(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0004453
(43) 공개일자 2024년01월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/535 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01) *A61P 37/06* (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01) *C12N 5/0783* (2010.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/535 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7038003
(22) 출원일자(국제) 2022년04월07일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년11월03일
(86) 국제출원번호 PCT/CA2022/050540
(87) 국제공개번호 WO 2022/213208
국제공개일자 2022년10월13일
(30) 우선권주장
63/171,933 2021년04월07일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
프로빈셜 헬스 서비시즈 오쏘리티
캐나다 브이5제트 4이6 비씨 밴쿠버 웨스트 10 애비뉴 600
유브이아이씨 인더스트리 파트너쉽스 인코포레이티드
캐나다 브리티시 콜럼비아 브이8더블유 2와이2 빅토리아 유니버시티 오브 빅토리아 세지위크 에이윙 피오 박스 1700 에스티엔 씨에스씨
(72) 발명자
불랑거, 마틴 제이.
캐나다, 브리티시 컬럼비아 브이8피 5씨2, 빅토리아, 피너티 로드 3800, 페치 빌딩, 빅토리아 대학교
넬슨, 브래드
캐나다, 브리티시 컬럼비아 브이8브이 2지6, 빅토리아, 멘지스 스트리트 312-225
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김영철, 김 순 영

전체 청구항 수 : 총 303 항

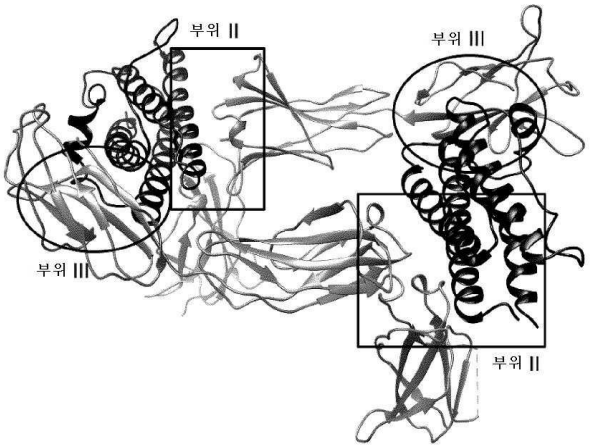
(54) 발명의 명칭 **변형된 과립구 집락-자극 인자(G-CSF) 및 이에 결합하는 키메라 사이토카인 수용체**

(57) 요 약

본 명세서에는 변이체 사이토카인 수용체 및 사이토카인 쌍을 사용한 세포의 선택적인 활성화를 위한 방법 및 조성물이 기재되며, 상기 사이토카인 수용체는 과립구-집락 자극 인자 수용체(G-CSFR)의 세포외 도메인(ECD)를 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물은 입양 세포 전달 요법을 위한 세포의 배타적인 활성화에 유용하다. 따라서, 본 명세서에는 천연 수용체에 결합하지 않는 사이토카인에 의해서 선택적으로 활성화되는 변이체 수용체를 발현하는 세포를 생산하는 방법이 포함된다. 또한 본 명세서에는 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법으로서, 대상체에게 G-CSFR의 세포외 도메인을 포함하는 변이체 수용체를 발현하는 세포를 투여하는 단계 및 변이체 수용체를 활성화시키는 변이체 사이토카인을 투여하는 단계를 포함한다.

대 표 도 - 도1

s



(52) CPC특허분류
A61K 39/4611 (2023.05)
A61K 39/4631 (2023.05)
A61P 35/00 (2018.01)
A61P 37/04 (2018.01)
A61P 37/06 (2018.01)
C07K 14/7153 (2013.01)
C12N 5/0636 (2023.05)
C07K 2319/03 (2013.01)

(72) 발명자
파월, 카메론
캐나다, 브리티시 컬럼비아 브이8피 5씨2, 빅토리아, 피너티 로드 3800, 페치 빌딩, 빅토리아 대학교
풀러, 메간
캐나다, 브리티시 컬럼비아 브이8엔 2비3, 빅토리아, 제퍼슨 애비뉴 1721

(30) 우선권주장
63/171,950 2021년04월07일 미국(US)
63/171,980 2021년04월07일 미국(US)
63/172,025 2021년04월07일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

변이체 과립구 집락 자극 인자(Granulocyte Colony-Stimulating Factor: G-CSF)로서,

상기 변이체 G-CSF는 부위 II 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이, 부위 III 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이 또는 이들의 조합을 포함하되; 상기 부위 II 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이는 L108R, D112R, E122R E122K, E123K 및 E123R 및 이들의 조합 중 적어도 하나를 포함하고; 상기 부위 II 계면 영역 돌연변이는 서열번호 1에 제시된 서열의 상응하는 아미노산 위치에 상대적이고;

상기 부위 III 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이는 서열번호 1에 제시된 서열의 상응하는 아미노산 위치에 비해서 돌연변이 E46R을 포함하고;

상기 변이체 G-CSF는 과립구 집락 자극 인자 수용체(G-CSFR)의 변이체 세포외 도메인(ECD)을 포함하는 수용체에 선택적으로 결합하는, 변이체 과립구 집락 자극 인자.

청구항 2

세포 표면 상에서 발현되는 수용체의 선택적 활성화를 위한 시스템으로서,

(a) 서열번호 83 또는 84에 상응하는 변이체 G-CSF; 및

(b) G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체

를 포함하되; 상기 변이체 G-CSF는 다른 것은 동일한 야생형 G-CSFR ECD와 비교할 때 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체에 우선적으로 결합하고, 상기 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체는 다른 것은 동일한 야생형 G-CSF와 비교할 때 변이체 G-CSF에 우선적으로 결합하고; 상기 변이체 G-CSFR은 G2R-3 또는 G12/2R-1을 포함하는, 시스템.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 변이체 G-CSF는 세포에 의해서 발현되는 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체에 결합하는, 변이체 G-CSF.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체를 발현하는 세포는 면역 세포인, 변이체 G-CSF.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체를 발현하는 면역 세포는,

T 세포 및 선택적으로,

NK 세포 및 선택적으로,

NKT 세포, 및 선택적으로,74

B 세포 및 선택적으로,

형질 세포 및 선택적으로,

대식세포 및 선택적으로,

수지상 세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 줄기세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 1차 세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 인간 세포인, 변이체 G-CSF.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 T-세포는 $CD8^+$ T 세포, 세포독성 $CD8^+$ T 세포, 미경험 $CD8^+$ T 세포, 미경험 $CD4^+$ T 세포, 헬퍼 T 세포, 조절성 T 세포, 기억 T 세포 및 γδT 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는, 변이체 G-CSF.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체에 대한 상기 변이체 G-CSF의 상기 선택적 결합은 상기 수용체를 발현하는 세포의 증식, 생존력, 지속성, 세포독성, 사이토카인 분비, 기억 및 향상된 활성 및 이들의 조합 중 적어도 하나를 포함하는 세포 반응을 초래하는, 변이체 G-CSF.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체는 부위 II 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이, 부위 III 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이 또는 이들의 조합을 포함하는, 변이체 G-CSF.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체는 R141E 또는 R167D 돌연변이 중 하나 또는 둘 다를 포함하는 G-CSFR ECD의 부위 II 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이를 포함하되;

상기 G-CSFR ECD의 부위 III 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이는 R41E 돌연변이를 포함하고;

상기 변이체 G-CSFR 돌연변이는 서열번호 2에 제시된 서열의 아미노산 위치에 상응하는, 변이체 G-CSF.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체는 키메라 수용체인, 변이체 G-CSF.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 G-CSF는 화학적으로 변형된, 변이체 G-CSF.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 화학적 변형은 페길화를 포함하는, 변이체 G-CSF.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 G-CSF는 상기 G-CSF의 N-말단 또는 C-말단에서 페길화된, 변이체 G-CSF.

청구항 14

제1항 내지 제6항 및 제10항 내지 제12항 중 어느 한 항의 변이체 G-CSF를 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열(들).

청구항 15

제10항의 핵산 서열을 포함하는, 하나 이상의 발현 벡터(들).

청구항 16

제1항 내지 제6항 및 제10항 내지 제12항 중 어느 한 항의 변이체 G-CSF를 발현하도록 조작된 세포.

청구항 17

제12항에 있어서, 상기 세포는 면역 세포인, 세포.

청구항 18

제13항에 있어서, 상기 면역 세포는,

T 세포 및 선택적으로,

NK 세포 및 선택적으로,

NKT 세포, 및 선택적으로,

B 세포 및 선택적으로,

형질 세포 및 선택적으로,

대식세포 및 선택적으로,

수지상 세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 줄기세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 1차 세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 인간 세포인, 세포.

청구항 19

제14항에 있어서, 상기 T 세포는 $CD8^+$ T 세포, 세포독성 $CD8^+$ T 세포, 세포독성 $CD4^+$ T 세포, 미경험 $CD8^+$ T 세포, 미경험 $CD4^+$ T 세포, 헬퍼 T 세포, 조절성 T 세포, 기억 T 세포 및 γδT 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는, 세포.

청구항 20

세포 표면 상에서 발현되는 수용체의 선택적 활성화를 위한 시스템으로서,

(a) 제1항 내지 제6항 및 제10항 내지 제12항 중 어느 한 항의 변이체 G-CSF를; 및

(b) G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체

를 포함하되; 상기 변이체 G-CSF는 다른 것은 동일한 야생형 G-CSFR ECD와 비교할 때 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체에 우선적으로 결합하고, 상기 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체는 다른 것은 동일한 야생형 G-CSF와 비교할 때 변이체 G-CSF에 우선적으로 결합하는, 시스템.

청구항 21

제16항에 있어서, 상기 변이체 G-CSF는 표 4A의 G-CSF 변이체 번호의 부위 II 및 부위 III 계면의 돌연변이의 조합을 포함하되; 상기 변이체 G-CSF 돌연변이는 서열번호 1에 제시된 서열의 아미노산 위치에 상응하는, 시스템.

청구항 22

제17항에 있어서, 상기 변이체 G-CSF는 서열번호 1에 제시된 서열의 상응하는 아미노산 위치에 비해서 돌연변이 E46R, L108K, D112R, E122R 및 E123R을 포함하되; 상기 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체는 서열번호 2에 제시된 서열의 상응하는 아미노산 위치에 비해서 돌연변이 R41E, R141E 및 R167D를 포함하는, 시스템.

청구항 23

제17항에 있어서, 상기 변이체 G-CSF는 서열번호 1에 제시된 서열의 상응하는 아미노산 위치에 비해서 돌연변이 E46R, L108K, D112R 및 E122K를 포함하되; 상기 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체는 서열번호 2에 제시

된 서열의 상응하는 아미노산 위치에 비해서 돌연변이 R41E, R141E 및 R167D를 포함하는, 시스템.

청구항 24

제17항에 있어서, 상기 변이체 G-CSF는 서열번호 1에 제시된 서열의 상응하는 아미노산 위치에 비해서 돌연변이 E46R, L108K, D112R 및 E123K를 포함하되; 상기 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체는 서열번호 2에 제시된 서열의 상응하는 아미노산 위치에 비해서 돌연변이 R41E, R141E 및 R167D를 포함하는, 시스템.

청구항 25

제17항에 있어서, 상기 변이체 G-CSF는 서열번호 1에 제시된 서열의 상응하는 아미노산 위치에 비해서 돌연변이 E46R, L108K, D112R 및 E122R을 포함하되; 상기 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체는 서열번호 2에 제시된 서열의 상응하는 아미노산 위치에 비해서 돌연변이 R41E, R141E 및 R167D를 포함하는, 시스템.

청구항 26

제17항에 있어서, 상기 변이체 G-CSF는 서열번호 1에 제시된 서열의 상응하는 아미노산 위치에 비해서 돌연변이 E46R, L108K, D112R 및 E123R을 포함하되; 상기 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체는 서열번호 2에 제시된 서열의 상응하는 아미노산 위치에 비해서 돌연변이 R41E, R141E 및 R167D를 포함하는, 시스템.

청구항 27

제17항에 있어서, 상기 변이체 G-CSF는 서열번호 1에 제시된 서열의 상응하는 아미노산 위치에 비해서 돌연변이 E46R, L108K, D112R, E122K 및 E123K를 포함하되; 상기 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체는 서열번호 2에 제시된 서열의 상응하는 아미노산 위치에 비해서 돌연변이 R41E, R141E 및 R167D를 포함하는, 시스템.

청구항 28

제20항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변이체 G-CSF는 화학적으로 변형된, 시스템.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 변이체 G-CSF의 화학적 변형은 페길화를 포함하는, 시스템.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 변이체 G-CSF는 상기 G-CSF의 N-말단 또는 C-말단에서 페길화된, 시스템.

청구항 31

제16항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)을 더 포함하되; 선택적으로, 상기 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 친화성 시약을 포함하는, 시스템.

청구항 32

제16항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 항원 결합 신호전달 수용체(들)를 더 포함하는, 시스템.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 하나 이상의 항원 결합 신호전달 수용체(들)는 천연 T 세포 수용체, 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), 천연 B 세포 수용체, 조작된 B 세포 수용체(BCR), 스트레스 리간드 수용체, 패턴 인식 수용체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 수용체를 포함하는, 시스템.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 항원 결합 신호전달 수용체(들)는 하나 이상의 CAR(들)을 포함하고; 선택적으로, 상기 CAR은 메소텔린 CAR인, 시스템.

청구항 35

제31항에 있어서, 상기 사이토카인(들) 또는 케모카인(들)은 IL-18, IL-21, 인터페론-α, 인터페론-β, 인터페론-γ, IL-17, IL-21, TNF-α, CXCL13, CCL3(MIP-1α), CCL4(MIP-1β), CD40 리간드, B 세포 활성화 인자(BAFF), Flt3 리간드, CCL21, CCL5, XCL1, CCL19, 수용체 NKG2D 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 시스템.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 사이토카인은 IL-18인, 시스템.

청구항 37

제35항 또는 제36항에 있어서, 상기 사이토카인은 인간인, 시스템.

청구항 38

세포의 표면 상에서 발현된 수용체의 선택적 활성화 방법으로서, G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체를 제1항 내지 제6항 및 제10항 내지 제12항 중 어느 한 항의 변이체 G-CSF와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체는 면역 세포 상에서 발현되고, 선택적으로, 상기 면역 세포는,

T 세포 및 선택적으로,

NK 세포 및 선택적으로,

NKT 세포, 및 선택적으로,

B 세포 및 선택적으로,

형질 세포 및 선택적으로,

대식세포 및 선택적으로,

수지상 세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 줄기세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 1차 세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 인간 세포인, 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 T 세포는 $CD8^+$ T 세포, 세포독성 $CD8^+$ T 세포, 세포독성 $CD4^+$ T 세포, 미경험 $CD8^+$ T 세포, 미경험 $CD4^+$ T 세포, 헬퍼 T 세포, 조절성 T 세포, 기억 T 세포 및 γδT 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 41

제39항에 있어서, 상기 면역 세포의 선택적 활성화는 상기 수용체를 발현하는 세포의 증식, 생존력, 지속성, 세포독성, 사이토카인 분비, 기억, 및 향상된 활성 중 적어도 하나를 포함하는 세포 반응을 초래하는, 방법.

청구항 42

면역 반응의 증가를 필요로 하는 대상체에서 면역 반응을 증가시키는 방법으로서,

G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체를 발현하는 세포(들)를 투여하는 단계 및 제1항 내지 제6항 및 제10항 내지 제12항 중 어느 한 항의 변이체 G-CSF를 상기 대상체에게 투여 또는 제공하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 43

질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 질환을 치료하는 방법으로서,

G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체를 발현하는 세포(들)를 투여하는 단계 및 제1항 내지 제6항 및 제10항 내지 제12항 중 어느 한 항의 변이체 G-CSF를 상기 대상체에게 투여 또는 제공하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 44

제42항 또는 제43항에 있어서, 상기 방법은 암을 치료하기 위해서 사용되는, 방법.

청구항 45

제42항 또는 제43항에 있어서, 상기 방법은 염증성 병태를 치료하기 위해서 사용되는, 방법.

청구항 46

제42항 또는 제43항에 있어서, 상기 방법은 자가면역 질환을 치료하기 위해서 사용되는, 방법.

청구항 47

제42항 또는 제43항에 있어서, 상기 방법은 퇴행성 질환을 치료하기 위해서 사용되는, 방법.

청구항 48

제42항 또는 제43항에 있어서, 상기 방법은 이식을 위한 자연 또는 조작된 세포, 조직 또는 기관을 생성하기 위해서 사용되는, 방법.

청구항 49

제42항 또는 제43항에 있어서, 상기 방법은 이식 거부를 예방 또는 치료하기 위해서 사용되는, 방법.

청구항 50

제42항 또는 제43항에 있어서, 상기 방법은 감염성 질환을 치료하기 위해서 사용되는, 방법.

청구항 51

제42항 또는 제43에 있어서, 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)을 제공하는 단계를 더 포함하되; 선택적으로, 상기 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 친화성 시약을 포함하는, 방법.

청구항 52

제42항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 각각 (i) G-CSFR ECD를 포함하는 구별되는 키메라 수용체 또는 (ii) G-CSF의 적어도 하나의 구별되는 변이체 형태 중 하나 또는 둘 다를 발현하는 2개 이상의 세포 집단이 투여되는, 방법.

청구항 53

제42항에 있어서, 세포의 적어도 하나의 집단(들)은 적어도 하나의 구별되는 항원 결합 신호전달 수용체(들)를 더 발현하고; 선택적으로, 상기 적어도 하나의 구별되는 항원 결합 신호전달 수용체(들)는 적어도 하나의 CAR(들)을 포함하는, 방법.

청구항 54

제52항에 있어서, 상기 면역 세포의 제1 및 제2 집단(들) 중 하나 또는 둘 다는 하기 중 하나 또는 둘 다를 추가로 발현하는, 방법:

(a) 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)로서, 선택적으로, 상기 적어도 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카

인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 다른 친화성 시약(들)을 포함하는, 상기 신호전달 단백질(들); 및

(b) 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체.

청구항 55

제52항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 세포의 하나 이상의 추가적인 집단을 추가로 포함하되; 면역 세포의 각각의 추가적인 집단은 (i) G-CSFR의 구별되는 변이체 ECD를 포함하는 구별되는 수용체, (ii) 구별되는 변이체 G-CSF, (iii) 구별되는 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질 및 (iv) 구별되는 항원 결합 신호전달 수용체 중 적어도 하나를 발현하는, 방법.

청구항 56

제42항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 적어도 하나의 수용체를 발현하는 세포는 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체(들)를 추가로 발현하는, 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 상기 항원 결합 신호전달 수용체는 천연 T 세포 수용체, 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), 천연 B 세포 수용체, 조작된 B 세포 수용체(BCR), 스트레스 리간드 수용체, 패턴 인식 수용체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 수용체를 포함하는, 방법.

청구항 58

제57항에 있어서, 상기 항원 결합 신호전달 수용체는 CAR을 포함하는, 방법.

청구항 59

제55항에 있어서, 상기 사이토카인 또는 케모카인은 IL-18, IL-21, 인터페론-α, 인터페론-β, 인터페론-γ, IL-17, IL-21, TNF-α, CXCL13, CCL3(MIP-1α), CCL4(MIP-1β), CD40 리간드, B 세포 활성화 인자(BAFF), Flt3 리간드, CCL21, CCL5, XCL1, CCL19, 수용체 NKG2D 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 60

제59항에 있어서, 상기 사이토카인은 IL-18인, 방법.

청구항 61

제61항 또는 제62항에 있어서, 상기 사이토카인은 인간인, 방법.

청구항 62

치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법으로서,

i) 면역 세포-함유 샘플을 단리시키는 단계; (ii) 상기 면역 세포(들)에 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체를 암호화하는 핵산 서열(들)을 형질도입 또는 형질주입시키는 단계; (iii) (ii)로부터의 상기 면역 세포(들)를 상기 대상체에게 투여하는 단계; 및 (iv) 상기 면역 세포(들)를 상기 수용체에 선택적으로 결합하는 제1항 내지 제6항 내지 제10항 내지 제12항 중 어느 한 항의 변이체 G-CSF와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 63

제62항에 있어서, 상기 대상체는 상기 세포를 상기 대상체에게 투여하기 전에 면역-고갈 치료를 경험한 적이 있는, 방법.

청구항 64

제62항에 있어서, 상기 면역 세포-함유 샘플은 상기 세포가 투여될 대상체로부터 단리되는, 방법.

청구항 65

제62항에 있어서, 상기 면역 세포-함유 샘플은 상기 세포가 투여될 대상체와 구별되는 대상체로부터 단리되는,

방법.

청구항 66

제62항에 있어서, 상기 면역 세포-함유 샘플은 상기 세포가 투여될 대상체 또는 상기 세포가 투여될 대상체와 구별되는 대상체로부터 유래된 세포로부터 생성되고, 선택적으로, 상기 세포는 줄기 세포, 및 선택적으로, 만능 줄기 세포인, 방법.

청구항 67

제62항에 있어서, 상기 면역 세포(들)는 상기 세포를 상기 대상체에게 투여하기 전에 시험관내에서 상기 변이체 G-CSF와 접촉되는, 방법.

청구항 68

제62항에 있어서, 상기 면역 세포(들)는 상기 수용체로부터의 신호전달을 활성화시키기에 충분한 시간 동안 상기 수용체에 결합하는 상기 변이체 G-CSF와 접촉되는, 방법.

청구항 69

키트로서,

G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체를 암호화하는 세포 및 사용 설명서를 포함하되;

상기 키트는 제1항 내지 제6항 및 제10항 내지 제12항 중 어느 한 항의 변이체 G-CSF를 포함하고; 선택적으로, 상기 세포는 면역 세포인, 키트.

청구항 70

키트로서,

(a) G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체를 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열(들);

(b) 제1항 내지 제6항 및 제10항 내지 제12항 중 어느 한 항의 변이체 G-CSF, 제7항의 핵산 서열(들) 또는 제11항의 하나 이상의 발현 벡터(들); 및

(c) 사용 설명서

를 포함하는, 키트.

청구항 71

제70항에 있어서, IL-18, IL-21, 인터페론-α, 인터페론-β, 인터페론-ɣ, IL-17, IL-21, TNF-α, CXCL13, CCL3(MIP-1α), CCL4(MIP-1β), CD40 리간드, B 세포 활성화 인자(BAFF), Flt3 리간드, CCL21, CCL5, XCL1, CCL19, 수용체 NKG2D 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 사이토카인(들) 또는 케모카인(들)을 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함하는, 키트.

청구항 72

제70항에 있어서, 적어도 하나의 항원 결합 수용체(들)를 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함하는, 키트.

청구항 73

제70항 또는 제72항에 있어서, 상기 적어도 하나의 항원 결합 수용체(들)는 천연 T 세포 수용체, 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), 천연 B 세포 수용체, 조작된 B 세포 수용체(BCR), 스트레스 리간드 수용체, 패턴 인식 수용체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 키트.

청구항 74

제73항에 있어서, 키메라 항원 수용체를 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함하는, 키트.

청구항 75

제69항에 있어서, 상기 세포는 IL-18, IL-21, 인터페론-α, 인터페론-β, 인터페론-γ, IL-17, IL-21, TNF-α, CXCL13, CCL3(MIP-1α), CCL4(MIP-1β), CCL19, 수용체 NKG2D 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 사이토카인(들) 또는 케모카인(들)을 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함하는, 키트.

청구항 76

제69항 또는 제75항에 있어서, 상기 세포는 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체(들)를 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함하는, 키트.

청구항 77

제76항에 있어서, 상기 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체(들)는 천연 T 세포 수용체, 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), 천연 B 세포 수용체, 조작된 B 세포 수용체(BCR), 스트레스 리간드 수용체, 패턴 인식 수용체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 키트.

청구항 78

제77항에 있어서, 상기 세포는 적어도 하나의 CAR(들)을 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함하고, 선택적으로, 상기 CAR은 메소텔린 CAR인, 키트.

청구항 79

키메라 수용체로서,

(a) 적어도 하나의 제2 도메인에 작동 가능하게 연결된 세포외 도메인(ECD)으로서; 상기 제2 도메인은

(b) 사이토카인 수용체의 세포내 도메인으로부터의 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위를 포함하는 세포내 도메인(ICD)을 포함하고;

상기 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위는 인터류킨(IL)-2Rβ의 SHC 결합 부위; IL-2Rβ의 STAT5 결합 부위, IL-4Rα의 IRS-1 또는 IRS-2 결합 부위, IL-4Rα의 STAT6 결합 부위, gp130의 SHP-2 결합 부위, gp130의 STAT3 결합 부위, EPOR의 SHP-1 또는 SHP-2 결합 부위, 에리트로포이에틴 수용체(EPOR)의 STAT5 결합 부위, 인터페론 알파 및 베타 수용체 소단위 2(IFNAR2)의 STAT1 또는 STAT2 결합 부위 및 인터페론 감마 수용체 1(IFNγR1)의 STAT1 결합 부위 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고;

상기 ICD는 G-CSFR, gp130, EPOR 및 인터페론 감마 수용체 2(IFNγR2) 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 단백질의 적어도 하나의 Box 1 영역 및 적어도 하나의 Box 2 영역을 추가로 포함하는, 상기 세포외 도메인; 및

(c) 막관통 도메인(TMD)을 포함하는 적어도 하나의 제3 도메인을 포함하되;

상기 ECD는 상기 TMD에 대해 N-말단이고, 상기 TMD는 상기 ICD에 대해 N-말단인, 키메라 수용체.

청구항 80

키메라 수용체로서,

제2 도메인에 작동 가능하게 연결된 ECD를 포함하되; 상기 제2 도메인은 ICD를 포함하고, 상기 ICD는,

(i)

(a) G-CSFR의 Box 1 및 Box 2 영역;

(b) IL-4Rα의 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위; 또는

(ii)

(a) gp130의 Box 1 및 Box 2 영역;

(b) gp130의 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위; 또는

(iii)

(a) 에리트로포이에틴 수용체(EPOR)의 Box 1 및 Box 2 영역;

(b) EPOR의 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위; 또는

(iv)

(a) G-CSFR의 Box 1 및 Box 2 영역;

(b) 인터페론 알파 및 베타 수용체 소단위 2(IFNAR2)의 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위; 또는

(v)

(a) 인터페론 감마 수용체 2(IFNγR2)의 Box 1 및 Box 2 영역;

(b) 인터페론 감마 수용체 1(IFN γR1)의 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위

를 포함하되; 상기 ECD는 TMD에 대해 N-말단이고, 상기 TMD는 상기 ICD에 대해 N-말단인, 키메라 수용체.

청구항 81

제79항 또는 제80항에 있어서, 상기 ECD는 G-CSFR(과립구 집락 자극 인자 수용체)의 ECD이되, 선택적으로 G-CSFR의 ECD는 제2항 내지 제10항 중 어느 한 항의 G-CSFR의 ECD를 포함하는, 키메라 수용체.

청구항 82

제79항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 TMD는 G-CSFR의 TMD이되, 선택적으로, 상기 TMD는 야생형 TMD인, 키메라 수용체.

청구항 83

제79항 내지 제82항에 있어서, 상기 키메라 수용체의 활성화된 형태는 동종이량체를 형성하고, 선택적으로,

키메라 수용체의 활성화는 수용체를 발현하는 세포의 증식, 생존력, 지속성, 세포독성, 사이토카인 분비, 기억 및 향상된 활성 중 적어도 하나를 포함하는 세포 반응을 초래하고, 선택적으로, 키메라 수용체는 G-CSF과의 접촉 시 활성화되고, 선택적으로

상기 G-CSF는 야생형 G-CSF이고, 선택적으로,

상기 G-CSFR의 세포외 도메인은 야생형 세포외 도메인인, 키메라 수용체.

청구항 84

제79항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 키메라 수용체는 세포, 및 선택적으로, 면역 세포에서 발현되되, 선택적으로 상기 면역 세포는,

T 세포 및 선택적으로,

NK 세포 및 선택적으로,

NKT 세포, 및 선택적으로,

B 세포 및 선택적으로,

형질 세포 및 선택적으로,

대식세포 및 선택적으로,

수지상 세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 줄기세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 1차 세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 인간 세포인, 키메라 수용체.

청구항 85

제84항에 있어서, 상기 T 세포는 $CD8^+$ T 세포, 세포독성 $CD8^+$ T 세포, 미경험 $CD4^+$ T 세포, 미경험 $CD8^+$ T 세포, 헬퍼 T 세포, 조절성 T 세포, 기억 T 세포 및 γδT 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는, 키메라 수용체.

청구항 86

제1항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ICD는,

(a) 서열번호 90 또는 91 중 하나 또는 둘 다의 아미노산 서열; 또는

(b) 서열번호 90 또는 92 중 하나 또는 둘 다의 아미노산 서열; 또는

(c) 서열번호 93의 아미노산 서열; 또는

(d) 서열번호 94의 아미노산 서열; 또는

(e) 서열번호 95 또는 96 중 하나 또는 둘 다의 아미노산 서열; 또는

(f) 서열번호 97 또는 98의 아미노산 서열; 또는

(g) 서열번호 99 또는 100의 아미노산 서열

을 포함하는, 키메라 수용체.

청구항 87

제1항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 서열번호 88에 제시된 서열을 포함하는, 키메라 수용체.

청구항 88

세포 표면 상에서 발현되는 수용체의 선택적 활성화를 위한 시스템으로서,

(a) 제1항 내지 제6항 및 제10항 내지 제12항 중 어느 한 항의 변이체 G-CSF를; 및

(b) 제79항 내지 제87항 중 어느 한 항의 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체

를 포함하되; 상기 변이체 G-CSF는 다른 것은 동일한 야생형 G-CSFR ECD와 비교할 때 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체에 우선적으로 결합하고, 상기 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체는 다른 것은 동일한 야생형 G-CSF와 비교할 때 변이체 G-CSF에 우선적으로 결합하는, 시스템.

청구항 89

제1항 내지 제88항 중 어느 한 항의 키메라 수용체를 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열(들).

청구항 90

제89항에 있어서, 상기 G-CSFR의 ECD는 서열번호 85, 86 또는 87 중 어느 하나에 제시된 핵산 서열(들)에 의해서 암호화되는, 핵산 서열(들).

청구항 91

제89항 또는 제90항의 핵산 서열(들)을 포함하는, 하나 이상의 발현 벡터(들).

청구항 92

제91항에 있어서, 상기 벡터(들)는 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데나바이러스 벡터 및 플라스미드로 이루어진 군으로부터 선택되는, 발현 벡터(들).

청구항 93

키메라 수용체를 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열(들)로서; 상기 키메라 수용체는

제2 도메인에 작동 가능하게 연결된 ECD를 포함하되; 상기 제2 도메인은,

(i)

(a) G-CSFR의 Box 1 및 Box 2 영역;

(b) IL-4Rα의 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위; 또는

(ii)

(a) gp130의 Box 1 및 Box 2 영역;

(b) gp130의 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위; 또는

(iii)

(a) 에리트로포이에틴 수용체(EPOR)의 Box 1 및 Box 2 영역;

(b) EPOR의 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위; 또는

(iv)

(a) G-CSFR의 Box 1 및 Box 2 영역;

(b) 인터페론 알파 및 베타 수용체 소단위 2(IFNAR2)의 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위; 또는

(v)

(a) 인터페론 감마 수용체 2(IFNγR2)의 Box 1 및 Box 2 영역;

(b) 인터페론 감마 수용체 1(IFN γR1)의 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위

를 포함하는, 하나 이상의 핵산 서열(들).

청구항 94

제93항에 있어서, 상기 ECD는 G-CSFR(과립구 집락 자극 인자 수용체)의 ECD인, 핵산.

청구항 95

제93항 또는 제94항에 있어서, 상기 TMD는 G-CSFR의 TMD이되, 선택적으로, 상기 TMD는 야생형 TMD인, 핵산.

청구항 96

제94항 또는 제95항에 있어서, 상기 G-CSFR의 ECD는 서열번호 85, 86 또는 87 중 어느 하나에 제시된 핵산 서열에 의해서 암호화되는, 핵산 서열(들).

청구항 97

하기를 포함하는, 제93항 내지 제96항 중 어느 한 항의 핵산 서열(들):

(a) 서열번호 90 또는 91 중 하나 또는 둘 다의 아미노산 서열을 포함하는 ICD를 암호화하는 서열; 또는

(b) 서열번호 90 또는 92 중 하나 또는 둘 다의 아미노산 서열을 포함하는 ICD를 암호화하는 서열; 또는

(c) 서열번호 93의 아미노산 서열을 포함하는 ICD를 암호화하는 서열; 또는

(d) 서열번호 94의 아미노산 서열을 포함하는 ICD를 암호화하는 서열; 또는

(e) 서열번호 95 또는 96 중 하나 또는 둘 다의 아미노산 서열을 포함하는 ICD를 암호화하는 서열; 또는

(f) 서열번호 97 또는 98의 아미노산 서열을 포함하는 ICD를 암호화하는 서열; 또는

(g) 서열번호 99 또는 100의 아미노산 서열을 포함하는 ICD를 암호화하는 서열.

청구항 98

제93항 내지 제97항 중 어느 한 항의 핵산 서열(들)을 포함하는 하나 이상의 발현 벡터(들).

청구항 99

제98항에 있어서, 상기 벡터(들)는 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데나바이러스 벡터 및 플라스미드로 이루어진 군으로부터 선택되는, 발현 벡터(들).

청구항 100

제79항 내지 제87항 중 어느 한 항의 키메라 수용체를 암호화하는 핵산 서열(들)을 포함하는 세포.

청구항 101

제100항에 있어서, 상기 세포는 면역 세포이되, 선택적으로 상기 면역 세포는,

T 세포 및 선택적으로,

NK 세포 및 선택적으로,

NKT 세포, 및 선택적으로,

B 세포 및 선택적으로,

형질 세포 및 선택적으로,

대식세포 및 선택적으로,

수지상 세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 줄기세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 1차 세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 인간 세포인, 세포.

청구항 102

제101항에 있어서, 상기 T 세포는 $CD8^+$ T 세포, 세포독성 $CD8^+$ T 세포, 미경험 $CD4^+$ T 세포, 미경험 $CD8^+$ T 세포, 헬퍼 T 세포, 조절성 T 세포, 기억 T 세포 및 γδT 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는, 세포.

청구항 103

제93항 내지 제97항 중 어느 한 항의 핵산 서열(들)을 포함하는 세포.

청구항 104

제98항 또는 제99항의 발현 벡터(들)를 포함하는 세포.

청구항 105

세포의 표면 상에서 발현되는 키메라 수용체의 선택적 활성화 방법으로서, 제79항 내지 제87항 중 어느 한 항의 키메라 수용체를 상기 키메라 수용체에 선택적으로 결합하는 사이토카인과 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 106

제105항에 있어서, 상기 키메라 수용체의 활성화된 형태는 동종이량체를 형성하고, 선택적으로,

키메라 수용체의 활성화는 수용체를 발현하는 세포의 증식, 생존력, 지속성, 세포독성, 사이토카인 분비, 기억 및 향상된 활성 중 적어도 하나를 포함하는 세포 반응을 초래하고, 선택적으로, 키메라 수용체는 사이토카인과의 접촉 시 활성화되는, 방법.

청구항 107

제105항 내지 제106항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 키메라 수용체에 선택적으로 결합하는 사이토카인은 G-CSF이되, 선택적으로, 상기 키메라 수용체는 G-CSF와의 접촉 시 활성화되고, 선택적으로,

상기 G-CSF는 야생형 G-CSF이고, 선택적으로,

상기 G-CSFR의 세포외 도메인은 야생형 세포외 도메인인, 방법.

청구항 108

제105항 내지 제107항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 키메라 수용체는 세포, 선택적으로,

면역 세포에서 발현되고, 선택적으로, 상기 면역 세포는,

T 세포 및 선택적으로,

NK 세포 및 선택적으로,

NKT 세포, 및 선택적으로,

B 세포 및 선택적으로,

형질 세포 및 선택적으로,

대식세포 및 선택적으로,

수지상 세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 줄기세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 1차 세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 인간 세포인, 방법.

청구항 109

제108항에 있어서, 면역 세포의 제1 집단은 키메라 수용체를 발현하고, 면역 세포의 제2 집단은 키메라 수용체에 결합하는 사이토카인을 발현하고; 선택적으로, 면역 세포의 제1 및 제2 집단(들) 중 하나 또는 둘 다는 적어도 하나의 구별되는 항원 결합 신호전달 수용체(들)를 추가로 발현하고; 선택적으로, 적어도 하나의 구별되는 항원 결합 신호전달 수용체(들)는 적어도 하나의 CAR을 포함하는, 방법.

청구항 110

제109항에 있어서, 상기 면역 세포의 제1 및 제2 집단(들) 중 하나 또는 둘 다는,

(a) 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)로서, 선택적으로, 상기 적어도 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 다른 친화성 시약(들)을 포함하는, 상기 신호전달 단백질(들); 및

(b) 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체

중 하나 또는 둘 다를 추가로 발현하는, 방법.

청구항 111

제109항 또는 제110항에 있어서, 면역 세포의 제1 및 제2 집단 각각은 G-CSFR의 구별되는 변이체 ECD 및 구별되는 변이체 G-CSF를 포함하는 구별되는 키메라 수용체를 발현하는, 방법.

청구항 112

제109항 내지 제111항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 세포의 하나 이상의 추가적인 집단을 추가로 포함하되; 면역 세포의 각각의 추가적인 집단은 (i) G-CSFR의 구별되는 변이체 ECD를 포함하는 구별되는 수용체, (ii) 구별되는 변이체 G-CSF, (iii) 구별되는 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질 및 (iv) 구별되는 항원 결합 신호전달 수용체 중 적어도 하나를 발현하는, 방법.

청구항 113

세포에서 키메라 수용체를 생산하는 방법으로서,

상기 세포에 제89항, 제90항 및 제93항 내지 제97항 중 어느 한 항의 핵산 서열(들) 또는 제91항, 제92항, 제98항 및 제99항 중 어느 한 항의 발현 벡터(들)를 도입하는 단계를 포함하고; 선택적으로, 유전자 편집을 포함하며; 선택적으로,

상기 세포는 면역 세포이고, 선택적으로, 상기 면역 세포는,

T 세포 및 선택적으로,

NK 세포 및 선택적으로,

NKT 세포, 및 선택적으로,

B 세포 및 선택적으로,

형질 세포 및 선택적으로,

대식세포 및 선택적으로,

수지상 세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 줄기세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 1차 세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 인간 세포인, 방법.

청구항 114

치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법으로서,

상기 대상체에게 제79항 내지 제87항 중 어느 한 항의 키메라 수용체를 발현하는 세포를 투여하는 단계 및 상기 대상체에게 키메라 수용체에 특이적으로 결합하는 사이토카인을 제공하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 115

제114항에 있어서, 상기 키메라 수용체의 활성화된 형태는 동종이량체를 형성하고, 선택적으로,

키메라 수용체의 활성화는 수용체를 발현하는 세포의 증식, 생존력, 지속성, 세포독성, 사이토카인 분비, 기억 및 향상된 활성 중 적어도 하나를 포함하는 세포 반응을 초래하고, 선택적으로, 키메라 수용체는 사이토카인과의 접촉 시 활성화되는, 방법.

청구항 116

제114항 또는 제115항에 있어서, 상기 사이토카인은 G-CSF이되; 선택적으로,

상기 G-CSF는 야생형 G-CSF이고, 선택적으로,

상기 G-CSFR의 세포외 도메인은 야생형 세포외 도메인인, 방법.

청구항 117

제114항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 키메라 수용체는 세포, 선택적으로,

면역 세포에서 발현되고, 선택적으로, 상기 면역 세포는,

T 세포 및 선택적으로,

NK 세포 및 선택적으로,

NKT 세포, 및 선택적으로,

B 세포 및 선택적으로,

형질 세포 및 선택적으로,

대식세포 및 선택적으로,

수지상 세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 줄기세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 1차 세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 인간 세포인, 방법.

청구항 118

제106항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)을 투여 또는 제공하는 단계를 추가로 포함하되; 선택적으로, 상기 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 친화성 시약(들)을 포함하는, 방법.

청구항 119

제114항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 각각 구별되는 키메라 수용체를 발현하고, 각각 사이토카인의 구별되는 변이체 형태를 발현하는 2개 이상의 세포 집단이 투여되는, 방법.

청구항 120

제114항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 키메라 수용체를 발현하는 세포는 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체를 추가로 발현하는, 방법.

청구항 121

제120항에 있어서, 상기 항원 결합 신호전달 수용체는 천연 T 세포 수용체, 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), 천연 B 세포 수용체, 조작된 B 세포 수용체(BCR), 스트레스 리간드 수용체, 패턴 인식 수용체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 수용체(들)를 포함하는, 방법.

청구항 122

제121항에 있어서, 상기 항원 결합 신호전달 수용체는 CAR인, 방법.

청구항 123

제118항에 있어서, 상기 적어도 하나의 사이토카인(들) 또는 케모카인(들)은 IL-18, IL-21, 인터페론-α, 인터페론-β, 인터페론-γ, IL-17, IL-21, TNF-α, CXCL13, CCL3(MIP-1α), CCL4(MIP-1β), CD40 리간드, B 세포 활성화 인자(BAFF), Flt3 리간드, CCL21, CCL5, XCL1 또는 CCL19 또는 수용체 NKG2D 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 124

제123항에 있어서, 상기 사이토카인은 IL-18인, 방법.

청구항 125

제123항 또는 제124항에 있어서, 상기 사이토카인은 인간인, 방법.

청구항 126

제114항 내지 제125항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 암을 치료하기 위해서 사용되는, 방법.

청구항 127

제114항 내지 제125항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 자가면역 질환을 치료하기 위해서 사용되는, 방법.

청구항 128

제114항 내지 제125항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 염증성 병태를 치료하기 위해서 사용되는, 방법.

청구항 129

제114항 내지 제125항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 퇴행성 질환을 치료하기 위해서 사용되는, 방법.

청구항 130

제114항 내지 제125항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 이식을 위한 자연 또는 조작된 세포, 조직 또는 기관을 생성하기 위해서 사용되는, 방법.

청구항 131

제114항 내지 제125항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 동종이식 거부를 예방하거나 치료하기 위해서 사용되는, 방법.

청구항 132

제114항에 있어서,

i) 면역 세포-함유 샘플을 단리시키는 단계; (ii) 상기 면역 세포에 키메라 사이토카인 수용체를 암호화하는 핵산 서열을 도입하는 단계; (iii) (ii)로부터의 면역 세포를 상기 대상체에게 투여하는 단계; 및 (iv) 상기 면역 세포를 상기 키메라 수용체에 결합하는 사이토카인과 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 133

제132항에 있어서, 상기 대상체는 상기 세포를 상기 대상체에게 투여하거나 주입하기 전에 면역-고갈 치료를 경험한 적이 있는, 방법.

청구항 134

제132항에 있어서, 상기 면역 세포-함유 샘플은 상기 세포가 투여될 대상체로부터 단리되는, 방법.

청구항 135

제132항에 있어서, 상기 면역 세포-함유 샘플은 상기 세포가 투여될 대상체와 구별되는 대상체로부터 단리되는, 방법.

청구항 136

제132항에 있어서, 상기 면역 세포-함유 샘플은 상기 세포가 투여될 대상체 또는 상기 세포가 투여될 대상체와 구별되는 대상체로부터 유래된 세포로부터 생성되고, 선택적으로, 상기 세포는 줄기 세포, 및 선택적으로, 만능 줄기 세포인, 방법.

청구항 137

제132항에 있어서, 상기 면역 세포는 상기 세포를 상기 대상체에게 투여하거나 주입하기 전에 시험관내에서 상기 사이토카인과 접촉되는, 방법.

청구항 138

제132항에 있어서, 상기 면역 세포는 상기 키메라 수용체로부터 신호전달을 활성화시키기에 충분한 시간 동안 상기 사이토카인과 접촉되는, 방법.

청구항 139

제132항 내지 제138항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 사이토카인은 G-CSF이되; 선택적으로,

상기 G-CSF는 야생형 G-CSF이고, 선택적으로,

상기 G-CSFR의 세포외 도메인은 야생형 세포외 도메인인, 방법.

청구항 140

키트로서,

제79항 내지 제87항 중 어느 한 항의 하나 이상의 키메라 수용체(들)를 암호화하는 세포로서,

선택적으로, 상기 세포는 면역 세포인, 상기 세포; 및

사용 설명서

를 포함하되; 선택적으로, 상기 키트는 키메라 수용체(들)에 결합하는 적어도 하나의 사이토카인(들)을 포함하는, 키트.

청구항 141

키트로서,

제79항 내지 제87항 중 어느 한 항의 하나 이상의 키메라 수용체(들)를 암호화하는 적어도 하나의 발현 벡터(들) 및 사용 설명서를 포함하되;

선택적으로, 상기 키트는 키메라 수용체(들)에 결합하는 적어도 하나의 사이토카인(들)을 포함하는, 키트.

청구항 142

제141항에 있어서, IL-18, IL-21, 인터페론-α, 인터페론-β, 인터페론-ɣ, IL-17, IL-21, TNF-α, CXCL13, CCL3(MIP-1α), CCL4(MIP-1β), CD40 리간드, B 세포 활성화 인자(BAFF), Flt3 리간드, CCL21, CCL5, XCL1 또는 CCL19 또는 수용체 NKG2D 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 사이토카인(들) 또는 케모카인(들)을 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함하는, 키트.

청구항 143

제141항 또는 제142항에 있어서, 적어도 하나의 항원 결합 수용체(들)를 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함하는, 키트.

청구항 144

제142항에 있어서, 상기 적어도 하나의 항원 결합 수용체(들)는 천연 T 세포 수용체, 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), 천연 B 세포 수용체, 조작된 B 세포 수용체(BCR), 스트레스 리간드 수용체, 패턴 인식 수용체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 키트.

청구항 145

제144항에 있어서, 적어도 하나의 CAR(들)을 암호화하는 발현 벡터를 추가로 포함하되, 선택적으로, 상기 CAR(들)은 메소텔린 CAR인, 키트.

청구항 146

제140항에 있어서, 상기 세포는 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)을 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함하되; 선택적으로, 상기 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 친화성 시약(들)을 포함하는, 키트.

청구항 147

제140항에 있어서, 상기 세포는 IL-18, IL-21, 인터페론-α, 인터페론-β, 인터페론-ɣ, IL-17, IL-21, TNF-α, CXCL13, CCL3(MIP-1α), CCL4(MIP-1β), CD40 리간드, B 세포 활성화 인자(BAFF), Flt3 리간드, CCL21, CCL5, XCL1 또는 CCL19 또는 수용체 NKG2D 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 사이토카인(들) 또는 케모카인(들)을 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함하는, 키트.

청구항 148

제142항에 있어서, 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)을 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함하되; 선택적으로, 상기 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 친화성 시약(들)을 포함하는, 키트.

청구항 149

제148항에 있어서, 상기 세포는 IL-18, IL-21, 인터페론-α, 인터페론-β, 인터페론-γ, IL-17, IL-21, TNF-α, CXCL13, CCL3(MIP-1α), CCL4(MIP-1β), CD40 리간드, B 세포 활성화 인자(BAFF), Flt3 리간드, CCL21, CCL5, XCL1 또는 CCL19 또는 수용체 NKG2D 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 사이토카인(들) 또는 케모카인(들)을 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함하는, 키트.

청구항 150

제140항, 제146항 및 제147항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체(들)를 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함하는, 키트.

청구항 151

제150항에 있어서, 상기 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체(들)는 천연 T 세포 수용체, 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), 천연 B 세포 수용체, 조작된 B 세포 수용체(BCR), 스트레스 리간드 수용체, 패턴 인식 수용체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 키트.

청구항 152

제140항, 제146항, 제147항, 제150항 및 제151항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 적어도 하나의 CAR(들)을 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함하되, 선택적으로, 상기 CAR은 메소텔린 CAR인, 키트.

청구항 153

제140항, 제146항, 제147항, 제150항 및 제151항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 제79항 내지 제87항 중 어느 한 항의 하나 이상의 구별되는 키메라 수용체(들)를 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함하는, 키트.

청구항 154

제141항 내지 제145항, 제148항 및 제149항 중 어느 한 항에 있어서, 제79항 내지 제87항 중 어느 한 항의 하나 이상의 구별되는 키메라 수용체(들)를 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함하는, 키트.

청구항 155

세포의 선택적 활성화를 위한 시스템으로서,

(i) 과립구 집락 자극 인자 수용체(G-CSFR)의 변이체 세포외 도메인(ECD)을 포함하는 수용체; 및

(ii) (i)의 수용체에 선택적으로 결합하는 변이체 G-CSF; 및

(a) 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)로서, 선택적으로, 상기 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 다른 친화성 시약(들)을 포함하는, 상기 신호전달 단백질(들);

및

(b) 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체(들)

중 하나 또는 둘 다

를 포함하는, 시스템.

청구항 156

제155항에 있어서, 상기 변이체 G-CSF는 제1항 내지 제6항 및 제10항 내지 제12항 중 어느 한 항을 포함하는, 시스템.

청구항 157

제155항 또는 제156항에 있어서, 상기 수용체는 제79항 내지 제87항 중 어느 한 항의 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는, 시스템.

청구항 158

제155항에 있어서, 상기 적어도 하나의 추가적인 사이토카인(들) 또는 케모카인(들)은 인터류킨(IL)-18, IL-21, 인터페론-α, 인터페론-β, 인터페론-ɣ, IL-17, IL-21, TNF- α, CXCL13, CCL3(MIP-1α), CCL4(MIP-1β), 및 CCL19 및 수용체 NKG2D 및 이들의 조합 중 적어도 하나를 포함하는, 세포의 선택적 활성화를 위한 시스템.

청구항 159

제158항에 있어서, 상기 적어도 하나의 추가적인 사이토카인(들)은 IL-18을 포함하는, 세포의 선택적 활성화를 위한 시스템.

청구항 160

제155항 내지 제159항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항원 결합 신호전달 수용체(들)는 천연 T 세포 수용체, 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), 천연 B 세포 수용체, 조작된 B 세포 수용체(BCR), 스트레스 리간드 수용체, 패턴 인식 수용체 및 이들의 조합 중 적어도 하나를 포함하는, 세포의 선택적 활성화를 위한 시스템.

청구항 161

제160항에 있어서, 상기 항원 결합 신호전달 수용체는 CAR을 포함하되; 선택적으로, 상기 CAR은 메소텔린 CAR인, 세포의 선택적 활성화를 위한 시스템.

청구항 162

제1항 내지 제160항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 G-CSFR의 변이체 ECD는 부위 II 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이, 부위 III 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이 또는 이들의 조합을 포함하는, 세포의 선택적 활성화를 위한 시스템.

청구항 163

제162항에 있어서,

상기 부위 II 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이는 서열번호 2에 제시된 서열의 아미노산 위치 141,167, 168, 171, 172, 173, 174, 197, 199, 200, 202 및 288로 이루어진 군으로부터 선택된 G-CSFR ECD의 아미노산 위치에 위치하는, 세포의 선택적 활성화를 위한 시스템.

청구항 164

제162항에 있어서, 상기 G-CSFR ECD의 부위 II 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이는 서열번호 2에 제시된 서열의 R141E, R167D, K168D, K168E, L171E, L172E, Y173K, Q174E, D197K, D197R, M199D, D200K, D200R, V202D, R288D 및 R288E로 이루어진 군으로부터 선택되는, 세포의 선택적 활성화를 위한 시스템.

청구항 165

제162항에 있어서,

상기 G-CSFR ECD의 부위 III 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이는 서열번호 2에 제시된 서열의 아미노산 2 내지 308의 아미노산 위치 30, 41, 73, 75, 79, 86, 87, 88, 89, 91 및 93으로 이루어진 군으로부터 선택되는,

세포의 선택적 활성화를 위한 시스템.

청구항 166

제162항에 있어서,

상기 G-CSFR ECD의 부위 III 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이는 서열번호 2에 제시된 서열의 S30D, R41E, Q73W, F75KF, S79D, L86D, Q87D, I88E, L89A, Q91D, Q91K 및 E93K로 이루어진 군으로부터 선택되는, 세포의 선택적 활성화를 위한 시스템.

청구항 167

제1항 내지 제166항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 G-CSFR ECD는 표 4에 제시된 설계 번호의 복수의 돌연변이의 조합을 포함하며; 상기 돌연변이는 서열번호 2에 제시된 서열의 아미노산 위치에 상응하는, 세포의 선택적 활성화를 위한 시스템.

청구항 168

제1항 내지 제167항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 G-CSFR ECD는 서열번호 2에 제시된 서열의 돌연변이 R41E, R141E 및 R167D를 포함하는, 세포의 선택적 활성화를 위한 시스템.

청구항 169

제1항 내지 제168항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체는 키메라 수용체인, 세포의 선택적 활성화를 위한 시스템.

청구항 170

제169항에 있어서,

상기 키메라 수용체는 적어도 하나의 제2 도메인에 작동 가능하게 연결되고; 상기 제2 도메인은 하나 이상의 사이토카인 수용체(들)의 세포내 도메인(ICD)으로부터의 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위를 포함하되; 상기 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위는 G-CSFR의 STAT3 결합 부위, 당단백질 130(gp130)의 STAT3 결합 부위, gp130의 SHP-2 결합 부위, IL-2Rβ의 SHC 결합 부위, IL-2Rβ의 STAT5 결합 부위, IL-2Rβ가 STAT3 결합 부위, IL-2Rβ의 STAT1 결합 부위, IL-7Rα의 STAT5 결합 부위, IL-7Rα의 포스파티딜이노시톨 3-키나제(PI3K) 결합 부위, IL-12Rβ$_2$의 STAT4 결합 부위, IL-12Rβ$_2$의 STAT5 결합 부위, IL-12Rβ$_2$의 STAT3 결합 부위, IL-21R의 STAT5 결합 부위, IL-21R의 STAT3 결합 부위, IL-21R의 STAT1 결합 부위, IL-4Rα의 IRS-1 또는 IRS-2 결합 부위, IL-4Rα의 STAT6 결합 부위, 에리트로포이에틴 수용체(EPOR)의 SHP-1 또는 SHP-2 결합 부위, EPOR의 STAT5 결합 부위, 인터페론 알파 및 베타 수용체 소단위 2(IFNAR2)의 STAT1 또는 STAT2 결합 부위, 및 인터페론 감마 수용체 1(IFNγR1)의 STAT1 결합 부위 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되며;

선택적으로, 상기 ICD는 G-CSFR, gp130 EPOR 및 인터페론 감마 수용체 2(IFNγR2) 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 Box 1 영역 및 Box 2 영역을 포함하고;

선택적으로, 상기 키메라 수용체는 G-CSFR, gp130(당단백질 130) 및 IL-2Rβ로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 막관통 도메인(TMD)을 포함하는 제3 도메인을 포함하고, 선택적으로, 상기 TMD는 야생형 TMD인, 세포의 선택적 활성화를 위한 시스템.

청구항 171

제169항에 있어서, 상기 키메라 수용체는 적어도 하나의 제2 도메인에 작동 가능하게 연결되되; 상기 제2 도메인은,

(i)

(a) gp130의 Box 1 및 Box 2 영역; 및

(b) IL-2Rβ의 C-말단 영역; 또는

(ii)

(a) G-CSFR의 Box 1 및 Box 2 영역; 및

(b) IL-2Rβ의 C-말단 영역; 또는

(iii)

(a) G-CSFR의 Box 1 및 Box 2 영역; 및

(b) IL-12Rβ$_2$의 C-말단 영역; 또는

(iv)

(a) G-CSFR의 Box 1 및 Box 2 영역; 및

(b) IL-21R의 C-말단 영역; 또는

(v)

(a) IL-2Rβ의 Box 1 및 Box 2 영역; 및

(b) IL-2Rβ의 C-말단 영역; 또는

(vi)

(a) G-CSFR의 Box 1 및 Box 2 영역; 및

(b) IL-7Rα의 C-말단 영역; 또는

(vii)

(a) G-CSFR의 Box 1 및 Box 2 영역;

(b) IL-4Rα의 C-말단 영역; 또는

(viii)

(a) gp130의 Box 1 및 Box 2 영역;

(b) gp130의 C-말단 영역; 또는

(ix)

(a) 에리트로포이에틴 수용체(EPOR)의 Box 1 및 Box 2 영역;

(b) EPOR의 C-말단 영역; 또는

(x)

(a) G-CSFR의 Box 1 및 Box 2 영역;

(b) 인터페론 알파 및 베타 수용체 소단위 2(IFNAR2)의 C-말단 영역; 또는

(xi)

(a) 인터페론 감마 수용체 2(IFNγR2)의 Box 1 및 Box 2 영역;

(b) 인터페론 감마 수용체 1(IFN γR1)의 C-말단 영역

을 포함하는, 세포의 선택적 활성화를 위한 시스템.

청구항 172

제170항 또는 제171항에 있어서, 상기 ECD는 TMD에 대해 N-말단이고, 상기 TMD는 ICD에 대해 N-말단인, 세포의 선택적 활성화를 위한 시스템.

청구항 173

제1항 내지 제172항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체는 세포 상에서 발현되는, 세포의 선택적 활성화를 위한 시스템.

청구항 174

제1항 내지 제173항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 면역 세포이되, 선택적으로 상기 면역 세포는,

T 세포 및 선택적으로,

NK 세포 및 선택적으로,

NKT 세포, 및 선택적으로,

B 세포 및 선택적으로,

형질 세포 및 선택적으로,

대식세포 및 선택적으로,

수지상 세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 줄기세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 1차 세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 인간 세포인, 세포의 선택적 활성화를 위한 시스템.

청구항 175

제174항에 있어서, 상기 T 세포는 $CD8^+$ T 세포, 세포독성 $CD8^+$ T 세포, 세포독성 $CD4^+$ T 세포, 미경험 $CD4^+$ T 세포, 미경험 $CD8^+$ T 세포, 헬퍼 T 세포, 조절성 T 세포, 기억 T 세포, 및 γδT 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는, 시스템.

청구항 176

제1항 내지 제175항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변이체 G-CSF에 의한 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체의 활성화는 상기 수용체를 발현하는 세포의 증식, 생존력, 지속성, 세포독성, 사이토카인 분비, 기억, 향상된 활성 또는 이들의 조합 중 적어도 하나를 포함하는 세포 반응을 초래하는, 세포의 선택적 활성화를 위한 시스템.

청구항 177

제1항 내지 제176항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변이체 G-CSF는 부위 II 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이, 부위 III 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이 또는 이들의 조합을 포함하는, 세포의 선택적 활성화를 위한 시스템.

청구항 178

제177항에 있어서, 상기 변이체 G-CSF의 부위 II 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이는 서열번호 1에 제시된 서열의 아미노산 위치 12, 16, 19, 20, 104, 108, 109, 112, 115, 116, 118, 119, 122 및 123으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 위치에 위치하는, 세포의 선택적 활성화를 위한 시스템.

청구항 179

제178항에 있어서, 상기 변이체 G-CSF의 부위 II 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이는 S12E, S12K, S12R, K16D, L18F, E19K, Q20E, D104K, D104R, L108K, L108R, D109R, D112R, D112K, T115E, T115K, T116D, Q119E, Q119R, E122K, E122R 및 E123R로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이의 군으로부터 선택되는, 세포의 선택적 활성화를 위한 시스템.

청구항 180

제177항 내지 제179항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변이체 G-CSF의 부위 III 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이는 서열번호 1에 제시된 서열의 38, 39, 40, 41, 46, 47, 48, 49 및 147로 이루어진 군으로부터 선택된

돌연변이의 군으로부터 선택되는, 세포의 선택적 활성화를 위한 시스템.

청구항 181

제180항에 있어서,

상기 변이체 G-CSF의 부위 III 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이는 T38R, Y39E, K40D, K40F, L41D, L41E, L41K, E46R, L47D, V48K, V48R, L49K 및 R147E로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이의 군으로부터 선택되는, 세포의 선택적 활성화를 위한 시스템.

청구항 182

제1항 내지 제181항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체 및 적어도 하나의 추가적인 사이토카인 또는 케모카인 둘 다를 발현하는, 세포의 선택적 활성화를 위한 시스템.

청구항 183

제155항 내지 제181항 중 어느 한 항에 있어서, 2개의 이상의 세포 집단은 각각 G-CSFR ECD를 포함하는 구별되는 키메라 수용체를 발현하고 각각 G-CSF의 구별되는 변이체 형태를 발현하는, 세포의 선택적 활성화를 위한 시스템.

청구항 184

제183항에 있어서, 상기 면역 세포의 제1 집단은 다음 중 하나 또는 둘 다를 추가로 발현하는, 세포의 선택적 활성화를 위한 시스템:

(a) 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)로서, 선택적으로, 상기 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 다른 친화성 시약(들)을 포함하는, 상기 신호전달 단백질(들); 및

(b) 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체.

청구항 185

제182항에 있어서, 상기 세포는 면역 세포이되; 상기 면역 세포는 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체를 추가로 발현하고; 항원 결합 신호전달 수용체는 제2 세포 상에서 발현되는 항원에 선택적으로 결합하는, 세포의 선택적 활성화를 위한 시스템.

청구항 186

제184항에 있어서, 상기 항원 결합 신호전달 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하되; 선택적으로, CAR은 메소텔린 CAR인, 세포의 선택적 활성화를 위한 시스템.

청구항 187

제186항에 있어서, 상기 추가적인 사이토카인은 IL-18을 포함하는, 세포의 선택적 활성화를 위한 시스템.

청구항 188

제184항 내지 제187항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 세포는 암 세포인, 세포의 선택적 활성화를 위한 시스템.

청구항 189

제1항 내지 제188항 중 어느 한 항의 시스템을 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열(들).

청구항 190

제189항의 핵산 서열(들)을 포함하는, 하나 이상의 발현 벡터(들).

청구항 191

제155항 내지 제188항 중 어느 한 항의 시스템을 발현하도록 조작된 하나 이상의 세포(들).

청구항 192

제191항에 있어서, 상기 세포(들)는 면역 세포이되, 선택적으로 상기 면역 세포는,

T 세포 및 선택적으로,

NK 세포 및 선택적으로,

NKT 세포, 및 선택적으로,

B 세포 및 선택적으로,

형질 세포 및 선택적으로,

대식세포 및 선택적으로,

수지상 세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 줄기세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 1차 세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 인간 세포인, 세포(들).

청구항 193

제192항에 있어서, 상기 T-세포는 $CD8^+$ T 세포, 세포독성 $CD8^+$ T 세포, 세포독성 $CD4^+$ T 세포, 미경험 $CD8^+$ T 세포, 미경험 $CD4^+$ T 세포, 헬퍼 T 세포, 조절성 T 세포, 기억 T 세포 및 γδT 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는, 세포(들).

청구항 194

세포의 표면 상에서 발현되는 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체의 선택적인 활성화 방법으로서,

상기 세포에 제155항 내지 제188항 중 어느 한 항의 시스템의 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 적어도 하나의 수용체(들)를 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열(들); 및

(i) 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)로서, 선택적으로, 상기 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 제155항 내지 제188항 중 어느 한 항의 시스템의 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 다른 친화성 시약(들)을 포함하는, 상기 신호전달 단백질(들); 및

(ii) 제155항 내지 제188항 중 어느 한 항의 시스템의 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체(들)

중 하나 또는 둘 다를 도입하는 단계; 및

상기 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체(들)를 변이체 G-CSF 또는 제155항 내지 제188항 중 어느 한 항의 또는 변이체 G-CSF와 접촉시키는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 195

제194항에 있어서, 상기 수용체(들)는 면역 세포에서 발현되고, 선택적으로 상기 면역 세포는,

T 세포 및 선택적으로,

NK 세포 및 선택적으로,

NKT 세포, 및 선택적으로,

B 세포 및 선택적으로,

형질 세포 및 선택적으로,

대식세포 및 선택적으로,

수지상 세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 줄기세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 1차 세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 인간 세포인, 방법.

청구항 196

제195항에 있어서, 상기 T 세포는 $CD8^+$ T 세포, 세포독성 $CD8^+$ T 세포, 세포독성 $CD4^+$ T 세포, 미경험 $CD4^+$ T 세포, 미경험 $CD8^+$ T 세포, 헬퍼 T 세포, 조절성 T 세포, 기억 T 세포, 및 γδT 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 197

제195항에 있어서, 상기 면역 세포 상에서 발현되는 수용체(들)의 선택적 활성화는 면역 세포의 증식, 생존력, 지속성, 세포독성, 사이토카인 분비, 기억, 향상된 활성 또는 이들의 조합 중 적어도 하나를 포함하는 세포 반응을 초래하는, 방법.

청구항 198

제195항에 있어서, 상기 면역 세포의 제1 집단은 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 하나 이상의 수용체(들)를 발현하고, 면역 세포의 제2 집단은 하나 이상의 변이체 G-CSF를 발현하고; 선택적으로, 상기 면역 세포의 제1 및 제2 집단(들) 중 하나 또는 둘 다는 적어도 하나의 구별되는 항원 결합 신호전달 수용체(들)를 추가로 발현하고; 선택적으로, 상기 적어도 하나의 구별되는 항원 결합 신호전달 수용체(들)는 적어도 하나의 CAR을 포함하는, 방법.

청구항 199

제198항에 있어서, 상기 면역 세포의 제1 및 제2 집단(들) 중 하나 또는 둘 다는,

(a) 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)로서, 선택적으로, 상기 적어도 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 다른 친화성 시약(들)을 포함하는, 상기 신호전달 단백질(들); 및

(b) 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체

중 하나 또는 둘 다를 추가로 발현하는, 방법.

청구항 200

제198항 또는 제199항에 있어서, 상기 면역 세포의 제1 및 제2 집단 각각은 G-CSFR의 구별되는 변이체 ECD 및 적어도 하나의 구별되는 변이체 G-CSF를 포함하는 적어도 하나의 구별되는 수용체(들)를 발현하는, 방법.

청구항 201

제198항 내지 제200항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 세포의 하나 이상의 추가적인 집단을 추가로 포함하되; 면역 세포의 각각의 추가적인 집단은 (i) G-CSFR의 구별되는 변이체 ECD를 포함하는 구별되는 수용체, (ii) 구별되는 변이체 G-CSF, (iii) 구별되는 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질 및 (iv) 구별되는 항원 결합 신호전달 수용체 중 적어도 하나를 발현하는, 방법.

청구항 202

제155항 내지 제188항 중 어느 한 항의 시스템의 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체 및

(i) 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)로서, 선택적으로, 상기 적어도 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 제155항 내지 제188항 중 어느 한 항의 시스템의 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 다른 친화성 시약(들)을 포함하는, 상기 신호전달 단백질(들); 및

(ii) 제155항 내지 제188항 중 어느 한 항의 시스템의 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체(들)

중 하나 또는 둘 다를 발현하는 세포의 생산 방법으로서, 상기 세포에 상기 수용체와, (i) 및 (ii) 중 하나 또는 둘 다를 암호화하는 하나 이상의 핵산(들) 또는 발현 벡터(들)를 도입하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 203

제200항에 있어서, 면역 세포의 제1 집단은 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체(들)를 발현하고, 면역 세포의 제2 집단은 변이체 G-CSF를 발현하는, 방법.

청구항 204

제203항에 있어서, 상기 면역 세포의 제1 및 제2 집단(들) 중 하나 또는 둘 다는,

(a) 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)로서, 선택적으로, 상기 적어도 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 다른 친화성 시약(들)을 포함하는, 상기 신호전달 단백질(들); 및 선택적으로

(b) 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체

중 하나 또는 둘 다를 추가로 발현하는, 방법:.

청구항 205

면역 반응의 증가를 필요로 하는 대상체에서 면역 반응을 증가시키는 방법으로서, 상기 대상체에게 제192항의 면역 세포(들)를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 206

질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 질환을 치료하는 방법으로서,

상기 대상체에게 제192항의 면역 세포(들)를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 207

제204항에 있어서, 적어도 하나의 변이체 G-CSF를 상기 대상체에게 투여하거나 제공하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 208

제204항 내지 제207항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 암을 치료하기 위해서 사용되는, 방법.

청구항 209

제204항 내지 제207항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 염증성 병태를 치료하기 위해서 사용되는, 방법.

청구항 210

제204항 내지 제207항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 자가면역 질환을 치료하기 위해서 사용되는, 방법.

청구항 211

제204항 내지 제207항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 퇴행성 질환을 치료하기 위해서 사용되는, 방법.

청구항 212

제204항 내지 제207항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 이식을 위한 자연 또는 조작된 세포, 조직 또는 기관을 생성하기 위해서 사용되는, 방법.

청구항 213

제204항 내지 제207항에 있어서, 상기 방법은 이식 거부를 예방 또는 치료하기 위해서 사용되는, 방법.

청구항 214

제204항 내지 제207항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 감염 질환을 치료하기 위해서 사용되는, 방법.

청구항 215

제204항 내지 제207항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 추가적인 활성제를 투여 또는 제공하는 단계를 추가로 포함하고; 선택적으로 상기 적어도 하나의 추가적인 활성제는 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)을 포함하고; 선택적으로, 상기 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들), 또는 다른 친화성 시약(들)을 포함하는, 방법.

청구항 216

치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법으로서,

(i) 면역 세포-함유 샘플을 단리시키는 단계;

(ii) 상기 면역 세포에 제155항 내지 제188항 중 어느 한 항의 시스템의 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 하나 이상의 수용체(들)를 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열(들); 및

(a) 적어도 하나의 추가적인 활성제로서; 선택적으로 상기 적어도 하나의 추가적인 활성제는 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)을 포함하고, 선택적으로, 상기 적어도 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 제155항 내지 제188항 중 어느 한 항의 시스템의 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 다른 친화성 시약(들)을 포함하는, 상기 적어도 하나의 추가적인 활성제; 및

(b) 제155항 내지 제188항 중 어느 한 항의 시스템의 하나 이상의 항원 결합 신호전달 수용체(들)

중 하나 또는 둘 다를 도입하는 단계;

(iii) (ii)로부터의 상기 면역 세포(들)를 상기 대상체에게 투여하는 단계; 및

(iv) 상기 면역 세포(들)를 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체(들)에 특이적으로 결합하는 변이체 G-CSF와 접촉시키는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 217

제216항에 있어서, 상기 대상체는 상기 면역 세포(들)를 상기 대상체에게 투여하거나 주입하기 전에 면역-고갈 치료를 경험한 적이 있는, 방법.

청구항 218

제216항에 있어서, 상기 면역 세포-함유 샘플은 상기 세포(들)가 투여되는 대상체로부터 단리되는, 방법.

청구항 219

제216항에 있어서, 상기 면역 세포-함유 샘플은 상기 세포(들)가 투여되는 대상체와 구별되는 대상체로부터 단리되는, 방법.

청구항 220

제216항 내지 제219항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역 세포-함유 샘플은 상기 세포(들)가 투여될 대상체 또

는 상기 세포가 투여될 대상체와 구별되는 대상체로부터 유래된 공급원 세포로부터 생성되고, 선택적으로, 상기 공급원 세포는 줄기 세포, 및 선택적으로, 만능 줄기 세포인, 방법.

청구항 221

제216항에 있어서, 상기 면역 세포(들)는 상기 대상체에게 면역 세포를 투여하기 전에 시험관내에서 상기 변이체 G-CSF 또는 추가적인 사이토카인 또는 케모카인과 접촉되는, 방법.

청구항 222

제216항 내지 제220항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역 세포(들)는 제1항 내지 제32항 중 어느 한 항의 시스템의 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체(들)로부터의 신호전달을 활성화시키기에 충분한 시간 동안 상기 변이체 G-CSF와 접촉되는, 방법.

청구항 223

키트로서,

제155항 내지 제188항 중 어느 한 항의 시스템의 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체: 및

(a) 제155항 내지 제188항 중 어느 한 항의 시스템의 적어도 하나의 추가적인 사이토카인 및 케모카인; 및

(b) 제155항 내지 제188항 중 어느 한 항의 시스템의 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체

중 하나 또는 둘 다를 암호화하는 세포;

및 사용 설명서

를 포함하되; 선택적으로, 상기 세포는 면역 세포인, 키트.

청구항 224

키트로서,

(i) 제155항 내지 제188항 중 어느 한 항의 시스템의 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체를 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열(들) 또는 발현 벡터(들); 및

(a) 적어도 하나의 추가적인 활성제(들)로서; 선택적으로 상기 적어도 하나의 추가적인 활성제는 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)을 포함하고, 선택적으로, 상기 적어도 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 제155항 내지 제188항 중 어느 한 항의 시스템의 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 다른 친화성 시약(들)을 포함하는, 상기 적어도 하나의 추가적인 활성제; 및

(b) 제155항 내지 제188항 중 어느 한 항의 시스템의 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체

중 하나 또는 둘 다;

(ii) 적어도 하나의 변이체 G-CSF; 및

(iii) 사용 설명서

를 포함하되; 상기 수용체(들) 및 (a) 및 (b) 중 하나 또는 둘 다는 동일한 또는 별개의 핵산 서열 또는 발현 벡터 상에 위치하는, 키트.

청구항 225

키트로서,

(i) 제155항 내지 제188항 중 어느 한 항의 시스템의 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체를 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열(들) 또는 발현 벡터(들)를 포함하는 세포; 및

(a) 적어도 하나의 추가적인 활성제(들)로서; 선택적으로 상기 적어도 하나의 추가적인 활성제는 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)을 포함하고, 선택적으로, 상기 적어도 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 제155항 내지 제188항 중 어느 한 항의 시스템의

하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 다른 친화성 시약(들)을 포함하는, 상기 적어도 하나의 추가적인 활성제; 및

(b) 제155항 내지 제188항 중 어느 한 항의 시스템의 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체(들)

중 하나 또는 둘 다; 및

(ii) 사용 설명서

를 포함하되; 선택적으로 상기 키트는 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체에 특이적으로 결합하는 변이체 G-CSF를 포함하는, 키트.

청구항 226

키메라 수용체로서,

(i) 인터류킨 수용체 알파(IL-7Rα)의 세포외 도메인(ECD);

(ii) 막관통 도메인(TMD); 및

(iii) 서열번호 109에 제시된 야생형, 인간 IL-7Rα 세포내 신호전달 도메인과 구별되는 사이토카인 수용체의 세포내 도메인(ICD)

을 포함하되, 상기 ECD 및 TMD는 상기 ICD에 작동 가능하게 연결된, 키메라 수용체.

청구항 227

제226항에 있어서, 상기 ECD의 카복시 말단(C-말단)은 TMD의 아미노 말단(N-말단)에 연결되고, 상기 TMD의 C-말단은 ICD의 N-말단에 연결된, 키메라 수용체.

청구항 228

제226항 또는 제227항에 있어서, 상기 ECD는 천연 인간 IL-7Rα의 ECD인, 키메라 수용체.

청구항 229

제226항 내지 제228항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 TMD는 IL-7Rα의 TMD인, 키메라 수용체.

청구항 230

제229항에 있어서, 상기 TMD는 천연 인간 IL-7Rα의 TMD인, 키메라 수용체.

청구항 231

제226항 내지 제230항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ICD는 사이토카인 수용체의 세포내 도메인으로부터의 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위를 포함하되, 선택적으로,

상기 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위는.

(a) IL-2Rβ, IL-4Rα, IL-7Ra, IL-21R 또는 gp130의 Jak 1 결합 부위(Box 1 및 2 영역);

(b) IL-2Rβ의 SHC 결합 부위;

(c) IL-2Rβ 또는 IL-7Ra의 STAT5 결합 부위;

(d) IL-21R 또는 gp130의 STAT3 결합 부위;

(e) IL-12Rβ2의 STAT4 결합 부위;

(f) IL-4Rα의 STAT6 결합 부위;

(g) IL-4Rα의 IRS-1 또는 IRS-2 결합 부위; 및

(h) gp130의 SHP-2 결합 부위;

(i) IL-7Rα의 PI3K 결합 부위;

또는 이들의 조합

을 포함하는, 키메라 수용체.

청구항 232

제226항 내지 제231항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ICD는 공통 감마 쇄(gc)와의 이종이량체화에 의해서 활성화되는 수용체의 적어도 세포내 신호전달 도메인을 포함하는, 키메라 수용체.

청구항 233

제226항 내지 제231항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ICD는 IL-2Rβ(인터류킨-2 수용체 베타), IL-4Rα(인터류킨-4 수용체 알파), IL-9Rα(인터류킨-9 수용체 알파), IL-12R β2(인터류킨-12 수용체), IL-21R(인터류킨-21 수용체) 및 당단백질 130(gp130) 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 사이토카인 수용체의 적어도 세포내 신호전달 도메인을 포함하는, 키메라 수용체.

청구항 234

키메라 수용체로서, IL-7Rα의 ECD 및 ICD에 작동 가능하게 연결된 TMD를 포함하되, 상기 ICD는,

(i)

(a) IL-2Rβ의 Box 1 및 Box 2 영역;

(b) IL-2Rβ의 SHC 결합 부위; 및

(c) IL-2Rβ의 STAT5 결합 부위; 또는

(ii)

(a) IL-7Rα의 Box 1 및 Box 2 영역;

(b) IL-2Rβ의 SHC 결합 부위; 및

(c) IL-2Rβ의 STAT5 결합 부위; 또는

(iii)

(a) IL-2Rβ의 Box 1 및 Box 2 영역;

(b) IL-2Rβ의 SHC 결합 부위;

(c) IL-2Rβ의 STAT5 결합 부위; 및

(d) IL-12Rβ2의 STAT4 결합 부위; 또는

(iv)

(a) IL-7Rα의 Box 1 및 Box 2 영역;

(b) IL-2Rβ의 SHC 결합 부위;

(c) IL-2Rβ의 STAT5 결합 부위; 및

(d) IL-12Rβ2의 STAT4 결합 부위; 또는

(v)

(a) IL-21R의 Box 1 및 Box 2 영역; 및

(b) IL-21R의 STAT3 결합 부위; 또는

(vi)

(a) IL-7Rα의 Box 1 및 Box 2 영역; 및

(b) IL-21R의 STAT3 결합 부위; 또는

(vii)

(a) IL-21R의 Box 1 및 Box 2 영역;

(b) IL-21R의 STAT3 결합 부위; 및

(c) IL-7Rα의 STAT5 및 PI3 키나제 결합 부위;

(viii)

(a) IL-7Rα의 Box 1 및 Box 2 영역;

(b) IL-21R의 STAT3 결합 부위; 및

(c) IL-7Rα의 STAT5 및 PI3 키나제 결합 부위;

(ix)

(a) IL-2Rβ의 Box 1 및 Box 2 영역;

(b) IL-2Rβ의 SHC 결합 부위;

(c) IL-2Rβ의 STAT5 결합 부위; 및

(d) IL-21R의 STAT3 결합 부위; 또는

(x)

(a) IL-7Rα의 Box 1 및 Box 2 영역;

(b) IL-2Rβ의 SHC 결합 부위;

(c) IL-2Rβ의 STAT5 결합 부위; 및

(d) IL-21R의 STAT3 결합 부위; 또는

(xi)

(a) IL-2Rβ의 Box 1 및 Box 2 영역;

(b) IL-2Rβ의 SHC 결합 부위;

(c) IL-2Rβ의 STAT5 결합 부위;

(d) IL12Rβ2의 STAT4 결합 부위; 및

(e) IL-21R의 STAT3 결합 부위; 또는

(xii)

(a) IL-7Rα의 Box 1 및 Box 2 영역;

(b) IL-2Rβ의 SHC 결합 부위;

(c) IL-2Rβ의 STAT5 결합 부위;

(d) IL12Rβ2의 STAT4 결합 부위; 및

(e) IL-21R의 STAT3 결합 부위; 또는

(xiii)

(a) IL-4Rα의 Box 1 및 Box 2 영역;

(b) IL-4Rα의 IRS-1 또는 IRS-2 결합 부위; 및

(c) IL-4Rα의 STAT6 결합 부위; 또는

(xiv)

(a) IL-7Rα의 Box 1 및 Box 2 영역;

(b) IL-4α의 IRS-1 또는 IRS-2 결합 부위; 및

(c) IL-4α의 STAT6 결합 부위; 또는

(xv)

(a) gp130의 Box 1 및 Box 2 영역;

(b) gp130의 SHP-2 결합 부위; 및

(c) gp130의 STAT3 결합 부위; 또는

(xvi)

(a) IL-7α의 Box 1 및 Box 2 영역;

(b) gp130의 SHP-2 결합 부위; 및

(c) gp130의 STAT3 결합 부위

를 포함하는, 키메라 수용체.

청구항 235

제234항에 있어서,

(b)는 (c)에 대해 N-말단이거나; 또는

(c)는 (b)에 대해 N-말단이거나; 또는

(c)는 (d)에 대해 N-말단이거나; 또는

(d)는 (c)에 대해 N-말단이거나; 또는

(d)는 (e)에 대해 N-말단이거나; 또는

(e)는 (d)에 대해 N-말단인, 키메라 수용체.

청구항 236

제1항 내지 제235항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ICD는 서열번호 85 내지 107 중 적어도 하나에 제시된 서열과 동일한 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함하는, 키메라 수용체.

청구항 237

제1항 내지 제236항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 키메라 수용체의 활성화된 형태는 이종이량체를 형성하고, 선택적으로, 상기 키메라 수용체의 활성화는 키메라 수용체를 발현하는 세포의 증식, 생존력, 지속성, 세포독성, 사이토카인 분비, 기억 및 향상된 활성 중 적어도 하나를 포함하는 세포 반응을 초래하고,

선택적으로, 상기 키메라 수용체는 인터류킨(IL)-7과의 접촉 시 활성화되는, 키메라 수용체.

청구항 238

제237항에 있어서, 상기 IL-7은 야생형, 인간 IL-7인, 키메라 수용체.

청구항 239

제237항에 있어서, 상기 IL-7은 야생형 IL-7에 비해서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 돌연변이를 보유하는, 키메라 수용체.

청구항 240

제237항에 있어서, 상기 IL-7은 하나 이상의 화학적 변형을 포함하는, 키메라 수용체.

청구항 241

제240항에 있어서, 상기 IL-7은 페길화에 의해서 변형되는, 키메라 수용체.

청구항 242

제241항에 있어서, 상기 IL-7은 상기 IL-7 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 폴리에틸렌 글리콜(PEG)를 화학적으로 첨가함으로써 페길화되는, 키메라 수용체.

청구항 243

제1항 내지 제242항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 키메라 수용체는 세포에서 발현되는, 키메라 수용체.

청구항 244

제243항에 있어서, 상기 세포는 면역 세포이되, 선택적으로 상기 면역 세포는,

T 세포 및 선택적으로,

NK 세포 및 선택적으로,

NKT 세포, 및 선택적으로,

B 세포 및 선택적으로,

형질 세포 및 선택적으로,

대식세포 및 선택적으로,

수지상 세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 줄기세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 1차 세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 인간 세포인, 키메라 수용체.

청구항 245

제244항에 있어서, 상기 T 세포는 $CD8^+$ T 세포, 세포독성 $CD8^+$ T 세포, 미경험 $CD4^+$ T 세포, 미경험 $CD8^+$ T 세포, 헬퍼 T 세포, 조절성 T 세포, 기억 T 세포 및 γδT 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는, 키메라 수용체.

청구항 246

제1항 내지 제245항 중 어느 한 항에 있어서,

IL-7에 의한 상기 수용체의 활성화는 수용체를 발현하는 세포의 증식, 생존력, 지속성, 세포독성, 사이토카인 분비, 기억, 및 향상된 활성 중 적어도 하나를 포함하는 세포 반응을 초래하는, 키메라 수용체.

청구항 247

제1항 내지 제188항 중 어느 한 항의 수용체를 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열(들).

청구항 248

제20항의 핵산 서열(들)을 포함하는 하나 이상의 발현 벡터(들).

청구항 249

제247항의 핵산 서열(들) 또는 제248항의 발현 벡터(들)를 포함하는 세포.

청구항 250

제249항에 있어서, 상기 세포는 면역 세포이되, 선택적으로 상기 면역 세포는,

T 세포 및 선택적으로,

NK 세포 및 선택적으로,

NKT 세포, 및 선택적으로,

B 세포 및 선택적으로,

형질 세포 및 선택적으로,

대식세포 및 선택적으로,

수지상 세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 줄기세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 1차 세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 인간 세포인, 세포.

청구항 251

제250항에 있어서, 상기 T 세포는 $CD8^+$ T 세포, 세포독성 $CD8^+$ T 세포, 미경험 $CD4^+$ T 세포, 미경험 $CD8^+$ T 세포, 헬퍼 T 세포, 조절성 T 세포, 기억 T 세포 및 γδT 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는, 세포.

청구항 252

세포 표면 상에서 발현되는 수용체의 활성화를 위한 시스템으로서,

(a) 제226항 내지 제245항 중 어느 한 항의 키메라 수용체; 및

(b) IL-7

을 포함하는, 시스템.

청구항 253

면역 세포의 활성화를 위한 시스템으로서,

(a) 제226항 내지 제245항 중 어느 한 항의 키메라 수용체; 및

(b) IL-7; 및

(c) 항원 결합 신호전달 수용체

를 포함하는, 시스템.

청구항 254

면역 세포의 활성화를 위한 시스템으로서,

(a) 제226항 내지 제245항 중 어느 한 항의 키메라 수용체;

(b) IL-7; 및

(c) 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)로서, 선택적으로, 상기 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 다른 친화성 시약을 포함하는, 상기 신호전달 백질(들)

을 포함하는, 시스템.

청구항 255

제254항에 있어서, 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체를 추가로 포함하는, 시스템.

청구항 256

제253항 또는 제255항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체는 천연 T 세포

수용체, 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), 천연 B 세포 수용체, 조작된 B 세포 수용체(BCR), 스트레스 리간드 수용체, 패턴 인식 수용체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 수용체를 포함하는, 시스템.

청구항 257

제256항에 있어서, 상기 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체는 CAR인, 시스템.

청구항 258

제254항에 있어서, 상기 사이토카인 또는 케모카인은 IL-18, IL-21, 인터페론-a, 인터페론-b, 인터페론-g, IL-17, IL-21, TNF-a, CXCL13, CCL3(MIP-1a), CCL4(MIP-1b), CCL19, NKG2D 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 시스템.

청구항 259

제258항에 있어서, 상기 사이토카인은 IL-18인, 시스템.

청구항 260

제258항 또는 제259항에 있어서, 상기 사이토카인은 인간인, 시스템.

청구항 261

세포의 표면 상에서 발현되는 키메라 수용체의 활성화 방법으로서,

상기 키메라 수용체를 IL-7과 접촉시켜 상기 키메라 수용체를 활성화시키는 단계를 포함하되; 상기 키메라 수용체는,

(i) IL-7Rα의 세포외 도메인(ECD);

(ii) 막관통 도메인(TMD); 및

(iii) 서열번호 109에 제시된 야생형, 인간 IL-7Rα 세포내 신호전달 도메인과 구별되는 사이토카인 수용체의 세포내 도메인(ICD)

을 포함하되, 상기 ECD 및 TMD는 상기 ICD에 작동 가능하게 연결된, 방법.

청구항 262

제253항에 있어서, 상기 키메라 수용체는 제227항 내지 제245항 중 어느 한 항의 키메라 수용체인, 방법.

청구항 263

세포에서 키메라 수용체를 생산하는 방법으로서,

상기 세포에 제247항의 핵산 서열(들) 또는 제262항의 발현 벡터(들)를 도입하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 264

제262항에 있어서, 상기 서열(들) 또는 상기 벡터(들)의 서열(들)을 상기 세포의 게놈 내에서 편집하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 265

제262항 또는 제263항에 있어서, 상기 세포는 면역 세포이되, 선택적으로 상기 면역 세포는,

T 세포 및 선택적으로,

NK 세포 및 선택적으로,

NKT 세포, 및 선택적으로,

B 세포 및 선택적으로,

형질 세포 및 선택적으로,

대식세포 및 선택적으로,

수지상 세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 줄기세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 1차 세포이고, 선택적으로,

상기 세포는 인간 세포인, 방법.

청구항 266

제265항에 있어서, 상기 T 세포는 $CD8^+$ T 세포, 세포독성 $CD8^+$ T 세포, 미경험 $CD4^+$ T 세포, 미경험 $CD8^+$ T 세포, 헬퍼 T 세포, 조절성 T 세포, 기억 T 세포 및 γδT 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 267

면역 반응의 증가를 필요로 하는 대상체에서 면역 반응을 증가시키는 방법으로서,

상기 대상체에게 제226항 내지 제245항 중 어느 한 항의 키메라 수용체를 발현하는 세포(들)를 투여하는 단계 및 상기 대상체에게 IL-7을 투여하거나 제공하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 268

치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법으로서,

상기 대상체에게 제226항 내지 제245항 중 어느 한 항의 키메라 수용체를 발현하는 세포(들)를 투여하는 단계 및 상기 대상체에게 IL-7을 투여하거나 제공하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 269

제267항 또는 제268항에 있어서, 상기 방법은 암을 치료하기 위해서 사용되는, 방법.

청구항 270

제267항 또는 제268항에 있어서, 상기 방법은 자가면역 질환을 치료하기 위해서 사용되는, 방법.

청구항 271

제267항 또는 제268항에 있어서, 상기 방법은 염증성 병태를 치료하기 위해서 사용되는, 방법.

청구항 272

제267항 또는 제268항에 있어서, 상기 방법은 퇴행성 질환을 치료하기 위해서 사용되는, 방법.

청구항 273

제267항 또는 제268항에 있어서, 상기 방법은 이식을 위한 자연 또는 조작된 세포, 조직 또는 기관을 생성하기 위해서 사용되는, 방법.

청구항 274

제267항 또는 제268항에 있어서, 상기 방법은 이식 거부를 예방 또는 치료하기 위해서 사용되는, 방법.

청구항 275

제267항 또는 제268항에 있어서, 상기 방법은 감염성 질환을 치료하기 위해서 사용되는, 방법.

청구항 276

제267항 또는 제268항에 있어서, 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)을 투여 또는 제공하는 단계를 추가로 포함하되; 선택적으로, 상기 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작

용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 친화성 시약을 포함하는, 방법.

청구항 277

제267항 또는 제268항에 있어서, 상기 대상체는 적어도 하나의 추가적인 구별되는 키메라 수용체를 발현하는 세포가 투여되는, 방법.

청구항 278

제277항에 있어서, 상기 적어도 하나의 추가적인 구별되는 키메라 수용체는 과립구 세포 자극 인자 수용체(G-CSFR)의 변이체 ECD를 포함하는 키메라 수용체인, 방법.

청구항 279

제278항에 있어서, 상기 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 적어도 하나의 추가적인 구별되는 키메라 수용체를 발현하는 세포는 하나 이상의 변이체 G-CSF와 접촉되고, 선택적으로, 상기 대상체는 하나 이상의 변이체 G-CSF가 투여되는, 방법.

청구항 280

제276항 내지 제279항 중 어느 한 항에 있어서,

i) 면역 세포-함유 샘플을 단리시키는 단계; (ii) 상기 면역 세포(들)에 키메라 사이토카인 수용체(들)를 암호화하는 핵산 서열(들)을 형질도입 또는 형질주입시키는 단계; (iii) (ii)로부터의 면역 세포(들)를 상기 대상체에게 투여하는 단계; 및 (iv) 상기 면역 세포를 IL-7과 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 281

제277항에 있어서, 상기 면역 세포(들)에 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)을 암호화하는 핵산 서열(들)을 도입하는 단계를 포함하되; 선택적으로, 상기 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 다른 친화성 시약을 포함하는, 방법.

청구항 282

제281항에 있어서, 상기 적어도 하나의 사이토카인 또는 케모카인은 IL-18, IL-21, 인터페론-a, 인터페론-b, 인터페론-g, IL-17, IL-21, TNF-a, CXCL13, CCL3(MIP-1a), CCL4(MIP-1b), CCL19, NKG2D 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 283

제280항에 있어서, 상기 면역 세포(들)에 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체를 암호화하는 핵산 서열(들)을 도입하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 284

제283항에 있어서, 상기 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체는 천연 T 세포 수용체, 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), 천연 B 세포 수용체, 조작된 B 세포 수용체(BCR), 스트레스 리간드 수용체, 패턴 인식 수용체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 285

제280항에 있어서, 상기 대상체는 상기 세포를 상기 대상체에게 투여하기 전에 면역-고갈 치료를 경험한 적이 있는, 방법.

청구항 286

제280항에 있어서, 상기 면역 세포-함유 샘플은 상기 세포가 투여되는 대상체로부터 단리되는, 방법.

청구항 287

제280항에 있어서, 상기 면역 세포-함유 샘플은 상기 세포가 투여될 대상체와 구별되는 대상체로부터 단리되는, 방법.

청구항 288

제280항에 있어서, 상기 면역 세포-함유 샘플은 상기 세포가 투여될 대상체 또는 상기 세포가 투여될 대상체와 구별되는 대상체로부터 유래된 세포로부터 생성되고, 선택적으로, 상기 세포는 줄기 세포, 및 선택적으로, 만능 줄기 세포인, 방법.

청구항 289

제280항에 있어서, 상기 면역 세포는 상기 세포를 상기 대상체에게 투여하기 전에 시험관내에서 IL-7 또는 변이체 G-CSF 중 하나 또는 둘 다와 접촉되는, 방법.

청구항 290

제280항에 있어서, 상기 면역 세포는 제226항 내지 제246항 중 어느 한 항의 키메라 수용체로부터의 신호전달을 활성화시키기에 충분한 시간 동안 IL-7 또는 변이체 G-CSF 중 하나 또는 둘 다와 접촉되는, 방법.

청구항 291

제267항 내지 제290항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체에게 투여되는 세포는 천연 T 세포 수용체, 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), 천연 B 세포 수용체, 조작된 B 세포 수용체(BCR), 스트레스 리간드 수용체, 패턴 인식 수용체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체를 발현하는, 방법.

청구항 292

제267항 내지 제291항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체에게 투여되는 세포는 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체를 추가로 발현하는, 방법.

청구항 293

제292항에 있어서, 상기 G-CSFR의 변이체 ECD는 부위 II 계면 영역 내의 적어도 1개의 돌연변이, 부위 III 계면 영역 내의 적어도 1개의 돌연변이 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

청구항 294

제267항 내지 제291항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체에게 투여되는 세포는 IL-18을 추가로 발현하는, 방법.

청구항 295

키트로서,

제226항 내지 제245항 중 어느 한 항의 키메라 수용체를 암호화하는 세포로서, 선택적으로, 상기 세포는 면역 세포인, 상기 세포; 및 사용 설명서를 포함하되; 선택적으로, 상기 키트는 IL-7을 포함하고, 선택적으로, 상기 키트는 변이체 G-CSF를 포함하는, 키트.

청구항 296

키트로서,

제226항 내지 제245항 중 어느 한 항의 키메라 수용체를 암호화하는 핵산 서열(들)을 포함하는 하나 이상의 발현 벡터(들) 및 사용 설명서를 포함하되; 선택적으로, 상기 키트는 IL-7을 포함하고, 선택적으로, 상기 키트는 변이체 G-CSF를 포함하는, 키트.

청구항 297

제296항에 있어서, IL-18, IL-21, 인터페론-a, 인터페론-b, 인터페론-g, IL-17, IL-21, TNF-a, CXCL13, CCL3(MIP-1a), CCL4(MIP-1b), CCL19, NKG2D 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 사이토카인 또는 케모카인을 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함하는, 키트.

청구항 298

제296항에 있어서, 천연 T 세포 수용체, 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), 천연 B 세포 수용체, 조작된 B 세포 수용체(BCR), 스트레스 리간드 수용체, 패턴 인식 수용체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 수용체를 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함하는, 키트.

청구항 299

제298항에 있어서, 키메라 항원 수용체를 암호화하는 발현 벡터를 추가로 포함하는, 키트.

청구항 300

제295항에 있어서, 상기 세포는 IL-18, IL-21, 인터페론-a, 인터페론-b, 인터페론-g, IL-17, IL-21, TNF-a, CXCL13, CCL3(MIP-1a), CCL4(MIP-1b), CCL19, NKG2D 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 사이토카인 또는 케모카인을 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함하는, 키트.

청구항 301

제295항에 있어서, 상기 세포는 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체(들)를 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함하는, 키트.

청구항 302

제301항에 있어서, 상기 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체(들)는 천연 T 세포 수용체, 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), 천연 B 세포 수용체, 조작된 B 세포 수용체(BCR), 스트레스 리간드 수용체, 패턴 인식 수용체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 키트.

청구항 303

제302항에 있어서, 상기 세포는 적어도 하나의 CAR(들)을 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함하는, 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 교차 참조**

[0002] 본 출원은 미국 가출원 제63/171,933호(출원일: 2021년 4월 7일; 제63/171,950호(출원일: 2021년 4월 7일); 제63/171,980호(2021년 4월 7일) 및 제63/172,025호(출원일: 2021년 4월 7일)의 이익을 주장하며, 상기 기초 출원 각각은 이들의 전문이 모든 목적을 위해서 본 명세서에 참조에 의해 원용된다.

[0003] **서열 목록**

[0004] 해당 없음

배 경 기 술

[0005] **기술분야**

[0006] 특정 양상에서, 본 명세서에는 변이체 사이토카인 수용체 및 사이토카인 쌍을 사용한 세포의 선택적 활성화를 위한 방법 및 조성물이 기재되며, 사이토카인 수용체는 과립구 집락 자극 인자 수용체(G-CSFR)의 변이체 세포외 도메인(ECD)을 포함한다. 또한 본 명세서에는 입양 세포 전달에 의해서 대상체를 치료하는 방법이 개시되는데, 이 방법은 대상체에게 변이체 수용체를 발현하는 세포를 투여하는 단계 및 변이체 사이토카인을 투여하여 신호를 변이체 수용체를 발현하는 세포에 보내는 단계를 포함한다. 본 개시내용에는 핵산, 발현 벡터 및 변이체 사이토카인 및 수용체를 발현하는 세포를 생산하기 위한 키트, 및 변이체 수용체에 결합하기 위한 사이토카인을

또한 제공하는 키트가 포함된다. 특정 양상에서, 본 명세서에는 관심 세포에서의 사이토카인 신호전달의 선택적인 활성화를 위한 G-CSFR(과립구-집락 자극 인자 수용체(Granulocyte-Colony Stimulating Factor Receptor)) 세포외 도메인 및 다양한 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 포함하는 키메라 사이토카인 수용체가 기재된다. 본 개시내용은 또한 키메라 사이토카인 수용체를 발현하는 세포 및/또는 키메라 사이토카인 수용체를 암호화하는 발현 벡터 및/또는 키메라 사이토카인 수용체에 결합하는 사이토카인을 포함하는, 입양 세포 전달(ACT)에 사용하기 위한 방법, 세포 및 키트를 포함한다. 특정 양상에서, 본 명세서에는 관심 세포에서의 사이토카인 신호전달의 선택적인 활성화를 위한 G-CSFR(과립구-집락 자극 인자 수용체(Granulocyte-Colony Stimulating Factor Receptor)) 세포외 도메인 및 다양한 사이토카인 수용체의 세포내 도메인을 포함하는 키메라 사이토카인 수용체를 포함하는 제어되는 주변분비 신호전달을 위한 시스템 및 방법이 기재된다.

[0007] 또한 본 명세서에는 변이체 사이토카인 수용체 및 사이토카인 쌍을 사용한 세포의 선택적 활성화를 위한 방법 및 조성물이 기재되며, 사이토카인 수용체는 인터류킨-7 수용체 알파(IL-7Rα)의 세포외 도메인(ECD)을 포함한다.

[0008] 지난 20년 동안 입양 세포 전달(ACT)에 의한 암의 치료에 많은 진전이 있었다. 자연적으로 발생하는 종양-침윤 T 세포(TIL)를 사용한 ACT는 이제 진행성 흑색종에서 50% 초과의 객관적인 임상 반응률을 재현 가능하게 나타낸다. B-계통 백혈병을 인식하도록 조작된 T 세포(CD19-지향 키메라 항원 수용체 또는 CD19 CAR 사용)를 사용한 ACT는 최대 90%의 완전 반응률을 나타내며, 대다수의 환자는 지속적인 반응을 달성한다. 조작된 T 세포 수용체(TCR)를 발현하는 T 세포를 사용한 ACT는 다양한 고형 종양에 대한 가능성을 나타낸다. 성공적인 ACT는 또한 자연 살해(NK) 세포, 자연 살해 T 세포(NKT 세포) 및 대식세포를 포함하여 T 세포 대신 다른 효과기 세포 유형을 사용하는 것으로 보고되어 있다. 이러한 놀라운 결과에 의해서 여러 회사에서 TIL, CAR 및 조작된 TCR ACT 접근 방식을 상용화하고 있다.

[0009] ACT에 대한 T 세포 또는 다른 효과기 세포의 생착, 확장 및 지속성은 임상적 안전성 및 효능의 중요한 결정인자이다. T 세포의 경우, 이는 보통 ACT 전달 후 전신 IL-2를 투여하고 전달 전에 IL-2를 사용하여 T 세포를 신체 외부로 확장함으로써 해결된다. 의도된 면역 자극 효과 외에도, 전신 IL-2 치료는 또한 환자 안전을 위해 엄격하게 통제되어야 하는 혈관 누출 증후군과 같은 심각한 독성으로 이어질 수 있다. 이러한 위험을 관리하기 위해서, 환자는 전형적으로 2 내지 3주 동안 입원해야 하며 예방 조치로 ICU에 접근할 수 있어야 한다. 더욱이, IL-2는 효과기 및 조절(저해) T 세포 둘 다의 증식을 유도하고(5); 따라서 환자에게 IL-2를 제공하는 것은 가속 페달 및 브레이크 페달을 동시에 누르는 것과 유사하다. CAR T 세포는 T-세포 확장 및 지속성이 일부 환자에서는 안전한 수준을 초과하고 다른 환자에서는 조기에 불안정해진다는 점에서 반대의 문제를 가져온다. 더욱이, 이들은 정상 B 세포(CD19을 또한 발현함)를 보편적으로 근절하여, 환자에서 부분적인 면역 결핍을 초래한다. 이상적으로는, T 세포의 증식, 지속성 및 효력을 안전하게 향상시키고 암이 근절된 후 전달된 세포를 제거하는 능력을 포함하여 ACT 후에 종양-반응성 T 세포의 수를 정밀하게 제어하고 싶어할 것이다. 줄기 세포 요법과 같은 다른 세포 기반 요법이 또한 주입된 세포의 확장, 분화 및 지속성에 대한 향상된 제어로부터 유익을 얻을 것이다.

[0010] 인간 G-CSF(Neupogen®, Filgrastim) 및 인간 G-CSF의 페길화된 버전(Neulasta®, Pegfilgrastim)은 암 환자에서 호중구 감소증을 치료하는 데 사용되는 승인된 치료제이다. G-CSF는 4-나선 다발이며(Hill, CP *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Jun 1;90(11):5167-71), 수용체 G-CSFR와 복합체를 이루는 G-CSF의 구조는 잘 특징규명되어 있다(Tamada, T *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Feb 28;103(9):3135-40). G-CSF:G-CSFR 복합체는 2:2 이종이량체이다. G-CSF는 G-CSFR과의 2개의 결합 계면을 갖는다. 하나의 계면은 *부위 II*로 지칭되고; 이것은 G-CSF와 G-CSFR의 사이토카인 수용체 동종(CRH) 도메인 사이의 더 큰 계면이다. 제2 계면은 *부위 III*이라고 지칭되며; 이는 G-CSF와 G-CSFR의 N-말단 Ig-유사 도메인 사이의 더 작은 계면이다.

[0011] 인터류킨 7(IL-7)은 안전하고 내약성이 양호한 사이토카인의 예이지만 암 면역요법 설정에서는 제한된 효력을 갖는다. IL-7은 T 세포와 B 세포에 대한 성장 인자이며, 흉선 발달에 중요하고 미경험 T 세포와 기억 T 세포의 생존 및 항상성을 지원한다. IL-2와 달리, IL-7은 최소한의 Treg 증식을 유도하는데, 이는 IL-7Rα가 억제성 림프구 집단에서 낮은 수준으로 발현되기 때문이다. IL-7은 조혈 세포에서 생성되지 않고 간질 세포에서 분비된다. IL-7은 T 세포 수, 지속성 및 활성 증가를 목표로 암 면역요법에 사용되어 왔다(Barata JT et al. Nat Immunol. 2019 Dec;20(12):1584-1593). 이는 내약성이 양호한 것으로 나타났지만; 단독요법으로서는 무시할 수 있는 항암 효능을 나타내었다(Rosenberg et al. J Immunother. 2006 May-Jun;29(3):313-9), (Sportès C. et al., Clin Cancer Res. 2010 Jan 15;16(2):727-35) 및 (Sportès C., et al., J Exp Med. 2008Jul7;205(7):1701-14). 더욱이, 이. 콜라이에서 만들어진 재조합 IL-7은 면역원성이 높은 것으로 입증되었

지만, 이 문제는 포유동물 세포에서 IL-7을 생산함으로써 개선되었다(Conlon KC, et al., J Interferon Cytokine Res. 2019 Jan;39(1):6-21). 이러한 이유로 인해서, IL-2 및 IL-15와 같은 치료적으로 보다 강력한 사이토카인에 비해 종양학에서 IL-7의 임상적 개발은 제한적이었다. 그러나, IL-7은 천연 IL-7 수용체에 의해 달성되는 것보다 더 강력한 세포내 신호를 유도하는 키메라 수용체에 대한 리간드로 사용하기에 매력적이다.

[0012] 사이토카인의 전신 전달과 연관된 독성 문제를 완화하기 위해서, 몇몇 그룹은 자가분비/주변분비 방식으로 사이토카인을 생산 및 분비하도록 T 세포 또는 NK 세포를 조작하였다. 목표는 조작된 T/NK 세포가 자체 소비 및 이웃 세포의 소비에 충분한 사이토카인을 생산하지만 전신 독성을 유발할 만큼 충분하지 않도록 하는 것이다. 예를 들어, 이러한 전략은 사이토카인, 예컨대, IL-2, IL-15, IL-12 및 IL-18을 사용하는 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포 및 CAR NK 세포 요법을 개선하기 위해 적용되었다. 일반적인 접근법은 레트로바이러스 또는 렌티바이러스를 사용하여 T 세포 또는 NK 세포 집단에 CAR 유전자와 사이토카인 유전자를 안정적으로 도입하는 것이다. 이는 2개의 바이러스 벡터의 공동 형질도입 또는 2개의 트랜스진을 운반하는 이시스트론성 바이러스 벡터를 사용하는 것과 같은 다양한 접근법을 통해 달성할 수 있다. CAR 및 사이토카인 트랜스진을 공발현하는 T 세포 및 NK 세포는 일반적으로 "armored CAR" 또는 "TRUCKS"로 지칭된다.

[0013] Armored CAR은 뮤린 종양 모델에서 평가되었으며, 인간 임상 시험에서는 그 정도가 더 적다. 몇몇 연구에서, armored CAR T/NK 세포는 표준 CAR T/NK 세포(즉, CAR은 있지만 사이토카인 트랜스진이 없는 세포)에 비해 안전하고 효과적인 것으로 입증되었다. 그러나, 일부 마우스 연구(Ataca Atilla P., et al., J Immunother Cancer. 2020 Sep;8(2):e001229) 및 임상 시험(Zhang L., et al., Clin Cancer Res. 2015 May 15;21(10):2278-88)에서 독성이 관찰되었다. 더욱이, T/NK 세포(또는 임의의 세포 유형)에 자가분비 성장 인자를 생산하는 능력을 부여하는 개념에 대한 이론적 우려가 항상 존재할 것이고; 이는 통제되지 않는 T/NK 세포 성장으로 이어져 2차 림프증식성 질환 또는 악성 종양이 발생할 가능성이 있다. 일부 연구자들은 독성, 통제되지 않는 성장 또는 다른 문제가 발생할 경우 약물에 대한 반응으로 T/NK 세포를 사멸시키는 데 사용될 수 있는 "자살 유전자"를 공발현하여 이러한 위험을 완화하려고 시도한다. 그러나 정의에 따른 자살 유전자의 배치는 세포 요법을 종료하고 잠재적으로 환자에게 잔류 종양 부담을 남긴다. 따라서, 치료 관련 사이토카인 신호가 안전하고 통제되는 방식으로 면역 세포에 전달될 수 있도록 하는 armored CAR 접근법과 연관된 독성 및 안전 위험을 줄이기 위한 새로운 조성물 및 방법이 필요하다.

발명의 내용

[0014] 본 명세서에는 변이체 과립구 집락 자극 인자(G-CSF)가 기재되며, 변이체 G-CSF는 부위 II 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이, 부위 III 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이 또는 이들의 조합을 포함하고; 부위 II 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이는 L108R, D112R, E122R E122K, E123K 및 E123R 및 이들의 조합으로 이루어진 돌연변이의 군으로부터 선택되고; 부위 II 계면 영역 돌연변이는 서열번호 1에 제시된 서열의 상응하는 아미노산 위치에 상대적이고; 부위 III 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이는 서열번호 1에 제시된 서열의 상응하는 아미노산 위치에 비해서 돌연변이 E46R을 포함하고; 변이체 G-CSF는 과립구 집락 자극 인자 수용체(G-CSFR)의 변이체 세포외 도메인(ECD)을 포함하는 수용체에 선택적으로 결합한다.

[0015] 특정 양상에서, 본 명세서에는 세포 표면 상에서 발현되는 수용체의 선택적 활성화를 위한 시스템이 기재되며, 이 시스템은 (a) 서열번호 83 또는 84에 상응하는 변이체 G-CSF; 및 (b) G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체를 포함하며; 변이체 G-CSF는 다른 것은 동일한 야생형 G-CSFR ECD와 비교할 때 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체에 우선적으로 결합하고, G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체는 다른 것은 동일한 야생형 G-CSF와 비교할 때 변이체 G-CSF에 우선적으로 결합하고; 변이체 G-CSFR은 G2R-3 또는 G12/2R-1을 포함한다.

[0016] 일부 실시형태에서, 변이체 G-CSF는 세포에 의해서 발현되는 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체에 결합한다. 일부 실시형태에서, G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체를 발현하는 세포는 면역 세포이다. 일부 실시형태에서, G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체를 발현하는 면역 세포는 T 세포 및 선택적으로, NK 세포 및 선택적으로, NKT 세포 및 선택적으로, B 세포 및 선택적으로, 형질 세포 및 선택적으로, 대식세포 및 선택적으로, 수지상 세포 및 선택적으로, 세포는 줄기세포이고, 선택적으로, 세포는 1차 세포이고, 선택적으로, 세포는 인간 세포이다. 일부 실시형태에서, T-세포는 $CD8^+$ T 세포, 세포독성 $CD8^+$ T 세포, 미경험 $CD8^+$ T 세포, 미경험 $CD4^+$ T 세포, 헬퍼 T 세포, 조절성 T 세포, 기억 T 세포 및 γδT 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0017] 일부 실시형태에서, G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체에 대한 변이체 G-CSF의 선택적 결합은 수용체를 발현하는 세포의 증식, 생존력, 지속성, 세포독성, 사이토카인 분비, 기억 및 향상된 활성 중 적어도 하나를 포함

하는 세포 반응을 초래한다. 일부 실시형태에서, G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체는 부위 II 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이, 부위 III 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체는 R141E 또는 R167D 돌연변이 중 하나 또는 둘 다를 포함하는 G-CSFR ECD의 부위 II 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이를 포함하고; G-CSFR ECD의 부위 III 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이는 R41E 돌연변이를 포함하고; 변이체 G-CSFR 돌연변이는 서열번호 2에 제시된 서열의 아미노산 위치에 상응한다. 일부 실시형태에서, G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체는 키메라 수용체이다.

[0018] 특정 양상에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 변이체 G-CSF를 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열(들)을 기재한다. 특정 양상에서, 본 개시내용은 핵산 서열을 포함하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 기재한다. 특정 양상에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 변이체 G-CSF를 발현하도록 조작된 세포를 기재한다. 일부 실시형태에서, 세포는 면역 세포이다. 일부 실시형태에서, 면역 세포는 T 세포 및 선택적으로, NK 세포 및 선택적으로, NKT 세포 및 선택적으로, B 세포 및 선택적으로, 형질 세포 및 선택적으로, 대식세포 및 선택적으로, 수지상 세포 및 선택적으로, 세포는 줄기세포이고, 선택적으로, 세포는 1차 세포이고, 선택적으로, 세포는 인간 세포이다. 일부 실시형태에서, T 세포는 $CD8^+$ T 세포, 세포독성 $CD8^+$ T 세포, 미경험 $CD8^+$ T 세포, 미경험 $CD4^+$ T 세포, 헬퍼 T 세포, 조절성 T 세포, 기억 T 세포 및 γδT 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0019] 특정 양상에서, 본 명세서에는 세포 표면 상에서 발현되는 수용체의 선택적 활성화를 위한 시스템이 기재되며, 이 시스템은 (a) 제1항 내지 [0014] 중 어느 한 항의 변이체 G-CSF; 및 (b) G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체를 포함하며; 변이체 G-CSF는 다른 것은 동일한 야생형 G-CSFR ECD와 비교할 때 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체에 우선적으로 결합하고, G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체는 다른 것은 동일한 야생형 G-CSF와 비교할 때 변이체 G-CSF에 우선적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 변이체 G-CSF는 표 4A의 G-CSF 변이체 번호의 부위 II 및 부위 III 계면의 돌연변이의 조합을 포함하되; 상기 변이체 G-CSF 돌연변이는 서열번호 1에 제시된 서열의 아미노산 위치에 상응한다.

[0020] 일부 실시형태에서, 변이체 G-CSF는 서열번호 1에 제시된 서열의 상응하는 아미노산 위치에 비해서 돌연변이 E46R, L108K, D112R, E122R 및 E123R을 포함하되; G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체는 서열번호 2에 제시된 서열의 상응하는 아미노산 위치에 비해서 돌연변이 R41E, R141E 및 R167D를 포함한다. 일부 실시형태에서, 변이체 G-CSF는 서열번호 1에 제시된 서열의 상응하는 아미노산 위치에 비해서 돌연변이 E46R, L108K, D112R 및 E122K를 포함하되; G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체는 서열번호 2에 제시된 서열의 상응하는 아미노산 위치에 비해서 돌연변이 R41E, R141E 및 R167D를 포함한다. 일부 실시형태에서, 변이체 G-CSF는 서열번호 1에 제시된 서열의 상응하는 아미노산 위치에 비해서 돌연변이 E46R, L108K, D112R 및 E123K를 포함하되; G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체는 서열번호 2에 제시된 서열의 상응하는 아미노산 위치에 비해서 돌연변이 R41E, R141E 및 R167D를 포함한다. 일부 실시형태에서, 변이체 G-CSF는 서열번호 1에 제시된 서열의 상응하는 아미노산 위치에 비해서 돌연변이 E46R, L108K, D112R 및 E122R을 포함하되; G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체는 서열번호 2에 제시된 서열의 상응하는 아미노산 위치에 비해서 돌연변이 R41E, R141E 및 R167D를 포함한다. 일부 실시형태에서, 변이체 G-CSF는 서열번호 1에 제시된 서열의 상응하는 아미노산 위치에 비해서 돌연변이 E46R, L108K, D112R 및 E123R을 포함하되; G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체는 서열번호 2에 제시된 서열의 상응하는 아미노산 위치에 비해서 돌연변이 R41E, R141E 및 R167D를 포함한다. 일부 실시형태에서, 변이체 G-CSF는 서열번호 1에 제시된 서열의 상응하는 아미노산 위치에 비해서 돌연변이 E46R, L108K, D112R, E122K 및 E123K를 포함하되; G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체는 서열번호 2에 제시된 서열의 상응하는 아미노산 위치에 비해서 돌연변이 R41E, R141E 및 R167D를 포함한다.

[0021] 일부 실시형태에서, 시스템은 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)을 추가로 포함하고; 선택적으로, 상기 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 친화성 시약을 포함한다. 일부 실시형태에서, 시스템은 항원 결합 신호전달 수용체를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 신호전달 수용체는 천연 T 세포 수용체, 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), 천연 B 세포 수용체, 조작된 B 세포 수용체(BCR), 스트레스 리간드 수용체 및 패턴 인식 수용체로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 수용체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 신호전달 수용체는 CAR이다. 일부 실시형태에서, 사이토카인 또는 케모카인은 IL-18, IL-21, 인터페론-α, 인터페론-β, 인터페론-γ, IL-17, IL-21, TNF-α, CXCL13, CCL3(MIP-1α), CCL4(MIP-1β), CD40 리간드, B 세포 활성화 인자(BAFF), Flt3 리간드,

CCL21, CCL5, XCL1, CCL19 및 수용체 NKG2D로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 사이토카인은 IL-18이다. 일부 실시형태에서, 사이토카인은 인간이다.

[0022] 특정 양상에서, 본 명세서에는 세포의 표면 상에서 발현된 수용체의 선택적 활성화 방법이 기재되며, 이 방법은 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체를 본 명세서에 기재된 변이체 G-CSF와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체는 면역 세포 상에서 발현되고, 선택적으로, 면역 세포는,

[0023] T 세포 및 선택적으로, NK 세포 및 선택적으로, NKT 세포 및 선택적으로, B 세포 및 선택적으로, 형질 세포 및 선택적으로, 대식세포 및 선택적으로, 수지상 세포 및 선택적으로, 세포는 줄기세포이고, 선택적으로, 세포는 1차 세포이고, 선택적으로, 세포는 인간 세포이다. 일부 실시형태에서, T 세포는 $CD8^+$ T 세포, 세포독성 $CD8^+$ T 세포, 미경험 $CD8^+$ T 세포, 미경험 $CD4^+$ T 세포, 헬퍼 T 세포, 조절성 T 세포, 기억 T 세포 및 γδT 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 면역 세포의 선택적 활성화는 상기 수용체를 발현하는 세포의 증식, 생존력, 지속성, 세포독성, 사이토카인 분비, 기억, 및 향상된 활성 중 적어도 하나를 포함하는 세포 반응을 초래한다.

[0024] 특정 양상에서, 본 개시내용은 면역 반응의 증가를 필요로 하는 대상체에서 면역 반응을 증가시키는 방법을 기재하며, 이 방법은 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체를 발현하는 세포(들)를 투여하는 단계 및 본 명세서에 기재된 변이체 G-CSF를 투여 또는 제공하는 단계를 포함한다. 특정 양상에서, 본 개시내용은 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 질환을 치료하는 방법을 기재하며, 이 방법은 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체를 발현하는 세포(들)를 투여하는 단계 및 대상체에게 본 명세서에 기재된 변이체 G-CSF를 투여 또는 제공하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 암을 치료하는 데 사용된다. 일부 실시형태에서, 방법은 염증성 병태를 치료하기 위해서 사용된다. 일부 실시형태에서, 방법은 자가면역 질환을 치료하기 위해서 사용된다. 일부 실시형태에서, 방법은 퇴행성 질환을 치료하기 위해서 사용된다. 일부 실시형태에서, 방법은 이식을 위한 자연 또는 조작된 세포, 조직 또는 기관을 생성하기 위해서 사용된다. 일부 실시형태에서, 방법은 이식 거부를 예방 또는 치료하기 위해서 사용된다. 일부 실시형태에서, 방법은 감염 질환을 치료하기 위해서 사용된다. 일부 실시형태에서, 방법은 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)을 투여 또는 제공하는 단계를 추가로 포함하고; 선택적으로, 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 친화성 시약을 포함한다.

[0025] 일부 실시형태에서, 대상체는 각각 (i) G-CSFR ECD를 포함하는 구별되는 키메라 수용체 및 (ii) G-CSF의 적어도 하나의 구별되는 변이체 형태 중 하나 또는 둘 다를 발현하는 2개 이상의 세포 집단이 투여되고, 세포의 적어도 하나의 집단(들)은 적어도 하나의 구별되는 항원 결합 신호전달 수용체(들)를 추가로 발현하고; 선택적으로, 적어도 하나의 구별되는 항원 결합 신호전달 수용체(들)는 적어도 하나의 CAR(들)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 면역 세포의 제1 및 제2 집단(들) 중 하나 또는 둘 다는 (a) 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)로서; 선택적으로, 적어도 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 다른 친화성 시약(들)을 포함하는, 상기 신호전달 단백질(들); 및(b) 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체 중 하나 또는 둘 다를 추가로 발현한다. 일부 실시형태에서, 방법은 면역 세포의 하나 이상의 추가적인 집단을 추가로 포함하고; 면역 세포의 각각의 추가적인 집단은 (i) G-CSFR의 구별되는 변이체 ECD를 포함하는 구별되는 수용체, (ii) 구별되는 변이체 G-CSF, (iii) 구별되는 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질 및 (iv) 구별되는 항원 결합 신호전달 수용체 중 적어도 하나를 발현한다.

[0026] 방법의 일부 실시형태에서, G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체를 발현하는 세포는 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체(들)를 추가로 발현한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 신호전달 수용체(들)는 천연 T 세포 수용체, 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), 천연 B 세포 수용체, 조작된 B 세포 수용체(BCR), 스트레스 리간드 수용체, 패턴 인식 수용체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 수용체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 신호전달 수용체(들)는 하나 이상의 CAR(들)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 사이토카인 또는 케모카인은 IL-18, IL-21, 인터페론-α, 인터페론-β, 인터페론-γ, IL-17, IL-21, TNF-α, CXCL13, CCL3(MIP-1α), CCL4(MIP-1β), CD40 리간드, B 세포 활성화 인자(BAFF), Flt3 리간드, CCL21, CCL5, XCL1, CCL19 및 수용체 NKG2D 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부

실시형태에서, 사이토카인은 IL-18이다. 일부 실시형태에서, 사이토카인은 인간이다.

[0027] 특정 양상에서, 본 명세서에는 치료를 필요로 하는 대상체에서 대상체를 치료하는 방법이 기재되며, 이 방법은 i) 면역 세포-함유 샘플을 단리시키는 단계; (ii) 면역 세포(들)에 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 적어도 하나의 수용체(들)를 암호화하는 핵산 서열(들)을 형질도입 또는 형질주입시키는 단계; (iii) (ii)로부터의 상기 면역 세포(들)를 대상체에게 투여하는 단계; 및 (iv) 면역 세포(들)를 수용체(들)에 선택적으로 결합하는 본 명세서에 기재된 하나 이상의 변이체 G-CSF와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 대상체는 세포를 대상체에게 투여하기 전에 면역-고갈 치료를 경험한 적이 있다. 일부 실시형태에서, 면역 세포-함유 샘플은 세포가 투여될 대상체로부터 단리된다. 일부 실시형태에서, 면역 세포-함유 샘플은 세포가 투여될 대상체 또는 세포가 투여될 대상체와 구별되는 대상체로부터 유래된 세포로부터 생성되고, 선택적으로, 세포는 줄기 세포, 및 선택적으로, 만능 줄기 세포이다. 일부 실시형태에서, 면역 세포(들)는 세포를 대상체에게 투여하기 전에 시험관내에서 적어도 하나의 변이체 G-CSF와 접촉된다. 일부 실시형태에서, 면역 세포(들)는 수용체(들)로부터의 신호전달을 활성화시키기에 충분한 시간 동안 수용체(들)에 결합하는 적어도 하나의 변이체 G-CSF와 접촉된다.

[0028] 특정 양상에서, 본 명세서에는 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 적어도 하나의 수용체(들)를 암호화하는 세포 및 사용 설명서를 포함하는 키트가 기재되며; 키트는 제1항 내지 [0014] 중 어느 하나의 적어도 하나의 변이체 G-CSF를 포함하고; 선택적으로, 세포는 면역 세포이다. 특정 양상에서, 본 명세서에는 (a) G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 하나 이상의 수용체(들)를 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열(들); (b) 본 명세서에 기재된 적어도 하나의 변이체 G-CSF, 본 명세서에 기재된 핵산 서열(들) 또는 본 명세서에 기재된 하나 이상의 발현 벡터(들); 및 (c) 사용 설명서를 포함하는 키트가 기재된다. 일부 실시형태에서, 키트는 IL-18, IL-21, 인터페론-α, 인터페론-β, 인터페론-γ, IL-17, IL-21, TNF-α, CXCL13, CCL3(MIP-1α), CCL4(MIP-1β), CD40 리간드, B 세포 활성화 인자(BAFF), Flt3 리간드, CCL21, CCL5, XCL1 및 CCL19 및 수용체 NKG2D 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 사이토카인(들) 또는 케모카인(들)을 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 적어도 하나의 항원 결합 수용체(들)를 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 결합 수용체(들)는 천연 T 세포 수용체, 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), 천연 B 세포 수용체, 조작된 B 세포 수용체(BCR), 스트레스 리간드 수용체, 패턴 인식 수용체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 키트는 키메라 항원 수용체를 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포는 IL-18, IL-21, 인터페론-α, 인터페론-β, 인터페론-γ, IL-17, IL-21, TNF-α, CXCL13, CCL3(MIP-1α), CCL4(MIP-1β), CD40 리간드, B 세포 활성화 인자(BAFF), Flt3 리간드, CCL21, CCL5, XCL1 및 CCL19 및 수용체 NKG2D 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 사이토카인(들) 또는 케모카인(들)을 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포는 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체(들)를 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체(들)는 천연 T 세포 수용체, 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), 천연 B 세포 수용체, 조작된 B 세포 수용체(BCR), 스트레스 리간드 수용체, 패턴 인식 수용체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 세포는 적어도 하나의 CAR(들)을 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함하고, 선택적으로, CAR은 메소텔린 CAR이다.

[0029] 특정 양상에서, 본 명세서에는 키메라 수용체가 기재되며, 키메라 수용체는 (a) 적어도 하나의 제2 도메인에 작동 가능하게 연결된 세포외 도메인(ECD)로서; 제2 도메인은 (b) 사이토카인 수용체의 세포내 도메인으로부터의 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위를 포함하는 세포내 도메인(ICD)을 포함하고; 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위는 인터류킨(IL)-2Rβ의 SHC 결합 부위; IL-2Rβ의 STAT5 결합 부위, IL-4Rα의 IRS-1 또는 IRS-2 결합 부위, IL-4Rα의 STAT6 결합 부위, gp130의 SHP-2 결합 부위, gp130의 STAT3 결합 부위, EPOR의 SHP-1 또는 SHP-2 결합 부위, 에리트로포이에틴 수용체(EPOR)의 STAT5 결합 부위, 인터페론 알파 및 베타 수용체 소단위 2(IFNAR2)의 STAT1 또는 STAT2 결합 부위 및 인터페론 감마 수용체 1(IFNγR1)의 STAT1 결합 부위 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고; ICD는 G-CSFR, gp130, EPOR 및 인터페론 감마 수용체 2(IFNγR2) 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 단백질의 적어도 하나의 Box 1 영역 및 적어도 하나의 Box 2 영역을 추가로 포함하는, 세포외 도메인; 및 (c) 막관통 도메인(TMD)을 포함하는 적어도 하나의 제3 도메인을 포함하되; ECD는 TMD에 대해 N-말단이고, TMD는 ICD에 대해 N-말단이다.

[0030] 특정 양상에서, 본 명세서에는 키메라 수용체가 기재되며, 키메라 수용체는 제2 도메인에 작동 가능하게 연결된 ECD를 포함하되; 제2 도메인은 ICD를 포함하고, ICD는,

[0031] (i)

[0032] (a) G-CSFR의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0033] (b) IL-4Rα의 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위; 또는

[0034] (ii)

[0035] (a) gp130의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0036] (b) gp130의 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위; 또는

[0037] (iii)

[0038] (a) 에리트로포이에틴 수용체(EPOR)의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0039] (b) EPOR의 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위; 또는

[0040] (iv)

[0041] (a) G-CSFR의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0042] (b) 인터페론 알파 및 베타 수용체 소단위 2(IFNAR2)의 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위; 또는

[0043] (v)

[0044] (a) 인터페론 감마 수용체 2(IFNγR2)의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0045] (b) 인터페론 감마 수용체 1(IFN γR1)의 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위를 포함하되; ECD는 TMD에 대해 N-말단이고, TMD는 ICD에 대해 N-말단이다.

[0046] 특정 실시형태에서, 키메라 수용체의 ECD는 G-CSFR (과립구 집락 자극 인자 수용체)의 ECD이다. 특정 실시형태에서, 키메라 수용체의 TMD는 G-CSFR의 TMD이고, 선택적으로, TMD는 야생형 TMD이다. 특정 실시형태에서, 키메라 수용체의 활성화된 형태는 동종이량체를 형성하고, 선택적으로, 키메라 수용체의 활성화는 수용체를 발현하는 세포의 증식, 생존력, 지속성, 세포독성, 사이토카인 분비, 기억 및 향상된 활성 중 적어도 하나를 포함하는 세포 반응을 초래하고, 선택적으로, 키메라 수용체는 G-CSF와의 접촉 시 활성화되고, 선택적으로, G-CSF는 야생형 G-CSF이고, 선택적으로, G-CSFR의 세포외 도메인은 야생형 세포외 도메인이다.

[0047] 특정 실시형태에서, 키메라 수용체는 세포 및 선택적으로, 면역 세포에서 발현되고, 선택적으로, 면역 세포는 T 세포 및 선택적으로, NK 세포 및 선택적으로, NKT 세포 및 선택적으로, B 세포 및 선택적으로, 형질 세포 및 선택적으로, 대식세포 및 선택적으로, 수지상 세포에서 발현되고, 선택적으로 세포는 줄기세포이고, 선택적으로, 세포는 1차 세포이고, 선택적으로, 세포는 인간 세포이다. 특정 실시형태에서, T 세포는 $CD8^+$ T 세포, 세포독성 $CD8^+$ T 세포, 미경험 $CD4^+$ T 세포, 미경험 $CD8^+$ T 세포, 헬퍼 T 세포, 조절성 T 세포, 기억 T 세포 및 γδT 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0048] 특정 실시형태에서, ICD는 하기를 포함한다:

[0049] (a) 서열번호 90 또는 91 중 하나 또는 둘 다의 아미노산 서열; 또는

[0050] (b) 서열번호 90 또는 92 중 하나 또는 둘 다의 아미노산 서열; 또는

[0051] (c) 서열번호 93의 아미노산 서열; 또는

[0052] (d) 서열번호 94의 아미노산 서열; 또는

[0053] (e) 서열번호 95 또는 96 중 하나 또는 둘 다의 아미노산 서열; 또는

[0054] (f) 서열번호 97 또는 98의 아미노산 서열; 또는

[0055] (g) 서열번호 99 또는 100의 아미노산 서열.

[0056] 특정 실시형태에서, 막관통 도메인은 서열번호 88에 제시된 서열을 포함한다.

[0057] 특정 양상에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 키메라 수용체를 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열(들)을

기재한다. 특정 실시형태에서, G-CSFR의 ECD의 핵산 서열(들)은 서열번호 85, 86 또는 87 중 어느 하나에 제시된 핵산 서열(들)에 의해서 암호화된다. 특정 실시형태에서, 본 개시내용은 핵산 서열(들)을 포함하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 기재한다. 특정 실시형태에서, 발현 벡터(들)는 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데나바이러스 벡터 및 플라스미드로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0058] 특정 양상에서, 본 개시내용은 키메라 수용체를 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열(들)을 기재하며; 키메라 수용체는 제2 도메인에 작동 가능하게 연결된 ECD를 포함하고; 제2 도메인은,

[0059] (i)

[0060] (a) G-CSFR의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0061] (b) IL-4Rα의 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위; 또는

[0062] (ii)

[0063] (a) gp130의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0064] (b) gp130의 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위; 또는

[0065] (iii)

[0066] (a) 에리트로포이에틴 수용체(EPOR)의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0067] (b) EPOR의 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위; 또는

[0068] (iv)

[0069] (a) G-CSFR의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0070] (b) 인터페론 알파 및 베타 수용체 소단위 2(IFNAR2)의 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위; 또는

[0071] (v)

[0072] (a) 인터페론 감마 수용체 2(IFNγR2)의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0073] (b) 인터페론 감마 수용체 1(IFN γR1)의 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위를 포함한다.

[0074] 본 명세서에 기재된 핵산(들)의 특정 실시형태에서, ECD는 G-CSFR(과립구 집락 자극 인자 수용체)의 ECD이다. 본 명세서에 기재된 핵산(들)의 특정 실시형태에서, TMD는 G-CSFR의 TMD이고, 선택적으로, TMD는 야생형 TMD이다. 본 명세서에 기재된 핵산(들)의 특정 실시형태에서, G-CSFR의 ECD는 서열번호 85, 86 또는 87 중 임의의 하나에 제시된 핵산 서열에 의해서 암호화된다. 특정 실시형태에서, 핵산 서열(들)은 (a) 서열번호 90 또는 91 중 하나 또는 둘 다의 아미노산 서열을 포함하는 ICD를 암호화하는 서열; 또는 (b) 서열번호 90 또는 92 중 하나 또는 둘 다의 아미노산 서열을 포함하는 ICD를 암호화하는 서열; 또는 (c) 서열번호 93의 아미노산 서열을 포함하는 ICD를 암호화하는 서열; 또는 (d) 서열번호 94의 아미노산 서열을 포함하는 ICD를 암호화하는 서열; 또는 (e) 서열번호 95 또는 96 중 하나 또는 둘 다의 아미노산 서열을 포함하는 ICD를 암호화하는 서열; 또는 (f) 서열번호 97 또는 98의 아미노산 서열을 포함하는 ICD를 암호화하는 서열; 또는 (g) 서열번호 99 또는 100의 아미노산 서열을 포함하는 ICD를 암호화하는 서열을 포함한다.

[0075] 특정 실시형태에서, 하나 이상의 발현 벡터(들)는 본 명세서에 기재된 핵산 서열(들)을 포함한다. 특정 실시형태에서, 발현 벡터(들)는 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데나바이러스 벡터 및 플라스미드로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0076] 특정 양상에서, 본 명세서에는 본 명세서에 기재된 키메라 수용체를 암호화하는 핵산 서열(들)을 포함하는 세포가 기재된다. 특정 실시형태에서, 세포는 면역 세포이고 및 선택적으로, 면역 세포는 T 세포 및 선택적으로, NK 세포 및 선택적으로, NKT 세포 및 선택적으로, B 세포 및 선택적으로, 형질 세포 및 선택적으로, 대식세포 및 선택적으로, 수지상 세포에서 발현되고, 선택적으로 세포는 줄기세포이고, 선택적으로, 세포는 1차 세포이고, 선택적으로, 세포는 인간 세포이다. 특정 실시형태에서, T 세포는 $CD8^+$ T 세포, 세포독성 $CD8^+$ T 세포, 미경험 $CD4^+$ T 세포, 미경험 $CD8^+$ T 세포, 헬퍼 T 세포, 조절성 T 세포, 기억 T 세포 및 γδT 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 세포는 본 명세서에 기재된 핵산 서열(들)을 포함한다. 특정 실시형태에

서, 세포는 본 명세서에 기재된 발현 벡터(들)를 포함한다.

[0077] 특정 양상에서, 본 명세서에는 세포의 표면 상에서 발현되는 키메라 수용체의 선택적 활성화 방법이 기재되며, 이 방법은 키메라 수용체를 키메라 수용체에 선택적으로 결합하는 사이토카인과 접촉시키는 단계를 포함한다. 특정 실시형태에서, 키메라 수용체의 활성화된 형태는 동종이량체를 형성하고, 선택적으로, 키메라 수용체의 활성화는 수용체를 발현하는 세포의 증식, 생존력, 지속성, 세포독성, 사이토카인 분비, 기억 및 향상된 활성 중 적어도 하나를 포함하는 세포 반응을 초래하고, 선택적으로, 키메라 수용체는 사이토카인과의 접촉 시 활성화된다.

[0078] 특정 실시형태에서, 키메라 수용체에 선택적으로 결합하는 사이토카인은 G-CSF이고, 선택적으로, 키메라 수용체는 G-CSF와의 접촉 시 활성화되고, 선택적으로, G-CSF는 야생형 G-CSF이고, 선택적으로, G-CSFR의 세포외 도메인은 야생형 세포외 도메인이다. 특정 실시형태에서, 키메라 수용체는 세포 및 선택적으로, 면역 세포에서 발현되고, 선택적으로, 면역 세포는 T 세포 및 선택적으로, NK 세포 및 선택적으로, NKT 세포 및 선택적으로, B 세포 및 선택적으로, 형질 세포 및 선택적으로, 대식세포 및 선택적으로, 수지상 세포에서 발현되고, 선택적으로 세포는 줄기세포이고, 선택적으로, 세포는 1차 세포이고, 선택적으로, 세포는 인간 세포이다.

[0079] 일부 실시형태에서, 면역 세포의 제1 집단은 키메라 수용체를 발현하고, 면역 세포의 제2 집단은 키메라 수용체에 결합하는 사이토카인을 발현하고; 선택적으로, 면역 세포의 제1 및 제2 집단(들) 중 하나 또는 둘 다는 적어도 하나의 구별되는 항원 결합 신호전달 수용체(들)를 추가로 발현하고; 선택적으로, 적어도 하나의 구별되는 항원 결합 신호전달 수용체(들)는 적어도 하나의 CAR을 포함한다. 일부 실시형태에서, 면역 세포의 제1 및 제2 집단(들) 중 하나 또는 둘 다는 (a) 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)로서; 선택적으로, 적어도 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 다른 친화성 시약(들)을 포함하는, 상기 신호전달 단백질(들); 및 (b) 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체 중 하나 또는 둘 다를 추가로 발현한다. 일부 실시형태에서, 면역 세포의 제1 및 제2 집단 각각은 G-CSFR의 구별되는 변이체 ECD 및 구별되는 변이체 G-CSF를 포함하는 구별되는 키메라 수용체를 발현한다. 일부 실시형태에서, 방법은 면역 세포의 하나 이상의 추가적인 집단을 추가로 포함하고; 면역 세포의 각각의 추가적인 집단은 (i) G-CSFR의 구별되는 변이체 ECD를 포함하는 구별되는 수용체, (ii) 구별되는 변이체 G-CSF, (iii) 구별되는 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질 및 (iv) 구별되는 항원 결합 신호전달 수용체 중 적어도 하나를 발현한다.

[0080] 특정 양상에서, 본 명세서에는 세포에서 키메라 수용체를 생산하는 방법이 기재되며, 이 방법은 세포에 본 명세서에 기재된 하나 이상의 핵산 서열(들) 또는 본 명세서에 기재된 하나 이상의 발현 벡터(들)를 도입하는 단계를 포함하며; 선택적으로, 이 방법은 유전자 편집을 포함하고, 선택적으로, 세포는 면역 세포이고 및 선택적으로, 면역 세포는 T 세포 및 선택적으로, NK 세포 및 선택적으로, NKT 세포 및 선택적으로, B 세포 및 선택적으로, 형질 세포 및 선택적으로, 대식세포 및 선택적으로, 수지상 세포에서 발현되고, 선택적으로 세포는 줄기세포이고, 선택적으로, 세포는 1차 세포이고, 선택적으로, 세포는 인간 세포이다.

[0081] 특정 양상에서, 본 명세서에는 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법이 기재되며, 이 방법은 대상체에게 본 명세서에 기재된 키메라 수용체를 발현하는 세포를 투여하는 단계 및 대상체에게 키메라 수용체에 특이적으로 결합하는 사이토카인을 제공하는 단계를 포함한다. 특정 실시형태에서, 키메라 수용체의 활성화된 형태는 동종이량체를 형성하고, 선택적으로, 키메라 수용체의 활성화는 수용체를 발현하는 세포의 증식, 생존력, 지속성, 세포독성, 사이토카인 분비, 기억 및 향상된 활성 중 적어도 하나를 포함하는 세포 반응을 초래하고, 선택적으로, 키메라 수용체는 사이토카인과의 접촉 시 활성화된다. 특정 실시형태에서, 사이토카인은 G-CSF이고; 선택적으로, G-CSF는 야생형 G-CSF이고, 선택적으로, G-CSFR의 세포외 도메인은 야생형 세포외 도메인이다.

[0082] 본 명세서에 기재된 방법의 특정 실시형태에서, 키메라 수용체는 세포 및 선택적으로, 면역 세포에서 발현되고, 선택적으로, 면역 세포는 T 세포 및 선택적으로, NK 세포 및 선택적으로, NKT 세포 및 선택적으로, B 세포 및 선택적으로, 형질 세포 및 선택적으로, 대식세포 및 선택적으로, 수지상 세포에서 발현되고, 선택적으로 세포는 줄기세포이고, 선택적으로, 세포는 1차 세포이고, 선택적으로, 세포는 인간 세포이다.

[0083] 특정 실시형태에서, 방법은 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)을 투여 또는 제공하는 단계를 추가로 포함하고; 선택적으로, 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 친화성 시약(들)을 포함한다. 특정 실시형태에서, 대상체는 각각 G-CSFR ECD를 포함하는 구별되는 키메라 수용체를 발현하고 각각 G-CSF의 구별되는 변이체 형태를 발현하는 2개 이상의 세포 집단이 투여된다. 특정 실시형

태에서, 키메라 수용체를 발현하는 세포는 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체를 추가로 발현한다. 특정 실시형태에서, 항원 결합 신호전달 수용체는 천연 T 세포 수용체, 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), 천연 B 세포 수용체, 조작된 B 세포 수용체(BCR), 스트레스 리간드 수용체, 패턴 인식 수용체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 수용체(들)를 포함한다. 특정 실시형태에서, 항원 결합 신호전달 수용체는 CAR이다. 특정 실시형태에서, 적어도 하나의 사이토카인(들) 또는 케모카인(들)은 IL-18, IL-21, 인터페론-α, 인터페론-β, 인터페론-γ, IL-17, IL-21, TNF-α, CXCL13, CCL3(MIP-1α), CCL4(MIP-1β), CD40 리간드, B 세포 활성화 인자(BAFF), Flt3 리간드, CCL21, CCL5, XCL1 또는 CCL19 또는 수용체 NKG2D 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 사이토카인은 IL-18이다. 특정 실시형태에서, 사이토카인은 인간이다.

[0084] 특정 실시형태에서, 방법은 암, 예를 들어, 비제한적으로 담관암, 방광암, 유방암, 자궁경부암, 난소암, 결장암, 자궁내막암, 혈액 악성종양, 신장암(신세포), 백혈병, 림프종, 폐암, 흑색종, 비호지킨 림프종, 췌장암, 전립선암, 육종 및 갑상선암을 치료하기 위해서 사용된다. 특정 실시형태에서, 방법은 자가면역 질환을 치료하기 위해서 사용된다. 특정 실시형태에서, 방법은 염증성 병태를 치료하기 위해서 사용된다. 특정 실시형태에서, 방법은 퇴행성 질환을 치료하기 위해서 사용된다. 특정 실시형태에서, 방법은 이식을 위한 자연 또는 조작된 세포, 조직 또는 기관을 생성하기 위해서 사용된다. 특정 실시형태에서, 방법은 동종이식 거부를 치료하기 위해서 사용된다.

[0085] 특정 실시형태에서, 방법은 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)을 투여 또는 제공하는 단계를 추가로 포함하고; 선택적으로, 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 친화성 시약(들)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 대상체는 각각 구별되는 키메라 수용체를 발현하고 각각 사이토카인의 구별되는 변이체 형태를 발현하는 2개 이상의 세포 집단이 투여된다.

[0086] 특정 실시형태에서, 방법은 i) 면역 세포-함유 샘플을 단리시키는 단계; (ii) 면역 세포에 키메라 사이토카인 수용체를 암호화하는 핵산 서열을 도입하는 단계; (iii) (ii)로부터의 면역 세포를 대상체에게 투여하는 단계; 및 (iv) 면역 세포를 키메라 수용체에 결합하는 사이토카인과 접촉시키는 단계를 포함한다. 특정 실시형태에서, 대상체는 세포를 대상체에게 투여하거나 주입하기 전에 면역-고갈 치료를 경험한 적이 있다. 특정 실시형태에서, 면역 세포-함유 샘플은 세포가 투여될 대상체로부터 단리된다.

[0087] 특정 실시형태에서, 면역 세포-함유 샘플은 세포가 투여될 대상체와 구별되는 대상체로부터 단리된다. 일부 실시형태에서, 면역 세포-함유 샘플은 세포가 투여될 대상체 또는 세포가 투여될 대상체와 구별되는 대상체로부터 유래된 세포로부터 생성되고, 선택적으로, 세포는 줄기 세포, 및 선택적으로, 만능 줄기 세포이다. 특정 실시형태에서, 면역 세포는 세포를 대상체에게 투여하거나 주입하기 전에 시험관내에서 사이토카인과 접촉된다. 특정 실시형태에서, 면역 세포는 키메라 수용체로부터 신호전달을 활성화시키기에 충분한 시간 동안 사이토카인과 접촉된다. 특정 실시형태에서, 사이토카인은 G-CSF이고; 선택적으로, G-CSF는 야생형 G-CSF이고, 선택적으로, G-CSFR의 세포외 도메인은 야생형 세포외 도메인이다.

[0088] 특정 양상에서, 본 명세서에는 키트가 기재되며, 키트는 본 명세서에 기재된 하나 이상의 키메라 수용체(들)를 발현하는 적어도 하나의 발현 벡터(들) 및 사용 설명서를 포함하고; 선택적으로, 키트는 키메라 수용체(들)에 결합하는 적어도 하나의 사이토카인(들)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)을 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함하고; 선택적으로, 상기 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 친화성 시약(들)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 IL-18, IL-21, 인터페론-α, 인터페론-β, 인터페론-γ, IL-17, IL-21, TNF-α, CXCL13, CCL3(MIP-1α), CCL4(MIP-1β), CD40 리간드, B 세포 활성화 인자(BAFF), Flt3 리간드, CCL21, CCL5, XCL1 또는 CCL19 또는 수용체 NKG2D 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 사이토카인(들) 또는 케모카인(들)을 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 적어도 하나의 항원 결합 수용체(들)를 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 결합 수용체(들)는 천연 T 세포 수용체, 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), 천연 B 세포 수용체, 조작된 B 세포 수용체(BCR), 스트레스 리간드 수용체, 패턴 인식 수용체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 키트는 하나 이상의 CAR(들)을 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함하고, 선택적으로, CAR(들)은 메소텔린 CAR이다. 일부 실시형태에서, 키트는 본 명세서에 기재된 하나 이상의 구별되는 키메라 수용체(들)를 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추

가로 포함한다.

[0089] 특정 양상에서, 본 명세서에는 본 명세서에 기재된 하나 이상의 키메라 수용체(들)를 암호화하는 세포로서, 선택적으로, 세포는 면역 세포인, 세포; 및

[0090] 사용 설명서를 포함하는 키트가 기재되며; 선택적으로, 키트는 키메라 수용체(들)에 결합하는 적어도 하나의 사이토카인(들)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포는 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)을 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함하고; 선택적으로, 상기 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 친화성 시약(들)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포는 IL-18, IL-21, 인터페론-α, 인터페론-β, 인터페론-ɣ, IL-17, IL-21, TNF-α, CXCL13, CCL3(MIP-1α), CCL4(MIP-1β), CD40 리간드, B 세포 활성화 인자(BAFF), Flt3 리간드, CCL21, CCL5, XCL1 또는 CCL19 또는 수용체 NKG2D 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 사이토카인(들) 또는 케모카인(들)을 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포는 IL-18, IL-21, 인터페론-α, 인터페론-β, 인터페론-ɣ, IL-17, IL-21, TNF-α, CXCL13, CCL3(MIP-1α), CCL4(MIP-1β), CD40 리간드, B 세포 활성화 인자(BAFF), Flt3 리간드, CCL21, CCL5, XCL1 또는 CCL19 또는 수용체 NKG2D 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 사이토카인(들) 또는 케모카인(들)을 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포는 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체(들)를 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체(들)는 천연 T 세포 수용체, 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), 천연 B 세포 수용체, 조작된 B 세포 수용체(BCR), 스트레스 리간드 수용체, 패턴 인식 수용체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 세포는 적어도 하나의 CAR(들)을 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함하고, 선택적으로, CAR은 메소텔린 CAR이다. 일부 실시형태에서, 세포는 본 명세서에 기재된 적어도 하나의 구별되는 키메라 수용체를 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함한다.

[0091] 특정 양상에서, 본 명세서에는 세포의 선택적 활성화를 위한 시스템이 기재되며, 이 시스템은 (i) 과립구 집락 자극 인자 수용체(G-CSFR)의 변이체 세포외 도메인(ECD)의 수용체; 및 (ii) (i)의 수용체에 선택적으로 결합하는 변이체 G-CSF; 및 (a) 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)로서, 선택적으로, 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 다른 친화성 시약(들)을 포함하는, 상기 신호전달 단백질(들) 및 (b) 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체(들) 중 하나 또는 둘 다를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 추가적인 사이토카인(들) 또는 케모카인(들)은 인터류킨(IL)-18, IL-21, 인터페론-a, 인터페론-β, 인터페론-ɣ, IL-17, IL-21, TNF-α, CXCL13, CCL3(MIP-1α), CCL4(MIP-1β), CD40 리간드, B 세포 활성화 인자(BAFF), Flt3 리간드, CCL21, CCL5, XCL1 또는 CCL19 또는 수용체 NKG2D 및 이들의 조합 중 적어도 하나를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 추가적인 사이토카인(들)은 IL-18을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 신호전달 수용체(들)는 천연 T 세포 수용체, 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), 천연 B 세포 수용체, 조작된 B 세포 수용체(BCR), 스트레스 리간드 수용체, 패턴 인식 수용체 및 이들의 조합 중 적어도 하나를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 신호전달 수용체는 CAR을 포함하고; 선택적으로, CAR은 메소텔린 CAR이다. 일부 실시형태에서, G-CSFR의 변이체 ECD는 부위 II 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이, 부위 III 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 부위 II 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이는 서열번호 2에 제시된 서열의 아미노산 위치 141,167, 168, 171, 172, 173, 174, 197, 199, 200, 202 및 288로 이루어진 군으로부터 선택된 G-CSFR ECD의 아미노산 위치에 위치한다. 일부 실시형태에서, G-CSFR ECD의 부위 II 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이는 서열번호 2에 제시된 서열의 R141E, R167D, K168D, K168E, L171E, L172E, Y173K, Q174E, D197K, D197R, M199D, D200K, D200R, V202D, R288D 및 R288E로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0092] 일부 실시형태에서, G-CSFR ECD의 부위 III 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이는 서열번호 2에 제시된 서열의 아미노산 2 내지 308의 아미노산 위치 30, 41, 73, 75, 79, 86, 87, 88, 89, 91 및 93으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, G-CSFR ECD의 부위 III 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이는 서열번호 2에 제시된 서열의 S30D, R41E, Q73W, F75KF, S79D, L86D, Q87D, I88E, L89A, Q91D, Q91K 및 E93K로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, G-CSFR ECD는 표 4, 22 및 23에 제시된 설계 번호의 복수의 돌연변이의 조합을 포함하며; 돌연변이는 서열번호 2에 제시된 서열의 아미노산 위치에 상응한다.

[0093] 일부 실시형태에서, G-CSFR ECD는 서열번호 2에 제시된 서열의 돌연변이 R41E, R141E 및 R167D를 포함한다. 일

부 실시형태에서, G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체는 키메라 수용체이다.

[0094] 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 적어도 하나의 제2 도메인에 작동 가능하게 연결되고; 제2 도메인은 하나 이상의 사이토카인 수용체(들)의 세포내 도메인(ICD)으로부터의 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위를 포함하고; 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위는 G-CSFR의 STAT3 결합 부위, 당단백질 130(gp130)의 STAT3 결합 부위, gp130의 SHP-2 결합 부위, IL-2Rβ의 SHC 결합 부위, IL-2Rβ의 STAT5 결합 부위, IL-2Rβ가 STAT3 결합 부위, IL-2Rβ의 STAT1 결합 부위, IL-7Rα의 STAT5 결합 부위, IL-7Rα의 포스파티딜이노시톨 3-키나제(PI3K) 결합 부위, IL-12Rβ$_2$의 STAT4 결합 부위, IL-12Rβ$_2$의 STAT5 결합 부위, IL-12Rβ$_2$의 STAT3 결합 부위, IL-21R의 STAT5 결합 부위, IL-21R의 STAT3 결합 부위, IL-21R의 STAT1 결합 부위, IL-4Rα의 IRS-1 또는 IRS-2 결합 부위, IL-4Rα의 STAT6 결합 부위, 에리트로포이에틴 수용체(EPOR)의 SHP-1 또는 SHP-2 결합 부위, EPOR의 STAT5 결합 부위, 인터페론 알파 및 베타 수용체 소단위 2(IFNAR2)의 STAT1 또는 STAT2 결합 부위, 및 인터페론 감마 수용체 1(IFNγR1)의 STAT1 결합 부위 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되며; 선택적으로, ICD는 G-CSFR, gp130 EPOR 및 인터페론 감마 수용체 2(IFNγR2) 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 Box 1 영역 및 Box 2 영역을 포함하고; 선택적으로, 키메라 수용체는 G-CSFR, gp130(당단백질 130) 및 IL-2Rβ로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 막관통 도메인(TMD)을 포함하는 제3 도메인을 포함하고, 선택적으로, TMD는 야생형 TMD이다.

[0095] 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 적어도 하나의 제2 도메인에 작동 가능하게 연결되고; 제2 도메인은,

[0096] (i)

[0097] (a) gp130의 Box 1 및 Box 2 영역; 및

[0098] (b) IL-2Rβ의 C-말단 영역; 또는

[0099] (ii)

[0100] (a) G-CSFR의 Box 1 및 Box 2 영역; 및

[0101] (b) IL-2Rβ의 C-말단 영역; 또는

[0102] (iii)

[0103] (a) G-CSFR의 Box 1 및 Box 2 영역; 및

[0104] (b) IL-12Rβ$_2$의 C-말단 영역; 또는

[0105] (iv)

[0106] (a) G-CSFR의 Box 1 및 Box 2 영역; 및

[0107] (b) IL-21R의 C-말단 영역; 또는

[0108] (v)

[0109] (a) IL-2Rβ의 Box 1 및 Box 2 영역; 및

[0110] (b) IL-2Rβ의 C-말단 영역; 또는

[0111] (vi)

[0112] (a) G-CSFR의 Box 1 및 Box 2 영역; 및

[0113] (b) IL-7Rα의 C-말단 영역; 또는

[0114] (vii)

[0115] (a) G-CSFR의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0116] (b) IL-4Rα의 C-말단 영역; 또는

[0117] (viii)

[0118] (a) gp130의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0119] (b) gp130의 C-말단 영역; 또는

[0120] (ix)

[0121] (a) 에리트로포이에틴 수용체(EPOR)의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0122] (b) EPOR의 C-말단 영역; 또는

[0123] (x)

[0124] (a) G-CSFR의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0125] (b) 인터페론 알파 및 베타 수용체 소단위 2(IFNAR2)의 C-말단 영역; 또는

[0126] (xi)

[0127] (a) 인터페론 감마 수용체 2(IFNγR2)의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0128] (b) 인터페론 감마 수용체 1(IFN γR1)의 C-말단 영역을 포함한다.

[0129] 일부 실시형태에서, ECD는 TMD에 대해 N-말단이고, TMD는 ICD에 대해 N-말단이다. 일부 실시형태에서, G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체는 세포 상에서 발현된다. 일부 실시형태에서, 세포는 면역 세포이고 및 선택적으로, 면역 세포는 T 세포 및 선택적으로, NK 세포 및 선택적으로, NKT 세포 및 선택적으로, B 세포 및 선택적으로, 형질 세포 및 선택적으로, 대식세포 및 선택적으로, 수지상 세포에서 발현되고, 선택적으로 세포는 줄기세포이고, 선택적으로, 세포는 1차 세포이고, 선택적으로, 세포는 인간 세포이다. 일부 실시형태에서, T 세포는 $CD8^+$ T 세포, 세포독성 $CD8^+$ T 세포, 미경험 $CD4^+$ T 세포, 미경험 $CD8^+$ T 세포, 헬퍼 T 세포, 조절성 T 세포, 기억 T 세포 및 γδT 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 변이체 G-CSF에 의한 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체의 활성화는 상기 수용체를 발현하는 세포의 증식, 생존력, 지속성, 세포독성, 사이토카인 분비, 기억, 향상된 활성 및 이들의 조합 중 적어도 하나를 포함하는 세포 반응을 초래한다. 일부 실시형태에서, 변이체 G-CSF는 부위 II 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이, 부위 III 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 변이체 G-CSF의 부위 II 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이는 서열번호 1에 제시된 서열의 아미노산 위치 12, 16, 19, 20, 104, 108, 109, 112, 115, 116, 118, 119, 122 및 123으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 위치에 위치한다. 일부 실시형태에서, 변이체 G-CSF의 부위 II 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이는 S12E, S12K, S12R, K16D, L18F, E19K, Q20E, D104K, D104R, L108K, L108R, D109R, D112R, D112K, T115E, T115K, T116D, Q119E, Q119R, E122K, E122R 및 E123R로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이의 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 변이체 G-CSF의 부위 III 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이는 서열번호 1에 제시된 서열의 38, 39, 40, 41, 46, 47, 48, 49 및 147로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이의 군으로부터 선택된다.

[0130] 일부 실시형태에서, 변이체 G-CSF의 부위 III 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이는 T38R, Y39E, K40D, K40F, L41D, L41E, L41K, E46R, L47D, V48K, V48R, L49K 및 R147E로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이의 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 세포는 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체 및 적어도 하나의 추가적인 사이토카인(들) 또는 케모카인(들)을 둘 다를 발현한다. 일부 실시형태에서, 2개 이상의 세포 집단은 각각 G-CSFR ECD를 포함하는 하나 이상의 구별되는 키메라 수용체(들)를 발현하고, 각각 G-CSF의 하나 이상의 구별되는 변이체 형태를 발현한다. 일부 실시형태에서, 면역 세포의 제1 집단은 (a) 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)로서; 선택적으로, 적어도 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 다른 친화성 시약(들)을 포함하는, 상기 신호전달 단백질(들); 및 (b) 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체(들) 중 하나 또는 둘 다를 추가로 발현한다. 일부 실시형태에서, 세포는 면역 세포이고; 면역 세포는 항원 결합 신호전달 수용체를 추가로 발현하고; 항원 결합 신호전달 수용체는 제2 세포 상에서 발현되는 항원에 선택적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 신호전달 수용체(들)는 키메라 항원 수용체(CAR), 및 선택적으로, 메소텔린 CAR을 포함한다. 일부 실시형태에서, 추가적인 사이토카인은 IL-18을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 세포는 암 세포이다.

[0131] 특정 양상에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 시스템을 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열(들)을 기재한다. 특정 양상에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 핵산 서열(들)을 포함하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 기재한다. 특정 양상에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 시스템을 발현하도록 조작된 하나 이상의

세포(들)를 기재한다. 일부 실시형태에서, 세포(들)는 면역 세포이고 및 선택적으로, 면역 세포는 T 세포 및 선택적으로, NK 세포 및 선택적으로, NKT 세포 및 선택적으로, B 세포 및 선택적으로, 형질 세포 및 선택적으로, 대식세포 및 선택적으로, 수지상 세포에서 발현되고, 선택적으로 세포는 줄기세포이고, 선택적으로, 세포는 1차 세포이고, 선택적으로, 세포는 인간 세포이다. 일부 실시형태에서, T-세포는 $CD8^+$ T 세포, 세포독성 $CD8^+$ T 세포, 미경험 $CD8^+$ T 세포, 미경험 $CD4^+$ T 세포, 헬퍼 T 세포, 조절성 T 세포, 기억 T 세포 및 γδT 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0132] 특정 양상에서, 본 명세서에는 세포의 표면 상에서 발현되는 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체의 선택적 활성화 방법이 기재되며, 이 방법은 세포에 본 명세서에 기재된 시스템의 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 하나 이상의 수용체(들)를 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열(들); 및 (i) 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)로서; 및 선택적으로, 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 본 명세서에 기재된 시스템의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 다른 친화성 시약(들)을 포함하는, 신호전달 단백질; 및 (ii) 본 명세서에 기재된 시스템의 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체(들) 중 하나 또는 둘 다를 도입하는 단계; 및 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체(들)를 본 명세서에 기재된 시스템의 하나 이상의 변이체 G-CSF 또는 변이체 G-CSF와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 수용체(들)는 면역 세포 상에서 발현되고, 선택적으로, 면역 세포는 T 세포 및 선택적으로, NK 세포 및 선택적으로, NKT 세포 및 선택적으로, B 세포 및 선택적으로, 형질 세포 및 선택적으로, 대식세포 및 선택적으로, 수지상 세포에서 발현되고, 선택적으로 세포는 줄기세포이고, 선택적으로, 세포는 1차 세포이고, 선택적으로, 세포는 인간 세포이다. 일부 실시형태에서, T 세포는 $CD8^+$ T 세포, 세포독성 $CD8^+$ T 세포, 미경험 $CD4^+$ T 세포, 미경험 $CD8^+$ T 세포, 헬퍼 T 세포, 조절성 T 세포, 기억 T 세포 및 γδT 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 면역 세포 상에서 발현되는 수용체(들)의 선택적 활성화는 면역 세포의 증식, 생존력, 지속성, 세포독성, 사이토카인 분비, 기억, 향상된 활성 및 이들의 조합 중 적어도 하나를 포함하는 세포 반응을 초래한다. 일부 실시형태에서, 면역 세포의 제1 집단은 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체를 발현하고, 면역 세포의 제2 집단은 변이체 G-CSF를 발현하고; 선택적으로, 면역 세포의 제1 및 제2 집단(들) 중 하나 또는 둘 다는 적어도 하나의 구별되는 항원 결합 신호전달 수용체(들)를 추가로 발현하고; 선택적으로, 적어도 하나의 구별되는 항원 결합 신호전달 수용체(들)는 적어도 하나의 CAR을 포함한다. 일부 실시형태에서, 면역 세포의 제1 및 제2 집단(들) 중 하나 또는 둘 다는 (a) 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)로서; 선택적으로, 적어도 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 다른 친화성 시약(들)을 포함하는, 상기 신호전달 단백질(들); 및 (b) 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체(들) 중 하나 또는 둘 다를 추가로 발현한다.

[0133] 일부 실시형태에서, 면역 세포의 제1 및 제2 집단 각각은 G-CSFR의 구별되는 변이체 ECD 및 적어도 하나의 구별되는 변이체 G-CSF를 포함하는 적어도 하나의 구별되는 수용체(들)를 발현한다. 일부 실시형태에서, 방법은 면역 세포의 하나 이상의 추가적인 집단을 추가로 포함하고; 면역 세포의 각각의 추가적인 집단은 (i) G-CSFR의 구별되는 변이체 ECD를 포함하는 구별되는 수용체, (ii) 구별되는 변이체 G-CSF, (iii) 구별되는 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질 및 (iv) 구별되는 항원 결합 신호전달 수용체 중 적어도 하나를 발현한다.

[0134] 특정 양상에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 시스템의 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 하나 이상의 수용체(들); 및 (i) 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)로서; 선택적으로, 적어도 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 본 명세서에 기재된 시스템의 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 다른 친화성 시약(들)을 포함하는, 신호전달 단백질(들); 및 (ii) 본 명세서에 기재된 시스템의 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체 중 하나 또는 둘 다를 발현하는 세포의 생산 방법이 기재되며; 이 방법은 세포에 수용체와, (i) 및 (ii) 중 하나 또는 둘 다를 암호화하는 하나 이상의 핵산(들) 또는 발현 벡터(들)를 도입하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 면역 세포의 제1 집단은 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체를 발현하고, 면역 세포의 제2 집단은 변이체 G-CSF를 발현한다. 일부 실시형태에서, 면역 세포의 제1 및 제2 집단(들) 중 하나 또는 둘 다는 (a) 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)로서; 선택적으로, 적어도 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 다른 친화성 시약(들)을 포함하는, 상기 신호전달 단

백질(들); 및 (b) 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체(들) 중 하나 또는 둘 다를 추가로 발현한다.

[0135] 특정 양상에서, 본 명세서에는 면역 반응의 증가를 필요로 하는 대상체에서 면역 반응을 증가시키는 방법이 기재되며, 이 방법은 대상체에게 본 명세서에 기재된 면역 세포(들)를 투여하는 단계를 포함한다. 특정 양상에서, 본 명세서에는 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 질환을 치료하는 방법이 기재되며, 이 방법은 대상체에게 본 명세서의 면역 세포(들)를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 대상체에게 변이체 G-CSF를 투여하거나 제공하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 암을 치료하는 데 사용된다. 일부 실시형태에서, 방법은 염증성 병태를 치료하기 위해서 사용된다. 일부 실시형태에서, 방법은 자가면역 질환 또는 병태를 치료하기 위해서 사용된다. 일부 실시형태에서, 방법은 퇴행성 질환을 치료하기 위해서 사용된다. 일부 실시형태에서, 방법은 이식을 위한 자연 또는 조작된 세포, 조직 또는 기관을 생성하기 위해서 사용된다. 일부 실시형태에서, 방법은 이식 거부를 예방 또는 치료하기 위해서 사용된다. 일부 실시형태에서, 방법은 감염 질환을 치료하기 위해서 사용된다. 일부 실시형태에서, 방법은 적어도 하나의 추가적인 활성제를 투여 또는 제공하는 단계를 추가로 포함하고; 선택적으로 적어도 하나의 추가적인 활성제는 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)을 포함하고; 선택적으로, 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 다른 친화성 시약(들)을 포함한다.

[0136] 특정 양상에서, 본 명세서에는 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법이 기재되며, 이 방법은 (i) 면역 세포-함유 샘플을 단리시키는 단계 ; (ii) 면역 세포에 [0048] 내지 [0054] 중 어느 하나의 시스템의 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 하나 이상의 수용체(들)를 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열(들); 및 (a) 적어도 하나의 추가적인 활성제로서; 선택적으로 적어도 하나의 추가적인 활성제는 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)을 포함하고; 선택적으로, 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 본 명세서에 기재된 시스템의 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 다른 친화성 시약(들)을 포함하는, 활성제; 및 선택적으로, (b) 본 명세서에 기재된 시스템의 항원 결합 신호전달 수용체 중 하나 또는 둘 다를 도입하는 단계; (iii) (ii)로부터의 면역 세포(들)를 대상체에게 투여하는 단계; 및 (iv) 면역 세포(들)를 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체(들)에 특이적으로 결합하는 변이체 G-CSF와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 대상체는 면역 세포(들)를 대상체에게 투여하거나 주입하기 전에 면역-고갈 치료를 경험한 적이 있다. 일부 실시형태에서, 면역 세포-함유 샘플은 세포(들)가 투여되는 대상체로부터 단리된다. 일부 실시형태에서, 면역 세포-함유 샘플은 세포(들)가 투여되는 대상체와 구별되는 대상체로부터 단리된다. 일부 실시형태에서, 면역 세포-함유 샘플은 공급원 세포가 투여될 대상체로부터 유래된 공급원 세포로부터 생성되고, 선택적으로, 세포는 줄기 세포, 및 선택적으로, 만능 줄기 세포이다. 일부 실시형태에서, 면역 세포-함유 샘플은 공급원 세포가 투여될 대상체와 구별되는 대상체로부터 유래된 공급원 세포로부터 생성되고, 선택적으로, 세포는 줄기 세포, 및 선택적으로, 만능 줄기 세포이다. 일부 실시형태에서, 면역 세포(들)는 대상체에게 면역 세포(들)를 투여하기 전에 시험관내에서 변이체 G-CSF 또는 추가적인 사이토카인(들) 또는 케모카인(들)과 접촉된다. 일부 실시형태에서, 면역 세포(들)는 본 명세서에 기재된 시스템의 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체(들)로부터의 신호전달을 활성화시키기에 충분한 시간 동안 변이체 G-CSF와 접촉된다.

[0137] 특정 양상에서, 본 명세서에는 본 명세서에 기재된 시스템의 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 하나 이상의 수용체(들); 및 (a) 본 명세서에 기재된 시스템의 하나 이상의 추가적인 사이토카인(들) 및 케모카인(들); 및 (b) 본 명세서에 기재된 시스템의 하나 이상의 항원 결합 신호전달 수용체(들) 중 하나 또는 둘 다를 암호화하는 세포; 및 사용 설명서를 포함하는 키트가 기재되며; 선택적으로, 세포는 면역 세포이다. 특정 양상에서, 본 명세서에는 (i) 본 명세서에 기재된 시스템의 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체(들)를 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열(들) 또는 발현 벡터(들); 및 (a) 적어도 하나의 추가적인 활성제(들)로서; 선택적으로 적어도 하나의 추가적인 활성제(들)는 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)을 포함하고; 선택적으로, 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 본 명세서에 기재된 시스템의 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 다른 친화성 시약(들)을 포함하는, 추가적인 활성제(들); 및, (b) 본 명세서에 기재된 시스템의 하나 이상의 항원 결합 신호전달 수용체 중 하나 또는 둘 다; 및 (ii) 하나 이상의 변이체 G-CSF; 및 (iii) 사용 설명서를 포함하는 키트가 기재되며; 수용체와, (a) 및 (b) 중 하나 또는 둘 다는 동일한 또는 별개의 핵산 서열 또는 발현 벡터 상에 위치된다.

[0138] 특정 양상에서, 본 명세서에는 (i) 본 명세서에 기재된 시스템의 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체(들)를

암호화하는 하나 이상의 핵산 서열(들) 또는 발현 벡터(들); 및 (a) 적어도 하나의 추가적인 활성제(들)로서; 선택적으로 적어도 하나의 추가적인 활성제(들)는 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)을 포함하고; 선택적으로, 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 본 명세서에 기재된 시스템의 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 다른 친화성 시약(들); 및 (b) 본 명세서에 기재된 시스템의 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체(들) 중 하나 또는 둘 다를 포함하는 세포; 및 (ii) 사용 설명서를 포함하는 키트가 기재되고, 선택적으로, 키트는 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체(들)에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 변이체 G-CSF를 포함한다.

[0139] 특정 양상에서, 본 명세서에는 (i) 인터류킨 수용체 알파(IL-7Rα)의 세포외 도메인(ECD); (ii) 막관통 도메인(TMD); 및 (iii) 서열번호 109에 제시된 야생형, 인간 IL-7Rα 세포내 신호전달 도메인과 구별되는 사이토카인 수용체의 세포내 도메인(ICD)을 포함하는 키메라 수용체가 개시되며; ECD 및 TMD는 각각 ICD에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시형태에서, ECD의 카복시 말단(C-말단)은 TMD의 아미노 말단(N-말단)에 연결되고, TMD의 C-말단은 ICD의 N-말단에 연결된다. 일부 실시형태에서, ECD는 천연 인간 IL-7Rα의 ECD이다. 일부 실시형태에서, TMD는 IL-7Rα의 TMD이다. 일부 실시형태에서, TMD는 천연 인간 IL-7Rα의 TMD이다. 일부 실시형태에서, ICD는 사이토카인 수용체의 세포내 도메인으로부터의 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위를 포함하고, 선택적으로, 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위는 (a) IL-2Rβ, IL-4Rα, IL-7Rα, IL-21R 또는 gp130의 JAK1 결합 부위(Box 1 및 2 영역); (b) IL-2Rβ의 SHC 결합 부위; (c) IL-2Rβ 또는 IL-7Rα의 STAT5 결합 부위; (d) IL-21R 또는 gp130의 STAT3 결합 부위; (e) IL-12Rβ2의 STAT4 결합 부위; (f) IL-4Rα의 STAT6 결합 부위; (g) IL-4Rα의 IRS-1 또는 IRS-2 결합 부위; 및 (h) gp130의 SHP-2 결합 부위; (i) IL-7Rα의 PI3K 결합 부위; 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, ICD는 동종이량체화 또는 공통 감마 쇄(gc)와의 이종이량체화에 의해서 활성화되는 수용체의 적어도 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, ICD는 IL-2Rβ(인터류킨-2 수용체 베타), IL-4Rα(인터류킨-4 수용체 알파), IL-9Rα(인터류킨-9 수용체 알파), IL-12R β2(인터류킨-12 수용체), IL-21R(인터류킨-21 수용체) 및 당단백질 130(gp130) 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 사이토카인 수용체의 적어도 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.

[0140] 특정 양상에서, 본 명세서에는 IL-7Rα의 ECD 및 ICD에 작동 가능하게 연결된 TMD를 포함하는 키메라 수용체가 기재되며, ICD는,

[0141] (i)

[0142] (a) IL-2Rβ의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0143] (b) IL-2Rβ의 SHC 결합 부위; 및

[0144] (c) IL-2Rβ의 STAT5 결합 부위; 또는

[0145] (ii)

[0146] (a) IL-7Rα의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0147] (b) IL-2Rβ의 SHC 결합 부위; 및

[0148] (c) IL-2Rβ의 STAT5 결합 부위; 또는

[0149] (iii)

[0150] (a) IL-2Rβ의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0151] (b) IL-2Rβ의 SHC 결합 부위;

[0152] (c) IL-2Rβ의 STAT5 결합 부위; 및

[0153] (d) IL-12Rβ2의 STAT4 결합 부위; 또는

[0154] (iv)

[0155] (a) IL-7Rα의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0156] (b) IL-2Rβ의 SHC 결합 부위;

[0157] (c) IL-2Rβ의 STAT5 결합 부위; 및

[0158] (d) IL-12Rβ2의 STAT4 결합 부위; 또는

[0159] (v)

[0160] (a) IL-21R의 Box 1 및 Box 2 영역; 및

[0161] (b) IL-21R의 STAT3 결합 부위; 또는

[0162] (vi)

[0163] (a) IL-7Rα의 Box 1 및 Box 2 영역; 및

[0164] (b) IL-21R의 STAT3 결합 부위; 또는

[0165] (vii)

[0166] (a) IL-21R의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0167] (b) IL-21R의 STAT3 결합 부위; 및

[0168] (c) IL-7Rα의 STAT5 및 PI3 키나제 결합 부위;

[0169] (viii)

[0170] (a) IL-7Rα의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0171] (b) IL-21R의 STAT3 결합 부위; 및

[0172] (c) IL-7Rα의 STAT5 및 PI3 키나제 결합 부위;

[0173] (ix)

[0174] (a) IL-2Rβ의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0175] (b) IL-2Rβ의 SHC 결합 부위;

[0176] (c) IL-2Rβ의 STAT5 결합 부위; 및

[0177] (d) IL-21R의 STAT3 결합 부위; 또는

[0178] (x)

[0179] (a) IL-7Rα의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0180] (b) IL-2Rβ의 SHC 결합 부위;

[0181] (c) IL-2Rβ의 STAT5 결합 부위; 및

[0182] (d) IL-21R의 STAT3 결합 부위; 또는

[0183] (xi)

[0184] (a) IL-2Rβ의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0185] (b) IL-2Rβ의 SHC 결합 부위;

[0186] (c) IL-2Rβ의 STAT5 결합 부위;

[0187] (d) IL12Rβ2의 STAT4 결합 부위; 및

[0188] (e) IL-21R의 STAT3 결합 부위; 또는

[0189] (xii)

[0190] (a) IL-7Rα의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0191] (b) IL-2Rβ의 SHC 결합 부위;

[0192] (c) IL-2Rβ의 STAT5 결합 부위;

[0193] (d) IL12Rβ2의 STAT4 결합 부위; 및

[0194] (e) IL-21R의 STAT3 결합 부위; 또는

[0195] (xiii)

[0196] (a) IL-4Rα의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0197] (b) IL-4Rα의 IRS-1 또는 IRS-2 결합 부위; 및

[0198] (c) IL-4Rα의 STAT6 결합 부위; 또는

[0199] (xiv)

[0200] (a) IL-7Rα의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0201] (b) IL-4α의 IRS-1 또는 IRS-2 결합 부위; 및

[0202] (c) IL-4α의 STAT6 결합 부위; 또는

[0203] (xv)

[0204] (a) gp130의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0205] (b) gp130의 SHP-2 결합 부위; 및

[0206] (c) gp130의 STAT3 결합 부위; 또는

[0207] (xvi)

[0208] (a) IL-7Rα의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0209] (b) gp130의 SHP-2 결합 부위; 및

[0210] (c) gp130의 STAT3 결합 부위를 포함한다.

[0211] 일부 실시형태에서, (b)는 (c)에 대해 N-말단이거나; (c)는 (b)에 대해 N-말단이거나; (c)는 (d)에 대해 N-말단이거나; (d)는 (c)에 대해 N-말단이거나; (d)는 (e)에 대해 N-말단이거나; (e)는 (d)에 대해 N-말단이다.

[0212] 일부 실시형태에서, ICD는 서열번호 192 내지 214 중 적어도 하나에 제시된 서열과 동일한 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다.

[0213] 일부 실시형태에서, 키메라 수용체의 활성화된 형태는 이종이량체를 형성하고, 선택적으로, 키메라 수용체의 활성화는 키메라 수용체를 발현하는 세포의 증식, 생존력, 지속성, 세포독성, 사이토카인 분비, 기억 및 향상된 활성 중 적어도 하나를 포함하는 세포 반응을 초래하고, 선택적으로, 키메라 수용체는 인터류킨(IL)-7과의 접촉 시 활성화된다. 일부 실시형태에서, IL-7은 야생형, 인간 IL-7이다. 일부 실시형태에서, IL-7은 야생형 IL-7에 비해서 1, 2, 3, 4 또는 5개의 돌연변이를 보유한다. 일부 실시형태에서, IL-7은 하나 이상의 화학적 변형을 포함한다.

[0214] 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 세포 상에서 발현된다. 세포는 면역 세포이고 및 선택적으로, 면역 세포는 T 세포 및 선택적으로, NK 세포 및 선택적으로, NKT 세포 및 선택적으로, B 세포 및 선택적으로, 형질 세포 및 선택적으로, 대식세포 및 선택적으로, 수지상 세포에서 발현되고, 선택적으로 세포는 줄기세포이고, 선택적으로, 세포는 1차 세포이고, 선택적으로, 세포는 인간 세포이다. 일부 실시형태에서, T 세포는 $CD8^+$ T 세포, 세포독성 $CD8^+$ T 세포, 미경험 $CD4^+$ T 세포, 미경험 $CD8^+$ T 세포, 헬퍼 T 세포, 조절성 T 세포, 기억 T 세포 및 γδT 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, IL-7에 의한 수용체의 활성화는 수용체를 발현하는 세포의 증식, 생존력, 지속성, 세포독성, 사이토카인 분비, 기억, 및 향상된 활성 중 적어도 하나를 포함하는 세포 반응을 초래한다.

[0215] 특정 양상에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 수용체를 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열(들)을 기재한다. 특정 양상에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 핵산 서열(들)을 포함하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 기재한다. 특정 양상에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 핵산 서열(들) 또는 발현 벡터(들)를 포함하는 세포를 기재한다. 일부 실시형태에서, 세포는 면역 세포이고 및 선택적으로, 면역 세포는 T 세포 및 선택적으로, NK 세포 및 선택적으로, NKT 세포 및 선택적으로, B 세포 및 선택적으로, 형질 세포 및 선택적으로, 대식세포

및 선택적으로, 수지상 세포에서 발현되고, 선택적으로 세포는 줄기세포이고, 선택적으로, 세포는 1차 세포이고, 선택적으로, 세포는 인간 세포이다. 일부 실시형태에서, T 세포는 $CD8^+$ T 세포, 세포독성 $CD8^+$ T 세포, 미경험 $CD4^+$ T 세포, 미경험 $CD8^+$ T 세포, 헬퍼 T 세포, 조절성 T 세포, 기억 T 세포 및 γδT 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0216] 특정 양상에서, 본 개시내용은 세포 표면 상에서 발현되는 수용체의 활성화를 위한 시스템을 기재하며, 시스템은 (a) 본 명세서에 기재된 키메라 수용체; 및 (b) IL-7을 포함한다.

[0217] 특정 양상에서, 본 개시내용은 면역 세포의 활성화를 위한 시스템을 기재하며, 시스템은 (a) 본 명세서에 기재된 키메라 수용체; (b) IL-7; 및 (c) 항원 결합 신호전달 수용체를 포함한다.

[0218] 특정 양상에서, 본 개시내용은 면역 세포의 활성화를 위한 시스템을 기재하며, 시스템은 (a) 본 명세서에 기재된 키메라 수용체; (b) IL-7; 및 (c) 적어도 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)을 포함하며; 선택적으로, 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 다른 친화성 시약을 포함한다.

[0219] 일부 실시형태에서, 시스템은 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체는 천연 T 세포 수용체, 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), 천연 B 세포 수용체, 조작된 B 세포 수용체(BCR), 스트레스 리간드 수용체, 패턴 인식 수용체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 수용체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체는 CAR이다. 일부 실시형태에서, 사이토카인 또는 케모카인은 IL-18, IL-21, 인터페론-α, 인터페론-β, 인터페론-γ, IL-17, IL-21, TNF-α, CXCL13, CCL3(MIP-1α), CCL4(MIP-1β), CD40 리간드, B 세포 활성화 인자(BAFF), Flt3 리간드, CCL21, CCL5, XCL1, CCL19, 수용체 NKG2D 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 사이토카인은 IL-18이다. 일부 실시형태에서, 사이토카인은 인간이다.

[0220] 특정 양상에서, 본 명세서에는 세포 표면 상에서 발현되는 키메라 수용체의 활성화 방법이 기재되며, 이 방법은 키메라 수용체를 IL-7과 접촉시켜 키메라 수용체를 활성화시키는 단계를 포함하며; 키메라 수용체는 (i) IL-7Rα의 세포외 도메인(ECD); (ii) 막관통 도메인(TMD); 및 (iii) 서열번호 109에 제시된 야생형, 인간 IL-7Rα 세포내 신호전달 도메인과 구별되는 사이토카인 수용체의 세포내 도메인(ICD)을 포함하며; ECD 및 TMD는 각각 ICD에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시형태에서, 키메라 수용체는 본 명세서에 기재된 키메라 수용체이다.

[0221] 특정 양상에서, 본 명세서에는 세포에서 키메라 수용체를 생산하는 방법이 기재되며, 이 방법은 세포에 본 명세서에 기재된 핵산 서열(들) 또는 본 명세서에 기재된 발현 벡터(들)를 도입하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 서열(들) 또는 벡터(들)의 서열(들)을 세포의 게놈 내에서 편집하는 단계를 추가로 포함한다.

[0222] 본 명세서에 기재된 방법의 일부 실시형태에서, 세포는 면역 세포이고 및 선택적으로, 면역 세포는 T 세포 및 선택적으로, NK 세포 및 선택적으로, NKT 세포 및 선택적으로, B 세포 및 선택적으로, 형질 세포 및 선택적으로, 대식세포 및 선택적으로, 수지상 세포에서 발현되고, 선택적으로 세포는 줄기세포이고, 선택적으로, 세포는 1차 세포이고, 선택적으로, 세포는 인간 세포이다. 일부 실시형태에서, T 세포는 $CD8^+$ T 세포, 세포독성 $CD8^+$ T 세포, 미경험 $CD4^+$ T 세포, 미경험 $CD8^+$ T 세포, 헬퍼 T 세포, 조절성 T 세포, 기억 T 세포 및 γδT 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0223] 특정 양상에서, 본 명세서에는 면역 반응의 증가를 필요로 하는 대상체에서 면역 반응을 증가시키는 방법이 기재되며, 이 방법은 대상체에게 본 명세서에 기재된 키메라 수용체를 발현하는 세포(들) 투여하는 단계, 및 대상체에게 IL-7을 투여 또는 제공하는 단계를 포함한다.

[0224] 특정 양상에서, 본 명세서에는 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법이 기재되며, 이 방법은 대상체에게 본 명세서에 기재된 키메라 수용체를 발현하는 세포(들) 투여하는 단계, 및 대상체에게 IL-7을 투여 또는 제공하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 암을 치료하는 데 사용된다. 일부 실시형태에서, 방법은 자가면역 질환을 치료하기 위해서 사용된다. 일부 실시형태에서, 방법은 염증성 병태를 치료하기 위해서 사용된다. 일부 실시형태에서, 방법은 퇴행성 질환을 치료하기 위해서 사용된다. 일부 실시형태에서, 방법은 이

식을 위한 자연 또는 조작된 세포, 조직 또는 기관을 생성하기 위해서 사용된다. 일부 실시형태에서, 방법은 이식 거부를 예방 또는 치료하기 위해서 사용된다. 일부 실시형태에서, 방법은 감염 질환을 치료하기 위해서 사용된다.

[0225] 특정 실시형태에서, 방법은 퇴행성 질환 또는 병태를 치료하기 위해서 사용된다. 퇴행성 질환 또는 병태의 예는 노화와 관련된 신경퇴행성 질환 또는 병태를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다.

[0226] 특정 실시형태에서, 방법은 이식을 위한 자연 또는 조작된 세포, 조직 또는 기관을 생성하기 위해서 사용된다.

[0227] 일부 실시형태에서, 방법은 적어도 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)을 투여 또는 제공하는 단계를 추가로 포함하고; 선택적으로, 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 친화성 시약을 포함한다. 일부 실시형태에서, 대상체는 적어도 하나의 추가적인 구별되는 키메라 수용체를 발현하는 세포가 투여된다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 추가적인 구별되는 키메라 수용체는 과립구 세포 자극 인자 수용체(G-CSFR)의 변이체 ECD를 포함하는 키메라 수용체이다. 일부 실시형태에서, G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 적어도 하나의 추가적인 구별되는 키메라 수용체를 발현하는 세포는 하나 이상의 변이체 G-CSF와 접촉되고, 선택적으로, 대상체는 하나 이상의 변이체 G-CSF가 투여된다. 일부 실시형태에서, 방법은 i) 면역 세포-함유 샘플을 단리시키는 단계; (ii) 면역 세포(들)에 키메라 사이토카인 수용체(들)를 암호화하는 핵산 서열(들)을 형질도입 또는 형질주입시키는 단계; (iii) (ii)로부터의 면역 세포(들)를 대상체에게 투여하는 단계; 및 (iv) 면역 세포를 IL-7과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0228] 일부 실시형태에서, 방법은 면역 세포(들)에 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)을 암호화하는 핵산 서열(들)을 도입하는 단계를 포함하며; 선택적으로, 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 다른 친화성 시약을 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 사이토카인 또는 케모카인은 IL-18, IL-21, 인터페론-α, 인터페론-β, 인터페론-γ, IL-17, IL-21, TNF-α, CXCL13, CCL3(MIP-1α), CCL4(MIP-1β), CD40 리간드, B 세포 활성화 인자(BAFF), Flt3 리간드, CCL21, CCL5, XCL1, CCL19, 수용체 NKG2D 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 방법은 면역 세포(들)에 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체를 암호화하는 핵산 서열(들)을 도입하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체는 천연 T 세포 수용체, 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), 천연 B 세포 수용체, 조작된 B 세포 수용체(BCR), 스트레스 리간드 수용체, 패턴 인식 수용체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 대상체는 세포를 대상체에게 투여하기 전에 면역-고갈 치료를 경험한 적이 있다. 일부 실시형태에서, 면역 세포-함유 샘플은 세포가 투여되는 대상체로부터 단리된다. 일부 실시형태에서, 면역 세포-함유 샘플은 세포가 투여될 대상체와 구별되는 대상체로부터 단리된다. 일부 실시형태에서, 면역 세포-함유 샘플은 세포가 투여될 대상체와 구별되는 대상체로부터 유래된 세포로부터 생성되고, 선택적으로, 세포는 줄기 세포, 및 선택적으로, 만능 줄기 세포이다. 일부 실시형태에서, 면역 세포는 세포를 대상체에게 투여하기 전에 시험관내에서 IL-7 또는 변이체 G-CSF 중 하나 또는 둘 다와 접촉된다. 일부 실시형태에서, 면역 세포는 본 명세서에 기재된 키메라 수용체로부터의 신호전달을 활성화시키기에 충분한 시간 동안 IL-7 또는 변이체 G-CSF 중 하나 또는 둘 다와 접촉된다.

[0229] 일부 실시형태에서, 대상체에게 투여되는 세포는 천연 T 세포 수용체, 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), 천연 B 세포 수용체, 조작된 B 세포 수용체(BCR), 스트레스 리간드 수용체, 패턴 인식 수용체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체를 발현한다. 일부 실시형태에서, 대상체에게 투여되는 세포는 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체를 추가로 발현한다. 일부 실시형태에서, G-CSFR의 변이체 ECD는 부위 II 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이, 부위 III 계면 영역 내의 적어도 하나의 돌연변이 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 대상체에게 투여되는 세포는 IL-18를 추가로 발현한다.

[0230] 특정 양상에서, 본 명세서에는 본 명세서에 기재된 키메라 수용체를 암호화하는 세포로서, 선택적으로, 세포는 면역 세포인, 세포; 및 사용 설명서를 포함하는 키트가 기재되며; 선택적으로, 키트는 IL-7을 포함하고, 선택적으로, 키트는 본 명세서에 기재된 변이체 G-CSF를 포함한다. 특정 양상에서, 본 명세서에는 본 명세서에 기재된 키메라 수용체를 암호화하는 핵산 서열(들)을 포함하는 하나 이상의 발현 벡터(들) 및 사용 설명서를 포함하는 키트가 기재되며; 선택적으로, 키트는 IL-7을 포함하고, 선택적으로, 키트는 본 명세서에 기재된 변이체 G-CSF를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단

백질(들)을 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함하고; 선택적으로, 상기 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 친화성 시약을 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 IL-18, IL-21, 인터페론-α, 인터페론-β, 인터페론-ɣ, IL-17, IL-21, TNF-α, CXCL13, CCL3(MIP-1α), CCL4(MIP-1β), CD40 리간드, B 세포 활성화 인자(BAFF), Flt3 리간드, CCL21, CCL5, XCL1 또는 CCL19 또는 수용체 NKG2D 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 사이토카인 또는 케모카인을 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 천연 T 세포 수용체, 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), 천연 B 세포 수용체, 조작된 B 세포 수용체(BCR), 스트레스 리간드 수용체, 패턴 인식 수용체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 수용체를 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함한다 일부 실시형태에서, 키트는 키메라 항원 수용체를 암호화하는 발현 벡터를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포는 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)을 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함하고; 선택적으로, 상기 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 친화성 시약을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포는 IL-18, IL-21, 인터페론-α, 인터페론-β, 인터페론-ɣ, IL-17, IL-21, TNF-α, CXCL13, CCL3(MIP-1α), CCL4(MIP-1β), CD40 리간드, B 세포 활성화 인자(BAFF), Flt3 리간드, CCL21, CCL5, XCL1 또는 CCL19 또는 수용체 NKG2D 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 사이토카인 또는 케모카인을 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포는 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체(들)를 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체(들)는 천연 T 세포 수용체, 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), 천연 B 세포 수용체, 조작된 B 세포 수용체(BCR), 스트레스 리간드 수용체, 패턴 인식 수용체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 세포는 적어도 하나의 CAR(들)을 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0231] 본 발명의 이러한 및 다른 특징, 양상 및 이점은 하기 설명 및 첨부된 도면과 관련하여 보다 잘 이해될 것이다.

도 1은 2:2 G-CSF:G-CSFR 이종이량체 복합체의 부위 II 및 III 계면의 구조를 나타낸 다이어그램.

도 2는 G-CSF:G-CSFR 계면 설계를 위해서 사용된 전략을 간략하게 설명한 다이어그램.

도 3은 부위 II 계면 상호작용의 활력 성분을 나타낸 그래프.

도 4는 부위 II 계면의 구조 및 부위 II 계면에서 G-CSFR(CRH)의 Arg167(좌측) 및 Arg141(우측)과 G-CSF 잔기의 상호작용을 나타낸 다이어그램.

도 5는 부위 II의 야생형 G-CSF(좌측) 및 부위 II 설계 #35의 3중 ZymeCAD™ 평균-필드 팩의 동일한 영역의 오버레이(우측)를 도시한 다이어그램.

도 6은 G-CSF 설계 #: 6, 7, 8, 9, 15, 17, 30, 34, 35 및 36(상단 패널) 및 공발현되고 정제된 부위 II 설계 복합체 #: 6, 7, 8, 9, 15, 17, 30, 34, 35 및 36(하단 패널), 제1 레인 WT G-CSF 대조군, 제2 레인 WT G-CSF:G-CSFR(CRH) 대조군의 G-CSF 풀다운 검정 결과를 나타낸 SDS-PAGE의 영상을 도시한 도면.

도 7은 WT-G-CSFR과 공발현된 G-CSF 설계 #: 6, 7, 8, 9, 15, 17, 30, 34, 35 및 36(상단 패널)의 G-CSF 풀다운 검정 및 G-CSFR 설계 #: 6, 7, 8, 9, 15, 17, 30, 34, 35 및 36과 공발현된 WT G-CSF의 G-CSF 풀다운 검정(하단 패널, 제1 레인 WT:WT G-CSF:G-CSFR 풀다운 대조군)의 결과를 도시한 SDS-PAGE의 영상.

도 8은 부위 III 계면 상호작용의 활력 성분을 나타낸 그래프.

도 9는 부위 III 계면의 구조 및 부위 III 계면에서 G-CSFR(Ig)의 R41(좌측) 및 E93(우측)과 G-CSF 잔기의 상호작용을 나타낸 다이어그램.

도 10은 설계 #401 및 402의 G-CSF 풀다운 검정(상단 패널) 및 WT G-CSFR과 공발현되고 정제된 부위 II/III 설계 복합체 #401 및 402 및 설계 #401 및 402 G-CSFR(하단 패널), 제1 레인 WT G-CSF 대조군, 제2 레인 WT G-CSF:G-CSFR(Ig-CRH) 대조군과 공발현된 WT G-CSF의 풀다운의 결과를 나타낸 SDS-PAGE의 영상.

도 11은 TEV 절단 후 WT(SX75) G-CSF 및 설계 130(SX75), 303(SX200) 및 401(SX200) G-CSF_E 돌연변이체의 크기 배제 크로마토그래피 프로파일을 나타낸 그래프.

도 12는 TEV 절단 후 정제된 WT(SX75) 및 정제된 설계 401(SX200) 및 402(SX200) G-$CSFR(Ig\text{-}CRH)_E$ 돌연변이체의 크기 배제 크로마토그래피 프로파일을 나타낸 그래프.

도 13은 동족 또는 미스페어링된 G-CSFR(Ig-CRH)에 결합하는 WT, 설계 #130, #401, #402 G-CSF에 대한 결합 SPR 센서그램을 나타낸 그래프. 각각 G-CSF 대 G-CSFR 쌍은 각각의 패널 하단에 표시되어 있다. 설계 #401 및 #402의 동족 쌍에 대한 KD를 도출하는 데 사용되는 대표적인 정상 상태 피팅을 해당 센서그램 아래에 표시한다.

도 14는 하기를 나타낸 그래프: 상단 좌측 패널: WT G-CSF, 설계 #130 및 #134 G-CSF_E의 DSC 열분석도; 우측 상단 패널: WT G-CSFR(Ig-CRH), 설계 #130 및 #134 G-$CSFR(Ig\text{-}CRH)_E$의 DSC 열분석도; 하단 좌측 패널: 설계 #401 및 #402 G-CSF_E의 DSC 열분석도; 우측 하단: 설계 #300, #303, #304 및 #307 G-CSF_E의 DSC 열분석도.

도 15는 A) G-$CSFR_{WT}$-$ICD_{IL\text{-}2Rb}$(동종이량체) 또는 B) G-$CSFR_{WT}$-$ICD_{IL\text{-}2Rb}$+G-$CSFR_{WT}$-ICD_{gc}(이종이량체)를 발현하는 32D-IL-2RβIL2Rb 세포의 증식을 나타낸 브로모-데옥시우리딘(BrdU) 검정의 결과를 나타낸 그래프. 사이토카인 없이 또는 IL-2(300IU/mℓ) 또는 G-CSF_{WT}(A에서는 100ng/mℓ, B에서는 30ng/mℓ)로 세포를 자극하였다.

도 16은 A) G-$CSFR_{137}$-$ICD_{gp130\text{-}IL\text{-}2Rb}$(동종이량체); 또는 B) G-$CSFR_{137}$-$ICD_{IL\text{-}2Rb}$+G-$CSFR_{137}$-$ICD_{gc}$(이종이량체)를 발현하는 32D-IL-2Rβ 세포의 증식을 나타낸 BrdU 검정의 결과를 나타낸 그래프. 세포를 사이토카인 없이 또는 IL-2(300IU/mℓ), G-CSF_{WT}(30ng/mℓ) 또는 G-$CSFR_{137}$(30ng/mℓ)로 자극하였다.

도 17은 A) G-$CSFR_{WT}$-$ICD_{gp130\text{-}IL\text{-}2Rb}$(동종이량체); 또는 B) G-$CSFR_{WT}$-$ICD_{IL\text{-}2Rb}$+G-$CSFR_{WT}$-$ICD_{gc}$(이종이량체)를 발현하는 32D-IL-Rβ 세포의 증식을 나타낸 BrdU 검정의 결과를 나타낸 그래프. 세포를 사이토카인 없이 또는 IL-2(300IU/mℓ), G-CSF_{WT}(30ng/mℓ) 또는 G-$CSFR_{137}$(30ng/mℓ)로 자극하였다.

도 18은 G-$CSFR_{WT}$-$ICD_{gp130\text{-}IL\text{-}2Rb}$(동종이량체), G-$CSFR_{137}$-$ICD_{gp130\text{-}IL\text{-}2Rb}$(동종이량체), G-$CSFR_{WT}$-$ICD_{IL\text{-}2Rb}$+ G-$CSFR_{WT}$-$ICD_{gc}$(이종이량체) 또는 G-$CSFR_{137}$-$ICD_{IL\text{-}2Rb}$+G-$CSFR_{137}$-$ICD_{gc}$(이종이량체)를 발현하는 32D-IL-2Rβ 세포의 신호전달을 나타낸 웨스턴 블롯. 세포를 사이토카인 없이 또는 IL-2(300IU/mℓ), G-CSF_{WT}(30ng/mℓ) 또는 G-$CSFR_{137}$(30ng/mℓ)로 자극하였다.

도 19는 사이토카인 없이, IL-2로 또는 WT, 130, 304 또는 307 사이토카인으로의 자극에 응답하여 제시된 키메라 수용체(또는 형질도입되지 않은 세포)를 발현하는 1차 뮤린 T 세포의 세포 주기 증식을 평가하기 위한 BrdU 혼입 검정의 결과를 나타낸 그래프. A 및 B는 실험 반복을 나타낸다.

도 20은 천연 IL-2Rβ, IL-2Rɣc 및 G-CSFR 소단위뿐만 아니라 G2R-1 수용체 소단위 설계의 개략도.

도 21은 제시된 G-CSFR 키메라 수용체 소단위를 발현하고, WT G-CSF로, IL-2로 또는 사이토카인 없이 자극된 32D-IL-2Rβ 세포(이것은 인간 IL-2Rβ 소단위를 안정적으로 발현하는 32D 세포주임)의 확장(세포 수의 배수 변화)을 나타낸 그래프. G/ɣc를 Myc 에피토프(Myc/G/ɣc)를 사용하여 이의 N-말단에 태깅하고, G/IL-2Rβ를 Flag 에피토프(Flag/G/IL-2Rβ)를 사용하여 이의 N-말단에 태깅하였고; 이들 에피토프 태그는 유세포 분석법에 의한 검출을 도우며, 수용체의 기능에 영향을 미치지 않는다. 또한, B-D에서 하단 패널은 배양 조건 각각 하에서 G-CSFR ECD를 발현하는 세포의 백분율(G-CSFR+%)을 나타낸다. 사각형은 IL-2로 자극된 세포를 나타낸다. 삼각형은 G-CSF로 자극된 세포를 나타낸다. 원은 사이토카인으로 자극되지 않은 세포를 나타낸다.

도 22는 Flag-태깅된 G/IL-2Rβ 소단위 단독, Myc-태깅된 G/ɣc 소단위 단독 또는 전장 G-CSFR을 발현하는 인간 T 세포의 확장(세포 수의 배수 변화)을 나타낸 그래프. A 내지 D) PBMC-유래 T 세포; E 내지 H) 종양-연관 림프구(TAL). 사각형은 IL-2로 자극된 세포를 나타낸다. 삼각형은 G-CSF로 자극된 세포를 나타낸다. 원은 사이토카인으로 자극되지 않은 세포를 나타낸다.

도 23은 JAK, STAT, Shc, SHP-2 및 PI3K 결합 부위를 나타낸, 천연 수용체 및 키메라 수용체의 개략도. 음영은 도 20으로부터의 수용체를 포함한다.

도 24는 JAK, STAT, Shc, SHP-2 및 PI3K 결합 부위를 나타낸 키메라 수용체의 개략도. 음영은 도 20 및 도 23

으로부터의 수용체를 포함한다.

도 25는 G2R-2 cDNA 삽입물을 함유하는 렌티바이러스 플라스미드의 다이어그램.

도 26은 G2R-2가 형질도입된 세포에서 G-CSFR ECD 발현을 나타낸 그래프. A) 32D-IL-2Rβ 세포주; B) PBMC-유래 인간 T 세포 및 인간 종양-연관 림프구(TAL).

도 27은 형질도입되지 않은 세포와 비교하여 G2R-2를 발현하는 세포의 확장(세포 수의 배수 변화)을 나타낸 그래프. 2개의 독립적인 실험으로부터의 A) 인간 PBMC-유래 T 세포; B, C) 인간 종양-연관 림프구(TAL). 사각형은 IL-2로 자극된 세포를 나타낸다. 삼각형은 G-CSF로 자극된 세포를 나타낸다. 원은 사이토카인으로 자극되지 않은 세포를 나타낸다.

도 28은 형질도입되지 않은 세포와 비교하여 G2R-2를 발현하는 CD4- 또는 CD8-선택 인간 종양-연관 림프구의 확장(세포 수의 배수 변화)을 나타낸 그래프. A) 형질도입되지 않은 CD4-선택 세포; B) 형질도입되지 않은 CD8-선택 세포; C) G2R-2가 형질도입된 CD4-선택 세포; D) G2R-2가 형질도입된 CD8-선택 세포. 회색 점선은 IL-2로 자극된 세포를 나타낸다. 흑색 실선은 G-CSF로 자극된 세포를 나타낸다. 회색 파선은 사이토카인으로 자극되지 않은 세포를 나타낸다.

도 29는 G2R-2를 발현하는 CD4+ 또는 CD8+ 종양-연관 림프구의 확장(세포 수의 배수 변화)을 나타낸 그래프. 세포를 먼저 제시된 바와 같이 G-CSF 또는 IL-2에서 확장시켰다. 그 다음 세포를 IL-2, G-CSF 또는 배지 단독에 플레이팅하였다. 회색 실선은 IL-2로 자극된 세포를 나타낸다. 회색 실선은 IL-2로 자극된 세포를 나타낸다. 흑색 실선은 G-CSF로 자극된 세포를 나타낸다. 밝은 회색 파선은 IL-2에서 확장된 세포를 나타내고, 그 다음 배지 단독으로 자극하였다. 밝은 흑회색 파선은 G-CSF에서 확장된 세포를 나타내고, 그 다음 배지 단독으로 자극하였다.

도 30은 G-CSF 또는 IL-2에서의 확장 후 형질도입되지 않은 세포와 비교하여 G2R-2 키메라 수용체 작제물을 발현하는 CD4- 또는 CD8-선택 종양-연관 림프구(TAL)의 (유세포 분석법에 의한) 면역표현형을 나타낸 그래프. A) CD4+, CD8+ 또는 CD3-CD56+ 세포 표면 표현형을 나타낸 살아있는 세포의 백분율. B) CD45RA 및 CCR7 발현에 기초하여 제시된 세포 표면 표현형을 나타낸 살아있는 세포의 백분율.

도 31은 형질도입되지 않은 세포와 비교하여 G2R-2를 발현하는 1차 인간 T 세포의 증식을 평가하기 위한 BrdU 혼입 검정의 결과를 나타낸 그래프. 검정 전에 제시된 바와 같이 IL-2 또는 G-CSF에서 배양하여 T 세포를 선택하였다. A) 종양-연관 림프구; B) PBMC-유래 T 세포.

도 32는 모의-형질도입된 세포와 비교하여 G2R-2 또는 단일-쇄 G/IL-2Rβ(G2R-1의 성분)를 발현하는 1차 뮤린 T 세포의 증식을 평가하기 위한 BrdU 혼입 검정의 결과를 나타낸 그래프. A) 제시된 사이토카인에서의 배양 후 G-CSFR ECD를 발현하는 세포의 백분율(유세포 분석법에 의함)에 의해서 반영된 형질도입 효율; B) 제시된 사이토카인에 응답하여 모든 살아있는 세포에서의 백분율 BrdU 혼입; C) G-CSFR ECD를 발현하는 세포(G-CSFR+ 세포)에 의한 백분율 BrdU 혼입. 모든 세포를 검정 전에 3일 동안 IL-2에서 확장시켰다. 사각형은 IL-2로 자극된 세포를 나타낸다. 삼각형은 G-CSF로 자극된 세포를 나타낸다. 원은 사이토카인으로 자극되지 않은 세포를 나타낸다.

도 33은 형질도입되지 않은 세포와 비교하여 G2R-2를 발현하는 인간 1차 T 세포에서 제시된 사이토카인 신호전달 사건을 검출하기 위한 웨스턴 블롯. β-액틴, 총 Akt 및 히스톤 H3을 단백질 로딩 대조군으로 제공한다. A, B) 종양-연관 림프구(TAL); C) PBMC-유래 T 세포.

도 34는 모의-형질도입된 세포와 비교하여 G2R-2 또는 (G2R-1로부터) 단일-쇄 G/IL-2Rβ를 발현하는 1차 뮤린 T 세포에서 제시된 사이토카인 신호전달 사건을 검출하기 위한 웨스턴 블롯. 화살표는 특정 포스포-JAK2 밴드 또는 다른 더 큰 밴드가 1차 항-포스포-JAK2 항체와 포스포-JAK1의 교차 반응성의 결과라고 추정된다는 것을 나타낸다. β-액틴 및 히스톤 H3은 단백질 로딩 대조군으로 제공된다.

도 35는 사이토카인 없이, IL-2(300IU/mℓ), WT G-CSF(30ng/mℓ) 또는 130 G-CSF(30ng/mℓ)로의 자극에 응답하여 제시된 키메라 수용체(또는 형질도입되지 않은 세포)를 발현하는 32D-IL-2Rβ 세포의 세포 주기 증식을 평가하기 위한 BrdU 혼입 검정의 결과를 나타낸 그래프.

도 36은 사이토카인 없이, IL-2, WT G-CSF 또는 G-CSF 변이체 130, 304 또는 307 사이토카인으로의 자극에 응답하여 제시된 키메라 수용체(또는 형질도입되지 않은 세포)를 발현하는 1차 뮤린 T 세포의 세포 주기 증식을 평가하기 위한 BrdU 혼입 검정의 결과를 나타낸 그래프. A 및 B는 실험 반복을 나타낸다.

도 37은 사이토카인 없이, IL-2로, WT G-CSF로 또는 130 G-CSF로의 자극에 응답하여 제시된 키메라 수용체 소단위를 발현하는 32D-IL-2Rβ 세포(또는 형질도입되지 않은 세포)에서 제시된 사이토카인 신호전달 사건을 검출하기 위한 웨스턴 블롯. β-액틴 및 히스톤 H3은 단백질 로딩 대조군으로 제공된다.

도 38은 A) 사이토카인 없이, IL-2로, WT G-CSF로, 130 G-CSF로 또는 304 G-CSF로의 자극에 응답하여 제시된 키메라 수용체 소단위를 발현하는 1차 뮤린 T 세포에서 제시된 사이토카인 신호전달 사건을 검출하기 위한 웨스턴 블롯. β-액틴 및 히스톤 H3은 단백질 로딩 대조군으로 제공된다. B) 인간 G-CSF 수용체의 세포외 도메인에 특이적인 항체를 사용한 유세포 분석법에 의해서 평가된 바와 같은 패널 A에서 사용된 세포의 형질도입 효율.

도 39는 제시된 키메라 수용체 작제물이 형질도입된 1차 인간 종양-연관 림프구(TAL)에서 유세포 분석법에 의한 G-CSFR ECD 발현을 나타낸 플롯. 살아있는 CD3+, CD56- 세포를 CD8 또는 CD4에 대해서 게이팅하고, G-CSFR ECD 발현을 각각의 집단에 대해서 나타낸다.

도 40은 형질도입되지 않은 세포와 비교하여 G2R-3을 발현하는 1차 인간 종양-연관 림프구(TAL)의 확장, 증식 및 신호전달을 나타낸 그래프 및 영상. A) T-세포 확장 검정의 결과를 나타낸 그래프, 여기서 세포에 G2R-3-암호화 렌티바이러스를 형질도입하고, 세척하고, IL-2(300IU/㎖)에, 야생형 G-CSF(100ng/㎖)에 또는 사이토카인 없이 재플레이팅하였다. 살아있는 세포를 3 내지 4일마다 계수하였다. 사각형은 IL-2로 자극된 세포를 나타낸다. 삼각형은 G-CSF로 자극된 세포를 나타낸다. 원은 사이토카인으로 자극되지 않은 세포를 나타낸다. B) 세포내 신호전달 사건을 평가하기 위한 웨스턴 블롯. 세포를 확장 검정으로부터 수거하고, IL-2(300IU/㎖) 또는 야생형 G-CSF(100ng/㎖)로 자극하였다. 화살표는 125kDa에서의 특정 포스포-JAK2 밴드를 나타내고; 더 큰 밴드는 1차 항-포스포-JAK2 항체와 포스포-JAK1의 교차 반응성의 결과라고 추정된다. β-액틴 및 히스톤 H3은 단백질 로딩 대조군으로 제공된다. C) T-세포 증식을 평가하기 위한 BrdU 혼입 검정의 결과를 나타낸 그래프. 세포를 확장 검정으로부터 수거하고, 세척하고, IL-2(300IU/㎖)에, 야생형 G-CSF(100ng/㎖)에 또는 사이토카인 없이 재플레이팅하였다

도 41은 형질도입되지 않은 세포와 비교하여 WT ECD를 갖는 G2R-3을 발현하는 1차 인간 PBMC-유래 T 세포의 배수 확장 및 G-CSFR ECD 발현을 나타낸 그래프. A) T-세포 확장 검정의 결과를 나타낸 그래프, 여기서 세포에 G2R-3-암호화 렌티바이러스를 형질도입하였다. 제1일에, WT G-CSF(100ng/㎖) 또는 사이토카인 없음(배지 단독)을 배양물에 첨가하였다. 그 후, 제21일까지, 세포에 WT G-CSF 함유하는 배지 또는 사이토카인이 없는 배지를 보충하였다. 확장 제21일에, 세포를 세척하고, WT G-CSF(100ng/㎖)로, IL-7(20ng/㎖)로 그리고 IL-15(20ng/㎖)로 또는 사이토카인 없이 재플레이팅하였다. 살아있는 세포를 2 내지 4일마다 계수하였다. 사각형은 G-CSF로 자극된 세포를 나타낸다. 삼각형은 G-CSF로 자극되고, 제21일에 IL-7 및 IL-15에 재플레이팅된 세포를 나타낸다. 원은 사이토카인으로 자극되지 않은 세포를 나타낸다. 다이아몬드는 G-CSF로 자극되고, 제21일에 배지 단독에 재플레이팅된 세포를 나타낸다. B) 확장 제21일 또는 제42일에 유세포 분석법에 의해서 결정된 바와 같은 G-CSFR ECD의 발현을 나타낸 그래프.

도 42는 형질도입되지 않은 세포와 비교하여 G2R-3을 발현하는 1차 인간 PBMC-유래 T 세포의 면역표현형 및 세포내 신호전달을 나타낸 그래프. A) 세포내 신호전달 사건을 평가하기 위한 웨스턴 블롯. 세포를 확장 검정으로부터 수거하고, IL-2(300IU/㎖) 또는 야생형 G-CSF(100ng/㎖)로 자극하였다. β-액틴은 단백질 로딩 대조군으로 제공된다. B, C) 확장 제42일에 형질도입되지 않은 세포와 비교하여 G2R-3을 발현하는 세포의 유세포 분석법에 의해서 평가된 면역표현형을 나타낸 대표적인 유세포 분석법 플롯 및 그래프.

도 43은 형질도입되지 않은 세포와 비교하여 304 또는 307 ECD를 갖는 G2R-3을 발현하는 1차 인간 PBMC-유래 T 세포의 배수 확장을 나타낸 그래프. A) T-세포 확장 검정의 결과를 나타낸 그래프, 여기서 세포에 G2R-3 304 ECD-암호화 렌티바이러스를 형질도입하였다. B) T-세포 확장 검정의 결과를 나타낸 그래프, 여기서 세포에 G2R-3 307 ECD-암호화 렌티바이러스를 형질도입하였다. C) 형질도입되지 않은 세포를 사용한 T-세포 확장 검정의 결과를 나타낸 그래프. 제2일에 IL-2(300IU/㎖), 304 G-CSF(100ng/㎖), 307 G-CSF(100ng/㎖) 또는 사이토카인 없음(배지 단독)을 배양물에 제시된 바와 같이 첨가하고, 그 후 2일마다 보충하였다. 살아있는 세포를 3 내지 4일마다 계수하였다. 다이아몬드는 304 G-CSF로 자극된 세포를 나타낸다. 사각형은 307 G-CSF로 자극된 세포를 나타낸다. 삼각형은 IL-2로 자극된 세포를 나타낸다. 역 삼각형은 사이토카인으로 자극되지 않은 세포를 나타낸다.

도 44는 형질도입되지 않은 세포와 비교하여 304 또는 307 ECD를 갖는 G2R-3을 발현하는 1차 인간 PBMC-유래 T 세포의 증식을 평가하기 위한 BrdU 혼입 검정의 결과를 나타낸 그래프. 세포에 G2R-3 304 ECD- 또는 307 ECD-암호화 렌티바이러스를 형질도입하고, 304 또는 307 G-CSF(100ng/㎖)에서 확장시켰다. 형질도입되지 않은 세포를

IL-2(300IU/㎖)에서 확장시켰다. 확장 제12일에, 세포를 세척하고, IL-2(300IU/㎖)에, 130 G-CSF(100ng/㎖)에, 304 G-CSF(100ng/㎖)에, 307 G-CSF(100ng/㎖)에 또는 사이토카인 없이 재플레이팅하였다

도 45는 제시된 키메라 수용체 작제물이 형질도입된 1차 뮤린 T 세포에서 유세포 분석법에 의한 G-CSFR ECD 발현을 나타낸 그래프.

도 46은 G21R-1 또는 G21R-2를 발현하는 1차 PBMC-유래 인간 T 세포에서 (유세포 분석법에 의해서 검출된) STAT3의 G-CSF-유도 인산화를 나타낸 도면. 세포를 G-CSFR-양성(상단 패널) 또는 G-CSFR-음성(하단 패널) 집단에 세분하였다(즉, 게이팅하였다).

도 47은 G21R-1 또는 G12R-1을 발현하는 1차 뮤린 T 세포에서 G-CSF-유도된 생화학적 신호전달 사건을 나타낸 그래프 및 영상. A) G21R-1이 형질도입되고 사이토카인 없이, IL-21로 또는 G-CSF로 자극된 CD4+ 또는 CD8+ 세포에서 STAT3의 인산화(유세포 분석법에 의해 검출됨)를 나타낸 그래프. B) 사이토카인 없이(흑색 원), IL-21로(사각형) 또는 WT G-CSF로(회색 원) 자극된 후 포스포-STAT3에 대해서 양성 염색된 세포의 백분율을 나타낸 그래프. 살아있는 세포를 CD8 또는 CD4 대해서 게이팅하고, 포스포-STAT3-양성 세포의 백분율을 각각의 집단에 대해서 나타낸다. C) G21R-1 또는 G12R-1을 발현하고, IL-21, IL-12 또는 WT G-CSF로 자극된 세포에서 제시된 사이토카인 신호전달 사건을 평가하기 위한 웨스턴 블롯. β-액틴 및 히스톤 H3은 단백질 로딩 대조군으로 제공된다.

도 48은 G2R-2, G2R-3, G7R-1, G21/7R-1 및 G27/2R-1을 발현하는 1차 뮤린 T 세포 또는 모의-형질도입된 T 세포에서 증식, G-CSFR ECD 발현 및 WT G-CSF-유도된 세포내 신호전달 사건을 나타낸 그래프 및 영상. A, B) T-세포 증식을 평가하기 위한 BrdU 혼입 검정의 결과를 나타낸 그래프. 세포를 수거하고, 세척하고, IL-2(300IU/㎖)에, 야생형 G-CSF(100ng/㎖)에 또는 사이토카인 없이 재플레이팅하였다 패널 A 및 B는 실험 반복이다. C) 제시된 키메라 수용체 작제물이 형질도입된 1차 뮤린 T 세포에서 유세포 분석법에 의한 G-CSFR ECD 발현을 나타낸 그래프. D) G2R-2, G2R-3, G7R-1, G21/7R-1 및 G27/2R-1을 발현하는 세포 또는 모의-형질도입된 T 세포에서 제시된 사이토카인 신호전달 사건을 평가하기 위한 웨스턴 블롯. 세포를 IL-2(300IU/㎖), IL-7(10ng/㎖), IL-21(10ng/㎖), IL-27(50ng/㎖) 또는 G-CSF(100ng/㎖)로 자극하였다. β-액틴 및 히스톤 H3은 단백질 로딩 대조군으로 제공된다.

도 49는 G21/2R-1, G12/2R-1 및 21/12/2R-1을 발현하는 1차 뮤린 T 세포 또는 모의-형질도입된 T 세포에서 증식, G-CSFR ECD 발현 및 G-CSF-유도된 생화학적 신호전달 사건을 나타낸 그래프 및 영상. A, B) T-세포 증식을 평가하기 위한 BrdU 혼입 검정의 결과를 나타낸 그래프. 세포를 수거하고, 세척하고, IL-2(300IU/㎖)에, 야생형 G-CSF(100ng/㎖)에 또는 사이토카인 없이 재플레이팅하였다 패널 A 및 B는 실험 반복이다. C) 제시된 키메라 수용체 작제물이 형질도입된 1차 뮤린 T 세포에서 유세포 분석법에 의한 G-CSFR ECD 발현을 나타낸 그래프. D) G21/2R-1, G12/2R-1 및 G21/12/2R-1을 발현하는 세포 또는 모의-형질도입된 T 세포에서 제시된 사이토카인 신호전달 사건을 평가하기 위한 웨스턴 블롯. 세포를 IL-2(300IU/㎖), IL-21(10ng/㎖), IL-12(10ng/㎖) 또는 G-CSF(100ng/㎖)로 자극하였다. β-액틴 및 히스톤 H3은 단백질 로딩 대조군으로 제공된다.

도 50은 형질도입되지 않은 세포와 비교하여 134 ECD를 갖는 G12/2R-1을 발현하는 1차 인간 PBMC-유래 T 세포의 배수 확장 및 G-CSFR ECD 발현을 나타낸 그래프. A) T-세포 확장 검정의 결과를 나타낸 그래프, 여기서 세포에 G12/2R-1 134 ECD를 암호화하는 렌티바이러스를 형질도입하고, IL-2(300IU/㎖), 130 G-CSF(100ng/㎖) 또는 배지에서 확장시켰다. 살아있는 세포를 4 내지 5일마다 계수하였다. 사각형은 사이토카인으로 자극되지 않은 세포를 나타낸다. 삼각형은 130 G-CSF로 자극된 세포를 나타낸다. 다이아몬드는 IL-2로 자극된 세포를 나타낸다. B) T-세포 확장 검정의 결과를 나타낸 그래프, 여기서 세포에 패널 A에서와 같이 형질도입하였다. 확장 제19일에, 세포를 세척하고, IL-2, 130 G-CSF 또는 배지 단독에 재플레이팅하였다. 살아있는 세포를 4 내지 5일마다 계수하였다. 사각형은 사이토카인으로 자극되지 않은 세포를 나타낸다. 밝은 회색 다이아몬드는 130 G-CSF로 자극된 세포를 나타낸다. 암회색 다이아몬드는 IL-2로 자극된 세포를 나타낸다. 밝은 회색 역삼각형은 먼저 IL-2로 자극되고, 그 다음 제19일에 배지 단독에 재플레이팅된 세포를 나타낸다. 암회색 삼각형은 먼저 130 G-CSF로 자극되고, 그 다음 제19일에 배지 단독에 재플레이팅된 세포를 나타낸다. C) 확장 제4일 또는 제16일에 유세포 분석법에 의해서 결정된 바와 같은 G-CSFR ECD의 발현을 나타낸 그래프.

도 51은 형질도입되지 않은 세포와 비교하여 G12/2R-1 134 ECD를 발현하는 1차 인간 PBMC-유래 T 세포의 증식 및 면역표현형을 나타낸 그래프. A) T-세포 증식을 평가하기 위한 BrdU 혼입 검정의 결과를 나타낸 그래프. 세포를 수거하고, 세척하고, IL-2(300IU/㎖), IL-2+IL-12(각각 300IU/㎖ 및 10ng/㎖), 130 G-CSF(300ng/㎖) 또는 배지 단독에 재플레이팅하였다. B, C) 확장 제16일에 형질도입되지 않은 세포와 비교하여 134 ECD를 갖는

G12/2R-1을 발현하는 세포의 유세포 분석법에 의해서 평가된 면역표현형을 나타낸 대표적인 유세포 분석법 플롯 및 그래프.

도 52는 형질도입되지 않은 세포와 비교하여 304 ECD를 갖는 G12/2R-1을 발현하는 1차 인간 PBMC-유래 T 세포의 배수 확장 및 증식을 나타낸 그래프. A) T-세포 확장 검정의 결과를 나타낸 그래프, 여기서 세포에 G12/2R-1 134 ECD를 암호화하는 렌티바이러스를 형질도입하고, IL-2(300IU/mℓ), 130 G-CSF(100ng/mℓ), 304 G-CSF(100ng/mℓ) 또는 배지 단독에서 확장시켰다. 형질도입되지 않은 세포를 IL-2, 130 G-CSF, 304 G-CSF 또는 배지 단독에서 배양하였다. 살아있는 세포를 3 내지 4일마다 계수하였다. 역 삼각형은 사이토카인으로 자극되지 않은 세포를 나타낸다. 삼각형은 IL-2로 자극된 세포를 나타낸다. 삼각형은 130 G-CSF로 자극된 세포를 나타낸다. 다이아몬드는 304 G-CSF로 자극된 세포를 나타낸다. B) 제12일에 세포를 확장 검정으로부터 수거하고, 세척하고, IL-2(300IU/mℓ)에, 130 G-CSF(300ng/mℓ)에, 304 G-CSF(100ng/mℓ)에, 307 G-CSF(100ng/mℓ)에 또는 배지 단독에 재플레이팅하였다.

도 53은 304 ECD를 갖는 G2R-3 또는 304 ECD를 갖는 G12/2R-1을 발현하는 1차 PBMC-유래 T 세포 또는 형질도입되지 않은 T 세포에서 제시된 사이토카인 신호전달 사건을 검출하기 위한 웨스턴 블롯. 세포를 확장 검정으로부터 수거하고, 제시된 바와 같이 304 G-CSF(100ng/mℓ), IL-2(300IU/mℓ), IL-2 및 IL-12(10ng/mℓ) 또는 배지 단독으로 자극하였다. 우측의 검은색 화살표와 작은 노출된 패널은 단백질 사다리에서 115kDa 및 140kDa의 분자량 마커를 나타낸다. β-액틴 및 히스톤 H3은 단백질 로딩 대조군으로 제공된다.

도 54는 리폴딩된 130a1 G-CSF(GCSF_130a1로 표지됨) 및 쿠마시 블루로 염색된 상응하는 SDS PAGE 순도 겔의 크기 배제 UV 흔적을 도시한 도면. 알려진 분자량의 표준에 비해 예측된 부피에서 용리된 리폴딩된 130a1 G-CSF.

도 55는 (A, B, C) 야생형(WT) 인간 G-CSFR을 자연적으로 발현하는 OCI-AML1 세포, 또는 (D, E) WT 뮤린 G-CSFR을 자연적으로 발현하는 32D 클론 3개의 세포의 증식을 평가하기 위한 BrdU 혼입 검정의 결과를 제시한 도면. 세포를 다음 사이토카인으로 자극하였다: (A) WT G-CSF 또는 G-CSF 변이체 130, 130a1, 130b1, 130a2 또는 130b2; (B) WT G-CSF 또는 G-CSF 변이체 130, 130a1 또는 130b1 또는 배지 단독(사이토카인 첨가하지 않음); (C) WT G-CSF 또는 G-CSF 변이체 130, 130a1 또는 130a1b1 또는 배지 단독; (D) WT G-CSF 또는 G-CSF 변이체 130, 130a1 또는 130b1 또는 배지 단독; 및 (E) WT G-CSF 또는 G-CSF 변이체 130, 130a1 또는 130a1b1 또는 배지 단독. 실선 사각형은 WT G-CSF를 나타내고; 실선 삼각형은 130 G-CSF를 나타내고; 채워진 역삼각형은 130a1 G-CSF를 나타내고; 빈 원은 130a2 G-CSF를 나타내고; 채워진 다이아몬드는 130b1 G-CSF를 나타내고; 빈 사각형은 130bd G-CSF를 나타내고; 빈 다이아몬드는 130a1b1 G-CSF를 나타낸다.

도 56은 G12/2R-1 134 ECD를 발현하는 PBMC-유래 인간 T 세포의 증식을 평가하기 위한 BrdU 혼입 검정의 결과를 제시한 도면. 세포를 (A) 배지 단독 또는 배지+ IL-2, IL-2+IL-12 또는 G-CSF 변이체 130, 130a1, 130b1, 130a2 또는 130b2; 또는 (B) 배지 단독 또는 배지+IL-2, IL-2+IL-12 또는 G-CSF 변이체 130 또는 130a1b1로 자극하였다. 결과를 G12/2R-1 134 ECD를 발현하는 T 세포(즉, 유세포 분석법에 의해 G-CSFR+인 T 세포)에 대해 나타낸다.

도 57은 G2R-3 134 ECD를 발현하도록 레트로바이러스가 형질도입되고, 그 다음 확립된 유방 종양(NOP23 종양주)을 보유한 동계 면역 적격 마우스에 주입된 종양 특이적 CD8 T 세포(Thy1.1+ OT-I T 세포)를 이용한 입양 세포 요법의 안전성 및 효능을 결정하기 위한 생체내 실험의 결과를 제시한 도면. T 세포 주입일(제0일)에서 시작하여, 마우스를 무작위 배정하고, 14일 동안 매일 비히클(n = 4마리) 또는 130a1 G-CSF(10㎍/용량; n=4마리)로 치료한 후, 14일 동안 격일로 총 21회 투여한다. (A) 제-2일부터 제80일까지의 종양 면적(길이 x 너비). 각각의 선은 개별 동물로부터의 결과를 나타낸다. (B) 제-2일부터 제20일까지 종양 영역에 대한 고해상도 뷰. (C) 제0일부터 제80일까지 동물의 백분율을 나타낸 Kaplan-Meier 플롯. (D) 모든 CD8+ T 세포에 대한 Thy1.1+(OT-I) 세포의 평균 백분율(평균 +/- SEM)로서 나타낸 말초 혈액에서 OT-I T 세포의 확장. (E) 말초 혈액에서 모든 CD45+ 세포에 대한 호중구의 백분율(평균 +/- SEM). (F) 말초 혈액에서 모든 CD45+ 세포에 대한 호산구의 백분율(평균 +/- SEM). (G) 말초 혈액에서 모든 CD45+ 세포에 대한 단핵구의 백분율(평균 +/- SEM). 회색 원은 비히클 처리된 동물을 나타내고 검은색 삼각형은 130a1 G-CSF 처리된 동물을 나타낸다.

도 58은 G12/2R-1 134 ECD를 발현하도록 레트로바이러스가 형질도입되고, 그 다음 확립된 유방 종양(NOP23 종양주)을 보유한 동계 면역 적격 마우스에 주입된 종양 특이적 CD8 T 세포(Thy1.1+ OT-I T 세포)를 이용한 입양 세포 요법의 안전성 및 효능을 결정하기 위한 생체내 실험의 결과를 제시한 도면. T 세포 주입일(제0일)에서 시작하여, 마우스를 무작위 배정하고, 14일 동안 매일 비히클(n = 4마리 동물) 또는 130a1 G-CSF(10㎍/용량; n=3마

리 동물)로 치료한 후, 14일 동안 격일로 총 21회 투여한다. (A) 제-2일부터 제80일까지의 종양 면적(길이 x 너비). 각각의 선은 개별 동물로부터의 결과를 나타낸다. (B) 제-2일부터 제20일까지 종양 영역에 대한 고해상도 뷰. (C) 제0일부터 제80일까지 동물의 백분율을 나타낸 Kaplan-Meier 플롯. (D) 모든 CD8+ T 세포에 대한 Thy1.1+(OT-I) 세포의 평균 백분율(평균 +/- SEM)로서 나타낸 말초 혈액에서 OT-I T 세포의 확장. (E) 말초 혈액에서 모든 CD45+ 세포에 대한 호중구의 백분율(평균 +/- SEM). (F) 말초 혈액에서 모든 CD45+ 세포에 대한 호산구의 백분율(평균 +/- SEM). (G) 말초 혈액에서 모든 CD45+ 세포에 대한 단핵구의 백분율(평균 +/- SEM). 회색 원은 비히클 처리된 동물을 나타내고 검은색 삼각형은 130a1 G-CSF 처리된 동물을 나타낸다.

도 59는 도 4 및 도 5에 도시된 실험으로부터의 3개 대조군에 대한 결과를 제시한 도면. 종양-특이적 CD8 T 세포(Thy1.1+ OT-I T 세포)는 모의 레트로바이러스 형질도입 절차를 겪은 후 확립된 유방 종양(NOP23 종양주)을 보유하는 동계 면역 적격 마우스에게 주입되었다. T 세포 주입일(제0일)에서 시작하여, 마우스를 무작위 배정하고, 14일 동안 매일 비히클(n = 4마리 동물), IL-2(30,000IU/용량; n=5마리 동물) 또는 130a1(10㎍/용량; n=5마리 동물)로 치료한 후, 14일 동안 격일로 총 21회 투여한다. (A) 제-2일부터 제80일까지의 종양 면적(길이 x 너비). 각각의 선은 개별 동물로부터의 결과를 나타낸다. (B) 제-2일부터 제20일까지 종양 영역에 대한 고해상도 뷰. (C) 제0일부터 제80일까지 동물의 백분율을 나타낸 Kaplan-Meier 플롯. (D) 모든 CD8+ T 세포에 대한 Thy1.1+(OT-I) 세포의 평균 백분율(평균 +/- SEM)로서 나타낸 말초 혈액에서 OT-I T 세포의 확장. (E) 말초 혈액에서 모든 CD45+ 세포에 대한 호중구의 백분율(평균 +/- SEM). (F) 말초 혈액에서 모든 CD45+ 세포에 대한 호산구의 백분율(평균 +/- SEM). (G) 말초 혈액에서 모든 CD45+ 세포에 대한 단핵구의 백분율(평균 +/- SEM). 회색 원은 비히클 처리된 동물을 나타내고; 회색 사각형은 IL-2-처리된 동물을 나타내고; 검은색 삼각형은 130a1 G-CSF 처리된 동물을 나타낸다.

도 60은 야생형 사이토카인 수용체 소단위 및 추가적인 키메라 수용체 설계의 개략도.

도 61은 G4R 134 ECD가 형질도입된 인간 PBMC-유래 CD3+ T 세포 상에서의 G-CSFR 134 ECD의 세포 표면 발현을 나타낸 유세포 분석법 데이터. 형질도입되지 않은 T 세포를 음성 대조군으로 제공하였다.

도 62는 (A) 배지 단독 또는 배지+IL-2, 130a1 G-CSF 또는 130a1 G-CSF+IL-2와 함께 배양된 G4R 134 ECD를 발현하는 인간 PBMC-유래 T 세포의 확장(세포 수의 배수 변화)을 나타낸 그래프. (B) 배지 단독 또는 배지+IL-2 또는 130a1 G-CSF+307 G-CSF와 함께 배양된 형질도입되지 않은 T 세포에 대한 결과. 307 G-CSF 변이체는 이 실험의 또 다른 아암에 대한 대조군 역할을 하기 위해 후자의 조건에 포함되었고(표시되지 않음); 본 발명자들은 130a1 G-CSF 및 307 G-CSF 모두 형질도입되지 않은 T 세포의 증식을 유도하지 않는다는 것을 이전에 확립하고 본 명세서에서 확인하였다. 다이아몬드는 130a1 G-CSF(패널 A) 또는 130a1 G-CSF+307 G-CSF(패널 B)과 함께 배양된 세포를 나타낸다. 삼각형은 IL-2와 함께 배양된 세포를 나타낸다. 밝은 회색 원은 130a1 G-CSF 및 IL-2와 함께 배양된 세포를 나타낸다. 검은색 원은 배지 단독(사이토카인 첨가하지 않음)으로 배양된 세포를 나타낸다.

도 63은 (A) G4R 134 ECD 대 (B) 형질도입되지 않은 T 세포를 발현하는 1차 인간 T 세포의 증식을 평가하기 위한 BrdU 혼입 검정의 결과를 나타낸 그래프. 세포를 배지 단독, IL-2, IL-4, IL2+IL-4, 130a1 G-CSF 또는 130a1 G-CSF+IL-2로 자극하였다. 데이터를 CD4+ 및 CD8+ T 세포 하위세트에 대해 별도로 나타낸다. 패널 A의 데이터는 G4R 134 ECD(인간 G-CSFR에 대한 항체를 사용하여 검출됨)를 발현하는 T 세포에 대해 게이팅된다.

도 64는 G4R 134 ECD를 발현하는 인간 PBMC-유래 T 세포 대 형질도입되지 않은 세포에서 제시된 생화학적 신호 전달 사건을 검출하기 위한 웨스턴 블롯. 세포를 IL-2, IL-4 또는 130a1 G-CSF로 자극하였다. β-액틴 및 히스톤 H3은 단백질 로딩 대조군으로 제공되었다.

도 65는 G6R 134 ECD를 암호화하는 렌티바이러스가 형질도입된 인간 PBMC-유래 CD3+ T 세포 상에서의 G-CSFR 134 ECD의 세포 표면 발현을 나타낸 유세포 분석법 데이터. 형질도입되지 않은 T 세포를 음성 대조군으로 제공하였다.

도 66은 (A) 배지 단독 또는 배지와 IL-2, 130a1 G-CSF 또는 130a1 G-CSF + IL-2와 함께 배양된 G6R 134 ECD 또는 (B) 형질도입되지 않은 T 세포를 발현하는 인간 PBMC-유래 T 세포의 확장(세포 수의 배수 변화)을 나타낸 그래프. 다이아몬드는 130a1 G-CSF로 자극된 세포를 나타낸다. 삼각형은 IL-2로 자극된 세포를 나타낸다. 밝은 회색 원은 130a1 G-CSF + IL-2로 자극된 세포를 나타낸다. 검은색 원은 배지 단독(사이토카인 첨가하지 않음)으로 자극된 세포를 나타낸다.

도 67은 (B) 형질도입되지 않은 T 세포와 비교하여 (A) G6R 134 ECD를 발현하는 PBMC 유래 인간 T 세포의 증식을 평가하기 위한 BrdU 혼입 검정의 결과를 나타낸 그래프. 세포를 배지 단독 또는 배지와 IL-2, IL-6, IL-

2+IL-6, 130a1 G-CSF 또는 130a1 G-CSF+IL-2로 자극하였다. 데이터를 CD4+ 및 CD8+ T 세포 하위세트에 대해 별도로 나타낸다. 패널 A의 데이터는 G4R 134 ECD(인간 G-CSFR에 대한 항체를 사용하여 검출됨)를 발현하는 T 세포에 대해 게이팅되었다.

도 68은 G6R 134 ECD를 발현하는 인간 PBMC-유래 T 세포 대 형질도입되지 않은 세포에서 제시된 생화학적 신호전달 사건을 검출하기 위한 웨스턴 블롯. 세포를 IL-2, IL-6 또는 130a1 G-CSF로 자극하였다. 히스톤 H3은 단백질 로딩 대조군으로 제공되었다. P-STAT3 영상에서 어둡고 더 높은 분자 밴드가 IL-2 자극 조건(특히 형질도입되지 않은 T 세포)에 나타난다는 것을 주목해야 한다. 이는 포스포-STAT5 항체를 사용하여 이 막을 이전에 프로빙한 결과 남은 신호이다. 저분자량 밴드(화살표)는 포스포-STAT3을 나타낸다.

도 69는 GEPOR 134 ECD가 형질도입된 인간 PBMC-유래 CD3+ T 세포 상에서의 G-CSFR 134 ECD의 세포 표면 발현을 나타낸 유세포 분석법 데이터. 형질도입되지 않은 T 세포를 음성 대조군으로 제공하였다.

도 70은 (A) 배지 단독 또는 배지와 IL-2, 130a1 G-CSF, 또는 130a1 G-CSF+IL-2와 함께 배양된 GEPOR 134 ECD 또는 (B) 형질도입되지 않은 T 세포를 발현하는 1차 인간 PBMC-유래 T 세포의 확장(세포 수의 배수 변화)을 나타낸 그래프. 형질도입되지 않은 T 세포의 경우, 307 G-CSF를 이 실험의 또 다른 아암에 대한 대조군 역할을 하기 위해 130a1 G-CSF 조건에 첨가하였고(표시되지 않음); 본 발명자들은 130a1 G-CSF 및 307 G-CSF 모두 형질도입되지 않은 T 세포의 증식을 유도하지 않는다는 것을 이전에 확립하고 본 명세서에서 확인하였다. 다이아몬드는 130a1 G-CSF +/- 307 G-CSF에서 배양된 세포를 나타낸다. 삼각형은 IL-2에서 배양된 세포를 나타낸다. 밝은 회색 원은 130a1 G-CSF+IL-2에서 배양된 세포를 나타낸다. 검은색 원은 배지 단독에서 배양된 세포를 나타낸다.

도 71은 GEPOR 134 ECD를 발현하는 인간 PBMC-유래 T 세포 대 형질도입되지 않은 세포에서 제시된 생화학적 신호전달 사건을 검출하기 위한 웨스턴 블롯. 세포를 배지 단독으로 또는 배지+IL-2 또는 130a1 G-CSF로 자극하였다. β-액틴 및 히스톤 H3은 단백질 로딩 대조군으로 제공되었다.

도 72는 GIFNAR 134 ECD가 형질도입된 인간 PBMC-유래 CD3+ T 세포 상에서의 G-CSFR 134 ECD의 세포 표면 발현을 나타낸 유세포 분석법 데이터. 형질도입되지 않은 T 세포를 음성 대조군으로 제공하였다.

도 73은 (A) 형질도입되지 않거나 또는 (B) GIFNAR 134 ECD를 발현하도록 형질도입되고 배지 단독 또는 배지와 IL-2, 130a1 G-CSF 또는 130a1 G-CSF+IL-2에서 배양된 1차 인간 PBMC-유래 T 세포의 확장(세포 수의 배수 변화)을 나타낸 그래프. 다이아몬드는 130a1 G-CSF에서 배양된 세포를 나타낸다. 삼각형은 IL-2에서 배양된 세포를 나타낸다. 밝은 회색 원은 130a1 G-CSF+IL-2에서 배양된 세포를 나타낸다. 검은색 원은 배지 단독에서 배양된 세포를 나타낸다.

도 74는 GIFNAR 134 ECD를 발현하는 인간 PBMC-유래 T 세포 대 형질도입되지 않은 세포에서 제시된 생화학적 신호전달 사건을 검출하기 위한 웨스턴 블롯. 세포를 배지 단독으로 또는 배지+IL-2, IFNα 또는 130a1 G-CSF로 자극하였다. β-액틴 및 히스톤 H3은 단백질 로딩 대조군으로 제공되었다.

도 75는 (A) GIFNGR-1 307 ECD, (B) G2R3 134 ECD, (C) GIFNGR-1 307 ECD 및 G2R3 134 ECD가 형질도입된 인간 PBMC-유래 T 세포 또는 (D) 형질도입되지 않은 T 세포의 표면 상에서 Myc-태그 및 Flag-태그 발현을 나타낸 유세포 분석 데이터. G2R3 134 ECD를 Myc 에피토프(EQKLISEEDL)를 사용하여 이의 N-말단에 태깅하고, GIFNGR-1 307 ECD를 Flag 에피토프(DYKDDDDK)를 사용하여 이의 N-말단에 태깅하였고; 이러한 에피토프 태그는 유세포 분석법에 의한 검출을 도우며, 수용체의 기능에 영향을 미치지 않는다. 플롯을 CD3+ 세포에 대해서 게이팅하였다.

도 76은 (A) GIFNGR-2 307 ECD, (B) G2R3 134 ECD, (C) GIFNGR-2 307 ECD 및 G2R3 134 ECD가 형질도입된 인간 PBMC-유래 T 세포 또는 (D) 형질도입되지 않은 T 세포의 표면 상에서 Myc-태그 및 Flag-태그 발현을 나타낸 유세포 분석 데이터. G2R3 134 ECD를 Myc 에피토프(EQKLISEEDL)를 사용하여 이의 N-말단에 태깅하고, GIFNGR-2 307 ECD를 Flag 에피토프(DYKDDDDK)를 사용하여 이의 N-말단에 태깅하였고; 이러한 에피토프 태그는 유세포 분석법에 의한 검출을 도우며, 수용체의 기능에 영향을 미치지 않는다. 플롯을 CD3+ 세포에 대해서 게이팅하였다.

도 77은 (A) 형질도입되지 않은, (B) GIFNGR-1 307 ECD를 발현하도록 형질도입된 또는 (C) GIFNGR-1 307 ECD 및 G2R-3 134 ECD를 발현하도록 공동 형질도입된 1차 인간 PBMC-유래 T 세포의 확장(세포 수의 배수 변화)을 나타낸 그래프. T 세포를 IL-2, 130a1 G-CSF 및 307 G-CSF의 제시된 조합과 함께 배지 단독 또는 배지에서 배양하였다. 다이아몬드 및 밝은 회색 원은 제시된 130a1 G-CSF, 307 G-CSF 및 IL-2의 조합에서 배양된 세포를 나타낸다. 삼각형은 IL-2에서 배양된 세포를 나타낸다. 검은색 원은 배지 단독에서 배양된 세포를 나타낸다.

도 78은 (A) 형질도입되지 않은, (B) GIFNGR-2 307 ECD를 발현하도록 형질도입된 또는 (C) GIFNGR-2 307 ECD 및 G2R-3 134 ECD를 발현하도록 공동 형질도입된 1차 인간 PBMC-유래 T 세포의 확장(세포 수의 배수 변화)을 나타낸 그래프. T 세포를 IL-2, 130a1 G-CSF 및 307 G-CSF의 제시된 조합과 함께 배지 단독 또는 배지에서 배양하였다. 다이아몬드 및 밝은 회색 원은 제시된 130a1 G-CSF, 307 G-CSF 및 IL-2의 조합에서 배양된 세포를 나타낸다. 삼각형은 IL-2에서 배양된 세포를 나타낸다. 검은색 원은 배지 단독에서 배양된 세포를 나타낸다.

도 79는 G2R-3 134 ECD 및/또는 GIFNGR-1 307 ECD를 발현하는 인간 PBMC-유래 T 세포의 증식을 평가하기 위한 BrdU 혼입 검정의 결과를 나타낸 그래프. (A) 형질도입되지 않은 T 세포 또는 (B) 제시된 키메라 수용체를 발현하는 CD4+ 및 (C) CD8+ T 세포(X-축 참조)에 대한 데이터를 나타낸다. IL-2, IFNɣ, 130a1 G-CSF, 307 G-CSF의 제시된 조합 또는 배지 단독으로 세포를 자극하였다.

도 80은 G2R-3 134 ECD 및/또는 GIFNGR-2 307 ECD를 발현하는 인간 PBMC-유래 T 세포의 증식을 평가하기 위한 BrdU 혼입 검정의 결과를 나타낸 그래프. (A) 형질도입되지 않은 T 세포 또는 (B) 제시된 키메라 수용체를 발현하는 CD4+ 및 (C) CD8+ T 세포(X-축 참조)에 대한 데이터를 나타낸다. IL-2, IFNɣ, 130a1 G-CSF, 307 G-CSF의 제시된 조합 또는 배지 단독으로 세포를 자극하였다.

도 81은 GIFNGR-1 307 ECD 또는 GIFNGR-2 307 ECD를 발현하는 인간 PBMC-유래 T 세포 대 형질도입되지 않은 세포에서 제시된 생화학적 신호전달 사건을 검출하기 위한 웨스턴 블롯. 세포를 배지 단독으로 또는 배지+IL-2, IFNɣ 또는 307 G-CSF로 자극하였다. β-액틴 및 히스톤 H3은 단백질 로딩 대조군으로 제공되었다.

도 82는 다음 일시스트론성 또는 이시스트론성 렌티바이러스 작제물이 형질도입된 인간 PBMC-유래 CD3+ T 세포에서 G2R-3 134 ECD 및 메소텔린 특이적 CAR의 세포 표면 발현을 도시한 세포 분석 데이터: (A) 형질도입되지 않은 T 세포(음성대조군); (B) 메소텔린 CAR 단독; (C) G2R-3 134 ECD 단독; (D) CAR_T2A_G2R-3-134 ECD, 이것은 다음 순서로 유전자 분절을 가짐: 메소텔린 CAR, T2A 부위 및 G2R-3 134 ECD; 및 (E) G2R-3-134 ECD_T2A_CAR, 이것은 다음 순서로 유전자 분절을 가짐: 메소텔린 CAR, T2A 부위 및 G2R-3 134 ECD.

도 83은 다음 일시스트론성 또는 이시스트론성 렌티바이러스 작제물이 형질도입된 인간 PBMC-유래 CD3+ T 세포에서 G12/2R-1 134 ECD 및 메소텔린 특이적 CAR의 세포 표면 발현을 도시한 세포 분석 데이터: (A) 형질도입되지 않은 T 세포(음성대조군); (B) 메소텔린 CAR 단독; (C) G2R-3 134 ECD 단독; (D) CAR_T2A_G12/2R-1-134 ECD, 이것은 다음 순서로 유전자 분절을 가짐: 메소텔린 CAR, T2A 부위 및 G12/2R-1 134 ECD; 및 (E) G12/2R-1-134 ECD_T2A_CAR, 이것은 다음 순서로 유전자 분절을 가짐: 메소텔린 CAR, T2A 부위 및 G12/2R-1 134 ECD.

도 84는 다음과 같이 변형된 PBMC-유래 인간 T 세포의 증식을 평가하기 위한 BrdU 혼입 검정의 결과를 제시한 도면. (A) 형질도입되지 않은 또는 메소텔린 CAR 단독을 발현하는; 또는 (B) G2R3 134 ECD, 또는 이시스트론성 CAR_T2A_G2R3-134 ECD 또는 이시스트론성 CAR_T2A_G12/2R-1-134 ECD 또는 이시스트론성 G12/2R-1-134ECD_T2A_CAR 작제물 발현. 세포를 배지 단독으로 또는 배지+IL-2 또는 130a1 G-CSF로 자극하였다. 패널 B의 결과를 유세포 분석법에 의한 G-CSFR ECD 발현에 대해서 양성인 T 세포에 대해서 나타낸다.

도 85는 (A) 메소텔린 CAR 단독; (B) G12/2R-1 134 ECD 단독, 또는 메소텔린 CAR을 함유하는 다음 이시스트론성 작제물: (C) CAR_T2A_G2R3-134 ECD, (D) G2R3-134 ECD_T2A_CAR, (E) CAR_T2A_G12/2R-1-134 ECD 또는 (F) G12/2R-1-134ECD_T2A_CAR을 발현하는 PBMC-유래 인간 CD4+ T 세포에서 메소텔린 CAR의 기능성 특성을 평가하기 위한 시험관내 공배양 검정의 결과를 나타낸 도면. 세포를 자극하지 않은 상태로 두거나 OVCAR3 세포로 13시간 동안 자극한 후 세포내 유세포 분석법에 의해서 사이토카인 IFNɣ, TNFα 및 IL-2뿐만 아니라 표면 분자 CD69 및 CD137의 발현을 검출하였다. 패널 A, C, D, E 및 F의 결과를 메소텔린 CAR을 발현하는 세포에 대해 게이팅한다.

도 86은 IL-7Rα, IL-2Rβ, gp130, IL-21R, IL-12Rβ2 및 IL-4Rα를 포함하는 천연 사이토카인 수용체의 개략도.

도 87은 7/2R-1, 7/2R-2, 7/2/12R-1, 7/2/12R-2, 7/21R-1, 7/21R-2, 7/7/21R-1, 7/7/21R-2, 7/2/21R-1, 7/2/21R-27/2/12/21R-1, 7/2/12/21R-2, 7/2/12/21R-3, 7/2/12/21R-4, 7/4R-1, 7/4R-2, 7/6R-1 및 7/6R-2 수용체 소단위 설계의 개략도.

도 88은 (A) 7/2R-1이 형질도입된 1차 인간 PBMC-유래 T 세포, (B) 형질도입되지 않은 T 세포, 또는 (C) 7/2R-1이 형질도입되지만 형광-마이너스-원(FMO) 대조군(즉, CD127에 대한 항체는 항체 염색 패널에서 제외됨)으로서 염색된 T 세포에서 유세포 분석법에 의해서 평가된 인간 CD127(IL-7Rα) 및 Flag-태그 발현을 나타낸 그래프.

7/2R-1을 Flag 에피토프를 사용하여 N-말단에서 태깅하였고; 에피토프 태그는 유세포 분석법에 의한 검출을 돕고 수용체 기능에 영향을 주지 않는다. 렌티바이러스 형질도입 12일 후에 수용체 발현을 분석하였다.

도 89는 IL-7, IL-7+IL-15 또는 사이토카인 없이 배양된 (A) 7/2R-1을 발현하는 1차 인간 PBMC 유래 T 세포 대 (B) 형질도입되지 않은 T 세포의 확장(세포 수의 배수 변화)을 나타낸 그래프. 다이아몬드는 IL-7로 자극된 세포를 나타낸다. 삼각형은 IL-7 및 IL-15로 자극된 세포를 나타낸다. 원은 배지 단독(사이토카인 첨가되지 않음)에서 배양된 세포를 나타낸다.

도 90은 (A) 7/2R-1 대 (B) 형질도입되지 않은 T 세포를 발현하는 1차 인간 T 세포의 증식을 평가하기 위한 BrdU 혼입 검정의 결과를 나타낸 그래프. 세포를 IL-7, IL-2, IL-2+IL-7 또는 배지 단독(사이토카인 첨가되지 않음)으로 자극하였다. 결과를 CD4+ 및 CD8+ T 세포 하위세트에 대해 별도로 나타낸다.

도 91은 형질도입되지 않은 T 세포와 비교하여 7/2R-1를 발현하는 인간 1차 T 세포에서 제시된 사이토카인 신호전달 사건을 검출하기 위한 웨스턴 블롯. β-액틴 및 히스톤 H3을 단백질 로딩 대조군으로 제공한다. 세포를 IL-7, IL-2, IL-2+IL-7 또는 배지 단독(사이토카인 첨가되지 않음)으로 자극하였다.

도 92는 변형되지 않은 130a1 G-CSF 및 130a1 G-CSF(PEG20k_G-CSF_130a1) 및 307 G-CSF(PEG20k_G-CSF_307)의 페길화된 형태를 검출하기 위한 SDS-PAGE 겔을 도시한 도면. 겔을 쿠마시 브릴리언트 블루로 염색하였다.

도 93은 G4R 134 ECD를 발현하도록 레트로바이러스가 형질도입되고, 그 다음 확립된 유방 종양(NOP23 종양주)을 보유한 동계 면역 적격 마우스에 주입된 종양 특이적 CD8 T 세포(Thy1.1+ OT-I T 세포)를 이용한 입양 세포 요법의 안전성 및 효능을 결정하기 위한 생체내 실험의 결과를 제시한 도면. T 세포 주입일(제0일)에서 시작하여, 마우스를 무작위 배정하고, 14일 동안 매일 비히클(n = 3마리 동물) 또는 130a1 G-CSF(10㎍/용량; n=3마리 동물)로 치료한 후, 14일 동안 격일로 총 21회 투여한다. (A) 제0일부터 제46일까지의 종양 면적(길이 x 너비). 각각의 선은 개별 동물로부터의 결과를 나타낸다. (B) 모든 CD8+ T 세포에 대한 Thy1.1+(OT-I) 세포의 평균 백분율(평균 +/- 표준 편차[SD]로서 나타낸 말초 혈액에서 OT-I T 세포의 확장. (C) T 효과기 기억(Tem; CD44+ CD62L-) 표현형을 나타낸 OT-I T 세포(Thy1.1+)의 백분율(평균 +/- SD). (D) Tem 표현형을 나타낸 숙주(Thy1.1-) CD8+ T 세포의 백분율(평균 +/- SD). (E) 예정사-1(PD-1)을 발현한 OT-I T 세포(Thy1.1+)의 백분율(평균 +/- SD). (F) PD-1을 발현한 숙주(Thy1.1-) CD8+ T 세포의 백분율(평균 +/- SD). (G) 말초 혈액에서 모든 CD45+ 세포에 대한 숙주(Thy1.1-) CD3+ T 세포의 백분율(평균 +/- SD). (H) 말초 혈액에서 모든 CD45+ 세포에 대한 숙주(Thy1.1-) CD19+ B 세포의 백분율(평균 +/- SD). 회색 원은 비히클 처리된 동물을 나타내고 검은색 삼각형은 130a1 G-CSF 처리된 동물을 나타낸다.

도 94는 G2R-3 134 ECD 또는 천연 G-CSF 수용체를 발현하는 세포의 증식을 자극하는 능력에 대해 페길화된 버전과 페길화된 버전의 G-CSF(야생형, 130a1 및 307)를 비교하기 위한 시험관내 실험의 결과를 나타낸 도면. 데이터는 중복 웰의 평균 및 표준 편차로 표시된다. (A) G2R-3 134 ECD를 발현하는 인간 PBMC-유래 CD4 및 CD8 T 세포를 제시된 사이토카인으로 자극하였다: 인간 IL-2(프로류킨(Proleukin), 300IU/㎖, 양성 대조군), 배지 단독 (음성 대조군) 또는 제시된 농도의 야생형 G-CSF, 페길화된 야생형 G-CSF, 130a1 G-CSF 또는 페길화된 130a1 G-CSF. 세포를 48시간 동안 배양하고 BrdU 혼입 검정으로 평가하였다. 결과를 인간 G-CSFR에 대해 양성인 T 세포에 대해서 제시한다. (B) 야생형 인간 G-CSF 수용체를 자연적으로 발현하는 인간 골수 세포주 OCI-AML-1을 사용하여 유사한 실험을 수행하였다. 세포를 제시된 사이토카인으로 자극하였다: 인간 GM-CSF(20ng/㎖, 양성 대조군), 배지 단독 (음성 대조군) 또는 제시된 농도의 야생형 G-CSF, 페길화된 야생형 G-CSF, 130a1 G-CSF, 페길화된 130a1 G-CSF, 307 G-CSF 또는 페길화된 307 G-CSF. 세포를 48시간 동안 배양하고 BrdU 혼입 검정으로 평가하였다.

도 95는 G2R-3 134 ECD를 발현하는 인간-PBMC 유래 T 세포에서 제시된 생화학적 신호전달 사건을 유도하는 130a1 G-CSF의 페길화된 버전과 페길화되지 않은 버전의 능력을 비교하는 시험관내 웨스턴 블롯 실험의 결과를 나타낸 도면. T 세포를 인간 IL-2(프로류킨, 300IU/㎖) 또는 제시된 농도(ng/㎖ 단위)의 페길화되지 않은 버전 또는 페길화(PEG)된 버전의 130a1 G-CSF로 20분 동안 자극하였다. 히스톤 H3 및 총 S6이 겔 로딩 대조군으로 제공된다.

도 96은 매일, 3일마다 또는 매주 간격으로 제공되는 페길화된(PEG) 버전과 페길화되지 않은 버전의 130a1 G-CSF의 효력을 비교하는 생체내 실험 결과를 나타낸 도면. 종양 특이적 CD8 T 세포(Thy1.1+ OT-I T 세포)에 G2R-3 134 ECD를 발현하도록 레트로바이러스를 형질도입하고, 그 다음 확립된 유방 종양(NOP23 종양주)을 보유한 동계 면역 적격 마우스에 주입하였다. 종양 크기(길이 x 너비)를 46일 기간 동안 플로팅한다. 각각의 선은 개별

동물로부터의 결과를 나타낸다. 우측 패널은 좌측 패널의 확장 버전이다. T 세포 주입일(제0일)에서 시작하여, 마우스를 무작위 배정하고, 제시된 바와 같이 비히클, 130a1 G-CSF 또는 PEG-130a1 G-CSF로 처리하였다. (A, B) "매일" 투여 코호트는 제시된 사이토카인(또는 비히클)을 14일 동안 매일 제공받았고, 그 다음 총 21회 용량 동안 14일 동안 격일로 제공받았다. (C, D) "3일마다" 투여 코호트는 총 9회 용량 동안 3일마다 제시된 사이토카인을 제공받았다. (E, F) "매주" 투여 코호트는 총 4회 용량 동안 7일마다 제시된 사이토카인을 제공받았다.

도 97은 도 96에 제시된 실험으로부터 제시된 시점에서 말초 혈액 내 OT-I T 세포의 확장 및 효과기 기억(Tem) 표현형을 도시한 도면. 좌측 패널은 모든 CD8+ T 세포에 대한 Thy1.1+(OT-I) T 세포의 백분율(평균 +/-SD)을 나타낸다. 우측 패널은 Tem(CD44+ CD62L-) 표현형을 갖는 Thy1.1+(OT-I) T 세포의 백분율(평균 +/- SD)을 나타낸다. (A, D) "매일" 투여 코호트. (B, E) "3일마다" 투여 코호트. (C,F) "매주" 투여 코호트.

도 98은 도 102 및 도 103에 제시된 실험으로부터의 "3일마다" 코호트로부터 제시된 시점에 말초 혈액에서 제시된 면역 세포 하위세트(모든 CD45+ 세포에 대한)의 백분율을 나타낸 도면. 평균 및 표준 편차를 플로팅한다. (A) 호중구(CD3-, CD19-, NK1.1-, CD11b+, CD11c-, Ly6G+). (B) 단핵구(CD3-, CD19-, NK1.1-, CD11b+, CD11c-, Ly6G-, SSC-low (Ly6C+ 또는 Ly6C-). (C) 호산구(CD3-, CD19-, NK1.1-, CD11b+, CD11c-, Ly6G-, SSC-high). (D) CD3+ T 세포. (E) CD19+ B 세포. (F) NK1.1+ 자연 살해 세포.

도 99는 IL-18 제어된 측분비 신호(CPS) 실험으로부터의 시험관내 데이터를 나타낸다. 인간 PBMC-유래 T 세포에 메소텔린-특이적 CAR, T2A 부위 및 G12/2R-1 134 ECD(Meso CAR_G12/2R-1)를 암호화하는 이시스트론성 벡터, 또는 메소텔린-특이적 CAR, T2A 부위, G12/2R-1 134 ECD 및 인간 IL-18(Meso CAR_G12/2R-1+h18)을 암호화하는 삼시스트론성 벡터를 형질도입하였다. (A) T 세포를 메소텔린 CAR(X축) 및 G12/2R-1 134 ECD(Y축)의 발현에 대해 유세포 분석법으로 평가하였다. (B) 시험관내 BrdU 검정을 사용하여 배지 단독; 인간 IL-2(프로류킨, 300IU/㎖); 인간 IL-18(100ng/㎖); 인간 IL-2+인간 IL-12(20ng/㎖); IL-2+IL-12+IL-18; 또는 130a1 G-CSF(100ng/㎖)에 대한 반응으로 T 세포 증식을 평가하였다. (C) ELISA를 사용하여 배지 단독; 인간 IL-2(프로류킨, 300IU/㎖)+인간 IL-12(20ng/㎖); 또는 130a1 G-CSF(100ng/㎖)를 사용하여 48시간 동안 자극된 T 세포로부터의 배양 상청액에서 인간 IL-18 수준을 평가하였다.

도 100은 뮤린 T 세포를 사용한 시험관내 IL-18 CPS 실험의 결과를 도시한 도면. 마우스 CD4 및 CD8 T 세포에 G12/2R-1 134 ECD를 암호화하는 일시스트론성 벡터, 또는 G12/2R 134 ECD, T2A 부위 및 뮤린 IL-18을 암호화하는 이시스트론성 벡터(G12/2R-1 134 ECD + m18)를 형질도입하였다. (A) T 세포를 G12/2R-1 134 ECD의 발현에 대해 유세포 분석법으로 평가하였다. (B) 시험관내 BrdU 검정을 사용하여 배지 단독; 뮤린 IL-2(프로류킨, 300IU/㎖); 뮤린 IL-18(100ng/㎖); 인간 IL-2+인간 IL-12(10ng/㎖); IL-2+IL-12+IL-18; 또는 130a1 G-CSF(100ng/㎖)에 대한 반응으로 T 세포 증식을 평가하였다. (C) ELISA를 사용하여 배지 단독; 인간 IL-2(프로류킨, 300IU/㎖)+뮤린 IL-12(10ng/㎖); 또는 130a1 G-CSF(100ng/㎖)를 사용하여 48시간 동안 자극된 T 세포로부터의 배양 상청액에서 뮤린 IL-18 수준을 평가하였다.

도 101은 뮤린 OT-I T 세포를 사용한 시험관내 IL-18 CPS 실험의 결과를 도시한 도면. OT-I T 세포에 G2R-2 134 ECD, G2R-3 134 ECD, G12/2R-1 134 ECD 또는 G12/2R-1 134 ECD + m18을 암호화하는 레트로바이러스 벡터(도면에서 G12/2R/18C로 약칭됨)를 형질도입하였다. 분비된 사이토카인을 검출하기 위해서, T 세포를 5일 후에 세척하고, 배지 단독(음성 대조군) 또는 인간 IL-2(프로류킨 300IU/㎖), 인간 IL-2+뮤린 IL-12(10ng/㎖), 또는 페길화된(Peg) 130a1(100ng/㎖)을 함유한 배지에서 48시간 동안 배양하고, 그 다음 멀티플렉스 검정하여 32개의 사이토카인을 검출한다. (A) 뮤린 IL-18 및 (B) 뮤린 IFN-감마에 대한 결과를 나타낸다. 다른 사이토카인에 대한 결과를 표 35에 나타낸다.

도 102는 NOP23 유방 종양 모델의 OT-I T 세포에서 G7R-1, G2R-2, G12/2R-1 및 G12/2R-1+m18(G12/2R/18C로 약칭)(모두 134 ECD를 가짐)의 특성을 비교한 생체내 실험 결과를 나타낸 도면. 종양-특이적 CD8 T 세포(Thy1.1+ OT-I T 세포)에 G7R-1, G2R-2, G12/2R-1 또는 G12/2R-1+m18(모두 134 ECD를 가짐)을 발현하도록 레트로바이러스를 형질도입하고, 그 다음 확립된 NOP23 유방 종양을 보유한 동계 면역 적격 마우스에 주입하였다. T 세포 주입일(제0일)에 시작하여, 마우스를 무작위 배정하여 총 4회 치료 동안 매주 기준으로 비히클 또는 페길화된(PEG) 130a1 G-CSF(10㎍/용량)를 제공하였다. (A 내지 D) T 세포 주입일(제0일)에 형질도입된 OT-I T 세포에 대한 수용체(G-CSFR) 발현을 나타낸 유세포 분석법 결과. (E 내지 H) 50일 기간에 걸친 종양 크기(길이 x 너비). 각각의 선은 개별 동물을 나타낸다. (I 내지 L) 연속 혈액 샘플에서 Thy1.1+ OT-I 세포의 확장 및 지속성. (M 내지 P) 혈액에서 T 효과기 기억(Tem) 표현형(CD44+CD62L-)을 나타낸 Thy1.1+ OT-I T 세포의 백분율.

도 103은 다양한 용량의 페길화된(PEG) 130a1 G-CSF 또는 야생형 IL-2를 비교한 NOP23 유방 종양 모델에서의 생

체내 실험 결과를 도시한 도면. G2R-3 134 ECD를 발현하는 Thy1.1+ OT-I T 세포를 확립된 종양을 보유하는 동계 면역 적격 마우스에 주입하였다. T 세포 주입일(제0일)에 시작하여, 마우스를 6개의 사이토카인 처리군으로 무작위 배정하였다: 비히클 단독(모든 패널에 표시됨); PEG-130a1 G-CSF 2μg/용량, 매주 4회 투여(패널 A, F, K, P); (3) PEG-130a1 G-CSF 0.4μg/용량, 매주 4회 투여(패널 B, G, L, Q); (4) PEG-130a1 G-CSF 0.08μg/용량, 매주 4회 투여(패널 C, H, M, R); (5) PEG-130a1 G-CSF를 0.1μg을 매일 4회 투여한 후 0.4μg을 주 4회 투여(패널 D, I, N, S); 또는 (6) 14일 동안 30,000IU/일의 인간 IL-2(프로류킨), 그 다음 14일 동안 2일마다 30,000IU(패널 E, J, O, T). 연속 혈액 샘플을 다음 매개변수에 대해 유세포 분석법으로 분석하였다: (A 내지 E) 모든 CD8+ T 세포에 대한 Thy1.1+ OT-I 세포의 백분율(평균 +/- SD). (F 내지 J) T 효과기 기억(Tem) 표현형(CD44+CD62L-)을 갖는 Thy1.1+ OT-I 세포의 백분율(평균 +/- SD). (K 내지 O) 모든 CD45+ 세포에 대한 호중구(CD3-, CD19-, NK1.1-, CD11b+, CD11c-, Ly6G+)의 백분율(평균 +/- SD). (P-T) 모든 CD45+ 세포에 대한 호산구(CD3-, CD19-, NK1.1-, CD11b+, CD11c-, Ly6G-, SSC-high)의 백분율(평균 +/- SD).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0232] 간략하면 그리고 하기에 보다 상세하게 기재된 바와 같이, 본 명세서에는 변이체 사이토카인 수용체 및 사이토카인 쌍을 사용한 세포의 선택적 활성화를 위한 방법 및 조성물이 기재되며, 사이토카인 수용체는 과립구 집락 자극 인자 수용체(G-CSFR)의 변이체 세포외 도메인(ECD)을 포함한다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물은 입양 세포 전달(ACT) 요법의 독점적인 활성화에 유용하다. 따라서, 본 명세서에는 천연 수용체에 결합하지 않는 사이토카인에 의해서 선택적으로 활성화되는 변이체 수용체를 발현하는 세포의 생산 방법이 포함된다. 또한 본 명세서에는 대상체에게 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체를 발현하는 세포를 투여하고, G-CSFR의 변이체 ECD에 결합하는 G-CSF의 변이체를 함께 투여하는 단계를 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체의 치료 방법이 개시된다. 특정 양상에서, 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법은 입양 세포 전달 방법을 위한 세포의 선택적 활성화에 대한 충족되지 않은 요구를 다루며, 입양 세포 전달 전에 대상체의 면역-고갈에 대한 요구 또는 광범위-작용 자극성 사이토카인, IL-2 투여에 대한 요구를 감소시키거나 제거할 수 있다.

[0233] **정의**

[0234] 달리 명시되지 않는 한, 청구범위 및 명세서에서 사용된 용어는 하기에 제시된 바와 같이 정의된다.

[0235] 용어 "치료"는 질환 상태, 예를 들어, 암 질환 상태의 치료, 중증도 또는 진행의 감소, 관해 또는 이의 치유에서의 임의의 치료적으로 유익한 결과를 지칭한다.

[0236] 용어 "생체내"는 살아있는 유기체에서 발생하는 과정을 지칭한다.

[0237] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "포유동물"은 인간 및 비-인간 둘 다를 포함하고, 인간, 비-인간 영장류, 개, 고양이, 뮤린, 소, 말 및 돼지를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다.

[0238] 용어 "충분한 양"은 목적하는 효과를 생성하기에 충분한 양, 예를 들어, 세포 상에서 발현되는 수용체를 선택적으로 활성화하기에 충분한 양을 지칭한다.

[0239] 용어 "치료적 유효량"은 질환의 증상을 개선하는데 효과적인 양이다.

[0240] 용어 "작동 가능하게 연결된"은 각각 또 다른 핵산 또는 아미노산 서열과 기능적 관계로 놓인 핵산 또는 아미노산 서열을 지칭한다. 일반적으로, "작동 가능하게 연결된"은 연결될 핵산 서열 또는 아미노산 서열이 인접하고, 분비성 리더의 경우 인접하고 판독 단계에 있음을 의미한다.

[0241] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "세포외 도메인"(ECD)은 세포 표면 상에서 발현될 때 원형질막 외부에 있는 수용체(예를 들어, G-CSFR)의 도메인을 지칭한다. 특정 실시형태에서 G-CSFR의 ECD는 서열번호 2 또는 서열번호 7의 적어도 일부를 포함한다.

[0242] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "세포내 도메인"(ICD)은 수용체가 세포 표면 상에서 발현될 때 세포 내에 위치하는 수용체의 도메인을 지칭한다.

[0243] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "막관통 도메인"(TMD 또는 TM)은 수용체가 세포 표면 상에서 발현될 때 원형질막 내에 위치하는 세포 표면 수용체의 도메인 또는 영역을 지칭한다.

[0244] 용어 "사이토카인"은 사이토카인 수용체에 결합하고, 세포 상에서 발현되는 사이토카인 수용체에 결합하여 활성화될 때 세포 신호전달을 유도할 수 있는 작은 단백질(약 5 내지 20 kDa)을 지칭한다. 사이토카인의 예는 인터

류킨, 림포카인, 집락 자극 인자 및 케모카인을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다.

[0245] 용어 "사이토카인 수용체"는 타입 1 및 타입 2 사이토카인 수용체를 포함하는 사이토카인에 결합하는 수용체를 지칭한다. 사이토카인 수용체는 G-CSFR, IL-2R(인터류킨-2 수용체), IL-7R(인터류킨-7 수용체), IL-12R(인터류킨-12 수용체) 및 IL-21R(인터류킨-21 수용체)을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다.

[0246] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "키메라 수용체"는 하나 이상의 상이한 막관통 단백질 또는 수용체의 서열로부터 유래된 적어도 하나의 도메인(예를 들어, ECD, ICD, TMD, 또는 C-말단 영역)의 적어도 일부를 갖도록 조작된 막관통 수용체를 지칭한다.

[0247] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "부위 II 계면", "부위 II 영역", "부위 II 계면 영역" 또는 "부위 II"는 G-CSF와 G-CSFR의 사이토카인 수용체 동종(CRH) 도메인 사이에 계면에 위치한, G-CSFR을 갖는 G-CSF의 G-CSF:G-CSFR 2:2 이종이량체 결합 계면 중 더 큰 것을 지칭한다.

[0248] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "부위 III 계면", "부위 III 영역", "부위 III 계면 영역" 또는 "부위 III"은 G-CSFR을 갖는 G-CSF의 G-CSF:G-CSFR 2:2 이종이량체 결합 계면 중 더 작은 것을 지칭하고, G-CSF와 G-CSFR의 N-말단 Ig-유사 도메인 사이의 계면에 위치된다.

[0249] 특정 양상에서 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "의 적어도 일부" 또는 "의 일부"는 본 명세서에 기재된 서열번호의 연속적인 핵산 염기 또는 아미노산의 길이의 75% 초과, 80% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 99% 초과를 지칭한다. 특정 양상에서, 본 명세서에 기재된 도메인 또는 결합 부위(예를 들어, ECD, ICD, 막관통, C-말단 영역 또는 신호전달 분자 결합 부위)의 적어도 일부는 본 명세서에 기재된 서열번호와 75% 초과, 80% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 99% 초과만큼 동일할 수 있다.

[0250] 용어 "야생형"은 폴리펩타이드의 천연 아미노산 서열 또는 본 명세서에 기재된 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자의 천연 핵산 서열을 지칭한다. 단백질 또는 유전자의 야생형 서열은 해당 단백질 또는 유전자에 대한 종에 대한 폴리펩타이드 또는 유전자의 가장 일반적인 서열이다.

[0251] 용어 "변이체 사이토카인-수용체 쌍", "변이체 사이토카인 및 수용체 쌍", "변이체 사이토카인 및 수용체 설계(들)", "변이체 사이토카인-수용체 스위치", 또는 "오쏘고널 사이토카인-수용체 쌍"은 (a) 천연 사이토카인 또는 동족 수용체에 대한 결합이 결여되고; (b) 대응하는 조작된(변이체) 리간드 또는 수용체에 특이적으로 결합하기 위해서 아미노산 변화에 의해서 변형된 유전자 조작된 단백질 쌍을 지칭한다.

[0252] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "변이체 수용체", 또는 "오쏘고널 수용체"는 변이체 사이토카인-수용체 쌍의 유전자 조작된 수용체를 지칭하고, 키메라 수용체를 포함한다.

[0253] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "변이체 ECD"는 변이체 사이토카인-수용체 쌍의 수용체(예를 들어, G-CSFR)의 유전자 조작된 세포외 도메인을 지칭한다.

[0254] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "변이체 사이토카인", "변이체 G-CSF" 또는 "오쏘고널 사이토카인"은 변이체 사이토카인-수용체 쌍의 유전자 조작된 사이토카인을 지칭한다.

[0255] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "결합하지 않는다", "결합하지 않는다" 또는 "결합할 수 없는"은 검출 가능한 결합이 없거나, 미미한 결합, 즉, 자연 리간드의 결합 친화도보다 훨씬 더 낮은 결합 친화도를 갖는 것을 지칭한다.

[0256] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "선택적으로 활성화시킨다" 또는 "선택적 활성화"는 사이토카인 및 변이체 수용체를 지칭하는 경우 변이체 수용체에 우선적으로 결합하는 사이토카인을 지칭하며, 이 수용체는 변이체 수용체에 대한 사이토카인의 결합 시에 활성화된다. 특정 양상에서, 사이토카인은 함께 존재하여 사이토카인에 특이적으로 결합한 키메라 수용체를 활성화시킨다. 특정 양상에서, 사이토카인은 야생형 사이토카인이고, 세포 상에서 발현되는 키메라 수용체를 선택적으로 활성화하는 반면, 사이토카인에 대한 천연 야생형 수용체는 세포에서 발현되지 않는다.

[0257] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "향상된 활성"은 변이체 사이토카인으로 자극 시 세포 상에서 발현되는 변이체 수용체의 증가된 활성을 지칭하며, 활성은 천연 사이토카인으로의 자극 시 천연 수용체에 대해 관찰되는 활성이다.

[0258] 용어 "항원 결합 신호전달 수용체"는 항원에 결합하고 항원에 결합할 때 세포내 신호를 생성할 수 있는 임의의 세포 표면 단백질 또는 단백질 복합체를 지칭한다.

[0259] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "효능작용적 신호전달 단백질"은 표적 결합 분자(예를 들어, 단백질 수용체 또는 항원)에 결합하는 단백질을 지칭하고, 이 결합은 표적 결합 분자를 보유하는 표적 세포에서 하나 이상의 신호전달 사건을 유도한다. 이와 상반되게, "길항작용적 신호전달 단백질"은 표적 결합 분자(예를 들어, 단백질 수용체 또는 항원)에 결합하는 단백질을 지칭하고, 이 결합은 (예를 들어, 동일한 표적 분자에 결합하기 위해서 다른 효능작용적 단백질을 방해함으로써) 표적 결합 분자를 보유하는 표적 세포에서 하나 이상의 신호전달 사건을 저해한다.

[0260] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "친화성 시약"은 임의의 표적 분자에 결합하는 능력을 갖는 임의의 분자(예를 들어, 단백질, 핵산 등)를 지칭한다.

[0261] 용어 "면역 세포"는 유기체의 면역계(선천성 및 후천성 면역 반응 포함)를 지원하는 기능을 하는 것으로 알려진 임의의 세포를 지칭하며, 림프구(예를 들어, B 세포, 형질 세포 및 T 세포), 자연 살해 세포(NK 세포), 대식세포, 단핵구, 수지상 세포, 호중구 및 과립구를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 면역 세포는 줄기 세포, 미성숙 면역 세포 및 분화 세포를 포함한다. 면역 세포는 또한 유기체에서 드물거나 풍부하지만 세포의 모든 하위 집단을 포함한다. 특정 실시형태에서, 면역 세포는 면역 세포 유형 및 하위 집단의 공지된 마커 (예를 들어, 세포 표면 마커)를 보유함으로써 그 자체로 확인된다.

[0262] 용어 "T 세포"는 CD3 및/또는 T 세포 항원 수용체의 발현을 특징으로 할 수 있는 포유동물 면역 효과기 세포를 지칭하며, 이 세포는 이종상동(orthologous) 사이토카인 수용체를 발현하도록 조작될 수 있다. 일부 실시형태에서, T 세포는 미경험 $CD8^+$ T 세포, 세포독성 $CD8^+$ T 세포, 미경험 $CD4^+$ T 세포, 헬퍼 T 세포, 예를 들어, T_H2, T_H9, T_H11, T_H22, T_{FH}; 조절성 T 세포, 예를 들어, T_R1, 자연 T_{Reg}, 유도성 T_{Reg}; 기억 T 세포, 예를 들어, 중심 기억 T 세포, 효과기 기억 T 세포, NKT 세포 및 γδT 세포로부터 선택된다.

[0263] 용어 "G-CSFR"은 과립구 집락-자극 인자 수용체를 지칭한다. G-CSFR은 GCSFR, G-CSF 수용체, 집락 자극 인자 3 수용체, CSF3R, CD114 항원 또는 SCN7이라고도 지칭될 수 있다. 인간 G-CSFR은 ENSG00000119535의 Ensembl 식별 번호를 갖는 유전자에 의해서 암호화된다. 인간 G-CSFR은 GeneBank 수탁 번호 NM_156039.3에 상응하는 cDNA 서열에 의해 암호화된다.

[0264] 용어 "G-CSF"는 과립구 집락 자극 인자를 지칭한다. G-CSF는 집락 자극 인자 3 및 CSF3이라고도 불릴 수 있다. 인간 G-CSF는 ENSG00000108342의 Ensembl 식별 번호를 갖는 유전자에 의해서 암호화된다. 인간 G-CSF는 GeneBank 수탁 번호 KP271008.1에 상응하는 cDNA 서열에 의해 암호화된다.

[0265] "JAK"는 또한 야누스 키나제로 지칭될 수 있다. JAK는 Jak-STAT 경로를 통해 사이토카인-매개 신호를 전달하는 세포내 비수용체 티로신 키나제 계열이며, JAK1, JAK2, JAK3 및 TYK2를 포함한다. 인간 JAK1는 ENSG00000162434의 Ensembl 식별 번호를 갖는 유전자에 의해서 암호화된다. 인간 JAK1은 GeneBank 수탁 번호 NM_002227에 상응하는 cDNA 서열에 의해 암호화된다. 인간 JAK2는 ENSG00000096968의 Ensembl 식별 번호를 갖는 유전자에 의해서 암호화된다. 인간 JAK2는 GeneBank 수탁 번호 NM_001322194에 상응하는 cDNA 서열에 의해 암호화된다. 인간 JAK3은 ENSG00000105639의 Ensembl 식별 번호를 갖는 유전자에 의해서 암호화된다. 인간 JAK3은 GeneBank 수탁 번호 NM_000215에 상응하는 cDNA 서열에 의해 암호화된다. 인간 TYK2는 ENSG00000105397의 Ensembl 식별 번호를 갖는 유전자에 의해서 암호화된다. 아인간 TYK2는 GeneBank 수탁 번호 NM_001385197에 상응하는 cDNA 서열에 의해 암호화된다.

[0266] STAT는 전사의 신호 전달인자 및 활성인자라고도 지칭될 수 있다. STAT는 7개의 STAT 단백질 STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B 및 STAT6 계열이다. 인간 STAT1은 ENSG00000115415의 Ensembl 식별 번호를 갖는 유전자에 의해서 암호화된다. 인간 STAT1은 GeneBank 수탁 번호 NM_007315에 상응하는 cDNA 서열에 의해 암호화된다. 인간_STAT2는 ENSG00000170581의 Ensembl 식별 번호를 갖는 유전자에 의해서 암호화된다. 인간 STAT2는 GeneBank 수탁 번호 NM_005419에 상응하는 cDNA 서열에 의해 암호화된다. 인간_STAT3은 ENSG00000168610의 Ensembl 식별 번호를 갖는 유전자에 의해서 암호화된다. 인간 STAT3은 GeneBank 수탁 번호 NM_139276에 상응하는 cDNA 서열에 의해 암호화된다. 인간 STAT4는 ENSG00000138378의 Ensembl 식별 번호를 갖는 유전자에 의해서 암호화된다. 인간 STAT4는 GeneBank 수탁 번호 NM_003151에 상응하는 cDNA 서열에 의해 암호화된다. 인간 STAT5A는 ENSG00000126561의 Ensembl 식별 번호를 갖는 유전자에 의해서 암호화된다. 인간 STAT5A는 GeneBank 수탁 번호 NM_003152에 상응하는 cDNA 서열에 의해 암호화된다. 인간 STAT5B는 ENSG00000173757의 Ensembl 식별 번호를 갖는 유전자에 의해서 암호화된다. 인간 STAT5B는 GeneBank 수탁 번호 NM_012448에 상응하는 cDNA 서열에 의해 암호화된다. 인간 STAT6은 ENSG00000166888의 Ensembl 식별 번호를 갖는 유전자에 의해서

암호화된다. 인간 STAT6은 GeneBank 수탁 번호 NM_003153에 상응하는 cDNA 서열에 의해 암호화된다.

[0267] SHC는 변형 단백질을 함유하는 Src 상동성 2 도메인이라고도 지칭된다. Shc는 3개의 아이소폼 계열이고, p66Shc, p52Shc 및 p46Shc, SHC1, SHC2 및 SHC3을 포함한다. 인간 SHC1은 ENSG00000160691의 Ensembl 식별 번호를 갖는 유전자에 의해서 암호화된다. 인간 SHC1은 GeneBank 수탁 번호 NM_183001에 상응하는 cDNA 서열에 의해 암호화된다. 인간 SHC2는 ENSG00000129946의 Ensembl 식별 번호를 갖는 유전자에 의해서 암호화된다. 인간 SHC2는 GeneBank 수탁 번호 NM_012435에 상응하는 cDNA 서열에 의해 암호화된다. 인간 SHC3은 ENSG00000148082의 Ensembl 식별 번호를 갖는 유전자에 의해서 암호화된다. 인간 SHC3은 GeneBank 수탁 번호 NM_016848에 상응하는 cDNA 서열에 의해 암호화된다.

[0268] SHP-2는 단백질 티로신 포스파타제 비-수용체 타입 11(PTPN11) 및 단백질-티로신 포스파타제 1D(PTP-1D)라고도 지칭될 수 있다. 인간 SHP-2는 ENSG00000179295의 Ensembl 식별 번호를 갖는 유전자에 의해서 암호화된다. 인간 SHP-2는 GeneBank 수탁 번호 NM_001330437에 상응하는 cDNA 서열에 의해 암호화된다.

[0269] PI3K는 포스파티딜이노시톨-4,5-비스포스페이트 3-키나제라고도 지칭될 수 있다. PI3K의 촉매적 소단위는 PIK3CA라고도 지칭될 수 있다. 인간 PIK3CA은 ENSG00000121879의 Ensembl 식별 번호를 갖는 유전자에 의해서 암호화된다. 인간 PIK3CA는 GeneBank 수탁 번호 NM_006218에 상응하는 cDNA 서열에 의해 암호화된다.

[0270] EPOR은 에리트로포이에틴 수용체라고도 지칭될 수 있다. 인간 EPOR은 ENSG00000187266의 Ensembl 식별 번호를 갖는 유전자에 의해서 암호화된다. 인간 EPOR은 GeneBank 수탁 번호 NM_000121에 상응하는 cDNA 서열에 의해 암호화된다.

[0271] IFNγR1은 인터페론 감마 수용체 1이라고도 지칭될 수 있다. 인간 IFNγR1은 ENSG00000027697의 Ensembl 식별 번호를 갖는 유전자에 의해서 암호화된다. 인간 IFNγR1은 GeneBank 수탁 번호 NM_000416에 상응하는 cDNA 서열에 의해 암호화된다.

[0272] IFNγR2는 인터페론 감마 수용체 2라고도 지칭될 수 있다. 인간 IFNγR2는 ENSG00000159128의 Ensembl 식별 번호를 갖는 유전자에 의해서 암호화된다. 인간 IFNγR2는 GeneBank 수탁 번호 NM_001329128에 상응하는 cDNA 서열에 의해 암호화된다.

[0273] IFNAR2는 인터페론 알파 및 베타 수용체 소단위 2라고도 지칭될 수 있다. 인간 IFNAR2는 ENSG00000159110의 Ensembl 식별 번호를 갖는 유전자에 의해서 암호화된다. 인간 IFNAR2는 GeneBank 수탁 번호 NM_000874에 상응하는 cDNA 서열에 의해 암호화된다.

[0274] 본 출원에서 사용되는 약어는 다음을 포함한다: ECD(세포외 도메인), ICD(세포내 도메인), TMD(막관통 도메인), G-CSFR(과립구 집락 자극 인자 수용체), G-CSF(과립구 집락 자극 인자), IL(인터류킨), IL-2R(인터류킨-2 수용체), IL-12R(인터류킨 12 수용체), IL-21R(인터류킨-21 수용체) 및 IL-7R 또는 IL-7Rα(인터류킨-7 수용체), IL-18(인터류킨-18), IL-21(인터류킨-21), IL-17(인터류킨-17), TNF- α(종양 괴사 인자알파), CXCL13(C-X-C 모티프 케모카인 리간드13), CCL3(C-C 모티프 케모카인 리간드 3 또는 MIP-1α), CCL4(C-C 모티프 케모카인 리간드 4 또는 MIP-1β), CD40 리간드, B 세포 활성화 인자(BAFF), Flt3 리간드, CCL21(C-C 모티프 케모카인 리간드 21), CCL5(C-C 모티프 케모카인 리간드 5), XCL1(X-C 모티프 케모카인 리간드 1), CCL19(C-C 모티프 케모카인 리간드 19) 및 NKG2D(살해 세포 렉틴 유사 수용체 K1). IL-2Rγ는 본 명세서에서 IL-2RG, IL-2Rgc, γc 또는 IL-2Rγ라고도 지칭될 수 있다. 키메라 사이토카인 수용체 설계를 선택하는 경우: "G-CSFRwt-ICDIL-2Rb"는 본 명세서에서 "G/IL-2Rb"라고도 지칭되고; "G-CSFRwt-ICDgc"는 본 명세서에서 "G/gc"라고도 지칭되고; "G-CSFR137-ICDgp130-IL-2Rb"는 본 명세서에서 "137 ECD를 갖는 G2R-2"라고도 지칭되고; "G-CSFR137-ICDIL-2Rb+GCSFR137-ICDgc"는 본 명세서에서 "137 ECD를 갖는 G2R-1"이라고도 지칭된다.

[0275] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 바와 같이, 단수 형태는 문맥이 명백하게 달리 지시하지 않는 한 복수 대상을 포함한다는 것을 주목해야 한다.

[0276] 값의 범위가 제공되는 경우, 문맥에서 명백하게 달리 지시하지 않는 한, 그 범위의 상한 및 하한 사이의 각각의 중간 값이 하한 단위의 10분의 1까지 구체적으로 개시되는 것으로 이해된다. 명시된 범위의 임의의 명시된 값 또는 중간 값과 해당 명시된 범위의 임의의 다른 명시된 또는 중간 값 사이의 각각의 더 작은 범위는 본 발명에 포함된다. 이러한 더 작은 범위의 상한 및 하한은 독립적으로 그 범위에 포함되거나 제외될 수 있으며, 두 한계 중 하나 또는 둘 다가 더 작은 범위에 포함되거나 어느 하나도 포함되지 않은 경우에도 각각의 범위가 또한 본 발명에 포함되고, 제시된 범위에서 임의의 구체적으로 제한된 제외한 한계가 적용된다. 명시된 범위가 제한 중

하나 또는 둘 다를 포함하는 경우, 포함된 제한 중 하나 또는 둘 다를 제외한 범위가 또한 본 발명에 포함된다.

[0277] **변이체 사이토카인 및 수용체 설계**

[0278] 본 명세서에는 변이체 수용체의 선택적 활성화를 위한 변이체 사이토카인과 수용체 쌍이 기재된다. 본 개시내용의 변이체 수용체는 G-CSFR의 세포외 도메인을 포함하고; 변이체 사이토카인은 변이체 수용체에 결합하여 이를 활성화시키는 G-CSF(과립구 집락 자극 인자)를 포함한다. 특정 실시형태에서, 변이체 수용체는 G-CSFR의 ECD 및 G-CSFR과 상이한 수용체의 ICD의 적어도 일부를 포함하는 키메라 수용체이다.

[0279] *변이체 G-CSF와 변이체 G-CSFR ECD 쌍*

[0280] 특정 양상에서, 본 명세서에 기재된 변이체 G-CSF 및 수용체 설계는 적어도 하나의 부위 II 계면 영역 돌연변이, 적어도 하나의 부위 III 계면 영역 돌연변이 및 이들의 조합을 포함한다. 특정 양상에서, 본 명세서에 기재된 변이체 G-CSF 및 수용체 설계는 표 2, 2A, 4 또는 6에 열거된 적어도 하나의 부위 II 또는 부위 III 계면 영역 돌연변이를 포함한다.

[0281] 특정 양상에서, 부위 II 계면 영역에서 변이체 수용체 상의 적어도 하나의 돌연변이는 G-CSFR 세포외 도메인(서열번호 2)의 아미노산 위치 141,167, 168, 171, 172, 173, 174, 197, 199, 200, 202 및 288로 이루어진 군으로부터 선택된 G-CSFR 세포외 도메인의 아미노산 위치에 위치한다.

[0282] 특정 양상에서, 변이체 G-CSF 부위 II 계면 영역 상의 적어도 하나의 돌연변이는 G-CSF (서열번호 1)의 아미노산 위치 12, 16, 19, 20, 104, 108, 109, 112, 115, 116, 118, 119, 122 및 123으로 이루어진 군으로부터 선택된 G-CSF의 아미노산 위치에 위치한다.

[0283] 특정 양상에서, 변이체 수용체 부위 II 계면 영역 상의 적어도 하나의 돌연변이는 R141E, R167D, K168D, K168E, L171E, L172E, Y173K, Q174E, D197K, D197R, M199D, D200K, D200R, V202D, R288D 및 R288E로 이루어진 G-CSFR 세포외 도메인의 돌연변이의 군으로부터 선택된다.

[0284] 특정 양상에서, 변이체 G-CSF 부위 II 계면 영역 상의 적어도 하나의 돌연변이는 K16D, R, S12E, S12K, S12R, K16D, L18F, E19K, E19R, Q20E, D104K, D104R, L108K, L108R, D109R, D112R, D112K, T115E, T115K, T116D, Q119E, Q119R, E122K, E122R 및 E123R로 이루어진 G-CSF의 돌연변이의 군으로부터 선택된다.

[0285] 특정 양상에서, 변이체 부위 III 계면 영역 상의 적어도 하나의 돌연변이는 서열번호 2의 아미노산 위치 30, 41, 73, 75, 79, 86, 87, 88, 89, 91 및 93으로 이루어진 군으로부터 선택된 G-CSFR 세포외 도메인의 돌연변이의 군으로부터 선택된다.

[0286] 특정 양상에서, 변이체 부위 III 계면 영역 상의 적어도 하나의 돌연변이는 서열번호 1의 아미노산 위치 38, 39, 40, 41, 46, 47, 48, 49, 및 147로 이루어진 군으로부터 선택된 G-CSF의 돌연변이의 군으로부터 선택된다.

[0287] 특정 양상에서, 변이체 수용체 부위 III 계면 영역 상의 적어도 하나의 돌연변이는S30D, R41E, Q73W, F75K, S79D, L86D, Q87D, I88E, L89A, Q91D, Q91K, 및 E93K로 이루어진 G-CSFR 세포외 도메인의 돌연변이의 군으로부터 선택된다.

[0288] 특정 양상에서, 변이체 G-CSF 부위 III 계면 영역 상의 적어도 하나의 돌연변이는 T38R, Y39E, K40D, K40F, L41D, L41E, L41K, E46R, L47D, V48K, V48R, L49K, 및 R147E로 이루어진 G-CSF의 돌연변이의 군으로부터 선택된다.

[0289] 본 명세서에 기재된 변이체 사이토카인과 수용체 쌍은 부위 II 영역 단독, 부위 III 영역 단독 또는 부위 II 및 부위 III 영역 둘 다 중 어느 하나에 돌연변이를 포함할 수 있다.

[0290] 본 명세서에 기재된 변이체 사이토카인과 수용체 쌍은 임의의 수의 본 명세서에 기재된 부위 II 및/또는 부위 III 돌연변이를 가질 수 있다. 특정 양상에서, 변이체 G-CSF 및 수용체는 표 4에 열거된 돌연변이를 갖는다. 특정 양상에서, 변이체 수용체 및/또는 변이체 G-CSF는 본 명세서에 기재된 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 돌연변이를 가질 수 있다. 특정 양상에서, 본 명세서에 기재된 변이체 사이토카인은 본 명세서에 기재된 변이체 사이토카인과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 아미노산 동일성을 공유한다. 특정 양상에서, 본 명세서에 기재된 변이체 사이토카인은 표 21의 변이체 사이토카인과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 아미노산 동일성을 공유한다.

[0291] 특정 양상에서, 본 명세서에 기재된 변이체 수용체는 본 명세서에 기재된 G-CSFR ECD 서열번호와 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 아미노산 동일성을 공유하는 G-CSFR ECD 도메인을 포함한다. 특정 양상에서, 키메라 수용체는 서열번호 2, 3, 6 또는 8의 아미노산 서열을 갖는 G-CSFR의 ECD를 포함한다.

[0292] 특정 양상에서, 본 명세서에 기재된 변이체 G-CSF는 G-CSFR ECD 서열번호 1과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 아미노산 동일성을 공유하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0293] 특정 양상에서, G-CSFR의 ECD는 R41E, R141E 및 R167D로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다.

[0294] 변이체 사이토카인 및/또는 수용체는 직접적으로뿐만 아니라 비상동 폴리펩타이드, 예를 들어, 신호 서열 또는 성숙 단백질 또는 폴리펩타이드의 N-말단에 특이적 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩타이드와의 융합 폴리펩타이드로서 재조합 방식으로 생산될 수 있다. 일반적으로, 신호 서열은 벡터의 성분일 수 있거나 그것은 벡터에 삽입되는 암호 서열의 일부일 수 있다. 선택된 비상동 신호 서열은 바람직하게는 숙주 세포에 의해서 인식되거나 가공되는(즉, 신호 펩티다제에 의해서 절단되는) 것이다. 포유동물 세포 발현에서 천연 신호 서열이 사용될 수 있거나, 다른 포유동물 신호 서열, 예컨대, 동일하거나 관련된 종의 분비된 폴리펩타이드로부터의 신호 서열뿐만 아니라 바이러스 분비성 리더가 적합할 수 있다. 특정 실시형태에서, 신호 서열은 G-CSFR 또는 GM-CSFR의 신호 서열이다. 특정 실시형태에서, 신호 서열은 서열번호 11 또는 서열번호 12이다.

[0295] 특정 양상에서, 변이체 수용체 및/또는 변이체 G-CSF는 안정성을 향상시키기 위해서 자연적으로 또는 합성적으로 변형되고, 예를 들어, 당 기 및 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이다. 예를 들어, 특정 실시형태에서, 변이체 사이토카인은 예를 들어, 당업계에 공지된 바와 같이 페길화, 글리코실화 등에 의해서 이의 반감기를 연장시키기 위해서 IgG의 Fc 도메인, 알부민 또는 다른 분자에 융합된다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 변이체 사이토카인은 화학적 페길화에 의해서 변형된다. 특정 실시형태에서, 표 21의 변이체 G-CSF 사이토카인은 페길화된다. 특정 실시형태에서, 서열번호 83, 83 내지 1, 83-2, 83-3, 83-4, 83-5 및 84에 상응하는 변이체 G-CSF 사이토카인은 페길화에 의해서 변형된다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 변이체 G-CSF 사이토카인 및/또는 키메라 사이토카인 수용체는 단백질의 N-말단 및/또는 C-말단에 대한 PEG의 첨가에 의해서 변형된다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 변이체 G-CSF 사이토카인 및/또는 키메라 사이토카인 수용체는 PEG를 포함하는 화합물의 첨가에 의해서 변형된다. 특정 실시형태에서, PEG 또는 PEG-함유 화합물은 약 20kDa 이하이다. 특정 실시형태에서, PEG 또는 PEG-함유 화합물은 20kDa 이하, 15kDa 이하, 10kDa 이하, 5kDa 이하 또는 1kDa 이하이다.

[0296] Fc-융합은 생체내에서 대안적인 Fc 수용체 매개 특성을 촉진시킬 수 있다. "Fc 영역"은 파파인을 사용한 IgG에 의한 소화에 의해서 생산된 IgG C-말단 도메인과 상동성인 자연 발생 또는 합성 폴리펩타이드일 수 있다. IgG Fc는 대략 50kDa의 분자량을 갖는다. 변이체 사이토카인은 전체 Fc 영역, 또는 그것이 일부인 키메라 폴리펩타이드의 순환 반감기를 연장시키는 능력을 보유하는 더 작은 부분을 포함할 수 있다. 또한, 전장 또는 단편화된 Fc 영역은 야생형 분자의 변이체일 수 있다.

[0297] 변이체 사이토카인이 변이체 수용체에 결합하면, 변이체 수용체는 천연 세포 요소를 통해 형질도입되는 신호전달을 활성화하여 천연 반응을 모방하지만 변이체 수용체를 발현하도록 조작된 세포에 특이적인 생물학적 활성을 제공한다. 특정 양상에서, 변이체 수용체와 G-CSF 쌍은 이의 천연, 야생형 G-CSF 또는 천연, 야생형 G-CSFR에 결합하지 않는다. 따라서, 특정 실시형태에서, 변이체 수용체는 변이체 사이토카인의 천연 대응물을 비롯한 내인성 대응물 사이토카인에 결합하지 않는 반면, 변이체 사이토카인은 변이체 수용체의 천연 대응물을 비롯한 임의의 내인성 수용체에 결합하지 않는다. 특정 실시형태에서, 변이체 사이토카인은 천연 사이토카인이 천연 사이토카인 수용체에 결합하는 것과 비교하여 상당히 감소된 친화도로 천연 수용체에 결합한다. 특정 실시형태에서, 천연 수용체에 대한 변이체 사이토카인의 친화도는 천연 사이토카인 수용체에 대한 천연 사이토카인의 친화도의 10X 미만, 100X 미만, 1,000X 미만 또는 10,000X 미만이다. 특정 실시형태에서, 변이체 사이토카인은 1×10^{-4}M 초과, 1×10^{-5}M 초과, 1×10^{-6}M 초과; 1×10^{-7}M 초과, 1×10^{-8}M 초과 또는 1×10^{-9}M 초과의 K_D로 천연 수용체에 결합한다. 특정 실시형태에서, 변이체 사이토카인 수용체는 천연 사이토카인 수용체가 천연 사이토카인 수용체에 결합하는 것과 비교하여 상당히 감소된 친화도로 천연 사이토카인에 결합한다. 특정 실시형태에서, 변이체 사이토카인 수용체는 천연 사이토킨 수용체에 대해 천연 사이토카인의 10X 미만, 100X 미만, 1,000X 미만 또는

10,000X 미만으로 천연 사이토카인에 결합한다. 특정 실시형태에서, 변이체 사이토카인 수용체는 1×10^{-4}M 초과, 1×10^{-5}M 초과, 1×10^{-6}M 초과; 또는 1×10^{-7}M 초과, 1×10^{-8}M 초과 또는 1×10^{-9}M 초과의 K_D로 천연 사이토카인에 결합한다. 일부 실시형태에서, 변이체 수용체에 대한 변이체 사이토카인의 친화도는 천연 수용체에 대한 천연 사이토카인의 친화도와 대등하고, 예를 들어, 천연 사이토카인 수용체 쌍 친화도의 적어도 약 1%, 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 25%, 적어도 약 50%, 적어도 약 75%, 적어도 약 100%인 친화도를 가지며, 천연 수용체에 대한 천연 사이토카인의 친화도의 2X, 3X, 4X, 5X, 10X 또는 그 초과보다 더 높을 수 있다. 친화도는 당업자에게 널리 공지된 임의의 수의 검정에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 친화도는 다양한 농도의 표지되지 않은 리간드의 존재 하에 단일 농도의 표지된 리간드를 사용하여 수용체의 결합을 측정하는 경쟁적 결합 실험으로 결정할 수 있다. 일반적으로 표지되지 않은 리간드의 농도는 적어도 여섯 자리수를 초과하게 달라진다. 경쟁적 결합 실험을 통해 IC_{50}을 결정할 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "IC_{50}"은 수용체와 표지된 리간드 사이의 회합을 50% 저해하는 데 필요한 표지되지 않은 리간드의 농도를 지칭한다. IC_{50}은 리간드-수용체 결합 친화도의 지표이다. 낮은 IC_{50}은 높은 친화도를 나타내는 반면, 높은 IC_{50}은 낮은 친화도를 나타낸다.

[0298] 세포 표면 상에서 발현되는 변이체 사이토카인 수용체에 대한 변이체 사이토카인의 결합은 (천연 사이토카인 수용체 활성과 비교하여) 변이체 사이토카인 수용체의 기능에 영향을 미치거나 영향을 미치지 않을 수 있고; 모든 경우에 천연 활성이 필요하거나 바람직한 것은 아니다. 특정 실시형태에서, 변이체 사이토카인 수용체에 대한 변이체의 결합은 천연 사이토카인 신호전달의 하나 이상의 양상을 유도할 것이다. 특정 실시형태에서, 세포 표면 상에서 발현되는 변이체 사이토카인 수용체에 대한 변이체 사이토카인의 결합은 증식, 생존력, 지속성, 세포독성, 사이토카인 분비, 기억 및 향상된 활성으로 이루어진 군으로부터 선택된 세포 반응을 초래한다.

표 1

서열 인간 WT G-CSF 및 인간 WT G-CSFR Ig-CRH 도메인의 서열

단백질	Uniprot ID	잔기 넘버링	폴리펩타이드 서열	서열 번호
G-CSF	A0A0B4U5E3	1-174	TPLGPASSLPQSFLLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCATYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRHLAQP	1
인간 이. 콜라이에서 재조합 방식으로 생산된 G-CSF			MTPLGPASSLPQSFLLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLCATYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRHLAQP	90
G-CSFR(Ig-CRH)	Q99062	Ig: 1-97 CRH: 98-308	EECGHISVSAPIVHLGDPITASCIIKQNCSHLDPEPQILWRLGAELQPGGRQQRLSDGTQESIITLPHLNHTQAFLSCSLNWGNSLQILDQVELRAGYPPAIPHNLSCLMNLTTSSLICQWEPGPETHLPTSFTLKSFKSRGNCQTQGDSILDCVPKDGQSHCSIPRKHLLLYQNMGIWVQAENALGTSMSPQLCLDPMDVVKLEPPMLRTMDPSPEAAPPQAGCLQLSWEPWQPGLHINQKCELRHKPQRGEASWALVGPLPLEALQYELCGLLPATAYTLQIRCIRWPLPGHWSDWSPSLELRTTE	2

[0299]

[0300] [표 1A]

인간 WT G-CSF 및 인간 WT G-CSFR Ig-CRH 도메인의 서열

단백질	Uniprot ID	잔기 넘버링	폴리펩타이드 서열	서열 번호
G-CSFR(Ig-CRH)	Q99062	Ig: 2-97 CRH: 98-308	ECGHISVSAPIVHLGDPITASCIIKQNCSHLDP EPQILWRLGAELQPGGRQQRLSDGTQESIITL PHLNHTQAFLSCSLNWGNSLQILDQVELRAG YPPAIPHNLSCLMNLTTSSLICQWEPGPETHL PTSFTLKSFKSRGNCQTQGDSILDCVPKDGQS HCSIPRKHLLLYQNMGIWVQAENALGTSMSP QLCLDPMDVVKLEPPMLRTMDPSPEAAPPQ AGCLQLSWEPWQPGLHINQKCELRHKPQRG EASWALVGPLPLEALQYELCGLLPATAYTLQ IRCIRWPLPGHWSDWSPSLELRTTE	101

[0301]

[0302] 표 1의 서열번호 2에 제시된 G-CSFR 아미노산 서열은 본 명세서에서 사용된 돌연변이 넘버링에 대한 G-CSFR 아미노산 위치에 상응한다. 표 1A에 열거된 서열번호 101에 제시된 G-CSFR 서열은 제거된 N-말단에서 하나의 아미노산(글루탐산)을 제외하고는 서열번호 2와 동일하다. 따라서, 본 명세서에서 사용된 돌연변이 넘버링에 대한 G-CSFR 아미노산 위치는 서열번호 101의 아미노산 2 내지 308에 상응한다.

표 2

G-CSFE 및 G-CSFREE 돌연변이체를 갖는 부위 II 설계.

[0303]

설계	돌연변이체 G-CSFE	돌연변이체 G-CSFREE
1	E19K	R288E
2	S12K_E19K	R288E
6	D104K	K168D
7	D104R_L108R_T115K	168D_L171E_Q174E
8	S12R_L18F_D104R_L108K_D112R	R167D_K168D_D197E
9	D104R_L108K_D112R_Q119R_E122K	R141E_R167D_K168D_Q174D
15	K16D_T115E_T116D_Q119E	L171R_Y173V_D197R
17	E122R_E123R	R141E
18	E19K_Q20E	Y173K_R288E
19	K16E_E19K	D200R_R288E
20	E19K_D104K	K168D_R288E
21	E19K_D112R	L172E_R288E
22	E19K_D104K	K168E_M199D_R288D
23	S12E_K16D_E19K	D197K_D200K_R288E
24	E19R_D112K	R167D_V202D_R288E
25	E19K_D109R_D112R	R167D_M199D_R288D
27	E19R_D104R_L108K_D112R	R167D_K168D_V202E_I239V_R288E
28	E19K_D109K_D112R_E122R_E123R	R141E_R167D_M199D_R288E
30	L108K D112R	R167D
34	L108K_D112R_E122R_E123R	R141E_R167D
35	T115K_E122R_E123R	R141E_L171E_Q174E
36	S12E_K16E_T115E_Q119E	L171R_D197K_D200R
42	E19K_D109K_D112R	R167D_L172E_M199D_R288D
43	E19R_D104R_D112K	R167D_K168D_V202D_R288E
44	E19K_D104R_L108R_D112R	R167D_K168D_R288D
45	E19K_D112K_T115K	R167E_L171E_Q174E_R288E
46	E19K_D104K_E122R_E123R	R141E_K168D_R288E
47	E19R_E122R_E123R	R141E_V202E_I239V_R288E
48	E19K_D109K_D112R	R167F_L172E_M199D_R288D
49	K16E_E19R_T115E_Q119E	L171R_D197K_D200K_R288E

[0304]

50	E19K_D104R_L108K_D112R	R167D_K168D_V202E_R288E
80	D112K T115K	R167E Q174E
81	E19K	R288D
82	L108K_D112R	R141E_R167D
83	E19R_D112K	R167D_R288E

표 3

부위 III 설계.

설계 #	돌연변이체 G-CSFE	돌연변이체 G-CSFRE
51	E46R_L49K	S30D_R41E
52	K40D_L41D	F75K_Q91K
53	L41K_E46R	R41E_Q91D
54	L41E_L47D	I88K
55	T38R_E46R	R41E_Q73E
56	K40D_R147E	F75K_E93K
57	E46R_V48R	R41E_Q87E
58	E46R	R41E_L86D
59	K40D_E46R	R41E_F75K
60	E46R	R41E_I88D
61	E46R_L49F	R41E_L89A
62	L41D	Q91K
63	T38R	Q73E
64	Y39E_K40D	F75K
65	L41K	I88E_Q91D
66	E46R	R41E
67	E46R	R41E_S79D
68	K40D	F75K
69	V48K	Q87D
70	R147E	E93K
71	L41K	Q91D
72	K40F	F75K

[0305]

표 4

부위 II 설계와 III 설계의 조합으로부터 생성된 설계의 예

[0306]

설계 번호	돌연변이체 G-CSF$_E$	돌연변이체 G-CSFR$_E$	모 부위 II 설계	모 부위 III 설계
106	E46R_D104K	R41E_K168D	6	66
117	E46R_E122R_E123R	R41E_R141E	17	66
130	E46R_L108K_D112R	R41E_R167D	30	66
134	E46R_L108K_D112R_E122R_E123R	R41E_R141E_R167D	34	66
135	E46R_T115K_E122R_E123R	R41E_R141E_L171E_Q174E	35	66
137	E46R_L108K_D112R	R41E_R141E_R167D	82	66
300	K40D_L41D_L108K_D112R	F75K_Q91K_R167D	30	52
301	T38R_E46R_L108K_D112R	R41E_Q73E_R167D	30	55
302	E46R_L108K_D112R	R41E_L86D_R167D	30	58
303	L108K D112R_R147E	E93K_R167D	30	70
304	E46R_L108K_D112R_R147E	R41E_E93K_R167D	30	66,70
305	E19K_E46R_L108K_D112R	R41E_R167D_R288E	1,30	66
307	S12E_K16D_E19K_E46R	R41E_D197K_D200K_R288E	23	66
308	E19R_E46R_D112K	R41E_R167D_V202D_R288E	24	66

[0307]

400	E19K_E46R_D109R_D112R	R41E_R167D_M199D_R288D	25	66
401	E19K_E46R_L108K_D112R	R41E_R167D_R288D	30,81	66
402	E19K_E46R_D112K_T115K	R41E_R167E_Q174E_R288E	1,80	66
403	E19R_E46R_D112K	R41E_R167D_R288E	83	66

[0308] [표 4A]

예시적인 G-CSFR 과 G-CSF 쌍

G-CSF 변이체 번호	G-CSF 돌연변이체	상응하는 G-CSFR 돌연변이체
130	E46R_L108K_D112R	R41E_R167D
130a1	E46R_L108K_D112R_E122K	R41E_R141E_R167D
130b1	E46R_L108K_D112R_ E123K	
130a2	E46R_L108K_D112R_E122R	
130b2	E46R_L108K_D112R_ E123R	
130a1b1	E46R_L108K_D112R_E122K_E123K	
134	E46R_L108K_D112R_E122R_E123R	

[0309]

[0310] *키메라 수용체*

[0311] 특정 양상에서, 본 명세서에 기재된 변이체 수용체는 키메라 수용체이다. 키메라 수용체는 본 명세서에 기재된 변이체 G-CSFR ECD 도메인 중 임의의 것을 포함할 수 있다. 특정 양상에서, 키메라 수용체는 상이한 사이토카인 수용체의 세포내 도메인(ICD)의 적어도 일부를 추가로 포함한다. 상이한 사이토카인 수용체의 세포내 도메인은 gp130(당단백질 130, 인터류킨-6 수용체 또는 IL-6R의 소단위), IL-2Rβ 또는 IL-2Rb(인터류킨-2 수용체 베타), IL-2Rɣ 또는 ɣc 또는 IL-2RG(인터류킨-2 수용체 감마), IL-7Rα(인터류킨-7 수용체 알파), IL-12Rβ$_2$(인터류킨-12 수용체 베타 2), IL-21R(인터류킨-21 수용체), IL-4R(인터류킨-4 수용체), EPOR (에리트로포이에틴 수용체), IFNAR(인터페론 알파/베타 수용체) 또는 IFNɣR(인터페론 감마 수용체)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 특정 양상에서, 세포내 도메인의 적어도 일부는 본 명세서에 기재된 사이토카인 수용체 ICD의 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 아미노산 동일성을 공유하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 양상에서, 사이토카인 수용체 ICD의 적어도 일부는 서열번호 4, 7 또는 9와 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 공유한다. 특정 양상에서, 세포내 도메인의 적어도 일부는 표 26에 열거된 사이토카인 수용체의 사이토카인 수용체 ICD의 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 아미노산 동일성을 공유하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0312] 특정 실시형태에서, 본 명세서에는 제2 도메인에 작동 가능하게 연결된 G-CSFR(과립구-집락 자극 인자 수용체)의 세포외 도메인(ECD)을 포함하는 키메라 사이토카인 수용체가 기재되고; 제2 도메인은 다중-소단위 사이토카인 수용체, 예를 들어, IL-2R의 세포내 도메인(ICD)의 적어도 일부를 포함한다. 특정 양상에서, 키메라 사이토카인 수용체는 표 15A, 표 15B, 표 23 및 표 24로부터의 ICD의 일부를 포함한다. 특정 양상에서, 키메라 사이토카인 수용체는 표 15A 및 표 15B로부터 선택된 막관통 도메인을 포함한다. 특정 양상에서, 키메라 사이토카인 수용체 ICD는 표 15A, 표 15B, 표 16 표 23 및 표 24로부터의 Bo×1 및 Box 2 영역을 포함한다.

[0313] 특정 양상에서, 키메라 사이토카인 수용체는 표 15A, 표 15B, 표 16, 표 23, 표 24 및 표 27로부터의 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위를 포함한다. 일부 실시형태에서, ICD의 신호전달 분자 결합 부위(들)는 서열번호 118 내지 146에 제시된 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, ICD의 신호전달 분자 결합 부위(들)은 서열번호 118 내지 146 중 적어도 하나에 제시된 서열과 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다.

[0314] 특정 양상에서, 본 명세서에 기재된 키메라 수용체는 표s 17-20, 23, 24, 26 및 32 각각에 개시된 서열의 N-말단에서 C-말단 순서로 아미노산 서열을 포함한다. 특정 양상에서, 본 명세서에 기재된 키메라 수용체의 서열은 표 17 내지 표 20 각각에 개시된 서열의 5'에서 3' 순서로 아미노산 서열을 포함한다. 특정 양상에서, 키메라 사이토카인 수용체는 표 17 내지 20 및 23, 24, 26 및 32 각각에 게시된 아미노산 서열의 N-말단에서 C-말단 순

서로 아미노산 서열과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 아미노산 동일성을 공유한다. 특정 양상에서, 키메라 사이토카인 수용체는 표 17 내지 표 20 각각에 게시된 아미노산 서열의 5'에서 3' 순서로 핵산 서열과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 핵산 동일성을 공유한다.

[0315] 특정 양상에서, 본 명세서에 기재된 키메라 수용체는 본 명세서에 기재된 ICD 서열번호과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 아미노산 또는 핵산 서열 동일성을 공유하는 사이토카인 수용체의 ICD의 적어도 일부를 포함한다. 특정 양상에서, 키메라 수용체는 서열번호 26, 29, 31, 39, 41, 43, 45, 47, 또는 49의 아미노산 서열을 갖는 IL-2Rβ의 ICD의 적어도 일부를 포함한다. 특정 양상에서, 키메라 수용체는 서열번호 54, 57, 59, 67, 69, 71, 73, 75, 또는 77의 핵산 서열을 갖는 IL-2Rβ, 즉, IL-2Rb의 ICD의 적어도 일부를 포함한다. 특정 양상에서, 키메라 수용체는 서열번호 51의 아미노산 서열 또는 서열번호 79의 핵산 서열을 갖는 IL-7Rα의 ICD의 적어도 일부를 포함한다. 특정 양상에서, 키메라 수용체는 서열번호 53의 아미노산 서열 또는 서열번호 81의 핵산 서열을 갖는 IL-7R의 ICD의 적어도 일부를 포함한다. 특정 양상에서, 키메라 수용체는 서열번호 35 또는 37의 아미노산 서열을 갖는 IL-21R의 ICD의 적어도 일부를 포함한다. 특정 양상에서, 키메라 수용체는 서열번호 63 또는 65의 핵산 서열을 갖는 IL-21R의 ICD의 적어도 일부를 포함한다. 특정 양상에서, 키메라 수용체는 서열번호 33, 42 또는 46의 아미노산 서열을 갖는 IL-12Rβ$_2$의 ICD의 적어도 일부를 포함한다. 특정 양상에서, 키메라 수용체는 서열번호 61, 70 또는 74의 핵산 서열을 갖는 IL-12Rβ$_2$의 ICD의 적어도 일부를 포함한다. 특정 양상에서, 키메라 수용체는 서열번호 30, 32, 34, 36, 38, 40, 44, 50 또는 52의 아미노산 서열을 갖는 G-CSFR의 ICD의 적어도 일부를 포함한다. 특정 양상에서, 키메라 수용체는 서열번호 58, 60, 62, 64, 66, 68, 72, 78 또는 80의 핵산 서열을 갖는 G-CSFR의 ICD의 적어도 일부를 포함한다. 특정 양상에서, 키메라 수용체는 서열번호 28 또는 48의 아미노산 서열을 갖는 gp130의 ICD의 적어도 일부를 포함한다. 특정 양상에서, 키메라 수용체는 서열번호 56 또는 76의 핵산 서열을 갖는 gp130의 ICD의 적어도 일부를 포함한다. 특정 양상에서, 키메라 수용체는 서열번호 27의 아미노산 서열을 갖는 IL-2Rɣ (즉, IL-2RG, IL-2Rgc, ɣc 또는 IL-2Rɣ)의 ICD의 적어도 일부를 포함한다. 특정 양상에서, 키메라 수용체는 서열번호 55의 핵산 서열을 갖는 IL-2Rɣ(즉, IL-2RG, IL-2Rgc, ɣc, 또는 IL-2Rɣ)의 ICD의 적어도 일부를 포함한다.

[0316] 특정 양상에서, 본 명세서에 기재된 ICD의 적어도 일부는 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위를 포함한다. 특정 양상에서, 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위는 G-CSFR의 STAT3 결합 부위; gp130의 STAT3 결합 부위; gp130의 SHP-2 결합 부위; IL-2Rβ의 Shc 결합 부위; IL-2Rβ의 STAT5 결합 부위; IL-2Rβ의 STAT3 결합 부위; IL-2Rβ의 STAT1 결합 부위; IL-7Rα의 STAT5 결합 부위; IL-7Rα의 포스파티딜이노시톨 3-키나제(PI3K) 결합 부위; IL-12Rβ$_2$의 STAT5 결합 부위; IL-12Rβ$_2$의 STAT4 결합 부위; IL-12Rβ$_2$의 STAT3 결합 부위; IL-21R의 STAT5 결합 부위; IL-21R의 STAT3 결합 부위; 및 IL-21R의 STAT1 결합 부위이다. 특정 양상에서, 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위는 표 16에 열거된 아미노산을 더 포함하는 서열을 포함한다.

[0317] 특정 실시형태에서, 키메라 수용체는 사이토카인 수용체의 세포내 도메인으로부터의 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위를 포함한다. 특정 실시형태에서, 키메라 수용체는 표 24의 세포내 도메인으로부터의 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위는 인터류킨(IL)-2Rβ의 SHC 결합 부위; IL-2Rβ의 STAT5 결합 부위, IL-4Rα의 IRS-1 또는 IRS-2 결합 부위, IL-4Rα의 STAT6 결합 부위, gp130의 SHP-2 결합 부위, gp130의 STAT3 결합 부위, 에리트로포이에틴 수용체(EPOR)의 SHP-1 또는 SHP-2 결합 부위, EPOR의 STAT5 결합 부위, 인터페론 알파 및 베타 수용체 소단위 2(IFNAR2)의 STAT1 또는 STAT2 결합 부위 및 인터페론 감마 수용체 1(IFNɣR1)의 STAT1 결합 부위 또한 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0318] 특정 실시형태에서, 키메라 수용체 ICD는 G-CSFR, gp130, EPOR 및 인터페론 감마 수용체 2(IFNɣR2) 또한 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 단백질의 적어도 하나의 Box 1 영역 및 적어도 하나의 Box 2 영역을 추가로 포함한다.

[0319] 특정 양상에서, 본 명세서에 기재된 ICD의 적어도 일부는 gp130 또는 G-CSFR의 Box 1 및 Box 영역을 포함한다. 특정 양상에서 Box 1 영역은 표 2에 열거된 아미노산의 서열을 포함한다. 특정 양상에서 Box 1 영역은 표 16에 열거된 Box 1 서열과 50%를 초과하게 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0320] 특정 양상에서, ICD는 (a) 서열번호 90 또는 91 중 하나 또는 둘 다의 아미노산 서열; 또는 (b) 서열번호 90 또는 92 중 하나 또는 둘 다의 아미노산 서열; 또는 (c) 서열번호 93의 아미노산 서열; 또는 (d) 서열번호 94의 아미노산 서열; 또는 (e) 서열번호 95 또는 96 중 하나 또는 둘 다의 아미노산 서열; 또는 (f) 서열번호 97 또는 98의 아미노산 서열; 또는 (g) 서열번호 99 또는 100의 아미노산 서열을 포함한다.

[0321] 특정 양상에서, 상이한 사이토카인 수용체의 세포내 도메인은 야생형 세포내 도메인이다.

[0322] 특정 양상에서, 본 명세서에 기재된 키메라 변이체 수용체는 G-CSFR의 막관통 도메인(TMD)의 적어도 일부를 추가로 포함한다. 특정 양상에서, 본 명세서에 기재된 키메라 변이체 수용체는 사이토카인 수용체의 막관통 도메인(TMD)의 적어도 일부를 추가로 포함한다. 상이한 사이토카인 수용체의 TMD는 G-CSFR, gp130(당단백질 130), IL-2Rβ(인터류킨-2 수용체 베타), IL-2Rɣ 또는 ɣc(IL-2 수용체 감마), IL-7Rα(인터류킨-7 수용체 알파), IL-12Rβ$_2$(인터류킨-12 수용체 베타 2) 및 IL-21R(인터류킨-21 수용체)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

특정 양상에서, TMD의 적어도 일부는 본 명세서에 기재된 사이토카인 수용체 TMD의 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 아미노산 동일성을 공유하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 양상에서, 사이토카인 수용체 TMD의 적어도 일부는 서열번호 4, 5, 7 또는 9와 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 아미노산 서열 동일성을 공유한다.

[0323] 특정 양상에서, 본 명세서에 기재된 키메라 수용체는 도 20, 23 및 24의 키메라 수용체 설계에 제시된 바와 같은 G-CSFR ECD 도메인, 막관통 도메인(TMD) 및 N-말단에서 C-말단 순서로 배열된 1개의 ICD의 적어도 하나의 부분을 포함한다.

[0324] 특정 양상에서, 키메라 수용체는 서열번호 3의 G-CSFR ECD, 서열번호 4의 gp130 TMD 및 ICD의 일부 및 서열번호 5의 IL-2Rβ ICD의 일부를 포함한다. 특정 양상에서, 키메라 수용체는 서열번호 6의 G-CSFR ECD, 및 서열번호 7의 IL-2Rβ ICD의 일부를 포함한다. 특정 양상에서, 키메라 수용체는 서열번호 8의 G-CSFR ECD, 및 서열번호 9의 IL-2Rɣ ICD의 일부를 포함한다.

[0325] 세포 표면 상에서 발현되는 키메라 사이토카인 수용체에 대한 변이체 또는 야생형 사이토카인의 결합은 (천연 사이토카인 수용체 활성과 비교하여) 변이체 사이토카인 수용체의 기능에 영향을 미치거나 영향을 미치지 않을 수 있고; 모든 경우에 천연 활성이 필요하거나 바람직한 것은 아니다. 특정 실시형태에서, 키메라 사이토카인 수용체에 대한 변이체의 결합은 천연 사이토카인 신호전달의 하나 이상의 양상을 유도할 것이다. 특정 실시형태에서, 세포 표면 상에서 발현되는 키메라 사이토카인 수용체에 대한 변이체 사이토카인의 결합은 증식, 생존력, 지속성, 세포독성, 사이토카인 분비, 기억 및 향상된 활성으로 이루어진 군으로부터 선택된 세포 반응을 초래한다.

[0326] *IL-7Rα의 ECD를 포함하는 수용체*

[0327] 특정 양상에서, 본 명세서에는 (i) 인터류킨-7 수용체 알파(IL-7Rα)의 세포외 도메인(ECD); (ii) 막관통 도메인(TMD); 및 (iii) 서열번호 109에 제시된 야생형, 인간 IL-7Rα 세포내 신호전달 도메인과 구별되는 사이토카인 수용체의 세포내 도메인(ICD)을 포함하는 키메라 수용체가 개시되며; ECD 및 TMD는 각각 ICD에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시형태에서, ECD의 카복시 말단(C-말단)은 TMD의 아미노 말단(N-말단)에 연결되고, TMD의 C-말단은 ICD의 N-말단에 연결된다. 일부 실시형태에서, ECD는 천연 인간 IL-7Rα의 ECD이다. 일부 실시형태에서, TMD는 IL-7Rα의 TMD이다. 일부 실시형태에서, TMD는 천연 인간 IL-7Rα의 TMD이다. 일부 실시형태에서, ICD는 사이토카인 수용체의 세포내 도메인으로부터의 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위를 포함하고, 선택적으로, 적어도 하나의 신호전달 분자 결합 부위는 (a) IL-2Rβ, IL-4Rα, IL-7Rα, IL-21R 또는 gp130의 JAK1 결합 부위(Box 1 및 2 영역); (b) IL-2Rβ의 SHC 결합 부위; (c) IL-2Rβ 또는 IL-7Rα의 STAT5 결합 부위; (d) IL-21R 또는 ɣp130의 STAT3 결합 부위; (e) IL-12Rβ2의 STAT4 결합 부위; (f) IL-4Rα의 STAT6 결합 부위; (g) IL-4Rα의 IRS-1 또는 IRS-2 결합 부위; (h) gp130의 SHP-2 결합 부위; (i) IL-7Rα의 PI3K 결합 부위; 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, ICD는 ICD가 이의 천연 수용체의 일부인 경우 공통 감마 쇄(ɣc)와의 이종이량체화에 의해서 활성화되는 수용체의 적어도 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 키메라 수용체의 ICD는 공통 감마 쇄와 이종이량체화되지 않는다. 일부 실시형태에서, 키메라 수용체의 ICD는 활성화 시 동종이량체화된다. 일부 실시형태에서, ICD는 IL-2Rβ(인터류킨-2 수용체 베타), IL-4Rα(인터류킨-4 수용체 알파), IL-9Rα(인터류킨-9 수용체 알파), IL-12Rβ2(인터류킨-12 수용체), IL-21R(인터류킨-21 수용체) 및 당단백질 130(gp130) 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 사이토카인 수용체의

적어도 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.

[0328] 특정 양상에서, 본 명세서에는 IL-7Rα의 ECD 및 ICD에 작동 가능하게 연결된 TMD를 포함하는 키메라 수용체가 기재되며, ICD는

[0329] (i)

[0330] (a) IL-2Rβ의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0331] (b) IL-2Rβ의 SHC 결합 부위; 및

[0332] (c) IL-2Rβ의 STAT5 결합 부위; 또는

[0333] (ii)

[0334] (a) IL-7Rα의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0335] (b) IL-2Rβ의 SHC 결합 부위; 및

[0336] (c) IL-2Rβ의 STAT5 결합 부위; 또는

[0337] (iii)

[0338] (a) IL-2Rβ의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0339] (b) IL-2Rβ의 SHC 결합 부위;

[0340] (c) IL-2Rβ의 STAT5 결합 부위; 및

[0341] (d) IL-12Rβ2의 STAT4 결합 부위; 또는

[0342] (iv)

[0343] (a) IL-7Rα의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0344] (b) IL-2Rβ의 SHC 결합 부위;

[0345] (c) IL-2Rβ의 STAT5 결합 부위; 및

[0346] (d) IL-12Rβ2의 STAT4 결합 부위; 또는

[0347] (v)

[0348] (a) IL-21R의 Box 1 및 Box 2 영역; 및

[0349] (b) IL-21R의 STAT3 결합 부위; 또는

[0350] (vi)

[0351] (a) IL-7Rα의 Box 1 및 Box 2 영역; 및

[0352] (b) IL-21R의 STAT3 결합 부위; 또는

[0353] (vii)

[0354] (a) IL-21R의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0355] (b) IL-21R의 STAT3 결합 부위; 및

[0356] (c) IL-7Rα의 STAT5 및 PI3 키나제 결합 부위;

[0357] (viii)

[0358] (a) IL-7Rα의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0359] (b) IL-21R의 STAT3 결합 부위; 및

[0360] (c) IL-7Rα의 STAT5 및 PI3 키나제 결합 부위;

[0361] (ix)

[0362] (a) IL-2Rβ의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0363] (b) IL-2Rβ의 SHC 결합 부위;

[0364] (c) IL-2Rβ의 STAT5 결합 부위; 및

[0365] (d) IL-21R의 STAT3 결합 부위; 또는

[0366] (x)

[0367] (a) IL-7Rα의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0368] (b) IL-2Rβ의 SHC 결합 부위;

[0369] (c) IL-2Rβ의 STAT5 결합 부위; 및

[0370] (d) IL-21R의 STAT3 결합 부위; 또는

[0371] (xi)

[0372] (a) IL-2Rβ의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0373] (b) IL-2Rβ의 SHC 결합 부위;

[0374] (c) IL-2Rβ의 STAT5 결합 부위;

[0375] (d) IL12Rβ2의 STAT4 결합 부위; 및

[0376] (e) IL-21R의 STAT3 결합 부위; 또는

[0377] (xii)

[0378] (a) IL-7Rα의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0379] (b) IL-2Rβ의 SHC 결합 부위;

[0380] (c) IL-2Rβ의 STAT5 결합 부위;

[0381] (d) IL12Rβ2의 STAT4 결합 부위; 및

[0382] (e) IL-21R의 STAT3 결합 부위; 또는

[0383] (xiii)

[0384] (a) IL-4Rα의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0385] (b) IL-4Rα의 IRS-1 또는 IRS-2 결합 부위; 및

[0386] (c) IL-4Rα의 STAT6 결합 부위; 또는

[0387] (xiv)

[0388] (a) IL-7Rα의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0389] (b) IL-4α의 IRS-1 또는 IRS-2 결합 부위; 및

[0390] (c) IL-4α의 STAT6 결합 부위; 또는

[0391] (xv)

[0392] (a) gp130의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0393] (b) gp130의 SHP-2 결합 부위; 및

[0394] (c) gp130의 STAT3 결합 부위; 또는

[0395] (xvi)

[0396] (a) IL-7Rα의 Box 1 및 Box 2 영역;

[0397] (b) gp130의 SHP-2 결합 부위; 및

[0398] (c) gp130의 STAT3 결합 부위를 포함한다.

[0399] 일부 실시형태에서, (b)는 (c)에 대해 N-말단이거나; (c)는 (b)에 대해 N-말단이거나; (c)는 (d)에 대해 N-말단이거나; (d)는 (c)에 대해 N-말단이거나; (d)는 (e)에 대해 N-말단이거나; (e)는 (d)에 대해 N-말단이다.

[0400] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 ICD는 gp130 또는 G-CSFR의 Box 1 및 Box 2 영역을 포함한다. 특정 양상에서 Box 1 영역은 표 16에 열거된 아미노산의 서열을 포함한다. 특정 양상에서 Box 1 영역은 표 16에 열거된 Box 1 서열과 50%를 초과하게 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0401] 일부 실시형태에서, ICD는 서열번호 192 내지 214 중 적어도 하나에 제시된 서열과 동일한 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다.

[0402] 일부 실시형태에서, ICD의 신호전달 분자 결합 부위(들)는 서열번호 118 내지 146에 제시된 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, ICD의 신호전달 분자 결합 부위(들)은 서열번호 118 내지 146 중 적어도 하나에 제시된 서열과 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 특정 양상에서, 키메라 사이토카인 수용체는 표 32에 게시된 아미노산 서열의 N-말단에서 C-말단 순서로 아미노산 서열과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 아미노산 동일성을 공유한다.

[0403] *키메라 수용체 및 IL-7을 포함하는 시스템*

[0404] 특정 양상에서, 본 개시내용은 세포 표면 상에서 발현되는 수용체의 선택적 활성화를 위한 시스템을 기재하며, 시스템은 (a) 본 명세서에 기재된 키메라 수용체; 및 (b) IL-7을 포함한다.

[0405] 특정 양상에서, 본 개시내용은 면역 세포의 선택적 활성화를 위한 시스템을 기재하며, 시스템은 (a) 본 명세서에 기재된 키메라 수용체; (b) IL-7; 및 (c) 항원 결합 신호전달 수용체를 포함한다.

[0406] 특정 양상에서, 본 개시내용은 면역 세포의 선택적 활성화를 위한 시스템을 기재하며, 시스템은 (a) 본 명세서에 기재된 키메라 수용체; (b) IL-7; 및 (c) 적어도 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)을 포함하며; 선택적으로, 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들), 또는 다른 친화성 시약을 포함한다. 일부 실시형태에서, 사이토카인 또는 케모카인은 IL-18, IL-21, 인터페론-α, 인터페론-β, 인터페론-γ, IL-17, IL-21, TNF-α, CXCL13, CCL3(MIP-1α), CCL4(MIP-1β), CD40 리간드, B 세포 활성화 인자(BAFF), Flt3 리간드, CCL21, CCL5, XCL1, CCL19, NKG2D 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 사이토카인은 IL-18이다. 일부 실시형태에서, 사이토카인은 인간이다.

[0407] 일부 실시형태에서, 시스템은 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체는 천연 T 세포 수용체, 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), 천연 B 세포 수용체, 조작된 B 세포 수용체(BCR), 스트레스 리간드 수용체, 패턴 인식 수용체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 수용체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체는 CAR이다.

[0408] **효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질**

[0409] 특정 양상에서, 본 명세서에 기재된 시스템 및 방법은 (a) 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)로서, 선택적으로, 상기 적어도 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 다른 친화성 시약(들)을 포함하는, 상기 신호전달 단백질(들); 및 (b) 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체(들)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 추가적인 사이토카인(들) 또는 케모카인(들)은 인터류킨(IL)-18, IL-21, 인터페론-α, 인터페론-β, 인터페론-γ, IL-17, IL-21, TNF-α, CXCL13, CCL3(MIP-1α), CCL4(MIP-1β), CD40 리간드, B 세포 활성화 인자(BAFF), Flt3 리간드, CCL21, CCL5, XCL1 또는 CCL19 및 수용체 NKG2D 및 이들의 조합 중 적어도 하나를 포함한다.

[0410] **항원 결합 신호전달 수용체**

[0411] 특정 양상에서, 본 명세서에 기재된 시스템 및 방법은 항원 결합 신호전달 수용체(들)를 포함한다. 일부 실시형

태에서, 항원 결합 신호전달 수용체(들)는 천연 T 세포 수용체, 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), 천연 B 세포 수용체, 조작된 B 세포 수용체(BCR), 스트레스 리간드 수용체, 패턴 인식 수용체 및 이들의 조합 중 적어도 하나를 포함한다. 본 명세서에 기재된 메소텔린 CAR 및 임의의 CAR을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 당업계에 공지된 임의의 CAR이 사용될 수 있다. 본 명세서에 기재된 임의의 TCR을 포함하지만 이들로 제한되지 않은 당업계에 공지된 임의의 TCR이 사용될 수 있다.

[0412] **변이체 사이토카인 및 수용체를 암호화하는 핵산**

[0413] 본 개시내용에는 본 명세서에 기재된 수용체 및 변이체 G-CSF 중 임의의 것을 암호화하는 핵산이 포함된다.

[0414] 변이체 수용체 또는 변이체 G-CSF는 직접적으로뿐만 아니라 비상동 폴리펩타이드, 예를 들어, 신호 서열 또는 성숙 단백질 또는 폴리펩타이드의 N-말단에 특이적 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩타이드와의 융합 폴리펩타이드로서 재조합 방식으로 생산될 수 있다. 일반적으로, 신호 서열은 벡터의 성분일 수 있거나 그것은 벡터에 삽입되는 암호 서열의 일부일 수 있다. 선택된 비상동 신호 서열은 바람직하게는 숙주 세포에 의해서 인식되거나 가공되는(즉, 신호 펩티다제에 의해서 절단되는) 것이다. 포유동물 세포 발현에서 천연 신호 서열이 사용될 수 있거나, 다른 포유동물 신호 서열, 예컨대, 동일하거나 관련된 종의 분비된 폴리펩타이드로부터의 신호 서열뿐만 아니라 바이러스 분비성 리더가 적합할 수 있다. 특정 양상에서, 신호 서열은 서열번호 2, 3, 6 또는 8의 N-말단 영역에서 신호 서열을 포함하는 아미노산 서열일 수 있다. 특정 양상에서, 신호 서열은 MARLGNCSLTWAALIILLLPGSLE(서열번호 11)의 아미노산 서열일 수 있다.

[0415] 본 개시내용에는 본 명세서에 기재된 수용체, IL-7 및 변이체 G-CSF 중 임의의 것을 암호화하는 핵산이 포함된다.

[0416] 변이체 수용체 또는 야생형 또는 변이체 IL-7 또는 변이체 G-CSF는 직접적으로뿐만 아니라 비상동 폴리펩타이드, 예를 들어, 신호 서열 또는 성숙 단백질 또는 폴리펩타이드의 N-말단에 특이적 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩타이드와의 융합 폴리펩타이드로서 재조합 방식으로 생산될 수 있다. 일반적으로, 신호 서열은 벡터의 성분일 수 있거나 그것은 벡터에 삽입되는 암호 서열의 일부일 수 있다. 선택된 비상동 신호 서열은 바람직하게는 숙주 세포에 의해서 인식되거나 가공되는(즉, 신호 펩티다제에 의해서 절단되는) 것이다. 포유동물 세포 발현에서 천연 신호 서열이 사용될 수 있거나, 다른 포유동물 신호 서열, 예컨대, 동일하거나 관련된 종의 분비된 폴리펩타이드로부터의 신호 서열뿐만 아니라 바이러스 분비성 리더가 적합할 수 있다. 특정 양상에서, 신호 서열은 서열번호 2, 3, 6 또는 8의 N-말단 영역에서 신호 서열을 포함하는 아미노산 서열일 수 있다. 특정 양상에서, 신호 서열은 MTILGTTFGMVFSLLQVVSG(서열번호 84)의 아미노산 서열일 수 있다. 특정 양상에서, 신호 서열은 MARLGNCSLTWAALIILLLPGSLE(서열번호 11)의 아미노산 서열일 수 있다.

[0417] **변이체 사이토카인 또는 수용체를 암호화하는 발현 벡터**

[0418] 본 명세서에는 또한 본 명세서에 기재된 변이체 수용체, 변이체 G-CSF 또는 야생형 변이체 IL-7 중 하나 이상을 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열(들)을 포함하는 발현 벡터 및 발현 벡터의 키트가 기재된다.

[0419] 특정 실시형태에서, 변이체 수용체 또는 변이체 G-CSF를 암호화하는 핵산이 발현을 위해서 복제 가능한 벡터에 삽입된다. 이러한 벡터는 그것이 본 명세서에 기재된 변이체 수용체 또는 사이토카인을 발현하도록 숙주 세포에 핵산 서열(들)을 도입하기 위해서 사용될 수 있다. 다수의 이러한 벡터가 이용 가능하다. 벡터 성분은 일반적으로 복제 기점, 1개 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터 및 전사 종결 서열 중 1개 이상을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 벡터는 바이러스 벡터, 플라스미드 벡터, 통합 벡터 등을 포함한다. 벡터는 예를 들어, 플라스미드 또는 바이러스 벡터, 예컨대, 레트로바이러스 벡터, 아데나바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 또는 트랜스포존-기반 벡터 또는 합성 mRNA일 수 있다. 벡터는 세포(예를 들어, T 세포, NK 세포 또는 다른 세포)를 형질주입 형질도입시킬 수 있다.

[0420] 발현 벡터는 일반적으로 선택 가능한 마커라고도 지칭되는 선택 유전자를 함유한다. 이 유전자는 선택적 배양 배지에서 성장된 형질전환된 숙주 세포의 생존 또는 성장에 필요한 단백질을 암호화한다. 선택 유전자를 함유하는 벡터로 형질전환되지 않은 숙주 세포는 배양 배지에서 생존할 수 없을 것이다. 전형적인 선택 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 독소, 예를 들어, 암피실린, 네오마이신, 메토트렉세이트 또는 테트라사이클린에 대한 내성을 부여하거나, (b) 영양요구성 결핍을 보완하거나, (c) 복합 배지로부터 입수 가능하지 않은 중요한 영양소를 공급하는 단백질을 암호화한다.

[0421] 특정 양상에서, 발현 벡터는 숙주 유기체에 의해 인식되고 변이체 단백질 암호 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 함유한다. 프로모터는 이들이 작동 가능하게 연결된 특정 핵산 서열의 전사 및 번역을 제어하는 구조

유전자의 시작 코돈(일반적으로 약 100 내지 1000bp 이내)의 상류(5')에 위치된 미번역 서열이다. 이러한 프로모터는 전형적으로 유도성 및 구성성의 두 가지 부류에 속한다. 유도성 프로모터는 배양 조건의 일부 변화, 예를 들어, 영양소의 존재 또는 부재 또는 온도 변화에 응답하여 이의 제어 하에서 DNA로부터 증가된 전사 수준을 개시하는 프로모터이다. 다양한 잠재적인 숙주 세포에 의해 인식되는 많은 수의 프로모터가 널리 공지되어 있다.

[0422] 포유동물 숙주 세포에서 벡터로부터의 전사는 예를 들어, 바이러스, 예컨대, 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스, 아데노바이러스(예컨대, 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 거대세포 바이러스, 레트로바이러스(예컨대, 뮤린 줄기세포 바이러스), B형 간염 바이러스 및 가장 바람직하게는 유인원 바이러스 40(SV40)의 게놈으로부터 얻은 프로모터에 의해서 또는 이종 포유동물 프로모터, 예를 들어, 액틴 프로모터, PGK(포스포글리세레이트 키나제) 또는 면역글로불린 프로모터, 열 충격 프로모터(이러한 프로모터가 숙주 세포 시스템과 상용성인 경우)로부터 제어될 수 있다 SV40 바이러스의 초기 및 후기 프로모터는 SV40 바이러스 복제 기점을 또한 함유하는 SV40 제한 단편으로 편리하게 얻어진다.

[0423] 고등 진핵생물에 의한 전사는 종종 인핸서 서열을 벡터에 삽입함으로써 증가된다. 인핸서는 보통 약 10 내지 300bp의 DNA의 시스-작용 요소이며, 이것은 프로모터에 작용하여 이의 전사를 증가시킨다. 인핸서는 인트론 내에서 뿐만 아니라 암호 서열 자체 내에서 전사 단위에 대해 5' 및 3'에서 발견된, 상대적인 배향 및 위치 독립적이다. 많은 인핸서 서열이 포유동물 유전자(글로빈, 엘라스타제, 알부민, 태아단백질 및 인슐린)로부터 공지되어 있다. 그러나, 전형적으로 진핵 세포 바이러스로부터의 인핸서를 사용한다. 예는 복제 기점의 후기 측면 상의 SV40 인핸서, 거대세포바이러스 초기 프로모터 인핸서, 복제 기점의 측면 상의 폴리오마 인핸서 및 아데노바이러스 인핸서를 포함한다. 인핸서는 암호 서열의 위치 5' 또는 3'에서 발현 벡터 내로 스플라이싱될 수 있지만, 바람직하게는 프로모터로부터 부위 5'에 위치된다.

[0424] 진핵 숙주 세포에서 사용되는 발현 벡터는 또한 전사 종결 및 mRNA 안정화에 필요한 서열을 함유할 것이다. 이러한 서열은 일반적으로 진핵생물 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5' 및 때로는 3', 미번역 영역으로부터 입수 가능하다. 상기에 열거된 성분 중 하나 이상을 함유하는 적합한 벡터의 작제는 표준 기술을 사용한다.

[0425] 특정 양상에서, 본 명세서에는 본 명세서에 개시된 키메라 수용체를 암호화하는 렌티바이러스 벡터가 개시된다. 특정 양상에서, 렌티바이러스 벡터는 HIV-1 5' LT 및 3' LTR을 포함한다. 특정 양상에서, 렌티바이러스 벡터는 EF1a 프로모터를 포함한다. 특정 양상에서, 렌티바이러스 벡터는 SV40 폴리 a 종결인자 서열을 포함한다. 특정 양상에서, 벡터는 psPAX2, 애드진사® 12260, pCMV-VSV-G 또는 애드진사® 8454이다.

[0426] 일부 실시형태에서, 높은 서열 동일성, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 서열에 대해 95, 96, 97, 98, 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 핵산 및 폴리펩타이드 서열이 또한 기재된다. 2개 이상의 핵산 또는 폴리펩타이드 서열과 관련하여 백분율 서열 "동일성"이라는 용어는 하기에 기재된 서열 비교 알고리즘 중 하나(예를 들어, BLASTP 및 BLASTN 또는 당업자가 사용할 수 있는 다른 알고리즘) 중 하나를 사용하거나 육안 검사에 의해 측정된 바와 같은 최대 관련성에 대해서 비교하거나 정렬할 때, 동일한 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기의 명시된 백분율을 갖는 2개 이상의 서열 또는 하위서열을 지칭한다. 적용에 따라, "동일성" 백분율은 비교될 서열의 영역에 걸쳐, 예를 들어, 기능성 도메인에 걸쳐 존재할 수 있거나, 대안적으로 비교될 2개의 서열의 전체 길이에 걸쳐 존재할 수 있다.

[0427] 서열 비교를 위해, 전형적으로 하나의 서열은 시험 서열이 비교되는 참조 서열로 작용한다. 서열 비교 알고리즘을 사용하는 경우, 시험 서열 및 참조 서열을 컴퓨터에 입력하고, 필요에 따라 하위서열 좌표를 지정하고, 서열 알고리즘 프로그램 매개변수를 지정한다. 그 다음 서열 비교 알고리즘은 지정된 프로그램 매개변수에 기초하여 참조 서열과 관련된 시험 서열(들)의 서열 동일성 백분율을 계산한다.

[0428] 비교를 위한 서열의 최적 정렬은 예를 들어, 문헌[Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)]의 국지 상동성 알고리즘에 의해서, 문헌[Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)]의 상동성 정렬 알고리즘에 의해서, 문헌[Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)]의 유사성 방법에 대한 탐색에 의해서, 이들 알고리즘의 컴퓨터 구현(Wisconsin Genetics Software Package의 GAP, BESTFIT, FASTA 및 TFASTA, 지네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group), 미국 위스콘신주 매디슨 575 사이언스 드라이브 소재)에 의해서 또는 육안 검사(일반적으로 하기 문헌[Ausubel et al.] 참조)에 의해서 수행될 수 있다.

[0429] 서열 동일성 백분율 및 서열 유사성을 결정하기에 적합한 알고리즘의 일례는 BLAST 알고리즘이며, 이는 문헌[Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)]에 기재되어 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트

웨어는 국립 생명공학 정보 센터(National Center for Biotechnology Information)(www.ncbi.nlm.nih.gov/)를 통해 공개적으로 제공된다.

[0430] **변이체 수용체를 발현하는 세포 및 변이체 사이토카인**

[0431] 변이체 수용체를 발현하는 세포가 또한 본 명세서에 기재된다. 조작된 면역 세포를 포함하는 숙주 세포는 변이체 사이토카인 또는 수용체 발현을 위한 상기에 기재된 발현 벡터가 형질주입되거나 형질도입될 수 있다.

[0432] 특정 실시형태에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 변이체 수용체 또는 변이체 사이토카인 중 하나 이상을 포함하는 세포를 제공한다. 세포는 본 명세서에 기재된 변이체 수용체 또는 변이체 사이토카인을 암호화하하는 핵산 또는 벡터를 포함할 수 있다. 본 개시내용은 또한 변이체 수용체를 발현하는 세포를 생산하는 방법을 제공한다. 특정 양상에서, 세포는 본 명세서에 기재된 핵산 또는 발현 벡터를 세포 내로 도입함으로써 생산된다. 핵산 또는 발현 벡터는 형질주입, 바이러스 벡터의 형질도입, 전위 또는 유전자 편집을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 임의의 과정에 의해서 세포 내에 도입될 수 있다. 클러스터링된 규칙적으로 배치된 짧은 회문 반복체(clustered regularly interspaced short palindromic repeats: CRISPR-Cas) 시스템, 징크 핑거 뉴클레아제, 전사 활성화제-유사 효과기-기반 뉴클레아제 및 메가뉴클레아제를 포함하는 기술을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 당업계에 공지된 임의의 유전자 편집 기술이 사용될 수 있다.

[0433] 숙주 세포는 신체 내의 임의의 세포일 수 있다. 특정 실시형태에서, 세포는 면역 세포이다. 일부 실시형태에서, 세포는 미경험 $CD8^+$ T 세포, 세포독성 $CD8^+$ T 세포, 미경험 $CD4^+$ T 세포, 헬퍼 T 세포, 예를 들어, T_H1, T_H2, T_H9, T_H11, T_H22, T_{FH}; 조절성 T 세포, 예를 들어, T_R1, 자연 T_{Reg}, 유도성 T_{Reg}; 기억 T 세포, 예를 들어, 중심 기억 T 세포, 효과기 기억 T 세포, NKT 세포, γδT 세포 등을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 T 세포이다. 특정 실시형태에서, 세포는 B 세포, 예컨대, 비제한적으로 미경험 B 세포, 배중심 B 세포, 기억 B 세포, 세포독성 B 세포, 사이토카인-생산 B 세포, 조절성 B 세포(Breg), 중심모세포, 중심세포, 항체-분비 세포, 형질 세포 등을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 특정 실시형태에서, 세포는 NK 세포 등을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 선천 림프계 세포이다. 특정 실시형태에서, 세포는 대식세포, 수지상 세포, 골수계-유래 억제 세포 등을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 골수계 세포이다.

[0434] 특정 실시형태에서, 세포는 조혈 줄기세포, 간충직 줄기세포, 신경 줄기세포 등을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 줄기세포이다.

[0435] 일부 실시형태에서, 세포는 대상체에게 전달하기 전에 생체외 절차로 유전자 변형된다. 세포는 요법을 위해서 단위 용량으로 제공될 수 있고, 의도된 수여자와 관련하여 동종이계, 자가유래 등일 수 있다.

[0436] T 세포 또는 T 림프구는 세포-매개 면역에 중요한 역할을 하는 림프구의 유형이다. 이들은 세포 표면 상의 T-세포 수용체(TCR)의 존재에 의해서, B 세포 및 자연 살해 세포(NK 세포)와 같은 다른 림프구와 구별될 수 있다. 하기에 요약된 바와 같은 다양한 유형의 T 세포가 존재한다.

[0437] 헬퍼 T 헬퍼 세포(Th 세포)는 B 세포의 형질 세포 및 기억 B 세포로의 성숙, 및 세포독성 T 세포 및 대식세포의 활성화를 포함하는 면역학적 과정에서 다른 백혈구 세포를 돕는다. Th 세포는 표면 상에서 CD4를 발현한다. Th 세포는, 그들이 항원 제시 세포(APC) 표면의 MHC 클래스 II 분자에 의해 펩타이드 항원으로 제시될 때 활성화된다. 이 세포는 Th1, Th2, Th3, Th17, Th9 또는 Tfh를 포함한 여러 하위유형 중 하나로 분화할 수 있으며, 이들은 다양한 유형의 면역 반응을 촉진하기 위해 상이한 사이토카인을 분비한다.

[0438] 세포용해성 T 세포(TC 세포 또는 CTL)는 바이러스에 감염된 세포 및 종양 세포를 파괴하고, 이식 거부에도 연관된다. 대부분의 CTL은 이의 표면에서 CD8을 발현한다. 이 세포는 모든 유핵 세포의 표면에 존재하는 MHC 클래스 I과 연관된 항원에 결합함으로써 표적을 인식한다.

[0439] 기억 T 세포는 감염이 해결된 후에도 장기간 지속되는 항원 특이적 T 세포의 하위세트이다. 이들은 이들의 동족 항원에 다시 노출되면 다수의 효과기 T 세포로 빠르게 확장되어 면역계에 과거 감염에 대한 "기억"을 제공한다. 기억 T 세포는 3개의 하위유형을 포함한다: 중심 기억 T 세포(TCM 세포) 및 2개유형의 효과기 기억 T 세포(TEM 세포 및 TEMRA 세포). 기억 세포는 CD4+ 또는 CD8+일 수 있다. 기억 T 세포는 일반적으로 세포 표면 단백질 CD45RO를 발현한다.

[0440] 이전에 억제 T 세포로 알려진 조절성 T 세포(Treg 세포)는 면역 관용의 유지에 중요하다. 이들의 주요 역할은 면역 반응이 끝날 때까지 T 세포 매개 면역을 차단하고, 흉선에서 음성 선택 과정을 벗어난 자가반응성 T 세포

를 억제하는 것이다. 2가지 주요 클래스의 CD4+ Treg 세포, 즉, 자연 발생 Treg 세포 및 적응 Treg 세포가 설명되어 있다.

[0441] 자연 발생 Treg 세포(CD4+CD25+FoxP3+ Treg 세포로도 알려짐)는 흉선에서 발생하며, 발달 중인 T 세포와 골수계(CD1 1c+) 및 형질세포양(CD123+) 수지상 세포(TSLP로 활성화됨) 사이의 상호작용과 관련이 있다. Treg 세포는 FoxP3라고 불리는 세포내 분자의 존재에 의해 다른 T 세포와 구별될 수 있다.

[0442] 적응 Treg 세포(Tr1 세포 또는 Th3 세포로도 알려짐)는 정상 면역 반응 동안 생성될 수 있다. 세포는 자연 살해 세포(또는 NK 세포)일 수 있다. NK 세포는 선천 면역계의 일부를 형성한다. NK 세포는 MHC 독립적인 방식으로 바이러스 감염된 세포의 선천적인 신호에 대한 빠른 반응을 제공한다.

[0443] 특정 양상에서, 본 명세서에 기재된 변이체 수용체 또는 변이체 사이토카인을 발현하는 세포는 종양-침윤 림프구(TIL) 또는 종양-연관 림프구(TAL)이다. 특정 양상에서, TIL 또는 TAL은 CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, 자연 살해(NK) 세포 및 이들의 조합물을 포함한다.

[0444] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 T 세포는 면역요법에 사용하기 위한 인공 T-세포 수용체를 생산하도록 유전적으로 조작된 키메라 항원 수용체 T 세포(CAR-T 세포)이다. 특정 양상에서, CAR-T 세포는 환자 자신의 혈액(즉, 자가유래)의 T 세포로부터 유래된다. 특정 양상에서, CAR-T는 또 다른 건강한 공여자(즉, 동종이계)의 T 세포로부터 유래된다. 특정 양상에서, CAR-T 세포는 비-면역 세포 유형, 예컨대, 만능 줄기 세포로부터 유래 또는 합성된다.

[0445] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 T 세포는 면역요법에 사용하기 위한 특정 T 세포 수용체를 생산하도록 유전자 조작된 T 세포 수용체(eTCR-T 세포)이다. 특정 양상에서, eTCR-T세포는 환자 자신의 혈액(즉, 자가유래)의 T 세포로부터 유래된다. 특정 양상에서, eTCR-T 세포는 공여자(즉, 동종이계)의 T 세포로부터 유래된다. 특정 양상에서, eTCR-T 세포는 비-면역 세포 유형, 예컨대, 만능 줄기 세포로부터 유래 또는 합성된다.

[0446] 특정 양상에서, 본 명세서에 기재된 키메라 사이토카인 수용체를 발현하는 세포는 NK 세포이다. NK 세포(선천성 림프계 세포의 군에 속함)는 거대 과립 림프구(LGL)로 정의되고, B 및 T 림프구를 생성하는 공통 림프계 전구세포로부터 분화된 세 번째 종류의 세포를 구성한다. NK 세포는 골수, 림프절, 비장, 편도선 및 흉선에서 분화 및 성숙된 다음 순환계로 들어가는 것으로 알려져 있다. 특정 양상에서, NK 세포는 환자 자신의 혈액(즉, 자가유래)의 NK 세포로부터 유래된다. 특정 양상에서, NK 세포는 공여자(즉, 동종이계)의 NK 세포로부터 유래된다. 특정 양상에서, NK 세포는 비-면역 세포 유형, 예컨대, 만능 줄기 세포로부터 유래 또는 합성된다.

[0447] 특정 양상에서, 본 명세서에 기재된 키메라 사이토카인 수용체를 발현하는 세포는 B 세포이다. B 세포는 미경험 B 세포, 배중심 B 세포, 기억 B 세포, 세포독성 B 세포, 사이토카인-생산 B 세포, 조절성 B 세포(Breg), 중심모세포, 중심세포, 항체-분피 세포, 형질 세포 등을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 특정 양상에서, B 세포는 환자 자신의 혈액(즉, 자가유래)의 B 세포로부터 유래된다. 특정 양상에서, B 세포는 공여자(즉, 동종이계)의 B 세포로부터 유래된다. 특정 양상에서, B 세포는 비-면역 세포 유형, 예컨대, 만능 줄기 세포로부터 유래 또는 합성된다.

[0448] 특정 양상에서, 본 명세서에 기재된 키메라 사이토카인 수용체를 발현하는 세포는 골수계 세포, 포함하지만 이들로 제한되지 않는, 대식세포, 수지상 세포, 골수계-유래 억제 세포 등이다. 특정 양상에서, 골수 세포는 환자 자신의 혈액(즉, 자가유래)의 골수 세포로부터 유래된다. 특정 양상에서, 골수 세포는 공여자(즉, 동종이계)의 골수 세포로부터 유래된다. 특정 양상에서, 골수 세포는 비-면역 세포 유형, 예컨대, 만능 줄기 세포로부터 유래 또는 합성된다.

[0449] 본 명세서에 기재된 변이체 수용체 또는 변이체 사이토카인을 발현하는 세포는 임의의 세포 유형일 수 있다. 특정 양상에서, 본 명세서에 기재된 변이체 수용체 또는 변이체 사이토카인을 발현하는 세포는 조혈계의 세포이다. 본 발명에 따른 면역 세포(예를 들어, T 세포 또는 NK 세포)는 환자 자신의 말초 혈액(제1자) 또는 기증자 말초 혈액(제2자)으로부터의 조혈 줄기세포의 설정에서 또는 연결되지 않은 기증자(제3자)의 말초 혈액으로부터 생체외에서 생성될 수 있다. 대안적으로, 본 명세서에 기재된 면역 세포는 유도성 전구세포 또는 배아 전구세포의 면역 세포로의 생체외 분화로부터 유래될 수 있다. 대안적으로, 효과기 기능을 보유하고(예를 들어, 용해 기능을 보유하는 T-세포 또는 NK-세포주; 항체 생산 기능을 보유하는 형질 세포주 또는 식세포 및 항원 제시 기능을 보유하는 수지상 세포주 또는 대식세포), 치료제로서 작용할 수 있는 불멸화된 면역 세포주가 사용될 수 있다. 이들 모든 실시형태에서, 변이체 수용체-발현 세포는 바이러스 벡터를 사용한 형질도입 또는 DNA 또는 RNA로의 형질주입을 포함하는 다수의 수단 중 하나에 의해 각각의 변이체 수용체(들)를 암호화하는 DNA 또는

RNA를 도입함으로써 생성된다.

[0450] 본 명세서에 기재된 세포는 변이체 수용체 및/또는 변이체 사이토카인을 발현하도록 생체외에서 조작된 대상체로부터 유래된 면역 세포일 수 있다. 면역 세포는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 샘플 또는 종양 샘플로부터 유래할 수 있다. 면역 세포는 본 발명의 제1 양상에 따른 변이체 수용체 또는 변이체 사이토카인을 제공하는 분자를 암호화하는 핵산으로 형질도입되기 전에, 예를 들어, 항-CD3 단클론성 항체 및/또는 IL-2로 처리함으로써 활성화 및/또는 확장될 수 있다. 본 발명의 면역 세포는 (i) 상기에 열거된 대상체 또는 다른 공급원으로부터 면역 세포-함유 샘플의 단리; 및 (ii) 변이체 수용체 또는 변이체 사이토카인을 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열(들)을 면역 세포에 형질도입 또는 형질주입시키는 단계에 의해서 제조될 수 있다.

[0451] 세포는 프로모터 유도, 형질전환체 선택 또는 목적하는 서열을 암호화하는 유전자 증폭에 적절하게 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양될 수 있다. 포유동물 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 상업적으로 입수 가능한 배지, 예컨대, Ham's F10(시그마사), 최소 필수 배지(Minimal Essential Medium: MEM), 시그마사), RPMI 1640(시그마사) 및 둘베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium: DMEM), 시그마사)가 숙주 세포 배양에 적합하다. 이들 배지 중 임의의 것은 필요에 따라 호르몬 및/또는 다른 성장 인자(예컨대, 인슐린, 트랜스페린 또는 표피 성장 인자), 염(예컨대, 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 인산염), 완충액(예컨대, HEPES), 뉴클레오사이드(예컨대, 아데노신 및 티미딘), 항생제, 미량 원소 및 글루코스 또는 동등한 에너지원으로 보충될 수 있다. 임의의 다른 필요한 보충물이 또한 당업자에게 공지된 적절한 농도로 포함될 수 있다. 온도, pH 등과 같은 배양 조건이 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 사전에 사용된 조건이며, 통상의 기술자에게 자명할 것이다.

[0452] 그 다음 면역 세포는 정제될 수 있고, 예를 들어, 항원-결합 폴리펩타이드의 항원-결합 도메인의 발현에 기초하여 선택될 수 있다. 특정 실시형태에서, 세포는 선택 가능한 마커(예를 들어, 단백질, 형광성 마커, 또는 에피토프 태그)의 발현에 의해 또는 세포의 선택, 단리 및/또는 정제를 위해 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 선택된다.

[0453] **키트**

[0454] 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 변이체 수용체 또는 변이체 G-CSF 중 임의의 것 중 적어도 하나를 발현하는 세포를 생산하기 위한 키트를 기재한다. 특정 양상에서, 본 명세서에는 본 명세서에 기재된 키메라 수용체를 암호화하는 세포로서, 선택적으로, 세포는 면역 세포인, 세포; 및 사용 설명서를 포함하는 키트가 기재되며; 선택적으로, 키트는 IL-7 및/또는 변이체 G-CSF를 포함한다. 특정 양상에서, 본 명세서에는 본 명세서에 기재된 키메라 수용체를 암호화하는 핵산 서열(들)을 포함하는 하나 이상의 발현 벡터(들) 및 사용 설명서를 포함하는 키트가 기재되며; 선택적으로, 키트는 IL-7 및/또는 변이체 G-CSF를 포함한다. 특정 실시형태에서, 키트는 적어도 하나의 변이체 수용체를 암호화하는 적어도 하나의 발현 벡터 및 사용 설명서를 포함한다. 특정 양상에서, 키트는 본 명세서에 기재된 변이체 수용체 중 적어도 하나에 결합하는 변이체 G-CSF를 암호화하는 발현 벡터 또는 약제학적 제형 중의 적어도 하나의 변이체 사이토카인을 추가로 포함한다. 특정 실시형태에서, 키트는 본 명세서에 기재된 변이체 수용체를 암호화하는 발현 벡터를 포함하는 세포를 포함한다.

[0455] 특정 실시형태에서 키트는 (CAR)/조작된 T 세포 수용체(eTCR) 등(예를 들어, 조작된 비-천연 TCR 수용체)을 암호화하는 발현 벡터를 포함하는 세포를 포함한다. 특정 실시형태에서 키트는 키메라 항원 수용체(CAR)/조작된 T 세포 수용체(eTCR) 등을 암호화하는 발현 벡터를 포함한다. 특정 실시형태에서 키트는 본 명세서에 기재된 변이체 수용체 및 키메라 항원 수용체(CAR)/조작된 T 세포 수용체(eTCR) 등을 암호화하는 발현 벡터를 포함한다.

[0456] 특정 양상에서, 본 명세서에 기재된 키트는 변이체 사이토카인을 추가로 포함한다. 특정 실시형태에서, 키트는 적어도 하나의 추가적인 변이체 사이토카인을 추가로 포함한다. 특정 양태에서, 키트는 약제학적 제형에 적어도 하나의 변이체 사이토카인을 추가로 포함한다. 특정 양상에서, 본 명세서에 기재된 키트는 적어도 하나의 사이토카인(예를 들어, IL-7 및/또는 변이체 G-CSF)을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 적어도 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)을 추가로 포함하고; 선택적으로, 상기 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 친화성 시약을 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 적어도 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)을 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함하고; 선택적으로, 상기 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 친화성 시약을 포함한다.

[0457] 특정 실시형태에서, 성분은 임의의 편리한 포장의 액체 또는 고체 형태의 투여 형태로 제공된다.

[0458] 일부 실시형태에서, 키트는 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)을 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터를 추가로 포함하고; 선택적으로, 적어도 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 친화성 시약(들)을 포함한다. 특정 실시형태에서, 키트는 IL-18, IL-21, 인터페론-α, 인터페론-β, 인터페론-ɣ, IL-17, IL-21, TNF-α, CXCL13, CCL3(MIP-1α), CCL4(MIP-1β), CD40 리간드, B 세포 활성화 인자(BAFF), F1t3 리간드, CCL21, CCL5, XCL1 또는 CCL19 또는 수용체 NKG2D 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 사이토카인(들) 또는 케모카인(들)을 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함한다. 특정 실시형태에서, 키트는 적어도 하나의 항원 결합 수용체(들)를 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함한다. 특정 실시형태에서, 적어도 하나의 항원 결합 수용체(들)는 천연 T 세포 수용체, 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), 천연 B 세포 수용체, 조작된 B 세포 수용체(BCR), 스트레스 리간드 수용체, 패턴 인식 수용체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 키트는 키메라 항원 수용체를 암호화하는 발현 벡터를 추가로 포함한다.

[0459] 일부 실시형태에서, 세포는 IL-18, IL-21, 인터페론-α, 인터페론-β, 인터페론-ɣ, IL-17, IL-21, TNF-α, CXCL13, CCL3(MIP-1α), CCL4(MIP-1β), CD40 리간드, B 세포 활성화 인자(BAFF), F1t3 리간드, CCL21, CCL5, XCL1 또는 CCL19 또는 수용체 NKG2D 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 사이토카인(들) 또는 케모카인(들)을 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포는 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체(들)를 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함한다.

[0460] 특정 양상에서, 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체(들)는 천연 T 세포 수용체, 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), 천연 B 세포 수용체, 조작된 B 세포 수용체(BCR), 스트레스 리간드 수용체, 패턴 인식 수용체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 세포는 적어도 하나의 CAR(들)을 암호화하는 하나 이상의 발현 벡터(들)를 추가로 포함하고, 선택적으로, CAR은 메소텔린 CAR이다. 특정 실시형태에서, 성분은 임의의 편리한 포장의 액체 또는 고체 형태의 투여 형태로 제공된다.

[0461] 제공된 세포 또는 본 명세서에 기재된 바와 같이 생산된 세포의 성장, 선택 및 준비를 위해 추가 시약이 제공될 수 있다. 예를 들어, 키트는 세포 배양을 위한 성분, 성장 인자, 분화제, 형질주입 또는 형질도입을 위한 시약 등을 포함할 수 있다.

[0462] 특정 실시형태에서, 상기 성분에 추가하여, 키트는 또한 사용 설명서를 포함할 수 있다. 지침서는 임의의 편리한 형식으로 제공될 수 있다. 예를 들어, 지침서는 인쇄된 정보, 키트의 포장, 패키지 삽입물 등으로 제공될 수 있다. 지침서는 정보가 기록된 컴퓨터 판독 가능 매체로도 제공될 수 있다. 또한 지침서는 정보에 접근하는 데 사용할 수 있는 웹부위 주소에 제공될 수 있다.

[0463] **변이체 수용체의 선택적 활성화 방법**

[0464] 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 변이체 수용체를 키메라 수용체를 선택적으로 활성화시키는 사이토카인과 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포 표면 상에 발현되는 변이체 수용체의 선택적 활성화 방법을 제공한다. 특정 양상에서, 키메라 수용체를 선택적으로 활성화하는 사이토카인은 변이체 G-CSF이다. G-CSF는 야생형 G-CSF 또는 천연(야생형) 사이토카인 수용체와 비교하여 변이체 수용체에 대한 G-CSF의 우선적인 결합 및 활성화를 부여하는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 G-CSF일 수 있다.

[0465] 특정 양상에서, 변이체 수용체에 대한 사이토카인의 결합에 의한 변이체 수용체의 선택적 활성화는 동종이량체화, 이종이량체화 또는 이들의 조합을 유도한다.

[0466] 특정 양상에서, 변이체 수용체의 활성화는 하류 신호전달 분자의 활성화로 이어진다. 특정 양상에서, 변이체 수용체는 천연 세포 신호전달 분자를 통해 형질도입되는 신호전달 분자 또는 경로를 활성화하여 천연 반응을 모방하지만 변이체 수용체를 발현하도록 조작된 세포에 특이적인 생물학적 활성을 제공한다. 특정 실시형태에서, 키메라 수용체의 활성화된 형태는 동종이량체를 형성하고; 선택적으로, 키메라 수용체의 활성화는 수용체를 발현하는 세포의 증식, 생존력, 지속성, 세포독성, 사이토카인 분비, 기억 및 향상된 활성 및 이들의 조합 중 적어도 하나를 포함하는 세포 반응을 초래하고, 선택적으로, 키메라 수용체는 사이토카인과의 접촉 시 활성화된다.

[0467] 특정 양상에서, 하류 신호전달 분자의 활성화는 세포의 주기 진행, 증식, 생존력 및/또는 향상된 활성을 자극하는 세포 신호전달 경로의 활성화를 포함한다. 특정 양상에서, 활성화되는 신호전달 경로 또는 분자는 JAK1,

JAK2, JAK3, TYK2, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B, STAT6, Shc, ERK1/2, IRS-1, IRS-2 및 Akt 이지만 이들로 제한되지 않는다. 특정 양상에서, 변이체 수용체의 활성화는 수용체에 결합하는 사이토카인의 투여 후 세포의 증가된 증식으로 이어진다. 특정 양상에서, 증식 정도는 세포가 IL-2로 자극될 때 관찰되는 증식의 0.1 내지 10배이다.

[0468] 특정 양상에서, 본 명세서에는 세포의 표면 상에서 발현되는 하나 이상의 키메라 수용체(들)의 활성화 방법이 기재되며, 이 방법은 하나 이상의 키메라 수용체(들)를 IL-7과 접촉시켜 키메라 수용체를 활성화시키는 단계를 포함하며; 키메라 수용체는 (i) IL-7Rα의 세포외 도메인(ECD); (ii) 막관통 도메인(TMD); 및 (iii) 서열번호 109에 제시된 야생형, 인간 IL-7Rα 세포내 신호전달 도메인과 구별되는 사이토카인 수용체의 세포내 도메인(ICD)을 포함하는 키메라 수용체가 개시되며; ECD 및 TMD는 각각 ICD에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시형태에서, 키메라 수용체(들)는 본 명세서에 기재된 ICD를 포함하는 키메라 수용체이다.

[0469] **세포의 선택적 활성화를 위한 방법 및 시스템**

[0470] 특정 양상에서, 본 명세서에는 (i) 과립구 집락 자극 인자 수용체(G-CSFR)의 변이체 세포외 도메인(ECD)을 포함하는 수용체; 및 (ii) (i)의 수용체에 선택적으로 결합하는 변이체 G-CSF; 및 (a) 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)로서;선택적으로, 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 다른 친화성 시약(들)을 포함하는, 신호전달 단백질(들); 및 (b) 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체 중 하나 또는 둘 다를 포함하는 세포의 선택적 활성화를 위한 방법 및 시스템이 기재된다. 일부 실시형태에서, 수용체(들)는 면역 세포 상에서 발현되고, 선택적으로, 면역 세포는 T 세포 및 선택적으로, NK 세포 및 선택적으로, NKT 세포 및 선택적으로, B 세포 및 선택적으로, 형질 세포 및 선택적으로, 대식세포 및 선택적으로, 수지상 세포에서 발현되고, 선택적으로 세포는 줄기세포이고, 선택적으로, 세포는 1차 세포이고, 선택적으로, 세포는 인간 세포이다. 일부 실시형태에서, T 세포는 $CD8^+$ T 세포, 세포독성 $CD8^+$ T 세포, 미경험 $CD4^+$ T 세포, 미경험 $CD8^+$ T 세포, 헬퍼 T 세포, 조절성 T 세포, 기억 T 세포 및 γδT 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 추가적인 사이토카인(들) 또는 케모카인(들)은 인터류킨(IL)-18, IL-21, 인터페론-α, 인터페론-β, 인터페론-γ, IL-17, IL-21, TNF-α, CXCL13, CCL3(MIP-1α), CCL4(MIP-1β), CD40 리간드, B 세포 활성화 인자(BAFF), Flt3 리간드, CCL21, CCL5, XCL1 및 CCL19 및 수용체 NKG2D 및 이들의 조합 중 적어도 하나를 포함한다. 특정 실시형태에서, G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체는 본 명세서에 기재된 키메라 수용체이다.

[0471] 특정 실시형태에서, 시스템은 항원 결합 신호전달 수용체를 추가로 포함한다. 특정 실시형태에서, 항원 결합 신호전달 수용체는 천연 T 세포 수용체, 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), 천연 B 세포 수용체, 조작된 B 세포 수용체(BCR), 스트레스 리간드 수용체, 패턴 인식 수용체 및 이들의 조합 중 적어도 하나를 포함한다. 메소텔린 CAR을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 당업계에 공지된 임의의 CAR이 사용될 수 있다.

[0472] 특정 양상에서, 본 명세서에는 본 명세서에 기재된 시스템의 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체 및 (i) 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들); 선택적으로, 적어도 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 본 명세서에 기재된 시스템의 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 다른 친화성 시약(들)을 포함하는, 신호전달 단백질(들); 및 (ii) 본 명세서에 기재된 시스템의 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체 중 하나 또는 둘 다를 발현하는 세포의 생산 방법이 기재된다. 일부 실시형태에서, 방법은 세포에 수용체와, (i) 및 (ii) 중 하나 또는 둘 다를 암호화하는 하나 이상의 핵산(들) 또는 발현 벡터(들)를 도입하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 면역 세포의 제1 집단은 G-CSFR의 변이체 ECD를 포함하는 수용체를 발현하고, 면역 세포의 제2 집단은 변이체 G-CSF를 발현한다. 일부 실시형태에서, 면역 세포의 제1 및 제2 집단(들) 중 하나 또는 둘 다는 (a) 적어도 하나의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)로서; 선택적으로, 적어도 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 다른 친화성 시약(들)을 포함하는, 신호전달 단백질(들); 및 (b) 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체 중 하나 또는 둘 다를 추가로 발현한다.

[0473] 특정 양상에서, 본 명세서에는 (a) 인터류킨 수용체 알파(IL-7Rα)의 세포외 도메인(ECD); (b) 막관통 도메인(TMD); 및 (c) 서열번호 109에 제시된 야생형, 인간 IL-7Rα 세포내 신호전달 도메인과 구별되는 사이토카인 수용체의 세포내 도메인(ICD)을 포함하는 키메라 수용체를 포함하는 세포의 활성화를 위한 방법 및 시스템이 기재

되며; ECD 및 TMD는 각각 ICD에 작동 가능하게 연결된다.

[0474] **입양 세포 전달 방법**

[0475] 본 발명은 본 명세서에 기재된 변이체 수용체 및/또는 변이체 사이토카인을 발현하는 세포를 (예를 들어, 하기에 기재된 바와 같은 약제학적 조성물로) 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 질환의 치료 및/또는 예방 방법을 제공한다.

[0476] 질환을 치료하는 방법은 본 명세서에 기재된 세포, 예를 들어, T 세포, NK 세포 또는 변이체 수용체를 발현하는 임의의 다른 면역 또는 비-면역 세포의 치료 용도에 관한 것이다. 세포는 질환과 관련된 적어도 하나의 증상을 경감, 감소 또는 개선하기 위해서 그리고/또는 질환의 진행을 둔화, 감소 또는 차단하기 위해 기존 질환 또는 병태를 갖는 대상체에게 투여될 수 있다. 질환의 예방 방법은 본 개시내용의 세포의 예방적 사용에 관한 것이다. 이러한 세포는 질환의 원인을 예방 또는 손상시키거나 질환과 연관된 적어도 하나의 증상의 발병을 감소시키거나 예방하기 위해 아직 질환에 걸리지 않았거나 질환의 어떠한 증상도 나타내지 않는 대상체에게 투여될 수 있다. 대상체는 질환에 대한 소인이 있거나 발병 위험이 있는 것으로 생각될 수 있다.

[0477] 일부 실시형태에서, 대상 조성물, 방법 및 키트는 면역 반응을 향상시키기 위해 사용된다. 일부 실시형태에서, 면역 반응은 사이토카인, 예를 들어, 사이토카인의 전신 투여, 예를 들어, 근육내, 복강내, 정맥내에 의해 표적 세포, 예를 들어, 암 세포, 감염된 세포, 자가면역 질환에 관여하는 면역 세포 등을 고갈시키거나 조절하는 것이 바람직한 병태에 대해 지시된다.

[0478] 방법은 (i) 면역 세포-함유 샘플을 단리시키는 단계; (ii) 이러한 세포에 예를 들어, 변이체 수용체를 발현하는 핵산 서열 또는 벡터를 형질도입 또는 형질주입시키는 단계; (iii) (ii)로부터의 세포를 대상체에게 투여(즉, 주입)하는 단계, 및 (iv) 주입된 세포를 자극하는 변이체 사이토카인을 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 특정 양상에서, 대상체는 세포를 대상체에게 투여하기 전에 면역-고갈 치료를 경험한 적이 있다. 특정 양상에서, 대상체는 세포를 대상체에게 투여하기 전에 면역-고갈 치료를 경험한 적이 없다. 특정 양상에서, 대상체는 대상체에게 세포를 투여하기 전에 본 명세서에 기재된 변이체 수용체를 사용하지 않고 달리 필요할 수도 있는 중증도, 용량 및/또는 기간이 감소된 면역 고갈 치료를 경험한 적이 있다.

[0479] 특정 실시형태에서, 방법은 적어도 하나의 추가적인 활성제, 및 선택적으로 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)을 투여 또는 제공하는 단계를 추가로 포함하고; 선택적으로, 적어도 하나 이상의 추가적인 효능작용적 또는 길항작용적 신호전달 단백질(들)은 하나 이상의 사이토카인(들), 케모카인(들), 호르몬(들), 항체(들) 또는 이의 유도체(들) 또는 친화성 시약(들)을 포함한다. 특정 실시형태에서, 대상체는 각각 구별되는 키메라 수용체를 발현하고 각각 사이토카인의 구별되는 변이체 형태를 발현하는 2개 이상의 세포 집단이 투여된다. 특정 실시형태에서, 키메라 수용체를 발현하는 세포는 적어도 하나의 항원 결합 신호전달 수용체를 추가로 발현한다. 특정 실시형태에서, 항원 결합 신호전달 수용체는 천연 T 세포 수용체, 조작된 T 세포 수용체(TCR), 키메라 항원 수용체(CAR), 천연 B 세포 수용체, 조작된 B 세포 수용체(BCR), 스트레스 리간드 수용체, 패턴 인식 수용체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 수용체(들)를 포함한다. 특정 실시형태에서, 항원 결합 신호전달 수용체는 CAR이다. 특정 실시형태에서, 적어도 하나의 사이토카인(들) 또는 케모카인(들)은 IL-18, IL-21, 인터페론-α, 인터페론-β, 인터페론-γ, IL-17, IL-21, TNF-α, CXCL13, CCL3(MIP-1α), CCL4(MIP-1β), CD40 리간드, B 세포 활성화 인자(BAFF), Flt3 리간드, CCL21, CCL5, XCL1 또는 CCL19 또는 수용체 NKG2D 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0480] 면역 세포-함유 샘플은 예를 들어, 상기에 기재된 바와 같이 대상체 또는 다른 공급원로부터 단리될 수 있다. 면역 세포는 환자 자신의 말초 혈액(제1자) 또는 기증자 말초 혈액(제2자)으로부터의 조혈 줄기세포의 설정에서 또는 연결되지 않은 기증자(제3자)의 말초 혈액으로부터 단리될 수 있다. 면역 세포는 또한 줄기 세포 또는 다른 형태의 전구 세포로부터 유도된 분화와 같은 시험관내 방법에 의해 유래될 수 있다.

[0481] 일부 실시형태에서, 면역 세포는 생체내에서 변이체 사이토카인과 접촉되며, 즉, 면역 세포가 수여자에게 전달되고, 유효 용량의 변이체 사이토카인이 수여자에게 투여되고, 이의 천연 위치, 예를 들어, 림프절 등에서 면역 세포와 접촉하도록 허용된다. 일부 실시형태에서, 접촉은 시험관내에서 수행된다. 세포가 시험관내에서 변이체 사이토카인과 접촉되는 경우, 사이토카인은 수용체로부터의 신호전달을 활성화하기에 충분한 시간 동안 및 그러한 용량으로 세포에 첨가되는데, 이는 천연 세포 머시너리, 예를 들어, 보조 단백질, 공수용체 등의 양상을 활용할 수 있다. 활성화된 세포는 항원 특이성의 결정, 사이토카인 프로파일링 및 생체내 전달용과 관련된 실험 목적을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 모든 목적에 사용할 수 있다.

[0482] 특정 양상에서, 치료 유효 수의 세포가 대상체에게 투여된다. 특정 양상에서, 대상체는 복수의 개별 경우에 변이체 수용체를 발현하는 세포가 투여되거나 주입된다. 특정 실시형태에서, 적어도 1×10^{6}개 세포/kg, 적어도 1×10^{7}개 세포/kg, 적어도 1×10^{8}개 세포/kg, 적어도 1×10^{9}개 세포/kg, 적어도 1×10^{10}개 세포/kg 또는 그 초과가 투여되고, 때로는 수집 동안 얻어진 세포, 예를 들어, 형질주입된 T 세포의 수에 의해서 제한된다. 형질주입된 세포는 임의의 생리학적으로 허용 가능한 배지에서 대상체에게 일반적으로 혈관내로 주입될 수 있지만, 세포가 성장을 위한 적절한 부위를 찾을 수 있는 임의의 다른 편리한 부위로 도입될 수도 있다.

[0483] 특정 양상에서, 치료적 유효량의 변이체 사이토카인이 대상체에게 투여된다. 특정 양상에서, 대상체는 복수의 개별 경우에 변이체 사이토카인을 투여받는다. 특정 양상에서, 투여되는 변이체 사이토카인의 양은 치료적으로 원하는 결과를 달성하기에(예를 들어, 대상체에서 질환의 증상을 감소시키기에) 충분한 양이다. 특정 양상에서, 투여되는 변이체 사이토카인의 양은 본 명세서에 기재된 변이체 사이토카인 수용체를 발현하는 세포의 세포 주기 진행, 증식, 생존력 및/또는 기능적 활성을 자극하기에 충분한 양이다. 특정 양상에서, 변이체 사이토카인은 치료적으로 원하는 결과를 달성하는 데 필요할 용량 및/또는 기간으로 투여된다. 특정 양상에서, 변이체 사이토카인은 본 명세서에 기재된 변이체 사이토카인 수용체를 발현하는 세포의 세포 주기 진행, 증식, 생존력 및/또는 기능적 활성을 자극하기에 충분한 용량 및/또는 기간으로 투여된다. 투여량과 빈도는 작용제; 투여 모드; 사이토카인의 특성 등에 따라 다를 수 있다. 이러한 지침은 개별 상황에 맞게 조정될 것임을 당업자는 이해할 수 있을 것이다. 투여량은 또한 국지 투여, 예를 들어, 비강내, 흡입 등, 전신 투여, 예를 들어, 근육내, 복강내, 혈관내 등에 대해서 달라질 수 있다.

[0484] *입양 세포 전달을 위한 적응증*

[0485] 본 개시내용은 질환의 치료 및/또는 예방에 사용하기 위한 본 명세서에 기재된 변이체 수용체를 발현하는 세포를 제공한다. 본 발명은 또한 질환의 치료 및/또는 예방을 위한 의약의 제조에서 본 명세서에 기재된 변이체 수용체를 발현하는 세포의 용도에 관한 것이다.

[0486] 본 발명의 방법에 의해 치료 및/또는 예방될 질환은 암성 질환, 예를 들어, 비제한적으로 담관암, 방광암, 유방암, 자궁경부암, 난소암, 결장암, 자궁내막암, 혈액 악성종양, 신장암(신세포), 백혈병, 림프종, 폐암, 흑색종, 비호지킨 림프종, 췌장암, 전립선암, 육종 및 갑상선암일 수 있다.

[0487] 치료 및/또는 예방될 질환은 자가면역 질환일 수 있다. 자가면역 질환은 자가-단백질, 폴리펩타이드, 펩타이드 및/또는 기타 자가 분자를 비정상적으로 표적으로 하는 T 및 B 림프구가 신체 내의 장기, 조직 또는 세포 유형(예를 들어, 췌장, 뇌, 갑상선 또는 위장관)의 손상 및/또는 기능부전을 일으켜서 질환의 임상 증상을 유발하는 것을 특징으로 한다. 자가면역 질환은 특정 조직에 영향을 미치는 질환뿐만 아니라 여러 조직에 영향을 미칠 수 있는 질환을 포함하며, 이는 반응이 특정 조직에 국한된 항원에 대한 것인지 또는 신체에 널리 분포된 항원에 대한 것인지에 부분적으로 좌우될 수 있다. 자가면역 질환은 제1형 당뇨병, 전신성 홍반성 루푸스, 류마티스 관절염, 자가면역 갑상선 질환 및 그레이브스병을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다.

[0488] 치료 및/또는 예방될 질환은 염증성 병태, 예컨대, 심장 섬유증일 수 있다. 일반적으로, 염증성 상태 또는 장애는 전형적으로 면역계가 신체의 자체 세포 또는 조직을 공격하게 하고, 비정상적인 염증을 유발할 수 있는데, 이는 만성 통증, 발적, 부기, 경직 및 정상 조직 손상을 유발할 수 있다. 염증성 병태는 염증을 특징으로 하거나 염증에 의해 유발되며 셀리악병, 혈관염, 루푸스, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD), 과민성 장 질환, 죽상동맥경화증, 관절염, 근염, 경피증, 통풍, 쇼그렌 증후군, 강직성 척추염, 항인지질 항체 증후군 및 건선을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다.

[0489] 특정 실시형태에서, 방법은 감염 질환을 치료하기 위해서 사용된다.

[0490] 특정 실시형태에서, 방법은 퇴행성 질환 또는 병태를 치료하기 위해서 사용된다. 퇴행성 질환 또는 병태의 예는 노화와 관련된 신경퇴행성 질환 또는 병태를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다.

[0491] 특정 실시형태에서, 방법은 이식을 위한 자연 또는 조작된 세포, 조직 또는 기관을 생성하기 위해서 사용된다.

[0492] 특정 실시형태에서, 치료될 병태는 이식 거부를 예방 및 치료하기 위한 것이다. 특정 실시형태에서, 치료 및/또는 예방될 병태는 동종이식 거부이다. 특정 양상에서, 동종이식 거부는 급성 동종이식 거부이다.

[0493] 치료 및/또는 예방될 질환은 영향을 받은 개체에게 세포, 조직, 기관 또는 기타 해부학적 구조를 이식하는 것을 포함할 수 있다. 세포, 조직, 기관 또는 기타 해부학적 구조는 동일한 개체(자가유래 또는 "자가" 이식) 또는

다른 개체(동종이계 또는 "동종" 이식)에서 유래할 수 있다. 세포, 조직, 기관 또는 기타 해부학적 구조는 세포 클로닝, 유도된 세포 분화 또는 합성 생체재료를 사용한 제조를 포함하는 시험관내 방법을 사용하여 생산할 수도 있다.

[0494] 본 발명은 (예를 들어, 상기에 기재된 바와 같은 약제학적 조성물 중의) 본 명세서에 기재된 변이체 사이토카인 및/또는 세포를 대상체에게 투여하는 하나 이상의 단계를 포함하는 질환의 치료 및/또는 예방 방법을 제공한다.

[0495] 질환의 치료 및/또는 예방 방법은 본 개시내용의 세포의 치료적 사용에 관한 것이다. 본 명세서에서 세포는 질환과 관련된 적어도 하나의 증상을 경감, 감소 또는 개선하기 위해서 그리고/또는 질환의 진행을 둔화, 감소 또는 차단하기 위해 기존 질환 또는 병태를 갖는 대상체에게 투여될 수 있다. 질환의 예방 방법은 본 개시내용의 세포의 예방적 사용에 관한 것이다. 이러한 세포는 질환의 원인을 예방 또는 손상시키거나 질환과 연관된 적어도 하나의 증상의 발병을 감소시키거나 예방하기 위해 아직 질환에 걸리지 않았거나 질환의 어떠한 증상도 나타내지 않는 대상체에게 투여될 수 있다. 대상체는 질환에 대한 소인이 있거나 발병 위험이 있는 것으로 생각될 수 있다. 방법은 (i) 면역 세포-함유 샘플을 단리시키는 단계; (ii) 이러한 세포에 본 발명에 의해서 제공된 핵산 서열 또는 벡터를 형질도입 또는 형질주입시키는 단계; (iii) (ii)로부터의 세포를 대상체에게 투여하는 단계, 및 (iv) 주입된 세포를 자극하는 변이체 사이토카인을 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 면역 세포-함유 샘플은 예를 들어, 상기에 기재된 바와 같이 대상체 또는 다른 공급원로부터 단리될 수 있다. 면역 세포는 환자 자신의 말초 혈액(제1자) 또는 기증자 말초 혈액(제2자)으로부터의 조혈 줄기세포의 설정에서 또는 연결되지 않은 기증자(제3자)의 말초 혈액으로부터 단리될 수 있다.

[0496] 치료는 다른 활성제, 예컨대, 비제한적으로 항생제, 항암제, 항바이러스제 및 기타 면역 조절제(예를 들어, 세포 예정사 단백질-1[PD-1] 경로에 대한 항체 또는 CTLA-4에 대한 항체)와 조합될 수 있다. 추가 사이토카인, 예를 들어, 인터페론 γ, 종양 괴사 인자 α, 인터류킨 12 등이 또한 포함될 수 있다.

[0497] **변이체 사이토카인 수용체를 발현하는 줄기세포의 사용 방법**

[0498] 본 발명은 본 명세서에 기재된 변이체 수용체 및/또는 변이체 사이토카인을 발현하는 세포를 투여하는 단계를 포함하는, 병태 또는 질환의 치료 및/또는 예방 방법을 제공한다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 변이체 사이토카인 수용체 및/또는 변이체 사이토카인을 발현하는 줄기세포는 재생 의학, 세포/조직/장기 이식, 조직 재건 또는 조직 복구에 사용된다.

[0499] **약제학적 조성물**

[0500] 본 개시내용은 또한 본 명세서에 기재된 변이체 수용체(들) 및/또는 본 명세서에 기재된 사이토카인을 발현하는 복수의 세포를 함유하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 본 개시내용은 또한 본 명세서에 기재된 변이체 사이토카인을 함유하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 세포는 약제학적 조성물로 제형화될 수 있다. 이들 조성물은 본 명세서에 기재된 변이체 수용체를 발현하는 세포 중 하나 이상에 더하여, 약제학적으로 허용 가능한 부형제, 담체, 완충제, 안정화제 또는 당업자에게 널리 공지된 기타 물질을 포함할 수 있다. 이러한 물질은 독성이 없어야 하며, 활성 성분의 효능을 방해해서는 안 된다. 약제학적 조성물은 선택적으로 1종 이상의 추가의 약제학적 활성 폴리펩타이드 및/또는 화합물을 포함할 수 있다. 이러한 제형은 예를 들어, 정맥내 주입에 적합한 형태일 수 있다.

[0501] 개체에게 제공될 본 개시내용에 따른 본 명세서에 기재된 변이체 수용체 및 변이체 사이토카인을 발현하는 세포의 경우, 투여는 바람직하게는 개체에게 이점을 나타내기에 충분한 "치료적 유효량"으로 수행된다. "예방적 유효량"은 또한 개체에게 이익을 나타내기에 충분할 때 투여될 수 있다. 투여되는 사이토카인의 실제 양 또는 세포의 수, 투여 속도 및 시간 경과는 치료될 질환의 성질 및 중증도에 따라 달라질 것이다. 치료 처방, 예를 들어, 복용량 등에 대한 결정은 일반의 및 기타 의사의 책임이며, 전형적으로 치료될 장애, 개별 환자의 상태, 전달 부위, 투여 방법 및 기타 실무자에게 알려진 요인을 고려한다. 상기에 언급된 기술 및 프로토콜의 예는 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed), 1980]에서 찾을 수 있다.

[0502] 약제학적 조성물은 단독으로 또는 다른 치료와 조합하여 치료될 병태에 따라 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다.

[0503] **실시예**

[0504] 하기는 본 발명을 수행하기 위한 특정 실시형태의 예이다. 실시예는 예시 목적으로만 제공되며 어떤 식으로든 본 발명의 범주를 제한하도록 의도되지 않는다. 사용된 수치(예를 들어, 양, 온도 등)와 관련하여 정확성을 보

장하기 위해 노력했지만 약간의 실험 오류 및 편차는 물론 허용되어야 한다.

[0505] 본 발명의 실시는 달리 명시되지 않는 한, 당업계의 기술 내에서 단백질 화학, 생화학, 재조합 DNA 기술, 세포 배양, 입양 세포 전달 및 약리학의 통상적인 방법을 사용할 것이다. 이러한 기술은 문헌에 완전히 설명되어 있다. 예를 들어, 문헌[T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., current addition)]; Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989)]; *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey and Sundberg *Advanced Organic Chemistry 3rd Ed.* (Plenum Press) Vols A and B(1992)] 참조.

[0506] **실시예 1: G-CSF:G-CSFR(CRH)의 독점 부위 II 계면의 합리적인 설계**

[0507] 야생형(WT) G-CSF$_{WT}$:G-CSFR$_{WT}$ 복합체는 2:2 이종이량체이다. G-CSF는 G-CSFR의 세포외 도메인(ECD)을 갖는 2개의 결합 계면을 갖는다. G-CSF와 G-CSFR의 세포외 사이토카인 수용체 동종(CRH) 도메인 사이의 더 큰 계면은 부위 II라고 지칭된다. G-CSF와 G-CSFR의 N-말단 Ig-유사(Ig) 세포외 도메인 사이의 더 작은 계면은 부위 III로서 지칭된다(도 1 참조).

[0508] 공동 진화되고, 조작된 (E) G-CSF$_E$:G-CSFR$_E$ 사이토카인: 수용체 쌍을 설계하기 위해서, 본 발명자들은 WT G-CSF와 G-CSFR(Protein data Bank ID 2D9Q, Tamada et al. PNAS 2006)의 Ig-CRH 세포외 도메인 간의 2:2 복합체를 각각 G-CSF:G-CSFR(CRH) 및 G-CSF:G-CSFR(Ig)(도 1 참고)로 이루어진 부위 II 및 부위 III 계면을 포함하는 2개의 구별되는 하위-복합체로 분리시켰다(서열에 대해서 표 1 및 표 1A 참조). 표 1의 서열번호 2에 제시된 G-CSFR 아미노산 서열은 G-CSFR에 대해서 본 명세서에서 사용된 돌연변이 넘버링에 대해서 사용된 아미노산 위치에 상응한다. 표 1A에 열거된 서열번호 101에 제시된 G-CSFR 서열은 제거된 N-말단에서 하나의 아미노산(글루탐산)을 제외하고는 서열번호 2와 동일하다. 따라서, 본 명세서에서 사용된 돌연변이 넘버링에 대한 아미노산 위치는 서열번호 101의 아미노산 2 내지 308에 상응한다.

[0509] **방법**

[0510] 공동 진화된, 독점 G-CSF$_E$:G-CSFR$_E$ 돌연변이체 쌍(설계)를 생성하기 위해서, 본 발명자들은 컴퓨터 설계 워크플로우(see 도 2)을 사용한다. 먼저, 본 발명자들은 부위 II에서 독점 설계를 생성시켰다.

[0511] G-CSF$_{WT}$:G-CSFR(CRH)$_{WT}$의 부위 II 계면 상호작용의 인실리코 구조 분석은 109.64kcal/mol의 부위 II에서 총 매력적인 AMBER 에너지에 기여하는 대부분의 분자 상호작용이 하전된 잔기에 의해서 이루어진다는 것을 나타낸다(도 3 참고). 심층 검사는, 예를 들어, 부위 II의 총 매력적인 AMBER 에너지의 28%를 차지하는 G-CSFR(CRH)의 R167과 G-CSF의 D112/D109 사이에서 대부분 정전기 및 수소 결합 상호작용을 나타낸다. 또 다른 중요한 정전기적 상호작용은 G-CSFR(CRH)의 R141과 G-CSF의 E122/E123 사이에 존재하며(도 4 참조), 이는 부위 II에서 총 매력적인 AMBER 에너지의 21.4%에 기여한다(도 3 참조). 마찬가지로, 사이토카인의 E19와 수용체 CRH 도메인의 R288 사이의 염다리는 17.3%에 기여하고, 아르기닌은 수용체 CRH 도메인의 D200에 대한 정전기 및 수소 결합 상호작용을 통해 더욱 안정화된다.

[0512] 부위 II의 각각의 설계는 G-CSF$_E$ 및 G-CSFR(CRH)$_E$의 돌연변이체 쌍으로 이루어진다. 첫째, 본 발명자들은 필요한 경우 추가 돌연변이를 통해 패킹 및 소수성 상호작용을 유지하면서 결합 파트너에서 염기성 잔기를 산성 잔기로 또는 그 반대로 돌연변이시킴으로써, 전하의 역전을 통해서 부위 II에서 양성 설계를 생성시켰다. 돌연변이체 쌍 G-CSF$_E$:G-CSFR(CRH)$_E$를 ZymeCAD™의 평균 필드 패킹 워크플로우로 패킹하였다. 부위 II에서 패킹된 인실리코 설계 모델을 구조적 무결성에 대해 시각적으로 검사하였고, 이들을 ZymeCAD™ 메트릭스로 평가하였다. 구체적으로, 본 발명자들은 상응하는 G-CSFR(CRH)$_E$ 돌연변이체(쌍의 상호작용)에 대해 ZymeCAD™ 인실리코 dAMBER 결합 친화도가 10 kcal/mol 미만이 되도록 G-CSF$_E$ 돌연변이체를 설계하는 것을 목표로 하였다. 이 메트릭스는 레나드 존스 친화도와 정전기적 친화도의 합인 AMBER 친화도를 WT:WT 사이토카인-수용체 쌍의 AMBER 친화도와 비교한다. dAMBER_folding > 80kcal/mol인 설계는 제외하였다. dAMBER 폴딩 메트릭스는 돌연변이 시 레나드 존스-결합 폴딩 및 정전기적 폴딩의 합계 변화를 점수 매긴다. 또한 본 발명자들은 dDDRW 아포안정성(apostability)에서 400kcal/mol 초과의 점수를 얻은 설계는 제외하였다. 이 메트릭스는 아포 형태에서 단백질

의 돌연변이에 따른 지식 기반 잠재적 안정성의 변화를 설명한다.

[0513] 다음으로 본 발명자들은 각각의 설계의 $G\text{-}CSF_E$ 돌연변이체를 ZymeCAD™를 사용하여 WT G-CSFR과(또는 그 반대로 $G\text{-}CSFR_E$를$G\text{-}CSF_{WT}$와)과 복합체로 패킹하여, 다음 2개의 복합체가 형성되는 경우 미스페어링 조건 하에서 각각의 양성 설계의 메트릭스를 평가하였다: $G\text{-}CSF_{WT}$:$G\text{-}CSFR(CRH)_E$ 및 $G\text{-}CSF_E$:$G\text{-}CSFR(CRH)_{WT}$. 본 발명자들은 ZymeCAD™를 사용하여 미스페어링된 배향에 대한 인실리코 ddAMBER 메트릭스를 계산하였다(DdAMBER_affinity_Awt_Bmut는 페이링된 조작된 복합체의 AMBER에서 미스페어링된 복합체 $G\text{-}CSF_{WT}$:$G\text{-}CSFR(CRH)_E$의 AMBER 친화도를 차감한 값이며, ddAMBER_affinity_Amut_Bwt는 미스페어링된 조작된 복합체의 AMBER 친화도에서 미스페어링된 복합체 $G\text{-}CSF_E$:$G\text{-}CSFR(CRH)_{WT}$의 AMBER 친화도를 차감한 값이다). 미스페어링된 ddAMBER 친화도 메트릭스를 최소화한 설계는 페어링된 결합 파트너에 대한 선택성이 야생형 사이토카인 또는 수용체 결합에 대한 결합보다 더 크다고 간주되었다.

[0514] 모든 부위 II 설계를 클러스터링하였고, $G\text{-}CSF_E$:$G\text{-}CSFR(CRH)_E$, $G\text{-}CSF_{WT}$:$G\text{-}CSFR(CRH)_E$, $G\text{-}CSF_E$:$G\text{-}CSFR(CRH)_W$의 패킹 메트릭스를 고려하여 페어링 강도(양성 설계) 및 WT G-CSF 및 G-CSFR(CRH)(음성 설계)와의 미스페어링에 대한 선택성을 평가하고, 설계를 순위매겼다.

[0515] **결과**

[0516] 표 2에 열거된 설계는 인실리코에서 $G\text{-}CSF_E$:$G\text{-}CSFR(CRH)_E$의 페어링을 선호하는 ZymeCAD™의 패킹 메트릭스를 갖고(표 5 참조), 인실리코 육안 검사에서 염다리, 수소 결합의 존재 및 심각한 충돌의 부재와 같은 만족스러운 상호작용을 나타내었다(도 5 참조). 이러한 설계는 또한 WT G-CSF 또는 G-CSFR(CRH)과의 미스페어링에 대한 높은 선택성을 나타내었다(표 5 참조).

[0517] 따라서, 표 2에 제시된 동일한 변이체 G-CSF 및 수용체 설계의 부위 II 돌연변이는 각각 야생형 G-CSFR 및 G-CSF에 비해 우선적인 결합을 나타낼 것으로 예측된다.

표 5

ZymeCAD™을 사용한 삼중 인실리코 평균-필드 팩으로부터의 kcal/mol 단위의 AMBER 메트릭스를 갖는 *부위 II* 설계

	$G\text{-}CSF_E$:G-CSFR$(CRH)_E$		$G\text{-}CSF_E$:G-CSFR$(CRH)_{WT}$	$G\text{-}CSF_{WT}$:G-CSFR$(CRH)_E$
설계	dAMBER_aff	dAMBER_folding	ddAMBER_aff_E_WT	ddAMBER_aff_WT_E
1	-13.2	36.0	-35.2	-47.3
2	-24.2	35.6	-41.0	-55.8
6	8.9	-7.5	-8.8	-13.3
7	-24.1	-7.8	-45.8	-51.7
8	-30.5	12.2	-73.5	-86.5
9	-25.1	17.4	-89.6	-119.5
15	-53.3	59.5	-72.4	-71.0
17	-0.2	19.3	-23.2	-28.5
18	-17.6	75.2	-44.2	-27.8
19	20.6	38.1	-10.7	-17.3
20	-9.9	28.5	-52.7	-64.4
21	-18.0	51.5	-55.4	-47.8
22	-32.3	52.2	-75.0	-53.3
24	-13.0	57.7	-50.8	-86.4
25	-49.8	83.5	-100.2	-91.3
27	-60.5	43.0	-131.4	-156.4
28	-61.6	82.6	-148.8	-135.9
30	9.6	-5.0	-31.4	-29.1
34	2.9	16.7	-60.4	-63.1
35	-27.4	0.3	-50.1	-63.0
36	-92.2	35.1	-110.7	-93.5
42	-82.1	67.7	-137.0	-119.7
43	-14.9	51.0	-87.4	-111.2
44	-20.2	53.6	-86.4	-108.4
45	-35.5	38.1	-70.7	-107.0
46	-11.6	44.2	-75.0	-95.8
47	-27.8	75.8	-72.4	-91.5
48	-69.7	76.8	-127.8	-87.7

[0518]

49	-55.9	79.3	-94.7	-84.7
50	-52.0	38.6	-123.5	-134.9
80	15.3	13.0	-16.2	10.8
81	-2.4	52.7	-24.5	-28.9
82	29.8	10.9	1.6	0.7
83	36.3	54.6	-21.6	5.5

[0519]

[0520] **실시예 2: 부위 II 설계의 시험관내 스크리닝**

[0521] 선택된 부위 II 설계는 바쿨로바이러스 기반 곤충 세포 시스템에서 공발현될 때 부위 II 복합체를 형성하는 능력에 대해 형식 $G\text{-}CSF_E$:G-CSFR$(CRH)_E$의 풀다운 실험에서 스크리닝되었다. 본 발명자들은 또한 각각의 설계$G\text{-}CSF_E$

돌연변이체를 G-CSFR(CRH)$_{WT}$와 공발현함으로써 그리고 역으로 각각의 설계 G-CSFR(CRH)$_{E}$ 돌연변이체를 GCSF$_{WT}$와 공발현함으로써 설계까 WT 수용체 또는 사이토카인과 미스페어링된 복합체를 형성할 수 있는지 여부를 평가하였다. G-CSF$_{E}$ 단독의 발현은 사이토카인 돌연변이체의 단일 감염에 의해 검증되었다.

[0522] **방법**

[0523] 간략하면, 부위 II G-CSF 설계 및 상응하는 페어링된 G-CSFR(CRH) 돌연변이체를 곤충 세포 형질주입 벡터에 별도로 클로닝하였다. G-CSF WT(잔기 1-173, 표 1) 및 돌연변이체를 N-말단 분비 신호 및 C 말단 TEV-절단 가능한 Twin Strep 태그(서열 AAA**ENLYFQ/G**SA**WSHPQFEK**GGGSGGGSGGSA**WSHPQFEK**를 가짐)가 있는 프레임 내에서 변형된 pAcGP67b 전달 벡터(파미겐사(Pharmingen))에 클로닝하였다. 수용체 세포외 도메인 중에서, 부위 II 설계 돌연변이가 있는 CRH 도메인(잔기 98-308, 표 1)만 N-말단 분비 신호 및 서열 **HHHHHH**SSGR**ENLYFQ/G**SMG의 TEV-절단 가능한 헥사히스티딘 태그가 있는 프레임 내에서 변형된 pAcGP67b 전달 벡터로 클로닝되었다. 모든 작제물을 합성하였고, 곤충 세포 발현을 위해 코돈 최적화하였다(진스크립트사). 전달 벡터 DNA를 Midi-prep(써모사이언티픽사, 카탈로그 K0481)에 의해 제조하였고, 내독소가 없었고 $A_{260/280}$ 흡광도 비율이 1.8 내지 2.0이었다. 재조합 바이러스 생성은 제조사(익스프레션 시스템즈사, 미국 캘리포니아주 소재)의 설명에 따라 부착 방법을 사용하여 스포돕테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) 9(Sf9) 세포의 벡터 DNA와 재조합 선형화된 바큘로바이러스 DNA를 공동 형질주입시켜 달성되었다. 형질주입 대략 1시간 전에, 0.46×10^{6}개 세포 $m\ell^{-1}$의 건강한 대수상 Sf9 세포 2mℓ를 6웰 조직 배양 플레이트(그레니어사, 카탈로그 657-160)의 웰당 시딩하였다. 형질주입 혼합물은 다음과 같이 준비하였다: 100㎕ 형질주입 배지(익스프레션 시스템즈사, 미국 캘리포니아주 소재, 카탈로그 95-020-100)를 2개의 멸균 1.5mℓ 마이크로퍼지 튜브 A와 B 각각에 넣었다. 튜브 A에 0.4㎍ 재조합 BestBac 2.0 Δv-cath/chiA 선형화된 DNA(익스프레션 시스템즈사, 미국 캘리포니아주 소재, 카탈로그 91-002)를 첨가하고 및 2㎍ 벡터 DNA를 첨가하였다. 튜브 B에 1.2㎕ 5X Express^{2}TR 형질주입 시약(Expres2ION, 카탈로그 S2-55A-001)을 첨가하였다. 용액 A와 B를 약 24℃에서 5분 동안 인큐베이션시킨 다음 합쳐서 30분간 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 후 800㎕의 형질주입 배지를 각각의 형질인큐베이션 반응에 첨가하여 부피를 1mℓ로 늘렸다. 기존 ESF 921 배지를 웰에서 제거하고 세포 단층을 방해하지 않도록 한 방울씩 적용한 1mℓ 형질주입 혼합물로 교체하였다. 플레이트를 앞뒤로 그리고 좌우로 부드럽게 흔들어 형질주입 혼합물을 고르게 분포시키고 27℃에서 4시간 동안 인큐베이션시켰다. 4시간 후, 형질주입 혼합물을 공동 형질주입 플레이트(들)에서 제거하고 10㎍/mℓ의 젠타마이신(카탈로그 15750-060)을 함유하는 2mℓ의 신선한 ESF 921 곤충 세포 배양 배지(익스프레션 시스템즈사, 미국 캘리포니아주 소재, 카탈로그 96-001-01)에 한 방울씩 첨가하였다. 증발을 방지하기 위해서, 플레이트를 사란 랩으로 싸서 멸균 플라스틱 상자에 넣고 27℃에서 4 내지 5일 동안 인큐베이션시켰다. 형질주입 후 4일 또는 5일째에 P1 상청액을 수집하고 5000rpm에서 5분 동안 원심분리시켜 정화한 후 새로운 멸균 튜브로 옮기고 광을 차단하여 4℃에 저장하였다.

[0524] 상기에 기재된 바와 같이 생산된 재조합 P1 스톡을 단백질 발현 연구를 위해 고역가, 저계대 P2 스톡으로 추가로 증폭시켰다. 다음 워크플로우에서는 공동 형질주입에서 수거된 바이러스의 P1 시드 스톡을 접종원으로 사용하여 50 내지 100mℓ의 바이러스를 생성시켰다. 1.5×10^{6}개의 세포 $m\ell^{-1}$의 대수상 Sf9 세포 50mℓ를 250mℓ 진탕 플라스크(피셔사이언티픽사, 카탈로그 PBV 250)에 접종하고, 0.5mℓ P1 바이러스 스톡을 첨가하였다. 세포를 27℃에서 인큐베이션시키고, 135rpm으로 진탕하면서 감염 여부를 모니터링하였다. P2 바이러스 상청액을 감염 후 5 내지 7일에 수거하고 4000rpm에서 10분 동안 원심분리시켜 정화하였다. 역가 손실을 최소화하기 위해 10% 열 불활성화 FBS(VWR, 카탈로그97068-085)를 첨가하고 P2 바이러스는 암실에서 4℃에 저장하였다.

[0525] P2 바이러스 스톡을 소규모로 단백질 발현에 대해 시험하였다. P2 바이러스를 사용하여 12웰 플레이트의 트리코플루시아 니(*Trichoplusia ni*)(Tni) 세포에서 G-CSF$_{E}$ 돌연변이체를 상응하는 G-CSFR$_{E}$ 돌연변이체 공동 감염시켰다. 각각의 설계 돌연변이에 대한 별도의 동시 감염은 G-CSF$_{WT}$ 및 GCSFR(CRH)$_{WT}$의 P2 스톡을 사용하고 G-CSF$_{E}$ 돌연변이에 대해서만 수행되었다. 각각의 반응에 대해서, 2×10^{6}개 세포 mℓ-^{1}의 건강한 대수상 Tni 2mℓ에 P2 바이러스 20㎕를 접종하였다. 플레이트를 135rpm에서 진탕시키면서 약 70시간 동안 27℃에서 인큐베이션시켰다. 5000rpm에서 3분 동안 원심분리시켜 상청액을 정화하고 분비된 단백질을 스트렙탁틴-XT 수퍼플로우(아이비에이 라이프사이언시스사, 카탈로그 2-4010-010)를 사용하는 배취식 모드에서 G-CSF$_{E}$ 돌연변이체 및 G-CSF$_{WT}$의 Twin-Strep Tag(TST)를 통해 풀다운시켰다. 간략하면, 각각의 1.8mℓ 반응 상청액에 0.2mℓ 10X HEPES 완충 식염수(HBS: 20mM HEPES pH8, 150mM NaCl)를 1X, 20㎕ 베드 부피(b.v)의 정제 비드에 첨가하고, 반응을 24℃에서 엔

드-오버-엔드 혼합(end-over-end mixing)하면서 30분 동안 인큐베이션시켰다. 추가로 20㎕ b.v의 정제 비드를 첨가한 후 두 번째 30분 동안 인큐베이션시켰다. 2200rpm에서 3분 동안 원심분리시켜 비드를 펠릿화하고, 상청액을 제거하고 비드를 1X HBS 완충액으로 세척하였다. 단백질을 30㎕ BXT 용출 완충액(100mM Tris-CL pH8, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 50mM 바이오틴, (아이비에이 라이프사이언시스사, 카탈로그 2-1042-025))으로 용출시키고, SDS-PAGE 샘플 완충액과 함께 끓였고, 12% Bolt Bis-Tris +, 12웰 겔(써모 피셔 사이언티픽사, 카탈로그 NW00122BOX)를 환원 조건에서 200V에서 30분간 전개시켰다.

[0526] **결과**

[0527] 부위 II 설계 #6,7,8,9,15,17,30,34,35,36은 G-CSF$_E$ 단독에 대한 발현을 나타내었고, G-CSF$_E$의 Twin Strep 태그를 통해 풀 다운된 충분히 안정한 페어링된 G-CSF$_E$:G-CSFR$_E$ 복합체를 형성하였다(도 6 참조). 예를 들어, 조작된 복합체의 풀 다운 후 부위 II 설계 #6은 약 22 kDa의 G-CSF$_E$ 돌연변이체뿐만 아니라 약 33kDa에서 이의 상응하는 공발현된 G-CSFR(CRH)$_E$ 돌연변이에 대한 SDS-PAGE의 밴드를 나타내었다(도 6 참조).

[0528] 부위 II 설계 #8, 9, 15 및 34는 또한 공발현 검정에서 WT G-CSF 및 WT G-CSFR(도 7 참조)과의 미스페어링에 대해 선택적이었는데, 그 이유는 이들이 WT G-CSF(도 7 하단 패널 참조)에 의해 풀 다운되지 않았고 WT 수용체는 G-CSF$_E$ 돌연변이체에 의해 풀다운되지 않았기 때문이다(도 7 상단 패널 참조). 부위 II G-CSFR$_E$ 설계 30 및 35는 이들이 WT G-CSF에 의해 풀 다운되지 않았기 때문에 공발현 검정에서 WT G-CSF와의 미스페어링에 대해 선택적이었고(도 7 하단 패널 참조), 상호 G -CSF$_E$ 설계는 WT G-CSFR이 풀 다운되었기 때문에 공발현 검정에서 WT G-CSFR과의 미스 페어링에 대해 선택적이지 않았다(도 7 상단 패널 참조). 부위 II 설계 6, 7, 17 및 36은 공발현 검정에서 WT G-CSF 또는 WT G-CSFR(도 7 참조)과의 미스페어링에 대해 선택적이지 않았는데, 그 이유는 이들이 WT G-CSFR을 풀 다운하고, WT G-CSF에 의해서 풀 다운되었기 때문이다.

[0529] 잔기 R288에 돌연변이가 있는 부위 II 수용체 돌연변이체는 Ig 도메인이 없는 G-CSFR(CRH) 수용체 쇄 형식으로 발현되지 않았다. R288 함유 설계를 Ig 도메인의 부위 III 설계와 조합된 SPR에 의한 페어링된 복합체 형성에 대해 평가하였다(실시예 6 참조). 따라서 WT G-CSF 및 WT G-CSFR과의 미스페어링에 대해서도 선택적인 충분히 안정적인 페어링된 G-CSF$_E$:G-CSFR$_E$ 복합체를 형성하는 여러 부위 II 설계를 확인하였다.

[0530] 따라서, 표 2에 제시된 동일한 변이체 G-CSF 및 수용체 설계의 다양한 부위 II 돌연변이는 각각 야생형 G-CSFR 및 G-CSF에 비해 우선적인 결합을 나타낸다.

[0531] **실시예 3: G-CSF:G-CSFR(Ig)의 독점 부위 III 계면의 합리적인 설계**

[0532] G-CSF에 결합하는 부위 III 수용체 Ig 도메인의 결합활성 효과는 G-CSF:G-CSFR(Ig-CRH) 복합체의 2:2 이종이량체 화학량론의 형성에 기여한다(도 1 참조) WT 부위 III 계면이 있는 부위 II에만 존재하는 선택적 설계는 완전히 배타적인 2:2 G-CSF$_E$:G-CSFR(Ig-CRH)$_E$ 복합체를 생성하기에는 불충분한 것으로 보인다. WT 사이토카인 또는 수용체에 대한 미스페어링된 결합보다 선택적으로 페어링된 공동 진화된 설계의 결합을 선호하기 위해서, 본 발명자들은 실시예 1에 기재된 인실리코 설계 워크플로우을 부위 III 계면에 적용하여 선택적 부위 III 설계를 만들었다(도 2 참조).

[0533] **방법**

[0534] 먼저, 본 발명자들은 부위 III 계면 상호작용의 구조적 분석을 수행하였다. 부위 III 계면은 G-CSF:G-CSFR 복합체에 55.64kcal/mol AMBER 에너지를 제공하며 계면 면적이 692.6Å^{2}인 부위 II에 비해 571.5Å^{2}로 전체 계면 면적이 더 작다. 부위 III 계면을 심층적으로 조사한 결과 부위 II 계면에 비해 정전기 및 수소 결합 상호 작용이 적은 것으로 나타났다(도 8 참조). 부위 III의 주요 상호작용은 예를 들어 G-CSF의 E46과 수용체 Ig 도메인의 R41 사이, 추가로 G-CSF의 R147과 수용체 Ig 도메인의 E93 사이의 염다리이다(도 9 참조). 두 상호작용 모두 부위 III의 총 매력적인 AMBER 에너지에 각각 15.9%와 15.4%에 기여한다. 추가 상호작용은 예를 들어, 수용체 Ig 도메인의 Q87을 통해 이루어지며, 이는 G-CSF 부위 III의 골격에 대한 측쇄 아마이드와 수소 결합 상호작용을 형성하고 E46 및 L49와 같은 사이토카인의 주변 측쇄와 레나드 존스 상호작용을 갖는다. 이러한 상호작용은 부위 III의 총 매력적인 AMBER 에너지의 12.3%에 기여한다.

[0535] 다음으로, 본 발명자들은 G-CSF$_E$ 돌연변이체가 공동 진화된 G-CSFR(Ig)$_E$ 돌연변이체(페어링된 상호작용)에 대해 인실리코에서 유리한 AMBER 결합 친화도를 갖는 부위 III에서 양성 설계를 생성시켰다. 이는 예를 들어, 유리한

레나드 존스와 수소 결합 상호작용을 유지하면서 전하를 반전시키거나 형상 상보성을 변경함으로써 수행되었다. 돌연변이체 쌍 G-CSF$_E$:G-CSFR(Ig)$_E$를 ZymeCAD™의 평균 필드 패킹 워크플로우로 패킹하였다. 부위 III에서의 패킹된 인실리코 설계 모델은 구조적 온전성을 육안으로 검사하고 실시예 1에 기재된 바와 같은 ZymeCAD™ 메트릭스로 평가하였다. 다음으로 본 발명자들은 각각의 설계의 G-CSF$_E$ 돌연변이체를 ZymeCAD™를 사용하여 WT G-CSFR(Ig)과(그리고 그 반대로 G-CSFR(Ig)$_E$를 G-CSF$_{WT}$와) 패킹하여 WT 사이토카인 및 수용체와 미스페어링하는 조건 하에서 메트릭스를 평가하였다. 본 발명자들은 실시예 1에서 부위 II에 대해 이전에 기재된 바와 같이 ZymeCAD™(표 6 참조)을 사용하여 부위 III 설계에 대한 ddAMBER 친화도 메트릭(G-CSF$_{WT}$:G-CSFR(Ig)$_E$, G-CSF$_E$:G-CSFR(Ig)$_{WT}$)을 계산하였다.

[0536] 부위 III 설계를 클러스터링하였고, 3개의 모든 인실리코 복합체 G-CSF$_E$:G-CSFR(Ig)$_E$, G-CSF$_{WT}$:G-CSFR(Ig)$_E$, G-CSF$_E$:G-CSFR(Ig)$_{WT}$의 패킹 메트릭스를 육안 조사와 함께 고려하여 설계를 순위매기기 위해서 페어링의 강도 및 WT와의 미스페어링에 대한 선택성을 평가하였다.

[0537] **결과**

[0538] 표 3에 열거된 설계는 WT G-CSF 또는 G-CSFR(Ig)과의 미스페어링에 비해 높은 선택성을 갖는 G-CSF$_E$:G-CSFR(Ig)$_E$의 페어링을 선호하는 ZymeCAD™의 인실리코 패킹 메트릭스를 갖는다.

[0539] 따라서, 표 3에 제시된 동일한 변이체 G-CSF 및 수용체 설계의 다양한 부위 III 돌연변이는 각각 야생형 G-CSFR 및 G-CSF에 비해 우선적인 결합을 나타낼 것으로 예측된다.

표 6

ZymeCAD™을 사용한 삼중 인실리코 평균-필드 팩으로부터의 kcal/mol 단위의 AMBER 메트릭스를 갖는 *부위 III* 설계

	G-CSF$_E$:G-CSFR(Ig)$_E$		G-CSF$_E$:G-CSFR(Ig)$_{WT}$	G-CSF$_{WT}$:G-CSFR(Ig)$_E$
설계 #	dAmber_affinity	dAmber_folding	ddAmber_affinity_E_WT	ddAmber_affinity_WT_E
51	-31.84	21.42	-28.60	-49.04
52	-31.81	21.57	-36.14	-42.08
53	-28.72	30.24	-36.29	-48.49
54	-27.30	36.15	-34.29	-31.51
55	-23.32	21.36	-33.71	-37.62
56	-21.25	28.70	-40.40	-36.60
57	-18.31	15.77	-24.68	-51.81
58	-17.69	17.14	-24.62	-36.77
59	-17.64	28.39	-27.76	-40.42
60	-16.01	30.54	-22.94	-45.27
61	-15.84	29.64	-9.07	-33.76
62	-14.29	2.89	-21.18	-12.78
63	-14.20	3.57	-14.42	-14.65
64	-13.68	34.79	-22.85	-22.93
65	-13.51	28.01	-15.43	-34.93
66	-12.58	10.88	-19.51	-26.53
67	-11.43	35.72	-21.79	-27.46
68	-10.95	15.99	-12.52	-20.20
69	-9.53	18.46	-7.37	-32.23
70	-9.34	13.13	-27.74	-10.28
71	-7.63	15.05	-7.95	-15.03
72	-5.68	10.95	-1.97	-16.54

[0540]

[0541] **실시예 4: 변이체, 공동 진화된 사이토카인-수용체 스위치를 생성하기 위한 부위 II와 III의 조합**

[0542] 2:2 이종이량체 조작된 복합체를 통해 결합 및 신호전달을 가능하게 하고 야생형 사이토카인 또는 수용체과의 교차 반응성이 낮거나 완전히 제거된 완전히 선택적인 설계 쌍 G-CSF$_E$:G-CSF(Ig-CRH)$_E$을 개발하기 위해 실시예 1 및 3에서 선택된 부위 II 및 III 설계를 조합하고(표 4 참조), 시험관내에서 시험하였다.

[0543] 동일한 방식으로 표 4의 설계를 조합한 결과, 실시예 1의 부위 II 설계(표 2)와 실시예 3의 부위 III 설계(표 3)의 임의의 다른 조합은 변이체 신호전달을 가능하게 하는 조합된 완전히 선택적인 G-CSF$_E$:G-CSFR(Ig-CRH)$_E$ 설계를 생성시킬 수 있다. 조합 설계 401 및 402를 조작된 G:CSF$_E$:G-CSFR(Ig-CRH)$_E$ 복합체를 형성하는 능력뿐만 아니라 WT 사이토카인 또는 수용체에 결합하는 능력에 대해서 실시예 2에 기재된 공발현 검정으로 시험하였다.

[0544] **방법**

[0545] 사이토카인 TST 태그를 통한 풀다운을 이용한 공발현 검정을 실시예 2에 상기에 기재된 바와 같이 대로 수행하였고, 차이점은 수용체 작제물이 G-CSFR(Ig-CRH)로 지칭되는 Ig 및 CRH 도메인(잔기 2-308, 표 1)을 함유한다는 것이다.

[0546] **결과**

[0547] 조합 설계 401 및 402는, 설계 사이토카인이 공동 진화된 조작된 수용체를 풀 다운시켰지만 WT 수용체는 풀 다운시키지 않았고 역으로 WT G-CSF는 조작된 수용체를 풀 다운시키지 않았다는 점에서 공발현 검정에서 완전히 선택적이었다(도 10 참조).

[0548] 이들 결과는 선택 부위 II 및 부위 III 돌연변이를 조합한 변이체 G-CSFR ECD 설계를 포함하는 수용체 및 변이체 G-CSF가 각각 조작된 사이토카인 수용체 쌍에 대한 특이적 결합이 가능하고 야생형 수용체 또는 사이토카인에는 결합하지 않음을 나타낸다.

[0549] **실시예 5: G-CSF 및 G-CSFR 야생형 및 돌연변이체의 생산**

[0550] 야생형 및 조작된 사이토카인 및 수용체 변이체를 생산하고 이들의 생물물리학적 특성을 비교하기 위해, 재조합 단백질을 곤충 세포로부터 발현시키고 정제시켰다.

[0551] **방법**

[0552] $G\text{-}CSF_E$ 및 $G\text{-}CSF_{WT}$를 상기 기재된 바와 같이 클로닝하였다. 재조합 단백질의 예비 규모 생산을 2 내지 4L의 건강한 대수기 Tni 세포에서 다음과 같이 수행하였다: 2×10^6개 세포 $m\ell^{-1}$의 800mℓ Tni에 2mℓ 세포당 20μℓ 사이토카인 변이체 P2 바이러스를 접종하고, 135rpm으로 진탕하면서 27℃에서 70시간 동안 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 후, 세포를 5500rpm에서 15분 동안 원심분리시켜 펠릿화하고, 상청액을 2회 여과하고, 먼저 1μm 유형 A/E 유리 섬유 필터(팰사(PALL), 카탈로그 61631)를 통해 여과한 다음 0.45μm PVDF 막 필터(시그마 알드리치사, 카탈로그 HVLP04700)를 통해 여과하였다. 프로테아제 저해제 칵테일 III(시그마 알드리치사, 카탈로그 539134)을 첨가하고 상청액 완충액을 HBS(20mM HEPES pH8, 150mM NaCl)로 교환하고 접선 흐름에서 300mℓ로 농축시켰다. 단백질을 3×3mℓ b.v Streptactin-XT 슈퍼플로우를 사용하여 배취 모드로 정제시키고 2×1시간 동안 인큐베이션시킨 후 4℃에서 교반하면서 1회 밤새 인큐베이션시켰다. 용출 전에 수지를 10 CV HBS 완충액으로 세척하였다. 단백질은 4×5mℓ의 BXT 용출 완충액에서 용출되었다. 용출액을 나노드롭(nanodrop) A280과 환원 SDS-PAGE로 분석하였고, 약 2mℓ로 농축시켰고, TST 정제 태그는 TEV:단백질의 1:80 비율로 18℃에서 밤새 엔드-오버-엔드 혼합하여 TEV와 함께 인큐베이션시켜 절단되었다. 절단 단백질을 20mM BisTris pH 6.5, 150mM NaCl에서 평형화된 SX75 16/600 또는 SX200 16/600 크기 배제 칼럼(지이 헬쓰케어사, 카탈로그 28-9893-33 또는 28-9893-35)에 로딩하기 전에 SDS-PAGE로 확인하였다(도 11 참고). 단백질 함유 분획을 환원 SDS-PAGE로 분석하고, 풀링시키고, 나노드롭 A280 측정으로 농도를 측정하였다.

[0553] 수용체 변이체의 단백질 정제를 위해, 야생형 및 $G\text{-}CSFR(Ig\text{-}CRH)_E$ 돌연변이체를 상기에 기재된 바와 같이 클로닝하였고, 정제를 위한 수용체 작제물에는 CRH 도메인(Uniprot ID Q99062의 잔기 3 내지 308, 표 1) 외에 Ig 도메인도 포함되었다. 상기에 기재된 바와 같이 바이러스 스톡을 준비하여 2 내지 4L 규모의 감염에 사용하였다. 정화된 상청액을 Ni-NTA 결합 완충액(20mM HEPES pH8, 1M NaCl, 30mM 이미다졸)으로 완충액 교환하고 상기에 기재된 바와 같이 300mM로 농축시켰다. 단백질을 3×3mℓ b.v Ni-NTA 슈퍼플로우를 사용하여 배취 결합 모드로 정제시키고 2×1시간 동안 인큐베이션시킨 후 4℃에서 교반하면서 1회 밤새 인큐베이션시켰다. 용출 전에 수지를 10 CV 결합 완충액으로 세척하였다. 단백질은 4×5 mℓ의 Ni-NTA 용출 완충액에서 용출되었다(20mM HEPES pH8, 1M NaCl, 250mM 이미다졸). 용출액을 분석하고 완충액을 20mM Bis-Tris pH 6.5, 150mM NaCl로 교환하고 농축하고 상기에 기재된 바와 같이 밤새 절단하였다. 이어서 절단 단백질을 20mM BisTris pH 6.5, 150mM NaCl에서 평형화된 SX 75 16/600 또는 SX200 16/600 크기 배제 칼럼(지이 헬쓰케어사)에 로딩하였다(도 12 참조). 단백질 함유 분획을 환원 SDS-PAGE로 분석하고, 풀링시키고, 나노드롭 A280 측정으로 농도를 측정하였다.

[0554] **결과**

[0555] 야생형, $G\text{-}CSF_E$ 및 $G\text{-}CSFR_E$ 돌연변이체는 환원 SDS-PAGE로 판단했을 때 SEC 후 90%를 초과하게 순수하였다(도 11 및 12 참조). 설계 401 및 402 $G\text{-}CSF_E$의 1L 배양물당 SEC 후 수율은 각각 2.7mg 및 1.6mg이었다. 설계 401 및 402 $G\text{-}CSFR_E$의 1L 생산당 SEC 후 수율은 각각 1.7mg 및 1.5mg이었다. WT G-CSF는 배양물 1L당 SEC 후 2.1mg의 수율로 정제되었으며, WT G-CSFR은 배양물 1L당 SEC 후 3.1mg의 수율로 정제되었다.

[0556] 이러한 결과는 변이체 G-CSF 및 수용체를 정제하는 데 사용된 방법이 시험관내 생물리학적 특성 분석에 사용할 정제된 단백질을 생성하는 데 효율적이라는 것을 확인시켜 준다.

[0557] **실시예 6: SPR에 의한 페어링된 결합 파트너 및 미스페어링된 결합 파트너에 대한 설계의 친화도 결정**

[0558] 공동 진화된 수용체 돌연변이체에 대한 설계 사이토카인의 친화성을 결정하기 위해, 본 발명자들은 $G\text{-}CSFR_E$에 대한 $G\text{-}CSF_E$의 친화도를 측정하였다. 본 발명자들은 또한 SPR(미스페어링된)에 의한 설계 하위세트에 대해 G-

$CSFR_{WT}$에 대한 G-CSF_E의 친화도 및 G-$CSFR_E$에 대한 G-CSF_{WT}의 친화도를 결정하였다.

[0559] **방법**

[0560] SPR 결합 검정은 PBS-T(PBS+0.05%(v/v) Tween 20) 전개 완충액을 사용하여 Biacore T200 기기(지이 헬쓰케어사, 캐나다 온타리오주 미시소거 소재)에서 25℃의 온도에서 수행하였다. CM5 시리즈 S 센서 칩, Biacore 아민 커플링 키트(NHS, EDC 및 1M 에탄올아민) 및 10mM 아세트산나트륨 완충액은 모두 지이 헬쓰케어사에서 구입하였다. 0.05% Tween20(PBS-T)을 포함하는 PBS 전개 완충액은 테크노바사(Teknova Inc.)(미국 캘리포니아주 홀리스터 소재)에서 구입하였다. 설계를 3개의 상이한 고정 방향으로 평가하였다.

[0561] G-$CSFR_E$에 대한 G-CSF_E의 결합 친화도를 결정하기 위해서, G-$CSFR_E$ 돌연변이체를 제조사(지이 라이프사이언시스(GE LifeSciences))가 기재된 바와 같이 표준 아민 커플링에 의해 포획하였다. 간략하면, EDC/NHS 활성화 직후, 10mM NaOAc, pH 5.0 중의 G-$CSFR_E$의 5㎍/㎖ 용액을 약 700 내지 900RU의 수용체 밀도에 도달할 때까지 5㎕/분의 유량으로 주입하였다. 1M 에탄올아민 염산염-NaOH(pH 8.5)를 10㎕/분으로 420초 동안 주입하여 나머지 활성군을 켄칭하였다. 단일 주기 동역학을 사용하여, 빈 완충액 대조를 사용하여 200nM에서 시작하는 상응하는 G-CSF_E 돌연변이체의 2배 연속 희석물의 6개 농도를 1800초 해리 단계와 함께 300초 동안 25 ㎕/분으로 순차적으로 주입하여 완충액 블랭크 참조가 있는 센서그램 세트를 생성하였다. 변이체가 포획되지 않은 참조 셀에서도 동일한 샘플 적정을 수행하였다. 칩을 30㎕/분에서 30초 동안 10mM 글리신/HCl, pH 2.0의 1펄스에 의해서 다음 주입 주기를 준비하기 위해 재생시켰다.

[0562] G-$CSFR_E$에 대한 G-CSF_{WT}의 결합 친화도를 평가하기 위해, G-CSF_E를 상기에 기재된 바와 같이 약 700 내지 900 RU의 밀도로 칩에 포획하였다. 단일 주기 동역학을 사용하여, 빈 완충액 대조를 사용하여 200nM에서 시작하는 각각의 G-$CSFR_{WT}$의 2배 연속 희석물의 6개 농도를 1800초 해리 시간과 함께 300초 동안 25 ㎕/분으로 순차적으로 주입하여 완충액 블랭크 참조가 있는 센서그램 세트를 생성하였다. 변이체가 포획되지 않은 참조 셀에서도 동일한 샘플 적정을 수행하였고, 칩을 상기에 기재된 바와 같이 재생하였다.

[0563] G-$CSFR_{WT}$에 대한 G-CSF_E의 결합 친화도를 평가히기 위해서, 실시예 5에 기재된 바와 같이 정제된 재조합 G-$CSFR_{WT}$를 본 실시예에 전술한 바와 같이 포획하였다. 단일 주기 동역학을 사용하여, 블랭크 완충액 대조군을 사용하여 200mM에서 시작하는 각각의 G-CSF_E 돌연변이체의 6가지 농도의 2배 연속 희석물을 상기에 기재된 바와 같이 순차적으로 주입하였다. 변이체가 포획되지 않은 참조 셀에서도 동일한 샘플 적정을 수행하였다. G-$CSFR_{WT}$ 표면을 상기에 기재된 바와 같이 재생하였다.

[0564] 대조군으로서, WT G-CSFR(Ig-CRH)에 대한 WT G-CSF의 결합을 각각의 실험에서 평가하고 각각의 독립적 측정 내에서 K_D 배수 변화를 계산하는 데 사용하였다.

[0565] 이중 또는 삼중 반복 주입으로부터의 이중 참조 센서그램을 Biacore™ T200 평가 소프트웨어 v3.0을 사용하여 분석하고 1:1 Langmuir 결합 모델에 피팅하였다.

[0566] **결과**

[0567] 곡선의 회합 및 해리 단계를 피팅하여 얻은 동역학 유래 친화도 상수(K_D). WT G-CSFR(Ig-CRH)에 대한 WT G-CSF의 K_D 범위는 1.8 내지 2.5E-9이다. 동역학 매개변수가 피팅되지 않는 경우 정상 상태 친화도 상수를 도출하려는 시도를 수행하였다. 이러한 경우, KD 배수 변화는 WT G-CSF:WT G-CSFR(Ig-CRH) 쌍에 대한 정상 상태 유래 K_D로부터 계산하였고 표 7에 제시한다.

[0568] 설계 9, 130, 134, 137, 307, 401 및 402는 공동 진화된 결합 파트너에 대한 친화도가 WT:WT KD와 2배 이하로 다른 것으로 나타났다(표 7 및 도 13 참조).

[0569] 설계 9, 30 및 34 G-$CSFR(Ig\text{-}CRH)_E$ 돌연변이체는 WT G-CSFR(Ig-CRH)에 비해 WT G-CSF에 대해 700배를 초과하게 더 약한 친화도를 나타내었다. 설계 #35 G-$CSFR(Ig\text{-}CRH)_E$는 WT 사이토카인과의 미스페이링에 대해 덜 선택적이었으며, WT G-CSF에 대한 친화도는 WT:WT 친화도에 비해 약 19배 감소하였다. 설계 130, 134, 401, 402, 300, 3003, 304 및 307 G-$CSFR(Ig\text{-}CRH)_E$ 돌연변이체는 WT G-CSF와의 미스페어링에 대해 가장 선택적이었으며 적정된

농도에서 WT G-CSF에 대한 감지할 수 있는 결합을 나타내지 않았다(표 8, 도 13 참조).

[0570] 설계 124, 130, 401, 402, 300, 303, 304 및 307 G-CSF$_E$ 돌연변이체는 적정된 농도에서 WT G-CSFR(Ig-CRH)에 대한 감지할 만한 결합을 나타내지 않았다. 설계 9, 30 및 34 G-CSF$_E$ 돌연변이체는 WT:WT KD에 비해 WT G-CSFR(Ig-CRH)에 대해 적어도 20배 더 약한 K_D를 나타내었다. 설계 #134 G-CSF$_E$는 WT G-CSFR(Ig-CRH)에 대해 약 500배 더 약한 친화성도를 나타내었다(표 9, 도 13 참조). 설계 35 및 117 G-CSF$_E$ 돌연변이체는 WT:WT KD와 유사한 WT G-CSFR(Ig-CRH)에 대한 결합을 나타내었다.

[0571] 이들 결과는 선택된 변이체 G-CSF 설계가 야생형 G-CSFR ECD에 결합하지 않거나 야생형 G-CSFR ECD에 대해 상당히 감소된 친화도(적어도 약 20배 더 약한 KD)으로 결합한다는 것을 나타낸다.

표 7

SPR에 의해 결정된 WT:WT 결합 친화도와 비교하여 상응하는 G-CSFR(Ig-CRH)$_E$ 돌연변이체에 대한 G-CSF$_E$ 돌연변이체의 결합 친화도(KD) 변화

	K_D 배수 변화
WT:WT 대조군	-
설계 G-CSF$_E$:G-CSFR(Ig-CRH)$_E$	
9	1.2
30	11
34	5.0
35	3.3
130	0.9
134	1.0
137	0.3
401	0.6^{ss}
402	0.8^{ss}
300	194
301	측정하지 않음
303	2.2^{ss}
304	6.5
307	0.6^{ss}

[0572] ^{ss}는 정상 상태 유래 친화도 상수를 나타낸다.

표 8

SPR에 의해 결정된 WT:WT 결합 친화도와 비교하여 G-CSFR(Ig-CRH)$_E$를 설계하기 위한 WT G-CSF의 결합 친화도 변화

	K_D 배수 변화
WT:WT 대조군	-
설계 G-CSFR(Ig-CRH)$_E$	
9	8807^{ss}
30	774
34	4258^{ss}
35	19
130	결합 없음
134	결합 없음
401	결합 없음
402	결합 없음
300	결합 없음
301	결정되지 않음
303	결합 없음
304	결합 없음
307	결합 없음

[0573] ^{ss}는 정상 상태 유래 친화도 상수를 나타낸다.

표 9

WT와 비교하여 야생형 G-CSFR(Ig-CRH)에 대한 $G\text{-}CSF_E$의 결합 친화도 변화: SPR에 의해 결정된 WT 결합 친화도

	K_D 배수 변화
WT:WT 대조군	-
설계 $G\text{-}CSF_E$	
9	79
30	20
34	33
35	5.0
117	3.4
124	결합 없음
130	결합 없음
134	465
401	결합 없음
402	결합 없음
300	결합 없음
301	결정되지 않음
303	결합 없음
304	결합 없음
307	결합 없음

[0574]

[0575] 실시예 7: 설계 $G\text{-}CSF_E$ 돌연변이체의 열 안정성 결정

[0576] WT 사이토카인 및 수용체와 비교하여 $G\text{-}CSF_E$ 및 $G\text{-}CSFR_E$ 돌연변이체의 열 안정성을 결정하기 위해서 본 발명자들은 시차 주사 열량측정법(DSC)을 수행하였다.

[0577] **방법**

[0578] 변이체의 열 안정성을 시차 주사 열량측정법(DSC)에 의해 다음과 같이 평가하였다: 1 내지 2mg/mℓ 농도의 정제된 샘플 950mℓ를 Nano DSC (티에이 인스트루먼츠사(TA instruments), 미국 델라웨어주 뉴 캐슬 소재)를 사용하여 DSC 분석을 위해서 사용하였다. 각각의 실행 시작 시, 기준선 안정화를 위해 블랭크 완충액 주입을 수행하였다. 각각의 샘플을 60psi 질소 압력을 사용하여 60℃/hr 속도로 25 내지 95℃에서 스캐닝하였다. 생성된 열분석도는 NanoAnalyze 소프트웨어를 사용하여 참조 및 분석되어 열 안정성의 지표로서 용융 온도(Tm)를 결정하였다.

[0579] **결과**

[0580] 조작된 변이체의 열 안정성은 동일한 조건 및 실험 설정 하에 측정된 조작된 분자와 동등한 야생형 분자의 가장 두드러진 전이(가장 높은 엔탈피) 사이의 차이로 보고된다. 측정된 WT GCSF Tm은 독립적인 실험에서 52.2 내지 55.4℃ 사이에서 변화하는 반면, WT G-CSFR은 50.5℃의 Tm을 나타낸다. 설계 #15 및 34를 제외하고 시험된 $G\text{-}CSF_E$ 돌연변이체는 WT G-CSF에 대한 Tm과 5℃ 미만의 Tm 차이를 나타내었다(표 10 및 도 14 참조). 시험된 모든 수용체 돌연변이체는 WT 수용체와 동일한 열 안정성을 나타내었다(표 10 및 도 14 참조).

[0581] 이들 결과는 변이체 G-CSF 및 변이체 G-CSFR ECD 설계를 갖는 수용체가 야생형 G-CSF 및 G-CSFR과 유사한 열 안정성을 갖는다는 것을 나타내고; 부위 II 및/또는 부위 III 돌연변이는 G-CSF 또는 G-CSFR ECD의 열 안정성을

방해하지 않는다.

표 10

DSC에 의해서 결정된 야생형과 비교된 설계 사이토카인 및 수용체 돌연변이체에 대한 용융 온도(Tm)의 변화.

GCSF$_E$ 설계 돌연변이체	ΔTm (°C)
WT	-
#15	-9.9
#34	-6.1
#35	-3.5
#106	+7.5
#130	-1.8
#134	+2.0
#135	-0.8
#300	+1.0
#301	-3.2
#303	+4.2
#304	+2.7
#307	-3.8
#401	-2.5
#402	-3.8
GCSFR (Ig-CRH)$_E$ 설계 돌연변이체	
WT	-
#9	+1.4
#30	+1.4
#34	+1.8
#35	+1.8
#130*	-1.9

[0582]

#134	-0.9
#300	측정하지 않음
#301	측정하지 않음
#303	측정하지 않음
#304	측정하지 않음
#307	측정하지 않음
#401	측정하지 않음
#402	측정하지 않음

*150mM NaCl, 20mM BisTris pH 6.5에서 결정

[0583]

[0584] **실시예 8: UPLC-SEC에 의한 G-CSF$_E$ 돌연변이체의 단분산성의 결정**

[0585] WT G-CSF와 비교하여 G-CSF$_E$ 돌연변이체의 단분산성을 결정하기 위해 본 발명자들은 UPLC-SEC에 의해 돌연변이

체를 분석하였다.

[0586] **방법**

[0587] UPLC-SEC를 30℃로 설정되고 PDA 검출기가 구비된 Agilent Technologies 1260 Infinity II 시스템에 장착된 Acquity BEH125 SEC 칼럼(4.6×150mm, 스테인리스강, 1.7μm 입자)(워터스사(Waters LTD), 캐나다 온타리오주 미시소거 소재)을 사용하여 SEC 정제된 단백질 샘플에 대해 수행하였다. 실행 시간은 0.4㎖/분의 유량에서 150mM NaCl, 20mM HEPES pH 8.0 또는 150mM NaCl, 20mM BisTris pH 6.5의 구배 완충액을 사용하여 7분으로 구성되었다. 210 내지 500 nm 범위의 UV 흡광도로 용리를 모니터링하고 280 nm에서 크로마토그램을 추출하였다. OpenLAB™ CDS ChemStation™ 소프트웨어를 사용하여 피크 적분을 수행하였다.

[0588] **결과**

[0589] WT G-CSF 및 설계 34, 35 및 130 G-CSF$_E$ 돌연변이체는 100% 단분산성이었다(표 11 참조). 돌연변이체 8, 9, 15, 117, 135는 65.3 내지 79.5% 사이의 더 낮은 단분산성을 나타내었다. 설계 #134 사이토카인은 pH 8.0에서 57.3%의 단분산성을 나타내었는데, 이는 pH 6.5에서 86.6%의 단분산성으로 개선되었다. 이동상의 더 낮은 pH에서 단분산성의 개선은 pI의 이동으로 인해 발생할 수 있고, 예를 들어, WT G-CSF에 대한 계산된 pI 5.41에서 설계 #134 G-CSF$_E$에 대한 계산된 pI 8.35까지이다.

[0590] 이들 결과는 변이체 G-CSF 설계 중 일부가 야생형 G-CSF와 같이 100% 단분산성을 갖는다는 것을 나타내는데; 이는 부위 II 및/또는 부위 III 돌연변이의 하위세트가 G-CSF의 단분산성을 방해하지 않는 반면; 다른 변이체 G-CSF 설계는 낮은 pH에서 증가된 단분산성를 낮춘다는 것을 나타낸다.

표 11

UPLC-SEC에 의해서 결정된 G-CSF$_E$ 설계 돌연변이체의 단분산성.

G-CSF$_E$ 설계 돌연변이체	단분산성 %
WT	100.0 (96.7*)
8	73.7
9	65.3
15	57.3
34	100.0
35	100.0
117	74.7*
130	100.0*
134	57.3 (86.6*)
135	79.5*
401	89.6*

*150mM NaCl, BisTris pH 6.5에서

[0591]

[0592] **실시예 9: 세포내 IL-2 수용체 신호전달 도메인을 갖는 키메라 G-CSF 수용체의 작제**

[0593] 설계 G-CSF$_E$ 사이토카인 돌연변이체가 설계 G-CSFR(Ig-CRH)$_E$ 수용체 돌연변이체를 통해 신호를 전달하고 면역 세포 증식을 유발할 수 있는지 여부를 조사하기 위해, 본 발명자들은 gp130 막관통(TM) 도메인 및 세포내 신호전달 도메인(ICD) 및 IL-2Rβ 세포내 신호전달 도메인에 융합된 G-CSFR ECD(G-CSFR$_{WT}$-ICD$_{gp130-IL-2R\beta}$)를 사용하여 단일 쇄 키메라 G-CSF 수용체를 작제하였다. 본 발명자들은 또한 이종이량체 수용체로서 공발현되도록 설계된 2개의 소단위로 구성된 키메라 G-CSFR을 활용하였다: 1) G-CSFR$_{WT}$-ICD$_{IL-2R\beta}$ 소단위는 IL-2Rβ TM 및 ICD에 융합된 G-CSFR ECD로 구성되고; 2) G-CSFR$_{WT}$-ICD$_{\gamma c}$ 소단위는 공통 감마 쇄(γc, IL-2Rγ) TM 및 ICD에 융합된 G-CSFR ECD로 이루어진다.

[0594] **방법**

[0595] 단일 쇄 키메라 수용체 작제물은 G-CSFR 신호 펩타이드 및 ECD에 이어 gp130 TM 및 부분 ICD, IL-2Rβ 부분 ICD를 포함하도록 설계되었다(표 12). 이종이량체 키메라 수용체 작제물을 다음을 포함하도록 설계하였다: 1) G-CSFR 신호 펩타이드 및 ECD, 이어서 IL-2Rβ TM 및 ICD(표 13); 및 2) G-CSFR 신호 펩타이드 및 ECD, 이어서 γc TM 및 ICD(표 14). 키메라 수용체 작제물을 렌티바이러스 전달 플라스미드로 클로닝하고, 작제물 서열을 생어 서열결정에 의해 검증하였다. 전달 플라스미드 및 렌티바이러스 패키징 플라스미드(psPAX2, pVSVG)를 다음과 같이 렌티바이러스 패키징 세포주 HEK293T/17 세포(ATCC)에 공동 형질주입시켰다. 세포를 10% 우태아 혈청 및 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 DMEM 및 배지에 밤새 플레이팅하고, 형질주입 2 내지 4시간 전에 배지를 변경하였다. 플라스미드 DNA 및 물을 폴리프로필렌 튜브에서 혼합하고, $CaCl_2$(0.25M)를 적가하였다. 2 내지 5분 인큐베이션 후, 2x HEPES-완충 식염수(0.28M NaCl, 1.5mM Na_2HPO_4, 0.1M HEPES)와 1:1로 혼합함으로써 침전시켰다. 침전된 DNA 혼합물을 세포에 첨가하고, 37℃, 5% CO_2에서 밤새 인큐베이션시켰다. 그 다음날 HEK293T/17 배지를 교체하고, 세포를 추가로 24시간 동안 인큐베이션시켰다. 다음날 아침, 세포 상청액을 플레이트로부터 수집하고, 약하게 원심분리시켜 부스러기를 제거하고, 0.45μm 필터를 통해 여과하였다. 상청액을 Beckman Optima L-XP Ultracentrifuge의 SW-32Ti Rotor를 사용하여 25,000rpm에서 90분 동안 회전시켰다. 상청액을 제거하고, 펠릿을 적합한 부피의 Opti-Mem 배지에 재현탁시켰다. BAF3 세포(10% 우태아 혈청, 페니실린, 스트렙토마이신 및 100IU/mℓ hIL-2를 함유하는 RPMI에서 성장)에 바이러스의 연속 희석물을 첨가함으로써 바이러스 역가를 결정하였다. 형질도입 48 내지 72시간 후, 세포를 항-인간 G-CSFR APC-접합 항체(1:50 희석) 및 eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 450(1:1000 희석)과 4℃에서 15분 동안 인큐베이션시키고, 세척하고, Cytek Aurora 또는 BD FACS Calibur 유세포 분석기에서 분석하였다. 이러한 방법에 의해 결정된 예상 역가를 사용하여, 32D-IL-2Rβ 세포주(10% 우태아 혈청, 페니실린, 스트렙토마이신 및 300IU/mℓ hIL-2를 함유하는 RPMI에서 성장)에 0.5의 MOI로 키메라 수용체 작제물을 암호화하는 렌티바이러스 상청액을 형질도입하였다. 세포에 바이러스 상청액의 관련 양을 첨가하고, 24시간 동안 인큐베이션시키고, 세포 배지를 대체함으로써 형질도입을 수행하였다. 형질도입 3 내지 4일 후, 본 발명자들은 상기에 기재된 바와 같은 유세포 분석법에 의해서 인간 G-CSFR의 발현을 확인하였다. 세포를 대략 14 내지 28일 동안 $G\text{-}CSF_{WT}$에서 확장시키고, 그 다음 BrdU 검정을 수행하였다.

[0596] 상기에 기재된 바와 같이 $G\text{-}CSF_{WT}$에서 확장된 32D-IL-2Rβ 세포를 PBS에서 3회 세척하고, 관련 검정 사이토카인(사이토카인 없음, hIL-2(300IU/mℓ), $G\text{-}CSF_{WT}$(30ng/mℓ) 또는 $G\text{-}CSF_{E}$(30ng/mℓ))을 함유하는 새로운 배지에 48시간 동안 재플레이팅하였다. BrdU 검정 절차는 하기를 추가하면서 BD Pharmingen™ APC BrdU Flow Kit(557892)에 대한 지침 매뉴얼을 따랐다: 세포를 BrdU 및 eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 450(1:5000)과 함께 30분 동안 공동 인큐베이션시켰다. 분석용 유세포 분석법을 Cytek Aurora 장비를 사용하여 수행하였다.

[0597] **결과**

[0598] BrdU 검정에서, 단일 쇄 키메라 수용체 작제물 $G\text{-}CSFR_{WT}\text{-}ICD_{gp130\text{-}IL\text{-}2R\beta}$ 또는 이종이량체 수용체 작제물 $G\text{-}CSFR_{WT}\text{-}ICD_{IL\text{-}2R\beta}$+$G\text{-}CSFR_{WT}\text{-}ICD_{\gamma c}$가 형질주입된 세포는 hIL-2(300IU/mℓ)에 비해서 G-CSFWT(30ng/mℓ)에 대한 반응에서 유사하거나 우수한 증식을 나타내었다. 사이토카인이 없으면 세포가 증식하지 않았다(도 15 참조).

[0599] 이러한 결과는 G-CSF에 의한 자극 시 단일 쇄 및 이종이량체 키메라 수용체 작제물이 활성화되어 세포 증식을 유도할 수 있음을 나타낸다.

[0600] **실시예 10: BrdU에 의해서 조사된 설계 137 $G\text{-}CSFR_{E}\text{-}ICD_{IL\text{-}2}$가 형질도입되고 야생형 또는 설계 $G\text{-}CSF_{137}$로 처리된 32D-IL-2Rβ 세포의 증식**

[0601] SPR 또는 공발현 검정으로 판단했을 때 충분히 선택적인 부위 II/III 조합 설계를 시험관 내에서 32D-IL-2Rβ 세포의 증식을 유도하는 능력에 대해 시험하였다.

[0602] **방법**

[0603] 설계 137에 대한 점 돌연변이를 표 12 내지 표 14에 기재된 작제물에 도입하였다. $G\text{-}CSFR_{137}\text{-}ICD_{gp130\text{-}IL\text{-}2R\beta}$(동종이량체) 또는 $G\text{-}CSFR_{137}\text{-}ICD_{IL\text{-}2R\beta}$+$G\text{-}CSFR_{137}\text{-}ICD_{\gamma c}$(이종이량체) 작제물의 클로닝 및 발현은 상기에 설명한 것과 동일한 절차를 따랐다. BrdU 검정을 수행하기 전에, 세포를 G-CSF137에서 대략 14 내지 28일 동안 확장시켰다.

[0604] 상기에 기재된 BrdU 검정 절차를 사용하여 G-CSF$_{137}$에서 확장된 32D-IL-2Rβ 세포를 G-CSF$_{137}$(30ng/mℓ), G-CSF$_{WT}$(30ng/mℓ), hIL-2(300IU/mℓ) 및 사이토카인 부재 하에서 증식에 대해 검정하였다.

[0605] **결과**

[0606] BrdU 검정에서, 단일 쇄 키메라 수용체 작제물 G-CSFR$_{137}$-ICD$_{gp130-IL-2Rβ}$ 또는 이종이량체 수용체 작제물 G-CSFR$_{137}$-ICD$_{IL-2Rβ}$ + G-CSFR$_{137}$-ICD$_{γc}$가 형질도입된 세포는 hIL-2(300IU/mℓ)와 비교하여 G-CSF$_{137}$(30ng/mℓ)에서 유사하거나 우수한 증식을 나타내었다. 세포는 사이토카인의 부재 하에 증식하지 않았고 G-CSF$_{WT}$(30ng/mℓ)에서 열등한 증식을 나타내었다(도 16).

[0607] 이러한 결과는 변이체 G-CSF가 조작된 수용체를 특이적으로 활성화하고; 반대로 조작된 수용체는 변이체 G-CSF에 의해 활성화되지만 야생형 G-CSF에 비해 현저히 낮게 활성화된다는 것을 나타낸다. 따라서, 변이체 G-CSF는 변이체 G-CSFR ECD와 함께 키메라 수용체를 특이적으로 활성화하여 키메라 수용체를 발현하는 세포의 증식을 특이적으로 유도할 수 있다.

[0608] **실시예 11: BrdU에 의해서 조사된 야생형 G-CSFR-ICD$_{IL-2}$가 형질도입되고 야생형 또는 설계 G-CSF$_{F}$로 처리된 32D-IL-2Rβ 세포의 증식**

[0609] 32D-IL-2R2Rβ 세포에서 페어링된 신호전달을 복원할 수 있는 부위 II/III 조합 설계를 후속적으로 단일 쇄 키메라 수용체 작제물 G-CSFR$_{WT}$-ICD$_{gp130-IL-2Rβ}$ 또는 이종이량체 수용체 작제물 G-CSFR$_{WT}$-ICD$_{IL-2Rβ}$+G-CSFR$_{WT}$-ICD$_{γc}$이 형질도입된 32D-IL-2R2Rβ 세포의 증식을 유도하는 능력에 대해 시험하였다.

[0610] **방법**

[0611] G-CSFR$_{WT}$-ICD$_{gp130-IL-2Rβ}$(동종이량체) 또는 G-CSFR$_{WT}$-ICD$_{IL-2Rβ}$+G-CSFR$_{WT}$-ICD$_{γc}$(이종이량체) 작제물의 클로닝 및 발현은 상기에 설명한 것과 동일한 절차를 따랐다. BrdU 검정을 수행하기 전에, 세포를 대략 14 내지 28일 동안 G-CSF$_{WT}$에서 확장시켰다.

[0612] 상기에 기재된 BrdU 검정 절차를 사용하여 G-CSF$_{WT}$에서 확장된 32D-IL-2Rβ 세포를 G-CSF$_{137}$(30ng/mℓ), G-CSF$_{WT}$(30ng/mℓ), hIL-2(300IU/mℓ) 및 사이토카인 부재 하에서 증식에 대해 검정하였다.

[0613] **결과**

[0614] BrdU 검정에서, 단일 쇄 키메라 수용체 작제물 G-CSFR$_{WT}$-ICD$_{gp130-IL-2Rβ}$ 또는 이종이량체 수용체 작제물 G-CSFR$_{WT}$-ICD$_{IL-2Rβ}$ 및 G-CSFR$_{WT}$-ICD$_{γc}$가 형질주입된 세포는 G-CSF$_{WT}$(30ng/mℓ)에 비해서 G-CSF$_{137}$(30ng/mℓ)의 열등한 증식을 나타내었다. 사이토카인이 없으면 세포가 증식하지 않았다(도 17 참조).

[0615] 이들 결과는 변이체 G-CSF가 야생형 G-CSFR에 효율적으로 결합하지 않고, 변이체 G-CSF가 조작된 수용체를 특이적으로 활성화여 세포 증식을 유도하지만 야생형 G-CSFR은 그렇지 않음을 나타낸다.

[0616] **실시예 12: 웨스턴 블롯에 의해 분석된 WT 또는 설계 137 G-CSFR$_{F}$-ICD$_{IL-2}$가 형질도입되고 야생형 또는 설계 G-CSF$_{137}$로 처리된 32D-IL-2Rβ 세포에서의 신호전달**

[0617] 32D-IL-2Rβ 세포에서 조작된 사이토카인-수용체 복합체를 통해 증식성 신호 전달을 복원할 수 있었지만 G-CSF$_{WT}$ 또는 WT-GCSFR-ICD-IL2 결합을 통해 유의미하게 신호를 전달하지 않은 부위 II/III 조합 설계를 G-CSF$_{WT}$ 또는 G-CSF$_{137}$에 반응하여 하류 신호 전달 분자를 활성화하는 능력에 대해 웨스턴 블롯으로 평가하였다.

[0618] **방법**

[0619] G-CSFR$_{WT}$-ICD$_{gp130-IL-2Rβ}$(동종이량체) 또는 G-CSFR$_{WT}$-ICD$_{IL-2Rβ}$+G-CSFR$_{WT}$-ICD$_{γc}$(이종이량체) 작제물의 클로닝 및 발현은 상기에 설명한 것과 동일한 절차를 따랐다. 세포를 대략 14 내지 28일 동안 G-CSF$_{137}$ 또는 G-CSF$_{WT}$에서 확장시키고, 그 다음 웨스턴 블롯 검정을 수행하였다. 형질도입되지 않은 세포를 IL-2에서 유지시켰다.

[0620] 웨스턴 블롯을 수행하기 위해서, 세포를 PBS로 3회 세척하고, 사이토카인 무함유 배지에서 16 내지 20시간 동안

휴지시켰다. 세포를 사이토카인 없이, IL-2(300IU/㎖), G-CSF$_{137}$(30ng/㎖) 또는 G-CSF$_{WT}$(30ng/㎖)로 20분 동안 37℃에서 자극하였다. 세포를 10mM HEPES, pH 777.9, 1mM $MgCl_2$, 0.05mM EGTA, 0.5mM EDTA, pH 8.0, 1 mM DTT, 1x Pierce Protease 및 Phosphatase Inhibitor Mini Tablets(A32961)를 함유하는 세척 완충액에서 1회 세척하였다. 세포를 0.2% Igepal CA630(시그마사)가 첨가된 상기 세척 완충액에서 10분 동안 얼음에서 용해시키고, 10분 동안 13,000rpm에서 4℃에서 원심분리시키고, 그 후 상청액(세포질 분획)을 수집하였다. 펠릿을 0.42M NaCl 및 20% 글리세롤을 첨가하여 상기 세척 완충액에서 재현탁시키고 용해시켰다. 세포를 자주 보텍싱시키면서 30분 동안 얼음에서 용해시키고, 20분 동안 13,000rpm에서 4℃에서 원심분리시킨 후 핵 분획(상청액)을 수집하였다. 세포질 분획 및 핵 분획은 10분 동안 환원시키고(70℃) NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Protein Gel에 전개시켰다. 겔을 나이트로셀룰로스 막(Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell에서 20V에서 60분)으로 옮기고, 건조시키고, TBS(927-50000) 중의 Odyssey® Blocking Buffer에서 1시간 동안 차단시켰다. 블롯을 0.1% Tween20을 함유하는 TBS 중의 Odyssey® Blocking Buffer에서 4℃에서 밤새 1차 항체(1:1,000)와 함께 인큐베이션시켰다. 이용된 1차 항체는 셀 시그널링 테크놀로지즈사(Cell Signaling Technologies)로부터 입수하였다: 포스포-Shc(Tyr239/240) 항체 #2434, 포스포-Akt(Ser473)(D9E) XP® 토끼 mAb #4060, 포스포-S6 리보솜 단백질(Ser235/236) 항체 #2211, 포스포-p44/42 MAPK(Erk1/2)(Thr202/Tyr204) 항체 #9101, β-액틴(13E5) 토끼 mAb #4970, 포스포-Stat3(Tyr705)(D3A7) XP® 토끼 mAb #9145, 포스포-Stat5(Tyr694)(C11C5) 토끼 mAb #9359, 및 히스톤 H3(96C10) 마우스 mAb #3638. 블롯을 0.1% Tween20을 함유하는 TBS 중에서 3회 세척하고, 0.1% Tween20을 함유하는 TBS 완충액 중의 2차 항체(1:10,000)와 30 내지 60분 동안 실온에서 인큐베이션시켰다. 2차 항체는 셀 시그널링 테크놀로지즈사로부터 입수하였다: 항-마우스 IgG(H+L)(DyLight™ 800 4X PEG 접합체) #5257 및 항-토끼 IgG(H+L)(DyLight™ 800 4X PEG 접합체) #5151이었다. 블롯을 세척하고, LI-COR Odyssey 이미저에 노출시켰다.

[0621] **결과**

[0622] 형질도입되지 않은 32D-IL-2Rβ 세포에서, 본 발명자들은 IL-2 단독으로의 자극에 반응한 활성화된 IL-2R-연관 신호전달 분자를 검출하였다. 본 발명자들은 G-CSFR$_{WT}$-ICD$_{gp130-IL-2Rβ}$ 또는 G-CSFR$_{WT}$-ICD$_{IL-2Rβ}$+G-CSFR$_{WT}$-ICD$_{γc}$를 발현하는 32D-IL-2Rβ 세포에서 IL-2 또는 G-CSF$_{WT}$에 반응한 활성화된 신호전달 분자의 유사한 패턴을 관찰하였다. 본 발명자들은 G-CSFR$_{WT}$-ICD$_{gp130-IL-2Rβ}$를 발현하는 32D-IL-2Rβ 세포 또는 G-CSFR$_{WT}$-ICD$_{IL-2Rβ}$+G-CSFR$_{WT}$-ICD$_{γc}$를 발현하는 세포의 G-CSF$_{137}$ 자극에 반응한 IL-2R-연관 신호전달 분자의 활성화를 관찰하지 못했다. 본 발명자들은 G-CSFR$_{137}$-ICD$_{gp130-IL-2Rβ}$ 또는 G-CSFR$_{137}$-ICD$_{IL-2Rβ}$+G-CSFR$_{137}$-ICD$_{γc}$를 발현하는 32D-IL-2Rβ 세포에서 IL-2 또는 G-CSF$_{137}$에 반응한 활성화된 신호전달 분자의 유사한 패턴을 관찰하였다. 본 발명자들은 G-CSFR$_{137}$-ICD$_{gp130-IL-2Rβ}$를 발현하는 32D-IL-2Rβ 세포 또는 G-CSFR$_{137}$-ICD$_{IL-2Rβ}$+G-CSFR$_{137}$-ICD$_{γc}$를 발현하는 세포에서 G-CSF$_{WT}$ 자극에 반응한 IL-2R2R2R-연관된 신호전달 분자의 활성화를 관찰하지 못했다(도 18 참조).

[0623] 이들 결과는, 변이체 G-CSF가 변이체 G-CSFR ECD를 발현하는 키메라 수용체를 활성화시켜 키메라 수용체를 발현하는 세포에서 천연 사이토카인 신호전달의 양상을 유도할 수 있음을 입증한다.

[0624] **실시예13 내지 30에 대한 방법**

[0625] **1차 세포 및 세포주:** 렌티바이러스 패키징 세포주 HEK293T/17(ATCC)을 10% 우태아 혈청 및 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 DMEM에서 배양하였다. 인간 IL-2Rβ 소단위의 BAF3 세포주 내로의 안정적인 형질주입에 의해서 BAF3-IL-2Rβ 세포를 미리 생성시키고, 10% 우태아 혈청, 페니실린, 스트렙토마이신 및 100IU/㎖ 인간 IL-2(hIL-2)(PROLEUKIN®, 노바티스 파마슈티컬즈 캐나다사(Novartis Pharmaceuticals Canada))를 함유하는 RPMI-1640에서 성장시켰다. 인간 IL-2Rβ 소단위의 32D 세포주 내로의 안정적인 형질주입에 의해서 32D-IL-2Rβ 세포주를 미리 생성시키고, 10% 우태아 혈청, 페니실린, 스트렙토마이신 및 300IU/㎖ hIL-2 또는 제시된 바와 같은 사이토카인을 함유하는 RPMI-1640에서 성장시켰다. 인간 PBMC-유래 T 세포(헤마케어사(Hemacare))를 3% 인간 AB 혈청(시그마사-Aldrich, H4522) 및 300IU/㎖ hIL-2, 또는 제시된 바와 같은 사이토카인을 함유하는 TexMACS™ 배지(밀레니이 바이오테크사(Milenyi Biotec), 130-097-196)에서 성장시켰다. 14일 동안 T 세포 배지(하기의 50:50 혼합물)에서 1차 복수 샘플의 배양에 의해서 인간 종양-연관 림프구(TAL)를 생성시켰다: 1) 10% 우태아 혈청, 50uM β-머캅토에탄올, 10mM HEPES, 2mM L-글루타민, 페니실린, 스트렙토마이신을 함유하는 RPMI-1640; 및 2) 3000IU/㎖ hIL-2의 최종 농도를 함유하는 AIM V™ 배지(써모피셔사, 12055083). 이러한 고 용량 IL-2 확장 후, TAL를 300IU/㎖ hIL-2 또는 제시된 바와 같은 다른 사이토카인을 함유하는 T 세포 배지에서 배양하였다.

레트로바이러스 패키징 세포주 Platinum-E(셀 바이오랩스사(Cell Biolabs), RV-101)를 10% FBS, 페니실린/스트렙토마이신, 퓨로마이신(1mcg/㎖) 및 블라스티시딘(10mcg/㎖)을 함유하는 DMEM에서 배양하였다.

[0626] **렌티바이러스 생산 및 32D-IL-2Rβ 세포의 형질도입:** 키메라 수용체 작제물을 렌티바이러스 전달 플라스미드로 클로닝하고, 생성된 서열을 생어 서열결정에 의해 검증하였다. 전이 플라스미드 및 렌티바이러스 패키징 플라스미드를 다음과 같은 인산칼슘 형질주입 방법을 사용하여 HEK293T/17 세포에 공동 형질주입시켰다: 세포를 밤새 플레이팅하고, 배지를 형질주입 2 내지 4시간 전에 교체하였다. 플라스미드 DNA 및 물을 폴리프로필렌 튜브에서 혼합하고, $CaCl_2$(0.25M)를 적가하였다. 2 내지 5분 인큐베이션 후, 2x HEPES-완충 식염수(0.28M NaCl, 1.5mM Na_2HPO_4, 0.1M HEPES)와 1:1로 혼합함으로써 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA 혼합물을 세포에 첨가하고, 37℃, 5% CO_2에서 밤새 인큐베이션시켰다. 그 다음날 HEK293T/17 배지를 교체하고, 세포를 추가로 24시간 동안 인큐베이션시켰다. 다음날 아침, 세포 상청액을 플레이트로부터 수집하고, 약하게 원심분리시켜 부스러기를 제거하고, 상청액을 0.45마이크론 필터를 통해 여과하였다. 상청액을 Beckman Optima L-XP Ultracentrifuge의 SW-32Ti Rotor를 사용하여 25000rpm에서 90분 동안 회전시켰다. 상청액을 제거하고, 펠릿을 적합한 부피의 Opti-Mem 배지에 재현탁시켰다. BAF3-IL-2Rβ 세포에 바이러스의 연속 희석물을 첨가함으로써 바이러스 역가를 결정하였다. 형질도입 48 내지 72시간 후, 세포를 항-인간 G-CSFR APC-접합 항체(1:50; 밀테니 바이오테크사, 130-097-308) 및 Fixable Viability Dye eFluor™ 450(1:1000, eBioscience™, 65-0863-14)과 4℃에서 15분 동안 인큐베이션시키고, 세척하고, Cytek Aurora 또는 BD FACS Calibur 유세포 분석기에서 분석하였다. 이러한 방법에 의해 결정된 예상 역가를 사용하여, 32D-IL-2Rβ 세포주에 0.5의 감염다중도(Multiplicity of Infection: MOI)로 키메라 수용체 작제물을 암호화하는 렌티바이러스 상청액을 형질도입하였다. 세포에 바이러스 상청액의 관련 양을 첨가하고, 24시간 동안 인큐베이션시키고, 그 다음 배지를 대체함으로써 형질도입을 수행하였다. 형질도입 3 내지 4일 후, 상기에 기재된 바와 같은 유세포 분석법에 의해서 인간 G-CSFR의 발현을 결정하였다.

[0627] **인간 1차 T 세포의 렌티바이러스 형질도입:** PBMC-유래 T 세포 및 TAL의 형질도입을 위해서, 세포를 해동시키고, 제조사의 지침에 따라서 인간 T Cell TransAct™(밀테니 바이오테크사, 130-111-160)의 존재 하에서 플레이팅하였다. 활성화 24시간 후, 렌티바이러스 상청액을 0.125 내지 0.5의 MOI로 첨가하였다. 활성화 48시간 후, 세포를 새로운 배지에 분할하여, 잔류하는 바이러스 및 활성화 시약을 제거하였다. 형질도입 2 내지 4일 후, 상기에 기재된 바와 같이 유세포 분석법에 의해서 형질도입 효율을 결정하였다. CD4+ 및 CD8+ 분획의 형질도입 효율을 별개로 결정하는 실험의 경우, 인간 G-CSFR, CD4(1:50, Alexa Fluor® 700 접합체, 바이오레전드사(BioLegend), 300526), CD8(1:50, PerCP 접합체, 바이오레전드사, 301030), CD3(1:50, Brilliant Violet 510™ 접합체, 바이오레전드사, 300448) 및 CD56(1:50, Brilliant Violet 711™ 접합체, 바이오레전드사, 318336)에 대한 항체를 Fixable Viability Dye eFluor™ 450(1:1000)과 함께 활용하였다.

[0628] **인간 T 세포 및 32D-IL-2Rβ 확장 검정:** 상기에 생성된 제시된 키메라 수용체 작제물을 발현하는 인간 1차 T 세포 또는 32-IL-2Rβ 세포를 PBS에서 3회 세척하고, 새로운 배지에 재플레이팅하거나 제시된 바와 같이 배지를 서서히 교체하였다. 완전 배지를 야생형 인간 G-CSF(인-하우스 또는 NEUPOGEN®(암젠 캐나다사(Amgen Canada))에서 생성됨), 돌연변이체 G-CSF(인-하우스에서 생성됨), hIL-2 또는 사이토카인 없음을 함유하도록 교체하였다. 3 내지 5일마다, 세포 생존력 및 밀도를 Trypan Blue 배제에 의해서 결정하였고, 출발 세포 수에 대해서 배수 확장을 계산하였다. G-CSFR 발현을 상기에 기재된 바와 같은 유세포 분석법에 의해서 평가하였다.

[0629] **CD4+ 및 CD8+ 인간 TAL 확장 검정:** TAL의 CD4+ 및 CD8+ 분획의 확장을 조사하기 위해서, 생체외 복수 샘플을 해동시키고, CD4+ 및 CD8+ 분획을 각각 인간 CD4+ T 세포 Isolation Kit(밀테니 바이오테크사, 130-096-533) 및 인간 CD8+ T 세포 Isolation Kit(밀테니 바이오테크사, 130-096-495)를 사용하여 농축시켰다. 사이토카인-함유 배지에서의 확장 후, 세포의 면역표현형을 Fixable Viability Dye eFluor™ 450(1:1000)과 함께 인간 G-CSFR, CD4 (1:50, Alexa Fluor® 700 접합체, 바이오레전드사, 300526), CD8 (1:50, PerCP 접합체, 바이오레전드사, 301030), CD3(1:50, Brilliant Violet 510™ 접합체, 바이오레전드사, 300448) 및 CD56(1:50, Brilliant Violet 711™ 접합체, 바이오레전드사, 318336)에 대한 항체를 사용하여 유세포 분석법에 의해서 평가하였다.

[0630] **1차 인간 T 세포 면역표현형결정 검정:** 사이토카인-함유 배지에서의 확장 후, T 세포의 면역표현형을 Fixable Viability Dye eFluor™ 450 또는 5106(1:1000)과 함께 인간 G-CSFR, CD4(1:100, Alexa Fluor® 700 접합체, 바이오레전드사, 300526 또는 PE 접합체, eBioscience™, 12-0048-42 또는 Brilliant Violet 570™ 접합체, 바이오레전드사, 317445), CD8(1:100, PerCP 접합체, 바이오레전드사, 301030), CD3(1:100, Brilliant Violet 510™ 또는 Brilliant Violet 750™ 접합체, 바이오레전드사, 300448 또는 344845), CD56(1:100, Brilliant Violet 711™ 접합체, 바이오레전드사, 318336), CCR7(1:50, APC/Fire™ 750 접합체, 바이오레전드사,

353246), CD62L(1:33, PE/Dazzle™ 594 접합체, 바이오레전드사, 304842), CD45RA(1:33, FITC 접합체, 바이오레전드사, 304148), CD45RO(1:25, PerCP-eFluor® 710 접합체, eBioscience™, 46-0457-42), CD95(1:33, PE-Cyanine7 접합체, eBioscience™, 25-0959-42)에 대한 항체를 사용하여 유세포 분석법에 의해서 평가하였다.

[0631] **레트로바이러스 형질도입:** IRES-GFP(BglII 대 PacI 부위)를 제거하고 맞춤형 다중 클로닝 부위를 암호화하는 어닐링된 프라이머를 도입하기 위해서 제한 엔도뉴클레아제 클로닝에 의해서 pMIG 전달 플라스미드(플라스미드 #9044, 애드진사(애드진사))를 변경시켰다. 키메라 수용체 작제물을 맞춤형 전달 플라스미드로 클로닝하고, 생성된 서열을 생어 서열결정에 의해 검증하였다. 전달 플라스미드를 상기에 기재된 바와 같은 인산칼슘 형질주입 방법을 사용하여 Platinum-E 세포에 형질주입시켰다. 형질주입 24시간 후에 배지를 5㎖의 새로운 완전 배지로 교체하였다. 형질주입 48시간 후에 세포 상청액을 플레이트로부터 수집하고, 0.45 마이크론 필터를 통해 여과하였다. 헥사다이메트린 브로마이드(1.6mcg/㎖, 시그마-알드리치사) 및 뮤린 IL-2(2ng/㎖, 페프로테크사(페프로테크사))를 상청액에 첨가하였다. 이러한 정제된 레트로바이러스 상청액을 사용하여 하기에 기재된 바와 같이 뮤린 림프구에 형질도입하였다.

[0632] 레트로바이러스 상청액을 수집하기 48시간 전에, 24-웰 부착 플레이트를 PBS 중에 희석된 비접합된 항-뮤린 CD3(5mcg/㎖, 비디 바이오사이언시스사(비디 사이언시스사), 553058) 및 항-뮤린 CD28(1mcg/㎖, 비디 바이오사이언시스사, 553294) 항체로 코팅하고, 4℃에서 저장하였다. 레트로바이러스 상청액을 수집하기 24시간 전에, C57Bl/6J 마우스(인-하우스에서 생성됨)를 빅토리아 대학교 동물 관리 위원회(University of Victoria Animal Care Committee)에서 관리하는 승인된 동물 사용 프로토콜에 따라 안락사시켰다. 비장을 수거하고, 뮤린 T 세포를 다음과 같이 단리시켰다: 비장을 수동으로 분리하고, 100마이크론 필터를 통해 여과하였다. 적혈구를 실온에서 5분 동안 ACK 용해 완충액(깁코사(깁코사), A1049201)에서 인큐베이션시켜서 용해시킨 후 혈청 함유 배지에서 1회 세척하였다. CD8a-양성 또는 Pan-T 세포를 특이적 비드-기반 단리 키트(밀테니 바이오테크사, 각각 130-104-075 또는 130-095-130)를 사용하여 단리시켰다. 세포를 뮤린 T 세포 확장 배지(10% FBS, 페니실린/스트렙토마이신, 0.05mM β-머캅토에탄올 및 2ng/㎖ 뮤린 IL-2(페프로테크사(페프로테크사), 212-12)를 함유하는 RPMI-1640) 또는 300IU/㎖ 인간 IL-2(프로류킨사(Proleukin)) 중의 항-CD3- 및 항-CD28-항체로 코팅된 플레이트에 첨가하고, 37℃, 5% CO_2에서 24시간 동안 인큐베이션시켰다. 형질도입 당일, 배지의 대략 절반을 상기에 생성된 레트로바이러스 상청액으로 교체하였다. 세포를 30℃에서 90분 동안 1000g의 레트로바이러스 상청액으로 스핀감염시켰다. 플레이트를 0 내지 4시간 동안 인큐베이터에 다시 넣은 다음, 배지의 대략 절반을 새로운 T 세포 확장 배지로 교체하였다. 레트로바이러스 형질도입을 총 2번의 형질도입을 위해 상기에 기재된 바와 같이 24시간 후에 반복하였다. 최종 형질도입 24시간 후, T 세포를 6-웰 플레이트로 분할하고, 항체 자극으로부터 제거하였다.

[0633] 형질도입 48 내지 72시간 후, 형질도입 효율을 유세포 분석법에 의해서 평가하여 상기에 기재된 바와 같이 인간 G-CSFR, CD4(Alexa Fluor 532 접합체, eBioscience™, 58-0042-82), CD8a(PerCP-eFluor 710 접합체, eBioscience™, 46-0081-82) 및 Fixable Viability Dye eFluor™ 450(1:1000 희석)을 검출하였다.

[0634] **BrdU 혼입 검정:** 상기에 기재된 바와 같이 생성된 인간 1차 T 세포, 32D-IL-2Rβ 세포 또는 뮤린 1차 T 세포를 PBS에서 3회 세척하고, 관련 검정 사이토카인: 사이토카인 없음, hIL-2(300IU/㎖), 야생형 또는 조작된 G-CSF(개별 실험에 제시된 농도에서)를 함유하는 새로운 배지에서 48시간 동안 재플레이팅하였다. BrdU 검정 절차는 하기를 추가하면서 BD Pharmingen™ APC BrdU Flow Kit(비디 바이오사이언시스사, 557892)에 대한 지침 매뉴얼을 따랐다: 세포를 BrdU 및 Fixable Viability Dye eFluor™ 450(1:5000)과 함께 30분 내지 4시간 동안 37℃에서 공동 인큐베이션시켰다. 유세포 분석법을 Cytek Aurora 장비를 사용하여 수행하였다. 키메라 수용체를 발현하는 뮤린 T 세포의 증식을 구체적으로 평가하기 위해서, 인간 G-CSFR(1:20 희석), CD4(1:50 희석) 및 CD8(1:50 희석)에 대한 추가 염색을 고정 전에 얼음 상에서 15분 동안 수행하였다.

[0635] **웨스턴 블롯:** 상기에 기재된 바와 같이 생성된 인간 1차 T 세포, 32D-IL-2Rβ 세포 또는 뮤린 1차 T 세포를 PBS로 3회 세척하고, 사이토카인 무함유 배지에서 16 내지 20시간 동안 휴지시켰다. 세포를 37℃에서 20분 동안 사이토카인 없음, IL-2(300IU/㎖), 야생형 G-CSF(개별 실험에 제시된 농도에서), 또는 $G\text{-}CSF_{137}$(30ng/㎖)로 자극하였다. 세포를 10mM HEPES, pH 7.9, 1mM $MgCl_2$, 0.05mM EGTA, 0.5mM EDTA, pH 8.0, 1 mM DTT, 및 1x Pierce Protease 및 Phosphatase Inhibitor Mini Tablets(A32961)를 함유하는 완충액에서 1회 세척하였다. 0.2% NP-40(시그마사)를 첨가하고 10분 동안 얼음 위에서 세포를 상기 세척 완충액에서 용해시켰다. 용해물을 4℃에서 13000rpm으로 10분 동안 원심분리시키고, 상청액(세포질 분획)을 수집하였다. 펠릿(핵 단백질 함유)을 0.42M NaCl 및 20% 글리세롤을 첨가하여 상기 세척 완충액에서 재현탁시키고 용해시켰다. 빈번하게 볼텍싱시키면서 핵

을 얼음 위에서 30분 동안 인큐베이션시키고, 4℃에서 13,000rpm으로 20분 동안 원심분리시킨 후 상청액(핵 분획)을 수집하였다. 세포질 분획 및 핵 분획은 10분 동안 환원시키고(70℃) NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Protein Gel에 전개시켰다. 겔을 나이트로셀룰로스 막(Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell에서 20V에서 60분)으로 옮기고, 건조시키고, TBS(927-50000) 중의 Odyssey® Blocking Buffer에서 1시간 동안 차단시켰다. 블롯을 0.1% Tween20을 함유하는 TBS 중의 Odyssey® Blocking Buffer에서 4℃에서 밤새 1차 항체(1:1000)와 함께 인큐베이션시켰다. 이용된 1차 항체는 셀 시그널링 테크놀로지즈사로부터 입수하였다: 포스포-JAK1(Tyr1034/1035)(D7N4Z) 토끼 mAb #74129, 포스포-JAK2(Tyr1007/1008) #3771, 포스포-JAK3(Tyr980/981)(D44E3) 토끼 mAb #5031, 포스포-p70 S6 키나제(Thr421/Ser424) 항체 #9204, 포스포-Shc(Tyr239/240) 항체 #2434, 포스포-Akt(Ser473) (D9E) XP® 토끼mAb #4060, 포스포-S6 리보솜 단백질(Ser235/236) 항체 #2211, 포스포-p44/42 MAPK(Erk1/2) (Thr202/Tyr204) 항체 #9101, β-액틴(13E5) 토끼 mAb #4970, 포스포-STAT1(Tyr701)(58D6) 토끼 mAb #9167, 포스포-STAT3(Tyr705)(D3A7) XP® 토끼 mAb #9145, 포스포-STAT4(Tyr693) 항체 #5267, 포스포-STAT5(Tyr694)(C11C5) 토끼 mAb #9359 및 히스톤 H3(96C10) 마우스 mAb #3638. 블롯을 0.1% Tween20을 함유하는 TBS 중에서 3회 세척하고, 0.1% Tween20을 함유하는 TBS 완충액 중의 2차 항체(1:10,000)와 30 내지 60분 동안 실온에서 인큐베이션시켰다. 셀 시그널링 테크놀로지즈사로부터 얻은 2차 항체는 항-마우스 IgG(H+L)(DyLight™ 800 4X PEG 접합체) #5257 및 항-토끼 IgG(H+L)(DyLight™ 800 4X PEG 접합체) #5151이었다. 블롯을 세척하고, LI-COR Odyssey 이미저에 노출시켰다.

[0636] **인산화된 단백질을 검출하기 위한 유세포 분석법:** 상기에 기재된 바와 같이 생성된 인간 1차 T 세포, 32D-IL-2Rβ 세포 또는 뮤린 1차 T 세포를 PBS로 3회 세척하고, 사이토카인 무함유 배지에서 16 내지 20시간 동안 휴지시켰다. 세포를 사이토카인 없음, IL-2(300IU/㎖) 또는 야생형 G-CSF (100ng/㎖)로 20분 동안 37℃에서, 제시된 바와 같이 Fixable Viability Dye eFluor™ 450(1:1000) 및 항-G-CSFR(1:20), 항-CD4(1:50) 및 항-CD8a(1:50)의 존재 하에서 자극하였다. 세포를 펠릿화하고, BD Phosflow™ Fix Buffer I(비디 사이언시스사, 557870)로 15분 동안 실온에서 고정시켰다. 세포를 세척하고, 그 다음 BD Phosflow™ Perm Buffer III(비디 사이언시스사, 558050)를 사용하여 얼음 위에서 15분 동안 투과시켰다. 세포를 2회 세척하고, 20ul의 BD Phosflow™ PE 마우스 항-Stat3 (pY705)(비디 사이언시스사, 612569) 또는 PE 마우스 IgG2a, κ 아이소타입 대조군(비디 사이언시스사, 558595)을 함유하는 완충액에 재현탁시켰다. 세포를 세척하고, 유세포 분석법을 Cytek Aurora 장비를 사용하여 수행하였다.

[0637] **실시예 13: G2R-1, G-CSFR/IL-2Rβ 소단위 단독, myc-태깅된 G-CSFR/감마-C 소단위 단독 또는 전장 G-CSFR을 발현하는 인간 T 세포의 확장.**

[0638] PBMC-유래 T 세포 또는 종양-연관 림프구(TAL)를 도 20, 24 및 24에 나타낸 키메라 수용체 작제물을 암호화하는 렌티바이러스에 형질도입하고, 세포를 세척하고, 제시된 사이토카인에 재플레이팅하였다. 세포를 3 내지 4일마다 계수하였다. G/γc를 Myc 에피토프(Myc/G/γc)를 사용하여 이의 N-말단에 태깅하고, G/IL-2Rβ를 Flag 에피토프(Flag/G/IL-2Rβ)를 사용하여 이의 N-말단에 태깅하였고; 이들 에피토프 태그는 유세포 분석법에 의한 검출을 도우며, 수용체의 기능에 영향을 미치지 않는다. 예상된 바와 같이, 모든 T 세포 배양물은 양성 대조군 사이토카인인 IL-2(300IU/㎖)에 응답한 증식을 나타내었다. G-CSF(100ng/㎖)로 자극한 후, G2R-1 키메라 사이토카인 수용체를 발현하는 PMBC-유래 T 세포 및 TAL에 대해서만 증식이 관찰되었다(도 22). 렌티바이러스 형질도입 효율은 100% 미만이어서 T 세포의 100% 미만이 제시된 키메라 사이토카인 수용체를 발현했는데, 이는 아마도 IL-2에 비해 G2R-1에 의해 매개되는 증식 속도가 더 낮기 때문일 것이다. 유사하게, 증가된 증식이 G-CSFR 키메라 수용체 소단위 G2R-1 및 G2R-2를 발현하고 G-CSF로 자극된 32D-IL-2Rβ 세포(인간 IL-2Rβ 소단위를 안정적으로 발현함)에서 관찰되었다(도 21). T 세포와 대조적으로, G/IL-2Rβ 키메라 수용체 소단위 단독을 발현하는 32D-IL-2Rβ 세포는 G-CSF에 응답하여 증식하였고(도 21); G-CSF-유도된 증식은 G/γc 키메라 수용체 소단위 단독을 발현하는 32D-IL-2Rβ 세포에서는 관찰되지 않았다(도 21).

[0639] 이들 결과는 G-CSF가 G2R-1 키메라 수용체를 발현하는 PMBC-유래 T 세포 및 TAL 및 G/IL-2Rβ, G2R-1 및 G2R-2 키메라 수용체를 발현하는 32D-IL-2Rβ 세포의 증식 및 생존력을 자극할 수 있음을 보여준다.

[0640] **실시예 14: G-CSFR ECD는 G/IL-2Rβ, G2R-1 및 G2R-2가 형질도입된 세포의 표면에서 발현된다.**

[0641] 세포가 세포 표면 상에서 G-CSFR ECD를 발현하는 지를 결정하기 위해서 G2R-2 키메라 사이토카인 수용체를 암호화하는 렌티바이러스 벡터로의 형질도입(도 23 및 도 25에 개략적으로 도시됨) 후 32D-IL-2Rβ 세포주, PBMC-유래 인간 T 세포 및 인간 종양-연관된 림프구에서 유세포 분석법을 수행하였다. G-CSFR 양성 세포를 모든 형질도입된 세포 유형에서 검출하였다(도 26). 별도의 실험에서, G/IL-2Rβ, G2R-1 및 G2R-2 키메라 수용체를 발현하

는 32D-IL-2Rβ 세포는 유세포 분석법에 의해서 G-CSFR ECD에 대해서 양성이었다(도 21B 내지 도 21D에서 하단 패널).

[0642] 이러한 결과는, G/IL-2Rβ, G2R-1 및 G2R-2 키메라 수용체가 세포 표면 상에서 발현된다는 것을 나타낸다.

[0643] 실시예 15: 형질도입되지 않은 세포와 비교하여 G2R-2를 발현하는 세포의 확장

[0644] 인간 PBMC-유래 T 세포 및 인간 종양-연관 림프구를 G2R-2 수용체 작제물로 렌티바이러스에 의해서 형질도입하고(도 23 및 도 25), 세척하고, 제시된 사이토카인으로 재플레이팅하였다. 일부 실험에서, T 세포를 또한 TransAct로의 자극에 의해서 주기적으로 재활성화시켰다. 살아있는 세포를 3 내지 4일마다 계수하였다. PMBC-유래 T 세포(도 27A) 및 종양-연관 림프구(도 27B, 도 27C에서의 2개의 독립적인 실험)의 증식을 형질도입되지 않은 세포에서가 아니라 G2R-2 키메라 수용체를 발현하는 세포에서 G-CSF(100ng/㎖)로의 자극 후에 관찰하였다.

[0645] 이러한 결과는, G2R-2 키메라 수용체의 G-CSF-유도 활성화가 면역 세포의 증식 및 생존력을 유도하기에 충분하다는 것을 나타낸다.

[0646] 실시예 16: 형질도입되지 않은 세포와 비교하여 G2R-2를 발현하는 CD4- 또는 CD8-선택된 인간 종양-연관 림프구의 확장 및 면역표현형

[0647] CD4-선택 인간 T 세포 및 CD8-선택 인간 T 세포에 G2R-2를 암호화하는 렌티바이러스 벡터를 형질도입하거나(도 25), 제시된 경우 형질도입되지 않은 채로 두었다. 세포를 세척하고 제시된 사이토카인으로 재플레이팅하고, 3 내지 4일마다 계수하였다. G2R-2를 발현하는 CD4- 또는 CD8-선택 TAL의 증식은 G-CSF(100ng/㎖) 또는 IL-2(300IU/㎖)로 자극한 후 관찰되었지만, 첨가된 사이토카인의 부재 하에서(배지 단독)는 관찰되지 않았다(도 28 및 도 29). 도 28에서, 각각의 선은 5명의 환자 샘플 중 하나의 결과를 나타낸다.

[0648] 유세포 분석법에 의한 면역표현형결정은, G-CSF 또는 IL-2에서 배양된 T 세포가 이러한 배양 조건 하에서 그들의 CD4+ 또는 CD8+ 동일성을 유지하고(도 30A), NK 세포 표현형이 결여되어 있고(CD3-CD56+)(도 30A), CD45RA-CCR7- T 효과기 기억(T_{EM}) 표현형을 나타내었다(도 30B)는 것을 입증하였다.

[0649] BrdU 검정을 수행하여 G-CSF로 자극 시 G2R-2를 발현하는 T 세포의 증가된 세포 주기 진행을 확인하였다(도 31). 검정 전에 제시된 바와 같이 IL-2 또는 G-CSF에서 배양하여 T 세포를 선택하였다. 종양-연관 림프구(도 31A) 및 PBMC-유래 T 세포(도 31B) 둘 다를 평가하였다.

[0650] 이들 결과는, G-CSF가 키메라 사이토카인 수용체 G2R-2의 활성화에 의해 1차 인간 TAL의 장기간 확장 및 세포 주기 진행을 선택적으로 활성화할 수 있음을 나타낸다. 이러한 결과는 또한 동종이량체 형성에 의한 G2R-2 키메라 수용체의 활성화가 TAL에서 사이토카인 유사 신호전달 및 증식을 활성화하기에 충분하다는 것을 나타낸다. 또한, G2R-2를 발현하는 TAL은 IL-2 철수에 대한 반응과 유사하게 G-CSF 철수 시 세포 사멸을 겪는다는 점에서 사이토카인 의존성을 유지한다. G-CSF에서 배양된 TAL은 IL-2에서 배양된 TAL과 유사한 면역표현형을 유지한다.

[0651] 실시예 17: G2R-2를 발현하는 1차 뮤린 T 세포는 G-CSF에 응답하여 증식한다.

[0652] BrdU 혼입 검정을 수행하여 G-CSF로 자극 시 모의-형질도입된 세포에 대한 G2R-2 또는 단일-쇄 G/IL-2Rβ(G2R-1의 성분)을 발현하는 1차 뮤린 T 세포의 증식을 평가하였다. 모든 세포를 검정 전에 3일 동안 IL-2에서 확장시켰다. G2R-2 또는 G/IL-2Rβ의 세포 표면 발현을 유세포 분석법에 의해 확인하였다(도 32A). 제시된 바와 같이, 세포를 IL-2(300IU/㎖)에, 야생형 G-CSF(100ng/㎖)에 또는 사이토카인 없이 플레이팅하였다. G-CSF로 자극한 후 증가된 세포 주기 진행은 형질도입되지 않은 세포 또는 단일-쇄 G/IL-2Rβ (를 발현하는 세포의 것보다 G2R-2를 발현하는 세포에서 더 높게 관찰되었다(도 32B, 도 32C). 패널 B 및 패널 C는 각각 모든 살아있는 세포 또는 G-CSFR+ 세포에 대한 결과를 나타낸다.

[0653] 이들 결과는, G-CSF-유도 동종이량체화에 대한 응답으로, G2R-2 키메라 수용체가 뮤린 T 세포에서 사이토카인-유사 신호전달 및 증식을 활성화하는 데 있어서 단일 쇄 G/IL-2Rβ 수용체보다 더 효율적임을 나타낸다.

[0654] 실시예 18: G-CSF 또는 IL-2에 응답하여 G2R-2를 발현하는 인간 1차 T 세포에서 사이토카인-연관 세포내 신호전달 사건의 활성화

[0655] 키메라 사이토카인 수용체가 실제로 IL-2의 것과 유사한 사이토카인 신호전달을 활성화할 수 있음을 확인하기 위해서, 다양한 신호전달 분자를 활성화하는 사이토카인 수용체의 능력을 평가하였다. G2R-2를 발현하는 종양-연관 림프구 및 PBMC-유래 T 세포를 미리 G-CSF에서 확장시킨 반면, 형질도입되지 않은 세포는 IL-2에서 미리 확장시켰다. 세포를 세척한 다음, IL-2(300IU/㎖), 야생형 G-CSF(100ng/㎖) 또는 사이토카인 없이 자극하고, 제

시된 신호전달 분자에 대해 지향되는 항체를 사용하여 세포 용해물에 대해 웨스턴 블롯을 수행하였다(도 33). 패널 A 및 패널 B는 TAL에 대한 결과를 나타내고, 패널 C는 PBMC-유래 T 세포에 대한 결과를 나타낸다. G2R-2를 발현하는 T 세포는 형질도입되지 않은 세포 또는 형질도입된 세포의 IL-2 자극 후에 관찰되는 것과 유사한 정도로 G-CSF로의 자극 시 IL-2-관련 신호전달 분자를 활성화하였지만, G-CSF는 JAK2 인산화를 유도한 반면, IL-2는 JAK3 인산화를 유도하였다는 예외가 예상되었다.

[0656] 이들 결과는 G2R-2 키메라 수용체가 G-CSF로 자극 시 IL-2 수용체-유사 사이토카인 수용체 신호전달을 활성화할 수 있음을 확인해 준다.

[0657] 실시예 19: 사이토카인 신호전달은 G2R-2를 발현하는 뮤린 1차 T 세포에서 G-CSF에 응답하여 활성화된다.

[0658] G2R-2 또는 단일-쇄 G/IL-2Rβ(G2R-1로부터)가 사이토카인 신호전달을 활성화할 수 있는지를 평가하기 위해서, 다양한 신호전달 분자를 활성화하는 이들 사이토카인 수용체의 능력을 모의-형질도입된 세포에 비교하여 G2R-2 또는 G/IL-2Rβ를 발현하는 뮤린 1차 T 세포의 세포 용해물의 웨스턴 블롯에 의해서 평가하였다. 모든 세포를 검정 전에 3일 동안 IL-2에서 확장시켰다. 그 다음, 세포를 세척하고, IL-2(300IU/㎖)로, 야생형 G-CSF(100ng/㎖)로 또는 사이토카인 없이 자극하였다. G2R-2를 발현하는 T 세포는 형질도입되지 않은 세포 또는 형질도입된 세포의 IL-2 자극 후에 관찰되는 것과 유사한 정도로 G-CSF로의 자극 시 IL-2-관련 신호전달 분자를 활성화하였지만, G-CSF는 JAK2 인산화를 유도한 반면, IL-2는 JAK3 인산화를 유도하였다는 예외가 예상되었다(도 34). 대조적으로, G/IL-2Rβ는 G-CSF에 노출되었을 때 사이토카인 신호전달을 활성화하지 않았다.

[0659] 이들 결과는, 1차 뮤린 T 세포에서, G2R-2 키메라 수용체가 G-CSF 자극 시 동종이량체화에 의해 IL-2 수용체-유사 사이토카인 수용체 신호전달을 활성화할 수 있는 반면, 단일-쇄 G/IL-2Rβ 단독은 G-CSF에 응답한 동종이량체화에 의해서 사이토카인 신호전달을 활성화할 수 없다는 것을 확인해 준다.

[0660] 실시예 20: 키메라 수용체의 발현은 오쏘고널(orthogonal) G-CSF로의 자극 후 32D-IL-2Rβ 세포 및 1차 뮤린 T 세포의 증식으로 이어진다.

[0661] 키메라 사이토카인 수용체를 발현하는 세포가 G-CSF의 오쏘고널 버전에 응답하여 선택적으로 활성화될 수 있는지를 결정하기 위해서, 32D-IL-2Rβ 세포 또는 1차 뮤린 T 세포에 야생형 G-CSFR ECD를 포함하는 키메라 수용체 G2R-1 및 G2R-2(G2R-1 WT ECD, G2R-2 WT ECD) 및 아미노산 치환 R41E, R141E 및 R167D를 보유하는 G-CSFR ECD를 포함하는 키메라 수용체 G2R-1 및 G2R-2(G2R-1 134 ECD, G2R-2 134 ECD)를 형질도입하였다. 세포를 IL-2, 야생형 G-CSF 또는 G2R-1 134 ECD 및 G2R-2 134 ECD에 결합할 수 있지만, 야생형 G-CSFR에 대한 결합을 유의하게 감소시키지 않는 오쏘고널 G-CSF(130 G-CSF)로 자극하였다. BrdU 혼입 검정을 수행하여 사이토카인 자극 시 세포 주기 진행을 촉진하는 세포의 능력을 평가하였다(도 35). G2R-2 134 ECD를 발현하는 32D-IL-2Rβ 세포는 130 G-CSF(아미노산 치환 E46R, L108K 및 D112R 보유, 30ng/㎖)로의 자극 시 세포 주기 진행을 나타내었지만 야생형 G-CSF(30ng/㎖)로의 자극 시에는 세포 주기 진행을 겪지 않았다. 조작된 사이토카인:수용체 ECD 쌍의 오쏘고널 특성은 "십자형" 증식 검정에서 1차 뮤린 T 세포를 자극함으로써 추가로 입증되었는데, 여기서 WT, 130, 134, 304 또는 307 ECD를 갖는 G2R-3을 발현하는 세포(도 23)를 WT, 130, 304 또는 307 사이토카인(100ng/㎖)으로 자극하였다(도 36). 130 ECD는 아미노산 치환: R41E 및 R167D를 보유한다. 304 ECD는 아미노산 치환: R41E, E93K 및 R167D를 보유하는 반면; 304 사이토카인은 아미노산 치환: E46R, L108K, D112R 및 R147E를 보유한다. 307 ECD는 아미노산 치환: R41E, D197K, D200K 및 R288E를 보유하는 반면; 307 사이토카인은 아미노산 치환: S12E, K16D, E19K 및 E46R을 보유한다. 도 36에서 패널 A 및 패널 B는 실험 반복을 나타낸다.

[0662] 이러한 결과는, 오쏘고널 키메라 사이토카인 수용체를 발현하는 세포가 오쏘고널 G-CSF CSF로의 자극 시 선택적인 활성화 및 세포 주기 진행이 가능하다는 것을 입증한다.

[0663] **실시예 21: 세포내 신호전달은 오쏘고널 키메라 사이토카인 수용체를 발현하고 오쏘고널 G-CSF로 자극된 1차 인간 T 세포 및 32D-IL2Rβ 세포에서 활성화된다.**

[0664] 키메라 사이토카인 수용체를 발현하는 세포가 G-CSF의 오쏘고널 버전에 응답하여 세포내 사이토카인 신호전달 사건을 선택적으로 활성화할 수 있는지를 결정하기 위해서, 32D-IL-2Rβ 세포에 야생형 G-CSFR ECD를 포함하는 키메라 수용체 G2R-1 및 G2R-2(G2R-1 WT ECD 및 G2R-2 WT ECD) 및 아미노산 치환 R41E, R141E 및 R167D를 보유하는 G-CSFR ECD를 포함하는 키메라 수용체 G2R-1 및 G2R-2(G2R-1 134 ECD, G2R-2 134 ECD)를 형질도입하였다. 세포를 IL-2(300IU/㎖), 야생형 G-CSF(30ng/㎖) 또는 G2R-1 134 ECD G2R-2 134 ECD에 결합할 수 있지만, 야생형 G-CSFR에 대한 결합을 유의하게 감소시키지 않는 오쏘고널 G-CSF(130 G-CSF - E46R_L108K_D112R; 30ng/㎖)로 자극하였다. 웨스턴 블롯을 세포 용리물에서 수행하여 사이토카인에 대한 노출 시 사이토카인 신호전달을 활

성화하는 세포의 능력을 평가하였다(도 37). G2R-2 134 ECD를 발현하는 세포는 야생형 G-CSF가 아닌 130 G-CSF로의 자극 시 사이토카인 신호전달의 증거를 나타내었다. 추가로, G2R-2 WT ECD를 발현하는 세포는 130 G-CSF로의 자극 시 사이토카인 신호전달을 활성화할 수 없었다.

[0665] 조작된 사이토카인:수용체 쌍의 오쏘고널 특성은 1차 뮤린 T 세포를 웨스턴 블롯 분석에 적용함으로써 추가로 입증되었는데, 여기서 WT, 134 또는 304 ECD (R41E_E93K_R167D)를 갖는 G2R-3을 발현하는 세포를 WT, 130 또는 304 G-CSF(E46R_L108K_D112R_R147E; 100ng/㎖)로 자극하였고, 나타낸 신호전달 사건을 측정하였다(도 38A). IL-2(300IU/㎖) 및 IL-12(10ng/㎖)를 대조군 사이토카인으로 제공하였다. G2R-3 WT ECD를 발현하는 세포는 IL-2, IL-12 또는 WT G-CSF로의 자극 시 사이토카인 신호전달의 증거를 나타내었다. G2R-3 134 ECD를 발현하는 세포는 IL-2, IL-12 또는 130 G-CSF로의 자극 시 사이토카인 신호전달의 증거를 나타내었다. G2R-3 304 ECD를 발현하는 세포는 IL-2, IL-12 또는 304 G-CSF로의 자극 시 사이토카인 신호전달의 증거를 나타내었다.

[0666] G2R-3의 3개의 ECD 변이체의 세포 표면 발현을 유세포 분석법에 의해서 확인하였다(도 38B).

[0667] 이러한 결과는, 오쏘고널 키메라 사이토카인 수용체를 발현하는 세포가 오쏘고널 G-CSF로의 자극 시 세포내 사이토카인 신호전달 사건의 선택적인 활성화가 가능하다는 것을 입증한다.

[0668] 실시예 22: G2R-3의 발현은 1차 인간 t 세포에서 확장, 세포 주기 진행 및 사이토카인-관련 세포내 신호전달 및 면역표현형으로 이어진다.

[0669] G2R-3 키메라 수용체가 1차 인간 T 세포에서 G-CSF로의 자극 시 사이토카인 신호전달-관련 사건을 촉진할 수 있는지의 여부를 결정하기 위해서, TAL을 G2R-3을 암호화하는 렌티바이러스 벡터에 형질도입하였다. T-세포 확장 검증을 수행하여 IL-2(300IU/㎖)로, 야생형 G-CSF(100ng/㎖)로 또는 사이토카인 없이 자극 시 세포 증식을 시험하였다. 살아있는 세포를 3 내지 4일마다 계수하였다. 형질도입되지 않은 대응물과 대조적으로, G2R-3을 발현하는 1차 TAL은 G-CSF에 응답하여 배양물에서 확장되었다(도 40A). G-CSF로 자극 시 사이토카인 신호전달 사건이 활성화되었는지를 결정하기 위해, 세포 용해물에 대해 웨스턴 블롯을 수행하여 세포내 신호전달을 평가하였다. 세포를 확장 검정으로부터 수거하고, 세척하고, IL-2(300IU/㎖) 또는 야생형 G-CSF(100ng/㎖)로 자극하였다. 1차 TAL은 G2R-3을 발현하는 G-CSF에 응답하여 IL-2-관련 신호전달 사건을 나타내었고, G-CSF가 JAK2 인산화를 유도한 반면 IL-2는 JAK3 인산화를 유도하였다는 예외가 예상되었다(도 40B).

[0670] BrdU 혼입 검정을 수행하여 G-CSF로 자극 시 세포 주기 진행을 평가하였다. 세포를 확장 검정으로부터 수거하고, 세척하고, IL-2(300IU/㎖)에, 야생형 G-CSF(100ng/㎖)에 또는 사이토카인 없이 재플레이팅하였다 G2R-3을 발현하는 1차 TAL은 G-CSF에 응답하여 세포 주기 진행을 나타내었다(도 40C).

[0671] G2R-3을 발현하는 세포의 G-CSF-유도 확장을 또한 1차 PBMC-유래 인간 T 세포를 사용하여 입증하였다(도 41). G2R-3 WT ECD를 발현하는 세포는 WT G-CSF에 응답하여 확장되었지만 배지 단독에서는 확장되지 않았다(도 41A). 외인성 사이토카인에 대한 세포의 지속적인 의존성을 입증하기 위해서, 배양 제21일에, G-CSF-확장 조건으로부터의 세포를 세척하고, WT G-CSF(100ng/㎖)에, IL-7(20ng/㎖)+IL-15(20ng/㎖)에 또는 배지 단독에 재플레이팅하였다. G-CSF 또는 IL-7+IL-15의 존재 하에서 재플레이팅된 세포만 시간 경과에 따라서 살아남은 채로 유지되었다.

[0672] 유세포 분석에 의해 평가된 바와 같은 G-CSFR ECD의 발현은 확장 21 내지 42일 사이에 CD4+ 및 CD8+ T 세포 둘 다에서 안정적으로 유지되었다(도 41B).

[0673] 웨스턴 블롯에 의해서, G2R-3을 발현하는 1차 PBMC-유래 T 세포는 G-CSF에 응답하여 IL-2-관련 신호전달 사건을 나타내었다(도 42A). IL-7+IL-15와 비교하여 WT G-CSF에서 42일 동안 확장된 1차 PBMC-유래 T 세포에서 유세포 분석법-기반 면역표현형결정을 수행하였다. G2R-3 WT ECD를 발현하고, G-CSF에서 배양된 세포는 IL-7+IL-15에서 배양된 형질도입되지 않은 세포와 유사한 표현형을 유지하였고, 주로 CD62L+, CD45RO+ 표현형이었는데, 이는 줄기세포-유사 기억 T 세포 표현형(T_{SCM})을 나타낸다(도 42B, 도 42C). 마찬가지로, 중심 기억(T_{CM}), 효과기 기억(T_{EM}) 및 최종 분화(T_{TE}) T 세포의 분율은 유사하였다.

[0674] 이러한 결과는, G2R-3 키메라 사이토카인 수용체가 사이토카인 신호전달 사건을 활성화할 수 있고, 1차 세포에서 세포 주기 진행 및 확장을 촉진할 수 있다는 것을 확인해 준다. G2R-3을 발현하고, G-CSF에서 장기간 확장된 T 세포의 면역표현형은 IL-7+IL-15에서 확장된 형질도입되지 않은 세포와 유사하다.

[0675] 실시예 23: 오쏘고널 G-CSF는 오쏘고널 ECD를 갖는 G2R-3을 발현하는 1차 인간 T 세포에서 확장 및 증식을 유도

한다.

[0676] 본 발명자들은 304(R41E_E93K_R167D) 또는 307(R41E_D197K_D200K_R288E) ECD를 갖는 키메라 사이토카인 수용체 G2R-3이 오쏘고널 리간드 130, 304 또는 307 G-CSF로의 자극에 응답하여 증식 및 확장을 유도할 수 있는지를 평가하였고, 1차 PBMC-유래 인간 T 세포에 GR-3 304 ECD 또는 G2R-3 307 (R41E_D197K_D200K_R288E) ECD를 암호화하는 렌티바이러스 벡터를 형질도입하였다. T-세포 성장 검정을 수행하여 IL-2(300IU/㎖)와 함께, 304 G-CSF(100ng/㎖)와 함께, 307 G-CSF(100ng/㎖)와 함께 또는 사이토카인 없이 배양하였을 때 세포의 배수 확장을 평가하였다. 살아있는 세포를 3 내지 4일마다 계수하였다. G2R-3 304 ECD를 발현하는 T 세포는 IL-2 또는 304 G-CSF에 응답하여 배양물에서 확장되었다(도 43A). G2R-3 307 ECD를 발현하는 T 세포는 IL-2 또는 307 G-CSF에 응답하여 배양물에서 확장되었다(도 43A). 형질도입되지 않은 T 세포만 IL-2에 응답하여 확장되었다(도 43C).

[0677] BrdU 혼입 검정을 수행하여 십자형 설계에서 130, 304 및 307 G-CSF로 자극 시 세포 주기 진행을 평가하였다. 세포를 확장 검정으로부터 수거하고, 세척하고, IL-2(300IU/㎖)에, 130 G-CSF(100ng/㎖)에, 304 G-CSF(100ng/㎖)에, 307 G-CSF(100ng/㎖)에 또는 사이토카인 없이 재플레이팅하였다 G2R-3 304 ECD를 발현하는 1차 인간 T 세포는 130 또는 304 G-CSF에 응답하여 세포 주기 진행을 나타내었지만, 307 G-CSF에는 응답하지 않았다(도 44). G2R-3 307 ECD를 발현하는 T 세포는 307 G-CSF에 응답하여 세포 주기 진행을 나타내었지만, 130 또는 304 G-CSF에는 응답하지 않았다. 모든 T 세포는 IL-2에 응답하여 세포 주기 진행을 나타내었다.

[0678] 결과는, 키메라 수용체 G2R-3 304 ECD 및 G2R-3 307 ECD가 각각 오쏘고널 304 또는 307 G-CSF로의 자극 시 선택적인 세포 주기 진행 및 1차 인간 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 확장을 유도할 수 있다는 것을 나타낸다. 추가로, 130 G-CSF는 G2R-3 307 ECD가 아닌 G2R-3 304 ECD를 발현하는 세포의 증식을 자극할 수 있다.

[0679] **실시예 24: G-CSFR ECD는 G21R-1, G21R-2, G12R-1 및 G2R-3 키메라 수용체 작제물이 형질도입된 1차 인간 종양-연관 림프구(TAL)의 표면 상에서 발현된다.**

[0680] 키메라 사이토카인 수용체 작제물이 1차 인간 종양-연관 림프구(TAL)의 표면 상에서 발현될 수 있는지를 평가하기 위해서, TAL에 G21R-1, G21R-2, G12R-1 및 G2R-3 키메라 수용체를 암호화하는 렌티바이러스 벡터를 형질도입하고, 세포를 세포 표면 상에서의 G-CSFR ECD 발현에 대해서 유세포 분석법에 의해서 시험하였다(도 39). 4개 모두의 키메라 사이토카인 수용체 설계를 위해서, G-CSFR ECD 양성 세포를 검출하였다.

[0681] 이러한 결과는, G21R-1, G21R-2, G12R-1 및 G2R-3 키메라 수용체가 1차 세포의 표면 상에서 발현될 수 있다는 것을 입증한다. 이들 결과는 또한 G-CSFR ECD 키메라 수용체 설계가 1차 세포의 표면 상에서 발현된다는 것을 나타낸다.

[0682] 실시예 25: G-CSFR ECD는 G12R-1 및 G21R-1 키메라 수용체 작제물이 형질도입된 1차 뮤린 T 세포의 표면 상에서 발현된다.

[0683] G12R-1 및 G21R-1 키메라 수용체가 1차 T 세포의 표면 상에서 발현될 수 있는지를 결정하기 위해서, 1차 뮤린 T 세포에 G12R-1 및 G21R-1 키메라 수용체를 암호화하는 레트로바이러스 벡터를 형질도입하고, 유세포 분석법에 의해서 분석하였다(도 45).

[0684] 결과는, G-CSFR ECD가 G12R-1 및 G21R-1을 암호화하는 레트로바이러스 벡터가 형질도입된 1차 뮤린 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 표면 상에서 발현된다는 것을 나타낸다.

[0685] **실시예 26: G-CSF는 G21R-1 또는 G21R-2를 발현하는 1차 PBMC-유래 인간 T 세포에서 사이토카인 신호전달 사건을 유도한다.**

[0686] G21R-1 및 G21R-2 작제물이 1차 세포에서 사이토카인 신호전달 사건을 유도할 수 있는지를 결정하기 위해서, 1차 PBMC-유래 인간 T 세포에 G21R-1 또는 G21R-2 키메라 사이토카인 수용체를 암호화하는 렌티바이러스 벡터를 형질도입하였다. 세포를 포스포-STAT3(p-STAT3) 특이적 항체로의 세포내 염색에 적용하고, 유세포 분석법에 의해서 평가하여 STAT3 활성화의 척도인 STAT3 인산화의 정도를 결정하였다(도 46). G-CSF(100ng/㎖)로의 자극 시, 인산화된 STAT3을 발현하는 세포의 수는 G21R-1 또는 G21R-2가 형질도입된 G-CSFR 양성 세포의 하위세트 중에서 증가하였다 이에 반해서, G-CSFR 음성(즉, 비-발현) 세포는 G-CSF로의 자극 시에 인산화된 STAT3의 증가를 나타내지 않았지만, IL-21로의 자극 시에는 이의 증가를 나타내었다.

[0687] 이러한 결과는, G21R-1 및 G21R-2 키메라 수용체가 1차 인간 T 세포에서 G-CSF로의 자극 시 IL-21-관련 사이토카인 신호전달 사건을 활성화할 수 있다는 것을 입증한다.

[0688] 실시예 27: G-CSF는 G21R-1 또는 G-12R-1을 발현하는 1차 뮤린 T 세포에서 세포내 신호전달 사건을 유도한다.

[0689] 키메라 사이토카인 수용체 G21R-1이 사이토카인 신호전달 사건을 활성화할 수 있는지를 결정하기 위해서, 1차 뮤린 T 세포에 G21R-1을 암호화하는 레트로바이러스 벡터를 형질도입하였고, 유세포 분석법에 의해서 평가하여 G-CSF로의 자극 시 인산화된 STAT3을 검출하였다. 살아있는 세포를 CD8 또는 CD4에 대해서 게이팅시키고, 사이토카인 없이, IL-21(1ng/㎖)로 또는 G-CSF(100ng/㎖)로의 자극 후 포스포-STAT3에 대해서 양성 염색된 세포의 백분율을 CD8 및 CD4 세포 집단에 대해서 결정하였다. G-CSF로의 자극 시, G21R-1(형질도입되지 않은 세포가 아님)을 발현하는 세포는 인산화된 STAT3의 증가된 양을 나타내었다(도 47A 및 도 47B). 웨스턴 블롯을 수행하여 G-CSF로의 자극 시 G21R-1 또는 G12R-1을 발현하는 세포에서 세포내 사이토카인 신호전달을 평가하였다. 예측된 바와 같이, G21R-1을 발현하고, G-CSF로 자극된 세포는 STAT3의 증가된 인산화를 나타내었고, 포스포-STAT4 및 포스포-STAT5가 약간 증가하였다(도 47C). 또한 예측된 바와 같이, G12R-1을 발현하는 세포에서, STAT4의 강한 인산화가 G-CSF에 응답하여 인지되었다. G-CSF는 모의 형질도입된 세포에서 어떠한 신호전달 사건도 유도하지 않았다. (G12R-1 군에서, 양성 대조군(hIL-12 10ng/㎖)은 어떠한 신호전달 사건도 유도하는 것으로 보이지 않았고; 이는 뮤린 IL-12R에 대한 인간 IL-12의 불량한 결합으로 인한 것일 수 있다는 것을 주목하기 바란다.)

[0690] 이러한 결과는, G21R-1 및 G12R-1은 G-CSF로의 자극 시 1차 뮤린 T 세포에서 사이토카인 신호전달 사건을 유도할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0691] 실시예 28: G-CSF는 G2R-2, G2R-3, G7R-1, G21/7R-1, G27/2R-1, G21/2R-1, G12/2R-1 또는 G21/12/2R-1을 발현하는 1차 뮤린 T 세포에서 증식 및 세포내 신호전달 사건을 유도한다.

[0692] 사이토카인 신호전달 사건 및 키메라 사이토카인 수용체에 의해서 매개된 세포 증식을 평가하기 위해서, 1차 뮤린 T 세포에 G2R-2, G2R-3, G7R-1, G21/7R-1, G27/2R-1, G21/2R-1, G12/2R-1 또는 G21/12/2R-1을 암호화하는 레트로바이러스 벡터를 형질도입하였다. BrdU 혼입 검정을 수행하여 G-CSF로 자극 시 세포 주기 진행을 평가하였다. 세포를 수거하고, 세척하고, IL-2(300IU/㎖)에, 야생형 G-CSF(100ng/㎖)에 또는 사이토카인 없이 재플레이팅하였다 G-CSF-유도된-세포 주기 진행이 G2R-2, G2R-3, G7R-1, G21/7R-1 또는 G27/2R-1(도 48A, 도 48B) 또는 G21/2R-1, G12/2R-1 또는 G21/12/2R-1(도 49A, 도 49B)을 발현하는 1차 뮤린 T 세포에서 인지되었다. G-CSFR ECD의 발현이 또한 유세포 분석법에 의해서 검출 가능하였다(도 48C, 도 49C).

[0693] 웨스턴 블롯에 의해서, 다수의 사이토카인 신호전달 사건이 제시된 키메라 사이토카인 수용체를 발현하는 세포에서 G-CSF(100ng/㎖)에 대한 응답으로 관찰되었으며, 모의 형질도입된 세포에서는 관찰되지 않았다(도 48D, 도 49D). 일반적으로, 관찰된 사이토카인 신호전달 사건은 다양한 ICD 설계에 혼입된 신호전달 도메인에 기초하여 예측된 바와 같았다(도 23 및 도 24). 일례로서, G7R-1 키메라 수용체는 STAT5의 인산화를 유도하였는데(도 48D), 이는 IL-7Rα로부터의 STAT5 결합 부위의 혼입으로 인한 것이라고 예측된다(도 23). 제2 예로서, G21/2R-1 키메라 수용체는 STAT3의 인산화를 유도하였는데(도 49D), 이는 G-CSFR로부터의 STAT3 결합 부위의 혼입으로 인한 것이라고 예측된다(도 24). 제3 예로서, G12/2R-1 키메라 수용체는 STAT4의 인산화를 유도하였는데, 이는 IL-12Rβ2로부터의 STAT4 결합 부위의 혼입으로 인한 것이라고 예측된다(도 24). 다른 키메라 사이토카인 수용체는 세포내 신호전달 사건의 다른 구별되는 패턴을 나타내었다.

[0694] 이러한 결과는, G2R-2, G2R-3, G7R-1, G21/7R-1, G27/2R-1, G21/2R-1, G12/2R-1 및 G21/12/2R-1이 G-CSF로의 자극 시 1차 뮤린 T 세포에서 사이토카인 신호전달 사건 및 증식을 유도할 수 있다는 것을 나타낸다. 추가로, 키메라 수용체의 ICD 내로의 상이한 신호전달 도메인의 혼입에 의해서 세포내 신호전달 사건의 상이한 패턴이 생성될 수 있다.

[0695] 실시예 29: 오쏘고널 G-CSF는 오쏘고널 ECD를 갖는 G12/2R-1을 발현하는 1차 인간 T 세포에서 확장, 증식, 사이토카인 관련 세포내 신호전달 및 면역표현형을 유도한다.

[0696] 134 ECD를 갖는 키메라 사이토카인 수용체 G12/2R-1이 오쏘고널 130 G-CSF로의 자극에 응답하여 증식 및 확장을 유도할 수 있는지를 결정하기 위해서, 1차 PBMC-유래 인간 T 세포에 G12/2R-1 134 ECD를 암호화하는 렌티바이러스 벡터를 형질도입하였다. T-세포 성장 검정을 수행하여 IL-2(300IU/㎖)로, 130 G-CSF(100ng/㎖)로 또는 사이토카인 없이 배양하였을 때 세포의 배수 확장을 평가하였다. 살아있는 세포를 4 내지 5일마다 계수하였다. G12/2R-1 134 ECD를 발현하는 1차 인간 T 세포는 IL-2 또는 130 G-CSF(도 50A)에 응답하여 배양물에서 확장되었지만, 배지 단독에서는 제한된 일시적인 확장을 나타내었다.

[0697] 본 실험의 제19일에, 130 G-CSF 또는 IL-2에서 확장된 T 세포를 3회 세척하고, IL-2, 130 G-CSF 또는 배지 단독에 재플레이팅하였다. 배지 단독에서, T 세포는 감소된 생존력 및 수의 감소를 나타내었다(도 50B). 이에 반

해서, IL-2 또는 G-CSF 130에 재플레이팅된 T 세포는 계속되는 생존력 및 안정적인 수를 나타내었다.

[0698] G-CSF 수용체에 대한 항체를 사용하여 유세포 분석법에 의해서 검출된 G12/2R-1 134 ECD의 발현은 130 G-CSF로의 자극에 의해서 확장된 CD4+ 및 CD8+ T 세포 둘 다에 대해서 제4일 제16일 사이에서 증가하였다(도 50C). BrdU 혼입 검정을 수행하여 130 G-CSF로 자극 시 세포 주기 진행을 평가하였다.

[0699] BrdU 검정에 의해서 세포 주기 진행을 평가하기 위해서, 세포를 확장 검정으로부터 수거하고, 세척하고, IL-2(300IU/㎖)에, IL-2에 그리고 IL-12(10ng/㎖)에, 130 G-CSF(300ng/㎖)에 또는 사이토카인 없이 재플레이팅하였다. G12/2R-1 134 ECD를 발현하는 1차 인간 T 세포는 130 G-CSF, IL-2 또는 IL-2+IL-12에 응답하여 세포 주기 진행을 나타낸 반면, 형질도입되지 않은 세포는 IL-2 또는 IL-2+IL-12에만 응답하였다(도 51A).

[0700] 16일 배양 기간 후, CD62L 및 CD45RO에 대한 항체를 사용한 유세포 분석법에 의해서 면역표현형결정을 수행하여 130 G-CSF에서 확장된 G12/2R-1 134 ECD를 발현하는 T 세포를 IL-2에서 확장된 형질도입되지 않은 세포와 비교하였다. 2개의 T 세포 집단은 줄기세포-유사 기억(T_{SCM}), 중심 기억(T_{CM}), 효과기 기억(T_{EM}) 및 최종 분화(T_{TE}) 표현형(도 51B, 도 51C)의 유사한 분율을 나타내었다.

[0701] (134 ECD와 상반되게) 304 ECD를 갖는 키메라 사이토카인 수용체 G12/2R-1를 사용하여 유사한 실험을 수행하였다. 1차 PBMC-유래 인간 T 세포에 G12/2R-1 304 ECD를 암호화하는 렌티바이러스 벡터를 형질도입하였다. T-세포 성장 검정을 수행하여 IL-2(300IU/㎖), 130 G-CSF(100ng/㎖), 304 G-CSF(100ng/㎖) 또는 배지 단독과 함께 배양될 때 세포의 배수 확장을 평가하였다. 살아있는 세포를 4 내지 5일마다 계수하였다. 304 ECD를 갖는 G12/2R-1을 발현하는 T 세포는 IL-2, 130 G-CSF 또는 304 G-CSF의 존재 하에서는 확장할 수 있었지만 배지 단독에서는 확장할 수 없는 반면, 형질도입되지 않은 세포는 단지 IL-2에 응답하여 확장할 수 있다(도 52A).

[0702] BrdU 검정에 의한 세포 주기 진행을 평가하기 위해서, 130 G-CSF 또는 304 G-CSF에서 미리 확장된 G12/2R-1 304 ECD를 발현하는 T 세포를 확장 검정으로부터 수거하고, 세척하고, IL-2(300IU/㎖), 130 G-CSF(100ng/㎖), 304 G-CSF(100ng/㎖), 307 G-CSF(100ng/㎖) 또는 배지 단독에 재플레이팅하였다. G12/2R-1 304 ECD를 발현하는 T 세포는 130 또는 304 G-CSF에 응답하여 세포 주기 진행을 나타내었지만, 307 G-CSF 또는 배지 단독에 응답하지 않았다(도 52B).

[0703] 이러한 결과는, G12/2R-1 134 ECD가 오쏘고널 130 G-CSF로의 자극 시 1차 인간 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 세포 주기 진행 및 확장을 유도할 수 있다. G12/2R-1 134 ECD를 발현하고, 130 G-CSF에서 확장된 세포의 T 세포 기억 표현형은 IL-2로 확장된 형질도입되지 않은 세포와 유사하다. 또한, G12/2R-1 304 ECD는 130 또는 304 G-CSF로의 자극 시 T 세포의 선택적인 세포 주기 진행 및 확장을 유도할 수 있지만. 307 G-CSF에는 응답하지 않는다.

[0704] 실시예 30: 오쏘고널 G-CSF는 오쏘고널 ECD를 갖는 G2R-3 또는 G12/2R-1을 발현하는 1차 인간 T 세포에서 구별되는 세포내 신호전달 사건을 유도한다.

[0705] 세포내 신호전달 사건을 평가하기 위해서, 1차 PBMC-유래 인간 T 세포에 G2R-3 304 ECD 또는 G12/2R-1 304 ECD를 암호화하는 렌티바이러스 벡터를 형질도입하였다. 웨스턴 블롯을 수행하여 304 G-CSF(100ng/㎖), IL-2(300IU/㎖), IL-2 및 IL-12(10ng/㎖) 또는 배지 단독으로의 자극 시 G2R-3 304 ECD 또는 G12/2R-1 304 ECD를 발현하는 세포 또는 형질도입되지 않은 세포에서 세포내 사이토카인 신호전달을 평가하였다. 형질도입된 T 세포 및 형질도입되지 않은 T 세포 둘 다에서, IL-2+IL-12 또는 IL-2 단독으로의 자극에 응답하여 STAT5의 강한 인산화가 검출되었다(도 53). IL-2+IL-12로의 자극에 응답하여 STAT4의 강한 인산화가 검출되었지만, IL-2 단독으로의 자극에 응답한 STAT4의 약한 인산화만 검출되었다. G2R-3 304 ECD를 발현하는 세포에서, IL-2 단독에 응답하여 관찰된 패턴과 유사하게, 304 G-CSF로의 자극에 응답한 STAT4의 약한 인산화 및 STAT5의 강한 인산화가 검출되었다. G12/2R-1 304 ECD를 발현하는 세포에서, IL-2+IL-12에 응답하여 관찰된 패턴과 유사하게, 304 G-CSF로의 자극에 응답한 STAT4 및 STAT5의 강한 인산화가 검출되었다. 형질도입되지 않은 T 세포는 304 G-CSF에 응답하지 않았다.

[0706] 이 결과는, 304 ECD를 갖는 G12/2R-1이 304 G-CSF로의 자극에 응답하여, STAT4 및 STAT5의 강한 인산화를 포함하여, 사이토카인 신호전달 사건을 유도할 수 있다는 것을 나타낸다. STAT4가 아닌 STAT5의 강한 인산화를 비롯한 상이한 패턴의 신호전달 사건이 304 G-CSF로의 자극 후 G2R-3 304 ECD를 발현하는 세포에서 관찰된다.

[0707] **실시예 31: 신규한 G-CSF 변이체의 설계**

[0708] 본 명세서에 기재된 발명은 G-GCSF 수용체(G-CSFR)의 상응하는 조작된 세포외 도메인(ECD)에 선택적으로 결합하는 조작된 변이체 G-CSF 사이토카인의 발명이다. 선택성에 대한 임계값은 변이체 G-CSF와 WT G-CSFR 사이, 그리

고 WT G-CSF와 변이체 G-CSFR 사이의 결합 및 유도된 세포 증식 정도를 측정하는 세포 기반 검정을 사용하여 확립된다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, 1세대 및 2세대 조작된 G-CSF/G-CSFR 쌍의 패널을 개발하였다. 본 실시예에서, 본 발명자들은 개선된 열 안정성과 선택성을 나타내는 3세대 G-CSF 설계(130a1, 130b1, 130a2, 130b2, 130a1b1)(표 4A)를 개시한다.

[0709] 2세대 G-CSF 130 변이체는 WT G-CSF에 비해 3개의 아미노산 치환(E46R, L108K 및 D112R)을 포함한다. 돌연변이되는 경우 WT G-CSFR에 대한 사이토카인 결합을 감소시킬 가능성이 있는 추가 잔기를 확인하기 위해서, 먼저 추가 지침을 위한 G-CSF/G-CSFR 공결정 구조를 사용하여 이전에 설계된 모든 본 발명자들의 G-CSF 변이체의 생물물리학적 및 세포 기반 데이터를 분석하였다. 반복 분석을 통해, 직렬 글루타메이트 잔기(E122 및 E123)가 치환을 위한 리드 후보로 확인되었다. 특히 이전에 설계된 2세대 G-CSF 134 변이체에서는 E46R, L108K, D112R 외에 이들 두 글루타메이트가 아르기닌로 치환되었는데, 이는 불안정한 것으로 입증되었다. 여기서 본 발명자들은 "전하-교환" 전략을 사용하여 E122 및 E123을 아르기닌 또는 라이신으로 개별적으로 치환하였다. 발명자들은 또한 E122 및 E123을 동시에 라이신으로 치환하였다. 구조 분석에 기초하여, 사이토카인 상의 위치 122 및/또는 123의 새로운 양으로 하전된 잔기는 WT G-CSFR ECD 상의 위치 141에 있는 상응하는 양으로 하전된 아르기닌을 접근하지 못하게 하여, 결합을 감소시켜 선택성을 향상시킬 것으로 예상된다. 하나의 위치(즉, E122 또는 E123)만 변형시킴으로써, 본 발명자들은 두 위치가 동시에 치환된 이전에 설계된 134 G-CSF에서 관찰된 안정성 문제를 감소시킬 수 있을 것으로 예측하였다. 또한, 구조 분석에 기초하여, 위치 122 및 123에 라이신(아르기닌 대신)을 혼입하면 G-CSF 134보다 더 안정적인 변이체가 생성될 것으로 예상되었다. 이러한 새로운 G-CSF 변이체(130a1, 130b1, 130a2, 130b2, 130a1b1로서 지정됨)(표 4A)은 상보적인 R141E 치환으로 인해 G-CSFR 134 ECD와 효율적으로 페어링될 것으로 예상되었다.

[0710] **실시예 32: 이. 콜라이에서 WT 및 조작된 변이체 G-CSF 사이토카인의 재조합 생산**

[0711] WT 및 조작된 G-CSF 사이토카인 변이체를 재조합 방식으로 생산하기 위해, 이. 콜라이-기반 발현 시스템을 사용하여 정확하게 폴딩된 관심 단백질이 리폴딩에 의해 정제되는 봉입체를 생성시켰다.

[0712] **방법**

[0713] 야생형 및 조작된 G-CSF 변이체를 T7 바이러스 프로모터의 제어 하에 pET 이. 콜라이 발현 벡터에 클로닝하였다. 재조합 사이토카인의 예비 규모 이. 콜라이 생산을 BL21(DE3) 세포의 2L 배양물에서 수행하였으며, 발현은 ZYP-5052 자가유도 배지에서 *lac* 오페론의 자연 작동에 의해 제어되는 락토스-기반 자가유도를 통해 유도하였고, 그 후 세포 배양물을 200rpm에서 진탕하면서 30℃에서 대략 16시간 동안 성장시켰다. 이어서, 세포를 8,200RCF에서 10분 동안 원심분리시켜 펠릿화하고 상청액을 버렸다. 세포 펠릿(약 10g)을 40㎖ 용해 완충액(50mM TRIS pH8, 1mM EDTA)에 재현탁시킨 후 프로테아제 저해제 칵테일 III(시그마 알드리치사, 카탈로그 539134)을 첨가하였다. 이. 콜라이 세포를 프렌치 프레스를 통해 용해시키고, 용해물을 용해 완충액으로 250㎖로 희석시킨 후 30,000RCF에서 30분 동안 원심분리시켰다. 상청액을 버리고, 봉입체를 함유한 펠릿을 70㎖ 세척 완충액 #1(50mM TRIS pH8, 5mM EDTA, 1% triton x-100)에 완전히 재현탁시키고 다시 원심분리시켰다. 그런 다음 세포 펠렛을 2회 더 세척하고; 70㎖ 세척 완충액 #2(50mM TRIS pH8, 5mM EDTA, 1% 데옥시콜산나트륨)로 1회, 70㎖ 세척 완충액 #3(50mM TRIS pH8, 5mM EDTA, 1M NaCl)로 1회. 마지막으로, 봉입체를 100㎖ 가용화 완충액(50mM TRIS pH10, 8M 유레아, 10mM 2-머캅토에탄올)에 재현탁시켰다. 봉입체의 완전한 용해를 보장하기 위해서 이 용액을 실온에서 1 내지 2시간 동안 교반한 후, 남아 있는 불용성 물질을 제거하기 위해 30,000RCF에서 30분 동안 원심분리시켰다. 이어서, 가용화된 봉입체를 투석 완충액 #1(50mM TRIS pH8, 1M 우레아, 100mM NaCl, 5mM 환원 글루타티온)을 사용하여 500㎖로 희석시켰다. 용해된 G-CSF를 8,000Da의 분자량 컷오프(mwco)를 갖는 투석 튜브(바이오디자인사(BioDesign Inc.), 카탈로그 D104)를 사용하여 4℃에서 40시간 동안 3L의 투석 완충액 #1에 대해 투석시킨 후, 3L의 투석 완충액 #2(50mM TRIS pH8, 100mmM NaCl, 1mM reduced glutathione)에 대해 8시간 동안 4℃에서 투석시키고, 마지막으로 3L의 투석 완충액 #3(25mM 아세트산 나트륨 pH4, 50mM NaCl)에 대해 16시간 동안 4℃에서 투석시켰다. 리폴딩된 G-CSF를 10 kDa mwco(밀리포어 시그마사(Millipore 시그마사), 카탈로그 UFC901024)가 있는 Amicon® Ultra-15 원심분리 필터 장치를 사용하여 농축시키고 ENrich™ S 5x50 칼럼(바이오-라드사(Bio-Rad), 카탈로그 7800021)을 투석 완충액 #3에서 평형화하고 50mM에서 500mM NaCl의 구배로 용리시켰다. 리폴딩된 G-CSF를 함유하는 분획을 풀링시키고, 농축시킨 후 25mM 아세트산나트륨(pH 4.0), 150mM NaCl로 평형화된 ENrich™ SEC70 10x300 크기 배제 칼럼(바이오-라드사, 카탈로그 7801070)에 로딩하였다(도 1). 단백질 함유 분획을 환원 SDS-PAGE로 분석하고, 풀링시키고, 흡광 계수 0.836을 사용하여 나노드롭 A280 측정으로 농도를 측정하였다.

[0714] **결과**

[0715] SEC 70로부터의 표준에 비해 예상 부피에서 용리된 야생형 및 조작된 G-CSF 변이체는 크로마토그래피 정제를 견딜 수 있을 만큼 충분한 안정성을 나타내는 정확하게 폴딩된 단백질과 일치한다. 더욱이, 응집체 단백질 피크가 관찰되지 않았으며, 이는 리폴딩 프로토콜의 효율성을 추가로 확인시켜 준다. G-CSF_130a1에 대한 대표적인 SEC UV 추적 및 SDS-PAGE 겔을 나타낸다(도 54). 배양물 1리터당 수율은 G-CSF 변이체에 따라 2.5 내지 5㎎의 정제된 리폴딩된 단백질 범위였다.

[0716] **실시예 33: 조작된 G-CSF 변이체의 열 안정성의 결정**

[0717] 시차 주사 형광 측정법(DSF)을 사용하여 WT G-CSF와 비교하여 리폴딩된 G-CSF 변이체의 열 안정성을 측정하였다. DSF는 단백질이 언폴딩 때 노출되는 단백질의 소수성 부분에 대해 친화도를 갖는 염료의 형광 변화를 모니터링하여 단백질 언폴딩을 측정한다.

[0718] **방법**

[0719] 여기 및 방출 파장을 각각 587 및 607nm로 설정하여 Applied Biosystems StepOnePlus™ RT-PCR 기기(써모피셔 사이언티픽사, 카탈로그 4376600)를 사용하여 시차 주사 형광 측정을 수행하였다. 간략하게, 1㎎/㎖ 농도의 정제된 G-CSF(WT 또는 변이체) 20㎕를 96웰 플레이트에 3회 분배하였다. 치료용 WT G-CSF(10mM 아세트산나트륨 pH4, 5% 솔비톨, 0.004% 폴리솔베이트-20)(PMID: 17822802)에 사용되는 임상적으로 검증된 제형을 근사화하기 위해 DSF에 사용된 검정 완충액은 10mM 아세트산나트륨 pH4, 25mM NaCl이었다. SYPRO 오렌지(인비트로젠사)를 5,000x 스톡에서 2x 농도로 희석시켰다. 열 안정성 측정을 위해서, 온도 스캔 속도를 0.5℃/분으로 고정시켰고 온도 범위는 20℃ 내지 95℃였다. 데이터 분석은 Protein Thermal Shift Software v1.4(써모피셔 사이언티픽사, 카탈로그 4466038)를 사용하여 수행하였고, 형광 데이터를 2상태 Boltzman 모델에 피팅하여 개별 복제물의 용융 온도(Tm)를 결정한 후 각각의 변형에 대한 3개의 Tm을 평균내었다.

[0720] **결과**

[0721] 시험된 모든 변이체 G-CSF 설계는 임상적으로 관련된 완충액에서 측정했을 때 WT G-CSF보다 10 내지 17℃더 높은 용융 온도를 갖는 것으로 밝혀졌는데(표 6A), 이는 조작된 돌연변이에 의해 부여된 상당히 향상된 열안정성을 입증한다.

[0722] [표 6A]

DSF에 의해 결정된 WT 및 조작된 G-CSF 변이체에 대한 용융 온도(Tm).

GCSF	Tm (°C)
WT	50.55 ± 0.34
130	61.96 ± 0.12
130a1	67.32 ± 0.02
130b1	66.73 ± 0.24
130a2	65.84 ± 0.02
130b2	66.38 ± 0.07

[0723] *10MM 아세트산나트륨 PH 4.0, 25MM NACL에서 결정

[0724] **실시예 34: 야생형 G-CSF 또는 조작된 사이토카인 130, 130a1, 130a2, 130b1, 130b2 및 130a1b1에서 야생형 G-CSF 수용체를 발현하는 인간 및 마우스 세포주의 증식**

[0725] WT G-CSFR ECD에 대한 결합에 대해 130 G-CSF보다 교차 반응성이 적을 것으로 예측되었지만 실시예 31 내지 33의 시험관내 검정에 의해 허용 가능한 생물물리학적 특성 및 열 안정성을 나타내는 사이토카인을, 세포주 OCI-AML1(WT 인간 G-CSFR을 자연적으로 발현함) 및 32D 클론 3(WT 뮤린 G-CSFR을 자연적으로 발현함)의 증식을 유도하는 능력에 대해서 시험하였다.

[0726] **방법**

[0727] OCI-AML1 세포주(DSMZ)를 20% 우태아 혈청(시그마사), 20ng/㎖ 인간 GM-CSF(페프로테크사) 및 1% 페니실린 및 스트렙토마이신을 함유하는 알파-MEM 배지(깁코사)에서 유지시켰다. 32D 클론 3 세포주(ATCC)(이하 "32D")를

10% 우태아 혈청, 1ng/㎖ 뮤린 IL-3(페프로테크사) 및 1% 페니실린 및 스트렙토마이신을 함유하는 RPMI 1640(ATCC 변형) 배지(깁코사)에 유지시켰다.

[0728] BrdU 혼입 검정을 수행하기 위해서, OCI-AML1 또는 32D 세포를 수거하고, 각각 PBS에서 2회, 알파-MEM 또는 RPMI에서 1회 세척하였다. 세포를 제시된 검정 사이토카인을 제시된 농도로 함유하는 새로운 완전 배지에 재플레이팅하고 37℃, 5% CO_2에서 48시간 동안 인큐베이션시켰다. BrdU 검정 절차는 BD Pharmingen™ FITC BrdU Flow Kit(557891)의 지침 매뉴얼을 따랐으며 다음 사항을 추가시켰다: 생존력 염색은 1:600 농도의 eFluorTM 450 Fixable Viability Dye(eBioscience™)를 사용하여 수행하였다. 유세포 분석법을 Cytek™ Aurora 장비를 사용하여 수행하였다.

[0729] **결과**

[0730] OCI-AML1 세포주를 활용한 BrdU 혼입 검정에서, 세포는 WT G-CSF와 비교하여 G-CSF 변이체 130, 130a1, 130a2, 130b1 및 130b2에 반응하여 더 낮은 증식을 나타내었다(도 55A). 또한, 세포는 130과 비교하여 G-CSF 변이체 130a1, 130a2, 130b1 및 130b2에 반응하여 더 낮은 증식을 나타내었다(도 55A).

[0731] 사이토카인 WT G-CSF 및 G-CSF 변이체 130, 130a1 및 130b1을 더 넓은 범위의 사이토카인 농도를 사용하는 BrdU 검정에서 추가로 평가하였다(도 55B). WT G-CSF와 비교하여, OCI-AML1 세포의 증식을 유도하려면 훨씬 더 높은 농도의 3종의 변이체 사이토카인이 필요하였다. 130 G-CSF와 비교하여, OCI-AML1 세포의 증식을 유도하기 위해서는 더 높은 농도의 130a1 및 130b1 G-CSF가 필요하였다(도 55B).

[0732] WT G-CSF와 G-CSF 변이체 130, 130a1 및 130a1b1을 비교하기 위해 독립적인 BrdU 검정을 수행하였다(도 55C). WT G-CSF와 비교하여, OCI-AML1 세포의 증식을 유도하려면 훨씬 더 높은 농도의 3종의 변이체 사이토카인이 필요하였다. 130 G-CSF와 비교하여, OCI-AML1 세포의 증식을 유도하기 위해서는 더 높은 농도의 130a1 및 130a1b1 G-CSF가 필요하였다(도 55C).

[0733] 유사한 결과를 32D 세포를 포함하는 BrdU 검정에서 인지하였다(도 55D, 도 55E). WT G-CSF와 비교하여, 32D 세포의 증식을 유도하려면 훨씬 더 높은 농도의G-CSF 변이체 130, 130a1, 130b1 및 130a1b1이 필요하였다(도 55D, 도 55E).

[0734] 따라서, 인간 또는 뮤린 WT G-CSF와 비교하여, G-CSF 변이체 130, 130a1, 130b1, 130a2, 130b2 및 130a1b1은 인간 또는 뮤린 WT G-CSFR을 발현하는 세포에서 증식을 유도하는 능력이 상당히 감소된 것으로 나타났다. 또한, 130 G-CSF와 비교하여 변이체 130a1, 130b1, 130a2, 130b2 및 130a1b1은 OCI-AML1 세포주의 증식을 유도하는 능력이 감소된 것으로 나타났다.

[0735] **실시예 35: 조작된 사이토카인 130, 130a1, 130a2, 130b1, 130b2 및 130a1b1에서 134 ECD를 갖는 G12/2R-1을 발현하는 1차 인간 T 세포의 증식**

[0736] G-CSF 변이체 130, 130a1, 130a2, 130b1, 130b2 및 130a1b1을 G12/2R-1 134 ECD를 발현하는 PBMC-유래 인간 T 세포의 증식을 유도하는 능력에 대해 시험하였다.

[0737] **방법**

[0738] G12/2R-1 134 ECD cDNA를 합성하고, 렌티바이러스 전달 플라스미드에 클로닝하였다. 전달 플라스미드 및 렌티바이러스 패키징 플라스미드(psPAX2, pMD2.G, 애드진사)를 다음과 같이 렌티바이러스 패키징 세포주 HEK293T/17(ATCC)에 공동 형질주입시켰다: 세포를 5% 우태아 혈청 및 0.2mM 피루브산 나트륨을 함유하는 Opti-MEM™ I 환원 혈청 배지, GlutaMAX™ 보충물(Gibco™)에 밤새 플레이팅하였다. 플라스미드 DNA와 Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent(Gibco™)를 제조사의 사양에 따라 혼합하고 세포에 적가하였다. 세포를 37℃, 5% CO_2에서 6시간 동안 인큐베이션시킨 후 배지를 교체하고 밤새 추가로 인큐베이션시켰다. 다음날 세포 상청액을 플레이트에서 수집하여 4℃에 보관하고 배지를 교체하였다. 다음날 다시 세포로부터 세포 상청액을 수집하여 전날의 상청액과 풀링시켰다. 상청액을 약하게 원심분리시켜 부스러기를 제거하고, 0.45m 필터를 통해 여과하였다. 상청액을 Beckman Optima L-XP Ultracentrifuge의 SW-32Ti Rotor를 사용하여 25,000rpm에서 90분 동안 회전시켰다. 상청액을 제거하고, 30분 동안 가볍게 진탕하여 펠릿을 Opti-MEM I 배지에 재현탁시켰다.

[0739] 인간 T 세포를 다음과 같이 건강한 공여자 백혈구 성분채집술 생성물로부터 단리시켰다. 말초 혈액 단핵 세포

(PBMC)를 밀도 구배 원심분리를 사용하여 단리시켰다. CD4+ 및 CD8+ T 세포를 제조사의 사양에 따라 인간 CD4 및 CD8 MicroBeads(밀테니 바이오테크사)를 사용하여 단리시켰다. 단리된 T 세포를 3% 인간 혈청(시그마사) 및 0.5% 젠타마이신(DIN 0226853)을 함유하는 TexMACS™ 배지(밀테니 바이오테크사)(이하 "완전 TexMACS"로 지칭함)의 48웰 플레이트에 웰당 5×10^5개로 플레이팅하였다. 인간 T 세포 TransAct™(밀테니 바이오테크사)을 첨가하고(웰당 10㎕) 세포를 37℃, 5% CO_2에서 인큐베이션시켰다. 활성화 후 20 내지 28시간에, T 세포에 G12/2R-1 134 ECD 작제물을 암호화하는 렌티바이러스를 형질도입하였다. 형질도입 24시간 후, 130a1 G-CSF(100ng/㎖)를 함유한 신선한 배지를 T 세포에 첨가하였다. 그 후, 세포 배양물에 2일마다 새로운 배지 및/또는 시토카인을 보충하고 ㎖당 대략 5×10^5 내지 1×10^6개 세포의 밀도를 유지하였다.

[0740] BrdU 혼입 검정을 위해, T 세포를 확장 10 내지 14일에 수거하고 PBS에서 2회, 완전 TexMACS에서 1회 세척하였다. 세포를 완전 TexMACS 함유 배지 단독 또는 다음 사이토카인을 함유하는 배지에 재플레이팅하였다: IL-2(300IU/㎖), IL-2+IL-12(각각 10ng/㎖) 또는 개별 G-CSF 변이체(130, 130a1, 130b1, 130a2, 130b2 또는 130a1b1, 각각 100ng/㎖). T 세포를 37℃, 5% CO_2에서 48시간 동안 인큐베이션시켰다. BrdU 검정의 나머지는 세포가 항-인간 G-CSFR APC-접합 및 CD3 BV750-접합 항체로 추가로 염색된다는 점을 제외하고는 실시예 34에 기재된 바와 같이 수행되었다.

[0741] **결과**

[0742] IL-2 또는 IL-2+IL-12와 비교하여, G-CSF 변이체 130, 130a1, 130b1, 130a2, 130b2 및 130a1b1은 모두 G12/2R-1 134 ECD를 발현하는 인간 T 세포의 유사한 수준의 증식을 유도하였다(도 56A). 배지 단독으로는 무시할 만한 증식이 관찰되었다. G-CSF 변이체 130 및 130a1b1을 사용한 반복 BrdU 검정에서 유사한 결과를 얻었다(도 56B).

[0743] 따라서, G-CSF 변이체 130, 130a1, 130b1, 130a2, 130b2 및 130a1b1은 키메라 수용체 G12/2R-1 134 ECD를 발현하는 T 세포의 증식을 효율적으로 유도하여, IL-2 또는 IL-2+IL-12에 의해 유발된 것과 유사한 증식 반응을 초래할 수 있다.

[0744] **실시예 36: 뮤린 유방 암종 모델에서, 변이체 사이토카인 130a1로의 처리는 G2R-3 134 ECD를 발현하는 종양-특이적 T 세포의 확장 및 항-종양 활성을 향상시킨다.**

[0745] G12/2R-1 134 ECD를 발현하는 T 세포의 증식을 자극하는 130a1 G-CSF의 능력 및 WT 뮤린 및 인간 G-CSFR과의 낮은 교차 반응성에 기초하여, 이것을 뮤린 유방암 모델에서 생체내에서 시험으로 발전시켰다.

[0746] **방법**

[0747] 모든 절차는 캐나다 동물 관리 위원회 지침을 따랐으며 빅토리아 대학교 동물 관리 위원회의 승인을 받았다. MMTV 프로모터의 제어 하에 유방 상피에서 $Neu^{OT-I/OT-II}$ 트랜스진을 발현하는 C57Bl/6 마우스를 종양 숙주로 활용하였다(Wall et al., 2007). 종양-특이적 CD8+ T 세포는 T 세포 수용체(TCR) 트랜스제닉 OT-I 마우스(이하 "OT-I" 마우스라고 함, 잭슨 래보러토리즈사)에서 얻었고; OT-I T 세포는 MHC 클래스 I에 의해 제시된 닭 오브알부민의 잔기 257-264를 인식한다. 본 발명자들은 또한 T 림프구-특이적 Thy1a(Thy1.1) 대립유전자를 보유하는 동형 마우스(이하 "Thy1.1+" 마우스라고 함; 잭슨 래보러토리즈사)를 얻었다. OT-I 및 Thy1.1+ 계통을 동형접합성으로 교배하여 "Thy1.1+ OT-I" 마우스를 생성시켰고; 이는 Thy1.1 마커를 사용하여 유세포 분석법으로 OT-I T 세포를 식별할 수 있게 한다. NOP23은 $Neu^{OT-I/OT-II}$ 및 유방 상피에서 p53의 우성 음성 버전을 발현하는 트랜스제닉 마우스의 자발적인 종양에서 유래된 동계 유방 종양 계통이다(Wall *et al.*, 2007)(Yang *et al.*, 2009). NOP23 세포는 MHC 클래스 I에 닭 오브알부민의 잔기 257 내지 264를 제시하므로 OT-I T 세포에 의해 인식될 수 있다. NOP23 세포를 초기 계대로 유지시키고, 10% 우태아 혈청, 1x 인슐린-트랜스페린-셀레늄 보충제(코닝사) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(깁코사)을 함유하는 DMEM-고 글루코스(하이클론사(Hyclone))에서 배양하였다. 세포주는 마우스 병원체 및 마이코플라스마 종에 대한 일상적인 시험을 거쳤다.

[0748] 숙주 MMTV $Neu^{OT-I/OT-II}$ 마우스의 뒤쪽 옆구리에 1×106개 NOP23 세포를 피하 이식하였다. 종양이 평균 면적 20 내지 50mm^2에 도달하면(이식 후 대략 15일), 마우스에게 다음 단락에 기재된 바와 같이 G2R-3 134 ECD를 발현하도록 레트로바이러스가 형질도입된 5×10^6개의 공여자 Thy1.1+ OT-I 림프구를 정맥내 주입하였다.

[0749] 레트로바이러스 패키징 세포주 Platinum-E(셀 바이오랩스사(Cell Biolabs), RV-101)를 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신, 퓨로마이신(1mg/㎖) 및 블라스티시딘(10mg/㎖)을 함유하는 DMEM에서 배양하였다. 키메라 수용

체 작제물을 합성하고, IRES-GFP(BglII 대 PacI 부위)를 제거하고 맞춤형 다중 클로닝 부위를 암호화하는 어닐링된 프라이머를 도입하기 위해서 제한 엔도뉴클레아제 클로닝에 의해서 변경된 pMIG 레트로바이러스 전달 플라스미드(플라스미드 #9044, 애드진사(Addgene))에 클로닝하였다. 생성된 서열을 생어 서열결정에 의해 검증하였다. 전달 플라스미드를 상기에 기재된 바와 같은 리포펙타민 3000 형질주입 방법을 사용하여 Platinum-E 세포에 형질주입시켰다. 레트로바이러스 상청액을 형질주입 24 및 48시간 후에 플레이트로부터 수집하고, 0.45 마이크론 필터를 통해 여과하였다. 헥사다이메트린 브로마이드(1.6mcg/㎖, 시그마-알드리치사) 및 인간 IL-2(300IU/㎖)를 상청액에 첨가하였다. 정제된 레트로바이러스 상청액을 사용하여 하기에 기재된 바와 같이 뮤린 림프구에 형질도입하였다.

[0750] 레트로바이러스 상청액을 수집하기 48시간 전에, 24-웰 부착 플레이트를 PBS 중에 희석된 비접합된 항-뮤린 CD3(10㎎/㎖, 비디 바이오사이언시스사(비디 사이언시스사), 553058) 및 항-뮤린 CD28(2㎎/㎖, 비디 바이오사이언시스사, 553294) 항체로 코팅하고, 4℃에서 저장하였다. 레트로바이러스 상청액을 수집하기 24시간 전에 Thy1.1+ OT-I 마우스를 안락사시키고 다음과 같이 비장으로부터 T 세포를 수거하였다. 비장을 수동으로 분리하고, 100마이크론 필터를 통해 여과하였다. 적혈구를 실온에서 5분 동안 ACK 용해 완충액(깁코사, A1049201)에서 인큐베이션시켜서 용해시킨 후 혈청 함유 배지에서 1회 세척하였다. CD8a-양성 또는 T 세포를 비드-기반 단리 키트(밀테니 바이오테크사, 130-104-075)를 사용하여 단리시켰다. 세포를 뮤린 T 세포 확장 배지(10% FBS, 페니실린/스트렙토마이신, 0.05mM β-머캅토에탄올 및 300IU/㎖ 인간 IL-2를 함유하는 RPMI-1640) 중의 항-CD3- 및 항-CD28-항체로 코팅된 플레이트에 첨가하고, 37℃, 5% CO_2에서 24시간 동안 인큐베이션시켰다.

[0751] 레트로바이러스 형질도입은 연속 2일(제1일 및 제2일)에 다음과 같이 수행하였다. 배지의 대략 절반을 (상기에 기재된 바와 같이 생성된) 레트로바이러스 상청액으로 교체하였다. 세포를 30℃에서 90분 동안 1000g의 레트로바이러스 상청액으로 스핀감염시켰다. 플레이트를 0 내지 4시간 동안 인큐베이터에 다시 넣은 다음, 배지의 대략 절반을 새로운 T 세포 확장 배지로 교체하였다. 다음날 절차를 반복하였다. 두 번째 형질도입 24시간 후, T 세포를 6-웰 플레이트로 분할하고, 항체 자극으로부터 제거하고, 표준 조건 하에서 배양하였다.

[0752] 제5일에, 형질도입된 T 세포를 수거하고, 인간 G-CSFR 및 CD8a에 대한 항체(PerCP-eFluor 710 접합체, eBioscience™, 46-0081-82)를 사용한 유세포 분석법뿐만 아니라 상기에 기재된 바와 같이 Fixable Viability Dye eFluor™ 506(1:1000 희석)으로 형질도입 효율을 평가하였다. 세포를 PBS로 3회 세척한 다음, 확립된 NOP23 종양을 보유하는 숙주 마우스에 꼬리 정맥 주사를 통해 주입하였다.

[0753] T 세포 주입 후, 말초 혈액에서 종양 성장 및 Thy1.1+ OT-I 세포의 생착에 대해 마우스를 모니터링하였다. 마우스를 무작위 배정하여 14일 동안 매일 비히클 대 130a1 G-CSF(10㎍/용량)를 복강내 주사한 후 추가로 14일 동안 격일로 총 21회 용량을 투여하였다. 사이토카인 치료 기간 동안, 작업자는 사이토카인 주사기의 내용물(즉, 비히클 대 130a1 G-CSF)에 대해서 맹검되었다. ACT 후 1, 4, 7, 10, 14 및 19일에 각각의 마우스로부터 말초 혈액 샘플을 수집하였다. PBMC를 ACK 용해(상기에 기재됨) 후 분리시키고, 마우스 Fc 블록 및 Zombie NIR viability dye(1:4,000)에서 인큐베이션시키고, 뮤린 CD45(PerCP-접합 항체, 1:200), CD3(AlexaFluor™ 700-접합 항체, 1:100), CD8a(APC-접합 항체, 1:80), NK1.1(PECy7-접합 항체, 1:25), CD19(SuperBright™ 780-접합 항체, 1:100), CD11b(FITC-접합 항체, 1:25), CD11c(BV510-접합 항체, 1:50), Ly6C(BV605-접합 항체, 1:10) 및 Ly6G(PE-접합 항체, 1:80)에 특이적인 항체로 염색하였다. 유세포 분석법을 Cytek Aurora 장비에서 수행하였다.

[0754] 마우스를 종양 크기, 체중 및 일반적인 건강에 대해 모니터링하고, 실험 종료점(150mm^2 초과의 종양 면적)에 도달했을 때 또는 완전한 종양 퇴행을 경험한 마우스의 경우 T 세포 주입 후 제80일에 안락사시켰다.

[0755] **결과**

[0756] 모든 마우스에게 G2R-3 134 ECD를 발현하도록 형질도입된 Thy1.1+ OT-I 세포의 등가 용량(5×10^6)을 제공하였다. 유세포 분석법에 의한 인간 G-CSFR을 발현하는 Thy1.1+ 세포의 백분율로 평가한 형질도입 효율은 36%였다. 130a1 G-CSF 처리군에서, 4/4마리의 마우스는 종양의 완전 퇴행(CR)을 경험하였고, 연구가 실질적인 이유로 중단된 제80일까지 종양이 없는 상태로 유지되었다(도 57A 및 57B). 대조적으로, 비히클 처리군에서는 1/4의 마우스만 CR을 경험한 반면, 나머지 3/4의 마우스는 실험 종점까지 진행된 종양을 가졌다. 이는 130a1 G-CSF 처리군에서는 100%의 마우스 생존율, 비히클 처리군에서는 25%의 생존률로 해석된다(도 57C).

[0757] Thy1.1+ OT-I 세포의 확장 및 지속성을 마우스로부터 수집한 연속 혈액 샘플에서 모니터링하였다. 130a1 G-CSF 처리군에서, Thy1.1+ OT-I 세포는 제7일에 모든 CD8+ T 세포의 49.8%의 평균 피크 생착에 도달한 반면, 비히클

처리군에서는 Thy1.1+ OT-I 세포는 제7일에 모든 CD8+ T 세포의 단지 8.6%의 평균 피크 생착에 도달하였다(도 57D).

[0758] 말초 혈액 샘플을 또한 모든 CD45+ 세포에 대한 골수 세포 하위세트의 백분율에 대해 평가하였다. 130a1 G-CSF- 및 비히클-처리군은 시간 경과에 따라서 말초 혈액에서 모든 CD45+ 세포에 비해서 호중구(CD3-, CD19-, NK1.1-, CD11b+, CD11c-, Ly6G+), 호산구(CD3-, CD19-, NK1.1-, CD11b+, CD11c-, Ly6G-, SSC^{high}) 또는 단핵구(CD3-, CD19-, NK1.1-, CD11b+, CD11c-, Ly6G-, SSC^{low})의 백분율에서 유의한 변화를 나타내지 않았다(도 57E, 도 57F 및 도 57G).

[0759] 연구 전반에 걸쳐, 두 군의 모든 마우스는 일부의 종양 진행에도 불구하고 정상 체중을 유지하고 양호한 전반적인 건강을 나타내었다.

[0760] 따라서, 130a1 G-CSF는 G2R-3 134 ECD를 발현하는 종양-특이적 CD8+ T 세포의 선택적이고 상당한 확장을 유도할 수 있었다. 이는 비히클 치료군의 25%에 비해 100%의 지속적인 CR 비율을 초래하였다. 130a1 G-CSF로의 처리는 말초 혈액의 호중구, 호산구 또는 단핵구 수에 영향을 미치지 않았다. 130a1 G-CSF 처리와 연관된 명백한 독성은 없었다.

[0761] **실시예 37: 뮤린 유방 암종 모델에서, 변이체 G-CSF 130a1로의 처리는 G12/2R-1 134 ECD를 발현하는 종양-특이적 T 세포의 확장 및 항-종양 활성을 향상시킨다.**

[0762] 생체내 뮤린 유방암 모델에서 G12/2R-1 134 ECD를 발현하도록 조작된 T 세포의 확장 및 항종양 활성을 향상시키는 능력에 대해 변이체 사이토카인 130a1 G-CSF를 추가로 시험하였다.

[0763] **방법**

[0764] 본 발명자들은 Thy1.1+ OT-I 세포가 레트로바이러스에 의해 형질도입되어 G2R-3 134 ECD 대신 G12/2R-1 134 ECD를 발현한다는 점을 제외하고는 실시예 36에 설명된 것과 동일한 방법을 사용하였다.

[0765] **결과**

[0766] 모든 마우스에게 G12/2R-1 134 ECD를 발현하도록 형질도입된 Thy1.1+ OT-I 세포의 등가 용량(5×10^6)을 제공하였다. 유세포 분석법에 의한 인간 G-CSFR+을 발현하는 Thy1.1+ 세포의 백분율로 평가한 형질도입 효율은 43%였다. 130a1 G-CSF 처리군에서, 3/3마리의 마우스는 종양의 완전 퇴행(CR)을 경험하였고, 연구가 실질적인 이유로 중단된 제80일까지 종양이 없는 상태로 유지되었다(도 58A 및 58B). 대조적으로, 비히클 처리군에서는 1/4의 마우스만 CR을 경험한 반면, 나머지 3/4의 마우스는 실험 종점까지 진행된 종양을 가졌다. 이는 130a1 G-CSF 처리군에서는 100%의 마우스 생존율, 비히클 처리군에서는 25%의 생존률로 해석된다(도 58C).

[0767] Thy1.1+ OT-I 세포의 확장 및 지속성을 마우스로부터 수집한 연속 혈액 샘플에서 모니터링하였다. 130a1 G-CSF 처리군에서, Thy1.1+ OT-I 세포는 제7일에 모든 CD8+ T 세포의 34.3%의 평균 피크 생착에 도달한 반면, 비히클 처리군에서는 Thy1.1+ OT-I 세포는 제7일에 모든 CD8+ T 세포의 단지 7.7%의 평균 피크 생착에 도달하였다(도 58D).

[0768] 말초 혈액 샘플을 또한 모든 CD45+ 세포에 대한 몇몇 골수 세포 하위세트의 백분율에 대해 평가하였다. 130a1 G-CSF- 및 비히클-처리군은 시간 경과에 따라서 말초 혈액에서 모든 CD45+ 세포에 비해서 호중구(CD3-, CD19-, NK1.1-, CD11b+, CD11c-, Ly6G+), 호산구(CD3-, CD19-, NK1.1-, CD11b+, CD11c-, Ly6G-, SSC^{high}) 또는 단핵구(CD3-, CD19-, NK1.1-, CD11b+, CD11c-, Ly6G-, SSC^{low})의 백분율에서 유의한 변화를 나타내지 않았다(도 58E, 도 58F 및 도 58G).

[0769] 연구 전반에 걸쳐, 두 군의 모든 마우스는 일부의 종양 진행에도 불구하고 정상 체중을 유지하고 양호한 전반적인 건강을 나타내었다.

[0770] 따라서, 130a1 G-CSF는 G12/2R-1 134 ECD를 발현하는 종양-특이적 CD8+ T 세포의 선택적이고 상당한 확장을 유도할 수 있었다. 이는 비히클 치료군의 25%에 비해 100%의 지속적인 CR 비율을 초래하였다. 130a1 G-CSF로의 처리는 말초 혈액의 호중구, 호산구 또는 단핵구 수에 영향을 미치지 않았다. 130a1 G-CSF 처리와 연관된 명백한 독성은 없었다.

[0771] **실시예 38: 130a1 G-CSF의 치료 효과는 종양-특이적 OT-I T 세포에 의한 동족의 조작된 사이토카인 수용체의 발**

현을 요구한다.

[0772] 130a1 G-CSF가 G-CSFR 134 ECD를 함유하는 수용체를 통해 면역학적 및 항종양 효과를 매개한다는 것을 입증하기 위해서, 상기 생체내 실험을 모의-형질도입된 OT-I T 세포(즉, 레트로바이러스 형질도입 과정을 겪었지만 레트로바이러스 작제물을 포함하지 않은 OT-I T 세포)를 사용하여 수행하였다. 130a1 G-CSF의 활성을 또한 인간 IL-2의 활성과 비교하였다.

[0773] **방법**

[0774] 본 발명자들은 다음의 두 가지 예외를 제외하고 실시예 36에 설명된 것과 동일한 방법을 사용하였다: (a) Thy1.1+ OT-I 세포를 모의-형질주입된 Platinum-Eco 세포로부터 유래된 상청액을 사용하여 모의-형질도입하였고; 레트로바이러스 형질도입 과정의 모든 다른 양상은 동일하였음; (b) 본 발명자들은 동일한 치료 일정에 따라 비히클 또는 130a1 G-CSF 대신 인간 인터류킨-2(30,000IU/용량, 프로류킨)를 제공받은 추가 마우스 대조군을 포함시켰음.

[0775] **결과**

[0776] 모든 마우스는 모의 형질도입 과정을 거친 Thy1.1+ OT-I 세포를 등가 용량(5×10^6)으로 제공받았다. 그런 다음 마우스를 무작위 배정하여 비히클, 130a1 G-CSF 또는 IL-2를 제공하였다. 130a1 G-CSF 처리군에서, 3/5마리의 마우스는 종양의 완전 퇴행(CR)을 경험하였고, 연구가 실질적인 이유로 중단된 제80일까지 종양이 없는 상태로 유지되었다(도 59A 및 59B). IL-2 처리군에서는 4/5마리의 마우스가 CR을 경험하고 80일까지 종양이 없는 상태를 유지하였다. 비히클 처리군에서는 3/4마리의 마우스가 CR을 경험하고 80일까지 종양이 없는 상태를 유지하였다(도 59A 및 도 59B). 이는 130a1 G-CSF 및 IL-2 처리군에서는 80%, 비히클 처리군에서는 75%의 생존율로 해석된다(도 59C).

[0777] 모의-형질도입된 OT-I T 세포에 의해 달성된 완전 반응률은 이들 군 중 어느 것도 G2R-3 134 ECD 또는 G12/2R-1 134 ECD를 통한 신호 전달의 이점을 갖지 않았다는 사실에도 불구하고 G2R-3 134 ECD 또는 G12/2R-1 134 ECD를 발현하는 비히클 처리된 OT-I T 세포에서 관찰된 것보다 더 높았다(실시예 36 및 37). 형질도입된 비히클-처리된 OT-I T 세포의 낮은 효능은 레트로바이러스 형질도입으로 인한 T 세포 기능의 약간의 손상을 반영하는 것일 것이다.

[0778] Thy1.1+ OT-I 세포의 확장 및 지속성을 마우스로부터 수집한 연속 혈액 샘플에서 모니터링하였다. Thy1.1+ OT-I 세포 수는 3개의 군 모두에서 제4일에 피크에 이르렀고, 130a1 G-CSF-, IL-2- 및 비히클-처리군의 경우 모든 CD8+ T 세포의 8.0%, 10.6% 및 9.9% 수준에 도달하였다(도 59D).

[0779] 130a1 G-CSF-, IL-2- 또는 비히클-처리군 사이에 모든 말초 혈액 CD45+ 세포의 백분율로서 호중구 또는 단핵구의 수에는 유의한 차이가 없었다(도 59E 및 도 59G).

[0780] 제7일에 호산구는 130a1 G-CSF- 및 비히클 처리군에서 각각 2.9% 및 2.7%에 비해 IL-2 처리군에서는 전체 CD45+ 세포의 평균 6.7%에 도달하였다(도 59F). 호산구 증가는 마우스와 인간에서 전신 IL-2 투여의 알려진 효과이다.

[0781] 연구 전반에 걸쳐, 두 군의 모든 마우스는 일부의 종양 진행에도 불구하고 정상 체중을 유지하고 양호한 전반적인 건강을 나타내었다.

[0782] 따라서, 모의-형질도입된 Thy1.1+ OT-I 세포를 제공받은 마우스에서, 130a1 G-CSF는 항종양 활성을 매개하거나 T 세포 확장을 유도하지 못했다. 상기에 기재된 바와 같이, 130a1 G-CSF는 말초 혈액의 호중구, 호산구 또는 단핵구 수에 영향을 미치지 않았다. 130a1 G-CSF 처리와 연관된 명백한 독성은 없었다. IL-2(사용된 용량 및 일정)는 일시적인 호산구증가증을 유발함에도 불구하고 T 세포 확장 및 항종양 활성에 대해 매우 미미한 효과를 나타냈다.

[0783] **실시예 39: G-CSFR 수용체로부터의 변이체 세포외 도메인 및 IL-4 수용체 알파로부터의 세포내 신호전달 도메인을 갖는 키메라 수용체의 작제 및 기능적 평가**

[0784] 본 발명자들은 인간 IL-4 수용체 알파의 세포내 도메인의 일부에 융합된 인간 G-CSFR의 세포외 도메인(134 변이체), 막관통 도메인, Box 1 및 2 영역을 함유하는 G4R 134 ECD(도 60)라는 불리는 키메라 수용체를 합성하였다. 키메라 수용체 소단위는 인간 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 형질도입하는 데 사용되는 렌티바이러스 벡터에 암호화되었다. 형질도입된 T 세포(및 형질도입되지 않은 대조군 T 세포)를 유세포 분석법으로 분석하여 G4R 134 ECD의 세포 표면 발현을 검출하였다. T 세포 확장 및 증식을 유도하는 G4R 134 ECD의 능력을 시험관내에서

평가하였다. G4R 134 ECD에 의해 매개되는 생화학적 신호 전달 사건을 STAT6 및 IL-4 신호전달과 관련된 기타 신호 전달 매개체에 대한 포스포-특이적 항체를 사용하여 웨스턴 블롯으로 평가하였다.

[0785] **방법**

[0786] 키메라 수용체 작제물 G4R 134 ECD를 합성하고 렌티바이러스 전달 플라스미드(트위스트 바이오사이언스사(Twist Bioscience))에 클로닝하였다. 전달 플라스미드 및 렌티바이러스 패키징 플라스미드(psPAX2, pMD2.G, 애드진사)를 다음과 같이 렌티바이러스 패키징 세포주 HEK293T/17(ATCC)에 공동 형질주입시켰다: 세포를 5% 우태아 혈청 및 0.2mM 피루브산 나트륨을 함유하는 Opti-MEM™ I 환원 혈청 배지, GlutaMAX™ 보충물(Gibco™)에 밤새 플레이팅하였다. 플라스미드 DNA와 Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent(Gibco™)를 제조사의 사양에 따라 혼합하고 세포에 적가하였다. 세포를 37℃, 5% CO_2에서 6시간 동안 인큐베이션시킨 후 배지를 교체하고 밤새 추가로 인큐베이션시켰다. 다음날 세포 상청액을 플레이트에서 수집하여 4℃에 보관하고 배지를 교체하였다. 다음날 다시 세포로부터 세포 상청액을 수집하여 전날의 상청액과 풀링시켰다. 상청액을 약하게 원심분리시켜 부스러기를 제거하고, 0.45mm 필터를 통해 여과하였다. 상청액을 Beckman Optima L-XP Ultracentrifuge의 SW-32Ti Rotor를 사용하여 25,000rpm에서 90분 동안 회전시켰다. 상청액을 제거하고, 30분 동안 가볍게 진탕하여 펠릿을 Opti-MEM I 배지에 재현탁시켰다.

[0787] 1차 인간 T 세포를 다음과 같이 건강한 공여자 백혈구 성분채집술 생성물로부터 단리시켰다. 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 밀도 구배 원심분리를 사용하여 단리시켰다. CD4+ 및 CD8+ T 세포를 제조사의 사양에 따라 인간 CD4 및 CD8 MicroBeads(밀테니 바이오테크사)를 사용하여 단리시켰다. 일부 실험의 경우 T 세포를 생존 가능하게 냉동시키고, 나중에 분석을 위해 해동시켰다. 단리된 T 세포를 3% 인간 혈청(시그마사) 및 0.5% 젠타마이신(DIN 0226853)을 함유하는 TexMACS™ 배지(밀테니 바이오테크사)(이하 "완전 TexMACS"로 지칭함)의 48웰 플레이트에 웰당 5×10^5개로 플레이팅하였다. 인간 T 세포 TransAct™(밀테니 바이오테크사)을 첨가하고(웰당 10㎖) 세포를 37℃, 5% CO_2에서 인큐베이션시켰다. 활성화 후 20 내지 28시간에, T 세포에 수용체 작제물을 암호화하는 렌티바이러스를 형질도입하였다. 다음날, IL-2(300IU/㎖), 130a1 G-CSF(100ng/㎖), IL-2+130a1 G-CSF(300IU/㎖ 또는 각각 100ng/㎖)와 함께 또는 사이토카인을 첨가하지 않고 새로운 배지를 T 세포에 첨가하였다. (형질도입되지 않은 T 세포의 경우, 307 G-CSF 변이체에 130a1 G-CSF를 첨가하여 실험의 또 다른 아암에 대한 대조군 역할을 하였고[표시되지 않음]; 이러한 실험적 편리함의 사용은 130a1 G-CSF 및 307 G-CSF 모두 형질도입되지 않은 T 세포에서 증식 또는 다른 신호전달 사건을 유도하지 않았다는 사실로 인해서 정당화되었다). T 세포를 ㎖당 대략 5 x 10^5 내지 1 x 10^6개 세포 밀도를 유지하면서 2일마다 새로운 배지 및/또는 제시된 사이토카인을 첨가하여 유지시켰다.

[0788] 형질도입 8일 후, G4R 134 ECD의 발현을 IL-2 배양 조건으로부터 수거된 T 세포의 유세포 분석법에 의해 평가하였다. T 세포를 15분 동안 4℃에서 항-인간 G-CSFR APC-접합 항체 (1:50 희석), 항-인간 CD3 BV750™ 접합 항체(1:50 희석), 항-인간 CD4 PE-접합 항체(1:25 희석), 항-인간 CD8 PerCP-접합 항체 (1:100) 및 eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 506 (1:1000 희석)과 함께 인큐베이션시켰다. 그런 다음 세포를 2회 세척하고 Cytek™ Aurora 유세포 분석기에서 분석하였다.

[0789] T 세포 확장을 평가하기 위해, Cytek™ Aurora 유세포 분석기를 사용하여 4일, 8일, 12일 및 16일에 각각의 배양 조건으로부터 세포를 계수하였다.

[0790] 세포 주기 진행(BrdU 혼입)을 평가하기 위해, 세포를 제12일에 수거하고(130a1 G-CSF+IL-2 배양 조건으로부터), PBS에서 2회, 완전 TexMACS 배지에서 1회 세척하고, 다음의 제시된 사이토카인을 함유하는 신선한 완전 TexMACS 배지에 재플레이팅하였다: IL-2(300IU/㎖), IL-4(50ng/㎖), IL-2 + IL-4(각각 300IU/㎖ 및 50ng/㎖), 130a1 G-CSF(100ng/㎖), 130a1 G-CSF + IL-2 또는 배지 단독(사이토카인 첨가하지 않음). 세포를 37℃, 5% CO_2에서 48시간 동안 배양하였다. BrdU 검정 절차는 다음을 제외하고는 BD Pharmingen™ FITC BrdU Flow Kit(557891)의 지침 매뉴얼을 따랐다: 세포를 또한 염색하여 G-CSFR ECD의 세포 표면 발현을 검출하였다(실시예 35에 기재된 바와 같음). 유세포 분석법을 Cytek™ Aurora 장비를 사용하여 수행하였다.

[0791] 웨스턴 블롯 실험을 위해, 세포를 130a1 G-CSF+IL-2 배양 조건으로부터 수거하고, 3회 세척하고, 완전 TexMACS에서 밤새 정치시켰다. 다음날, 세포를 배지 단독 또는 배지+IL-2(300IU/㎖), IL-4(50ng/㎖) 또는 130a1 G-CSF(100ng/㎖)로 20분 동안 37℃에서 자극하였다. 세포를 10mM HEPES, pH 7.9, 1mM $MgCl_2$, 0.05mM EGTA, 0.5mM

EDTA, pH 8.0, 1 mM DTT, 및 1x Pierce Protease 및 Phosphatase Inhibitor Mini Tablets(A32961)를 함유하는 완충액에서 1회 세척하였다. 세포를 0.2% NP-40 대체물(시그마사)을 함유하는 세척 완충액 내 얼음에서 10분 동안 용해시켰다. 용해물을 4℃에서 13,000rpm으로 10분 동안 원심분리시킨 후 상청액(세포질 분획)을 수집하였다. 핵 분획을 추출하기 위해, 용해 단계로부터의 펠릿을 0.42M NaCl 및 20% 글리세롤을 첨가하여 상기 세척 완충액에 재현탁시켰다. 핵 분획을 자주 보텍싱시키면서 30분 동안 얼음에서 인큐베이션시키고, 20분 동안 13,000rpm에서 4℃에서 원심분리시킨 후 핵 분획(상청액)을 수집하였다. 세포질 및 핵 분획을 환원 조건에서 10분 동안 가열(70℃)시키고 NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris 단백질 겔에서 전개시켰다. 겔 내용물의 나이트로셀룰로스 막(Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell에서 20V에서 60분)으로 옮기고, 건조시키고, TBS(927-600001, LI-COR) 중의 Intercept® Blocking Buffer에서 1시간 동안 차단시켰다. 블롯을 0.1% Tween20을 함유하는 TBS 중의 Intercept® Blocking Buffer에서 4℃에서 밤새 1차 항체(1:1,000)와 함께 인큐베이션시켰다. 1차 항체는 셀 시그널링 테크놀로지즈사로부터 입수하였다: 포스포-Shc(Tyr239/240) 항체 #2434, 포스포-Akt (Ser473)(D9E) XP® 토끼 단클론성 항체 #4060, 포스포-S6 리보솜 단백질(Ser235/236) 항체 #2211, 포스포-p44/42 MAPK(Erk1/2) (Thr202/Tyr204) 항체 #9101, β-액틴(13E5) 토끼 단클론성 항체 #4970, 포스포-JAK1(Tyr1034/1035)(D7N4Z) 토끼 단클론성 항체 #74129, 포스포-JAK3(Tyr980/981)(D44E3) 토끼 단클론성 항체 #5031, 포스포-Stat6(Tyr641)(C11C5) 토끼 단클론성 항체 #9361, 및 히스톤 H3(96C10) 마우스 단클론성 항체 #3638. 블롯을 0.1% Tween20을 함유하는 TBS 중에서 3회 세척하고, 0.1% Tween20을 함유하는 TBS 완충액 중의 2차 항체(1:10,000)와 30 내지 60분 동안 실온에서 인큐베이션시켰다. 2차 항체는 셀 시그널링 테크놀로지즈사로부터 얻었다: 항-마우스 IgG(H+L)(DyLight™ 800 4X PEG 접합체) #5257 및 항-토끼 IgG(H+L)(DyLight™ 800 4X PEG 접합체) #5151이었다. 블롯을 세척하고, LI-COR Odyssey 이미저에 노출시켰다.

[0792] **결과**

[0793] 유세포 분석법(도 61)에 따르면, G4R 134 ECD를 암호화하는 렌티바이러스 벡터가 형질도입된 CD3+ T 세포의 큰 비율(93.7%)이 G-CSFR ECD를 발현한 반면, 형질도입되지 않은 T 세포는 그렇지 않았다.

[0794] 따라서, G4R 134 ECD는 조작된 T 세포의 표면에서 발현될 수 있다.

[0795] 도 62에 도시된 바와 같이, G4R 134 ECD를 암호화하는 렌티바이러스 벡터가 형질도입된 T 세포는 IL-2 또는 IL-2+130a1 G-CSF를 함유하는 배지에서 양호하게 확장되었으며 130a1 G-CSF 단독에 반응하여 중간 수준의 확장을 나타내었다(도 62A). 형질도입되지 않은 T 세포는 IL-2에 반응하여 양호하게 확장되었지만 130a1 G-CSF+G-CSF 변이체 307의 조합에 대해서는 반응을 나타내지 않았다(후자는 이 실험의 개별 아암에 대한 대조군으로 포함되었음; 표시되지 않음)(도 62B). 어느 배양물도 배지 단독에서는 양호하게 확장되지 않았다.

[0796] 따라서, T 세포에서 G4R 134 ECD의 발현은 130a1 G-CSF에 대한 반응으로 증가된 확장을 유도하며, 이는 G4R 134 ECD의 하이브리드 세포내 도메인이 T 세포에서 기능적 성장 신호를 전달한다는 것을 입증한다.

[0797] 도 63에 도시된 바와 같이, G4R 134 ECD를 발현하는 CD4+ 및 CD8+ T 세포는 IL-2, IL-4, IL-2+IL-4, 130a1 G-CSF 또는 130a1 G-CSF+IL-2에 반응하여 증식(BrdU 혼입)을 나타내었다(도 63A). 대조적으로, 형질도입되지 않은 CD4+ 및 CD8+ T 세포는 IL-2, IL-4, IL-2+IL-4 및 130a1 G-CSF+IL-2에 반응하여 증식하였지만 130a1 G-CSF 단독에는 반응하지 않았다(도 63B). 이 특정 실험에서 배경 증식이 증가한 G4R 134 ECD를 발현하는 CD8+ T 세포를 제외하고, 배양물 중 어느 것도 배지 단독에 반응하여 증식하지 않았다.

[0798] 따라서, CD4+ 및 CD8+ T 세포에서 G4R 134 ECD의 발현은 130a1 G-CSF에 대한 반응으로 증식을 증가시켜 IL-2 또는 IL-4에 의해 유도된 수준과 동일하거나 심지어 이를 초과하는 수준을 달성한다. 이는 G4R 134 ECD의 하이브리드 세포내 도메인이 T 세포에서 기능적 증식 신호를 전달한다는 것을 입증한다.

[0799] 도 64에 나타난 바와 같이, 형질도입되지 않은 T 세포와 G4R134 ECD를 발현하는 T 세포 둘 다에서 IL-2는 JAK1, JAK3, Shc, Erk1/2, Akt 및 S6의 인산화를 유도하였다. IL-4는 STAT6, JAK1 및 JAK3의 인산화를 유도했으며 Erk1/2, Akt 및 S6의 인산화는 보통 수준이었고 Shc의 인산화는 없었다. G4R 134 ECD를 발현하는 T 세포에서 130a1 G-CSF는 Erk1/2, Akt 및 S6의 중간 인산화(IL-2에 비해)와 함께 STAT6 및 JAK1의 인산화를 유도했으며 JAK3 또는 Shc의 인산화는 없었다. G4R 134 ECD가 JAK3 대신 JAK2와 결합하는 인간 G-CSFR의 Box 1 및 2 영역을 사용한다는 점을 고려하면 JAK3의 인산화가 부족할 것으로 예상된다. 예상한 바와 같이, 130a는 형질도입되지 않은 T 세포에서 어떠한 신호전달 사건도 유도하지 않았다.

[0800] 따라서, G4R 134 ECD의 하이브리드 세포내 도메인은 천연 IL-4 수용체와 동일한 많은 생화학적 신호 전달 사건, 특히 STAT6의 티로신 인산화를 활성화한다.

[0801] **실시예 40: G-CSFR 수용체로부터의 변이체 세포외 도메인 및 IL-6 수용체 베타(gp130)로부터의 세포내 신호전달 도메인을 갖는 키메라 수용체의 작제 및 기능적 평가**

[0802] 본 발명자들은 인간 IL-6 수용체 베타(gp130)의 세포내 도메인의 일부에 융합된 인간 G-CSFR의 세포외 도메인(134 변이체), 막관통 도메인, Box 1 및 2 영역을 함유하는 G6R 134 ECD(도 60)라는 불리는 키메라 수용체를 합성하였다. 키메라 수용체 소단위는 인간 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 형질도입하는 데 사용되는 렌티바이러스 벡터에 암호화되었다. 형질도입된 T 세포(및 형질도입되지 않은 대조군 T 세포)를 유세포 분석법으로 분석하여 G6R 134 ECD의 세포 표면 발현을 검출하였다. T 세포 확장 및 증식을 유도하는 G6R 134 ECD의 능력을 시험관내에서 평가하였다. G6R 134 ECD에 의해 매개되는 생화학적 신호 전달 사건을 STAT3 및 STAT5에 대한 포스포-특이적 항체를 사용하여 웨스턴 블롯으로 평가하였다.

[0803] **방법**

[0804] 일반적으로, 본 발명자들은 실시예 39에 설명된 것과 유사한 방법을 따랐지만, 실험은 IL-6 신호전달 메커니즘에 초점을 맞추도록 개작되었다. 예를 들어 IL-6을 IL-4 대신 참조 사이토카인으로 사용하였다.

[0805] 인간 T 세포를 G6R 134 ECD를 발현하도록 조작하였고, 형질도입 효율을 실시예 39에 따라 제8일에 유세포 분석법에 의해 결정하였다.

[0806] T 세포를 IL-2(300IU/㎖), 130a1 G-CSF(100ng/㎖), IL-2+130a1 G-CSF(각각 300IU/㎖ 및 100ng/㎖) 또는 배지 단독(사이토카인 첨가하지 않음)에서 16일 동안 확장시키고, 배지 및 제시된 사이토카인을 2일마다 새로 교체하였다. 확장 4일, 8일, 12일 및 16일에 Cytek™ Aurora 유세포 분석기를 사용하여 T 세포를 계수하였다.

[0807] BrdU 혼입 검정을 위해, 확장 제12일에 T 세포를 IL-2 배양 조건에서 수거하고 PBS로 2회, 완전 TexMACS 배지로 1회 세척하였다. 세포를 관련 다음 검정 사이토카인을 함유하는 새로운 완전 TexMACS 배지에 재플레이팅하였다: IL-2(300IU/㎖), IL-6(100ng/㎖), IL-2+IL-6(각각 300IU/㎖ 및 100ng/㎖), 130a1 G-CSF(100ng/㎖), 130a1 G-CSF+IL-2(각각 300IU/㎖ 및 100ng/㎖) 또는 배지 단독(사이토카인 첨가하지 않음). 세포를 37℃, 5% CO_2에서 48시간 동안 배양하였다. BrdU 혼입 검정을 실시예 39에 기재된 바와 같이 수행하였다.

[0808] 웨스턴 블롯 실험을 위해, 세포를 IL-2(300IU/㎖)에서 18일 동안 확장시킨 다음, 상기와 같이 세척하고 완전 TexMACS 배지에서 밤새 정치시켰다. 다음날, 세포를 배지 단독 또는 배지와 IL-2(300IU/㎖), IL-6(100ng/㎖) 또는 130a1 G-CSF(100ng/㎖)로 20분 동안 37℃에서 자극하였다. 실시예 39에 기재된 바와 같이 세포질 및 핵 분획을 준비하고 웨스턴 블롯을 수행하였다. 1차 항체는 셀 시그널링 테크놀로지즈사로부터 입수하였다: 포스포-Stat3(Tyr705)(D3A7) 토끼 mAb #9145, 포스포-Stat5(Tyr694)(C11C5) 토끼 mAb #9359 및 히스톤 H3(96C10) 마우스 mAb #3638.

[0809] **결과**

[0810] 유세포 분석법(도 65)에 따르면, G6R 134 ECD를 암호화하는 렌티바이러스 벡터가 형질도입된 CD3+ T 세포의 큰 비율(93.7%)이 G-CSFR ECD를 발현한 반면, 형질도입되지 않은 T 세포는 그렇지 않았다.

[0811] 따라서, G6R 134 ECD는 조작된 T 세포의 표면에서 발현될 수 있다.

[0812] 도 66에 도시된 바와 같이, G6R 134 ECD를 암호화하는 렌티바이러스 벡터가 형질도입된 T 세포는 IL-2를 함유하는 배지에서 양호하게 확장되었으며, IL-2+130a1 G-CSF에 반응하여 중간 수준의 확장을 나타내었고, 130a1 G-CSF 단독에 반응하여 불량한 확장을 나타내었다(도 66A). 형질도입되지 않은 T 세포는 IL-2에 반응하여 양호하게 확장되었지만 130a1 G-CSF에는 반응하지 않았다(도 66B). 어느 배양물도 배지 단독에서는 양호하게 확장되지 않았다.

[0813] 따라서, 이 확장 검정에 의해 평가된 바와 같이, G6R 134 ECD는 T 세포에서 성장 신호를 유도하지 않는 것으로 보인다.

[0814] 도 67에 나타낸 바와 같이, G6R 134 ECD를 발현하는 CD4+ 및 CD8+ T 세포는 IL-2, IL-2+IL-6 또는 130a1 G-CSF+IL-2에 대한 반응으로 증식(BrdU 혼입)을 나타내었고; 130a1 G-CSF는 CD4+ T 세포의 중간 정도의 증식 및 CD8+ T 세포의 약한 증식을 유도하였다(도 67A). 대조적으로, 형질도입되지 않은 CD4+ 및 CD8+ T 세포는 IL-2, IL-2+IL-6 및 130a1 G-CSF+IL-2에 반응하여 증식하였지만 IL-6 또는 130a1 G-CSF 단독에는 반응하지 않았다(도 67B). 이 특정 실험에서 배경 증식이 증가한 G6R 134 ECD를 발현하는 CD8+ T 세포를 제외하고, 배양물 중 어느 것도 배지 단독에 반응하여 증식하지 않았다.

[0815] 따라서, G6R 134 ECD는 각각 CD8+ 및 CD4+ T 세포에서 약하거나 중간 정도의 증식 신호를 유도하는 것으로 보인다.

[0816] 도 68에 나타난 바와 같이, 형질도입되지 않은 T 세포와 G6R 134 ECD를 발현하는 T 세포 모두에서 IL-2는 STAT3(화살표) 및 STAT5의 티로신 인산화를 유도한 반면, IL-6은 STAT5가 아닌 STAT3의 티로신 인산화를 유도하였다(화살표). G6R 134 ECD를 발현하는 T 세포에서 130a1 G-CSF는 STAT5가 아닌 STAT3의 티로신 인산화를 유도하였다. 130a는 형질도입되지 않은 T 세포에서 STAT3 또는 STAT5의 티로신 인산화를 유도하지 않았다. P-STAT3 영상에서 어둡고 더 높은 분자 밴드가 IL-2 자극 조건(특히 형질도입되지 않은 T 세포)에 나타난다는 것을 주목해야 한다. 이는 포스포-STAT5 항체를 사용하여 이 막을 이전에 프로빙한 결과 남은 신호이다. 저분자량 밴드(화살표)는 포스포-STAT3을 나타낸다.

[0817] 따라서, G6R 134 ECD의 하이브리드 세포내 도메인은 T 세포에서 IL-6에 의해 유도된 것과 유사한 STAT 인산화 패턴을 유도한다.

[0818] **실시예 41: G-CSFR 수용체로부터의 변이체 세포외 도메인 및 EPO 수용체의 세포내 도메인을 갖는 키메라 수용체의 작제 및 기능적 평가**

[0819] 본 발명자들은 인간 EPO 수용체의 전체 세포내 도메인에 융합된 인간 G-CSFR의 세포외 도메인(134 변이체) 및 막관통 도메인을 함유하는 GEPOR 134 ECD(도 60)라고 불리는 키메라 수용체를 합성하였다. 키메라 수용체 소단위는 인간 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 형질도입하는 데 사용되는 렌티바이러스 벡터에 암호화되었다. 형질도입된 T 세포(및 형질도입되지 않은 대조군 T 세포)를 유세포 분석법으로 분석하여 GEPOR 134 ECD의 세포 표면 발현을 검출하였다. T 세포 확장을 유도하는 GEPOR 134 ECD의 능력을 시험관내에서 평가하였다. GEPOR 134 ECD에 의해 매개되는 생화학적 신호 전달 사건을 STAT5 및 기타 신호 전달 매개체에 대한 포스포-특이적 항체를 사용하여 웨스턴 블롯으로 평가하였다.

[0820] **방법**

[0821] 일반적으로, 본 발명자들은 실시예 39에 설명된 것과 유사한 방법을 따랐지만, 실험은 EPO-R 및 IL-2 신호전달 메커니즘에 초점을 맞추도록 개작되었다.

[0822] 인간 T 세포를 GEPOR 134 ECD를 발현하도록 조작하였고, 형질도입 효율을 실시예 39에 따라 제8일에 유세포 분석법에 의해 결정하였다.

[0823] T 세포를 IL-2(300IU/㎖), 130a1 G-CSF(100ng/㎖), IL-2+130a1 G-CSF(각각 300IU/㎖ 및 100ng/㎖) 또는 배지 단독(사이토카인 첨가하지 않음)에서 16일 동안 확장시키고, 배지 및 제시된 사이토카인을 2일마다 새로 교체하였다. 형질도입되지 않은 T 세포의 경우, 307 G-CSF에 130a1 G-CSF를 첨가하여 실험의 또 다른 아암에 대한 대조군 역할을 하였고(표시되지 않음); 이러한 실험적 편리함의 사용은 130a1 G-CSF 및 307 G-CSF 모두 형질도입되지 않은 T 세포에서 증식 또는 다른 신호전달 사건을 를 유도하지 않았다는 사실로 인해서 정당화되었다. 확장 4일, 8일, 12일 및 16일에 Cytek™ Aurora 유세포 분석기를 사용하여 T 세포를 계수하였다.

[0824] 웨스턴 블롯 실험을 위해, 세포를 IL-2(300IU/㎖)에서 18일 동안 확장시킨 다음, 상기와 같이 세척하고 완전 TexMACS 배지에서 밤새 정치시켰다. 다음날, 세포를 배지 단독 또는 배지와 IL-2(300IU/㎖) 또는 130a1 G-CSF(100ng/㎖)로 20분 동안 37℃에서 자극하였다. 실시예 39에 기재된 바와 같이 세포질 및 핵 분획을 준비하고 웨스턴 블롯을 수행하였다. 1차 항체는 셀 시그널링 테크놀로지즈사로부터 입수하였다: 포스포-Stat5(Tyr694)(C11C5) 토끼 mAb #9359, 히스톤 H3(96C10) 마우스 mAb #3638, 포스포-JAK2(Tyr1007/1008) 항체 #3771, 포스포-Akt(Ser473)(D9E) XP® 토끼 mAb #4060, 포스포-p44/42 MAPK(Erk1/2)(Thr202/Tyr204) 항체 #9101 및 β-액틴(13E5) 토끼 mAb #4970.

[0825] **결과**

[0826] 유세포 분석법(도 69)에 따르면, GEPOR 134 ECD를 암호화하는 렌티바이러스 벡터가 형질도입된 CD3+ T 세포의 큰 비율(96.5%)이 G-CSFR ECD를 발현한 반면, 형질도입되지 않은 T 세포는 그렇지 않았다.

[0827] 따라서, GEPOR 134 ECD는 조작된 T 세포의 표면에서 발현될 수 있다.

[0828] 도 70에 도시된 바와 같이, GEPOR 134 ECD를 암호화하는 렌티바이러스 벡터가 형질도입된 T 세포는 IL-2 또는 IL-2+130a1 G-CSF를 함유하는 배지에서 양호하게 확장되었으며 130a1 G-CSF 단독에 반응하여 중간 수준의 확장을 나타내었다(도 64A). 형질도입되지 않은 T 세포는 IL-2에 반응하여 양호하게 확장되었지만 130a1 G-CSF+307

G-CSF에는 반응하지 않았다(도 70B). 어느 배양물도 배지 단독에서는 양호하게 확장되지 않았다.

[0829] 따라서, 이 확장 검정에 의해 평가된 바와 같이, GEPOR 134 ECD는 T 세포에서 중간 정도의 성장 신호를 유도하는 것으로 보인다.

[0830] 도 71에 나타난 바와 같이, 형질도입되지 않은 T 세포와 GEPOR 134 ECD를 발현하는 T 세포 둘 다에서 IL-2는 STAT5, Akt 및 ERK1/2의 인산화를 유도하였고; IL-2에 반응하는 JAK2의 명백한 인산화는 항-포스포-JAK2 항체와 포스포-JAK3의 교차 반응성으로 인한 것이다(화살표로 표시된 실제 JAK2와 비교한 단백질 크기의 차이를 주목하기 바란다). GEPOR 134 ECD를 발현하는 T 세포에서, 130a1 G-CSF는 STAT5, JAK2(화살표) 및 ERK1/2의 인산화 및 Akt의 약한 인산화를 유도하였다. 예상한 바와 같이, 130a1 G-CSF는 형질도입되지 않은 T 세포에서 어떠한 생화학적 신호전달 사건도 유도하지 않았다.

[0831] 따라서, GEPOR 134 ECD는 IL-2에 의해 유도된 것과 유사하지만 Akt의 인산화가 더 약하고 JAK3 대신 JAK2의 예상되는 활성화와 함께 생화학적 신호전달 사건을 유도한다.

[0832] **실시예 42: G-CSFR 수용체로부터의 변이체 세포외 도메인 및 인터페론 알파 수용체 2의 세포내 도메인을 갖는 키메라 수용체의 작제 및 기능적 평가**

[0833] 본 발명자들은 인간 인터페론 수용체 알파 2의 세포내 도메인의 일부에 융합된 인간 G-CSFR의 세포외 도메인(134 변이체), 막관통 도메인, Box 1 및 2 영역을 함유하는 GIFNAR 134 ECD(도 60)라는 불리는 키메라 수용체를 합성하였다. 키메라 수용체 소단위는 인간 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 형질도입하는 데 사용되는 렌티바이러스 벡터에 암호화되었다. 형질도입된 T 세포(및 형질도입되지 않은 대조군 T 세포)를 유세포 분석법으로 분석하여 GIFNAR 134 ECD의 세포 표면 발현을 검출하였다. T 세포 확장을 유도하는 GIFNAR 134 ECD의 능력을 시험관내에서 평가하였다. GIFNAR 134 ECD에 의해 매개되는 생화학적 신호 전달 사건을 STAT1, STAT2 및 기타 신호 전달 매개체에 대한 포스포-특이적 항체를 사용하여 웨스턴 블롯으로 평가하였다.

[0834] **방법**

[0835] 일반적으로, 본 발명자들은 실시예 39에 설명된 것과 유사한 방법을 따랐지만, 실험은 IFN 알파 신호전달 메커니즘에 초점을 맞추도록 개작되었다.

[0836] 인간 T 세포를 GIFNAR 134 ECD를 발현하도록 조작하였고, 형질도입 효율을 실시예 39에 따라 제8일에 유세포 분석법에 의해 결정하였다.

[0837] T 세포를 IL-2(300IU/㎖), 130a1 G-CSF(100ng/㎖), IL-2+130a1 G-CSF(각각 300IU/㎖ 및 100ng/㎖) 또는 배지 단독(사이토카인 첨가하지 않음)에서 16일 동안 확장시키고, 배지 및 제시된 사이토카인을 2일마다 새로 교체하였다. 확장 4일, 8일, 12일 및 16일에 Cytek™ Aurora 유세포 분석기를 사용하여 T 세포를 계수하였다.

[0838] 웨스턴 블롯 실험을 위해, 세포를 IL-2(300IU/㎖)에서 18일 동안 확장시킨 다음, 상기와 같이 세척하고 완전 TexMACS 배지에서 밤새 정치시켰다. 다음날, 세포를 배지 단독 또는 배지와 IL-2(300IU/㎖), IFNα(300IU/㎖) 또는 130a1 G-CSF(100ng/㎖)로 20분 동안 37℃에서 자극하였다. 실시예 39에 기재된 바와 같이 세포질 및 핵 분획을 준비하고 웨스턴 블롯을 수행하였다. 1차 항체는 셀 시그널링 테크놀로지즈사로부터 입수하였다: 포스포-Stat1(Tyr701)(58D6) 토끼 mAb #9167, 포스포-Stat2(Tyr690)(D3P2P) 토끼 mAb #88410, 히스톤 H3 (96C10) 마우스 mAb #3638, 포스포-JAK1(Tyr1034/1035)(D7N4Z) 토끼 mAb #74129, 포스포-Akt(Ser473) (D9E) XP® 토끼 mAb #4060, 포스포-S6 리보솜 단백질(Ser235/236) 항체 #2211 및 β-액틴(13E5) 토끼 mAb #4970.

[0839] **결과**

[0840] 유세포 분석법(도 72)에 따르면, GIFNAR 134 ECD를 암호화하는 렌티바이러스 벡터가 형질도입된 CD3+ T 세포의 큰 비율(97.9%)이 G-CSFR ECD를 발현한 반면, 형질도입되지 않은 T 세포는 그렇지 않았다.

[0841] 따라서, GIFNAR 134 ECD는 조작된 T 세포의 표면에서 발현될 수 있다.

[0842] 도 73에 도시된 바와 같이, GIFNAR 134 ECD를 암호화하는 렌티바이러스 벡터가 형질도입된 T 세포는 IL-2를 함유하는 배지에서 양호하게 확장되었지만 130a1 G-CSF 단독 또는 IL-2+130a1 G-CSF를 함유하는 배지에서는 현저하게 감소된 확장을 나타내었으며; 실제로, 이들 후자의 두 조건 하에서의 확장 수준은 배지 단독에서 관찰된 것보다 열등한 것으로 나타났다(도 73B). 형질도입되지 않은 T 세포는 IL-2에 반응하여 양호하게 확장되었지만 130a1 G-CSF에는 반응하지 않았다(도 73A). 어느 배양물도 배지 단독에서는 양호하게 확장되지 않았다.

[0843] 따라서, GIFNAR 134 ECD는 이러한 확장 검정에 의해 평가된 바와 같이 T 세포에서 성장 저해 신호를 유도하는 것으로 보인다.

[0844] 도 74에 나타난 바와 같이, 형질도입되지 않은 T 세포 및 GIFNAR 134 ECD를 발현하는 T 세포 둘 다에서, IL-2는 STAT1의 약한 인산화 및 JAK1, Akt 및 S6의 일반적인 수준의 인산화를 유도하였다. 형질도입되지 않은 T 세포 및 GIFNAR 134 ECD를 발현하는 T 세포 둘 다에서, IFNα는 JAK1, Akt 또는 S6의 명백한 인산화 없이 STAT1 및 STAT2의 강한 인산화를 유도하였다. GIFNAR 134 ECD를 발현하는 T 세포에서, 130a1 G-CSF는 Akt 또는 S6의 명백한 인산화 없이 STAT1, STAT2 및 JAK1의 강한 인산화를 유도하였다. 130a는 형질도입되지 않은 T 세포에서 어떠한 생화학적 신호전달 사건도 유도하지 않았다.

[0845] 따라서, GIFNAR 134 ECD는 IFNα에 의해 유도된 것과 유사한 생화학적 신호 전달 사건을 유도한다.

[0846] **실시예 43: G-CSFR 수용체로부터의 변이체 세포외 도메인 및 인터페론 감마 수용체로부터의 세포내 신호전달 도메인을 갖는 키메라 수용체의 작제 및 기능적 평가**

[0847] 본 발명자들은 GIFNGR-1 307 ECD 및 GIFNGR-2 307 ECD라고 불리는 두 개의 키메라 수용체를 합성하였다(도 60). GIFNGR-1 307 ECD는 인간IFNγR2의 Box 1 및 2 영역과 인간 IFNγR1의 세포내 도메인의 STAT1 결합 부위에 융합된 인간 G-CSFR의 세포외 도메인(307 변이체) 및 막관통 도메인을 포함한다. GIFNGR-2 307 ECD는 인간 IFNγR1의 세포내 도메인의 STAT1 결합 부위에 융합된 인간 G-CSFR의 세포외 도메인(307 변종), 막관통 도메인, 박스 1 및 2 영역을 포함한다. 키메라 수용체 소단위는 인간 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 형질도입하는 데 사용되는 별개의 렌티바이러스 벡터에 암호화되었다. 형질도입된 T 세포(및 형질도입되지 않은 대조군 T 세포)를 유세포 분석법으로 분석하여 GIFNGR-1 307 ECD 및 GIFNGR-2 307 ECD의 세포 표면 발현을 검출하였다. T 세포 확장을 유도하는 GIFNGR-1 307 ECD 및 GIFNGR-2 307 ECD의 능력을 시험관내에서 평가하였다. GIFNGR-1 307 ECD 및 GIFNGR-2 307 ECD에 의해 매개되는 생화학적 신호 전달 사건을 STAT1 및 기타 신호 전달 매개체에 대한 포스포-특이적 항체를 사용하여 웨스턴 블롯으로 평가하였다.

[0848] **방법**

[0849] 일반적으로, 본 발명자들은 실시예 39에 설명된 것과 유사한 방법을 따랐지만, 실험은 IFN 감마 신호전달 메커니즘에 초점을 맞추도록 개작되었다.

[0850] 인간 T 세포에 GIFNGR-1 307 ECD 또는 GIFNGR-2 307 ECD를 암호화하는 렌티바이러스 벡터를 형질도입하였다. 또한, 일부 T 세포에 GIFNGR-1 307 ECD 및 G2R-3 134 ECD, 또는 GIFNGR-2 307 ECD 및 G2R-3 134 ECD를 암호화하는 렌티바이러스 벡터로 공동 형질도입하였다. G2R-3 134 ECD는 Myc 에피토프(EQKLISEEDL)를 사용하여 N 말단에 태깅된 반면, GIFNGR-1 307 ECD 및 GIFNGR-2 307 ECD는 Flag 에피토프(DYKDDDDK)를 사용하여 N-말단에 태깅되었는데, 이것은 상이한 수용체 소단위가 유세포 분석법으로 구별되게 한다.

[0851] 형질도입 효율은 실시예 39에 따라 제8일에 유세포 분석법으로 측정하였다. Flag 및 Myc 태그를 각각 BV421-접합 항체 및 AlexaFluorTM 488-접합 항체를 사용하여 검출하였다.

[0852] T 세포를 IL-2(300IU/㎖), 130a1 G-CSF 및/또는 307(각각 100ng/㎖), IL-2+130a1 G-CSF(300IU/㎖ 및 100ng/㎖, respectively), IL-2+307 G-CSF(300IU/㎖ 및 100ng/㎖, respectively) 또는 배지 단독(사이토카인 첨가하지 없음)에서 18일 동안 확장시켰다. 배지 및 제시된 사이토카을은 2일마다 새로 교체하였다. 확장 4일, 8일, 12일 및 16일에 Cytek™ Aurora 유세포 분석기를 사용하여 T 세포를 계수하였다.

[0853] BrdU 혼입 검정을 위해, IL-2에서 확장된 T 세포를 제12일에 수거하고 PBS에서 2회, 완전 TexMACS 배지에서 1회 세척하였다. 세포를 배지 단독 또는 배지 단독 또는 배지와 IL-2(300IU/㎖), IFNγ(100ng/㎖), IL-2+IFNγ(각각 300IU/㎖ 및 100ng/㎖), 130a1 G-CSF(100ng/㎖), 307 G-CSF(100ng/㎖), 130a1 G-CSF+307 G-CSF(각각 100ng/㎖), 130a1 G-CSF+IFNγ(각각 100ng/㎖) 또는 307 G-CSF+IL-2 (각각 100ng/㎖ 및 300IU/㎖)를 함유하는 새로운 완전 TexMACS 배지 재플레이팅하였다. 세포를 37℃, 5% CO_2에서 48시간 동안 인큐베이션시켰다. BrdU 검정을 실시예 39에 기재된 바와 같이 수행하였다.

[0854] 웨스턴 블롯 실험을 위해, T 세포를 IL-2(300IU/㎖)에서 18일 동안 확장시킨 다음, 상기와 같이 세척하고 완전 TexMACS 배지에서 밤새 정치시켰다. 다음날, 세포를 배지 단독 또는 배지와 IL-2(300IU/㎖), IFNγ(100ng/㎖) 또는 307 G-CSF(100ng/㎖)로 20분 동안 37℃에서 자극하였다. 실시예 39에 기재된 바와 같이 세포질 및 핵 분획을 준비하고 웨스턴 블롯을 수행하였다. 1차 항체는 셀 시그널링 테크놀로지즈사로부터 입수하였다: 포스포-Stat1(Tyr701)(58D6) 토끼 mAb #9167, 히스톤 H3(96C10) 마우스 mAb #3638, 포스포-JAK2(Tyr1007/1008) 항체

#3771, 포스포-Akt(Ser473)(D9E) XP® 토끼 mAb #4060, 포스포-S6 리보솜 단백질(Ser235/236) 항체 #2211 및 β-액틴(13E5) 토끼 mAb #4970.

[0855] **결과**

[0856] 유세포 분석법(도 75)에 따르면 GIFNGR-1 307 ECD를 암호화하는 렌티바이러스 벡터가 형질도입된 CD3+ T 세포의 큰 비율(93.8%)이 G-CSFR 307 ECD에서 Flag 에피토프를 발현하였다(도 75A). 마찬가지로, G2R-3 134 ECD를 암호화하는 렌티바이러스 벡터가 형질도입된 CD3+ T 세포의 큰 비율(51.7%)이 G-CSFR 134 ECD에서 Myc 에피토프를 발현하였다(도 75B). GIFNGR-1 307 ECD 및 G2R-3 134 ECD를 암호화하는 렌티바이러스 벡터가 공동 형질도입된 T 세포의 경우, 32.0%가 각각 G-CSFR 307 및 134 ECD에서 Flag 및 Myc 에피토프 둘 다를 공발현하였다(도 69C). 예상된 바와 같이, 형질도입되지 않은 T 세포는 Myc 또는 Flag 에피토프를 발현하지 않았다(도 75D).

[0857] 따라서, GIFNGR-1 307 ECD는 G2R-3 134 ECD가 있거나 없는 조작된 T 세포의 표면에서 발현될 수 있다.

[0858] GIFNGR-2 307 ECD를 사용하여 유사한 유세포 분석 결과를 얻었다(도 76). GIFNGR-2 307 ECD를 암호화하는 렌티바이러스 벡터가 형질도입된 CD3+ T 세포의 큰 비율(97.6%)이 G-CSFR 307 ECD에서 Flag 에피토프를 발현하였다(도 76A). 마찬가지로, G2R-3 134 ECD를 암호화하는 렌티바이러스 벡터가 형질도입된 CD3+ T 세포의 큰 비율(51.7%)이 G-CSFR 134 ECD에서 Myc 에피토프를 발현하였다(도 76B; 이는 도 75B에서와 동일한 데이터임). GIFNGR-2 307 ECD 및 G2R-3 134 ECD를 암호화하는 렌티바이러스 벡터가 공동 형질도입된 T 세포의 경우, 32.6%가 각각 G-CSFR 307 및 134 ECD에서 Flag 및 Myc 에피토프 둘 다를 공발현하였다(도 76C). 예상된 바와 같이, 형질도입되지 않은 T 세포는 Myc 또는 Flag 에피토프를 발현하지 않았다(도 76D; 이는 도 75D에서와 동일한 데이터임).

[0859] 따라서, GIFNGR-2 307 ECD는 G2R-3 134 ECD가 있거나 없는 조작된 T 세포의 표면에서 발현될 수 있다.

[0860] 도 71에 도시된 바와 같이, GIFNGR-1 307 ECD를 암호화하는 렌티바이러스 벡터가 형질도입된 T 세포는 IL-2 또는 IL-2+307 G-CSF를 함유하는 배지에서 양호하게 확장되었지만 307 G-CSF 단독 또는 배지 단독에서는 그렇지 않았다(도 77B). GIFNGR-1 307 ECD 및 G2R-3 134 ECD를 암호화하는 렌티바이러스 벡터가 공동 형질도입된 T 세포는 IL-2 또는 IL-2+130a1 G-CSF를 함유하는 배지에서 양호하게 확장되었다(도 77C). 이들 T 세포를 130a1 G-CSF+307 G-CSF에서 배양한 경우, 제12일에 감소된 확장을 나타내었고 제16일에는 증가하였다(도 77C). 형질도입되지 않은 T 세포는 IL-2에 반응하여 양호하게 확장되었지만 130a1 G-CSF+307 G-CSF에는 반응하지 않았다(도 77A). T 세포주 중 어느 것도 배지 단독에서 양호하게 확장되지 않았다.

[0861] 따라서, GIFNGR-1 307 ECD는 이러한 확장 검정에 의해 평가된 바와 같이 T 세포 성장에 무시할 만한 효과를 갖는 것으로 보인다.

[0862] 도 78에 나타낸 바와 같이, GIFNGR-2 307 ECD를 암호화하는 렌티바이러스 벡터가 형질도입된 T 세포는 IL-2를 함유하는 배지에서는 양호하게 확장되었지만 307 G-CSF 단독, IL-2+307 G-CSF를 함유하는 배지 또는 배지 단독에서는 그렇지 않았다(도 78B). GIFNGR-2 307 ECD 및 G2R-3 134 ECD를 암호화하는 렌티바이러스 벡터가 공동 형질도입된 T 세포는 IL-2 또는 IL-2+130a1 G-CSF를 함유하는 배지에서 양호하게 확장되었다(도 78C). 이들 T 세포는 130a1 G-CSF+307 G-CSF에서 배양된 경우 확장에 실패하였다(도 78C). 형질도입되지 않은 T 세포는 IL-2에 반응하여 양호하게 확장되었지만 130a1 G-CSF+307 G-CSF에는 반응하지 않았다(도 78A, 이는 도 77A와 동일한 데이터를 나타냄). T 세포주 중 어느 것도 배지 단독에서 양호하게 확장되지 않았다.

[0863] 따라서, GIFNGR-2 307 ECD는 이러한 확장 검정에 의해 평가된 바와 같이 T 세포 성장을 저해하는 것으로 보인다.

[0864] 도 79에 제시된 바와 같이, 형질도입되지 않은 CD4+ 및 CD8+ T 세포는 IL-2, IL-2+IFNγ 및 307 G-CSF+IL-2에 반응하여 증식(BrdU 혼입)을 나타내었다(도 79A).

[0865] G2R-3 134 ECD 단독을 발현하는 CD4+ 및 CD8+ T 세포는 IL-2, IL-2+IFNγ, 130a1 G-CSF, 130a1 G-CSF+307 G-CSF, 130a1 G-CSF+IFNγ 및 307 G-CSF+IL-2에 반응하여 증식을 나타내었다(도 79B, 도 79C).

[0866] GIFNGR-1 307 ECD 단독을 발현하는 CD4+ 및 CD8+ T 세포는 IL-2, IL-2+IFNγ, 및 307 G-CSF+IL-2에 반응하여 증식을 나타내었다(도 79B, 도 79C).

[0867] GIFNGR-1 307 ECD 및 G2R-3 134 ECD를 공발현하는 CD4+ 및 CD8+ T 세포는 IL-2, IL-2+IFNγ, 130a1 G-CSF, 130a1 G-CSF+307 G-CSF, 130a1 G-CSF+IFNγ 및 307 G-CSF+IL-2에 반응하여 증식을 나타내었다(도 79B, 도

79C). 이들은 또한 307 G-CSF 단독에 반응하여 약한 증식을 나타내었다(도 79B, 도 79C).

[0868] 따라서, GIFNGR-1 307 ECD는 CD8+ 및 CD4+ T 세포 증식에 대해 중립적이거나 무시할 수 있는 효과를 갖는 것으로 보인다.

[0869] 도 80은 GIFNGR-2에 대한 증식 결과를 나타낸다. 형질도입되지 않은 T 세포 및 G2R-3 134 ECD 단독을 발현하는 CD4+ 및 CD8+ T 세포에 대한 데이터는 도 79에 나타낸 것과 동일하므로 다시 설명하지 않는다.

[0870] GIFNGR-2 307 ECD 단독을 발현하는 CD4+ 및 CD8+ T 세포는 IL-2, IL-2+IFNɣ, 307 G-CSF, 130a1 G-CSF+307 G-CSF, 및 307 G-CSF+IL-2에 반응하여 증식을 나타내었다(도 80B, 도 80C).

[0871] GIFNGR-2 307 ECD 및 G2R-3 134 ECD를 공발현하는 CD4+ 및 CD8+ T 세포는 IL-2, IL-2+IFNɣ, 130a1 G-CSF, 307, 130a1 G-CSF+307 G-CSF, 130a1 G-CSF+IFNɣ 및 307 G-CSF+IL-2에 반응하여 증식을 나타내었다(도 80B, 도 80C).

[0872] 따라서, 장기간 배양에서 T 세포 확장을 저해함에도 불구하고(도 78), GIFNGR-2 307 ECD는 BrdU 검정에 의해 평가된 바와 같이 CD4+ 및 CD8+ T 세포 증식을 향상시키는 것으로 보인다.

[0873] 도 81에 나타난 바와 같이, 형질도입되지 않은 T 세포 및 GIFNGR-1 307 ECD 또는 GIFNGR-2 307 ECD를 발현하는 T 세포 둘 다에서, IL-2는 STAT1의 약한/무시할 만한 인산화, Akt의 강한 인산화 및 (이러한 특정 실험에서는) S6의 약한 인산화를 유도하였다. IFNɣ는 이러한 신호 사건을 유도하지 않는 것으로 보였다. GIFNGR-1 307 ECD 또는 GIFNGR-2 307 ECD를 발현하는 T 세포에서 307 G-CSF는 STAT1의 강한 인산화를 유도하였다. GIFNGR-2 307 ECD를 발현하는 T 세포에서, 307 G-CSF는 또한 JAK2 및 Akt의 강한 인산화를 유도하였다.

[0874] 따라서, GIFNGR-1 307 ECD 및 GIFNGR-2 307 ECD는 STAT1의 티로신 인산화를 유도하지만 천연 IFNɣ 수용체 신호와는 다른 방식에서 다르다.

[0875] **실시예 44: 키메라 수용체 G12/2R-1 134 ECD 또는 G2R-3 134 ECD 및 메소텔린-특이적 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 이시스트론성 작제물의 작제 및 기능적 평가**

[0876] 본 발명자들은 CAR_T2A_G2R-3-134-ECD, G2R-3-134-ECD_T2A_CAR, CAR_T2A_G12/2R-1-134-ECD, 및 G12/2R-1-134-ECD_T2A_CAR이라고 불리는 이시스트론성 작제물뿐만 아니라 메소텔린 CAR 단독의 발현을 유도하는 일시스트론성 작제물을 합성하였다. 이시스트론성 작제물의 명명법은 유전자 분절이 5'에서 3' 단부로 정렬되는 방식을 나타낸다. 예를 들어, CAR_T2A_G2R-3-134-ECD는 (5'에서 3'로) 메소텔린-특이적 CAR, T2A 리보솜 스킵 요소 및 G2R-3 134 ECD를 암호화한다. 이시스트론성 작제물은 T2A 리보솜 스킵 요소에 의해 분리된 메소텔린 CAR 및 G2R-3 134 ECD 또는 G12/2R-1 ECD를 암호화하는 단일 렌티바이러스 벡터를 사용하여 발현되었다. 이러한 이시스트론성 작제물을 사용하여 인간 CD4+ 및 CD8+ T 세포에 형질도입하였고, 형질도입된 T 세포(및 형질도입되지 않은 대조군 T 세포)를 유세포 분석법으로 분석하여 G-CSFR ECD 및 CAR의 세포 표면 발현을 검출하였다. G2R-3 134 ECD 또는 G12/2R-1 134 ECD를 통해 T 세포 증식을 유도하는 130a1 G-CSF의 능력을 시험관 내에서 평가하였다. T 세포를 또한 T 세포와 메소텔린-양성 인간 난소암 세포주 OVCAR3의 공배양에 의해서 CAR 활성화에 반응하는 IFNɣ, TNFα 및 IL-2뿐만 아니라 세포 표면 마커 CD69 및 CD137의 발현을 측정하기 위해 세포내 유세포 분석법으로 평가하였다.

[0877] **방법**

[0878] 일반적으로, 본 발명자들은 실시예 31에 기재된 것과 유사한 방법을 따랐지만, 실험은 하기에 기재된 바와 같이 메소텔린 CAR 및 조작된 키메라 사이토카인 수용체 G2R-3 134 ECD 및 G12/2R-1 134 ECD의 공발현 및 기능성에 초점을 맞추도록 개작되었다.

[0879] G-CSFR ECD 및 메소텔린 CAR을 검출하기 위한 유세포 분석을 위해, 세포를 IL-7 및 IL-15(각각 10ng/㎖)에서 8일 동안 확장시켰다. 세포를 CD3(BV750-접합), CD4(PE-접합), CD8(PerCP-접합) 및 G-CSFR ECD(APC-접합)에 특이적인 항체뿐만 아니라 재조합 Fc-태깅된 메소텔린 단백질(FITC-접합) 및 efluor506™ viability dye와 함께 인큐베이션시켰다.

[0880] 세포내 유세포 분석을 위해, 형질도입된 T 세포를 130a1 G-CSF에서 13일 동안 확장시켰다. OVCAR3 세포(ATCC)를 0.01㎎/㎖ 소 인슐린 및 20% 우태아 혈청을 함유하는 ATCC-제형 RPMI-1640 배지에서 성장시켰다. T 세포를 세척하고, OVCAR3 세포(효과기:표적 세포 비율 2:1)의 존재 또는 부재 하에서 완전 TexMACS 배지에 13시간 동안 섭씨 37도, 5% CO2에서 재플레이팅하였다. 마지막 4시간의 인큐베이션을 단백질 수송 저해제(Brefeldin A)의 존재

하에 수행하였다. 인큐베이션이 끝나면, 세포를 Zombie NIR™ Fixable Viability Kit로 염색한 후 CD3(BV510-접합), CD4(AlexaFluor™ 700-접합), G-CSFR(APC-접합), CD69(BV785-접합) 및 CD137(BV605-접합)뿐만 아니라 재조합 메소텔린(FITC-접합) 및 Fc 블록에 대한 항체의 칵테일로 염색하였다. 그 다음 세포를 고정하고 투과화하고(BD Cytofix/Cytoperm™ 세트) 사이토카인 IFNγ(BV650-접합), TNFα(PECy7-접합) 및 IL-2(PE-CF594-접합)에 대해 염색하였다. Cytek Aurora 유세포 분석기를 사용하여 세포를 분석하였다.

[0881] **결과**

[0882] 유세포 분석법(도 82 및 83)에 따르면, 형질도입되지 않은 세포는 G-CSFR ECD 및 메소텔린 CAR의 발현이 미미한 것으로 나타난 반면(도 66A 및 67A), 메소텔린 CAR 작제물 단독을 암호화하는 렌티바이러스가 형질도입된 CD3+ T 세포의 55.3%가 CAR을 발현하였고(도 82B 및 83B), G2R-3 134 ECD를 암호화하는 렌티바이러스가 형질도입된 T 세포의 13.1%가 G-CSFR ECD를 발현하였다(도 82C). CAR_T2A_G2R-3-134ECD를 암호화하는 렌티바이러스가 형질도입된 T 세포의 26.7%가 G-CSFR ECD 및 메소텔린 CAR을 모두 발현한 반면(도 82D), G2R-3-134ECD_T2A_CAR을 암호화하는 렌티바이러스가 형질도입된 CD3+ T 세포의 25.2%는 G-CSFR ECD 및 메소텔린 CAR 둘 다를 발현하였다(도 82E). 마찬가지로, G12/2R-1 134 ECD를 암호화하는 렌티바이러스만 형질도입된 T 세포의 13.1%가 G-CSFR ECD를 발현하였다(도 83C). CAR_T2A_G12/2R-1-134ECD를 암호화하는 렌티바이러스가 형질도입된 T 세포의 30.8%는 G-CSFR ECD 및 메소텔린 CAR 둘 다를 발현하였고(도 83D), G12/2R-1-134ECD_T2A_CAR을 암호화하는 렌티바이러스가 형질도입된 T 세포의 36.0%는 G-CSFR ECD 및 메소텔린 CAR 둘 다를 발현하였다(도 83E).

[0883] 따라서, 메소텔린 CAR+G2R-3 134 ECD 또는 메소텔린 CAR+G12/2R-1 134 ECD를 암호화하는 이시스트론성 렌티바이러스 벡터는 CAR 및 키메라 시토카인 수용체 둘 다의 세포 표면 발현을 유발할 수 있다.

[0884] BrdU 혼입 검정(도 84)에 따르면, 형질도입되지 않은 T 세포 또는 메소텔린 CAR 단독을 발현하도록 조작된 T 세포는 IL-2에 대한 반응으로 증식하였고, 130a1 G-CSF 또는 배지 단독에 대한 반응한 증식은 무시할 수 있었다. G2R-3 134 ECD 단독을 발현하는 T 세포는 IL-2 또는 130a1 G-CSF에 반응하여 증식하였다(도 84B). CAR_T2A_G2R-3-134ECD, CAR_T2A_G12/2R-1-134ECD, 또는 G12/2R-1-134ECD_T2A_CAR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터가 형질도입된 T 세포는 IL-2 또는 130a1 G-CSF에 반응하여 증식하였다. T 세포 집단 중 어느 것도 배지 단독에 반응하여 유의미한 증식을 나타내지 않았다.

[0885] 따라서, G2R-3 134 ECD 및 G12/2R-1 134 ECD는 이들이 CAR의 상류 또는 하류에 배열되는지 여부에 관계없이 메소텔린 CAR과 함께 이시스트론성 작제물의 일부로서 공발현될 때 이들의 기능적 특성을 유지한다.

[0886] 세포내 유세포 분석법(도 85)에 따르면, 일시스트론성 메소텔린 CAR을 발현하는 T 세포는 OVCAR3 세포로의 자극에 반응하여 사이토카인 IFNγ, TNFα 및 IL-2 및 활성화 마커 CD69 및 CD137의 발현을 상향조절하였다(도 85A). 이에 반해, G12/2R-1 134 ECD를 단독으로 발현하도록 조작되고 OVCAR3 세포로 자극된 T 세포에서는 IFNγ, TNFα, IL-2, CD69 또는 CD137의 발현 변화가 관찰되지 않았다(도 85B). 이시스트론성 작제물 CAR_T2A_G2R-3-134ECD를 발현하는 T 세포는 OVCAR3 세포에 반응하여 IFNγ, TNFα, IL-2, CD69 및 CD137의 증가된 발현을 나타내었다(도 85C). 마찬가지로, G2R-3-134ECD_T2A_CAR, CAR_T2A_G12/2R-1-134ECD 또는 G12/2R-1-134ECD_T2A_CAR 작제물을 발현하는 T 세포는 OVCAR3 세포로의 자극에 반응하여 이들 사이토카인 및 마커의 발현 증가를 나타내었다(도 85D, 도 85E 및 도 85F).

[0887] 따라서, IFNγ, TNFα 및 IL-2의 상향조절 및 OVCAR3 세포에 대한 동족 항원 자극에 반응한 활성화 마커 CD69 및 CD137에 의해 입증되는 바와 같이, 메소텔린 CAR은 G2R-3 134 ECD 또는 G12/2R-1 134 ECD를 갖는 이시스트론성 렌티바이러스 작제물의 일부로 발현될 때 이의 기능적 특성을 유지한다. CAR은 G2R-3 134 ECD 또는 G12/2R-1 134 ECD의 상류 또는 하류에 배열되었을 때 기능적이었다.

[0888] **실시예 45: 메소텔린-특이적 CAR 및 IL-2 모방(emulating) 키메라 사이토카인 수용체를 공발현하는 인간 T 세포는 메소텔린-발현 표적 세포에 대한 세포독성을 나타낸다.**

[0889] 공발현되는 경우 CAR 작제물 및 키메라 사이토카인 수용체가 예상되는 기능적 특성을 나타내고 G2R-3 134 ECD와 같은 키메라 사이토카인 수용체의 자극이 적절한 CAR 항원을 발현하는 표적 세포에 대한 CAR-매개 세포독성을 향상시킨다는 것을 나타내기 위해서 실험을 수행하였다. 다음 실시예는 G2R-3 134 ECD와 공발현된 메소텔린 특이적 CAR을 사용한다.

[0890] **방법**

[0891] 반딧불이 루시퍼라제, pCCL Luc 퓨로마이신을 암호화하는 포유동물 발현 전달 플라스미드를 표준 인산칼슘 형질주입 프로토콜 및 2세대 패키징 벡터(애드진사)를 사용하여 렌티바이러스 벡터에 도입한다. 메소텔린-발현 OVCAR3 세포주를 루시퍼라제-암호화 렌티바이러스에 형질도입하고, 퓨로마이신(1.5㎍/㎖, 시그마사, 카탈로그 번호 P8833)에 대한 내성에 대해 2주에 걸쳐 선택하여 세포독성 검정에서 표적 세포 집단으로 사용하기 위한 퓨로마이신-내성 세포주를 생성시킨다.

[0892] 루시퍼라제-발현 표적 OVCAR3 계통을 96웰 플레이트(코닝사, 카탈로그 번호 3917)에 웰당 100㎕, 2×10^4개 세포로 시딩하고 밤새 인큐베이션시켜 플레이트에 부착되도록 하였다. 인간 PBMC-유래 T 세포를 메소텔린-특이적 CAR을 단독으로 또는 G2R-3 134 ECD와 함께 발현하도록 렌티바이러스로 형질도입하였다. T 세포를 96웰 플레이트에 플레이팅하고(웰당 100㎕) 2배 연속 희석물로 분할하여 20:1에서 0.625:1까지의 효과기 대 표적(E:T) 비율 범위를 달성한다. 그 다음 희석된 T 세포 현탁액을 부착성 종양 세포 배양물에 첨가하여 총 부피 200㎕를 달성한다. IL-2(300IU/㎖), 130a1 G-CSF(100ng/㎖) 또는 PBS를 일부 웰에 첨가하여 IL-2 또는 130a1 G-CSF에 의해 세포독성이 향상되는지 여부를 확인한다. 모든 조건을 3회 반복하여 시험한다. 3개 웰의 표적 세포 단독 및 3개 웰의 배지 단독을 플레이팅하여 검정에 대한 최대 및 최소 상대 발광 단위(RLU)를 결정한다. 세포를 5% CO_2, 37℃에서 24 내지 48시간 동안 배양한다.

[0893] 검정 당일, Xenolight™ D-루시페린(퍼킨 엘머사, 카탈로그 번호 122799)의 22㎕ 10X 스톡을 각각의 웰에 첨가하고 플레이트를 암실에서 실온에서 10분 동안 인큐베이션시킨다. 플레이트를 발광 플레이트 판독기(Perkin Elmer Wallac Envision 2104 Multilabel Reader)에서 스캐닝한다. 삼중 웰로부터의 RLU를 평균화하고, 특정 세포독성 백분율을 다음 수학식으로 결정한다: 특정 세포독성 백분율 = 100 x (최대 발광 RLU - 시험 발광 RLU) / (최소 발광 RLU - 최대 발광 RLU). 또한, 표적 세포를 24시간 및 48시간에 세포 사멸의 형태학적 징후에 대해서 영상화한다.

[0894] **예상 결과**

[0895] 메소텔린-특이적 CAR을 발현하는 T 세포는 용량 의존적 방식으로 표적 세포의 용해를 유발한다. IL-2의 첨가에 의해서 표적 세포 용해가 증가하는데, 이는 낮은 E:T 비율에서 사멸이 증가한 것으로 반영된다. G2R-3 134 ECD와 메소텔린-특이적 CAR을 공발현하는 T 세포의 경우, 표적 세포 용해는 130a1 G-CSF의 첨가로 IL-2에서 인지할 수 있는 것과 유사한 정도로 증가한다. 이러한 결과는 G2R-3 134 ECD와 메소텔린 특이적 CAR을 공발현하는 T 세포에서 CAR이 예상된 바와 같이 표적 세포 인식 및 사멸을 매개하고 T 세포의 세포독성이 130a1 G-CSF를 사용한 G2R-3 134 ECD의 자극에 의해 선택적으로 향상될 수 있음을 나타낸다.

[0896] **실시예 46: CAR과 페어링된 제어된 주변분비 신호전달 시스템의 작제 및 기능적 평가**

[0897] 실시예 41에 기재된 방법을 사용하여, CPS 시스템을 G12/2R 134 ECD, IL-18 및 메소텔린-특이적 CAR의 예를 사용하여 CAR과 페어링한다(표 31의 CAR_P2A_G12-2R1-134_T2A_hIL-18이라는 작제물 참조). 이러한 조합 시스템을 시험관내 및 생체내에서 기능적으로 평가한다.

[0898] **방법**

[0899] 3개의 cDNA를 P2A 및 T2A 부위에 의해 분리하여 3개의 단백질이 단일 mRNA 전사체로부터 생성되도록 한다. 이러한 삼시스트론성 작제물을 사용하면, 하나의 cDNA가 다른 것보다 더 높은 수준으로 발현되는 경우가 흔하며, 최적의 구성은 경험적으로 결정되어야 한다. 따라서 적어도 3개의 구성이 작제된다(5'에서 3'로 열거): (a) G12/2R-1 134 ECD, IL-18, Meso CAR; (b) IL-18, G12/2R-1 134 ECD, Meso CAR; 및 (c) Meso CAR G12/2R-1 134 ECD, IL-18(도 82 내지 도 85)(표 31).

[0900] T 세포 형질도입, 확장, 증식, IL-18 분비 및 생화학적 신호전달을 실시예 49와 유사한 방법을 사용하여 평가할 것이다. 메소텔린-양성 종양 세포의 CAR 발현, 인식 및 사멸을 실시예 44와 유사한 방법을 사용하여 평가할 것이다.

[0901] **예상 결과**

[0902] T 세포에 2개의 상이한 렌티바이러스 작제물을 형질도입한다: 하나는 IL-18 및 Meso CAR과 함께 G12/2R-1 134 ECD를 암호화하는 것(본 실시예에서는 $CPS^{2/12+18+}$Meso CAR로 지칭; 표 31의 CAR_P2A_G12-2R1-134_T2A_hIL-18), 그리고 다른 것은 G12/2R-1 134 ECD 및 Meso CAR을 암호화하는 것(표 31)(대조군 역할을 함).

[0903] 유세포 분석법에 따르면, $CPS^{2/12+18+}$Meso CAR 또는 G12/2R-1+Meso CAR을 발현하는 T 세포는 상당한 비율(15 내지 90%)의 T 세포에서 인간 G-CSFR ECD 및 Meso CAR의 공발현을 나타낸다. Meso CAR-발현 T 세포는 실시예 44와 유사하게 메소텔린을 발현하는 표적 세포에 노출될 때 활성화 마커, 예컨대, CD69 또는 CD137의 발현을 상향조절한다.

[0904] BrdU 검정에 따르면, Meso CAR-발현 T 세포는 메소텔린을 발현하는 표적 세포에 반응하여 증식한다.

[0905] IFN-γ ELISA에 따르면, Meso CAR-발현 T 세포는 메소텔린을 발현하는 표적 세포에 반응하여 IFN-γ를 분비한다. IFN-γ 분비는 배양물에 IL-2, IL-2+IL-12 및/또는 130a1 G-CSF를 첨가하여 향상된다. 130a1 G-CSF의 효과는 $CPS^{2/12+18+}$Meso CAR을 발현하는 세포에서 더욱 두드러지는데, 그 이유는 IL-18은 특히 IL-2 및 IL-12 신호와 결합될 때 T 세포에 의한 IFN-γ 분비를 향상시킬 수 있기 때문이다.

[0906] 시험관내 세포독성 검정(실시예 45와 유사)에 따르면, Meso CAR-발현 T 세포는 메소텔린을 발현하는 표적 세포를 사멸시킨다. 이 효과는 IL-2, IL-2+IL-12 및/또는 130a1 G-CSF를 배양물에 첨가함으로써 향상되는데, 이는 IL-2 및 IL-12 둘 다 T 세포의 세포독성을 향상시킬 수 있기 때문이다. 130a1 G-CSF의 효과는 $CPS^{2/12+18+}$Meso CAR을 발현하는 세포에서 더욱 두드러지는데, 그 이유는 IL-18이 IL-2 및 IL-12 신호와 결합될 때 T 세포에 의한 세포독성을 향상시킬 수 있기 때문이다.

[0907] 생체내 종양 퇴행 모델에서, Meso CAR-발현 T 세포는 메소텔린을 발현하는 종양 세포의 퇴행을 유도한다. IL-2가 T 세포의 세포독성을 향상시킬 수 있기 때문에 이러한 효과는 배양물에 IL-2 또는 130a1 G-CSF를 투여함으로써 향상된다. (IL-12는 너무 독성이 강해서 전신적으로 안전하게 투여할 수 없다.) 130a1 G-CSF는 IL-2보다 더 강력한 항종양 효과를 갖는데, 그 이유는 G12/2R 134 ECD로부터의 조합된 IL-2+IL-12 신호가 IL-2 단독보다 더 강력하기 때문이다. 130a1 G-CSF의 효과는 $CPS^{2/12+18+}$Meso CAR을 발현하는 세포에서 훨씬 더 두드러지는데, 그 이유는 IL-18이 IL-2 및 IL-12 신호와 결합될 때 T 세포에 의한 항종양 활성을 향상시키기 때문이다.

[0908] 유세포 분석법 및 면역조직학과 같은 방법에 따르면, $CPS^{2/12+18+}$Meso CAR을 발현하는 T 세포는 (G12/2R-1+Meso CAR을 발현하는 T 세포와 비교하여) 더 강력한 항종양 면역 반응을 유도한다. 이는 종양 미세환경에서 IL-18의 주변분비 효과로 인해 활성화된 숙주 T 세포, NK 세포, 골수 세포 및 다른 세포 유형에 의한 종양 침윤 증가에 의해서 반영된다.

[0909] 따라서, 본 실시예의 실험은 T 세포에 의한 IFN-γ 분비 및 세포 독성와 같은 기능에 대한 IL-18의 자극 효과 및 숙주 면역 세포에 대한 주변분비 효과로 인해 G12/2R-1 단독을 발현하는 T 세포에 비해 $CPS^{2/12+18}$을 발현하는 T 세포의 우수한 효과기 기능을 입증한다.

[0910] **실시예 47: 이중-사이토카인 제어된 주변분비 신호전달 시스템의 작제 및 기능적 평가**

[0911] 만성 신호전달은 세포에 바람직하지 않거나 해로운 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, IL-12 신호에 대한 장기간 또는 만성 노출은 T 세포의 최종 분화를 촉진하여, 증식 가능성 및/또는 지속성을 제한할 수 있다. 따라서, 일부 상황에서는 예를 들어, IL-2 및 IL-12 신호가 별개의 오쏘고널 사이토카인에 의해 제어되는 CPS 시스템을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 방식에서, T 세포는 하나의 사이토카인에 반응하여 증식하도록 유도되고 (예를 들어, IL-2 신호를 모방하기 위해 130a1 G-CSF로 G2R-3을 자극함으로써) 추후에 또 다른 사이토카인에 반응하여 분화하도록 유도된다(예를 들어, IL-12 신호를 모방하기 위해 307 G-CSF로 G12R-1을 자극함으로써). 이러한 제어를 가능하게 하기 위해, 상기 실시예에 기재된 방법을 사용하여 G2R-3 134 ECD, G12R-1 307 ECD 및 IL-18을 암호화하는 삼시스트론성 벡터($CPS^{2+12+18}$이라고 함)로 구성된 CPS 시스템을 작제하고 평가하였다. 이러한 조합 시스템을 시험관내 및 생체내에서 기능적으로 평가한다.

[0912] **실시예 48: 다른 사이토카인 조합을 모방하는 제어된 주변분비 신호전달 시스템의 작제 및 기능적 평가**

[0913] 실시예 41에 기재된 방법을 사용하여, G12/2R-1을 도 31에 도시된 것과 같은 다른 ICD를 암호화하는 키메라 사이토카인 수용체로 대체함으로써 다른 사이토카인 조합을 모방한다. 이들 키메라 수용체는 인간 G-CSFR의 134 ECD 또는 인간 G-CSFR의 다른 변이체 ECD(예를 들어, 307 ECD) 또는 다른 사이토카인 수용체로부터의 ECD를 사용할 수 있다.

[0914] IL-18 cDNA 대신에, CXCL13, IL-21, CCL3, CCL4, CD40 리간드, B 세포 활성화 인자(BAFF), Flt3 리간드,

CCL21, CCL5, XCL1, CCL19, IFN-γ, IFN-α, IL-17 또는 TNF-α와 같은 다른 사이토카인 또는 케모카인을 암호화하는 cDNA를 삽입한다. 수용체 NKG2D와 같은 다른 세포 표면 단백질을 삽입한다(표 30). 의도된 적용에 따라 인간, 뮤린 또는 이러한 요소의 다른 버전을 사용한다.

[0915] **실시예 49: IL-7 알파 수용체 소단위로부터의 세포외 및 막관통 도메인 및 IL-2/IL-15 수용체 베타 소단위로부터의 세포내 도메인을 갖는 키메라 수용체의 작제 및 발현**

[0916] 본 발명자들은 인간 IL-2/IL-15 수용체 베타 소단위의 세포내 도메인에 융합된 인간 IL-7 수용체 알파 소단위의 세포외 및 막관통 도메인을 함유한 7/2R-1(도 92 및 도 93)이라고 불리는 키메라 수용체를 합성하였다. IL-7 수용체 알파 소단위를 또한 T 세포에 의해 자주 발현되는 천연 IL-7 수용체 알파 소단위와 이러한 키메라 수용체 소단위를 구별할 수 있도록 표준 Flag 에피토프(DYKDDDDK)로 N 말단에 태깅하였다. 키메라 수용체 소단위는 인간 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 형질도입하는 데 사용되는 렌티바이러스 벡터에 암호화되었다. 12일 후, 형질도입된 세포(및 형질도입되지 않은 대조군 세포)를 유세포 분석법으로 분석하여 천연 IL-7 수용체 알파 소단위에 대한 키메라 수용체 소단위의 발현을 검출하였다.

[0917] **방법**

[0918] Flag-태깅된 키메라 수용체(7/2R-1)를 합성하고, 렌티바이러스 전달 플라스미드(트위스트 바이오사이언스사)에 클로닝하였다. 전달 플라스미드 및 렌티바이러스 패키징 플라스미드(psPAX2, pMD2.G, 애드진사)를 다음과 같이 렌티바이러스 패키징 세포주 HEK293T/17(ATCC)에 공동 형질주입시켰다: 세포를 5% 우태아 혈청 및 0.2mM 피루브산 나트륨을 함유하는 Opti-MEM™ I 환원 혈청 배지, GlutaMAX™ 보충물(Gibco™)에 밤새 플레이팅하였다. 플라스미드 DNA와 Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent(Gibco™)를 제조사의 사양에 따라 혼합하고 세포에 적가하였다. 세포를 37℃, 5% CO_2에서 6시간 동안 인큐베이션시킨 후 배지를 교체하고 밤새 추가로 인큐베이션시켰다. 다음날 세포 상청액을 플레이트에서 수집하여 4℃에 보관하고 배지를 교체하였다. 다음날 세포로부터 세포 상청액을 수집하여 전날의 상청액과 풀링시켰다. 상청액을 약하게 원심분리시켜 부스러기를 제거하고, 0.45 μm 필터를 통해 여과하였다. 상청액을 Beckman Optima L-XP Ultracentrifuge의 SW-32Ti Rotor를 사용하여 25,000rpm에서 90분 동안 회전시켰다. 상청액을 제거하고, 30분 동안 가볍게 진탕하여 펠릿을 적합한 부피의 Opti-MEM I 배지에 재현탁시켰다.

[0919] 1차 인간 T 세포를 다음과 같이 건강한 공여자 백혈구 성분채집술 생성물로부터 단리시켰다. 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 밀도 구배 원심분리를 사용하여 단리시켰다. CD4+ 및 CD8+ T 세포를 제조사의 사양에 따라 인간 CD4 및 CD8 MicroBeads(밀테니 바이오테크사)를 사용하여 단리시켰다. 일부 실험의 경우 T 세포를 생존 가능하게 냉동시키고, 추후 시점에 해동시켰다. 단리된 T 세포를 3% 인간 혈청(시그마사) 및 0.5% 젠타마이신(DIN 02268533)을 함유하는 TexMACS™ 배지(밀테니 바이오테크사)(이하 "완전 TexMACS"로 지칭함)의 48웰 플레이트에 웰당 5×10^5개로 플레이팅하였다. 인간 T 세포 TransAct™(밀테니 바이오테크사)을 첨가하고(웰당 10㎕) 세포를 37℃, 5% CO_2에서 인큐베이션시켰다. 활성화 후 20 내지 28시간에, T 세포에 수용체 작제물을 암호화하는 렌티바이러스를 형질도입하였다. 형질도입 24시간 후, IL-7(10ng/mℓ), IL-7 및 IL-15(각각 10ng/mℓ)와 함께 새로운 배지를 T 세포에 첨가하거나 사이토카인을 첨가하지 않았으며, 세포를 추가로 48시간 동안 인큐베이션시켰다. 확장 제12일에, 수용체 발현을 다음과 같이 유세포 분석법으로 평가하였다. 세포를 15분 동안 4℃에서 항-인간 CD127 eFluor™ 450-접합 항체 (1:50 희석), PE 또는 PECy7에 접합된 항-Flag 항체(1:50 희석), BV750™에 접합된 항-인간 CD3 항체(1:50 희석), PE 또는 AlexaFluor™ 700에 접합된 항-인간 CD4 항체(1:25 희석), PerCP에 접합된 항-인간 CD8 항체(1:100) 및 EBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 506(1:1000 희석)과 함께 인큐베이션시켰다. 그런 다음 세포를 완충액에서 2회 세척하고 Cytek™ Aurora 유세포 분석기에서 분석하였다. 도 88은 CD4+ 및 CD8+ 하위세트 둘 다를 포함하는 CD3+ T 세포에 대한 결과를 나타낸다.

[0920] **결과**

[0921] 7/2R-1을 암호화하는 렌티바이러스 벡터가 형질도입된 CD3+ T 세포의 높은 비율(48.5%)이 CD127(IL-7Rα) 및 Flag 에피토프 태그를 공발현하는 반면(도 88A), 형질도입되지 않은 T 세포는 천연 CD127의 낮은/중간 발현을 나타내었지만 Flag 에피토프 태그는 그렇지 않았다(도 88B). CD127 검출의 특이성을 CD127 FMO 대조군에 의해 확인하였다(도 88C).

[0922] 따라서, 7/2R-1은 렌티바이러스가 형질도입된 T 세포의 표면에서 발현될 수 있다.

[0923] **실시예 50: 7/2R-1가 형질도입되고 IL-7로 자극된 인간 T 세포의 확장**

[0924] 7/2R-1이 T 세포 확장(세포 수의 증가)을 촉진하는지 여부를 결정하기 위해, 실시예 49의 형질도입 조건 및 형질도입되지 않은 조건으로부터의 T 세포를 배지 단독 대 IL-7+IL-15 또는 IL-7에서 배양하고, 규칙적인 간격에서 계수하였다. IL-7+IL-15의 조합은 IL-7 단독에 대한 비교자로 선택되었는데, 그 이ㅠ는 IL-7+IL-15가 렌티바이러스 형질도입 후 인간 T 세포를 확장하는 데 일반적으로 사용되기 때문이다.

[0925] **방법**

[0926] 실시예 49(제0일)에 기재된 바와 같이 인간 T 세포를 단리시키고 형질도입하여 7/2R-1을 발현시켰다. 세포를 IL-7(10ng/㎖), IL-7 및 IL-15(각각 10ng/㎖) 또는 배지 단독에서 총 16일 동안 확장시켰고, 배지 및 사이토카인을 2일마다 새로 교체하였다. 확장 4, 8, 12 및 16일에 Cytek™ Aurora 유세포 분석기를 사용하여 살아있는 T 세포를 계수하여 0일에 대한 확장 배수를 평가하였다.

[0927] **결과**

[0928] 도 57에 나타난 바와 같이, 7/2R-1을 암호화하는 렌티바이러스 벡터가 형질도입된 CD3+ T 세포는 IL-7 또는 IL-7+IL-15에서 동등한 확장을 보인 나타낸 반면(도 89A), 형질도입도지 않은 CD3+ T 세포는 IL-7+IL-15에서는 양호하게 확장되었지만 IL-7에서는 중간 정도만 확장되었다(도 89B). 어느 배양물도 배지 단독에서는 양호하게 확장되지 않았다.

[0929] 따라서, T 세포에서 7/2R-1의 발현은 IL-7에 대한 반응으로 증가된 확장을 유도하여, IL-7+IL-15에 의해 유도된 것과 동등한 세포 밀도에 도달한다. 이는 IL-2/IL-15 수용체 베타 소단위의 세포내 도메인이 7/2R-1 키메라 수용체와 관련하여 기능적이라는 기능적 증거를 제공한다.

[0930] **실시예 51: BrdU 혼입 검정에 의해서 평가된 7/2R-1이 형질도입되고 IL-7로 자극된 인간 T 세포의 증식**

[0931] 7/2R-1이 세포 증식(세포 순환)을 촉진하는지 여부를 결정하기 위해, 실시예 49로부터의 형질도입 및 형질도입되지 않은 조건으로부터의 T 세포를 배지 단독 대 IL-2, IL-7 또는 IL-2+IL-7의 조합을 함유하는 배지에서 배양하였다. 세포 증식을 48시간 BrdU 검정으로 측정하였다.

[0932] **방법**

[0933] 실시예 49에 기재된 바와 같이 세포를 단리시키고 7/2R-1을 발현하도록 조작하였다. 7/2R-1을 발현하는 세포를 IL-7(10ng/㎖)에서 확장시키고, 형질도입되지 않은 세포를 IL-7 및 IL-15(각각 10ng/㎖)에서 확장시켰다. 확장 제12일에, 세포를 수거하고 PBS에서 2회, 완전 TexMACS 배지에서 1회 세척하고, 관련 검정 사이토카인(10ng/㎖의 IL-7, 300IU/㎖의 IL-2, 각각 10ng/㎖ 및 300IU/㎖의 IL-7 및 IL-2 또는 사이토카인 첨가하지 않음)을 함유하는 새로운 완전 TexMACS 배지에 48시간 동안 37℃, 5% CO_2에서 재플레이팅하였다. BrdU 검정 절차는 BD PharmingenTM FITC BrdU Flow Kit(557891)의 지침 매뉴얼을 따랐으며 다음 사항을 추가시켰다: BrdU 혼입 외에 7/2R-1 발현을 평가하기 위해 실시예 49에 기재된 바와 같이 표면 염색을 수행하였다. 유세포 분석법을 Cytek™ Aurora 장비를 사용하여 수행하였다.

[0934] **결과**

[0935] 도 58에 나타난 바와 같이, 7/2R-1을 암호화하는 렌티바이러스 벡터가 형질도입된 CD4+ 및 CD8+ T 세포는 IL-2, IL-7 또는 IL-2+IL-7에 반응하여 동등한 증식을 나타내었고(도 90A), 반면 형질도입되지 않은 CD4+ 및 CD8+ T 세포는 IL-2 및 IL-2+IL-7에 반응하여 양호하게 증식하였지만 IL-7에 반응하여 약간만 증식하였다(도 90B). 이 특정 검정에서 배경 증식이 높은 7/2R-1을 발현하는 CD8+ T 세포를 제외하고, 배양물 중 어느 것도 배지 단독에서 양호하게 증식하지 않았다.

[0936] 따라서, T 세포에서 7/2R-1의 발현은 IL-7에 반응하여 증식을 증가시켜 IL-2 또는 IL-2+IL-7에 의해 유도된 것과 동일한 수준에 도달한다. 이는 IL-2/IL-15 수용체 베타 소단위의 세포내 도메인이 7/2R-1 키메라 수용체와 관련하여 기능적이라는 기능적 증거를 제공한다.

[0937] **실시예 52: 7/2R-1을 발현하는 인간 T 세포에서 생화학적 신호전달 사건의 웨스턴 블롯 검출**

[0938] 7/2R-1이 천연 IL-2 수용체와 유사한 생화학적 신호전달 사건을 유도하는지 여부를 결정하기 위해, 실시예 31로부터의 형질도입 및 형질도입되지 않은 조건으로부터의 T 세포를 배지 단독 대 IL-2, IL-7 또는 IL-2+IL-7의 조합을 함유하는 배지에서 배양하였다. 세포 용해물을 제조하고, IL-7 및 IL-2 수용체 신호전달에 관여하는 다양

한 단백질에 대한 항체를 사용하여 웨스턴 블롯으로 프로빙하였다(도 91).

[0939] **방법**

[0940] 실시예 49에 기재된 바와 같이 세포를 단리시키고 7/2R-1을 발현하도록 조작하였다. 7/2R-1을 발현하는 세포를 IL-7(10ng/㎖)에서 확장시키고, 형질도입되지 않은 세포를 IL-7 및 IL-15(각각 10ng/㎖)에서 확장시켰다. 확장 제12일에 세포를 수거하고 PBS로 2회 세척하고 완전 TexMACS 배지에서 1회 세척하고, 사이토카인이 첨가되지 않은 완전 TexMACS 배지에서 37℃, 5% CO_2에서 밤새 정치시켰다.

[0941] 웨스턴 블롯을 수행하기 위해, 세포를 사이토카인 없음, IL-2(300IU/㎖), IL-7(10ng/㎖), 또는 IL-2와 IL-7(각각 300IU/㎖ 및 10ng/㎖)으로 37℃에서 20분 동안 자극하였다. 세포를 10mM HEPES, pH 7.9, 1mM $MgCl_2$, 0.05mM EGTA, 0.5mM EDTA, pH 8.0, 1 mM DTT, 및 1x Pierce Protease 및 Phosphatase Inhibitor Mini Tablets(A32961)를 함유하는 완충액에서 1회 세척하였다. 세포를 0.2% NP-40 대체물(시그마사)이 첨가된 상기 세척 완충액에서 10분 동안 얼음에서 용해시키고, 10분 동안 13,000rpm에서 4℃에서 원심분리시키고, 그 후 상청액(세포질 분획)을 수집하였다. 핵 펠릿을 0.42M NaCl 및 20% 글리세롤을 첨가하여 상기 세척 완충액에서 재현탁시키고 추출하였다. 핵 펠릿을 자주 보텍싱시키면서 30분 동안 얼음에서 추출하고, 20분 동안 13,000rpm에서 4℃에서 원심분리시킨 후 가용성 핵 분획(상청액)을 수집하였다. 세포질 및 핵 분획을 환원 완충액에서 10분 동안 가열(70℃)시키고 NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris 단백질 겔에서 전개시켰다. 겔을 나이트로셀룰로스 막(Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell에서 20V에서 60분)으로 옮기고, 건조시키고, TBS(927-50000, LI-COR) 중의 Intercept® Blocking Buffer에서 1시간 동안 차단시켰다. 블롯을 0.1% Tween20을 함유하는 TBS 중의 Intercept® Blocking Buffer에서 4℃에서 밤새 제시된 1차 항체(1:1,000)와 함께 인큐베이션시켰다. 이용된 1차 항체는 셀 시그널링 테크놀로지즈사(세포 신호전달 Technologies)로부터 입수하였다: 포스포-Shc(Tyr239/240) 항체 #2434, 포스포-Akt (Ser473)(D9E) XP® 토끼 단클론성 항체 #4060, 포스포-S6 리보솜 단백질(Ser235/236) 항체 #2211, 포스포-p44/42 MAPK(Erk1/2)(Thr202/Tyr204) 항체 #9101, β-액틴(13E5) 토끼 단클론성 항체 #4970, 포스포-JAK1(Tyr1034/1035)(D7N4Z) 토끼 단클론성 항체 #74129, 포스포-JAK3(Tyr980/981) (D44E3) 토끼 단클론성 항체 #5031, 포스포-Stat5(Tyr694)(C11C5) 토끼 단클론성 항체 #9359, 및 히스톤 H3 (96C10) 마우스 단클론성 항체 #3638. 블롯을 0.1% Tween20을 함유하는 TBS 중에서 3회 세척하고, 0.1% Tween20을 함유하는 TBS 완충액 중의 2차 항체(1:10,000)와 30 내지 60분 동안 실온에서 인큐베이션시켰다. 2차 항체는 셀 시그널링 테크놀로지즈사로부터 얻었다: 항-마우스 IgG(H+L)(DyLight™ 800 4X PEG 접합체) #5257 및 항-토끼 IgG(H+L)(DyLight™ 800 4X PEG 접합체) #5151이었다. 블롯을 세척하고, LI-COR Odyssey 이미저에 노출시켰다.

[0942] **결과**

[0943] 도 59에 나타난 바와 같이, 형질도입되지 않은 T 세포와 7/2R-1을 발현하는 T 세포 둘 다에서 IL-2는 STAT5, JAK1, JAK3, Shc, Erk1/2, Akt 및 S6의 인산화를 유도하였다. 두 T 세포 배양 모두에서 IL-2+IL-7에 대한 반응에서도 유사한 패턴이 나타났다. 형질도입되지 않은 T 세포에서 IL-7 자극은 IL-2 자극에 비해 STAT5, Shc, Akt 및 S6의 인산화를 덜 유도하였다. 대조적으로, 7/2R-1을 발현하는 T 세포에서는 IL-7과 IL-2에 의해 유도된 인산화 패턴을 구별할 수 없었다. 히스톤 H3 및 베타-액틴은 로딩 대조군으로 사용되었다.

[0944] 따라서, IL-7에 의한 7/2R-1의 자극은 천연 IL-2 수용체의 자극 후에 나타나는 것과 같이 T 세포에서 유사한 생화학적 신호 전달 사건을 초래하며, 이는 IL-2/IL-15 수용체 베타 소단위의 세포내 도메인이 7/2R-1 키메라 수용체와 관련하여 기능적이라는 생화학적 증거를 제공한다.

[0945] **실시예 53: IL-7 수용체 알파 도메인의 세포외 및 막관통 도메인 및 IL-2 수용체 베타 소단위의 세포내 도메인을 함유하는 대안적인 키메라 수용체의 작제 및 평가**

[0946] 본 발명자들은 7/2R-2로 지칭되는 7/2R-1의 대체 버전을 설계하였다(도 92 및 도 93). 주요 차이점은 IL-7R 알파와 IL-2R 베타 사이의 융합 부위가 이동되어 7/2R-2가 IL-2Rβ가 아닌 IL-7Rα의 Box 1 및 2 영역을 포함한다는 것이다. 예를 들어, 7/2R-1의 융합 부위가 인간에서 면역원성인 것으로 입증되면 이 수용체가 유리할 수 있다. 실시예 49 내지 52의 방법에 따라, 7/2-R2의 Flag 에피토프 태깅된 버전을 작제하고 렌티바이러스 벡터에 암호화하고, 이 렌티바이러스 벡터를 T 세포에 형질도입한다. 7/2R-2의 발현은 유세포 분석법으로 평가하고; 7/2R-2의 기능적 특성은 확장 및 증식 분석으로 평가하고; 7/2R-2의 생화학적 신호 특성은 웨스턴 블롯으로 평가한다.

[0947] **실시예 54: 130a1 G-CSF의 N-말단에 대한 PEG20k 모이어티의 화학적 첨가**

[0948] 본 발명자들은 단백질의 N-말단에 화학적으로 연결된 20kDa 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 모이어티를 갖는 130a1 G-CSF의 전체 서열을 포함하는 PEG20K_G-CSF_130a1(도 93)(PEG-130a1 G-CSF로도 지칭됨)이라는 변형된 단백질을 합성하였다. 또한, 본 발명자들은 PEG20K_G-CSF_307 또는 PEG-307 G-CSF라고 하는 307 G-CSF의 유사한 버전을 합성하였다.

[0949] **방법**

[0950] 20mg의 정제된 130a1 G-CSF를 44mg의 20 kDa 메톡시-폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드(mPEG-ALD, Creative PEGworks)와 조합하였다. 반응 완충액(10mM 아세트산나트륨 pH 5.0, 5mM NaCl)을 최종 부피 2mℓ에 첨가하였다. 페길화 반응을 나트륨 사이아노보로하이드라이드(최종 [$NaBH_3CN$] = 20mM)의 1.0M 용액 40㎕를 첨가하고 완전히 혼합하여 시작시켰다. 그런 다음 반응물을 회전기에서 18℃에서 8시간 동안 인큐베이션시켰다. 종결 완충액(10mM 아세트산나트륨 pH 3.5, 5mM NaCl) 3mℓ를 첨가하여 반응을 종결시켰다. 그런 다음 최종 5mℓ 샘플을 양이온 교환 칼럼에서 작동시켜 모노-페길화된 단백질을 남아 있는 변형되지 않은 단백질 또는 다중-페길화된 종으로부터 분리시켰다. 동일한 프로토콜이 307 G-CSF로 성공적으로 완료되었다.

[0951] **결과**

[0952] SDS-PAGE는 모노-페길화된 130a1 G-CSF 및 307 G-CSF의 균질한 집단을 나타내었는데, 이는 시험관 내에서 변형되지 않은 단백질과 유사한 신호 활성을 나타내었다.

[0953] **실시예 55: 뮤린 유방 암종 모델에서, 130a1 G-CSF로의 처리는 G4R-1 134 ECD를 발현하는 종양-특이적 T 세포의 확장 및 항-종양 표현형을 향상시킨다.**

[0954] 생체내 뮤린 유방암 모델에서 G4R 134 ECD를 발현하도록 조작된 T 세포의 확장 및 표현형 및 항종양 활성을 향상시키는 능력에 대해 변이체 사이토카인 130a1 G-CSF를 시험하였다.

[0955] **방법**

[0956] 본 발명자들은 Thy1.1+ OT-I 세포가 레트로바이러스에 의해 형질도입되어 G2R-3 134 ECD 대신 G4R 134 ECD를 발현한다는 점을 제외하고는 실시예 36에 설명된 것과 유사한 방법을 사용하였다. 혈액 샘플의 유세포 분석에 사용된 항체 패널은 다음을 포함하였다: 뮤린 CD45(클론 30-F11, APC-접합), CD3(클론 17A2, AF700-접합), CD8a(클론 53-6.7, PerCP-접합), CD4(클론 RM4-5, BV510-접합), NK1.1(클론 PK136, PECy7-접합), CD19(클론 6D5, SparkNIR685-접합), CD11b(클론 M1/70, FITC-접합), CD11c(클론 N418, BV711-접합), Ly6C(클론 HK1.4, BV605-접합) 및 Ly6G(클론 1A8, PE-접합). 유세포 분석법을 Cytek Aurora 장비에서 수행하였다.

[0957] **결과**

[0958] 모든 마우스에게 G4R 134 ECD를 발현하도록 형질도입된 Thy1.1+ OT-I 세포의 등가 용량(5×10^6)을 제공하였다. 제0일에 유세포 분석법에 의한 인간 G-CSFR+을 발현하는 Thy1.1+ 세포의 백분율로 평가한 형질도입 효율은 74.7%였다.

[0959] 130a1 G-CSF 처리군에서, 1/3마리의 마우스는 종양의 완전 퇴행(CR)을 경험하였고, 연구가 실질적인 이유로 중단된 제46일까지 종양이 없는 상태로 유지되었다(도 93A). 유사하게 비히클-처리군에서, 1/3 마우스가 CR을 경험하였다. 따라서, 130a1 G-CSF 처리군과 비히클 처리군은 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다.

[0960] Thy1.1+ OT-I 세포의 확장 및 지속성을 마우스로부터 수집한 연속 혈액 샘플에서 유세포 분석법에 의해서 모니터링하였다. 130a1 G-CSF 처리군에서 Thy1.1+ OT-I 세포는 비히클 처리군의 최고 3.3%와 비교하여 제4일에 모든 CD8+ T 세포의 평균 최고 생착률 6.1%에 도달하였다(도 93B).

[0961] Thy1.1+ OT-I 세포의 표현형을 일련의 혈액 샘플의 유세포 분석법에 의해 모니터링하였다. 130a1 G-CSF 처리군에서 Thy1.1+ OT-I 세포의 대다수(평균 = 70.4%)는 제8일까지 T 효과기 기억(Tem) 표현형(CD44+CD62L-)을 채택하였고, 비히클 처리군의 경우 평균 27.9%였다(도 93C). 대조적으로, 숙주(Thy1.1-) CD8+ T 세포는 임의의 시점에서 130a1 G-CSF- 처리군과 비히클 처리군 사이의 Tem 세포의 백분율에서 유의미한 차이를 나타내지 않았다(도 93D).

[0962] 예정사-1(PD-1) 분자의 발현을 유세포 분석법에 의해 평가하였다. 130a1 G-CSF 처리군에서는 Thy1.1+ OT-I 세포 중 소수(평균 = 1.3%)만 제12일까지 PD-1을 발현한 반면, 비히클 처리군의 평균은 15.5%였다(도 93E). 대조적으

로, 숙주(Thy1.1-) CD8+ T 세포는 임의의 시점에서 130a1 G-CSF- 처리군과 비히클 처리군 사이의 PD-1+ 세포의 백분율에서 유의미한 차이를 나타내지 않았다(도 93F).

[0963] 유세포 분석법은 숙주(Thy1.1-) CD4+ T 세포 및 CD19+ B 세포(숙주 CD45+ 세포에 비해)의 전체 백분율이 어느 시점에서든 130a1 G-CSF- 처리군과 비히클 처리군 간에 크게 다르지 않음을 입증하였다(도 93G, 도 93H). 마찬가지로, 130a1 G-CSF 처리는 말초 혈액의 호중구, 호산구 또는 단핵구 수에 영향을 미치지 않았다(데이터는 표시되지 않음).

[0964] 연구 전반에 걸쳐, 두 군의 모든 마우스는 일부의 종양 진행에도 불구하고 정상 체중을 유지하고 양호한 전반적인 건강을 나타내었다.

[0965] 따라서, 130a1 G-CSF는 G4R 134 ECD를 발현하는 종양-특이적 CD8+ T 세포의 약하지만 선택적인 확장을 유도할 수 있었다. 이는 33%의 지속적인 CR 비율을 초래하였다. 130a1 G-CSF로 처리하면 상당한 비율의 종양 특이적 CD8+ T 세포가 Tem 표현형을 채택하고 PD-1의 발현이 감소하도록 유도되었다. 130a1 G-CSF 처리와 연관된 명백한 독성은 없었다.

[0966] **실시예 56: 세포 증식 검정에서, 페길화된 G-CSF 130a1 및 307 버전은 페길화된 버전과 비교하여 유사한 효능 및 선택성을 나타낸다.**

[0967] G2R-3 134 ECD 또는 야생형 인간 G-CSF 수용체를 발현하는 세포의 증식을 자극하는 능력에 대해 페길화된 버전과 페길화된 버전의 G-CSF(야생형, 130a1 및 307)를 비교하기 위해 시험관내 세포 증식 실험을 수행하였다.

[0968] **방법**

[0969] 도 94A에서, 건강한 공여자의 PBMC로부터 유래된 인간 CD4 및 CD8 T 세포에 실시예 35와 유사한 방법을 사용하여 G2R-3 134 ECD를 발현하도록 렌티바이러스로 형질도입하였다 증식(BrdU 혼입)을 평가하기 위해, T 세포를 PBS에서 2회 세척하고, 배지에서 1회 세척한 후 다음에 제시된 사이토카인을 새로운 배지에 재플레이팅하였다: 인간 IL-2(프로류킨, 300IU/㎖, 양성 대조군), 배지 단독 (음성 대조군), 또는 제시된 농도(ng/㎖)의 야생형 G-CSF, 페길화된 야생형 G-CSF(PEG-WT G-CSF), 130a1 G-CSF 또는 PEG-130a1 G-CSF. T 세포를 48시간 동안 배양하였다. BrdU 검정 절차는 다음을 제외하고는 BD Pharmingen™ FITC BrdU Flow Kit(557891)의 지침 매뉴얼을 따랐다: 세포를 또한 염색하여 G-CSFR ECD의 세포 표면 발현을 검출하였다(실시예 35에 기재된 바와 같음). 유세포 분석법을 Cytek Aurora 장비를 사용하여 수행하였다. BrdU 혼입은 G-CSFR 발현에 양성인 T 세포에 대해 표시된다.

[0970] 도 94B에서, 야생형 G-CSF에 반응하여 야생형 인간 G-CSF 수용체를 자연적으로 발현하고 증식하는 인간 골수 세포주 OCI-AML-1을 사용하여 유사한 실험을 수행하였다(실시예 34 참고). 세포를 PBS에서 2회 세척하고, 배지에서 1회 세척한 후 다음에 제시된 사이토카인을 배지에 재플레이팅하였다: 인간 GM-CSF(20ng/㎖, 양성 대조군), 배지 단독 (음성 대조군), 또는 제시된 농도(ng/㎖)의 야생형 G-CSF, PEG-WT G-CSF, 130a1 G-CSF, PEG-130a1 G-CSF, 307 G-CSF, 또는 PEG-307 G-CSF. 세포를 48시간 동안 배양하고 유세포 분석법에 의해서 BrdU 혼입에 대해서 평가하였다.

[0971] **결과**

[0972] 도 94A에 나타낸 바와 같이, G2R-3 134 ECD를 발현하는 인간 T 세포는 다양한 사이토카인 농도에 걸쳐 페길화된 130a1 G-CSF 대 페길화된 130a1 G-CSF에 대해 유사한 증식 반응을 나타내었다. 이들 세포는 또한 페길화된 야생형 G-CSF와 페길화된 페길화되지 않은 야생형 G-CSF에 대해 유사한 증식 반응을 나타내었지만; 반응은 130a1 버전의 G-CSF에서 볼 수 있는 것보다 상당히 약했다.

[0973] 도 94B에 도시된 바와 같이, 인간 OCI-AML1 골수 세포는 다양한 농도에 걸쳐 페길화된 130a1 G-CSF 대 비페길화되지 않은 130a1 G-CSF에 대해 유사한 증식 반응을 나타냈고; 주목할 만한 유일한 차이점은 동일한 수준의 세포 증식을 유도하려면 약간 더 높은 농도의 페길화된 130a1 G-CSF가 필요하다는 것이다. OCI-AML1 세포는 페길화된 307 G-CSF와 페길화되지 않은 307 G-CSF에 대해 유사한 증식 반응을 나타내었다. 마지막으로, OCI-AML1 세포는 페길화된 야생형 G-CSF와 페길화되지 않은 야생형 G-CSF에 대해 유사한 증식 반응을 나타내었고; 낮은 농도에서는 페길화된 G-CSF에 대한 반응이 페길화되지 않은 G-CSF에 대한 반응보다 더 컸다. OCI-AML1 세포는 130a1 또는 307 버전의 G-CSF보다 야생형 버전의 G-CSF에 대해 훨씬 더 강한 반응을 나타내었다.

[0974] 따라서, 130a1 G-CSF의 페길화는 G2R-3 134 ECD 수용체를 통해 세포 증식을 유도하는 능력에 무시할 만한 영향

을 미쳤다. 더욱이, 130a1 G-CSF 또는 307 G-CSF의 페길화는 야생형 G-CSF 수용체에 비해 G2R-3 134 ECD에 대한 이들 사이토카인의 특이성에 무시할 만한 영향을 미쳤다.

[0975] **실시예 57: 130a1 G-CSF의 페길화된 버전 및 페길화되지 않은 버전은 T 세포에서 유사한 생화학적 신호전달 사건을 유도한다.**

[0976] G2R-3 134 ECD를 발현하는 인간 T 세포에서 생화학적 신호전달 사건을 유도하는 능력에 대해 페길화된 130a1 G-CSF와 페길화되지 않은 130a1 G-CSF를 비교하기 위해 시험관내 웨스턴 블롯 실험을 수행하였다.

[0977] **방법**

[0978] G2R-3 134 ECD를 발현하는 인간 PBMC-유래 T 세포를 실시예 39와 유사하게 제조한 후 배지 단독; 인간 IL-2(프로류킨, 300 IU/㎖); 또는 1 내지 400ng/㎖ 범위의 130a1 G-CSF의 페길화되지 않은 버전 또는 페길화된 버전으로 20분 동안 자극하였다. 실시예 39와 유사하게, 세포 및 핵 추출물을 제조하고 도 95에 제시되고 이전 실시예에 상세히 기술된 항체를 사용하여 웨스턴 블로팅을 실시하였다.

[0979] **결과**

[0980] 도 95에 열거된 바와 같이, 130a1 G-CSF의 페길화된 버전과 페길화되지 않은 버전 둘 다는 STAT5, STAT3, Erk-1/2, Akt 및 S6의 인산화를 포함하여 IL-2와 유사한 신호 전달 사건을 유도하였다. IL-2와는 달리, 페길화된 130a1 G-CSF 및 비페길화된 130a1 G-CSF는 JAK2의 인산화를 유도하였는데, 이는 그들의 설계에 기초하여 예상된다. 페길화된 130a1 G-CSF는 페길화되지 않은 130a1 G-CSF보다 약간 덜 강력한 것으로 나타났는데, 이는 1ng/㎖에서 인산화 현상이 약간 감소한 것에 의해서 입증된다.

[0981] 따라서, 130a1 G-CSF의 페길화된 버전과 페길화되지 않은 버전은 인간 T 세포에서 유사한 생화학적 신호 전달 사건을 유도하며 효력에는 약간의 차이만 존재한다.

[0982] **실시예 58: 뮤린 유방 암종 모델에서, 페길화된 G-CSF 130a1로의 처리는 G2R-3 134 ECD를 발현하는 종양-특이적 T 세포의 확장 및 항-종양 활성을 향상시킨다.**

[0983] 변이체 사이토카인 130a1 G-CSF의 페길화된 형태를 뮤린 유방암 모델에서 G2R-3 134 ECD를 발현하는 T 세포의 확장, 표현형 및 항종양 활성을 향상시키는 능력에 대해 3가지 투여 일정에 걸쳐 시험하였다.

[0984] **방법**

[0985] 실시예 36에 설명된 것과 유사한 방법을 사용하였다. 모든 마우스에게 G2R-3 134 ECD를 발현하도록 형질도입된 Thy1.1+ OT-I 세포의 등가 용량(5×10^6)을 제공하였다. 혈액 샘플의 유세포 분석에 사용된 항체 패널은 실시예 59와 동일하였다.

[0986] **결과**

[0987] 제0일에 유세포 분석법에 의한 인간 G-CSFR+을 발현하는 Thy1.1+ 세포의 백분율로 평가한 형질도입 효율은 79.8%였다. 입양 세포 전달일(제0일)부터, 마우스를 상이한 사이토카인 군에 무작위 배정하였다. "매일" 군에서, 마우스를 무작위 배정하여 다음 일정에 따라 비히클, 130a1 G-CSF(10㎍/용량) 또는 페길화된(PEG) 130a1 G-CSF(10㎍/용량)을 제공하였다: 14일 동안 매일, 그 다음 14일 동안 격일. "3일 마다" 군에서 마우스를 무작위 배정하여 9주기 동안 3일마다 130a1 G-CSF 또는 페길화된 130a1 G-CSF를 제공하였다. "매주" 군에서 마우스를 무작위 배정하여 4주기 동안 7일마다 130a1 G-CSF 또는 페길화된 130a1 G-CSF를 제공하였다.

[0988] 비히클 처리군에서, 1/4마리의 마우스는 종양의 완전 퇴행(CR)을 경험하였고, 연구가 실질적인 이유로 중단된 제46일까지 종양이 없는 상태로 유지되었다(도 96A, 도 96B). "매일" 130a1 G-CSF 및 PEG-130a1 G-CSF 처리군 둘 다에서 4/4의 마우스가 CR을 경험하였다. "3일마다" 130a1 G-CSF 및 PEG-130a1 G-CSF 처리군에서, 3/4 및 4/4 마우스가 각각 CR을 경험하였다(도 96C, 도 96D). "매주" 130a1 G-CSF 및 PEG-130a1 G-CSF 처리군에서, 3/3 및 4/4 마우스가 각각 CR을 경험하였다(도 96E, 도 96F).

[0989] Thy1.1+ OT-I 세포의 확장 및 지속성을 마우스로부터 수집한 연속 혈액 샘플에서 유세포 분석법에 의해서 모니터링하였다(도 97A 내지 도 97C). "매일" 코호트에서, 제4일에 Thy1.1+ OT-I 세포는 비히클, 130a1 G-CSF 및 PEG-130a1 G-CSF 처리군에 대해서 각각 8.85%, 52.75% 및 43.63%(모두 CD8+ T 세포와의 비교)의 평균 피크 수준에 이르렀다(도 97A). "3일마다" 코호트에서, 제4일에 Thy1.1+ OT-I 세포는 130a1 G-CSF 및 PEG-130a1 G-CSF 처리군에 대해서 각각 8.41% 및 31.13%의 평균 피크 수준에 이르렀다(도 97B). "매주" 코호트에서, 제4일에

Thy1.1+ OT-I 세포는 130a1 G-CSF 및 PEG-130a1 G-CSF 처리군에 대해서 각각 13.63% 및 41.93%의 평균 피크 수준에 이르렀다(도 97C).

[0990] Thy1.1+ OT-I 세포의 T 효과기 기억(Tem, CD44+ CD62L-) 표현형을 또한 일련의 혈액 샘플에서 유세포 분석법으로 모니터링하였다(도 97D 내지 도 97F). "매일" 코호트에서, 제4일에 Tem 표현형을 나타내는 Thy1.1+ OT-I 세포의 평균 백분율은 비히클, 130a1 G-CSF 및 PEG-130a1 G-CSF 처리군 각각에 대해서 24.50%, 49.35% 및 74.40%였다(도 97D). "3일마다" 코호트에서, 제4일에 Tem 표현형을 나타내는 Thy1.1+ OT-I 세포의 평균 백분율은 130a1 G-CSF 및 PEG-130a1 G-CSF 처리군 각각에 대해서 32.03% 및 71.53%였다(도 97E). "매주" 코호트에서, 제4일에 Tem 표현형을 나타내는 Thy1.1+ OT-I 세포의 평균 백분율은 130a1 G-CSF 및 PEG-130a1 G-CSF 처리군 각각에 대해서 32.33% 및 70.58%였다(도 97F).

[0991] 예정사-1(PD-1) 분자의 발현을 또한 연속 혈액 샘플에서 유세포 분석법에 의해 평가하였다. 3가지 투여 일정 중 임의의 시점에 걸쳐 임의의 시점에서 130a1 G-CSF와 PEG-130a1 G-CSF 치료군 사이의 PD-1+ OT-I T 세포의 백분율에서 유의미한 차이가 관찰되지 않았다(데이터 나타내지 않음).

[0992] T 세포 면역글로불린 및 뮤신 도메인-함유 단백질 3(TIM-3) 분자의 발현을 또한 연속 혈액 샘플에서 유세포 분석법으로 평가하였다. 3가지 투여 일정 중 임의의 시점에 걸쳐 임의의 시점에서 130a1 G-CSF와 PEG-130a1 G-CSF 치료군 사이의 TIM-3+ OT-I T 세포의 백분율에서 유의미한 차이가 관찰되지 않았다(데이터 나타내지 않음).

[0993] 도 98은 "3일마다" 투여 코호트의 연속 혈액 샘플로부터의 숙주 호중구, 단핵구, 호산구, CD3+ T 세포, CD19+ B 세포 및 NK1.1+ 자연 살해 세포의 유세포 분석 기반 평가를 나타낸다. 어느 시점에서든 비히클, 130a1 G-CSF 또는 PEG-130a1 G-CSF 처리군 사이에서 이들 세포 유형 중 임의의 비율에 있어서 실질적인 차이가 관찰되지 않았다.

[0994] 연구 전반에 걸쳐, 모든 치료군의 모든 마우스는 일부의 종양 진행에도 불구하고 정상 체중을 유지하고 양호한 전반적인 건강을 나타내었다.

[0995] 따라서, PEG-130a1 G-CSF는 이 모델에서 항종양 효능의 관점에서 130a1 G-CSF와 적어도 동등한 것으로 보인다. 130a1 G-CSF와 비교하여, PEG-130a1 G-CSF는 "3일마다" 및 매주 투여 일정을 통해 실질적으로 더 큰 OT-I T 세포 확장을 유도하였다. 세 가지 투여 일정 모두에서 PEG-130a1 G-CSF는 130a1 G-CSF에 비해 더 많은 비율의 OT-I T 세포가 Tem 표현형을 채택하도록 유도하였다. 두 가지 형태의 130a1 G-CSF를 사용한 치료와 관련된 명백한 독성은 존재하지 않았다.

[0996] **실시예 59: 인간 T 세포에서 IL-2, IL-12 및 IL-18 신호의 조합을 모방하는 제어된 주변분비 신호전달 전략의 시험관내 입증**

[0997] 건강한 공여자 PBMC로부터의 인간 CD4 및 CD8 T 세포에 메소텔린 특이적 CAR 및 G12/2R을 암호화하는 이시스트론성 벡터, 또는 메소텔린 특이적 CAR, G12/2R 134 ECD 및 인간 IL-18를 암호화하는 삼시스트론 벡터를 형질도입하였다. T 세포를 CAR 및 G12/2R-1 134 ECD의 발현에 대해; 증식에 대해 그리고 IL-18 생산에 대해 시험관내에서 평가하였다.

[0998] **방법**

[0999] 실시예 35와 유사한 방법을 사용하여, 건강한 공여자 PBMC로부터의 인간 CD4 및 CD8 T 세포에 (5'에서 3' 순서로) 메소텔린 특이적 CAR, T2A 리보솜 스킵 부위, G12/2R-1 134 ECD, T2A 리보솜 스킵 부위 및 인간 IL-18의 성숙 형태(서열번호 102)를 암호화하는 삼시스트론성 렌티바이러스 벡터를 형질도입하였다. 대조군에는 형질도입되지 않은 T 세포 및 메소텔린 특이적 CAR을 암호화하는 바이시스트론 렌티바이러스 벡터, T2A 리보솜 스킵 부위 및 G12/2R 134 ECD로 형질도입된 T 세포가 포함되었다. 형질도입되지 않은 T 세포를 IL-2에서 12일 동안 확장시켰고; 형질도입된 T 세포를 130a1 G-CSF에서 확장시켰다. 확장 후, T 세포를 G-CSFR ECD에 특이적인 항체(APC-접합) 및 재조합 Fc-태깅된 메소텔린 단백질(FITC-접합)을 사용하여 유세포 분석에 적용하였다.

[1000] T 세포 증식을 실시예 60에 따라 다음 사이토카인을 사용한 BrdU 혼입 검정에 의해 평가하였다: 인간 IL-2(프로류킨, 300IU/㎖); 인간 IL-18(100ng/㎖); 인간 IL-2+인간 IL-12(100ng/㎖); IL-2+IL-12+IL-18; 또는 130a1 G-CSF(100ng/㎖).

[1001] 인간 IL-18 생산을 ELISA에 의해서 검출하였다. T 세포를 1×106/㎖로 플레이팅하고 배지 단독을 함유하는 배지에서 배양하였다. 인간 IL-2(프로류킨, 300 IU/㎖)+인간 IL-12(20ng/㎖); 또는 130a1 G-CSF(100ng/㎖). 48시간 후 상청액을 수집하고 제조사의 지침에 따라 ELISA(R&D Systems, Human Total IL-18 DuoSet ELISA 키트,

DuoSet ELISA Ancillary Reagent 키트, 카탈로그 #DY008과 함께 사용되는 카탈로그 #DY318-05)를 수행하였다. 절대 IL-18 농도는 키트와 함께 제공된 표준 곡선을 사용하여 결정하였다.

[1002] **결과**

[1003] 도 99A에 도시된 바와 같이, 메소텔린 CAR 및 G12/2R 134 ECD의 공발현은 이시스트론성 벡터가 형질도입된 T 세포의 38.18% 및 삼시스트론 벡터로 형질도입된 T 세포의 78.40%에서 나타났다. 예상된 바와 같이, 형질도입되지 않은 T 세포에서는 두 수용체 모두 검출되지 않았다.

[1004] 도 99B에 나타난 바와 같이, 이시스트론성 또는 삼시스트론성 벡터가 형질도입된 T 세포는 IL-2에 반응하여 증식하였고; IL-2+IL-12; IL-2+IL-12+IL-18; 또는 130a1 G-CSF; 배지 또는 IL-18 단독에 대한 반응에서는 증식이 관찰되지 않았다. T 세포의 CD4+ 및 CD8+ 하위 집합 모두에 대해 유사한 결과가 나타났다(데이터 나타내지 않음).

[1005] 도 99C에 도시된 바와 같이, 인간 IL-18은 삼시스트론성 벡터를 발현하고 130a1 G-CSF로 자극된 T 세포에 의해 생산되었다. 다른 조건에서는 무시할 만한 수준의 IL-18이 검출되었다.

[1006] 따라서, G12/2R 134 ECD 및 인간 IL-18을 암호화하는 벡터(본 실시예에서는 메소텔린 특이적 CAR과 함께)가 형질도입된 인간 T 세포에서 T 세포 증식은 130a1 G-CSF뿐만 아니라 다양한 IL-2 함유 사이토카인 조합에 반응하여 유도되었다. IL-18의 발현은 130a1 G-CSF에 반응하여 유도되었다.

[1007] **실시예 60: 뮤린 T 세포에서 IL-18-기반 제어된 주변분비 신호전달 시스템의 시험관내 입증**

[1008] 뮤린 CD4 및 CD8 T 세포에 G12/2R 134 ECD 또는 G12/2R 134 ECD와 성숙 형태의 뮤린 IL-18(m18)을 암호화하는 레트로바이러스 벡터를 형질도입하였다. 형질도입된 수용체의 발현은 유세포 분석법으로 평가하였다. T 세포를 뮤린 IL-18의 증식 및 생산에 대해 평가하였다.

[1009] **방법**

[1010] 실시예 36과 유사한 방법을 사용하여, 건강한 공여자 마우스(C57Bl/6J)로부터 벌크 CD4 및 CD8 T 세포를 단리시키고, 가용성 항-CD3 및 항-CD28로 활성화하고, 인간 IL-2 (300 IU/㎖)의 존재 하에 4일 동안 확장시켰다. 세포에 G12/2R-1 134 ECD 또는 G12/2R-1 134 ECD + m18을 암호화하는 레트로바이러스 벡터를 형질도입하였다. 모의 형질도입된 T 세포는 레트로바이러스 없이 형질도입 프로토콜을 거쳤다. 확장 후, 세포를 세척하고 다음 사이토카인 조건에서 재플레이팅하였다: 배지 단독; 인간 IL-2(프로류킨, 300IU/㎖); 뮤린 IL-18(100ng/㎖); IL-2+mIL-12(10ng/㎖); IL-2+IL-12 +18; 또는 130a1 G-CSF(100ng/㎖). T 세포 증식을 48시간 후에 BrdU 혼입에 의해 평가하였다. IL-18 생산을 평가하기 위해, 형질도입된 T 세포를 세척하고 2×10^6 세포/㎖의 밀도로 48시간 동안 배지 단독; 인간 IL-2(300IU/㎖)+뮤린 IL-12(10ng/㎖); 또는 130a1 G-CSF(100ng/㎖)에 플레이팅하였다. 뮤린 IL-18은 ELISA(알앤디 시스템즈사(R&D Systems), 마우스 IL-18 ELISA 키트, 카탈로그 번호 7625)에 의해 세포 배양 상청액에서 검출되었다.

[1011] **결과**

[1012] 도 100A에 제시된 바와 같이, 인간 G-CSFR ECD의 발현은 모든 형질도입된 T 세포 집단에서 검출되었으며, 이는 성공적인 형질도입을 나타낸다. G12/2R 134 ECD의 발현은 그 자체에 비해 IL-18 CPS의 맥락에서 더 낮았고; 이는 이 레트로바이러스 벡터의 기술적 문제를 반영하는 것으로 보이는데, 그 이유는 이 문제가 동등한 렌티바이러스 벡터로 형질도입된 인간 T 세포에서는 나타나지 않았기 때문이다(실시예 57 참조).

[1013] 도 100B에 제시된 바와 같이, G12/2R 134 ECD 또는 G12/2R 134 ECD + m18로 형질도입된 T 세포는 IL-2, IL-2+IL-12, IL-2+IL-12+IL-18 또는 130a1 G-CSF에 반응하여 증식하였다.

[1014] 도 100C에 제시된 바와 같이, 뮤린 IL-18은 G12/2R 134 ECD + m18로 형질도입되고 IL-2+IL-12 또는 130a1 G-CSF로 자극된 T 세포에 의해 생산되었다.

[1015] 따라서, G12/2R 134 ECD + m18이 형질도입된 뮤린 T 세포에서, 130a1 G-CSF에 의한 자극은 증식 및 뮤린 IL-18 분비를 유도한다.

[1016] **실시예 61: 조작된 수용체 및 IL-18 CPS를 통해서 자극된 뮤린 T 세포의 시험관내 사이토카인 분비 프로파일**

[1017] OT-I T 세포를 G2R-2, G2R-3, G12/2R-1 또는 G12/2R-1+m18(모두 134 ECD 포함)을 암호화하는 레트로바이러스 벡터로 형질도입하였다. 형질도입된 수용체의 발현은 유세포 분석법으로 평가하였다. IL-18 및 32개의 다른 사

이토카인의 발현을 다중 비드 기반 분석으로 평가하였다.

[1018] **방법**

[1019] 실시예 36과 유사한 방법을 사용하여 건강한 공여자 마우스의 OT-IT T 세포에 G2R-2, G2R-3, G12/2R-1 또는 G12/2R-1+ m18(모두 134ECD)을 암호화하는 레트로바이러스 벡터를 형질도입하였다. 5일 후, T 세포에 G-CSFR ECD에 특이적인 항체를 사용하여 유세포 분석을 실시하였다. 분비된 사이토카인을 검출하기 위해 T 세포를 PBS로 3회 세척하고 48웰 플레이트에서 무(배지 단독, 음성 대조군), 인간 IL-2(프로류킨 300IU/㎖), 인간 IL-2+뮤린 IL-12(10ng/㎖) 또는 PEG-130a1 G-CSF(100ng/㎖)이 보충된 조직 배양 배지에서 2×10^6개 세포/㎖로 배양하였다. 48시간 후, 배양 상청액을 수집하고 -80℃에서 동결시켰다. 상청액을 이브 테크놀로지즈사(Eve Technologies)(캐나다 앨버타주 캘거리 소재)로 보내어 비드 기반 멀티플렉스 사이토카인 검정(Mouse Cytokine/Chemokine 31-Plex Discovery Assay® Array, MD31) 및 IL-18 검출 검정(Mouse IL-18 Single Plex Discovery Assay® Array, MDIL18)을 실시하였다.

[1020] **결과**

[1021] 도 100A에 제시된 바와 같이, 인간 G-CSFR ECD의 발현은 모든 형질도입된 T 세포 집단에서 검출되었으며, 이는 성공적인 형질도입을 나타낸다. G12/2R 134 ECD의 발현은 그 자체에 비해 IL-18 CPS의 맥락에서 더 낮았고; 이는 이 레트로바이러스 벡터의 기술적 문제를 반영하는 것으로 보이는데, 그 이유는 이 문제가 동등한 렌티바이러스 벡터로 형질도입된 인간 T 세포에서는 나타나지 않았기 때문이다(실시예 57 참조).

[1022] 도 101의 상단 패널은 뮤린 IL-18 생산에 대한 결과를 나타낸다. G12/2R 134 ECD + m18을 발현하는 T 세포만 검출 가능한 수준의 뮤린 IL-18을 생산하였다. 이들 세포에 의한 뮤린 IL-18의 발현은 IL-2+IL-12 또는 PEG-130a1 G-CSF에 의한 자극에 의해 증가되었다.

[1023] 표 35에 나타난 바와 같이, IL-2 또는 IL-2+IL-12에 의해 다음 사이토카인의 발현이 유도되었다: GM-CSF, TNF-알파, IL-10 및 VEGF. IL-2+IL-12는 추가로 IFN-감마의 발현을 유도하였다(표 35 및 도 101의 하단 패널). G12/2R 134 ECD + m18을 발현하는 T 세포에서, IL-2+IL-12는 IP-10의 발현을 추가로 유도하고 IFN-감마, TNF-알파 및 GM-CSF의 발현을 증가시켰다(표 35).

[1024] G2R-2 134 ECD, G2R-3 134 ECD 또는 G12/2R-1 134 ECD(IL-18 CPS 없음)를 발현하는 T 세포에서, PEG-130a1 G-CSF는 다음 사이토카인의 발현을 유도하였다: GM-CSF, TNF-알파, IL-10 및 VEGF. G12/2R-1 134 ECD + m18을 발현하는 T 세포에서, PEG-130a1 G-CSF는 IFN-감마 및 IP-10의 발현을 추가로 유도하고 GM-CSF, TNF-알파 및 IL-10의 발현을 증가시켰다(표 35).

[1025] 따라서, PEG-130a1 G-CSF에 반응하여, G2R-2 및 G2R-3은 IL-2에 의해 유도된 것과 유사한 사이토카인 분비 패턴을 유도하였다. G2/12R 134 ECD + m18을 발현하는 세포에서 IL-2+IL-12 또는 PEG-130a1 G-CSF로 자극하면 IL-18 생산이 증가하고, PEG-130a1 G-CSF로 자극하면 IL-2+IL-12에 의해에 의해서 유도되는 것과 유사한 사이토카인 분비 패턴이 유도된다.

[1026] **실시예 62: IL-2, IL-12 및 IL-18 신호를 모방하는 제어된 주변분비 신호전달 전략은 뮤린 유방 암종 모델에서 항-종양 활성을 향상시킨다.**

[1027] NOP 23 유방 종양 모델을 사용하여, G12/2R-1 134 ECD + m18을 암호화하는 레트로바이러스 벡터로 조작된 OT-I T 세포를 생체내 확장, 효과기 표현형 및 항종양 활성에 대해 평가하였다. 비교를 위해, 다른 마우스 군에 G7R-1, G2R-2 또는 G12/2R-1을 발현하는 OT-I T 세포(모두 134 ECD 포함)를 투여하였다.

[1028] **방법**

[1029] 본 발명자들은 실시예 36에 설명된 것과 유사한 방법을 사용하였다. Thy1.1+ OT-I 세포에 G7R-1, G2R-2, G12/2R-1 또는 G12/2R-1+m18(모두 134 ECD를 가짐)을 발현하도록 레트로바이러스를 형질도입하였다. 혈액 샘플의 유세포 분석에 사용된 항체 패널은 실시예 59와 유사하였다.

[1030] **결과**

[1031] 도 102A 내지 도 102D에 나타난 바와 같이, 입양 세포 전달일(제0일)에 형질도입된 OT-I T 세포는 인간 G-CSFR에 대해서 검출된 바와 같이 G7R, G2R-2 또는 G12/2R-1(모두 134 ECD를 가짐)을 발현하였다. G12/2R-1 134 ECD의 발현은 그 자체에 비해 IL-18 CPS의 맥락에서 더 낮았고; 이는 이 레트로바이러스 벡터의 기술적 문제를 반영하는 것으로 보이는데, 그 이유는 이 문제가 동등한 렌티바이러스 벡터로 형질도입된 인간 T 세포에서는 나

타나지 않았기 때문이다(실시예 59 참조).

[1032] 모든 마우스에게 동등한 용량(2.5×10^6)의 형질도입된 Thy1.1+ OT-I 세포를 제공하였다. 입양 세포 전달(제0일차) 후, 마우스를 무작위 배정하고 4주기 동안 7일마다 비히클 또는 PEG-130a1 G-CSF(10㎍/용량)를 무작위로 제공하였다.

[1033] G7R-1 코호트에서, 비히클만 제공받은 2/4 마우스는 PEG-130a1 G-CSF 치료군의 2/4 4 마우스와 비교하여 종양의 완전 퇴행(CR)을 경험하였다(도 102E). G2R-2 코호트에서, 비히클만 제공받은 1/5 마우스는 PEG-130a1 G-CSF 치료군의 3/4 마우스와 비교하여 종양의 완전 퇴행(CR)을 경험하였다(도 102 F). G12/2R-1 코호트에서는 PEG-130a1 G-CSF 치료군의 3/4 마우스에 비해 비히클만 제공받은 1/4 마우스가 CR을 경험하였지만, 후자 동물 중 한 마리는 약 35일 후에 종양 재발을 경험하였다(도 102G). G12/2R-1+m18 코호트에서, 비히클만 제공받은 3/4 마우스는 PEG-130a1 G-CSF 치료군의 4/4 마우스와 비교하여 CR을 경험하였다(도 102H). 모든 코호트에서 지속적인 CR을 경험한 마우스는 실질적인 이유로 연구가 중단되는 경우 제53일까지 종양이 없는 상태로 유지되었다.

[1034] Thy1.1+ OT-I 세포의 확장 및 지속성을 마우스로부터 수집한 연속 혈액 샘플에서 유세포 분석법에 의해서 모니터링하였다. G7R 코호트에서, 제4일에 Thy1.1+ OT-I 세포는 비히클 및 PEG-130a1 G-CSF 처리군에 대해서 각각 1.99% 및 15.31%(모두 CD8+ T 세포와의 비교)의 평균 피크 수준에 이르렀다(도 102I). G2R-2 코호트에서, 제4일에 Thy1.1+ OT-I 세포는 비히클 및 PEG-130a1 G-CSF 처리군에 대해서 각각 1.21% 및 13.78%의 평균 피크 수준에 이르렀다(도 102J). G12/2R-1 코호트에서, Thy1.1+ OT-I 세포는 130a1 G-CSF 및 PEG-130a1 G-CSF 처리군에 대해서 각각 2.18% 및 11.63%의 평균 피크 수준에 이르렀다(도 102K). G12/2R-1+m18 코호트에서, Thy1.1+ OT-I 세포는 130a1 G-CSF 및 PEG-130a1 G-CSF 처리군에 대해서 각각 2.35% 및 6.21%의 평균 피크 수준에 이르렀다(도 102L).

[1035] Thy1.1+ OT-I 세포의 T 효과기 기억(Tem, CD44+ CD62L-) 표현형을 또한 일련의 혈액 샘플에서 유세포 분석법으로 모니터링하였다. G7R 코호트에서, 제4일에 Tem 표현형을 나타내는 Thy1.1+ OT-I 세포의 평균 백분율은 비히클 및 PEG-130a1 G-CSF 처리군 각각에 대해서 17.75% 및 34.65%였다(도 102M). G2R-2 코호트에서, 이들 값은 비히클 및 PEG-130a1 G-CSF 처리군에 대해서 각각 15.12% 및 57.85%였다(도 102N). G12/2R-1 코호트에서, 이들 값은 비히클 및 PEG-130a1 G-CSF 처리군에 대해서 각각 14.78% 및 48.80%의 평균 피크 수준에 이르렀다(도 102O). G12/2R/18C 코호트에서, 이들 값은 비히클 및 PEG-130a1 G-CSF 처리군에 대해서 각각 42.03% 및 57.55%의 평균 피크 수준에 이르렀다(도 102P).

[1036] 연구 전반에 걸쳐, 모든 치료군의 모든 마우스는 일부의 종양 진행에도 불구하고 정상 체중을 유지하고 양호한 전반적인 건강을 나타내었다.

[1037] 따라서, 페길화된 130a1 G-CSF에 반응하는 OT-1 생체내 확장 및 효과기 분화의 정도는 수용체 세포내 도메인 및 CPS 사이토카인에 의해 영향을 받는다. G12/2R-1+m18은 이 모델에서 가장 강력한 항종양 효능을 나타내었다.

[1038] **실시예 63: 뮤린 유방 암종 모델에서 IL-2과 비교한 PEG-130a1 G-CSF의 생체내 용량-반응 특징**

[1039] NOP23 유방 종양 모델을 사용하여 G2R-3 134 ECD를 발현하는 OT-I T 세포를 다양한 용량의 PEG-130a1 G-CSF 또는 인간 IL-2(프로류킨)에 대한 반응으로 생체내 확장 및 효과기 표현형에 대해 평가하였다 말초 혈액의 호중구 및 호산구 수에 대한 이러한 사이토카인의 효과도 평가하였다.

[1040] **방법**

[1041] 본 발명자들은 실시예 36에 설명된 것과 유사한 방법을 사용하였다. Thy1.1+ OT-I T 세포에 G2R-3 134 ECD를 발현하도록 레트로바이러스를 형질도입하였다. 모든 마우스에게 2.5×10^6개 OT-I T 세포의 용량을 제공하였다. 입양 세포 전달일(제0일)에, 마우스를 6개의 사이토카인 군에 무작위 배정하였다: (1) 비히클 단독; (2) PEG-130a1 G-CSF 2㎎/용량, 주 4회 투여; (3) PEG-130a1 G-CSF 0.4㎎/용량, 주 4회 투여; (4) PEG-130a1 G-CSF 0.08㎎/용량, 주 4회 투여; (5) PEG-130a1 G-CSF, 0.1㎎의 매일 4회 투여 그 다음 0.4㎎의 주 3회 투여; 또는 (6) 인간 IL-2(프로류킨), 14일 동안 30,000IU/일, 그 다음 14일 동안 2일마다 30,000IU. 혈액 샘플의 유세포 분석에 사용된 항체 패널은 실시예 55에서 사용된 것과 유사하였다.

[1042] **결과**

[1043] Thy1.1+ OT-I 세포의 확장 및 지속성을 마우스로부터 수집한 연속 혈액 샘플에서 유세포 분석법에 의해서 모니터링하였다. 도 103A 내지 도 103E는 상이한 사이토카인 치료군에 대한 제4일에 Thy1.1+ OT-I 세포의 피크 백분

율(모두 CD8+ T 세포와 비교)을 나타낸다: 비히클 단독군 = 0.70%(각각의 패널에 나타냄); (A) 2mg PEG-130a1 G-CSF 군 = 9.38%; (B) 0.4mg PEG-130a1 G-CSF 군 = 4.09%; (C) 0.08mg PEG-130a1 G-CSF 군 = 1.50%; (D) 0.1, 그 다음 0.4mg PEG-130a1 G-CSF 군 = 18.80%; (E) 인간 IL-2 군 = 4.56%.

[1044] Thy1.1+ OT-I 세포의 T 효과기 기억(Tem, CD44+ CD62L-) 표현형을 또한 일련의 혈액 샘플에서 유세포 분석법으로 모니터링하였다. 도 103F 내지 도 103J는 제4일에 Tem 표현형을 나타낸 Thy1.1+ OT-I 세포의 평균 백분율을 나타낸다: 비히클 군 = 27.05%(각각의 패널에 나타냄); (A) 2mg PEG-130a1 G-CSF 군 = 66.38%; (B) 0.4mg PEG-130a1 G-CSF 군 = 74.80%; (C) 0.08mg PEG-130a1 G-CSF 군 = 33.03%; (D) 0.1, 그 다음 0.4mg PEG-130a1 G-CSF 군 = 74.90%; (E) 인간 IL-2 군 = 64.30%.

[1045] 시점에 걸쳐, 모든 사이토카인 처리군은 비히클 군과 비교하여 유사한 수준의 호중구를 나타냈다(도 103K 내지 도 103O).

[1046] 시점에 걸쳐 모든 사이토카인 처리군은 비히클 군과 비교하여 유사한 수준의 호산구를 나타내었지만(도 103P 내지 103S), 단, 8일과 12일에 호산구의 증가를 보인 IL-2 처리군은 예외이다(도 103T).

[1047] 연구 전반에 걸쳐 모든 치료군의 모든 마우스는 정상적인 체중을 유지했으며 한 가지 예외를 제외하고는 양호한 전반적인 건강 상태를 나타내었고; IL-2 치료군의 마우스 한 마리는 제19일에 사망했는데, 이는 아마도 IL-2 관련 독성으로 인한 것일 것이다.

[1048] 따라서, 말초 혈액에서 OT-1 T 세포의 생체내 확장 및 효과기 분화의 정도는 페길화된 130a1 G-CSF의 용량에 의해 영향을 받는다. 페길화된 130a1 G-CSF 및 IL-2는 혈액에서 유사한 OT-I T 세포 확장 및 분화 프로파일을 유도하였다. 평가된 용량에서 사이토카인은 혈액 내 호중구 수준에 큰 영향을 미치지 않았다. IL-2는 호산구 증가증을 고유하게 유발했으며 치료와 관련된 사망을 초래했을 수 있다.

[1049] 본 발명이 바람직한 실시형태 및 다양한 대안적인 실시형태를 참조하여 구체적으로 도시되고 설명되었지만, 당업자는 본 발명의 사상 및 범주에서 벗어나지 않으면서 형태 및 세부사항의 다양한 변경이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다.

[1050] 본 명세서의 본문 내에서 인용된 모든 참고문헌, 등록 특허 및 특허 출원은 모든 목적을 위해 전문이 참조에 의해 본 명세서에 원용된다.

[1051] 참고문헌

Wall EM, Milne K, Martin ML, Watson PH, Theiss P, Nelson BH (2007) Spontaneous mammary tumors differ widely in their inherent sensitivity to adoptively transferred T cells. Cancer Res 67:6442–6450

Yang, T., Martin, M. L., Nielsen, J. S., Milne, K., Wall, E. M., Lin, W., Watson, P. H., & Nelson, B. H. (2009). Mammary tumors with diverse immunological phenotypes show differing sensitivity to adoptively transferred CD8+ T cells lacking the Cbl-b gene. Cancer Immunology, Immunotherapy, 58(11), 1865–1875.

[1052]

표 12

G-CSFR$_{WT}$-ICD$_{GP130-IL-2R\beta}$의 서열

단백질	Uniprot ID	잔기 넘버링	폴리펩타이드 서열	서열 번호
G-CSFR (신호 펩타이드, ECD)	Q99062	1-627	MARLGNCSLTWAALIILLLPGSLEECGHISVS APIVHLGDPITASCIIKQNCSHLDPEPQILWRL GAELQPGGRQQRLSDGTQESIITLPHLNHTQA FLSCCLNWGNSLQILDQVELRAGYPPAIPHNL SCLMNLTTSSLICQWEPGPETHLPTSFTLKSF KSRGNCQTQGDSILDCVPKDGQSHCCIPRKH LLLYQNMGIWVQAENALGTSMSPQLCLDPM DVVKLEPPMLRTMDPSPEAAPPQAGCLQLC WEPWQPGLHINQKCELRHKPQRGEASWALV GPLPLEALQYELCGLLPATAYTLQIRCIRWPL PGHWSDWSPSLELRTTERAPTVRLDTWWRQ RQLDPRTVQLFWKPVPLEEDSGRIQGYVVSW RPSGQAGAILPLCNTTELSCTFHLPSEAQEVA LVAYNSAGTSRPTPVVFSESRGPALTRLHAM ARDPHSLWVGWEPPNPWPQGYVIEWGLGPP SASNSNKTWRMEQNGRATGFLLKENIRPFQL YEIIVTPLYQDTMGPSQHVYAYSQEMAPSHA PELHLKHIGKTWAQLEWVPEPPELGKSPLTH YTIFWTNAQNQSFSAILNASSRGFVLHGLEPA SLYHIHLMAASQAGATNSTVLTLMTLTPEGS ELH	3
gp130 (TM, ICD)	P40189	628-751	AIVVPVCLAFLLTTLLGVLFCFNKRDLIKKHI WPNVPDPSKSHIAQWSPHTPPRHNFNSKDQM YSDGNFTDVSVVEIEㅁKKPFPEDLKSLDLFK KEKINTEGHSSGIGGSSCMSSSRPSIS	4
IL-2RβICD)	P14784	752-857	ASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEAC QVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQ PLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPS TAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLG PPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGP	5

[1053]

			REGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAY LSLQELQGQDPTHLV	

[1054]

표 13

G-CSFR$_{WT}$-ICD$_{IL-2R\beta}$의 서열

단백질	Uniprot ID	잔기 넘버링	폴리펩타이드 서열	서열 번호
G-CSFR (신호 펩타이드, ECD)	Q99062	1-627	MARLGNCSLTWAALIILLLPGSLEECGHISVS APIVHLGDPITASCIIKQNCSHLDPEPQILWRL GAELQPGGRQQRLSDGTQESIITLPHLNHTQA FLSCCLNWGNSLQILDQVELRAGYPPAIPHNL SCLMNLTTSSLICQWEPGPETHLPTSFTLKSF KSRGNCQTQGDSILDCVPKDGQSHCCIPRKH LLLYQNMGIWVQAENALGTSMSPQLCLDPM DVVKLEPPMLRTMDPSPEAAPPQAGCLQLC WEPWQPGLHINQKCELRHKPQRGEASWALV GPLPLEALQYELCGLLPATAYTLQIRCIRWPL PGHWSDWSPSLELRTTERAPTVRLDTWWRQ RQLDPRTVQLFWKPVPLEEDSGRIQGYVVSW RPSGQAGAILPLCNTTELSCTFHLPSEAQEVA LVAYNSAGTSRPTPVVFSESRGPALTRLHAM ARDPHSLWVGWEPPNPWPQGYVIEWGLGPP SASNSNKTWRMEQNGRATGFLLKENIRPFQL YEIIVTPLYQDTMGPSQHVYAYSQEMAPSHA PELHLKHIGKTWAQLEWVPEPPELGKSPLTH YTIFWTNAQNQSFSAILNASSRGFVLHGLEPA SLYHIHLMAASQAGATNSTVLTLMTLTPEGS ELH	6
IL-2Rβ (TM 및 ICD)	P14784	628-956	AIVVPVCLAFLLTTLLGVLFCFNKRDLIKKHI WPNVPDPSKSHIAQWSPHTPPRHNFNSKDQM YSDGNFTDVSVVEIE및KKPFPEDLKSLDLFK KEKINTEGHSSGIGGSSCMSSSRPSISASLSSN HSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTY DPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDD AYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSG AGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVP	7

[1055]

			DLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFP WSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQ GQDPTHLV	

[1056]

표 14

G-CSFR$_{WT}$-ICD$_{\gamma C}$의 서열

단백질	Uniprot ID	잔기 넘버링	폴리펩타이드 서열	서열 번호
G-CSFR (신호 펩타이드, ECD)	Q99062	1-627	MARLGNCSLTWAALIILLLPGSLEECGHISVS APIVHLGDPITASCIIKQNCSHLDPEPQILWRL GAELQPGGRQQRLSDGTQESIITLPHLNHTQA FLSCCLNWGNSLQILDQVELRAGYPPAIPHNL SCLMNLTTSSLICQWEPGPETHLPTSFTLKSF KSRGNCQTQGDSILDCVPKDGQSHCCIPRKH LLLYQNMGIWVQAENALGTSMSPQLCLDPM DVVKLEPPMLRTMDPSPEAAPPQAGCLQLC WEPWQPGLHINQKCELRHKPQRGEASWALV GPLPLEALQYELCGLLPATAYTLQIRCIRWPL PGHWSDWSPSLELRTTERAPTVRLDTWWRQ RQLDPRTVQLFWKPVPLEEDSGRIQGYVVSW RPSGQAGAILPLCNTTELSCTFHLPSEAQEVA LVAYNSAGTSRPTPVVFSESRGPALTRLHAM ARDPHSLWVGWEPPNPWPQGYVIEWGLGPP SASNSNKTWRMEQNGRATGFLLKENIRPFQL YEIIVTPLYQDTMGPSQHVYAYSQEMAPSHA PELHLKHIGKTWAQLEWVPEPPELGKSPLTH YTIFWTNAQNQSFSAILNASSRGFVLHGLEPA SLYHIHLMAASQAGATNSTVLTLMTLTPEGS ELH	8
IL-2Rγ (TM 및 ICD)	P31785	628-735	VVISVGSMGLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLK NLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPD YSERLCLVSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSP YWAPPCYTLKPET	9

[1057]

[1058] [표 15A]

키메라 사이토카인 수용체

명칭	ECD	TMD	Box1/2	ICD	STAT 부위(들)	다른 부위(들)
G2R-1	G-CSFR	IL-2Rβ + γc	IL-2Rβ + γc	IL-2Rβ + γc	5, 5	Shc
G2R-2	G-CSFR	gp130	gp130	IL-2Rβ	5, 5	Shc
G2R-3	G-CSFR	G-CSFR	G-CSFR	IL-2Rβ	5, 5	Shc
G21R-1	G-CSFR	G-CSFR	G-CSFR	IL-21R	3	
G21R-2	G-CSFR	G-CSFR	G-CSFR	IL-21R	3	미지
G12R-1	G-CSFR	G-CSFR	G-CSFR	IL-12Rβ$_2$	4	

[1059]

[1060] [표 15B]

키메라 사이토카인 수용체

명칭	ECD	TMD	Box1/2	ICD	STAT 부위(들)	다른 부위(들)
G21/2R-1	G-CSFR	G-CSFR	G-CSFR	G-CSFR, IL-2Rβ	3, 5, 5	Shc
G12/2R-1	G-CSFR	G-CSFR	G-CSFR	IL-12Rβ$_2$ 로부터의 STAT4 부위가 IL-2Rβ로부터의 STAT5 부위를 대체함	4, 5	Shc
G21/12/2R-1	G-CSFR	G-CSFR	G-CSFR	G-CSFR ICD 로부터의 STAT3 부위; IL-12Rβ$_2$로부터의 STAT4 부위가 IL-2Rβ로부터의 STAT5 부위를 대체함	3, 4, 5	Shc
G27/2R-1	G-CSFR	gp130	gp130	gp130 + IL-2Rβ	3, 5, 5	SHP-2, Shc
G7R-1	G-CSFR	G-CSFR	G-CSFR	IL-7Rα	5	PI3K

[1061]

표 16

천연 ICD	Box 1 (공급원)	서열번호	Shc	SHP-2	STAT5	STAT4	STAT3	STAT1	PI3K
G-CSFR	LWPSVPDPA (Q99062)		n/a	n/a	n/a	n/a	Y704	n/a	n/a
gp130	IWPNVPDPS (P40189)		n/a	Y759	n/a	n/a	Y767	n/a	n/a
IL-2Rβ	LKCNTPDPS (P14784)		Y338	n/a	Y392, Y510	n/a	Y392, Y510	Y392, Y510	n/a
IL-21R	KIWAVPSPE (Q9HBE5)		n/a	n/a	n/a	n/a	Y510	Y510	n/a
IL-12Rβ$_2$	CSREIPDPA (Q99665)		n/a	n/a	Y800	Y800	Y800	n/a	n/a
IL-7Rα	VWPSLPDHK (P16871)		n/a	n/a	Y449	n/a	n/a	n/a	Y449

[1062]

표 17

신호 펩타이드

도메인	Uniprot ID	폴리펩타이드 서열	서열 번호
G-CSFR (신호 펩타이드)	Q99062	MARLGNCSLTWAALIILLLPGSLE	11
GM-CSFR-알파 (신호 펩타이드)	P15509	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP	12
도메인	**Genbank 수탁 ID**	**핵산 서열**	
G-CSFR (신호 펩타이드, 천연 서열)	NP_000751	ATGGCAAGGCTGGGGAAACTGCAGCCTGACTTGGGCTGCCCTGATC ATCCTGCTGCTCCCCGGAAGTCTGGAG	13
GM-CSFR-알파 (신호 펩타이드, 천연 서열)	NP_034100	ATGCTGCTGCTAGTGACCTCCCTGCTGCTCTGTGAGCTGCCTCACCC GGCGTTCCTGCTGATTCCT	14

[1063]

표 18

야생형 G-CSFR 세포외 도메인(ECD):

도메인	Uniprot ID	폴리펩타이드 서열	서열 번호
G-CSFR (ECD)	Q99062	ECGHISVSAPIVHLGDPITASCIIKQNCSHLDPEPQILWRLGAELQPGG RQQRLSDGTQESIITLPHLNHTQAFLSCCLNWGNSLQILDQVELRAGY PPAIPHNLSCLMNLTTSSLICQWEPGPETHLPTSFTLKSFKSRGNCQTQ GDSILDCVPKDGQSHCCIPRKHLLLYQNMGIWVQAENALGTSMSPQL CLDPMDVVKLEPPMLRTMDPSPEAAPPQAGCLQLCWEPWQPGLHI NQKCELRHKPQRGEASWALVGPLPLEALQYELCGLLPATAYTLQIRCIR WPLPGHWSDWSPSLELRTTERAPTVRLDTWWRQRQLDPRTVQLFW KPVPLEEDSGRIQGYVVSWRPSGQAGAILPLCNTTELSCTFHLPSEAQE VALVAYNSAGTSRPTPVVFSESRGPALTRLHAMARDPHSLWVGWEP PNPWPQGYVIEWGLGPPSASNSNKTWRMEQNGRATGFLLKENIRPF QLYEIIVTPLYQDTMGPSQHVYAYSQEMAPSHAPELHLKHIGKTWAQ LEWVPEPPELGKSPLTHYTIFWTNAQNQSFSAILNASSRGFVLHGLEP ASLYHIHLMAASQAGATNSTVLTLMTLTPEGSELH	15
도메인	**Genbank 수탁 ID**	**핵산 서열**	
G-CSFR (ECD, 천연 서열)	NP_000751	GAGTGCGGGCACATCAGTGTCTCAGCCCCCATCGTCCACCTGGGG GATCCCATCACAGCCTCCTGCATCATCAAGCAGAACTGCAGCCATC TGGACCCGGAGCCACAGATTCTGTGGAGACTGGGAGCAGAGCTTC AGCCCGGGGGCAGGCAGCAGCGTCTGTCTGATGGGACCCAGGAA TCTATCATCACCCTGCCCCACCTCAACCACACTCAGGCCTTTCTCTCC TGCTGCCTGAACTGGGGCAACAGCCTGCAGATCCTGGACCAGGTT GAGCTGCGCGCAGGCTACCCTCCAGCCATACCCCACAACCTCTCCT GCCTCATGAACCTCACAACCAGCAGCCTCATCTGCCAGTGGGAGCC AGGACCTGAGACCCACCTACCCACCAGCTTCACTCTGAAGAGTTTC AAGAGCCGGGGCAACTGTCAGACCCAAGGGGACTCCATCCTGGAC TGCGTGCCCAAGGACGGGCAGAGCCACTGCTGCATCCCACGCAAA CACCTGCTGTTGTACCAGAATATGGGCATCTGGGTGCAGGCAGAG AATGCGCTGGGGACCAGCATGTCCCCACAACTGTGTCTTGATCCCA TGGATGTTGTGAAACTGGAGCCCCCCATGCTGCGGACCATGGACC CCAGCCCTGAAGCGGCCCCTCCCCAGGCAGGCTGCCTACAGCTGT GCTGGGAGCCATGGCAGCCAGGCCTGCACATAAATCAGAAGTGTG AGCTGCGCCACAAGCCGCAGCGTGGAGAAGCCAGCTGGGCACTG GTGGGCCCCCTCCCCTTGGAGGCCCTTCAGTATGAGCTCTGCGGGC TCCTCCCAGCCACGGCCTACACCCTGCAGATACGCTGCATCCGCTG GCCCCTGCCTGGCCACTGGAGCGACTGGAGCCCCAGCCTGGAGCT GAGAACTACCGAACGGGCCCCCACTGTCAGACTGGACACATGGTG GCGGCAGAGGCAGCTGGACCCCAGGACAGTGCAGCTGTTCTGGA AGCCAGTGCCCCTGGAGGAAGACAGCGGACGGATCCAAGGTTAT GTGGTTTCTTGGAGACCCTCAGGCCAGGCTGGGGCCATCCTGCCCC TCTGCAACACCACAGAGCTCAGCTGCACCTTCCACCTGCCTTCAGA AGCCCAGGAGGTGGCCCTTGTGGCCTATAACTCAGCCGGGACCTC	16

[1064]

		TCGTCCCACTCCGGTGGTCTTCTCAGAAAGCAGAGGCCCAGCTCTG ACCAGACTCCATGCCATGGCCCGAGACCCTCACAGCCTCTGGGTAG GCTGGGAGCCCCCCAATCCATGGCCTCAGGGCTATGTGATTGAGT GGGGCCTGGGCCCCCCCAGCGCGAGCAATAGCAACAAGACCTGG AGGATGGAACAGAATGGGAGAGCCACGGGGTTTCTGCTGAAGGA GAACATCAGGCCCTTTCAGCTCTATGAGATCATCGTGACTCCCTTGT ACCAGGACACCATGGGACCCTCCCAGCATGTCTATGCCTACTCTCA AGAAATGGCTCCCTCCCATGCCCCAGAGCTGCATCTAAAGCACATT GGCAAGACCTGGGCACAGCTGGAGTGGGTGCCTGAGCCCCCTGA GCTGGGGAAGAGCCCCCTTACCCACTACACCATCTTCTGGACCAAC GCTCAGAACCAGTCCTTCTCCGCCATCCTGAATGCCTCCTCCCGTGG CTTTGTCCTCCATGGCCTGGAGCCCGCCAGTCTGTATCACATCCACC TCATGGCTGCCAGCCAGGCTGGGGCCACCAACAGTACAGTCCTCA CCCTGATGACCTTGACCCCAGAGGGGTCGGAGCTACAC	
G-CSFR (ECD, 변경된 4 개의 코돈)		GAGTGCGGGCACATCAGTGTCTCAGCCCCCATCGTCCACCTGGGG GATCCCATCACAGCCTCCTGCATCATCAAGCAGAACTGCAGCCATC TGGACCCGGAGCCACAGATTCTGTGGAGACTGGGAGCAGAGCTTC AGCCCGGGGGCAGGCAGCAGCGTCTGTCTGATGGGACCCAGGAA TCTATCATCACCCTGCCCCACCTCAACCACACTCAGGCCTTTCTCTCC TGCTGCCTGAACTGGGGCAACAGCCTGCAGATCCTGGACCAGGTT GAGCTGCGCGCAGGCTACCCTCCAGCCATACCCCACAACCTCTCCT GCCTCATGAACCTCACAACCAGCAGCCTCATCTGCCAGTGGGAGCC AGGACCTGAGACCCACCTACCCACCAGCTTCACTCTGAAGAGTTTC AAGAGCCGGGGCAACTGTCAGACCCAAGGGGACTCCATCCTGGAC TGCGTGCCCAAGGACGGGCAGAGCCACTGCTGCATCCCACGCAAA CACCTGCTGTTGTACCAGAATATGGGCATCTGGGTGCAGGCAGAG AATGCGCTGGGGACCAGCATGTCCCCACAACTGTGTCTTGATCCCA TGGATGTTGTGAAACTGGAGCCCCCCATGCTGCGGACCATGGACC CCAGCCCTGAAGCGGCCCCTCCCCAGGCAGGCTGCCTACAGCTGT GCTGGGAGCCATGGCAGCCAGGCCTGCACATAAATCAGAAGTGTG AGCTGCGCCACAAGCCGCAGCGTGGAGAAGCCAGCTGGGCACTG GTGGGCCCCCTCCCCTTGGAGGCCCTTCAGTATGAGCTCTGCGGGC TCCTCCCAGCCACGGCCTACACCCTGCAGATACGCTGCATCCGCTG GCCCCTGCCTGGCCACTGGAGCGACTGGAGCCCCAGCCTGGAGCT GAGAACTACCGAACGGGCCCCCACTGTCAGACTGGACACATGGTG GCGGCAGAGGCAGCTGGACCCCAGGACAGTGCAGCTGTTCTGGA AGCCAGTGCCCCTGGAGGAAGACAGCGGACGCATCCAAGGTTATG TGGTTTCTTGGAGACCCTCAGGCCAGGCTGGGGCCATCCTGCCCCT CTGCAACACCACAGAGCTCAGCTGCACCTTCCACCTGCCTTCAGAA GCCCAGGAGGTGGCCCTTGTGGCCTATAACTCAGCCGGGACCTCTC GCCCCACCCCGGTGGTCTTCTCAGAAAGCAGAGGCCCAGCTCTGAC CAGACTCCATGCCATGGCCCGAGACCCTCACAGCCTCTGGGTAGGC TGGGAGCCCCCCAATCCATGGCCTCAGGGCTATGTGATTGAGTGG GGCCTGGGCCCCCCCAGCGCGAGCAATAGCAACAAGACCTGGAG GATGGAACAGAATGGGAGAGCCACGGGGTTTCTGCTGAAGGAGA ACATCAGGCCCTTTCAGCTCTATGAGATCATCGTGACTCCCTTGTAC CAGGACACCATGGGACCCTCCCAGCATGTCTATGCCTACTCTCAAG AAATGGCTCCCTCCCATGCCCCAGAGCTGCATCTAAAGCACATTGG	17

[1065]

		CAAGACCTGGGCACAGCTGGAGTGGGTGCCTGAGCCCCCTGAGCT GGGGAAGAGCCCCCTTACCCACTACACCATCTTCTGGACCAACGCT CAGAACCAGTCCTTCTCCGCCATCCTGAATGCATCCTCCCGTGGCTT TGTCCTCCATGGCCTGGAGCCCGCCAGTCTGTATCACATCCACCTCA TGGCTGCCAGCCAGGCTGGGGCCACCAACAGTACAGTCCTCACCCT GATGACCTTGACCCCAGAGGGGTCGGAGCTACAC	

[1066]

표 19

TRANSMEMBRANE 도메인 (TM)

도메인	Uniprot ID	폴리펩타이드 서열	서열 번호
G-CSFR (TM)	Q99062	IILGLFGLLLLLTCLCGTAWLCC	18
gp130 (TM)	P40189	AIVVPVCLAFLLTTLLGVLFCF	19
IL-2Rb (TM)	P14784	IPWLGHLLVGLSGAFGFIILVYLLI	20
IL-2RG (TM)	P31785	VVISVGSMGLIISLLCVYFWL	21
도메인	Genbank 수탁 ID	핵산 서열	
G-CSFR (TM)	NP_000751	ATCATCCTGGGCCTGTTCGGCCTCCTGCTGTTGCTCAC CTGCCTCTGTGGAACTGCCTGGCTCTGTTGC	22
gp130 (TM)	NM_002184	GCCATAGTCGTGCCTGTTTGCTTAGCATTCCTATTGAC AACTCTTCTGGGAGTGCTGTTCTGCTTT	23
IL-2Rb (TM)	NM_000878	ATTCCGTGGCTCGGCCACCTCCTCGTGGGTCTCAGCGG GGCTTTTGGCTTCATCATCTTAGTGTACTTGCTGATC	24
IL-2RG (TM)	NP_000197	GTGGTTATCTCTGTTGGCTCCATGGGATTGATTATCAG CCTTCTCTGTGTGTATTTCTGGCTG	25

[1067]

표 20

세포내 도메인(ICD)

도메인	Uniprot ID	폴리펩타이드 서열	서열 번호
IL-2Rb (ICD, G2R-1)	P14784	NCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSF SPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQ GYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPL SGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSL QERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGP REGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV*	26
IL-2RG (ICD, G2R-1)	P31785	ERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCL VSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSPYWAPPCYTLKPET*	27
gp130 (ICD, G2R-2)	P40189	NKRDLIKKHIWPNVPDPSKSHIAQWSPHTPPRHNFNSKDQMYSDGN FTDVSVVEIE 및 KKPFPEDLKSLDLFKKEKINTEGHSSGIGGSSCMSSSR PSIS	28
IL-2Rb (ICD, G2R-2)	P14784	ASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEG VAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTA PGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPE LVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLS LQELQGQDPTHLV*	29
G-CSFR (ICD, G2R-3)	Q99062	SPNRKNPLWPSVPDPAHSSLGSWVPTIMEEDAFQLPGLGTPPITKLTV LEEDEKKPVPWESH	30
IL-2Rb (ICD, G2R-3)	P14784	SSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAG APTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGG SGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVL REAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQ ELQGQDPTHLV*	31
G-CSFR (ICD, G12R-1)	Q99062	SPNRKNPLWPSVPDPAHSSLGSWVPTIMEEDAFQLPGLGTPPITKLTV LEEDEKKPVPWESHNSSET	32
IL-12Rb2 (ICD, G12R-1)	Q99665	AGDLPTHDGYLPSNIDDLPSHEAPLADSLEELEPQHISLSVFPSSSLHPL TFSCGDKLTLDQLKMRCDSLML*	33
G-CSFR (ICD, G21R-1)	Q99062	SPNRKNPLWPSVPDPAHSSLGSWVPTIMEEDAFQLPGLGTPPITKLTV LEEDEKKPVPWESHNSSET	34
IL-21R (ICD, G21R-1)	Q9HBE5	SPGDEGPPRSYLRQWVVIPPPLSSPGPQAS*	35
G-CSFR (ICD, G21R-2)	Q99062	SPNRKNPLWPSVPDPAHSSLGSWVPTIMEEDAFQLPGLGTPPITKLTV LEEDEKKPVPWESHN	36
IL-21R (ICD, G21R-2)	Q9HBE5	QNSGGSAYSEERDRPYGLVSIDTVTVLDAEGPCTWPCSCEDDGYPAL DLDAGLEPSPGLEDPLLDAGTTVLSCGCVSAGSPGLGGPLGSLLDRLKP PLADGEDWAGGLPWGGRSPGGVSESEAGSPLAGLDMDTFDSGFVG SDCSSPVECDFTSPGDEGPPRSYLRQWVVIPPPLSSPGPQAS*	37
G-CSFR (ICD, G21/2R-1)	Q99062	SPNRKNPLWPSVPDPAHSSLGSWVPTIMEEDAFQLPGLGTPPITKLTV LEEDEKKPVPWESHNSSETCGLPTLVQTYVLQGDPRAVSTQPQSQ	38
IL-2Rb	P14784	SSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAG APTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGG	39

[1068]

[1069]

(ICD, G21/2R-1)		SGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVL REAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQ ELQGQDPTHLV*	
G-CSFR (ICD, G12/2R-1)	Q99062	SPNRKNPLWPSVPDPAHSSLGSWVPTIMEEDAFQLPGLGTPPITKLTV LEEDEKKPVPWESH	40
IL-2Rb (ICD, G12/2R-1)	P14784	SSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDP	41
IL-12Rb2 (ICD, G12/2R-1)	Q99665	AGDLPTHDGYLPSNIDDLPS	42
IL-2Rb (ICD, G12/2R-1)	P14784	GGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPD LVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNAR LPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV*	43
G-CSFR (ICD, G21/12/2R-1)	Q99062	SPNRKNPLWPSVPDPAHSSLGSWVPTIMEEDAFQLPGLGTPPITKLTV LEEDEKKPVPWESHNSSETCGLPTLVQTYVLQGDPRAVSTQPQSQ	44
IL-2Rb (ICD, G21/12/2R-1)	P14784	SSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDP	45
IL-12Rb2 (ICD, G21/12/2R-1)	Q99665	AGDLPTHDGYLPSNIDDLPS	46
IL-2Rb (ICD, G21/12/2R-1)	P14784	GGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPD LVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNAR LPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV*	47
gp130 (ICD, G27/2R-1)	P40189	NKRDLIKKHIWPNVPDPSKSHIAQWSPHTPPRHNFNSKDQMYSDGN FTDVSVVEIE 및 KKPFPEDLKSLDLFKKEKINTEGHSSGIGGSSCMSSSR PSISSSDENESSQNTSSTVQYSTVVHSGYRHQVPSVQVFSR	48
IL-2Rb (ICD, G27/2R-1)	P14784	ASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEG VAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTA PGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPE LVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLS LQELQGQDPTHLV*	49
G-CSFR (ICD, G7R-1)	Q99062	SPNRKNPLWPSVPDPAHSSLGSWVPTIMEEDAFQLPGLGTPPITKLTV LEEDEKKPVPWESH	50
IL-7Ra (ICD, G7R-1)	P16871	SGKNGPHVYQDLLLSLGTTNSTLPPPFSLQSGILTLNPVAQGQPILTSLG SNQEEAYVTMSSFYQNQ*	51
G-CSFR (ICD, G21/7R-1)	Q99062	SPNRKNPLWPSVPDPAHSSLGSWVPTIMEEDAFQLPGLGTPPITKLTV LEEDEKKPVPWESHNSSETCGLPTLVQTYVLQGDPRAVSTQPQSQ	52
IL7R (ICD, G21/7R-1)	P16871	SSSRSLDCRESGKNGPHVYQDLLLSLGTTNSTLPPPFSLQSGILTLNPVA QGQPILTSLGSNQEEAYVTMSSFYQNQ*	53
도메인	**Genbank 수탁 ID**	**핵산 서열**	
IL-2RB (ICD, G2R-1)	NM_000878	AACTGCAGGAACACCGGGCCATGGCTGAAGAAGGTCCTGAAGTGT AACACCCCAGACCCCTCGAAGTTCTTTTCCCAGCTGAGCTCAGAGC ATGGAGGAGACGTCCAGAAGTGGCTCTCTTCGCCCTTCCCCTCATC GTCCTTCAGCCCTGGCGGCCTGGCACCTGAGATCTCGCCACTAGAA GTGCTGGAGAGGGACAAGGTGACGCAGCTGCTCCTGCAGCAGGA CAAGGTGCCTGAGCCCGCATCCTTAAGCAGCAACCACTCGCTGACC AGCTGCTTCACCAACCAGGGTTACTTCTTCTTCCACCTCCCGGATGC CTTGGAGATAGAGGCCTGCCAGGTGTACTTTACTTACGACCCCTAC	54

		TCAGAGGAAGACCCTGATGAGGGTGTGGCCGGGGCACCCACAGG GTCTTCCCCCCAACCCCTGCAGCCTCTGTCAGGGGAGGACGACGCC TACTGCACCTTCCCCTCCAGGGATGACCTGCTGCTCTTCTCCCCCAG TCTCCTCGGTGGCCCCAGCCCCCCAAGCACTGCCCCTGGGGGCAGT GGGGCCGGTGAAGAGAGGATGCCCCCTTCTTTGCAAGAAAGAGTC CCCAGAGACTGGGACCCCCAGCCCCTGGGGCCTCCCACCCCAGGA GTCCCAGACCTGGTGGATTTTCAGCCACCCCCTGAGCTGGTGCTGC GAGAGGCTGGGGAGGAGGTCCCTGACGCTGGCCCCAGGGAGGGA GTCAGTTTCCCCTGGTCCAGGCCTCCTGGGCAGGGGGAGTTCAGG GCCCTTAATGCTCGCCTGCCCCTGAACACTGATGCCTACTTGTCCCT CCAAGAACTCCAGGGTCAGGACCCAACTCACTTGGTGTAG	
IL-2RG (ICD, G2R-1)	NP_000197	GAACGGACGATGCCCCGAATTCCCACCCTGAAGAACCTAGAGGAT CTTGTTACTGAATACCACGGGAACTTTTCGGCCTGGAGTGGTGTGT CTAAGGGACTGGCTGAGAGTCTGCAGCCAGACTACAGTGAACGAC TCTGCCTCGTCAGTGAGATTCCCCCAAAAGGAGGGGCCCTTGGGG AGGGGCCTGGGGCCTCCCCATGCAACCAGCATAGCCCCTACTGGG CCCCCCCATGTTACACCCTAAAGCCTGAAACCTGA	55
gp130 (ICD, G2R-2)	NM_002184	AATAAGCGAGACCTAATTAAAAAACACATCTGGCCTAATGTTCCAG ATCCTTCAAAGAGTCATATTGCCCAGTGGTCACCTCACACTCCTCCA AGGCACAATTTTAATTCAAAAGATCAAATGTATTCAGATGGCAATT TCACTGATGTAAGTGTTGTGGAAATAGAAGCAAATGACAAAAAGC CTTTTCCAGAAGATCTGAAATCATTGGACCTGTTCAAAAAGGAAAA AATTAATACTGAAGGACACAGCAGTGGTATTGGGGGGTCTTCATG TATGTCATCTTCTAGGCCAAGCATTTCT	56
IL-2Rb (ICD, G2R-2)	NM_000878	GCATCCTTAAGCAGCAACCACTCGCTGACCAGCTGCTTCACCAACC AGGGTTACTTCTTCTTCCACCTCCCGGATGCCTTGGAGATAGAGGC CTGCCAGGTGTACTTTACTTACGACCCCTACTCAGAGGAAGACCCT GATGAGGGTGTGGCCGGGGCACCCACAGGGTCTTCCCCCCAACCC CTGCAGCCTCTGTCAGGGGAGGACGACGCCTACTGCACCTTCCCCT CCAGGGATGACCTGCTGCTCTTCTCCCCCAGTCTCCTCGGTGGCCCC AGCCCCCCAAGCACTGCCCCTGGGGGCAGTGGGGCCGGTGAAGA GAGGATGCCCCCTTCTTTGCAAGAAAGAGTCCCCAGAGACTGGGA CCCCCAGCCCCTGGGGCCTCCCACCCCAGGAGTCCCAGACCTGGTG GATTTTCAGCCACCCCCTGAGCTGGTGCTGCGAGAGGCTGGGGAG GAGGTCCCTGACGCTGGCCCCAGGGAGGGAGTCAGTTTCCCCTGG TCCAGGCCTCCTGGGCAGGGGGAGTTCAGGGCCCTTAATGCTCGC CTGCCCCTGAACACTGATGCCTACTTGTCCCTCCAAGAACTCCAGG GTCAGGACCCAACTCACTTGGTGTAG	57
G-CSFR (ICD, G2R-3)	NP_000751	AGCCCCAACAGGAAGAATCCCCTCTGGCCAAGTGTCCCAGACCCAG CTCACAGCAGCCTGGGCTCCTGGGTGCCCACAATCATGGAGGAGG ATGCCTTCCAGCTGCCCGGCCTTGGCACGCCACCCATCACCAAGCT CACAGTGCTGGAGGAGGATGAAAAGAAGCCGGTGCCCTGGGAGT CCCAT	58

[1070]

[1071]

IL-2Rb (ICD, G2R-3)	NM_000878	AGCAGCAACCACTCGCTGACCAGCTGCTTCACCAACCAGGGTTACT TCTTCTTCCACCTCCCGGATGCCTTGGAGATAGAGGCCTGCCAGGT GTACTTTACTTACGACCCCTACTCAGAGGAAGACCCTGATGAGGGT GTGGCCGGGGCACCCACAGGGTCTTCCCCCCAACCCCTGCAGCCTC TGTCAGGGGAGGACGACGCCTACTGCACCTTCCCCTCCAGGGATG ACCTGCTGCTCTTCTCCCCCAGTCTCCTCGGTGGCCCCAGCCCCCCA AGCACTGCCCCTGGGGGCAGTGGGGCCGGTGAAGAGAGGATGCC CCCTTCTTTGCAAGAAAGAGTCCCCAGAGACTGGGACCCCCAGCCC CTGGGGCCTCCCACCCCAGGAGTCCCAGACCTGGTGGATTTTCAGC CACCCCCTGAGCTGGTGCTGCGAGAGGCTGGGGAGGAGGTCCCTG ACGCTGGCCCCAGGGAGGGAGTCAGTTTCCCCTGGTCCAGGCCTC CTGGGCAGGGGGAGTTCAGGGCCCTTAATGCTCGCCTGCCCCTGA ACACTGATGCCTACTTGTCCCTCCAAGAACTCCAGGGTCAGGACCC AACTCACTTGGTGTAG	59
G-CSFR (ICD, G12R-1)	NP_000751	AGCCCCAACAGGAAGAATCCCCTCTGGCCAAGTGTCCCAGACCCAG CTCACAGCAGCCTGGGCTCCTGGGTGCCCACAATCATGGAGGAGG ATGCCTTCCAGCTGCCCGGCCTTGGCACGCCACCCATCACCAAGCT CACAGTGCTGGAGGAGGATGAAAAGAAGCCGGTGCCCTGGGAGT CCCATAACAGCTCAGAGACC	60
IL-12Rb2 (ICD, G12R-1)	NP_001550	GCAGGTGACCTTCCCACCCATGATGGCTACTTACCCTCCAACATAG ATGACCTCCCCTCACATGAGGCACCTCTCGCTGACTCTCTGGAAGA ACTGGAGCCTCAGCACATCTCCCTTTCTGTTTTCCCCTCAAGTTCTCT TCACCCACTCACCTTCTCCTGTGGTGATAAGCTGACTCTGGATCAGT TAAAGATGAGGTGTGACTCCCTCATGCTCTGA	61
G-CSFR (ICD, G21R-1)	NP_000751	AGCCCCAACAGGAAGAATCCCCTCTGGCCAAGTGTCCCAGACCCAG CTCACAGCAGCCTGGGCTCCTGGGTGCCCACAATCATGGAGGAGG ATGCCTTCCAGCTGCCCGGCCTTGGCACGCCACCCATCACCAAGCT CACAGTGCTGGAGGAGGATGAAAAGAAGCCGGTGCCCTGGGAGT CCCATAACAGCTCAGAGACC	62
IL-21R (ICD, G21R-1)	NP_068570 (변경된 1 개의 코돈)	AGCCCTGGGGACGAAGGACCCCCCCGGAGCTACCTCCGCCAGTGG GTGGTCATTCCTCCGCCACTTTCGAGCCCTGGACCCCAGGCCAGCT AA	63
G-CSFR (ICD, G21R-2)	NP_000751	AGCCCCAACAGGAAGAATCCCCTCTGGCCAAGTGTCCCAGACCCAG CTCACAGCAGCCTGGGCTCCTGGGTGCCCACAATCATGGAGGAGG ATGCCTTCCAGCTGCCCGGCCTTGGCACGCCACCCATCACCAAGCT CACAGTGCTGGAGGAGGATGAAAAGAAGCCGGTGCCCTGGGAGT CCCATAAC	64
IL-21R (ICD, G21R-2)	NP_068570 (변경된 1 개의 코돈)	CAGAACTCGGGGGGCTCAGCTTACAGTGAGGAGAGGGATCGGCC ATACGGCCTGGTGTCCATTGACACAGTGACTGTGCTAGATGCAGA GGGGCCATGCACCTGGCCCTGCAGCTGTGAGGATGACGGCTACCC AGCCCTGGACCTGGATGCTGGCCTGGAGCCCAGCCCAGGCCTAGA GGACCCACTCTTGGATGCAGGGACCACAGTCCTGTCCTGTGGCTGT GTCTCAGCTGGCAGCCCTGGGCTAGGAGGGCCCCTGGGAAGCCTC	65

		CTGGACAGACTAAAGCCACCCCTTGCAGATGGGGAGGACTGGGCT GGGGGACTGCCCTGGGGTGGCCGGTCACCTGGAGGGGTCTCAGA GAGTGAGGCGGGCTCACCCCTGGCCGGCCTGGATATGGACACGTT TGACAGTGGCTTTGTGGGCTCTGACTGCAGCAGCCCTGTGGAGTGT GACTTCACCAGCCCTGGGGACGAAGGACCCCCCCGGAGCTACCTCC GCCAGTGGGTGGTCATTCCTCCGCCACTTTCGAGCCCTGGACCCCA GGCCAGC	
G-CSFR (ICD, G21/2R-1)	NP_000751	AGCCCCAACAGGAAGAATCCCCTCTGGCCAAGTGTCCCAGACCCAG CTCACAGCAGCCTGGGCTCCTGGGTGCCCACAATCATGGAGGAGG ATGCCTTCCAGCTGCCCGGCCTTGGCACGCCACCCATCACCAAGCT CACAGTGCTGGAGGAGGATGAAAAGAAGCCGGTGCCCTGGGAGT CCCATAACAGCTCAGAGACCTGTGGCCTCCCCACTCTGGTCCAGAC CTATGTGCTCCAGGGGGACCCAAGAGCAGTTTCCACCCAGCCCCAA TCCCAG	66
IL-2Rb (ICD, G21/2R-1)	NM_000878	AGCAGCAACCACTCGCTGACCAGCTGCTTCACCAACCAGGGTTACT TCTTCTTCCACCTCCCGGATGCCTTGGAGATAGAGGCCTGCCAGGT GTACTTTACTTACGACCCCTACTCAGAGGAAGACCCTGATGAGGGT GTGGCCGGGGCACCCACAGGGTCTTCCCCCCAACCCCTGCAGCCTC TGTCAGGGGAGGACGACGCCTACTGCACCTTCCCCTCCAGGGATG ACCTGCTGCTCTTCTCCCCCAGTCTCCTCGGTGGCCCCAGCCCCCCA AGCACTGCCCCTGGGGGCAGTGGGGCCGGTGAAGAGAGGATGCC CCCTTCTTTGCAAGAAAGAGTCCCCAGAGACTGGGACCCCCAGCCC CTGGGGCCTCCCACCCCAGGAGTCCCAGACCTGGTGGATTTTCAGC CACCCCCTGAGCTGGTGCTGCGAGAGGCTGGGGAGGAGGTCCCTG ACGCTGGCCCCAGGGAGGGAGTCAGTTTCCCCTGGTCCAGGCCTC CTGGGCAGGGGGAGTTCAGGGCCCTTAATGCTCGCCTGCCCCTGA ACACTGATGCCTACTTGTCCCTCCAAGAACTCCAGGGTCAGGACCC AACTCACTTGGTGTAG	67
G-CSFR (ICD, G12/2R-1)	NP_000751	AGCCCCAACAGGAAGAATCCCCTCTGGCCAAGTGTCCCAGACCCAG CTCACAGCAGCCTGGGCTCCTGGGTGCCCACAATCATGGAGGAGG ATGCCTTCCAGCTGCCCGGCCTTGGCACGCCACCCATCACCAAGCT CACAGTGCTGGAGGAGGATGAAAAGAAGCCGGTGCCCTGGGAGT CCCAT	68
IL-2Rb (ICD, G12/2R-1)	NM_000878	AGCAGCAACCACTCGCTGACCAGCTGCTTCACCAACCAGGGTTACT TCTTCTTCCACCTCCCGGATGCCTTGGAGATAGAGGCCTGCCAGGT GTACTTTACTTACGACCCCTACTCAGAGGAAGACCCT	69
IL-12Rb2 (ICD, G12/2R-1)	NP_001550	GCAGGTGACCTTCCCACCCATGATGGCTACTTACCCTCCAACATAG ATGACCTCCCCTCA	70
IL-2Rb (ICD, G12/2R-1)	NM_000878	GGTGGCCCCAGCCCCCCAAGCACTGCCCCTGGGGGCAGTGGGGCC GGTGAAGAGAGGATGCCCCCTTCTTTGCAAGAAAGAGTCCCCAGA GACTGGGACCCCCAGCCCCTGGGGCCTCCCACCCCAGGAGTCCCA GACCTGGTGGATTTTCAGCCACCCCCTGAGCTGGTGCTGCGAGAG GCTGGGGAGGAGGTCCCTGACGCTGGCCCCAGGGAGGGAGTCAG TTTCCCCTGGTCCAGGCCTCCTGGGCAGGGGGAGTTCAGGGCCCTT	71

[1072]

		AATGCTCGCCTGCCCCTGAACACTGATGCCTACTTGTCCCTCCAAGA ACTCCAGGGTCAGGACCCAACTCACTTGGTGTAG	
G-CSFR (ICD, G21/12/2R-1)	NP_000751	AGCCCCAACAGGAAGAATCCCCTCTGGCCAAGTGTCCCAGACCCAG CTCACAGCAGCCTGGGCTCCTGGGTGCCCACAATCATGGAGGAGG ATGCCTTCCAGCTGCCCGGCCTTGGCACGCCACCCATCACCAAGCT CACAGTGCTGGAGGAGGATGAAAAGAAGCCGGTGCCCTGGGAGT CCCATAACAGCTCAGAGACCTGTGGCCTCCCCACTCTGGTCCAGAC CTATGTGCTCCAGGGGGACCCAAGAGCAGTTTCCACCCAGCCCCAA TCCCAG	72
IL-2Rb (ICD, G21/12/2R-1)	NM_000878	AGCAGCAACCACTCGCTGACCAGCTGCTTCACCAACCAGGGTTACT TCTTCTTCCACCTCCCGGATGCCTTGGAGATAGAGGCCTGCCAGGT GTACTTTACTTACGACCCCTACTCAGAGGAAGACCCT	73
IL-12Rb2 (ICD, G21/12/2R-1)	NP_001550	GCAGGTGACCTTCCCACCCATGATGGCTACTTACCCTCCAACATAG ATGACCTCCCCTCA	74
IL-2Rb (ICD, G21/12/2R-1)	NM_000878	GGTGGCCCCAGCCCCCCAAGCACTGCCCCTGGGGGCAGTGGGGCC GGTGAAGAGAGGATGCCCCCTTCTTTGCAAGAAAGAGTCCCCAGA GACTGGGACCCCCAGCCCCTGGGGCCTCCCACCCCAGGAGTCCCA GACCTGGTGGATTTTCAGCCACCCCCTGAGCTGGTGCTGCGAGAG GCTGGGGAGGAGGTCCCTGACGCTGGCCCCAGGGAGGGAGTCAG TTTCCCCTGGTCCAGGCCTCCTGGGCAGGGGGAGTTCAGGGCCCTT AATGCTCGCCTGCCCCTGAACACTGATGCCTACTTGTCCCTCCAAGA ACTCCAGGGTCAGGACCCAACTCACTTGGTGTAG	75
gp130 (ICD, G27/2R-1)	NM_002184 (변경된 3 개의 코돈)	AATAAGCGAGACCTAATTAAAAAACACATCTGGCCTAATGTTCCAG ATCCTTCAAAGAGTCATATTGCCCAGTGGTCACCTCACACTCCTCCA AGGCACAATTTCAATTCAAAGGATCAAATGTATTCAGATGGCAATT TCACTGATGTAAGTGTTGTGGAAATAGAAGCAAATGACAAAAAGC CTTTTCCAGAAGATCTGAAATCATTGGACCTGTTCAAAAAGGAAAA AATTAATACTGAAGGACACAGCAGTGGTATTGGGGGGTCTTCATG TATGTCATCTTCTAGGCCAAGCATTTCTAGCAGTGATGAAAATGAA TCTTCACAAAACACTTCGAGCACTGTCCAGTATTCTACCGTGGTACA CAGTGGCTACAGACACCAAGTTCCGTCAGTCCAAGTCTTCTCAAGA	76
IL-2Rb (ICD, G27/2R-1)	NM_000878 (변경된 2 개의 코돈)	GCATCCTTAAGCAGCAACCACTCGCTGACCAGCTGCTTCACCAACC AGGGTTACTTCTTCTTCCACCTCCCGGATGCCTTGGAGATAGAGGC CTGCCAGGTGTACTTTACTTACGACCCCTACTCAGAGGAAGACCCT GATGAGGGTGTGGCCGGGGCACCCACAGGGTCTTCCCCCCAACCC CTGCAGCCTCTGTCAGGGGAGGACGACGCCTACTGCACCTTCCCCT CCAGGGATGACCTGCTGCTCTTCTCCCCCAGTCTCCTCGGTGGCCCC AGCCCCCCAAGCACTGCCCCTGGGGGCAGTGGGGCCGGTGAAGA GAGGATGCCCCCTTCTTTGCAAGAAAGAGTCCCCAGAGACTGGGA CCCCCAGCCCCTGGGGCCTCCCACCCCAGGAGTCCCAGACCTGGTG GATTTTCAGCCACCCCCTGAGCTGGTGCTGCGAGAGGCTGGGGAG GAGGTCCCTGACGCTGGCCCCAGGGAGGGAGTCAGTTTCCCCTGG TCCAGGCCTCCTGGGCAGGGGGAGTTCAGGGCCCTTAATGCTCGC	77

[1073]

		CTGCCCCTGAACACTGATGCCTACTTGTCCCTCCAAGAACTCCAGG GTCAGGACCCAACTCACTTGGTGTAG	
G-CSFR (ICD, G7R-1)	NP_000751	AGCCCCAACAGGAAGAATCCCCTCTGGCCAAGTGTCCCAGACCCAG CTCACAGCAGCCTGGGCTCCTGGGTGCCCACAATCATGGAGGAGG ATGCCTTCCAGCTGCCCGGCCTTGGCACGCCACCCATCACCAAGCT CACAGTGCTGGAGGAGGATGAAAAGAAGCCGGTGCCCTGGGAGT CCCAT	78
IL-7Ra (ICD, G7R-1)	NP_002176	AGTGGCAAGAATGGGCCTCATGTGTACCAGGACCTCCTGCTTAGCC TTGGGACTACAAACAGCACGCTGCCCCCTCCATTTTCTCTCCAATCT GGAATCCTGACATTGAACCCAGTTGCTCAGGGTCAGCCCATTCTTA CTTCCCTGGGATCAAATCAAGAAGAAGCATATGTCACCATGTCCAG CTTCTACCAAAACCAGTGA	79
G-CSFR (ICD, G21/7R-1)	NP_000751	AGCCCCAACAGGAAGAATCCCCTCTGGCCAAGTGTCCCAGACCCAG CTCACAGCAGCCTGGGCTCCTGGGTGCCCACAATCATGGAGGAGG ATGCCTTCCAGCTGCCCGGCCTTGGCACGCCACCCATCACCAAGCT CACAGTGCTGGAGGAGGATGAAAAGAAGCCGGTGCCCTGGGAGT CCCATAACAGCTCAGAGACCTGTGGCCTCCCCACTCTGGTCCAGAC CTATGTGCTCCAGGGGGACCCAAGAGCAGTTTCCACCCAGCCCCAA TCCCAG	80
IL7R (ICD, G21/7R-1)	NP_002176	TCCTCTTCCAGGTCCCTAGACTGCAGGGAGAGTGGCAAGAATGGG CCTCATGTGTACCAGGACCTCCTGCTTAGCCTTGGGACTACAAACA GCACGCTGCCCCCTCCATTTTCTCTCCAATCTGGAATCCTGACATTG AACCCAGTTGCTCAGGGTCAGCCCATTCTTACTTCCCTGGGATCAA ATCAAGAAGAAGCATATGTCACCATGTCCAGCTTCTACCAAAACCA GTGA	81

[1074]

표 21

안정성을 증가시키기 위해서 설계된 재조합 인간 G-CSF 사이토카인의 WT 및 변이체 형태의 단백질 서열 및 130a1(서열번호 83-1 내지 83-5)의 변형.

단백질	Uniprot ID	잔기 넘버링	폴리펩타이드 서열	서열번호
WT G-CSF	P09919	*0-174 (*0 은 천연 G-CSF 에 존재하지 않는 M 을 지칭한다)	MTPLGPASSLPQSFLLKCLEQVRKIQGDGAALQEKL CATYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLA GCLSQLHSGLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQLD VADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAF QRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRHLAQP	82
130a1 변이체 돌연변이체 밑줄	P09919 로부터 유래	*0-174	MTPLGPASSLPQSFLLKCLEQVRKIQGDGAALQEKL CATYKLCHPERLVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQL AGCLSQLHSGLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQK DVARFATTIWQQMKELGMAPALQPTQGAMPAFAS AFQRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRHLAQP	83
307 변이체 돌연변이체 밑줄	P09919 로부터 유래	*0-174	MTPLGPASSLPQEFLLDCLKQVRKIQGDGAALQEKL CATYKLCHPERLVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQL AGCLSQLHSGLFLYQGLLQALEGISPELGPTLDTLQL DVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASA FQRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRHLAQP	84

[1075]

표 22

인간 G-CSF 수용체 세포외 및 막관통 도메인 및 신호 펩타이드의 WT 및 변이체 형태의 단백질 서열

단백질	Uniprot ID	도메인 및 잔기 넘버링	폴리펩타이드 서열	서열 번호
WT G-CSFR	Q99062	ECD: 2-308	ECGHISVSAPIVHLGDPITASCIIKQNCSHLDPEPQILWRLGAELQP GGRQQRLSDGTQESIITLPHLNHTQAFLSCSLNWGNSLQILDQVEL RAGYPPAIPHNLSCLMNLTTSSLICQWEPGPETHLPTSFTLKSFKSR GNCQTQGDSILDCVPKDGQSHCSIPRKHLLLYQNMGIWVQAENA LGTSMSPQLCLDPMDVVKLEPPMLRTMDPSPEAAPPQAGCLQLS WEPWQPGLHINQKCELRHKPQRGEASWALVGPLPLEALQYELCG LLPATAYTLQIRCIRWPLPGHWSDWSPSLELRTTE	85
134 G-CSFR 변이체 (돌연변이체 밑줄)	로부터 유래 Q99062	ECD: 2-308	ECGHISVSAPIVHLGDPITASCIIKQNCSHLDPEPQILW**E**LGAELQP GGRQQRLSDGTQESIITLPHLNHTQAFLSCSLNWGNSLQILDQVEL RAGYPPAIPHNLSCLMNLTTSSLICQWEPGPETHLPTSFTLKSFKS**E** GNCQTQGDSILDCVPKDGQSHCSIP**D**KHLLLYQNMGIWVQAENA LGTSMSPQLCLDPMDVVKLEPPMLRTMDPSPEAAPPQAGCLQLS WEPWQPGLHINQKCELRHKPQRGEASWALVGPLPLEALQYELCG LLPATAYTLQIRCIRWPLPGHWSDWSPSLELRTTE	86
307 G-CSFR 변이체 (돌연변이체 밑줄)	로부터 유래 Q99062	ECD: 2-308	ECGHISVSAPIVHLGDPITASCIIKQNCSHLDPEPQILW**E**LGAELQP GGRQQRLSDGTQESIITLPHLNHTQAFLSCSLNWGNSLQILDQVEL RAGYPPAIPHNLSCLMNLTTSSLICQWEPGPETHLPTSFTLKSFKSR GNCQTQGDSILDCVPKDGQSHCSIPRKHLLLYQNMGIWVQAENA LGTSMSPQLCL**K**PM**K**VVKLEPPMLRTMDPSPEAAPPQAGCLQLS WEPWQPGLHINQKCELRHKPQRGEASWALVGPLPLEALQYELCG LLPATAYTLQIRCI**E**WPLPGHWSDWSPSLELRTTE	87
WT G-CSFR	Q99062	TMD: 309-331	IILGLFGLLLLLTCLCGTAWLCC	88
WT G-CSFR	Q99062	신호 펩타이드	MARLGNCSLTWAALIILLLPGSLE	89

[1076]

표 23

세포내 도메인 (ICD)

키메라 수용체	단백질 (도메인)	Uniprot ID	폴리펩타이드 서열	서열번호
G2R-3	G-CSFR: Box 1 밑줄 Box 2 볼드체 밑줄	Q99062	SPNRKNPLWPSVPDPAHSSLGSWVPTIMEEDAFQLPGLGTPPITK**LTVL**EE DEKKPVPWESH	90
	IL-2Rβ: Shc 및 STAT5 결합 부위 볼드체 밑줄 *정지 코돈	P14784	SSNHSLTSCFTNQG**Y**FFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAP TGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAG EERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEV PDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDA**Y**LSLQELQGQDPTH LV*	91
G4R	G-CSFR: Box 1 밑줄 Box 2 볼드체 밑줄	Q99062	SPNRKNPLWPSVPDPAHSSLGSWVPTIMEEDAFQLPGLGTPPITK**LTVL**EE DEKKPVPWESH	90
	IL4Rα: IRS-1 및 2 및 STAT6 결합 부위 볼드체 밑줄 *정지 코돈	P24394	DEDPHKAAKEMPFQGSGKSAWCPVEISKTVLWPESISVVRCVELFEAPVE CEEEEEVEEEKGSFCASPESSRDDFQEGREGIVARLTESLFLDLLGEENGGF CQQDMGESCLLPPSGSTSAHMPWDEFPSAGPKEAPPWGKEQPLHLEPS PPASPTQSPDNLTCTETPLVIAGNPA**Y**RSFSNSLSQSPCPRELGPDPLLARH LEEVEPEMPCVPQLSEPTTVPQPEPETWEQILRRNVLQHGAAAAPVSAPT SGYQEFVHAVEQGGTQASAVVGLGPPGEAG**Y**KAFSSLLASSAVSPEKCGF GASSGEEG**Y**KPFQDLIPGCPGDPAPVPVPLFTFGLDREPPRSPQSSHLPSSS PEHLGLEPGEKVEDMPKPPLPQEQATDPLVDSLGSGIVYSALTCHLCGHLK QCHGQEDGGQTPVMASPCCGCCCGDRSSPPTTPLRAPDPSPGGVPLEAS LCPASLAPSGISEKSKSSSSFHPAPGNAQSSSQTPKIVNFVSVGPTYMRVS*	92
G6R	gp130: Box 1 밑줄 Box 2 볼드체 밑줄 SHP-2 및 STAT3 결합 부위 밑줄, 티로신 볼드체 *정지 코돈	P40189	NKRDLIKKHIWPNVPDPSKSHIAQWSPHTPPRHNFNSKDQMYSDGNFT D**VSVV**EIE 및 KKPFPEDLKSLDLFKKEKINTEGHSSGIGGSSCMSSSRPSISS SDENESSQNTSSTVQ**Y**STVVHSG**Y**RHQVPSVQVFSRSESTQPLLDSEERPE DLQLVDHVDGGDGILPRQQ**Y**FKQNCSQHESSPDISHFERSKQVSSVNEED FVRLKQQISDHISQSCGSGQMKMFQEVSAADAFGPGTEGQVERFETVG MEAATDEGMPKS**Y**LPQTVRQGG**Y**MPQ*	93
GEPOR	EPOR: Box 1 밑줄 Box 2 볼드체 밑줄 SHP-1 및 2, STAT5 결합 부위 볼드체 밑줄 *정지 코돈	P19235	HRRALKQKIWPGIPSPESEFEGLFTTHKGNFQ**LWLY**QNDGCLWWSPCTP FTEDPPAS**LEVL**SERCWGTMQAVEPGTDDEGPLLEPVGSEHAQDT**Y**LVL DKWLLPRNPPSEDLPGPGGSVDIVAMDEGSEASSCSSALASKPSPEGASA ASFE**Y**TILDPSSQLLRPWTLCPELPPTPPHLKYL**Y**LVVSDSGISTDYSSGDSQ GAQGGLSDGPYSNPYENSLIPAAEPLPPS**Y**VACS*	94
GIFNAR2	G-CSFR: Box 1 밑줄 Box 2 볼드체 밑줄	Q99062	SPNRKNPLWPSVPDPAHSSLGSWVPTIMEEDAFQLPGLGTPPITK**LTVL**EE DEKKPVPWESHNSS	95
	IFNAR2: STAT1 및 2 결합 부위 볼드체 밑줄	P48551	KKKVWDYNYDDESDSDTEAAPRTSGGG**Y**TMHGLTVRPLGQASATSTES QLIDPESEEEPDLPEVDVELPTMPKDSPQQLELLSGPCERRKSPLQDPFPEE DYSSTEGSGGRITFNVDLNSVFLRVLDDEDSDDLEAPLMLSSHLEEMVDPE	96

[1077]

	*정지 코돈		DPDNVQSNHLLASGEGTQPTFPSPSSEGLWSEDAPSDQSDTSESDVDLG DG**Y**IMR*	
GIFNGR1	IFNγR2: Box 1 밑줄 Box 2 볼드체 밑줄	P38484	KYRGLIKYWFH**T**PPSIPLQIEEYLKDPTQPILEALDKDSSPKDDVWDS**VSII**S FPEKEQEDVLQTL	97
	IFNγR1: STAT1 결합 부위 볼드체 밑줄 *정지 코돈	P15260	EGQELITVIKAPTSFG**Y**DKPHVLVDLLVDDS*	98
GIFNGR2	G-CSFR: Box 1 밑줄 Box 2 볼드체 밑줄	Q99062	SPNRKNPLWPSVPDPAHSSLGSWVPTIMEEDAFQLPGLGTPPITK**LTVL**EE DEKKPVPWESHNS	99
	IFNγR1: STAT1 결합 부위 볼드체 밑줄 *정지 코돈	P15260	TEGQELITVIKAPTSFG**Y**DKPHVLVDLLVDDS*	100

[1078]

표 24

키메라 사이토카인 수용체의 도메인 구성

명칭	신호 펩타이드 (서열번호)	ECD (서열번호)	TMD (서열번호)	Box1/2 (서열번호)	ICD (서열번호)	STAT 부위(들)	다른 부위(들)
G2R-3	G-CSFR (11)	G-CSFR_134 (86)	G-CSFR (18)	G-CSFR (90)	IL-2Rβ (91)	5	Shc
G4R	G-CSFR (11)	G-CSFR_134 (86)	G-CSFR (18)	G-CSFR (90)	IL-4Rα (92)	6	IRS-1 및 2
G6R	G-CSFR (11)	G-CSFR_134 (86)	G-CSFR (18)	gp130 (93)	gp130 (93)	3	SHP-2
GEPOR	G-CSFR (11)	G-CSFR_134 (86)	G-CSFR (18)	EPOR (94)	EPOR (94)	5	SHP-1 및 2
GIFNAR	G-CSFR (11)	G-CSFR_134 (86)	G-CSFR (18)	G-CSFR (95)	IFNAR2 (96)	1,2	
GIFNGR-1	G-CSFR (11)	G-CSFR_307 (87)	G-CSFR (18)	IFNγR2 (97)	IFNγR1 (98)	1	
GIFNGR-2	G-CSFR (11)	G-CSFR_307 (87)	G-CSFR (18)	G-CSFR (99)	IFNγR1 (100)	1	

[1079]

표 25

돌연변이체 IN G-CSF 및 G-CSFR 변이체

G-CSF 변이체 번호	G-CSF 돌연변이체	상응하는 G-CSFR 변이체 번호	상응하는 G-CSFR 돌연변이체
130a1	E46R L108K D112R E122K	134	R41E R141E R167D
307	S12E_K16D_E19K_E46R	307	R41E_D197K_D200K_R288E

[1080]

표 26

인간 사이토카인 수용체의 단백질 서열

단백질	Uniprot ID	도메인	폴리펩타이드 서열	서열 번호
IL-2Rβ/ IL-15Rβ	P14784	신호 펩타이드 ECD TM ICD	MAAPALSWRLPLLILLLPLATSWASAAVNGTSQFTCFYNSRANISCV WSQDGALQDTSCQVHAWPDRRRWNQTCELLPVSQASWACNLILG APDSQKLTTVDIVTLRVLCREGVRWRVMAIQDFKPFENLRLMAPISL QVVHVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTL KQKQEWICLETLTPDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSPWSQPLAFRTK PAALGKDTIPWLGHLLVGLSGAFGFIILVYLLINCRNTGPWLKKVLKC NTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLE RDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEA CQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSR DDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQ PLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPP GQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV	111
IL-2Rγc	P31785	신호 펩타이드 ECD TM ICD	MLKPSLPFTSLLFLQLPLLGVGLNTTILTPNGNEDTTADFFLTTMPTDS LSVSTLPLPEVQCFVFNVEYMNCTWNSSSEPQPTNLTLHYWYKNSD NDKVQKCSHYLFSEEITSGCQLQKKEIHLYQTFVVQLQDPREPRRQA TQMLKLQNLVIPWAPENLTLHKLSESQLELNWNNRFLNHCLEHLVQ YRTDWDHSWTEQSVDYRHKFSLPSVDGQKRYTFRVRSRFNPLCGSA QHWSEWSHPIHWGSNTSKENPFLFALEAVVISVGSMGLIISLLCVYF WLERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSER LCLVSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSPYWAPPCYTLKPET	112
IL-4Rα	P24394	신호 펩타이드 ECD TM ICD	MGWLCSGLLFPVSCLVLLQVASSGNMKVLQEPTCVSDYMSISTCEW KMNGPTNCSTELRLLYQLVFLLSEAHTCIPENNGGAGCVCHLLMDD VVSADNYTLDLWAGQQLLWKGSFKPSEHVKPRAPGNLTVHTNVSD TLLLTWSNPYPPDNYLYNHLTYAVNIWSENDPADFRIYNVTYLEPSLR IAASTLKSGISYRARVRAWAQCYNTTWSEWSPSTKWHNSYREPFEQ HLLLGVSVSCIVILAVCLLCYVSITKIKKEWWDQIPNPARSRLVAIIIQD AQGSQWEKRSRGQEPAKCPHWKNCLTKLLPCFLEHNMKRDEDPHK AAKEMPFQGSGKSAWCPVEISKTVLWPESISVVRCVELFEAPVECEE EEEVEEEKGSFCASPESSRDDFQEGREGIVARLTESLFLDLLGEENGGF CQQDMGESCLLPPSGSTSAHMPWDEFPSAGPKEAPPWGKEQPLHL EPSPPASPTQSPDNLTCTETPLVIAGNPAYRSFSNSLSQSPCPRELGPD PLLARHLEEVEPEMPCVPQLSEPTTVPQPEPETWEQILRRNVLQHGA AAAPVSAPTSGYQEFVHAVEQGGTQASAVVGLGPPGEAGYKAFSSL LASSAVSPEKCGFGASSGEEGYKPFQDLIPGCPGDPAPVPVPLFTFGL DREPPRSPQSSHLPSSSPEHLGLEPGEKVEDMPKPPLPQEQATDPLV DSLGSGIVYSALTCHLCGHLKQCHGQEDGGQTPVMASPCCGCCCG DRSSPPTTPLRAPDPSPGGVPLEASLCPASLAPSGISEKSKSSSSFHPA PGNAQSSSQTPKIVNFVSVGPTYMRVS	113

[1081]

IL-9R	Q01113	신호 펩타이드 ECD TM ICD	MGLGRCIWEGWTLESEALRRDMGTWLLACICICTCVCLGVSVTGEG QGPRSRTFTCLTNNILRIDCHWSAPELGQGSSPWLLFTSNQAPGGT HKCILRGSECTVVLPPEAVLVPSDNFTITFHHCMSGREQVSLVDPEYL PRRHVKLDPPSDLQSNISSGHCILTWSISPALEPMTTLLSYELAFKKQE EAWEQAQHRDHIVGVTWLILEAFELDPGFIHEARLRVQMATLEDDV VEEERYTGQWSEWSQPVCFQAPQRQGPLIPPWGWPGNTLVAVSIF LLLTGPTYLLFKLSPRVKRIFYQNVPSPAMFFQPLYSVHNGNFQTWM GAHGAGVLLSQDCAGTPQGALEPCVQEATALLTCGPARPWKSVALE EEQEGPGTRLPGNLSSEDVLPAGCTEWRVQTLAYLPQEDWAPTSLT RPAPPDSEGSRSSSSSSSSNNNNYCALGCYGGWHLSALPGNTQSSG PIPALACGLSCDHQGLETQQGVAWVLAGHCQRPGLHEDLQGMLLP SVLSKARSWTF	114
IL-12Rβ2	Q99665	신호 펩타이드 ECD TM ICD	MAHTFRGCSLAFMFIITWLLIKAKIDACKRGDVTVKPSHVILLGSTVNI TCSLKPRQGCFHYSRRNKLILYKFDRRINFHHGHSLNSQVTGLPLGTT LFVCKLACINSDEIQICGAEIFVGVAPEQPQNLSCIQKGEQGTVACTW ERGRDTHLYTEYTLQLSGPKNLTWQKQCKDIYCDYLDFGINLTPESPE SNFTAKVTAVNSLGSSSSLPSTFTFLDIVRPLPPWDIRIKFQKASVSRCT LYWRDEGLVLLNRLRYRPSNSRLWNMVNVTKAKGRHDLLDLKPFTE YEFQISSKLHLYKGSWSDWSESLRAQTPEEEPTGMLDVWYMKRHID YSRQQISLFWKNLSVSEARGKILHYQVTLQELTGGKAMTQNITGHTS WTTVIPRTGNWAVAVSAANSKGSSLPTRINIMNLCEAGLLAPRQVS ANSEGMDNILVTWQPPRKDPSAVQEYVVEWRELHPGGDTQVPLN WLRSRPYNVSALISENIKSYICYEIRVYALSGDQGGCSSILGNSKHKAPL SGPHINAITEEKGSILISWNSIPVQEQMGCLLHYRIYWKERDSNSQPQ LCEIPYRVSQNSHPINSLQPRVTYVLWMTALTAAGESSHGNEREFCL QGKANWMAFVAPSICIAIIMVGIFSTHYFQQKVFVLLAALRPQWCSR EIPDPANSTCAKKYPIAEEKTQLPLDRLLIDWPTPEDPEPLVISEVLHQ VTPVFRHPPCSNWPQREKGIQGHQASEKDMMHSASSPPPPRALQA ESRQLVDLYKVLESRGSDPKPENPACPWTVLPAGDLPTHDGYLPSNI DDLPSHEAPLADSLEELEPQHISLSVFPSSSLHPLTFSCGDKLTLDQLK MRCDSLML	115
IL-21R	Q9HBE5	신호 펩타이드 ECD TM ICD	MPRGWAAPLLLLLLQGGWGCPDLVCYTDYLQTVICILEMWNLHPST LTLTWQDQYEELKDEATSCSLHRSAHNATHATYTCHMDVFHFMAD DIFSVNITDQSGNYSQECGSFLLAESIKPAPPFNVTVTFSGQYNISWRS DYEDPAFYMLKGKLQYELQYRNRGDPWAVSPRRKLISVDSRSVSLLP LEFRKDSSYELQVRAGPMPGSSYQGTWSEWSDPVIFQTQSEELKEG WNPHLLLLLLLVIVFIPAFWSLKTHPLWRLWKKIWAVPSPERFFMPLY KGCSGDFKKWVGAPFTGSSLELGPWSPEVPSTLEVYSCHPPRSPAKR LQLTELQEPAELVESDGVPKPSFWPTAQNSGGSAYSEERDRPYGLVSI DTVTVLDAEGPCTWPCSCEDDGYPALDLDAGLEPSPGLEDPLLDAGT TVLSCGCVSAGSPGLGGPLGSLLDRLKPPLADGEDWAGGLPWGGRS PGGVSESEAGSPLAGLDMDTFDSGFVGSDCSSPVECDFTSPGDEGP PRSYLRQWVVIPPPLSSPGPQAS	116
gp130	P40189	신호 펩타이드 ECD	MLTLQTWLVQALFIFLTTESTGELLDPCGYISPESPVVQLHSNFTAVC VLKEKCMDYFHVNANYIVWKTNHFTIPKEQYTIINRTASSVTFTDIASL	117

[1082]

		TM ICD	NIQLTCNILTFGQLEQNVYGITIISGLPPEKPKNLSCIVNEGKKMRCEW DGGRETHLETNFTLKSEWATHKFADCKAKRDTPTSCTVDYSTVYFVN IEVWVEAENALGKVTSDHINFDPVYKVKPNPPHNLSVINSEELSSILKL TWTNPSIKSVIILKYNIQYRTKDASTWSQIPPEDTASTRSSFTVQDLKP FTEYVFRIRCMKEDGKGYWSDWSEEASGITYEDRPSKAPSFWYKIDP SHTQGYRTVQLVWKTLPPFEANGKILDYEVTLTRWKSHLQNYTVNA TKLTVNLTNDRYLATLTVRNLVGKSDAAVLTIPACDFQATHPVMDLK AFPKDNMLWVEWTTPRESVKKYILEWCVLSDKAPCITDWQQEDGT VHRTYLRGNLAESKCYLITVTPVYADGPGSPESIKAYLKQAPPSKGPTV RTKKVGKNEAVLEWDQLPVDVQNGFIRNYTIFYRTIIGNETAVNVDS SHTEYTLSSLTSDTLYMVRMAAYTDEGGKDGPEFTFTTPKFAQGEIEA IVVPVCLAFLLTTLLGVLFCFNKRDLIKKHIWPNVPDPSKSHIAQWSP HTPPRHNFNSKDQMYSDGNFTDVSVVEIE및KKPFPEDLKSLDLFKK EKINTEGHSSGIGGSSCMSSSRPSISSSDENESSQNTSSTVQYSTVVHS GYRHQVPSVQVFSRSESTQPLLDSEERPEDLQLVDHVDGGDGILPRQ QYFKQNCSQHESSPDISHFERSKQVSSVNEEDFVRLKQQISDHISQSC GSGQMKMFQEVSAADAFGPGTEGQVERFETVGMEAATDEGMPK SYLPQTVRQGGYMPQ	

[1083]

표 27

ICD 어댑터 단백질 결합 부위

수용체 명칭	Uniprot ID	결합 부위	폴리펩타이드 서열	서열 번호
IL-7Rα	P16871	Box 1	KRIKPIVWPSLPDHKKTLEHL	118
		Box 2 - 1	KKPRKN**LNVS**FNPESF	119
		Box 2 - 2	PESFLD**CQIH**RVDDIQ	120
IL-2Rβ	P14784	Box 1	PWLKKVLKCNTPDPSKFFSQL	121
		Box 2	APEISP**LEVL**ERDKVT	122
		Shc	TSCFTNQG**Y**FFFHLPDA	123
		STAT5	RLPLNTDA**Y**LSLQELQG	124
IL-2Rγc	P31785	Box 1	ERTMPRIPTLKNLEDL	125
		Box 2	PDYSER**LCLV**SEIPPK	126
IL-4Rα	P24394	Box 1	KIKKE**WWD**QIPNPARSRLVA	127
		Box 2	LTKLLP**CFLE**HNMKRD	128
		IRS-2	LVIAGNPA**Y**RSFSNSLS	129
		STAT6 - 1	LGPPGEAG**Y**KAFSSLLA	130
		STAT6 - 2	GASSGEEG**Y**KPFQDLIP	131
IL-9R	Q01113	Box 1	SPRVKRIFYQNVPSPAMFFQP	132
		Box 2 - 1	GAHGAG**VLLS**QDCAGT	133
		Box 2 - 2	GTPQGA**LEPC**VQEATA	134
IL-12Rβ2	Q99665	STAT4	AGDLPTHDG**Y**LPSNIDDLPSHEAPLA	135
IL-21R	Q9HBE5	Box 1	LWRLWKKIWAVPSPERFFMPL	136
		Box 2 - 1	PFTGSS**LELG**PWSPEV	137
		Box 2 - 2	PEVPST**LEVY**SCHPPR	138
		STAT3	GDEGPPRS**Y**LRQWVVIP	139
gp130	P40189	Box 1	DLIKKHIWPNVPDPSKSHIAQ	140
		Box 2	DGNFTD**VSVV**EIE 및	141
		SHP-2	QNTSSTVQ**Y**STVVHSG	142
		STAT3 - 1	STVVHSG**Y**RHQVPSVQ	143
		STAT3 - 2	DGILPRQQ**Y**FKQNCSQHESS	144

[1084]

		STAT3 - 3	EGMPKS**Y**LPQTVRQ	145
		STAT3 - 4	TVRQGG**Y**MPQ	146

[1085]

표 28

조작된 T 세포 수용체(eTCR)의 예

키메라 수용체	수용체 명칭: 도메인	특허	폴리펩타이드 서열	서열 번호
HPV 16 E7 eTCR	LVL-변형된 키메라 TCR: β 쇄 가변 영역 - 뮤린 β 쇄 불변 영역 - 링커 펩타이드 (P2A) - 인간 α 쇄 가변 영역 - 뮤린 α 쇄 불변 영역 - 뮤린 α 쇄 TMD	US 10174098 B2	MAPGLLCWALLCLLGAGLVDAGVTQSPTHLIKTRGQ QVTLRCSPK**SGHDTV**SWYQQALGQGPQFIFQ**YYEE** **EE**RQRGNFPDRFSGHQFPNYSSELNVNALLLGDSAL YLC**ASSLGWRGGRYNEQF**FGPGTRLTVLEDLRNVTP PKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSW WVNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSAT FWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTQ NISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSA*TILYEILLGKAT* *LYAVLVSTLVV*MAMVKRKNS**RAKRSGSGATNFSLLK** **QAGDVEENPGP**MWGVFLLYVSMKMGGTTGQNID QPTEMTATEGAIVQINCTYQ**TSGFNG**LFWYQQHAG EAPTFLSY**NVLDGL**EEKGRFSSFLSRSKGYSYLLLKELQ MKDSASYLC**ASVDGNNRLA**FGKGNQVVVIP**NIQNP** **EPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESG** **TFITDKTVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSFTCQDIF** **KETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLLVI** VLRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS	147
	Cys-치환된, LVL-변형된 키메라 TCR: β 쇄 가변 영역 - 뮤린 β 쇄 불변 영역 - 링커 펩타이드 (P2A) - 인간 α 쇄 가변 영역 - 뮤린 α 쇄 불변 영역 - 뮤린 α 쇄 TMD		MAPGLLCWALLCLLGAGLVDAGVTQSPTHLIKTRGQ QVTLRCSPK**SGHDTV**SWYQQALGQGPQFIFQ**YYEE** **EE**RQRGNFPDRFSGHQFPNYSSELNVNALLLGDSAL YLC**ASSLGWRGGRYNEQF**FGPGTRLTVLEDLRNVTP PKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSW WVNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSAT FWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTQ NISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSA*TILYEILLGKAT* *LYAVLVSTLVV*MAMVKRKNS**RAKRSGSGATNFSLLK** **QAGDVEENPGP**MWGVFLLYVSMKMGGTTGQNID QPTEMTATEGAIVQINCTYQ**TSGFNG**LFWYQQHAG EAPTFLSY**NVLDGL**EEKGRFSSFLSRSKGYSYLLLKELQ MKDSASYLC**ASVDGNNRLA**FGKGNQVVVIP**NIQNP** **EPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESG** **TFITDKCVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSFTCQDIF** **KETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLLVI** VLRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS	148
NY-ESO-1 eTCR	NY-ESO-1^{c259} TCR a 쇄	WO 2020/049496 A1	METLLGLLILWLGLGWVSSKGEVTGIPAALSVPEGEN LVLNCSFTDSAIYNLGWFRGDPGKGLTSLLLIGSSGRE GTSGRLNASLDKSSGRSTLYIAASGPGDSATYLCAVR PLYGGSYIPTFGRGTSLIVHPYIONPDPAVYQLRDSKS SDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMR SMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFP	149

[1086]

			SPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFCNLSVIGFRILLLKVA GFNLLMTLRLWSS	
	NY-ESO-1 ^{c259} TCR b 쇄		RMSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTGTPKFGVLKTG GSMTLGCAGDMNHEYMSWYRGDPGMGLRLIHYS VGAGITDGGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSGT SVYFCASSYVGNTGELFFGEGSRLTVLEDLKNVFPPE VAVFEPSEAEISHTCKATLVCLATGFYPDHVELSWW VNGKEVHSGVSTDPGPLKEGPALNDSRYCLSSRLRVS ATFWGNPRNHFRCGVGFYGLSENDEWTODRAKPV TOIVSAEAWGRADCGFTSESYOOGVLSATILYEILLG KATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG	150

[1087]

표 29

키메라 항원 수용체(CAR)의 예

키메라 수용체	수용체 명칭 도메인	특허	폴리펩타이드 서열	서열 번호
2 세대 4-1BB 항-CD19 CAR 함유	**CTL019:** 리더 - VH - 링커 - VL - CD8 힌지 - CD8 TM - 4-1BB - CD3ζ	WO2014153270A1	MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRIHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRITIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	151
	리더		MALPVTALLLPLALLLHAARP	152
	VH		DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRIHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT	153
	링커		GGGGSGGGGSGGGGS	154
	VL		EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRITIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	155
	CD8 힌지		TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD	156
	CD8 TM		IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	157
	4-1BB		KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	158
	CD3ζ		RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	159
2 세대 항-메소텔린 CAR	**P4-z:** 리더 - VH - 링커 - VL - CD8 힌지 - CD8 TM - CD3ζ	US 9272002 B2	MALPVTALLLPLALLLHAARPGSQVQLQQSGPGLVTPSQTLSLTCAISGDSVSSNSATWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRMSINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARGMMTYYYGMDVWGQGTTVTVSSGILGSGGGGSGGGGSGGGGSQPVLTQSSSLSASPGASASLTCTLRSGINVGPYRIYWYQQKPGSPPQYLLNYKSDSDKQQGSGVPSRFSGSKDASANAGVLLISGLRSED	160

[1088]

			EADYYCMIWHSSAAVFGGGTQLTVLSASTTTPAPRPPTPAPTIASRPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRVKFSRSADAPAYQNGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELNKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	
	리더		MALPVTALLLPLALLLHAARPGSQVQLQQSGPGL	161
	VH		VTPSQTLSLTCAISGDSVSSNSATWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRMSINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARGMMTYYYGMDVWGQGTTVTVSSGIL	162
	링커		GSGGGGSGGGGSGGGGS	163
	VL		QPVLTQSSSLSASPGASASLTCTLRSGINVGPYRIYWYQQKPGSPPQYLLNYKSDSDKQQGSGVPSRFSGSKDASANAGVLLISGLRSEDEADYYCMIWHSSAAVFGGGTQLTVLSAS	164
	CD8 힌지		TTTPAPRPPTPAPTIASRPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD	165
	CD8 TM		IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC	166
	CD3ζ		RVKFSRSADAPAYQNGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELNKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	167
2 세대 CD28 항-메소텔린 CAR 함유	**HN1scFv-28Z:** 리더 - VH - 링커 - VL - CD8 힌지 - CD8 TM - CD28 ICD - CD3ζ	US 9359447 B2	MVLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQAQVQLVQSGAEVKRPGASVQVSCRASGYSINTYYMQWVRQAPGAGLEWMGVINPSGVTSYAQKFQGRVTLTNDTSTNTVYMQLNSLTSADTAVYYCARWALWGDFGMDVWGKGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSTLSASIGDRVTITCRASEGIYHWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLASGAPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPDDFATYYCQQYSNYPLTFGGGTKLEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	168
	리더		MVLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQ	169
	VH		AQVQLVQSGAEVKRPGASVQVSCRASGYSINTYYMQWVRQAPGAGLEWMGVINPSGVTSYAQKFQGRVTLTNDTSTNTVYMQLNSLTSADTAVYYCARWALWGDFG	170

[1089]

			MDVWGKGTLVTVSS	
	링커		GGGGSGGGGSGGGGS	171
	VL		DIQMTQSPSTLSASIGDRVTITCRASEGIYHWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLASGAPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPDDFATYYCQQYSNYPLTFGGGTKLEIKR	172
	CD8 힌지		AAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP	173
	CD8 TM		FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	174
	CD28 ICD		RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	175
	CD3ζ		RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	176
3 세대 CD28 및 4-1BB 항-메소텔린 CAR 함유	**HN1scFv-28BBZ:** 리더 - VH - 링커 - VL - CD28 힌지 - CD28 TM - CD28 ICD - 4-1BB - CD3ζ		MVLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQAQVQLVQSGAEVKRPGASVQVSCRASGYSINTYYMQWVRQAPGAGLEWMGVINPSGVTSYAQKFQGRVTLTNDTSTNTVYMQLNSLTSADTAVYYCARWALWGDFGMDVWGKGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSTLSASIGDRVTITCRASEGIYHWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLASGAPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPDDFATYYCQQYSNYPLTFGGGTKLEIKRAAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	177
	리더 -		MVLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQ	178
	VH -		AQVQLVQSGAEVKRPGASVQVSCRASGYSINTYYMQWVRQAPGAGLEWMGVINPSGVTSYAQKFQGRVTLTNDTSTNTVYMQLNSLTSADTAVYYCARWALWGDFGMDVWGKGTLVTVSS	179
	링커 -		GGGGSGGGGSGGGGS	180
	VL -		DIQMTQSPSTLSASIGDRVTITCRASEGIYHWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLASGAPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPDDFATYYCQQYSNYPLTFGGGTKLEIKR	181
	CD28 힌지 -		AAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA	182

[1090]

			CRPAAGGAVHTRGLDFACD	
	CD28 TM -		IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN	183
	CD28 ICD -		RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	184
	4-1BB -		RFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	185
	CD3ζ		RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	186

[1091]

표 30

사이토카인, 케모카인 및 신호전달 단백질:

사이토카인	Uniprot ID	폴리펩타이드 서열	서열 번호
hIL-18: 신호 펩타이드 밑줄	Q14116	MAAEPVEDNCINFVAMKFIDNTLYFIAEDDENLESDYFGKLESKLSVIRNL NDQVLFIDQGNRPLFEDMTDSDCRDNAPRTIFIISMYKDSQPRGMAVTI SVKCEKISTLSCENKIISFKEMNPPDNIKDTKSDIIFFQRSVPGHDNKMQF ESSSYEGYFLACEKERDLFKLILKKEDELGDRSIMFTVQNED	102
hCXCL13: 신호 펩타이드 밑줄	Q52X90	MKFISTSLLLMLLVSSLSPVQGVLEVYYTSLRCRCVQESSVFIPRRFIDRIQI LPRGNGCPRKEIIVWKKNKSIVCVDPQAEWIQRMMEVLRKRSSSTLPVP VFKRKIP	103
hIL-21: 신호 펩타이드 밑줄	Q9HBE4	MRSSPGNMERIVICLMVIFLGTLVHKSSSQGQDRHMIRMRQLIDIVDQL KNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINV SIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIH QHLSSRTHGSEDS	104
hCCL3: 신호 펩타이드 밑줄	P10147	MQVSTAALAVLLCTMALCNQFSASLAADTPTACCFSYTSRQIPQNFIAD YFETSSQCSKPGVIFLTKRSRQVCADPSEEWVQKYVSDLELSA	105
hCCL4: 신호 펩타이드 밑줄	P13236	MKLCVTVLSLLMLVAAFCSPALSAPMGSDPPTACCFSYTARKLPRNFVV DYYETSSLCSQPAVVFQTKRSKQVCADPSESWVQEYVYDLELN	106
hCCL19: 신호 펩타이드 밑줄	Q99731	MALLLALSLLVLWTSPAPTLSGTNDAEDCCLSVTQKPIPGYIVRNFHYLLI KDGCRVPAVVFTTLRGRQLCAPPDQPWVERIIQRLQRTSAKMKRRSS	107
hIFNγ: 신호 펩타이드 밑줄	P01579	MKYTSYILAFQLCIVLGSLGCYCQDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNG TLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDM NVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKT GKRKRSQMLFRGRRASQ	108
hIFNα-1/13: 신호 펩타이드 밑줄	P01562	MASPFALLMVLVVLSCKSSCSLGCDLPETHSLDNRRTLMLLAQMSRISPS SCLMDRHDFGFPQEEFDGNQFQKAPAISVLHELIQQIFNLFTTKDSSAA WDEDLLDKFCTELYQQLNDLEACVMQEERVGETPLMNADSILAVKKYF RRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSLSLSTNLQERLRRKE	109
hIL-17: 신호 펩타이드 밑줄	Q16552	MTPGKTSLVSLLLLLSLEAIVKAGITIPRNPGCPNSEDKNFPRTVMVNLNI HNRNTNTNPKRSSDYYNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHLGC INADGNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPPHCPNSFRLEKILVSVGCTCVTP IVHHVA	110

[1092]

hTNF-α: 막-결합 부분 밑줄	P01357	MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFLSLFSFLIVAGATTLFCLL HFGVIGPQREEFPRDLSLISPLAQAVRSSSRTPSDKPVAHVVANPQAEG QLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQGCPST HVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGV FQLEKGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIAL	111
hNKG2-D: ICD-TM-ECD	P26718	MGWIRGRRSRHSWEMSEFHNYNLDLKKSDFSTRWQKQRCPVVKSKC RENASPFFFCCFIAVAMGIRFIIMVAIWSAVFLNSLFNQEVQIPLTESYCG PCPKNWICYKNNCYQFFDESKNWYESQASCMSQNASLLKVYSKEDQDL LKLVKSYHWMGLVHIPTNGSWQWEDGSILSPNLLTIIEMQKGDCALYA SSFKGYIENCSTPNTYICMQRTV	112

[1093]

표 31

제어된 주변분비 신호전달(CPS) 예시적인 작제물에 대한 DNA 서열

유전자	Ref Seq ID	잔기 넘버링	DNA 서열	서열 번호
CAR_P2A_G12-2R1-134_T2A_hIL-18		1-4758	CCCGCCAGGATCCTGACGCGTATGGTGCTGCTGGTC ACCAGCTTACTCCTGTGCGAGCTCCCCCATCCTGCGT TCTTGCTGATCCCCGACATCCAGCAGGTGCAGCTGC AACAGTCGGGCCCCGAGTTAGAAAAACCCGGCGCCT CCGTGAAGATCTCGTGTAAAGCTTCGGGCTACTCGT TTACCGGCTACACCATGAATTGGGTTAAGCAGAGCC ATGGAAAGTCTCTTGAATGGATAGGCCTGATTACGC CTTATAATGGGGCCTCGAGCTACAACCAGAAATTTC GTGGTAAGGCAACTCTGACTGTAGACAAGTCGTCCT CCACCGCATACATGGATCTTCTGAGCCTAACCTCAG AAGACAGCGCAGTCTACTTCTGCGCCCGTGGTGGTT ACGATGGCCGCGGATTCGACTATTGGGGCCAGGGCA CCACCGTCACCGTGAGCTCCGGCGGTGGCGGGTCCG GTGGCGGCGGCTCAAGCGGAGGAGGTAGTGACATC GAGTTGACCCAGTCGCCTGCCATCATGTCCGCATCC CCCGGCGAGAAGGTGACGATGACGTGTTCTGCTTCC AGCTCTGTATCGTACATGCACTGGTACCAACAGAAG TCCGGCACCTCCCCCAAGCGTTGGATCTACGACACT TCCAAGCTGGCGTCTGGCGTCCCTGGGCGCTTTTCAG GTAGCGGGTCCGGCAATAGCTATTCCTTGACGATCA GTAGCGTGGAGGCTGAGGATGATGCCACCTACTACT GCCAGCAGTGGAGCAAGCACCCGCTCACCTTCGGCG CCGGGACCAAGCTTGAAATCAAGGCGGCGGCGATC GAGGTGATGTATCCTCCTCCCTACCTGGACAACGAG AAATCCAATGGCACTATCATCCACGTGAAGGGGAAG CACCTGTGCCCGAGCCCCCTGTTCCCCGGCCCTTCCA AGCCTTTTTGGGTGCTTGTTGTGGTCGGCGGCGTGCT GGCCTGCTACTCTCTGCTGGTAACCGTAGCGTTCATC ATCTTCTGGGTGCGATCTAAGCGGTCCCGGCTGTTGC ACAGTGACTACATGAACATGACCCCGCGCCGCCCCG GCCCAACCCGCAAGCACTACCAGCCGTACGCTCCAC CTCGCGACTTTGCCGCCTACAGGTCGCGAGTGAAAT TTTCGCGCTCCGCGGACGCGCCGGCCTATCAGCAGG GCCAGAACCAGCTTTACAACGAGTTGAACCTCGGGC GCAGGGAGGAGTACGACGTGCTGGATAAACGTAGA GGTCGGGACCCGGAGATGGGCGGCAAACCACGCCG CAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAACGAGCTCCA GAAGGACAAAATGGCTGAGGCGTACTCGGAGATTG GGATGAAAGGCGAGCGGCGCCGCGGCAAGGGCCAC GATGGCCTGTACCAGGGGCTATCTACCGCTACAAAG GACACCTACGACGCCCTACATATGCAGGCCCTGCCA CCGCGTGGCTCTGGCGCAACCAACTTCTCGCTTCTGA AGCAGGCCGGTGATGTGGAGGAAAACCCAGGTCCT ATGGCCCGCCTGGGCAACTGCTCGCTGACCTGGGCG	149

[1094]

[1095]

			GCCCTGATCATCCTGCTGCTGCCCGGCTCTCTGGAGG AGTGTGGCCATATTTCCGTGTCAGCTCCAATCGTGCA CCTGGGCGACCCCATCACCGCTTCTTGCATCATCAA GCAGAACTGCTCTCACCTCGACCCTGAGCCCCAAAT ACTTTGGGAGCTGGGCGCGGAGCTCCAGCCTGGAGG ACGCCAGCAGCGTTTGTCAGACGGCACTCAGGAATC CATCATCACCCTCCCACATCTGAATCACACCCAGGC GTTCCTGTCTTGTTGTCTCAACTGGGGCAACTCCTTG CAGATACTGGACCAGGTGGAGCTGAGAGCTGGCTAT CCCCCGGCAATTCCTCACAACCTGTCCTGTCTGATGA ACCTGACCACCTCCAGTCTGATCTGTCAGTGGGAGC CCGGGCCAGAGACTCACCTTCCCACCAGCTTCACCC TTAAGTCGTTCAAATCCGAGGGCAACTGCCAGACCC AGGGTGATTCTATTTTGGATTGCGTGCCCAAGGACG GGCAGTCTCACTGTTGTATTCCCGACAAGCACCTCCT TTTATACCAGAATATGGGCATCTGGGTGCAGGCCGA GAATGCCCTGGGAACGTCTATGTCTCCACAGCTATG CCTGGATCCAATGGACGTAGTGAAGCTGGAGCCCCC CATGCTACGCACTATGGATCCTAGCCCAGAGGCCGC TCCCCCTCAGGCGGGGTGCCTGCAGCTTTGTTGGGA ACCCTGGCAACCCGGGTTGCACATTAACCAGAAGTG CGAGCTGCGCCACAAGCCCCAGAGAGGAGAGGCCT CCTGGGCCCTCGTGGGCCCTCTGCCGTTGGAGGCCTT GCAGTATGAGCTGTGCGGCCTCTTGCCCGCTACAGC TTATACTCTGCAAATCAGGTGTATTCGCTGGCCTTTG CCCGGACACTGGTCCGACTGGTCCCCCAGCCTTGAG CTGAGAACCACGGAGCGCGCCCCCACCGTACGCTTG GACACCTGGTGGCGCCAGAGGCAGCTGGACCCTCGC ACTGTGCAGCTGTTCTGGAAGCCGGTGCCCCTGGAG GAGGACTCCGGACGCATCCAGGGCTACGTGGTCAGC TGGCGTCCGAGTGGGCAGGCCGGGGCCATCCTGCCC CTGTGCAACACGACTGAGCTGAGCTGCACTTTCCAT CTGCCCAGCGAGGCTCAGGAGGTGGCGCTCGTGGCT TACAACTCCGCAGGCACTTCTCGCCCAACCCCCGTG GTGTTCTCTGAGAGTCGGGGCCCCGCCCTGACGCGC CTTCACGCCATGGCGCGCGACCCGCATTCCCTTTGG GTCGGTTGGGAGCCACCTAACCCATGGCCGCAGGGC TACGTGATCGAGTGGGGCCTGGGCCCCCCGAGCGCA TCGAACAGCAACAAGACCTGGAGAATGGAACAGAA CGGCCGCGCAACCGGCTTCCTATTAAAGGAGAACAT CCGCCCGTTCCAGCTGTACGAGATCATCGTGACACC GCTGTACCAGGACACTATGGGGCCTTCTCAGCACGT TTACGCCTACTCCCAGGAGATGGCCCCGAGCCACGC ACCGGAACTGCACCTAAAGCACATCGGTAAGACCTG GGCACAGCTCGAGTGGGTCCCCGAGCCTCCCGAGCT AGGCAAGTCGCCGCTGACCCATTACACCATCTTCTG GACCAACGCGCAGAACCAGTCCTTTAGCGCGATCCT CAATGCCTCCTCCCGCGGTTTCGTCTTGCACGGGCTG GAGCCAGCCTCCTTATACCACATCCACCTGATGGCG GCTTCCCAGGCTGGTGCTACCAACAGCACAGTTTTG ACACTGATGACCCTGACCCCCGAGGGCTCGGAGCTC CACATCATTTTGGGACTCTTCGGACTGCTGCTGCTGC TGACCTGCCTGTGCGGCACTGCTTGGCTCTGCTGTTC TCCCAACCGCAAGAACCCTCTTTGGCCCTCTGTCCCT	

			GACCCGGCCCATTCTAGCCTGGGATCTTGGGTCCCG ACCATCATGGAAGAAGACGCGTTCCAGCTCCCTGGG CTGGGCACCCCTCCGATCACGAAGCTCACGGTCCTG GAGGAGGACGAGAAGAAGCCCGTACCGTGGGAGAG CCACTCCTCGAATCATAGCCTAACCTCCTGCTTTACA AACCAGGGGTATTTTTTTTTCCACTTGCCCGACGCTC TGGAGATCGAGGCCTGCCAGGTGTACTTCACCTACG ACCCCTACAGCGAGGAGGACCCTGCCGGTGATCTGC CCACCCATGACGGCTATCTGCCATCAAACATTGACG ACCTGCCGTCCGGAGGTCCCAGTCCTCCGTCCACCG CCCCCGGCGGTTCTGGTGCCGGCGAAGAACGGATGC CTCCCTCCCTGCAGGAGCGTGTGCCACGGGATTGGG ACCCACAGCCCTTAGGGCCGCCTACCCCCGGCGTGC CCGACCTCGTCGATTTCCAGCCGCCTCCTGAGCTGGT TCTCCGAGAGGCAGGAGAGGAGGTGCCTGATGCTGG ACCCCGTGAGGGCGTGAGCTTTCCTTGGTCTCGCCC GCCAGGACAGGGGGAGTTCCGTGCTCTCAACGCGCG TCTGCCGTTGAACACTGATGCATACCTCAGTCTTCAG GAGCTGCAGGGCCAGGATCCAACCCACCTCGTTGGC TCAGGGGAAGGTCGCGGCTCGCTGTTGACGTGTGGT GACGTGGAGGAGAACCCCGGCCCGTACTTCGGTAAG CTGGAGTCTAAACTGTCGGTGATACGGAACCTGAAC GACCAGGTCCTGTTCATTGACCAGGGTAACCGCCCG CTGTTCGAGGACATGACTGACTCCGATTGCCGCGAC AATGCCCCCCCGCACGATCTTCATTATCTCCATGTACA AGGATAGCCAACCCCGTGGTATGGCCGTGACCATTA GCGTCAAATGTGAGAAGATCTCTACTCTGTCCTGTG AGAATAAGATTATCTCCTTCAAGGAGATGAACCCCC CTGATAACATCAAAGACACTAAATCGGACATCATTT TCTTTCAGAGGAGCGTGCCAGGCCACGACAACAAGA TGCAGTTCGAGAGTTCTAGTTACGAGGGATATTTCCT GGCCTGCGAAAAAGAACGTGACCTCTTCAAGCTAAT CCTGAAGAAGGAGGACGAGCTCGGTGACAGGAGCA TCATGTTTACTGTCCAAAACGAGGACTGA	
5' 상류 서열 Kozak 포함		1-21	CCCGCCAGGATCCTGACGCGT	150
메소텔린 CAR	n/a	22-1482	ATGGTGCTGCTGGTCACCAGCTTACTCCTGTGCGAG CTCCCCCATCCTGCGTTCTTGCTGATCCCCGACATCC AGCAGGTGCAGCTGCAACAGTCGGGCCCCGAGTTAG AAAAACCCGGCGCCTCCGTGAAGATCTCGTGTAAAG CTTCGGGCTACTCGTTTACCGGCTACACCATGAATTG GGTTAAGCAGAGCCATGGAAAGTCTCTTGAATGGAT AGGCCTGATTACGCCTTATAATGGGGCCTCGAGCTA CAACCAGAAATTTCGTGGTAAGGCAACTCTGACTGT AGACAAGTCGTCCTCCACCGCATACATGGATCTTCT GAGCCTAACCTCAGAAGACAGCGCAGTCTACTTCTG CGCCCGTGGTGGTTACGATGGCCGCGGATTCGACTA TTGGGGCCAGGGCACCACCGTCACCGTGAGCTCCGG CGGTGGCGGGTCCGGTGGCGGCGGCTCAAGCGGAG GAGGTAGTGACATCGAGTTGACCCAGTCGCCTGCCA TCATGTCCGCATCCCCCGGCGAGAAGGTGACGATGA	151

[1096]

			CGTGTTCTGCTTCCAGCTCTGTATCGTACATGCACTG GTACCAACAGAAGTCCGGCACCTCCCCCAAGCGTTG GATCTACGACACTTCCAAGCTGGCGTCTGGCGTCCC TGGGCGCTTTTCAGGTAGCGGGTCCGGCAATAGCTA TTCCTTGACGATCAGTAGCGTGGAGGCTGAGGATGA TGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGAGCAAGCACCC GCTCACCTTCGGCGCCGGGACCAAGCTTGAAATCAA GGCGGCGGCGATCGAGGTGATGTATCCTCCTCCCTA CCTGGACAACGAGAAATCCAATGGCACTATCATCCA CGTGAAGGGGAAGCACCTGTGCCCGAGCCCCCTGTT CCCCGGCCCTTCCAAGCCTTTTTGGGTGCTTGTTGTG GTCGGCGGCGTGCTGGCCTGCTACTCTCTGCTGGTA ACCGTAGCGTTCATCATCTTCTGGGTGCGATCTAAGC GGTCCCGGCTGTTGCACAGTGACTACATGAACATGA CCCCGCGCCGCCCCGGCCCAACCCGCAAGCACTACC AGCCGTACGCTCCACCTCGCGACTTTGCCGCCTACA GGTCGCGAGTGAAATTTTCGCGCTCCGCGGACGCGC CGGCCTATCAGCAGGGCCAGAACCAGCTTTACAACG AGTTGAACCTCGGGCGCAGGGAGGAGTACGACGTG CTGGATAAACGTAGAGGTCGGGACCCGGAGATGGG CGGCAAACCACGCCGCAAGAACCCTCAGGAAGGCC TGTACAACGAGCTCCAGAAGGACAAAATGGCTGAG GCGTACTCGGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGGCG CCGCGGCAAGGGCCACGATGGCCTGTACCAGGGGCT ATCTACCGCTACAAAGGACACCTACGACGCCCTACA TATGCAGGCCCTGCCACCGCGT	
P2A		1483-1548	GGCTCTGGCGCAACCAACTTCTCGCTTCTGAAGCAG GCCGGTGATGTGGAGGAAAACCCAGGTCCT	152
G12/2R-1134 ECD		1549-4221	ATGGCCCGCCTGGGCAACTGCTCGCTGACCTGGGCG GCCCTGATCATCCTGCTGCTGCCCGGCTCTCTGGAGG AGTGTGGCCATATTTCCGTGTCAGCTCCAATCGTGCA CCTGGGCGACCCCATCACCGCTTCTTGCATCATCAA GCAGAACTGCTCTCACCTCGACCCTGAGCCCCAAAT ACTTTGGGAGCTGGGCGCGGAGCTCCAGCCTGGAGG ACGCCAGCAGCGTTTGTCAGACGGCACTCAGGAATC CATCATCACCCTCCCACATCTGAATCACACCCAGGC GTTCCTGTCTTGTTGTCTCAACTGGGGCAACTCCTTG CAGATACTGGACCAGGTGGAGCTGAGAGCTGGCTAT CCCCCGGCAATTCCTCACAACCTGTCCTGTCTGATGA ACCTGACCACCTCCAGTCTGATCTGTCAGTGGGAGC CCGGGCCAGAGACTCACCTTCCCACCAGCTTCACCC TTAAGTCGTTCAAATCCGAGGGCAACTGCCAGACCC AGGGTGATTCTATTTTGGATTGCGTGCCCAAGGACG GGCAGTCTCACTGTTGTATTCCCGACAAGCACCTCCT TTTATACCAGAATATGGGCATCTGGGTGCAGGCCGA GAATGCCCTGGGAACGTCTATGTCTCCACAGCTATG CCTGGATCCAATGGACGTAGTGAAGCTGGAGCCCCC CATGCTACGCACTATGGATCCTAGCCCAGAGGCCGC TCCCCCTCAGGCGGGGTGCCTGCAGCTTTGTTGGGA ACCCTGGCAACCCGGGTTGCACATTAACCAGAAGTG CGAGCTGCGCCACAAGCCCCAGAGAGGAGAGGCCT CCTGGGCCCTCGTGGGCCCTCTGCCGTTGGAGGCCTT GCAGTATGAGCTGTGCGGCCTCTTGCCCGCTACAGC	153

[1097]

[1098]

			TTATACTCTGCAAATCAGGTGTATTCGCTGGCCTTTG CCCGGACACTGGTCCGACTGGTCCCCCAGCCTTGAG CTGAGAACCACGGAGCGCGCCCCCACCGTACGCTTG GACACCTGGTGGCGCCAGAGGCAGCTGGACCCTCGC ACTGTGCAGCTGTTCTGGAAGCCGGTGCCCCTGGAG GAGGACTCCGGACGCATCCAGGGCTACGTGGTCAGC TGGCGTCCGAGTGGGCAGGCCGGGGCCATCCTGCCC CTGTGCAACACGACTGAGCTGAGCTGCACTTTCCAT CTGCCCAGCGAGGCTCAGGAGGTGGCGCTCGTGGCT TACAACTCCGCAGGCACTTCTCGCCCAACCCCCGTG GTGTTCTCTGAGAGTCGGGGCCCCGCCCTGACGCGC CTTCACGCCATGGCGCGCGACCCGCATTCCCTTTGG GTCGGTTGGGAGCCACCTAACCCATGGCCGCAGGGC TACGTGATCGAGTGGGGCCTGGGCCCCCCGAGCGCA TCGAACAGCAACAAGACCTGGAGAATGGAACAGAA CGGCCGCGCAACCGGCTTCCTATTAAAGGAGAACAT CCGCCCGTTCCAGCTGTACGAGATCATCGTGACACC GCTGTACCAGGACACTATGGGGCCTTCTCAGCACGT TTACGCCTACTCCCAGGAGATGGCCCCGAGCCACGC ACCGGAACTGCACCTAAAGCACATCGGTAAGACCTG GGCACAGCTCGAGTGGGTCCCCGAGCCTCCCGAGCT AGGCAAGTCGCCGCTGACCCATTACACCATCTTCTG GACCAACGCGCAGAACCAGTCCTTTAGCGCGATCCT CAATGCCTCCTCCCGCGGTTTCGTCTTGCACGGGCTG GAGCCAGCCTCCTTATACCACATCCACCTGATGGCG GCTTCCCAGGCTGGTGCTACCAACAGCACAGTTTTG ACACTGATGACCCTGACCCCCGAGGGCTCGGAGCTC CACATCATTTTGGGACTCTTCGGACTGCTGCTGCTGC TGACCTGCCTGTGCGGCACTGCTTGGCTCTGCTGTTC TCCCAACCGCAAGAACCCTCTTTGGCCCTCTGTCCCT GACCCGGCCCATTCTAGCCTGGGATCTTGGGTCCCG ACCATCATGGAAGAAGACGCGTTCCAGCTCCCTGGG CTGGGCACCCCTCCGATCACGAAGCTCACGGTCCTG GAGGAGGACGAGAAGAAGCCCGTACCGTGGGAGAG CCACTCCTCGAATCATAGCCTAACCTCCTGCTTTACA AACCAGGGGTATTTTTTTTTCCACTTGCCCGACGCTC TGGAGATCGAGGCCTGCCAGGTGTACTTCACCTACG ACCCCTACAGCGAGGAGGACCCTGCCGGTGATCTGC CCACCCATGACGGCTATCTGCCATCAAACATTGACG ACCTGCCGTCCGGAGGTCCCAGTCCTCCGTCCACCG CCCCCGGCGGTTCTGGTGCCGGCGAAGAACGGATGC CTCCCTCCCTGCAGGAGCGTGTGCCACGGGATTGGG ACCCACAGCCCTTAGGGCCGCCTACCCCCGGCGTGC CCGACCTCGTCGATTTCCAGCCGCCTCCTGAGCTGGT TCTCCGAGAGGCAGGAGAGGAGGTGCCTGATGCTGG ACCCCGTGAGGGCGTGAGCTTTCCTTGGTCTCGCCC GCCAGGACAGGGGGAGTTCCGTGCTCTCAACGCGCG TCTGCCGTTGAACACTGATGCATACCTCAGTCTTCAG GAGCTGCAGGGCCAGGATCCAACCCACCTCGTT	
T2A		4222-4284	GGCTCAGGGGAAGGTCGCGGCTCGCTGTTGACGTGT GGTGACGTGGAGGAGAACCCCGGCCCG	154
IL-18	NM_001562.4	4285-4758	TACTTCGGTAAGCTGGAGTCTAAACTGTCGGTGATA CGGAACCTGAACGACCAGGTCCTGTTCATTGACCAG	155

			GGTAACCGCCCGCTGTTCGAGGACATGACTGACTCC GATTGCCGCGACAATGCCCCCCGCACGATCTTCATT ATCTCCATGTACAAGGATAGCCAACCCCGTGGTATG GCCGTGACCATTAGCGTCAAATGTGAGAAGATCTCT ACTCTGTCCTGTGAGAATAAGATTATCTCCTTCAAGG AGATGAACCCCCCTGATAACATCAAAGACACTAAAT CGGACATCATTTTCTTTCAGAGGAGCGTGCCAGGCC ACGACAACAAGATGCAGTTCGAGAGTTCTAGTTACG AGGGATATTTCCTGGCCTGCGAAAAAGAACGTGACC TCTTCAAGCTAATCCTGAAGAAGGAGGACGAGCTCG GTGACAGGAGCATCATGTTTACTGTCCAAAACGAGG ACTGA	
G12-2R1_134_ECD_T2A_hIL-18		1-3210	ATGGCTCGCCTCGGAAATTGTTCCCTGACCTGGGCA GCATTGATCATTCTCCTGCTACCAGGGAGTCTCGAA GAATGTGGCCATATCTCTGTAAGCGCCCCTATTGTGC ACTTGGGAGACCCAATCACAGCATCATGCATCATCA AGCAGAATTGCTCTCATCTCGATCCAGAGCCACAGA TACTCTGGGAGCTGGGCGCAGAACTGCAACCCGGAG GGCGCCAGCAGAGACTGAGTGATGGAACACAGGAG AGCATTATCACTTTACCTCATCTGAACCACACCCAG GCCTTTCTTAGCTGCTGTTTGAACTGGGGCAACAGTC TCCAGATTCTGGACCAGGTGGAGCTGAGGGCGGGTT ACCCGCCCGCCATTCCACACAATTTGTCCTGTCTCAT GAACCTGACAACAAGTAGCCTGATATGCCAGTGGGA GCCAGGGCCGGAGACCCATCTCCCAACTAGTTTCAC GCTCAAGAGCTTCAAGTCAGAGGGGAACTGCCAGAC ACAAGGGGACAGCATTCTCGACTGTGTGCCCAAGGA CGGGCAGAGTCACTGTTGCATTCCAGACAAGCATCT GCTGCTGTATCAGAACATGGGCATTTGGGTTCAGGC CGAAAATGCCCTCGGTACTTCCATGAGTCCACAGTT GTGTCTTGACCCCATGGATGTGGTGAAGCTGGAACC GCCAATGCTGAGGACCATGGATCCCTCACCTGAGGC TGCTCCGCCACAGGCAGGGTGTCTGCAGCTGTGCTG GGAGCCCTGGCAGCCTGGATTGCACATAAACCAAAA ATGTGAGCTGAGGCACAAGCCCCAGAGAGGTGAGG CGAGTTGGGCCCTGGTAGGGCCTCTTCCTCTAGAAG CCCTGCAGTATGAATTGTGTGGATTACTTCCCGCAAC CGCCTACACTCTTCAGATCAGGTGTATCCGGTGGCCT CTGCCCGGCCACTGGAGCGACTGGTCTCCGAGCCTC GAATTGAGAACAACAGAACGGGCTCCTACGGTGCGT CTGGATACATGGTGGAGGCAGCGACAGTTGGACCCG CGTACAGTGCAGCTGTTCTGGAAGCCCGTACCTCTG GAAGAGGATAGTGGTCGGATTCAGGGATATGTGGTC TCTTGGCGGCCTTCCGGTCAGGCTGGGGCTATCCTTC CCTTATGCAACACTACAGAGCTCAGCTGTACCTTTCA TTTACCCAGCGAAGCCCAGGAAGTGGCTCTCGTCGC CTATAATTCCGCTGGAACGTCAAGACCCACCCCTGT CGTGTTCTCTGAGTCTCGGGGACCTGCCCTAACCAG GCTCCATGCAATGGCACGCGATCCTCACAGTCTGTG GGTTGGCTGGGAACCACCAAATCCCTGGCCTCAGGG CTATGTCATCGAATGGGGCCTTGGCCCCCCATCAGC CTCCAATAGCAACAAGACCTGGAGAATGGAGCAAA ATGGGAGAGCAACCGGGTTCCTGCTGAAGGAGAAC ATCCGACCGTTCCAGCTTTATGAAATTATTGTAACTC	156

[1099]

			CACTGTACCAGGACACAATGGGACCATCTCAGCATG TCTACGCTTATTCCCAGGAGATGGCGCCTAGTCATG CTCCTGAATTACACTTGAAGCACATAGGGAAAACTT GGGCCCAATTAGAGTGGGTCCCGGAGCCTCCCGAGC TGGGGAAAAGCCCATTGACCCATTACACGATATTTT GGACCAATGCTCAGAACCAATCCTTTTCTGCCATCCT GAATGCCTCATCTCGAGGCTTTGTGCTGCATGGCCTA GAGCCTGCATCACTCTACCACATTCACCTGATGGCC GCCAGCCAGGCGGGTGCCACAAACTCCACAGTTCTC ACTTTAATGACTCTAACCCCAGAGGGCAGTGAACTG CACATCATATTAGGGTTATTCGGATTGCTGCTTCTTT TGACTTGCCTCTGTGGCACTGCGTGGCTGTGCTGCTC CCCGAACCGAAAGAATCCTCTCTGGCCTAGCGTTCC CGATCCTGCTCACAGTTCACTAGGATCATGGGTGCC AACCATCATGGAAGAGGATGCCTTCCAGCTACCAGG ACTGGGTACGCCGCCCATAACCAAATTAACGGTCCT TGAAGAGGATGAGAAGAAACCAGTTCCATGGGAAA GCCACTCTTCCAATCATAGCCTCACCTCTTGCTTCAC CAACCAAGGGTATTTTTTTTTCCACCTGCCCGACGCT CTGGAAATTGAGGCCTGCCAAGTGTATTTCACCTAC GACCCTTACTCTGAAGAAGATCCGGCAGGCGACCTA CCCACTCATGATGGCTACCTGCCGTCAAACATCGAC GACTTACCGAGTGGAGGACCCTCCCCACCTTCTACA GCCCCTGGTGGCTCCGGTGCAGGGGAGGAAAGGAT GCCTCCCTCACTGCAGGAGAGAGTCCCCAGAGACTG GGATCCTCAGCCACTTGGACCACCCACACCTGGTGT GCCTGACCTTGTGGATTTTCAGCCCCCTCCTGAGCTT GTTCTTCGAGAAGCAGGTGAGGAGGTTCCTGATGCA GGCCCACGTGAGGGGGTCTCCTTTCCCTGGTCCAGG CCTCCTGGCCAAGGAGAGTTCCGCGCTCTGAATGCA CGCTTGCCTCTGAACACAGATGCTTACCTGAGCCTA CAAGAGTTACAAGGCCAGGATCCGACACACCTGGTG GGATCTGGCGAGGGTAGAGGCAGCCTCCTAACTTGT GGCGACGTGGAGGAGAACCCCGGTCCCTACTTCGGT AAGCTGGAGTCTAAACTGTCGGTGATACGGAACCTG AACGACCAGGTCCTGTTCATTGACCAGGGTAACCGC CCGCTGTTCGAGGACATGACTGACTCCGATTGCCGC GACAATGCCCCCCGCACGATCTTCATTATCTCCATGT ACAAGGATAGCCAACCCCGTGGTATGGCCGTGACCA TTAGCGTCAAATGTGAGAAGATCTCTACTCTGTCCTG TGAGAATAAGATTATCTCCTTCAAGGAGATGAACCC CCCTGATAACATCAAAGACACTAAATCGGACATCAT TTTCTTTCAGAGGAGCGTGCCAGGCCACGACAACAA GATGCAGTTCGAGAGTTCTAGTTACGAGGGATATTT CCTGGCCTGCGAAAAAGAACGTGACCTCTTCAAGCT AATCCTGAAGAAGGAGGACGAGCTCGGTGACAGGA GCATCATGTTTACTGTCCAAAACGAGGACTGATGA	
G12/2R-1134 ECD		1-2673	ATGGCTCGCCTCGGAAATTGTTCCCTGACCTGGGCA GCATTGATCATTCTCCTGCTACCAGGGAGTCTCGAA GAATGTGGCCATATCTCTGTAAGCGCCCCTATTGTGC ACTTGGGAGACCCAATCACAGCATCATGCATCATCA AGCAGAATTGCTCTCATCTCGATCCAGAGCCACAGA TACTCTGGGAGCTGGGCGCAGAACTGCAACCCGGAG GGCGCCAGCAGAGACTGAGTGATGGAACACAGGAG	157

[1100]

[1101]

			AGCATTATCACTTTACCTCATCTGAACCACACCCAG GCCTTTCTTAGCTGCTGTTTGAACTGGGGCAACAGTC TCCAGATTCTGGACCAGGTGGAGCTGAGGGCGGGTT ACCCGCCCGCCATTCCACACAATTTGTCCTGTCTCAT GAACCTGACAACAAGTAGCCTGATATGCCAGTGGGA GCCAGGGCCGGAGACCCATCTCCCAACTAGTTTCAC GCTCAAGAGCTTCAAGTCAGAGGGGAACTGCCAGAC ACAAGGGGACAGCATTCTCGACTGTGTGCCCAAGGA CGGGCAGAGTCACTGTTGCATTCCAGACAAGCATCT GCTGCTGTATCAGAACATGGGCATTTGGGTTCAGGC CGAAAATGCCCTCGGTACTTCCATGAGTCCACAGTT GTGTCTTGACCCCATGGATGTGGTGAAGCTGGAACC GCCAATGCTGAGGACCATGGATCCCTCACCTGAGGC TGCTCCGCCACAGGCAGGGTGTCTGCAGCTGTGCTG GGAGCCCTGGCAGCCTGGATTGCACATAAACCAAAA ATGTGAGCTGAGGCACAAGCCCCAGAGAGGTGAGG CGAGTTGGGCCCTGGTAGGGCCTCTTCCTCTAGAAG CCCTGCAGTATGAATTGTGTGGATTACTTCCCGCAAC CGCCTACACTCTTCAGATCAGGTGTATCCGGTGGCCT CTGCCCGGCCACTGGAGCGACTGGTCTCCGAGCCTC GAATTGAGAACAACAGAACGGGCTCCTACGGTGCGT CTGGATACATGGTGGAGGCAGCGACAGTTGGACCCG CGTACAGTGCAGCTGTTCTGGAAGCCCGTACCTCTG GAAGAGGATAGTGGTCGGATTCAGGGATATGTGGTC TCTTGGCGGCCTTCCGGTCAGGCTGGGGCTATCCTTC CCTTATGCAACACTACAGAGCTCAGCTGTACCTTTCA TTTACCCAGCGAAGCCCAGGAAGTGGCTCTCGTCGC CTATAATTCCGCTGGAACGTCAAGACCCACCCCTGT CGTGTTCTCTGAGTCTCGGGGACCTGCCCTAACCAG GCTCCATGCAATGGCACGCGATCCTCACAGTCTGTG GGTTGGCTGGGAACCACCAAATCCCTGGCCTCAGGG CTATGTCATCGAATGGGGCCTTGGCCCCCCATCAGC CTCCAATAGCAACAAGACCTGGAGAATGGAGCAAA ATGGGAGAGCAACCGGGTTCCTGCTGAAGGAGAAC ATCCGACCGTTCCAGCTTTATGAAATTATTGTAACTC CACTGTACCAGGACACAATGGGACCATCTCAGCATG TCTACGCTTATTCCCAGGAGATGGCGCCTAGTCATG CTCCTGAATTACACTTGAAGCACATAGGGAAAACTT GGGCCCAATTAGAGTGGGTCCCGGAGCCTCCCGAGC TGGGGAAAAGCCCATTGACCCATTACACGATATTTT GGACCAATGCTCAGAACCAATCCTTTTCTGCCATCCT GAATGCCTCATCTCGAGGCTTTGTGCTGCATGGCCTA GAGCCTGCATCACTCTACCACATTCACCTGATGGCC GCCAGCCAGGCGGGTGCCACAAACTCCACAGTTCTC ACTTTAATGACTCTAACCCCAGAGGGCAGTGAACTG CACATCATATTAGGGTTATTCGGATTGCTGCTTCTTT TGACTTGCCTCTGTGGCACTGCGTGGCTGTGCTGCTC CCCGAACCGAAAGAATCCTCTCTGGCCTAGCGTTCC CGATCCTGCTCACAGTTCACTAGGATCATGGGTGCC AACCATCATGGAAGAGGATGCCTTCCAGCTACCAGG ACTGGGTACGCCGCCCATAACCAAATTAACGGTCCT TGAAGAGGATGAGAAGAAACCAGTTCCATGGGAAA GCCACTCTTCCAATCATAGCCTCACCTCTTGCTTCAC CAACCAAGGGTATTTTTTTTTCCACCTGCCCGACGCT	

[1102]

			CTGGAAATTGAGGCCTGCCAAGTGTATTTCACCTAC GACCCTTACTCTGAAGAAGATCCGGCAGGCGACCTA CCCACTCATGATGGCTACCTGCCGTCAAACATCGAC GACTTACCGAGTGGAGGACCCTCCCCACCTTCTACA GCCCCTGGTGGCTCCGGTGCAGGGGAGGAAAGGAT GCCTCCCTCACTGCAGGAGAGAGTCCCCAGAGACTG GGATCCTCAGCCACTTGGACCACCCACACCTGGTGT GCCTGACCTTGTGGATTTTCAGCCCCCTCCTGAGCTT GTTCTTCGAGAAGCAGGTGAGGAGGTTCCTGATGCA GGCCCACGTGAGGGGGTCTCCTTTCCCTGGTCCAGG CCTCCTGGCCAAGGAGAGTTCCGCGCTCTGAATGCA CGCTTGCCTCTGAACACAGATGCTTACCTGAGCCTA CAAGAGTTACAAGGCCAGGATCCGACACACCTGGTG	
T2A		2674-2736	GGATCTGGCGAGGGTAGAGGCAGCCTCCTAACTTGT GGCGACGTGGAGGAGAACCCCGGTCCC	157

표 32

인간 IL-7Rα 세포외, 막관통 및 세포내 도메인 및 신호 펩타이드의 단백질 서열

단백질	Uniprot ID	도메인 및 잔기 넘버링	폴리펩타이드 서열	서열 번호
IL-7Rα	P16871	ECD: 1-219	ESGYAQNGDLEDAELDDYSFSCYSQLEVNGSQHSLTCAFEDPDV NITNLEFEICGALVEVKCLNFRKLQEIYFIETKKFLLIGKSNICVKVG EKSLTCKKIDLTTIVKPEAPFDLSVVYREG 및 FVVTFNTSHLQKKY VKVLMHDVAYRQEKDENKWTHVNLSSTKLTLLQRKLQPAAMYE IKVRSIPDHYFKGFWSEWSPSYYFRTPEINNSSGEMD	187
IL-7Rα	P16871	TMD: 220-244	PILLTISILSFFSVALLVILACVLW	188
IL-7Rα	P16871	ICD: 245-439	KKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKNLNVSFNPESFLDCQIHR VDDIQARDEVEGFLQDTFPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSED VVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLDCRESGKNGPH VYQDLLLSLGTTNSTLPPPFSLQSGILTLNPVAQGQPILTSLGSNQ EEAYVTMSSFYQNQ	189
IL-7Rα	P16871	신호 펩타이드	MTILGTTFGMVFSLLQVVSG	190
IL-7	A8K673	사이토카인: 1-152	DCDIEGKDGKQYESVLMVSIDQLLDSMKEIGSNCLNNEFNFFKRHI CDANKEGMFLFRAARKLRQFLKMNSTGDFDLHLLKVSEGTTILLNC TGQVKGRKPAALGEAQPTKSLEENKSLKEQKKLNDLCFLKRLLQEIK TCWNKILMGTKEH	191

[1103]

표 33

세포내 도메인 (ICD). ICD는 하기 중 하나로 이루어짐:

조작된 작제물	단백질 (도메인)	Uniprot ID	폴리펩타이드 서열	서열 번호
7/2R-1	IL-2Rβ: Box 1 모티프 Box 2, Shc, 및 STAT5 결합 부위 불드체 모티프	P14784	NCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV*	192
7/2R-2	IL-7Rα: Box 1 모티프 Box 2 불드체 모티프	P16871	KKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKNLNVSFNPESFLDCQIHRVDDIQARDEVEG	193
	IL-2Rβ: Shc 및 STAT5 결합 부위 불드체 모티프 *정지 코돈	P14784	LERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV*	194
7/2/12R-1	IL-2Rβ: Box 1 모티프 Box 2, Shc, 및 STAT5 결합 부위 불드체 모티프	P14784	NCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV	192
	IL-12Rβ2: STAT4 결합 부위 불드체 모티프	Q99665	TVLPAGDLPTHDGYLPSNIDDLPSHEAPLADSLEELEPQHISLSVFPSSSLHPLTFSCGDKLTLDQLKMRCDSLML*	195
7/2/12R-2	IL-7Rα: Box 1 모티프 Box 2 불드체 모티프	P16871	KKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKNLNVSFNPESFLDCQIHRVDDIQARDEVEG	193
	IL-2Rβ: Shc 및 STAT5 결합 부위 불드체 모티프 *정지 코돈	P14784	LERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV	194
	IL-12Rβ2:	Q99665	TVLPAGDLPTHDGYLPSNIDDLPSHEAPLADSLEELEPQHISLSVFPSSSLHPLTFSCGDKLTLDQLKMRCDSLML*	195

[1104]

	STAT4 결합 부위 볼드체 밑줄			
7/12/2R-1	IL-2Rβ: Box 1 밑줄 Box 2 및 Shc 결합 부위 볼드체 밑줄	P14784	NCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDP	196
	IL-12Rβ2: STAT4 결합 부위 볼드체 밑줄	Q99665	AGDLPTHDGYLPSNIDDLPS	197
	IL-2Rβ: STAT5 결합 부위 볼드체 밑줄 *경지 코돈	P14784	GGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV*	198
7/12/2R-2	IL-7Rα: Box 1 밑줄 Box 2 볼드체 밑줄	P16871	KKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKNLNVSFNPESFLDCQIHRVDDIQAR	199
	IL-12Rβ2: STAT4 결합 부위 볼드체 밑줄	Q99665	AGDLPTHDGYLPSNIDDLPSHEAPLADSLEELEPQHISLSVFPSSSLHPLTFSCGDKLTLDQLKMRC	200
	IL-2Rβ: Shc 및 STAT5 결합 부위 볼드체 밑줄 *경지 코돈	P14784	LERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHLV*	194
7/21-R1	IL-21R: Box 1 밑줄 Box 2 및 STAT3 결합 부위 볼드체 밑줄	Q9HBE5	LWRLWKKIWAVPSPERFFMPLYKGCSGDFKKWVGAPFTGSSLELGPWSPEVPSTLEVYSCHPPRSPAKRLQLTELQEPAELVESDGVPKPSFWPTAQNSGGSAYSEERDRPYGLVSIDTVTVLDAEGPCTWPCSCEDDGYPALDLDAGLEPSPGLEDPLLDAGTTVLSCGCVSAGSPGLGGPLGSLLDRLKPPLADGEDWAGGLPWGGRSPGGVSESEAGSPLAGLDMDTFDSGFVGSDCSSPVECDFTSPGDEGPPRSYLRQWVVIPPPLSSPGPQAS*	201
7/21-R2	IL-7Rα: Box 1 밑줄 Box 2 볼드체 밑줄	P16871	KKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKNLNVSFNPESFLDCQIHRVDDIQARD	202
	IL-21R: STAT3 결합 부위 볼드체 밑줄	Q9HBE5	RSPAKRLQLTELQEPAELVESDGVPKPSFWPTAQNSGGSAYSEERDRPYGLVSIDTVTVLDAEGPCTWPCSCEDDGYPALDLDAGLEPSPGLEDPLLDAGTTVLSCGCVSAGSPGLGGPLGSLLDRLKPPLADGEDWAGGLPWGGRSPGGVSESEAGSPLAGLDMDTFDSGFVGSDCSSPVECDFTSPGDEGPPRSYLRQWVVIPPPLSSPGPQAS*	203
7/21/7R-1	IL-21R: Box 1 밑줄 Box 2 및 STAT3 결합 부위 볼드체 밑줄	Q9HBE5	LWRLWKKIWAVPSPERFFMPLYKGCSGDFKKWVGAPFTGSSLELGPWSPEVPSTLEVYSCHPPRSPAKRLQLTELQEPAELVESDGVPKPSFWPTAQNSGGSAYSEERDRPYGLVSIDTVTVLDAEGPCTWPCSCEDDGYPALDLDAGLEPSPGLEDPLLDAGTTVLSCGCVSAGSPGLGGPLGSLLDRLKPPLADGEDWAGGLPWGGRSPGGVSESEAG	201

[1105]

			SPLAGLDMDTFDSGFVGSDCSSPVECDFTSPGDEGPPRS**Y**LRQ WVVIPPPLSSPGPQAS	
	IL-7Rα: STAT5 및 PI3K 결합 부위 불드체밑줄	P16871	DCRESGKNGPHV**Y**QDLLLSLGTTNSTLPPPFSLQSGILTLNPVAQ GQPILTSLGSNQEEA**Y**VTMSSF**Y**QNQ*	204
7/7/21R-1	IL-7Rα: Box 1 밑줄 Box 2, STAT5 및 PI3K 결합 부위 불드체 밑줄	P16871	KKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKN**LNVS**FNPESFLD**CQIH**R VDDIQARDEVEGFLQDTFPQQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSED VVITPESFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLDCRESGKNGPH V**Y**QDLLLSLGTTNSTLPPPFSLQSGILTLNPVAQGQPILTSLGSNQ EEA**Y**VTMSSF**Y**QNQ	205
	IL-21R: STAT3 결합 부위 불드체 밑줄	Q9HBE5	SPGDEGPPRS**Y**LRQWVVIPPPLSSPGPQAS*	206
7/2/21R-1	IL-2Rβ: Box 1 밑줄 Box 2, Shc 및 STAT5 결합 부위 불드체 밑줄	P14784	NCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFP SSSFSPGGLAPEISP**LEVL**ERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLT SCFTNQG**Y**FFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPT GSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGG SGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPE LVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTD A**Y**LSLQELQGQDPTHLV	192
	IL-21R: STAT3 결합 부위 불드체 밑줄	Q9HBE5	SPGDEGPPRS**Y**LRQWVVIPPPLSSPGPQAS*	206
7/2/21R-2	IL-7Rα: Box 1 밑줄 Box 2 불드체 밑줄	P16871	KKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKN**LNVS**FNPESFLD**CQIH**R VDDIQARDEVEG	193
	IL-2Rβ: Shc 및 STAT5 결합 부위 불드체 밑줄 *경지 코돈	P14784	LERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQG**Y**FFFHLPDA LEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDA YCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQER VPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGP REGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDA**Y**LSLQELQGQDPT HLV	194
	IL-21R: STAT3 결합 부위 불드체 밑줄	Q9HBE5	SPGDEGPPRS**Y**LRQWVVIPPPLSSPGPQAS*	206
7/2/12/21R-1	IL-2Rβ: Box 1 밑줄 Box 2, Shc 및 STAT5 결합 부위 불드체 밑줄	P14784	NCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFP SSSFSPGGLAPEISP**LEVL**ERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLT SCFTNQG**Y**FFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPT GSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGG SGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPE LVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTD A**Y**LSLQELQGQDPTHLV	192
	IL-12Rβ2: STAT4 결합 부위 불드체 밑줄	Q99665	TVLPAGDLPTHDG**Y**LPSNIDDLPSHEAPLADSLEELEPQHISLSVF PSSSLHPLTFSCGDKLTLDQLKMRCDSLML	195

[1106]

	IL-21R: STAT3 결합 부위 불드체 밑줄	Q9HBE5	SPGDEGPPRS**Y**LRQWVVIPPPLSSPGPQAS*	206
7/2/12/21R-2	IL-7Rα: Box 1 밑줄 Box 2 불드체 밑줄	P16871	KKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKN**LNVS**FNPESFLD**CQIH**R VDDIQARDEVEG	193
	IL-2Rβ: Shc 및 STAT5 결합 부위 불드체 밑줄	P14784	LERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQG**Y**FFFHLPDA LEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDA YCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQER VPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGP REGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDA**Y**LSLQELQGQDPT HLV	194
	IL-12Rβ2: STAT4 결합 부위 불드체 밑줄	Q99665	TVLPAGDLPTHDG**Y**LPSNIDDLPSHEAPLADSLEELEPQHISLSVF PSSSLHPLTFSCGDKLTLDQLKMRCDSLML	195
	IL-21R: STAT3 결합 부위 불드체 밑줄	Q9HBE5	SPGDEGPPRS**Y**LRQWVVIPPPLSSPGPQAS*	206
7/2/21/12R-1	IL-2Rβ: Box 1 밑줄 Box 2, Shc, 및 STAT5 결합 부위 불드체 밑줄	P14784	NCRNTGPWLKKVLKCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFP SSSFSPGGLAPEISP**LEVL**ERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLT SCFTNQG**Y**FFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPT GSSPQPLQPLSGEDDAYCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGG SGAGEERMPPSLQERVPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPE LVLREAGEEVPDAGPREGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTD A**Y**LSLQELQGQDPTHLV	192
	IL-21R: STAT3 결합 부위 불드체 밑줄	Q9HBE5	SPGDEGPPRS**Y**LRQWVVIPPPLSSPGPQA	207
	IL-12Rβ2: STAT4 결합 부위 불드체 밑줄	Q99665	AGDLPTHDG**Y**LPSNIDDLPSHEAPLADSLEELEPQHISLSVFPSSSL HPLTFSCGDKLTLDQLKMRCDSLML*	208
7/2/21/12R-2	IL-7Rα: Box 1 밑줄 Box 2 불드체 밑줄	P16871	KKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKN**LNVS**FNPESFLD**CQIH**R VDDIQARDEVEG	193
	IL-2Rβ: Shc 및 STAT5 결합 부위 불드체 밑줄 *정지 코돈	P14784	LERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHSLTSCFTNQG**Y**FFFHLPDA LEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQPLQPLSGEDDA YCTFPSRDDLLLFSPSLLGGPSPPSTAPGGSGAGEERMPPSLQER VPRDWDPQPLGPPTPGVPDLVDFQPPPELVLREAGEEVPDAGP REGVSFPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDA**Y**LSLQELQGQDPT HLV	194
	IL-21R: STAT3 결합 부위 불드체 밑줄	Q9HBE5	SPGDEGPPRS**Y**LRQWVVIPPPLSSPGPQA	207
	IL-12Rβ2: STAT4 결합 부위 불드체 밑줄	Q99665	AGDLPTHDG**Y**LPSNIDDLPSHEAPLADSLEELEPQHISLSVFPSSSL HPLTFSCGDKLTLDQLKMRCDSLML*	208

[1107]

7/4R-1	IL-4Rα: Box 1 밀줄 Box 2, IRS-2 및 STAT6 결합 부위 볼드체 밀줄	P24394	KIKKEWWDQIPNPARSRLVAIIIQDAQGSQWEKRSRGQEPAKCP HWKNCLTKLLP**CFLE**HNMKRDEDPHKAAKEMPFQGSGKSAWC PVEISKTVLWPESISVVRCVELFEAPVECEEEEEVEEEKGSFCASPE SSRDDFQEGREGIVARLTESLFLDLLGEENGGFCQQDMGESCLLP PSGSTSAHMPWDEFPSAGPKEAPPWGKEQPLHLEPSPPASPTQ SPDNLTCTETPLVIAGNPA**Y**RSFSNSLSQSPCPRELGPDPLLARHL EEVEPEMPCVPQLSEPTTVPQPEPETWEQILRRNVLQHGAAAAP VSAPTSGYQEFVHAVEQGGTQASAVVGLGPPGEAG**Y**KAFSSLLA SSAVSPEKCGFGASSGEEG**Y**KPFQDLIPGCPGDPAPVPVPLFTFG LDREPPRSPQSSHLPSSSPEHLGLEPGEKVEDMPKPPLPQEQATD PLVDSLGSGIVYSALTCHLCGHLKQCHGQEDGGQTPVMASPCC GCCCGDRSSPPTTPLRAPDPSPGGVPLEASLCPASLAPSGISEKSK SSSSFHPAPGNAQSSSQTPKIVNFVSVGPTYMRVS*	209
7/4R-2	IL-7Rα: Box 1 밀줄 Box 2 볼드체 밀줄	P16871	KKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKN**LNVS**FNPESFLD**CQIH**R VDDIQA	210
	IL-4Rα: IRS-2 및 STAT6 결합 부위 볼드체 밀줄	P24394	DEDPHKAAKEMPFQGSGKSAWCPVEISKTVLWPESISVVRCVEL FEAPVECEEEEEVEEEKGSFCASPESSRDDFQEGREGIVARLTESL FLDLLGEENGGFCQQDMGESCLLPPSGSTSAHMPWDEFPSAGP KEAPPWGKEQPLHLEPSPPASPTQSPDNLTCTETPLVIAGNPA**Y**R SFSNSLSQSPCPRELGPDPLLARHLEEVEPEMPCVPQLSEPTTVP QPEPETWEQILRRNVLQHGAAAAPVSAPTSGYQEFVHAVEQGG TQASAVVGLGPPGEAG**Y**KAFSSLLASSAVSPEKCGFGASSGEEG**Y** KPFQDLIPGCPGDPAPVPVPLFTFGLDREPPRSPQSSHLPSSSPEH LGLEPGEKVEDMPKPPLPQEQATDPLVDSLGSGIVYSALTCHLCG HLKQCHGQEDGGQTPVMASPCCGCCCGDRSSPPTTPLRAPDPS PGGVPLEASLCPASLAPSGISEKSKSSSSFHPAPGNAQSSSQTPKI VNFVSVGPTYMRVS*	211
7/6R-1	Gp130: Box 1 밀줄 Box 2, SHP-2 및 STAT3 결합 부위 볼드체 밀줄	P40189	KNKRDLIKKHIWPNVPDPSKSHIAQWSPHTPPRHNFNSKDQMY SDGNFTD**VSVV**EIE 및 KKPFPEDLKSLDLFKKEKINTEGHSSGIG GSSCMSSSRPSISSSDENESSQNTSSTVQ**Y**STVVHSG**Y**RHQVPSV QVFSRSESTQPLLDSEERPEDLQLVDHVDGGDGILPRQQ**Y**FKQN CSQHESSPDISHFERSKQVSSVNEEDFVRLKQQISDHISQSCGSG QMKMFQEVSAADAFGPGTEGQVERFETVGMEAATDEGMPKS **Y**LPQTVRQGG**Y**MPQ*	212
7/6R-2	IL-7Rα: Box 1 밀줄 Box 2 볼드체 밀줄	P16871	KKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKN**LNVS**FNPESFLD**CQIH**R VDDIQARDEVE	213
	Gp130: SHP-2 및 STAT3 결합 부위 볼드체 밀줄	P40189	KKPFPEDLKSLDLFKKEKINTEGHSSGIGGSSCMSSSRPSISSSDEN ESSQNTSSTVQ**Y**STVVHSG**Y**RHQVPSVQVFSRSESTQPLLDSEER PEDLQLVDHVDGGDGILPRQQ**Y**FKQNCSQHESSPDISHFERSKQ VSSVNEEDFVRLKQQISDHISQSCGSGQMKMFQEVSAADAFGP GTEGQVERFETVGMEAATDEGMPKS**Y**LPQTVRQGG**Y**MPQ*	214

[1108]

표 34

키메라 사이토카인 수용체의 도메인 구성

명칭	신호 펩타이드	ECD	TMD	Box1/2 \	ICD	STAT 부위(들)	다른 부위(들)
7/2R-1	IL-7Rα (190)	IL-7Rα (187)	IL-7Rα (188)	IL-2Rβ (192)	IL-2Rβ (192)	5	Shc
7/2R-2	IL-7Rα (190)	IL-7Rα (187)	IL-7Rα (188)	IL-7Rα (193)	IL-2Rβ (194)	5	Shc
7/2/12R-1	IL-7Rα (190)	IL-7Rα (187)	IL-7Rα (188)	IL-2Rβ (192)	IL-2Rβ (195) IL-12Rβ2 (195)	4,5	Shc
7/2/12R-2	IL-7Rα (190)	IL-7Rα (187)	IL-7Rα (188)	IL-7Rα (193)	IL-2Rβ (194) IL-12Rβ2 (195)	4,5	Shc
7/12/2R-1	IL-7Rα (190)	IL-7Rα (187)	IL-7Rα (188)	IL-2Rβ (196)	IL-2Rβ (196) IL-12Rβ2 (197) IL-2Rβ (198)	4,5	Shc
7/12/2R-2	IL-7Rα (190)	IL-7Rα (187)	IL-7Rα (188)	IL-7Rα (199)	IL-12Rβ2 (200) IL-2Rβ (194)	4,5	Shc
7/21-R1	IL-7Rα (190)	IL-7Rα (187)	IL-7Rα (188)	IL-21R (201)	IL-21R (201)	3	N/A
7/21-R2	IL-7Rα (190)	IL-7Rα (187)	IL-7Rα (188)	IL-7Rα (202)	IL-21R (203)	3	N/A
7/21/7R-1	IL-7Rα (190)	IL-7Rα (187)	IL-7Rα (188)	IL-21R (201)	IL-21R (201) IL-7Rα (204)	3,5	PI3K
7/7/21R-1	IL-7Rα (190)	IL-7Rα (187)	IL-7Rα (188)	IL-7Rα (205)	IL-7Rα (205) IL-21R (206)	3,5	PI3K
7/2/21R-1	IL-7Rα (190)	IL-7Rα (187)	IL-7Rα (188)	IL-2Rβ (192)	IL-2Rβ (192) IL-21R (206)	3,5	Shc
7/2/21R-2	IL-7Rα (190)	IL-7Rα (187)	IL-7Rα (188)	IL-7Rα (193)	IL-2Rβ (194) IL-21R (206)	3,5	Shc
7/2/12/21 R-1	IL-7Rα (190)	IL-7Rα (187)	IL-7Rα (188)	IL-2Rβ (192)	IL-2Rβ (192) IL-12Rβ2 (195) IL-21R (206)	3,4,5	Shc
7/2/12/21 R-2	IL-7Rα (190)	IL-7Rα (187)	IL-7Rα (188)	IL-7Rα (193)	IL-2Rβ (194) IL-12Rβ2 (195) IL-21R (206)	3,4,5	Shc
7/2/21/12 R-1	IL-7Rα (190)	IL-7Rα (187)	IL-7Rα (188)	IL-2Rβ (192)	IL-2Rβ (192) IL-21R (207) IL-12Rβ2 (208)	3,4,5	Shc
7/2/21/12 R-2	IL-7Rα (190)	IL-7Rα (187)	IL-7Rα (188)	IL-7Rα (193)	IL-2Rβ (194) IL-21R (207) IL-12Rβ2 (208)	3,4,5	Shc
7/4R-1	IL-7Rα (190)	IL-7Rα (187)	IL-7Rα (188)	IL-4Rα (209)	IL-4Rα (209)	6	IRS-2
7/4R-2	IL-7Rα (190)	IL-7Rα (187)	IL-7Rα (188)	IL-7Rα (210)	IL-7Rα (210) IL-4Rα (211)	6	IRS-2

[1109]

7/6R-1	IL-7Rα (190)	IL-7Rα (187)	IL-7Rα (188)	gp130 (212)	gp130 (212)	3	SHP-2
7/6R-2	IL-7Rα (190)	IL-7Rα (187)	IL-7Rα (188)	IL-7Rα (213)	IL-7Rα (213) gp130 (214)	3	SHP-2

[1110]

표 35

키메라 사이토카인 수용체를 암호화하는 레드로바이러스 벡터가 형질도입된 뮤린 OT-I T 세포에서 제어된 주변분비 신호전달 및 분비된 사이토카인의 검출

수용체	사이토카인	IL-18	에오탁신	G-CSF	GM-CSF	IFN-g	IL-1a	IL-1b	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5
G2R-2	배지	OOR <	OOR <	0.79	3.31	0.95	0.58	0.43	OOR <	1.25	0.12	OOR <
G2R-2	IL-2	OOR <	OOR <	1.08	13.70	1.32	OOR <	0.14	OOR <	0.35	0.14	0.57
G2R-2	PEG-130a1	OOR <	0 96	0.91	17.70	2.29	2.51	OOR<	OOR <	0.35	0.12	1.09
G2R-3	배지	OOR <	OOR <	0.86	3.34	0.83	OOR <	029	OOR <	0.86	0.17	OOR <
G2R-3	IL-2	OOR <	OOR <	1.01	14.09	0.86	OOR <	0.14	OOR <	0.45	0.15	0.30
G2R-3	PEG-130a1	OOR <	OOR <	1.01	14.52	0.95	OOR <	OOR<	OOR <	0.35	0.12	0.06
G12/2R-1	배지	OOR <	OOR <	0.72	3.34	1.20	OOR <	OOR<	OOR <	0.92	0.16	OOR <
G12/2R-1	IL-2 + IL-12	OOR <	OOR <	0.79	95.76	717.93	7.94	029	OOR <	OOR <	0.18	OOR <
G12/2R-1	PEG-130a1	OOR <	OOR <	1.38	15.79	2.00	0.96	0.43	OOR <	0.19	0.16	OOR <
G12/2R-1 +m18	배지	155.62	0.18	0.86	12.20	6.92	OOR <	OOR<	OOR <	0.17	021	OOR <
G12/2R-1 + m18	IL-2 + IL-12	288.24	OOR <	1.52	972.75	9871.71	40.19	OOR<	0.59	0.86	023	0.81
G12/2R-1 + m18	PEG-130a1	811.10	OOR <	1.27	271.81	7426.63	19.56	OOR<	OOR <	0.47	020	7.59

수용체	사이토카인	IL-6	IL-7	IL-9	IL-10	IL-12p40	IL-12p70	IL-13	IL-15	IL-17	IP-10	KC
G2R-2	배지	0.24	025	OOR <	2.61	OOR <	3.19	OOR <	1.28	OOR<	2.46	0.96
G2R-2	IL-2	0.38	0.54	OOR <	52.28	OOR <	1.77	OOR<	OOR <	0.10	2.97	2.48
G2R-2	PEG-130a1	0.27	0.74	OOR <	300.01	OOR <	526	OOR <	2.56	0.28	3.59	1.20
G2R-3	배지	0.34	0.30	OOR <	3.29	OOR <	1.73	OOR <	OOR <	0.07	1.98	0.57
G2R-3	IL-2	0.33	0.19	OOR <	44.22	OOR <	2.59	OOR <	OOR <	OOR <	2.74	0.55
G2R-3	PEG-130a1	0.28	0.08	OOR <	68.26	OOR <	2.17	OOR <	OOR <	0.03	2.90	0.21
G12/2R	배지	0.49	023	OOR <	2.43	OOR <	1.90	OOR<	OOR <	OOR <	2.76	0.55
G12/2R	IL-2 + IL-12	0.33	0.11	020	1402.50	24.79	1166.81	OOR<	OOR <	0.10	4.29	0.96
G12/2R	PEG-130a1	0.29	0.05	020	160.37	OOR <	2.79	OOR<	OOR <	OOR <	3.26	8.23
G12/2R/18C	배지	0.48	0.30	OOR <	12.99	OOR <	1.77	OOR<	0.65	0.47	8.95	1.05
G12/2R/18C	IL-2 + IL-12	18.08	0.54	0.39	2911.40	19.69	875.39	OOR<	OOR <	1.51	18.77	2.57
G12/2R/18C	PEG-130a1	1.94	0.53	OOR <	1202.95	OOR <	2.99	OOR <	0.97	0.79	11.07	0.44

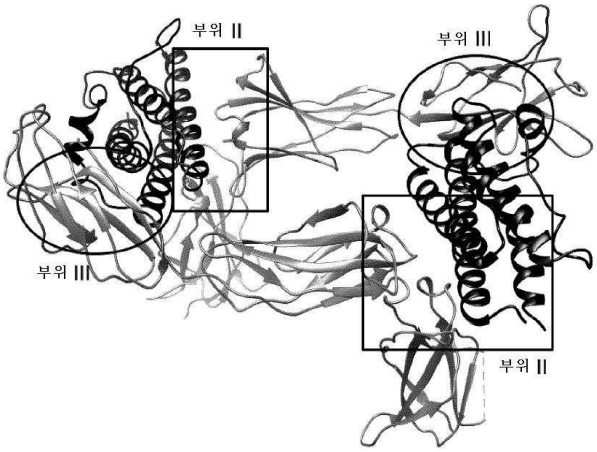
수용체	사이토카인	LIF	LIX	MCP-1	M-CSF	MG	MP-1a	MP-1b	MP-2	RANTES	TNFa	VEGF
G2R-2	배지	11.58	96.40	5.13	0.28	0.02	4.19	OOR <	OOR <	0.33	2.69	3.67
G2R-2	IL-2	11.91	80.86	320	0.73	0.02	OOR <	OOR <	20.29	1.64	6.56	45.30
G2R-2	PEG-130a1	15.25	87.57	0.99	0.23	0.04	4.02	12.86	33.70	3.12	10.33	78.42
G2R-3	배지	7.70	53.21	6.51	0.28	0.04	OOR <	OOR <	15.72	0.48	3.01	6.90
G2R-3	IL-2	7.55	78.33	4.30	0.46	OOR <	3.38	OOR <	13.24	1.60	5.45	40.10
G2R-3	PEG-130a1	8.86	104.04	4.86	0.32	OOR <	OOR <	OOR <	OOR <	1.95	7.34	76.88
G12/2R	배지	5.38	69.45	5.96	0.46	OOR <	OOR <	5.61	37.16	1.14	2.44	2.88
G12/2R	IL-2 + IL-12	12.60	80.50	9.57	0.82	0.18	7.98	3.52	7.05	1.92	7.12	38.94
G12/2R	PEG-130a1	7.07	117.52	4.86	0.73	0.07	3.38	OOR <	33.70	2.82	6.57	56.95
G12/2R/18C	배지	13.79	70.40	4.58	0.82	0.06	3.38	OOR <	39.25	5.58	6.77	8.30
G12/2R/18C	IL-2 + IL-12	39.84	88.99	8.18	0.60	0.39	7.98	7.97	26.47	6.46	26.12	121.10
G12/2R/18C	PEG-130a1	17.54	85.52	7.07	0.87	0.08	OOR <	OOR <	20.86	8.46	16.67	78.03

[1111]

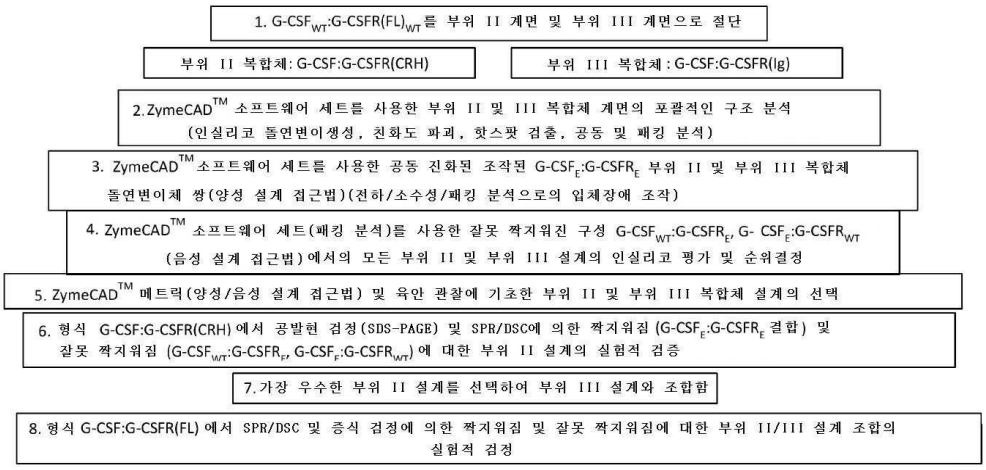
도면

도면1

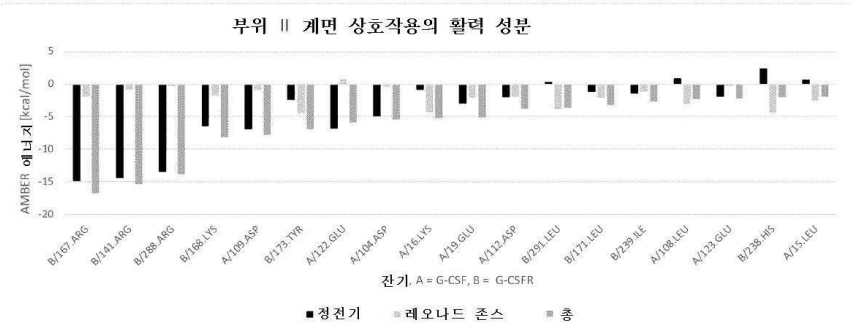
s



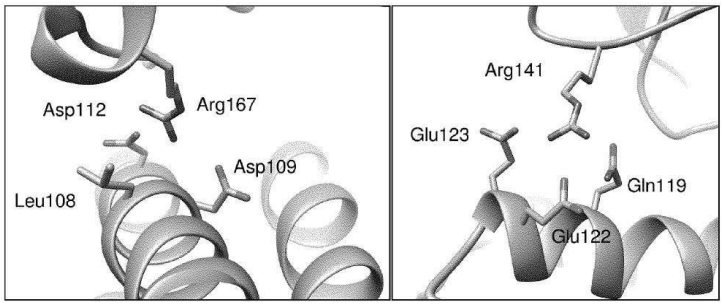
도면2



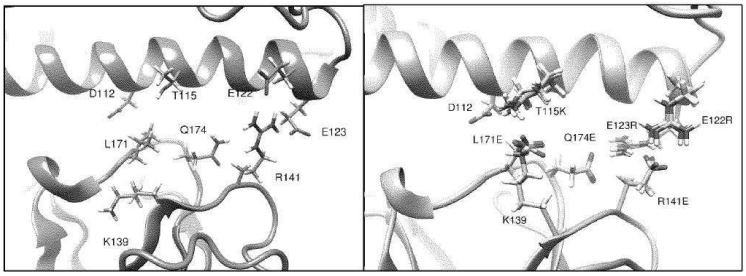
도면3



도면4

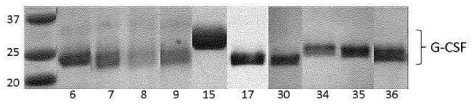


도면5



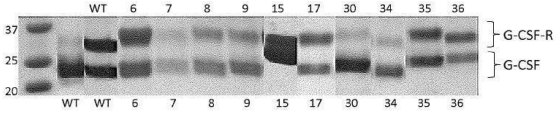
도면6

변이체 부위 II G-CSF 풀다운



*변이체 GCSF는 이의 돌연변이에 기초하여 가변적으로 이동한다.

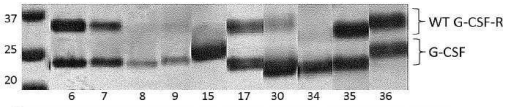
변이체 부위 II 공동 발현되고 정제된 복합체



* 변이체 왕은 성공적인 복합체를 형성한다.

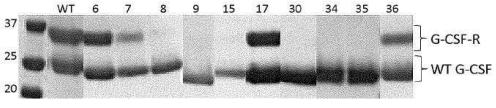
도면7

WT G-CSFR과 공발현된 변이체 부위 II G-CSF



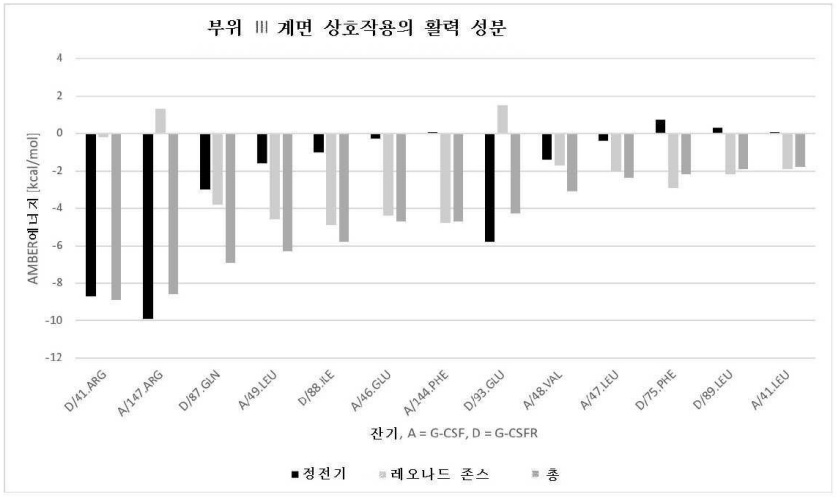
*변이체 G-CSF 8, 9, 15 및 34는 WT G-CSF-R에 결합하지 않는다

변이체 부위 II G-CSFR과 공발현된 WT G-CSF

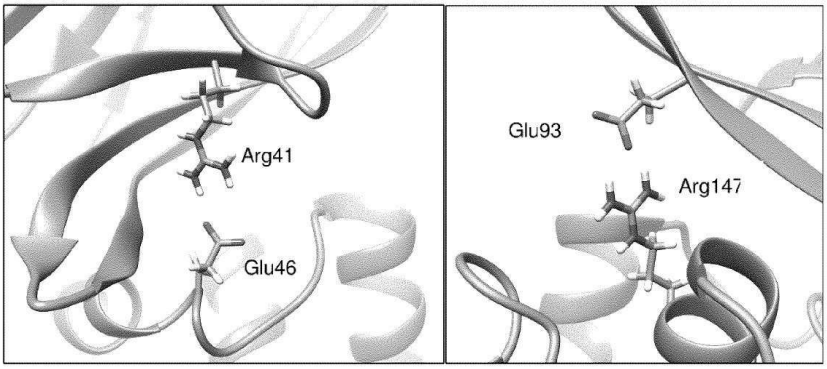


*변이체 G-CSF-R 8, 9, 15, 30, 34 및 35는 WT G-CSF에 결합하지 않는다

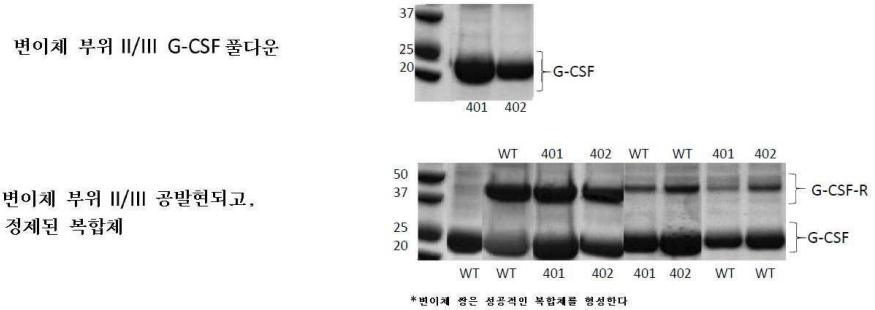
도면8


부위 III 계면 상호작용의 활력 성분
AMBER에너지 [kcal/mol]
4
2
0
-2
-4
-6
-8
-10
-12
D/41.ARG
A/147.ARG
D/87.GLN
A/49.LEU
D/88.ILE
A/46.GLU
A/144.PHE
D/93.GLU
A/48.VAL
A/47.LEU
D/75.PHE
D/89.LEU
A/41.LEU
잔기, A = G-CSF, D = G-CSFR
정전기
레오나드 존스
총

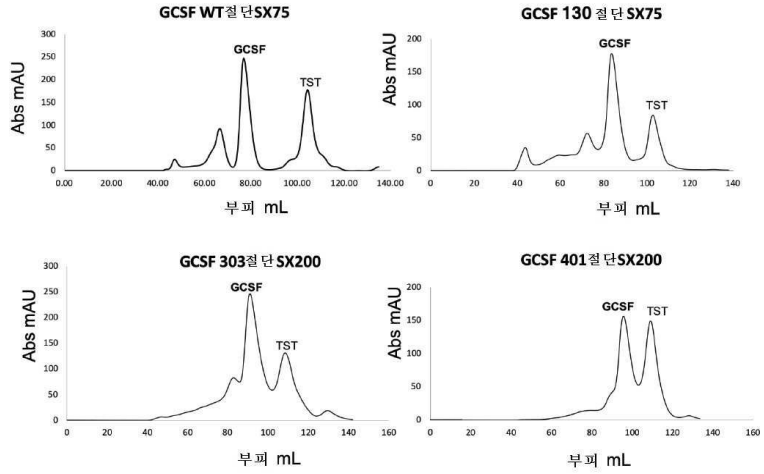
도면9


Arg41
Glu46
Glu93
Arg147

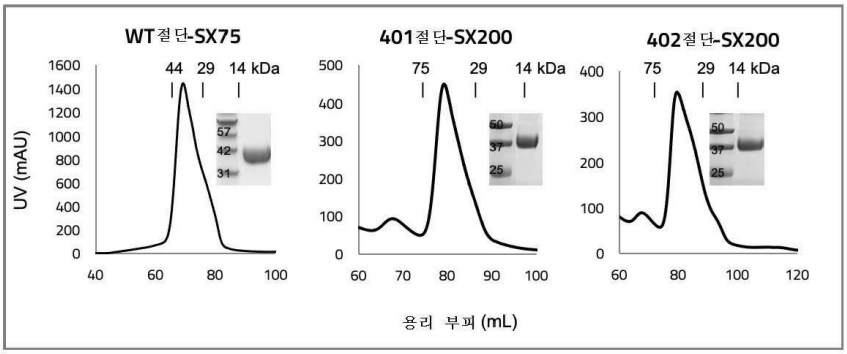
도면10


변이체 부위 II/III G-CSF 풀다운
37
25
20
G-CSF
401
402
변이체 부위 II/III 공발현되고,
정제된 복합체
WT
401
402
WT
WT
401
402
50
37
25
20
G-CSF-R
G-CSF
WT
WT
401
402
401
402
WT
WT
*변이체 쌍은 성공적인 복합체를 형성한다

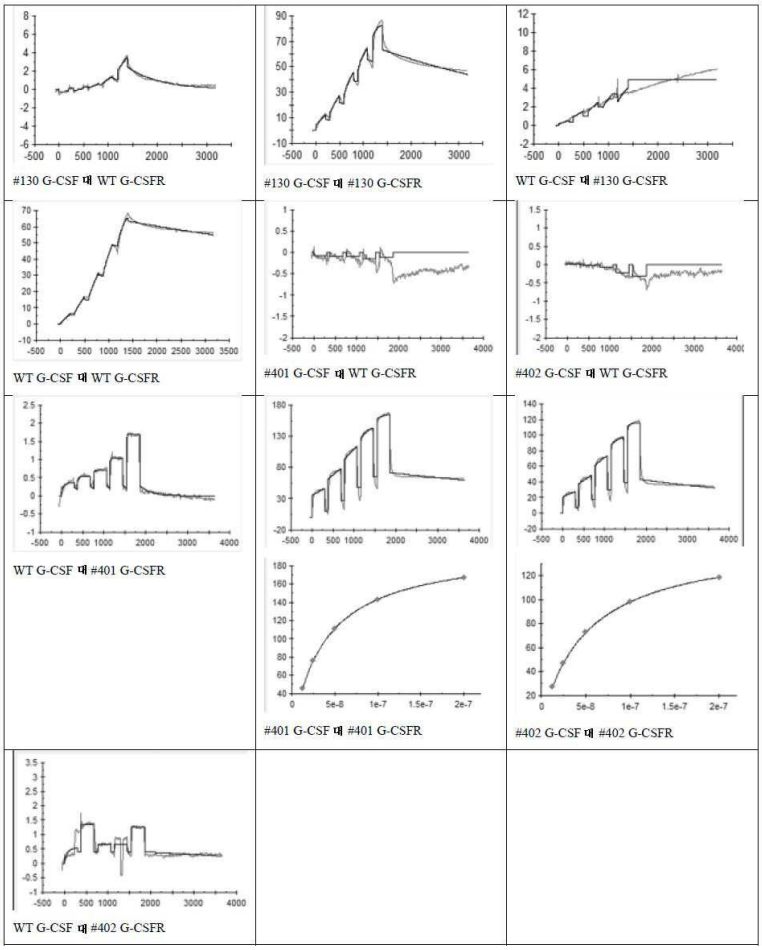
도면11


GCSF WT절단SX75
GCSF 130 절단 SX75
GCSF 303절단 SX200
GCSF 401절단SX200
GCSF
TST
Abs mAU
부피 mL

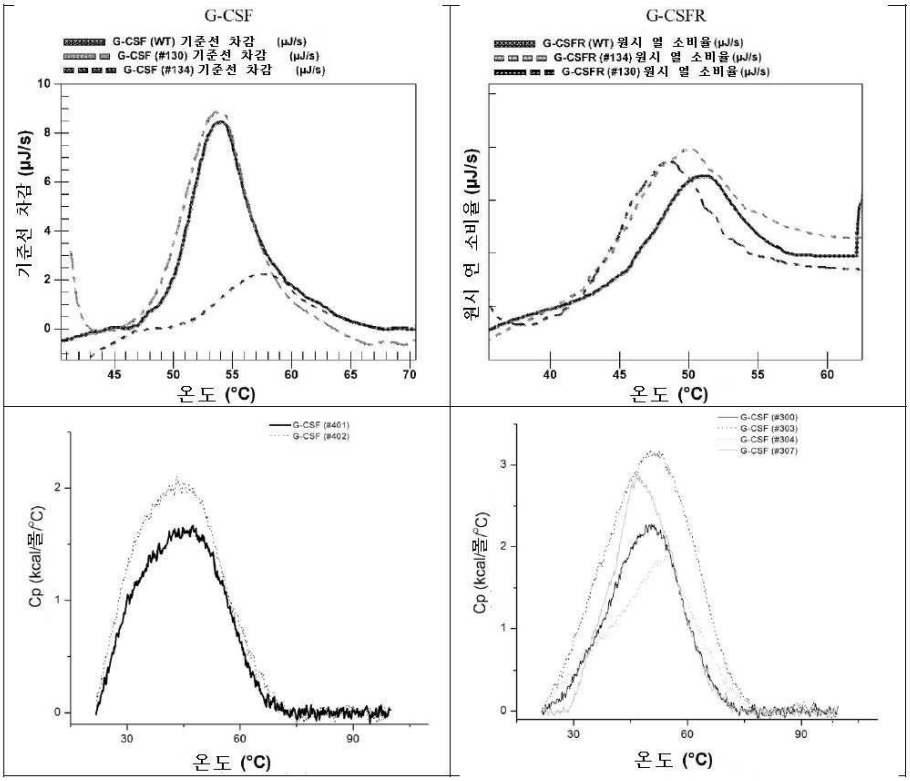
도면12


WT절단-SX75
401절단-SX200
402절단-SX200
44 29 14 kDa
75 29 14 kDa
UV (mAU)
용리 부피 (mL)

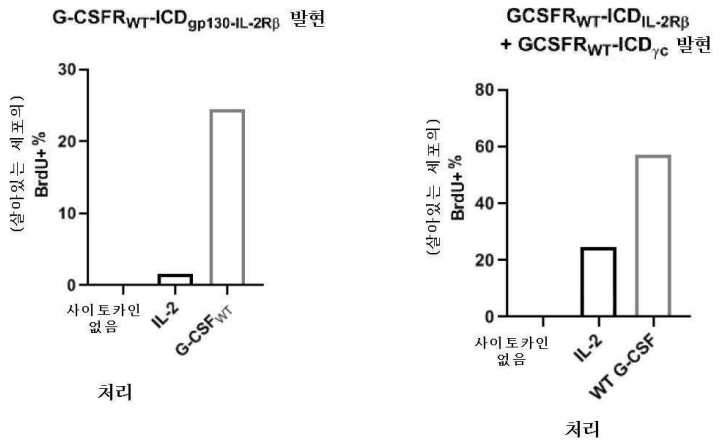
도면13


#130 G-CSF 대 WT G-CSFR
#130 G-CSF 대 #130 G-CSFR
WT G-CSF 대 #130 G-CSFR
WT G-CSF 대 WT G-CSFR
#401 G-CSF 대 WT G-CSFR
#402 G-CSF 대 WT G-CSFR
WT G-CSF 대 #401 G-CSFR
#401 G-CSF 대 #401 G-CSFR
#402 G-CSF 대 #402 G-CSFR
WT G-CSF 대 #402 G-CSFR

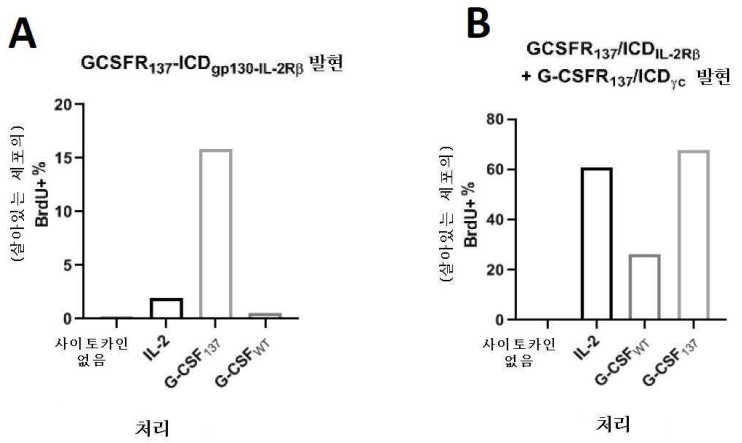
도면14


G-CSF
G-CSF (WT) 기준선 차감 (μJ/s)
G-CSF (#130) 기준선 차감 (μJ/s)
G-CSF (#134) 기준선 차감 (μJ/s)
기준선 차감 (μJ/s)
온도 (°C)
G-CSFR
G-CSFR (WT) 원시 열 소비율(μJ/s)
G-CSFR (#134) 원시 열 소비율(μJ/s)
G-CSFR (#130) 원시 열 소비율(μJ/s)
원시 연 소비율 (μJ/s)
온도 (°C)
G-CSF (#401)
G-CSF (#402)
Cp (kcal/몰/°C)
온도 (°C)
G-CSF (#300)
G-CSF (#303)
G-CSF (#304)
G-CSF (#307)
Cp (kcal/몰/°C)
온도 (°C)

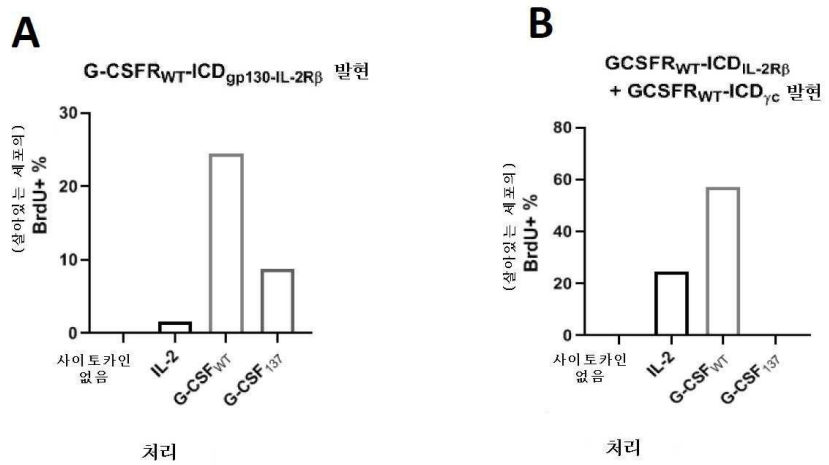
도면15


G-CSFR$_{WT}$-ICD$_{gp130-IL-2R\beta}$ 발현
(살아있는 세포의) BrdU+ %
사이토카인 없음
IL-2
G-CSF$_{WT}$
처리
GCSFR$_{WT}$-ICD$_{IL-2R\beta}$ + GCSFR$_{WT}$-ICD$_{\gamma c}$ 발현
(살아있는 세포의) BrdU+ %
사이토카인 없음
IL-2
WT G-CSF
처리

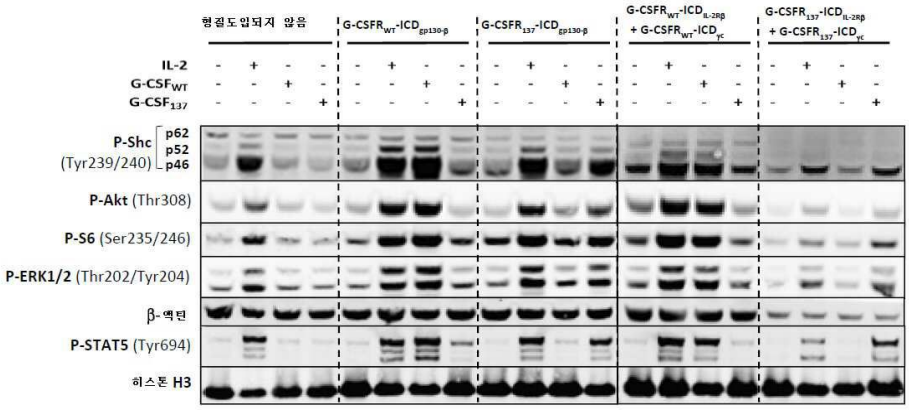
도면16



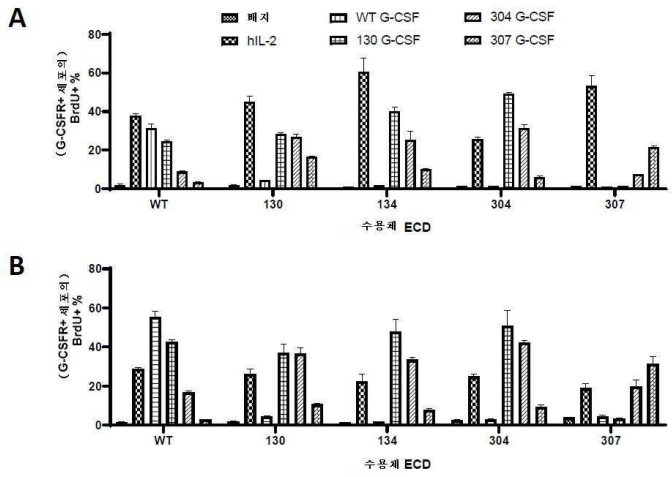
도면17



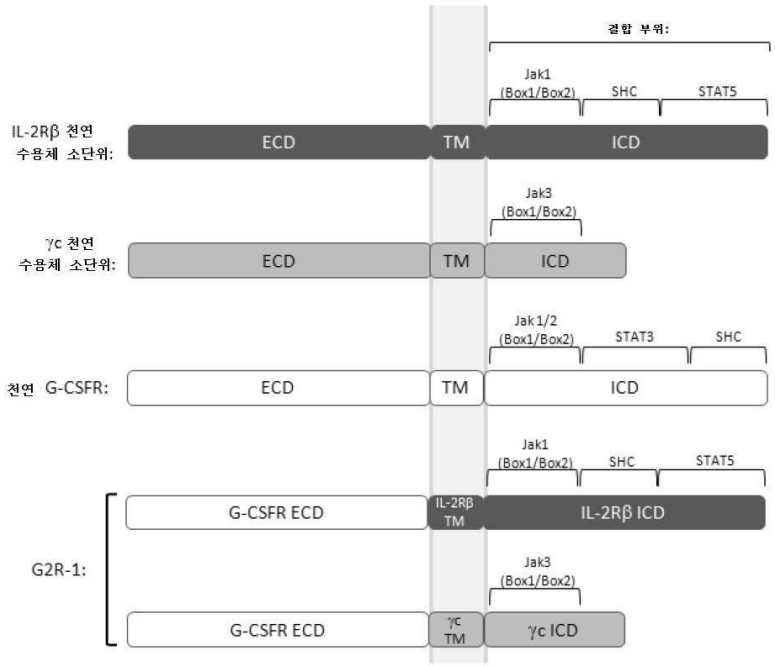
도면18



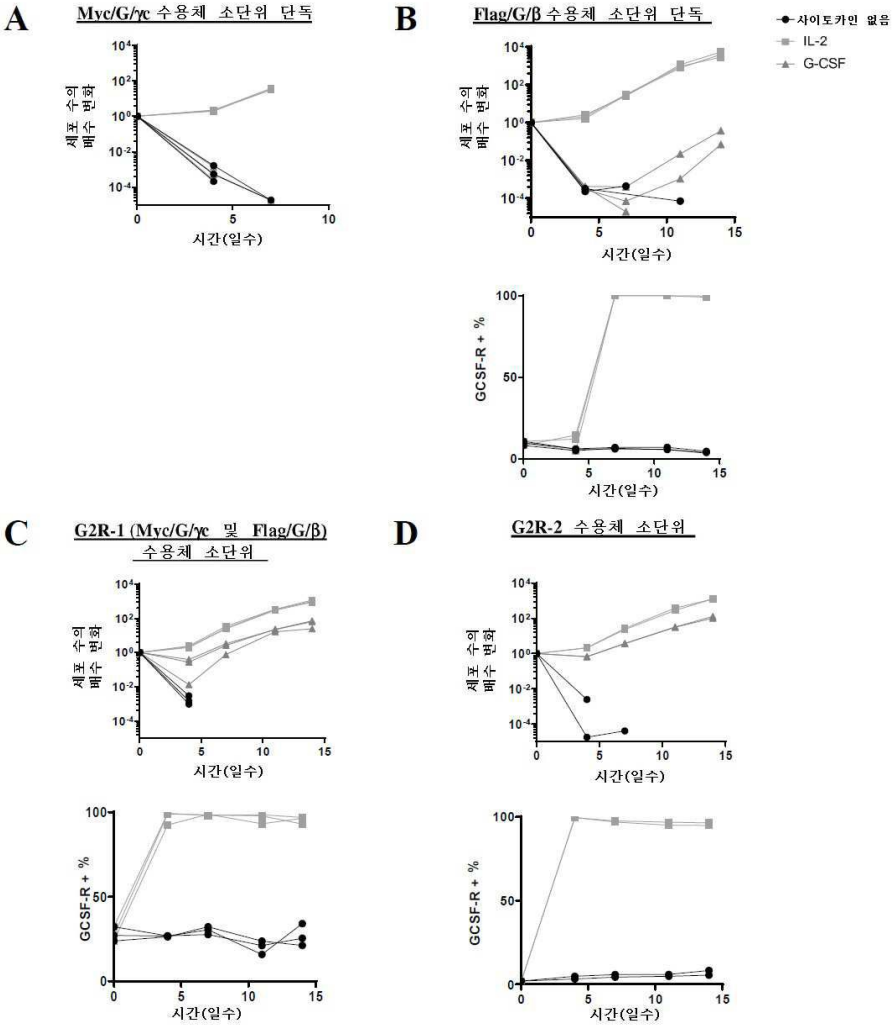
도면19


A
베지
hIL-2
WT G-CSF
130 G-CSF
304 G-CSF
307 G-CSF
(G-CSFR+ 세포의) BrdU+ %
0
20
40
60
80
WT
130
134
304
307
수용체 ECD
B
(G-CSFR+ 세포의) BrdU+ %
0
20
40
60
80
WT
130
134
304
307
수용체 ECD

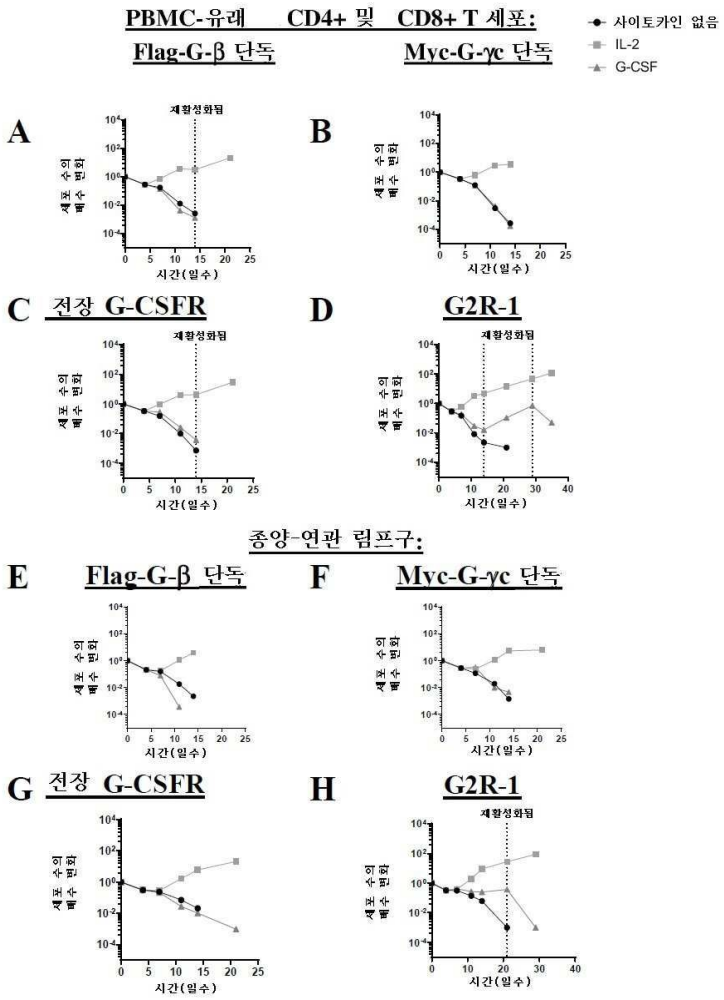
도면20


결합 부위:
Jak1 (Box1/Box2)
SHC
STAT5
IL-2Rβ 천연 수용체 소단위:
ECD
TM
ICD
Jak3 (Box1/Box2)
γc 천연 수용체 소단위:
ECD
TM
ICD
Jak1/2 (Box1/Box2)
STAT3
SHC
천연 G-CSFR:
ECD
TM
ICD
Jak1 (Box1/Box2)
SHC
STAT5
G2R-1:
G-CSFR ECD
IL-2Rβ TM
IL-2Rβ ICD
Jak3 (Box1/Box2)
G-CSFR ECD
γc TM
γc ICD

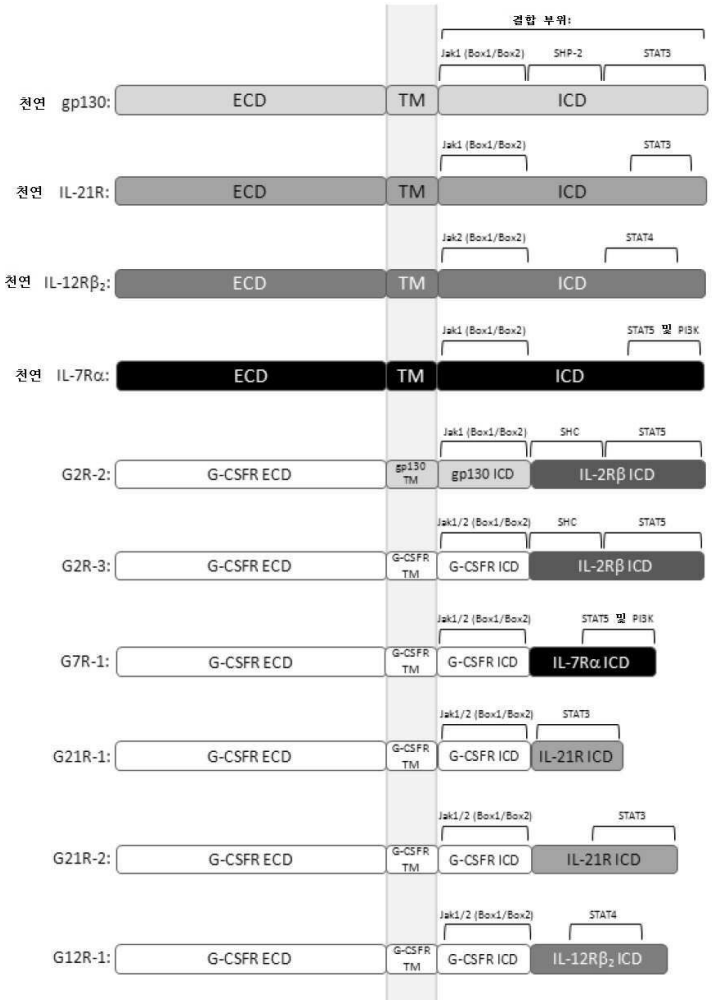
도면21


A
Myc/G/γc 수용체 소단위 단독
B
Flag/G/β 수용체 소단위 단독
사이토카인 없음
IL-2
G-CSF
세포 수의 배수 변화
시간(일수)
GCSF-R + %
C
G2R-1 (Myc/G/γc 및 Flag/G/β) 수용체 소단위
D
G2R-2 수용체 소단위

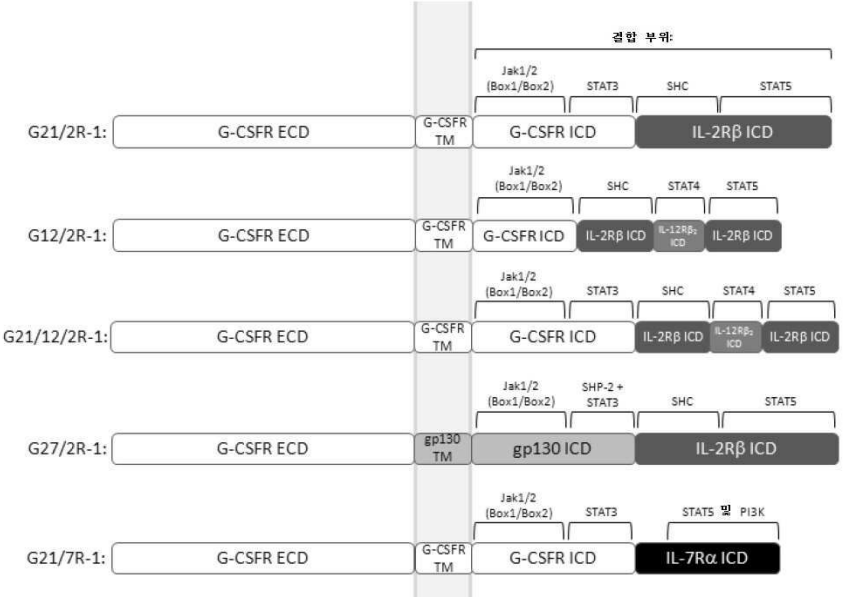
도면22


PBMC-유래 CD4+ 및 CD8+ T 세포:
Flag-G-β 단독
Myc-G-γc 단독
사이토카인 없음
IL-2
G-CSF
A
B
C 전장 G-CSFR
D G2R-1
재활성화됨
세포 수의 배수 변화
시간(일수)
종양-연관 림프구:
E Flag-G-β 단독
F Myc-G-γc 단독
G 전장 G-CSFR
H G2R-1

도면23


결합 부위:
천연 gp130:
ECD
TM
ICD
Jak1 (Box1/Box2)
SHP-2
STAT3
천연 IL-21R:
천연 IL-12Rβ2:
Jak2 (Box1/Box2)
STAT4
천연 IL-7Rα:
STAT5 및 PI3K
G2R-2:
G-CSFR ECD
gp130 TM
gp130 ICD
IL-2Rβ ICD
SHC
STAT5
G2R-3:
G-CSFR TM
G-CSFR ICD
G7R-1:
IL-7Rα ICD
G21R-1:
IL-21R ICD
G21R-2:
G12R-1:
IL-12Rβ2 ICD

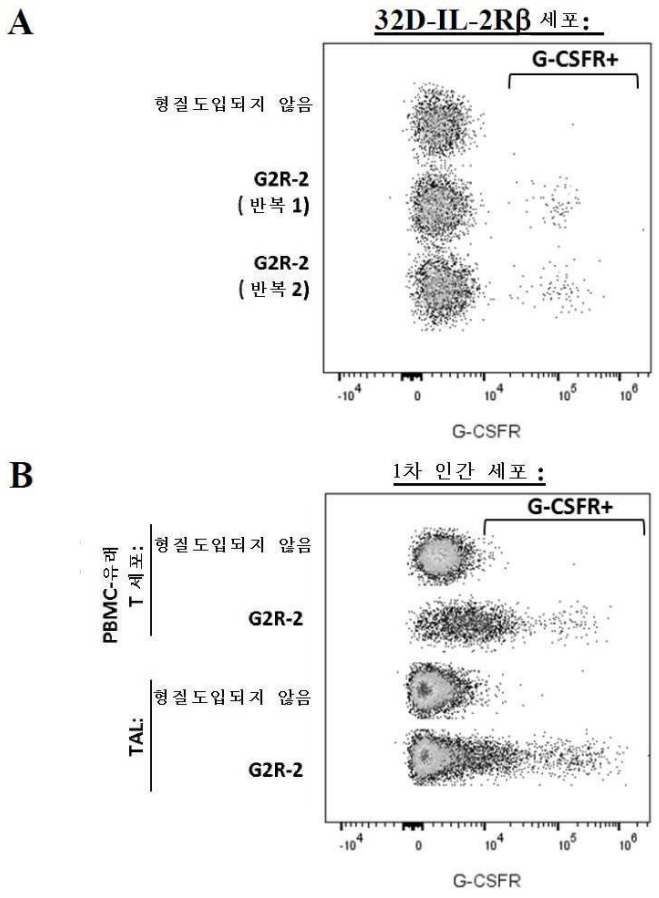
도면24


결합 부위:
Jak1/2 (Box1/Box2)
STAT3
SHC
STAT5
G21/2R-1:
G-CSFR ECD
G-CSFR TM
G-CSFR ICD
IL-2Rβ ICD
STAT4
G12/2R-1:
IL-12Rβ2 ICD
G21/12/2R-1:
G27/2R-1:
SHP-2 + STAT3
gp130 ICD
G21/7R-1:
STAT5 및 PI3K
IL-7Rα ICD

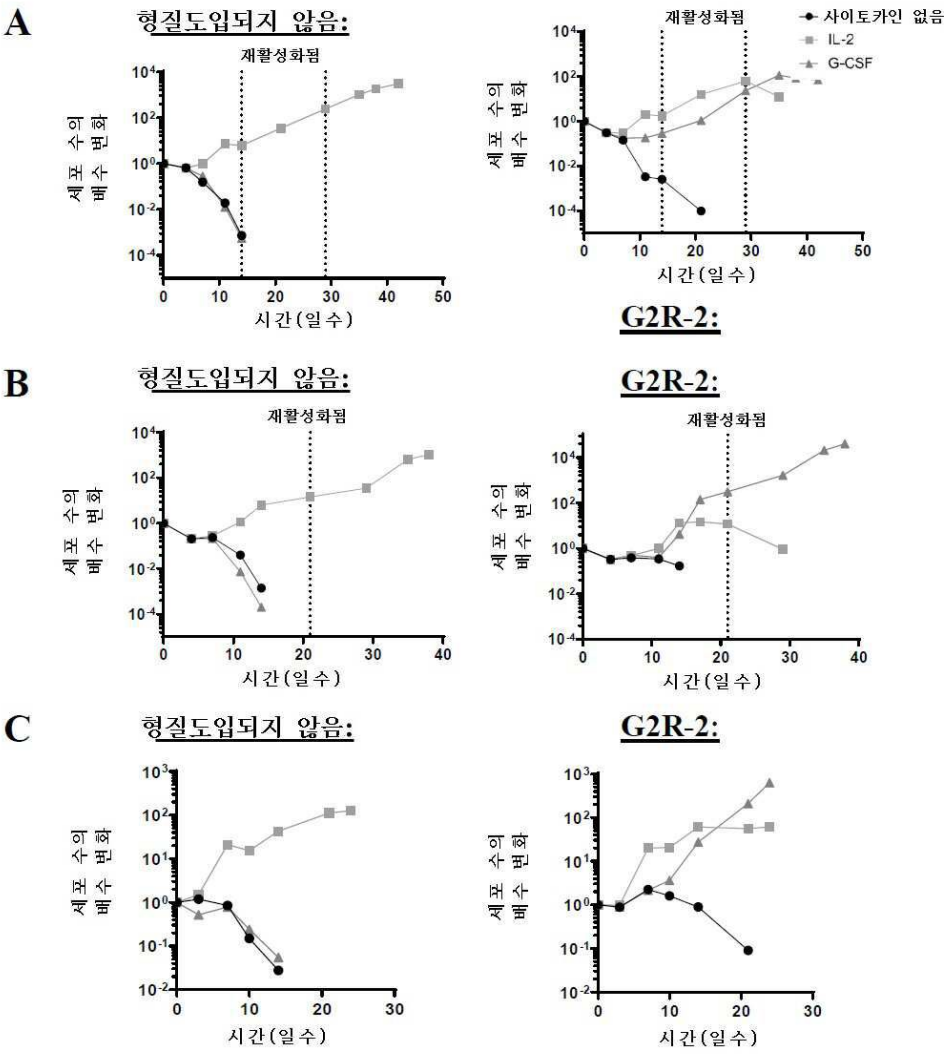
도면25


프로모터
GCSFR ECD
gp130 TM
gp130 ICD
IL2Rβ ICD
STAT5 도킹 부위
3' LTR
5' LTR
AmpR
G2R-2 렌티바이러스 플라스미드
11,001 bp
10,998
1,000
1,500
2,000
2,500
3,000
3,500
4,000
4,500
5,000
5,500
6,000
6,500
7,000
7,500
8,000
8,500
9,000
9,500
10,000
10,500
500

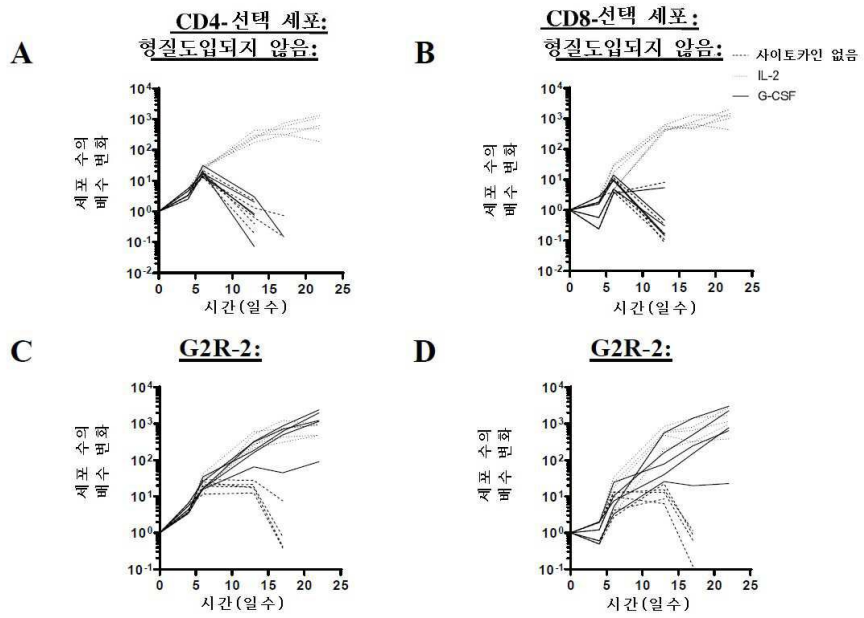
도면26


A
32D-IL-2Rβ 세포:
G-CSFR+
형질도입되지 않음
G2R-2
(반복 1)
G2R-2
(반복 2)
G-CSFR
B
1차 인간 세포 :
G-CSFR+
PBMC-유래
T 세포:
형질도입되지 않음
G2R-2
TAL:
형질도입되지 않음
G2R-2
G-CSFR

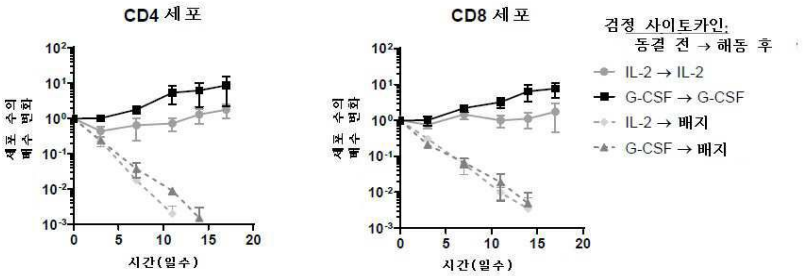
도면27



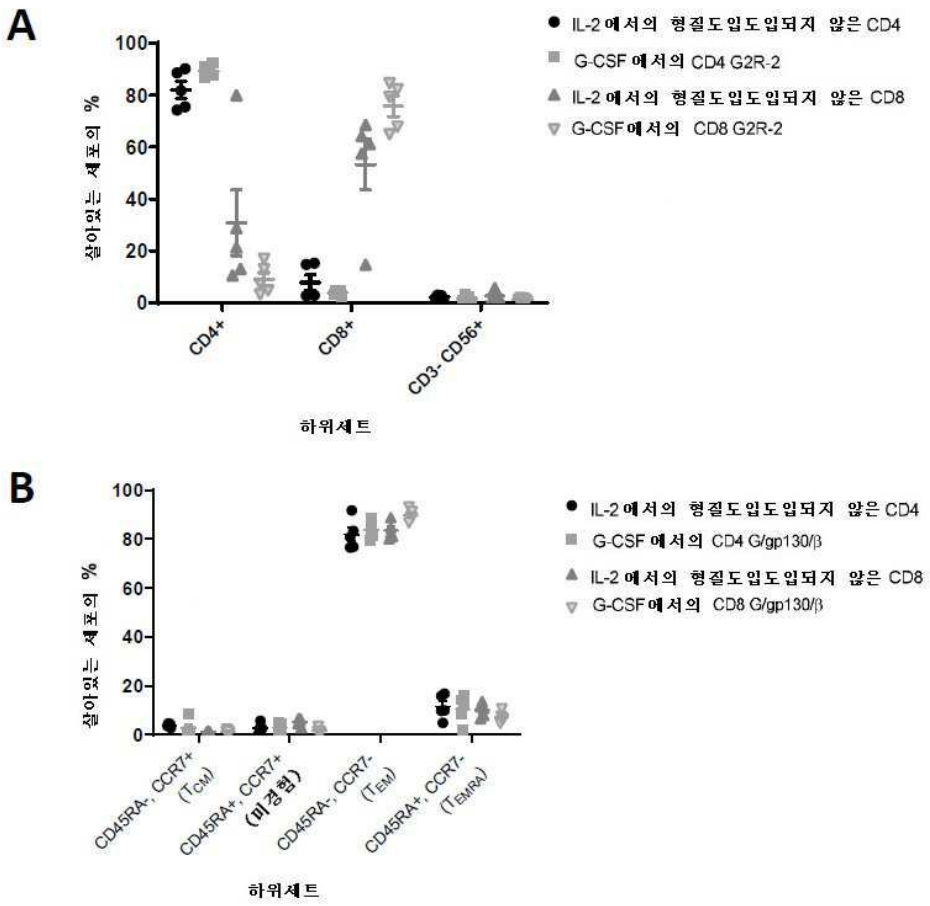
도면28


A
CD4-선택 세포:
형질도입되지 않음:
B
CD8-선택 세포:
형질도입되지 않음:
사이토카인 없음
IL-2
G-CSF
C
G2R-2:
D
G2R-2:
세포 수의 배수 변화
시간(일수)

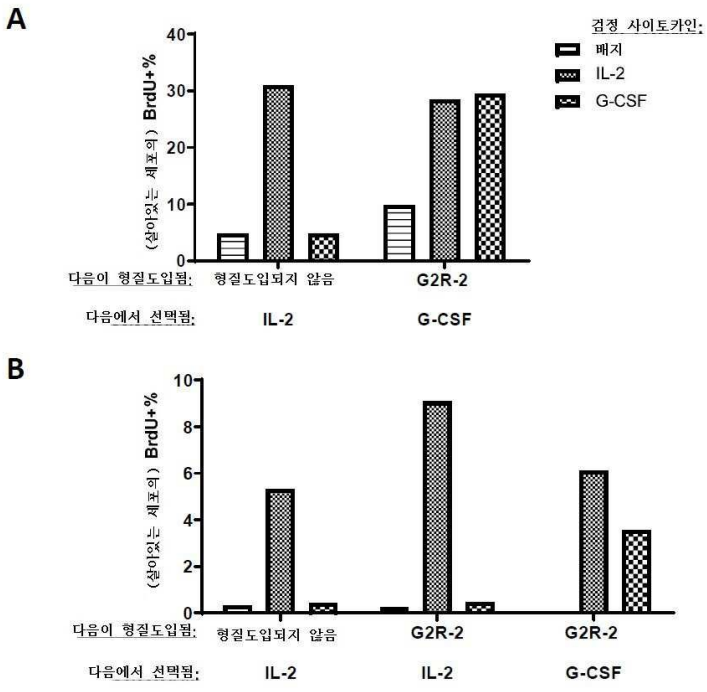
도면29


CD4 세포
CD8 세포
검정 사이토카인:
동결 전 → 해동 후
IL-2 → IL-2
G-CSF → G-CSF
IL-2 → 배지
G-CSF → 배지
세포 수의 배수 변화
시간(일수)

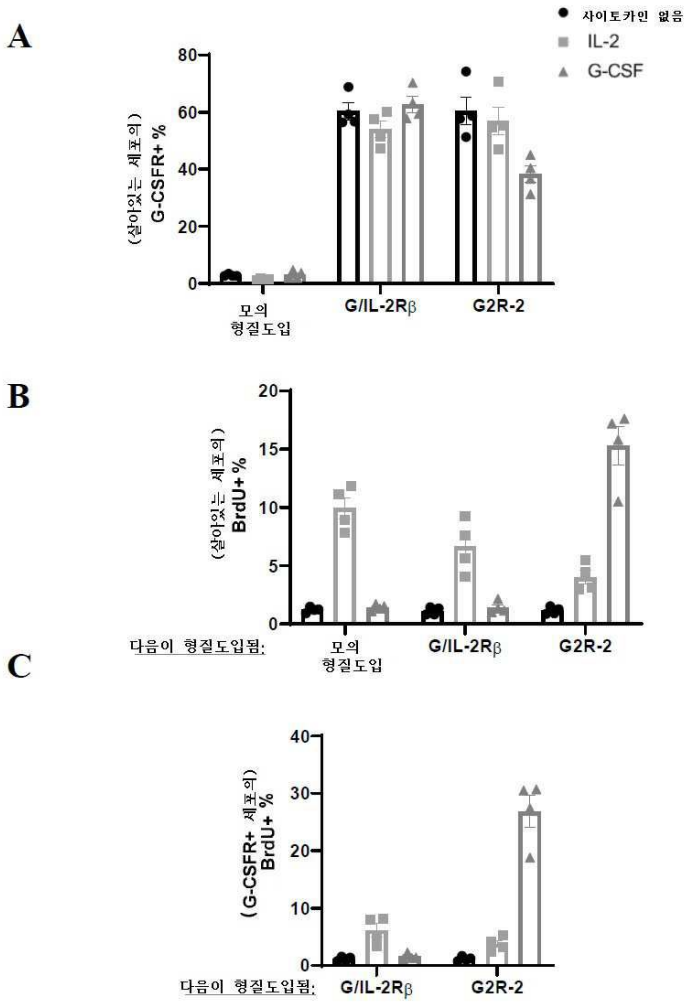
도면30


A
IL-2 에서의 형질도입되지 않은 CD4
G-CSF 에서의 CD4 G2R-2
IL-2 에서의 형질도입되지 않은 CD8
G-CSF에서의 CD8 G2R-2
살아있는 세포의 %
100
80
60
40
20
0
CD4+
CD8+
CD3- CD56+
하위세트
B
IL-2 에서의 형질도입되지 않은 CD4
G-CSF 에서의 CD4 G/gp130/β
IL-2 에서의 형질도입되지 않은 CD8
G-CSF에서의 CD8 G/gp130/β
살아있는 세포의 %
CD45RA-, CCR7+ (TCM)
CD45RA+, CCR7+ (미결합)
CD45RA-, CCR7- (TEM)
CD45RA+, CCR7- (TEMRA)
하위세트

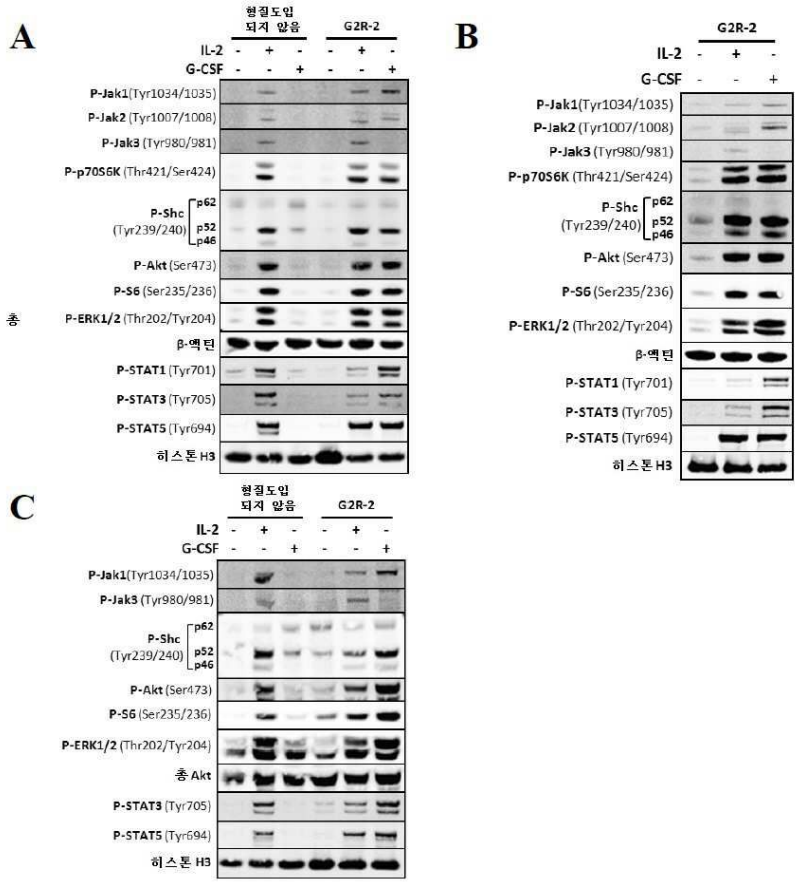
도면31


A
결정 사이토카인:
배지
IL-2
G-CSF
(살아있는 세포의) BrdU+ %
40
30
20
10
0
다음이 형질도입됨:
형질도입되지 않음
G2R-2
다음에서 선택됨:
IL-2
G-CSF
B
(살아있는 세포의) BrdU+ %
10
8
6
4
2
0
다음이 형질도입됨:
형질도입되지 않음
G2R-2
G2R-2
다음에서 선택됨:
IL-2
IL-2
G-CSF

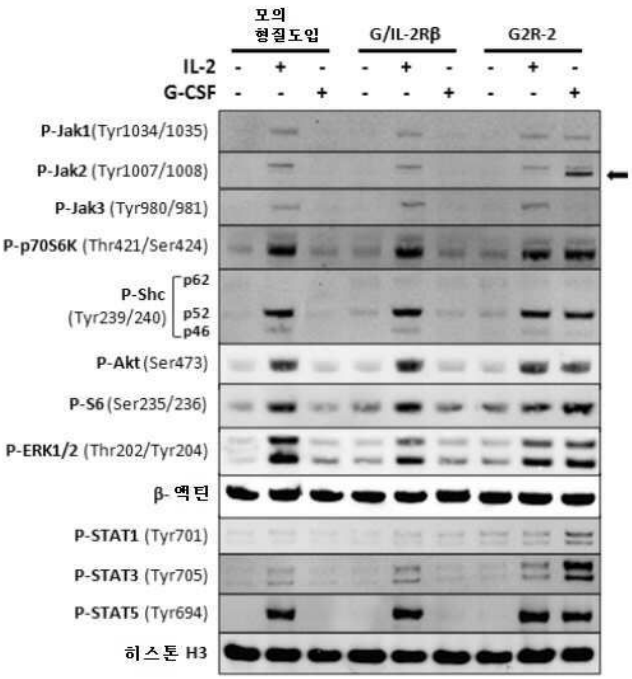
도면32


A
사이토카인 없음
IL-2
G-CSF
(살아있는 세포의) G-CSFR+ %
80
60
40
20
0
모의 형질도입
G/IL-2Rβ
G2R-2
B
(살아있는 세포의) BrdU+ %
20
15
10
5
0
다음이 형질도입됨:
모의 형질도입
G/IL-2Rβ
G2R-2
C
(G-CSFR+ 세포의) BrdU+ %
40
30
20
10
0
다음이 형질도입됨:
G/IL-2Rβ
G2R-2

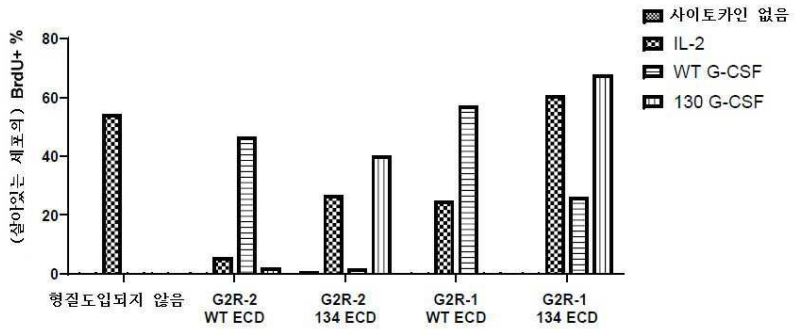
도면33


A
형질도입 되지 않음
G2R-2
IL-2
G-CSF
P-Jak1(Tyr1034/1035)
P-Jak2 (Tyr1007/1008)
P-Jak3 (Tyr980/981)
P-p70S6K (Thr421/Ser424)
P-Shc (Tyr239/240)
p62
p52
p46
P-Akt (Ser473)
P-S6 (Ser235/236)
P-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)
총 Akt
β-액틴
P-STAT1 (Tyr701)
P-STAT3 (Tyr705)
P-STAT5 (Tyr694)
히스톤 H3
B
C

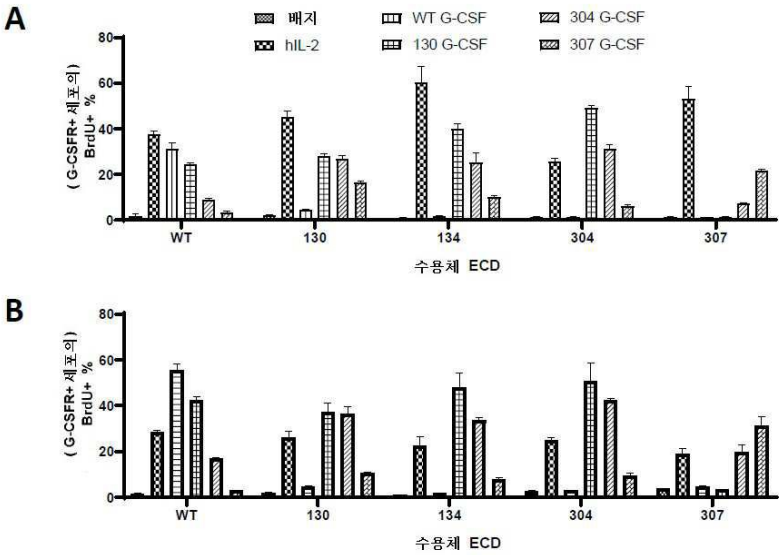
도면34


모의 형질도입
G/IL-2Rβ
G2R-2
IL-2
G-CSF
P-Jak1(Tyr1034/1035)
P-Jak2 (Tyr1007/1008)
P-Jak3 (Tyr980/981)
P-p70S6K (Thr421/Ser424)
P-Shc (Tyr239/240)
p62
p52
p46
P-Akt (Ser473)
P-S6 (Ser235/236)
P-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)
β-액틴
P-STAT1 (Tyr701)
P-STAT3 (Tyr705)
P-STAT5 (Tyr694)
히스톤 H3

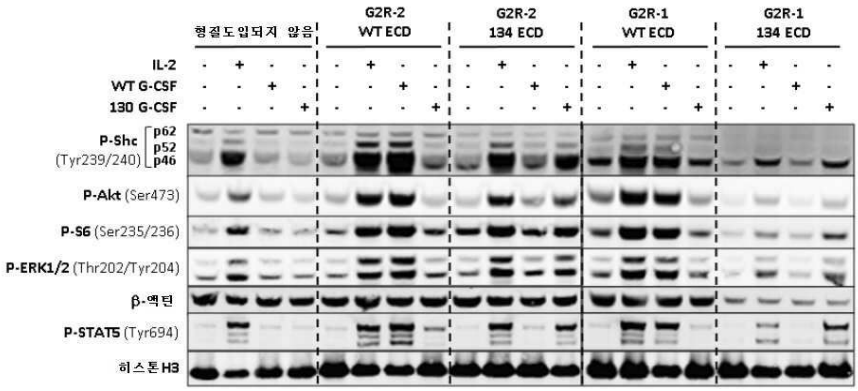
도면35



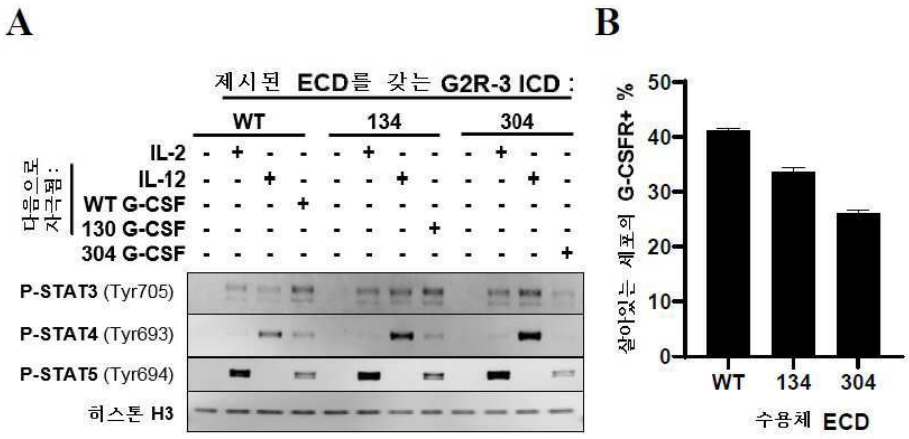
도면36



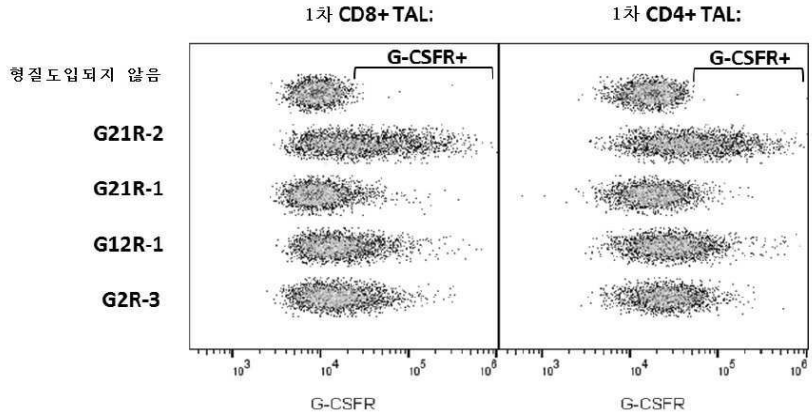
도면37



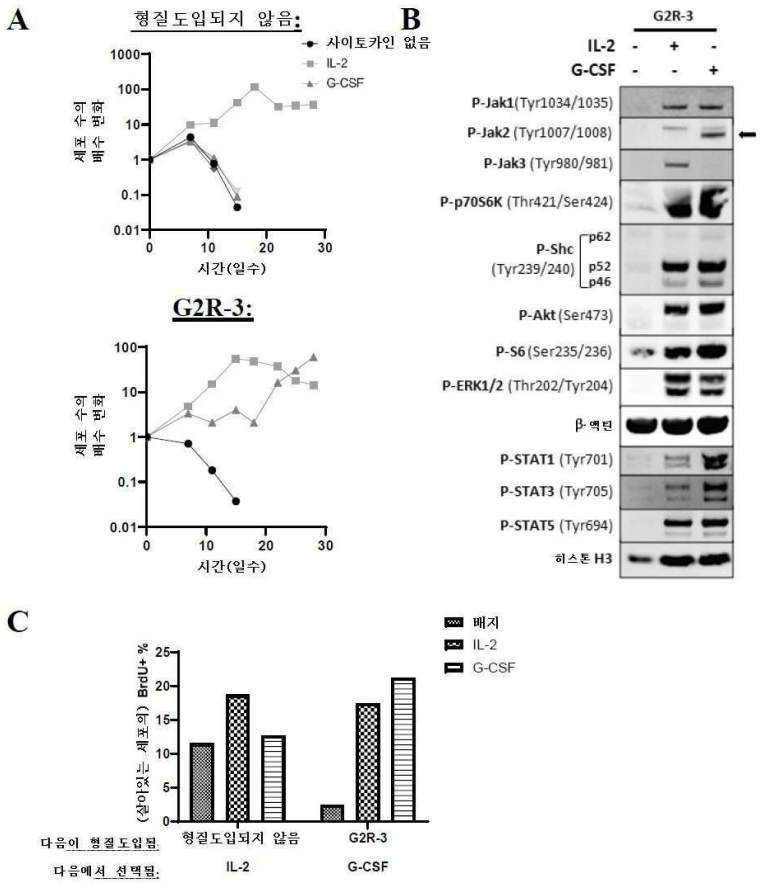
도면38


A
B
제시된 ECD를 갖는 G2R-3 ICD :
WT
134
304
다음으로 자극됨 :
IL-2
IL-12
WT G-CSF
130 G-CSF
304 G-CSF
P-STAT3 (Tyr705)
P-STAT4 (Tyr693)
P-STAT5 (Tyr694)
히스톤 H3
살아있는 세포의 G-CSFR+ %
50
40
30
20
10
0
WT
134
304
수용체 ECD

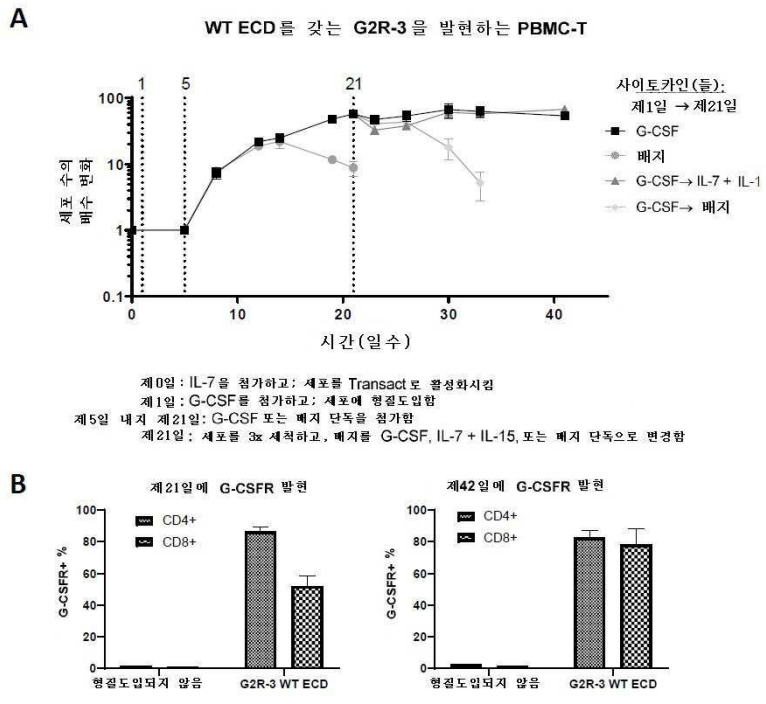
도면39


1차 CD8+ TAL:
1차 CD4+ TAL:
형질도입되지 않음
G21R-2
G21R-1
G12R-1
G2R-3
G-CSFR+
G-CSFR+
G-CSFR
G-CSFR

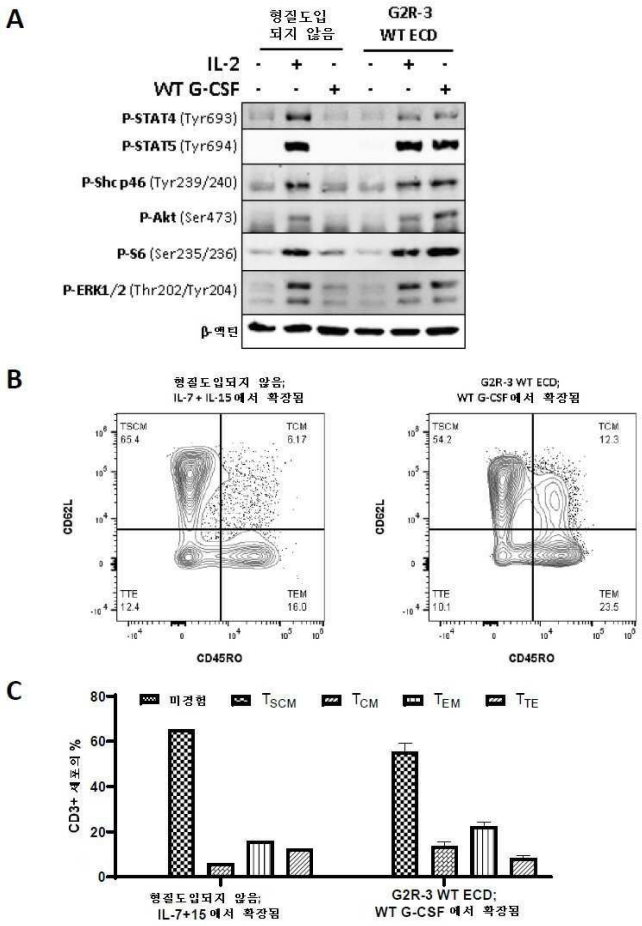
도면40


A
형질도입되지 않음:
사이토카인 없음
IL-2
G-CSF
세포 수의 배수 변화
시간(일수)
G2R-3:
B
G2R-3
IL-2
G-CSF
P-Jak1(Tyr1034/1035)
P-Jak2 (Tyr1007/1008)
P-Jak3 (Tyr980/981)
P-p70S6K (Thr421/Ser424)
P-Shc (Tyr239/240)
p62
p52
p46
P-Akt (Ser473)
P-S6 (Ser235/236)
P-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)
β-액틴
P-STAT1 (Tyr701)
P-STAT3 (Tyr705)
P-STAT5 (Tyr694)
히스톤 H3
C
배지
IL-2
G-CSF
(살아있는 세포의) BrdU+ %
다음이 형질도입됨:
다음에서 선택됨:
형질도입되지 않음
G2R-3
IL-2
G-CSF

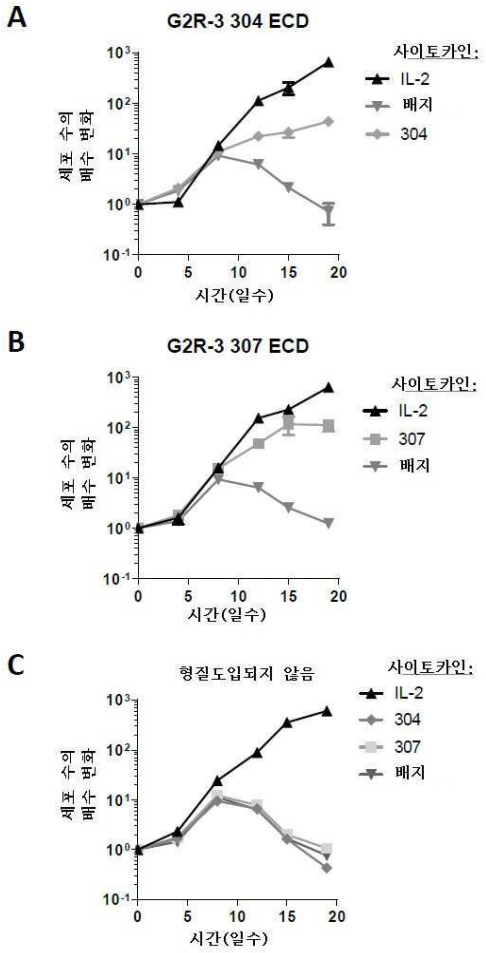
도면41


A
WT ECD를 갖는 G2R-3을 발현하는 PBMC-T
사이토카인(들):
제1일 → 제21일
G-CSF
배지
G-CSF→ IL-7 + IL-1
G-CSF→ 배지
세포 수의 배수 변화
시간(일수)
제0일 : IL-7을 첨가하고; 세포를 Transact로 활성화시킴
제1일 : G-CSF를 첨가하고; 세포에 형질도입함
제5일 내지 제21일: G-CSF 또는 배지 단독을 첨가함
제21일 : 세포를 3x 세척하고, 배지를 G-CSF, IL-7 + IL-15, 또는 배지 단독으로 변경함
B
제21일에 G-CSFR 발현
제42일에 G-CSFR 발현
CD4+
CD8+
G-CSFR+ %
형질도입되지 않음
G2R-3 WT ECD

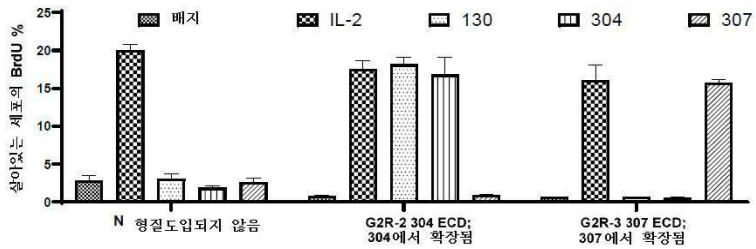
도면42


A
형질도입 되지 않음
G2R-3 WT ECD
IL-2
WT G-CSF
P-STAT4 (Tyr693)
P-STAT5 (Tyr694)
P-Shc p46 (Tyr239/240)
P-Akt (Ser473)
P-S6 (Ser235/236)
P-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)
β-액틴
B
형질도입되지 않음; IL-7+IL-15에서 확장됨
G2R-3 WT ECD; WT G-CSF에서 확장됨
TSCM 65.4
TCM 6.17
TTE 12.4
TEM 16.0
TSCM 54.2
TCM 12.3
TTE 10.1
TEM 23.5
CD62L
CD45RO
C
미경험
TSCM
TCM
TEM
TTE
CD3+ 세포의 %
형질도입되지 않음; IL-7+15에서 확장됨
G2R-3 WT ECD; WT G-CSF에서 확장됨

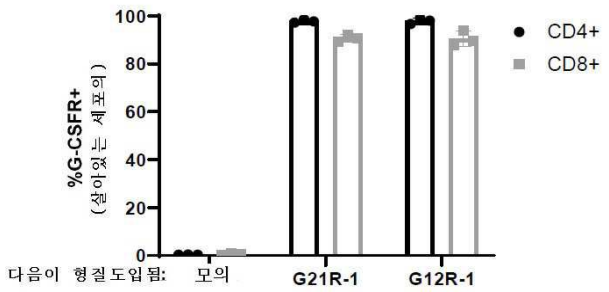
도면43



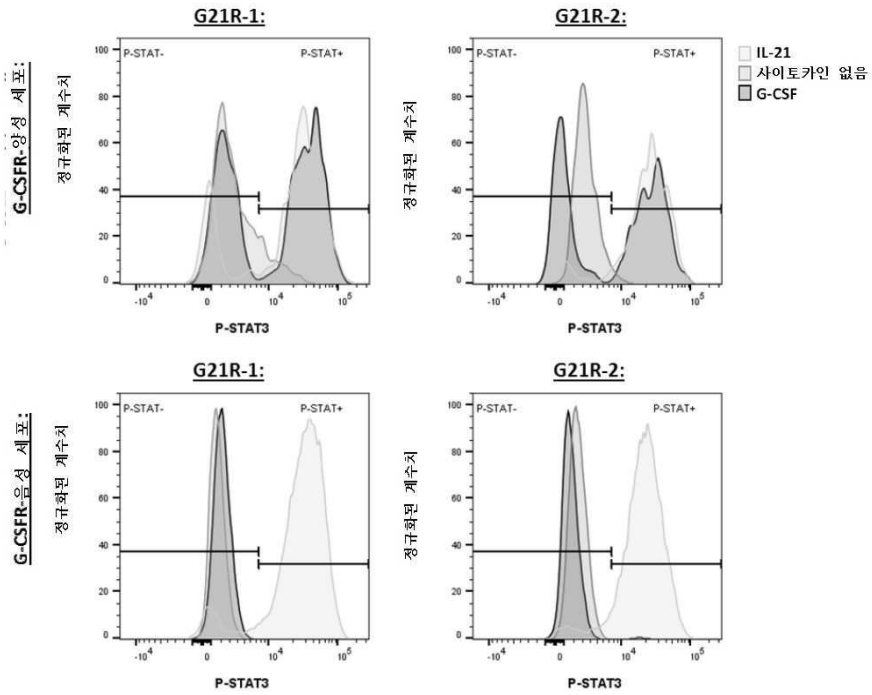
도면44



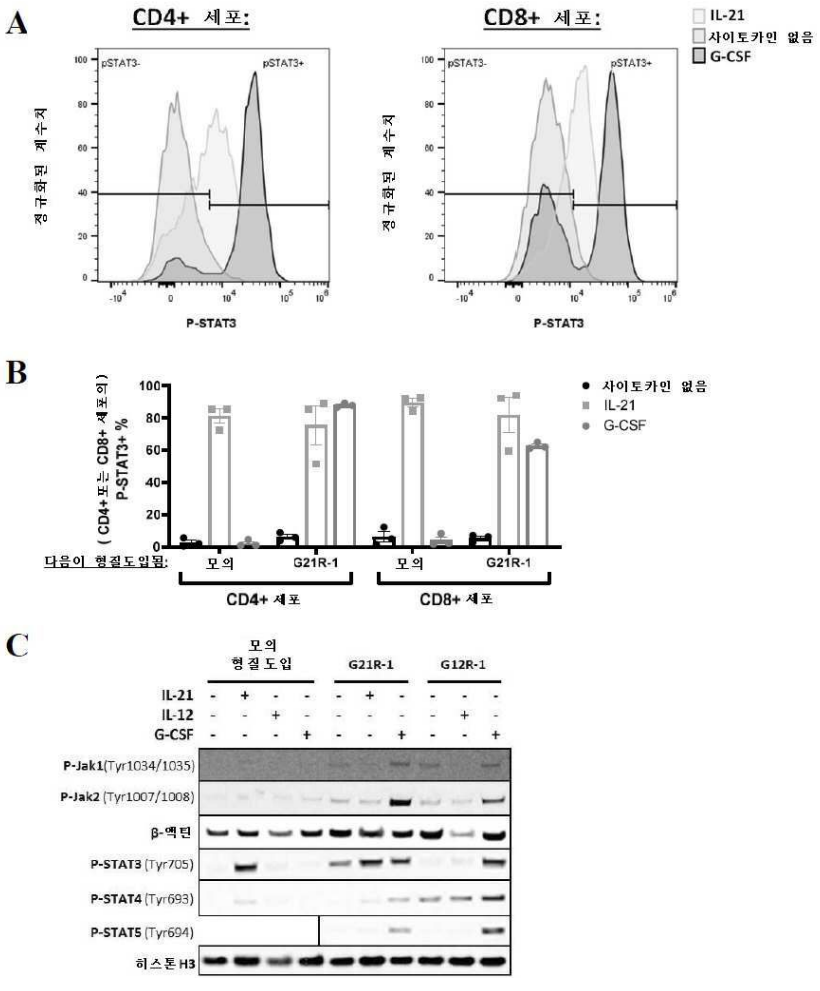
도면45



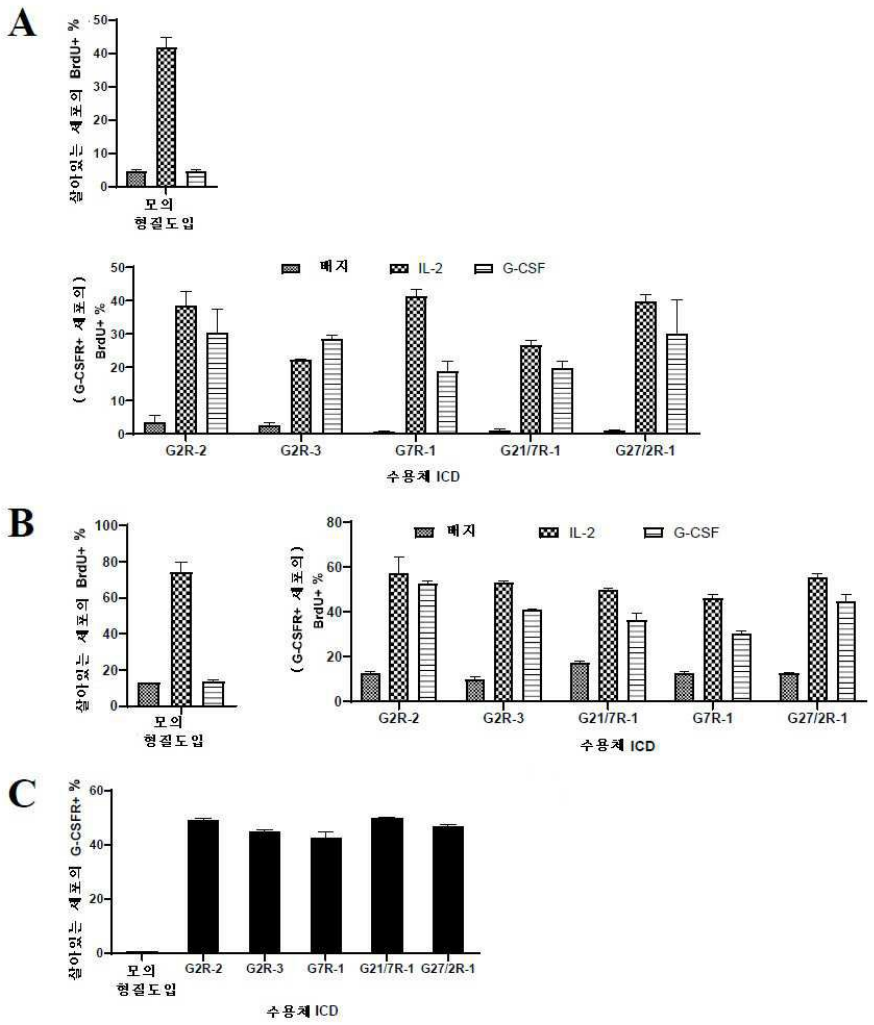
도면46


G21R-1:
G21R-2:
G-CSFR-양성 세포:
G-CSFR-음성 세포:
정규화된 계수치
P-STAT-
P-STAT+
P-STAT3
IL-21
사이토카인 없음
G-CSF

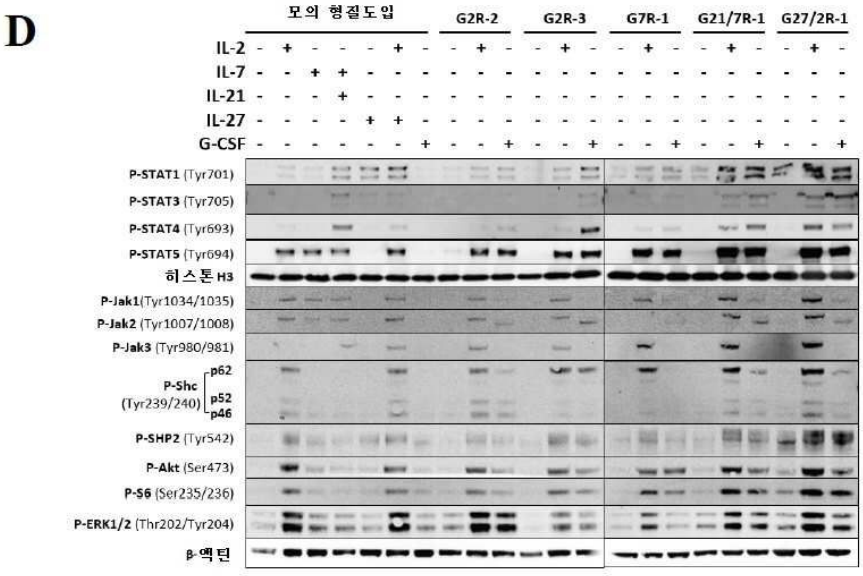
도면47


A
CD4+ 세포:
CD8+ 세포:
pSTAT3-
pSTAT3+
정규화된 계수치
P-STAT3
IL-21
사이토카인 없음
G-CSF
B
(CD4+ 또는 CD8+ 세포의) P-STAT3+ %
다음이 형질도입됨:
모의
G21R-1
CD4+ 세포
CD8+ 세포
C
모의 형질도입
G21R-1
G12R-1
IL-21
IL-12
G-CSF
P-Jak1(Tyr1034/1035)
P-Jak2 (Tyr1007/1008)
β-액틴
P-STAT3 (Tyr705)
P-STAT4 (Tyr693)
P-STAT5 (Tyr694)
히스톤 H3

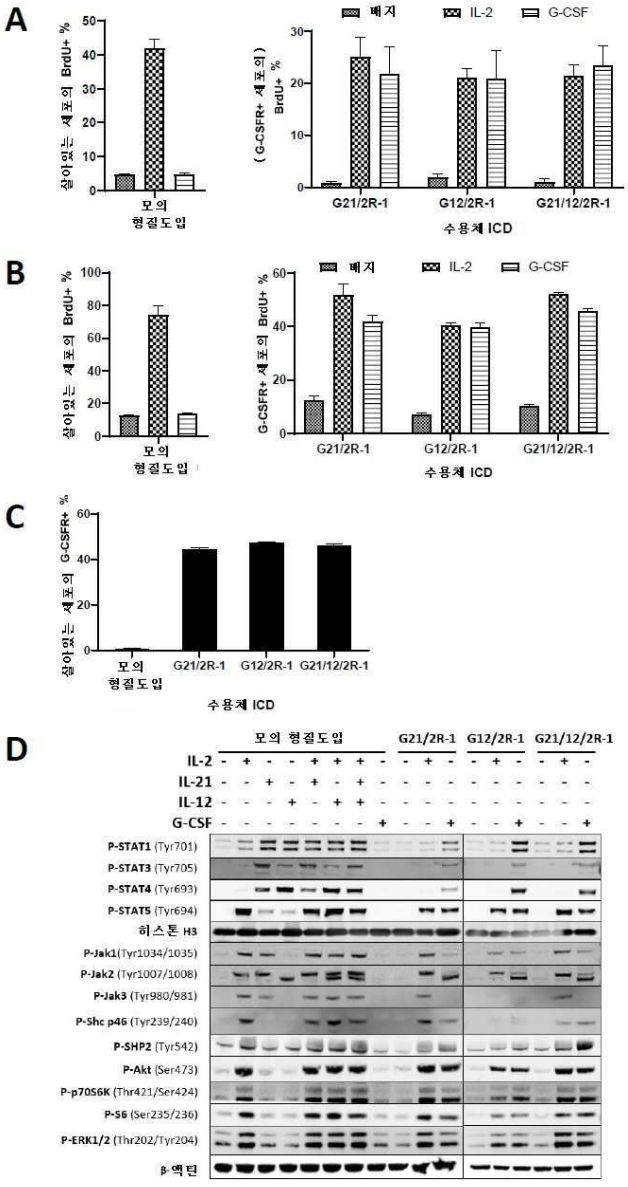
도면48ac



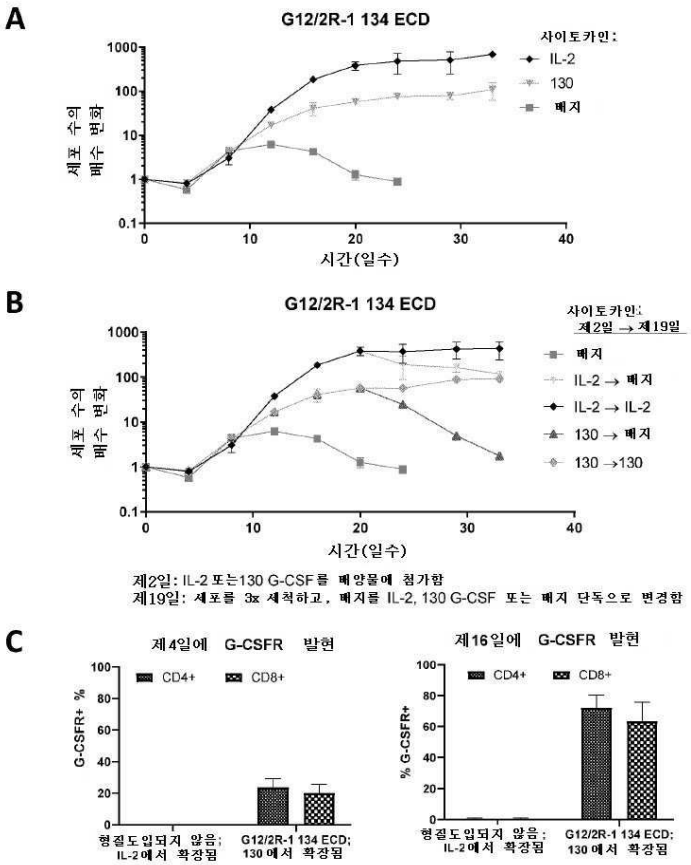
도면48d



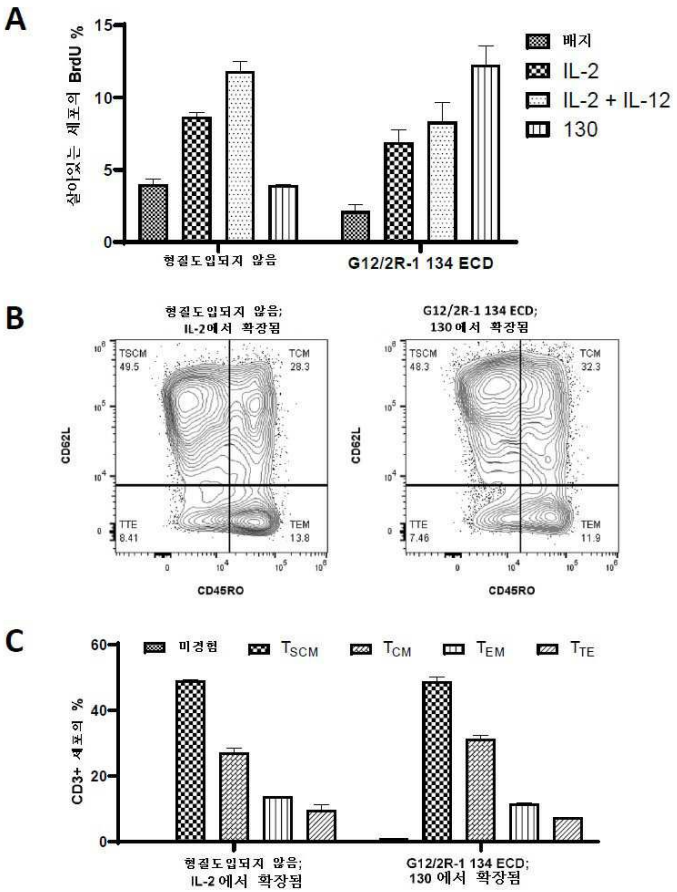
도면49


A
살아있는 세포의 BrdU+ %
모의
형질도입
베지
IL-2
G-CSF
(G-CSFR+ 세포의) BrdU+ %
G21/2R-1
G12/2R-1
G21/12/2R-1
수용체 ICD
B
살아있는 세포의 BrdU+ %
모의
형질도입
베지
IL-2
G-CSF
G-CSFR+ 세포의 BrdU+ %
G21/2R-1
G12/2R-1
G21/12/2R-1
수용체 ICD
C
살아있는 세포의 G-CSFR+ %
모의
형질도입
G21/2R-1
G12/2R-1
G21/12/2R-1
수용체 ICD
D
모의 형질도입
G21/2R-1
G12/2R-1
G21/12/2R-1
IL-2
IL-21
IL-12
G-CSF
P-STAT1 (Tyr701)
P-STAT3 (Tyr705)
P-STAT4 (Tyr693)
P-STAT5 (Tyr694)
히스톤 H3
P-Jak1(Tyr1034/1035)
P-Jak2 (Tyr1007/1008)
P-Jak3 (Tyr980/981)
P-Shc p46 (Tyr239/240)
P-SHP2 (Tyr542)
P-Akt (Ser473)
P-p70S6K (Thr421/Ser424)
P-S6 (Ser235/236)
P-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)
β-액틴

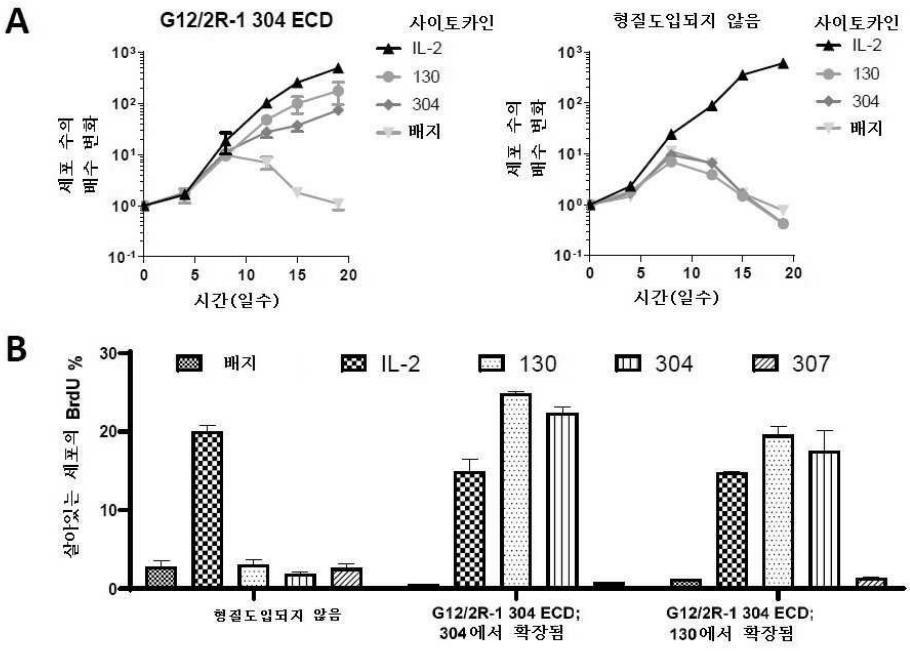
도면50


A
G12/2R-1 134 ECD
사이토카인:
IL-2
130
배지
세포 수의 배수 변화
시간(일수)
B
G12/2R-1 134 ECD
사이토카인:
제2일 → 제19일
배지
IL-2 → 배지
IL-2 → IL-2
130 → 배지
130 →130
세포 수의 배수 변화
시간(일수)
제2일: IL-2 또는130 G-CSF를 배양물에 첨가함
제19일: 세포를 3x 세척하고, 배지를 IL-2, 130 G-CSF 또는 배지 단독으로 변경함
C
제4일에 G-CSFR 발현
CD4+
CD8+
G-CSFR+ %
형질도입되지 않음; IL-2에서 확장됨
G12/2R-1 134 ECD; 130 에서 확장됨
제16일에 G-CSFR 발현
CD4+
CD8+
% G-CSFR+
형질도입되지 않음; IL-2에서 확장됨
G12/2R-1 134 ECD; 130 에서 확장됨

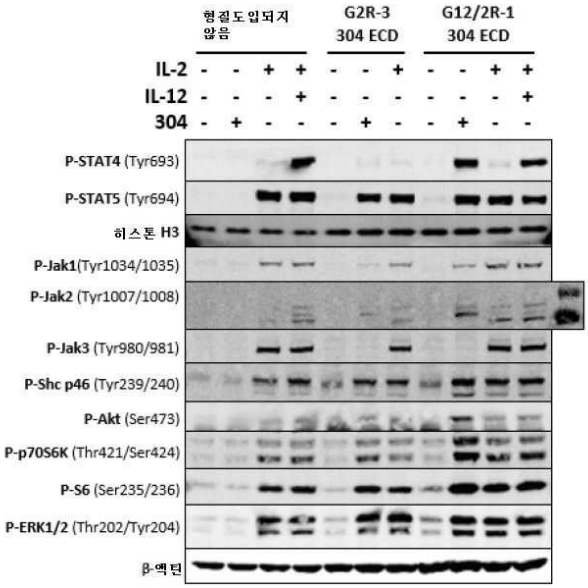
도면51


A
살아있는 세포의 BrdU %
배지
IL-2
IL-2 + IL-12
130
형질도입되지 않음
G12/2R-1 134 ECD
B
형질도입되지 않음;
IL-2에서 확장됨
G12/2R-1 134 ECD;
130에서 확장됨
CD62L
CD45RO
TSCM
TCM
TTE
TEM
C
CD3+ 세포의 %
미경험
TSCM
TCM
TEM
TTE
형질도입되지 않음;
IL-2에서 확장됨
G12/2R-1 134 ECD;
130에서 확장됨

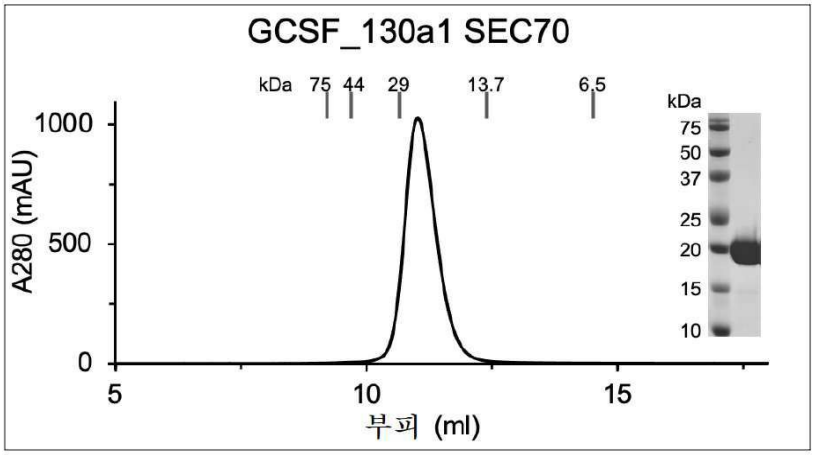
도면52


A
G12/2R-1 304 ECD
사이토카인
IL-2
130
304
배지
세포 수의 배수 변화
시간(일수)
형질도입되지 않음
B
살아있는 세포의 BrdU %
307
형질도입되지 않음
G12/2R-1 304 ECD;
304에서 확장됨
G12/2R-1 304 ECD;
130에서 확장됨

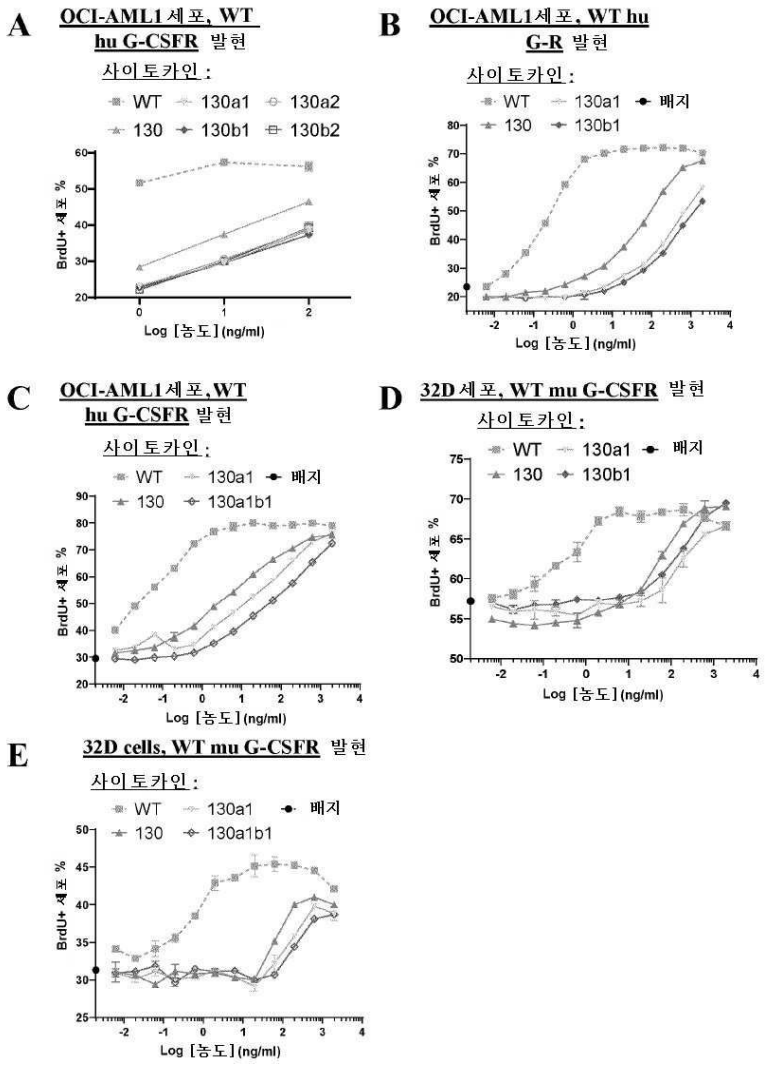
도면53


형질도입되지 않음
G2R-3 304 ECD
G12/2R-1 304 ECD
IL-2
IL-12
304
P-STAT4 (Tyr693)
P-STAT5 (Tyr694)
히스톤 H3
P-Jak1(Tyr1034/1035)
P-Jak2 (Tyr1007/1008)
P-Jak3 (Tyr980/981)
P-Shc p46 (Tyr239/240)
P-Akt (Ser473)
P-p70S6K (Thr421/Ser424)
P-S6 (Ser235/236)
P-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)
β-액틴

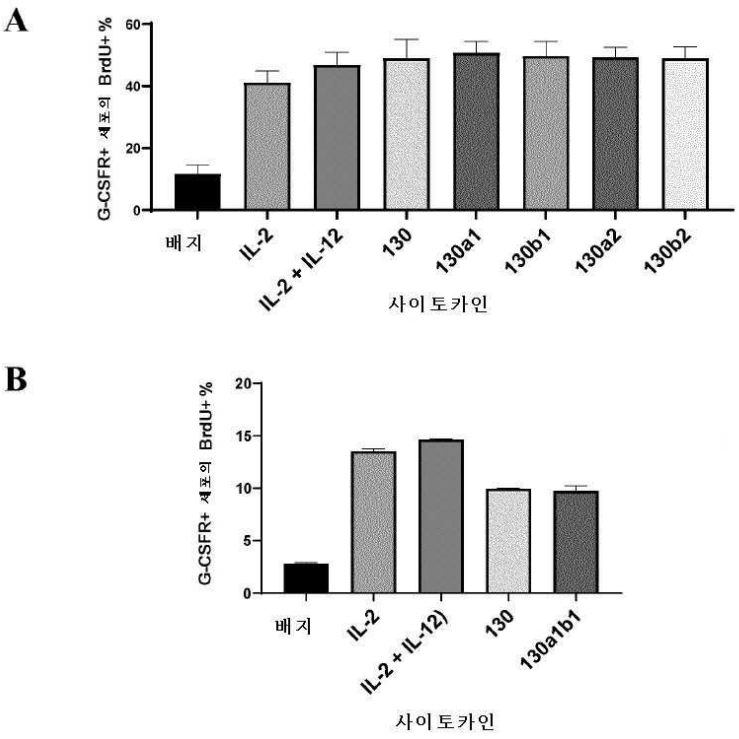
도면54


GCSF_130a1 SEC70
kDa 75 44 29 13.7 6.5
A280 (mAU)
1000
500
0
5
10
15
부피 (ml)
kDa
75
50
37
25
20
15
10

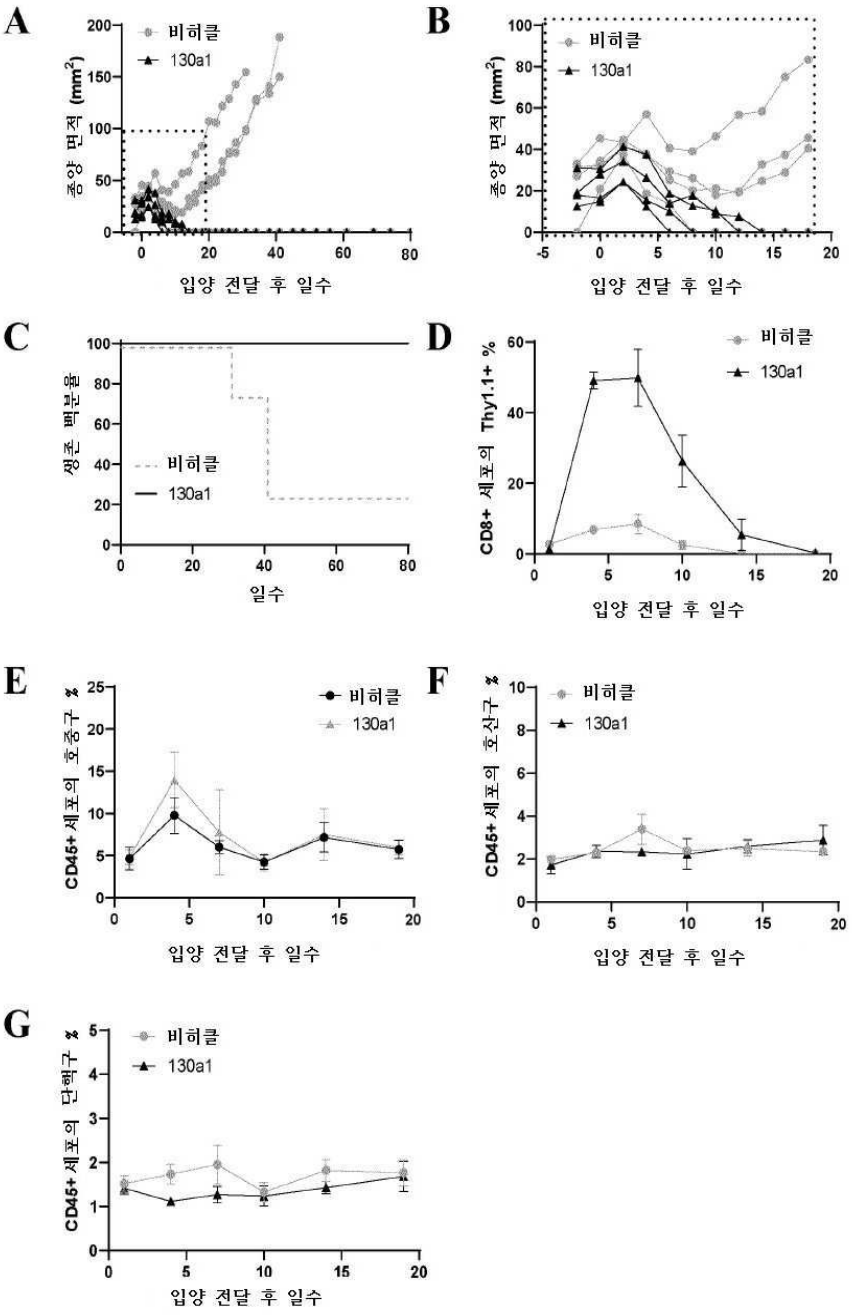
도면55


A
OCI-AML1 세포, WT hu G-CSFR 발현
사이토카인 :
WT
130a1
130a2
130
130b1
130b2
BrdU+ 세포 %
Log [농도] (ng/ml)
B
OCI-AML1세포, WT hu G-R 발현
사이토카인 :
WT
130a1
배지
130
130b1
BrdU+ 세포 %
Log [농도] (ng/ml)
C
OCI-AML1세포,WT hu G-CSFR 발현
사이토카인 :
WT
130a1
배지
130
130a1b1
BrdU+ 세포 %
Log [농도] (ng/ml)
D
32D 세포, WT mu G-CSFR 발현
사이토카인 :
WT
130a1
배지
130
130b1
BrdU+ 세포 %
Log [농도] (ng/ml)
E
32D cells, WT mu G-CSFR 발현
사이토카인 :
WT
130a1
배지
130
130a1b1
BrdU+ 세포 %
Log [농도] (ng/ml)

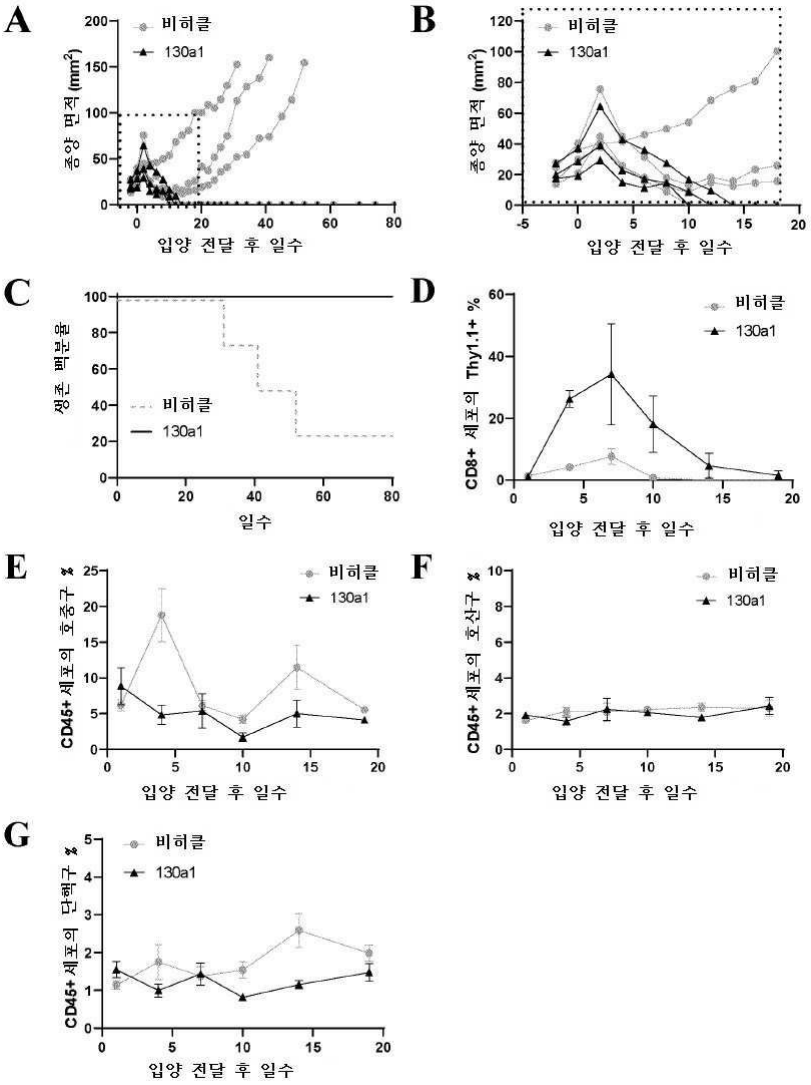
도면56


A
G-CSFR+ 세포의 BrdU+ %
60
40
20
0
배지
IL-2
IL-2 + IL-12
130
130a1
130b1
130a2
130b2
사이토카인
B
G-CSFR+ 세포의 BrdU+ %
20
15
10
5
0
배지
IL-2
IL-2 + IL-12)
130
130a1b1
사이토카인

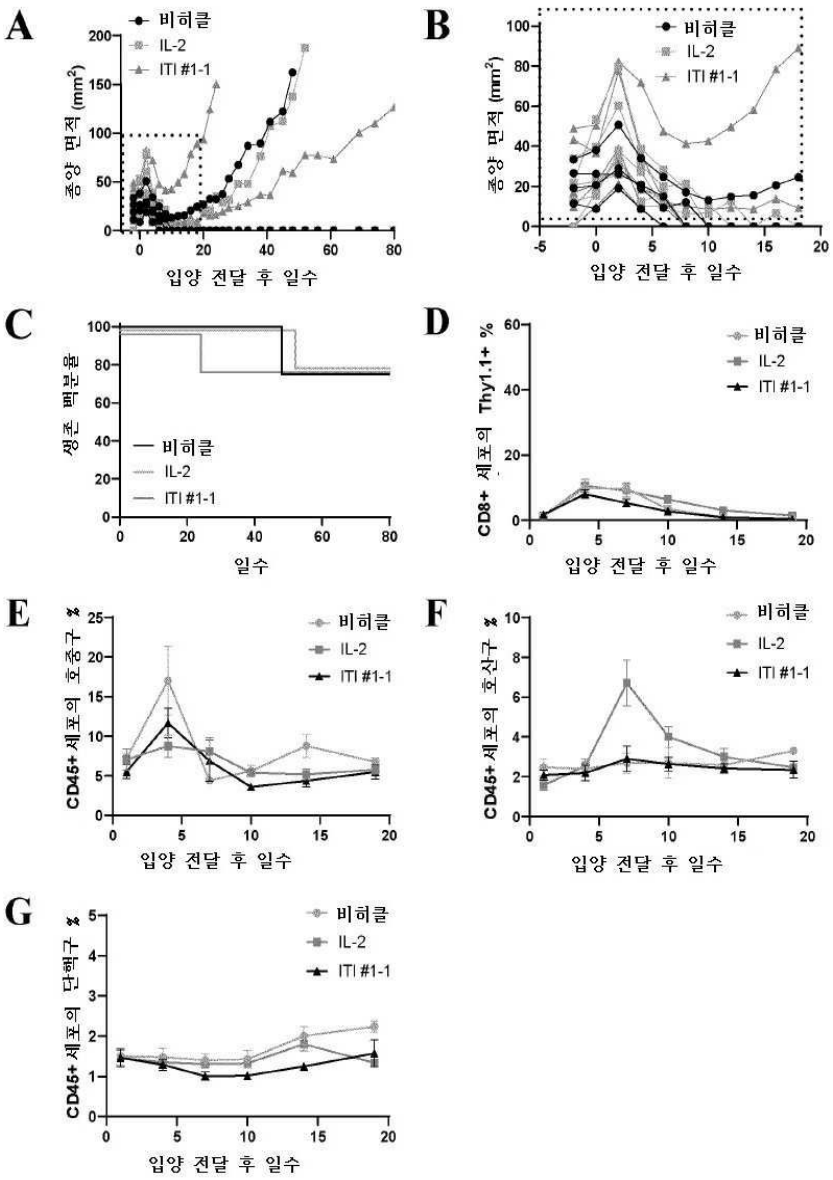
도면57


A
종양 면적 (mm²)
비히클
130a1
입양 전달 후 일수
B
종양 면적 (mm²)
비히클
130a1
입양 전달 후 일수
C
생존 백분율
비히클
130a1
일수
D
CD8+ 세포의 Thy1.1+ %
비히클
130a1
입양 전달 후 일수
E
CD45+ 세포의 호중구 %
비히클
130a1
입양 전달 후 일수
F
CD45+ 세포의 호산구 %
비히클
130a1
입양 전달 후 일수
G
CD45+ 세포의 단핵구 %
비히클
130a1
입양 전달 후 일수

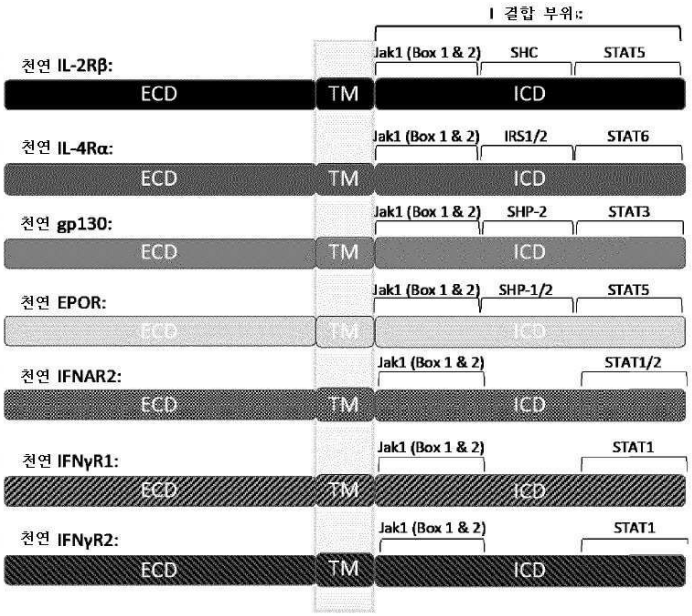
도면58


A
비히클
130a1
종양 면적 (mm²)
입양 전달 후 일수
B
비히클
130a1
종양 면적 (mm²)
입양 전달 후 일수
C
생존 백분율
비히클
130a1
일수
D
비히클
130a1
CD8+ 세포의 Thy1.1+ %
입양 전달 후 일수
E
비히클
130a1
CD45+ 세포의 호중구 %
입양 전달 후 일수
F
비히클
130a1
CD45+ 세포의 호산구 %
입양 전달 후 일수
G
비히클
130a1
CD45+ 세포의 단핵구 %
입양 전달 후 일수

도면59

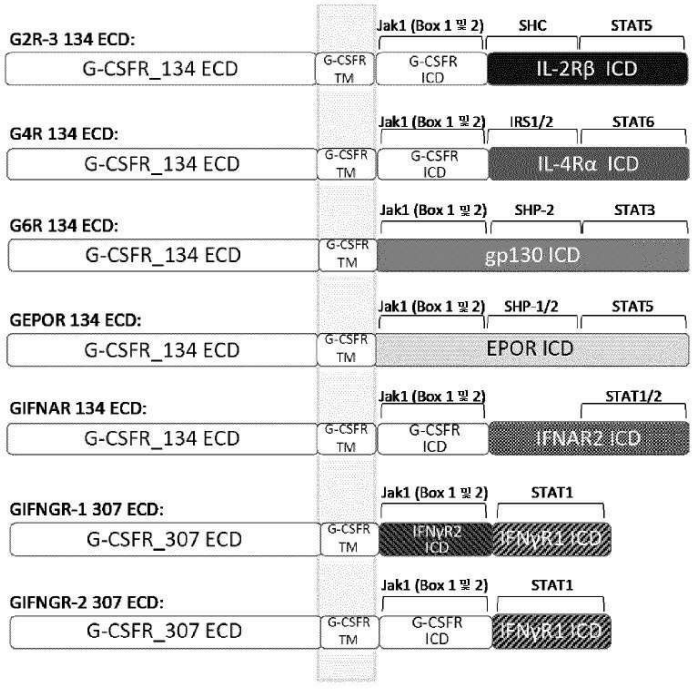

A
비히클
IL-2
ITI #1-1
종양 면적 (mm²)
입양 전달 후 일수
B
비히클
IL-2
ITI #1-1
종양 면적 (mm²)
입양 전달 후 일수
C
생존 백분율
비히클
IL-2
ITI #1-1
일수
D
CD8+ 세포의 Thy1.1+ %
비히클
IL-2
ITI #1-1
입양 전달 후 일수
E
CD45+ 세포의 호중구 %
비히클
IL-2
ITI #1-1
입양 전달 후 일수
F
CD45+ 세포의 호산구 %
비히클
IL-2
ITI #1-1
입양 전달 후 일수
G
CD45+ 세포의 단핵구 %
비히클
IL-2
ITI #1-1
입양 전달 후 일수

도면60a



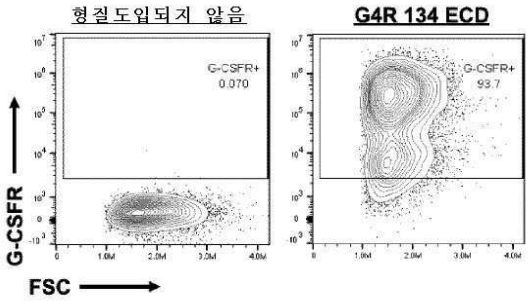
수용체 개략도

도면60b



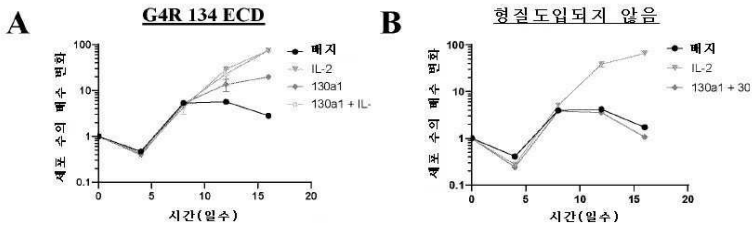
수용체 개략도

도면61



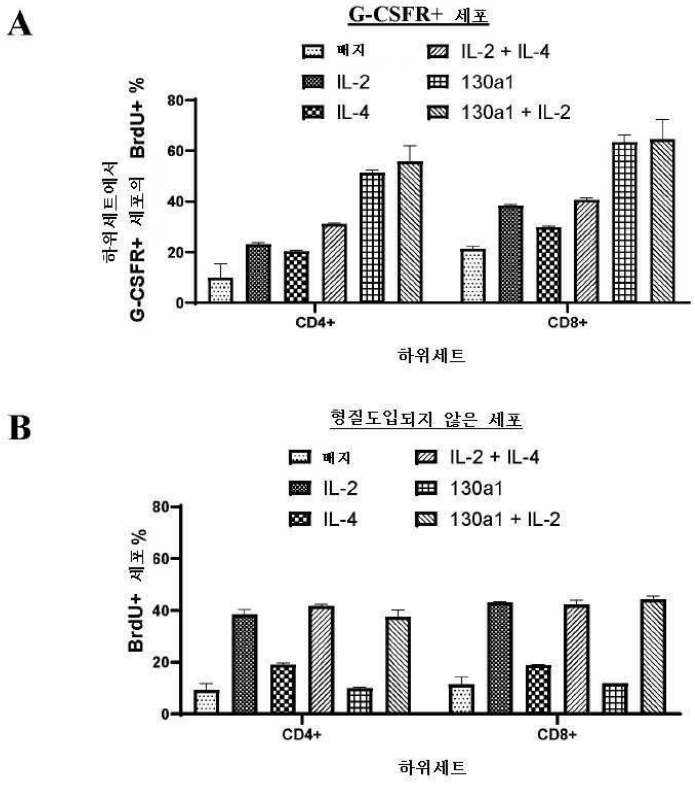
확장 제8일에 G4R 134 ECD 발현

도면62



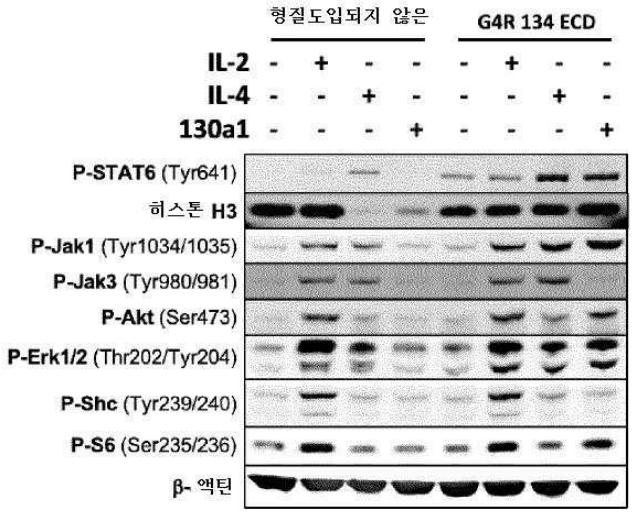
G4R 134 ECD를 발현하는 인간 T 세포의 확장

도면63



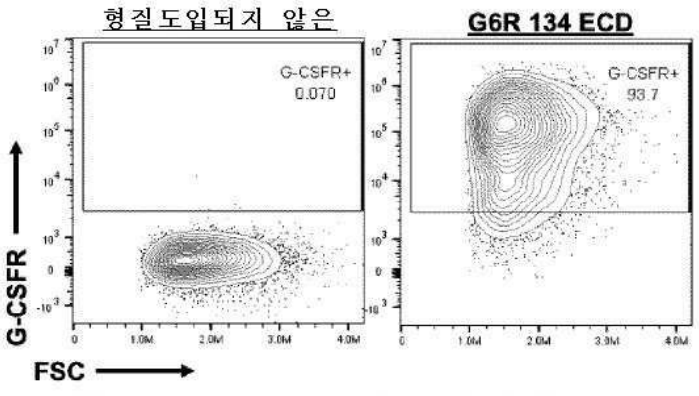
G4R 134 ECD를 발현하는 인간 T 세포의 증식

도면64



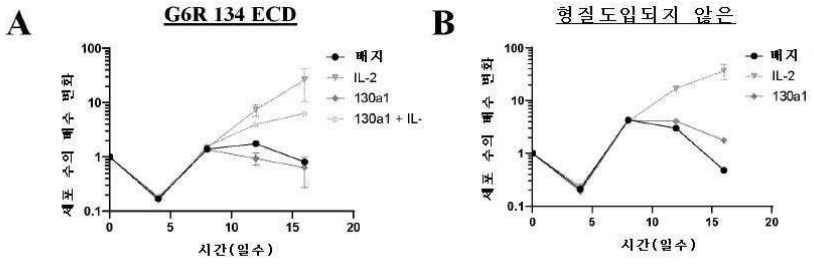
형질도입되지 않거나 G4R 134 ECD를 발현하는 인간 T 세포의 웨스턴 블롯

도면65



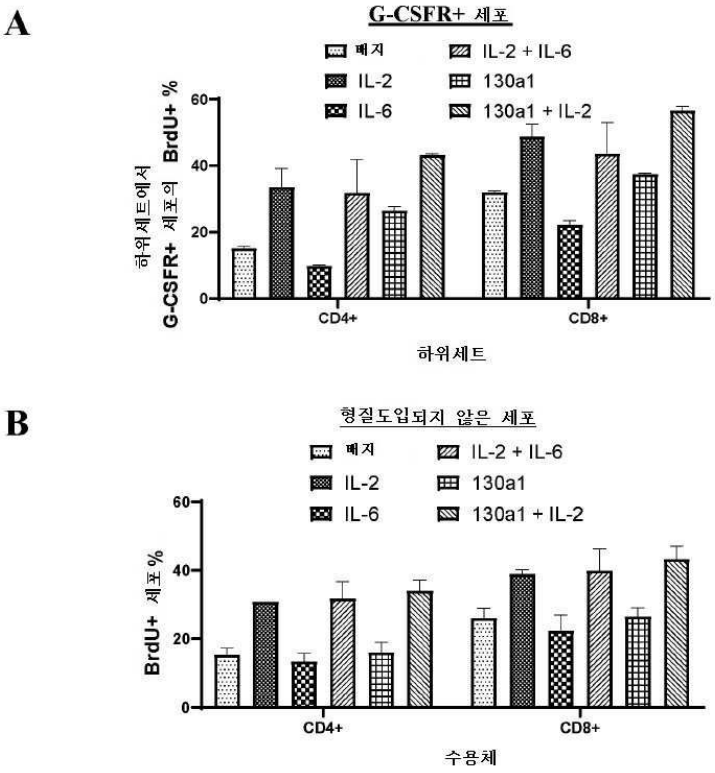
확장 제8일에 G6R 134 ECD 발현

도면66



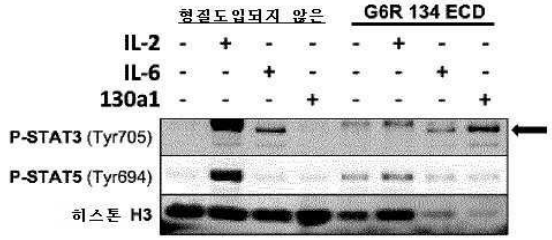
G6R 134 ECD를 발현하는 인간 T 세포의 확장

도면67



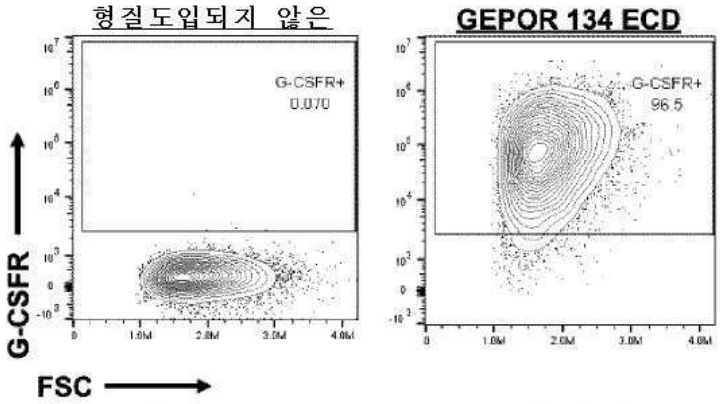
G6R 134 ECD 를 발현하는 인간 T 세포의 증식

도면68



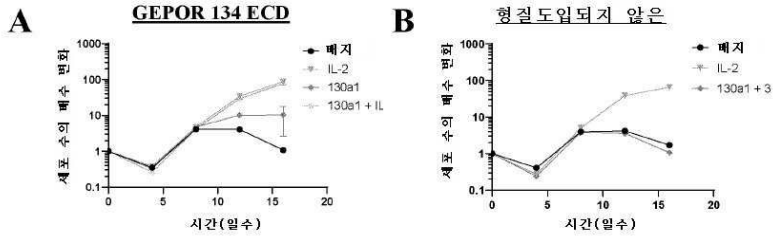
형질도입되지 않거나 G6R 134 ECD를 발현하는 인간 T 세포의 웨스턴 블롯

도면69



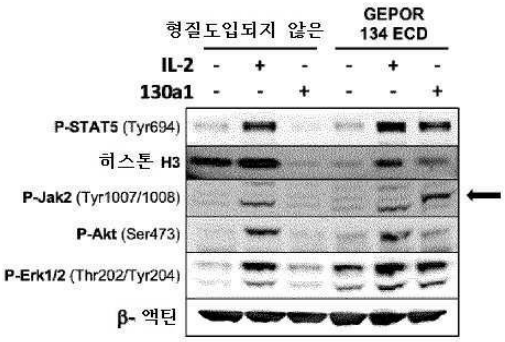
확장 제8일에 GEPOR 134 ECD 발현

도면70



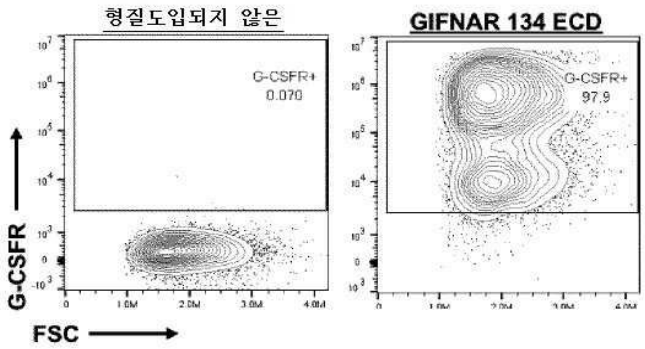
GEPOR 134 ECD를 발현하는 인간 T 세포의 확장

도면71



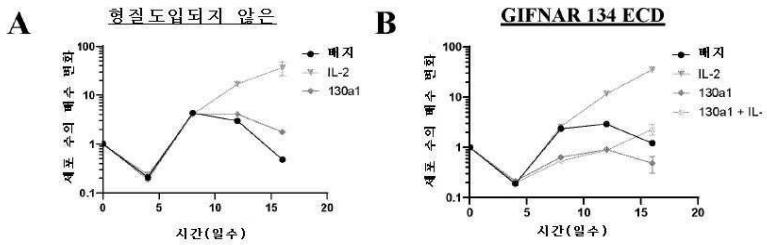
형질도입되지 않거나 GEPOR 134 ECD를 발현하는 인간 T 세포의 웨스턴 블롯

도면72



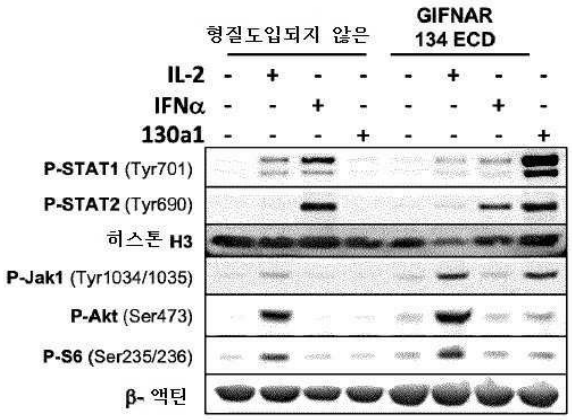
확장 제8일에 GIFNAR 134 ECD 발현

도면73



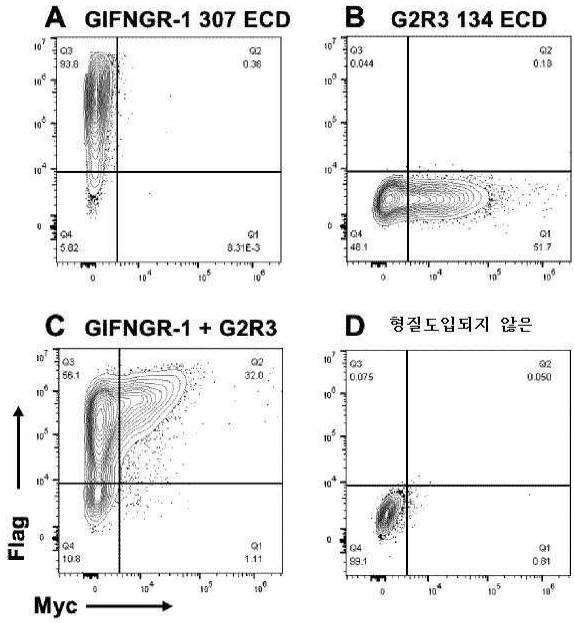
GIFNAR 134 ECD를 발현하는 인간 T 세포의 확장

도면74



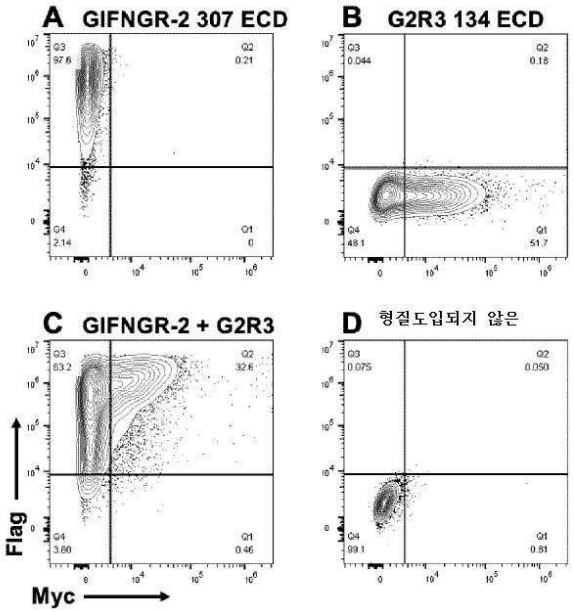
형질도입되지 않거나 GIFNAR 134 ECD를 발현하는 인간 T 세포의 웨스턴 블롯

도면75



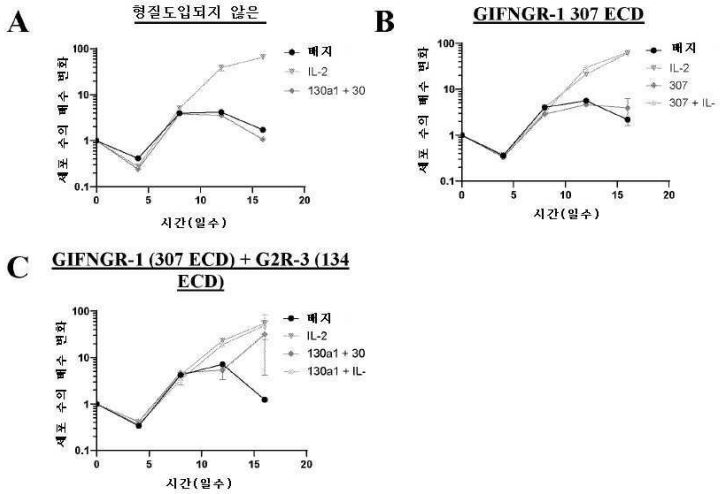
확장 제8일에 GIFNGR-1 307 ECD(Flag-태깅됨) 및 G2R3(Myc-태깅됨)의 발현.
A) GIFNGR-1 307 ECD 단독의 형질도입; B) G2R3 134 ECD 단독의 형질도입; C) GIFNGR-1 307 ECD 및 G2R3 134 ECD의 공동 형질도입; 및 D) 형질도입되지 않음.

도면76



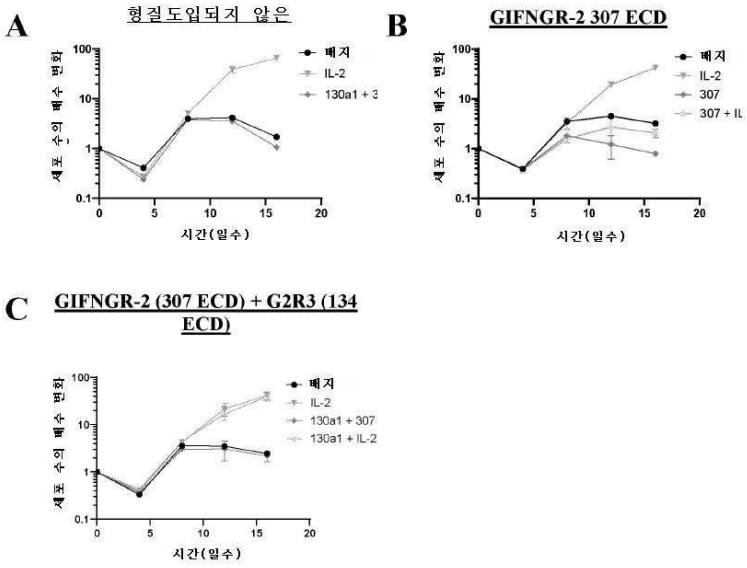
확장 제8일에 GIFNGR-2 307 ECD(Flag-태깅됨) 및 G2R3(Myc-태깅됨)의 발현.
A) GIFNGR-2 307 ECD 단독의 형질도입; B) G2R3 134 ECD 단독의 형질도입; C) GIFNGR-2 307 ECD 및 G2R3 134 ECD의 공동 형질도입; 및 D) 형질도입되지 않음.

도면77



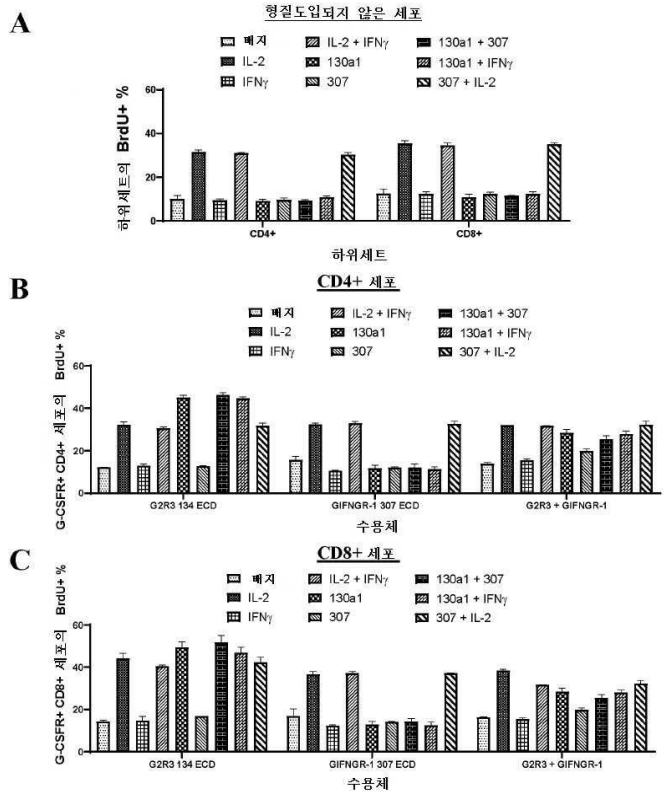
GIFNGR-1 307 ECD를 발현하는 인간 T 세포의 확장

도면78



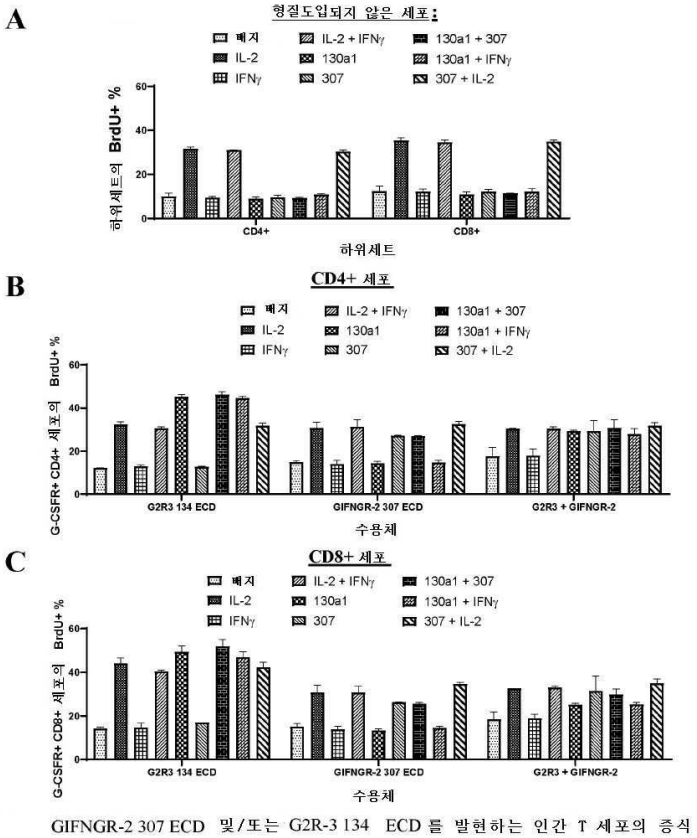
GIFNGR-2 307 ECD를 발현하는 인간 T 세포의 확장

도면79



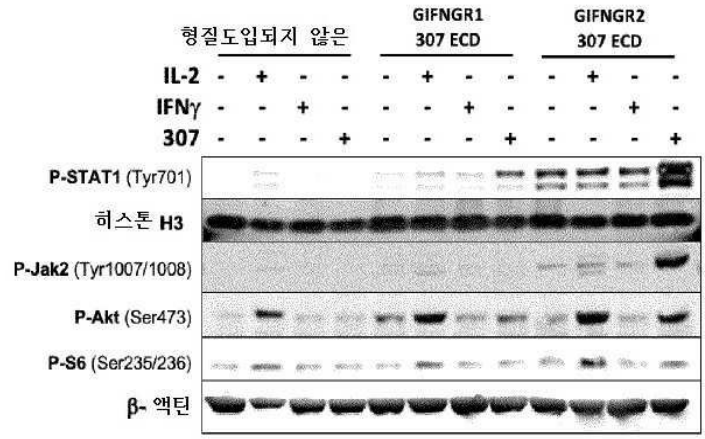
GIFNGR-1 307 ECD 및/또는 G2R-3 134 ECD 를 발현하는 인간 T 세포의 증식

도면80



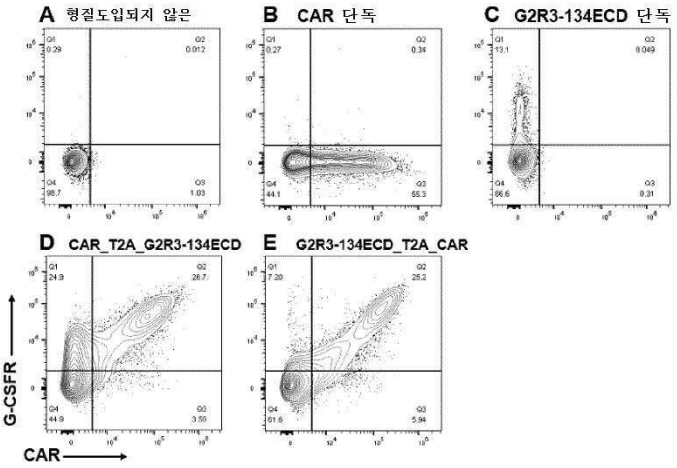
GIFNGR-2 307 ECD 및/또는 G2R-3 134 ECD 를 발현하는 인간 T 세포의 증식

도면81



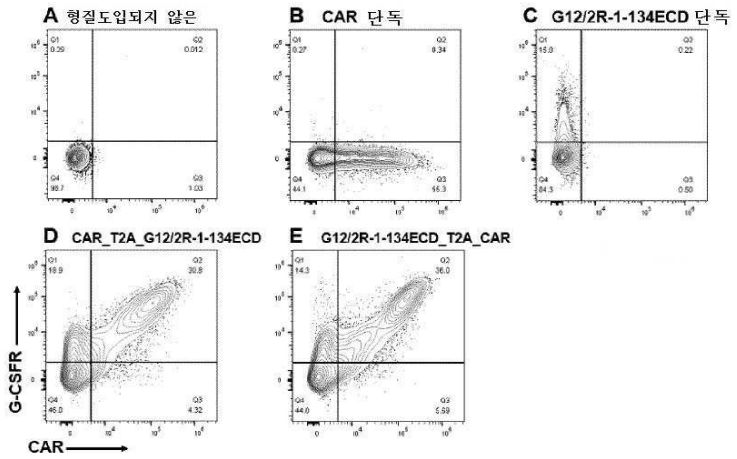
형질도입되지 않거나 GIFNGR-1 307 ECD 또는 GIFNGR-2 307 ECD를 발현하는 인간 T 세포의 웨스턴 블롯

도면82



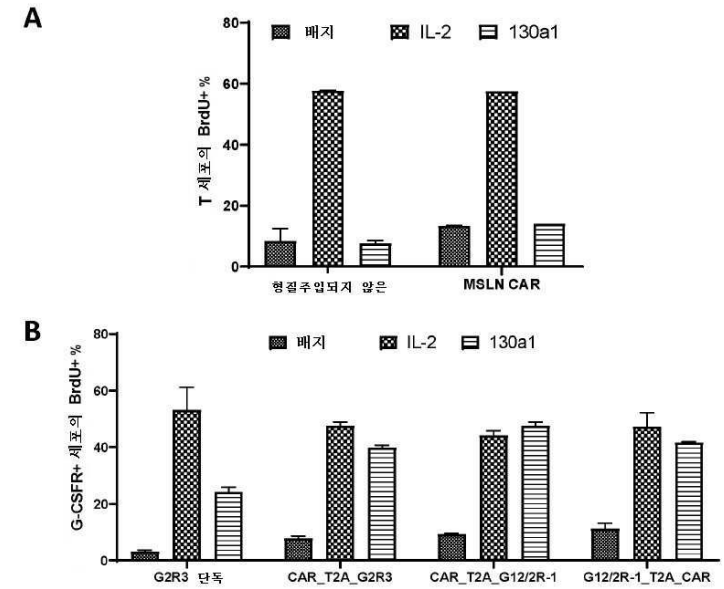
인간 T 세포에서 이시스트론성 CAR 및 G2R3 134 ECD 작제물의 발현

도면83



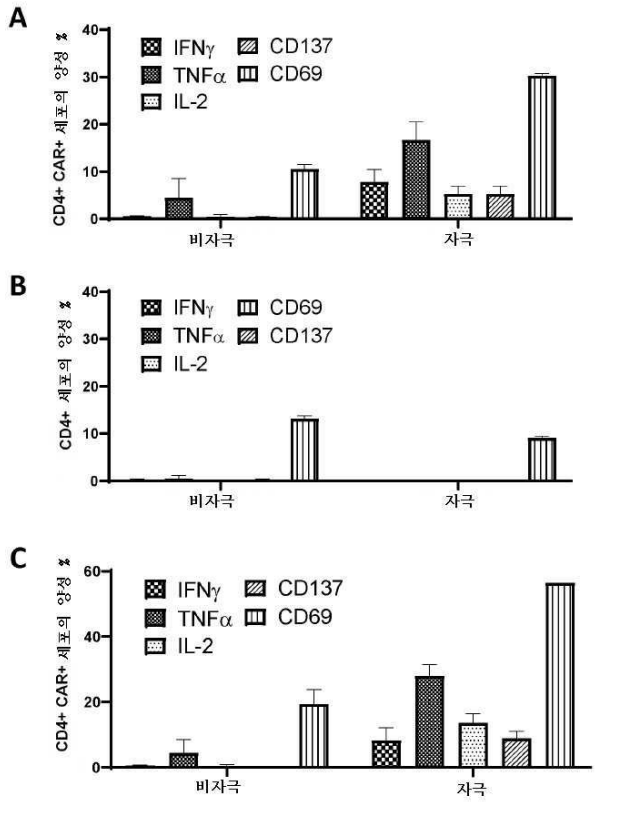
인간 T 세포에서 이시스트론성 CAR 및 G12/2R-1-134 ECD 작제물의 발현

도면84



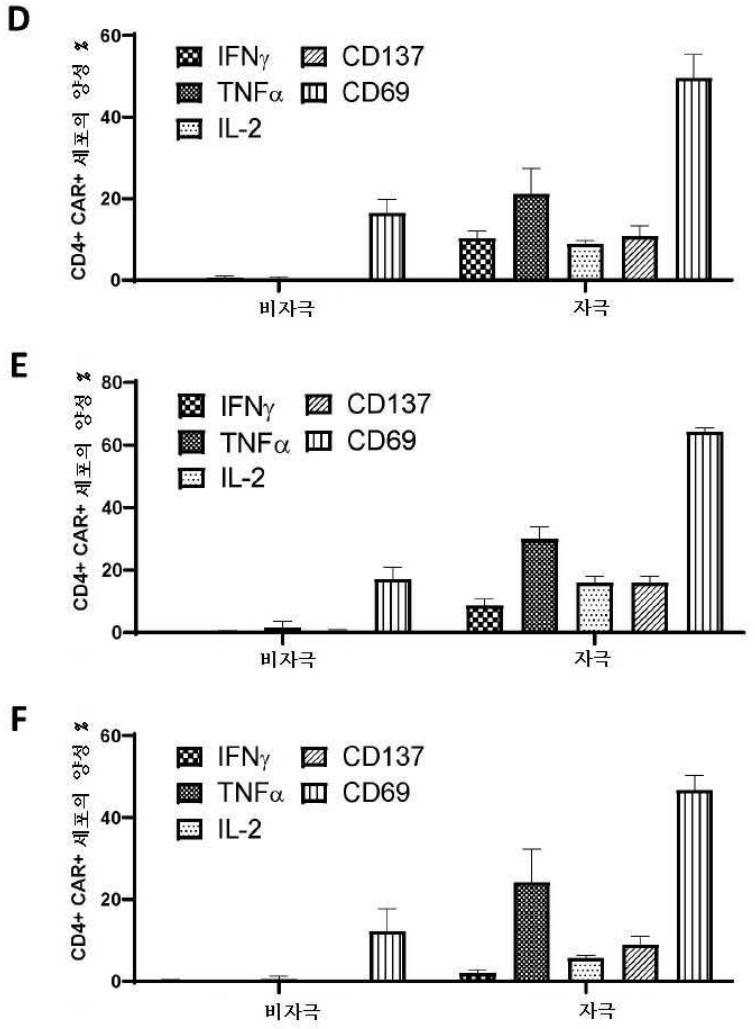
G2R3 134 ECD 또는 G12/2R-1 134 ECD 를 갖거나 갖지 않는
메소텔린 CAR을 발현하는 CD3+ T 세포의 증식

도면85ac



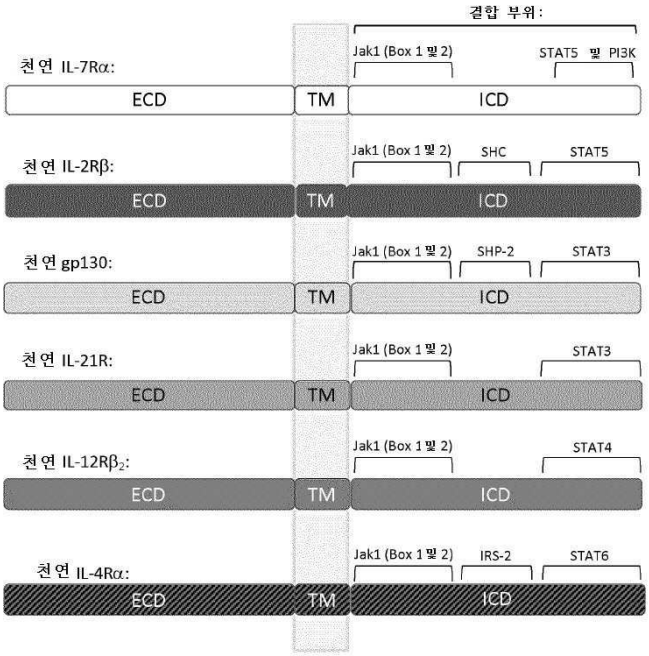
이시스트론성 메소텔린 CAR 작제물을 발현하는 CD4+T 세포에 의한
IFNγ, TNFα, IL-2, CD137 및 CD69 의 발현

도면85df



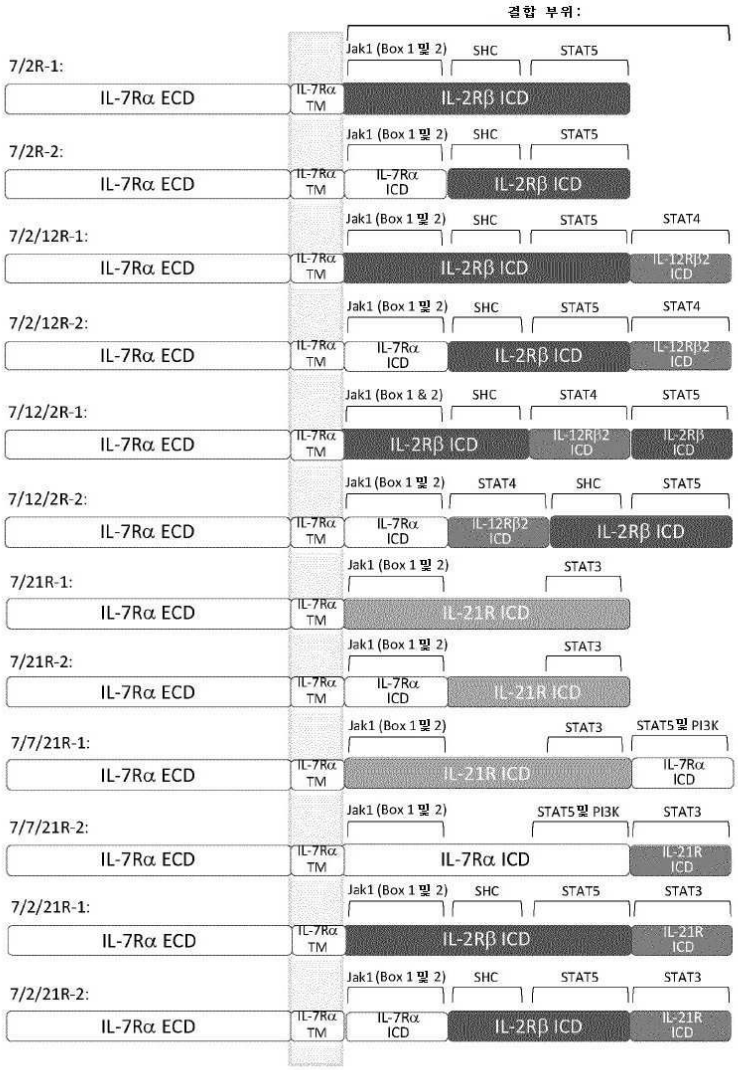
이시스트론성 메소텔린 CAR 작제물을 발현하는 CD4+T 세포에 의한 IFNγ, TNFα, IL-2, CD137 및 CD69 의 발현

도면86



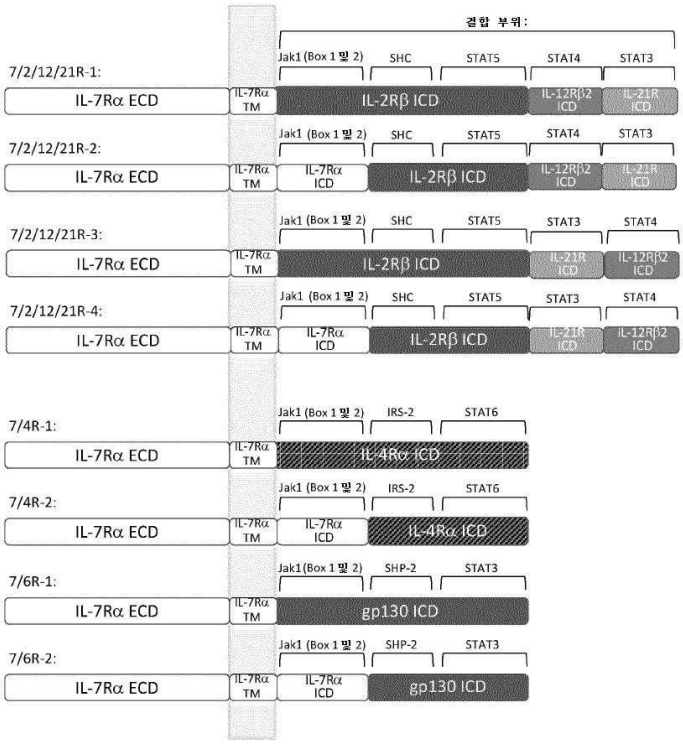
천연 사이토카인 수용체 개략도

도면87a



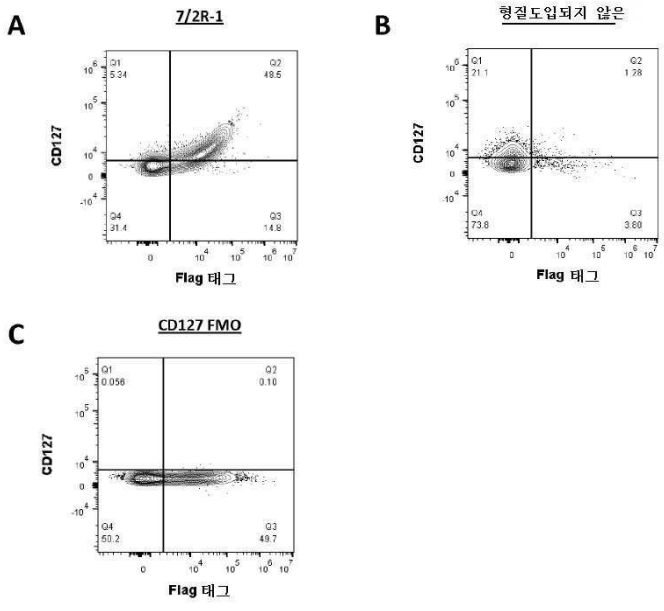
키메라 수용체 개략도

도면87b



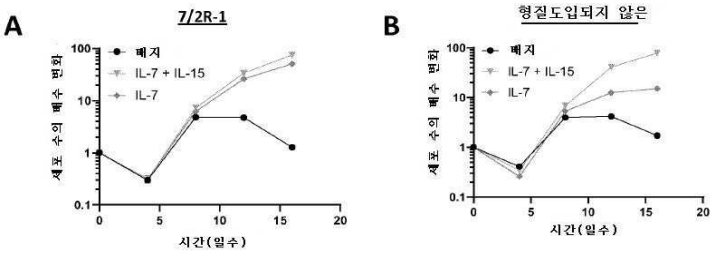
키메라 수용체 개략도

도면88



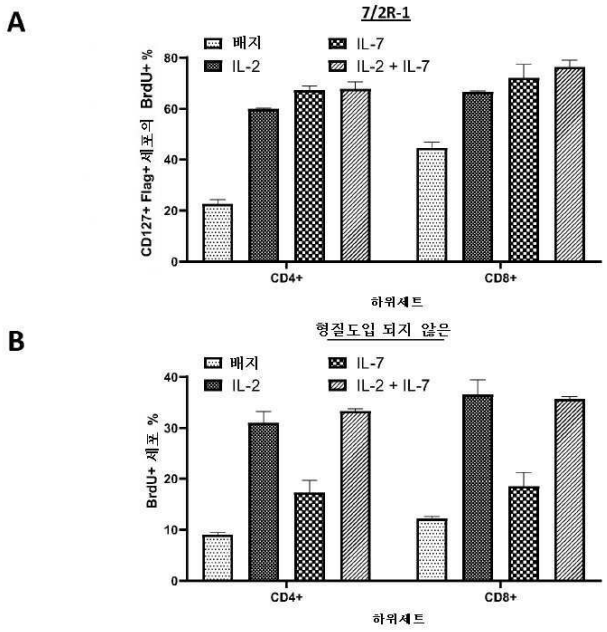
확장 12일에 7/2R-1 수용체 발현

도면89



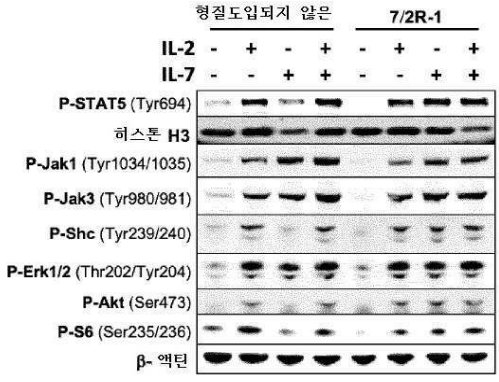
7/2R-1 을 발현하는 인간 T 세포의 확장

도면90



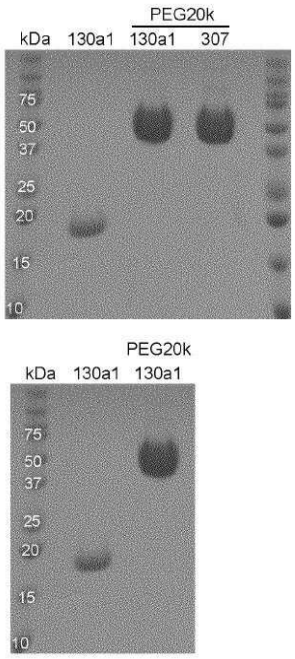
7/2R-1 을 발현하는 인간 T 세포의 증식

도면91

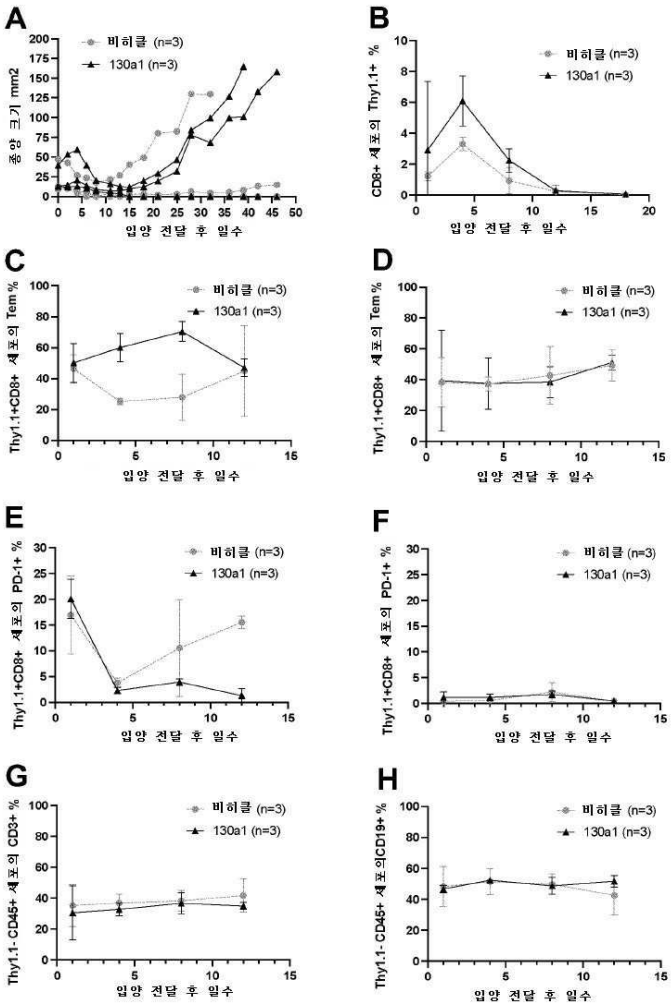


형질도입되지 않거나 7/2R-1 을 발현하는 인간 T 세포의 웨스턴 블롯

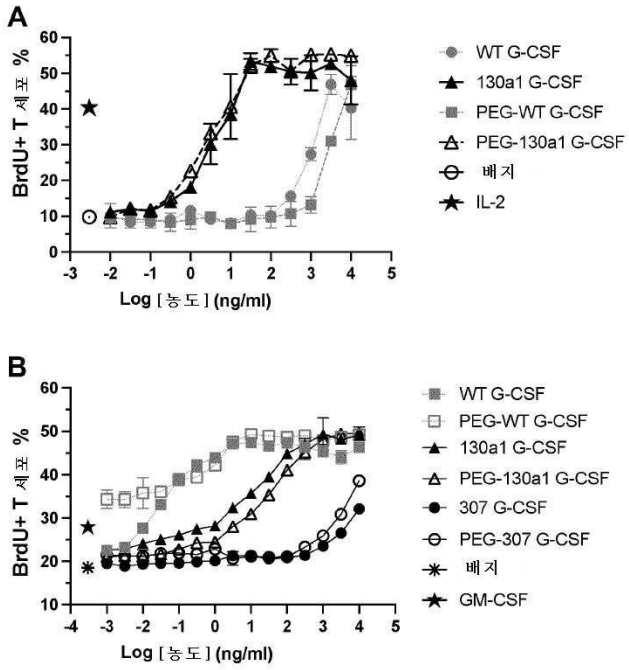
도면92


PEG20k
kDa
130a1
130a1
307
75
50
37
25
20
15
10
PEG20k
kDa
130a1
130a1
75
50
37
25
20
15
10

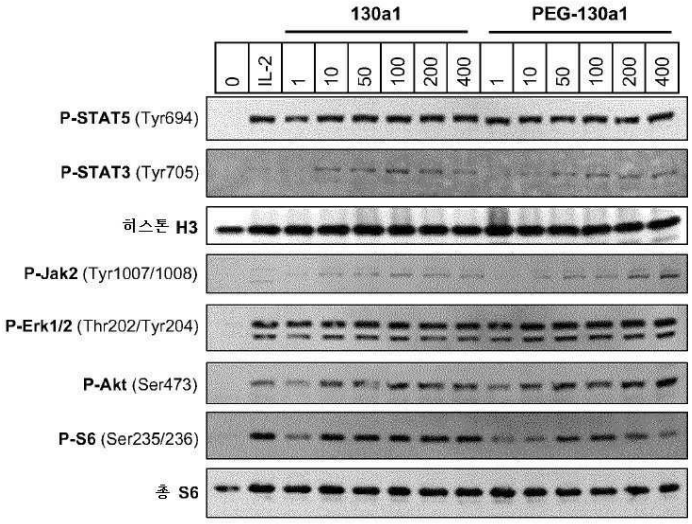
도면93


A
종양 크기 mm2
비히클 (n=3)
130a1 (n=3)
입양 전달 후 일수
B
CD8+ 세포의 Thy1.1+ %
비히클 (n=3)
130a1 (n=3)
입양 전달 후 일수
C
Thy1.1+CD8+ 세포의 Tem %
비히클 (n=3)
130a1 (n=3)
입양 전달 후 일수
D
Thy1.1+CD8+ 세포의 Tem %
비히클 (n=3)
130a1 (n=3)
입양 전달 후 일수
E
Thy1.1+CD8+ 세포의 PD-1+ %
비히클 (n=3)
130a1 (n=3)
입양 전달 후 일수
F
Thy1.1+CD8+ 세포의 PD-1+ %
비히클 (n=3)
130a1 (n=3)
입양 전달 후 일수
G
Thy1.1- CD45+ 세포의 CD3+ %
비히클 (n=3)
130a1 (n=3)
입양 전달 후 일수
H
Thy1.1- CD45+ 세포의CD19+ %
비히클 (n=3)
130a1 (n=3)
입양 전달 후 일수

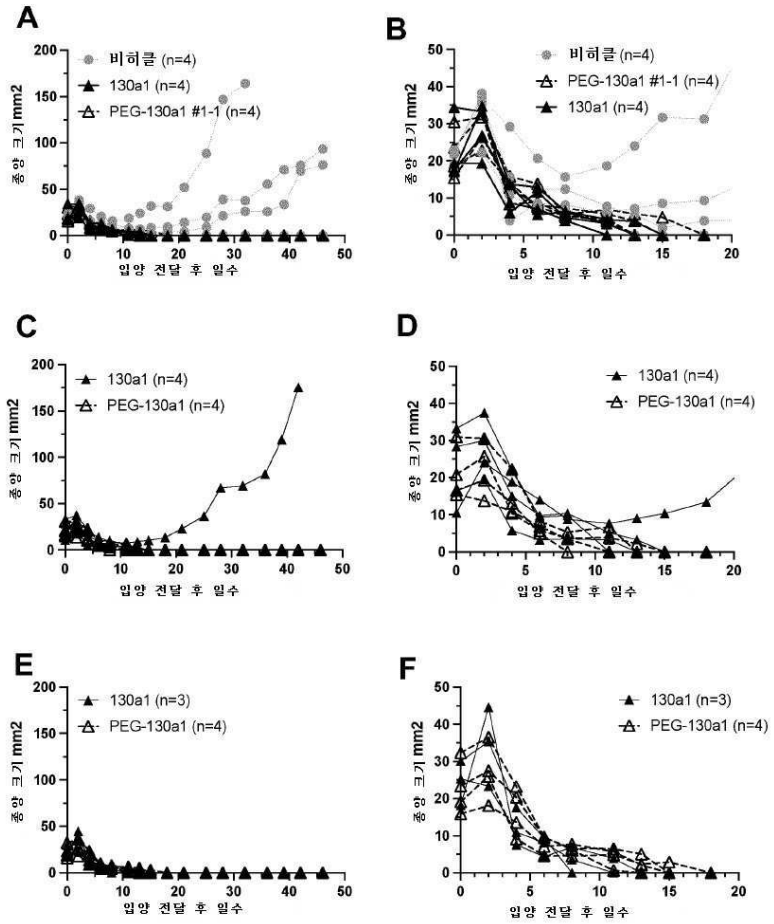
도면94


A
BrdU+ T 세포 %
Log [농도] (ng/ml)
WT G-CSF
130a1 G-CSF
PEG-WT G-CSF
PEG-130a1 G-CSF
배지
IL-2
B
BrdU+ T 세포 %
Log [농도] (ng/ml)
WT G-CSF
PEG-WT G-CSF
130a1 G-CSF
PEG-130a1 G-CSF
307 G-CSF
PEG-307 G-CSF
배지
GM-CSF

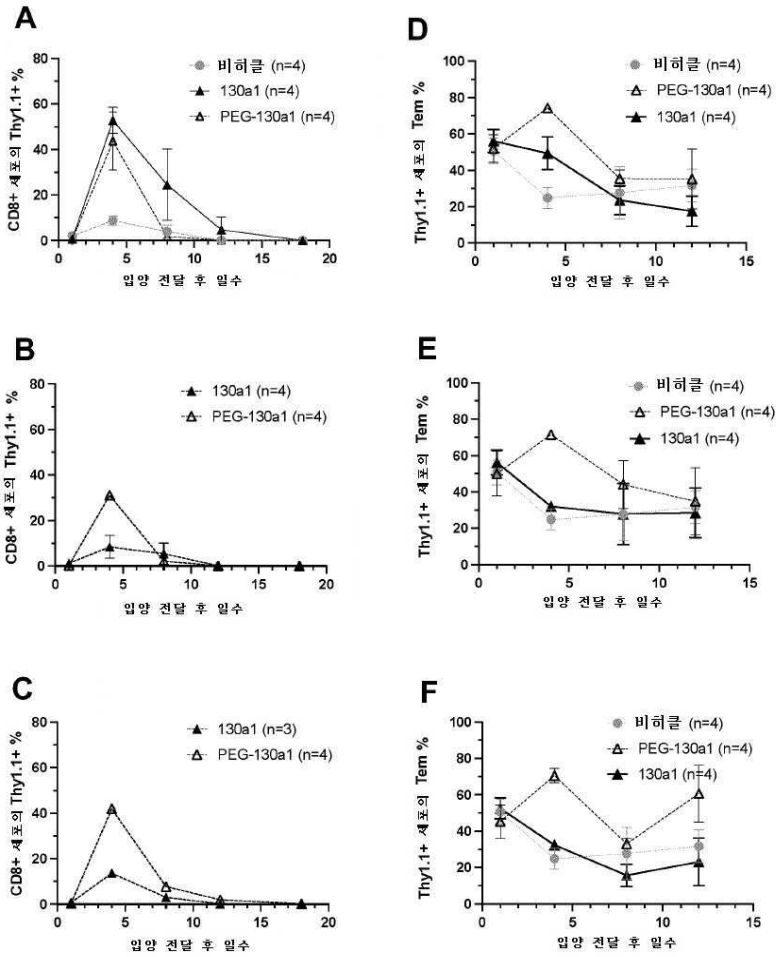
도면95


130a1
PEG-130a1
0
IL-2
1
10
50
100
200
400
1
10
50
100
200
400
P-STAT5 (Tyr694)
P-STAT3 (Tyr705)
히스톤 H3
P-Jak2 (Tyr1007/1008)
P-Erk1/2 (Thr202/Tyr204)
P-Akt (Ser473)
P-S6 (Ser235/236)
총 S6

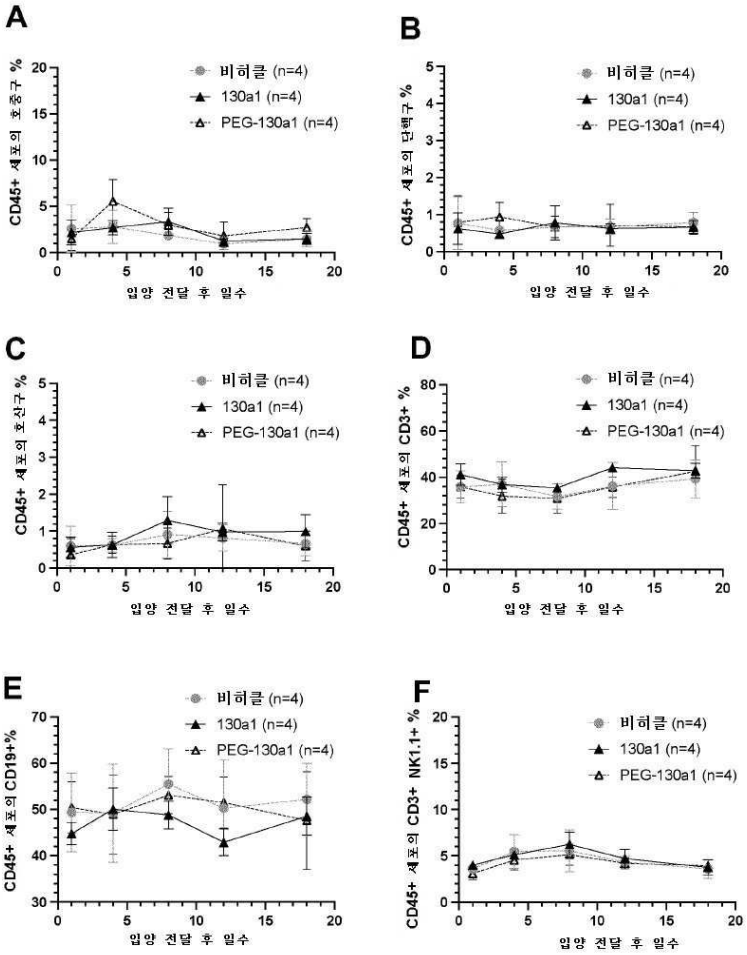
도면96


A
비히클 (n=4)
130a1 (n=4)
PEG-130a1 #1-1 (n=4)
종양 크기 mm2
입양 전달 후 일수
B
비히클 (n=4)
PEG-130a1 #1-1 (n=4)
130a1 (n=4)
종양 크기 mm2
입양 전달 후 일수
C
130a1 (n=4)
PEG-130a1 (n=4)
종양 크기 mm2
입양 전달 후 일수
D
130a1 (n=4)
PEG-130a1 (n=4)
종양 크기 mm2
입양 전달 후 일수
E
130a1 (n=3)
PEG-130a1 (n=4)
종양 크기 mm2
입양 전달 후 일수
F
130a1 (n=3)
PEG-130a1 (n=4)
종양 크기 mm2
입양 전달 후 일수

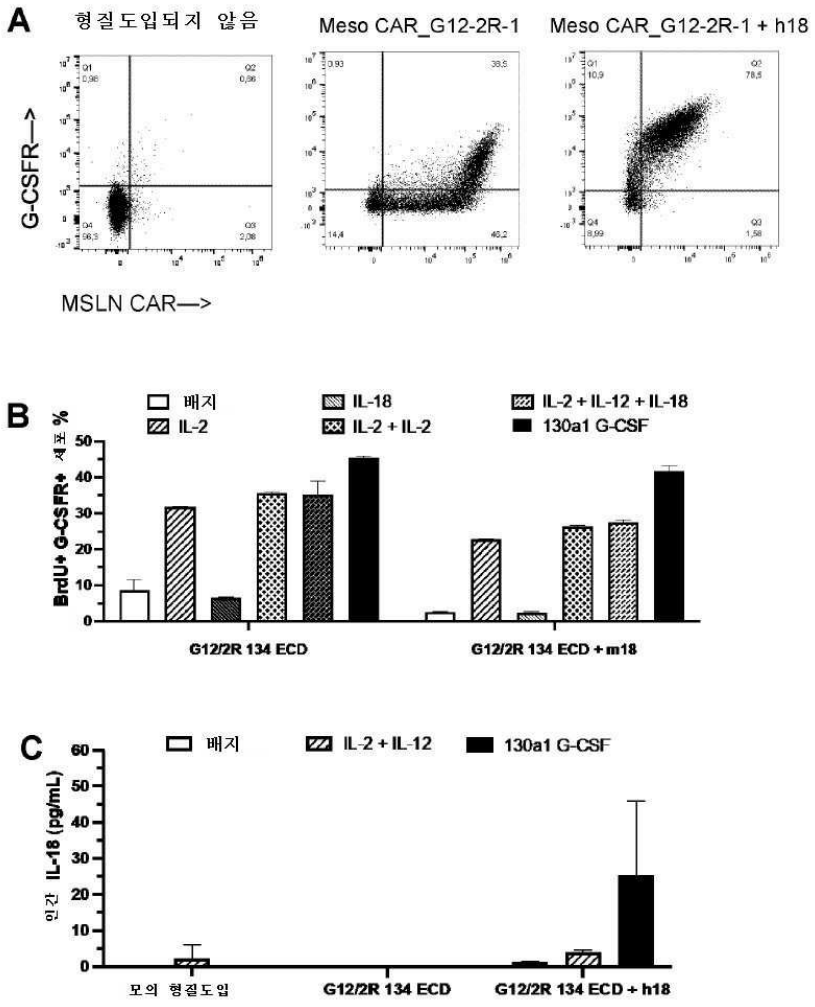
도면97


A
CD8+ 세포의 Thy1.1+ %
비히클 (n=4)
130a1 (n=4)
PEG-130a1 (n=4)
입양 전달 후 일수
D
Thy1.1+ 세포의 Tem %
비히클 (n=4)
PEG-130a1 (n=4)
130a1 (n=4)
입양 전달 후 일수
B
CD8+ 세포의 Thy1.1+ %
130a1 (n=4)
PEG-130a1 (n=4)
입양 전달 후 일수
E
Thy1.1+ 세포의 Tem %
비히클 (n=4)
PEG-130a1 (n=4)
130a1 (n=4)
입양 전달 후 일수
C
CD8+ 세포의 Thy1.1+ %
130a1 (n=3)
PEG-130a1 (n=4)
입양 전달 후 일수
F
Thy1.1+ 세포의 Tem %
비히클 (n=4)
PEG-130a1 (n=4)
130a1 (n=4)
입양 전달 후 일수

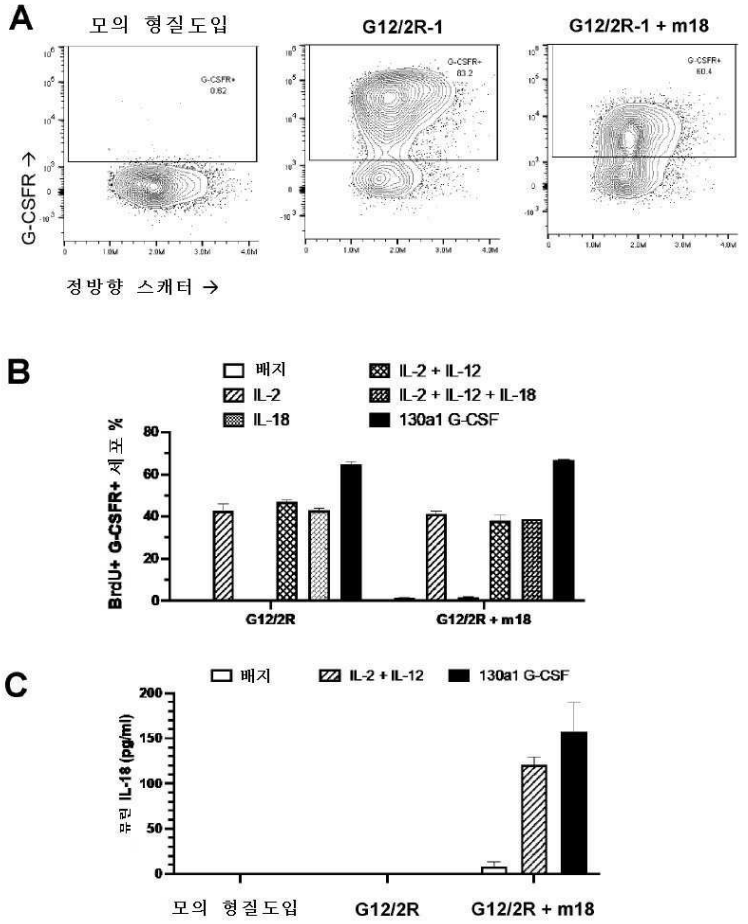
도면98


A
CD45+ 세포의 호중구 %
비히클 (n=4)
130a1 (n=4)
PEG-130a1 (n=4)
입양 전달 후 일수
B
CD45+ 세포의 단핵구 %
비히클 (n=4)
130a1 (n=4)
PEG-130a1 (n=4)
입양 전달 후 일수
C
CD45+ 세포의 호산구 %
비히클 (n=4)
130a1 (n=4)
PEG-130a1 (n=4)
입양 전달 후 일수
D
CD45+ 세포의 CD3+ %
비히클 (n=4)
130a1 (n=4)
PEG-130a1 (n=4)
입양 전달 후 일수
E
CD45+ 세포의 CD19+%
비히클 (n=4)
130a1 (n=4)
PEG-130a1 (n=4)
입양 전달 후 일수
F
CD45+ 세포의 CD3+ NK1.1+ %
비히클 (n=4)
130a1 (n=4)
PEG-130a1 (n=4)
입양 전달 후 일수

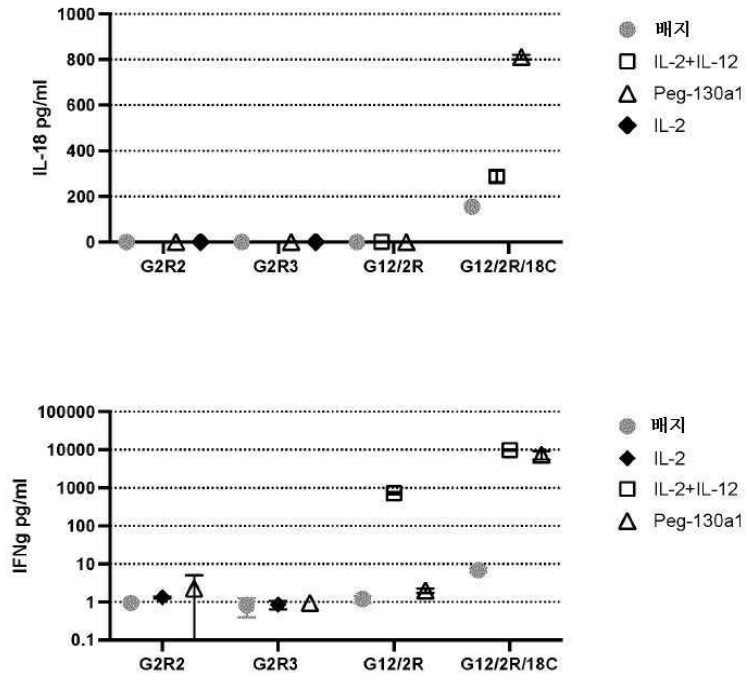
도면99


A
형질도입되지 않음
Meso CAR_G12-2R-1
Meso CAR_G12-2R-1 + h18
G-CSFR—>
MSLN CAR—>
B
배지
IL-18
IL-2 + IL-12 + IL-18
IL-2
IL-2 + IL-2
130a1 G-CSF
BrdU+ G-CSFR+ 세포 %
G12/2R 134 ECD
G12/2R 134 ECD + m18
C
배지
IL-2 + IL-12
130a1 G-CSF
인간 IL-18 (pg/mL)
모의 형질도입
G12/2R 134 ECD
G12/2R 134 ECD + h18

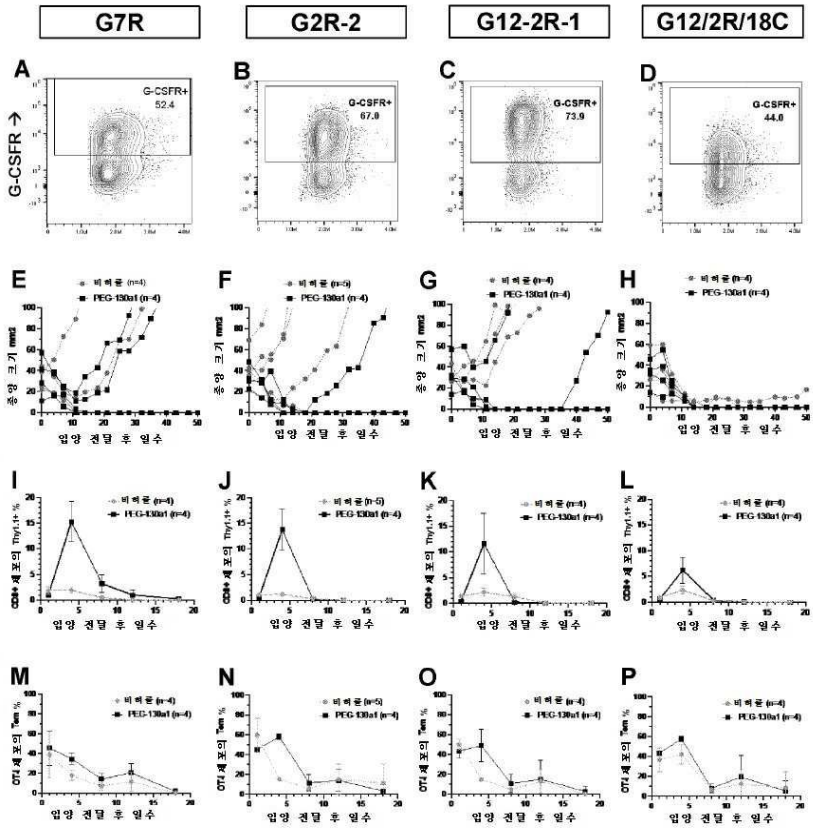
도면100


A
모의 형질도입
G12/2R-1
G12/2R-1 + m18
G-CSFR →
정방향 스캐터 →
B
베지
IL-2
IL-18
IL-2 + IL-12
IL-2 + IL-12 + IL-18
130a1 G-CSF
BrdU+ G-CSFR+ 세포 %
G12/2R
G12/2R + m18
C
베지
IL-2 + IL-12
130a1 G-CSF
뮤린 IL-18 (pg/ml)
모의 형질도입
G12/2R
G12/2R + m18

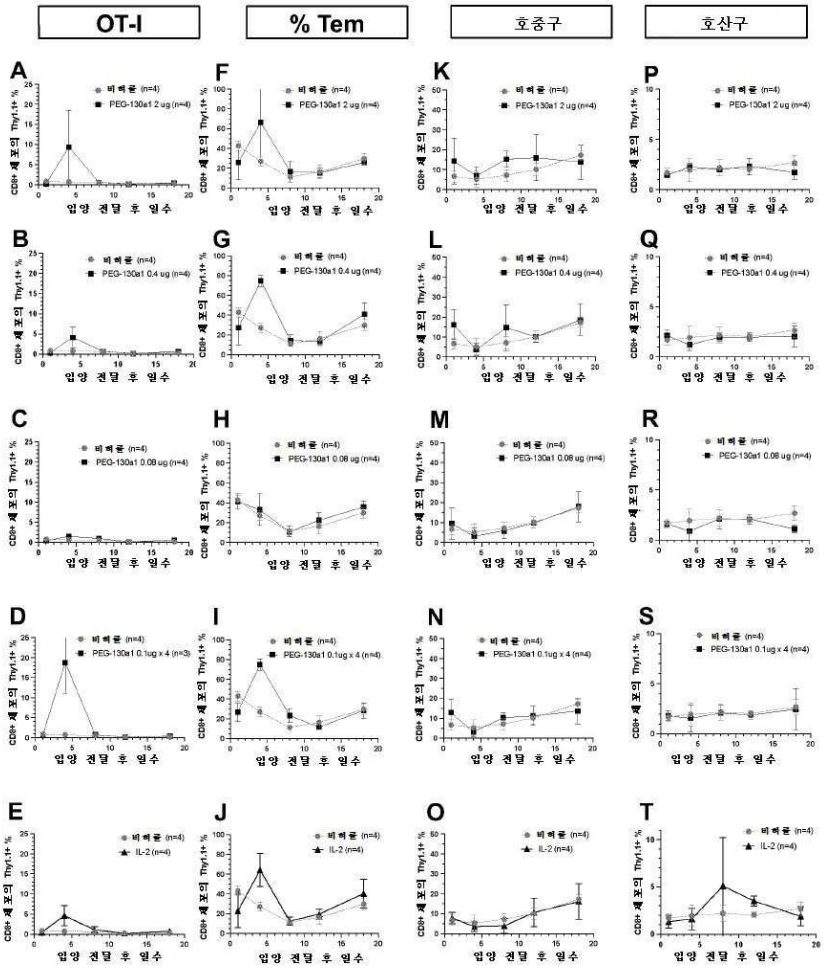
도면101


IL-18 pg/ml
G2R2
G2R3
G12/2R
G12/2R/18C
베지
IL-2+IL-12
Peg-130a1
IL-2
IFNg pg/ml
G2R2
G2R3
G12/2R
G12/2R/18C
베지
IL-2
IL-2+IL-12
Peg-130a1

도면102


G7R
G2R-2
G12-2R-1
G12/2R/18C
A
B
C
D
G-CSFR →
G-CSFR+
52.4
G-CSFR+
67.9
G-CSFR+
73.9
G-CSFR+
44.8
E
F
G
H
종양 크기 mm2
입양 전달 후 일수
I
J
K
L
CD8+ 세포의 Thy1.1+ %
입양 전달 후 일수
M
N
O
P
OT-I 세포의 Tem %
입양 전달 후 일수

도면103



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> PROVINCIAL HEALTH SERVICES AUTHORITY

UVIC INDUSTRY PARTNERSHIPS INC.

<120> MODIFIED GRANULOCYTE COLONY-STIMULATING FACTOR (G-CSF) AND CHIMERIC CYTOKINE RECEPTORS BINDING SAME

<130> V818187WO

<140> PCT/CA2022/050540

<141> 2022-04-07

<150> 63/171,933

<151> 2021-04-07

<150> 63/171,950

<151> 2021-04-07

<150> 63/171,980

<151> 2021-04-07

<150> 63/172,025

<151> 2021-04-07

<160> 231

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 174

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-CSF

<400> 1

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

Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln
20 25 30

Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val
35 40 45

Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys
50 55 60

Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser
65 70 75 80

Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser
85 90 95

Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp
100 105 110

Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro
115 120 125

Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe
130 135 140

Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe
145 150 155 160

Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro

165 170

<210> 2

<211> 308

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-CSFR (Ig-CRH)

<400> 2

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

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

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

Gln Leu Cys Leu Asp Pro Met Asp Val Val Lys Leu Glu Pro Pro Met
195 200 205

Leu Arg Thr Met Asp Pro Ser Pro Glu Ala Ala Pro Pro Gln Ala Gly
210 215 220

Cys Leu Gln Leu Ser Trp Glu Pro Trp Gln Pro Gly Leu His Ile Asn
225 230 235 240

Gln Lys Cys Glu Leu Arg His Lys Pro Gln Arg Gly Glu Ala Ser Trp
245 250 255

Ala Leu Val Gly Pro Leu Pro Leu Glu Ala Leu Gln Tyr Glu Leu Cys
260 265 270

Gly Leu Leu Pro Ala Thr Ala Tyr Thr Leu Gln Ile Arg Cys Ile Arg
275 280 285

Trp Pro Leu Pro Gly His Trp Ser Asp Trp Ser Pro Ser Leu Glu Leu
290 295 300

Arg Thr Thr Glu
305

<210> 3

<211> 627

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-CSFR (Signal peptide, ECD)

<400> 3

Met Ala Arg Leu Gly Asn Cys Ser Leu Thr Trp Ala Ala Leu Ile Ile
1 5 10 15

Leu Leu Leu Pro Gly Ser Leu Glu Glu Cys Gly His Ile Ser Val Ser
20 25 30

Ala Pro Ile Val His Leu Gly Asp Pro Ile Thr Ala Ser Cys Ile Ile
35 40 45

Lys Gln Asn Cys Ser His Leu Asp Pro Glu Pro Gln Ile Leu Trp Arg
50 55 60

Leu Gly Ala Glu Leu Gln Pro Gly Gly Arg Gln Gln Arg Leu Ser Asp
65 70 75 80

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

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

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

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

Trp Ser Pro Ser Leu Glu Leu Arg Thr Thr Glu Arg Ala Pro Thr Val

325 330 335

Arg Leu Asp Thr Trp Trp Arg Gln Arg Gln Leu Asp Pro Arg Thr Val

340 345 350

Gln Leu Phe Trp Lys Pro Val Pro Leu Glu Glu Asp Ser Gly Arg Ile

355 360 365

Gln Gly Tyr Val Val Ser Trp Arg Pro Ser Gly Gln Ala Gly Ala Ile

370 375 380

Leu Pro Leu Cys Asn Thr Thr Glu Leu Ser Cys Thr Phe His Leu Pro

385 390 395 400

Ser Glu Ala Gln Glu Val Ala Leu Val Ala Tyr Asn Ser Ala Gly Thr

405 410 415

Ser Arg Pro Thr Pro Val Val Phe Ser Glu Ser Arg Gly Pro Ala Leu

420 425 430

Thr Arg Leu His Ala Met Ala Arg Asp Pro His Ser Leu Trp Val Gly

435 440 445

Trp Glu Pro Pro Asn Pro Trp Pro Gln Gly Tyr Val Ile Glu Trp Gly

450 455 460

Leu Gly Pro Pro Ser Ala Ser Asn Ser Asn Lys Thr Trp Arg Met Glu

465 470 475 480

Gln Asn Gly Arg Ala Thr Gly Phe Leu Leu Lys Glu Asn Ile Arg Pro

485 490 495

Phe Gln Leu Tyr Glu Ile Ile Val Thr Pro Leu Tyr Gln Asp Thr Met

500 505 510

Gly Pro Ser Gln His Val Tyr Ala Tyr Ser Gln Glu Met Ala Pro Ser

515 520 525

His Ala Pro Glu Leu His Leu Lys His Ile Gly Lys Thr Trp Ala Gln

530 535 540

Leu Glu Trp Val Pro Glu Pro Pro Glu Leu Gly Lys Ser Pro Leu Thr

545 550 555 560

His Tyr Thr Ile Phe Trp Thr Asn Ala Gln Asn Gln Ser Phe Ser Ala

565 570 575

Ile Leu Asn Ala Ser Ser Arg Gly Phe Val Leu His Gly Leu Glu Pro
580 585 590
Ala Ser Leu Tyr His Ile His Leu Met Ala Ala Ser Gln Ala Gly Ala
595 600 605
Thr Asn Ser Thr Val Leu Thr Leu Met Thr Leu Thr Pro Glu Gly Ser
610 615 620
Glu Leu His
625

<210> 4
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> gp130 (TM, ICD)

<400> 4
Ala Ile Val Val Pro Val Cys Leu Ala Phe Leu Leu Thr Thr Leu Leu
1 5 10 15
Gly Val Leu Phe Cys Phe Asn Lys Arg Asp Leu Ile Lys Lys His Ile
20 25 30
Trp Pro Asn Val Pro Asp Pro Ser Lys Ser His Ile Ala Gln Trp Ser
35 40 45
Pro His Thr Pro Pro Arg His Asn Phe Asn Ser Lys Asp Gln Met Tyr
50 55 60

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

<210> 5
<211> 205

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2R beta ICD)

<400> 5

Ala Ser Leu Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln
1 5 10 15

Gly Tyr Phe Phe Phe His Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala Cys
20 25 30

Gln Val Tyr Phe Thr Tyr Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro Asp Glu
35 40 45

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

50 55 60

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

Leu Leu Leu Phe Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ser
85 90 95

Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro Pro Ser
100 105 110

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

115 120 125

Pro Thr Pro Gly Val Pro Asp Leu Val Asp Phe Gln Pro Pro Pro Glu
130 135 140

Leu Val Leu Arg Glu Ala Gly Glu Glu Val Pro Asp Ala Gly Pro Arg
145 150 155 160

Glu Gly Val Ser Phe Pro Trp Ser Arg Pro Pro Gly Gln Gly Glu Phe
165 170 175

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

180 185 190

Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val
195 200 205

<210> 6

<211> 627

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-CSFR (Signal peptide, ECD)

<400> 6

Met Ala Arg Leu Gly Asn Cys Ser Leu Thr Trp Ala Ala Leu Ile Ile
1 5 10 15
Leu Leu Leu Pro Gly Ser Leu Glu Glu Cys Gly His Ile Ser Val Ser
20 25 30

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

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

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

210 215 220

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

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

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

Ser Arg Pro Thr Pro Val Val Phe Ser Glu Ser Arg Gly Pro Ala Leu
420 425 430
Thr Arg Leu His Ala Met Ala Arg Asp Pro His Ser Leu Trp Val Gly
435 440 445
Trp Glu Pro Pro Asn Pro Trp Pro Gln Gly Tyr Val Ile Glu Trp Gly
450 455 460

Leu Gly Pro Pro Ser Ala Ser Asn Ser Asn Lys Thr Trp Arg Met Glu
465 470 475 480

Gln Asn Gly Arg Ala Thr Gly Phe Leu Leu Lys Glu Asn Ile Arg Pro
485 490 495
Phe Gln Leu Tyr Glu Ile Ile Val Thr Pro Leu Tyr Gln Asp Thr Met
500 505 510
Gly Pro Ser Gln His Val Tyr Ala Tyr Ser Gln Glu Met Ala Pro Ser
515 520 525
His Ala Pro Glu Leu His Leu Lys His Ile Gly Lys Thr Trp Ala Gln
530 535 540

Leu Glu Trp Val Pro Glu Pro Pro Glu Leu Gly Lys Ser Pro Leu Thr
545 550 555 560
His Tyr Thr Ile Phe Trp Thr Asn Ala Gln Asn Gln Ser Phe Ser Ala
565 570 575
Ile Leu Asn Ala Ser Ser Arg Gly Phe Val Leu His Gly Leu Glu Pro
580 585 590
Ala Ser Leu Tyr His Ile His Leu Met Ala Ala Ser Gln Ala Gly Ala
595 600 605

Thr Asn Ser Thr Val Leu Thr Leu Met Thr Leu Thr Pro Glu Gly Ser
610 615 620
Glu Leu His
625

<210> 7
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> IL-2R beta (TM and ICD)
<400> 7
Ala Ile Val Val Pro Val Cys Leu Ala Phe Leu Leu Thr Thr Leu Leu
1 5 10 15
Gly Val Leu Phe Cys Phe Asn Lys Arg Asp Leu Ile Lys Lys His Ile

20 25 30

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

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

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

Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro Pro Ser Leu Gln Glu Arg Val
225 230 235 240
Pro Arg Asp Trp Asp Pro Gln Pro Leu Gly Pro Pro Thr Pro Gly Val
245 250 255
Pro Asp Leu Val Asp Phe Gln Pro Pro Pro Glu Leu Val Leu Arg Glu
260 265 270

Ala Gly Glu Glu Val Pro Asp Ala Gly Pro Arg Glu Gly Val Ser Phe
275 280 285

Pro Trp Ser Arg Pro Pro Gly Gln Gly Glu Phe Arg Ala Leu Asn Ala
290 295 300
Arg Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu Ser Leu Gln Glu Leu Gln
305 310 315 320
Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val
325

<210> 8
<211> 627
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> G-CSFR (Signal peptide, ECD)
<400> 8
Met Ala Arg Leu Gly Asn Cys Ser Leu Thr Trp Ala Ala Leu Ile Ile

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

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

130 135 140

Glu Pro Gly Pro Glu Thr His Leu Pro Thr Ser Phe Thr Leu Lys Ser

145 150 155 160

Phe Lys Ser Arg Gly Asn Cys Gln Thr Gln Gly Asp Ser Ile Leu Asp

165 170 175

Cys Val Pro Lys Asp Gly Gln Ser His Cys Cys Ile Pro Arg Lys His

180 185 190

Leu Leu Leu Tyr Gln Asn Met Gly Ile Trp Val Gln Ala Glu Asn Ala

195 200 205

Leu Gly Thr Ser Met Ser Pro Gln Leu Cys Leu Asp Pro Met Asp Val

210 215 220

Val Lys Leu Glu Pro Pro Met Leu Arg Thr Met Asp Pro Ser Pro Glu

225 230 235 240

Ala Ala Pro Pro Gln Ala Gly Cys Leu Gln Leu Cys Trp Glu Pro Trp

245 250 255

Gln Pro Gly Leu His Ile Asn Gln Lys Cys Glu Leu Arg His Lys Pro

260 265 270

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

275 280 285

Ala Leu Gln Tyr Glu Leu Cys Gly Leu Leu Pro Ala Thr Ala Tyr Thr

290 295 300

Leu Gln Ile Arg Cys Ile Arg Trp Pro Leu Pro Gly His Trp Ser Asp

305 310 315 320

Trp Ser Pro Ser Leu Glu Leu Arg Thr Thr Glu Arg Ala Pro Thr Val

325 330 335

Arg Leu Asp Thr Trp Trp Arg Gln Arg Gln Leu Asp Pro Arg Thr Val

340 345 350

Gln Leu Phe Trp Lys Pro Val Pro Leu Glu Glu Asp Ser Gly Arg Ile

355 360 365

Gln Gly Tyr Val Val Ser Trp Arg Pro Ser Gly Gln Ala Gly Ala Ile

370 375 380

Leu Pro Leu Cys Asn Thr Thr Glu Leu Ser Cys Thr Phe His Leu Pro

385 390 395 400

Ser Glu Ala Gln Glu Val Ala Leu Val Ala Tyr Asn Ser Ala Gly Thr

405 410 415

Ser Arg Pro Thr Pro Val Val Phe Ser Glu Ser Arg Gly Pro Ala Leu

420 425 430

Thr Arg Leu His Ala Met Ala Arg Asp Pro His Ser Leu Trp Val Gly

435 440 445

Trp Glu Pro Pro Asn Pro Trp Pro Gln Gly Tyr Val Ile Glu Trp Gly

450 455 460

Leu Gly Pro Pro Ser Ala Ser Asn Ser Asn Lys Thr Trp Arg Met Glu

465 470 475 480

Gln Asn Gly Arg Ala Thr Gly Phe Leu Leu Lys Glu Asn Ile Arg Pro

485 490 495

Phe Gln Leu Tyr Glu Ile Ile Val Thr Pro Leu Tyr Gln Asp Thr Met

500 505 510

Gly Pro Ser Gln His Val Tyr Ala Tyr Ser Gln Glu Met Ala Pro Ser

515 520 525

His Ala Pro Glu Leu His Leu Lys His Ile Gly Lys Thr Trp Ala Gln

530 535 540

Leu Glu Trp Val Pro Glu Pro Pro Glu Leu Gly Lys Ser Pro Leu Thr

545 550 555 560

His Tyr Thr Ile Phe Trp Thr Asn Ala Gln Asn Gln Ser Phe Ser Ala

565 570 575

Ile Leu Asn Ala Ser Ser Arg Gly Phe Val Leu His Gly Leu Glu Pro

580 585 590

Ala Ser Leu Tyr His Ile His Leu Met Ala Ala Ser Gln Ala Gly Ala

595 600 605

Thr Asn Ser Thr Val Leu Thr Leu Met Thr Leu Thr Pro Glu Gly Ser

610 615 620

Glu Leu His

625

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2R gamma (TM and ICD)

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Pro Pro Cys Tyr Thr Leu Lys Pro Glu Thr

100 105

<210> 10

<211> 0

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Not Availabe

<400> 10

000

<210> 11

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-CSFR (Signal peptide)

<400> 11

Met Ala Arg Leu Gly Asn Cys Ser Leu Thr Trp Ala Ala Leu Ile Ile
1 5 10 15
Leu Leu Leu Pro Gly Ser Leu Glu
20

<210> 12
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> GM-CSFR-alpha (Signal peptide)
<400> 12
Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15
Ala Phe Leu Leu Ile Pro
20

<210
> 13
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> G-CSFR (Signal peptide, native sequence)
<400> 13
atggcaaggc tgggaaactg cagcctgact tgggctgccc tgatcatcct gctgctcccc 60
ggaagtctgg ag 72
<210> 14
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> GM-CSFR-alpha (Signal peptide, native sequence)
<400> 14
atgctgctgc tagtgacctc cctgctgctc tgtgagctgc ctcacccggc gttcctgctg 60
attcct 66

<210> 15

<211> 603

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-CSFR (ECD)

<400> 15

Glu Cys Gly His Ile Ser Val Ser Ala Pro Ile Val His Leu Gly Asp
1 5 10 15

Pro Ile Thr Ala Ser Cys Ile Ile Lys Gln Asn Cys Ser His Leu Asp
20 25 30

Pro Glu Pro Gln Ile Leu Trp Arg Leu Gly Ala Glu Leu Gln Pro Gly
35 40 45

Gly Arg Gln Gln Arg Leu Ser Asp Gly Thr Gln Glu Ser Ile Ile Thr
50 55 60

Leu Pro His Leu Asn His Thr Gln Ala Phe Leu Ser Cys Cys Leu Asn
65 70 75 80

Trp Gly Asn Ser Leu Gln Ile Leu Asp Gln Val Glu Leu Arg Ala Gly
85 90 95

Tyr Pro Pro Ala Ile Pro His Asn Leu Ser Cys Leu Met Asn Leu Thr
100 105 110

Thr Ser Ser Leu Ile Cys Gln Trp Glu Pro Gly Pro Glu Thr His Leu
115 120 125

Pro Thr Ser Phe Thr Leu Lys Ser Phe Lys Ser Arg Gly Asn Cys Gln
130 135 140

Thr Gln Gly Asp Ser Ile Leu Asp Cys Val Pro Lys Asp Gly Gln Ser
145 150 155 160

His Cys Cys Ile Pro Arg Lys His Leu Leu Leu Tyr Gln Asn Met Gly
165 170 175

Ile Trp Val Gln Ala Glu Asn Ala Leu Gly Thr Ser Met Ser Pro Gln
180 185 190

Leu Cys Leu Asp Pro Met Asp Val Val Lys Leu Glu Pro Pro Met Leu
195 200 205

Arg Thr Met Asp Pro Ser Pro Glu Ala Ala Pro Pro Gln Ala Gly Cys

210 215 220

Leu Gln Leu Cys Trp Glu Pro Trp Gln Pro Gly Leu His Ile Asn Gln

225 230 235 240

Lys Cys Glu Leu Arg His Lys Pro Gln Arg Gly Glu Ala Ser Trp Ala

245 250 255

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

260 265 270

Leu Leu Pro Ala Thr Ala Tyr Thr Leu Gln Ile Arg Cys Ile Arg Trp

275 280 285

Pro Leu Pro Gly His Trp Ser Asp Trp Ser Pro Ser Leu Glu Leu Arg

290 295 300

Thr Thr Glu Arg Ala Pro Thr Val Arg Leu Asp Thr Trp Trp Arg Gln

305 310 315 320

Arg Gln Leu Asp Pro Arg Thr Val Gln Leu Phe Trp Lys Pro Val Pro

325 330 335

Leu Glu Glu Asp Ser Gly Arg Ile Gln Gly Tyr Val Val Ser Trp Arg

340 345 350

Pro Ser Gly Gln Ala Gly Ala Ile Leu Pro Leu Cys Asn Thr Thr Glu

355 360 365

Leu Ser Cys Thr Phe His Leu Pro Ser Glu Ala Gln Glu Val Ala Leu

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Asp Pro His Ser Leu Trp Val Gly Trp Glu Pro Pro Asn Pro Trp Pro

420 425 430

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

435 440 445

Ser Asn Lys Thr Trp Arg Met Glu Gln Asn Gly Arg Ala Thr Gly Phe

450 455 460

Leu Leu Lys Glu Asn Ile Arg Pro Phe Gln Leu Tyr Glu Ile Ile Val
465 470 475 480
Thr Pro Leu Tyr Gln Asp Thr Met Gly Pro Ser Gln His Val Tyr Ala
485 490 495
Tyr Ser Gln Glu Met Ala Pro Ser His Ala Pro Glu Leu His Leu Lys

500 505 510
His Ile Gly Lys Thr Trp Ala Gln Leu Glu Trp Val Pro Glu Pro Pro
515 520 525
Glu Leu Gly Lys Ser Pro Leu Thr His Tyr Thr Ile Phe Trp Thr Asn
530 535 540
Ala Gln Asn Gln Ser Phe Ser Ala Ile Leu Asn Ala Ser Ser Arg Gly
545 550 555 560
Phe Val Leu His Gly Leu Glu Pro Ala Ser Leu Tyr His Ile His Leu

565 570 575
Met Ala Ala Ser Gln Ala Gly Ala Thr Asn Ser Thr Val Leu Thr Leu
580 585 590
Met Thr Leu Thr Pro Glu Gly Ser Glu Leu His
595 600

<210> 16
<211> 1809
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> G-CSFR (ECD, native sequence)
<400> 16

gagtgcgggc acatcagtgt ctcagccccc atcgtccacc tgggggatcc catcacagcc 60
tcctgcatca tcaagcagaa ctgcagccat ctggacccgg agccacagat tctgtggaga 120

ctgggagcag agcttcagcc cgggggcagg cagcagcgtc tgtctgatgg gacccaggaa 180
tctatcatca ccctgcccca cctcaaccac actcaggcct ttctctcctg ctgcctgaac 240
tggggcaaca gcctgcagat cctggaccag gttgagctgc gcgcaggcta ccctccagcc 300
ataccccaca acctctcctg cctcatgaac ctcacaacca gcagcctcat ctgccagtgg 360
gagccaggac ctgagaccca cctacccacc agcttcactc tgaagagttt caagagccgg 420
ggcaactgtc agacccaagg ggactccatc ctggactgcg tgcccaagga cgggcagagc 480

cactgctgca tcccacgcaa acacctgctg ttgtaccaga atatgggcat ctgggtgcag 540

gcagagaatg cgctggggac cagcatgtcc ccacaactgt gtcttgatcc catggatgtt 600
gtgaaactgg agcccccccat gctgcggacc atggacccca gccctgaagc ggcccctccc 660
caggcaggct gcctacagct gtgctgggag ccatggcagc caggcctgca cataaatcag 720
aagtgtgagc tgcgccacaa gccgcagcgt ggagaagcca gctgggcact ggtgggcccc 780
ctccccttgg aggcccttca gtatgagctc tgcgggctcc tcccagccac ggcctacacc 840
ctgcagatac gctgcatccg ctggcccctg cctggccact ggagcgactg gagccccagc 900
ctggagctga gaactaccga acgggcccccc actgtcagac tggacacatg gtggcggcag 960

aggcagctgg accccaggac agtgcagctg ttctggaagc cagtgcccct ggaggaagac 1020
agcggacgga tccaaggtta tgtggtttct tggagaccct caggccaggc tggggccatc 1080
ctgcccctct gcaacaccac agagctcagc tgcaccttcc acctgccttc agaagcccag 1140
gaggtggccc ttgtggccta taactcagcc gggacctctc gtcccactcc ggtggtcttc 1200
tcagaaagca gaggcccagc tctgaccaga ctccatgcca tggcccgaga ccctcacagc 1260
ctctgggtag gctgggagcc ccccaatcca tggcctcagg gctatgtgat tgagtggggc 1320
ctgggccccc ccagcgcgag caatagcaac aagacctgga ggatggaaca gaatgggaga 1380

gccacggggt ttctgctgaa ggagaacatc aggccctttc agctctatga gatcatcgtg 1440
actcccttgt accaggacac catgggaccc tcccagcatg tctatgccta ctctcaagaa 1500
atggctccct cccatgcccc agagctgcat ctaaagcaca ttggcaagac ctgggcacag 1560
ctggagtggg tgcctgagcc ccctgagctg gggaagagcc cccttaccca ctacaccatc 1620
ttctggacca acgctcagaa ccagtccttc tccgccatcc tgaatgcctc ctcccgtggc 1680
tttgtcctcc atggcctgga gcccgccagt ctgtatcaca tccacctcat ggctgccagc 1740
caggctgggg ccaccaacag tacagtcctc accctgatga ccttgacccc agaggggtcg 1800

gagctacac 1809

<210> 17

<211> 1809

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-CSFR (ECD, 4 codons altered)

<400> 17

gagtgcgggc acatcagtgt ctcagccccc atcgtccacc tgggggatcc catcacagcc 60
tcctgcatca tcaagcagaa ctgcagccat ctggacccgg agccacagat tctgtggaga 120

ctgggagcag agcttcagcc cgggggcagg cagcagcgtc tgtctgatgg gacccaggaa 180

tctatcatca ccctgcccca cctcaaccac actcaggcct ttctctcctg ctgcctgaac 240

tggggcaaca gcctgcagat cctggaccag gttgagctgc gcgcaggcta ccctccagcc 300

ataccccaca acctctcctg cctcatgaac ctcacaacca gcagcctcat ctgccagtgg 360

gagccaggac ctgagaccca cctacccacc agcttcactc tgaagagttt caagagccgg 420

ggcaactgtc agacccaagg ggactccatc ctggactgcg tgcccaagga cgggcagagc 480

cactgctgca tcccacgcaa acacctgctg ttgtaccaga atatgggcat ctgggtgcag 540

gcagagaatg cgctggggac cagcatgtcc ccacaactgt gtcttgatcc catggatgtt 600

gtgaaactgg agcccccccat gctgcggacc atggacccca gccctgaagc ggcccctccc 660

caggcaggct gcctacagct gtgctgggag ccatggcagc caggcctgca cataaatcag 720

aagtgtgagc tgcgccacaa gccgcagcgt ggagaagcca gctgggcact ggtgggcccc 780

ctccccttgg aggcccttca gtatgagctc tgcgggctcc tcccagccac ggcctacacc 840

ctgcagatac gctgcatccg ctggcccctg cctggccact ggagcgactg gagccccagc 900

ctggagctga gaactaccga acgggccccc actgtcagac tggacacatg gtggcggcag 960

aggcagctgg accccaggac agtgcagctg ttctggaagc cagtgccccct ggaggaagac 1020

agcggacgca tccaaggtta tgtggtttct tggagaccct caggccaggc tggggccatc 1080

ctgcccctct gcaacaccac agagctcagc tgcaccttcc acctgccttc agaagcccag 1140

gaggtggccc ttgtggccta taactcagcc gggacctctc gccccacccc ggtggtcttc 1200

tcagaaagca gaggcccagc tctgaccaga ctccatgcca tggcccgaga ccctcacagc 1260

ctctgggtag gctgggagcc ccccaatcca tggcctcagg gctatgtgat tgagtggggc 1320

ctgggccccc ccagcgcgag caatagcaac aagacctgga ggatggaaca gaatgggaga 1380

gccacggggt ttctgctgaa ggagaacatc aggccctttc agctctatga gatcatcgtg 1440

actcccttgt accaggacac catgggaccc tcccagcatg tctatgccta ctctcaagaa 1500

atggctccct cccatgcccc agagctgcat ctaaagcaca ttggcaagac ctgggcacag 1560

ctggagtggg tgcctgagcc ccctgagctg gggaagagcc cccttaccca ctacaccatc 1620

ttctggacca acgctcagaa ccagtccttc tccgccatcc tgaatgcatc ctcccgtggc 1680

tttgtcctcc atggcctgga gcccgccagt ctgtatcaca tccacctcat ggctgccagc 1740

caggctgggg ccaccaacag tacagtcctc accctgatga ccttgacccc agaggggtcg 1800

gagctacac 1809

<210> 18

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-CSFR (TM)

<400> 18

Ile Ile Leu Gly Leu Phe Gly Leu Leu Leu Leu Leu Thr Cys Leu Cys

1 5 10 15

Gly Thr Ala Trp Leu Cys Cys

20

<210> 19

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> gp130 (TM)

<400> 19

Ala Ile Val Val Pro Val Cys Leu Ala Phe Leu Leu Thr Thr Leu Leu

1 5 10 15

Gly Val Leu Phe Cys Phe

20

<210> 20

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2Rb (TM)

<400

> 20

Ile Pro Trp Leu Gly His Leu Leu Val Gly Leu Ser Gly Ala Phe Gly

1 5 10 15

Phe Ile Ile Leu Val Tyr Leu Leu Ile

20 25

<210> 21

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2RG (TM)

<400> 21

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

1 5 10 15

Val Tyr Phe Trp Leu

20

<210> 22

<

211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-CSFR (TM)

<400> 22

atcatcctgg gcctgttcgg cctcctgctg ttgctcacct gcctctgtgg aactgcctgg 60

ctctgttgc 69

<210> 23

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gp130 (TM)

<400> 23

gccatagtcg tgcctgtttg cttagcattc ctattgacaa ctcttctggg agtgctgttc 60

tgcttt 66

<210> 24

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2Rb (TM)

<400> 24

attccgtggc tcggccacct cctcgtgggt ctcagcgggg cttttggctt catcatctta 60

gtgtacttgc tgatc 75

<210> 25

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2RG (TM)

<400> 25

gtggttatct ctgttggctc catgggattg attatcagcc ttctctgtgt gtatttctgg 60

ctg 63

<210> 26

<211> 286

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2Rb (ICD, G2R-1)

<400> 26

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

<210> 27

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2RG (ICD, G2R-1)

<400> 27

Glu Arg Thr Met Pro Arg Ile Pro Thr Leu Lys Asn Leu Glu Asp Leu

1 5 10 15

Val Thr Glu Tyr His Gly Asn Phe Ser Ala Trp Ser Gly Val Ser Lys

20 25 30

Gly Leu Ala Glu Ser Leu Gln Pro Asp Tyr Ser Glu Arg Leu Cys Leu

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Thr Leu Lys Pro Glu Thr

85

<210> 28

<211> 101

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> gp130 (ICD, G2R-2)

<400> 28

Asn Lys Arg Asp Leu Ile Lys Lys His Ile Trp Pro Asn Val Pro Asp
1 5 10 15

Pro Ser Lys Ser His Ile Ala Gln Trp Ser Pro His Thr Pro Pro Arg
20 25 30

His Asn Phe Asn Ser Lys Asp Gln Met Tyr Ser Asp Gly Asn Phe Thr
35 40 45

Asp Val Ser Val Val Glu Ile Glu Ala Asn Asp Lys Lys Pro Phe Pro
50 55 60

Glu Asp Leu Lys Ser Leu Asp Leu Phe Lys Lys Glu Lys Ile Asn Thr
65 70 75 80

Glu Gly His Ser Ser Gly Ile Gly Gly Ser Ser Cys Met Ser Ser Ser
85 90 95

Arg Pro Ser Ile Ser
100

<210> 29

<211> 205

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> IL-2Rb (ICD, G2R-2)

<400> 29

Ala Ser Leu Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln
1 5 10 15

Gly Tyr Phe Phe Phe His Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala Cys
20 25 30

Gln Val Tyr Phe Thr Tyr Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro Asp Glu
35 40 45

Gly Val Ala Gly Ala Pro Thr Gly Ser Ser Pro Gln Pro Leu Gln Pro
50 55 60

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

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

Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val
195 200 205
<210> 30
<211> 62
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> G-CSFR (ICD, G2R-3)
<400> 30
Ser Pro Asn Arg Lys Asn Pro Leu Trp Pro Ser Val Pro Asp Pro Ala
1 5 10 15
His Ser Ser Leu Gly Ser Trp Val Pro Thr Ile Met Glu Glu Asp Ala
20 25 30
Phe Gln Leu Pro Gly Leu Gly Thr Pro Pro Ile Thr Lys Leu Thr Val

35 40 45

Leu Glu Glu Asp Glu Lys Lys Pro Val Pro Trp Glu Ser His

50 55 60

<210> 31

<211> 202

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2Rb (ICD, G2R-3)

<400> 31

Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln Gly Tyr Phe

1 5 10 15

Phe Phe His Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala Cys Gln Val Tyr

20 25 30

Phe Thr Tyr Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro Asp Glu Gly Val Ala

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Phe Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ser Thr Ala Pro

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Ser Phe Pro Trp Ser Arg Pro Pro Gly Gln Gly Glu Phe Arg Ala Leu

165 170 175

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

180 185 190

Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val

195 200

<210> 32

<211> 67

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-CSFR (ICD, G12R-1)

<400> 32

Ser Pro Asn Arg Lys Asn Pro Leu Trp Pro Ser Val Pro Asp Pro Ala

1 5 10 15

His Ser Ser Leu Gly Ser Trp Val Pro Thr Ile Met Glu Glu Asp Ala

20 25 30

Phe Gln Leu Pro Gly Leu Gly Thr Pro Pro Ile Thr Lys Leu Thr Val

35 40 45

Leu Glu Glu Asp Glu Lys Lys Pro Val Pro Trp Glu Ser His Asn Ser

50 55 60

Ser Glu Thr

65

<210> 33

<211> 72

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-12Rb2 (ICD, G12R-1)

<400> 33

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

1 5 10 15

Asp Leu Pro Ser His Glu Ala Pro Leu Ala Asp Ser Leu Glu Glu Leu

20 25 30

Glu Pro Gln His Ile Ser Leu Ser Val Phe Pro Ser Ser Ser Leu His

35 40 45

Pro Leu Thr Phe Ser Cys Gly Asp Lys Leu Thr Leu Asp Gln Leu Lys

50 55 60

Met Arg Cys Asp Ser Leu Met Leu

65 70

<210> 34

<211> 67

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-CSFR (ICD, G21R-1)

<400> 34

Ser Pro Asn Arg Lys Asn Pro Leu Trp Pro Ser Val Pro Asp Pro Ala

1 5 10 15

His Ser Ser Leu Gly Ser Trp Val Pro Thr Ile Met Glu Glu Asp Ala

20 25 30

Phe Gln Leu Pro Gly Leu Gly Thr Pro Pro Ile Thr Lys Leu Thr Val

35 40 45

Leu Glu Glu Asp Glu Lys Lys Pro Val Pro Trp Glu Ser His Asn Ser

50 55 60

Ser Glu Thr

65

<210> 35

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-21R (ICD, G21R-1)

<400> 35

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

1 5 10 15

Val Ile Pro Pro Pro Leu Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala

20 25

<210> 36

<211> 63

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-CSFR (ICD, G21R-2)

<400> 36

Ser Pro Asn Arg Lys Asn Pro Leu Trp Pro Ser Val Pro Asp Pro Ala
1 5 10 15

His Ser Ser Leu Gly Ser Trp Val Pro Thr Ile Met Glu Glu Asp Ala
20 25 30

Phe Gln Leu Pro Gly Leu Gly Thr Pro Pro Ile Thr Lys Leu Thr Val
35 40 45

Leu Glu Glu Asp Glu Lys Lys Pro Val Pro Trp Glu Ser His Asn
50 55 60

<210> 37

<211> 183

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-21R (ICD, G21R-2)

<400> 37

Gln Asn Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Ser Glu Glu Arg Asp Arg Pro Tyr
1 5 10 15

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

Cys Thr Trp Pro Cys Ser Cys Glu Asp Asp Gly Tyr Pro Ala Leu Asp
35 40 45

Leu Asp Ala Gly Leu Glu Pro Ser Pro Gly Leu Glu Asp Pro Leu Leu
50 55 60

Asp Ala Gly Thr Thr Val Leu Ser Cys Gly Cys Val Ser Ala Gly Ser
65 70 75 80

Pro Gly Leu Gly Gly Pro Leu Gly Ser Leu Leu Asp Arg Leu Lys Pro
85 90 95

Pro Leu Ala Asp Gly Glu Asp Trp Ala Gly Gly Leu Pro Trp Gly Gly
100 105 110

Arg Ser Pro Gly Gly Val Ser Glu Ser Glu Ala Gly Ser Pro Leu Ala
115 120 125

Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp Ser Gly Phe Val Gly Ser Asp Cys
130 135 140
Ser Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe Thr Ser Pro Gly Asp Glu Gly Pro
145 150 155 160

Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val Val Ile Pro Pro Pro Leu Ser
165 170 175
Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser
180

<210> 38
<211> 93
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> G-CSFR (ICD, G21/2R-1)
<400> 38
Ser Pro Asn Arg Lys Asn Pro Leu Trp Pro Ser Val Pro Asp Pro Ala
1 5 10 15
His Ser Ser Leu Gly Ser Trp Val Pro Thr Ile Met Glu Glu Asp Ala
20 25 30

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

<210>
39
<211> 202
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> IL-2Rb (ICD, G21/2R-1)
<400> 39

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

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

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

180 185 190
Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val
195 200
<210> 40
<211> 62
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> G-CSFR (ICD, G12/2R-1)
<400> 40

Ser Pro Asn Arg Lys Asn Pro Leu Trp Pro Ser Val Pro Asp Pro Ala
1 5 10 15
His Ser Ser Leu Gly Ser Trp Val Pro Thr Ile Met Glu Glu Asp Ala
20 25 30

Phe Gln Leu Pro Gly Leu Gly Thr Pro Pro Ile Thr Lys Leu Thr Val
35 40 45
Leu Glu Glu Asp Glu Lys Lys Pro Val Pro Trp Glu Ser His
50 55 60

<210> 41
<211> 43
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> IL-2Rb (ICD, G12/2R-1)
<400> 41
Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln Gly Tyr Phe
1 5 10 15
Phe Phe His Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala Cys Gln Val Tyr

20 25 30
Phe Thr Tyr Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro
35 40

<210> 42
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> IL-12Rb2 (ICD, G12/2R-1)
<400> 42
Ala Gly Asp Leu Pro Thr His Asp Gly Tyr Leu Pro Ser Asn Ile Asp
1 5 10 15
Asp Leu Pro Ser
20

<210> 43
<211> 116
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2Rb (ICD, G12/2R-1)

<400> 43

Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ser Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly
1 5 10 15

Glu Glu Arg Met Pro Pro Ser Leu Gln Glu Arg Val Pro Arg Asp Trp
20 25 30

Asp Pro Gln Pro Leu Gly Pro Pro Thr Pro Gly Val Pro Asp Leu Val
35 40 45

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

50 55 60

Val Pro Asp Ala Gly Pro Arg Glu Gly Val Ser Phe Pro Trp Ser Arg
65 70 75 80

Pro Pro Gly Gln Gly Glu Phe Arg Ala Leu Asn Ala Arg Leu Pro Leu
85 90 95

Asn Thr Asp Ala Tyr Leu Ser Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro
100 105 110

Thr His Leu Val
115

<210> 44

<211> 93

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-CSFR (ICD, G21/12/2R-1)

<400> 44

Ser Pro Asn Arg Lys Asn Pro Leu Trp Pro Ser Val Pro Asp Pro Ala
1 5 10 15

His Ser Ser Leu Gly Ser Trp Val Pro Thr Ile Met Glu Glu Asp Ala
20 25 30

Phe Gln Leu Pro Gly Leu Gly Thr Pro Pro Ile Thr Lys Leu Thr Val
35 40 45

Leu Glu Glu Asp Glu Lys Lys Pro Val Pro Trp Glu Ser His Asn Ser

50 55 60

Ser Glu Thr Cys Gly Leu Pro Thr Leu Val Gln Thr Tyr Val Leu Gln

65 70 75 80

Gly Asp Pro Arg Ala Val Ser Thr Gln Pro Gln Ser Gln

85 90

<210> 45

<211> 43

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2Rb (ICD, G21/12/2R-1)

<400> 45

Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln Gly Tyr Phe

1 5 10 15

Phe Phe His Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala Cys Gln Val Tyr

20 25 30

Phe Thr Tyr Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro

35 40

<210> 46

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-12Rb2 (ICD, G21/12/2R-1)

<400> 46

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

1 5 10 15

Asp Leu Pro Ser

20

<210> 47

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2Rb (ICD, G21/12/2R-1)

<400> 47

Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ser Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly
1 5 10 15

Glu Glu Arg Met Pro Pro Ser Leu Gln Glu Arg Val Pro Arg Asp Trp
20 25 30

Asp Pro Gln Pro Leu Gly Pro Pro Thr Pro Gly Val Pro Asp Leu Val
35 40 45

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

Val Pro Asp Ala Gly Pro Arg Glu Gly Val Ser Phe Pro Trp Ser Arg
65 70 75 80

Pro Pro Gly Gln Gly Glu Phe Arg Ala Leu Asn Ala Arg Leu Pro Leu
85 90 95

Asn Thr Asp Ala Tyr Leu Ser Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro
100 105 110

Thr His Leu Val
115

<210> 48

<211> 138

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> gp130 (ICD, G27/2R-1)

<400> 48

Asn Lys Arg Asp Leu Ile Lys Lys His Ile Trp Pro Asn Val Pro Asp
1 5 10 15

Pro Ser Lys Ser His Ile Ala Gln Trp Ser Pro His Thr Pro Pro Arg
20 25 30

His Asn Phe Asn Ser Lys Asp Gln Met Tyr Ser Asp Gly Asn Phe Thr
35 40 45

Asp Val Ser Val Val Glu Ile Glu Ala Asn Asp Lys Lys Pro Phe Pro
50 55 60

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

Ser Ser Thr Val Gln Tyr Ser Thr Val Val His Ser Gly Tyr Arg His
115 120 125
Gln Val Pro Ser Val Gln Val Phe Ser Arg
130 135

<210> 49
<211> 204
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> IL-2Rb (ICD, G27/2R-1)
<400> 49
Ala Ser Leu Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln
1 5 10 15
Gly Tyr Phe Phe Phe His Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala Cys

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

85 90 95
Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro Pro Ser
100 105 110
Leu Gln Glu Arg Val Pro Arg Asp Trp Asp Pro Gln Pro Leu Gly Pro
115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200

<210> 50

<211> 62

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-CSFR (ICD, G7R-1)

<400> 50

Ser Pro Asn Arg Lys Asn Pro Leu Trp Pro Ser Val Pro Asp Pro Ala

1 5 10 15

His Ser Ser Leu Gly Ser Trp Val Pro Thr Ile Met Glu Glu Asp Ala

20 25 30

Phe Gln Leu Pro Gly Leu Gly Thr Pro Pro Ile Thr Lys Leu Thr Val

35 40 45

Leu Glu Glu Asp Glu Lys Lys Pro Val Pro Trp Glu Ser His

50 55 60

<210> 51

<211> 67

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-7Ra (ICD, G7R-1)

<400> 51

Ser Gly Lys Asn Gly Pro His Val Tyr Gln Asp Leu Leu Leu Ser Leu

1 5 10 15

Gly Thr Thr Asn Ser Thr Leu Pro Pro Pro Phe Ser Leu Gln Ser Gly

20 25 30

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

35 40 45

Leu Gly Ser Asn Gln Glu Glu Ala Tyr Val Thr Met Ser Ser Phe Tyr

50 55 60

Gln Asn Gln

65

<210> 52

<211> 93

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-CSFR (ICD, G21/7R-1)

<400> 52

Ser Pro Asn Arg Lys Asn Pro Leu Trp Pro Ser Val Pro Asp Pro Ala

1 5 10 15

His Ser Ser Leu Gly Ser Trp Val Pro Thr Ile Met Glu Glu Asp Ala

20 25 30

Phe Gln Leu Pro Gly Leu Gly Thr Pro Pro Ile Thr Lys Leu Thr Val

35 40 45

Leu Glu Glu Asp Glu Lys Lys Pro Val Pro Trp Glu Ser His Asn Ser

50 55 60

Ser Glu Thr Cys Gly Leu Pro Thr Leu Val Gln Thr Tyr Val Leu Gln

65 70 75 80

Gly Asp Pro Arg Ala Val Ser Thr Gln Pro Gln Ser Gln

85 90

<210> 53

<211> 77

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IL7R (ICD, G21/7R-1)

<400> 53

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

Glu Ala Tyr Val Thr Met Ser Ser Phe Tyr Gln Asn Gln
65 70 75

<210> 54

<211> 861

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2RB (ICD, G2R-1)

<400> 54

aactgcagga acaccgggcc atggctgaag aaggtcctga agtgtaacac cccagacccc 60

tcgaagttct tttcccagct gagctcagag catggaggag acgtccagaa gtggctctct 120

tcgcccttcc cctcatcgtc cttcagccct ggcggcctgg cacctgagat ctcgccacta 180

gaagtgctgg agagggacaa ggtgacgcag ctgctcctgc agcaggacaa ggtgcctgag 240

cccgcatcct taagcagcaa ccactcgctg accagctgct tcaccaacca gggttacttc 300

ttcttccacc tcccggatgc cttggagata gaggcctgcc aggtgtactt tacttacgac 360

ccctactcag aggaagaccc tgatgagggt gtggccgggg cacccacagg gtcttccccc 420

caacccctgc agcctctgtc aggggaggac gacgcctact gcaccttccc ctccagggat 480

gacctgctgc tcttctcccc cagtctcctc ggtggcccca gccccccaag cactgccccc 540

gggggcagtg gggccggtga agagaggatg ccccccttctt tgcaagaaag agtccccaga 600

gactgggacc cccagcccct ggggcctccc accccaggag tcccagacct ggtggatttt 660

cagccacccc ctgagctggt gctgcgagag gctggggagg aggtccctga cgctggcccc 720

agggagggag tcagtttccc ctggtccagg cctcctgggc agggggagtt cagggccctt 780

aatgctcgcc tgcccctgaa cactgatgcc tacttgtccc tccaagaact ccagggtcag 840

gacccaactc acttggtgta g 861

<210> 55

<211> 261

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2RG (ICD, G2R-1)

<400> 55

Gly Ala Ala Cys Gly Gly Ala Cys Gly Ala Thr Gly Cys Cys Cys Cys
1 5 10 15

Gly Ala Ala Thr Thr Cys Cys Cys Ala Cys Cys Cys Thr Gly Ala Ala
20 25 30

Gly Ala Ala Cys Cys Thr Ala Gly Ala Gly Gly Ala Thr Cys Thr Thr
35 40 45

Gly Thr Thr Ala Cys Thr Gly Ala Ala Thr Ala Cys Cys Ala Cys Gly
50 55 60

Gly Gly Ala Ala Cys Thr Thr Thr Thr Cys Gly Gly Cys Cys Thr Gly
65 70 75 80

Gly Ala Gly Thr Gly Gly Thr Gly Thr Gly Thr Cys Thr Ala Ala Gly
85 90 95

Gly Gly Ala Cys Thr Gly Gly Cys Thr Gly Ala Gly Ala Gly Thr Cys
100 105 110

Thr Gly Cys Ala Gly Cys Cys Ala Gly Ala Cys Thr Ala Cys Ala Gly
115 120 125

Thr Gly Ala Ala Cys Gly Ala Cys Thr Cys Thr Gly Cys Cys Thr Cys
130 135 140

Gly Thr Cys Ala Gly Thr Gly Ala Gly Ala Thr Thr Cys Cys Cys Cys
145 150 155 160

Cys Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Cys Cys Cys Thr
165 170 175

Thr Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Cys Cys Thr Gly Gly Gly
180 185 190

Gly Cys Cys Thr Cys Cys Cys Cys Ala Thr Gly Cys Ala Ala Cys Cys
195 200 205

Ala Gly Cys Ala Thr Ala Gly Cys Cys Cys Cys Thr Ala Cys Thr Gly
210 215 220
Gly Gly Cys Cys Cys Cys Cys Cys Cys Ala Thr Gly Thr Thr Ala Cys
225 230 235 240
Ala Cys Cys Cys Thr Ala Ala Ala Gly Cys Cys Thr Gly Ala Ala Ala
245 250 255
Cys Cys Thr Gly Ala
260

<210> 56
<211> 303
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220
><223> gp130 (ICD, G2R-2)
<400> 56
aataagcgag acctaattaa aaaacacatc tggcctaatg ttccagatcc ttcaaagagt 60
catattgccc agtggtcacc tcacactcct ccaaggcaca attttaattc aaaagatcaa 120
atgtattcag atggcaattt cactgatgta agtgttgtgg aaatagaagc aaatgacaaa 180
aagccttttc cagaagatct gaaatcattg gacctgttca aaaaggaaaa aattaatact 240
gaaggacaca gcagtggtat tgggggtct tcatgtatgt catcttctag gccaagcatt 300
tct 303
<210> 57

<211> 618
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> IL-2Rb (ICD, G2R-2)
<400> 57
gcatccttaa gcagcaacca ctcgctgacc agctgcttca ccaaccaggg ttacttcttc 60
ttccacctcc cggatgcctt ggagatagag gcctgccagg tgtactttac ttacgacccc 120
tactcagagg aagaccctga tgagggtgtg gccggggcac ccacagggtc ttcccccaa 180
cccctgcagc ctctgtcagg ggaggacgac gcctactgca ccttcccctc cagggatgac 240
ctgctgctct tctcccccag tctcctcggt ggccccagcc ccccaagcac tgcccctggg 300
ggcagtgggg ccggtgaaga gaggatgccc ccttctttgc aagaaagagt ccccagagac 360

tgggaccccc agcccctggg gcctcccacc ccaggagtcc cagacctggt ggattttcag 420

ccacccccctg agctggtgct gcgagaggct ggggaggagg tccctgacgc tggccccagg 480

gagggagtca gtttcccctg gtccaggcct cctgggcagg gggagttcag ggcccttaat 540

gctcgcctgc ccctgaacac tgatgcctac ttgtccctcc aagaactcca gggtcaggac 600

ccaactcact tggtgtag 618

<210> 58

<211> 186

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-CSFR (ICD, G2R-3)

<400> 58

agccccaaca ggaagaatcc cctctggcca agtgtcccag acccagctca cagcagcctg 60

ggctcctggg tgcccacaat catggaggag gatgccttcc agctgcccgg ccttggcacg 120

ccacccatca ccaagctcac agtgctggag gaggatgaaa agaagccggt gccctgggag 180

tcccat 186

<210> 59

<211> 609

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2Rb (ICD, G2R-3)

<400> 59

agcagcaacc actcgctgac cagctgcttc accaaccagg gttacttctt cttccacctc 60

ccggatgcct tggagataga ggcctgccag gtgtacttta cttacgaccc ctactcagag 120

gaagaccctg atgagggtgt ggccggggca cccacagggt cttcccccca acccctgcag 180

cctctgtcag gggaggacga cgcctactgc accttcccct ccagggatga cctgctgctc 240

ttctccccca gtctcctcgg tggccccagc cccccaagca ctgcccctgg gggcagtggg 300

gccggtgaag agaggatgcc cccttctttg caagaaagag tccccagaga ctgggacccc 360

cagcccctgg ggcctcccac cccaggagtc ccagacctgg tggattttca gccacccccct 420

gagctggtgc tgcgagaggc tggggaggag gtccctgacg ctggccccag ggagggagtc 480

agtttcccct ggtccaggcc tcctgggcag ggggagttca gggcccttaa tgctcgcctg 540

cccctgaaca ctgatgccta cttgtccctc caagaactcc agggtcagga cccaactcac 600

ttggtgtag 609

<210> 60

<211> 201

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-CSFR (ICD, G12R-1)

<400> 60

agccccaaca ggaagaatcc cctctggcca agtgtcccag acccagctca cagcagcctg 60

ggctcctggg tgcccacaat catggaggag gatgccttcc agctgcccgg ccttggcacg 120

ccacccatca ccaagctcac agtgctggag gaggatgaaa agaagccggt gccctgggag 180

tcccataaca gctcagagac c 201

<210> 61

<211

> 219

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-12Rb2 (ICD, G12R-1)

<400> 61

gcaggtgacc ttcccaccca tgatggctac ttaccctcca acatagatga cctcccctca 60

catgaggcac ctctcgctga ctctctggaa gaactggagc ctcagcacat ctccctttct 120

gttttcccct caagttctct tcacccactc accttctcct gtggtgataa gctgactctg 180

gatcagttaa agatgaggtg tgactccctc atgctctga 219

<210> 62

<211> 201

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-CSFR (ICD, G21R-1)

<400

> 62

agccccaaca ggaagaatcc cctctggcca agtgtcccag acccagctca cagcagcctg 60

ggctcctggg tgcccacaat catggaggag gatgccttcc agctgcccgg ccttggcacg 120

ccacccatca ccaagctcac agtgctggag gaggatgaaa agaagccggt gccctgggag 180

tcccataaca gctcagagac c 201

<210> 63

<211> 93

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-21R (ICD, G21R-1)

<400> 63

agccctgggg acgaaggacc cccccggagc tacctccgcc agtgggtggt cattcctccg 60

ccactttcga gccctggacc ccaggccagc taa 93

<210> 64

<211> 189

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-CSFR (ICD, G21R-2)

<400> 64

agccccaaca ggaagaatcc cctctggcca agtgtcccag acccagctca cagcagcctg 60

ggctcctggg tgcccacaat catggaggag gatgccttcc agctgcccgg ccttggcacg 120

ccacccatca ccaagctcac agtgctggag gaggatgaaa agaagccggt gccctgggag 180

tcccataac 189

<210> 65

<211> 549

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-21R (ICD, G21R-2)

<400> 65

cagaactcgg ggggctcagc ttacagtgag gagagggatc ggccatacgg cctggtgtcc 60

attgacacag tgactgtgct agatgcagag gggccatgca cctggccctg cagctgtgag 120

gatgacggct acccagccct ggacctggat gctggcctgg agcccagccc aggcctagag 180

gacccactct tggatgcagg gaccacagtc ctgtcctgtg gctgtgtctc agctggcagc 240

cctgggctag gagggcccct gggaagcctc ctggacagac taaagccacc ccttgcagat 300

ggggaggact gggctggggg actgccctgg ggtggccggt cacctggagg ggtctcagag 360

agtgaggcgg gctcacccct ggccggcctg gatatggaca cgtttgacag tggctttgtg 420

ggctctgact gcagcagccc tgtggagtgt gacttcacca gccctgggga cgaaggaccc 480

ccccggagct acctccgcca gtgggtggtc attcctccgc cactttcgag ccctggaccc 540

caggccagc 549

<210> 66

<211> 279

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-CSFR (ICD, G21/2R-1)

<400> 66

agccccaaca ggaagaatcc cctctggcca agtgtcccag acccagctca cagcagcctg 60

ggctcctggg tgcccacaat catggaggag gatgccttcc agctgcccgg ccttggcacg 120

ccacccatca ccaagctcac agtgctggag gaggatgaaa agaagccggt gccctgggag 180

tcccataaca gctcagagac ctgtggcctc cccactctgg tccagaccta tgtgctccag 240

ggggacccaa gagcagtttc cacccagccc caatcccag 279

<210> 67

<211> 609

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2Rb (ICD, G21/2R-1)

<400> 67

agcagcaacc actcgctgac cagctgcttc accaaccagg gttacttctt cttccacctc 60

ccggatgcct tggagataga ggcctgccag gtgtacttta cttacgaccc ctactcagag 120

gaagaccctg atgagggtgt ggccggggca cccacagggt cttcccccca acccctgcag 180

cctctgtcag gggaggacga cgcctactgc accttcccct ccagggatga cctgctgctc 240

ttctccccca gtctcctcgg tggccccagc cccccaagca ctgcccctgg gggcagtggg 300

gccggtgaag agaggatgcc cccttctttg caagaaagag tccccagaga ctgggacccc 360

cagcccctgg ggcctcccac cccaggagtc ccagacctgg tggattttca gccacccccc 420

gagctggtgc tgcgagaggc tggggaggag gtccctgacg ctggccccag ggagggagtc 480

agtttcccct ggtccaggcc tcctgggcag ggggagttca gggcccttaa tgctcgcctg 540

cccctgaaca ctgatgccta cttgtccctc caagaactcc agggtcagga cccaactcac 600

ttggtgtag 609

<210> 68

<211> 186

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-CSFR (ICD, G12/2R-1)

<400> 68

agccccaaca ggaagaatcc cctctggcca agtgtcccag acccagctca cagcagcctg 60

ggctcctggg tgcccacaat catggaggag gatgccttcc agctgcccgg ccttggcacg 120

ccacccatca ccaagctcac agtgctggag gaggatgaaa agaagccggt gccctgggag 180

tcccat 186

<210> 69

<211> 129

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2Rb (ICD, G12/2R-1)

<400> 69

agcagcaacc actcgctgac cagctgcttc accaaccagg gttacttctt cttccacctc 60

ccggatgcct tggagataga ggcctgccag gtgtacttta cttacgaccc ctactcagag 120

gaagaccct 129

<210> 70

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-12Rb2 (ICD, G12/2R-1)

<400> 70

gcaggtgacc ttcccaccca tgatggctac ttaccctcca acatagatga cctcccctca 60

<210> 71

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> IL-2Rb (ICD, G12/2R-1)

<400> 71

ggtggcccca gccccccaag cactgcccct gggggcagtg gggccggtga agagaggatg 60

ccccccttctt tgcaagaaag agtccccaga gactgggacc cccagcccct ggggcctccc 120

accccaggag tcccagacct ggtggatttt cagccacccc ctgagctggt gctgcgagag 180

gctggggagg aggtccctga cgctggcccc agggagggag tcagtttccc ctggtccagg 240

cctcctgggc agggggagtt cagggccctt aatgctcgcc tgcccctgaa cactgatgcc 300

tacttgtccc tccaagaact ccagggtcag gacccaactc acttggtgta g 351

<210> 72

<211> 279

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-CSFR (ICD, G21/12/2R-1)

<400> 72

agccccaaca ggaagaatcc cctctggcca agtgtcccag acccagctca cagcagcctg 60

ggctcctggg tgcccacaat catggaggag gatgccttcc agctgcccgg ccttggcacg 120

ccacccatca ccaagctcac agtgctggag gaggatgaaa agaagccggt gccctgggag 180

tcccataaca gctcagagac ctgtggcctc cccactctgg tccagaccta tgtgctccag 240

ggggacccaa gagcagtttc cacccagccc caatcccag 279

<210> 73

<211> 129

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2Rb (ICD, G21/12/2R-1)

<400> 73

agcagcaacc actcgctgac cagctgcttc accaaccagg gttacttctt cttccacctc 60

ccggatgcct tggagataga ggcctgccag gtgtacttta cttacgaccc ctactcagag 120

gaagaccct 129

<210> 74

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-12Rb2 (ICD, G21/12/2R-1)

<400> 74

gcaggtgacc ttcccaccca tgatggctac ttaccctcca acatagatga cctcccctca 60

<210> 75

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2Rb (ICD, G21/12/2R-1)

<400> 75

ggtggcccca gccccccaag cactgcccct gggggcagtg gggccggtga agagaggatg 60

cccccttctt tgcaagaaag agtccccaga gactgggacc cccagcccct ggggcctccc 120

accccaggag tcccagacct ggtggatttt cagccacccc ctgagctggt gctgcgagag 180

gctggggagg aggtccctga cgctggcccc agggagggag tcagtttccc ctggtccagg 240

cctcctgggc agggggagtt cagggccctt aatgctcgcc tgcccctgaa cactgatgcc 300

tacttgtccc tccaagaact ccagggtcag gacccaactc acttggtgta g 351

<210> 76

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> gp130 (ICD, G27/2R-1)

<400> 76

aataagcgag acctaattaa aaaacacatc tggcctaatg ttccagatcc ttcaaagagt 60

catattgccc agtggtcacc tcacactcct ccaaggcaca atttcaattc aaaggatcaa 120

atgtattcag atggcaattt cactgatgta agtgttgtgg aaatagaagc aaatgacaaa 180

aagccttttc cagaagatct gaaatcattg gacctgttca aaaaggaaaa aattaatact 240

gaaggacaca gcagtggtat tgggggggtct tcatgtatgt catcttctag gccaagcatt 300

tctagcagtg atgaaaatga atcttcacaa aacacttcga gcactgtcca gtattctacc 360

gtggtacaca gtggctacag acaccaagtt ccgtcagtcc aagtcttctc aaga 414

<210> 77

<211> 618

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2Rb (ICD, G27/2R-1)

<400> 77

gcatccttaa gcagcaacca ctcgctgacc agctgcttca ccaaccaggg ttacttcttc 60

ttccacctcc cggatgcctt ggagatagag gcctgccagg tgtactttac ttacgacccc 120

tactcagagg aagaccctga tgagggtgtg gccggggcac ccacagggtc ttccccccaa 180

cccctgcagc ctctgtcagg ggaggacgac gcctactgca ccttcccctc cagggatgac 240

ctgctgctct tctcccccag tctcctcggt ggccccagcc ccccaagcac tgcccctggg 300

ggcagtgggg ccggtgaaga gaggatgccc ccttctttgc aagaaagagt ccccagagac 360

tgggaccccc agcccctggg gcctcccacc ccaggagtcc cagacctggt ggattttcag 420

ccacccccctg agctggtgct gcgagaggct ggggaggagg tccctgacgc tggccccagg 480

gagggagtca gtttcccctg gtccaggcct cctgggcagg gggagttcag ggcccttaat 540

gctcgcctgc ccctgaacac tgatgcctac ttgtccctcc aagaactcca gggtcaggac 600

ccaactcact tggtgtag 618

<210> 78

<211> 186

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-CSFR (ICD, G7R-1)

<400> 78

agccccaaca ggaagaatcc cctctggcca agtgtcccag acccagctca cagcagcctg 60

ggctcctggg tgcccacaat catggaggag gatgccttcc agctgcccgg ccttggcacg 120

ccacccatca ccaagctcac agtgctggag gaggatgaaa agaagccggt gccctgggag 180

tcccat 186

<210> 79

<211> 204

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-7Ra (ICD, G7R-1)

<400> 79

agtggcaaga atgggcctca tgtgtaccag gacctcctgc ttagccttgg gactacaaac 60

agcacgctgc cccctccatt ttctctccaa tctggaatcc tgacattgaa cccagttgct 120

cagggtcagc ccattcttac ttccctggga tcaaatcaag aagaagcata tgtcaccatg 180

tccagcttct accaaaaacca gtga 204

<210> 80

<211> 279

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-CSFR (ICD, G21/7R-1)

<400> 80

agccccaaca ggaagaatcc cctctggcca agtgtcccag acccagctca cagcagcctg 60

ggctcctggg tgcccacaat catggaggag gatgccttcc agctgcccgg ccttggcacg 120

ccacccatca ccaagctcac agtgctggag gaggatgaaa agaagccggt gccctgggag 180

tcccataaca gctcagagac ctgtggcctc cccactctgg tccagaccta tgtgctccag 240

ggggacccaa gagcagtttc cacccagccc caatcccag 279

<210> 81

<211> 234

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL7R (ICD, G21/7R-1)

<400> 81

tcctcttcca ggtccctaga ctgcagggag agtggcaaga atgggcctca tgtgtaccag 60

gacctcctgc ttagccttgg gactacaaac agcacgctgc cccctccatt ttctctccaa 120

tctggaatcc tgacattgaa cccagttgct cagggtcagc ccattcttac ttccctggga 180

tcaaatcaag aagaagcata tgtcaccatg tccagcttct accaaaacca gtga 234

<210> 82

<211> 175

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> WT G-CSF

<400> 82

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu
1 5 10 15

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu
20 25 30

Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu
35 40 45

Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser
50 55 60

Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His
65 70 75 80

Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile
85 90 95

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

100 105 110

Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala

115 120 125

Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala

130 135 140

Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser

145 150 155 160

Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro

165 170 175

<210> 83

<211> 175

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 130a1 variant with mutation

<400> 83

Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu

1 5 10 15

Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu

20 25 30

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

35 40 45

Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser

50 55 60

Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His

65 70 75 80

Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile

85 90 95

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

100 105 110

Arg Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Lys Glu Leu Gly Met Ala

115 120 125

Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala
130 135 140
Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser
145 150 155 160
Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
165 170 175

<210> 84
<211> 175
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> 307 variant with mutation
<400> 84
Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Glu Phe Leu Leu
1 5 10 15
Asp Cys Leu Lys Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu
20 25 30
Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Arg Leu
35 40 45
Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser

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

115 120 125
Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala
130 135 140
Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser
145 150 155 160

Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
165 170 175

<210> 85

<211> 307

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> WT G-CSFR

<400> 85

Glu Cys Gly His Ile Ser Val Ser Ala Pro Ile Val His Leu Gly Asp
1 5 10 15

Pro Ile Thr Ala Ser Cys Ile Ile Lys Gln Asn Cys Ser His Leu Asp
20 25 30

Pro Glu Pro Gln Ile Leu Trp Arg Leu Gly Ala Glu Leu Gln Pro Gly
35 40 45

Gly Arg Gln Gln Arg Leu Ser Asp Gly Thr Gln Glu Ser Ile Ile Thr
50 55 60

Leu Pro His Leu Asn His Thr Gln Ala Phe Leu Ser Cys Ser Leu Asn
65 70 75 80

Trp Gly Asn Ser Leu Gln Ile Leu Asp Gln Val Glu Leu Arg Ala Gly
85 90 95

Tyr Pro Pro Ala Ile Pro His Asn Leu Ser Cys Leu Met Asn Leu Thr
100 105 110

Thr Ser Ser Leu Ile Cys Gln Trp Glu Pro Gly Pro Glu Thr His Leu
115 120 125

Pro Thr Ser Phe Thr Leu Lys Ser Phe Lys Ser Arg Gly Asn Cys Gln
130 135 140

Thr Gln Gly Asp Ser Ile Leu Asp Cys Val Pro Lys Asp Gly Gln Ser
145 150 155 160

His Cys Ser Ile Pro Arg Lys His Leu Leu Leu Tyr Gln Asn Met Gly
165 170 175

Ile Trp Val Gln Ala Glu Asn Ala Leu Gly Thr Ser Met Ser Pro Gln

180 185 190

Leu Cys Leu Asp Pro Met Asp Val Val Lys Leu Glu Pro Pro Met Leu
195 200 205

Arg Thr Met Asp Pro Ser Pro Glu Ala Ala Pro Pro Gln Ala Gly Cys
210 215 220

Leu Gln Leu Ser Trp Glu Pro Trp Gln Pro Gly Leu His Ile Asn Gln
225 230 235 240

Lys Cys Glu Leu Arg His Lys Pro Gln Arg Gly Glu Ala Ser Trp Ala
245 250 255

Leu Val Gly Pro Leu Pro Leu Glu Ala Leu Gln Tyr Glu Leu Cys Gly
260 265 270

Leu Leu Pro Ala Thr Ala Tyr Thr Leu Gln Ile Arg Cys Ile Arg Trp
275 280 285

Pro Leu Pro Gly His Trp Ser Asp Trp Ser Pro Ser Leu Glu Leu Arg
290 295 300

Thr Thr Glu
305

<210> 86

<211> 307

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 134 G-CSFR variant

<400> 86

Glu Cys Gly His Ile Ser Val Ser Ala Pro Ile Val His Leu Gly Asp
1 5 10 15

Pro Ile Thr Ala Ser Cys Ile Ile Lys Gln Asn Cys Ser His Leu Asp
20 25 30

Pro Glu Pro Gln Ile Leu Trp Glu Leu Gly Ala Glu Leu Gln Pro Gly
35 40 45

Gly Arg Gln Gln Arg Leu Ser Asp Gly Thr Gln Glu Ser Ile Ile Thr
50 55 60

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

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

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

Leu Val Gly Pro Leu Pro Leu Glu Ala Leu Gln Tyr Glu Leu Cys Gly
260 265 270
Leu Leu Pro Ala Thr Ala Tyr Thr Leu Gln Ile Arg Cys Ile Arg Trp
275 280 285
Pro Leu Pro Gly His Trp Ser Asp Trp Ser Pro Ser Leu Glu Leu Arg
290 295 300
Thr Thr Glu
305

<210> 87

<211> 307

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 307 G-CSFR variant

<400> 87

Glu Cys Gly His Ile Ser Val Ser Ala Pro Ile Val His Leu Gly Asp
1 5 10 15

Pro Ile Thr Ala Ser Cys Ile Ile Lys Gln Asn Cys Ser His Leu Asp
20 25 30

Pro Glu Pro Gln Ile Leu Trp Glu Leu Gly Ala Glu Leu Gln Pro Gly
35 40 45

Gly Arg Gln Gln Arg Leu Ser Asp Gly Thr Gln Glu Ser Ile Ile Thr
50 55 60

Leu Pro His Leu Asn His Thr Gln Ala Phe Leu Ser Cys Ser Leu Asn
65 70 75 80

Trp Gly Asn Ser Leu Gln Ile Leu Asp Gln Val Glu Leu Arg Ala Gly
85 90 95

Tyr Pro Pro Ala Ile Pro His Asn Leu Ser Cys Leu Met Asn Leu Thr
100 105 110

Thr Ser Ser Leu Ile Cys Gln Trp Glu Pro Gly Pro Glu Thr His Leu
115 120 125

Pro Thr Ser Phe Thr Leu Lys Ser Phe Lys Ser Arg Gly Asn Cys Gln
130 135 140

Thr Gln Gly Asp Ser Ile Leu Asp Cys Val Pro Lys Asp Gly Gln Ser
145 150 155 160

His Cys Ser Ile Pro Arg Lys His Leu Leu Leu Tyr Gln Asn Met Gly
165 170 175

Ile Trp Val Gln Ala Glu Asn Ala Leu Gly Thr Ser Met Ser Pro Gln
180 185 190

Leu Cys Leu Lys Pro Met Lys Val Val Lys Leu Glu Pro Pro Met Leu

195 200 205

Arg Thr Met Asp Pro Ser Pro Glu Ala Ala Pro Pro Gln Ala Gly Cys

210 215 220

Leu Gln Leu Ser Trp Glu Pro Trp Gln Pro Gly Leu His Ile Asn Gln

225 230 235 240

Lys Cys Glu Leu Arg His Lys Pro Gln Arg Gly Glu Ala Ser Trp Ala

245 250 255

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

260 265 270

Leu Leu Pro Ala Thr Ala Tyr Thr Leu Gln Ile Arg Cys Ile Glu Trp

275 280 285

Pro Leu Pro Gly His Trp Ser Asp Trp Ser Pro Ser Leu Glu Leu Arg

290 295 300

Thr Thr Glu

305

<210> 88

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> WT G-CSFR

<400> 88

Ile Ile Leu Gly Leu Phe Gly Leu Leu Leu Leu Leu Thr Cys Leu Cys

1 5 10 15

Gly Thr Ala Trp Leu Cys Cys

20

<210> 89

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> WT G-CSFR

<400> 89

Met Ala Arg Leu Gly Asn Cys Ser Leu Thr Trp Ala Ala Leu Ile Ile

1 5 10 15

Leu Leu Leu Pro Gly Ser Leu Glu

20

<210

> 90

<211> 62

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> G2R-3 (G-CSFR)

<400> 90

Ser Pro Asn Arg Lys Asn Pro Leu Trp Pro Ser Val Pro Asp Pro Ala

1 5 10 15

His Ser Ser Leu Gly Ser Trp Val Pro Thr Ile Met Glu Glu Asp Ala

20 25 30

Phe Gln Leu Pro Gly Leu Gly Thr Pro Pro Ile Thr Lys Leu Thr Val

35 40 45

Leu Glu Glu Asp Glu Lys Lys Pro Val Pro Trp Glu Ser His

50 55 60

<210> 91

<211> 202

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> G2R-3 (IL-2R beta)

<400> 91

Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln Gly Tyr Phe

1 5 10 15

Phe Phe His Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala Cys Gln Val Tyr

20 25 30

Phe Thr Tyr Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro Asp Glu Gly Val Ala

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Phe Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ser Thr Ala Pro
85 90 95
Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro Pro Ser Leu Gln Glu
100 105 110

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

Asn Ala Arg Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu Ser Leu Gln Glu
180 185 190
Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val
195 200

<210> 92
<211> 505
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> G4R (IL4R alfa)
<400> 92
Asp Glu Asp Pro His Lys Ala Ala Lys Glu Met Pro Phe Gln Gly Ser
1 5 10 15
Gly Lys Ser Ala Trp Cys Pro Val Glu Ile Ser Lys Thr Val Leu Trp

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

Gly Ile Val Ala Arg Leu Thr Glu Ser Leu Phe Leu Asp Leu Leu Gly

85 90 95

Glu Glu Asn Gly Gly Phe Cys Gln Gln Asp Met Gly Glu Ser Cys Leu

100 105 110

Leu Pro Pro Ser Gly Ser Thr Ser Ala His Met Pro Trp Asp Glu Phe

115 120 125

Pro Ser Ala Gly Pro Lys Glu Ala Pro Pro Trp Gly Lys Glu Gln Pro

130 135 140

Leu His Leu Glu Pro Ser Pro Pro Ala Ser Pro Thr Gln Ser Pro Asp

145 150 155 160

Asn Leu Thr Cys Thr Glu Thr Pro Leu Val Ile Ala Gly Asn Pro Ala

165 170 175

Tyr Arg Ser Phe Ser Asn Ser Leu Ser Gln Ser Pro Cys Pro Arg Glu

180 185 190

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

195 200 205

Glu Met Pro Cys Val Pro Gln Leu Ser Glu Pro Thr Thr Val Pro Gln

210 215 220

Pro Glu Pro Glu Thr Trp Glu Gln Ile Leu Arg Arg Asn Val Leu Gln

225 230 235 240

His Gly Ala Ala Ala Ala Pro Val Ser Ala Pro Thr Ser Gly Tyr Gln

245 250 255

Glu Phe Val His Ala Val Glu Gln Gly Gly Thr Gln Ala Ser Ala Val

260 265 270

Val Gly Leu Gly Pro Pro Gly Glu Ala Gly Tyr Lys Ala Phe Ser Ser

275 280 285

Leu Leu Ala Ser Ser Ala Val Ser Pro Glu Lys Cys Gly Phe Gly Ala

290 295 300

Ser Ser Gly Glu Glu Gly Tyr Lys Pro Phe Gln Asp Leu Ile Pro Gly

305 310 315 320

Cys Pro Gly Asp Pro Ala Pro Val Pro Val Pro Leu Phe Thr Phe Gly

325 330 335

Leu Asp Arg Glu Pro Pro Arg Ser Pro Gln Ser Ser His Leu Pro Ser

340 345 350

Ser Ser Pro Glu His Leu Gly Leu Glu Pro Gly Glu Lys Val Glu Asp

355 360 365

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

370 375 380

Asp Ser Leu Gly Ser Gly Ile Val Tyr Ser Ala Leu Thr Cys His Leu

385 390 395 400

Cys Gly His Leu Lys Gln Cys His Gly Gln Glu Asp Gly Gly Gln Thr

405 410 415

Pro Val Met Ala Ser Pro Cys Cys Gly Cys Cys Cys Gly Asp Arg Ser

420 425 430

Ser Pro Pro Thr Thr Pro Leu Arg Ala Pro Asp Pro Ser Pro Gly Gly

435 440 445

Val Pro Leu Glu Ala Ser Leu Cys Pro Ala Ser Leu Ala Pro Ser Gly

450 455 460

Ile Ser Glu Lys Ser Lys Ser Ser Ser Ser Phe His Pro Ala Pro Gly

465 470 475 480

Asn Ala Gln Ser Ser Ser Gln Thr Pro Lys Ile Val Asn Phe Val Ser

485 490 495

Val Gly Pro Thr Tyr Met Arg Val Ser

500 505

<210> 93

<211> 277

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> G6R (gp130)

<400> 93

Asn Lys Arg Asp Leu Ile Lys Lys His Ile Trp Pro Asn Val Pro Asp

1 5 10 15

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

Glu Gly His Ser Ser Gly Ile Gly Gly Ser Ser Cys Met Ser Ser Ser
85 90 95
Arg Pro Ser Ile Ser Ser Ser Asp Glu Asn Glu Ser Ser Gln Asn Thr
100 105 110
Ser Ser Thr Val Gln Tyr Ser Thr Val Val His Ser Gly Tyr Arg His
115 120 125
Gln Val Pro Ser Val Gln Val Phe Ser Arg Ser Glu Ser Thr Gln Pro
130 135 140

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

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

260 265 270

Gly Tyr Met Pro Gln
275

<210> 94
<211> 235
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> GEPOR
<400> 94

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

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

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

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

<210> 95

<211> 65

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GIFNAR2 (G-CSFR)

<400> 95

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

<210> 96

<211> 206

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GIFNAR2 (IFNAR2)

<400> 96

Lys Lys Lys Val Trp Asp Tyr Asn Tyr Asp Asp Glu Ser Asp Ser Asp
1 5 10 15
Thr Glu Ala Ala Pro Arg Thr Ser Gly Gly Gly Tyr Thr Met His Gly

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Leu Ser Gly Pro Cys Glu Arg Arg Lys Ser Pro Leu Gln Asp Pro

85 90 95

Phe Pro Glu Glu Asp Tyr Ser Ser Thr Glu Gly Ser Gly Gly Arg Ile

100 105 110

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

115 120 125

Glu Asp Ser Asp Asp Leu Glu Ala Pro Leu Met Leu Ser Ser His Leu

130 135 140

Glu Glu Met Val Asp Pro Glu Asp Pro Asp Asn Val Gln Ser Asn His

145 150 155 160

Leu Leu Ala Ser Gly Glu Gly Thr Gln Pro Thr Phe Pro Ser Pro Ser

165 170 175

Ser Glu Gly Leu Trp Ser Glu Asp Ala Pro Ser Asp Gln Ser Asp Thr

180 185 190

Ser Glu Ser Asp Val Asp Leu Gly Asp Gly Tyr Ile Met Arg

195 200 205

<210> 97

<211> 66

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GIFNGR1 (IFN Gamma R2)

<400> 97

Lys Tyr Arg Gly Leu Ile Lys Tyr Trp Phe His Thr Pro Pro Ser Ile

1 5 10 15

Pro Leu Gln Ile Glu Glu Tyr Leu Lys Asp Pro Thr Gln Pro Ile Leu

20 25 30

Glu Ala Leu Asp Lys Asp Ser Ser Pro Lys Asp Asp Val Trp Asp Ser

35 40 45

Val Ser Ile Ile Ser Phe Pro Glu Lys Glu Gln Glu Asp Val Leu Gln

50 55 60

Thr Leu

65

<210> 98

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GIFNGR1 (IFN Gamma R1)

<400> 98

Glu Gly Gln Glu Leu Ile Thr Val Ile Lys Ala Pro Thr Ser Phe Gly

1 5 10 15

Tyr Asp Lys Pro His Val Leu Val Asp Leu Leu Val Asp Asp Ser

20 25 30

<210> 99

<211> 64

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GIFNGR2 (G-CSFR)

<400> 99

Ser Pro Asn Arg Lys Asn Pro Leu Trp Pro Ser Val Pro Asp Pro Ala

1 5 10 15

His Ser Ser Leu Gly Ser Trp Val Pro Thr Ile Met Glu Glu Asp Ala

20 25 30

Phe Gln Leu Pro Gly Leu Gly Thr Pro Pro Ile Thr Lys Leu Thr Val

35 40 45

Leu Glu Glu Asp Glu Lys Lys Pro Val Pro Trp Glu Ser His Asn Ser

50 55 60

<210> 100

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GIFNGR2 (IFN Gamma R1)

<400> 100

Thr Glu Gly Gln Glu Leu Ile Thr Val Ile Lys Ala Pro Thr Ser Phe

1 5 10 15

Gly Tyr Asp Lys Pro His Val Leu Val Asp Leu Leu Val Asp Asp Ser

20 25 30

<210> 101

<211> 307

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-CSFR(Ig-CRH)

<400> 101

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

1 5 10 15

Pro Ile Thr Ala Ser Cys Ile Ile Lys Gln Asn Cys Ser His Leu Asp

20 25 30

Pro Glu Pro Gln Ile Leu Trp Arg Leu Gly Ala Glu Leu Gln Pro Gly

35 40 45

Gly Arg Gln Gln Arg Leu Ser Asp Gly Thr Gln Glu Ser Ile Ile Thr

50 55 60

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

65 70 75 80

Trp Gly Asn Ser Leu Gln Ile Leu Asp Gln Val Glu Leu Arg Ala Gly

85 90 95

Tyr Pro Pro Ala Ile Pro His Asn Leu Ser Cys Leu Met Asn Leu Thr

100 105 110

Thr Ser Ser Leu Ile Cys Gln Trp Glu Pro Gly Pro Glu Thr His Leu

115 120 125

Pro Thr Ser Phe Thr Leu Lys Ser Phe Lys Ser Arg Gly Asn Cys Gln

130 135 140

Thr Gln Gly Asp Ser Ile Leu Asp Cys Val Pro Lys Asp Gly Gln Ser
145 150 155 160

His Cys Ser Ile Pro Arg Lys His Leu Leu Leu Tyr Gln Asn Met Gly
165 170 175

Ile Trp Val Gln Ala Glu Asn Ala Leu Gly Thr Ser Met Ser Pro Gln
180 185 190

Leu Cys Leu Asp Pro Met Asp Val Val Lys Leu Glu Pro Pro Met Leu
195 200 205

Arg Thr Met Asp Pro Ser Pro Glu Ala Ala Pro Pro Gln Ala Gly Cys
210 215 220

Leu Gln Leu Ser Trp Glu Pro Trp Gln Pro Gly Leu His Ile Asn Gln
225 230 235 240

Lys Cys Glu Leu Arg His Lys Pro Gln Arg Gly Glu Ala Ser Trp Ala
245 250 255

Leu Val Gly Pro Leu Pro Leu Glu Ala Leu Gln Tyr Glu Leu Cys Gly
260 265 270

Leu Leu Pro Ala Thr Ala Tyr Thr Leu Gln Ile Arg Cys Ile Arg Trp
275 280 285

Pro Leu Pro Gly His Trp Ser Asp Trp Ser Pro Ser Leu Glu Leu Arg
290 295 300

Thr Thr Glu
305

<210> 102

<211> 193

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hIL-18

<400> 102

Met Ala Ala Glu Pro Val Glu Asp Asn Cys Ile Asn Phe Val Ala Met
1 5 10 15

Lys Phe Ile Asp Asn Thr Leu Tyr Phe Ile Ala Glu Asp Asp Glu Asn

20 25 30

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

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

Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys
165 170 175
Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu
180 185 190
Asp

<210> 103
<211> 109
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> hCXCL13
<400> 103
Met Lys Phe Ile Ser Thr Ser Leu Leu Leu Met Leu Leu Val Ser Ser
1 5 10 15

Leu Ser Pro Val Gln Gly Val Leu Glu Val Tyr Tyr Thr Ser Leu Arg

20 25 30

Cys Arg Cys Val Gln Glu Ser Ser Val Phe Ile Pro Arg Arg Phe Ile

35 40 45

Asp Arg Ile Gln Ile Leu Pro Arg Gly Asn Gly Cys Pro Arg Lys Glu

50 55 60

Ile Ile Val Trp Lys Lys Asn Lys Ser Ile Val Cys Val Asp Pro Gln

65 70 75 80

Ala Glu Trp Ile Gln Arg Met Met Glu Val Leu Arg Lys Arg Ser Ser

85 90 95

Ser Thr Leu Pro Val Pro Val Phe Lys Arg Lys Ile Pro

100 105

<210> 104

<211> 162

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hIL-21

<400> 104

Met Arg Ser Ser Pro Gly Asn Met Glu Arg Ile Val Ile Cys Leu Met

1 5 10 15

Val Ile Phe Leu Gly Thr Leu Val His Lys Ser Ser Ser Gln Gly Gln

20 25 30

Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp Gln

35 40 45

Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro Ala Pro

50 55 60

Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys Phe Gln

65 70 75 80

Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg Ile Ile

85 90 95

Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr Asn Ala

100 105 110

Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr

115 120 125

Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu Leu

130 135 140

Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser Glu

145 150 155 160

Asp Ser

<210> 105

<211> 92

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hCCL3

<400> 105

Met Gln Val Ser Thr Ala Ala Leu Ala Val Leu Leu Cys Thr Met Ala

1 5 10 15

Leu Cys Asn Gln Phe Ser Ala Ser Leu Ala Ala Asp Thr Pro Thr Ala

20 25 30

Cys Cys Phe Ser Tyr Thr Ser Arg Gln Ile Pro Gln Asn Phe Ile Ala

35 40 45

Asp Tyr Phe Glu Thr Ser Ser Gln Cys Ser Lys Pro Gly Val Ile Phe

50 55 60

Leu Thr Lys Arg Ser Arg Gln Val Cys Ala Asp Pro Ser Glu Glu Trp

65 70 75 80

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

85 90

<210> 106

<211> 92

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hCCL4

<400> 106

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

Phe Gln Thr Lys Arg Ser Lys Gln Val Cys Ala Asp Pro Ser Glu Ser
65 70 75 80
Trp Val Gln Glu Tyr Val Tyr Asp Leu Glu Leu Asn
85 90

<210> 107
<211> 98
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> hCCL19
<400> 107
Met Ala Leu Leu Leu Ala Leu Ser Leu Leu Val Leu Trp Thr Ser Pro
1 5 10 15
Ala Pro Thr Leu Ser Gly Thr Asn Asp Ala Glu Asp Cys Cys Leu Ser

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

85 90 95
Ser Ser

<210> 108

<211> 166

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hIFN Gamma

<400> 108

Met Lys Tyr Thr Ser Tyr Ile Leu Ala Phe Gln Leu Cys Ile Val Leu
1 5 10 15

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

Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn
35 40 45

Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp
50 55 60

Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe
65 70 75 80

Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile
85 90 95

Lys Glu Asp Met Asn Val Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg
100 105 110

Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val
115 120 125

Gln Arg Lys Ala Ile His Glu Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser
130 135 140

Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg
145 150 155 160

Gly Arg Arg Ala Ser Gln
165

<210> 109

<211> 189

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hIFN alfa -1/13

<400> 109

Met Ala Ser Pro Phe Ala Leu Leu Met Val Leu Val Val Leu Ser Cys
1 5 10 15

Lys Ser Ser Cys Ser Leu Gly Cys Asp Leu Pro Glu Thr His Ser Leu
20 25 30

Asp Asn Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Ser Arg Ile Ser
35 40 45

Pro Ser Ser Cys Leu Met Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu

50 55 60

Glu Phe Asp Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Pro Ala Ile Ser Val Leu
65 70 75 80

His Glu Leu Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Thr Thr Lys Asp Ser
85 90 95

Ser Ala Ala Trp Asp Glu Asp Leu Leu Asp Lys Phe Cys Thr Glu Leu
100 105 110

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

115 120 125

Val Gly Glu Thr Pro Leu Met Asn Ala Asp Ser Ile Leu Ala Val Lys
130 135 140

Lys Tyr Phe Arg Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser
145 150 155 160

Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Leu Ser
165 170 175

Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Arg Leu Arg Arg Lys Glu

180 185

<210> 110

<211> 155

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hIL-17

<400> 110

Met Thr Pro Gly Lys Thr Ser Leu Val Ser Leu Leu Leu Leu Leu Ser

1 5 10 15

Leu Glu Ala Ile Val Lys Ala Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn Pro Gly

20 25 30

Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn

35 40 45

Leu Asn Ile His Asn Arg Asn Thr Asn Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser

50 55 60

Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu

65 70 75 80

Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His

85 90 95

Leu Gly Cys Ile Asn Ala Asp Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser

100 105 110

Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His

115 120 125

Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys

130 135 140

Thr Cys Val Thr Pro Ile Val His His Val Ala

145 150 155

<210> 111

<211> 551

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2R beta/IL-15R beta

<400> 111

Met Ala Ala Pro Ala Leu Ser Trp Arg Leu Pro Leu Leu Ile Leu Leu

1 5 10 15

Leu Pro Leu Ala Thr Ser Trp Ala Ser Ala Ala Val Asn Gly Thr Ser

20 25 30

Gln Phe Thr Cys Phe Tyr Asn Ser Arg Ala Asn Ile Ser Cys Val Trp

35 40 45

Ser Gln Asp Gly Ala Leu Gln Asp Thr Ser Cys Gln Val His Ala Trp

50 55 60

Pro Asp Arg Arg Arg Trp Asn Gln Thr Cys Glu Leu Leu Pro Val Ser

65 70 75 80

Gln Ala Ser Trp Ala Cys Asn Leu Ile Leu Gly Ala Pro Asp Ser Gln

85 90 95

Lys Leu Thr Thr Val Asp Ile Val Thr Leu Arg Val Leu Cys Arg Glu

100 105 110

Gly Val Arg Trp Arg Val Met Ala Ile Gln Asp Phe Lys Pro Phe Glu

115 120 125

Asn Leu Arg Leu Met Ala Pro Ile Ser Leu Gln Val Val His Val Glu

130 135 140

Thr His Arg Cys Asn Ile Ser Trp Glu Ile Ser Gln Ala Ser His Tyr

145 150 155 160

Phe Glu Arg His Leu Glu Phe Glu Ala Arg Thr Leu Ser Pro Gly His

165 170 175

Thr Trp Glu Glu Ala Pro Leu Leu Thr Leu Lys Gln Lys Gln Glu Trp

180 185 190

Ile Cys Leu Glu Thr Leu Thr Pro Asp Thr Gln Tyr Glu Phe Gln Val

195 200 205

Arg Val Lys Pro Leu Gln Gly Glu Phe Thr Thr Trp Ser Pro Trp Ser

210 215 220

Gln Pro Leu Ala Phe Arg Thr Lys Pro Ala Ala Leu Gly Lys Asp Thr

225 230 235 240

Ile Pro Trp Leu Gly His Leu Leu Val Gly Leu Ser Gly Ala Phe Gly

245 250 255

Phe Ile Ile Leu Val Tyr Leu Leu Ile Asn Cys Arg Asn Thr Gly Pro

260 265 270

Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn Thr Pro Asp Pro Ser Lys Phe

275 280 285

Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly Gly Asp Val Gln Lys Trp Leu

290 295 300

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

305 310 315 320

Glu Ile Ser Pro Leu Glu Val Leu Glu Arg Asp Lys Val Thr Gln Leu

325 330 335

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

340 345 350

His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln Gly Tyr Phe Phe Phe His

355 360 365

Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala Cys Gln Val Tyr Phe Thr Tyr

370 375 380

Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro Asp Glu Gly Val Ala Gly Ala Pro

385 390 395 400

Thr Gly Ser Ser Pro Gln Pro Leu Gln Pro Leu Ser Gly Glu Asp Asp

405 410 415

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

420 425 430

Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ser Thr Ala Pro Gly Gly Ser

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

Asp Leu Val Asp Phe Gln Pro Pro Pro Glu Leu Val Leu Arg Glu Ala

485 490 495

Gly Glu Glu Val Pro Asp Ala Gly Pro Arg Glu Gly Val Ser Phe Pro

500 505 510

Trp Ser Arg Pro Pro Gly Gln Gly Glu Phe Arg Ala Leu Asn Ala Arg

515 520 525

Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu Ser Leu Gln Glu Leu Gln Gly

530 535 540

Gln Asp Pro Thr His Leu Val

545 550

<210> 112

<211> 369

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2R Gamma c

<400> 112

Met Leu Lys Pro Ser Leu Pro Phe Thr Ser Leu Leu Phe Leu Gln Leu

1 5 10 15

Pro Leu Leu Gly Val Gly Leu Asn Thr Thr Ile Leu Thr Pro Asn Gly

20 25 30

Asn Glu Asp Thr Thr Ala Asp Phe Phe Leu Thr Thr Met Pro Thr Asp

35 40 45

Ser Leu Ser Val Ser Thr Leu Pro Leu Pro Glu Val Gln Cys Phe Val

50 55 60

Phe Asn Val Glu Tyr Met Asn Cys Thr Trp Asn Ser Ser Ser Glu Pro

65 70 75 80

Gln Pro Thr Asn Leu Thr Leu His Tyr Trp Tyr Lys Asn Ser Asp Asn

85 90 95

Asp Lys Val Gln Lys Cys Ser His Tyr Leu Phe Ser Glu Glu Ile Thr

100 105 110

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

115 120 125

Val Val Gln Leu Gln Asp Pro Arg Glu Pro Arg Arg Gln Ala Thr Gln

130 135 140

Met Leu Lys Leu Gln Asn Leu Val Ile Pro Trp Ala Pro Glu Asn Leu

145 150 155 160

Thr Leu His Lys Leu Ser Glu Ser Gln Leu Glu Leu Asn Trp Asn Asn

165 170 175

Arg Phe Leu Asn His Cys Leu Glu His Leu Val Gln Tyr Arg Thr Asp

180 185 190

Trp Asp His Ser Trp Thr Glu Gln Ser Val Asp Tyr Arg His Lys Phe
195 200 205
Ser Leu Pro Ser Val Asp Gly Gln Lys Arg Tyr Thr Phe Arg Val Arg

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

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

340 345 350
Gln His Ser Pro Tyr Trp Ala Pro Pro Cys Tyr Thr Leu Lys Pro Glu
355 360 365
Thr

<210> 113
<211> 825
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> IL-4R alfa
<400> 113
Met Gly Trp Leu Cys Ser Gly Leu Leu Phe Pro Val Ser Cys Leu Val
1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Cys Val Ser Asp Tyr Met Ser Ile Ser Thr Cys Glu Trp Lys Met

35 40 45

Asn Gly Pro Thr Asn Cys Ser Thr Glu Leu Arg Leu Leu Tyr Gln Leu

50 55 60

Val Phe Leu Leu Ser Glu Ala His Thr Cys Ile Pro Glu Asn Asn Gly

65 70 75 80

Gly Ala Gly Cys Val Cys His Leu Leu Met Asp Asp Val Val Ser Ala

85 90 95

Asp Asn Tyr Thr Leu Asp Leu Trp Ala Gly Gln Gln Leu Leu Trp Lys

100 105 110

Gly Ser Phe Lys Pro Ser Glu His Val Lys Pro Arg Ala Pro Gly Asn

115 120 125

Leu Thr Val His Thr Asn Val Ser Asp Thr Leu Leu Leu Thr Trp Ser

130 135 140

Asn Pro Tyr Pro Pro Asp Asn Tyr Leu Tyr Asn His Leu Thr Tyr Ala

145 150 155 160

Val Asn Ile Trp Ser Glu Asn Asp Pro Ala Asp Phe Arg Ile Tyr Asn

165 170 175

Val Thr Tyr Leu Glu Pro Ser Leu Arg Ile Ala Ala Ser Thr Leu Lys

180 185 190

Ser Gly Ile Ser Tyr Arg Ala Arg Val Arg Ala Trp Ala Gln Cys Tyr

195 200 205

Asn Thr Thr Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser Thr Lys Trp His Asn Ser

210 215 220

Tyr Arg Glu Pro Phe Glu Gln His Leu Leu Leu Gly Val Ser Val Ser

225 230 235 240

Cys Ile Val Ile Leu Ala Val Cys Leu Leu Cys Tyr Val Ser Ile Thr

245 250 255

Lys Ile Lys Lys Glu Trp Trp Asp Gln Ile Pro Asn Pro Ala Arg Ser

260 265 270

Arg Leu Val Ala Ile Ile Ile Gln Asp Ala Gln Gly Ser Gln Trp Glu

275 280 285

Lys Arg Ser Arg Gly Gln Glu Pro Ala Lys Cys Pro His Trp Lys Asn

290 295 300

Cys Leu Thr Lys Leu Leu Pro Cys Phe Leu Glu His Asn Met Lys Arg

305 310 315 320

Asp Glu Asp Pro His Lys Ala Ala Lys Glu Met Pro Phe Gln Gly Ser

325 330 335

Gly Lys Ser Ala Trp Cys Pro Val Glu Ile Ser Lys Thr Val Leu Trp

340 345 350

Pro Glu Ser Ile Ser Val Val Arg Cys Val Glu Leu Phe Glu Ala Pro

355 360 365

Val Glu Cys Glu Glu Glu Glu Glu Val Glu Glu Glu Lys Gly Ser Phe

370 375 380

Cys Ala Ser Pro Glu Ser Ser Arg Asp Asp Phe Gln Glu Gly Arg Glu

385 390 395 400

Gly Ile Val Ala Arg Leu Thr Glu Ser Leu Phe Leu Asp Leu Leu Gly

405 410 415

Glu Glu Asn Gly Gly Phe Cys Gln Gln Asp Met Gly Glu Ser Cys Leu

420 425 430

Leu Pro Pro Ser Gly Ser Thr Ser Ala His Met Pro Trp Asp Glu Phe

435 440 445

Pro Ser Ala Gly Pro Lys Glu Ala Pro Pro Trp Gly Lys Glu Gln Pro

450 455 460

Leu His Leu Glu Pro Ser Pro Pro Ala Ser Pro Thr Gln Ser Pro Asp

465 470 475 480

Asn Leu Thr Cys Thr Glu Thr Pro Leu Val Ile Ala Gly Asn Pro Ala

485 490 495

Tyr Arg Ser Phe Ser Asn Ser Leu Ser Gln Ser Pro Cys Pro Arg Glu

500 505 510

Leu Gly Pro Asp Pro Leu Leu Ala Arg His Leu Glu Glu Val Glu Pro
515 520 525
Glu Met Pro Cys Val Pro Gln Leu Ser Glu Pro Thr Thr Val Pro Gln

530 535 540
Pro Glu Pro Glu Thr Trp Glu Gln Ile Leu Arg Arg Asn Val Leu Gln
545 550 555 560
His Gly Ala Ala Ala Ala Pro Val Ser Ala Pro Thr Ser Gly Tyr Gln
565 570 575
Glu Phe Val His Ala Val Glu Gln Gly Gly Thr Gln Ala Ser Ala Val
580 585 590
Val Gly Leu Gly Pro Pro Gly Glu Ala Gly Tyr Lys Ala Phe Ser Ser

595 600 605
Leu Leu Ala Ser Ser Ala Val Ser Pro Glu Lys Cys Gly Phe Gly Ala
610 615 620
Ser Ser Gly Glu Glu Gly Tyr Lys Pro Phe Gln Asp Leu Ile Pro Gly
625 630 635 640
Cys Pro Gly Asp Pro Ala Pro Val Pro Val Pro Leu Phe Thr Phe Gly
645 650 655
Leu Asp Arg Glu Pro Pro Arg Ser Pro Gln Ser Ser His Leu Pro Ser

660 665 670
Ser Ser Pro Glu His Leu Gly Leu Glu Pro Gly Glu Lys Val Glu Asp
675 680 685
Met Pro Lys Pro Pro Leu Pro Gln Glu Gln Ala Thr Asp Pro Leu Val
690 695 700
Asp Ser Leu Gly Ser Gly Ile Val Tyr Ser Ala Leu Thr Cys His Leu
705 710 715 720
Cys Gly His Leu Lys Gln Cys His Gly Gln Glu Asp Gly Gly Gln Thr

725 730 735
Pro Val Met Ala Ser Pro Cys Cys Gly Cys Cys Cys Gly Asp Arg Ser
740 745 750
Ser Pro Pro Thr Thr Pro Leu Arg Ala Pro Asp Pro Ser Pro Gly Gly

755 760 765

Val Pro Leu Glu Ala Ser Leu Cys Pro Ala Ser Leu Ala Pro Ser Gly

770 775 780

Ile Ser Glu Lys Ser Lys Ser Ser Ser Ser Phe His Pro Ala Pro Gly

785 790 795 800

Asn Ala Gln Ser Ser Ser Gln Thr Pro Lys Ile Val Asn Phe Val Ser

805 810 815

Val Gly Pro Thr Tyr Met Arg Val Ser

820 825

<210> 114

<211> 521

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-9R

<400> 114

Met Gly Leu Gly Arg Cys Ile Trp Glu Gly Trp Thr Leu Glu Ser Glu

1 5 10 15

Ala Leu Arg Arg Asp Met Gly Thr Trp Leu Leu Ala Cys Ile Cys Ile

20 25 30

Cys Thr Cys Val Cys Leu Gly Val Ser Val Thr Gly Glu Gly Gln Gly

35 40 45

Pro Arg Ser Arg Thr Phe Thr Cys Leu Thr Asn Asn Ile Leu Arg Ile

50 55 60

Asp Cys His Trp Ser Ala Pro Glu Leu Gly Gln Gly Ser Ser Pro Trp

65 70 75 80

Leu Leu Phe Thr Ser Asn Gln Ala Pro Gly Gly Thr His Lys Cys Ile

85 90 95

Leu Arg Gly Ser Glu Cys Thr Val Val Leu Pro Pro Glu Ala Val Leu

100 105 110

Val Pro Ser Asp Asn Phe Thr Ile Thr Phe His His Cys Met Ser Gly

115 120 125

Arg Glu Gln Val Ser Leu Val Asp Pro Glu Tyr Leu Pro Arg Arg His

130 135 140

Val Lys Leu Asp Pro Pro Ser Asp Leu Gln Ser Asn Ile Ser Ser Gly

145 150 155 160

His Cys Ile Leu Thr Trp Ser Ile Ser Pro Ala Leu Glu Pro Met Thr

165 170 175

Thr Leu Leu Ser Tyr Glu Leu Ala Phe Lys Lys Gln Glu Glu Ala Trp

180 185 190

Glu Gln Ala Gln His Arg Asp His Ile Val Gly Val Thr Trp Leu Ile

195 200 205

Leu Glu Ala Phe Glu Leu Asp Pro Gly Phe Ile His Glu Ala Arg Leu

210 215 220

Arg Val Gln Met Ala Thr Leu Glu Asp Asp Val Val Glu Glu Glu Arg

225 230 235 240

Tyr Thr Gly Gln Trp Ser Glu Trp Ser Gln Pro Val Cys Phe Gln Ala

245 250 255

Pro Gln Arg Gln Gly Pro Leu Ile Pro Pro Trp Gly Trp Pro Gly Asn

260 265 270

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

275 280 285

Leu Leu Phe Lys Leu Ser Pro Arg Val Lys Arg Ile Phe Tyr Gln Asn

290 295 300

Val Pro Ser Pro Ala Met Phe Phe Gln Pro Leu Tyr Ser Val His Asn

305 310 315 320

Gly Asn Phe Gln Thr Trp Met Gly Ala His Gly Ala Gly Val Leu Leu

325 330 335

Ser Gln Asp Cys Ala Gly Thr Pro Gln Gly Ala Leu Glu Pro Cys Val

340 345 350

Gln Glu Ala Thr Ala Leu Leu Thr Cys Gly Pro Ala Arg Pro Trp Lys

355 360 365

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

370 375 380

Gly Asn Leu Ser Ser Glu Asp Val Leu Pro Ala Gly Cys Thr Glu Trp
385 390 395 400
Arg Val Gln Thr Leu Ala Tyr Leu Pro Gln Glu Asp Trp Ala Pro Thr

405 410 415
Ser Leu Thr Arg Pro Ala Pro Pro Asp Ser Glu Gly Ser Arg Ser Ser
420 425 430
Ser Ser Ser Ser Ser Ser Asn Asn Asn Asn Tyr Cys Ala Leu Gly Cys
435 440 445
Tyr Gly Gly Trp His Leu Ser Ala Leu Pro Gly Asn Thr Gln Ser Ser
450 455 460
Gly Pro Ile Pro Ala Leu Ala Cys Gly Leu Ser Cys Asp His Gln Gly

465 470 475 480
Leu Glu Thr Gln Gln Gly Val Ala Trp Val Leu Ala Gly His Cys Gln
485 490 495
Arg Pro Gly Leu His Glu Asp Leu Gln Gly Met Leu Leu Pro Ser Val
500 505 510
Leu Ser Lys Ala Arg Ser Trp Thr Phe
515 520

<210> 115
<211> 862
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> IL-12R breta2
<400> 115

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

50 55 60

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

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

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

Leu Arg Tyr Arg Pro Ser Asn Ser Arg Leu Trp Asn Met Val Asn Val
260 265 270
Thr Lys Ala Lys Gly Arg His Asp Leu Leu Asp Leu Lys Pro Phe Thr
275 280 285
Glu Tyr Glu Phe Gln Ile Ser Ser Lys Leu His Leu Tyr Lys Gly Ser
290 295 300

Trp Ser Asp Trp Ser Glu Ser Leu Arg Ala Gln Thr Pro Glu Glu Glu
305 310 315 320

Pro Thr Gly Met Leu Asp Val Trp Tyr Met Lys Arg His Ile Asp Tyr
325 330 335

Ser Arg Gln Gln Ile Ser Leu Phe Trp Lys Asn Leu Ser Val Ser Glu
340 345 350

Ala Arg Gly Lys Ile Leu His Tyr Gln Val Thr Leu Gln Glu Leu Thr
355 360 365

Gly Gly Lys Ala Met Thr Gln Asn Ile Thr Gly His Thr Ser Trp Thr
370 375 380

Thr Val Ile Pro Arg Thr Gly Asn Trp Ala Val Ala Val Ser Ala Ala
385 390 395 400

Asn Ser Lys Gly Ser Ser Leu Pro Thr Arg Ile Asn Ile Met Asn Leu
405 410 415

Cys Glu Ala Gly Leu Leu Ala Pro Arg Gln Val Ser Ala Asn Ser Glu
420 425 430

Gly Met Asp Asn Ile Leu Val Thr Trp Gln Pro Pro Arg Lys Asp Pro
435 440 445

Ser Ala Val Gln Glu Tyr Val Val Glu Trp Arg Glu Leu His Pro Gly
450 455 460

Gly Asp Thr Gln Val Pro Leu Asn Trp Leu Arg Ser Arg Pro Tyr Asn
465 470 475 480

Val Ser Ala Leu Ile Ser Glu Asn Ile Lys Ser Tyr Ile Cys Tyr Glu
485 490 495

Ile Arg Val Tyr Ala Leu Ser Gly Asp Gln Gly Gly Cys Ser Ser Ile
500 505 510

Leu Gly Asn Ser Lys His Lys Ala Pro Leu Ser Gly Pro His Ile Asn
515 520 525

Ala Ile Thr Glu Glu Lys Gly Ser Ile Leu Ile Ser Trp Asn Ser Ile
530 535 540

Pro Val Gln Glu Gln Met Gly Cys Leu Leu His Tyr Arg Ile Tyr Trp

545 550 555 560

Lys Glu Arg Asp Ser Asn Ser Gln Pro Gln Leu Cys Glu Ile Pro Tyr

565 570 575

Arg Val Ser Gln Asn Ser His Pro Ile Asn Ser Leu Gln Pro Arg Val

580 585 590

Thr Tyr Val Leu Trp Met Thr Ala Leu Thr Ala Ala Gly Glu Ser Ser

595 600 605

His Gly Asn Glu Arg Glu Phe Cys Leu Gln Gly Lys Ala Asn Trp Met

610 615 620

Ala Phe Val Ala Pro Ser Ile Cys Ile Ala Ile Ile Met Val Gly Ile

625 630 635 640

Phe Ser Thr His Tyr Phe Gln Gln Lys Val Phe Val Leu Leu Ala Ala

645 650 655

Leu Arg Pro Gln Trp Cys Ser Arg Glu Ile Pro Asp Pro Ala Asn Ser

660 665 670

Thr Cys Ala Lys Lys Tyr Pro Ile Ala Glu Glu Lys Thr Gln Leu Pro

675 680 685

Leu Asp Arg Leu Leu Ile Asp Trp Pro Thr Pro Glu Asp Pro Glu Pro

690 695 700

Leu Val Ile Ser Glu Val Leu His Gln Val Thr Pro Val Phe Arg His

705 710 715 720

Pro Pro Cys Ser Asn Trp Pro Gln Arg Glu Lys Gly Ile Gln Gly His

725 730 735

Gln Ala Ser Glu Lys Asp Met Met His Ser Ala Ser Ser Pro Pro Pro

740 745 750

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

755 760 765

Val Leu Glu Ser Arg Gly Ser Asp Pro Lys Pro Glu Asn Pro Ala Cys

770 775 780

Pro Trp Thr Val Leu Pro Ala Gly Asp Leu Pro Thr His Asp Gly Tyr

785 790 795 800

Leu Pro Ser Asn Ile Asp Asp Leu Pro Ser His Glu Ala Pro Leu Ala
805 810 815
Asp Ser Leu Glu Glu Leu Glu Pro Gln His Ile Ser Leu Ser Val Phe
820 825 830

Pro Ser Ser Ser Leu His Pro Leu Thr Phe Ser Cys Gly Asp Lys Leu
835 840 845
Thr Leu Asp Gln Leu Lys Met Arg Cys Asp Ser Leu Met Leu
850 855 860

<210> 116
<211> 538
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> IL-21R
<400> 116

Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Gly
1 5 10 15
Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr

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

85 90 95
Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe
100 105 110
Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr Val
115 120 125
Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp
130 135 140

Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr

145 150 155 160

Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile

165 170 175

Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys

180 185 190

Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser

195 200 205

Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln

210 215 220

Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Pro His Leu Leu Leu

225 230 235 240

Leu Leu Leu Leu Val Ile Val Phe Ile Pro Ala Phe Trp Ser Leu Lys

245 250 255

Thr His Pro Leu Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile Trp Ala Val Pro Ser

260 265 270

Pro Glu Arg Phe Phe Met Pro Leu Tyr Lys Gly Cys Ser Gly Asp Phe

275 280 285

Lys Lys Trp Val Gly Ala Pro Phe Thr Gly Ser Ser Leu Glu Leu Gly

290 295 300

Pro Trp Ser Pro Glu Val Pro Ser Thr Leu Glu Val Tyr Ser Cys His

305 310 315 320

Pro Pro Arg Ser Pro Ala Lys Arg Leu Gln Leu Thr Glu Leu Gln Glu

325 330 335

Pro Ala Glu Leu Val Glu Ser Asp Gly Val Pro Lys Pro Ser Phe Trp

340 345 350

Pro Thr Ala Gln Asn Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Ser Glu Glu Arg Asp

355 360 365

Arg Pro Tyr Gly Leu Val Ser Ile Asp Thr Val Thr Val Leu Asp Ala

370 375 380

Glu Gly Pro Cys Thr Trp Pro Cys Ser Cys Glu Asp Asp Gly Tyr Pro

385 390 395 400

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

405 410 415

Pro Leu Leu Asp Ala Gly Thr Thr Val Leu Ser Cys Gly Cys Val Ser

420 425 430

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

435 440 445

Leu Lys Pro Pro Leu Ala Asp Gly Glu Asp Trp Ala Gly Gly Leu Pro

450 455 460

Trp Gly Gly Arg Ser Pro Gly Gly Val Ser Glu Ser Glu Ala Gly Ser

465 470 475 480

Pro Leu Ala Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp Ser Gly Phe Val Gly

485 490 495

Ser Asp Cys Ser Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe Thr Ser Pro Gly Asp

500 505 510

Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val Val Ile Pro Pro

515 520 525

Pro Leu Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser

530 535

<210> 117

<211> 918

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> gp130

<400> 117

Met Leu Thr Leu Gln Thr Trp Leu Val Gln Ala Leu Phe Ile Phe Leu

1 5 10 15

Thr Thr Glu Ser Thr Gly Glu Leu Leu Asp Pro Cys Gly Tyr Ile Ser

20 25 30

Pro Glu Ser Pro Val Val Gln Leu His Ser Asn Phe Thr Ala Val Cys

35 40 45

Val Leu Lys Glu Lys Cys Met Asp Tyr Phe His Val Asn Ala Asn Tyr

50 55 60

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

115 120 125

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

180 185 190

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

245 250 255

Tyr Asn Ile Gln Tyr Arg Thr Lys Asp Ala Ser Thr Trp Ser Gln Ile
260 265 270
Pro Pro Glu Asp Thr Ala Ser Thr Arg Ser Ser Phe Thr Val Gln Asp
275 280 285
Leu Lys Pro Phe Thr Glu Tyr Val Phe Arg Ile Arg Cys Met Lys Glu

290 295 300

Asp Gly Lys Gly Tyr Trp Ser Asp Trp Ser Glu Glu Ala Ser Gly Ile

305 310 315 320

Thr Tyr Glu Asp Arg Pro Ser Lys Ala Pro Ser Phe Trp Tyr Lys Ile

325 330 335

Asp Pro Ser His Thr Gln Gly Tyr Arg Thr Val Gln Leu Val Trp Lys

340 345 350

Thr Leu Pro Pro Phe Glu Ala Asn Gly Lys Ile Leu Asp Tyr Glu Val

355 360 365

Thr Leu Thr Arg Trp Lys Ser His Leu Gln Asn Tyr Thr Val Asn Ala

370 375 380

Thr Lys Leu Thr Val Asn Leu Thr Asn Asp Arg Tyr Leu Ala Thr Leu

385 390 395 400

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

405 410 415

Pro Ala Cys Asp Phe Gln Ala Thr His Pro Val Met Asp Leu Lys Ala

420 425 430

Phe Pro Lys Asp Asn Met Leu Trp Val Glu Trp Thr Thr Pro Arg Glu

435 440 445

Ser Val Lys Lys Tyr Ile Leu Glu Trp Cys Val Leu Ser Asp Lys Ala

450 455 460

Pro Cys Ile Thr Asp Trp Gln Gln Glu Asp Gly Thr Val His Arg Thr

465 470 475 480

Tyr Leu Arg Gly Asn Leu Ala Glu Ser Lys Cys Tyr Leu Ile Thr Val

485 490 495

Thr Pro Val Tyr Ala Asp Gly Pro Gly Ser Pro Glu Ser Ile Lys Ala

500 505 510

Tyr Leu Lys Gln Ala Pro Pro Ser Lys Gly Pro Thr Val Arg Thr Lys

515 520 525

Lys Val Gly Lys Asn Glu Ala Val Leu Glu Trp Asp Gln Leu Pro Val

530 535 540

Asp Val Gln Asn Gly Phe Ile Arg Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Arg Thr
545 550 555 560
Ile Ile Gly Asn Glu Thr Ala Val Asn Val Asp Ser Ser His Thr Glu

565 570 575
Tyr Thr Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Thr Leu Tyr Met Val Arg Met
580 585 590
Ala Ala Tyr Thr Asp Glu Gly Gly Lys Asp Gly Pro Glu Phe Thr Phe
595 600 605
Thr Thr Pro Lys Phe Ala Gln Gly Glu Ile Glu Ala Ile Val Val Pro
610 615 620
Val Cys Leu Ala Phe Leu Leu Thr Thr Leu Leu Gly Val Leu Phe Cys

625 630 635 640
Phe Asn Lys Arg Asp Leu Ile Lys Lys His Ile Trp Pro Asn Val Pro
645 650 655
Asp Pro Ser Lys Ser His Ile Ala Gln Trp Ser Pro His Thr Pro Pro
660 665 670
Arg His Asn Phe Asn Ser Lys Asp Gln Met Tyr Ser Asp Gly Asn Phe
675 680 685
Thr Asp Val Ser Val Val Glu Ile Glu Ala Asn Asp Lys Lys Pro Phe

690 695 700
Pro Glu Asp Leu Lys Ser Leu Asp Leu Phe Lys Lys Glu Lys Ile Asn
705 710 715 720
Thr Glu Gly His Ser Ser Gly Ile Gly Gly Ser Ser Cys Met Ser Ser
725 730 735
Ser Arg Pro Ser Ile Ser Ser Ser Asp Glu Asn Glu Ser Ser Gln Asn
740 745 750
Thr Ser Ser Thr Val Gln Tyr Ser Thr Val Val His Ser Gly Tyr Arg

755 760 765
His Gln Val Pro Ser Val Gln Val Phe Ser Arg Ser Glu Ser Thr Gln
770 775 780
Pro Leu Leu Asp Ser Glu Glu Arg Pro Glu Asp Leu Gln Leu Val Asp

785 790 795 800

His Val Asp Gly Gly Asp Gly Ile Leu Pro Arg Gln Gln Tyr Phe Lys

805 810 815

Gln Asn Cys Ser Gln His Glu Ser Ser Pro Asp Ile Ser His Phe Glu

820 825 830

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

835 840 845

Lys Gln Gln Ile Ser Asp His Ile Ser Gln Ser Cys Gly Ser Gly Gln

850 855 860

Met Lys Met Phe Gln Glu Val Ser Ala Ala Asp Ala Phe Gly Pro Gly

865 870 875 880

Thr Glu Gly Gln Val Glu Arg Phe Glu Thr Val Gly Met Glu Ala Ala

885 890 895

Thr Asp Glu Gly Met Pro Lys Ser Tyr Leu Pro Gln Thr Val Arg Gln

900 905 910

Gly Gly Tyr Met Pro Gln

915

<210> 118

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-7R alfa

<400> 118

Lys Arg Ile Lys Pro Ile Val Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys Lys

1 5 10 15

Thr Leu Glu His Leu

20

<210> 119

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-7R alfa

<400> 119

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

1 5 10 15

<210> 120

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-7R alfa

<400> 120

Pro Glu Ser Phe Leu Asp Cys Gln Ile His Arg Val Asp Asp Ile Gln

1 5 10 15

<210> 121

<

211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2R beta

<400> 121

Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn Thr Pro Asp Pro Ser Lys

1 5 10 15

Phe Phe Ser Gln Leu

20

<210> 122

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2R beta

<400> 122

Ala Pro Glu Ile Ser Pro Leu Glu Val Leu Glu Arg Asp Lys Val Thr

1 5 10 15

<210> 123

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2R beta

<400> 123

Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln Gly Tyr Phe Phe Phe His Leu Pro Asp
1 5 10 15
Ala

<210> 124

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2R beta

<400> 124

Arg Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu Ser Leu Gln Glu Leu Gln
1 5 10 15
Gly

<210> 125

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2R Gamma c

<400> 125

Glu Arg Thr Met Pro Arg Ile Pro Thr Leu Lys Asn Leu Glu Asp Leu
1 5 10 15

<210> 126

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2R Gamma c

<400> 126

Pro Asp Tyr Ser Glu Arg Leu Cys Leu Val Ser Glu Ile Pro Pro Lys
1 5 10 15

<210> 127

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-4R alfa

<400> 127

Lys Ile Lys Lys Glu Trp Trp Asp Gln Ile Pro Asn Pro Ala Arg Ser
1 5 10 15

Arg Leu Val Ala
20

<210> 128

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-4R alfa

<400> 128

Leu Thr Lys Leu Leu Pro Cys Phe Leu Glu His Asn Met Lys Arg Asp
1 5 10 15

<210> 129

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-4R alfa

<400> 129

Leu Val Ile Ala Gly Asn Pro Ala Tyr Arg Ser Phe Ser Asn Ser Leu
1 5 10 15

Ser

<210> 130

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-4R alfa

<400> 130

Leu Gly Pro Pro Gly Glu Ala Gly Tyr Lys Ala Phe Ser Ser Leu Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 131

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-4R alfa

<400> 131

Gly Ala Ser Ser Gly Glu Glu Gly Tyr Lys Pro Phe Gln Asp Leu Ile

1 5 10 15

Pro

<210> 132

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-9R

<400> 132

Ser Pro Arg Val Lys Arg Ile Phe Tyr Gln Asn Val Pro Ser Pro Ala

1 5 10 15

Met Phe Phe Gln Pro

20

<210> 133

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> IL-9R

<400> 133

Gly Ala His Gly Ala Gly Val Leu Leu Ser Gln Asp Cys Ala Gly Thr

1 5 10 15

<210> 134

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-9R

<400> 134

Gly Thr Pro Gln Gly Ala Leu Glu Pro Cys Val Gln Glu Ala Thr Ala

1 5 10 15

<210> 135

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-12R beta2

<400> 135

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

1 5 10 15

Asp Leu Pro Ser His Glu Ala Pro Leu Ala

20 25

<210> 136

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-21R

<400> 136

Leu Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile Trp Ala Val Pro Ser Pro Glu Arg

1 5 10 15

Phe Phe Met Pro Leu

20

<210> 137

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-21R

<400> 137

Pro Phe Thr Gly Ser Ser Leu Glu Leu Gly Pro Trp Ser Pro Glu Val

1 5 10 15

<210> 138

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-21R

<400> 138

Pro Glu Val Pro Ser Thr Leu Glu Val Tyr Ser Cys His Pro Pro Arg

1 5 10 15

<210> 139

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-21R

<400> 139

Gly Asp Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val Val Ile

1 5 10 15

Pro

<210> 140

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> gp130

<400> 140

Asp Leu Ile Lys Lys His Ile Trp Pro Asn Val Pro Asp Pro Ser Lys

1 5 10 15

Ser His Ile Ala Gln

20

<210> 141

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> gp130

<400> 141

Asp Gly Asn Phe Thr Asp Val Ser Val Val Glu Ile Glu Ala Asn Asp

1 5 10 15

<210> 142

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> gp130

<400> 142

Gln Asn Thr Ser Ser Thr Val Gln Tyr Ser Thr Val Val His Ser Gly

1 5 10 15

<210> 143

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> gp130

<400> 143

Ser Thr Val Val His Ser Gly Tyr Arg His Gln Val Pro Ser Val Gln

1 5 10 15

<210> 144

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> gp130

<400> 144

Asp Gly Ile Leu Pro Arg Gln Gln Tyr Phe Lys Gln Asn Cys Ser Gln

1 5 10 15

His Glu Ser Ser

20

<210> 145

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> gp130

<400> 145

Glu Gly Met Pro Lys Ser Tyr Leu Pro Gln Thr Val Arg Gln

1 5 10

<210> 146

<211> 10

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> gp130

<400> 146

Thr Val Arg Gln Gly Gly Tyr Met Pro Gln

1 5 10

<210> 147

<211> 598

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HPV 16 E7eTCR (LVL-modified chimeric TCR)

<400> 147

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

1 5 10 15

Gly Leu Val Asp Ala Gly Val Thr Gln Ser Pro Thr His Leu Ile Lys

20 25 30

Thr Arg Gly Gln Gln Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Lys Ser Gly His

35 40 45

Asp Thr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Ala Leu Gly Gln Gly Pro Gln Phe

50 55 60

Ile Phe Gln Tyr Tyr Glu Glu Glu Glu Arg Gln Arg Gly Asn Phe Pro

65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly His Gln Phe Pro Asn Tyr Ser Ser Glu Leu Asn

85 90 95

Val Asn Ala Leu Leu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser

100 105 110

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

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

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

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

Gly Gln Asn Ile Asp Gln Pro Thr Glu Met Thr Ala Thr Glu Gly Ala

355 360 365

Ile Val Gln Ile Asn Cys Thr Tyr Gln Thr Ser Gly Phe Asn Gly Leu

370 375 380

Phe Trp Tyr Gln Gln His Ala Gly Glu Ala Pro Thr Phe Leu Ser Tyr

385 390 395 400

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

405 410 415

Ser Arg Ser Lys Gly Tyr Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Glu Leu Gln Met

420 425 430

Lys Asp Ser Ala Ser Tyr Leu Cys Ala Ser Val Asp Gly Asn Asn Arg

435 440 445

Leu Ala Phe Gly Lys Gly Asn Gln Val Val Val Ile Pro Asn Ile Gln

450 455 460

Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg Ser Gln Asp

465 470 475 480

Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn Val Pro

485 490 495

Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp

500 505 510

Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp Ser Asn

515 520 525

Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr Asn Ala Thr

530 535 540

Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr Glu Lys Ser

545 550 555 560

Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Leu Val Ile Val

565 570 575

Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr

580 585 590

Leu Arg Leu Trp Ser Ser

595

<210> 148

<211> 598

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HPV 16 E7eTCR (Cys-substituted, LVL-modified chimeric TCR)

<400> 148

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

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

Thr Arg Gly Gln Gln Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Lys Ser Gly His
35 40 45

Asp Thr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Ala Leu Gly Gln Gly Pro Gln Phe

50 55 60

Ile Phe Gln Tyr Tyr Glu Glu Glu Glu Arg Gln Arg Gly Asn Phe Pro
65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly His Gln Phe Pro Asn Tyr Ser Ser Glu Leu Asn
85 90 95

Val Asn Ala Leu Leu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser
100 105 110

Ser Leu Gly Trp Arg Gly Gly Arg Tyr Asn Glu Gln Phe Phe Gly Pro

115 120 125

Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro
130 135 140

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

Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val
165 170 175

Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys

180 185 190

Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser
195 200 205

Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His
210 215 220
Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp
225 230 235 240
Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala

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

305 310 315 320
Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met
325 330 335
Trp Gly Val Phe Leu Leu Tyr Val Ser Met Lys Met Gly Gly Thr Thr
340 345 350
Gly Gln Asn Ile Asp Gln Pro Thr Glu Met Thr Ala Thr Glu Gly Ala
355 360 365
Ile Val Gln Ile Asn Cys Thr Tyr Gln Thr Ser Gly Phe Asn Gly Leu

370 375 380
Phe Trp Tyr Gln Gln His Ala Gly Glu Ala Pro Thr Phe Leu Ser Tyr
385 390 395 400
Asn Val Leu Asp Gly Leu Glu Glu Lys Gly Arg Phe Ser Ser Phe Leu
405 410 415
Ser Arg Ser Lys Gly Tyr Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Glu Leu Gln Met
420 425 430
Lys Asp Ser Ala Ser Tyr Leu Cys Ala Ser Val Asp Gly Asn Asn Arg

435 440 445
Leu Ala Phe Gly Lys Gly Asn Gln Val Val Val Ile Pro Asn Ile Gln

450 455 460

Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg Ser Gln Asp

465 470 475 480

Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn Val Pro

485 490 495

Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp

500 505 510

Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp Ser Asn

515 520 525

Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr Asn Ala Thr

530 535 540

Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr Glu Lys Ser

545 550 555 560

Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Leu Val Ile Val

565 570 575

Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr

580 585 590

Leu Arg Leu Trp Ser Ser

595

<210> 149

<211> 274

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NY-ESO-1eTCR (NY-ESO-1c259 TCR a chain)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (136)..(136)

<223> Xaa = Pyrrolysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (144)..(144)

<223> Xaa = Pyrrolysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (164)..(164)

<223> Xaa = Pyrrolysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (169)..(169)

<223> Xaa = Pyrrolysine

<400> 149

Met Glu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Ile Leu Trp Leu Gly Leu Gly Trp
1 5 10 15

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

Pro Glu Gly Glu Asn Leu Val Leu Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala
35 40 45

Ile Tyr Asn Leu Gly Trp Phe Arg Gly Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr
50 55 60

Ser Leu Leu Leu Ile Gly Ser Ser Gly Arg Glu Gly Thr Ser Gly Arg
65 70 75 80

Leu Asn Ala Ser Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile
85 90 95

Ala Ala Ser Gly Pro Gly Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Arg
100 105 110

Pro Leu Tyr Gly Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser
115 120 125

Leu Ile Val His Pro Tyr Ile Xaa Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Xaa
130 135 140

Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp
145 150 155 160

Phe Asp Ser Xaa Thr Asn Val Ser Xaa Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr
165 170 175

Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser
180 185 190

Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn
195 200 205

Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro

210 215 220

Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp

225 230 235 240

Thr Asn Leu Asn Phe Cys Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu

245 250 255

Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp

260 265 270

Ser Ser

<210> 150

<211> 312

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NY-ESO-1eTCR (NY-ESO-1 c259 TCR b chain)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (244)..(244)

<223> Xaa = Pyrrolysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (252)..(252)

<223> Xaa = Pyrrolysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (272)..(272)

<223> Xaa = Pyrrolysine

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (273)..(273)

<223> Xaa = Pyrrolysine

<400> 150

Arg Met Ser Ile Gly Leu Leu Cys Cys Ala Ala Leu Ser Leu Leu Trp

1 5 10 15

Ala Gly Pro Val Asn Ala Gly Val Thr Gly Thr Pro Lys Phe Gly Val

20 25 30

Leu Lys Thr Gly Gly Ser Met Thr Leu Gly Cys Ala Gly Asp Met Asn

35 40 45

His Glu Tyr Met Ser Trp Tyr Arg Gly Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg

50 55 60

Leu Ile His Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gly Gly Glu Val

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Ser Ser Tyr Val Gly Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser

115 120 125

Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val

130 135 140

Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Cys Lys Ala

145 150 155 160

Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu

165 170 175

Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp

180 185 190

Pro Gly Pro Leu Lys Glu Gly Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys

195 200 205

Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gly Asn Pro Arg

210 215 220

Asn His Phe Arg Cys Gly Val Gly Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp

225 230 235 240

Glu Trp Thr Xaa Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Xaa Ile Val Ser Ala

245 250 255

Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Xaa

260 265 270

Xaa Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys

275 280 285

Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met

290 295 300

Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly

305 310

<210> 151

<211> 486

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Second generation 4-1BB containing anti-CD19 CAR (CTL019)

<400> 151

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 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu

20 25 30

Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln

35 40 45

Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr

50 55 60

Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Ile His Ser Gly Val Pro

65 70 75 80

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile

85 90 95

Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly

100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly

165 170 175

Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly

180 185 190

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser

195 200 205

Arg Ile Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys

210 215 220

Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys

225 230 235 240

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

245 250 255

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro

260 265 270

Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu

275 280 285

Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp

290 295 300

Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly

305 310 315 320

Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg

325 330 335

Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln

340 345 350

Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu

355 360 365

Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala

370 375 380

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

385 390 395 400

Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp

405 410 415

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu
420 425 430

Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile
435 440 445

Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
450 455 460

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met
465 470 475 480

Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485

<210> 152
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Second generation 4-1BB containing anti-CD19 CAR (Leader)
<400> 152
Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15
His Ala Ala Arg Pro
20

<210> 153
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Second generation 4-1BB containing anti-CD19 CAR (VH)

<400> 153
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr His Thr Ser Arg Ile His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr
100 105

<210> 154
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Second generation 4-1BB containing anti-CD19 CAR (Linker)
<400> 154
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10

<210> 155
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Second generation 4-1BB containing anti-CD19 CAR (VL)
<400> 155
Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30
Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu

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

85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 156

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Second generation 4-1BB containing anti-CD19 CAR (CD8 hinge)

<400> 156

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala

1 5 10 15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly

20 25 30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp

35 40 45

<210> 157

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Second generation 4-1BB containing anti-CD19 CAR (CD8 TM)

<400> 157

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu

1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys

20

<210> 158

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Second generation 4-1BB containing anti-CD19 CAR (4-1BB)

<400> 158

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
35 40

<210> 159

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

Second generation 4-1BB containing anti-CD19 CAR (CD3 Zeta)

<400> 159

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly
1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45

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

50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 160

<211> 465

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> First generation anti-mesothelin CAR (P4-z)

<400> 160

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 Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro
20 25 30
Gly Leu Val Thr Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser
35 40 45
Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Trp Asn Trp Ile Arg Gln

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

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

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

Ser Ala Asn Ala Gly Val Leu Leu Ile Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp

245 250 255

Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Met Ile Trp His Ser Ser Ala Ala Val Phe

260 265 270

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

275 280 285

Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Arg Pro Leu

290 295 300

Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His

305 310 315 320

Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu

325 330 335

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

340 345 350

Cys Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Asn

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

Arg

465

<210> 161

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> First generation anti-mesothelin CARb (Leader)

<400> 161

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 Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro

20 25 30
Gly Leu

<210> 162

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> First generation anti-mesothelin CARb (VH)

<400> 162

Val Thr Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp
1 5 10 15
Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro

20 25 30
Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp

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

85 90 95
Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

100 105 110
Gly Ile Leu

115

<210> 163

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> First generation anti-mesothelin CARb (Linker)

<400> 163

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15
Ser

<210> 164

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> First generation anti-mesothelin CARb (VL)

<400> 164

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

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

<210> 165

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> First generation anti-mesothelin CARb (CD8 hinge)

<400> 165

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
1 5 10 15

Ser Arg Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
20 25 30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
35 40 45

<210> 166

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> First generation anti-mesothelin CARb (CD8 TM)

<400> 166

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
20

<210> 167

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> First generation anti-mesothelin CARb (CD3 Zeta)

<400> 167

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Asn Gly
1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Lys
50 55 60
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 168
<211> 490
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Second generation CD28 containing anti-mesothelin CAR (HN1scFv-28Z)
<400> 168
Met Val Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15

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

Gly Val Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr
85 90 95
Asn Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr
100 105 110
Ser Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Ala Leu Trp Gly

115 120 125

Asp Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

145 150 155 160

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Ile Gly

165 170 175

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Gly Ile Tyr His Trp

180 185 190

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

195 200 205

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ser Arg Phe Ser Gly

210 215 220

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

225 230 235 240

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Leu

245 250 255

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Ile

260 265 270

Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly

275 280 285

Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe

290 295 300

Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val

305 310 315 320

Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp

325 330 335

Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met

340 345 350

Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala

355 360 365

Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg
370 375 380
Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
385 390 395 400

Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
405 410 415
Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
420 425 430
Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
435 440 445
Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
450 455 460

Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
465 470 475 480
Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485 490

<210> 169
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Second generation CD28 containing anti-mesothelin CAR (Leader)
<400> 169
Met Val Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15
Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln

20 25
<210> 170
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Second generation CD28 containing anti-mesothelin CAR (VH)
<400> 170

Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Arg Pro Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Met Gly Val Ile Asn Pro Ser Gly Val Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Asn Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Trp Ala Leu Trp Gly Asp Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Lys

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 171

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Second generation CD28 containing anti-mesothelin CAR (Linker)

<400> 171

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 172

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Second generation CD28 containing anti-mesothelin CAR (VL)

<400> 172

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Ile Gly

1 5 10 15

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

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

<210> 173
<211> 42
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Second generation CD28 containing anti-mesothelin CAR (CD8 hinge)

<400> 173
Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu
1 5 10 15
Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro
20 25 30
Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro
35 40

<210> 174
<211> 27
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Second generation CD28 containing anti-mesothelin CAR (CD8 TM)

<400>
174
Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val

20 25

<210> 175

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Second generation CD28 containing anti-mesothelin CAR (CD28 ICD)

<400> 175

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr

1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro

20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

35 40

<210> 176

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Second generation CD28 containing anti-mesothelin CAR (CD3 zeta)

<400> 176

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 177

<211> 554

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Third generation CD28 and 4-1BB containing anti-mesothelin CAR (HN1scFv-28BBZ)

<400> 177

Met Val Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Gln
20 25 30

Ser Gly Ala Glu Val Lys Arg Pro Gly Ala Ser Val Gln Val Ser Cys
35 40 45

Arg Ala Ser Gly Tyr Ser Ile Asn Thr Tyr Tyr Met Gln Trp Val Arg
50 55 60

Gln Ala Pro Gly Ala Gly Leu Glu Trp Met Gly Val Ile Asn Pro Ser
65 70 75 80

Gly Val Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr
85 90 95

Asn Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr
100 105 110

Ser Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Ala Leu Trp Gly
115 120 125

Asp Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
145 150 155 160

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Ile Gly
165 170 175

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Gly Ile Tyr His Trp

180 185 190

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

195 200 205

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ser Arg Phe Ser Gly

210 215 220

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

225 230 235 240

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Leu

245 250 255

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Phe

260 265 270

Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg

275 280 285

Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg

290 295 300

Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly

305 310 315 320

Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr

325 330 335

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

340 345 350

Arg Asn Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn

355 360 365

Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr

370 375 380

Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Phe Ser Val Val

385 390 395 400

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met

405 410 415

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe

420 425 430

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg
435 440 445

Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn
450 455 460

Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg
465 470 475 480

Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro
485 490 495

Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala
500 505 510

Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His
515 520 525

Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp
530 535 540

Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
545 550

<210> 178

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Third generation CD28 and 4-1BB containing anti-mesothelin CAR (Leader)

<400> 178

Met Val Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln
20 25

<210> 179

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Third generation CD28 and 4-1BB containing anti-mesothelin CAR

(VH)

<400> 179

Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Arg Pro Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Gln Val Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Ser Ile Asn Thr
20 25 30

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

Ala Arg Trp Ala Leu Trp Gly Asp Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Lys
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 180

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Third generation CD28 and 4-1BB containing anti-mesothelin CAR

(Linker)

<400> 180

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 181

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Third generation CD28 and 4-1BB containing anti-mesothelin CAR

(VL)

<400> 181

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Ile Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Gly Ile Tyr His Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asn Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 182

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Third generation CD28 and 4-1BB containing anti-mesothelin CAR (CD28 hinge)

<400> 182

Ala Ala Ala Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr
1 5 10 15

Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro
20 25 30

Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val
35 40 45

His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
50 55

<210> 183

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Third generation CD28 and 4-1BB containing anti-mesothelin CAR (CD28 TM)

<400> 183

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn
20 25

<210> 184

<211>

41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Third generation CD28 and 4-1BB containing anti-mesothelin CAR (CD28 ICD)

<400> 184

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
35 40

<210> 185

<211> 47

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Third generation CD28 and 4-1BB containing anti-mesothelin CAR (4-1BB)

<400> 185

Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

<210> 186

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Third generation CD28 and 4-1BB containing anti-mesothelin CAR (CD3 zeta)

<400> 186

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 187

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-7R alfa

<400> 187

Glu Ser Gly Tyr Ala Gln Asn Gly Asp Leu Glu Asp Ala Glu Leu Asp

1 5 10 15

Asp Tyr Ser Phe Ser Cys Tyr Ser Gln Leu Glu Val Asn Gly Ser Gln

20 25 30

His Ser Leu Thr Cys Ala Phe Glu Asp Pro Asp Val Asn Ile Thr Asn

35 40 45

Leu Glu Phe Glu Ile Cys Gly Ala Leu Val Glu Val Lys Cys Leu Asn

50 55 60

Phe Arg Lys Leu Gln Glu Ile Tyr Phe Ile Glu Thr Lys Lys Phe Leu

65 70 75 80

Leu Ile Gly Lys Ser Asn Ile Cys Val Lys Val Gly Glu Lys Ser Leu

85 90 95

Thr Cys Lys Lys Ile Asp Leu Thr Thr Ile Val Lys Pro Glu Ala Pro

100 105 110

Phe Asp Leu Ser Val Val Tyr Arg Glu Gly Ala Asn Asp Phe Val Val

115 120 125

Thr Phe Asn Thr Ser His Leu Gln Lys Lys Tyr Val Lys Val Leu Met

130 135 140

His Asp Val Ala Tyr Arg Gln Glu Lys Asp Glu Asn Lys Trp Thr His

145 150 155 160

Val Asn Leu Ser Ser Thr Lys Leu Thr Leu Leu Gln Arg Lys Leu Gln

165 170 175

Pro Ala Ala Met Tyr Glu Ile Lys Val Arg Ser Ile Pro Asp His Tyr

180 185 190

Phe Lys Gly Phe Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser Tyr Tyr Phe Arg Thr

195 200 205

Pro Glu Ile Asn Asn Ser Ser Gly Glu Met Asp

210 215

<210> 188

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-7R alfa

<400> 188

Pro Ile Leu Leu Thr Ile Ser Ile Leu Ser Phe Phe Ser Val Ala Leu
1 5 10 15

Leu Val Ile Leu Ala Cys Val Leu Trp
20 25

<210> 189

<211> 195

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-7R alfa

<400> 189

Lys Lys Arg Ile Lys Pro Ile Val Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys
1 5 10 15

Lys Thr Leu Glu His Leu Cys Lys Lys Pro Arg Lys Asn Leu Asn Val
20 25 30

Ser Phe Asn Pro Glu Ser Phe Leu Asp Cys Gln Ile His Arg Val Asp
35 40 45

Asp Ile Gln Ala Arg Asp Glu Val Glu Gly Phe Leu Gln Asp Thr Phe
50 55 60

Pro Gln Gln Leu Glu Glu Ser Glu Lys Gln Arg Leu Gly Gly Asp Val
65 70 75 80

Gln Ser Pro Asn Cys Pro Ser Glu Asp Val Val Ile Thr Pro Glu Ser
85 90 95

Phe Gly Arg Asp Ser Ser Leu Thr Cys Leu Ala Gly Asn Val Ser Ala
100 105 110

Cys Asp Ala Pro Ile Leu Ser Ser Ser Arg Ser Leu Asp Cys Arg Glu
115 120 125

Ser Gly Lys Asn Gly Pro His Val Tyr Gln Asp Leu Leu Leu Ser Leu
130 135 140

Gly Thr Thr Asn Ser Thr Leu Pro Pro Pro Phe Ser Leu Gln Ser Gly
145 150 155 160

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

165 170 175

Leu Gly Ser Asn Gln Glu Glu Ala Tyr Val Thr Met Ser Ser Phe Tyr

180 185 190

Gln Asn Gln

195

<210> 190

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-7R alfa

<400> 190

Met Thr Ile Leu Gly Thr Thr Phe Gly Met Val Phe Ser Leu Leu Gln

1 5 10 15

Val Val Ser Gly

20

<210> 191

<211> 152

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-7

<400> 191

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp

35 40 45

Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg

50 55 60

Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu

65 70 75 80

Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val

85 90 95

Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser
100 105 110
Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu

115 120 125
Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys
130 135 140
Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
145 150
<210> 192
<211> 286
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 7/2R-1 (IL-2R?)
<400> 192
Asn Cys Arg Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn
1 5 10 15

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

Pro Ala Ser Leu Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn
85 90 95
Gln Gly Tyr Phe Phe Phe His Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala
100 105 110
Cys Gln Val Tyr Phe Thr Tyr Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro Asp
115 120 125
Glu Gly Val Ala Gly Ala Pro Thr Gly Ser Ser Pro Gln Pro Leu Gln

130 135 140

Pro Leu Ser Gly Glu Asp Asp Ala Tyr Cys Thr Phe Pro Ser Arg Asp
145 150 155 160
Asp Leu Leu Leu Phe Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro
165 170 175
Ser Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro Pro
180 185 190
Ser Leu Gln Glu Arg Val Pro Arg Asp Trp Asp Pro Gln Pro Leu Gly
195 200 205

Pro Pro Thr Pro Gly Val Pro Asp Leu Val Asp Phe Gln Pro Pro Pro
210 215 220
Glu Leu Val Leu Arg Glu Ala Gly Glu Glu Val Pro Asp Ala Gly Pro
225 230 235 240
Arg Glu Gly Val Ser Phe Pro Trp Ser Arg Pro Pro Gly Gln Gly Glu
245 250 255
Phe Arg Ala Leu Asn Ala Arg Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu
260 265 270

Ser Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val
275 280 285

<210> 193
<211> 58
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 7/2R-2 (IL-7R alfa)
<400> 193
Lys Lys Arg Ile Lys Pro Ile Val Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys
1 5 10 15
Lys Thr Leu Glu His Leu Cys Lys Lys Pro Arg Lys Asn Leu Asn Val
20 25 30
Ser Phe Asn Pro Glu Ser Phe Leu Asp Cys Gln Ile His Arg Val Asp

35 40 45

Asp Ile Gln Ala Arg Asp Glu Val Glu Gly
50 55

<210> 194

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7/2R-2 (IL-2R beta)

<400> 194

Leu Glu Arg Asp Lys Val Thr Gln Leu Leu Leu Gln Gln Asp Lys Val
1 5 10 15
Pro Glu Pro Ala Ser Leu Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe
20 25 30

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

Arg Asp Asp Leu Leu Leu Phe Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser
100 105 110
Pro Pro Ser Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met
115 120 125
Pro Pro Ser Leu Gln Glu Arg Val Pro Arg Asp Trp Asp Pro Gln Pro
130 135 140
Leu Gly Pro Pro Thr Pro Gly Val Pro Asp Leu Val Asp Phe Gln Pro
145 150 155 160

Pro Pro Glu Leu Val Leu Arg Glu Ala Gly Glu Glu Val Pro Asp Ala
165 170 175
Gly Pro Arg Glu Gly Val Ser Phe Pro Trp Ser Arg Pro Pro Gly Gln
180 185 190

Gly Glu Phe Arg Ala Leu Asn Ala Arg Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala
195 200 205
Tyr Leu Ser Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val
210 215 220

<210> 195
<211> 76
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 7/2/12R-1 (IL-12R beta2)
<400> 195
Thr Val Leu Pro Ala Gly Asp Leu Pro Thr His Asp Gly Tyr Leu Pro
1 5 10 15
Ser Asn Ile Asp Asp Leu Pro Ser His Glu Ala Pro Leu Ala Asp Ser
20 25 30
Leu Glu Glu Leu Glu Pro Gln His Ile Ser Leu Ser Val Phe Pro Ser
35 40 45

Ser Ser Leu His Pro Leu Thr Phe Ser Cys Gly Asp Lys Leu Thr Leu
50 55 60
Asp Gln Leu Lys Met Arg Cys Asp Ser Leu Met Leu
65 70 75
<210> 196
<211> 127
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 7/12/2R-1 (IL-2R beta)
<400> 196
Asn Cys Arg Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn
1 5 10 15
Thr Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly

20 25 30
Gly Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe
35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

<210> 197

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7/12/2R-1 (IL-12R beta2)

<400> 197

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

1 5 10 15

Asp Leu Pro Ser

20

<210> 198

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7/12/2R-1 (IL-2R beta)

<400> 198

Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ser Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly

1 5 10 15

Glu Glu Arg Met Pro Pro Ser Leu Gln Glu Arg Val Pro Arg Asp Trp

20 25 30

Asp Pro Gln Pro Leu Gly Pro Pro Thr Pro Gly Val Pro Asp Leu Val

35 40 45

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

Val Pro Asp Ala Gly Pro Arg Glu Gly Val Ser Phe Pro Trp Ser Arg
65 70 75 80

Pro Pro Gly Gln Gly Glu Phe Arg Ala Leu Asn Ala Arg Leu Pro Leu
85 90 95

Asn Thr Asp Ala Tyr Leu Ser Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro
100 105 110

Thr His Leu Val
115

<210> 199

<211> 53

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7/12/2R-2 (IL-7R alfa)

<400> 199

Lys Lys Arg Ile Lys Pro Ile Val Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys
1 5 10 15

Lys Thr Leu Glu His Leu Cys Lys Lys Pro Arg Lys Asn Leu Asn Val
20 25 30

Ser Phe Asn Pro Glu Ser Phe Leu Asp Cys Gln Ile His Arg Val Asp
35 40 45

Asp Ile Gln Ala Arg
50

<210> 200

<211> 67

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7/12/2R-2 (IL-12R beta2)

<400> 200

Ala Gly Asp Leu Pro Thr His Asp Gly Tyr Leu Pro Ser Asn Ile Asp
1 5 10 15

Asp Leu Pro Ser His Glu Ala Pro Leu Ala Asp Ser Leu Glu Glu Leu

20 25 30

Glu Pro Gln His Ile Ser Leu Ser Val Phe Pro Ser Ser Ser Leu His

35 40 45

Pro Leu Thr Phe Ser Cys Gly Asp Lys Leu Thr Leu Asp Gln Leu Lys

50 55 60

Met Arg Cys

65

<210> 201

<211> 279

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7/21-R1 (IL-21R)

<400> 201

Leu Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile Trp Ala Val Pro Ser Pro Glu Arg

1 5 10 15

Phe Phe Met Pro Leu Tyr Lys Gly Cys Ser Gly Asp Phe Lys Lys Trp

20 25 30

Val Gly Ala Pro Phe Thr Gly Ser Ser Leu Glu Leu Gly Pro Trp Ser

35 40 45

Pro Glu Val Pro Ser Thr Leu Glu Val Tyr Ser Cys His Pro Pro Arg

50 55 60

Ser Pro Ala Lys Arg Leu Gln Leu Thr Glu Leu Gln Glu Pro Ala Glu

65 70 75 80

Leu Val Glu Ser Asp Gly Val Pro Lys Pro Ser Phe Trp Pro Thr Ala

85 90 95

Gln Asn Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Ser Glu Glu Arg Asp Arg Pro Tyr

100 105 110

Gly Leu Val Ser Ile Asp Thr Val Thr Val Leu Asp Ala Glu Gly Pro

115 120 125

Cys Thr Trp Pro Cys Ser Cys Glu Asp Asp Gly Tyr Pro Ala Leu Asp

130 135 140

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

145 150 155 160

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

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

<210> 202
<211> 54
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> 7/21-R2 (IL-7R alfa)
<400> 202
Lys Lys Arg Ile Lys Pro Ile Val Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys
1 5 10 15
Lys Thr Leu Glu His Leu Cys Lys Lys Pro Arg Lys Asn Leu Asn Val
20 25 30
Ser Phe Asn Pro Glu Ser Phe Leu Asp Cys Gln Ile His Arg Val Asp
35 40 45
Asp Ile Gln Ala Arg Asp
50

<210> 203

<211> 216
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> 7/21-R2 (7/21-R2)
<400> 203

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

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

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

180 185 190
Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val Val Ile Pro Pro Pro Leu

195 200 205

Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser

210 215

<210> 204

<211> 71

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7/21/7R-1 (IL-7R alfa)

<400> 204

Asp Cys Arg Glu Ser Gly Lys Asn Gly Pro His Val Tyr Gln Asp Leu

1 5 10 15

Leu Leu Ser Leu Gly Thr Thr Asn Ser Thr Leu Pro Pro Pro Phe Ser

20 25 30

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

35 40 45

Ile Leu Thr Ser Leu Gly Ser Asn Gln Glu Glu Ala Tyr Val Thr Met

50 55 60

Ser Ser Phe Tyr Gln Asn Gln

65 70

<210> 205

<211> 195

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7/7/21R-1 (IL-7R alfa)

<400> 205

Lys Lys Arg Ile Lys Pro Ile Val Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys

1 5 10 15

Lys Thr Leu Glu His Leu Cys Lys Lys Pro Arg Lys Asn Leu Asn Val

20 25 30

Ser Phe Asn Pro Glu Ser Phe Leu Asp Cys Gln Ile His Arg Val Asp

35 40 45

Asp Ile Gln Ala Arg Asp Glu Val Glu Gly Phe Leu Gln Asp Thr Phe

50 55 60

Pro Gln Gln Leu Glu Glu Ser Glu Lys Gln Arg Leu Gly Gly Asp Val

65 70 75 80

Gln Ser Pro Asn Cys Pro Ser Glu Asp Val Val Ile Thr Pro Glu Ser

85 90 95

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

100 105 110

Cys Asp Ala Pro Ile Leu Ser Ser Ser Arg Ser Leu Asp Cys Arg Glu

115 120 125

Ser Gly Lys Asn Gly Pro His Val Tyr Gln Asp Leu Leu Leu Ser Leu

130 135 140

Gly Thr Thr Asn Ser Thr Leu Pro Pro Pro Phe Ser Leu Gln Ser Gly

145 150 155 160

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

165 170 175

Leu Gly Ser Asn Gln Glu Glu Ala Tyr Val Thr Met Ser Ser Phe Tyr

180 185 190

Gln Asn Gln

195

<210> 206

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7/7/21R-1 (IL-21R)

<400> 206

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

1 5 10 15

Val Ile Pro Pro Pro Leu Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser

20 25 30

<210> 207

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7/2/21/12R-1 (IL-21R)

<400> 207

Ser Pro Gly Asp Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val
1 5 10 15

Val Ile Pro Pro Pro Leu Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala
20 25

<210> 208

<211> 71

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7/2/21/12R-1 (IL-12R beta2)

<400> 208

Ala Gly Asp Leu Pro Thr His Asp Gly Tyr Leu Pro Ser Asn Ile Asp
1 5 10 15

Asp Leu Pro Ser His Glu Ala Pro Leu Ala Asp Ser Leu Glu Glu Leu
20 25 30

Glu Pro Gln His Ile Ser Leu Ser Val Phe Pro Ser Ser Ser Leu His
35 40 45

Pro Leu Thr Phe Ser Cys Gly Asp Lys Leu Thr Leu Asp Gln Leu Lys
50 55 60

Met Arg Cys Asp Ser Leu Met
65 70

<210> 209

<211> 569

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7/4R-1 (IL-4R alfa)

<400> 209

Lys Ile Lys Lys Glu Trp Trp Asp Gln Ile Pro Asn Pro Ala Arg Ser
1 5 10 15

Arg Leu Val Ala Ile Ile Ile Gln Asp Ala Gln Gly Ser Gln Trp Glu

20 25 30

Lys Arg Ser Arg Gly Gln Glu Pro Ala Lys Cys Pro His Trp Lys Asn

35 40 45

Cys Leu Thr Lys Leu Leu Pro Cys Phe Leu Glu His Asn Met Lys Arg

50 55 60

Asp Glu Asp Pro His Lys Ala Ala Lys Glu Met Pro Phe Gln Gly Ser

65 70 75 80

Gly Lys Ser Ala Trp Cys Pro Val Glu Ile Ser Lys Thr Val Leu Trp

85 90 95

Pro Glu Ser Ile Ser Val Val Arg Cys Val Glu Leu Phe Glu Ala Pro

100 105 110

Val Glu Cys Glu Glu Glu Glu Glu Val Glu Glu Glu Lys Gly Ser Phe

115 120 125

Cys Ala Ser Pro Glu Ser Ser Arg Asp Asp Phe Gln Glu Gly Arg Glu

130 135 140

Gly Ile Val Ala Arg Leu Thr Glu Ser Leu Phe Leu Asp Leu Leu Gly

145 150 155 160

Glu Glu Asn Gly Gly Phe Cys Gln Gln Asp Met Gly Glu Ser Cys Leu

165 170 175

Leu Pro Pro Ser Gly Ser Thr Ser Ala His Met Pro Trp Asp Glu Phe

180 185 190

Pro Ser Ala Gly Pro Lys Glu Ala Pro Pro Trp Gly Lys Glu Gln Pro

195 200 205

Leu His Leu Glu Pro Ser Pro Pro Ala Ser Pro Thr Gln Ser Pro Asp

210 215 220

Asn Leu Thr Cys Thr Glu Thr Pro Leu Val Ile Ala Gly Asn Pro Ala

225 230 235 240

Tyr Arg Ser Phe Ser Asn Ser Leu Ser Gln Ser Pro Cys Pro Arg Glu

245 250 255

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

260 265 270

Glu Met Pro Cys Val Pro Gln Leu Ser Glu Pro Thr Thr Val Pro Gln
275 280 285
Pro Glu Pro Glu Thr Trp Glu Gln Ile Leu Arg Arg Asn Val Leu Gln
290 295 300
His Gly Ala Ala Ala Ala Pro Val Ser Ala Pro Thr Ser Gly Tyr Gln
305 310 315 320

Glu Phe Val His Ala Val Glu Gln Gly Gly Thr Gln Ala Ser Ala Val
325 330 335
Val Gly Leu Gly Pro Pro Gly Glu Ala Gly Tyr Lys Ala Phe Ser Ser
340 345 350
Leu Leu Ala Ser Ser Ala Val Ser Pro Glu Lys Cys Gly Phe Gly Ala
355 360 365
Ser Ser Gly Glu Glu Gly Tyr Lys Pro Phe Gln Asp Leu Ile Pro Gly
370 375 380

Cys Pro Gly Asp Pro Ala Pro Val Pro Val Pro Leu Phe Thr Phe Gly
385 390 395 400
Leu Asp Arg Glu Pro Pro Arg Ser Pro Gln Ser Ser His Leu Pro Ser
405 410 415
Ser Ser Pro Glu His Leu Gly Leu Glu Pro Gly Glu Lys Val Glu Asp
420 425 430
Met Pro Lys Pro Pro Leu Pro Gln Glu Gln Ala Thr Asp Pro Leu Val
435 440 445

Asp Ser Leu Gly Ser Gly Ile Val Tyr Ser Ala Leu Thr Cys His Leu
450 455 460
Cys Gly His Leu Lys Gln Cys His Gly Gln Glu Asp Gly Gly Gln Thr
465 470 475 480
Pro Val Met Ala Ser Pro Cys Cys Gly Cys Cys Cys Gly Asp Arg Ser
485 490 495
Ser Pro Pro Thr Thr Pro Leu Arg Ala Pro Asp Pro Ser Pro Gly Gly
500 505 510

Val Pro Leu Glu Ala Ser Leu Cys Pro Ala Ser Leu Ala Pro Ser Gly

515 520 525

Ile Ser Glu Lys Ser Lys Ser Ser Ser Ser Phe His Pro Ala Pro Gly

530 535 540

Asn Ala Gln Ser Ser Ser Gln Thr Pro Lys Ile Val Asn Phe Val Ser

545 550 555 560

Val Gly Pro Thr Tyr Met Arg Val Ser

565

<210> 210

<211> 52

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7/4R-2 (IL-7R alfa)

<400> 210

Lys Lys Arg Ile Lys Pro Ile Val Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys

1 5 10 15

Lys Thr Leu Glu His Leu Cys Lys Lys Pro Arg Lys Asn Leu Asn Val

20 25 30

Ser Phe Asn Pro Glu Ser Phe Leu Asp Cys Gln Ile His Arg Val Asp

35 40 45

Asp Ile Gln Ala

50

<

210> 211

<211> 505

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7/4R-2 (IL-4R alfa)

<400> 211

Asp Glu Asp Pro His Lys Ala Ala Lys Glu Met Pro Phe Gln Gly Ser

1 5 10 15

Gly Lys Ser Ala Trp Cys Pro Val Glu Ile Ser Lys Thr Val Leu Trp

20 25 30

Pro Glu Ser Ile Ser Val Val Arg Cys Val Glu Leu Phe Glu Ala Pro

35 40 45

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

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

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

His Gly Ala Ala Ala Ala Pro Val Ser Ala Pro Thr Ser Gly Tyr Gln
245 250 255
Glu Phe Val His Ala Val Glu Gln Gly Gly Thr Gln Ala Ser Ala Val
260 265 270
Val Gly Leu Gly Pro Pro Gly Glu Ala Gly Tyr Lys Ala Phe Ser Ser
275 280 285

Leu Leu Ala Ser Ser Ala Val Ser Pro Glu Lys Cys Gly Phe Gly Ala
290 295 300

Ser Ser Gly Glu Glu Gly Tyr Lys Pro Phe Gln Asp Leu Ile Pro Gly
305 310 315 320
Cys Pro Gly Asp Pro Ala Pro Val Pro Val Pro Leu Phe Thr Phe Gly
325 330 335
Leu Asp Arg Glu Pro Pro Arg Ser Pro Gln Ser Ser His Leu Pro Ser
340 345 350
Ser Ser Pro Glu His Leu Gly Leu Glu Pro Gly Glu Lys Val Glu Asp
355 360 365

Met Pro Lys Pro Pro Leu Pro Gln Glu Gln Ala Thr Asp Pro Leu Val
370 375 380
Asp Ser Leu Gly Ser Gly Ile Val Tyr Ser Ala Leu Thr Cys His Leu
385 390 395 400
Cys Gly His Leu Lys Gln Cys His Gly Gln Glu Asp Gly Gly Gln Thr
405 410 415
Pro Val Met Ala Ser Pro Cys Cys Gly Cys Cys Cys Gly Asp Arg Ser
420 425 430

Ser Pro Pro Thr Thr Pro Leu Arg Ala Pro Asp Pro Ser Pro Gly Gly
435 440 445
Val Pro Leu Glu Ala Ser Leu Cys Pro Ala Ser Leu Ala Pro Ser Gly
450 455 460
Ile Ser Glu Lys Ser Lys Ser Ser Ser Ser Phe His Pro Ala Pro Gly
465 470 475 480
Asn Ala Gln Ser Ser Ser Gln Thr Pro Lys Ile Val Asn Phe Val Ser
485 490 495

Val Gly Pro Thr Tyr Met Arg Val Ser
500 505

<210> 212

<211> 278

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7/6R-1 (Gp130)

<400> 212

Lys Asn Lys Arg Asp Leu Ile Lys Lys His Ile Trp Pro Asn Val Pro
1 5 10 15

Asp Pro Ser Lys Ser His Ile Ala Gln Trp Ser Pro His Thr Pro Pro
20 25 30

Arg His Asn Phe Asn Ser Lys Asp Gln Met Tyr Ser Asp Gly Asn Phe
35 40 45

Thr Asp Val Ser Val Val Glu Ile Glu Ala Asn Asp Lys Lys Pro Phe
50 55 60

Pro Glu Asp Leu Lys Ser Leu Asp Leu Phe Lys Lys Glu Lys Ile Asn
65 70 75 80

Thr Glu Gly His Ser Ser Gly Ile Gly Gly Ser Ser Cys Met Ser Ser
85 90 95

Ser Arg Pro Ser Ile Ser Ser Ser Asp Glu Asn Glu Ser Ser Gln Asn
100 105 110

Thr Ser Ser Thr Val Gln Tyr Ser Thr Val Val His Ser Gly Tyr Arg
115 120 125

His Gln Val Pro Ser Val Gln Val Phe Ser Arg Ser Glu Ser Thr Gln
130 135 140

Pro Leu Leu Asp Ser Glu Glu Arg Pro Glu Asp Leu Gln Leu Val Asp
145 150 155 160

His Val Asp Gly Gly Asp Gly Ile Leu Pro Arg Gln Gln Tyr Phe Lys
165 170 175

Gln Asn Cys Ser Gln His Glu Ser Ser Pro Asp Ile Ser His Phe Glu
180 185 190

Arg Ser Lys Gln Val Ser Ser Val Asn Glu Glu Asp Phe Val Arg Leu
195 200 205

Lys Gln Gln Ile Ser Asp His Ile Ser Gln Ser Cys Gly Ser Gly Gln
210 215 220

Met Lys Met Phe Gln Glu Val Ser Ala Ala Asp Ala Phe Gly Pro Gly

225 230 235 240

Thr Glu Gly Gln Val Glu Arg Phe Glu Thr Val Gly Met Glu Ala Ala

245 250 255

Thr Asp Glu Gly Met Pro Lys Ser Tyr Leu Pro Gln Thr Val Arg Gln

260 265 270

Gly Gly Tyr Met Pro Gln

275

<210> 213

<211> 57

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7/6R-2 (IL-7R alfa)

<400> 213

Lys Lys Arg Ile Lys Pro Ile Val Trp Pro Ser Leu Pro Asp His Lys

1 5 10 15

Lys Thr Leu Glu His Leu Cys Lys Lys Pro Arg Lys Asn Leu Asn Val

20 25 30

Ser Phe Asn Pro Glu Ser Phe Leu Asp Cys Gln Ile His Arg Val Asp

35 40 45

Asp Ile Gln Ala Arg Asp Glu Val Glu

50 55

<210> 214

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7/6R-2 (Gp130)

<400> 214

Lys Lys Pro Phe Pro Glu Asp Leu Lys Ser Leu Asp Leu Phe Lys Lys

1 5 10 15

Glu Lys Ile Asn Thr Glu Gly His Ser Ser Gly Ile Gly Gly Ser Ser

20 25 30

Cys Met Ser Ser Ser Arg Pro Ser Ile Ser Ser Ser Asp Glu Asn Glu
35 40 45
Ser Ser Gln Asn Thr Ser Ser Thr Val Gln Tyr Ser Thr Val Val His
50 55 60

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

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

Met Glu Ala Ala Thr Asp Glu Gly Met Pro Lys Ser Tyr Leu Pro Gln
195 200 205
Thr Val Arg Gln Gly Gly Tyr Met Pro Gln
210 215
<210> 215
<211> 233
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> hTNF- alfa
<400> 215
Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala
1 5 10 15

Leu Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe

20 25 30

Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro

85 90 95

Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu

100 105 110

Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser

115 120 125

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

130 135 140

Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala

145 150 155 160

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

165 170 175

Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu

180 185 190

Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu

195 200 205

Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly

210 215 220

Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu

225 230

<210> 216

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hNKG2-D: ICD-TM-ECD

<400> 216

Met Gly Trp Ile Arg Gly Arg Arg Ser Arg His Ser Trp Glu Met Ser
1 5 10 15

Glu Phe His Asn Tyr Asn Leu Asp Leu Lys Lys Ser Asp Phe Ser Thr
20 25 30

Arg Trp Gln Lys Gln Arg Cys Pro Val Val Lys Ser Lys Cys Arg Glu
35 40 45

Asn Ala Ser Pro Phe Phe Phe Cys Cys Phe Ile Ala Val Ala Met Gly
50 55 60

Ile Arg Phe Ile Ile Met Val Ala Ile Trp Ser Ala Val Phe Leu Asn
65 70 75 80

Ser Leu Phe Asn Gln Glu Val Gln Ile Pro Leu Thr Glu Ser Tyr Cys
85 90 95

Gly Pro Cys Pro Lys Asn Trp Ile Cys Tyr Lys Asn Asn Cys Tyr Gln
100 105 110

Phe Phe Asp Glu Ser Lys Asn Trp Tyr Glu Ser Gln Ala Ser Cys Met
115 120 125

Ser Gln Asn Ala Ser Leu Leu Lys Val Tyr Ser Lys Glu Asp Gln Asp
130 135 140

Leu Leu Lys Leu Val Lys Ser Tyr His Trp Met Gly Leu Val His Ile
145 150 155 160

Pro Thr Asn Gly Ser Trp Gln Trp Glu Asp Gly Ser Ile Leu Ser Pro
165 170 175

Asn Leu Leu Thr Ile Ile Glu Met Gln Lys Gly Asp Cys Ala Leu Tyr
180 185 190

Ala Ser Ser Phe Lys Gly Tyr Ile Glu Asn Cys Ser Thr Pro Asn Thr
195 200 205

Tyr Ile Cys Met Gln Arg Thr Val
210 215

<210> 217

<211> 4758

<212> DNA

<213>

Artificial Sequence

<220><223> CAR_P2A_G12-2R1-134_T2A_hIL-18

<400> 217

cccgccagga tcctgacgcg tatggtgctg ctggtcacca gcttactcct gtgcgagctc 60

ccccatcctg cgttcttgct gatccccgac atccagcagg tgcagctgca acagtcgggc 120

cccgagttag aaaaacccgg cgcctccgtg aagatctcgt gtaaagcttc gggctactcg 180

tttaccggct acaccatgaa ttgggttaag cagagccatg gaaagtctct tgaatggata 240

ggcctgatta cgccttataa tggggcctcg agctacaacc agaaatttcg tggtaaggca 300

actctgactg tagacaagtc gtcctccacc gcatacatgg atcttctgag cctaacctca 360

gaagacagcg cagtctactt ctgcgcccgt ggtggttacg atggccgcgg attcgactat 420

tggggccagg gcaccaccgt caccgtgagc tccggcggtg gcgggtccgg tggcggcggc 480

tcaagcggag gaggtagtga catcgagttg acccagtcgc ctgccatcat gtccgcatcc 540

cccggcgaga aggtgacgat gacgtgttct gcttccagct ctgtatcgta catgcactgg 600

taccaacaga agtccggcac ctcccccaag cgttggatct acgacacttc caagctggcg 660

tctggcgtcc ctgggcgctt ttcaggtagc gggtccggca atagctattc cttgacgatc 720

agtagcgtgg aggctgagga tgatgccacc tactactgcc agcagtggag caagcacccg 780

ctcaccttcg gcgccgggac caagcttgaa atcaaggcgg cggcgatcga ggtgatgtat 840

cctcctccct acctggacaa cgagaaatcc aatggcacta tcatccacgt gaaggggaag 900

cacctgtgcc cgagcccccc gttccccggc ccttccaagc ctttttgggt gcttgttgtg 960

gtcggcggcg tgctggcctg ctactctctg ctggtaaccg tagcgttcat catcttctgg 1020

gtgcgatcta agcggtcccg gctgttgcac agtgactaca tgaacatgac cccgcgccgc 1080

cccggcccaa cccgcaagca ctaccagccg tacgctccac ctcgcgactt tgccgcctac 1140

aggtcgcgag tgaaattttc gcgctccgcg gacgcgccgg cctatcagca gggccagaac 1200

cagctttaca acgagttgaa cctcgggcgc agggaggagt acgacgtgct ggataaacgt 1260

agaggtcggg acccggagat gggcggcaaa ccacgccgca agaaccctca ggaaggcctg 1320

tacaacgagc tccagaagga caaaatggct gaggcgtact cggagattgg gatgaaaggc 1380

gagcggcgcc gcggcaaggg ccacgatggc ctgtaccagg ggctatctac cgctacaaag 1440

gacacctacg acgccctaca tatgcaggcc ctgccaccgc gtggctctgg cgcaaccaac 1500

ttctcgcttc tgaagcaggc cggtgatgtg gaggaaaacc caggtcctat ggcccgcctg 1560

ggcaactgct cgctgacctg ggcggccctg atcatcctgc tgctgcccgg ctctctggag 1620

gagtgtggcc atatttccgt gtcagctcca atcgtgcacc tgggcgaccc catcaccgct 1680
tcttgcatca tcaagcagaa ctgctctcac ctcgaccctg agccccaaat actttgggag 1740
ctgggcgcgg agctccagcc tggaggacgc cagcagcgtt tgtcagacgg cactcaggaa 1800
tccatcatca ccctcccaca tctgaatcac acccaggcgt tcctgtcttg ttgtctcaac 1860
tggggcaact ccttgcagat actggaccag gtggagctga gagctggcta tcccccggca 1920
attcctcaca acctgtcctg tctgatgaac ctgaccacct ccagtctgat ctgtcagtgg 1980
gagcccgggc cagagactca ccttcccacc agcttcaccc ttaagtcgtt caaatccgag 2040

ggcaactgcc agacccaggg tgattctatt ttggattgcg tgcccaagga cgggcagtct 2100
cactgttgta ttcccgacaa gcacctcctt ttataccaga atatgggcat ctgggtgcag 2160
gccgagaatg ccctgggaac gtctatgtct ccacagctat gcctggatcc aatggacgta 2220
gtgaagctgg agccccccat gctacgcact atggatccta gcccagaggc cgctcccctc 2280
caggcggggt gcctgcagct ttgttgggaa ccctggcaac ccgggttgca cattaaccag 2340
aagtgcgagc tgcgccacaa gccccagaga ggagaggcct cctgggccct cgtgggccct 2400
ctgccgttgg aggccttgca gtatgagctg tgcggcctct tgcccgctac agcttatact 2460

ctgcaaatca ggtgtattcg ctggcctttg cccggacact ggtccgactg gtcccccagc 2520
cttgagctga gaaccacgga gcgcgccccc accgtacgct tggacacctg gtggcgccag 2580
aggcagctgg accctcgcac tgtgcagctg ttctggaagc cggtgcccct ggaggaggac 2640
tccggacgca tccagggcta cgtggtcagc tggcgtccga gtgggcaggc cggggccatc 2700
ctgcccctgt gcaacacgac tgagctgagc tgcactttcc atctgcccag cgaggctcag 2760
gaggtggcgc tcgtggctta caactccgca ggcacttctc gcccaacccc cgtggtgttc 2820
tctgagagtc ggggccccgc cctgacgcgc cttcacgcca tggcgcgcga cccgcattcc 2880

ctttgggtcg gttgggagcc acctaaccca tggccgcagg gctacgtgat cgagtggggc 2940
ctgggccccc cgagcgcatc gaacagcaac aagacctgga gaatggaaca gaacggccgc 3000
gcaaccggct tcctattaaa ggagaacatc cgcccgttcc agctgtacga gatcatcgtg 3060
acaccgctgt accaggacac tatggggcct tctcagcacg tttacgccta ctcccaggag 3120
atggccccga gccacgcacc ggaactgcac ctaaagcaca tcggtaagac ctgggcacag 3180
ctcgagtggg tccccgagcc tcccgagcta ggcaagtcgc cgctgaccca ttacaccatc 3240
ttctggacca acgcgcagaa ccagtccttt agcgcgatcc tcaatgcctc ctcccgcggt 3300

ttcgtcttgc acgggctgga gccagcctcc ttataccaca tccacctgat ggcggcttcc 3360

caggctggtg ctaccaacag cacagttttg acactgatga ccctgacccc cgagggctcg 3420

gagctccaca tcattttggg actcttcgga ctgctgctgc tgctgacctg cctgtgcggc 3480

actgcttggc tctgctgttc tcccaaccgc aagaaccctc tttggccctc tgtccctgac 3540

ccggcccatt ctagcctggg atcttgggtc ccgaccatca tggaagaaga cgcgttccag 3600

ctccctgggc tgggcacccc tccgatcacg aagctcacgg tcctggagga ggacgagaag 3660

aagcccgtac cgtgggagag ccactcctcg aatcatagcc taacctcctg ctttacaaac 3720

caggggtatt ttttttcca cttgcccgac gctctggaga tcgaggcctg ccaggtgtac 3780

ttcacctacg acccctacag cgaggaggac cctgccggtg atctgcccac ccatgacggc 3840

tatctgccat caaacattga cgacctgccg tccggaggtc ccagtcctcc gtccaccgcc 3900

cccggcggtt ctggtgccgg cgaagaacgg atgcctccct ccctgcagga gcgtgtgcca 3960

cgggattggg acccacagcc cttagggccg cctacccccg gcgtgcccga cctcgtcgat 4020

ttccagccgc ctcctgagct ggttctccga gaggcaggag aggaggtgcc tgatgctgga 4080

ccccgtgagg gcgtgagctt tccttggtct cgcccgccag gacaggggga gttccgtgct 4140

ctcaacgcgc gtctgccgtt gaacactgat gcatacctca gtcttcagga gctgcagggc 4200

caggatccaa cccacctcgt tggctcaggg gaaggtcgcg gctcgctgtt gacgtgtggt 4260

gacgtggagg agaaccccgg cccgtacttc ggtaagctgg agtctaaact gtcggtgata 4320

cggaacctga acgaccaggt cctgttcatt gaccagggta accgcccgct gttcgaggac 4380

atgactgact ccgattgccg cgacaatgcc ccccgcacga tcttcattat ctccatgtac 4440

aaggatagcc aaccccgtgg tatggccgtg accattagcg tcaaatgtga gaagatctct 4500

actctgtcct gtgagaataa gattatctcc ttcaaggaga tgaaccccc tgataacatc 4560

aaagacacta aatcggacat cattttcttt cagaggagcg tgccaggcca cgacaacaag 4620

atgcagttcg agagttctag ttacgaggga tatttcctgg cctgcgaaaa agaacgtgac 4680

ctcttcaagc taatcctgaa gaaggaggac gagctcggtg acaggagcat catgtttact 4740

gtccaaaacg aggactga 4758

<210> 218

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' upstream sequence including Kozak

<400> 218

cccgccagga tcctgacgcg t 21

<210> 219

<211> 1461

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mesothelin CAR

<400> 219

atggtgctgc tggtcaccag cttactcctg tgcgagctcc cccatcctgc gttcttgctg 60

atccccgaca tccagcaggt gcagctgcaa cagtcgggcc ccgagttaga aaaacccggc 120

gcctccgtga agatctcgtg taaagcttcg ggctactcgt ttaccggcta caccatgaat 180

tgggttaagc agagccatgg aaagtctctt gaatggatag gcctgattac gccttataat 240

ggggcctcga gctacaacca gaaatttcgt ggtaaggcaa ctctgactgt agacaagtcg 300

tcctccaccg catacatgga tcttctgagc ctaacctcag aagacagcgc agtctacttc 360

tgcgcccgtg gtggttacga tggccgcgga ttcgactatt ggggccaggg caccaccgtc 420

accgtgagct ccggcggtgg cgggtccggt ggcggcggct caagcggagg aggtagtgac 480

atcgagttga cccagtcgcc tgccatcatg tccgcatccc ccggcgagaa ggtgacgatg 540

acgtgttctg cttccagctc tgtatcgtac atgcactggt accaacagaa gtccggcacc 600

tcccccaagc gttggatcta cgacacttcc aagctggcgt ctggcgtccc tgggcgcttt 660

tcaggtagcg ggtccggcaa tagctattcc ttgacgatca gtagcgtgga ggctgaggat 720

gatgccacct actactgcca gcagtggagc aagcacccgc tcaccttcgg cgccgggacc 780

aagcttgaaa tcaaggcggc ggcgatcgag gtgatgtatc ctcctcccta cctggacaac 840

gagaaatcca atggcactat catccacgtg aaggggaagc acctgtgccc gagccccctg 900

ttccccggcc cttccaagcc tttttgggtg cttgttgtgg tcggcggcgt gctggcctgc 960

tactctctgc tggtaaccgt agcgttcatc atcttctggg tgcgatctaa gcggtcccgg 1020

ctgttgcaca gtgactacat gaacatgacc ccgcgccgcc ccggcccaac ccgcaagcac 1080

taccagccgt acgctccacc tcgcgacttt gccgcctaca ggtcgcgagt gaaattttcg 1140

cgctccgcgg acgcgccggc ctatcagcag ggccagaacc agctttacaa cgagttgaac 1200

ctcgggcgca gggaggagta cgacgtgctg gataaacgta gaggtcggga cccggagatg 1260

ggcggcaaac cacgccgcaa gaaccctcag gaaggcctgt acaacgagct ccagaaggac 1320

aaaatggctg aggcgtactc ggagattggg atgaaaggcg agcggcgccg cggcaagggc 1380

cacgatggcc tgtaccaggg gctatctacc gctacaaagg acacctacga cgccctacat 1440

atgcaggccc tgccaccgcg t 1461

<210> 220

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P2A

<400> 220

ggctctggcg caaccaactt ctcgcttctg aagcaggccg gtgatgtgga ggaaaaccca 60

ggtcct 66

<210> 221

<211> 2673

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G12/2R-1 134 ECD

<400> 221

atggcccgcc tgggcaactg ctcgctgacc tgggcggccc tgatcatcct gctgctgccc 60

ggctctctgg aggagtgtgg ccatatttcc gtgtcagctc caatcgtgca cctgggcgac 120

cccatcaccg cttcttgcat catcaagcag aactgctctc acctcgaccc tgagccccaa 180

atactttggg agctgggcgc ggagctccag cctggaggac gccagcagcg tttgtcagac 240

ggcactcagg aatccatcat caccctccca catctgaatc acacccaggc gttcctgtct 300

tgttgtctca actggggcaa ctccttgcag atactggacc aggtggagct gagagctggc 360

tatcccccgg caattcctca caacctgtcc tgtctgatga acctgaccac ctccagtctg 420

atctgtcagt gggagcccgg gccagagact caccttccca ccagcttcac ccttaagtcg 480

ttcaaatccg agggcaactg ccagacccag ggtgattcta ttttggattg cgtgcccaag 540

gacgggcagt ctcactgttg tattcccgac aagcacctcc ttttatacca gaatatgggc 600

atctgggtgc aggccgagaa tgccctggga acgtctatgt ctccacagct atgcctggat 660

ccaatggacg tagtgaagct ggagcccccc atgctacgca ctatggatcc tagcccagag 720

gccgctcccc ctcaggcggg gtgcctgcag ctttgttggg aaccctggca acccgggttg 780

cacattaacc agaagtgcga gctgcgccac aagccccaga gaggagaggc ctcctgggcc 840

ctcgtgggcc ctctgccgtt ggaggccttg cagtatgagc tgtgcggcct cttgcccgct 900

acagcttata ctctgcaaat caggtgtatt cgctggcctt tgcccggaca ctggtccgac 960

tggtccccca gccttgagct gagaaccacg gagcgcgccc ccaccgtacg cttggacacc 1020

tggtggcgcc agaggcagct ggaccctcgc actgtgcagc tgttctggaa gccggtgccc 1080

ctggaggagg actccggacg catccagggc tacgtggtca gctggcgtcc gagtgggcag 1140

gccggggcca tcctgcccct gtgcaacacg actgagctga gctgcacttt ccatctgccc 1200

agcgaggctc aggaggtggc gctcgtggct tacaactccg caggcacttc tcgcccaacc 1260

cccgtggtgt tctctgagag tcggggcccc gccctgacgc gccttcacgc catggcgcgc 1320

gacccgcatt ccctttgggt cggttgggag ccacctaacc catggccgca gggctacgtg 1380

atcgagtggg gcctgggccc cccgagcgca tcgaacagca acaagacctg gagaatggaa 1440

cagaacggcc gcgcaaccgg cttcctatta aaggagaaca tccgcccgtt ccagctgtac 1500

gagatcatcg tgacaccgct gtaccaggac actatggggc cttctcagca cgtttacgcc 1560

tactcccagg agatggcccc gagccacgca ccggaactgc acctaaagca catcggtaag 1620

acctgggcac agctcgagtg ggtccccgag cctcccgagc taggcaagtc gccgctgacc 1680

cattacacca tcttctggac caacgcgcag aaccagtcct ttagcgcgat cctcaatgcc 1740

tcctcccgcg gtttcgtctt gcacgggctg gagccagcct ccttatacca catccacctg 1800

atggcggctt cccaggctgg tgctaccaac agcacagttt tgacactgat gaccctgacc 1860

cccgagggct cggagctcca catcattttg ggactcttcg gactgctgct gctgctgacc 1920

tgcctgtgcg gcactgcttg gctctgctgt tctcccaacc gcaagaaccc tctttggccc 1980

tctgtccctg acccggccca ttctagcctg ggatcttggg tcccgaccat catggaagaa 2040

gacgcgttcc agctccctgg gctgggcacc cctccgatca cgaagctcac ggtcctggag 2100

gaggacgaga agaagcccgt accgtgggag agccactcct cgaatcatag cctaacctcc 2160

tgctttacaa accaggggta ttttttttttc cacttgcccg acgctctgga gatcgaggcc 2220

tgccaggtgt acttcaccta cgacccctac agcgaggagg accctgccgg tgatctgccc 2280

acccatgacg gctatctgcc atcaaacatt gacgacctgc cgtccggagg tcccagtcct 2340

ccgtccaccg cccccggcgg ttctggtgcc ggcgaagaac ggatgcctcc ctccctgcag 2400

gagcgtgtgc cacgggattg ggacccacag cccttagggc cgcctacccc cggcgtgccc 2460

gacctcgtcg atttccagcc gcctcctgag ctggttctcc gagaggcagg agaggaggtg 2520

cctgatgctg gaccccgtga gggcgtgagc tttccttggt ctcgcccgcc aggacagggg 2580

gagttccgtg ctctcaacgc gcgtctgccg ttgaacactg atgcatacct cagtcttcag 2640

gagctgcagg gccaggatcc aacccacctc gtt 2673

<210> 222

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> T2A

<400> 222

ggctcagggg aaggtcgcgg ctcgctgttg acgtgtggtg acgtggagga gaaccccggc 60

ccg 63

<210> 223

<211> 474

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-18

<400> 223

tacttcggta agctggagtc taaactgtcg gtgatacgga acctgaacga ccaggtcctg 60

ttcattgacc agggtaaccg cccgctgttc gaggacatga ctgactccga ttgccgcgac 120

aatgcccccc gcacgatctt cattatctcc atgtacaagg atagccaacc ccgtggtatg 180

gccgtgacca ttagcgtcaa atgtgagaag atctctactc tgtcctgtga gaataagatt 240

atctccttca aggagatgaa ccccccctgat aacatcaaag acactaaatc ggacatcatt 300

ttctttcaga ggagcgtgcc aggccacgac aacaagatgc agttcgagag ttctagttac 360

gagggatatt tcctggcctg cgaaaaagaa cgtgacctct tcaagctaat cctgaagaag 420

gaggacgagc tcggtgacag gagcatcatg tttactgtcc aaaacgagga ctga 474

<210> 224

<211> 3213

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G12-2R1_134_ECD_T2A_hIL-18

<400> 224

atggctcgcc tcggaaattg ttccctgacc tgggcagcat tgatcattct cctgctacca 60

gggagtctcg aagaatgtgg ccatatctct gtaagcgccc ctattgtgca cttgggagac 120

ccaatcacag catcatgcat catcaagcag aattgctctc atctcgatcc agagccacag 180

atactctggg agctgggcgc agaactgcaa cccggagggc gccagcagag actgagtgat 240

ggaacacagg agagcattat cactttacct catctgaacc acacccaggc ctttcttagc 300

tgctgtttga actggggcaa cagtctccag attctggacc aggtggagct gagggcgggt 360

tacccgcccg ccattccaca caatttgtcc tgtctcatga acctgacaac aagtagcctg 420

atatgccagt gggagccagg gccggagacc catctcccaa ctagtttcac gctcaagagc 480

ttcaagtcag aggggaactg ccagacacaa ggggacagca ttctcgactg tgtgcccaag 540

gacgggcaga gtcactgttg cattccagac aagcatctgc tgctgtatca gaacatgggc 600

atttgggttc aggccgaaaa tgccctcggt acttccatga gtccacagtt gtgtcttgac 660

cccatggatg tggtgaagct ggaaccgcca atgctgagga ccatggatcc ctcacctgag 720

gctgctccgc cacaggcagg gtgtctgcag ctgtgctggg agccctggca gcctggattg 780

cacataaacc aaaaatgtga gctgaggcac aagccccaga gaggtgaggc gagttgggcc 840

ctggtagggc ctcttcctct agaagccctg cagtatgaat tgtgtggatt acttcccgca 900

accgcctaca ctcttcagat caggtgtatc cggtggcctc tgcccggcca ctggagcgac 960

tggtctccga gcctcgaatt gagaacaaca gaacgggctc ctacggtgcg tctggataca 1020

tggtggaggc agcgacagtt ggacccgcgt acagtgcagc tgttctggaa gcccgtacct 1080

ctggaagagg atagtggtcg gattcaggga tatgtggtct cttggcggcc ttccggtcag 1140

gctggggcta tccttccctt atgcaacact acagagctca gctgtacctt tcatttaccc 1200

agcgaagccc aggaagtggc tctcgtcgcc tataattccg ctggaacgtc aagacccacc 1260

cctgtcgtgt tctctgagtc tcggggacct gccctaacca ggctccatgc aatggcacgc 1320

gatcctcaca gtctgtgggt tggctgggaa ccaccaaatc cctggcctca gggctatgtc 1380

atcgaatggg gccttggccc cccatcagcc tccaatagca acaagacctg gagaatggag 1440

caaaatggga gagcaaccgg gttcctgctg aaggagaaca tccgaccgtt ccagctttat 1500

gaaattattg taactccact gtaccaggac acaatgggac catctcagca tgtctacgct 1560

tattcccagg agatggcgcc tagtcatgct cctgaattac acttgaagca catagggaaa 1620

acttgggccc aattagagtg ggtcccggag cctcccgagc tggggaaaag cccattgacc 1680

cattacacga tattttggac caatgctcag aaccaatcct tttctgccat cctgaatgcc 1740

tcatctcgag gctttgtgct gcatggccta gagcctgcat cactctacca cattcacctg 1800

atggccgcca gccaggcggg tgccacaaac tccacagttc tcactttaat gactctaacc 1860

ccagagggca gtgaactgca catcatatta gggttattcg gattgctgct tcttttgact 1920

tgcctctgtg gcactgcgtg gctgtgctgc tccccgaacc gaaagaatcc tctctggcct 1980

agcgttcccg atcctgctca cagttcacta ggatcatggg tgccaaccat catggaagag 2040

gatgccttcc agctaccagg actgggtacg ccgcccataa ccaaattaac ggtccttgaa 2100

gaggatgaga agaaaccagt tccatgggaa agccactctt ccaatcatag cctcacctct 2160

tgcttcacca accaagggta tttttttttc cacctgcccg acgctctgga aattgaggcc 2220

tgccaagtgt atttcaccta cgacccttac tctgaagaag atccggcagg cgacctaccc 2280

actcatgatg gctacctgcc gtcaaacatc gacgacttac cgagtggagg accctcccca 2340
ccttctacag cccctggtgg ctccggtgca ggggaggaaa ggatgcctcc ctcactgcag 2400
gagagagtcc ccagagactg ggatcctcag ccacttggac cacccacacc tggtgtgcct 2460
gaccttgtgg attttcagcc ccctcctgag cttgttcttc gagaagcagg tgaggaggtt 2520
cctgatgcag gcccacgtga gggggtctcc tttccctggt ccaggcctcc tggccaagga 2580
gagttccgcg ctctgaatgc acgcttgcct ctgaacacag atgcttacct gagcctacaa 2640
gagttacaag gccaggatcc gacacacctg gtgggatctg gcgagggtag aggcagcctc 2700

ctaacttgtg gcgacgtgga ggagaacccc ggtccctact tcggtaagct ggagtctaaa 2760
ctgtcggtga tacggaacct gaacgaccag gtcctgttca ttgaccaggg taaccgcccg 2820
ctgttcgagg acatgactga ctccgattgc cgcgacaatg ccccccgcac gatcttcatt 2880
atctccatgt acaaggatag ccaaccccgt ggtatggccg tgaccattag cgtcaaatgt 2940
gagaagatct ctactctgtc ctgtgagaat aagattatct ccttcaagga gatgaacccc 3000
cctgataaca tcaaagacac taaatcggac atcattttct ttcagaggag cgtgccaggc 3060
cacgacaaca agatgcagtt cgagagttct agttacgagg gatatttcct ggcctgcgaa 3120

aaagaacgtg acctcttcaa gctaatcctg aagaaggagg acgagctcgg tgacaggagc 3180
atcatgttta ctgtccaaaa cgaggactga tga 3213

<210> 225
<211> 2673
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> G12/2R-1 134 ECD
<400> 225

Ala Thr Gly Gly Cys Thr Cys Gly Cys Cys Thr Cys Gly Gly Ala Ala
1 5 10 15
Ala Thr Thr Gly Thr Thr Cys Cys Cys Thr Gly Ala Cys Cys Thr Gly
20 25 30

Gly Gly Cys Ala Gly Cys Ala Thr Thr Gly Ala Thr Cys Ala Thr Thr
35 40 45
Cys Thr Cys Cys Thr Gly Cys Thr Ala Cys Cys Ala Gly Gly Gly Ala
50 55 60

Gly Thr Cys Thr Cys Gly Ala Ala Gly Ala Ala Thr Gly Thr Gly Gly
65 70 75 80
Cys Cys Ala Thr Ala Thr Cys Thr Cys Thr Gly Thr Ala Ala Gly Cys
85 90 95

Gly Cys Cys Cys Cys Thr Ala Thr Thr Gly Thr Gly Cys Ala Cys Thr
100 105 110
Thr Gly Gly Gly Ala Gly Ala Cys Cys Cys Ala Ala Thr Cys Ala Cys
115 120 125
Ala Gly Cys Ala Thr Cys Ala Thr Gly Cys Ala Thr Cys Ala Thr Cys
130 135 140
Ala Ala Gly Cys Ala Gly Ala Ala Thr Thr Gly Cys Thr Cys Thr Cys
145 150 155 160

Ala Thr Cys Thr Cys Gly Ala Thr Cys Cys Ala Gly Ala Gly Cys Cys
165 170 175
Ala Cys Ala Gly Ala Thr Ala Cys Thr Cys Thr Gly Gly Gly Ala Gly
180 185 190
Cys Thr Gly Gly Gly Cys Gly Cys Ala Gly Ala Ala Cys Thr Gly Cys
195 200 205
Ala Ala Cys Cys Cys Gly Gly Ala Gly Gly Gly Cys Gly Cys Cys Ala
210 215 220

Gly Cys Ala Gly Ala Gly Ala Cys Thr Gly Ala Gly Thr Gly Ala Thr
225 230 235 240
Gly Gly Ala Ala Cys Ala Cys Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Cys Ala
245 250 255
Thr Thr Ala Thr Cys Ala Cys Thr Thr Thr Ala Cys Cys Thr Cys Ala
260 265 270
Thr Cys Thr Gly Ala Ala Cys Cys Ala Cys Ala Cys Cys Cys Ala Gly
275 280 285

Gly Cys Cys Thr Thr Thr Cys Thr Thr Ala Gly Cys Thr Gly Cys Thr
290 295 300
Gly Thr Thr Thr Gly Ala Ala Cys Thr Gly Gly Gly Gly Cys Ala Ala

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

Cys Ala Thr Thr Cys Cys Ala Gly Ala Cys Ala Ala Gly Cys Ala Thr
565 570 575
Cys Thr Gly Cys Thr Gly Cys Thr Gly Thr Ala Thr Cys Ala Gly Ala
580 585 590
Ala Cys Ala Thr Gly Gly Gly Cys Ala Thr Thr Thr Gly Gly Gly Thr
595 600 605

Thr Cys Ala Gly Gly Cys Cys Gly Ala Ala Ala Ala Thr Gly Cys Cys
610 615 620
Cys Thr Cys Gly Gly Thr Ala Cys Thr Thr Cys Cys Ala Thr Gly Ala
625 630 635 640
Gly Thr Cys Cys Ala Cys Ala Gly Thr Thr Gly Thr Gly Thr Cys Thr
645 650 655
Thr Gly Ala Cys Cys Cys Cys Ala Thr Gly Gly Ala Thr Gly Thr Gly
660 665 670

Gly Thr Gly Ala Ala Gly Cys Thr Gly Gly Ala Ala Cys Cys Gly Cys
675 680 685
Cys Ala Ala Thr Gly Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Cys Cys Ala Thr
690 695 700
Gly Gly Ala Thr Cys Cys Cys Thr Cys Ala Cys Cys Thr Gly Ala Gly
705 710 715 720
Gly Cys Thr Gly Cys Thr Cys Cys Gly Cys Cys Ala Cys Ala Gly Gly
725 730 735

Cys Ala Gly Gly Gly Thr Gly Thr Cys Thr Gly Cys Ala Gly Cys Thr
740 745 750
Gly Thr Gly Cys Thr Gly Gly Gly Ala Gly Cys Cys Cys Thr Gly Gly
755 760 765
Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Ala Thr Thr Gly Cys Ala Cys Ala
770 775 780
Thr Ala Ala Ala Cys Cys Ala Ala Ala Ala Ala Thr Gly Thr Gly Ala
785 790 795 800

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

805 810 815

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

820 825 830

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

835 840 845

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

850 855 860

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

865 870 875 880

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

885 890 895

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

900 905 910

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

915 920 925

Thr Cys Cys Gly Gly Thr Gly Gly Cys Cys Thr Cys Thr Gly Cys Cys

930 935 940

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

945 950 955 960

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

965 970 975

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

980 985 990

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

995 1000 1005

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

1010 1015 1020

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

1025 1030 1035

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

1040 1045 1050

Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Thr Gly Thr Thr Cys Thr Gly Gly
1055 1060 1065
Ala Ala Gly Cys Cys Cys Gly Thr Ala Cys Cys Thr Cys Thr Gly
1070 1075 1080
Gly Ala Ala Gly Ala Gly Gly Ala Thr Ala Gly Thr Gly Gly Thr
1085 1090 1095
Cys Gly Gly Ala Thr Thr Cys Ala Gly Gly Gly Ala Thr Ala Thr
1100 1105 1110

Gly Thr Gly Gly Thr Cys Thr Cys Thr Thr Gly Gly Cys Gly Gly
1115 1120 1125
Cys Cys Thr Thr Cys Cys Gly Gly Thr Cys Ala Gly Gly Cys Thr
1130 1135 1140
Gly Gly Gly Gly Cys Thr Ala Thr Cys Cys Thr Thr Cys Cys Cys
1145 1150 1155
Thr Thr Ala Thr Gly Cys Ala Ala Cys Ala Cys Thr Ala Cys Ala
1160 1165 1170

Gly Ala Gly Cys Thr Cys Ala Gly Cys Thr Gly Thr Ala Cys Cys
1175 1180 1185
Thr Thr Thr Cys Ala Thr Thr Thr Ala Cys Cys Cys Ala Gly Cys
1190 1195 1200
Gly Ala Ala Gly Cys Cys Cys Ala Gly Gly Ala Ala Gly Thr Gly
1205 1210 1215
Gly Cys Thr Cys Thr Cys Gly Thr Cys Gly Cys Cys Thr Ala Thr
1220 1225 1230

Ala Ala Thr Thr Cys Cys Gly Cys Thr Gly Gly Ala Ala Cys Gly
1235 1240 1245
Thr Cys Ala Ala Gly Ala Cys Cys Cys Ala Cys Cys Cys Cys Thr
1250 1255 1260
Gly Thr Cys Gly Thr Gly Thr Thr Cys Thr Cys Thr Gly Ala Gly
1265 1270 1275
Thr Cys Thr Cys Gly Gly Gly Gly Ala Cys Cys Thr Gly Cys Cys

1280 1285 1290

Cys Thr Ala Ala Cys Cys Ala Gly Gly Cys Thr Cys Cys Ala Thr
1295 1300 1305
Gly Cys Ala Ala Thr Gly Gly Cys Ala Cys Gly Cys Gly Ala Thr
1310 1315 1320
Cys Cys Thr Cys Ala Cys Ala Gly Thr Cys Thr Gly Thr Gly Gly
1325 1330 1335
Gly Thr Thr Gly Gly Cys Thr Gly Gly Gly Ala Ala Cys Cys Ala
1340 1345 1350

Cys Cys Ala Ala Ala Thr Cys Cys Cys Thr Gly Gly Cys Cys Thr
1355 1360 1365
Cys Ala Gly Gly Gly Cys Thr Ala Thr Gly Thr Cys Ala Thr Cys
1370 1375 1380
Gly Ala Ala Thr Gly Gly Gly Gly Cys Cys Thr Thr Gly Gly Cys
1385 1390 1395
Cys Cys Cys Cys Cys Ala Thr Cys Ala Gly Cys Cys Thr Cys Cys
1400 1405 1410

Ala Ala Thr Ala Gly Cys Ala Ala Cys Ala Ala Gly Ala Cys Cys
1415 1420 1425
Thr Gly Gly Ala Gly Ala Ala Thr Gly Gly Ala Gly Cys Ala Ala
1430 1435 1440
Ala Ala Thr Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly Cys Ala Ala Cys Cys
1445 1450 1455
Gly Gly Gly Thr Thr Cys Cys Thr Gly Cys Thr Gly Ala Ala Gly
1460 1465 1470

Gly Ala Gly Ala Ala Cys Ala Thr Cys Cys Gly Ala Cys Cys Gly
1475 1480 1485
Thr Thr Cys Cys Ala Gly Cys Thr Thr Thr Ala Thr Gly Ala Ala
1490 1495 1500
Ala Thr Thr Ala Thr Thr Gly Thr Ala Ala Cys Thr Cys Cys Ala
1505 1510 1515

Cys Thr Gly Thr Ala Cys Cys Ala Gly Gly Ala Cys Ala Cys Ala
1520 1525 1530

Ala Thr Gly Gly Gly Ala Cys Cys Ala Thr Cys Thr Cys Ala Gly
1535 1540 1545
Cys Ala Thr Gly Thr Cys Thr Ala Cys Gly Cys Thr Thr Ala Thr
1550 1555 1560
Thr Cys Cys Cys Ala Gly Gly Ala Gly Ala Thr Gly Gly Cys Gly
1565 1570 1575
Cys Cys Thr Ala Gly Thr Cys Ala Thr Gly Cys Thr Cys Cys Thr
1580 1585 1590

Gly Ala Ala Thr Thr Ala Cys Ala Cys Thr Thr Gly Ala Ala Gly
1595 1600 1605
Cys Ala Cys Ala Thr Ala Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ala Cys Thr
1610 1615 1620
Thr Gly Gly Gly Cys Cys Cys Ala Ala Thr Thr Ala Gly Ala Gly
1625 1630 1635
Thr Gly Gly Gly Thr Cys Cys Cys Gly Gly Ala Gly Cys Cys Thr
1640 1645 1650

Cys Cys Cys Gly Ala Gly Cys Thr Gly Gly Gly Gly Ala Ala Ala
1655 1660 1665
Ala Gly Cys Cys Cys Ala Thr Thr Gly Ala Cys Cys Cys Ala Thr
1670 1675 1680
Thr Ala Cys Ala Cys Gly Ala Thr Ala Thr Thr Thr Thr Gly Gly
1685 1690 1695
Ala Cys Cys Ala Ala Thr Gly Cys Thr Cys Ala Gly Ala Ala Cys
1700 1705 1710

Cys Ala Ala Thr Cys Cys Thr Thr Thr Thr Cys Thr Gly Cys Cys
1715 1720 1725
Ala Thr Cys Cys Thr Gly Ala Ala Thr Gly Cys Cys Thr Cys Ala
1730 1735 1740
Thr Cys Thr Cys Gly Ala Gly Gly Cys Thr Thr Thr Gly Thr Gly

1745 1750 1755

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

1760 1765 1770

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

1775 1780 1785

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

1790 1795 1800

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

1805 1810 1815

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

1820 1825 1830

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

1835 1840 1845

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

1850 1855 1860

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

1865 1870 1875

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

1880 1885 1890

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

1895 1900 1905

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

1910 1915 1920

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

1925 1930 1935

Thr Gly Gly Cys Thr Gly Thr Gly Cys Thr Gly Cys Thr Cys Cys

1940 1945 1950

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

1955 1960 1965

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

1970 1975 1980

Gly Thr Thr Cys Cys Cys Gly Ala Thr Cys Cys Thr Gly Cys Thr
1985 1990 1995
Cys Ala Cys Ala Gly Thr Thr Cys Ala Cys Thr Ala Gly Gly Ala
2000 2005 2010

Thr Cys Ala Thr Gly Gly Gly Thr Gly Cys Cys Ala Ala Cys Cys
2015 2020 2025
Ala Thr Cys Ala Thr Gly Gly Ala Ala Gly Ala Gly Gly Ala Thr
2030 2035 2040
Gly Cys Cys Thr Thr Cys Cys Ala Gly Cys Thr Ala Cys Cys Ala
2045 2050 2055
Gly Gly Ala Cys Thr Gly Gly Gly Thr Ala Cys Gly Cys Cys Gly
2060 2065 2070

Cys Cys Cys Ala Thr Ala Ala Cys Cys Ala Ala Ala Thr Thr Ala
2075 2080 2085
Ala Cys Gly Gly Thr Cys Cys Thr Thr Gly Ala Ala Gly Ala Gly
2090 2095 2100
Gly Ala Thr Gly Ala Gly Ala Ala Gly Ala Ala Ala Cys Cys Ala
2105 2110 2115
Gly Thr Thr Cys Cys Ala Thr Gly Gly Gly Ala Ala Ala Gly Cys
2120 2125 2130

Cys Ala Cys Thr Cys Thr Thr Cys Cys Ala Ala Thr Cys Ala Thr
2135 2140 2145
Ala Gly Cys Cys Thr Cys Ala Cys Cys Thr Cys Thr Thr Gly Cys
2150 2155 2160
Thr Thr Cys Ala Cys Cys Ala Ala Cys Cys Ala Ala Gly Gly Gly
2165 2170 2175
Thr Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Cys Cys Ala Cys
2180 2185 2190

Cys Thr Gly Cys Cys Cys Gly Ala Cys Gly Cys Thr Cys Thr Gly
2195 2200 2205
Gly Ala Ala Ala Thr Thr Gly Ala Gly Gly Cys Cys Thr Gly Cys

2210 2215 2220

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

2225 2230 2235

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

2240 2245 2250

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

2255 2260 2265

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

2270 2275 2280

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

2285 2290 2295

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

2300 2305 2310

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

2315 2320 2325

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

2330 2335 2340

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

2345 2350 2355

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

2360 2365 2370

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

2375 2380 2385

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

2390 2395 2400

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

2405 2410 2415

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

2420 2425 2430

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

2435 2440 2445

Cys Cys Thr Gly Gly Thr Gly Thr Gly Cys Cys Thr Gly Ala Cys
2450 2455 2460
Cys Thr Thr Gly Thr Gly Gly Ala Thr Thr Thr Thr Cys Ala Gly
2465 2470 2475
Cys Cys Cys Cys Cys Thr Cys Cys Thr Gly Ala Gly Cys Thr Thr
2480 2485 2490

Gly Thr Thr Cys Thr Thr Cys Gly Ala Gly Ala Ala Gly Cys Ala
2495 2500 2505
Gly Gly Thr Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Thr Thr Cys Cys Thr
2510 2515 2520
Gly Ala Thr Gly Cys Ala Gly Gly Cys Cys Cys Ala Cys Gly Thr
2525 2530 2535
Gly Ala Gly Gly Gly Gly Gly Thr Cys Thr Cys Cys Thr Thr Thr
2540 2545 2550

Cys Cys Cys Thr Gly Gly Thr Cys Cys Ala Gly Gly Cys Cys Thr
2555 2560 2565
Cys Cys Thr Gly Gly Cys Cys Ala Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly
2570 2575 2580
Thr Thr Cys Cys Gly Cys Gly Cys Thr Cys Thr Gly Ala Ala Thr
2585 2590 2595
Gly Cys Ala Cys Gly Cys Thr Thr Gly Cys Cys Thr Cys Thr Gly
2600 2605 2610

Ala Ala Cys Ala Cys Ala Gly Ala Thr Gly Cys Thr Thr Ala Cys
2615 2620 2625
Cys Thr Gly Ala Gly Cys Cys Thr Ala Cys Ala Ala Gly Ala Gly
2630 2635 2640
Thr Thr Ala Cys Ala Ala Gly Gly Cys Cys Ala Gly Gly Ala Thr
2645 2650 2655
Cys Cys Gly Ala Cys Ala Cys Ala Cys Cys Thr Gly Gly Thr Gly
2660 2665 2670

<210> 226

<211> 63

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> T2A

<400> 226

Gly Gly Ala Thr Cys Thr Gly Gly Cys Gly Ala Gly Gly Gly Thr Ala
1 5 10 15

Gly Ala Gly Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Cys Cys Thr Ala Ala Cys
20 25 30

Thr Thr Gly Thr Gly Gly Cys Gly Ala Cys Gly Thr Gly Gly Ala Gly
35 40 45

Gly Ala Gly Ala Ala Cys Cys Cys Cys Gly Gly Thr Cys Cys Cys
50 55 60

<210> 227

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Myc epitope

<400> 227

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10

<210> 228

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flag epitope

<400> 228

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 229

<211> 175

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human G-CSF recombinantly produced in E. coli

<400> 229

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

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

Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala
130 135 140
Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser
145 150 155 160
Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro
165 170 175

<210> 230

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TEV-cleavable Twin Strep tag

<400> 230

Ala Ala Ala Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ser Ala Trp Ser His Pro

1 5 10 15

Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ala

20 25 30

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

35 40

<210> 231

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TEV-cleavable Hexahistidine

<400> 231

His His His His His His Ser Ser Gly Arg Glu Asn Leu Tyr Phe Gln

1 5 10 15

Gly Ser Met Gly

20