

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0101745

(43) 공개일자 2022년07월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/00 (2006.01) A61K 35/17 (2014.01)

A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)

(52) CPC특허분류

A61K 39/001112 (2018.08)

A61K 35/17 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-7022607(분할)

(22) 출원일자(국제) 2011년12월09일

심사청구일자 없음

(62) 원출원 특허 10-2021-7011458

원출원일자(국제) 2011년12월09일

심사청구일자 2021년05월17일

(85) 번역문제출일자 2022년07월01일

(86) 국제출원번호 PCT/US2011/064191

(87) 국제공개번호 WO 2012/079000

국제공개일자 2012년06월14일

(30) 우선권주장

61/421470 2010년12월09일 미국(US)

61/502649 2011년06월29일 미국(US)

(71) 출원인

더 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 펜실바니아

미국, 19104 펜실바니아주, 필라델피아, 9층, 씨빅 센터 볼러바드 3600

(72) 발명자

준, 칼, 에이치.

미합중국, 펜실바니아 19066, 메리온 스테이션, 바일드 로드 409

레빈, 브루체, 엘.

미합중국, 뉴저지 08003, 체리 힐, 리벌티 벨 드라이브 1258

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

장수길, 김영

전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 암을 치료하기 위한 키메라 항원 수용체 변형 T 세포의 용도

(57) 요약

본 발명은 인간에서 암을 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 본 발명은 CAR을 발현하기 위해 유전적으로 변형된 T 세포를 투여하는 단계를 포함하되, 상기 CAR은 항원 결합 도메인, 막통과 도메인, 공자극성 신호전달 영역 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함한다.

(52) CPC특허분류

A61K 39/39558 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/2803 (2013.01)

C12N 5/0636 (2013.01)

A61K 2039/5156 (2013.01)

A61K 2039/5158 (2013.01)

A61K 2039/585 (2013.01)

C12N 2510/00 (2013.01)

(72) 발명자

포터, 데이비드, 엘.

미합중국, 펜실바니아 19064, 스프링필드, 크롬 크
릭 로드 821

카로스, 마이클, 디.

미합중국, 펜실바니아 19119, 필라델피아, 카펜터
레인 716

밀온, 마이클, 씨.

미합중국, 뉴저지 08002, 체리 힐, 서레이 로드
314

명세서

청구범위

청구항 1

키메릭 항원 수용체(chimeric antigen receptor, CAR)를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 인간 T 세포의 용도로서,

상기 CAR은 서열 번호: 20의 아미노산 서열을 포함하는 CD19 항원 결합 도메인, CD8 α 힌지 도메인, CD8 α 막통과 도메인, 4-1BB 공자극성 신호 전달 영역, 및 CD3 제타 신호 전달 도메인을 포함하고, 여기에서 상기 T 세포는 CD19+ 혈액학적 암(hematological cancer)이 있는 인간 유래인 것을 특징으로 하는,

인간 T 세포의 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암을 치료하기 위한 키메릭 항원 수용체 변형 T 세포의 용도에 관한 것이다.

[0002] 관련 출원서의 교차 참조

[0003] 본 출원서는 2010년 12월 9일자로 출원된 미국 가출원 제 61/421,470 호, 및 2011년 6월 29일자로 출원된 미국 가출원 제 61/502,649 호에 대한 우선권을 주장하며, 이의 모든 개시내용은 본원에서 전체가 참고로 인용된다.

배경 기술

[0005] 만성 림프구성 백혈병(CLL)을 포함한 B-세포 악성 종양을 앓고 있는 대부분의 환자는 이들 질병으로 인해 사망할 것이다. 환자를 치료하기 위한 하나의 접근법은 키메릭 항원 수용체(CAR)의 발현을 통해 종양 세포 상에 발현된 표적 항원에 대한 T 세포를 유전적으로 변형시키는 것이다. CAR은 인간 백혈구 항원 의존성 방식으로 세포 표면 항원을 인식하도록 설계된 항원 수용체이다. 이러한 유형의 환자를 치료하기 위해 CAR을 발현하는 유전적으로 변형된 세포를 이용하려는 시도는 매우 제한된 성공만을 이루어냈다. 예를 들어, Brentjens 등, 2010, *Molecular Therapy* 18:4, 666-668, Morgan 등, 2010, *Molecular Therapy*, 2010년 2월 23일자로 온라인 상에 공개, pages 1-9, 및 Till 등, 2008, *Blood*. 112:2261-2271을 참고한다.

[0006] 대부분의 암에서, 종양 특이적 항원은 아직까지 명확하게 정의되어 있지 않지만, B 세포 악성 종양에서는 CD19는 매력적인 종양 표적이다. CD19의 발현은 정상 및 악성 B 세포에 제한되어(Uckun 등, *Blood*. 1988, 71:13-29), CD19는 CAR을 안전하게 시험하기 위한 널리 허용된 표적이다. CAR이 내생성 T-세포 수용체와 유사한 방식으로 T-세포 활성화를 개시할 수 있을 지라도, 현재까지 이러한 기술의 임상적 적용에 대한 주요 장애로는 CAR+ T 세포의 제한된 생체 내(*in vivo*) 확장, 주입 이후의 상기 세포의 신속한 소실, 및 실망스러운 임상적 활성이 있었다(Jena 등, *Blood*. 2010, 116:1035-1044; 및 Uckun 등, *Blood*. 1988, 71: 13-29).

[0007] 따라서 생체 내에서 확장할 수 있는 CAR을 이용하여 암을 치료하기 위한 조성물 및 방법에 대한 당해 기술분야에서의 필요성이 절실하다. 본 발명은 이러한 필요성을 제시한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0009] 발명의 요약

- [0010] 본 발명은 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 단리된 핵산 서열에 있어서, 상기 CAR은 항원 결합 도메인, 막통과 도메인, 공자극성 신호전달 영역, 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하고, 이때 상기 CD3 제타 신호전달 도메인은 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 단리된 핵산 서열을 포함한다.
- [0011] 하나의 실시형태에서, 상기 핵산서열은 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 단리된 핵산 서열을 포함한다.
- [0012] 하나의 실시형태에서, 상기 핵산서열은 서열번호 8의 핵산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 단리된 핵산 서열을 포함한다.
- [0013] 하나의 실시형태에서, 상기 항원 결합 도메인은 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 것을 특징으로 하는, 단리된 핵산 서열을 포함하고, 상기 항원 결합 단편은 Fab 또는 scFv인 것을 특징으로 하는, 단리된 핵산 서열을 포함한다.
- [0014] 하나의 실시형태에서, 상기 항원 결합 도메인은 종양 항원에 결합하는 것을 특징으로 하는, 단리된 핵산 서열을 포함한다.
- [0015] 하나의 실시형태에서, 상기 종양 항원은 혈액학적 악성 종양과 연관된 것을 특징으로 하는, 단리된 핵산 서열을 포함하고, 상기 종양 항원은 고형 종양과 연관된 것을 특징으로 하는, 단리된 핵산 서열을 포함하며, 상기 종양 항원은 CD19, CD20, CD22, ROR1, 메소텔린(mesothelin), CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, 당지질 F77, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR, 및 임의의 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 단리된 핵산 서열을 포함한다.
- [0016] 하나의 실시형태에서, 상기 공자극성 신호전달 영역은 CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능 연관 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, CD83과 특이적으로 결합하는 리간드, 및 임의의 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공자극성 분자의 세포 내 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는, 단리된 핵산 서열을 포함한다.
- [0017] 하나의 실시형태에서, 상기 CD3 제타 신호전달 도메인은 서열번호 18의 핵산 서열에 의해 암호화되는 것을 특징으로 하는, 단리된 핵산 서열을 포함한다.
- [0018] 본 발명은 항원 결합 도메인, 막통과 도메인, 공자극성 신호전달 영역 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 단리된 키메라 항원 수용체(CAR)에 있어서, 상기 CD3 제타 신호전달 도메인은 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 단리된 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함한다.
- [0019] 하나의 실시형태에서, 상기 CAR은 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 단리된 CAR를 포함한다.
- [0020] 하나의 실시형태에서, 상기 항원 결합 도메인은 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 것을 특징으로 하는, 단리된 CAR를 포함하며, 상기 항원 결합 단편은 Fab 또는 scFv인 것을 특징으로 하는, 단리된 CAR를 포함한다.
- [0021] 하나의 실시형태에서, 상기 항원 결합 도메인은 종양 항원과 결합하는 것을 특징으로 하는, 단리된 CAR를 포함하고, 상기 종양 항원은 혈액학적 악성 종양과 연관된 것을 특징으로 하는, 단리된 CAR를 포함하며, 상기 종양 항원은 고형 종양과 연관된 것을 특징으로 하는, 단리된 CAR를 포함한다. 상기 종양 항원은 CD19, CD20, CD22, ROR1, 메소텔린, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, 당지질 F77, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR, 및 임의의 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 단리된 CAR를 포함한다.
- [0022] 하나의 실시형태에서, 상기 공자극성 신호전달 영역은 CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능 연관 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, CD83과 특이적으로 결합하는 리간드, 및 임의의 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공자극성 분자의 세포 내 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는, 단리된 CAR를 포함한다.
- [0023] 본 발명은 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 세포에 있어서, 상기 CAR은 항원 결합 도메인, 막통과 도메인, 공자극성 신호전달 영역, 및 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는, 세포를 포함한다.
- [0024] 하나의 실시형태에서, 상기 CAR은 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 세포를 포함한다.

- [0025] 하나의 실시형태에서, 상기 핵산은 서열번호 8의 핵산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 세포를 포함한다.
- [0026] 하나의 실시형태에서, 상기 항원 결합 도메인은 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 것을 특징으로 하는, 세포를 포함하고, 상기 항원 결합 단편은 Fab 또는 scFv인 것을 특징으로 하는, 세포를 포함한다.
- [0027] 하나의 실시형태에서, 상기 항원 결합 도메인은 종양 항원과 결합하는 것을 특징으로 하는, 세포를 포함한다. 상기 종양 항원은 혈액학적 악성 종양과 연관된 것을 특징으로 하는, 세포를 포함하고, 상기 종양 항원은 고형 종양과 연관된 것을 특징으로 하는, 세포를 포함한다. 상기 종양 항원은 CD19, CD20, CD22, ROR1, 메소텔린, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, 당지질 F77, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR, 및 임의의 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 세포를 포함한다.
- [0028] 하나의 실시형태에서, 상기 공자극성 신호전달 영역은 CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능 연관 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, CD83과 특이적으로 결합하는 리간드, 및 임의의 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공자극성 분자의 세포 내 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는, 세포를 포함한다.
- [0029] 하나의 실시형태에서, 상기 CD3 제타 신호전달 도메인은 서열번호 18의 핵산 서열에 의해 암호화되는 것을 특징으로 하는, 세포를 포함한다.
- [0030] 하나의 실시형태에서, 상기 세포는 T 세포, 자연 살해(NK) 세포, 세포 독성 T 림프구(CTL) 및 조절용 T 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 세포를 포함한다.
- [0031] 하나의 실시형태에서, 상기 세포는 상기 항원 결합 도메인이 이의 상응하는 항원과 결합하는 경우에 항-종양 면역성을 나타내는 것을 특징으로 하는, 세포를 포함한다.
- [0032] 본 발명은 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 벡터에 있어서, 상기 CAR은 항원 결합 도메인, 공자극성 신호전달 영역 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하고, 상기 CD3 제타 신호전달 도메인은 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 벡터를 포함한다.
- [0033] 하나의 실시형태에서, 상기 CAR은 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 벡터를 포함한다.
- [0034] 하나의 실시형태에서, CAR을 암호화하는 상기 단리된 핵산 서열은 서열번호 8의 핵산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 벡터를 포함한다.
- [0035] 하나의 실시형태에서, 상기 항원 결합 도메인은 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 것을 특징으로 하는, 벡터를 포함한다. 상기 항원 결합 단편은 Fab 또는 scFv인 것을 특징으로 하는, 벡터를 포함한다.
- [0036] 하나의 실시형태에서, 상기 항원 결합 도메인은 종양 항원과 결합하는 것을 특징으로 하는, 벡터를 포함한다. 상기 종양 항원은 혈액학적 악성 종양과 연관된 것을 특징으로 하는, 벡터를 포함한다. 상기 종양 항원은 고형 종양과 연관된 것을 특징으로 하는, 벡터를 포함한다. 상기 종양 항원은 CD19, CD20, CD22, ROR1, 메소텔린, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, 당지질 F77, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR, 및 임의의 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 벡터를 포함한다.
- [0037] 하나의 실시형태에서, 상기 공자극성 신호전달 영역은 CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능 연관 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, CD83과 특이적으로 결합하는 리간드, 및 임의의 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공자극성 분자의 세포 내 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는, 벡터를 포함한다.
- [0038] 하나의 실시형태에서, 상기 CD3 제타 신호전달 도메인은 서열번호 18의 핵산 서열에 의해 암호화되는 것을 특징으로 하는, 벡터를 포함한다.
- [0039] 본 발명은 포유동물에서 표적 세포 개체군 또는 조직에 대한 T 세포 매개 면역 반응을 자극하기 위한 방법에 있어서, 상기 방법은 CAR을 발현하기 위해 유전적으로 변형된 유효량의 세포를 포유동물에 투여하는 단계를 포함 하되, 상기 CAR은 항원 결합 도메인, 공자극성 신호전달 영역, 및 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하고, 상기 항원 결합 도메인은 상기 표적 세포 개체군 또는 조직을 특이적으로 인식하도록 선택되는 것을 특징으로 하는, 방법을 포함한다.
- [0040] 본 발명은 또한 포유동물에서 항-종양 면역성을 제공하는 방법에 있어서, 상기 방법은 CAR을 발현하기 위해 유

전적으로 변형된 유효량의 세포를 포유동물에 투여하는 단계를 포함하되, 상기 CAR은 항원 결합 도메인, 공자극성 신호전달 영역, 및 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하여, 상기 포유동물에서 항-종양 면역성을 제공하는 것을 특징으로 하는, 방법을 포함한다.

- [0041] 본 발명은 종양 항원의 증가된 발현과 연관된 질병, 질환 또는 이상을 앓고 있는 포유동물을 치료하는 방법에 있어서, 상기 방법은 CAR을 발현하기 위해 유전적으로 변형된 유효량의 세포를 포유동물에 투여하는 단계를 포함하되, 상기 CAR은 항원 결합 도메인, 공자극성 신호전달 영역, 및 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하여, 상기 포유동물을 치료하는 것을 특징으로 하는, 방법을 포함한다.
- [0042] 하나의 실시형태에서, 상기 세포는 자가성 T 세포인 것을 특징으로 하는, 방법을 포함한다.
- [0043] 하나의 실시형태에서, 상기 종양 항원은 CD19, CD20, CD22, ROR1, 메소텔린, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, 당지질 F77, EGFRvIII, GD-2, NY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR, 및 임의의 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 방법을 포함한다.
- [0044] 본 발명은 만성 림프구성 백혈병을 앓는 인간을 치료하는 방법에 있어서, 상기 방법은 CAR을 발현하기 위해 유전적으로 변형된 T 세포를 인간에 투여하는 단계를 포함하되, 상기 CAR은 항원 결합 도메인, 공자극성 신호전달 영역, 및 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법을 포함한다.
- [0045] 하나의 실시형태에서, 상기 인간은 적어도 하나의 화학 요법제에 대해 내성이 있는 것을 특징으로 하는, 방법을 포함한다.
- [0046] 하나의 실시형태에서, 상기 만성 림프구성 백혈병은 난치성 CD19+ 백혈병 및 림프종인 것을 특징으로 하는, 방법을 포함한다.
- [0047] 본 발명은 암으로 진단된 인간에서 유전적으로 조작된 T 세포의 존속 개체군을 생성하는 방법에 있어서, 상기 방법은 CAR을 발현하기 위해 유전적으로 조작된 T 세포를 인간에 투여하는 단계를 포함하되, 상기 CAR은 항원 결합 도메인, 공자극성 신호전달 영역, 및 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하고, 상기 유전적으로 조작된 T 세포의 존속 개체군은 투여 이후에 적어도 1개월 동안 존속하는 것을 특징으로 하는, 방법을 포함한다.
- [0048] 하나의 실시형태에서, 상기 유전적으로 조작된 T 세포의 존속하는 개체군은 상기 인간에 투여된 T 세포, 상기 인간에 투여된 T 세포의 자손, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법을 포함한다.
- [0049] 하나의 실시형태에서, 상기 유전적으로 조작된 T 세포의 존속 개체군은 메모리 T 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법을 포함한다.
- [0050] 하나의 실시형태에서, 상기 암은 만성 림프구성 백혈병인 것을 특징으로 하는, 방법을 포함한다. 상기 만성 림프구성 백혈병은 난치성 CD19+ 백혈병 및 림프종인 것을 특징으로 하는, 개체군의 생성 방법과 만성 림프구성 백혈병은 치료되는 것을 특징으로 하는, 개체군의 생성 방법을 포함한다.
- [0051] 하나의 실시형태에서, 상기 유전적으로 조작된 T 세포의 존속 개체군은 투여 이후에 적어도 3개월 동안 상기 인간에서 존속하는 것을 특징으로 하는, 개체군의 생성 방법을 포함한다.
- [0052] 하나의 실시형태에서, 상기 유전적으로 조작된 T 세포의 존속하는 개체군은 투여 이후 적어도 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 2년, 또는 3년 동안 상기 인간에서 존속하는 것을 특징으로 하는, 개체군의 생성 방법을 포함한다.
- [0053] 본 발명은 암으로 진단된 인간에서 유전적으로 조작된 T 세포의 개체군을 확장하는 방법에 있어서, 상기 방법은 CAR을 발현하기 위해 유전적으로 조작된 T 세포를 인간에 투여하는 단계를 포함하되, 상기 CAR은 항원 결합 도메인, 공자극성 신호전달 영역, 및 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하고, 상기 투여된 유전적으로 조작된 T 세포는 상기 인간에서 자손 T 세포의 개체군을 생성하는 것을 특징으로 하는, 방법을 포함한다.
- [0054] 하나의 실시형태에서, 상기 인간에서 상기 자손 T 세포는 메모리 T 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법을 포함한다.

- [0055] 하나의 실시형태에서, 상기 T 세포는 자가성 T 세포인 것을 특징으로 하는, 방법을 포함한다.
- [0056] 하나의 실시형태에서, 상기 인간은 적어도 하나의 화학 요법제에 대해 내성이 있는 것을 특징으로 하는, 방법을 포함한다.
- [0057] 하나의 실시형태에서, 상기 암은 만성 림프구성 백혈병인 것을 특징으로 하는, 방법을 포함한다. 상기 만성 림프구성 백혈병은 난치성 CD19+ 백혈병 및 림프종인 것을 특징으로 하는, 방법을 포함한다.
- [0058] 하나의 실시형태에서, 상기 자손 T 세포의 개체군은 투여 이후에 적어도 3개월 동안 상기 인간에서 존속하는 것을 특징으로 하는, 방법을 포함한다.
- [0059] 하나의 실시형태에서, 상기 자손 T 세포의 개체군은 투여 이후에 적어도 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 2년, 또는 3년 동안 상기 인간에서 존속하는 것을 특징으로 하는, 방법을 포함한다.
- [0060] 하나의 실시형태에서, 상기 암은 치료되는 것을 특징으로 하는, 방법을 포함한다.

도면의 간단한 설명

- [0062] 본 발명의 바람직한 실시형태의 하기 상세한 설명은 첨부된 도면을 참고하여 나타내는 경우에 더욱 양호하게 이해될 것이다. 본 발명을 예시할 목적으로, 현재 바람직한 실시형태가 도면에 도시되어 있다. 그러나 본 발명은 도면에 도시된 실시형태의 정확한 배열 및 방편에 제한되지 않는 것으로 이해되어야 한다.

도 1A 내지 도 1C를 포함한 도 1은 유전자 전달 벡터 및 이식 유전자, 유전자 변형된 T 세포의 제조 및 임상적 프로토콜 설계를 개략적으로 보여주는 일련의 이미지이다. 도 1A는 주요 기능 요소를 나타내는 렌티바이러스 벡터 및 이식 유전자를 나타낸다. FMC63 쥐 단일 클론성 항체로부터 유래한 항-CD19 scFv, 인간 CD8α 힌지(hinge) 및 막통과 도메인, 및 인간 4-1BB 및 CD3 제타 신호전달 도메인의 발현을 지시하는 수포성 구내염 바이러스 단백질 G 유형(pseudo유형)의 임상적 등급 렌티바이러스 벡터(pELPs 19BBz로 명명됨)를 제조하였다. 상기 이식 유전자의 항구적 발현은 EF-1α(연장 인자-1α 프로모터); LTR, 긴 말단 반복서열; RRE, rev 반응 요소; 중심 폴리피리미딘 트랙(cPPT); 및 중심 종결 서열(CTS)의 포함에 의해 나타났다. 도면은 일정한 축적으로 도시되지 않았다. 도 1B는 T 세포의 제조를 나타낸다. 자가성 세포는 아페레시스(apheresis)를 통해 획득되었고, T 세포는 단핵성 세포 수비(cell elutriation)에 의해 부유화되고 세척되었으며, 잔류 백혈병 세포는 T 세포의 수동 선택 및 활성화를 위해 항-CD3/CD28로 코팅된 상자성 비드를 첨가함으로써 고갈되었다. 렌티바이러스 벡터는 세포 활성화 시점에 첨가되고, 배양 개시 3일 후에 세척하였다. 세포는 8 내지 12일 동안 교반용 플랫폼 장치(WAVE 생물 반응기 시스템) 상에서 배양하였다. 배양 마지막 날에 상기 비드를 자기장 상에 통과시킴으로써 제거하였으며, CART19 T 세포를 수확하고, 불용해성 배지에서 냉동 보존하였다. 도 1C는 임상적 프로토콜 설계를 나타낸다. 환자를 상술한 바와 같은 림프구 제거 화학요법에 적용한 후, 15 내지 20분의 기간에 걸쳐 정맥 내 증력 유동 적하에 의해 첫 번째 CART19를 주입하였다. 상기 주입은 화학요법이 완료된 지 최초 1 내지 5일 이후에 3일 동안에 걸친 분할 투여량 접근법(10%, 30% 및 60%)을 이용하여 이루어졌다. 종료점 검정은 연구 4번째 주에 수행되었다. 능동 모니터링이 끝날 무렵에 개체를 FDA 지침서에 따라 장기간 추적 조사를 위한 목적지 프로토콜로 전입하였다.

도 2A 내지 도 2F를 포함한 도 2는 CART19 세포가 혈액 및 골수의 생체 내 증식 및 존속이 지속됨을 증명한 일련의 이미지이다. 도 2A 및 도 2D에서 도시된 바와 같은 UPN 01, 도 2B 및 도 2E에서 도시된 바와 같은 UPN 02 및 도 2C 및 도 2F에서 도시된 바와 같은 UPN 03으로부터 수득된 샘플인 도 2A 내지 도 2C에 도시된 바와 같은 전혈 또는 도 2D 내지 도 2F에 도시된 바와 같은 골수로부터 분리된 DNA를 CART19 서열을 검출하고 정량화하기 위해 정량화된 검정을 이용하는 Q-PCR 분석에 대량으로 적용하였다. 각각의 데이터 포인트(data point)는 최대 % CV가 1.56% 미만인 상태에서 100 내지 200ng의 게놈 DNA에 대한 3회 측정치의 평균을 나타낸다. 상기 검정을 위한 성공/실패 파라미터에는 참고용 샘플의 증폭 기울기 및 효율, 및 참고용 샘플의 증폭에 대한 기존의 범위가 포함되어 있다. 표준 곡선 범위에 의해 확립된 검정에 대한 정량화의 하한치는 게놈 DNA의 마이크로그램(μg) 당 이식 유전자 2개의 복사수였고; 이 같은 수치 미만의 샘플 값은 추정치로서 고려되며, 적어도 2/3 복제수가 상기 값에 대한 % CV가 15%인 상태에서 Ct 값을 생성하는 경우에 제시된다. CART19 세포는 UPN 01 및 UPN 03에 대해 0일째, 1일째 및 2일째 날에 주입되었고, UPN 02에 대해 0일째, 1일째, 2일째 및 11일째 날에 주입되었다.

도 3A 내지 도 3D를 포함한 도 3은 CART19 세포의 주입 및 도 3D에 도시된 바와 같이 UPN 03으로부터 골수에서

동일한 분석물질의 일련의 평가 이후의 표시된 날짜에 도 3A에 도시된 바와 같은 UPN 01, 도 3B에 도시된 바와 같은 UPN 02 및 도 3C에 도시된 바와 같은 UPN 03에서의 혈청 사이토카인, 케모카인 및 사이토카인 수용체에서의 변화를 종단적으로 측정한다. CAR T 세포의 주입 전후에 혈청 및 골수 사이토카인을 증명한 일련의 이미지이다. 샘플은 루미넥스(Luminex) 비드 배열 기술 및 기-조립되고 실증된 다중분석 키트를 이용하는 다중 분석에 적용하였다. 3배 이상의 변화를 갖는 분석물질이 표시되어 있으며, 도 3A 내지 도 3C에 도시된 바와 같은 기준선으로부터의 상대적인 변화, 또는 도 3D에 도시된 바와 같은 절대값으로서 작도된다. 각각의 시점에서의 각각의 분석물질에 대한 절대값은 표준 곡선에 대한 80 내지 120%의 관측/예상 절사값(cutoff value)에 의해 결정된 정량화 상한치 및 하한치(ULOQ 및 LLOQ)와 함께 3배의 8점 회색 시리즈에 대한 재조합 단백질 기반 표준 곡선으로부터 결정되었다. 각각의 샘플은 산정된 평균값 및 대부분의 경우에 10% 미만의 % CV로 2회 평가되었다. 절대값에 대한 광범위한 범위의 정황에서 통합된 데이터 표현을 조절 위해 데이터는 각각의 분석물질에 대한 기준선 값에 대해 배수 변화로서 나타낸다. 기준선 값이 검출 불가능한 경우, 표준 곡선의 최저치의 절반을 기준선 값으로 사용하였다. 분석물질 및 기준선(0번째 날)의 값에 대한 표준 곡선 범위(UPN 01, UPN 02 및 UPN 03에 대해 괄호 안에 순서대로 나열됨: 전체 단위는 pg/ml임): IL1- α : 35.5-29,318(689, 301, 287); IL-6: 2.7-4,572(7, 10.1, 8.7); IFN- γ : 11.2-23,972(2.8, ND, 4.2); CXCL10: 2.1-5,319(481, 115, 287); MIP-1 β : 3.3-7,233(99.7, 371, 174); MCP-1: 4.8-3,600(403, 560, 828); CXCL9: 48.2-3,700(1,412, 126, 177); IL2- α : 13.4-34,210(4,319, 9,477, 610); IL-8: 2.4-5,278(15.3, 14.5, 14.6); IL-10: 6.7-13,874(8.5, 5.4, 0.7); MIP-1 α : 7.1-13,778(57.6, 57.3, 48.1).

도 4A 내지 도 4D를 포함한 도 4는 CART19의 장기간 표면 발현 및 기능적 메모리 CAR의 생체 내 확립을 나타낸 일련의 이미지이다. 도 4A는 말초 및 골수에서 CAR 발현 CD3+ 림프구의 검출 및 B 세포의 부재를 나타낸다. CART19 세포의 주입 후 169일째 날에 UPN 03으로부터 수득된 새로이 가공된 말초 혈액 또는 골수 단핵성 세포는 CAR19의 표면 발현(상부) 또는 B 세포의 부재(하부)는 유동 세포분석법으로 측정되었으며; 대조군으로서 건강한 기증자 ND365로부터 수득된 PBMC를 염색하였다. CD3+ 및 B 세포 개체군에 대한 게이팅(gating) 전략은 도 9에 나타나 있다. CD3+ 림프구에서의 CAR19 발현을 평가하기 위해, 샘플을 CD14-PE-Cy7 및 CD16-PE-Cy7(덤프 채널) 및 CD3-FITC에 대한 항체로 동시 염색하고, CD3+ 상에서 수동적으로 게이팅하였으며, CD8a-PE, 및 알렉사(Alexa)-647에 접합된 항-CAR19 유전자형 항체로 동시 염색함으로써 CD8+ 및 CD8-림프구 구획에서의 CAR19 발현에 대해 측정하였다. 작도에서의 데이터는 덤프음성채널/CD3 양성 세포 개체군 상에서 게이팅된다. B 세포의 존재를 평가하기 위해, 샘플을 CD14-APC 및 CD3-FITC(덤프 채널)에 대한 항체로 동시 염색하고, CD20-PE 및 CD19-PE-Cy-7에 대한 항체로 동시 염색함으로써 덤프 음성 채널 분획에서의 B 세포의 존재에 대해 평가하였다. 모든 경우에, 음성 게이트 4분원(gate quadrant)이 도 4B 및 도 4C에 도시된 바와 같이 비-염색 대조군 상에서 발현되었다. CD4+(도 4B) 및 CD8+(도 4C) T 세포의 서브셋의 T 세포 면역 표현형 검사가 도시되어 있다. T 세포 주입 후 56일째 및 169일째 날에 아페레시스에 의해 수득된 UPN 03으로부터의 냉동된 말초 혈액 샘플을 어떠한 인자의 첨가 없이 배양 배지에 하룻밤 동안 방치하고, 세척하고, T 세포 메모리, 활성화 및 고갈에 대한 마커의 발현을 위한 다중 파라미터 면역 표현형 검사를 실시하였다. 도 8에 도시된 바와 같은 게이팅 전략은 덤프음성 채널(CD14, CD16, 라이브/데드 아쿠아(live/dead aqua)) 및 CD3 양성 세포에 대한 초기 게이팅과 그 이후의 CD4+ 및 CD8+ 세포에 대한 양성 게이팅을 포함한다. 게이트 및 4분원은 FMO 대조군(CAR, CD45RA, PD-1, CD25, CD127, 및 CCR7)을 이용하여 확립되거나, 양성 세포 개체군(CD3, CD4, 및 CD8) 상에서 게이팅 및 명확하게 설명된 서브셋(CD27, CD28, 및 CD57)에 의해 확립되었으며; 데이터는 사건의 객관적인 가시화를 위한 이중 지수 변환 이후에 표시되었다. 도 4D는 존속하는 CAR 세포의 기능적 역량을 나타낸다. T 세포 주입 주입 후 56일째 및 169일째 날에 아페레시스에 의해 수득된 UPN 03으로부터의 냉동된 말초 혈액 샘플은 어떠한 인자의 첨가 없이 배양 배지에서 하룻밤 동안 방치하고, 세척하였으며, CD107 과립 감소 검정을 이용하여 CD19 발현 표적 세포를 인식하는 능력에 대해 생체 외에서 직접 평가하였다. 항-CD28, 항-CD49d 및 CD107-FITC의 존재 하에 2시간의 배양 이후에 세포 혼합물을 수확하고, 세척하였으며, CD19 발현 표적에 반응하여 과립 감소하도록 하는 CART19 세포의 능력을 평가하기 위해 다중 파라미터 유동 세포 분석법에 적용하였다. 상기 게이팅 전략은 덤프음성채널(CD14-PE-Cy7, CD16-PE-Cy7, 라이브/데드 아쿠아) 및 CD3-PE 양성 세포 상에서의 초기 게이팅, 및 그 이후의 CD8-PE-텍사스 레드(Texas Red) 양성 세포에 대한 게이팅을 포함하고 있었으며; 제시된 데이터는 CD8+ 게이팅된 개체군을 위한 것이었다. 모든 경우에, 음성 게이트 4분원은 비-염색 대조군 상에서 확립되었다.

도 5A 내지 도 5C를 포함한 도 5는 CART19 세포의 주입 이후에 임상적 반응을 평가하는 실험 결과를 나타낸 일련의 이미지이다. 도 5A는 UPN 02가 최소 반응(R/B, 화살표)으로 2사이클의 리툭시맙(rituximab) 및 벤다무스틴(bendamustine)으로 처리되었다는 것을 나타낸다. CART19 T 세포는 벤다무스틴만(B, 화살표)으로 처리한지 초기 4일 이후에 주입되었다. 리툭시맙 및 벤다무스틴 내성 백혈병은 주입 18일 이내에 절대 림프구 개수(ALC)에서

60,600/ μ l에서 200/ μ l로 감소에 의해 나타난 바와 같이 혈액으로부터 신속하게 제거되었다. 코르티코스테로이드 처리는 불안감 및 비감염성 발열 증상으로 인해 주입 후 18일째 날에 시작되었다. 참고용 라인(점선)은 ALC에 대한 정상 상한치를 나타낸다. 도 5B는 CD20에 대한 UPN 01 및 UPN 03 환자로부터 얻은 순차적인 골수 생검 또는 응고 검체를 염색하는 예시적인 실험의 결과를 나타낸다. 환자 둘 모두에 존재하는 백혈병에 의한 전처리 침윤은 세포충실도(cellularity) 및 3계통 조혈(trilineage hematopoiesis)의 정상화가 동반되는 후처리 검체 상에는 존재하지 않았다. UPN 01은 유동 세포 분석법, 세포 유전학 및 형광 원위치 형성법(fluorescence in situ hybridization, FISH)를 시행한 바, 어떠한 CLL세포도 검출되지 않았으며, 골수 또는 혈액에서의 유동 세포 분석법에 의해 검출된 정상 B 세포를 갖지 않았다. UPN 03은 +23일째 날에 유동 세포 분석법에 의해 확인된 5%의 잔류 정상 CD5 음성 B 세포를 가졌으며, 이는 이들이 다클론성임을 나타냈으며; +176일째 날에는 어떠한 정상 B 세포가 검출되지 않았다. 도 5C는 화학요법 내성의 일반적인 림프샘 장애의 신속한 분해능을 평가하기 위해 순차적인 CT 이미지화를 이용한 실험 결과를 나타낸다. 좌우 액액량(Bilateral axillary mass)은 화살표 및 원으로 표시된 바와 같이 주입 후 83일째(UPN 01) 및 31일째(UPN 03) 정도에 분해되었다.

도 6A 내지 도 6C를 포함한 도 6은 UPN 01, UPN 02 및 UPN 03에 대해 순환 중인 절대 림프구의 개수 및 총 CART19+ 세포를 나타내는 일련의 이미지이다. 순환 중인 총 CART19+ 세포에 대한 림프구(총 정상 세포 및 CLL 세포)의 총수는 혈액의 부피가 5.0 l 이라는 가정 하에 CBC 값으로부터의 절대 림프구 개수를 이용하여 3개의 개체 모두에 대해 작도된다. 순환 중인 CART19 세포의 총수는 도 2에 도시된 바와 같이 절대 림프구 개수를 갖는 직렬식 CBC 값 및 Q-PCR 마킹 값을 이용하여 산정되었으며, 복사수/ μ g DNA를 본원에서 다른 경우에 개시된 바와 같이 평균 마킹율(%)로 변환하였다. 상기 Q-PCR 마킹율(%)은 주입 생성물의 유동 세포 분석 특성화 및 샘플로부터의 데이터와 밀접하게 관련(2 미만의 배수 변이)이 있는 것으로 밝혀졌으며, 이때 수반되는 유동 세포 분석법 데이터는 염색에 의해 직접적으로 CART19 세포를 계산하는데 이용 가능하였다.

도 7A 내지 도 7D를 포함한 도 7은 T 세포 주입 후 71일째 날에 UPN-01 PBMC 중의 CART19 양성 세포의 직접적인 생체 외(ex vivo) 검출을 포함하는 실험을 나타낸 일련의 이미지이다. 주입 후 71일째 날에 새로운 아폐레시스 이후에 수집되거나 T 세포 생성물(기준선)의 제조를 위해 아폐레시스 시점에 냉동되고 염색 이전에 생존 가능하게 해동된 UPN-01 PBMC는 표면 상의 CAR19 일부분을 발현하는 CART19 세포의 존재 여부를 검출하기 위해 유동 세포 분석법을 적용하였다. 림프구에서 CAR19의 발현을 평가하기 위해, 샘플을 CD3-PE, 및 알렉사-647에 접합된 항-CAR19 유전자형 항체와 동시 염색하고, CD3-PE 단독으로 동시 염색하였다(CAR19를 위한 FMO). 도 7A는 초기 림프구 게이트가 전방 및 측면 산란(FSC 대 SSC)에 기초하여 확립된 후, CD3+ 세포 상의 게이팅에 의해 확립되었다는 것을 나타낸다. 도 7B는 CD3+ 림프구 게이트를 나타내고; 도 7C는 CAR 유전자형 염색을 나타내고; 도 7D는 CAR 유전자형 FMO를 나타낸다. CAR19 양성 게이트는 CAR19 FMO 샘플 상에서 확립되었다.

도 8A 내지 도 8C를 포함한 도 8은 UPN 03 혈액 검체에서의 다색성 유동 세포 분석법을 이용함으로써 CART19 발현을 확인하기 위한 게이팅 전략을 나타낸 일련의 이미지이다. 도 8C에 대한 게이팅 전략은 56일째 날의 UPN 03 샘플에 대해 도시되어 있으며, 169일째 날의 UPN 03 샘플에 대해 사용된 전략을 나타낸다. 도 8A는 덤프(CD14, CD16, 라이브/데드 아쿠아) 음성 및 CD3 양성인 일차 게이트를 나타낸다. 도 8B는 CD4 양성 및 CD8 양성인 이차 게이트를 나타낸다. 도 8C는 CAR19 양성 및 CAR19 음성인 삼차 게이트를 나타내며, 이들은 CAR FMO 샘플(가장 오른쪽 패널) 상에서 발현되었다.

도 9는 혈액 및 골수 검체에서의 CART19 발현 및 B 세포를 직접적으로 확인하기 위한 게이팅 전략을 나타낸다. 말초 및 골수에서의 CAR 발현 CD3+ 림프구의 검출 및 B 세포의 부재를 나타내는 도 4A에 대한 게이팅 전략: 좌측 작도: 세포 게이트; 상부 패널: CD3+ 세포에 대한 양성 게이트; 및 하부 패널: B 세포에 대한 음성 게이트(CD14 음성 및 CD3 음성). NC365는 건강한 기증자로부터의 말초 혈액 대조군 세포이다.

도 10은 환자의 인구 통계 및 반응을 요약한 이미지이다.

도 11은 CART-19 세포의 제조 공정을 나타낸다.

도 12A 내지 도 12D를 포함한 도 12는 환자에서의 임상적 반응을 나타낸 일련의 이미지이다. 도 12A는 환자로부터 T 세포를 감염시키기 위해 사용된 렌티바이러스 벡터를 나타낸다. FMC63 쥐 단일 클론성 항체로부터 유래한 항-CD19 scFv, 인간 CD8 α 힌지 및 막통과 도메인, 및 인간 4-1BB 및 CD3 ζ 신호전달 도메인의 발현을 지지하는 수포성 구내염 바이러스 단백질 G(pELPs 19-BB-z)의 위형의 임상적 등급의 렌티바이러스 벡터를 제조하였다. 도 12A의 하면에서 CAR19 이식 유전자의 세부사항은 주요 기능 요소를 나타낸다. 도면은 일정한 축적으로 도시되지 않는다. 3'LTR은 3' 긴 말단 반복서열을 나타내고; 5'LTR은 5' 긴 말단 반복서열을 나타내며; Amp R은 암피실린 저항 유전자를 나타내고; 소 GH Poly A는 폴리아데닐화 꼬리를 갖는 소 성장 호르몬을 나타내고; cPPT/CTS는 중

심 종결 서열을 갖는 중심 폴리푸린 트랙을 나타내고; EF-1a는 연장 인자 1-알파를 나타내며; env는 외피를 나타내고; gag는 그룹 특이적 항원을 나타내고; pol은 폴리머라아제 및 역전사 효소를 암호화하는 HIV 유전자를 나타내고; R은 반복서열을 나타내고; RRE는 *rev* 반응 요소를 나타내고; scFv는 단일-체인 가변성 단편을 나타내고; TM은 횡단막을 나타내고; WPRE는 우드처크(Woodchuck) 간염 바이러스의 전사후 조절용 요소를 나타낸다. 도 12B는 첫 번째 CART19-세포 주입 이후의 1일째부터 28일째까지의 혈청 크레아틴, 요산, 및 젖산 탈수소효소(LDH)의 수준을 나타낸다. 상기 피크 수준은 중앙 용해 증후군으로 인한 입원과 일치한다. 도 12C는 화학요법(CART19-세포 주입 전 -1일째) 후 3일째, 및 CART19-세포 주입(헤마톡실린(hematoxylin) 및 에오신(eosin)) 후 23일째 및 6개월째 날에 수득된 골수-생검 검체를 나타낸다. 기준선 검체는 총 세포충실도의 40%를 차지하는 작고 성숙한 림프구의 지배적으로 간질성인 집성체에 의해 침윤된 3계통 조혈을 갖는 과세포성 골수(60%)를 나타낸다. 23일째 날에 수득된 검체는 T 세포와 CD5 음성 B 세포의 혼합물과 함께 만성 림프성 백혈병(CLL)에 대해 음성인 잔류 림프성 집성체(10%)를 나타낸다. 주입 후 6개월째 수득된 검체는 림프성 집성체의 부재 및 CLL의 계속적인 부재와 더불어 3계통 조혈을 나타낸다. 도 12D는 환자가 상기 연구에 등록하기 전에 수득된 조영 증강된 CT 스캔, 및 첫 번째 주입 이후 31일째 및 104일째 수득된 조영 증강된 CT 스캔을 나타낸다. 전-주입 CT 스캔은 1cm 대 3cm 크기의 좌우 엽액량을 나타낸다. 거드랑이 림프샘 장애의 회귀는 주입 1개월 이내에 발생하고, 유지되었다. 화살표는 치료요법 이전의 다양한 확대된 림프절을 강조하며, 요법 이후의 상당한 CT 스캔 상의 림프절 반응을 강조하고 있다.

도 13A 내지 도 13E를 포함한 도 13은 키메릭 항원 수용체 T-세포의 주입 전후의 혈청 및 골수 사이토카인을 나타낸 일련의 이미지이다. 사이토카인 인터페론- γ (도 13A), 인터페론- γ 자극 케모카인인 C-X-C 모티프 케모카인 10(CXCL10)(도 13B) 및 C-X-C 모티프 리간드 9(CXCL9)(도 13C), 및 인터류킨-6(도 13D)에 대한 일련의 측정은 주어진 시점에 수행되었다. 이들 염증성 사이토카인 및 케모카인의 증가는 중앙 용해 증후군의 발현과 일치하였다. 낮은 수준의 인터류킨-6이 기준선에서 검출되는 반면, 인터페론- γ , CXCL9 및 CXCL10은 기준선에서의 검출 제한치 미만이었다. 괄호 안에 주어진 환자에서의 분석물질 및 기준선 값에 대한 표준-곡선 범위는 하기와 같다: 인터페론- γ 는 1ml 당 11.2 내지 23,972pg(1ml 당 1.4pg); CXCL10은 1ml 당 2.1 내지 5,319pg(1ml 당 274pg)이고; CXCL9는 1ml 당 48.2 내지 3,700pg(1ml 당 177pg)이고; 인터류킨-6은 1ml 당 2.7 내지 4,572pg(1ml 당 8.3pg)이고; 중앙 피사 인자 α (TNF- α)는 1ml 당 1.9 내지 4,005(검출 불능)이고; 가용성 인터류킨-2 수용체는 1ml 당 13.4 내지 34,210pg(1ml 당 644pg)이다. 도 13E는 골수에서의 면역 반응의 유도를 나타낸다. 사이토카인 TNF- α , 인터류킨-6, 인터페론- γ , 케모카인 CXCL9 및 가용성 인터류킨-2 수용체는 CART19 세포 주입 전후에 주어진 날짜에 골수 흡인물로부터 수득된 상등액에서 측정되었다. 인터류킨-6, 인터페론- γ , CXCL9 및 가용성 인터류킨-2 수용체 수준에서의 증가는 중앙 용해 증후군, 피크 키메릭 항원 수용체 T 세포의 침윤, 및 백혈병 침윤의 소거와 일치하였다.

도 14A 내지 도 14C를 포함한 도 14는 키메릭 항원 수용체 T 세포의 생체 내 확장 및 존속을 나타낸 일련의 이미지이다. 게놈 DNA(gDNA)는 키메릭 항원 수용체 T-세포의 주입 전후의 일련의 시점에 수집된 환자의 전혈(도 14A) 및 골수 흡인물(도 14B)의 샘플로부터 분리되고, 정량적 실시간 폴리머라아제 연쇄 반응(PCR) 분석을 위해 사용되었다. 유전자 도입 DNA 및 CAR19를 발현하는 림프구의 비율(%)에 기초하여 평가된 바와 같이, 키메릭 항원 수용체 T 세포는 말초 혈액 및 골수에서 초기 이식 수준보다 1,000배 이상 높은 수준까지 증가하였다. 키메릭 항원 수용체 T 세포의 피크 수준은 일시적으로는 중앙 용해 증후군과 연관이 있었다. 0일째 수득된 혈액 샘플, 및 1일째 수득된 골수 샘플은 기준선에서 어떠한 PCR 신호를 갖지 않았다. 기준선에서의 골수 흡인물의 유동 세포 분석(도 14C)은 소량의 T 세포와 함께 면역 글로불린 카파 경쇄의 염색에 의해 평가된 바와 같이 클론성인 CD19+CD5+ 세포에 의해 현저한 침윤을 나타낸다. 주입 후 31일째 날에 CD5+ T 세포가 존재했으며, 어떠한 정상 B 세포 또는 악성 B 세포도 검출되지 않았다. 수치는 각각의 4분원에서 세포의 상대적인 빈도를 나타낸다. x축 및 y축 둘 모두는 로그10 축척을 나타낸다. 게이팅 전략은 좌측의 박스 내의 CD19+ 및 CD5+ 세포의 초기 게이팅, 및 CD19+CD5+ 서브셋 상의 면역 글로불린 카파 및 람다의 발현의 후속적인 확인(우측 박스)을 포함한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063]

본 발명은 혈액학적 악성 중앙 및 고형 종양을 포함하지만 이에 한정되지 않는 암을 치료하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 본 발명은 키메릭 항원 수용체(CAR)를 발현하기 위해 형질 도입된 T 세포의 입양 세포 전달의 전략에 관한 것이다. CAR은 특이적 항-종양 세포성 면역 활성을 나타내는 키메릭 단백질을 생성하기 위해 T 세포 수용체 활성화 세포 내 도메인과 목적하는 항원(예를 들어, 중앙 항원)에 대한 항체 기반 특이성을 조합하는 분자이다.

- [0064] 본 발명은 일반적으로 목적하는 CAR을 안정적으로 발현하기 위해 유전적으로 변형된 세포에 관한 것이다. CAR을 발현하는 T 세포는 본원에서 CAR T 세포 또는 CAR 변형된 T 세포로 지칭된다. 바람직하게는, 상기 세포는 이의 표면 상에 항체 결합 도메인을 안정하게 발현하여 MHC에 독립적인 신규한 항원 특이성을 부여하기 위해 유전적으로 변형될 수 있다. 몇몇의 경우, 상기 T 세포는 CD3-제타 체인 또는 Fc γ RI 단백질의 세포 내 도메인과 특정 항체의 항원 인식 도메인을 조합하는 CAR을 단일 키메라 단백질 내로 안정적으로 발현하기 위해 유전적으로 변형된다.
- [0065] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 항원 인식 도메인을 갖는 세포 외 도메인, 막통과 도메인 및 세포질 도메인을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 자연적으로 상기 CAR 내의 도메인 중 하나와 연관이 있는 막통과 도메인이 사용된다. 다른 실시형태에서, 상기 막통과 도메인은 수용체 복합체의 기타 멤버와의 상호작용을 최소화하기 위해 동일하거나 상이한 표면 막 단백질의 막통과 도메인에 대한 이 같은 도메인의 결합을 피하도록 아미노산 치환에 의해 선택되거나 변형될 수 있다. 바람직하게는, 상기 막통과 도메인은 CD8 α 힌지 도메인이다.
- [0066] 세포질 도메인에 대하여, 본 발명의 CAR은 CD28 및/또는 4-1BB 신호전달 도메인 자체를 포함하도록 설계될 수 있거나, 본 발명의 CAR의 배경에서 유용한 임의의 기타 목적하는 세포질 도메인(들)과 조합될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 상기 CAR의 세포질 도메인은 CD3-제타의 신호전달 도메인을 추가로 포함하도록 설계될 수 있다. 예를 들어, 상기 CAR의 세포질 도메인은 CD3-제타, 4-1BB 및 CD28 신호전달 모듈 및 이의 조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 따라서 본 발명은 CAR T 세포, 및 주입 요법을 위한 이들의 사용 방법을 제공한다.
- [0067] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 CAR T 세포는 목적하는 CAR, 예를 들어 항-CD19, CD8 α 힌지 및 막통과 도메인, 및 인간 4-1BB 및 CD3제타 신호전달 도메인을 포함하는 CAR을 포함하는 렌티바이러스 벡터를 세포에 도입함으로써 생성될 수 있다. 본 발명의 CAR T 세포는 생체 내에서 복제할 수 있으며, 이는 종양 억제 유지를 초래할 수 있는 장기간 존속을 초래한다.
- [0068] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 림프구 주입을 이용하여 암을 앓고 있는 환자 또는 암에 걸릴 위험성이 있는 환자의 치료를 위해 CAR을 발현하는 유전적으로 변형된 T 세포를 투여하는 것에 관한 것이다. 바람직하게는, 자가성 림프구 주입은 치료에 사용된다. 자가성 PBMC는 치료가 필요한 환자로부터 수집되고, T 세포는 본원에 개시되고 당해 기술분야에 공지된 방법을 이용하여 활성화되고 증식되고, 이후에 환자에 다시 주입된다.
- [0069] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 일반적으로 CLL이 발병할 위험성이 있는 환자의 치료에 관한 것이다. 본 발명은 또한 악성 종양, 또는 환자에서의 화학요법 및/또는 면역 요법이 환자에서 유의한 면역 억제를 초래하여, 환자에서 CLL이 발병할 위험성을 증가시키는 자가 면역 질환을 치료하는 것에 관한 것이다.
- [0070] 본 발명은 CD3-제타 및 4-1BB 공자극성 도메인(CART19 T 세포로도 지칭됨) 둘 모두를 포함하는 항-CD19 CAR을 발현하는 T 세포의 사용을 포함한다. 본 발명의 CART19 T 세포는 강력한 생체 내 T 세포의 증식을 초래하며, 혈액 및 골수에서 증가된 시간 동안에 높은 수준으로 유지되는 CD19 특이적 메모리 세포를 발현시킬 수 있다. 몇몇의 경우, 환자에 주입된 본 발명의 CART19 T 세포는 진전된 화학요법 내성 CLL을 앓는 환자의 생체 내 백혈병 세포를 제거할 수 있다. 그러나 본 발명은 CART19 T 세포에 제한되지 않는다. 오히려, 본 발명은 CD137(4-1BB) 신호전달 도메인, CD28 신호전달 도메인, a CD3제타 신호전달 도메인, 및 임의의 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 세포 내 도메인과 융합된 임의의 항원 결합 일부분을 포함한다.
- [0072] 정의
- [0073] 본원에서 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 당해 기술분야의 통상의 사람에 의해 일반적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에서 개시된 방법 및 재료 유사하거나 등가인 임의의 방법 및 재료가 본 발명의 시험을 위한 실시예에 사용될 수 있을 지라도, 바람직한 재료 및 방법이 본원에 개시되어 있다. 본 발명을 개시하고 청구할 때 하기 용어가 사용될 것이다.
- [0074] 또한 본원에 사용된 용어는 특정 실시형태를 개시할 목적으로만 개시되며, 제한할 의도는 없는 것으로 이해되어야 한다.
- [0075] 관사는 관사의 하나 또는 하나 이상(즉, 적어도 하나)의 문법적 목적을 지칭하기 위해 본원에서 사용된다. 일례로, "하나의 요소"는 하나 또는 그 이상의 요소를 의미한다.
- [0076] 양, 시간적 지속 등과 같은 측정 가능한 값을 지칭하는 경우에 본원에서 사용된 바와 같은 "약"은 이 같은 변형 값이 본원에 개시된 방법을 수행하기에 적절함에 따라 구체적인 값으로부터 $\pm 20\%$ 또는 $\pm 10\%$, 더욱 바람직하게

는 $\pm 5\%$, 더욱더 바람직하게는 $\pm 1\%$, 및 더더욱 바람직하게는 $\pm 0.1\%$ 의 변형값을 포함한다는 것으로 의미한다.

- [0077] 본원에서 사용된 바와 같은 "활성화"는 검출 가능한 세포성 증식을 유도하기 위해 충분히 자극되어 있는 T 세포의 상태를 지칭한다. 활성화는 또한 유도된 사이토카인 생성 및 검출 가능한 효과기의 기능과 연관되어 있을 수 있다. "활성화된 T 세포"란 용어는 기타 물건들 중에서 세포 분열을 경험하고 있는 T 세포를 지칭한다.
- [0078] 본원에서 사용된 바와 같은 "항체"란 용어는 항원과 특이적으로 결합하는 면역 글로불린 분자를 지칭한다. 항체는 천연 공급원 또는 재조합 공급원에서 유래한 온전한 면역 글로불린일 수 있으며, 온전한 면역 글로불린의 면역 반응성 일부일 수 있다. 항체는 전형적으로 면역 글로불린 분자의 사량체이다. 본 발명에 따른 항체는, 예를 들어 단일쇄 항체 및 인간화된 항체뿐만 아니라 다클론성 항체, 단일 클론성 항체, Fv, Fab 및 F(ab)₂를 포함하는 다양한 형태로 존재할 수 있다(Harlow 등, 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow 등, 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston 등, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883; 및 Bird 등, 1988, *Science* 242: 423-426).
- [0079] "항체 단편"이란 용어는 온전한 항체의 일부를 지칭하며, 온전한 항체의 항원성 결정 가변성 영역을 지칭한다. 항체 단편의 예로는 항체 단편으로부터 형성된 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편, 일차 항체, scFv 항체, 및 다중 특이성 항체를 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0080] 본원에서 사용된 바와 같은 "항체 중쇄"는 이들의 자연적으로 발생하는 구성에서 모든 항체 분자에 존재하는 2가지 유형의 폴리펩티드쇄 중 보다 큰 유형을 지칭한다.
- [0081] 본원에서 사용된 바와 같은 "항체 경쇄"는 이들의 자연적으로 발생하는 구성에서 모든 항체 분자에 존재하는 2가지 유형의 폴리펩티드쇄 중 보다 작은 유형을 지칭한다. k 및 l 경쇄는 2개의 주요 항체 경쇄 아이소타입(isotype)을 지칭한다.
- [0082] 본원에서 사용된 바와 같은 "합성 항체"란 용어는, 예를 들어 본원에 개시된 바와 같은 박테리오파지에 의해 발현된 항체와 같이 재조합 DNA 기술을 이용하여 생성된 항체를 의미한다. 상기 용어는 또한 항체를 암호화하는 DNA 분자의 합성에 의해 생성되었던 항체를 의미하는 것으로 이해되어야 하며, 이때 상기 DNA 분자는 항체 단백질을 발현하거나, 상기 항체를 구체화하는 아미노산 서열을 발현하며, 이때 상기 DNA 또는 아미노산 서열은 당해 기술분야에서 이용 가능하거나 널리 공지된 합성 DNA 또는 아미노산 서열 기술을 이용하여 획득되었다.
- [0083] 본원에서 사용된 바와 같은 "항원" 또는 "Ag"이란 용어는 면역 반응을 유발하는 분자로서 정의된다. 이러한 면역 반응은 항체의 생성, 또는 특정 면역학적 적격 세포의 활성화, 또는 이들 둘 모두를 포함할 수 있다. 당업자는 실질적으로 모든 단백질 또는 펩티드를 포함한 임의의 거대 분자가 항원으로 작용할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 더욱이, 항원은 재조합 DNA 또는 게놈 DNA로부터 유래할 수 있다. 따라서 당업자는 면역 반응을 유도하는 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 또는 부분 뉴클레오티드 서열을 포함하는 임의의 DNA가 이 같은 용어가 본원에서 사용됨에 따라 "항원"을 암호화한다는 것을 이해할 것이다. 더욱이, 당해 기술분야의 숙련자는 항원이 유전자의 전장 뉴클레오티드 서열에 의해서만 암호화될 필요가 없다는 것을 이해할 것이다. 본 발명이 하나 이상의 유전자의 부분 뉴클레오티드 서열의 용도를 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 이들 뉴클레오티드 서열이 목적하는 면역 반응을 유도하기 위해 다양한 조합으로 배열된다는 것이 매우 자명하다. 게다가, 당업자는 항원이 전적으로 "유전자"에 의해 암호화될 필요가 없다는 것을 이해할 것이다. 항원이 생성되거나 합성될 수 있거나, 생물학적 샘플로부터 유래할 수 있다는 것이 매우 자명하다. 이 같은 생물학적 샘플로는 조직 샘플, 종양 샘플, 세포 또는 생물학적 유체를 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0084] 본원에서 사용된 바와 같은 "항-종양 효과"란 용어는 종양 부피에서의 감소, 종양 세포 개수에서의 감소, 전이 개수의 감소, 평균 예상 수명의 증가, 또는 암적인 이상과 연관된 다양한 생리학적 증상의 개선에 의해 증명될 수 있는 생물학적 효과를 지칭한다. "항-종양 효과"는 또한 먼저 종양 발생의 예방에서 본 발명의 펩티드, 폴리뉴클레오티드, 세포 및 항체의 능력에 의해 증명될 수 있다.
- [0085] 본 발명에 따르면, "자가 항원"이란 용어는 이질적인 것으로서 면역 시스템에 의해 잘못 인식되는 임의의 자체 항원을 의미한다. 자가 항원은 세포 표면 수용체를 포함하는 세포성 단백질, 인단백질(phosphoprotein), 세포성 표면 단백질, 세포성 지질, 핵산, 및 당단백질을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0086] 본원에서 사용된 바와 같은 "자가 면역 질환"이란 용어는 자가 면역 반응으로부터 유래하는 질환으로서 정의된다. 자가 면역 질환은 자체 항원에 대한 부적절한 과잉 반응의 결과이다. 자가 면역 질환의 예로는 기타 질병

중에서 에디슨병, 원형 탈모증, 강직성 척추염, 자가 면역 간염, 자가 면역 이하선염, 크론병, 당뇨병(I형), 수포성 표피 박리증, 부고환염, 사구체신염, 그레이브스병, 길랑-바레 증후군(Guillain-Barr syndrome), 하시모토병, 용혈성 빈혈, 전신성 홍반 낭창, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 심상성 천포창(pemphigus vulgaris), 건선, 류머티즘열, 류머티즘성 관절염, 유육종증, 경피증, 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 척추 관절염, 갑상선염, 맥관염, 백반(vitiligo), 점액 수종, 악성 빈혈, 및 케양성 대장염을 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

- [0087] 본원에서 사용된 바와 같이, "자가성"이란 용어는 동일한 개인으로부터 유래하고, 이후에 다시 상기 개인에게 도입될 수 있는 임의의 재료를 지칭하는 것으로 의미한다.
- [0088] "동종성"은 동일한 종의 다른 동물에서 유래한 이식편을 지칭한다.
- [0089] "이종성"은 다른 종의 동물에서 유래한 이식편을 지칭한다.
- [0090] 본원에서 사용된 바와 같은 "암"이란 용어는 변종 세포의 신속하고 제어되지 않은 성장을 특징으로 하는 질병으로서 정의된다. 암 세포는 국부적으로 또는 혈류 및 림프계를 통해 체내의 기타 부분으로 퍼져나갈 수 있다. 다양한 암의 예로는 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁 경부암, 피부암, 췌장암, 대장암, 신장암, 간암, 뇌암, 림프종, 백혈병, 폐암 등을 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0091] 본원에서 상기 용어가 사용되는 경우, "공자극성 리간드"는 항원 제시 세포(예를 들어, aAPC, 수지상 세포, B 세포 등) 상의 분자를 포함하며, 이때 상기 항원 제시 세포는 T 세포 상의 동종의 공자극성 분자를 특이적으로 결합시켜, 예를 들어 펩티드와 함께 로딩된 MHC 분자와 TCR/CD3 복합체의 결합에 의해 일차 신호 이외에도 증식, 활성화, 분화 등을 포함하지만 이에 제한되지 않은 T 세포 반응을 매개하는 신호를 제공한다. 공자극성 리간드로는 CD7, B7-1(CD80), B7-2(CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, 유도성 공자극성 리간드(ICOS-L), 세포간 접착 분자(ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, 림포톡신(lymphotoxin) 베타 수용체, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, 톨(Toll) 리간드 수용체를 결합시키는 강화제(agonist) 또는 항체, 및 B7-H3과 특이적으로 결합하는 리간드를 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 그 중에서도 공자극성 리간드는 또한 T 세포 상에 존재하는 공자극성 분자와 특이적으로 결합하는 항체, 예를 들어 이에 제한되지 않지만 CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능 연관 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 및 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드를 포함한다.
- [0092] "공자극성 분자"는 공자극성 리간드와 특이적으로 결합하여 T 세포에 의한 공자극성 반응, 예를 들어 이에 제한되지 않지만 증식을 매개하는 T 세포 상의 동종의 결합 파트너(binding partner)를 지칭한다. 공자극성 분자는 MHC 클래스 I 분자, BTLA 및 톨 리간드 수용체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0093] 본원에서 사용된 바와 같이, "공자극성 신호"는 TCR/CD3 연결(ligation)과 같은 일차 신호와 함께 T 세포 증식 및/또는 주요 분자의 상향조절(upregulation) 또는 하향조절(downregulation)을 초래하는 신호를 지칭한다.
- [0094] "질병"은 동물의 건강 상태이며, 여기서 상기 동물은 항상성을 유지할 수 없으며, 상기 질병이 개선되지 않는 경우에 동물의 건강이 계속해서 악화된다. 대조적으로, 동물에서의 "질환"은 동물이 항상성을 유지할 수 있지만, 동물의 건강 상태가 질환이 없을 때와 비교해서 덜 유리한 건강 상태이다. 치료하지 않은 채로 방치하는 경우, 질환은 필연적으로 동물의 건강 상태의 추가적인 손실을 야기하지는 않는다.
- [0095] 본원에서 사용된 바와 같은 "유효량"은 치료적 또는 예방적 효과를 제공하는 양을 의미한다.
- [0096] "암호화"란 뉴클레오타이드(즉, rRNA, tRNA 및 mRNA)의 제한된 서열 및 아미노산의 제한된 서열 중 하나를 구비한 생물학적 공정에서 기타 고분자 및 거대 분자의 합성을 위한 주형으로 작용하기 위해 유전자, cDNA 또는 mRNA와 같은 폴리뉴클레오타이드 중의 뉴클레오타이드의 특정 서열의 고유 특성, 및 이들로부터 유래한 생물학적 특성을 지칭한다. 따라서 유전자는 이 같은 유전자에 상응하는 mRNA의 전사 및 번역이 세포 또는 기타 생물학적 시스템에서 단백질을 생성하는 경우에 단백질을 암호화한다. mRNA 서열과 동일하고 일반적으로는 서열 목록으로 제공되는 뉴클레오타이드 서열인 코딩 가닥 및 유전자 또는 cDNA의 전사를 위한 주형으로 사용되는 비코딩 가닥 둘 모두는 이 같은 유전자 또는 cDNA의 단백질 또는 기타 생성물을 암호화하는 것으로 지칭될 수 있다.
- [0097] 본원에서 사용된 바와 같이, "내생성"은 유기체, 세포, 조직 또는 시스템으로부터의 임의의 재료 또는 이의 내부에서 생성되는 임의의 재료를 지칭한다.
- [0098] 본원에서 사용된 바와 같이, "외생성"이란 용어는 유기체, 세포, 조직 또는 시스템으로부터 도입되거나 외부에

서 생성되는 임의의 재료를 지칭한다.

- [0099] 본원에서 사용된 바와 같은 "발현"이란 용어는 자신의 프로모터에 의해 구동되는 특정 뉴클레오타이드 서열의 전사 및/또는 번역으로서 정의된다.
- [0100] "발현 벡터"는 뉴클레오타이드 서열이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 발현 제어 서열을 포함하는 제조합 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 벡터를 지칭한다. 발현 벡터는 발현을 위해 충분한 시스 작용 요소(cis-acting element)를 포함하지만, 발현을 위한 기타 요소는 숙주 세포에 의해 제공되거나, 시험관 내(in vitro) 발현 시스템에서 제공될 수 있다. 발현 벡터는 당해 기술분야에 공지된 모든 벡터, 예를 들어 코스미드(cosmid), 플라스미드(예를 들어, 노출형(naked)이거나 리포솜에 포함됨), 및 제조합 폴리뉴클레오타이드를 혼입하는 바이러스(예를 들어, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 및 아데노 연관 바이러스)를 포함한다.
- [0101] "상동성"은 2개의 폴리펩티드 또는 2개의 핵산 분자 사이의 서열 유사성 또는 서열 동일성을 지칭한다. 2개의 비교된 서열 둘 모두에서의 위치는 동일한 염기 또는 아미노산 단량체 서브유닛에 의해 차지되는 경우, 예를 들어 2개의 DNA 분자에서의 위치가 아데닌에 의해 차지되는 경우, 분자는 그 위치에서 상동성이다. 2개의 서열 사이의 상동성의 비율(%)은 X 100과 비교한 위치의 개수로 나눈 2개의 서열이 공유하는 정합 또는 상동성 위치의 개수의 함수이다. 예를 들어, 2개의 서열 내의 10개의 위치 중 6개가 정합하거나 상동성인 경우, 상기 2개의 서열은 상동성이 60%이다. 일례로, ATGCG 및 TATGCG의 DNA 서열은 50%의 상동성을 나타낸다. 일반적으로, 2개의 서열이 최대 상동성을 나타내기 위해 배열되는 경우에 비교가 이루어진다.
- [0102] 본원에서 사용된 바와 같이, "면역 글로불린" 또는 "Ig"이란 용어는 항체로서 기능을 하는 단백질의 부류로서 정의된다. B 세포에 의해 발현되는 항체는 종종 BCR(B 세포 수용체) 또는 항원 수용체로서 지칭된다. 이러한 단백질의 부류에 포함된 5개의 멤버는 IgA, IgG, IgM, IgD, 및 IgE이다. IgA는 체내 분비물, 예를 들어 타액, 눈물, 모유, 위장관 분비물, 및 호흡관 및 비뇨생식관의 점액 분비물에 존재하는 일차 항체이다. IgG는 가장 일반적인 혈중 항체이다. IgM는 대부분의 개체에서 일차 면역 반응에서 생성되는 주요 면역 글로불린이다. 이는 응집, 보체 고정 및 기타 항체 반응에서 가장 효율적인 면역 글로불린이며, 박테리아 및 바이러스에 대한 방어에서 중요하다. IgD는 항체 기능이 알려져 있지 않지만 항원 수용체로서 작용할 수 있는 면역 글로불린이다. IgE는 알레르겐(allergen)에 노출 시에 비만 세포 및 호염기성 세포로부터의 매개물질의 방출을 야기함으로써 즉시형 과민반응을 매개하는 면역 글로불린이다.
- [0103] 본원에서 사용된 바와 같이, "교육용 재료"는 간행물, 기록물, 도면, 또는 본 발명의 조성물 및 방법의 유용성을 제공하기 위해 사용될 수 있는 임의의 기타 발현 매체를 포함한다. 본 발명의 키트의 교육용 재료는, 예를 들어 본 발명의 핵산, 펩티드 및/또는 조성물을 함유하는 용기에 고정될 수 있거나, 상기 핵산, 펩티드 및/또는 조성물을 함유하는 용기와 함께 선적될 수 있다. 대안적으로는, 상기 교육용 재료는 상기 교육용 재료 및 화합물이 수령인에 의해 협조적으로 사용될 수 있도록 본 발명에 따라 상기 용기와는 별도로 선적될 수 있다.
- [0104] "단리"는 천연 상태에서부터 변경되거나 제거된 것을 의미한다. 예를 들어, 살아있는 동물에 자연적으로 존재하는 핵산 또는 펩티드는 "단리"된 것이 아니지만, 이의 자연 상태의 공존하는 재료로부터 부분적으로 또는 완전하게 분리된 동일한 핵산 또는 펩티드는 "단리"된 것이다. 단리된 핵산 또는 단백질을 실질적으로 정제된 형태로 존재할 수 있거나, 예를 들어 숙주 세포와 같이 선천적이지 못한 환경에 존재할 수 있다.
- [0105] 본 발명의 배경에서, 일반적으로 나타나는 핵산 염기에 대한 하기 약어가 사용된다. "A"는 아데노신을 지칭하고, "C"는 시토신을 지칭하고, "G"는 구아닌을 지칭하고, "T"는 티미딘을 지칭하며, "U"는 우리딘을 지칭한다.
- [0106] 달리 규명하지 않는 한, "아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열"은 서로에 대한 축중 버전(degenerate version)이고 동일한 아미노산 서열을 암호화하는 모든 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. "단백질 또는 RNA를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열"이란 표현은 몇몇 버전에서 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열이 인트론(들)을 함유하는 정도로 인트론을 또한 포함할 수 있다.
- [0107] 본원에서 사용된 바와 같은 "렌티바이러스"는 레트로바이러스과(Retroviridae) 패밀리의 속(genus)을 지칭한다. 렌티바이러스는 비-분열성 세포를 감염시킬 수 있는 레트로바이러스 중에서도 특이하지만, 이들은 숙주 세포의 DNA 내로 유의한 양의 유전자 정보를 전달하여, 이들이 유전자 전달 벡터의 가장 효율적인 방법 중 하나이다. HIV, SIV 및 FIV는 모두 렌티바이러스의 일례이다. 렌티바이러스에서 유래한 벡터는 생체 내에서 유의한 수준의 유전자 전달을 달성하기 위한 수단을 제공한다.
- [0108] 본원에서 사용된 바와 같이, "조절"란 용어는 처리 또는 화합물의 부재 하에 개체에서의 반응 수준, 및/또는 다

르게는 동일하지만 처리되지 않은 개체에서의 반응 수준과 비교해서 개체에서의 반응 수준에서의 검출 가능한 증가 또는 감소를 매개하는 것을 의미한다. 상기 용어는 고유의 신호 또는 반응을 방해하고/하거나 상기 고유의 신호 또는 반응에 영향을 주어 개체, 바람직하게는 인간에서 이로온 치료적 반응을 매개하는 것을 포함한다.

- [0109] 달리 규명하지 않는 한, "아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열"은 서로에 대한 축중 버전이고 동일한 아미노산 서열을 암호화하는 모든 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 단백질 및 RNA를 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 인트론을 포함할 수 있다.
- [0110] "작동 가능한 연결"이란 용어는 이중성 핵산 서열의 발현을 초래하는 조절용 서열과 이중성 핵산 서열 사이의 기능적인 연결을 지칭한다. 예를 들어, 제1 핵산 서열이 제2 핵산 서열과 기능적인 관계 하에 위치한 경우에 상기 제1 핵산 서열은 상기 제2 핵산 서열과 작동 가능하게 연결되어 있다. 예를 들어, 프로모터가 코딩 서열의 전사 또는 발현에 영향을 미치는 경우에 상기 프로모터는 코딩 서열에 작동 가능하게 연결되어 있다. 작동 가능하게 연결된 DNA 서열은 일반적으로는 연속되어 있으며, 2개의 단백질 코딩 영역을 연결하는데 필요한 경우에는 동일한 리딩 프레임(reading frame) 내에 있다.
- [0111] "과발현된" 종양 항원 또는 상기 종양 항원의 "과발현"이란 용어는 환자의 특정 조직 또는 기관으로부터 유래한 정상 세포에서의 발현 수준에 비해 이 같은 조직 또는 기관 내의 고형 종양과 같은 질병 구역에서 유래한 세포에서의 종양 항원의 비정상적인 발현 수준을 나타내도록 의도된다. 종양 항원의 과발현을 특징으로 하는 고형 종양 또는 혈액학적 악성 종양을 갖는 환자는 당해 기술분야에 공지된 표준 검정에 의해 결정될 수 있다.
- [0112] 면역성 조성물의 "비경구" 투여는, 예를 들어 피하(s.c.), 정맥 내(i.v.), 근육내(i.m.) 또는 흉골내 주사 또는 주입 기법을 포함한다.
- [0113] "환자", "개체", "개인" 등의 용어는 본원에서 상호 교환 가능하게 사용되며, 시험관 내 또는 원위치(*in situ*)에서 본원에 개시된 방법에 적용 가능한 임의의 동물 또는 이의 세포를 지칭한다. 특징의 비제한적인 실시형태에서, 환자, 개체 또는 개인은 인간이다.
- [0114] 본원에서 사용된 바와 같은 "폴리뉴클레오티드"이란 용어는 뉴클레오티드의 채로서 정의된다. 더욱이, 핵산은 뉴클레오티드의 고분자이다. 따라서 본원에서 사용된 바와 같은 핵산 및 폴리뉴클레오티드는 상호 교환 가능하다. 당해 기술분야의 숙련자는 핵산이 단량체성 "뉴클레오티드"로 가수분해 될 수 있는 폴리뉴클레오티드라는 일반적인 지식을 갖는다. 단량체성 뉴클레오티드는 뉴클레오시드로 가수분해 될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 폴리뉴클레오티드는 재조합 수단, 즉 통상적인 클로닝 기술 및 PCRTM을 이용하여 재조합 라이브러리 또는 세포 계능으로부터의 핵산 서열의 클로닝을 포함하지만 이에 포함되지 않는, 당해 기술분야에서 이용 가능한 임의의 수단, 및 합성 수단에 의해 수득되는 모든 핵산 서열을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0115] 본원에서 사용된 바와 같이, "펩티드", "폴리펩티드" 및 "단백질"이란 용어는 상호 교환 가능하게 사용되며, 펩티드 결합에 의해 공유 결합된 아미노산 잔기로 구성된 화합물을 지칭한다. 단백질 또는 펩티드는 적어도 2개의 아미노산을 포함해야 하며, 단백질 또는 펩티드의 서열을 포함할 수 있는 아미노산의 최대 개수에 대한 어떠한 제한도 없다. 폴리펩티드는 펩티드 결합에 의해 서로 연결된 2개 이상의 아미노산을 포함하는 임의의 펩티드 또는 단백질을 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 상기 용어는 당해 기술분야에서 펩티드, 올리고 펩티드 및 소량체로서 일반적으로 지칭되는 단쇄, 및 많은 유형이 존재하는 단백질로서 당해 기술분야에서 일반적으로 지칭되는 장쇄 둘 모두를 지칭한다. 기타 펩티드 중에서, "폴리펩티드"는, 예를 들어 생물학적으로 활성인 단편, 실질적으로 상동성인 폴리펩티드, 올리고 펩티드, 동질 이량체, 이질 이량체, 폴리펩티드의 변형체, 변형된 폴리펩티드, 유도체, 유사체, 및 융합 단백질을 포함한다. 상기 폴리펩티드는 천연 펩티드, 재조합 펩티드, 합성 펩티드, 또는 이의 조합을 포함한다.
- [0116] 본원에서 사용된 바와 같은 "프로모터"란 용어는 세포의 합성 기관, 또는 폴리뉴클레오티드 서열의 특정 전사를 개시하기 위해 요구되는 도입된 합성 기관에 의해 인식되는 DNA 서열로서 정의된다.
- [0117] 본원에서 사용된 바와 같이, "프로모터/조절용 서열"이란 용어는 프로모터/조절용 서열에 작동 가능하게 연결된 유전자 산물의 발현을 위해 요구되는 핵산 서열을 의미한다. 몇몇의 경우, 이러한 서열은 코어 프로모터 서열일 수 있으며, 기타 예에서 이러한 서열은 또한 유전자 산물의 발현을 위해 요구되는 인핸서 서열 및 기타 조절용 요소를 포함할 수 있다. 프로모터/조절용 서열은, 예를 들어 조직 특이적 방식으로 유전자 산물을 발현하는 것일 수 있다.
- [0118] "항구적" 프로모터는 유전자 산물을 암호화하거나 구체화하는 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하게 연결되는 경우

에 유전자 산물을 세포의 대부분 또는 모든 생리학적 이상 하에 세포에서 생성되도록 하는 뉴클레오티드 서열이다.

- [0119] "유도성" 프로모터는 유전자 산물을 암호화하거나 구체화하는 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하게 연결되는 경우에 상기 프로모터에 상응하는 유도인자(inducer)가 세포에 존재할 때만 유전자 산물이 실질적으로 세포에서 생성되도록 하는 뉴클레오티드 서열이다.
- [0120] "조직 특이적" 프로모터는 유전자에 의해 암호화되거나 구체화된 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하게 연결되는 경우에 세포가 프로모터에 상응하는 조직 유형의 세포일 때만 실질적으로 세포에서 생성되도록 하는 뉴클레오티드 서열이다.
- [0121] 항체에 대해서 본원에서 사용된 바와 같이 "특이적 결합"이란 용어는 특정 항원을 인식하지만, 샘플 중에서 기타 분자를 실질적으로 인식하거나 결합하지 못하는 항체를 의미한다. 예를 들어, 하나의 종으로부터의 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 또한 하나 이상의 종으로부터의 그 같은 항원에 대해서도 결합할 수 있다. 그러나 이 같은 종간 반응성은 그 자체가 항체의 분류를 특이적인 것으로 변경하지는 않는다. 다른 예에서, 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 또한 항원의 상이한 대립 유전자 형태에 결합할 수 있다. 그러나 이 같은 교차 반응성은 그 자체가 항체의 분류를 특이적인 것으로 변경하지는 않는다. 몇몇의 경우, "특정 결합" 또는 "특이적 결합"이란 용어는 제 2 화학종과 항체, 단백질 또는 펩티드의 상호작용이 상기 화학종 상의 특정한 구조(예를 들어, 항원성 결정인자 또는 에피토프(epitope))의 존재에 의존한다는 것을 의미하도록 상기 상호작용을 참고하여 사용될 수 있지만, 예를 들어 항체는 일반적으로 단백질이 아닌 특정 단백질 구조를 인식하고 결합한다. 항체가 에피토프 "A"에 대해 특이적인 경우, 표지 "A" 및 항체를 포함하는 반응물에서 에피토프 A(또는 유리 비표지 A)를 포함하는 분자의 존재는 항체에 결합한 표지 A의 양을 감소시킬 것이다.
- [0122] "자극"이란 용어는 자극 분자(예를 들어, a TCR/CD3 복합체)와 이의 동종 리간드가 결합하여 TCR/CD3 복합체를 통한 신호 형질 도입을 포함하지만 이에 한정되지 않는 신호 형질 도입 사건을 매개함으로써 유도된 일차 반응을 의미한다. 자극은 TGF- β 의 하향조절, 및/또는 세포 골격 구조의 재구성 등과 같이 특정 분자의 변경된 발현을 매개할 수 있다.
- [0123] 용어가 본원에서 사용되는 경우, "자극 분자"는 항원 제시 세포에 존재하는 동종 자극 리간드와 특이적으로 결합하는 T 세포 상의 분자를 의미한다.
- [0124] 본원에서 사용된 바와 같이, "자극 리간드"는 항원 제시 세포(예를 들어, aAPC, 수지상 세포, B 세포 등) 상에 존재하는 경우에 T 세포 상의 동종 결합 파트너("자극 분자"로서 지칭됨)와 특이적으로 결합하여 활성화, 면역 반응의 개시, 증식 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 T 세포에 의한 일차 반응을 매개할 수 있는 리간드를 의미한다. 자극 리간드는 당해 기술분야에 널리 공지되어 있으며, 그 중에서도 펩티드가 로딩된 MHC 클래스 I 분자, 항-CD3 항체, 초강화제 항-CD28 항체, 및 초강화제 항-CD2 항체를 포함한다.
- [0125] "개체"란 용어는 면역 반응이 유도될 수 있는 살아 있는 유기체(예를 들어, 포유동물)를 포함하는 것으로 의도된다. 개체의 예로는 인간, 개, 고양이, 쥐, 생쥐 및 이의 유전자 도입종을 들 수 있다.
- [0126] 본원에서 사용된 바와 같이, "실질적으로 정제된" 세포는 기타 세포 유형이 본질적으로 존재하지 않는 세포이다. 실질적으로 정제된 세포는 또한 이의 자연적으로 발생하는 상태에서 세포가 정상적으로 연관되어 있는 기타 세포 유형과는 분리되어 있는 세포를 지칭한다. 몇몇의 경우, 실질적으로 정제된 세포의 개체군은 세포의 상동성 개체군을 지칭한다. 기타 예에서, 이러한 용어는 단순히 이들의 자연 상태에서 이들이 자연적으로 연관되어 있는 세포와는 분리되어 있었던 세포를 지칭한다. 몇몇 실시형태에서, 상기 세포는 시험관 내에서 배양된다. 기타 실시형태에서, 상기 세포는 시험관 내에서 배양되지 않는다.
- [0127] 본원에서 사용된 바와 같은 "치료"란 용어는 처치 및/또는 예방을 의미한다. 치료적 효과는 질병 상태의 억제, 완화, 또는 소거에 의해 수득된다.
- [0128] "치료적 유효량"이란 용어는 연구원, 의사, 또는 기타 임상가에 의해 탐구되고 있는 조직, 시스템 또는 개체의 생물학적 반응 또는 의약 반응을 유도할 청구주제 화합물의 양을 지칭한다. "치료적 유효량"이란 용어는 화합물이 투여되는 경우에 치료될 질환 또는 질병의 하나 이상의 징후 또는 증상의 발생을 예방하거나 어느 정도 완화하기에 충분한 화합물의 양을 포함한다. 치료적 유효량은 화합물, 질병 및 이의 중증도, 및 치료될 개체의 나이, 체중 등에 의존하여 상이할 수 있다.
- [0129] 본원에서 용어가 사용되는 경우 질병의 "치료"는 개체가 경험한 질병 또는 질환의 적어도 하나의 징후 또는 증

상의 빈도 또는 중증도를 감소시키는 것을 의미한다.

[0130] 본원에서 사용된 바와 같은 "형질 감염" 또는 "형질전환" 또는 "형질 도입"이란 용어는 숙주 세포 내로 외생성 핵산이 전달되거나 도입되는 공정을 지칭한다. "형질 감염" 또는 "형질전환" 또는 "형질 도입"된 세포는 외생성 핵산으로 형질 감염, 형질전환 또는 형질 도입되어 있는 것이다. 상기 세포는 일차 청구주제 세포 및 그의 자손을 포함한다.

[0131] 본원에서 사용된 바와 같은 "전사 조절 하의" 또는 "작동 가능하게 연결된"이라 표현은 RNA 폴리머라아제에 의한 전사의 개시 및 폴리뉴클레오타이드의 발현을 제어하기 위해 프로모터가 폴리뉴클레오타이드에 대해 정확한 위치 및 배양으로 존재한다는 것을 의미한다.

[0132] "벡터"는 단리된 핵산을 포함하는 물질 및 단리된 핵산을 세포의 내부로 전달하기 위해 사용될 수 있는 물질의 조성물이다. 선형 폴리뉴클레오타이드, 이온성 또는 양친매성 화합물과 연관된 폴리뉴클레오타이드, 플라스미드 및 바이러스를 포함하지만 이에 제한되지 않은 다수의 벡터는 당해 기술분야에 공지되어 있다. 따라서 "벡터"란 용어는 자가 복제하는 플라스미드 또는 바이러스를 포함한다. 상기 용어는 또한, 예를 들어 폴리리신 화합물, 리포좀 등과 같이 세포 내로의 핵산의 전달을 조장하는 비-플라스미드 및 비-바이러스성 화합물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 바이러스성 벡터의 예로는 아데노바이러스성 벡터, 아데노 연관 바이러스 벡터, 레트로바이러스성 벡터 등을 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0133] 범위: 본원의 개시내용 전반에 걸쳐 본 발명의 다양한 양태가 범위의 포맷으로 제시될 수 있다. 범위의 포맷에서의 개시내용은 편의 및 간결성을 위한 것으로, 본 발명의 범주에 대한 유연성 없는 제한으로 파악되어서는 안 되는 것으로 이해되어야 한다. 따라서 범위에 대한 개시내용은 이러한 범위 내의 각각 수치뿐만 아니라 가능한 하위 범위 모듈 구체적으로 개시하고 있는 것으로 고려되어야 한다. 예를 들어, 1 내지 6과 같은 범위에 대한 개시내용은 이러한 범위의 개별 숫자, 예를 들어, 1, 2, 2.7, 3, 4, 5, 5.3 및 6뿐만 아니라 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6 등과 같이 하위 범위를 구체적으로 개시하고 있는 것으로 고려되어야 한다. 이는 상기 범위의 크기와는 무관하게 적용된다.

[0135] 상세한 설명

[0136] 본 발명은 기타 질병들 중에서 암을 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 상기 암은 혈액학적 악성 종양, 고형 종양, 또는 일차 또는 전이성 종양일 수 있다. 바람직하게는, 상기 암은 혈액학적 악성 종양이고, 더욱 바람직하게는 상기 암은 만성 림프구성 백혈병(CLL)이다. 본 발명의 조성물 및 방법을 이용하여 치료 가능한 기타 질병으로는 자가 면역 질환뿐만 아니라 바이러스성, 박테리아성 및 기생체성 감염을 들 수 있다.

[0137] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 CAR T 세포가 항-종양 특성을 나타내는 CAR을 발현하도록 조작된 세포(예를 들어, T 세포)를 제공한다. 본 발명의 CAR은 T 세포 항원 수용체 복합체의 제타 체인(예를 들어, CD3 제타)의 세포 내 신호전달 도메인에 융합된 항원 결합 도메인을 갖는 세포 외 도메인을 포함하도록 조작될 수 있다. 본 발명의 CAR은 T 세포에서 발현되는 경우에 항원 결합 특이성에 기초하여 항원 인식을 재지향할 수 있다. 예시적인 항원은 CD19인데, 이는 이러한 항원이 악성 B 세포 상에서 발현되기 때문이다. 그러나 본 발명은 CD19를 표적화하는데 제한되지 않는다. 오히려 본 발명은 이의 동종 항원에 결합하는 경우에 종양 세포가 성장하지 못하게 하고 죽도록 조장되도록 종양 세포에 영향을 미치거나, 그렇지 않는 경우에 환자에서 종양 부하(tumor burden)가 감소하거나 제거되도록 영향을 받는 임의의 항원 결합 일부분을 포함한다. 항원 결합 일부분은 바람직하게는 공자극성 분자 및 제타 체인 중 하나 이상으로부터 세포 내 도메인과 융합된다. 바람직하게는, 항원 결합 일부분은 CD137(4-1BB) 신호전달 도메인, CD28 신호전달 도메인, CD3제타 신호 도메인 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 세포 내 도메인과 융합된다.

[0138] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 CD137(4-1BB) 신호전달 도메인을 포함한다. 이는 본 발명이 부분적으로는 CAR 매개 T-세포 반응이 공자극성 도메인의 첨가와 더불어 증강될 수 있다는 발견에 기초하기 때문이다. 예를 들어, CD137(4-1BB) 신호전달 도메인이 포함됨으로 인해 CD137(4-1BB)을 발현하도록 조작되지 않은 동일한 CAR T 세포와 비교시, CAR T 세포의 항-종양 활성 및 생체 내 존속이 유의하게 증가되었다.

[0140] 조성물

[0141] 본 발명은 세포 외 및 세포 내 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 제공한다. 상기 세포 외 도메인은

다르게는 항원 결합 일부분으로 지칭되는 표적 특이적 결합 요소를 포함한다. 상기 세포 내 도메인 또는 다르게는 상기 세포질 도메인은 공자극성 신호전달 영역 및 제타 체인 일부를 포함한다. 상기 공자극성 신호전달 영역은 공자극성 분자의 세포 내 도메인을 포함하는 CAR의 일부를 지칭한다. 공자극성 분자는 항원에 대한 림프구의 효율적인 반응을 위해 요구되는 항원 수용체 또는 이들의 리간드가 아닌 세포 표면 분자이다.

[0142] 상기 CAR의 세포 외 도메인과 막통과 도메인 사이, 또는 상기 CAR의 세포질 도메인과 막통과 도메인 사이에는 스페이서 도메인이 혼입되어 있을 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, "스페이서 도메인"이란 용어는 일반적으로 폴리펩티드쇄에서 막통과 도메인을 세포 외 도메인 및 세포질 도메인 중 하나에 연결시키는 기능을 갖는 임의의 올리고펩티드 또는 폴리펩티드를 의미한다. 스페이서 도메인은 최대 300개의 아미노산, 바람직하게는 10 내지 100개의 아미노산 및 가장 바람직하게는 25 내지 50개의 아미노산을 포함할 수 있다.

[0143] 항원 결합 일부분

[0144] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 다르게는 항원 결합 일부분으로 지칭되는 표적 특이적 결합 요소를 포함한다. 일부분의 선택은 표적 세포의 표면을 한정하는 리간드의 유형 및 개수에 의존한다. 예를 들어, 항원 결합 도메인은 특정한 질병 상태와 연관이 있는 표적 세포 상의 세포 표면 마커로서 작용하는 리간드를 인식하도록 선택될 수 있다. 따라서 본 발명의 CAR에서 항원 일부분 도메인을 위한 리간드로서 작용할 수 있는 세포 표면 마커의 예로는 바이러스성 감염, 박테리아성 감염, 기생체성 감염, 자가 면역 질환 및 암 세포와 연관된 마커를 들 수 있다.

[0145] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 종양 세포 상의 항원에 특이적으로 결합하는 목적하는 항원 결합 일부분을 조작하는 방식으로 원하는 종양 항원을 표적화하도록 조작될 수 있다. 본 발명의 배경에서, "종양 항원", "과증식성 질환 항원" 또는 "과증식성 질환과 연관된 항원"은 암과 같은 특정 과증식성 질환에서 일반적인 항원을 지칭한다. 본원에서 토의된 항원은 단순히 예로서 포함된다. 상기 목록은 제한적인 것으로 의도되지 않으며, 추가의 예들이 당해 기술분야의 숙련자에게 매우 자명할 것이다.

[0146] 종양 항원은 면역 반응, 특히 T-세포 매개 면역 반응을 유도하는 종양 세포에 의해 생성된 단백질이다. 본 발명의 항원 결합 일부분의 선택은 치료될 암의 특정한 유형에 의존한 것이다. 종양 항원은 당해 기술분야에 널리 공지되어 있으며, 예를 들어 신경교종 연관 항원, 암태아 항원(CEA), β -인간 융모성 고나도트로핀, 알파-페토프로테인(α -fetoprotein, AFP), 렉틴 반응성 AFP, 타이로글로불린(thyroglobulin), RAGE-1, MN-CA IX, 인간 텔로머라제 역전사 효소(telomerase reverse transcriptase), RU1, RU2(AS), 장내 카르복시에스테라아제(intestinal carboxyl esterase), mut hsp70-2, M-CSF, 프로스타아제(protease), 전립선 특이적 항원(PSA), PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, p53, 프로스테인(protein), PSMA, Her2/neu, 서바이빈(survivin) 및 텔로머라제, 전립선-암종 종양 항원-1 (PCTA-1), MAGE, ELF2M, 중성구 엘라스타제, ephrinB2, CD22, 인슐린 성장 인자(IGF)-I, IGF-II, IGF-I 수용체 및 메소텔린을 포함한다.

[0147] 하나의 실시형태에서, 상기 종양 항원은 악성 종양과 연관된 하나 이상의 항원성 암 에피토프를 포함한다. 악성 종양은 면역 공격(immune attack)을 위한 표적 항원으로서 작용할 수 있는 다수의 단백질을 발현시킨다. 이들 분자로는 흑색종의 경우에 MART-1, 티로시나아제(tyrosinase) 및 GP 100, 및 전립선암의 경우에 전립선 산 포스파타제(PAP) 및 전립선 특이적 항원(PSA)과 같은 조직 특이적 항원을 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 기타 표적 분자는 종양 유전자 HER-2/Neu/ErbB-2와 같은 형질전환 관련 분자의 그룹에 속한다. 또 다른 표적 항원의 그룹은 암태아 항원(CEA)과 같은 종양 태아성 항원이다. B-세포 림프종에서 상기 종양 특이적 유전자형 면역글로불린은 개별 종양에 특이적인 정확히 종양 특이적 면역 글로불린 항원을 구성한다. CD19, CD20 및 CD37과 같은 B-세포 분화 항원은 B-세포 림프종에서 표적 항원의 기타 후보물질이다. 몇몇 이들 항원(CEA, HER-2, CD19, CD20, 유전자형)은 단일 클론성 항체를 이용한 수동 면역 요법을 위한 표적으로서 사용되어 왔지만, 제한적으로 성공하였다.

[0148] 본 발명에서 지칭된 종양 항원의 유형은 또한 종양 특이적 항원(TSA) 또는 종양 연관 항원(TAA)일 수 있다. TSA는 종양 세포에 대해 특이적이며, 체내의 기타 세포 상에 나타나지는 않는다. TAA 연관 항원은 종양 세포에 대해 특이하지 않으며, 대신에 항원에 대한 면역학적 내성 상태를 유도하지 못하는 조건 하에서 정상 세포 상에서 발현된다. 종양 상에서의 항원의 발현은 면역 시스템이 항원에 반응하도록 할 수 있는 조건 하에서 발생할 수 있다. TAA는 면역 시스템이 성숙하지 않아서 반응할 수 없거나, 이들이 정상적으로는 정상 세포 상에서 극도로 낮은 수준으로 존재하지만 종양 세포 상에서는 훨씬 높은 수준으로 발현되는 경우에 태아 발생 도중에 정상 세포 상에서 발현되는 항원일 수 있다.

- [0149] TSA 또는 TAA 항원의 비제한적인 예로는 하기와 같다: MART-1/MelanA (MART-I), gp100 (Pmel 17), 티로시나아제, TRP-1, 및 TRP-2와 같은 분화 항원; MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, 및 p15와 같은 종양 특이적 다중 계통 항원; CEA와 같은 과발현된 태아성 항원; p53, Ras, HER-2/neu와 같은 과발현된 종양 유전자 및 돌연변이된 종양-억제 유전자; BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR와 같이 염색체 전좌로부터 유래된 독특한 종양 항원; 및 엡스타인-바(Epstein Barr) 바이러스 항원인 EBVA 및 인간 파필로마바이러스(HPV) 항원인 E6 및 E7과 같은 바이러스성 항원. 기타 대형의 단백질 기반 항원으로는 TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, 베타-카테닌(beta-Catenin), CDK4, Mum-1, p 15, p 16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, 알파-페토프로테인, 베타-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3/CA 27.29/BCAA, CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68/P1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733/EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90/Mac-2 결합 단백질/사이클로필린 C 연관 단백질, TAAL6, TAG72, TLP, 및 TPS를 들 수 있다.
- [0150] 바람직한 실시형태에서, 상기 CAR의 항원 결합 일부분의 일부는 CD19, CD20, CD22, ROR1, 메소텔린, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, 당지질 F77, EGFRvIII, GD-2, MY-ESO-1 TCR, MAGE A3 TCR 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 항원을 표적화한다.
- [0151] 표적화될 목적하는 항원에 의존하여 본 발명의 CAR은 목적하는 항원 표적에 특이적인 적절한 항원 결합 일부분을 포함하도록 조작될 수 있다. 예를 들어, CD19가 표적화되어야 할 목적하는 항원인 경우에 CD19에 대한 항체는 본 발명의 CAR로의 혼입을 위해 항원 결합 일부분으로서 사용될 수 있다.
- [0152] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 CAR의 항원 결합 일부분의 일부는 CD19를 표적화한다. 바람직하게는, 본 발명의 CAR 내의 항원 결합 일부분의 일부는 항-CD19 scFV이며, 이때 상기 항-CD19 scFV의 핵산 서열은 서열번호 14로 개시된 서열을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 항-CD19 scFV는 서열번호 20의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 CAR의 항-CD19 scFV 일부는 서열번호 20으로 개시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0154] 막통과 도메인
- [0155] 막통과 도메인에 대하여, CAR은 상기 CAR의 세포 외 도메인에 융합되어 있는 막통과 도메인을 포함하도록 설계될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 상기 CAR의 도메인 중 하나와 자연적으로 연관되어 있는 막통과 도메인이 사용된다. 몇몇의 경우, 상기 막통과 도메인은 수용체 복합체의 기타 멤버와의 상호작용을 최소화하기 위해 동일하거나 상이한 표면 막 단백질의 막통과 도메인에 대한 이 같은 도메인의 결합을 피하기 위해 선택되거나 아미노산 치환에 의해 변형될 수 있다.
- [0156] 막통과 도메인은 천연 및 합성 공급원 중 하나로부터 유래할 수 있다. 상기 공급원이 천연형인 경우, 상기 도메인은 임의의 막 결합형 단백질 또는 횡단막 단백질로부터 유래할 수 있다. 본 발명에서 특별히 사용되는 횡단막 영역은 T-세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 체인(적어도 이들의 횡단막 영역(들)), CD28, CD3 엘스론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 및 CD154로부터 유래할 수 있다. 대안적으로는, 상기 막통과 도메인은 합성된 것일 수 있으며, 이러한 경우에 이는 류신 및 발린과 같이 지배적으로 소수성인 잔기를 포함할 것이다. 바람직하게는 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의 트리플렛(삼중t)은 합성 막통과 도메인의 각 말단에서 발견될 것이다. 임의적으로는, 짧은 올리고펩티드 또는 폴리펩티드 링커, 바람직하게는 2와 10개 아미노산 길이를 갖는 링커는 막통과 도메인과 CAR의 세포질 신호전달 도메인 사이의 연결을 형성할 수 있다. 글리신-세린 더블릿은 특히 적합한 링커를 제공한다.
- [0157] 바람직하게는, 본 발명의 CAR 내의 막통과 도메인은 CD8 막통과 도메인이다. 하나의 실시형태에서, 상기 CD8 막통과 도메인은 서열번호 16의 핵산 서열을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 CD8 막통과 도메인은 서열번호 22의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 다른 실시형태에서, 상기 CD8 막통과 도메인은 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0158] 몇몇의 경우, 본 발명의 CAR의 막통과 도메인은 CD8 α 힌지 도메인을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 CD8 힌지 도메인은 서열번호 15의 핵산 서열을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 CD8 힌지 도메인은 서열번호 21의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 다른 실시형태에서, 상기 CD8 힌지 도메인은 서열번호 21의 아미노산 서열을 포함한다.

[0160] 세포질 도메인

[0161] 본 발명의 CAR의 세포질 도메인 또는 다르게는 세포 내 신호전달 도메인은 CAR이 위치하고 있었던 면역 세포의 상 효과기 기능들 중 적어도 하나를 활성화시키는 역할을 한다. "효과기 기능"이란 용어는 세포의 구체화된 기능을 지칭한다. T 세포의 효과기 기능은, 예를 들어 사이토카인의 분비를 포함한 세포 용해성 활성 또는 헬퍼(helper) 활성일 수 있다. 따라서 "세포 내 신호전달 도메인"이란 용어는 효과기 기능 신호를 변환하고 세포가 구체화된 기능을 수행하도록 지시하는 단백질의 일부를 지칭한다. 일반적으로 세포 내 신호전달 도메인 전체가 이용될 수 있는 반면, 많은 경우에 체인 전체를 사용할 필요가 없다. 세포 내 신호전달 도메인의 절두된 일부가 사용되도록 연장시키기 위해선 이 같이 절단된 일부가 효과기 기능 신호를 변환하여 온전한 체인을 대신하여 사용될 수 있다. 따라서 "세포 내 신호전달 도메인"이란 용어는 효과기 기능 신호를 변환하기에 충분한 세포 내 신호전달 도메인의 임의의 절두된 일부를 포함하는 것으로 의미한다.

[0162] 본 발명의 CAR에 사용하기 위한 세포 내 신호전달 도메인의 바람직한 예로는 항원 수용체 관여(engagement) 이후에 신호 형질 도입을 개시하도록 협조적으로 작용하는 T 세포 수용체(TCR) 및 보조 수용체의 세포질 서열뿐만 아니라, 이들 서열의 임의의 유도체 또는 변이체, 및 동일한 기능적 능력을 갖는 임의의 합성 서열을 들 수 있다.

[0163] TCR이 단독으로는 생성된 신호가 T 세포의 완전한 활성화에 불충분하고, 이차 또는 공자극성 신호가 또한 요구된다는 것이 공지되어 있다. 따라서 T 세포 활성화는 세포질 신호전달 서열의 2개의 특이한 부류에 의해 매개되는 것으로 언급될 수 있으며, 상기 2개의 부류에는 TCR을 통한 항원 의존성 일차 활성화를 개시하는 신호전달 서열(일차 세포질 신호전달 서열) 및 이차 또는 공자극성 신호를 제공하기 위해 항원 의존성 방식으로 작용하는 신호전달 서열(이차 세포질 신호전달 서열)이 있다.

[0164] 일차 세포질 신호전달 서열은 자극 방식 및 억제 방식 중 하나로 TCR 복합체의 일차 활성화를 조절한다. 자극 방식으로 작용하는 일차 세포질 신호전달 서열은 면역 수용체 티로신 기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로 공지되어 있는 신호전달 모티프를 함유할 수 있다.

[0165] 본 발명에서 특별히 사용되는 일차 세포질 신호전달 서열을 함유하는 ITAM의 예로는 TCR 제타, FcR 감마, FcR 베타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD5, CD22, CD79a, CD79b 및 CD66d로부터 유래한 ITAM을 들 수 있다. 본 발명의 CAR 내의 세포질 신호전달 분자는 CD3 제타에서 유래한 세포질 신호전달 서열을 포함하는 것이 특히 바람직하다.

[0166] 바람직한 실시형태에서, 상기 CAR의 세포질 도메인은 CD3-제타 신호전달 도메인 자체를 포함하거나 본 발명의 CAR의 배경에서 유용한 임의의 기타 목적하는 세포질 도메인(들)과 조합된 CD3-제타 신호전달 도메인을 포함하도록 설계될 수 있다. 예를 들어, 상기 CAR의 세포질 도메인은 CD3 제타 체인 일부 및 공자극성 신호전달 영역을 포함할 수 있다. 상기 공자극성 신호전달 영역은 공자극성 분자의 세포 내 도메인을 포함하는 CAR의 일부를 지칭한다. 공자극성 분자는 항원에 대한 림프구의 효율적인 반응을 위해 요구되는 항원 수용체 또는 이들의 리간드가 아닌 세포 표면 분자이다. 이 같은 분자의 예로는 CD27, CD28, 4-1BB(CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능 연관 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 및 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드 등을 들 수 있다. 따라서 본 발명이 공자극성 신호전달 요소로서 4-1BB와 함께 주로 예시될지라도 기타 공자극성 요소는 본 발명의 범주 내에 있다.

[0167] 본 발명의 CAR의 세포질 신호전달 일부 내에 있는 세포질 신호전달 서열은 무작위 또는 구체화된 순서로 서로 연결될 수 있다 임의적으로는, 짧은 올리고펩티드 또는 폴리펩티드 링커, 바람직하게는 2와 10개 아미노산 길이를 갖는 링커는 연결을 형성할 수 있다. 글리신-세린 더블릿은 특히 적합한 링커를 제공한다.

[0168] 하나의 실시형태에서, 상기 세포질 도메인은 CD3-제타의 신호전달 도메인 및 CD28의 신호전달 도메인을 포함하도록 설계되었다. 다른 실시형태에서, 상기 세포질 도메인은 CD3-제타의 신호전달 도메인 및 4-1BB의 신호전달 도메인을 포함하도록 설계된다. 또 다른 실시형태에서, 상기 세포질 도메인은 CD3-제타의 신호전달 도메인 및 CD28 및 4-1BB의 신호전달 도메인을 포함하도록 설계되었다.

[0169] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 CAR 내의 세포질 도메인은 4-1BB의 신호전달 도메인 및 CD3-제타의 신호전달 도메인을 포함하도록 설계되며, 상기 4-1BB의 신호전달 도메인은 서열번호 17로 개시된 핵산 서열을 포함하고, 상기 CD3-제타의 신호전달 도메인은 서열번호 18로 개시된 핵산 서열을 포함한다.

- [0170] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 CAR 내의 세포질 도메인은 4-1BB의 신호전달 도메인 및 CD3-제타의 신호전달 도메인을 포함하도록 설계되되, 상기 4-1BB의 신호전달 도메인은 서열번호 23의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열을 포함하고, 상기 CD3-제타의 신호전달 도메인은 서열번호 24의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.
- [0171] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 CAR 내의 세포질 도메인은 4-1BB의 신호전달 도메인 및 CD3-제타의 신호전달 도메인을 포함하도록 설계되되, 상기 4-1BB의 신호전달 도메인은 서열번호 23으로 개시된 아미노산 서열을 포함하고, 상기 CD3-제타의 신호전달 도메인은 서열번호 24로 개시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0173] 벡터
- [0174] 본 발명은 CAR의 서열을 포함하는 DNA 구조체를 포함하되, 여기서 상기 서열은 세포 내 도메인의 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 항원 결합 일부분의 핵산 서열을 포함한다. 본 발명의 CAR에 사용될 수 있는 예시적인 세포 내 도메인으로는 CD3-제타, CD28, 4-1BB 등의 세포 내 도메인을 들 수 있지만, 본 발명에서는 이에 제한되지 않는다. 몇몇의 경우, 상기 CAR은 CD3-제타, CD28, 4-1BB 등의 임의의 조합을 포함할 수 있다.
- [0175] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 항-CD19 scFv, 인간 CD8 힌지 및 막통과 도메인, 및 인간 4-1BB 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 서열번호 8로 개시된 핵산 서열을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 서열번호 12의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 CAR은 서열번호 12로 개시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0176] 목적하는 분자를 코딩하는 핵산 서열은 당해 기술분야에 공지된 재조합 방법을 이용하여 획득될 수 있으며, 예를 들어 표준 기법을 이용하여 상기 유전자를 발현하는 세포로부터 라이브러리를 스크리닝하거나, 상기 동일한 유전자를 포함하도록 공지된 벡터로부터 유전자를 유도하거나, 상기 동일한 유전자를 포함하는 세포 및 조직으로부터 직접 분리함으로써 획득될 수 있다. 대안적으로는, 상기 관심이 있는 유전자는 클로닝이 아닌 합성에 의해 생성될 수 있다.
- [0177] 본 발명은 또한 본 발명의 DNA가 삽입되어 있는 벡터를 제공한다. 렌티바이러스와 같은 레트로바이러스에서 유래한 벡터는 이들이 이식 유전자의 장기간 안정한 통합 및 딸세포에서의 상기 유전자의 증식을 허용하기 때문에 장기간 유전자 전달을 달성하기에 적합한 도구이다. 렌티바이러스 벡터는 간세포와 같은 비증식성 세포를 형질 도입할 수 있다는 점에서 쥐 백혈병 바이러스와 같은 암-레트로바이러스로부터 유래한 벡터에 대한 추가적인 이점을 갖는다. 이들은 또한 면역성이 낮다는 추가적인 이점을 갖는다.
- [0178] 간단하게 요약하면, CAR을 암호화하는 천연 또는 합성 핵산의 발현은 전형적으로 CAR 폴리펩티드 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산을 프로모터에 작동 가능하게 연결하고 상기 구조체를 발현 벡터에 도입함으로써 달성된다. 상기 벡터는 복제 및 통합 진핵생물용으로 적합할 수 있다. 전형적인 클로닝 벡터는 전사 및 번역 종결인자, 개시 서열, 및 목적하는 핵산 서열의 발현의 조절에 유용한 프로모터를 포함한다.
- [0179] 본 발명의 발현 구조체는 또한 표준 유전자 전달 프로토콜을 이용하여 핵산 번역화 및 유전자 요법을 위해 사용될 수 있다. 유전자 전달을 위한 방법이 당해 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 본원에서 전체가 참고로 인용된 미국 특허 제 5,399,346 호, 제 5,580,859 호 및 제 5,589,466 호를 참고한다. 다른 실시형태에서, 본 발명은 유전자 요법 벡터를 제공한다.
- [0180] 상기 핵산은 다수 유형의 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 예를 들어, 상기 핵산은 플라스미드, 파지미드(phagemid), 파지 유도체, 동물 바이러스 및 코스미드를 포함하지만 이에 제한되지 않는 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 특히 관심이 있는 벡터로는 발현 벡터, 복제 벡터, 탐침 생성 벡터 및 시퀀싱 벡터를 들 수 있다.
- [0181] 또한 상기 발현 벡터는 바이러스성 벡터의 형태인 세포에 제공될 수 있다. 바이러스성 벡터 기술은 당해 기술분야에 널리 공지되어 있으며, 예를 들어 샘브룩(Sambrook) 등(2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)에 개시되어 있으며, 기타 바이러스학 및 분자생물학 설명서에 개시되어 있다. 벡터로서 유용한 바이러스로는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노 연관 바이러스, 포진 바이러스 및 렌티바이러스를 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 일반적으로, 적합한 벡터는 적어도 하나의 유기체에서 기능적인 복제 기원, 프로모터 서열, 편리한 제한 엔도뉴클레아제 부위 및 하나 이상의 선택 가능한 마커를 포함한다(예를 들어, 국제 공개공보 제 WO 01/96584 호; 제 WO 01/29058 호; 및 미국 특허 제 6,326,193 호).

- [0182] 다수의 바이러스 기반 시스템은 포유동물 세포 내로의 유전자 전달을 위해 개발되었다. 예를 들어, 레트로바이러스는 유전자 전달 시스템을 위한 편리한 플랫폼(platform)을 제공한다. 선택된 유전자는 벡터 내로 삽입되고, 당해 기술분야에 공지된 기법을 이용하여 레트로바이러스성 입자에 패키징(packaging)된다. 이어 재조합 바이러스는 단리되어, 생체 내 및 생체 외 중 하나에서 개체의 세포로 전달될 수 있다. 다수의 레트로바이러스성 시스템이 당해 기술분야에 공지되어 있다. 몇몇 실시형태에서, 아데노바이러스 벡터가 사용된다. 다수의 아데노바이러스 벡터가 당해 기술분야에 공지되어 있다. 하나의 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터가 사용된다.
- [0183] 부가적인 프로모터 요소, 예를 들어 인헨서는 전사 개시의 빈도를 조절한다. 전형적으로는, 최근에 다수의 프로모터가 출발 부위의 하류에 기능 요소를 또한 함유하도록 나타나 있을지라도 상기 출발 부위의 상류에서 30 내지 110bp 영역에 프로모터 요소가 위치한다. 프로모터 요소들 사이의 간격은 종종 가요성이어서, 프로모터 기능은 요소들이 삽입되거나 서로에 대해 이동하는 경우에 보존된다. 티미딘 키나아제(tk) 프로모터에서 프로모터 요소들 사이의 간격은 활성이 감소하기 시작하기 전에는 50bp까지 증가할 수 있다. 프로모터에 따라 개별 요소가 전사를 활성화하기 위해 협조적 또는 독립적으로 기능할 수 있는 것으로 보인다.
- [0184] 적합한 프로모터의 하나의 예는 즉시형 초기 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터 서열이다. 이러한 프로모터 서열은 자신에 작동 가능하게 연결된 임의의 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 높은 수준으로 구동할 수 있는 강력한 항구적 프로모터 서열이다. 적합한 프로모터의 다른 예는 연장 성장 인자-1 α (EF-1 α)이다. 그러나 액틴 프로모터, 미오신 프로모터, 헤모글로빈 프로모터 및 크레아틴 키나아제 프로모터를 포함하지만 이에 제한되지 않은 인간 유전자 프로모터뿐만 아니라, 원숭이 바이러스 40(SV40) 초기 프로모터, 생쥐 유방 종양 바이러스(MMTV), 인간 면역 결핍 바이러스(HIV) 긴 말단 반복서열(LTR) 프로모터, MoMuLV 프로모터, 조류 백혈병 바이러스 프로모터, 엡스타인-바 바이러스 즉시형 초기 프로모터, 및 라우스 육종 바이러스 프로모터를 포함하는 기타 항구적 프로모터 서열은 또한 사용될 수 있다. 또한 본 발명은 항구적 프로모터의 용도에 제한되지 않아야 한다. 유도성 프로모터는 본 발명의 일부로서 고려된다. 유도성 프로모터의 용도는 이 같은 발현이 요구되는 경우에 상기 유도성 프로모터가 작동 가능하게 연결되어 있는 폴리뉴클레오티드 서열을 발현을 시작할 수 있거나 상기 발현이 요구되지 않는 경우에 발현을 중단할 수 있는 분자 스위치를 제공한다. 유도성 프로모터의 예로는 메탈로티오닌 프로모터, 글루코코르티코이드 프로모터, 프로게스테론 프로모터 및 테트라사이클린 프로모터를 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0185] CAR 폴리펩티드 또는 이의 일부의 발현을 평가하기 위해, 세포 내로 도입될 발현 벡터는 또한 바이러스성 벡터를 통해 형질 감염되거나 감염되는 것으로 생각되는 세포의 개체군으로부터 발현 세포의 확인 및 선택을 조장하기 위해 선택 가능한 마커 유전자 및 리포터 유전자 중 하나 또는 둘 모두를 포함할 수 있다. 기타 양태에서, 선택 가능한 마커는 DNA 개별 단편 상에서 존재할 수 있으며, 공-형질 감염 과정에 사용될 수 있다. 선택 가능한 마커 및 리포터 유전자 둘 모두는 숙주 세포에서 발현을 가능케 하기 위해 적절한 조절용 서열의 측면에 위치할 수 있다. 유용한 선택 가능한 마커로는, 예를 들어 neo 등과 같은 항생제 저항 유전자를 들 수 있다.
- [0186] 리포터 유전자는 잠재적으로 형질 감염된 세포를 확인하고 조절용 서열의 기능성을 평가하기 위해 사용된다. 일반적으로, 리포터 유전자는 수취성 유기체 또는 조직에 존재하지 않거나 이에 의해 발현되지 않으며, 몇몇 용이하게 검출 가능한 특성, 예를 들어, 효소 활성에 의해 발현이 확인된 폴리펩티드를 암호화하는 유전자이다. 리포터 유전자의 발현은 DNA가 수취성 세포 내로 도입된 이후 적절한 시간에 검정된다. 적합한 리포터 유전자는 루시페라아제, 베타-갈락토시다아제, 클로람페니콜 아세틸 전이효소, 분비된 알카라인 포스파타제 또는 녹색 형광 단백질 유전자(예를 들어, Ui-Tei 등, 2000 FEBS Letters 479: 79-82)를 암호화하는 유전자를 포함할 수 있다. 적합한 발현 시스템은 널리 공지되어 있으며, 공지된 방법으로 제조되거나 상업적으로 수득될 수 있다. 일반적으로, 리포터 유전자의 가장 높은 발현 수준을 나타내는 최소 5' 측부 영역을 갖는 구조체는 프로모터로서 확인되었다. 이 같은 프로모터 영역은 포터 유전자에 연결될 수 있으며, 프로모터 구동 전사를 조정하는 능력 때문에 약제를 평가하기 위해 사용될 수 있다.
- [0187] 세포 내로 유전자를 도입하고 발현하는 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다. 발현 벡터의 배경에서, 상기 벡터는 당해 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해 숙주 세포, 예를 들어, 포유동물 세포, 박테리아성 세포, 효모 세포 또는 곤충 세포 내로 신속하게 도입될 수 있다. 예를 들어, 발현 벡터는 물리적, 화학적 또는 생물학적 수단에 의해 숙주 세포에 전달될 수 있다.
- [0188] 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입하는 물리적 방법으로는 인산칼슘 침전, 리포펙션(lipofection), 입자 충격, 미세주사, 전기 천공 등을 들 수 있다. 벡터 및/또는 외생성 핵산을 포함하는 세포를 생성하는 방법은 당해 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 샘브록 등(2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*,

Cold Spring Harbor Laboratory, New York)을 참고한다. 숙주 세포 내로의 폴리뉴클레오티드의 도입을 위한 바람직한 방법은 인산칼슘 형질 감염이다.

[0189] 대상 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에 도입하기 위한 생물학적 방법으로는 DNA 및 RNA 벡터의 사용을 들 수 있다. 바이러스성 벡터, 및 특히 레트로바이러스성 벡터는 유전자를 포유동물 세포, 예를 들어 인간 세포 내로 삽입하기 위해 가장 광범위하게 사용된 방법이다. 기타 바이러스성 벡터는 렌티바이러스, 수두 바이러스, 단순 포진 바이러스 I, 아데노바이러스, 아데노 연관 바이러스 등으로부터 유래할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제 5,350,674 호 및 제 5,585,362 호를 참고한다.

[0190] 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입하기 위한 화학적 수단으로는 거대 분자 복합체, 나노캡슐, 미소구체, 비드, 및 수중유 유체, 미셀, 혼합 미셀 및 리포솜을 포함하는 지질 기반 시스템과 같은 콜로이드성 분산 시스템을 들 수 있다. 시험관 내 및 생체 내에서 전달 비히클로서 사용하기 위한 예시적인 콜로이드성 시스템은 리포솜(예를 들어, 인공 막소포)이다.

[0191] 비-바이러스성 전달 시스템이 사용되는 경우에 예시적인 전달 비히클은 리포솜이다. 지질 제형의 사용은 숙주 세포 내로의 핵산의 도입(시험관 내, 생체 외 또는 생체 내)을 위해 고려된다. 다른 양태에서, 상기 핵산은 지질과 연관될 수 있다. 지질과 연관된 핵산은 리포솜의 수정 내부에 캡슐화되거나, 리포솜의 지질 이중층 내에 산재하거나, 리포솜 및 올리고뉴클레오티드 둘 모두와 연관이 있는 연결 분자를 통해 리포솜에 부착되거나, 리포솜에 포획되거나, 리포솜과 착체를 형성하거나, 지질을 함유하는 용액에 분산되거나, 지질과 혼합되거나, 지질과 조합되거나, 지질 중의 현탁액으로서 포함되거나, 미셀과 함께 포함되거나 착체를 형성하거나, 다르게는 지질과 연관되어 있다. 지질, 지질/DNA 또는 지질/발현 벡터 연관 조성물은 용액 중의 임의의 특정한 구조에 제한되지 않는다. 예를 들어, 이들은 미셀로서 이중층 구조에 존재할 수 있거나, "붕괴된" 구조로 존재할 수 있다. 이들은 용액 중에서 단순히 산재되어 있을 수 있으며, 이로 인해 가능하게도 크기 또는 형태가 균일하지 않는 집성체가 형성된다. 지질은 자연적으로 발생하는 지질 또는 합성 지질일 수 있는 지방 물질이다. 예를 들어, 지질은 지방산, 알코올, 아민, 아미노 알코올 및 알데하이드와 같은 장쇄 지방족 탄화수소 및 이들의 유도체를 포함하는 화합물의 부류뿐만 아니라 세포질에서 자연적으로는 발생하는 지방 비말(fatty droplet)을 포함한다.

[0192] 사용에 적합한 지질은 공업용 공급원으로부터 취득될 수 있다. 예를 들어, 디미리스틸 포스파티딜콜린("DMPC")은 미주리주 세인트루이스에 소재한 시그마(Sigma)사로부터 취득될 수 있고, 디세틸포스페이트("DCP")는 뉴욕주 플레인뷰에 소재한 케이앤드케이 레보레토리스(K & K Laboratories)사로부터 취득될 수 있고, 콜레스테롤("choi")은 칼바이오캠-베링(Calbiochem-Behring)사로부터 취득될 수 있고, 디미리스틸 포스파티딜글리세롤("DMPG") 및 기타 지질은 알라바마주 버밍햄에 소재한 아반티 폴라 리비즈(Avanti Polar Lipids, Inc.)사로부터 취득될 수 있다. 클로로포름 또는 클로로포름/메탄올 중의 지질의 저장 용액은 약 -20℃에서 저장될 수 있다. 클로로포름은 메탄올보다 용이하게 증발하기 때문에 유일한 용매로서 사용된다. "리포솜"은 동봉된 지질 이중층 또는 집성체의 생성에 의해 형성된 다양한 단일 및 다중 라멜라성 지질 비히클을 포함하는 일반적인 용어이다. 리포솜은 인지질 이중층 막 및 내부 수성 배지가 구비된 수포성 구조를 갖는 것으로 특징지어질 수 있다. 다중 라멜라성 리포솜은 수성 배지에 의해 분리된 다중 지질층을 갖는다. 이들은 과량의 수용액에서 인지질이 현탁되는 경우에 동시에 형성된다. 지질 성분은 폐쇄된 구조의 형성 이전에 자가 재배열을 경험하고, 물 및 지질 이중층에 용해된 용질을 포획한다(Ghosh 등, 1991 *Glycobiology* 5: 505-10). 그러나 용액에서 정상 수포성 구조와는 상이한 구조를 갖는 조성물이 또한 포함된다. 예를 들어, 상기 지질은 미셀 구조를 나타낼 수 있거나, 지질 분자의 불균일한 집성체로서 단순히 존재할 수 있다. 또한 리포펙타민-핵산 복합체가 고려된다.

[0193] 외생성 핵산을 숙주 세포 내로 도입하거나 다르게는 세포를 본 발명의 억제제에 노출시키기 위해 사용된 상기 방법과는 무관하게, 숙주 세포에서 재조합 DNA 서열의 존재를 확인하기 위해 다양한 검정이 수행될 수 있다. 이 같은 검정으로는, 예를 들어 서던 및 노던 블롯팅(Southern and Northern blotting), RT-PCR 및 PCR과 같이 당해 기술분야의 숙련자에게 널리 공지된 "분자 생물학적" 검정; 예를 들어 본 발명의 범주 이내에 있는 약제를 확인하기 위해 본원에서 개시된 검정 또는 면역학적 수단(ELISAs 및 Western blots)에 의해 특정 펩티드의 존재 또는 부재를 검출하는 것과 같은 "생화학적" 검정을 들 수 있다.

[0195] T 세포의 공급원

[0196] 본 발명의 T 세포의 증식 및 유전자 변형 이전에 T 세포의 공급원은 개체로부터 취득된다. T 세포는 말초 혈액

단핵성 세포, 골수, 림프절 조직, 재대혈, 흉선 조직, 감염 부위, 복수 부위 또는 흉막 유출 부위로부터의 조직, 비장 조직, 및 종양을 포함한 다수의 공급원으로부터 수득될 수 있다. 본 발명의 특정 실시형태에서, 당해 기술분야에서 이용 가능한 다수의 임의의 T 세포주가 사용될 수 있다. 본 발명의 특정 실시형태에서, T 세포는 피콜TM(FicollTM) 분리와 같이 당업자에게 공지된 다수의 임의의 기법을 이용하여 개체로부터 수집된 혈액 단위로 수득될 수 있다. 하나의 바람직한 실시형태에서, 개체의 순환 혈액으로부터의 세포는 아페레시스에 의해 수득된다. 아페레시스 생성물은 전형적으로는 T 세포, 단핵 세포, 과립구, B 세포, 기타 핵 형성 백혈구 세포, 적혈구 세포 및 혈소판을 포함한 림프구를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 아페레시스에 의해 수집된 세포는 플라스마 분획을 제거하고 후속적인 가공 단계를 위해 상기 세포를 적절한 완충액 또는 배지에 넣기 위해 세척될 수 있다. 본 발명의 하나의 실시형태에서, 상기 세포는 인산 완충 식염수(PBS)로 세척한다. 대안적인 실시형태에서, 세척액에는 칼슘이 결핍되고, 마그네슘이 결핍될 수 있거나, 모두가 2가 양이온이 아닌 경우에 많은 것이 결핍될 수 있다. 또한 놀랍게도, 칼슘의 부재 하에서의 초기 활성화 단계는 변형된 활성화를 초래한다. 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자는 세척 단계는 제조사의 지시에 따라 반자동화된 "통과형(flow-through)" 원심분리기(예를 들어, Cobe 2991 세포 프로세서, Baxter CytoMate 또는 Haemonetics Cell Saver 5)를 이용하는 것과 같이 당해 기술분야의 숙련자에게 공지된 방법에 의해 달성될 수 있다는 것을 용이하게 인식할 수 있다. 세척 이후, 상기 세포는, 예를 들어 Ca^{2+} 부재 PBS, Mg^{2+} 부재 PBS, 플라스마라이트(PlasmaLyte) A, 또는 완충액의 유무에 따른 기타 식염수 용액과 같은 다양한 생체 적합성 완충액에 재현탁될 수 있다. 대안적으로는, 상기 아페레시스 샘플의 바람직하지 못한 성분은 제거될 수 있으며, 상기 세포는 배양 배지에 직접 현탁될 수 있다.

[0197] 다른 실시형태에서, T 세포는 적혈구 세포를 용해하고, 예를 들어 PERCOLLTM 구배를 통한 원심분리 또는 역류 원심분리성 수비에 의해 단핵 세포를 고갈시킴으로써 말초 혈액 림프구로부터 단리된다. CD3^+ , CD28^+ , CD4^+ , CD8^+ , CD45RA^+ 및 CD45RO^+ T세포와 같은 세포의 특정 하위 개체군은 양성 또는 음성 선택 기법에 의해 추가로 단리될 수 있다. 예를 들어, 하나의 실시형태에서, T 세포는 목적하는 T 세포의 양성 선택을 위해 충분한 기간 동안 DYNABEADS[®] M-450 CD3/CD28 T와 같은 항- CD3 /항- CD28 (즉, 3x28) 접합 비드와 함께 배양함으로써 단리된다. 하나의 실시형태에서, 상기 기간은 약 30분이다. 또 다른 실시형태에서, 상기 기간은 30분 내지 36시간의 범위이며, 그 이상일 수 있으며, 이들 사이의 모든 값은 정수이다. 또 다른 실시형태에서, 상기 기간은 적어도 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간 또는 6시간이다. 또 다른 바람직한 실시형태에서, 상기 기간은 10시간 내지 24시간이다. 하나의 바람직한 실시형태에서, 상기 배양 기간은 24시간이다. 백혈병을 앓는 환자로부터 T 세포의 단리를 위해 더욱 긴 배양 시간, 예를 들어 24시간의 사용은 세포 수율을 증가시킬 수 있다. 더욱 긴 배양 시간은 기타 세포 유형과 비교해서 T 세포의 수가 적은 임의의 상황, 예를 들어 종양 조직 또는 면역 저하(immune-compromising)된 개인으로부터 종양 침윤성 림프구(TIL)를 단리하는 것과 같은 상황에서 T 세포를 단리하기 위해 사용될 수 있다. 또한 더욱 긴 배양 시간의 사용은 CD8^+ T 세포의 포획 효율을 증가시킬 수 있다. 따라서 T 세포가 CD3/CD28 비드에 결합하도록 상기 시간을 단순히 감소시키거나 증가시키는 것 및/또는 T 세포에 대한 비드의 비율을 증가시키거나 감소시킴으로써(본원에서 추가로 개시된 바와 같음), T 세포의 하위 개체군은 배양 개시 시점 또는 공정 도중의 기타 시점이 우선적으로 선택될 수 있다. 부가적으로는, 비드 또는 기타 표면의 항- CD3 및/또는 항- CD28 항체의 비율을 증가시키거나 감소시킴으로써 T 세포의 하위 개체군은 배양 개시 시점 또는 기타 목적하는 시점이 우선적으로 선택될 수 있다. 당업자는 여러 번의 선택이 또한 본 발명의 배경에 사용될 수 있다는 것을 인식할 수 있다. 특정 실시형태에서, 선택 과정을 수행하고, 활성화 및 확장 공정에서 "선택되지 않은" 세포를 이용하는 것이 바람직할 수 있다. "선택되지 않은" 세포는 또한 추가 회수의 선택이 적용될 수도 있다.

[0198] 음성 선택에 의한 T 세포 개체군의 부유화는 음성으로 선택된 세포에 특이적인 표면 마커로 향하는 항체의 조합에 의해 달성될 수 있다. 하나의 방법은 음성으로 선택된 세포 상에 존재하는 세포 표면 마커로 향하는 단일 클론성 항체의 칵테일(cocktail)을 이용하는 음자성 면역 부착법 또는 유동 세포 분석법을 통한 세포 분류 및/또는 선택이다. 예를 들어, 음성 선택에 의해 CD4^+ 세포용으로 부유화하기 위해, 단일 클론성 항체 칵테일은 전형적으로는 CD14 , CD20 , CD11b , CD16 , HLA-DR 및 CD8 에 대한 항체를 포함한다. 특정 실시형태에서, 전형적으로 CD4^+ , CD25^+ , CD62L^{hi} , GITR^+ 및 FoxP3^+ 를 발현하는 조절용 T 세포용으로 부유화하거나 양성으로 선택하는 것이 바람직할 수 있다. 대안적으로는, 특정 실시형태에서는 T 조절용 세포는 항-C25 접합 비드 또는 기타 유사한 선택 방법으로 고갈될 수 있다.

- [0199] 양성 또는 음성 선택에 의한 세포의 목적하는 개체군을 분리하기 위해, 세포 및 표면(예를 들어, 비드와 같은 입자)의 농도는 다를 수 있다. 특정 실시형태에서, 세포 및 비드의 최대 접촉을 확보하기 위해 비드 및 세포가 함께 혼합되어 있는 부피를 유의하게 증가시키는 것(즉, 세포의 농도를 증가시키는 것)이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 하나의 실시형태에서, 1ml 당 20억 개의 세포 농도가 사용된다. 하나의 실시형태에서, 1ml 당 10억 개의 세포 농도가 사용된다. 또 다른 실시형태에서, 1ml 당 1억 개 초과와 세포가 사용된다. 또 다른 실시형태에서, 1ml 당 1천만, 1천5백만, 2천만, 2천5백만, 3천만, 3천5백만, 4천만, 4천5백만 또는 5천만 개 세포의 세포 농도가 사용된다. 또 다른 실시형태에서, 1ml 당 7천5백만, 8천만, 8천5백만, 9천만, 9천5백만 또는 1억 개 세포의 세포 농도가 사용된다. 또 다른 실시형태에서, 1ml 당 1억 2천5백만 또는 1억 5천만 개의 세포 농도가 사용될 수 있다. 고농도의 사용은 세포 수율, 세포 활성화 및 세포 확장의 증가를 초래할 수 있다. 또한 높은 세포 농도의 사용은 CD28 음성 T 세포와 같이 관심이 있는 표적 항원을 약하게 발현할 수 있는 세포의 더욱 효율적인 포획을 허용하거나, 이때 다수의 종양 세포가 존재하는 샘플(즉, 백혈병성 혈액, 종양 조직 등)로부터 상기 세포의 더욱 효율적인 포획을 허용한다. 이 같은 세포의 개체군은 치료적 값을 가질 수 있으며, 상기 세포의 개체군을 수득하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 고농도의 세포의 사용은 정상적으로는 더욱 약한 CD28 발현을 나타내는 CD8⁺ T 세포의 더욱 효율적인 선택을 허용한다.
- [0200] 관련 실시형태에서, 더욱 낮은 농도의 세포를 이용하는 것이 바람직할 수 있다. T 세포와 표면(예를 들어, 비드와 같은 입자)의 혼합물을 유의하게 희석함으로써 입자와 세포 사이의 상호작용을 최소화된다. 이는 다량의 목적하는 항원을 발현하여 상기 입자에 결합되는 세포를 위해 선택된다. 예를 들어, CD4⁺ T 세포는 더욱 높은 수준의 CD28을 발현하고, 희석 농도에서 CD8⁺ T 세포보다 더욱 효율적으로 포획된다. 하나의 실시형태에서, 사용된 세포의 농도는 $5 \times 10^6 / \text{ml}$ 이다. 기타 실시형태에서, 사용된 농도는 약 $1 \times 10^5 / \text{ml}$ 내지 $1 \times 10^6 / \text{ml}$ 일 수 있으며, 이들 사이에 있는 임의의 정수 값이다.
- [0201] 기타 실시형태에서, 상기 세포는 2 내지 10°C 및 실온 중 하나에서 변하는 속도로 변하는 시간의 길이 동안 회전 상에서 배양될 수 있다.
- [0202] 자극을 위한 T 세포는 또한 세척 단계 이후에 냉동될 수 있다. 이론에 결부되지 않기를 바라면서, 냉동 단계 및 후속적인 해동 단계는 세포 개체군 내의 과립구를 제거하고 어느 정도는 단핵 세포를 제거함으로써 더욱 균일한 생성물을 제공한다. 플라즈마 및 혈소판을 제거하는 세척 단계 이후, 상기 세포는 동결액에 현탁될 수 있다. 많은 동결액 및 파라미터가 당해 기술분야에 공지되어 있고, 이러한 배경에서 유용할지라도, 하나의 방법은 20% DMSO 및 8% 인간 혈청 알부민을 함유하는 PBS, 또는 10% 텍스트란 40 및 5% 텍스트로오스를 함유하는 배양 배지, 20% 인간 혈청 알부민 및 7.5% DMSO, 또는 31.25% 플라즈마라이트-A, 31.25% 텍스트로오스 5%, 0.45% NaCl, 10% 텍스트란 40 및 5% 텍스트로오스, 20% 인간 혈청 알부민, 및 7.5% DMSO, 및 예를 들어 헤스판(Hespan) 및 플라즈마라이트 A를 함유하는 기타 적합한 세포 동결 배지의 이용을 포함한다. 이어 상기 세포는 1분 당 1°의 속도로 -80°C까지 냉동되고, 기화상태의 액체 질소 저장 탱크에 저장된다. -20°C에서 또는 액체 질소 중에서 제어되지 않는 즉시형 동결뿐만 아니라 기타 제어된 동결 방법이 사용될 수 있다.
- [0203] 특정 실시형태에서, 냉동에서 보존된 세포는 상술한 바와 같이 해동하고, 세척하며, 본 발명의 방법을 이용한 활성화 이전에 실온에서 1시간 동안 방치한다.
- [0204] 본원에서 개시된 바와 같이 증식된 세포가 필요로 할 시기 이전의 기간에 개체로부터 혈액 샘플 또는 아페레시스 생성물을 수집하는 것이 본 발명의 배경에서 또한 고려된다. 상기와 같이, 확장될 세포의 공급원은 임의의 필요한 시점에 수집될 수 있으며, T 세포 같이 목적하는 세포는 본원에서 개시된 바와 같은 T 세포 요법으로부터 이점을 가질 수 있는 다수의 임의의 질병 또는 이상에 대해 T 세포 요법에서 추후에 사용하기 위해 분리되고 냉동된다. 하나의 실시형태에서, 혈액 샘플 또는 아페레시스는 일반적으로 건강한 개체로부터 얻어진다. 특정 실시형태에서, 혈액 샘플 또는 아페레시스는 질병에 걸릴 위험이 있지만 아직까지 질병에 걸리지 않은 일반적으로 건강한 개체로부터 얻어지고, 및 관심이 있는 세포는 추후의 사용을 위해 분리되고 냉동된다. 특정 실시형태에서, 상기 T 세포는 증식되고, 냉동되며, 추후의 시간에 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서, 샘플은 본원에서 개시된 바와 같은 특정한 질병의 진단 직후지만 임의의 치료 이전에 환자로부터 수집된다. 또 다른 실시형태에서, 상기 세포는 다수의 임의의 관련된 치료 양식 이전에 개체에서 유래한 혈액 샘플 또는 아페레시스로부터 분리되며, 이때 상기 관련된 치료 양식으로는 나탈리주맙(natalizumab), 에팔리주맙(efalizumab) 및 항바이러스제와 같은 약제, 사이클로스포린, 아자티오프린(azathioprine), 메토트렉세이트(methotrexate), 마이코페놀레이트(mycophenolate) 및 FK506과 같은 면역 억제제, CAMPATH, 항-CD3 항체, 사이토산(cytoxan), 플루다라빈

(fludarabine), 사이클로스포린, FK506, 라파마이신(rapamycin), 마이코페놀산, 스테로이드류 및 FR901228과 같은 항체 또는 기타 면역 절제제, 및 방사선요법을 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 이들 약제는 칼슘 의존성 포스포타아제인 칼시뉴린(calcineurin)(사이클로스포린 및 FK506)을 억제하거나, 성장 인자 유도 신호전달(라파마이신)에 중요한 p70S6 키나아제를 억제한다(Liu 등, *Cell* 66: 807-815, 1991; Henderson 등, *Immun.* 73: 316-321, 1991; Bierer 등, *Curr. Opin. Immun.* 5: 763-773, 1993). 또 다른 실시형태에서, 상기 세포는 환자를 위해 단리 하여, 골수 또는 줄기세포 이식, 및 플루다라빈, 외부 방사선 요법(XRT) 또는 싸이클로포스파마이드(cyclophosphamide)와 같은 화학요법제 및 OKT3 또는 CAMPATH와 같은 항체 중 하나를 이용하는 T 세포 절제 요법(예를 들어, 이전, 동시 또는 이후)과 함께 추후 사용을 위해 냉동된다. 다른 실시형태에서, 상기 세포는 CD20과 반응하는 약제, 예를 들어 리툭산(Rituxan)과 같은 B-세포 절제 요법 이전에 단리하여, 상기 B-세포 절제 요법 이후에 추후 사용을 위해 냉동될 수 있다.

[0205] 본 발명의 또 다른 실시형태에서, T 세포는 치료 직후에 환자로부터 수득된다. 이와 관련하여, 특정 암 치료 이후, 면역 시스템을 손상시키는 약제에 의한 특별한 치료에서, 그리고 상기 치료에 의해 환자가 정상적으로 회복할 수 있는 기간 동안의 치료 직후에 수득된 T 세포의 양이 최적일 수 있으며, 생체 외에서 증식하는 이들의 능력을 위해 개선될 수 있는 것으로 관측되었다. 마찬가지로, 본원에 개시된 방법을 이용한 생체 외 조작 이후에 이들 세포는 증강된 이식 및 생체 내 증식을 위해 바람직한 상태일 수 있다. 따라서 이러한 회복 단계 도중에 조혈 계통의 T 세포, 수지상 세포 또는 기타 세포를 포함한 혈액 세포를 수집하기 위해 본 발명의 배경 내에서 고려된다. 또한 특정 실시형태에서, 고정화(예를 들어, GM-CSF와의 고정화) 및 컨디셔닝 양생법(conditioning regimen)은 특히 요법 이후에 소정의 시간의 창 도중에 특정한 세포 유형의 재증식, 재순환, 재생, 및/또는 확장이 선호되는 개체에서 이상을 야기하기 위해 사용될 수 있다. 예시적인 세포 유형으로는 T 세포, B 세포, 수지상 세포, 및 상기 면역 시스템의 기타 세포를 들 수 있다.

[0207] T 세포의 활성화 및 증식

[0208] 바람직한 CAR을 발현하기 위해 T 세포의 유전자 변형 이전이든 이후이든 간에, 상기 T 세포는, 예를 들어 일반적으로는 미국 특허 제 6,352,694 호; 제 6,534,055 호; 제 6,905,680 호; 제 6,692,964 호; 제 5,858,358 호; 제 6,887,466 호; 제 6,905,681 호; 제 7,144,575 호; 제 7,067,318 호; 제 7,172,869 호; 제 7,232,566 호; 제 7,175,843 호; 제 5,883,223 호; 제 6,905,874 호; 제 6,797,514 호; 및 제 6,867,041 호, 및 미국 특허출원 제 2006-0121005 호에 개시된 방법을 이용하여 활성화되고 증식될 수 있다.

[0209] 일반적으로, 본 발명의 T 세포는 CD3/TCR 복합체 연관 신호를 자극하는 약제 및 T 세포의 표면 상의 공자극성 분자를 자극하는 리간드가 부착되어 있는 표면과의 접촉에 의해 증식된다. 특히, T 세포 개체군은 항-CD3 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 표면 상에 고정된 항-CD2 항체와의 접촉, 또는 칼슘 이온 투과 담체(calcium ionophore)와 함께 단백질 키나아제 C 활성화인자(예를 들어, 브리오스타틴(bryostatin))와의 접촉에 의한 것과 같이 본원에 개시된 바와 같이 자극될 수 있다. T 세포의 표면 상의 보조 분자의 공자극을 위해 상기 보조 분자와 결합하는 리간드가 사용된다. 예를 들어, T 세포의 개체군은 T 세포의 증식을 자극하기에 적절한 조건 하에 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체와 접촉될 수 있다. CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포 중 하나의 증식을 자극하기 위해, 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체가 사용된다. 항-CD28 항체의 예로는 9.3, B-T3, 및 XR-CD28(디아클론(Diaclone), 프랑스 베상송(Besancon) 소재)을 들 수 있으며, 이들은 당해 기술분야에 일반적으로 공지된 기타 방법으로서 사용될 수 있다(Berg 등, *Transplant Proc.* 30(8): 3975-3977, 1998; Haanen 등, *J. Exp. Med.* 190(9): 1319-1328, 1999; Garland 등, *J. Immunol Meth.* 227(1-2): 53-63, 1999 등 참조).

[0210] 특정 실시형태에서, T 세포를 위한 일차 자극 신호 및 공자극성 신호는 상이한 프로토콜에 의해 제공될 수 있다. 예를 들어, 각각의 신호를 제공하는 약제는 용액 상태일 수 있거나, 표면에 결합되어 있을 수 있다. 표면에 결합되어 있는 경우, 상기 약제는 동일한 표면 (즉, "시스" 형태) 또는 개별 표면(즉, "트랜스" 형태)에 결합될 수 있다. 대안적으로는, 하나의 약제가 표면에 결합될 수 있고, 기타 약제는 용액 상태일 수 있다. 하나의 실시형태에서, 공자극성 신호를 제공하는 약제는 세포 표면에 결합되어 있고, 일차 활성화 신호를 제공하는 약제는 용액 상태이거나 표면에 결합되어 있다. 특정 실시형태에서, 상기 약제 둘 모두는 용액 상태일 수 있다. 다른 실시형태에서, 상기 약제는 가용성 형태일 수 있으며, 이어 Fc 수용체를 발현하는 세포 또는 항체, 또는 상기 약제와 결합하는 기타 결합 약제와 같은 표면에 고정될 수 있다. 이와 관련하여, 예를 들어 본 발명에서 T 세포를 활성화시키고 증식하는데 사용하기 위해 고려되는 인공 항원 제시 세포(aAPC)에 대해서는 미국 특허출원 제 2004-0101519 호 및 제 2006-0034810 호를 참조한다.

[0211] 하나의 실시형태에서, 상기 2개의 약제는 비드 상에 고정되는데, 동일한 비드, 즉 "시스" 상에 또는 개별 비드, 즉 "트랜스"에 고정된다. 일례로, 일차 활성화 신호를 제공하는 약제는 항-CD3 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고, 공자극성 신호를 제공하는 약제는 항-CD28 항체 또는 이의 항원 결합 단편이며, 상기 약제 둘 모두는 등가의 분자량으로 동일한 비드에 동시 고정된다. 하나의 실시형태에서, $CD4^+$ T 세포 확장 및 T 세포 성장을 위한 비드에 결합된 각 항체의 1:1의 비율이 사용된다. 본 발명의 특정한 양태에서, 비드에 결합된 항-CD3:CD28 항체의 비율은 1:1의 비율을 이용하여 관측된 증식에 비해 T 세포 증식에서의 증가가 관측되도록 사용된다. 하나의 특정한 실시형태에서, 1:1의 비율을 이용하여 관측된 확장에 비해 약 1 내지 약 3배의 증가가 관측된다. 하나의 실시형태에서, 비드에 결합된 CD3:CD28 항체의 비율은 100:1 내지 1:100의 범위이고, 모든 정수 값이 상기 범위 사이에 존재한다. 본 발명의 하나의 양태에서, 항-CD3 항체보다 상기 입자에 더 많은 항-CD28 항체가 결합한다. 즉, CD3:CD28의 비율은 1미만이다. 본 발명의 특정 실시형태에서, 비드에 결합된 항-CD3 항체에 대한 항-CD28 항체의 비율은 2:1을 초과한다. 하나의 특정 실시형태에서, 비드에 결합된 항체의 1:100 CD3:CD28의 비율이 사용된다. 다른 실시형태에서, 비드에 결합된 항체의 1:75 CD3:CD28의 비율이 사용된다. 또 다른 실시형태에서, 비드에 결합된 항체의 1:50 CD3:CD28의 비율이 사용된다. 다른 실시형태에서, 비드에 결합된 항체의 1:30 CD3:CD28의 비율이 사용된다. 하나의 바람직한 실시형태에서, 비드에 결합된 항체의 1:10 CD3:CD28의 비율이 사용된다. 다른 실시형태에서, 비드에 결합된 항체의 1:3 CD3:CD28의 비율이 사용된다. 또 다른 실시형태에서, 비드에 결합된 항체의 3:1 CD3:CD28의 비율이 사용된다.

[0212] 1:500 내지 500:1 범위의 세포에 대한 입자의 비율, 및 이들 사이의 임의의 정수값은 T 세포 또는 기타 표적 세포를 자극하기 위해 사용될 수 있다. 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 인지하는 바와 같이, 상기 세포에 대한 입자의 비율은 표적 세포에 대한 입자 크기에 의존할 수 있다. 예를 들어, 크기가 작은 비드는 소수의 세포와만 결합하는 반면, 대형 비드는 많은 세포와 결합할 수 있다. 특정 실시형태에서, 상기 입자에 대한 세포의 비율은 1:100 내지 100:1의 범위이고, 이들 사이의 임의의 정수 값을 포함하며, 또 다른 실시형태에서는 상기 비율이 1:9 내지 9:1의 범위를 포함하고, 이들 사이의 임의의 정수 값을 포함하며, 또한 T 세포를 자극하기 위해 사용될 수 있다. T 세포의 자극을 야기하는 T 세포에 대한 항-CD3- 및 항-CD28 결합 입자의 비율은 상술한 바와 같이 변할 수 있지만, 특정 바람직한 값으로는 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 및 15:1을 들 수 있으며, 이때 하나의 바람직한 비율은 T 세포 당 적어도 1:1의 입자이다. 하나의 실시형태에서, 1:1 이하의 세포에 대한 입자의 비율이 사용된다. 하나의 특정 실시형태에서, 바람직한 입자:세포 비율은 1:5이다. 또 다른 실시형태에서, 세포에 대한 입자의 비율은 자극 날짜에 따라 다를 수 있다. 예를 들어, 하나의 실시형태에서, 세포에 대한 입자의 비율은 첫째 날에는 1:1 내지 10:1의 범위이고, 부가적인 입자를 그 이후에 최대 10일 동안 매일 또는 하루걸러 1:1에서 1:10까지의 최종 비율(첨가한 날의 세포 개수에 기초함)로 세포에 첨가한다. 하나의 특정 실시형태에서, 세포에 대한 입자의 비율은 자극 첫째 날에 1:1이고, 자극 4일 및 5일째 날에 1:5로 조절한다. 다른 실시형태에서, 입자는 자극 첫째 날에 1:1의 최종 비율, 및 자극 4일 및 5일째 날에 1:5의 최종 비율로 매일 또는 하루걸러 첨가한다. 다른 실시형태에서, 세포에 대한 입자의 비율은 자극 첫째 날에 2:1이고, 자극 4일 및 5일째 날에 1:10로 조절한다. 다른 실시형태에서, 입자는 자극 첫째 날에 1:1의 최종 비율, 및 자극 4일 및 5일째 날에 1:10의 최종 비율로 매일 또는 하루걸러 첨가한다. 당해 기술분야의 숙련자라면, 다양한 기타 비율이 본 발명에서 사용하기에 적합할 수 있다는 것을 인지할 것이다. 특히, 입자 크기, 및 세포 크기 및 유형에 따라 비율이 변한 것이다.

[0213] 본 발명의 또 다른 실시형태에서, T 세포와 같은 세포는 약제 코팅된 비드와 조합되고, 상기 비드 및 세포는 후속적으로 분리된 후, 상기 세포를 배양한다. 대안적인 실시형태에서, 배양 이전에 약제 코팅된 비드 세포를 분리하지 않고 함께 배양한다. 또 다른 실시형태에서, 상기 비드 및 세포는 먼저 자력과 같은 힘을 가하여 농축하며, 이는 세포 표면 마커의 연결을 증가하여 세포 자극을 유도한다.

[0214] 일례로, 세포 표면 단백질은 항-CD3 및 항-CD28이 부착된 상자성 비드가 T 세포와 접촉하도록 함으로써 연결될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포(예를 들어, 10^4 내지 10^9 개의 T세포) 및 비드(예를 들어, 1:1 비율의 DYNABEADS[®] M-450 CD3/CD28 T 상자성 비드)가 완충액, 바람직하게는 PBS(칼슘 및 마그네슘과 같은 2가 양이온의 부재)에서 조합된다. 또한, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 임의의 세포 농도가 사용될 수 있다는 것을 용이하게 인지할 수 있다. 예를 들어, 상기 표적 세포는 상기 샘플에 매우 희박할 수 있으며, 상기 샘플의 0.01%만을 포함할 수 있거나, 전체 샘플(즉, 100%)은 관심이 있는 표적 세포를 포함할 수 있다. 따라서 임의의 세포 개수는 본 발명의 배경 이내에 있다. 특정 실시형태에서, 세포와 입자의 최대 접촉을 확보하기 위

해 세포 및 입자를 함께 혼합한 부피를 유의하게 감소시키는 것(즉 세포의 농도를 증가시키는 것)이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 하나의 실시형태에서, 1ml 당 약 20억 개의 세포 농도가 사용된다. 다른 실시형태에서, 1 ml 당 1억 개 초과인 세포 농도가 사용된다. 또 다른 실시형태에서, 1ml 당 1천만, 1천5백만, 2천만, 2천5백만, 3천만, 3천5백, 4천만, 4천5백만, 또는 5천만 개의 세포 농도가 사용된다. 또 다른 실시형태에서, 1ml 당 7천5백만, 8천만, 8천5백만, 9천만, 9천5백만, 또는 1억만 개의 세포 농도가 사용된다. 또 다른 실시형태에서, 1 ml 당 1억2천5백 또는 1억5천만 개의 세포 농도가 사용될 수 있다. 고농도의 사용은 세포 수율의 증가, 세포 활성화, 및 세포 증식을 초래할 수 있다. 또한 높은 세포 농도의 사용은 CD28 음성 T 세포와 같이 관심이 있는 표적 항원을 약하게 발현할 수 있는 세포의 더욱 효율적인 포획을 허용한다. 이 같은 세포의 개체군은 치료적 값을 가질 수 있으며, 특정 실시형태에서 수득하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 고농도의 세포의 사용은 정상적으로는 더욱 약한 CD28 발현을 나타내는 CD8⁺ T 세포의 더욱 효율적인 선택을 허용한다.

[0215] 본 발명의 하나의 실시형태에서, 상기 혼합물은 수 시간(약 3시간) 내지 약 14일 또는 이들 사이의 임의의 정수 값의 시간 동안 배양할 수 있다. 다른 실시형태에서, 상기 혼합물은 21일 동안 배양할 수 있다. 본 발명의 하나의 실시형태에서, 상기 비드 및 T 세포는 약 8일 동안 함께 배양한다. 다른 실시형태에서, 상기 비드 및 T 세포는 2 내지 3일 동안 함께 배양한다. 몇몇 자극 주기는 또한 T 세포의 배양 시간이 60일 이상일 수 있도록 요구될 수 있다. T 세포 배양에 적절한 조건으로는 증식 및 생존력에 필요한 인자를 함유할 수 있는 적절한 배지(예를 들어, 최소 필수 배지 또는 RPMI 배지 1640 또는 X-vivo 15(론자(Lonza)))를 들 수 있으며, 이때 상기 적절한 배지는 혈청(예를 들어, 소 또는 인간 태아 혈청), 인터류킨-2(IL-2), 인슐린, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF β , 및 당업자에 공지된 세포의 성장을 위한 TNF- α 또는 임의의 기타 첨가제를 포함한다. 세포의 성장을 위한 기타 첨가제로는 계면활성제, 플라즈마네이트(plasmanate), 및 N-아세틸-시스테인 및 2-메르캅토에탄올과 같은 환원제를 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 배지는 RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15, 및 X-Vivo 20을 포함할 수 있으며, 옵티마이저(optimizer)는 첨가된 아미노산, 피루브산나트륨 및 비타민과 함께 무혈청이거나 적절한 양의 혈청(또는 플라즈마) 또는 제한된 세트의 호르몬, 및/또는 T 세포의 성장 및 증식에 충분한 양의 사이토카인(들)이 보충된 상태이다. 항생제, 예를 들어 페니실린 및 스트렙토마이신은 개체 내로 주입되어야 하는 세포의 배양이 아닌 실험용 배양에서만 포함될 수 있다. 표적 세포는 성장을 지원하는데 필요한 조건, 예를 들어 적절한 온도(예를 들어, 37°C) 및 대기조건(5% CO₂를 포함하는 대기)하에 유지된다.

[0216] 다양한 자극 기간에 노출되었던 T 세포는 상이한 특징을 나타낼 수 있다. 예를 들어, 전형적인 혈액 또는 아페레시스된 말초 혈액 단핵성 세포 생성물은 세포 독성 또는 억제 T 세포 개체군(T_C, CD8⁺)보다 많은 헬퍼 T 세포 개체군(T_H, CD4⁺)을 갖는다. CD3 및 CD28 수용체를 자극함으로써 T 세포의 생체 외 확장은 약 8 내지 9일째 이전에 주로 T_H 세포로 이루어진 T 세포의 개체군을 생성하지만, 약 8 내지 9일째 이후에는 상기 T 세포의 개체군은 T_C 세포의 점진적으로 초과하는 개체군을 포함한다. 따라서 치료 목적에 따라 주로 T_H 세포로 구성된 T 세포 개체군으로 개체를 주입하는 것이 유리할 수 있다. 유사하게도, T_C 세포의 항원 특이적 서브셋이 단리되는 경우, 이는 이러한 서브셋을 더욱 크게 증식하는데 이로울 수 있다.

[0217] CD4 및 CD8 마커 이외에도 또한 기타 표현형 마커는 유의하게 다르지만, 세포 확장 공정 과정 동안에 주로 복제 가능하게 다르다. 따라서 이 같은 복제 가능성은 특정한 목적을 위해 활성화된 T 세포 생성물을 테일러링(tailoring)하는 능력을 가능케 한다.

[0219] 치료 적용

[0220] 본 발명은 렌티바이러스 벡터(LV)로 형질 도입된 세포(예를 들어, T 세포)를 포함한다. 예를 들어, 상기 LV는 특정 항체의 항원 인식 도메인을 CD3-제타, CD28, 4-1BB 또는 임의의 이의 조합의 세포 내 도메인을 조합하는 CAR을 암호화한다. 따라서 몇몇의 경우, 상기 형질 도입된 T 세포는 CAR 매개 T-세포 반응을 유도할 수 있다.

[0221] 본 발명은 종양 항원에 대한 일차 T 세포의 특이성을 재지향(redirecting)하기 위한 CAR의 용도를 제공한다. 따라서 본 발명은 포유동물에서 표적 세포 개체군 또는 조직에 대한 T 세포 매개 면역 반응을 자극하기 위한 방법을 제공하며, 상기 방법은 CAR을 발현하는 T 세포를 포유동물에 투여하는 단계를 포함하되, 상기 CAR은 소정의 표적과 특이적으로 상호작용하는 결합 일부분, 예를 들어 인간 CD3 제타의 세포 내 도메인을 포함하는 제타 체

인 일부, 및 공자극성 신호전달 영역을 포함한다.

- [0222] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 세포성 요법의 유형을 포함하며, 이때 T 세포는 CAR을 발현하기 위해 유전적으로 변형되어 있으며, 상기 CAR T 세포는 이의 치료가 필요한 환자에게 주입된다. 주입된 세포는 환자에서 종양 세포를 살해할 수 있다. 항체 요법과는 달리, CAR T 세포는 생체 내에서 복제하여, 지속된 종양 제어를 야기할 수 있는 장기간 존속을 초래할 수 있다.
- [0223] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 CAR T 세포는 강력한 생체 내 T 세포 증식을 경험할 수 있으며, 증가된 양의 시간 동안 존속할 수 있다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 CAR T 세포는 임의의 부가적인 종양 형성 또는 성장을 억제하도록 반응성화될 수 있는 특정 메모리 T 세포로 발달한다. 예를 들어, 본 발명의 CART19 세포는 강력한 생체 내 T 세포 확장을 경험할 수 있고, 혈액 및 골수에서 증가된 양의 시간 동안 높은 수준으로 존속할 수 있으며, 특정 메모리 T 세포를 형성할 수 있다는 것은 예상치 못한 것이었다. 임의의 특정한 이론에 결부되지 않기를 바라면서, CAR T 세포는 대체 항원을 발현하는 표적 세포와 충돌 및 이의 후속적인 제거 시에 생체 내에서 중추 메모리 유사 상태로 분화할 수 있다.
- [0224] 임의의 특정한 이론에 결부되지 않기를 바라면서, 상기 CAR 변형 T 세포에 의해 유도된 항-종양 면역성 반응은 능동 또는 수동 면역 반응일 수 있다. 또한, 상기 CAR 매개 면역 반응은 CAR 변형 T 세포가 CAR 내의 항원 결합 일부분에 대해 특이적인 면역 반응을 유도하는 입양 면역 요법 접근법의 일부일 수 있다. 예를 들어, CART19 세포는 CD19를 발현하는 세포에 대해 특이적인 면역 반응을 유도한다.
- [0225] 본원에 개시된 데이터는 FMC63 쥐 단일 클론성 항체에서 유래한 항-CD19 scFv, 인간 CD8 α 힌지 및 막통과 도메인, 및 인간 4-1BB 및 CD3제타 신호전달 도메인을 포함하는 렌티바이러스 벡터를 구체적으로 개시하고 있을지라도, 본 발명은 본원의 다른 곳에서 개시된 바와 같은 구조체의 성분 각각에 대한 다수의 임의의 변이치를 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 즉, 본 발명은 상기 항원 결합 일부분에 대해 특이적인 CAR 매개 T-세포 반응을 발생하기 위해 CAR 내의 임의의 항원 결합 일부분의 용도를 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 CAR 내의 항원 결합 일부분은 암을 치료할 목적으로 종양 항원을 표적화할 수 있다.
- [0226] 치료될 수 있는 암은 혈관 생성된 종양뿐만 아니라 혈관이 생성되지 않거나 아직까지 실질적으로 혈관이 생성되지 않는 종양을 포함한다. 상기 암은 비-고형 종양(예를 들어, 혈액학적 종양, 예를 들어 백혈병 및 림프종)을 포함할 수 있거나, 고형 종양을 포함할 수 있다. 본 발명의 CAR로 치료될 암의 유형으로는 암종, 아세포종, 및 육종, 및 특정 백혈병 또는 림프성 악성 종양, 양성 및 악성 종양, 및 악성 종양, 예를 들어, 육종, 암종 및 흑색종을 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 성인성 종양/암 및 소아성 종양/암이 또한 포함된다.
- [0227] 혈액 암은 혈액 또는 골수의 암이다. 혈액(또는 조혈성) 암의 예로는 급성 백혈병(예를 들어, 급성 림프구성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병 및 골수모세포종, 전립선구성, 골수 단구성, 단구성 및 적백혈병), 만성 백혈병(예를 들어, 만성 림프구성(과립구성) 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 및 만성 림프구성 백혈병), 진성 적혈구 증가증, 림프종, 호지킨병, 비-호지킨 림프종(지연형 및 높은 단계의 형태), 다발성 골수종, 왈덴스트렘 마크로글로불린 혈증(Waldenstrom's macroglobulinemia), 중쇄 질환, 골수이형성 증후군, 모발 세포 백혈병 및 골수이형성증을 포함한 백혈병을 들 수 있다.
- [0228] 고형 종양은 일반적으로 피낭 또는 액체 구역을 포함하지 않는 비정상적인 조직 덩어리이다. 고형 종양은 양성 또는 악성일 수 있다. 상이한 유형의 고형 종양은 이들(예를 들어, 육종, 암종 및 림프종)을 형성하는 세포의 유형에 대해 명명되어 있다. 육종 및 암종과 같은 고형 종양의 예로는 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 및 기타 육종, 윤활막종(synovioma), 중피종(mesothelioma), 유위(Ewing) 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 직장 암종, 림프성 악성 종양, 췌장암, 유방암, 폐암, 난소암, 전립선암, 간세포성 암종, 편평 세포 암종, 기저 세포 암종, 선암, 땀샘 암종, 수질 갑상선 암종, 유두성 갑상선 암종, 갈색 세포종, 피지선 암종, 유두성 암종, 유두성 선암, 수질성 암종, 기관지 암종, 신장 세포 암종, 간종양, 담관 암종, 융모막암종, 윌름즈 종양(Wilms' tumor), 자궁 경부암, 고환 종양, 정소암(seminoma), 방광암 암종, 흑색종, 및 CNS 종양(예를 들어, 신경교종(예를 들어, 뇌간 신경교종 및 혼합형 신경교종), 교아세포종(다형성 교아세포종으로도 공지됨), 성상세포종, CNS 림프종, 배아세포종, 수질아세포종, 신경초종 두개인두종(Schwannoma craniopharyngioma), 상의세포종(ependymoma), 송과체종(pinealoma), 혈관모세포종, 청신경종(acoustic neuroma), 희소돌기 아교세포종(oligodendroglioma), 수막종, 신경아세포종, 망막아세포종 및 뇌전이)을 들 수 있다.
- [0229] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 CAR의 항원 결합 일부분의 일부는 특정한 암을 치료하기 위해 설계된다. 예를

들어, CD19를 표적화하기 위해 설계된 CAR은 전-B ALL(소아성 적응증), 성인성 ALL, 외투 세포 림프종, 미만성 거대 B-세포 림프종, 동종이계 골수 이식 후 구원(salvage) 등을 들 수 있지만 이에 제한되지 않는 암 및 질환을 치료하기 위해 사용될 수 있다.

- [0230] 다른 실시형태에서, 상기 CAR은 미만성 거대 B-세포 림프종을 치료하기 위해 CD22를 표적화하도록 설계될 수 있다.
- [0231] 하나의 실시형태에서, 전-B ALL(소아성 적응증), 성인성 ALL, 외투 세포 림프종, 미만성 거대 B-세포 림프종, 동종이계 골수 이식 후 구원 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 암 및 질환은 CD19, CD20, CD22 및 ROR1을 표적화하는 CAR의 조합을 이용하여 치료될 수 있다.
- [0232] 하나의 실시형태에서, 상기 CAR은 중피종, 췌장암, 난소암 등을 치료하기 위해 메소텔린을 표적화하도록 설계될 수 있다.
- [0233] 하나의 실시형태에서, 상기 CAR은 급성 골수성 백혈병 등을 치료하기 위해 CD33/IL3Ra를 표적화하도록 설계될 수 있다.
- [0234] 하나의 실시형태에서, 상기 CAR은 삼중 음성 유방암, 비-소세포 폐암 등을 치료하기 위해 c-Met를 표적화하도록 설계될 수 있다.
- [0235] 하나의 실시형태에서, 상기 CAR는 전립선암 등을 치료하기 위해 PSMA를 표적화하도록 설계될 수 있다.
- [0236] 하나의 실시형태에서, 상기 CAR는 전립선암 등을 치료하기 위해 당지질 F77을 표적화하도록 설계될 수 있다.
- [0237] 하나의 실시형태에서, 상기 CAR는 교아세포종 등을 치료하기 위해 EGFRvIII를 표적화하도록 설계될 수 있다.
- [0238] 하나의 실시형태에서, 상기 CAR는 신경아세포종, 흑색종 등을 치료하기 위해 GD-2를 표적화하도록 설계될 수 있다.
- [0239] 하나의 실시형태에서, 상기 CAR는 골수종, 육종, 흑색종 등을 치료하기 위해 NY-ESO-1 TCR을 표적화하도록 설계될 수 있다.
- [0240] 하나의 실시형태에서, 상기 CAR는 골수종, 육종, 흑색종 등을 치료하기 위해 MAGE A3 TCR을 표적화하도록 설계될 수 있다.
- [0241] 그러나 본 발명은 본원에 개시된 항원 표적 및 질병에만 제한되는 것으로 이해되어서는 안 된다. 오히려, 본 발명은 질병을 치료하기 위해 CAR이 사용될 수 있는 질병과 연관이 있는 임의의 항원성 표적을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0242] 본 발명의 CAR 변형 T 세포는 또한 포유동물에서 생체 외 면역화 및/또는 생체 내 요법을 위한 백신의 유형으로서 작용할 수 있다. 바람직하게는, 포유동물은 인간이다.
- [0243] 생체 외 면역화에 대하여, 하기들 중 적어도 하나가 세포를 포유동물에 투여하기 이전에 시험관 내에서 발생한다: i) 세포의 증식, ii) 세포 내로의 CAR을 암호화하는 핵산의 도입, 및/또는 iii) 세포의 냉동 보존.
- [0244] 생체 외 과정은 당해 기술분야에 널리 공지되어 있으며, 하기에 더욱 상세하게 토의되어 있다. 간단하게, 세포는 포유동물(바람직하게는 인간)로부터 단리되어, 본원에 개시된 CAR을 발현하는 벡터로 유전적으로 변형된다(즉, 시험관 내에서 형질 도입되거나 형질 감염됨). CAR 변형 세포는 치료적 효과를 제공하기 위해 포유동물 수취인에 투여될 수 있다. 포유동물 수취인은 인간일 수 있으며, CAR 변형 세포는 상기 수취인에 대해 자가성일 수 있다. 대안적으로는, 상기 세포는 동종성, 동계성(syngeneic) 또는 이종성일 수 있다.
- [0245] 조혈 모세포 및 전구 세포의 생체 외 확장 과정은 본원에서 참고로 인용된 미국 특허 제 5,199,942 호에 개시되어 있으며, 본 발명의 세포에 적용될 수 있다. 기타 적합한 방법이 당해 기술분야에 공지되어 있으며, 따라서 본 발명은 세포의 생체 외 확장을 위한 임의의 특정한 방법에 제한되지 않는다. 간단하게도, T 세포의 생체 외 배양 및 확장은 (1) 말초 혈액 수확물 또는 골수 외식편으로부터 CD34+ 조혈 모세포 및 전구 세포를 수집하는 단계; 및 (2) 이 같은 세포를 생체 외에서 확장하는 단계를 포함한다. 미국 특허 제 5,199,942 호에 개시된 세포성 성장 인자 이외에도, flt3-L, IL-1, IL-3 및 c-kit 리간드와 같은 기타 인자가 세포의 배양 및 확장을 위해 사용될 수 있다.
- [0246] 생체 외 면역화의 측면에서 세포 기반 백신을 사용한다는 것 이외에도, 본 발명은 또한 환자에서 항원에 대항하

는 면역 반응을 유도하기 위해 생체 내 면역화를 위한 조성물 및 방법을 제공한다.

- [0247] 일반적으로, 본원에서 개시된 바와 같이 활성화되고 확장된 세포는 면역 저하된 개인에서 발생하는 질병의 치료 및 예방에 이용될 수 있다. 특히, 본 발명의 CAR 변형 T 세포는 CLL의 치료에 사용된다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 세포는 CLL에 걸릴 위험이 있는 환자의 치료에 사용된다. 따라서 본 발명은 CLL의 치료 또는 예방을 위한 방법을 제공하며, 이때 상기 방법은 이의 치료가 필요한 개체에 본 발명의 CAR 변형 T 세포를 치료적 유효량으로 투여하는 단계를 포함한다.
- [0248] 본 발명의 CAR 변형 T 세포는 단독으로 투여되거나, 희석제 및/또는 IL-2 또는 기타 사이토카인과 같은 기타 성분, 또는 세포 개체군과 함께 약학 조성물로서 투여될 수 있다. 간단하게는, 본 발명의 약학 조성물은 하나 이상의 약학적으로 또는 생리학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제와 함께 본원에서 개시된 바와 같은 표적 세포 개체군을 포함할 수 있다. 이 같은 조성물은 중성 완충 식염수, 인산 완충 식염수 등과 같은 완충액; 글루코오스, 만노오스, 수크로오스 또는 텍스트란 등과 같은 탄수화물; 만니톨; 단백질; 폴리펩티드 또는 글리신과 같은 아미노산; 항산화제; EDTA 또는 글루타티온과 같은 킬레이트제; 보조제(예를 들어, 수산화알루미늄); 및 보존제를 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 정맥 내 투여를 위해 제형화하는 것이 바람직하다.
- [0249] 본 발명의 약학 조성물은 치료(예방)될 질병에 적절한 방식으로 투여될 수 있다. 적절한 투여량이 임상 시험에 의해 결정될지라도 투여량 및 투여 빈도는 환자의 조건, 환자 질병의 유형 및 중증도와 같은 인자에 의해 결정될 것이다.
- [0250] "면역학적 유효량", "항-종양 유효량", "종양 억제 유효량" 또는 "치료량"이 나타나 있는 경우, 투여될 본 발명의 조성물의 정확한 양은 나이, 체중, 종양의 크기, 감염 또는 전이 정도, 환자(개체)의 조건에서의 개인차를 고려하여 전문의에 의해 결정될 수 있다. 일반적으로는 본원에서 개시된 T 세포를 포함하는 약학 조성물은 체중(kg) 당 10^4 내지 10^9 개의 세포 투여량, 적합하게는 체중당 10^5 내지 10^6 세포투여량(이들 범위 내에 있는 모든 정수 값을 포함함)으로 투여될 수 있는 것으로 언급될 수 있다. T 세포 조성물은 또한 이들 투여량에서 수회 투여될 수 있다. 상기 세포는 면역 요법에서 일반적으로 공지되어 있는 주입 기법을 이용하여 투여될 수 있다(예를 들어, Rosenberg 등, *New Eng. J. of Med.* 319: 1676, 1988). 특정한 환자를 위한 최적의 투여량 및 치료 양생법은 질병의 징후에 대해 환자를 모니터링하고 그 결과로서 치료를 조절함으로써 의학 분야의 숙련자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0251] 특정 실시형태에서, 이는 활성화된 T 세포를 개체에 투여한 후 후속적으로 다시 수혈하고(또는 아페레시스를 수행하고), 본 발명에 따라 이로부터 T 세포를 활성화하고, 이들 활성화되고 증식된 T 세포로 환자에 재주입하기 위해 요구될 수 있다. 이러한 공정은 수 주일마다 수회 수행될 수 있다. 특정 실시형태에서, T 세포는 10cc 내지 400cc의 수혈액으로부터 활성화될 수 있다. 특정 실시형태에서, T 세포는 20cc, 30cc, 40cc, 50cc, 60cc, 70cc, 80cc, 90cc 또는 100cc의 수혈액으로부터 활성화된다. 이론과 결부되지 않은 채, 다중 수혈/다중 재주입 프로토콜은 T 세포의 특정 개체군을 선별하도록 작용할 수 있다.
- [0252] 개별 조성물의 투여는 에어로졸 흡입, 주사, 섭취, 수혈, 주입 또는 이식을 포함한 임의의 편리한 방식으로 수행될 수 있다. 본원에서 개시된 조성물은 환자에 피하, 피내, 종양 내, 결절 내, 수질 내, 근육 내 투여될 수 있거나, 정맥 내(*i.v.*) 주사에 의해 투여되거나, 또는 복막 내 투여될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 본 발명의 T 세포 조성물은 피내 또는 피하 주사에 의해 환자에 투여된다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 T 세포 조성물은 바람직하게는 정맥 내 주사에 의해 투여된다. 상기 T 세포의 조성물은 종양, 림프절 또는 감염 부위 내로 직접 주사될 수 있다.
- [0253] 본 발명의 특정 실시형태에서, 본원에 개시된 방법, 또는 T 세포가 치료적 수준까지 증식된 당해 기술분야에 공지된 기타 방법을 이용하여 활성화되고 증식된 세포는 다수의 임의의 관련된 처리 양식(예를 들어, 이전, 동시 또는 이후)과 함께 환자에 투여되며, 이때 상기 관련된 처리 양식으로는 항바이러스성 요법, 시도포비르(cidofovir) 및 인터루킨-2, 시타라빈(Cytarabine, ARA-C로도 공지됨) 등과 같은 약제의 처리, 또는 MS 환자를 위한 나탈리주맵 처리 또는 건선 환자를 위한 에팔리주맵 처리, 또는 PML 환자를 위한 기타 처리를 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 T 세포는 화학요법, 방사선, 사이클로스포린, 아자티오프린, 메토트렉세이트, 마이코페놀레이트, 및 FK506과 같은 면역 억제제, 항체, 또는 CAM PATH와 같은 기타 면역 절제제, 항-CD3 항체 또는 기타 항체 요법, 사이토신, 플루다리빈(fludaribine), 사이클로스포린, FK506, 라파마이신, 마이코페놀산, 스테로이드류, FR901228, 사이토카인류 및 방사선요법과 함께 사용될 수 있다. 이들 약물은 칼슘 의존성 포스포타아제 칼시뉴린(사이클로스포린 및 FK506)을 억제하거나, 성장 인자 유도 신호전달(라파마이신)에 중요한 p70S6 키나아제를 억제한다(Liu 등, *Cell* 66: 807-815, 1991; Henderson 등,

Immun. 73: 316-321, 1991; Bierer 등, *Curr. Opin. Immun.* 5: 763-773, 1993). 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 세포 조성물은 골수 이식, 및 플루다라빈, 외부 방사선 요법(XRT) 또는 싸이클로포스파마이드와 같은 화학요법제 및 OKT3 또는 CAMPATH와 같은 항체 중 하나를 이용하는 T 세포 절제 요법(예를 들어, 이전, 동시 또는 이후)과 함께 환자에 투여된다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 세포 조성물은 CD20과 반응하는 약제, 예를 들어 리툽산과 같은 B-세포 절제 요법 이후에 투여된다. 예를 들어, 하나의 실시형태에서, 개체는 높은 투여량의 화학요법 이후에 말초 혈액 줄기세포 이식에 의한 표준 치료를 경험할 수 있다. 특정 실시형태에서, 이식 이후에 개체는 본 발명의 확장된 면역 세포의 주입액을 투여 받는다. 부가적인 실시형태에서, 확장된 세포는 수술 이전 또는 이후에 투여된다.

[0254] 환자에 투여될 상기 치료 투여량은 치료되는 조건의 정확한 특성, 및 치료받을 수취인에 따라 다를 것이다. 인간 투여를 위한 투여량의 스케일링(scaling)은 당해 기술분야에서 허용된 관행에 따라 수행될 수 있다. 예를 들어 CAMPATH에 대한 복용량은 일반적으로 성인 환자에 있어서 1 내지 약 100mg의 범위일 것이고, 일반적으로는 1일과 30일 사이의 기간 동안에 매일 투여될 것이다. 바람직한 1일 복용량은 몇몇의 경우 1일 최대 40mg 이상의 복용량이 사용될 수 있을 지라도(미국 특허 제 6,120,766 호에 개시됨) 1일 1 내지 10mg이다.

[0256] 실험예

[0257] 본 발명은 하기 실험예를 참고하여 상세하게 추가로 개시되어 있다. 이들 실시예는 단지 예시를 목적으로 제공되며, 달리 규명하지 않는 한 제한적인 것으로 의도되지 않는다. 따라서 본 발명은 결코 하기 실시예에 제한되는 것으로 이해되어서는 안 되지만, 오히려 본원에 개시된 교시의 결과로서 자명하게 되는 임의의 모든 변형예를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0258] 추가적인 상세한 설명 없이, 상세한 상세한 설명 및 하기 예시적인 실시예를 이용하여 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 화합물을 제조하고 이용하며, 청구된 방법을 실행할 수 있는 것으로 여겨진다. 따라서 하기 실시예는 특이적으로는 본 발명의 바람직한 실시형태를 나타내며, 개시 내용의 나머지 부분을 임의의 방식으로 제한하는 것으로 이해되어서는 안 된다.

[0260] 실시예 1: 키메릭 수용체를 발현하는 T 세포는 진전된 백혈병을 앓는 환자에서 메모리 및 강력한 항-종양 효과를 확립한다

[0261] 키메릭 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 조작된 림프구는 이전의 임상 시험에서 최소 생체 내 확장 및 항-종양 효과가 있는 것으로 증명되었다. 본원에서 제시된 결과에 따르면, CD137을 함유한 CAR T 세포는 진전된 만성 림프구성 백혈병(CLL)이 치료된 3명의 환자 중 3명에서 주입 이후에 강력한 비-교차 저항성 임상적 활성을 갖는 것으로 증명된다. 상기 조작된 T 세포는 생체 내에서 1천배 이상 확장되고, 골수로 트래피킹(trafficking)하며, 계속해서 적어도 6개월 동안 기능적 CAR을 높은 수준으로 발현한다. 대략, 각각의 주입된 CAR+ T 세포는 적어도 1,000개의 CLL 세포를 소거하였다. CD19 특정 면역 반응은 혈액 및 골수에서 증명되었으며, 3명의 환자 중 2명에서 완전한 경감이 동반되었다. 상기 세포의 일부는 메모리 CAR+ T 세포로서 존속하였으며, 이는 B 세포 악성 종양의 효과적인 치료를 위해 이러한 비-MHC 제한적 접근법의 가능성을 나타낸다.

[0262] 하기에 이들 실험에서 이용된 재료 및 방법이 개시된다.

[0264] 재료 및 방법

[0265] 일반적인 실험용 성명서

[0266] 연구 샘플 가공, 동결, 및 실험용 분석은 샘플 수령, 가공, 동결, 및 분석을 위한 확립된 SOP 및/또는 프로토콜과 함께 우수 실험실 운영 기준(principles of Good Laboratory Practice) 하에 운영되는 펜실베이니아 대학교의 번역 및 상관관계 연구 실험(Translational and Correlative Studies Laboratory)에서 수행되었다. 검정 성능 및 데이터 보고는 MIATA 지침과 일치한다(Janetzki 등, 2009, *Immunity* 31: 527-528).

[0268] 프로토콜 설계

[0269] 임상 시험(NCT01029366)은 도 1에 도시된 바와 같이 수행되었다. 적어도 이전 2회의 치료 섭생법 이후에 지속되는 질병과 함께 CD19 양성 혈액학적 악성 종양을 앓고 있고, 동종성 줄기세포 이식에 적합하지 않은 환자는 상기 임상 시험에 적합하였다. 종양 재등급화(tumor restaging) 이후, CART19 제조를 위한 말초 혈액 T 세포는 아페레시스에 의해 수집되었고, 주입 이전의 1주 도중에 도 10에 나타나 있는 바와 같은 단일 화학요법 과정이 개체에 적용된다. CART19 세포는 도 10에 나타나 있는 복용량으로 3일 분할 투여량 섭생법(10%, 30% 및 60%)을 이용하여 정맥 내 주입에 의해 투여되었으며, 이용 가능한 경우에 두 번째 복용량은 10일째 투여되었고, 환자 UPN 02만이 두 번째 주입을 위한 충분한 세포를 가졌다. 개체는 적어도 6개월 동안 빈번한 간격으로 독성 및 반응에 대해 평가되었다. 상기 프로토콜은 미국 식약청(US Food and Drug Administration), 재조합 DNA 자문위원회(Recombinant DNA Advisory Committee) 및 펜실베이니아 대학교의 임상시험심사위원회(Institutional Review Board)에 의해 승인되었다. 주입 첫째 날을 연구 0일째 날로 설정되었다.

[0270] 개체: 임상 요약

[0271] 진료 요약은 도 10에 대략적으로 도시되어 있으며, 상세한 이력은 본원의 다른 곳에서 제공된다. 환자 UPN 01은 먼저 55세의 나이로 단계 II의 B 세포 CLL을 앓는 것으로 진단되었다. 상기 환자는 자각 증상은 없었으며, 진행성 림프구 증가증, 혈소판 감소증, 선병증(adenopathy) 및 비장 비대증에 대한 요법이 요구될 때까지 약 1 내지 1/2년 동안 관찰되었다. 시간이 경과함에 따라 상기 환자는 이전 차수의 요법을 받았다. 대부분의 최근 요법은 최소 반응으로 CART19 세포 주입 2개월 전에 2회의 펜토스타틴(pentostatin), 싸이클로포스파마이드 및 리톡시맵을 받는 것이었다. 이어 상기 환자는 CART-19 세포의 주입 이전에 림프구 제거 화학요법으로서 1회의 벤다무스틴을 투여 받았다.

[0272] 환자 UPN 02는 피로 및 백혈구 증가증을 앓는 것으로 나타날 때에 상기 환자는 먼저 68세의 나이로 CLL을 앓고 있는 것으로 진단을 받았다. 상기 환자는 요법이 필요한 진행성 백혈구 증가증 ($195,000/\mu\text{l}$), 빈혈증 및 혈소판 감소증이 발현하였을 때 4년 동안 비교적 안정하였다. 핵형 분석에 따르면, CLL 세포는 염색체 17p의 결실을 갖는 것으로 나타났다. 진행성 질병으로 인해, 환자는 부분적인 반응 상태로 알렘투주맵(alemtuzumab)으로 치료하였지만, 1년 반 이내에 상기 환자는 진행성 질병을 가졌다. 상기 환자는 부분적인 반응으로 18주 동안 알렘투주맵으로 치료를 받았고, 1년간 진행이 없는 기간을 가졌다. 이어 상기 환자는 유의한 반응이 없는 상태로 리톡시맵과 함께 2회의 벤다무스틴을 투여 받았다(도 5A). 상기 환자는 CART-19 세포의 주입 이전에 림프구 제거 화학요법으로서 단일 약제인 벤다무스틴을 투여 받았다.

[0273] 환자 UPN 03은 자각 증상이 없는 단계 I의 CLL을 앓는 50세의 나이인 것으로 나타났고, 수 년 동안 관찰이 이어졌다. 상기 환자는 요법이 요구되는 진행성 백혈구 증가증(백혈구 개수: $92,000/\mu\text{l}$) 및 진행성 선병증을 가졌다. 상기 환자는 플루다라빈과 함께 2회의 리톡시맵을 투여 받았으며, 그 결과 혈액 개수의 정상화 및 선병증의 완치는 아니지만 유의한 개선을 초래하였다. 상기 환자는 약 3년간 진행이 없는 기간을 가졌다. 핵형 실험에 따르면, 세포가 FISH에 의해 염색체 17p의 결실을 포함하는 것으로 나타났으며, 그 결과 200개의 세포 중 170개에서 TP53 결실이 증명되었다. 차기 수년에 걸쳐, 상기 환자는 진행성 백혈구 증가증 및 선병증에 대해 3회의 상이한 차수의 요법을 받았으며(도 10), 마지막으로 CART19 세포의 주입 6개월 전에 부분적인 반응 상태에서 알렘투주맵을 투여 받았다. 상기 환자는 ART-19 세포의 주입 이전에 림프구 제거 화학요법으로서 펜토스타틴 및 싸이클로포스파마이드를 투여 받았다.

[0275] 백터 생성

[0276] CD19-BB-z 이식 유전자(GeMCRIS 0607-793)를 Milone 등, 2009, *Mol Ther.* 17: 1453-1464에 개시된 바와 같이 설계하고 구성하였다. 렌티바이러스 백터는 Zufferey 등, 1997, *Nature biotechnol* 15: 871-875에 개시된 바와 같이 렌티젠 코포레이션(Lentigen Corporation)사에서 3-플라스미드 생성 접근법을 이용하여 현재 우수한 제조 기준(good manufacturing practice)에 따라 생산하였다.

[0278] CART19 세포 생성물의 제조

[0279] 항-CD3 및 항-CD28 단일 클론성 항체로 코팅된 상자성 폴리스티렌 비드를 이용하는 T 세포의 제조 방법은 개시되어 있다(Laport 등, 2003, *Blood* 102: 2004-2013). 렌티바이러스성 형질 도입은 개시된 바와 같이 수행되었다(Levine 등, 2006, *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 17372-17377).

[0281] 종양 부하의 산정 방법

[0282] 기준선에서의 CLL 부하는 도 10에 도시된 바와 같이 평가되었다. CLL 세포의 양은 하기에 개시된 바와 같이 골수, 혈액 및 이차 림프성 조직에서 산정되었다.

[0283] 골수: 건강한 성인에서, 골수는 총 체중의 약 5%를 나타낸다(Woodard 등, 1960, *Phys Med Biol*, 5: 57-59; Bigler 등, 1976, *Health Phys* 31: 213-218). 장골능(iliac crest) 샘플 내의 골수는 나이가 들면서 불활성(지방) 골수의 비율(%)이 증가하는데, 5세의 나이에는 총 골수의 20%에서 35세의 나이 정도에는 약 50%까지 증가하며, 이때 이는 65세의 나이가 될 때까지는 안정하게 유지된 후에 75세의 나이 정도에는 불활성 골수가 약 67%까지 증가한다(Hartsock 등, 1965, *Am J Clin Path* 43: 326-331). 35세의 남성의 경우 활성(적색) 및 불활성(지방) 골수의 총 골격 중량에 대한 국제 표준치는 각각 1,170g 및 2,480g로 현재 설정되어 있다(방사선 호보에 사용하기 위한 기본적인 해부 및 생리학 데이터: The Skeleton in Annals of the ICRP, Vol. 25 (ed. Smith, H.) 58-68(1995년 옥스퍼드의 국제 방사선 보호 위원회(International Commission on Radiological Protection)의 제2 위원회 태스크 그룹의 보고서)). 35세 와 65세 사이의 성인 남성은 활성(적색) 골수로서 1.6% 및 불활성(지방) 골수로서 3.4%로 구성된 체중의 총 5.0%를 나타내는 골수를 갖는다(방사선 호보에 사용하기 위한 기본적인 해부 및 생리학 데이터: The Skeleton in Annals of the ICRP, Vol. 25 (ed. Smith, H.) 58-68(1995년 옥스퍼드의 국제 방사선 보호 위원회의 제2 위원회 태스크 그룹의 보고서)). 골수 생검 및 흡입물 검체에 기초하여, 기준선에서 3명의 환자에 대한 CLL 세포의 중량은 표 1에 나타나 있는 바와 같이 산정하였다. 이어 총 CLL 골수량의 이들 측정치는 $1\text{kg} = 10^{12}$ 개의 세포를 이용하여 골수에서 총 CLL 세포수로 전환되었으며, 얻어진 수치는 도 10에 도시되어 있다. 이들 산정은 CLL이 골수에서 균일한 분포를 갖는다는 가정에 기반을 두고 있다. 환자 UPN 01에 있어서, 벤다무스틴 화학요법 이전에 획득되었던 골수 생검에 대해 산정이 나타나 있고, 벤다무스틴 및 전-CART19 주입 이후에 획득된 흡입물에 대해 산정이 나타나 있다. 첫째 날의 흡입물에 대한 기술적 제한으로 인해 첫째 날의 흡입물에 대해서는 14일째 날의 생검 검체에 비해 수치가 덜 정확하다. 환자 UPN 02는 CLL에 의한 골수의 완전한 교체를 나타내는 단일 전처리 생검 검체를 갖는다. 이러한 환자는 CART19 후 30일째 날에 검체는 변화가 없다. 환자 UPN 03에 대한 골수 부하는 화학요법 후 생검 및 CART19 주입 전 생검에 기초하여 산정되었다.

표 1

[0285]

골수량			
	활성 골수 중량(kg)	불활성 골수 중량(kg)	골수 총량(kg)
정상 남성(ICRP 참고용 표준)	1.17	2.48	3.65
14일째 UPN 01(95% 세포)	3.47	0.18	3.65
47일째 UPN 02(95% 세포)	3.47	0.18	3.65
1일째 UPN 03(60% 세포)	2.19	1.46	3.65
CLL의 중량(kg)			
14일째 UPN 01(70% CLL)	2.43		
1일째 UPN 01(응고에 의한 50% CLL)	1.73		
47일째 UPN 02(95% 초과 CLL)	3.29		
1일째 UPN 03(40% CLL)	0.88		

[0286]

혈액: 환자 UPN 02만이 CART19 주입 전에 혈액에서 실질적인 CLL 종양 부하를 갖는다. 유동 세포 분석법에 따르면, 상기 세포는 희미한 표면 카파-제한된 CD5+ CD10-CD19+ CD20(dim)+ CD23(가변성)+ IgM-B 세포 개체군과 함께 클론성 개체군으로서 전형적인 표현형을 갖는 것으로 나타난다. CLL 세포의 약 35%가 CD38을 동시 발현하였다. 상기 CLL 부하는 3회 벤다무스틴 화학요법에 의해 제거되지 않았으며, CART19 주입 시에 존재하였다. CART19 주입 시, 혈액 중의 CLL 개수는 $1\mu\text{l}$ 당 55,000개의 세포였다. 혈액 부피가 5.0L라고 가정하면, 환자 UPN 02는 0일째 날에 혈액 중의 CLL세포는 2.75×10^{11} 개였다. 환자 UPN 01 및 03에서 전체 정상 WBC가 주어진다면, 이들 환자에서 순환성 질병 부하는 산정되지 않았으며, 이는 총 체내 부하의 약간의 과소평가를 초래할 수 있다. 이차 림프성 조직: 림프샘 장애 및 비장 비대증의 부피는 FDA 승인 소프트웨어를 이용하여 측정 CT 스캔 상에서

정량화되었다. 상기 부피는 오직 흉부, 복부 및 골반에 대한 것이었다. T1 척추뼈 몸체에서 총 대퇴 동맥의 분기 수준까지의 양을 모든 환자에서 측정하였으며, 일부에서는 서혜부 구역 내의 결절이 또한 포함되었다. 머리/목 및 사지 내의 결절은 분석에서 제외되었고, 기준선 CLL 표적 세포수에서 제외되었으며, 이는 또한 총 체내 부하에서 약간의 과소평가를 초래할 수 있었다. 환자 UPN 01 및 03은 6개월을 넘어서 완전한 경감이 지속되었으며, 따라서 수식(기준선 부피 - 3개월째의 부피)을 이용하여 기준선으로부터의 종양 부하의 감소를 결정하였지만, 환자 UPN 02는 선병증에서 질병이 안정하였으며, 따라서 기준선 종양의 양은 연령대 대비 건강한 남성에서 참고용 비장 부피를 뺀으로서 평가된다(Harris 등, 2010, *Eur J Radiol* 75: e97-e101). 기준선 종양의 양은 밀도 접근법(1kg/L 밀도, 및 1kg = 1,012개의 세포) 또는 부피 접근법(형태가 구형이라고 가정하면 CLL 세포의 직경은 10 μ M 또는 600fL임)를 이용하여 CLL 세포로 변환하였으며, 2개의 값 모두는 도 10에 제시되어 있다. 3명의 환자에서 이차 림프성 조직 내의 종양 부피는 이용 가능한 CT 스캔으로부터 산정된 바와 같이 하기 표 2에 나타나 있다.

표 2

종양 부피				
환자	연구 일자	LN 부피(mm^3)	비장 부피(mm^3)	총 부피(mm^3)
UPN 01	-37	239655	1619180	1858835
	1개월	105005	1258575	1363580
	3개월	65060	1176625	1241685
UPN 02	-24	115990	1166800	1282790
	1개월	111755	940960	1052715
UPN 03	-10	239160	435825	674985
	1개월	111525	371200	482725
	3개월	47245	299860	347105

환자 UPN 01에 대한 기준선 CT 스캔은 2회의 펜토스타틴/싸이클로포스파마이드/리툭시맵 주입 8일 후에 수행되었으며, 이전 CT 스캔에 비해 이러한 화학요법 섭생법에 대한 반응을 나타내지 않았다. 환자는 CART19 이전에 1회의 벤다무스틴을 투여 받았으며, 따라서 UPN 01에 있어서 -37일째 날로부터 +31일째 날까지의 종양 부피의 변화는 CART19뿐만 아니라 벤다무스틴의 가능한 기여도를 배제할 수 없었다. 유사하게도, UPN 03에 있어서 종양 부피의 변화는 1회의 펜타스타틴(pentastatin)/싸이클로포스파마이드와 CART19의 조합된 효과를 반영한다. 환자가 효과적 인 생체 내 E:T 비율을 평가하기 위한 방법살해된 종양 세포의 수에 대한 주입된 CAR T 세포의 E:T 비율은 CAR T 세포의 주사 시에 존재하는 종양 세포수 및 주입된 CAR T 세포수를 이용하여 산정되었다(Carpenito 등, 2009, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 3360-3365). 본 발명에 있어서, 도 10에 도시된 바와 같이 주입된 CART19+ T 세포의 수는 생체 내에 존재하는 CART19+ T 세포의 절대 수치를 충분히 정확하고 정밀하게 결정하는 것이 가능하기 때문에 사용되었다. 혈액 및 골수에서의 CART19 확장에 대한 이용 가능한 데이터는 도 2 및 도 6에 도시된 바와 같이 강력하다. 그러나 이차 림프성 조직과 같은 기타 부위로의 CART19의 트래킹을 결정하는 것이 불가능하였으며, 그 결과 종양의 최대 감소 시에 생체 내에서 달성된 CART19 세포의 총수에 대한 실질적인 불확실성을 야기하였다. 표 3으로부터의 산정된 값은 효과적인 E:T 비율을 유도하기 위해 사용되었다.

표 3

생체 내에서 달성된 산정된 CART19 E:T 비율						
환자	종양 부하(기준선 및 델타)				주입된 CART19+ 세포	생체 내 E:T
	골수 기준선	혈액 기준선	결절/비장 ¹ 기준선	CLL 부하의 총 변화		
UPN 01	1.70E+12	N/A	8.1E+11	2.51E+12	1.13E+09	1:2200
UPN 02	3.20E+12	2.75E+11	1.6E+12	2.74E+11 ²	5.80E+08	1:1000
UPN 03	8.80E+11	N/A	4.4E+11	1.32E+12	1.42E+07	1:93,000
					범위	1000-93,000

1 = 밀도 및 부피 방법의 평균 2 = 환자 UPN02는 골수에서는 반응하지 않았으며, 비장 및 림프절에서 CT에 의해 측정된 종양의 양에서 선병증(3.1E+11 세포)의 부분적인 감소를 나타냈다. 혈액 중에서의 반응을 위해

도 5A를 참고한다. 샘플 가공 및 동결

[0291] 샘플(말초 혈액 및 골수)은 라벤더색 상부(K2EDTA) 또는 적색 상부(첨가제 무) 진공 채혈관(vacutainer tube, 벡톤 디킨슨(Becton Dickinson))에서 수집하고, 수혈 2시간 이내에 TCSL로 보냈다. 샘플을 확립된 실험실용 SOP에 따라 수령 30분 이내에 가공하였다. 말초 혈액 및 골수 단핵성 세포는 피콜-파크(GE Health care사, 17-1440-03)를 이용한 피콜 밀도 구배 원심분리를 통해 정제되고, 5100 Cryo 1° 냉동 용기를 이용하여 4% 인간 혈청 알부민(Gemini Bio-Products사, 800-120), 2% 헤타스타치(Novaplus사, NDC0409-7248-49) 및 10% DMSO(Sigma사, D2650)가 보충된 RPMI(Gibco사 11875-135)에서 냉동하였으며, -80℃에서 24 내지 72시간 이후에 세포를 장기 저장에 위해 액체 질소로 이동시켰다. 아페레시스 샘플은 펜실베이니아 대학 병원의 혈액은행을 통해 수득되었으며, 피콜 구배 정제에 의해 CVPF에서 가공되고, 상술한 바와 같이 냉동하였다. 해동 직후의 생존력이 평가되었을 때 85%를 초과하였다. 혈청 단리를 위해, 샘플은 실온에서 1.5 내지 2시간 동안 응고하도록 하였으며, 혈청은 원심분리에 의해 단리되고, 100 μ l의 단일 사용 분취량은 -80℃에 냉동하였다.

[0292] 세포주

[0293] K562(CML, CD19 음성)는 ATCC(CCL-243)로부터 수득되었다. K562/CD19는 까르민 까르페니토(Carmine Carpenito)의 위대한 업적이며, CD19 분자를 발현하기 위해 100%의 빈도로 K562가 렌티바이러스성으로 형질 도입된 것이다. CD19 양성 비-T, 비-B ALL 전구체 B 세포주(Hurwitz 등, 1979, *Int J Cancer* 23: 174-1800)이고 CD19 항원을 발현하는 것으로 확인된 NALM-6은 로렌스 쿠퍼(Laurence Cooper)의 위대한 업적이었다. 상기 세포주는 R10 배지(10% 소 태아 혈청(하이클론(Hyclone)이 보충된 RPMI 1640(집코, 11875)) 및 1% 펜-스트렙(Pen-Strep)(집코, 15140-122)에서 유지되었다. 건강한 기증자로부터의 말초 단핵성 세포(ND365)는 펜실베이니아 대학교의 인간 면역학 코어(Human Immunology Core)로부터 아페레시스에 의해 수득하고, 가공하고, 상술한 바와 같이 냉동하였다.

[0295] DNA 단리 및 Q-PCR 분석

[0296] 전혈 또는 골수 샘플은 라벤더색 상부(K3EDTA) BD 진공 채혈관(벡톤 디킨슨)에서 수집하였다. 게놈 DNA는 QIAamp DNA 혈액 미디 키트(blood midi kit, Qiagen사)를 이용하여 전혈로부터 직접 단리하였고, 확립된 실험실용 SOP는 분광 광도계로 정량화하고, -80℃에서 저장하였다. 게놈 DNA 샘플에 대한 Q-PCR 분석은 통합된 CD19 CAR 이식 유전자 서열을 검출하기 위해 123 내지 200ng 게놈 DNA/시점 ABI Taqman 기술 및 실증된 검정을 이용하여 대량으로 수행되었다. 표준 곡선 기울기 및 r^2 값을 포함한 성공/실패 파라미터 범위, 참고용 샘플(1,000개의 복제수/플라스미드 스파이크)을 정확하게 정량화하기 위한 능력, 및 건강한 기증자 DNA 샘플에서의 무증폭은 정량화 연구 및 예정된 허용 범위로부터 산정되었다. CD19 CAR 이식 유전자를 위한 프라이머/탐침은 Milone 등, 2009, *Mol Ther* 17: 1453-1464에서 상술한 바와 같다. 복제수/단위 DNA를 결정하기 위해, 100ng의 비-형질 도입된 대조군 게놈 DNA 내로 스파이킹(spiking)된 10^6 -5개의 복제수의 렌티바이러스 플라스미드로 구성된 8점 표준 곡선을 생성하였다. 각각의 데이터 점(샘플, 표준 곡선, 참고용 샘플)은 보고된 평균값으로 3회 평가되었다. 환자 UPN 01에 있어서, 모든 보고된 값은 0.46% 미만의 CV(%)로 3/3 복제사본(replicate)에서 양성 Ct 값으로부터 유래하였다. 환자 UPN 02에 있어서, +177일째 날의 샘플(양성의 2/3 복제사본 및 높은 CV(%))을 제외하면 모든 보고된 값은 0.72% 미만의 CV(%)로 3/3 복제사본에서 양성 Ct 값으로부터 유래하였다. 환자 UPN 03에 있어서, +1일째 날의 샘플(양성의 2/3 복제사본 및 0.8%의 CV) 및 +3일째 날의 샘플(양성의 2/3 복제사본 및 0.67%의 CV)을 제외하면 모든 보고된 값은 1.56% 미만의 CV(%)로 3/3 복제사본에서 양성 Ct 값으로부터 유래하였다. 검정을 위한 정량화(LLOQ) 하한치는 2개의 복제수/ μ g DNA(10개의 복제수/200ng 입력 DNA)에서 표준 곡선으로부터 결정되었지만, LLOQ 미만의 평균값(즉, 보고 가능하지만 정량화 할 수 없음)이 근접치인 것으로 고려된다. 문의된 DNA의 양을 조절하기 위한 평행 증폭 반응은 12 내지 20ng의 입력 게놈 DNA, CDKN1A 유전자(유전자은행: Z85996)(센스 프라이머: GAAAGCTGACTGCCCTATTTG; 서열번호: 25, 안티센스 프라이머: GAGAGGAAGTGCTGGGAACAAT; 서열번호: 26, 탐침: VIC- CTC CCC AGT CTC TTT; 서열번호: 27)의 상류에 있는 비-전사된 게놈 서열에 대해 특이적인 조합, 및 대조군 게놈 DNA의 희석에 의해 생성된 8점 표준 곡선을 이용하여 수행되었지만, 이들 증폭 반응은 보정 인자(CF)(검출(ng)/입력(ng))를 생성하였다. 이식 유전자의 복제수/DNA(μ g)는 하기 식에 따라 산정되었다: $CD19 \text{ 표준 곡선/입력 DNA(ng)} \times CF \times 1000ng$ 으로부터 산정된 복제수. 이러한 검정의 정확성은 하기 수식에 따라 Q-PCR을 이용하여 주입된 세포 생성물의 마킹을 정량화하는 능력에 의해 결정되었다: $\text{평균 마킹} = \text{검출된 복제수/입력 DNA} \times 6.3pg \text{의 DNA/남성 체세포} \times CF$ 대 CAR 특이적 검출 시약을 이용한 유동 세포 분석법에 의한 이식 유전자 양성(transgenic positivity). 이들 맹검 결정은 UPN 01주입 생성물에

대해 22.68%의 마킹(유동 세포 분석법에 의해 22.6%의 마킹), UPN 02 주입 생성물에 대해 32.33%의 마킹(유동 세포 분석법에 의해 23%의 마킹), 및 UPN 03 주입 생성물에 대해 4.3%의 마킹(유동 세포 분석법에 의해 4.7%의 마킹)을 생성하였다.

[0298] 사이토카인 분석

[0299] 가용성 사이토카인 인자의 정량화는 루미넥스 비드 배열 기술 및 라이프 테크놀로지스(Life technologies; 인비트로젠(Invitrogen)사)로부터 구입한 키트를 이용하여 수행되었다. 검정은 3배 희석 시리즈를 이용하여 생성된 8점 표준 곡선과 함께 제조사의 프로토콜에 따라 수행되었다. 각각의 표준 점 및 샘플은 1:3 희석액에서 3회 평가되었지만, 2회 측정치에 대한 산정된 CV(%)는 15% 미만이었다. 데이터는 바이오플렉스(Bioplex) 200 상에서 얻어졌으며, 5-파라미터 로지스틱 회귀 분석을 이용하는 바이오플렉스 매니저(Bioplex Manager) 5.0 버전 소프트웨어로 분석하였다. 표준 곡선 정량화 범위는 80 내지 120%(관측값/기대값) 범위로 결정되었다. 개인 분석물 질 정량화 범위는 도면의 범례에 보고되어 있다.

[0301] CAR 기능을 검출하기 위한 세포성 검정

[0302] 세포는 표적 세포에 대한 반응에서 CD107 과립의 감소량을 측정함으로써 해동 및 TCM에서 하룻밤 동안의 방치 이후에 기능성에 대해 평가되었다. 과립 감소 검정은 Betts 등, 2003, *J Immunol Methods* 281: 65 - 78에 본질적으로 개시되어 있는 CD49d(벡톤 디킨슨), 항-CD28, 모넨신(monensin, 이-바이오사이언스(e-Bioscience)) 및 CD107a-FITC 항체(이-바이오사이언스)의 부재 하에 37°C에서 2시간 동안 48웰 플레이트에서 500 μ l의 최종 부피로 1 $\times$ 10⁶ PBMC 및 0.25 $\times$ 10⁶ 표적 세포를 이용하여 수행되었다.

[0303] 항체 시약

[0304] 하기 항체는 이들 연구를 위해 사용되었다: 알렉사 647에 접합된 쥐의 항-CD19 CAR 항체인 MDA-CAR은 비폴렌두예나(Bipulendu) 및 로렌스 쿠퍼(앤디 앤더슨(MD Anderson) 암센터) 박사의 위대한 업적이었다. 다중 파라미터 면역 표현형 검사 및 기능적 검정을 위해: 항-CD3-A700, 항-CD8-PE-Cy7, 항-PD-1-FITC 항-CD25-AF488, 항-CD28-PercP-Cy5.5, 항-CD57-eF450, 항-CD27-APC-eF780, 항-CD17-APC-eF780, 항-CD45RA-eF605NC, 및 CD107a-FITC(모두 이-바이오사이언스사로부터 구입), 항-CD4-PE-텍사스 레드 및 라이브/데드 아쿠아(라이프 테크놀로지스사로부터 구입) 및 항-CD14-V500, 항-CD16-V500(벡톤 디킨슨사로부터 구입). 일반적인 면역 표현형 검사를 위해: CD3-PE, CD14-APC, CD14-PE-Cy7, CD16-FITC, CD16 - PE-Cy7 및 CD19-PE-Cy7, CD20-PE(모두 벡톤 디킨슨사로부터 구입).

[0306] 다중 파라미터 유동 세포 분석법

[0307] 세포는 피콜-파크 가공 직후, 또는 냉동된 경우에 5% 인간 AB 혈청(젠콜(GemCal1), 100-512), 1% 헤피즈(Hepes)(집코, 15630-080), 1% 펜-스트랩(집코, 15140-122), 1% 글루타맥스(Glutamax)(집코, 35050-061) 및 0.2% N-아세틸 시스테인(아레리칸 레진트(American Regent), NDC0517-7610-03)이 보충된 T 세포 배지(TCM)(X-vivo 15(론자, 04-418Q)에서 2 $\times$ 10⁶ 세포/ml의 밀도로 하룻밤 동안 방치 이후에 유동 세포 분석법으로 평가되었다. 다중 파라미터 면역 표현형 검사는 본문에 개시된 바와 같이 FMO 염료를 이용하여 총 4 $\times$ 10⁶개의 세포/조건 상에서 수행되었다. 세포는 제조사에 의해 추천되는 항체 및 시약의 농도를 이용하여 얼음 상에서 30분 동안 1 $\times$ 10⁶ 세포/100 μ l PBS의 밀도로 염색되고, 세척하고, 0.5% 파라포름알데하이드에서 재현탁하고, 상기 항체 조합의 검출 및 분리를 위해 청색(488nm), 바이올렛(405nm), 녹색(532nm) 및 적색(633nm) 레이저 및 적절한 필터 세트가 구비된 변형 LSRII(BD 면역세포분석 시스템(Immunocytometry system))을 이용하여 얻어졌다. 최소 100,000개의 CD3+ 세포가 각 염료에 대해 얻어졌다. 기능적 검정을 위해 세포를 세척하고, 표면 마커에 대해 염색하고, 0.5% 파라포름알데하이드에 재현탁하고, 상기와 같이 수득하였지만, 최소 50,000개의 CD3+ 사건(event)이 각각의 염색 조건에 대해 수집되었다. 보상 값은 단일 항체 염료 및 BD 보상 비드(벡톤 디킨슨)를 이용하여 확립되었고, 산정되었으며, 기기에 의해 자동적으로 적용되었다. 데이터는 FlowJo 소프트웨어(8.8.4 버전, Treestar사)를 이용하여 분석하였다. 일반적인 면역 표현형 검사를 위해, 세포는 청색(488nm) 및 적색(633nm) 레이저가 구비된 아큐리(Accuri) C6 세포분석기를 이용하여 얻어졌다. 보상 값은 단일 항체 염료 및 BD 보상 비

드(백톤 디킨슨)를 이용하여 확립되었으며, 수동으로 산정하였다. 데이터는 C-Flow 소프트웨어 분석 패키지 (1.0.264.9 버전, 아큐리 세포분석기)를 이용하여 분석하였다.

[0309] 환자의 과거 의료 이력과 치료요법에 대한 반응

[0310] 임상적 치료 요약은 도 10에 대략적으로 나타나 있다. 환자 UPN 01은 먼저 55세의 나이로 단계 II B 세포 CLL로 진단되었다. 상기 환자는 자각 증상은 없었으며, 진행성 림프구 증가증, 혈소판 감소증, 선병증 및 비장 비대증에 대한 요법이 요구될 때까지 약 1 내지 1/2년 동안 관측되었다. 4회의 플루다라빈 이후에, 상기 환자는 혈액 개수의 완전한 표준화 및 CT 스캔에 의한 완전한 반응을 나타냈다. 림프구 증가증 및 혈소판 감소증은 자각 증상이 없으며 선병증은 증가한 상태로 5개월 이내에 진행이 현저했다. 상기 환자는 약 3년 동안 증상 없이 관측되었으며, 추후에 진행성 백혈구 증가증, 빈혈증 및 혈소판 감소증에 대해 리툽시맵 및 플루다라빈의 처치를 필요로 하였다. 상기 환자는 혈액 개수의 부분적인 개선으로 플루다라빈과 함께 4회의 리툽시맵으로 치료 받았다. 또한 상기 환자는 백혈구 증가증(WBC: $150,000/\mu\text{l}$) 및 혈소판 감소증(혈소판: $30,000/\mu\text{l}$)에 의해 증명된 요법이 요구되는 1년 이내에 진행을 나타냈으며, 혈액 개수의 정상화로 알렘투주맵으로 치료 받았다. 13개월 이내에 진행이 현저하였다. 이어 상기 환자는 유의한 반응 없이 단일 약제인 리툽시맵을 투여 받았으며, 그 이후에 최소 반응으로 리툽시맵, 싸이클로포스파마이드, 빈크리스틴 및 프레드니손(R-CVP)을 2회 투여 받은 후 레날리도마이드(lenalidomide)를 투여 받았다. 레날리도마이드는 독성으로 인해 중단되었다. 상기 환자는 최소 반응으로 2회의 펜토스타틴, 싸이클로포스파마이드 및 리툽시맵을 투여 받았다.

[0311] 추후, 상기 환자는 CART19 세포의 주입 4일 전에 림프구 제거 화학요법으로서 벤다무스틴을 투여 받았다. 요법 이전에 WBC는 $14,200/\mu\text{l}$ 이고, 헤모글로빈은 11.4gm/dl 이고, 혈소판 개수는 $78,000/\mu\text{l}$ 이고, ALC는 $8000/\mu\text{l}$ 이었다. CT 스캔에서는 확산성 선병증이 나타났으며, 골수는 CLL로 광범위하게 침윤되었다(세포의 67%). 상기 환자는 1.6×10^7 CART-19 세포/kg(FACS에 의해 평가된 바와 같이 총 1.13×10^9 개의 CART19 세포)를 투여 받았다. 주입에 의한 독성은 없었다. 상기 환자는 벤다무스틴 주입 약 10일 이후 및 CART19 세포 주입 6일 이후에 호중구 감소증으로 되었으며, 첫 번째 CART19를 주입한지 초기 10일 이후에 환자는 신열, 오한 및 일시적인 저혈압이 발병하였다. 동시에, 흉부 X선 및 CT 스캔에서는 항생제로 치료 받은 좌상엽 폐렴이 발견되었다. 신열은 약 2주 동안 존속되었으며, 호중구 회복이 있는 경우에 치유되었다. 상기 환자는 추가적인 감염성 또는 체질 증상은 없었다.

[0312] 상기 환자는 도 5에 도시된 바와 같이 신속하고 완전한 반응을 달성하였다. 후 주입 1개월과 6개월 사이에 어떠한 순환성 CLL 세포도 유동 세포 분석법에 의해 혈액에서 검출되지 않았다. CART-19 세포의 주입 후 1, 3 및 6개월 시점에 골수에서는 형태학 및 유동 세포 분석법 시험에 의해 림프구성 침윤물의 부재가 지속되는 것으로 나타났다. 주입 후 1개월 및 3개월 시점의 CT 스캔에서는 비정상적인 선병증의 완치가 나타났다. 상기 환자는 지속적인 백혈구 감소증(WBC: 1000 내지 $3900/\mu\text{l}$) 및 혈소판 감소증(혈소판: 약 $100,000/\mu\text{l}$) 및 경미한 저감마글로불린 혈증(IgG 525mg/dl , 정상 650 내지 $2,000\text{mg/dl}$)을 나타냈지만, 감염성 합병증은 없었다.

[0313] 환자 UPN 02는 77세 나이로 CART19 세포로 치료 받았다. 상기 환자는 관상 동맥 질환의 관련된 이력을 가지고 있었으며, 먼저 환자에서 피로 및 백혈구 증가증이 나타났을 때 2000년에 68세의 나이로 CLL을 진단 받았다. 상기 환자는 치료가 필요한 진행성 백혈구 증가증($195,000/\mu\text{l}$), 빈혈증 및 혈소판 감소증이 발병했던 4년 동안 상대적으로 안정하였다. 그 당시의 유전자 검사에 따르면, CLL 세포는 염색체 17p의 결실을 갖는 것으로 나타났다. 진행성 질병으로 인해, 상기 환자는 부분적인 반응 및 혈액 개수에서의 개선으로 12주 과정으로 알렘투주맵으로 치료 받았다. 1년 6개월 이내에 상기 환자는 진행성 백혈구 증가증, 빈혈증, 혈소판 감소증, 및 비장 비대증에 걸렸다. 핵형 분석에 따르면, 현재 염색체 13q의 결실과 함께 염색체 17p의 결실이 있는 것으로 확인되었다. 상기 환자는 백혈구 증가증의 개선 및 빈혈증 및 비장 비대증의 안정화로 18주 동안 알렘투주맵으로 치료 받았다. 상기 환자에서는 1년 이내에 진행성 백혈구 증가증, 빈혈증 및 혈소판 감소증의 흔적이 나타났다. 치료는 리툽시맵과 함께 2회의 벤다무스틴 주입을 포함하며, 이는 도 5A에 도시된 바와 같이 안정한 질명을 초래하지만, 유의한 개선은 없었다.

[0314] 상기 환자는 CART-19 세포의 주입 이전에 림프구 제거 화학요법으로서 벤다무스틴을 단독으로 투여 받았다. 상기 환자는 24시간 동안 102°F 정도의 높은 일시적인 신열로 인해 악화된 3회 분할 주입에서 4.3×10^6 CART19 세포/kg(총 4.1×10^8 개의 세포)를 투여 받았다. 첫 번째 주입 후 11일째 날, 상기 환자는 증강된 4.1×10^8 (4.3

$\times 10^6$ /kg) CART19 세포를 투여 받았으며, 이러한 주입은 24시간 입원을 요하는 저산소혈증 없이 신열, 오한 및 호흡 장애에 의해 악화되었다. 심장성 허혈증에 대한 증거는 없었으며, 상기 증상은 치유되었다. 첫 번째 CART-19의 주입 후 15일째, 및 증강된 CART19 세포의 주입 후 4일째 날에 상기 환자는 높은 신열(최대 104°F), 오한 및 오한으로 병원에 입원했다. 혈액 및 소변 배양 및 CXR을 이용한 광범위한 검사로는 감염 공급원을 확인하지 못했다. 상기 환자는 호흡 장애로 불평을 호소했지만, 저산소혈증은 없었다. 초음파 심장 진단도 (echocardiogram)에 따르면, 심각한 운동 감소(hypokinesia)가 나타났다. 방출 분획은 20%였다. 상기 환자는 1 일 동안 1kg 당 1mg의 프레드니손, 및 약 1주일 동안 1kg 당 0.3mg의 프레드니손을 투여 받았다. 이는 신열 및 신부전증의 완치를 초래했다.

[0315] 높은 신열의 발생과 동시에 환자는 도 5A에 도시된 바와 같이 말초 혈액에서 신속한 림프구의 감소를 나타냈다. 환자가 백혈구 개수의 정상화를 나타낼지라도, 상기 환자는 지속적인 순환성 CLL, 안정하고 경미한 빈혈증 및 혈소판 감소증을 나타냈다. 골수는 극적인 말초 혈액 세포수 감소에도 불구하고 요법 이후 1개월째에 CLL의 지속적인 광범위한 침윤을 나타냈으며, CT 스캔에 따르면 선병증 및 비장 비대증의 부분적인 감소가 나타났다. CART19 세포의 주입 5개월 후에 상기 환자는 진행성 림프구 증가증에 걸렸다. 주입 9개월 이후에 상기 환자는 안정하고 경미한 빈혈증과 함께 림프구 증가증($16,500/\mu\text{l}$), 및 안정한 선병증과 함께 혈소판 감소증을 나타냈다. 상기 환자는 자각 증상이 없는 상태였으며, 추가의 요법도 받지 않았다.

[0316] 환자 UPN 03은 50세의 나이로 자각 증상이 없는 단계 I의 CLL로 진단을 받았으며, 6년 동안에 관찰이 이어졌다. 추후, 상기 환자는 치료가 요구되는 진행성 백혈구 증가증(백혈구 개수 $92,000/\mu\text{l}$) 및 진행성 선병증을 나타냈다. 상기 환자는 플루다라빈과 함께 2회의 리툭시맵을 투여 받았으며, 이는 혈액 개수의 정상화 및 선병증의 완치는 아니지만 유의한 개선을 초래하였다. 상기 환자는 치료가 요구되는 신속 진행성 백혈구 증가증(WBC $165,000/\mu\text{l}$) 및 진행성 선병증으로 다음 6개월에 걸쳐 이어지는 약 3년간 진행이 없는 기간을 가졌다. 상기 환자는 혈액 개수의 정상화 및 촉진성 선병증(palpable adenopathy)의 치료로 플루다라빈과 함께 1회의 플루다라빈 및 3회의 리툭시맵을 투여 받았다. 상기 환자는 신속하게 진행되는 백혈구 증가증 및 선병증에 다시 걸릴 때까지 약 20개월간 진행이 없는 기간을 가졌다. 이때 골수는 CLL에 의해 광범위하게 침윤되었으며, 핵형 분석에 따르면 200개의 세포 중 170개에서 TP53 결실을 증명한 FISH에 의해 상기 세포가 염색체 17p의 결실을 포함하는 것으로 나타났다. 상기 환자는 벤다무스틴과 함께 1회의 리툭시맵을 투여 받은 후, 4회의 벤다무스틴만을 투여 받았다(리툭시맵에 대한 심각한 알레르기 반응으로 인함). 상기 환자는 혈액 개수의 초기 정상화를 나타냈으며, 요법의 중단 직후에 진행성 백혈구 증가증 및 선병증을 나타냈다.

[0317] 자가성 T 세포는 환자 UPN3으로부터 아페레시스에 의해 수집되고, 냉동 보존된다. 이어 상기 환자는 우수한 혈액학적 반응으로 11주 내내 알렘투주맵으로 치료 받았다. 선병증의 완치는 없었지만 개선은 있었다. 상기 환자는 다음 6개월에 걸쳐 활성적이지만 안정한 질병을 나타냈다. 추후, 상기 환자는 CART19 세포의 주입 이전에 림프구 제거 화학요법으로서 펜토스타틴 및 싸이클로포스파마이드를 투여 받았다.

[0318] 화학요법 이후 3일째 이전만 세포 주입 이전에 골수는 CLL에 의한 약 40%의 연루로 과세포성(60%)이었다. 표 3 및 (Bonyhadi 등, 2005, *J Immunol* 174: 2366-2375)에 나타나 있는 바와 같이, CLL 환자로부터 아페레시스 수집에 본질적인 제조 제한으로 인해 상기 환자에는 3일에 걸쳐 1kg 당 총 1.46×10^5 CART19+ 세포(총 1.42×10^7 개의 CART19+ 세포)를 주입하였다. 주입에 의한 독성은 없었다. 첫 번째 주입 14일 이후, 상기 환자는 증상에 따라 치료되는 오한, 102°F 정도의 높은 신열, 오한, 메스꺼움 및 설사가 나타나기 시작했다. 상기 환자는 호흡기 또는 심장 증후군은 없었다. 주입 후 22일째 날에 종양 용해 증후군이 진단되었으며, 이는 증가된 LDH 및 요산에 의해 확인되고, 신부전에 의해 악화되었다. 상기 환자는 입원해서, 요산 및 신장 기능의 정상화로 유체 소생법 및 라스부리카제(rasburicase)로 치료를 받았다. CXR 및 혈액, 소변 및 대변 배양에 의한 세부적인 임상적 평가가 수행되었으며, 모두 음성 또는 정상이었다.

[0319] CART-19 주입 1개월 이내에 상기 환자는 형태학, 유동 세포 분석법, 세포유전학 분석 및 FISH 분석에 의해 혈액 및 골수로부터 순환성 CLL을 제거하였으며, CT 스캔에 따르면 비정상적인 선병증의 치유를 나타냈다(도 5C). 상기 환자의 경감이 CART19 세포의 초기 주입으로부터 8개월을 넘어 지속되었다.

[0320] 현재, 실험 결과가 개시된다.

[0322] 임상 프로토콜

[0323] 진전된 화학요법 내성 CLL을 앓는 3명의 환자는 도 1에 도시된 바와 같이 실험적인 임상 시험에 등록하였다. 모든 환자는 도 10에 도시된 바와 같이 다양한 화학요법 및 생물학적 접생법으로 광범위하게 예비 치료를 받았다. 상기 환자 중 2명은 통상적인 요법에 대한 빈약한 반응 및 신속한 진행을 예시하는 결실인 p53 결핍 CLL을 앓고 있었다(Dohner 등, 1995, *Blood*, 85:1580-1589). 환자 각각은 예비 화학요법 이후에 광범위한 골수 침윤(40 내지 95%) 및 림프샘 장애를 포함한 큰 종양 부하를 나타냈지만, 환자 UPN 02는 또한 유의한 말초 림프구 증가증을 나타냈다. CART19 T 세포는 도 1B에 도시된 바와 같이 제조되었으며, 상기 세포 제조 및 각 환자에 대한 생성물의 특성화의 세부사항은 표 4에 나타나 있다. 모든 환자는 CART19 T 세포의 주입 1 내지 4일 전에 림프구 제거 화학요법으로 예비 치료를 받았다. 분할 투여량 세포 주입 스케줄은 도 1A에 도시된 바와 같이 상기 시험에서 4-1BB 공자극성 신호전달 도메인을 혼입하는 CAR을 검사하였기 때문에 사용되었다.

표 4

[0325]

아페레시스 생성물 및 CART19 생성물의 방출 기준					
	검정	사양	UPN 01	UPN 02	UPN 03
아페레시스 생성물					
	CD45+의 CD3+에 대한 유동 세포분석	N/A	4.46%	2.29%	2.67%
CART19 생성물					
	주입된 총 세포수	약 $2-5 \times 10^9$	5×10^9	1.275×10^9 1.275×10^9 [총 2.55×10^9]	3×10^8
	세포 생존 가능성	70% 이상	96.2%	95.3(90.5) ¹	90.3
	CD3+ 세포(%)	80% 이상	88.9%	98.8	98.9
	잔류 비드#	100개 이하의 비드/ 3×10^6 세포	3.95	1	4
	내독소	3.5이하의 EU/ml	0.5미만의 EU/ml	0.5미만의 EU/ml	0.5미만의 EU/ml
	마이코플라즈마	음성	음성	음성	음성
	멸균 (Bactec)	성장 못함	성장 못함	성장 못함	성장 못함
	진균 배양	성장 못함	성장 못함	성장 못함	성장 못함
	BAS ELISA	1 μ g 이하/ml	0.5 미만/ml	0.5 미만/ml	0.5 미만/ml
	복제 캄피토프 렌티바이러스(RCL)	RCL 검출 불가	검출 불가	미확정 ²	미확정 ²
	혈질 도입 효율(scFv 발현)	20% 이상	22.6%	23%	4.74% ⁴
	백터 DNA 서열(CART19 PCR)	0.2-3 복제수/세포	0.15 ³	0.275	0.101

[0326]

1 = 두 번째 복용량.2 = 12일째 날에 LOQ 미만의 검정 값으로, 백터 생성으로부터의 플라스미드 DNA의 전달과 일치하는 확장에서 초기부터 감소함. 정보 수정안으로서 FDA에 제출됨.3 = FACS에 의한 표면 염색에 기초한 생성물 방출.4 = 외부 DSMC 및 IRB에 의한 방출 기준을 위해 제공된 치료 제외.

[0328]

CART19의 생체 내 증식 및 존속 및 골수로의 트래피킹

[0329]

CD3/CD28 비드를 사용하여 증식되고 4-1BB 신호전달 도메인을 발현하는 CAR+ T 세포는 4-1BB가 결핍된 CAR에 대해 개선된 것으로 여겨진다. Q-PCR 검정은 혈액 및 골수에서 CART19 세포의 정량적 트래피킹을 가능케 하기 위해 개발되었다. 모든 환자는 도 2A 및 도 2C에 도시된 바와 같이 적어도 6개월 동안 혈액 내의 CART19-세포의 증식 및 존속을 나타냈다. 놀랍게도, 환자 UPN 01 및 UPN 03은 주입 후 첫 1개월 동안에 혈액 내의 CAR+ T 세포의 확장이 1,000 내지 10,000배였다. 피크 확장 수준은 환자 UPN 01(15일째 날) 및 환자 UPN 03(23일째 날)에

서 주입 후 임상적 증상의 발현과 일치하였다. 더욱이, 일차 역학으로 모델링될 수 있는 초기 감쇄 이후, CART19 T 세포 수준은 주입 후 90일째 날에서 180일째 날까지 3명의 환자 모두에서 안정화되었다. 유의하게도, 비록 도 2D 내지 도 2F에서 도시된 바와 같이 혈액에서 관측된 것보다 5배 내지 10배 정도 낮은 지라도 CART19 T 세포는 또한 환자 모두에서 골수로 트래피킹되었다. 환자 UPN 01 및 03은 소실($T^{1/2}$)이 약 35일로서 로그 선형 감쇄를 나타냈다.

[0330] CART19 주입 이후 혈액 및 골수 구획에서의 특정 면역 반응의 유도

[0331] 모든 환자로부터의 혈청 샘플을 수집하고, 사이토카인 수준을 정량적으로 결정하기 위해 배치(batch) 분석하였으며, 그 결과 도 3에 도시된 바와 같이 잠재성 독성을 평가하고 CART19 세포 기능의 증거를 제공하기 위해 사이토카인, 케모카인 및 기타 가용성 인자의 패널을 평가하였다. 30개의 검사된 분석물질 중, 4개의 사이토카인(IL-6, INF- γ , IL-8 및 IL-10), 5개의 케모카인(MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, CXCL9, CXCL10) 및 IL-1R α 및 IL-2R α 에 대한 가용성 수용체를 포함한 11개의 분석물질이 기준선에서 3배 이상의 변화를 나타냈다. 이들 중 인터페론- γ 는 기준선에서 가장 큰 상대적인 변화를 나타냈다. 흥미롭게도, UPN 01 및 UPN 03에서 사이토카인 증가에 대한 피크 시간은 앞서 개시된 임상적 증상 및 각 환자에서 혈액 내의 CART19 세포의 피크 수준과 일시적으로 서로 관련이 있었다. 오직 경미한 변화가 아마도 이러한 환자에 제공된 코르티코스테로이드 치료 결과서 환자 UPN 02에서 나타났다. 가용성 IL-2의 증가는 비로 4-1BB 신호전달 도메인을 갖는 CAR+ T 세포를 개발하기 위한 예비 임상적 원리(rationale)들 중 하나가 CD28 신호전달 도메인에 비해 IL-2의 분비를 개시하는 경향에서의 감소일지라도 환자의 혈청에서 검출되지 않았다(Milone 등, 2009, *Mol Ther.* 17: 1453-1464). 이는 이전 연구에서 CAR+ T 세포가 조절용 T 세포에 의해 잠재적으로 억제되는 것으로 나타났을 지라도 지속된 임상적 활성화와 관련이 있을 수 있다(Lee 등, 2011, *Cancer Res* 71: 2871-2881), 상기 조절용 T 세포는 실질적인 양의 IL-2를 분비하는 CAR에 의해 유도될 수 있거나 주입 후 외생성 IL-2의 제공에 의해 유도될 수 있는 세포이다. 최종적으로, UPN 03의 골수 흡인물로부터의 상층액에서 사이토카인 분비의 강력한 유도는 도 3D에 도시된 바와 같이 관측되었으며, 이는 또한 중앙 용해 증후군의 발명 및 완치와 일치하였다.

[0332] 혈액 내 메모리 CART19 세포의 개체군의 장기간 발현 및 확립

[0333] CAR 매개 암 면역 요법에서의 주요 논점은 최적화된 세포 제도 및 공자극 도메인이 유전적으로 변형된 T 세포의 존손을 증강시키고, 환자에서 CAR+ 메모리 T 세포의 확립을 허용하는 지의 여부이다. 이전 연구에 따르면, 주입 이후에 CAR의 강력한 증식, 장기간 존속 및/또는 T 세포 상의 발현이 증명되지 않았다(Kershaw 등, 2006, *Clin Cancer Res* 12: 6106-6115; Lamers 등, 2006, *J Clin Oncol* 24: e20-e22; Ti11 등, 2008, *Blood*, 112, 2261-2271; Savoldo 등, 2011, *J Clin Invest* doi: 10.1172/JCI46110). 주입 후 169일째 날에 혈액 및 골수 모두로부터의 샘플의 유동 세포 분석에 따르면, UPN 03에서 세포를 발현하는 CAR19의 존재(도 4A 및 도 4B) 및 도 4A에 도시된 바와 같은 B 세포의 부재가 들어났다. 놀랍게도, Q-PCR 검정에 의해 3명의 환자 모두는 도 2 및 도 6에 도시된 바와 같이 4개월 및 그 이상 동안 존속하는 CAR+ 세포를 가졌다. 유동 세포 분석법에 의한 CAR+ 세포의 생체 내 빈도는 CART19 이식 유전자에 대한 PCR 검정으로부터 수득된 값과 밀접하게 일치하였다. 중요하게도, 도 4A에 도시된 바와 같이 CAR19+ 세포가 CD16 양성 또는 CD14 양성 서브셋에서 검출될 수 없음에 따라 환자 UPN 03에서 CD3+ 세포만이 CAR19를 발현하였다. CAR 발현은 또한 도 7에 도시된 바와 같이 주입 후 71일째 날에 환자 UPN 01의 혈액 내에서 4.2%의 T 세포의 표면 상에서 검출되었다.

[0334] 다음으로, 다색성 유동 세포 분석법은, 도 8에 도시된 항-CAR 유전자형 항체(MDA-647) 및 게이팅 전략을 이용하여 UPN 03에서 CART19 세포의 발현, 표현형 및 기능을 추가로 특성화하도록 상세한 연구를 수행하기 위해 사용되었다. CAR19 발현에 기초하여 CD8+ 및 CD4+ 세포 둘 모두에서 메모리 및 활성화 마커의 발현에서의 현저한 차이가 관측되었다. 56일째 날에, CART19 CD8+ 세포는 주로 도 4C에 도시된 바와 같이 항원에 대한 장기간의 강력한 노출과 일치하는 효과기 메모리 표현형(CCR7-CD27-CD28-)을 나타냈다. 대조적으로, CAR 음성 CD8+ 세포는 세포의 서브셋에서의 CCR7 발현 및 CD27+/CD28- 및 CD27+/CD28+ 분획에서의 실질적인 개수와 함께 효과기와 중추 메모리 세포의 혼합물로 이루어져 있었다. CART19 및 CAR 음성 세포 개체군 둘 모두가 실질적으로 CD57을 발현할지라도, 이러한 분자는 균일하게 CART19 세포에서의 PD-1과 동시 발현되며, 이는 이들 세포의 광대한 복제 이력을 반영할 가능성이 있다. CAR 음성 세포 개체군과는 대조적으로, 전체 CART19 CD8+ 개체군은 CD25 및 CD127 둘 모두의 발현을 하지 못했다. 169일째 날 정도에, CAR 음성 세포 개체군의 표현형은 56일째 날의 샘플과 유사하게 유지되었으며, CART19 개체군은 PD-1 음성, CD57 음성 및 CD127 양성인 CAR+ 세포뿐만 아니라, 중추 메모리 세포의 특징, CCR7의 현저한 발현, 및 CD27 및 CD28의 더욱 높은 수준과 함께 소수 개체군을 포함하도록 발달하였다.

- [0335] CD4+ 구획에서, 56일째 날에 CART19 세포는 도 4B에 도시된 바와 같이 CCR7의 균일한 결핍, CD57+ 구획 및 CD57-구획 둘 모두 내에 분포한 CD27+/CD28+/PD-1+ 세포의 우점종(predominance), 및 CD25 및 CD127 발현의 본질적인 부재를 특징으로 하였다. 대조적으로, 이러한 시점에서의 CAR 음성 세포는 CCR7, CD27 및 PD-1 발현에서 이질적이며, CD127을 발현시키고, 또한 실질적인 CD25+/CD127-(잠재성 조절용 T 세포) 개체군을 포함하고 있었다. 169일째 날 정도에, CD28 발현이 모든 CAR+CD4+ 세포에서 균일하게 양성으로 유지되는 반면, CART19 CD4+ 세포의 분획은 CCR7의 발현, CD27-세포의 더욱 높은 비율(%), PD-1 음성 서브셋의 발생, 및 CD127 발현의 획득과 함께 중추 메모리 표현형으로 발달하였다. CAR 음성 세포는 CD27 발현에서의 감소 및 CD25+/CD127-세포의 비율(%)에서의 감소를 제외하고 이들의 56일째 날의 대응물과 매우 일관되어 있는 상태이다.
- [0337] CART19 세포는 혈액에서 6개월 이후에서 효과기 기능을 유지할 수 있다
- [0338] 짧은 존속 및 부적절한 생체 내 증식 이외에도, CAR+ T 세포를 이용한 이전 시험의 제한은 주입된 T 세포의 생체 내 기능적 활성의 신속한 상실이었다. 환자 UPN 01 및 03에서의 높은 수준의 CART19 세포의 존속 및 CAR19 분자의 표면 발현은 저온 보존된 말초 혈액 샘플로부터 회수된 세포에서의 항-CD19 특이적 효과기 기능을 직접 검사하기 위한 기회를 제공한다. 환자 UPN 03으로부터의 PBMC는 CD19 발현에 대해 양성 또는 음성인 표적 세포와 함께 배양되었다(도 4d). CART19 T 세포의 강력한 CD19 특이적 효과기 기능은 표면 CD107a 발현에 의해 평가된 바와 같이 CD19 양성이지만 CD19 음성이 아닌 표적 세포에 대해 특정한 과립 감소에 의해 증명되었다. 현재 하계도, CD19 양성 표적에 대한 CART19 개체군의 노출은 표준 유동 세포 염색에서 동일한 효과기 세포에서 CAR19의 표면 발현을 위해 도 8에 도시된 바와 같이 표면 CAR-19의 신속한 내재화(internalization)를 유도하였다. 표적 세포 상에 공자극성 분자의 존재는 NALM-6 세포주가 CD80 또는 CD86을 발현하지 않기 때문에 CART19 세포의 과립 감소를 개시하기 위해 요구되지 않는다(Brentjens 등, 2007, *Clin Cancer Res* 13: 5426-5435). 효과기 기능은 주입 56일째 날에 명백히 나타났고, 169일째 날의 시점에도 유지되었다. CAR+ 및 CAR-T 세포의 강력한 효과기 기능은 또한 약리학적 자극에 의해 증명될 수 있다.
- [0340] CART19 세포의 임상적 활성
- [0341] 임의의 환자에서 상기 주입 이후 4 동안에 일시적인 발열 반응이 아닌 유의한 독성이 관측되지 않았다. 그러나 모든 환자는 후속적으로 첫 번째 주입 후 7일째 날과 21일째 날 사이에 유의한 임상적 독성 및 실험용 독성을 발현하였다. 이들 독성은 기간이 짧으며, 가역적이었다. 현재까지 치료를 받은 3명의 환자 중, 표준 기준에 따라 CART19 주입 후 6개월 초과 기간에 CR이 2명이고 PR이 1명이다(Hallek 등, 2008, *Blood* 111: 5446). 각각의 환자에 대한 과거의 의료 이력 및 요법에 대한 반응에 대한 세부사항은 도 10에 도시되어 있다.
- [0342] 간단하게 말해서, 환자 UPN 01은 주입 한지 초기 10일 이후에 오한 및 일시적인 저혈압과 함께 발열 증상을 발현하였다. 신열은 약 2주 동안 존속하였으며, 치유되었지만, 상기 환자는 추가의 체질 증상은 없었다. 상기 환자는 도 5에 도시된 바와 같이 신속하고 완전한 반응을 달성하였다. 주입 후 1일째 날과 6일째 날 사이에 유동 세포 분석법에 의해 혈액 내에서는 어떠한 순환성 CLL 세포가 검출되지 않았다. CART19 세포의 주입 후 1개월, 3개월 및 6개월째 날에 골수는 도 5B에 도시된 바와 같이 형태학 및 유동 세포 분석에 의해 림프구성 침윤물의 지속적인 부재를 나타냈다. 주입 후 1개월 및 3개월 날의 CT 스캔에 따르면, 도 5C에 도시된 바와 같이 선병증의 치유가 나타난다. 완치는 이러한 보고 시기에 추가의 10개월 이상 동안 지속되었다.
- [0343] 환자 UPN 02는 리툭시맵과 함께 2회의 벤다무스틴으로 치료 받았으며, 그 결과 도 5A에 도시된 바와 같이 안정한 질병을 초래하였다. 상기 환자는 CART19 T 세포의 주입 이전에 림프구 제거 화학요법으로서 3번째 복용량의 벤다무스틴을 투여 받았다. 상기 환자는 첫 번째 주입 이후 11일째 날 및 두 번째 CART19 세포의 증강 당일에 24시간의 입원을 요하는 40℃까지의 신열, 오한 및 호흡곤란을 나타냈다. 신열 및 신체 증상은 존속하였으며, 15일째 날에 상기 환자는 일시적인 신부전증을 나타냈지만, 모든 증상은 18일째 날에 코르티코스테로이드 요법을 개시한 이후에 치유되었다. CART19 주입 이후, 및 높은 신열의 발병과 동시에 상기 환자는 도 5A에 도시된 바와 같이 말초 혈액으로부터 p53 결핍 CLL 세포의 신속한 제거 및 선병증의 부분적인 감소를 나타냈으며, 골수는 극적인 말초 혈액 세포수의 감소에도 불구하고 요법 1개월 이후에 CLL의 지속적이고 광범위한 침윤을 나타냈다. 상기 환자는 자각 증상이 없는 상태이다.
- [0344] 환자 UPN 03은 CART19 세포의 주입 이전에 림프구 제거 화학요법으로서 펜토스타틴 및 싸이클로포스파마이드를 투여 받았다. 화학요법 3일 후지만 세포 주입 이전에, 골수는 CLL에 의한 약 50%의 연루로

과세포성(60%)이었다. 상기 환자는 낮은 복용량의 CART19 세포(3일에 걸쳐 분할 투여된 1.5×10^5 CAR+ T 세포/kg)를 투여 받았다. 또한 주입에 의한 급성 독성은 없었다. 그러나 첫 번째 주입 14일 후에 상기 환자는 오한, 신열, 메스꺼움 및 설사가 나타나기 시작했다. 주입 후 22일째 정도에 종양 용해 증후군은 입원을 요하는 것으로 진단되었다. 상기 환자는 체질 증상의 치유를 나타냈고, CART19 주입 1개월 이내에 상기 환자는 형태학, 유동 세포 분석법, 세포유전학 분석 및 FISH 분석에 의해 혈액 및 골수로부터 순환성 CLL의 제거를 나타냈다. CT 스캔에 따르면, 도 5B 및 도 5C에 도시된 바와 같이 비정상적인 선병증의 치유가 나타났다. 완치는 초기 CART19 세포의 주입 시부터 8개월 이상 지속되었다.

[0346] CLL 표적 세포에 대한 생체 내 CART19 효과기 비율의 고려

[0347] 비록 주입 이후에 이들 계산으로 T 세포의 확장을 설명할 수 없을지라도, 예비 임상적 연구에 따르면 대형 종양은 제거될 수 있으며, 2.2×10^7 개의 CAR의 주입은 인간화된 생쥐에서 1:42의 생체 내 E:T 비율을 위해 1×10^9 개의 세포로 구성된 종양을 소적할 수 있는 것으로 나타났다(Carpenito 등, 2009, *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 3360-3365). 시간의 경과에 따른 CLL 종양 부하의 추정치는 주입된 CAR+ T 세포의 개수에 기초하여 3명의 개체의 생체 내에서 달성된 종양 감소 및 추정된 CART19 E:T 비율에 의해 산정되었다. 골수, 혈액 및 이차 림프성 조직에서 CLL 부하량을 측정함으로써 종양 부하를 산정하였다. 도 10에 도시된 바와 같은 기준선 종양 부하에 따르면, 각각의 환자는 CART19 주입 이전에 10^{12} 개의 차수로 CLL 세포(즉 1kg의 종양 부하량)를 갖는 것으로 나타나 있다. 환자 UPN 03은 용적 CT 스캔 분석 방법에 따라 1-일째 날(즉, 화학요법 이후 및 CART19 주입 이전)에 골수에서 8.8×10^{11} 개의 CLL 세포의 추정된 기준선 종양 부하, 및 3.3 내지 5.5×10^{11} 개의 CLL 세포의 이차 림프성 조직에서의 측정된 종양의 양을 가졌다. 총 초기 종양 부하(1.3×10^{12} CLL 세포)의 추정치를 이용하여 1.4×10^7 개의 CART19 세포로만 UPN 03에 주입하고 치료 이후에 어떠한 CLL 세포가 검출 불가능하였다고 가정하면, 현재한 1:93,000의 E:T 비율이 달성되었다. 유사한 산정에 의해 1:2200 및 1:1000의 효과적인 생체 내 E:T 비율이 표 3에 나타나 있는 바와 같이 UPN 01 및 UPN 02에 대해 산정되었다. 결국, 1,000배 초과인 생체 내 CART19 확장과 조합된 CART19 T 세포의 일련의 살해 기여는 CART19 세포에 의해 매개되는 강력한 항-백혈병성 효과에 기여할 가능성이 있었다.

[0349] 키메라 수용체를 발현하는 T 세포는 진전된 백혈병을 앓는 환자에서 메모리 및 강력한 항-종양 효과를 확립한다

[0350] CAR의 제한된 생체 내 발현 및 효과기 기능은 1차 생성 CAR을 검사하는 시험에서 주요 제한요소였다(Kershaw 등, 2006, *Clin Cancer Res* 12: 6106-6115; Lamers 등, 2006, *J Clin Oncol* 24: e20-e22; Till 등, 2008, *Blood*, 112, 2261-2271; Park 등, 2007, *Mol Ther* 15: 825-833; Pule 등, 2008, *Nat Med* 14: 1264-1270). 4-1BB 신호전달 모듈을 포함하는 CAR의 증강된 존속을 증명하는 예비 임상적 모델링(Milone 등, 2009, *Mol Ther.* 17: 1453-1464; Carpenito 등, 2009, *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 3360-3365)에 기초하여, 렌티바이러스 벡터 기술에 의해 조작된 CAR의 2차 생성을 발현하도록 실험을 설계하였다. 이러한 CAR의 2차 생성은 만성 HIV 감염 환경에서도 안전한 것으로 밝혀졌다(Levine 등, 2006, *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 17372-17377). 현재의 결과에 따르면, 이러한 2차 생성 CAR이 T 세포에서 발현되고, 중추 메모리 T 세포의 이식을 조작하도록 설계된 조건 하에서 배양되었을 경우(Rapoport 등, 2005, *Nat Med* 11: 1230-1237; Bondanza 등, 2006, *Blood* 107: 1828-1836), 이번 보고에 비해 주입 이후의 CAR T 세포의 개선된 확장이 관측되는 것으로 나타난다. CART19 세포는 CD19 특이적 세포성 메모리를 확립하였고, 생체 내에서 이전에는 달성되지 않았던 E:T 비율로 종양 세포를 살해하였다.

[0351] CART19는 4-1BB 신호전달 도메인을 혼입하기 위한 첫 번째 CAR 시험 및 렌티바이러스 벡터 기술을 이용하기 위한 첫 번째 CAR 시험이다. 현재 결과에 따르면, CD19 특이성을 나타냈던 "종양 침윤성 림프구"의 사실상(*de facto*) 확립과 함께 종양 부위에 대한 CAR의 효율적인 트래피킹이 증명된다. 현재한 생체 내 확장은 환자로부터 직접 회수한 CAR은 수개월 동안 생체 내에서 효과기 기능을 유지할 수 있다는 첫 번째 증명을 가능케 하였다. 이전 연구에 따르면, 1차 생성 CAR의 바이러스 특이적 T 세포 내로의 도입이 일차 T 세포에 있어서 바람직한 것으로 제시되었지만(Pule 등, 2008, *Nat Med* 14: 1264-1270), 최적으로 공자극된 일차 T 세포 내로 도입된 2차 생성 CAR에 대한 결과는 이러한 개념에 대한 의의를 제기한다. 임의의 특정한 이론에 결부되지 않기를 바라면서, 3명의 환자 모두에서 킬로그램 크기의 종양 부하의 용해로 임상적 효과가 충분하고 선례가 없었으며,

상기 환자 중 2명에서 잠재적으로 위험할 정도로 높은 수준의 사이토카인의 지연 방출이 동반된다는 경계의 주석도 제기되고 있다. 전형적인 사이토카인 폭풍 효과는 관측되지 않았다. 그러나 현재의 연구는 3일만에 걸쳐 CART19의 신중한 주입에 의해 이러한 가능성을 완화하도록 설계되었다.

[0352] 매우 낮은 복용량의 CAR이 강력한 임상적 반응을 유도할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 이는 CART19 벡터 설계의 안전성을 증명한 시험적인 연구였다. 이전 시험에서 검사된 것보다 수십 배 정도 낮은 복용량의 CART19 세포가 임상적인 이점을 가질 수 있다는 관측은 더욱 광범위한 규모로 CAR 요법의 추후 실행 및 CD19가 아닌 표적에 대하여 CAR을 검사하는 시험의 설계를 위한 중요한 암시를 내포할 수 있다.

[0353] 현재의 연구에 따르면, 추가로 중추 메모리 및 효과기 T 세포 둘 모두에서 CART19가 발현되는 것으로 나타나 있으며, 이는 이전 연구에 비해 이들의 장기간 생존에 기여할 가능성이 있다. 임의의 특정한 이론에 결부되지 않기를 바라면서, CAR T는 대체 항원을 발현하는 표적 세포(예를 들어, CLL 종양 세포 또는 정상 B 세포)와 충돌 및 이의 후속적인 제거 시에 생체 내에서 중추 메모리 유사 상태로 분화할 수 있다. 실제로, 4-1BB의 신호전달은 TCR 신호전달의 배경에서 메모리의 발달을 조장하는 것으로 보고되어 있었다(Sabbagh 등, 2007, *Trends Immunol* 28: 333-339).

[0354] CART19의 연장된 증식 및 생존은 이전에 보고되지 않았던 CAR T 세포의 약물 동력학의 양태를 밝혀냈다. 혈청 및 골수에서 사이토카인 방출의 동력학은 피크 CART19 수준과 관련이 있어, CD19를 발현하는 세포성 표적이 제한적이 되는 경우에 감쇄가 개시될 가능성이 있는 것으로 관측되었다. CART19의 연장된 생존에 대한 기작은 상술한 4-1BB 도메인의 도입 또는 천연 TCR 및/또는 CAR을 통한 신호전달과 관련이 있을 수 있다. 흥미로운 가능성은 상기 연장된 생존이 골수 검체에서 확인되었던 CART19의 개체군과 관련이 있고, 이로 인해 골수에서 B 세포 전구와의 충돌에 의해 CD19 CAR이 유지될 수 있다는 가설이 제안된다는 것이다. 생체 내에서 CART19 세포의 초기 확장을 추진하는 것이 이러한 논쟁과 관련이 있습니까? 라는 질문과 관련된 드문 예외(Savoldo 등, 2011, *J Clin Invest* doi: 10.1172/JCI46110; Pule 등, 2008, *Nat Med* 14: 1264-12700)로서, 현재의 연구는 IL-2 주입이 생략되어 있는 유일한 시험이어서, CART19 세포는 항상성 사이토카인에 반응하여 확장될 가능성이 있거나, 백혈병성 표적 및/또는 정상 B 세포 상에 발현된 CD19에 반응하여 확장될 가능성이 더욱 크다. 후자의 경우, 정상 세포 상에서 CART19가 자가 재생이 일어나서, "자가 백신화/증강" 및 그에 따른 장기간 종양 면역 감시에 의한 CAR 메모리를 위한 기작을 제공할 가능성이 있음에 따라 이는 CD19 및 CD20과 같은 정상 APC 상의 표적에 대한 CAR에 있어서 매력적인 특성이 될 수 있다. CART19 항상성 기작은 세포 고유 또는 비고유의 존속 기작을 규명하기 위해 추가의 연구를 필요로 할 수 있다. 이들 결과에 앞서, 대부분의 연구원들은 면역 요법의 일시적인 형태로서 CAR 요법을 고려하였지만, 최적화된 신호전달 도메인을 갖는 CAR은 장기간 면역 감시뿐만 아니라 경감 유도 및 통합 둘 모두에서 역할을 할 수 있다.

[0355] p53 결핍 백혈병을 앓는 2명의 환자를 포함한 3명의 환자 모두에서 강력한 항-백혈병성 효과가 관측되었다. CAR을 이용한 이전 연구는 림프구 제거 화학요법으로부터 항-종양 효과를 분리하는 데 어려움이 있었다. 그러나 현재의 연구에서 생체 내 CAR 확장과 동시에 일어나고 상기 생체 내 CAR 확장에 의존할 가능성이 있는 플루다라빈-난치성 환자에서 임상적 암(Clin Cancer)의 동력학과 결부된 지연된 사이토카인 방출은 CART19가 강력한 항-종양 효과를 조정한다는 것을 보여준다. 현재의 결과는 CAR의 효과를 증가시키는데 있어 화학요법에 대한 역할을 배제하지 않는다.

[0356] 기타 센터에서 계속되는 연구로부터의 결과와 벡터, 이식 유전자 및 세포의 제조과정의 면밀한 비교는 CAR T 세포의 지속적인 기능을 생체 내에서 획득하기 위해 요구되는 주요 특성을 완전하게 이해하기 위해 요구될 수 있다. 항체 요법과 달리, CAR 변형 T 세포는 생체 내에서 복제할 잠재성을 가지며, 장기간 존속은 지속된 종양 제거를 야기할 수 있다. 비-교차 저항성 살해 T 세포로 구성된 맞춤형 요법의 이용 가능성은 B 세포 악성 종양을 앓는 환자의 결과를 개선시키기 위한 잠재성을 갖는다. 예를 들어 리톡시맵 및 베비시주맵(bevizumab)과 같은 약제를 이용한 항체 요법의 제한은 반복적인 항체 주입을 요구하는 요법으로, 불편하면서도 비용이 높다. CART19 세포의 단일 주입 이후에 T 세포 상에서 발현된 항-CD19 scFv를 이용한 장기간 항체 요법(이러한 경우 현재까지 치료를 받은 3명의 환자 중 3명 모두에 있어서 적어도 6개월 동안)의 전달(이러한 경우 현재까지 치료를 받은 3명의 환자 중 3명 모두에 있어서 적어도 6개월 동안의 전달)은 편의성 및 비용 절약을 포함한 다수의 실질적인 이점을 갖는다.

[0358] 실시예 2: 만성 림프성 백혈병에서의 키메라 항원 수용체 변형 T 세포

- [0359] CD137(T 세포[4-1BB] 내의 공자극성 수용체) 및 CD3-제타(T-세포 항원 수용체의 신호-형질 도입 성분) 신호전달 도메인과 결합되고 B-세포 항원 CD19에 대해 특이성을 갖는 키메라 항원 수용체를 발현하는 렌티바이러스 벡터를 설계하였다. 난치성 만성 림프구성 백혈병(CLL)을 앓는 환자 내로 주입된 낮은 복용량(1kg의 체중 당 약 1.5×10^5 개의 세포)의 자가성 키메라 항원 수용체 변형 T 세포는 생체 내의 초기 이식 수준 정도보다 1,000배 정도 더 높은 수준까지 확장하는 것으로 관측되었다. 또한 환자는 종양 용해 증후군의 지연된 발병 및 완전한 완화를 나타내는 것으로 관측되었다.
- [0360] 종양 용해 증후군은 별도로, 키메라 항원 수용체 T 세포와 관련된 유일한 기타 3/4 등급 독성 효과가 림프구 감소증이었다. 조작된 세포는 혈액 및 골수에서 적어도 6개월 동안 높은 수준으로 존속하였으며, 계속해서 키메라 항원 수용체를 발현하였다. 특정 면역 반응은 골수에서 검출되었으며, 이는 CD19를 발현하는 정상 B 세포 및 백혈병 세포의 손실이 동반되었다. 저감마글로불린 혈증은 예상되는 만성 독성 효과였다.
- [0361] 이하 이들 실험에 이용된 재료 및 방법이 개시되어 있다.
- [0363] 재료 및 방법
- [0364] 연구 과정
- [0365] 이전에 보고된 바와 같이 예비 임상적 안전성 검사에 적용되었던 자가 불활성화 렌티바이러스 벡터(GeMCRIS 0607-793)를 설계하였다(Milone 등, 2009, *Mol Ther.* 17: 1453-64). T 세포의 제조 방법은 또한 이전에 개시되어 있었다(Porter 등, 2006, *Blood*, 107:1325-31). 정량적 폴리머라아제 연쇄 반응(PCR) 분석은 혈액 및 골수에서 메릭 항원 수용체 T 세포를 검출하기 위해 수행되었다. 정량화의 하한치는 표준 곡선으로부터 결정되었지만, 상기 정량화의 하한치 미만의 평균 값(즉, 보고 가능하지만 정량화 할 수 없음)이 근접치인 것으로 고려된다. 상기 검정의 정량화의 하한치는 $1\mu\text{g}$ 의 게놈 DNA 당 25개의 복제수이었다.
- [0366] 가용성 인자의 분석은 1회 사용을 위해 분취량으로 분리되어 -80°C 에서 저장된 전혈 및 골수에서 유래한 혈청을 사용하여 수행되었다. 가용성 사이토카인 인자의 정량화는 루미넥스 비드 배열 기술 및 시약(라이프 테크놀로지스)을 사용하여 수행되었다.
- [0368] 첫 번째 아페레시스
- [0369] 12 내지 15ℓ의 아페레시스 과정은 아페레시스 센터에서 수행된다. 말초 혈액 단핵성 세포(PBMC)는 이러한 과정 도중에 CART-19 T 세포의 생성을 위해 수득된다. 1회의 적혈구 아페레시스(leukapheresis)로부터 적어도 50×10^9 개의 백혈구 세포를 수확하여 CART-19 T 세포를 제조하였다. 기준선 혈액 백혈구를 또한 수득하여 냉동 보존한다.
- [0371] 세포 감소(cytoreductive) 화학요법
- [0372] 화학요법은 CART-19 세포가 상기 화학요법이 완료된 이후에 1일 내지 2일 정도 주어질 수 있도록 주입 약 5일 내지 10일 이전에 시작한다. 따라서 화학요법의 개시 타이밍은 섭생법의 기간에 의존한다. 상기 화학요법의 목적은 CART-19 세포의 이식 및 항상성 확장을 조장하기 위해 림프구 감소증을 유도하는 것이다. 화학요법은 또한 질병 종양의 부하를 감소시키기 위해 선택될 수 있다.
- [0373] 세포 감소 화학요법은 지역 종양학자에 의해 선택되고 투여된다. 화학요법의 선택은 환자의 잠재적인 질병 또는 이전 치료법에 의존한다. 플루다라빈($30\text{mg}/\text{m}^2/\text{일} \times 3\text{일}$) 및 싸이클로포스파마이드($300\text{mg}/\text{m}^2/\text{일} \times 3\text{일}$)는 입양 면역 요법을 조장하는데 있어 이들 약제의 사용에 가장 많은 경험이 있는 경우에 정선된 약제이다. CHOP, HyperCVAD, EPOCH, DHAP, ICE 또는 기타 섭생법을 포함한, FDA에 의해 승인된 약물을 이용한 몇몇 기타 허용 가능한 섭생법이 적절하다.
- [0375] 재등급화 평가
- [0376] 제한된 재등급화는 기준선 종양 부하의 측정을 제공하기 위해 화학요법의 완료 시에 수행된다. 이는 이미지화,

신체검사 및 최소 잔류 질병(MRD) 평가를 포함한다. 개체는 사전 주입 검사를 위해 신체검사, 위해 사건의 문서화, 및 혈액학, 화학 및 임신 진단(적용 가능한 경우)을 위한 채혈을 실시한다.

[0378] CART-19 T 세포의 제조

[0379] 자가성 T 세포는 CD19에 대해 특이성을 갖는 세포 외 단일 체인 항체(scFv)를 발현하기 위해 조작된다. 세포 외 scFv는 악성 세포의 표면 및 정상 B 세포 상에서의 발현에 제한되는 분자인 CD19를 발현하는 세포에 대해 상기 형질 도입된 T 세포의 특이성을 재지향할 수 있다. CD19 scFv 이외에도, 상기 세포는 TCR ζ 체인, 및 4-1BB 및 TCR ζ 신호전달 모듈로 구성된 직렬식 신호전달 도메인 중 하나로 구성된 세포 내 신호전달 분자를 발현하도록 형질 도입된다. 상기 scFv는 생쥐 단일 클론성 항체에서 유래하며, 따라서 생쥐 서열을 포함하고, 상기 신호전달 도메인은 전적으로 고유의 인간 서열로 이루어져 있다. CART-19 T 세포는 아페레시스에 의해 T 세포를 분리함으로써 제조되며, 렌티바이러스 벡터 기술(Dropulic 등, 2006, *Human Gene Therapy*, 17: 577-88; Naldini 등, 1996, *Science*, 272: 263-7; Dull 등, 1998, *J Virol.* 72: 8463-71)을 이용하여 CD4 및 CD8 T 세포 내로 scFv:TCR ζ :4-1BB를 도입한다. 몇몇 환자에서는 대조군 scFv:TCR ζ 가 경쟁적 재증식 실험을 위해 일부 세포에 도입된다. 이들 수용체는 MHC 의존성 방식으로 항원에 결합하고, 따라서 하나의 수용체 구조체는 CD19 항원 양성 종양을 앓는 환자의 개체군을 치료하기 위해 사용될 수 있다는 점에서 "보편적"이다.

[0380] CAR 구조체는 펜실베이니아 대학교에서 개발되었고, 임상적 등급 벡터는 렌티젠 코포레이션사에서 제조되었다. CART-19 세포는 도 11에 도시된 공정에 따라 펜실베이니아 대학교의 임상적 세포 및 백신 생산 시설(Clinical Cell and Vaccine Production Facility)에서 제조된다. 세포 배양이 끝날 무렵에 상기 세포는 불용해성 냉동배지에서 냉동 보존된다. 총 2.5×10^9 내지 5×10^9 개의 세포 주입액을 포함하는 CART-19 형질 도입된 T 세포의 1회 복용량은 1 또는 2 봉지 단위로 투여된다. 각각의 봉지에는 봉지 당 약 2.5 내지 5×10^9 개의 자가성 T 세포와 함께 하기 불용해성 등급의 시약(%v/v)들, 즉 31.25%v/v의 플라스마라이트-A, 31.25%v/v의 텍스트로오스(5%), 0.45%v/v의 NaCl, 최대 7.50%v/v의 DMSO, 1.00%v/v의 텍스트란 40 및 5.00%v/v의 인간 혈청 알부민이 함유되어 있다. 증가된 안전성을 위해, 첫 번째 복용량은 0일, 1일 및 2일째 날에 분할 투여량으로서 주어지며, 0일째 날에 세포의 약 10%, 1일째 날에 세포의 30%, 및 2일째 날에 세포의 60%이다.

[0382] 저장

[0383] CART-19-형질 도입된 T 세포를 함유하는 봉지(10 내지 100ml의 용량)는 모니터링되는 -135°C 냉동 장치에서 혈액은행 조건으로 저장된다. 주입 봉지는 필요할 때까지 냉동 장치에서 저장된다.

[0385] 세포 해동

[0386] 연구용 제약분야에 상기 세포를 기록한 이후, 냉동된 세포는 드라이아이스에서 개체의 머리말에 갖다 놓는다. 36°C 내지 38°C 로 유지되는 수욕(water bath)을 이용하여 한번에 한 봉지씩 머리말에서 상기 세포를 해동한다. 상기 세포가 녹을 때까지만 봉지를 부드럽게 마사지 한다. 냉동된 덩어리가 용기에 남아 있어서는 안 된다. CART-19 세포 생성물이 손상되거나 봉지가 누수되는 것처럼 보이거나, 혹은 더럽혀진 것처럼 보이는 경우, 이는 주입되어서는 안 된다.

[0387] 예비 마취

[0389] *T 세포 주입의 부작용으로는 일시적인 신열, 오한 및/또는 메스꺼움을 들 수 있다. 개체는 CART-19 세포의 주입 이전에 650mg의 아세트아미노펜을 경구 투여로 예비 마취시키고, 25 내지 50mg의 디펜하이드라민 염산염으로 경구 또는 정맥 내 투여로 예비 마취시키는 것이 추천되고 있다. 이들 약물 투여는 필요한 경우에 6시간 마다 반복될 수 있다. 비스테로이드성 항-염증 약물 투여 과정은 환자가 아세트아미노펜에 의해 누그러지지 않는 신열을 계속해서 갖는 경우에 처방될 수 있다. 환자는 생명을 위협하는 응급상황의 경우를 제외하고 임의의 시기에 하이드로코르티손, 프레드니손, 프레드니솔론(솔루-메드롤(Solu-Medrol)사) 또는 텍사메타손(데카드론(Decadron))과 같은 전신성 코르티코스테로이드를 투여 받는 것이 추천되고 있으며, 이는 이것이 T 세포에 악영향을 미칠 수 있기 때문이다. 코르티코스테로이드가 신속한 주입 반응을 위해 요구되는 경우에 100mg의 하

이드로코르티손의 초기 복용량이 추천된다.

[0391] 투여/주입

[0392] 화학요법이 완료된 지 1 내지 2일 이후에 주입이 시작된다. 첫 번째 주입 당일에는 환자는 차액(differential)을 갖는 CBC를 가지며, CD3, CD4 및 CD8의 평가는 화학요법이 부분적으로는 림프구 감소증을 유도하기 위해 제공되기 때문에 중요하다. 임의의 특정한 이론에 결부되지 않기를 바라면서, $2.5-5 \times 10^9$ 개의 CART-19 세포의 초기 정맥 내 복용량은 이러한 프로토콜에 있어서 최적인 것으로 여겨진다. 건강한 성인에서 약 1×10^{12} 개의 T 세포가 존재하기 때문에 제안된 총 복용량은 T 세포의 총 신체 용적의 약 0.5%에 상응한다(Roederer, 1995, *Nat Med.* 1: 621-7; Macallan 등, 2003, *Eur J Immunol.* 33: 2316-26). 첫 번째 복용량은 0일째(10%), 1일째(30%) 및 2일째(60%) 날에 분할 투여량을 이용하여 투여된다. 개체는 단리된 공간에서 주입을 받는다. 세포는 본원의 다른 부분에서 개시된 바와 같이 환자의 머리말에서 용해한다. 상기 용해된 세포는 주입 기간이 약 10 내지 15 분이 되도록 허용되는 한 신속한 주입 속도로 제공된다. 상기 형질 도입된 T 세포는 3-웨이 콕마개(3-way stopcock)가 구비되고 라텍스가 없는 18게이지 Y형 혈액 세트를 통해 1분 당 약 10ml 내지 20ml의 유속으로 신속한 정맥 내 주입을 통해 투여된다. 주입 기간은 약 15분이다. 한 봉지 또는 두 봉지의 CART-19 변형된 세포는 얼음 위에 놓고, 세포는 차가운 상태로 개체에 투여된다. CART-19 세포의 혼합물을 투여 받은 개체에서, 혼합을 조장하기 위해 상기 세포를 Y-어댑터(Y-adapter)를 이용하여 동시에 투여된다. 개체는 본원의 다른 부분에서 개시된 바와 같이 주입하여 예비 마취시킨다. 개체의 생명 징후가 평가되고, 산소포화도 측정법(pulse oximetry)은 복용 이전, 주입이 끝날 무렵, 및 그 이후에 1시간 동안 매 15분마다 수행되며, 이들이 안정하고 만족스러울 때까지 수행된다. 기준선 CART-19의 수준을 결정하기 위한 혈액 샘플은 주입 전 및 주입 20분 후에 수집된다. 이들 전술한 세포 감소 화학요법으로부터 독성을 경험한 환자는 이들 독성이 해결될 때까지 이들의 주입 스케줄을 연기하였다. T 세포 주입의 지연을 허용케 하는 특정 독성으로는 1) 폐: 95% 초과 포화도 또는 진행성인 흉부 X선 상의 방사선학적 이상의 존재 유지하기 위해 보충 산소에 대한 요건; 2) 심장: 의학적인 관리에 의해 제어되지 않는 새로운 심장성 부정맥; 3) 혈압증진 지지체(pressor support)가 요구되는 저혈압; 및 4) 활성 감염: T 세포의 주입 48시간 이내의 박테리아, 진균 또는 바이러스용 양성 혈액 배양을 들 수 있다. 칼륨 및 요산용 혈청 샘플은 첫 번째 주입 이전에 수집하고, 또한 후속적인 각각의 주입 2시간 후에 수집한다.

[0394] 이식 및 존속을 평가하기 위한 주입 후의 실험실

[0395] 개체는 초기 CART-19 세포의 주입 후 4일째 및 10일째 날에 내원하여 혈청 사이토카인 수준을 위해 채혈을 하였고, CART-19 세포의 부재를 평가하기 위해 CART-19 PCR을 수행하였다. 개체는 3주 동안 1주에 1회씩 내원하여 신체검사, 위해 사건의 문서화, 및 혈액학, 화학, CART-19 세포의 이식 및 존속 및 연구 실험을 위한 채혈을 실시한다.

[0396] 두 번째 주입

[0397] 임의의 특정한 이론에 결부되지 않기를 바라면서, 환자가 첫 번째 복용량에 대해 적절한 내성을 나타내고 충분한 CART-19 세포가 제조되었다면 CART-19 세포의 두 번째 복용량이 11일째 날에 환자에 제공될 수 있는 것으로 여겨진다. 복용량은 총 2 내지 5×10^9 개의 세포이다. 칼륨 및 요산용 혈청 샘플은 상기 주입 2시간 후에 수집될 수 있다.

[0399] 두 번째 아페레시스

[0400] 2ℓ의 아페레시스 과정은 아페레시스 센터에서 수행된다. PBMC는 연구용으로 수득되고, 냉동 보존된다. 개체는 신체검사, 위해 사건의 문서화, 및 혈액학, 화학, CART-19 세포의 이식 및 존속 및 연구 실험을 위한 채혈을 실시한다. 또한 중앙 부하의 측정을 제공하기 위해 재등급화가 수행된다. 재등급화 검사는 질병 유형에 의해 결정되며, 이미지화, MRD 평가, 골수 흡인물 및 생검 및/또는 림프절 생검을 포함한다.

[0402] 주입 2 내지 6개월 후의 월별 평가

- [0403] 개체는 CART-19 세포의 주입 후 2 내지 6개월 기간 동안에 매월 내원한다. 이들 연구 방문에서 개체는 병용 약물치료, 신체검사, 위해 사건의 문서화, 및 혈액학, 화학, CART-19 세포의 이식 및 존속 및 연구 실험을 위한 채혈을 실시한다. HIV DNA 검정은 검출 가능한 RCL의 존재를 제외시키기 위해 CART-19 세포의 주입 후 2 내지 6개월째 날에 수행된다.
- [0405] 주입 후 최대 2년간 분기 평가
- [0407] *개체는 주입 후 2년이 될 때까지 분기별로 평가를 받는다. 이들 연구 방문에서 개체는 병용 약물치료, 신체검사, 위해 사건의 문서화, 및 혈액학, 화학, CART-19 세포의 이식 및 존속 및 연구 실험을 위한 수혈을 경험한다. HIV DNA 검정은 검출 가능한 RCL의 존재를 제외시키기 위해 CART-19 세포의 주입 후 3개월 및 6개월째 날에 수행된다.
- [0408] 이하 실험 결과가 개시되어 있다.
- [0410] 환자 이력
- [0411] 1996년에 환자는 단계 1의 CLL의 진단을 받았다. 그는 먼저 진행성 백혈구 증가증 및 선병증에 대해 관측한지 6년 이후에 치료를 필요로 하였다. 2002년에 그는 플루다라빈에 더해서 2회의 리투시맵으로 치료를 받았지만, 이러한 치료는 혈액 개수의 정상화 및 선병증의 부분적인 치유를 초래하였다. 2006년에 그는 다시 혈액 개수의 정상화 및 선병증의 부분적인 퇴화와 함께 질병의 진행으로 인해 4회의 리투시맵 및 플루다라빈을 투여 받았다. 이러한 반응은 20개월간 진행이 없는 기간 및 2년간 치료가 없는 기간이 이어졌다. 2009년 2월에 그는 신속 진행성 백혈구 증가증 및 재발성 선병증을 나타냈다. 그의 골수는 CLL에 의해 광범위하게 침윤되어 있었다. 세포유전학 분석에 따르면, 15개의 세포 중 3개의 세포가 염색체 17p의 결실을 포함하는 것으로 나타났고, 형광 원위치 혼성화(FISH) 검사에 따르면 200개의 세포 중 170개의 세포가 염색체 17p 상의 *TP53*을 포함한 결실을 가졌다. 그는 (심각한 알레르기 반응으로 인해) 리투시맵 없이 1회 및 부가적인 3회의 벤다무스틴의 투여에 대해 벤다무스틴과 함께 리투시맵을 투여 받았다. 이러한 치료는 림프구 증가증에서 일시적인 개선만을 초래하였다. 진행성 선병증은 요법 이후에 컴퓨터 단층 촬영(CT)에 의해 문서화되었다.
- [0412] 자가성 T 세포는 적혈구 아페레시스에 의해 수집되어, 냉동 보존되었다. 이어 상기 환자는 개선된 조혈 및 선병증의 부분적인 치유로 인해 11주 동안 알렘투주맵(항-CD52/성숙한 림프구/세포 표면 항원)을 투여 받았다. 다음 6개월에 걸쳐 그는 지속적이고 광범위한 골수 연루와 함께 안정한 질병을 나타냈고, 1 내지 3cm 크기의 다중 림프절과 함께 확산성 선병증을 나타냈다. 2010년 7월에 상기 환자는 키메릭 항원 수용체 변형 T 세포의 단계 1 임상 시험에 등록하였다.
- [0413] 세포 주입
- [0414] 상기 환자로부터의 자가성 T 세포를 해동하고, CD19 특이적 키메릭 항원 수용체를 발현하기 위해 렌티바이러스로 형질 도입하였으며(도 12A), 티바이러스 벡터 및 관련된 서열을 위한 서열 식별자는 표 5에 나타나 있다. 세포 주입 4일 전에 상기 환자는 리투시맵의 투여 없이 림프구의 고갈을 위해 설계된 화학요법(1m²의 체표면 구역 당 4mg의 복용량의 펜토스타틴 및 1m²의 체표면 구역 당 600mg의 복용량의 싸이클로포스파이드)을 투여 받았다(Lamanna 등, 2006, *J Clin Oncol.* 24: 1575-81). 화학요법 3일 후지만 세포 주입 이전에 골수는 CLL에 의한 약 40%의 연루로 과세포성이었다. 백혈병 세포는 카파 경쇄 및 CD5, CD19, CD20, 및 CD23을 발현하였다. 세포유전학 분석에 따르면, 2개의 개별적인 클론이 나타났으며, 둘 모두는 염색체 17p의 손실을 초래하고, *TP53* 좌위(locus)인 (46,XY,del(17)(p12)[5]/46,XY,der(17)t(17;21)(q10;q10)[5]/46,XY[14])를 초래하였다. 화학요법 4일 후, 상기 환자는 3회 연속 정맥 내 1일 주입(1일째 날에 10%, 2일째 날에 30%, 및 3일째 날에 60%)으로 분할된 총 1.42×10^7 개의 형질 도입된 세포(1kg 당 1.46×10^5 개의 세포)를 얻기 위해 총 3×10^8 개의 T 세포를 투여 받았으며, 상기 세포 중 5%는 형질 도입되었다. 주입 이후에는 어떠한 사이토카인도 투여되지 않았다. 주입에 의한 독성 효과는 현저하지 않았다.

표 5

[0416]

pELPS-CD19-BBz 전달 벡터에 대한 서열 식별자	
서열번호	동일성
서열번호 1	pELPS-CD19-BBz 전달 벡터(핵산 서열)
서열번호 2	RSV의 U3(핵산 서열)
서열번호 3	HIV R 반복서열(핵산 서열)
서열번호 4	HIV U5 반복서열(핵산 서열)
서열번호 5	부분 Gag/Pol(핵산 서열)
서열번호 6	cPPT(핵산 서열)
서열번호 7	EF1 α 프로모터(핵산 서열)
서열번호 8	CD19-BB제타 CAR(핵산 서열)
서열번호 9	Hu 우드치크 PRE(핵산 서열)
서열번호 10	R 반복서열(핵산 서열)
서열번호 11	U5 반복서열(핵산 서열)
서열번호 12	CD19-BB제타 CAR(아미노산 서열)
서열번호 13	CD8 리더(핵산 서열)
서열번호 14	항-CD19scFv(핵산 서열)
서열번호 15	CD8 힌지(핵산 서열)
서열번호 16	CD8 횡단막(핵산 서열)
서열번호 17	4-1BB(핵산 서열)
서열번호 18	CD3제타(핵산 서열)
서열번호 19	CD8 리더(아미노산 서열)
서열번호 20	항-CD19scFv(아미노산 서열)
서열번호 21	CD8 힌지(아미노산 서열)
서열번호 22	CD8 횡단막(아미노산 서열)
서열번호 23	4-1BB(아미노산 서열)
서열번호 24	CD3제타(아미노산 서열)

[0417]

임상적 반응 및 평가 첫 번째 주입 후 14일째, 환자는 2등급의 피로와 연관된 오한 및 약간의 신열이 나타나기 시작했다. 다음 5일에 걸쳐 오한이 증대했고, 그의 체온은 39.2°C(102.5°F)까지 상승하였으며, 오한, 발한, 식욕감퇴, 메스꺼움 및 설사가 발병하였다. 그는 호흡기 또는 심장 증후군을 나타내지 않았다. 신열로 인해 흉부 방사선 촬영 및 혈액, 소변 및 대변 배양을 수행하였으며, 모두 음성이거나 정상이었다. 종양 용해 증후군은 주입 후 22일째 날에 진단 받았다(도 12B). 요산 수준은 1dl 당 10.6mg(1ℓ 당 630.5μmol)이고, 인 수준은 1dl 당 4.7mg(1ℓ 당 1.5mmol)이고(정상 범위는 1ℓ 당 2.4 내지 4.7mg[1ℓ 당 0.8 내지 1.5mmol]임), 젖산 탈수소 효소 수준은 1ℓ 당 1,130U이다(정상 범위는 98 내지 192U임). 급성 신장 손상의 흔적은 없었으며, 이때 크레아틴 수준은 1dl 당 2.60mg(1ℓ 당 229.8μmol)이다(기준선 수준은 1dl 당 1.0mg 미만[1ℓ 당 88.4μmol 미만]임). 상기 환자는 입원하여, 유체 소생법 및 라스부리카제로 치료를 받았다. 상기 요산 수준은 24시간 이내에 정상 수준으로 되돌아 왔으며, 상기 크레아틴 수준은 3일 이내에 정상 수준으로 되돌아 왔고, 그는 입원 4일째 날에 퇴원하였다. 상기 젖산 탈수소효소 수준은 점진적으로 감소하여 다음 1개월에 걸쳐 정상이 되었다. CART19-세포의 주입 후 28일째 날 정도에, 선병증은 더 이상 촉진성이 아니었으며, 23일째 날에 골수에서 CLL의 흔적이 없었다(도 12C). 핵형은 15개의 세포(46,XY) 중 15개 세포에서 현재 정상이며, FISH 검사는 검증된 200개의 세포 중 198개의 세포에서 TP53의 결실에 대해 음성이었지만, 이는 음성 대조군에서 정상적인 제한치 내에 있는 것으로 고려된다. 유동 세포 분석에 따르면, 어떠한 잔류 CLL도 나타나지 않았으며, B 세포는 검출 불가능하였다(CD5 + CD10 - CD19 + CD23 + 림프구 게이트 내의 세포의 1% 미만). 주입 후 31일째 날에 수행된 CT 스캐닝에 따르면, 선병증의 치유가 나타났다(도 12D). CART19-세포의 주입 3개월 및 6개월 이후에 신체검사는 촉진성 선병증 없이 평범한 상태가 유지되었으며, CART19-세포의 주입 3개월째 날에 수행된 CT 스캐닝에 따르면 지속된 완화가 나타났다(도 12D). 3개월 및 6개월 동안의 골수 연구에 따르면, 형태학적 분석, 핵형 분석(46,XY) 또는 유동 세포 분석에 의한 CLL의 흔적은 없는 것으로 나타났으며, 정상 B 세포의 결핍도 또한 계속되었다. 완화는 10개월 동안 지속되었다.

[0419]

CART19 세포의 독성

[0420] 세포 주입은 급성 독성 효과를 나타나지 않았다. 언급된 유일한 심각한(3 또는 4등급) 위해 사건은 상술한 3등급의 종양 용해 증후군이었다. 상기 환자는 기준선에서 1등급의 림프구 감소증 및 2 또는 3등급의 림프구 감소증을 나타냈으며, 이는 요법 이후 첫째 날에 시작하여 적어도 10개월째 날까지 계속되었다. 1mm³ 당 140개의 세포의 절대 림프구 개수를 갖는 4등급의 림프구 감소증이 19일째 날에 기록되었으며, 22일째 날로부터 적어도 10개월째 날까지 상기 절대 림프구 개수는 1mm³ 당 390 내지 780개의 세포 범위였다(2 또는 3등급의 림프구 감소증). 상기 환자는 19일째 날로부터 26일째 날까지 일시적인 1등급의 혈소판 감소증(혈소판 개수: mm³ 당 98,000 내지 131,000개의 세포)을 나타냈으며, 17일째 날로부터 33일째 날까지 1 또는 2등급의 호중구 감소증(절대 호중구 개수: mm³ 당 1,090 내지 1,630개의 세포)을 나타냈다. 상기 연구 치료와 관련이 있을 가능성이 있는 기타 징후 및 증상은 아미노전달효소 및 알카라인 포스파타제 수준에서 1 및 2등급 증가를 포함하며, 이는 첫 번째 주입 17일째 발병하여 33일째 정도에 치유되었다. 1 및 2등급의 신체 증상은 신열, 오한, 발한, 근육통, 두통 및 피로로 이루어져 있다. 2등급의 저감마글로불린 혈증은 정맥 내 면역 글로불린의 주입으로 치료되었다.

[0422] 혈청 및 골수 사이토카인의 분석

[0423] 환자의 임상적 반응은 기준선 수준에 비해 160배 높은 인터페론- γ , 인터페론- γ 반응성 케모카인인 CXCL9 및 CXCL10, 및 인터류킨-6의 수준과 함께 염증성 사이토카인의 수준에서의 지연된 증가가 동반되었다. 사이토카인 수준에서의 일시적인 증가는 임상적 증상에 필적하였으며, 첫 번째 CART19-세포의 주입 17 내지 23일째 날에 정점에 도달했다.

[0424] 일련의 골수 흡인물로부터의 상층액은 사이토카인에 대해 측정하였으며, 면역 활성화의 흔적이 나타났다(도 13E). 인터페론- γ , CXCL9, 인터류킨-6 및 가용성 인터류킨-2 수용체의 유의한 증가는 T-세포 주입 전 당일 날에 기준선 수준과 비교해서 현저하였지만, 상기 피크 값은 첫 번째 CART19-세포 주입 후 23일째 날에 정점에 도달했다. 골수 사이토카인의 증가는 골수로부터 백혈병 세포의 제거와 일치하였다. 혈청 및 골수의 종양 괴사 인자 α 는 변함없이 유지되었다.

[0426] 키메라 항원 수용체 T 세포의 증식 및 존속

[0427] 첫 번째 주입 이후 첫째 날에 시작하여 실시간 PCR을 통해 항-CD19 키메라 항원 수용체(CAR19)를 암호화하는 DNA를 검출하였다(도 14A). 상기 세포의 생체 내 3의 로그 이상의 확장은 주입 21일째 날에 현저하였다. 피크 수준에서 혈액 내의 CART19 세포는 순환성 림프구의 20% 이상을 차지하고 있지만, 이들 피크 수준은 체질 증상의 발생, 종양 용해 증후군(도 12B), 및 혈청 사이토카인 수준에서의 증가(도 13A 내지 도 13D)와 일치하였다. CART19 세포는 상기 값이 피크 수준에서 10의 인수 정도 감소하였을지라도 주입 6개월 이후에도 높은 수준으로 검출 가능한 상태로 유지되었다. 혈액 내의 키메라 항원 수용체 T 세포의 배가 시간은 약 1.2일이며, 제거 반감기는 31일이었다.

[0429] 골수 내의 키메라 항원 수용체 T 세포

[0430] CART19 세포는 첫 번째 주입 이후 23일째 날에 시작하여 골수 검체에서 확인되었으며(도 14B), 적어도 6개월 동안 존속하였으며, 감쇄 반감기는 34일이었다. 골수에서 CART19 세포의 가장 높은 수준은 첫 번째 주입 23일 이후의 첫 번째 평가에서 확인되었으며, 사이토카인-분비 프로파일에 의해 표시된 바와 같이 면역 반응의 유도과 일치하였다(도 13E). 골수 흡인물의 유동 세포 분석에 따르면, 주입 1개월 이후에 존재하지 않았던 기준선 및 주입 3개월 이후에 수득된 샘플 내의 CD5+CD19+ 세포의 클론성 확장이 나타났다(데이터 미 도시). 정상 B 세포는 치료 이후에는 검출되지 않았다(도 14C).

[0432] 유전적으로 변형된 자가성 CART19 세포에 의한 치료

[0433] CD3-제타 및 CD137(4-1BB) 신호전달 도메인에 연결된 항-CD19를 발현하는 렌티바이러스 벡터에 의한 형질 도입을 통해 CD19를 표적화하도록 유전적으로 변형된 자가성 T 세포에 의한 치료 3주 후에 종양 용해 증후군의 지연된 발현 및 완전한 반응이 본원에 개시되어 있다. 유전적으로 변형된 세포는 주입 이후 적어도 6개월 동안 골수

에서 높은 수준으로 존재하였다. 골수에서 CD19 특이적 면역 반응의 발생은 사이토카인의 일시적인 방출 및 백혈병 세포의 제거에 의해 증명되었으며, 이는 키메라 항원 수용체 T 세포의 피크 침윤과 일치하였다. 세포성 면역 치료요법 이후에 종양 용해 증후군의 발현은 이전에는 보고되지 않았다(Baeksgaard 등, 2003, *Cancer Chemother Pharmacol.* 51: 187-92).

[0434] 표적 특정 종양 항원에 대한 자가성 T 세포의 유전자 조작은 암 요법에 있어서 매력적인 전략이다(Sadelain 등, 2009, *Curr Opin Immunol.* 21: 215-23; Jena 등, 2010, *Blood* 116: 1035-44). 본원에 개시된 접근법의 중요한 특징은 메릭 항원 수용체 T 세포가 HLA 무제한 방식으로 종양 표적을 인식할 수 있어, "맞춤형" 키메라 항원 수용체가 매우 다양한 조직학적 특징을 갖는 종양에 대해 구성될 수 있다는 것이다. HIV 유래 렌티바이러스 벡터는 레트로바이러스성 벡터의 사용에 대해 몇몇 이점을 가질 수 있는 접근법인 암 요법용으로 사용되었다(June 등, 2009, *Nat Rev Immunol.* 9: 704-16).

[0435] 키메라 항원 수용체 T 세포에 대한 이전 시험에서, 객관적인 종양 반응은 경미하였으며, 변형된 세포의 생체 내 증식은 지속되지 않았다(Kershaw 등, 2006, *Clin Cancer Res.* 12: 6106-15; Ti11 등, 2008, *Blood* 112: 2261-71; Pule 등, 2008, *Nat Med.* 14: 1264-70). 브렌헨스(Brentjens) 및 동료들은 CD28 신호전달 도메인에 연결된 CD19-표적화된 키메라 항원 수용체에 대한 임상 시험의 예비 결과를 보고하고, 진전된 CLL을 앓는 3명의 환자 중 2명에서 일시적인 종양 반응을 발견하였지만(Brentjens 등, 2010, *Mol Ther.* 18: 666-8), 키메라 항원 수용체는 순환으로부터 신속하게 사라졌다.

[0436] 매우 낮은 복용량으로 주입된 키메라 항원 수용체 T 세포는 임상적으로 명백한 항-종양 반응을 초래할 수 있다는 것이 예상치 못한 것이었다. 실제로, 1kg 당 주입된 1.5×10^5 개의 키메라 항원 수용체 T 세포의 복용량은 키메라 항원 수용체 또는 유전자 도입 T-세포 수용체를 발현하도록 변형된 T 세포에 대한 이전 연구에서 사용된 복용량보다 수십 배 낮았다(Kershaw 등, 2006, *Clin Cancer Res.* 12: 6106-15; Brentjens 등, 2010, *Mol Ther.* 18: 666-8; Morgan 등, 2010, *Mol Ther.* 18: 843-51; Johnson 등, 2009, *Blood*, 114: 535-46). 임의의 특정한 이론에 대한 결부 없이, 화학요법은 키메라 항원 수용체의 효과를 증강시킬 수 있는 것으로 사료된다.

[0437] 4-1BB 신호전달 도메인의 포함함으로써 환자의 혈액 및 골수에서 CART19세포가 장기간 존속하게 된다. 정상 B 세포의 CART19-세포 매개 제거는 쥐 서열을 포함하는 단일쇄 Fv 항체 단편을 발현하는 CART19 세포가 거부 반응을 일으키지 않기 때문에 키메라 항원 수용체에 대한 면역학적 내성의 유도를 조장하였을 가능성이 있다. 이러한 환자 검출 가능한 CD19 양성 백혈병 세포의 부재라고 가정하면서 임의의 특정한 이론에 결부되지 않는 경우, 상기 키메라 항원 수용체 T 세포의 항상성은 상기 세포들이 골수에서 나타나기 시작함에 따라 초기 B-세포 전구체에 의해 전달된 자극으로부터 적어도 부분적으로 달성되었다는 것이 가능하다. 본 발명은 "메모리" 키메라 항원 수용체 T 세포를 유지하기 위해 새로운 기작이 존재할 수 있다는 발견에 관한 것이다.

[0438] 정상 및 악성 B 세포에 제한된 발현과 함께 CD19가 매력적인 종양 표적일지라도, 키메라 항원 수용체 T 세포의 존속이 장기간 B-세포 결핍을 조정할 수 있다는 관심이 있다. 사실상, 환자에서는 주입 후 6개월 동안 혈액 및 골수에서 B 세포가 존재하지 않았다. 이러한 환자는 재발성 감염을 나타내지 않았다. 리톡시맵을 이용하여 CD20을 통해 B 세포를 표적화하는 것은 B-세포 신생물을 갖는 환자에 있어서는 효과적인 상대적으로 안전한 전략이며, 장기간 B-세포 림프구 감소증은 관리 가능하다(Molina, 2008, *Ann Rev Med*, 59: 237-50]). 리톡시맵으로 치료 받은 환자는 요법의 중단 이후에 수개월 이내에 B 세포의 재발을 나타내는 것으로 보고되어 있다. 항-B-세포 T 세포가 생체 내에서 존속하는 환자에서 이 같은 회복이 일어나는 지에 대해서는 아직 명확하지 않다.

[0439] TP53 결실과 함께 CLL을 앓는 환자는 표준 요법 이후에 잠시 동안 완화된다(Dohner 등, 1995, *Blood*, 85: 1580-9). 동종성 골수 이식은 진전된 CLL을 앓는 환자에서 장기간의 완화를 유도했던 유리한 접근법이었다(Gribben 등, 2011, *Biol Blood Marrow Transplant*, 17: Suppl: S63-S70). 그러나 상기 얻어진 강력한 이식편대 종양 효과는 종종 노인 환자, 즉 CLL에 전형적으로 감염된 환자에서 특히 심각한 고빈도의 만성 이식편대 숙주 질병으로 인한 상당한 이병률과 연관이 있다(Gribben 등, 2011, *Biol Blood Marrow Transplant*, 17: Suppl: S63-S70; Sorror 등, 2008, *Blood*, 111: 446-52). 본원에서 제시된 데이터에 따르면, 유전적으로 변형된 자가성 T 세포는 이러한 제한을 우회할 수 있는 것으로 제안된다.

[0440] 활발한 생체 내 키메라 항원 수용체 T-세포 확장 및 현저한 항백혈병 활성과 조합된 종양 용해 증후군 및 사이토카인 분비의 지연된 개시는 CART19 세포의 실질적이고 지속된 효과를 암시한다. 본원에서 개시된 실험은 이러한 요법의 유효성을 강조하며, 강력한 신호전달 도메인에 연결된 키메라 항원 수용체의 형질 도입을 통해 CD19(및 기타 표적)를 표적화하도록 유전적으로 변형된 자가성 T 세포의 상세한 연구를 위한 지원을 제공한다. 항체 매개 요법과는 달리, 키메라 항원 수용체 변형 T 세포는 생체 내에서 복제할 가능성을 가지며, 장기간

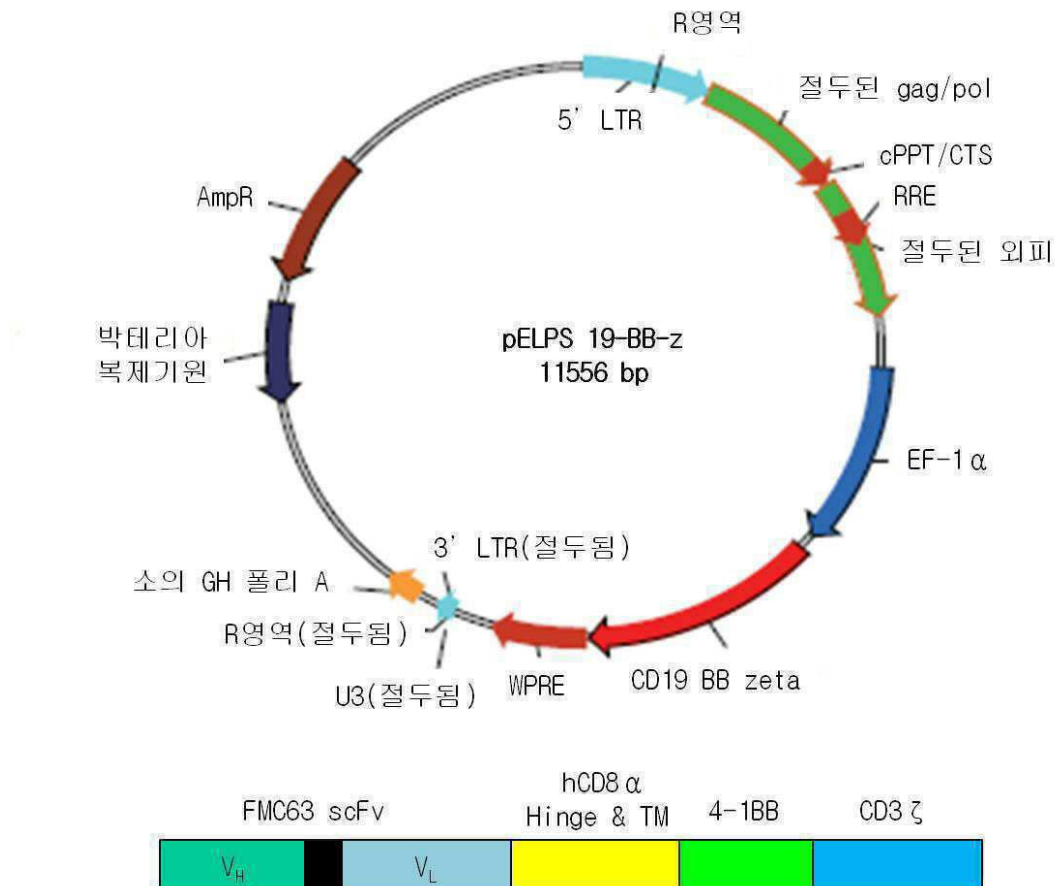
존속은 지속된 중양 제어를 초래할 수 있다. 진전된 CLL을 앓는 2명의 기타 환자는 또한 이러한 프로토콜에 따라 CART19 주입액을 투여 받았으며, 3명 모두는 중양 반응을 나타냈다. 이들 발견은 B-세포 신생물에 대한 CD19-제지향된 T 세포에 대한 계속된 연구를 보장한다.

[0442]

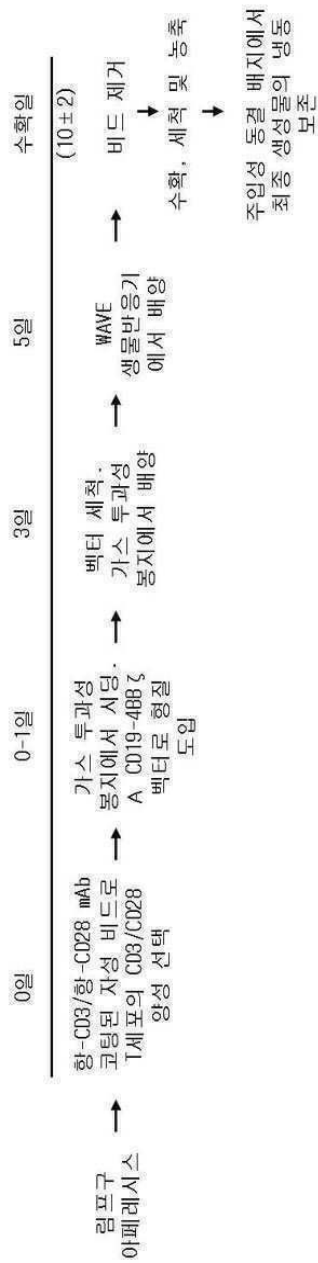
본원에 인용된 각각 및 모든 특허, 특허 출원 및 공개공보의 개시내용은 본원에서 그 전체가 참고로 인용된다. 본 발명이 특정 실시형태를 참고하여 개시되었을지라도, 본 발명의 기타 실시형태 및 변형형태는 본 발명의 진의 및 범주에서 벗어나지 않는 한 당해 기술분야의 기타 숙련자에 의해 고안될 수 있다는 것이 자명하다. 첨부된 특허청구범위는 이 같은 실시형태 및 등가의 변형형태 모두를 포함하는 것으로 이해되도록 의도된다.

도면

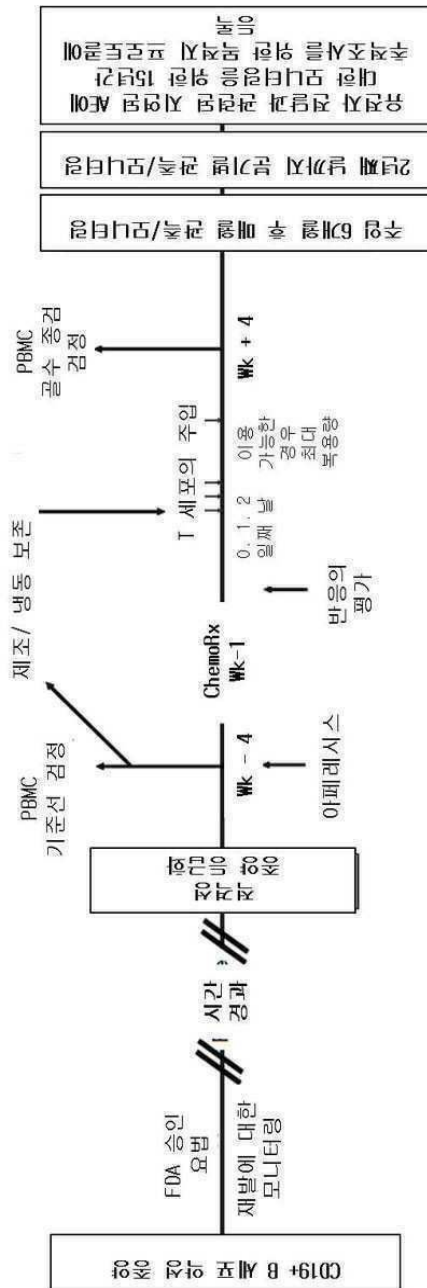
도면1a



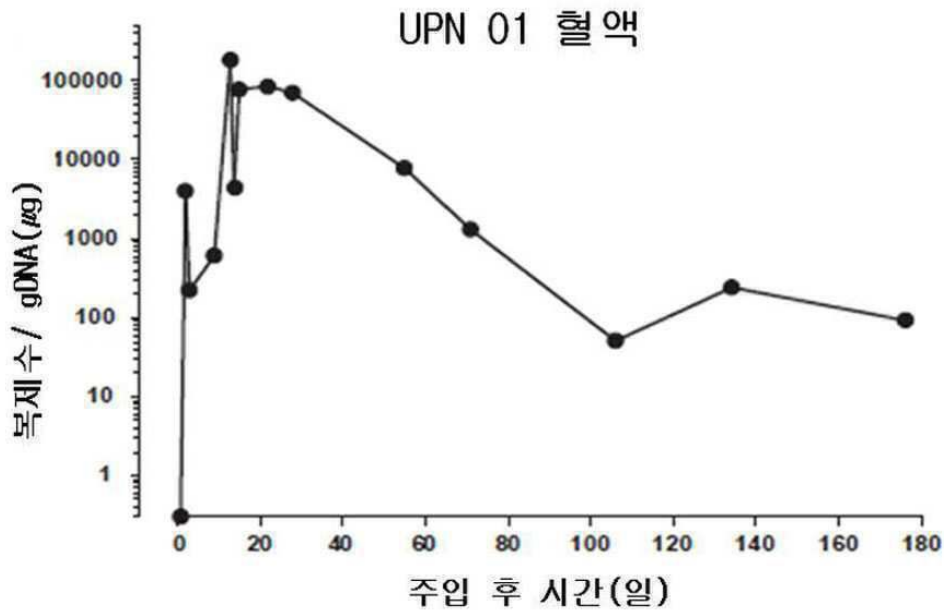
도면1b



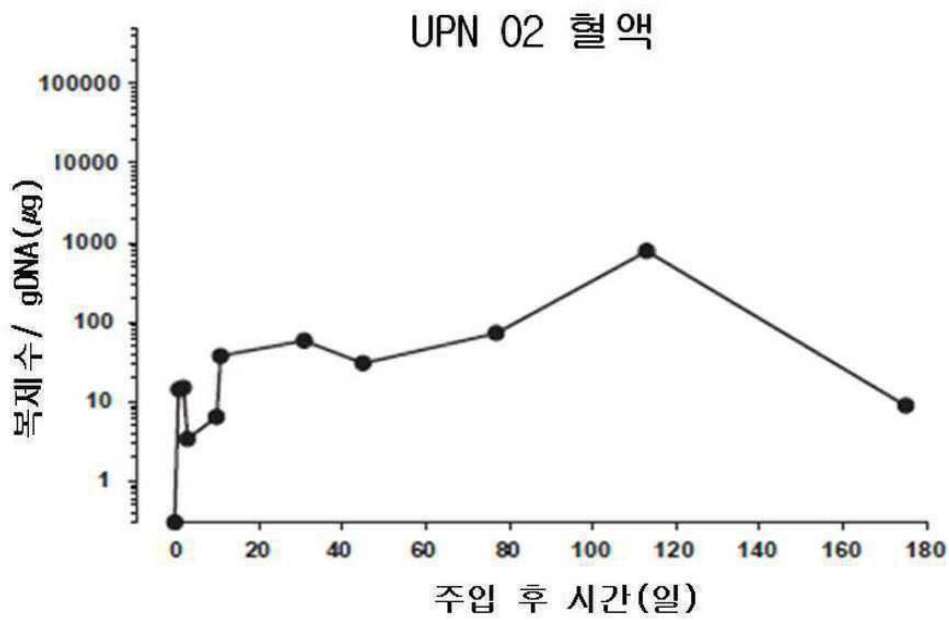
도면1c



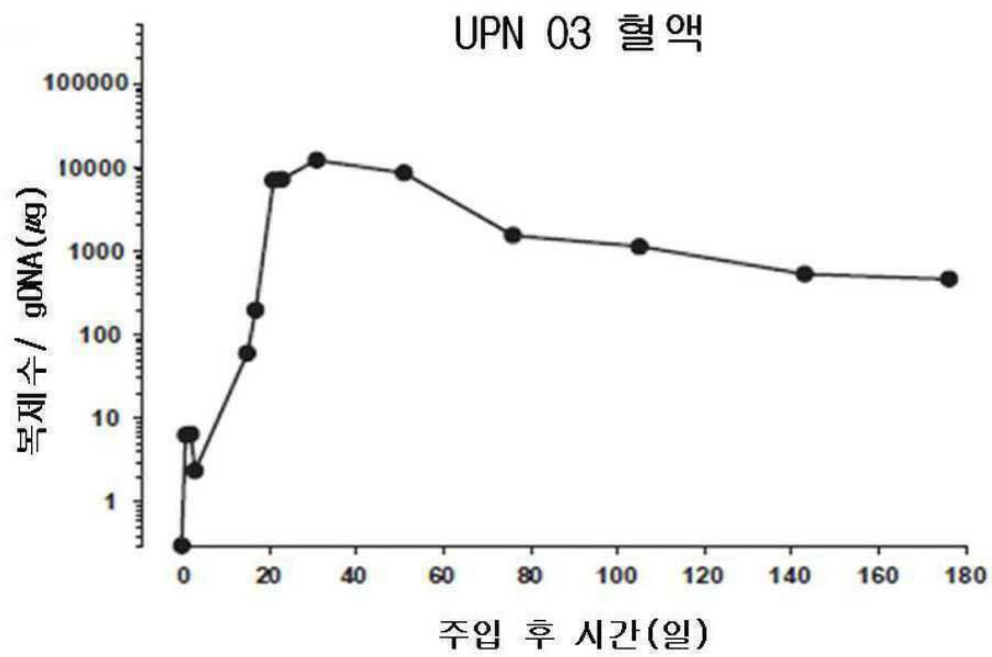
도면2a



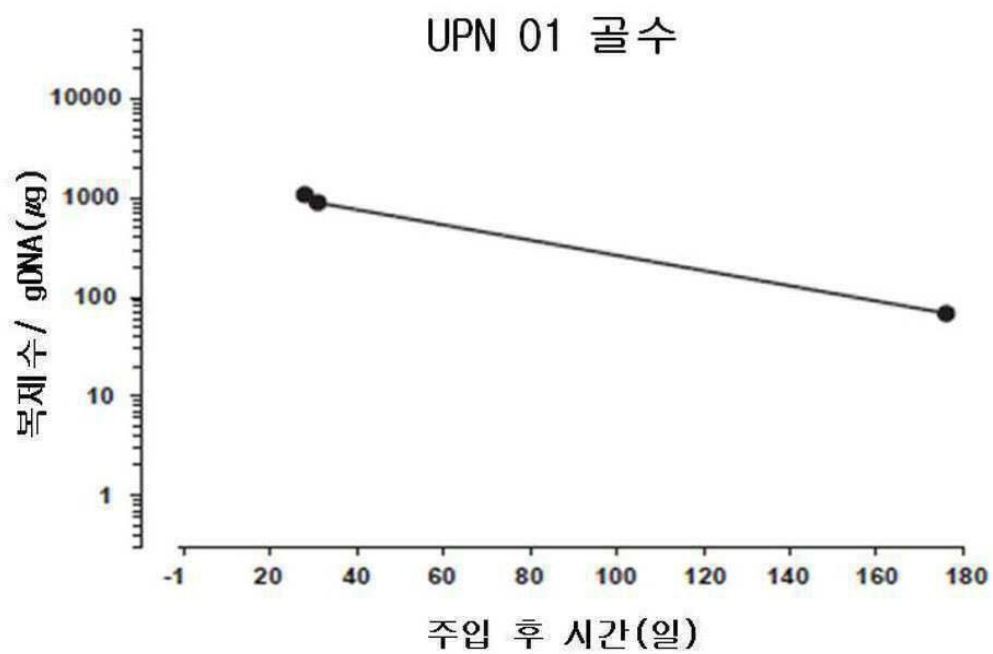
도면2b



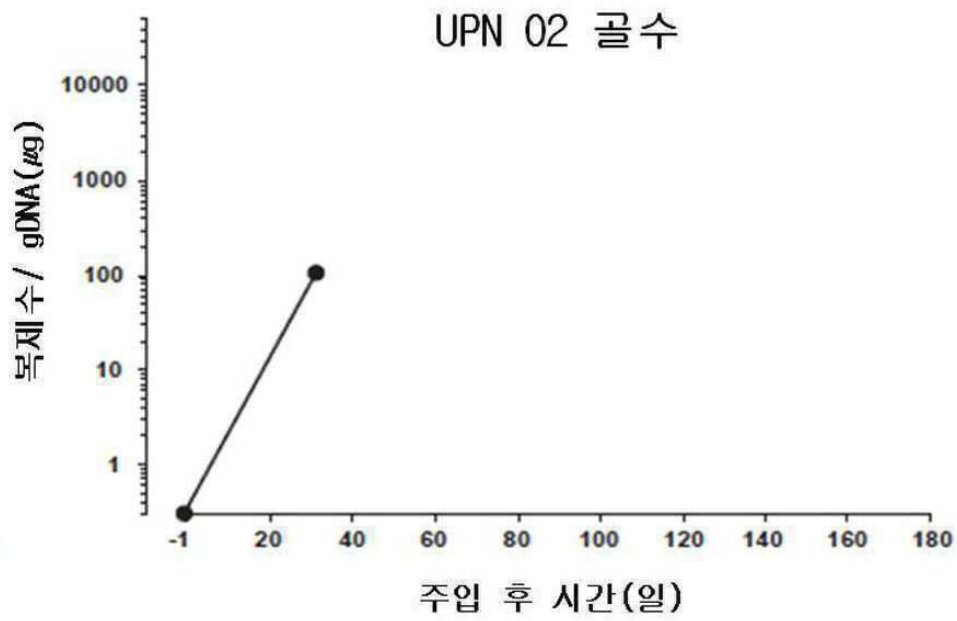
도면2c



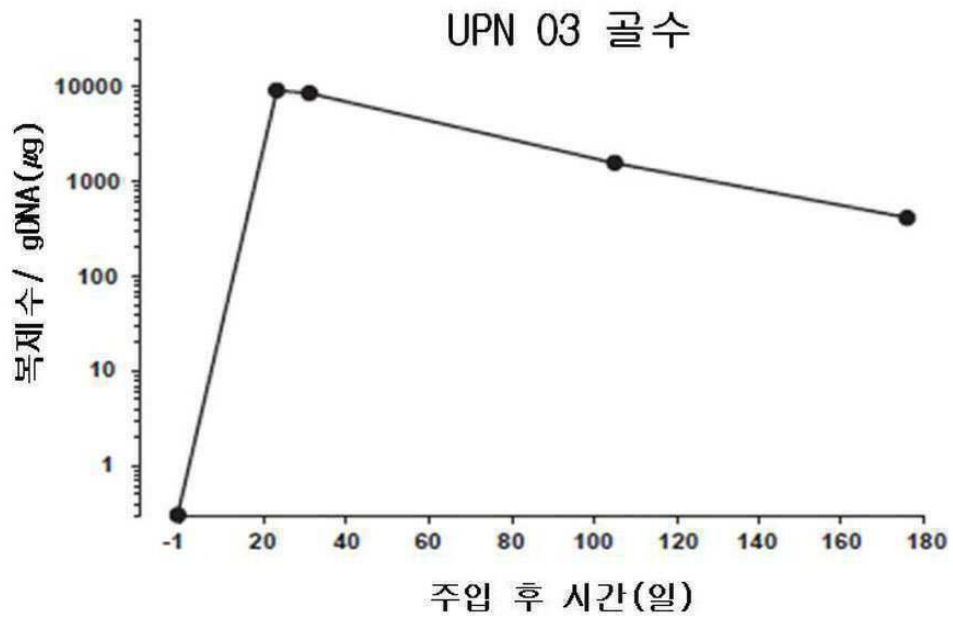
도면2d



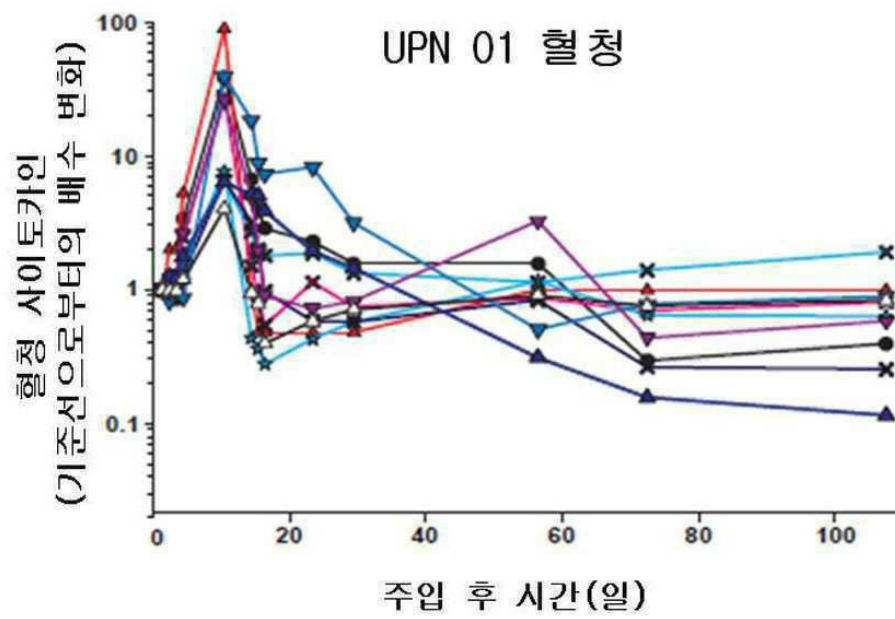
도면2e



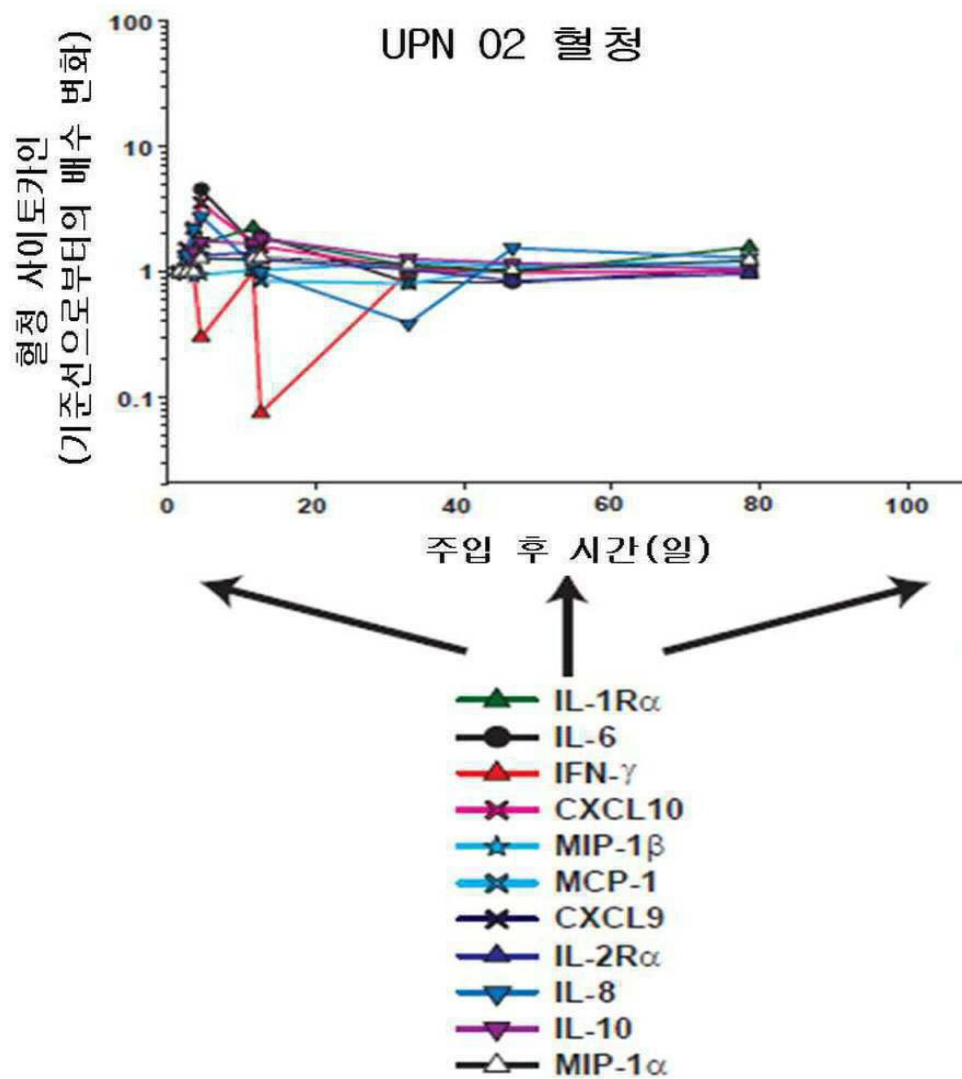
도면2f



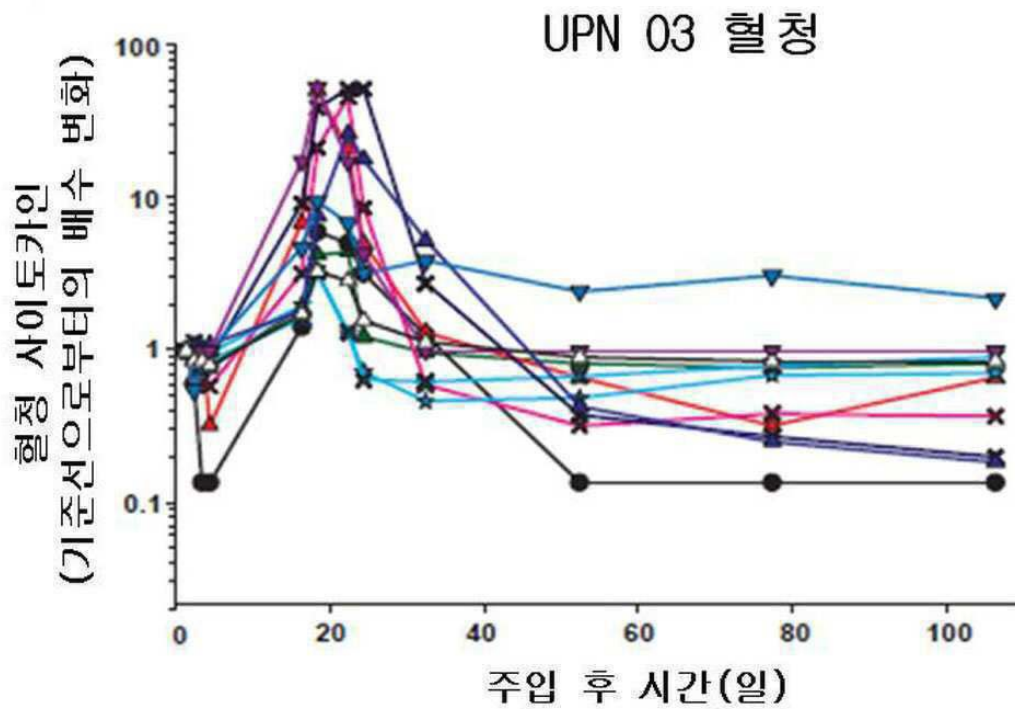
도면3a



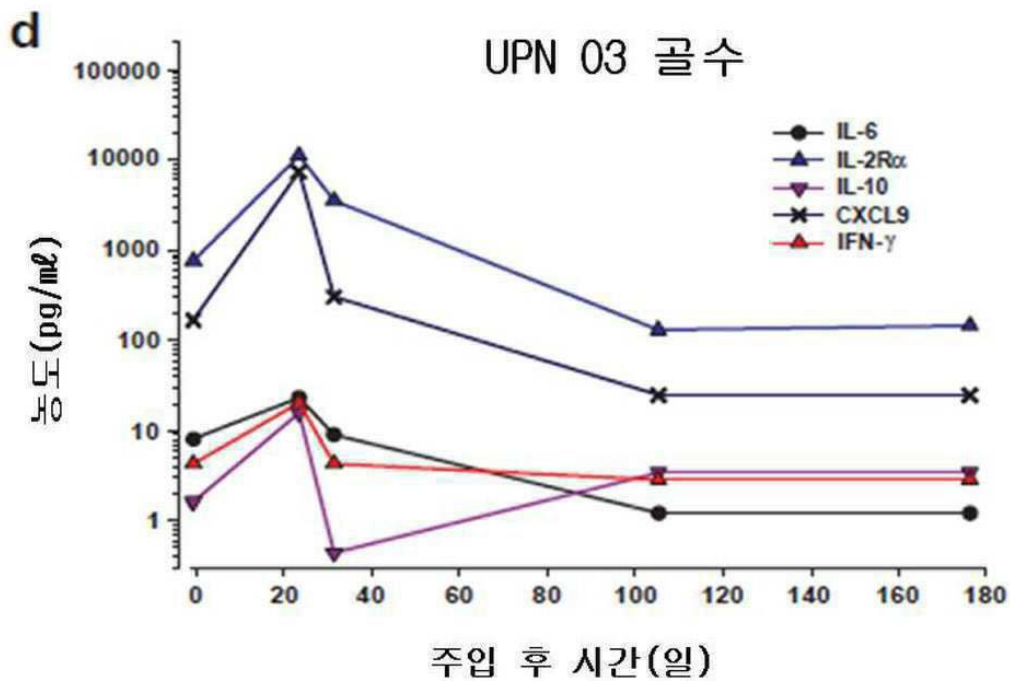
도면3b



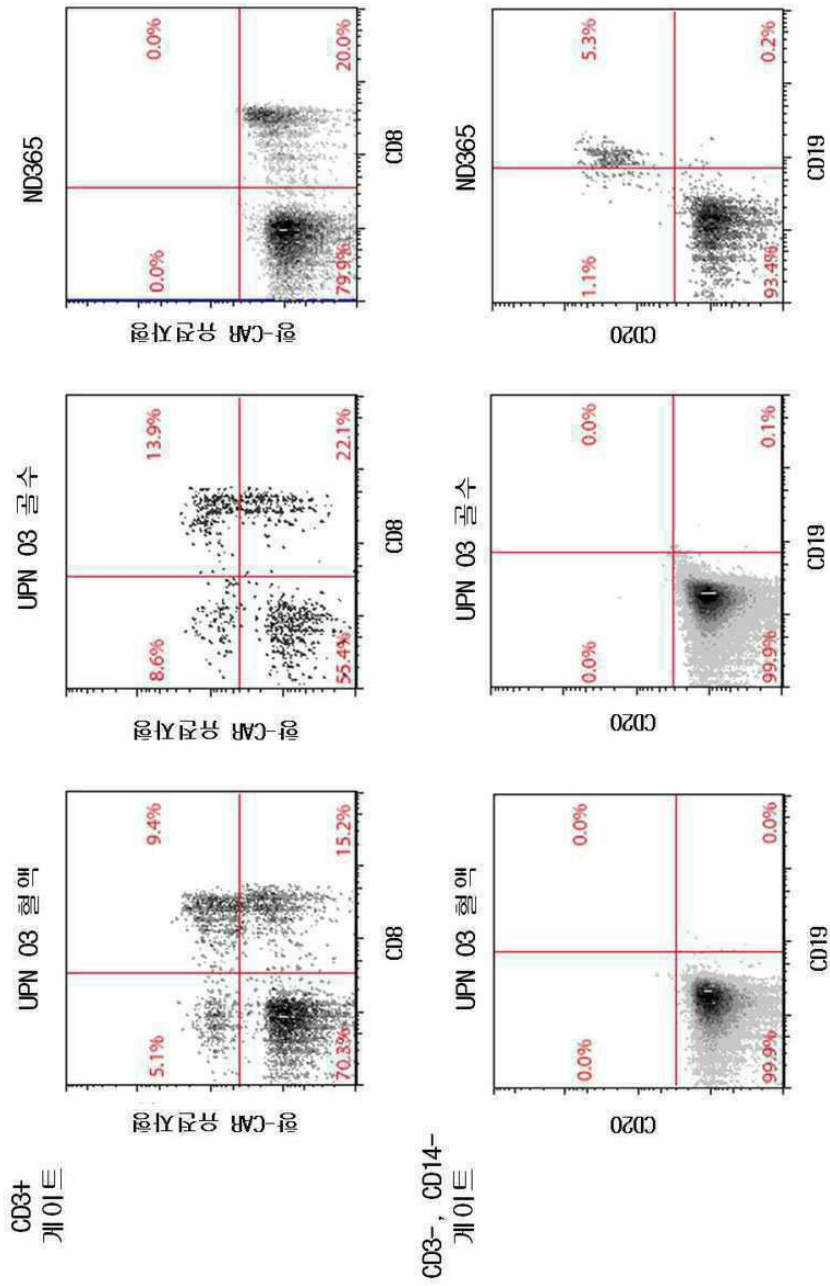
도면3c



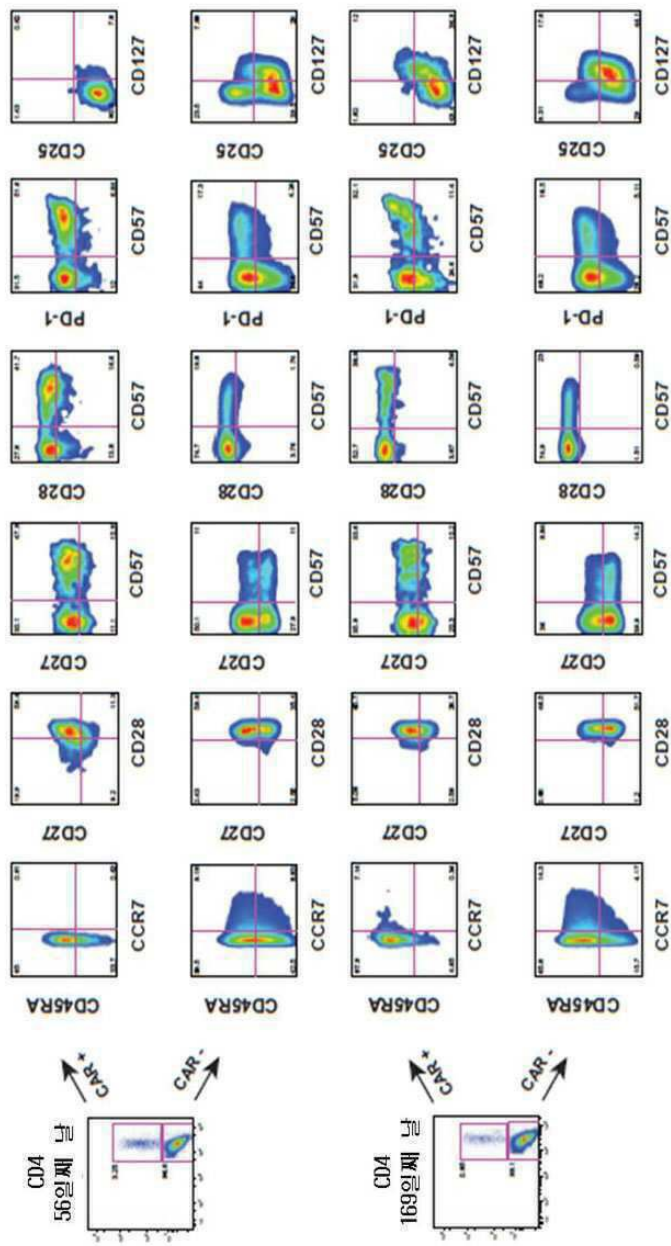
도면3d



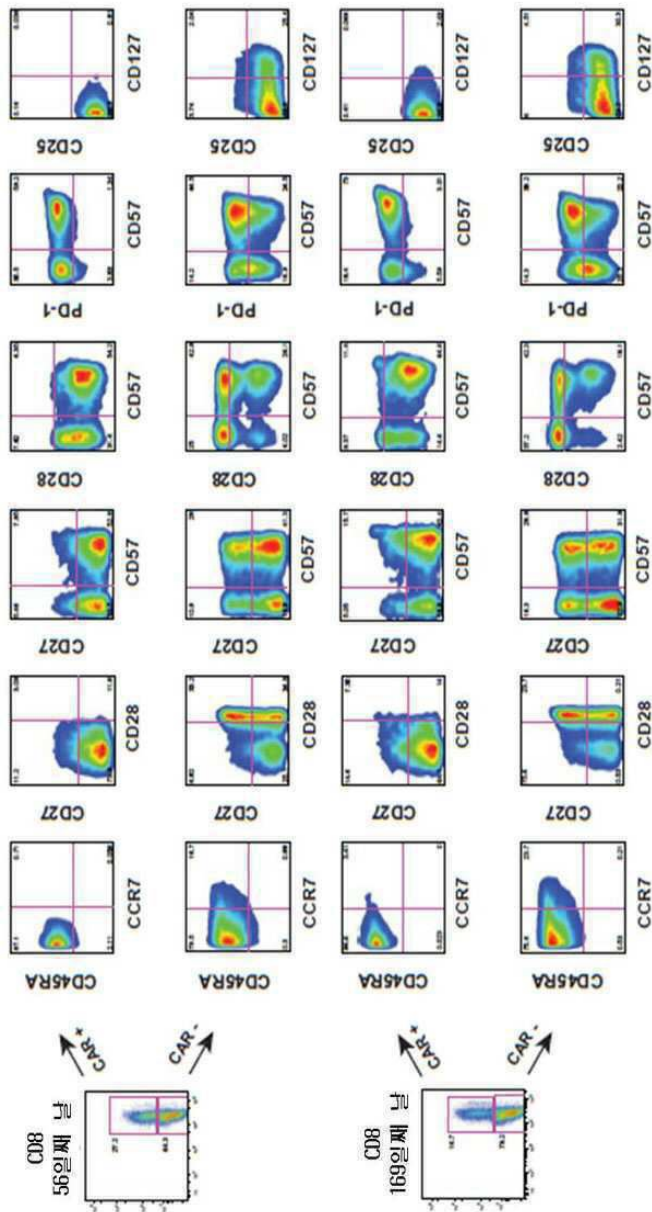
도면4a



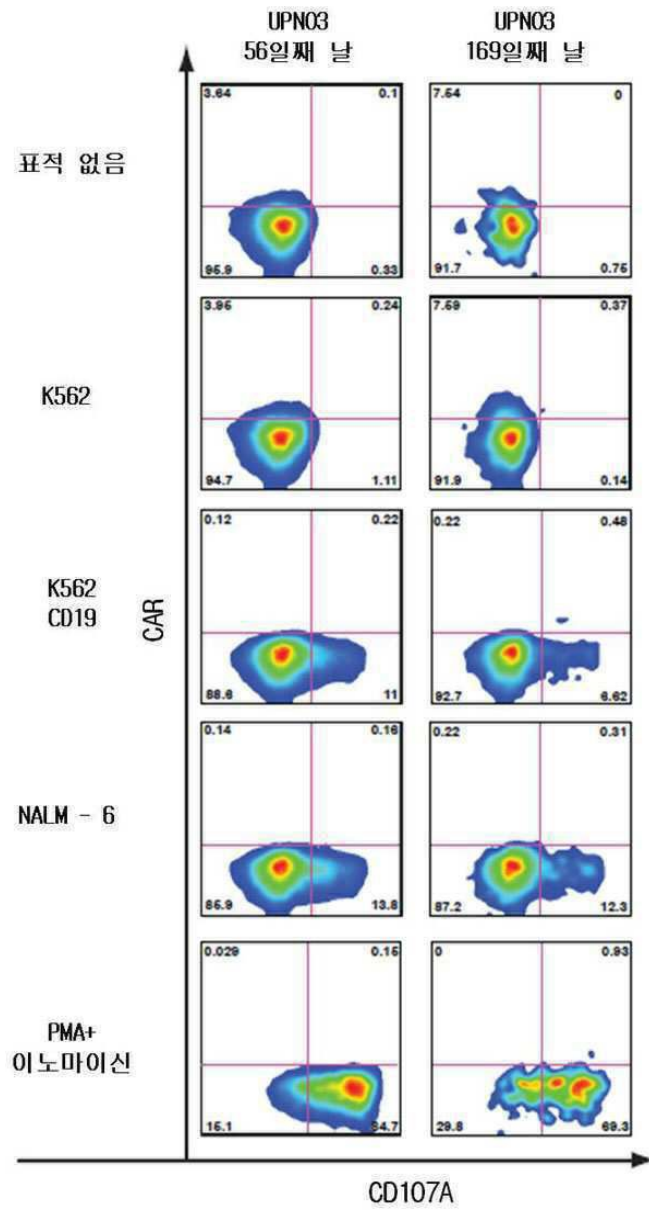
도면4b



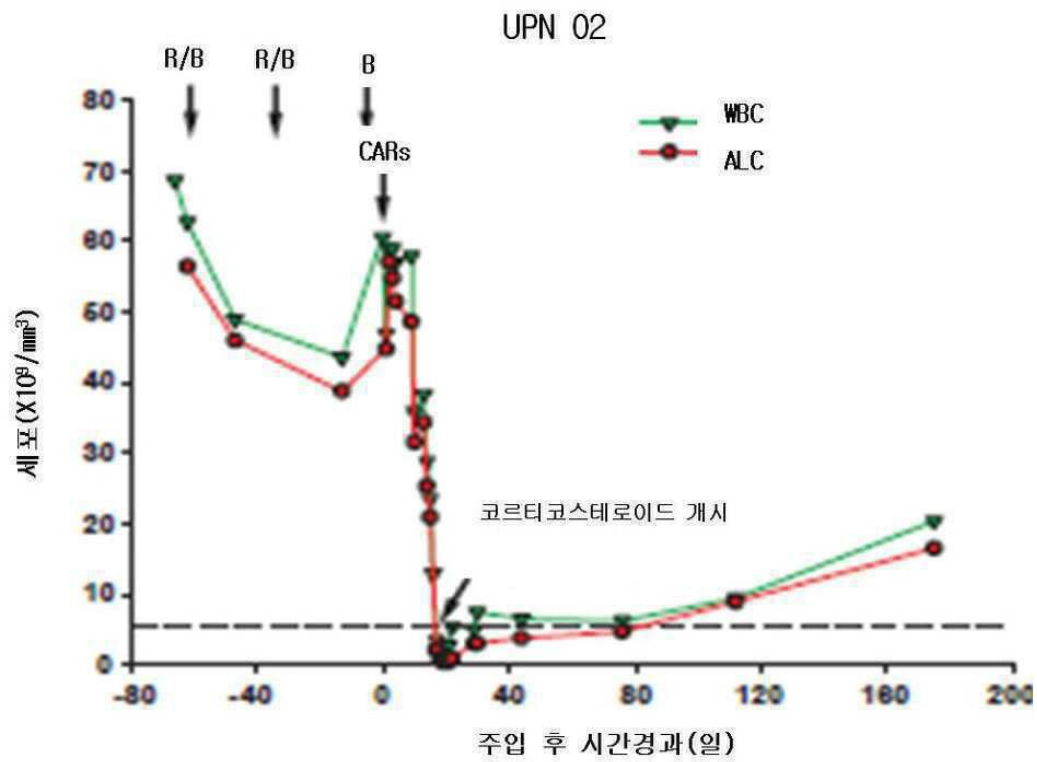
도면4c



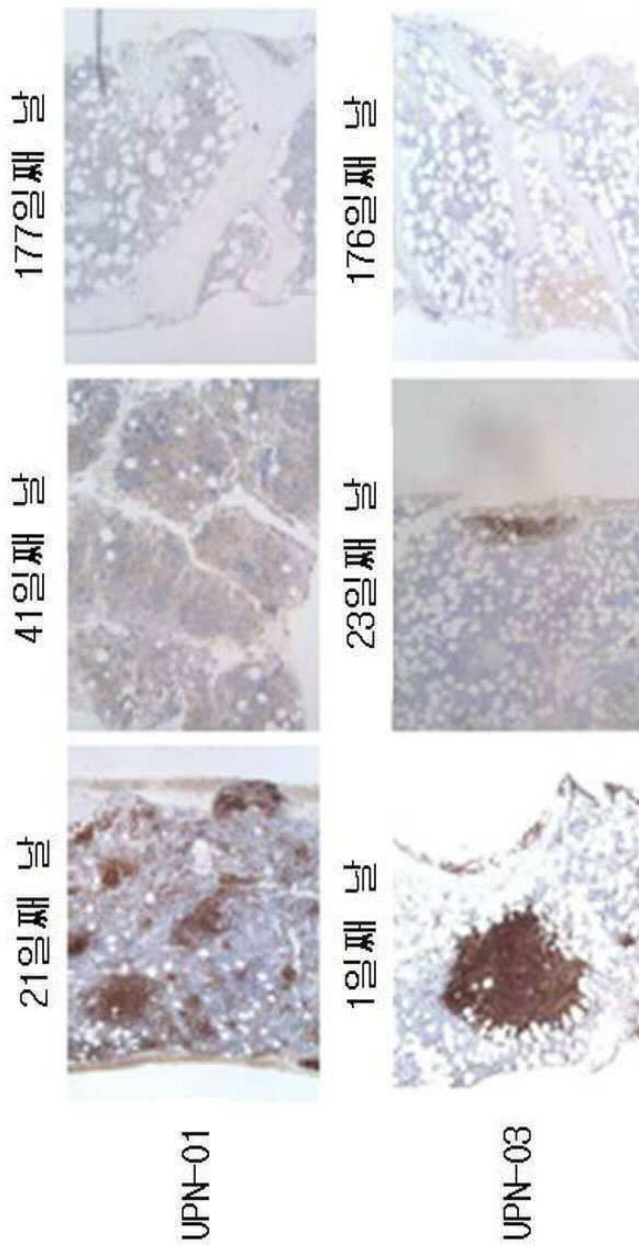
도면4d



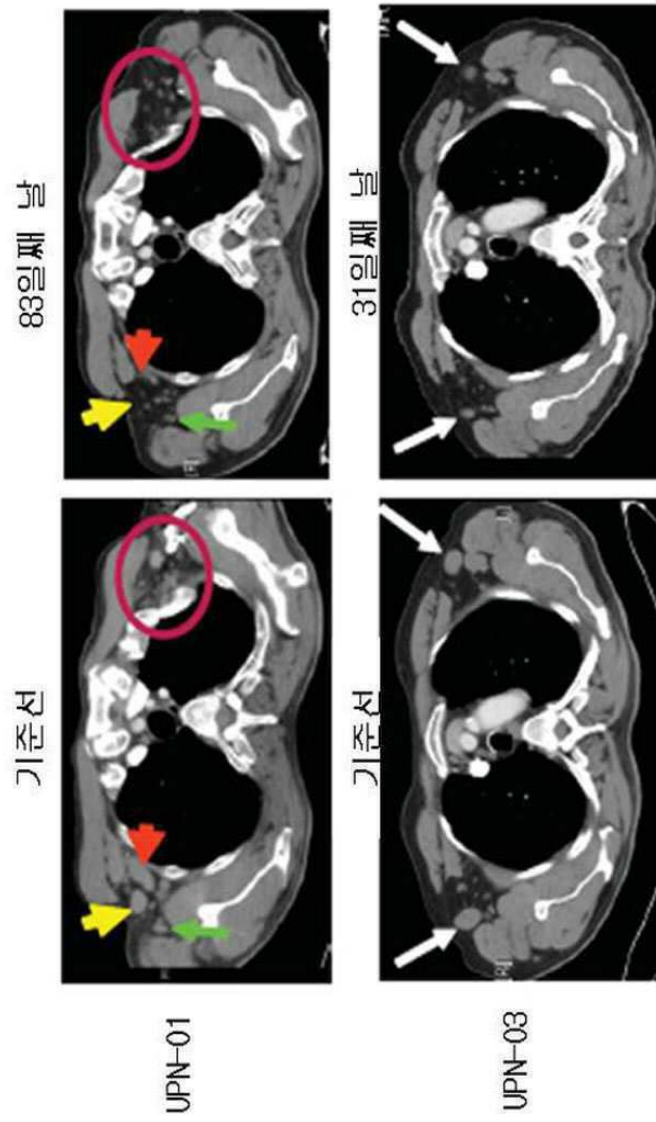
도면5a



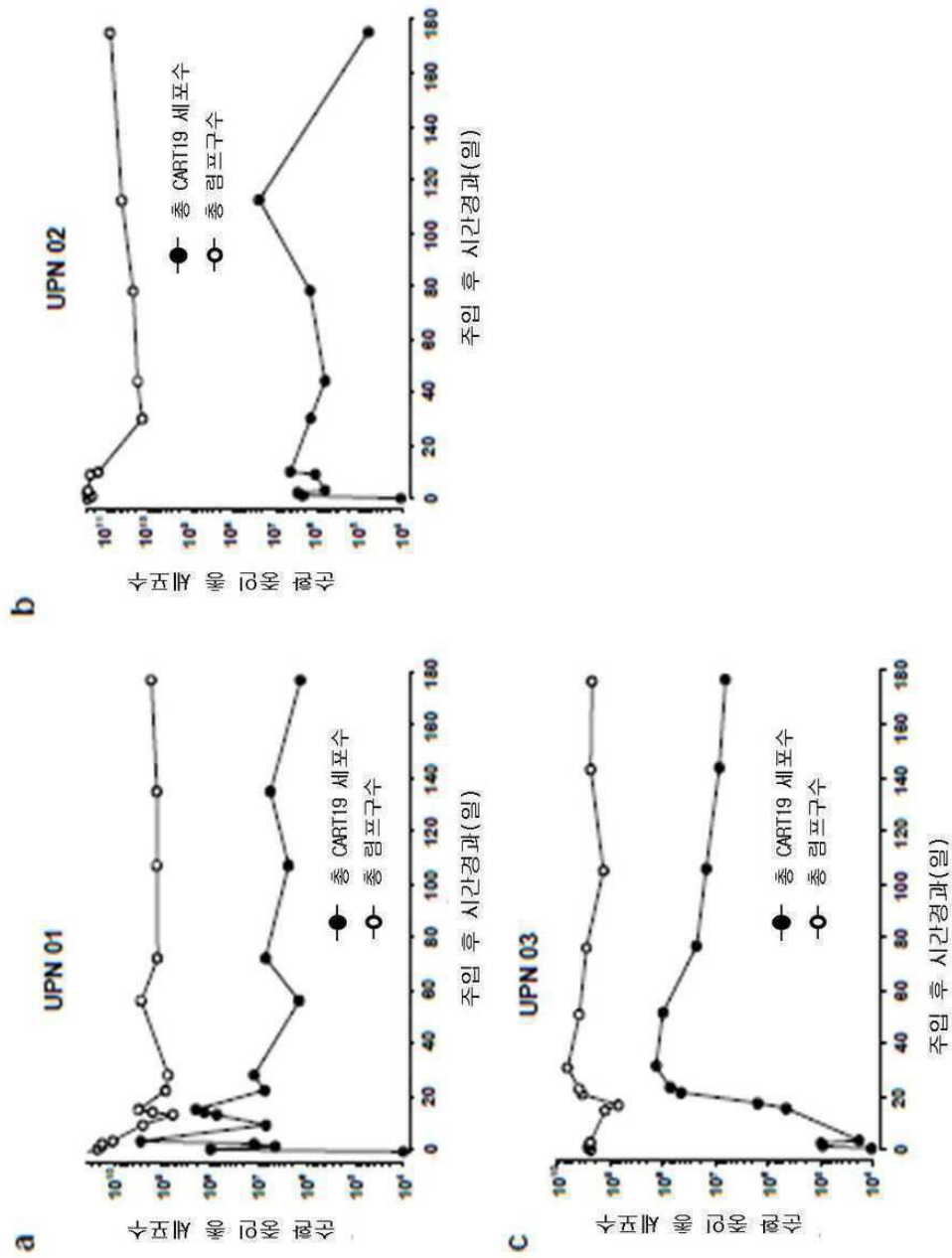
도면5b



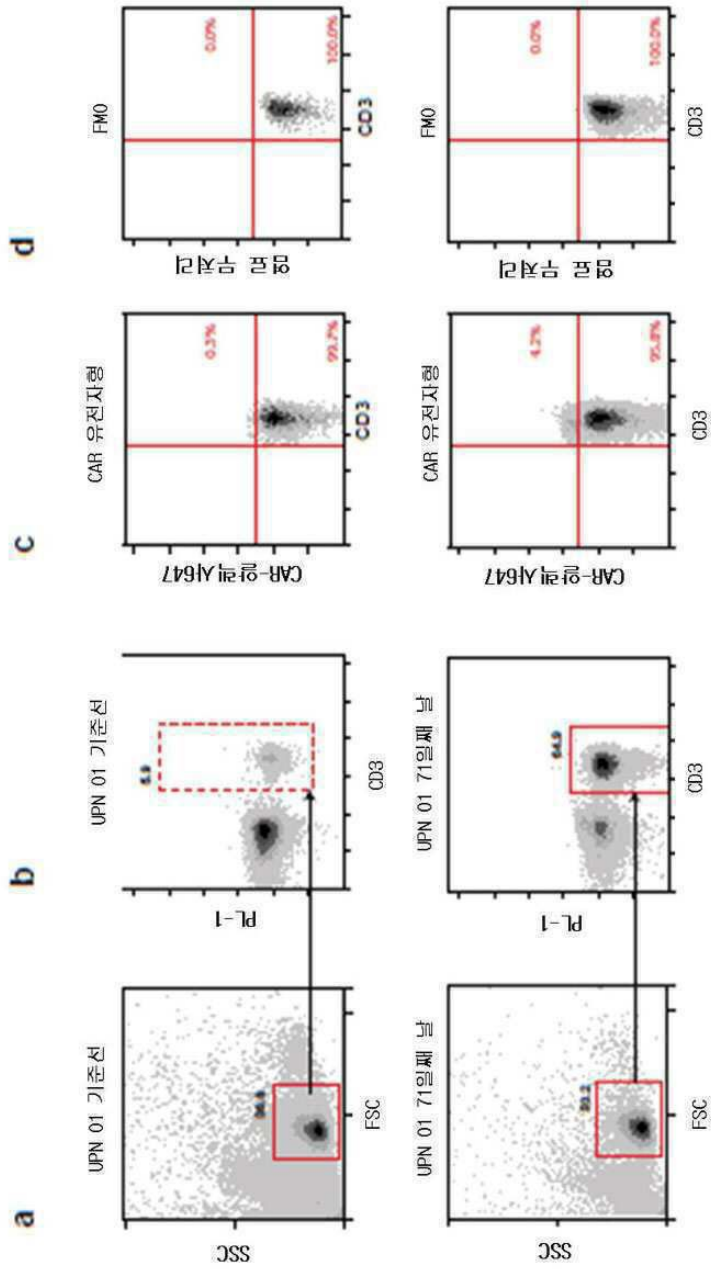
도면5c



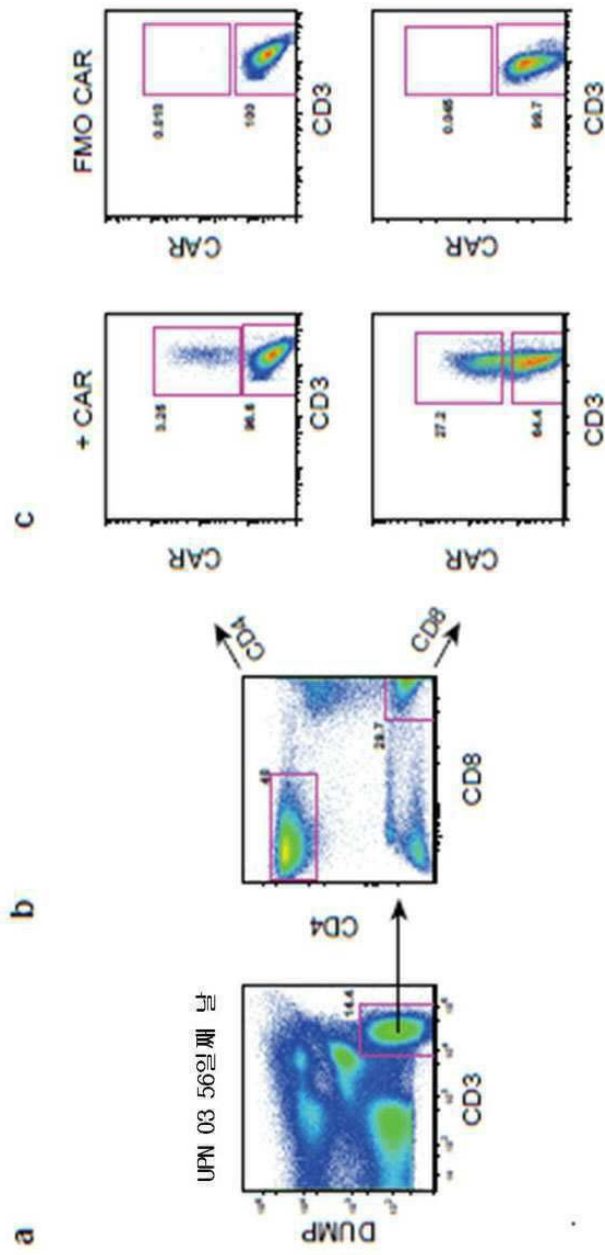
도면6



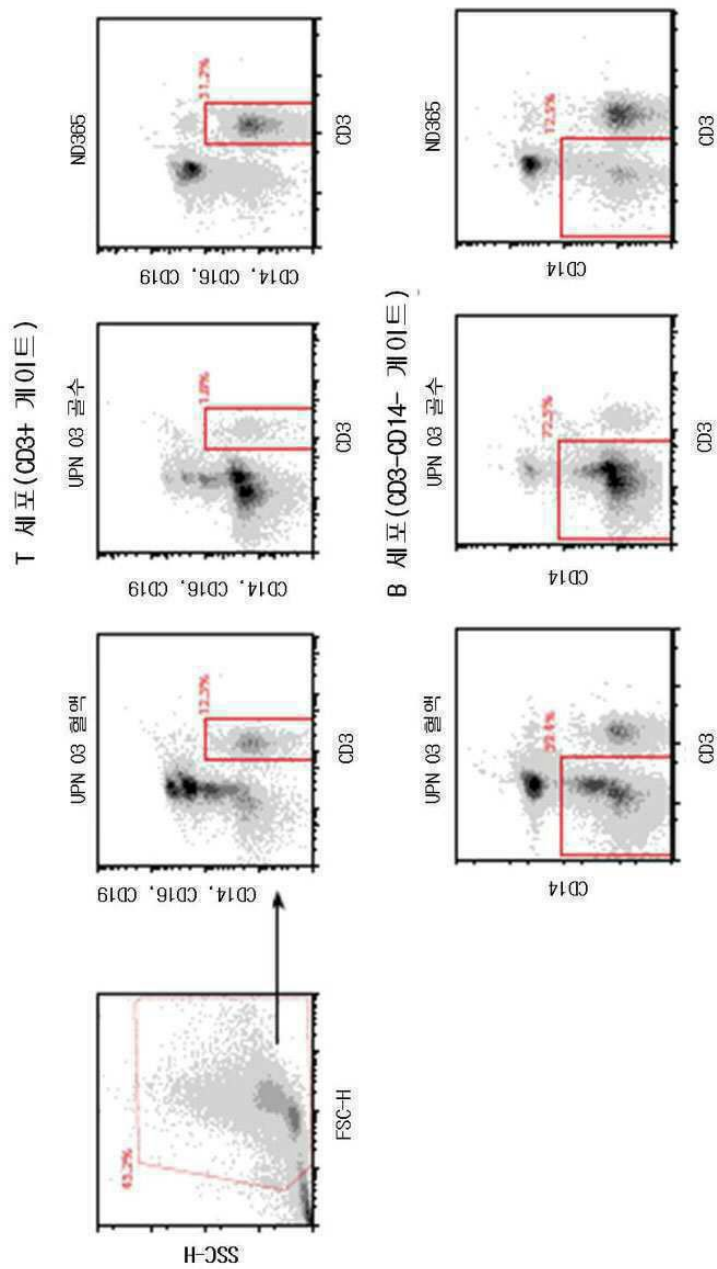
도면7



도면8



도면9



도면10

개체 UPN	나이/성별	이전 치료요법	기존선에서의 CLL 종양 부하			CART19의 총 복용량 (세포/kg)	반응 D+30 (기간)
	혈형		골수 ³ (연구일)	혈액 ³ (연구일)	결절/비장 ³ (연구일)		
01	65/M 정상	4회 플루다라빈(2002년) 4회 리톡시맙/플루다라빈(2005년) 12주간 알렌투주맙(2006년) 리톡시맙(2회의 과정, 2008년~2009년) 2회의 R-CVP(2009년) 레날리도마이드(2009년) 2회의 PCR(2010년 5월 18일~ 2010년 6월 18일) CART19 투여 전 1회의 벤다무스틴(2010년 7월 31일 ~ 2010년 8월 1일)	과세포성 70% CLL 2.4X10 ¹² 개의 CLL 세포(14일째 날) 1.7X10 ¹² 개의 CLL(첫째날)	N/A	6.2X10 ¹¹ - 1.0X10 ¹² 개의 CLL 세포(37일째 날)	1.1X10 ⁸ (1.6X10 ⁷ /kg)	CR (8개월+)
02	77/M Del(17)(p13) ¹	16주간 알렌투주맙(2007년 6월) 18주간 알렌투주맙(2009년 3월) 벤다무스틴/ 리톡시맙: CART 투여 전 2010년 7월 1일(1회차 투여) 2010년 7월 28일(2회차 투여) 2010년 8월 26일(3회차 투여) 2회의 R-플루다라빈(2002년) 4회의 R-플루다라빈(2006년 10월-2007년 1월) 1회의 R-벤다무스틴(2009년 2월) 3회의 벤다무스틴(2009년 3월-5월) 11주간 알렌투주맙(2009년 12월-2010년 3월) CART19 투여 전 펜타스타틴/사이클로포스파마이드(2010년 9월 10일)	과세포성 95% 초과 의 CLL 3.24X10 ¹² 개의 CLL 세포(47일째 날)	2.75X10 ¹¹ 개의 CLL 세포(첫째 날)	1.2X10 ¹² - 2.0X10 ¹² 개의 CLL 세포(24일째 날)	5.8X10 ⁸ (1.0X10 ⁷ /kg)	PR (5개월)
03	64/M Del(17)(p13) ²	2회의 R-플루다라빈(2002년) 4회의 R-플루다라빈(2006년 10월-2007년 1월) 1회의 R-벤다무스틴(2009년 2월) 3회의 벤다무스틴(2009년 3월-5월) 11주간 알렌투주맙(2009년 12월-2010년 3월) CART19 투여 전 펜타스타틴/사이클로포스파마이드(2010년 9월 10일)	과세포성 40% CLL 8.8X10 ¹² 개의 CLL 세포(첫째날)	N/A	3.3X10 ¹¹ - 5.5X10 ¹¹ 개의 CLL 세포(10일째 날)	1.4X10 ⁷ (1.46X10 ⁶ /kg)	CR (7개월+)

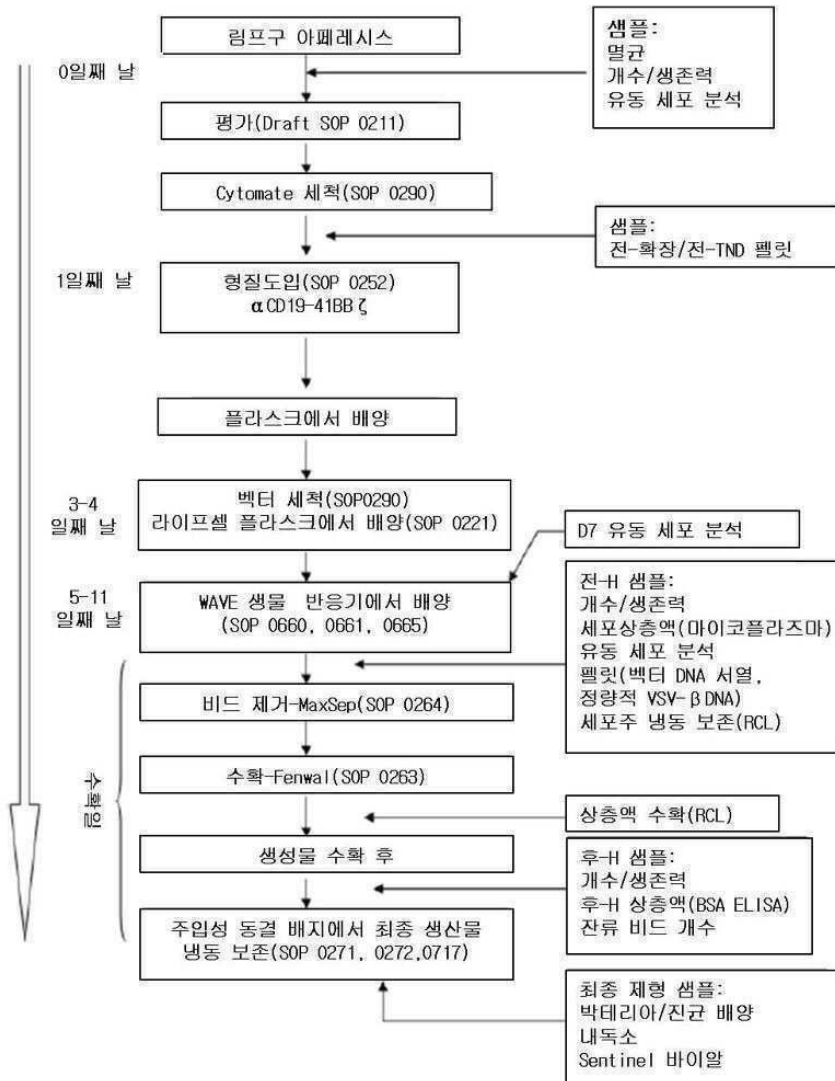
1. UPN 02 핵형(ISCN 명명): 45,XY,del(1)(q25),+del(1)(p13),t(2;20)(p13;q11.2),t(3;5)(p13;q35),add(9)(p22),?del(13)(q14q34),-14,del(17)(p13)[cp24]

2. UPN 03 핵형(ISCN 명명): 46,XY,del(17)(p12)[18]/44~46,idel,der(17)t(17;21)(p11.2;q11.2)[cp41]/40~45,XY,-17[cp3]

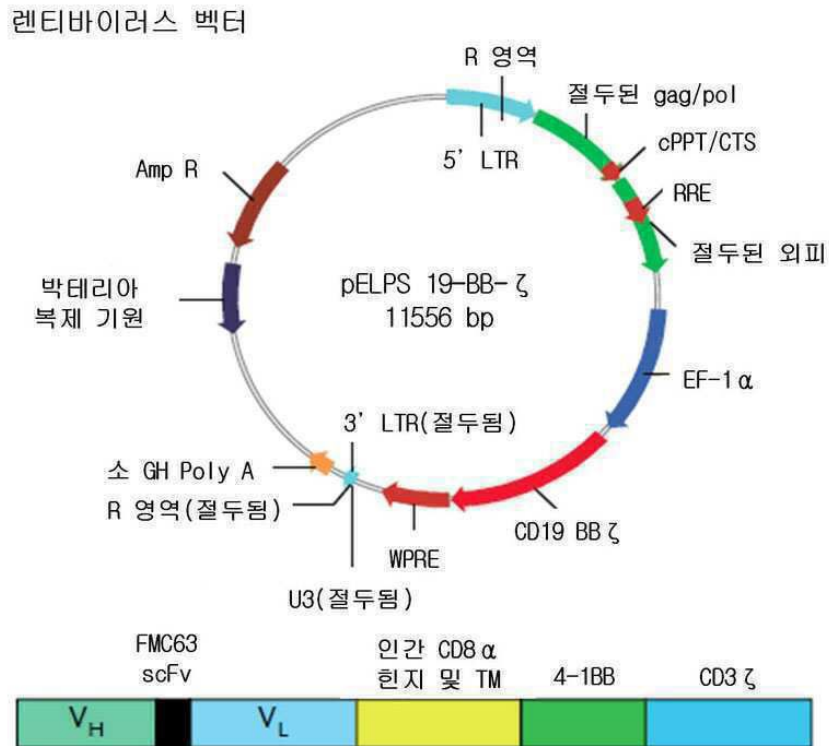
3. 종양 부하의 결정 방법을 위한 보충 재료를 참고

도면11

CART19 제조 공정

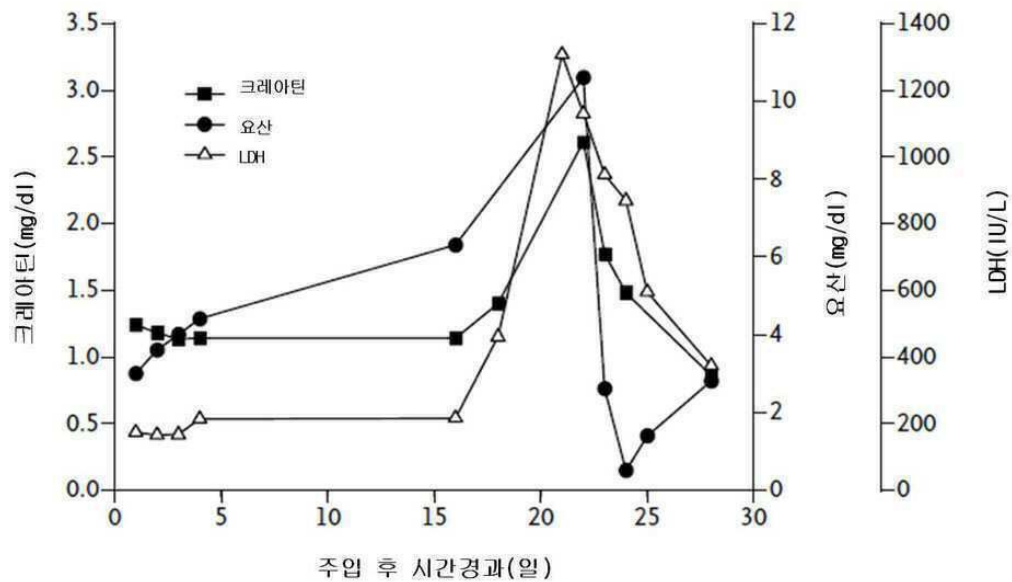


도면12a



도면12b

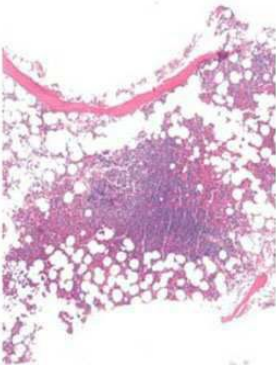
혈청 크레아틴, 요산 및 LDH



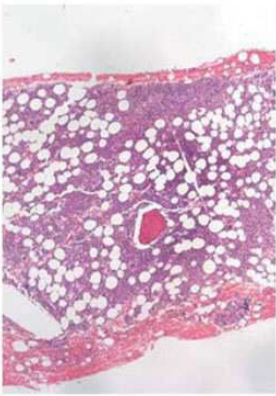
도면12c

골수-생검 검체

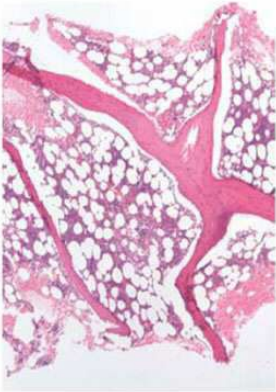
1일째 날(기준선)



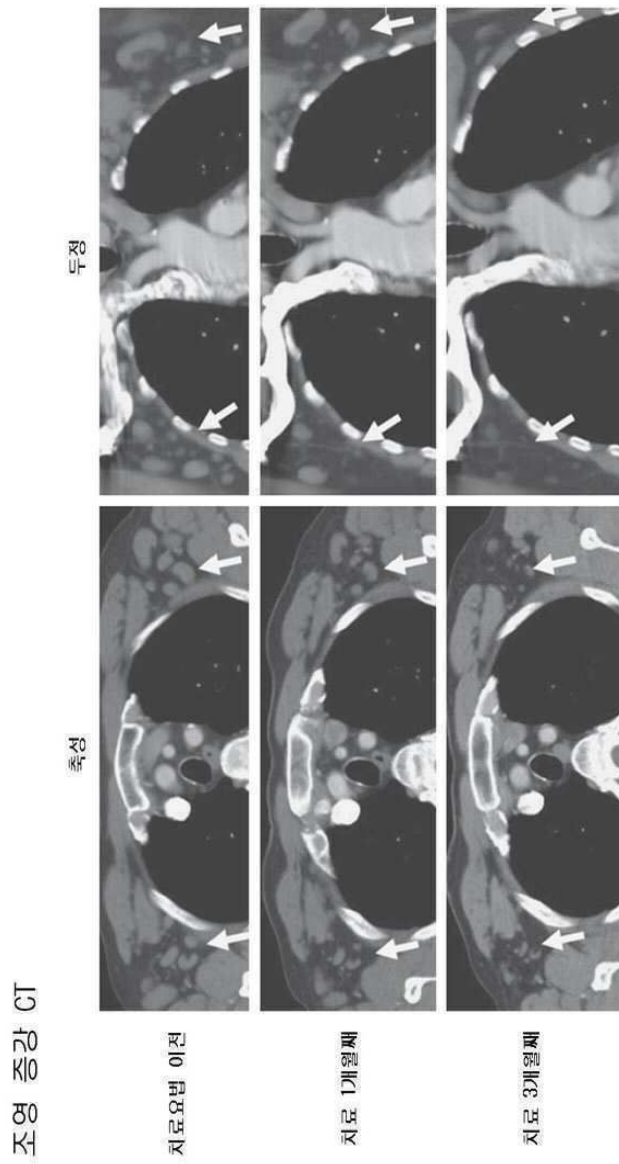
23일째 날



6개월째 날

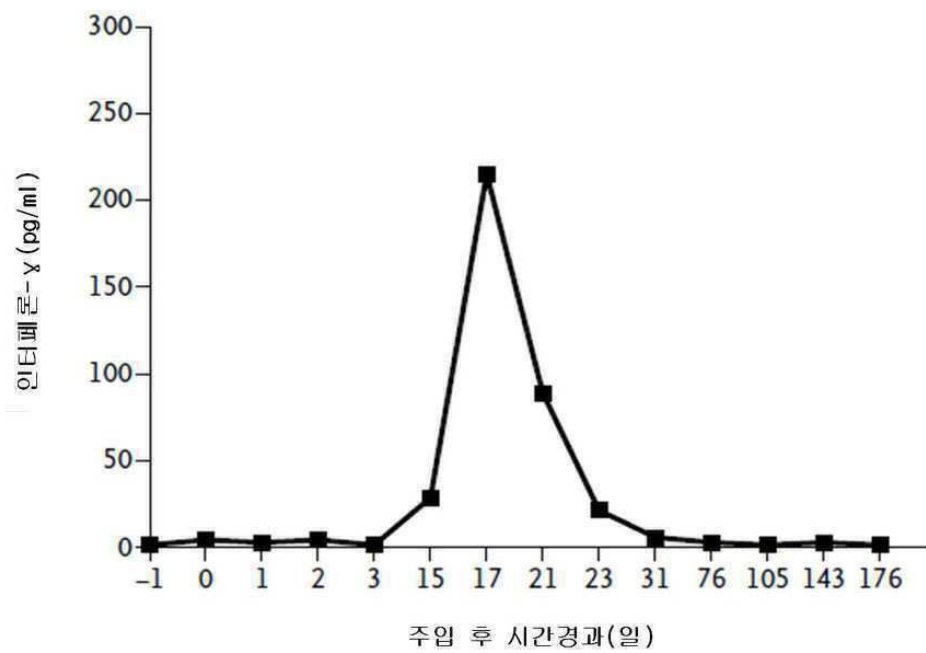


도면12d



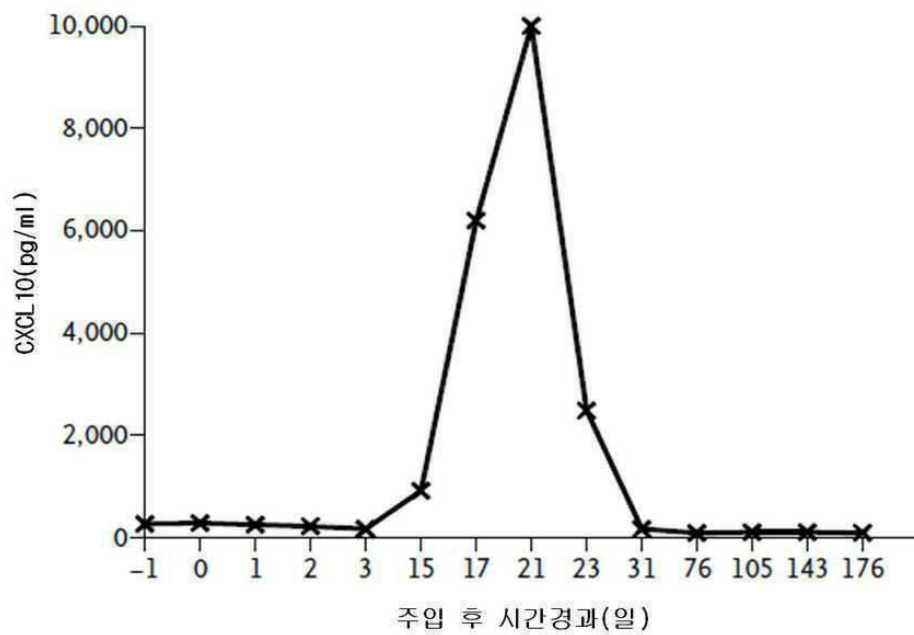
도면13a

인터페론- γ

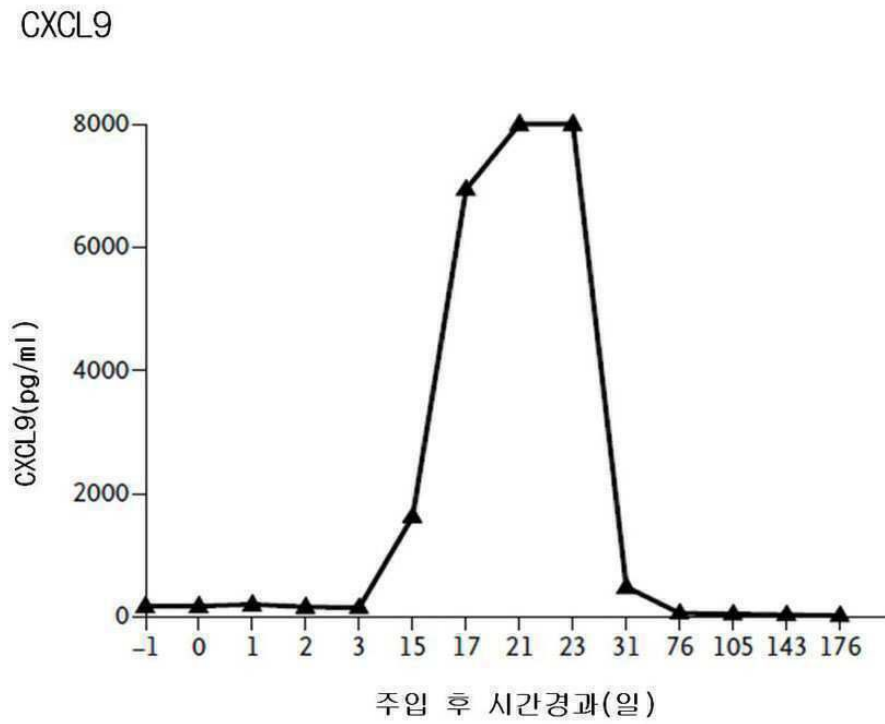


도면13b

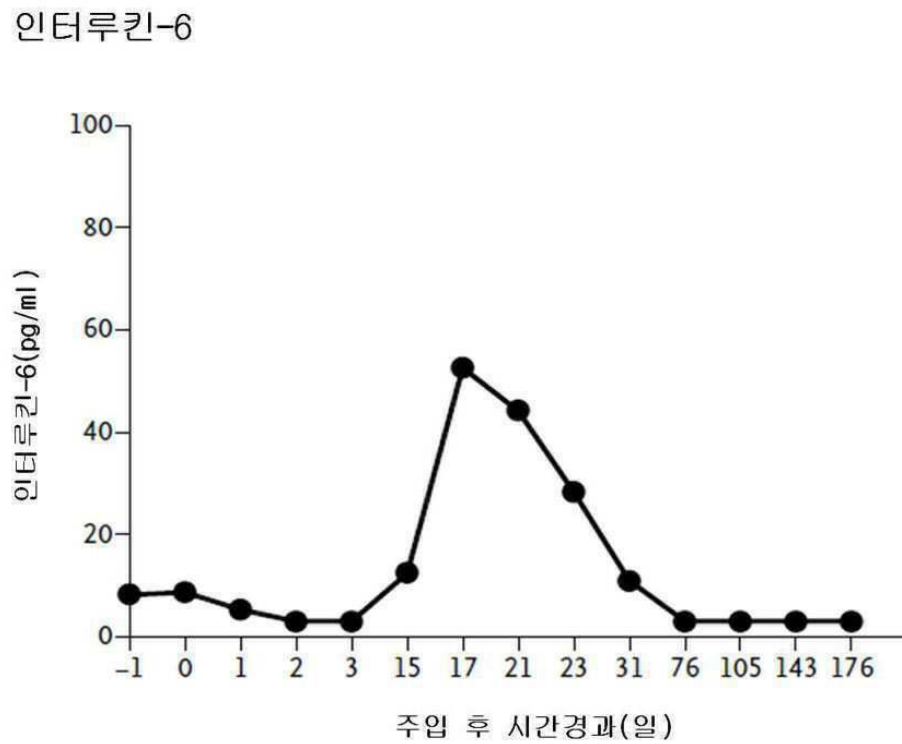
CXCL10



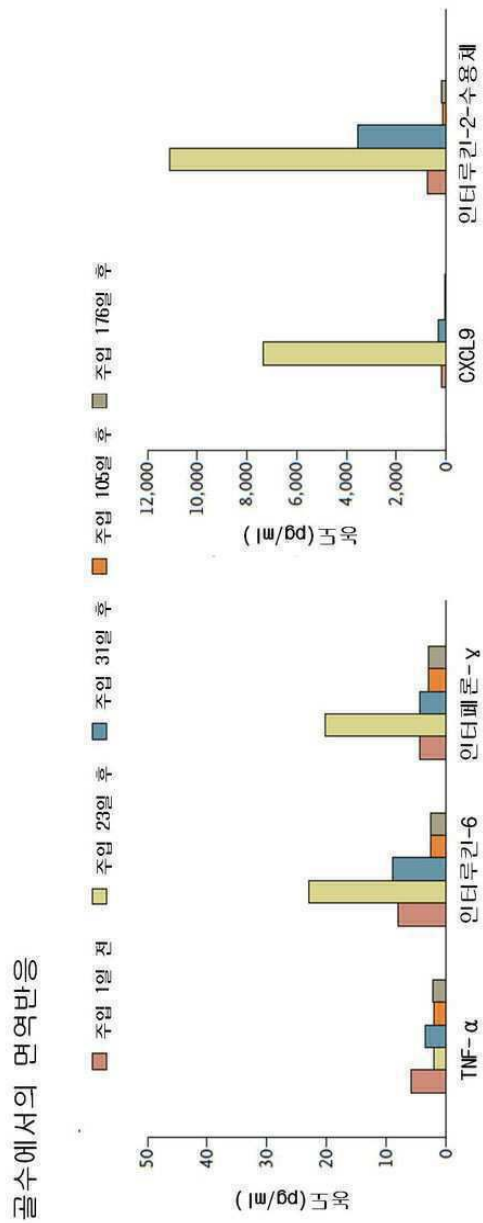
도면13c



도면13d

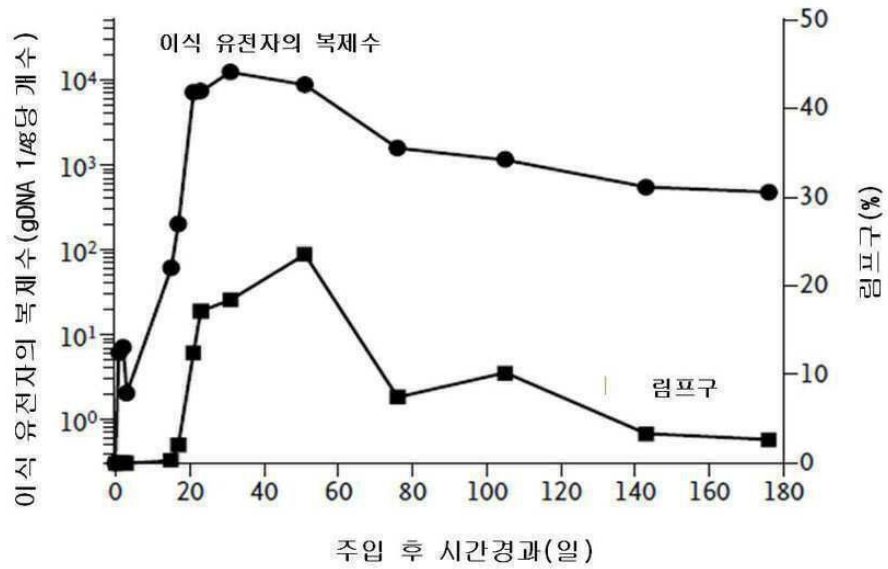


도면13e



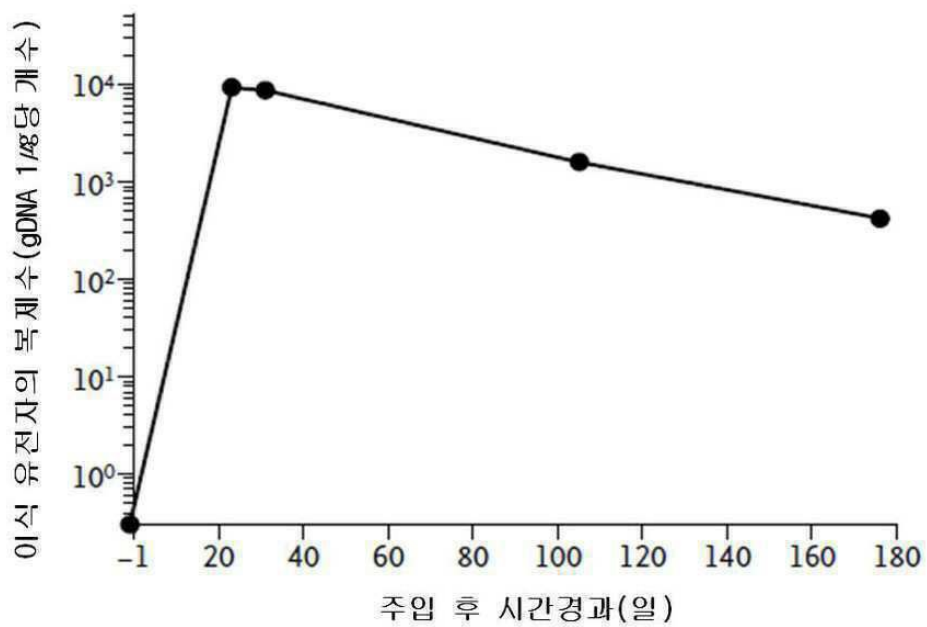
도면14a

전혈

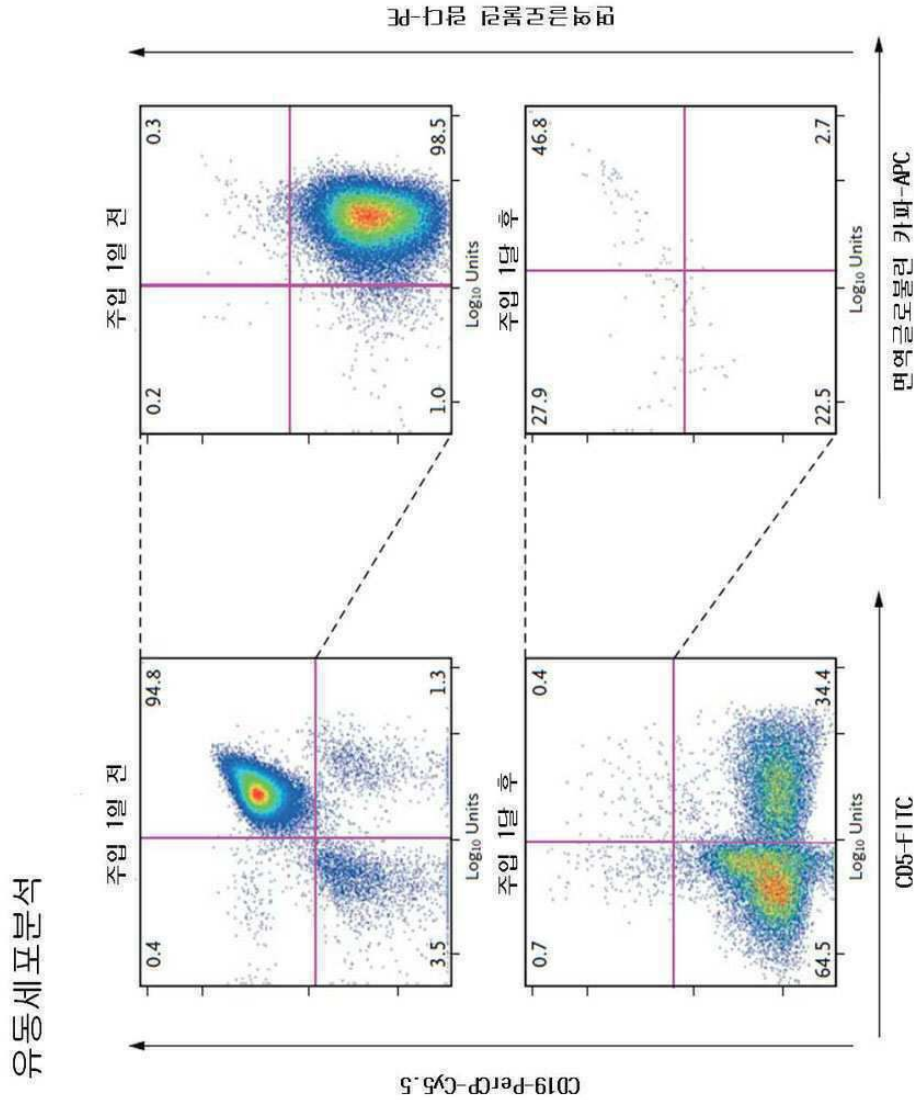


도면14b

골수 흡인물



도면14c



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> The Trustees of the University of Pennsylvania

June, Carl H

Porter, David L

Kalos, Michael

Levine, Bruce L

<120> USE OF CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR-MODIFIED T CELLS TO TREAT CANCER

<130> 46483-6001-00-WO.601218

<150> 61/421,470

<151> 2010-12-09

<150> 61/502,649

<151> 2010-06-29

<160> 27

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 9174

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized

<400> 1

gcgcgctcac tggccgtcgt tttaacaagt cgtgactggg aaaaccctgg cgttacccaa 60
 cttaatcgcc ttgcagcaca tccccctttc gccagctggc gtaatagcga agaggcccg 120
 accgatcgcc cttcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatgggacgc gccctgtagc 180
 ggcgcattaa gcgcggcggg tgttggtggtt acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc 240
 gccctagcgc ccgtcctttt cgttttcttc ccttcctttc tcgccacgtt cgccggcttt 300
 ccccgtaag ctctaaatcg ggggctccct ttagggttcc gatttagtgc ttacggcac 360
 ctcgacccca aaaaacttga ttagggtgat ggttcacgta gtgggccatc gccctgatag 420

acggtttttc gccctttgac gttggagtcc acgttcttta atagtggact cttgttccaa 480
 actggaacaa cactcaacce tatctcggtc tattcttttg atttataagg gatattgccc 540
 atttcggcct attggttaaa aaatgagctg atttaacaaa aatttaacgc gaattttaac 600
 aaaatattaa cgcttacaat ttaggtggca cttttcgggg aaatgtgcgc ggaacccta 660
 ttgttttatt ttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taacctgat 720
 aaatgcttca ataataattga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgccc 780
 ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc tcaccagaa acgtggtga 840

aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cagcagtgagg ttacatcgaa ctggatctca 900
 acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg atgagcatt 960
 ttaaagtctt gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccgggcaa gagcaactcg 1020
 gtcgccgat acactattct cagaatgact tggttgagta ctaccagtc acagaaaagc 1080
 atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtata 1140

acactcgggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt	1200
tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag	1260
ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtagc aatggcaaca acgttgcgca	1320
aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccgga acaattaata gactggatgg	1380
aggcgataa agttgcagga ccacttctgc gctcgccct tccggctggc tggtttattg	1440
ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctcgcggtat cattgcagca ctggggccag	1500
atggtaaacc ctcccgatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca actatggatg	1560
aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg taactgtcag	1620
accaagttaa ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga	1680
tctagtgaa gatccttttt gataatctca tgacaaaat cccttaacgt gagttttcgt	1740
tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat ctttttttc	1800
tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaacaa aaccaccgct accagcggtg gtttgtttgc	1860
cggatcaaga gctaccaact ctttttcga aggttaactgg cttcagcaga gcgcagatac	1920
caaatactgt tcttctagt tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac	1980
gcctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt	2040
cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct	2100
gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat	2160
acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaaag gcggacaggt	2220
atccgtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaacg	2280
cctggatctt ttatagtctt gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt	2340
gatgctctgc agggggggcg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt	2400
tcctggcctt ttgctggcct tttgtcaca tgttctttcc tgcgttatcc cctgattctg	2460
tggataaccg tattaccgcc tttgagttag ctgataccgc tcgccgcagc cgaacgaccg	2520
agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcgccc aatacgcaaa ccgcctctcc	2580
ccgcgcgttg gccattcat taatgcagct ggcacgacag gtttcccgac tggaaagcgg	2640
gcagtgagcg caacgcaatt aatgtgagtt agctcactca ttaggcaccc caggctttac	2700
actttatgct tccggctcgt atgttgtgtg gaattgtgag cggataacaa tttcacacag	2760
gaaacagcta tgacatgat tacgccaagc gcgcaattaa cctcactaa agggaacaaa	2820
agctggagct gcaagcttaa tgtagtctta tgcaatactc ttgtagtctt gcaacatggt	2880

aacgatgagt tagcaacatg cttacaagg agagaaaaag caccgtgcat gccgattggt 2940

 ggaagtaagg tggtagcatc gtgccttatt aggaaggcaa cagacgggtc tgacatggat 3000
 tggacgaacc actgaattgc cgcattgcag agatattgta ttttaagtgc tagctcgata 3060
 cataaacggg tcctcttggt tagaccagat ctgagcctgg gagctctctg gctaactagg 3120
 gaacccactg cttaaagctc aataaagctt gccttgagtg cttcaagtag tgtgtgcccg 3180
 tctgttggtg gactctggta actagagatc cctcagaccc ttttagtcag tgtggaaaat 3240
 ctctagcagt ggcgcccgaa cagggacttg aaagcgaaag ggaaaccaga ggagctctct 3300
 cgacgcagga ctcggttgc tgaagcgcgc acggcaagag gcgaggggcg gcgactggtg 3360

 agtacccaa aaattttgac tagcggaggc tagaaggaga gagatgggtg cgagagcgtc 3420
 agtattaagc gggggagaat tagatcgca tgggaaaaaa ttcggttaag gccaggggga 3480
 aagaaaaat ataaattaaa acatatagta tgggcaagca gggagctaga acgattcgca 3540
 gtaatcctg gcctgttaga aacatcagaa ggctgttagc aaatactggg acagctacaa 3600
 ccatcccttc agacaggatc agaagaactt agatcattat ataatacagt agcaaccctc 3660
 tattgtgtgc atcaaaggat agagataaaa gacaccaagg aagctttaga caagatagag 3720
 gaagagcaaa acaaaagtaa gaccaccgca cagcaagcgg ccgctgatct tcagacctgg 3780

 aggaggagat atgagggaca attggagaag tgaattatat aaatataaag tagtaaaaat 3840
 tgaaccatta ggagtagcac ccaccaaggc aaagagaaga gtggtgcaga gagaaaaaag 3900
 agcagtggga ataggagctt tgttccttgg gtctctggga gcagcaggaa gcactatggg 3960
 cgacgcgtca atgacgtga cggtagaggc cagacaatta ttgtctggta tagtgcagca 4020
 gcagaacaat ttgttagagg ctattgaggc gcaacagcat ctgttgcaac tcacagtctg 4080
 gggcatcaag cagctccagg caagaatcct ggctgtggaa agatacctaa aggatcaaca 4140
 gctcctgggg atttggggtt gctctggaaa actcatttgc accactgctg tgccttgga 4200

 tgctagttag agtaataaat ctctggaaca gatttgaat cacacgacct ggatggagtg 4260
 ggacagagaa attaacaatt acacaagctt aatacactcc ttaattgaag aatcgcaaaa 4320
 ccagcaagaa aagaatgaac aagaattatt ggaattagat aaatgggcaa gtttgtggaa 4380
 ttggtttaac ataacaaatt ggctgtggta tataaaatta ttcataatga tagtaggagg 4440
 ctgttaggtt ttaagaatag tttttgctgt actttctata gtgaatagag ttaggcaggg 4500
 atattacca ttatcgtttc agaccacct cccaaccccg aggggacccg acaggcccga 4560
 aggaatagaa gaagaagggt gagagagaga cagagacaga tccattcgat tagtgaacgg 4620

atctcgacgg tatcgattag actgtagccc aggaatatgg cagctagatt gtacacattt	4680
agaaggaaaa gtatatcttg tagcagttca ttagccagt ggatatatag aagcagaagt	4740
aattccagca gagacagggc aagaaacagc atacttcctc ttaaaattag caggaagatg	4800
gccagtaaaa acagtacata cagacaatgg cagcaatttc accagtacta cagttaaggc	4860
cgcctgttgg tgggcgggga tcaagcagga atttggcatt ccctacaatc cccaaagtca	4920
aggagtaata gaatctatga ataaagaatt aaagaaaatt ataggacagg taagagatca	4980
ggctgaacat cttaagacag cagtacaaat ggcaagtatt atccacaatt ttaaaagaaa	5040
aggggggatt ggggggtaca gtgcagggga aagaatagta gacataatag caacagacat	5100
acaaactaaa gaattacaaa aacaaattac aaaaattcaa aattttcggg ttatttacag	5160
ggacagcaga gatccagttt ggctgcattg atcacgtgag gctccggtgc ccgtcagtg	5220
gcagagcgca catcgccac agtccccgag aagttagggg gaggggtcgg caattgaacc	5280
ggtgcctaga gaaggtggcg cggggtaaac tgggaaagt atgtcgtgta ctggctccgc	5340
ctttttccc agggtagggg agaaccgtat ataagtgcag tagtcgccgt gaacgttctt	5400
tttcgcaacg ggtttgccgc cagaacacag gtaagtgcg tgtgtggttc ccgcgggcct	5460
ggcctcttta cgggttatgg cccttgcgtg ccttgaatta cttccacctg gctgcagtac	5520
gtgattcttg atcccagct tcgggttga agtgggtggg agagttcgag gccttgcgt	5580
taaggagccc ctgcgctg tgcttgagtt gaggcctggc ctggcgctg gggccgccgc	5640
gtgcgaatct ggtggcacct tcgcgcctgt ctgcgtgctt tcgataagtc tctagccatt	5700
taaaattttt gatgacctgc tgcgacgtt tttttctggc aagatagtct tgtaaatgcg	5760
ggccaagatc tgcacactgg tatttcggtt tttagggccg cgggcggcga cggggcccgt	5820
gcgtcccagc gcacatgttc ggcgaggcgg ggcttgcgag cgcggccacc gagaatcgga	5880
cggggtagt ctcaagctgg ccggcctgct ctggtgcctg gcctcgccc gccgtgtatc	5940
gccccgccct gggcggcaag gctggcccgg tcggcaccag ttgcgtgagc ggaaagatgg	6000
ccgtttccc gccctgctgc agggagctca aaatggagga cgcggcgctc gggagagcgg	6060
gcgggtgagt caccacaca aaggaaaagg gcctttccgt cctcagccgt cgcttcatgt	6120
gactccactg agtaccgggc gccgtccagg cacctcgatt agttctcgag cttttggagt	6180
acgtcgtctt taggttgggg ggaggggttt tatgcgatgg agtttccca cactgagtgg	6240
gtggagactg aagttaggcc agcttggcac ttgatgtaat tctccttgga atttgcctt	6300
tttgagtttg gatcttggtt cattctcaag cctcagacag tggttcaaag ttttttctt	6360
ccatttcagg tgcgtgatc tagaggatcc atggccttac cagtaccgc cttgctcctg	6420
ccgtggcct tgcgtctcca cgccgccagg ccggacatcc agatgacaca gactacatcc	6480

tcctgtctg ccctctctggg agacagagtc accatcagtt gcagggaag tcaggacatt	6540
agtaaatatt taaattggta tcagcagaaa ccagatggaa ctgttaaact cctgatctac	6600
catacatcaa gattacactc aggagtccca tcaaggttca gtggcagtgg gtctggaaca	6660
gattattctc tcaccattag caacctggag caagaagata ttgccactta cttttgcca	6720
cagggaata cgcttccgta cacgttcgga ggggggacca agctggagat cacaggtggc	6780
ggtggctcgg gcggtgggtg gtccgggtggc ggcggatctg aggtgaaact gcaggagtca	6840
ggacctggcc tgggtggcgc ctcacagagc ctgtccgtca catgcactgt ctcaggggtc	6900
tcattaccgc actatggtgt aagctggatt cgccagcctc cacgaaaggg tctggagtgg	6960
ctgggagtaa tatggggtag tgaaccaca tactataatt cagctctcaa atccagactg	7020
accatcatca aggacaactc caagagccaa gttttcttaa aaatgaacag tctgcaaact	7080
gatgacacag ccatttacta ctgtgcaaaa cattattact acggtggtag ctatgctatg	7140
gactactggg gccaaagAAC ctcagtcacc gtctcctcaa ccacgacgc agcgccgcga	7200
ccaccaacac cggcgcccac catcgctcg cagccctgt ccctgcgccc agaggcgtgc	7260
cggccagcgg cggggggcgc agtgcacacg agggggctgg acttcgcctg tgatatctac	7320
atctgggcgc ccttggccgg gacttgtggg gtcttctcc tgtcactggt tatcacctt	7380
tactgaaac ggggcagaaa gaaactcctg tatatatca aacaaccatt tatgagacca	7440
gtacaaacta ctcaagagga agatggctgt agctgccgat ttccagaaga agaagaagga	7500
ggatgtgaac tgagagtga gttcagcagg agcgacagc ccccgcgta caagcagggc	7560
cagaaccagc tctataacga gtcAatcta ggacgaagag aggagtacga tgttttgac	7620
aagagacgtg gccgggaccc tgagatgggg ggaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa	7680
ggcctgtaca atgaactgca gaaagataag atggcgagg cctacagtga gattgggatg	7740
aaaggcgagc gccggagggg caaggggcac gatggccttt accagggtct cagtacagcc	7800
accaaggaca cctacgacgc ccttcacatg caggccctgc cccctcgcta agtcgacaat	7860
caacctctgg attacaaaat ttgtgaaaga ttactggta ttcttaacta tgttgctcct	7920
tttacgctat gtggatacgc tgctttaatg cctttgtatc atgctattgc ttccegtatg	7980
gctttcattt tctcctcctt gtataaatcc tggttgctgt ctctttatga ggagtgtgg	8040
cccgttgtca ggcaacgtgg cgtggtgtgc actgtgtttg ctgacgcaac cccactggt	8100
tggggcattg ccaccacctg tcagctcctt tccgggactt tcgctttccc cctccctatt	8160
gccacggcgg aactcatcgc cgcctgcctt gcccgctgct ggacaggggc tcggctgttg	8220
ggcactgaca attccgtggt gttgtcgggg aagctgacgt cctttccatg gctgctcgcc	8280
tgtgttgcca cctggattct gcgcgggacg tccttctgct acgtcccttc ggccctcaat	8340

ccagcggacc ttctttcccg cggcctgctg ccggctctgc ggcctcttcc gcgtcttcgc 8400

cttcgccctc agacgagtcg gatctccctt tgggccgcct ccccgctgg aattcgagct 8460

cggtagcttt aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac tttttaaaag 8520

aaaagggggg aciggaaggg ctaattcact cccaacgaag acaagatctg ctttttgctt 8580

gtactgggtc tctctggta gaccagatct gagcctggga gctctctggc taactaggga 8640

accactgct taagcctcaa taaagcttgc cttgagtgc tcaagtagtg tgtgcccgctc 8700

tgttgtgtga ctctggtaac tagagatccc tcagaccctt ttagtcagtg tggaaaatct 8760

ctagcagtag tagttcatgt catcttatta ttcagtatct ataacttgca aagaaatgaa 8820

tatcagagag tgagaggaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata 8880

gcatcacaaa tttcacaat aaagcatttt tttcactgca ttctagtgtt ggtttgtcca 8940

aactcatcaa tgtatcttat catgtctggc tctagctatc ccgccctaa ctccgcccat 9000

ccgcccccta actccgccca gtccgccca ttctccgcc catggctgac taattttttt 9060

tatttatgca gaggccgagg ccgcctcggc ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg 9120

cttttttgga ggcctaggga cgtacccaat tcgccctata gtgagtcgta ttac 9174

<210> 2

<211> 228

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized

<400> 2

atgtagtctt atgcaatact cttgtagtct tgcaacatgg taacgatgag ttagcaacat 60

gccttacaag gagagaaaaa gcaccgtgca tgccgattgg tggaagtaag gtggtacgat 120

cgtgccttat taggaaggca acagacgggt ctgacatgga ttggacgaac cactgaattg 180

ccgcattgca gagatattgt atttaagtgc ctgctcgat acataaac 228

<210> 3

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized

<400> 3

gggtctctct ggtagacca gatctgagcc tgggagctct ctggctaact agggaaccca 60

ctgcttaagc ctcaataaag cttgccttga gtgcttca	98
<210> 4	
<211> 85	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Chemically Synthesized	
<400> 4	
agtagtgtgt gcccgctctgt tgtgtgactc tggtaactag agatccctca gaccctttta	60
gtcagtgtgg aaaatctcta gcagt	85
<210> 5	
<211> 1377	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Chemically Synthesized	
<400> 5	
cgaacaggga ctigaaagcg aaagggaac cagaggagct ctctcgacgc aggactcggc	60
ttgctgaagc gcgcacggca agaggcgagg ggcggcgact ggtgagtacg ccaaaaattt	120
tgactagcgg aggcctagaag gagagagatg ggtgcgagag cgtcagtatt aagcggggga	180
gaattagatc gcgatgggaa aaaattcggg taaggccagg gggaaagaaa aaatataaat	240
taaaacatat agtatgggca agcagggagc tagaacgatt cgcagttaat cctggcctgt	300
tagaaacatc agaaggctgt agacaaatac tgggacagct acaaccatcc cttcagacag	360
gatcagaaga acttagatca ttatataata cagtagcaac cctctattgt gtgcatcaaa	420
ggatagagat aaaagacacc aaggaagctt tagacaagat agaggaagag caaaacaaaa	480
gtaagaccac cgcacagcaa gcggccgctg atcttcagac ctggaggagg agatatgagg	540
gacaattgga gaagtgaatt atataaatat aaagtagtaa aaattgaacc attaggagta	600
gcacccacca aggcaaagag aagagtgggt cagagagaaa aaagagcagt gggaatagga	660
gctttgttcc ttgggttctt gggagcagca ggaagcacta tgggcgcagc gtcaatgacg	720
ctgacggtac aggccagaca attattgtct ggtatagtgc agcagcagaa caatttgctg	780
agggtctatt aggcgcaaca gcatctgttg caactcacag tctggggcat caagcagctc	840
caggcaagaa tcctggctgt ggaaagatac ctaaaggatc aacagctcct ggggatttgg	900
ggttgctctg gaaaactcat ttgcaccact gctgtgcctt ggaatgctag ttggagtaat	960
aaatctctgg aacagatttg gaatcacacg acctggatgg agtgggacag agaaattaac	1020

aattacacaa gcttaataca ctcccttaatt gaagaatcgc aaaaccagca agaaaagaat 1080
 gaacaagaat tattggaatt agataaatgg gcaagtttgt ggaattgggt taacataaca 1140
 aattggctgt ggtatataaa attattcata atgatatag gaggcttggt aggtttaaga 1200
 atagtttttg ctgtactttc tatagtgaat agagttaggc agggatattc accattatcg 1260
 tttcagacc acctccaac cccgagggga cccgacaggc ccgaaggaat agaagaagaa 1320

ggtggagaga gagacagaga cagatccatt cgattagtga acggatctcg acggtat 1377

<210> 6

<211> 547

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized

<400> 6

tagactgtag cccaggaata tggcagctag attgtacaca tttagaagga aaagttatct 60
 tggtagcagt tcatgtagcc agtggatata tagaagcaga agtaattcca gcagagacag 120
 ggcaagaaac agcatacttc ctcttaaaat tagcaggaag atggccagta aaaacagtac 180
 atacagacaa tggcagcaat ttcaccagta ctacagttaa ggccgcctgt tggtagggcgg 240
 ggatcaagca ggaatttggc attccctaca atcccaaaag tcaaggagta atagaatcta 300

tgaataaaga attaaagaaa attataggac aggtaaagaga tcaggctgaa catcttaaga 360
 cagcagtaca aatggcagta ttcattccaca attttaaaag aaaagggggg attggggggt 420
 acagtgcagg ggaagaata gtagacataa tagcaacaga catacaaact aaagaattac 480
 aaaaacaaat tacaaaaatt caaaattttc gggtttatta caggacagc agagatccag 540
 tttggct 547

<210> 7

<211> 1178

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized

<400> 7

gtccgggtgc ccgtcagttg gcagagcgca catcgccac agtccccgag aagttggggg 60

gaggggtcgg caattgaacc ggtgcctaga gaaggtggcg cggggtaaac tgggaaagtg 120
 atgtcgtgta ctggctccgc cttttcccg agggtagggg agaaccgtat ataagtgcag 180
 tagtcgccgt gaacgttctt tttcgcaacg gggttgccgc cagaacacag gtaagtgccg 240

tgtgtgggttc ccgcgggcct ggcctcttta cgggttatgg cccttgctg ccttgaatta 300
 cttccacctg gctgcagtac gtgattcttg atccccagct tcgggttgga agtgggtggg 360
 agagtccag gccttgctg taaggagccc ctctgcctcg tgcttgagtt gaggcctggc 420
 ctgggcgctg gggccgccc gtgcgaatct ggtggcacct tcgcgcctgt ctgcctgctt 480

 tcgataagtc tctagccatt taaaattttt gatgacctgc tgcgacgctt tttttctggc 540
 aagatagtct tgtaaatgcg ggccaagatc tgcacactgg tatttcggtt tttggggccg 600
 cgggcggcga cggggcccgt gcgtcccagc gcacatgttc ggcgaggcgg ggcctgcgag 660
 cgcgccacc gagaatcgga cgggggtagt ctcaagctgg ccggcctgct ctggtgcctg 720
 gcctcgcgc gccgtgtatc gccccgcctt gggcggcaag gctggcccgg tcggcaccag 780
 ttgcgtgagc ggaaagatgg ccgcttcccg gccttgctgc agggagctca aaatggagga 840
 cgcggcgctc gggagagcgg gcgggtgagt caccacaca aaggaaaagg gcctttccgt 900

 cctcagccgt cgcttcatgt gactccactg agtaccgggc gccgtccagg cacctcgatt 960
 agttctcgag cttttggagt acgtcgtctt taggttgggg ggagggttt tatgcgatgg 1020
 agtttcccca cactgagtgg ttggagactg aagttaggcc agcttggcac ttgatgtaat 1080
 tctccttgga atttgccctt tttagatttg gatcttggtt cattctcaag cctcagacag 1140
 tggttcaaag ttttttctt ccatttcagg tgcgtga 1178

 <210> 8
 <211> 1459
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Chemically Synthesized
 <400> 8
 atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60

 ccggacatcc agatgacaca gactacatcc tcctgtctg cctctctggg agacagagtc 120
 accatcagtt gcagggaag tcaggacatt agtaaattatt taaattggta tcagcagaaa 180
 ccagatggaa ctgttaaact cctgatctac catacatcaa gattacactc aggagtccca 240
 tcaaggttca gtggcagtgg gtctggaaca gattattctc tcaccattag caacctggag 300
 caagaagata ttgccactta cttttgcca cagggttaata cgcttccgta cacgttcgga 360
 ggggggacca agctggagat cacaggtggc ggtggctcgg gcggtggtgg gtcgggtggc 420
 ggcggtatct aggtgaaact gcaggagtca ggacctggcc tgggtggcgc ctacagagc 480

 ctgtccgtca catgactgt ctcaggggtc tcattaccg actatggtgt aagctggatt 540

cgccagcctc cacgaaaggg tctggagtgg ctgggagtaa tatgggtag tgaaaccaca 600
tactataatt cagctctcaa atccagactg accatcatca aggacaactc caagagccaa 660
gttttcttaa aaatgaacag tctgcaaact gatgacacag ccatttacta ctgtgccaaa 720
cattattact acggtggtag ctatgctatg gactactggg gccaaaggaac ctcagtcacc 780
gtctctcaa ccacgacgcc agcgccgga ccaccaacac cggcgccac catcgctcg 840
cagccctgt cctcgcccc agaggcgtgc cgccagcgg cggggggcgc agtgcacacg 900

agggggctgg acttcgcctg tgatatctac atctgggcgc ccttggccgg gacttgtggg 960
gtctctctcc tgtcactgtt taccacctt tactgcaaac ggggcagaaa gaaactcctg 1020
tatatatca aacaaccatt tatgagacca gtacaaacta ctcaagagga agatggctgt 1080
agctgccgat ttccagaaga agaagaagga ggatgtgaac tgagagtga gttcagcagg 1140
agcgagacg cccccgcta caagcagggc cagaaccagc tctataacga gctcaatcta 1200
ggacgaagag aggagtacga tgttttgac aagagacgtg gccgggaccc tgagatgggg 1260
ggaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa ggctgtaca atgaactgca gaaagataag 1320

atggcggagg cctacagtga gattgggatg aaaggcgagc gccggagggg caaggggcac 1380
gatggccttt accagggtct cagtacagcc accaaggaca cctacgacgc cttcacatg 1440
cagccctgc cccctcgt 1459

<210> 9
<211> 591
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Chemically Synthesized
<400> 9

atcaacctct ggattacaaa atttgtgaaa gattgactgg tattcttaac tatgttgctc 60
cttttacgt atgtggatg gctgctttaa tgctttgta tcatgctatt gcttcccgtg 120
tggtttcat tttctctcc ttgtataaat cctggttgct gtctctttat gaggagtgt 180

ggcccgttgt caggcaacgt ggcgtgggtg gcactgtgtt tgctgacga accccactg 240
gttggggcat tgccaccacc tgctagctcc tttccgggac tttcgcttc cccctcccta 300
ttgccacggc ggaactcatc gccgcctgcc ttgcccgctg ctggacagg gctcggctgt 360
tgggcactga caattccgtg gtgttgctgg ggaagctgac gtcctttcca tggctgctcg 420
cctgtgttg cacctggatt ctgcgcggga cgtcctctg ctacgtccct tcggccctca 480
atccagcgga cttccttcc cgcggcctgc tgccggtct gcggcctct cgcgtcttc 540

gccttcgccc tcagacgagt cggatctccc ttggggccgc ctccccgcct g 591

<210> 10

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized

<400> 10

gggtctctct ggtagacca gatctgagcc tgggagctct ctggctaact agggaaccca 60

ctgcttaagc ctcaataaag ctgacctga gtgcttca 98

<210> 11

<211> 84

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized

<400> 11

agtagtgtgt gccgctctgt tgtgtgactc tggtaactag agatccctca gacccttta 60

gtcagtgtgg aaaatctcta gcag 84

<210> 12

<211> 486

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized

<400> 12

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 Leu 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	Leu	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> 13

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized

<400> 13

atggccttac cagtgaccgc cttgtcctcg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60

ccg 63

<210> 14

<211> 726

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized

<400> 14

gacatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc	60
atcagttgca gggcaagtca ggacattagt aaatatttaa attggtatca gcagaaacca	120
gatggaactg ttaaactcct gatctacat acatcaagat tacactcagg agtcccatca	180
aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa	240
gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtaatcgc ttccgtacac gttcggaggg	300
gggaccaagc tggagatcac aggtggcggc ggctcgggcg gtggtgggtc gggcggcg	360
ggatctgagg tgaactgca ggagtcagga cctggcctgg tggcgccctc acagagcctg	420
tccgtcacat gcactgtctc aggggtctca ttacccgact atggtgtaag ctggattcgc	480
cagcctccac gaaagggtct ggagtggctg ggagtaatat ggggtagtga aaccacatac	540
tataattcag ctctcaaatc cagactgacc atcatcaagg acaactcaa gagccaagtt	600
ttcttaaaaa tgaacagtct gcaactgat gacacagcca ttactactg tgccaacat	660
tattactacg gtggtagcta tgctatggac tactggggcc aaggaaactc agtcaccgtc	720
tcctca	726

<210> 15

<211> 135

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized

<400> 15

accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca ccggcgccca ccatcgctc gcagccctg	60
tcctcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg	120
gacttcgcct gtgat	135

<210> 16

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized

<400> 16

atctacatct gggcgccctt ggccgggact tgtgggtcc ttctcctgtc actggttata 60
accctttact gc 72
<210> 17
<211> 126
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Chemically Synthesized
<400> 17
aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa 60
actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt 120

gaactg 126
<210> 18
<211> 336
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Chemically Synthesized
<400> 18
agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtaca agcagggcca gaaccagctc 60
tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgatg ttttggacaa gagacgtggc 120
cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat 180
gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc 240
cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc 300

tacgacgcc ttcacatgca ggccctgccc cctcgc 336
<210> 19
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Chemically Synthesized
<400> 19
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

<210> 20

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized

<400> 20

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

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

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

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

195 200 205
 Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly
 210 215 220
 Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val
 225 230 235 240
 Ser Ser

<210> 21

<211> 47

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized

<400> 21

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala

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

<210> 22

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized

<400> 22

Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu

1 5 10 15

Val Ile Thr Leu Tyr Cys

20

<210> 23

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized

<400> 23

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> 24

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized

<400> 24

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> 25

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized

<400> 25

gaaagctgac tgcccctatt tg

22

<210> 26

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized

<400> 26

gagaggaagt gctgggaaca at

22

<210> 27

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chemically Synthesized

<400> 27

ctccccagtc tcttt

15