(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0012465
(43) 공개일자 2023년01월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) *A61K 35/17* (2015.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61P 31/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *A61P 37/00* (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0638 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7033196
(22) 출원일자(국제) 2021년02월23일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년09월23일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/019252
(87) 국제공개번호 WO 2021/173560
국제공개일자 2021년09월02일
(30) 우선권주장
62/980,844 2020년02월24일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
이매틱스 유에스 인코포레이티드
미국 텍사스주 77030 휴스턴 웨스트 홀콤 블러바드 2201 스위트 205
(72) 발명자
마타 멜린다
미국 텍사스주 77030 휴스턴 웨스트 홀콤 블러바드 2201 스위트 205
칼라 맘타
미국 텍사스주 77030 휴스턴 웨스트 홀콤 블러바드 2201 스위트 205
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
제일특허법인(유)

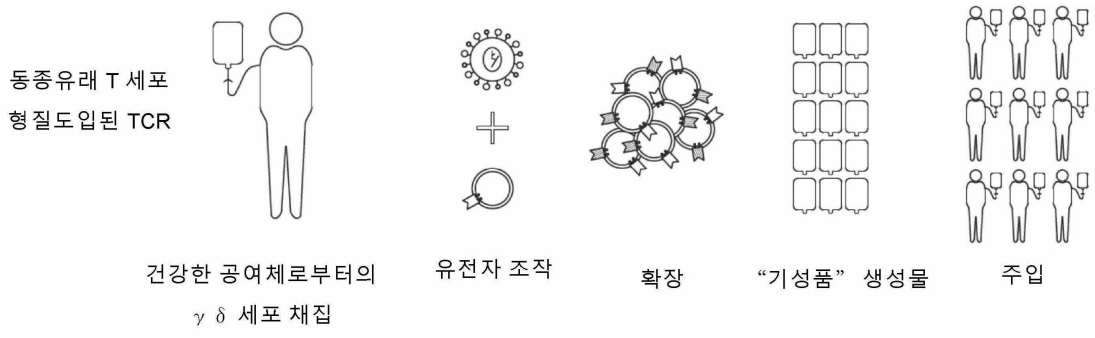
전체 청구항 수 : 총 80 항

(54) 발명의 명칭 **암 및 관련 악성 종양을 치료하기 위해 T 세포를 확장하는 방법**

(57) 요 약

γδ T 세포를 확장하는 시험관내 방법은 인간 대상체의 혈액 검체로부터 γδ T 세포를 단리하는 단계, 아미노비스포스포네이트 및/또는 배양보조 세포 및 적어도 하나의 사이토카인의 존재 하에서 상기 단리된 T 세포를 활성화하는 단계, 상기 활성화된 γδ T 세포를 확장시키는 단계, 및, 선택적으로, 상기 확장된 γδ T 세포를 재자극하는 단계를 포함한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 39/00 (2013.01)
A61P 31/00 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61P 37/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C12N 2500/42 (2013.01)
C12N 2502/30 (2013.01)
C12N 2502/99 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)

(72) 발명자
모하메드 알리
미국 텍사스주 77030 휴스턴 웨스트 홀콤 블러바드 2201 스위트 205
왈터 스테판
미국 텍사스주 77030 휴스턴 웨스트 홀콤 블러바드 2201 스위트 205
불리어드 얀닉
미국 텍사스주 77030 휴스턴 웨스트 홀콤 블러바드 2201 스위트 205

(30) 우선권주장
63/038,008 2020년06월11일 미국(US)
63/082,881 2020년09월24일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

인간 대상체의 혈액 검체로부터 γδ T 세포를 단리하는 단계,

배양보조 세포, 및 인터류킨(IL)-1, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, 인터페론(IFN)-α 및 IFN-β로 구성되는 군으로부터 선택적으로 선택되는 적어도 하나의 사이토카인의 존재 하에서 단리된 γδ T 세포를 활성화하는 단계,

활성화된 γδ T 세포로 T 세포 수용체(TCR) 또는 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 핵산을 포함하는 벡터를 도입하는 단계, 및

상기 도입된 γδ T 세포를 확장하는 단계

를 포함하는, γδ T 세포를 제조하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 혈액 검체는 백혈구성분채집술 생성물을 포함하는, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 혈액 검체는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 포함하는, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 활성화하는 단계는 아미노비스포스포네이트의 존재 하에서 더 수행되는, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 아미노비스포스포네이트는 파미드론산, 알렌드론산, 졸레드론산, 리세드론산, 이반드론산, 인카드론산, 이들의 염 및/또는 이들의 수화물을 포함하는, 방법.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서,

상기 아미노비스포스포네이트는 졸레드론산을 포함하는, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 적어도 하나의 사이토카인은 IL-2 및 IL-15를 포함하는, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 단리하는 단계는 항-α 및 항-β T 세포 수용체(TCR) 항체와 상기 혈액 검체를 접촉시키는 단계, 및 상기 혈액 검체로부터 α-TCR 및/또는 β-TCR 양성 세포를 고갈시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 배양보조 세포는 인간 세포, 비인간 세포, 바이러스 감염 세포, 비바이러스 감염 세포, 세포 추출물, 입자, 비드, 필라멘트 또는 이들의 조합인, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 인간 세포는 K562 세포인, 방법.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서,

상기 인간 세포는 적어도 하나의 재조합 단백질을 포함하는 조작된 종양 세포인, 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 적어도 하나의 재조합 단백질은 CD86, 4-1BBL, IL-15 및 이들의 임의의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 IL-15는 막 결합 IL-15인, 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 배양보조 세포는 방사선 조사된, 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 단리된 γδ T 세포 및 상기 배양보조 세포는 약 1:1 내지 약 50:1(배양보조 세포:단리된 γδ T 세포)의 비율로 혼합된, 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 벡터는 바이러스성 벡터 또는 비바이러스성 벡터인, 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 확장하는 단계는 아미노비스포스포네이트의 부재 하에서 및 적어도 하나의 사이토카인의 존재 하에서 수행되는, 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 확장된 γδ T 세포를 재자극하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 재자극하는 단계는 추가 배양보조 세포와 상기 확장된 γδ T 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 추가 배양보조 세포는 상기 배양보조 세포와 동일하거나 상이할 수 있는, 방법.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서,

상기 확장된 γδ T 세포 및 상기 추가 배양보조 세포는 약 1:1 내지 약 50:1(추가 배양보조 세포:확장된 γδ T 세포)의 비율로 혼합된, 방법.

청구항 22

제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 추가 배양보조 세포는 단핵구, PBMC 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 23

제19항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 추가 배양보조 세포는 상기 인간 대상체에 대하여 자가유래인, 방법.

청구항 24

제19항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 추가 배양보조 세포는 상기 인간 대상체에 대하여 동종유래인, 방법.

청구항 25

제19항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 추가 배양보조 세포는 αβ T 세포가 고갈된, 방법.

청구항 26

제19항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 추가 배양보조 세포는 아미노비스포스포네이트와 접촉하는, 방법.

청구항 27

제26항에 있어서,

상기 아미노비스포스포네이트는 졸레드론산을 포함하는, 방법.

청구항 28

제19항에 있어서,

상기 추가 배양보조 세포는 인간 세포, 비인간 세포, 바이러스 감염 세포, 비바이러스 감염 세포, 세포 추출물, 입자, 비드, 필라멘트 또는 이들의 조합인, 방법.

청구항 29

제28항에 있어서,

상기 인간 세포는 K562 세포인, 방법.

청구항 30

제28항 또는 제29항에 있어서,

상기 인간 세포는 적어도 하나의 재조합 단백질을 포함하는 조작된 종양 세포인, 방법.

청구항 31

제30항에 있어서,

상기 적어도 하나의 재조합 단백질은 CD86, 4-1BBL, IL-15 및 이들의 임의의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 32

제31항에 있어서,

상기 IL-15는 막 결합 IL-15인, 방법.

청구항 33

제19항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 추가 배양보조 세포는 방사선 조사된, 방법.

청구항 34

인간 대상체의 혈액 검체로부터 γδ T 세포를 단리하는 단계,

인터류킨(IL)-1, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, 인터페론(IFN)-α 및 IFN-β로 구성되는 군으로부터 선택적으로 선택되는 적어도 하나의 사이토카인, 및 아미노비스포스포네이트 및 배양보조 세포 중 하나 이상의 존재하에서 단리된 γδ T 세포를 활성화하는 단계,

활성화된 γδ T 세포를 확장하는 단계, 및

상기 확장된 γδ T 세포를 재자극하는 단계

를 포함하는, γδ T 세포를 확장하는 시험관내 방법.

청구항 35

제34항에 있어서,

상기 혈액 검체는 백혈구성분채집술 생성물을 포함하는, 방법.

청구항 36

제34항 또는 제35항에 있어서,

상기 혈액 검체는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 포함하는, 방법.

청구항 37

제34항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 아미노비스포스포네이트는 존재하며 파미드론산, 알렌드론산, 졸레드론산, 리세드론산, 이반드론산, 인카드론산, 이들의 염 및/또는 이들의 수화물을 포함하는, 방법.

청구항 38

제34항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 아미노비스포스포네이트는 존재하며 졸레드론산을 포함하는, 방법.

청구항 39

제34항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 적어도 하나의 사이토카인은 IL-2 및 IL-15를 포함하는, 방법.

청구항 40

제34항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 단리하는 단계는 항-α 및 항-β T 세포 수용체(TCR) 항체와 상기 혈액 검체를 접촉시키는 단계, 및 상기 혈액 검체로부터 α-TCR 및/또는 β-TCR 양성 세포를 고갈시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 41

제34항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 배양보조 세포는 존재하며 인간 세포, 비인간 세포, 바이러스 감염 세포, 비바이러스 감염 세포, 세포 추출물, 입자, 비드, 필라멘트 또는 이들의 조합인, 방법.

청구항 42

제41항에 있어서,

상기 인간 세포는 K562 세포인, 방법.

청구항 43

제41항 또는 제42항에 있어서,

상기 인간 세포는 적어도 하나의 재조합 단백질을 포함하는 조작된 종양 세포인, 방법.

청구항 44

제43항에 있어서,

상기 적어도 하나의 재조합 단백질은 CD86, 4-1BBL, IL-15 및 이들의 임의의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 45

제44항에 있어서,

상기 IL-15는 막 결합 IL-15인, 방법.

청구항 46

제41항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 배양보조 세포는 방사선 조사된, 방법.

청구항 47

제41항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 단리된 γδ T 세포 및 상기 배양보조 세포는 약 1:1 내지 약 50:1(배양보조 세포:단리된 γδ T 세포)의 비율로 혼합된, 방법.

청구항 48

제34항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 확장하는 단계 전에 재조합 바이러스성 벡터를 사용하여 상기 활성화된 γδ T 세포를 형질도입하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 49

제34항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 확장하는 단계는 아미노비스포스포네이트의 부재 하에서 및 적어도 하나의 사이토카인의 존재 하에서 수행되는, 방법.

청구항 50

제34항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 재자극하는 단계는 추가 배양보조 세포와 상기 확장된 γδ T 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 51

제50항에 있어서,

상기 추가 배양보조 세포는 상기 배양보조 세포와 동일하거나 상이할 수 있는, 방법.

청구항 52

제50항 또는 제51항에 있어서,

상기 확장된 γδ T 세포 및 상기 추가 배양보조 세포는 약 1:1 내지 약 50:1(추가 배양보조 세포:확장된 γδ T 세포)의 비율로 혼합된, 방법.

청구항 53

제50항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 추가 배양보조 세포는 단핵구, PBMC 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 54

제50항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 추가 배양보조 세포는 상기 인간 대상체에 대하여 자가유래인, 방법.

청구항 55

제50항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 추가 배양보조 세포는 상기 인간 대상체에 대하여 동종유래인, 방법.

청구항 56

제50항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 추가 배양보조 세포는 αβ T 세포가 고갈된, 방법.

청구항 57

제50항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 추가 배양보조 세포는 아미노비스포스포네이트와 접촉하는, 방법.

청구항 58

제57항에 있어서,

상기 아미노비스포스포네이트는 졸레드론산을 포함하는, 방법.

청구항 59

제50항에 있어서,

상기 추가 배양보조 세포는 인간 세포, 비인간 세포, 바이러스 감염 세포, 비바이러스 감염 세포, 세포 추출물,

입자, 비드, 필라멘트 또는 이들의 조합인, 방법.

청구항 60

제59항에 있어서,

상기 인간 세포는 K562 세포인, 방법.

청구항 61

제59항 또는 제60항에 있어서,

상기 인간 세포는 적어도 하나의 재조합 단백질을 포함하는 조작된 종양 세포인, 방법.

청구항 62

제61항에 있어서,

상기 적어도 하나의 재조합 단백질은 CD86, 4-1BBL, IL-15 및 이들의 임의의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 63

제62항에 있어서,

상기 IL-15는 막 결합 IL-15인, 방법.

청구항 64

제50항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 추가 배양보조 세포는 방사선 조사된, 방법.

청구항 65

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 확장된 γδ T 세포의 집단으로서,

상기 확장된 γδ T 세포의 밀도는 적어도 약 1 x 10^5세포/ml, 적어도 약 1 x 10^6세포/ml, 적어도 약 1 x 10^7세포/ml, 적어도 약 1 x 10^8세포/ml 또는 적어도 약 1 x 10^9세포/ml인, 확장된 γδ T 세포의 집단.

청구항 66

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 확장된 γδ T 세포 또는 제65항의 확장된 γδ T 세포의 집단의 유효량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 암을 치료하는 방법.

청구항 67

제66항에 있어서,

상기 암은 급성 림프아구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 부신피질 암종, AIDS-관련 암, AIDS-관련 림프종, 항문암, 충수암, 성상세포종, 신경모세포종, 기저세포암종, 담관암, 방광암, 골암, 뇌종양, 예컨대, 소뇌성상세포종, 대뇌성상세포종/악성 신경교종, 상의세포종, 수모세포종, 천막상 원발성 신경외배엽 종양, 시각 경로 및 시상하부 신경교종, 유방암, 기관지 선종, 버킷 림프종, 원발 불명의 암종, 중추신경계 림프종, 소뇌성상세포종, 자궁경부암, 소아암, 만성 림프성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 골수증식 장애, 결장암, 피부 T 세포 림프종, 결합조직형성 소원형세포 종양, 자궁내막암, 상의세포종, 식도암, 유잉 육종, 생식세포 종양, 담낭암, 위암, 위장관 유암종, 위장관 기질 종양, 신경교종, 모발상세포 백혈병, 두경부암, 심장암, 간세포(간) 암, 호지킨 림프종, 하인두암, 안구 내 흑색종, 섬세포암종, 카포시 육종, 신장암, 후두암, 입술 및 구강 암, 지방육종, 간암, 폐암, 예컨대, 비소세포 및 소세포 폐암, 림프종, 백혈병, 마크로글로불린혈증, 뼈의 악성 섬유성 조직구종/골육종, 수모세포종, 흑색종, 중피종, 잠복 원발성의 전이성 경부 편평세포암, 입암(mouth cancer), 다발성 내분비종양증 증후군, 골수형성이상 증후군, 골수성 백혈병, 비강 및 부비동 암, 비인두암종, 신경모세포종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 구강암(oral cancer), 구인두암, 골육종/뼈의 악성 섬유성 조직구종, 난

소암, 난소상피암, 난소 생식 세포 종양, 췌장암, 췌장암 섬세포, 부비동 및 비강 암, 부갑상선암, 음경암, 인두암, 갈색세포종, 송과체 성상세포종, 송과체 배아세포종, 뇌하수체 선종, 흉막폐 아세포종, 혈장 세포 신생물, 원발성 중추신경계 림프종, 전립선암, 직장암, 신세포 암종, 신우 및 요관 이행세포암, 망막모세포종, 횡문근육종, 타액선암, 육종, 피부암, 메르켈 세포 피부암종, 소장암, 연조직 육종, 편평세포 암종, 위암, T 세포 림프종, 인후암, 흉선종, 흉선암종, 갑상선암, 영양막 종양(임신성), 원발 부위 불명의 암, 요도암, 자궁육종, 질암, 외음부암, 발덴스트룀 마크로글로불린혈증 및 윌름스 종양으로 구성되는 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 68

제67항에 있어서,

상기 암은 흑색종인, 방법.

청구항 69

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 확장된 γδ T 세포 또는 제65항의 확장된 γδ T 세포의 집단의 유효량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 감염 질환을 치료하는 방법.

청구항 70

제69항에 있어서,

상기 감염 질환은 뎅기열, 에볼라, 마르부르그 바이러스, 결핵(TB), 뇌수막염 및 매독으로 구성되는 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 71

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 확장된 γδ T 세포 또는 제65항의 확장된 γδ T 세포의 집단의 유효량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 자가면역 질환을 치료하는 방법.

청구항 72

제71항에 있어서,

상기 자가면역 질환은 관절염, 만성 폐쇄성 폐 질환, 강직성 척추염, 크론병(특발성 염증성 장 질환(IBD)의 두 유형 중 하나), 피부근염, 1형 당뇨병, 자궁내막증, 굿파스처 증후군, 그레이브스병, 길랭-바레 증후군(GBS), 하시모토병, 화농성 한선염, 가와사키병, IgA 신장병증, 특발성 혈소판 감소성 자반증, 간질성 방광염, 홍반성 낭창, 혼합결합조직병, 국소피부경화증, 중증근무력증, 기면증, 신경근육긴장증, 심상성천포창, 악성 빈혈, 건선, 건선성 관절염, 다발성근염, 원발성 담즙성 경변증, 재발성 다발성연골염, 류마티스 관절염, 조현병, 경피증, 쇼그렌 증후군, 강직 인간 증후군, 측두동맥염(또한, “거대 세포 동맥염”으로도 알려짐”), 궤양성 대장염(특발성 염증성 장 질환(IBD)의 두 유형 중 하나), 혈관염, 백반증 및 베게너 육아종증으로 구성되는 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 73

인간 대상체의 혈액 검체로부터 γδ T 세포를 단리하는 단계,

배양보조 세포의 부재 하에서 단리된 γδ T 세포를 활성화하는 단계,

활성화된 γδ T 세포로 T 세포 수용체(TCR) 또는 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 핵산을 포함하는 벡터를 도입하는 단계, 및

배양보조 세포의 존재 하에서 형질도입된 γδ T 세포를 확장하는 단계

를 포함하는, γδ T 세포를 제조하는 방법.

청구항 74

제73항에 있어서,

상기 활성화하는 단계, 상기 형질도입하는 단계 및/또는 상기 확장하는 단계는 인터류킨(IL)-1, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, 인터페론(IFN)-α 및 IFN-β로 구성되는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 사이토카인

의 존재 하에서 수행되는, 방법.

청구항 75

제73항 또는 제74항에 있어서,

상기 배양보조 세포는 인간 세포, 비인간 세포, 바이러스 감염 세포, 비바이러스 감염 세포, 세포 추출물, 입자, 비드, 필라멘트 또는 이들의 조합인, 방법.

청구항 76

제73항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 배양보조 세포는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 및/또는 림프아구 세포(LCL)를 포함하는, 방법.

청구항 77

제73항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 활성화하는 단계, 상기 형질도입하는 단계 및/또는 상기 확장하는 단계는 OKT3의 존재 하에서 수행되는, 방법.

청구항 78

제73항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 벡터는 바이러스성 벡터 또는 비바이러스성 벡터인, 방법.

청구항 79

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 확장된 γδ T 세포는 δ1 및/또는 δ2 T 세포를 포함하는, 방법.

청구항 80

제1항 내지 제64항 및 제73항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 벡터는 TCR을 인코딩하는 핵산, 및 CD8αβ 또는 CD8α를 인코딩하는 핵산을 포함하는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 전자 제출 서열목록에 대한 참조

[0002] 서열 목록의 공식 사본은 파일명이 "3000011-020977_Seq_Listing_ST25.txt"이고 2021년 2월 22일에 생성되었으며 51,360바이트의 크기를 갖고 명세서와 함께 제출된 파일을 갖는 ASCII 형식 서열목록으로서 EFS-Web을 통해 전자적으로 제출된다. 상기 ASCII 형식의 문서에 포함된 서열목록은 본 명세서의 일부이며 이의 전체가 참조에 의해 본원에 원용된다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 개시내용은 T 세포의 확장 및 활성화에 관한 것이다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 전이유전자 발현을 위해 사용될 수 있는 γδ T 세포의 확장 및 활성화에 관한 것이다 다른 양태에서, 본 개시내용은 α-TCR 및/또는 β-TCR 양성 세포를 고갈시키는 동안 γδ T 세포의 확장 및 활성화에 관한 것이다. 또한, 확장된 γδ T 세포 및 고갈되거나 감소된 α-TCR 및/또는 β-TCR 양성 세포를 포함하는 T 세포 집단이 본 개시내용에 의해 제공된다. 또한, 본 개시내용은 개시된 T 세포 집단을 사용하는 방법을 제공한다.

배 경 기 술

[0005] γδ T 세포는 αβ TCR 대신 γδ TCR을 발현하는 T 세포의 하위집단을 나타낸다. γδ T 세포는 조직 결합 Vδ2 음성 세포 및 말초 순환 Vδ2 양성 세포, 더 구체적으로는, Vγ9δ2의 2개의 주요 하위집단으로 나눌 수 있

다. 각 하위집단은 항바이러스 및 항종양 활성을 갖는 것으로 나타났다. 종래의 αβ TCR 발현 세포와는 달리, γδ TCR 발현 세포는 고전적인 MHC I 및 II와는 무관하게 이들의 표적을 인식한다. 자연 살해(NK) T 세포와 유사하게, γδ T 세포는 NKG2D를 발현하며, 이는 비고전적인 MHC 분자, 즉, MHC 클래스 I 폴리펩티드-관련 서열 A(MICA) 및 MHC 클래스 I 폴리펩티드-관련 서열 B(MICB)에 결합하며, 이는 스트레스 받은 세포 및/또는 종양 세포에서 존재한다. γδ TCR은 다양한 리간드, 예를 들어, 스트레스 및/또는 종양 관련 인항원(phosphoantigen)을 인식한다. γδ T 세포는 여러 기전, 즉, TRAIL, FasL, 퍼포린 및 그란자임 분비를 통해 이들의 표적의 직접적인 세포용해를 매개한다. 또한, CD16을 발현하는 γδ T 세포는 항체-의존적 세포 매개 세포독성(ADCC)의 효능을 높인다.

[0006] 말초 혈액에서 일반적으로 단 1 내지 5%의 양으로 존재할 수 있는 γδ T 세포의 문제점은 의료적 치료를 위해 충분한 γδ T 세포의 순도 및 수가 확보될 수 없다는 것으로, 특히, 적은 양의 혈액이 채집된 후 이로부터 유래한 세포가 활성화되고/되거나 증식되는 경우 그러하다. 또한, 의료적 치료를 위해 충분한 순도 및 수를 확보하기 위한 환자로부터의 혈액 채집량의 증가는 환자에게 큰 부담을 준다는 문제가 있다.

[0007] 상업적으로 실행가능한 요법 생성물로서 충분한 γδ T 세포 수를 제조할 수 있는 방법이 필요하다. 이러한 기술적 문제에 대한 해결책은 청구범위를 특징으로 하는 실시양태에 의해 제공된다.

발명의 내용

[0008] 본 발명은 인간 대상체의 혈액 검체로부터 γδ T 세포를 단리하는 단계, 배양보조 세포 및 적어도 하나의 사이토카인의 존재 하에서 단리된 γδ T 세포를 활성화하는 단계, 및 활성화된 γδ T 세포를 확장하는 단계를 포함하는 γδ T 세포를 확장하는 방법을 제공한다.

[0009] 본 개시내용은 인간 대상체의 혈액 검체로부터 γδ T 세포를 단리하는 단계, 적어도 하나의 사이토카인 및 1) 아미노비스포스포네이트, 2) 배양보조 세포 또는 3) 아미노비스포스포네이트 및 배양보조 세포 중 하나 이상의 존재 하에서 단리된 γδ T 세포를 활성화하는 단계, 활성화된 γδ T 세포를 확장하는 단계, 및 확장된 γδ T 세포를 재자극하는 단계를 포함하는 γδ T 세포를 확장하는 방법을 더 제공한다.

[0010] 일부 양태에서, 혈액 검체는 백혈구성분채집술 생성물을 포함한다.

[0011] 일부 양태에서, 혈액 검체는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 포함한다.

[0012] 일부 양태에서, 활성화하는 단계는 아미노비스포스포네이트의 존재 하에서 수행된다.

[0013] 일부 양태에서, 아미노비스포스포네이트는 파미드론산, 알렌드론산, 졸레드론산, 리세드론산, 이반드론산, 인카드론산, 이들의 염 및/또는 이들의 수화물을 포함한다.

[0014] 일부 양태에서, 아미노비스포스포네이트는 졸레드론산을 포함한다.

[0015] 일부 양태에서, 적어도 하나의 사이토카인은 인터류킨(IL)-1, IL-2, IL-12, IL-18, IL-15, IL-21, 인터페론(IFN)-α 및 IFN-β로 구성되는 군으로부터 선택된다.

[0016] 일부 양태에서, 적어도 하나의 사이토카인은 IL-2 및 IL-15를 포함한다.

[0017] 일부 양태에서, 단리하는 단계는 항-α 및 항-β T 세포 수용체(TCR) 항체와 혈액 검체를 접촉시키는 단계, 및 혈액 검체로부터 α-TCR 및/또는 β-TCR 양성 세포를 고갈시키는 단계를 포함한다.

[0018] 일부 양태에서, 배양보조 세포는 종양 세포 또는 림프아구 세포주이다.

[0019] 일부 양태에서, 종양 세포는 K562 세포이다.

[0020] 일부 양태에서, 종양 세포는 적어도 하나의 재조합 단백질을 포함하는 조작된 종양 세포이다.

[0021] 일부 양태에서, 적어도 하나의 재조합 단백질은 CD86, 4-1BBL, IL-15 및 이들의 임의의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택된다.

[0022] 일부 양태에서, IL-15는 막 결합 IL-15이다.

[0023] 일부 양태에서, 적어도 하나의 재조합 단백질은 4-1BBL 및/또는 막 결합 IL-15이다.

[0024] 일부 양태에서, 배양보조 세포는 방사선 조사된다.

[0025] 일부 양태에서, 단리된 γδ T 세포 및 배양보조 세포는 약 1:1 내지 약 50:1(배양보조 세포:단리된 γδ T 세

포)의 비율로 혼합된다. 일부 양태에서, 단리된 γδ T 세포 및 배양보조 세포는 약 2:1 내지 약 20:1(배양보조 세포:단리된 γδ T 세포)의 비율로 존재한다. 일부 양태에서, 단리된 γδ T 세포 및 배양보조 세포는 약 1:1, 약 1:5:1, 약 2:1, 약 3:1, 약 4:1, 약 5:1, 약 6:1, 약 7:1, 약 8:1, 약 9:1, 약 10:1, 약 11:1, 약 12:1, 약 13:1, 약 14:1, 약 15:1, 약 20:1, 약 25:1, 약 30:1, 약 35:1, 약 40:1, 약 45:1 또는 약 50:1(배양보조 세포:단리된 γδ T 세포)의 비율로 존재한다.

[0026] 일부 양태에서, 본 발명의 방법은 확장하는 단계 전에 재조합 바이러스성 벡터를 사용하여 활성화된 γδ T 세포를 형질도입하는 단계를 더 포함한다.

[0027] 일부 양태에서, 확장하는 단계는 아미노비스포스포네이트의 부재 하에서 및 적어도 하나의 사이토카인, 예컨대, 예를 들어, IL-2 및/또는 IL-15의 존재 하에서 수행된다.

[0028] 일부 양태에서, 본 개시내용의 방법은 확장된 γδ T 세포를 재자극하는 단계를 포함한다.

[0029] 일부 양태에서, 재자극하는 단계는 (존재하는 경우) 활성화 동안 사용되는 배양보조 세포와 동일하거나 상이할 수 있는 추가 배양보조 세포와 확장된 γδ T 세포를 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0030] 일부 양태에서, 확장된 γδ T 세포 및 추가 배양보조 세포는 약 1:1 내지 약 50:1(추가 배양보조 세포:확장된 γδ T 세포)의 비율로 혼합된다. 일부 양태에서, 확장된 γδ T 세포 및 추가 배양보조 세포는 약 2:1 내지 약 20:1(추가 배양보조 세포:확장된 γδ T 세포)의 비율로 존재한다. 일부 양태에서, 확장된 γδ T 세포 및 추가 배양보조 세포는 약 1:1, 약 1:5:1, 약 2:1, 약 3:1, 약 4:1, 약 5:1, 약 6:1, 약 7:1, 약 8:1, 약 9:1, 약 10:1, 약 11:1, 약 12:1, 약 13:1, 약 14:1, 약 15:1, 약 20:1, 약 25:1, 약 30:1, 약 35:1, 약 40:1, 약 45:1 또는 약 50:1(추가 배양보조 세포:확장된 γδ T 세포)의 비율로 존재한다.

[0031] 일부 양태에서, 추가 배양보조 세포는 단핵구, PBMC 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택된다.

[0032] 일부 양태에서, 추가 배양보조 세포는 인간 대상체에 대하여 자가유래이다.

[0033] 일부 양태에서, 추가 배양보조 세포는 인간 대상체에 대하여 동종유래이다.

[0034] 일부 양태에서, 추가 배양보조 세포는 αβ T 세포가 고갈된다.

[0035] 일부 양태에서, 추가 배양보조 세포는 재자극 전에 아미노비스포스포네이트, 예컨대, 졸레드론산과 접촉되거나 이를 사용하여 펄스 처리된다.

[0036] 일부 양태에서, 추가 배양보조 세포는 종양 세포 또는 림프아구 세포주이다.

[0037] 일부 양태에서, 종양 세포는 K562 세포이다.

[0038] 일부 양태에서, 종양 세포는 적어도 하나의 재조합 단백질을 포함하는 조작된 종양 세포이다.

[0039] 일부 양태에서, 적어도 하나의 재조합 단백질은 CD86, 4-1BBL, IL-15 및 이들의 임의의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택된다.

[0040] 일부 양태에서, IL-15는 막 결합 IL-15이다.

[0041] 일부 양태에서, 추가 배양보조 세포는 방사선 조사된다.

[0042] 일부 양태에서, 본 발명은 본 개시내용의 방법에 의해 제조된 확장된 γδ T 세포의 집단에 관한 것이며, 확장된 γδ T 세포의 밀도는 적어도 약 1 x 10^5세포/ml, 적어도 약 1 x 10^6세포/ml, 적어도 약 1 x 10^7세포/ml, 적어도 약 1 x 10^8세포/ml 또는 적어도 약 1 x 10^9세포/ml이다.

[0043] 일부 양태에서, 본 발명은 암을 치료하는 방법에 관한 것이며, 본 개시내용의 방법에 의해 제조된 확장된 γδ T 세포의 유효량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0044] 일부 양태에서, 암은 급성 림프아구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 부신피질 암종, AIDS-관련 암, AIDS-관련 림프종, 항문암, 충수암, 성상세포종, 신경모세포종, 기저세포암종, 담관암, 방광암, 골암, 뇌종양, 예컨대, 소뇌성상세포종, 대뇌성상세포종/악성 신경교종, 상의세포종, 수모세포종, 천막상 원발성 신경외배엽 종양, 시각경로 및 시상하부 신경교종, 유방암, 기관지 선종, 버킷 림프종, 원발 불명의 암종, 중추신경계 림프종, 소뇌성상세포종, 자궁경부암, 소아암, 만성 림프성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 골수증식 장애, 결장암, 피부 T 세포 림프종, 결합조직형성 소원형세포종양, 자궁내막암, 상의세포종, 식도암, 유잉 육종, 생식세포 종양, 담낭

암, 위암, 위장관 유암종, 위장관 기질 종양, 신경교종, 모발상세포 백혈병, 두경부암, 심장암, 간세포(간) 암, 호지킨 림프종, 하인두암, 안구 내 흑색종, 섬세포암종, 카포시 육종, 신장암, 후두암, 입술 및 구강 암, 지방육종, 간암, 폐암, 예컨대, 비소세포 및 소세포 폐암, 림프종, 백혈병, 마크로글로불린혈증, 뼈의 악성 섬유성 조직구종/골육종, 수모세포종, 흑색종, 중피종, 잠복 원발성의 전이성 경부 편평세포암, 입암(mouth cancer), 다발성 내분비종양증 증후군, 골수형성이상 증후군, 골수성 백혈병, 비강 및 부비동 암, 비인두암종, 신경모세포종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 구강암(oral cancer), 구인두암, 골육종/뼈의 악성 섬유성 조직구종, 난소암, 난소상피암, 난소 생식 세포 종양, 췌장암, 췌장암 섬세포, 부비동 및 비강 암, 부갑상선암, 음경암, 인두암, 갈색세포종, 송과체 성상세포종, 송과체 배아세포종, 뇌하수체 선종, 흉막폐 아세포종, 혈장 세포 신생물, 원발성 중추신경계 림프종, 전립선암, 직장암, 신세포 암종, 신우 및 요관 이행세포암, 망막모세포종, 횡문근육종, 타액선암, 육종, 피부암, 메르켈 세포 피부암종, 소장암, 연조직 육종, 편평세포 암종, 위암, T 세포 림프종, 인후암, 흉선종, 흉선암종, 갑상선암, 영양막 종양(임신성), 원발 부위 불명의 암, 요도암, 자궁육종, 질암, 외음부암, 발덴스트룀 마크로글로불린혈증 및 윌름스 종양으로 구성되는 군으로부터 선택된다.

[0045] 일부 양태에서, 암은 흑색종이다.

[0046] 일부 양태에서, 본 발명은 감염 질환을 치료하는 방법에 관한 것이며, 이는 본 개시내용의 방법에 의해 제조된 확장된 γδ T 세포의 유효량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0047] 일부 양태에서, 감염 질환은 뎅기열, 에볼라, 마르부르그 바이러스, 결핵(TB), 뇌수막염 및 매독으로 구성되는 군으로부터 선택된다.

[0048] 일부 양태에서 본 발명은 자가면역 질환을 치료하는 방법에 관한 것이며, 이는 본 개시내용의 방법에 의해 제조된 확장된 γδ T 세포의 유효량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0049] 일부 양태에서, 자가면역 질환은 관절염, 만성 폐쇄성 폐 질환, 강직성 척추염, 크론병(특발성 염증성 장 질환(IBD)의 두 유형 중 하나), 피부근염, 1형 당뇨병, 자궁내막증, 굿파스처 증후군, 그레이브스병, 길랭-바레 증후군(GBS), 하시모토병, 화농성 한선염, 가와사키병, IgA 신장병증, 특발성 혈소판 감소성 자반증, 간질성 방광염, 홍반성 낭창, 혼합결합조직병, 국소피부경화증, 중증근무력증, 기면증, 신경근육긴장증, 심상성천포창, 악성 빈혈, 건선, 건선성 관절염, 다발성근염, 원발성 담즙성 경변증, 재발성 다발성연골염, 류마티스 관절염, 조현병, 경피증, 쇼그렌 증후군, 강직 인간 증후군, 측두동맥염(또한, "거대 세포 동맥염"으로도 알려짐"), 궤양성 대장염(특발성 염증성 장 질환(IBD)의 두 유형 중 하나), 혈관염, 백반증 및 베게너 육아종증으로 구성되는 군으로부터 선택된다.

[0050] 일부 양태에서, 본 발명은 인간 대상체의 혈액 검체로부터 γδ T 세포를 단리하는 단계, 배양보조 세포의 부재 하에서 단리된 γδ T 세포를 활성화하는 단계, 활성화된 γδ T 세포로 T 세포 수용체(TCR) 또는 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 핵산을 포함하는 벡터를 도입하는 단계, 및 배양보조 세포의 존재 하에서 형질도입된 γδ T 세포를 확장하는 단계를 포함하는 γδ T 세포를 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0051] 다른 양태에서, 활성화하는 단계, 형질도입하는 단계 및/또는 확장하는 단계는 인터류킨(IL)-1, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, 인터페론(IFN)-α 및 IFN-β로 구성되는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 사이토카인의 존재 하에서 수행될 수 있다.

[0052] 다른 양태에서, 배양보조 세포는 인간 세포, 비인간 세포, 바이러스 감염 세포, 비바이러스 감염 세포, 세포 추출물, 입자, 비드, 필라멘트 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0053] 다른 양태에서, 배양보조 세포는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 및/또는 림프아구 세포(LCL)를 포함할 수 있다.

[0054] 다른 양태에서, 활성화하는 단계, 형질도입하는 단계 및/또는 확장하는 단계는 OKT3의 존재 하에서 수행될 수 있다.

[0055] 다른 양태에서, 확장된 γδ T 세포는 δ1 및/또는 δ2 T 세포를 포함할 수 있다.

[0056] 다른 양태에서, 벡터는 바이러스성 벡터 또는 비바이러스성 벡터일 수 있다.

[0057] 다른 양태에서, 벡터는 TCR을 인코딩하는 핵산 및 CD8αβ 또는 CD8α를 인코딩하는 핵산을 포함할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0058] 특허 또는 출원 파일은 적어도 하나의 색상이 있는 도면을 포함한다. 색상 도면(들)을 갖는 본 특허 또는 특허

출원공개공보의 사본은 요청 및 필요한 수수료 지불 시 특허청에 의해 제공될 것이다.

본 개시내용의 성질, 목적, 및 이점의 추가적인 이해를 위해, 하기 도면과 함께 하기 상세한 설명을 참조해야 하며, 여기서 동일한 참조 번호는 동일한 구성요소를 나타낸다.

도 1은 본 개시내용의 실시양태에 따른 동종유래 T 세포 요법을 나타낸다. 동종유래 T 세포 요법은 건강한 공여체로부터 γδ T 세포를 채집하는 단계, 관심 외인성 유전자, 예컨대, 외인성 TCR의 바이러스성 형질도입 이후 세포 확장에 의해 γδ T 세포를 조작하는 단계, 환자에게 주입하기 전에, T 세포 생성물로서 냉동보존될 수 있는, 확장된 조작된 γδ T 세포를 채취하는 단계를 포함할 수 있다.

도 2는 본 개시내용의 실시양태에 따른 γδ T 세포 생산을 나타낸다. γδ T 세포 생산은 백혈구 또는 PBMC, 예를 들어, 백혈구성분채집술 생성물을 채집 또는 수득하는 단계, PBMC 또는 백혈구성분채집술 생성물로부터 αβ T 세포를 고갈시키는 단계를 포함할 수 있으며, 이후 γδ T 세포의 활성화, 형질도입, 확장 및, 선택적으로, 재자극했다.

도 3a 및 도 3b는 γδ T 세포의 확장에 대한 자가유래 단핵구를 사용한 재자극의 영향을 나타낸다. 도 3a는 재자극 과정을 나타낸다. 간단히 설명하자면, 0일차에, αβ-TCR 발현 T 세포(CD4+ 및 CD8+ T 세포 포함) 고갈된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)(“γδ T 세포”)가 졸레드로네이트(ZOL)(5μM), IL-2(100U/ml) 및 IL-15(100ng/ml)의 존재 하에서 활성화되었다. 3일차에, 활성화된 γδ T 세포가 모의 형질도입되었다. 4일차에, 모의 형질도입된 세포가 확장된다. 7일차에, 확장된 세포가 10(단핵구):1(γδ T 세포)의 비율로 4시간 동안 ZOL(100μM)의 존재 하에서 PBMC(Miltenyi)로부터 CD14+ 선택에 의해 수득된 자가유래 단핵구를 사용하여 재자극되었다.

도 3b는 단핵구를 사용한 재자극이 재자극이 없는 경우와 비교하여 2개의 공여체(D1 및 D2)로부터 수득된 γδ T 세포의 배수 확장을 증가시키는 것을 나타낸다. 재자극된 세포의 배수 확장은 10일 후 감소한다 14일까지, 재자극된 세포의 배수 확장은 재자극이 없는 경우와 유사한 배수 확장으로 감소한다.

도 4a 및 도 4b는 γδ T 세포의 확장에 대한 방사선 조사된 자가유래 단핵구를 사용한 재자극의 영향을 나타낸다. 도 4a는 재자극 과정을 나타낸다. 간단히 설명하자면, 0일차에, αβ-TCR 발현 T 세포(CD4+ 및 CD8+ T 세포 포함) 고갈된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)(“γδ T 세포”)가 졸레드로네이트(ZOL)(5μM), IL-2(100U/ml) 및 IL-15(100ng/ml)의 존재 하에서 활성화되었다. 2일차에, 활성화된 γδ T 세포가 모의 형질도입되었다. 3일차에, 모의 형질도입된 세포가 확장된다. 7일차에, 확장된 세포가 5:1 또는 10:1(αβ-TCR 발현 T 세포 고갈된 PBMC:γδ T 세포)의 비율로 4시간 동안 ZOL(100μM)의 존재 하에서 방사선 조사된 (100 Gy) 자가유래 αβ-TCR 발현 T 세포 고갈된 PBMC를 사용하여 재자극되었다.

도 4b는 5:1 및 10:1의 비율로 αβ-TCR 발현 T 세포 고갈된 PBMC를 사용한 재자극이 재자극이 없는 경우와 비교하여 2개의 공여체(D1 및 D2)로부터 수득된 γδ T 세포의 배수 확장을 증가시키는 것을 나타낸다.

도 5는 도 6 내지 도 11에서 제시되는 데이터를 생성하기 위해 사용되는 확장 과정을 나타낸다. 간단히 설명하자면, 0일차에, αβ-TCR 발현 T 세포(CD4+ 및 CD8+ T 세포 포함) 고갈된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)(“γδ T 세포”)가 졸레드로네이트(ZOL)(5μM), IL-2(100U/ml) 및 IL-15(100ng/ml)의 존재 하에서 활성화되었다. 2일차에, 활성화된 γδ T 세포가 모의 형질도입되었다. 3일차에, 모의 형질도입된 세포가 확장된다. 7일차에 및 14일차에, 확장된 세포는 1) 1:1, 5:1 또는 10:1(단핵구:γδ T 세포)의 비율로 자가유래 단핵구(PBMC(Miltenyi)로부터 CD14+ 선택에 의해 수득되며 4시간 동안 ZOL(100μM)를 사용하여 펄스 처리됨) 또는 2) 10:1 또는 20:1(αβ 고갈된 PBMC:γδ T 세포)의 비율로 방사선 조사된 (100 Gy) 자가유래 αβ-TCR 발현 T 세포 고갈된 PBMC(4시간 동안 ZOL(100μM)를 사용하여 펄스 처리됨)를 사용하여 재자극되었다.

도 6a 및 도 6b는 2개의 공여체(D1(도 6a) 및 D2(도 6b))로부터 유래한 γδ T 세포 확장에 대한 자가유래 단핵구 또는 방사선 조사된 자가유래 αβ 고갈된 PBMC를 사용한 여러 번의 재자극의 영향을 나타낸다. γδ T 세포는 도 5에 나타낸 바와 같이 활성화되고 확장되었다.

도 7a 내지 도 7c는 일 공여체로부터 유래한 γδ T 세포의 확장에 대한 자가유래 단핵구 또는 방사선 조사된 자가유래 αβ 고갈된 PBMC를 사용한 여러 번의 재자극의 영향을 나타낸다. γδ T 세포는 도 5에 나타낸 바와 같이 활성화되고 확장되었다. 도 7a는 총 γδ T 세포의 배수 확장을 나타낸다. 도 7b는 δ2 T 세포의 배수 확장을 나타낸다. 도 7c는 δ1 T 세포의 배수 확장을 나타낸다.

도 8a 내지 8c는 제2 공여체로부터 유래한 γδ T 세포의 확장에 대한 자가유래 단핵구 또는 방사선 조사된 자

가유래 αβ 고갈된 PBMC를 사용한 여러 번의 재자극의 영향을 나타낸다. γδ T 세포는 도 5에 나타낸 바와 같이 활성화되고 확장되었다. 도 8a는 총 γδ T 세포의 배수 확장을 나타낸다. 도 8b는 δ2 T 세포의 배수 확장을 나타낸다. 도 8c는 δ1 T 세포의 배수 확장을 나타낸다.

도 9는 자가유래 단핵구 또는 방사선 조사된 자가유래 αβ 고갈된 PBMC를 사용한 여러 번의 재자극이 확장된 γδ T 세포의 기억 표현형을 현저하게 변경하지 않는 것을 나타낸다. 일 공여체로부터 유래한 γδ T 세포가 도 5에 나타낸 바와 같이 활성화되었고 확장되었으며, 21일차에 채취되었고, 유세포 분석으로 분석되어 세포 표면의 CD45, CD27 및 CCR7의 검출로 기억 표현형을 결정하였다. CD27 발현의 소폭 증가가 10:1 단핵구를 사용하여 재자극된 확장된 γδ T 세포에서 검출되었다.

도 10은 자가유래 단핵구 또는 방사선 조사된 자가유래 αβ 고갈된 PBMC를 사용한 여러 번의 재자극이 확장된 γδ T 세포의 기억 표현형을 현저하게 변경하지 않는 것을 나타낸다.제2 공여체로부터 유래한 γδ T 세포가 도 5에 나타낸 바와 같이 활성화되었고 확장되었으며, 21일차에 채취되었고, 유세포 분석으로 분석되어 세포 표면의 CD45, CD27 및 CCR7의 검출로 기억 표현형을 결정하였다. CD27 발현의 소폭 증가가 10:1 단핵구를 사용하여 재자극된 확장된 γδ T 세포에서 검출되었다.

도 11a 및 11b는 확장된 γδ T 세포의 생존율에 대한 자가유래 단핵구 또는 방사선 조사된 자가유래 αβ 고갈된 PBMC를 사용한 여러 번의 재자극의 영향을 나타낸다. 2개의 공여체로부터 유래한 δ T 세포가 도 5에 나타낸 바와 같이 활성화되고 확장되었으며, 21일차에 채취되었고, 유세포 분석으로 분석되어 총 γδ T 세포 집단 내의 생존 세포의 백분율을 결정하였다. 공여체 1의 결과는 도 11a에 나와 있고 공여체 2의 결과는 도 11b에 나와 있다.

도 12a 및 도 12b는 γδ T 세포에 대한 조작된 종양 유래 세포의 공동배양의 영향을 나타낸다. 간단히 설명하자면, 0일차에, αβ-TCR 발현 T 세포(CD4+ 및 CD8+ T 세포 포함) 고갈된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)(“γδ T 세포”)가 졸레드로네이트(ZOL)(5μM), IL-2(100U/ml) 및 IL-15(100ng/ml)의 존재 하에서 활성화되었다. 방사선 조사된 종양 유래 세포(K562)가 ZOL의 존재 또는 부재 하에서 일부 검체에 2:1 비율(종양 유래 세포 : γδ T 세포)로 첨가되었다. 다른 검체는 항-CD28 또는 항-CD27 mAb 코팅 플레이트에서 배양되었다. 3일차에, 활성화된 γδ T 세포가 모의 형질도입되었다. 4일차에, 모의 형질도입된 세포가 확장되었다. 확장된 세포는 21일차에 동결되었다 도 12a 및 도 12b는 방사선 조사된 종양 유래 세포 +/- ZOL을 사용하여 자극된 2개의 공여체(D1(도 12a) 및 D2(도 12b))로부터 수득된 γδ T 세포가 항-CD28 항체 + ZOL, 항-CD27 항체 + ZOL 및 ZOL 단독(대조군)을 사용하여 자극된 경우보다 더 높은 배수 확장을 갖는 것을 나타낸다.

도 13a 내지 도 13c는 γδ T 세포의 활성화 동안 다양한 종양 유래 세포의 공동배양의 결과를 나타낸다. 도 13a는 1) 종양 유래 세포(대조군)의 부재 하에서; 2) 야생형 종양 유래 세포(K562 WT)를 사용하여; 3) 변형된 종양 유래 세포(K562 변이체 1)를 사용하여; 4) 변형된 종양 유래 세포(K562 변이체 2)를 사용하여; 5) ZOL의 부재 하에서 변형된 종양 유래 세포(K562 변이체 2)를 사용하여; 및 6) 7일차 및 14일차에 재자극(K562 변이체 2 + IL-2 + IL-15)을 사용하여 ZOL의 부재 하에서 변형된 종양 유래 세포(K562 변이체 2)를 사용하여; 졸레드로네이트(ZOL)(5μM), IL-2(100U/ml) 및 IL-15(100ng/ml)의 존재 하에서 0일차에 활성화된 2개의 공여체(D1(상단 채널) 및 D2(하단 패널))로부터 수득된 γδ T 세포의 배수 확장을 나타낸다. 도 13b 및 도 13c는 공여체 1(도 13b) 및 공여체 2(도 13c)에서 δ1(좌측 패널) 및 δ2(우측 패널)의 확장을 나타낸다.

도 14a 및 도 14b는 γδ T 세포의 활성화 동안 다양한 종양 유래 세포의 공동배양의 결과를 나타낸다. 도 14a 및 도 14b는 전체 생존 세포 집단 내에서 존재하는 γδ T 세포의 백분율을 나타낸다. 간단히 설명하자면, 2개의 공여체(D1(도 14a) 및 D2(도 14b))로부터 수득된 세포는 1) 종양 유래 세포(대조군)의 부재 하에서; 2) 야생형 종양 유래 세포(K562 WT)를 사용하여; 3) 변형된 종양 유래 세포(K562 변이체 1)를 사용하여; 4) 변형된 종양 유래 세포(K562 변이체 2)를 사용하여; 5) ZOL의 부재 하에서 변형된 종양 유래 세포(K562 변이체 2)를 사용하여; 및 6) 7일차 및 14일차에 재자극(K562 변이체 2 + IL-2 + IL-15)을 사용하여 ZOL의 부재 하에서 변형된 종양 유래 세포(K562 변이체 2)를 사용하여; 졸레드로네이트(ZOL)(5μM), IL-2(100U/ml) 및 IL-15(100ng/ml)의 존재 하에서 0일차에 활성화되었다.

도 15는 배양에서의 졸레드로네이트의 결여가 졸레드로네이트가 배양에 있었던 조건과 비교하여 다클론성 집단(δ1 및 δ2 γδ T 세포 모두)을 초래하는 것을 나타낸다. 간단히 설명하자면, 2개의 공여체(D1(상단 패널) 및 D2(하단 패널))로부터 수득된 세포는 1) 종양 유래 세포(대조군)의 부재 하에서; 2) 야생형 종양 유래 세포(K562)를 사용하여; 3) ZOL의 부재 하에서 변형된 종양 유래 세포(K562 변이체 2)를 사용하여; 4) 7일차 및 14일차에 재자극(K562 변이체 2 + IL-2 + IL-15)을 사용하여 ZOL의 부재 하에서 변형된 종양 유래 세포(K562 변이

체 2)를 사용하여; 5) 변형된 종양 유래 세포(K562 변이체 2)를 사용하여; 및 6) 변형된 종양 유래 세포(K562 변이체 1)를 사용하여; 졸레드로네이트(ZOL)(5μM), IL-2(100U/ml) 및 IL-15(100ng/ml)의 존재 하에서 0일차에 활성화되었다. 세포는 21일차에 채취되었으며 유세포 분석으로 분석되어 δ1 및 δ2 집단을 결정하였다.

도 16은 종양 유래 공동 배양이 확장된 γδ T 세포의 기억 표현형을 변경하지 않는 것을 나타낸다. 간단히 설명하자면, 2개의 공여체(D1(상단 패널) 및 D2(하단 패널))로부터 수득된 세포는 1) 종양 유래 세포(대조군)의 부재 하에서; 2) 야생형 종양 유래 세포를 사용하여; 3) ZOL의 부재 하에서 4-1BBL 및 막 결합 IL-15(mbIL15)를 발현하도록 조작된 종양 유래 세포를 사용하여; 4) 7일차 및 14일차에 재자극(4-1BBL 및 mbIL15 + IL-2 + IL-15를 발현하는 종양 유래 세포)을 사용하여 ZOL의 부재 하에서 4-1BBL 및 mbIL15를 발현하는 종양 유래 세포를 사용하여; 5) 4-1BBL 및 mbIL15를 발현하는 종양 유래 세포 사용하여; 및 6) CD86을 발현하는 종양 유래 세포를 사용하여; 졸레드로네이트(ZOL)(5μM), IL-2(100U/ml) 및 IL-15(100ng/ml)의 존재 하에서 0일차에 활성화되었다. 세포는 21일차에 채취되었으며 유세포 분석으로 분석되어 세포 표면의 CD45, CD27 및 CCR7의 검출로 기억 표현형을 결정하였다.

도 17a 및 17b는 2개의 공여체(D1(도 17a) 및 D2(도 17b))로부터 유래한 γδ T 세포 확장에 대한 방사선 조사된 동종유래 PBMC +/- LCL을 사용한 여러 번의 재자극의 영향을 나타낸다. 간단히 설명하자면, 2개의 공여체(D1 및 D2)로부터 수득된 세포는 졸레드로네이트(ZOL)(5μM), IL-2(100U/ml) 및 IL-15(100ng/ml)의 존재 하에서 0일차에 활성화되었으며, 2일차에 모의 형질도입되었고, 3일차에 확장되었다. 7일차 및 14일차에, 확장된 세포는 1) 대조군(100U/ml IL-2 + 100ng/ml IL-15); 2) PBMC+LCL+OKT3(2개 내지 3개의 공여체로부터 풀링된 25x106 방사선 조사된 동종유래 PBMC + 5x106 방사선 조사된 LCL + 30ng/ml sOTK3 + 50U/ml IL-2); 3) PBMC(2개 내지 3개의 공여체로부터 풀링된 25x106 방사선 조사된 동종유래 PBMC + 50U/ml IL-2); 4) LCL(5x106 방사선 조사된 LCL + 50U/ml IL-2); 또는 5) OKT3(30ng/ml sOTK3 + 50U/ml IL-2);을 사용하여 재자극되었다.

도 18a 내지 도 18c는 2개의 공여체로부터 유래한 γδ T 세포의 확장에 대한 방사선 조사된 동종유래 PBMC +/- LCL을 사용한 여러 번의 재자극의 영향을 나타낸다. γδ T 세포는 도 17a 및 도 17b에 대하여 상기 설명된 바와 같이 활성화되고 확장되었다. 도 18a 및 도 18b는 2개의 공여체로부터 유래한 δ1 T 세포의 배수 확장을 나타낸다. 도 18c는 대조군 처리(IL-2 + IL-15) 및 PBMC+LCL+OKT3 재자극 처리로부터 유래한 2개의 공여체로부터 유래한 21일차의 유세포 분석 결과를 나타낸다.

도 19a 및 도 19b는 PBMC +/- LCL을 사용하여 재자극된 2개의 공여체로부터 유래한 확장된 γδ T 세포의 기억 표현형을 나타낸다. 간단히 설명하자면, 2개의 공여체(D1 및 D2)로부터 수득된 세포는 졸레드로네이트(ZOL)(5μM), IL-2(100U/ml) 및 IL-15(100ng/ml)의 존재 하에서 0일차에 활성화되었으며, 2일차에 모의 형질도입되었고, 3일차에 확장되었다. 7일차에, 확장된 세포는 1) 대조군(100U/ml IL-2 + 100ng/ml IL-15); 2) PBMC+LCL+OKT3(2개 내지 3개의 공여체로부터 풀링된 25x106 방사선 조사된 동종유래 PBMC + 5x106 방사선 조사된 LCL + 30ng/ml OTK3 + 50U/ml IL-2); 3) PBMC(2개 내지 3개의 공여체로부터 풀링된 25x106 방사선 조사된 동종유래 PBMC + 50U/ml IL-2); 또는 4) LCL(5x106 방사선 조사된 LCL + 50U/ml IL-2);을 사용하여 재자극되었다. 세포는 14일차에 채취되었으며 유세포 분석으로 분석되어 세포 표면의 CD45, CD27 및 CCR7의 검출로 기억 표현형을 결정하였다.

도 20a 및 도 20b는, 펩티드 양성 U2OS 세포(도 20a) 또는 펩티드 음성 MCF7 세포(도 20b)에 대하여, 다양한 과정에 의해 제조된 TCR(TCR-T)을 사용하여 형질도입되거나 형질도입이 없는(NT) γδ T 세포의 사멸 활성을 나타낸다.

도 21은 본 개시내용의 일 실시양태에 따른 T 세포 생산 과정을 나타낸다.

도 22a 내지 도 22d는 대조군 과정(도 22a), 과정 1(도 22b), 과정 2(도 22c) 및 과정 3(도 22d)에 의해 제조되는 γδ T 세포의 배수 확장을 나타낸다.

도 23a 내지 도 23c는 다양한 과정에 의해 제조되는 표현형 CD27+CD45RA-(도 23a), CD62L+(도 23b) 및 CD57+(도 23c)를 나타낸다.

도 24a 내지 도 24d는 다양한 과정에 의해 제조되는 PD1(도 24a), LAG3(도 24b), TIM3(도 24c) 및 TIGIT(도 24d)를 발현하는 γδ T 세포의 백분율을 나타낸다.

도 25a 및 도 25b는 전이유전자, 예를 들어, TCR(FIG. 25a)을 발현하는 γδ T 세포의 백분율 및 다양한 과정에 의해 제조되는 γδ T 세포의 통합된 TCR(도 25b)의 복제 수를 나타낸다.

도 26a 내지 도 26c는 PRAME 펩티드/MHC 복합체에 결합하는 전이유전자, 예를 들어, CD8 및 TCR을 발현하는 γδ T 세포의 백분율 나타내며, 이는 대조군 과정(도 26a), 과정 2(도 26b) 및 과정 3(도 26c)에 의해 제조된다.

도 27a는 본 개시내용의 다른 실시양태에 T 세포 생산을 나타낸다.

도 27b는 다양한 과정에 의해 제조되는 γδ T 세포의 배수 확장을 나타낸다.

도 28a 내지 도 28c는 전이유전자, 예를 들어, CD8 및 TCR을 발현하는 γδ T 세포의 백분율을 나타내며, 이는 0일차에 K562를 사용한 자극 이후 2일차에 60μl(도 28a), 120μl(도 28b) 및 240μl(도 28c)로 전이유전자를 인코딩하는 바이러스성 벡터를 사용한 형질도입에 의해 제조된다.

도 28d는 도 28a 내지 도 28c에서 나타낸 과정에 의해 제조되는 γδ T 세포에서 통합된 전이유전자의 복제 수를 나타낸다.

도 28e는 전이유전자, 예를 들어, CD8 및 TCR을 발현하는 % γδ 세포의 백분율을 나타내며, 이는 60μl로 2일차에 전이유전자를 인코딩하는 바이러스성 벡터를 사용한 형질도입 이후 4일차에 K562 세포를 사용한 자극에 의해 제조되는 것을 나타낸다.

도 28f는 도 28e에서 나타낸 과정에 의해 제조되는 γδ T 세포에서 통합된 전이유전자의 복제 수를 나타낸다.

도 29는 전이유전자, 예를 들어, CD8 및 TCR을 발현하는 γδ T 세포의 백분율을 나타내며, 이는 다양한 과정에 의해 제조된다.

도 30은 본 개시내용의 다른 실시양태에 따른 γδ T 세포 생산을 나타낸다.

도 31a 내지 도 31d는 UACC257 세포(도 31a), U2OS 세포(도 31b), A375 세포(도 31c) 및 MCF7 세포(도 31d)에 대한 다양한 과정에 의해 제조되는 γδ T 세포의 사멸 활성을 나타낸다.

도 32a 내지 도 32c는 UACC257 세포(도 32a), U2OS 세포(도 32b) 및 MCF7 세포(도 32c)에 대한 다양한 과정에 의해 제조되는 γδ T 세포로부터의 IFNγ 분비를 나타낸다.

도 33a 내지 도 33c는 UACC257 세포(도 33a), U2OS 세포(도 33b) 및 MCF7 세포(도 33c)에 대한 다양한 과정에 의해 제조되는 γδ T 세포로부터의 TNFα 분비를 나타낸다.

도 34a 내지 도 34c는 UACC257 세포(도 34a), U2OS 세포(도 34b) 및 MCF7 세포(도 34c)에 대한 다양한 과정에 의해 제조되는 γδ T 세포로부터의 GM-CSF 분비를 나타낸다.

도 35a 및 도 35b는 다양한 과정에 의해 제조되는 2개의 공여체(공여체 1(도 35a) 및 공여체 2(도 35b))로부터 수득되는 γδ T에 의해 유도되는 UACC257 세포의 성장 억제를 나타낸다.

도 36은 다양한 과정에 의해 제조되는 PD1, LAG3, TIM3 또는 TIGIT를 발현하는 전이유전자(CD8 및 TCR) 발현 γδ T 세포의 백분율을 나타낸다.

도 37은 본 개시내용의 일부 실시양태에 따른 γδ T 세포 생산을 나타낸다.

도 38은 다양한 과정에 의해 제조되는 CD28+CD62L+ γδ T 세포를 나타낸다.

도 39a 내지 도 39c는 다양한 과정에 의해 제조되는 3개의 공여체(SD01004687(도 39a), D155410(도 39b) 및 SD010000256(도 39c))로부터 수득되는 γδ T 세포의 배수 확장을 나타낸다.

도 40a 내지 도 40c는 대조군 과정(도 40a), HDACi + IL-21(w1)(도 40b) 및 HDACi + IL-21(w2)(도 40c)에 의해 제조되는 δ1 및 δ2 T 세포의 백분율을 나타낸다.

도 41a는 다양한 과정에 의해 제조되는 CD28+CD62L+ γδ T 세포의 백분율을 나타낸다.

도 41b는 다양한 과정에 의해 제조되는 CD27+CD45RA- γδ T 세포의 백분율을 나타낸다.

도 41c는 다양한 과정에 의해 제조되는 CD57+ γδ T 세포의 백분율을 나타낸다.

도 42은 본 개시내용의 일부 실시양태에 따른 γδ T 세포 생산을 나타낸다.

도 43a 및 도 43b는 IL-2Rα, IL-2Rβ, IL-2Rγ, IL-7Rα 및 IL-21R을 발현하는 2개의 공여체(D155410(도 43a) 및 SD010004867(도 43b))로부터 수득되는 γδ T 세포의 백분율을 나타낸다.

도 44a 내지 도 44c는 다양한 과정에 의해 제조되는 3개의 공여체(SD010004867(도 44a), D155410(도 44b) 및

SD010000256(도 44c))로부터 수득되는 γδ T 세포의 배수 확장을 나타낸다.

도 45a 내지 도 45c는 IL-12 + IL-18 프라임(도 45a), IL-2 + IL-15(도 45b) 및 대조군 과정(도 45c)에 의해 제조되는 δ1 및 δ2 T 세포의 백분율을 나타낸다.

도 46a는 다양한 과정에 의해 제조되는 CD27+CD45RA- γδ T 세포의 백분율을 나타낸다.

도 46b는 다양한 과정에 의해 제조되는 CD28+CD62L+ γδ T 세포의 백분율을 나타낸다.

도 46c는 다양한 과정에 의해 제조되는 CD57+ γδ T 세포의 백분율을 나타낸다.

도 47a 및 도 47Bb 다양한 과정에 의해 제조되는 2개의 공여체(D148960(도 47a) 및 SD010000723(도 47b))로부터 수득되는 δ1 및 δ2 T 세포의 백분율을 나타낸다.

도 48a 및 도 48b는 다양한 과정에 의해 제조되는 공여체 SD010000723로부터 수득되는 δ1(도 48a) 및 δ2(도 48b) T 세포의 백분율을 나타낸다.

도 49a 및 도 49b는 다양한 과정에 의해 제조되는 공여체 D148960로부터 수득되는 δ1(도 49a) 및 δ2(도 49b) T 세포의 백분율을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059] 동종이계 T 세포 요법은 유전자 조작 동종이계 γδ T 세포를 기반으로 하여 외인성 TCR을 발현할 수 있다. 이소성 TCR 또는 CAR을 통한 특이적 종양 인식에 더해, γδ T 세포는 본원에 설명된 바와 같이 많은 종양 유형에 대한 활성을 가질 수 있다.

[0060] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "γδ T 세포(감마 델타 T 세포)"는 이의 표면에서 별개의 T 세포 수용체(TCR)인 γδ TCR을 발현하는 T 세포의 하위집단을 지칭하며, 이는 1개의 γ 사슬 및 1개의 δ 사슬로 구성된다. 용어 "γδ T 세포"는 구체적으로 Vδ1 및 Vδ2, Vδ3 γδ T 세포뿐만 아니라 나이브(naive), 작용기 기억, 중추 기억 및 말단 분화 γδ T 세포를 포함하나 이에 제한되지 않는 γδ T 세포의 모든 하위집단을 포함한다. 추가 예로서, 용어 "γδ T 세포"는 Vδ4, Vδ5, Vδ7 및 Vδ8 γδ T 세포뿐만 아니라 Vγ2, Vγ3, Vγ5, Vγ8, Vγ9, Vγ10 및 Vγ11 γδ T 세포를 포함한다.

[0061] "농축된" 세포 집단 또는 제제는 출발 집단 내 해당 세포 유형의 백분율보다 더 큰 백분율의 특이적 세포 유형을 함유하는 출발 혼합 세포 집단으로부터 유래된 세포 집단을 지칭한다. 예를 들어, 출발 혼합 세포 집단은 특이적 γδ T 세포 집단에 대해 농축될 수 있다. 일 실시양태에서, 농축된 γδ T 세포 집단은 출발 집단 내 해당 세포 유형의 백분율보다 더 큰 백분율의 δ1 세포를 함유한다. 다른 예로서, 농축된 γδ T 세포 집단은 출발 집단 내 해당 세포 유형의 백분율보다 더 큰 백분율의 δ1 세포와 더 큰 백분율의 δ3 세포를 둘 다 함유할 수 있다. 또 다른 예로서, 농축된 γδ T 세포 집단은 출발 집단 내 해당 세포 유형의 백분율보다 더 큰 백분율의 δ1 세포와 더 큰 백분율의 δ4 세포를 둘 다 함유할 수 있다. 또 다른 예로서, 농축된 γδ T 세포 집단은 출발 집단 내 해당 세포 유형의 백분율보다 더 큰 백분율의 δ1 T 세포, δ3 T 세포, δ4 T 세포 및 δ5 T 세포를 함유할 수 있다. 다른 실시양태에서, 농축된 γδ T 세포 집단은 출발 집단 내 해당 세포 유형보다 더 큰 백분율의 δ2 세포를 함유한다. 또 다른 실시양태에서, 농축된 γδ T 세포 집단은 출발 집단 내 해당 세포 유형보다 더 큰 백분율의 δ1 세포와 δ2 세포를 둘 다 함유한다. 모든 실시양태에서, 농축된 γδ T 세포 집단은 더 적은 백분율의 αβ T 세포 집단을 함유한다.

[0062] 본원에서 사용된 바와 같이 "확장된"은 농축된 제제에서 원하는 또는 표적 세포 유형(예를 들어, δ1 및/또는 δ2 T 세포)의 수가 초기 또는 출발 세포 집단 내 수보다 더 높다는 것을 의미한다. "선택적으로 확장"은 표적 세포 유형(예를 들어, δ1 또는 δ2 T 세포)이 다른 비표적 세포 유형, 예를 들어, αβ T 세포 또는 NK 세포보다 우선적으로 확장될 수 있다는 것을 의미한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 활성화제는 δ2 T 세포의 현저한 확장 없이, 예를 들어, 조작된 또는 비조작된, δ1 T 세포를 선택적으로 확장할 수 있다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 활성화제는 δ1 T 세포의 현저한 확장 없이, 예를 들어, 조작된 또는 비조작된, δ2 T 세포를 선택적으로 확장할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 활성화제는 δ2 T 세포의 현저한 확장 없이, 예를 들어, 조작된 또는 비조작된, δ1 및 δ3 T 세포를 선택적으로 확장할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 활성화제는 δ2 T 세포의 현저한 확장 없이, 예를 들어, 조작된 또는 비조작된, δ1 및 δ4 T 세포를 선택적으로 확장할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 활성화제는 δ2 T 세포의 현저한 확장 없이, 예를 들어, 조작된 또는 비조작된, δ1, δ3, δ4 및 δ5 T 세포를 선택적으로 확장할 수 있다. 이러한 맥락에서, 용어 "현

저한 확장 없이"는 우선적으로 확장된 세포 집단이 기준 세포 집단보다 적어도 10배, 바람직하게는 100배 및 더 바람직하게는 1,000배보다 많이 확장된다는 것을 의미한다. 확장된 T 세포 집단은 예를 들어, 상이한 집단을 구별하는 세포 표면 마커에 대한 자기 활성화 세포 분류(MACS) 및/또는 형광 활성화 세포 분류(FACS) 염색에 의해 특징지어질 수 있다.

[0063] γδ T 세포의 단리

[0064] 일부 양태에서, 본 발명은 조작된 또는 비조작된 γδ T 세포의 확장을 위한 생체외 방법을 제공할 수 있다. 일부 경우, 방법은 γδ T 세포의 특이적 집단의 확장을 선호하는 사이토카인, 예컨대, IL-4, IL-2 또는 IL-15 또는 이들의 조합을 포함하지 않을 수 있는 하나 이상의 (예를 들어, 제1 및/또는 제2) 확장 단계를 사용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 단리된 혼합된 세포 집단으로부터 농축된 γδ T 세포 집단을 생성하기 위한 생체외 방법을 제공할 수 있으며, 이는 하나 이상의 제제와 혼합된 세포 집단을 접촉시키는 단계를 포함하며, 이는 농축된 γδ T 세포 집단을 제공하기 위해 각각 δ1 TCR; δ1 및 δ4 TCR; 또는 δ1, δ3, δ4 및 δ5 TCR에 특이적인 에피토프에 결합하는 단계에 의해 δ1 T 세포; δ1 T 세포 및 δ3 T 세포; δ1 T 세포 및 δ4 T 세포; 또는 δ1, δ3, δ4 및 δ5 T 세포를 선택적으로 확장한다. 다른 양태에서, 본 발명은 단리된 혼합된 세포 집단으로부터 농축된 γδ T 세포 집단을 생성하는 생체외 방법을 제공할 수 있으며, 이는 하나 이상의 제제와 혼합된 세포 집단을 접촉시키는 단계를 포함하며, 이는 농축된 γδ T 세포 집단을 제공하기 위해 δ2 TCR에 특이적인 에피토프에 결합하는 단계에 의해 δ2 T 세포를 선택적으로 확장한다.

[0065] 일부 양태에서, 본 개시내용은 T 세포의 확장 및/또는 활성화에 관한 것이다. 다른 양태에서, 본 개시내용은 γδ TCR에 특이적인 에피토프, 예컨대, γδ TCR에 대한 항체에 결합하는 제제의 부재 하에서 γδ T 세포의 확장 및/또는 활성화에 관한 것이다. 다른 양태에서, 본 개시내용은 전이유전자 발현을 위해 사용될 수 있는 γδ T 세포의 확장 및/또는 활성화에 관한 것이다

[0066] 본 개시내용은 α-TCR 및/또는 β-TCR T 양성 세포를 고갈시키는 동안 γδ T 세포의 확장 및 활성화에 관한 것이다. 또한, 확장된 γδ T 세포 및 고갈되거나 감소된 α-TCR 및/또는 β-TCR 양성 세포를 포함하는 T 세포 집단이 본 개시내용에 의해 제공된다. 또한, 본 개시내용은 개시된 T 세포 집단을 사용하는 방법을 제공한다.

[0067] 일부 양태에서, 대규모 우수 의약품 제조·관리 기준(Good Manufacturing Practice; GMP) 등급 TCR 조작된 Vγ9δ2 T 세포를 생성하기 위한 방법이 본원에서 제공된다.

[0068] 배양보조 세포의 부재 하에서, 정제된 γδ T 세포로의 IL-18의 첨가는 IL-2(CD25 또는 IL-2Ra)에 대한 표면 고친화성 수용체 양에서 주목할 만한 증가를 갖는 γδ T 세포의 확장을 증진한다. 또한, 톨 유사 수용체 2(TLR2) 리간드인 암포테리신 B는 γδ T 세포, CD8+ T 세포 및 NK 세포를 활성화하고 CD25의 표면 발현의 검출, 고 친화성 IL-2Rα를 증진할 수 있다. 종합적으로, 이러한 관찰은 Vγ9δ2 T 세포의 졸레드로네이트 매개 활성화 및 확장에서 IL-2 신호전달의 중요한 역할을 강조한다. 따라서, IL-2 신호전달을 통한 γδ T 세포 증식에 대한 IL-2의 가용성을 최대화하기 위해(또는 αβ T 세포의 높은 수치로 IL-2의 격리를 최소화하기 위해), 본 개시내용의 방법은 항-αβ TCR 상업적으로 이용가능한 GMP 시약을 사용하여 정상 PBMC로부터 αβ T 세포를 고갈시키는 단계를 포함할 수 있다. 재조합 IL-18은 현재 상업적인 GMP 시약으로 이용가능하지 않기 때문에, 본 개시내용의 방법은 저용량 암포테리신 B를 갖는 배양을 보충하여 CD25 표면 발현을 증가시켜 IL-2 결합 및 신호전달을 증진할 수 있으며, 이는 결과적으로 활성화/확장 동안 IL-2 반응성을 증진할 수 있다. 또한, IL-15는 IL-15가 IPP로 처리된 Vγ9δ2 T 세포의 증식 및 생존을 증가시키는 것으로 나타났기 때문에 첨가될 수 있다.

[0069] 도 1은 종양에서 관심 표적을 발현하는 특이적 암을 갖는 적합한 환자의 신속한 치료를 위해 “기성품” T 세포 생성물, 예컨대, γδ T 세포 생성물을 전달할 수 있는 입양 동종유래 T 세포 요법을 위한 접근을 나타낸다. 이러한 접근은 건강한 공여체로부터 γδ T 세포를 채집하는 단계, 관심 외인성 유전자, 예컨대, 외인성 TCR의 바이러스성 형질도입 이후 세포 확장에 의해 γδ T 세포를 조작하는 단계, 환자에게 주입하기 전에, “기성품” T 세포 생성물로서 냉동보존될 수 있는, 확장된 조작된 γδ T 세포를 채취하는 단계를 포함할 수 있다. 그러므로, 이러한 접근은 개인화된 T 세포 생산에 대한 필요를 제거할 수 있다.

[0070] 일부 양태에서, γδ T 세포를 단리하기 위해, γδ T 세포는 대상체로부터 또는 대상체의 복합 검체로부터 단리될 수 있다. 일부 양태에서, 복합 검체는 말초 혈액 검체, 제대혈 검체, 종양 검체, 줄기 세포 전구체, 종양 생검, 림프이거나 또는 외부 환경과 직접 접촉하는 대상체의 상피 부위로부터 유래되거나 또는 줄기 전구체 세포로부터 유래될 수 있다. γδ T 세포는, 예를 들어, 유세포 분석 기법을 사용하여 하나 이상의 세포 표면 마

커를 발현하는 γδ T 세포를 분류하여, 대상체의 복합 검체로부터 직접 단리될 수 있다. 야생형 γδ T 세포는 γδ T 세포와 연관될 수 있는 많은 항원 인식, 항원 제시, 공동 배양 및 유착을 제시할 수 있다. 하나 이상의 세포 표면 마커, 예컨대, 특이적 γδ TCR, 항원 인식, 항원 제시, 리간드, 유착 분자 또는 공동자극 분자는 복합 검체로부터 야생형 γδ T 세포를 단리하기 위해 사용될 수 있다. γδ T 세포와 연관되거나 이에 의해 발현되는 다양한 분자가 복합 검체로부터 γδ T 세포를 단리하기 위해 사용될 수 있다. 다른 양태에서, 본 개시내용은 Vδ1+, Vδ2+, Vδ3+ 세포 또는 이들의 임의의 조합의 혼합된 집단의 단리를 위한 방법을 제공한다.

[0071] 예를 들어, 말초 혈액 단핵 세포는, 예를 들어, Ficoll-Paque™ PLUS(GE Healthcare) 시스템을 포함한 성분채집술 기계 또는 다른 적합한 장치/시스템을 사용하여 대상체로부터 채취될 수 있다. γδ T 세포(들) 또는 γδ T 세포(들)의 원하는 하위집단은, 예를 들어, 유세포 분석 기법을 사용하여, 채집된 샘플로부터 정제될 수 있다. 또한, 제대혈 세포는 대상체의 출생 동안 제대혈로부터 수득될 수 있다.

[0072] 채집된 γδ T 세포에서 발현되는 세포 표면 마커의 양성 및/또는 음성 선택은 말초 혈액 검체, 제대혈 검체, 종양, 종양 생검, 조직, 림프로부터 또는 대상체의 상피 검체로부터 γδ T 세포 또는 유사한 세포 표면 마커를 발현하는 γδ T 세포의 집단을 직접 단리하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, γδ T 세포는 CD2, CD3, CD4, CD8, CD24, CD25, CD44, Kit, TCR α, TCR β, TCR α, TCR δ, NKG2D, CD70, CD27, CD30, CD16, CD337(NKp30), CD336(NKp46), OX40, CD46, CCR7 및 다른 적합한 세포 표면 마커의 양성 또는 음성 발현에 기반한 복합 검체로부터 단리될 수 있다.

[0073] 일부 양태에서, γδ T 세포는 시험관내에서 배양된 복합 검체로부터 단리될 수 있다. 다른 양태에서, 특이적 세포 집단, 예컨대, 단핵구, αβ T 세포, B 세포 및 NK 세포의 사전 고갈이 없는 전체 PBMC 집단은 활성화되고 확장될 수 있다. 다른 양태에서, 농축된 γδ T 세포 집단은 이들의 특이적 활성화 및 확장 전에 생성될 수 있다. 다른 양태에서, γδ T 세포의 활성화 및 확장은 천연 또는 조작된 APC의 존재 없이 수행될 수 있다. 다른 양태에서, 종양 표본으로부터 유래한 γδ T 세포의 단리 및 확장은 γδ TCR에 특이적인 항체를 포함하는 부동화된 γδ T 세포 미토겐 및 렉틴을 포함하는 다른 γδ TCR 활성화 제제를 사용하여 수행될 수 있다. 다른 양태에서, 종양 표본으로부터 유래한 γδ T 세포의 단리 및 확장은 γδ TCR에 특이적인 항체를 포함하는 부동화된 γδ T 세포 미토겐 및 렉틴을 포함하는 다른 γδ TCR 활성화 제제의 부재 하에서 수행될 수 있다.

[0074] 일부 양태에서, γδ T 세포는 대상체, 예를 들어, 인간 대상체의 백혈구성분채집술로부터 단리된다. 다른 양태에서, γδ T 세포는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 단리되지 않는다.

[0075] 도 2는 본 개시내용의 실시양태에 따른 γδ T 세포 생산을 나타낸다. 이러한 과정은 백혈구성분채집술 생성물로부터 백혈구 또는 PBMC를 채집하거나 수득하는 단계를 포함할 수 있다. 백혈구성분채집술은 공여체로부터 전혈을 채집하는 단계, 및 성분채집술 기계를 사용하여 성분을 분리하는 단계를 포함할 수 있다. 성분채집술 기계는 원하는 혈액 성분을 분리하며 나머지는 공여체의 순환계로 반환한다. 예를 들어, 백혈구, 혈장 및 혈소판은 성분채집술 장비를 사용하여 채집될 수 있으며, 적혈구 및 호중구는 공여체의 순환계로 반환된다. 상업적으로 이용가능한 백혈구성분채집술 생성물이 이러한 과정에서 사용될 수 있다. 백혈구 세포를 수득하는 다른 방법은 이를 버피 코트로부터 수득하는 것이다. 버피 코트를 단리하기 위해, 전체 항응고된 혈액이 공여체로부터 수득되고 원심분리된다. 원심분리 후, 혈액은 혈장, 적혈구 및 버피 코트로 분리된다. 버피 코트는 혈장과 적혈구 층 사이에 위치한 층이다. 백혈구성분채집술 채집은 버피 코트 채집에 의해 도달된 경우보다 높은 순도와 상당히 증가된 단핵 세포 함량을 야기할 수 있다. 백혈구성분채집술을 사용하여 가능한 단핵 세포 함량은 버피 코트로부터 수득된 경우보다 전형적으로 20배 더 높을 수 있다. 단핵 세포를 농축하기 위해, 피콜 구배의 사용이 추가 분리를 위해 필요할 수 있다.

[0076] PBMC로부터 αβ T 세포를 고갈시키기 위해, αβ TCR 발현 세포는, 예를 들어, 항-αβ TCR 항체로 코팅된 CliniMACS® 자기 비드를 사용하는, 자기 분리에 의해 PBMC로부터 분리한 다음, αβ TCR-T 세포 고갈된 PBMC를 냉동보존할 수 있다. "기성품" T 세포 생성물을 생산하기 위해, 냉동보존된 αβ TCR-T 세포 고갈된 PBMC가 해동되고 1 내지 10일 동안, 예를 들어, 2 내지 6일 동안 아미노비스포스포네이트 및/또는 이소펜테닐 파이로포스페이트(IPP) 및/또는 사이토카인, 예를 들어, 인터류킨 2(IL-2), 인터류킨 15(IL-15), 및/또는 인터류킨 18(IL-18) 및/또는 다른 활성화제, 예를 들어, 톨 유사 수용체 2(TLR2) 리간드의 존재 하에서 소/중규모, 예를 들어, 24 내지 4-6 웰 플레이트 또는 T75/T175 플라스크에서 또는 대규모, 예를 들어, 50 ml 내지 100리터 백에서 활성화될 수 있다.

[0077] 일부 양태에서 단리된 γδ T 세포는 하나 이상의 항원과의 접촉에 반응하여 신속하게 확장할 수 있다. Vγ9Vδ2+ T 세포와 같은 일부 γδ T 세포는 조직 배양 중 프레닐-파이로포스페이트, 알킬 아민, 대사산물 또는 미

생물 추출물과 같은 일부 항원과의 접촉에 반응하여 시험관내에서 신속하게 확장할 수 있다. 자극된 γδ T 세포는 복합 검체로부터 유래한 γδ T 세포의 단리를 용이하게 할 수 있는 많은 항원 제시, 공동자극 및 유착 분자를 제시할 수 있다. 복합 검체 내의 γδ T 세포는 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일 또는 다른 적합한 기간 동안 적어도 하나의 항원을 사용하여 시험관내에서 자극될 수 있다. 적합한 항원을 사용하는 γδ T 세포의 자극은 시험관내 γδ T 세포 집단을 확장할 수 있다.

[0078] 시험관내 복합체 검체로부터 γδ T 세포의 확장을 자극하기 위해 사용될 수 있는 항원의 비제한적 예는 프레닐-파이로포스페이트, 예컨대, 이소펜테닐 파이로포스페이트(IPP), 알킬-아민, 인간 미생물 병원균의 대사물질, 상용 박테리아의 대사물질, 메틸-3-부테닐-1-파이로포스페이트(2M3B1PP), (E)-4-하이드록시-3-메틸-부트-2-엔일 파이로포스페이트(HMB-PP), 에틸 파이로포스페이트(EPP), 파르네실 파이로포스페이트(FPP), 디메틸알릴 포스페이트(DMAP), 디메틸알릴 파이로포스페이트(DMAPP), 에틸-아데노신 트리포스페이트(EPPPA), 제라닐 파이로포스페이트(GPP), 제라닐제라닐 파이로포스페이트(GGPP), 이소펜테닐-아데노신 트리포스페이트(IPPPA), 모노에틸 포스페이트(MEP), 모노에틸 파이로포스페이트(MEPP), 3-포르밀-1-부틸-파이로포스페이트(TUBAg 1), X-파이로포스페이트(TUBAg 2), 3-포르밀-1-부틸-우리딘 트리포스페이트(TUBAg 3), 3-포르밀-1-부틸-데옥시티미딘 트리포스페이트(TUBAg 4), 모노에틸 알킬아민, 알릴 파이로포스페이트, 크로토일 파이로포스페이트, 디메틸알릴-γ-우리딘 트리포스페이트, 크로토일-γ-유리딘 트라이포스페이트, 알릴-γ-우리딘 트리포스페이트, 에틸아민, 이부소틸아민, sec-부틸아민, 이소-아밀아민 및 질소 함유 비스포스포네이트를 포함할 수 있다.

[0079] γδ T 세포의 활성화 및 확장은 특이적 γδ T 세포 증식 및 지속적 집단을 촉발하기 위해 본원에 설명된 활성화제 및 공동자극제를 사용하여 수행될 수 있다. 일부 양태에서, 상이한 배양으로부터 유래한 γδ T 세포의 활성화 및 확장은 별개의 클론성 또는 혼합 다클론성 집단 하위집단을 이룰 수 있다. 다른 양태에서, 상이한 작용제가 특이적 γδ 활성화 신호를 제공하는 제제를 식별하기 위해 사용될 수 있다 다른 양태에서, 특이적 γδ 활성화 신호를 제공하는 제제는 γδ TCR로 향하는 상이한 단클론성 항체(MAb)일 수 있다. 다른 양태에서, 세포 에너지 및 세포자멸사의 유도 없이 특이적 γδ T 세포 증식의 촉발을 보조하는 동반 공동자극제가 사용될 수 있다. 이러한 공동자극제는 γδ 세포에서 발현되는 수용체에 결합하는 리간드, 예컨대, NKG2D, CD161, CD70, JAML, DNAX 부속 분자-1(DNAM-1), ICOS, CD27, CD137, CD30, HVEM, SLAM, CD122, DAP 및 CD28을 포함할 수 있다. 다른 양태에서, 공동자극제는 CD2 및 CD3 분자에서 고유한 에피토프에 특이적인 항체일 수 있다. CD2 및 CD3은 αβ 또는 γδ T 세포에서 발현되는 경우 상이한 배좌 구조를 가질 수 있다. 다른 양태에서, CD3 및 CD2에 대한 특이적 항체는 별개의 γδ T 세포의 활성화로 이어질 수 있다.

[0080] 일부 양태에서, γδ T 세포의 활성화 및/또는 확장은 배양보조 세포, 예컨대, 종양 세포, 예를 들어, K562 세포 또는 림프아구 세포(LCL)의 존재 하에서 수행될 수 있다. 일부 양태에서, 배양보조 세포는 하나 이상의 공동자극제, 예컨대, 예를 들어, CD86, 4-1BBL, IL-15 및 막 결합 IL-15(mbIL-15)를 발현하기 위해 변형될 수 있다. 일부 양태에서, 배양보조 세포는 자가유래 세포, 예컨대, 단핵구 또는 PBMC일 수 있다. 배양보조 세포는 방사선 조사된 배양보조 세포, 예컨대, γ선 조사된 배양보조 세포일 수 있다. 일부 양태에서, 배양보조 세포는 활성화 동안 γδ T 세포와 공동배양된다. 일부 양태에서, 배양보조 세포는, 예를 들어, 하나 이상의 재자극 단계에서, 확장 동안 γδ T 세포와 공동배양된다. 활성화 동안 사용되는 배양보조 세포는 확장 동안 사용되는 배양보조 세포와 동일하거나 상이할 수 있다.

[0081] 일부 양태에서, γδ T 세포 및 배양보조 세포는 약 1:1 내지 약 50:1(배양보조 세포:γδ T 세포)의 비율로 존재한다. 일부 양태에서, γδ T 세포 및 배양보조 세포는 약 2:1 내지 약 20:1(배양보조 세포:γδ T 세포)의 비율로 존재한다. 일부 양태에서, γδ T 세포 및 배양보조 세포는 약 1:1, 약 1:5:1, 약 2:1, 약 3:1, 약 4:1, 약 5:1, 약 6:1, 약 7:1, 약 8:1, 약 9:1, 약 10:1, 약 11:1, 약 12:1, 약 13:1, 약 14:1, 약 15:1, 약 20:1, 약 25:1, 약 30:1, 약 35:1, 약 40:1, 약 45:1 또는 약 50:1(배양보조 세포:γδ T 세포)의 비율로 존재한다.

[0082] γδ T 세포의 집단은 γδ T 세포를 조작하는 단계 전에 생체외에서 확장될 수 있다. 시험관내에서 γδ T 세포 집단의 확장을 촉진하기 위해 사용될 수 있는 시약의 비제한적인 예는 항-CD3 또는 항-CD2, 항-CD27, 항-CD30, 항-CD70, 항-OX40 항체, IL-2, IL-15, IL-12, IL-9, IL-33, IL-18 또는 IL-21, CD70(CD27 리간드), 피토헤마글루티닌(PHA), 콘카발린 A(ConA), 미국자리공(PWM), 단백질 땅콩 응집소(PNA), 대두 응집소(SBA), 렌즈콩 응집소(LCA), 완두 응집소(PSA), 헬릭스 포마티아 응집소(HPA), 비시아 그라미네아 렉틴(VGA) 또는 T 세포 증식을 자극할 수 있는 다른 적합한 미토겐을 포함할 수 있다.

[0083] 광범위한 항원을 인식하는 γδ T 세포의 능력은 γδ T 세포의 유전자 조작에 의해 증진될 수 있다. 일부 양태에서, γδ T 세포는 조작되어 생체내에서 선택된 항원을 인식하는 보편 동종이계 요법을 제공할 수 있다.

γδ T 세포의 유전자 조작은 생체외 및 생체내 T 세포 증식, 생존 및 기능을 증진시키기 위해 단리된 γδ T 세포(들)의 게놈, 사이토카인(IL-15, IL-12, IL-2. IL-7. IL-21, IL-18, IL-19, IL-33, IL-4, IL-9, IL-23, IL1β)으로의 종양 인식 모이어티, 예컨대, αβ TCR, γδ TCR, 단일 수용체로 항원 결합 및 T 세포 활성화 기능을 조합하는 키메라 항원 수용체(CAR), 이의 항원 결합 단편 또는 림프구 활성화 도메인을 발현하는 작제물을 안정하게 통합시키는 것을 포함할 수 있다. 또한, 단리된 γδ T 세포의 유전자 조작은 단리된 γδ T 세포의 게놈, 예컨대, MHC 좌(들)에서 하나 이상의 내인성 유전자의 유전자 발현을 제거하거나 방해하는 단계를 포함할 수 있다.

[0084] 본원에 개시된 T 세포 생산 방법은 신뢰가능하며 재현가능한 방식으로 고 친화성 T 세포 수용체(조작된 TCR) 또는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하기 위해 변형된 T 세포를 확장하는 단계에 유용할 수 있다. 일 실시양태에서, T 세포는 유전자 변형되어 하나 이상의 조작된 TCR 또는 CAR을 발현할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, T 세포는 αβ T 세포, γδ T 세포 또는 자연 살해 T 세포일 수 있다.

[0085] 조작된 TCR

[0086] 자연 발생 T 세포 수용체는 2개의 하위단위인 α-하위단위 및 β-하위단위를 포함하며, 각각은 각 T 세포의 게놈의 재조합 사건으로 생성된 고유한 단백질이다. TCR의 라이브러리는 특정 표적 항원에 대한 선택성에 대해 선별될 수 있다. 이러한 방식으로 표적 항원에 대한 높은 결합활성 및 반응성을 갖는 자연 TCR 세포는 선택되고 클로닝되며 이후 입양 면역요법을 위해 사용되는 T 세포의 집단으로 도입될 수 있다.

[0087] 일 실시양태에서, T 세포는 표적 항원을 발현하는 종양 세포에 대해 T 세포에 특이성을 부여하는 TCR을 형성하는 능력을 갖는 TCR의 하위단위를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 도입하는 단계에 의해 변형될 수 있다. 특정 실시양태에서, 하위단위가 표적 세포로 돌아갈 수 있는 능력을 형질감염된 T 세포에 부여하는 TCR을 형성하는 기능을 보유하고 면역학적으로 관련된 사이토카인 신호전달에 참여하는 한, 하위단위는 자연 발생 하위단위와 비교하여 하나 이상의 아미노산 치환, 결실, 삽입 또는 변형을 갖는다. 또한, 조작된 TCR은 바람직하게는 높은 결합활성을 갖는 관련 종양 연관 펩티드를 나타내는 표적 세포에 결합하며 선택적으로 생체내에서 관련 펩티드를 제시하는 표적 세포의 효율적인 사멸을 매개한다.

[0088] 조작된 TCR을 인코딩하는 핵산은 바람직하게는 T 세포의 (자연적으로 발생하는) 염색체에서 이들의 자연적인 맥락으로부터 단리될 수 있으며, 본원에 설명된 바와 같이 적합한 벡터로 혼입될 수 있다. 유용하게 이들을 포함하는 핵산 및 벡터 모두는 세포로 전달될 수 있으며, 이러한 세포는 바람직하게는 T 세포, 더 바람직하게는 γδ T 세포일 수 있다. 그 후, 변형된 T 세포는 형질도입된 핵산 또는 핵산들에 의해 인코딩된 TCR의 두 사슬 모두를 발현 가능할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 조작된 TCR은 특정 TCR을 일반적으로 발현하지 않는 T 세포로 도입될 수 있기 때문에 외인성 TCR일 수 있다. 조작된 TCR의 필수 양태는 이것이 주요 조직적합성 복합체(MHC) 또는 유사한 면역학적 성분에 의해 제시된 종양 항원에 대해 높은 결합활성을 가질 수 있다는 것이다. 조작된 TCR과 대조적으로, CAR은 조작되어 MHC 비의존적인 방식으로 표적 항원에 결합할 수 있다.

[0089] 일부 양태에서, 조작된 TCR은 CD8(CD8αβ 이종이량체 및/또는 CD8αα 일종이량체) 비의존적인 방식으로 γδ T 세포에서 기능할 수 있다. 다른 양태에서 조작된 TCR은 CD8(CD8αβ 이종이량체 및/또는 CD8αα 일종이량체) 의존적인 방식으로 γδ T 세포에서 기능할 수 있다. 후자의 경우에서, γδ T 세포는 TCR 및 CD8(CD8α 및 CD8β 사슬 또는 CD8α 사슬) 모두를 인코딩하는 외인성 핵산을 발현하는 단계에 의해 변형될 수 있다. 일부 양태에서, γδ T 세포는 TCR 및 CD8(CD8α 및 CD8β 사슬 또는 CD8α 사슬)을 인코딩하는 핵산을 사용하여 형질도입되거나 형질감염될 수 있으며, 이는 동일한 벡터 또는 별도의 벡터에서 있을 수 있다.

[0090] 핵산에 의해 인코딩되는 단백질은 부착된 추가적인 폴리펩티드가 기능 T 세포 수용체 및 MHC 의존적인 항원 인식을 형성하는 α-사슬 또는 β-사슬의 능력을 방해하지 않는 한 TCR의 α-사슬 β-사슬의 아미노 말단 또는 카복실 말단 부분에 부착된 추가적인 폴리펩티드를 사용하여 발현될 수 있다.

[0091] 조작된 TCR에 의해 인식되는 항원은 혈액암 및 고형 종양에 대한 항원을 포함하는 암 항원을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 예시적인 항원은 알파 엽산 수용체, 5T4, αvβ6 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FRα, GD2, GD3, *글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11Rα, IL-13Rα2, 람다, 루이스-Y, 카파, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 서바이빈, TAG72, TEM 또는 VEGFR2를 포함하나

이에 제한되지 않는다.

[0092] 일부 양태에서 본 개시내용의 T 세포는 미국 특허출원공개공보 제2017/0267738호; 미국 특허출원공개공보 제2017/0312350호; 미국 특허출원공개공보 제2018/0051080호; 미국 특허출원공개공보 제2018/0164315호; 미국 특허출원공개공보 제2018/0161396호; 미국 특허출원공개공보 제2018/0162922호; 미국 특허출원공개공보 제2018/0273602호; 미국 특허출원공개공보 제2019/0016801호; 미국 특허출원공개공보 제2019/0002556호; 미국 특허출원공개공보 제2019/0135914호; 미국 등록특허공보 제10,538,573호; 미국 등록특허공보 제10,626,160호; 미국 특허출원공개공보 제2019/0321478호; 미국 특허출원공개공보 제2019/0256572호; 미국 등록특허공보 제10,550,182호; 미국 등록특허공보 제10,526,407호; 미국 특허출원공개공보 제2019/0284276호; 미국 특허출원공개공보 제2019/0016802호; 미국 특허출원공개공보 제2019/0016803호; 미국 특허출원공개공보 제2019/0016804호; 미국 등록특허공보 제10,583,573호; 미국 특허출원공개공보 제2020/0339652호; 미국 등록특허공보 제10,537,624호; 미국 등록특허공보 제10,596,242호; 미국 특허출원공개공보 제2020/0188497호; 미국 등록특허공보 제10,800,845호; 미국 특허출원공개공보 제2020/0385468호; 미국 등록특허공보 제10,527,623호; 미국 등록특허공보 제10,725,044호; 미국 특허출원공개공보 제2020/0249233호; 미국 등록특허공보 제10,702,609호; 미국 특허출원공개공보 제2020/0254106호; 미국 등록특허공보 제10,800,832호; 미국 특허출원공개공보 제2020/0123221호; 미국 등록특허공보 제10,590,194호; 미국 등록특허공보 제10,723,796호; 미국 특허출원공개공보 제2020/0140540호; 미국 등록특허공보 제10,618,956호; 미국 특허출원공개공보 제2020/0207849호; 미국 특허출원공개공보 제2020/0088726호; 및 미국 특허출원공개공보 제2020/0384028호;에서 설명된 TCR 및 항원 결합 단백질을 발현할 수 있으며, 이에 설명된 각각의 이러한 간행물 및 서열목록의 내용은 이의 전체가 참조에 의해 본원에 원용된다. T 세포는 αβ T 세포, γδ T 세포 또는 자연 살해 T 세포일 수 있다. 일 실시양태에서, 본원에 설명된 TCR은 단일 사슬 TCR 또는 가용성 TCR일 수 있다.

[0093] 키메라 항원 수용체(CAR)

[0094] 본원에 개시된 T 세포 생산 방법은 하나 이상의 CAR을 발현하기 위해 T 세포를 변형하는 단계를 포함할 수 있다. T 세포는 αβ T 세포, γδ T 세포 또는 자연 살해 T 세포일 수 있다. 다양한 실시양태에서, 본 개시내용은 종양 세포에 대한 세포독성을 재지정하는 CAR을 발현하도록 설계된 벡터를 사용하여 유전자 조작된 T 세포를 제공한다. CAR은 T 세포 수용체 활성화 세포내 도메인과 표적 항원, 예를 들어, 종양 항원에 대한 항체 기반 특이성을 조합하여 특이적 항-종양 세포 면역 활성을 나타내는 키메라 단백질을 생성하는 분자이다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 “키메라”는 상이한 기원으로부터 유래한 상이한 단백질 또는 DNA의 부분으로 구성되는 것을 설명한다.

[0095] CAR은 특이적 표적 항원에 결합하는 세포외 도메인(또한, 결합 도메인 또는 항원 특이적 결합 도메인이라고도 함), 막전위 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 함유할 수 있다. CAR의 주요 특성은 면역 작용기 세포 특이성을 재지정하는 이의 기능이며, 이에 의해 증식, 사이토카인 생성, 식세포작용 또는 주요 조직적합성(MHC) 비의존적인 방식으로 표적 항원 발현 세포의 세포사를 매개할 수 있는 분자의 생성을 유발하며, 이는 단클론성 항체, 가용성 리간드 또는 세포 특이적 공동수용체의 세포 특이적 표적화 능력을 이용한다.

[0096] 특정 실시양태에서, CAR은 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 테더링된 리간드 또는 종양 연관 항원(TAA) 또는 종양 특이적 항원(TSA)인 표적 항원에 특이적으로 결합하는 공동수용체의 세포외 도메인을 포함하나 이에 제한되지 않는 세포외 결합 도메인을 함유할 수 있다. 특정 실시양태에서, TAA 또는 TSA는 혈액암 세포에서 발현될 수 있다. 다른 실시양태에서, TAA 또는 TSA는 고형 종양의 세포에서 발현될 수 있다. 특정 실시양태에서, 고형암은 교모세포종, 비소세포 폐암, 비소세포 폐암 외의 폐암, 유방암, 전립선암, 췌장암, 간암, 결장암, 위암, 비장암, 피부암, 교모세포종 외의 뇌암, 신장암, 갑상선암 등일 수 있다.

[0097] 특정 실시양태에서, TAA 또는 TSA는 알파 엽산 수용체, 5T4, αvβ6 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FRα, GD2, GD3, *글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11Rα, IL-13Rα2, 람다, 루이스-Y, 카파, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 서바이빈, TAG72, TEM 또는 VEGFR2로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있다.

[0098] 일부 양태에서, 본원에 설명된 방법 및 실시양태를 갖는 사용 가능한 종양 연관 항원(TAA) 펩티드는 예를 들어, 미국 공개특허공보 제20160187351호, 미국 공개특허공보 제20170165335호, 미국 공개특허공보 제20170035807호,

미국 공개특허공보 제20160280759호, 미국 공개특허공보 제20160287687호, 미국 공개특허공보 제20160346371호, 미국 공개특허공보 제20160368965호, 미국 공개특허공보 제20170022251호, 미국 공개특허공보 제20170002055호, 미국 공개특허공보 제20170029486호, 미국 공개특허공보 제20170037089호, 미국 공개특허공보 제20170136108호, 미국 공개특허공보 제20170101473호, 미국 공개특허공보 제20170096461호, 미국 공개특허공보 제20170165337호, 미국 공개특허공보 제20170189505호, 미국 공개특허공보 제20170173132호, 미국 공개특허공보 제20170296640호, 미국 공개특허공보 제20170253633호, 미국 공개특허공보 제20170260249호, 미국 공개특허공보 제20180051080호 및 미국 공개특허공보 제20180164315호에서 설명된 TAA 펩티드를 포함하며, 이에 설명된 각각의 이러한 간행물 및 서열목록의 내용은 이의 전체가 참조에 의해 본원에 원용된다.

[0099] 일부 양태에서, 본원에 설명된 T 세포는 상기 설명된 특허 및 간행물 중 하나 이상에서 설명된 TAA 펩티드를 제시하는 세포를 선택적으로 인식한다.

[0100] 다른 양태에서, 본원에 설명된 방법 및 실시양태를 갖는 사용 가능한 TAA는 서열 식별 번호: 6 내지 서열 식별 번호: 166으로부터 선택되는 적어도 하나를 포함한다. 일부 양태에서, T 세포는 서열 식별 번호:6 내지 166 또는 본원에 설명된 임의의 특허 또는 공개에서 설명된 TAA 펩티드를 제시하는 세포를 선택적으로 인식한다.

[0101]

서열 식별 번호:	아미노산 서열	서열 식별 번호:	아미노산 서열	서열 식별 번호:	아미노산 서열
6	YLYDSETKNA	59	LLWGHPRVALA	111	VLLNEILEQV
7	HLMDQPLSV	60	VLDGKVAVV	112	SLLNQPKAV
8	GLLKKINSV	61	GLLGKVTSV	113	KMSELQTYV
9	FLVDGSSAL	62	KMISAIPTL	114	ALLEQTGDMSL
10	FLFDGSANLV	63	GLLETTGLLAT	115	VIIKGLEEITV
11	FLYKIIDEL	64	TLNTLDINL	116	KQFEGTVEI
12	FILDSAETTTL	65	VIIKGLEEI	117	KLQEEIPVL
13	SVDVSPPKV	66	YLEDGFAYV	118	GLAEFQENV
14	VADKIHSV	67	KIWEELSVLEV	119	NVAEIVIHI
15	IVDDLTINL	68	LLIPFTIFM	120	ALAGIVTNV
16	GLLEELVTV	69	ISLDEVAVSL	121	NLLIDDKGTIKL
17	TLDGAAVNQV	70	KISDFGLATV	122	VLMQDSRLYL
18	SVLEKEIYSI	71	KLIGNIHGNEV	123	KVLEHVVRV
19	LLDPKTIFL	72	ILLSVLHQL	124	LLWGNLPEI
20	YTFSGDVQL	73	LDSEALLTL	125	SLMEKNQSL
21	YLMDDFSSL	74	VLQENSSDYQSNL	126	KLLAVIHEL
22	KVWSDVTPL	75	HLLGEGAFAQV	127	ALGDKFLLRV
23	LLWGHPRVALA	76	SLVENIHVL	128	FLMKNSDLYGA
24	KIWEELSVLEV	77	YTFSGDVQL	129	KLIDHQGLYL
25	LLIPFTIFM	78	SLSEKSPEV	130	GPGIFPPPPPQP
26	FLIENLLAA	79	AMFPDTIPRV	131	ALNESLVEC

27	LLWGHPRVALA	80	FLIENLLAA	132	GLAALAVHL
28	FLLEREQLL	81	FTAEFLEKV	133	LLLEAVWHL
29	SLAETIFIV	82	ALYGNVQQV	134	SIIEYLPTL
30	TLLEGISRA	83	LFQSRIAGV	135	TLHDQVHLL
31	ILQDGQFLV	84	ILAEEPIYIRV	136	SLLMWITQC
32	VIFEGEPMYL	85	FLLEREQLL	137	FLLDKPQDLSI
33	SLFESLEYL	86	LLLPLELSLA	138	YLLDMPLWYL
34	SLLNQPKAV	87	SLAETIFIV	139	GLLDCPIFL
35	GLAEFQENV	88	AILNVDEKNQV	140	VLIEYNFSI
36	KLLAVIHEL	89	RLFEEVLGV	141	TLYNPERTITV
37	TLHDQVHLL	90	YLDEVAFML	142	AVPPPPSSV
38	TLYNPERTITV	91	KLIDEDEPLFL	143	KLQEELNKV
39	KLQEKIQEL	92	KLFEKSTGL	144	KLMDPGSLPPL
40	SVLEKEIYSI	93	SLLEVNEASSV	145	ALIVSLPYL
41	RVIDDSLVVGV	94	GVYDGREHTV	146	FLLDGSANV
42	VLFGELPAL	95	GLYPVTLVGV	147	ALDPSGNQLI
43	GLVDIMVHL	96	ALLSSVAEA	148	ILIKHLVKV
44	FLNAIETAL	97	TLLEGISRA	149	VLLDTILQL
45	ALLQALMEL	98	SLIEESEEL	150	HLIAEIHTA
46	ALSSSQAEV	99	ALYVQAPTV	151	SMNGGVFAV
47	SLITGQDLLSV	100	KLIYKDLVSV	152	MLAEKLLQA
48	QLIEKNWLL	101	ILQDGQFLV	153	YMLDIFHEV
49	LLDPKTIFL	102	SLLDYEVSI	154	ALWLPTDSATV

[0102]

50	RLHDENILL	103	LLGDSSFFL	155	GLASRILDA
51	YTFSGDVQL	104	VIFEGEPMYL	156	ALSVLRLAL
52	GLPSATTTV	105	ALSYILPYL	157	SYVKVLHHL
53	GLLPSAESIKL	106	FLFVDPELV	158	VYLPKIPSW
54	KTASINQNV	107	SEWGSPHAAVP	159	NYEDHFPLL
55	SLLQHLIGL	108	ALSELERVL	160	VYIAELEKI
56	YLMDDFSSL	109	SLFESLEYL	161	VHFEDTGKTLLF
57	LMYPYIYHV	110	KVLEYVIKV	162	VLSPFILTL
58	KVWSDVTPL			163	HLLEGSVGV
				164	ALREEEEGV
				165	KEADPTGHSY
				166	TLDEKVAEL

[0103]

[0104] CAR의 결합 도메인

[0105] 특정 실시양태에서, 본원에 고려된 CAR은 종양 세포에서 발현되는 표적 폴리펩티드, 예를 들어, 표적 항원에 특이적으로 결합하는 세포외 결합 도메인을 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "결합 도메인", "세포외 도메인", "세포외 결합 도메인", 항원특이적 결합 도메인" 및 "세포외 항원 특이적 결합 도메인"은 혼용하여 사용될 수 있으며 관심 표적 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는 CAR을 제공한다.

[0106] 결합 도메인은 임의의 단백질, 폴리펩티드, 올리고펩티드 또는 생물학적 분자(예를 들어, 세포 표면 수용체 또는 종양 단백질, 지질, 다당류 또는 다른 세포 표면 표적 분자 또는 이의 성분)를 특이적으로 인식하고 이에 결합하는 능력을 갖는 펩티드를 포함할 수 있다. 결합 도메인은 관심 생물학적 분자에 대한 임의의 자연 발생, 합성, 반합성(semi-synthetic) 또는 재조합 생성 결합 대상을 포함할 수 있다.

[0107] 특정 실시양태에서, CAR의 세포외 결합 도메인은 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함할 수 있다. "항체"는 적어도 경쇄 또는 중쇄 면역글로불린 가변 영역을 함유하는 폴리펩티드인 결합제를 지칭하며, 이는 표적 항원의 에피토프, 예컨대, 펩티드, 지질, 다당류 또는 항원 결정제를 함유하는 핵산, 예컨대, 면역 세포에 의해 인식되는 핵산을 특이적으로 인식하고 이에 결합한다. 항체는 이의 항원 결합 단편을 포함할 수 있다. 또한, 해당 용어는 유전자 조작된 형태, 예컨대, 키메라 항체(예를 들어, 인간화 뮤린 항체), 이종접합체 항체, 예를 들어, 이중특이적 항체 및 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 또한, 문헌[Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., W. H. Freeman & Co., New York, 1997]을 참조한다.

[0108] 특정 실시양태에서 표적 항원은 알파 엽산 수용체, 5T4, αvβ6 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FRα, GD2, GD3, *글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11Rα, IL-13Rα2, 람다, 루이스-Y, 카파, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 서바이빈, TAG72, TEM 또는 VEGFR2 폴리펩티드의 에피토프일 수 있다.

[0109] 경쇄 및 중쇄 가변 영역은 3개의 초가변 영역에 의해 차단된 "프레임워크" 영역을 함유할 수 있으며, 이는 또한 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로 지칭된다. CDR은 종래의 방법에 의해, 예컨대, 카바트(Kabat) 등(문헌[Wu, TT and Kabat, E. A., J Exp Med. 132(2):211-50, (1970)]; 문헌[Borden, P. and Kabat E. A., PNAS, 84: 2440-2443 (1987)])에 따른 서열에 의해; (문헌[Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological

Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991] 참조, 이는 참조에 의해 본원에 원용됨), 또는 코티아(Chothia) 등(문헌[Choithia, C. and Lesk, A.M., J Mol. Biol, 196(4): 901-917 (1987)], 문헌[Choithia, C. et al, Nature, 342: 877 - 883 (1989)])에 따른 구조에 의해, 정의되거나 식별될 수 있다. 상기 참조문헌의 내용은 이의 전체가 참조에 의해 본원에 원용된다. 상이한 경쇄 또는 중쇄의 프레임워크 영역의 서열은 종, 예컨대, 인간 내에서 상대적으로 보존될 수 있다. 구성 경쇄 및 중쇄의 조합된 프레임워크 영역인 항체의 프레임워크 영역은 3차원 공간에서 CDR을 위치지정하고 정렬하는 역할을 할 수 있다. CDR은 주로 항원의 에피토프에 대한 결합에 관여한다. 각 사슬의 CDR은 N-말단으로부터 순차적으로 출발하여 넘버링되는 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 전형적으로 지칭될 수 있으며, 또한 전형적으로 특정 CDR이 위치되어 있는 사슬에 의해 식별된다. 따라서, 항체의 중쇄의 가변 도메인에 위치된 CDR은 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3으로 지칭되는 반면, 항체의 경쇄의 가변 도메인에 위치된 CDR은 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3으로 지칭된다. 상이한 특이성(즉, 상이한 항원에 대한 상이한 조합 부위)을 갖는 항체는 상이한 CDR을 갖는다. 항체마다 CDR이 상이하지만, CDR 내의 아미노산 위치의 제한된 수만이 항원 결합에 직접 관여한다. CDR 내의 이러한 위치는 특이성 결정 잔기(SDR)로 지칭된다.

[0110] "VH"에 대한 지칭 또는"VH"는 면역글로불린 중쇄의 가변 영역을 지칭하며, 이는 Fv, scFv, dsFv, Fab 또는 다른 항체 단편의 것을 포함한다. "VL"에 대한 지칭 또는 "VL"은 면역글로불린 경쇄의 가변 영역을 지칭하며, 이는 Fv, scFv, dsFv, Fab 또는 다른 항체 단편의 것을 포함한다.

[0111] "단클론성 항체"는 B 림프구의 단일 클론, 또는 단일 항체의 경쇄 및 중쇄 유전자가 형질감염되는 세포에 의해 생성된 항체이다. 단클론성 항체는 통상의 기술자에게 알려진 방법에 의해, 예를 들어, 면역 비장 세포와 골수종 세포의 융합으로부터 혼성 항체 형성 세포를 제조함으로써 생성될 수 있다. 단클론성 항체는 인간화 단클론성 항체를 포함할 수 있다.

[0112] "키메라 항체"는 하나의 종, 예컨대, 인간으로부터 유래한 프레임워크 잔기 및 다른 종, 예컨대, 마우스로부터 유래한 CDR(이는 일반적으로 항원 결합을 부여함)을 갖는다. 특정 바람직한 실시양태에서, 본원에 개시된 CAR은 키메라 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 항원 특이적 결합 도메인을 함유할 수 있다.

[0113] 특정 실시양태에서, 항체는 종양 세포의 표면 단백질에 특이적으로 결합하는 인간화 항체(예컨대, 인간화 단클론성 항체)일 수 있다. "인간화" 항체는 인간 프레임워크 영역 및 비인간(예를 들어, 마우스, 랫트, 또는 합성) 면역글로불린으로부터 유래한 하나 이상의 CDR을 포함하는 면역글로불린이다. 인간화 항체는 유전자 조작(예를 들어, 미국 등록특허공보 제5,585,089호 참조, 이의 내용은 이의 전체가 참조에 의해 본원에 원용됨)에 의해 작제될 수 있다.

[0114] 실시양태에서, CAR의 세포외 결합 도메인은 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함할 수 있으며, 이는 낙타 Ig(낙타과 항체(VHH)), Ig NAR, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab)'2 단편, F(ab)'3 단편, Fv, 단일 사슬 Fv 항체("scFv"), 비스-scFv,(scFv)2, 미니바디, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 이황화 안정화 Fv 단백질("dsFv") 및 단일-도메인 항체(sdAb, 나노바디)를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0115] 본원에 사용된 "낙타 Ig" 또는 "낙타과 VHH"는 중쇄 항체의 알려진 최소 항원 결합 단위를 지칭한다(문헌[Koch-Nolte, et al, FASEB J., 21:3490-3498 (2007)], 이의 내용은 이의 전체가 참조에 의해 본원에 원용됨). "중쇄 항체" 또는 "낙타과 항체"는 2개의 VH 도메인을 함유하고 경쇄를 함유하지 않는 항체를 지칭한다(문헌[Riechmann L. et al, J. Immunol. Methods 231:25-38 (1999)]; WO94/04678; WO94/25591; 미국 등록특허공보 제6,005,079호; 이의 내용은 이의 전체가 참조에 의해 본원에 원용됨).

[0116] "면역글로불린 신규 항원 수용체"의 "IgNAR"은 1개의 가변 신규 항원 수용체(VNAR) 도메인 및 5개의 불변 신규 항원 수용체(CNAR) 도메인의 일종이량체로 구성되는 상어 면역 레퍼토리로부터 유래하는 항체 부류를 지칭한다.

[0117] 항체의 파파인 소화는 각각 단일 항원 결합 부위를 갖는 "Fab" 단편으로 지칭되는 2개의 동일한 항원 결합 단편 및 잔류 "Fc" 단편을 생성하고, 이의 명칭은 용이하게 결정화하는 이의 능력을 반영한다. Fab 단편은 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 함유하며, 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인(CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카복시 말단에서 몇몇 잔기의 첨가에 의해 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 유리 티올기를 포함하는 Fab'에 대한 본원에서의 명명이다. F(ab')2 항체 단편은 원래는 이들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로서 생성되었다. 또한, 항체 단편의 기타 화학적 결합이 알려져 있다.

[0118] "Fv"는 완전한 항원 결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 단일 사슬 Fv(scFv) 종에서, 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인은 경쇄 및 중쇄가 2개 사슬 Fv 종의 것과 유사한 "이량체성" 구조로 회합할 수 있도록

가요성 펩티드 링커에 의해 공유 연결될 수 있다.

[0119] 용어 "디아바디"는 2개의 항원 결합 부위를 갖는 항체 단편을 지칭하며, 이는 단편이 동일한 폴리펩티드 사슬(VH-VL)의 경쇄 가변 도메인(VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함한다. 너무 짧아서 동일한 사슬의 2개의 도메인 사이의 페어링을 허용하지 않는 링커를 사용하여, 도메인은 다른 사슬의 상보적 도메인과 강제로 쌍을 이루고 2개의 항원 결합 부위를 생성한다. 디아바디는 이가적 또는 이중특이적이다. 디아바디는 예를 들어, EP 404,097; WO 1993/01161; 문헌[Hudson et al, Nat. Med. 9:129-134 (2003)]; 및 문헌[Hollinger et al, PNAS USA 90: 6444-6448 (1993)]에서 더 충분히 설명된다. 또한, 트리아바디 및 테트라바디는 문헌[Hudson et al, Nat. Med. 9:129-134 (2003)]에서 설명되어 있다. 상기 참조문헌의 내용은 이의 전체가 참조에 의해 본원에 원용된다.

[0120] "단일 도메인 항체" 또는 "sdAb" 또는 "나노바디"는 항체 중쇄의 가변 영역(VH 도메인) 또는 항체 경쇄의 가변 영역(VL 도메인)으로 구성되는 항체 단편을 지칭한다(문헌[Holt, L., et al, Trends in Biotechnology, 21(11): 484-490], 이의 내용은 이의 전체가 참조에 의해 본원에 원용됨).

[0121] “단일 사슬 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하며, 여기서 이러한 도메인은 단일 폴리펩티드 사슬에서 그리고 어느 하나의 배향(예를 들어, VL-VH 또는 VH-VL)으로 존재한다. 일반적으로, scFv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합에 바람직한 구조를 형성하도록 하는 VH 및 VL 사이에 폴리펩티드 링커를 더 포함한다. scFv의 검토를 위해, 예를 들어, 문헌[Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315]을 참조하도록 하며, 이의 내용은 이의 전체가 참조에 의해 본원에 원용된다.

[0122] 특정 실시양태에서, scFv는 알파 엽산 수용체, 5T4, αvβ6 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CALX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FRα, GD2, GD3, *글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11Rα, IL-13Rα2, 람다, 루이스-Y, 카파, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 서바이빈, TAG72, TEM 또는 VEGFR2 폴리펩티드에 결합한다.

[0123] CAR의 링커

[0124] 특정 실시양태에서, CAR은 분자의 적절한 간격 및 배좌를 위해 첨가된 다양한 도메인, 예를 들어, VH 및 VL 도메인 사이에 링커 잔기를 함유할 수 있다. CAR은 1, 2, 3, 4 또는 5개 또는 그 이상의 링커를 함유할 수 있다. 특정 실시양태에서, 링커의 길이는 약 1개 내지 약 25개 아미노산, 약 5개 내지 약 20개 아미노산 또는 약 10개 내지 약 20개 아미노산 또는 임의의 중간 길이의 아미노산일 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25개 또는 그 이상의 아미노산 길이일 수 있다. 링커의 예시적인 예는 글리신 중합체(G)n; 글리신-세린 중합체(Gi_sSi_5)n, 여기서 n은 적어도 1, 2, 3, 4 또는 5의 정수이며; 글리신-알라닌 중합체; 알라닌-세린 중합체; 및 해당 기술분야에서 알려진 다른 가요성 링커를 포함한다. 글리신 및 글리신-세린 중합체는 비교적 비구조화되어 있으며, 따라서, 융합 단백질, 예컨대, CAR의 도메인 사이에서 중성 테더(neutral tether) 역할을 할 수 있다. 글리신은 심지어 알라닌보다 현저하게 더 파이-프사이(phi-psi) 공간에 접근할 수 있으며, 보다 긴 측쇄를 갖는 잔기보다 보다 덜 제한될 수 있다(문헌[Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992)] 참조, 이의 내용은 이의 전체가 참조에 의해 본원에 원용됨). 통상의 기술자는 특정 실시양태에서 CAR의 설계가 전부 또는 부분적으로 가요성일 수 있는 링커를 포함할 수 있으며, 따라서 링커가 원하는 CAR 구조를 제공하기 위해 보다 덜 가요성인 구조를 부여하는 하나 이상의 부분뿐만 아니라 가요성 링커를 포함할 수 있음을 인식할 수 있다.

[0125] 특정 실시양태에서, CAR은 가변 영역 연결 서열을 더 함유할 수 있는 scFV를 포함할 수 있다. “가변 영역 연결 서열”은 생성되는 폴리펩티드가 동일한 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 함유할 수 있는 항체와 동일한 표적 분자에 대해 특이적 결합 친화성을 보유하도록 경쇄 가변 영역에 중쇄 가변 영역을 연결하고 2개의 하위결합 도메인의 상호작용과 양립가능한 스페이서 기능을 제공하는 아미노산 서열이다. 일 실시양태에서, 가변 영역 연결 서열은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25개 또는 그 이상의 아미노산 길이일 수 있다. 특정 실시양태에서, 가변 영역 연결 서열은 글리신-세린 중합체(Gi_sSi_5)n를 함유할 수 있으며, 여기서 n은 적어도 1, 2, 3, 4 또는 5의 정수이다. 다른 실시양태에서, 가변 영역 연결 서열은 (G4S)3 아미노산 링커를 포함한다.

[0126] CAR의 스페이서 도메인

[0127] 특정 실시양태에서, CAR의 결합 도메인 이후 하나 이상의 "스페이서 도메인"이 이어질 수 있으며, 이는 적절한 세포/세포 접촉, 항원 결합 및 활성화를 가능하게 하기 위해 작용기 세포 표면으로부터 떨어지도록 항원 결합 도메인을 이동시키는 영역을 지칭한다(문헌[Patel et al, Gene Therapy, 1999; 6: 412-419], 이의 내용은 이의 전체가 참조에 의해 본원에 원용됨). 스페이서 도메인은 천연, 합성, 반합성(semi-synthetic) 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다 특정 실시양태에서, 스페이서 도메인은 면역글로불린의 일부일 수 있으며, 이는 하나 이상의 중쇄 불변 영역, 예를 들어, CH2 및 CH3을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 스페이서 도메인은 자연 발생 면역글로불린 힌지 영역 또는 변경된 면역글로불린 힌지 영역의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일 실시양태에서, 스페이서 도메인은 IgG1의 CH2 및 CH3을 포함할 수 있다.

[0128] CAR의 힌지 도메인

[0129] CAR의 결합 도메인 이후 일반적으로 하나 이상의 “힌지 도메인”이 이어질 수 있으며, 이는 적절한 세포/세포 접촉, 항원 결합 및 활성화를 가능하게 하기 위해 작용기 세포 표면으로부터 떨어지도록 항원 결합 도메인의 위치결정에 중요한 역할을 할 수 있다. CAR은 일반적으로 결합 도메인 및 막관통 도메인(TM) 사이의 하나 이상의 힌지 도메인을 포함할 수 있다. 힌지 도메인은 천연, 합성, 반합성(semi-synthetic) 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다 힌지 도메인은 자연 발생 면역글로불린 힌지 영역 또는 변경된 면역글로불린 힌지 영역의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. CAR에서 사용하기에 적합한 예시적인 힌지 도메인은 제1유형 1 막 단백질, 예컨대, CD8a, CD4, CD28 및 CD7의 세포외 영역으로부터 유래하는 힌지 영역을 포함하며, 이는 이러한 분자로부터 유래한 야생형 힌지 영역일 수 있거나 변화될 수 있다. 다른 실시양태에서, 힌지 도메인은 CD8α 힌지 영역을 포함할 수 있다.

[0130] CAR의 막관통(TM) 도메인

[0131] “막관통 도메인”은 세포외 결합 부분 및 세포내 신호전달 도메인을 융합시킬 수 있고 면역 작용기 세포의 원형질 막에 CAR을 고정시키는 CAR의 일부일 수 있다. TM 도메인은 천연, 합성, 반합성(semi-synthetic) 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다 예시적인 TM 도메인은 T 세포 수용체의 α, β, 또는 ζ 사슬, CD3ε, CD3ζ, CD4, CD5, CD9, CD16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, 및 CD154로부터 유래할 수 있다(이들의 적어도 막관통 영역(들)을 포함). 일 실시양태에서, CAR은 CD8a로부터 유래된 TM 도메인을 함유할 수 있다. 다른 실시양태에서, 본원에서 고려하는 CAR은 CD8α로부터 유래하는 TM 도메인 및, 바람직하게는 CAR의 TM 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 연결하는 길이가 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산 사이인, 짧은 올리고펩티드 또는 폴리펩티드 링커를 포함한다. 글리신-세린 링커는 특히 적합한 링커를 제공한다.

[0132] CAR의 세포내 신호전달 도메인

[0133] 특정 실시양태에서, CAR은 세포내 신호전달 도메인을 함유할 수 있다. “세포내 신호전달 도메인"은 작용기 세포 기능, 예를 들어, 활성화, 사이토카인 생성, 증식 및 CAR 결합 표적 세포에 대한 세포독성 인자의 방출을 포함하는 세포독성 활성 또는 세포외 CAR 도메인에 대한 항원 결합으로 유발된 기타 세포 반응을 유발하기 위해 면역 작용기 세포의 내부로의 표적 항원에 대한 효과적 CAR 결합의 메시지의 형질도입에 관여하는 CAR의 부분을 지칭한다.

[0134] 용어 "작용기 기능"은 세포의 특수화된 기능을 지칭한다. T 세포의 작용기 기능은 예를 들어, 세포용해 활성 또는 사이토카인의 분비를 포함하는 활성의 도움일 수 있다. 따라서, 용어 "세포내 신호전달 도메인"은 작용기 기능 신호를 형질도입할 수 있고 세포가 특수화된 기능을 수행하도록 지시하는 단백질의 일부를 지칭한다. 통상적으로 전체 세포내 신호전달 도메인이 사용될 수 있지만, 많은 경우 전체 도메인을 사용할 필요는 없다. 세포내 신호전달 도메인의 절단된 부분이 사용될 수 있는 정도로, 이러한 절단된 부분은 작용기 기능 신호를 형질도입할 수 있는 한 전체 도메인 대신에 사용될 수 있다. 용어 세포내 신호전달 도메인은 작용기 기능 신호를 형질도입하기 위해 충분한 세포내 신호전달 도메인의 임의의 절단된 부분을 포함하는 것을 의미할 수 있다.

[0135] TCR 단독으로 생성된 신호는 T 세포의 완전한 활성화에 불충분하며 2차 또는 공동자극 신호가 또한 요구되는 것으로 알려져 있다. 따라서, T 세포 활성화는 2개의 별개의 부류의 세포내 신호전달 도메인, 즉, TCR을 통한 항원 의존적인 1차 활성화를 개시하는 일차 신호전달 도메인(예를 들어, TCR/CD3 복합체) 및 2차 또는 공동자극 신호를 제공하기 위해 항원 비의존적인 방식으로 작용하는 공동자극 신호전달 도메인에 의해 매개된다고 할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, CAR은 하나 이상의 "공동자극 신호전달 도메인" 및 "1차 신호전달 도메인"을 함

유할 수 있는 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 1차 신호전달 도메인은 자극 방식으로 또는 억제 방식으로 TCR 복합체의 1차 활성화를 조절할 수 있다. 자극 방식으로 작용하는 1차 신호전달 도메인은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(immunoreceptor tyrosine-based activation motif) 또는 ITAM으로 알려져 있는 신호전달 모티프를 함유할 수 있다. 본 발명에서 특히 사용되는 1차 신호전달 도메인을 함유하는 ITAM의 예시적인 예는 TCRζ, FcRγ, FcRβ, CD3γ, CD3δ, CD3ε, CD3ζ CD22, CD79a, CD79b 및 CD66d로부터 유래된 ITAM을 포함할 수 있다. 특히 바람직한 실시양태에서, CAR은 CD3ζ 1차 신호전달 도메인 및 하나 이상의 공동자극 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 세포내 1차 신호전달 및 공동자극 신호전달 도메인은 막관통 도메인의 카복시 말단에 나란히 임의의 순서로 연결될 수 있다.

[0136] CAR은 CAR 수용체를 발현하는 T 세포의 효능 및 확장을 증진하기 위해 하나 이상의 공동자극 신호전달 도메인을 함유할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "공동자극 신호전달 도메인" 또는 "공동자극 도메인"은 공동자극 분자의 세포내 신호전달 도메인을 지칭한다. 이러한 공동자극 분자의 예시적인 예는 CD27, CD28, 4-1BB(CD137), OX40(CD134), CD30, CD40, PD-1, ICOS(CD278), CTLA4, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, TRIM, LCK3, SLAM, DAP10, LAG3, HVEM 및 NKD2C 및 CD83을 포함할 수 있다. 일 실시양태에서, CAR은 CD28, CD137 및 CD134로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 공동자극 신호전달 도메인 및 CD3ζ 1차 신호전달 도메인을 함유할 수 있다.

[0137] 일 실시양태에서, CAR은 알파 엽산 수용체, 5T4, αvβ6 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CALX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FRα, GD2, GD3, *글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11Rα, IL-13Rα2, 람다, 루이스-Y, 카파, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 서바이빈, TAG72, TEM 또는 VEGFR2 폴리펩티드; CD8α; CD4, CD45, PD-1 및 CD152로 구성되는 군으로부터 선택되는 폴리펩티드로부터 유래되는 막관통 도메인; 및 CD28, CD54, CD134, CD137, CD152, CD273, CD274 및 CD278로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 세포내 공동자극 신호전달 도메인; 및 CD3ζ 1차 신호전달 도메인;에 결합하는 scFv를 함유할 수 있다.

[0138] 다른 실시양태에서, CAR은 알파 엽산 수용체, 5T4, αvβ6 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CALX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FRα, GD2, GD3, *글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11Rα, IL-13Rα2, 람다, 루이스-Y, 카파, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 서바이빈, TAG72, TEM 또는 VEGFR2 폴리펩티드; IgG1 힌지/CH2/CH3 및 CD8α, 및 CD8α로 구성되는 군으로부터 선택되는 힌지 도메인; CD8α; CD4, CD45, PD-1 및 CD152로 구성되는 군으로부터 선택되는 폴리펩티드로부터 유래되는 막관통 도메인; 및 CD28, CD134 및 CD137로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 세포내 공동자극 신호전달 도메인; 및 CD3ζ 1차 신호전달 도메인;에 결합하는 scFv를 함유할 수 있다.

[0139] 또 다른 실시양태에서, CAR은 알파 엽산 수용체, 5T4, αvβ6 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FRα, GD2, GD3, *글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11Rα, IL-13Rα2, 람다, 루이스-Y, 카파, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 서바이빈, TAG72, TEM 또는 VEGFR2 폴리펩티드; IgG1 힌지/CH2/CH3 및 CD8α, 및 CD8α로 구성되는 군으로부터 선택되는 힌지 도메인; CD8α; CD4, CD45, PD-1 및 CD152로 구성되는 군으로부터 선택되는 폴리펩티드로부터 유래되는 TM 도메인을 포함하는 막관통 도메인 및, 바람직하게는 CAR의 세포내 신호전달 도메인에 TM 도메인을 연결하는 길이가 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산 사이인, 짧은 올리고펩티드 또는 폴리펩티드 링커; 및 CD28, CD134 및 CD137로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 세포내 공동자극 신호전달 도메인; 및 CD3ζ 1차 신호전달 도메인;에 결합하는, 링커를 더 포함하는, scFv를 함유할 수 있다.

[0140] 특정 실시양태에서, CAR은 알파 엽산 수용체, 5T4, αvβ6 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FRα,

GD2, GD3, *글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11Rα, IL-13Rα2, 람다, 루이스-Y, 카파, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 서바이빈, TAG72, TEM 또는 VEGFR2 폴리펩티드; CD8α 폴리펩티드를 함유하는 힌지 도메인; 약 3개의 아미노산의 폴리펩티드 링커를 함유하는 CD8α 막관통 도메인; CD28, CD134 및 CD137로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 세포내 공동자극 신호전달 도메인; 및 CD3ζ 1차 신호전달 도메인;에 결합하는 scFv를 함유할 수 있다.

[0141] 바이러스

[0142] 일부 양태에서, "바이러스"는 자연 발생 바이러스 및 인공 바이러스를 지칭한다. 본 개시내용의 일부 실시양태에 따른 바이러스는 외피 보유 또는 외피 비보유 바이러스일 수 있다. 파보바이러스(예컨대, AAV)는 외피 비보유 바이러스의 예이다. 바람직한 실시양태에서, 바이러스는 외피 보유 바이러스일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 바이러스는 레트로바이러스 및 특히 렌티바이러스일 수 있다. 진핵 세포의 바이러스 감염을 촉진할 수 있는 바이러스 외피 단백질은 수포성 구내염 바이러스(VSV-G), 변형된 고양이과 내인성 레트로바이러스(RD114TR) 및 변형된 긴팔원숭이 백혈병 바이러스(GALVTR)로부터 유래한 외피 당단백질(GP)로 위형 HIV-1 유래 각막 렌티바이러스 벡터(LV)를 포함할 수 있다. 이러한 외피 단백질은, 아데노 연관 바이러스(AAV)를 포함한, 파보바이러스와 같은, 다른 바이러스의 유입을 효율적으로 촉진할 수 있으며, 이로 인해 이의 광범위한 효율성을 보여준다. 예를 들어, 다른 바이러스성 외피 단백질은 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스(MLV) 4070 env(예컨대, 문헌[Merten et al., J. Virol. 79:834-840, 2005]에서 설명된 바와 같음; 이는 참조에 의해 본원에 원용됨), RD114 env(서열 식별 번호: 2), 키메라 외피 단백질 RD114pro 또는 RDpro(이는 HIV-1 매트릭스/캡시드(MA/CA) 절단 서열을 갖는 RD114의 R 펩티드 절단 서열의 재배치에 의해 작제된 RD114-HIV 키메라임, 예컨대, 문헌[Bell et al. Experimental Biology and Medicine 2010; 235: 1269-1276]에서 설명된 바와 같음; 이는 참조에 의해 본원에 원용됨), 바쿨로바이러스 GP64 env(예컨대, 문헌[Wang et al. J. Virol. 81:10869-10878, 2007]에서 설명된 바와 같음; 이는 참조에 의해 본원에 원용됨) 또는 GALV env(예컨대, 문헌[Merten et al., J. Virol. 79:834-840, 2005]에서 설명된 바와 같음; 이는 참조에 의해 본원에 원용됨) 또는 이의 유도체를 포함하여 사용될 수 있다.

[0143] RD114TR

[0144] RD114TR은 고양이과 백혈병 바이러스 RD114의 세포외 및 막관통 도메인 및 중간엽 뮤린 백혈병 바이러스 외피의 세포질 미부(TR)로 구성되는 키메라 외피 당단백질이다. RD114TR 위형 벡터는 인간 조혈 전골수구 및 NOD/SCID 재집락 세포로 효율적인 유전자 전달을 매개할 수 있다. 문헌[Di Nunzio et al., Hum. Gene Ther: 811-820 (2007)], 이의 내용은 이의 전체가 참조에 의해 본원에 원용됨. 또한, RD114 위형 벡터는 대형 동물 모델에서 효율적인 유전자 전달을 매개할 수 있다. 문헌[Neff et al., Mal. Ther. 2:157-159 (2004); Hu et al., Mal. Ther: 611-617 (2003); and Kelly et al., Blood Cells, Molecules, & Diseases 30:132-143 (2003)] 참조, 이의 내용은 이의 전체가 참조에 의해 본원에 원용됨.

[0145] 본 개시내용은 서열 식별 번호:1 또는 서열 식별 번호:5의 아미노산 서열에 대하여 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 RD114TR 변이체를 포함할 수 있다. 예를 들어, RD114TR(서열 식별 번호: 1)에 대하여 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98% 또는 적어도 약 99%의 서열 동일성을 갖는 RD114TR 변이체(RD114TRv1(서열 식별 번호: 5))가 사용될 수 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용은 변형된 아미노산 잔기를 갖는 RD114TR 변이체를 제공한다. 변형된 아미노산 잔기는 아미노산 삽입, 결실 또는 치환으로부터 선택될 수 있다. 일부 양태에서, 본원에 설명된 치환은 보존적 아미노산 치환이다. 즉, RD114TR의 아미노산은 유사한 특성을 갖는 다른 아미노산으로 대체될 수 있다(보존적 변화, 예컨대, 유사한 소수성, 친수성, 항원성, α-나선 구조 또는 β-병풍 구조를 형성하거나 파괴하는 경향성). 일부 양태에서, RD114TR은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산 변형(들)을 가질 수 있다. 다른 양태에서, RD114TR은 많게는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산 변형(들)을 가질 수 있다. 또 다른 양태에서, RD114TR은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산 변형(들)을 가질 수 있다. 보존적 치환의 비제한적인 예는 예를 들어, 문헌[Creighton (1984) Proteins. W.H. Freeman and Company]에서 찾을 수 있으며, 이의 내용은 이의 전체가 참조로서 원용된다.

[0146] 다른 양태에서, 본 개시내용은 서열 식별 번호:1, 2, 3, 4 또는 5의 아미노산 서열에 대하여 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%

또는 100%의 서열 동일성을 갖는 변이체를 포함할 수 있다.

[0147] 일부 양태에서, 보존적 치환은 문헌[Dayhoff in "The Atlas of Protein Sequence and Structure. Vol. 5", Natl. Biomedical Research]에서 설명되는 보존적 치환을 포함할 수 있으며, 이의 내용은 이의 전체가 참조에 의해 원용된다. 예를 들어, 일부 양태에서, 다음의 군 중 하나에 속한 아미노산은 서로 교환될 수 있으며, 따라서, 보존적 교환을 구성한다: 군 1: 알라닌(A), 프롤린(P), 글리신(G), 아스파라긴(N), 세린(S), 트레오닌(T); 군 2: 시스테인(C), 세린(S), 티로신(Y), 트레오닌(T); 군 3: 발린(V), 이소류신(I), 류신(L), 메티오닌(M), 알라닌(A), 페닐알라닌(F); 군 4: 리신(K), 아르기닌(R), 히스티딘(H); 군 5: 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W), 히스티딘(H); 및 군 6: 아스파르트산(D), 글루탐산(E).

[0148] 일부 양태에서, 보존적 아미노산 치환은 동일한 부류의 다른 하나, 예를 들어, (1) 무극성: Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp; (2) 하전되지 않은 극성: Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln; (3) 산성: Asp, Glu; 및 (4) 염기성: Lys, Arg, His;에 의한 아미노산의 치환을 포함할 수 있다. 또한, 다른 보존적 아미노산 치환은 다음과 같이 이루어질 수 있다: (1) 방향족: Phe, Tyr, His; (2) 양성자 주개: Asn, Gln, Lys, Arg, His, Trp; 및 (3) 양성자 받개: Glu, Asp, Thr, Ser, Tyr, Asn, Gln(미국 등록특허공보 제10106805호 참조).

[0149] 다른 양태에서, 보존적 치환은 표 A에 따라 이루어질 수 있다. 단백질 변형에 대한 내성을 예측하는 방법은 예를 들어, 문헌[Guo et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 101(25):9205-9210 (2004)]에서 찾을 수 있으며, 이의 내용은 이의 전체가 참조에 의해 원용된다.

[0150] 표 A

보수적 아미노산 치환	
아미노산	치환(다른 것도 당업계에 알려짐)
Ala	Ser, Gly, Cys
Arg	Lys, Gln, His
Asn	Gln, His, Glu, Asp
Asp	Glu, Asn, Gln
Cys	Ser, Met, Thr
Gln	Asn, Lys, Glu, Asp, Arg
Glu	Asp, Asn, Gln
Gly	Pro, Ala, Ser
His	Asn, Gln, Lys
Ile	Leu, Val, Met, Ala
Leu	Ile, Val, Met, Ala
Lys	Arg, Gln, His
Met	Leu, Ile, Val, Ala, Phe
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp, His
Ser	Thr, Cys, Ala
Thr	Ser, Val, Ala
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe, His
Val	Ile, Leu, Met, Ala, Thr

[0151]

[0152] 일부 양태에서, 형질도입 후 약 10일차에 RD114TR 위형 레트로바이러스성 벡터에 대한 전이유전자 발현은 약 20% 내지 약 60%, 약 30% 내지 약 50% 또는 약 35% 내지 약 45%이다. 일부 양태에서, 형질도입 후 10일차에 RD114TR 위형 레트로바이러스성 벡터에 대한 전이유전자 발현은 동일한 조건 하에서 형질도입 후 10일차에 약 5% 내지 약 25%, 약 2% 내지 약 20%, 약 3% 내지 약 15% 또는 약 5% 내지 약 12%인 VSV-G 위형 벡터에 대한 전이유전자 발현에 비해 약 20% 내지 약 60% 약 30% 내지 약 50% 또는 약 35% 내지 약 45%이다. 또 다른 양태에서, 형질도입 후 10일차에 RD114TR 위형 레트로바이러스성 벡터에 대한 전이유전자 발현은 형질도입 후 10일차에 약 3.6%인 VSV-G 위형 벡터에 대한 전이유전자 발현에 비해 약 40%이다.

[0153] 또 다른 양태에서, 형질도입 후 약 5일차에 RD114TR 위형 레트로바이러스성 벡터에 대한 전이유전자 발현은 약 20% 내지 약 50%, 약 15% 내지 약 30% 또는 약 20% 내지 약 30%이다. 일부 양태에서, 형질도입 후 5일차에 RD114TR 위형 레트로바이러스성 벡터에 대한 전이유전자 발현은 동일한 조건 하에서 형질도입 후 5일차에 약 10% 내지 약 20%, 약 15% 내지 약 25% 또는 약 17.5% 내지 약 20%인 VSV-G 위형 벡터에 대한 전이유전자 발현

에 비해 약 20% 내지 약 50% 약 15% 내지 약 30% 또는 약 20% 내지 약 30%이다. 또 다른 양태에서, 형질도입 후 5일차에 RD114TR 위형 레트로바이러스성 벡터에 대한 전이유전자 발현은 형질도입 후 5일차에 약 19%인 VSV-G 위형 벡터에 대한 전이유전자 발현에 비해 약 24%이다.

[0154] 다른 양태에서, 형질도입 후 10일차에 RD114TR 위형 레트로바이러스성 벡터에 대한 전이유전자 발현은 형질도입 후 10일차에서 VSV-G 위형 벡터에 대한 전이유전자 발현에 비해 약 2배, 약 3배, 약 4배, 약 5배 또는 약 10배, 약 11배 또는 약 12배 또는 그 이상이다.

[0155] 일부 양태에서, 본 개시내용은 T 세포를 형질도입하기 위해 RD114TR 위형(예를 들어, 서열 식별 번호: 1, 서열 식별 번호: 5 또는 이들의 변이체)을 갖는 레트로바이러스를 사용하는 방법을 제공한다. 다른 양태에서 T 세포는 VSV-G 위형(예를 들어, 서열 식별 번호: 3)을 갖는 레트로바이러스와 비교하여 RD114TR 위형(예를 들어, 서열 식별 번호: 1, 서열 식별 번호: 5 또는 이들의 변이체)을 갖는 레트로바이러스에 의해 더 효율적으로 형질도입된다. 다른 양태에서, RD114TR 외피는 렌티벡터를 위형화하기 위해 사용되며, 그 후, 이는 우수한 효율성으로 T 세포를 형질도입하기 위해 사용된다.

[0156] 조작된 γδ T 세포는 다양한 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 종양 인식 또는 다른 유형의 인식 모이어티를 포함하는 발현 카세트를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 트랜스포손(transposon)/유전자전위효소(transposase) 시스템 또는 바이러스성 기반 유전자 전달 시스템, 예컨대, 렌티바이러스성 또는 레트로바이러스성 시스템 또는 다른 적합한 방법, 예컨대, 형질감염, 전기천공, 형질도입, 리포펙션, 인산칼슘(CaPO4), 나노공학 물질, 예컨대, 오르모실(Ormosil), 아데노바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노 연관 바이러스를 포함한 바이러스성 전달 방법 또는 다른 적합한 방법에 의해 γδ T 세포로 안정적으로 도입될 수 있다. 많은 바이러스성 방법, 예컨대, WO 1993020221에서 설명된 방법이 인간 유전자 요법에 사용되고 있으며, 이는 이의 전체가 본원에 원용된다. γδ T 세포를 조작하기 위해 사용될 수 있는 바이러스성 방법의 비제한적인 예는 γ-레트로바이러스성, 아데노바이러스성, 렌티바이러스성, 단순 포진 바이러스, 백시니아 바이러스, 수두 바이러스 또는 아데노 바이러스 연관 바이러스성 방법을 포함할 수 있다.

[0157] 도 2는 활성화된 T 세포가 단리된 γδ T 세포로, 특정 암 항원 및 CD8에 대한 αβ TCR과 같은 관심 외인성 유전자를 발현하는, RD114TR γ-레트로바이러스성 벡터 및 RD114TR 렌티바이러스성 벡터와 같은 바이러스성 벡터를 사용하여 형질도입하여 조작될 수 있음을 나타낸다. 또한, 바이러스성 벡터는 핵 및 세포질 mRNA 수준이 증가하게 하여 전이유전자의 발현을 증진하기 위해 전사 후 조절 요소(PRE) 예컨대, 우드척(Woodchuck) PRE(WPRE)를 함유할 수 있다. 또한, 마우스 RNA 수송 요소(RTE), 유인원 레트로바이러스 1형(SRV-1)의 구성적 수송 요소(CTE) 및 인간 열 충격 단백질 70(Hsp70 5'UTR)의 5' 비번역 영역을 포함하는 하나 이상의 조절 요소는 전이유전자 발현을 증가시키기 위해 사용되고/되거나 WPRE와 조합하여 사용될 수 있다. 형질도입은 1/2일 내지 5일, 예를 들어, 1일 동안 소규모, 예를 들어, 24 내지 4-6웰 플레이트 또는 중/대규모로 안정적인 전이유전자 발현에 도달하기 위해 1회 또는 다회 수행될 수 있다.

[0158] RD114TR은 뮤린 백혈병 바이러스의 세포질 미부(TR)에 융합되는 고양이과 외인성 바이러스(RD114)의 세포외 및 막관통 도메인을 함유하는 키메라 외피 당단백질이다. 일부 양태에서, 형질도입 후 약 10일차에 RD114TR 위형 레트로바이러스성 벡터에 대한 전이유전자 발현은 VSV-G 위형 벡터에 대해 더 높다.

[0159] 또한, 다른 바이러스성 외피 단백질, 예컨대, VSV-G env, MLV 4070 env, RD114 env, 키메라 외피 단백질 RD114pro, 바쿨로바이러스 GP64 env 또는 GALV env 또는 이들의 유도체가 사용될 수 있다.

[0160] 비바이러스성 벡터

[0161] 벡터는 바이러스를 기반으로 하지 않는다는 점에서 비바이러스 벡터이다. 이는 세포로 벡터가 들어갈 수 있도록 임의의 바이러스 성분을 포함하지 않는다. 비바이러스성 벡터는 플라스미드, 미니서클, 코스미드, 인공 염색체(예를 들어, BAC), 선형 공유 폐쇄(LCC) DNA 벡터(예를 들어, 미니서클, 미니벡터 및 미니노트(miniknot)), 선형 공유 폐쇄(LCC) 벡터(예를 MIDGE, MiLV, 미니스터링(ministering), 미니플라스미드), 미니-인트론 플라스미드, pDNA 발현 벡터 또는 핵산분해효소 매개 유전자 편집, 예를 들어, 징크-핑거(zinc-finger) 핵산분해효소(ZFN), 전사 활성화제 유사 작용기 핵산분해효소(TALEN) 및 CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)로부터 선택될 수 있다.

[0162] 일부 실시양태에서, 핵산의 전달을 위한 비바이러스성 벡터 시스템은 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리에틸렌이민(PEI) 및 PTD/CPP 기능성을 갖는 펩티드 서열로 구성되는 중합체 접합체를 포함할 수 있다. 예를 들어, PTD/CPP 기능성을 갖는 단백질은 TAT-펩티드 또는 TAT-펩티드와 관련이 있을 수 있는 펩티드 서열일 수 있다. 예를

들어, TAT-펩티드와 관련이 있는 서열은 데카펩티드 서열 GRKKKRRQRC(서열 식별 번호: 167)일 수 있다. 다른 잘 알려진 TAT-펩티드 관련 서열이 대안적으로 사용될 수 있다. 또한, 세포내 효소(예를 들어, 엔도좀, 리소좀에서)에 관한 안정성에 더하여, 본 발명에 따른 핵산의 전달을 위한 비바이러스성 벡터 시스템은 세포외 환경에서 매우 안정적일 수 있다. 예를 들어, PEI와 비교하여, TAT-PEG-PEI 폴리플렉스의 안정성은 고농도의 헤파린, Alveofact®, BALF 및 DNase I의 존재 하에서 현저하게 높을 수 있다.

[0163] 또한, 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 폴리펩티드, 예를 들어, TCR 및 CAR은 비바이러스성 기반 전달 시스템, 예컨대, 척추동물의 염색체로 DNA 서열을 도입하기 위한 합성 DNA 트랜스포손 시스템을 지칭하는 "슬리핑 뷰티(SB) 트랜스포손 시스템"을 사용하여 작용기 세포, 예컨대, T 세포로 도입될 수 있다. 시스템은 예를 들어, 미국 등록특허공보 제6,489,458호 및 제8,227,432호에서 설명된다. 이의 내용은 이의 전체가 참조에 의해 본원에 원용된다.

[0164] 슬리핑 뷰티(Sleeping Beauty) 트랜스포손 시스템은 슬리핑 뷰티(SB) 유전자전위효소 및 SB 트랜스포손으로 구성될 수 있다. DNA 트랜스포손은 간단한 오려 붙이기(cut-and-paste) 방식으로 하나의 DNA 부위에서 다른 부위로 전위된다. 전위는 정밀한 과정일 수 있으며, 여기에서 정제된 DNA 분절은 하나의 DNA 분자로부터 절단되어 동일한 또는 상이한 DNA 분자 또는 게놈의 다른 부위로 이동할 수 있다. 다른 Tc1/마리너(mariner) 유형 유전자전위효소가 하는 바와 같이, SB 유전자전위효소는 수용자 DNA 서열의 TA 디뉴클레오티드 염기 쌍으로 트랜스포손을 삽입한다. 삽입 부위는 동일한 DNA 분자에서 또는 다른 DNA 분자(또는 염색체)에서 다른 위치에 있을 수 있다. 인간을 포함한 포유류 게놈에서, 약 2억 개의 TA 부위가 있다. TA 삽입 부위는 트랜스포손 통합 과정에서 중복될 수 있다. 이러한 TA 서열의 중복은 전위의 특징일 수 있으며 일부 실험에서 기전을 확인하기 위해 사용된다. 유전자전위효소는 트랜스포손 내에서 인코딩될 수 있고 또는 유전자전위효소는 다른 공급원에 의해 공급될 수 있으며, 이 경우, 트랜스포손은 비자율적 요소가 된다. 비자율적 트랜스포손은 유전적 도구로서 유용할 수 있는데, 삽입 후 비의존적으로 절단 및 재삽입을 계속할 수 없기 때문이다. SB 트랜스포손은 척추 동물의 게놈으로의 유전자의 도입을 위한 또는 유전자 요법을 위한 비바이러스성 벡터로서 사용되는 것이 예상될 수 있다.

[0165] 간단히 설명하자면, 슬리핑 뷰티(SB) 시스템(문헌[Hackett et al., Mol Ther 18:674-83, (2010)])은 T 세포를 유전자 변형하기 위해 채택된다(문헌[Cooper et al., Blood 105:1622-31, (2005)]). 이는 2가지 단계, 즉, (i) SB 트랜스포손(즉, T 세포 특이성을 재지정하기 위한 키메라 항원 수용체(CAR)(문헌[Jin et al., Gene Ther 18:849-56, (2011)]; 문헌[Kebriaei et al., Hum Gene Ther 23:444-50, (2012)]) 및 SB 유전자전위효소를 발현하는 DNA 플라스미드의 전기전달 (ii) K562 세포주로부터 유래된 설계자 인공 항원 제시 세포(AaPC)(또는 AaPC(Activating and Propagating Cells)라고도 알려짐)에서 성분 일부를 안정적으로 발현하는 T 세포의 전파 및 확장을 포함한다. 상기 인용된 참조문헌의 내용은 이의 전체가 참조에 의해 본원에 원용된다. 일 실시양태에서, SB 트랜스포손 시스템은 mbIL-15, 세포 태그 및/또는 CAR을 인코딩하는 코딩 서열을 포함할 수 있다. 일 실시양태에서, SB 트랜스포손 시스템은 mbIL-15, 세포 태그 및/또는 TCR을 인코딩하는 코딩 서열을 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 제2 단계(ii)가 제거되며 유전자 변형 T 세포는 냉동보존될 수 있거나 환자에게 즉시 주입될 수 있다. 특정 실시양태에서, 유전자 변형 T 세포는 환자에게 주입하기 전에 냉동보존되지 않을 수 있다. 일부 실시양태에서, 슬리핑 뷰티(Sleeping Beauty) 유전자전위효소는 SB11, SB100X 또는 SB110일 수 있다.

[0166] 본 발명에 따른 핵산 전달을 위한 비바이러스성 벡터 시스템은 흡입, 경구, 직장, 비경구 정맥내, 근육내 또는 피하, 수조내, 질내, 복강내, 혈관내, 국소(분말, 연고 또는 점적제), 기관내 삽관, 기관내 점적 또는 스프레이로, 약제학적으로 허용 가능한 조성물의 일부로서, 환자에게 적용될 수 있다.

[0167] 일부 양태에서, 조작된 (또는 형질도입된) γδ T 세포는 항원 제시 세포 또는 아미노비스포스포네이트에 의한 자극 없이 생체외에서 확장될 수 있다. 본 개시내용의 항원 반응성 조작된 T 세포는 생체외에서 및 생체내에서 확장될 수 있다. 다른 양태에서, 본 개시내용의 조작된 γδ T 세포의 활성 집단은 항원 제시 세포, 항원성 펩티드, 비펩티드 분자, 또는 소분자 화합물, 예컨대, 아미노비스포스포네이트에 의한 항원 자극 없이 그러나 특정 항체, 사이토카인, 미토겐 또는 융합 단백질, 예컨대, IL-17 Fc 융합, MICA Fc 융합 및 CD70 Fc 융합을 사용하여 생체외에서 확장될 수 있다. γδ T 세포 집단의 확장에서 사용될 수 있는 항체의 예는 항-CD3, 항-CD27, 항-CD30, 항-CD70, 항-OX40, 항-NKG2D 또는 항-CD2 항체를 포함할 수 있으며, 사이토카인의 예는 IL-2, IL-15, IL-12, IL-21, IL-18, IL-9, IL-7, 및/또는 IL-33을 포함할 수 있으며, 미토겐의 예는 인간 CD27에 대한 리간드인 CD70, 피토헤마글루티닌(PHA), 콘카발린 A(ConA), 미국자리공 미토겐(PWM), 단백질 땅콩 응집소(PNA), 대두 응집소(SBA), 렌즈콩 응집소(LCA), 완두 응집소(PSA), h 포마티아 응집소(HPA), 비시아 그라미네아 렉틴

(VGA) 또는 T 세포 증식을 자극할 수 있는 다른 적합한 미토겐을 포함할 수 있다. 다른 양태에서, 조작된 γδ T 세포의 집단은 60일 미만, 48일 미만, 36일 미만, 24일 미만, 12일 미만 또는 6일 미만에 확장될 수 있다.

[0168] 다른 양태에서, 본 개시내용은 입양 전달 요법을 위해 조작된 γδ T 세포의 집단의 생체외 확장을 위한 방법을 제공한다. 본 개시내용의 조작된 γδ T 세포는 생체외에서 확장될 수 있다. 본 개시내용의 조작된 γδ T 세포는 APC에 의한 활성화 없이, 또는 APC 및 아미노포스페이트와 공동배양 없이 시험관내에서 확장될 수 있다.

[0169] 다른 양태에서, γδ T 세포 집단은 36일 미만에, 35일 미만에, 34일 미만에, 33일 미만에, 32일 미만에, 31일 미만에, 30일 미만에, 29일 미만에, 28일 미만에, 27일 미만에, 26일 미만에, 25일 미만에, 24일 미만에, 23일 미만에, 22일 미만에, 21일 미만에, 20일 미만에, 19일 미만에, 18일 미만에, 17일 미만에, 16일 미만에, 15일 미만에, 14일 미만에, 13일 미만에, 12일 미만에, 11일 미만에, 10일 미만에, 9일 미만에, 8일 미만에, 7일 미만에, 6일 미만에, 5일 미만에, 4일 미만에 또는 3일 미만에 시험관내에서 확장될 수 있다.

[0170] 도 2는 형질도입된 또는 조작된 γδ T 세포의 확장이 7일 내지 35일, 예를 들어, 14일 내지 28일 동안 소/중규모, 예를 들어, 플라스크/G-Rex에서 또는 대규모, 예를 들어, 50ml 내지 100리터 백에서 사이토카인, 예를 들어, IL-2, IL-15, IL-18 등의 존재 하에서 수행될 수 있다는 점을 나타낸다.

[0171] 일부 양태에서, γδ T 세포 집단은 확장 동안 1회 이상 재자극될 수 있다. 예를 들어, 조작된 (또는 형질도입된) γδ T 세포 집단은 일정 기간 동안 생체외에서 확장된 후 배양보조 세포와 확장된 γδ T 세포를 접촉시켜 재자극될 수 있다. 예를 들어, 배양보조 세포는, 단핵구, PBMC 또는 단핵구 및 PBMC의 조합일 수 있다. 다른 양태에서, γδ T 세포 집단은 확장 동안 재자극되지 않는다.

[0172] 일부 양태에서, 배양보조 세포는 인간 대상체에 대하여 자가유래이다. 일부 양태에서, 배양보조 세포는 인간 대상체에 대하여 동종유래이다.

[0173] 일부 양태에서, 배양보조 세포는 αβ T 세포가 고갈된다.

[0174] 일부 양태에서, 배양보조 세포는 γδ T 세포로의 첨가 전에 아미노비스포스포네이트, 예컨대, 졸레드론산을 사용하여 펄스 처리된다.

[0175] 다른 양태에서, 배양보조 세포는 세포주, 예컨대, 종양 세포주 또는 림프아구 세포주일 수 있다. 다른 양태에서, 배양보조 세포는 종양 세포, 예컨대, 자가유래 종양 세포일 수 있다. 일부 양태에서, 종양 세포는 K562 세포일 수 있다. 일부 양태에서, 배양보조 세포는 적어도 하나의 재조합 단백질, 예컨대, 예를 들어, 사이토카인을 포함하는 조작된 종양 세포이다. 사이토카인은 예를 들어, CD86, 4-1BBL, IL-15 및 이들의 임의의 조합일 수 있다. 일부 양태에서, IL-15는 막 결합 IL-15이다.

[0176] 일부 양태에서, 배양보조 세포는 본원에 설명된 임의의 배양보조 세포의 조합이다. 예를 들어, 배양보조 세포는 자가유래 단핵구, 동종유래 단핵구, 자가유래 PBMC, 동종유래 PBMC, 종양 세포, 자가유래 종양 세포, 조작된 종양 세포, K562 세포, 종양 세포주 및 림프아구 세포주로부터 선택되는 2개 이상의 배양보조 세포의 조합일 수 있다. 일부 양태에서, 배양보조 세포는 PBMC 및 림프아구 세포주의 조합이다.

[0177] 일부 양태에서, 배양보조 세포는 방사선 조사, 예를 들어, γ선 조사된다.

[0178] 일부 양태에서, 확장된 γδ T 세포 및 배양보조 세포는 약 1:1 내지 약 50:1(배양보조 세포:확장된 γδ T 세포)의 비율로 존재한다. 예를 들어, 확장된 γδ T 세포 및 배양보조 세포는 약 2:1 내지 약 20:1(배양보조 세포:확장된 γδ T 세포)의 비율로 존재한다. 일부 양태에서, 확장된 γδ T 세포 및 배양보조 세포는 약 1:1, 약 1:5:1, 약 2:1, 약 3:1, 약 4:1, 약 5:1, 약 6:1, 약 7:1, 약 8:1, 약 9:1, 약 10:1, 약 11:1, 약 12:1, 약 13:1, 약 14:1, 약 15:1, 약 20:1, 약 25:1, 약 30:1, 약 35:1, 약 40:1, 약 45:1 또는 약 50:1(배양보조 세포:확장된 γδ T 세포)의 비율로 존재한다.

[0179] 일부 양태에서, 본 개시내용의 확장된 γδ T 세포 집단은 특정 항체, 사이토카인, 미토겐 또는 융합 단백질, 예컨대, IL-17 Fc 융합, MICA Fc 융합 및 CD70 Fc 융합을 사용하여 재자극될 수 있다. 확장된 γδ T 세포 집단을 재자극하기 위해 사용될 수 있는 항체의 예는 항-CD3, 항-CD27, 항-CD30, 항-CD70, 항-OX40, 항-NKG2D 또는 항-CD2 항체를 포함할 수 있으며, 사이토카인의 예는 IL-2, IL-15, IL-12, IL-21, IL-18, IL-9, IL-7, 및/또는 IL-33을 포함할 수 있으며, 미토겐의 예는 인간 CD27에 대한 리간드인 CD70, 피토헤마글루티닌(PHA), 콘카발린 A(ConA), 미국자리공 미토겐(PWM), 단백질 땅콩 응집소(PNA), 대두 응집소(SBA), 렌즈콩 응집소(LCA), 완두 응집소(PSA), h 포마티아 응집소(HPA), 비시아 그라미네아 렉틴(VGA) 또는 T 세포 증식을 자극할 수 있는 다

른 적합한 미토겐을 포함할 수 있다.

[0180] 확장된 γδ T 세포의 재자극은 본원에 설명된 재자극제, 예컨대, 배양보조 세포, 항체, 사이토카인, 미토겐, 융합 단백질 등의 임의의 조합을 γδ T 세포와 접촉하게 하여 수행될 수 있다.

[0181] 일부 양태에서, 확장된 γδ T 세포는 확장 동안 1회 재자극된다. 다른 양태에서, 확장된 γδ T 세포는 확장 동안 1회 넘게 재자극된다. 예를 들어, 확장된 γδ T 세포는 확장 동안 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회 또는 10회 또는 그 이상 재자극될 수 있다. 통상의 기술자는 확장의 조건 및 길이에 따라 확장 동안 수행되는 재자극의 수를 용이하게 최적화할 수 있다.

[0182] 일부 양태에서, 확장된 γδ T 세포는 확장 동안 매일 재자극된다. 일부 양태에서, 확장된 γδ T 세포는 확장 동안 1일 1회 넘게 재자극된다. 다른 양태에서, 확장된 γδ T 세포는 2일마다 1회, 3일마다 1회, 4일마다 1회, 5일마다 1회, 6일마다 1회, 7일마다 1회, 8일마다 1회, 9일마다 1회, 10일마다 1회, 11일마다 1회, 12일마다 2회, 13일마다 1회, 14일마다 1회 등으로 재자극된다. 다른 양태에서, 확장된 γδ T 세포는 1주마다 1회, 1주마다 2회, 1주마다 3회, 1주마다 4회, 1주마다 5회, 1주마다 6회 등으로 재자극된다. 다른 양태에서, 확장된 γδ T 세포는 2주마다 1회, 3주마다 1회, 4주마다 1회 등으로 재자극된다. 통상의 기술자는 확장의 조건 및 길이에 따라 확장 동안 수행되는 재자극 사이의 기간을 용이하게 최적화할 수 있다.

[0183] 확장 동안 여러 번의 재자극이 수행되는 경우 각 재자극은 동일하거나 상이할 수 있다는 점을 이해해야 한다. 예를 들어, 각 재자극은 임의의 양으로 본원에 설명된 재자극제의 임의의 조합을 사용하여 수행될 수 있다. 사용되는 특정 재자극제와 이의 양은 각 재자극 동안 동일하거나 상이할 수 있다.

[0184] 그 후, 확장된 형질도입된 T 세포 생성물은 환자로의 주입을 위해 “기성품” T 세포 생성물로서 냉동보존될 수 있다.

[0185] 치료 방법

[0186] 본원에 설명된 조작된 γδ T 세포를 함유하는 조성물은 예방적 및/또는 요법적 치료를 위해 투여될 수 있다. 치료적 응용에서, 약제학적 조성물은 질환 또는 병태의 증상을 치료하거나 적어도 부분적으로 저지하는 데 충분한 양으로 질환 또는 병태를 이미 앓는 대상체에게 투여될 수 있다. 또한, 조작된 γδ T 세포는 병태의 발생, 감염 또는 악화 가능성을 줄이기 위해 투여될 수 있다. 치료적 용도를 위한 조작된 γδ T 세포의 집단의 유효량은 질환 또는 병태의 중증도 및 과정, 이전 요법, 대상체의 건강 상태, 체중 및/또는 약물에 대한 반응 및/또는 의사의 판단에 기반하여 다양할 수 있다.

[0187] 본 개시내용의 조작된 γδ T 세포는 본원에 설명된 병태, 예를 들어, 암, 감염 질환 및/또는 면역 질환에 대한 치료가 필요한 대상체를 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[0188] γδ T 세포를 사용하여 대상체에서 병태(예를 들어, 질병)를 치료하는 방법은 조작된 γδ T 세포의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 본 개시내용의 γδ T 세포는 다양한 용법(예를 들어, 시기, 농도, 용량, 치료 사이의 간격 및/또는 제형)으로 투여될 수 있다. 대상체는 본 개시내용의 조작된 γδ T 세포를 받기 이전에 예를 들어, 화학요법, 방사선 또는 이들의 조합으로 전조건화(precondition)될 수 있다. 또한, 조작된 γδ T 세포의 집단은 대상체로 투여되기 전에 동결되거나 냉동보존될 수 있다. 조작된 γδ T 세포의 집단은 동일하거나 상이한 종양 인식 모이어티 또는 동일 및 상이한 종양 인식 모이어티의 조합을 발현하는 2개 이상의 세포를 포함할 수 있다. 예를 들어, 조작된 γδ T 세포의 집단은 상이한 항원 또는 동일한 항원의 상이한 에피토프를 인식하기 위해 설계된 여러 별개의 조작된 γδ T 세포의 집단을 포함할 수 있다.

[0189] 본 개시내용의 γδ T 세포는 다양한 병태를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 일부 양태에서, 본 개시내용의 조작된 γδ T 세포는 고형암 및 혈액 악성종양을 포함하는 암을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 암의 비제한적인 예는 급성 림프아구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 부신피질 암종, AIDS-관련 암, AIDS-관련 림프종, 항문암, 충수암, 성상세포종, 신경모세포종, 기저세포암종, 담관암, 방광암, 골암, 뇌종양, 예컨대, 소뇌성상세포종, 대뇌성상세포종/악성 신경교종, 상의세포종, 수모세포종, 천막상 원발성 신경외배엽 종양, 시각 경로 및 시상하부 신경교종, 유방암, 기관지 선종, 버킷 림프종, 원발 불명의 암종, 중추신경계 림프종, 소뇌성상세포종, 자궁경부암, 소아암, 만성 림프성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 골수증식 장애, 결장암, 피부 T 세포 림프종, 결합조직형성 소원형세포 종양, 자궁내막암, 상의세포종, 식도암, 유잉 육종, 생식세포종양, 담낭암, 위암, 위장관 유암종, 위장관 기질 종양, 신경교종, 모발상세포 백혈병, 두경부암, 심장암, 간세포(간) 암, 호지킨 림프종, 하인두암, 안구 내 흑색종, 섬세포암종, 카포시 육종, 신장암, 후두암, 입술 및 구강 암, 지방육종, 간암, 폐암, 예컨대, 비소세포 및 소세포 폐암, 림프종, 백혈병, 마크로글로불린혈증, 뼈의

악성 섬유성 조직구종/골육종, 수모세포종, 흑색종, 중피종, 잠복 원발성의 전이성 경부 편평세포암, 입암(mouth cancer), 다발성 내분비종양증 증후군, 골수형성이상 증후군, 골수성 백혈병, 비강 및 부비동 암, 비인두암종, 신경모세포종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암, 구강암(oral cancer), 구인두암, 골육종/뼈의 악성 섬유성 조직구종, 난소암, 난소상피암, 난소 생식 세포 종양, 췌장암, 췌장암 섬세포, 부비동 및 비강 암, 부갑상선암, 음경암, 인두암, 갈색세포종, 송과체 성상세포종, 송과체 배아세포종, 뇌하수체 선종, 흉막폐 아세포종, 혈장 세포 신생물, 원발성 중추신경계 림프종, 전립선암, 직장암, 신세포 암종, 신우 및 요관 이행세포암, 망막모세포종, 횡문근육종, 타액선암, 육종, 피부암, 메르켈 세포 피부암종, 소장암, 연조직 육종, 편평세포 암종, 위암, T 세포 림프종, 인후암, 흉선종, 흉선암종, 갑상선암, 영양막 종양(임신성), 원발 부위 불명의 암, 요도암, 자궁육종, 질암, 외음부암, 발덴스트룀 마크로글로불린혈증 및 윌름스 종양을 포함한다.

[0190] 일부 양태에서, 본 개시내용의 조작된 γδ T 세포는 감염 질환, 예컨대, 바이러스성 또는 박테리아성 감염, 예를 들어, 뎅기열, 에볼라, 마르부르크 바이러스, 결핵(TB), 뇌수막염 및 매독을 치료하기 위해 사용될 수 있으며, 바람직하게는 면역 반응이 MHC 클래스 I 반응인 한, 방법이 감염 기관의 항생제 내성 균주, 자가면역 질환, 기생충 감염, 예컨대, 말라리아 및 다른 질환, 예컨대, MS 및 파킨슨병에 대하여 사용된다.

[0191] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용의 조작된 γδ T 세포는 면역 질환, 예컨대, 자가면역 질환을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 자가 면역질환(자가면역질환으로 공식적으로 등재되지 않은 질환 포함)의 예는 관절염, 만성 폐쇄성 폐 질환, 강직성 척추염, 크론병(특발성 염증성 장 질환(IBD)의 두 유형 중 하나), 피부근염, 1형 당뇨병, 자궁내막증, 굿파스처 증후군, 그레이브스병, 길랭-바레 증후군(GBS), 하시모토병, 화농성 한선염, 가와사키병, IgA 신장병증, 특발성 혈소판 감소성 자반증, 간질성 방광염, 홍반성 낭창, 혼합결합조직병, 국소피부경화증, 중증근무력증, 기면증, 신경근육긴장증, 심상성천포창, 악성 빈혈, 건선, 건선성 관절염, 다발성근염, 원발성 담즙성 경변증, 재발성 다발성연골염, 류마티스 관절염, 조현병, 경피증, 쇼그렌 증후군, 강직 인간 증후군, 측두동맥염(또한, “거대 세포 동맥염”으로도 알려짐”), 궤양성 대장염(특발성 염증성 장 질환(IBD)의 두 유형 중 하나), 혈관염, 백반증 및 베게너 육아종증이다.

[0192] 본 개시내용의 γδ T 세포를 사용한 치료는 병태의 임상적 발현 전에, 동안에 및 후에 대상체에게 제공될 수 있다. 치료는 질환의 임상적 발현 후에 1일, 1주, 6개월, 12개월 또는 2년 후에 대상체에게 제공될 수 있다. 치료는 질환의 임상적 발현 후에 1일, 1주, 1개월, 6개월, 12개월, 2년, 3년, 4년, 5년, 6년, 7년, 8년, 9년, 10년 또는 그 이상 동안 대상체에게 제공될 수 있다. 치료는 질환의 임상적 발현 후에 1일, 1주, 1개월, 6개월, 12개월 또는 2년 미만 동안 대상체에게 제공될 수 있다. 또한, 치료는 임상 시험에서 인간을 치료하는 단계를 포함할 수 있다. 치료는 본 개시내용의 조작된 γδ T 세포를 포함하는 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0193] 다른 양태에서, 대상체로의 본 개시내용의 조작된 γδ T 세포의 투여는 대상체의 신체에서 내인성 림프구의 활성을 조절할 수 있다. 다른 양태에서, 대상체로의 본 개시내용의 조작된 γδ T 세포의 투여는 내인성 T 세포에 항원을 제공할 수 있으며 면역 반응을 증가시킬 수 있다. 다른 양태에서, 기억 T 세포는 CD4+ T 세포일 수 있다. 다른 양태에서, 기억 T 세포는 CD8+ T 세포일 수 있다. 다른 양태에서, 대상체로의 본 개시내용의 조작된 γδ T 세포의 투여는 다른 면역세포의 세포독성을 활성화할 수 있다. 다른 양태에서, 다른 면역 세포는 CD8+ T 세포일 수 있다. 다른 양태에서, 다른 면역 세포는 자연 살해 T 세포일 수 있다. 다른 양태에서, 대상체로의 본 개시내용의 조작된 γδ T 세포의 투여는 조절 T 세포를 억제할 수 있다. 다른 양태에서, 조절 T 세포는 FOX3+ Treg 세포일 수 있다. 다른 양태에서, 조절 T 세포는 FOX3- Treg 세포일 수 있다. 활성이 본 개시내용의 조작된 γδ T 세포에 의해 조절될 수 있는 세포의 비제한적인 예는 조혈 줄기 세포; B 세포; CD4; CD8; 적혈구; 백혈구; 수지상 세포(수지상 항원 존재 세포 포함); 백혈구; 대식세포; 기억 B 세포; 기억 T 세포; 단핵구; 자연 살해 세포; 호중구 과립구; T 보조 세포; 및 T 살해 세포;를 포함할 수 있다.

[0194] 대부분의 골수 이식 동안, 전신 방사선 조사와 사이클로포스파미드의 조합이 대상체의 면역계에 의한 이식에서의 조혈 줄기 세포(HSC)의 거부를 방지하기 위해 통상적으로 사용될 수 있다. 일부 양태에서, 생체외에서 인터류킨-2(IL-2)를 사용한 공여체 골수의 배양은 골수에서 살해 림프구의 생성을 증진하기 위해 수행될 수 있다. 인터류킨-2(IL-2)는 야생형 림프구의 성장, 증식 및 분화에 필요할 수 있는 사이토카인이다. 인간으로의 γδ T 세포의 입양 전달에 대한 현재 연구에는 γδ T 세포 및 인터류킨-2의 공동투여가 필요할 수 있다. 그러나 저투여량 및 고투여량의 IL-2는 모두 높은 독성 부작용을 가질 수 있다. IL-2 독성은 여러 기관/계, 가장 현저하게, 심장, 폐, 신장 및 중추 신경계에서 나타날 수 있다. 다른 양태에서, 본 개시내용은 천연 사이토카인 또는 이의 변형된 형태, 예컨대, IL-2, IL-15, IL-12, IL-21의 공동투여 없이 대상체로 조작된 γδ T 세포를 투여하는 방법을 제공한다. 다른 양태에서, 조작된 γδ T 세포는 IL-2의 공동투여 없이 대상체로 투여될 수 있

다. 다른 양태에서, 조작된 γδ T 세포는 IL-2의 공동투여 없이 수술, 예컨대, 골수 이식 동안 대상체로 투여될 수 있다.

[0195] 투여 방법

[0196] 하나 또는 복수의 조작된 γδ T 세포 집단은 임의의 순서로 또는 동시에 대상체에게 투여될 수 있다. 동시에 투여되는 경우, 복수의 조작된 γδ T 세포는 단일한 통합된 형태로, 예컨대, 정맥내 주사로 또는 여러 형태, 예를 들어, 여러 번의 정맥내 주사, 피하(s.c.) 주사 또는 알약으로 제공될 수 있다. 조작된 γδ T 세포는 단일 포장으로 또는 복수의 포장으로 함께 또는 별도로 포장될 수 있다. 하나의 또는 모든 조작된 γδ T 세포는 여러 용량으로 제공될 수 있다. 동시에 투여되지 않는 경우, 여러 용량 사이의 시기는 약 1주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월 또는 약 1년까지로 다양할 수 있다. 다른 양태에서, 조작된 γδ T 세포는 대상체로의 투여 후 생체내에서, 즉, 대상체의 체내에서 확장할 수 있다. 조작된 γδ T 세포는 동일한 세포 제제를 사용한 여러 번의 치료를 위한 세포를 제공하기 위해 동결될 수 있다. 본 개시내용의 조작된 γδ T 세포 및 이를 포함하는 약제학적 조성물은 키트로서 포장될 수 있다. 키트는 조작된 γδ T 세포 및 이를 포함하는 조성물의 사용에 대한 지시(예를 들어, 서면 지침)를 포함할 수 있다.

[0197] 다른 양태에서, 암, 감염 질환 또는 면역질환을 치료하는 방법은 조작된 γδ T 세포의 치료적 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함할 수 있으며, 여기서 투여는 암, 감염 질환 또는 면역 질환을 치료한다. 다른 실시양태에서, 조작된 γδ T 세포의 치료적 유효량은 적어도 약 10초, 30초, 1분, 10분, 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 12시간, 24시간, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월 또는 1년 동안 투여될 수 있다. 다른 양태에서, 조작된 γδ T 세포의 치료적 유효량은 적어도 1주 동안 투여될 수 있다. 다른 양태에서, 조작된 γδ T 세포의 치료적 유효량은 적어도 2주 동안 투여될 수 있다.

[0198] 본원에 설명된 조작된 γδ T 세포는 질환 또는 병태의 발생 전에, 동안에 및 후에 투여될 수 있으며, 조작된 γδ T 세포를 함유하는 약제학적 조성물을 투여하는 시기는 다를 수 있다. 예를 들어, 조작된 γδ T 세포는 예방제로서 사용될 수 있으며 질환 또는 병태의 발생 가능성을 줄이기 위해 병태 또는 질병에 대한 경향성을 갖는 대상체로 지속적으로 투여될 수 있다. 조작된 γδ T 세포는 증상의 발현 동안 또는 발현 후 가능한 한 빨리 대상체로 투여될 수 있다. 조작된 γδ T 세포의 투여는 증상의 발현 내에 즉시, 증상의 발현 최초 3시간 내에, 증상의 발현 최초 6시간 내에, 증상의 발현 최초 24시간 내에, 증상의 발현 최초 48시간 내에 또는 증상의 발현으로부터 임의의 기간 내에 개시될 수 있다. 초기 투여는 본원에 설명된 임의의 제형을 사용하여 본원에 설명된 임의의 경로에 의해서와 같이 실제적인 임의의 경로를 통해 수행될 수 있다. 다른 양태에서, 본 개시내용의 조작된 γδ T 세포의 투여는 정맥내 투여일 수 있다. 조작된 γδ T 세포의 1회 또는복수 투여량은 암, 감염 질환, 면역 질환, 패혈증 발현 후 가능한 한 빨리 또는 골수 이식과 함께 또는 면역 질환의 치료를 위해 필요한 기간, 예컨대, 예를 들어, 약 24시간 내지 약 48시간, 약 48시간 내지 약 1주, 약 1주 내지 약 2주, 약 2주 내지 약 1개월, 약 2주 내지 약 1개월, 약 1개월 내지 3개월 동안 투여될 수 있다. 암 치료를 위해, 1회 또는 복수 투여량의 조작된 γδ T 세포가 암의 발현 후 및 다른 치료 전후 수 년 동안 투여될 수 있다. 다른 양태에서 조작된 γδ T 세포는 적어도 약 10분, 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 12시간, 24시간, 적어도 48시간, 적어도 72시간, 적어도 96시간, 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 4주, 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 4개월, 적어도 5개월, 적어도 6개월, 적어도 7개월, 적어도 8개월, 적어도 9개월, 적어도 10개월, 적어도 11개월, 적어도 12개월, 적어도 1년, 적어도 2년, 적어도 3년, 적어도 4년 또는 적어도 5년 동안 투여될 수 있다. 치료 기간은 각 대상체마다 다양할 수 있다.

[0199] 보존

[0200] 일부 양태에서, γδ T 세포는 동결 배지에서 제형화된 다음 적어도 약 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 1년, 2년, 3년 또는 적어도 5년의 장기간 보관 동안 액체질소 동결기(-196℃)와 같은 극저온 저장 유닛 또는 초저온 동결기(-65℃, -80℃, -120℃ 또는 -150℃)에 배치될 수 있다. 동결 배지는 약 6.0 내지 약 6.5, 약 6.5 내지 약 7.0, 약 7.0 내지 약 7.5, 약 7.5 내지 약 8.0 또는 약 6.5 내지 약 7.5 사이로 pH를 유지하기 위해 생리학적 pH 완충제를 갖는 디메틸 설폭사이드(DMSO) 및/또는 염화 나트륨(NaCl) 및/또는 덱스트로스 및/또는 덱스트란 설페이트 및/또는 하이드록시에틸 녹말(HES)을 함유할 수 있다. 냉동보존된 γδ T 세포는 해동될 수 있으며 본원에 설명된 항체, 단백질, 펩티드 및/또는 사이토카인을 사용한 자극에 의해 더 처리될 수 있다. 냉동보존된 γδ T 세포는 해동될 수 있으며 본원에 설명된 바이러스성 벡터(레트로바이러스성, 아데노 연관 바이러스(AAV) 및 렌티바이러스성 벡터) 또는 비바이러스성 수단(RNA DNA, 예를 들어, 트랜스포손 및 단백질

포함)을 사용하여 유전자 변형될 수 있다. 변형된 γδ T 세포는 동결 배지에서 mL 당 약 적어도 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9 또는 적어도 약 10^{10}세포로 적어도 약 1, 5, 10, 100, 150, 200, 500개 바이알의 양으로 세포 은행을 생성하기 위해 더 냉동보존될 수 있다. 냉동보존된 세포은행은 이들의 기능성을 보유할 수 있으며 해동된 후 자극되고 확장될 수 있다. 다른 양태에서, 해동된 세포는 동종이계 세포 생성물로서 많은 세포를 생성하기 위해 적합한 폐쇄 용기, 예컨대, 세포 배양 백 및/또는 생물반응기에서 자극되고 확장될 수 있다. 냉동보존된 γδ T 세포는 냉동 보관 조건 하에서 적어도 약 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 13개월, 15개월, 18개월, 20개월, 24개월, 30개월, 36개월, 40개월, 50개월 또는 적어도 약 60개월 동안 이들의 생물학적 기능을 유지할 수 있다. 다른 양태에서, 보존제가 제형에 사용되지 않을 수 있다. 냉동보존된 γδ T 세포는 해동되어 동종이계 기성품 세포 생성물로서 여러 명의 환자에게 주입될 수 있다.

[0201] 일부 양태에서, 본원에 설명된 조작된 γδ T 세포는 적어도 1×10^3세포/ml, 적어도 2×10^3세포/ml, 적어도 3×10^3세포/ml, 적어도 4×10^3세포/ml, 적어도 5×10^3세포/ml, 적어도 6×10^3세포/ml, 적어도 7×10^3세포/ml, 적어도 8×10^3세포/ml, 적어도 9×10^3세포/ml, 적어도 1×10^4세포/ml, 적어도 2×10^4세포/ml, 적어도 3×10^4세포/ml, 적어도 4×10^4세포/ml, 적어도 5×10^4세포/ml, 적어도 6×10^4세포/ml, 적어도 7×10^4세포/ml, 적어도 8×10^4세포/ml, 적어도 9×10^4세포/ml, 적어도 1×10^5세포/ml, 적어도 2×10^5세포/ml, 적어도 3×10^5세포/ml, 적어도 4×10^5세포/ml, 적어도 5×10^5세포/ml, 적어도 6×10^5세포/ml, 적어도 7×10^5세포/ml, 적어도 8×10^5세포/ml, 적어도 9×10^5세포/ml, 적어도 1×10^6세포/ml, 적어도 2×10^6세포/ml, 적어도 3×10^6세포/ml, 적어도 4×10^6세포/ml, 적어도 5×10^6세포/ml, 적어도 6×10^6세포/ml, 적어도 7×10^6세포/ml, 적어도 8×10^6세포/ml, 적어도 9×10^6세포/ml, 적어도 1×10^7세포/ml, 적어도 2×10^7세포/ml, 적어도 3×10^7세포/ml, 적어도 4×10^7세포/ml, 적어도 5×10^7세포/ml, 적어도 6×10^7세포/ml, 적어도 7×10^7세포/ml, 적어도 8×10^7세포/ml, 적어도 9×10^7세포/ml, 적어도 1×10^8세포/ml, 적어도 2×10^8세포/ml, 적어도 3×10^8세포/ml, 적어도 4×10^8세포/ml, 적어도 5×10^8세포/ml, 적어도 6×10^8세포/ml, 적어도 7×10^8세포/ml, 적어도 8×10^8세포/ml, 적어도 9×10^8세포/ml, 적어도 1×10^9세포/ml 또는 그 이상, 약 1×10^3세포/ml 내지 약 적어도 1×10^8세포/ml, 약 1×10^5세포/ml 내지 약 적어도 1×10^8세포/ml 또는 약 1×10^6세포/ml 내지 약 적어도 1×10^8세포/ml의 양으로 조성물에 존재할 수 있다.

[0202] 예를 들어, 종양 항원 특이적 TCR을 발현하기 위해 조작될 수 있는, 실행가능한 동종이계 T 세포 생성물, 예를 들어, 키메라 CD8α-CD4tm/세포내 단백질을 발달시키기 위해, 본 개시내용의 실시양태는 최종 동종이계 생성물에서 잔여 αβ T 세포의 존재는 최소화하는 반면 γδ T 세포의 수율은 최대화하는 방법을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용의 실시양태는 αβ T 세포를 고갈시키고 분자, 예컨대, 암포테리신 B, N-아세틸 시스테인(NAC)(또는 고용량 글루타민/글루타멕스), IL-2 및/또는 IL-15를 성장 배지에 공급하여 γδ T 세포를 확장하고 활성화하는 방법을 포함할 수 있다.

[0203] 일부 양태에서, 본원에 설명된 방법은 본 개시내용의 일부 양태에 따른 자가유래 또는 동종유래 생성물을 생성하기 위해 사용될 수 있다.

[0204] 본 발명은 하기 실시예를 참조하여 더 잘 이해될 수 있으며, 이는 청구범위의 범위를 제한하도록 의도되지 않는다.

[0205] 실시예

[0206] 실시예 1

[0207] 자가유래 세포를 사용한 확장 동안 γδ T 세포의 재자극은 증진되며 연장되는 확장으로 이어진다.

[0208] 도 3a 및 도 3b는 γδ T 세포의 확장에서 자가유래 단핵구를 사용한 재자극의 영향을 나타낸다. 도 3a는 도 3b에서 존재하는 데이터를 생성하기 위해 사용되는 확장 과정을 나타낸다. 간단히 설명하자면, 0일차에, αβ-TCR 발현 T 세포(CD4+ 및 CD8+ T 세포 포함) 고갈된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)(“γδ T 세포”)가 졸레드로네이트(ZOL)(5μM), IL-2(100U/ml) 및 IL-15(100ng/ml)의 존재 하에서 활성화되었다. 3일차에, 활성화된 γδ T 세포가 모의 형질도입되었다. 4일차에, 모의 형질도입된 세포는 확장된다. 7일차에, 확장된 세포는 10(단핵구):1

(γδ T 세포)의 비율로 (4시간 동안 ZOL(100μM)을 사용하여 펄스 처리된 PBMC(Miltenyi)로부터 CD14+ 선택에 의해 수득된) 자가유래 단핵구를 사용하여 재자극되었다. 확장된 세포는 14일차에 동결되었다.

[0209] 도 3b는 자가유래 단핵구를 사용한 재자극이 재자극이 없는 경우와 비교하여 2개의 공여체(D1 및 D2)로부터 수득된 γδ T 세포의 배수 확장을 증가시킨다는 점을 나타낸다. 재자극된 세포의 배수 확장은 10일 후 감소되었다. 14일까지, 재자극된 세포의 배수 확장은 재자극이 없는 경우와 유사한 배수 확장으로 감소되었다.

[0210] 도 4a 및 도 4b는 γδ T 세포의 확장에 대한 방사선 조사된 자가유래 αβ 고갈된 PBMC를 사용한 재자극의 영향을 나타낸다. 도 4a는 도 4b에서 존재하는 데이터를 생성하기 위해 사용되는 확장 과정을 나타낸다. 간단히 설명하자면, 0일차에, αβ-TCR 발현 T 세포(CD4+ 및 CD8+ T 세포 포함) 고갈된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)("γδ T 세포")가 졸레드로네이트(ZOL)(5μM), IL-2(100U/ml) 및 IL-15(100ng/ml)의 존재 하에서 활성화되었다. 2일차에, 활성화된 γδ T 세포가 모의 형질도입되었다. 3일차에, 모의 형질도입된 세포는 확장된다. 7일차에, 확장된 세포는 5:1 또는 10:1(αβ 고갈된 PBMC:γδ T 세포)의 비율로 (4시간 동안 ZOL(100μM)로 펄스 처리된) 방사선 조사된 (100 Gy) 자가유래 αβ-TCR 발현 T 세포 고갈된 PBMC를 사용하여 재자극되었다.

[0211] 도 4b는 5:1 및 10:1의 비율로 αβ 고갈된 PBMC를 사용한 재자극이 재자극이 없는 경우와 비교하여 2개의 공여체(D1 및 D2)로부터 수득된 γδ T 세포의 배수 확장을 증가시킨다는 점을 나타낸다.

[0212] 도 5 내지 도 11은 γδ T 세포의 확장에 대한 자가유래 단핵구 또는 방사선 조사된 자가유래 αβ 고갈된 PBMC를 사용한 여러 번의 재자극의 영향을 나타낸다.

[0213] 도 5는 도 6 내지 도 11에서 존재하는 데이터를 생성하기 위해 사용되는 확장 과정을 나타낸다. 간단히 설명하자면, 0일차에, αβ-TCR 발현 T 세포(CD4+ 및 CD8+ T 세포 포함) 고갈된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)("γδ T 세포")가 졸레드로네이트(ZOL)(5μM), IL-2(100U/ml) 및 IL-15(100ng/ml)의 존재 하에서 활성화되었다. 2일차에, 활성화된 γδ T 세포가 모의 형질도입되었다. 3일차에, 모의 형질도입된 세포는 확장된다. 7일차에 및 14일차에, 확장된 세포는 1) 1:1, 5:1 또는 10:1(단핵구:γδ T 세포)의 비율로 자가유래 단핵구(PBMC(Miltenyi)로부터 CD14+ 선택에 의해 수득되며 4시간 동안 ZOL(100μM)를 사용하여 펄스 처리됨) 또는 2) 10:1 또는 20:1(αβ 고갈된 PBMC:γδ T 세포)의 비율로 방사선 조사된 (100 Gy) 자가유래 αβ-TCR 발현 T 세포 고갈된 PBMC(4시간 동안 ZOL(100μM)를 사용하여 펄스 처리됨)를 사용하여 재자극되었다.

[0214] 도 6a 및 도 6b는 2개의 공여체로부터 유래한 γδ T 세포 확장에 대한 자가유래 단핵구 또는 방사선 조사된 자가유래 αβ 고갈된 PBMC를 사용한 여러 번의 재자극의 영향을 나타낸다. 도 6a는 공여체 1로부터의 데이터를 나타낸다. 대조군 검체에서 그리고 단핵구:γδ T 세포의 더 낮은 비율로, 확장이 대략 14일차에 정체되었다. 그러나, 7일차 및 14일차에 10:1(단핵구:γδ T 세포)의 비율로 단핵구를 사용한 또는 20:1(αβ 고갈된 PBMC:γδ T 세포)의 비율로 방사선 조사된 αβ 고갈된 PBMC를 사용한 γδ T 세포의 재자극은 이러한 정체를 방지했으며, 이는 적어도 17일 동안 확장을 현저하게 증진하였다. 예를 들어, δ2 세포는 정체 도달 없이 7일차 및 14일차에 20:1(αβ 고갈된 PBMC:γδ T 세포)의 비율로 방사선 조사된 αβ 고갈된 PBMC를 사용하여 재자극되는 경우 17일차에 2498배 확장에 도달하였다.

[0215] 도 6b는 제2 공여체로부터 유래한 γδ T 세포의 확장에 대한 자가유래 단핵구 또는 방사선 조사된 자가유래 αβ 고갈된 PBMC를 사용한 여러 번의 재자극의 영향을 나타낸다. 도 5B에 나타낸 데이터와 유사하게, 확장은 대조군에서 그리고 단핵구:γδ T 세포의 더 낮은 비율로 대략 14일차까지 정체되었다. 그러나 7일차 및 14일차에 5:1 또는 10:1의 비율(단핵구: γδ T 세포)로 단핵구를 사용한 또는 10:1 또는 20:1의 비율(αβ 고갈된 PBMC : γδ T 세포)로 방사선 조사된 αβ 고갈된 PBMC를 사용한 γδ T 세포의 재자극은 이러한 정체를 방지했으며, 이는 적어도 17일 동안 확장을 현저하게 증진하였다. 예를 들어, δ2 세포는 정체 도달 없이 7일차 및 14일차에 20:1(αβ 고갈된 PBMC:γδ T 세포)의 비율로 방사선 조사된 αβ 고갈된 PBMC를 사용하여 재자극되는 경우 17일차에 305배 확장에 도달하였다.

[0216] 도 7a 내지 도 7c 및 도 8a 내지 도 8c는 2개의 공여체로부터 유래한 γδ T 세포의 확장에 대한 자가유래 단핵구 또는 방사선 조사된 자가유래 αβ 고갈된 PBMC를 사용한 여러 번의 재자극의 영향을 나타낸다. 또한, 이러한 데이터는 아래 표 1에서 요약되어 있다.

[0217] 표 1 21일차에 대조군 병태 대비 확장에서의 배수 변화.

공여체	배양보조 세포	범 γδ T 세포	δ2 T 세포
D1	단핵구 10:1	1.2	1.2
	단핵구 5:1	0.5	0.5
	단핵구 1:1	0.4	0.4
	PBMC 20:1	12.2	13.2
	PBMC 10:1	-	-
D2	단핵구 10:1	5.5	5.6
	단핵구 5:1	2.6	2.6
	단핵구 1:1	1.7	1.7
	PBMC 20:1	18.8	19.2
	PBMC 10:1	15.6	67.8

[0218]

[0219] 표 1 및 도 7a 내지 도 7c에서 볼 수 있듯이, 배수 확장은 공여체 2에 비해 공여체 1에서 더 낮았다(도 8a 내지 도 8c 참조). 이러한 결과는 21일차에서 볼 수 있는 대조군 검체의 확장에서의 급격한 증가에 기인할 수 있다. 이에도 불구하고, 방사선 조사된 자가유래 αβ 고갈된 PMBC를 사용한 재자극은 공여체 모두에서 자가유래 단핵구를 사용한 재자극과 비교하여 총 γδ T 세포의 더 높은 배수 확장을 초래한다는 점이 명백하다. 이러한 영향은 주로 δ2 T 세포의 증가로 인한 것으로 보인다.

[0220] 도 9 및 도 10은 자가유래 단핵구 또는 방사선 조사된 자가유래 αβ 고갈된 PBMC를 사용한 여러 번의 재자극이 확장된 γδ T 세포의 기억 표현형을 현저하게 변경하지 않는 것을 나타낸다. CD27 발현의 소폭 증가가 공여체 모두에서 10:1 단핵구를 사용하여 재자극된 확장된 γδ T 세포에서 검출되었다.

[0221] 도 11a 및 도 11b는 확장된 γδ T 세포의 생존율에 대한 자가유래 단핵구 또는 방사선 조사된 자가유래 αβ 고갈된 PBMC를 사용한 여러 번의 재자극의 영향을 나타낸다. 확장된 γδ T 세포의 생존율의 감소는 재자극 조건에서 관찰되었다. 이 영향은 방사선 조사된 자가유래 αβ 고갈된 PBMC(20 PBMC:1 γδ T 세포)를 사용하여 재자극된 γδ T 세포에서 가장 확연했다. 생존율은 재자극 후 감소하는 경향이 있으며 1주 이내에 반등한다

[0222] 실시예 2

[0223] 종양 유래 세포를 사용한 γδ T 세포의 자극은 확장을 증진하며 연장한다.

[0224] 도 12a 및 도 12b는 γδ T 세포에 대한 조작된 종양 유래 세포의 공동배양의 영향을 나타낸다. 간단히 설명하자면, 0일차에, αβ-TCR 발현 T 세포(CD4+ 및 CD8+ T 세포 포함) 고갈된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)(“γδ T 세포”)가 졸레드로네이트(ZOL)(5μM), IL-2(100U/ml) 및 IL-15(100ng/ml)의 존재 하에서 활성화되었다. 방사선 조사된 종양 유래 세포(K562)가 일부 검체에 2:1 비율(종양 유래 세포:γδ T 세포)로 첨가되었다. 다른 검체는 항-CD28 또는 항-CD27 mAb 코팅 플레이트에서 배양되었다. 3일차에, 활성화된 γδ T 세포가 모의 형질도입되었다. 4일차에, 모의 형질도입된 세포는 확장되었다. 확장된 세포는 21일차에 동결되었다

[0225] 도 12a 및 도 12b는 방사선 조사된 종양 유래 세포 +/- ZOL을 사용하여 자극된 2개의 공여체(D1(도 12a) 및 D2(도 12b))로부터 수득된 γδ T 세포가 항-CD28 항체 + ZOL, 항-CD27 항체 + ZOL 및 ZOL 단독(대조군)을 사용하여 자극된 경우보다 더 높은 배수 확장을 갖는 것을 나타낸다.

[0226] 실시예 3

[0227] 재자극을 사용한 종양 유래 세포를 사용한 γδ T 세포의 자극은 γδ T 세포의 확장을 증진하며 연장한다.

[0228] 표 2는 본 실험에서 시험된 조건을 요약한다. 간단히 설명하자면, 2개의 공여체로부터 수득된 γδ T 세포는 a) 종양 유래 세포(대조군)의 부재 하에서; b) 야생형 방사선 조사된 종양 유래 세포(K562 WT)를 사용하여; c) ZOL

의 부재 하에서 방사선 조사된 변형된 종양 유래 세포(K562 변이체 2)를 사용하여; c-재자극) 7일차 및 14일차에 재자극을 사용하여 ZOL의 부재 하에서 방사선 조사된 변형된 종양 유래 세포(K562 변이체 2)를 사용하여; d) 방사선 조사된 변형된 종양 유래 세포(K562 변이체 2)를 사용하여; 및 e) 방사선 조사된 변형된 종양 유래 세포(K562 변이체 1)를 사용하여; IL-2(100U/ml) 및 IL-15(100ng/ml) +/- 졸레드로네이트(ZOL)(5μM) +/- 종양 유래 세포(2 종양 유래 세포:1 T cell) +/- 재자극의 존재 하에서 0일차에 활성화되었다. 세포는 2일차에 모의 형질도입되었으며 3일차에 확장되었다. 세포에 7, 10, 14 및 17일차에 영양이 공급되었고 선택적으로 7일차 및 14일차에 재자극되었다. 세포는 21일차에 동결되었다.

[0229] 표 2

공여체	검체 번호	배양보조 세포 **(0 일차)**	졸레드로네이트 **(5uM; 0 일차)**	재자극 **(7 일차)**	재자극 **(14 일차)**
D1	1a	해당 없음	+	-	-
	1b	K562 WT	+	-	-
	1c	K562 변이체 2	-	-	-
	1c_재자극	K562 변이체 2	-	K562 변이체 2	K562 변이체 2
	1d	K562 변이체 2	+	-	-
	1e	K562 변이체 1	+	-	-
D2	2a	해당 없음	+	-	-
	2b	K562 WT	+	-	-
	2c	K562 변이체 2	-	-	-
	2c_재자극	K562 변이체 2	-	K562 변이체 2	K562 변이체 2
	2d	K562 변이체 2	+	-	-
	2e	K562 변이체 1	+	-	-

[0230]

[0231] 도 13a 내지 도 13c는 γδ T 세포의 활성화 동안 다양한 종양 유래 세포의 공동배양의 결과를 나타낸다. 도 13a는 1) 종양 유래 세포(대조군)의 부재 하에서; 2) 야생형 방사선 조사된 종양 유래 세포(K562 WT)를 사용하여; 3) 방사선 조사된 변형된 종양 유래 세포(K562 변이체 1)를 사용하여; 4) 방사선 조사된 변형된 종양 유래 세포(K562 변이체 2)를 사용하여; 5) ZOL의 부재 하에서 방사선 조사된 변형된 종양 유래 세포(K562 변이체 2)를 사용하여; 및 6) 7일차 및 14일차에 재자극을 사용하여 ZOL의 부재 하에서 방사선 조사된 변형된 종양 유래 세포(K562 변이체 2)를 사용하여; 졸레드로네이트(ZOL)(5μM), IL-2(100U/ml) 및 IL-15(100ng/ml)의 존재 하에서 0일차에 활성화된 2개의 공여체(D1(좌측 채널) 및 D2(우측 패널))로부터 수득된 γδ T 세포의 배수 확장을 나타낸다.

[0232] 도 13b 및 도 13c는 공여체 1(도 13b) 및 공여체 2(도 13c)에서 δ1(좌측 패널) 및 δ2(우측 패널)의 확장을 나타낸다.

[0233] 도 14a 및 도 14b는 공여체 1(도 14a) 및 공여체 2(도 14b)에서 전체 생존 세포 집단 내에서 존재하는 γδ T 세포의 백분율을 나타낸다.

[0234] 도 15는 배양에서의 졸레드로네이트의 결여가 졸레드로네이트가 배양에 있는 조건과 비교하여 다클론성 집단(δ1 및 δ2 γδ T 세포 모두)을 초래하는 것을 나타낸다. 세포는 21일차에 채취되었으며 유세포 분석으로 분석되어 δ1 및 δ2 집단을 결정하였다.

[0235] 도 16은 종양 유래 세포 공동 배양이 확장된 γδ T 세포의 기억 표현형을 변경하지 않는 것을 나타낸다. 세포는 21일차에 채취되었으며 유세포 분석으로 분석되어 세포 표면의 CD45, CD27 및 CCR7의 검출로 기억 표현형을

결정하였다.

[0236] 실시예 4

[0237] 동종유래 세포를 사용한 확장 동안 γδ T 세포의 재자극은 증진되며 연장되는 확장으로 이어진다.

[0238] 도 17a 및 도 17b는 γδ T 세포의 확장에 대한 방사선 조사된 동종유래 PBMC를 사용한 재자극의 영향을 나타낸다. 간단히 설명하자면, 0일차에, αβ-TCR 발현 T 세포(CD4+ 및 CD8+ T 세포 포함) 고갈된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)(“γδ T 세포”)가 졸레드로네이트(ZOL)(5μM), IL-2(100U/ml) 및 IL-15(100ng/ml)의 존재 하에서 활성화되었다. 2일차에, 활성화된 γδ T 세포가 모의 형질도입되었다. 3일차에, 모의 형질도입된 세포는 확장되었다. 7일차에, 확장된 γδ T 세포는 동종유래 배양보조 세포를 사용한 재자극의 영향을 조사하기 위해 5개의 별도의 군으로 분리되었다. 구체적으로, 2x106 확장된 γδ T 세포가 각 대조군에 배치되었다. 처리군은 다음과 같았다: 1) IL-2 + IL-15(대조군); 2) PBMC + LCL + OKT3 + IL-2; 3) PBMC + IL-2; 4) LCL + IL-2; 5) OKT3 + IL-2. 각 군에 대하여, PBMC = 동종유래 PBMC는 2 내지 3개의 공여체로부터 풀링되고 방사선 조사되었으며 25x106세포의 양으로 첨가되었다. LCL = 방사선 조사된 림프아구 세포이며 5x106세포의 양으로 첨가되었다. OKT3 = 가용성 OKT3, 활성화 항 CD3 항체는 30ng/ml의 양으로 첨가되었다. IL-2는 50U/ml의 양으로 첨가되었다.

[0239] 각 재자극 처리는 14일차에 반복되었으며 세포는 21일차에 채취되었고 분석되었다.

[0240] 도 17a 및 도 17b는 동종유래 PBMC 및/또는 LCL을 사용한 재자극이 재자극이 없는 경우와 비교하여 2개의 공여체(D1 및 D2)로부터 수득된 γδ T 세포의 성장 정체 없이 배수 확장을 증가시키는 것을 나타낸다.

[0241] 도 18a 내지 도 18c는 동종유래 PBMC 및/또는 LCL을 사용한 재자극이 다클론성(δ1 및 δ2 γδ T 세포 모두) 집단을 생성하는 것을 나타낸다. 생존 세포의 백분율로서 δ1 세포의 존재는 도 18a 및 도 18b에서 2개의 공여체에 대해 나타나 있다. 이러한 데이터는 δ1 세포의 존재가 공여체 의존적이라는 점을 예시한다. 도 18c는 21일차에 2개의 공여체로부터 유래한 대조군 처리(IL-2 + IL-15)의 및 (IL-2의 존재 하에서) PBMC+LCL+OKT3 처리의 결과를 나타낸다.

[0242] 도 19a 및 도 19b는 PBMC 및/또는 LCL을 사용한 재자극에 대하여 확장된 γδ T 세포 집단의 기억 표현형을 나타낸다. 기억 표현형은 21일차 대신 14일차에 측정되었으며, 따라서, 7일차에 단 한 번 재자극되었다. 확장된 γδ T 세포 집단은 유세포 분석으로 분석되어 세포 표면의 CD45, CD27 및 CCR7의 검출로 기억 표현형을 결정하였다. 도 19a는 확장된 γδ T 세포 집단에 대한 CD27 검출을 제시한다. PBMC+LCL+OKT3을 사용하여 재자극된 확장된 γδ T 세포에서 CD27의 백분율이 소폭 감소하는 것으로 보인다. 도 19b는 CD45 및 CCR7 발현을 제시한다. CCR7의 증가된 백분율이 PBMC를 사용하여 및 PBMC+LCL+OKT3를 사용하여 재자극된 확장된 γδ T 세포에서 나타난다.

[0243] 실시예 5

[0244] γδ T 세포의 활성화를 위해 졸레드로네이트를 사용하여 펄스 처리된 동종유래 PBMC의 생성.

[0245] 실시예 1에서 상기 나타낸 바와 같이, 졸레드로네이트(ZOL)를 사용하여 펄스 처리된 후 방사선 조사된 새로운 자가유래 PBMC는 7일차에 γδ T 세포의 재자극을 위해 및 선택적으로 (예를 들어, 14일차 등) 재자극 단계에서 사용될 수 있다. 그러나, 이러한 방법은 임상적 공여체로부터의 여러 채집을 필요로 한다.

[0246] 여러 번의 채집에 대한 필요를 방지하기 위해서, ZOL로 펄스 처리된 PBMC의 동종유래 은행이 하나 이상의 재자극에서 사용하기 위해 생성될 수 있다. 이러한 PBMC의 동종유래 은행은 다음과 같이 생성된다. 공여체로부터 채집된 (αβ T를 포함하는) 동결된 동종유래 PBMC를 해동하고 4시간 동안 100μM ZOL을 사용하여 펄스 처리하였다. 그 후, 이러한 ZOL 처리된 동종유래 PBMC는 세척되고 동결되었다. ZOL 처리된 동종유래 PBMC를 함유한 동결된 바이알이 50 Gy로 방사선 조사되며 추수 사용하기 위해 보관되었다. 이러한 방사선 조사된 ZOL 처리된 동종유래 PBMC는 생산 과정의 7일차에 재자극을 위해 해동되었다.

[0247] 실시예 6

[0248] 형질도입된 gd T 세포의 펩티드 특이적 사멸 활성

[0249] 형질도입된 γδ T 세포는 표 3에서 나타낸 확장 방법에 의해 제조되었다.

[0250] 표 3

	과정 1	과정 2	과정 3	대조군
배양보조제	방사선 조사된 K562-41BBL-mbIL15 (즉, 막 결합 IL15 및 4-1 BB 리간드를 발현하는 K562 세포)	졸레드로네이트 펄스 처리된 방사선 조사된 동종유래 PBMC	풀링된 방사선 조사된 동종유래 PBMC(2 내지 3 개의 공여체) + LCL + OKT3	없음
다음에 배양에 첨가된 배양보조제	0 일차	7 일차 및 14 일차	7 일차 및 14 일차	없음
배양보조제:γδ T 세포 비율	2 K562:1 총 세포(PBMC + γδ T 세포) 비율	20 PBMC:1 γδ T 세포 비율	1 γδ T 세포:2.5 LCL:12.5 PBMC 비율	없음
사이토카인	생산 21 일차까지 IL15 + IL2 에서 성장한 세포	생산 21 일차까지 IL15 + IL2 에서 성장한 세포	최초 7 일 동안 IL15 + IL2 에서 성장하였으며 그 후 생산 7 일차에서 21 일차까지 오직 IL2 로 전환한 세포	생산 21 일차까지 IL15 + IL2 에서 성장한 세포

[0251]

[0252] 상기 과정은 과정 1로부터 펩티드/MHC-특이적 TCR-형질도입 T (Tet+) γδ 세포 6.8%, 과정 2로부터 Tet+ 세포 21.9%, 과정 3으로부터 Tet+ 세포 47.4% 및 대조군으로부터 Tet+ 세포 28.8%를 생성하였다. TCR(TCR-T)을 사용하여 형질도입된 γδ T 세포의 펩티드 특이적 사멸 활성을 결정하기 위해, 작용기 T 세포, 즉, 과정 1, 2, 3 또는 대조군 과정에 의해 확장된 γδ T 세포가 3:1(작용기 세포:종양 세포) 비율로 종양 세포(예를 들어, 펩티드 양성 U2OS 세포(세포 당 약 242개 복제 수를 제시할 수 있음) 및 펩티드 음성 MCF-7 세포)와 공동배양되었다. 형질도입되지 않은 γδ T 세포(NT)는 음성 대조군 역할을 한다. 종양 세포 생존율/사멸이 인큐사이트(IncuCyte) 생존 세포 분석 시스템을 사용하여 실시간으로 분석되었다. 도 20a는 펩티드 양성 U2OS 세포에 대하여 과정 3에 의해 확장된 γδ T 세포(TCR-T)의 사멸 활성이 과정 1 또는 과정 2에 의해 확장된 경우보다 현저하게 더 높으며 대조군(TCR-T)에 의해 확장된 경우와 유사하다는 점을 나타낸다. 과정 2, 과정 3 및 대조군에 의해 확장된 γδ TCR-T 세포는 이의 각각의 γδ NT 세포보다 더 높은 사멸 활성을 나타낸다. 과정 1에 의해 확장된 γδ TCR-T 세포 및 γδ NT 세포의 사멸 활성 사이에 현저한 차이가 없는 것으로 보인다. 도 20b는 펩티드 음성 MCF-7에 대하여 다양한 과정에 의해 확장된 γδ T 세포(TCR-T)의 사멸 활성이 이의 각 비형질도입된 γδ T 세포(NT) 세포의 사멸 활성과 유사한 것으로 보이는 것을 나타낸다. 이러한 결과는 과정 2, 과정 3 및 대조군에 의해 확장된 TCR 형질도입된 γδ T 세포가 펩티드 특이적 방식으로 종양 세포를 인식하고 사멸할 수 있다는 점을 제시한다.

[0253] 실시예 7

[0254] γδ T 세포 생산 최적화

[0255] 도 21은 γδ T 세포 생산 과정, 예를 들어, 대조군 및 과정 1 내지 과정 3(표 3)을 나타내며, 여기서 세포는

배양보조 세포 및/또는 작용제 I 또는 II, 예를 들어, 항-CD3, 항-CD28, 항-41BB, 항-ICOS, 항-CD40 및 항-OX40 항체의 존재 하에서 해동되고/되거나, 활성화되고/되거나 확장될 수 있다. 배양보조 세포가 0일차에(과정 1) 또는 7일차에(재자극) 및 14일차에(재자극)(과정 2 및 과정 3) 첨가되었다. 도 22a 내지 도 22d는 대조군 과정(배양보조제 없음)(도 22a)에 의해 제조된 γδ T 세포에서 관찰된 성장 정체가 배양보조 세포 자극(예를 들어, 과정 1(도 22b), 과정 2(도 22c) 및 과정 3(도 22d))에 의해 극복되는 것을 나타낸다. 대조군 과정, 과정 2 및 과정 3에 의해 생성된 세포에서 관찰된 활성화 후 γδ T 세포의 손실은 과정 1에 의해 생성된 세포에서 증진되었다. 한편, 과정 2 및 과정 3에 의해 생성된 γδ T 세포는 과정 1에 의해 생성된 경우보다 더 높은 배수 변화를 나타낸다. 과정 3에 의해 생성된 γδ T 세포는 적어도 10,000배 확장에 도달하였다.

[0256] 과정 3에 의해 생성된 γδ T 세포는 “더 젊은” T 세포 표현형을 나타낸다.

[0257] 대조군 과정 및 과정 1 내지 과정 3에 의해 생성된 γδ T 세포의 표현형이 분석되었다. 도 23a는 14일차 및 21일차에 과정 3에 의해 생성된 γδ T 세포가 대조군 과정, 과정 1 및 과정 2에 의해 생성된 경우보다 Tcm 표현형, 예를 들어, CD27+CD45RA-를 제시하는 γδ T 세포의 더 높은 백분율을 갖는 것을 나타낸다. 일관적으로, 14일차 및 21일차에 과정 3에 의해 생성된 γδ T 세포가 대조군 과정, 과정 1 및 과정 2에 의해 생성된 경우보다 Tcm 표현형, 예를 들어, CD62L+(도 23b)를 제시하는 γδ T 세포의 더 높은 백분율 및 비 Tcm 표현형, 예를 들어, CD57+ (도 23c)를 제시하는 γδ T 세포의 더 낮은 백분율을 갖는다. (n=4; 평균+SD; 대조군 대비 Tukey 사후 분석을 사용한 ANOVA; **** p<0.0001; ***p<0.001; **p<0.01; *p<0.5)

[0258] 다양한 과정에 의해 생성된 γδ T 세포에서 면역 체크포인트 단백질 발현에 대한 영향

[0259] 다양한 과정에 의해 생성된 γδ T 세포에서 면역 체크포인트 단백질 발현을 결정하기 위해, PD1+(도 24a), LAG3+(도 24b), TIM3+(도 24c) 및 TIGIT+(도 2d) γδ T 세포의 백분율이 측정되었다. 도 24a는, 14일차에, 과정 1 내지 과정 3에 의해 생성된 PD1+ γδ T 세포의 백분율이 대조군 과정(C)에 의해 생성된 경우와 비교하여 감소하는 것을 나타낸다. 한편, 과정 1에 의해 제조된 PD1+ γδ T 세포의 백분율은 14일차부터 21일차까지 증가한다. 과정 2 및 과정 3에 의해 생성된 PD1+ γδ T 세포의 백분율은 14일차부터 21일차까지 비슷한 것으로 보인다. 도 24b는 과정 2 및 과정 3에 의해 생성된 LAG3+ γδ T 세포의 백분율이 14일차에 대조군 과정(C)에 의해 생성된 경우와 비교하여 감소한다는 점을 나타낸다. 과정 2 및 과정 3에 의해 생성된 LAG3+ γδ T 세포의 백분율이 14일차부터 21일차까지 비교하여 비슷하다고 보이며, 과정 1에 의해 생성된 LAG3+ γδ T 세포의 백분율은 14일차부터 21일차까지 증가한다. 도 24c는 과정 1 내지 과정 3에 의해 생성된 TIM3+ γδ T 세포의 백분율이 14일차부터 21일차까지 감소한다는 점을 나타낸다. 도 24d는 과정 1 내지 과정 3에 의해 생성된 TIGIT+ γδ T 세포의 백분율이 14일차부터 21일차까지 감소한다는 점을 나타낸다.

[0260] 다양한 과정에 의해 생성된 γδ T 세포의 전이유전자 발현에 대한 영향

[0261] 과정 1 내지 과정 3 및 대조군 과정(C)에 의해 생성된 γδ T 세포는 CD8αβ 및 TCRαβ(PTE.CD8.TCR.WPRE)를 인코딩하는 바이러스성 벡터를 사용하여 형질도입한 이후 표적 퀩티드(PRAME)/MHC 사량체(Tet) 염색을 했다. 도 25a는 제1 재자극 후 14일차에, 과정 3에 의해 생성된 PTE.CD8.TCR.WPRE를 사용하여 형질도입된 Tet+ γδ T 세포의 백분율이 과정 1, 과정 2 및 대조군 과정에 의해 생성된 경우보다 더 높은 것을 나타낸다. 비형질도입된(NT) 세포는 음성 대조군 역할을 한다. 과정 3에 의해 생성된 PTE.CD8.TCR.WPRE를 사용하여 형질도입된 γδ T 세포가 대조군 과정에 의해 (18.4% 도 26a) 및 과정 2에 의해 (12.1%, 도 26b) 생성된 경우보다 더 높은 CD8+PRAME Tet+ γδ T 세포 수율(39%, 도 26c)을 보였다. MFI는 형질도입 조건에 걸쳐 유사하다. 도 25b는 과정 3에 의해 생성된 γδ T 세포에 포함된 전이유전자의 복제 수가 약 2 카피/세포라는 점을 나타내며, 이는 대조군 과정에 의해 생성된 경우와 비슷하며 과정 1 및 과정 2에 의해 생성된 경우보다 더 높은 것을 나타낸다,

[0262] 형질도입 및 확장에 대한 과정 1에서 초기 K562 자극의 영향

[0263] 도 27a에 나타낸 바와 같이 과정 1에 의해 제조된 γδ T 생성물에 대한 초기 K562 자극의 영향을 측정하기 위해, γδ T 세포가 2일차에 PTE.CD8.TCR.WPRE를 사용한 형질도입 전에 0일차에 자극되었거나 γδ T 세포가 2일차에 PTE.CD8.TCR.WPRE를 사용한 형질도입 후에 4일차에 자극되었다. 도 27b는 형질도입을 사용하여 또는 사용하지 않고 4일차에 자극된 γδ T 세포의 배수 확장이 0일차에 자극된 경우보다 더 낮다는 점을 나타낸다. 도 28a 내지 도 28c는 0일차에 K562 세포를 사용하여 자극된 γδ T 세포에 대하여, 60μl, 120μl 및 240μl의 PTE.CD8.TCR.WPRE를 사용하여 형질도입된 γδ T 세포가 각각 8.62%, 17.5% 및 31.1%의 CD8+PRAME Tet+ 세포 수율을 보였다는 점을 나타낸다. 도 28d는 통합된 전이유전자의 복제 수를 나타낸다. 240μl의 PTE.CD8.TCR.WPRE를 사용하여 형질도입된 γδ T 세포가 31.1%의 CD8+PRAME Tet+ 세포 수율을 보였지만(도

28c), 통합된 전이유전자의 복제 수는 7.53 카피/세포였으며, 이는 5 카피/세포 안전 한계를 초과한다. 대조적으로, 도 28e는 60㎕의 PTE.CD8.TCR.WPRE를 사용하여 형질도입된 후 4일차에 K562 세포를 사용하여 자극한 γδ T 세포가 1.71 카피/세포의 통합된 전이유전자의 복제 수를 갖는 31.8%의 CD8+PRAME Tet+ 세포 수율을 보였다는 점을 나타낸다. 이러한 데이터는 형질도입 후 4일차에 K562 자극이 형질도입 전에 0일차에 자극된 경우보다 더 우수한 및 더 안전한 T 세포 생성물을 초래하는 충분한 형질도입을 허용할 수 있으며, 이는 확장을 제한한다는 점을 제시한다.

[0264] 전이유전자 발현에 대한 재자극의 영향

[0265] 도 29는 전이유전자(PTE.CD8.TCR.WPRE) 발현, 예를 들어, CD8+PRAME Tet+ γδ 세포의 백분율은 (1) 4일차에 자극을 갖는 과정 1(n = 2)에 의해 생성된 세포에 대하여 14일차 내지 21일차에 증가하며; (2) 7일차 및 14일차에 재자극을 갖는 과정 2(n = 4)에 의해 생성된 세포에 대하여 7일차 내지 21일차에 감소하며; 및 (3) 7일차 및 14일차에 재자극을 갖는 과정 3(n = 4)에 의해 생성된 세포에 대하여 7일차 내지 14일차에 증가한 후 14일차 내지 21일차에 감소한다. 전이유전자 발현은 대조군 과정에 의해 생성된 세포에 대하여 유사한 수준을 유지했다.

[0266] 다양한 과정에 의해 생성된 γδ T 세포의 기능에 대한 영향

[0267] 도 30은 7일차에 제1 재자극 후 14일차에 수행된 기능 평가를 나타낸다. 과정 2 및 과정 3 및 대조군 과정(C)에 의해 생성된 γδ T 세포는 (2-T, 3-T 및 C-T 각각) PTE.CD8.TCR.WPRE를 사용하여 형질도입되었거나 (2-NT, 3-NT 및 C-NT 각각) 형질도입이 없었다. 동일한 TCR을 사용하여 형질도입되거나 형질도입되지 않은 CD8+ αβ T 세포는 양성 대조군(P-T 및 P-NT) 역할을 한다. 따라서, 제조된 세포는 3:1의 작용기/표적 비율로 표적 세포, 예를 들어, UACC257(~1081 표적 펩티드 /세포), U2OS(~242 표적 펩티드/세포), A375(~51 표적 펩티드/세포) 및 MCF-7(0 표적 펩티드/세포)와 함께 배양되었으며, 이후 세포독성 검정을 수행했다. 작용기 세포를 형질도입 효율로 정규화하였다. 도 31a 내지 도 31c는 제1 재자극 후, 과정 2(2-T) 및 과정 3(3-T)에 의해 생성되는 γδ T 세포의 세포용해 활성이 각각 UACC257, U2OS 및 A375 세포에 대하여 C-T 및 P-T의 경우보다 더 낮다는 점을 나타낸다. 도 31d는 비표적 MCF7 세포에 대하여 과정 2(2-T) 및 과정 3(3-T)에 의해 생성된 γδ T 세포의 최소 세포용해 활성을 나타낸다. (대조군 대비 Tukey 사후 분석을 사용한 ANOVA; n = 4 공여체; **p<0.01; *p<0.5)

[0268] 도 32a 및 도 32b는 제1 재자극 후 과정 2(2) 및 과정 3(3)에 의해 생성된 γδ T 세포로부터의 IFNγ 분비가 3:1의 작용기/표적 비율로 각각 UACC257 및 U2OS에 대하여 대조군 과정(C)에 의해 생성된 경우와 비슷하다는 점을 나타낸다. 작용기 세포를 형질도입 효율로 정규화하였다. 도 32c는 비표적 MCF7 세포에 대하여 과정 2(2) 및 과정 3(3)에 의해 생성된 γδ T 세포로부터의 최소 IFNγ 분비를 나타낸다. 비형질도입된(NT) 세포는 음성 대조군 역할을 한다. 동일한 TCR을 사용하여 형질도입된 CD8+ αβ T 세포는 양성 대조군(P) 역할을 했다. (n = 2 공여체; 2 기술적 복제/공여체)

[0269] 도 33a 및 도 33b는 제1 재자극 후 과정 2(2) 및 과정 3(3)에 의해 생성된 γδ T 세포로부터의 TNFα 분비가 3:1의 작용기/표적 비율로 UACC257 및 U2OS에 대하여 대조군 과정에 의해 생성된 경우과 비교하여 감소한다는 점을 나타낸다. 작용기 세포를 형질도입 효율로 정규화하였다. 도 33c는 비표적 MCF7 세포에 대하여 과정 2(2) 및 과정 3(3)에 의해 생성된 γδ T 세포로부터의 최소 TNFα 분비를 나타낸다. 비형질도입된(NT) 세포는 음성 대조군 역할을 한다. 동일한 TCR을 사용하여 형질도입된 CD8+ αβ T 세포는 양성 대조군(P) 역할을 했다. (n = 2 공여체; 2 기술적 복제/공여체)

[0270] 도 34a는 제1 재자극 후 과정 3(3)에 의해 생성된 γδ T 세포로부터의 GM-CSF 분비가 3:1의 작용기/표적 비율로 UACC257에 대하여 과정 2(2) 및 대조군 과정(C)에 의해 생성된 경우와 비교하여 증가한다는 점을 나타낸다. 작용기 세포를 형질도입 효율로 정규화하였다. 도 34b는 GM-CSF의 이러한 증가가 U2OS 세포에 대하여 관찰되지 않았다는 점을 나타내며, 이는 더 낮은 표적 펩티드 수를 나타낸다. 도 34c는 비표적 MCF-7 세포에 대하여 과정 2(2) 및 과정 3(3)에 의해 생성된 γδ T 세포로부터의 최소 GM-CSF 분비를 나타낸다. 비형질도입된(NT) 세포는 음성 대조군 역할을 한다. 동일한 TCR을 사용하여 형질도입된 CD8+ αβ T 세포는 양성 대조군(P) 역할을 했다. (n = 2 공여체; 2 기술적 복제/공여체) 또한, IL-6, 퍼포린 및 그란자임 B의 발현 수준에서 비형질도입된 세포 및 형질도입된 세포 사이에서 차이가 관찰되지 않았다. 시험되었으나 검출 한계 미만인 다른 피분석물은 IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70 및 IL-17a를 포함한다.

[0271] 다양한 과정에 의해 생성된 γδ T 세포에 의한 종양 세포 사멸

[0272] 종양 세포 사멸 검정이 5:1의 작용기/표적 비율로 수행되었다. 작용기 세포를 UACC257 세포를 사용하여 형질도입 효율로 정규화하였다(세포당 1081 표적 펩티드까지). UACC257세포가 표시된 바와 같이 3개의 상이한 시점에

서 검정에 첨가되었다. 도 35a는 UACC257 종양 세포 성장이 과정 1(4일차 자극), 과정 2 및 대조군 과정에 의해 생성된 공여체 1로부터 수득된 γδ T 세포에 의해 억제된다는 점을 나타낸다. 동일한 TCR을 사용하여 형질도입된 CD8+ αβ T 세포는 양성 대조군(P) 역할을 했다. 도 35b는 UACC257 종양 세포 성장이 과정 2, 과정 3 및 대조군 과정에 의해 생성된 공여체 2로부터 수득된 γδ T 세포에 의해 억제된다는 점을 나타낸다. 동일한 TCR을 사용하여 형질도입된 CD8+ αβ T 세포는 양성 대조군(P) 역할을 했다.

[0273] 최대 3배 종양 자극(1, 2 및 3) 후 다양한 과정에 의해 생성된 PTE.CD8.TCR.WPRE를 사용하여 형질도입된 γδ T 세포에서 면역 체크포인트 분자, 예를 들어, LAG3, PD-1, TIGIT 및 TIM3의 발현이 결정되었다. 도 36은 LAG3, PD-1, TIGIT 및 TIM3의 발현이 과정 1, 과정 2 및 대조군 과정에 의해 생성된 γδ T 세포 간에 비슷한 것으로 보임을 나타낸다. 동일한 TCR을 사용하여 형질도입된 CD8+ αβ T 세포가 양성 대조군(양성) 역할을 했다.

[0274] 실시예 8

[0275] γδ T 세포 생산에 대한 히스톤 탈아세틸화 억제제(HDACi) 및 IL-21의 영향

[0276] 문헌[Wang et.al.]은 HDACi 및 IL21이 기억 T 세포에 대한 인간 작용기 CD8+ T 세포를 재프로그래밍 하기 위해 협력할 수 있음을 나타낸다. (문헌[Cancer Immunol Res June 1 2020 (8) (6) 794-805]; 이의 내용은 이의 전체가 참조에 의해 본원에 원용됨). 예를 들어, IL-21의 존재 하에서 HDACi, 예를 들어 수베로일라닐리드 히드록삼산(SAHA) 또는 파노비노스타트(Pano)로 종양 침윤 림프구를 전처리하면 배양 2주 후에 Tcm αβ T 세포(CD28+CD62L+)가 증가할 수 있다.

[0277] 과정 3 배양보조 세포에 의해 제조된 T 세포 생성물에 대한 HDACi + IL-21의 영향을 시험하기 위해, 도 37은 실험 설계를 나타낸다. 예를 들어, 조건 4 하에서, γδ T 세포는 0일차에 졸레드로네이트 + IL-2 + IL-15의 존재 하에서 활성화될 수 있으며, 0일차부터 6일차까지 IL-2 + IL-15의 존재 하에서 확장될 수 있으며, 이후 7일차에 사이토카인의 부재 하에서 과정 3 배양보조 세포에 의한 재자극이 수행될 수 있으며, 이후 8일차부터 14일차까지 HDACi + IL-21 + IL-2 + IL-15의 존재 하에서 확장될 수 있다. 조건 5 하에서, γδ T 세포는 0일차에 졸레드로네이트 + IL-2 + IL-15의 존재 하에서 활성화될 수 있으며, 0일차부터 6일차까지 HDACi + IL-21 + IL-2 + IL-15의 존재 하에서 확장될 수 있으며, 이후 7일차에 사이토카인의 부재 하에서 과정 3 배양보조 세포에 의한 재자극이 수행될 수 있으며, 이후 8일차부터 14일차까지 IL-2 + IL-15의 존재 하에서 확장될 수 있다.

[0278] 도 38은, HDACi 및 IL-21의 부재 하에서, 7일차에 및 14일차에 과정 3 배양보조 세포(풀링된 방사선 조사된 동종유래 PBMC + LCL + OKT3)에 의한 재자극이 과정 1 배양보조 세포(방사선 조사된 K562-41BBL-mbIL15), 과정 2 배양보조 세포(졸레드로네이트 펄스 처리된 방사선 조사된 동종유래 PBMC) 및 대조군 과정(배양보조 세포 없음)에 의해 재자극되는 경우보다 14일차 및 21일차에 더 많은 CD28+CD62L+ γδ T 세포를 초래하는 것을 나타낸다. CD28+CD62L+ γδ T 세포의 양은 모든 과정 동안 14일차에 제2 재자극 후 감소된다. (n = 4; 평균+SD; 대조군 대비 다중 비교를 사용한 ANOVA; ***p<0.0005; *p<0.5)

[0279] 7일차에 과정 3 배양보조 세포(풀링된 방사선 조사된 동종유래 PBMC + LCL + OKT3)에 의한 제1 재자극 후 조건 4(IL-21 + HDACi(w2)) 및 조건 5(IL-21 + HDACi(w1)) 하에서의 γδ T 세포의 배수 확장이 조사되었다. 도 39a 내지 도 39c는 대조군(IL-21 + HDACi 없음), 제1주(w1) 동안 IL-21 + HDACi(조건 5) 및 제2주(w2) 동안 IL-21 + HDACi(조건4)를 사용하여 처리된 3개의 상이한 공여체(SD01004687(도 39a), D155410(도 39b) 및 SD01000256(도 39c))로부터 수득된 γδ T 세포의 배수 확장을 나타낸다. 결과는 제1주(w1) 동안 IL-21 + HDACi(조건 5)에 의해 제조된 γδ T 세포의 배수 확장이 제2주(w2) 동안 IL-21 + HDACi(조건 4) 및 대조군 과정에 의해 제조된 경우보다 낮은 것을 나타낸다. 그러나, 이러한 감소는 세포가 IL-2 + IL-15의 존재 하에서 확장된 후에 14일차에 회복되었다. (**는 과정 3 배양보조 세포 재자극을 표시함)

[0280] 7일차에 과정 3 배양보조 세포에 의한 제1 재자극 후 조건 4(IL-21 + HDACi(w2)) 및 조건 5(IL-21 + HDACi(w1)) 하에서의 δ2 및 δ1 세포가 조사되었다. 도 40a 내지 도 40c는 대조군(도 40a), IL-21 + HDACi(w1)(도 40b) 및 IL-21 + HDACi(w2)(도 40c)를 사용하여 처리된 생존 δ2 및 δ1 세포의 백분율을 나타낸다. 도 40b는 δ2 T 세포의 양이 대조군 과정(도 40a)에 의해 제조된 경우와 비교하여 HDACi + IL21(IL-21 + HDACi(w1))의 존재 하에서 배양의 제1주 동안 감소하는 것을 나타낸다. 도 40c는 HDACi + IL21(IL-21 + HDACi(w2))의 존재 하에서 배양의 제2주 동안 δ2 및 δ1 세포의 양이 대조군 과정(도 40a)에 의해 제조된 경우와 비교하여 비슷한 것을 나타낸다. (**는 과정 3 배양보조 세포 재자극을 표시함)

[0281] 도 41a는 배양의 제1주 동안 HDACi + IL-21(IL-21 + HDACi(w1))(조건 5), 제2주 동안 IL-2 + IL-15로의 스위치가 CD28+CD62L+ Tcm γδ T 세포의 감소를 초래한 것을 나타낸다. 반면, 배양의 제1주 동안 IL-2 + IL-15, 제2

주 동안 IL-21 + HDACi (w2)(조건 4)로의 스위치가 CD28+CD62L+ Tcm γδ T 세포의 증가를 초래했다. (n = 3; 평균+SD; 대조군과 다중 비교를 통한 ANOVA; ****p<0.0001, **p<0.005)

[0282] 유사하게, 도 41b는 배양의 제1주 동안 HDACi + IL-21(IL-21 + HDACi(w1))(조건 5), 제2주 동안 IL-2 + IL-15로의 전환이 CD27+CD45RA- Tcm γδ T 세포의 감소를 초래했한 것을 나타낸다. 반면, 배양의 제1주 동안 IL-2 + IL-15, 제2주 동안 IL-21 + HDACi (w2)(조건 4)로의 전환은 CD27+CD45RA- Tcm γδ T 세포의 증가를 초래했다. (n = 3; 평균+SD; 대조군 대비 다중 비교를 사용한 ANOVA; ****p<0.0001, **p<0.005)

[0283] 도 41c는 배양의 제1주(IL-21 + HDACi(w1))(조건 5) 동안 또는 배양의 제2주(IL-21 + HDACi(w2))(조건 4) 동안 HDACi + IL-21이 CD57+ γδ T 세포에 대하여 영향을 거의 미치지 않는 것을 나타낸다. (n = 3; 평균+SD; 대조군 대비 다중 비교를 사용한 ANOVA; **p<0.0005; *p<0.5)

[0284] 종합하자면, HDACi + IL-21은 γδ T 세포에서 Tcm을 촉진할 수 있다. 그러나, 이러한 Tcm 표현형은 HDACi + IL-21 제거 후 복귀될 수 있다. 또한, HDACi + IL-21이 배양의 제1주(0일차 내지 7일차) 동안 사용되는 경우, HDACi + IL-21은 확장 또는 δ1 및 δ2 T 세포 하위집단 백분율에 영향을 줄 수 있다.

[0285] 실시예 9

[0286] γδ T 세포 생산에 대한 IL-12 및 IL-18의 존재 하에서 재자극의 영향

[0287] 도 42는 0일차에 PBMC에서 αβ TCR 활성 T 세포가 고갈되었으며 이후 졸레드로네이트(ZOL)(5μM), IL-2 및 IL-15의 존재 하에서 활성화가 수행된 것을 나타낸다. 그 후, 세포는 IL-2 및 IL-15의 존재 하에서 확장되었다. 7일차에, 세포는 IL-2 및 IL-15의 존재 하에서 지속적으로 확장되거나 7일차에서 14일차까지 IL-12 및 IL-18의 존재 하에서 및 IL-2 및 IL-15의 부재 하에서 확장되었다(사이토카인 스위치). 사이토카인 스위치는 γδ T 세포의 확장을 감소시켰으며, 이는 IL-12 및 IL-18을 사용한 장기간 배양이 γδ T 세포 성장에 부정적인 영향을 가질 수 있음을 시사한다. IL-2 수용체, 예를 들어, IL-2Rα, IL-2Rβ 및 IL-2γ, IL-7 수용체, 예를 들어, IL-7Rα 및 IL-21 수용체(IL-21R)를 발현하는 γδ T 세포의 백분율이 0, 7, 10 및 14일차에 결정되었다. 그 결과, 7일차 내지 14일차에서 IL-2 및 IL-15의 부재 하에서 IL-2 + IL-15 내지 IL-12 + IL-18의 사이토카인 스위치가 2개의 공여체(D155410(도 43a) 및 SD010004867(도 43b))로부터 수득된 세포에서 IL-2Rα, IL-2Rγ 및 IL-21R을 발현하는 γδ T 세포의 백분율을 증가시키는 것을 나타낸다. 점선은 IL-12 + IL-18(사이토카인 스위치)을 사용한 대조군을 나타낸다. 사이토카인 스위치는 IL-2Rβ 및 IL-7Rα를 발현하는 δ T 세포의 백분율에 거의 영향을 미치지 않는다.

[0288] 조건 3(7일차 재자극에서 IL-12 + IL-18 프라이밍 및 재자극 후 IL-2 + IL-15)에서 γδ T 세포 확장의 영향을 시험하기 위해, 도 37에 나타낸 바와 같이 조건 1(대조군), 조건 2(IL-2 + IL-15) 및 조건 3에 의해 생성된 세포의 배수 확장을 비교하였다. IL-12 + IL-18 프라이밍(조건 3)은 대조군 및 조건2(IL-2 + IL-15)에 의해 생성된 경우와 비교하여 γδ T 세포 확장에 대하여 거의 영향을 미치지 않는다. 3개의 공여체(SD01004687(도 44a), D155410(도 44b) 및 SD010000256(도 44c))로부터 수득된 세포로부터 유래한 IL-12 + IL-18 프라이밍한 γδ T 세포 및 IL-12 + IL-18 프라이밍을 하지 않은 (IL-2 + IL-15) γδ T 세포 사이에서 배수 확장에서 현저한 차이가 없다. 또한, 대조군(도 45c)과 비교하여 IL-12 + IL-18 프라이밍(도 45a)을 사용하여 및 IL-12 + IL-18 프라이밍(도 45b)을 사용하지 않고 (IL-2 + IL-15) 제조된 δ1 T 세포의 백분율과 δ2 T 세포의 백분율 사이에서 현저한 차이가 없다. 도 37에서 나타낸 바와 같이 조건 1(대조군), 조건 2(IL-2 + IL-15) 및 조건 3(IL-12 + IL-18 프라이밍)에 의해 제조된 δ2 세포의 표현형이 14일차(IL-12 + IL-18 프라이밍 후 7일차)에 n = 3 공여체로 평가되었다. 도 46a는 IL-12 + IL-18 프라이밍에 의해 제조된 γδ T 세포의 Tcm 표현형, 예를 들어, CD27+CD45RA-가 대조군 및 IL-2 + IL-15에 의해 생성되는 경우와 비교하여 현저하게 감소된 것을 나타낸다. 도 46b는 IL-12 + IL-15에 의해 제조된 γδ T 세포의 Tcm 표현형, 예를 들어, CD28+CD62L+가 대조군 및 IL-2 + IL-18 프라이밍에 의해 생성되는 경우와 비교하여 현저하게 감소된 것을 나타낸다. 도 46c는 γδ T 세포의 비 Tcm 표현형, 예를 들어, CD57+가 대조군, IL-2 + IL-15 및 IL-12 + IL-18 프라이밍에 의해 생성되는 세포에서 최소인 것을 나타낸다.

[0289] 종합하자면, 사이토카인 스위치 또는 IL-12 + IL-18 프라이밍은 확장 또는 δ1 및 δ2 T 세포 하위집단 백분율에 영향을 주지 않을 수 있다. 사이토카인 스위치 또는 IL-12 + IL-18 프라이밍은 대조군 방법과 비교하여 14일차까지 Tcm γδ T 세포를 감소시킬 수 있다.

[0290] 실시예 10

[0291] γδ T 세포 생산에 대해 야생형(WT) K562 대 K562-41BBL-mbIL15를 사용한 초기 자극의 영향

[0292] 표 4

공여체	과정	초기 자극 배양보조제	초기 졸레드로네이트(5μM)	7 일차 재자극	14 일차 재자극
D148960	a	없음	있음	없음	없음
	b	K562 WT	있음	없음	없음
	c	K562-41BB-mbIL15	없음	없음	없음
	d	K562-41BB-mbIL15	없음	K562-41BB-mbIL15	K562-41BB-mbIL15
	e	K562-41BB-mbIL15	있음	없음	없음
	f	K562-CD86	있음	없음	없음
SD01000723	a	없음	있음	없음	없음
	b	K562 WT	있음	없음	없음
	c	K562-41BB-mbIL15	없음	없음	없음
	d	K562-41BB-mbIL15	없음	K562-41BB-mbIL15	K562-41BB-mbIL15
	e	K562-41BB-mbIL15	있음	없음	없음
	f	K562-CD86	있음	없음	없음

[0293]

[0294] 2개의 공여체(D148960 및 SD01000723)로부터 수득된 γδ T 세포는 표 4에 나타낸 과정에 따른 K562 WT, K562-41BB-mbIL15 또는 K562-CD86(CD86을 발현하도록 조작된 K562 세포) 배양보조 세포를 사용한 초기 자극을 사용하여 제조되었다.

[0295] 결과는, 일반적으로, 과정 b 내지 f에 의해 제조되는 2개의 공여체(D148960(도 47a) 및 SD01000723(도 47b))로부터 수득되는 범 γδ T 세포의 배수 확장이 과정 a(대조군)에 의한 경우보다 더 높음을 나타낸다. K562 WT(과정 b) 또는 K562-41BB-mbIL15(과정 c, d 및 e)를 사용한 초기 자극은 유사한 결과를 나타냈다. 일반적으로, 과정 b 내지 f에 의해 제조되는 2개의 공여체(D148960(도 48a 및 도 48b) 및 SD01000723(도 49a 및 도 49b))로부터 수득되는 δ1 및 δ2 하위집단 T 세포의 배수 확장은 과정 a(대조군)에 의한 경우보다 더 높다.

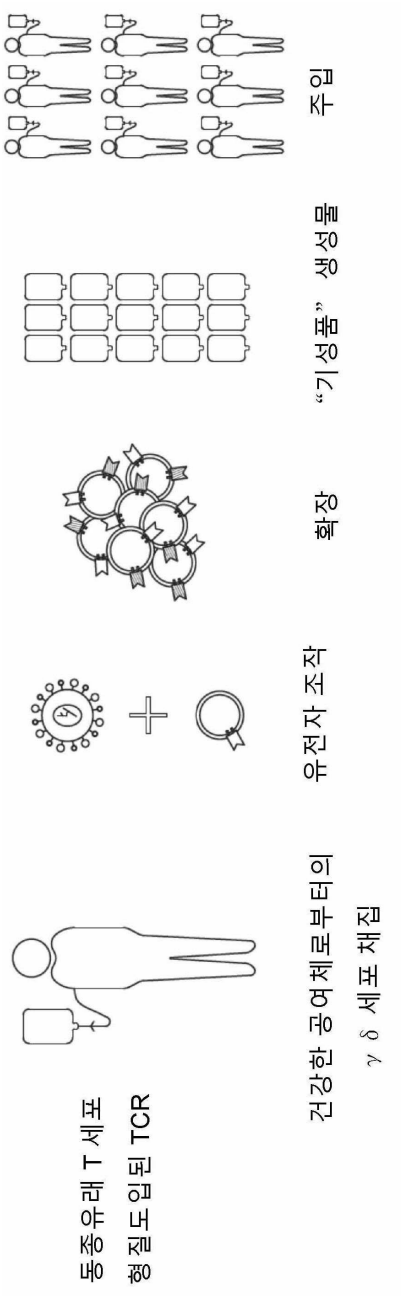
[0296] 본 명세서에 인용된 모든 참조문헌은 각 참조문헌이 참조에 의해 원용된다는 점을 구체적이고 개별적으로 나타낸 바와 같이 참조에 의해 본원에 원용된다. 임의의 참조문헌의 인용은 출원일 이전의 이의 개시내용에 대한 것이며 본 개시내용이 선행 발명으로 인해 이러한 참조문헌보다 선행할 자격이 없음을 인정하는 것으로 해석해서는 안 된다.

[0297] 상기 설명된 각각의 요소 또는 둘 이상이 함께 상기 설명된 유형과 상이한 다른 유형의 방법에서도 유용한 응용

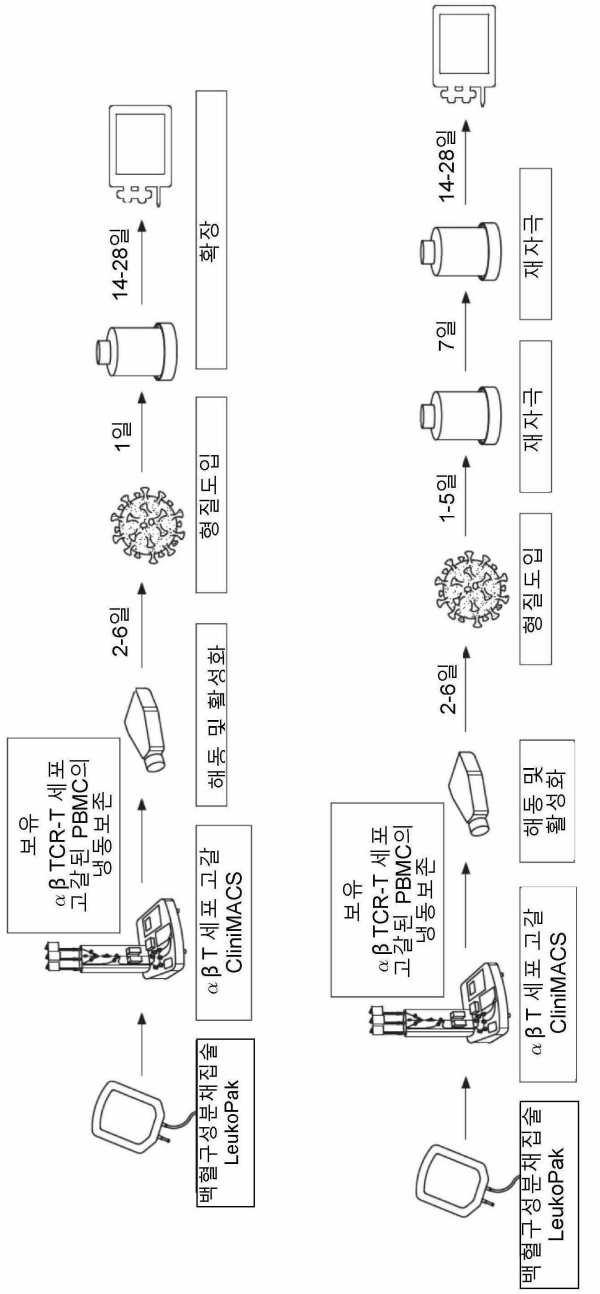
을 찾을 수 있다는 점을 이해해야 한다. 추가 분석 없이, 상기 내용은 본 개시내용의 요지를 충분히 나타내어 다른 사람이, 선행 기술의 관점에서, 첨부된 청구범위에서 제시된 본 발명의 일반적인 또는 특정 양태의 본질적 특성을 상당히 구성하는 특징을 생략하지 않고 이를, 현재 지식을 적용하여, 다양한 응용에 용이하게 적용할 수 있을 것이다. 상기 실시양태는 오직 예로서 제시되며, 본 개시내용의 범위는 다음 청구범위에 의해서만 제한되어야 한다.

도면

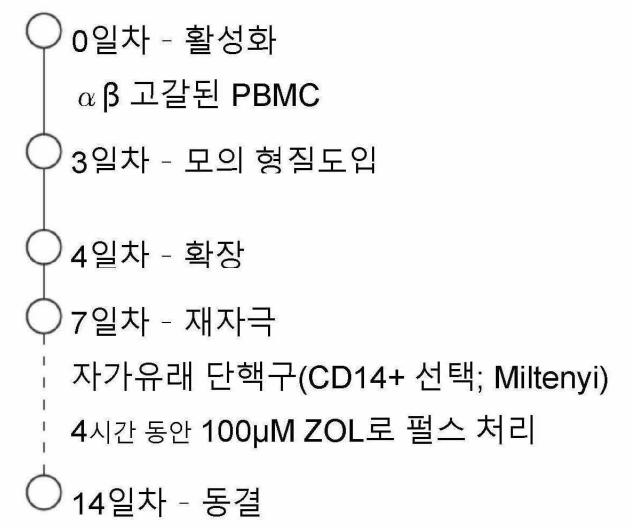
도면1



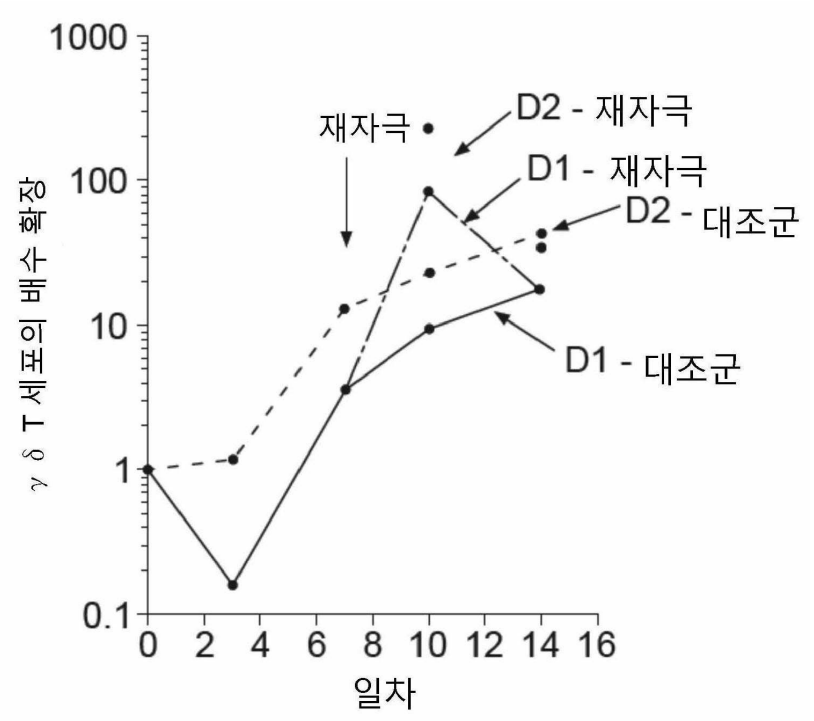
도면2


백혈구성분채집술
LeukoPak
αβ T 세포 고갈
CliniMACS
보유
αβ TCR-T 세포
고갈된 PBMC의
냉동보존
해동 및 활성화
2-6일
형질도입
1일
14-28일
확장
백혈구성분채집술
LeukoPak
αβ T 세포 고갈
CliniMACS
보유
αβ TCR-T 세포
고갈된 PBMC의
냉동보존
해동 및
활성화
2-6일
형질도입
1-5일
재자극
7일
재자극
14-28일

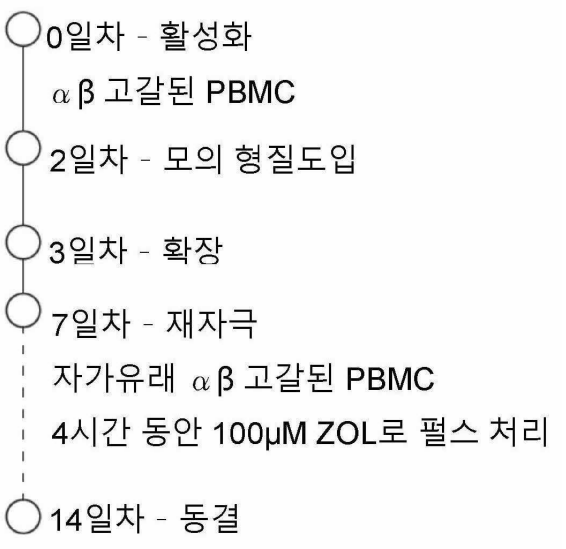
도면3a


0일차 - 활성화
αβ 고갈된 PBMC
3일차 - 모의 형질도입
4일차 - 확장
7일차 - 재자극
자가유래 단핵구(CD14+ 선택; Miltenyi)
4시간 동안 100μM ZOL로 펄스 처리
14일차 - 동결

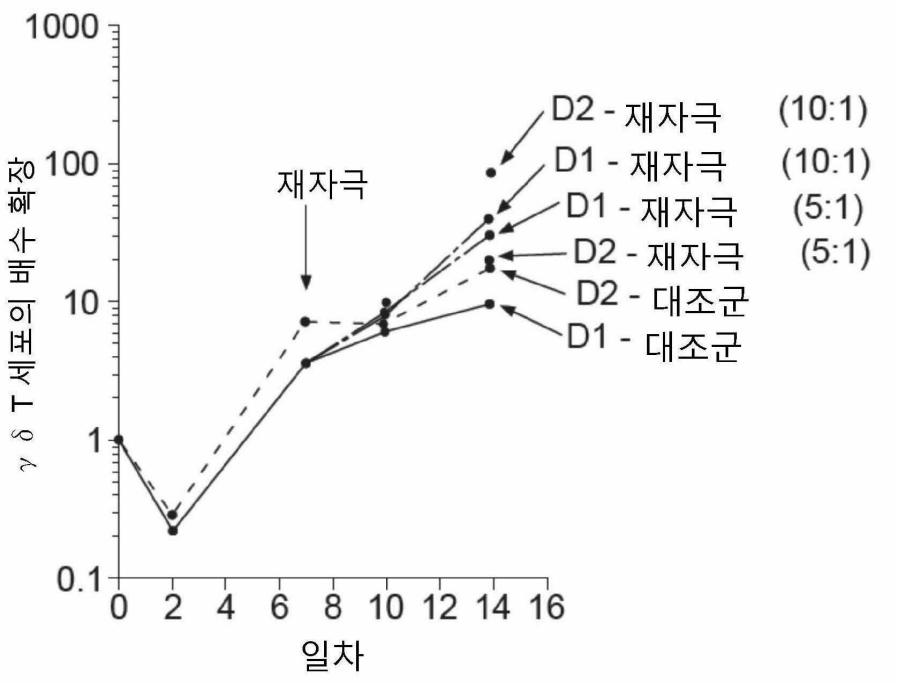
도면3b


1000
100
10
1
0.1
γδ T 세포의 배수 확장
0 2 4 6 8 10 12 14 16
일차
재자극
D2 - 재자극
D1 - 재자극
D2 - 대조군
D1 - 대조군

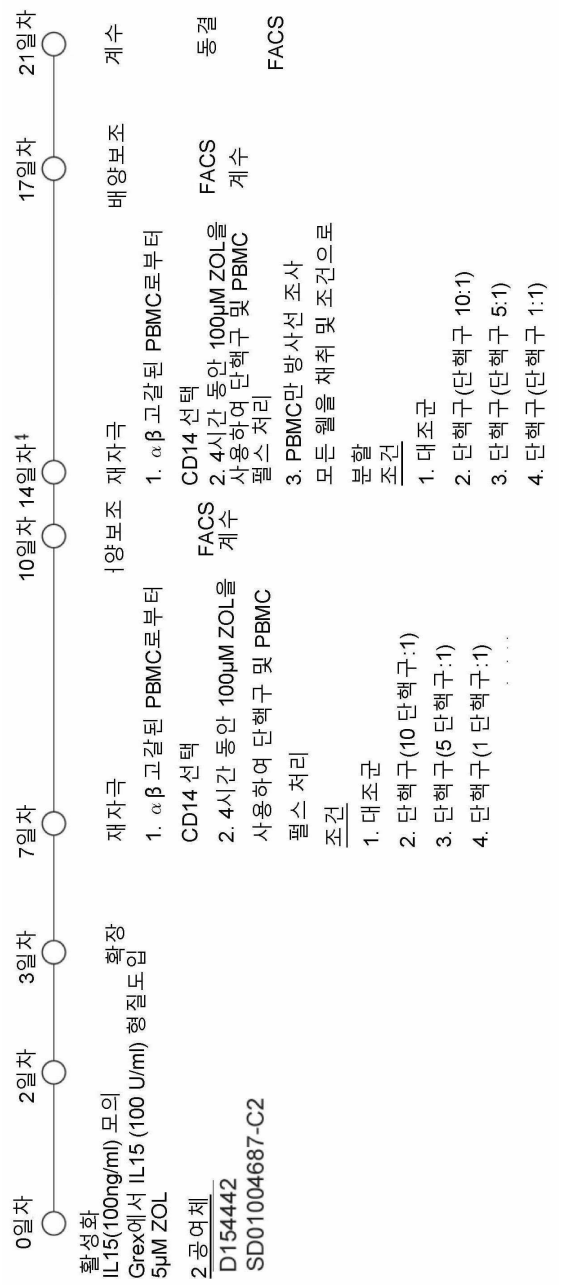
도면4a


0일차 - 활성화
αβ 고갈된 PBMC
2일차 - 모의 형질도입
3일차 - 확장
7일차 - 재자극
자가유래 αβ 고갈된 PBMC
4시간 동안 100μM ZOL로 펄스 처리
14일차 - 동결

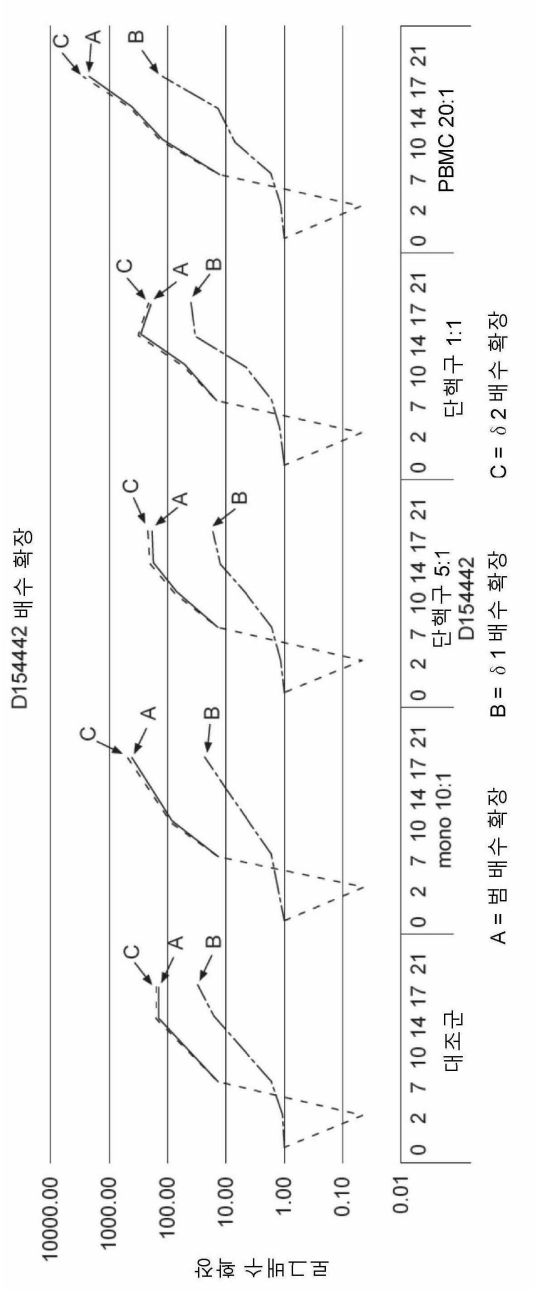
도면4b


1000
100
10
1
0.1
γδ T 세포의 배수 확장
재자극
0 2 4 6 8 10 12 14 16
일차
D2 - 재자극 (10:1)
D1 - 재자극 (10:1)
D1 - 재자극 (5:1)
D2 - 재자극 (5:1)
D2 - 대조군
D1 - 대조군

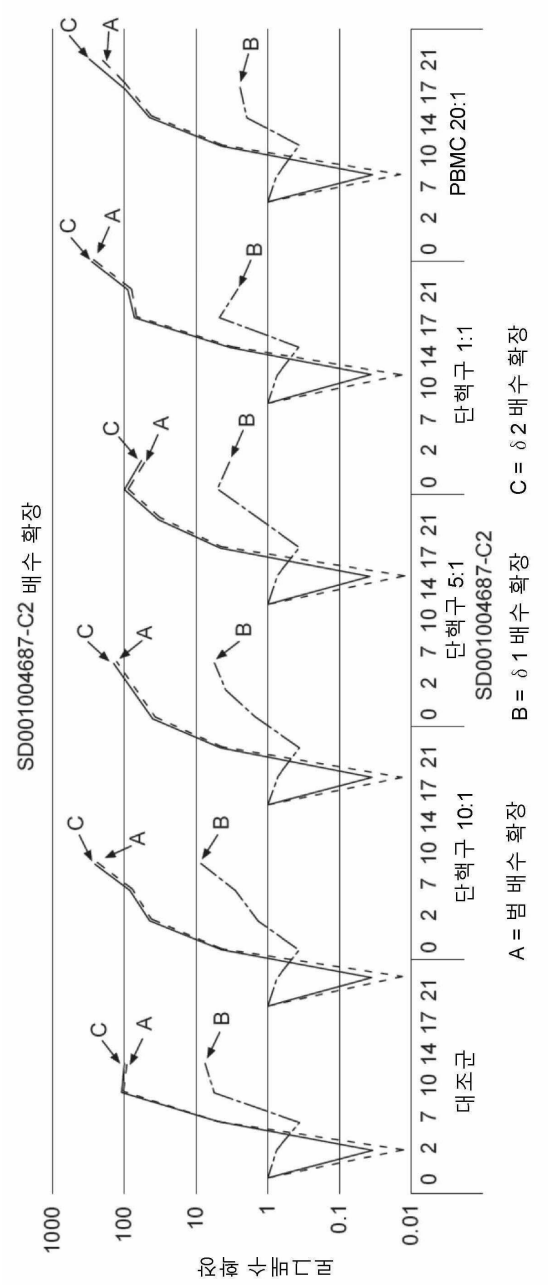
도면5


0일차
2일차
3일차
7일차
10일차 14일차†
17일차
21일차
활성화
IL15(100ng/ml) 모의
Grex에서 IL15 (100 U/ml) 형질도입
5μM ZOL
확장
2.공여체
D154442
SD01004687-C2
재자극
1. αβ 고갈된 PBMC로부터
CD14 선택
2. 4시간 동안 100μM ZOL을
사용하여 단핵구 및 PBMC
펄스 처리
조건
1. 대조군
2. 단핵구(10 단핵구:1)
3. 단핵구(5 단핵구:1)
4. 단핵구(1 단핵구:1)
†양보조
FACS
계수
재자극
1. αβ 고갈된 PBMC로부터
CD14 선택
2. 4시간 동안 100μM ZOL을
사용하여 단핵구 및 PBMC
펄스 처리
3. PBMC만 방사선 조사
모든 웰을 채취 및 조건으로
분할
조건
1. 대조군
2. 단핵구(10 단핵구:1)
3. 단핵구(5 단핵구:1)
4. 단핵구(1 단핵구:1)
배양보조
FACS
계수
계수
동결
FACS

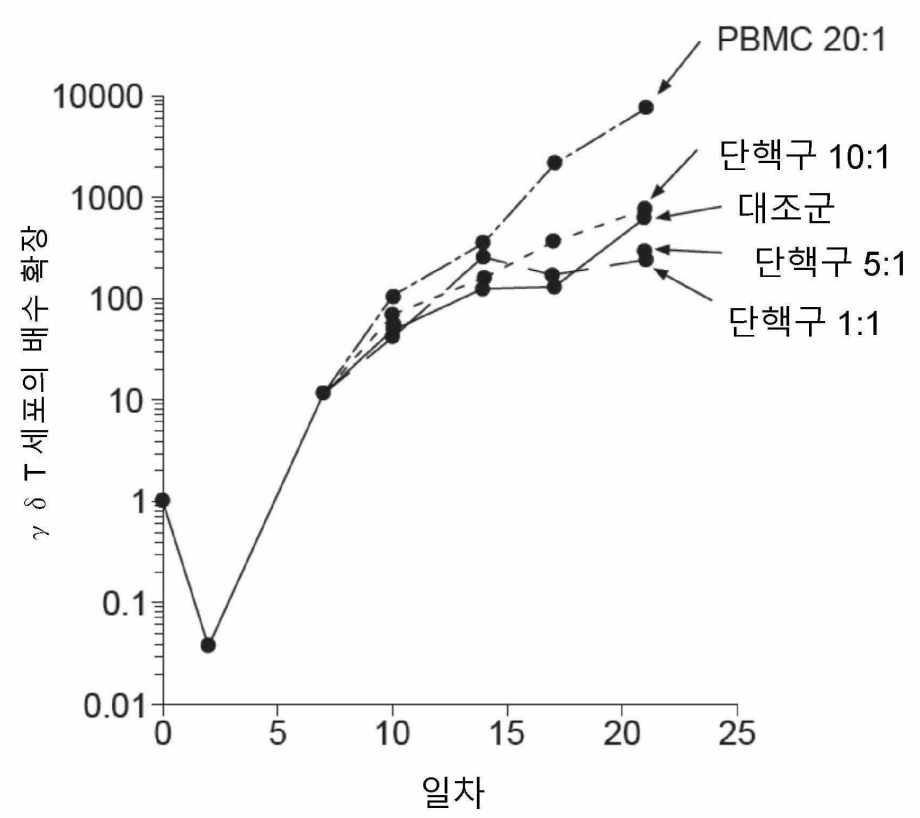
도면6a


D154442 배수 확장
로그배수 확장
10000.00
1000.00
100.00
10.00
1.00
0.10
0.01
0 2 7 10 14 17 21
대조군
mono 10:1
단핵구 5:1
D154442
단핵구 1:1
PBMC 20:1
A = 범 배수 확장
B = δ 1 배수 확장
C = δ 2 배수 확장

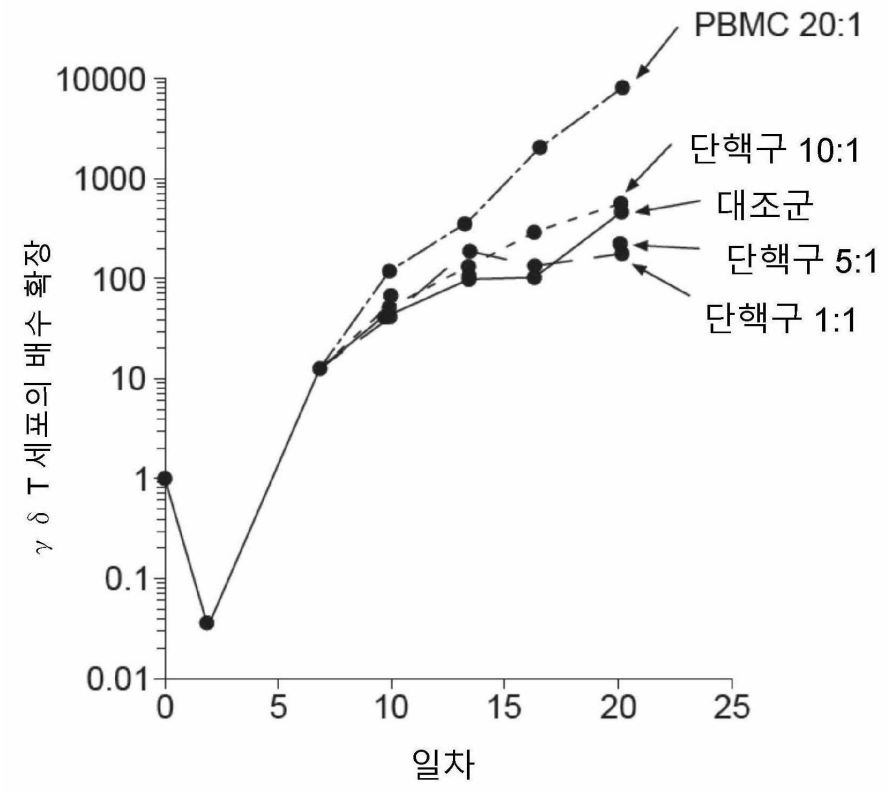
도면6b


SD001004687-C2 배수 확장
로그배수 확장
1000
100
10
1
0.1
0.01
0 2 7 10 14 17 21
대조군
단핵구 10:1
단핵구 5:1
단핵구 1:1
PBMC 20:1
SD001004687-C2
A = 범 배수 확장
B = δ1 배수 확장
C = δ2 배수 확장

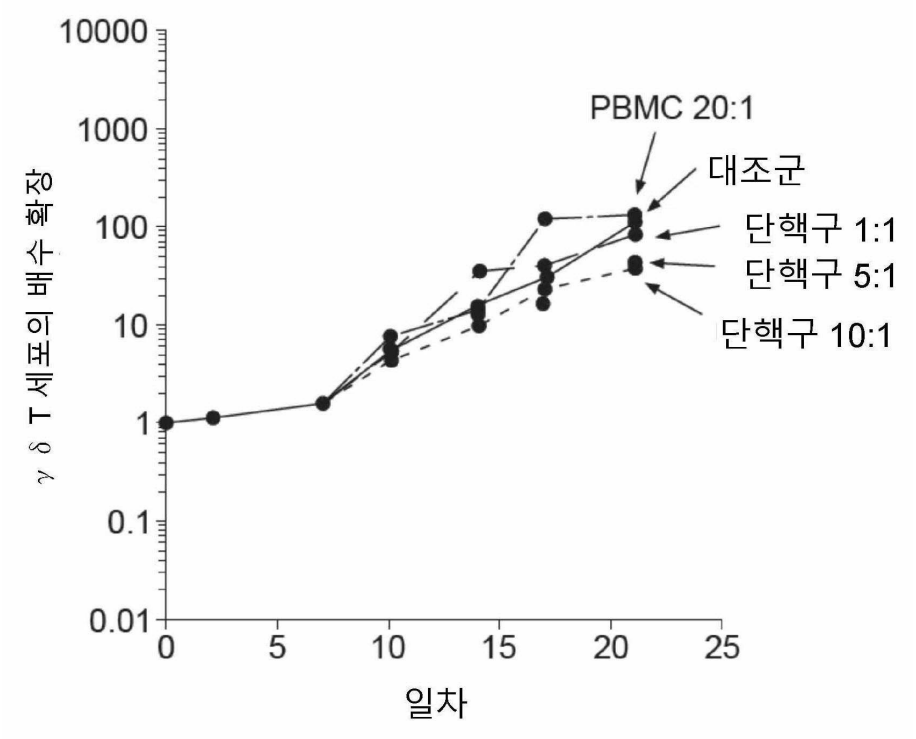
도면7a


PBMC 20:1
단핵구 10:1
대조군
단핵구 5:1
단핵구 1:1
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
0
5
10
15
20
25
γδ T 세포의 배수 확장
일차

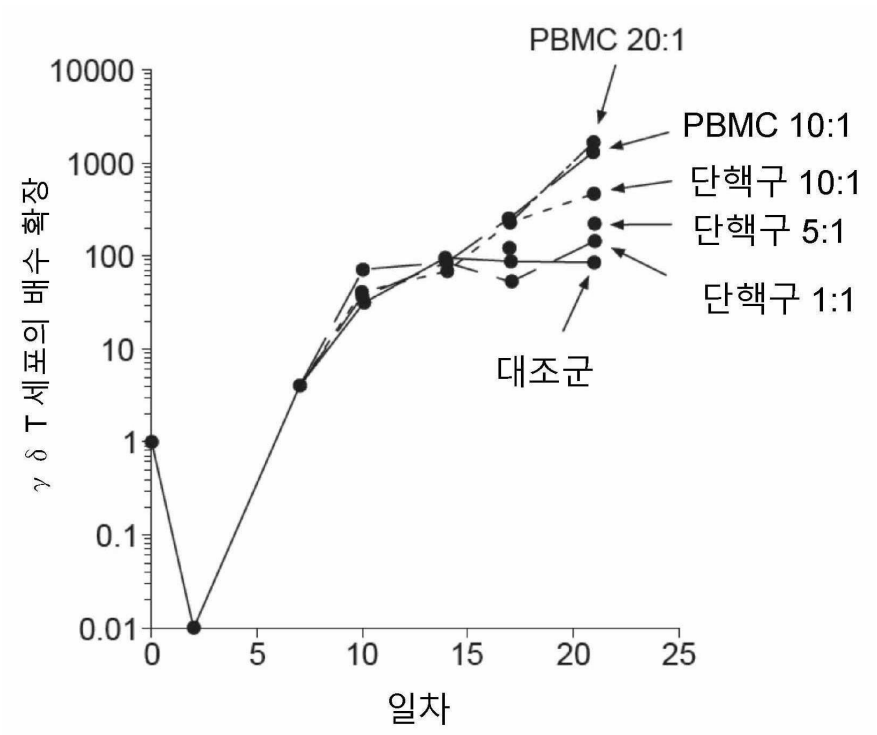
도면7b


PBMC 20:1
단핵구 10:1
대조군
단핵구 5:1
단핵구 1:1
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
0
5
10
15
20
25
γδ T 세포의 배수 확장
일차

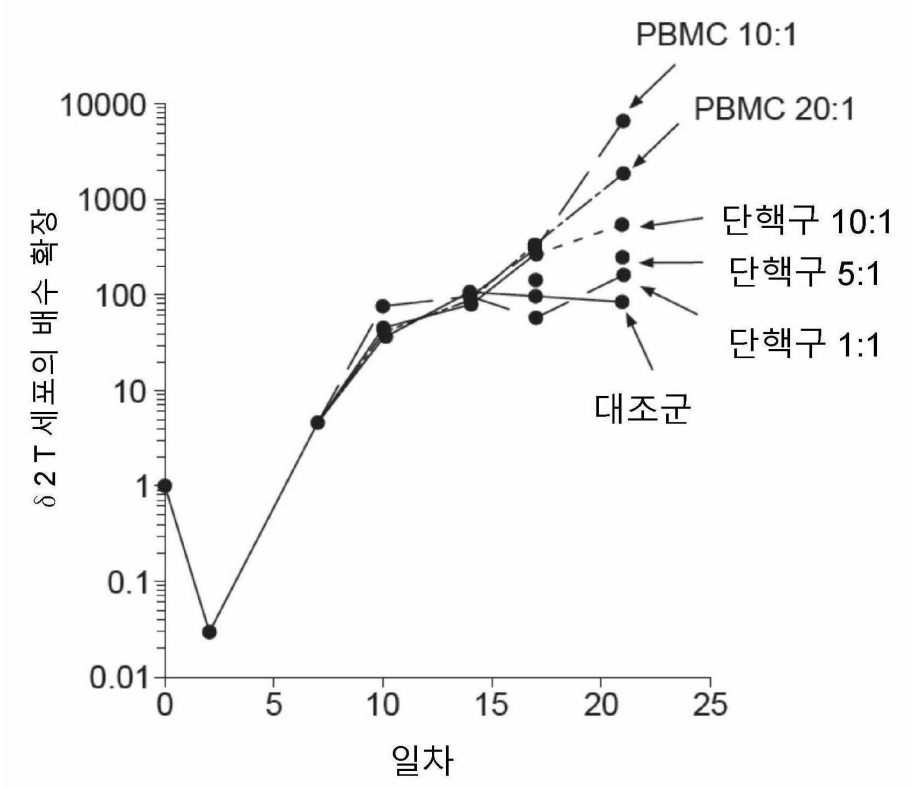
도면7c


10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
γδ T 세포의 배수 확장
0
5
10
15
20
25
일차
PBMC 20:1
대조군
단핵구 1:1
단핵구 5:1
단핵구 10:1

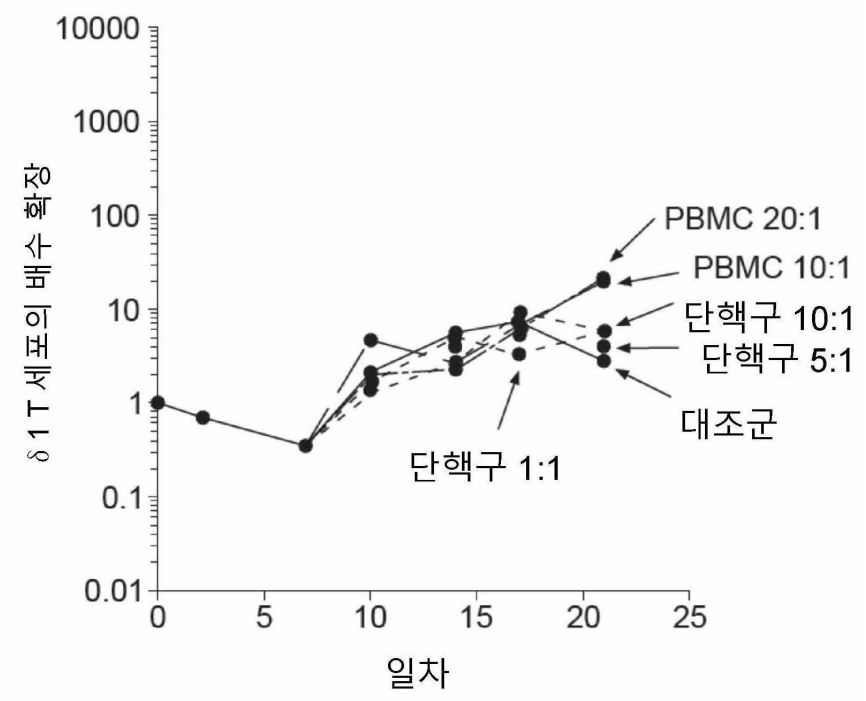
도면8a


10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
γδ T 세포의 배수 확장
0
5
10
15
20
25
일차
PBMC 20:1
PBMC 10:1
단핵구 10:1
단핵구 5:1
단핵구 1:1
대조군

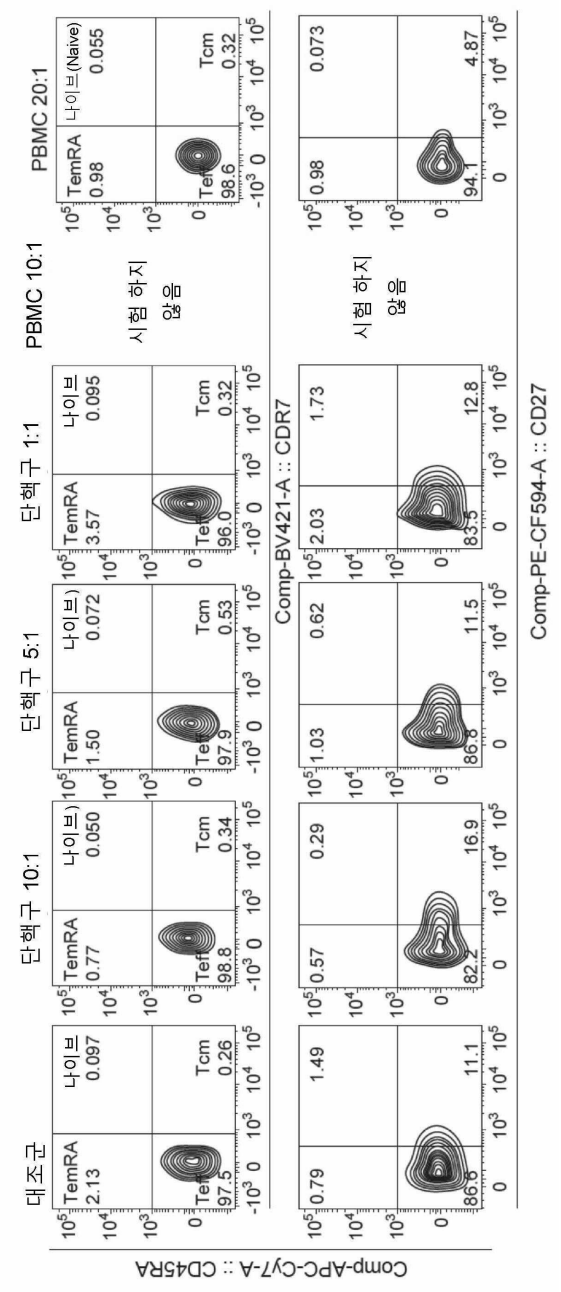
도면8b


PBMC 10:1
PBMC 20:1
단핵구 10:1
단핵구 5:1
단핵구 1:1
대조군
δ2 T 세포의 배수 확장
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
0
5
10
15
20
25
일차

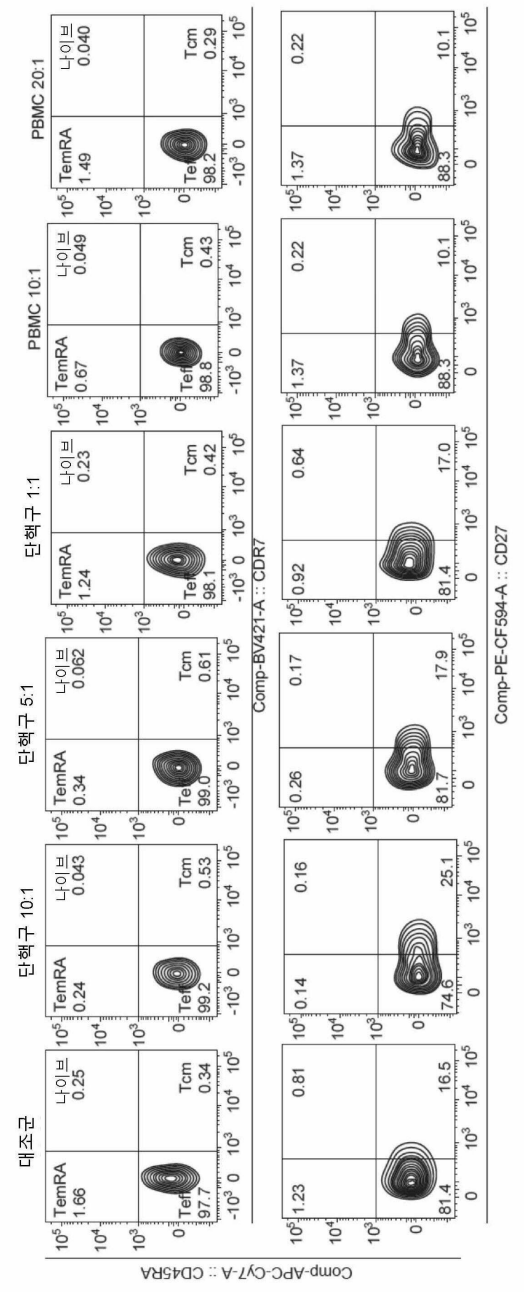
도면8c


PBMC 20:1
PBMC 10:1
단핵구 10:1
단핵구 5:1
대조군
단핵구 1:1
δ1 T 세포의 배수 확장
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
0
5
10
15
20
25
일차

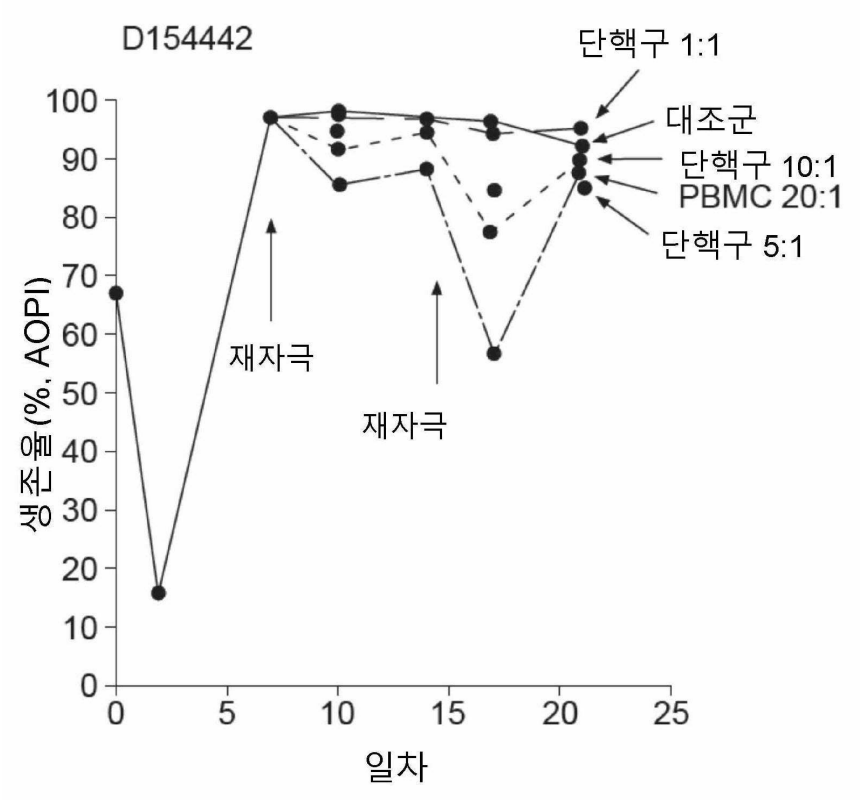
도면9


대조군
단핵구 10:1
단핵구 5:1
단핵구 1:1
PBMC 10:1
PBMC 20:1
시험 하지 않음
시험 하지 않음
TemRA
나이브
Tcm
Tem
나이브(Naive)
Comp-BV421-A :: CDR7
Comp-APC-Cy7-A :: CD45RA
Comp-PE-CF594-A :: CD27

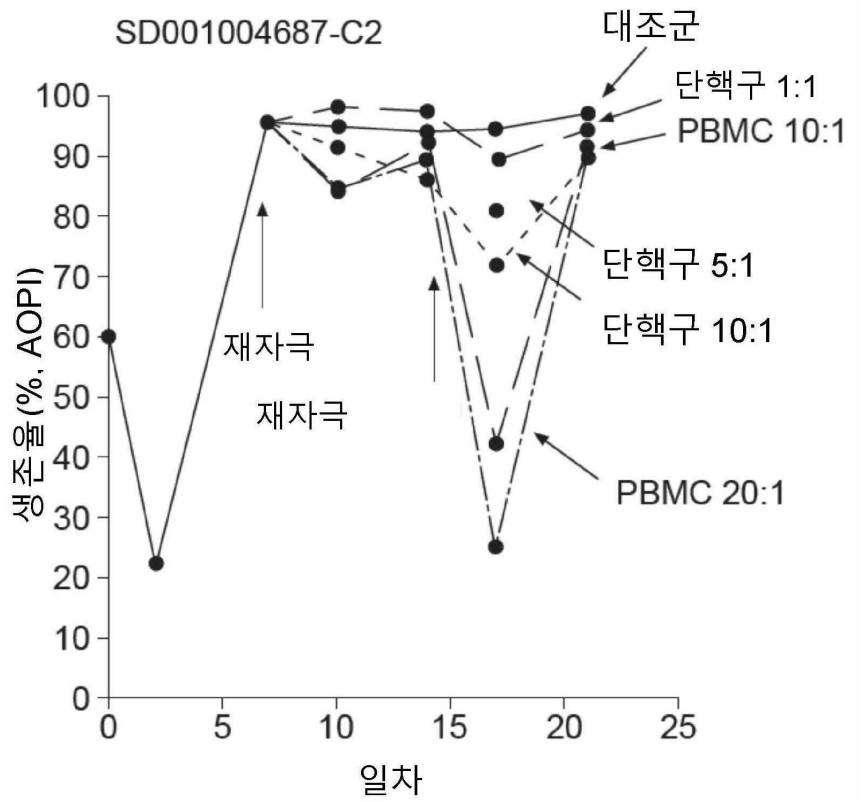
도면10


대조군
단핵구 10:1
단핵구 5:1
단핵구 1:1
PBMC 10:1
PBMC 20:1
TemRA
나이브
Tcm
Comp-BV421-A :: CDR7
Comp-PE-CF594-A :: CD27
Comp-APC-Cy7-A :: CD45RA

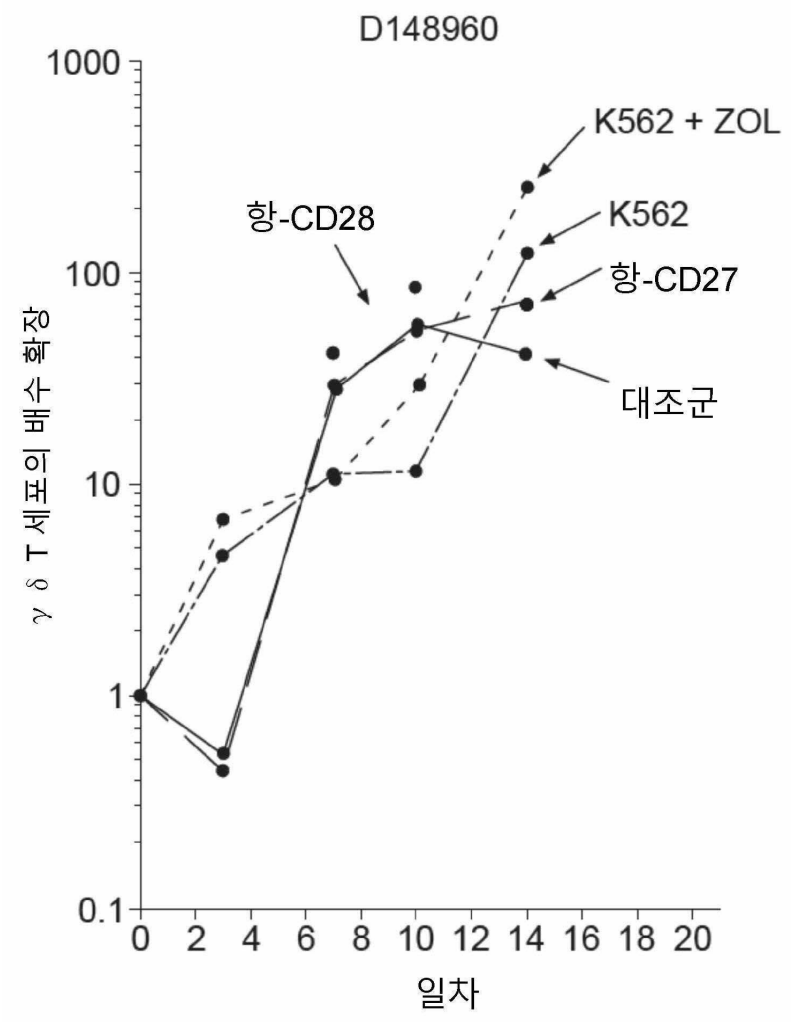
도면11a


D154442
단핵구 1:1
대조군
단핵구 10:1
PBMC 20:1
단핵구 5:1
재자극
재자극
생존율(%, AOPI)
일차

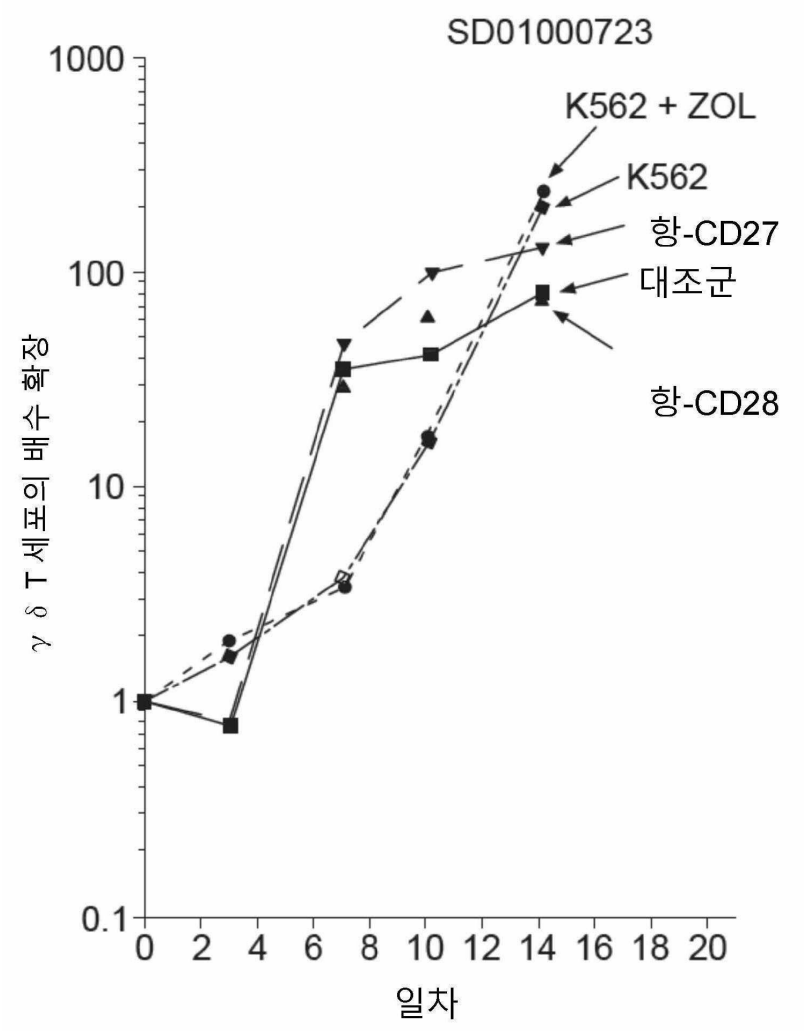
도면11b


SD001004687-C2
대조군
단핵구 1:1
PBMC 10:1
단핵구 5:1
단핵구 10:1
재자극
재자극
PBMC 20:1
생존율(%, AOPI)
일차

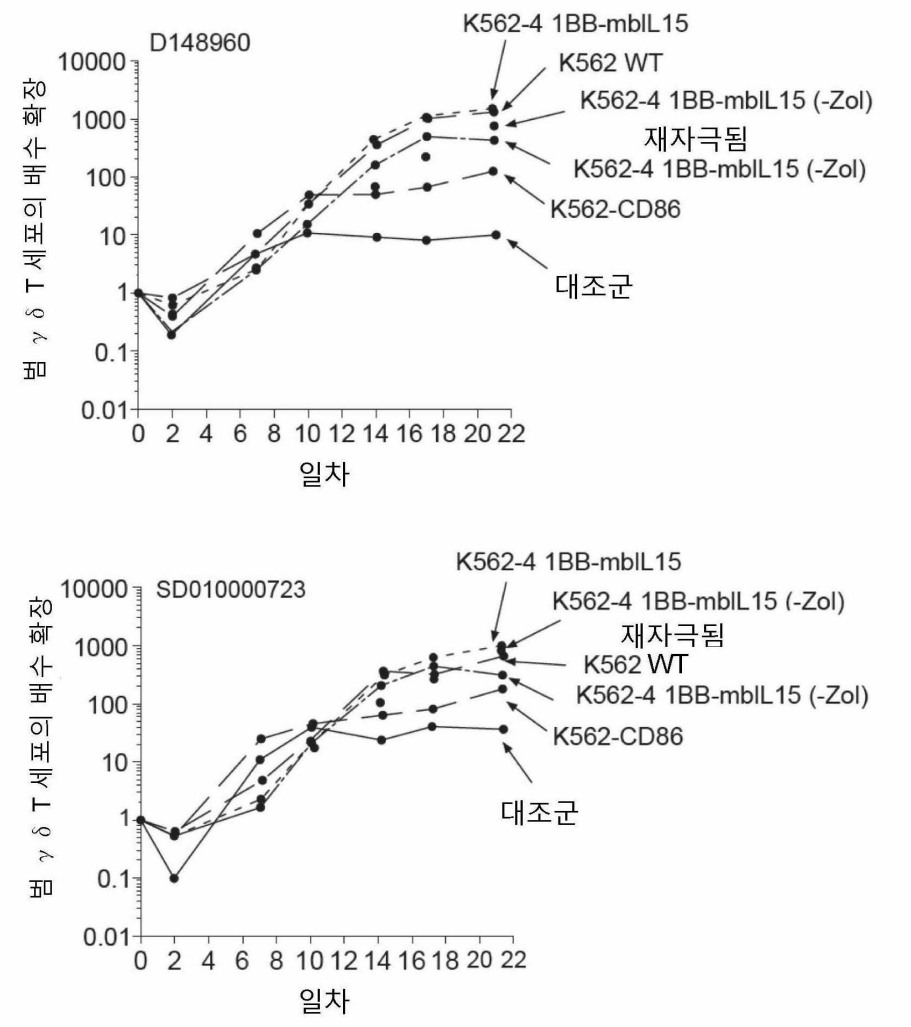
도면12a


D148960
1000
100
10
1
0.1
γδ T 세포의 배수 확장
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20
일차
K562 + ZOL
K562
항-CD27
항-CD28
대조군

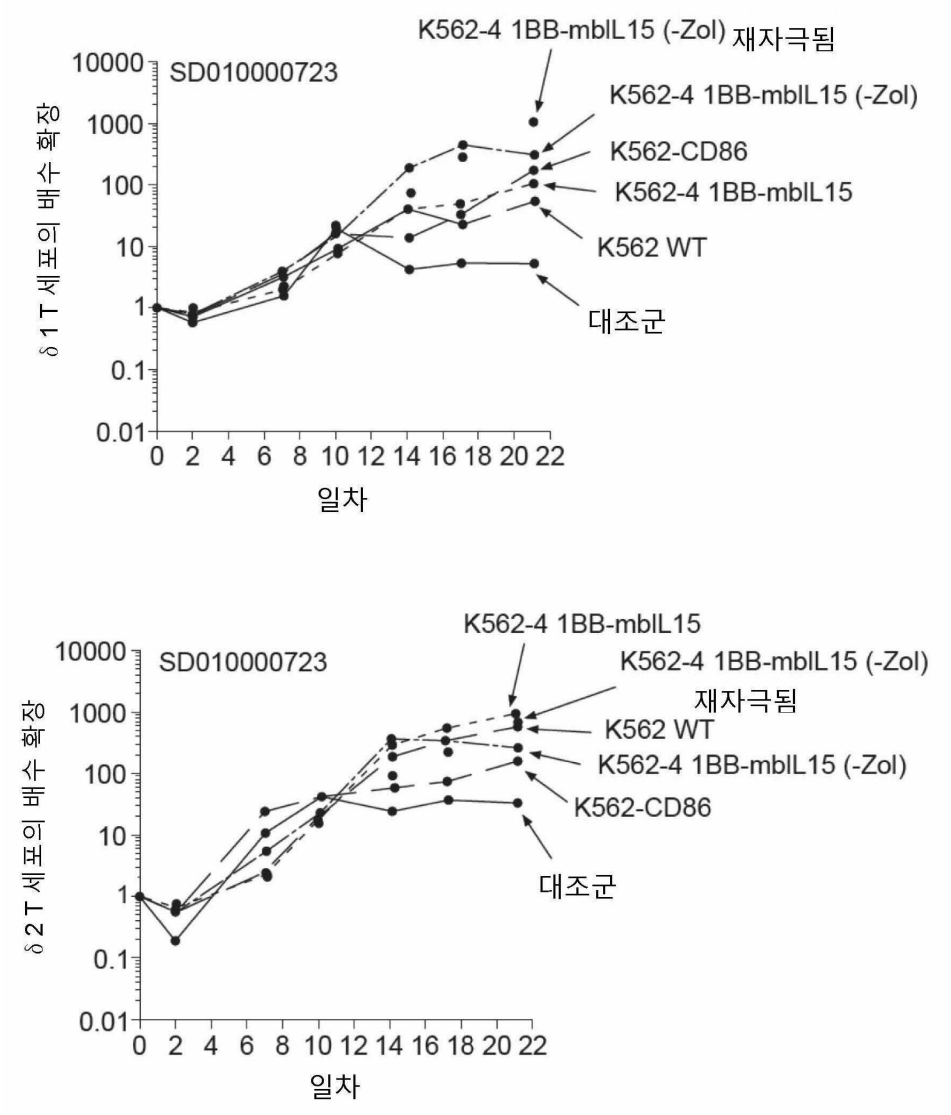
도면12b


SD01000723
K562 + ZOL
K562
항-CD27
대조군
항-CD28
γδ T 세포의 배수 확장
1000
100
10
1
0.1
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20
일차

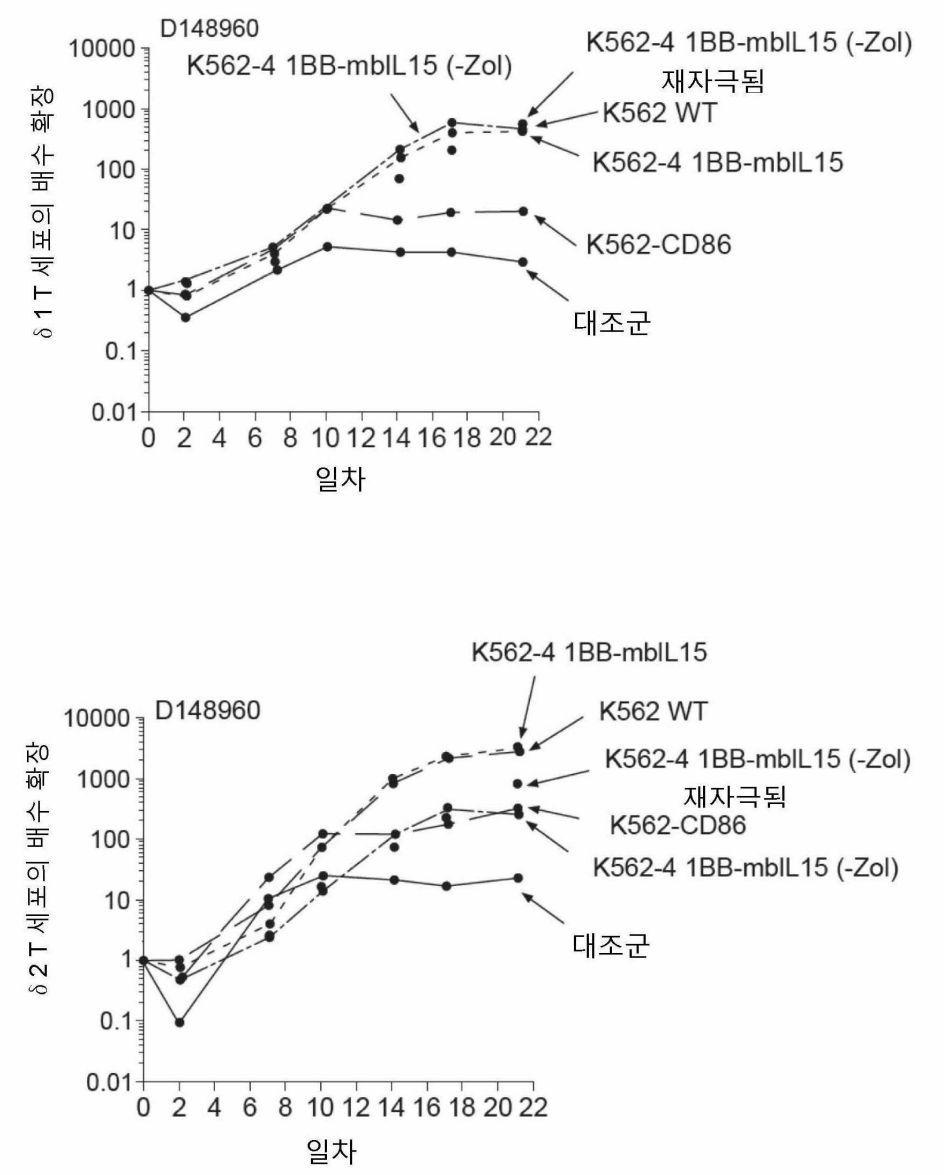
도면13a


D148960
K562-4 1BB-mblL15
K562 WT
K562-4 1BB-mblL15 (-Zol)
재자극됨
K562-4 1BB-mblL15 (-Zol)
K562-CD86
대조군
범 γδ T 세포의 배수 확장
일차
SD010000723
K562-4 1BB-mblL15
K562-4 1BB-mblL15 (-Zol)
재자극됨
K562 WT
K562-4 1BB-mblL15 (-Zol)
K562-CD86
대조군
범 γδ T 세포의 배수 확장
일차

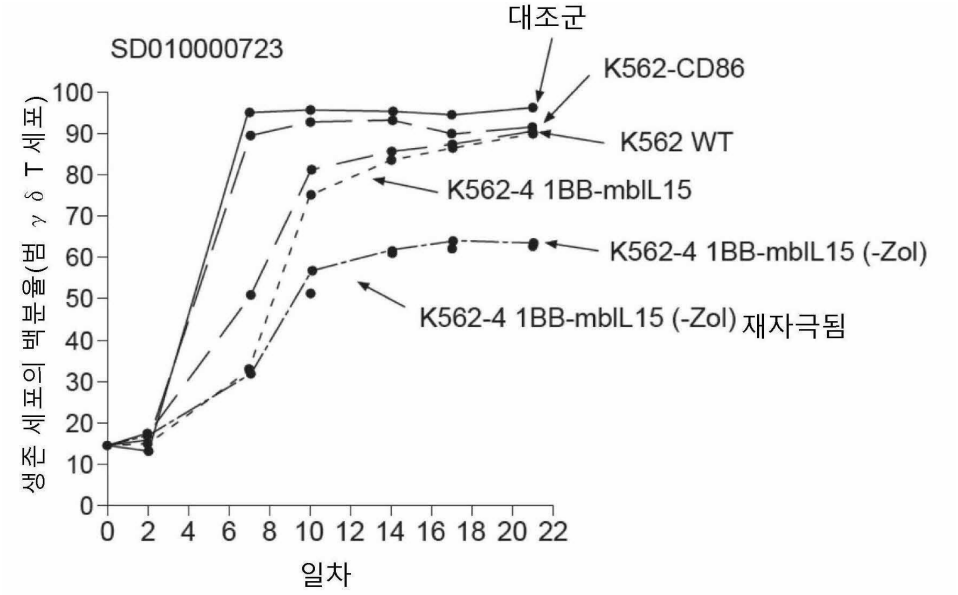
도면13b


SD010000723
δ1 T 세포의 배수 확장
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22
일차
K562-4 1BB-mblL15 (-Zol) 재자극됨
K562-4 1BB-mblL15 (-Zol)
K562-CD86
K562-4 1BB-mblL15
K562 WT
대조군
SD010000723
δ2 T 세포의 배수 확장
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22
일차
K562-4 1BB-mblL15
K562-4 1BB-mblL15 (-Zol)
재자극됨
K562 WT
K562-4 1BB-mblL15 (-Zol)
K562-CD86
대조군

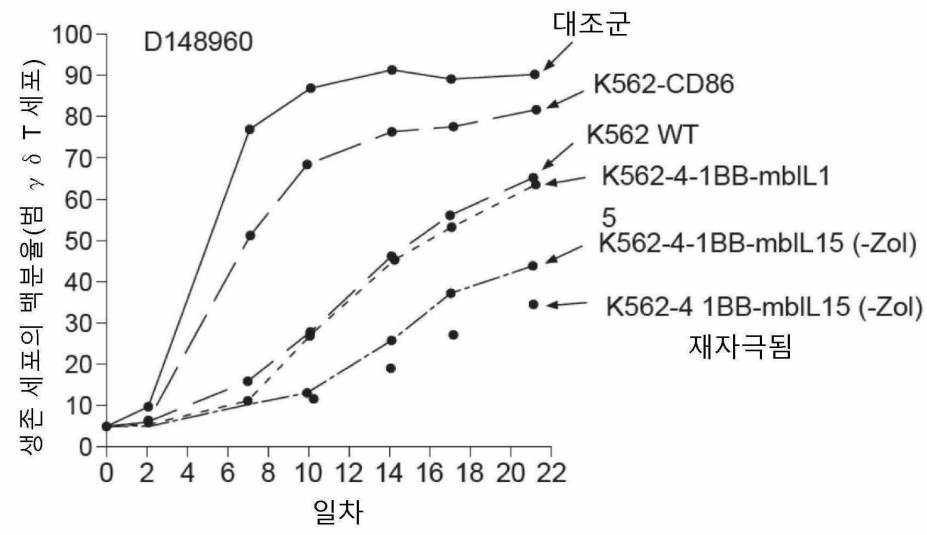
도면13c


D148960
K562-4 1BB-mblL15 (-Zol)
δ1T 세포의 배수 확장
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22
일차
K562-4 1BB-mblL15 (-Zol)
재자극됨
K562 WT
K562-4 1BB-mblL15
K562-CD86
대조군
D148960
δ2T 세포의 배수 확장
K562-4 1BB-mblL15
K562 WT
K562-4 1BB-mblL15 (-Zol)
재자극됨
K562-CD86
K562-4 1BB-mblL15 (-Zol)
대조군

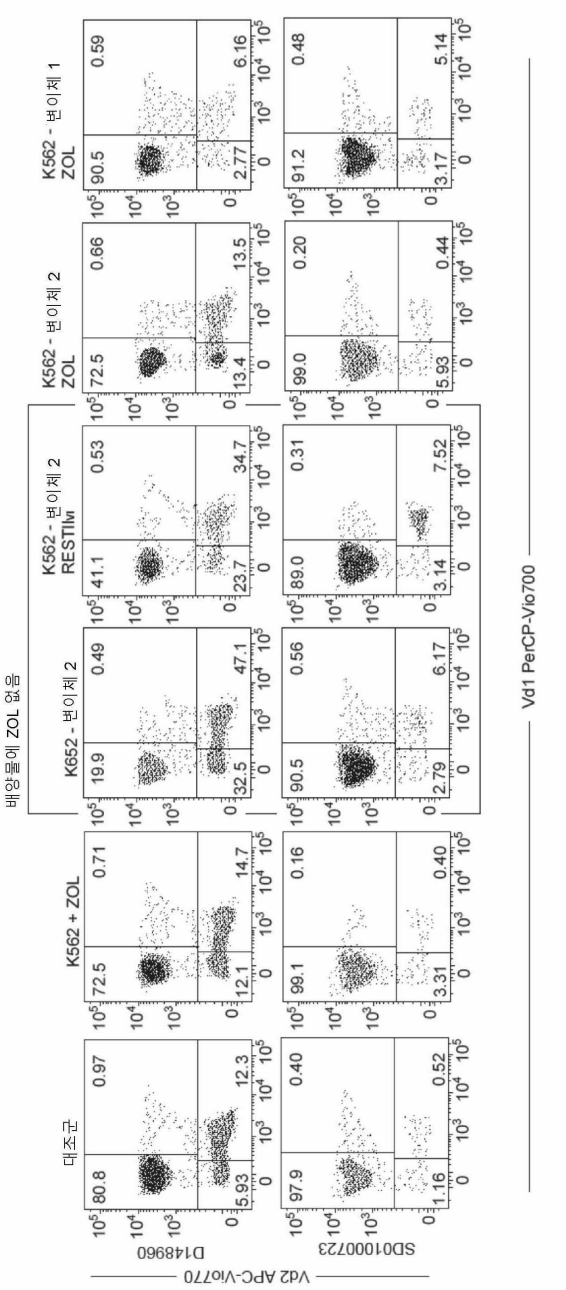
도면14a


SD010000723
대조군
K562-CD86
K562 WT
K562-4 1BB-mblL15
K562-4 1BB-mblL15 (-Zol)
K562-4 1BB-mblL15 (-Zol) 재자극됨
생존 세포의 백분율(범 γδ T 세포)
일차

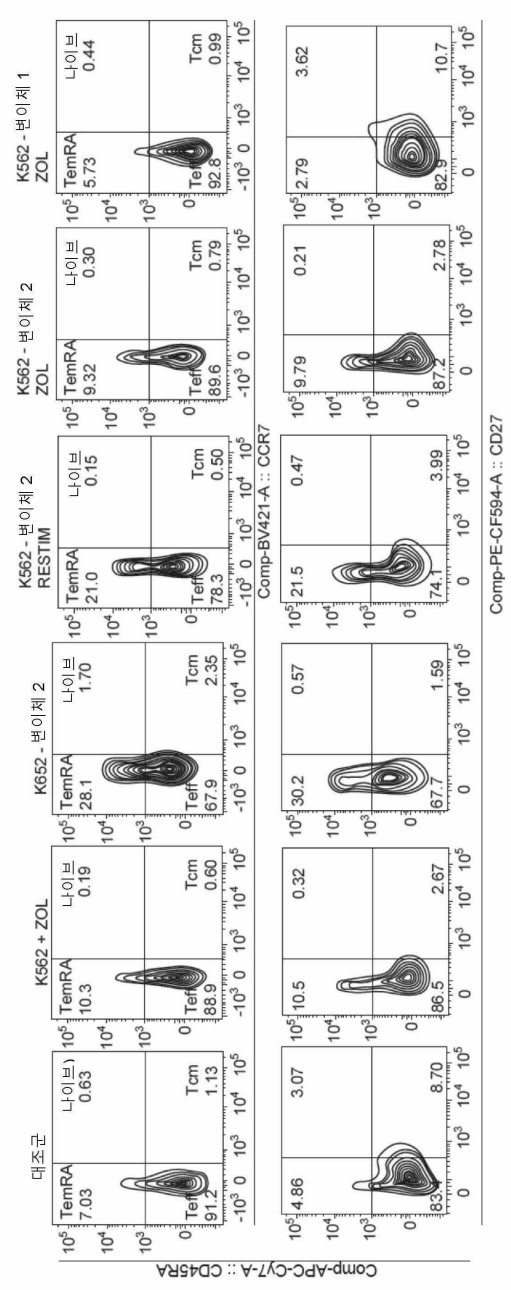
도면14b


D148960
대조군
K562-CD86
K562 WT
K562-4-1BB-mblL1
5
K562-4-1BB-mblL15 (-Zol)
K562-4 1BB-mblL15 (-Zol)
재자극됨
생존 세포의 백분율(범 γδ T 세포)
일차

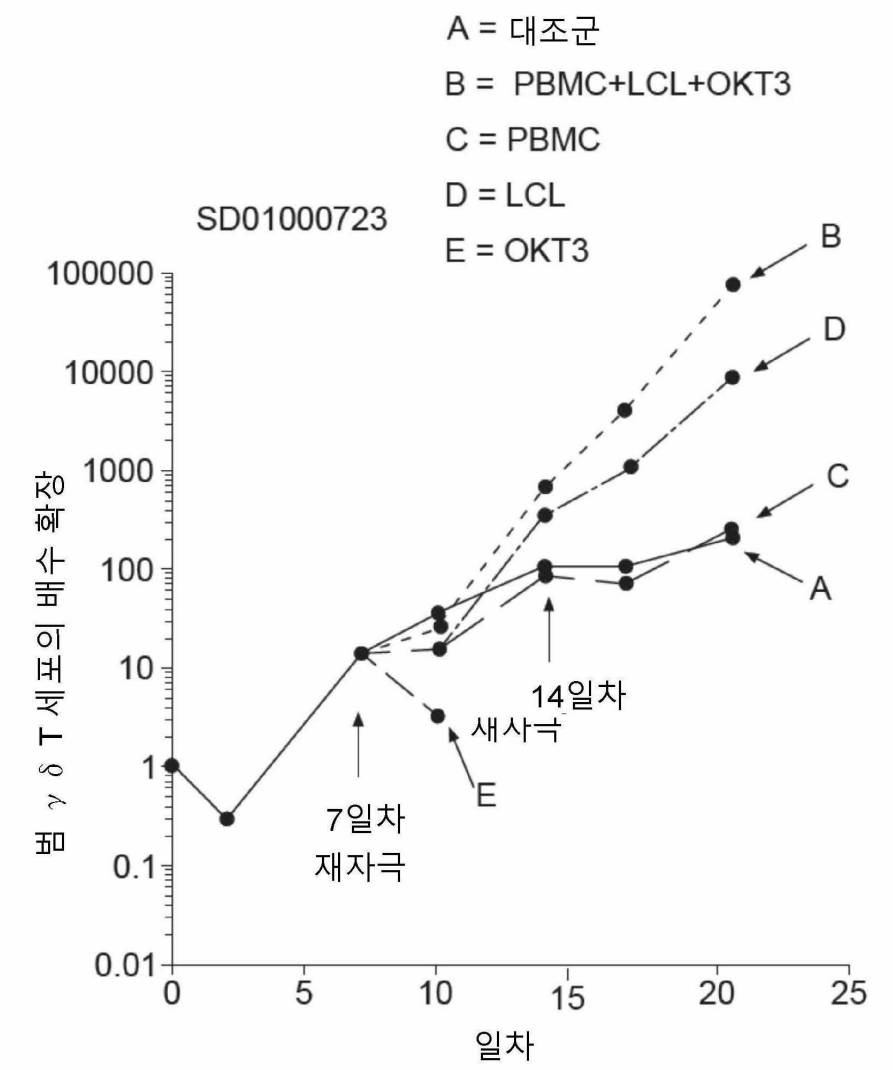
도면15


배양물에 ZOL 없음
대조군
K562 + ZOL
K652 - 변이체 2
K562 - 변이체 2 RESTIm
K562 - 변이체 2 ZOL
K562 - 변이체 1 ZOL
Vd1 PerCP-Vio700
Vd2 APC-Vio770
D14896O
SD0100072J3

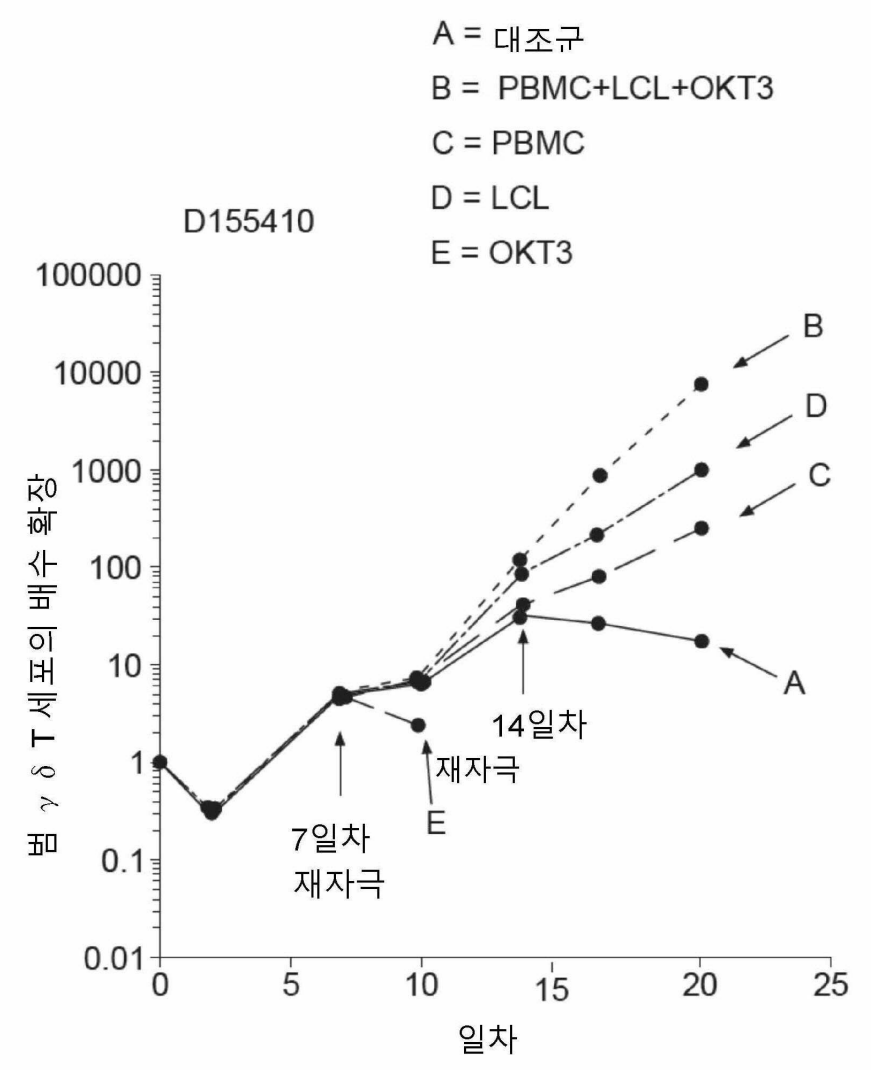
도면16


대조군
K562 + ZOL
K652 - 변이체 2
K562 - 변이체 2 RESTIM
K562 - 변이체 2 ZOL
K562 - 변이체 1 ZOL
TemRA
나이브
Tcm
Teff
Comp-APC-CY7-A :: CD45RA
Comp-BV421-A :: CCR7
Comp-PE-CF594-A :: CD27

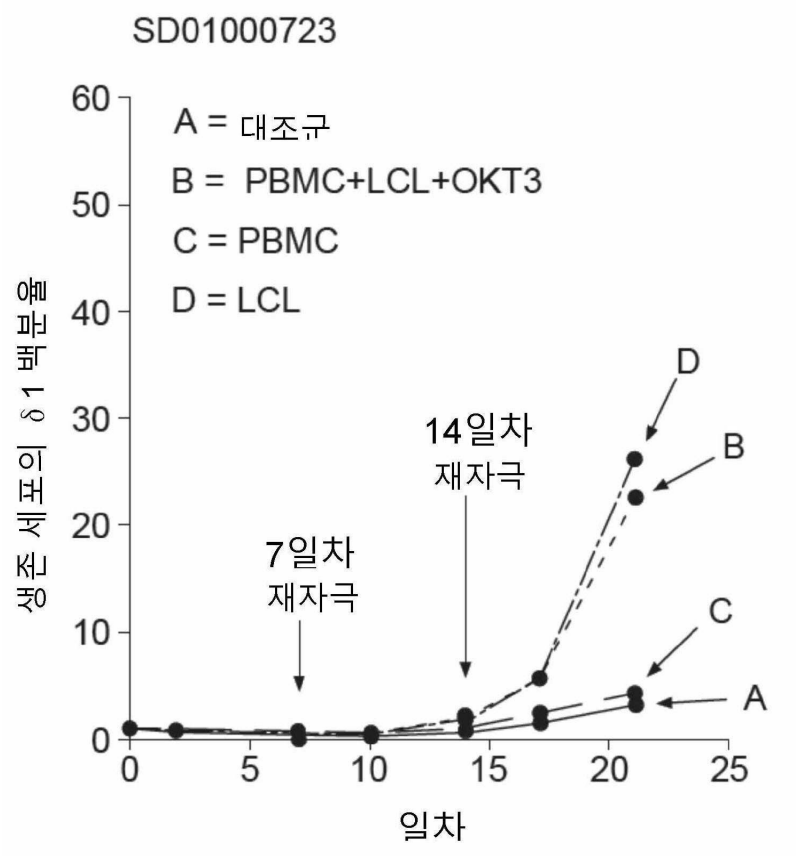
도면17a


A = 대조군
B = PBMC+LCL+OKT3
C = PBMC
D = LCL
E = OKT3
SD01000723
B
D
C
A
100000
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
0
5
10
15
20
25
범 γδ T 세포의 배수 확장
일차
14일차
새사극
E
7일차
재자극

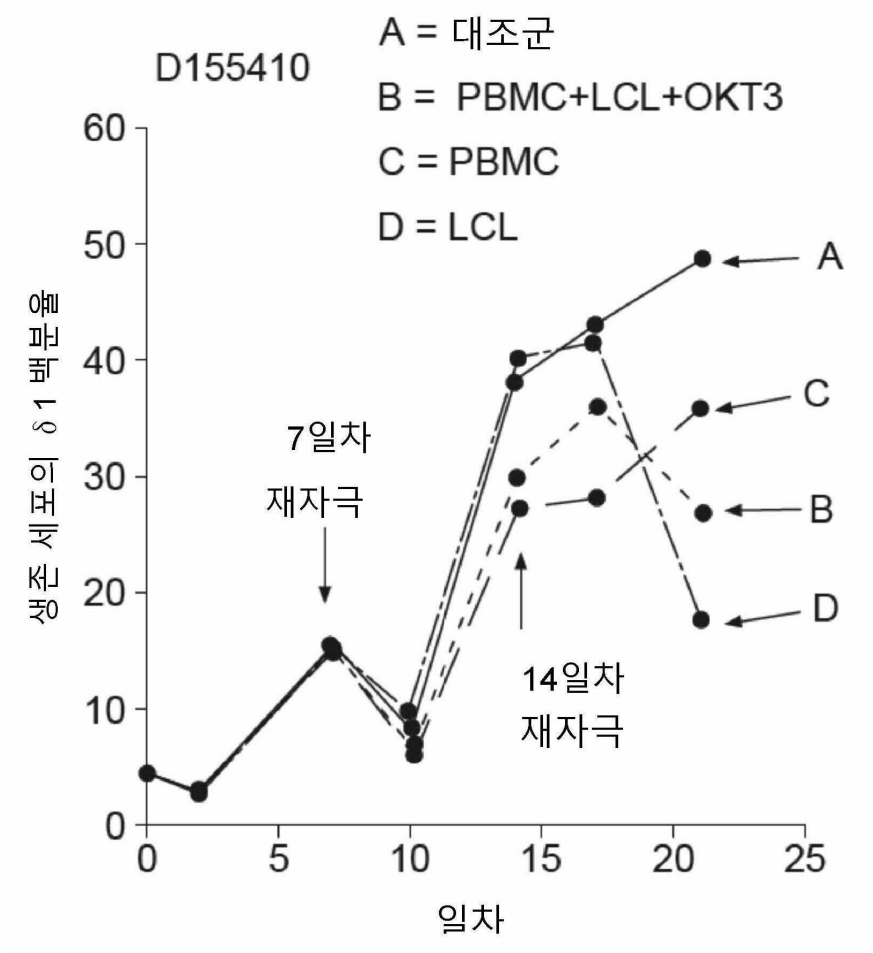
도면17b


A = 대조군
B = PBMC+LCL+OKT3
C = PBMC
D = LCL
E = OKT3
D155410
100000
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
0
5
10
15
20
25
일차
평균 γδ T 세포의 배수 확장
B
D
C
A
14일차
재자극
E
7일차
재자극

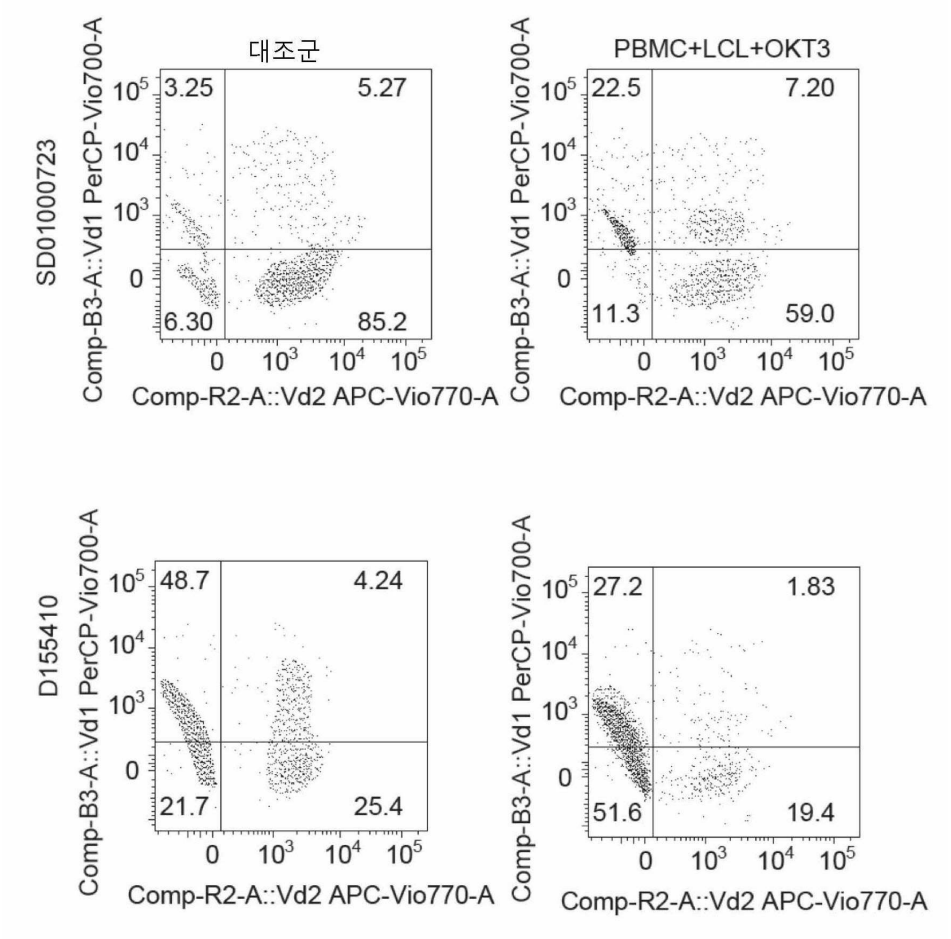
도면18a


SD01000723
A = 대조군
B = PBMC+LCL+OKT3
C = PBMC
D = LCL
14일차
재자극
7일차
재자극
D
B
C
A
생존 세포의 δ1 백분율
일차
0
10
20
30
40
50
60
0
5
10
15
20
25

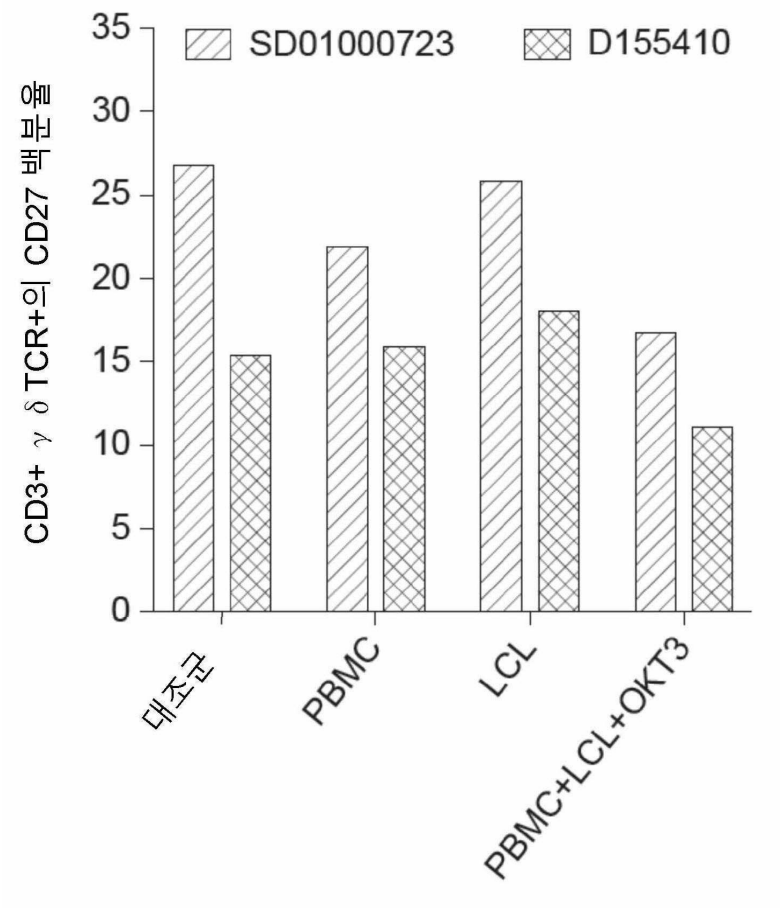
도면18b


D155410
A = 대조군
B = PBMC+LCL+OKT3
C = PBMC
D = LCL
생존 세포의 δ1 백분율
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
20
25
일차
7일차
재자극
14일차
재자극
A
C
B
D

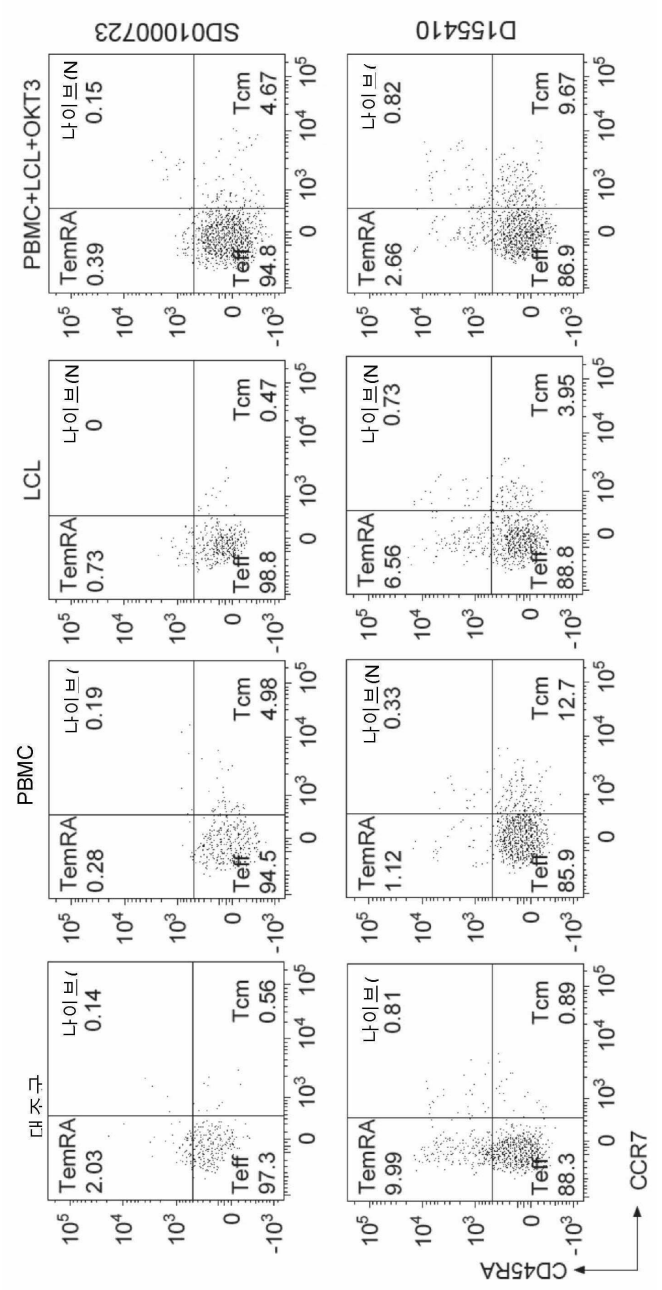
도면18c


대조군
PBMC+LCL+OKT3
SD01000723
D155410
Comp-B3-A::Vd1 PerCP-Vio700-A
Comp-R2-A::Vd2 APC-Vio770-A
3.25
5.27
6.30
85.2
22.5
7.20
11.3
59.0
48.7
4.24
21.7
25.4
27.2
1.83
51.6
19.4

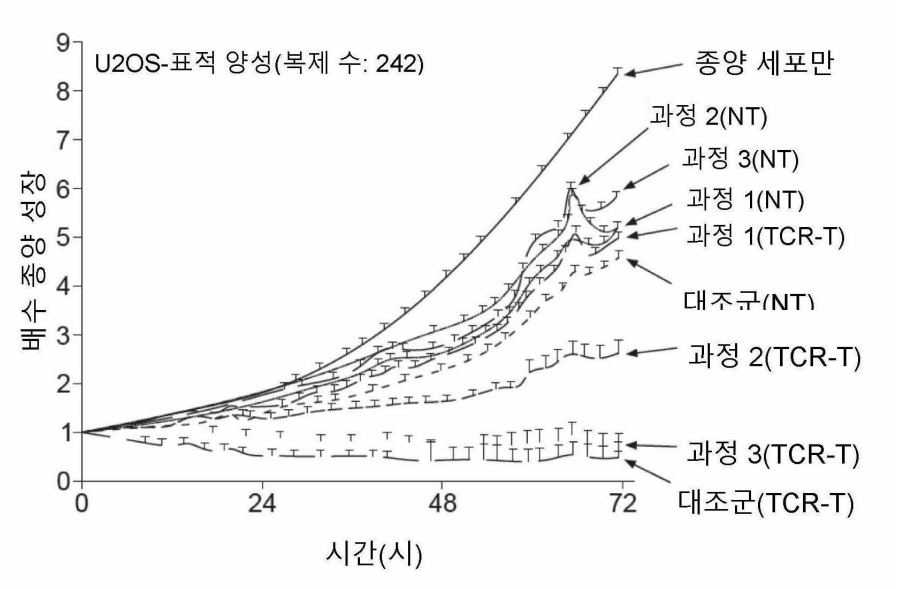
도면19a


SD01000723
D155410
CD3+ γδ TCR+의 CD27 백분율
35
30
25
20
15
10
5
0
대조군
PBMC
LCL
PBMC+LCL+OKT3

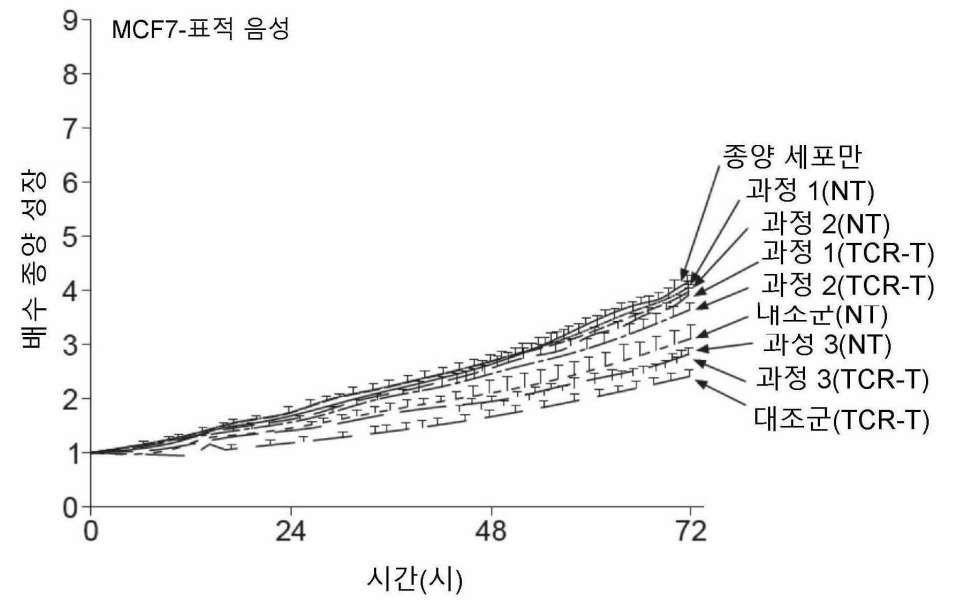
도면19b


대조군
PBMC
LCL
PBMC+LCL+OKT3
SD0100072
D155410
TemRA
Teff
Tcm
나이브(N
CD45RA
CCR7

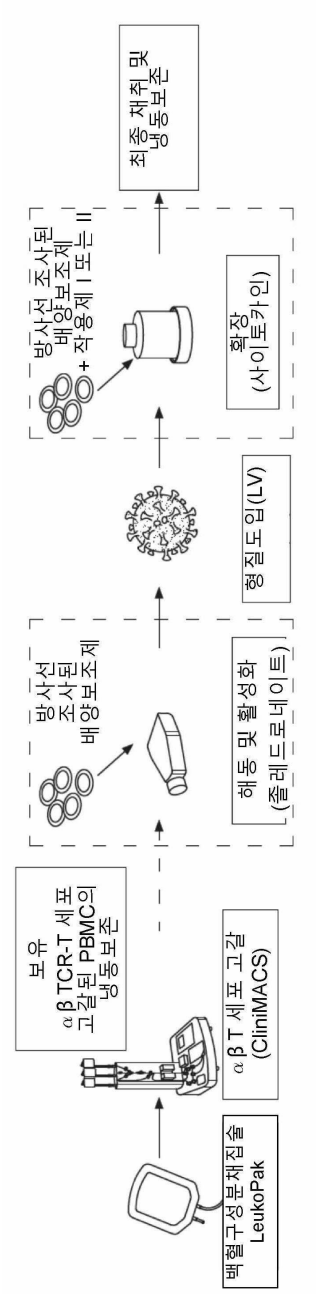
도면20a


U2OS-표적 양성(복제 수: 242)
종양 세포만
과정 2(NT)
과정 3(NT)
과정 1(NT)
과정 1(TCR-T)
대조군(NT)
과정 2(TCR-T)
과정 3(TCR-T)
대조군(TCR-T)
배수 종양 성장
시간(시)
0
24
48
72
1
2
3
4
5
6
7
8
9

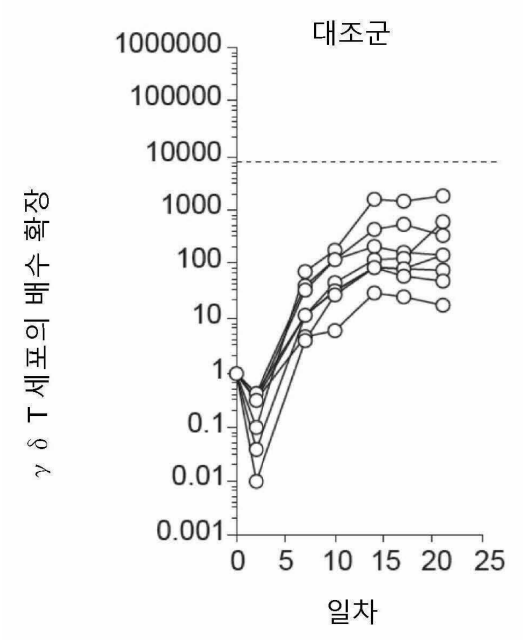
도면20b


MCF7-표적 음성
종양 세포만
과정 1(NT)
과정 2(NT)
과정 1(TCR-T)
과정 2(TCR-T)
내소군(NT)
과성 3(NT)
과정 3(TCR-T)
대조군(TCR-T)
배수 종양 성장
시간(시)
0
24
48
72
1
2
3
4
5
6
7
8
9

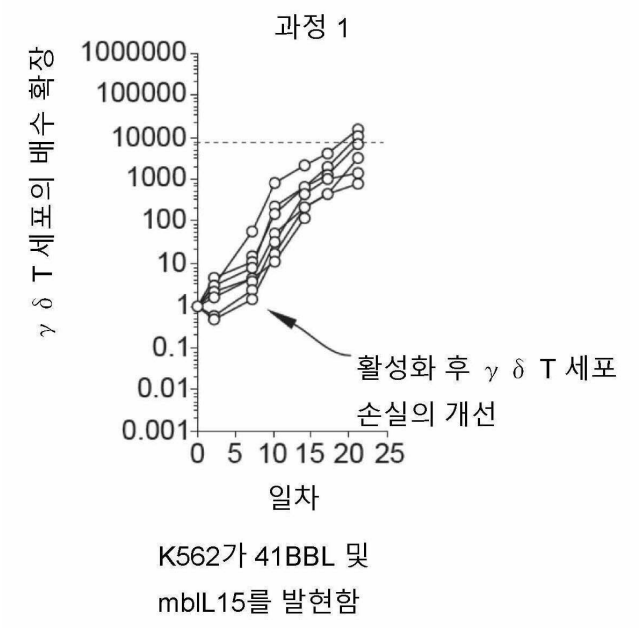
도면21


백혈구성분채집술
LeukoPak
αβ T 세포 고갈
(CliniMACS)
보유
αβ TCR-T 세포
고갈된 PBMC의
냉동보존
방사선
조사된
배양보조제
해동 및 활성화
(졸레드로네이트)
형질도입(LV)
방사선 조사된
배양보조제
+ 작용제 I 또는 II
확장
(사이토카인)
최종 채취 및
냉동보존

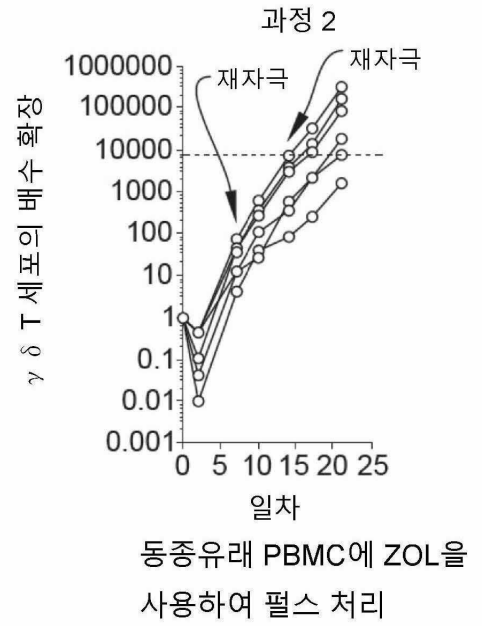
도면22a


대조군
γδ T 세포의 배수 확장
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0 5 10 15 20 25
일차

도면22b

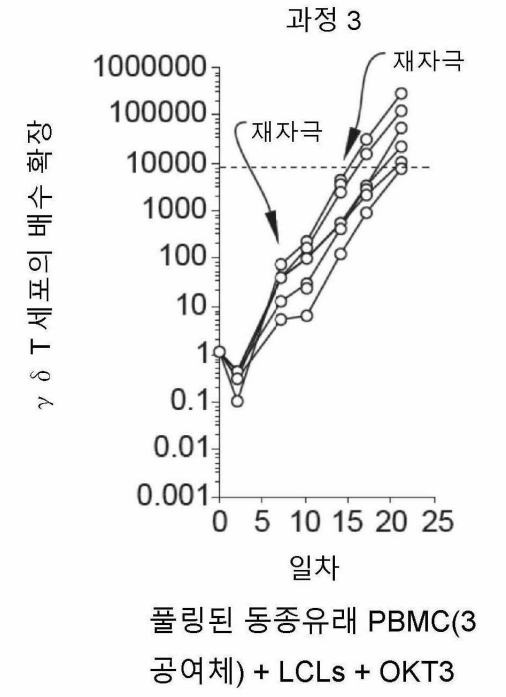

과정 1
γδ T 세포의 배수 확장
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0 5 10 15 20 25
일차
활성화 후 γδ T 세포
손실의 개선
K562가 41BBL 및
mbIL15를 발현함

도면22c



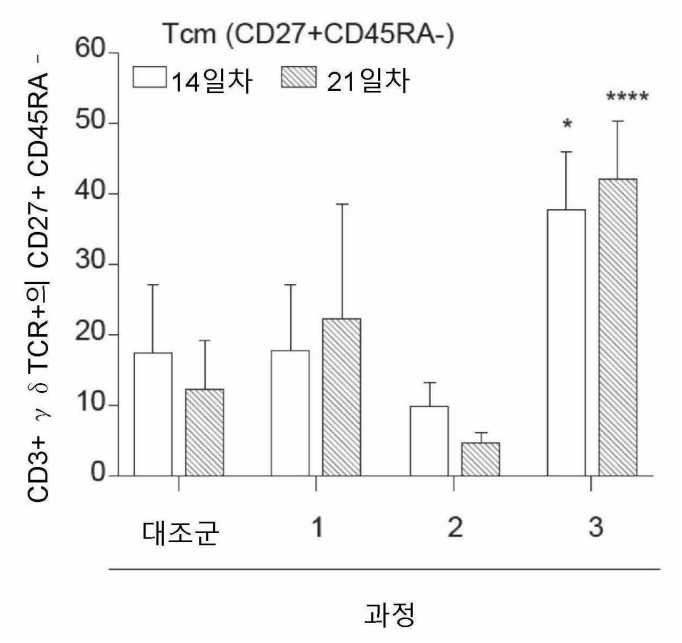
동종유래 PBMC에 ZOL을 사용하여 펄스 처리

도면22d

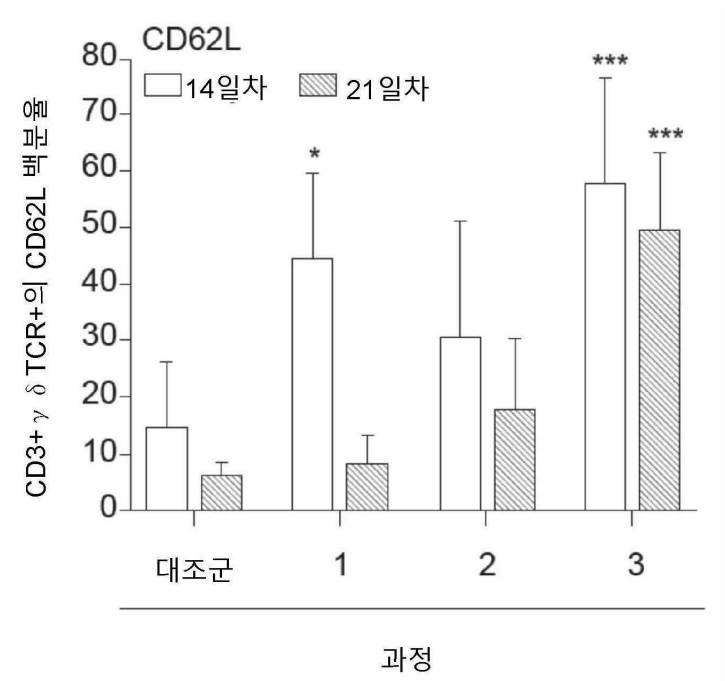


풀링된 동종유래 PBMC(3 공여체) + LCLs + OKT3

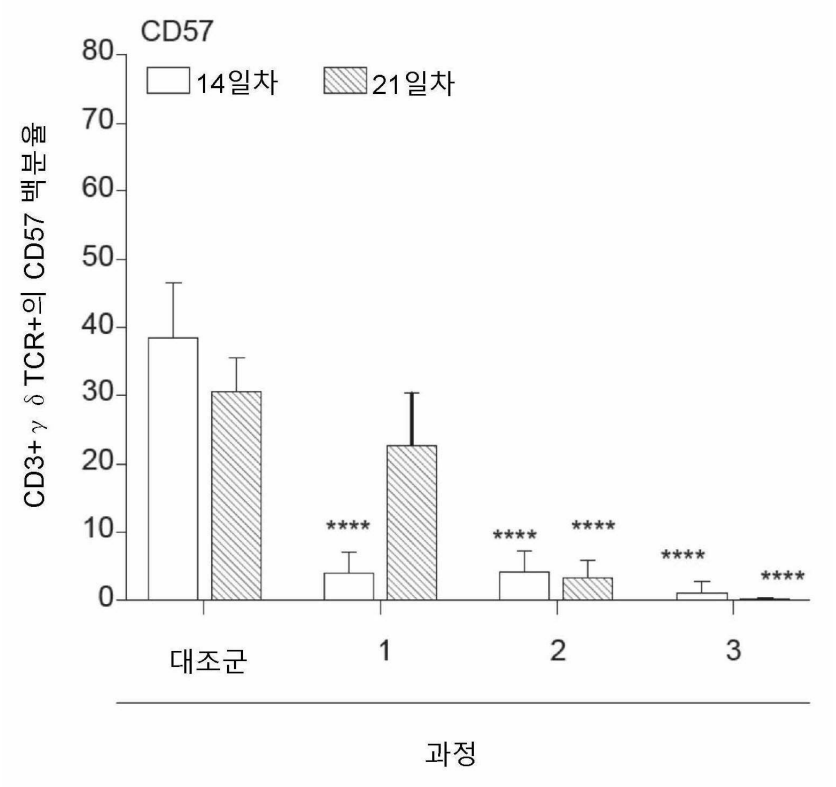
도면23a


Tcm (CD27+CD45RA-)
14일차
21일차
CD3+ γδ TCR+의 CD27+ CD45RA -
60
50
40
30
20
10
0
*
****
대조군
1
2
3
과정

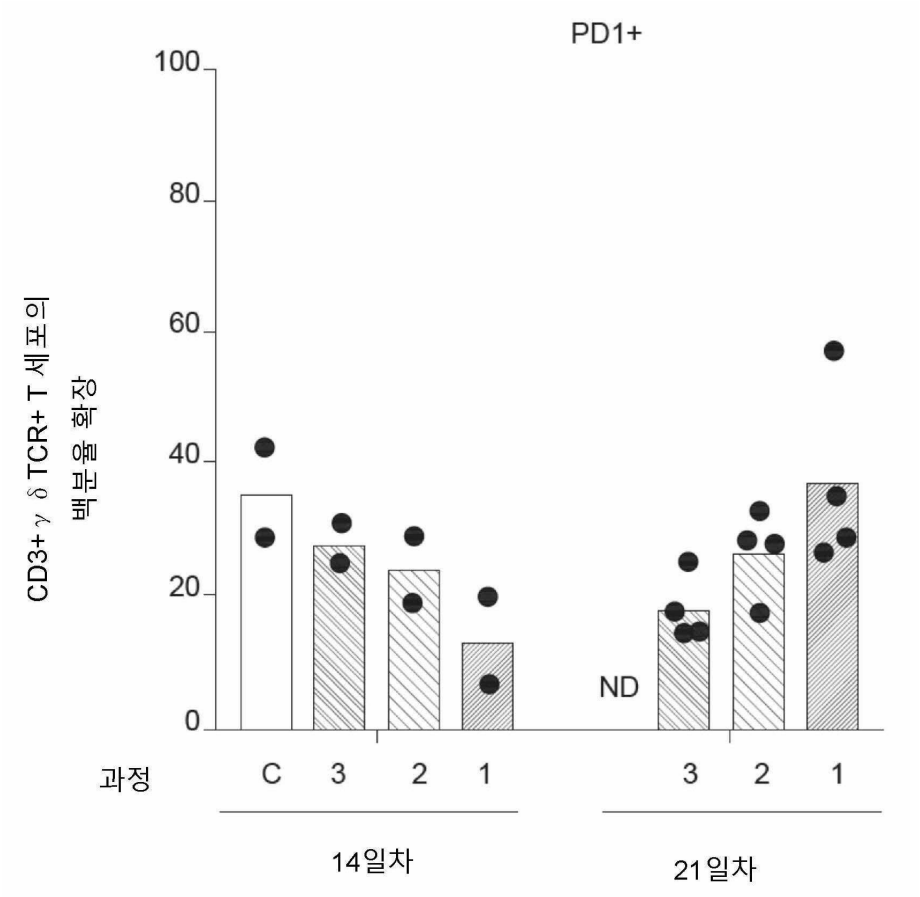
도면23b


CD62L
14일차
21일차
CD3+ γδ TCR+의 CD62L 백분율
80
70
60
50
40
30
20
10
0
*
***
***
대조군
1
2
3
과정

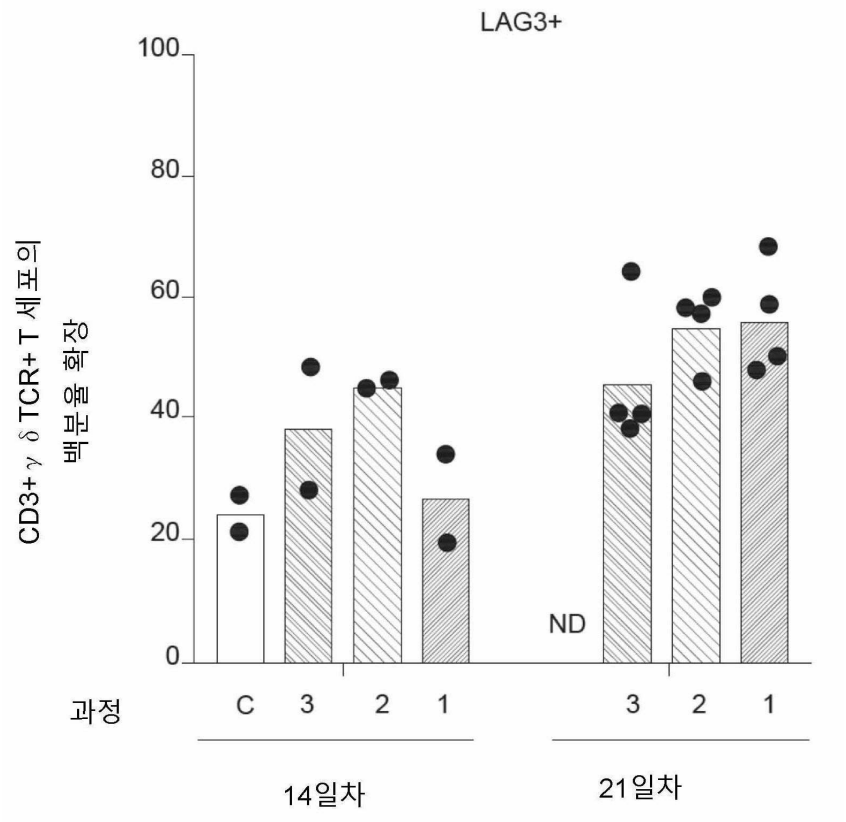
도면23c


CD57
14일차
21일차
CD3+ γ δ TCR+의 CD57 백분율
80
70
60
50
40
30
20
10
0
****
****
****
****
대조군
1
2
3
과정

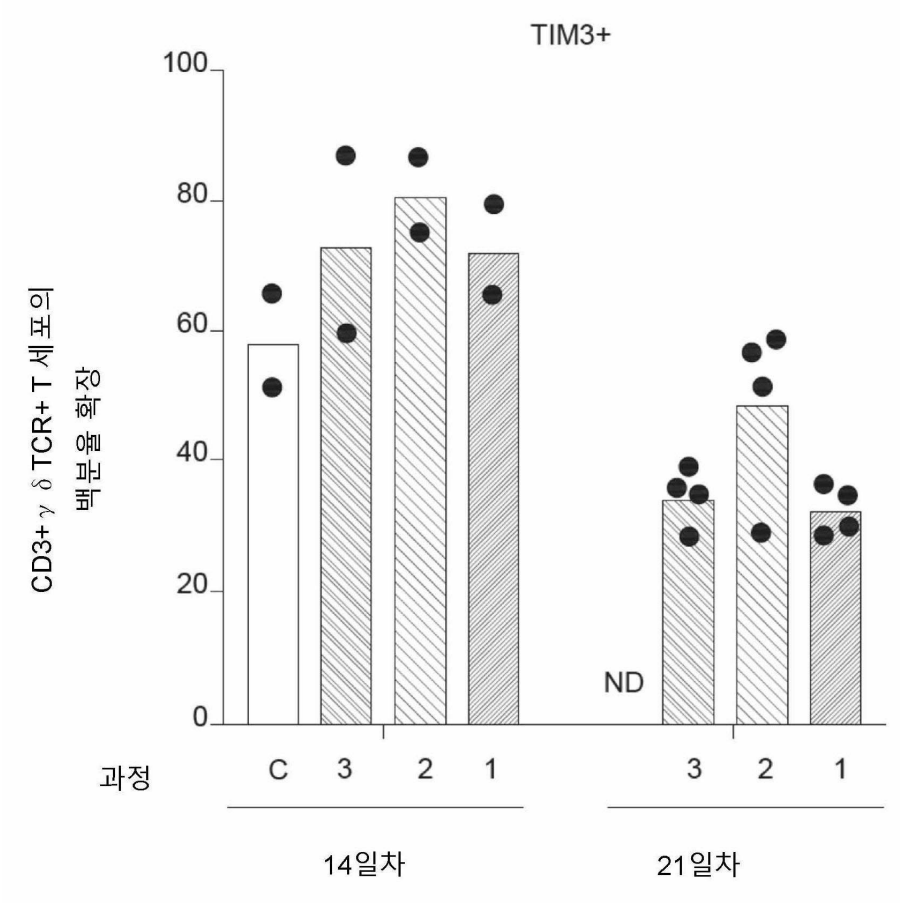
도면24a


PD1+
CD3+ γ δ TCR+ T 세포의
백분율 확장
100
80
60
40
20
0
ND
과정
C
3
2
1
3
2
1
14일차
21일차

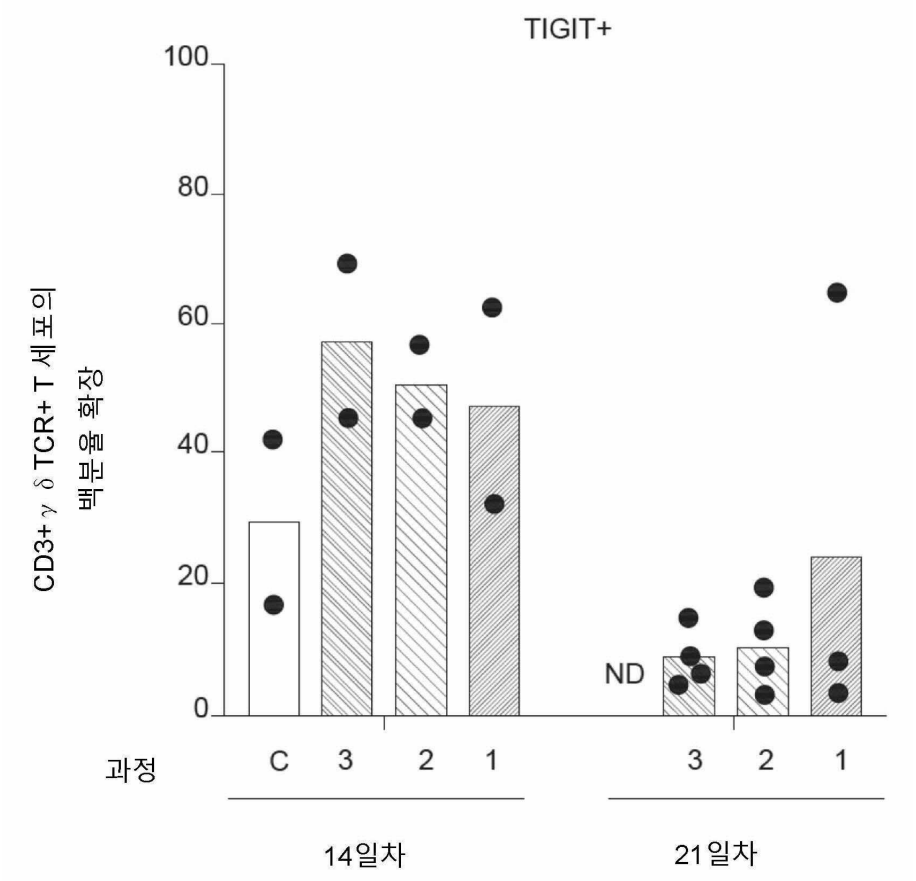
도면24b


LAG3+
100
80
60
40
20
0
CD3+ γ δ TCR+ T 세포의
백분율 확장
ND
과정
C
3
2
1
3
2
1
14일차
21일차

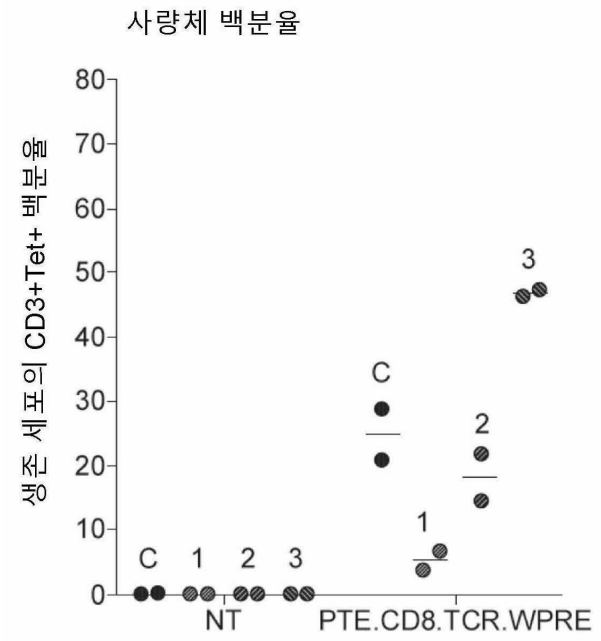
도면24c


TIM3+
100
80
60
40
20
0
CD3+ γδTCR+ T 세포의
백분율 확장
ND
과정
C
3
2
1
3
2
1
14일차
21일차

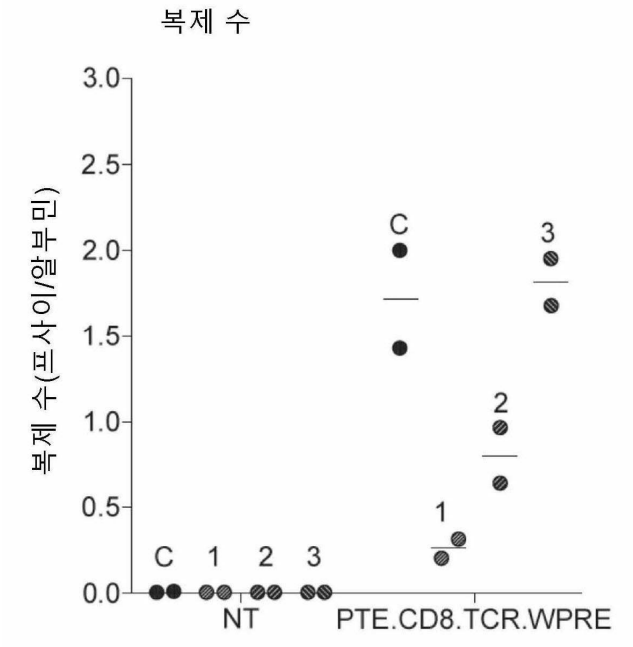
도면24d


TIGIT+
CD3+ γ δ TCR+ T 세포의
백분율 확장
100
80
60
40
20
0
ND
과정
C
3
2
1
3
2
1
14일차
21일차

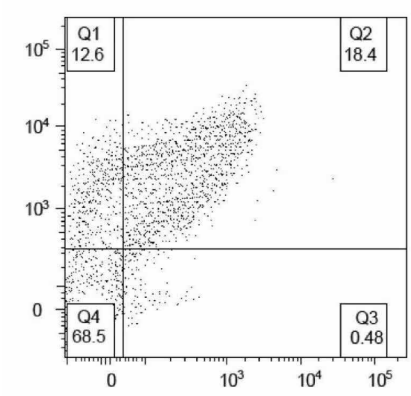
도면25a


사량체 백분율
생존 세포의 CD3+Tet+ 백분율
80
70
60
50
40
30
20
10
0
C
1
2
3
C
1
2
3
NT
PTE.CD8.TCR.WPRE

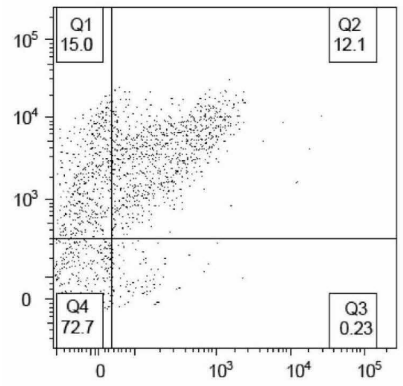
도면25b



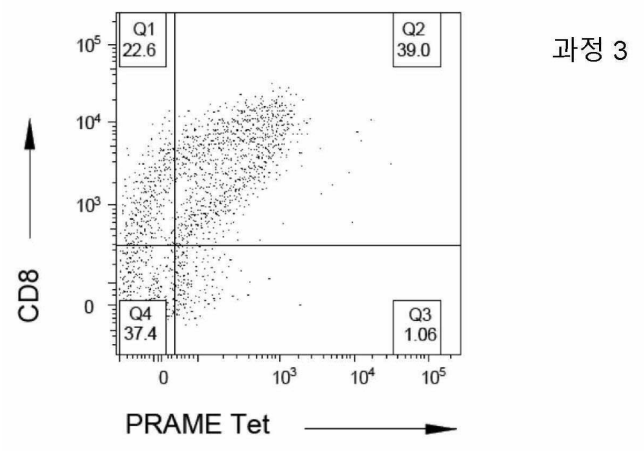
도면26a



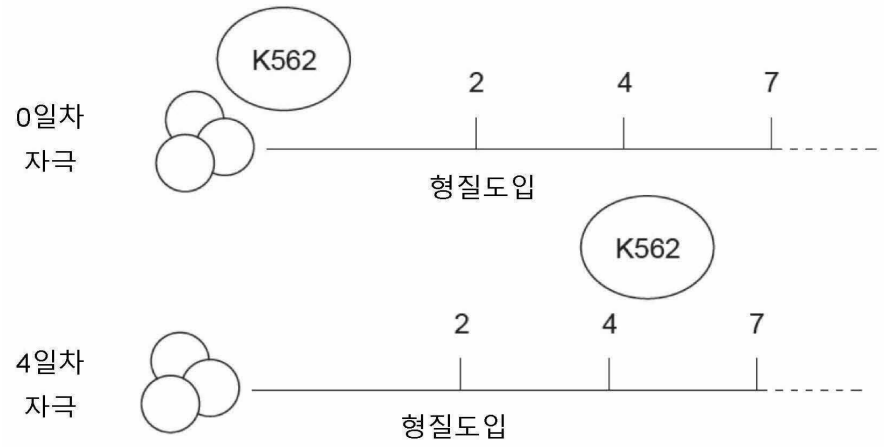
도면26b



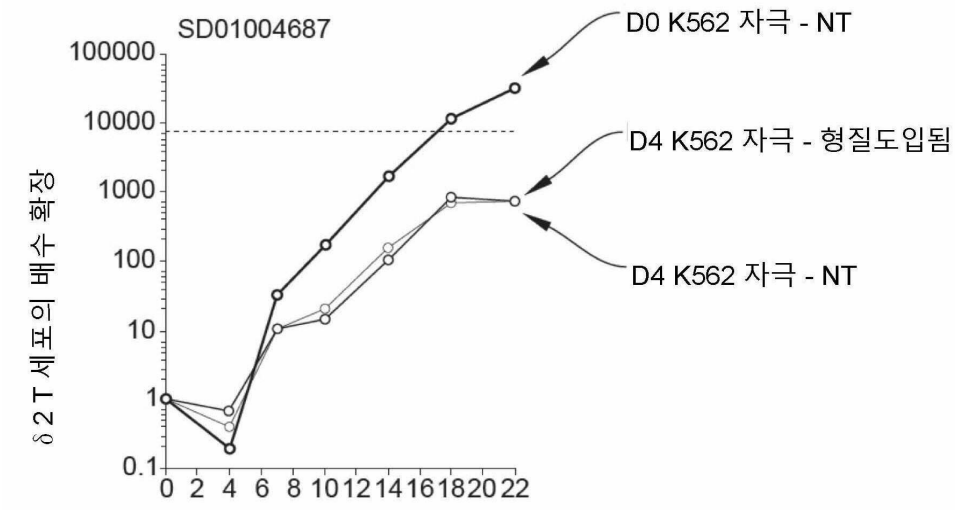
도면26c



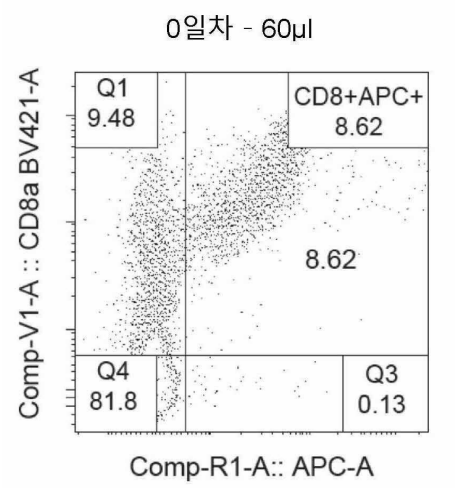
도면27a



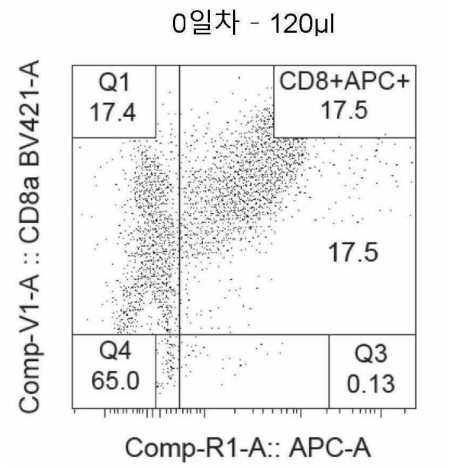
도면27b



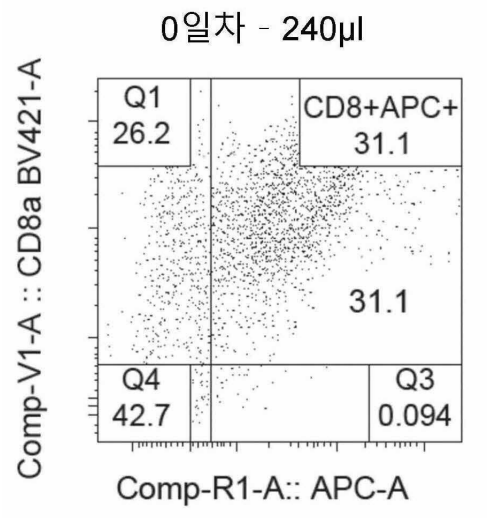
도면28a



도면28b



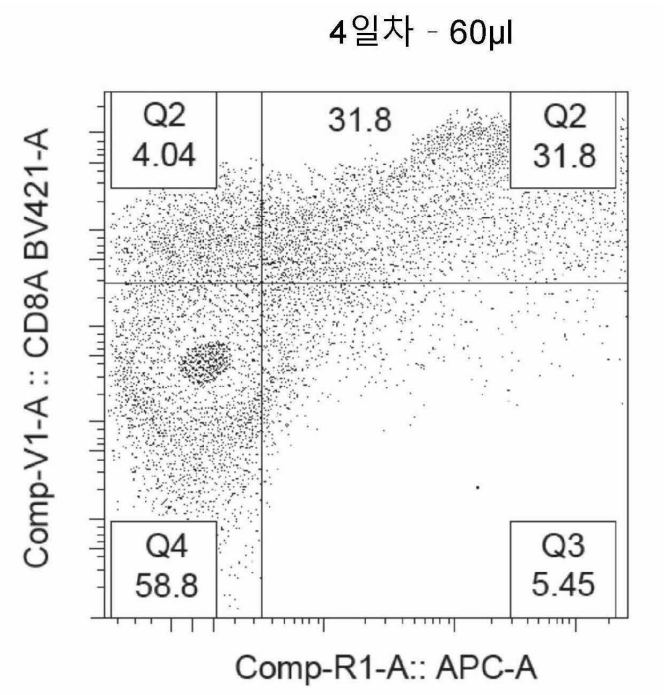
도면28c



도면28d

검체	복제 수
NT	0.00
60μl	1.71
120μl	2.61
240μl	7.53

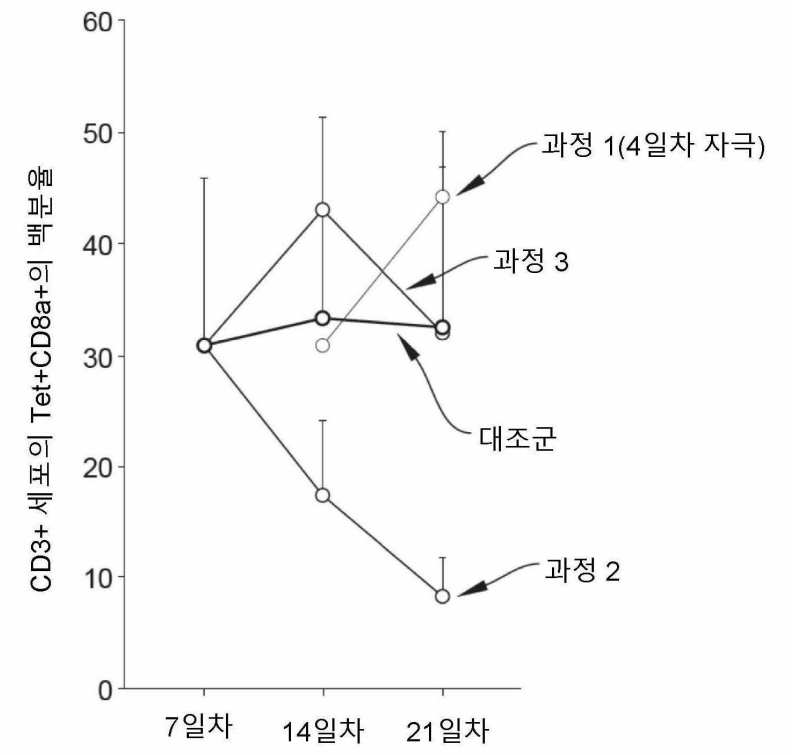
도면28e



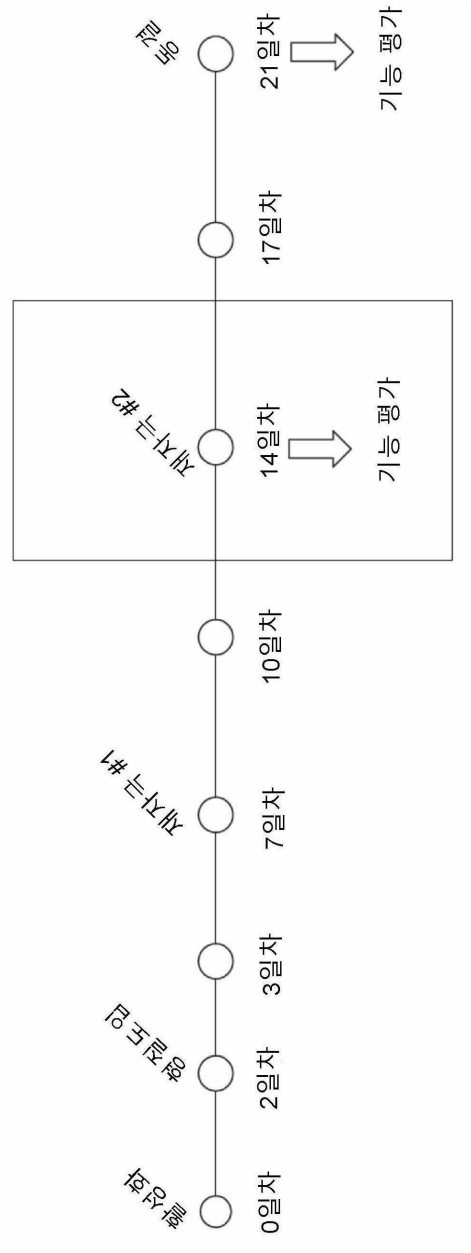
도면28f

검체	복제 수
NT	0.00
형질도입됨	1.71

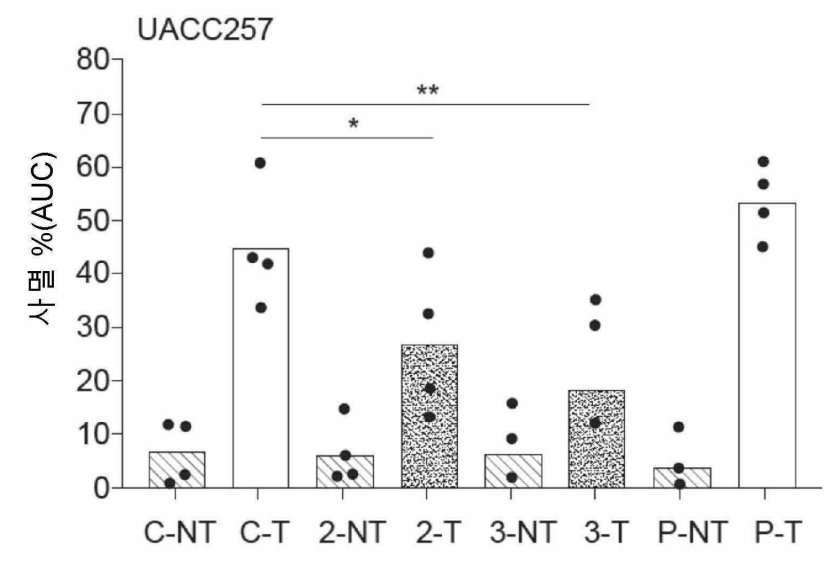
도면29


60
50
40
30
20
10
0
CD3+ 세포의 Tet+CD8a+의 백분율
과정 1(4일차 자극)
과정 3
대조군
과정 2
7일차
14일차
21일차

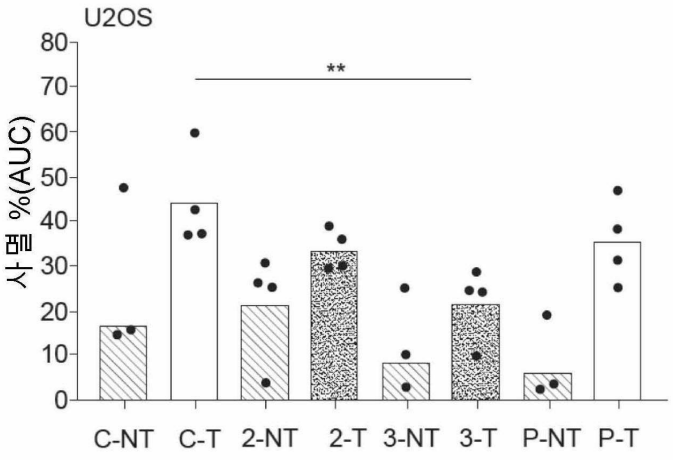
도면30



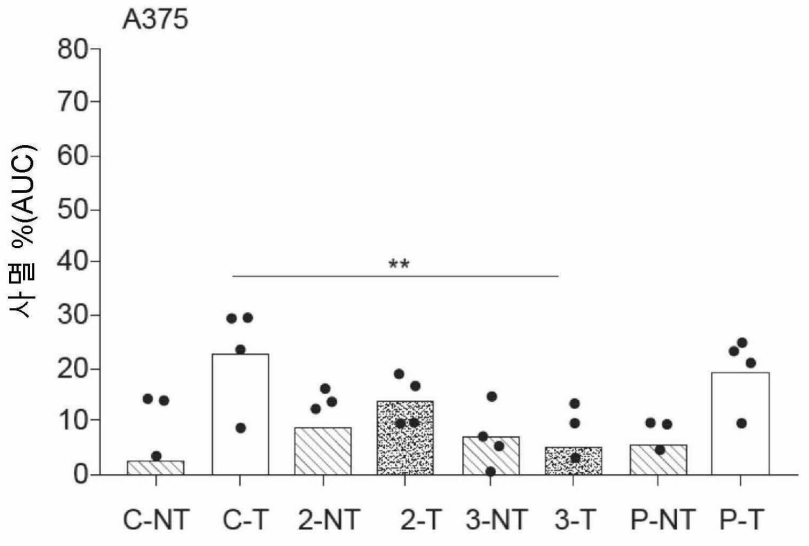
도면31a



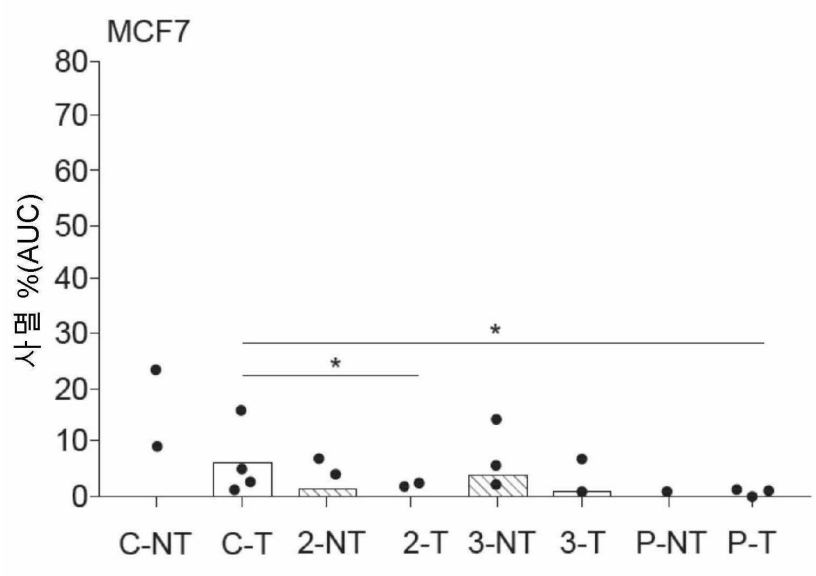
도면31b



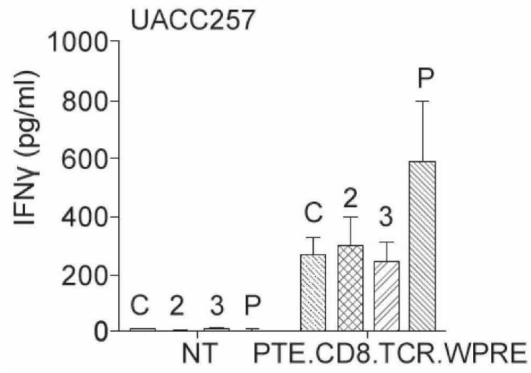
도면31c



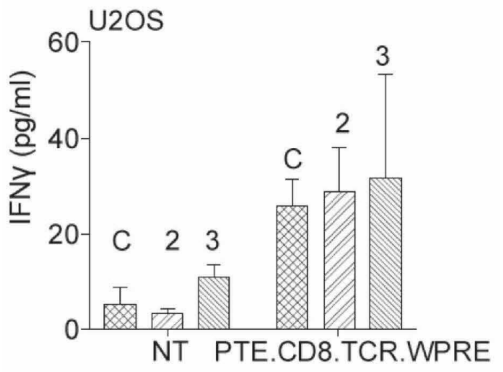
도면31d



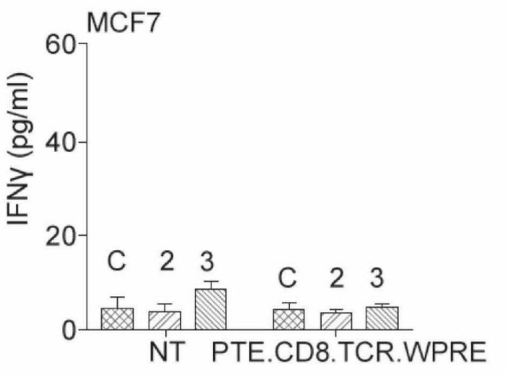
도면32a



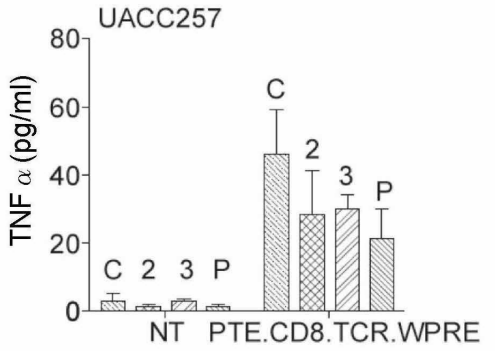
도면32b



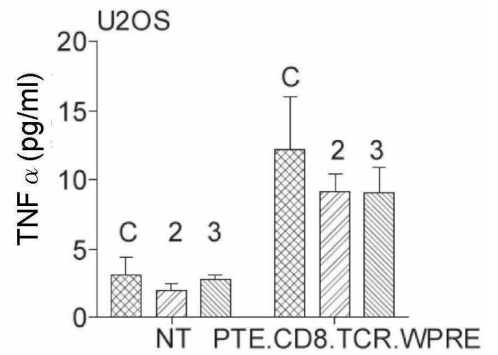
도면32c



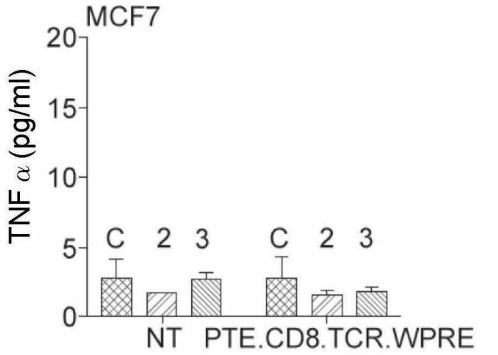
도면33a



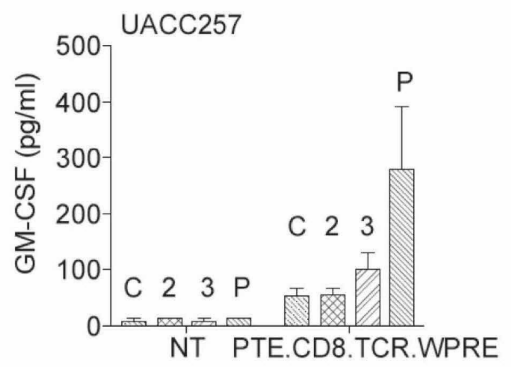
도면33b



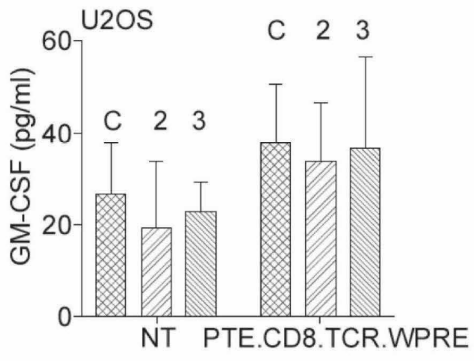
도면33c



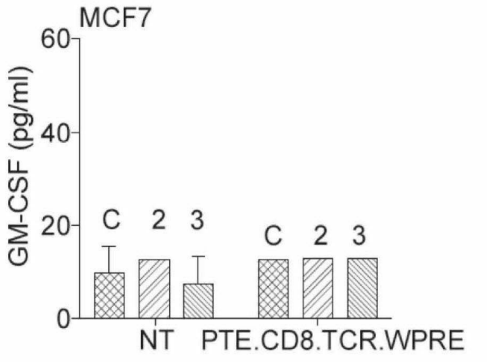
도면34a



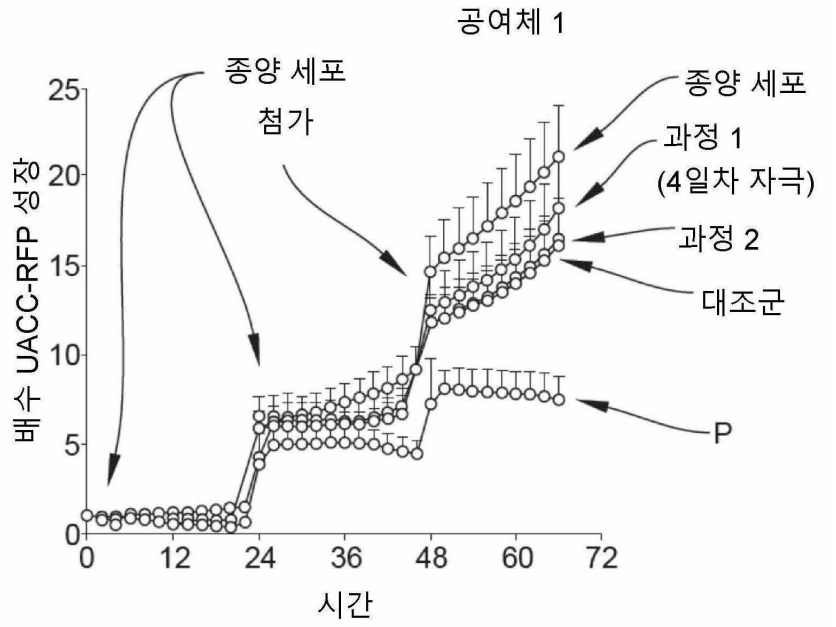
도면34b



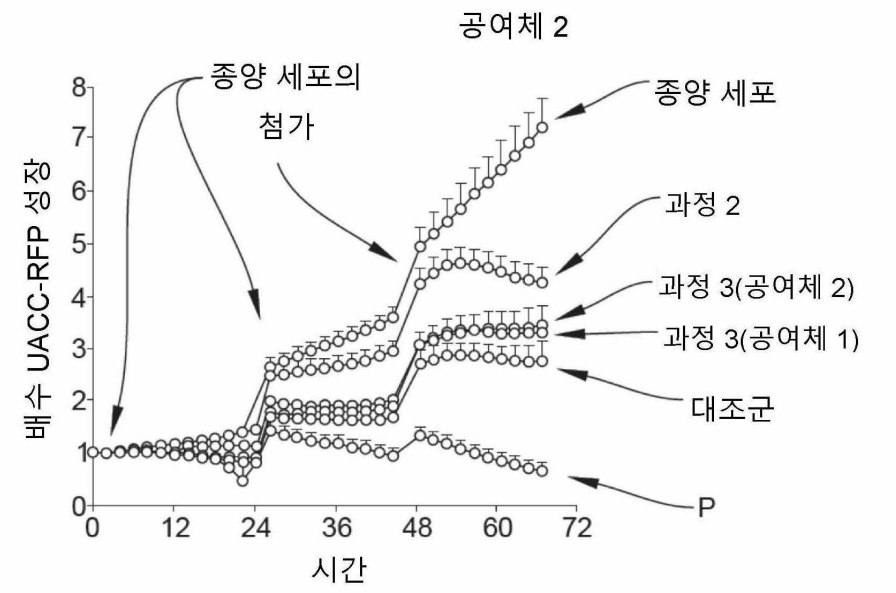
도면34c



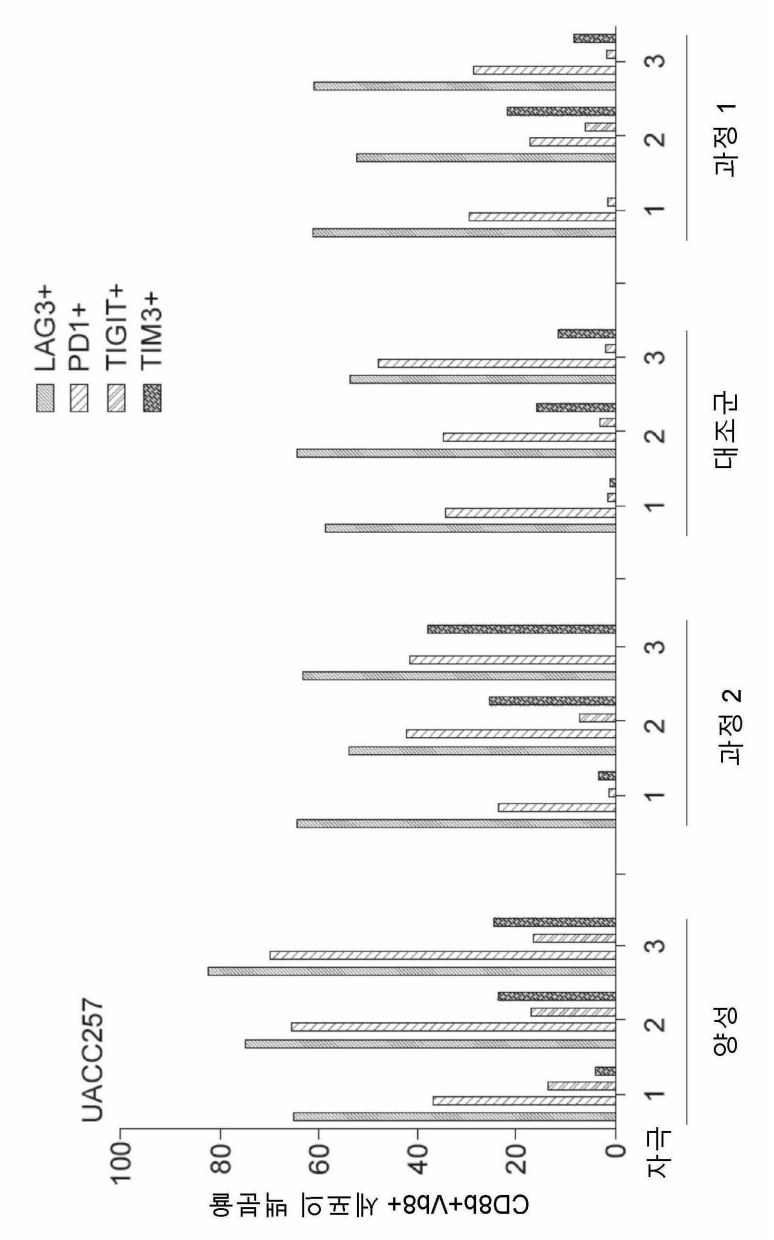
도면35a


공여체 1
종양 세포
첨가
종양 세포
과정 1
(4일차 자극)
과정 2
대조군
P
배수 UACC-RFP 성장
시간
0
5
10
15
20
25
0
12
24
36
48
60
72

도면35b


공여체 2
종양 세포의
첨가
종양 세포
과정 2
과정 3(공여체 2)
과정 3(공여체 1)
대조군
P
배수 UACC-RFP 성장
시간
0
1
2
3
4
5
6
7
8
0
12
24
36
48
60
72

도면36

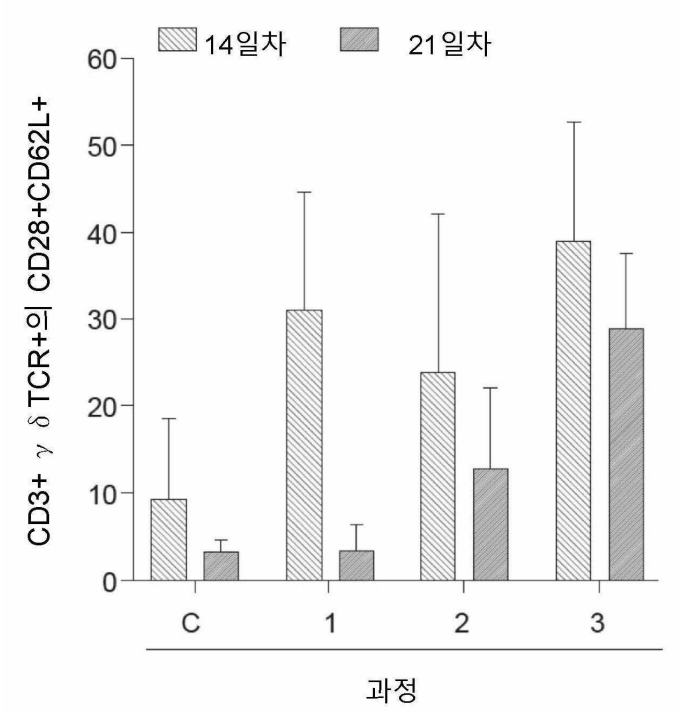

LAG3+
PD1+
TIGIT+
TIM3+
UACC257
CD8b+Vb8+ 세포의 백분율
100
80
60
40
20
0
자극
1
2
3
양성
1
2
3
과정 2
1
2
3
대조군
1
2
3
과정 1

도면37

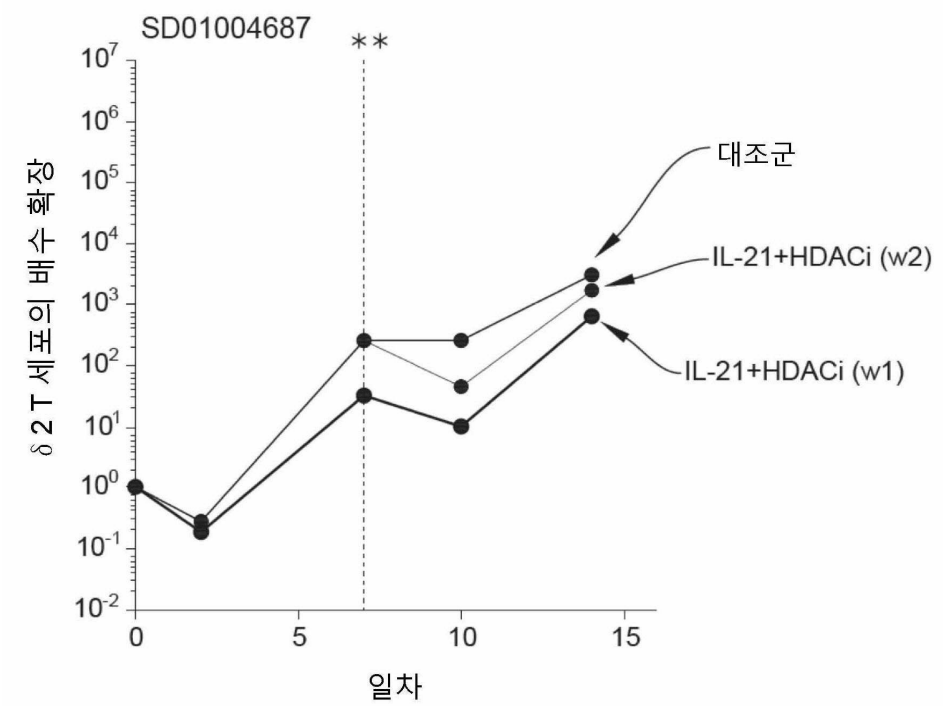
*재자극

	일차	0일차-6일차	7일차*	8일차-14일차
조건 1	대조군	IL-2 + IL-15	사이토카인 없음	IL-2
조건 2	IL-2 + IL-15	IL-2 + IL-15	사이토카인 없음	IL-2 + IL-15
조건 3	IL-12 + IL-18 프라이밍	IL-12 + IL-15	IL-12 + IL-18 프라이밍	IL-2 + IL-15
조건 4	IL-21 + HDACi(조건 1)	IL-2 + IL-15	사이토카인 없음	IL-21 + HDACI + IL-2 + IL-15
조건 5	IL-21 + HDACi(조건 2)	IL-21 + HDACI + IL-2 + IL-15	사이토카인 없음	IL-2 + IL-15

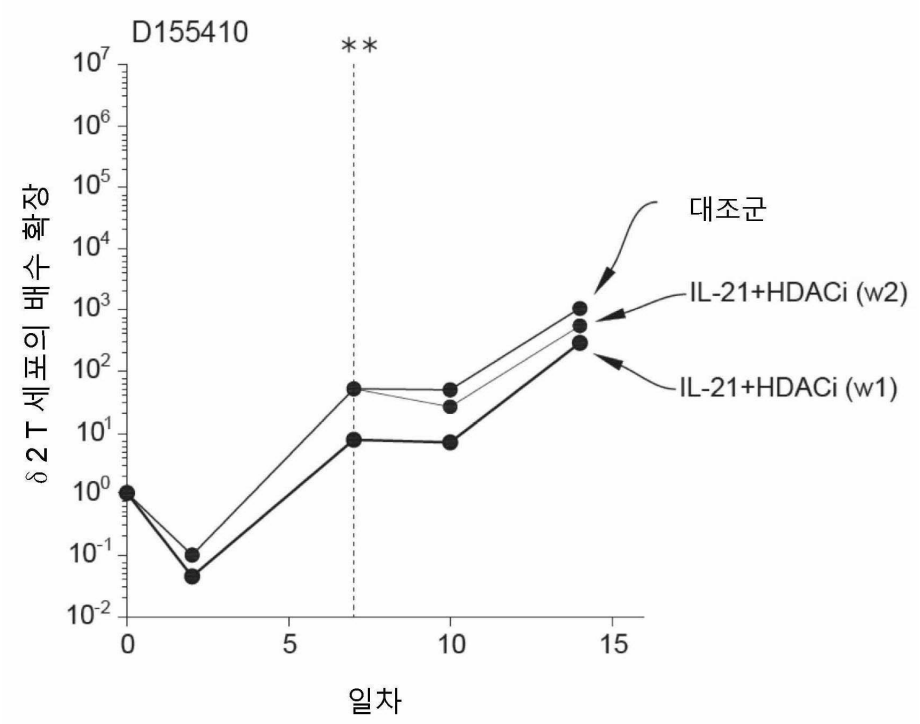
도면38


14일차
21일차
CD3+ γδ TCR+의 CD28+CD62L+
60
50
40
30
20
10
0
C
1
2
3
과정

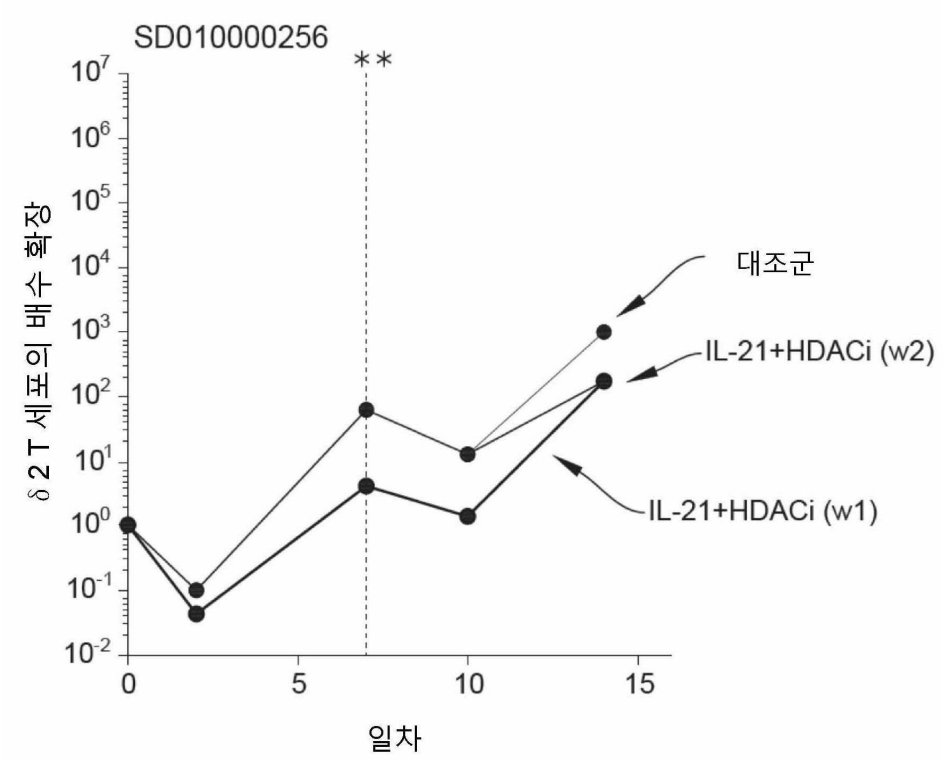
도면39a


SD01004687
**
δ 2 T 세포의 배수 확장
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
10^{-1}
10^{-2}
0
5
10
15
일차
대조군
IL-21+HDACi (w2)
IL-21+HDACi (w1)

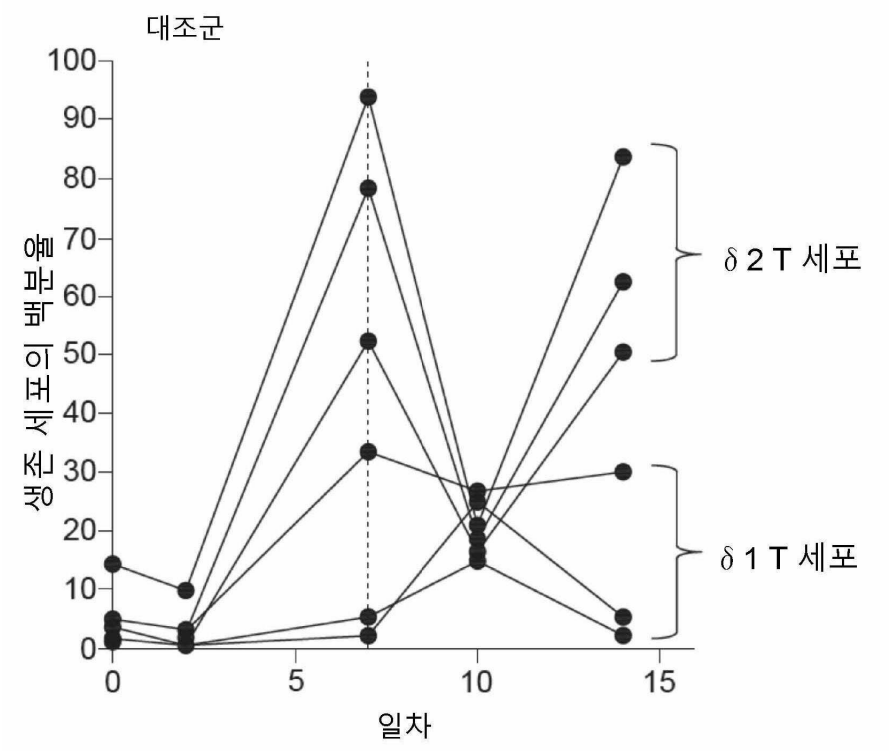
도면39b


D155410
**
δ 2 T 세포의 배수 확장
대조군
IL-21+HDACi (w2)
IL-21+HDACi (w1)
일차

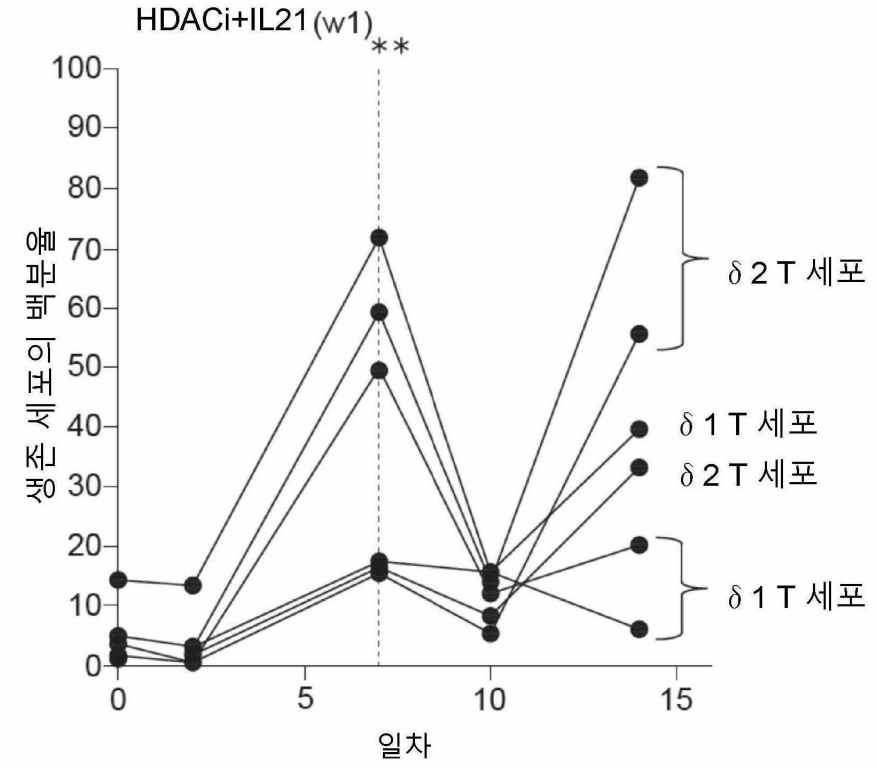
도면39c


SD010000256
**
δ 2 T 세포의 배수 확장
대조군
IL-21+HDACi (w2)
IL-21+HDACi (w1)
일차

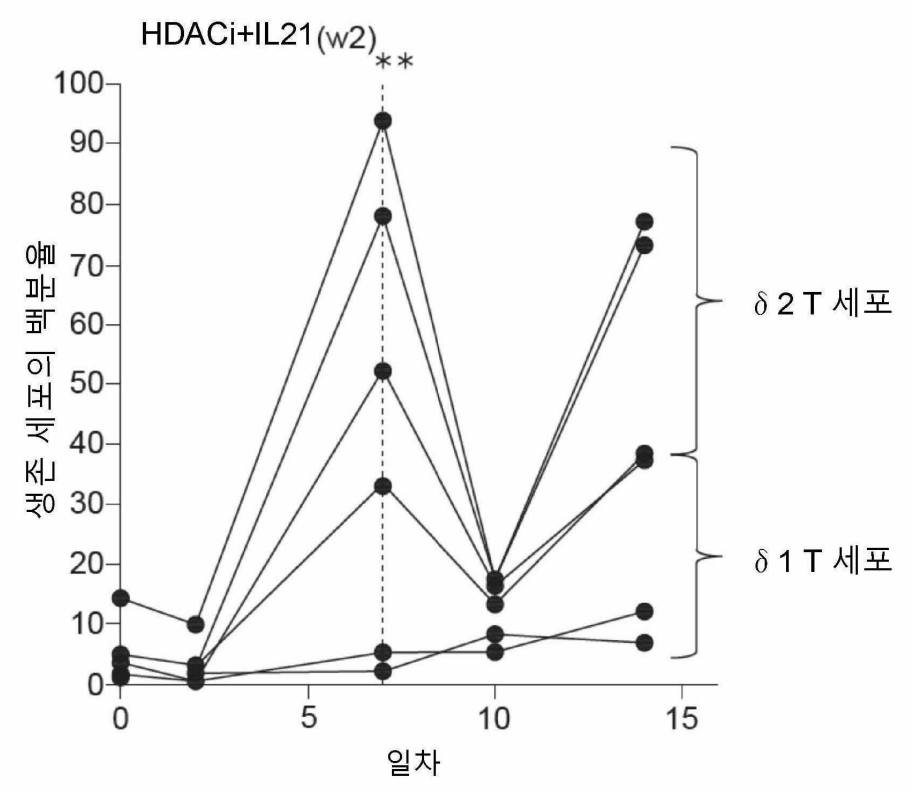
도면40a


대조군
생존 세포의 백분율
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
일차
δ 2 T 세포
δ 1 T 세포

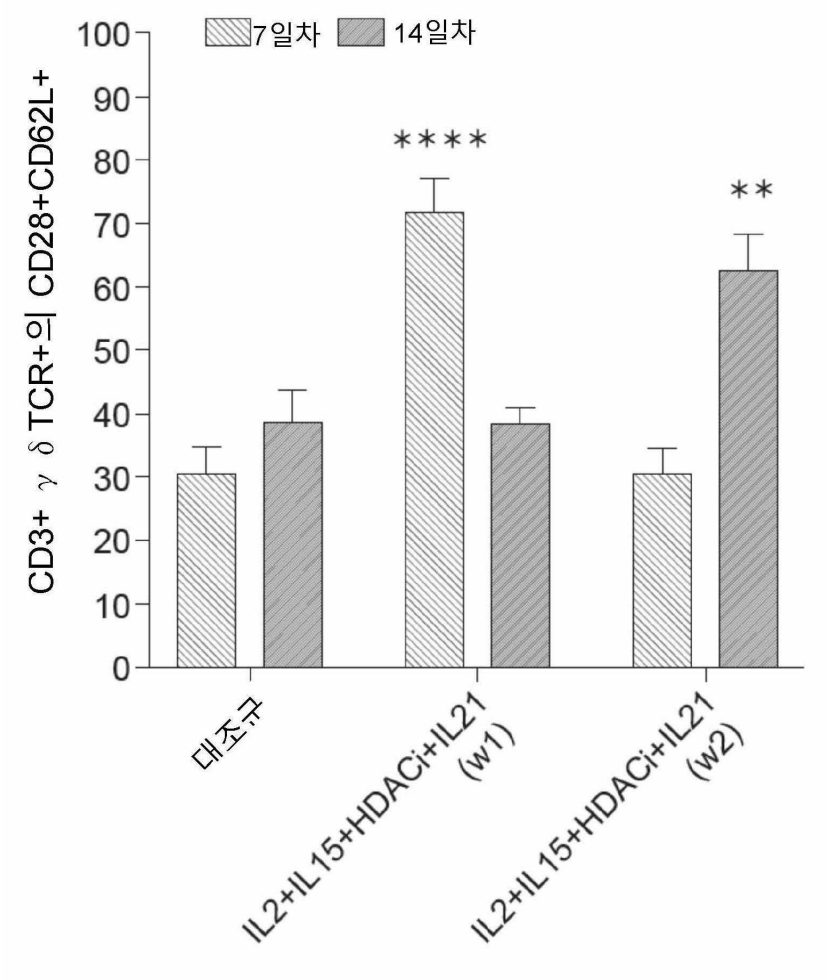
도면40b


HDACi+IL21 (w1)
**
생존 세포의 백분율
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
일차
δ 2 T 세포
δ 1 T 세포
δ 2 T 세포
δ 1 T 세포

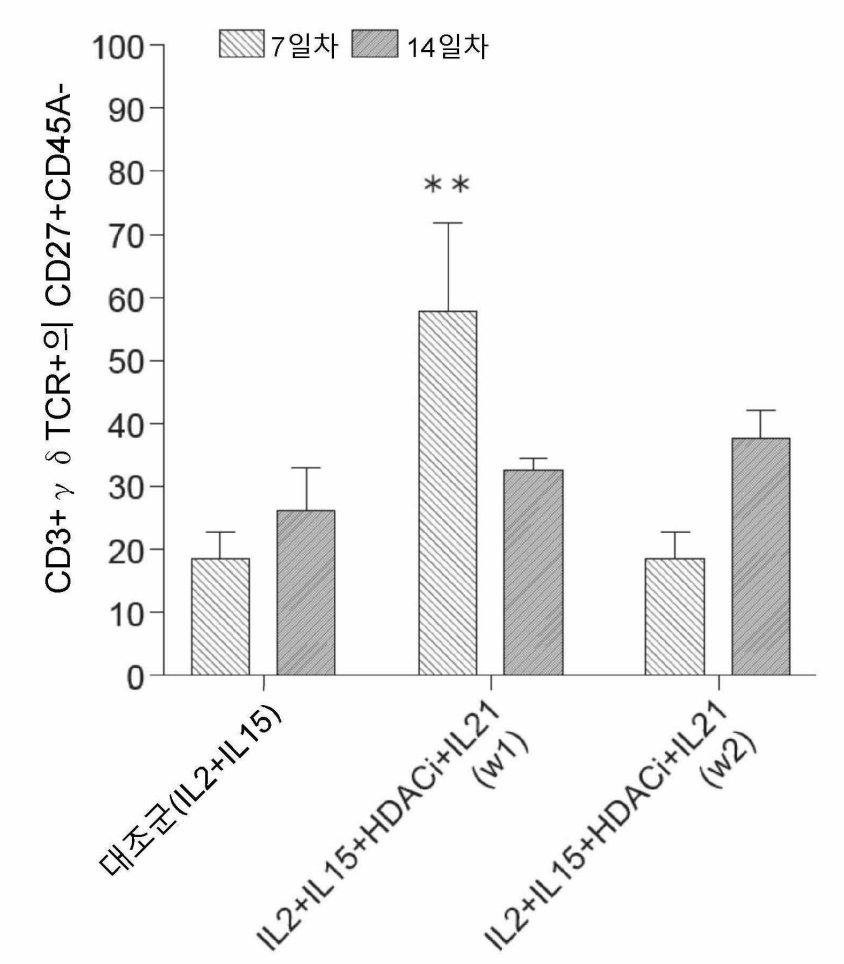
도면40c


HDACi+IL21(w2)
**
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
일차
δ2T 세포
δ1T 세포

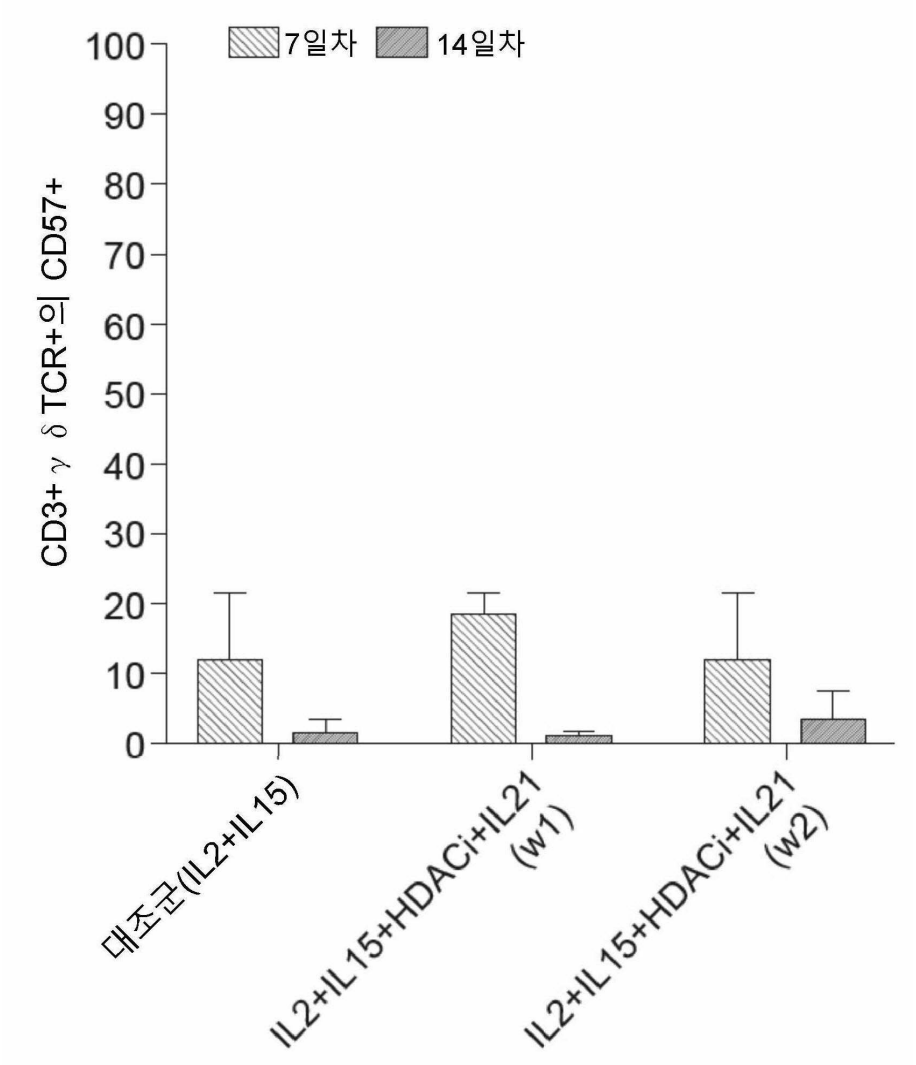
도면41a


7일차
14일차
CD3+ γδ TCR+의 CD28+CD62L+
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
****
**
대조군
IL2+IL15+HDACi+IL21 (w1)
IL2+IL15+HDACi+IL21 (w2)

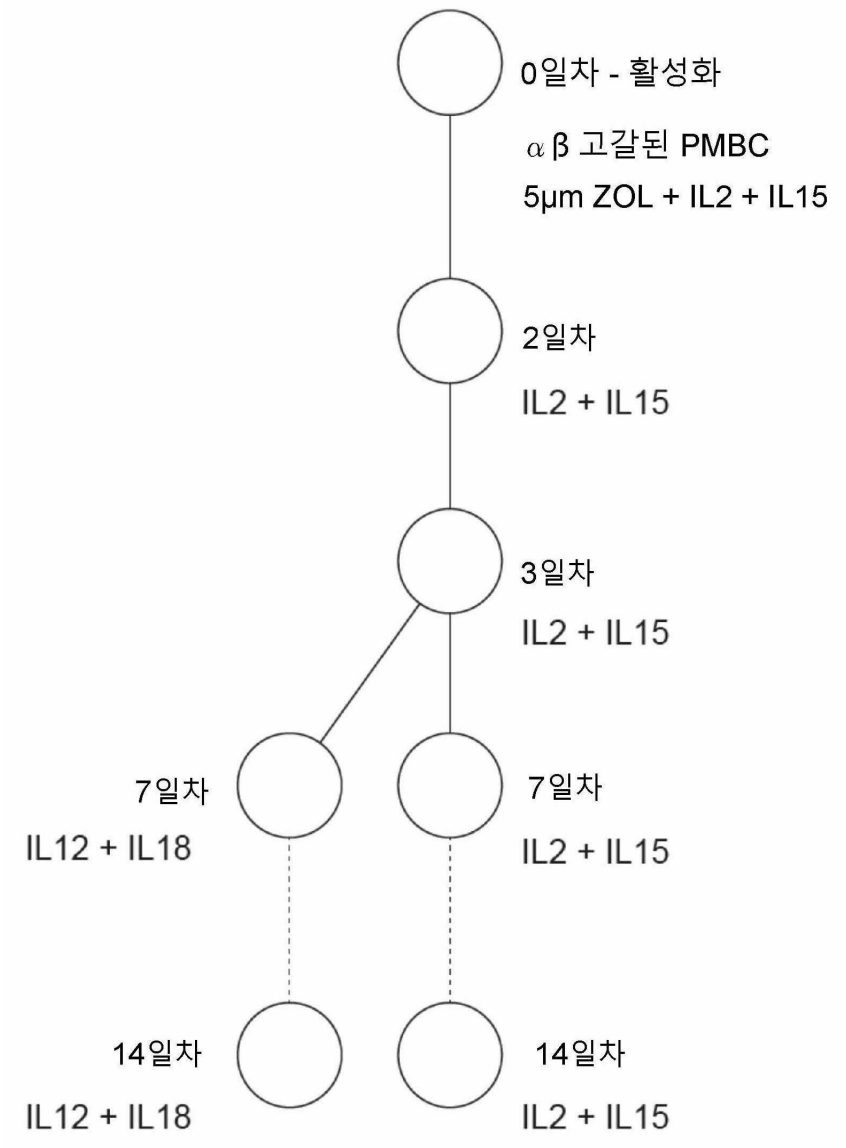
도면41b


7일차
14일차
CD3+ γ δ TCR+의 CD27+CD45A-
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
**
대조군(IL2+IL15)
IL2+IL15+HDACi+IL21 (w1)
IL2+IL15+HDACi+IL21 (w2)

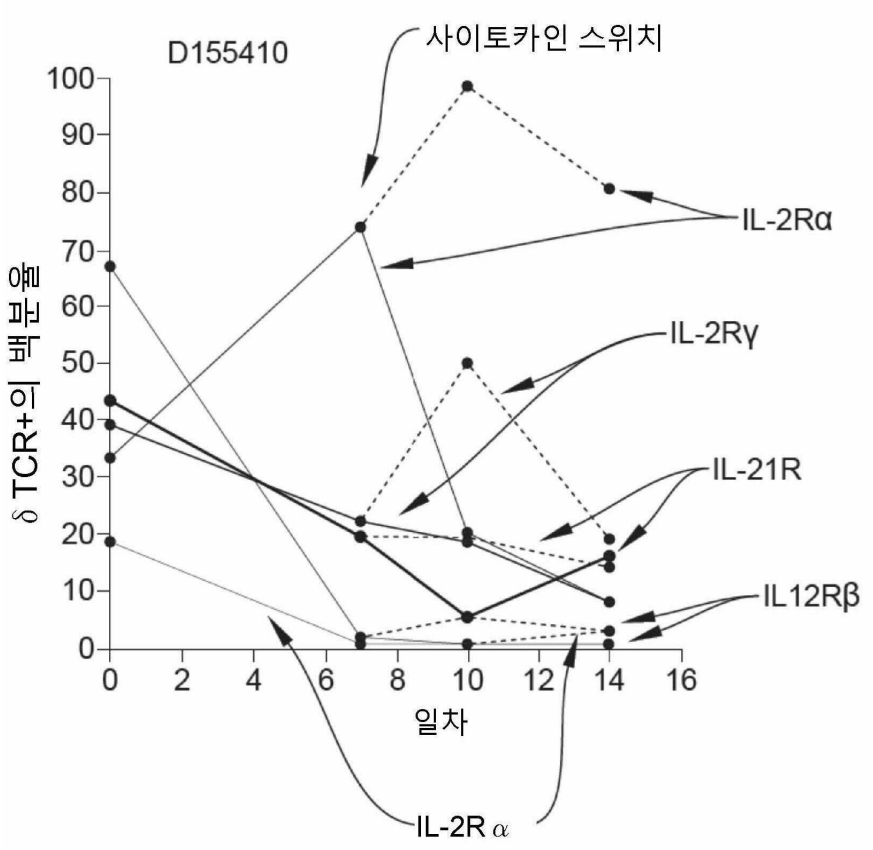
도면41c


7일차
14일차
CD3+ γ δ TCR+의 CD57+
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
대조군(IL2+IL15)
IL2+IL15+HDACi+IL21 (w1)
IL2+IL15+HDACi+IL21 (w2)

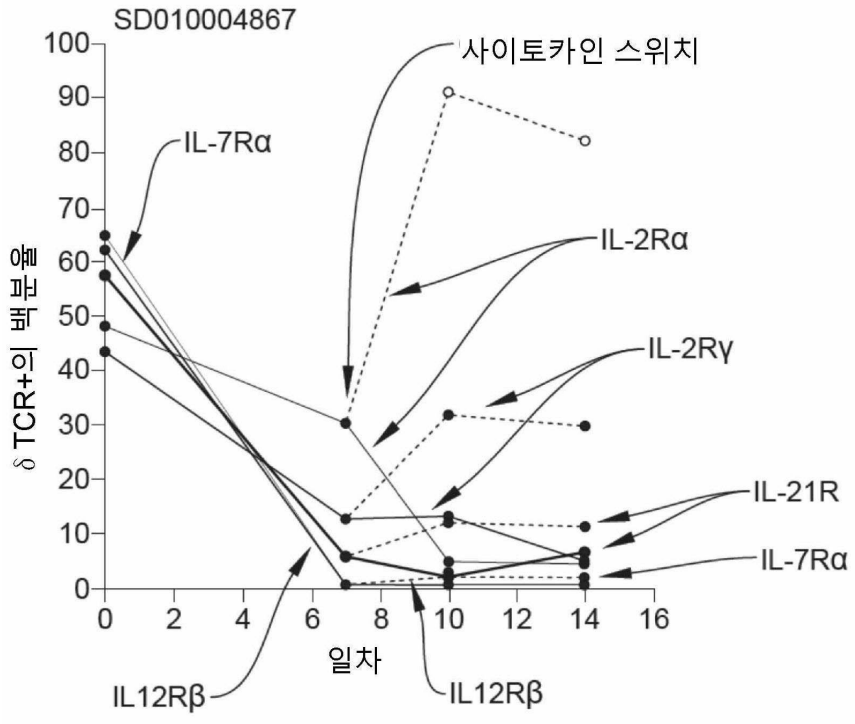
도면42


0일차 - 활성화
αβ 고갈된 PMBC
5μm ZOL + IL2 + IL15
2일차
IL2 + IL15
3일차
IL2 + IL15
7일차
IL12 + IL18
7일차
IL2 + IL15
14일차
IL12 + IL18
14일차
IL2 + IL15

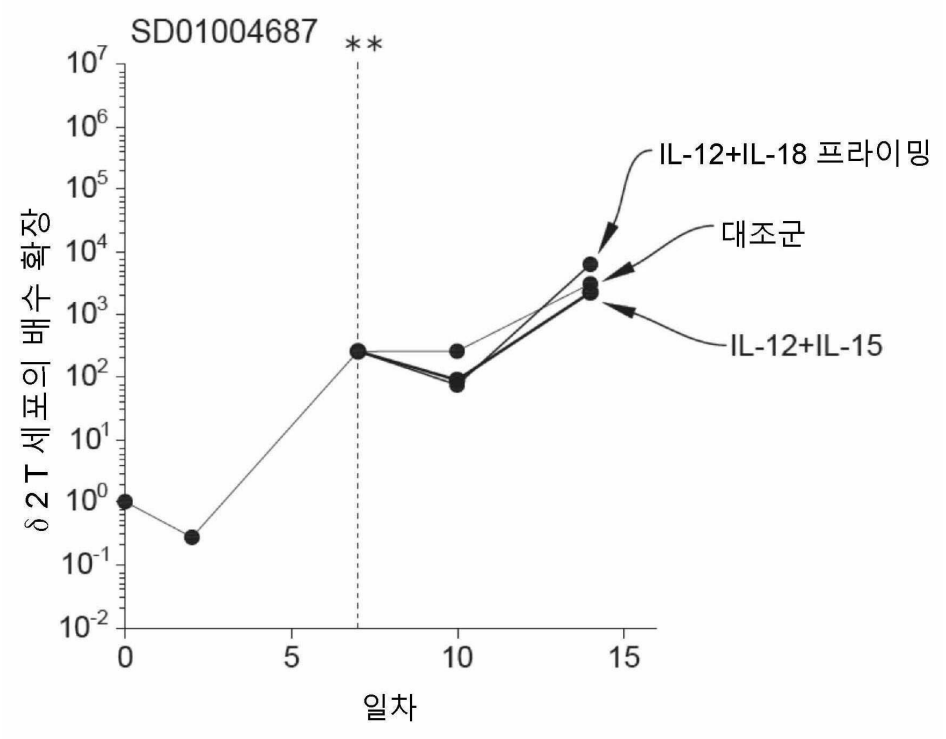
도면43a


D155410
사이토카인 스위치
IL-2Rα
IL-2Rγ
IL-21R
IL12Rβ
IL-2R α
δ TCR+의 백분율
일차
0
2
4
6
8
10
12
14
16
20
30
40
50
60
70
80
90
100

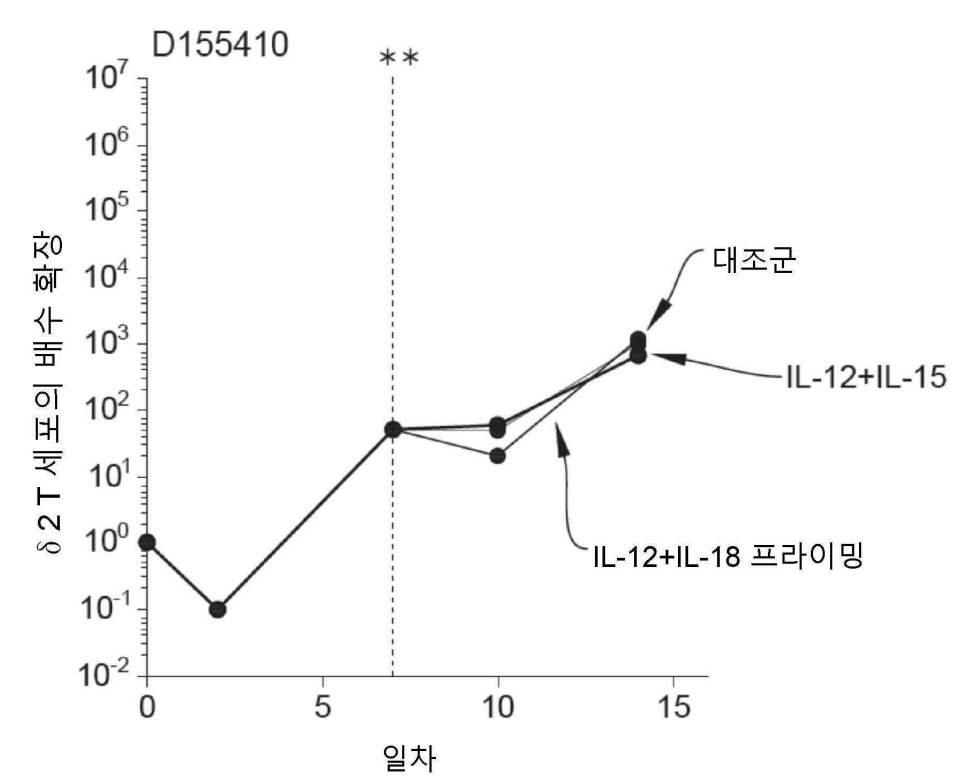
도면43b


SD010004867
사이토카인 스위치
IL-7Rα
IL-2Rα
IL-2Rγ
IL-21R
IL-7Rα
IL12Rβ
IL12Rβ
δ TCR+의 백분율
일차
0
2
4
6
8
10
12
14
16
20
30
40
50
60
70
80
90
100

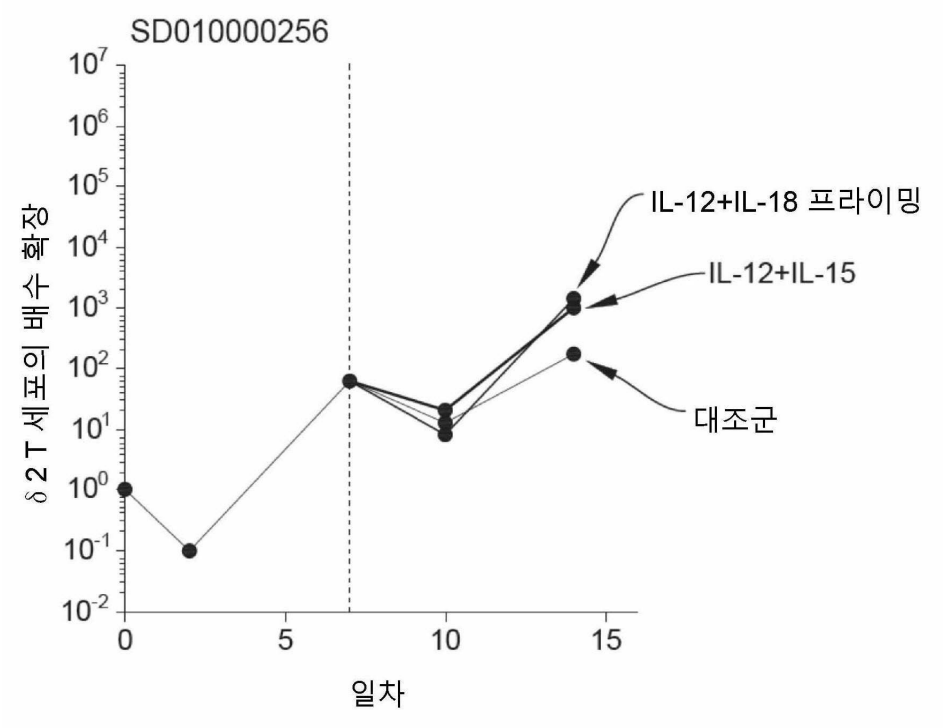
도면44a


SD01004687
**
IL-12+IL-18 프라이밍
대조군
IL-12+IL-15
δ2 T 세포의 배수 확장
일차

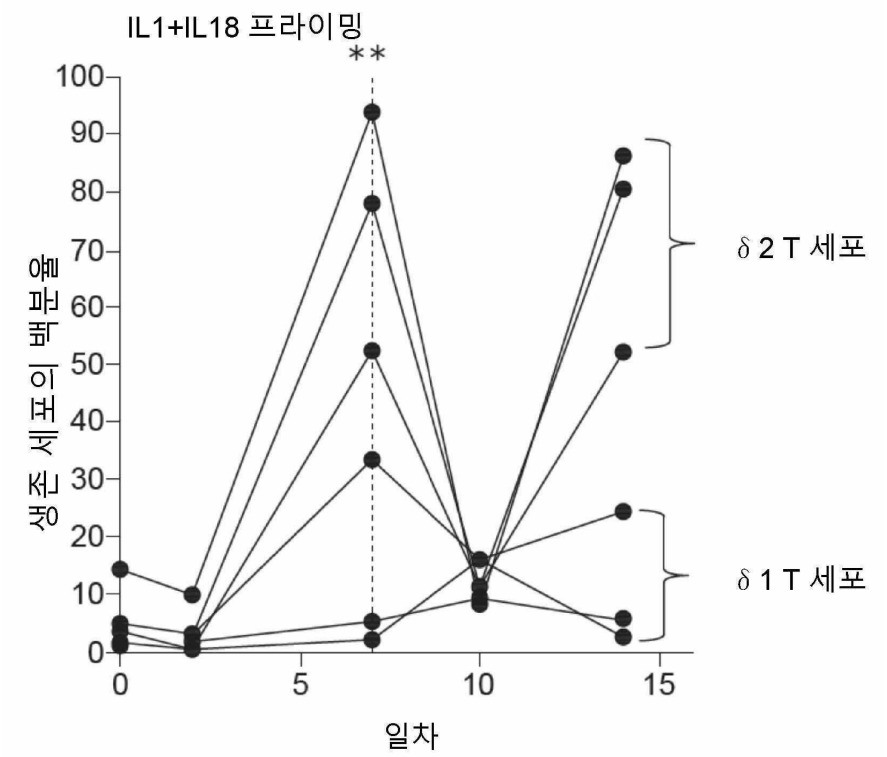
도면44b


D155410
**
대조군
IL-12+IL-15
IL-12+IL-18 프라이밍
δ2 T 세포의 배수 확장
일차

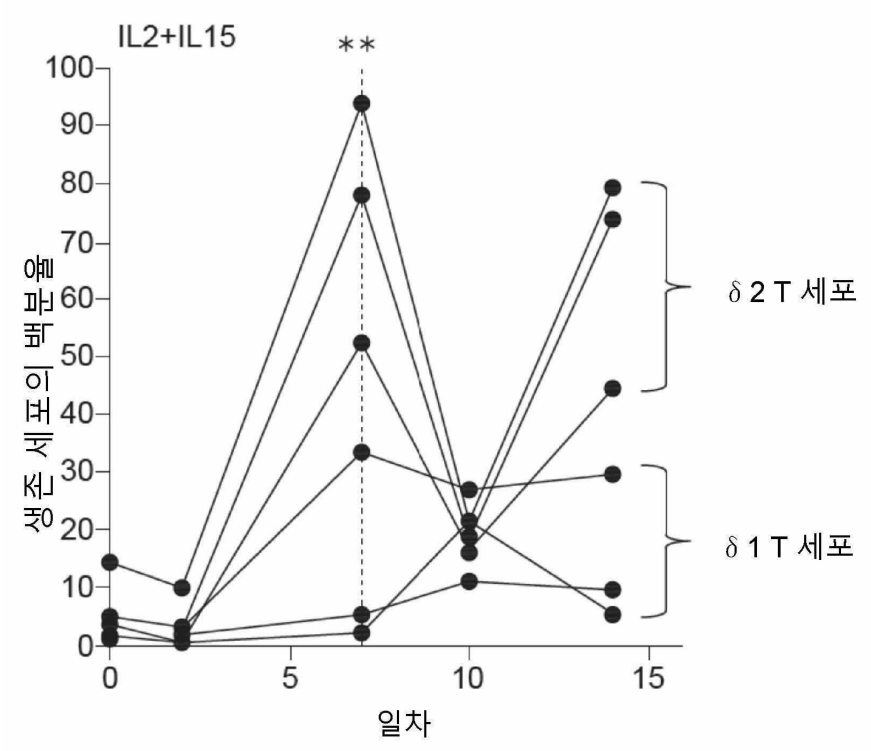
도면44c


SD010000256
δ2 T 세포의 배수 확장
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
10^{-1}
10^{-2}
0
5
10
15
일차
IL-12+IL-18 프라이밍
IL-12+IL-15
대조군

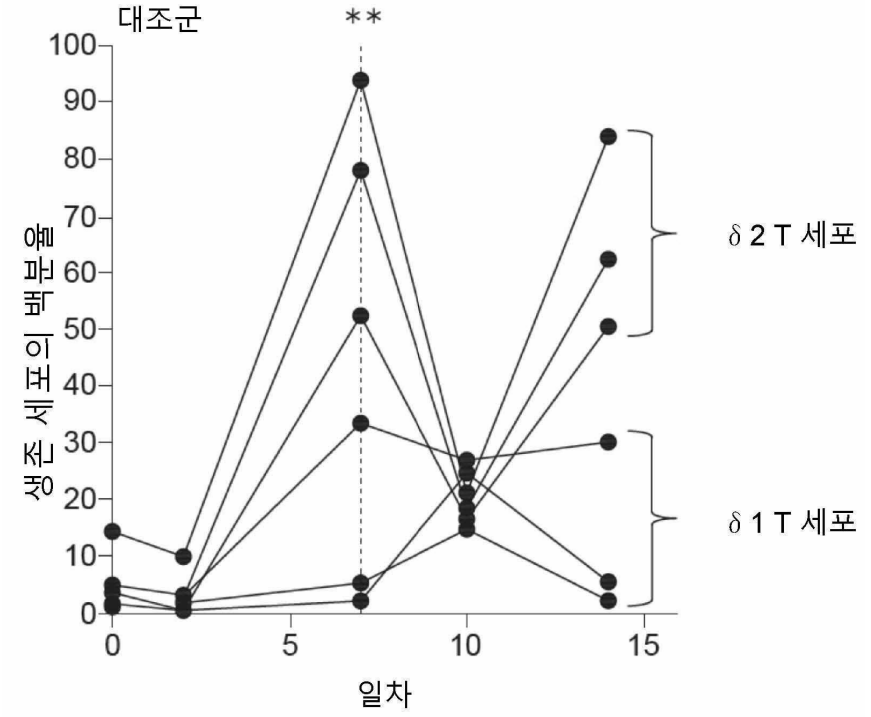
도면45a


IL1+IL18 프라이밍
**
생존 세포의 백분율
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
일차
δ2 T 세포
δ1 T 세포

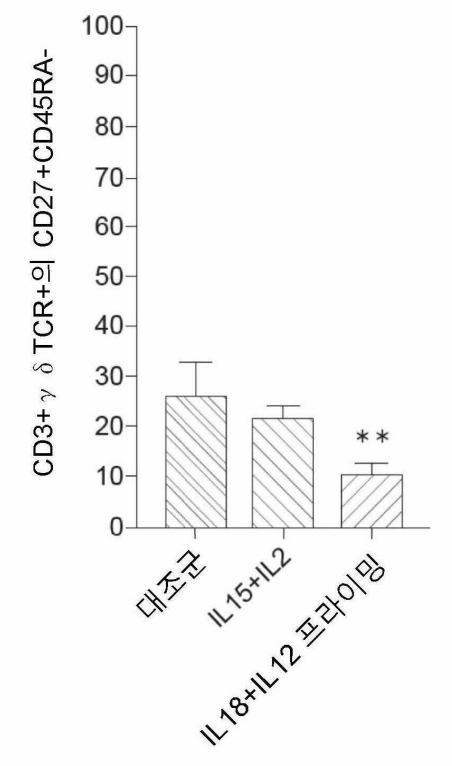
도면45b


IL2+IL15
**
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
일차
혈관내피세포 수
δ2 T 세포
δ1 T 세포

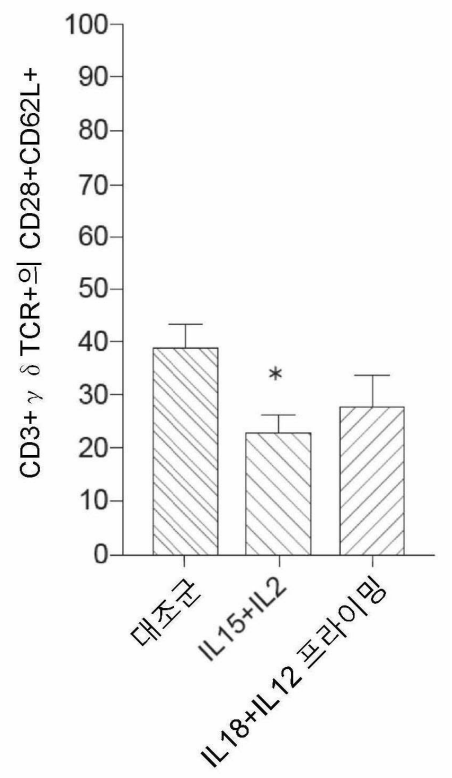
도면45c


대조군
**
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
일차
혈관내피세포 수
δ2 T 세포
δ1 T 세포

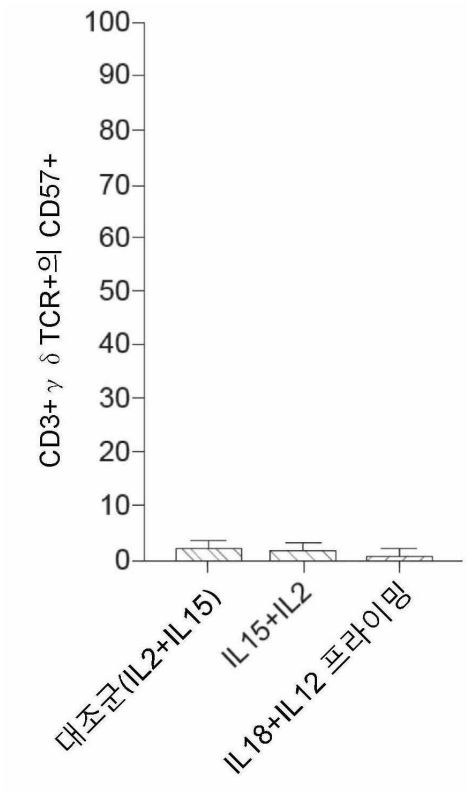
도면46a


CD3+ γ δ TCR+의 CD27+CD45RA-
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
**
대조군
IL15+IL2
IL18+IL12 프라이밍

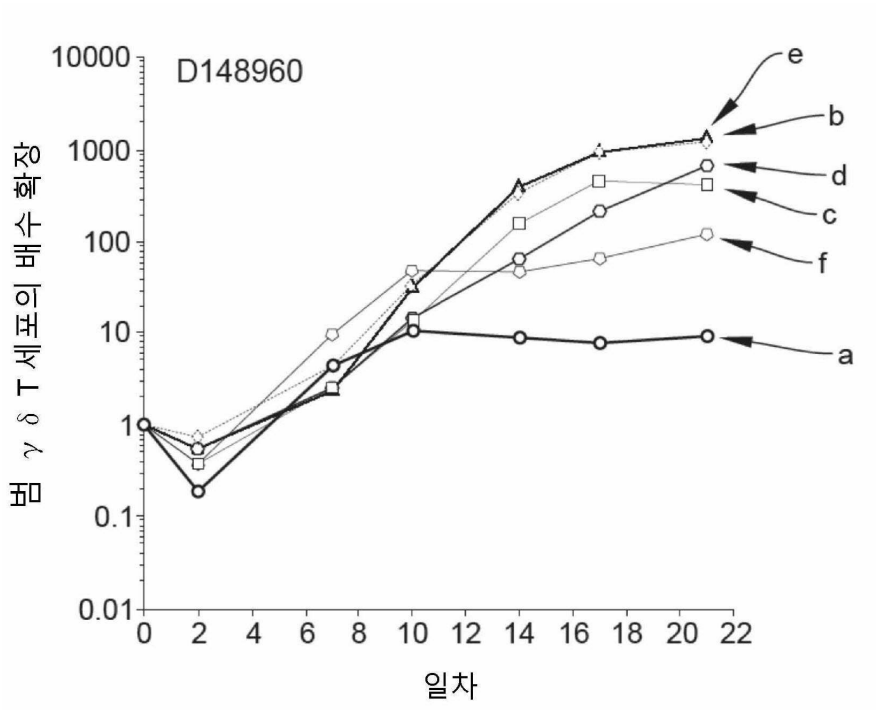
도면46b


CD3+ γ δ TCR+의 CD28+CD62L+
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
*
대조군
IL15+IL2
IL18+IL12 프라이밍

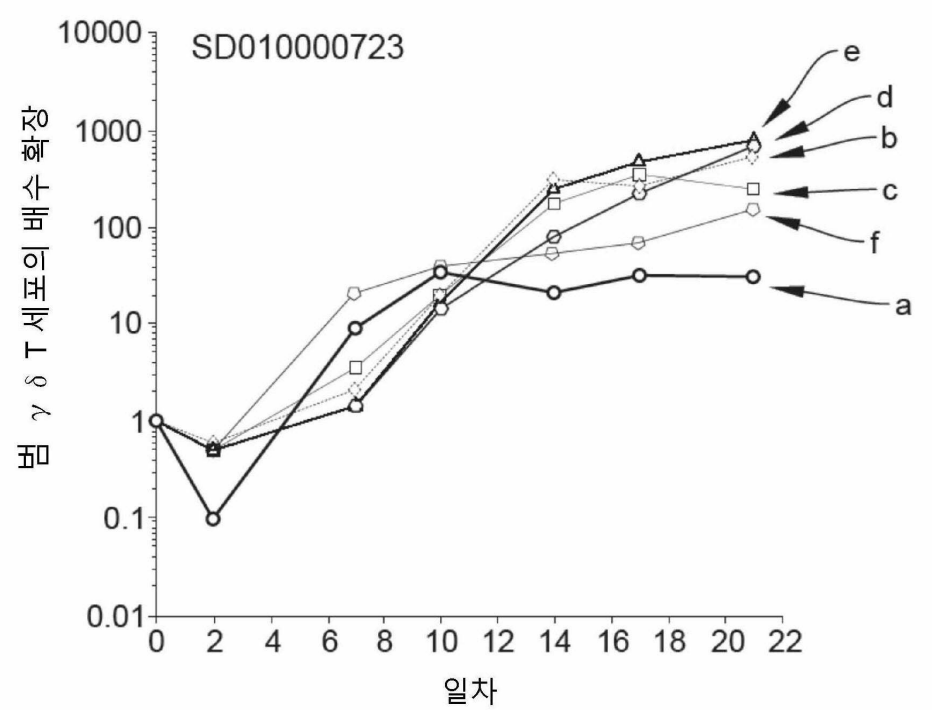
도면46c


CD3+ γ δ TCR+의 CD57+
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
대조군(IL2+IL15)
IL15+IL2
IL18+IL12 프라이밍

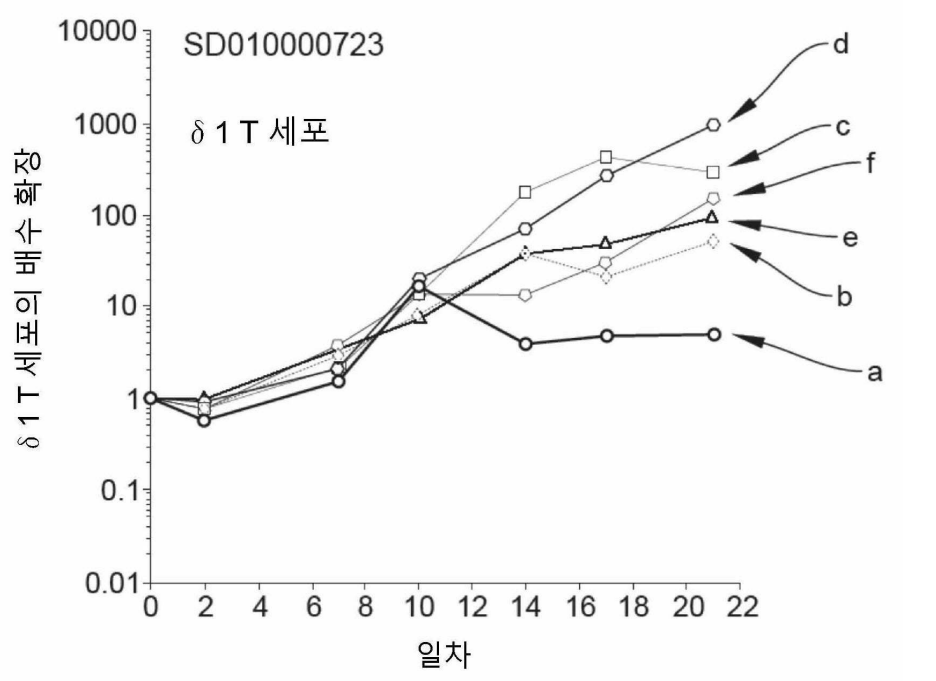
도면47a


D148960
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
범 γ δ T 세포의 배수 확장
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
일차
e
b
d
c
f
a

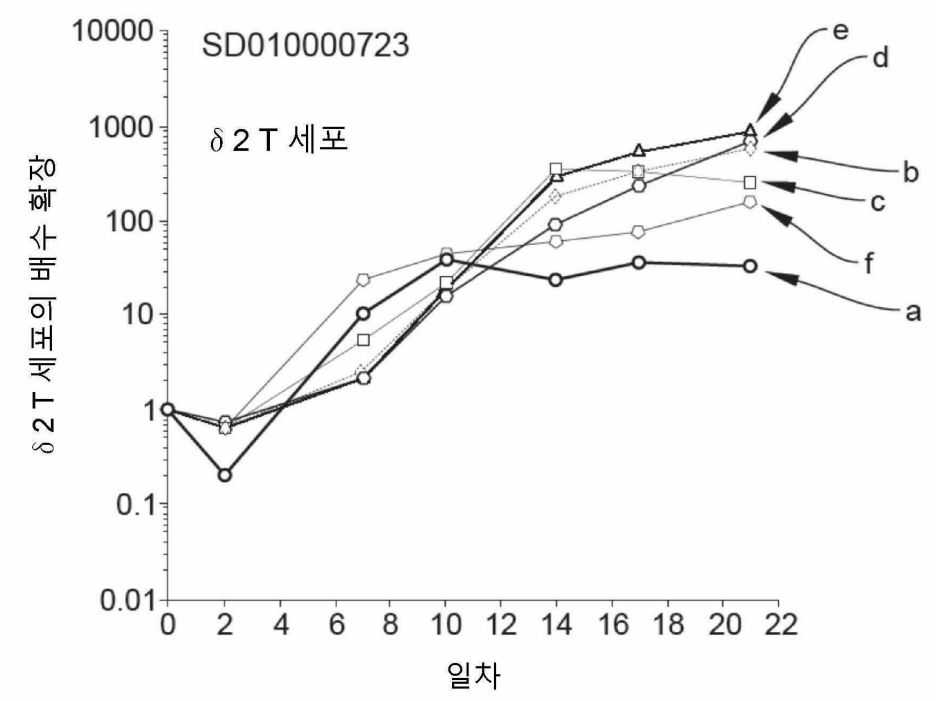
도면47b


SD010000723
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22
일차
범 γδT 세포의 배수 확장
e
d
b
c
f
a

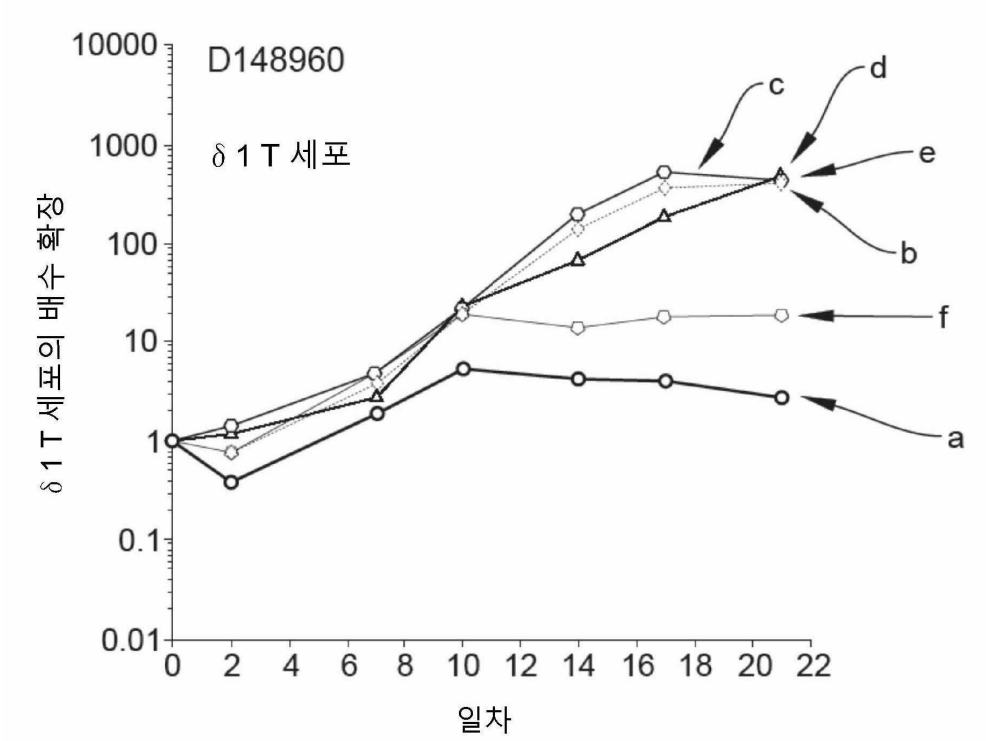
도면48a


SD010000723
δ1T 세포
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22
일차
δ1T 세포의 배수 확장
d
c
f
e
b
a

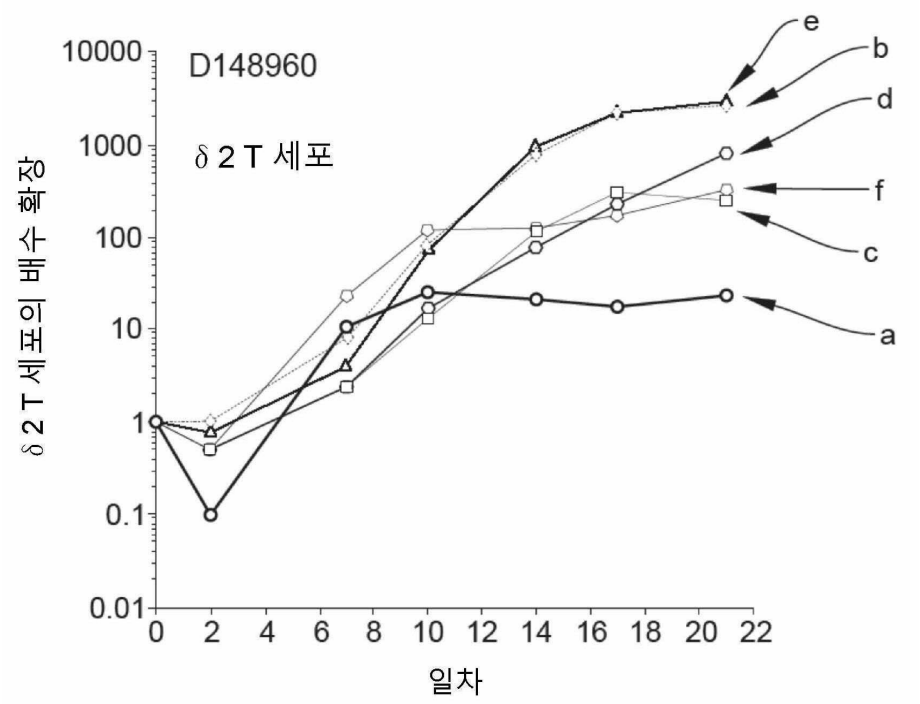
도면48b


SD010000723
δ2T 세포
δ2T 세포의 배수 확장
일차
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
a
b
c
d
e
f

도면49a


D148960
δ1T 세포
δ1T 세포의 배수 확장
일차
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
a
b
c
d
e
f

도면49b



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Immatics US, Inc.

<120> METHODS FOR EXPANDING T CELLS FOR THE TREATMENT OF CANCER AND RELATED MALIGNANCIES

<130> P209WO; 3000011-020977

<140> PCT/US2021/019252

<141> 2021-02-23

<150> US 62/980,844

<151> 2020-02-24

<150> US 63/038,008

<151> 2020-06-11

<150> US 63/082,881

<151> 2020-09-24

<160> 167

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 559

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RD114TR Fusion Protein

<400

> 1

Met Lys Leu Pro Thr Gly Met Val Ile Leu Cys Ser Leu Ile Ile Val
1 5 10 15

Arg Ala Gly Phe Asp Asp Pro Arg Lys Ala Ile Ala Leu Val Gln Lys
20 25 30

Gln His Gly Lys Pro Cys Glu Cys Ser Gly Gly Gln Val Ser Glu Ala
35 40 45

Pro Pro Asn Ser Ile Gln Gln Val Thr Cys Pro Gly Lys Thr Ala Tyr
50 55 60

Leu Met Thr Asn Gln Lys Trp Lys Cys Arg Val Thr Pro Lys Ile Ser
65 70 75 80

Pro Ser Gly Gly Glu Leu Gln Asn Cys Pro Cys Asn Thr Phe Gln Asp
85 90 95

Ser Met His Ser Ser Cys Tyr Thr Glu Tyr Arg Gln Cys Arg Arg Ile
100 105 110

Asn Lys Thr Tyr Tyr Thr Ala Thr Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly Ser
115 120 125

Leu Asn Glu Val Gln Ile Leu Gln Asn Pro Asn Gln Leu Leu Gln Ser
130 135 140

Pro Cys Arg Gly Ser Ile Asn Gln Pro Val Cys Trp Ser Ala Thr Ala
145 150 155 160

Pro Ile His Ile Ser Asp Gly Gly Gly Pro Leu Asp Thr Lys Arg Val
165 170 175

Trp Thr Val Gln Lys Arg Leu Glu Gln Ile His Lys Ala Met Thr Pro
180 185 190

Glu Leu Gln Tyr His Pro Leu Ala Leu Pro Lys Val Arg Asp Asp Leu
195 200 205

Ser Leu Asp Ala Arg Thr Phe Asp Ile Leu Asn Thr Thr Phe Arg Leu
210 215 220

Leu Gln Met Ser Asn Phe Ser Leu Ala Gln Asp Cys Trp Leu Cys Leu
225 230 235 240
Lys Leu Gly Thr Pro Thr Pro Leu Ala Ile Pro Thr Pro Ser Leu Thr
245 250 255

Tyr Ser Leu Ala Asp Ser Leu Ala Asn Ala Ser Cys Gln Ile Ile Pro
260 265 270
Pro Leu Leu Val Gln Pro Met Gln Phe Ser Asn Ser Ser Cys Leu Ser
275 280 285
Ser Pro Phe Ile Asn Asp Thr Glu Gln Ile Asp Leu Gly Ala Val Thr
290 295 300
Phe Thr Asn Cys Thr Ser Val Ala Asn Val Ser Ser Pro Leu Cys Ala
305 310 315 320

Leu Asn Gly Ser Val Phe Leu Cys Gly Asn Asn Met Ala Tyr Thr Tyr
325 330 335
Leu Pro Gln Asn Trp Thr Arg Leu Cys Val Gln Ala Ser Leu Leu Pro
340 345 350
Asp Ile Asp Ile Asn Pro Gly Asp Glu Pro Val Pro Ile Pro Ala Ile
355 360 365
Asp His Tyr Ile His Arg Pro Lys Arg Ala Val Gln Phe Ile Pro Leu
370 375 380

Leu Ala Gly Leu Gly Ile Thr Ala Ala Phe Thr Thr Gly Ala Thr Gly
385 390 395 400
Leu Gly Val Ser Val Thr Gln Tyr Thr Lys Leu Ser His Gln Leu Ile
405 410 415
Ser Asp Val Gln Val Leu Ser Gly Thr Ile Gln Asp Leu Gln Asp Gln
420 425 430
Val Asp Ser Leu Ala Glu Val Val Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp
435 440 445

Leu Leu Thr Ala Glu Gln Gly Gly Ile Cys Leu Ala Leu Gln Glu Lys
450 455 460
Cys Cys Phe Tyr Ala Asn Lys Ser Gly Ile Val Arg Asn Lys Ile Arg

465 470 475 480

Thr Leu Gln Glu Glu Leu Gln Lys Arg Arg Glu Ser Leu Ala Ser Asn

485 490 495

Pro Leu Trp Thr Gly Leu Gln Gly Phe Leu Pro Tyr Leu Leu Pro Leu

500 505 510

Leu Gly Pro Leu Leu Thr Leu Leu Leu Ile Leu Thr Ile Gly Pro Cys

515 520 525

Val Phe Asn Arg Leu Val Gln Phe Val Lys Asp Arg Ile Ser Val Val

530 535 540

Gln Ala Leu Val Leu Thr Gln Gln Tyr His Gln Leu Lys Pro Leu

545 550 555

<210> 2

<211> 662

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Feline Endogeneous Virus

<400> 2

Met Lys Pro Pro Ala Gly Met Val Phe Leu Trp Val Leu Thr Ser Leu

1 5 10 15

Gly Ala Gly Ile Gly Ala Lys Ile Val Lys Glu Gly Asn Pro His Gln

20 25 30

Val Tyr Thr Leu Thr Trp Gln Ile Tyr Ser Gln Ser Gly Glu Val Val

35 40 45

Trp Glu Val Gln Gly Asn His Ala Leu Asn Thr Trp Trp Pro Pro Leu

50 55 60

Thr Pro Asp Phe Cys Gln Leu Ala Ala Gly Leu Asp Thr Trp Asp Ile

65 70 75 80

Pro Ala Arg Ser Pro Lys Asn Leu Gln Ser Tyr Met Gly Glu Arg Ile

85 90 95

Gln Gln Met Thr Ala His Gly Cys Ser Ser Pro Thr Ala Arg Cys Arg

100 105 110

Leu Ala Gln Ala Glu Phe Tyr Val Cys Pro Arg Asp Asn Arg Asp Arg

115 120 125

Ala Thr Ala His Arg Cys Gly Gly Tyr Glu Glu Tyr Phe Cys Ser Ala

130 135 140

Trp Gly Cys Glu Thr Thr Gly Asp Ala Tyr Trp Gln Pro Thr Ser Ser

145 150 155 160

Trp Asp Leu Ile Thr Ile Thr Arg Gly Tyr Thr Lys Pro Asp Pro Asp

165 170 175

Gly His Thr Cys Tyr Tyr Lys Lys Gly Thr Glu Gly Tyr His His Trp

180 185 190

Ile Ser Pro Leu Ser Leu Pro Leu Lys Ile Thr Phe Thr Asp Ser Gly

195 200 205

Lys Arg Ala Leu Gly Trp Gln Thr Gly Tyr Thr Trp Gly Leu Arg Trp

210 215 220

Tyr Leu Pro Gly Lys Asp Arg Gly Ile Val Leu Lys Ile Lys Leu Lys

225 230 235 240

Ile Asp Thr Ile Thr Gln Thr Val Gly Pro Asn Leu Val Leu Ala Asp

245 250 255

Gln Lys Ala Pro Val Gln Leu Ala Ile Pro Val Gln Pro Pro Arg Ala

260 265 270

Pro Thr Gln Thr Pro Gly Ile Asn Pro Val Asn Ser Thr Leu Ser Pro

275 280 285

Ser Leu Gly Tyr Pro Thr Pro Pro Leu Asp Arg Ala Gln Gly Asp Arg

290 295 300

Leu Leu Asn Leu Val Gln Gly Val Tyr Leu Thr Leu Asn Leu Thr Ala

305 310 315 320

Pro Asn Gln Thr Gln Asp Cys Trp Leu Cys Leu Thr Ala Lys Pro Pro

325 330 335

Tyr Tyr Gln Gly Val Ala Ile Ile Gly Asn Phe Thr Asn His Thr Asn

340 345 350

Ala Pro Leu Arg Cys Ser Thr Thr Pro Arg His Gly Leu Thr Leu Thr

355 360 365

Glu Val Thr Gly His Gly Leu Cys Ile Gly Lys Ile Pro Pro Ser His
370 375 380
Gln Asn Leu Cys Ser Gln Thr Ile Pro Ser Val Gly Gln Gly Pro Tyr

385 390 395 400
Tyr Leu Thr Ala Pro Asn Gly Thr Tyr Trp Val Cys Asn Thr Gly Leu
405 410 415
Thr Pro Cys Ile Ser Leu Gln Val Leu Asn Asn Thr Ala Asp Tyr Cys
420 425 430
Ile Leu Ile Glu Leu Trp Pro Lys Ile Phe Tyr His Asp Ser Glu Tyr
435 440 445
Ile Tyr Gly His Tyr Glu Pro Gly Gly Arg Phe Arg Arg Glu Pro Val

450 455 460
Ser Leu Thr Val Ala Leu Leu Leu Gly Gly Leu Thr Met Gly Ser Leu
465 470 475 480
Ala Ala Gly Ile Gly Thr Gly Thr Ala Ala Leu Ile Glu Thr Asn Gln
485 490 495
Phe Lys Gln Leu Gln Ile Ala Met His Ser Asp Ile Gln Ala Leu Glu
500 505 510
Glu Ser Ile Ser Ala Leu Glu Arg Ser Leu Thr Ser Leu Ser Glu Val

515 520 525
Val Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp Leu Leu Phe Leu Gln Glu Gly
530 535 540
Gly Leu Cys Ala Ala Leu Lys Glu Glu Cys Cys Phe Tyr Ala Asp His
545 550 555 560
Thr Gly Ile Val Arg Asp Ser Met Ala Lys Leu Arg Glu Arg Leu Lys
565 570 575
Gln Arg Gln Lys Leu Phe Glu Ser Gln Gln Gly Trp Phe Glu Gly Trp

580 585 590
Tyr Asn Lys Ser Pro Trp Phe Thr Thr Leu Val Ser Ser Leu Met Gly
595 600 605
Pro Leu Ile Leu Leu Leu Leu Ile Leu Met Phe Gly Pro Cys Ile Leu

610 615 620

Asn Arg Leu Val Gln Phe Ile Arg Glu Arg Leu Ser Val Ile Gln Ala

625 630 635 640

Leu Val Leu Thr Gln Gln Tyr His Gln Leu Arg Gln Phe Asp Ala Glu

645 650 655

Arg Pro Asp Thr Ile Glu

660

<210> 3

<211> 511

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Vesicular Stomatitis Virus

<400> 3

Met Lys Cys Leu Leu Tyr Leu Ala Phe Leu Phe Ile Gly Val Asn Cys

1 5 10 15

Lys Phe Thr Ile Val Phe Pro His Asn Gln Lys Gly Asn Trp Lys Asn

20 25 30

Val Pro Ser Asn Tyr His Tyr Cys Pro Ser Ser Ser Asp Leu Asn Trp

35 40 45

His Asn Asp Leu Ile Gly Thr Ala Leu Gln Val Lys Met Pro Lys Ser

50 55 60

His Lys Ala Ile Gln Ala Asp Gly Trp Met Cys His Ala Ser Lys Trp

65 70 75 80

Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His

85 90 95

Ser Ile Arg Ser Phe Thr Pro Ser Val Glu Gln Cys Lys Glu Ser Ile

100 105 110

Glu Gln Thr Lys Gln Gly Thr Trp Leu Asn Pro Gly Phe Pro Pro Gln

115 120 125

Ser Cys Gly Tyr Ala Thr Val Thr Asp Ala Glu Ala Val Ile Val Gln

130 135 140

Val Thr Pro His His Val Leu Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp Val

145 150 155 160

Asp Ser Gln Phe Ile Asn Gly Lys Cys Ser Asn Tyr Ile Cys Pro Thr

165 170 175

Val His Asn Ser Thr Thr Trp His Ser Asp Tyr Lys Val Lys Gly Leu

180 185 190

Cys Asp Ser Asn Leu Ile Ser Met Asp Ile Thr Phe Phe Ser Glu Asp

195 200 205

Gly Glu Leu Ser Ser Leu Gly Lys Glu Gly Thr Gly Phe Arg Ser Asn

210 215 220

Tyr Phe Ala Tyr Glu Thr Gly Gly Lys Ala Cys Lys Met Gln Tyr Cys

225 230 235 240

Lys His Trp Gly Val Arg Leu Pro Ser Gly Val Trp Phe Glu Met Ala

245 250 255

Asp Lys Asp Leu Phe Ala Ala Ala Arg Phe Pro Glu Cys Pro Glu Gly

260 265 270

Ser Ser Ile Ser Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Asp Val Ser Leu Ile

275 280 285

Gln Asp Val Glu Arg Ile Leu Asp Tyr Ser Leu Cys Gln Glu Thr Trp

290 295 300

Ser Lys Ile Arg Ala Gly Leu Pro Ile Ser Pro Val Asp Leu Ser Tyr

305 310 315 320

Leu Ala Pro Lys Asn Pro Gly Thr Gly Pro Ala Phe Thr Ile Ile Asn

325 330 335

Gly Thr Leu Lys Tyr Phe Glu Thr Arg Tyr Ile Arg Val Asp Ile Ala

340 345 350

Ala Pro Ile Leu Ser Arg Met Val Gly Met Ile Ser Gly Thr Thr Thr

355 360 365

Glu Arg Glu Leu Trp Asp Asp Trp Ala Pro Tyr Glu Asp Val Glu Ile

370 375 380

Gly Pro Asn Gly Val Leu Arg Thr Ser Ser Gly Tyr Lys Phe Pro Leu

385 390 395 400

Tyr Met Ile Gly His Gly Met Leu Asp Ser Asp Leu His Leu Ser Ser
405 410 415
Lys Ala Gln Val Phe Glu His Pro His Ile Gln Asp Ala Ala Ser Gln

420 425 430
Leu Pro Asp Asp Glu Ser Leu Phe Phe Gly Asp Thr Gly Leu Ser Lys
435 440 445
Asn Pro Ile Glu Leu Val Glu Gly Trp Phe Ser Ser Trp Lys Ser Ser
450 455 460
Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile Ile Gly Leu Ile Ile Gly Leu Phe Leu
465 470 475 480
Val Leu Arg Val Gly Ile His Leu Cys Ile Lys Leu Lys His Thr Lys

485 490 495
Lys Arg Gln Ile Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
500 505 510

<210> 4
<211> 685
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Gibbon ape leukemia virus
<400> 4
Met Val Leu Leu Pro Gly Ser Met Leu Leu Thr Ser Asn Leu His His
1 5 10 15
Leu Arg His Gln Met Ser Pro Gly Ser Trp Lys Arg Leu Ile Ile Leu
20 25 30

Leu Ser Cys Val Phe Gly Gly Gly Gly Thr Ser Leu Gln Asn Lys Asn
35 40 45
Pro His Gln Pro Met Thr Leu Thr Trp Gln Val Leu Ser Gln Thr Gly
50 55 60
Asp Val Val Trp Asp Thr Lys Ala Val Gln Pro Pro Trp Thr Trp Trp
65 70 75 80
Pro Thr Leu Lys Pro Asp Val Cys Ala Leu Ala Ala Ser Leu Glu Ser

85 90 95

Trp Asp Ile Pro Gly Thr Asp Val Ser Ser Ser Lys Arg Val Arg Pro
100 105 110
Pro Asp Ser Asp Tyr Thr Ala Ala Tyr Lys Gln Ile Thr Trp Gly Ala
115 120 125
Ile Gly Cys Ser Tyr Pro Arg Ala Arg Thr Arg Met Ala Ser Ser Thr
130 135 140
Phe Tyr Val Cys Pro Arg Asp Gly Arg Thr Leu Ser Glu Ala Arg Arg
145 150 155 160

Cys Gly Gly Leu Glu Ser Leu Tyr Cys Lys Glu Trp Asp Cys Glu Thr
165 170 175
Thr Gly Thr Gly Tyr Trp Leu Ser Lys Ser Ser Lys Asp Leu Ile Thr
180 185 190
Val Lys Trp Asp Gln Asn Ser Glu Trp Thr Gln Lys Phe Gln Gln Cys
195 200 205
His Gln Thr Gly Trp Cys Asn Pro Leu Lys Ile Asp Phe Thr Asp Lys
210 215 220

Gly Lys Leu Ser Lys Asp Trp Ile Thr Gly Lys Thr Trp Gly Leu Arg
225 230 235 240
Phe Tyr Val Ser Gly His Pro Gly Val Gln Phe Thr Ile Arg Leu Lys
245 250 255
Ile Thr Asn Met Pro Ala Val Ala Val Gly Pro Asp Leu Val Leu Val
260 265 270
Glu Gln Gly Pro Pro Arg Thr Ser Leu Ala Leu Pro Pro Pro Leu Pro
275 280 285

Pro Arg Glu Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Asp Ser Asn Ser Thr Ala
290 295 300
Leu Ala Thr Ser Ala Gln Thr Pro Thr Val Arg Lys Thr Ile Val Thr
305 310 315 320
Leu Asn Thr Pro Pro Pro Thr Thr Gly Asp Arg Leu Phe Asp Leu Val
325 330 335

Gln Gly Ala Phe Leu Thr Leu Asn Ala Thr Asn Pro Gly Ala Thr Glu
340 345 350

Ser Cys Trp Leu Cys Leu Ala Met Gly Pro Pro Tyr Tyr Glu Ala Ile
355 360 365
Ala Ser Ser Gly Glu Val Ala Tyr Ser Thr Asp Leu Asp Arg Cys Arg
370 375 380
Trp Gly Thr Gln Gly Lys Leu Thr Leu Thr Glu Val Ser Gly His Gly
385 390 395 400
Leu Cys Ile Gly Lys Val Pro Phe Thr His Gln His Leu Cys Asn Gln
405 410 415

Thr Leu Ser Ile Asn Ser Ser Gly Asp His Gln Tyr Leu Leu Pro Ser
420 425 430
Asn His Ser Trp Trp Ala Cys Ser Thr Gly Leu Thr Pro Cys Leu Ser
435 440 445
Thr Ser Val Phe Asn Gln Thr Arg Asp Phe Cys Ile Gln Val Gln Leu
450 455 460
Ile Pro Arg Ile Tyr Tyr Tyr Pro Glu Glu Val Leu Leu Gln Ala Tyr
465 470 475 480

Asp Asn Ser His Pro Arg Thr Lys Arg Glu Ala Val Ser Leu Thr Leu
485 490 495
Ala Val Leu Leu Gly Leu Gly Ile Thr Ala Gly Ile Gly Thr Gly Ser
500 505 510
Thr Ala Leu Ile Lys Gly Pro Ile Asp Leu Gln Gln Gly Leu Thr Ser
515 520 525
Leu Gln Ile Ala Ile Asp Ala Asp Leu Arg Ala Leu Gln Asp Ser Val
530 535 540

Ser Lys Leu Glu Asp Ser Leu Thr Ser Leu Ser Glu Val Val Leu Gln
545 550 555 560
Asn Arg Arg Gly Leu Asp Leu Leu Phe Leu Lys Glu Gly Gly Leu Cys
565 570 575
Ala Ala Leu Lys Glu Glu Cys Cys Phe Tyr Ile Asp His Ser Gly Ala

580 585 590

Val Arg Asp Ser Met Lys Lys Leu Lys Glu Lys Leu Asp Lys Arg Gln

595 600 605

Leu Glu Arg Gln Lys Ser Gln Asn Trp Tyr Glu Gly Trp Phe Asn Asn

610 615 620

Ser Pro Trp Phe Thr Thr Leu Leu Ser Thr Ile Ala Gly Pro Leu Leu

625 630 635 640

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ile Leu Gly Pro Cys Ile Ile Asn Lys Leu

645 650 655

Val Gln Phe Ile Asn Asp Arg Ile Ser Ala Val Lys Ile Leu Val Leu

660 665 670

Arg Gln Lys Tyr Gln Ala Leu Glu Asn Glu Gly Asn Leu

675 680 685

<210> 5

<211> 565

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RD114TR fusion protein

<400> 5

Met Lys Leu Pro Thr Gly Met Val Ile Leu Cys Ser Leu Ile Ile Val

1 5 10 15

Arg Ala Gly Phe Asp Asp Pro Arg Lys Ala Ile Ala Leu Val Gln Lys

20 25 30

Gln His Gly Lys Pro Cys Glu Cys Ser Gly Gly Gln Val Ser Glu Ala

35 40 45

Pro Pro Asn Ser Ile Gln Gln Val Thr Cys Pro Gly Lys Thr Ala Tyr

50 55 60

Leu Met Thr Asn Gln Lys Trp Lys Cys Arg Val Thr Pro Lys Asn Leu

65 70 75 80

Thr Pro Ser Gly Gly Glu Leu Gln Asn Cys Pro Cys Asn Thr Phe Gln

85 90 95

Asp Ser Met His Ser Ser Cys Tyr Thr Glu Tyr Arg Gln Cys Arg Ala

100 105 110

Asn Asn Lys Thr Tyr Tyr Thr Ala Thr Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly

115 120 125

Ser Leu Asn Glu Val Gln Ile Leu Gln Asn Pro Asn Gln Leu Leu Gln

130 135 140

Ser Pro Cys Arg Gly Ser Ile Asn Gln Pro Val Cys Trp Ser Ala Thr

145 150 155 160

Ala Pro Ile His Ile Ser Asp Gly Gly Gly Pro Leu Asp Thr Lys Arg

165 170 175

Val Trp Thr Val Gln Lys Arg Leu Glu Gln Ile His Lys Ala Met His

180 185 190

Pro Glu Leu Gln Tyr His Pro Leu Ala Leu Pro Lys Val Arg Asp Asp

195 200 205

Leu Ser Leu Asp Ala Arg Thr Phe Asp Ile Leu Asn Thr Thr Phe Arg

210 215 220

Leu Leu Gln Met Ser Asn Phe Ser Leu Ala Gln Asp Cys Trp Leu Cys

225 230 235 240

Leu Lys Leu Gly Thr Pro Thr Pro Leu Ala Ile Pro Thr Pro Ser Leu

245 250 255

Thr Tyr Ser Leu Ala Asp Ser Leu Ala Asn Ala Ser Cys Gln Ile Ile

260 265 270

Pro Pro Leu Leu Val Gln Pro Met Gln Phe Ser Asn Ser Ser Cys Leu

275 280 285

Ser Ser Pro Phe Ile Asn Asp Thr Glu Gln Ile Asp Leu Gly Ala Val

290 295 300

Thr Phe Thr Asn Cys Thr Ser Val Ala Asn Val Ser Ser Pro Leu Cys

305 310 315 320

Ala Leu Asn Gly Ser Val Phe Leu Cys Gly Asn Asn Met Ala Tyr Thr

325 330 335

Tyr Leu Pro Gln Asn Trp Thr Gly Leu Cys Val Gln Ala Ser Leu Leu

340 345 350

Pro Asp Ile Asp Ile Ile Pro Gly Asp Glu Pro Val Pro Ile Pro Ala

355 360 365

Ile Asp His Tyr Ile His Arg Pro Lys Arg Ala Val Gln Phe Ile Pro

370 375 380

Leu Leu Ala Gly Leu Gly Ile Thr Ala Ala Phe Thr Thr Gly Ala Thr

385 390 395 400

Gly Leu Gly Val Ser Val Thr Gln Tyr Thr Lys Leu Ser His Gln Leu

405 410 415

Ile Ser Asp Val Gln Val Leu Ser Gly Thr Ile Gln Asp Leu Gln Asp

420 425 430

Gln Val Asp Ser Leu Ala Glu Val Val Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu

435 440 445

Asp Leu Leu Thr Ala Glu Gln Gly Gly Ile Cys Leu Ala Leu Gln Glu

450 455 460

Lys Cys Cys Phe Tyr Ala Asn Lys Ser Gly Ile Val Arg Asn Lys Ile

465 470 475 480

Arg Thr Leu Gln Glu Glu Leu Gln Lys Arg Arg Glu Ser Leu Ala Ser

485 490 495

Asn Pro Leu Trp Thr Gly Leu Gln Gly Phe Leu Pro Tyr Leu Leu Pro

500 505 510

Leu Leu Gly Pro Leu Leu Thr Leu Leu Leu Ile Leu Thr Ile Gly Pro

515 520 525

Cys Val Phe Ser Arg Leu Met Ala Phe Ile Asn Asp Arg Leu Asn Val

530 535 540

Val His Ala Met Val Leu Ala Gln Gln Tyr Gln Ala Leu Lys Ala Glu

545 550 555 560

Glu Glu Ala Gln Asp

565

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Tyr Leu Tyr Asp Ser Glu Thr Lys Asn Ala

1 5 10

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

His Leu Met Asp Gln Pro Leu Ser Val

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Gly Leu Leu Lys Lys Ile Asn Ser Val

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Phe Leu Val Asp Gly Ser Ser Ala Leu

1 5

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Phe Leu Phe Asp Gly Ser Ala Asn Leu Val

1 5 10

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Phe Leu Tyr Lys Ile Ile Asp Glu Leu

1 5

<210> 12

<211> 11

<212

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Phe Ile Leu Asp Ser Ala Glu Thr Thr Thr Leu

1 5 10

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Ser Val Asp Val Ser Pro Pro Lys Val

1 5

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Val Ala Asp Lys Ile His Ser Val

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Ile Val Asp Asp Leu Thr Ile Asn Leu

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Gly Leu Leu Glu Glu Leu Val Thr Val

1 5

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Thr Leu Asp Gly Ala Ala Val Asn Gln Val

1 5 10

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Ser Val Leu Glu Lys Glu Ile Tyr Ser Ile

1 5 10

<210> 19

<211

> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Leu Leu Asp Pro Lys Thr Ile Phe Leu

1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Tyr Thr Phe Ser Gly Asp Val Gln Leu

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Tyr Leu Met Asp Asp Phe Ser Ser Leu

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Lys Val Trp Ser Asp Val Thr Pro Leu

1 5

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Leu Leu Trp Gly His Pro Arg Val Ala Leu Ala

1 5 10

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Lys Ile Trp Glu Glu Leu Ser Val Leu Glu Val

1 5 10

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Leu Leu Ile Pro Phe Thr Ile Phe Met

1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Phe Leu Ile Glu Asn Leu Leu Ala Ala

1 5

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Leu Leu Trp Gly His Pro Arg Val Ala Leu Ala

1 5 10

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Phe Leu Leu Glu Arg Glu Gln Leu Leu

1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Ser Leu Ala Glu Thr Ile Phe Ile Val

1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Thr Leu Leu Glu Gly Ile Ser Arg Ala

1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Ile Leu Gln Asp Gly Gln Phe Leu Val

1 5

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Val Ile Phe Glu Gly Glu Pro Met Tyr Leu

1 5 10

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Ser Leu Phe Glu Ser Leu Glu Tyr Leu

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Ser Leu Leu Asn Gln Pro Lys Ala Val

1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Gly Leu Ala Glu Phe Gln Glu Asn Val

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Lys Leu Leu Ala Val Ile His Glu Leu

1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu

1 5

<210> 38

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Thr Leu Tyr Asn Pro Glu Arg Thr Ile Thr Val

1 5 10

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Lys Leu Gln Glu Lys Ile Gln Glu Leu

1 5

<210> 40

<211

> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Ser Val Leu Glu Lys Glu Ile Tyr Ser Ile

1 5 10

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Arg Val Ile Asp Asp Ser Leu Val Val Gly Val

1 5 10

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Val Leu Phe Gly Glu Leu Pro Ala Leu

1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400

> 43

Gly Leu Val Asp Ile Met Val His Leu

1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Phe Leu Asn Ala Ile Glu Thr Ala Leu

1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Ala Leu Leu Gln Ala Leu Met Glu Leu

1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Ala Leu Ser Ser Ser Gln Ala Glu Val

1 5

<210> 47

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Ser Leu Ile Thr Gly Gln Asp Leu Leu Ser Val

1 5 10

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Gln Leu Ile Glu Lys Asn Trp Leu Leu

1 5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Leu Leu Asp Pro Lys Thr Ile Phe Leu

1 5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Arg Leu His Asp Glu Asn Ile Leu Leu

1 5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Tyr Thr Phe Ser Gly Asp Val Gln Leu

1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Gly Leu Pro Ser Ala Thr Thr Thr Val

1 5

<210> 53

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Gly Leu Leu Pro Ser Ala Glu Ser Ile Lys Leu

1 5 10

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Lys Thr Ala Ser Ile Asn Gln Asn Val

1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Ser Leu Leu Gln His Leu Ile Gly Leu

1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Tyr Leu Met Asp Asp Phe Ser Ser Leu

1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Leu Met Tyr Pro Tyr Ile Tyr His Val

1 5

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Lys Val Trp Ser Asp Val Thr Pro Leu

1 5

<210> 59

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Leu Leu Trp Gly His Pro Arg Val Ala Leu Ala

1 5 10

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Val Leu Asp Gly Lys Val Ala Val Val

1 5

<210> 61

<211

> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Gly Leu Leu Gly Lys Val Thr Ser Val

1 5

<210> 62

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Lys Met Ile Ser Ala Ile Pro Thr Leu

1 5

<210> 63

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Gly Leu Leu Glu Thr Thr Gly Leu Leu Ala Thr

1 5 10

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Thr Leu Asn Thr Leu Asp Ile Asn Leu

1 5

<210> 65

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Val Ile Ile Lys Gly Leu Glu Glu Ile

1 5

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Tyr Leu Glu Asp Gly Phe Ala Tyr Val

1 5

<210> 67

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Lys Ile Trp Glu Glu Leu Ser Val Leu Glu Val

1 5 10

<210> 68

<211

> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

Leu Leu Ile Pro Phe Thr Ile Phe Met

1 5

<210> 69

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Ile Ser Leu Asp Glu Val Ala Val Ser Leu

1 5 10

<210> 70

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

Lys Ile Ser Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val

1 5 10

<210> 71

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

Lys Leu Ile Gly Asn Ile His Gly Asn Glu Val

1 5 10

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Ile Leu Leu Ser Val Leu His Gln Leu

1 5

<210> 73

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Leu Asp Ser Glu Ala Leu Leu Thr Leu

1 5

<210> 74

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Val Leu Gln Glu Asn Ser Ser Asp Tyr Gln Ser Asn Leu

1 5 10

<210> 75

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

His Leu Leu Gly Glu Gly Ala Phe Ala Gln Val

1 5 10

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Ser Leu Val Glu Asn Ile His Val Leu

1 5

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Tyr Thr Phe Ser Gly Asp Val Gln Leu

1 5

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Ser Leu Ser Glu Lys Ser Pro Glu Val

1 5

<210> 79

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Ala Met Phe Pro Asp Thr Ile Pro Arg Val

1 5 10

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Phe Leu Ile Glu Asn Leu Leu Ala Ala

1 5

<210> 81

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Phe Thr Ala Glu Phe Leu Glu Lys Val

1 5

<210> 82

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Ala Leu Tyr Gly Asn Val Gln Gln Val

1 5

<210> 83

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

Leu Phe Gln Ser Arg Ile Ala Gly Val

1 5

<210> 84

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

Ile Leu Ala Glu Glu Pro Ile Tyr Ile Arg Val

1 5 10

<210> 85

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Phe Leu Leu Glu Arg Glu Gln Leu Leu

1 5

<210> 86

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Leu Leu Leu Pro Leu Glu Leu Ser Leu Ala

1 5 10

<210> 87

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

Ser Leu Ala Glu Thr Ile Phe Ile Val

1 5

<210> 88

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Ala Ile Leu Asn Val Asp Glu Lys Asn Gln Val

1 5 10

<210> 89

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

Arg Leu Phe Glu Glu Val Leu Gly Val

1 5

<210> 90

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

Tyr Leu Asp Glu Val Ala Phe Met Leu

1 5

<210> 91

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

Lys Leu Ile Asp Glu Asp Glu Pro Leu Phe Leu

1 5 10

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

Lys Leu Phe Glu Lys Ser Thr Gly Leu

1 5

<210> 93

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

Ser Leu Leu Glu Val Asn Glu Ala Ser Ser Val

1 5 10

<210> 94

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

Gly Val Tyr Asp Gly Arg Glu His Thr Val

1 5 10

<210> 95

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

Gly Leu Tyr Pro Val Thr Leu Val Gly Val

1 5 10

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

Ala Leu Leu Ser Ser Val Ala Glu Ala

1 5

<210> 97

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

Thr Leu Leu Glu Gly Ile Ser Arg Ala

1 5

<210> 98

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 98

Ser Leu Ile Glu Glu Ser Glu Glu Leu

1 5

<210> 99

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 99

Ala Leu Tyr Val Gln Ala Pro Thr Val

1 5

<210> 100

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 100

Lys Leu Ile Tyr Lys Asp Leu Val Ser Val

1 5 10

<210> 101

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 101

Ile Leu Gln Asp Gly Gln Phe Leu Val

1 5

<210> 102

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 102

Ser Leu Leu Asp Tyr Glu Val Ser Ile

1 5

<210> 103

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 103

Leu Leu Gly Asp Ser Ser Phe Phe Leu

1 5

<210> 104

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 104

Val Ile Phe Glu Gly Glu Pro Met Tyr Leu

1 5 10

<210> 105

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 105

Ala Leu Ser Tyr Ile Leu Pro Tyr Leu

1 5

<210> 106

<211>

9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 106

Phe Leu Phe Val Asp Pro Glu Leu Val

1 5

<210> 107

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 107

Ser Glu Trp Gly Ser Pro His Ala Ala Val Pro

1 5 10

<210> 108

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 108

Ala Leu Ser Glu Leu Glu Arg Val Leu

1 5

<210> 109

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 109

Ser Leu Phe Glu Ser Leu Glu Tyr Leu

1 5

<210> 110

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 110

Lys Val Leu Glu Tyr Val Ile Lys Val

1 5

<210> 111

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

Val Leu Leu Asn Glu Ile Leu Glu Gln Val

1 5 10

<210> 112

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 112

Ser Leu Leu Asn Gln Pro Lys Ala Val

1 5

<210> 113

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 113

Lys Met Ser Glu Leu Gln Thr Tyr Val

1 5

<210> 114

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 114

Ala Leu Leu Glu Gln Thr Gly Asp Met Ser Leu

1 5 10

<210> 115

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 115

Val Ile Ile Lys Gly Leu Glu Glu Ile Thr Val

1 5 10

<210> 116

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 116

Lys Gln Phe Glu Gly Thr Val Glu Ile

1 5

<210> 117

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 117

Lys Leu Gln Glu Glu Ile Pro Val Leu

1 5

<210> 118

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 118

Gly Leu Ala Glu Phe Gln Glu Asn Val

1 5

<210> 119

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 119

Asn Val Ala Glu Ile Val Ile His Ile

1 5

<210> 120

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 120

Ala Leu Ala Gly Ile Val Thr Asn Val

1 5

<210> 121

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 121

Asn Leu Leu Ile Asp Asp Lys Gly Thr Ile Lys Leu

1 5 10

<210> 122

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 122

Val Leu Met Gln Asp Ser Arg Leu Tyr Leu

1 5 10

<210> 123

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 123

Lys Val Leu Glu His Val Val Arg Val

1 5

<210> 124

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 124

Leu Leu Trp Gly Asn Leu Pro Glu Ile

1 5

<210> 125

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 125

Ser Leu Met Glu Lys Asn Gln Ser Leu

1 5

<210> 126

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 126

Lys Leu Leu Ala Val Ile His Glu Leu

1 5

<210> 127

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 127

Ala Leu Gly Asp Lys Phe Leu Leu Arg Val

1 5 10

<210> 128

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 128

Phe Leu Met Lys Asn Ser Asp Leu Tyr Gly Ala

1 5 10

<210> 129

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 129

Lys Leu Ile Asp His Gln Gly Leu Tyr Leu

1 5 10

<210> 130

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 130

Gly Pro Gly Ile Phe Pro Pro Pro Pro Pro Gln Pro

1 5 10

<210> 131

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 131

Ala Leu Asn Glu Ser Leu Val Glu Cys

1 5

<210> 132

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 132

Gly Leu Ala Ala Leu Ala Val His Leu

1 5

<210> 133

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 133

Leu Leu Leu Glu Ala Val Trp His Leu

1 5

<210> 134

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 134

Ser Ile Ile Glu Tyr Leu Pro Thr Leu

1 5

<210> 135

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 135

Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu

1 5

<210> 136

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 136

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys

1 5

<210> 137

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 137

Phe Leu Leu Asp Lys Pro Gln Asp Leu Ser Ile

1 5 10

<210> 138

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 138

Tyr Leu Leu Asp Met Pro Leu Trp Tyr Leu

1 5 10

<210> 139

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 139

Gly Leu Leu Asp Cys Pro Ile Phe Leu

1 5

<210> 140

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 140

Val Leu Ile Glu Tyr Asn Phe Ser Ile

1 5

<210> 141

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 141

Thr Leu Tyr Asn Pro Glu Arg Thr Ile Thr Val

1 5 10

<210> 142

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 142

Ala Val Pro Pro Pro Pro Ser Ser Val

1 5

<210> 143

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 143

Lys Leu Gln Glu Glu Leu Asn Lys Val

1 5

<210> 144

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 144

Lys Leu Met Asp Pro Gly Ser Leu Pro Pro Leu

1 5 10

<210> 145

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 145

Ala Leu Ile Val Ser Leu Pro Tyr Leu

1 5

<210> 146

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 146

Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ala Asn Val

1 5

<210> 147

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 147

Ala Leu Asp Pro Ser Gly Asn Gln Leu Ile

1 5 10

<210> 148

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 148

Ile Leu Ile Lys His Leu Val Lys Val

1 5

<210> 149

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 149

Val Leu Leu Asp Thr Ile Leu Gln Leu

1 5

<210> 150

<211>

9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 150

His Leu Ile Ala Glu Ile His Thr Ala

1 5

<210> 151

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 151

Ser Met Asn Gly Gly Val Phe Ala Val

1 5

<210> 152

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 152

Met Leu Ala Glu Lys Leu Leu Gln Ala

1 5

<210> 153

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 153

Tyr Met Leu Asp Ile Phe His Glu Val

1 5

<210> 154

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 154

Ala Leu Trp Leu Pro Thr Asp Ser Ala Thr Val

1 5 10

<210> 155

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 155

Gly Leu Ala Ser Arg Ile Leu Asp Ala

1 5

<210> 156

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 156

Ala Leu Ser Val Leu Arg Leu Ala Leu

1 5

<210> 157

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 157

Ser Tyr Val Lys Val Leu His His Leu

1 5

<210> 158

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 158

Val Tyr Leu Pro Lys Ile Pro Ser Trp

1 5

<210> 159

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 159

Asn Tyr Glu Asp His Phe Pro Leu Leu

1 5

<210> 160

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 160

Val Tyr Ile Ala Glu Leu Glu Lys Ile

1 5

<210> 161

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 161

Val His Phe Glu Asp Thr Gly Lys Thr Leu Leu Phe

1 5 10

<210> 162

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 162

Val Leu Ser Pro Phe Ile Leu Thr Leu

1 5

<210> 163

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 163

His Leu Leu Glu Gly Ser Val Gly Val

1 5

<210

> 164

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 164

Ala Leu Arg Glu Glu Glu Glu Gly Val

1 5

<210> 165

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 165

Lys Glu Ala Asp Pro Thr Gly His Ser Tyr

1 5 10

<210> 166

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 166

Thr Leu Asp Glu Lys Val Ala Glu Leu

1 5

<210> 167

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TAT peptide

<400> 167

Gly Arg Lys Lys Lys Arg Arg Gln Arg Cys

1 5 10