

ÖZET

TRANSDÜSE T HÜCRE SEÇİMİNE YÖNELİK KESİK EPİDERİMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜ (EGFRt)

5

İmmünojenik-olmayan bir seleksiyon epitopu, proteine ait belirli amino asit dizilerinin uzaklaştırılması ile üretilebilir. Örneğin, membran distal EGF-bağlayıcı alanı ve sitoplazmik sinyalleşme kuyruğu bulunmayan kesik bir insan epidermal hücre faktörü reseptörü polipeptidini (EGFRt) kodlayan, ancak bir anti-EGFR antikoru tarafından tanınan hücre dışı bir epitopu tutan bir gen sağlanır. Hücreler EGFRt'yi ifade etmek üzere genetik olarak modifiye edilebilir ve akabinde tam-uzunluğa sahip EGFR immünoaktivitesinin kullanımına eşlik edebilen immünoaktivite olmadan saflaştırılabilir. Akış sitometrik analizi yoluyla, EGFRt farelerde genetik olarak modifiye edilmiş insan T hücre melezleşmesine yönelik bir in vivo takip markörü olarak başarılı olarak kullanılmıştır. İlaveten, EGFRt'nin setüksimab aracılı antikora bağlı hücresel sitotoksiste (ADCC) yolakları yoluyla hücresel tükenme potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir. Bu yüzden, EGFRt terapötik potansiyele sahip olan genetik olarak modifiye edilmiş hücrelere yönelik bir immünojenik-olmayan seleksiyon aleti, takip markörü, bir tükenme ila intihar geni olarak kullanılabilir.

20

İSTEMLER

1. EGFR Alanı III, EGFR transmembran alanı ve EGFR Alanı IV'ten oluşan kesik bir EGFR'yi kodlayan bir diziden oluşan modifiye edilmiş bir EGFR genidir.
5
2. İstem 1'in genidir, burada modifiye edilmiş EGFR geni sadece GMCSFR alfa zinciri sinyal dizisini kodlayan bir nükleotid dizisine bağlanır.
- 10 3. İstem 1 veya istem 2'nin genidir, burada modifiye edilmiş EGFR geni tarafından kodlanan amino asit dizisi SEQ ID NO: 3 ile en az %90 aynıdır.
4. İstemler 1-3'ten herhangi birinin genidir, burada modifiye edilmiş EGFR geni tarafından kodlanan amino asit dizisi SEQ ID NO: 3'ten oluşur.
15
5. İstemler 1-4'ten herhangi birinin genini içeren bir yapıdır, burada modifiye edilmiş EGFR geni tümör ile ilişkili bir antijene yönelik spesifik olan kimerik bir antijen reseptörünü kodlayan bir nükleotid dizisi ile bağlanır, burada kimerik bir antijen reseptörünü kodlayan nükleotid dizisini, bir C-terminal 2A bölünebilir bağlayıcısını kodlayan bir nükleotid dizisi ve modifiye edilmiş EGFR genine yönelik kodlama dizisi takip eder.
20
6. İstem 5'in yapısıdır, burada tümör ile ilişkili bir antijene yönelik spesifik olan kimerik antijen reseptörü CD19, CD20 ve CD22'den seçilir.
25
7. İstem 6'nın yapısıdır, burada tümör ile ilişkili bir antijen CD19'dur.
8. İstem 5 veya istem 7'nin yapısıdır, burada yapı CD19R-CD28gg-Zeta(CO)-T2A-EGFRt'dir ve amino asit dizisi SEQ ID NO: 6'yı kodlayan bir nükleotid dizisi içerir.
30

- 5 9. İstemler 1-4'ten herhangi birinin geni ile transdüse edilen T hücrelerinin genetik olarak modifiye edilmiş bir popülasyonudur, burada gen tümörü hedefleyen bir kimerik antijen reseptörünü (CAR) kodlayan bir gene bağlanır, burada T-hücreleri aktif olmayan modifiye edilmiş EGFR'yi ifade eder.
- 10 10. İstem 9'un T hücrelerinin popülasyonudur, burada T hücreleri adoptif immünoterapide kullanıma yöneliktir.
- 10 11. İstem 10'a göre kullanıma yönelik T hücrelerinin popülasyonudur, burada adoptif immünoterapi kanserin tedavi edilmesinde kullanıma yöneliktir.
- 15 12. İstemler 1-4'ten herhangi birinin geni tarafından kodlanan immünojenik-olmayan bir seleksiyon epitopu veya istemler 5-8'den herhangi birinin yapısıdır.
- 20 13. İstem 12'nin seleksiyon epitopudur, burada seleksiyon epitopu aşağıdakilerden seçilen bir kullanımda kullanıma yöneliktir:
- 25 (a) immünomanyetik seleksiyon ile uyumlu olan immünojenik-olmayan bir seleksiyon aleti olarak kullanım;
(b) *in vivo* T hücresi melezlemesine yönelik bir takip markörü olarak kullanım ve
(c) immünoterapötik potansiyele sahip transdüse T hücrelerine yönelik bir intihar geni olarak kullanım, setüksimab aracılı kompleman ve/veya antikora bağlı hücre aracılı sitotoksiste (ADCC) yolakları aracılığıyla isteğe bağlı olarak bir intihar geni olarak kullanıma yöneliktir.
- 30 14. İstem 12'nin seleksiyon epitopudur, burada seleksiyon epitopu immünomanyetik seleksiyon ile uyumludur ve hücre ürünleri istenmeyen

immünolojik reddetme durumu olmadan kanser hastalarında
immünoterapiyi kolaylaştırır.

TARİFNAME

TRANSDÜSE T HÜCRE SEÇİMİNE YÖNELİK KESİK EPİDERİMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜ (EGFRt)

5

TEKNİK SAHA

Mevcut ürünler ve yöntemler kanser immünoterapisinde kullanıma yönelik immünoloji ve genetik olarak modifiye edilmiş hücrelerin saflaştırılması gibi sahalarda, özellikle setüksimab ile eşleştirilen insan epidermal hücre faktörü reseptöründen (EGFR) derive edilen bir polipeptid gibi karşılık gelen bir antikor ile eşleştirilen kesik bir reseptör ile ilgilidir.

ALT YAPI

15

Tümörleri hedef alan kimerik antijen reseptörlerine (CAR'ler) ait homojen ifadesine sahip immün hücre ürünleri, transgen ifadesinin bunun dışında akabinde gerçekleşen seçim olmadan transdüksiyona özgü ve diğer genetik modifikasyon prosedürlerinin üründen ürüne değişkenliğini ortadan kaldırmak üzere adaptif terapi stratejilerinin klinik değerlendirmesine yönelik istenir. Genetik olarak yeniden yönlendirilmiş immün hücrelerini kullanan immünoterapi, çeşitli kanser hastalarında minimal rezidüel hastalığın tedavi edilmesine yönelik ilgi çekici bir yaklaşımdır. Ancak, transdüksiyon stratejisinin bir parçası olarak antibiyotik seleksiyon proteinlerini ifade eden hücre ürünlerinin immünolojik olarak reddedilmesi, bu stratejiyi sekteye uğratmıştır. İnsan lenfositlerinde ifade edilmeyen yeni bir seleksiyon markörü, endojen sinyalleşme veya trafik fonksiyonunu içermez ve seleksiyona, *in vivo* trafiğine, yönelik kullanılabilen bilinen, tercihen ticari olarak temin edilebilen, bir farmasötik dereceli antikor reaktifi tarafından tanınır ve transdüse hücrelerin tükenmesi teknikte kayda değer bir gelişme olabilir.

US6790614, seçilebilir hücre markörleri olarak mutasyona uğramış bir protein-tirozin kinaz reseptörü (PTKR), özellikle mutasyona uğramış bir epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) veya mutasyona uğramış kas spesifik kinaz (MuSK) ailesi üyesi kullanılarak genetik olarak modifiye edilmiş hücrelerin tanımlanmasına yönelik bir yöntem ile ilgilidir.

KISA AÇIKLAMA

Mevcut buluş, EGFR Alanı III, EGFR transmembran alanı ve EGFR Alanı IV'ten oluşan kesik bir EGFR'yi kodlayan bir diziden oluşan modifiye edilmiş bir EGFR geni sağlar. Modifiye edilmiş EGFR geni, sadece GMCSFR alfa zinciri sinyal dizisini kodlayan bir nükleotid dizisine bağlanabilir. Modifiye edilmiş EGFR geni tarafından kodlanan amino asit dizisi, SEQ ID NO: 3 ile en az %90 aynı olabilir veya bundan oluşabilir.

Mevcut buluş ayrıca buluşun genini içeren bir yapı sağlar, burada modifiye edilmiş EGFR geni tümör ile ilişkili olan bir antijene yönelik spesifik olan kimerik bir antijen reseptörünü kodlayan bir nükleotid dizisi ile bağlanır, burada kimerik bir antijen reseptörünü kodlayan nükleotid dizisini, bir C-terminal 2A bölünebilir bağlayıcısını kodlayan bir nükleotid dizisi ve modifiye edilmiş EGFR genine yönelik kodlama dizisi takip eder.

Tümör ile ilişkilendirilen bir antijene yönelik spesifik olan kimerik antijen reseptörü, CD19, CD20 ve CD22'den seçilebilir ve uygun bir şekilde CD19 olabilir. Uygun bir şekilde, yapı CD19R-CD28gg-Zeta(CO)-T2A-EGFRt olabilir ve amino asit dizisi SEQ ID NO: 6'yı kodlayan bir nükleotid dizisi içerebilir.

Mevcut buluş aynı zamanda buluşun geni ile transdüse edilen T hücrelerinin genetik olarak modifiye edilmiş bir popülasyonunu sağlar, burada gen tümörü hedefleyen bir kimerik antijen reseptörünü (CAR) kodlayan bir gene bağlanır, burada T-hücreleri aktif olmayan modifiye edilmiş EGFR'yi ifade eder. Uygun bir

şekilde, T hücreleri adoptif immünoterapide kullanıma yönelik olabilir. Adoptif immünoterapi, kanserin tedavi edilmesinde kullanıma yönelik olabilir.

Hücre ürünlerine yönelik istenmeyen immünojenik bir reddetme olmadan kanser hastalarında immünoterapiyi kolaylaştıran immünomanyetik seleksiyon ile uyumlu olan immünojenik-olmayan bir seleksiyon epitopu (yani, görüldüğü üzere antibiyotik seleksiyon proteinleri ifade edildiğinde), proteinin belirli amino asit dizilerinin uzaklaştırılması tarafından üretilebilir. İmmünojenik-olmayan seleksiyon epitopu, bilinen bir antikor veya bunun işlevsel bir parçası tarafından tanınan hücre dışı bir epitopu tutmak üzere ve herhangi bir sinyalleşmeyi veya trafik alanlarını ve/veya bilinen antikor tarafından tanınmayan herhangi bir hücre dışı alanları uzaklaştırmak üzere kesilen endojen bir hücre-yüzeyi molekülünü kodlayan bir gendir. Bilinen antikor tarafından tanınmayan sinyalleşme veya trafik alanları ve/veya herhangi bir hücre dışı alanların uzaklaştırılması, endojen hücre yüzeyi molekülünü atıl hale getirir, bu moleküle yönelik istenilen bir özelliktir. İmmünojenik-olmayan seleksiyon epitopu, aynı zamanda bir seleksiyon aletine veya takip markörüne yönelik kullanılabilir.

Buna göre, mevcut buluş, buluşun geni veya yapısı tarafından kodlanan immünojenik-olmayan bir seleksiyon epitopu sağlar. Uygun bir şekilde, seleksiyon epitopu, aşağıdakilerden seçilen bir kullanımda kullanıma yönelik olabilir:

- (a) immünomanyetik seleksiyon ile uyumlu olan immünojenik-olmayan bir seleksiyon aleti olarak kullanım;
- (b) in vivo T hücresi melezlemesine yönelik bir takip markörü olarak kullanım ve
- (c) immünoterapötik potansiyele sahip transdüse T hücrelerine yönelik bir intihar geni olarak kullanım, setüksimab aracılı kompleman ve/veya antikora bağlı hücre aracılı sitotoksiste (ADCC) yolları aracılığıyla isteğe bağlı olarak bir intihar geni olarak kullanıma yöneliktir.

Uygun bir şekilde, seleksiyon epitopu, immünomanyetik seleksiyon ile uyumlu olabilir ve hücre ürünlerinin istenmeyen immünolojik reddetme durumu olmadan kanser hastalarında immünoterapiyi kolaylaştırır.

- 5 Burada açıklanan modifiye edilmiş endojen hücre-yüzeyi molekülüleri, bunlarla sınırlı olmamak üzere, herhangi bir hücre-yüzeyi ile ilgili reseptör, ligand, glikoprotein, hücre adezyon molekülü, antijen, integrin veya burada açıklandığı üzere modifiye edilen farklılaşma kümesi (CD) olabilir. Modifiye edilmiş endojen
- 10 hücre-yüzeyi molekülü, kesik bir tirozin kinaz reseptörüdür. Bir açıda, kesik tirozin kinaz reseptörü, epidermal büyüme faktörü reseptör ailesinin bir üyesidir (örneğin, ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4).

- Aynı zamanda EGFR, ErbB1 ve HER1 olarak bilinen epidermal büyüme faktörü
- 15 reseptörü, hücre dışı ligandların epidermal büyüme faktörü ailesinin üyelerine yönelik bir hücre-yüzeyi reseptörüdür. EGFR aktivitesindeki değişiklikler, belirli kanserleri içermektedir. Birinci bir açıda, bir EGFR polipeptidi kodlayan bir gen, membran distal EGF-bağlanma bölgesi ve sitoplazmik sinyal kuyruğu ("kesilmiş bir EGFR" veya "EGFRt") dahil olmak üzere polipeptidleri kodlayan nükleik asit
- 20 dizilerinin uzaklaştırılması ile inşa edilen insan epidermal hücre faktörü reseptörünü (EGFR) içerir, ancak bir anti-EGFR antikoru tarafından tanınan hücre dışı membran proksimal epitopu tutar. Tercihen, antikor setüksimab, matuzumab, nesitumumab veya panitumumab gibi bilinen bir ticari olarak temin edilebilen anti-EGFR monoklonal antikordur.

- 25 Anti-biyotin mikro boncuklar ile kombinasyon halinde immünomanyetik seleksiyona biyotinlenmiş-setüksimabın uygulanması, başarılı bir şekilde hücre preparatına yönelik gözlenebilen toksisite olmadan popülasyonun %2'si kadar düşük ila %90'dan daha fazla saflık olarak EGFRt-içeren yapılar ile lentiviral
- 30 olarak transdüse edilmiş olan T hücrelerini güçlendirir. Bu atıl EGFRt molekülünün yapıcı ifadesi, koordine olarak ifade edilen kimerik antijen reseptörü

(CAR), CD19R tarafından yönetildiği üzere T hücre fenotipi veya efektör fonksiyonunu etkilemez. Akış sitometrik analiz yoluyla, EGFRt farelerde T hücre melezleşmesine yönelik bir *in vivo* takip markörü olarak başarılı olarak kullanılmıştır. İlaveten, EGFRt'nin Erbitux® aracılı antikora bağlı hücresel sitotoksiste (ADCC) yolakları yoluyla intihar geni potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir. Bu yüzden, EGFRt immünoterapötik potansiyele sahip olan transdüse T hücrelerine yönelik bir immünojenik-olmayan seleksiyon aleti, takip markörü ve intihar geni olarak kullanılabilir. EGFRt nükleik asit aynı zamanda teknikte iyi bilinen yollar ile tespit edilebilir.

10

Burada açıklandığı üzere antikorlara, tercihen ticari olarak temin edilebilen antikorlara, bağlanan modifiye edilmiş, kesik ve değiştirilmiş endojen hücre-yüzeyi moleküllerinin keşfedilmesi ve tasarlanmasına yönelik yöntemler açıklanır. Yöntemler, antikor-bağlayıcı kısımlara dokunulmazken ilgili proteinin modellenmesi ve işlevsel kısımların kesilmesini içerir. Ortaya çıkan modifiye edilmiş reseptör veya ligand, etiketlenmiş bir antikor kullanılarak sınıflandırılabilir ve akabinde güçlendirilir, böylece modifiye edilmiş reseptör veya ligandın konsantrasyonu artırılır.

20 T hücrelerinin modifiye edilmiş, kesik veya değiştirilmiş bir endojen hücre-yüzeyi molekül geni dizisi (örneğin, kesik EGFR) ile transdüse edilmesini ve akabinde modifiye edilmiş ligand veya reseptör dizisini transdüse T hücrelerine bağlayan bir antikor uygulanmasını içeren transdüse T hücrelerinin seçilmesine yönelik bir yöntem burada açıklanır. Modifiye edilmiş reseptör dizisinin EGFRt olması halinde, antikor tercihen biyotinlenmiş bir anti-EGFR monoklonal antikordur. T hücreleri akabinde anti-biyotin mikro boncukların eklenmesi ve immünomanyetik ayırma kullanılarak T hücrelerinin seçilmesi, florokrom ile konjuge edilen anti-biyotin eklenmesi ve Floresan Aktif Hücre Ayırma veya herhangi bir diğer güvenilir hücre ayırma yöntemi kullanılarak T hücrelerinin seçilmesi ile ayrılır.

30 EGFRt dizisi gibi modifiye edilmiş ligand veya reseptör dizileri, lentiviral bir vektör gibi uygun bir transfer aracının içinde bulunabilir.

Bu ve diğer düzenlemeler, ayrıca buradaki şekillerde ve detaylı açıklamada açıklanır.

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

5

Şekil 1, kristal yapı dizilerine bağlı olarak EGFRt proteinlerine karşılık EGFR 'nin moleküler bir modelidir. Soldaki EGFR yapısı, dört hücre dışı alanın (Alanlar I-IV) yapısı ile tam uzunluğa sahip bir EGFR'yi gösterir. Orta yapı modifiye edilmemiş bir EGFR ile karşılaştırıldığında Alan I, Alan II, Jukstamembran Alan ve Tirosin Kinaz Alanı içermeyen kesik EGFR'yi (EGFRt) içerir. Sağdaki EGFRt, V_H-C_{H1} ve V_L-C_L 'den oluşan Eribitux® Fab'a bağlanan kesik yapıyı gösterir. Alanlar kesikli çizgiler ile ayrılır.

Şekil 2, biyotinlenmiş setüksimab (şekillerde Erbitux® olarak refere edilen) kullanılarak EGFRt⁺ T hücrelerinin seleksiyonunu gösterir.

Şekil 2a, setüksimab biyotinleme ve reformülasyon prosesinin bir şematığıdır. Şekil 2b, biyotinlenmiş setüksimabın titrasyonunu gösteren bir grafikdir. 10^6 EGFR⁺ hücreleri, 0µg (siyah), 1.45µg (kırmızı), 0.145µg (turuncu), 14.5ng (sarı), 1.45ng (yeşil), 0.145ng (mavi) veya 14.5pg (mor) biyotinlenmiş setüksimab akabinde 05µg PE-konjuge edilen streptavidin ile lekelenmiştir ve akış sitometrisi ile analiz edilmiştir. 14.5ng veya daha fazla biyotinlenmiş setüksimab, ilerideki lekelemeye yönelik yeterli olarak düşünülmüştür. Şekil 2c, hem immünomanyetik (üst) hem de floresan ile aktive edilen hücre ayırma (alt) EGFRt seleksiyon prosedürlerinin şematiklerini gösterir.

Şekil 2d, CAR ve EGFRt içeren yapılar ile lentiviral olarak trandüze edilen çeşitli T hücre hatlarının immünomanyetik seleksiyonunu gösterir. Lentiviral vektörlerin içinde bulunan CD19CAR-T2A-EGFRt (sol) ve CD19CAR-T2A-EGFRt-IMPDH2dm (sağ) yapılarının şematikleri, yüzey EGFRt ifadelerine yönelik karşılık gelen seleksiyon öncesi ve sonrası akış sitometrik analizlerinin üzerinde gösterilir. CD19'a özgü, CD28 ko-uyarıcı

CAR, akabinde kendiliğinden ayrılabilir T2A, EGFRt ve IMPDH2dm seleksiyon markörlerinin kodon ile optimize edilen dizi kısımları, Uzatma Faktörü 1 promotörü dizileri (EF-1p) ve GCSFR alfa zinciri sinyal dizileri (yüzey ifadesini yönlendiren GCSFRss) ile birlikte belirtilir. Bir

5 biyotinlenmiş-setüksimab antikoru ve PE ile konjuge edilen anti-biyotin antikoru (siyah histogramlar) ile lekelenmiş olan lentiviral olarak transdüse edilen T hücre hatlarının akış sitometrik analizi, hem giriş T hücreleri (PRE SLXN) hem de AutoMACS™'den elde edilen pozitif fraksiyon (POS FRXN) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Açık histogramlar,

10 tek başına PE ile konjuge edilen anti-biyotin antikoru ile lekelenmeyi temsil eder ve pozitif hücrelerinin yüzdesi her bir histogramda belirtilir. CD19CAR⁺EGFRt⁺ Hat A'nın seleksiyonu, T hücre patlamalarının transdüksiyonundan 3 gün sonra meydana gelmiştir. CD19CAR⁺EGFRt⁺ Hat B'nin seleksiyonu, transdüse CMVpp65'e özgü

15 T_{CM} ile derive edilen hücrelerin 3 REM stimülasyonundan sonra meydana gelmiştir. CD19CAR⁺EGFRt⁺ Hat C'nin seleksiyonu, transdüse CD8⁺ T_{CM} ile derive edilen hücrelerin 2 REM stimülasyonundan sonra meydana gelmiştir. CD19CAR⁺EGFRt⁺ Hat D'nin seleksiyonu, transdüse T_{EM} ile derive edilen hücrelerin 1 REM stimülasyonundan sonra meydana

20 gelmiştir. CD19CAR⁺EGFRt⁺IMPDH2dm⁺ Hat E'nin seleksiyonu, transdüse T_{CM} ile derive edilen hücrelerin 1 REM stimülasyonundan sonra meydana gelmiştir.

Şekil 3, seçilen T hücrelerinde ifade edilen EGFRt'nin atıl olduğunu gösterir. Şekil 3a'da, T hücrelerinde ifade edilen EGFRt, EGF ile birlikte

25 inkübasyondan sonra fosforile edilmemiştir. Negatif kontrol T hücreleri, CD19CAR⁺EGFRt⁺ Hat A hücreleri veya A431 hücreleri, 100ng/mL EGF veya setüksimab (şekillerde ErbtX olarak refere edilen) ile veya bunlar olmadan 5 dakika inkübe edilmiştir ve akabinde fosfataz inhibitörün varlığında çözünmüştür. Western blotlarının üzerinde çalışan lizatlar,

30 akabinde β-aktin, EGFR'nin sitoplazmik alanı veya EGFR'nin 1068 pozisyonunda fosforile edilmiş tirozine yönelik spesifik olan antikorlar

kullanılarak sonda ile incelenmiştir. Şekil 3b, EGF'nin EGFRt ifade eden T hücrelerinin yüzeyine bağlanmadığını gösterir. A431, Hat A ve negatif kontrol T hücreleri PE ile konjuge edilen anti-EGFR veya biyotinlenmiş setüksimab veya biyotinlenmiş EGF ile, akabinde PE ile konjuge edilen izotip kontrol Ab veya akış sitometrisi ile tek başına streptavidinin (açık histogram) karşısında PE ile konjuge edilen streptavidin (siyah histogram) ile lekelenmiştir. Pozitif lekeleme yüzdesi her bir histogramda belirtilir.

Şekil 4, seçilen EGFRt⁺ CD19R⁺ T hücrelerinin efektör fenotipinin korunması ile genişletilebileceğini gösterir. Şekil 4a, hızlı genişleme ortamı (REM) stimülasyonu, AutoMACS™ seleksiyon gününde (gün 0) başlatıldıktan sonra 12 veya daha fazla gün boyunca EGFRt ile seçilen T hücrelerinin, Hatlar A-E'nin genişlemesini gösteren bir hat grafiğidir. (MACS manyetik olarak aktif hale getirilen hücre ayırma işlemidir.) Hızlı genişleme ortamında (REM) T hücrelerinin genişlemesi, gün 1'den başlayarak 48 saatte bir 50U/mL rhIL-2 ve 10ng/ml rhIL-15 (CellGenix) eklenmesi ile 50 mL CM içinde 30 ng/mL anti-CD3ε (OKT3; Ortho Biotech, Raritan, NJ), 5 x 10⁷ γ ile ışınlanmış PBMC'ler (3500 cGy) ve 10⁷ γ ile ışınlanmış LCL'ler (8000 cGy) ile 10⁶T hücrenin inkübasyonunu içermiştir. T hücreleri 14 günde bir bu şekilde tekrardan stimüle edilmiştir.

Şekil 4b, yüzey EGFR'si (yani, EGFRt, biyotinlenmiş setüksimab ile), Fc (yani, CAR) ve akış sitometrisi ile izotip kontrol Ab'sinin (açık histogram) karşısında T hücre markörleri CD4 veya CD8'e (siyah histogram) yönelik fenotiplenmiş olan EGFRt ile seçilen T hücrelerini (stimülasyondan sonra 11 ila 13 gün) temsil eden histogramları gösterir. Pozitif lekeleme yüzdesi her bir histogramda belirtilir. "N.D." veri yok anlamına gelir. Şekil 4C, belirtilen E:T oranlarında hedefler olarak ⁵¹Cr ile etiketlenen NS0, U251T, CD19t- ifade eden NS0, CMV pp65-ifade eden U251T, CD19-ifade eden Daudi veya SupB15 veya OKT3-ifade eden LCL hücreleri ile 4 saat inkübe edilen EGFRt ile seçilen T hücrelerinin (REM stimülasyonundan sonra 11 ila 15 gün içinde) Hatlar A-E'den her biri için bir tane olacak şekilde beş hat grafiğidir. Kromiyum salınımı sitotoksik aktiviteyi

- belirlemek üzere ölçülmüştür. Şekil 4d, CD19CAR⁺EGFRt⁺IMPDH2dm⁺ Hat E'nin MPA direncini gösteren bir grafiktir. IMPDH2dm ve EGFRt ile seçilen IMPDH2dm-ifade eden Hat E hücrelerini ifade etmeyen kontrol T hücreleri, 1µM MPA veya bu olmadan
- 5 kùltùrlenmiřtir ve toplam hùcre sayısı izlenmiştir.
- şekil 5, in vivo T hùcre melezlemesine yùnelik EGFRt ifadesinin bir takip markùrù olarak kullanılabileceğini gùsterir. Bir kontrol faresi veya gùn 0'da 10⁷ CD19CAR⁺EGFRt⁺ Hat C'yi alan bir fareden hasat edilen Gùn 36'daki kemik iliği, PerCP ile konjuge edilen anti-insan CD45 ve
- 10 biyotinlenmiş setùksimab ("Bio-Erb") akabinde PE ile konjuge edilen streptavidin kullanılarak lekelenmiştir. Kuadrantlar, izotip kontrol lekelemesine bağlı olarak yaratılmıştır ve her bir kuadrantta bulunan pozitif lekeleme yùzdesi her bir histogramda belirtilir.
- şekil 6, setùksimab (şekilde Erbitux® olarak refere edilen) aracılı
- 15 ADCC'ye yùnelik EGFRt ifade hedefleri T hùcrelerini gùsteren bir grafiktir. ⁵¹Cr ile etiketlenen Hat A hùcreleri, efektùrler olarak insan PBMC'nin eklenmesinden ònce negatif bir kontrol olarak 20µg/mL kadar setùksimab veya CD20'ye òzgù mAbRituksan ile veya bunlar olmadan ònceden inkùbe edilmiştir.
- 20 şekil 7, EGFRt'ye bağlanan GMCSFR alfa zincir sinyal dizisinin nùkleotid (sens dizi SEQ ID NO: 1'dir, antisens dizi SEQ ID NO: 2'dir) veya amino asit (SEQ ID NO: 3) dizileridir. Yùzey ifadesini yùnlendiren GMCSFR alfa zincir sinyal dizisi, nùkleotidler 1-66 ile kodlanır. EGFRt , nùkleotidler 67-1071 ile kodlanır.
- 25 şekil 8, CD19R-CD28gg-Zeta(CO)-T2A-EGFRt'nin nùkleotid (sens dizi SEQ ID NO: 4'tùr, antisens dizi SEQ ID NO: 5'tir) ve amino asit (SEQ ID NO: 6) dizileridir. CD19R-CD28gg-Zeta(CO), nùkleotidler 1-2040 ile kodlanır; T2A nùkleotidler 2041-2112 ile kodlanır; GMCSFR nùkleotidler 2113-2178 ile kodlanır; EGFRt nùkleotidler 2179-3186 ile kodlanır.
- 30 şekil 9, CD19R-CD28gg-Zeta(CO)-T2A-EGFRt ifadesini gùsteren bir grafiktir. CD19R-CD28gg-Zeta(CO)-T2A-EGFRt_epHIV7 lentiviral

- vektör (MOI = 3) ile anti-CD3/anti-CD28 boncuk ile stimüle edilen primer T hücre patlamalarının transdüksiyonu, gün 4'te akış sitometrisi tarafından hem CAR (biyotinlenmiş bir anti-Fc Ab ve streptavidin-PE kullanılarak) hem de kesik EGFR molekülünün (biyotinlenmiş bir setüksimab Ab ve streptavidin-PE kullanılarak) yüzey tespiti ile sonuçlanır. Her bir paneldeki beyaz pik, tradüce-edilmeyen kontrol T hücre patlamalarıdır. Şekil 10, mevcut tarifnamenin ürünlerini test etmek amacıyla klinik deneylere yönelik olası bir proses akışını gösteren bir şemadır.

10 DETAYLI AÇIKLAMA

Buluşun belirli düzenlemeleri, spesifik örnekler, diziler ve çizimler kullanılarak detaylı olarak açıklanır.

- 15 Erbitux®, anti-EGFR monoklonal antikor setüksimaba yönelik tescilli bir markadır ve ticari ürünün formülasyonu, jenerik ilacı ve ticari ürünün aktif farmasötik etken maddesini(maddelerini) bağımsız olarak içermesi amaçlanır.

- 20 "Genetik modifikasyon" terimi, endojen bir nükleotid dizisini ekleyen, silen, değiştiren veya bozan herhangi bir proses anlamına gelir ve bunlarla sınırlı olmamak üzere viral aracılı gen transferi, lipozom aracılı transferi, transformasyonu, transfeksiyonu ve transdüksiyonu, örneğin, lentivirüs, adenovirüs, retrovirüsler, adeno-ilişkili virüs ve herpes virüsü gibi DNA virüslerine bağlı olarak vektörlerin kullanımı gibi viral aracılı gen transferi içerir.

25

"Antikor" terimi, monoklonal antikorları, poliklonal antikorları, dimer, multimer, multispesifik antikorlar ve insan, fare, insanlaştırılmış, kimerik veya başka bir türden derive edilen antikor fragmanlarını içerir. "Monoklonal bir antikor" spesifik bir antijenik bölgeye yönlendirilen büyük ölçüde homojen olan antikorların bir popülasyonundan elde edilen bir antikordur.

30

"Varyant" natif bir dizi polipeptidinden belirli bir derecede farklı olan amino asit dizilerine sahip polipeptidlere refere eder. Genellikle, amino asit dizisi varyantları, en az yaklaşık %80 dizi kimliğine, daha çok tercihen dizi olarak en az yaklaşık %90 homologluğa sahip olacaktır. Amino asit dizi varyantları, referans amino asit dizisi içindeki belirli pozisyonlardaki değiştirme, silme ve/veya sokma işlemlerini içerebilir.

"Kimlik oranı" veya "kimlik yüzdesi" maksimum dizi kimliği yüzdesi elde etmek üzere dizilerin en iyi şekilde hizalanmasından ve gerekli olması halinde boşlukların dahil edilmesinden sonra aynı olan amino asit dizi varyantında kalıntıların oranı olarak tanımlanır. Hizalamaya yönelik yöntemler ve bilgisayar programları teknikte iyi bilinir. Bu tür programlar GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST veya Align 2'yi içerir.

"Antikora-bağlı hücre-aracılı sitotoksiste" ve "ADCC" hücre-aracılı bir reaksiyona refere eder, burada doğal öldürücü hücreler, nötrofiller ve makrofajlar gibi Fc reseptörlerini ifade eden spesifik olmayan sitotoksik hücreler, hedef bir hücrede bağlanma antikorunu tanır ve hedef hücrenin lizisine neden olur. ADCC aktivitesi, U.S. Pat. No. 5,821,337'de açıklananlar gibi yöntemler kullanılarak değerlendirilebilir.

"Efektör hücreler" bir veya daha fazla sabit bölge reseptörünü ifade eden lökositlerdir ve efektör işlevleri gerçekleştirir.

Kanser gibi bir hastalık veya bir bozukluğu "tedavi etmek" hastalık veya bozukluğu azaltmak veya hafifletmek üzere terapötik önlemler veya önleyici önlemler almak anlamına gelir. Bu tür bir tedavi önleme, semptomların hafifletilmesi, azaltma veya etki alanının stabilizasyonu ve/veya gerilemeyi içerir. "Terapötik olarak etkili miktar" terimi, bir hastalığı veya bozukluğu tedavi etmek üzere etkili olan bir bileşiğin veya molekülün bir miktarına refere eder.

"Kanser" kontrolsüz hücresel büyüme yaşayan hücrelere refere eder. Kanser örnekleri kolorekta kanser ve baş ile boyun kanserini içerir. "Kemoterapötik bir ajan" kanserin tedavisinde kullanışlı olan kimyasal bir bileşiktir.

- 5 Bir "sitokin" olarak bir hücre içi aracı olarak diğer bir hücrede görev yapmak üzere bir hücre tarafından salınan bir proteindir.

- 10 "İmmünojenik-olmayan" immün yanıtının adaptif ve/veya kalıtsal immün yanıtlarını içerdiği bir yerde bir immün yanıtını başlatmayan, uyarmayan veya geliştirmeyen bir materyale refere eder.

- 15 "Gen" terimi, DNA bölümünün bir polipeptid zincirinin üretiminde bulunduğu anlamına gelir; "lider" ve "takipçi" olarak kodlayıcı bölgenin önünde bulunan veya bunu takip eden bölgeler, aynı zamanda ayrı kodlama bölümlerinin (eksonlar) arasında araya giren diziler (intronlar) içerir. Tamamen veya kısmen intron bulundurmeyen bazı genler geliştirilebilir. Bazı lider diziler nükleik asidin polipeptidlere translasyonunu geliştirebilir.

- 20 "İzole" terimi, materyalin orijinal ortamından uzaklaştırıldığı (örneğin, doğal olarak meydana gelmesi halinde, doğal ortamı) anlamına gelir. Örneğin, canlı bir hayvanda mevcut olan doğal olarak meydana gelen bir polinükleotid veya polipeptid izole değildir, ancak doğal sistemde birlikte var olan materyallerin tümünden veya bazılarından ayrılan aynı polinükleotid veya polipeptid izoledir. Bu tür polinükleotidler bir vektörün parçası olabilir ve/veya bu tür polinükleotidler veya polipeptidler bir bileşimin parçası olabilir ve bu tür vektör veya bileşimin bunun doğal ortamının bir parçası olmaması bakımından yine de izole olabilir.

Burada kullanıldığı üzere bir "vektör" konak bir hücrede nükleik asidi iletebilen veya muhafaza edebilen bir ajan olabilir ve viral vektörleri (örneğin, retroviral vektörler, lentiviral vektörler, adenoviral vektörler veya adeno-ilişkili viral vektörler), plazmitler, yalın nükleik asitler, polipeptid veya diğer moleküller ile

5 kompleks haline getirilen nükleik asitler, katı faz parçacıklarının üzerine immobilize edilen nükleik asitleri içerir. Uygun DNA dizisi, bir dizi prosedür yoluyla vektörün içine yerleştirilebilir. Genelde, DNA dizisi teknikte bilinen yöntemler yoluyla uygun bir kısıtlama endonükleaz bölgesinin içine yerleştirilir. Bu tür prosedürler ve diğerleri teknikte uzman kişilerin alanına dahil olarak

10 düşünülür. Mevcut buluşun polipeptidlerini daha fazla ökaryot ile kodlayan DNA transkripsiyonu, vektörün içine bir arttırıcının yerleştirilmesi yoluyla arttırılır. Arttırıcılar, bir başlatıcının üzerinde transkripsiyonunu arttırmak üzere görev yapan genellikle yaklaşık 10 ila 300 bp arasında olan DNA'nın yöndeş-hareket eden elemanlarıdır. Örnekler, 100 ila 270 bp arasında olan replikasyon

15 başlangıcının son tarafındaki SV40 arttırıcı, bir sitomegalovirüs erken başlatıcı arttırıcı, replikasyon başlangıcının son tarafındaki polyoma arttırıcı ve adenovirüs arttırıcılarını içerir.

"Reseptör" bir moleküle spesifik olarak bağlanabilen bir polipeptid anlamına gelir. Öte yandan, birçok reseptör tipik olarak bir hücrenin yüzeyinde çalışabilir,

20 bazı reseptörler hücrenin içinde bulunduğu (ve yüzeye taşınmadan önce) ligandlara bağlanabilir veya ağırlıklı olarak hücre içinde olacak şekilde kalabilir ve buradaki ligandı bağlayabilir.

25 "Antikor veya bunun işlevsel bir parçası" belirli bir antijen veya epitopa spesifik olarak bağlanan veya bunun ile immünolojik olarak reaktif olan bir immünoglobulin molekülü anlamına gelir ve hem poliklonal hem de monoklonal antikorları içerir. Antikor terimi, hücre içi antikorlar, peptit antikorlar, kimerik antikorlar, tamamen insan antikorlar, insanlaştırılmış antikorlar ve heterokonjugat antikorlar (örneğin

30 bispesifik antikorlar, diya antikorlar, tria antikorlar ve tetra antikorlar) gibi immünoglobulinlerin genetik olarak değiştirilmiş veya başka bir deyişle modifiye

edilmiş formlarını içerir. İşlevsel antikor parçası terimi, örneğin Fab', F(ab').sub.2, Fab, Fv, rlgG ve scFv parçaları dahil olmak üzere antikorların antijen bağlama parçalarını içerir. scFv terimi, bir zincir oluşturmak üzere birleştirilen klasik bir iki zincirli antikora ait ağır zincir ve hafif zincirin değişken alanlarının tek bir zincirli Fv antikoruna refere eder.

Tek bir düzenlemede, EGFR Alan III, EGFR transmembran alan ve EGFR Alan IV'ten oluşan kesik bir EGFR'yi kodlayan bir diziden oluşan modifiye edilmiş bir EGFR genini kodlayan bir gen, sağlanan immüno manyetik seleksiyon ile uyumlu immünojenik-olmayan bir seleksiyon epitopu olarak kullanılabilir. Bu tür immünojenik-olmayan bir seleksiyon epitopu, hücre ürünlerine yönelik istenmeyen immünolojik reddetme durumu olmadan kanser hastalarında immünoterapiyi kolaylaştırabilir. Modifiye edilmiş EGFR geni, bilinen bir antikor veya bunun işlevsel bir parçası tarafından tanınan hücre dışı bir epitopu tutar ve söz konusu bilinen antikor tarafından tanınmayan herhangi bir sinyalleşme veya trafik alanı ve/veya herhangi bir hücre dışı alanı uzaklaştırır. Söz konusu bilinen antikor tarafından tanınmayan bir sinyalleşme veya trafik alanı ve/veya herhangi bir hücre dışı alanı bulundurmeyen modifiye edilmiş endojen bir hücre-yüzeyi molekülü, atıl olarak belirtilir.

20

Burada açıklanan modifiye edilmiş endojen hücre-yüzeyi molekülleri, burada açıklandığı üzere herhangi bir immünojenik-olmayan hücre-yüzeyi ile ilgili reseptör, glikoprotein, hücre adezyon molekülü, antijen, integrin veya modifiye edilen farklılaşma kümesidir (CD). Bu tür hücre-yüzeyi moleküllerinin modifikasyonu, bilinen bir antikor veya bunun işlevsel bir parçası tarafından tanınan bir epitopun tutulması ve bilinen bir antikor tarafından tanınmayan herhangi bir sinyalleşme veya trafik alanı ve/veya herhangi bir hücre dışı alanın uzaklaştırılması yoluyla sağlanır. Bilinen bir antikor tarafından tanınmayan sinyalleşme veya trafik alanları ve/veya herhangi bir hücre dışı alanın uzaklaştırılması, endojen hücre yüzeyi molekülünü immünojenik-olmayan ve/veya atıl hale getirir.

30

Modifiye edilebilen veya kesilebilen endojen hücre-yüzeyi moleküllerinin örnekleri, bunlarla sınırlı olmamak üzere, EpCAM, VEGFR, integrinler (örneğin, integrinler $\alpha\beta3$, $\alpha4$, $\alpha\text{IIb}\beta3$, $\alpha4\beta7$, $\alpha5\beta1$, $\alpha\text{v}\beta3$, αv), TNF reseptörü süper ailesi (örneğin, TRAIL-R1, TRAIL-R2), PDGF Reseptör, interferon reseptörü, folat reseptörü, GPNMB, ICAM-1, HLA-DR, CEA, CA-125, MUC1, TAG-72, IL-6 reseptörü, 5T4, GD2, GD3 veya farklılaşma kümelerini (örneğin, CD2, CD3, CD4, CD5, CD11, CD11a/LFA-1, CD15, CD18/ITGB2, CD19, CD20, CD22, CD23/IgE Reseptörü, CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD41, CD44, CD51, CD52, CD62L, CD74, CD80, CD125, CD147/basigin, CD152/CTLA-4, CD154/CD40L, CD195/CCR5, CD319/SLAMF7) içerir.

Modifiye edilmiş veya kesik bir endojen hücre-yüzeyi molekülünü tanımak üzere kullanılabilen karşılık gelen ticari antikolar, bunlarla sınırlı olmamak üzere; 3F8, abagovomab, abciksimab, adekatumumab, afutuzumab, alemtuzumab, altumomabpentetat, anatumomabmafenatoks, apolizumab, arsitumomab, aselizumab, atlizumab (= tosilizumab), basiliksimab, bektumomab, benralizumab, besilesomab, bivatumumabmertansin, blinatumomab, brentuksimabvedotin, kantuzumabmertansin, kapromabpendetid, katumaksomab, CC49, sedelizumab, selmoleukin, sitatumumabbogatoks, klenoliksimab, klivatuzumabtetraksetan, CNTO-95, konatumumab, dasetuzumab, daklizumab, daratumumab, detumomab, ekromeksimab, edrekolomab, efalizumab, elotuzumab, enlimomabpegol, epitumomabcituksetan, epratuzumab, erlizumab, etarasizumab, fanolesomab, faralimomab, farletuzumab, galiksimab, gavilimomab, gentuzumabozogamisin, glembatumumabvedotin, gomiliksimab, ibalizumab, ibritumomabtiuksetan, igovomab, intetumumab, iratumumab, inolimomab, inotuzumabozogamisin, ipilimumab, keliksimab, labetuzumab, lintuzumab, leksatumumab, lukatumumab, lumiliksimab, mapatumumab, maslimomab, milatuzumab, minretumomab, mitumomab, muromonab-CD3, naptumomabestafenatoks, natalizumab, okrelizumab, odulimomab, ofatumumab, olaratumab, oportuzumabmonatoks, oregovomab, oteliksizumab, pentumomab, priliksizumab, PRO 140, rituksimab, rovelizumab, ruplizumab, satumomabpendetid, siplizumab, sontuzumab,

tadosizumab, taplitumomabpaptoks, teneliksımab, teplizumab, TGN1412, tisilimumab (= tremelimumab), tigatuzumab, tosilizumab (= atlizumab), toralizumab, tositumomab, tremelimumab, tukotuzumab, vedolizumab, veltuzumab, visilizumab, vitaksin, volociksımab, votumumab, zanolimumab, ziralimumab, zolimomabaritoyu içerir.

Modifiye edilmiş endojen hücre-yüzeyi molekülü, modifiye edilmiş veya kesik bir tirosin kinaz reseptör geni tarafından kodlanabilir. Burada açıklanan düzenlemelere göre modifiye edilmiş veya kesik olabilen tirosin kinaz reseptörlerine yönelik örnekler, bunlarla sınırlı olmamak üzere; endotel büyüme faktörü reseptörü ailesinin üyeleri (EGFR/ErbB1/HER1; ErbB2/HER2/neu; ErbB3/HER3; ErbB4/HER4), hepatosit büyüme faktörü reseptörü (HGFR/c-MET) ve insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü-1'i (IGF-1R) içerir. Bazı düzenlemelere göre, modifiye edilmiş tirosin kinaz reseptörleri, bilinen bir antikor veya bunun işlevsel bir parçası tarafından tanınan hücre dışı bir epitopu tutar ve en azından bir tirosin kinaz alanı eksiktir. En azından bir tirosin kinaz alanı olmayan modifiye edilmiş bir tirosin kinaz reseptörü, reseptörü atıl hale getirir.

Modifiye edilmiş bir tirosin kinaz reseptörünü tanımak üzere kullanılabilen ticari antikorlar, bunlarla sınırlı olmamak üzere, AMG-102, AMG-479, BIIB022OA-5D5, CP-751,871, IMC-A12, R1507, setüksımab, siksutumumab, ertumaksomab, figitumumab, matuzumab, nesitumumab, panitumumab, pertuzumab, nimotuzumab, robatumumab, trastuzumab, zalutumumabı içerir.

Bir düzenlemede, modifiye edilmiş endojen hücre-yüzeyi molekülü, kesik bir EGFR'dir (tEGFR). tEGFR modifiye edilmemiş bir EGFR (Şekil 1) ile kıyaslandığında, Alan I, Alan II, Jukstamembran Alan ve Tirosin Kinaz Alanını içermez.

Modifiye edilmiş bir endojen hücre-yüzeyi molekülünü kodlayan bir gen, immün hücrelerin genetik olarak modifiye edilmiş bir popülasyonuna (örneğin, T

hücreleri) yönelik bir hücre seleksiyonu veya geliştirme markörü olarak kullanılabilir. Modifiye edilmiş bir endojen hücre-yüzeyi molekülünü kodlayan gen, tümörü hedef alan kimerik bir antijen reseptörünü (CAR) kodlayan bir gene bağlanabilir. Bu genler T hücrelerinin popülasyonunu genetik olarak modifiye edilmiş bir şekilde transdüse etmek üzere bir vektörün içine yerleştirilebilir. Transdüksiyondan sonra, başarılı olarak transdüse edilen ve CAR ile modifiye edilmiş endojen hücre-yüzeyi molekülünü ifade eden hücreler, transdüse hücre tarafından ifade edilen modifiye edilmiş endojen hücre-yüzeyi molekülünü tanıyan ticari bir antikor kullanılarak floresan ile aktive edilen hücre ayırma işlemine yönelik anti-biyotin mikro boncukları veya florokrom ile konjuge edilen anti-biyotin ile immünomanyetik saflaştırma gibi herhangi bir uygun saflaştırma yöntemi ile geliştirilebilir.

Diğer bir düzenlemede, membran distal EGF-bağlayıcı alanı ve sitoplazmik sinyalleşme kuyruğu bulunmayan, ancak FDA-onaylı anti-EGFR monoklonal antikor (mAb) setüksimab veya diğer bir anti-EGFR antikor tarafından tanınan hücre dışı membran proksimal epitopunu tutan kesik bir insan epidermal hücre faktörü reseptörünü (EGFRt) kodlayan bir gen, oluşturulur ve burada açıklanır. EGFRt, bir tümör ile ilgili antijene yönelik spesifik olan kimerik antijen reseptörleri ile bağlanabilir. Tümör ile ilgili antijen CD19, CD20 veya CD22 veya herhangi bir diğer tümör ile ilgili antijen olabilir, ancak tercihen CD19'dur (CD19CAR). Tümör ile ilgili antijeni, EGFRt'ye yönelik bir C-terminal 2A ayrılabilir bağlayıcı ve kodlayıcı dizi takip eder. Biyotinlenmiş-setüksimab, tümör ile ilgili antijen/CAR-ifade eden transdüktanların immünomanyetik olarak saflaştırılmasına amacına yönelik ticari olarak temin edilebilen anti-biyotin mikro boncukları ile birlikte kullanılabilir. Tümör ile ilgili antijenin CD19 olduğu örnekte, ürün CD19CAR-ifade eden transdüktanlardır. Alternatif olarak, biyotinlenmiş-setüksimab, floresan ile aktive edilen hücre ayırmasına yönelik Florokrom ile konjuge edilen anti-biyotin ile birlikte kullanılabilir.

Diğer bir düzenlemede, modifiye edilmiş endojen bir hücre-yüzeyi molekülü *in vivo* T hücresi melezlemesine yönelik bir markör olarak kullanılabilir. Örneğin, modifiye edilmiş endojen bir hücre-yüzeyi molekülü EGFRt olduğunda, EGFRt T hücrelerinin veya bir aktarım durumunda kemik iliği hücreleri gibi T hücrelerini hedefleyen hücrelerin hücresel işlevini etkilemeden *in vivo* olarak bağlandığı T hücrelerinin alımını takip etmek üzere kullanılabilir. Sr39TK gibi problemlere veya raportör genlere konjuge edilen setüksimabın kullanımı, PET görüntüleme teknikleri aracılığıyla hastalara EGFRt-ifade eden hücrelerin takip etme potansiyelini geliştirmek üzere kullanılabilir.

10

Ayrı bir düzenlemede, modifiye edilmiş endojen bir hücre-yüzeyi molekülü hücre intiharını indüklemek üzere kullanılabilir. Örneğin, EGFRt setüksimab aracılı tamamlayıcı ve/veya antikora bağlı hücre aracılı sitotoksikite (ADCC) yolları aracılığıyla bir intihar geni olarak kullanılabilir. Setüksimabın terapötik FDA-onaylı bir antikör olması, ayrıca klinik ortamda EGFRt'nin intihar geni potansiyelini kolaylaştırır.

Diğer düzenlemelerde, kesik epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFRt) seleksiyon epitopu veya diğer bir modifiye edilmiş hücre-yüzeyi molekülü diğer dizilere bağlanır. Bir örnek dizi, EGFRt'ye bağlı, yüzey ifadesini yönlendiren, GMCSFR alfa zinciri sinyal dizisidir. GMCSFR, nükleotidler 1-66 tarafından kodlanır ve EGFRt SEQ ID NO: 1'e ait nükleotidler 67-1071 tarafından kodlanır. Şekil 7'ye bakınız. Ayrıca Şekil 7'de, EGFRt'ye bağlı GMCSFR alfa zinciri sinyal dizisine ait antisens dizisi (SEQ ID NO: 2) ve amino asit (SEQ ID NO: 3) dizileri bulunur. Bu tür diğer bir dizi, bir anti-CD19 kostimülatör kimerik antijen reseptörünü (CD19R-CD28gg-Zeta(CO)) ve ayrılabilir bir T2A bağlayıcısını kodlayan kodon-optimizeli bir cDNA dizisidir. Sitoplazmik CD3- ζ alanına kaynaşık hale gelen sitoplazmik kostimülatör (CD28) bir alan aracılığıyla sinyal yollayan CD19'a özgü kimerik bir antijen reseptörünü (CAR) ifade etmek üzere modifiye edilen sitotoksik T lenfositleri (CTL'ler), CD28-aracılı hayatta kalma ve geliştirilmiş sitokin üretimine atfedilen daha üstün anti-tümör potansiyeli gösterir.

- Bu yapı, ayrıca setüksimab-biyotin/anti-biyotin mikro boncukları kullanılarak CAR-ifadeli transdüktanların immünomanyetik olarak saflaştırılması amacı ile kesik bir insan EGFR'sine (EGFRt) yönelik bir C-terminal 2A ayrılabilir bağlayıcı, akabinde kodlayıcı dizi içermek üzere modifiye edilebilir. Şekil 8
- 5 olarak eklenen CD19R-CD28gg-Zeta(CO)-T2A-EGFRt dizisi, SEQ ID NO'lar 4 (nükleotid sens dizisi), 5 (nükleotid anti-sens dizisi) ve 6'ya (protein) bakınız. Primer insan T hücrelerinin bu kodon-optimizeli cDNA ile lentivektör transdüksiyonu, CAR ve EGFRt'nin koordineli ifadesini yönlendirir (Şekil 9).
- 10 Aksi halde ilerideki seleksiyon olmadan transdüksiyon prosedürlerinin özünde olan transgen ifade ürünleri arasındaki değişkenliği ortadan kaldırmak üzere, CliniMACS cihazı (MiltenyiBiotec, BergischGladbach, Almanya) kullanılarak immünomanyetik seleksiyon ile uyumlu immünojenik-olmayan bir seleksiyon epitopu (EGFRt) geliştirilmiştir. Örneğin, EGFRt membran distal EGF-bağlayıcı
- 15 alanı ve ektoplazmik sinyalleşme kuyruğu bulunmayan kesik bir insan epidermal hücre faktörü reseptörüdür, ancak ticari anti-EGFR mAbsetüksimabı tarafından tanınan hücre dışı membran proksimal epitopunu tutar. Şekil 1'e bakınız. Biyotinlenmiş-setüksimab, anti-biyotin mikro boncukları (Miltenyi) ile kombinasyon halinde immünomanyetik seleksiyona uygulanır. CD19R-CD28gg-
- 20 Zeta(CO)-T2A-EGFRt ile lentiviral olarak transdüse edilen insan OKT3 patlamaları, MiltenyiAutoMACS cihazı kullanılarak immünomanyetik seleksiyona tabi tutulmuştur ve EGFRt+CAR+ T hücrelerinin sıklığı, hücre preparatı bakımından gözlenebilir toksisite olmadan %22'den (seleksiyon öncesi) %99'a (seleksiyon sonrası) arttırılmıştır (Şekil 3). İmmünomanyetik ayırmanın
- 25 yerine veya buna ek olarak EGFRt'nin floresan temelli hücre ayırma teknikleri kullanılarak saflaştırılması aynı zamanda mümkündür.

- EGF-bağlayıcı alanlar ve hücre içi sinyalleşme alanlarının yokluğundan dolayı, EGFRt T hücreleri tarafından ifade edildiğinde aktif değildir. Önemli bir şekilde,
- 30 EGFRt ile seçilen T hücreleri istenilen efektör fenotiplerini muhafaza eder - buna EGFRt ile koordineli olarak ifade edilen kimerik antijen reseptörü aracılı olan

anti-tümör sitotoksik aktivite dahildir ve var olan genişleme protokollerine göre uygun olmaya devam eder.

Sonuç olarak, bu EGFRt önceden belirtilmiş olan diğer seleksiyon markörleri ile karşılaştırıldığında immünoterapötik hücre ürünlerine yönelik birçok avantaja sahiptir. Spesifik olarak, kesik CD4 ve CD19'un aksine bu, lenfositlerin alt popülasyonları tarafından endojen olarak ifade edilmez. İlaveten, kesik CD34 ve düşük afiniteli büyüme faktörü reseptörünün aksine, immün hücre ürünlerini negatif olarak etkileyebilecek (yani, sinyalleşme veya trafik bakımından) herhangi bir aktiviteye sahip değildir. Son olarak, tek başına bilinen, tercihen ticari olarak temin edilebilen, farmasötik dereceli antikör reaktifine, yani, setüksimaba bağlanabilir/tanınabilir. Birlikte, bu katkılar adoptif immünoterapi bakımından hücre ürünlerinin üretimine uygulanabilen herhangi bir transfeksiyon/transdüksiyon sistemine yönelik EGFRt'yi daha üstün bir seleksiyon markörü yapar. Bu yüzden, EGFRt immünoterapötik olarak alakalı olan lentiviral olarak transdüse edilen T hücrelerine yönelik bir seleksiyon markörü olarak kullanılmak üzere oldukça uygundur.

Aynı zamanda, aşağıdaki kriterlere sahip yeni terapötik hücre ürünlerinin tanımlanmasına yönelik yöntemler sağlanır: terapötik olarak kullanılabilir olması amaçlanan öznde modifiye edilmiş olarak endojen bir şekilde ifade edilmeyen modifiye edilmiş bir endojen hücre-yüzeyi molekül, ligandı veya reseptörü, ürünün veya ürünün uygulanacağı öznenin işlevselliğini engelleyebilecek ve bilinen bir antikör tarafından tanınabilecek herhangi bir immünoaktiviteye veya diğer bir işlevsel aktiviteye sahip değildir.

Örnekler, buluşun anlaşılmasına yardımcı olmak üzere belirtilir, ancak herhangi bir şekilde bunun kapsamını kısıtlama amacını taşımaz veya kısıtlamak üzere oluşturulmamalıdır. Örnekler, klasik yöntemlerin detaylı açıklamalarını içermez. Bu tür yöntemler, teknikte uzman kişilerce iyi bilinir ve sayısız yayında açıklanır.

Örnek 1: EGFRt'nin üretilmesi ve EGFRt ifade eden T hücrelerinin immünomanyetik seleksiyonu

Materyaller & Yöntemler

5

Antikorlar ve Akış Sitometrisi

FITC-, PE- ve PerCP ile konjuge edilen izotip kontrolleri, PerCP ile konjuge edilen anti-CD8, FITC ile konjuge edilen anti-CD4, PE ile konjuge edilen anti-IFNy, PerCP ile konjuge edilen anti-CD45 ve PE ile konjuge edilen streptavidin, BD Biosciences'dan (San Jose, Kaliforniya) elde edilmiştir. Biotinlenmiş anti-Fc, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. (Westgrove, PA) şirketinden alınmıştır. PE ile konjuge edilen anti-Biotin, MiltenyiBiotec (Auburn, Kaliforniya) şirketinden alınmıştır. Biotinlenmiş EGF, Molecular Probes® Invitrogen (Carlsbad, Kaliforniya) şirketinden alınmıştır. PE ile konjuge edilen anti-EGFR, Abcam Inc. (Cambridge, MA) şirketinden alınmıştır. Tüm antikorlar ve biyotin-EGF, üreticinin talimatlarına göre kullanılmıştır. Akış sitometrik verisini, bir FACScalibur (BD Biosciences) ile gerçekleştirilmiştir ve bir analiz bölgesindeki hücre yüzdesi FCS Express V3 (De Novo Software, Los Angeles, Kaliforniya) kullanılarak hesaplanmıştır.

Biotinlenmiş-setüksimabın üretimine yönelik, 200mg setüksimab (Erbitux®), 527mL bir MidGee Halka Kartuşu (UFP-30-E-H42LA) kullanılarak PBS'ye (D-PBS, pH 7.5± 0.1) tampon ile değiştirilmiştir (19 saat). 2mg/mL'deki materyal akabinde oda sıcaklığında 1 saat gerçekleştirilen bir reaksiyonda Sulfo-NHS-LC-Biotin kullanılarak 20:1 oranında modifiye edilmiştir ve akabinde aşırı biyotini uzaklaştırmak üzere diyafiltrelenmiştir. 200 mg biyotinlenmiş setüksimab, akabinde 533 mL MidGee Halka Kartuşu (UFP-30-E-H42LA) kullanılarak PBS'ye (D-PBS, pH 7.5± 0.1) tampon ile değiştirilmiştir (18 saat). Gliserol, % 20 olan nihai bir konsantrasyona eklenmiştir ve akabinde materyal küçük şişelerin içinde dondurulmuştur.

Hücre hatları

- Aksi belirtilmediği sürece, tüm hücre hatları, bundan sonra kültür ortamı olarak refere edilen (CM) olarak 2 mM L-glutamin (Irvine Scientific), 25 mM N-2-hidroksietilpiperazin-N'-2-etansülfonik asit (HEPES, Irvine Scientific), 100 U/mL penisilin, 0.1 mg/mL streptomisin (Irvine Scientific) ve %10 ısı ile devre dışı bırakılan fetal dana serumu (FCS, Hyclone, Logan, UT) ile takviye edilen RPMI 1640'da (Irvine Scientific, Santa Ana, Kaliforniya) muhafaza edilmiştir.
- 10 T hücrelerini üretmek üzere, insan periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC), City of Hope Ulusal Tıp Merkezi İç Denetleme Kurulu-onaylı bir protokole katılan rızası alınan sağlıklı donörlerden elde edilen heparin uygulanmış periferik kandan Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) üzerinde yoğunluk gradyanı santrifüj işlemi ile izole edilmiştir. Hat A'nın üretimine yönelik
- 15 yıkanmış PBMC, 25U/mL IL-2 ve 1:1 (hücre:boncuk) oranına sahip bir Dynabeads® İnsan T genişleticisi CD3/CD28 (Invitrogen, Carlsbad, Kaliforniya) ile stimüle edilmiştir. Diğer hatların üretimine yönelik yıkanmış PBMC, ilk önce kullanıcının her bir protokolü için anti-CD45RA boncukları (MiltenyiBiotec) kullanılarak utoMACS™ ile sonuna kadar tüketilmiştir ve bazı durumlarda aynı
- 20 zamanda anti-PE boncuklar (MiltenyiBiotec) içeren PE ile konjuge edilen anti-CD4 (BD Biosciences) ile sonuna kadar tüketilmiştir. Ortaya çıkan hücreler akabinde saflaştırılmış CD62L⁺CD45RO⁺ T_{CM} üretmek üzere biyotinlenmiş DREG56 (anti-CD62L) ve anti-biyotin boncukları (MiltenyiBiotec) kullanılarak autoMACS™ pozitif seleksiyona tabi tutulmuştur. CD8⁺ hücreleri üreticinin her
- 25 bir protokolüne yönelik AutoMACS™ (MiltenyiBiotec) kullanılarak bazı durumlarda ayrıca seçilmiştir. CMV'ye özgü hücreler, spesifik-olmayan stimülasyondan kaçınmak üzere FCS'nin yerine %10 insan serumu kullanılarak üç hafta boyunca haftada bir 4:1 (cevap veren: stimülatör) olan bir oranda 5U/ml rhIL-2 (Chiron, Emeryville, Kaliforniya) ile T hücrelerinin ve otolog radyasyona
- 30 maruz kalmış viral antijen bulunduran hücrelerin stimüle edilmesi ile üretilmiştir.

Viral antijen bulunduran hücreler, CMVpp65 antijenini ifade etmek üzere genetik olarak modifiye edilmiş olan PBMC'den derive edilmiştir.

PBMC, İnsan T hücresi Nükleofektör kiti (Amara Inc., Gaithersburg, MD) kullanılarak nükleofeksiyon solüsyonunda tekrardan süspanse edilmiştir ve 5×10^7 hücreleri, 100 pL/küvet olan nihai bir hacimde 10µg HygroR-pp65_pEK (veya Amara Inc. şirketinden pmaxGFP, bir transfeksiyon kontrolü olarak) içeren 0.2-cm küvetlerin içine sıvı bölüntü haline getirilmiştir ve bundan sonra hücrelerin γ -ışınlanmasından (1200 cGy) önce 37°C'de 6 saat toparlanmasına izin verilmiştir.

CD19CAR-T2A-EGFRt_epHIV7 (pJ02104) ve CD19CAR-T2A-EGFRt-T2A-IMPDH2dm_epHIV7 (pJ02111) lentiviral yapıları, belirtildiği üzere a) CD19'a özgü FmC63 mAb, bir IgG1 bağlı-CH₂-CH₃, kostimülatör molekül CD28'in transmembran ve sitoplazmik sinyalleşme alanları ve CD3 ζ zincir[10] kısmının sitoplazmik alanına ait V_H ve V_L geni bölümlerinden oluşan kimerik antijen reseptörü (CAR) dizilerini; b) kendiliğinden-ayrılan T2A dizisi[11] kısmını; c) kesik EGFR dizisini (Şekil 1'e bakınız) ve d) MPA-direnci sunan IMPDH2 çift mutantı içerir. Lentiviral transdüksiyon, 1:10 olan bir oranda 30 ng/mL anti-CD3 ϵ (OKT3; Ortho Biotech, Raritan, NJ) (yani, Hat A'ya yönelik) veya insan CD3/CD28Dynal boncukları (yani, Hatlar B, C, D ve E'ye yönelik) ve 25U IL2/ml ile stimüle edilen T hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. Hücreler, 3 MOI olarak lentivirüs ve 5µg/ml polibrenin eklenmesinden önce RetroNectin® (50ug/ml) kaplı plakaların üzerinde 37°C'de 2 saat kadar kültürlenmiştir. 4 saat sonra, sıcak ortam hacmi üçe katlamak üzere eklenmiştir ve hücreler akabinde yıkanmıştır ve 48 saat sonra taze ortamda kaplanmıştır. EGFRt-ifade eden hücrelerin AutoMACS™ ile ayrılması, üreticinin her bir talimatı için biyotinlenmiş setüksimab ve anti-biyotin mikro boncukları (MiltenyiBiotec) ile gerçekleştirilmiştir. Hızlı genişleme ortamında (REM) T hücrelerinin genişlemesi, gün 1'den başlayarak 48 saatte bir 50U/mL rhIL-2 ve 10ng/ml rhIL-15 (CellGenix) eklenmesi ile 50 mL CM içinde 30 ng/mL anti-CD3 ϵ (OKT3; Ortho

Biotech, Raritan, NJ), 5×10^7 γ ile ışınlanmış PBMC'ler (3500 cGy) ve 10^7 γ ile ışınlanmış LCL'ler (8000 cGy) ile 10^6 T hücrenin inkübasyonunu içermiştir. T hücreleri 14 günde bir bu şekilde tekrardan stimüle edilmiştir.

- 5 EBV ile transforme edilen lenfoblastoid hücre hatları (LCL'ler) önceden açıklandığı üzere PBMC'den yapılmıştır [13]. LCL-OKT3 hücreleri, AmaxaNükleofektör kiti T kullanılarak nükleofeksiyon solüsyonu içinde LCL'nin tekrardan süspanse edilmesi, $5\mu\text{g}/10^7$ hücrelerinde OKT3-2A-Higromisin_pEK (pJ01609) plazmidinin eklenmesi ve AmaxaNükleofektör I (program T-20)
- 10 kullanılarak elektroliz yöntemi ile gözenekli hale getirilmesi yoluyla üretilmiştir. Ortaya çıkan LCL - OKT3-2A-Higro_pEK (cJ03987), 0.4mg/ml higromisin içeren CM içinde büyütülmüştür. Fare miyelom hattı NS0 (Andrew Raubitschek'den hediye, City of Hope Ulusal Tıp Merkezi, Duarte, Kaliforniya), Nükleofektör kiti T (Amaya Inc., Gaithersburg, MD) kullanılarak nükleofeksiyon
- 15 solüsyonunun içinde tekrardan süspanse edilmiştir, CD19t-DHFRdm-2A-IL12_pEK (pJ01607) veya GFP-IMPDH2dm-2A-IL15_pcDNA3.1(+) (pJ01043) plazmidi, $5\mu\text{g}/5 \times 10^6$ hücrelerine eklenmiştir ve hücreler AmaxaNükleofektör I (program T-27) kullanılarak elektroliz yöntemi ile gözenekli hale getirilmiştir. Ortaya çıkan NS0 - CD19t-DHFRdm-2A-IL12_pEK (cJ03935) ve NS0 -
- 20 GFP:IMPDH2-IL15(IL2ss)_pcDNA3.1(+) (cJ02096), 0.05uM metotreksat (MTX) veya 6 μM mikofenolik asidin (MPA) varlığında %10 ısı ile devre dışı bırakılan FCS, 25mM HEPES ve 2 mM L-glutamin ile takviye edilen DMEM'nin (Irvine Scientific, Santa Ana, Kaliforniya) içinde büyütülmüştür. U251T olarak adlandırılan U251'in tümörjenik suşu, Dr. WaldemarDebinski (Wake Forest,
- 25 New York) tarafından verilen zarif bir hediye olmuştur. U251T-pp65, 1 MOI'de pp65-2A-eGFP-ffluc_epHIV7 (pJ01928) ile U251T'nin lentiviral transdüksiyonu tarafından üretilmiştir. Ortaya çıkan U251T - pp65-2A-eGFP-ffluc_epHIV7, akabinde GFP⁺ popülasyonuna (cJ05058) yönelik FACS ile ayrılmıştır. Daudi lenfoma hattı, ATCC'den satın alınmıştır ve RPMI 1640 (Irvine Scientific), 2
- 30 mM L-Glutamin (Irvine Scientific), %10 ısı ile devre dışı bırakılan FCS'den

(Hiklon) oluşan ortamda büyütülmüştür. SupB15 akut lenfoblastik lösemi hücreleri ve A431 epidermoid karsinoma hücreleri, ATCC'den satın alınmıştır.

Protein Analizi

5

Hücreler (10^7 'ye kadar), fosfataz inhibitör kokteyli II'yi (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) (hacim olarak 1:20 inhibitör ila tampon) içeren 80µL olarak %1 Triton-X liziz tamponu ile çözünmüştür. 50µg protein, her bir şeride yüklenmiştir ve Western blotları, üreticinin her bir talimatına göre Fosfo-EGF reseptör antikoru numune kiti (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA) akabinde IRDye™ 680CW veya 800CW ile konjuge edilen keçi anti-tavşan antikoları (LI-COR, Lincoln, NE), aynı zamanda IRDye™ 800 ile konjuge edilen anti-beta-Aktin antikorundan (LI-COR) antikolar ile sonda yoluyla incelenmiştir. Blotlar, Odyssey Kızıl Ötesi Görüntüleme Sistemi'nde (LI-COR) görüntülenmiştir.

15

Kromiyum-salınım analizleri

T hücrelerinin sitolitik aktivitesi, 4-saatlik kromiyum-salınım analizi (CRA) tarafından belirlenmiştir, burada efektör hücreler, 200 uL CM içinde çeşitli E:T oranlarında 5×10^3 ^{51}Cr -etiketli hedef T hücrelerini ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$; (5mCi/mL); Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ) içeren V-altı 96-gözlü mikro-plakaların üç misli gözlerine ekilmiştir ve %5 CO_2 , 37°C'de 4 saat inkübe edilmiştir. Plakalar santrifüjlenmiştir ve 100 µl süpernatant bir γ-sayacı (Packard Cobra II, Downer's Grove, IL) kullanılarak kromiyum salınımını değerlendirmek üzere her bir gözden uzaklaştırılmıştır. Spesifik liziz yüzdesi, aşağıdaki gibi hesaplanmıştır: $100 \times (\text{deneysel salınım} - \text{kendiliğinden salınım}) / (\text{maksimum salınım} - \text{kendiliğinden salınım})$. Maksimum salınım, %2 SDS ile çözünen etiketlenen hedefleri içeren gözlerdeki ^{51}Cr içeriğinin ölçülmesi ile belirlenmiştir.

30 Antikora bağlı hücre aracılı sitotoksiste, 10µg/mL kadar setüksimab veya rituksimab (CD20'ye özgü bir mAb) ile 90 dakika önceden inkübe edilen 5×10^3

⁵¹Cr-etiketli hedef T hücreleri kullanılarak yukarıdaki gibi kromiyum salınımı ile belirlenmiştir, yıkanmıştır ve akabinde 5×10^5 taze izole PBMC ile birlikte inkübe edilmiştir.

5 *T hücre melezlemesi ve in vivo olarak setüksimab aracılı intihar*

T hücre melezlemesine yönelik, altı ila on haftalık NOD/*Ckby* IL-2R γ C^{sifir} fareleri 10^7 T hücreleri ile gün 0'da damar yoluyla enjekte edilmiştir (Hat C). 2×10^7 ışınlanan (8000 rad) NS0 - GFP:IMPDH2-IL15(IL2ss)_pcDNA3.1(+) (cJ02096) hücreleri, *in vivo* olarak insan IL-15'in sistematik tedarikini sağlamak üzere gün 0'dan başlayarak haftada 3 kez intraperitoneal yolla uygulanır. Kemik iliği, ötenazi uygulanmış hayvanlardan hasat edilmiştir ve akış sitometrisi ile analiz edilmiştir. Antikora bağlı hücre aracılı sitotoksiste analizleri, EGFRt⁺ T hücrelerine karşı setüksimabın aktivitesini belirlemek üzere gerçekleştirilir.

15

Sonuçlar

EGFRt ifade eden T hücrelerinin immünomanyetik seleksiyonu

20 Tüm uzunluğa sahip EGFR'nin sadece transmembran alanı ve hücre dışı alanları III ve IV'ü içeren kesik bir insan EGFR (EGFRt), immünomanyetik seleksiyon ile uyumlu immünojenik-olmayan bir seleksiyon epitopu olarak üretilmiştir. Şekil 1'de gösterildiği üzere molekül modeli, EGFRt setüksimab ile bağlanma özelliğini korur, ancak hücre içi alanların yokluğundan dolayı herhangi bir sinyalleşme 25 kapasitesine sahip değildir. İlaveten, EGF-bağlanmasına yönelik gerekli olan N-terminal alanı bulunmaz.

EGFRt-ifade eden hücrelere yönelik immünomanyetik olarak seçmek üzere, biyotinlenmiş-setüksimab, ticari olarak temin edilebilen anti-biyotin mikro 30 boncukları ve bir AutoMACS™ ayırıcısı (MiltenyiBiotec) (Şekil 2c) ile birlikte kullanılmak üzere üretilmiştir (Şekil 2a, b). EGFRt-içeren yapılar ile çeşitli T

hücre hatlarının lentiviral transdüksiyonu, burada EGFRt geni, kendiliğinden-
ayrılan T2A dizisi ile bir veya her iki tarafta ilgili diğer genlerden ayrılmıştır,
%40'tan daha az hücrede EGFRt molekülünün yüzey tespiti ile tutarlı olarak
sonuçlanmıştır (Şekil 2d). Yüzey tespiti, aynı zamanda bir EGFRt-sr39TK
5 füzyonu ile sağlanabilir. İmmünomanyetik seleksiyon, %90'dan daha fazla saflık
ile EGFRt⁺ T hücre popülasyonlarının toparlanmasına izin vermiştir. T hücre
popülasyonları bu transdüksiyonu yaşamıştır ve seleksiyon prosedürü, anti-
CD3/anti-CD28 boncuk ile stimüle edilen T hücre patlamalarını (Hat A'ya
yönelik), merkezi bellek (CD45RO⁺CD62L⁺ T_{CM}) ile derive edilen T hücrelerini
10 (Hatlar B, C ve E'ye yönelik), bu bazı durumlarda aynı zamanda CMV
spesifikliği (endojen TCR aracılığıyla; Hat B'ye yönelik) veya CD8 ifadesine (Hat
C'ye yönelik), aynı zamanda efektör bellek (CD62L⁻CD45RO⁺ T_{EM}) ile derive
edilen T hücrelerine (Hat D'ye yönelik) yönelik önceden seçilmiştir. Bu veriler,
orijinal transdüksiyon etkinliğinin %2 kadar düşük olması halinde bile,
15 EGFRt'nin T hücre transdüktanlarının çeşitli kaynaklarına yönelik bir seleksiyon
markörü olarak başarılı bir şekilde kullanılabileceğini gösterir.

Seçilen T hücrelerinde EGFRt'nin inaktivitesi

20 EGFRt'nin aktif olmadığını doğrulamak üzere, EGFR fosforilasyonuna yönelik
Western immünoiblot analizleri, EGF veya setüksimab ile kültür işleminden sonra
EGFRt-seçilen T hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. Beklendiği üzere, setüksimab
EGFR⁺ hücre hattı A431'de bile yukarıda arka planda EGFR fosforilasyonunu
başlatmamıştır (Şekil 3A). İlaveten, A431 hücreleri ile görülen aksine, EGF ile
25 birlikte inkübasyondan sonra Hat A'nın lizatlarında herhangi bir fosforilasyon
görülmemiştir. Gerçekten de, biyotinlenmiş EGF kullanılarak, akış sitometrik
analizi, EGF'nin beklendiği üzere N-terminusunda bulunan kesikten dolayı
EGFRt-seçilen T hücrelerini bağlayamadığını doğrulamıştır (Şekil 3b). Bu
EGFRt⁺ T hücreleri, aynı zamanda setüksimabdan ayrı herhangi bir diğer anti-
30 EGFR antikoru tarafından tanınmamıştır.

Genişlemiş EGFRt⁺ CD19CAR⁺T hücrelerinde efektör fenotipinin korunması

AutoMACS™ ayırma işleminden hemen sonra, seçilen T hücreleri OKT3, 5 ışınlanmış PBMC besleme hattı ile LCL, IL-2 ve IL-15 ile birlikte REM stimülasyonundan sonra 12 gün içinde 30-kat veya daha fazla genişlemiştir (Şekil 4a). Ortaya çıkan genişlemiş EGFRt⁺ T hücrelerinin akış sitometrik analizi, ayrıca bunların CD19CAR ve CD8, TCR, CD3, perforin, granzim vb. gibi T hücre markörlerini ifade ettiklerini doğrulamıştır (Şekil 4b). İlaveten, bu EGFRt-seçilen 10 hatların CD19CAR ile yönlendirilen sitotoksik aktivitesi, CD19-ifade eden tümör hedefleri kullanılarak kromiyum salınım analizlerinde açıkça görülmüştür (Şekil 4c). Hat E'nin CD19'a özgü yeniden aktivitesi karşısında bunun seçilmemiş veya 'parental' kopyasının direkt bir karşılaştırması, EGFRt-seleksiyonundan sonra geliştirilmiş CD19CAR-aracılı sitotoksikite olduğunu gösterir. Ek olarak, 15 CMV'ye özgü T_{CM} ile derive edilen CD19CAR⁺EGFRt Hat B hücreleri, aynı zamanda CMV-pp65 antijenini ifade eden hedeflere karşı bunların endojen T hücre reseptörleri yoluyla sitotoksik aktiviteyi gösterir.

CD19CAR⁺EGFRt⁺IMPDH2dm⁺ Hat E'ye yönelik, inosin monofosfat 20 dehidrogenaz 2 çift mutantının (IMPDH2dm), IMPDH2-inhibitör mikofenolik asidine (MPA; organ naklinde reddetme durumunu önlemek üzere kullanılan yaygın bir immünosüpresan) karşı direnç gösterme kabiliyeti, aynı zamanda test edilmiştir. 1 uM MPA'da kültür işleminden sonra, Hat E hücrelerinin hayatta kalması ve/veya çoğalması engellenmez (Şekil 4d). Bu durum, IMPDH2dn geni 25 ifadesi bulundurmayan bir kontrol T hücre hattı ile görülen inhibisyona terstir. Bu veriler, EGFRt-aracılı seleksiyonun T hücrelerini transdüse etmek üzere kullanılan lentiviral yapıda mevcut olan diğer genlerin karşılık gelen seleksiyonu ile sonuçlandığına dair daha fazla kanıt sağlar.

EGFRt⁺ T hücrelerinin in vivo olarak takip edilmesi

- İn vivo olarak melezlenen T hücrelerinin tespit edilmesine yönelik potansiyeli test etmek üzere, CD19CAR⁺EGFRt⁺Hat C ile melezlenmiş olan farelerden toplanan kemik iliği hücreleri, biyotinlenmiş setüksimab kullanılarak akış sitometrisi ile analiz edilmiştir (Şekil 5). T hücrelerini almamış olan kontrol fareleri, murin EGFR'ye karşı setüksimabın biraz karşı-reaksiyon gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Bu yüzden, melezlenen Hat C hücrelerinin başarılı olarak tespit edilmesinin hem insan CD45 hem de EGFRt'ye yönelik çift lekeleme gerektirdiği belirlenmiştir.
- Hücreler, aynı zamanda biyopsi materyalinin görüntülenmesine yönelik potansiyeli belirlemek üzere immünhistokimya kullanılarak analiz edilebilir.

EGFRt⁺ T hücrelerinin setüksimab aracılı sitotoksitesi

- Setüksimabın antikora bağlı hücre aracılı sitotoksiste (ADCC) aracılığıyla EGFR-ifade eden hücreleri çözdüğünün bilinmesinden dolayı, analizler EGFRt⁺T hücrelerine karşı setüksimabın ADCC aktivitesini belirlemek üzere gerçekleştirilmiştir (Şekil 6). ⁵¹Cr ile etiketlenen Hat A hücreleri hedeflenen olarak ve taze izole insan PBMC'nin efektör olarak kullanılması yoluyla, CD20'ye özgü insanlaştırılmış mAbRituksan kullanılırken setüksimabın yukarıda görüldüğü üzere kromiyum-salınımına büyük ölçüde aracı olduğu bulunmuştur.

EGFRt⁺ T hücrelerinin terapötik kullanımının örneği

- Otolog bir miyeloablatif kök hücre nakli prosedürüne yönelik aday olan yüksek riskli orta dereceli β -hücre lenfomasına sahip yetişkin özneler, adoptif olarak transfer edilen otolog Tcm ile derive edilen CD19R⁺ CD8⁺ EGFRt⁺ T hücre greftleri ile nakil-sonrası immünoterapi alabilir. Her hastadan toplanan bir lökoferez ürünü, Tcm seleksiyonu, klinik dereceli CD19CART2A-EGFRt_epHIV7 ile transdüksiyon ve akabinde kapalı bir sistemde EGFRt⁺ hücrelerinin seleksiyonu ve genişlemesini yaşar. Elde edilen hücre ürünleri

- (sterilite ve tümöre özgü sitotoksosite testleri dahil olmak üzere) kalite kontrol testlerinden geçirildikten sonra, dondurulmuşlardır. Öte yandan, lökoferezi takiben, çalışma katılımcıları sitoredüktif kemoterapi ve G-CSF ile oto HSC toplama işlemine yönelik mobilizasyon ile birlikte standart kurtarma kemoterapisine başlar. EGFRt ile seçilen, CD19'a özgü T hücrelerinin aynı zamanda normal CD20⁺(CD19⁺) B hücrelerini hedefleyecek olmasından dolayı, B hücre sayıları ilk önce genetik olarak modifiye edilmiş CTL'nin alınmasından sonra alıcının enflamatuvar yanıtını azaltmak üzere Rituximab™ kullanılarak azaltılabilir ve aynı zamanda lenfoma hücrelerini derhal hedef almak üzere infüzyon T hücrelerinin kullanılabilirliğini artırır. İlaveten, Rituximab™ genetik olarak modifiye edilmiş T hücrelerine karşı humoral bir immün tepkisini köreltebilir. Rituximab™'nin Kurtarma/Hazırlayıcı kemoterapi rejiminin bir parçası olarak verilmemesi halinde, araştırma katılımcıları 4 haftalık planlı oto-HSCT prosedürünün içinde 375 mg/m²'de tek bir intravenöz Rituximab™ infüzyonunu alabilir (kimerik anti-CD20 antikoru). Rituximab™ infüzyonu, difenhidramin ve asetaminofen ve hidrokortizon ile premedikasyon dahil olmak üzere standart uygulama başına gerçekleştirilebilir. HSCT'den sonra Gün +2 veya Gün +3'te, otolog dondurulmuş CD19R + CD8 + EGFRt + T hücre ürünü taşınacaktır, eritilecektir ve hasta yatağında infüzyon yöntemi ile uygulanacaktır.
- Araştırma katılımcıları, T hücresi infüzyonundan en az 30 dakika önce 15 mg/kg asetaminofen P.O (maksimum 650mg) ve difenhidramin 0.5-1 mg/kg I.V. (maksimum doz 50mg) ile önceden ilaç ile tedavi edilebilir. Klinik ve laboratuvar korelasyon takip çalışmaları akabinde hekimin takdirine göre yapılabilir ve CD19 ifade eden lenfoma hücrelerinin ve/veya adoptif olarak transfer edilen T hücrelerinin varlığına yönelik kantitatif RT-PCR çalışmalarını, FDG-PET ve/veya CT taramalarını;
- hastalığa özgü patolojik değerlendirmeye yönelik kemik iliği muayenesini; lenf düğümü biyopsisini ve/veya gen transferi çalışmalarında uygulanan FDA'nın Biyolojik Tepki Değiştiriciler Danışma Komitesi tarafından belirlenen rehber ilkelere göre uzun süreli takibi içerebilir. Şekil 10, mevcut ürünlerin ve yöntemlerin klinik olarak test edilmesine yönelik olası bir şemayı sağlar.

Mevcut buluş, buluşun birkaç açısının açıklamaları olarak amaçlanan örneklerde açıklanan spesifik düzenlemeler tarafından kapsam bakımından kısıtlanmaz.

REFERANSLAR

5

1. Berger, C, Flowers, ME, Warren, EH, and Riddell, SR (2006). Analysis of transgene-specific immune responses that limit the in vivo persistence of adoptively transferred HSV-TK-modified donor T cells after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 107: 2294-302.

10

2. Tey, SK, Dotti, G, Rooney, CM, Heslop, HE, and Brenner, MK (2007). Inducible caspase 9 suicide gene to improve the safety of allodepleted T cells after haploidentical stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 13: 913-24.

15

3. Fehse, B, Richters, A, Putimtseva-Scharf, K, Klump, H, Li, Z, Ostertag, W, et al. (2000). CD34 splice variant: an attractive marker for selection of gene-modified cells. *Mol Ther* 1: 448-56.

20

4. Gaines, P, and Wojchowski, DM (1999). pIRES-CD4t, a dicistronic expression vector for MACS- or FACS-based selection of transfected cells. *Biotechniques* 26: 683-8.

25

5. Fehse, B, Uhde, A, Fehse, N, Eckert, HG, Clausen, J, Ruger, R, et al. (1997). Selective immunoaffinity-based enrichment of CD34+ cells transduced with retroviral vectors containing an intracytoplasmatically truncated version of the human low-affinity nerve growth factor receptor (deltaLNGFR) gene. *Hum Gene Ther* 8: 1815-24.

30

6. Lemoine, FM, Mesel-Lemoine, M, Cherai, M, Gallot, G, Vie, H, Leclercq, V, et al. (2004). Efficient transduction and selection of human T-lymphocytes with bicistronic Thy1/HSV1-TK retroviral vector produced by a human packaging cell line. *J Gene Med* 6: 374-86.

7. Li, S, Schmitz, KR, Jeffrey, PD, Wiltzius, JJ, Kussie, P, and Ferguson, KM (2005). Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* 7: 301-11.

8. Dawson, JP, Berger, MB, Lin, CC, Schlessinger, J, Lemmon, MA, and Ferguson, KM (2005). Epidermal growth factor receptor dimerization and activation require ligand-induced conformational changes in the dimer interface. *Mol Cell Biol* 25: 7734-42.
- 5 9. Lange, C, Li, Z, Fang, L, Baum, C, and Fehse, B (2007). CD34 modulates the trafficking behavior of hematopoietic cells in vivo. *Stem Cells Dev* 16: 297-304.
- 10 10. Kowolik, CM, Topp, MS, Gonzalez, S, Pfeiffer, T, Olivares, S, Gonzalez, N, et al. (2006). CD28 costimulation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor enhances in vivo persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells. *Cancer Res* 66: 10995-1004.
- 15 11. Szymczak, AL, Workman, CJ, Wang, Y, Vignali, KM, Dilioglou, S, Vanin, EF, et al. (2004). Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. *Nat Biotechnol* 22: 589-94.
- 20 12. Yam, P, Jensen, M, Akkina, R, Anderson, J, Villacres, MC, Wu, J, et al. (2006). Ex vivo selection and expansion of cells based on expression of a mutated inosine monophosphate dehydrogenase 2 after HIV vector transduction: effects on lymphocytes, monocytes, and CD34+ stem cells. *Mol Ther* 14: 236-44.
- 25 13. Pelloquin, F, Lamelin, JP, and Lenoir, GM (1986). Human B lymphocytes immortalization by Epstein-Barr virus in the presence of cyclosporin A. *In Vitro Cell Dev Biol* 22: 689-94.

DİZİ LİSTESİ

<110> JENSEN, Michael C

- 5 <120> TRANSDÜSE T HÜCRE SEÇİMİNE YÖNELİK KESİK EPİDERİMAL
BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜ (EGFRt)

<130> 54435.8070.WO00

- 10 <140> PCT/US2010/055329

<141> 2010-11-03

<150> US 61/257,567

<151> 2009-11-03

- 15

<160> 6

<170> PatentIn versiyonu 3.5

- 20 <210> 1

<211> 1071

<212> DNA

<213> Homo sapiens

- 25

<400> 1

```

atgctttctcc tggtagacag ccttctgctc tgtgagttac caccaccagc attctctctg      60
atcccacgca aagtgtagaa aggaataggt atttgtagat ttaagactc actctctata      120
aatgctacga atattaaaca cttcaaaaac tgcacctcca tcagtggcga tctccacatc      180
ctgcgggtgg cacttagggg tgactcttc acacatactt cttcttggg tccacaggaa      240
ctggatattc tgaaaaccgt aaaggaaatc acagggtttt tgcagattca ggcctggcct      300
gaaaacggg cggacttca tgcctttag aactagaa tctatggg caggatcag      360
caacatggc aqttttctct tgcagtctc agcctgaaca taacatctt cggattacgc      420
tctctaaag agataagtag tggagatgtg ataatttcag gaaaacaaa tttagtgat      480
gaaaatcaca taactggaa aaactgttt cggacctccg gtcagaaac caaattata      540
agaaacagag gtgaaacag ctgaaggcc acaggccagg tctgcatgc cttagctcc      600
cccagggtct gctgggccc ggcgccagg gactgctct cttgcaggaa tctcagccg      660
ggcagggaat gctggaaa gtcacactt ctggagggtg agccaggga gtltctggag      720
aactctgagt gcatacagt ccccccagag tgcctgcctc aggcctatga cctacactgc      780
ataggacggg gaccagaaa ctgatacag tctgcccact acattgacgg ccccactgc      840
gtcaagacct gcccgccagg agtcatggg gaaaacaaa ccttggtctg gaagtacga      900
gacgcgggc atgtgtgca cctgtgcac caaactgca cctacggatg cactgggca      960
ggtcttgaag gctgtccac gaatggcct aagatccct ccatagccac tgggatggt      1020
ggggcctcc ccttgctgt ggtggggcc ctggggatg gctcttcat g      1071

```

5 <210> 2

<211> 1071

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

tacgaagagg accactgttc ggaagacgaq acactcaatg gtgtcggttcg taagcaggac      60
tagggttcgt ttcacacatt gccctatcca taacacatta aatttcctag tgaagagtat      120
ttacgatgct talaatttqt gaagtttttg acgtcgaggt agtcaccgtc agaggtctag      180
gagggccarr gtaaatccc actgaggaaq tctgtatgag gaggagacct aggtgtcttt      240
qacctataag acttttggca ttctctttag tctcccaaaa acgactaagt ccgaaccgga      300
cttttgtctt gcttggaggt acggaactc ttggatcttt agtatgcct gtctgtgttc      360
gttgtaccag tcaaaagaga acgtcaccag tcggaactgt atttgtaggaa cccctaattg      420
agggaagttc tctattcact acctctaac tatttaaaqt ctttgttttt aaacacgata      480
cgtttatgtt atttgacctt ttctgacaaa ccttggaggt cagtcttttg gtcttaatat      540
tcgttgtctc cacttttgtc gacgttcctg tctccgttc agccggtacg gacacagag      600
gggtctccga cgaacccggg cctgggttc ctgacgaga gaacggctt acagtgggt      660
ccgtccctta cgcacctgtt caggttgaa gacctccac tcggttccct caaacacctc      720
ttgagactta cgtatgttac ggtgggttc acggacggag tctgtactt gtagtggag      780
tgtcttgccc ctggctgttt gacataggtc aacgggtga tctaacgac gggggtgag      840
cagttatgga cgggtcgtcc taagtacct cttttgttct gggacagaa cttcatgct      900
ctggggccgg tacacacggt ggacacgga ggtttgacct ggatgcctac gtgacccggt      960
ccagaacttc cgaacaggtt cttaccgga ttctagga cgtacggtg acctaccac      1020
ccccggagg gaaagagga ccccaacga gacccctagc cggagaaqa c      1071

```

5 <210> 3

<211> 357

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1          5          10          15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly
20          25          30

Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe
35          40          45

Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala
50          55          60

```


Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu
 65 70 75 80
 Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile
 85 90 95
 Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu
 100 105 110
 Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala
 115 120 125
 Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu
 130 135 140
 Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr
 145 150 155 160
 Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys
 165 170 175
 Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly
 180 185 190
 Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu
 195 200 205
 Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys
 210 215 220
 Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu
 225 230 235 240
 Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met
 245 250 255
 Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala
 260 265 270
 His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val
 275 280 285
 Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His
 290 295 300
 Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro

02319-P-0001

305 310 315 320
 Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala
 325 330 335
 Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly
 340 345 350
 Ile Gly Leu Phe Met
 355

<210> 4

<211> 3186

5 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

atgctgctac tggtagccag cctcctcctc tgcagactgc cccacccccc cttttctgtc	60
atccccgaca tccagatgac ccagaccacc tcagactga ggcacagct gggcagccgg	120
gtgaccatca gctgcggggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg giatcagcag	180
aagcccgagc gcaacgtaaa gctcctgctc taccacacca gtcggctgca cagcggcgtg	240
cccagccggt tttagcggcag cggctccggc accgaactaca gcttgaccat ctccaaacctg	300
gacagggaag atattgcaac taccctttgc cagcaggga aacacatgca ctacaccttt	360
ggcggcggaa caaagctgga aatcacccgc agccacctcc gcagcggcaa gcttgccagc	420
ggcggggga gcaacagggt tgaagtgaa cctgcaggaa gggcctctgg cctggtggc	480
cccagccaga gcttgagcgt gacctgcacc gtgagcggcg tgagcctgcc cgaactacgc	540
gtgaactgga tccggcagcc ccccaaggaa ggccttggaat ggttgggctg gatctggggc	600
agcgagacaa cctactaaaa cagcgccttg aagagcggcg tgaccatcat caaggacaa	660
agcaagagcc aggtgttctt gaagatgaac agcctgcaga ccaagacac cgcactctac	720
tattgcgcaa agcaactata ctacgggggc agctargcaa tggactactg gggcagggc	780
accagcgtga ccttgagca cgaagcaaa tactgcctc cctgcacccc ttgcctctgc	840
cccaggttcc tgggggggac cagcgtcttc ctgttcccc cccagcccaa ggcacacctg	900
atgatcagcc ggcaccccca ggtgacctgc gtggttggtg acgtgagcca ggaagatccc	960
gaggttcagt tcaattggtt cgtcgacggc gtggaagtgc acacagccaa gaccaagccc	1020
agagaggaac agttcaaccg caccacccgc gtggtgtctg tgcctgacct gctgcaccag	1080
gattggttga acggcaagga atacaagtgc aaggtgttca aaagggcctt gctcagcagc	1140
atcgaaaaga ccaatagaaa ggccaaaggg cagcctctgg agccccaggt gtaacacctg	1200
cttcctctcc aggaagagat gaccaagaa caggtgtccc tgaacttgcct ggtgaagggc	1260

tttatcccca ggcgatatgc cgtggagtgg gaggagaaag ggcagactga gaacaaetac 1320
 aagaccaccc ctcccttact ggcacagcac gccacgttct tectgtacag ccgqctgacc 1380
 gtggacaaga gccgggtggc ggaaggcaac gtcttttagc gtaggtgat gacggaggcc 1440
 ctgcacaacc actatacca gaagagcttg agcctgtccc tgggcaagat gtctgggtg 1500
 ctgggtggtgg tgggtgggtt gctggcttgc taccagctgc tggtagact ggcttccatc 1560
 atcttttggg tggggagcaa ggcgagcaga ggcggccaca ggcactacat gaacatgacc 1620
 cttagcggg ctggcctac tgggaagcac taccagctt atgcctcat cagggaattt 1680
 gccgcctacc ggtccggcgc aqgcgcgctg aaqcttcaaa gaagcgcga cgcctctgc 1740
 taccagcagg gcagaaatca gctgtacaa qagctgaac tgggtgaag ggaagactac 1800
 gacgtcctgg ataaggcgag aggcggggac cctgagatgg gggcaagcc tggggggag 1860
 aatccctagg aaggtctgta taaggaattg cagaagaca agatggcga ggctacagg 1920
 gagatcggca tgaaggcgca ggcgagcgg ggcgaaggcc ccgaaggcc statcaggcc 1980
 ctgtctaccg taccgaagg taccacgac gctctgaca tgaaggcc tgcctcagg 2040
 ctcgagggcg gccgagaggc cagagggaat cttctaacat gccgtgact ggaggagaat 2100
 ctgqctcta ggaatgttct cctggtgaca agcctttctg ttgttgactt aaacaccca 2160
 gaattctctc tgatccccc caaggtgtgt aacggaatag gtattggtga atttaagac 2220
 tcactctcca taattgtac gattattaaa caattcaaa actgacctc cctcagtgc 2280
 gatctccaca tectgcgggt ggcatttagg ggtgaactct taacacatac tctctcttg 2340
 gatacaccag aactggtat tctcaaaac gtaaaagaaa taccagqgtt ttctgtatt 2400
 caggtctggc ctgaaacag gacggacctc catgctttg agaacctaga aatcataggc 2460
 qgcagcacca agcaacatg taagtttct ctttgactg taagctgaa cataacatc 2520
 ttgggttat gctcctcaa ggcataagt gatggagatg tgaatttc aggaacaca 2580
 aattttgtgt atgaatatc aataaactg aaaaactct ttgggacctc cgttcagaaa 2640
 accaaaatta taagcaaac aqctgaaaac agctgcacag caacagqcca ggtctgcct 2700
 gcctttgtgt ccccccagg ctgctggggc ccgagaccca ggaactgct ctcttgcag 2760
 aatgtcagcc gaggtaggga atggtggac aagtgcaacc ttctggagg tgaacaaag 2820
 gagtttgtgg acaactctga gtgcatacag tcccacccag agtgccctgc tcaggccatg 2880
 aatcatcact gcacaggagc gggactagac aactgtatc agtggcga ctacattgac 2940
 ggcacccact gctcaagac ctgcacgca ggaactatg gaaaaaaa caccctgtc 3000
 tggaaatag cagagcggc caatgtgtg caatgtgtg atcacaactc caactacgga 3060
 tgcactgggc caggctctga aggtgtcca acgaatggc ctaagatccc gtccatgcc 3120
 atgggatgg tgggggctt cctctgttg ctggtgggg gctggggat cggctcttc 3180
 atgtga 318b

<210> 5

5 <211> 3186

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

5

```

tacgacgacg accactggtc ggaacgacgac acgcctcgacg gggtagggcg gaaagacgac      60
taggggctgt aggttacttg gggtcggttg aggttagact cggggtcgga cctgttggtc      120
cactggtagt cgaacggcccg gtcggctctg tagtcgttca tggacttgac catagtcttc      180
ttcgggttgc agtggcagtt cgaacgactag atgggtgtggt cggctgacct ctgcctgac      240
gggtcgggca aatcgccgtc gccgagcccg tggctgaggt cggacttgta gaggctggac      300
cttctctctc tatagcggtg gatgaaaacg gtcgtccctt tctgtgacgg gatgtggaca      360
cggccgcctt gtttgacct ttagtggccg tggtagggc cgtcgccctt cgggacgtcg      420
cgcctccctt agtgattacc gctcacttc gacgtctctt cgcaggata cgaaccacgg      480
gggtcggtct cggactcgca ctggacgtg cactcgccg actcggaagg gctgatggcg      540
cactgacact aagccctcgg cgggtctctc ccgacactta ccgaccgca ctgaccccg      600
tcgctctggg agatgatgtt gtcggggac ttctcgccg actggtagta gttctgtttg      660
tcgttctcgg tccacaagga cttctacttg tggacgtct ggtgctgtg gggtagatg      720
atgacgcggt tctgtatgat gctgcgcgg tcgatgcgtt acctgattac cccggtcccg      780
tggtcgcact ggcactcgtc gctctcgttc atgcggggg ggcgggggg aacgggacgg      840
gggtctaaag acccgccctg gtcgacaaag gataaggcg ggttcgggtt cttgtggac      900
tactagtctg cctgggggct ccaactggac caccaccacc tgcactcggt ccttctaggg      960
cttcaggtaa agttaacct gcaactgacg cacttccag tcttgccgtt ctggttcggg      1020
tcctctcttg tcaagttgtc gtcggtggc caccacagac aggactggca cggcgtggtc      1080
ctgaccgact tgcggtttct tatgttccg ttccacaggt tcttccgga cgggtctgtg      1140
tagcttttct ggtagtggtt ccggttcccg gtcggagcgc tgggggtcca catgtggac      1200
ggagggaggg tctctctata ctggttcttg gtcacagcg actggaagg ccaactcccg      1260
aagatggggt agtgtatg gcactcacc cttctggttg cggtagact cttgttgatg      1320
ttctggttgg gagggcacga cctctcgttg cgtcgagga aggacatgtc ggcgactcg      1380
cactgtttct aggtacgtt cttctggttg cagaatcga cgtcgacta cgtgtctcgg      1440
gacgtgttgg tgatgtgggt cttctcgac tgggacagg accggttcta caagaccac      1500
gaccaccacc acccgccca cgaacggac atgtcggaag acaactgtca cgggaagtac      1560
tagaaaacc accgctcggt cgcctcgtct ccgcgggtgt ggtgatgta cttgtacttg      1620

```

ggggtatgccc gaccgggggtg ggccttcctg atggtcggga tgcgggggtgg gtccctgaaa 1680
 cggcggaatgg ccaggccgpc tccggccac ttcaagtcgt ctccgggtt gtcggggatgg 1740
 atggtcgtcc cggctcttagt cgcacatggtg ctccacttgg acccgtcttc ccttctcatg 1800
 ctgcaggac tcttgcctc tccggccctg ggaattacc cgcgcttcgg agccgcttc 1860
 ttgggggtcc ctccggacat attgcttgac gtctttctgt ctaccgggt ccggatgtcg 1920
 ctctagccgt atttccgct tgcctccgc ccgttccgg tcttgcggc catagtcctg 1980
 gacagtggtg gttggttctt atgcatgctg cgggagctgt acgtccggga cgggggttcc 2040
 gagctccgc agctcttcc gtcctctta gaagattgta cgcactga cctctctta 2100
 gggccgggat ctacgaaga ggaccactgt tcggaagag agaccctaa tgggtgtggg 2160
 cgttaaggag actagggtgc gttccacaa ttgcctata ctaaacact taactttctg 2220
 agtgagaggt atttaccatg cttataatt gtgaagttt tgcggtggag gtatgcaccg 2280
 ctgaggtgt aggaaggca ccgaattc cactgaggc agtgtgtatg aggaggagc 2340
 ctagggtgct ttgacctata agacttttg ctttctctt agtgcccaa aaccgactaa 2400
 gtccgaaccg gacttttgc ctgcctggag gtaccgaat tcttgatct ttatgtatcg 2460
 ccgtctcgt tctgtgtacc agtcaaaaga gaacgtcag agtcggactt gtattgtagg 2520
 aacctaatg agagggggtt cctctattc ctacctatc actattaaag tcttttgtt 2580
 ttaaacaga taagtctatg ttattgacc tttttgaa aacctggag gctagcttt 2640
 tggttttat attcgttgtc tccactttg tgcagttcc ggtgtccgt ccagacgta 2700
 cggaacaga gggggctccc gacgacccc ggcctcgggt cctgacgca gagaacggcc 2760
 ttacagtccg ctccgtccct tacgacctg ttccagttc aagacctcc actcgttcc 2820
 ctcaaacac tcttgagat cactatgtc aggttgggtc taccgagcg agtcggtac 2880
 ttgtatgga cgtgtccgc ccttggtctg ttgacatac tccacgggt gatgtactg 2940
 cgggggtga ggcgttttg gacgggctt cctcagiac ctcttttgtt gtcggacag 3000
 acctctatg gtctgcgac ggtacacac gtgcatccg taqgtttgac gtgcatgct 3060
 agtgacccg gtccagact tccgacaggt tctttaccg gattctagg caggtaggg 3120
 tgacctacc acccccgga ggcgaacgac gaccacacc gggacctc cccgagagc 3180
 tacact 3186

<210> 6

<211> 1061

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

```

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1      5      10      15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser
20      25      30

Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser
35      40      45

Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly
50      55      60

Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val
65      70      75      80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr
85      90      95

Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
100     105     110

Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
115     120     125

Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
130     135     140

Thr Lys Gly Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala
145     150     155     160

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu
165     170     175

Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu
180     185     190

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser
195     200     205

Ala Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
210     215     220

Val Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr
225     230     235     240

Tyr Cys Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
245     250     255

```

Pro Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Glu Ser Lys Tyr Gly
 260 265 270
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
 275 280 285
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 290 295 300
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 305 310 315 320
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 325 330 335
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 340 345 350
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 355 360 365
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 370 375 380
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 385 390 395 400
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 405 410 415
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 420 425 430
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 435 440 445
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 450 455 460
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 465 470 475 480
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 485 490 495
 Met Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser
 500 505 510

Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Thr Val Arg Ser Lys Arg
 515 520 525
 Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro
 530 535 540
 Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe
 545 550 555 560
 Ala Ala Tyr Arg Ser Gly Gly Gly Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala
 565 570 575
 Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Cln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu
 580 585 590
 Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly
 595 600 605
 Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu
 610 615 620
 Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser
 625 630 635 640
 Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly
 645 650 655
 Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu
 660 665 670
 His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg
 675 680 685
 Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg
 690 695 700
 Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
 705 710 715 720
 Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly
 725 730 735
 Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe
 740 745 750
 Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala

```

755              760      765
Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu
770              775              780

Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile
785              790              795              800

Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu
805              810              815

Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala
820              825              830

Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu
835              840              845

Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr
850              855              860

Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys
865              870              875              880

Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly
885              890              895

Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu
900              905              910

Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys
915              920              925

Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu
930              935              940

Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met
945              950              955              960

Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala
965              970              975

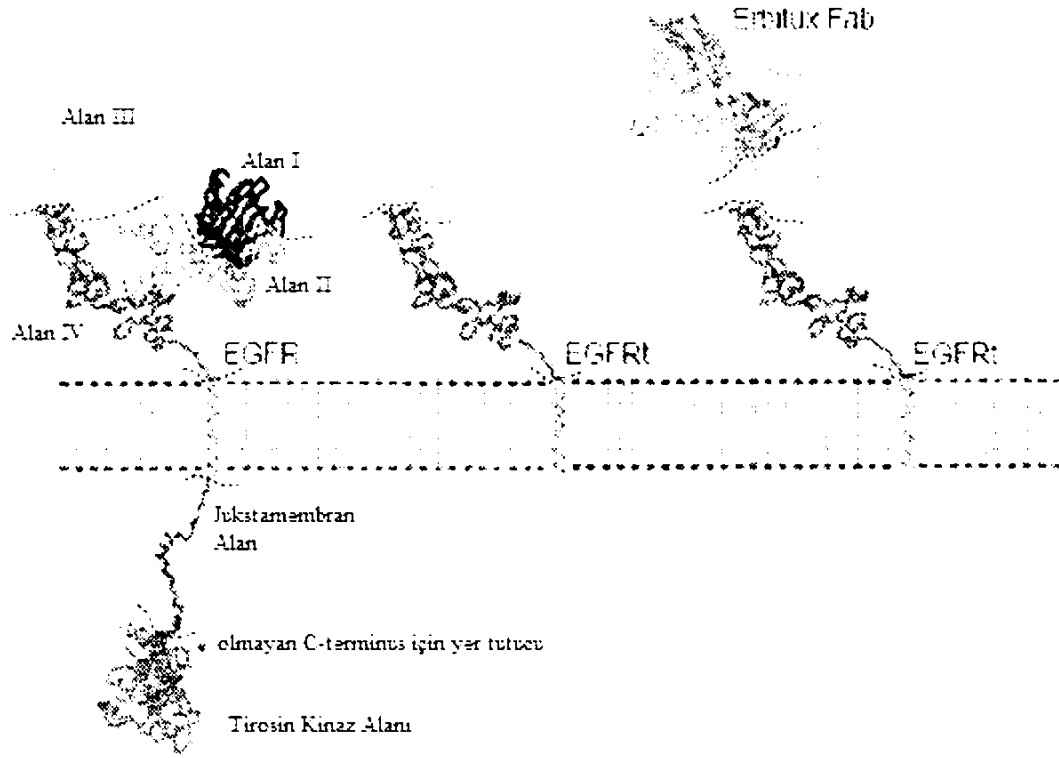
His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val
980              985              990

Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His
995              1000              1005

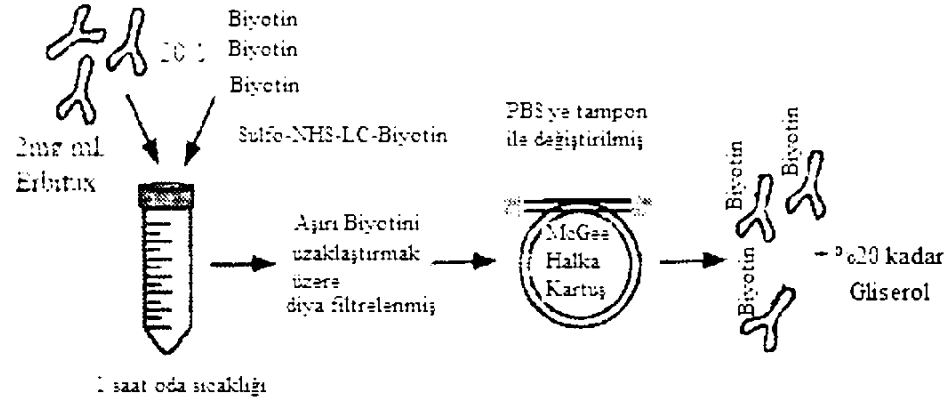
```

Val	Cys	His	Leu	Cys	Phe	Pro	Asn	Cys	Thr	Tyr	Gly	Cys	Thr	Gly
1010						1015					1020			
Pro	Gly	Leu	Glu	Gly	Cys	Phe	Thr	Asn	Gly	Pro	Lys	Ile	Pro	Ser
1025						1030					1035			
Ile	Ala	Thr	Gly	Met	Val	Gly	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Val
1040						1045					1050			
Ala	Leu	Gly	Ile	Gly	Leu	Phe	Met							
1055						1060								

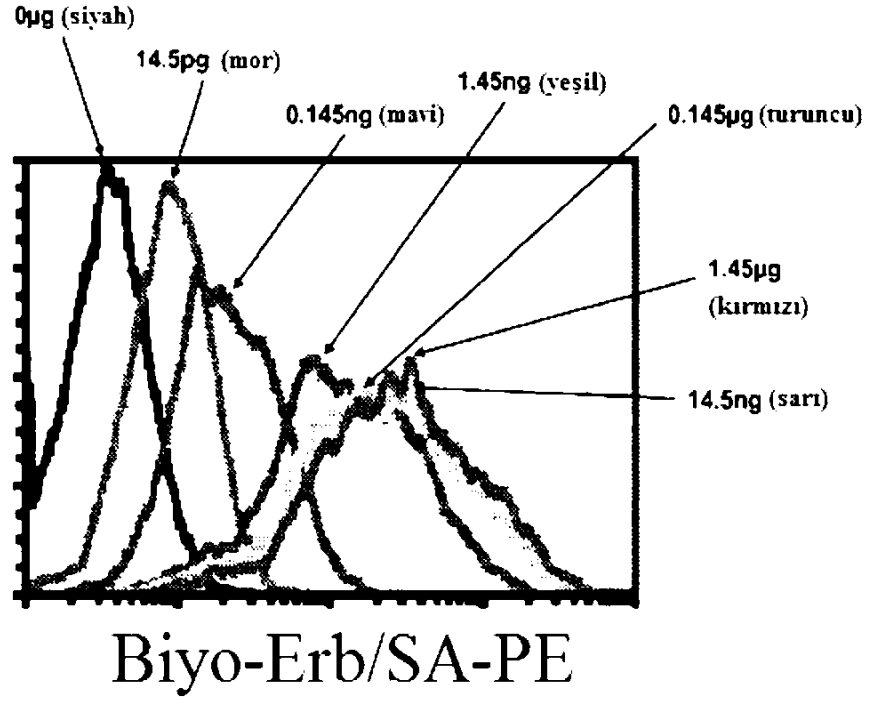
Şekil 1



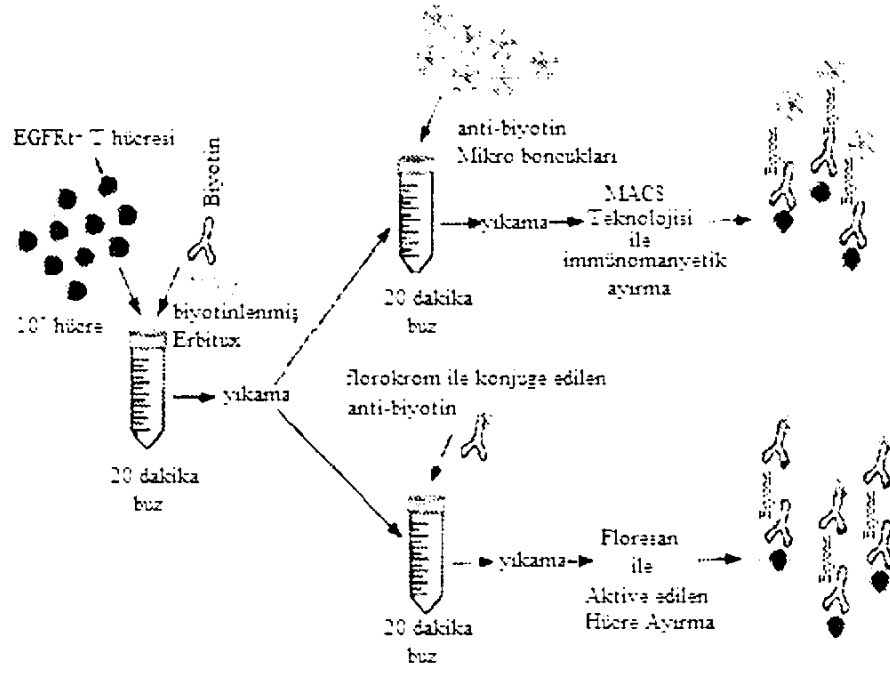
Şekil 2A



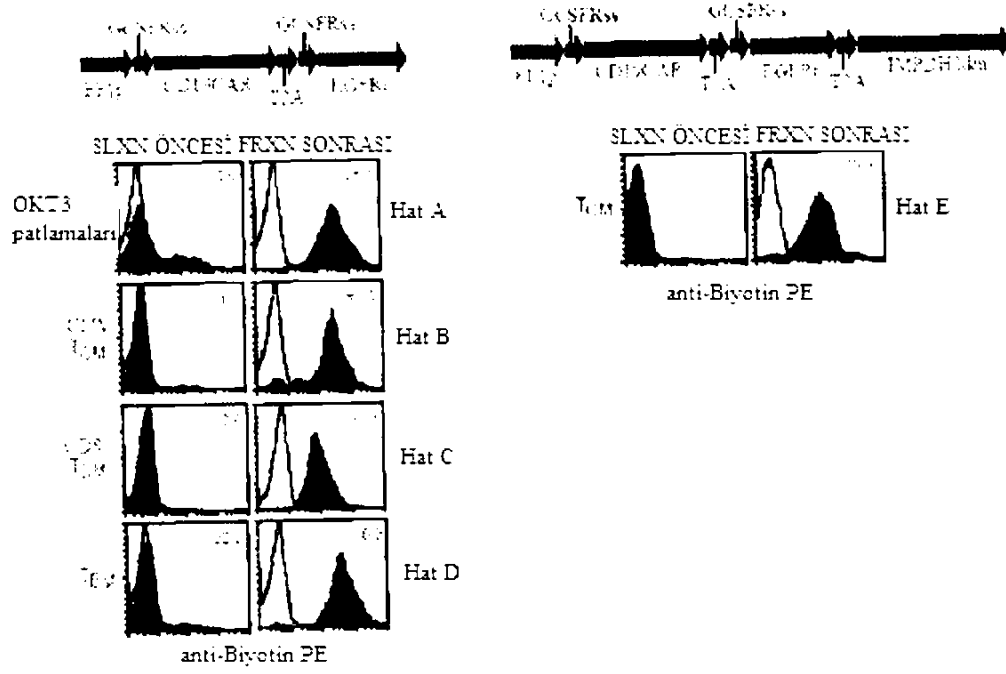
Şekil 2B



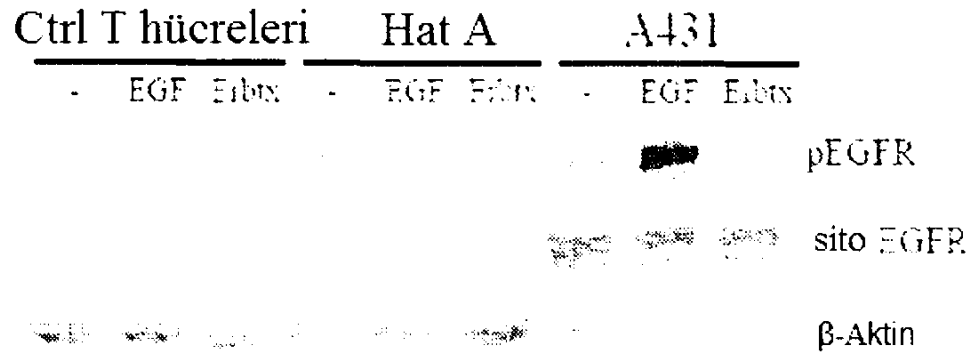
Şekil 2C



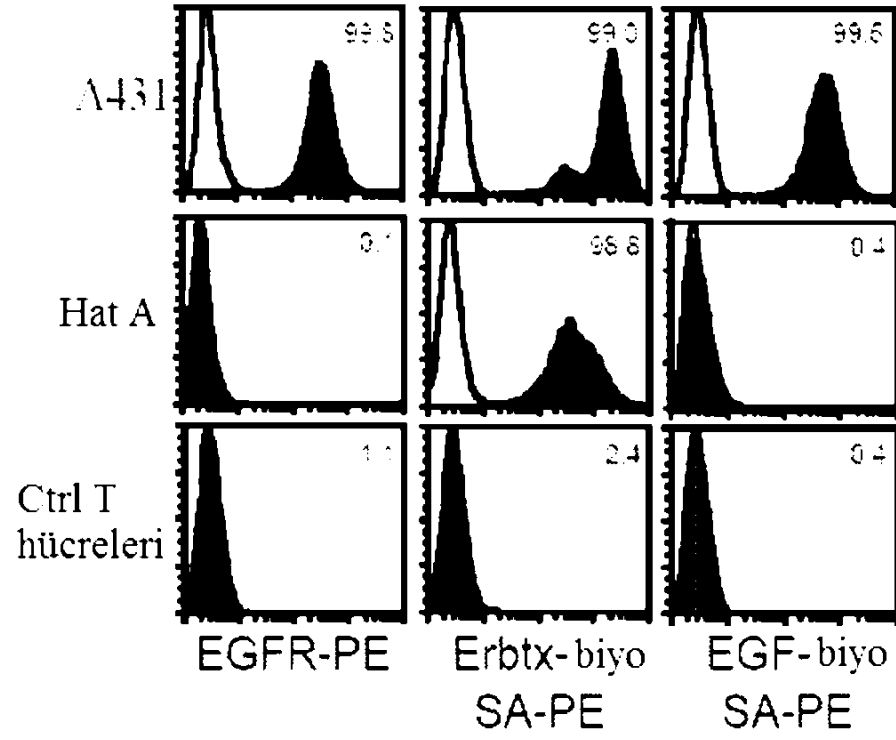
Şekil 2D



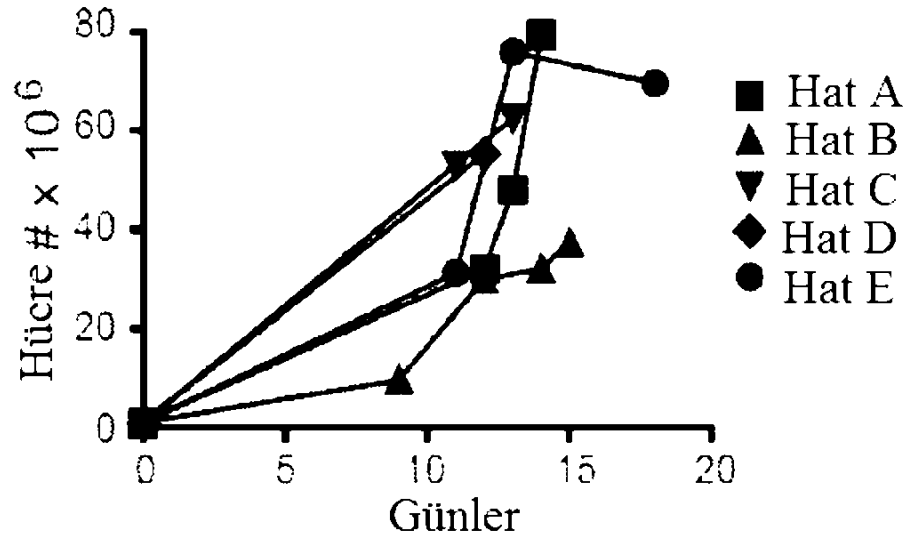
Şekil 3A



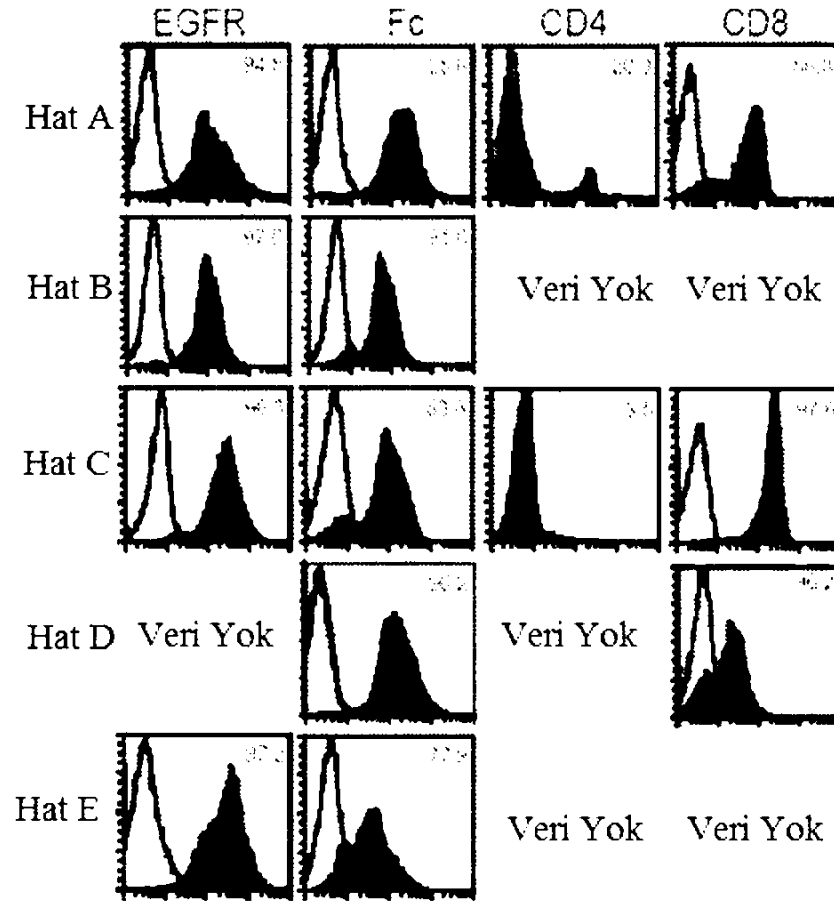
Şekil 3B



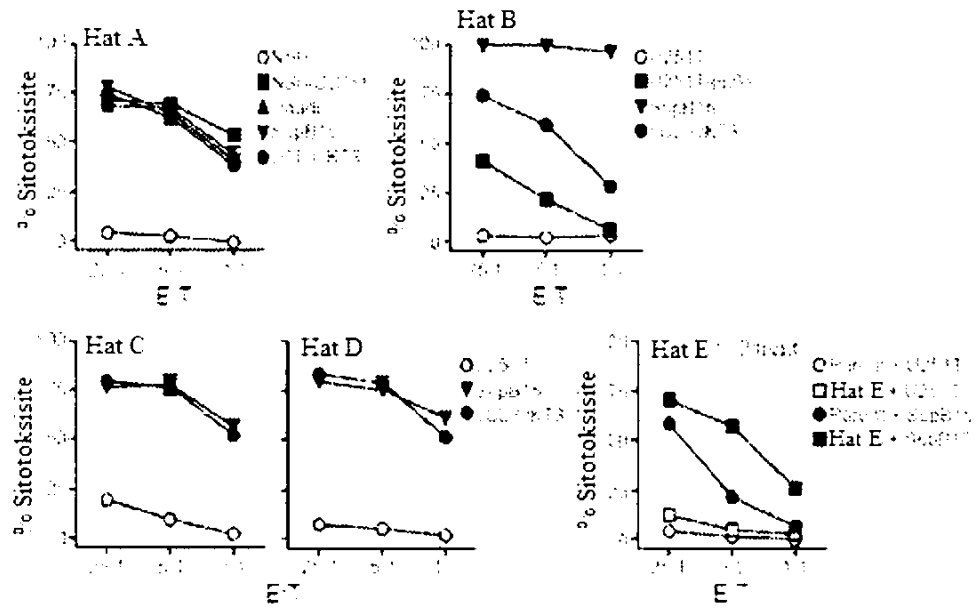
Şekil 4A



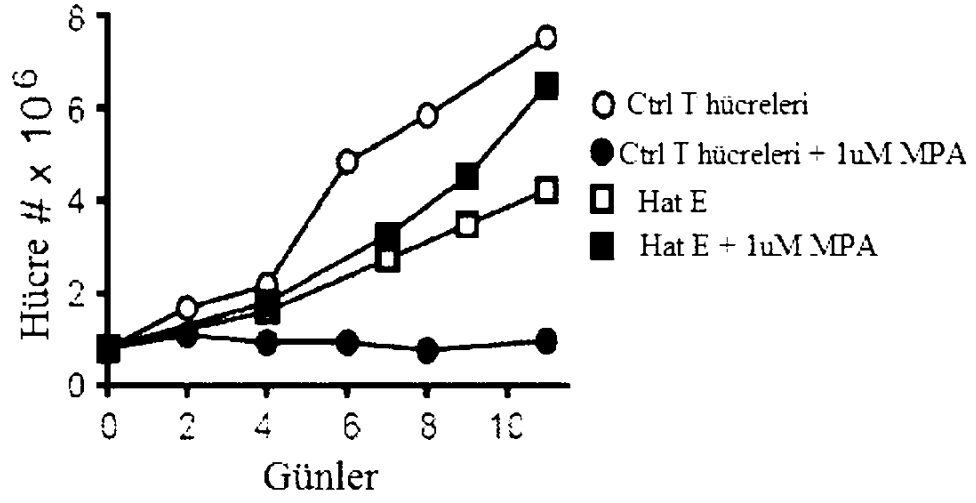
Şekil 4B



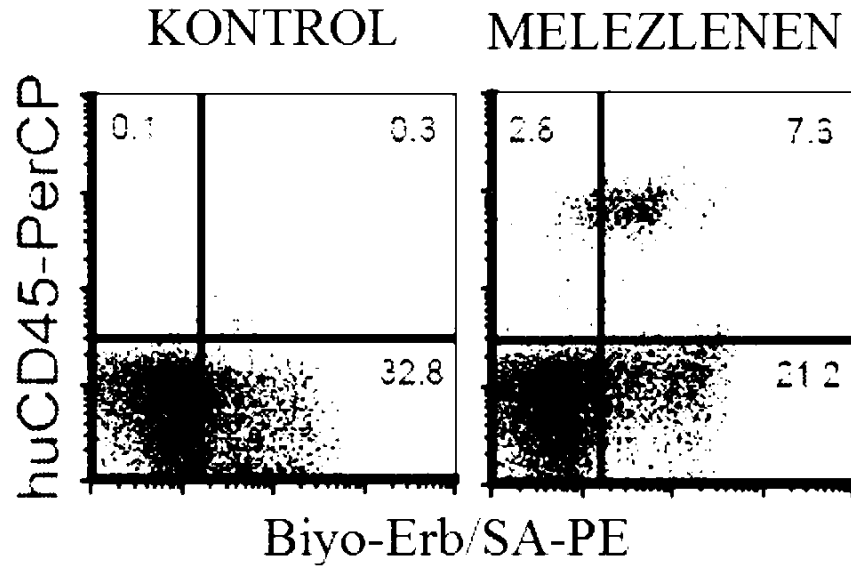
Şekil 4C



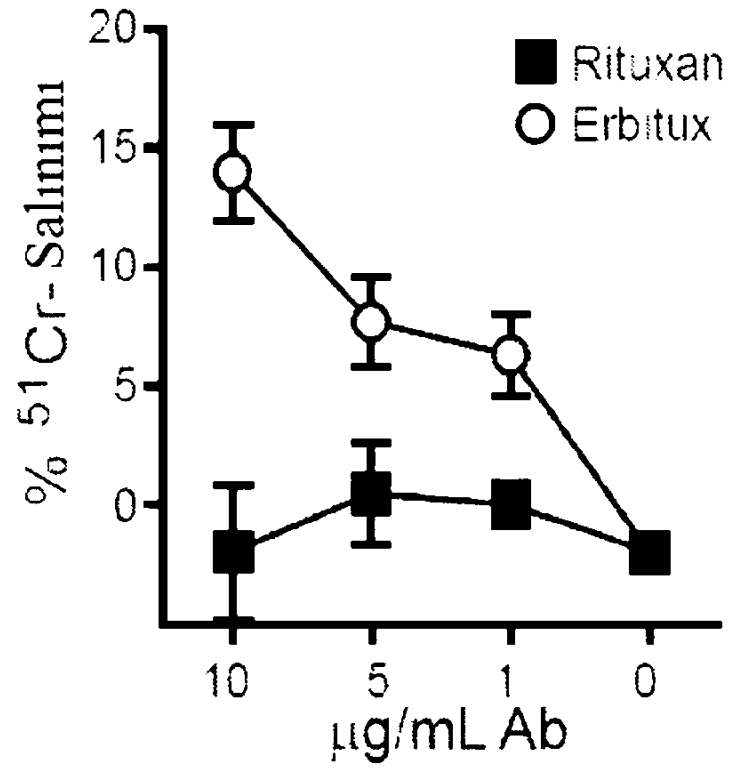
Şekil 4D



Şekil 5



Şekil 6



Şekil 7

[illegible]

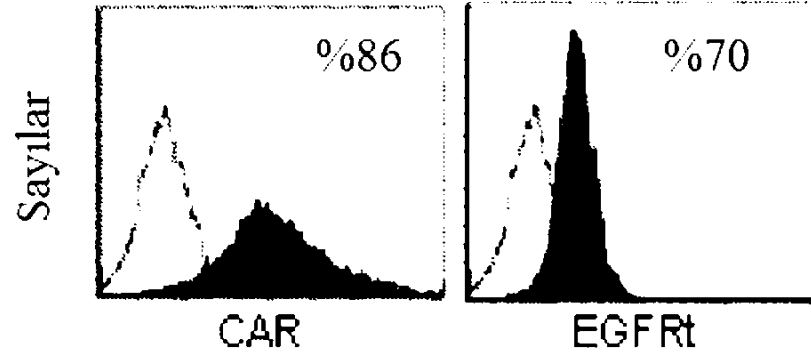
Şekil 8 CD19R-CD28 ζ g-Zeta(CD)-T2A-EGFR

[illegible]

[illegible]

[illegible]

Şekil 9



Şekil 10

