



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년05월09일
 (11) 등록번호 10-1976882
 (24) 등록일자 2019년05월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-7027313
- (22) 출원일자(국제) 2012년03월23일
 심사청구일자 2017년03월23일
- (85) 번역문제출일자 2013년10월16일
- (65) 공개번호 10-2014-0023931
- (43) 공개일자 2014년02월27일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2012/030388
- (87) 국제공개번호 WO 2012/129514
 국제공개일자 2012년09월27일
- (30) 우선권주장
 61/466,552 2011년03월23일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 BLOOD, Vol 106, Pages 2995-3003(2005)*
 J. Clin. Invest., Vol 118, Pages
 294-305(2008)*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
프레드 헛친슨 켄서 리서치 센터
 미국 워싱턴 98109, 시애틀, 1100 페어뷰 애버뉴
 엔.,
- (72) 발명자
리델, 스텐리, 알.
 미국, 워싱턴 98075, 사마미시, 1763 268 에스이
휴드섹, 마이클
 독일, 04107 라이프치히, 모짜라트스트라스
 13/810
- (74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 24 항

심사관 : 김영수

(54) 발명의 명칭 **세포 면역요법용 방법 및 조성물**

(57) 요약

본 발명은, 예를 들면, 종양-특이적, 서브셋 특이적 유전적으로 변형된 CD4+ T 세포의 존재하에 유전적으로 변형된 종양 특이적 CD8+ T 세포를 양자 전달함으로써 세포 면역요법에 의해 매개된 면역 반응을 제공 및/또는 증가시키는 방법 및 조성물을 제공하고, 상기 CD4+ T 세포는 항-종양 반응성을 지속시키는 CD8+ T 세포의 능력을 제공 및/또는 증가시키고 목적하는 종양 특이적 CD8+ T 세포의 종양-특이적 증식을 증가 및/또는 최대화한다. 또한, 상기 방법에 의해 생성된 억제학적 제형 및 이를 사용하는 방법이 기재되어 있다.

명세서

청구범위

청구항 1

키메라 항원 수용체-변형된 CD4⁺ T 림프구 및 키메라 항원 수용체-변형된 CD8⁺ T 림프구를 포함하는 양자 (adoptive) 세포 면역요법 조성물로서,

(a) 조성물 중의 키메라 항원 수용체-변형된 CD4⁺ T 림프구는, 항원에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체를 포함하는 CD4⁺ T 헬퍼 림프구로 이루어지고;

(b) 조성물 중의 키메라 항원 수용체-변형된 CD8⁺ T 림프구는, 중추 기억-풍부 CD8⁺ 세포 집단으로부터 유도되고 항원에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체를 포함하는 CD8⁺ 세포독성 T 림프구로 이루어지는 것인, 양자 세포 면역요법 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

CD4⁺ T 헬퍼 림프구가 하기로부터 유도되는 것인, 양자 세포 면역요법 조성물:

(a) CD62L⁺ CD45RA⁺ 천연(naive) T 세포-풍부 CD4⁺ 집단;

(b) CD62L⁺ CD45RO⁺ 중추 기억 T 세포-풍부 CD4⁺ 집단;

(c) CD62L⁺ CD45RA⁺ 천연 T 세포-풍부 및 CD62L⁺ CD45RO⁺ 중추 기억 T 세포-풍부 CD4⁺ 집단; 또는

(d) 벌크 CD4⁺ T 세포 집단.

청구항 3

제1항에 있어서,

CD4⁺ 헬퍼 T 림프구 및 CD8⁺ 세포독성 T 림프구가 대상체로부터 유도되고, 상기 조성물이 하기 (a) 내지 (d) 중 적어도 하나의 특징을 갖는, 양자 세포 면역요법 조성물:

(a) 대상체로부터의 효과기(effector) 기억 T 세포-풍부 CD4⁺ T 세포 집단 또는 벌크 CD4⁺ T 세포 집단으로부터 시험관 내에서 증대되고 CD4⁺ 헬퍼 T 림프구에 의해 포함된 키메라 항원 수용체를 포함하도록 변형된 CD4⁺ T 세포의 참조 집단과 비교하여, CD4⁺ 헬퍼 T 림프구가, 항원의 존재 하에서 배양시, 더욱 많은 양의 IL-2를 분비하거나, 더욱 높은 정도의 증식을 나타내거나, 더욱 많은 양의 IL-2를 분비하면서 더욱 높은 정도의 증식을 나타냄;

(b) 대상체로부터의 효과기 기억-풍부 CD4⁺ T 세포 집단 또는 벌크 CD4⁺ T 세포 집단으로부터 시험관 내에서 증대되고 CD4⁺ 헬퍼 T 림프구에 의해 포함된 키메라 항원 수용체를 포함하도록 변형된 CD4⁺ T 세포의 참조 집단과 비교하여, 더욱 높은 비율(%)의 키메라 항원 수용체-변형된 CD4⁺ 헬퍼 T 림프구가, CD62L, CD45RA, 또는 이들 둘 다에 대해 표면 양성임;

(c) 대상체로부터의 효과기 기억-풍부 CD8⁺ T 세포 집단 또는 벌크 CD8⁺ T 세포 집단으로부터 시험관 내에서 증대되고 CD8⁺ 세포독성 T 림프구에 의해 포함된 키메라 항원 수용체를 포함하도록 변형된 CD8⁺ T 세포의 참조 집단과 비교하여, 더욱 높은 비율의 키메라 항원 수용체-변형된 CD8⁺ 세포독성 T 림프구가, CD62L, CD45RO, 및 CCR7 중 하나 이상에 대해 표면 양성임; 및

(d) 대상체로부터의 효과기 기억-풍부 CD4⁺ T 세포 집단 또는 벌크 CD4⁺ T 세포 집단으로부터 시험관 내에서 증대되고 CD4⁺ 헬퍼 T 림프구에 의해 포함된 키메라 항원 수용체를 포함하도록 변형된 CD4⁺ T 세포의 참조 집단과 함께 동일 조건 하에서 공동-배양시의 CD8⁺ 세포독성 T 림프구의 증식 정도와 비교하여, 키메라 항원 수용체-변형된 CD8⁺ 세포독성 T 림프구가, 항원의 존재 하에서 CD4⁺ 헬퍼 T 림프구와 함께 시험관내에서 공동-배양시 더욱 높은 정도로 증식함.

청구항 4

제3항에 있어서,

CD4⁺ T 헬퍼 림프구가 하기로부터 유도되는 것인, 양자 세포 면역요법 조성물:

- (a) CD62L⁺ CD45RA⁺ 천연(naive) T 세포-풍부 CD4⁺ 집단;
- (b) CD62L⁺ CD45RO⁺ 중추 기억 T 세포-풍부 CD4⁺ 집단;
- (c) CD62L⁺ CD45RA⁺ 천연 T 세포-풍부 및 CD62L⁺ CD45RO⁺ 중추 기억 T 세포-풍부 CD4⁺ 집단; 또는
- (d) 벌크 CD4⁺ T 세포 집단.

청구항 5

키메라 항원 수용체-변형된 CD4⁺ T 림프구 및 키메라 항원 수용체-변형된 CD8⁺ T 림프구를 포함하는 양자 세포 면역요법 조성물로서,

- (a) 키메라 항원 수용체-변형된 CD4⁺ T 림프구가 항원에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체를 포함하고, 조성물 중의 적어도 50%의 키메라 항원 수용체-변형된 CD4⁺ 헬퍼 T 림프구가 CD62L, CD45RA, 또는 이들 둘 다에 대해 표면 양성이며;
- (b) 키메라 항원 수용체-변형된 CD8⁺ T 림프구가 항원에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체를 포함하고, 조성물 중의 적어도 50%의 CD8⁺ 세포독성 T 림프구가 CD62L, CD45RO, 또는 이들 둘 다에 대해 표면 양성인 것인, 양자 세포 면역요법 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물 중의 키메라 항원 수용체-변형된 CD4⁺ 헬퍼 T 림프구와 키메라 항원 수용체-변형된 CD8⁺ 세포독성 T 림프구는 조성물 내에 2:1 내지 1:2의 비율로 존재하는, 양자 세포 면역요법 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물 중의 키메라 항원 수용체-변형된 CD4⁺ 헬퍼 T 림프구와 키메라 항원 수용체-변형된 CD8⁺ 세포독성 T 림프구는 조성물 내에 2:1, 1:1, 또는 1:2의 비율로 존재하는, 양자 세포 면역요법 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 하기 (a) 내지 (d) 중 적어도 하나의 특징을 갖는, 양자 세포 면역요법 조성물:

- (a) 적어도 60%의 키메라 항원 수용체-변형된 CD4⁺ T 림프구가 CD62L, CD45RA, 또는 이들 둘 다에 대해 표면 양성임;

(b) 적어도 60%의 키메라 항원 수용체-변형된 CD8⁺ T 림프구가 CD62L, CD45RO, 또는 이들 둘 다에 대해 표면 양성임;

(c) 적어도 80%의 키메라 항원 수용체-변형된 CD4⁺ T 림프구가 CD62L, CD45RA, 또는 이들 둘 다에 대해 표면 양성임; 및

(d) 적어도 80%의 키메라 항원 수용체-변형된 CD8⁺ T 림프구가 CD62L, CD45RO, 또는 이들 둘 다에 대해 표면 양성임.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

키메라 항원 수용체가 질환 또는 장애와 관련된 항원에 특이적인 세포의 항체 가변 도메인 또는 단쇄 항체 단편, 및 세포내 신호전달 모듈을 포함하는 것인, 양자 세포 면역요법 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

CD4⁺ T 림프구에 의해 포함된 키메라 항원 수용체의 세포 내 신호전달 모듈 및 CD8⁺ T 림프구에 의해 포함된 키메라 항원 수용체의 세포 내 신호전달 모듈이, 개별적으로,

(a) CD28 공자극(costimulatory) 도메인, 및 CD3 세포내 신호전달 도메인, 또는

(b) 4-1BB 공자극 도메인 및 CD3 세포내 도메인

을 포함하는 것인, 양자 세포 면역요법 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서,

(a) CD8⁺ T 림프구에 의해 포함된 키메라 항원 수용체의 세포 내 신호전달 도메인이 CD4⁺ T 림프구에 의해 포함된 키메라 항원 수용체의 세포 내 신호전달 도메인과 동일하거나;

(b) CD8⁺ T 림프구에 의해 포함된 키메라 항원 수용체의 세포 내 신호전달 도메인이 CD4⁺ T 림프구에 의해 포함된 키메라 항원 수용체의 세포 내 신호전달 도메인과 상이하거나;

(c) CD8⁺ T 림프구에 의해 포함된 키메라 항원 수용체가 CD4⁺ T 림프구에 의해 포함된 키메라 항원 수용체와 동일하거나;

(d) CD8⁺ T 림프구에 의해 포함된 키메라 항원 수용체가 CD4⁺ T 림프구에 의해 포함된 키메라 항원 수용체와 상이한 것인, 양자 세포 면역요법 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

항원이 고휘종양, 혈액암, 흑색종, 및 병원체로의 감염 중에서 선택되는 질환 또는 장애와 관련된 것인, 양자 세포 면역요법 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

항원이 오편(orphan) 티로신 키나제 수용체 ROR1, tEGFR, Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, 메소텔린, CEA, HIV 항원, HCV 항원, HBV 항원, CMV 항원, 기생충 항원 및 B형 간염 표면 항원 중에서 선택되는 것인, 양자 세포 면역요법 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,
조성물이 암 치료에 사용되는 것임을 특징으로 하는, 양자 세포 면역요법 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서,
암이 고형 종양, 혈액암, 및 흑색종 중에서 선택되는 것인, 양자 세포 면역요법 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,
조성물이 감염 질환의 치료에 사용되는 것임을 특징으로 하는, 양자 세포 면역요법 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서,
감염 질환이 바이러스 감염인, 양자 세포 면역요법 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서,
바이러스 감염이 헤르페스 바이러스, 레트로바이러스, 또는 플라비바이러스로의 감염인, 양자 세포 면역요법 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서,
바이러스 감염이 간염 바이러스로의 감염인, 양자 세포 면역요법 조성물.

청구항 20

제14항에 있어서,
키메라 항원 수용체-변형된 $CD4^+$ T 림프구가 키메라 항원 수용체-변형된 $CD8^+$ 세포독성 T 림프구의 효과기 기능을 증가시킬 수 있는 것인, 양자 세포 면역요법 조성물.

청구항 21

제16항에 있어서,
키메라 항원 수용체-변형된 $CD4^+$ T 림프구가 키메라 항원 수용체-변형된 $CD8^+$ 세포독성 T 림프구의 효과기 기능을 증가시킬 수 있는 것인, 양자 세포 면역요법 조성물.

청구항 22

제14항에 있어서,
적어도 80%의 키메라 항원 수용체-변형된 $CD8^+$ T 림프구가 $CD8^+$ 중추 기억 T 세포인, 양자 세포 면역요법 조성물.

청구항 23

제16항에 있어서,
적어도 80%의 키메라 항원 수용체-변형된 $CD8^+$ T 림프구가 $CD8^+$ 중추 기억 T 세포인, 양자 세포 면역요법

조성물.

청구항 24

하기를 포함하는, 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 양자 세포 면역요법 조성물의 제조방법:

- (a) (i) 중추 기억-풍부 CD8⁺ T 림프구의 집단 및 (ii) CD4⁺ T 림프구의 집단을, 개별적으로, 시험관 내에서 증대시켜, 증대된 CD8⁺ T 림프구 집단 및 증대된 CD4⁺ T 림프구 집단을 생성하는 단계;
- (b) 항원에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체를 코딩하는 핵산 분자를 도입하여 증대된 CD8⁺ T 림프구의 세포를 변형시키고, 항원에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체를 코딩하는 핵산을 도입하여 증대된 CD4⁺ T 림프구 세포를 변형시키는 단계; 및
- (c) 임의로, 변형된 CD8⁺ T 림프구 및 변형된 CD4⁺ T 림프구를 혼합 또는 배합하여, 양자 세포 면역요법 조성물을 생성하는 단계.

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 출원은, 미국을 제외한 모든 지정국에 대해 미국 법인인 프레드 허친슨 캔서 리서치 센터(Fred Hutchinson Cancer Research Center)의 출원인 명칭 및 지정국 미국 단독에 대해 스탠리 알. 리델(Stanley R. Riddell; 캐나다 국민) 및 미하엘 후데ček(Michael Hudeček; 독일 국민)의 출원인 명칭으로, 미국 특허출원 제61,466,552호(2011년 3월 23일자로 출원됨)를 우선권으로 주장하는 PCT 국제 특허원으로 2012년 3월 23일자로 출원되어 있으며, 이의 기술 내용은 본 명세서에 전부 참고로 인용된다.
- [0002] 본 발명은 생물의학 및 구체적으로는 암 치료에 유용한 방법의 분야에 관한 것이다. 특히, 본 발명의 실시양태는 세포 면역요법을 수행하는 방법 및 이를 위한 조성물에 관한 것이다.
- [0003] 연방 후원 연구에 관한 진술
- [0004] 본 발명은 미국 보건 사회 복지부의 승인 R01CA18029, 국립 보건 연구소 및 백혈병 및 림프종 협회 SCORE 승인의 형태로 정부 지원하에 이루어졌다. 미국 정부는 본 발명에 특정 권리를 갖는다.

배경 기술

- [0005] 설치류에서의 연구는 항원 특이적 T 세포에 의한 양자(adoptive) 면역요법이 암 및 감염에 효과적임을 증명하였고, 이러한 종류가 인간에서 치료 활성을 갖는다는 증거가 있다¹⁻⁸. 임상 적용의 경우, 감염되거나 형질전환된 세포를 표적화하는 수용체를 발현시키기 위해 목적하는 항원 특이성의 T 세포를 분리하거나 T 세포를 유전적으로 조작한 다음, 이들 세포를 배양물에서 증식할 필요가 있다⁹⁻¹⁴. T 세포 클론의 전달은, 이것이 특이성 및 기능의 조절을 가능하게 하고 생체내 지속성, 독성 및 효능의 평가를 용이하게 하기 때문에 흥미를 끌고 있다. 추가로, 동종이계 줄기 세포 이식의 설정에 있어서, 변원체 또는 악성 세포를 표적화하는 공여체로부터 T 세포 클론의 수용체로의 투여는 선택되지 않은 공여체 T 세포의 주입으로 발생하는 이식-대-숙주 질환을 피할 수 있다^{3,4,15}. 그러나, 배양된 T 세포, 특히 클로닝된 CD8+ T 세포의 효능은 양자 전달 후에 지속하지 못함으로써 빈번히 제한된다는 것이 임상 연구로부터 명백하다^{16,17}.
- [0006] 양자 면역요법을 위한 T 세포가 유도될 수 있는 림프구 풀은 천연 및 장기간 생존하는, 항원 경험 기억 T 세포(T_M)를 함유한다. T_M은, 표현형, 회귀 특성 및 기능이 상이한 중추 기억(T_{CM}) 및 효과기 기억(T_{EM}) 세포의 서브셋으로 추가로 분화될 수 있다¹⁸. CD8+ T_{CM}은 세포 표면에서 CD62L 및 CCR7을 발현하고, 이는 림프절 내로의 이동을 촉진시키며, 항원에 재노출되는 경우에 신속하게 증식한다. CD8+ T_{EM}은 세포 표면 CD62L을 결여하고, 말초 조직으로 우선적으로 이동하며, 즉시 효과기 기능을 나타낸다¹⁹. 항원 자극에 반응하여, CD8+ T_{CM} 및 T_{EM} 둘 다는, 고도의 그랜자임 및 퍼포린을 발현하지만 단시간 생존하는 세포용해 효과기 T 세포(T_E) 내로 분화한다²⁰. 따라서, 임상 면역요법 시험에서 T 세포의 불량한 생존은, 시험관내 배양 동안, 사멸할 것으로 예정되는 T_E로의 이들의 분화로부터 단순히 발생할 수 있다^{17,21,22}.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 생체내에서 양자 전달된 T 세포의 증가된 생존을 제공하는 세포 모집단 및 방법을 확인할 필요가 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 한 가지 실시양태에서, 본 발명은, 예를 들면, 종양-특이적, 서브셋 특이적 유전적으로 변형된 CD4+ T 세포를 양자 전달함으로써 세포 면역요법에 의해 매개된 면역 반응을 제공 및/또는 증가시키는 방법 및 조성물에 관한 것이고, 여기서 상기 CD4+ T 세포는 항-종양 반응성을 지속시키는 CD8+ T 세포의 능력을 제공 및/또는 증가시키고 목적하는 종양-특이적 증식을 증가 및/또는 최대화한다.

[0009] 한 가지 실시양태에서, 본 발명은, 세포 면역 반응을 제공하는 유전적으로 변형된 세포독성 T 림프구 세포 제제를 대상체에게 투여함으로써 질환 또는 장애를 갖는 대상체에서 세포 면역요법을 수행하는 방법을 제공하고, 여기서 상기 세포독성 T 림프구 세포 제제는 상기 질환 또는 장애와 관련된 항원에 특이적인 세포의 항체 가변 도메인 및 T 세포 또는 기타 수용체의 세포내 신호전달 도메인(예: 공자극 도메인)을 갖는 키메라 항원 수용체를 갖는 CD8+ T 세포를 포함하고, 기타 사이토키ンを 생성할 뿐만 아니라 우성 Th1 표현형을 나타내는 유전적으로 변형된 헬퍼 T 림프구 세포 제제는 직접 종양 인식을 유도하고 세포 면역 반응을 매개하는 유전적으로 변형된 세포독성 T 림프구 세포 제제의 능력을 증가시키며, 상기 헬퍼 T 림프구 세포 제제는 상기 질환 또는 장애와 관련된 항원에 특이적인 세포의 항체 가변 도메인 및 T 세포 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체를 갖는 CD4+ T 세포를 포함한다. 상기 방법의 다양한 변형이 가능하다. 예를 들면, CD4+ T 세포 및 CD8+ 세포를 변형시키는 키메라 항원 수용체는 동일하거나 상이할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, T 세포는 재조합 T 세포 수용체(TCR)로 변형될 수 있다. TCR은 임의의 항원, 병원체 또는 종양에 특이적일 수 있다. 흑색종(예: MART1, gp100), 백혈병(예: WT1, 부조직적합성(minor histocompatibility) 항원), 유방암(예: her2, NY-BR1)에서 다수의 종양 항원에 대한 TCR이 있다.

[0010] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은, 세포 면역 반응을 유도하는 유전적으로 변형된 CD8+ 세포독성 T 림프구 세포 제제를 갖는 양자 세포 면역요법 조성물을 제공하고, 여기서 상기 세포독성 T 림프구 세포 제제는 당해 질환 또는 장애와 관련된 항원에 특이적인 세포의 가변 도메인 항체 및 T 세포 또는 기타 수용체의 세포내 신호전달 도메인(예: 공자극 도메인)을 갖는 키메라 항원 수용체를 갖는 CD8+ T 세포를 포함하고, 기타 사이토키ンを 생성할 뿐만 아니라 우성 Th1 표현형을 나타내는 유전적으로 변형된 헬퍼 T 림프구 세포 제제는 직접 종양 인식을 유도하고 세포 면역 반응을 매개하는 유전적으로 변형된 세포독성 T 림프구 세포 제제의 능력을 증가시키며, 헬퍼 T 림프구 세포 제제는 당해 질환 또는 장애와 관련된 항원에 특이적인 세포의 항체 가변 도메인 및 T 세포 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 갖는 키메라 항원 수용체를 갖는 CD4+ T 세포를 포함한다.

[0011] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은, 세포 면역 반응을 유도하는 키메라 항원 수용체 변형된 종양-특이적 CD8+ 세포독성 T 림프구 세포 제제를 갖는 양자 세포 면역요법 조성물을 제공하고, 여기서 상기 세포독성 T 림프구 세포 제제는, CD45RO 음성, CD62L 양성 CD4 양성 T 세포로부터 유도된 항원-반응성 키메라 항원 수용체 변형된 천연 CD4+ T 헬퍼 세포 및 약제학적으로 허용가능한 담체와 조합하여, 당해 질환 또는 장애와 관련된 항원에 특이적인 세포의 단쇄 항체 및 T 세포 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체를 갖는 CD8+ T 세포를 포함한다.

[0012] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은, Th1 사이토킨 반응을 유도하고 병원체에 대한 CD8+ 면역 반응을 증가시키는 항원-반응성 키메라 항원 수용체 변형된 CD4+ T 헬퍼 세포와 함께 환자로부터 유도된 CD8+ T 세포를 포함하는, 세포 면역 반응을 유도하는 항원 특이적 CD8+ 세포독성 T 림프구 세포 제제를 갖는 양자 세포 면역요법 조성물을 제공하고, 여기서 상기 헬퍼 T 림프구 세포 제제는 당해 질환 또는 장애와 관련된 항원에 특이적인 세포의 항체 가변 도메인 및 T 세포 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 갖는 키메라 항원 수용체를 갖는 CD4+ T 세포를 포함한다.

[0013] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은, 직접 종양 인식을 유도하고 병원체에 대한 CD8+ 면역 반응을 증가시키는 항원-반응성 키메라 항원 수용체 변형된 CD4+ T 헬퍼 세포를 갖는 양자 세포 면역요법 조성물을 제공하고, 여기서 상기 헬퍼 T 림프구 세포 제제는 당해 질환 또는 장애와 관련된 항원에 특이적인 세포의 항체 가변 도메인 및 T

세포 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체를 갖는 CD4+ T 세포를 포함한다.

[0014] 또 다른 측면에서, 본 발명은, 세포 면역 반응을 유도하는 키메라 항원 수용체 변형된 종양-특이적 CD8+ 세포독성 T 림프구 세포 제제 및 항원-반응성 키메라 항원 수용체를 수득하고 Th1 사이토킨 반응을 유도하는 변형된 천연 CD4+ T 헬퍼 세포를 수득함으로써 양자 면역요법 조성물을 제조하는 방법을 제공하고, 여기서 상기 변형된 세포독성 T 림프구 세포 제제는 당해 질환 또는 장애와 관련된 항원에 특이적인 세포의 항체 가변 도메인 및 T 세포 수용체의 세포내 신호전달 모듈을 갖는 키메라 항원 수용체를 갖는 세포의 항체 가변 도메인을 포함하고, 상기 변형된 헬퍼 T 림프구 세포 제제는 당해 질환 또는 장애와 관련된 항원에 특이적인 세포의 항체 가변 도메인 및 T 세포 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 갖는 키메라 항원 수용체를 갖는 CD4+ 세포를 포함한다.

[0015] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은, Th1 사이토킨 반응을 유도하는 변형된 천연 CD4+ T 헬퍼 세포를 수득하고, 상기 변형된 천연 CD4+ T 헬퍼 세포를, 당해 질환 또는 장애와 관련된 항원에 특이적인 세포의 항체 가변 도메인 및 T 세포 또는 기타 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 갖는 키메라 항원 수용체를 갖는 항원 특이적 중추 기억 CD8+ 세포독성 T 림프구 세포 제제와 배합함으로써 양자 면역요법 조성물을 제조하는 방법을 제공하고, 여기서 상기 변형된 헬퍼 T 림프구 세포 제제는 당해 질환 또는 장애와 관련된 항원에 특이적인 세포의 항체 가변 도메인 및 T 세포 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체를 갖는 CD4+ T 세포를 포함한다.

[0016] 한 가지 실시양태에서, 본 발명은, 유전적으로 변형된 헬퍼 T 림프구 세포 제제를 대상체에게 투여함으로써 질환 또는 장애를 갖는 대상체에서 세포 면역요법을 수행하는 방법을 제공하고, 여기서 상기 변형된 헬퍼 T 림프구 세포 제제는 당해 질환 또는 장애와 관련된 항원에 특이적인 세포의 항체 가변 도메인 및 T 세포 수용체의 세포내 신호전달 모듈을 포함하는 키메라 항원 수용체를 갖는 CD4+ T 세포를 포함한다.

[0017] 본 발명의 이들 및 기타 실시양태는 첨부 명세서, 도면 및 특허청구범위에서 추가로 기재된다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 ROR1-CAR로 형질도입된 CAR 코딩 렌티바이러스 및 대조군으로서 비형질도입된 CD8+ T 세포주에서 키메라 항원 수용체(CAR) 발현의 표현형 및 분석을 나타낸다. ROR1-CAR 카세트는 형질도입 마커로서 사용되고 항-EGFR 모노클로날 항체로 염색에 의해 검출될 수 있는 단축된 EGFR을 함유한다. 단축된 Fc-ROR1 융합 단백질은 ROR1-CAR의 항원-결합 도메인에 직접 연결되고, 형질도입된 ROR1-CAR을 선택적으로 염색시키지만 비형질도입된 대조군 T 세포주를 염색시키지 않는다. CD8+ T 세포의 세포 표면 상에서 ROR1-CAR의 발현은 ROR1-Fc 융합 단백질에 대한 결합으로 직접 측정되고, 벡터에서 2A 서열 하류에 코딩된 단축 EGFR의 발현에 의해 간접적으로 측정된다.

도 2는 ⁵¹Cr 방출 분석에 있어서 인간 ROR1-양성 종양 세포주(K562) 및 원발성 종양 세포(B-CLL) 및 자가 정상 B-세포의 패널에 대해 ROR1-특이적 키메라 항원 수용체를 발현하는 CD8+ T 세포의 세포용해 활성을 나타낸다. 악성 B 세포 상에서는 ROR1의 균일한 발현과 일치하지만 성숙 정상 B 세포 상에서는 일치하지 않게, 유전적으로 변형된 CD8+ ROR1-CAR T 세포는 단지 ROR1+ 종양 세포를 용해시켰고 성숙 정상 B 세포를 용해시키지 않았다. CD8+ ROR1-CAR T 세포는 원발성 CLL를 포함하는 ROR1-양성 종양 세포에 대해 특이적 용해 활성을 나타내지만, 정상 B 세포에 대해서는 나타내지 않는다.

도 3은 형질도입된 ROR1-CAR 및 대조군으로서 비형질도입된 CD4+ T 세포주의 표현형 및 CAR 발현을 나타낸다. CD4+ T 세포의 세포 표면 상에서 ROR1-CAR의 발현은 ROR1-Fc 융합 단백질에 대한 특이적 결합에 의해 측정된다. Fc 단백질이 아닌 단축된 Fc ROR1 융합 단백질은 단독으로 ROR1-CAR에 직접 결합하고 형질전환된 ROR1-CAR을 선택적으로 염색시키지만 비형질전환된 대조군 CD4+ T 세포주를 염색시키지 않고, 이는 세포 표면 상에서 ROR1-CAR의 발현 및 ROR1-단백질에 대한 결합을 확인시켜 준다. CD4+ T 세포의 세포 표면 상에서 ROR1-CAR의 발현은 ROR1-Fc 융합 단백질에 대한 특이적 결합, 그러나 대조군 Fc 융합 단백질에 대한 비특이적 결합에 의해 측정된다.

도 4(즉, 총괄적으로 도 4a-4b)는 ⁵¹Cr 방출 분석에서 CD4+ ROR1-CAR T 세포의 약하지만 특이적 세포용해 활성을 나타낸다. 원발성 CLL을 포함하는 ROR1-양성 종양 세포의 패널에 대해, 맨틀 세포 림프종 라인 jeko-1, K562 세포는 ROR1(K562/ROR1)으로 안정하게 형질감염되었지만, 천연 ROR1-음성 K562 세포는 형질감염되지 않았다. CD4+ ROR1-CAR T 세포는 ROR1-양성 종양 세포에 대해 약하지만 특이적 용해 활성을 나타낸다.

도 5(즉, 총괄적으로 도 5A-5B)는 INF γ ELISA(도 5a) 및 다중 사이토킨 분석(도 5b)으로부터의 결과를 나타낸다. CD4+ 및 CD8+ ROR1-CAR T 세포주의 사이토킨 분비. CD4+ ROR1-CAR 및 CD8 ROR1-CAR T 세포를 ROR1+ 종양 세포와 공배양하고, 인터페론 감마(INF γ)의 수준을 ELISA(5a)로 측정하고, IFN γ , TNF α , IL-2, IL-4, IL-10 및 IL-17을 루미넥스(Luminex) 분석(5b)으로 측정했다. CD4+ ROR1-CAR 변형된 T 세포는 ROR1-양성 종양 세포 및 종양 세포주를 특이적으로 인식하고, CD8+ ROR1-CAR 변형된 T 세포보다 높은 양의 Th1 사이토킨(IFN- γ , TNF- α 및 특히 IL-2 포함)을 생성한다. 이들 데이터는 CD4+ ROR1-CAR T 세포가 ROR1-CAR을 통해 자극 후에 헬퍼 효과기 기능을 나타내고, 직접 항-종양 반응성의 매개에 추가하여, 세포 면역 반응을 매개하는 CD8+ ROR1-CAR 변형된 T 세포의 능력을 증가시키기 위해 또한 사용될 수 있음을 입증한다.

도 6은, CD4+ ROR1-CAR T 세포가 ROR1-양성 종양 세포주 및 원발성 종양 세포(CFSE 분석)에 의한 자극 후에 증식하기 위해 유도되고, 증식하는 서브셋이 경험한 증식 세포의 비율 및 세포 분화의 수 둘 다는 CD8+ ROR1-CAR 변형된 T 세포에 대해 현저히 높게 비교됨을 나타내는 증식 결과를 도시한다. CD4+ ROR1-CAR T 세포는 CD8+ ROR1-CAR CTL과 비교하여 ROR1-양성 종양 세포(K562/ROR1, 원발성 CLL 및 Jeko MCL)로 자극 후에 보다 격렬하게 증식한다.

도 7은 폴리클로날 비선택된 CD4+ ROR1 CAR T 세포가 종양에 대한 반응으로 이들의 증식을 촉진시킴으로써 CD8+ ROR1-CAR CTL에 대한 도움을 제공함을 나타낸다. CD4+ ROR1-CAR T 세포(벌크 CD4+ T 세포로부터 유도됨)는 폴리클로날 비선택된 CD8+ ROR1-CAR CTL의 증식을 현저히 증가시켰다(개개 배양물에서 18% \rightarrow CD4+ CAR T 세포와의 공-배양 후에 31.5%).

도 8(즉, 총괄적으로 도 8a-8d)은 유동 분류 정제된 CD4+ 천연, 중추 기억 및 효과기 기억 서브셋으로부터 CD4+ CAR T 세포주의 생성 및 T-세포 기능의 분석을 나타낸다. 사이토킨 프로파일 및 증식 능력은 천연 CD4+ T 세포로부터 유도된 CD4+ ROR1-CAR T 세포가 CD8+ CTL에 대한 도움을 제공하기 위해 가장 적합할 수 있음을 시사한다. 유사한 데이터는 CD19-특이적 CAR을 발현하는 CD4+ CAR T-세포주의 기능을 비교하여 실험에서 획득되었다. 도 8a는 CD45RA, CD45RO, CD62L의 발현에 기반한 천연, 중추 및 효과기 기억 CD4+ T 세포의 유동 분류 정제를 나타낸다. 도 8b는 분류 정제된 천연, 중추 및 효과기 기억 CD4+ T 세포(CFSE 분석)의 렌티바이러스형질도입에 의해 유도된 ROR1-CAR T 세포주의 분석을 나타낸다. 도 8c는 분류 정제된 천연, 중추 및 효과기 기억 CD4+ T 세포로부터 ROR1-CAR T 세포주의 사이토킨 분비의 분석을 나타낸다(루미넥스 분석). 도 8d는 분류 정제된 천연, 중추 및 효과기 기억 CD4+ T 세포로부터 CD19-CAR T-세포주의 사이토킨 분비의 분석을 나타낸다(루미넥스 분석). 다중 사이토킨 분석에 의해 획득한 사이토킨 프로파일(도 8b) 및 CFSE 염색에 의한 증식 성능(도 8c)은 천연 서브셋으로부터 유도된 CD4+ ROR1-CAR 변형된 T 세포가 최고 수준의 Th1 사이토킨을 생성했고 ROR1-양성 종양 세포에 의한 자극 후에 가장 격렬하게 증식했음을 나타내고, 이는 이들이 CD8+ ROR1-CAR CTL의 증가에 가장 적합할 수 있음을 시사한다. 분류-정제된 천연, 중추 및 효과기 기억 CD4+ T 세포로부터 CD19-CAR T 세포주의 사이토킨 분비의 분석(루미넥스 분석)은, CD4 T 세포 서브셋의 활성이 다수의 CAR로 일반화될 수 있음을 증명한다.

도 9는 CD8+ ROR1-CAR T 세포와 CD4+ ROR1-CAR 변형된 T 세포(그러나 비형질도입된 대조군 CD4+ T 세포는 아님)와의 공-배양을 나타낸다. CD8+ ROR1-CAR CTL 및 CD4+ ROR1-CAR T 세포주의 공-배양은 천연, 중추 및 효과기 기억 서브셋으로부터 유도되어, CD8+ ROR1-CAR CTL의 최대 증식을 허용할 수 있는 CD8+ 및 CD4+ T 세포의 최적 조합을 규정한다. CD4 천연 ROR1-CAR T 세포주는 CD8 중추 기억 ROR1-CAR CTL의 최대 증식을 제공한다. 공배양은 CD8+ 서브셋의 종양-특이적 증식의 증가를 유도하고, CD8+ 서브셋의 최대 증식은 천연 CD4+ T 세포로부터 유도된 CD4+ ROR1-CAR T 세포와의 공-배양 후에 관찰된다.

도 10은, CD19+ 맨틀 세포 림프종 라인 Jeko-1으로 자극시킨 CD8+ CD19-CAR CTL 및 CD4+ CD19-CAR T-세포주를 사용한 공배양 실험에서 중추 기억-유도된 CD8+ CAR CTL의 종양-특이적 증식을 증가시키는 천연 서브셋으로부터 유도된 CD4+ CAR T-세포주의 우수한 능력을 나타낸다. 중추 기억-유도된 CD8+ CAR CTL의 종양-특이적 증식을 증가시키는 천연 서브셋으로부터 유도된 CD4+ CAR T-세포주의 우수한 능력은 CD19+ 맨틀 세포 림프종 종양 라인 Jeko-1으로 자극시킨 CD8+ CD19-CAR CTL 및 CD4+ CD19-CAR T-세포주를 사용한 공배양 실험에서 확인되었다.

도 11은 CD8+ CAR T 세포 및 CD4+ CAR T 세포가 면역결핍 마우스(NOD/SCID-Raji)의 림프종 모델에서 직접 항-종양 효능을 제공함을 나타낸다. 마우스(n=3)의 그룹은 꼬리 정맥 주사를 통해 반딧불-루시퍼라제 발현 Raji 종양 세포로 접종하고, 10×10^6 T 세포의 단일 용량으로 처리했다. 마우스는 형질도입된 CD19-CAR 또는 대조군 모의-형질도입된 CD8+ 중추 기억-유도된 T 세포(a), 또는 형질도입된 CD19-CAR 또는 대조군 모의-형질도입된 CD4+ 천연-유도된 T 세포(b)를 제공했다. 종양 하중 및 분포는 연속 생물발광 영상화를 사용하는 분석했다.

도 12는 전신 맨틀 세포 림프종(NSG/Jeko-1-ffLuc)의 마우스 종양 모델에서 CD8+ ROR1-CAR CTL의 항-종양 효능에 대한 CD4+ ROR1-CAR 변형된 T 세포의 증가 및 상승작용 효과를 나타낸다. 전신 침략 맨틀 세포 림프종(NSG/Jeko-1)의 마우스 종양 모델에서 ROR1-CAR 변형된 CD8+ 및 CD4+ T 세포의 항-종양 효능. CD8+ ROR1-CAR CTL, CD4+ ROR1-CAR T 세포 또는 CD8+ 및 CD4+ ROR1-CAR T 세포의 조합물의 양자 전달 후에 생물발광 영상화를 사용한 종양 하중의 분석. 모든 마우스는 동일한 전체 용량의 CAR T 세포를 제공했다.

도 13은 전신 림프종(NSG/Raji)의 마우스 모델에서 CD8+ 및 CD19-CAR T 세포의 상승작용을 나타낸다. NSG 마우스는 반딧불-루시페라제 형질도입된 Raji 종양 세포로 접종했다. Raji 종양의 접종은 종양 접종(처리 전)후 6일에 생물발광 영상화에 의해 확인시켜 준다(처리 개략도는 a에 제시되고, 생물발광에 의한 종양 접종은 b에 제시된다). 이어서, 마우스 그룹(n=5)은, CD8+ 및 CD4+ CD19-CAR T 세포 둘 다를 함유하는, CD8+ CD19-CAR 변형된 T 세포 또는 조합된 T-세포 생성물로 처리했다. 모든 마우스는 동일한 전체 용량의 T 세포(10×10^6)를 제공했다. 생물발광 영상화를 사용한 종양 하중의 분석은 CD8+ CD19-CAR T 세포로 처리한 마우스 코호트, 및 조합된 CD8+ 및 CD4 CD19-CAR T-세포 생성물로 처리한 마우스에서 Raji 종양의 완전한 소거를 나타냈다(처리 후 중간 흑색 및 회색 막대, b). 이어서, 마우스를 Raji 종양 세포의 2차 접종물로 자극시키고, 말초 혈액에서 CD4+ 및 CD8+ CAR T 세포의 빈도 및 종양 접종을 분석했다. 조합된 CD8+ 및 CD4+ CAR T-세포 생성물로 처리한 마우스에서, 종양 자극 후에 현저히 높은 수준의 CD8+ CAR T 세포(c 하부 패널) 및 Raji 접종물의 완전한 거부(종양 자극 후에 우측 회색 막대, b). 대조적으로, CD8+ CD19-CAR CTL 단독을 제공한 마우스에서, 본 발명자들은 종양 자극 후에 CAR T 세포의 증가를 검출하지 못했고(c), Raji 종양 세포는 접종할 수 있었다(종양 자극 후에 우측 흑색 막대, 패널 b).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 본원에 사용된 "T 세포" 또는 "T 림프구"는 임의의 포유동물, 바람직하게는 영장류, 원숭이, 개 및 인간을 포함하는 종의 것일 수 있다. 일부 실시양태에서, T 세포는 수용 대상체로서 동종이계(동일한 종이지만, 상이한 공여체)이고; 일부 양태에서 T 세포는 자가(공여체 및 수용체가 동일함)이고, 일부 양태에서 T 세포는 동계(공여체 및 수용체가 상이하지만, 일란성 쌍생아임)이다.
- [0020] 본원에 사용된 세포독성 T 림프구(CTL)는 이의 표면 상에서 CD8을 발현하는 T 림프구를 지칭한다(즉, CD8⁺ T 세포). 일부 실시양태에서, 이러한 세포는 바람직하게는 항원-경험을 한 "기억" T 세포(T_M 세포)이다.
- [0021] 본원에 사용된 "중추 기억" T 세포(또는 "T_{CM}")는 이의 표면 상에서 CD62L 및 CD45RO를 발현하고 천연 세포와 비교하여 CD45RA를 발현하지 않거나 발현 감소를 갖는 항원 경험한 CTL을 지칭한다. 실시양태에서, 중추 기억 세포는 CD62L, CCR7, CD28, CD127, CD45RO 및 CD95의 발현에 양성이고, 천연 세포와 비교하여 CD54RA의 발현 감소를 갖는다.
- [0022] 본원에 사용된 "효과기 기억" T 세포(또는 "T_{EM}")는 중추 기억 세포와 비교하여 이의 표면 상에서 CD62L을 발현하지 않거나 발현 감소를 갖고 천연 세포와 비교하여 CD45RA를 발현하지 않거나 발현 감소를 갖는 항원 경험한 CTL을 지칭한다. 실시양태에서, 효과기 기억 세포는 CD62L, CCR7, CD28, CD45RA의 발현에 음성이고, 천연 세포 또는 중추 기억 세포와 비교하여 CD127에 양성이다.
- [0023] 본원에 사용된 "천연" T 세포는 CD62L 및 CD45RA를 발현하고 중추 기억 세포와 비교하여 CD45RO를 발현하지 않거나 발현 감소를 갖는 항원 비경험한 T 림프구를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 천연 CD8+ T 림프구는 CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD127 및 CD45RA를 포함하는 천연 T 세포의 표현형 마커의 발현을 특징으로 한다.
- [0024] 본원에 사용된 "효과기", "T_E" T 세포는 CD62L, CCR7, CD28을 발현하지 않거나 발현 감소를 갖고 중추 기억 세포와 비교하여 그랜자임 B 및 퍼포린에 양성인 항원 경험한 세포독성 림프구 세포를 지칭한다.
- [0025] 혼합물에서 세포 종류의 양을 기재하기 위해 본원에 사용된 "풍부한" 및 "고갈된"은 "농후한" 종류 수의 증가 및 "고갈된" 세포 수의 감소를 제공하는 공정 또는 단계로 세포 혼합물을 처리하는 것을 지칭한다. 따라서, 농후화 공정으로 처리된 세포의 본래 모집단의 공급원에 따라, 혼합물 또는 조성물은 60, 70, 80, 90, 95 또는 99% 이상(수 또는 계수)의 "농후한" 세포 및 40, 30, 20, 10, 5 또는 1% 이하(수 또는 계수)의 "고갈된" 세포를 함유할 수 있다.

- [0026] 인터류킨-15는 공지된 것이며, 예를 들면, 미국 특허 제6,344,192호에 기재되어 있다.
- [0027] 본원에 사용된 "CAR"은 당해 질환 또는 장애와 관련된 항원에 특이적인 항체의 세포외 가변 도메인 및 T 세포 또는 기타 수용체의 세포내 신호전달 도메인(예: 공자극 도메인)을 포함하는 키메라 항원 수용체를 지칭한다.
- [0028] **기재 방식**
- [0029] 시험관내 배양 동안 CD4+ T 림프구는 시험관내 및 생체내에서 종양-특이적 CD8+ T 세포의 증식, 존속 및 항-종양 반응성을 현저히 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 천연 CD4+ T 세포는 중추 및 효과기 기억으로부터 유도된 CD4+ T 세포 또는 벌크 CD4+ T 세포와 비교하여 우수한 헬퍼 활성을 유도하는 고유 프로그래밍을 보유한다.
- [0030] 실시양태에서, 종양-반응성 CD4+ T 세포는 오픈 티로신 키나제 수용체 ROR1 또는 CD19 분자에 특이적인 단쇄 항체-유도된 키메라 항원 수용체(CAR)로 변형시킨다. ROR1은 만성 림프구성 백혈병(CLL) 맨들 세포 림프종(MCL) 상에서 균일하게 발현되고, 항-ROR1 모노클로날 항체(mAb)로부터의 ROR1-특이적 CAR은, CD8+ 세포독성 T 세포(CTL)에서 발현시키는 경우, 악성 B-세포의 특이적 인식을 제공하지만 성숙 정상 B-세포의 특이적 인식을 제공하지 않는다. 벌크 및 유동 분류 정제된 천연, 중추 및 효과기 기억 CD4+ T 세포로부터의 ROR1-CAR T 세포는 건강한 공여체 및 CLL 환자 둘 다의 말초 혈액으로부터 수득한다. CD4+ CAR T 세포는 ROR1으로 형질감염된 원발성 CLL, MCL 라인 Jeko-1 및 K562를 포함하는 ROR1+ 종양에 대해 특이적이지만 약한 세포용해 활성을 갖는다. 다중 사이토킨 분석은 CD8+ CAR CTL과 비교하여 현저히 높은 수준의 IFN γ , TNF α 및 특히 IL-2와 함께 Th1 사이토킨의 고도의 생성을 검출한다. CFSE 염색은 ROR1-양성 종양 세포에 의한 자극 후에 현저히 높은 증식을 나타내고, 증식이 유도된 세포 비율 및 증식 서브셋이 경형한 세포 분화 수는 CD8+ CAR CTL과 비교하여 현저히 높았다. 건강한 공여체 및 CLL 환자 둘 다로부터 수득한 CD4+ T 세포는 ROR1-특이적 CAR로 유전적으로 변형 후에 항-종양 반응성을 획득한다. 더욱이, 외인성 사이토킨의 부재하에 증식하고 고도의 Th1 사이토킨을 생성하는 능력은 CD4+ CAR T 세포가 CAR을 통한 자극 후에 전형적인 헬퍼 기능을 나타냄을 입증하고, 직접 항-종양 효과를 제공하는 것과 더불어, 종양-특이적 CD8+ CTL을 증가시키기 위해 사용될 수 있음을 시사한다.
- [0031] 유동 분류 정제된 CD4+ 천연, 중추 및 효과기 기억 서브셋으로부터 유도된 ROR1-CAR T 세포의 사이토킨 프로파일 및 증식 성능이 수득된다. 천연 CD45RA+ CD45RO- CD62L+ 서브셋으로부터 유도된 CD4+ CAR T 세포는 최고 수준의 Th1 사이토킨, 특히 IL-2를 생성하고, ROR1+ 종양 세포와 반응하여 증식한다. 실제로, 공-배양 실험에서, 비형질도입된 CD4+ T 세포가 아닌 형질도입된 CAR T 세포의 부가는 CD8+ CAR CTL의 종양-특이적 증식의 현저한 증가를 유도한다. 일부 실시양태에서, 중추 및 효과기 기억 서브셋 또는 벌크 CD4+ T 세포가 아닌 천연 서브셋으로부터 유도된 CAR-변형된 CD4+ T 세포는 CD8+ CAR CTL의 향상된 증식을 생성한다.
- [0032] CD8+ 중추 기억 T 세포는 투여 후에 연장된 기간 동안 이들을 지속시키는 고유 프로그래밍을 갖고, 이는 이들을 면역요법을 위한 CD8+ T 세포의 바람직한 서브셋으로 되게 한다. 실시양태에서, 분류 정제된 CD8+ 중추 기억 T 세포로부터 ROR1-CAR 또는 CD19 CAR 변형된 CLT 및 CD4+ 천연 CAR-변형된 T 세포는 CD8+ T 세포 서브셋의 향상된 증식을 제공한다. 실시양태에서, 종양-특이적 CD4+ T 세포는 항-종양 활성을 나타내고, 시험관내 및 생체내에서 종양-특이적 CD8+ T 세포에 대한 도움을 제공한다. 특정 실시양태에서, 천연 서브셋으로부터의 종양-특이적 CD8+ T 세포가 사용된다.
- [0033] 또 다른 실시양태에서, CD8+ 및 CD4+ T 세포는 T 세포 수용체(TCF)로 변형시킬 수 있다. TCR은 임의의 항원, 병원체 또는 종양[흑색종(예: MART1, gp100), 백혈병(예: WT1, 부조직적합성 항원), 유방암(예: her2, NY-BR1)에서 다수의 종양 항원을 위한 TCR이 존재한다.]에 특이적일 수 있다.
- [0034] **상세한 설명**
- [0035] **조성물**
- [0036] 본 명세서는, 세포 면역 반응을 매개하는 유전적으로 변형된 세포독성 T 림프구 세포 제제의 능력을 증가시키는 유전적으로 변형된 헬퍼 T 림프구 세포 제제를 포함하는 양자 세포 면역요법 조성물을 제공하고, 여기서 상기 헬퍼 T 림프구 세포 제제는 당해 질환 또는 장애와 관련된 항원에 특이적인 세포외 항체 가변 도메인 및 T 세포 수용체 또는 기타 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체를 갖는 CD4+ T 세포를 포함한다.

- [0037] 일부 실시양태에서, 양자 세포 면역요법 조성물은 세포 면역 반응을 유도하는 키메라 항원 수용체 변형된 중앙-특이적 CD8+ 세포독성 T 림프구 세포 제제를 추가로 포함하고, 여기서 상기 세포독성 T 림프구 세포 제제는 당해 질환 또는 장애와 관련된 항원에 특이적인 세포의 단쇄 항체 및 T 세포 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체를 갖는 CD8+ T 세포를 포함한다.
- [0038] 일부 실시양태에서, 양자 세포 면역요법 조성물은 세포 면역 반응을 유도하는 키메라 항원 수용체 변형된 중앙-특이적 CD8+ 세포독성 T 림프구 세포 제제를 포함하고, 여기서 상기 세포독성 T 림프구 세포 제제는, CD45RO 음성, CD62L 양성 CD4 양성 T 세포로부터 유도된 항원-반응성 키메라 항원 수용체 변형된 천연 CD4+ T 헬퍼 세포 및 약제학적으로 허용가능한 담체와 조합하여, 당해 질환 또는 장애와 관련된 항원에 특이적인 세포의 단쇄 항체 및 T 세포 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체를 갖는 CD8+ T 세포를 포함한다.
- [0039] 다른 실시양태에서, 양자 세포 면역요법 조성물은, CD8+ 면역 반응을 증가시키는 항원-반응성 키메라 항원 수용체 변형된 천연 CD4+ T 헬퍼 세포와 조합된, 환자로부터 유도된 세포 면역 반응을 유도하는 항원 특이적 CD8+ 세포독성 T 림프구 세포 제제를 포함하고, 여기서 상기 헬퍼 T 림프구 세포 제제는 당해 질환 또는 장애와 관련된 항원에 특이적인 세포의 항체 가변 도메인 및 T 세포 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체를 갖는 CD4+ T 세포를 포함한다.
- [0040] 추가의 실시양태에서, 양자 세포 면역요법 조성물은 CD8+ 면역 반응을 증가시키는 항원-반응성 키메라 항원 수용체 변형된 천연 CD4+ T 헬퍼 세포를 포함하고, 여기서 상기 헬퍼 T 림프구 세포 제제는 당해 질환 또는 장애와 관련된 항원에 특이적인 세포의 항체 가변 도메인 및 T 세포 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체를 갖는 CD4+ T 세포를 포함한다.
- [0041] 실시양태에서, CD4+ T 헬퍼 림프구 세포는 천연 CD4+ T 세포, 중추 기억 CD4+ T 세포, 효과기 기억 CD4+ T 세포 또는 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, CD4+ 헬퍼 림프구 세포는 천연 CD4+ T 세포이고, 상기 천연 CD4+ T 세포는 CD45RO-, CD45RA+, CD62L+ CD4+ T 세포를 포함한다. 실시양태에서, CD8+ T 세포독성 림프구 세포는 천연 CD8+ T 세포, 중추 기억 CD8+ T 세포, 효과기 기억 CD8+ T 세포 또는 벌크 CD8+ T 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, CD8+ 세포독성 T 림프구 세포는 중추 기억 T 세포이고, 당해 중추 기억 T 세포는 CD45RO+, CD62L+, CD8+ T 세포를 포함한다. 여전히 다른 실시양태에서, CD8+ 세포독성 T 림프구 세포는 중추 기억 T 세포이고, CD4+ 헬퍼 T 림프구 세포는 천연 CD4+ T 세포이다.
- [0042] 대체 실시양태에서, T 세포는 재조합체 T 세포 수용체로 변형시킬 수 있다. TCR은 임의의 항원, 병원체 또는 종양에 특이적일 수 있다. 흑색종(예: MART1, gp100), 백혈병(예: WT1, 부조직적합성 항원), 유방암(예: her2, NY-BR1)에서 다수의 중앙 항원을 위한 TCR이 있다.

[0043] **T 림프구 모집단의 선택 및 분류**

- [0044] 본원에 기재된 조성물은 항원 반응성 CD4+ 및 CD8+ T 림프구를 제공한다.
- [0045] T 림프구는 공지된 기술에 따라 수집될 수 있고, 유동 혈구계산 및/또는 면역자기 선택 등의 항체에 대한 친화성 결합과 같은 공지된 기술에 의해 풍부화 또는 고갈된다. 풍부화 및/또는 고갈 단계 후, 목적하는 T 림프구의 시험관내 증식은 공지된 기술(이로써 한정되는 것은 아니지만, 리델(Riddell) 등의 미국 특허 제6,040,177호에 기재된 것들을 포함) 또는 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 수 있는 이의 변형태에 따라 수행할 수 있다.
- [0046] 예를 들면, 목적하는 T 세포 모집단 또는 아집단은 시험관내에서 배양 배지에 1차 T 림프구 모집단을 부가한 다음, 배양 배지에 공급물 세포, 예를 들면, 미분화 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)(예를 들면, 생성된 세포 모집단이 증식되는 1차 모집단 중에 각 T 림프구에 대해 적어도 약 5, 10, 20 또는 40개 이상의 PBMC 공급물 세포를 함유하도록)를 부가하고, 배양물을 배양(예: T 세포 수를 증식시키기 위해 충분한 시간 동안)함으로써 증식시킬 수 있다. 미분화 공급물 세포는 감마선-조사된 PBMC 공급물 세포를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, PBMC는 약 3000 내지 3600 rad 범위에서 감마선으로 조사된다. 배양 배지에 대한 T 세포 및 공급물 세포의 부가 순서는 필요에 따라 역전될 수 있다. 배양물은 T 림프구의 성장에 적합한 온도 등의 조건하에 통상 배양될 수 있다. 인간 T 림프구의 성장을 위해, 예를 들면, 온도는 일반적으로 적어도 약 25℃, 바람직하게는 적어도 약 30℃, 보다 바람직하게는 약 37℃일 수 있다.

- [0047] 증식된 T 림프구는 세포독성 T 림프구(CTL), 및 인간 종양 또는 병원체 상에 존재하는 항원에 특이적인 헬퍼 T 림프구를 포함한다.
- [0048] 임의로, 증식 방법은 공급물 세포로서 비-분화 EBV-형질전환된 림프아구성 세포(LCL)을 추가하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. LCL은 약 6000 내지 10,000 rad의 범위에서 감마선으로 조사될 수 있다. LCL 공급물 세포는 임의의 적합한 양, 예를 들면, 적어도 약 10:1의 LCL 공급물 세포 대 1차 T 림프구의 비율로 제공될 수 있다.
- [0049] 임의로, 증식 방법은 배양 배지에 항-CD3 모노클로날 항체를 추가하는 단계를 추가로 포함할 수 있다(예: 적어도 약 0.5 ng/ml의 농도로). 임의로, 증식 방법은 배양 배지에 IL-2 및/또는 IL-15를 추가하는 단계를 추가로 포함할 수 있다(예를 들면, 여기서 IL-2의 농도는 적어도 약 10 단위/ml이다).
- [0050] T 림프구의 분리 후, 세포독성 및 헬퍼 T 림프구 둘 다는 팽창 전후에 천연, 기억 및 효과기 T 세포 아모집단으로 분류될 수 있다.
- [0051] CD8+ 세포는 표준 방법을 사용하여 수득할 수 있다. 일부 실시양태에서, CD8+ 세포는 CD8+ 세포의 이들 유형 각각과 결합되는 세포 표면 항원을 동정함으로써 천연, 중추 기억 및 효과기 세포로 추가 분류된다. 실시양태에서, 기억 T 세포는 CD8+ 말초 혈액 림프구의 CD62L+ 및 CD62L-서브셋 둘 다에 존재한다. PBMC는 항-CD8 및 항-CD62L 항체로 염색한 후에 CD62L-CD8+ 및 CD62L+ CD8+ 분획으로 분류된다. 일부 실시양태에서, 중추 기억 TCM의 표현형 마커의 발현은 CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 및 CD127을 포함하고, 그랜자임 B에 음성이다. 일부 실시양태에서, 중추 기억 T 세포는 CD45RO+, CD62L+, CD8+ T 세포이다. 일부 실시양태에서, 효과기 T_E는 CD62L, CCR7, CD28 및 CD127에 음성이고, 그랜자임 B 및 퍼포린에 양성이다. 일부 실시양태에서, 천연 CD8+ T 림프구는 CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD127 및 CD45RA를 포함하는 천연 T 세포의 표현형 마커의 발현을 특징으로 한다.
- [0052] 세포 또는 세포 모집단이 특정한 세포 표면 마커에 양성인지의 여부는 표면 마커에 대한 특이적 항체 및 이소형 매칭된 대조군 항체에 의한 염색을 사용하는 유동 혈구계산에 의해 측정할 수 있다. 마커에 대한 세포 모집단 음성은 이소형 대조군과 비교하여 특이적 항체를 갖는 세포 모집단의 현저한 염색의 부재를 지칭하고, 세포 모집단 양성은 이소형 대조군과 비교하여 세포 모집단의 균일한 염색을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 하나 또는 마커들의 발현 감소는 평균 형광 강도의 1 log₁₀의 소실 및/또는, 참조 세포 모집단과 비교하는 경우, 세포 중 적어도 20%, 세포 중 적어도 30%, 세포 중 적어도 35%, 세포 중 적어도 40%, 세포 중 적어도 45%, 세포 중 적어도 50%, 세포 중 적어도 55%, 세포 중 적어도 60%, 세포 중 적어도 65%, 세포 중 적어도 70%, 세포 중 적어도 75%, 세포 중 적어도 80%, 세포 중 적어도 85%, 세포 중 적어도 90%, 세포 중 적어도 95% 및 세포 중 적어도 100%의 마커를 나타내는 세포 비율의 감소를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 하나 또는 마커에 대한 세포 모집단 양성은, 참조 세포 모집단과 비교하는 경우, 세포 중 적어도 50%, 세포 중 적어도 55%, 세포 중 적어도 60%, 세포 중 적어도 65%, 세포 중 적어도 70%, 세포 중 적어도 75%, 세포 중 적어도 80%, 세포 중 적어도 85%, 세포 중 적어도 90%, 세포 중 적어도 95% 및 세포 중 적어도 100% 및 50 내지 100%의 모든 %의 마커를 나타내는 세포 비율을 지칭한다.
- [0053] CD4+ T 헬퍼 세포는 세포 표면 항원을 갖는 세포 모집단을 동정함으로써 천연, 중추 기억 및 효과기 세포로 분류된다. CD4+ 림프구는 표준 방법으로 수득할 수 있다. 일부 실시양태에서, 천연 CD4+ T 림프구는 CD45RO-, CD45RA+, CD62L+ CD4+ T 세포이다. 일부 실시양태에서, 중추 기억 CD4+ 세포는 CD62L 양성 및 CD45RO 양성이다. 일부 실시양태에서, 효과기 CD4+ 세포는 CD62L 및 CD45RO 음성이다.
- [0054] 항원 특이적인 CD4+ 및 CD8+의 모집단은 천연 또는 항원 특이적 T 림프구를 항원으로 자극시킴으로써 수득할 수 있다. 예를 들면, 항원 특이적 T 세포 클론은 감염된 대상체로부터 T 세포를 분리하고 당해 세포를 시험관내에서 동일한 항원으로 자극함으로써 사이토메갈로바이러스 항원으로 생성될 수 있다. 천연 T 세포가 또한 사용될 수 있다. 종양 세포, 암 세포 또는 감염성 제체로부터 임의의 수의 항원을 사용할 수 있다. 이러한 항원의 예는 HIV 항원, HCV 항원, HBV 항원, CMV 항원, 기생충 항원 및 종양 항원, 예를 들면, 오피인 티로신 키나제 수용체 ROR1, tEGFR, Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, 메소텔린 및 CEA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 양자 세포 면역요법 조성물은 고형 종양, 혈액암, 흑색종 또는 바이러스에 의한 감염을 포함하는 질환 또는 장애의 치료에 유용하다.
- [0055]
- [0056] 림프구 모집단의 변형

- [0057] 일부 실시양태에서, 본 명세서의 기재에 따라 면역요법에 사용되는 T 세포 내로 기능성 유전자를 도입하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들면, 도입된 유전자 또는 유전자들은 전달된 T세포의 생존능 및/또는 기능을 촉진시킴으로써 치료 효과를 개선시킬 수 있거나; 이들은 생체내 생존 또는 이동의 선택 및/또는 평가는 가능하게 하는 유전자 마커를 제공할 수 있거나; 이들은, 예를 들면, 음성 선별가능한 마커와 음성 선별가능한 마커의 융합으로부터 유도된 이작용성 선별가능한 융합 유전자의 사용을 기재하는, 문헌[참조: Lupton S. D. et al., *Mol. and Cell Biol.*, 11:6 (1991); and Riddell et al., *Human Gene Therapy* 3:319-338 (1992); 또한 공보 PCT/US91/08442 and PCT/US94/05601 by Lupton et al.]에 기재된 바와 같이 생체내에서 음성 선별에 감수성인 세포를 제조함으로써 면역요법의 안전성을 개선시키는 기능을 도입할 수 있다. 이는 공지된 기술(예를 들면, 미국 특허 제6,040,177호, Riddell et al., columns 14-17) 또는 본 명세서의 기재에 기초하여 당해 기술분야의 기술자에게 명백할 수 있는 이의 변형태에 따라 수행할 수 있다.
- [0058] 실시양태에서, T 세포는 키메라 항원 수용체(CAR)로 변형된다. 일부 실시양태에서, CAR은 T-세포 활성화 및 세포독성을 매개하는 TCR CD3+ 쇠에 연결된 모노클로날 항체(mAb)의 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL)로부터 유도되는 단쇄 항체 단편(scFv)을 포함한다. 공자극 신호는 또한 CD28 또는 4-1BB의 공자극 도메인을 CD3+ 쇠에 융합시킴으로써 CAR를 통해 제공될 수 있다. CAR은 HLA와 독립적인 세포 표면 분자에 특이적이고, 따라서 HLA-제한을 포함하는 TCR-인식 및 종양 세포에 대한 낮은 수준의 HLA-발현의 제한을 극복한다.
- [0059] 예를 들면, 항체 분자의 항원 결합 단편 또는 항체 가변 도메인을 사용하여 임의의 세포 표면 마커에 대한 특이성을 갖는 CAR이 작제될 수 있다. 항원 결합 분자는 하나 이상의 세포 신호전달 모듈에 연결될 수 있다. 실시양태에서, 세포 신호전달 모듈은 CD3 막관통 도메인, CD3 세포내 신호전달 도메인 및 CD28 막관통 도메인을 포함한다. 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 세포내 도메인에 연결된 CD28 막관통 및 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, CAR은 또한 eTGF α R 등의 형질도입 마커를 포함할 수 있다.
- [0060] 당해 실시양태에서, CD8+ 세포독성 T 세포의 세포내 신호전달 도메인은 CD4+ 헬퍼 T 세포의 세포내 신호전달 도메인과 동일하다. 다른 실시양태에서, CD8+ 세포독성 T 세포의 세포내 신호전달 도메인은 CD4+ 헬퍼 T 세포의 세포내 신호전달 도메인과 상이하다.
- [0061] 일부 실시양태에서, CD8+ T 세포 및 CD4+ T 세포는 모두 병원체-특이적 세포 표면 항원에 특이적으로 결합하는 항체 중쇄 도메인으로 유전적으로 변형된다. 당해 실시양태에서, CAR은 병원체, 종양 또는 암 세포에 결합된 세포 표면 발현된 항원에 특이적이다. 일부 실시양태에서, CAR은 HIV 항원, HCV 항원, HBV 항원, CMV 항원, 기생충 항원 및 종양 항원, 예를 들면, 오피온 티로신 키나제 수용체 ROR1, tEGFR, Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, 메소텔린 및 CEA에 특이적이다. CAR을 생성하는 방법은 본원에 기재되어 있고, 또한 문헌[참조: 미국 특허 제6,410,319호(Forman) 및 WO 2002/077029, 제7,446,191호, 2010/065818, 2010/025177, 2007/059298, 및 7,514,537(Jensen et al.) 및 Berger C. et al., *J. Clinical Investigation*, 118:1 294-308 (2008), 이들은 본원에서 참조로서 인용됨]에서 발견할 수 있다.
- [0062] 실시양태에서, 동일하거나 상이한 CAR은 CD4+ 및 CD8+ T 림프구 각각 내로 도입될 수 있다. 실시양태에서, 이들 모집단 각각 내의 CAR은 동일한 항원에 특이적으로 결합하는 항원 결합 분자를 갖는다. 세포 신호전달 분자는 상이할 수 있다. 실시양태에서, 각각의 CD4 또는 CD8 T 림프구는 형질도입 전에 천연, 중추 기억, 효과기 기억 또는 효과기 세포로 분류될 수 있다. 대체 실시양태에서, 각각의 CD4 또는 CD8 T 림프구는 형질도입 전에 천연, 중추 기억, 효과기 기억 또는 효과기 세포로 분류될 수 있다.
- [0063] 대체 실시양태에서, T 세포는 재조합체 T 세포 수용체로 변형시킬 수 있다. TCR은 임의의 항원, 병원체 또는 종양에 특이적일 수 있다. 흑색종(예: MART1, gp100), 백혈병(예: WT1, 부조직적합성 항원), 유방암(예: her2, NY-BR1)에서 다수의 종양 항원에 대한 TCR이 존재한다.
- [0064] 유전자 전달을 위해 재조합 감염성 바이러스 입자를 사용하는 다양한 감염 기술이 개발되었다. 이는 본 발명의 T 림프구의 형질도입에 대한 현재 바람직한 방법을 나타낸다. 이러한 방식으로 사용되어 왔던 바이러스 벡터는 시미안 바이러스 40, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스(AAV), 렌티바이러스 벡터 및 레트로바이러스로부터 유도된 바이러스 벡터를 포함한다. 따라서, 유전자 전달 및 발현 방법은 다수가 있지만, 본질적으로 포유동물 세포에서 유전자 물질을 도입 및 발현하도록 기능한다. 인산칼슘 형질감염, 원형질체 융합, 전기천공, 및 재조합 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스 및 레트로바이러스 벡터에 의한 감염을 포함하는 상기 기술 중의 몇몇을 사용하여, 조혈 세포 또는 임파 세포를 형질도입할 수 있다. 원발성 T 림프구는 전기천공 및 레트로바이러스 감염에 의해 공공적으로 형질도입되었다.

- [0065] 레트로바이러스 벡터는 진핵 세포 내로 유전자 전달을 위한 매우 효율적인 방법을 제공한다. 더욱이, 레트로바이러스 삽입은 조절된 방식으로 일어나고, 세포당 새로운 유전자 정보의 하나 또는 소수 카피의 안정한 삽입을 제공한다.
- [0066] 자극 인자(예: 림포카인 또는 사이토킨)의 과발현은 처리된 개체에게 독성일 수 있는 것으로 고려된다. 따라서, 본 발명의 T 세포가 생체내에서 음성 선택에 감수성있게 하는 유전자 세그먼트를 포함하는 것도 본 발명의 범위 내에 포함된다. "음성 선택"이란, 융합된 세포가 개체의 생체내 조건하에서 변화의 결과로서 제거될 수 있음을 의미한다. 음성 선별가능한 표현형은 투여된 제제(예: 화합물)에 민감성을 제공하는 유전자의 삽입으로부터 발생할 수 있다. 음성 선별가능한 유전자는 당해 기술분야에 공지되어 있고, 특히 하기를 포함한다: 간사이클로비르 민감성을 제공하는 헤르페스 심플렉스 바이러스 유형 I 티미딘 키나제(HSV-I TK) 유전자(Wigler et al., Cell 11:223, 1977); 세포 하이포크산틴 포스포리보실트랜스퍼라제(HPRT) 유전자, 세포 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제(APRT) 유전자, 박테리아 사이토신 데아미나제[참조: Mullen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:33 (1992)].
- [0067] 일부 실시양태에서, 시험관내에서 음성 선별가능한 표현형의 세포를 선별할 수 있는 양성 마커를 T 세포에 포함하는 것이 유용할 수 있다. 양성 선별가능한 마커는, 숙주 세포 내로 도입하면, 당해 유전자를 포함하는 세포의 양성 선별을 허용하는 우성 표현형을 발현하는 유전자일 수 있다. 이러한 유형의 유전자는 당해 기술분야에 공지되어 있고, 특히 하이드로마이신 B에 내성을 부여하는 하이드로마이신-B 포스포트랜스퍼라제 유전자(hph), 항생제 G418에 대한 내성을 코딩하는 Tn5로부터의 아미노 글리코시드 포스포트랜스퍼라제 유전자(neo 또는 aph), 디하이드로폴레이트 리덕타제(DHFR) 유전자, 아데노신 다미나제 유전자(ADA) 및 다중-약물 내성(MDR) 유전자를 포함한다.
- [0068] 바람직하게는, 양성 선별가능한 마커 및 음성 선별가능한 요소는 음성 선별가능한 요소의 소실이 필수적으로 양성 선별가능한 마커의 소실에 의해 또한 달성되도록 연결된다. 보다 더 바람직하게는, 양성 및 음성 선별가능한 마커는 하나의 소실이 또 다른 것의 소실을 강제적으로 유도하도록 융합된다. 발현 생성물로서 수득되는 융합된 폴리뉴클레오티드의 예는 상기한 목적하는 양성 및 음성 선별 특성 둘 다를 제공하는 폴리펩티드가 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제 티미딘 키나제 융합 유전자(HyTK)인 것이다. 이러한 유전자의 발현은 시험관내에서 양성 선별을 위한 하이드로마이신 B 내성, 및 생체내에서 음성 선별을 위한 간사이클로비르 민감성을 제공하는 폴리펩티드를 생성한다[참조: Lupton S. D., et al, Mol. and Cell. Biology 11:3374- 3378, 1991]. 또한, 바람직한 실시양태에서, 키메라 수용체를 코딩하는 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 융합 유전자, 특히 시험관내에서 양성 선별을 위한 하이드로마이신 B 내성, 및 생체내에서 음성 선별을 위한 간사이클로비르 민감성을 부여하는 것들, 예를 들면, 문헌[참조: Lupton, S. D. et al. (1991), supra]에 기재된 HyTK 레트로바이러스 벡터에 존재한다. 또한, 우성 양성 선별가능한 마커와 음성 선별가능한 마커의 융합으로부터 유도된 이작용성 선별가능한 융합 유전자의 사용을 기재하는 공보[참조: PCT/US91/08442 및 PCT/US94/05601, S. D. Lupton]를 참조한다.
- [0069] 바람직한 양성 선별가능한 마커는 hph, nco 및 gpt로 이루어진 그룹으로부터 선택된 유전자로부터 유도되고, 바람직한 음성 선별가능한 마커는 사이토신 데아미나제, HSV-I TK, VZV TK, HPRT, APRT 및 gpt로 이루어진 그룹으로부터 선택된 유전자로부터 유도된다. 특히 바람직한 마커는 이작용성 선별가능한 융합 유전자이고, 여기서 양성 선별가능한 마커는 hph 또는 neo로부터 유도되고, 음성 선별가능한 마커는 사이토신 데아미나제 또는 TK 유전자 또는 선별가능한 마커로부터 유도된다.
- [0070] 당해 기술분야에 공지된 바와 같은 다양한 방법을 T 림프구의 형질도입에 사용할 수 있다. 예를 들면, 레트로바이러스 형질도입은 다음과 같이 수행할 수 있다: 본원에 기재된 바와 같은 REM을 사용하는 자극 후, 1일차에, 세포를 20-30 단위/ml IL-2와 함께 제공하고, 3일 차에, 매질의 절반을 표준 방법에 따라 제조한 레트로바이러스 상청으로 대체한 다음, 배양물을 5 ug/ml 폴리브렌 및 20-30 단위/ml IL-2로 보충하고; 4일차에, 세포를 세척하고, 이들을 20-30 단위/ml IL-2가 보충된 신선한 배양 배지에 넣고; 5일차에, 레트로바이러스에 노출을 반복하고; 6일차에, 세포를 30 단위/ml IL-2가 보충된 선별 배지(예를 들면, 레트로바이러스 벡터에 제공된 항생제 내성 유전자에 상응하는 항생제를 함유함)에 넣고; 13일차에, 피콜 하이팩 밀도 구배 분리를 사용하는 사멸 세포로부터 생존 세포를 분리한 다음, 생존 세포를 서브클로닝한다.
- [0071] CD4+ 및 CD8+ 세포는 CAR을 코딩하는 발현 벡터로 변형시킬 수 있다. 실시양태에서, 이들 세포를, 이들 세포 모집단 각각에 특이적인 세포 표면 항원을 분류함으로써 상기한 바와 같은 천연, 중추 기억 및 효과기 세포의 아모집단으로 추가로 분류한다. 또한, CD4+ 또는 CD8+ 세포 모집단은 이들의 사이토킨 프로파일 또는 증식 활성에 의해 선별할 수 있다. 예를 들면, 항원으로 자극하는 경우, 모의 형질도입된 세포 또는 형질도입된 CD8+ 세포

와 비교하여, IL-2, IL-4, IL-10, TNF α 및 IFN γ 등의 사이토킨의 증가된 생성을 갖는 CD4+ T 림프구를 선별할 수 있다. 다른 실시양태에서, IL-2 및/또는 TNF α의 증가된 생성을 갖는 천연 CD4+ T 세포가 선별된다. 마찬가지로, 증가된 IFN γ 생성을 갖는 CD8+ 세포가 모의 형질도입된 CD8+ 세포와 비교하여 선별된다.

- [0072] 실시양태에서, 항원과 반응하여 증식하는 CD4+ 및 CD8+ 세포가 선별된다. 예를 들면, 항원으로 자극하는 경우, 모의 형질도입된 세포 또는 CD8+ 형질도입된 세포와 비교하여, 격렬하게 증식하는 CD4+ 세포가 선별된다.
- [0073] 일부 실시양태에서, 항원 함유 세포에 대해 세포독성인 CD4+ 및 CD8+ 세포가 선별된다. 실시양태에서, CD4+는 CD8+ 세포와 비교하여 약하게 세포독성인 것으로 예상된다.
- [0074] 당해 개시는 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 조합물이 당해 조성물에 사용될 수 있음을 고려한다. 한 가지 실시양태에서, CAR 형질도입된 CD4+ 세포의 조합물은 CAR과 동일한 항원성 특이성까지 CD8+ 항원 반응성 세포와 조합될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, CAR 변형된 CD4+ 및 CD8+ 세포가 조합된다.
- [0075] 본원에 기재된 바와 같이, 당해 개시는 CD4+ 및 CD8+ 세포가 아모집단, 예를 들면, 천연, 중추 기억 및 효과기 세포 모집단으로 추가로 분리될 수 있음을 고려한다. 본원에 기재된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 천연 CD4+ 세포는 CD45RO-, CD45RA+, CD62L+ CD4+ T 세포이다. 일부 실시양태에서, 중추 기억 CD4+ 세포는 CD62L 양성 및 CD45RO 양성이다. 일부 실시양태에서, 효과기 CD4+ 세포는 CD62L 음성 및 CD45RO 양성이다. 각각의 이들 모 집단은 독립적으로 CAR로 변형시킬 수 있다.
- [0076] 본원에 기재된 바와 같이, 실시양태에서, 기억 T 세포는 CD8+ 말초 혈액 림프구의 CD62L+ 및 CD62L- 서브셋 둘 다에 존재한다. PBMC는 항-CD8 및 항-CD62L 항체로 염색 후에 CD62L-CD8+ 및 CD62L+CD8+ 분획으로 분류된다. 일부 실시양태에서, 중추 기억 TCM의 표현형 마커의 발현은 CD62L, CCR7, CD28, CD3 및 CD127을 포함하고, 그랜 자임에 대해 음성이다. 일부 실시양태에서, 중추 기억 T 세포는 CD45RO+, CD62L+, CD8+ T 세포이다. 일부 실시 양태에서, 효과기 T_E는 CD62L, CCR7, CD28 및 CD127에 대해 음성이고, 그랜자임 B 및 퍼포린에 대해 양성이다. 일부 실시양태에서, 천연 CD8+ T 림프구는 CD8+, CD62L+, CD45RO+, CCR7+, CD28+ CD127+ 및 CD45RO+를 특징으 로 한다. 이들 모집단 각각은 독립적으로 CAR로 독립적으로 변형시킬 수 있다.
- [0077] CD4+ 및 CD8+ 세포의 아모집단 각각은 서로 조합될 수 있다. 특정 실시양태에서, 변형된 천연 CD4+ 세포는 변형 된 중추 기억 CD8+ T 세포와 조합되어, 종양 세포 등의 항원 함유 세포에 대해 상승작용 세포독성 효과를 제공 한다.
- [0078] **방법**
- [0079] 본 명세서는 양자 면역요법 조성물을 제조하는 방법 및 질환 또는 장애를 갖는 환자에서 세포 면역요법을 수행 하기 위한 이들 조성물의 용도 또는 사용 방법을 제공한다.
- [0080] 실시양태에서, 당해 조성물을 제조하는 방법은 변형된 천연 CD4+ T 헬퍼 세포를 획득하는 것을 포함하고, 여기 서 상기 변형된 헬퍼 T 림프구 세포 제제는 당해 질환 또는 장애와 관련된 항원에 특이적인 세포외 항체 가변 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체를 갖는 CD4+ T 세포를 포함한다.
- [0081] 다른 실시양태에서, 당해 방법은 변형된 CD8+ 세포독성 T 세포를 획득하는 것을 추가로 포함하고, 여기서 상기 변형된 세포독성 T 림프구 세포 제제는 당해 질환 또는 장애와 관련된 항원에 특이적인 세포외 항체 가변 도메 인 및 T 세포 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체를 갖는 CD8+ 세포를 포함한다.
- [0082] 다른 실시양태에서, 당해 방법은 변형된 CD8+ 세포독성 T 세포를 획득하는 것을 포함하고 변형된 CD8+ 세포독성 T 세포를 항원 특이적 CD4+ 헬퍼 세포 림프구 세포 제제와 조합하는 것을 추가로 포함하며, 여기서 상기 변형된 세포독성 T 림프구 세포 제제는 당해 질환 또는 장애와 관련된 항원에 특이적인 세포외 항체 가변 도메인 및 T 세포 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체를 갖는 CD8+ T 세포를 포함한다.
- [0083] CAR로 변형시킨 CD4+ 및 CD8+ 세포의 제조는 실시예 뿐만 아니라 상기 기재되어 있다. 항원 특이적 T 림프구는 당해 질환 또는 장애를 갖는 환자로부터 획득할 수 있거나, 항원의 존재하에 T 림프구의 시험관내 자극에 의해 제조할 수 있다. CD4+ 및 CD8+ T 림프구의 아모집단은 또한 본원에 기재된 바와 같이 분리될 수 있고 제조 방법 과 조합될 수 있다.
- [0084] 본 명세서는 또한, 청구항 제1항 내지 제19항 중의 어느 한 항의 조성물을 투여함을 포함하는, 질환 또는 장애 를 갖는 대상체에서 세포 면역요법을 수행하는 방법을 제공한다. 다른 실시양태에서, 당해 방법은 세포 면역 반

응을 제공하는 유전적으로 변형된 세포독성 T 림프구 세포 제제, 및 직접 종양 인식을 유도하고 세포 면역 반응을 매개하는 유전적으로 변형된 세포독성 T 림프구 세포 제제의 능력을 증가시키는 유전적으로 변형된 헬퍼 T 림프구 세포 제제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 여기서 상기 세포독성 T 림프구 세포 제제는 당해 질환 또는 질환과 관련된 항원에 특이적인 세포의 항체 가변 도메인 및 T 세포 또는 기타 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체를 갖는 CD8+ T 세포를 포함하고, 상기 헬퍼 T 림프구 세포 제제는 당해 질환 또는 장애와 관련된 항원에 특이적인 세포의 항체 가변 도메인 및 T 세포 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체를 갖는 CD4+ T 세포를 포함한다.

[0085] 또 다른 실시양태에서, 질환 또는 장애를 갖는 대상체에서 세포 면역요법을 수행하는 방법은 유전적으로 변형된 헬퍼 T 림프구 세포 제제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 여기서 상기 변형된 헬퍼 T 림프구 세포 제제는 당해 질환 또는 장애와 관련된 항원에 특이적인 세포의 항체 가변 도메인 및 T 세포 수용체의 세포내 신호전달 모듈을 포함하는 키메라 항원 수용체를 갖는 CD4+ T 세포를 포함한다. 한 가지 실시양태에서, 당해 방법은 유전적으로 변형된 세포독성 T 림프구 세포 제제를 대상체에게 투여하는 것을 추가로 포함하고, 여기서 상기 변형된 세포독성 T 림프구 세포 제제는 당해 질환 또는 장애와 관련된 항원에 특이적인 세포의 항체 가변 도메인 및 T 세포 수용체의 세포내 신호전달 모듈을 포함하는 키메라 항원 수용체를 갖는 CD8 양성 세포를 포함한다.

[0086] 또 다른 실시양태는, 당해 질환 또는 장애와 관련된 항원의 존재에 대해 대상체의 생물학적 샘플을 분석하고 본원에 기재된 양자 면역요법 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 질환 또는 장애를 갖는 대상체에서 세포 면역요법을 수행하는 방법을 기재하며, 여기서 상기 키메라 항원 수용체는 상기 항원에 특이적으로 결합한다.

[0087] CAR이 생성되며, 이는 고형 종양, 암, 바이러스 감염 및 기생충에 의한 감염 등의 질환 또는 상태와 관련된 항원에 대한 특이적 결합을 제공하는 성분을 갖는다. 한 가지 실시양태에서, 키메라 항원 수용체의 T 세포 수용체의 세포내 신호전달 모듈은 막관통 도메인, CD28 신호전달 도메인, 및 CD3 세포내 신호전달 도메인, 또는 T 세포 공자극 분자의 기타 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 분자는 CD3 세포내 도메인, CD28 도메인, CD3 세포내 도메인에 연결된 CD28 막관통 및 신호전달 도메인, 또는 T 세포 공자극 분자의 기타 도메인을 포함한다.

[0088] 대체 실시양태에서, T 세포는 재조합체 T 세포 수용체로 변형시킬 수 있다. TCR은 임의의 항원, 병원체 또는 종양에 특이적일 수 있다. 흑색종(예: MART1, gp100), 백혈병(예: WT1, 부조직적합성 항원), 유방암(예: her2, NY-BR1)에서 다수 종양 항원을 위한 TCR이 존재한다.

[0089] 일부 실시양태에서, CD4+ T 헬퍼 림프구 세포는 천연 CD4+ T 세포, 중추 기억 CD4+ T 세포, 효과기 기억 CD4+ T 세포 또는 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 특정한 실시양태에서, CD4+ 헬퍼 림프구 세포는 천연 CD4+ T 세포이고, 여기서 상기 천연 CD4+ T 세포는 CD45RO-, CD45RA+, CD62L+ CD4+ T 세포를 포함한다. 다른 실시양태에서, CD8+ T 세포독성 림프구 세포는 천연 CD8+ T 세포, 중추 기억 CD8+ T 세포, 효과기 기억 CD8+ T 세포 또는 벌크 CD8+ T 세포로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 특정한 실시양태에서, CD8+ 세포독성 T 림프구 세포는 중추 기억 T 세포이고, 여기서 상기 중추 기억 T 세포는 CD45RO+, CD62L+, CD8+ T 세포를 포함한다. 특정한 실시양태에서, CD8+ 세포독성 T 림프구 세포는 중추 기억 T 세포이고, CD4+ 헬퍼 T 림프구 세포는 천연 CD4+ T 세포이다.

[0090] 실시양태에서, CD8+ T 세포 및 CD4+ T 세포는 병원체 또는 종양-특이적 세포 표면 항원에 특이적으로 결합하는 항체 중쇄 도메인을 포함하는 CAR로 둘 다 유전적으로 변형된다. 다른 실시양태에서, CD8 세포독성 T 세포의 세포내 신호전달 도메인은 CD4 헬퍼 T 세포의 세포내 신호전달 도메인과 동일하다. 다른 실시양태에서, CD8 세포독성 T 세포의 세포내 신호전달 도메인은 CD4 헬퍼 T 세포의 세포내 신호전달 도메인과 상이하다.

[0091] 본 발명에 의해 치료될 수 있는 대상체는, 일반적으로 인간 및 기타 영장류 대상체, 예를 들면 가축 의료 목적을 위한 원숭이 및 유인원이다. 이러한 대상체는 수컷 또는 암컷일 수 있고, 유아, 아동, 청년, 성인 및 노인 대상체를 포함하는 임의의 적합한 연령일 수 있다.

[0092] 본 발명의 방법은, 예를 들면, 고형 종양, 혈액암, 흑색종, 또는 바이러스 또는 기타 병원체에 의한 감염의 치료에 유용하다. 병원체에 의한 감염은 HIV, HCV, HBV, CMV 및 기생충 질환을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 당해 질환 또는 장애와 관련된 항원은 오피 티로신 키나제 수용체 ROR1, tEGFR, Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, 메소텔린, CEA 및 B형 간염 표면 항원으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0093] 치료될 수 있는 대상체는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 결장, 폐, 간, 유방, 전립선, 난소, 피부(흑색종 포함), 골 및 뇌 암 등을 포함하는 암이 발병된 대상체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항원과 관련된 종양, 예

를 들면, 흑색종, 유방암, 편평 상피암, 결장암, 백혈병, 골수종, 전립선암 등은 공지되어 있다(이들 양태에서, 기억 T 세포는 T 세포 수용체 유전자를 도입함으로써 분리되거나 유전적으로 조작될 수 있다). 다른 실시양태에서, 종양 관련된 단백질은 유전적으로 조작된 면역수용체를 발현하는 유전적으로 변형된 T 세포로 표적화시킬 수 있다. 이의 예에는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, B 세포 림프종, 유방암, 유방암, 전립선암 및 백혈병이 포함된다.

[0094] 치료될 수 있는 대상체는 또한, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 바이러스, 레트로바이러스, 박테리아 및 원생 동물 감염 등을 포함하는 감염성 질환이 발병되거나 발병 위험이 있는 대상체를 포함한다. 치료될 수 있는 대상체는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 이식 환자에서 사이토메갈로바이러스(CMV), 엡스테인-바르 바이러스(EBV), 아데노바이러스, BK 폴리오마바이러스 감염 등을 포함하는 바이러스 감염이 발병된 면역결핍 환자를 포함한다.

[0095] 상기한 바와 같이 제조한 세포는, 공지된 기술, 또는 본 명세서에 기반하여 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명백한 이의 변형태에 따라 양자 면역요법을 위한 방법 및 조성물에 사용될 수 있다[참조: 미국 특허 출원 공개 번호 제2003/0170238호(Gruenberg et al); 미국 특허 제4,690,915호(Rosenberg)].

[0096] 일부 실시양태에서, 세포는 이들을 먼저 이들의 배양 배지로부터 수거하고, 세척한 다음, 세포를 투여에 적합한 매질 및 용기 시스템("약제학적으로 허용가능한" 담체)에서 치료 유효량으로 농축시킴으로써 제형화된다. 적합한 주입 매질은 임의의 등장성 매질 제형, 통상적으로 표준 염수, 노르모솔 R(Abbott) 또는 플라즈마-라이트(Plasma-Lyte) A(Baxter)일 수 있고, 또한 수중 5% 텍스트로즈 또는 링거 락테이트가 사용될 수 있다. 주입 매질은 인간 혈청 알부민으로 보충될 수 있다.

[0097] 당해 조성물 중의 치료 유효량의 세포는 적어도 2개 세포(예: 1개의 CD8+ 중추 기억 T 세포 및 1개의 CD4+ 헬퍼 T 세포 서브셋)이거나, 보다 통상적으로 10^2 개 초과와 10^6 개 이하, 및 10^8 개 또는 10^9 개 이하의 세포이고, 10^{10} 개 이상의 세포일 수 있다. 세포의 수는 당해 조성물이 의도되는 최종 용도 및 그 속에 포함되는 세포의 종류에 따라 달라질 수 있다. 예를 들면, 특정 항원에 특이적인 세포가 요구되는 경우, 당해 모집단은 70% 초과, 일반적으로 80% 초과, 85% 및 90 내지 95%의 이러한 세포를 함유할 것이다. 본원에 제공된 용도를 위해, 당해 세포는 일반적으로 1리터 이하의 용적으로 존재하며, 500ml 이하, 심지어 250ml 또는 100ml 이하일 수 있다. 따라서, 목적하는 세포의 밀도는 통상 10^6 개 세포/ml 초과이고, 일반적으로 10^7 개 세포/ml 초과, 일반적으로 10^8 개 세포/ml 초과이다. 임상적 관련된 면역 세포 수는 10^9 , 10^{10} 또는 10^{11} 세포를 점차 초과하는 복수 주입으로 분배할 수 있다.

[0098] 일부 실시양태에서, 본 발명의 림프구는 면역성을 개체에 제공하기 위해 사용될 수 있다. "면역성"이란, 병원체에 의한 감염 또는, 림프구 반응이 지시되는 종양에 대한 반응과 관련된 하나 이상의 물리적 증상의 감소를 의미한다. 투여된 세포의 양은 통상적으로 병원체에 대한 면역성을 갖는 표준 개체에 존재하는 범위로 존재한다. 따라서, 당해 세포는 주입에 의해 통상 투여되며, 각각의 주입은 2개 세포로부터, 적어도 10^6 개 내지 10^{10} 개 세포 / m^2 이하, 바람직하게는 적어도 10^7 개 내지 10^9 개 세포/ m^2 의 범위이다. 클론은 단일 주입 또는 소정 시간에 걸쳐 복수 주입에 의해 투여될 수 있다. 그러나, 상이한 개체는 반응성이 상이할 것으로 예상되기 때문에, 주입된 세포의 종류 및 양 뿐만 아니라 복수 주입이 제공되는 주입 수 및 시간 범위는 주치의에 의해 결정되며, 통상의 검사에 의해 결정될 수 있다. 충분한 수준의 T 림프구(세포독성 T 림프구 및/또는 헬퍼 T 림프구를 포함함)의 생성은, 본원에 예시된 바와 같이, 본 발명의 신속한 증식 방법을 사용하여 용이하게 달성될 수 있다[참조: 미국 특허 제6,040,177호(Riddell et al), column 17].

[0099] 본 발명은 하기 기재된 실시예에서 추가로 설명된다.

[0100] 실험

[0101] 실시예 1 - T 세포 형질도입 및 CAR 발현의 분석

[0102] ROR1-특이적 CAR은 인간 CD8+ T 세포에서 발현시킬 수 있고, 성숙 정상 B 세포가 아닌 ROR1+ B-세포의 특이적 인식을 제공한다. 본 발명자들은, 건강한 공여체 또는 CLL 환자로부터의 T 세포에서 발현시키는 경우, 원발성 B-CLL 및 맨틀 세포 림프종의 특이적 인식을 제공하는 ROR1-특이적 키메라 항원 수용체를 작제했다.

- [0103] **재료 및 방법**
- [0104] **세포주**
- [0105] 엠스타인-바르 바이러스 형질전환된 B 세포(EBV-LCL)는 기재된 바와 같이 생성했다(25). 종양 세포주 Jeko-1 및 BALL-1은 올리버 프레스 및 제랄드 래디취 박사(Drs Oliver Press and Jerald Radich)(Fred Hutchinson Cancer Research Center)에 의해 제공되었다. 모든 세포주는 RPMI, 10% 소태아 혈청, 0.8 mM L-글루타민 및 1% 페니실린-스트렙토마이신(LCL 매질)에서 유지시켰다. K562 세포는 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection)으로부터 입수했다.
- [0106] **ROR1을 사용한 K562 세포의 형질감염**
- [0107] ROR1-유전자의 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)-증폭을 위해, 전체 RNA를 B-CLL 세포(RNeasyPlusKit; QIAGEN)로부터 획득하고, M-MLVReverse 트랜스크립타제(Invitrogen)에 의해 cDNA로 역전사시켰다. PCR은 헤르쿨라제-II DNA 폴리머라제(Stratagene)를 사용하여 특정 프라이머
- [0108] (*ROR1-F*: 5-*Xho*IAGAGGAGGAATGCACCGGCC-3 및
- [0109] *ROR1-R*: 5-*Xho*I-CACAGAAGGTACTTGTGCGATGT-3)에 의해 수행했다. PCR 생성물을 MIGR-1 레트로바이러스 벡터(23) 내로 클로닝시키고, 서열 분석했다. 이펙텐(Efectene) 형질감염 시약(QIAGEN)을 사용하여 플라티눔-A 세포(Cell Biolabs)를 MIGR-1/*ROR1*로 형질감염시키고, *ROR1*-코딩 레트로바이러스를 생성한다. K562 세포는 32°C에서 60분 동안 2500rpm으로 원심분리에 의해 레트로바이러스에 형질도입하고, 증식시키고, ROR1-양성 서브셋을 분류-정제했다.
- [0110] **실시간 정량 PCR**
- [0111] B-CLL, 정상 휴지 및 활성화 B 세포 및 EBV-LCL의 제1-가닥 cDNA는 상기 문단에 기재된 바와 같이 제조했다. 정상 조직으로부터의 제1-가닥 cDNA(Human Tissue panels I/II, Blood Fractions)은 클론테크(Clontech)로부터 획득했다. *ROR1* mRNA의 발현은 이중으로 분석하고, *GAPDH*에 대해 표준화시켰다. 증폭은 25 μL 파워(Power) SYBR 그린(Green) PCR 마스터 믹스(Master Mix)(Applied Biosystems), 2.5 ng의 cDNA 및 300nM 유전자-특이적 전방 및 역방 프라이머로 이루어진 50 μL 반응물에서 ABI 프리즘 7900(Applied Biosystems) 상에서 수행했다:
- [0112] *ROR1-F* 5-AGCGTGCATTCAAAGGATT-3,
- [0113] *ROR1-R* 5-GACTGGTGCCGACGATGACT-3,
- [0114] *GAPDH-F* 5-GAAGTGAAGGTCGGAGTC-3,
- [0115] 및 *GAPDH-R* 5-GAAGATGGTATGGGATTTC-3.
- [0116] 사이클 역치(Ct)는 SDS 소프트웨어 v2.2.2(Applied Biosystems)를 사용하여 측정했고, 유전자 발현 수준은 비교용 Ct 방법($2^{-\Delta\Delta Ct}$)를 사용하여 계산했다.
- [0117] **벡터 작제 및 렌티바이러스의 생성**
- [0118] CD20-CAR(CD20R-epHIV7) 및 그린 형광 단백질(GFP)-코딩 렌티바이러스 벡터(GFP-epHIV7)는 이미 기재되어 있다(24). ROR1-CAR를 동일한 벡터에 코딩시켰다. 원발성 B-CLL 및 MCL 종양 라인 상에서 발현된 인간 ROR1에 대한 특이적 결합을 입증하는 마우스 mAb(클론 2A2)를 생성하고, 클로닝시키고, 사전 연구로 특성화시켰다. mAb 2A2의 VL 및 VH 체를 함유하는 scFv를 코딩하는 코돈-최적화된 뉴클레오티드 서열을 합성하고(GENEART), *Nhe*I 및 *Rsr*II 제한 부위를 사용하여 CD20R-epHIV7 내로 클로닝시켜 CD20-특이적 scFv를 대체했다. 렌티바이러스는 이펙텐(Qiagen)을 사용하여 렌티바이러스 벡터 및 팩키징 벡터 pCHGP-2, pCMVRev2 및 pCMV-G로 공형질감염된 293T 세포에서 생성되었다. 매질은 형질감염 16시간 후에 변경하였고, 렌티바이러스는 48시간 후에 수집했다.

[0119] **렌티바이러스 형질도입 및 CAR-형질도입된 T 세포 클론의 분리**

[0120] 건강한 공여체 및 B-CLL 환자로부터의 PBMC, 및 분류-정제된 CD8+ CD45RO+ CD62L+ 중추 기억 T 세포(TCM)는 항-CD3 mAb(30 ng/mL)로 활성화시키고(25), 32°C에서 60분 동안 2500rpm에서 원심분리하여 활성화 후 2일 및 3일 차에 1 µg/mL 폴리브렌(Sigma-Aldrich) 및 50 IU/mL 재조합체 인간 인터류킨-2(IL-2)가 보충된 렌티바이러스 상청액에서 형질도입시켰다. T 세포는 10% 인간 혈청, 2 mM L-글루타민 및 1% 페니실린 스트렙토마이신(CTL 매질)을 함유하는 RPMI에서 증식시켰다(25). 증식 후, 각 형질도입된 T-세포주의 분획을 비오틴-접합된 항-EGFR(상피 성장 인자 수용체) mAb, 스트렙트아비딘-PE 및 항-CD8 mAb로 염색시켰다. EGFR+ CD8+ T 세포는 분류 정제하고, 제한 희석(0.5 세포/웰)에 의해 클로닝시켰다(25). ROR1-CAR 형질도입된 T 세포는 비오틴-접합된 재조합체 Fc-ROR1 세포의 도메인 융합 단백질 및 스트렙트아비딘-PE로 염색하여 동정했다. 재조합체 ROR1-단백질은 일시적으로 형질감염된 293F 세포(Invitrogen)에서 생성되었고, 기재된 바와 같이 정제하고(26), 비오틴 태그 키트(Sigma)를 사용하여 비오틴화시켰다. GFP-형질도입된 CD8+ T 세포는 유동 혈구계산에 의해 동정하고, 분류-정제하고, 유사한 방식으로 클로닝시켰다.

[0121] **크롬 방출 및 사이토킨 분비 분석**

[0122] 표적 세포는 밤색 ⁵¹Cr(PerkinElmer)로 표지하고, 세척하고, 다양한 효과기 대 표적(E:T) 비율에서 효과기 T 세포로 1-2 × 10³ 세포/웰로 삼중으로 배양했다. 상청액은 배양 4시간 후에 γ 계수를 위해 수거하고, 특정한 용해는 표준 화학식을 사용하여 계산했다(25).

[0123] **결과**

[0124] 형질도입된 CD8+ T 세포는 비오틴화된 항-EGFR mAb 및 스트렙트아비딘 접합된 염료를 사용하여 분류-정제했다. 분류-정제된 T 세포의 표면 상에서 ROR1-CAR 발현은 당해 세포를, ROR1-CAR의 scFv에 직접 결합하는 비오틴화된 재조합체 Fc-ROR1 세포의 도메인 융합 단백질로 염색하고 스트렙트아비딘-접합체를 함유시킴으로써 평가했다. Fc-ROR1-단백질은 ROR1-CAR 렌티바이러스 벡터로 형질도입된 CD8+ T 세포를 특이적으로 염색시켰지만, GFP를 코딩하는 대조군 렌티바이러스 벡터로 형질도입된 CD8+ T 세포를 염색시키지 않았다(도 1).

[0125] 본 발명자들은 제한 희석에 의해 ROR1-CAR 형질도입된(n=10) 및 대조군 GFP-형질도입된 CD8+ T-세포 클론(n=4)을 확립했고, 복수회의 시험관내 증식 후에 CAR의 안정한 표면 발현을 확인했다. 비형질도입된 또는 GFP-형질도입된 T-세포 클론과 비교하여 ROR1-CAR 형질도입된 클론의 성장은 명백한 차이가 없었다(데이터는 도시하지 않음).

[0126] ROR1-CAR 형질도입된 T-세포 클론은 *ROR1*-유전자로 안정하게 형질감염된 원발성 B-CLL 및 K562를 효율적으로 용해시켰지만, 천연 ROR1-음성 K562 세포를 용해시키지 않았으며, 이는 ROR1의 특이적 인식을 입증한다(도 2).

[0127] **논의**

[0128] CAR-변형된 T 세포를 사용하는 양자 면역요법은 B-세포 악성종양에 대한 임상 시험에서 연구되고 있다. 표적화되는 표면 분자는 B-세포 계열-특이적이고, B-세포 단계 전으로부터 혈장 세포까지 정상 B-계통 세포 상에서 발현되는 CD19, 및 B-세포 단계 전으로부터 기억 B 세포까지 정상 B 세포 상에서 발현되는 CD20을 포함한다. 따라서, 이들 분자를 표적화하는 효과적인 요법의 예상된 결과는 정상 B 세포 및 B-세포 전구체의 고갈이다. 유전자 발현 프로파일 연구는 악성 세포에 의해 우선적으로 또는 배타적으로 발현되지만 정상 B 세포에 의해 발현되지 않는 유전자를 동정했고, *ROR1*은 2개의 독립적인 분석(28, 28)에서 CLL 표시 유전자로서 나타났다. ROR1에 대한 특이적 항체는, CD154를 발현시키기 위해 변형시킨 자가 종양 세포를 사용한 백신접종, 및 정상 조직에 대한 명백한 독성 없이 렌알리도미드에 의한 처리 후에 CLL 환자에서 발달했고, 이는 당해 종양 항원이 면역요법에 적합한 표적일 수 있음을 시사한다(29, 30).

[0129] 본 발명자들의 연구는 ROR1-CAR을 발현하는 유전적으로 조작된 T 세포로 ROR1-양성 악성 세포를 표적화하는 가능성을 설명한다. CD8+ ROR1-CAR T 세포는 벌크 PBMC 또는 분류-정제된 TCM의 렌티바이러스 형질도입 후에 정상 공여체 및 CLL 환자 둘 다로부터 유도될 수 있고, 이는 동물 모델에서 양자 전달 후에 연장된 기간 동안 지속한

다(31). ROR1-CAR 형질도입된 T 세포는 원발성 B-CLL을 효율적으로 용해시켰지만, 정상 휴지 또는 활성화 B-세포를 용해시키지 않았다. 이들 T 세포는 INF- α , IFN γ 및 IL-2를 포함하는 효과기 사이토킨을 생성했고, ROR1-발현 종양 세포에 반응하여 증식할 수 있다.

[0130] **실시예 2 - CD4+ CAR T 세포주의 생성 및 효과기 기능의 분석**

[0131] CD4+ ROR1-CAR T 세포는 건강한 공여체/CLL-환자의 PBMC로부터 생성될 수 있다. ROR1-특이적 CAR은 인간 CD4+ T 세포에서 발현될 수 있고, 성숙한 정상 B 세포가 아니라 ROR1+ B-세포 종양의 특이적 인식을 제공한다.

[0132] **재료 및 방법**

[0133] **세포주**

[0134] Epstein-바르(Epstein-Barr) 바이러스 형질전환된 B 세포(EBV-LCL)를 기재된 바와 같이 생성했다(25). 종양 세포주 Jeko-1, 및 BALL-1은 올리버 프레스(Oliver Press) 및 제랄드 래디치(Jerald Radich) 박사(Fred Hutchinson Cancer Research Center)로부터 제공되었다. 모든 세포주는 RPMI, 10% 소태아 혈청, 0.8mM L-글루타민 및 1% 페니실린-스트렙토마이신(LCL 배지)에서 유지시켰다. K562 및 293T 세포를 아메리칸 타입 컬처 컬렉션으로부터 취득하여 지시된 바와 같이 배양했다.

[0135] **ROR1에 의한 K562 세포의 형질감염**

[0136] ROR1-유전자의 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)-증폭을 위해, 전체 RNA는 B-CLL 세포(RNeasyPlusKit; QIAGEN)로부터 취득했고, M-MLVReverse 트랜스크립타제(Invitrogen)를 사용하여 cDNA로 역전사시켰다. PCR은 헤르쿨라제-II DNA 폴리머라제(Stratagene)를 사용하여 특이적 프라이머

[0137] (ROR1-F: 5-*Xho*IAGAGGAGGAATGCACCGCC-3 및

[0138] ROR1-R: 5-*Xho*I-CACAGAAGGTACTTGTGCGATGT-3)로 수행했다. PCR 생성물을 MIGR-1 레트로바이러스 벡터(23)로 클로닝하고, 서열을 확인했다. 이펙텐 형질감염 시약(QIAGEN)을 사용하여 백금-A 세포(Cell Biolabs)를 MIGR-1/ROR1로 형질감염시키고, ROR1-코딩 레트로바이러스를 생성했다. K562 세포를 32°C에서 60분 동안 2500rpm에서 원심분리에 의해 레트로바이러스에 형질도입하고, 증식시키고, ROR1-양성 서브셋을 분류 정제시켰다.

[0139] **벡터 작제 및 렌티바이러스의 생성**

[0140] CD20-CAR(CD20R-epHIV7) 및 그린 형광 단백질(GFP)-코딩 렌티바이러스 벡터(GFP-epHIV7)는 이미 기재되었다(24). ROR1-CAR를 동일한 벡터로 코딩시켰다. 인간 ROR1에 대한 특이적 결합이 입증된 마우스 mAb(클론 2A2)는 원발성 B-CLL 상에서 발현시키고, MCL 종양 라인을 생성하였고, 클로닝하여 이전 연구에서 특성화했다. mAb 2A2의 VL 및 VH 채를 함유하는 scFv를 코딩하는 코돈 최적화 뉴클레오티드 서열을 합성하였고(GENEART), NheI 및 RsrII 제한 부위를 사용하여 CD20R-epHIV7로 클로닝하여 CD20-특이적 scFv를 대체시켰다. 렌티바이러스는 이펙텐(Qiagen)을 사용하여 렌티바이러스 벡터 및 패키징 벡터 pCHGP-2, pCMVRev2 및 pCMV-G로 공형질감염된 293T 세포에서 생성시켰다. 배지를 형질감염후 16시간에 변화시켰고, 렌티바이러스를 48시간 후에 수집했다.

[0141] **렌티바이러스 형질도입 및 CD4+ ROR1-CAR T 세포주의 분리**

[0142] CD4+ T 세포를 건강한 공여체의 PBMC로부터 분리하고, 항-CD3 mAb(30 ng/mL)로 활성화시키고(25), 32°C에서 60분 동안 2500rpm에서 원심분리로 활성화후, 2일 및 3일차에 1 μ g/mL 폴리브렌(Sigma-Aldrich) 및 50 IU/mL 제조합 인간 인터류킨-2(IL-2)로 보충된 렌티바이러스 상층액에 형질도입했다. T 세포를 10% 인간 혈청, 2mM L-글루타민 및 1% 페니실린 스트렙토마이신(CTL 배지)를 함유하는 RPMI에서 증식시켰다(25). 증식 후, 각 형질도입된 T-세포주의 분획을 비오틴-접합된 항-EGFR(상피 성장 인자 수용체) mAb, 스트렙트아비딘-PE 및 항-CD4 mAb로 염색했다. EGFR+ CD4+ T 세포를 분류 정제시키고 증식시켰다. ROR1-CAR 형질도입된 T 세포를 비오틴닐화 제조합 Fc-ROR1 세포의 도메인 융합 단백질 및 스트렙트아비딘-PE로 염색시켜 동정했다. 제조합 ROR1-단백질은 일시

적으로 형질감염된 293 세포(Invitrogen)에서 생성하였고, 기술된 바와 같이 정제시켰고(26), 비오틴태그 키트(BiotinTag kit)(Sigma)를 사용하여 비오틴화하였다. GFP-형질도입된 CD4+ T 세포를 유동 혈구계산으로 동정하였고, 분류 정제시키고, 유사한 방식으로 클로닝했다.

[0143] 크롬 방출 및 사이토킨 분비 분석

[0144] 표적 세포를 방사성 ⁵¹Cr(PerkinElmer)로 표지하고, 세척하고, 각종 효과기 대 표적(E:T) 비율에서 효과기 T 세포로 1-2 × 10³ 세포/웰에서 삼중 배양했다. 상청액을 4시간 배양 후 γ 계수를 위해 수거했고, 특이적 용해를 표준식을 사용하여 계산했다(25). 사이토킨 분비의 분석을 위해, 표적 및 효과기 세포를 E/T 비 2:1에서 삼중 웰 중에서 플레이팅하였고, 인터페론 INF γ, 종양 괴사 인자(TNF-α) 및 IL-2를, 24시간 배양 후 제거된 상청액에서 다중 사이토킨 면역분석(Luminex)에 의해 측정했다.

[0145] CFSE 증식 분석

[0146] T 세포를 0.2 μM 카복시플루오레세인 석신이미딜 에스테르(CFSE; Invitrogen)로 표지하고, 세척하고, 10U/mL 재조합 인간 IL-2를 함유하는 CTL 배지 중에서 자극 세포로 2:1 비로 플레이팅했다. 72시간 배양 후, 세포를 항-CD4 mAb 및 요오드화프로피듐(PI)으로 표지하여 분석으로부터 사멸 세포를 제외시켰다. 샘플을 유동 혈구계산으로 분석하였고, 살아있는 CD4+ T 세포의 세포 분열을 CFSE 회색으로 평가했다.

[0147] 공-배양 분석

[0148] ROR1-CAR 형질도입된 CD4+ T 세포 및 ROR1-CAR 형질도입된 CD8+ 세포독성 T 림프구를 CFSE로 표지하였고, 2:1, 1:1 및 1:2 비에서 공-배양시켰다. 이어서, 공-배양물을 K562/ROR1 세포 및 대조군 K562 세포로 자극하였고, 세포 증식을 배양 5일 후에 CFSE 염료 회색 분석으로 측정했다. 유동 분석을 위해, 샘플을 집합된 항-CD8 및 항-CD4 mAb로 염색시켜 CD8+ 및 CD4+ 서브셋을 구별했다.

[0149] 결과

[0150] 건강한 공여체 및 CLL 환자의 PBMC로부터 CD4⁺ ROR1-CAR T 세포의 생성

[0151] 본 발명자들은, 암태아성 티로신 키나제 수용체 ROR1가 CLL 및 MCL 상에서 균일하게 발현되고, CD8⁺ T 세포에서 발현될 때 성숙한 정상 B 세포가 아니라 악성 B 세포의 특이적 인식을 제공하는 항-ROR1 mAb로부터 ROR1-CAR를 발달시켰음을 나타냈다. 여기서, 본 발명자들은 직접 종양 인식 및 CD8⁺ ROR1-CAR CTL을 증가시키는 이들의 능력을 분석하기 위해 CD4⁺ ROR1-CAR T 세포를 생성했다. CAR-변형된 CD4⁺ T 세포는 ROR1-CAR 코딩 렌티바이러스 벡터를 사용하여 건강한 공여체(n=4) 및 CLL 환자(n=4)의 벌크 말초 CD4⁺ T 세포로부터 용이하게 생성될 수 있었다. 이 벡터에서, 본 발명자들은 둘 다 형질도입 마커로서 작용하고 항-EGFR mAb를 갖는 전이유전자 발현 T 세포의 풍부화를 위한 ROR1-CAR 및 자체 분리가능한 2A 요소의 하류에 단축된 EGFR(상피 성장 인자 수용체, tEGFR) 도메인을 코딩했다(도 3). 본 발명자들은 tEGFR 마커를 사용하여 ROR1-CAR 코딩 렌티바이러스(MOI=3)으로 단일 형질도입 후 d12차에 CAR-변형된 T 세포의 빈도를 측정했고, 동일 개체로부터 수득된 CD8⁺ CAR T 세포 주와 비교하여 CD4⁺에서 일관되게 높은 형질도입 효율을 밝혀냈다. CD4⁺ T 세포의 표면 상에서 ROR1-CAR의 발현을 확인하기 위해, 본 발명자들은 ROR1-CAR의 scFv에 직접 결합하는 비오틴화 제조함 Fc-ROR1 세포의 도메인 융합 단백질을 사용했고, 형질도입되지 않은 대조군 CD4⁺ T 세포가 아니라 ROR1-CAR 렌티바이러스로 형질도입된 CD4⁺ T 세포를 특이적으로 염색했다(도 3). 본 발명자들은 tEGFR 마커를 사용하여 전이유전자 발현 CD4⁺ T 세포를 풍부화하고, 항-CD3 mAb로 자극시켜 CAR-양성 T 세포 서브셋을 증식했다. CD4⁺ CAR T 세포의 3-log 이상의 증식은 14-일 자극 사이클의 말기에 달성될 수 있었고, 이는 CD8⁺ CAR CTL에서 관찰된 증폭과 동등하다. 증식

후, 본 발명자들은 CD4⁺ CAR T 세포의 세포 표면에서 ROR1-CAR의 안정한 발현(데이터는 도시되지 않음)을 확인했고, ROR1-양성 종양 세포의 인식을 분석했다.

[0152] CD4⁺ ROR1-CAR T 세포는 ROR1-양성 종양을 특이적으로 인식한다.

[0153] 본 발명자들은 ROR1-양성 원발성 종양 세포 및 종양 세포주에 대한 CD4⁺ ROR1-CAR T 세포의 효과기 기능을 분석했다. 본 발명자들은 크롬 방출 분석(CRA)에 의해 직접 세포독성을 제공하는 CD4⁺ CAR T 세포의 능력을 분석하고, 표준 4-시간 배양의 말기에 ROR1-양성 표적 세포의 약하지만 특이적 용해를 검출했다(도 4). 본 발명자들은 CRA를 10시간으로 연장시키고, 특이적 용해의 추가의 증가를 관찰했지만, CD4⁺ CAR T 세포의 전체 세포용해 활성은 여전히 CD8⁺ ROR1-CAR CTL 미만이었다(도 2, 4). 건강한 공여체 및 CLL 환자 둘 다로부터 CD4⁺ ROR1-CAR T 세포는 원발성 CLL 세포, ROR1-양성 종양 세포주 Jeko-1(MCL) 및 BALL-1(B-ALL), 및 IFN- γ ELISA에 의해 천연 ROR1-음성 K562 세포가 아니라 ROR1-유전자(K562/ROR1)로 안정하게 형질감염된 K562 세포를 특이적으로 인식하고, 이는 표적 세포의 세포 표면 상에서 ROR1의 특이적 인식을 입증했다(도 5a). 다중 사이토킨 분석은 CD8⁺ CAR CTL과 비교하여 현저히 높은 수준에서 기타 Th1 사이토킨, 예를 들면, TNF- α 및 IL-2의 생성, 및 IL-4, IL-10 및 IL-17의 생성을 나타냈다(도 5b).

[0154] 이어서, 본 발명자들은 CFSE 염색에 의해 ROR1-양성 종양 세포에 의한 자극 후 CD4⁺ CAR T 세포의 증식을 평가하고, 임의의 잠재적인 비특이적 자극을 제거하기 위해 외인성 사이토킨의 첨가 없이 엄격한 배양 조건을 사용했다. CD4⁺ CAR T 세포는 ROR1-양성 종양 세포에 반응하여 현저한 및 특이적 증식을 나타냈다. 증식하도록 유도된 T 세포의 비율 및 서브셋의 증식이 수행된 세포 분열의 수는 CD8⁺ CAR T 세포와 비교하여 CD4⁺에서 현저히 높았다(도 6). 총괄하여, 본 발명자들의 데이터는 건강한 공여체 및 CLL 환자 둘 다로부터 수득된 CD4⁺ T 세포가 ROR1-특이적 CAR에 의한 유전적으로 변형 후 항-종양 반응성을 획득한다는 것을 입증한다. 또한, 외인성 사이토킨의 부재하에 증식하고 고수준의 Th1 사이토킨을 생성하는 능력은, CD4⁺ CAR T 세포가 CAR을 통해 자극 후에 통상적인 헬퍼 기능을 나타내고, 직접 항-종양 효과를 부여하는 것 이외에, 또한 CD8⁺ CAR CTL을 증가시키기 위해 사용될 수 있다.

[0155] 비형질도입된 CD4⁺ T 세포가 아닌 CAR-변형된 T 세포는 CD8⁺ CAR CTL에 도움을 제공한다.

[0156] CD4⁺ CAR T 세포가 CD8⁺ CAR CTL에 도움을 제공할 수 있는지의 여부를 분석하기 위해, 본 발명자들은, 본 발명자들이 건강한 공여체 및 CLL 환자로부터 확립한 CAR-형질도입된 및 대조군 비형질도입된 폴리클로날 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포주로 공배양 실험을 수행했다. 도움 제공의 관점에서, 본 발명자들은 단독으로 배양된 CD8⁺ T 세포와 비교하여 CD4⁺ T 세포의 존재하에 종양 특이적 CD8⁺ 효과기 기능의 개선을 규정했다. 본 발명자들은 CAR-형질도입되거나 비형질도입된 대조군 CD4⁺ T 세포를 별개의 CD4:CD8 비(2:1, 1:1, 1:2)로 CD8⁺ CAR CTL과 배합하고, 이들을 ROR1-양성 종양 세포로 자극하고, CFSE 염료 희석에 의해 증식을 측정했다. 본 발명자들은, 비형질도입된 CD4⁺ T 세포가 아니라 CAR-형질도입된 CD4⁺ T 세포를 CD8⁺ CAR CTL에 첨가하면 CD8⁺ CAR CTL 단독과 비교하여 CD8⁺ 서브셋의 특이적 증식이 현저히 증가된다는 것을 밝혀냈다(도 7). 증식의 증가는, 적어도 등가량의 CD4⁺ CAR T 세포(CD4:CD8 비 2:1 또는 1:1)가 공배양물에 첨가될 때, 가장 현저했다. 비형질도입된 CD4⁺와 비형질도입된 CD8⁺ T 세포의 배합은 추가의 대조군으로서 사용하고, CD8⁺ 서브셋에서 비특이적 증식을 유도하지 않았다(데이터는 도시되지 않음).

[0157] 논의

[0158] 유전자 발현 프로파일링 연구는 2개의 독립적인 분석(27,28)에서 CLL 특징 유전자로서 출현된 정상 B 세포 및

ROR1에 의해서가 아니라 악성 B 세포로서 우선적으로 또는 배타적으로 발현된 유전자를 동정했다. 본 연구는 ROR1-CAR을 발현시키는 유전적으로 조작된 T 세포로 ROR1-양성 악성 세포를 표적화하는 가능성을 설명한다. CD8 및 CD4+ ROR1-CAR T 세포는 벌크 PBMC 또는 분류 정제된 T 세포의 렌티바이러스 형질도입 후 정상 공여체로부터 유도될 수 있다. CD8+ ROR1-CAR 형질도입된 T 세포는 정상 휴지성 또는 활성화된 B-세포가 아닌 원발성 B-CLL을 효율적으로 용해시켰다. CD4+ ROR1-CAR 형질도입된 T 세포는 정상 휴지성 또는 활성화된 B-세포가 아닌 원발성 B-CLL을 약하게 용해시켰다. 이러한 T 세포는 TNF- α , IFN γ , IL-2, IL-4 및 IL-10을 포함하는 효과기 사이토킨을 생성했다. CAR-형질도입된 CD4+ T 세포는 형질도입된 CD8+ 세포보다 현저히 높은 양의 사이토킨을 생성했다. 두 세포 종류는 ROR1-발현 종양 세포에 반응하여 증식할 수 있었다. 또한, CD4+ ROR1-CAR T 세포는 CD8+ ROR1-CAR CTL보다 2-3배 더 높게 증식했다. 이러한 결과들은 형질도입된 CD4+ 헬퍼 T 세포가 통상적인 헬퍼 기능을 나타내고, 이는 CD8+ CAR CTL을 증가시키기 위해 사용될 수 있음을 제시한다.

[0159] **실시예 3 - 천연, 중추 및 효과기 기억 서브셋으로부터 유도된 CD4+ ROR1-CAR T 세포의 효과기 기능**

[0160] 천연, 중추 및 효과기 기억 서브셋으로부터 유도된 다음, ROR1 CAR로 변형된 CD4 T 세포의 효과기 기능을 비교했다.

[0161] **재료 및 방법**

[0162] **천연, 중추 및 효과기 기억 CD4 세포의 분류 정제**

[0163] CD4+ T 세포를, 순수한 CD4+ T 세포를 제공하는 음성 자기 비드 선별(Miltenyi CD4 분리 키트)을 사용하여 건강한 공여체의 PBMC로부터 분리했다. CD4+ 분획을 접합된 항-CD45RA, 항-CD45RO 및 항-CD62L mAb로 표지하고, FACS 아리아 유동 분리장치(BD Biosciences)를 사용하여 유동 분류 정제하고, 천연(CD45RA+ CD45RO- CD62L+), 중추 기억(CD45RA- CD45RO+ CD62L+) 및 효과기 기억(CD45RA- CD45RO+ CD62L-) CD4+ T 세포를 이러한 규정된 마커의 발현에 기반하여 정제했다.

[0164] **CFSE 증식 분석**

[0165] T 세포를 0.2 μ M 카복시폴루오레세인 석신이미딜 에스테르(CFSE; Invitrogen)로 표지하고, 세척하고, 10U/mL 재조합 인간 IL-2를 함유하는 CTL 배지 중에서 자극 세포로 2:1 비로 플레이팅했다. 72시간 배양 후, 세포를 항-CD8 또는 CD4 mAb 및 요오드화프로피듐(PI)으로 표지하여 분석으로부터 사멸 세포를 제외시켰다. 샘플을 유동 혈구계산으로 분석하였고, 살아있는 CD8+ 및 CD4+ T 세포의 세포 분열을 CFSE 회색으로 평가했다.

[0166] **사이토킨 분석**

[0167] 사이토킨 분비의 분석을 위해, 표적 및 효과기 세포를 E/T 비 2:1에서 삼중 웰 중에서 플레이팅하였고, 인터페론 INF γ , 종양 괴사 인자(TNF- α) 및 IL-2를 24시간 배양 후 제거된 상청액에서 다중 사이토킨 면역분석(Luminex)에 의해 측정했다.

[0168] **결과**

[0169] 본 발명자들은 CD45RA, CD45RO 및 CD62L의 발현에 기반하여 3명의 건강한 공여체의 말초 혈액으로부터 CD4⁺ N, 중추(CM) 및 효과기 기억(EM) CD4⁺ T 세포를 유동 분류 정제시키고(도 8a), ROR1-CAR로 변형 후 이들의 효과기 기능을 비교했다. 본 발명자들은 3개의 서브셋 각각으로부터 유도된 CAR T 세포주에서 유사하게 높은 형질도입 효율을 달성했다. 이식유전자 발현 T 세포의 풍부화 후 다중파라미터 유동 혈구계산은, 렌티바이러스 형질도입 후 활성화된 표현형과 일치하는, CD4⁺ N CAR T 세포주에서 CD45RO의 발현 및 CD45RA의 소실을 나타냈다. CD4⁺ N, CM 및 EM CAR T 세포주는 CD62L의 차등 발현을 유지시키고, 이는 초기 유동 분류 정제가 고순도로 수행되었음을 확인시켜 준다.

[0170] 이어서, 본 발명자들은 N, CM 및 EM 서브셋으로부터 유도된 CD4⁺ CAR T 세포의 중앙 인식, 사이토킨 분비 및 증식을 분석하고, 이들을 벌크 CD4⁺ T 세포로부터 생성된 CAR T 세포주와 비교했다. 본 발명자들은 세포주 각각에서 IFN- γ ELISA에 의해 ROR1-양성 중앙 세포의 특이적 인식을 관찰했다. 다중 사이토킨 분석은, N 서브셋으로부터 유도된 CD4⁺ CAR T 세포가 지금까지 최고 수준의 Th1 사이토킨, 특히 IL-2를 생성했음을 나타냈고(도 8c), CFSE 염료 회색은, 이들이 ROR1-양성 중앙 세포에 의한 자극에 반응하여 가장 격렬하게 증식했다는 것을 나타냈다(도 8b).

[0171] **논의**

[0172] 본 연구는 ROR1-CAR을 발현시키는 유전적으로 조작된 T 세포로 ROR1-양성 악성 세포를 표적화하는 가능성을 설명한다. CD8 및 CD4+ ROR1-CAR T 세포는 규정된 천연 또는 기억 T 세포 서브셋으로부터의 벌크 PBMC 및 분류 정제된 T 세포의 렌티바이러스 형질도입 후에 두 정상 공여체로부터 유도될 수 있다. CD4+ 천연, 중추 기억 및 효과기 T 세포는 TNF- α , IFN γ , IL-2, IL-4 및 IL-10을 포함하는 효과기 사이토킨을 생성했다. 천연 서브셋으로부터 유도된 CAR-형질도입된 CD4+ 세포는 CAR을 통해 신호전달 후에 중추 및 효과기 기억 유도된 CD4+ CAR T 세포보다 현저히 높은 양의 TNF α 및 IL-2를 생성했다. 모든 CD4 세포 종류는 ROR1/K562에 반응하여 증식시킬 수 있었지만, 천연 서브셋으로부터 유도된 CAR-형질도입된 CD4+ 세포에서, 증식하도록 유도된 T 세포 비율 및 서브셋 증식이 수행된 세포 분열의 수가 현저히 높았다. 두 사이토킨 프로파일 및 증식 능력은 천연 CD4+ ROR1-CAR T 세포가 CD8+ ROR1-CAR CTL을 증가시키는데 가장 적합할 수 있음을 기술한다.

[0173] **실시예 4 - 천연 CD4+ T 세포가 기억 CD4+ T 세포보다 우수한 헬퍼이다.**

[0174] 천연, 중추 기억 및 효과기 형질도입된 CD4+ 세포를 형질도입된 CD8+ 세포독성 림프구로 공배양시켰고, 세포의 증식 반응을 K562/ROR1 세포로의 자극에 반응하여 측정했다.

[0175] **재료 및 방법**

[0176] **공동-배양**

[0177] 천연, 중추 및 효과기 기억 유도된 ROR1-CAR 형질도입된 CD4+ T 세포 및 천연 및 중추 기억 CD8+ 세포로부터 유도된 ROR1-CAR 형질도입된 CD8+ 세포독성 T 림프구를 CFSE로 표지하고, CD4+ 및 CD8+ CAR T 세포주를 1:1 비로 공동배양시켰다. 이어서, 공동배양물을 K562/ROR1 세포 및 대조군 K562 세포로 자극시켰고, 세포 증식을, 배양 5일 후, CFSE 염료 회색 분석에 의해 측정했다. 유동 분석을 위해, 샘플을 접합된 항-CD8 및 항-CD4 mAb로 염색시켜 CD8+ 및 CD4+ 서브셋을 구별했다.

[0178] **결과**

[0179] CD4⁺ 천연 CAR T 세포는 CD8⁺ CAR CTL의 효과기 기능을 증가시키는 우수한 능력을 갖는다.

[0180] 본 발명자들은 CD4⁺ N CAR T 세포의 우수한 사이토킨 프로파일 및 증식 가능성이 또한 CD8⁺ CAR CTL에 대한 가장 강력한 헬퍼 효과로 해석될 수 있는지를 측정하기 위해 CD4⁺ N, CM 및 EM CAR T 세포주의 헬퍼 기능을 비교했다. 사전 연구는 양자 면역요법에 대한 이들의 잠재적인 유용성에 영향을 미치는 N, CM 및 EM CD8⁺ T 세포 사이에 고유한 차이가 존재함을 입증했다. 본 그룹은 최근에, EM이 아니라 CM 유도된 CD8⁺ T 세포가 이들이 면역요법(33,34)에 대해 CD8⁺ T 세포의 바람직한 서브셋이도록 하는 양자 전달 후에 연장된 기간 동안 지속될 수 있음을 나타냈다. 기타 그룹은, CD8⁺ N T 세포가 또한 T 세포 치료(35,36)에 사용하기 위한 양호한 특성을 포함할 수 있다고 제안했다. 따라서, 본 발명자들은 CD8⁺ 및 CD4⁺ CAR T 세포 서브셋의 최적 배합을 측정하기 위해 분류 정제된 N 및 CM T 세포로부터 CD8⁺ CAR CTL을 생성했다. 렌티바이러스 형질도입 및 tEGFR 마커를 사용하여

CAR-형질도입된 CD8⁺ T 세포의 풍부화에 이어서, 본 발명자들은 CD8⁺ N, 및 CM CAR CTL의 종양 반응성을 확인하였고(데이터는 도시되지 않음), 이전과 같이 CD4⁺ N CAR T 세포를 사용하여 공배양 실험을 수행했다. 예상한 바와 같이, CD4⁺ N CAR T 세포를 사용하는 CD8⁺ N, 및 CM CAR CTL의 공배양은, CD4⁺ CM 또는 EM CAR T 세포, 또는 CD8⁺ CAR CTL 단독에 의한 공배양과 비교하여, CD8⁺ 서브셋의 현저히 더 높은 종양 특이적 증식을 유도한다(도 9). 모든 배합으로부터, ROR1-양성 종양 세포에 의한 자극에 반응하여 CD8⁺ CAR CTL의 최대 증식은 CD8⁺ CM CAR CTL에 의한 CD4⁺ N CAR T 세포의 공배양 후에 관찰되었다(도 9). 총괄하여, 본 데이터는, CD4⁺ N T 세포에서 IL-2의 높은 생성 및 우수한 증식과 함께, 이들의 사이토킨 프로파일 및 증식 가능성에 있어서 N, CM 및 EM CD4⁺ T 세포 사이에 고유한 차이가 존재함을 입증한다. 본 데이터는, CM, EM 또는 벌크 CD4⁺ T 세포보다 분류 정제된 N, CD4⁺ T 세포가 CD8⁺ CTL의 효과기 기능을 증가시키는데 가장 적합할 수 있음을 시사하고, CM 유도된 CD8⁺ T 세포가 양자 면역요법에 사용하기 위한 양호한 특성을 포함한다는 CD8⁺ T 세포에서의 선행 연구를 보충한다.

[0181] **논의**

[0182] 총괄적으로, 이들 데이터는 ROR1-CAR 변형된 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 양자 전달이 침략적 전신 림프종의 생체내 모델에서 강력한 항-종양 반응을 제공하고, CD8⁺ CAR CTL의 항-종양 효능에 대한 CD4⁺ CAR T 세포의 유리한 및 상승작용 효과에 대한 증거를 제공함을 입증한다. 본 발명자들의 데이터는 세포-고유 품질의 분석이 암 면역요법의 결과를 향상시키기 위해 종양-특이적 CD8⁺ 및 CD4⁺ T 세포 둘 다를 함유하는 세포 생성물의 합리적 설계를 어떻게 알려줄 수 있는지를 설명한다.

[0183] **실시예 5 - 전신 맨틀 세포 림프종(NSG/Jeko-1-ffLuc)의 마우스 종양 모델**

[0184] 본 발명자들은 침략적 전신 맨틀 세포 림프종의 생체내 모델에서 ROR1-CAR 변형된 CD8⁺ CTL의 항-종양 효능에 대한 CD4⁺ 도움을 제공하는 효과를 검사했다.

[0185] **재료 및 방법**

[0186] 치사량에 가깝게 조사된 NOD/SCID/감마^{-/-} (NSG) 마우스는, 생물발광 영상화를 사용하여 종양 하중 및 분포의 평가를 가능하게 하도록 반딧불 루시퍼라제(Jeko-1-ffLuc)로 안정하게 형질감염시킨 5×10⁵ Jeko-1 세포를 사용한 꼬리 정맥내 주사에 의해 접종시켰다. 본 발명자들은 이들 조건하에 NSG 마우스에서 신속하게 단계적 산재된 림프종의 일정한 접종(흡수 속도 = 100%) 및 발달을 확인했다. 종양 접종 후, 3마리 마우스 그룹은 꼬리 정맥 주사에 의해 CD8⁺ CAR CTL(그룹 1), CD4⁺ CAR T 세포(그룹 2), CD8⁺와 CD4⁺ ROR1-CAR 형질도입된 T 세포의 조합(그룹 3), 비형질도입된 대조군 T 세포(그룹 4, 5, 6)을 제공하거나 무처리했다(그룹 7). 전달된 T 세포의 전체 수는 모든 경우에 10×10⁶개였다. 본 발명자들은 양자 전달 2일 후에 마우스로부터 눈 출혈을 수득했고, 말초 혈액에서 ROR1-CAR 형질도입된 또는 비형질도입된 T 세포의 존재를 확인했다.

[0187] **결과**

[0188] T-세포 전달 6일 차에, 본 발명자들은 종양 하중을 평가하기 위해 생물발광 영상화를 수행했다. 가장 강력한 항-종양 효과는, 대조군 그룹과 비교하여 생물발광 신호의 > 2 log 감소와 함께, CD8⁺ 및 CD4⁺ ROR1-CAR T 세포의 조합물을 제공한 마우스에서 관찰되었다(도 10). 본 발명자들은 또한, 대조군과 비교하여 생물발광 신호의 > 1 log 감소와 함께, CD8⁺ 또는 CD4⁺ ROR1-CAR 변형된 T 세포를 제공한 마우스에서 강력한 항-종양 효과를 관찰했다(도 10). 중요하게는, CD8⁺/CD4⁺ CAR T 세포 조합물의 투여 후에 종양 하중의 감소는 조합된 CD8⁺ CAR CTL 및 CD4⁺ CAR T 세포 그룹의 것보다 크고, 이는 CD4⁺ CAR T 세포 및 CD8⁺ CAR CTL은 상승작용적으로 작용함을 시사한다.

[0189] **논의**

[0190] 총괄적으로, 이들 데이터는 ROR1-CAR 변형된 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 양자 전달이 침략적 전사 림프종의 생체내 모델에서 잠재적 항-종양 반응을 제공하고 CD8+ CAR CTL의 항-종양 효능에 대한 CD4+ CAR T 세포의 유리한 및 상승작용 효과에 대한 증거를 제공함을 입증한다. 본 발명자들의 데이터는 세포-고유 품질의 분석이 암 면역요법의 결과를 향상시키기 위해 종양-특이적 CD8+ 및 CD4+ T 세포 둘 다를 함유하는 세포 생성물의 합리적 설계를 어떻게 알려줄 수 있는지를 설명한다.

[0191] **실시예 6 - CD19 CAR T 세포는 동일한 상승작용을 나타낸다.**

[0192] 본 발명자들은, 침략적 전신 맨틀 세포 림프종의 시험관내 및 생체내 모델에서 공배양시에 CD19 변형된 CD8+ CTL의 항-종양 효능에 대한 CD4 도움을 제공하는 효과를 검사했다.

[0193] **재료 및 방법**

[0194] CD19 CAR T 세포는, 참조로서 본원에서 도입되는 미국 특허원 제US 2008/0131415호에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다.

[0195] **공배양 분석**

[0196] CD19-CAR 형질도입된 CD4+ T 세포 및 CD19-CAR 형질도입된 CD8+ 세포독성 T 림프구를 CFSE로 표지하고, 2:1, 1:1 및 1:2 비율로 공배양시켰다. 이어서, 공-배양물을 K562/ROR1 세포 및 대조군 K562 세포로 자극시키고, 세포 증식을 배양 5일 후에 DFSE 염료 희석 분석에 의해 측정했다. 유동 분석을 위해, 샘플을 집합된 항-CD8 및 항-CD4 mAb로 염색하여 CD8+ 및 CD4+ 서브셋을 구별했다.

[0197] **생체내 모델**

[0198] 치사에 가깝게 조사된 NOD/SCID/감마^{-/-} (NSG) 마우스는, 생물발광 영상화를 사용하여 종양 하중 및 분포의 평가를 가능하게 하도록 반딧불 루시퍼라제(Jeko-1/ffLuc)로 안정하게 형질감염시킨 5×10^5 Jeko-1 세포를 사용한 꼬리 정맥내 주사에 의해 접종시켰다. 본 발명자들은 이들 조건하에 NSG 마우스에서 신속하게 단계적 산재된 림프종의 일정한 집중(흡수 속도 = 100%) 및 발달을 확인했다. 종양 접종 후, 3마리 마우스 그룹은 꼬리 정맥 주사에 의해 CD8+ CD19 CAR CTL(그룹 1), CD4+ CD19 CAR T 세포(그룹 2), CD8+와 CD4+ CD19 CAR 형질도입된 T 세포의 조합(그룹 3), 비형질도입된 대조군 T 세포(그룹 4, 5, 6)을 제공하거나 무처리했다(그룹 7). 전달된 T 세포의 전체 수는 모든 경우에 10×10^6 개였다. 본 발명자들은 양자 전달 2일 후에 마우스로부터 눈 출혈을 수득했다.

[0199] **결과**

[0200] 도 10은 CD19+ 맨틀 세포 림프종 종양 라인 Jeko-1으로 자극시킨 CD8+ CD19-CAR CTL 및 CD4+ CD19-CAR T-세포주를 사용한 공배양 실험에서 중추 기억-유도된 CD8+ CD19-CAR의 종양-특이적 증식을 증가시키기 위해 천연 서브셋으로부터 유도된 CD4+ CAR T-세포주의 우수한 능력을 나타낸다. 중추 또는 효과기 기억 서브셋으로부터 유도된 CD4+ CAR T-세포주는 중추 기억-유도된 CD8+ CAR CTL의 종양-특이적 증식을 매우 적은 정도까지 증가시킨다.

[0201] 도 11은 CD8+ CAR T 세포 및 CD4+ CAR T 세포가 면역결핍 마우스(NOD/SCID-Raji)에서 직접 항-종양 효능을 독립적으로 제공함을 나타낸다. 마우스는 CD19-CAR 형질도입된 또는 대조군 모의-형질도입된 CD8+ 중추 기억-유도된(a), 또는 CD19-CAR 형질도입된 또는 대조군 모의-형질도입된 CD4+ 천연-유도된 T 세포(b)를 제공했다.

[0202] 도 12는 전신 맨틀 세포 림프종(NSG/Jeko-1-ffLuc)의 마우스 종양 모델에서 CD8+ ROR1-CAR CTL의 항-종양 효능

에 대한 CD4+ ROR1-CAR 변형된 T 세포의 증가 및 상승작용 효과를 나타낸다. 전신 침략적 맨틀 세포 림프종 (NSG/Jeko-1)의 마우스 종양 모델에서 ROR1-CAR 변형된 CD8+ 및 CD4+ T 세포의 항-종양 효능은 세포 모집단 단독과 비교하여 또는 비형질도입된 세포와 비교하여 증가했다.

[0203] 도 13은 전신 림프종(NSG/Raji)의 마우스 모델에서 CD8+ 및 CD4+ CD19-CAR T 세포의 상승작용을 나타낸다. Raji 종양의 접종은 종양 접종 6일 후(처리 전)에 생물발광 영상화에 의해 확인되었다(처리 개략도는 a에 제시되고, 생물발광에 의한 종양 접종은 b에 제시됨). 생물발광 영상화를 사용한 종양 하중의 분석은 CD8+ CD19-CAR T 세포로 처리한 마우스의 코호트에서 및 조합된 CD8+ 및 CD4+ CD19-CAR T-세포 생성물로 처리한 마우스에서 Raji 종양의 완전한 소거를 나타냈다(처리후 중간 흑색 및 회색 막대, b). 이어서, 마우스는 Raji 종양 세포의 2차 접종으로 자극시키고, 말초 혈액에서 CD4+ 및 CD8+ CAR T 세포의 빈도 및 종양 접종을 분석했다. 조합된 CD8+ 및 CD4+ CAR T-세포 생성물로 처리한 마우스에서는, 종양 자극 후에 현저히 높은 수준의 CD8+ CAR 세포(c 하부 패널) 및 Raji 접종의 완전한 거부(종양 자극후 우측 회색 막대, b)를 나타냈다. 대조적으로, CD8+ CD19-CAR CTL 단독을 제공한 마우스에서, 본 발명자들은 종양 자극 후에 CAR T 세포의 증가를 검출하지 못했고(c), Raji 종양 세포는 접종할 수 있었다(종양 자극후 우측 흑색 막대, 패널 b).

[0204] 논의

[0205] 총괄적으로, 이들 데이터는 당해 세포를 또 다른 CAR 작제물, CD19, CD19-CAR 변형된 CD4+ 및 CD8+ T 세포로 형질도입시키는 것이 침략적 전신 림프종의 생체내 모델에서 강력한 항-종양 반응을 제공하고 CD8+ CAR CTL의 항-종양 효능에 대한 CD4+ CAR T 세포의 유리한 및 상승작용 효과에 대한 증거를 제공함을 증명한다.

[0206] 상기는 본 발명의 설명하는 것이며, 본 발명의 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 본 발명은 하기 특허청구범위에 의해 한정되며, 당해 특허청구범위의 등가물은 본원에 포함된다. 본원에서 언급된 모든 참조 및 문헌은 이에 의해 참조로서 도입된다.

[0207] 참조문헌

[0208] 1. Cheever, M. A., et al., Specificity of adoptive chemoimmunotherapy of established syngeneic tumors. *J. Immunol.* **125**, 711-714 (1980).

[0209] 2. Pahl-Seibert, M.-F. et al. Highly protective in vivo function of cytomegalovirus IE1 epitope-specific memory CD8 T cells purified by T-cell receptor-based cell sorting. *J. Virol.* **79**, 5400-5413 (2005).

[0210] 3. Riddell, S R. et al. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* **257**, 238-241 (1992).

[0211] 4. Walter, E. A. et al. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N. Engl. J. Med.* **333**, 1038-1044 (1995).

[0212] 5. Rooney, C. M. et al. Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood* **92**, 1549-1555 (1998).

[0213] 6. Dudley, M. E. et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* **298**, 850-854 (2002)/

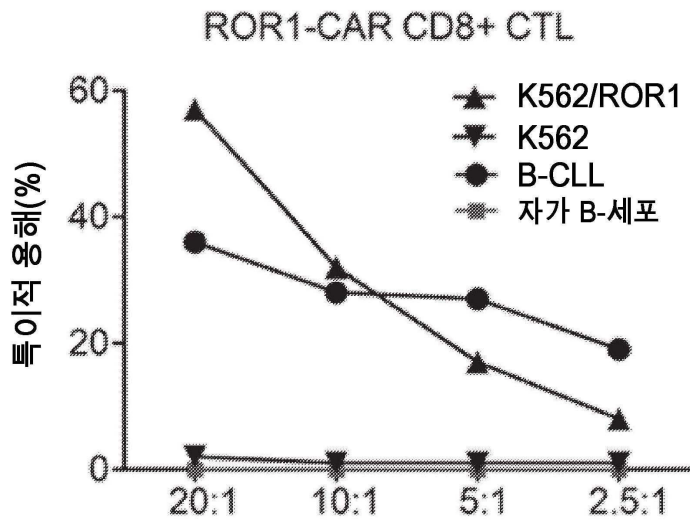
[0214] 7. Bollard, C. M. et al. Cytotoxic T lymphocyte therapy for Epstein-Barr virus+ Hodgkin's disease. *J. Exp. Med.* **200**, 1623-1633 (2004).

[0215] 8. Dudley, M. E. et al. Adoptive cell transfer therapy following nonmyeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* **23**, 2346-2357 (2005).

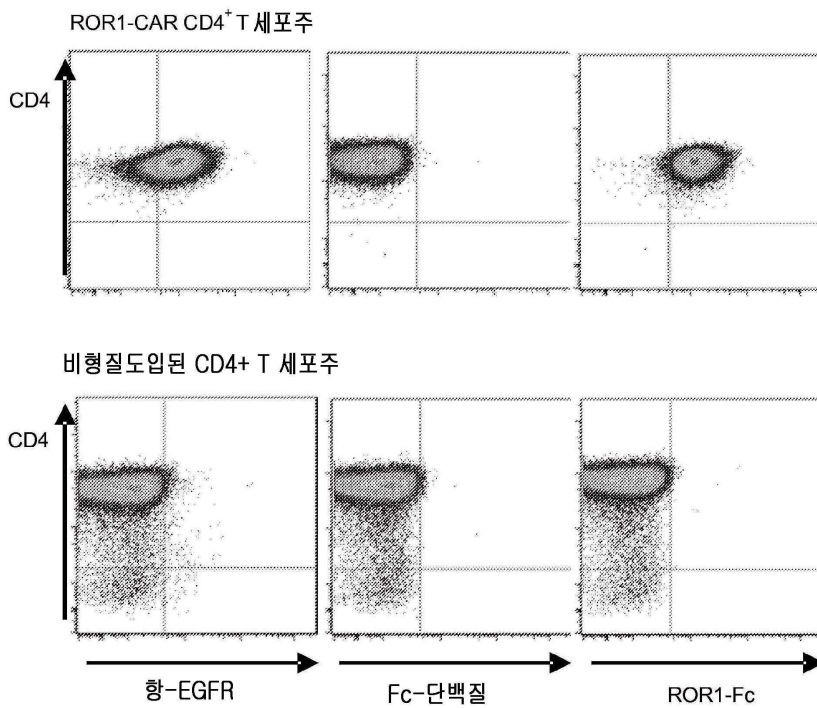
[0216] 9. Gattinoni, L., Powell Jr, D. J., Rosenberg, S. A., & Restifo, N. P. Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 383-393 (2006).

- [0217] 10. Blattman, J. N. & Greenberg, P. D. Cancer Immunotherapy: A treatment for the masses. *Science* **305**, 200-205 (2004).
- [0218] 11. Kessels, H. W. H. G. *et al.* Immunotherapy through TCR gene transfer. *Nat. Immunol.* **2**, 957-961 (2001).
- [0219] 12. Stanislowski, T. *et al.* Circumventing tolerance to a human MDM2-derived tumor antigen by TCR gene transfer. *Nat. Immunol.* **2**, 962-970 (2001).
- [0220] 13. Brentjens, R. J. *et al.* Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nat. Med.* **9**, 279-286 (2003).
- [0221] 14. Morgan, R. A. *et al.* Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* advance online publication Aug. 31, (2006). DOI: 10.1126/science.1129003
- [0222] 15. Bleakley, M. & Riddell, S. R. Molecules and mechanisms of the graft versus- leukemia effect. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 371-380 (2004).
- [0223] 16. Dudley, M. E. *et al.* Adoptive transfer of cloned melanoma-reactive T lymphocytes for the treatment of patients with metastatic melanoma. *J. Immunother.* **24**, 363-373 (2001).
- [0224] 17. Yee, C. *et al.* Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: In vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 16168-16173 (2002).
- [0225] 18. Sallusto, F. *et al.*, Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 745-763 (2004).
- [0226] 19. Butcher, E. C. & Picker, L. J. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* **272**, 60-66 (1996).
- [0227] 21. Dudley, M. E. *et al.* A phase I study of nonmyeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes in patients with metastatic melanoma. *J. Immunother.* **25**, 243-251 (2002).
- [0228] 22. Gattinorti, L. *et al.* Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells. *J. Clin. Invest.* **115**, 1616-1626 (2005).
- [0229] 23. Schmitt TM, Ciofani M, Petrie HT, Zuniga-Plucker JC. Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions. *J Exp Med.* 2004;200(4):469-479.
- [0230] 24. Wang J, Press OW, Lindgren CG, *et al.* Cellular immunotherapy for follicular lymphoma using genetically modified CD20-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Mol Ther.* 2004;9(4): 577-586.
- [0231] 25. Riddell SR, Greenberg PD. The use of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells. *J Immunol Methods.* 1990;128(2):189-201.
- [0232] 26. Baskar S, Kwong KY, Hofer T, *et al.* Unique cell surface expression of receptor tyrosine kinase ROR1 in human B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res.* 2008;14(2):396-404.
- [0233] 27. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, *et al.* Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med.* 2001;194(11):1625-1638.
- [0234] 28. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, *et al.* Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med.* 2001;
- [0235] 29. Fukuda T, Chen L, Endo T, *et al.* Antisera induced by infusions of autologous Ad-CD154-leukemia B cells identify ROR1 as an oncofetal antigen and receptor for Wnt5a. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(8):3047-3052.
- [0236] 30. Lapalombella R, Andritsos L, Liu Q, *et al.* Lenalidomide treatment promotes CD154 expression on CLL

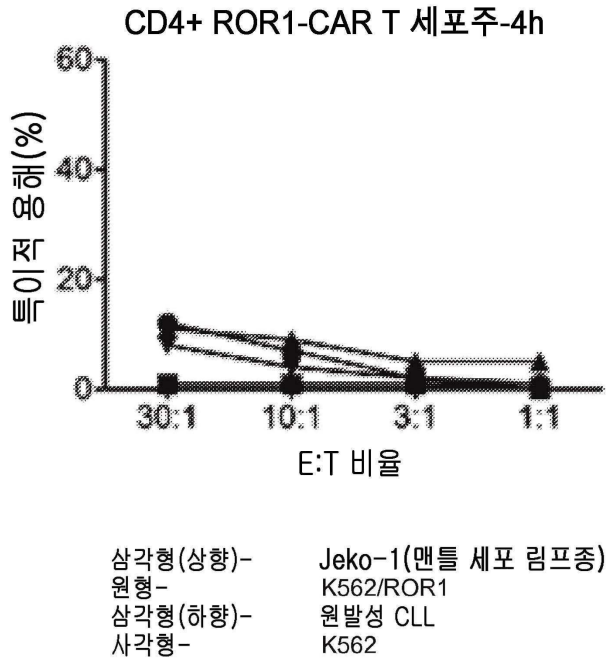
도면2



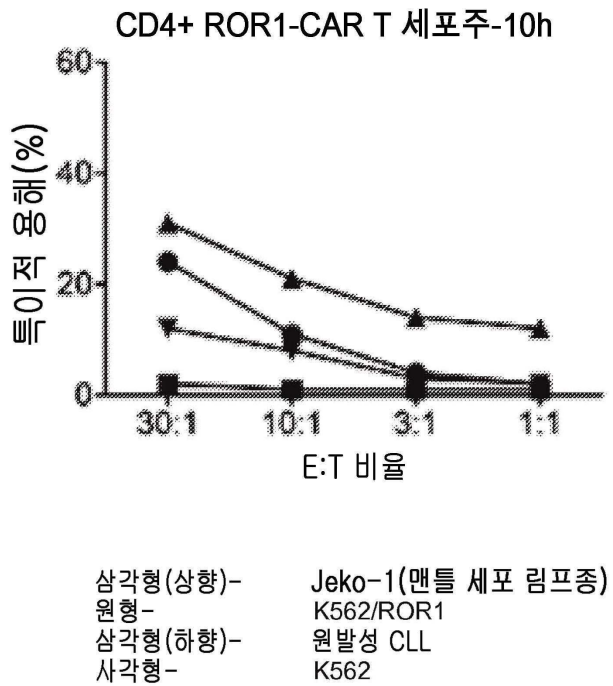
도면3



도면4a

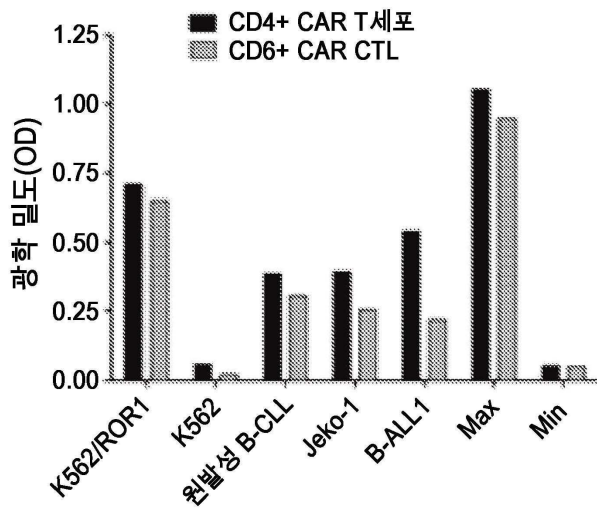


도면4b



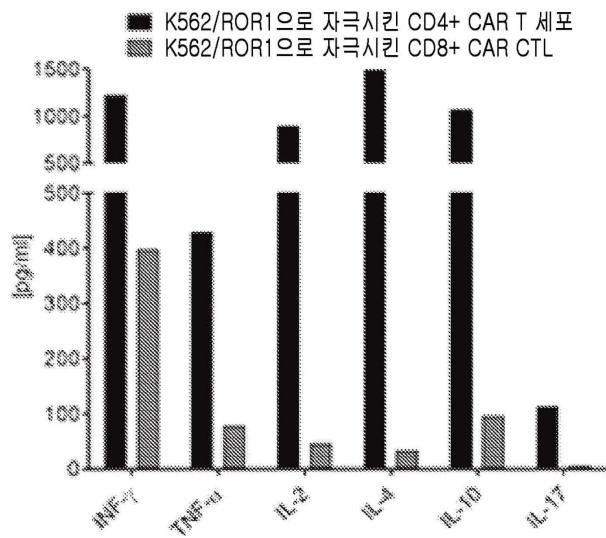
도면5a

IFN γ ELISA

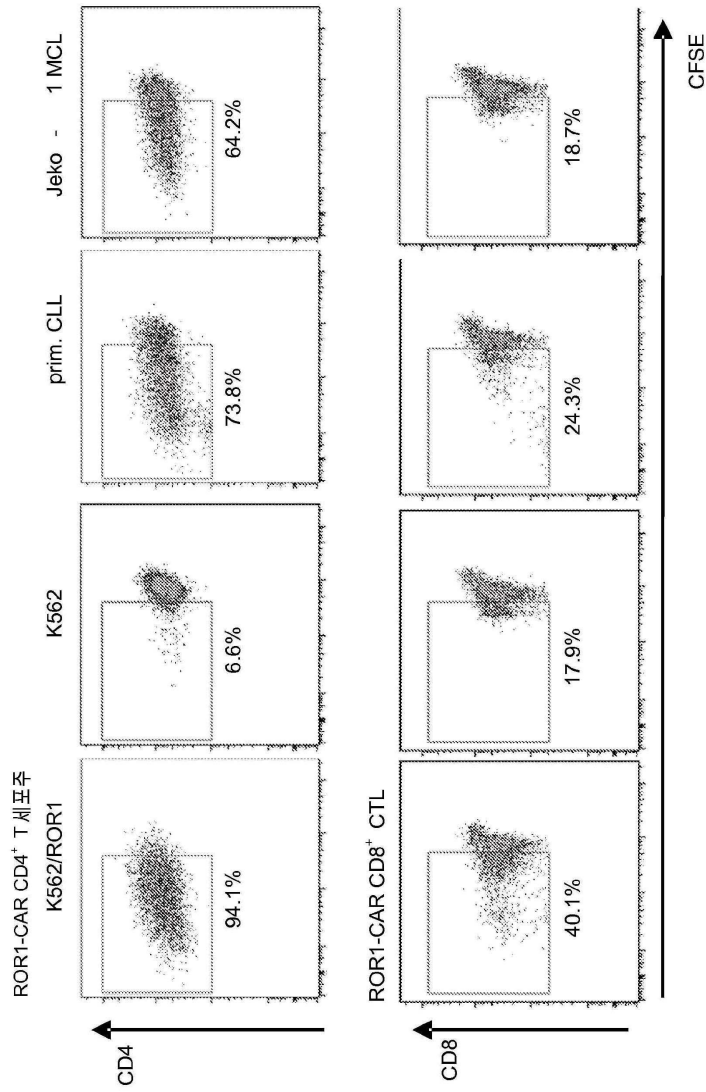


도면5b

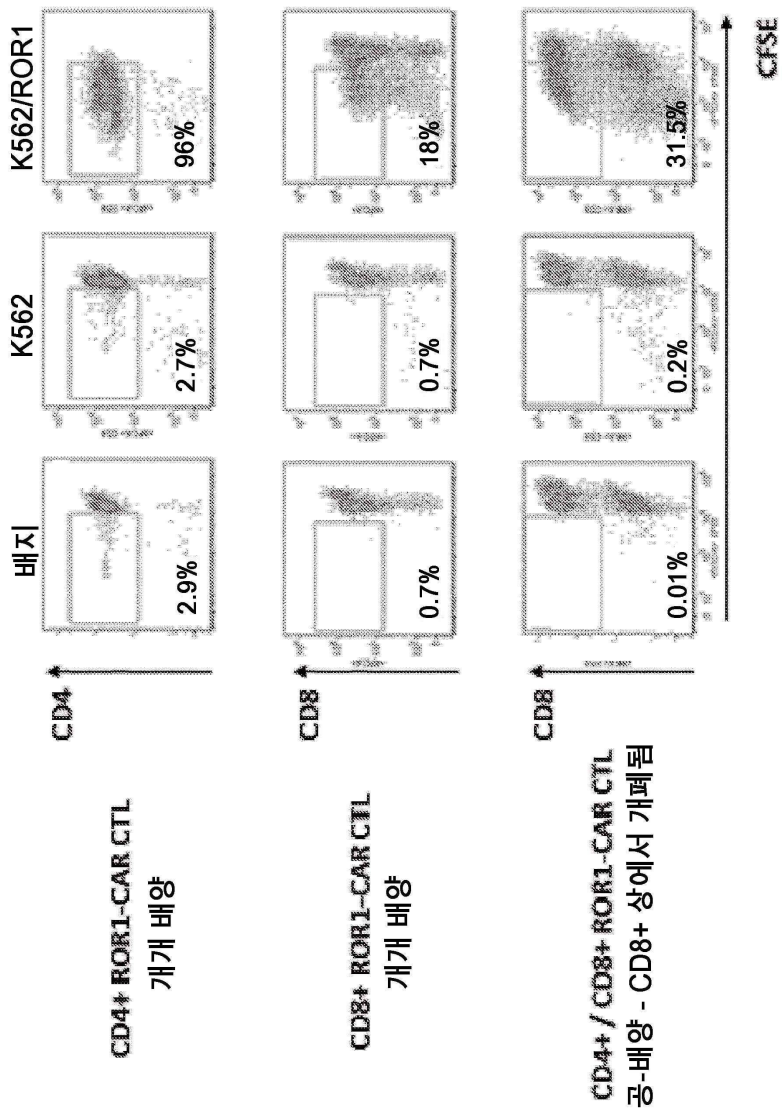
다중 사이토킨 분석(루미넥스)



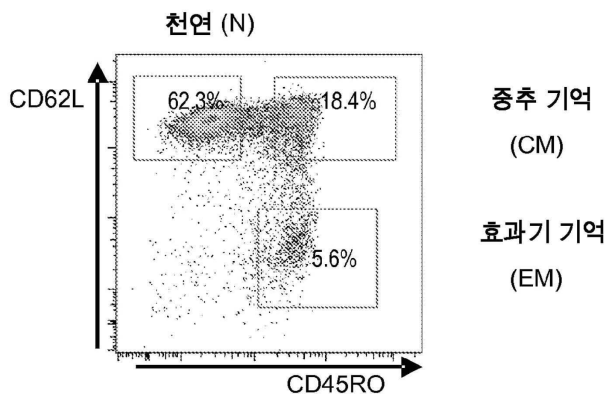
도면6



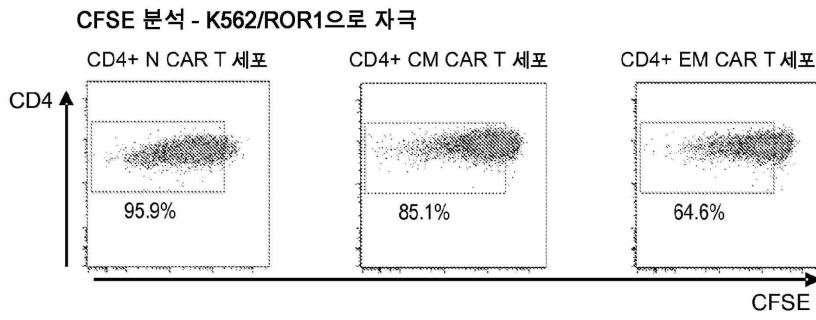
도면7



도면8a

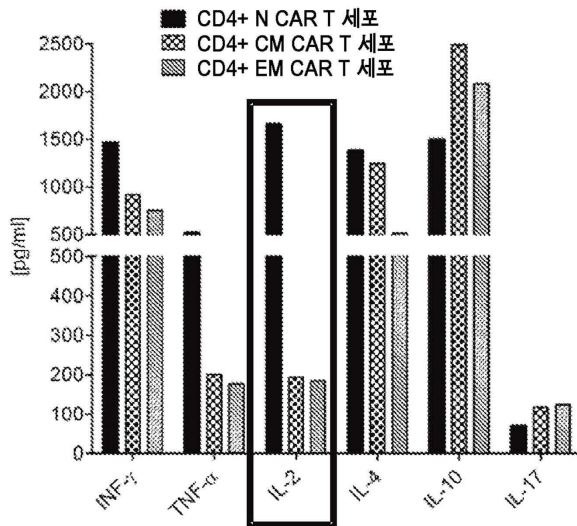


도면8b



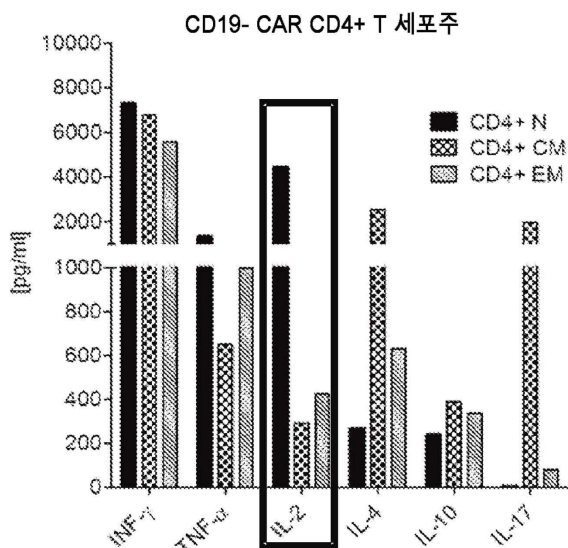
도면8c

루미넥스 분석 - K562/CD19로 자극

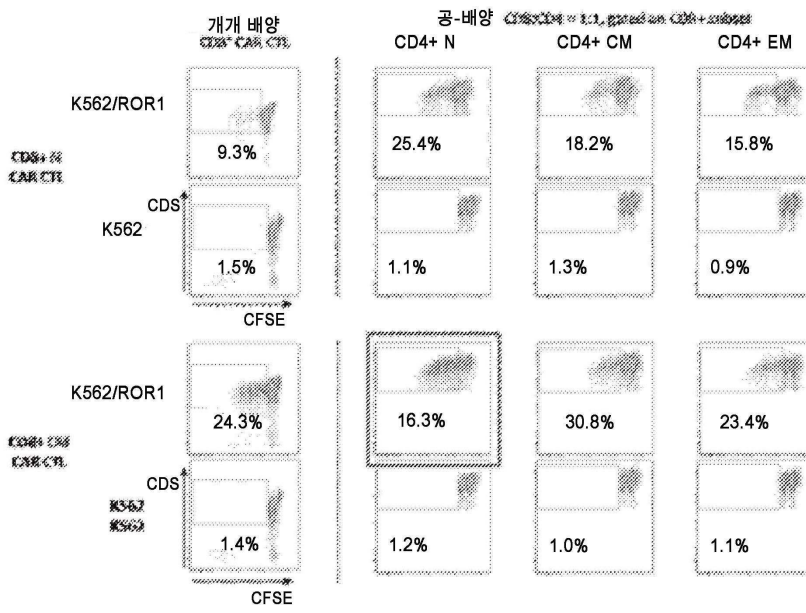


도면8d

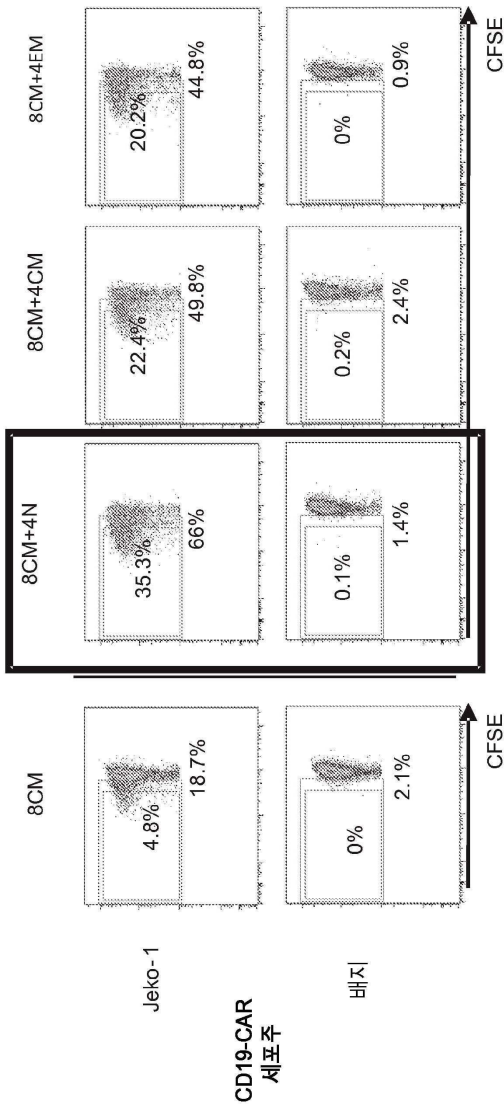
루미넥스 분석 - K562/CD19로 자극



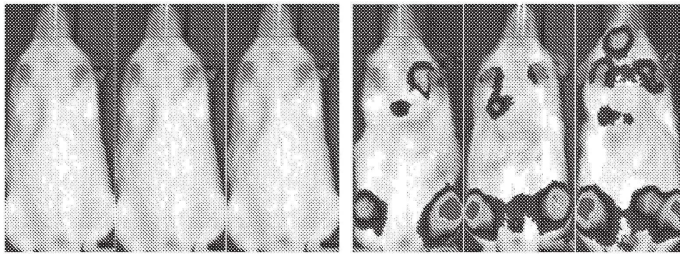
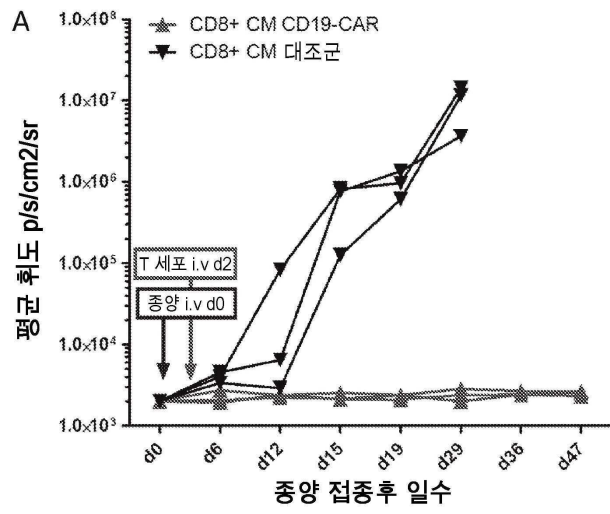
도면9



도면10



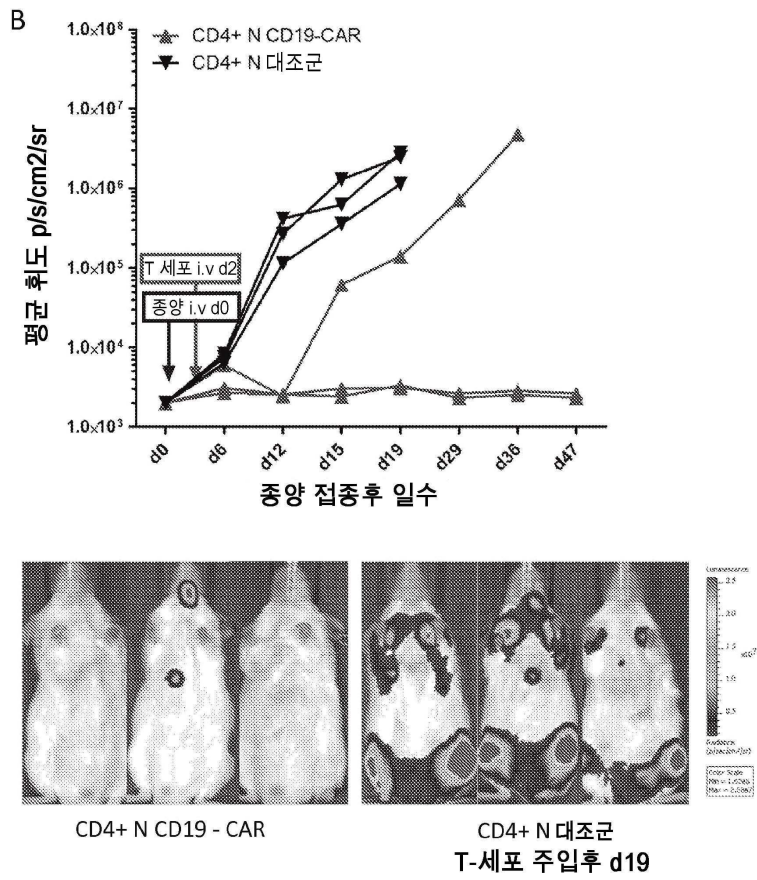
도면11a



CD8+ CM CD19 -

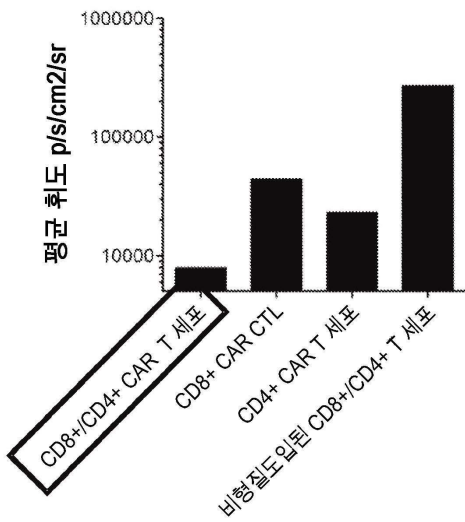
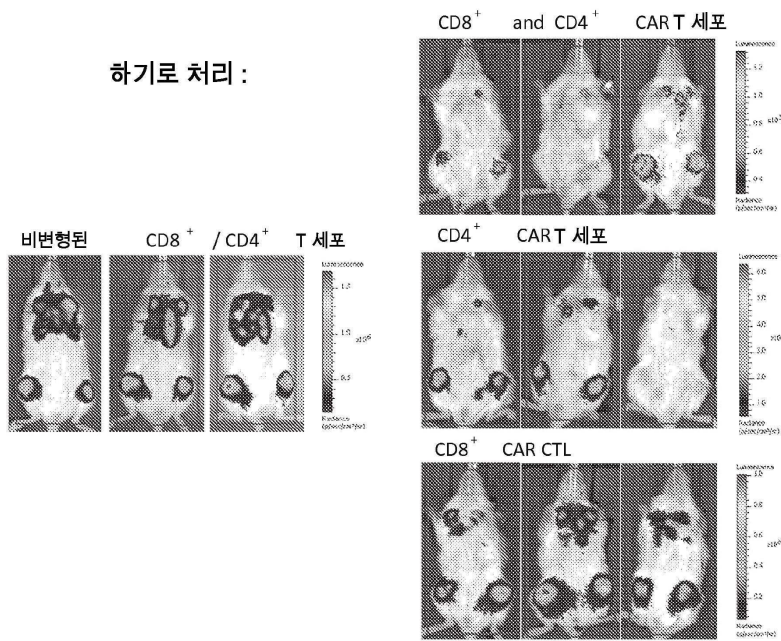
CD8+ C
T-세포 주입 후 d19

도면11b



도면12

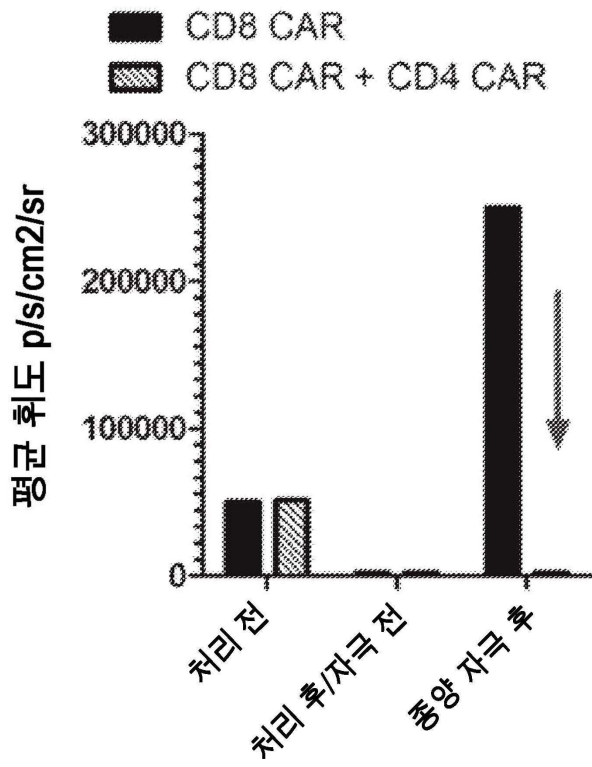
하기로 처리 :



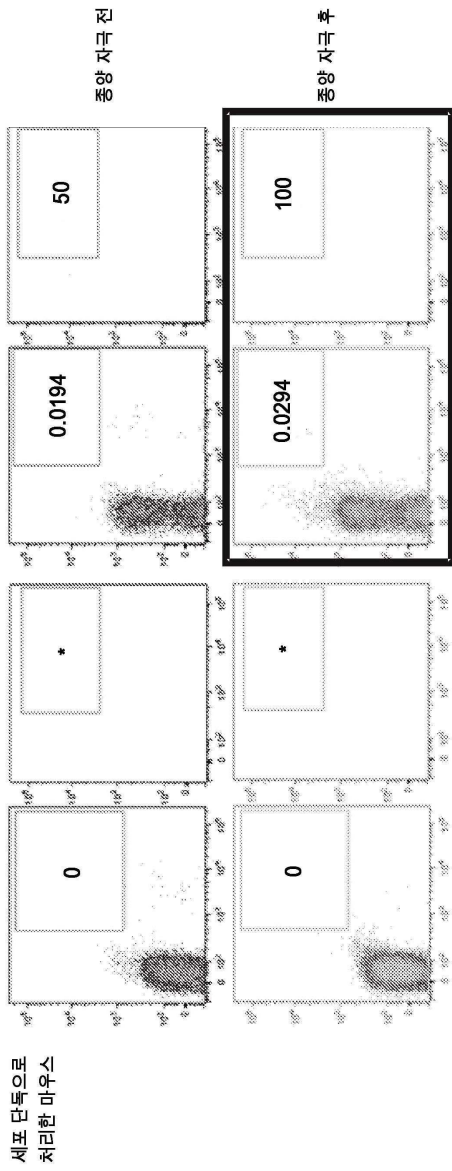
도면13a



도면13b



도면13c



도면13d

