



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0123837

(43) 공개일자 2024년08월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) C12N 15/86 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2023.05)
C12N 15/86 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7024364
(22) 출원일자(국제) 2022년12월22일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년07월19일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/053815
(87) 국제공개번호 WO 2023/122277
국제공개일자 2023년06월29일
(30) 우선권주장
63/292,843 2021년12월22일 미국(US)

(71) 출원인
큐어.에이아이, 인코포레이티드
미국, 오하이오 44118, 웨이커 하이츠, 셀번 로드 19015
(72) 발명자
왈드, 데이비드
미국, 오하이오 44118, 웨이커 하이츠, 셀번 로드 19015
(74) 대리인
특허법인정진

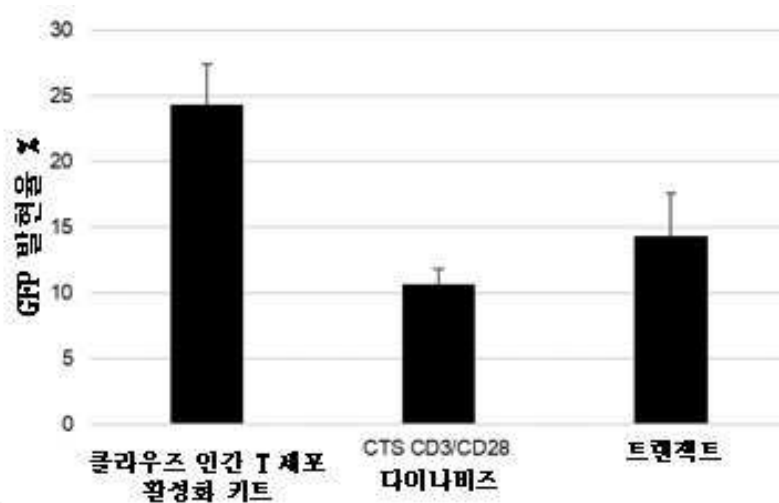
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 신속한 T 세포 제조

(57) 요약

본 개시는 T-세포와 같은 유전자 변형 면역 이펙터 세포의 신속한 제조 방법을 제공한다. 이 방법은 CAR T 세포와 같은 유전자 변형 면역 이펙터 세포를 신속하게(< 1일) 생산하게 할 수 있다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

C12N 2501/2302 (2013.01)
C12N 2501/2307 (2013.01)
C12N 2501/2312 (2013.01)
C12N 2501/2315 (2013.01)
C12N 2501/2318 (2013.01)
C12N 2501/2321 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)
C12N 2740/16043 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

유전자 변형 T 세포 집단의 신속한 제조 방법으로서,

혼합 단핵 세포 집단을 얻는 단계;

실질적으로 동시에,

상기 혼합 단핵 세포 집단에 포함된 T 세포 집단을 활성화시키는 단계; 및

상기 혼합 단핵 세포 집단에 포함된 적어도 상기 T 세포 집단을 외래 뉴클레오티드로 형질도입하기에 적합한 바이러스 벡터에 상기 혼합 단핵 세포 집단을 노출시키는 단계,

를 포함하는, 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

동시에 활성화시키는 단계 및 적어도 하나의 바이러스 벡터에 노출시키는 단계로부터 최대 24시간 경과시 적어도 유전자 변형 T-세포 집단을 포함하는 혼합 단핵 세포 집단을 수확하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 활성화시키는 단계가 혼합 단핵 세포를 IL-2, IL-7, IL-15, IL-12, IL-18, 및 IL21로 이루어진 사이토카인 그룹 중 하나 이상으로부터 선택되는 활성화 제제에, 및/또는 CD3, CD28, OX40, CD2, CD27, ICAM-1, LFA-1(CD11a/CD18), ICOS(CD278), 및 4-1BB(CD137) 중 하나 이상에 대한 활성화제로부터 선택되는 활성화 제제에 노출시킴으로써 수행되는, 방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서,

상기 활성화시키는 단계가 상기 혼합 단핵 세포를 IL-7 및 IL-15로 이루어진 그룹 중 하나 이상으로부터 선택된 활성화 제제에 노출시킴으로써 수행되는, 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 활성화시키는 단계 및 바이러스 벡터에 노출시키는 단계 이전에 상기 단핵 세포 집단에 포함된 단핵구 집단의 부착에 의해 적어도 부분적으로 고갈시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 활성화시키는 단계 및 바이러스 벡터에 노출시키는 단계가 임의의 외인성 사이토카인의 부재 하에 수행되는, 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서,

상기 활성화시키는 단계가 혼합 단핵 세포 집단을 CD3 활성화제, CD28 활성화제, 가용성 또는 표면 결합 CD3 항

체, 또는 가용성 또는 표면 결합 CD28 중 하나 이상에 노출시킴으로써 수행되는, 방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서,

상기 활성화시키는 단계가 상기 혼합 단핵 세포 집단을 CD3 활성화제 또는 가용성 또는 표면 결합 CD3 항체 중 하나 또는 둘 다에 노출시킴으로써 수행되는, 방법.

청구항 9

청구항 1에 있어서,

상기 활성화시키는 단계 및 바이러스 벡터에 노출시키는 단계가 사전 T 세포 분리 또는 사전 활성화 단계 없이 수행되는, 방법.

청구항 10

청구항 1에 있어서,

상기 유전자 변형 T 세포 집단을 포함하는 상기 혼합 단핵 세포 집단을 냉동보존하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 11

청구항 1에 있어서,

성분채집술(apheresis) 또는 말초 혈액 채취에 의해 상기 혼합 단핵 세포 집단을 얻는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 12

청구항 1에 있어서,

렌티바이러스, 레트로바이러스, 및 아데노바이러스로 이루어진 그룹으로부터 바이러스 형질도입 벡터를 선택하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 13

청구항 1에 있어서,

DNA 크기 선별에 의해 게놈 DNA로부터 플라스미드 DNA를 제거하기 위해 바이러스 형질도입 벡터를 실질적으로 동시에 활성화시키고 이에 노출시키는 단계 이후에 차등 원심분리 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 14

청구항 1 내지 청구항 12 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산된 유전자 변형 T-세포.

청구항 15

청구항 1 내지 청구항 12 중 어느 한 항에 따른 유전자 변형 T 세포 집단의 신속한 제조를 위한 방법을 수행하기 위한 폐쇄 시스템 키트로서,

혼합 단핵 세포 집단을 수용하기에 적합한 제1 멸균 용기;

단핵구 고갈된 혼합 단핵 세포 집단을 수용하기에 적합한 제2 멸균 용기;

비드 결여 T 세포 활성화 제제;

T 세포 집단을 외래 뉴클레오티드로 형질도입하기에 적합한 바이러스 벡터;

적합한 배양 배지; 및

적합한 세포 세척 용액;

을 포함하고,

적어도 상기 제1 용기는 혼합 단핵 세포 집단으로부터 단핵구를 고갈시키는 데 적합한 재료로 제작된 것이고;

추가로, 상기 제1 용기와 제2 용기는 비드 결여 T 세포 활성화 제제, 바이러스 형질도입 벡터, 배양 배지, 및 세포 세척 용액의 멸균 도입을 위해 적합한 것인, 폐쇄 시스템 키트.

청구항 16

청구항 15에 있어서,

비드 결여 T 세포 활성화 제제가 CD3 활성화제, CD28 활성화제, OX40 활성화제, CD2 활성화제, CD27 활성화제, ICAM-1 활성화제, LFA-1(CD11a/CD18) 활성화제, ICOS(CD278) 활성화제, 4-1BB(CD137) 활성화제, 및 CD3 항체로 이루어진 그룹 중 하나 이상으로부터 선택된 것인, 폐쇄 시스템 키트.

청구항 17

청구항 16에 있어서,

IL-2, IL-7 및 IL-15로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 사이토카인을 추가로 포함하는, 폐쇄 시스템 키트.

청구항 18

청구항 16에 있어서,

상기 비드 결여 T 세포 활성화 제제가 가용성 또는 표면 결합된 CD3 항체 및 가용성 또는 표면 결합된 CD28 항체 중 하나 이상으로 이루어진 그룹 중 하나 이상으로부터 선택된 것인, 폐쇄 시스템 키트.

청구항 19

청구항 18에 있어서,

상기 비드 결여 T 세포 활성화 제제가 가용성 또는 표면 결합 CD3 항체 중 하나 이상으로 이루어진 그룹 중 하나 이상으로부터 선택된 것인, 폐쇄 시스템 키트.

청구항 20

청구항 15에 있어서,

상기 바이러스 벡터가 렌티바이러스, 레트로바이러스 및 아데노바이러스로 이루어진 그룹으로부터 선택된 것인, 폐쇄 시스템 키트.

청구항 21

청구항 15에 있어서,

상기 제1 용기 및 제2 용기 중 하나 또는 둘 다가 세포 배양 백 및 세포 배양 플라스크로 이루어진 그룹으로부터 선택된 것인, 폐쇄 시스템 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2021년 12월 22일에 출원된 미국 가출원 제63/292,843호에 대한 우선권을 주장하는 실용 특허 출원이며, 이의 전문은 본 명세서에 참조로 통합된다.

[0003] 전자적으로 제출된 서열 목록에 대한 참조

[0004] 2022년 12월 22일에 생성되고 크기가 13000바이트인 2459S_005W0.xml이라는 명칭의 XML 파일로 본 출원과 함께 전자문서로 제출된 서열 목록은, 그의 전문이 본 명세서에 참조로 통합된다.

[0005] 기술분야

[0006] 본 개시는 바이러스 매개 형질도입(transduction)을 이용하여 1일 이내에 유전자 변형 T 세포 생성물의 생산을 가능하게 하고 또한 이 생성물의 임상적 이용에 있어 장애를 해소하기 위한 생성물 출시 테스트에서의 혁신을 제공하는 신속한 T 세포 제조 워크플로우에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] T 세포 치료법은 질환, 특히 암, 감염성 질환 및 자가면역 질환의 치료에 엄청난 잠재력을 지니는 것으로 드러났다. T 세포 치료법을 강화하는 한 가지 방법은 원하는 표적 세포에 대한 활성 및/또는 특이성을 강화하기 위해 바이러스 매개 유전자 전달을 이용하여 T 세포를 유전적으로 변형하는 것이다. 예를 들어, 렌티바이러스와 레트로바이러스를 이용한 T 세포에서의 키메라 항원 수용체(CAR)의 발현은 암 치료에서 엄청난 잠재력이 있음을 보여주었다. 특히 CD19에 대한 키메라 항원 수용체(CAR-T 세포)를 발현하는 자가(autoologous) T 세포는 재발성 또는 불응성 B 세포 악성 종양 환자에서 상당한 효능을 나타냈다.

[0008] 유전자 변형 T 세포의 잠재력은 재발성/불응성 비호지킨 림프종(NHL) 및 급성 림프성 백혈병(ALL)에서 자가 CD19 CAR-T 세포의 놀라운 임상적 성공에 의해 강조된다. 공격성, 재발성, 또는 불응성 질환은 고용량 치료법으로 치료한 다음, 질환이 여전히 화학요법에 민감한 경우 자가 줄기 세포 구제로 치료하게 된다(1, 2). 불행하게도, 환자의 최대 50%가 재발하거나 불응성이 되고, 재발/불응성 환자의 결과는 기존 화학요법으로는 좋지 않다(예를 들어, 완전 반응률(CR)은 7%이고 전체 생존(OS)은 6.3개월(3)). 이와 대조적으로 CD19 CAR-T 치료법은 이들 환자에서 상당히 개선된 결과(예를 들어, 1년차에 >50% CR 및 >50% OS(4))를 입증했다.

[0009] 미국에서 상업적인 CD19 및 BCMA CAR-T 세포 생성물에 대한 FDA의 승인을 비롯하여 전 세계의 다른 많은 국가에서의 규제 승인에도 불구하고, 기존 치료법은 전 세계 대다수에서 사용하기에는 여전히 비용이 많이 들고, 심지어 미국에서조차 상당한 경제적 부담을 초래한다. 현재 제약회사에서 자가 유래 CAR-T 생성물을 제조하는 데 드는 비용은 환자당 ~100k 달러(USD)로 추산되고 있다(5). 비용 외에도, 제조 공정이 느려 환자 치료가 지연되는 바람직하지 않은 결과로 이어진다. 현재 FDA 승인 제품은 환자에게 전달되는 데 약 3 내지 6주 이상이 소요되며 이로 인한 치료 지연으로 상당수의 환자에서 질병 진행이 초래된다. 현재 CAR-T 치료법의 또 다른 과제는 NHL, 급성 림프성 백혈병 및 다발성 골수종과 같은 B 세포 악성 종양 이외의 대부분의 악성 종양에 대한 효능이 낮다는 것이다. 또한, 초기 결과가 유망한 NHL과 같은 질환의 경우에도, 많은 환자(~50%)가 1년 후에도 지속적인 완화를 얻지 못하게 될 수 있다(6, 7). 환자에서 CAR-T 치료법의 최적이지 않는 결과의 원인은 다인자일 가능성이 높지만, 한 가지 문제점은 환자에서 주입된 CAR-T 세포의 지속성이 빈약하다는 것이다. CAR-T 세포의 지속성은 제조된 CAR-T 생성물의 분화 상태와 상관관계가 있는 것으로 보고되었다. 특히, 더 분화된 생성물은 미성숙/나이브 세포가 더 많은 생성물에 비해 생체내(in vivo) 지속성이 감소되는 것으로 여겨진다((8)에서 검토되었음).

[0010] 종래의 CAR-T 제조는 일반적으로 T 세포 분리, T 세포 활성화, T 세포 형질도입(종종 스펜 접종, 레트로벡터, 폴리브렌 등과 같은 형질도입 효율을 향상시키는 전략과 결합됨)을 포함하는 길고 복잡하며 값비싼 공정이다. 효율적인 형질도입을 가능하게 하는 T 세포 자극에는 일반적으로 CD3 또는 CD3/CD28 항체로의 자극과 사이토카인 자극(예를 들어, IL-2, IL-7, IL-21 및/또는 IL-15)이 포함된다. 많은 경우 고가의 장비가 필요한 복잡하고 정교한 제조 공정을 이용하는 것 외에도, 이 공정은 시간과 노동 집약적이다. 예를 들어, T 세포는 일반적으로 길고 고가의 공정을 포함하는 자기 비드를 이용하여 분리된다. 또한 비드는 일반적으로 제거가 필요하며, 이는 제조를 위한 시간, 특수 장비 및 전문 지식이 필요한 또 다른 단계를 추가하게 한다. 또한 복잡한 제조에서는 생성물의 무균성을 보장하기 위해 거의 항상 특수 클린룸 시설을 이용해야 한다.

[0011] T 세포에 바이러스(예를 들어, 렌티바이러스 또는 레트로바이러스)가 효율적으로 형질도입되도록 하려면, 바이러스 형질도입 이전에 1 내지 3일의 기간 동안 사이토카인(예를 들어, IL-2, IL-7 및/또는 IL-15) 존재 하에서(예를 들어, CD3 또는 CD3/CD28 자극으로) T 세포가 먼저 활성화되어야 한다는 것이 이전에 보고되었으며 해당 분야에서 거의 보편적으로 실행되고 있다. 따라서, 통상적인 제조에는 CD3 및/또는 CD3/CD28을 이용한 초기 활성화 단계를 거친 다음, 이어서 1 내지 3일을 거치고 난 후에야 형질도입이 효율적으로 수행될 수 있다. 활성화 후 1 내지 2주 동안 T 세포가 확장되도록 하는 것이 널리 실행되고 있다. 바이러스 형질도입 후, 통상적인 제조에서는 T 세포 확장 단계를 부분적으로 활용하여 환자 주입에 충분한 T 세포를 생성한다.

[0012] 임상 CAR-T 세포 제조 사례의 큰 비율에서, T 세포는 초기 제조 단계(즉, 바이러스 형질도입 전)에서 분리된다. 특히, T 세포 분리 단계는 바이러스 기반 유전자 조작을 포함하는 이전에 보고된 모든 신속한 유전자 조작 T 세포

포 제조 워크플로우(1일 이하)의 일부이다. 임상 제조를 위해 T 세포를 분리하는 거의 모든 경우에, T 세포는 자기 비드(일반적으로 CD3/CD28 다이내비즈(Dynabeads)®(써모피셔 사이언티픽(ThermoFisher Scientific), 메사추세츠(MA)주, 월섬(Waltham)) 또는 CD4/CD8 자기 비드(밀테니 바이오텍(Miltenyi Biotec), 독일, 베르기슈 글라트바흐))를 이용하여 정제된다. 환자 주입 전에 대부분 제거해야 하는 이러한 비드는 T 세포에 단단히 결합되어 있으며, 탈리(일반적으로 표적 표면 항원의 내재화 후에 발생함)되기까지 며칠이 걸린다. 예를 들어, 제조 업체인 써모피셔 사이언티픽은 CD3/CD28 비드가 탈리되는 데 며칠이 걸리며, ~3일 전에 비드 제거를 시도하는 경우 비드 제거는 (결합된 비드로 인해) T 세포의 상당 부분의 손실을 초래하게 될 수 있다고 보고한다. (assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/11131D_32D_61D.pdf).

[0013] 밀테니 바이오텍은 자사의 자기 비드가 결합된 세포에서 2~3일 동안 방출되지 않는다고 보고했다. 사실, 밀테니 바이오텍 비드는 실제로 방출되는 대신 며칠 후에 내재화되기 때문에, 이들은 T 세포 생성물에 알려지지 않은 영향을 미칠 수 있다고 보고되었다 (thermofisher.com/us/en/home/life-science/cell-analysis/cell-isolation-and-expansion/cell-isolation/see-how-miltenyi-microbeads-interact-with-your-t-cells.html).

[0014] 복잡한 제조 워크플로우에 내재된 비용 및 치료 지연과 나이트 집단을 유지하기 위해, T 세포의 배양 기간을 줄이는 이점(예를 들어, 생체 내 지속성 향상)으로 인해, 간단하고 신속한 제조 워크플로우가 바람직하다. 특히, 1일 이하의 워크플로우는 배양 지속기간의 단축으로 나이트 T 세포 집단을 유의하게 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라 궁극적으로 클린룸 시설 외부에서 간단하고 폐쇄된 시스템 제조를 가능하도록 하기 때문에 특히 유리하다. 또한, T 세포의 분리가 필요하지 않은 공정은 더 적은 비용과 전문 지식이 필요한 공정의 단순성을 높이고 요구 사항을 줄여 확장성을 높이는 것을 포함하여 여러 가지 이유로 유리할 것이다. 또한, T 세포 분리 단계를 피함으로써 생성물에는 종양이나 병원체 감염 세포를 용해시키는 능력과 같은 유리한 치료 특성이 있는 것으로 알려진 NK 세포와 같은 추가 세포 유형이 포함될 수 있다. 놀랍게도, 본 발명자들의 연구를 통해 신속한 CAR-T 제조를 위해 분리된 T 세포와 달리 단핵 세포(예를 들어, PBMC 또는 단핵구 고갈된 PBMC)의 혼합 집단을 이용하는 것의 추가적인 이점을 밝혀냈다. 예를 들어, 분리된 T 세포는 T 세포 분리 단계 없이 PBMC를 이용하여 수행된 동일한 제조 공정과 비교하여 제조된 생성물에서 매우 바람직한 나이트 T 세포 집단의 감소를 보여준다.

[0015] 선행 기술의 임상적 신속한 CAR-T 제조 워크플로우에서는 바이러스 유전자 전달을 이용하는 것으로 보고되었다. 제조 방법은 불필요한 비용과 복잡성을 추가하는 T 세포 분리 단계를 이용하며, 상당한 세포 손실 없이 세포에서 자기 비드를 제거할 수 없기 때문에 가능한 가장 짧은 시간에 효율적으로 세포를 제조하는 능력을 손상시킬 수 있다.

[0016] 한 선행 기술 워크플로우에서, ~24시간 생체의 배양을 포함하는 2일 미만의 제조 프로토콜을 보고했다 (shpublications.org/blood/article/138/Supplement%201/2848/481328/ Preservation-of-T-Cell-Stemness-with-a-Novel). 이 공정은 T 세포 분리 단계를 포함하는 것으로 보고되었다. 주요 차이점은 T 세포 분리, T 세포 활성화 방법, 사이토카인 사용 및 자동화 사용으로, 이는 기기(~400k) 및 높은 소모품 비용 둘 다에 상당한 비용을 추가시킨다. 마이크로비드의 사용으로 인해 이 생성물에는 내재화된 마이크로비드가 포함될 가능성도 있다.

[0017] 보고된 바에 따르면 1일에 걸쳐 수행될 수 있는 또 다른 선행 기술 워크플로우에서는 분리된 T 세포에 대해 CD3/CD28 다이내비즈 및 고용량 IL-2(300ul/ml)의 사용을 필요로 한다. 다이내비즈의 사용으로 인해, 이 공정은 세포가 1일에 수확되면 T 세포의 상당한 손실을 초래할 수 있다. 또한, 고용량 IL-2의 사용은 T 세포의 상당한 분화를 유도할 수 있다.

[0018] 유전자 변형 T 세포에 대한 복잡하고 길며 비용이 많이 드는 제조 워크플로우의 한계와 현재의 많은 접근 방식에서 T 세포 분화에 따른 문제점으로 인해, 효과적이고 저렴한 CAR-T 생성물로 이어지는 신속하고 비용 효율적이며 확장 가능한 CAR-T 제조 플랫폼을 개발해야 하는 충족되지 않은 주요한 요구가 존재한다. 본 명세서의 방법과 시스템은 이러한 오랜 요구를 충족한다.

발명의 내용

[0019] 본 명세서에 기재된 목적 및 이점에 따라, 본 개시내용의 한 양태에 있어서, 유전자 변형 T 세포 집단의 신속한 제조 방법으로서, 혼합 단핵 세포 집단을 얻는 단계, 및, 실질적으로 동시에, 혼합 단핵 세포 집단에 포함된 T 세포 집단을 활성화시키는 단계 및 상기 혼합 단핵 세포 집단에 포함된 적어도 상기 T 세포 집단을 외래 뉴클레오타이드로 형질도입하기에 적합한(adapted) 바이러스 벡터에 상기 혼합 단핵 세포 집단을 노출시키는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 이 방법은 T 세포 분리 단계를 필요로 하지 않는다. 실시형태에 있어서, 이 방법은 상

기 동시에 활성화시키고 적어도 하나의 바이러스 벡터에 노출시키는 단계로부터 최대 24시간 경과시 적어도 유전자 변형 T 세포 집단을 포함하는 혼합 단핵 세포 집단을 수확하는 단계를 포함한다.

[0020] 실시형태에 있어서, 활성화시키는 단계는 혼합 단핵 세포를 IL-2, IL-7, IL-15 및 IL21로 이루어진 사이토카인 그룹 중 하나 이상으로부터 선택되는 활성화 제제(activation agent)에, 및/또는 CD3, CD28, OX40, CD2, CD27, ICAM-1, LFA-1(CD11a/CD18), ICOS(CD278), 및 4-1BB(CD137) 중 하나 이상에 대한 활성화제 중에서 선택된 활성화 제제에 노출시킴으로써 수행된다. 실시형태에 있어서, 활성화시키는 단계는 혼합 단핵 세포를 IL-7 및 IL-15로 이루어진 그룹 중 하나 이상으로부터 선택되는 활성화제에 노출시킴으로써 수행된다. 다른 실시형태에 있어서, 이 방법은 활성화시키고 바이러스 벡터에 노출시키는 단계 이전에 단핵 세포 집단에 포함된 단핵구 집단의 부착에 의해 적어도 부분적으로 고갈시키는 단계를 포함한다.

[0021] 방법의 실시형태에 있어서, 활성화시키는 단계 및 바이러스 벡터에 노출시키는 단계는 바람직하게는 임의의 외인성 사이토카인의 부재하에 수행된다. 활성화시키는 단계는 혼합 단핵 세포 집단을 CD3 활성화제, CD28 활성화제, 가용성(soluble) 또는 표면 결합 CD3 항체, 또는 가용성 또는 표면 결합 CD28 항체 중 하나 이상에 노출시킴으로써 수행될 수 있다.

[0022] 유전자 변형 T 세포 집단을 포함하는 혼합 단핵 세포 집단. 혼합 단핵 세포 집단은 성분채집술(apheresis) 또는 말초 혈액 채취를 통해 얻을 수 있다.

[0023] 실시형태에 있어서, 바이러스 형질도입 벡터는 렌티바이러스, 레트로바이러스 및 아데노바이러스로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 실시형태에 있어서, DNA 크기 선별(selection)에 의해 게놈 DNA로부터 플라스미드 DNA를 제거하기 위해 실질적으로 동시에 활성화시키고 바이러스 형질도입 벡터에 노출시키는 단계 이후에 차등 원심 분리 단계가 제공된다.

[0024] 또 다른 양태에 있어서, 본 개시는 상기 방법에 의해 생산된 유전자 변형 T-세포를 제공한다.

[0025] 또 다른 양태에 있어서, 본 개시는 상기 방법에 따라 유전자 변형 T 세포 집단의 신속한 제조를 위한 방법을 수행하기 위한 폐쇄 시스템 키트를 제공한다. 폐쇄 시스템 키트는 혼합 단핵 세포 집단을 수용하기에 적합한 제1 멸균 용기, 단핵구 고갈된 혼합 단핵 세포 집단을 수용하게 적합한 제2 멸균 용기, 비드 결여 T 세포 활성화 제제, T 세포 집단을 외래 뉴클레오티드로 형질도입하기에 적합한 바이러스 벡터, 적합한 배양 배지; 및 적합한 세포 세척 용액을 포함할 수 있다. 실시형태에 있어서, 적어도 제1 용기는 혼합 단핵 세포 집단으로부터 단핵구를 고갈시키는 데 적합한 재료로 제작된다. 제1 및 제2 용기는 비드 결여 T 세포 활성화 제제, 바이러스 형질도입 벡터, 배양 배지, 및 세포 세척 용액의 멸균 도입을 위해 구성된 것일 수 있다.

[0026] 폐쇄 시스템 키트의 다양한 요소/시약은 그 외에는 실질적으로 상술한 것과 같다. 제1 용기 및 제2 용기 중 하나 또는 둘 다는 세포 배양 백 및 세포 배양 플라스크로 이루어진 그룹에서 선택될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 본 발명의 신규한 특징은 첨부된 청구범위에 구체적으로 설명되어 있다. 본 발명의 특징과 이점에 대한 더 나은 이해는 본 발명의 원리가 사용되는 예시적인 실시형태를 설명하는 이하의 상세한 설명과 첨부 도면을 참조하여 얻어질 것이다:

도 1a는 20시간 동시 형질도입/활성화 공정과 단핵구 고갈된 PBMC에 대한 다양한 T 세포 활성화 시약을 이용하는 GFP 렌티바이러스 벡터를 이용한 형질도입 효율의 비교결과를 보여준다. 20시간 후, 세포를 세척하여 유리 바이러스/활성화 시약을 제거하고 클라우즈(Cloudz)® 시약을 용해 완충액으로 제거했다. GFP 발현을 형질도입/활성화 3일 후 유세포 분석법(flow cytometry)으로 결정했다. 활용되는 워크플로우는 **신속한 제조 워크플로우의 상세한 실시예** 섹션에 설명되어 있다. 패널 A는 매트릭스 또는 비드에 접합된 CD3 및 CD28 항체를 모두 포함하는 3가지 상용 시약의 사용을 보여준다.

도 1b는 활성화 시약으로 가용성 CD3(100 ng/ml OKT3) 또는 가용성 CD3(100 ng/ml)과 CD28(300 ng/ml) 항체의 조합을 이용하는 것을 제외하고는 도 1a에서와 같이 수행한 T 세포 제조를 보여준다. 또한, IL-7 및 IL-15의 부재 또는 존재하에 제조를 수행했다.

도 1c는 T 세포 활성화 시약으로 포함된, 제조업체 권장 농도의 이뮤노컬트(Immunocult)®를 이용하는 것을 제외하고는 도 1b에 설명된 대로 수행된 T 세포 제조를 보여주며, 사이토카인은 모든 샘플(IL-7 및 IL-15)에 사용되었다.

도 1d는 T 세포 활성화가 가용성 CD3(100 ng/ml OKT3), 표면 결합 CD3(5 µg/ml OKT3으로 코팅된 표면) 또는 트랜잭트(TransAct)®(제조업체 권장 농도)을 이용하여 수행되었다는 점을 제외하고는 도 1a에 설명된 워크플로우를 이용하여 수행한 T 세포 제조를 보여준다. CD69 발현을 생성물 수확(20시간 배양) 시 유세포 측정법으로 측정했다.

도 2는 동시 대 순차적 T 세포 활성화를 예시한다: CD19 CAR 발현을 유세포 분석법에 의해 항-FMC63 항체(액트로바이오시스템즈(Acrobiosystems), 델라웨어주, 뉴어크)를 이용하여 평가했다. 세포를 형질도입 4일 후 CAR 발현에 대해 검사했다. PBMC를 렌티바이러스 벡터 첨가와 동시에 또는 바이러스 첨가 24시간 전에 클라우즈® T 세포 활성화 시약으로 플레이팅하고 활성화시켰다.

도 3은 신속한 제조 워크플로우를 이용하여 형질도입 효율을 조절하는 데 있어서 다양한 사이토카인의 비교결과를 보여준다. 단핵구 고갈된 PBMC는 표시된 사이토카인을 이용하는 **신속한 제조 워크플로우의 상세한 실시예** 섹션에 설명된 공정을 이용하여 CD19 CAR 렌티바이러스 벡터로 형질도입되었으며 FMC63 특이적 항체(액트로바이오시스템즈)를 이용하여 유세포 분석법으로 72시간 후 CD19 CAR 발현에 대해 평가했다.

도 4는 신속한 제조 워크플로우를 이용한 다양한 배양 기간에 대한 평가를 제시한다. 단핵구 고갈된 PBMC를 활성화시키고 **신속한 제조 워크플로우의 상세한 실시예** 섹션에 설명된 대로 CD19 CAR 벡터로 형질도입시켰다. 세포를 세척하여 유리 바이러스를 제거하고 클라우즈® T 세포 활성화 시약을 공정 개시 후 6시간 또는 17시간에 제거했다. 이어서, 유세포 측정법으로 CD19 CAR 표면 발현을 평가하기 위해 세포를 72시간 동안 배양하여 유지시켰다.

도 5는 UF-KURE19 세포가 6일 동안 제조된 유사한 CAR-T 세포에 비해 증가된 생체내 효능을 나타냈음을 보여준다. NSG 마우스(그룹당 n=5-7마리)에게 RAJI-루시퍼라제 세포(0.5×10^6)를 정맥내로 주사한 후 7일째에 표시된 수의 UF-Kure19 CAR-T 세포 또는 6일 동안 제조된 동일한 CAR을 발현하는 CAR-T 세포를 주사했다.

도 6은 외인성 사이토카인이 효과적인 신속한 T 세포 제조 워크플로우에 필요하지 않음을 보여준다. NSG 마우스에 Raji-루시퍼라제 세포를 주사하고 표시된 CD19 CAR-T 생성물 또는 비히클을 7일 후에 주사한 후 표시된 날짜에 생물발광 이미지화를 수행했다.

도 7a는 작은 단편 제거를 이용한 qPCR 출시 테스트의 테스트를 보여준다. 데이터는 신속한 제조 워크플로우를 이용하여 CD19 CAR-T 형질도입 세포에서 준비되고 20시간 후에 수확된 DNA 샘플에 대한 VSVG(복제 가능 렌티바이러스)의 TaqMan 기반 qPCR 테스트 결과를 보여준다. 작은(low) 단편 제거를 위해 위에서 설명한 프로토콜(PacBio 시약 사용)을 이용하여 DNA 준비를 수행했다. 작은 단편 제거를 수반하거나 수반하지 않은 샘플에 대해 PCR 테스트를 수행했다.

도 7b는 CD19 CAR 렌티바이러스 벡터로 형질도입되고 다양한 MOI에서 8일 동안 배양된 T 세포에 대한 형질도입된 세포당 벡터 카피 수를 나타내는 데이터를 보여준다. CD19 CAR 발현은 CD19 CAR 특이적 항체(액트로바이오시스템즈)를 이용하여 유세포 분석법으로 결정되었고, 카피수는 GAG 및 PTPB2에 대한 qPCR로 결정되었다.

도 7c는 도 7b에 설명된 벡터에 대해 10:1의 MOI를 이용한 신속한 제조 워크플로우를 이용하여 제조된 T 세포에 대한 형질도입된 세포당 벡터 카피수 및 CD19 CAR 표면 발현을 나타내는 데이터를 보여준다. 형질도입된 세포당 벡터 카피 수를 도 7b에 설명된 대로 qPCR 및 유세포 분석법으로 결정했다. SRE 키트(PacBio)를 이용하여 PCR 전에 작은 단편 크기의 DNA를 제거했다.

도 7d는 작은 단편 제거가 게놈 DNA의 양 또는 크기 분포에 크게 영향을 미치지 않음을 입증하는 DNA 겔 전기영동의 결과를 보여준다. CD19 CAR 벡터로 렌티바이러스를 형질도입하고 20시간 후에 수확한 두 개의 서로 다른 T 세포 샘플의 게놈 DNA를 DNeasy 혈액 및 조직 키트를 이용하여 준비했다. 아가로스 겔 전기영동은 게놈 DNA 샘플에서 직접 수행되거나 PacBio 10kb SRE 키트를 이용하여 낮은 입력 고갈을 수행한 후 수행되었다. 레인 1: DNA 마커 레인 2: 샘플 1 총 게놈 DNA 레인 3: SRE 키트 처리 후 총 게놈 DNA 레인 4: 샘플 2 총 게놈 DNA 레인 5: 샘플 2 SRE 키트 처리 후 총 게놈 DNA.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 개시는 다양한 수정 및 대안적인 형태가 가능하지만, 그의 구체적 실시형태는 도면에 예시적으로 도시되어 있으며 본 명세서에서는 아래에서 상세하게 설명된다. 그러나, 구체적 실시형태에 대한 설명은 첨부된 청구범위에 의해 정의된 본 개시의 사상 및 범위 내에 있는 모든 변형, 균등물 및 대안을 포괄하기 위해 본 개시를 제한

[0028]

하려는 의도가 아니라는 것이 이해되어야 한다.

- [0029] 본 명세서에 개시된 발명 주제의 하나 이상의 실시형태의 세부내용이 본 명세서에 설명되어 있다. 본 명세서에 설명된 실시형태 및 다른 실시형태에 대한 변형은 본 명세서에 제공된 정보를 연구한 후에 당업자에게 명백할 것이다. 본 명세서에 제공된 정보, 특히 설명된 예시적인 실시형태의 특정 세부내용은 주로 이해의 명확성을 위해 제공되며 이로부터 불필요한 제한이 없음을 이해해야 한다. 충돌이 발생할 경우, 정의를 포함하여 본 명세서의 내용이 우선한다.
- [0030] 위에서 요약한 선행 기술 방법론의 다른 단점을 해결하기 위해 그리고 견고하고 비용 효율적이며 간단하고 확장 가능한 초고속 T 세포 제조 방법(즉, 1일 이하)을 개발하기 위해, 본 발명자들은 자기 비드를 이용하지 않거나 또는 일부 경우에 심지어 T 세포 분리나 사이토카인을 이용할 필요 없이 CAR-T 세포를 제조하는 방법을 개발했다. 이 경우에, 본 발명자들은 놀랍게도 임의의 인헨서(예를 들어, 폴리브렌, 스핀 접종, 레트로벡터)를 이용할 필요 없이 동시적인 T 세포 활성화 및 바이러스 형질도입을 이용하여 T 세포(혼합 PBMC, 단핵구 고갈된 PBMC 또는 분리된 T 세포로 출발)의 형질도입을 높은 효율로 가능하게 하는 방법을 확인했다. 놀랍게도, 이 공정은 임의의 사이토카인(예를 들어, IL-2, IL-7 및/또는 IL-15)이 부재하거나 사이토카인이 존재하는 경우에도 수행될 수 있다. 이전 제안과 달리, 이 방법을 이용한 T 세포 형질도입 효율은 보다 관용적인 T 세포 활성화와 이어서 활성화 후 1 내지 3일 후의 바이러스 형질도입을 활용한 형질도입 효율만큼 높은 것으로 나타났다. 분리된 T 세포와 달리 PBMC를 출발 소스로 사용하는 또 다른 이점은 자극 신호를 제공하는 다른 단핵 세포의 존재로 인해 CD28 공동 자극에 대한 필요 없이 CD3 활성화만 활용할 수 있다는 것이다. T 세포 활성화가 수행될 때, CD3/CD28 활성화 시약을 이용할 필요 없이 CD3 자극만으로 바람직한 중심 기억 T 세포가 더 많이 보존되는 것으로 알려져 있다(9). 따라서, 개발된 T 세포 제조 워크플로우에는 이전에 보고된 방법에 비해 상당히 비용을 절감하고 효율성을 향상시킬 수 있는 매우 단순화된 공정이 포함된다.
- [0031] **PBMC, 단핵구 고갈된 PBMC 또는 분리된 T세포를 출발물질로 활용할 수 있는 초고속 제조공정 개발**
- [0032] 본 명세서에 개시된 방법에 따르면, T 세포 사전 분리 단계에 대한 필요가 있거나 없이도 제조가 이루어질 수 있다. T 세포 사전 분리 단계를 수행하지 않음으로써, 제조 워크플로우를 보다 신속하게 수행하고 비용을 절감할 수 있으며 놀랍게도 바람직한 나이브 T 세포 비율이 더 높은 생성물을 생산할 수도 있다. 직접적인 T 세포 분리없이, 혈액 성분채집술이나 말초 혈액 샘플을 이용하는 경우, 고체 표면(예를 들어, 조직 배양 플라스크/플레이트 또는 백)에 단순 부착에 의해 단핵구 고갈을 통해 T 세포를 농축할 수 있다. 단핵구 고갈은 플레이트나 백과 같은 부착 표면에서 수행할 수 있으며, 폐쇄 시스템에서도 수행할 수 있다. 단핵구 고갈은 생성물을 부분적으로 정제하는 간단하고 저렴하며 신속한 방법이다.
- [0033] 또 다른 양태에 있어서, T 세포 분리 단계를 수행하지 않음으로써, 최종 생성물에는 유전자 변형 T 세포뿐만 아니라 유익한 치료 특성을 나타낼 수 있는 NK 세포와 같은 다른 세포 유형도 포함될 수 있다.
- [0034] 본 개시내용에 따르면, T 세포는 한 양태에서 비드 결여(bead-free) 활성화 시약을 이용하여 동시에 활성화되고, 낮은 농도의 IL-7 및 IL-15(예를 들어, 5-10 ng/ml 또는 그 미만) 존재 하에 중요하게는 IL-2 부재 하에 형질도입된다. IL-2는 T 세포 분화를 유도하는 것으로 알려진 사이토카인이며, IL-2의 존재 하에 배양된 세포는 나이브/미분화 표현형의 감소된 보존을 나타내는 것으로 알려져 있다. 이는 고용량(예를 들어, 300 IU/ml)을 이용할 때 특히 그렇다(11-12).
- [0035] 또 다른 양태에 있어서, 놀랍게도 T 세포의 동시 활성화 및 형질도입을 수반하는 워크플로우는 IL-7 또는 IL-15의 존재 하에 매우 효율적이며 두 사이토카인을 모두 필요로 하지 않는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 제조 워크플로우는 IL-7 단독 또는 IL-15 단독으로 수행될 수 있다.
- [0036] 또 다른 양태에 있어서, 놀랍게도, T 세포의 동시 활성화 및 형질도입을 수반하는 워크플로우는 IL-2, IL-7 또는 IL-15를 포함하는 외인성 사이토카인 첨가가 완전히 부재할 때 매우 효율적이다. 따라서, 임의의 외인성 사이토카인을 추가하여 제조 워크플로우를 수행할 수 있다.
- [0037] 다른 양태에 있어서, 유전자 변형 T 세포 생성물은 바람직하게는 대략 17-20시간의 배양 시간을 포함하여 24시간 이내에 제조될 수 있다.
- [0038] 이 워크플로우에서는 제조 시간과 비용을 절약하는데 중요한 바이러스 형질도입 또는 T 세포 분리 둘 다 이전에 사전 활성화 단계를 필요로 하지 않는다. 비정제 단핵 세포(예를 들어, PBMC) 또는 단핵구 고갈된 PBMC(정제 T 세포와 반대)의 동시 형질도입 및 활성화를 이용하여 신속한 CAR-T 제조를 효율적으로 수행할 수 있다는 보고는

이전에 없었다.

- [0039] 세포 활성화는 트랜잭트(밀텐니바이오텍), 클라우즈 T 세포 활성화제(바이오테크니), 가용성 또는 표면 결합된 CD3 및/또는 CD28 항체 또는 CD3 및/또는 접합된 CD3/CD28 항체가 있는 맞춤형 마이크로버블을 포함하여 CD3 또는 CD3 및 CD28을 통해 T 세포를 활성화하는 다양한 시약을 이용하여 일어날 수 있다. 특히, 클라우즈 T 세포 활성화제는 트랜잭트에 비해 T 세포를 동시에 활성화하고 바이러스로 형질도입하는 예상치 못한 높은 활성을 발휘할 수 있는 것으로 확인되었다. 또한, CD28이 있거나 없는 가용성 또는 표면 결합 CD3도 본 명세서에 설명된 워크플로우에서 1일 미만으로 작동할 수 있다.
- [0040] 세포 활성화는 또한 CD3 및 CD28 외에(또는 CD28에 추가로) 다른 공동자극 분자, 예컨대 OX40, CD2, CD27, ICAM-1, LFA-1(CD11a/CD18), ICOS (CD278) 및 4-1BB(CD137)를 통해 T 세포를 활성화하는 시약을 사용하여 유발될 수 있다.
- [0041] 세포의 활성화 및 형질도입 후, 세포는 형질도입 후 1일 이내에(예를 들어, ~17-20시간) 수확할 수 있으며 치료 목적으로 직접 사용하거나 나중에 사용하기 위해 냉동보존할 수 있다. 이러한 제조 방법은 T 세포에 형질도입된 유전자의 발현이 세포를 수확하여 수용자에게 주입할 때 완전히 발현되지 않는다는 사실에도 불구하고 높은 치료 효능을 나타내는 T 세포를 유도한다.
- [0042] 따라서, 이 방법은 1일 이내에 수행될 수 있는 세포 치료제 생성물의 신속한 제조 프로토콜을 가능하게 한다.
- [0043] 이 접근법의 또 다른 구성요소에서, T 세포 제조 공정은 수동 또는 자동화 공정을 이용하여 완전히 폐쇄된 시스템에서 수행될 수 있다. 또 다른 구성요소에서는 클린룸 외부의 완전 폐쇄형 시스템에서 제조를 수행할 수 있어 특수 클린룸 인프라 없이 많은 센터에서 제조가 가능하다.
- [0044] 이 접근법의 또 다른 구성요소는 신속한 제조에서 발생하는 바이러스 형질도입 세포 치료제 생성물에 대해 요구되는 출시 테스트에 대한 위양성 반응성을 제거하는 방법이다. 렌티바이러스 또는 레트로바이러스를 생산하기 위한 세포 형질감염(예를 들어, 293 또는 293T 세포)에서 유래된 잔여 플라스미드 DNA는 제조 후 처음 며칠 동안 세포치료제 생성물에 존재한다. 이 플라스미드 DNA는 벡터 카피 수 및 복제 가능(replication competent) 바이러스 테스트 qPCR 분석에 대해 위양성 결과를 제공한다. 이 워크플로에서는 출시 테스트가 워크플로에 통합되어 있으며 이 플라스미드 DNA를 제거하고 생성물 출시에 종종 요구되는 신속하게 제조된 T 세포 생성물의 임상적 사용을 가능하게 하기 위해 차등 원심분리에 기반한 크기 분리 단계가 포함된다.
- [0045] 본 명세서에 개시된 주제는 아래의 구체적이지만 비제한적인 실시예에 의해 추가로 예시된다. 아래의 실시예에는 본 발명과 관련된 개발 및 실험 과정 중 다양한 시점에 수집된 데이터를 대표하는 데이터의 편집이 포함되어 있을 수 있다.
- [0046] **실시예**
- [0047] **신속한 유전자 변형 T 세포 제조공정 개발**
- [0048] 현재까지 이전에 기술된 신속한(예를 들어, 1일 이하) 바이러스 기반 유전자 변형 T 세포 제조 공정은 초기 T 세포 분리 단계를 포함한다. 본 명세서에서 본 발명자들은 분리된 T 세포 외에 PBMC 또는 단핵구 고갈된 PBMC를 활용할 수 있는 신속한 제조 공정을 개발했다. PBMC를 출발 소스로 이용하는 경우, 선택적 초기 단계는 단핵구 고갈을 수행하는 것이며, 이는 일부 경우에 생성물에서 단핵구를 부분적으로 고갈시키는 것이 바람직할 수 있기 때문이다. 이러한 고갈은, 예를 들어, 바이러스가 T 세포 그리고 일부 경우에 NK 세포를 포함하여 최종 생성물에 더 바람직할 수 있는 특정 세포 유형을 우선적으로 감염시킬 수 있게 한다. 그러나, 고갈이 완전하지 않아 단핵구가 T 세포에 자극 신호(예를 들어, CD80/CD86)를 제공할 수 있다(예를 들어, 외인성 CD28 또는 다른 자극과의 공동 자극 없이 외인성 CD3 자극만을 이용하여 T 세포 활성화를 가능하게 한다). 일반적으로, 아래에 설명된 고갈 방법은 도 1에서 볼 수 있듯이 플레이팅 후 2시간부터 출발 혈액 생성물에서 대략 50%의 단핵구 감소를 야기한다. 2시간 후 추가 배양 지속기간은 이 접근법을 이용한 고갈에 유의하게 영향을 미치지 않았다. 또한, 플레이팅된 세포의 세포 밀도(5×10^6 개 세포/ml 및 2×10^6 개 세포/ml)는 동등한 결과를 나타냈다. 고갈은 조직 배양 플레이트 또는 플라스크를 이용하거나 세인트 고베인(Saint Gobain)(프랑스 파리)에서 제조한 뷰라이프(VueLife)® "AC" 시리즈 백과 같은 백을 이용하는 폐쇄 시스템에서 유사한 결과를 나타냈다.

표 1

PBMC로부터의 단핵구 고갈.

	1시간	2시간	3시간	4시간
플레이팅된 세포 농도	MO%	MO%	MO%	MO%
2 x 10 ⁶ /ml	21.46	13.77	14.86	14.95
5 x 10 ⁶ /ml	20.87	11.25	10.97	11.09

[0049]

[0050] 말초 혈액 성분채집 샘플의 단핵 세포를 표시된 시점 동안 섭씨 37도의 조직 배양 인큐베이터 내 6웰 조직 배양 플레이트에서 배양했다. 단핵구 백분율을 혈액학 분석기(히마벳(Hemavet)®, 드류 사이언티픽(Drew Scientific), 플로리다주, 10마이에미 레이크스)를 이용하여 다음 시점에 비부착 세포에서 결정했다. 시작 집단은 25.02%의 시작 단핵구 백분율로 구성되었다. MO% = 단핵구 백분율.

[0051] 분리된 T 세포를 이용하려면, 이들은 전혈, 성분채집 샘플 또는 T 세포의 다른 소스에서 직접 분리할 수 있다. T 세포는 이용 가능한 모든 방법을 이용하여 분리할 수 있다. 예를 들어 CD3, CD4 또는 CD8 자기 비드(예를 들어, 밀테니 바이오텍 마이크로비드 또는 써모피셔 사이언티픽 다이내비즈®)와 같은 자기 비드 접근법을 이용할 수 있다. T 세포는 또한 CD3 마이크로버블, CD3/CD28, 또는 CD3 및 임의의 다른 T 세포 공동 자극 리간드와 결합된 마이크로버블을 이용하여 효율적이고 신속하게 분리될 수 있다. 특히 마이크로버블, 특히 지질 마이크로버블은 신속하고 효율적인 분리 방법을 제공하는 동시에 활성화 신호도 제공한다.

[0052] T 세포의 활성화는 다양한 접근법을 통해 달성될 수 있다. PBMC 또는 단핵구 PBMC를 활용하는 경우, 가용성 활성화 시약 또는 표면 결합(예를 들어, 플레이트/백)은 자기 비드 기반 접근 방식에 비해 신속한 제조 워크플로우에 선호된다. 한 가지 효과적인 활성화 접근법은 CD3/CD28 용해성 미소구체(바이오테크니/R&D 시스템즈(미네소타주, 미네아폴리스)의 클라우즈® 인간 T 세포 활성화 시약)를 이용하는 것이다. 이 시약은 몇 분 내에 용해 가능한 알기네이트 공중합체로 구성되어 있어, 자성 비드를 필요로 하지 않으며 생성물 오염을 야기시키지 않는다. 이뮤노컬트® CD3/CD28 활성화제(스템 셀 테크놀로지스, 캐나다 밴쿠버)와 같은 대체 활성화 시약도 활용할 수 있다. 활용될 수 있는 대체 활성화제에는 CD3 또는 CD3/CD28 자기 비드(예를 들어, 다이내비즈® 써모피셔 사이언티픽) 또는 트랜잭트®(밀테니 바이오텍)가 포함된다. 자기 비드 기반 및 트랜잭트® 제제는 자기 비드에 노동력이 증가하고 초기 시점에 비드가 단단히 결합되어 제거 단계가 까다롭기 때문에 최적의 것으로 여겨지지 않는다. 이로 인해 과도한 세포 손실이 발생할 수 있다. 트랜잭트® 활성화 시약은 또한 다른 생성물에 비해 "더 부드럽고 느린(gentler and slower)" 활성화 시약으로 보고되어 있으며 이는 추후 시점에 최적의 바이러스 형질도입 창을 제공한다. 트랜잭트®는 최적의 바이러스 형질도입을 가능하게 하기 위해 바이러스 형질도입 전 T 세포 활성화에 1~2일이 필요한 것으로 보고되었다. 또한, 첨가 후 2 내지 3일 이전에 트랜잭트®를 씻어내면, 이는 T 세포 증식을 방해할 수 있는 것으로 보고되었다([miltenyibiotec.com/upload/assets/IM0017348.PDF](https://www.miltenyibiotec.com/upload/assets/IM0017348.PDF)). 따라서, 트랜잭트®는 하루 이내에 생성물을 동시에 활성화/형질도입하고 수확하는 제조 프로토콜에 선호되는 활성화 시약이 아니다.

[0053] 매트릭스 관련 활성화 시약 외에도, 가용성 또는 표면 코팅된 CD3 항체(예를 들어, OKT3 항체 또는 기타 CD3 항체)는 단독으로 또는 가용성 CD28 항체 또는 다른 T 세포 공동자극 자극과 조합하여 설명된 신속한 제조 워크플로우와 완벽하게 호환되는 또 다른 효과적인 활성화 전략이다. 특히, 이 접근법은 외인성 CD28 또는 공동 자극을 위한 다른 제제에 대한 필요 없이 T 세포의 활성화를 가능하게 하는 PBMC 기반 접근법의 혜택을 누리게 된다. 또한, OKT3와 같은 CD3 항체를 이용하는 이 방법은 다른 활성화 자극에 비해 비용을 상당히 감소시키며, 환자에게 알려지지 않은 부작용을 나타낼 수 있는 제조된 생성물에 존재하는 스캐폴드(예를 들어, 알지네이트, 마그네틱 비드 등)에 수반되는 위험을 최소화시킨다.

[0054] 특정 T 세포 활성화 시약은 본 명세서에 설명된 1일 미만의 신속한 제조 워크플로우를 이용하여 더욱 효율적으로 기능하는 것으로 밝혀졌다. 특정 T 세포 활성화 시약을 비교하기 위해, 단핵구 고갈된 PBMC(100 µl에

200,000개 세포)를 IL-7(10ng/ml) 및 IL-15(5ng/ml)을 함유하는 텍스맥스(TexMACs)®(밀테니 바이오텍) 배지 중의 3% CTS® 면역 세포 혈청 대체품(써모피셔 사이언티픽)이 있는 96웰 플레이트에 플레이팅했다. GFP 렌티바이러스 벡터와 표시된 활성화 시약(제조업체가 제안한 농도 사용)을 첨가하고 세포를 4일 동안 배양했다. 세포를 세척하고 20시간 후에 배지를 교체하여 유리 바이러스와 유리 활성화 시약을 제거했다. 클라우즈® 시약이 포함된 세포의 경우, 용해 완충액을 이용하여 활성화 시약도 제거했다. GFP의 발현을 유세포 분석법으로 측정했다. 도 2a에서 볼 수 있듯이, 클라우즈® 인간 T 세포 활성화 시약은 신속한 제조 워크플로우를 이용하여 형질도입 효율성을 극대화하는 데 있어서 트랜젝트® 및 CTS CD3/CD28 다이내믹스®에 비해 더 효과적이었다. 대부분의 수치에서 주목할 점은 형질도입 효율을 최대화하기 위해 과도한 바이러스를 이용하는 것과는 반대로 조건 간의 차이가 쉽게 이용되도록 하기 위해 사용된 바이러스 벡터의 양을 적게 유지했다는 것이다. 도 2에서는 높은 수준의 렌티바이러스 벡터를 이용하여 (여전히 형질전환된 세포당 벡터 카피 수를 5 미만으로 유지하고 있음에도 불구하고) 높은 형질도입 효율성을 유도하는 신속한 제조 워크플로우의 능력을 관찰할 수 있다. 도 2b에서도 볼 수 있듯이 신속한 제조 워크플로우는 수용성 CD3 및/또는 수용성 CD3 및 CD28 항체에도 적용된다(도 2c). 예를 들어, 널리 사용되는 CD3 항체인 OKT3를 이 워크플로우를 통해 사용하는 것이 가능하다(도 2c). 단핵구 고갈된 PBMC와 함께 이 제조 공정을 이용하면, CD3 및 CD28 항체 보충과 비교하여 CD3를 단독 사용하여도 형질도입 효율 측면에서 유사하게 기능한다. 주목할 만한 점은, OKT3 CD3 항체 자극이 이 제조 워크플로우의 형질도입 효율성 측면에서 이뮤노컬트®보다 더 효율적으로 기능했다는 것이다(도 2c). 신속한 제조 워크플로우를 이용하면, 표면 결합(예를 들어, 플레이트 또는 플라스크) CD3 항체와 가용성 CD3 항체 둘 모두가 생성물 수확 시(배양 시작 후 20시간) CD69 발현으로 측정했을 때 CD4 및 CD8 T 세포의 유사한 활성화를 유도한다. 주목할 만한 점은 트랜젝트®가 가용성/표면 결합 CD3로 처리한 그룹과 비교하여 CD4 T 세포에서 CD69 상향 조절 수준을 감소시키는 것으로 관찰되었다는 것이다. 이 발견은 배양 용기에 결합된 가용성 CD3 또는 CD3가 신속한 워크플로우를 이용하여 T 세포 활성화에 효율적으로 사용될 수 있음을 보여준다. 또한 이러한 활성화 시약은 트랜젝트®와 같은 다른 제제보다 우수한 것으로 보인다.

[0055] 바이러스 형질도입 효율을 최대화하기 위해서는 순차적인 T 세포 활성화에 이어 바이러스 형질도입이 필요하다는 것이 해당 분야에서 일반적으로 가정되어 왔다. 그러나, 본 명세서의 결과는 적어도 본 발명자들의 특정 제조 워크플로우를 활용하여 동시 T 세포 활성화 및 바이러스 형질도입이 순차적 방법과 본질적으로 동등한 형질도입 효율을 야기한다는 것을 보여준다. 예를 들어, 클라우즈® T 세포 활성화 시약을 이용하여 단핵구 고갈된 PBMC를 활성화하고 클라우즈® 첨가와 동시에 렌티바이러스 CD19 키메라 항원 수용체(CAR) 벡터로 형질도입하거나 24시간 후에 **신속한 제조 워크플로우의 상세한 실시예** 섹션에 설명된 제조 공정을 이용하여 형질도입했다. 도 2에서 볼 수 있듯이, 설명된 제조 워크플로우를 이용하여 동시 또는 순차적 바이러스 형질도입을 이용한 CAR 발현 간에는 큰 차이가 없었다.

[0056] 통상적이고 이전에 보고된 신속한 T 세포 제조 접근법은 모두 IL-2, IL-15 및/또는 IL-7과 같은 사이토카인을 거의 보편적으로 사용하는 배양 조건을 이용한다. 신속한 제조 워크플로에 사용할 최적의 사이토카인을 평가하기 위해, **신속한 제조 워크플로우의 상세한 실시예** 섹션에 설명된 제조 공정을 IL-2(300 u/ml), IL-15(5 ng/ml), IL-7(10 ng/ml), IL-15와 IL-7의 조합을 이용하거나 또는 외인성 사이토카인의 완전한 부재 하에 수행했다(도 4). 형질도입 후 72시간에 T 세포에서 CD19 CAR의 발현을 비교할 때 관찰된 형질도입 효율에서는 서로 다른 사이토카인 그룹 간에 차이가 관찰되지 않았다. 놀랍게도 사이토카인이 전혀 없는 경우에도 형질도입 효율에는 차이가 없었다. 따라서, 제조 공정을 더욱 단순화하여 임의의 외인성 사이토카인 없이 수행할 수 있어 비용을 더욱 절감하고 바람직하지 않은 분화/활성화를 초래할 수 있는 T 세포에 대한 자극 효과를 방지할 수 있다. 도 1b에서 볼 수 있듯이, 신속한 T 세포 제조는 사이토카인 유무에 관계없이 수행된 제조와 비교할 때 T 세포(cells)의 GFP 형질도입을 유도하는 데 거의 동일하게 효율적이었다.

[0057] 제조 공정의 또 다른 주요 속성은 배양 기간이다. 제조 워크플로우의 목표 중 하나는 순수 T 세포 분획을 보존하기 위해 기간을 제한하는 것에 있으므로, 6시간과 17시간의 배양 기간을 활용하여 제조 공정을 비교했다. 두 시점 모두가 끝나면, 용해 완충액을 이용하여 클라우즈® 시약을 제거하고, 세포를 세척하여 바이러스를 제거하고, CAR 발현을 측정하기 위해 총 72시간 동안 배양하여 바이러스나 활성화 시약이 없는 새로운 배지에 현탁시켰다. 도 4에서 볼 수 있듯이, 렌티바이러스 벡터와 T 세포 활성화 시약의 6시간 배양 기간은 유세포 분석법으로 3일에 측정했을 때 유의미한 CD19 CAR 발현을 유도하기에는 충분하지 않았다. 1시간 초과 15시간 미만의 중간 기간은 일반적인 1일 작업시간에 걸쳐 제조를 수행할 수 있는 제약으로 인해 바람직하지 않은 것으로 보이지 않는다.

[0058] 제조 플랫폼은 PBMC 또는 단핵구 고갈된 PBMC를 출발 소스로 활용할 수 있고 생성물이 1일 이내에 배양되므로,

최종 생성물은 T 세포 외에 추가적인 단핵 세포로 구성될 수 있다. 생성물의 조성을 평가하기 위해, **신속한 제조 워크플로우의 상세한 실시예** 섹션에 설명된 방법을 이용하여 3회의 제조 실행을 수행했다. 표 2에서 볼 수 있듯이, T 세포는 생성물의 가장 큰 부분을 차지하지만, 생성물에는 더 적은 수의 B 세포, NK 세포 및 단핵구도 포함되어 있다. 워크플로우에서 선호되는 방법은 냉동보존된 생성물의 생산을 포함하므로, 생성물을 해동시킨 후 이 테스트를 수행했다. 과립구는 출발 성분채집 생성물의 적은 구성요소에 해당하고, 동결/해동에 매우 민감하기 때문에, 생성물에서 과립구는 사실상 검출되지 않았다.

표 2

해동된 UF-KURE19 제품에 대한 3가지 제조 실행의 제품 조성(17시간 제조)

	생성물 1	생성물 2	생성물 3
생존율 %	88	94	90
T 세포 (CD3) %	78	82	78
T 세포의 CD4 %	53	45	56
T 세포의 CD8 %	47	55	44
B 세포 (CD19) %	7	5	5
NK 세포 (CD56) %	11	6	8
단핵구 (CD14) %	6	3	7

[0059]

[0060]

생존력을 평가하기 위해 CD3, CD4, CD8, CD19, CD56 및 CD14 항체와 7-AAD를 이용한 유세포 분석법을 이용하여 생성물 조성을 결정했다.

[0061]

렌티바이러스 형질도입 후 CAR과 같은 단백질의 유의한 발현은 T 세포에서 17-20시간 이내에 발생하지 않으므로, 시험관 내에서 형질도입된 CD19 CAR-T 생성물의 활성을 평가하기 위해, 본 발명자들은 **신속한 제조 워크플로우의 상세한 실시예** 섹션에 설명된 제조 워크플로우를 이용하여 단핵구 고갈된 PBMC에서 CD19 CAR-T 세포를 제조했다. 20시간의 활성화/형질도입 후, 세포에서 유리 바이러스를 세척하고 클라우즈® T 세포 활성화 시약을 제거했다. 이어서, 세포를 3일의 총 배양 기간 동안 배양한 후 표적 RAJI 인간 림프종 세포에 대한 세포 독성 활성을 평가하고 CAR 표면 발현을 측정했다. 표 3에서 볼 수 있듯이, 신속하게 제조된 CAR-T 세포는 RAJI 종양 세포를 효율적으로 용해할 수 있었다.

표 3

배양 3일 후 신속하게 제조된 CD19 CAR-T 세포의 시험관내 세포독성 활성을 테스트한 결과.

	생성물 1	생성물 2	생성물 3
T 세포에서 CAR 발현율 %	50	44	53
RAJI 세포의 용해율 (5:1 CAR-T/RAJI 비율) %	51	56	56

[0062]

[0063]

단핵구 고갈된 PBMC에 CD19 CAR 렌티바이러스 벡터를 형질도입하고 T 세포를 **신속한 제조 워크플로우의 상세한 실시예** 섹션에 설명된 대로 클라우즈® T 세포 활성화 시약으로 활성화시켰다. 유리 바이러스를 제거하고 T 세포 활성화 시약을 20시간 후에 용해시킨 후 세포 배양을 3일 동안 계속했다. CD19 CAR-T 세포의 세포독성 활성을 유세포 분석법으로 CAR-T 세포와 4시간 공동 배양 후 종양 세포로부터의 칼시엔 AM 염료의 손실을 측정함으로써 RAJI 종양 세포에 대해 평가했다. CD19 CAR 발현을 FMC63 특이적 항체(액크로바이오시스템즈)를 이용하여 유세포 분석법으로 측정했다.

[0064]

CD19 CAR 단백질은 생성물이 배양 17-20시간에 수확될 때 표준 유세포 분석법을 이용하여 T 세포의 표면에서 유의하게 발현되지 않으므로, 생성물의 효능을 입증하기 위해 T 세포의 활성을 마우스 모델에서도 평가했다. 이러한 방식으로, CAR의 완전한 발현이 생체 내에서 일어나고 이어서 T 세포가 인간 CD19를 발현하는 세포에 대해

세포독성 활성을 발휘할 수 있게 된다. 신속하게 제조된 CAR-T 생성물의 향상된 효능을 입증하기 위해, 이 생체 내 연구에서는 **신속한 제조 워크플로우의 상세한 실시예** 섹션에 설명된 워크플로우에 따라 단핵구 고갈된 PBMC로 시작하여 17시간 동안 제조되고 CD19 CAR 렌티바이러스 벡터로 형질도입된 냉동보존 세포를 활용하였다. CD19 CAR을 발현하는 이 생성물을 UF-KURE19 세포로 명명했다. 동일한 워크플로우를 이용하여 제조되었지만 17시간이 아닌 6일 동안 배양이 유지된 세포를 Kure19로 명명했다. 이 세포를 인간 림프종의 순환 마우스 모델에서 테스트하였으며 이는 인간 RAJI 종양 세포를 면역결핍 마우스(NSG)에 정맥 주사한 다음, 이어서 종양 세포 주입 7일 후 단일 용량의 CAR-T 생성물을 정맥 주사하는 것을 포함한다. 통상적으로, 이 모델에서는 유의한 효능을 입증하기 위해, 약 500만 개의 CAR T 세포를 사용하였지만, 신속하게 제조된 생성물의 효능 증가가 예상되었기에 더 적은 용량을 사용했다. UF-Kure19 생성물의 경우, UF-KURE19 코호트에는 200만 및 400만개의 CAR 양성 T 세포를 이용했고, 6일 제조 생성물의 경우 200만 개의 CAR 양성 T 세포를 이용했다. 도 5에서 볼 수 있듯이 UF-KURE19 세포는 저용량 및 고용량 수준 모두에서 현저한 효능을 나타냈다. 대조적으로, 6일 배양 생성물은 비히클 처리된 마우스에 비해 종양 진행이 감소한 반면, UF-KURE19 생성물과 비교하면 효능이 극적으로 감소했다. Kure19를 이용한 마우스 연구와 유사하게, UF-KURE19 주사 그룹은 명백한 독성 징후 없이 치료를 잘 견뎌냈다(체중 변화, 섭식, 외모 및 행동으로 모니터링했음).

[0065] CD19 CAR-T 세포는 수개월 및 심지어 수년 동안 지속되는 것으로 밝혀졌다(트랜스진의 검출에 의해 측정됨). 예를 들어, Tisa-cel 생성물은 양호한 임상 결과를 보인 일부 환자에서 최소 2년 동안 지속되는 것으로 밝혀졌다(10). RAJI 림프종 종양을 지니는 NSG 마우스의 혈액 내 인간 T 세포의 증식을 유세포 분석법으로 측정했다. 도 9에서, 마우스 말초 혈액 1 μ L당 검출된 인간 T 세포의 평균 수가 암컷 NSG 마우스에 RAJI 종양 세포 주사(50만 개 i.v.) 후 지정된 시점에 표시되어 있다(측정은 시점당 n=3-5마리 마우스에 대해 수행되었음). 주목할 만한 점은 이러한 측정을 위한 혈액 샘플이 위에 제시된 마우스 효능 연구에서 파생되었다는 것이다. 표 4에 나타난 바와 같이, UF-KURE19 세포의 효능은 인간 T 세포 확장과 상관관계가 있는 6일 제조 KURE19 CAR-T 세포보다 유의하게 높았다.

표 4

유세포 분석법으로 검출한 마우스 혈액 1 μ L당 T 세포

	UF-Kure19 4x10 ⁶ 세포	UF-Kure19 2x10 ⁶ 세포	6 일차 CAR-T 2x10 ⁶ 세포
32일	126.7	60.1	2.7
39일	410.1	ND	7.3
46일	969.1	995.6	14.9

ND = 결정되지 않음.

[0066]

[0067] 상기 기재된 바와 같이, 유의한 형질도입 효율을 달성하기 위해 신속한 제조 워크플로우 동안 사이토카인의 사용은 필요하지 않았다. 따라서, 수확(20시간) 시 T 세포의 기억/분화 상태에 대한 사이토카인 사용의 영향을 유세포 분석법으로 평가했다. 또한, 이 연구에서는 사이토카인이 생성물에 미치는 영향을 더 잘 평가하기 위해 도 10에 표시된 대로 제조 공정에서 다양한 사이토카인을 이용하거나 사이토카인이 없는 방식을 이용했다. 마지막으로 이 연구에서는 단핵구 고갈된 PBMC와 분리된 T 세포를 출발 소스로 사용하는 방법도 비교했다. **신속한 제조 워크플로우의 상세한 실시예** 섹션에 설명된 제조 워크플로우를 활용했으며 정제된 T 세포를 샘플 하위 집합의 출발 소스로 사용했다는 것만 예외였다. T 세포를 로제트셉(RosetteSep)[®] 인간 T 세포 농축 키트(스템셀 테크놀로지스)를 이용하여 말초 혈액에서 정제했다. 표 5에서 볼 수 있듯이, 단핵구 고갈된 PBMC와 분리된 T 세포로 시작하여 제조된 생성물을 CD8⁺ T 세포에서 비교하면 생성물의 CD8⁺ T 세포 성분이 동일하지 않은 것으로 관찰되었다. 특히, PBMC로 시작한 경우 효과기 기억 T 세포의 수준이 약간 낮았고 TEMRA 세포의 비율이 약간 더 높았다.

[0068] CD8⁺ TEMRA 세포의 역할은 완전히 밝혀지지 않았지만 이들은 유익할 수 있는 증가된 세포독성 활성을 부여하는 것으로 생각된다. CAR-T 효능과 상관관계가 있는 것으로 알려진 매우 유익한 나이브 T 세포의 수준은 CD8⁺ T 세포 구획에 있는 PBMC 또는 분리된 T 세포에서 시작하여 유사하지만, 분리된 T 세포와 비교하여 PBMC에는 유익한 중심 기억 T 세포의 비율이 더 높으며, 더 분화되고 덜 바람직한 효과기 기억 세포의 수준은 더 낮았다. CD4⁺ T 세포 구획에서는 분리된 T 세포에 비해 PBMC로 출발할 때, 매우 유익한 나이브 T 세포 비율이 증가한다. 따라서, 생성물 표현형 분석을 기반으로, PBMC를 이용하여 워크플로우를 시작하면 향상된 임상 결과와 생체 내 CAR-T 세포 지속성이 향상될 것으로 예측할 수 있는 보다 바람직한 워크플로우를 제공하는 것으로 나타났다. 또

한, 이 연구에서는 제조 과정에서 다양한 사이토카인(IL2, IL7, IL-15)의 사용 또는 사이토카인의 부재 여부도 조사했다. 표 5에서 볼 수 있듯이, PBMC로 시작할 때 T 세포 기억/분화 표현형 측면에서 모든 조건에서 20시간 워크플로우 동안 유의미한 차이가 없었으며, 이는 놀랍게도 사이토카인이 단핵구 고갈된 PBMC로 시작할 때 이 제조 워크플로우에 필수적인 구성요소가 아니라는 점을 시사한다. 흥미롭게도, 분리된 T 세포로 시작하면, 사이토카인을 이용하지 않았을 때 나이브 T 세포의 감소가 나타났으며, 이는 분리된 T 세포를 출발 소스로 사용하면 사이토카인의 사용이 제조에 더 중요할 수 있음을 시사한다. PBMC가 사이토카인의 내인성 소스를 제공하는 것이 가능하다.

[표 5]

신속한 워크플로우를 이용하여 제조한 T 세포의 표현형.

CD8+ T 세포

T 세포

		TEMRA CCR7-	나이브	CM	EM
활성화	사이토카인	CD45RA+	CCR7+CD45RA+	CCR7+CD45RA-	CCR7-CD45RA-
아니오	아니오	4.79	63	6.01	26.2
네	아니오	5.87	58.9	8.53	26.7
네	IL2 (300u/ml)	6.75	65.7	5.81	21.7
네	IL7 (10ng/ml)	6.73	62.1	6.6	24.6
네	IL15 (5ng/ml)	5.02	66.1	6.13	22.8
네	IL7 + IL15	5.62	65.4	6.86	22.2

PBMCs

		TEMRA CCR7-	나이브	CM	EM
활성화	사이토카인	CD45RA+	CCR7+CD45RA+	CCR7+CD45RA-	CCR7-CD45RA-
아니오	아니오	3.3	66.8	8.2	21.8
네	아니오	10.4	64.8	10.1	14.8
네	IL2 (300u/ml)	10	64.7	12	13.3
네	IL15 (5ng/ml)	8.2	66.3	11.6	13.9
네	IL7+IL15	5.6	68.4	11.8	14.2

CD4+ T 세포

T 세포

		TEMRA CCR7-	나이브	CM	EM CCR7-
활성화	사이토카인	CD45RA+	CCR7+CD45RA+	CCR7+CD45RA-	CD45RA-
아니오	아니오	4.1	66.1	18.1	11.6
네	아니오	3.5	63.6	23.2	9.7
네	IL2 (300u/ml)	4.1	70.3	18.3	7.3
네	IL7 (10ng/ml)	3.3	68.0	20.4	8.3
네	IL15 (5ng/ml)	1.9	70.1	21.2	6.8
네	IL7 + IL15	2.4	70.2	20.6	6.8

PBMCs

		TEMRA CCR7-	나이프	CM	EM CCR7-
활성화	사이토카인	CD45RA+	CCR7+CD45RA+	CCR7+CD45RA-	CD45RA-
아니오	아니오	2.0	74.4	15.9	7.8
네	아니오	5.4	77.0	13.8	3.8
네	IL2 (300u/ml)	4.7	79.7	12.4	3.2
네	IL15 (5ng/ml)	3.8	78.7	14.3	3.2
네	IL7 + IL15	2.7	82.0	12.3	3.1

[0073]

[0074]

신속한 제조 워크플로우의 상세한 실시예 섹션에 설명된 빠른 워크플로우를 이용하거나 단리된 T 세포를 시작 세포 공급원으로 사용했다는 점을 제외하고 동일한 워크플로우를 이용하여 T 세포를 제조했다. 20시간 후 유세포 분석법을 통해 세포의 T 세포 표현형을 평가했다.

[0075]

시험관 내 연구에서 PBMC로 시작하면 T 세포를 효율적으로 형질도입하거나 신속한 제조 공정을 이용하여 바람직한 기억/분화 T 세포 표현형을 유지하는 데 사이토카인이 필요하지 않은 것이 입증되었으므로, 마우스 생체 내 효능 연구를 수행하여 그 결과를 추가로 확인했다. CD19 CAR-T 세포를 배양 중에 IL-7(10ng/ml) 및 IL-15(5ng/ml)을 이용하거나 사이토카인을 이용하지 않고 단핵구 고갈된 PBMC로 출발하는 신속한 제조 워크플로우를 이용하여 제조했다. 위에서 설명한 NSG 마우스의 동일한 인간 림프종 종양 모델(RAJI)을 이용했다. 이 경우, 종양 세포 주사 후 7일에 마우스당 1.2×10^6 개 CD19 CAR 양성 T 세포를 주사했다. 도 6에서 볼 수 있듯이, 외인성 사이토카인이 전혀 없는 상태에서 제조된 CAR-T 생성물은 사이토카인으로 제조된 생성물과 유사한 방식으로 종양 진행을 효율적으로 제어했다. 모든 비히클 대조군 마우스는 45일에 수행된 영상화 이전에 질병 진행으로 인해 사망했다. 주목할 만한 점은 1.2×10^6 개 CD19 CAR 양성 T 세포의 저용량은 도 6A에 표시된 대로 높은 효능을 보였으며, 이는 신속한 CAR-T 생성물의 효능을 추가로 입증한다. 이 연구는 또한 PBMC에서 시작하여 신속하게(1일 미만) 제조된 CAR-T 생성물을 만드는 데 외인성 사이토카인이 필요하지 않음을 명확하게 입증한다.

[0076]

유사한 효능 외에도, 사이토카인 결여 생성물을 이용한 경우 마우스에서 순환하는 인간 T 세포의 감소는 없었다. 인간 특이적 CD3 항체와 유세포 분석법을 이용하여 종양 세포 주입 후 41일째에 도 6에 표시된 실험을 통해 마우스 혈액에서 인간 T 세포를 정량했다. 사이토카인 부재 CAR-T 그룹: 마우스 혈액 마이크로리터당 인간 T 세포 4495개. IL7/IL15 CAR-T 그룹: 마우스 혈액 마이크로리터당 인간 T 세포 1618개.

[0077]

신속한 제조 워크플로우의 상세한 실시예.

[0078]

이 워크플로우에 대해 선택된 대표적인 수정 사항은 괄호 안에 표시되어 있다. 아래에 제시된 비교적 수동적인 워크플로우 외에도 전체 워크플로우는 완전 폐쇄형 및/또는 반자동 또는 자동화된 방식으로 수행될 수 있다. 예를 들어, 세포 세척, 수확 등은 자동화 장비를 이용하여 수행할 수 있다.

[0079]

단핵구 고갈된 PBMC로 출발하여 1일 미만의 CAR-T 생성물을 생산하는 제조 공정:

[0080]

A. 시작 세포 조달(-1일 또는 0일)

[0081]

백혈구분출술(leukapheresis)(또는 말초 혈액 채취)을 이용하여 환자로부터 자가 말초 혈액 단핵 세포를 채취했다. 세포 생성물을 즉시 처리하거나 밤새 보관했다. (필요한 경우 세포 생성물을 냉동보존하고 나중에 처리할 수도 있다.)

[0082]

B. 성분채집 샘플 처리(0일차)

[0083]

혈장을 제거하고 오염된 혈소판의 수를 줄이기 위해 성분채집 샘플을 원심분리로 세척했다. (성분채집 샘플 대신 말초 혈액 채취물(draw)을 이용한 경우, PBMC를 예컨대 피콜(ficoll) 기반 분리 방법으로 분리했다). 다음으로, 성분채집 샘플을 CTS 면역세포 혈청 대체물(썬코퍼서 사이언티픽)이 보충된 텍스맥스(밀테니 바이오텍)와 같은 배양배지에 희석하고, 조직배양 플라스크(들) 또는 세포배양백에 넣어 $37^\circ\text{C} (\pm 2^\circ\text{C})$ 에서 배양 배양기에 배치하고 인큐베이션하여 단핵구를 ml당 최대 5백만 개의 세포 농도로 부착시켰다. 단핵구를 적어도 2시간 동안 플라스크(들) 또는 백(들)에 부착시킨 후, 부착되지 않은 세포를 새로운 조직 배양 플라스크(들) 또는 백(들)으로 옮겼다. IL7(10 ng/ml) 및 IL15(5 ng/ml)을 함유한 배양 배지를 이용하여 부피를 ml당 2백만 개의 세포로 조정했다. (임의의 외인성 사이토카인을 첨가하지 않거나 IL-7 단독, IL15 단독 또는 다른 사이토카인을 첨가하여

배양 배지를 제조할 수도 있다).

- [0084] C. T 세포의 활성화(0일차)
- [0085] 단핵구가 고갈되고 처리된 성분채집 생성물이 들어 있는 플라스크에 클라우즈® CD3/CD28 T 세포 활성화 시약(R&D 시스템즈/바이오테크니)을 첨가할 수 있다. (가용성 CD3 항체, 가용성 CD3/CD28 항체, CD28 가용성 항체가 있거나 없는 표면 결합 CD3 항체, 이뮤노컬트®(스텐셀 테크놀로지스) 또는 임의의 다른 T 세포 활성화 시약을 포함한 다른 활성화 시약을 이용할 수 있다).
- [0086] D. 세포 형질도입(0일차)
- [0087] 5개 미만의 세포당 복제수를 초래하는 것으로 결정된 감염 다중도(MOI)를 이용하여 T 세포 활성화 시약을 첨가한 직후 단핵구 고갈된 PBMC를 함유하는 플라스크 또는 백에 바이러스 벡터를 첨가했다. 세포를 17 내지 20시간 동안 37°C(± 2° C)에서 5%(± 0.5%) CO₂ 인큐베이터에서 인큐베이션했다.
- [0088] E. 세포 수확(1일차)
- [0089] 세포가 클라우즈® 시약을 이용하여 활성화되면, GMP 등급 6X 방출 완충액(R&D 시스템즈/바이오테크니)을 활성화/형질도입된 세포가 들어 있는 플라스크 또는 백에 직접 첨가했다. 다음으로, 세포를 세척하고 크라이오백(들) 또는 바이알(들)에 들어 있는 플라스마라이트(Plasmalyte)-A, 5% HSA 및 5% DMSO와 같은 동결 완충액에 현탁시켰다.
- [0090] **신속한 유전자 조작 T 세포 생성물을 이용하여 벡터 카피 수 및 복제 가능 바이러스 방출 테스트를 가능하게 하는 방법에 대한 설명:**
- [0091] 바이러스 벡터를 포함하는 신속한 T 세포 제조 워크플로우 분야의 주요 장애물은 필요한 생성물 출시 테스트를 수행하는 것이므로, 아래에 설명된 방법을 개발했다. 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 형질도입 세포치료제에 대해 현재 요구되는 출시 테스트 요구사항에는 복제 능력이 있는 렌티바이러스 및 벡터 사본 수를 평가하는 것이 포함된다. 이 두 가지 분석법 모두 통상적인 qPCR 기반 분석법을 이용할 때 유리 플라스미드에 의한 오염 수준이 낮은 경우에도 상당한 위양성 결과를 나타낸다. 293개 세포 형질감염의 잔여 유리 플라스미드가 바이러스 벡터에 존재한다. 바이러스 형질도입 후 제조 초기 시점에는 벡터에 잔류 플라스미드가 남아 있으며 기존 테스트 방법으로는 위양성 결과를 제거하는 것이 거의 불가능하다. 이러한 위양성 반응은 주요 장애물이었으며 환자에게 사용할 수 있는 생성물을 신속하게 제조하는 능력을 제한했다.
- [0092] 바이러스 통합 및 복제 가능 벡터 둘 다에 대한 관심 DNA는 통합된 바이러스 DNA이므로, 여기에 포함된 제조 워크플로우는 유리 잔여 플라스미드 DNA를 제거하는 방법과 짝을 이루어 이러한 위양성 반응 없이 벡터 카피 수와 복제 능력이 있는 렌티바이러스 모두에 대해 PCR 반응 또는 기타 분자 테스트를 수행할 수 있게 된다. 특히 유리 플라스미드 DNA는 게놈 DNA보다 훨씬 작다. 원심분리 기반 방법은 더 큰 게놈 DNA를 유지하면서 작은 DNA를 고갈시키는 데 사용된다. 이 방법을 이용하면 플라스미드 DNA의 위양성 반응성이 없으므로 빠른 CAR-T 제조의 주요 장애물을 극복하는 동시에 게놈에 통합된 DNA를 측정하는 것이 가능해진다.
- [0093] 단기간(예를 들어, 0~3일) 동안 확장된 CAR-T 생성물에서 유리 플라스미드 DNA를 제거하기 위해, 작은 크기의 DNA(예를 들어, 10kb 미만)를 고갈시킬 수 있으며 이때 게놈 DNA는 원심분리를 이용하여 유지시킬 수 있다(예를 들어, 고분자량 DNA를 우선적으로 침전시키기 위해 염/폴리머 용액과 같은 용액을 이용). 예를 들어, 팍바이오(PacBio) 짧은 판독 제거기 키트(PacBio; 캘리포니아주, 멘로 파크)를 이용할 수 있으며, 이것은 단일 원심분리 단계에서 이러한 분리를 가능하게 한다([circulomics.com/store/Short-Read-Eliminator-Kit-p131401036](https://www.circulomics.com/store/Short-Read-Eliminator-Kit-p131401036)). 이 상업용 시약 외에도, 대안적인 방법은 이전에 작은 크기 단편(예를 들어, 전체 DNA에서 <10kb)을 효과적으로 고갈시키는 것으로 나타났기 때문에 상업용 버퍼 SRE 대신 아래 설명된 프로토콜에서 4% PVP 360,000, 1.2 M KCL, 20 mM Tris-HCL pH 8을 활용하는 것이다(11). 정제된 DNA는 분석 테스트(예를 들어, qPCR 분석)에 직접 사용할 수 있다. 이 키트는 이 특정 적응증을 위해 설계되지 않았지만, 잘 작동하고 간단하고 비용 효율적이며 빠른 접근 방식을 제공한다.
- [0094] 이 방법이 사용될 수 있는 방법의 한 예는 인간 게놈 DNA를 분리할 수 있는 임의의 상업용 전체 DNA 분리 키트(예를 들어, DN이지(DNeasy) 블러드 앤 티슈 키트, 퀴아젠(Qiagen), 독일, 힐텐)를 이용하여 초기에 전체 DNA를 분리하는 것이다. 그 다음, 소량의 단편 DNA를 제거하기 위해 아래 방법이나 유사한 접근법을 따를 수 있다.
- [0095] 1. 내경이 넓은 피펫 팁을 이용하여, Buffer SRE를 시작 게놈 DNA 샘플에 첨가하고 피펫팅으로 완전히

혼합한다. PacBio 또는 기타 상용 시약을 이용하지 않는 경우, 4% PVP 360,000, 1.2M KCL, 20mM Tris-HCL pH 8 을 전체 DNA 샘플에 1:1 부피 비율로 추가할 수 있다.

- [0096] 2. 실온에서 30분간 10,000 x g로 원심분리한다.
- [0097] 3. 피펫을 이용하여 상층액을 제거한다.
- [0098] 4. 튜브에 70% 에탄올을 첨가한다.
- [0099] 5. 튜브를 실온에서 약 2분간 10,000 x g로 원심분리한다.
- [0100] 6. 상층액을 제거하고 70% 에탄올 세척을 반복한다.
- [0101] 7. 튜브에 완충액 EB(또는 PacBio 키트를 이용하지 않는 경우, 10mM Tris-HCL pH 8)를 추가하고 50℃에서 10 내지 30분 동안 배양한 다음 DNA 펠릿을 재현탁시킨다.
- [0102] 신속한 제조 워크플로우와 함께 작은 단편 제거 워크플로우를 이용하면 배양 초기 시점(예를 들어, 17시간 내지 3일)에 유전자 조작 T 세포 생성물에 대해 출시 테스트를 수행할 수 있는 효과적인 공정이라는 것이 입증되었다. 예를 들어, 17-20시간 워크플로우를 이용하여 제조된 CAR-T 생성물은 20시간에 수확되었고 대체 (surrogate) 분취량은 72시간에 수확되었다. DN이지 블러드 앤 티슈 키트(퀴아젠)을 이용하여 전체 DNA를 분리 하고 Short Read Eliminator Kit(PacBio)를 이용하여 작은 단편 고갈 DNA를 준비했다. VSV-G에 대한 실시간 PCR 분석과 GAG 및 하우스키핑 유전자 PTPB2에 대한 실시간 PCR 분석을 이용하는 벡터 통합을 이용하여 복제 가능 렌티바이러스에 대해 전체 DNA 샘플뿐만 아니라 작은 단편 고갈 DNA 샘플을 테스트했다. PCR 반응에 사용된 프라이머와 형광 프로브는 표 6에서 확인할 수 있다.

표 6

GAG, VSV-G 및 PTPB2 qPCR 검정에 사용된 PCR 프라이머 및 프로브.

GAG 프라이머

5'-GGA GCT AGA ACG ATT CGC AGT TA-3'

5' GGT TGT AGC TGT CCC AGT ATT TGT C-3'

GAG 프로브

5'-/56-FAM/ACA GCC TTC TGA TGT TTC TAA CAG GCC AGG 3'BHQ-1

PTPB2 프라이머

5'-TCT CCA TTC CCT ATG TTC ATG C-3'

5'-GTT CCC GCA GAA TGG TGA GGT G-3'

PTPB2 프로브

5'-/5HEX/ATG TTC CTC /ZEN/GGA CCA ACT TG 3iabfq 3'

VSVG 프라이머

5'-AGG GAA CTG TGG GAT GAC TG

5'-GAA CAC CTG AGC CTT TGA GC

VSVG 프로브

5'-6FAM-GAACACCTGAGCCTTTGAGC MGBNFQ-3'

[0103]

[0104]

PCR 생성물을 GAG, VSV-G 및 PTPB2의 단일 카피를 발현하도록 조작된 선형화된 플라스미드로 구성된 표준 프로브를 이용하여 정량했다. 도 7A에서 볼 수 있듯이, 작은 단편이 고갈된 DNA로 수행된 qPCR 반응으로는 VSV-G가 검출되지 않았고 따라서 20시간 동안 제조된 2가지 다른 생성물에서 예상된 대로 복제 능력이 있는 렌티바이러스에 대해 음성이었다. 대조적으로, 작은 단편 고갈 없이 전체 게놈 DNA를 활용한 경우, 두 샘플 모두 작은 단편 없는 플라스미드 오염으로 인해 VSV-G에 대해 위양성 qPCR 결과를 나타냈다. 3일 동안(20시간이 아닌) 세포 세척 또는 배양과 같은 대체 접근법이 복제 가능 렌티바이러스 테스트의 위양성 반응성을 극복할 수 있는지 평

가하기 위해 추가 분석을 수행했다. 특히, 본 발명자들은 렌티바이러스로 형질도입된 CD19 CAR-T 생성물을 20시간과 72시간에 수확하고 게놈 DNA 분리 전에 세포의 광범위한 세척을 수행했다. 특히, 세포(5×10^6 개 세포)를 50 ml PBS로 72시간 샘플의 경우 15회, 20시간 샘플의 경우 5회 세척했다. 모든 경우(두 생성물 모두 20시간 및 72시간 샘플)에서 VSV-G qPCR 분석을 이용하면 위양성 반응이 나타났다. 따라서, 배양 기간을 3일로 늘리고 광범위하게 세포를 세척하는 것은 이러한 위양성 반응성을 줄이는 데 충분하지 않았다.

[0105] 복제 가능 렌티바이러스 테스트에 대해 주목할 점은, 위양성 반응성으로 인해 17-20시간 및 72시간의 신속한 생성물 제조로 일관되게 관찰된 양성 반응성을 강화하는 임상 생성물에 대해 지난 10년 동안 FDA에 보고된 양성 테스트가 없었다는 것이다([fda.gov/media/113790/download](https://www.fda.gov/media/113790/download)). 또한, 배양 기간이 8일로 연장되면 VSV-G qPCR 분석은 음성이 되며 이는 유리 플라스미드 DNA가 해당 시점까지 손실되고 진정한 복제 가능 바이러스가 존재하지 않음을 의미한다.

[0106] 복제 가능 렌티바이러스 테스트와 유사하게, 바이러스로 형질도입된 세포치료제에 대한 또 다른 중요한 출시 테스트는, 유리 플라스미드 오염이 바이러스 벡터에도 존재하고 위양성 반응성을 나타낼 수 있는 GAG 유전자에 대한 흔히 qPCR로 측정되는 벡터 통합이다. 처음에, 벡터의 감염 다중도(MOI)를 평가하고 전체 벡터 통합에 대한 기준선을 평가하기 위해, 8일 동안 배양에서 유지된 CD19 CAR 렌티바이러스로 형질도입된 T 세포의 벡터 카피 수를 결정하기 위해 GAG/PTPB2 qPCR을 수행했다. 도 7B에서 볼 수 있듯이, 10:1의 MOI는 1.5의 형질도입된 T 세포(즉, CD19 CAR 발현)당 피크 벡터 카피 수를 야기했다. 그 다음, 세포를 20시간, 3일 및 7일에 수확한 것을 제외하고 10:1의 CD19 CAR 벡터의 MOI를 이용한 경우, 신속한 제조 워크플로우를 이용하여 형질도입된 세포당 벡터 카피 수를 결정했다. 또한, 작은 단편 DNA를 제거하기 위해 SRE 키트(PacBio)를 활용했다. 도 7C에서 볼 수 있듯이, 벡터 통합 결과는 모든 시점에서 유사했다. 중요한 점은 CD19 CAR 표면 발현은 20시간에서는 매우 낮지만, 약 72시간에는 완전히 발현된다는 것이다.

[0107] 마지막으로, 작은 단편 제거 전후에 2개의 20시간 신속 제조 T 세포 생성물로부터 제조된 전체 DNA 샘플의 겔 전기영동은 예상대로 게놈 DNA가 유지되고 따라서 바람직하지 않은 저분자량 단편만이 고갈된다는 것을 입증했다(도 7D). 또한, 나노드롭(Nanodrop)® 분광광도계(썬모피셔 사이언티픽)를 이용한 DNA 농도의 정량화에서는 작은 단편 제거 전후의 DNA 농도에서 측정 가능한 변화가 전혀 나타나지 않았으며 이는 단지 극소량의 DNA만 제거된다는 것을 입증한다.

[0108] 이해되는 바와 같이, 현재 기술된 CAR-T 세포 제조 워크플로우는 선행 기술 방법론에 비해 상당한 개선을 제공한다. 특히 어떠한 제한도 의도하지 않는다:

[0109] 1. 성분채집 생성물로부터 분리되지 않은 세포 또는 고체 표면에 부착되어 단핵구 고갈된 성분채집 세포를 이용하여 주로 제조를 수행한다. 또한, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 또는 말초 혈액에서 직접 분리된 단핵구 고갈된 PBMC를 활용할 수 있다. 따라서, 바이러스 형질도입과 관련된 신속한 CAR-T 워크플로우에 중요하다고 가정되었던 정제된 T 세포를 필요로 하지 않는다. 본 발명자들이 알고 있는 한, 이는 바이러스 형질도입을 이용하여 신속한 유전자 변형 T 세포 제조를 위한 출발 소스로서 분리된 T 세포가 아닌 PBMC를 이용하는 최초의 1일 이하 프로토콜이다.

[0110] 2. 세포 활성화는 다양한 방법을 이용하여 수행된다. 자기 비드가 세포에서 떨어지려면 며칠이 걸리므로 이러한 비드를 이용하는 방법론은 생성물을 수확할 수 있는 날짜를 지연시키거나 비드에 결합된 세포의 손실로 인해 생성물 수율이 크게 감소하는 결과를 초래한다. 또한, 예기치 않게 본 발명자들은 특정 비자성 비드 기반 T 세포 활성화 시약을 이용하여 형질도입 효율이 향상됨을 관찰했다. 현재 기술된 활성화 접근법은 종래 기술 방법에서 요구되는 자기 비드를 활용하는 것과 관련된 증가된 비용 및 제조 복잡성의 회피와 결합되어 향상된 형질도입 효율을 제공한다.

[0111] 3. 본 명세서에 설명된 제조 공정은 외인성 사이토카인 없이 효율적으로 수행될 수 있는 최초의 워크플로우인 신속한 CAR-T 제조 워크플로우이다. 제조 공정에서 사이토카인은 비용을 상당히 증가시키며 T 세포의 변화를 유발할 수도 있다. 신속한 제조 워크플로우의 주요 이점은 T 세포(예를 들어, 순수 T 세포)의 출발 집단을 환자로부터 수집한 원래 세포에 최대한 가깝게 유지하는 것이므로, 외인성 사이토카인을 피하는 것은 주요 이점으로 여겨진다.

[0112] 4. 백을 이용하여 T 세포 생성물을 제조하기 위해 설명된 완전히 폐쇄된 시스템을 이용하면 바이러스/배지/활성화 시약 등이 백에 제공된 다음 성분채집 생성물과 혼합되는 편리한 키트 기반 생성물을 제공할 수 있다. 이 방법을 이용하여 클린룸 외부에서 생성물을 제조할 수 있어 생성물의 광범위한 사용 및 제조가 용이해 비용을 절

감하고 접근성을 높일 수 있다.

- [0113] 5. 본 명세서에 설명된 방법은 필수적인 생성물 출시 테스트 수행 분야의 주요 장애물을 극복한다. 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 형질도입 세포치료제 생성물에 대해 현재 요구되는 출시 시험 요구사항에는 복제 능력이 있는 렌티바이러스 및 벡터 카피 수를 평가하는 것이 포함된다. 이 2가지 분석법 모두 통상적인 qPCR 기반 분석법을 이용할 때 유리 플라스미드에 의한 오염 수준이 낮은 경우에도 상당한 위양성 결과를 나타낸다. 293 세포와 같은 바이러스 생산자 세포의 잔여 유리 플라스미드는 바이러스 벡터에 존재한다. 바이러스 형질도입 후 제조 초기 시점에는 벡터에 잔류 플라스미드가 남아 있으며 기존 테스트 방법으로는 위양성 결과를 제거하는 것이 거의 불가능하다. 이러한 위양성 반응성은 다른 그룹의 주요 장애물이었으며 환자에게 사용할 수 있는 생성물을 신속하게 제조하는 능력을 제한했다. 바이러스 통합 및 복제 가능 벡터 모두에 대한 관심 DNA는 통합된 바이러스 DNA이므로, 본 명세서에 포함된 제조 워크플로우는 유리 잔류 플라스미드 DNA를 제거하는 방법과 결합되어 이러한 위양성 반응 없이 벡터 카피 수와 복제 가능 렌티바이러스 모두에 대해 qPCR 반응을 수행할 수 있다. 특히 유리 플라스미드 DNA는 게놈 DNA보다 훨씬 작다. 원심분리 기반 방법은 더 큰 게놈 DNA를 유지하면서 작은 DNA를 고갈시키는 데 사용된다. 이 방법을 이용하면 플라스미드 DNA의 위양성 반응성이 없으므로 신속한 CAR-T 제조의 주요 장애물을 극복하는 동시에 게놈에 통합된 DNA를 측정하는 것이 가능하다.
- [0114] 다르게 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명(들)이 속하는 기술 분야의 숙련자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다.
- [0115] 달리 명시하지 않는 한, 본 명세서의 전체 개시 내용 전반에 걸쳐 언급된 모든 특허, 특허 출원, 공개 출원 및 간행물, 진뱅크(GenBank) 서열, 데이터베이스, 웹사이트 및 기타 공개 자료는 그 전체가 참조로 통합된다.
- [0116] URL이나 다른 식별자 또는 주소를 참조하는 경우, 그러한 식별자는 변경될 수 있고 인터넷의 특정 정보는 왔다 갔다 할 수 있지만 인터넷 검색을 통해 동등한 정보를 찾을 수 있다는 것은 이해되어야 한다. 이에 대한 참조는 그러한 정보의 이용가능성 및 공개적 유포를 입증한다.
- [0117] 본 명세서에 사용된 임의의 보호기, 아미노산 및 다른 화합물에 대한 약어는, 달리 나타내지 않는 한, 이들의 일반적인 사용법, 인정된 약어, 또는 IUPAC-IUB 생화학 명명법 위원회에 따른다(Biochem. (1972) 11(9):1726-1732 참조).
- [0118] 본 명세서에 설명된 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법, 장치, 및 재료를 본 명세서에 개시된 발명 주제를 실행하거나 테스트하는데 사용할 수 있지만, 대표적인 방법, 장치 및 재료가 본 명세서에 설명되어 있다.
- [0119] 특정 예에서, 본 명세서에 개시된 뉴클레오타이드 및 폴리펩티드는 진뱅크(GENBANK)[®] 및 스위스포트(SWISSPROT)와 같은 공개적으로 이용 가능한 데이터베이스에 포함되어 있다. 그러한 공개적으로 이용가능한 데이터베이스에 포함된 그러한 뉴클레오타이드 및 폴리펩티드와 관련된 서열 및 기타 정보를 포함하는 정보는 의도적으로 참조로 통합된다. 달리 표시되거나 명백하지 않은 한, 공개적으로 이용가능한 데이터베이스에 대한 참조는 본 출원의 출원일 현재 가장 최신 버전의 데이터베이스에 대한 참조이다.
- [0120] 달리 명시하지 않는 한, 본 명세서 및 청구범위에 사용된 성분의 양, 반응 조건과 같은 특성 등을 표현하는 모든 숫자는 모든 경우에 "약(about)"이라는 용어로 변경되는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 달리 명시하지 않는 한, 본 명세서 및 청구범위에 제시된 수치적 파라미터는 본 명세서에 개시된 발명 주제에 의해 얻고자 하는 원하는 특성에 따라 달라질 수 있는 근사치이다.
- [0121] "예를 들어(for example)", "예컨대(such as)", "포함하는(including)" 등의 문구가 본 명세서에서 사용되는 경우, 달리 명시적으로 언급하지 않는 한 "제한 없이(and without limitation)"라는 문구가 따르는 것으로 이해되어야 한다. 마찬가지로 "일예(an example)", "예시적인(exemplary)" 등은 제한되지 않는 것으로 이해되어야 한다. "실질적으로(substantially)"라는 용어는 의도된 목적에 부정적인 영향을 주지 않는 설명에서 벗어나는 것을 허용한다. 설명적인 용어는 "실질적으로"라는 단어가 명시적으로 언급되지 않은 경우에도 "실질적으로"라는 용어로 수정되는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 예를 들어, "레버가 수직으로 연장된다(wherewithin the lever extends vertically)"라는 문구는 레버가 그 기능을 수행하기 위해 정확한 수직 배열이 필요하지 않은 한 "레버가 실질적으로 수직으로 연장된다(wherewithin the lever extends substantially vertically)"는 것을 의미한다.
- [0122] "포함하는(comprising)" 및 "함유하는(including)" 및 "갖는(having)" 및 "포함하는(involving)"(및 유사하게 "포함하다(comprises)", "함유하다(includes)", "갖다(has)" 및 "포함하다(involves)") 등의 용어는 상호교환

적으로 사용되며 동일한 의미를 갖는다. 구체적으로, 각각의 용어는 "포함하는(comprising)"이라는 일반적인 미국 특허법상 정의와 일관되게 정의되므로 "적어도 다음의 것(at least the following)"을 의미하는 개방형 용어로 해석되며, 또한 추가적인 특징, 제한, 양상 등을 배제하지 않는 것으로 해석된다. 따라서, 예를 들어 "a, b 및 c 단계를 포함하는 프로세스(a process involving steps a, b, and c)"는 해당 프로세스가 적어도 a, b 및 c 단계를 포함한다는 것을 의미한다. "a" 또는 "an"이라는 용어가 사용되는 경우, 해당 해석이 문맥상 무의미하지 않는 한 "하나 이상(one or more)"으로 이해된다. "포함하다(comprise)", "가지다(have)", "함유하다(include)" 및 "포함하다(contain)"(및 그 변형)라는 용어는 개방형 연결 동사이며 청구항에 사용될 때 다른 요소를 추가할 수 있다.

[0123] 청구범위 또는 명세서에서 "포함하는(comprising)"이라는 용어와 함께 사용되는 "a" 또는 "an"이라는 단어의 사용은 문맥상 달리 명시하지 않는 한 하나 또는 하나 이상을 의미한다.

[0124]본 명세서에 사용된 용어 "약(about)"은 질량, 중량, 시간, 부피, 농도 또는 백분율의 양 또는 값을 언급할 때 지정된 양으로부터 일부 실시형태에서는 $\pm 20\%$, 일부 실시형태에서는 $\pm 10\%$, 일부 실시형태에서는 $\pm 5\%$, 일부 실시형태에서는 $\pm 1\%$, 일부 실시형태에서는 $\pm 0.5\%$, 일부 실시형태에서는 $\pm 0.1\%$, 일부 실시형태에서는 $\pm 0.01\%$, 일부 실시형태에서는 $\pm 0.001\%$ 의 변동을 포함하는 것을 의미하며, 그러한 변형은 개시된 방법을 수행하는데 적절하기 때문이다. 청구범위에서 "또는(or)"이라는 용어의 사용은 대안만을 지칭하도록 명시적으로 나타내지 않거나 대안이 상호 배타적인 경우를 제외하고는 "및/또는(and/or)"을 의미하는 데 사용된다.

[0125]본 명세서에 사용된 바와 같이, 범위는 "약(about)" 하나의 특정 값 및/또는 "약" 또 다른 특정 값으로 표현될 수 있다. 또한, 본 명세서에 개시된 다수의 값이 있고, 각각의 값은 또한 값 자체에 더하여 특정 값 "약"으로서 본 명세서에 개시된다는 것이 이해되어야 한다. 예를 들어 값 "10"이 개시되면, "약 10"도 개시된 것이다. 2개의 특정 유닛 사이의 각 유닛도 개시되어 있는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 10과 15가 개시되어 있으면, 11, 12, 13, 14도 개시된 것이다.

[0126]본 명세서에 사용된 "선택적(optional)" 또는 "선택적으로(optionally)"는 이후에 설명되는 사건 또는 상황이 발생하거나 일어나거나 일어나지 않으며, 설명에는 상기 사건 또는 상황이 일어나는 경우와 일어나지 않는 경우가 포함된다는 것을 의미한다. 예를 들어, 선택적으로 변형 부분은 해당 부분이 변형 또는 비변형임을 의미한다.

[0127]본 명세서에 개시된 발명 주제의 다양한 세부 사항은 본 명세서에 개시된 발명 주제의 범위를 벗어나지 않고 변경될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 또한, 전술한 설명은 단지 예시를 위한 것이며 제한을 위한 것이 아니다. 위의 가르침에 비추어 명백한 수정 및 변형이 가능하다. 그러한 모든 수정 및 변형은 공정하고, 적법하며 공평하게 자격이 있는 범위에 따라 해석될 때 첨부된 청구범위의 범위 내에 있다.

[0128]참고문헌:

1. Rodriguez J, Caballero MD, Gutierrez A, Solano C, Arranz R, Lahuerta JJ, Sierra J, Gandarillas M, Perez-Simon JA, Zuazu J, Lopez-Guillermo A, Sureda A, Carreras E, Garcia-Larana J, Marin J, Garcia JC, Fernandez De Sevilla A, Rifon J, Varela R, Jarque I, Albo C, Leon A, SanMiguel J, Conde E. Autologous stem-cell transplantation in diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma not achieving complete response after induction chemotherapy: the GEL/TAMO experience. *Ann Oncol*. 2004;15(10):1504-9. Epub 2004/09/16. doi: 10.1093/annonc/mdh391. PubMed PMID: 15367411.

2. Vose JM, Zhang MJ, Rowlings PA, Lazarus HM, Bolwell BJ, Freytes CO, Pavlovsky S, Keating A, Yanes B, van Besien K, Armitage JO, Horowitz MM, Autologous B, Marrow Transplant Registry Lymphoma Working C. Autologous transplantation for diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma in patients never achieving remission: a report from the

[0129]

Autologous Blood and Marrow Transplant Registry. *J Clin Oncol*. 2001;19(2):406-13. Epub 2001/02/24. doi: 10.1200/JCO.2001.19.2.406. PubMed PMID: 11208832.

3. Crump M, Neelapu SS, Farooq U, Van Den Neste E, Kuruvilla J, Westin J, Link BK, Hay A, Cerhan JR, Zhu L, Boussetta S, Feng L, Maurer MJ, Navale L, Wiecek J, Go WY, Gisselbrecht C. Outcomes in refractory diffuse large B-cell lymphoma: results from the international SCHOLAR-1 study. *Blood*. 2017;130(16):1800-8. Epub 2017/08/05. doi: 10.1182/blood-2017-03-769620. PubMed PMID: 28774879; PMCID: PMC5649550.

4. Westin JR, Kersten MJ, Salles G, Abramson JS, Schuster SJ, Locke FL, Andreadis C. Efficacy and Safety of CD19-Directed CAR-T Cell Therapies in Patients With Relapsed/Refractory Aggressive B-Cell Lymphomas: Observations From the JULIET, ZUMA-1, and TRANSCEND Trials. *American journal of hematology*. 2021. Epub 2021/07/27. doi: 10.1002/ajh.26301. PubMed PMID: 34310745.

5. Harrison RP, Zylberberg E, Ellison S, Levine BL. Chimeric antigen receptor-T cell therapy manufacturing: modelling the effect of offshore production on aggregate cost of goods. *Cytotherapy*. 2019;21(2):224-33. Epub 2019/02/17. doi: 10.1016/j.jcyt.2019.01.003. PubMed PMID: 30770285.

6. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, Lekakis LJ, Miklos DB, Jacobson CA, Braunschweig I, Oluwole OO, Siddiqi T, Lin Y, Timmerman JM, Stiff PJ, Friedberg JW, Flinn IW, Goy A, Hill BT, Smith MR, Deol A, Farooq U, McSweeney P, Munoz J, Avivi I, Castro JE, Westin JR, Chavez JC, Ghobadi A, Komanduri KV, Levy R, Jacobsen ED, Witzig TE, Reagan P, Bot A, Rossi J, Navale L, Jiang Y, Aycock J, Elias M, Chang D, Wiecek J, Go WY. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N*

[0130]

Engl J Med. 2017;377(26):2531-44. Epub 2017/12/12. doi: 10.1056/NEJMoa1707447. PubMed PMID: 29226797; PMCID: PMC5882485.

7. Kersten MJ, Spanjaart AM, Thieblemont C. CD19-directed CAR T-cell therapy in B-cell NHL. Curr Opin Oncol. 2020;32(5):408-17. Epub 2020/08/03. doi: 10.1097/CCO.0000000000000668. PubMed PMID: 32740094.

8. Zhang H, Zhao P, Huang H. Engineering better chimeric antigen receptor T cells. Exp Hematol Oncol. 2020;9(1):34. Epub 2020/12/10. doi: 10.1186/s40164-020-00190-2. PubMed PMID: 33292660; PMCID: PMC7709221.

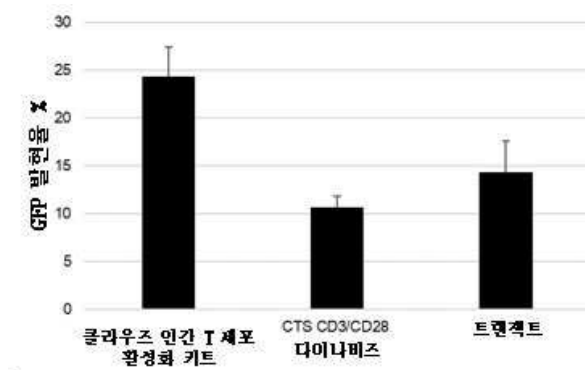
9. Li Y, Kurlander RJ. Comparison of anti-CD3 and anti-CD28-coated beads with soluble anti-CD3 for expanding human T cells: differing impact on CD8 T cell phenotype and responsiveness to restimulation. Journal of translational medicine. 2010;8:104. Epub 2010/10/28. doi: 10.1186/1479-5876-8-104. PubMed PMID: 20977748; PMCID: PMC2987859.

10. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, Waller EK, Borchmann P, McGuirk JP, Jager U, Jaglowski S, Andreadis C, Westin JR, Fleury I, Bachanova V, Foley SR, Ho PJ, Mielke S, Magenau JM, Holte H, Pantano S, Pacaud LB, Awasthi R, Chu J, Anak O, Salles G, Maziarz RT, Investigators J. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. The New England journal of medicine. 2019;380(1):45-56. Epub 2018/12/07. doi: 10.1056/NEJMoa1804980. PubMed PMID: 30501490.

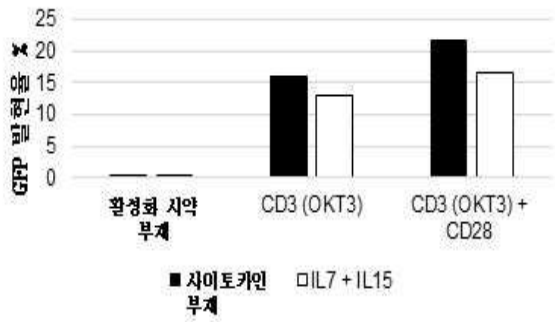
11. Jones A, Torkel C, Stanley D, Nasim J, Borevitz J, Schwessinger B. High-molecular weight DNA extraction, clean-up and size selection for long-read sequencing. PloS one. 2021;16(7):e0253830. Epub 2021/07/16. doi: 10.1371/journal.pone.0253830. PubMed PMID: 34264958; PMCID: PMC8282028.

도면

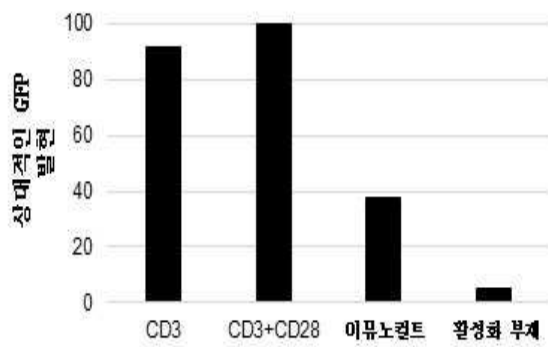
도면1a



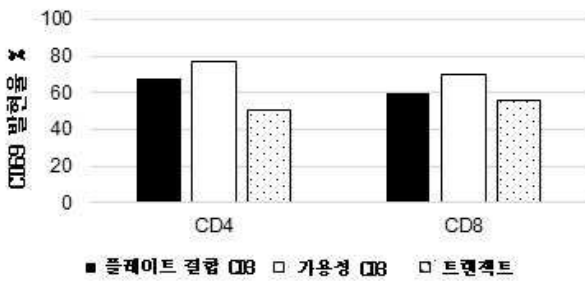
도면1b



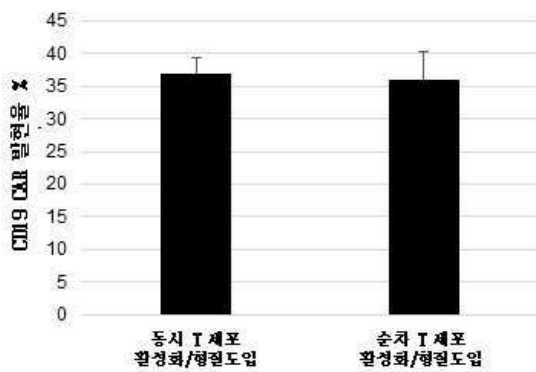
도면1c



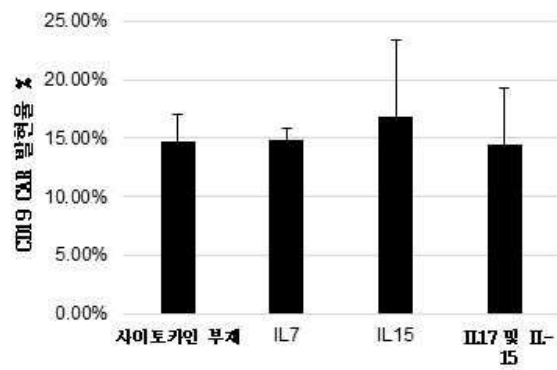
도면1d



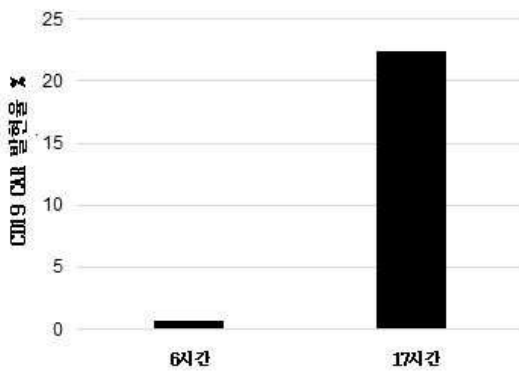
도면2



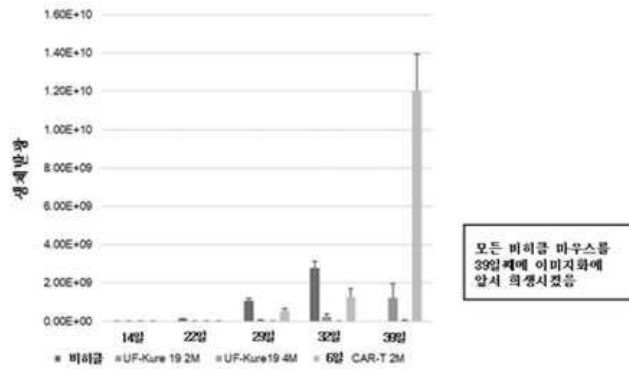
도면3



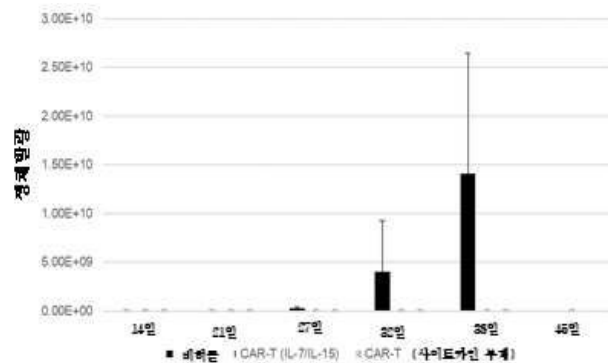
도면4



도면5



도면6



도면7a

VSV-G		
+ SRE		
생성물 1	총 게놈 DNA	총 게놈 DNA + SRE
	+	-
생성물 2	+	-

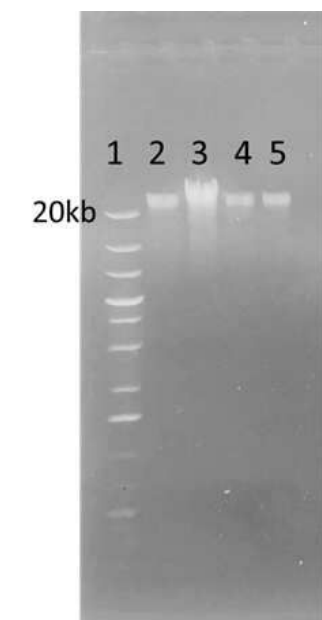
도면7b

	카피 수
비-형질도입된 T 세포	0
2:1	0.25
5:1	0.93
7.5:1	1.2
10:1	1.5

도면7c

	20시간	3일	7일
CAI 발현율 %	0.3	33	31
VON/형질도입된 세포	1.4	1.3	1.5

도면7d



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.