



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년04월01일

(11) 등록번호 10-2095700

(24) 등록일자 2020년03월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/85 (2006.01) A61K 35/17 (2014.01)
C07K 14/725 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/87 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)

(52) CPC특허분류
C12N 15/85 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-7035444

(22) 출원일자(국제) 2014년05월14일

심사청구일자 2019년05월14일

(85) 번역문제출일자 2015년12월14일

(65) 공개번호 10-2016-0007653

(43) 공개일자 2016년01월20일

(86) 국제출원번호 PCT/US2014/038005

(87) 국제공개번호 WO 2014/186469

국제공개일자 2014년11월20일

(30) 우선권주장

61/823,253 2013년05월14일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

Rowley, J. et al., Eur. J. Immunol. (2009)
39:491-506*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

보드 오브 리전츠, 더 유니버시티 오브 텍사스 시스템

미국 텍사스주 78701 오스틴 웨스트 7번 스트리트 210

(72) 발명자

쿠퍼 로렌스 제이.엔.

미국 텍사스주 77030 휴스턴 유니트 907 홀콤 블러바드 1515

왕-요하닝 펄

미국 텍사스주 78602 바스트롭 쿨 워터 드라이브 650

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

장훈

전체 청구항 수 : 총 28 항

심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 가공된 키메라 항원 수용체 (CAR) T-세포의 인간 적용

(57) 요약

본 발명은 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함하는 변형된 T 세포를 이용한 면역요법을 위한 조성물에 관계한다. 특정 양상에서, CAR-발현 T-세포는 최소 탈체 확대를 필요로 하거나 또는 질환 (가령, 암) 치료를 위해 환자에 직접적으로 투여될 수 있는 CAR-발현 세포의 개체군을 생산하기 위해, 트랜스포존-기초된 통합 시스템과 함께 전기천공을 이용하여 생산된다.

(52) CPC특허분류

C07K 14/7051 (2013.01)

C07K 16/2896 (2013.01)

C12N 15/87 (2013.01)

C12N 5/0636 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C12N 2501/20 (2013.01)

C12N 2501/2301 (2013.01)

C12N 2501/2321 (2013.01)

C12N 2502/11 (2013.01)

(72) 발명자

토리카이 호로키

미국 텍사스주 77030 휴스턴 유니트 907 홀콤 블러
바드 1515

홀스 헬렌

미국 텍사스주 77030 휴스턴 유니트 907 홀콤 블러
바드 1515

허튼 렌카

미국 텍사스주 77030 휴스턴 유니트 907 홀콤 블러
바드 1515

크리슈나무르티 자나니

미국 텍사스주 77030 휴스턴 유니트 907 홀콤 블러
바드 1515

울리바레스 사이몬

미국 텍사스주 77030 휴스턴 유니트 907 홀콤 블러
바드 1515

장 링

미국 텍사스주 77030 휴스턴 유니트 907 홀콤 블러
바드 1515

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 키메라 항원 수용체 (CAR); 및
(b) IL-15 및 IL-15R α 를 포함하는 막 결합 융합 단백질
을 포함하는, 가공된 세포.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 융합 단백질이 상기 IL-15 및 IL-15R α 를 연결하는 링커를 추가로 포함하는, 세포.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 융합 단백질이 서열 번호: 6과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 세포.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 융합 단백질이 서열 번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는, 세포.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 융합 단백질이 서열 번호: 7과 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 DNA에 의해 인코딩되는, 세포.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 융합 단백질이 서열 번호: 7의 서열을 포함하는 DNA에 의해 인코딩되는, 세포.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 CAR을 인코딩하는 DNA가 상기 세포의 유전체 내로 통합되는, 세포.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 융합 단백질을 인코딩하는 DNA가 염색체외 벡터에 포함되는, 세포.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 융합 단백질을 인코딩하는 DNA가 상기 세포의 유전체 내로 통합되는, 세포.

청구항 10

제1항에 따른 하나 이상의 세포들을 포함하는, 암을 치료하는데 사용하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 세포가 암세포 항원을 표적으로 하는 CAR을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

서열 번호: 6과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 IL-15, IL-15R α 융합 단백질.

청구항 16

제15항에 있어서, 서열 번호: 6의 아미노산 서열을 포함하는 융합 단백질.

청구항 17

서열 번호: 6과 적어도 90% 동일한 IL-15, IL-15R α 융합 단백질을 인코딩하는 DNA 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 18

제17항에 있어서, 서열 번호: 7과 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 19

제17항에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는 가공된 세포.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 세포가 T-세포, T-세포 전구체, NK 세포 또는 aAPC인, 세포.

청구항 21

제11항에 있어서, 상기 암세포 항원이 CD19, ROR1, CD56, EGFR, CD123, c-met, GD2, HER2, CD20, MUC-1, CD23 또는 CD30인, 약제학적 조성물.

청구항 22

제11항에 있어서, 상기 암이 백혈병 또는 고형 종양인, 약제학적 조성물.

청구항 23

제2항에 있어서, 상기 링커가 세린-글리신 링커를 추가로 포함하는, 세포.

청구항 24

제1항에 있어서, 상기 융합 단백질이 IgE 신호 펩티드를 추가로 포함하는, 세포.

청구항 25

- (a) 키메라 항원 수용체 (CAR); 및
- (b) IL-15 및 IL-15R α 를 포함하는 융합 단백질을 인코딩하는 DNA를 포함하는, 가공된 세포.

청구항 26

제25항에 있어서, 유전자전위효소를 추가로 포함하는, 세포.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 유전자전위효소가 잠자는 미너 유전자전위효소(Sleeping Beauty transposase)인, 세포.

청구항 28

제26항에 있어서, 상기 유전자전위효소가 DNA 발현 벡터로서 제공되는, 세포.

청구항 29

제26항에 있어서, 상기 유전자전위효소가 잠자는 미녀 유전자전위효소를 인코딩하는 mRNA인, 세포.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 mRNA가 캡, 폴리-A 꼬리 또는 이들 둘 다를 포함하는, 세포.

청구항 31

제2항에 있어서, 상기 융합 단백질이 서열 번호: 6과 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 세포.

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 2013년 5월 14일자 제출된 미국 특허가출원 번호 61/823,253에 우선권을 주장하고, 이것은 본원에서 전체적으로 참조로서 편입된다.

[0002] 본 발명은 국방부에 의해 수여된 보조금 번호 W81XWH-11-1-0002-01 하에 정부 지원을 받아 만들어졌다. 정부는 본 발명에서 일정한 권리를 갖는다.

[0003] 서열 목록의 편입

[0004] 37 KB (Microsoft Windows®에서 계측될 때)이고 2014년 5월 14일자에 작성된 "UTF8.P1222WO_ST25.txt"로 명명된 파일에서 내포되는 서열 목록은 전자 제출에 의해 함께 제출되고 본원에 참조로서 편입된다.

[0005] 발명의 배경

[0006] 1. 발명의 분야

[0007] 본 발명은 약학, 면역학, 세포생물학, 그리고 분자생물학의 분야에 전반적으로 관계한다. 일정한 양상에서, 본 발명의 분야는 면역요법에 관계한다. 더욱 구체적으로, 이것은 임상적-등급 키메라 항원 수용체 (CAR) T 세포의 제조 및 이런 세포를 이용한 치료 방법에 관계한다.

배경 기술

[0008] 2. 관련된 기술의 설명

[0009] 임상적-등급 T 세포의 효능은 유전자 요법을 면역요법과 합동하여, (i) 종양-연관된 항원 (TAAs)의 우수한 인식에 대한 잠재력, (ii) 주입 후 존속, (iii) 종양 부위로의 이주에 대한 잠재력, 그리고 (iv) 종양 미세환경 내에서 작동체 기능을 재활용하는 능력을 갖는 생물학적 산물을 가공함으로써 향상될 수 있다. 유전자 요법과 면역요법의 이런 조합은 B-계통 항원에 대한 T 세포의 특이성을 전향시킬 수 있고, 그리고 진행된 B-세포 악성을 앓는 환자는 이런 종양 특이적 T 세포의 주입으로부터 이익을 얻는다 (Jena *et al.*, 2010; Till *et al.*, 2008; Porter *et al.*, 2011; Brentjens *et al.*, 2011; Cooper and Bollard, 2012; Kalos *et al.*, 2011; Kochenderfer *et al.*, 2010; Kochenderfer *et al.*, 2012; Brentjens *et al.*, 2013). 인간 적용을 위해 가공된 T 세포의 유전자 조작에 대한 대부분의 접근법은 키메라 항원 수용체 (CAR)의 안정된 발현을 위해 레트로바이러스와 렌티바이러스를 이용하였다 (Jena *et al.*, 2010; Ertl *et al.*, 2011; Kohn *et al.*, 2011). 이러한 접근법은 비록 현재 의약품 제조 품질 관리 기준 (cGMP)에 부합하긴 하지만, 제한된 숫자의 생산 시설로부터 임상적-등급 재조합 바이러스의 제조와 방출에 의존하기 때문에 많은 비용이 들어갈 수 있다. 혈액학적 악성 및 고형 종양에 대한 특이성을 갖는 유전적으로-변형된 임상적-등급 T 세포 산물을 산출하기 위한 새로운 방법이 필요하다.

발명의 내용

[0010] 발명의 요약

[0011] 첫 번째 구체예에서, 질환을 앓는 인간 개체에서 T-세포 반응을 제공하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 개체로부터 세포의 표본 (T-세포 또는 T-세포 선조체 포함)을 획득하고; 이들 세포를 세포의 유전체 내로 통합할 수 있는, 키메라 T 세포 수용체 (CAR)를 인코딩하는 핵산으로 형질감염시키고, 그리고 효과량의 유전자도입 세포를 개체에 투여하여 T-세포 반응을 제공하는 것을 포함한다.

[0012] 따라서, 일부 양상에서, 구체예의 방법은 다음을 포함한다: (a) 개체로부터 세포의 표본을 획득하고, 상기 표본은 T-세포 또는 T-세포 선조체를 포함하고; (b) 이들 세포를 트랜스포손-접하는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 인코딩하는 DNA 및 CAR을 인코딩하는 DNA를 세포의 유전체 내로 통합하는데 효과적인 유전자전위효소로 형질감염시켜, 유전자도입 CAR-발현 세포의 개체군을 제공하고; (c) 임의선택적으로, CAR-발현 T-세포의 증식을 선별적으로 증강하는 배지에서 탈체에서 유전자도입 CAR 세포의 개체군을 배양하고, 여기서 유전자도입 CAR 세포는 적어도, 21 일 이내 배양되고; 그리고 (d) 효과량의 유전자도입 CAR 세포를 개체에 투여하여 T-세포 반응을 제공한다. 따라서, 일부 양상에서, 유전자도입 CAR 세포는 21 일보다 적게, 예를 들면, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 일 또는 그 이하보다 적게 탈체에서 배양된다. 일정한 양상에서, CAR 세포는 3 내지 5 일 이내로 탈체에서 배양된다. 또 다른 양상에서, 본 발명 방법의 단계 (a)-(d) (즉, 세포 표본의 획득에서부터 CAR T 세포의 투여까지)는 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 또는 5 일 이내에 완결된다.

[0013] 추가의 양상에서, 구체예에 따라 질환을 앓는 인간 개체에서 T-세포 반응을 제공하는 방법은 다음을 포함한다: (a) 개체로부터 세포의 표본을 획득하고, 상기 표본은 T-세포 또는 T-세포 선조체를 포함하고, 그리고 개체로부터 획득될 때 약 20과 200 ml 사이에 초기 부피를 갖고; (b) 이들 세포를 트랜스포손-접하는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 인코딩하는 DNA 및 CAR을 인코딩하는 DNA를 세포의 유전체 내로 통합하는데 효과적인 유전자전위효소로 형질감염시켜, 유전자도입 CAR-발현 T-세포의 개체군을 제공하고; (c) 임의선택적으로, CAR-발현 T-세포의 증식을 선별적으로 증강하는 배지에서 탈체에서 유전자도입 CAR 세포의 개체군을 배양하고; 그리고 (d) 효과량의 유전자도입 CAR T-세포를 개체에 투여하여 T-세포 반응을 제공한다. 가령, 개체로부터 세포의 표본은 약 200 ml보다 적은 말초혈 또는 체대혈의 표본일 수 있다. 일부 양상에서, 표본은 성분채집술에 의해 수집될 수 있다. 하지만, 일정한 바람직한 양상에서, 표본은 성분채집술을 수반하지 않는 방법 (가령, 정맥천자)에 의해 수집된다. 또 다른 양상에서, 세포의 표본은 약 175, 150, 125, 100, 75, 50 또는 25 ml보다 적은 초기 부피를 갖는다 (가령, 세포의 표본은 개체로부터 획득될 때, 약 50과 200 ml, 50과 100ml, 또는 100과 200 ml 사이에 초기

부피를 갖는다).

- [0014] 추가 구체예에서, HERV-K의 외피 단백질에 표적화된 발현된 CAR을 포함하는 단리된 유전자도입 세포가 제공된다. 일정한 양상에서, 이들 세포는 세포의 유전체 내로 통합된 CAR을 인코딩하는 DNA (가령, 트랜스포손 반복 서열에 의해 접하는 CAR DNA)를 포함한다. 가령, CAR 서열은 단일클론 항체 6H5의 CDR 서열 (가령, CDR 1-6) 또는 단일클론 항체 6H5의 scFv 서열을 포함할 수 있다. 일부 양상에서, HERV-K-표적화된 CAR은 서열 번호: 4의 아미노산 서열과 최소한 85% 동일하다 (가령, 서열 번호: 4와 최소한 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 서열). 일정한 양상에서, 구체예의 세포 (가령, 인간 HERV-K-표적화된 CAR 세포)는 HERV-K-발현 암을 갖는 개체를 치료하는데 (또는 개체에서 면역 반응을 제공하는데) 이용될 수 있다.
- [0015] 또 다른 추가의 구체예에서, 발현된 CAR 및 발현된 막-결합된 IL-15를 포함하는 단리된 유전자도입 세포가 제공된다. 가령, 일부 양상에서, 막-결합된 IL-15는 IL-15와 IL-15R α 사이에 융합 단백질을 포함한다. 다른 추가 양상에서, 막-결합된 IL-15는 서열 번호: 6 (mIL15로서 본원에서 지칭됨)과 최소한 약 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 본원에서 더욱 상술된 바와 같이, 일부 경우에, 막-결합된 IL-15는 RNA 또는 DNA (가령, 염색체의 또는 에피솜 벡터)에 의해 인코딩된다. 일정한 양상에서, 세포는 세포의 유전체 내로 통합된 막-결합된 IL-15를 인코딩하는 DNA (가령, 트랜스포손 반복 서열에 의해 접하는 코딩 DNA)를 포함한다. 일정한 양상에서, 구체예의 세포 (가령, 막-결합된 사이토킨을 발현하는 인간 CAR 세포)는 낮은 수준의 표적 항원을 갖는 개체, 예를 들면, 최소 잔존 질환 (본원에서 더욱 상술된 바와 같이)을 앓는 개체를 치료하는데 (또는 개체에서 면역 반응을 제공하는데) 이용될 수 있다.
- [0016] 일부 양상에서, 구체예의 방법은 이들 세포를 키메라 T 세포 수용체 (CAR)를 인코딩하는 DNA 및 일부 경우에, 유전자전위효소로 형질감염시키는 것에 관계한다. 세포의 형질감염의 방법은 당분야에서 널리 공지되지만, 일정한 양상에서, 고도로 효율적인 형질감염 방법, 예를 들면, 전기천공이 이용된다. 가령, 핵산은 뉴클레오펙션 기구를 이용하여 세포 내로 도입될 수 있다. 바람직하게는, 형질감염 단계는 이들 세포를 바이러스로 감염시키거나 또는 형질도입하는 것을 수반하지 않는데, 이것은 유전독성을 유발하고 및/또는 치료된 개체에서 바이러스 서열을 내포하는 세포에 대한 면역 반응을 야기할 수 있다.
- [0017] 구체예의 추가 양상은 세포를 CAR을 인코딩하는 발현 벡터로 형질감염시키는 것에 관계한다. 넓은 범위의 CAR 구조체 및 이들에 대한 발현 벡터는 당분야에서 공지되고 본원에서 더욱 상술된다. 가령, 일부 양상에서, CAR 발현 벡터는 DNA 발현 벡터, 예를 들면, 플라스미드, 선형 발현 벡터 또는 에피솜이다. 일부 양상에서, 벡터는 추가 서열, 예를 들면, CAR의 발현을 용이하게 하는 서열, 예를 들면, 프로모터, 인핸서, 폴리-A 신호, 및/또는 하나 또는 그 이상의 인트론을 포함한다. 바람직한 양상에서, CAR 코딩 서열은 유전자전위효소의 존재가 코딩 서열이 형질감염된 세포의 유전체 내로 통합할 수 있게 허용하도록 트랜스포손 서열과 측면에서 접한다.
- [0018] 상기 상술된 바와 같이, 일정한 양상에서, 세포는 형질감염된 세포의 유전체 내로 CAR 코딩 서열의 통합을 용이하게 하는 유전자전위효소로 더욱 형질감염된다. 일부 양상에서, 유전자전위효소는 DNA 발현 벡터로서 제공된다. 하지만, 바람직한 양상에서, 유전자전위효소는 유전자전위효소의 장기간 발현이 유전자도입 세포에서 발생하지 않도록 발현가능 RNA 또는 단백질로서 제공된다. 가령, 일부 양상에서, 유전자전위효소는 mRNA (가령, 캡 및 폴리-A 꼬리를 포함하는 mRNA)로서 제공된다. 임의의 유전자전위효소 시스템이 구체예에 따라 이용될 수 있다. 하지만, 일부 양상에서, 유전자전위효소는 연어과-유형 Tc1-유사 유전자전위효소 (SB)이다. 가령, 유전자전위효소는 이른바 "잠자는 미녀" 유전자전위효소일 수 있고, 예로서 본원에 참조로서 편입된 U.S. 특허 6,489,458을 참조한다. 일정한 양상에서, 유전자전위효소는 증가된 효소적 활성을 갖는 가공된 효소이다. 유전자전위효소의 일부 특정한 실례는 제한 없이, SB10, SB11 또는 SB100x 유전자전위효소를 포함한다 (가령, 본원에 참조로서 편입된 Mates *et al.*, 2009를 참조한다). 가령, 방법은 SB10, SB11 또는 SB100x 유전자전위효소를 인코딩하는 mRNA로 세포의 전기천공을 수반할 수 있다.
- [0019] 또 다른 양상에서, 구체예의 유전자도입 CAR 세포는 T-세포의 증식 및/또는 생존을 자극하는 막-결합된 사이토킨의 발현을 위한 발현 벡터를 더욱 포함한다. 특히, 이런 사이토킨을 포함하는 CAR 세포는 사이토킨 발현에 의해 제공된 시뮬레이션으로 인해 활성화하고 증식하는 세포 (AaPCs) 또는 인공 항원 제시 세포 (aAPCs)로 탈체 배양이 거의 또는 전혀 없이 증식하고 및/또는 존속할 수 있다. 유사하게, 이런 CAR 세포는 심지어, CAR에 의해 인식된 대량의 항원이 존재하지 않을 때에도 (가령, 관해 중인 암 환자 또는 최소 잔존 질환을 앓는 환자의 경우에서처럼) 생체내에서 증식할 수 있다. 일부 양상에서, CAR 세포는 C γ 사이토킨의 발현을 위한 DNA 또는 RNA 발현 벡터 및 상기 사이토킨의 표면 발현을 제공하는 원소 (가령, 막경유 도메인)을 포함한다. 가령, CAR 세포는 IL-7, IL-15 또는 IL-21의 막-결합된 이형을 포함할 수 있다. 일부 양상에서, 사이토킨은 사이토킨 코딩 서

열 및 상기 사이토킨에 대한 수용체의 융합에 의해 막에 묶인다. 가령, 세포는 IL-15-IL-15R α 융합 단백질 (가령, 서열 번호: 6의 서열을 포함하는 단백질)의 발현을 위한 벡터를 포함할 수 있다. 또 다른 양상에서, 막-결합된 C γ 사이토킨을 인코딩하는 벡터는 DNA 발현 벡터, 예를 들면, CAR 세포의 유전체 내로 통합된 벡터 또는 염색체의 벡터 (가령, 그리고 에피솜 벡터)이다. 또 다른 양상에서, 막-결합된 C γ 사이토킨의 발현은 CAR 세포에서 사이토킨의 발현 (및 따라서, CAR 세포의 증식)이 프로모터 활성을 유도하거나 또는 억제함으로써 제어될 수 있도록, 유도성 프로모터 (가령, 약물 유도성 프로모터)의 제어 하에 있다.

[0020] 구체예의 양상은 NK 세포, NKT 세포, T-세포 또는 T-세포 선조체 세포를 포함하는 환자로부터 표본을 획득하는 것에 관계한다. 가령, 일부 경우에, 표본은 체대혈 표본, 말초혈 표본 (가령, 단핵 세포 분획물) 또는 다능성 세포를 포함하는 개체로부터 표본이다. 일부 양상에서, 개체로부터 표본은 유도된 다능성 줄기 (iPS) 세포를 산출하기 위해 배양될 수 있고, 그리고 이들 세포는 NK 세포, NKT 세포 또는 T-세포를 생산하는데 이용될 수 있다. 세포 표본은 개체로부터 직접적으로 배양될 수 있고, 또는 이용에 앞서 냉동보존될 수 있다. 일부 양상에서, 세포 표본을 획득하는 것은 세포 표본을 수집하는 것을 포함한다. 다른 양상에서, 표본은 제삼자에 의해 획득된다. 또 다른 양상에서, 개체로부터 표본은 표본 내에 T-세포 또는 T-세포 선조체를 정제하거나 또는 농축하기 위해 처리될 수 있다. 가령, 표본은 구매 정제, 세포 배양 선별 및/또는 세포 분류 (가령, 형광-활성화된 세포 분류 (FACS)를 통해)에 종속될 수 있다.

[0021] 일부 양상에서, 구체예의 방법은 항원 제시 세포를 획득하거나, 생산하거나 또는 이용하는 것을 더욱 포함한다. 가령, 항원 제시 세포는 수지상 세포, 활성화하고 증식하는 세포 (AaPCs), 또는 비활성화된 (가령, 방사선조사된) 인공 항원 제시 세포 (aAPCs)일 수 있다. 이런 aAPCs를 생산하기 위한 방법은 당분야에서 공지되고 본원에서 더욱 상술된다. 따라서, 일부 양상에서, 유전자도입 CAR 세포는 CAR 세포 개체군을 확대하기 위해 제한된 기간 동안 탈체에서, 비활성화된 aAPCs와 공동배양된다. CAR 세포를 aAPCs와 공동배양하는 단계는 예로서, 인터류킨-21 (IL-21) 및/또는 인터류킨-2 (IL-2)를 포함하는 배지에서 행해질 수 있다. 일부 양상에서, 공동배양은 약 10:1 내지 약 1:10; 약 3:1 내지 약 1:5; 또는 약 1:1 내지 약 1:3의 CAR 세포 대 비활성화된 aAPCs의 비율에서 수행된다. 가령, CAR 세포와 aAPCs의 공동배양은 약 1:1, 약 1:2 또는 약 1:3의 비율에서 있을 수 있다.

[0022] 일부 양상에서, CAR 세포의 배양을 위한 세포, 예를 들면, AaPCs 또는 aAPCs는 CAR 세포의 성장을 증강하기 위해 특정한 폴리펩티드를 발현하도록 가공된다. 가령, 이들 세포는 (i) 유전자도입 CAR 세포 상에서 발현된 CAR에 의해 표적화된 항원; (ii) CD64; (iii) CD86; (iv) CD137L; 및/또는 (v) aAPCs의 표면 상에서 발현된 막-결합된 IL-15를 포함할 수 있다. 일부 양상에서, AaPCs 또는 aAPCs는 AaPCs 또는 aAPCs의 표면 상에서 발현된 CAR-결합 항체 또는 이의 단편을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명 방법에서 이용을 위한 AaPCs 또는 aAPCs는 감염성 물질에 대해 검사되고 없는 것으로 확증되고 및/또는 검사되고 비활성화되고 비-증식성인 것으로 확증된다.

[0023] AaPCs 또는 aAPCs에서 확대가 배양액에서 CAR 세포의 숫자 또는 농도를 증가시킬 수 있긴 하지만, 이러한 진행은 노동 집중적이고 비용이 많이 든다. 게다가, 일부 양상에서, 요법이 필요한 개체는 가능한 짧은 시간 내에 유전자도입 CAR 세포가 재주입되어야 한다. 따라서, 일부 양상에서, 유전자도입 CAR 세포 (c)를 탈체 배양하는 것은 14 일 이내, 7 일 이내 또는 3 일 이내 동안이다. 가령, 탈체 배양 (가령, AaPCs 또는 aAPCs의 존재에서 배양)은 유전자도입 CAR 세포의 한 개체군 배가보다 적게 수행될 수 있다. 또 다른 양상에서, 유전자도입 세포는 AaPCs 또는 aAPCs의 존재에서 탈체에서 배양되지 않는다.

[0024] 또 다른 양상에서, 구체예의 방법은 세포의 형질감염 (단계 (b)) 후 또는 세포의 탈체 확대 (단계 (c)) 후, CAR-발현 T-세포에 대해 세포 개체군을 농축하기 위한 단계를 포함한다. 가령, 농축 단계는 예로서, CAR 또는 CAR-결합 항체에 의해 결합된 항원을 이용함으로써, 세포의 분류 (가령, FACS를 통해)를 포함할 수 있다. 또 다른 양상에서, 농축 단계는 비-T-세포의 고갈 또는 CAR 발현을 결여하는 세포의 고갈을 포함한다. 가령, CD56⁺ 세포는 배양 개체군으로부터 고갈될 수 있다. 다른 추가 양상에서, CAR 세포의 표본은 이들 세포가 개체에 투여될 때 보존된다 (또는 배양액에서 유지된다). 가령, 표본은 추후 확대 또는 분석을 위해 냉동보존될 수 있다.

[0025] 일정한 양상에서, 구체예의 유전자도입 CAR 세포는 내인성 T 세포 수용체 및/또는 내인성 HLA의 발현에 대해 비활성화된다. 가령, T 세포는 내인성 알파/베타 T 세포 수용체 (TCR)의 발현을 제거하도록 가공될 수 있다. 특정한 구체예에서, CAR⁺ T 세포는 TCR의 발현을 제거하도록 유전적으로 변형된다. 일부 양상에서, 아연 핑거 뉴클레아제 (ZFNs)를 이용하여 CAR-발현 T 세포에서 T 세포 수용체 α/β 의 교란이 있다. 일정한 양상에서, CAR-발현 T 세포에서 T 세포 수용체 $\alpha\beta$ -사슬은 예로서, 아연 핑거 뉴클레아제를 이용함으로써 적중된다.

- [0026] 본원에서 더욱 상술된 바와 같이, 구체예의 CAR 세포는 넓은 범위의 질환과 장애를 치료하는데 이용될 수 있다. 본질적으로, 특정 항원의 특정한 또는 증강된 발현을 수반하는 임의의 질환은 CAR 세포를 항원에 표적화함으로써 치료될 수 있다. 가령, 자가면역 질환, 감염, 그리고 암이 본 발명의 방법 및/또는 조성물로 치료될 수 있다. 이들은 암, 예를 들면, 원발성, 전이성, 재발성, 요법 민감성, 요법 난치성 암 (가령, 화학-난치성 암)을 포함한다. 암은 혈액, 폐, 뇌, 결장, 전립선, 유방, 간, 신장, 위, 자궁경부, 난소, 고환, 뇌하수체, 식도, 비장, 피부, 뼈, 기타 등등의 암 (가령, B-세포 림프종 또는 흑색종)일 수 있다. 암 치료의 경우에, CAR 세포는 암 세포 항원 (종양-연관된 항원 (TAA)으로서 또한 알려져 있음)을 전형적으로 표적으로 한다.
- [0027] 또 다른 양상에서, 구체예의 유전자도입 CAR 세포는 최소 잔존 질환을 앓는 개체 (가령, 매우 낮은 양의 CAR-표적화된 항원이 존재하는 개체), 예를 들면, 명백한 관해에 있는 암 환자를 치료하는데 이용될 수 있다. 새로운 고도로 민감한 진단적 기술을 이용하여, 암-연관된 항원 (또는 암 세포)이 명시적인 암 증상을 전하지 않는 환자에서 검출될 수 있다. 이런 환자는 항원-표적화된 CAR 세포의 이용에 의해 잔존 질환을 제거하는 본 발명 방법에 의해 치료될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 잔존 질환의 표적화를 위한 유전자도입 CAR 세포는 막-결합된 증식성 사이토킨의 발현을 더욱 포함하는데, 그 이유는 이들 세포가 낮은 양의 표적 항원에도 불구하고 생체 내에서 확대하는 능력을 유지할 것이기 때문이다.
- [0028] 이들 구체예의 과정은 다양한 종양 항원 (가령, CD19, ROR1, CD56, EGFR, CD123, c-met, GD2)에 대한 CAR⁺ T 세포 (가령, 임상 시험을 위해)를 제조하는데 활용될 수 있다. 이러한 기술을 이용하여 산출된 CAR⁺ T 세포는 백혈병 (AML, ALL, CML), 감염 및/또는 고형 종양을 앓는 환자를 치료하는데 이용될 수 있다. 가령, 구체예의 방법은 세포 증식성 질환, 진균, 바이러스, 세균 또는 기생충성 감염을 치료하는데 이용될 수 있다. 표적화될 수 있는 병원체는 제한 없이, 열원충 (*Plasmodium*), 과동편모충, 아스페르길루스 (*Aspergillus*), 칸디다 (*Candida*), HSV, RSV, EBV, CMV, JC 바이러스, BK 바이러스, 또는 에볼라 병원체를 포함한다. 구체예의 CAR 세포에 의해 표적화될 수 있는 항원의 추가 실례는 제한 없이, CD19, CD20, 암배아 항원, 알파 태아단백질, CA-125, 5T4, MUC-1, 상피 종양 항원, 흑색종-연관된 항원, 돌연변이된 p53, 돌연변이된 ras, HER2/Neu, ERBB2, 엽산염 결합 단백질, HIV-1 외피 당단백질 gp120, HIV-1 외피 당단백질 gp41, GD2, CD123, CD23, CD30, CD56, c-Met, 메소텔린, GD3, HERV-K, IL-11R알파, 카파 사슬, 람다 사슬, CSPG4, ERBB2, EGFRvIII, 또는 VEGFR2를 포함한다. 일정한 양상에서, 구체예의 방법은 CD19 또는 HERV-K-발현 세포의 표적화에 관계한다. 가령, HERV-K 표적화된 CAR 세포는 단일클론 항체 6H5의 scFv 서열을 포함하는 CAR을 포함할 수 있다. 또 다른 양상에서, 구체예의 CAR은 사이토킨, 예를 들면, IL-2, IL-7, IL-15, IL-21 또는 이들의 조합과 접합되거나 또는 이것과 융합될 수 있다.
- [0029] 일부 구체예에서, 의학적 질환을 앓는 개체를 치료하기 위한 방법이 제공되고, 상기 방법은 일부 양상에서 1회보다 많이, 예를 들면, 최소한 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14일, 또는 그 이상 이격을 비롯하여, 본원에서 설명된 세포 개체군으로부터 세포의 효과량을 제공하는 단계를 포함한다. 특정한 구체예에서, 암은 림프종, 백혈병, 비호지킨 림프종, 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프모구성 백혈병, 만성 림프성 백혈병, 또는 B 세포-연관된 자가면역 질환이다.
- [0030] 또 다른 추가 구체예에서, 서열 번호: 1과 최소한 약 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 CD19-표적화된 CAR을 포함하는 단리된 또는 재조합 폴리펩티드가 제공된다. 관련된 구체예에서, CD19-표적화된 CAR을 인코딩하는 (가령, 서열 번호: 1과 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 인코딩하는) 단리된 또는 재조합 폴리뉴클레오티드 서열이 제공된다. 가령, 일부 양상에서, 폴리뉴클레오티드 서열은 서열 번호: 3 (CD19-표적화된 CAR을 인코딩한다) 또는 서열 번호: 4 (CD19-표적화된 CAR, 발현 제어 서열 및 측면에 접하는 트랜스포손 반복을 인코딩한다)와 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하다. 또 다른 추가의 구체예에서, 이들 구체예의 CD19-표적화된 CAR을 인코딩하는 폴리펩티드 및/또는 CD19-표적화된 CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 가령, 숙주 세포는 T-세포 또는 T-세포 전구체일 수 있다. 바람직하게는, 숙주 세포는 인간 세포이다. 당업자는 본원에서 상술된 방법에 따라 전술한 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 또는 숙주 세포 중에서 한 가지가 이용될 수 있다는 것을 인식할 것이다.
- [0031] 또 다른 추가 구체예에서, 서열 번호: 4와 최소한 약 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 HERV-K-표적화된 CAR을 포함하는 단리된 또는 재조합 폴리펩티드가 제공된다. 관련된 구체예에서, HERV-K-표적화된 CAR을 인코딩하는 (가령, 서열 번호: 4와 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 인코딩하는) 단리된 또는 재조합 폴리뉴클레오티드

티드 서열이 제공된다. 가령, 일부 양상에서, 폴리뉴클레오티드 서열은 서열 번호: 5 (HERV-K-표적화된 CAR, 발현 제어 서열 및 측면에 접하는 트랜스포손 반복을 인코딩한다)와 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하다. 또 다른 추가의 구체예에서, 이들 구체예의 HERV-K-표적화된 CAR을 인코딩하는 폴리펩티드 및/또는 HERV-K-표적화된 CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 가령, 숙주 세포는 T-세포 또는 T-세포 전구체일 수 있다. 바람직하게는, 숙주 세포는 인간 세포이다. 당업자는 본원에서 상술된 방법에 따라 전술한 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 또는 숙주 세포 중에서 한 가지가 이용될 수 있다는 것을 인식할 것이다.

[0032] 또 다른 추가 구체예에서, 서열 번호: 6과 최소한 약 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 막-결합된 IL-15를 포함하는 단리된 또는 재조합 폴리펩티드가 제공된다. 관련된 구체예에서, 막-결합된 IL-15를 인코딩하는 (가령, 서열 번호: 6과 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 인코딩하는) 단리된 또는 재조합 폴리뉴클레오티드 서열이 제공된다. 가령, 일부 양상에서, 폴리뉴클레오티드 서열은 서열 번호: 7 (막-결합된 IL-15, 발현 제어 서열 및 측면에 접하는 트랜스포손 반복)과 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하다. 또 다른 추가의 구체예에서, 이들 구체예의 막-결합된 IL-15를 인코딩하는 폴리펩티드 및/또는 막-결합된 IL-15를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 가령, 숙주 세포는 T-세포, T-세포 전구체 또는 aAPC일 수 있다. 바람직하게는, 숙주 세포는 인간 세포이다. 당업자는 본원에서 상술된 방법에 따라 전술한 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 또는 숙주 세포 중에서 한 가지가 이용될 수 있다는 것을 인식할 것이다.

[0033] 본원의 명세서 이용된 바와 같이, 단수 ("a" 또는 "an")은 하나 또는 그 이상을 의미할 수 있다. 본원의 청구항 (들)에서 이용된 바와 같이, 단어 "포함하는"과 함께 이용될 때, 단수 단어 ("a" 또는 "an")은 하나 또는 하나 이상을 의미할 수 있다.

[0034] 청구항에서 용어 "또는"의 이용은 비록 본 발명이 단지 대안 및 "및/또는"을 지칭하는 정의를 뒷받침하긴 하지만, 단지 대안만을 지칭하는 것으로 명시적으로 지시되지 않으면 또는 이들 대안이 상호간에 배타적이지 않으면, "및/또는"을 의미하는데 이용된다. 본원에서 이용된 바와 같이, "다른"은 최소한 두 번째 또는 그 이상을 의미할 수 있다.

[0035] 본 출원 전반에서, 용어 "약"은 값이 장치, 값을 결정하는데 이용된 방법에 대한 오차의 내재하는 변이, 또는 연구 개체 사이에서 존재하는 변이를 포함한다는 것을 지시하는데 이용된다.

[0036] 본 발명의 다른 목적, 특질과 이점은 다음의 상술된 설명으로부터 명백해질 것이다. 하지만, 상세한 설명과 특정한 실례는 본 발명의 바람직한 구체예를 지시하긴 하지만, 단지 예시에 의하여 제공되는 것으로 이해되어야 하는데, 그 이유는 발명의 사상과 범위 내에 다양한 변화와 변형이 이러한 상술된 설명으로부터 당업자에게 명백해질 것이기 때문이다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도면의 간단한 설명

다음의 도면은 본 명세서의 일부를 형성하고 본 발명의 일정한 양상을 더욱 증명하기 위해 포함된다. 본 발명은 본원에서 제공된 특정한 구체예의 상세한 설명과 합동으로, 이들 도면 중에서 하나 또는 그 이상을 참조함으로써 더욱 잘 이해될 수 있다.

도면 1: PB와 UCB로부터 CAR⁺ T 세포를 전기천공하고 증식하는 과정을 개설하는 단계.

도면 2: PB로부터 유전적으로 변형된 T 세포의 특성화. (a) 유전자 전달의 효율을 사정하기 위한 첫 번째 자극 주기의 0 일자에 EGFP의 발현. (b) 전기천공 후 대략 24 시간 및 (c) aAPC에서 공동배양 후 28 일에 CD3⁺, CD8⁺ 과 CD4⁺ T 세포에서 유세포분석법에 의해 사정될 때 CD19-특이적 CAR (CD19RC28)의 발현. CAR의 유사한 발현이 UCB-유래된 T 세포에서 관찰되었다. (d) CAR 발현의 동역학.

도면 3: PB-유래된 CAR⁺ T 세포의 증식. 재조합 인간 가용성 IL-2와 IL-21의 존재에서 γ-방사선조사된 aAPC에서 반복된 공동배양에 의해 PB로부터 유래된 CD3⁺과 CAR⁺ T 세포의 수치 확대의 비율. 상향 화살표는 각 자극 주기의 시작을 표시하는 γ-방사선조사된 aAPC의 첨가를 지시한다. UCB-유래된 CAR⁺ T 세포는 유사한 비율의 수치

확대를 전시한다.

도면 4: PB와 UCB로부터 유래된 CAR⁺ T 세포를 유전적으로 변형하고 증식하기 위해 SB와 aAPC 시스템을 이용하는 제조 공정의 계통도. CD19-특이적 CAR⁺ T 세포는 SB-유래된 초나선 DNA 플라스미드의 전자 전달 및 제조함 인간 가용성 IL-2와 IL-21의 존재에서 K562-유래된 aAPC (클론 #4)에서 차후 공동배양에 의해 산출되었다.

도면 5: aAPC의 수확과 특성화. (a, b) Sepax 부피 감소. VueLife 가방에서 성장된 aAPC 클론 #4는 Sepax II에서 CS-490.1 키트를 이용하여 수확되었다. Sepax 수확 (S, n=4)은 수동 (M, n=1) 절차와 비교되었다. Sepax 시스템을 이용한 평균 처리전/처리후 세포-수치 (4.9×10^8 대 5×10^8)는 유사하였다. (c) aAPC (클론 #4)의 표현형. K562 aAPC와 K562 부모 대조에서, CD19, CD64, CD86, CD137L 및 EGFP와 공동발현된 IL-15 (변형된 IgG4 Fc 영역에 융합된 캡티드)의 막-결합된 이형 (mIL-15-EGFP)의 발현을 보여주는 유세포분석법 분석.

도면 6: 임상적 등급 CD19-특이적 T 세포를 산출하는 과정의 계통도. MCB (PACT) 및 WCB (MDACC)가 K562-유래된 aAPC (클론 #4)에 대해 산출되었다. CAR⁺ T 세포의 산출을 위해, aAPC는 가방에서 수치적으로 확대되고, Sepax II 시스템을 이용하여 수확되고, 방사선조사되고 (100 Gy), 그리고 추후 이용을 위해 냉동보존되었다. CD19-특이적 T 세포는 아래와 같이 제조되었다; PBMC가 Sepax II 시스템을 이용하여 정상적인 공여자 성분채집술 산물로부터 단리되고 냉동보존되었다. PBMC는 추후 해동되고, 뉴클레오펙터 시스템을 이용하여 SB DNA 플라스미드 (CD19RC28 CAR 트랜스포손, SB11 유전자전위효소)로 전기천공되고, 28 일의 배양 기간 동안 사이토킨 (IL-2와 IL-21)과 함께 해동 방사선조사된 aAPC와 공동배양되고, 그리고 냉동보존되었다.

도면 7: CAR⁺ T 세포의 표현형. (a) 전기천공 다음날 (배양 1 일자) 및 CD19⁺ aAPC의 결여와 함께 aAPC 클론 #4에서 28 일의 공동배양 후, T 세포에서 CD19RC28 CAR의 발현. (b) CD3-ζ 특이적 항체를 이용한 웨스턴 블롯 분석에 의한 CAR 발현. 전체 세포 용해물은 환원 조건 하에 SDS-PAGE에서 이동되었다. 분자량 마커 (M), 부모 Jurkat 세포 (레인 1), CD19RC28⁺ Jurkat 세포 (레인 2), CAR^{유형} 대조 원발성 T 세포 (레인 3) 및 CD19RC28⁺ T 세포 (레인 4). (c) 시간의 흐름에서 배양액에서 림프구 게이트 내에서 CD3⁺, CD4⁺CAR⁺ 및 CD8⁺CAR⁺ T 세포의 퍼센트 발현. 각 부호는 별개의 실험을 나타낸다; 실선은 3가지 검증 실험의 평균이다. (d) 공동배양의 종결점 (d28)에서 CAR⁺ T 세포에서 기억/무경험, 부착, 활성화, 세포용해와 소진 마커의 면역표현형.

도면 8: CAR⁺ T 세포의 확대 동역학과 전향된 특이성. 유전적으로 변형된 T 세포는 28 일 동안 aAPC 클론 #4와 공동배양되었다. 각 자극 주기 (7 일)의 종결점에서, 세포는 계수되었고 CAR과 CD3의 발현에 대해 염색되었다. 3가지 검증 실험 (V1, V2, 그리고 V3)이 수행되었고, 그리고 그래프는 시간의 흐름에서 추론된 (a) CAR⁺ T 세포, (b) CD3⁺ T 세포, (c) 전체 생존가능 세포를 나타낸다. 화살표는 배양액에 aAPC의 첨가를 지시한다. (d) CAR⁺ T 세포에 의한 4-시간 크롬 방출 검정을 이용하여 CD19^{유형} EL-4의 배경 용해와 비교하여 CD19⁺ 표적 (Daudi β_{2m}, NALM-6, CD19⁺ EL-4)의 용해. 3가지 검증 실험의 평균 ± SD가 표현된다.

도면 9: SB 시스템과 연관된 안전성 프로파일. (a) 세포의 말단소립 길이가 형광 제자리 혼성화 및 유세포분석법 (Flow-FISH) 검정을 이용하여 계측되었다. 28 일자에 우세한 T 세포 개체군 (V1과 V2, CD8⁺ T 세포; V3, CD4⁺ T 세포)은 0 일자로부터 T 세포의 개별 miltenyi 칼럼 정제된 부분집합과 비교되었다. (b) 28 일자에 CAR⁺ T 세포로부터 유전체 DNA는 CD19RC28 CAR에 특이적인 프라이머와 프로브를 이용하여 증폭되었다. CD19RC28 표적 사본수의 상대적 양 (RQ) 분석이 CD19RC28 CAR-형질도입된 Jurkat 세포를 이용하여 결정되었는데, 이들 세포는 참고로서, FISH 분석으로부터 유전체마다 CD19RC28 CAR 및 정규화군으로서 내인성 RNA분해효소P의 하나의 통합을 갖는 것으로 알려져 있다. (c) 28 일자와 35 일자 CAR⁺ T 세포의 TCR Vβ 분석. 데이터는 0 일자 비조작된 대조와 비교하여 3가지 검증 실험 CAR⁺ T 세포의 평균 ± SD를 보여준다. (d) SB11 유전자전위효소 통합의 결여를 보여주는 유전체 PCR. 유전체 DNA (20 ng)는 SB11 또는 GAPDH 프라이머를 이용하여 증폭되었다. SB11 프라이머를 이용하여 증폭된 CAR^{유형} 대조 T 세포 (레인 5) 및 CAR⁺ T 세포 (레인 7); GAPDH 프라이머를 이용하여 증폭된 CAR^{유형} 대조 T 세포 (레인 6), CAR⁺ T 세포 (레인 8) 및 SB11을 안정되게 발현하는 Jurkat (레인 4). SB11 프라이머를 이용하여 증폭된 SB11을 안정되게 발현하는 Jurkat (Jurkat/SB11-IRES2-EGFP) (레인 3) 및 선형화

된 플라스미드, pKan-CMV-SB11 (레인 2)는 양성 대조로서 이용되었다. (e) 3가지 검증 실행으로부터 CAR⁺ T 세포의 G-줄무늬 핵형은 구조 또는 수치 변경 없음을 드러낸다. 검증 2로부터 대표적인 확산이 도시된다.

도면 10: CD19CD28 CAR 트랜스포손의 산출. 코돈 최적화된 키메라 항원 수용체 (CAR) 및 SB DNA 플라스미드 pT-MNDU3-EGFP (Singh *et al.*, 2008; Hollis *et al.*, 2006)를 내포하는 CD19CD28mz (CoOp)/pEK 벡터는 *SpeI* & *NheI* 및 *SpeI* & *NruI*로 절단되어 각각, CAR과 EGFP 단편이 방출되었다. EGFP-결합된 pT-MNDU3 벡터는 이후, CAR 단편으로 결합되어 CD19CD28mz (CoOp)/pT-MNDU3 벡터가 산출되었다. 게다가, 카나마이신 내성 유전자 및 pEK 벡터의 *AseI* & *PacI* 절단에 의해 획득된 ColE1 복제 기점이 *SaI* & *ZraI* 절단된 CD19CD28mz (CoOp)pT-MNDU3 벡터 내로 결합되어 Pre-CD19CD28mz (CoOp)/pSBSO가 창출되었다. 마지막 단계에서, Pre-CD19CD28mz(CoOp)/pSBSO로부터 MNDU3 프로모터가 *NheI* & *NsiI*로 절단을 이용하여 방출되고, 그리고 *XhoI* & *NheI*을 이용하여 pViro4 벡터로부터 획득된 hEF-1a 프로모터 단편으로 대체되어 최종 벡터 CD19CD29mz(CoOp)/pSBSO가 산출되었다.

도면 11: SB11 유전자전위효소의 산출. SB 유전자전위효소 벡터 pCMV-SB11은 *PvuII*로 절단되어 CMV 프로모터/인핸서 및 SB 유전자전위효소 인코딩 유전자를 내포하는 단편이 방출되었고, 이것은 카나마이신 내성 유전자 및 pEK 벡터로부터 ColE1 복제 기점을 내포하는 단편에 결합되어 pKan-CMV-SB11 벡터가 산출되었다.

도면 12: CD19 발현 플라스미드, Δ CD19CoOp-F2A-Neo/pSBSO의 계통도. 플라스미드 CoOpCD19CD28/pSBSO로부터 CD19CD28 CAR을 인코딩하는 DNA 단편은 F2A 링커 (아미노산, VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP; [Szymczak *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011])를 거쳐 코돈-최적화된 (GENEART) 절두된 CD19 (Δ CD19, [Serrano *et al.*, 2006; Mahmoud *et al.*, 1999])에 융합된 네오마이신 내성 유전자 (NeoR)를 인코딩하는 DNA 단편 [pSelect-Neo (InvivoGen)로부터 PCR 클로닝된]으로 교환되어 Δ CD19CoOp-F2A-Neo/pSBSO가 산출되었다. EF1 α 프로모터, 연장 인자-1 α 프로모터; NeoR, 네오마이신 내성 유전자; bGhAn, 소 성장 호르몬으로부터 폴리아데닐화 신호; ColE1, ori; KanR, 카나마이신 내성 유전자; IR, SB-반전된/직접 반복.

도면 13: CD19-특이적 CAR⁺ T 세포의 수치 확대의 비율. 유전적으로 변형된 T 세포가 7-일 자극 주기에서 aAPC와 공동배양되었고, 그리고 전체, CD3⁺과 CAR⁺ T 세포에 대한 각 자극 주기의 종결점에서 각 검증 실행으로부터 주간 배수-확대 비율이 계산되었다. 평균 배수-확대가 도시된다 (n=3).

도면 14: CD19-특이적 CAR⁺ T 세포의 전향된 특이성. 표준 4-시간 크롬 검정에서 3가지 검증 실행 (V1, V2, V3)에서 산출된 CAR⁺ T 세포에 의한 CD19⁺ 종양 표적 (Daudi β_{2m} , NALM-6, CD19⁺ EL-4)의 CD19-특이적 용해. CAR⁺ 대조에 대하여 배경 자가 용해는 1.5%이었다.

도면 15: 염색체 이상에 관한 안전성. 검증 실행 (V1과 V3)으로부터 산출된 CAR⁺ T 세포의 G-줄무늬 핵형은 구조 또는 수치 변경 없음을 드러낸다.

도면 16: (a) 아이소타입 IgG2a 대조 염색 (아래쪽 패널)과 비교할 때, HERV-K 발현 (위쪽 패널)의 변하는 강도 (0-3 채점됨)를 갖는 종양 세포의 대표적인 사진 (200X). (b) 점상이고 세포막의 경계와 접하는 HERV-K 염색 (고체 화살표) 또는 더욱 널리 퍼진 세포질 염색 (부점 화살표)을 보여주는 종양 세포 (400X)의 사진. (c) 각 환자의 H-지수를 나타내는 반점 플롯은 양성 조직과 종양 조직 사이에 유의미한 차이 ($p < 0.0267$)를 보여주었다. (d) 악성 종양과 전이성 종양 사이에 어떤 유의미한 차이도 목격되지 않았다. 그리고 양성 종양 및 악성 또는 전이성 종양 사이에 유의미한 차이가 목격되었다.

도면 17: (a) SB 플라스미드를 인코딩하는 HERV-K-특이적 CAR. (b) CD3⁺ HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포의 1 일자와 35 일자에 CAR (Fc) 발현을 나타내는 흐름 플롯. 흐름 플롯의 사분면 백분율은 위쪽 오른쪽 코너에 있다. CAR, 키메라 항원 수용체. (c) HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포 및 비특이적 CD-19 CAR⁺ T 세포 사이에 전체 세포 성장에서 유의미한 차이 없음. (d) 21 일자까지, 모든 HERV-K-특이적 CAR 세포는 CD3⁺ T 세포이다. (e) CAR 통합 분석은 HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포가 세포당 2개보다 적은 통합을 갖는다는 것을 보여준다. 데이터는 삼중으로 수행된 3명의 상이한 공여자로 2가지 독립된 실험의 평균을 나타낸다. (f) HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포의 표현형은 높은 수준의 그랜자임 B를 생산하는 CD3⁺CD56⁺CD45RO^{hi} CD45RA^{lo}CD27⁺CD62L⁺ T 세포이다. 모든 데이터는 4명의 공

여자의 평균을 나타낸다.

도면 18: (a) 아이소타입 대조 (청색)와 비교하여 종양 세포 표면에서 HERV-K 항원 발현 (적색)에서 히스토그램 표현. (b) No DNA 대조 T 세포 (점선)와 비교하여 변하는 희석도의 HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포 (실선)와 함께 흑색종 종양 표적의 표준 4-시간 CRA. 데이터는 2가지 독립된 실험으로부터 모아진 4명의 건강한 공여자로부터 평균 $\pm$ SD (각 공여자에 대한 삼중 측정의 평균)이다. 본페로니 사후 검증으로 이원 변량분석 (ANOVA)이 HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포 및 No DNA 대조 세포 사이에 (b)와 (c)에서 수행되었다. CAR, 키메라 항원 수용체; CRA, 크롬 방출 검정; E:T, 작동체 대 표적 비율. (d) 표적과 함께 배양 시에 CAR⁺ T 세포에 의한 IFN- γ 생산. PMA-이오노마이신이 양성 대조로서 이용된다.

도면 19: HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포의 특이성. (a) HERV-K 항원을 인위적으로 발현하는 EL4 세포 (흑색)의 히스토그램은 HERV-K^{음성} EL4 부모 (청색) 및 아이소타입 대조 염색 (오렌지)과 함께 플롯팅되었다. (b) 4 시간 CRA는 변하는 E:T 비율에서 HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포에 의해 부모와 비교하여, 상기 항원을 발현하는 EL4 세포를 사멸시키는데 있어서 유의미한 증가 ($p < 0.001$)를 보여주었다. (c) 면역블롯 검정은 A888 부모 또는 스크램블된 shRNA로 처리된 A888과 비교할 때, A888 세포에서 HERV-K env-특이적 shRNA-매개된 녹다운을 보여주기 위해 수행되었다. 아래쪽 패널은 대조로서 액틴 단백질 발현을 보여준다. (d) A888 HERV-K KD 세포, A888 부모 (A888P) 및 A888 스크램블된 대조 (A888 scra)와 함께 HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포의 CRA는 T 세포에 의한 유의미한 항원 특이적 사멸을 보여주었다. 모든 데이터는 삼중으로 미리 수행된 3명 공여자에 의한 2가지 독립된 실험의 평균을 나타낸다. 본페로니 사후 검증으로 이원 변량분석 (ANOVA)이 EL4 부모를 HERV-K⁺ EL4와 비교하기 위해 (B)에 이용되었고, 그리고 뉴먼 쿨스 복수 비교 검사로 일원 변량분석 (ANOVA)이 A888KD를 A888 P 및 A888 scra와 비교하기 위해 (c)에 이용되었다.

도면 20: 15 시간 기간에 걸쳐 HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포의 활성을 결정하기 위해, 표적과 작동체 세포가 배지에서 Sytox® (Invitrogen, 죽은 세포 염색)로 1:5 비율에서 도말되었다. 작동체 세포와 함께 각 표적의 50개 이미지가 이러한 기간 동안 7 분마다 기록되었다. (a) 다양한 시점에서 CAR⁺ T 세포와 함께 HERV-K⁺ 흑색종 세포 (A888과 A375) 및 HERV-K음성 대조 (HEK293 부모) 세포를 나타내는 사진. 녹색으로 변한 세포는 죽은 세포로서 기록되었고, 그리고 형광의 강도가 계속되었다. (b, c, d)는 표적 세포의 평균 형광 강도를 나타낸다. 위쪽 라인은 죽은 세포를 나타내고, 반면 아래쪽 라인은 기저 강도의 살아있는 세포를 나타낸다. (e) HEK293 부모 세포와 비교하여 15 시간 시점에서 평균 형광 강도에서 유의미한 차이 ($p < 0.05$)를 나타내는 플롯. 데이터는 각각 50개 이미지로 2번의 독립된 실험의 평균을 나타낸다. Tukey 사후 검증으로 일원 변량분석 (ANOVA)이 수행되었다.

도면 21: HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포의 생체내 항종양 활성. (a) 실험의 계통도. (b) 3 일자부터 25 일자까지 생쥐의 대표적인 이미지. (c) mKate⁺rRLuc⁺HERV-K⁺ A375-SM 종양으로부터 유래된 BLI 및 (d) mKate⁺종양 전이성 초점을 나타내는 적색 반점을 갖는 간 조직의 사후 분석. 데이터는 평균 $\pm$ SD이다 (군당 $n = 5-6$ 마리 생쥐). 본페로니 사후 검증으로 이원 변량분석 (ANOVA) (d)에서, 그리고 처리된 생쥐와 처리되지 않은 생쥐 사이에서 수행된 통계. ** $P < 0.01$ 및 *** $P < 0.001$. ANOVA, 분산 분석; BLI, 생물발광 영상; CAR, 키메라 항원 수용체; IL, 인터류킨.

도면 22: (a) 29개 정상적인 장기로부터 조직 섹션에서 HERV-K 항원 발현의 대표적인 사진 (200X)이 도시된다. H-지수는 제로로서 계산되었는데, 그 이유는 이들 조직 중에서 어디에서도 염색이 관찰되지 않았기 때문이다. (b) 다양한 장기와 상이한 환자로부터 악성 조직의 H-지수가 반점 플롯에서 도시된다.

도면 23: (a) CD8⁺ HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포와 대비하여 CD4⁺의 성장이 도시된다. (b) No DNA 대조 세포와 대비하여 HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포에서 다양한 유전자의 발현을 나타내는 nCounter 분석. 적색은 높은 발현을 지시하고, 반면 녹색은 낮은 mRNA 수준을 지시한다. (c) HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포에서 고도로 발현된 유전자의 독창성 경로 분석.

도면 24: 4 시간 표준 CRA가 흑색종과 CD19-특이적 종양 표적 및 CD19 CAR⁺ T 세포로 수행되었다. 모든 데이터는 6명 공여자의 평균으로 수행되고 본페로니 사후 검증으로 이원 변량분석 (ANOVA)을 이용하여 분석된 2가지 독립된 실험을 나타낸다.

도면 25: hEF-1α 프로모터 하에 HERV-K 항원 및 CMV 프로모터 하에 네오마이신 내성 유전자를 인코딩하는 양방향성 SB 플라스미드.

도면 26: 종양 세포 표면에서 HERV-K 항원 (적색)과의 HERV-K-특이적 CAR (녹색) 맞닿음을 나타내는 도면.

도면 27: (a) 네오마이신 내성 유전자와 함께 myc-ffLuc를 인코딩하는 SB 플라스미드. (b) HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포 및 HERV-K-특이적 CAR-ffLuc⁺ T 세포의 전체 세포 성장. (c) HERV-K-특이적 CAR-ffLuc⁺ T 세포와 함께 A375SM과 EL4 부모 세포의 4-시간 CRA. (d) ffLuc 활성을 나타내는 생쥐 이미지. (e) 종양 세포 영상을 위해 RLuc와 mKate를 인코딩하는 렌티바이러스 플라스미드.

도면 28a-b: mIL15의 계통도. a) *잠자는 미녀* 발현 플라스미드의 성분인 반전된 반복에 의해 접하는 mIL15 구조체. mIL15 돌연변이단백질은 유연한 세린-글리신 링커에 의한 IL-15와 전장 IL-15Rα의 융합이다. b) mIL15의 발현된 단백질 구조를 나타내는 계통도.

도면 29a-b: 5회 자극 주기 후, aAPC에서 탈체 확대 후 유전적으로 변형된 T 세포에서 CAR과 mIL15 발현. a) 5명 공여자의 대표적인 표본의 발현. b) 유전적으로 변형된 T 세포에서 표시된 마커 (CAR 및/또는 mIL15)의 발현.

도면 30: pSTAT5의 포스플로우 (phosflow)를 통해 mIL15의 기능성의 검증. 달리 언급되지 않으면, 기저와 IL-15-매개된 인산화를 획득하기 위해 혈청과 사이토킨-없는 조건에서 세포의 5 시간 배양. 대표적인 플롯 (n=6).

도면 31: aAPC에서 4회 자극 주기 후, mIL15의 공동발현이 있거나 또는 없는 CAR⁺ T 세포의 추론된 수치. CAR⁺ T 세포는 가용성 IL-2와 IL-21 (표준 배양 조건) 또는 IL-15와 IL-21 (가용성 사이토킨 대조)과 함께 배양되고, 그리고 mIL15⁺ CAR⁺ T 세포는 IL-21과 함께 배양되었다. 데이터는 평균 ± SD, n=4이다.

도면 32a-b: 탈체 확대된 mIL15⁺ CAR⁺ T 세포의 표현형과 특정한 용해 능력. a) aAPC에서 4회 자극 후, 일정한 T 세포의 퍼센트 표면 발현, 활성화, 그리고 분화-연관된 마커. 수평선은 평균 값을 지시한다. *P = 0.047, 짝비교 t 검증, n > 4. b) 4-시간 크롬 방출 검증으로부터 CD19⁺ 또는 CD19^{음성} 표적의 aAPC에서 5회 자극 후, CAR⁺ T 세포 (왼쪽 패널)와 mIL15+CAR⁺ T 세포 (오른쪽 패널) 특정한 용해. 데이터는 평균 ± SD, n = 3으로서 표현된다.

도면 33: 기능적으로 적격성이고 AICD에 내성인 채로 남아있는 mIL15⁺ CAR⁺ T 세포의 시험관내 장기간 존속. a) 4회 aAPC 자극 후 탈체 확대된 mIL15^{+/−} CAR⁺ T 세포는 장기간 시험관내 존속을 사정하고 60+ 일에 걸쳐 확대 동역학을 관찰하기 위해 항원 재자극으로부터 도피를 겪었다. mIL15⁺ CAR⁺ T 세포는 임의의 외인성 사이토킨 뒷받침을 받지 않았고, 반면 CAR⁺ T 세포는 사이토킨 없음, IL-2, 또는 IL-15를 받았다. 데이터는 평균 ± SD의 로그이다, ****P < 0.0001, RM ANOVA, n=3. b) 항원 노출후 75 일을 초과한 시점에 생존 T 세포는 6 시간 동안 표적 없음, CD19^{+/−} EL4, CD19⁺ NaIm-6, 또는 LAC와 함께 배양에 의해 항원 반응성에 대해 검사되었다. 분석은 IFNγ 세포내 염색의 유세포분석법에 의하였다. 도시된 대표적인 흐름 플롯, n=3. c) 도피후 75 일 후에 생존 T 세포는 앞서 설명된 바와 같이 aAPC로 1:1 자극 검사되었고, 그리고 배지가 도피 배양 유지 동안 이용된 사이토킨 (만약 있으면) + IL-21의 첨가로 보충되었다. 8 일 후, T 세포는 자극된 배양액에서 아포토시스성/괴사성 세포와 대비하여 살아있는 세포의 비율을 결정하기 위해 아넥신 V로 염색되었다. 도시된 대표적인 흐름 플롯, n=3.

도면 34a-c: 장기간 존속하는 mIL15⁺ CAR⁺ T 세포는 이분지 CD45RA⁺ CCR7^{+/−} 표현형을 취한다. a) 자극 4로부터 mIL15⁺ CAR⁺ T 세포 및 마지막 항원 자극 후 75 일에 존속하는 것들로부터 CD45RA와 CCR7 개체군의 대표적인 흐름 플롯, n=7. b) (A)로부터 개체군 부분집합의 빈도. ***P < 0.001 및 ****P < 0.0001, RM ANOVA, n=7. c) 자극 4로부터 CCR7^{음성} 과 CCR7⁺ mIL15⁺ CAR⁺ T 세포 및 마지막 항원 자극 후 75 일에 존속하는 것들에서 아넥신 V 수준

을 보여주는 대표적인 히스토그램, $n=3$. 히스토그램은 비특이적 CCR7 염색을 방지하기 위해 림프구 개체군 위에 게이팅된다.

도면 35a-d: 그래프는 유세포분석법 분석에 의한 $mIL15^{+}CAR^{+}$ T 세포의 추가 특성화를 보여준다. 도면 35a, 1-2 년 동안 항원 재자극 없이 배양된, 3가지 정상적인 공여자로부터 WD- $mIL15^{+}CAR^{+}$ T 세포의 항상성 증식 수준 (염색 후 10 일에 PKH 희석) (위쪽 패널), 그리고 aAPC로 항원 재자극 시에 이들 세포의 증식 능력 (아래쪽 패널). 도면 35b, 핵형분석을 위해 제출된 장기간 도피 $mIL15^{+}CAR^{+}$ T 세포의 표현형 (CD3과 $mIL15$ 표면 발현). 도피 T 세포는 먼저, 표현형분석, 그리고 핵형분석을 위한 제출에 앞서 aAPC로 재자극되었다. 도면 35c, 항원 재자극과 외인성 사이토킨의 부재에서 시험관내에서 장기간 (1.5-2.46 년) 존속하는 $mIL15^{+}CAR^{+}$ T 세포의 정상적인 핵형 (G-줄무늬) 결과. 대표적인 중기 확산은 4명의 정상적인 공여자로부터 보여진다. 도면 35d, K562 aAPCs를 이용하여 세포의 자극 후 기억 동역학. 도면 3E, CAR과 $mIL15^{+}CAR^{+}$ T 세포의 1 대 2 자극으로 기억 동역학.

도면 36: 분자 프로파일링은 장기간 존속하는 $mIL15^{+}CAR^{+}$ T 세포가 덜 분화된 T 세포 부분집합과 연관된 특징을 전시한다는 것을 지시한다. 자극 4로부터 $mIL15^{+}CAR^{+}$ T 세포 및 도피 조건을 통해 존속하는 것들 사이에 유의미하게 차별적으로 발현된 모든 유전자는 유전자 존재론 정보에 기초된 광범위한 범주 하에 기능적으로 분류된다. 범주 내에 유전자는 존속하는 도피 $mIL15^{+}CAR^{+}$ T 세포에서 상향- 또는 하향-조절에 기초하여 분할된다.

도면 37: T 세포 분화 상태와 연관된 전사 인자의 검증은 장기간 존속하는 $mIL15^{+}CAR^{+}$ T 세포가 낮은 분화 상태를 전시한다는 것을 지시한다. 위쪽 패널: 선별된 차별적으로 발현된 유전자 (Tcf-7, Blimp-1, 그리고 T-bet)가 세포내 염색에 의해 검증되고 유세포분석법에 의해 분석되었다. 도시된 대표적인 흐름 플롯, $n=5$. 아래쪽 패널: nCounter 분석 시스템 출력으로부터 정규화된 mRNA 사본수.

도면 38: T 세포 분화 상태와 연관된 표면 마커의 검증은 장기간 존속하는 $mIL15^{+}CAR^{+}$ T 세포가 더욱 적은 분화를 전시한다는 것을 지시한다. 위쪽 패널: 선별된 차별적으로 발현된 유전자, IL-7Ra와 CCR7이 염색에 의해 검증되고 유세포분석법에 의해 분석되었다. $*P = 0.0156$ 및 $***P < 0.001$, 각각 1-측 윌콕슨 정합된-쌍 서명된 순위 검사 및 짝비교 1-측 T 검증. 도시된 대표적인 흐름 플롯, $n=5-7$. 아래쪽 패널: nCounter 분석 시스템 출력으로부터 정규화된 mRNA 사본수, $n=3$.

도면 39: $mIL15^{+}CAR^{+}$ T 세포에 의한 IL-2 생산 능력의 획득. a) 자극되지 않거나 또는 림프구 활성화 각테일 (LAC)로 6 시간 동안 활성화된 자극 4 및 존속하는 항원 도피 $mIL15^{+}CAR^{+}$ T 세포 (WD- $mIL15$ -CAR)의 IL-2 세포내 염색, 그 이후에 세포내 IL-2 염색 및 유세포분석법에 의한 분석의 대표적인 히스토그램. b) (A)로부터 IL-2을 생산하는 LAC-자극된 T 세포의 빈도. $****P < 0.0001$, $n=6$, 짝비교 t 검증.

도면 40a-d: 풍부한 종양 항원을 갖는 환경에서 $mIL15^{+}CAR^{+}$ T 세포의 생체내 존속과 항종양 활성. a) 실험의 계통도. b) Nalm-6 종양 도입 후 생쥐 내로 입양 전달된 $mIL15^{+/-}CAR^{+}ffluc^{+}$ T 세포로부터 유래된 BLI ($n=5$). c) 인간 CD3으로 염색 및 유세포분석법에 의한 검출에 의해 인간 T 세포의 존재에 대해 14 일자에 비장 (위쪽 패널)과 골수 (아래쪽 패널)의 분석. 대표적인 흐름 플롯 ($n=5$). d) CD3⁺과 CD19⁺ 세포의 존재에 대해 유세포분석법에 의한 말초혈의 분석. 무린 CD45⁺ 세포를 게이팅 아웃한 후에 획득된 빈도. 데이터는 개별 생쥐 및 평균 $\pm$ SD를 묘사한다. $***P < 0.001$, 일원 변량분석 (ANOVA), $n=3-5$.

도면 41a-e: 낮은 항원 환경에서 $mIL15^{+}CAR^{+}$ T 세포 존속과 항종양 효력을 사정하는 생체내 모델. a) 실험의 계통도. b) CAR^{+} T 세포 또는 $mIL15^{+}CAR^{+}$ T 세포의 입양 전달, 그 이후에 6 일의 T 세포 이식 후 CD19⁺ Nalm-6 종양 주입을 받은 생쥐의 T 세포 ($ffLuc^{+}$) BLI. c) 종적 BLI 모니터링 Nalm-6 부담. 이미지는 Nalm-6 세포-유래된 $rLuc$ 활성으로부터 광양자 플럭스를 나타낸다. d) CAR^{+} T 세포, $mIL15^{+}CAR^{+}$ T 세포, 또는 T 세포 없음으로 처리된 생쥐의 시간의 흐름에서 종양 플럭스 ($rLuc$). 데이터는 평균 $\pm$ SD이다. $****P < 0.0001$, 일원 변량분석 (ANOVA), $n = 4-5$. e) 수확된 조직과 혈액의 분석, 여기서 인간 T 세포 (인간 CD3⁺)와 Nalm-6 종양 세포 (인간

CD19⁺)가 유세포분석법에 의해 검출되었다. e) 낮은 종양 모델을 이용하여, 생쥐의 장기간 생존이 98 일까지 평가되었다. 실험적 조건은 낮은 종양 모델에 대해 앞서 설명된 바와 유사하게 수행되었는데, 여기서 생쥐는 mIL15-CAR T 세포 ($n = 7$), CAR T 세포 ($n = 8$), 또는 T 세포 없음 ($n = 8$)으로 이식되고, 그 이후에 NALM-6 종양 공격이 수행되었다. 팔호 안에 분율은 98 일까지 생존하는 생쥐의 비율을 나타낸다. * $P = 0.045$ (CAR T 세포 처리와 대비하여 mIL15-CAR), 로그 순위 (Mantel-Cox).

도면 42a-e: 항원과는 관계없이 mIL15+CAR+ T 세포의 존속과 유지된 기능. a) 실험의 계통도. b) 종양 항원의 부재에서 CAR+과 mIL15+CAR+ T 세포로 처리된 생쥐에서 ffluc+ T 세포의 BLI. c) 유세포분석법에 의해 검출될 때, 인간 CD3+ T 세포와 CD19+ 종양 세포에 대한 골수, 비장, 그리고 말초혈의 분석. 대표적인 흐름 플롯 (왼쪽 패널) 및 인간 CD3+ T 세포의 플롯팅된 빈도 (오른쪽 패널)가 도시된다. 데이터는 평균 $\pm$ SD, $n=5$ 로서 표현된다. ** $P=0.0027$ (골수), ** $P=0.0081$ (비장), ns=유의하지 않음, 비대칭 t 검증. d) T 세포 플럭스 (ffluc)의 종적 플롯팅. 배경 발광 (회색 음영)은 ffluc+ T 세포를 받지 않은 생쥐로부터 획득된 플럭스에 의해 규정되었다. 데이터는 평균 $\pm$ SD, $n=5$ 로서 표현된다. * $P=0.0128$, ** $P=0.00231$, 비대칭 t 검증. e) 비장, 간, 또는 골수로부터 단리된 세포는 CD19-와 CD19+ 표적에 대한 응답으로 세포내 IFN γ 생산을 사정하기 위한 충분한 세포 수를 산출하기 위해 aAPC에서 탈체 확대되었다 (앞서 설명된 바와 같음), $n = 3$ 가지 조직 공급원 및 4마리 생쥐로부터 7. 히스토그램은 CD3 위에 게이팅되었다.

도면 43: mRNA로서 제공된 SB 유전자전위효소를 이용한 CAR T 세포 생산을 위한 실험 프로토콜을 보여주는 계통도. 활성 CAR T 세포의 효과적인 양이 2 주 또는 그 이하 (가령, 16 일)에서 생산될 수 있었다.

도면 44a-d: 도면 44a, 그래프 (왼쪽 패널) 및 유세포분석법 히스토그램 (오른쪽 패널)은 CAR을 안정되게 발현하는 T-세포의 백분율이 9 일자 (8.3%)에서부터 16 일자 (66.2%)까지 유의미하게 증가한다는 것을 보여준다. 도면 44b, 그래프는 T-세포가 전기천공 후 16 일까지 빠르게 성장하고 20-배 증폭된다는 것을 보여준다. 도면 44c, 그래프는 16 일자 T-세포를 이용한 크롬 방출 검증으로부터 결과를 보여준다. 생산된 CAR T-세포는 표적 세포에 대하여 CD-19-특이적 세포독성을 제공하였다 (왼쪽 패널). 변형되지 않은 T-세포에 대해 본질적으로 어떤 세포독성 활성도 관찰되지 않았다 (오른쪽 패널). 도면 44d, 전기천공 후 9 일자 (왼쪽 패널)와 17 일자 (오른쪽 패널)에 중심 기억 T-세포 (Tcm)의 숫자를 보여주는 유세포분석법 히스토그램. 이들 연구를 위한 세포는 #0로서 지정된 공여자로부터 입수되었고, 그리고 SB11 mRNA가 전기천공에서 이용되었다.

도면 45a-b: 도면 45a, 그래프는 9 일자 (위쪽 패널)와 15 일자 (아래쪽 패널) T-세포를 이용한 크롬 방출 검증으로부터 결과를 보여준다. 생산된 CAR T-세포는 표적 세포에 대하여 CD-19-특이적 세포독성을 제공하였다 (왼쪽 패널). 변형되지 않은 T-세포에 대해 본질적으로 어떤 세포독성 활성도 관찰되지 않았다 (오른쪽 패널). 변형된 T-세포는 상이한 숫자의 CAR-양성 세포에도 불구하고, 9 일자와 15 일자에 유사한 효율로 CD19-양성 표적 세포를 사멸시킨다. 도면 45b, 그래프는 전기천공된 세포에서 CAR 사본수 (왼쪽 패널) 및 CAR 발현 (오른쪽 패널)을 보여준다. 결과는 CAR DNA 사본수가 15 일자에서부터 22 일까지 1.5에서 0.9로 감소하고, 그리고 상기 시점 후 안정된 상태로 있다는 것을 보여준다. 이들 연구를 위한 세포는 #1로서 지정된 공여자로부터 입수되었고, 그리고 SB100x mRNA가 전기천공에서 이용되었다.

도면 46: 전기천공 이후에 세포 생존력을 보여주는 유세포분석법 데이터. DNA/mRNA로 전기천공 후, 세포의 총수가 초기에 (1 일자와 2 일자) 감소하고, 그리고 이후, 세포가 증가하기 시작한다. 셀로미터 수치에 따르면, 세포 수는 전기천공 후 2 일자에 59% - 76% 감소한다 (생존력 24-41%).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

예시적인 구체예의 설명

임상 시험은 원하는 특이성을 갖도록 유전적으로 변형된 T 세포를 제공받은 환자에서 항종양 효과를 나타냈다. 본원에서, cGMP에 따라 항원 특이적 CAR⁺ T 세포를 제조하는 새로운 접근법이 상술된다. 상기 시스템은 트랜스포손 및 유전자전위효소 시스템 CAR 유전자 통합과 함께 고도로 효율적인 형질감염 시스템을 이용한다. 이들 바이러스 접근법은 바이러스-매개된 형질도입에 대안으로서 유의미한 이점을 갖는데, 그 이유는 임상적 등급 CAR⁺ T 세포가 바람직하게는, 부가된 바이러스 서열을 포함하지 않아야 하기 때문이다. 높은 품질 cGMP CAR T-세포는 트랜스포손 시스템, 예를 들면, *잠자*는 *미너* 또는 piggyBac로부터 유래된 DNA 플라스미드의 전자 전달, 그리고 aAPC에서 유전적으로 변형된 T 세포의 증식에 의해 달성되었다. 이러한 접근법은 그들의 표적 항원 (가

령, CD19)에 대해 특이성을 나타내는 임상적으로 매력적인 숫자의 CAR⁺ T 세포의 성장을 유발하였다. 중요하게는, 이들 세포는 임상 시험에서 이용을 위해 FDA에 의해 확립된 방출 기준에 부합하였다. 이들 방법은 바이러스의 이용으로 인한 바이러스-매개된 형질도입과 면역원성에 기인한 유전독성을 방지한다.

[0040] 키메라 항원 수용체 (CAR)는 인간 백혈구 항원 (HLA)과는 관계없이 세포 표면 종양-연관된 항원을 인식하고, 그리고 사멸, 증식, 그리고 사이토킨 생산을 위해 유전적으로 변형된 T 세포를 활성화시키기 위한 하나 또는 그 이상의 신호전달 분자를 이용한다 (Jena *et al.*, 2010). CAR을 발현하는 T 세포의 입양 전달은 복수 임상 시험에서 희망을 보여주었다. 현재, 임상적 등급 유전적으로 변형된 T 세포를 제조하기 위해 모듈식 접근법을 이용하는 것이 가능하다. 일정한 구체예에서, 본원에서 개시된 플랫폼 기술은 (i) 전기천공 장치 (가령, 뉴클레오펙터를) 이용한 비바이러스 유전자 전달, (ii) 전위 (가령, SB 트랜스포손, 본원에 참조로서 편입된 U.S. 특허 6,489,458을 참조한다), (iii) 엔도도메인 (가령, CD28/CD3- ζ , CD137/CD3- ζ , 또는 다른 조합)을 통해 신호하는 CAR, (iv) 항원 인식 도메인을 세포 표면에 연결하는 세포외 도메인의 가변적 길이를 갖는 CAR, 그리고 일부 경우에, (v) CAR⁺ T 세포를 강건하게 및 수치적으로 확대할 수 있는 K562으로부터 유래된 인공 항원 제시 세포 (aAPC) (Singh *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2012)를 포함한다.

[0041] 일부 구체예에서, 현재 개시된 과정은 aAPC를 이용하여 시험관내에서 수치적으로 확대될 수 있는 CAR(들)을 발현하기 위해, 말초혈 및/또는 제대혈로부터 유래된 T 세포를 유전적으로 변형하는데 이용될 수 있다 (Singh *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2011). 이러한 과정은 DNA 플라스미드 생산, 전기천공, 해동된 γ -방사선조사된 마스터-은행 aAPC의 이용의 상대적 용이함으로 인해 세포와 유전자 요법에 대한 함의를 갖고, 그리고 I/II 단계 시험을 위한 현재 의약품 제조 품질 관리 기준 (cGMP)에 따라 가동 중인 시설로 쉽게 이전될 수 있다. T 세포를 제조하는 개시된 방법은 최소한, 이것이 (i) 바이러스-형질도입 또는 (ii) 나신 DNA 전기천공, 그 이후에 PBMC/LCL 영양세포층의 급속한 확대를 이용하지 않는다는 점에서 독특하다. 실례로서, HLA와는 관계없이 CD19를 인식하는 CAR의 강제된 발현을 통해 CD19를 표적으로 하기 위한 방법이 개시된다. 이들 T 세포는 무균, 표현형, 생존력, 그리고 세포 수에 의해 규정된 방출 기준에 부합한다. 공정중 검사는 전기천공된/증식된 T 세포가 기억/미경형 개체군에서 CAR을 발현하고, 정상적인 핵형, 보존된 TCR V β 레퍼토리를 갖고, 그리고 CD19⁺ 종양 표적을 CAR-의존성 방식으로 인식하고 용해할 수 있다는 것을 드러냈다.

[0042] 비바이러스 플라스미드의 전자 전달은 형질도입에 대한 매력적인 대안인데, 그 이유는 DNA 종류가 재조합 GMP-등급 바이러스의 대략 1/10 비용에서 임상적 등급까지 생산될 수 있기 때문이다. 통합의 효율을 향상시키기 위해, 본 발명자들은 인간 적용을 위해 잠자는 *미녀* (SB) 트랜스포손과 유전자전위효소를 적합시켰다 (Aronovich *et al.*, 2011; Hackett *et al.*, 2010; Izsvak *et al.*, 2010; Kebriaei *et al.*, 2012; Williams, 2008). 추가적으로, 이들은 CAR의 발현을 시행하기 위해 piggyBac 트랜스포손/유전자전위효소 시스템을 이용하였다 (Manuri *et al.*, 2010). 본 발명자의 SB 시스템은 관심되는 유전자 (가령, 2세대 CD19-특이적 CAR 도입유전자, 예를 들면, 지정된 CD19RCD28)를 코딩하는 트랜스포손 및 도입유전자를 표적 세포 유전체 내에 TA 디뉴클레오티드 반복 내로 삽입하는 유전자전위효소 (가령, SB11)를 포함하는 2개의 DNA 플라스미드를 이용한다 (Geurts *et al.*, 2006; Ivics *et al.*, 1997; Izsvak and Ivics, 1997). 치료 잠재력을 향상시키기 위해, 본 발명자의 2세대 CAR (Kowolik *et al.*, 2006)은 CD28과 CD3- ζ 을 통해 신호하는데, 이것은 생체내에서 T-세포 증식을 지속하고 작동체 기능을 재활용할 것으로 기대된다. 이에 더하여, 변하는 세포외 길이 및 상이한 엔도도메인 신호전달 모티프를 갖는 CAR은 SB 시스템을 이용하여 발현될 수 있다.

[0043] CAR을 안정되게 발현하는 T-세포 구성 부분을 회수하기 위해, 지속된 CAR-매개된 증식을 할 수 있는 T 세포에 대해 시험관내 선별하기 위해 동시자극성 분자, 예를 들면, CD86, CD137L, 인터류킨 (IL)-15의 막-결합된 이형 (IL-15 수용체 알파에 융합된 변형된 IgG4 Fc 영역 또는 사이토킨 펩티드에 융합된 펩티드), 그리고 CD64 (Fc- γ 수용체 1)와 함께, 원하는 항원 (가령, CD19)을 발현하는 K562 aAPC (클론 #4)가 개발되었다. 이러한 유력한 기술은 인간 적용에 적합한 임상적으로 유관한 숫자 (10^{10} 까지)의 CAR⁺ T 세포의 제조를 허용하였다. 필요에 따라, 더욱 큰 숫자의 유전적으로 변형된 T 세포를 산출하기 위해 추가 자극 주기가 착수될 수 있다. 게다가, 더욱 적은 CAR⁺ T 세포가 필요하면, 전기천공과 증식의 접근법이 축소되어 더욱 적은 큐벳이 이용되고 aAPC (각 자극 주기의 시작 시점에 첨가된)에서 0, 1, 또는 그 이상 라운드의 증식을 위해 수치적으로 확대된 T 세포의 부분집합만이 진척될 수 있다. 전형적으로, 증식된 T 세포 중에서 최소한 90%가 CAR을 발현하고 주입을 위해 냉동보존된다. 게다가, 이러한 접근법은 도입된 CAR의 특이성을 aAPC에서 CAR에 의해 인식된 종양-연관된 항원 (TAA)의 발현과 짝짓기함으로써 다양한 종양 유형에 대한 T 세포를 산출하는데 이용될 수 있다. 탈체 확대 플랫폼

폼은 또한, NK 세포, NK T 세포, 그리고 $\gamma\delta$ T 세포를 제조하기 위해 적합되었다.

[0044] 2세대 CAR을 발현하는 $CD4^+$ 와 $CD8^+$ T 세포의 생장은 줄기-세포/기억/미경험 표현형을 갖는 세포를 포함하고 전향된 특이성의 3가지 홀마크를 전시한다. 첫 번째, 유전적으로 변형된 T 세포는 $CD19^+$ 표적을 특이적으로 용해한다. 두 번째, 이들은 $CD19^+$ 자극기 세포에 대한 응답으로 사이토킨 (가령, $IFN-\gamma$)을 생산한다. 세 번째, 이들은 온전히 CAR-의존성 방식으로, $CD19^+$ 자극에 대한 응답으로 증식한다 (Singh *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2008). aAPC와 조직 배양 환경 (가령, IL-21의 첨가)은 조혈 줄기-세포 이식 후 주입을 위한 환자-와 공여자-유래된 $CD19^+$ -특이적 T 세포를 산출하기 위해 변형되었다 (Singh *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2008). 본 발명자들은 정맥천자에 의해 간단히 획득된 말초혈로부터 CAR^+ T 세포를 생산할 수 있는데, 이것은 성분채집술에 의해 단핵 세포를 획득할 때의 비용, 불편, 그리고 불편함을 방지한다. 적은 숫자의 단핵 세포로부터 다수의 CAR^+ T 세포를 끌어내는 능력은 동종이계 제대혈 이식 후 T 세포를 주입하는데 있어서 특히 매력적이다. 신생아 공여자의 작은 크기와 익명성은 이러한 개체를 추후 시점에서 재접근하는 것을 배제하고, 그리고 단지 제한된 숫자의 수확된 단핵 세포만 조혈을 간섭하는 것을 방지하기 위해 T 세포 제조를 위한 출발 물질로서 가용하다. 게다가 제조 공정까지 진전은 취급을 최소화하기 위해 완전히 폐쇄된 WAVE 생물반응장치와 연계된 고처리량 전기천공 장치를 포함한다.

[0045] 제조를 위한 현재의 접근법은 작업 부하를 감소시키고 무균에서 파괴에 대비하여 보호하기 위한 처리와 배양 시스템의 실행을 포함한다. 이를 위해, 본 발명자들은 플라스크보다는 생물반응장치 및/또는 가방에서 T 세포를 γ -방사선조사된 aAPC와 공동배양하였다. 이러한 전이는 전형적으로, 전기천공 이후에 14 일자 후 발생한다. 이에 더하여, 공급원 물질로서 aAPC는 생물반응장치 및/또는 가방에서 수치적으로 확대되고, 그리고 본 발명자들은 냉동보존용으로 aAPC를 처리하기 위해 Sepax 장치를 적합시켰다. Sepax 수확 절차는 큰 부피의 배양 배지 (>900 mL)를 이용할 때 자동화를 뛰어 넘어 추가 이점을 갖는데, 그 이유는 이것이 수동 과정에 의해 필요한 추가 원심분리 단계를 감소시키기 때문이다.

[0046] I. 정의

[0047] 용어 "키메라 항원 수용체 (CARs)"는 본원에서 이용된 바와 같이, 예로서 인공 T 세포 수용체, 키메라 T 세포 수용체, 또는 키메라 면역수용체를 지칭할 수 있고, 그리고 특정 면역 작동체 세포 위에 인공 특이성을 이식하는 가공된 수용체를 포괄한다. CAR은 T 세포 위에 단일클론 항체의 특이성을 부여하고, 따라서 다수의 특정한 T 세포가 예로서, 입양 세포 요법에서 이용을 위해 산출될 수 있도록 하는데 이용될 수 있다. 특정한 구체예에서, CAR은 세포의 특이성을 예로서, 종양 연관된 항원으로 향하게 한다. 일부 구체예에서, CAR은 세포내 활성화 도메인, 막영역 도메인, 그리고 종양 연관된 항원 결합 영역을 포함하는 세포외 도메인을 포함한다. 특정 양상에서, CAR은 CD3-제타 막영역 도메인 및 엔도도메인에 융합된, 단일클론 항체로부터 유래된 단일 사슬 가변 단편(scFv)의 융합을 포함한다. 다른 CAR 설계의 특이성은 수용체 (가령, 펩티드)의 리간드로부터 또는 패턴-인식 수용체, 예를 들면, 렉틴으로부터 유래될 수 있다. 특정 구체예에서, B-계통 분자, $CD19$ 에 특이적인 CAR을 이용함으로써 T 세포의 특이성을 전향시킴으로써 악성 B 세포를 표적으로 할 수 있다. 일정한 경우에, 항원 인식 도메인의 이격은 활성화-유도된 세포 사멸을 감소시키도록 변형될 수 있다. 일정한 경우에, CAR은 추가 동시자극성 신호전달, 예를 들면, $CD3$ -제타, FcR, $CD27$, $CD28$, $CD137$, DAP10, 및/또는 OX40에 대한 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 동시자극성 분자, 영상 (가령, 양성자 방출 단층촬영술)을 위한 리포터 유전자, 전구약물의 첨가시에 T 세포를 조건적으로 마멸시키는 유전자 산물, 귀소 수용체, 케모킨, 케모킨 수용체, 사이토킨, 그리고 사이토킨 수용체를 비롯한 분자가 CAR과 공동발현될 수 있다.

[0048] 용어 "T 세포 수용체 (TCR)"는 본원에서 이용된 바와 같이, 알파 (α)와 베타 (β) 사슬의 이형이합체로 구성되는 T 세포에서 단백질 수용체를 지칭하고, 하지만 일부 세포에서는 TCR이 감마와 델타 (γ/δ) 사슬로 구성된다. 본 발명의 구체예에서, TCR은 예로서, 보조 T 세포, 세포독성 T 세포, 기억 T 세포, 조절 T 세포, 자연 킬러 T 세포, 그리고 감마 델타 T 세포를 비롯하여, TCR을 포함하는 임의의 세포에서 변형될 수 있다.

[0049] 용어 "종양-연관된 항원" 및 "암 세포 항원"은 본원에서 교체가가능하게 이용된다. 각 경우에, 이들 용어는 암 세포에 의해 특이적으로 또는 우선적으로 발현되는 단백질, 당단백질 또는 탄수화물을 지칭한다.

[0050] II. 키메라 항원 수용체

[0051] 본원에서 이용된 바와 같이, 용어 "항원"은 항체 또는 T 세포 수용체에 의해 결합될 수 있는 분자이다. 항원은 부가적으로, B 및/또는 T 림프구의 생산을 야기하는 체액성 면역 반응 및/또는 세포성 면역 반응을 유도할 수

있다.

[0052] 본 발명의 구체예는 세포내 신호전달 도메인, 막경유 도메인, 그리고 하나 또는 그 이상의 신호전달 모티프를 포함하는 세포의 도메인을 포함하는, 면역원성 (hCAR)을 감소시키기 위해 인간화된 CAR을 비롯한 항원 특이적 키메라 항원 수용체 (CAR) 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 비롯한 핵산을 수반한다. 일정한 구체예에서, CAR은 하나 또는 그 이상의 항원 사이에 공유된 공간으로 구성된 에피토프를 인식할 수 있다. 패턴 인식 수용체, 예를 들면, 텍틴-1은 탄수화물 항원에 대한 특이성을 끌어내는데 이용될 수 있다. 일정한 구체예에서, 결합 영역은 단일클론 항체의 상보성 결정 영역, 단일클론 항체의 가변 영역, 및/또는 이의 항원 결합 단편을 포함할 수 있다. 다른 구체예에서, 특이성은 수용체에 결합하는 펩티드 (가령, 사이토킨)로부터 유래된다. 상보성 결정 영역 (CDR)은 항원을 보완하고 이런 이유로, 수용체에 상기 특정 항원에 대한 특이성을 제공하는, 항원 수용체 (가령, 면역글로불린 및 T 세포 수용체) 단백질의 가변 도메인에서 발견되는 짧은 아미노산 서열이다. 항원 수용체의 각 폴리펩티드 사슬은 3개의 CDR (CDR1, CDR2, 그리고 CDR3)을 내포한다. 이들 항원 수용체가 전형적으로, 2개의 폴리펩티드 사슬로 구성되기 때문에, 항원과 접촉할 수 있는 각 항원 수용체에 대한 6개 CDR이 있다 -- 각 중쇄와 경쇄는 3개의 CDR을 내포한다. 면역글로불린 및 T 세포 수용체와 연관된 대부분의 서열 변이가 CDR에서 발견되기 때문에, 이들 영역은 때때로, 추가변 도메인으로서 지칭된다. 이들 사이에서, CDR3은 최대 가변성을 보여주는데, 그 이유는 이것이 VJ (중쇄와 TCR $\alpha\beta$ 사슬의 경우에 VDJ) 영역의 재조합에 의해 인코딩되기 때문이다. 인간 CAR 핵산은 인간 환자에 대한 세포 면역요법을 증강하는 인간 유전자인 것으로 예기된다. 특정한 구체예에서, 본 발명은 전장 CAR cDNA 또는 코딩 영역을 포함한다. 항원 결합 영역 또는 도메인은 특정 인간 단일클론 항체, 예를 들면, 본원에 참조로서 편입된 U.S. 특허 7,109,304에서 설명된 것들로부터 유래된 단일 사슬 가변 단편 (scFv)의 V_H 와 V_L 사슬의 단편을 포함할 수 있다. 단편은 또한, 인간 항원 특이적 항체의 수많은 상이한 항원 결합 도메인일 수 있다. 더욱 특정한 구체예에서, 단편은 인간 세포에서 발현을 위해 인간 코돈 사용빈도에 대해 최적화된 서열에 의해 인코딩된 항원 특이적 scFv이다.

[0053] 배열은 다중결합, 예를 들면, 디아바디 또는 다합체일 수 있었다. 다합체는 아마도, Winters에 의해 디아바디로서 지칭된 것으로의 경쇄와 중쇄의 가변적 부분의 교차 짝짓기에 의해 형성된다. 이러한 구조체의 힌지 부분은 완전히 결실되는 것에서부터 첫 번째 시스테인이 유지되는 것까지, 세린 치환보다는 프롤린 치환까지, 첫 번째 시스테인까지 절두되는 것까지의 복수 대안을 가질 수 있다. Fc 부분은 결실될 수 있다. 안정되고 및/또는 이합체화하는 임의의 단백질은 이러한 목적에 이바지할 수 있다. 이들 Fc 도메인 중에서 단지 한 가지, 예를 들면, 인간 면역글로불린으로부터 CH2 또는 CH3 도메인을 이용할 수 있었다. 또한, 이합체화를 향상시키기 위해 변형된 인간 면역글로불린의 힌지, CH2와 CH3 영역을 이용할 수 있었다. 또한, 면역글로불린의 힌지 부분만을 이용할 수 있었다. 또한, CD8알파의 부분을 이용할 수 있었다.

[0054] 본 발명의 키메라 수용체의 세포내 신호전달 도메인은 키메라 수용체가 배치된 면역 세포의 정상적인 작동체 기능 중에서 최소한 한 가지의 활성화를 책임진다. 용어 "작동체 기능"은 분화된 세포의 특수한 기능을 지칭한다. T 세포의 작동체 기능은 예로서, 세포용해 활성 또는 사이토킨의 분비를 비롯한 보조 활성일 수 있다. 미경험, 기억, 또는 기억-유형 T 세포에서 작동체 기능은 항원-의존성 증식을 포함한다. 따라서 용어 "세포내 신호전달 도메인"은 작동체 기능 신호를 변환하고, 그리고 특수한 기능을 수행하도록 세포를 지휘하는 단백질의 부분을 지칭한다. 통상적으로 전체 세포내 신호전달 도메인이 이용될 것이긴 하지만, 많은 경우에 전체 세포내 폴리펩티드를 이용하는 것이 필요하지는 않을 것이다. 세포내 신호전달 도메인의 절두된 부분이 용도를 발견할 수 있는 정도까지, 이런 절두된 부분은 작동체 기능 신호를 여전히 변환하기만 하면, 본래 사슬 대신에 이용될 수 있다. 용어 세포내 신호전달 도메인은 따라서, 작동체 기능 신호를 변환하는데 충분한 세포내 신호전달 도메인의 임의의 절두된 부분을 포함하는 것으로 의미된다. 실시예는 T 세포 수용체의 제타 사슬 또는 임의의 이의 동족체 (가령, 에타, 델타, 감마, 또는 엡실론), MB1 사슬, B29, Fc RIII, Fc RI, 그리고 신호전달 분자의 조합, 예를 들면, CD3 ζ 와 CD28, CD27, 4-1BB, DAP-10, OX40 및 이들의 조합뿐만 아니라 다른 유사한 분자와 단편을 포함한다. 활성화 단백질의 패밀리의 다른 구성원의 세포내 신호전달 부분, 예를 들면, Fc γ RIII와 Fc ϵ RI가 이용될 수 있다. 이들 대안적 막경유와 세포내 도메인을 이용한 cTCR의 개시를 위해 Gross *et al.* (1992), Stancovski *et al.* (1993), Moritz *et al.* (1994), Hwu *et al.* (1995), Weijtens *et al.* (1996), 그리고 Hekele *et al.* (1996)을 참조한다. 바람직한 구체예에서, 인간 CD3 ζ 세포내 도메인이 활성화를 위해 취해졌다.

[0055] 항원 특이적 세포의 도메인 및 세포내 신호전달-도메인은 막경유 도메인, 예를 들면, 인간 IgG₄Fc 힌지와 Fc 영역에 의해 연결될 수 있다. 대안은 인간 CD4 막경유 도메인, 인간 CD28 막경유 도메인, 막경유 인간 CD3 ζ 도메인, 또는 시스테인 돌연변이된 인간 CD3 ζ 도메인, 또는 다른 인간 막경유 신호전달 단백질, 예를 들면, CD16과

CD8과 에리트로포이에틴 수용체로부터 다른 막경유 도메인을 포함한다.

- [0056] 일부 구체예에서, CAR 핵산은 다른 동시자극성 수용체, 예를 들면, 막경유 도메인 및 변형된 CD28 세포내 신호 전달 도메인을 인코딩하는 서열을 포함한다. 다른 동시자극성 수용체에는 CD28, CD27, OX-40 (CD134), DAP10, 그리고 4-1BB (CD137) 중에서 하나 또는 그 이상이 포함되지만 이들에 한정되지 않는다. CD3 ζ 에 의해 시작된 일차 신호에 더하여, 인간 CAR에서 삽입된 인간 동시자극성 수용체에 의해 제공된 추가 신호가 T 세포의 완전한 활성화에 중요하고, 그리고 생체내 존속 및 입양 면역요법의 치료적 성공을 향상시키는데 도움을 줄 수 있었다.
- [0057] 특정 구체예에서, 본 발명은 CAR을 인코딩하는 DNA 서열을 함유하는 단리된 핵산 분절과 발현 카세트에 관계한다. 본 발명의 벡터는 일차적으로, 조절된 진행 프로모터, 예를 들면, MNDU3 프로모터, CMV 프로모터, EF1알파 프로모터, 또는 유비퀴틴 프로모터의 제어 하에 면역 세포, 바람직하게는 T 세포에 원하는 유전자를 전달하도록 설계된다. 또한, 벡터는 다른 이유 없이, 시험관내에서 그들의 조작을 용이하게 하기 위한 선별가능 마커를 내포할 수 있다. 다른 구체예에서, CAR은 DNA 원형으로부터 시험관내 전사된 mRNA로부터 발현될 수 있다.
- [0058] 키메라 항원 수용체 분자는 재조합이고, 그리고 항원에 결합할 뿐만 아니라 그들의 세포질 꼬리 내에 존재하는 면역수용체 활성화 모티프 (ITAM's)를 거쳐 활성화 신호를 변환하는 그들의 능력에 의해 식별된다. 항원 결합 모이어티 (가령, 단일 사슬 항체 (scFv)로부터 산출된)를 활용하는 수용체 구조체는 이들이 HLA-독립된 방식으로 표적 세포 표면 상에서 선천적 항원에 결합한다는 점에서, "보편적임"의 추가 이점을 제공한다. 가령, 여러 실험실이 CD3 복합체의 제타 사슬 (ζ), Fc 수용체 감마 사슬, 그리고 sky 티로신 키나아제의 세포내 부분을 코딩하는 서열에 융합된 scFv 구조체에 관해 보고하였다 (Eshhar *et al.*, 1993; Fitzer-Attas *et al.*, 1998). CTL에 의한 종양 인식과 용해를 포함하는 전향된 T 세포 작동체 기전이 여러 뮤린과 인간 항원-scFv: ζ 시스템에서 방증되었다 (Eshhar, 1997; Altenschmidt *et al.*, 1997; Brocker *et al.*, 1998).
- [0059] 현재까지, 비-인간 항원 결합 영역이 전형적으로, 키메라 항원 수용체를 작제하는데 이용된다. 비-인간 항원 결합 영역, 예를 들면, 뮤린 단일클론 항체를 이용할 때 잠재적 문제점은 인간 작동체 기능의 결여 및 종양 덩어리를 뚫고 들어가는 능력 없음이다. 다시 말하면, 이런 항체는 보체-의존성 용해를 매개하거나, 또는 CAR을 발현하는 세포를 파괴하는 항체-의존성 세포 독성 또는 Fc-수용체 매개된 식균작용을 통해 인간 표적 세포를 용해할 수 없을 수도 있다. 게다가, 비-인간 단일클론 항체는 인간 숙주에 의해 외래 단백질로서 인식될 수 있고, 그리고 이런 이유로, 이런 외래 항체의 반복된 주사는 유해한 과민 반응을 야기하는 면역 반응의 유도를 야기할 수 있다. 뮤린-기초된 단일클론 항체의 경우에, 이것은 종종, 인간 항생제 항체 (HAMA) 반응으로서 지칭된다. 이런 이유로, 인간 항체의 이용이 더욱 바람직한데, 그 이유는 이들이 뮤린 항체만큼 강한 HAMA 반응을 이끌어 내지 않기 때문이다. 유사하게, CAR에서 인간 서열의 이용은 면역-매개된 인식, 그리고 이런 이유로, 수용자 내에 체류하고 HLA의 배경에서 처리된 항원을 인식하는 내인성 T 세포에 의한 제거를 방지할 수 있다.
- [0060] 일부 구체예에서, 키메라 항원 수용체는 a) 세포내 신호전달 도메인, b) 막경유 도메인, 그리고 c) 항원 결합 영역을 포함하는 세포외 도메인을 포함한다.
- [0061] 특정한 구체예에서, CAR에서 세포내 수용체 신호전달 도메인은 단독으로 또는 예로서, CD3제타와 일련으로, T 세포 항원 수용체 복합체의 것들, 예를 들면, CD3의 제타 사슬, 또한 Fc γ RIII 동시자극성 신호전달 도메인, CD28, CD27, DAP10, CD137, OX40, CD2를 포함한다. 특정한 구체예에서, 세포내 도메인 (세포질 도메인으로서 지칭될 수 있다)은 TCR 제타 사슬, CD28, CD27, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, Fc ϵ RI γ , ICOS/CD278, IL-2R베타/CD122, IL-2R알파/CD132, DAP10, DAP12, 그리고 CD40 중에서 하나 또는 그 이상의 부분 또는 전부를 포함한다. 일부 구체예에서, 세포내 도메인에서 내인성 T 세포 수용체 복합체의 임의의 부분이 이용된다. 하나 또는 복수 세포질 도메인이 이용될 수 있는데, 그 이유는 이른바 3세대 CAR이 예로서, 부가 또는 상승 효과를 위해 함께 융합된 최소한 2개 또는 3개의 신호전달 도메인을 갖기 때문이다.
- [0062] 키메라 항원 수용체의 일정한 구체예에서, 수용체의 항원 특이적 부분 (항원 결합 영역을 포함하는 세포외 도메인으로서 지칭될 수 있다)은 패턴-인식 수용체, 예를 들면, 텍틴-1에 의해 인식된 탄수화물 항원을 비롯한 종양 연관된 항원 또는 병원체-특이적 항원 결합 도메인을 포함한다. 종양 연관된 항원은 종양 세포의 세포 표면 상에서 발현되지만 하면, 임의의 종류일 수 있다. 종양 연관된 항원의 예시적인 구체예는 CD19, CD20, 암배아 항원, 알파 태아단백질, CA-125, MUC-1, CD56, EGFR, c-Met, AKT, Her2, Her3, 상피 종양 항원, 흑색종-연관된 항원, 돌연변이된 p53, 돌연변이된 ras, 기타 등등을 포함한다. 일정한 구체예에서, CAR은 낮은 양의 종양-연관된 항원이 있을 때, 존속을 향상시키기 위해 막-결합된 사이토킨과 공동발현될 수 있다. 가령, CAR은 막-결합된 IL-15와 공동발현될 수 있다.

- [0063] 일정한 구체예에서, 세포내 종양 연관된 항원, 예를 들면, HA-1, 서바이빈, WT1, 그리고 p53이 표적화될 수 있다. 이것은 HLA의 배경에서 세포내 종양 연관된 항원으로부터, 설명된 처리된 펩티드를 인식하는 보편적인 T 세포 상에서 발현된 CAR에 의해 달성될 수 있다. 이에 더하여, 보편적인 T 세포는 HLA의 배경에서 세포내 처리된 종양 연관된 항원을 인식하는 T 세포 수용체 짝짓기를 발현하도록 유전적으로 변형될 수 있다.
- [0064] 병원체는 임의의 종류일 수 있지만, 특정한 구체예에서 병원체는 예로서, 균류, 세균, 또는 바이러스이다. 예시적인 바이러스 병원체는 아데노바이러스과 (Adenoviridae), 엡스타인-바르 바이러스 (EBV), 시토메갈로바이러스 (CMV), 호흡기 합포체 바이러스 (RSV), JC 바이러스, BK 바이러스, HSV, 바이러스의 HHV 패밀리, 피코르나바이러스과 (Picornaviridae), 헤르페스바이러스과 (Herpesviridae), 헤파드나바이러스과 (Hepadnaviridae), 플라비바이러스과 (Flaviviridae), 레트로바이러스과 (Retroviridae), 오소믹소바이러스과 (Orthomyxoviridae), 파라믹소바이러스과 (Paramyxoviridae), 파포바바이러스과 (Papovaviridae), 폴리오마바이러스, 람도바이러스과 (Rhabdoviridae), 그리고 토가바이러스과 (Togaviridae)의 패밀리의 것들을 포함한다. 예시적인 병원성 바이러스는 천연두, 인플루엔자, 유행성이하선염, 홍역, 수두, 에볼라, 그리고 풍진을 유발한다. 예시적인 병원성 균류는 칸디다 (*Candida*), 아스페르길루스 (*Aspergillus*), 크립토코쿠스 (*Cryptococcus*), 히스토플라스마 (*Histoplasma*), 폐포자충 (*Pneumocystis*), 그리고 스타치보트리스 (*Stachybotrys*)를 포함한다. 예시적인 병원성 세균은 스트렙토코쿠스 (*Streptococcus*), 슈도모나스 (*Pseudomonas*), 시겔라 (*Shigella*), 캄필로박터 (*Campylobacter*), 스탕틸로코쿠스 (*Staphylococcus*), 헬리코박터 (*Helicobacter*), 대장균 (*E. coli*), 리케차 (*Rickettsia*), 바실루스 (*Bacillus*), 보르데텔라 (*Bordetella*), 클라미디아 (*Chlamydia*), 스피로헨테스 (*Spirochetes*), 그리고 살모넬라 (*Salmonella*)를 포함한다. 한 구체예에서, 병원체 수용체 텍틴-1이 균류의 세포 벽 상에서 탄수화물 구조를 인식하는 CAR을 산출하는데 이용될 수 있다. 텍틴-1의 특이성에 기초하여 CAR을 발현하도록 유전적으로 변형된 T 세포는 아스페르길루스 (*Aspergillus*)를 인식하고 팽이실 성장을 표적으로 할 수 있다. 다른 구체예에서, CAR은 바이러스 감염과 병리를 방해하기 위해 바이러스 결정인자 (가령, CMV와 에볼라 (Ebola)로부터 당단백질)를 인식하는 항체에 기초하여 만들어질 수 있다.
- [0065] 일부 구체예에서, 병원성 항원은 CAR에서 세포의 도메인이 진균 세포 벽의 탄수화물의 패턴을 예로서, 텍틴-1을 거쳐 인식하는 아스페르길루스 (*Aspergillus*) 탄수화물 항원이다.
- [0066] 본 발명에 따른 키메라 면역수용체는 당분야에서 공지된 임의의 수단에 의해 생산될 수 있고, 하지만 바람직하게는, 재조합 DNA 기술을 이용하여 생산된다. 키메라 수용체의 여러 영역을 인코딩하는 핵산 서열은 분자 클로닝의 표준 기술 (유전체 라이브러리 선별검사, PCR, 프라이머-보조된 절찰, 효모와 세균으로부터 scFv 라이브러리, 특정 부위 돌연변이유발 등)에 의해 제조되고 완전한 코딩 서열로 조립될 수 있다. 결과의 코딩 영역은 발현 벡터 내로 삽입되고, 그리고 적합한 발현 숙주 동종이계 T-세포주를 형질전환하는데 이용될 수 있다.
- [0067] 본원에서 이용된 바와 같이, 핵산 구조체 또는 핵산 서열 또는 폴리뉴클레오티드는 산물 (가령, 키메라 항원 수용체)을 생산하기 위해, T 세포 내로 형질전환되거나 또는 도입되고, 그리고 전사되고 번역될 수 있는 DNA 분자를 의미하는 것으로 의도된다.
- [0068] 본 발명에서 이용된 예시적인 핵산 구조체 (폴리뉴클레오티드)에서, 프로모터가 본 발명의 키메라 수용체를 인코딩하는 핵산 서열에 작동가능하게 연결된다, 다시 말하면, 이들은 키메라 수용체를 인코딩하는 DNA로부터 전령 RNA의 전사를 증진하기 위해 배치된다. 프로모터는 유전체 기원이거나 또는 합성적으로 산출될 수 있다. T 세포에서 이용을 위한 다양한 프로모터가 당분야에서 널리 공지된다 (가령, Marodon *et al.* (2003)에 의해 개시된 CD4 프로모터). 프로모터는 구조성 또는 유도성일 수 있는데, 여기서 유도는 예로서, 특정한 세포 유형 또는 특정한 성숙 수준과 연관된다. 대안으로, 다수의 널리 공지된 바이러스 프로모터 역시 적합하다. 관심되는 프로모터는 β -액틴 프로모터, SV40 초기와 후기 프로모터, 면역글로불린 프로모터, 인간 시토메갈로바이러스 프로모터, 레트로바이러스 프로모터, 그리고 Friend 비장 초점-형성 바이러스 프로모터를 포함한다. 프로모터는 인헨서와 연관되거나 또는 연관되지 않을 수도 있는데, 여기서 인헨서는 특정 프로모터와 자연적으로 연관되거나 또는 상이한 프로모터와 연관될 수 있다.
- [0069] 키메라 수용체를 인코딩하는 개방 해독틀의 서열은 유전체 DNA 공급원, cDNA 공급원으로부터 획득될 수 있거나, 또는 합성될 수 있거나 (가령, PCR을 통해), 또는 이들의 조합일 수 있다. 유전체 DNA의 크기 및 인트론의 숫자에 따라, cDNA 또는 이들의 조합을 이용하는 것이 바람직할 수 있는데, 그 이유는 인트론이 mRNA를 안정시키거나 또는 T 세포-특이적 발현을 제공하는 것으로 밝혀졌기 때문이다 (Barthel and Goldfeld, 2003). 또한, mRNA를 안정시키기 위해 내인성 또는 외인성 비코딩 영역을 이용하는 것이 더욱 유리할 수 있다.
- [0070] 본 발명의 키메라 항원 수용체의 발현을 위해, 키메라 수용체의 N 말단 성분을 인코딩하는 핵산 서열의 자연발

생 또는 내인성 전사 개시 영역이 표적 숙주에서 키메라 수용체를 산출하는데 이용될 수 있다. 대안으로, 구조성 또는 유도성 발현을 허용하는 외인성 전사 개시 영역이 이용될 수 있는데, 여기서 발현은 표적 숙주, 원하는 발현 수준, 표적 숙주의 성격, 기타 등등에 따라 제어될 수 있다.

[0071] 유사하게, 키메라 수용체를 표면 막으로 향하게 하는 신호 서열은 키메라 수용체의 N 말단 성분의 내인성 신호 서열일 수 있다. 임의선택적으로, 일부 경우에, 이러한 서열을 상이한 신호 서열로 교환하는 것이 바람직할 수 있다. 하지만, 선별된 신호 서열은 키메라 수용체가 T 세포의 표면 상에서 제시되도록, T 세포의 분비 경로와 양립성이어야 한다.

[0072] 유사하게, 종결 영역이 키메라 수용체의 C 말단 성분을 인코딩하는 핵산 서열의 자연발생 또는 내인성 전사 종결 영역에 의해 제공될 수 있다. 대안으로, 종결 영역은 상이한 공급원으로부터 유래될 수 있다. 대부분의 경우에, 종결 영역의 공급원은 일반적으로, 재조합 단백질의 발현에 결정적인 것으로 고려되지 않고, 그리고 매우 다양한 종결 영역이 발현에 부정적으로 영향을 주지 않으면서 이용될 수 있다.

[0073] 당업자에 의해 인지되는 바와 같이, 일부 경우에, CAR 내에 항원 결합 도메인의 단부에서 소수의 아미노산, 예를 들면, 통상적으로 10개보다 많지 않은, 더욱 통상적으로 5개보다 많지 않은 잔기가 결실될 수 있다. 또한, 경계에서 적은 숫자의 아미노산, 통상적으로 10개보다 많지 않은, 더욱 통상적으로 5개보다 많지 않은 잔기를 도입하는 것이 바람직할 수 있다. 아미노산의 결실 또는 삽입은 작제의 필요의 결과이고, 편의한 제한 부위, 조각의 용이함, 발현 수준에서 향상, 또는 기타 등등을 제공할 수 있다. 이에 더하여, 상이한 아미노산으로 하나 또는 그 이상의 아미노산의 치환이 유사한 이유로 일어날 수 있는데, 통상적으로 임의의 한 도메인 내에서 약 5개보다 많은 아미노산이 치환되지 않는다.

[0074] 본 발명에 따른 키메라 수용체를 인코딩하는 키메라 구조체는 전통적인 방식으로 제조될 수 있다. 대부분의 경우에, 자연 서열이 이용될 수 있기 때문에, 자연 유전자는 다양한 성분의 적절한 연결을 허용하기 위해, 타당하면 단리되고 조작될 수 있다. 따라서, 키메라 수용체의 N 말단과 C 말단 단백질을 인코딩하는 핵산 서열은 유전자의 바람직하지 않은 부분의 결실을 유발하는 적절한 프라이머를 이용한 중합효소 연쇄 반응 (PCR)을 이용함으로써 단리될 수 있다. 대안으로, 클로닝된 유전자의 제한 절단이 키메라 구조체를 산출하는데 이용될 수 있다. 어떠한 경우에도, 이들 서열은 평활 말단이거나, 또는 상보성 중복을 갖는 제한 부위를 제공하도록 선별될 수 있다.

[0075] 키메라 구조체를 제조하기 위한 다양한 조작이 시험관내에서 수행될 수 있고, 그리고 특정 구체예에서, 키메라 구조체는 표준 형질전환 또는 형질감염 방법을 이용하여 적절한 숙주에서 클로닝과 발현을 위한 벡터 내로 도입된다. 따라서, 각 조작 후, DNA 서열의 연결로부터 결과의 구조체가 클로닝되고, 벡터가 단리되고, 그리고 서열이 이러한 서열이 원하는 키메라 수용체를 인코딩하도록 담보하기 위해 선별검사된다. 서열은 제한 분석, 염기서열결정, 또는 기타 등등에 의해 선별검사될 수 있다.

[0076] 본 발명의 키메라 구조체는 암을 앓거나 또는 앓는 것으로 의심되는 개체에서 종양의 크기를 감소시키거나 또는 종양의 성장 또는 재성장을 예방함으로써 이들 개체에서 적용을 발견한다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 키메라 구조체를 개체의 단리된 T 세포 내로 도입하고, 그리고 형질전환된 T 세포를 상기 개체 내로 재도입하고, 따라서 항종양 반응을 산출하여 개체에서 종양을 감소시키거나 또는 제거함으로써, 개체에서 종양의 성장을 감소시키거나 또는 종양 형성을 예방하기 위한 방법에 더욱 관계한다. 이용될 수 있는 적합한 T 세포는 세포독성 림프구 (CTL) 또는 교란이 필요한 T 세포 수용체를 갖는 임의의 세포를 포함한다. 당업자에게 널리 공지된 바와 같이, 개체로부터 이들 세포를 단리하기 위한 다양한 방법이 쉽게 가용하다. 가령, 세포 표면 마커 발현을 이용하여 또는 상업적으로 가용한 키트 (가령, Pierce, Rockford, Ill.로부터 ISOCELL™)를 이용하여.

[0077] 키메라 구조체는 나신 DNA로서 또는 적합한 벡터에서 개체 자신의 T 세포 내로 도입될 수 있는 것으로 예기된다. 나신 DNA를 이용한 전기천공에 의해 T 세포를 안정되게 형질감염시키는 방법은 당분야에서 공지된다. 가령, U.S. 특허 번호 6,410,319를 참조한다. 나신 DNA는 일반적으로, 발현을 위한 적절한 방향에서 플라스미드 발현 벡터에서 내포된 본 발명의 키메라 수용체를 인코딩하는 DNA를 지칭한다. 유리하게는, 나신 DNA의 이용은 본 발명의 키메라 수용체를 발현하는 T 세포를 생산하는데 필요한 시간을 감소시킨다.

[0078] 대안으로, 바이러스 벡터 (가령, 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노 연관된 바이러스 벡터, 또는 렌티바이러스 벡터)가 키메라 구조체를 T 세포 내로 도입하는데 이용될 수 있다. 본 발명의 방법에 따른 이용에 적합한 벡터는 개체의 T 세포에서 비복제성이다. 바이러스에 기초되는 다수의 벡터가 알려져 있는데, 여기서 세포에서 유지된 바이러스의 사본수는 세포의 생존력을 유지할 만큼 낮다. 예시적인 벡터는 본원에서 개시된

pFB-neo 벡터 (STRATAGENE®)뿐만 아니라 HIV, SV40, EBV, HSV, 또는 BPV에 기초된 벡터를 포함한다.

[0079] 일단 형질감염된 또는 형질도입된 T 세포가 원하는 조절로 및 원하는 수준에서, 키메라 수용체를 표면 막 단백질로서 발현할 수 있는 것으로 확립되면, 키메라 수용체가 숙주 세포에서 원하는 신호 유도를 제공하는데 있어서 기능적인지가 결정될 수 있다. 차후에, 형질도입된 T 세포는 개체에서 항종양 반응을 활성화시키기 위해, 개체에 재도입되거나 또는 투여된다. 투여를 용이하게 하기 위해, 본 발명에 따른 형질도입된 T 세포는 제약학적으로 허용될 수 있는 적절한 담체 또는 희석제를 이용하여, 제약학적 조성물로 만들어지거나 또는 생체내 투여에 적절한 이식물로 만들어질 수 있다. 이런 조성물 또는 이식물을 만드는 수단은 당분야에서 설명되었다 (가령, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed., Mack, ed. (1980)을 참조한다). 적절한 경우에, 형질도입된 T 세포는 그들의 개별 투여 루트에 대해 상용의 방식으로, 반고체 또는 액체 형태의 제제물, 예를 들면, 캡슐, 용액, 주사, 흡입제, 또는 에어로졸로 조제될 수 있다. 당분야에서 공지된 수단이 조성물이 표적 조직 또는 장기에 도달할 때까지 조성물의 방출과 흡수를 예방하거나 또는 최소화하는데, 또는 조성물의 일정한 방출을 담보하는데 활용될 수 있다. 바람직하게는, 하지만, 키메라 수용체를 발현하는 세포를 무효화시키지 않는 제약학적으로 허용되는 형태가 이용된다. 따라서, 바람직하게는, 형질도입된 T 세포는 균형 염 용액, 바람직하게는 Hanks 균형 염 용액, 또는 정상 식염수를 내포하는 제약학적 조성물로 만들어질 수 있다.

[0080] III. 구체예에 관련된 방법과 조성물

[0081] 일정한 양상에서, 본 발명은 항원 특이적 전향된 T 세포를 만들고 및/또는 확대하는 방법을 포함하고, 상기 방법은 T 세포를, hCAR을 인코딩하는 DNA 구조체를 내포하는 발현 벡터로 형질감염시키고, 이후 임의선택적으로, 이들 세포를 항원 양성 세포, 재조합 항원, 또는 수용체에 대한 항체로 자극하여 세포가 증식하도록 유발하는 것을 포함한다.

[0082] 다른 양상에서, 전기천공, 또는 나신 DNA를 이용한 다른 비바이러스 유전자 전달 (예로서, 하지만 제한 없이 소노포레이션)에 의해 T 세포를 안정되게 형질감염시키고 전향시키는 방법이 제공된다. 대부분의 조사자는 이중성 유전자를 T 세포 내로 운반하기 위해 바이러스 벡터를 이용하였다. 나신 DNA를 이용함으로써, 전향된 T 세포를 생산하는데 필요한 시간이 감소될 수 있다. "나신 DNA"는 발현을 위한 적절한 방향으로 발현 카세트 또는 벡터에서 내포된 키메라 T 세포 수용체 (cTCR)를 인코딩하는 DNA를 의미한다. 본 발명의 전기천공 방법은 표면 상에서 키메라 TCR (cTCR)을 발현하고 운반하는 안정된 형질감염체를 생산한다.

[0083] "키메라 TCR"은 T 세포에 의해 발현되고 세포내 신호전달, 막경유, 그리고 세포의 도메인을 포함하는 수용체를 의미하는데, 여기서 세포의 도메인은 MHC 무제한 방식으로, T 세포 수용체에 의해 정상적으로 결합되지 않는 항원에 이러한 방식으로 특이적으로 결합할 수 있다. 적절한 조건 하에 항원에 의한 T 세포의 자극은 이들 세포의 증식 (확대) 및/또는 IL-2의 생산을 유발한다. 본 출원의 예시적인 CD19-와 HERV-K 특이적 키메라 수용체는 키메라 TCR의 실례이다. 하지만, 이러한 방법은 다른 표적 항원에 특이적인 키메라 TCR, 예를 들면, HER2/Neu (Stancovski *et al.*, 1993), ERBB2 (Moritz *et al.*, 1994), 엽산염 결합 단백질 (Hwu *et al.*, 1995), 신장 세포 암종 (Weitjens *et al.*, 1996), 그리고 HIV-1 외피 당단백질 gp120과 gp41 (Roberts *et al.*, 1994)에 특이적인 키메라 TCR로 형질감염에 적용가능하다. 다른 세포-표면 표적 항원에는 CD20, 암배아 항원, 메소텔린, ROR1, c-Met, CD56, GD2, GD3, 알파 태아단백질, CD23, CD30, CD123, IL-11R알파, 카파 사슬, 람다 사슬, CD70, CA-125, MUC-1, EGFR과 변이체, 상피 종양 항원 등이 포함되지만 이들에 한정되지 않는다.

[0084] 일정한 양상에서, T 세포는 일차 인간 T 세포, 예를 들면, 인간 말초혈 단핵 세포 (PBMC), G-CSF로 자극 후 수집된 PBMC, 골수, 또는 제대혈로부터 유래된 T 세포이다. 조건은 mRNA와 DNA 및 전기천공의 이용을 포함한다. 형질감염 이후에, 이들 세포는 즉시 주입되거나 또는 보관될 수 있다. 일정한 양상에서, 형질감염 이후에, 이들 세포는 세포 내로 유전자 전달 이후에 약 1, 2, 3, 4, 5 일 또는 그 이상 이내에 벌크 개체군으로서 탈체에서 수일, 수주, 또는 수개월 동안 증식될 수 있다. 추가의 양상에서, 형질감염 이후에, 형질감염체는 클로닝되고, 그리고 단일 통합된 또는 에피솜에 유지된 발현 카세트 또는 플라스미드의 존재, 그리고 키메라 수용체의 발현을 나타내는 클론은 탈체에서 확대된다. 확대에 대해 선별된 클론은 CD19 발현 표적 세포를 특이적으로 인식하고 용해하는 능력을 나타낸다. 재조합 T 세포는 IL-2, 또는 통상적인 감마-사슬에 결합하는 다른 사이토킨 (가령, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21 등)으로 자극에 의해 확대될 수 있다. 재조합 T 세포는 인공 항원 제시 세포로 자극에 의해 확대될 수 있다. 재조합 T 세포는 인공 항원 제시 세포 상에서, 또는 CD3을 T 세포 표면 상에서 교차연결하는 항체, 예를 들면, OKT3으로 확대될 수 있다. 재조합 T 세포의 부분집합은 인공 항원 제시 세포 상에서, 또는 T 세포 표면 상에서 CD52에 결합하는 항체, 예를 들면, Campath로 결실될 수 있다. 추가의 양상에서, 유전적으로 변형된 세포는 냉동보존될 수 있다.

- [0085] 주입 후 T-세포 증식 (생존)은 (i) CAR에 특이적인 프라이머를 이용한 q-PCR; (ii) CAR에 특이적인 항체를 이용한 유세포분석법; 및/또는 (iii) 가용성 TAA에 의해 사정될 수 있다.
- [0086] 본 발명의 구체예에는 또한, 전향된 면역 T 세포를 이용하여 CD19-특이적인 세포 표면 에피토프로, B 세포를 포함하는 B-세포 악성 또는 장애의 표적화에 관계한다. 악성 B 세포는 전향된 T 세포에 대한 탁월한 표적인데, 그 이유는 B 세포가 T 세포에 대한 면역자극성 항원 제시 세포로서 이바지할 수 있기 때문이다. 인간 또는 인간화 CAR을 보유하는 공여자-유래된 CD19-특이적 T-세포로 입양 요법의 항종양 활성을 뒷받침하는 전임상 연구는 (i) CD19⁺ 표적의 전향된 사멸, (ii) CD19⁺ 표적/자극기 세포와 함께 배양 후 사이토킨의 전향된 분비/발현, 그리고 (iii) CD19⁺ 표적/자극기 세포와 함께 배양 후 지속된 증식을 포함한다.
- [0087] 본 발명의 일정한 구체예에서, CAR 세포는 치료가 필요한 개체, 예를 들면, 암 또는 감염을 앓는 개체에 전달된다. 이들 세포는 이후, 개별 암 또는 병원성 세포를 공격하도록 개체의 면역계를 증강한다. 일부 경우에, 개체는 항원 특이적 CAR T-세포의 1회 또는 그 이상 분량이 제공된다. 개체가 2회 또는 그 이상 분량의 항원 특이적 CAR T-세포가 제공되는 사례에서, 투여 사이에 지속 기간은 개체에서 증식을 위한 시간을 허용하는데 충분해야 하고, 그리고 특정한 구체예에서 투여 사이에 지속 기간은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7일, 또는 그 이상이다.
- [0088] 키메라 항원 수용체를 포함하도록 변형되고 기능적 TCR을 결여하는 동종이계 T 세포의 공급원은 임의의 종류일 수 있지만, 특정한 구체예에서 이들 세포는 예로서, 제대혈, 말초혈, 인간 배아 줄기 세포, 또는 유도된 다능성 줄기 세포의 은행으로부터 획득된다. 치료 효과를 위한 적합한 분량은 투약마다, 예를 들면, 바람직하게는 일련의 투약 주기에서 최소한 10^5 또는 약 10^5 및 약 10^{10} 세포 사이일 것이다. 예시적인 투약 섭생은 0 일자에 최소한 약 10^5 세포에서 시작하여 단계적 확대 분량, 예를 들면, 환자내 분량 단계적 계획을 개시하고 수 주 이내에 약 10^{10} 세포의 표적 분량까지 점증적으로 증가시키는 4회 1 주 투약 주기로 구성된다. 적합한 투여 방식은 정맥내, 피하, 강내 (가령, 저장소-접근 장치에 의해), 복막내, 그리고 중앙 덩어리 내로 직접적인 주사를 포함한다.
- [0089] 본 발명의 제약학적 조성물은 단독으로 또는 암을 치료하는데 유용한 다른 충분히 확립된 작용제와 합동으로 이용될 수 있다. 단독으로 또는 다른 작용제와 합동으로 전달되는 지와 상관없이, 본 발명의 제약학적 조성물은 포유류, 특히 인간 신체에서 특정 효과를 달성하기 위해 다양한 루트를 통해 및 다양한 부위에 전달될 수 있다. 당업자는 비록 하나 이상의 루트가 투여에 이용될 수 있긴 하지만, 특정 루트가 다른 루트보다 더욱 즉각적이고 더욱 효과적인 반응을 제공할 수 있다는 것을 인식할 것이다. 가령, 흑색종의 치료를 위해 피내 전달이 흡입보다 유리하게 이용될 수 있다. 국부 또는 전신 전달은 체강 내로 체제의 적용 또는 점적주입, 에어로졸의 흡기 또는 흡입을 포함하는 투여에 의해, 또는 근육내, 정맥내, 내문, 간내, 복막, 피하, 또는 피내 투여를 포함하는 비경구 도입에 의해 달성될 수 있다.
- [0090] 본 발명의 조성물은 단위 약형에서 제공될 수 있는데, 여기서 각 복용 단위, 예를 들면, 주사는 단독으로 또는 다른 활성제와의 적절한 합동으로, 미리 결정된 양의 조성물을 내포한다. 용어 단위 약형은 본원에서 이용된 바와 같이, 인간과 동물 개체에 대한 단위 용량으로서 적합한 물리적으로 구별된 단위를 지칭하고, 각 단위는 단독으로, 또는 적절한 경우에 제약학적으로 허용되는 희석제, 담체, 또는 운반제와 관련하여 원하는 효과를 산출하는데 충분한 양으로 계산된 다른 활성제와 합동으로, 미리 결정된 양의 본 발명의 조성물을 내포한다. 본 발명의 신규한 단위 약형에 대한 명세는 특정 개체에서 제약학적 조성물과 연관된 특정 약리학에 의존한다.
- [0091] 바람직하게, 효과량 또는 충분한 숫자의 단리된 형질도입된 T 세포가 조성물에서 존재하고, 그리고 이런 치료의 부재에서 만약 그렇지 않으면 발생할 것보다 종양의 크기를 감소시키거나 또는 종양 성장 또는 재성장을 제거하는 장기간, 특정한 항종양 반응이 확립되도록 개체 내로 도입된다. 바람직하게는, 개체 내로 재도입된 형질도입된 T 세포의 양은 형질도입된 T 세포가 존재하지 않는 점을 제외하고 모든 면에서 동일한 조건과 비교할 때 종양 크기에서 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 100% 감소를 유발한다.
- [0092] 따라서, 투여된 형질도입된 T 세포의 양은 투여 루트를 고려해야 하고, 그리고 원하는 치료적 반응을 달성하기 위해 충분한 숫자의 형질도입된 T 세포가 도입될 정도이어야 한다. 게다가, 본원에서 설명된 조성물 내에 포함된 각 활성제의 양 (가령, 접촉되는 각 세포당 양 또는 일정한 체중마다 양)은 상이한 적용에서 변할 수 있다. 일반적으로, 형질도입된 T 세포의 농도는 바람직하게는, 치료되는 개체에서, 최소한 약 1×10^6 내지 약 1×10^9 형질도입된 T 세포, 훨씬 바람직하게 약 1×10^7 내지 약 5×10^8 형질도입된 T 세포를 제공하는데 충분해야 하

고, 하지만 그 이상, 예를 들면, 5×10^8 세포보다 많은, 또는 그 미만, 예를 들면, 1×10^7 보다 적은 세포의 임의의 적절한 양이 활용될 수 있다. 투약 일정은 충분히 확립된 세포-기초된 요법 (가령, Topalian and Rosenberg, 1987; U.S. 특허 번호 4,690,915를 참조한다)에 기초될 수 있거나, 또는 교대적 연속 주입 전략이 이용될 수 있다.

[0093] 이들 값은 발명의 실시를 위해 본 발명의 방법을 최적화할 때 의사에 의해 활용되는 형질도입된 T 세포의 범위의 일반적인 보도를 제공한다. 본원에서 이런 범위의 열거는 특정 적용에서 보증됐던 것처럼, 성분의 더욱 많은 또는 더욱 적은 양의 이용을 결코 배제하지 않는다. 가령, 실제 분량과 일정은 조성물이 다른 제약학적 조성물과 합동으로 투여되는 지에 따라, 또는 약물동력학, 약물 소인 및 물질대사에서 개체간 차이에 따라 변할 수 있다. 당업자는 특정 환경의 긴급 사항에 따라 임의의 필요한 조정을 쉽게 할 수 있다.

[0094] IV. 예시적인 인간 CD19-특이적 키메라 항원 수용체 T 세포

[0095] 면역글로불린 상과의 세포 표면 당단백질인 CD19는 B 세포-연관된 악성의 항체 요법을 위한 잠재적으로 매력적인 표적이다. 이러한 항원은 조절 줄기 세포로부터 부재하고, 그리고 건강한 개체에서 이의 존재는 B-계통 및 아마도 일부 모낭성 수지상 세포에 배타적으로 한정된다 (Scheuermann *et al.*, 1995). 실제로, 이것은 B-세포 모구로의 발달 동안 가장 빨리 인식가능한 B-계통 세포로부터 B 세포 상에 존재하지만, 형질 세포로 성숙 시에 상실된다. 게다가, CD19는 세포 표면으로부터 탈락되지 않고 신생물 변형 동안 드물게 상실된다 (Scheuermann *et al.*, 1995). 상기 단백질은 만성 림프성 백혈병 (CLL), 비호지킨 림프종 (NHL), 그리고 급성 림프모구성 백혈병 (ALL)을 앓는 환자로부터 세포를 비롯한 대부분의 악성 B-계통 세포 상에서 발현된다 (Uckun *et al.*, 1988). CD19는 일차적으로, CD21 및 CD81과 함께, B 세포 공동수용체로서 행동한다. 활성화 시에, CD19의 세포질 꼬리는 인산화되는데, 이것은 Src-패밀리 키나아제에 의한 결합 및 PI-3 키나아제의 모집을 야기한다.

[0096] 한 양상에서, 이들 구체예의 조성물과 방법은 세포내 신호전달 도메인, 막경유 도메인, 그리고 세포외 도메인을 포함하는 인간 CD19-특이적 키메라 T 세포 수용체 (또는 키메라 항원 수용체, CAR) 폴리펩티드 (hCD19CAR로 지정됨)에 관계하고, 상기 세포외 도메인은 인간 CD19 결합 영역을 포함한다. 다른 양상에서, CD19 결합 영역은 F(ab')₂, Fab', Fab, Fv, 또는 scFv이다. 결합 영역은 야생형 아미노산 서열과 최소한, 최대한, 또는 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 세포내 도메인은 인간 CD3ζ의 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있고, 그리고 인간 CD28 세포내 분절을 더욱 포함할 수 있다. 일정한 양상에서, 막경유 도메인은 CD28 막경유 도메인이다.

[0097] 추가의 양상에서, 본 발명의 조성물은 앞서 설명된 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 포함한다. 일정한 양상에서, 핵산 서열은 인간 코돈 사용빈도에 대해 최적화된다.

[0098] 다른 추가 양상에서, 본 발명의 조성물은 본원에서 설명된 폴리펩티드를 발현하는 세포를 포함한다. T 세포는 hCD19CAR 폴리펩티드를 인코딩하는 발현 카세트를 포함할 수 있다. 발현 카세트는 비바이러스 벡터, 예를 들면, 트랜스포손, 또는 인간 트랜스포손, 또는 이의 재조합 변이체에 포함될 수 있다. 발현 카세트는 바이러스 벡터 또는 이의 재조합 변이체에 포함될 수 있다. 발현 카세트는 유전체적으로 통합되거나 또는 에피솜에 유지되거나 또는 mRNA로부터 발현될 수 있다.

[0099] 또 다른 추가 양상에서, 본 발명은 인간 CD19-특이적 CAR을 발현하는 T 세포를 만드는 방법을 포함하고, 상기 방법은 발현 카세트를 세포 내로 도입하는 것을 포함하고, 여기서 상기 발현 카세트는 인간 세포외 CD19 결합 도메인, 막경유 도메인, 그리고 하나 또는 그 이상의 세포내 신호전달 도메인(들)을 포함하는 폴리펩티드를 인코딩한다. 상기 방법은 이들 세포를 CD19⁺ 세포, 재조합 CD19, 또는 이들 세포가 증식하고, 사멸하고, 및/또는 사이토키ンを 만들도록 유발하는 수용체에 대한 항체로 자극하는 것을 더욱 포함할 수 있다; 예로서, 이들 세포는 CD19⁺ 인공 항원 제시 세포로, 증식하거나 또는 확대되도록 자극될 수 있다.

[0100] 일정한 양상에서, 본 발명은 내인성 CD19를 발현하는 세포와 연관된 인간 질환 상태를 치료하는 방법을 포함하고, 상기 방법은 상기 질환을 치료하는데 충분한 양의 인간 CD19-특이적 CAR을 발현하는 재조합 세포를 환자에 주입하는 것을 포함하고, 여기서 인간 CD19-특이적 CAR은 인간 CD19 세포외 결합 도메인, 막경유 도메인, 그리고 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 질환은 예로서, 림프종, 백혈병, 비호지킨 림프종, 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프모구성 백혈병, 만성 림프성 백혈병, 또는 B 세포-연관된 자가면역 질환일 수 있다.

[0101] 본 발명은 인간 CD19-특이적 키메라 항원 수용체 (hCD19RCD28 또는 hCAR)의 산출에 관계한다. 일정한 양상에서, hCAR을 발현하는 재조합 세포는 향상된 생체내 존속 및 항종양 효력을 갖는다. 인간 hCAR은 무관 CD19-특이적

단일클론 항체 (mAb)로부터 유래된 scFv 분절을 포함하는 무린 hCAR과 비교하여 감소된 면역원성을 갖는다. 항 종양 효과는 유전적으로 변형된 세포에 의해 증대되고, CD19에 특이적이도록 만들어질 수 있다. 전형적으로, T 세포 특이성은 hCAR을 인코딩하는 발현 카세트의 전자 전달에 의해 달성된다.

[0102] hCAR은 하나 또는 그 이상의 활성화 엔도도메인(들), 예를 들면, CD3- ζ -유래된 활성화 도메인을 포함하는 키메라 수용체일 수 있다. 추가 T-세포 활성화 모티프에는 CD28, CD27, OX-40, DAP10, 그리고 4-1BB가 포함되지만 이들에 한정되지 않는다. 일정한 양상에서, 활성화 도메인은 또한, CD28 막경유 및/또는 활성화 도메인을 포함할 수 있다. 추가의 양상에서, 인간 세포와 개체에서 발현을 위해 최적화된 hCAR 인코딩 영역 및/또는 발현 카세트 코돈, 예를 들면, 한 구체예에서 CD19-특이적 인간 항체의 VH와 VL 서열로부터 획득된 scFv 영역이 hCAR의 CD19 결합 분절 내로 통합된다 (가령, U.S. 특허 번호 7,109,304를 참조하고, 이것은 전체적으로 본원에 참조로서 편입된다). 다른 구체예에서, hCAR 발현 카세트는 에피솜에 유지되거나 또는 재조합 세포의 유전체 내로 통합된다. 일정한 양상에서, 발현 카세트는 인테그라아제 기전, 바이러스 벡터, 예를 들면, 레트로바이러스 벡터, 또는 비바이러스 벡터, 예를 들면, 트랜스포손 기전을 이용함으로써, 통합할 수 있는 핵산 내에 포함된다. 추가 구체예에서, 발현 카세트는 트랜스포손 기초된 핵산 내에 포함된다. 특정 구체예에서, 발현 카세트는 증강된 비바이러스 유전자 전달을 위해 트랜스포손 및 유전자전위효소를 활용하는 2가지 성분 *감자*는 *미너* (SB) 또는 piggyBac 시스템의 일부이다.

[0103] 재조합 hCAR 발현 세포는 임상적으로-의미있는 숫자까지 수치적으로 확대될 수 있다. 이런 확대의 한 가지 실례는 인공 항원 제시 세포 (aAPC)를 이용한다. 재조합 hCAR 발현 세포는 유세포분석법 및 웨스턴 블롯 분석에 의해 실증되고 확인될 수 있다. CD19-특이적 CAR을 발현하는 재조합 hCAR 발현 T 세포는 CD19 발현 표적 세포를 인식하고 사멸시킬 수 있다. 추가의 양상에서, hCAR은 만능 세포로 발현될 수 있는데, 이것은 면역원성을 예방하는데 도움을 주기 위해 이식 장벽을 교차하여 주입될 수 있다. hCAR은 세포독성의 이벤트에서, T 세포의 영상 (가령, 양전자 방출 단층촬영술, PET)과 조건적 절제를 위해 인간 유전자와 함께 이용될 수 있다. 본 발명의 재조합 세포는 CD19-특이적 세포 요법에서 이용될 수 있다.

[0104] V. 예시적인 HERV-표적화 키메라 항원 수용체 T 세포

[0105] 인간 유전체 사업 동안, 인간 내인성 레트로바이러스 (HERVs)로 명명된 일단의 고대 레트로바이러스가 인간 유전체 내로 안정되게 통합되고 전체 인간 유전체의 8.5%를 형성하는 것으로 발견되었다. 이들 HERV 사이에서, HERV-K는 다양한 자가면역 질환, 예를 들면, 다발성 경화증 및 류마티스성 관절염과 함께, 흑색종, 유방암, 난소암, 기형암종 및 전립선암에 관련된 종양원성 대립형질 변이체로서 밝혀졌다 (Buscher *et al.*, 2005; Dreyfus, 2011; Seifarth *et al.*, 1995). HERV-K의 종양원성 잠재력은 외피 (env) 및 GAG 단백질 (Rec)에 의해 기여된다. 최근 연구는 정상적인 피부 세포가 아닌 종양 세포 표면에서만 배타적으로 HERV-K env 단백질의 발현을 보여주었다 (Wang-Johanning *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010). HERV-K env 단백질의 발현은 덜 공격적이고 국부화된 유형 I 흑색종보다 더욱 공격적인 전이성 유형 III과 유형 IV 흑색종에서 증가하는 것으로 밝혀졌다 (Buscher *et al.*, 2005; Hahn *et al.*, 2008; Serafino *et al.*, 2009). 흑색종 세포 상에서 HERV-K env 단백질의 이러한 선별적인 발현은 난치성 또는 전이성 흑색종을 앓는 환자에 대한 치료 전략으로 이용될 수 있다. 전이성 흑색종을 앓는 환자는 전통적인 요법, 예를 들면, 화학요법, 방사선과 수술에 내성으로 인해 불량의 예후를 갖는다 (Bhatia *et al.*, 2009). 따라서, 치료 결과를 향상시키기 위해 새로운 표적화된 치료 전략이 필요하다.

[0106] 흑색종에 대한 T-세포 요법을 산출하기 위해, 본 발명자들은 HERV로부터 유래된 TAA를 표적으로 하였는데, 이의 유전체는 수백만 년 전에 인간 내로 안정되게 통합되었다. HERV-K를 표적으로 하기 위해, T 세포는 CD19-특이적 CAR의 항원 결합 엑소도메인을 항-HERV-K env-특이적 단일클론 항체의 단일 사슬 항체 (scFv) 서열로 대체함으로써, env 단백질에 특이적인 CAR을 발현하도록 가공되었다. 이러한 새로운 CAR은 SB 시스템 내로 트랜스포손으로서 클로닝되었다. HERV-K env-특이적 CAR 및 SB 유전자전위효소를 코딩하는 DNA 플라스미드는 일차 인간 T 세포 내로 전자 전달되었고, 그리고 유전적으로 변형된 CAR⁺ T 세포는 HERV-K env 및 원하는 T-세포 동시자극성 분자를 발현하는 방사선조사된 인공 항원 제시 세포 (aAPC)에서 선별적으로 증식되었다. γ -방사선조사된 aAPC에서 공동배양 후, CD3⁺ T 세포 중에서 95%가 CAR을 발현하였고, 그리고 이들 CAR⁺ T 세포는 HERV-K env⁺를 특이적으로 사멸시킬 수 있었지만, CAR⁺ T 세포와 대조적으로 시험관내에서 종양 표적인 HERV-K env⁻를 그러하지 못하였다. 이들 CAR⁺ T 세포의 특이성은 HERV-K env⁻ EL4 부모 세포와 비교하여 우선적으로 사멸된 항원 음성 EL4 생쥐 세포에서 HERV-K env 단백질을 발현함으로써 증명되었고, 그리고 A888-me1 세포에서 shRNA에 의한 HERV-K

녹다운 (HERV-K env RNA에 대한 특정한 표적화)은 부모와 비교하여 감소된 사멸을 유발하였다. CAR⁺ T 세포는 또한, 폐에서부터 간까지 생체내에서 A375-슈퍼 전이성 (SM) 종양 세포의 종양 성장과 전이를 감소시키는데 성공적이었다. CAR⁺ T 세포를 제공받는 종양을 앓는 생쥐는 더욱 오래 생존하고 종양 단독 생쥐 군보다 건강한 것으로 나타났다. 따라서, 활성 레트로바이러스를 표적으로 하는 T 세포는 임상 시험에 대한 변용 매력을 갖는 접근법을 이용하여, 흑색종에 대한 면역요법으로서 이용될 수 있다.

[0107] 흑색종 세포의 클론 진화는 종양 인식을 위한 MHC 복합체에서 TCR 요법의 의존성으로 인해, 상기 요법을 무효하게 만들 수 있다. CAR은 TCR-기초된 T-세포 요법과 달리, MHN 독립된 방식으로 매개된 세포 사멸에 의해 흑색종 세포의 이러한 클론 진화를 극복할 수 있다. HERV-K 항원은 종양 세포 표면 상에서만 발현되고 정상적인 세포에서는 발현되지 않는다. 이런 이유로, HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포는 임의의 불리한 부작용 없이, 종양 세포를 특이적으로 표적으로 하고 전폐할 수 있다. 이들은 최소 잔존 질환에서부터, 벌크 종양까지, 전통적인 요법에 난치성인 질환까지 암 스펙트럼을 따라서 많은 시기에서 HERV-K⁺ 악성을 치료하기 위해 주입될 수 있다.

[0108] HERV-K는 흑색종 (Muster *et al.*, 2003; Buscher *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2010; Reiche *et al.*, 2010; Serafino *et al.*, 2009), 유방암 (Patience *et al.*, 1996; Wang-Johanning *et al.*, 2003; Seifarth *et al.*, 1995), 난소암 (Wang-Johanning *et al.*, 2007), 림프종 (Contreras-Galindo *et al.*, 2008), 그리고 기형암종 (Bieda *et al.*, 2001; Lower *et al.*, 1993)이 포함되지만 이들에 한정되지 않는 많은 종양 유형에서 발현된다. 게다가, HIV에 의해 감염된 세포 (Jones *et al.*, 2012)를 비롯한 감염된 세포 역시 HERV-K를 발현한다. 이것은 HERV-K를 표적으로 하는 CAR 설계가 다양한 암과 감염을 치료하는데 이용될 수 있는 매력적인 기회를 제공한다.

[0109] **VI. 최소 잔존 질환을 표적으로 하기 위한 키메라 항원 수용체 T 세포를 공동발현하는 예시적인 막-결합된 IL-15**

[0110] 성체와 소아 B-계통 급성 림프모구성 백혈병 (B-ALL)의 화학요법 치료는 약제내성 잔존 질환으로 인해, 각각 65%와 20%의 질환 재발율을 갖는다. 특히 불량한 예후 군에서 B-ALL 재발의 높은 발생률은 동종이체 조혈 줄기 세포 이식 (HSCT)을 이용한 면역-기초된 요법의 이용을 유발하였다. 이러한 요법은 질환 없는 생존을 향상시키기 위해, 잔여 백혈병 세포, 또는 최소 잔존 질환의 근절을 위한 공여자 이식편 내에 존재하는 동종반응성 세포에 의존한다. 공여자 림프구 주입은 동종이체 HSCT 후 잔여 B-ALL를 표적으로 하는 이식된 T 세포의 능력을 증강하는데 이용되었지만, 이런 환자에 대한 이러한 치료 접근법은 10%보다 적은 관해 비율을 달성하고, 그리고 이식편-대-숙주 질환 (GVHD)의 빈도와 심각도로부터 높은 정도의 이환율과 사망률과 연관된다. 이들 난치성 악성에서 통상적이고 치명적인 문제인 재발 시에, HSCT 후 말초혈 단핵 세포 (PBMC)-유래된 T 세포를 이용한 입양 요법이 종양-연관된 항원 (TAA)에 대한 공여자 T 세포의 특이성을 재표적화함으로써, 항종양 효과, 또는 이식편-대-백혈병 (GVL) 효과를 증가시키는데 이용될 수 있다.

[0111] 표적 항원에 특이적인 CAR의 다양한 제제가 개발되었는데, CD19-특이적 CAR은 B-ALL의 세포 표면 상에서 CD19 항원을 표적으로 한다. CAR⁺ 세포의 장기간 존속을 관찰하고 상이한 임상적 프로토콜 전역에서 환자에서 오래가는 반응을 달성하는 것은 CAR-기초된 요법의 치료 효력을 방해하는 결정적인 문제로서 남아있다.

[0112] 현재, CAR-변형된 T 세포는 종양 항원과 조우할 때에만 발생하는 CAR을 통한 생존 신호전달을 획득하는 것에 의존한다. 이들 CAR-변형된 T 세포가 부피가 큰 질환을 앓는 환자 내로 주입되는 임상적 환경에서, CAR을 통한 충분한 활성화와 생존 신호전달을 제공하는 풍부한 종양 항원이 존재한다. 하지만, 재발된 B-ALL을 앓는 환자는 종종, 골수소멸성 화학요법, 그 이후에 HSCT로 조건화되고 최소 잔존 질환 (MRD)을 나타낸다. 이러한 경우에, 환자는 낮은 종양 부하를 갖고, 그리고 극미한 수준의 TAA는 주입된 T 세포를 뒷받침하기 위해 필요한 CAR-매개된 신호전달을 심하게 제한하고, 결과적으로 치료 잠재력을 손상시킨다. T 세포 존속을 향상시키기 위한 대체 CAR-독립된 수단은 CAR-변형된 T 세포의 이식을 향상시킬 것으로 기대될 것이다.

[0113] 통상적인 감마 사슬 수용체 패밀리에 (γC)에서 사이토킨은 림프구양 기능, 생존, 그리고 증식에 결정적인 T 세포에 대한 중요한 동시 자극 분자이다. IL-15는 입양 요법에 바람직한 여러 속성을 소유한다. IL-15는 오래 지속되는 기억 세포독성 T 세포의 생존을 뒷받침하고, 종양-상대성 세포의 기능적 억제를 경감함에 의하여 확립된 종양의 근절을 증진하고, 그리고 AICD를 저해하는 항상성 사이토킨이다.

[0114] IL-15는 조직 한정되고, 그리고 단지 병리학적 장애 하에서만 혈청 내에서, 또는 전신적으로 임의의 수준에서 관찰된다. 주변 환경 내로 분비되는 다른 γC 사이토킨과 달리, IL-15는 IL-15 수용체 알파 (IL-15Rα)의 배경에서 생산 세포에 의해 T 세포에 트랜스-제시된다. T 세포 및 다른 반응 세포로 이러한 사이토킨의 독특한 전달

기전은 (i) 고도로 표적화되고 국부화되며, (ii) IL-15의 안정성과 반감기를 증가시키고, 그리고 (iii) 가용성 IL-15에 의해 달성되는 것과 정성적으로 상이한 신호전달을 산출한다.

[0115] 한 구체예에서, 본 발명은 예로서, 최소 잔존 질환 (MRD)을 전시하는 백혈병 환자를 치료하는 목적으로 오래 지속되는 생체내 잠재력을 갖는 키메라 항원 수용체 (CAR)-변형된 T 세포를 산출하는 방법을 제공한다. 전체적으로, 이러한 방법은 가용성 분자, 예를 들면, 사이토킨이 어떻게 세포 표면에 융합되어 치료 잠재력을 증대시킬 수 있는지를 설명한다. 이러한 방법의 코어는 CAR T 세포를, 이후에 mIL15로서 지칭되는 인터류킨-15 (IL-15)의 인간 사이토킨 돌연변이단백질로 동시변형하는데 의존한다. mIL15 융합 단백질은 유연한 세린-글리신 링커를 거쳐 전장 IL15 수용체 알파에 융합된 IL-15의 코돈-최적화된 cDNA 서열로 구성된다. 이러한 IL-15 돌연변이단백질은 (i) mIL15 발현을 CAR^+ T 세포의 표면으로 제한하여 사이토킨의 확산을 비-표적 생체내 환경으로 한정하고, 따라서 외인성 가용성 사이토킨 투여가 독성을 야기한다는 점에서, 이의 안전성 프로필을 잠재적으로 향상시키고; 그리고 (ii) IL-15R α 의 배경에서 IL-15를 제시하여 생리학적으로 유관한 정성적 신호전달뿐만 아니라 더욱 긴 사이토킨 반감기를 위한 IL-15/IL-15R α 복합체의 안정화와 재활용을 모의하기 위한 방식으로 설계되었다. mIL15를 발현하는 T 세포는 지속된 지지적 사이토킨 신호전달을 할 수 있고, 이것은 주입후 그들의 생존에 결정적이다. 임상적으로 적용가능한 플랫폼에서 비바이러스 잠자는 미너 시스템 유전자 변형 및 차후 탈체 확대에 의해 산출된 mIL15 CAR^+ T 세포는 높은 종양 부담, 낮은 종양 부담, 또는 종양 부담 없음을 갖는 무인 모델에서 주입 후 증강된 존속을 갖는 T 세포 주입 산물을 산출하였다. 게다가, mIL15 CAR^+ T 세포는 또한, 높은 또는 낮은 종양 부담 모델 둘 모두에서 향상된 항종양 효력을 나타냈다.

[0116] 높은 종양 부담 모델에서 CAR^+ T 세포에 비하여 mIL15 CAR^+ T 세포의 향상된 존속과 항종양 활성은 종양 부담이 유력한 활성 질환을 앓는 백혈병 환자를 치료하는데 있어서 mIL15 CAR^+ T 세포가 CAR^+ T 세포보다 유효할 수 있다는 것을 지시한다. 따라서, mIL15 CAR^+ T 세포는 가장 광범위한 적용에서 임상 요법에서 CAR^+ T 세포를 대체할 수 있었다. CAR를 통한 생존 신호전달과는 관계없이 생존하는 mIL15 CAR^+ T 세포의 능력은 이들 변형된 T 세포가 종양 항원의 결여에도 불구하고 주입후 존속할 수 있게 한다. 결과적으로, 이것은 MRD 치료 세팅에서, 특히 골수소멸성 화학요법 및 조혈 줄기 세포 이식을 받은 환자에서 치료 효력에서 최대 충격을 산출할 것으로 기대된다. 이들 환자는 그들의 MRD를 치료하고 재발을 예방하기 위해, mIL15 CAR^+ T 세포로 임상 T 세포 전달을 받을 것이다.

[0117] 막-결합된 사이토킨, 예를 들면, mIL15는 광범위한 함의를 갖는다. 막-결합된 IL-15에 더하여, 다른 막-결합된 사이토킨이 구상된다. 막-결합된 사이토킨은 또한, 인간 적용을 위해 이용된 활성화하고 증식하는 세포와 연관된 다른 분자의 세포 표면 발현까지 연장될 수 있다. 이들에는 사이토킨, 케모킨, 그리고 인간 적용을 위해 이용된 세포의 활성화와 증식에 기여하는 다른 분자가 포함되지만 이들에 한정되지 않는다.

[0118] 막-결합된 사이토킨, 예를 들면, mIL15는 인간 적용(들)을 위한 세포를 제조하기 위해 탈체에서 이용될 수 있고, 그리고 인간 적용을 위해 이용된 주입된 세포 (가령, T 세포) 상에 있을 수 있다. 가령, 막-결합된 IL-15는 활성화 및/또는 증식을 위한 T 세포와 NK 세포 (뿐만 아니라 다른 세포)를 자극하기 위해, 예로서 K562로부터 유래된 인공 항원 제시 세포 (aAPC) 상에서 발현될 수 있다. aAPC 상에서 mIL15에 의해 활성화된/증식된 T 세포의 개체군은 유전적으로 변형된 림프구를 포함하고, 또한 종양-침윤 림프구 및 다른 면역 세포를 포함한다. 이들 aAPC는 주입되지 않는다. 대조적으로, mIL15 (및 다른 막-결합된 분자)는 주입되는 T 세포 및 다른 세포 상에서 발현될 수 있다.

[0119] CAR-변형된 T 세포로 MRD 치료의 치료 효력은 T 세포의 임상 전달 후 존속의 결여에 의해 방해된다. 종양 항원과는 관계없이 생체내에서 장기간 생존하는 mIL15 CAR^+ T 세포의 능력은 MRD를 앓는 환자를 치료하기 위한 큰 잠재력을 지시한다. 이러한 경우에, mIL15 및 이것이 뒷받침하는 존속하는 T 세포는 MRD 환자에 대한 현재 접근법이 불충분하다는 점에서, 요구를 해소할 것이다. MRD를 앓는 환자에서 주입되는 T 세포 및 다른 림프구의 존속은 CAR^+ T 세포를 뛰어 넘어 적용된다. 악성, 감염 또는 자가면역 질환을 치료하고 예방하는데 이용되는 임의의 면역 세포는 지속된 치료적 충격이 달성되려면 장기간에 걸쳐 존속할 수 있어야 한다. 따라서, 내인성 T 세포 수용체 또는 도입된 면역수용체로부터 유래된 신호를 뛰어 넘어 존속을 위해 T 세포를 활성화하는 것은 임상 면역요법의 많은 양상에 중요하다. 막-결합된 사이토킨(들)의 발현은 따라서, 다양한 병리학적 장애를 위해 주입된 T 세포 및 다른 면역 세포의 치료 잠재력과 존속을 증대시키는데 이용될 수 있다.

[0120] 본 발명자들은 CAR^+ T 세포 상에서 IL-15와 IL-15R α 의 막-결합된 융합 단백질 (mIL15)로서 발현되는 IL-15의 돌연변이단백질을 산출하였다. mIL15 구조체는 일차 인간 T 세포 내로, 2개의 잠자는 *미너* DNA 트랜스포손 플라스미드로서 CD19-특이적 CAR과 공동-전자 전달되었다 (0 일자에). 임상적으로 유관한 숫자의 mIL15 $^+$ CAR^+ T 세포가 CD19 $^+$ 인공 항원 제시 세포 및 보충된 IL-21에서 공동배양에 의해 산출되었다. 유전적으로 변형된 T 세포에서 IL-15 수용체 복합체를 통한 신호전달은 STAT5의 인산화 (pSTAT5)에 의해 검증되었고, 그리고 이들 T 세포는 CAR^+ T 세포에 동등한 CD19 $^+$ 종양 표적의 전향된 특정한 용해를 나타냈다. 게다가, 항원 도피 후, mIL15에 의해 산출된 신호전달은 특정한 세포 표면 마커, 전사 인자, 그리고 IL-2를 분비하는 능력을 비롯한 기억-연관된 속성을 소유하는 덜 분화된/더욱 어린 표현형을 갖는 T 세포의 우세를 증가시켰다. 이들 특징은 입양 전달에서 이용된 T 세포에서 바람직한 특성인데, 그 이유는 이들이 생체내에서 장기간 존속하는 증명된 능력을 갖는 T 세포 부분집합과 상관이 있기 때문이다. 과중성 CD19 $^+$ 백혈병을 보유하는 면역손상된 NSG 생쥐에서, mIL15 $^+$ CAR^+ T 세포는 존속과 항종양 효과 둘 모두를 나타냈고, 반면 이의 CAR^+ T 세포 대응물은 TAA의 존재에도 불구하고 유의미한 존속을 유지할 수 없었다. mIL15 $^{+/-}$ CAR^+ T 세포가 먼저 6 일 동안 이식되고, 그 이후에 과중성 CD19 $^+$ 백혈병이 도입되는 방지적 생쥐 (NSG) 모델에서, 단지 mIL15 $^+$ CAR^+ T 세포만 존속할 뿐만 아니라 종양 이식을 예방하는 것으로 밝혀졌다. mIL15 $^+$ CAR^+ T 세포가 TAA로부터 자극과는 관계없이 존속할 수 있는 지를 검사하기 위해, mIL15 $^{+/-}$ CAR^+ T 세포가 종양이 없는 NSG 생쥐 내로 입양 전달되었다. 단지 mIL15 $^+$ CAR^+ T 세포만 외인성 사이토킨 뒷받침 또는 CD19 TAA의 존재 없이 이러한 생체내 환경에서 존속할 수 있었다. 이들 데이터는 mIL15가 CAR^+ T 세포 상에서 공동발현되어, TAA 또는 외인성 사이토킨 뒷받침에 대한 필요 없이 증강된 생체내 존속을 유발할 수 있다는 것을 증명한다. 요약하면, 이러한 사이토킨 융합 분자는 (i) pSTAT5를 통해 자극성 신호를 제공하여, 종양 특이적 기능성을 유지하면서 증대된 생체내 T-세포 존속을 야기하고, (ii) 기억-유사 표현형을 증진하는 T-세포 부분집합을 유지하고, (iii) 시험관내와 생체내 T-세포 확대와 존속을 위한 임상적-등급 IL-2에 대한 요구와 비용을 제거하고, 그리고 (iv) 임상적-등급 가용성 IL-15에 대한 요구를 경감한다.

[0121] VII. 면역계 및 면역요법

[0122] 일부 구체예에서, 의학적 장애는 특정한 면역 반응을 이끌어내는 전향된 T 세포의 전달에 의해 치료된다. 본 발명의 한 구체예에서, B-세포 계통 악성 또는 장애는 특정한 면역 반응을 이끌어내는 전향된 T 세포의 전달에 의해 치료된다. 따라서, 면역학적 반응의 기본적인 이해가 필요하다.

[0123] 적응성 면역계의 세포는 림프구로 불리는 한 유형의 백혈구이다. B 세포와 T 세포는 림프구의 주요 유형이다. B 세포와 T 세포는 동일한 다능성 조혈 줄기 세포로부터 유래되고, 그리고 그들이 활성화된 이후까지 서로 구별하기 어렵다. B 세포는 체액성 면역 반응에서 큰 역할을 수행하고, 반면 T 세포는 세포-매개된 면역 반응에 친밀하게 관련된다. 이들은 T 세포 수용체 (TCR)로 불리는 그들의 세포 표면 상에서 특수한 수용체의 존재에 의해, 다른 림프구 유형, 예를 들면, B 세포와 NK 세포로부터 식별될 수 있다. 거의 모든 다른 척추동물에서, B 세포와 T 세포는 골수 내에 줄기 세포에 의해 생산된다. T 세포는 흉선으로 이동하고 여기에서 발달하는데, 그들의 명칭은 이로부터 파생된다. 인간에서, 림프구 풀의 대략 1%-2%가 항원 특이적 림프구가 두 번째 림프구양 조직 내에서 그들의 특이적 항원을 찾아내는 기회를 최적화하기 위해 매 시간 재순환된다.

[0124] T 림프구는 골수 내에 조혈 줄기 세포로부터 발생하고, 그리고 전형적으로, 성숙을 위해 흉선으로 이주한다. T 세포는 그들의 막 상에서 독특한 항원 결합 수용체 (T 세포 수용체)를 발현하는데, 이것은 다른 세포의 표면 상에서 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 분자와 관련된 항원만을 인식할 수 있다. T 보조 세포 및 T 세포독성 세포로서 알려져 있는, T 세포의 최소한 2가지 개체군이 있다. T 보조 세포 및 T 세포독성 세포는 각각, 막 결합된 당단백질 CD4와 CD8의 전시에 의해 일차적으로 식별된다. T 보조 세포는 B 세포, T 세포독성 세포, 대식세포, 그리고 면역계의 다른 세포의 활성화에 결정적인 다양한 림포카인을 분비한다. 대조적으로, 항원-MHC 복합체를 인식하는 T 세포독성 세포는 증식하고 세포독성 T 림프구 (CTLs)로 불리는 작동체 세포로 분화한다. CTL은 세포 용해를 유발하는 물질을 생산함으로써, 항원을 전시하는 신체의 세포, 예를 들면, 바이러스 감염된 세포 및 종양 세포를 제거한다. 자연 살해 세포 (또는 NK 세포)는 선천성 면역계의 주요 성분을 구성하는 한 유형의 세포독성 림프구이다. NK 세포는 종양 및 바이러스에 의해 감염된 세포의 거부에서 주요한 역할을 수행한다. 이들 세포는 표적 세포가 아포토시스에 의해 사멸하도록 유발하는 퍼포린과 그랜자임으로 불리는 단백질의 작은 세포질 과립을 방출함으로써 사멸시킨다.

- [0125] 대식세포, B 림프구, 그리고 수지상 세포를 포함하는 항원 제시 세포는 특정 MHC 분자의 발현에 의해 식별된다. APC는 항원을 내재화하고, 그리고 그들의 외부 세포막 상에서 MHC 분자와 함께, 상기 항원의 부분을 재발현한다. 주요 조직적합성 복합체 (MHC)는 복수 좌위를 갖는 큰 유전자 복합체이다. MHC 좌위는 클래스 I과 클래스 II MHC로서 지칭된, MHC 막 분자의 2가지 주요 부류를 인코딩한다. T 보조 림프구는 일반적으로, MHC 클래스 II 분자와 연관된 항원을 인식하고, 그리고 T 세포독성 림프구는 MHC 클래스 I 분자와 연관된 항원을 인식한다. MHC는 인간에서 HLA 복합체로서 지칭되고, 그리고 생쥐에서 H-2 복합체로서 지칭된다.
- [0126] T 세포 수용체, 또는 TCR은 일반적으로, 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 분자에 결합된 항원을 인식하는 것을 책임지는, T 림프구 (또는 T 세포)의 표면 상에서 발견되는 분자이다. 이것은 95%의 T 세포에서 알파와 베타 사슬로 구성되는 이형이합체이고, 반면 5%의 T 세포는 감마와 델타 사슬로 구성되는 TCR을 갖는다. TCR의 항원 및 MHC와의 맞닿음은 연관된 효소, 공동수용체, 그리고 특수한 보조 분자에 의해 매개된 일련의 생화학적 이벤트를 통해 T 림프구의 활성화를 유발한다. 면역학에서, CD3 항원 (CD는 분화 무리를 의미한다)은 포유동물에서 4개의 상이한 사슬 (CD3 γ , CD3 δ , 그리고 2배 CD3 ϵ)로 구성된 단백질 복합체이고, 이것은 T 세포 수용체 (TCR) 및 ζ -사슬로서 알려져 있는 분자와 연관되어 T 림프구에서 활성화 신호를 산출한다. TCR, ζ -사슬, 그리고 CD3 분자는 함께, TCR 복합체를 구성한다. CD3 γ , CD3 δ , 그리고 CD3 ϵ 사슬은 단일 세포의 면역글로불린 도메인을 내포하는 면역글로불린 상과의 고도로 관련된 세포 표면 단백질이다. CD3 사슬의 막경유 영역은 음성으로 하전되는데, 이러한 특징은 이들 사슬이 양성으로 하전된 TCR 사슬 (TCR α 와 TCR β)과 연관되도록 허용한다. CD3 분자의 세포내 꼬리는 TCR의 신호전달 능력에 필수적인 면역수용체 티로신-기초된 활성화 모티프 또는 요약해서 ITAM으로서 알려져 있는 단일 보존된 모티프를 내포한다.
- [0127] CD28은 T 세포 활성화에 필요한 동시자극성 신호를 제공하는, T 세포 상에서 발현된 분자 중에서 한 가지이다. CD28은 B7.1 (CD80) 및 B7.2 (CD86)에 대한 수용체이다. Toll-유사 수용체 리간드에 의해 활성화될 때, B7.1 발현이 항원 제시 세포 (APCs)에서 상향조절된다. 항원 제시 세포 상에서 B7.2 발현은 구조성이다. CD28은 미경험 T 세포 상에서 구조성으로 발현된 유일한 B7 수용체이다. TCR에 더하여 CD28을 통한 자극은 다양한 인터류킨 (특히, IL-2와 IL-6)의 생산을 위해 T 세포에 강력한 동시자극성 신호를 제공할 수 있다.
- [0128] 인간 질환에 대한 치료적 개입으로서 항원 특이적 T 세포를 분리하고 확대하는 전략이 임상 시험에서 검증되었다 (Riddell *et al.*, 1992; Walter *et al.*, 1995; Heslop *et al.*, 1996).
- [0129] 악성 B 세포는 전향된 T 세포에 대한 탁월한 표적인 것으로 보이는데, 그 이유는 B 세포가 T 세포에 대한 면역 자극성 항원 제시 세포로서 이바지할 수 있기 때문이다 (Glimcher *et al.*, 1982). 림프종은 림프절 형성에 의해서, T 세포-매개된 인식과 제거를 위해 해부학적으로 이상적으로 위치된다. 주입된 T 세포의 큰 숫자에서 림프절로의 국지화가 HIV-특이적 CD8⁺ CTL 클론의 주입을 받는 HIV 환자에서 방증되었다. 이들 환자에서, 림프절 생검 재료의 평가는 주입된 클론이 림프절의 CD8⁺ 세포의 대략 2%-8%를 구성한다는 것을 드러냈다. 림프절 귀소는 T 세포를, 구조성 프로모터 하에 L-선별 분자를 인코딩하는 cDNA 구조체로 동시형질감염시킴으로써 더욱 향상될 지도 모르는데, 그 이유는 이러한 부작 분자가 순환 T 세포를 림프절로 되돌려 향하게 하고 시험관내 확대에 의해 하향조절되기 때문이다 (Chao *et al.*, 1997). 본 발명은 내인성 CD19를 발현하는 세포와 연관된 인간 질환 상태를 치료하는 방법을 제공할 수 있는데, 상기 방법은 앞서 설명된 바와 같은 재조합 인간 CD19-특이적 CAR 발현 세포의 치료적으로 유효 분량을 환자에 주입하는 것을 포함한다. 내인성 CD19를 발현하는 세포와 연관된 인간 질환 상태는 림프종, 백혈병, 비호지킨 림프종, 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프모구성 백혈병, 만성 림프성 백혈병, 그리고 B 세포-연관된 자가면역 질환으로 구성된 군에서 선택될 수 있다.
- [0130] 백혈병은 혈액 또는 골수의 암이고, 그리고 혈액 세포, 통상적으로 백혈구 (백혈구)의 비정상적인 증식 (증가에 의한 생산)에 의해 특징화된다. 이것은 혈액학적 신생물로 불리는 질환의 광범위한 군의 일부이다. 백혈병은 질환의 스펙트럼을 포괄하는 광범위한 용어이다. 백혈병은 급성과 만성 형태로 임상적으로 및 병리학적으로 분할된다.
- [0131] 급성 백혈병은 미성숙 혈액 세포의 급속한 증식에 의해 특징화된다. 이러한 군집은 골수가 건강한 혈액 세포를 생산할 수 없도록 만든다. 급성 형태의 백혈병은 아동과 어린 성체에서 일어날 수 있다. 실제로, 이것은 어떤 다른 유형의 악성 질환보다 미국에서 아동 사망의 더욱 통상적인 원인이다. 급속한 진행 및 악성 세포의 축적으로 인해 급성 백혈병에서 즉각적인 치료가 필요한데, 이들 악성 세포는 이후, 혈류로 넘쳐 나오고 신체의 다른 장기로 확산된다. 비록 상기 질환이 뇌신경 마비를 때때로 유발할 수 있긴 하지만, 중추신경계 (CNS) 침범은 흔하지 않다. 만성 백혈병은 상대적으로 성숙하지만, 여전히 비정상적인 혈액 세포의 과도한 빌드업에 의해 식별

된다. 진행하는데 전형적으로 수개월 내지 수년이 걸리는 이들 세포는 정상적인 세포보다 훨씬 높은 비율에서 생산되고, 혈액 내에 많은 비정상적인 백혈구를 유발한다. 만성 백혈병은 주로 더욱 나이가 든 사람들에서 발생하지만, 이론적으로는 임의의 연령 군에서 발생할 수 있다. 급성 백혈병은 즉시 치료되어야 하는 반면, 만성 형태는 때때로, 요법의 최고 유용성을 담보하기 위해 치료 전에 얼마 동안 모니터링된다.

[0132] 게다가, 이들 질환은 림프성 또는 림프모구성으로 분류되고, 이들은 정상적으로 진행하면 림프구를 형성하는 한 유형의 골수 세포에서 암성 변화가 일어났다는 것을 지시하고, 그리고 골수성 또는 골수구성으로 분류되는데, 이들은 정상적으로 진행하면 적혈구, 일부 유형의 백혈구, 그리고 혈소판을 형성하는 한 유형의 골수 세포에서 암성 변화가 일어났다는 것을 지시한다 (림프구양 세포 대 골수 세포를 참조한다).

[0133] 급성 림프성 백혈병 (급성 림프모구성 백혈병, 또는 ALL로서 또한 알려져 있음)은 어린 아동에서 가장 흔한 유형의 백혈병이다. 이러한 질환은 또한, 성체, 특히 65세 및 그 이상의 성체에 영향을 준다. 만성 림프성 백혈병 (CLL)은 주로, 55세 이상의 성체에 영향을 준다. 이것은 때때로, 더욱 어린 성체에서 발생하지만, 아동에게는 거의 영향을 주지 않는다. 급성 골수성 백혈병 (급성 골수구성 백혈병, 또는 AML로서 또한 알려져 있음)은 아동에서보다 성체에서 더욱 통상적으로 발생한다. 이러한 유형의 백혈병은 이전에 "급성 비림프구성 백혈병"으로 불렸다. 만성 골수성 백혈병 (CML)은 성체에서 주로 발생한다. 매우 적은 숫자의 아동 역시 이러한 질환이 발생한다.

[0134] 림프종은 림프구 (척추동물 면역계에서 한 유형의 백혈구)에서 기원하는 한 유형의 암이다. 많은 유형의 림프종이 있다. U.S. 국립보건원에 따르면, 림프종은 미국에서 암의 모든 사례의 약 5 퍼센트를 차지하고, 그리고 특히, 호지킨 림프종은 미국에서 암의 모든 사례의 1보다 적은 퍼센트를 차지한다. 림프계가 신체의 면역계의 일부이기 때문에, 예로서 HIV 감염으로부터 또는 일정한 약물 또는 약제로부터 약화된 면역계를 갖는 환자는 또한, 림프종의 더욱 높은 발생률을 갖는다.

[0135] 19세기와 20세기에, 이러한 고통은 호지킨병으로 불렸는데, 그 이유는 이것이 1832년에 Thomas Hodgkin에 의해 발견되었기 때문이다. 구어적으로, 림프종은 호지킨 림프종 및 비호지킨 림프종 (림프종의 모든 다른 유형)으로서 광범위하게 분류된다. 림프종의 유형의 과학적 분류가 더욱 상술된다. 비록 더욱 오래된 분류는 조직구 림프종을 지칭하였지만, 이들은 B, T, 또는 NK 세포 계통의 더욱 새로운 분류에서 인식된다.

[0136] 자가면역 질환, 또는 자가면역은 생물체가 자신의 성분 부분 (아분자 수준까지 아래로)을 "자기"로서 인식하지 못함인데, 이것은 자신의 세포와 조직에 대하여 면역 반응을 유발한다. 이런 이상 면역 반응으로부터 발생하는 임의의 질환은 자가면역 질환으로 명명된다. 두드러진 실례는 소아 지방변증, 1형 당뇨병 (IDDM), 전신성 홍반성 루푸스 (SLE), 쇼그렌 증후군, 다발성 경화증 (MS), 하시모토 갑상선염, 그레이브스병, 특발성 혈소판감소성 자반병, 그리고 류마티스성 관절염 (RA)을 포함한다.

[0137] 자가면역 질환을 비롯한 염증성 질환은 또한, B-세포 장애와 연관된 한 부류의 질환이다. 자가면역 질환의 실례에는 급성 특발성 혈소판감소성 자반병, 만성 특발성 혈소판감소성 자반병, 피부근염, 시드남 무도병, 중증 근무력증, 전신성 홍반성 루푸스, 루푸스 신장염, 류마티스열, 다선성 증후군, 수포성 유천포창, 진성 당뇨병, 헤노흐-췌라인 자색반, 연쇄상구균 감염후 신장염, 결절 홍반, 타카야수 동맥염, 에디슨병, 류마티스성 관절염, 다발성 경화증, 사르코이드증, 궤양성 대장염, 다형 홍반, IgA 신장병증, 결절성 다발동맥염, 강직성 척추염, 굿파스튜어 증후군, 폐색성 혈전혈관염, 쇼그렌 증후군, 원발성 담즙성 간경변, 하시모토 갑상선염, 갑상선종독증, 경피증, 만성 황성 간염, 다발근육염/피부근염, 다발연골염, 심상성 천포창, 베게너 육아종증, 막성 신장병증, 근위축성 측삭 경화증, 척수 매독, 거대 세포 동맥염/다발근육통증, 악성 빈혈, 급속 진행 사구체신염, 건선, 그리고 섬유성 폐포염이 포함되지만 이들에 한정되지 않는다. 가장 흔한 치료제는 코르티코스테로이드 및 세포독성 약물인데, 이들은 매우 독성일 수 있다. 이들 약물은 또한, 전체 면역계를 억제하고, 심각한 감염을 유발할 수 있고, 그리고 골수, 간 및 신장에 대한 불리한 효과를 갖는다. 클래스 II 자가면역 질환을 치료하는데 현재까지 이용된 다른 치료제는 T 세포 및 대식세포에 대해 지향되었다. 자가면역 질환, 특히 클래스 II 자가면역 질환을 치료하는 더욱 효과적인 방법이 요구된다.

[0138] VIII. 인공 항원 제시 세포

[0139] 일부 경우에, aAPCs는 구체예의 치료적 조성물 및 세포 요법 산물을 제조하는데 유용하다. 항원-제시 시스템의 제조와 이용에 관한 일반적인 보도를 위해, 예로서, U.S. 특허 번호 6,225,042, 6,355,479, 6,362,001과 6,790,662; U.S. 특허 출원 공개 번호 2009/0017000과 2009/0004142; 그리고 국제 공개 번호 WO2007/103009)를 참조한다.

[0140] aAPCs는 전형적으로, 추가 처리 없이 MHC 분자에 펩티드의 직접적인 결합을 허용하는 최적 길이의 펩티드와 함께 배양된다. 대안으로, 이들 세포는 관심되는 항원을 발현할 수 있다 (즉, MHC-독립된 항원 인식의 경우에). 관심되는 펩티드-MHC 분자 또는 항원에 더하여, aAPC 시스템은 또한, 최소한 하나의 외인성 보조 분자를 포함할 수 있다. 임의의 적절한 숫자와 조합의 보조 분자가 이용될 수 있다. 보조 분자는 동시자극성 분자 및 부착 분자와 같은 보조 분자에서 선택될 수 있다. 예시적인 동시자극성 분자는 CD70 및 B7.1 (B7.1은 이전에 B7로서 알려졌다고, 또한 CD80으로서 알려졌다)을 포함한다, 이들은 그 중에서도 특히, T 세포의 표면 상에서 CD28 및/또는 CTLA-4 분자에 결합하고, 따라서 예로서, T-세포 확대, Th1 분화, 단기 T-세포 생존, 그리고 사이토킨 분비, 예를 들면, 인터류킨 (IL)-2에 영향을 준다 (Kim et al., 2004, Nature, Vol. 22(4), pp. 403-410을 참조한다). 부착 분자는 예로서, 세포-대-세포 또는 세포-대-매트릭스 접촉을 증진하는 탄수화물-결합 당단백질, 예를 들면, 셀렉틴, 막경유 결합 당단백질, 예를 들면, 인테그린, 칼슘-의존성 단백질, 예를 들면, 카드헤린, 그리고 단일-통과 막경유 면역글로불린 (Ig) 상과 단백질, 예를 들면, 세포간 부착 분자 (ICAMs)를 포함할 수 있다. 예시적인 부착 분자는 LFA-3 및 ICAMs, 예를 들면, ICAM-1을 포함한다. 동시자극성 분자 및 부착 분자를 비롯한 예시적인 보조 분자의 선별, 클로닝, 제조, 그리고 발현에 유용한 기술, 방법 및 시약은 예로서, U.S. 특허 번호 6,225,042, 6,355,479, 그리고 6,362,001에서 예시된다.

[0141] aAPCs가 되는 선별된 세포는 바람직하게는, 세포내 항원-처리, 세포내 펩티드 트래피킹, 및/또는 세포내 MHC 클래스 I 또는 클래스 II 분자-펩티드 적하에서 결합을 갖거나, 또는 변온 (즉, 포유류 세포주보다 온도 공격에 덜 민감한)이거나, 또는 결합과 변온 성질 둘 모두를 소유한다. 바람직하게는, aAPCs가 되는 선별된 세포는 또한, 최소한 하나의 내인성 대응물 (가령, 앞서 설명된 바와 같은 내인성 MHC 클래스 I 또는 클래스 II 분자 및/또는 내인성 보조 분자)을, 이들 세포 내로 도입되는 외인성 MHC 클래스 I 또는 클래스 II 분자 및 보조 분자 성분으로 발현하는 능력을 결여한다. 게다가, aAPCs는 바람직하게는, aAPCs를 산출하기 위한 변형에 앞서 이들 세포에 의해 소유된 이들 결합과 변온 성질을 유지한다. 예시적인 aAPCs는 항원 처리 (TAP)-결합성 세포주, 예를 들면, 곤충 세포주와 연관된 전달체를 구성하거나 또는 이로부터 유래된다. 예시적인 변온 곤충 세포주는 초파리 (*Drosophila*) 세포주, 예를 들면, Schneider 2 세포주이다 (가령, Schneider, J. Embryol. Exp. Morph. 1972 Vol 27, pp. 353-365를 참조한다). Schneider 2 세포의 제조, 성장과 배양을 위한 예시적인 방법은 U.S. 특허 번호 6,225,042, 6,355,479, 그리고 6,362,001에서 제공된다.

[0142] 한 구체예에서, aAPCs는 동결-해동 주기에 또한 종속된다. 예시적인 동결-해동 주기에서, aAPCs는 동결이 급속히 발생하도록, aAPCs를 내포하는 적합한 용기를 적절한 양의 액체 질소, 고체 이산화탄소 (즉, 드라이아이스), 또는 유사한 낮은 온도 물질과 접촉시킴으로써 동결될 수 있다. 동결된 aAPCs는 이후, 낮은 온도 물질로부터 aAPCs의 이전 및 주변 실온 조건에 노출에 의해, 또는 미지근한 수조 또는 따뜻한 손이 더욱 짧은 해동 시간을 보장하는데 이용되는 조장된 해동 과정에 의해 해동된다. 추가적으로, aAPCs는 동결되고 해동에 앞서 연장된 기간 동안 보관될 수 있다. 동결된 aAPCs는 또한, 해동되고, 그리고 이후 추가 이용 전에 동결건조될 수 있다 바람직하게는, 동결-해동 절차에 유해하게 충격을 줄지도 모르는 보존제, 예를 들면, 디메틸설폭시드 (DMSO), 폴리에틸렌 글리콜 (PEGs), 그리고 다른 보존제가 동결-해동 주기를 겪는 aAPCs를 내포하는 배지로부터 부재하거나, 또는 예로서, 이런 보존제를 본질적으로 결여하는 배지에 aAPCs의 이전에 의해 본질적으로 제거된다.

[0143] 다른 바람직한 구체예에서, 이중유전성 핵산 및 aAPCs에 내인성 핵산은 비활성화 후 핵산의 세포 성장, 복제 또는 발현이 본질적으로 발생하지 않도록 교차연결함으로써 비활성화될 수 있다. 한 구체예에서, aAPCs는 외인성 MHC와 보조 분자의 발현, aAPCs의 표면 상에서 이런 분자의 제시, 그리고 선별된 펩티드 또는 펩티드들로 제공된 MHC 분자의 적하 다음에 한 포인트에서 비활성화된다. 따라서, 이런 비활성화되고 선별된 펩티드 적하된 aAPCs는 본질적으로 증식하거나 또는 복제할 수 없도록 만들어지긴 하지만, 선별된 펩티드 제시 기능을 유지한다. 바람직하게는, 교차연결은 또한, aAPCs의 항원 제시 세포 기능을 실제적으로 줄이지 않으면서, 오염 미생물, 예를 들면, 세균과 바이러스가 본질적으로 없는 aAPCs를 산출한다. 따라서 교차연결은 aAPCs를 이용하여 개발된 세포 요법 산물의 안전성에 관한 우려를 경감하는데 도움을 주면서, aAPCs의 중요한 APC 기능을 유지한다. 교차연결 및 aAPCs에 관련된 방법을 위해, 예로서 U.S. 특허 출원 공개 번호 20090017000을 참조하고, 이것은 본원에 참조로서 편입된다.

[0144] IX. 본 발명의 키트

[0145] 본원에서 설명된 조성물 중에서 한 가지는 키트 내에 포함될 수 있다. 일부 구체예에서, 동종이계 CAR T-세포가 키트에서 제공되는데, 이것은 또한, 이들 세포를 확대하는데 적합한 시약, 예를 들면, 배지, aAPCs, 성장 인자, 항체 (가령, CAR T-세포를 분류하거나 또는 특징짓기 위해) 및/또는 CARs 또는 유전자전위효소를 인코딩하는 플

라스미드를 포함할 수 있다.

[0146] 무제한적 실험에서, 키메라 수용체 발현 구조체, 키메라 수용체 발현 구조체를 산출하는 하나 또는 그 이상의 시약, 발현 구조체의 형질감염을 위한 세포, 및/또는 발현 구조체의 형질감염을 위한 동종이계 세포를 획득하기 위한 하나 또는 그 이상의 기기 (이런 기기는 주사기, 피펫, 겹자, 및/또는 임의의 이와 같은 의학적으로 승인된 기구일 수 있다).

[0147] 일부 구체예에서, 내인성 TCR α/β 발현을 제거하기 위한 발현 구조체, 이러한 구조체를 산출하기 위한 하나 또는 그 이상의 시약, 및/또는 CAR⁺ T 세포가 키트에서 제공된다. 일부 구체예에서, 아연 핑거 뉴클레아제(들)를 인코딩하는 발현 구조체가 포함된다.

[0148] 일부 양상에서, 키트는 세포의 전기천공을 위한 시약 또는 기구를 포함한다.

[0149] 키트는 본 발명의 하나 또는 그 이상의 적절하게 분취된 조성물 또는 본 발명의 조성물을 산출하기 위한 시약을 포함할 수 있다. 키트의 성분은 수성 매체에서 또는 동결건조된 형태에서 포장될 수 있다. 키트의 용기 수단은 성분이 배치되고, 그리고 바람직하게는, 적절하게 분취될 수 있는 최소한 하나의 바이알, 시험관, 플라스크, 병, 주사기, 또는 다른 용기 수단을 포함할 수 있다. 키트 내에 하나 이상의 성분이 있는 경우에, 키트는 또한, 일반적으로 추가 성분이 별도로 배치될 수 있는 두 번째, 세 번째, 또는 다른 추가 용기를 내포할 것이다. 하지만, 성분의 다양한 조합이 바이알 내에 포함될 수 있다. 본 발명의 키트는 또한, 전형적으로 상업적인 판매를 위해 근접하게 밀폐되는 키메라 수용체 구조체 및 임의의 다른 시약 용기를 내포하기 위한 수단을 포함한다. 이런 용기는 예로서, 원하는 바이알이 유지되는 주입 또는 취입 성형된 플라스틱 용기를 포함할 수 있다.

[0150] X. 실시예

[0151] 다음 실시예는 본 발명의 바람직한 구체예를 예시하기 위해 포함된다. 다음 실시예에서 개시된 기술은 발명의 실시에서 충분히 기능하는 것으로 발명자에 의해 발견된 기술을 대표하고, 그리고 따라서, 이의 실시를 위한 바람직한 방식을 구성하는 것으로 고려될 수 있는 것으로 당업자에 의해 인지되어야 한다. 하지만, 당업자는 본 발명에 비추어, 개시되는 특정한 구체예에서 많은 변화가 만들어질 수 있고 발명의 사상과 범위로부터 벗어나지 않으면서 비슷한 또는 유사한 결과를 여전히 획득할 수 있다는 것을 인지할 것이다.

[0152] 실시예 1 - 말초혈과 제대혈로부터 T 세포를 유전적으로 변형하기 위한 잠자는 미녀 및 인공 항원 제시 세포의 임상적 적용 - 재료와 방법

[0153] PB와 UCB로부터 단핵 세포 (MNC)의 분리. 0 일자에 또는 0 일자 전에, PB를 동등한 부피로, 그리고 UCB를 4 부피의 PBS-EDTA로 희석한다. 희석된 혈액 (25 mL)을 50 mL 원심분리기 튜브(들)에서 피콜 (12 mL) 위에 천천히 층으로 쌓아올리고 400 x g에서 30-40 분 (제동 없음) 동안 원심분리한다. 단핵 세포 분획물 (경계면)을 수집하고 전달 피펫을 이용하여 새로운 50 mL 원심분리기 튜브로 이전한다. 부피를 PBS-EDTA로 50 mL까지 가져가고 450 x g에서 10 분 동안 원심분리한다. 상층액을 흡인하고 세포 펠렛(들)을 50 mL의 완전한 배양 배지 (CCM)에서 부드럽게 재현탁한다. 400 x g에서 10 분 동안 원심분리한다. 세포 펠렛을 부드럽게 재현탁하고 CCM에서 모으고, 그리고 트리판 블루 배제 (셀로미터, PBMC 프로그램)를 이용하여 세포 계수를 수행한다. MNC는 전기천공 (뉴클레오펙션)을 이용되거나 또는 장래 이용을 위해 냉동보존될 수 있다.

[0154] 0 일자에 전기천공을 위한 T 세포의 제조. 냉동보존된 MNC를 이용하면, 37 °C 수조에서 전체 규모 전기천공을 위한 충분한 세포를 빠르게 해동한다 (원심분리 및 2 시간 배양 동안 세포 소실을 설명하기 위해 ~20%를 추가한 2×10^8). 세포를 부드럽게 재현탁하고 미리 가온된 완전한 페놀-없는 RPMI 배양 배지 (PF-RPMI)를 내포하는 적절하게 크기산정된 원심분리기 튜브에 이전하고, 200 x g에서 10 분 (제동 없음) 동안 원심분리하고, 그리고 상층액을 흡인한다. 그 다음, 그리고 새로 분리된 MNC를 이용하면, MNC를 PF-RPMI에서 재현탁하고, 세포 계수 (셀로미터)를 수행하고, 그리고 세포를 10^6 세포/mL의 농도에서 적절하게 크기산정된 세포 배양 용기로 이전한다. 세포를 가습된 37 °C/5% CO₂ 인큐베이터에서 2 시간 $\pm$ 30 분 동안 배양한다. MNC를 무균 원심분리기 튜브로 이전하고, 200 x g에서 5 분 (제동 없음) 동안 회전시키고, 상층액을 흡인하고, 그리고 세포 펠렛을 부드럽게 재현탁하고 PF-RPMI에서 합동한다. 세포 계수 (셀로미터)를 수행하고 필요한 세포 현탁액의 부피 (2×10^8 MNC)를 계산한다. 계산된 부피를 무균 50 mL 원심분리기 튜브에 이전하고 200 x g에서 10 분 (제동 없음) 동안 회전시킨다. 잔여 배지가 남아있지 않도록 상층액을 흡인하고, 그리고 튜브의 측면을 가볍게 두드림으로써 부드럽게 재현탁한다.

- [0155] 0 일자에 MNC (10 큐벳을 이용한 전체 규모 과정)의 전기천공 (뉴클레오펙션). 4 mL의 따뜻한 PF-RPMI를 내포하는 10개 웰을 갖는 무균 12-웰 평판을 가습된 37 °C/5% CO₂ 인큐베이터에서 전배양한다. 생물안전 캐비닛 (BSC)에서 Lonza 뉴클레오펙터 용액 인간 T 세포 키트 (제조업체의 사용설명서에 따라 재구성됨, www.lonza.com)를 제조하고 주위 온도까지 미리 가온한다. 반응/큐벳마다 100 μL의 보충된 뉴클레오펙터 용액, 15 μg의 트랜스포존 (CD19RCD28/pSBS0으로서 지정된 초나선 DNA 플라스미드), 그리고 5 μg의 유전자전위효소 (pCMV-SB11로서 지정된 초나선 DNA 플라스미드)를 첨가함으로써 뉴클레오펙터 용액/DNA 마스터 믹스를 제조한다. 원심분리기 튜브의 측면을 부드럽게 두드림으로써 MCN 세포 펠렛을 분산시키고, 그리고 2×10^7 세포/100 μL의 최종 세포 농도에서 뉴클레오펙션 용액/DNA 마스터 믹스에서 재현탁한다. 기포 발생에 주의하면서, 100 μL의 세포 현탁액을 10개 Lonza 뉴클레오펙션 큐벳 각각에 조심스럽게 이전한다. 큐벳을 가볍게 한번 두드리고, 그리고 프로그램 U-014 (자극되지 않은 T 세포의 경우에)를 이용하여 전기천공한다. 큐벳 및 12-웰 평판을 BSC에 이전한다. 상응하는 웰로부터 ~500 μL의 미리 가온된 배양 배지를 첨가함으로써, 전기천공된 세포를 Amaxa 미세 침투 전달 펌프를 이용하여 각 큐벳으로부터 수확하고, 그리고 평판을 가습된 37 °C/5% CO₂ 인큐베이터로 2 시간 ± 30 분 동안 복귀시킨다. 2-시간 배양 이후에, 모든 웰로부터 세포를 수확하고 무균 원심분리기 튜브로 이전한다. 140 x g에서 8 분 동안 원심분리 (주위 온도, 제동 없음)에 의해 세포를 세척하고, 그리고 잔여 배지가 세포 펠렛을 덮지 않도록 상층액을 흡인하고 폐기한다. 원심분리기 튜브의 측면을 부드럽게 두드림으로써 세포 펠렛을 분산시키고 CCM에서 부드럽게 재현탁하여 단일 세포 현탁액을 달성한다. 세포 계수를 수행하고 세포 농도를 CCM에서 10^6 세포/mL까지 조정한다. 세포 현탁액을 세포 배양 플라스크(들)로 이전하고 인큐베이터에 하룻밤 동안 배치한다. 대조 EGFP-형질감염된 세포 (5 μg Amaxa 대조 EGFP 초나선 플라스미드, pmaxGFP를 갖는 5×10^6 세포/큐벳)에 대해 동일한 과정이 이용될 수 있다.
- [0156] 첫 번째와 하위순위 자극 주기의 1 일자에 유세포분석법에 의한 CAR 발현의 분석. 전기천공된 세포를 수확하고 트리판 블루 배제 (혈구계)를 이용하여 세포 계수를 수행한다. CAR 발현의 수치로서 CD3, CD4, CD8, 그리고 인간 IgG Fc γ에 특이적인 항체로 세포 ($1-2 \times 10^6$)를 염색한다. FACS Calibur에서 세포를 획득하고, 그리고 CAR의 발현을 계산하기 위해 FCS Express 소프트웨어를 이용하여 데이터를 분석한다. 다음 공식에 의해 배양 중인 CAR⁺ 세포를 계산한다: (전체 생존가능 세포의 숫자) x (% CAR⁺ 세포) = CAR⁺ 세포의 숫자.
- [0157] 첫 번째와 차후 자극 주기의 1 일자에 aAPC (클론 #4)의 제조. aAPC (클론 #4)는 원하는 T 세포 동시자극성 분자를 공동발현하기 위해 K562 세포 (American Type Culture Collection으로부터 획득된 부모 라인)로부터 유래되었다. 동결된 100 Gy 방사선조사된 aAPC의 분취량을 37 °C 수조에서 해동한다. 세포는 CCM에서 400 x g에서, 10 분 동안 원심분리에 의해 2회 세척되고 셀로미터 (트리판 블루 배제)를 이용하여 계수된다. 자극에 필요한 생존가능 aAPC의 숫자를 계산한다: (CAR⁺ 세포의 숫자) x 2 = 필요한 방사선조사된 aAPC의 숫자
- [0158] 첫 번째와 차후 자극 주기의 1 일자에 시작하여 CAR⁺ T 세포의 aAPC-매개된 자극. 전기천공된 세포 (CAR을 발현) 및 γ-방사선조사된 aAPC (클론 #4)를 무균 용기에서 CCM에서 1:2의 비율 (CAR⁺ 세포: 생존가능 aAPC)에서 혼합한다. 주목할 점은 aAPC 비율이 전기천공 다음날 유세포분석법에 기초하여 CAR의 발현에 대해 조정된다는 것이다. IL-21 (30 ng/mL)을 세포 현탁액에 추가한다. T-75 cm² 플라스크(들) 및/또는 VueLife 배양 가방에서 10^6 세포/mL의 농도로 분취하고 인큐베이터로 복귀시킨다.
- [0159] 3과 5 일자에 CAR⁺ T 세포의 지속된 배양. 절반-배지 교체를 수행하고, IL-21을 보충하고, 그리고 T 세포를 10^6 세포/mL의 농도에서 유지한다.
- [0160] 7 일자에 첫 번째 aAPC-매개된 자극 주기의 종결. 세포를 수확하고, 계수하고, 그리고 CD3, CD4, CD8, 그리고 Fc γ (CAR)에 대해 염색한다.
- [0161] 전기천공 후 7일과 14 일 사이에 CD56⁺ 세포의 고갈.
- [0162] CD56⁺ CD3^{음성} 림프구 ≥10%이면, 상자성 비드를 이용하여 CD56 고갈을 수행한다.
- [0163] 8 → 14 일자, 15 → 21 일자, & 22 → 28 일자에 상응하는 자극 주기 #2, #3, & #4 동안 임상적으로-충분한 숫자까지 T 세포를 증식하기 위한 aAPC의 반복되는 첨가. 자극 과정을 4 회까지 반복한다. 7, 14와 21 일자에

시작하고, 그리고 이후 각 배지 교체 시점 (주 3회, 월요일-수요일-금요일 일정에서)에서 IL-2 (50 U/mL)를 이들 배양액에 추가한다. 방출 검사 및 주입을 위해 제어된 속도 냉동기를 이용하여, 필요에 따라 과잉 T 세포를 냉동보존한다 (보관한다).

[0164] **실시예 2 - 말초혈과 제대혈로부터 T 세포를 유전적으로 변형하기 위한 잠자는 미너 및 인공 항원 제시 세포의 임상적 적용 - 결과**

[0165] DNA 플라스미드의 전자 전달 및 γ -방사선조사된 aAPC에서 T 세포의 증식이 인간 적용을 위해 PB와 UCB로부터 유래된 임상적으로-매력적인 숫자의 T 세포를 산출하는데 이용될 수 있다. 이들 유전적으로 변형된 T 세포는 주요 조직적합성 복합체와는 관계없이, TAA CD19를 인식하는 도입된 CAR을 발현한다. (i) 트랜스포손, CD28과 CD3- ϵ 을 통해 신호하는 2세대 CAR (CD19CD28)⁽¹⁴⁾, 그리고 (ii) 유전자전위효소, SB11 (Jin *et al.*, 2011)을 발현하는 SB-유래된 DNA 플라스미드는 기존 문헌에서 설명되었다 (Singh *et al.*, 2011; Davies *et al.*, 2010; Kebriaei *et al.*, 2012). 현재 연구에서 이용된 플라스미드는 Waisman Clinical Biomanufacturing Facility (Madison, WI)에 의해 상업적으로 생산되었다. K562 세포 (American Type Culture Collection으로부터 획득된 부모 라인)로부터 유래된 aAPC (클론 #4)는 기존 문헌에서 설명된 바와 같이 (Manuri *et al.*, 2010), 원하는 T 세포 동시자극성 분자 (aAPC의 세포 표면 상에서 90%에서 각 도입된 분자)를 공동발현한다. 여기서, CD19-특이적 T 세포는 CAR을 도입하기 위한 SB 전위, 그 이후에 T 세포를 CAR-의존성 방식으로 수치적으로 확대하기 위한 aAPC의 첨가를 이용하여, PB 또는 UCB로부터 유래된 단핵 세포 (MNC)로부터 산출될 수 있었다 (도면 1과 4) (Singh *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2008). 10개 큐벳 (2x10⁷ MNC/큐벳)은 트랜스포손 (CAR)을 코딩하는 15 μ g의 DNA 플라스미드 (CD19CD28/pSBSO) 및 유전자전위효소 (SB11)를 코딩하는 5 μ g의 DNA 플라스미드 (pCMV-SB11)를 이용하여 각 수용자에 대해 전기천공되었다. MNC가 실험실 작업을 위해 제한되거나 또는 축소되면, 큐벳의 숫자가 감소될 수 있다. 전기천공의 당일은 자극 주기 #1의 "0 일자"로서 규정된다. 유세포분석법 및 배양 조건에 대한 대조로서, 자가 T 세포가 모의 전기천공되고 (DNA 플라스미드 없이), 그리고 T 세포 증식을 지속하기 위해 CD3을 교차연결하는 OKT3으로 미리 적하된 γ -방사선조사된 aAPC (클론 #4)에서 수치적으로 확대된다. 전기천공 다음날 T 세포의 전자 전달 효율과 생존력이 일과적으로 사정되었다 (도면 2b). 이러한 초기 시점에서 대조 DNA 플라스미드 (pmaxGFP으로서 지정됨) 및 CAR로부터 EGFP의 발현은 통합된 에피솜 플라스미드로부터 단백질 발현을 반영한다. 전형적으로, 전기천공 다음날 EGFP 발현은 60%에서 예측되고, 그리고 CAR 발현은 ~40%에서 예측되었는데 (도면 2a), T 세포 생존력이 40%-50% 사이이었다. 가용성 재조합 인간 IL-2와 IL-21의 존재에서 γ -방사선조사된 aAPC의 반복되는 첨가는 CAR을 안정되게 발현하는 T 세포 (CD19CD28)를 회수한다. CD3^{음성}CD56⁺ NK 세포는 이들 NK 세포의 백분율이 $\geq 10\%$ 이고, 특히 T 세포 상에서 발현된 CAR의 백분율이 낮으면, CD56-특이적 상자성 비드를 이용하여 배양액으로부터 고갈된다. 이러한 고갈은 CAR⁺ T 세포의 증식을 지속하는 aAPC의 능력을 간섭하는, NK 세포의 급속한 과도성장을 예방한다. 때때로, CAR⁺ T 세포로부터 NK 세포의 고갈은 마지막 2번의 자극 주기 동안 착수되지만, 이것은 일부 CAR⁺ T 세포 상에서 CD56의 공동발현으로 인해 원하는 세포의 상실을 유도한다. T 세포는 14 일자를 지나, VueLife 배양 가방을 이용한 기능적으로 폐쇄된 시스템에서 성장되었다. 유전적으로 변형되고 증식된 T 세포의 부분집합은 전형적으로, aAPC에서 공동배양의 14 일자 또는 21 일자 (자극 주기 #2 또는 #3의 종결점)에 냉동보존되어 장래 분석을 위한 보관된 물질의 공급원으로서 이바지하고, 그리고 제조 공정 동안 예상하지 못한 문제가 차후에 발생하면 해동된다. T 세포는 전형적으로, >90% CAR을 일과적으로 발현하고 >80% 생존가능한 (도면 2c, d) 28 일자 또는 약 28 일자의 배양액 (도면 3)에서 수확된다. aAPC에서 4 주의 공동배양 후, CD3⁺ T 세포의 평균 배수적 확대는 19,800 $\pm$ 11,313이고 CAR⁺ 발현은 90% $\pm$ 7.5%이다 (Singh *et al.*, 2011). 이들 T 세포는 냉동보존되고, 그리고 제조된 산물의 안전성과 치료 잠재력에 관한 정보를 제공하는 과정중 검사와 방출 검사를 받는다. 방출 검사는 임상 시험에서 수용자 내로 주입에 앞서 분석의 증명서를 산출하기 위해 임상 실험실 개선 개정 (CLIA)에 따라 착수된다.

[0166] **실시예 3 - 잠자는 미너 및 인공 항원 제시 세포를 이용하여 키메라 항원 수용체를 안정되게 발현하는 임상적-등급 CD19-특이적 T 세포의 제조 - 재료와 방법**

[0167] **임상적-등급 DNA 플라스미드의 산출.** SB 트랜스포손, CoOpCD19CD28/pSBSO는 연장 인자-1 α (EF-1 α) (Kim *et al.*, 1990) 및 인간 T-세포 백혈병 바이러스 (HTLV)의 5' 비번역 영역으로 구성된 EF-1/HTLV 하이브리드 복합 프로모터 (InvivoGen) 하에 인간 코돈 최적화된 (CoOp) 2세대 CoOpCD19CD28 CAR (서열 번호: 1)을 발현한다 (Singh *et al.*, 2011; Davies *et al.*, 2010). 이러한 DNA 플라스미드의 유도는 도면 10에서 설명된다. SB 유전

자전위효소, SB11은 시토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터 하에, DNA 플라스미드 pCMV-SB11로부터 시스 (*cis*) 발현되었다 (Singh *et al.*, 2011). 이러한 DNA 플라스미드의 유도는 **도면 11**에서 설명된다. 양쪽 플라스미드는 전체적으로 염기서열화되고, 그리고 세균 균주 대장균 (*E. coli*) DH5 α의 선별을 위한 카나마이신을 이용하여 Waisman Clinical Biomanufacturing Facility (Madison, WI)에 의해 제조되었다. 이들 DNA 플라스미드에 대한 방출 기준은 **표 1**에서 도시된다. CD19는 DNA 플라스미드 ΔCD19_{Coop}-F2A-Neo/pSBS0 (**도면 12**)을 이용하여 발현되었다.

표 1

SB 트랜스포손 및 유전자전위효소를 코딩하는 DNA 플라스미드에 대한 방출 기준.

검사	명세
모습	투명한 무색 액체
제한 지도작성 & 아가로오스 겔	트랜스포손의 경우에 Nde I; AflIII & NheI; HindIII & AvrII; Xba & NcoI로 절단한다. 유전자전위효소의 경우에 NdeI; XhoI & PvuII; AflIII; NcoI로 절단한다
염기서열결정	서열은 본래 코딩에 합치한다
흡광도를 통한 농도	2.0±0.2mg/mL
A260/A280 흡광도 비율	1.8-2.0
세균 내독소에 대한 활동적 LAL 검사	<50EU/mg
플라스미드 형태 (HPLC를 통한 % 초나선)	>90% 초나선
무균 검사	성장 관찰되지 않음
ELISA를 통한 대장균 (<i>E. coli</i>)속주 단백질	<0.3%
HPLC를 통한 대장균 (<i>E. coli</i>)RNA	<10%

[0168]

[0169]

세포 계수. 살아있는 세포를 죽은 세포로부터 식별하는데 트리판 블루 배제가 이용되었고 셀로미터 (Nexcelom Bioscience)를 이용하여 계수되었다 (Singh *et al.*, 2011).

[0170]

PBMC의 분리. 2명의 남성 지원자 건강한 공여자로부터 혈액구성분채집술 산물이 Key Biologics LLC (Memphis, TN)로부터 구입되었다. 말초혈 단핵 세포 (PBMC)는 cGMP에 따른 작업을 위해 Biosafe Sepax 시스템 (Eysins, Switzerland)을 개조함으로써 분리되었다. 간단히 말하면, CS-900 키트에서 모든 클램프를 폐쇄한 후에, 100 mL 피콜 (GE Healthcare)이 60 mL 주사기에 의해 Luer-lock 연결기를 거쳐 밀도 구배 배지 가방 ("피콜 가방")으로 무균 이전되고, 그리고 배관은 소형 밀봉기 (Sebra, 모델 2380)를 이용하여 열 밀봉되었다. 상기 키트는 세척을 위해 20 mL 25% 인간 혈청 알부민 (HSA) (Baxter) (2% v/v, 세척 완충액)을 포함하는 ClinIMACS 완충액 (PBS/EDTA, Miltenyi, Cat#70026)을 내포하는 1,000 mL 가방, 최종 산물 가방 [연결기가 달린 300 mL 전달 팩 (Baxter/Fenwal 4R2014)], 그리고 시약/혈액 가방에 스파이크-연결되었다. 밀도 구배-기초된 분리 프로토콜 (v126)을 이용하여, 주사기 피스톤이 원심분리기 챔버 내로 적하되고 Sepax 단위의 덮개가 폐쇄되었다. 시약/혈액 가방 및 산물 가방은 매달리고, 그리고 모든 조리개는 'T' 위치에서 회전성 핀 위에 착석되었다. 압력-센서 라인을 연결한 후에, 키트는 자동 단일 이용 검사에 의해 검증되고 그리고 이후, 중력 흐름을 이용하여 수동으로 기폭되었다. 주기의 완결 후, 최종 산물은 원심분리기 튜브 내로 무균 이전되고 각각 400g에서 10 분 동안 세척 완충액 및 인간혈 완충된 식염수 (PBS)으로 1회 세척되었다. 계수 후, 세포는 제어된-속도 냉동기 (Planer Kryo 750)에서 BM5 프로그램 (비율 -2℃/분에서 4℃에서 -4℃로, 비율 -35℃/분에서 -4℃에서 -60℃로, 비율 8℃/분에서 -60℃에서 -20℃로, 비율 -2.5℃/분에서 -20℃에서 -45℃로, 비율 -10℃/분에서 -45℃에서 -80℃로)을 이용하여, CryoMACS 동결 가방 (Miltenyi) 및 바이알 (Nunc)에서 냉동보존 매체 (50% HSA, 40% Plasmalyte, 10% DMSO)를 이용하여 냉동보존되었다.

[0171]

aAPC (클론 #4) 마스터와 작업 세포 은행의 제조. K562는 (i) CD19, (ii) CD64, (iii) CD86, (iv) CD137L, 그리고 (v) 막 결합된 IL-15 (mIL15)를 공동발현하는 aAPC (클론 #4, CJK64.86.41BBL.GFP.IL-15.CD19로서 지정됨)를 EGFP를 포함하는 이중시스템 벡터로서 산출하기 위해, the University of Pennsylvania에서 렌티바

이러스에 의해 형질도입되었다. aAPC는 10% 열-비활성화된 규정된 FBS (Hyclone) 및 세포를 5×10^5 세포/mL에서 유지하는 2 mM 글루타맥스-1 (Life technologies-Invitrogen) 배양 배지 (CM)를 내포하는 HyQ RPMI 1640 (Hyclone)에서 수치적으로 확대되었다. 320개 바이알의 마스터 세포 은행 (MCB)이 세포 요법의 생산 지원 (Production Assistance of Cellular Therapies, PACT)을 통해 생산되었다 (표 2). 이후, MCB로부터 유래된 클론 4 aAPC의 200개 바이알 작업 세포 은행 (WCB)이 MDACC에서 산출되고 검사되었다 (표 3).

표 2

K562-유래된 aAPC (클론 #4) 마스터 세포 은행에 대한 방출 기준.

검사	명세
복제-적격성 렌티바이러스	음성
레트로바이러스의 검출을 위한 산물 증강된 역전사효소	음성
내독소 LAL	음성
한천 배양가능 및 비-한천 배양가능 미코플라스마 (Mycoplasma)	음성
PCR에 의한 HIV-1/2 프로바이러스 DNA	음성
PCR에 의한 HBV DNA	음성
RT-PCR에 의한 HCV RNA	음성
PCR에 의한 CMV DNA	음성
파보바이러스 (Parvovirus) B19	음성
PCR에 의한 HTLV-I/II 프로바이러스 DNA	음성
PCR에 의한 EBV DNA	음성
PCR에 의한 HHV-6 DNA	음성
PCR에 의한 HHV-7 DNA	음성
PCR에 의한 HHV-8 DNA	음성
아데노 연관된 바이러스	음성
생체내 불현성 바이러스	음성
	음성
9CFR에 의한 소 바이러스	음성
변형된 9CFR PT-1에 의한 돼지 바이러스	음성
아데노 연관된 바이러스	음성
동종효소 분석	인간 기원
전파 전자 현미경검사에 의한 형태	인지가능한 바이러스-유사 입자 및 임의의 다른 미생물 작용제 없음
면역표현형분석:	
CD19	90%
CD64	90%
CD86	90%
CD137L	90%
EGFP-mIL15	90%
정균작용 & 생장저지작용	음성
2ICFR610.2에 의한 무균	음성

[0172]

표 3

K562-유래된 aAPC (클론 #4) 작업 세포 은행에 대한 방출 기준

검사	실험실	명세
정균작용 및 생장저지작용	AppTec Laboratory Services	음성
21CFR610.12에 의한 무균	AppTec Laboratory Services	음성
한천 배양가능 및 비- 한천 배양가능 미코플라스마 (Mycoplasma)	BioReliance	음성
시험관내 우발적인 바이러스 시험	BioReliance	음성
동일성 동종효소 분석	BioReliance	인간 기원
표현형	MDACC GMP Flow Cytometry Laboratory	≥80% GFP ⁺ ≥80% CD19 ⁺ ≥80% CD86 ⁺ ≥80% CD137L ⁺ ≥80% CD64 ⁺ ≥80% CD32 ⁺
내독소 (LAL) EndoSafe	MDACC GMP Quality Control Laboratory	≤5 EU/mL
트리판 블루에 의한 생존력	MDACC GMP Quality Control Laboratory	≥ 60%

[0173]

[0174]

CAR⁺ T 세포를 선별적으로 증식하는 aAPC (클론 #4). γ -방사선조사된 aAPC가 유전적으로 변형된 T 세포를 수치적으로 확대하는데 이용되었다. WCB로부터 해동된 aAPC는 VueLife 세포 배양 가방에서 최대 60 일 동안 CM에서 증식되고 Biosafe Sepax II 수확 절차를 이용하여 수확되었다. 간단히 말하면, CS-490.1 키트가 Luer lock 결합을 통해 300 mL 출력 가방 (전달 팩)에 연결되었다. 분리 챔버가 구멍 내에 설치되었고, 그리고 배관이 T 위치에서 정렬된 광학 센서와 조리개 내로 삽입되었다. 압력 센서 라인을 연결한 후에, 산물 가방 및 상층액/혈장 가방이 홀더에 매달렸다. 변형된 프로토콜 PBSCv302가 Sepax 메뉴로부터 선별되었고, 그리고 처리되는 입력 산물의 부피 (초기 부피)가 ≤840 mL로 설정되었다. 검증과 키트 검사 후, 절차가 시작되었다. 완결 이후에, 이들 가방이 제거되고, 클램프가 폐쇄되고, 그리고 키트가 제거되었다. 최종 산물 가방으로부터 세포가 무균 제거되고, 세척 매체 (Plasmalyte에서 10% HSA)로 2회 세척되고, 계수되었다. aAPC가 CIS BIO International 방열기 (IBL-437 C#09433)를 이용하여 방사선조사되고 (100 Gy), 그리고 제어된-속도 냉동기 (Planer Kryo 750)를 이용하여 냉동보존 매체에서 추후 이용을 위해 냉동보존되었다.

[0175]

aAPC의 OKT3-적하. OKT3-적하된 (CD64를 거쳐) aAPC (클론)는 유전자 변형을 겪지 않은 대조 (CAR^{음성}) 자가 대조 T 세포를 증식하는데 이용되었다. 배양액으로부터 획득된 aAPC는 적하 배지 (LM)로 명명된, 0.2% 아세트인 (Acetadote, Cumberland Pharmaceuticals)을 내포하는 혈청-없는 X-Vivo 15 (cat # 04-744Q, Lonza)에서 하룻밤 동안 배양되었다. 그 다음날, 세포는 세척되고, Gamma Cell 1000 Elite Cs-137 방열기 (MDS Nordion)를 이용하여 방사선조사되고 (100 Gy), $1 \mu\text{g}/10^6$ 세포의 기능적 등급 정제된 항인간 CD3 (클론-OKT3, 16-0037-85, eBioscience)과 함께 10^6 세포/mL의 농도에서 LM에서 재현탁되고, 그리고 4°C에서 30 분 동안 3-D 회전기 (Lab-Line)에서 온건한 교반과 함께 배양되었다. LM으로 3회 세척 이후에, 이들 세포는 실험에 이용되거나 또는 추후 이용을 위해 증기 층에서 액체 질소에서 분취량으로 동결되었다.

[0176]

CAR⁺ T 세포의 제조. 해동된 PBMC는 (ii) CD19RCD28 CAR 트랜스포손을 코딩하는 DNA 플라스미드 (CoopCD19RCD28/pSBS0) (큐벳마다 2×10^7 PBMC당 15 μg 초나선 DNA), 그리고 (iii) SB11 유전자전위효소를 코딩하는 DNA 플라스미드 (pCMV-SB11) (큐벳마다 2×10^7 PBMC당 5 μg 초나선 DNA)와 함께, (i) 인간 T-세포 키트 (cat# VPA-1002, Lonza; 한 큐벳에서 2×10^7 세포에 대해 100 μL)에서 재현탁되었다. 이러한 혼합물은 큐

벡 (Lonza)으로 즉시 이전되고, 뉴클레오펙터 II (Amara/Lonza)를 이용하여 전기천공되고 (배양 0 일자를 규정), 10% RPMI 완전한 배지에서 2 내지 3 시간 동안 안정되고, 그리고 절반-배지 교체 후, 37 °C, 5% CO₂에서 하룻밤 동안 배양되었다. 그 다음날, 세포는 수확되고, 계수되고, 유세포분석법에 의해 표현형분석되고, 그리고 1:2 (CAR⁺ T 세포:aAPC)의 비율에서 γ -방사선조사된 aAPC와 공동배양되었는데, 이것은 배양 1 일자 및 7-일 자극 주기의 시작을 표시하였다. IL-21 (cat # AF-200-21, PeproTech) 및 IL-2 (cat # NDC 65483-116-07, Novartis)가 각각, 1 일자와 7 일자에 이어서 월요일-수요일-금요일 일정에서 첨가되었다. NK 세포는 특히 그들의 과도성장이 조직 배양 과정에서 초기에 발생하면, CAR⁺ T 세포의 수치 확대를 예방할 수 있다. 이런 이유로, CD3^{음성}CD56⁺ 세포 $\geq 10\%$ 이면, 25% HSA (80 μ L/10⁷ 세포)를 내포하는 ClinMACS 완충액에서 LS 칼럼 (cat #130-042-401, Miltenyi Biotech)에서 CD56 비드 (cat #70206, Miltenyi Biotech, 20 μ L 비드/10⁷ 세포)를 이용하여 CD56-고갈이 수행되었다. T 세포는 앞서 설명된 바와 같이 제어된-속도 냉동기 (Planer Kryo 750)를 이용하여 전기천공 후 배양 21 일자 및 세 번째 자극 주기의 종결점에서 백업으로서 냉동보존되고, 그리고 액체 질소 (증기-층)에서 보관되었다. 전체, CD3⁺, 그리고 CAR⁺ T 세포에 대한 세포 계수가 시간의 흐름에서 플롯팅되고, 그리고 기울기가 선형 회귀를 이용하여 결정되었다. 배수적 확대 결과는 스튜던트 t 검증을 이용하여 비교되었다. CD4/CD8 비율은 각 시점 및 검증 실행마다 계산되고 평균화되었다.

[0177] **CAR^{음성} 대조 T 세포의 산출.** 대조로서, 5x10⁶ 모의 형질감염된 PBMC가 7-일 자극 주기에서 1:1의 비율에서 방사선조사되고 항-CD3 (OKT3) 적하된 K562-유래된 aAPC 클론 #4와 공동배양되었다. 모든 배양액은 배양 1 일자부터 계속해서 IL-21 (30 ng/mL), 그리고 배양의 시작 후 7 일에 시작하여 IL-2 (50 U/mL)으로 보충되었다. 모든 사이토킨은 월요일-수요일-금요일 일정에서 차후 첨가되었다.

[0178] **세포주.** CD19⁺ Daudi β_2m [버킷 림프종, β_2 마이크로글로불린을 공동발현, (Rabinovich *et al.*, 2008)] 및 CD19⁺ NALM-6 (프리-B 세포)은 기존 문헌에서 설명된 바와 같이 배양되었다 (Singh *et al.*, 2011). ATCC로부터 EL-4 세포 (생쥐 T-세포 림프종 라인)는 구조체 Δ CD19_{cop}-F2A-Neo/pSBSO를 이용하여 CD19를 발현하도록 변형되었다. 간단히 말하면, 5x10⁶ EL-4 세포는 SB 트랜스포손 (Δ CD19_{cop}-F2A-Neo/pSBSO, 3 μ g) 및 SB 유전자전위효소 (pCMV-SB11, 1 μ g)를 포함하는 100 μ L의 Amara 생쥐 T 세포 뉴클레오펙터 키트 (카탈로그 #VPA-1006)에서 재현탁되고, 그리고 뉴클레오펙터 II (Lonza)를 이용하여 전기천공되었다 (프로그램 X-001). 형질감염체는 세포 파괴성 농도의 G418 (0.8 mg/mL)에서 배양되고, 그리고 클론 (클론 #17)을 획득하기 위해 CD19의 균질한 발현을 위한 형광 활성화된 세포 분류 (FACS)를 겪었다. Jurkat 세포는 ATCC로부터 획득되고, 그리고 Amara/Lonza 뉴클레오펙터 용액 (키트 V)을 이용하여 _{cop}CD19RCD28mz (CoOp)/pSBSO와 함께 전기천공되었다 (프로그램 T-14, 뉴클레오펙터 II, Lonza). 전기천공 후 2 주에, CAR을 안정되게 발현하는 Jurkat 세포는 클론 (클론 #12)을 획득하기 위해 CAR의 균질한 발현을 위한 FACS를 겪었다 (Maiti *et al.*, 2013). 세포주는 2 mM 글루타맥스-1 (Invitrogen) 및 10% 열-비활성화된 소 태아 혈청 (FCS) (Hyclone; 10% RPMI)으로 보충된 HyQ RPMI 1640 (Hyclone)에서 유지되었다. 모든 세포주는 기관 세포주 인증 정책에 따라 STR 프로파일링 또는 핵형분석을 이용하여 검증되었다.

[0179] **세포의 면역표현형.** 세포는 4°C에서 30 분 동안 100 μ L FACS 완충액 (2% FBS, 0.1% 아지드화나트륨)에서 항체 (표 4)를 이용하여 염색되었다. 세포내 염색을 위해, 20 분 동안 고정/투과화 후, 세포는 4°C에서 30 분 동안 파마 세척 완충액에서 적절한 항체로 염색되었다. 획득은 FACSCalibur (BD Bioscience)를 이용하여 수행되고 Cell Quest BD Bioscience) 또는 FCS Express 3.00.0612 (De Novo Software, Thornhill, Ontario, Canada)를 이용하여 분석되었다.

표 4

유세포분석법에 이용된 항체.

세포	항체/플루오로크롬	판매자	카탈로그 번호
T 세포	CD3-PE	BD Biosciences	347347
	CD4-APC	BD Biosciences	340443
	CD8-PerCPCy5.5	BD Biosciences	341051
	CD16-PE	BD Biosciences	347616
	CD25-APC	BD Biosciences	555434
	CD28-PerCPCy5.5	BD Biosciences	337181
	CD32-FITC	BD Biosciences	555448
	CD39-FITC	eBioscience	11-0399-42
	CD45TA-APC	BD Biosciences	550855
	CD45RO-PE	BD Biosciences	555489
	CD57-FITC	BD Biosciences	555619
	CD56-APC	BD Biosciences	555518
	CD62L-PE	BD Biosciences	555544
	CD69-PE	BD Biosciences	555531
	CD127 (IL-7Ra) - Alexa Fluor 647	BD Biosciences	558598
	CD150-PE	BD Biosciences	559592
	CD279 (PD-1) -PE	BD Biosciences	557946
	CCR7-PerCPCy5.5	BioLegend	335605
	그랜자임 B-Alexa Fluor 647	BD Biosciences	560212
	HLA-DR-PerCPCy5.5	BD Biosciences	339205
	퍼포린-FITC	BD Biosciences	556577
	항인간 Fcγ-PE	Invitrogen	H10104
K562 aAPC (클론 #4)	CD19-PE	BD Biosciences	555413
	CD19-APC	BD Biosciences	555415
	CD64-PE	BD Biosciences	558592
	CD86-PE	BD Biosciences	555658
	CD137L-PE	BD Biosciences	559446
	염소 항생쥐 IgG의 F(ab') ₂ 단편, F(ab') ₂ 단편 특정한-PE (OKT3 적하를 위해)	Jackson Immunoresearch	115-116-072

[0180]

[0181]

웨스턴 블롯. CD19CD28로부터 유래된 키메라 CD3-ζ (73-kDa)의 단백질 발현은 기존 문헌에서 설명된 바와 같이 사정되었다 (Singh *et al.*, 2008). 간단히 말하면, 단백질 용해물은 iBlot 건조 블로팅 시스템 (Invitrogen)을 이용하여 니트로셀룰로오스 막 위에 이전되고, 생쥐 항인간 CD3-ζ 단일클론 항체 (cat # 551033, 0.5 μg/mL, BD Biosciences, CA), 그 이후에 양고추냉이 과산화효소 (HRP)-접합된 염소 항생쥐 IgG (cat # 1858413, 1:10,000; Pierce, IL)와 함께 배양되고, SuperSignal West Femto 최고 감수성 기질 (Pierce, IL)을 이용하여 전개되고, 그리고 VersaDoc™ 4000 겔 문서화 시스템 (BioRad, CA)을 이용하여 화학발광이 포착되었다.

[0182]

형광 제자리 혼성화 및 유세포분석법 (Flow-FISH)에 의한 말단소립 길이 분석. T 세포의 말단소립 길이는 제조업체의 사용설명서에 따라, 유세포분석법을 위한 말단소립 PNA 키트/FITC (DAKO)를 이용함으로써 측정되었다. 간단히 말하면, 단리된 세포 (CD4 또는 CD8) 및 대조 세포 (cat # 85112105, CEM-1301 세포주; ECACC)는 82℃에서 10 분 동안, FITC-표지화된 말단소립 PNA 프로브가 있거나 또는 없는 혼성화 용액에서 동등한 척도에서 혼합되고; 실온에서 어둠 하에서 하룻밤 동안 혼성화되고; 40℃에서 세척 용액으로 2회 세척되고; 2% FCS 및 프로피디움 요오드화물 (1 μg/mL)을 내포하는 PBS에서 재현탁되고; 그리고 FACSCalibur (BD Biosciences)에서 분석되었다. FITC-표지화된 형광 보정 비드 (cat # 824A, Quantum™ FITC MESF, Bangs Laboratories)가 유세포분석법 기계의 보정에 이용되었다. 상대적 말단소립 길이 (RTL)는 다음에 의하여 T 세포를 CEM-1301 세포주와 비교함으로써 결정되었다:

[0183]

$$RTL = ((\text{프로브를 갖는 평균 } FL1 \text{ 표본 세포} - \text{프로브가 없는 평균 } FL1 \text{ 표본 세포}) \times 2 \times 100) / (\text{프로브를 갖는 평균 } FL1 \text{ 참고 세포} - \text{프로브가 없는 평균 } FL1 \text{ 참고 세포})$$

- [0184] **크롬 방출 검정.** T 세포는 ^{51}Cr -표지화된 표적 세포를 이용한 표준 4-시간 크롬 방출 검정에서 그들의 세포독성에 대해 평가되었다. T 세포는 96-웰 V-바닥 평판 (Costar)에서 5×10^3 표적 세포로 1×10^5 , 0.5×10^5 , 0.25×10^5 , 0.125×10^5 및 0.0625×10^5 세포/웰에서 삼중으로 도말되었다. 배양 후, 50 μL 의 상층액이 LumaPlate (Perkin Elmer) 위에 수확되고, TopCount NXT (Perkin Elmer)에서 판독되고, 그리고 특정한 용해 퍼센트가 다음에 의하여 계산되었다:
- [0185]
$$(\text{방출된 실험적 } ^{51}\text{Cr} - \text{방출된 자발적 } ^{51}\text{Cr}) / (\text{방출된 최고 } ^{51}\text{Cr} - \text{방출된 자발적 } ^{51}\text{Cr}) \times 100$$
- [0186] 자발적 방출과 최고 방출은 각각, CM 또는 0.1% Triton X-100 (Sigma)과 함께 배양된 표적 세포로부터 조건 상층액에서 크롬을 계측함으로써 결정되었다.
- [0187] **내독소 시험.** 최종 산물에서 내독소 수준은 제조업체의 지침에 따라 Endosafe®-PTS 이동식 검사 시스템 (Charles River Laboratories)을 이용하여 결정되었다. 상기 검사는 0.01-10 EU/mL의 검출 한계를 갖는데, 이것은 EU/환자 중량으로 전환될 수 있다.
- [0188] **미코플라스마 (Mycoplasma) 시험.** PCR에 의한 미코플라스마 (Mycoplasma) 검출이 제조업체의 사용설명서에 따라 TaKaRa 미코플라스마 검출 키트 (Clontech)를 이용하여 수행되었다.
- [0189] **T 세포 수용체 $V\beta$ 레퍼토리.** 배양 28 일자와 35 일자 CAR^+ T 세포의 T 세포 수용체 (TCR)- $V\beta$ 용법은 CD3-특이적 mAb (cat # 340949, BD Biosciences, 10 μL) 및 아이소타입-정합된 대조 mAb (cat # 552834, BD Biosciences)와 관련하여 이용된 24개 TCR $V\beta$ -특이적 mAb (cat # IM3497, IO TEST 베타 표지 TCR- $V\beta$ 레퍼토리 키트, Beckman Coulter)의 패널을 이용하여 결정되었다.
- [0190] **통합된 CAR의 사본수를 결정하기 위한 실시간 PCR.** 유전적으로 변형된 T 세포에서 통합된 CD19RCD28 CAR의 사본수를 결정하기 위해, 50-100 ng 유전체 DNA (cat # 80204, AllPrep DNA/RNA 미니 키트, Qiagen)는 다음의 프라이머: 전방 (5'-CAGCGACGGCAGCTTCTT-3'; 서열 번호: 8), 후방 (5'-TGCATCACGGAGCTAAA-3'; 서열 번호: 9) 및 프로브 (5'-AGAGCCGGTGGCAGG-3'; 서열 번호: 10)을 이용한 PCR 반응 (50°C에서 2 분, 95°C에서 10 분, 그 이후에 95°C에서 15 초 및 60°C에서 1 분의 40회 주기)에서 Steponeplus 실시간 PCR 시스템 (Applied Biosystems)을 이용하여 증폭되었다. RNA분해효소 P 유전자에 대한 프라이머 (Cat # 4316844, Applied Biosystems)가 내부 대조로서 이용되었다. CD19RCD28mz (CoOp)/pSBSO DNA 플라스미드로부터 CAR의 1개 사본을 내포하는 유전적으로 변형된 Jurkat-세포 (클론 # 12)로부터 연속으로-회색된 유전체 DNA가 표준 곡선을 산출하는데 이용되었다 (Maiti *et al.*, 2013). 모든 프라이머, 프로브와 TaqMan 유전자 발현 마스터 믹스는 Applied Biosystems로부터 구입되었다.
- [0191] **SB11 유전자전위효소에 대한 PCR.** CAR^+ T 세포로부터 단리된 DNA (20 ng) (AllPrep DNA/RNA 미니 키트, Qiagen)는 PCR 반응 (5 분 동안 95°C; 95°C에서 15 초, 58°C에서 40 초, 72°C에서 60 초의 25회 주기; 그 이후에 72°C에서 7 분 동안 최종 연장)에서 전방 (5'-ATGGGAAAATCAAAAGAAATC-3'; 서열 번호: 11) 및 후방 (5'-CTAGTATTTGGTAGCATTGC-3'; 서열 번호: 12) 프라이머를 이용하여 유전자 증폭기 (PTC-200, DNA Engine, BioRad)를 이용하여 증폭되었다. GAPDH가 하우스키핑 유전자로서 이용되고, 그리고 전방 (5'-TCTCCAGAACATCATCCCTGCCAC-3'; 서열 번호: 13) 및 후방 (5'-TGGGCCATGAGGTCCACCACCTG-3'; 서열 번호: 14) 프라이머를 이용한 동일한 PCR 반응에서 증폭되었다. 선형화된 pCMV-SB11 플라스미드 DNA (1 ng) 및 SB11과 EGFP (DNA 플라스미드 SB11-IRES2-EGFP로부터 발현됨)를 안정되게 발현하는 유전적으로 변형된 Jurkat 세포로부터 유전체 DNA (20 ng) (Maiti *et al.*, 2013)가 양성 대조로서 이용되었다. 모의 전기천공되고 (DNA 없음) OKT3-aAPC-증식된 T 세포가 음성 대조로서 이용되었다.
- [0192] **원치 않는 자율 T-세포 성장을 사정하는 검정.** 이상 T-세포 성장을 모니터링하기 위해, 4 aAPC-매개된 자극 주기 후 (전기천공 후 28 일) 수확된 2×10^5 CAR^+ T 세포는 추가 18 일 동안 24-웰 조직 배양 평판에서 삼중으로 배양되었다. (i) 양성 대조: aAPC와 사이토킨 (50 U/mL IL-2 및 30 ng/mL IL-21)의 존재. (ii) 검사: aAPC와 사이토킨의 부재. 유전적으로 변형된 T 세포는 18 일자에 전체 생존가능 세포가 (i) aAPC 및 사이토킨과 함께 배양된 CAR^+ T 세포의 경우에 $>2 \times 10^5$ 세포, 그리고 (ii) aAPC 및 사이토킨 없이 배양된 CAR^+ T 세포의 경우에 $<2 \times 10^4$ 세포일 때, 검정을 통과하였다.
- [0193] **G-줄무늬 핵형분석.** 공동배양의 종결점에서 CAR^+ T 세포가 수확되고, 그리고 슬라이드가 표준 절차를 이용하여

Giemsa 염색을 이용하여 염색되었다. 총 20개 G-줄무늬 중기가 분석되었다.

[0194] 실시예 4 - 잡자는 미녀 및 인공 항원 제시 세포를 이용하여 키메라 항원 수용체를 안정되게 발현하는 임상적-등급 CD19-특이적 T 세포의 제조 - 결과

[0195] aAPC (클론 #4). aAPC (클론 #4)로서 기능하는 K562는 CAR^+ T 세포를 선별적으로 증식하는데 이용되었다. 배양된 aAPC는 ~40 분이 소요되는 부피 감소 절차를 이용하여 Sepax II 장치에 의해 VueLife 가방으로부터 수확되었다. 평균 전처리 부피 및 aAPC 수치는 각각, 575 mL (범위 500-700mL) 및 4.9×10^8 (범위 3.2×10^8 내지 7.7×10^8)이었다. Sepax II로 처리 후, 세포의 평균 회수가 108% (범위 75% 내지 136%)이었는데, 125 mL (범위 50-200 mL)의 출력 부피는 78.3%의 평균 부피 감소 (범위 60% 내지 91.6%, 도면 5a, b)를 유발하였다. 자동화된 세포 회수는 45 분의 지속된 오퍼레이터 시간이 소요되고 91% 부피 감소를 유발한 수동 부피 감소 절차 (82%)와 유사하였다. aAPC는 CD19, CD64, CD86, CD137L, 그리고 EGFP (mIL15의 발현에 대한 마커로서)를 코딩하는 도입된 도입유전자의 >80% 발현에 대해 유세포분석법에 의해 규칙적으로 모니터링되었다. 면역표현형분석은 MCB와 WCB를 산출할 시에, 그리고 T-세포 배양액에 γ -방사선조사된 aAPC의 각 첨가 (이것은 각 자극 주기의 시작을 표시하였다, 도면 5c) 시에 착수되었다. 클론 4 aAPC에 대한 MCB와 WCB는 세포와 세포 상층액에서 무균 및 미코플라스마에 대해 음성으로 검사되었다. 생물안전 시험에서, 우발적인 바이러스 시험, 복제 적격성 레트로바이러스 시험, 그리고 다양한 인간 병원성 바이러스에 대한 선별검사에 의해 어떤 바이러스도 검출되지 않았다. 시험은 aAPC (클론 #4)가 지문확인에 기초하여 K562로부터 유래된다는 것을 검증하였다 (표 5).

표 5

K562 aAPC의 STR 지문확인 (클론 #4).

STR	K562 aAPC (클론 4)
AMEL	X
CSF1PO	9, 10
D13S317	8
D16S539	11, 12
D18S51	15, 16
D19S433	14, 14.2
D21S11	29, 30, 31
D2S1338	17
D3S1358	16
D5S818	11
D7S820	9, 11
D8S1179	12
FGA	21
TH01	9.3
TPOX	8, 9
vWA	16

[0196]

[0197] CAR^+ T 세포의 제조.

[0198] PBMC가 전기천공되고 임상적으로 의미있는 숫자까지 증식될 수 있고 (Huls *et al.*, 2013) (도면 6), 그리고 미리 확립된 방출 규준에 부합한다는 (표 6) 것을 확립하기 위해, CD19-특이적 CAR^+ T 세포의 대규모 생산에 대한 검증 연구가 착수되었다. 2가지 정상적인 공여자 성분채집술 산물이 Sepax 세포-처리 시스템을 이용하여 단핵 세포 (MNC)를 분리하기 위해 처리되었다. 성분채집술 산물 201 mL (공여자 1) 및 202 mL (공여자 2)는 2개 배치 (~100 mL/배치)에서 처리되어 50 mL 출력 산물을 산출하였다. 처리전 수치는 성분채집술 산물의 처리후 수치와 유사하였다. 공여자 1과 공여자 2로부터 각각, 40.5% 및 51% $CD3^+$ T 세포를 내포하는 총 5.3×10^9 와 7.1×10^9 세포가 분리되었다. 세포는 이후, 추후 이용을 위해 CryoMACS 동결 가방 (10 mL) 및 참고 냉동바이알 (1 mL)에서 분취량 (4×10^7 세포/mL)으로 냉동보존되었다. 3가지 별개의 검증 실험이 수행되었고 표 6에서 요약된다. 검증 실험 1과 2 (V1, V2)를 위해 공여자 1로부터 세포 및 검증 3 (V3)을 위해 공여자 2로부터 세포가 이용되었다. 각 실험을 위해, 새로-해동된 PBMC는 전기천공되고 별개의 배양 절차에서 탈체에서 수치적으로 확대되었다 (표 7). 배양 0 일자에, 3×10^8 (V1) 및 8×10^8 (V2, V3) 세포가 해동되고 (생존력, 88.9% 내지 97.6%) 전기천공에 앞서 2 시간 동안 안정되었다. 2 내지 3×10^8 세포 (V1 = 2×10^8 ; V2와 V3 = 3×10^8)는 CD19RCD28mz(CoOp)/pSBSO 트랜스포

손 및 pCMV-SB11 유전자전위효소 DNA 플라스미드와 함께 큐벳마다 2×10^7 세포로 전기천공되고, 그리고 그 다음 날 (배양 1 일자), CAR 발현에 기초하여 aAPC 클론 #4와 공동배양되었다. 3가지 검증 실행에 대한 전기천공 효율이 CAR의 발현 (33.7%, 25.5% 및 47.1%)에 의해 측정된 바와 같이 배양 1 일자에서 사정되었다. 공동배양의 종결점 (배양 28 일자)에서 CAR 발현은 92%, 99.2% 및 96.7%이었고, 그리고 배양액은 미미한 양의 오염 $CD19^+$ 세포 (평균 = $0.7\% \pm 0.15\%$) 및 $CD32^+$ aAPC (평균 = $0.6\% \pm 0.6\%$, **도면 7a**, **표 6**)와 함께 평균 $95\% \pm 5.3\%$ $CD3^+$ T 세포를 내포하였다. 본 발명자들은 예상된 73-kDa 키메라 ζ 사슬을 드러내는 $CD3-\zeta$ 사슬-특이적 mAb를 이용하여, 전기천공된/증식된 T 세포의 전체-세포 용해물의 웨스턴 블롯에 의한 CAR 발현을 더욱 확증하였다 (Singh *et al.*, 2008) (**도면 7b**). aAPC에서 T-세포 성장의 동역학의 검사 시에, 본 발명자들은 두 번째 주의 배양의 종결점 (자극 주기 2의 종결점)에서 T-세포 증식의 가속된 속도를 관찰하였는데, 이것은 자극의 첫 번째 주에서 배수적 확대와 비교하여 전체 ($p = 0.01$)와 $CD3^+$ ($p = 0.01$) T 세포의 증가된 배수적 확대와 일치한다. 전체 ($p = 0.01$, $p < 0.001$), $CD3^+$ ($p = 0.03$, $p < 0.001$), CAR^+ ($p = 0.02$, $p < 0.001$) T 세포에 대한 세 번째와 네 번째 주의 종결점에서 주간 배수적 확대는 각각, 1 주차의 것보다 일관되게 높았다 (**도면 13**).

표 6

전기천공되고 증식된 T 세포를 방출하기 위한 용인 기준

검사	명세	결과		
		검증 실행 #1	검증 실행 #2	검증 실행 #3
무균 - 세균 및 균류	음성 (14 일에서 성장 없음)	14 일에서 성장 없음	14 일에서 성장 없음	14 일에서 성장 없음
미코플라스마 (Mycoplasma)	PCR에 의해 음성	음성	음성	음성
시각적 검사	오염의 증거 없음	오염의 증거 없음	오염의 증거 없음	오염의 증거 없음
생존력 (트리판 블루 또는 7AAD)	$\geq 70\%$	99%	99%	98%
게이팅된 면역표현형 분석	$\geq 80\%$ $CD3^+ \geq 10\%$ $CAR^+ < 5\%$ $CD32^+ < 5\%$ $CD19^+$	89% $CD3^+ 92\%$ $CAR^+ 1.3\%$ $CD32^+ 0.75\%$ $CD19^+$	97% $CD3^+ 99\%$ $CAR^+ 0.04\%$ $CD32^+ 0.49\%$ $CD19^+$	99% $CD3^+ 96\%$ $CAR^+ 0.51\%$ $CD32^+ 0.78\%$ $CD19^+$
내독소 LAL	내독소 수준 < 5 EU/수용자 중량 (검증을 위해, mL당)	< 0.004 EU/mL	< 0.667 EU/mL	< 0.089 EU/mL
원치 않는 자율 성장에 대한 스크린	18 일자에 사이토킨 또는 aAPC가 없는 세포의 경우에 $< 2 \times 10^4$ 세포/mL	$< 2 \times 10^4$ 세포/mL	$< 2 \times 10^4$ 세포/mL	$< 2 \times 10^4$ 세포/mL

[0199]

표 7

γ-방사선조사된 aAPC에서 공동배양 전후에 T 세포의 특성화.

실험	성분채집술				전기천공 후 1 일자						공동배양의 28 일자							
	CD3 ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁺	CA ⁺	CD3 ⁺ CA ⁺	CD4 ⁺ CA ⁺	CD8 ⁺ CA ⁺	C ⁺ D3 ⁺	C ⁺ D4 ⁺	C ⁺ A ⁺	C ⁺ D3 ⁺	C ⁺ D4 ⁺	C ⁺ D8 ⁺	생존력	배수실험*
V1	40.5	1.65	18.5	11.2	64.7	2.4	33.7	41.0	28.0	11.1	88.9	0.02	92.0	97.7	2.46	87.2	99%	82.6
V2					59.8	4.1	25.5	17.1	25.9	3.8	97.1	0.01	99.2	97.4	1.77	91.2	99%	53.7
V3	51.2	1.59	29.1	18.3	87.7	2.3	47.1	45.0	20.1	31.5	99.2	0.8	96.0	96.0	43.4	51.4	98%	56.2

* 전체 (추론된) 생존가능 세포

[0200]

[0201]

본 발명자들은 1 주차 자극을 지나서, CD3⁺과 CAR⁺ T 세포에 대한 유사한 주간 배수적 확대를 관찰하였다. γ-방사선조사된 aAPC에서 4 주의 공동배양 후, CD3⁺ T 세포의 평균 545-배 수치 확대 및 CAR⁺ T 세포의 1,111-배 확대가 있었다. 탈체 확대 (배양 28 일자)는 평균 2.86×10^{10} CD3⁺ T 세포를 유발하였는데, 이들 중에서 거의 모두는 CAR⁺ (2.65×10^{10})이었다. 3가지 검증 실행에 대한 전체 ($p = 0.18$), CD3⁺ ($p = 0.17$) 및 CAR⁺ ($p = 0.2$) T 세포의 증식 동역학은 유사하였다 (도면 8a, b, c). 이들 데이터는 CD19-특이적 T 세포의 선별적인 생장을 위한 aAPC의 반복되는 첨가를 뒷받침한다.

[0202]

전기천공되고 증식된 CAR⁺ T 세포의 면역표현형. 3가지 검증 실행 중에서 2가지는 CD4⁺CAR⁺ T 세포 (평균 $16\% \pm 24\%$)와 비교하여 CD8⁺CAR⁺ T 세포 (평균 $76\% \pm 22\%$)의 우선적 성장을 유발하였는데 (도면 7c), 이것은 IL-21의 포함에 의해 예측되었다 (Singh *et al.*, 2011). CAR⁺ T 세포에 대한 평균 CD4/CD8 비율은 공동배양의 코스 동안 조정되었는데, 그 이유는 배양 14 일자에서 동등한 양의 CD4⁺CAR⁺과 CD8⁺CAR⁺ T 세포 (비율 = 0.9)를 야기하는, aAPC에서 공동배양의 시작 (배양 1 일자, 비율 = 3.3)에서 CD4⁺CAR⁺ T 세포의 우세가 있었기 때문이고, 그 이후 상기 비율은 감퇴하였다 (배양 21 일자, 비율 = 0.4; 배양 28 일자, 비율 = 0.3). 전체 CD4/CD8 비율은 유사한 경향을 추종하고 시간의 흐름에서 감퇴하였다 (표 7). 증식 기간의 종결점 (배양 28 일자)에서 CAR⁺ T 세포는 활성화되고 (CD69 발현, 평균 43.6%; HLA-DR 발현, 평균 61.2%), 세포용해할 수 있고 (그랜자임 B 발현, 평균 92.3%), 그리고 기억/미경험 T 세포의 마커를 발현하였다 (CD62L 발현, 평균 45.6%; CD28 발현, 평균 66.4%; CD27 발현, 평균 77.5%, CD45RA 발현, 평균 99.7%). 본 발명자들은 소진/노화의 세포 표면 마커를 검출할 수 없었다 (PD-1 발현, 평균 2.7%; CD57 발현, 평균 3.3%) (도면 7d). 이들 데이터는 aAPC와 일치하고 CAR⁺ T 세포의 비균질성 개체군의 생장을 뒷받침한다.

[0203]

CAR⁺ T 세포의 전향된 특이성. 모두 3가지 검증 실행으로부터 산출된 T 세포는 CD19⁺ 종양 표적을 특이적으로 용해할 수 있었다. 평균적으로 $57\% \pm 4\%$ (평균 $\pm$ SD, 범위, 61.2% 내지 53.8%) Daudi β_{2m} 및 $49\% \pm 7\%$ (평균 $\pm$ SD, 범위, 41% 내지 54%) NALM-6이 20:1의 작동체 대 표적 비율에서 용해되었다. CD19-특이적 사멸은 CAR⁺ (모의 전기천공된) 대조에 의한 1.4 ± 1 (평균 $\pm$ SD)-배 배경 CD19-특이적 용해를 갖는 20:1의 작동체/표적 비율에서 CD19⁺ 부모 EL-4 세포와 비교하여, CD19⁺ EL-4의 평균 6.2 ± 2.6 (평균 $\pm$ SD)-배 높은 사멸 (범위, 4.2 내지 9.2 배)에 의해 증명되었다 (도면 8d, 14). 이것은 전기천공되고 증식된 T 세포에서 CAR이 사멸을 CD19로 전향시켰다는 것을 암시한다.

[0204]

유전적으로 변형되고 증식된 T 세포에 의한 원치 않는 자율 증식의 결여. 본 발명자들은 SB 전위에 의해 유발된

잠재적 유전독성으로 인한 이상 T-세포 성장을 배제하기 위해, K562 aAPC 및 사이토킨 (IL-2 및 IL-21)의 존재/부재에서 CAR⁺ T 세포의 성장을 평가하였다. 18 일 배양의 종결점에서, 본 발명자들은 사이토킨 및 aAPC가 투여되지 않은 유전적으로 변형된 T 세포에서 $<2 \times 10^4$ 세포 (평균 2,800, 범위 $0.0-5.6 \times 10^3$)를 관찰하였고, 반면 사이토킨 및 aAPC가 투여된 대조군은 평균적으로 7.6×10^7 세포, 범위 4.12×10^7 내지 12.8×10^7 까지 수치적으로 확대되었다 (표 8). 이들 데이터는 CAR⁺ T 세포가 성장 인자 및 항원 자극의 도피 시에 증식을 지속할 수 없다는 것을 지시한다.

표 8

유전적으로 변형된 T 세포에 의한 자율 세포 성장의 결여.

실험	배양 일자 ^a	파종된 T 세포의 숫자 ^b	T 세포의 숫자 (18 일자)		T 세포의 % 배수적 변화 ^e
			사이토킨과 aAPC 없음 ^c	사이토킨과 aAPC 있음 ^d	
V1	28	2×10^5	0	12.80×10^7	0.000%
V2	28	2×10^5	5.6×10^3	5.88×10^7	0.009%
V3	28	2×10^5	2.8×10^3	4.12×10^7	0.007%

a T 세포가 파종된 배양 일자

b 실험의 시작에서 배양 중에 파종된 T 세포의 총 수

c 사이토킨 및 aAPC의 부재에서 계수된 T 세포의 총 수

d 사이토킨 및 aAPC의 존재에서 계수된 T 세포의 전체 (추론된) 숫자 (양성대조)

e 완벽한 배수적 변화 = $[(c/b) \div (d/b)] \times 100$

[0205]

표 9

전기천공되고 증식된 T 세포에 대한 공정 검증 검사

발현	
세포 표면 CAR 발현	유세포 분석법
전체 CAR 발현	웨스턴 블롯 분석
기능성	
세포 독성	크롬 방출 검정
존속	
기억/미경험 표현형	유세포 분석법
말단 소립 길이	Flow-FISH
안전성	
CAR 사본 수	Q-PCR
SB11 검출	PCR
TCR Vβ 레퍼토리	유세포 분석법
핵형 분석	G-줄무늬

[0206]

[0207]

CAR⁺ T 세포에서 말단소립 길이. 말단소립 길이는 세포 분화 및 노화 진행의 중요한 척도이다. 이런 이유로, 말단소립 길이에 대한 CAR⁺ T 세포의 SB 전위와 탈체 수치 확대의 효과를 평가하기 위해, 본 발명자들은 Flow-FISH 검정을 이용하여, CAR⁺ T 세포 (배양 28 일자)로부터 말단소립 길이를 그들의 개별 정합된 비조작된 대조 (전기천공에 앞서)와 비교하였다. V1과 V2에서 CD8⁺ CAR⁺ T 세포 및 V3에서 CD4⁺ CAR⁺ T 세포의 지배적인 산출로 인해, 본 발명자들은 V1과 V2의 경우에 CD8⁺ T 세포 및 V3의 경우에 CD4⁺ T 세포의 말단소립 길이를 각각, 증식에 앞서 CD8⁺과 CD4⁺ T 세포와 비교하였다 (도면 9a). 탈체 수치 확대 후 T 세포의 평균 말단소립 길이 (배양 28 일자, $8.93\% \pm 1.33\%$)는 비조작된 대조 T 세포의 평균 말단소립 길이 (0 일자, $7.77\% \pm 1.21\%$)와 유사하

었다. 이들 결과는 CAR^+ T 세포의 전기천공과 증식이 말단소립 길이의 침식을 유발하지 않는다는 것을 지시한다.

- [0208] **CAR 도입유전자의 사본수.** 통합된 CD19RCD28 도입유전자의 사본수는 참고로서 CD19RCD28⁺ Jurkat 세포 클론 #12 및 정규화군으로서 내인성 RNA분해효소 P를 이용하여 결정되었다 (Maiti *et al.*, 2013). 검증 실험에서 산출된 T 세포당 평균 도입유전자 사본은 0.96 ± 0.09 (범위, 0.75 내지 1.07, **도면 9b**)이었다. 이들 데이터는 SB 전위가 T-세포 유전체마다 CAR의 대략 하나의 통합된 사본을 유발하였다는 것을 지시한다.
- [0209] **TCR V β 용법.** T 세포의 전기천공과 증식은 우선적 성장을 지시하고, 따라서, 유전자독성 이벤트의 지표일 수 있었던, T 세포의 올리고클론 또는 클론 개체군의 출현을 야기할 수 있다. 이런 이유로, 본 발명자들은 레퍼토리 다양성을 사정하기 위한 수단으로서, TCR V β 용법을 유세포분석법에 의해 평가하였다. 검사된 모든 24개 TCR V β 패밀리는 aAPC에서 28 일의 공동배양 후 T 세포에서 보존되고, 그리고 전기천공전 레퍼토리와 유사하였다. 게다가, TCR V β 패밀리는 연장된 배양 시간 동안 보존되었다 (배양 35 일자, **도면 9c**). 이들 데이터는 배양된 CAR^+ T 세포에서 광범위한 TCR 다양성의 유지를 암시하고, 그리고 TCR 서열의 이용에서 불균형을 드러내지 않는다.
- [0210] **CAR^+ T 세포에서 SB11 유전자전위효소의 결여.** SB11 유전자전위효소의 지속된 발현은 통합된 CAR 도입유전자의 재동원을 야기할 수 있다. 이런 이유로, 본 발명자들은 CAR^+ T 세포에서 SB11을 코딩하는 DNA 플라스미드의 변칙 상동성 재조합을 배제하기 위해 유전체 PCR을 수행하였다. 검정의 한계 내에서, 본 발명자들은 28 일 동안 배양되고 SB11-특이적 프라이머를 이용하여 증폭된 CAR^+ T 세포로부터 DNA를 내포하는 PCR 반응물에서 띠 (~1 kb)를 검출할 수 없었다 (**도면 9d**). 이들 데이터는 전기천공되고 증식된 T 세포에서 SB11 유전자전위효소의 통합의 결여를 지시한다.
- [0211] **CAR^+ T 세포의 핵형.** SB 전위와 연관된 전체 유전독성을 배제하기 위해, 염색체 구조의 완전성이 평가되었다. 모두 3가지 검증 실험으로부터 CAR^+ T 세포 (전기천공 후 28 일에 수확됨)의 G-줄무늬는 모든 분석된 중기 확산에서 정상적인 (수컷) 핵형을 드러냈다 (**도면 9e, 15**).
- [0212] **실시예 5 - 키메라 항원 수용체를 발현하도록 가공된 입양 T 세포를 이용하여, 암과 감염에서 발현된 고대 레트로바이러스를 표적화 - 방법**
- [0213] **면역조직화학.** U.S. Biomax (Rockville, MD)로부터 획득된 조직 마이크로어레이 (#ME1004a, ME2082b, FDA998t)는 DiH₂O로 수화되었다. EDTA가 없는 구연산염 완충액 pH 6을 이용한 항원 회수가 수행되었다. 슬라이드는 3% 과산화수소 (Biocare Medical, Concord, CA), 아비딘 (Biocare Medical), 비오틴 (Biocare Medical) 및 다가 전체 혈청 (Biocare Medical)으로 차단되었다. 슬라이드는 1:20 희석에서 HERV-K mAb (0.6 mg/ml), 그 이후에 비오틴화된 항생쥐 IgG (Biocare Medical) 및 스트렙타비딘-HRP (Sigma-Aldrich, St Louis, MO)로 각각 30 분 동안 배양되고 Mayer의 헤마톡실린 대비염색제 (Sigma-Aldrich)로 가시화되었다. 유사한 염색 절차가 아이소타입 대조 생쥐 IgG2a (0.25 mg/ml) 항체 (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ)를 갖는 슬라이드에서 수행되었다.
- [0214] **플라스미드.** HERV-K 외피 단백질에 대한 scFv 서열 (mAb 클론 6H5로부터)은 코돈 최적화되고 (CoOp) (Invitrogen, Carlsbad, CA), 그리고 SB 반전된 반복에 의해 접하는, 인간 연장 인자-1 α (hEF-1 α) 프로모터의 제어 하에 SB 트랜스포손 내로 클로닝되어 CoOp6H5CD28/pSBSO를 형성하였다.
- [0215] HERV-K 항원은 양지향성 프로모터 hEF-1 α 및 시토메갈로바이러스 (CMV)를 내포하는 SB 플라스미드로부터 발현되었다. 바이러스 막경유 도메인을 갖는 코돈 최적화된 전장 항원 서열은 hEF-1 α 프로모터의 제어 하에 클로닝되고, 그리고 네오마이신 유전자는 양지향성 벡터 내에 CMV 프로모터의 제어 하에 전사되었다. 유전자전위효소 (SB11)는 플라스미드 pCMV-SB11로부터 시스 (*cis*) 발현되었다 (Davies *et al.*, 2010).
- [0216] T 세포에 대한 생체내 영상 SB 플라스미드를 산출하기 위해, 코돈 최적화된 개뿔벌레 루시페라아제가 myc 태그에 융합되었고 CMV 프로모터의 제어 하에 발현되었다. eEF1 α 프로모터의 제어 하에 mKate-레닐라 루시페라아제를 인코딩하는 렌티바이러스 벡터는 생체내에서 흑색종 종양 세포에 대한 영상 벡터로서 이용되었다.
- [0217] **세포주 및 이들의 증식.** A375-mel과 A888-mel은 The University of Texas MD Anderson Cancer Center (Houston, TX)의 Dr. Lazlo Radvanyi로부터 선의적 선물이었다. A624-mel과 EL4 부모는 American Type Culture

Collection (Rockville, MD)으로부터 획득되었다. A375-SM (슈퍼-전이성 흑색종 세포주)은 the University of Texas MD Anderson Cancer Center (Houston, TX)의 CCGS 코어 시설로부터 받아들여졌다. 모든 세포주는 10% FBS (Thermo scientific) 및 5% 글루타맥스 (Gibco Life technologies, Grand Island, NY)를 포함하는 RPMI (Thermo scientific, Rockford, IL)에서 배양되었다. 모든 세포주는 형태, 세포 지문확인 및/또는 유세포분석법에 의해 실증되었다. 이들은 미코플라스마 (*Mycoplasma*)에 대해 검사되고 연구 세포 은행에서 보존되었다.

[0218] **HERV-K-특이적 CAR 발현 T 세포의 산출과 확대.** 건강한 공여자로부터 PBMC는 피콜-파크 밀도 기울기 원심분리 (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ)에 의해 분리되고, 그리고 Amaxa 전기천공 시스템을 이용하여 HERV-K SB 트랜스포손 및 SB11 유전자전위효소로 전기천공되었다. 간단히 말하면, 2×10^7 PBMC 세포는 세척되고, 그리고 10% 소 태아 혈청 (Thermo scientific) 및 1% 글루타맥스 (Gibco Life technologies)로 보충된 완전한 RPMI에서 2 시간 동안 배양되었다. 이들 세포는 이후, HERV-K CAR 트랜스포손 (6H5CD28/pSBSO, 15 μ g) 및 SB 유전자전위효소 (pCMV-SB11, 5 μ g)와 함께 100 μ l의 Amaxa 뉴클레오펙터 용액 (인간 T-세포 키트)에서 재현탁되고, 단일 큐벳으로 이전되고, 그리고 Amaxa 전기천공기 (Lonza, USA)에서 U-14 프로그램을 이용하여 전기천공되었다. 전기천공된 T 세포는 완전한 페놀-없는 RPMI (Thermo Scientific)에서 37 °C에서 4 시간 동안 배양되고, 그 후에 절반-배지 교체가 수행되었다.

[0219] K562는 내인성 HERV-K 항원을 발현하고, 따라서 HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포를 증식하기 위한 aAPC로서 이바지한다. 10% FBS를 내포하는 RPMI에서 배양된 전기천공된 T 세포는 1:2 T 세포:aAPC 비율에서 γ -방사선조사된 (100 Gy) K562-aAPC로 보충되었다. 방사선조사된 aAPCs는 T 세포 자극을 위해 매주의 종결점에서 동일한 비율에서 첨가되었다. 가용성 IL-21 (eBioscience)과 IL-2 (Chiron) 사이토킨은 전기천공 후 배양액에서 격일로, 완전한 RPMI 배지에 각각 30 ng/ml와 50 U/ml의 농도에서 보충되었다. OKT3 적하된 K562 세포의 존재에서 성장된 모의 형질감염된 No DNA 대조 T 세포는 음성 대조로서 이바지하였다. $CD19CARCD28/pSBSO$ 및 SB11 유전자전위효소로 전기천공된 $CD19CAR^+$ T 세포는 CAR⁺ T 세포에서와 동일한 배양 조건 하에 성장되었고 비특이적 CAR⁺ T 세포 대조로서 이바지하였다.

[0220] 매주 T 세포 배양액은 $CD3^{+}CD56^{+}$ 세포의 존재에 대해 모니터링되었고 이러한 개체군이 전체 개체군의 10%를 초과하면 고갈되었다. 이러한 고갈은 통상적으로, aAPCs와 초기 공동배양의 10 일과 14 일 사이에 일어났다. 고갈은 제조업체의 사용설명서에 따라, 양성 선별 "포셀 (possel)"을 이용하여 Automax (Miltenyi Biotech)에서 CD56 비드 (Miltenyi Biotech Inc, Auburn, CA)를 이용하여 수행되었다.

[0221] T-세포 생존력은 셀로미터 자동화된 세포 계수기 (Auto T4 세포 계수기, Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA)를 이용하여 트리판 블루 배제에 기초하여 사정되었다. 생존력은 전기천공과 공동배양 기간 동안 프로그램 "PBMC_인간_동결" 및 "활성화된 T 세포"를 이용하여 분석되었다. 개별 공여자에 대한 7, 14, 28, 32 일의 공동 배양의 종결점에서 전체, $CD3^{+}$, $CD4^{+}$, $CD8^{+}$ 및 CAR⁺ 세포의 배수적 확대 (1 일자와 비교하여)가 계산되었고, 그리고 3명 공여자의 평균이 스튜던트 t 검증을 이용하여 $CD19CAR^+$ T 세포 및 No DNA 대조 세포 사이에 비교되었다.

[0222] **유세포분석법.** 모든 시약은 달리 언급되지 않으면, BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ)로부터 획득되었다. 1 백만 세포는 플루오레세인 이소티오시안산염 (FITC)과 접합된 항체, 피코에리트린 (PE), 시아닌 염색제에 접합된 페리딘 클로로필 단백질 (PerCPCy5.5), 또는 알로피코시아닌 (APC)으로 염색되었다. 이용된 항체는 항-CD3 FITC (5 μ l), 항-CD3 PerCPCy5.5 (2.5 μ l), 항-CD3 PE (2 μ l) 항-CD4 APC (2.5 μ l), 항-CD8 PerCPCy5.5 (4 μ l), 항-CD56 APC (2.5 μ l), 아넥신 V (5 μ l), 항-CD32 FITC (5 μ l), 항-CD45RA FITC (5 μ l), 항-CD45RO APC (2.5 μ l), 항-그랜자임 B FITC (5 μ l), 항-CD62L APC (2.5 μ l), 항-IFN- γ APC (2 μ l), 항-CD27 PE (2 μ l), 항- $\alpha\beta$ TCR FITC (5 μ l), 항- $\gamma\delta$ TCR PE (2 μ l), 그리고 항-CCR7 PerCPCy5.5 (2.5 μ l, Biolegend)를 포함한다. 염소 항인간 Fc γ 의 FITC-접합되고 (3 μ l, Invitrogen) PE-접합된 (2.5 μ l, Invitrogen) F(ab')₂ 단편이 HERV-K-특이적 CAR의 세포 표면 발현을 검출하는데 이용되었다. 비특이적 항체 결합의 차단은 FACS 세척 완충액 (PBS에서 2% FBS와 0.1% 아지드화나트륨)을 이용하여 달성되었다. 자료 획득은 CellQuest 버전 3.3 (BD Biosciences)을 이용하여 FACSCalibur (BD Biosciences)에서 이루어졌다. 중앙 형광 강도 (MFI)의 분석과 계산은 FlowJo 버전 7.5.5를 이용하여 착수되었다.

[0223] **nCounter 분석 디지털 유전자 발현 시스템.**

- [0224] HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포 및 No DNA 대조 T 세포 사이에 유전자 발현에서 차이는 nCounter 분석 시스템 (모델 번호 NCT-SYST-120, NanoString Technologies; Geiss *et al.*, 2008)을 이용하여 평가되었다. 간단히 말하면, 10⁴ HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포 또는 No DNA T 세포가 RNeasy 용해 완충액 (RLT; 5 µl, Qiagen, Gaithersburg, MD)에서 용해되었고, 그리고 mRNA가 보고된 코드 세트 및 nCounter 유전자 발현 검정 키트를 이용하여 맞춤 설계된 포획 코드 세트로, 65°C에서 12 시간 동안 혼성화되었다. nCounter prep 스테이션이 혼성화후 과정에 이용되었다. Nanomir 소프트웨어가 mRNA 수준을 내부 대조로 정규화하는데 이용되었다. R-프로그램, 트리뷰 및 클러스터뷰가 통계학적 분석을 갖는 데이터를 출력하는데 이용되었다. 정규화된 결과는 상대적 mRNA 수준으로서 표현되었다. 문헌 출처로부터 유래된 데이터베이스에 기초하여 통계학적으로 유의한 유전자들의 생물학적 상호작용을 이해하기 위해, 독창성 경로 분석 (IPA) (Ingenuity Systems, www.ingenuity.com)이 이들 유전자에서 수행되었다.
- [0225] **통합 분석.** HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포로부터 유전체 DNA는 QIAamp DNA 미니 키트 (Qiagen)를 이용하여 단리되고, 그리고 실시간 PCR이 기존 문헌에서 설명된 바와 같이 수행되었다 (Maiti *et al.*, 2013). 앞서 설명된 CAR 사본의 단일 통합을 보유하는 Jurkat 세포 (클론 #14)로부터 유전체 DNA가 양성 대조로서 이용되었다 (Maiti *et al.*, 2013). 실험은 20 µl의 전체 반응 부피에서 10 µl의 TaqMan 유전자 발현 마스터 믹스 (Applied Biosystems, Foster City, CA), IgG4Fc에 특이적인 1 µl (250 nM에서 1x 프로브 및 900 nM에서 1x 프라이머)의 20x FAM-표지화된 CAR-특이적 TaqMan 프로브 프라이머 세트 [전방 (5'-GAGGGCAACGTCTTAGCTG-3'; 서열 번호: 15) 및 후방 (5'-GATGATGAAGGCCACTGTC-3'; 서열 번호: 16) 프라이머 및 카복시플루오레세인 (FAM)-표지화된 프로브 (5'-AGATGTTCTGGGTGCTGGTC-3'; 서열 번호: 17)], 그리고 1 µl (900 nM에서 1x 프라이머 및 250 nM에서 1x 프로브)의 20x VIC 표지화된 TaqMan RNA분해효소P 프로브 프라이머 세트 (Applied Biosystems)와 혼합된 100 ng의 유전체 DNA로 삼중으로 행위되었다. 프라이머 혼성화는 CAR의 IgG4Fc 부분에서 일어났다. 증폭 주기는 50°C에서 2 분, 95°C에서 10 분, 그리고 95°C에서 15 초와 60°C에서 1 분의 40회 주기를 포함하였다. 검출은 StepOnePlus 실시간 PCR 시스템 (Applied Biosystems)으로 수행되었다. 두배수체 세포마다 2개 사본으로 존재하는 상염색체 RNA분해효소P 유전자가 정규화를 위한 내인성 참고로서 이용되었다 (Jin *et al.*, 2011). $\Delta\Delta C_T$ 방법 (Applied Biosystems, CA)이 정규화 대조로서 RNA분해효소P와 Jurkat 클론에 관하여 통합의 숫자를 계산하는데 이용되었다.
- [0226] **크롬 방출 검정 (CRA).** CRA는 기존 문헌에서 설명된 바와 같이 수행되었다 (Maiti *et al.*, 2013; Jin *et al.*, 2011). 간단히 말하면, HERV-K⁺ 표적이 ⁵¹Cr로 2 시간 동안 처리되고 35 일자 HERV-K-특이적 CAR⁺ T-세포 또는 No DNA 대조 T 세포와 함께 배양되었고, 그리고 ⁵¹Cr 방출의 백분율이 다음의 공식을 이용하여 계산되었다:
- [0227]
$$\% \text{ } ^{51}\text{Cr 방출} = (\text{실험적 방출} - \text{배경 방출}) / (\text{최고 방출} - \text{배경 방출}) \times 100$$
- [0228] **저속도 바이오-영상.** (A) 종양 세포 상에서 항원과의 CAR 맞닿음을 가시화하기 위해, 저속도 영상화가 BioStation IM 세포-S1/세포-S1-P 시스템 (Nikon, Melville, NY)을 이용하여 수행되었다. K562 부모 세포는 항-HERV-K APC 항체 (1 µg)로 염색되었고, 그리고 HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포는 염소 항인간 Fcγ 항체 (5 µl, BD Biosciences)의 FITC 표지화된 F(ab')₂ 단편을 이용하여 CAR 표면 발현에 대해 염색되었다. T 세포와 표적 세포는 5:1의 비율에서 혼합되고 T-35 mm 유리 바닥 평판 (Fisher Scientific, Hampton, NH) 상에 완전한 RPMI 배양 배지에서 도말되었다. 이들 세포는 37°C에서 최대 8 시간 동안 2 분마다 즉시 영상화되었다. 각 이미지는 각각, 1/125와 1/5 초의 노출 시간에서 녹색 HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포를 관찰하기 위한 위상차, 형광 통로 2, 그리고 적색 K562 세포를 관찰하기 위한 형광 통로 3을 이용하여, 20X 대물렌즈로 1600 x 1200 픽셀에서 기록되었다. 항원과의 CAR 맞닿음은 APC-표지된 항원이 녹색-표지화된 CAR과 겹쳐질 때 목격되었다.
- [0229] (B) HERV-K 특이적 CAR⁺ T 세포가 종양 세포를 사멸시키는데 소요된 시간을 가시화하고 정량하기 위해, 종양 세포는 1 ng/mg Sytox® (Invitrogen)를 내포하는 완전한 RPMI를 포함하는 T-35 mm 유리 바닥 평판에서 HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포로 도말되었다. 종양 세포 사멸은 종양 세포 벽이 천자되고 세포가 BiostationIM 세포-S1-P 시스템 (Nikon)을 이용하여 녹색으로 변하는 때의 시간으로서 기록되었다. 각 종양 세포에서 녹색 형광의 강도는 15 시간의 기간에 걸쳐 생존 세포 영상 소프트웨어 (Nikon)를 이용하여 기록되었다.
- [0230] **세포내 IFN-γ 방출 검정.** HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포는 200 µl의 완전한 RPMI 배양 배지를 포함하는 둥근 바

다 96-웰 평판에서 1:10 비율에서 종양 세포와 공동배양되었다. 단백질 운반 저해제 (브레펠딘 A를 내포하는 BD Golgi Plug)가 IFN- γ 을 세포 내부에 트랩하기 위해 모든 웰에서 첨가되었다. 공동배양액은 37°C에서 4 시간 동안 배양되고, 그리고 이후, 4°C에서 20 분 동안 HERV-K-특이적 CAR 발현에 대해 염색되었다. 이들 세포는 이후, 세척되고, 고정되고, 그리고 4°C에서 20 분 동안 100 μ l의 Cytofix/Cytoperm 완충액 (카탈로그 번호 555028)으로 투과화되었다. 투과화된 세포는 이후, 항-IFN- γ APC 접합된 항체로 사이토킨에 대해 염색되었다. 이들 세포는 세척되고 FACSCalibur에 의해 분석되었다. PMA (포르볼 12 미리스트산염 13 아세트산염) 및 이오노마이신 (BD Biosciences) 처리된 T 세포가 이러한 검정을 위한 양성 대조로서 이용되었다. 유사한 검정이 No DNA 대조 T 세포로 수행되었다.

[0231] **HERV-K⁺ EL4 세포주의 발달.** 2 백만 EL4 세포는 100 ml의 최종 부피까지 HERV-K 항원-발현 SB 트랜스포손 및 SB11 유전자전위효소 (2 μ g의 전체 DNA)와 함께 AMAXA 생쥐 T 세포 뉴클레오펙터 용액 (Amaxa, USA)에서 현탁되었다. 이러한 현탁액은 단일 큐벳으로 이전되고 Amexa 전기천공기에서 C-09 프로그램을 이용하여 전기천공되었다. 세포는 10% FBS (Thermo Scientific Pierce)로 보충된 키트로 공급된 전기천공 배지에서 37°C에서 4 시간 동안 배양되었다. 이들 세포는 이후, DMEM, 10% FBS (Thermo Scientific Pierce) 및 5% 글루타맥스 (Gibco Life Technologies)로 이전되었다. 이들 세포는 이후, 0.8 mg/ml의 G418의 존재에서 성장되었고, 그리고 네오마이신-내성 HERV-K⁺ EL4 세포는 순수한 세포 개체군을 획득하기 위해 HERV-K 항체를 이용하여 분류되고 성장되었다.

[0232] **A888-mel 세포에서 shRNA-매개된 HERV-K 녹다운.** A888-mel 세포는 6-웰 평판에서 90% 합류점까지 성장되었다. 배지는 100 μ l의 HERV-K-특이적 shRNA 또는 스크램블된 shRNA 렌티바이러스 및 폴리브렌 (5 μ g/ml)을 이용하여 추후 대체되고, 37°C에서 4 시간 동안 형질도입되고, 그리고 이후, 정기적인 RPMI 배지로 대체되었다. 세포는 이후, GFP 발현에 기초하여 분류되고 성장되었다. 스크램블된 shRNA-형질도입된 A888-mel 세포가 대조로서 이용되었다. HERV-K 녹다운의 정도를 결정하기 위해, 세포주 용해물의 면역블롯 검정이 수행되었다. 6H5 HERV-K 항체는 HERV-K shRNA 또는 스크램블된 shRNA 또는 부모 세포로 A888-mel 세포 상에서 HERV-K 항원 발현을 검출하는데 이용되었다. 10 백만 세포가 단백질분해효소 저해제 (Roche Applied Science, San Francisco, CA)를 내포하는 RIPA 완충액으로 용해되었다. 단백질 농도를 검출하기 위해, BCA 검정이 수행되었다 (Thermo Scientific Pierce). 4%-20% 구배 겔 (Biorad, Hercules, CA)이 SDS 적하 완충액에서 끓여진 10 μ g의 단백질을 이동시키는데 이용되었다. 단백질은 이후, 니트로셀룰로오스 막으로 이전되고, PBST에서 5% 우유로 차단되고, 그리고 6H5 HERV-K 항체 (mg/ml)와 함께 배양되었다. 결합은 염소 항생쥐 Fc-HRP (Sigma-Aldrich)에 의해 검출되고 ECL Westfemto™ 기질 (Thermo scientific Pierce)을 이용하여 전개되었다. 블롯은 Versa doc Quantityone™ 소프트웨어 (Biorad)를 이용하여 영상화되었고, 그리고 블롯은 이미지 J 소프트웨어를 이용하여 정량되었다.

[0233] **생체내 분석.** 전이성 흑색종 모델: 5-주령 암컷 NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1wjl}/SzJ (NSG) 생쥐 (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME)는 0 일자에 106 A375-SM 세포로 정맥내 주사되었다. A375-SM 세포는 mKate-rRLuc로 이전에 안정되게 형질도입되고 균질한 개체군에 대해 세포 분류되었다. 처리 코호트 (n = 7)에서 생쥐는 7, 14와 21 일자에 시작하여, 2x10⁶ HERV-K-특이적 CAR-FfLuc⁺ T 세포를 제공받기 시작하였다. IL-2 (600 U; eBioscience)가 치료 기간 동안 주 3회 복막내 (i.p.) 주사되었다. 종양을 보유하는 생쥐의 한 코호트 (n = 6)는 치료를 받지 않았고, 반면 종양이 없는 생쥐의 대조군 (n = 3)은 처리군에서와 유사한 숫자의 CAR⁺ T 세포를 제공받았다.

[0234] **플럭스 정량:** 생물발광 영상 (BLI)은 종양과 T 세포 활성을 생체내에서 영상화하기 위해 매주 수행되었다. 생쥐는 마취되고 기존 문헌에서 설명된 바와 같이 (Singh *et al.*, 2007), Xeno IVIS 100 시리즈 시스템 (Caliper Life Sciences)을 이용하여 BLI를 위한 전방 후방 위치에서 배치되었다. HERV-K-특이적 CAR-ffLuc⁺ T 세포 활성을 영상화하기 위해, 150 μ l (200 μ g/생쥐)의 D-루시페린 칼륨 염 (Caliper Life Sciences)이 복막내 (i.p.) 주사되었다. 주사 후 10 분에, 방출된 광양자가 Living Image 이미지 2.50.1 (Caliper Life Sciences) 프로그램을 이용하여 정량되었다. 종양 세포 활성을 영상화하기 위해, 100 μ l의 엔두린 (Promega, Fitchburg, WA)이 i.p 주사되었다. 주사 후 20 분에, 종양 활성은 ffLuc와 유사하게 정량되었다. 플럭스의 통계학적 유의성을 확립하기 위해 비대칭 스튜던트 t 검증이 수행되었다.

[0235] **통계학적 분석.** 다양한 등급과 시기의 흑색종 및 정상적인 조직 사이에 항원 발현에서 통계학적 차이를 분석하기 위해, 스튜던트 t 검증 및 ANOVA가 이용되었다. 대조 대 HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포 확대 사이에 차이를 분

석하기 위해, 표현형 분석, 그리고 기능적 검정, 스튜던트 t 검정, 평균, 표준 편차, 그리고 95% 신뢰 구간 (CIs)이 계산되었다. 전이성 흑색종 모델의 경우에, 생체내, 스튜던트 t 검정이 종양 및 처리군 사이에 플럭스 데이터에서 유의성을 분석하는데 이용되었다. 모든 통계학적 검사는 양쪽이고 Graph Pad Prism 소프트웨어 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA)를 이용하여 수행되었다. 0.05보다 적은 모든 *P* 값은 통계학적으로 유의한 것으로 고려되었다.

[0236] 실시예 6 - 키메라 항원 수용체를 발현하도록 가공된 입양 T 세포를 이용하여, 암과 감염에서 발현된 고대 레트로바이러스를 표적화 - 결과

[0237] **흑색종 환자 표본에서 HERV-K의 발현.** 생체내에서 흑색종 침입과 전이 동안 HERV-K의 생리학적 관련성을 설명하기 위해, 본 발명자들은 다양한 시기의 흑색종을 앓는 환자로부터 획득된 생검에서 종양 항원 HERV-K 외피 단백질의 발현을 사정하는 것을 추구하였다. 2,648명 환자로부터 악성 종양 조직 및 40명 환자로부터 양성 피부와 유방 조직이 IHC를 이용하여 분석되었다. 종양 조직 염색은 HERV-K에 대해 양성인 종양 세포의 백분율 및 염색의 강도에 기초하여 등급 매겨졌고, 그리고 H-지수를 획득하기 위해 그들의 산물이 계산되었다. 종양 조직은 변하는 수준의 염색 강도를 보여주었고, 그리고 동일한 조직에서 아이소타입 대조 염색과 비교할 때 0, 1, 2 또는 3 (도면 16a)으로 채점되었다. 항원은 고체 화살표로 보여진 바와 같이 세포 표면을 따라 점상 형태에서 또는 부정 화살표로 보여진 바와 같이 확산성 세포질 염색으로서 세포 상에서 발현되었다 (도면 16b). 이것은 바이러스 단백질 (REF)을 벗겨내는 목적으로 항원의 순환 및 항원의 세포 표면 위에 축적을 암시할 수 있다. 종양 세포는 양성 종양과 비교하여 HERV-K 항원의 훨씬 높은 H-지수를 발현한다 (도면 16c). 비록 악성과 전이성 종양 사이에 H-지수에서 차이가 없긴 하지만, 유의미한 차이는 III과 IV 기에서 종양과 비교하여 I과 II 기에서 종양 사이에 목격될 수 있다 (도면 16d, e). 정상적인 세포가 아닌 종양 세포에서 HERV-K 발현의 특이성을 더욱 증명하기 위해, 3명의 정상적인 공여자로부터 각각 획득된 정상적인 장기의 33가지 유형으로부터 조직이 분석되었다. HERV-K의 유의미한 발현이 정상적인 장기 조직 중에서 어느 것에서도 관찰되지 않았다 (도면 22). 이들 조사 결과는 종양 세포에서 특이적으로 HERV-K 상향조절이 면역요법을 위한 독특한 표적 마커로서 이바지할 수 있다는 것을 암시한다.

[0238] **HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포의 증식과 특성화.** HERV-K env-특이적 단일클론 항체 (mAb)가 생쥐에서 개발되었고, 그리고 6H5 mAb 클론이 시험관내에서 항원을 검출하는데 가장 민감한 것으로 밝혀졌다 (Wang-Johanning *et al.*, 2003). 6H5 mAb 클론의 scFv 서열이 CAR을 작제하는데 이용되었다. scFv 카세트는 유연한 링커, 그 이후에 CD28 막경유 및 CD28와 CD3z 세포내 도메인에 의해 IgG4Fc 영역에 융합되었다. 이것은 이후, SB 트랜스포손 벡터 내로 클로닝되었다 (도면 17a).

[0239] HERV-K env 항원에 특정한 CAR⁺ T 세포를 산출하기 위해, 본 발명자들은 말초혈 단핵 세포 (PBMCs)를 SB11 유전 자전위효소와 함께 SB 트랜스포손으로 전기천공하고 이들 세포를 내생적으로-유래된 HERV-K⁺ K562 aAPC에서 증식하였다. CAR의 안정된 발현을 갖는 T 세포를 선별적으로 증식하기 위해, HERV-K 항원을 내생적으로 발현하는 이들 aAPC는 원하는 T-세포 동시자극성 분자 CD86, 4-1BBL, 그리고 막 결합된 IL-15 (증강된 녹색 형광 단백질, EGFP와 공동발현됨)을 공동발현하도록 유전적으로 변형되었다 (Singh *et al.*, 2008). 트랜스포손으로 전기천공되지 않고, 동일한 배양 조건 하에 OKT3-적화된 aAPCs에서 성장된 PBMCs는 음성 No DNA 대조로서 역할하였다.

[0240] CAR의 발현은 IgG4Fc 영역에 특이적인 다중클론 Fc 항체를 이용하여 검출되었다. CAR⁺ T 세포는 배양액을 방사선조사된 aAPCs로 보충하기 전에, 7 일마다 Fc 항체로 염색되었다. 흐름 데이터는 T 세포 중에서 95%가 자신의 표면 상에서 CAR을 발현한다는 것을 드러냈는데, 이것은 최대 35 일의 배양 동안 검출될 수 있었다 (도면 17b). No DNA 대조 세포와 비교할 때 HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포의 성장 동역학에서 어떤 유의미한 차이도 목격되지 않았고, 그리고 모든 HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포는 배양 14 일자까지 CD3⁺ T 세포였다 (도면 17c, d). CAR⁺ CD4의 퍼센트 평균 숫자는 증가하고, 반면 CAR⁺ CD8 세포는 배양 기간을 따라서 감소한다 (도면 23a). No DNA 대조 세포와 비교하여 HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포의 유전체 DNA에서 실시간 PCR 분석은 CAR⁺ T 세포 유전체에서 CAR의 2회 보다 적은 통합이 있다는 것을 보여주었다 (도면 17d). 배양된 CAR⁺ T 세포는 작동체 기억 표현형을 갖는데, 이것은 그랜자임 B 수준에 의해 관찰된 실제적인 용해 잠재력을 갖는 CD3⁺CD56⁺CD45RO⁺TCR α β⁺CD27^{음성}CCR7^{음성} 세포를 포함한다 (도면 17f).

- [0241] 3명의 정상적인 공여자로부터 HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포의 mRNA 수준이 계측되고, 그리고 nCounter 분석을 이용하여 배양의 28 일자에 No DNA 대조 T 세포로부터 mRNA 수준과 비교되었다. HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포는 훨씬 높은 수준의 화학유인물질, 전사 조절인자 및 활성체를 가졌다. CAR⁺ T 세포에서 퍼포린 1과 그랜자임 H의 증가된 수준은 이들 세포의 더욱 높은 용해 잠재력을 보여준다 (도면 23b). 독창성 경로 분석 (IPA) ($p < 0.05$)은 HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포에서 이들 상향조절된 유전자 중에서 여러 개가 NF- κ B 활성화에 관련된다는 것을 제안하였다. 화학유인물질과 사이토킨은 IL-10, IFN- γ 및 IL-12 조절에 관련되었다 (도면 23c). 이들 데이터는 HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포가 중심 작동체 표현형을 갖는다는 이전 관찰 결과를 강화한다.
- [0242] **HERV-K CAR⁺ T 세포 기능성의 특성화.** 흑색종 세포주, 예를 들면, A888, A375, A375-SM, A624에서 항원 발현은 HERV-K env 단백질에 대해 지향된 단일클론 6H5 항체를 이용하여 분석되었다 (도면 18a). 흑색종 세포에서 HERV-K 항원 발현은 아이소타입 대조 (생쥐 IgG2a)와 비교되었다. HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포의 기능성을 분석하기 위해, HERV-K⁺ 종양 세포는 방사성 크롬으로 펠싱되고 변하는 비율의 HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포와 함께 배양되었다. CRA는 음성 대조로서 no DNA 대조로 수행되었다. 훨씬 높은 수준의 HERV-K⁺ 종양 세포 용해가 no DNA 대조 T 세포와 비교할 때, HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포에서 관찰되었다 (도면 18b). 관련 없는 CAR, 예를 들면, CD19-특이적 CAR⁺ T 세포 역시 CRA를 수행하는데 이용되었고, 그리고 기저 수준의 비특이적 사멸이 CD19 항원 양성 종양 세포, 예를 들면, CD19 항원을 보유하는 EL-4 세포와 비교할 때, HERV-K 항원 양성 종양 세포에서 관찰되었다 (도면 24a).
- [0243] 이들 HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포의 기능성을 더욱 입증하기 위해, 4-시간 IFN- γ 방출이 수행되었다. 흑색종 종양 표적이 1:10 비율에서 HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포 또는 No DNA 대조 T 세포와 공동배양되었고, 그리고 세포 내 사이토킨 수준이 유세포분석법을 이용하여 분석되었다. PMA-이오노마이신과 함께 배양된 T 세포는 양성 대조로서 이바지하였다. HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포는 no DNA 대조 T 세포와 비교하여 IFN- γ 방출의 더욱 높은 수준을 보여주었고 (도면 18c), 그리고 이러한 결과는 CRA와 상관한다.
- [0244] **HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포의 특이성.** HER-K-특이적 CAR의 특이성을 보여주기 위해, HERV-K^{음성} EL-4 세포는 hEF-1 α 프로모터 하에 HERV-K 항원 및 CMV 프로모터 하에 네오마이신 내성을 인코딩하는 양방향성 SB 벡터로 전기천공되었다 (도면 25a). EL-4 HERV-K⁺ 세포는 이후, 순수한 HERV-K env-발현 개체군을 획득하기 위해, 단일 세포 분류되고 포유류 선별 마커, 네오마이신의 존재에서 성장되었다. 흥미롭게도, 이들 세포는 번역후 변형 및 단백질분해 개별로 인해, 10 일의 배양 이내에 HERV-K 항원 발현을 상실하였다. 4-시간 CRA가 10 일의 분류 이내에 이들 EL-4 HERV-K⁺ 세포에서 수행되었다. 크롬 펠싱된 EL-4 HERV-K⁺ 세포 및 HERV-K^{음성} EL4 부모 세포는 변하는 농도의 HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포와 공동배양되었고, 그리고 등급 매겨진 종양 특이적 용해가 항원 특이적 방식으로 관찰되었다 (도면 19b).
- [0245] 특이성을 더욱 입증하기 위해, HERV-K env 항원은 shRNA 렌티바이러스를 이용하여 A888 흑색종 세포에서 녹다운되었다. 면역블롯 분석은 A888 부모와 대조 스크램블된 shRNA와 비교하여 HERV-K 단백질 수준에서 약 50% 녹다운을 보여주었다 (도면 19c). HERV-K 녹다운 세포, A888 부모, 그리고 A888-스크램블된 shRNA와 함께 HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포의 CRA는 부모와 대조 종양 세포와 비교하여 HERV-K 녹다운으로 사멸에서 유의미한 감소를 보여주었다 (도면 19d).
- [0246] CAR⁺ T 세포가 종양 표적을 사멸시키는데 소요된 시간 및 15 시간의 기간에 걸쳐 사멸된 종양 세포의 숫자를 가시화하고 정량하기 위해 저속도 영상화가 수행되었다. 종양 세포 및 T 세포는 세포막이 손상될 때 세포를 녹색으로 변화시키는 Sytox®의 존재에서 1:5의 비율에서 배양되었다. 흑색종 표적 A888과 A375 세포가 HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포에 의해 사멸되었기 때문에, 녹색 형광에서 스파이크가 대략 5 시점에 보고되었고, 이것은 15 시간 기간에 걸쳐 점진적으로 증가하였다. HERV-K^{음성} HEK293 부모 표적에서 어떤 사멸도 관찰되지 않았다. 약 30%의 A888 세포 및 35%의 A375 세포가 15 시간의 기간에 걸쳐 CAR⁺ T 세포에 의해 사멸되었다. 항원 특이적 CAR 맞닿음을 가시화하기 위해, K562 세포는 적색으로 HERV-K 항원에 대해 양성 염색되었고, 그리고 HERV-K-특

이적 CAR은 녹색으로 Fc에 대해 염색되었다. CAR과 항원의 중복이 5 시간의 기간에 걸쳐 목격되었고, 그 후에 항체-결합된 항원 및 CAR이 이들 세포에 의해 내재화되었다 (도면 26a).

[0247] **생체내에서 HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포의 종양 사멸 능력.** PBMC는 SB11 유전자전위효소와 함께 HERV-K-특이적 CAR 및 myc-FFLuc를 인코딩하는 SB 벡터로 이중 전기전공되었다. myc-ffLuc 유전자를 갖는 SB 벡터는 링커를 통해 부착된 네오마이신 내성 유전자를 갖는다 (도면 27a). 이들 HERV-K-특이적 CAR-ffLuc⁺ T 세포는 HERV-K-특이적-CAR⁺ T 세포와 유사한 성장 동역학을 가졌고, 그리고 그들의 종양 사멸 능력과 특이성이 필적하였다 (도면 27b, c).

[0248] A375-슈퍼 전이성 (A375-SM) 세포주가 NSG 생쥐의 꼬리 정맥을 통해 주입된 전이성 흑색종 모델이 개발되었다. 이들 세포는 폐에서 이식되고 간으로 전이되었다. 종양 덩어리에서 감소를 비침습적으로 가시화하기 위해, 종양 세포는 mKate-rRLuc 유전자를 보유하는 렌티바이러스 벡터로 형질도입되고, 그리고 이들 세포의 순수한 개체군을 획득하기 위해 mKate 마커를 이용하여 분류되었다 (도면 21a). 종양 세포 이식의 1 주 후, 20 백만 CAR⁺ T 세포가 3 주 동안 주 2회 IL-2 (i.p.)와 함께 8, 15, 그리고 22 일자에 정맥내 주입되었다. 생물발광 영상 (BLI)이 생쥐의 각 군에서 rRLuc 활성을 사정하는데 이용되었다. 종양 세포만을 갖는 생쥐 군은 HERV-K CAR⁺ T 세포를 제공받은 종양 세포를 갖는 생쥐 군과 비교하여, 25 일자까지 훨씬 높은 루시페라아제 활성을 가졌다 (도면 21a, b). 또한 종양만을 갖는 생쥐는 종양의 간으로의 높은 전이로 인해 28 일자까지 죽어가고, 반면 CAR⁺ T 세포를 제공받은 생쥐 군은 건강한 식욕과 활동을 전시하였다. 종양 세포 상에서 mKate의 탈체 영상은 종양 단독 생쥐가 처리군보다 간에서 훨씬 많은 종양 집락을 갖는다는 것을 보여주었다 (도면 21c). 병리학적 검사는 이러한 관찰 결과를 입증하였고, 여기서 종양 군은 처리군과 비교하여 간에서 훨씬 높은 전이성 집락을 가졌는데, 이것은 종양 성장과 전이를 감소시키는데 있어서 HERV-K CAR⁺ T 세포의 역할을 암시하였다 (도면 21d).

[0249] **논의.** 이들 결과는 HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포가 시험관내에서 바이러스 당단백질을 성공적으로 표적으로 하고 HERV-K⁺ 종양 세포를 항원 특이적 방식으로 사멸시키고, 그리고 생체내에서 흑색종 종양 성장과 전이를 감소시킬 수 있었다는 것을 보여준다.

[0250] HERV-K env는 흑색종 전이 동안 현저하게 상향조절되고, 그리고 종양 세포에 배타적으로 존재하고 인접한 정상적인 멜라닌세포에는 존재하지 않는다. 흑색종에서, HERV-K env 단백질은 종양 진행에 관련된 MEK-ERK와 p16INK4A-CDK4 경로 활성화와 연관된다 (Li *et al.*, 2010). HERV-K 분자 모방은 또한, 감소된 글루타티온 과산화효소 수준을 유발하고 조직에서 증가된 반응성 산소 종을 유발하여 흑색종발생을 야기한다 (Krone *et al.*, 2005). 비정상적인 수준의 HERV-K env 발현은 형태학적 변형과 세포 변형을 유발하여 종양 진행을 유발하는 흑색종 개시에 관련된 촉발 인자인 것으로 보인다 (Serafino *et al.*, 2009). HERV-K의 바이러스 전사의 조절은 증가된 염증 및 흑색종 세포에서 형태학적 분화를 유발하였다 (Sciamanna *et al.*, 2005). 조직 마이크로어레이는 흑색종 진행과 상관하는 증가된 수준의 항원 발현을 나타내고, 반면 정상적인 인간 조직은 기저 수준의 HERV-K 발현 또는 HERV-K 발현의 부재를 갖는다.

[0251] 흑색종의 면역원성 성격은 이를 강력한 T 세포-기초된 요법을 개발하기 위한 매력적인 모델과 표적으로 만든다. T 세포-기초된 요법에서 주요 한계 중에서 한 가지는 TCR에서 HLA-기초된 제한인데, 이것은 항원 인식을 제한한다 (Garrido *et al.*, 1997. 종양 항원 특이적 수용체를 발현하도록 T 세포를 유전적으로 변형하는 것은 이러한 제한을 회피하고 비-HLA-기초된 항원 인식을 부여한다 (Gross *et al.*, 1989). 이들 T 세포 변형은 바이러스 또는 비바이러스 벡터를 이용함으로써 달성될 수 있다. *잠자는 미녀* 벡터는 유전자를 T 세포 내로 도입하는 비바이러스 접근법이다. 다른 바이러스 형질도입 방법에 비하여 *잠자는 미녀* 시스템의 주요 이점 중에서 한 가지는 이것이 유전적으로 안전하고, 효율적이고, 그리고 레트로바이러스 형질도입보다 덜 비싸다는 것이다 (Maiti *et al.*, 2013). 이들 CAR⁺ T 세포를 IL-2 및 IL-21과 함께 배양하는 것은 주입 목적을 위한 필요한 만큼의 세포를 산출한다. 이것은 B-계통 악성에 대항하여 CD19 CAR⁺ T 세포를 이용한 예비적 임상 시험을 야기하였다. HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포는 임상적-등급 CD19 CAR⁺ T 세포와 유사한 방식으로 성장되었다. 이들 HERV-K-특이적 CAR⁺ T 세포는 주로, 작동체 기억 표현형이었는데, 이들은 종양 세포를 표적으로 하고 사멸시키도록 충분히 적합된다.

[0252] 복수 인자, 예를 들면 사이토킨, 호르몬 및 화학물질은 암 동안 HERV-K 수준을 조절하는 것으로 알려져 있다

(Taruscio and Mantovani, 2004). HERV-K env 항원은 세포막과 세포질 사이에 순환하고, 그리고 또한, 일정한 종양 조건에서 세포 표면으로부터 갈라져 나오는 것으로 알려져 있다. 따라서, 입양 T 세포 요법을 이용하는 것은 세포 표면 상에서 일시적인 항원 발현만을 필요로 하는 우호적인 치료 전략일 수 있다.

[0253] HERV-K env 항원은 또한, 유방암, 난소암, 전립선암, 림프종, 기형암종, 자가면역 질환, 예를 들면, 다발성 경화증, 그리고 감염성 질환, 예를 들면, HIV와 연관된 것으로 밝혀졌다 (Wang-Johanning *et al.*, 2003; Contreras-Galindo *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2012; Ono, 1986; Wang-Johanning *et al.*, 2007). 따라서, 입양 T 세포 요법을 이용하여 env 항원을 표적으로 하는 것은 복수 질환 상태에 대한 치료 옵션일 수 있다. 이러한 가설과 일관되게, HERV-K env는 HERV-K CAR⁺ T 세포에 의해 성공적으로 및 선별적으로 표적화될 수 있다. 이들 유전적으로 변형된 CAR⁺ T 세포를 생체내 주입하는 것은 종양 퇴화 및 감소된 전이와 연관되었는데, 이것은 이들 세포의 항종양 활성을 증명하였다.

[0254] **실시예 7 - 최소 잔존 질환의 면역요법에서 이용을 위한 오래 지속되는 생체내 잠재력을 갖는 T 세포를 산출하기 위한 막-결합된 사이토킨(들) 이용**

[0255] **mIL15의 산출과 발현.** mIL15 구조체 (도면 28)는 IL-15 cDNA 서열 (NM_000585.4)을 세린-글리신 링커로 전장 IL-15R α (NM_002189.3)에 융합한다. IL-15와 IL-15R α 에 대한 신호 펩티드는 제외되었고, 그리고 IgE 신호 펩티드 (gb|AAB59424.1)가 mIL15 구조체에 이용되었다. 이러한 구조체는 막-결합되지만, 또한 앞서 설명된 트랜스-표현 모델에 유사한 IL-15R α 의 배경에서 제시되는 IL-15를 생산할 것이다. 이들 DNA 플라스미드는 GeneArt (Regensburg, Germany)에 의해 합성되고, 그리고 차후에 *잠자는 미녀* 플라스미드 (비바이러스 유전자 전달 방법) 내로 하위클로닝되었다. 일차 인간 T 세포는 mIL15 플라스미드, 그리고 SB-11 트랜스포손과 함께 또는 이들 없이, CAR 플라스미드 (CD19에 특이적)로 동시전기천공되었다. 유전적으로 변형된 T 세포의 증식과 확대는 41BBL 및 CD86 동시자극성 분자를 발현하는 CD19⁺ K562 인공 항원 제시 세포 (aAPC) 변이체로 주 1회 자극에 의해 달성되었다. 이용된 CAR은 CD3 ζ 과 CD28 신호전달 세포질 도메인을 내포하는 2세대 CAR이다. aAPC 상에서 CD19의 존재는 항원 특이적 T 세포의 선별적인 생장을 허용하고, 반면 동시자극성 분자는 시험관내 확대를 향상시킨다. mIL15 분자는 변형된 T 세포에 의해 CAR과 안정되게 공동발현될 수 있고, 그리고 공동발현 T 세포는 개체군의 대부분을 나타낸다 (도면 29). 부가적으로, 변형된 T 세포에서 전체 CAR-발현은 mIL15-CAR-변형된 T 세포의 경우에 90% 이상에 도달한다 (도면 29).

[0256] **mIL15의 기능성.** IL-15 수용체 복합체 신호전달은 전사 5의 신호 변환기와 활성체의 인산화를 일차적으로 유도한다. 포스플로우 (phosflow)를 이용하여 인산화된 STAT5 (pSTAT5)를 살펴봄으로써, mIL15가 사이토킨 신호전달 경로를 유도할 수 있는 지가 결정될 수 있다. pSTAT5 수준은 사이토킨 보충을 가졌던 CAR⁺ T 세포에서 상승되었는데, 이들 수준은 혈청과 사이토킨 기아 하에 제거되었다. 기아 조건 하에, mIL15⁺CAR⁺ T 세포에서 pSTAT5 수준이 유지되었다 (도면 30). 이들 데이터는 mIL15가 기능적이고 사이토킨 신호전달 경로의 pSTAT5 부분을 활성화시킨다는 것을 증명한다.

[0257] **임상적으로 유의미한 숫자의 mIL15⁺CAR⁺ T 세포의 증식.** CAR로 T 세포 특이성을 전향시키는데 있어서, 탈체 확대에서 초점은 mIL15와 함께 또는 이것 없이 CAR⁺ T 세포 개체군, 본원의 경우에 CAR을 주동하는데 있다. 표준 CAR⁺ T 세포는 가용성 IL-2와 IL-21과 함께 성장되고, 반면 mIL15⁺CAR⁺ T 세포는 IL-15와 IL-21 사이에 보고된 상승작용을 활용하기 위해 가용성 IL-21이 제공되었다. IL-21로 보충된 mIL15⁺CAR⁺ T 세포는 표준 CAR⁺ T 세포뿐만 아니라 IL-15와 IL-21이 제공된 대조 CAR⁺ T 세포에 필적하는 확대를 보여주었다 ($P = 0.53$, 이원 변량분석 (ANOVA); 도면 31). mIL15⁺CAR⁺ T 세포의 탈체 확대는 임상적으로 유의미한 숫자의 세포를 생산한다.

[0258] **mIL15⁺CAR⁺ T 세포의 표현형과 기능성을 사정.** 탈체 확대된 mIL15⁺CAR⁺ T 세포의 표현형은 IL-7Ra 발현을 제외하고 CAR⁺ T 세포와 대체로 유사하다. 이러한 시점에서 주입 산물을 나타내는 이들 세포의 일반적인 표현형은 두드러지게는, 활성화 마커 CD45RO와 CD25의 중간 내지 높은 발현을 갖는 CD8⁺ (세포독성) T 세포이다. 양쪽 T 세포 군에 대해 T 세포 기억-연관된 마커 (CD62L, CCR7, CD27, 그리고 CD28) (도면 32a)의 가변적인 낮은 내지 중간 수준의 발현이 있었다. 변형된 T 세포의 탈체 확대 후, T 세포가 그들의 전향된 T 세포 특이성과 용해성 기능을 유지하는 것이 필요하다. 확대 산물에서 T 세포의 기능을 사정하기 위해 크롬 방출 검정이 수행되었다. CD19⁺와

CD19⁻ EL4 표적은 변하는 작동체 대 표적 비율에서 변형된 T 세포로 도달되었다. CD19⁺ 종양 표적의 특정한 용해는 mIL15⁺ CAR⁺ T 세포와 CAR⁺ T 세포 둘 모두에 의해 모든 작동체 대 표적 비율에 걸쳐 증명되었고 ($P < 0.001$, 이원 변량분석 (ANOVA), $n=3$), 그리고 서로 상이하지 않았다 ($P > 0.05$, 이원 변량분석 (ANOVA)). mIL15⁺ CAR⁺ T 세포에 의한 CD19⁺ 표적 용해는 특이적이고, 그리고 CD19⁻ 표적의 배경 용해와 유의미하게 상이하였다 ($P < 0.001$, 이원 변량분석 (ANOVA)) (도면 32b). mIL15⁺ CAR⁺ T 세포는 그들의 전향된 특이성과 용해 능력을 유지하였다.

[0259]

특정한 mIL15⁺ CAR⁺ T 세포 부분집합은 시험관내에서 장기간 존속하고 기능적으로 남아있다. 장기간 시험관내 존속을 사정하기 위해, 4회 aAPC 자극 확대된 mIL15^{+/+} CAR⁺ T 세포는 추가 항원 재자극 없이 장기간 배양되었다. CAR⁺ T 세포는 IL-2, IL-15, 또는 사이토킨 보충 없음을 제공받았고, 반면 mIL15⁺ CAR⁺ T 세포는 외인성 사이토킨을 제공받지 않았다. 예상한 대로, 사이토킨 보충 없음을 제공받은 CAR⁺ T 세포는 존속하지 않았다. mIL15⁺ CAR⁺ T 세포뿐만 아니라 IL-2 또는 IL-15를 제공받은 CAR⁺ T 세포는 보충되지 않은 CAR⁺ T 세포보다 훨씬 큰 상대적 배수적 확대를 가졌다 ($P < 0.0001$, 반복된 척도 ANOVA, $n=3$; 도면 33a). 제로에 근접한 mIL15⁺ CAR⁺ T 세포 상대적 확대의 유지는 또한, 이들 변형된 세포가 제한되지 않은 방식으로 성장하지 않는다는 것을 암시한다. 임상적 적용에 이익이 되기 위해서, CAR⁺ T 세포는 항원에 반응성인 상태로 남아있어야 한다. 따라서, 항원 조우로부터 75+ 일에서 이들 T 세포가 표적 없음, CD19⁻ EL-4, CD19⁺ EL-4, CD19⁺ NaIm-6 (인간 백혈병 세포주)으로 공격되거나, 또는 림프구 활성화 각테일 (LAC)과 인터페론 γ (IFN γ) 생산이 표적과 함께 6 시간 배양 후 세포내 사이토킨 염색에 의해 사정되었다. IL-2 또는 IL-15를 제공받는 CAR⁺ T 세포와 유사하게, mIL15⁺ CAR⁺ T 세포는 또한, CD19⁺ 표적 및 LAC에 대한 응답으로 IFN γ 를 생산하였다 (도면 33b). 다른 검정에서, 이들 75-일 도피 T 세포는 aAPC로 자극되고 IL-21로 보충되었다. 따라서, IL-2와 함께 배양된 CAR⁺ T 세포는 IL-2와 IL-21이 지금 제공되었고, IL-15 배양액 T 세포는 이후, IL-15와 IL-21을 제공받았고, 그리고 mIL15⁺ CAR⁺ T 세포는 IL-21 단독으로 보충되었다. T 세포 생존력은 aAPC 자극 후 8 일에 아넥신 V 염색을 통해 사정되었다. mIL15⁺ CAR⁺ T 세포는 최대 생존 세포 개체군 (아넥신 V^{음성})을 갖는 것으로 나타났고 (도면 33c), 그리고 활성화 유도된 세포 사멸에 대한 내성을 나타낸다.

[0260]

존속하는 mIL15⁺ CAR⁺ T 세포는 덜 분화된 T 세포의 특성을 소유한다. 장기간 존속하는 mIL15⁺ CAR⁺ T 세포를 특징짓는데 있어서, 본 발명자들은 존속하는 mIL15⁺ CAR⁺ T 세포가 덜 분화된 T 세포 부분집합과 연관된 특징을 전시킬 것으로 가정하였는데, 그 이유는 이들 세포 부분집합이 그들의 오래 지속되는 잠재력에 대해 알려져 있기 때문이다. 구조성 존재, 그리고 따라서 가능한 구조성 신호전달로, mIL15⁺ CAR⁺ T 세포의 탈체 배양 동안, 본 발명자들은 이들 T 세포가 존속 이점을 갖는 세포를 산출할 덜 분화된 상태를 위한 분자 프로그래밍을 갖는 지를 사정하였다. nCounter 분석 시스템을 이용한 다중화된 디지털 유전자 프로파일링의 분석이 CAR⁺ 및 자극 4 (도피 검정 T 세포 입력)로부터 mIL15⁺ CAR⁺ T 세포에서 수행되었다. 정규화된 mRNA 수치의 분석은 음성 이항 분포-기초된 통계학적 프로그램 (Lohse *et al.*, Nucleic Acids Res. (2012) 40, W622-7)을 이용하였다. 유전자는 2-배 차별적 mRNA 수치보다 크면, 유의미하게 차별적으로 발현되는 것으로 고려되었다, $P < 0.05$, FDR $q < 0.05$. 단지 5개 유전자만 이들 기준을 이용하여 차별적으로 발현되는 것으로 고려되었고, 따라서 mIL15에 의해 제공되는 배양 또는 분자 프로그래밍 이점이 없다는 것을 지시한다.

[0261]

본 발명자들은 이후, 장기간 존속하는 mIL15⁺ CAR⁺ T 세포를 특징지었다. 먼저, 이들의 표현형이 그들의 분화 상태를 표현형적으로 설명하는 CD45RA와 CCR7 마커를 이용하여 사정되었다. 이들 마커는 T 세포의 분화 상태를, 세포를 최소 분화된 상태에서부터 가장 분화된 상태까지 나타내는 CD45RA⁺CCR7⁺ < CD45RA⁺CCR7⁻ < CD45RA⁻CCR7⁻ < CD45RA⁻CCR7⁺로서 특징짓는다. 75-일 도피 mIL15⁺ CAR⁺ T 세포를 실험의 개시 시점에서 그들의 대응물 (자극 4 mIL15⁺ CAR⁺ T 세포)과 비교함에 있어서, 존속하는 mIL15⁺ CAR⁺ T 세포 배양액은 증가된 비율의 CD45RA⁺CCR7⁺과

CD45RA⁺CCR7⁻ T 세포 부분집합을 갖는 것으로 관찰된다 (***) ($P < 0.001$, 이원 반복된 척도 ANOVA, $n=7$; 도면 34). CCR7 발현은 CAR T 세포에 비하여 도피 mIL15⁺CAR⁺ T 세포에서 유의미하게 증강되었다. CCR7^{음성}과 CCR7⁺ 부분집합의 생존력은 mIL15⁺CAR⁺ T 세포, IL-2 (50U/ml)를 제공받는 CAR⁺ T 세포, 그리고 항원 도피 후 가용성 IL-15 (5ng/ml)를 제공받는 CAR⁺ T 세포의 아넥신 V 염색에 의해 사정되었다. 사이토킨 자극 (IL-2, IL-15 복합체, 또는 mIL15)의 유형과 상관없이, CCR7^{음성} T 세포는 동등한 빈도의 생존 세포를 보여주는 것으로 밝혀졌다. 대조적으로, mIL15에 노출된 CCR7⁺ T 세포는 IL-2 또는 IL-15 복합체를 제공받는 CAR T 세포보다 훨씬 높은 생존력을 가졌다 (둘 모두 $P < 0.05$; 도면 34). 이들 데이터는 mIL15가 CCR7⁺ 표현형을 뒷받침하는데 충분하고, 이것은 따라서, 덜 분화된 CD45RA⁺CCR7⁺ T 세포 부분집합을 유지하는데 기여한다는 것을 암시한다. 덜 분화된 T 세포의 존속을 증진하는 mIL15⁺CAR⁺ T 세포의 능력은 입양 요법을 위한 바람직한 표현형이고, 그리고 오래 지속되는 T 세포 부분집합이 덜 분화된 표현형을 소유한다는 것을 보고하는 다른 연구를 확장하는 것으로 보인다. 추가적으로, 고도로 분화된 부분집합의 생존은 또한, 아마도 구조성 IL-15 신호전달에 의해 뒷받침되는 것으로 관찰되었다.

[0262] 장기간 존속하는 mIL15⁺CAR⁺ T 세포는 덜 분화된 T 세포 부분집합과 연관된 일부 분자 마커를 전시한다. 이들 T 세포는 nCounter 분석 시스템을 이용하여 그들의 유전자 발현 패턴에 대해 분석되었고, 그리고 자극 4로부터 mIL15⁺CAR⁺ T 세포 및 도피의 75 일자까지 생존하는 것들 사이에 차별적으로 발현된 유전자의 계층적으로 군집된 열 지도가 산출되었다 (>2-배 컷오프, $P < 0.05$, FDR $q < 0.05$). 이들 연구는 108개의 유의미하게 차별적으로 발현된 유전자를 확인하였다 (>2-배 컷오프, $P < 0.05$, FDR $q < 0.05$). 유전자 존재론 분류는 DAVID 기능적 주해를 이용하여 사정되었다. 차별적으로 발현된 유전자의 기능적 분류는 광범위한 범주로 그룹화될 수 있다: T 세포 활성화, 분화, 증식, 그리고 아포토시스. 다시 말하면, 분화의 양성 조절, 아포토시스의 조절, 그리고 아포토시스의 유도에서 하향조절되는 mIL15⁺CAR⁺ T 세포에서 더욱 큰 숫자의 유전자가 있었다. mIL15⁺CAR⁺ T 세포에서 더욱 큰 숫자의 유전자가 분화의 음성 조절 및 Wnt 신호전달 경로에서 상향조절되었다 (도면 36). 이것은 존속하는 mIL15⁺CAR⁺ T 세포의 분자 서명이 자극 4에서 mIL15⁺CAR⁺ T 세포 (실험 개시에서 T 세포)보다 덜 분화된다는 것을 암시한다.

[0263] 선별된 유전자의 발현은 유세포분석법에 의해 검증되었다. 덜 분화된 상태와 연관된 전사 인자 (Tcf-7)의 발현 및 작동체 기능/분화된 상태 (Blimp-1 및 Tbet)의 획득은 존속하는 mIL15⁺CAR⁺ T 세포가 덜 분화된 세포와 연관된 전사 인자 균형을 전시한다는 것을 지시한다. 이것은 Tcf-7의 더욱 큰 발현 및 Blimp-1과 Tbet의 더욱 낮은 발현에 의해 특징화된다 (도면 37). 세포 표면 마커 IL-7Ra와 CCR7의 사정이 행위되었는데, 그 이유는 이들이 덜 분화된 T 세포 부분집합에 의해 특징적으로 발현되기 때문이다. 존속하는 mIL15⁺CAR⁺ T 세포는 오래 지속되는 T 세포 부분집합과 연관된 이들 마커의 발현을 증가시켰다 (도면 38). T 세포 분화의 수준을 식별하기 위한 한 가지 추가 척도는 IL-2를 생산하는 덜 분화된 T 세포의 능력에 의한이다. 자극 4 또는 75-일 도피 배양액으로부터 mIL15⁺CAR⁺ T 세포는 모의-처리되거나 또는 LAC로 6 시간 동안 처리되고, 그리고 이후, 세포내 사이토킨 염색에 의해 IL-2 생산에 대해 사정되었다. 자극 4 T 세포는 IL-2를 생산할 수 없었고, 반면 존속하는 75-일 금단 T 세포는 IL-2를 생산하는 능력을 획득하였다 (도면 39). 이들 결과는 탈체 확대된 CAR⁺ T 세포 또는 mIL15⁺CAR⁺ T 세포 사이에 인지가능한 차이가 없긴 하지만, 결과의 장기간 존속하는 mIL15⁺CAR⁺ T 세포가 생체내에서 장기간 생존을 나타내는 덜 분화된 T 세포 부분집합과 연관된 특징을 전시한다는 것을 집합적으로 암시한다.

[0264] **높은 중앙 부담 모델에서 mIL15⁺CAR⁺ T 세포의 생체내 존속과 항종양 효력.** 생체내 존속을 사정하기 위해, mIL15⁺CAR⁺ T 세포 및 CAR⁺ T 세포는 생물발광 영상 (BLI)을 이용하여 생체내에서 T 세포의 종적 모니터링을 할 수 있게 하기 위해 개통벌레 루시페라아제 (ffLuc)를 발현하도록 동시변형되었다. 이들 변형된 T 세포는 20×10^6 CAR⁺ T 세포의 1회 T 세포 주입을 이용하여, 처리 없음 대조군과 함께 파종성 NaIm-6 (CD19⁺) 악성을 보유하는 NSG 생쥐 내로 입양 전달되었다. 14 일후, 생쥐는 희생되었다. CAR⁺ T 세포는 존속하지 않는 것으로 밝혀진 반면, mIL15⁺CAR⁺ T 세포는 BLI에 의해, 11 일 영상 기간 내내 존속하는 것으로 관찰되었다 (도면 40b). 골수,

비장, 그리고 말초혈이 수확되고, 그리고 마커로서 인간 CD3 및 게이팅 아웃 튜브를 이용하여 인간 T 세포의 존재에 대해 유세포분석법에 의해 사정되었다. mIL15⁺CAR⁺ T 세포로 주입된 생쥐는 유의미한 CD3⁺ T 세포가 골수 (0.49-2.17%, $P = 0.0001$, 비대칭 t 검증, n=5), 비장 (1.15-12.38%, $P < 0.0001$, 비대칭 t 검증, n=5) 및 말초혈 (58.39-92.60%, $P < 0.0001$, 비대칭 t 검증, n=5)에서 검출되었다 (도면 40c). 사정된 조직 중에서 어디에서도 CAR⁺ T 세포 처리군 (도면 40c) 및 처리 없음 군 (종양 단독)으로부터 표본에서 CD3⁺ 세포가 검출되지 않았다. 이러한 모델에서, mIL15⁺CAR⁺ T 세포는 말초혈에서 종양 억제력을 보였지만 (도면 40d), 완전한 종양 소실이 관찰되지 않았다. 이들 데이터는 종양 항원의 우세에도 불구하고, CAR⁺ T 세포가 불충분한 생체내 존속을 갖는 반면, mIL15⁺CAR⁺ T 세포가 신체 전반에서 유의미한 수준에서 존재한다는 것을 지시한다.

[0265] **낮은 종양 부담 모델에서 mIL15⁺CAR⁺ T 세포의 생체내 존속과 항종양 효력.** 본 발명자들은 그 다음, 낮은 종양 부담을 갖는 방지적 모델에서 T 세포 이식 및 항종양 활성을 사정하였다. 변형된 T 세포 (mIL15^{+/+}CAR⁺ffLuc⁺)가 외인성 사이토킨 없이 NSG 생쥐 내로 주입되고, 그리고 레닐라 루시페라아제 (rLuc)-변형된 Nalm-6의 주입 전 6 일 동안 이식되도록 허용되었다. 이들 생쥐는 30 일의 코스 동안 BLI를 겪었다. 이러한 방지적 모델에서, mIL15⁺CAR⁺ T 세포는 실험의 지속 기간 내내 존속하는 것으로 관찰되었고 종양 이식을 예방하였는데, 이것은 CAR⁺ T 세포 및 T 세포 처리 없음 군과 비교하여 유의미한 항종양 효과이었다 ($P < 0.0001$, 일원 변량분석 (ANOVA), n = 4-5) (도면 41c-d). 유세포분석법에 의한 장기와 말초혈의 분석은 mIL15⁺CAR⁺ T 세포 처리군에서 인간 CD3⁺ T 세포를 검출하였지만, 흥미롭게도 이들 T 세포는 단지 골수에서만 발견되었고 (도면 41e), 그리고 종양 조우 후 우선적 귀소 또는 생존을 지시할 수 있다. 유사한 실험에서, 생존이 검사되고, 그리고 mIL15⁺CAR⁺ T 세포-처리된 생쥐가 T 세포 처리 없음 생쥐 또는 CAR⁺ T 세포-처리된 생쥐와 비교하여 유의미하게 향상된 생존을 전시하였다 [$P = 0.045$ (CAR⁺ T 세포와 대비하여 mIL15⁺CAR⁺ T 세포, 로그 순위 Mantel-Cox 검사, n=7-8; 도면 41)].

[0266] **CAR 활성화의 부재에서 mIL15⁺CAR⁺ T 세포의 생체내 존속.** mIL15⁺CAR⁺ T 세포가 CAR 신호전달에 대한 필요 없이 생체내에서 장기간 존속할 수 있다는 것을 사정하기 위해, 변형된 T 세포 (mIL15^{+/+}CAR⁺ffLuc⁺)가 생쥐 (종양 또는 외인성 사이토킨 없음) 내로 주입되고 최대 47 일 동안 모니터링되었다. T 세포를 이러한 방식으로 시험하는 것은 또한, 존속하는 T 세포가 제한되지 않은 성장을 나타내는 지 또는 이들이 그들의 개체군을 항상성-유사 방식으로 유지하는 지를 석명할 것이다. 어떤 CAR⁺ T 세포도 존속하는 것으로 관찰되지 않았고, 반면 mIL15⁺CAR⁺ T 세포의 존재는 외인성 사이토킨과 항원의 부재에서 지속된 존속을 전시하였다 (도면 42b). 이것은 골수, 비장, 그리고 말초혈로부터 단리된 CD3 염색된 세포의 유세포분석법에 의해 더욱 확증되었다 (도면 43c). 종적 T 세포 존속을 사정할 때, 플럭스 값은 mIL15⁺CAR⁺ T 세포 수준이 시간의 흐름에서 수평을 유지하거나 또는 천천히 감퇴하는 것으로 보이긴 하지만, 통제되지 않은 확대의 발생을 나타내지 않았다는 것을 지시한다 (도면 42d). 이들 존속하는 T 세포는 유전적으로 변형된 T 세포의 탈체 확대에 대해 앞서 설명된 바와 동일한 방식으로 수확되고 탈체 확대되었다. 이들 세포는 인터페론- γ 생산에 의해 검정될 때 항원 특이적 활성화를 할 수 있었다 (도면 42e). 이러한 생체내 데이터는 항원 특이적 반응성을 유지하면서, CAR-독립되고 항상성-유사한 방식에서 mIL15⁺CAR⁺ T 세포의 증강된 존속을 증명한다.

[0267] **mIL15⁺CAR⁺ T 세포에서 세포 증식과 기억 동역학.** 유세포분석법 분석이 mIL15⁺CAR⁺ T 세포를 더욱 특징짓는데 이용되었다 (도면 35에서 도시된 결과). 장기간 존속하는 mIL15⁺CAR⁺ T 세포는 1 년 이상 동안 일정하게 배양된 표본에서 10 일에 걸쳐 최소 PKH 희석에 의해 지시된 바와 같이, 배양 동안 낮은 회전을 유지한다. 게다가, 분열 세포는 두드러지게 CCR7⁺ 인 것으로 나타났다. 이런 데이터는 T 세포가 제한되지 않은 자율 증식 또는 성장과는 대조적으로 항상성으로 유지된다는 것을 지시한다 (도면 35a). 연속적 장기간 배양 (1.5 내지 2.45 년) 동안 mIL15⁺CAR⁺ T 세포는 aAPCs로 활성화되고, 표현형분석되고, 그리고 핵형분석을 위해 제출되었다. 표현형분석은 이들 T 세포가 mIL15를 발현한다는 것을 보여주었고, 그리고 모든 제출된 공여자에 대한 핵형분석 결과는 정상적인 중기-확산을 보여주었다 (도면 35b-c). 도면 35d는 K562 aAPCs를 이용한 세포의 자극 후 기억 동역학을 보

여준다: 도피 동안 mIL15⁺CAR 조건과 대비하여 자극 1- CAR: 이들 연구를 위해 CAR T 세포는 자극의 첫 9 일 동안 단지 IL-21만을 제공받고, 그리고 이후, Ag 도피 조건 동안 단지 IL2만을 제공받았다; mIL15⁺CAR T 세포는 첫 9 일 동안 IL-21을 제공받고, 그리고 이후 도피 조건 동안 외인성 사이토킨을 제공받지 않았다. 결과는 CAR 및 mIL15⁺CAR T 세포 사이에 자극1 후 19 일자에 CCR7과 IL-7Ra 발현에서 차이가 없다는 것을 지시한다. CCR7과 IL-7Ra 발현은 mIL15-변형된 T 세포 단독의 경우에 항원 노출 (29 일자 대 19 일자)로부터 시간이 멀어짐에 따라서 증가한다. CAR 발현은 항원에 노출이 없으면 ~ 80%까지 증가한다 (자극1 후 9 일에 PB522는 51%이고 PB273은 53%이었다. 도면 35e는 CAR과 mIL15⁺CAR T 세포의 2회 자극과 대비하여 기억 동역학 1을 보여준다. 도피 동안 조건: CAR T 세포는 Ag 도피 동안 단지 IL2만을 제공받았는데, 이것은 자극 후 10 일에 설정되었다; mIL15⁺CAR T 세포는 도피 동안 외인성 사이토킨을 제공받지 않았다. 1회 자극과 2회 자극 후 유사한 시점에서 CCR7과 IL-7Ra 발현을 비교하는 것은 19 일자에 1회 자극에서 CAR 대 mIL15⁺CAR 사이에 기억 차이 없음을 지시하였다. 자극 2에서, 자극 1과 동등한 시점에서, 2회 자극을 갖는 CAR T 세포는 자극 1 대응물과 비교하여 훨씬 적은 CCR7을 갖고 IL-7Ra가 거의 없다. 2회 자극을 갖는 mIL15⁺CAR T 세포는 또한, CAR 단독 T 세포보다 적은 기억을 갖지만, 더욱 많은 "기억"을 유지하는데, mIL15⁺CAR T 세포에 일부 CCR7이 남겨진다 (하지만 IL-7Ra는 거의 완전하게 사라진다).

[0268] **실시예 8 - SB 유전자전위효소를 코딩하는 mRNA를 이용하여 최소한으로 조작된 T-세포의 산출**

[0269] 전기천공을 위한 mRNA로서 제공된 SB 유전자전위효소의 이용이 SB 유전자전위효소 시스템을 이용하여 CAR T 세포 생산을 더욱 증강할 수 있는 지를 결정하기 위한 연구가 착수되었다. 이들 연구를 위해, 세포는 트랜스포돈 반복에 의해 접하는 CAR을 인코딩하는 플라스미드 및 유전자전위효소 (가령, SB11 또는 100x)를 인코딩하는 mRNA 둘 모두를 이용하여 상기 상술된 바와 같이 전기천공되었다. 이들 연구를 위한 mRNA는 m7GTP 캡핑되고 폴리-A 꼬리를 포함하였다. mRNA로서 제공된 mRNA SB 유전자전위효소를 이용한 CAR T 세포 생산을 위한 프로토콜을 보여주는 계통도는 도면 43에서 도시된다. 이들 연구를 위해, 공여자 #0로부터 세포는 SB11 mRNA로 전기천공되었고, 반면 공여자 #1로부터 연구 세포는 100x mRNA로 전기천공되었다.

[0270] 공여자 #0로부터 생산된 세포는 CAR 발현 및 세포 증식에 대한 유세포분석법 분석에 의해 특징화되었다. 도면 44a에 나타나 있는 바와 같이, CAR을 안정되게 발현하는 T-세포의 백분율은 9 일자 (8.3%)에서부터 16 일자 (66.2%)까지 유의미하게 증가한다. T-세포는 빠르게 성장하고 전기천공 후 16 일자까지 20-배 증폭된다 (도면 44b). 도면 44d에서 도시된 추가 연구가 전기천공 후 9 일자 (왼쪽 패널) 및 17 일자 (오른쪽 패널)에서 중심 기억 T-세포 (Tcm)의 숫자를 사정하는데 이용되었다. 이들 결과는 비록 덜 분화된 중심 기억 T-세포 (Tcm)의 숫자가 9 일자와 17 일자 사이에 감퇴하지만, 여전히 상대적으로 높게 (27%) 남아있다는 것을 보여준다. 그 다음, 크롬 방출 검정이 이들 세포의 세포독성 활성을 결정하는데 이용되었다. 도면 44c에 나타나 있는 바와 같이, 생산된 CAR T-세포는 표적 세포에 대항하여 CD-19-특이적 세포독성을 제공하고, 반면 변형되지 않은 T-세포의 경우에 본질적으로 어떤 세포독성 활성도 목격되지 않았다.

[0271] 공여자 #1로부터 생산된 세포 역시 연구되었다. 도면 45a에 나타나 있는 바와 같이, 이러한 공여자로부터 생산된 CAR T-세포 역시 표적 세포에 대항하여 CD-19-특이적 세포독성을 제공하였고, 그리고 변형되지 않은 T-세포 (오른쪽 패널)의 경우에 본질적으로 어떤 세포독성 활성도 목격되지 않았다. 게다가, 변형된 T-세포는 상이한 숫자의 CAR-양성 세포에도 불구하고, 9 일자와 15 일자에 유사한 효율로 CD19-양성 표적 세포를 사멸시킨다. 도면 45b에서, CAR 사본수와 발현을 사정하는 연구의 결과가 도시된다. 이들 결과는 CAR DNA 사본수가 15 일자에서부터 22 일자까지 1.5에서 0.9로 감소하고 상기 시점 후 안정되게 남아있다는 것을 지시한다.

[0272] 최종적으로, 유세포분석법이 전기천공 이후에 세포 생존력을 사정하는데 이용되었다. 도면 46에 나타나 있는 바와 같이, DNA/mRNA로 전기천공 후, 세포의 총수가 초기에 감소하고 (1 일자와 2 일자) 그리고 이후, 세포가 성장하기 시작한다. 셀로미터 수치에 따르면, 세포 수는 전기천공 후 2 일자에 59% - 76% 감소한다 (생존력 24-41%).

[0273] 따라서, 전술한 데이터는 유전자전위효소를 인코딩하는 mRNA를 이용하는 CAR 생산 기술의 이용에 의해, 효과적인 숫자의 표적-특이적 세포독성 T 세포가 극히 짧은 기간에서 및 최소 조작으로 생산될 수 있다는 것을 증명하였다. 비록 mRNA 전기천공의 효율이 공여자-의존성이긴 하지만, SB100x 유전자전위효소가 CAR 생산에서 더욱 효율적일 수 있는 것으로 보인다. 흥미롭게도, 비록 전기천공 후 초기에 (9 일자) 더욱 낮은 백분율의 세포가 CAR

을 발현하지만, 전체 세포 개체군은 후기 시기 (15-16 일자)로부터 전체 세포 개체군과 거의 동일하게 효율적으로, 표적화된 중앙 세포를 사멸시키고 더욱 많은 중심 기억 (덜 분화된) 세포를 내포한다. SB11과 SB100x 코딩 mRNA는 검사된 조건 하에 세포 유전체마다 약 1 사본 CAR-코딩 유전자의 통합을 제공하는 것으로 또한 입증되었다.

[0274] * * *

[0275] 본원에서 개시되고 청구된 모든 방법은 본 발명에 비추어 과도한 실험 없이 만들어지고 실행될 수 있다. 본 발명의 조성물과 방법이 바람직한 구체예의 면에서 설명되긴 했지만, 변이가 발명의 개념, 사상과 범위로부터 벗어나지 않으면서 본원에서 설명된 방법에, 그리고 이들 방법의 단계에서 또는 단계의 순서에서 적용될 수 있다는 것은 당업자에게 명백할 것이다. 더욱 특정하게는, 화학적으로 및 생리학적으로 관련되는 일정한 작용제가 동일한 또는 유사한 결과를 달성하면서, 본원에서 설명된 작용제를 대신할 수 있다는 것은 명백할 것이다. 당업자에게 명백한 모든 이런 유사한 대체재와 변형은 첨부된 청구항에 의해 규정된 바와 같은 발명의 사상, 범위와 개념 내에 있는 것으로 간주된다.

[0276] 참고문헌

[0277] 다음의 참고문헌은 이들이 본원에서 진술된 것들에 보충의 예시적인 절차적 또는 다른 상세를 제공하는 정도까지, 특정적으로 본원에 참조로서 편입된다.

- Aronovich *et al.*, The *Sleeping Beauty* transposon system: a non-viral vector for gene therapy. *Hum. Mol. Genet.*, 20:R14-20, 2011.
- Bhatia *et al.*, Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncology*, 23:488-496, 2009.
- Bieda *et al.*, Phenotypic heterogeneity of human endogenous retrovirus particles produced by teratocarcinoma cell lines. *J. Gen. Virol.*, 82:591-596, 2001.
- Brentjens *et al.*, Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood*, 118:4817-4828, 2011.
- Brentjens *et al.*, CD19-Targeted T Cells Rapidly Induce Molecular Remissions in Adults with Chemotherapy-Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia. *Sci. Transl. Med.*, 5:177ra138, 2013.
- Buscher *et al.*, Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines. *Cancer Res.*, 65:4172-4180, 2005.
- Contreras-Galindo *et al.*, Human endogenous retrovirus K (HML-2) elements in the plasma of people with lymphoma and breast cancer. *J. Virol.*, 82:9329-9336, 2008.
- Cooper and Bollard, Good T cells for bad B cells. *Blood*, 119:2700-2702, 2012.
- Davies *et al.*, Combining CD19 redirection and alloanergization to generate tumor-specific human T cells for allogeneic cell therapy of B-cell malignancies. *Cancer Res.*, 70:3915-3924, 2010.
- Dreyfus, Autoimmune disease: A role for new anti-viral therapies? *Autoimmunity Reviews*, 11:88-97, 2011.
- Ertl *et al.*, Considerations for the clinical application of chimeric antigen receptor T cells: observations from a recombinant DNA Advisory Committee Symposium held June 15, 2010. *Cancer Res.*, 71:3175-3181, 2011.
- Garrido *et al.*, Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol. Today*, 18:89-95, 1997.
- Geiss *et al.*, Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol.*, 26:317-325, 2008.

[0278]

- Geurts *et al.*, Structure-based prediction of insertion-site preferences of transposons into chromosomes. *Nucleic Acids Res.*, 34:2803-2811, 2006.
- Gross *et al.*, Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:10024-10028, 1989.
- Hackett *et al.*, A transposon and transposase system for human application. *Mol. Ther.*, 18:674-683, 2010.
- Hackett *et al.*, Efficacy and safety of *Sleeping Beauty* transposon-mediated gene transfer in preclinical animal studies. *Curr. Gene Ther.*, 11:341-349, 2011.
- Hahn *et al.*, Serological response to human endogenous retrovirus K in melanoma patients correlates with survival probability. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 24:717-723, 2008.
- Hollis *et al.*, Stable gene transfer to human CD34(+) hematopoietic cells using the *Sleeping Beauty* transposon. *Exp. Hematol.*, 34:1333-1343, 2006.
- Huang *et al.*, Genetically modified T cells targeting interleukin-11 receptor alpha-chain kill human osteosarcoma cells and induce the regression of established osteosarcoma lung metastases. *Cancer Res.*, 72:271-281, 2012.
- Huang *et al.*, *Sleeping Beauty* transposon-mediated engineering of human primary T cells for therapy of CD19+ lymphoid malignancies. *Mol. Ther.*, 16:580-589, 2008.
- Huang *et al.*, DNA transposons for modification of human primary T lymphocytes. *Methods Mol. Biol.*, 506:115-126, 2009.
- Huls *et al.*, Clinical application of sleeping beauty and artificial antigen presenting cells to genetically modify T cells from peripheral and umbilical cord blood. *J. Vis. Exp.*, e50070, 2013.
- Ivics *et al.*, Molecular reconstruction of *Sleeping Beauty*, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell*, 91:501-510, 1997.
- Izsvak and Ivics, *Sleeping beauty* transposition: biology and applications for molecular therapy. *Mol. Ther.*, 9:147-156, 2004.
- Izsvak *et al.*, Translating *Sleeping Beauty* transposition into cellular therapies: victories and challenges. *Bioessays*, 32:756-767, 2010.
- Jena *et al.*, Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor. *Blood*, 116:1035-1044, 2010.
- Jena *et al.*, Chimeric Antigen Receptor (CAR)-Specific Monoclonal Antibody to Detect CD19-Specific T Cells in Clinical Trials. *PLoS ONE*, 8:e57838, 2013.

[0279]

- Jin *et al.*, The hyperactive *Sleeping Beauty* transposase SB100X improves the genetic modification of T cells to express a chimeric antigen receptor. *Gene Ther.*, 18:849-856, 2011.
- Jones *et al.*, HERV-K-specific T cells eliminate diverse HIV-1/2 and SIV primary isolates. *J. Clin. Invest.*, 122:4473-4489, 2012.
- Kalos *et al.*, T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci. Transl. Med.*, 3:95ra73, 2011.
- Kebriaei *et al.*, Infusing CD19-directed T cells to augment disease control in patients undergoing autologous hematopoietic stem-cell transplantation for advanced B-lymphoid malignancies. *Hum. Gene Ther.*, 23:444-450, 2012.
- Kebriaei *et al.*, CARs: driving T-cell specificity to enhance anti-tumor immunity. *Front. Biosci. (Schol. Ed.)*, 4:520-531, 2012.
- Kim *et al.*, Use of the human elongation factor 1 alpha promoter as a versatile and efficient expression system. *Gene*, 91:217-223, 1990.
- Kim *et al.*, High Cleavage Efficiency of a 2A Peptide Derived from Porcine Teschovirus-1 in Human Cell Lines, Zebrafish and Mice. *PLoS ONE*, 6:e18556, 2011.
- Kochenderfer *et al.*, Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood*, 116:4099-4102, 2010.
- Kochenderfer *et al.*, B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood*, 119:2709-2720, 2012.
- Kohn *et al.*, CARs on track in the clinic. *Mol. Ther.*, 19:432-438, 2011.
- Kowolik *et al.*, CD28 costimulation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor enhances *in vivo* persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells. *Cancer Res.*, 66:10995-11004, 2006.
- Krone *et al.*, Protection against melanoma by vaccination with Bacille Calmette-Guerin (BCG) and/or vaccinia: an epidemiology-based hypothesis on the nature of a melanoma risk factor and its immunological control. *Eur. J. Cancer*, 41:104-117, 2005.
- Li *et al.*, Expression of HERV-K correlates with status of MEK-ERK and p16INK4A-CDK4 pathways in melanoma cells. *Cancer Invest.*, 28:1031-1037, 2010.

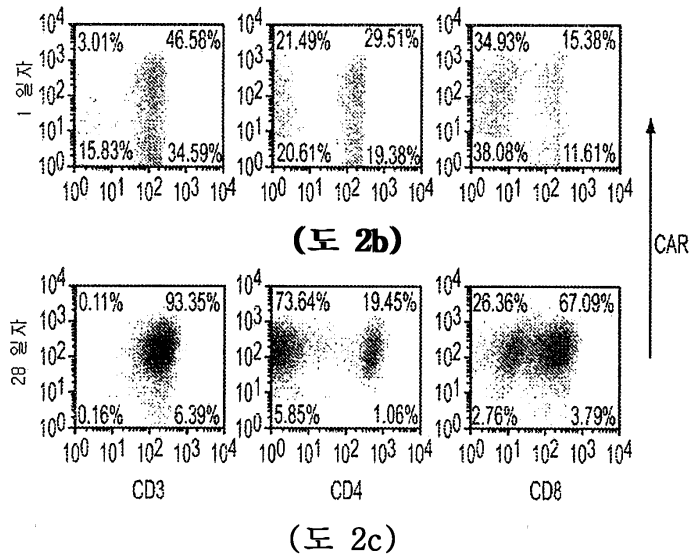
[0280]

- Lower *et al.*, A general method for the identification of transcribed retrovirus sequences (R-U5 PCR) reveals the expression of the human endogenous retrovirus loci HERV-H and HERV-K in teratocarcinoma cell. *Virology*, 192:501-511, 1993.
- Mahmoud *et al.*, Enforced CD19 expression leads to growth inhibition and reduced tumorigenicity. *Blood*, 94:3551-3558, 1999.
- Maiti *et al.*, Sleeping beauty system to redirect T-cell specificity for human applications. *J. Immunother.*, 36:112-123, 2013.
- Manuri *et al.*, piggyBac transposon/transposase system to generate CD19-specific T cells for the treatment of B-lineage malignancies. *Hum. Gene Ther.*, 21:427-437, 2010.
- Mates *et al.*, Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nat. Genetics*. 41(6):753-61, 2009.
- Muster *et al.*, An endogenous retrovirus derived from human melanoma cells. *Cancer Res.*, 63:8735-8741, 2003.
- Nakazawa *et al.*, PiggyBac-mediated cancer immunotherapy using EBV-specific cytotoxic T-cells expressing HER2-specific chimeric antigen receptor. *Mol. Ther.*, 19:2133-2143, 2011.
- Ono, Molecular cloning and long terminal repeat sequences of human endogenous retrovirus genes related to types A and B retrovirus genes. *J. Virol.*, 58:937-944, 1986.
- Patience *et al.*, Human endogenous retrovirus expression and reverse transcriptase activity in the T47D mammary carcinoma cell line. *J. Virol.*, 70:2654-2657, 1996.
- Porter *et al.*, Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 365:725-733, 2011.
- Rabinovich *et al.*, A role for the MHC class I-like Mill molecules in nutrient metabolism and wound healing. *Immunol. Cell. Biol.*, 86:489-496, 2008.
- Reiche *et al.*, Differential expression of human endogenous retrovirus K transcripts in primary human melanocytes and melanoma cell lines after UV irradiation. *Melanoma Res.*, 20:435-440, 2010.
- Sciamanna *et al.*, Inhibition of endogenous reverse transcriptase antagonizes human tumor growth. *Oncogene*, 24:3923-3931, 2005.
- Seifarth *et al.*, Retrovirus-like particles released from the human breast cancer cell line T47-D display type B- and C-related endogenous retroviral sequences. *J. Virol.*, 69:6408-6416, 1995.
- Serafino *et al.*, The activation of human endogenous retrovirus K (HERV-K) is implicated in melanoma cell malignant transformation. *Exp. Cell Res.*, 315:849-862, 2009.

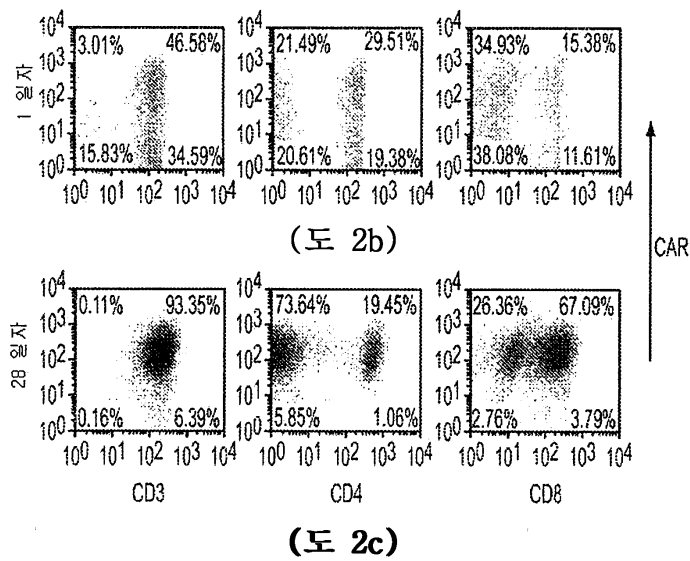
- Serrano *et al.*, Differentiation of naive cord-blood T cells into CD19-specific cytolytic effectors for posttransplantation adoptive immunotherapy. *Blood*, 107:2643-2652, 2006.
- Singh *et al.*, Combining adoptive cellular and immunocytokine therapies to improve treatment of B-lineage malignancy. *Cancer Res.*, 67:2872-2880, 2007.
- Singh *et al.*, Redirecting specificity of T-cell populations for CD19 using the Sleeping Beauty system. *Cancer Res.*, 68:2961-2971, 2008.
- Singh *et al.*, Reprogramming CD19-specific T cells with IL-21 signaling can improve adoptive immunotherapy of B-lineage malignancies. *Cancer Res.*, 71:3516-3527, 2011.
- Szymczak *et al.*, Correction of multi-gene deficiency *in vivo* using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. *Nat. Biotechnol.*, 22:589-594, 2004.
- Taruscio and Mantovani, Factors regulating endogenous retroviral sequences in human and mouse. *Cytogenet. Genome Res.*, 105:351-362, 2004.
- Till *et al.*, Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. *Blood*, 112:2261-2271, 2008.
- Wang-Johanning *et al.*, Quantitation of HERV-K env gene expression and splicing in human breast cancer. *Oncogene*, 22:1528-1535, 2003.
- Wang-Johanning *et al.*, Expression of multiple human endogenous retrovirus surface envelope proteins in ovarian cancer. *Int. J. Cancer*, 120:81-90, 2007.
- Williams, *Sleeping beauty* vector system moves toward human trials in the United States. *Mol. Ther.*, 16:1515-1516, 2008.
- Yang *et al.*, Development of optimal bicistronic lentiviral vectors facilitates high-level TCR gene expression and robust tumor cell recognition. *Gene Ther.*, 15:1411-1423, 2008.

[0282]

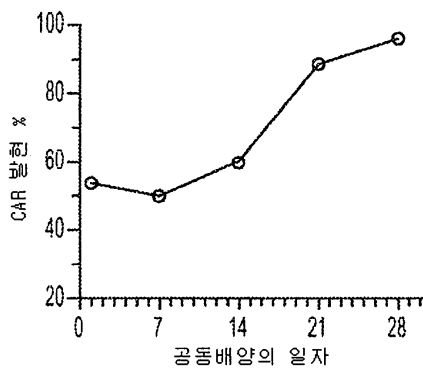
도면2b



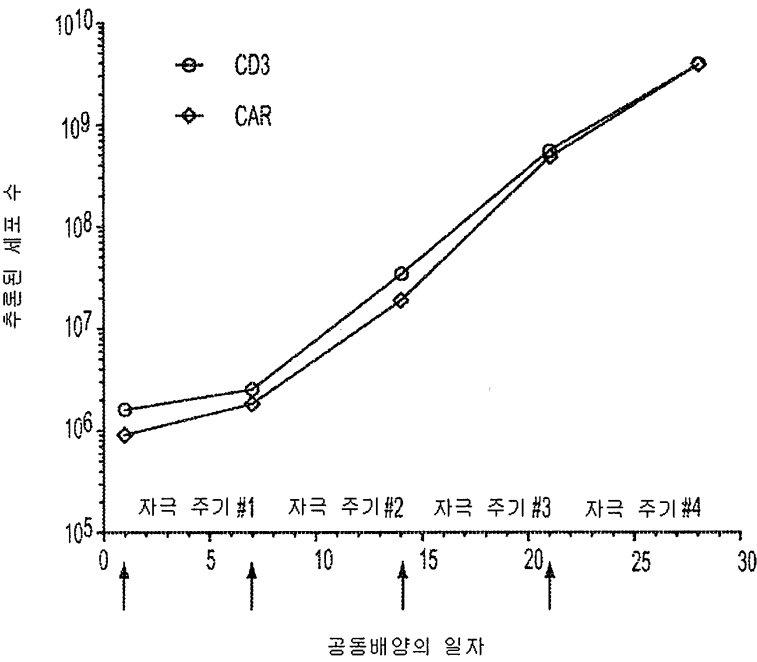
도면2c



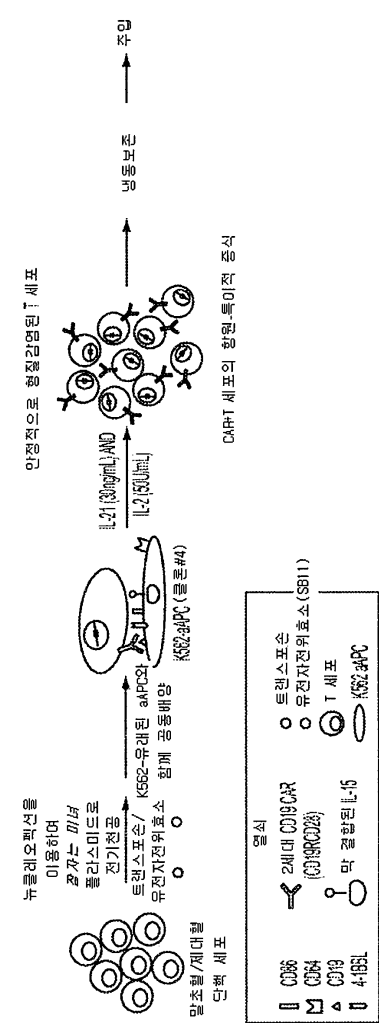
도면2d



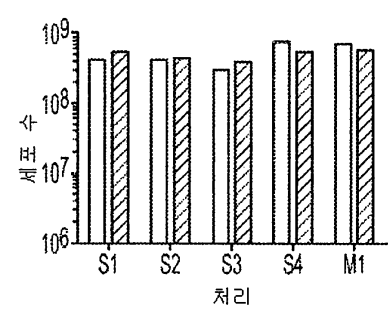
도면3



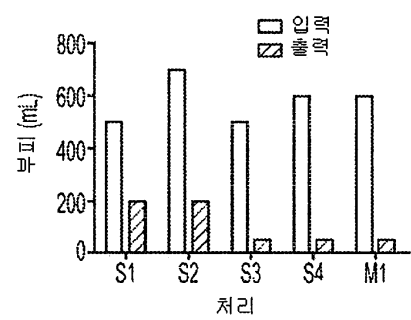
도면4



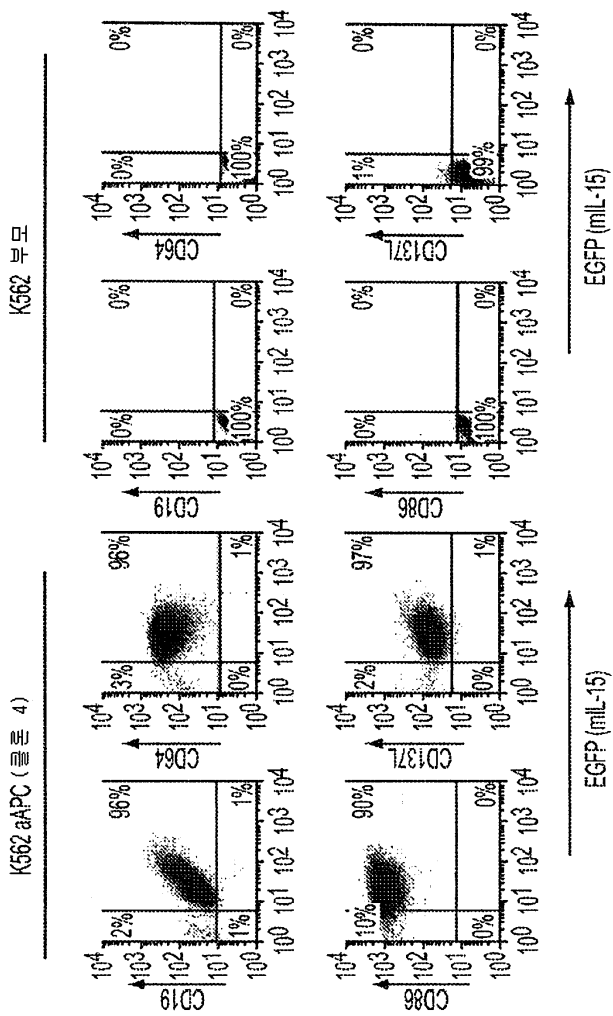
도면5a



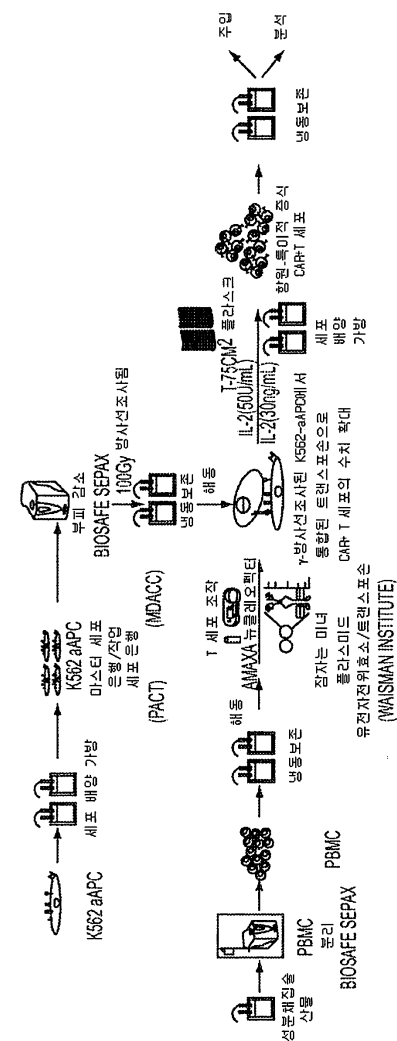
도면5b



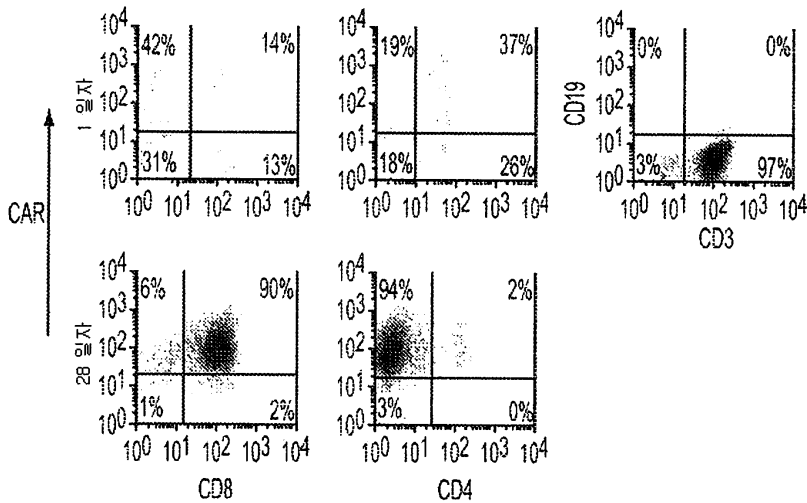
도면5c



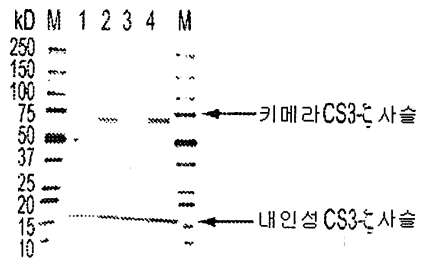
도면6



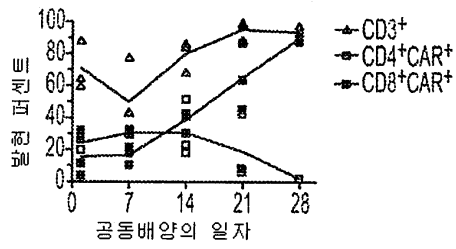
도면7a



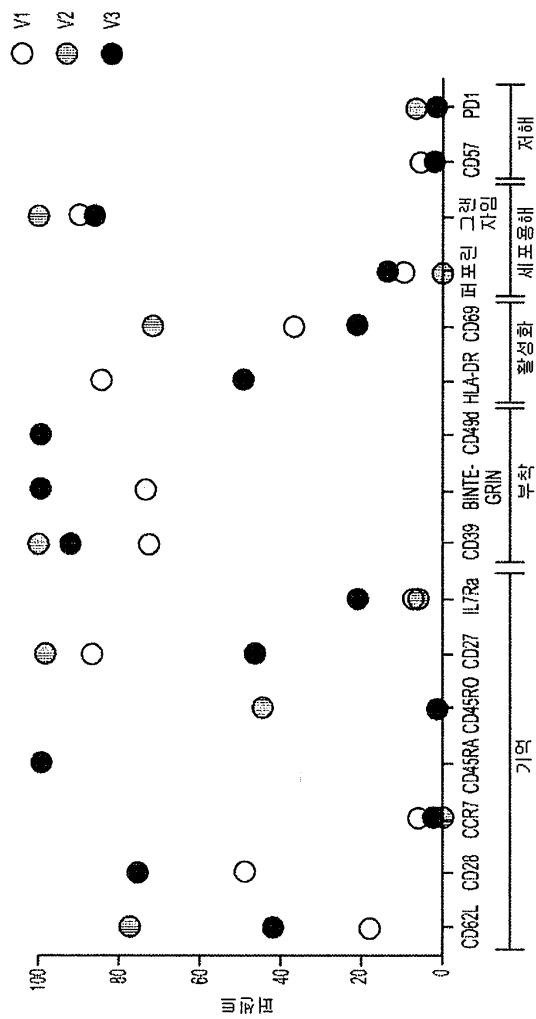
도면7b



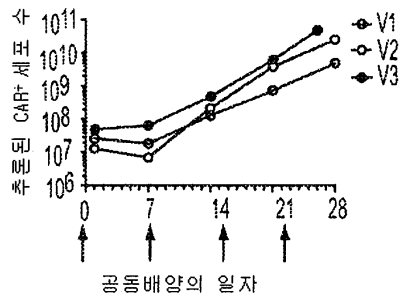
도면7c



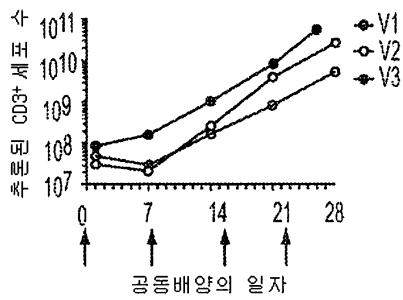
도면7d



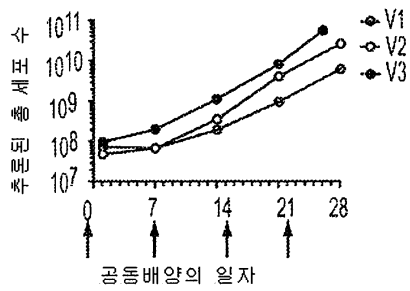
도면8a



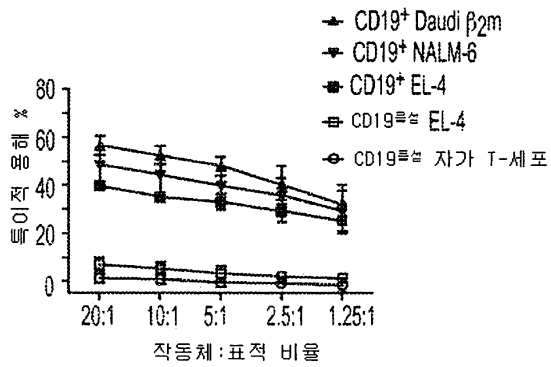
도면8b



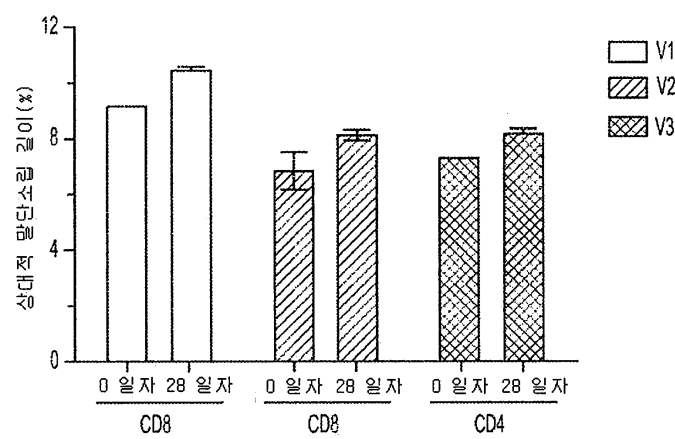
도면8c



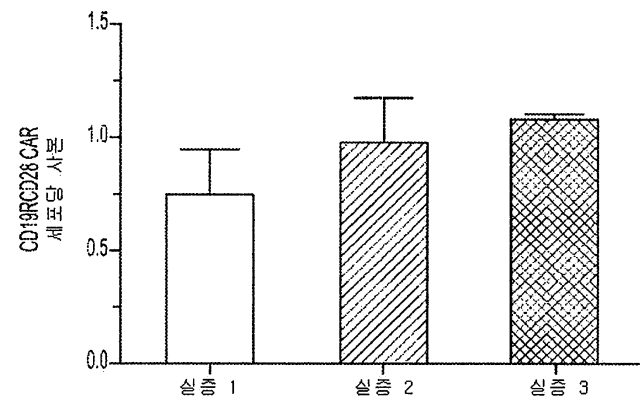
도면8d



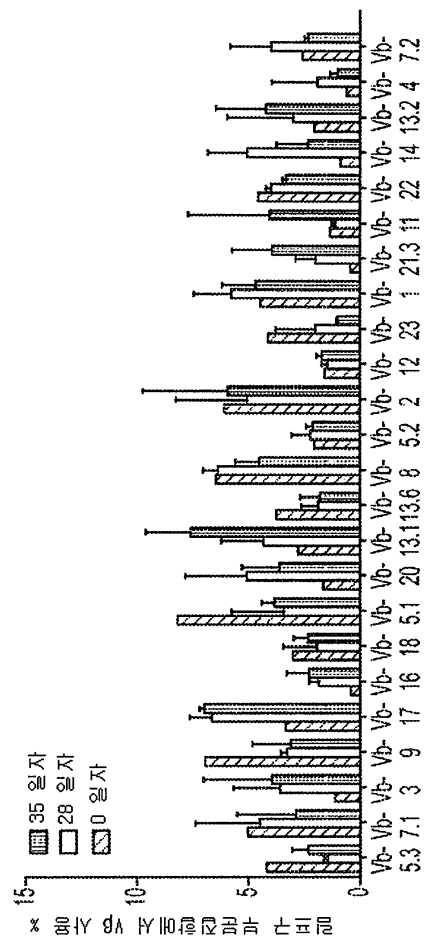
도면9a



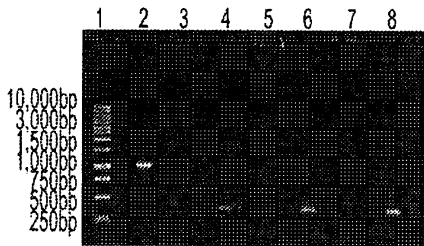
도면9b



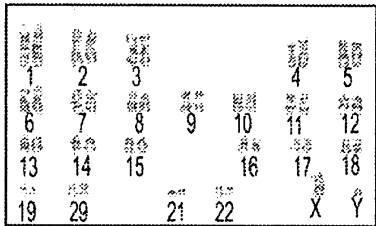
도면9c



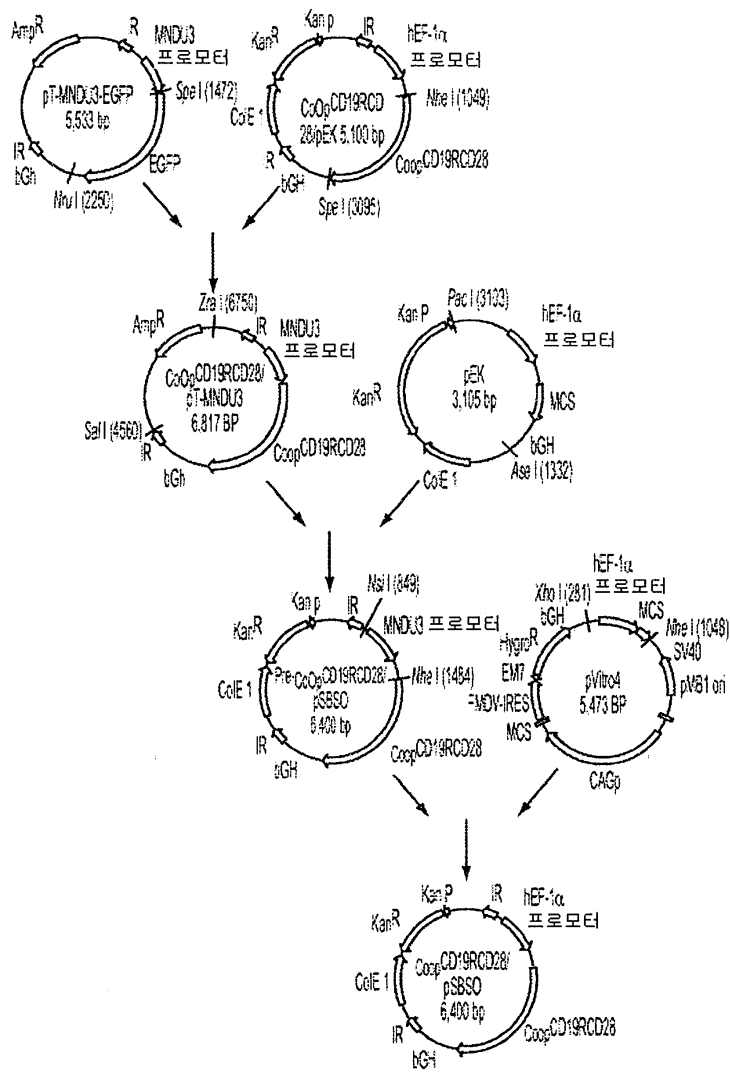
도면9d



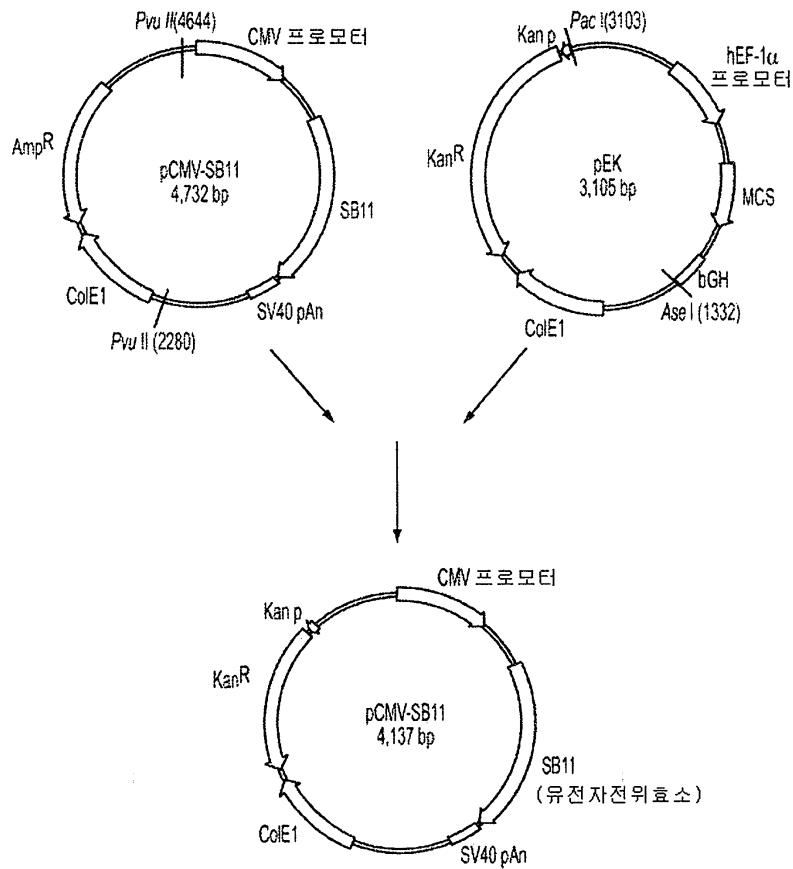
도면9e



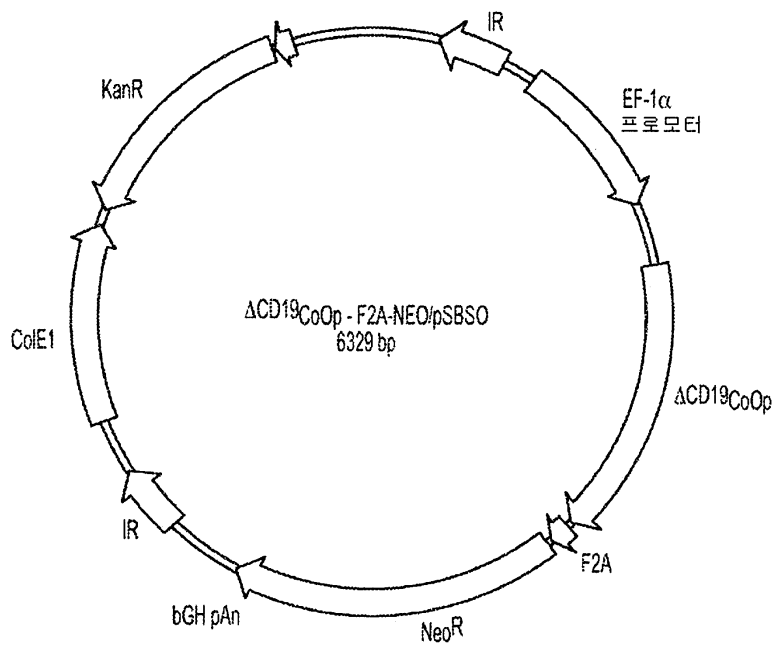
도면10



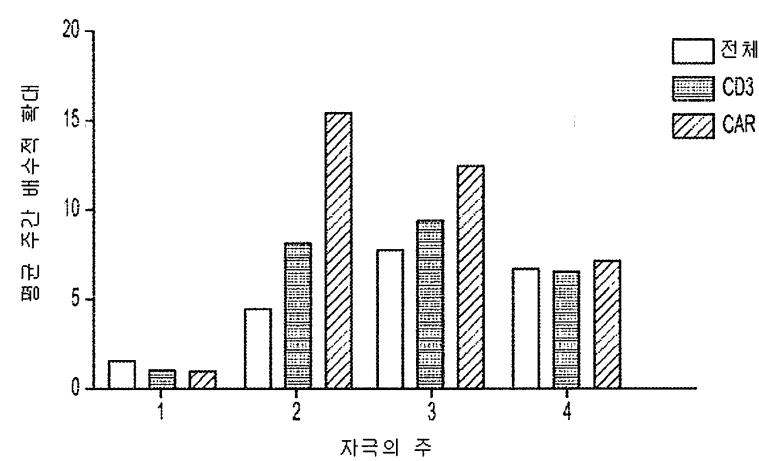
도면11



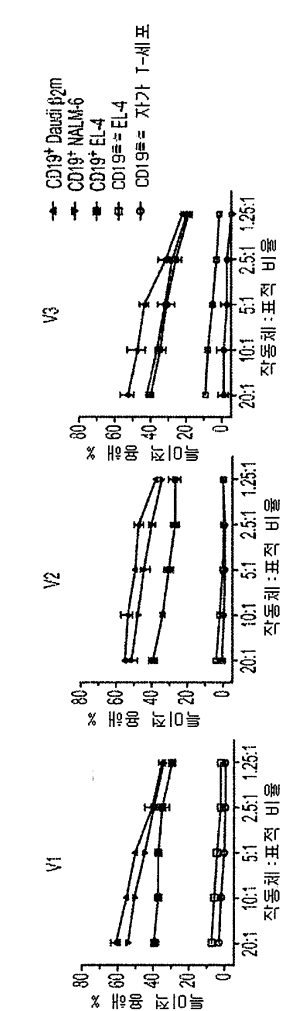
도면12



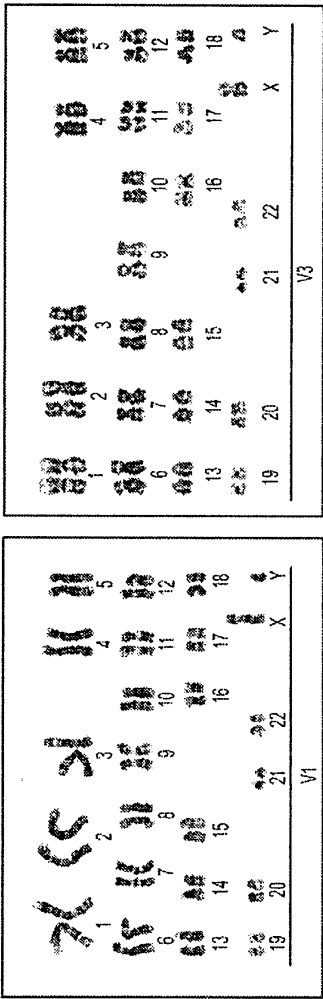
도면13



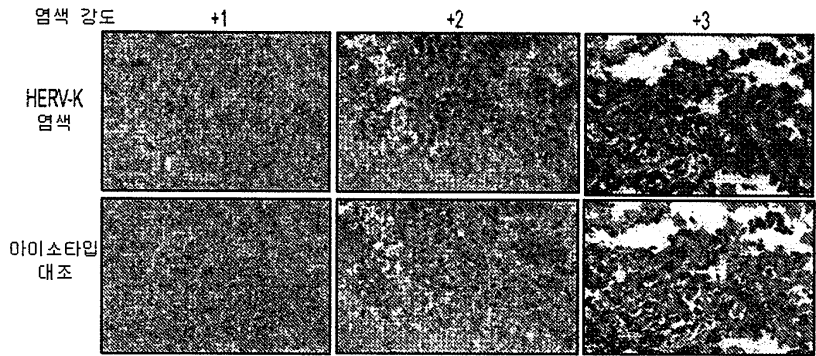
도면14



도면15



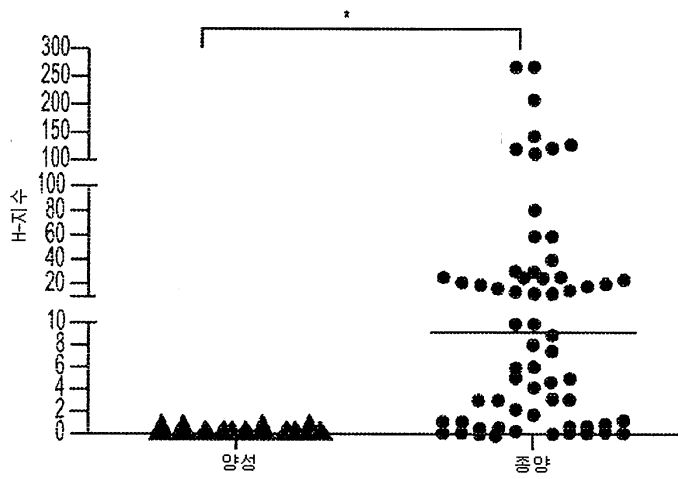
도면16a



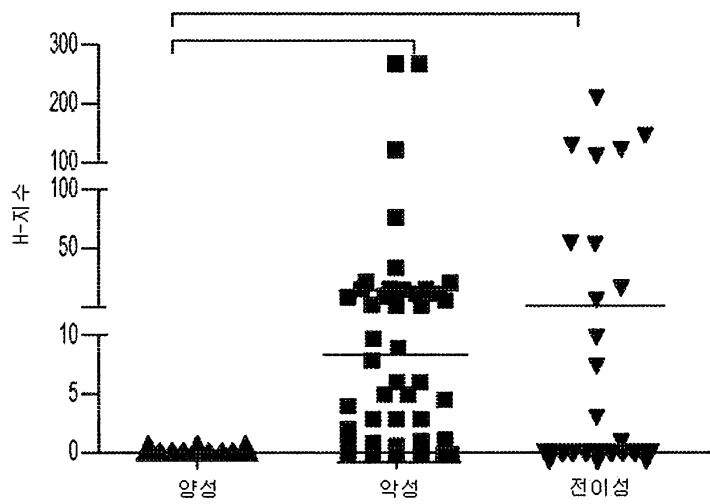
도면16b



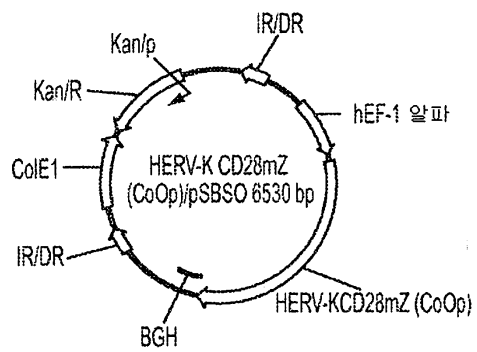
도면16c



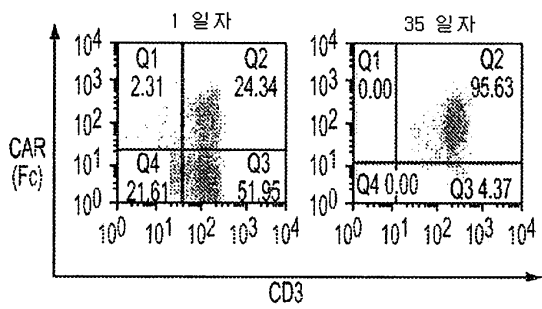
도면16d



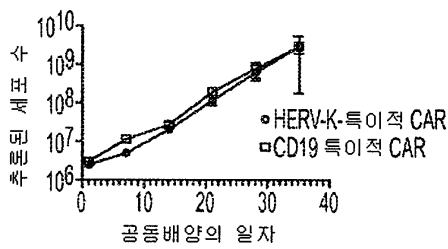
도면17a



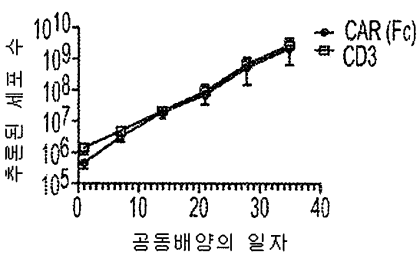
도면17b



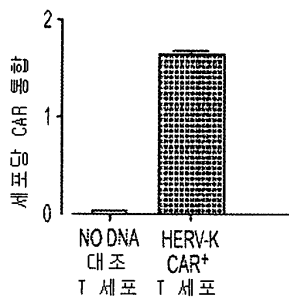
도면17c



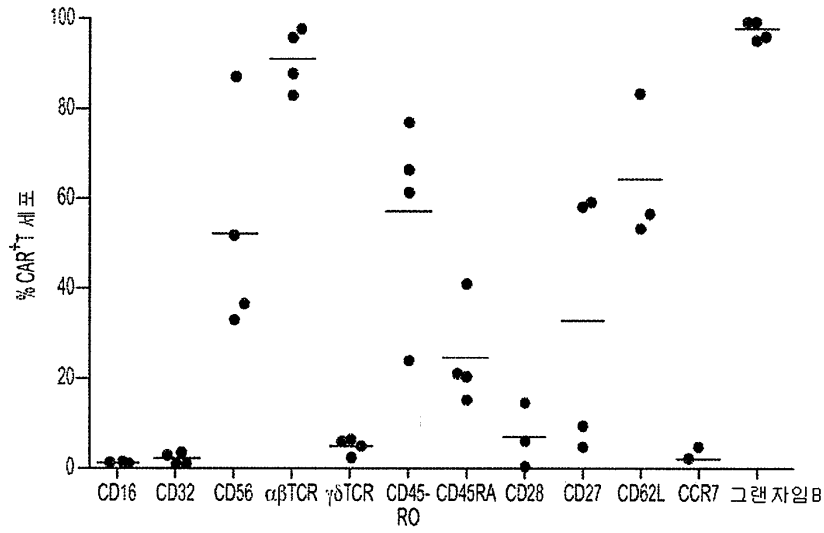
도면17d



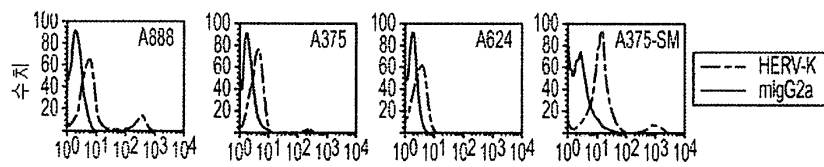
도면17e



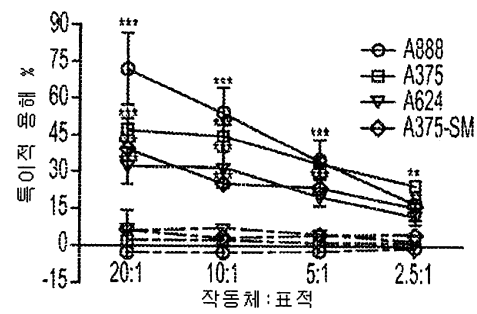
도면17f



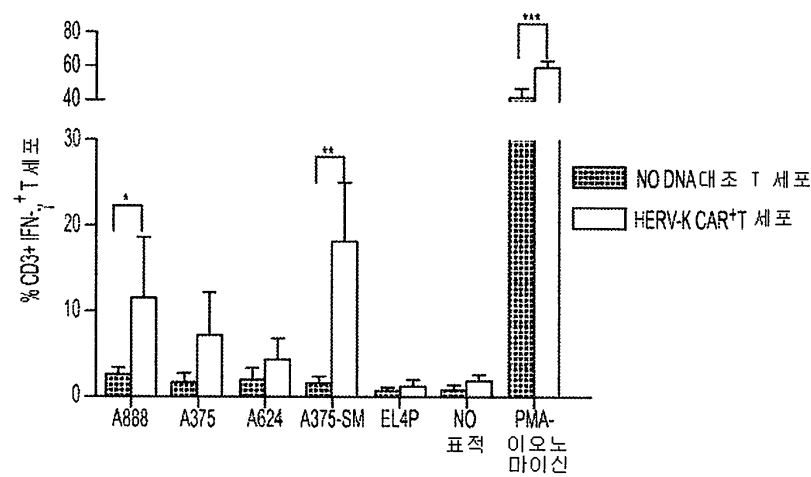
도면18a



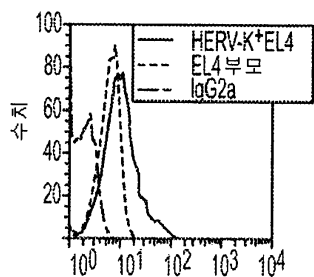
도면18b



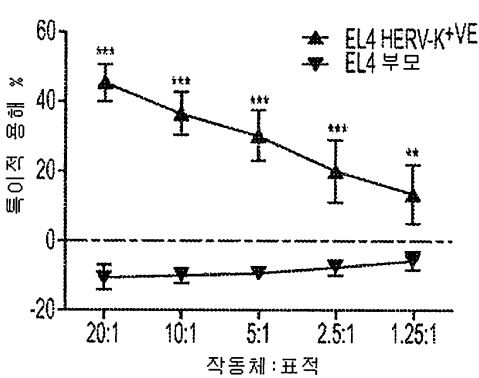
도면18c



도면19a



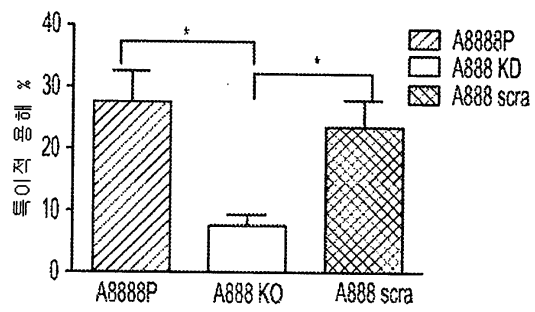
도면19b



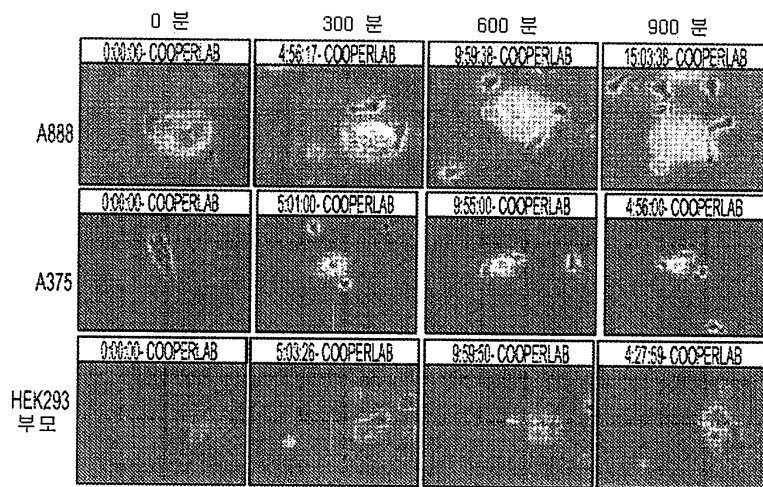
도면19c

A888	A888	A888	
부모	KD	스크램블된	
1.00	0.54	1.09	HERVK
1.00	0.96	0.91	액틴

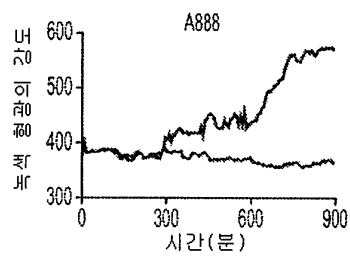
도면19d



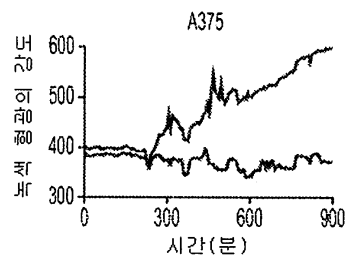
도면20a



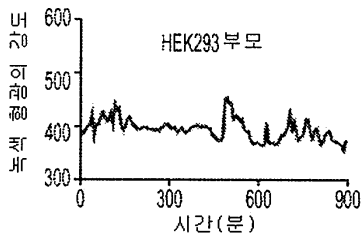
도면20b



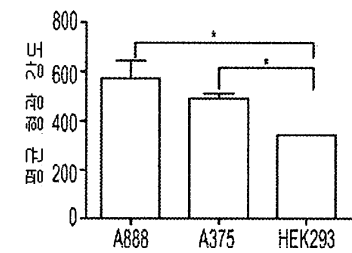
도면20c



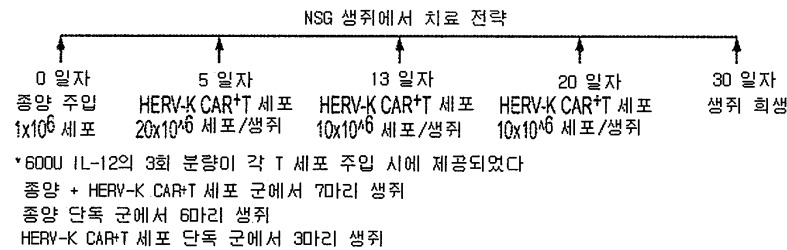
도면20d



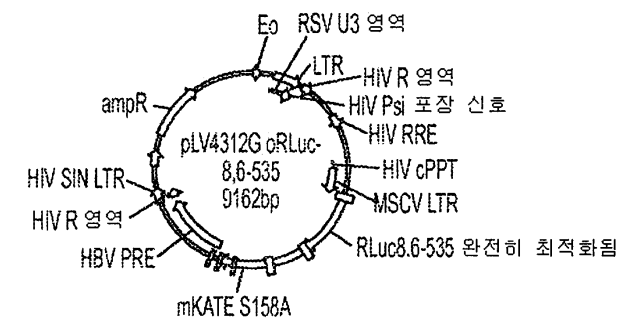
도면20e



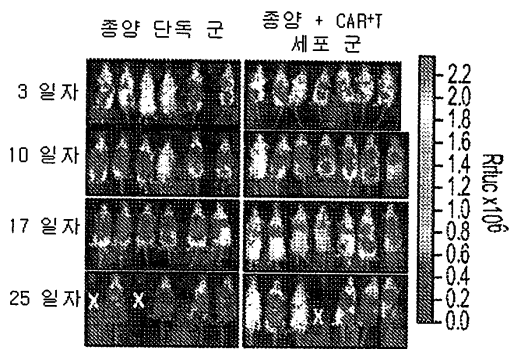
도면21a



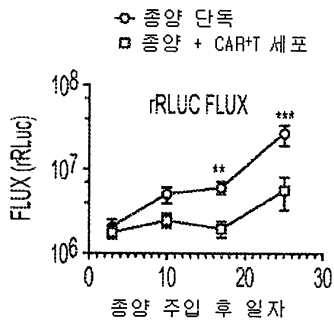
도면21b



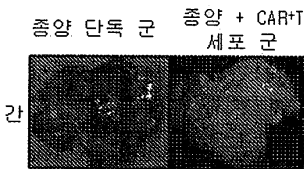
도면21c



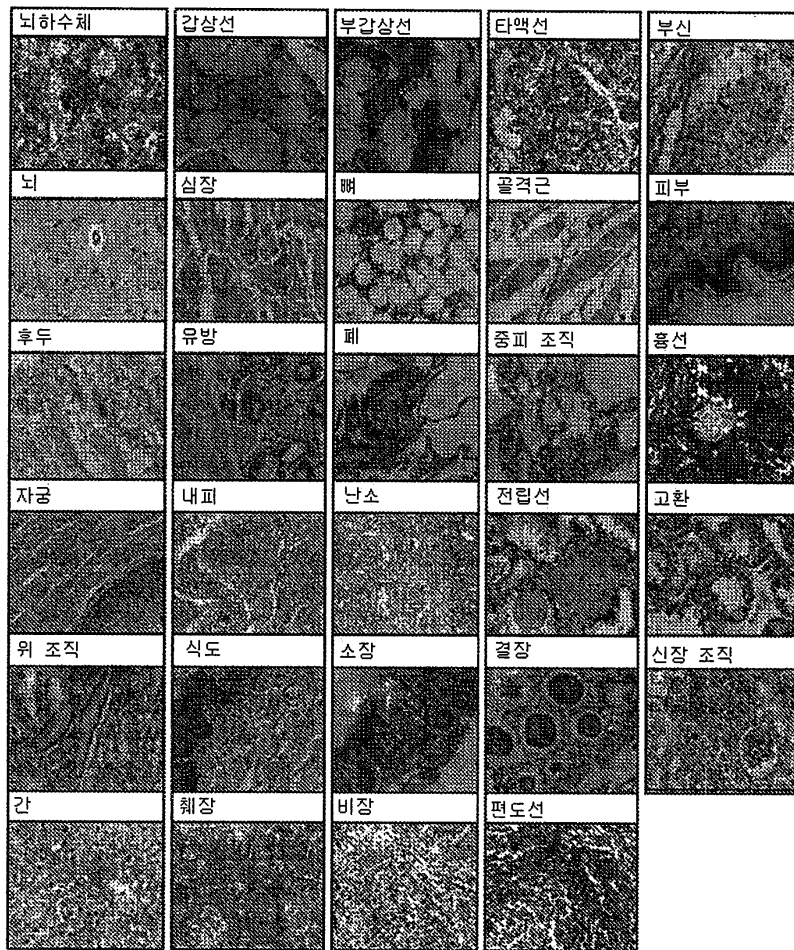
도면21d



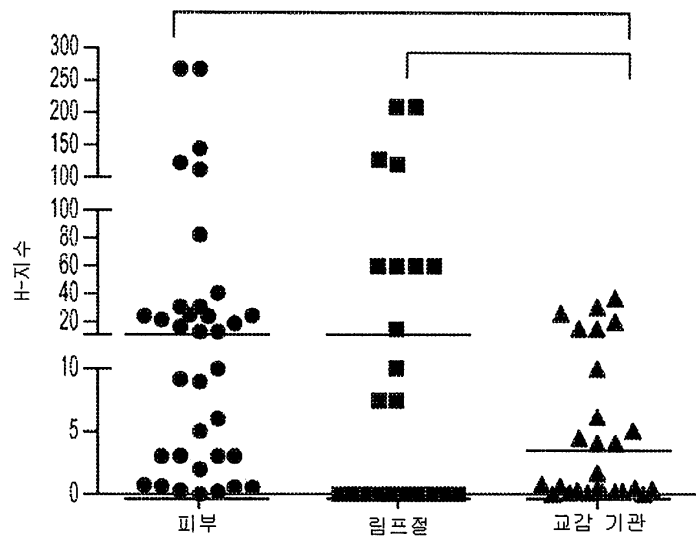
도면21e



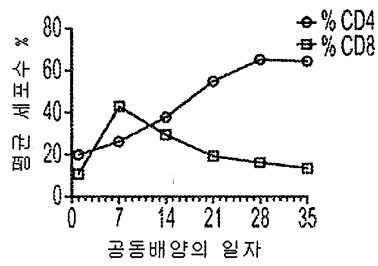
도면22a



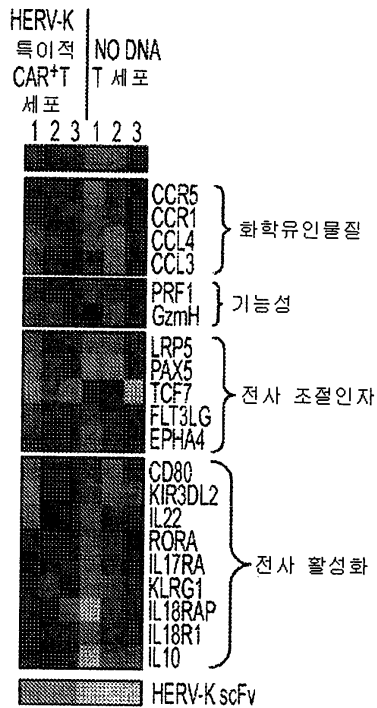
도면22b



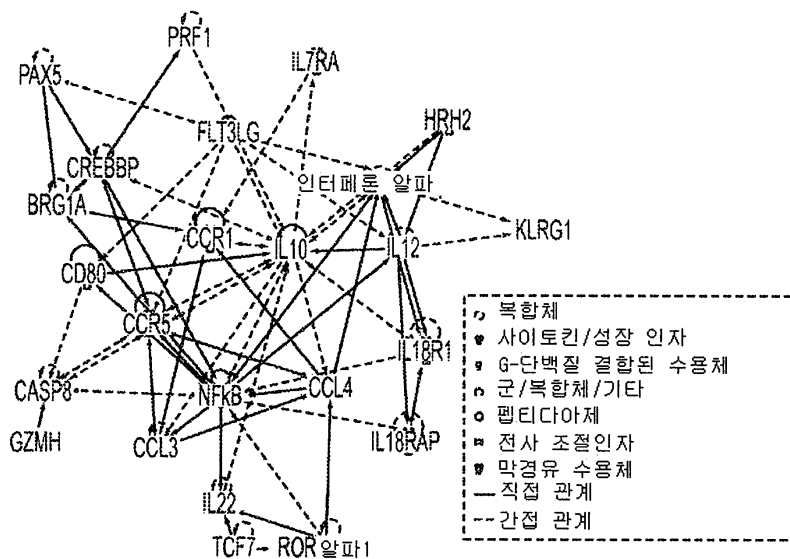
도면23a



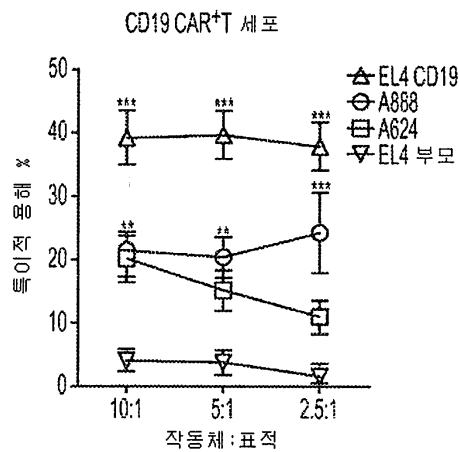
도면23b



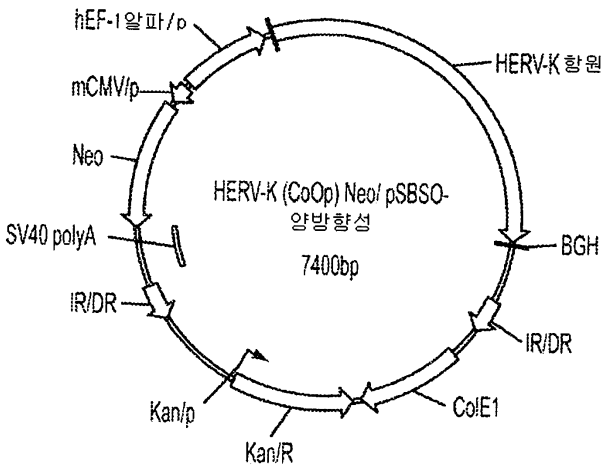
도면23c



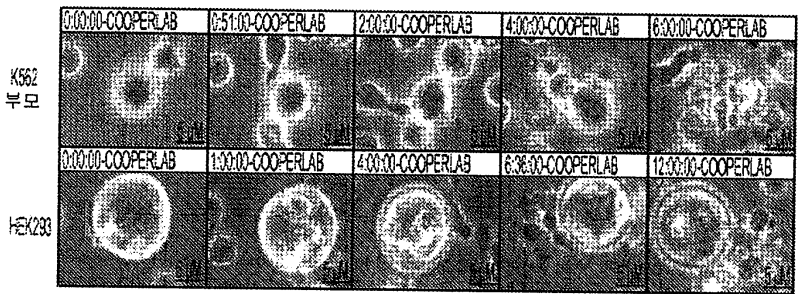
도면24



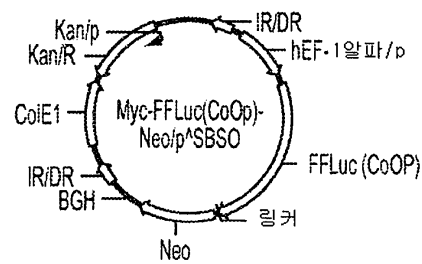
도면25



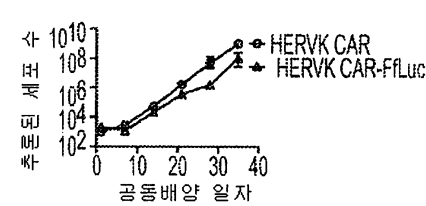
도면26



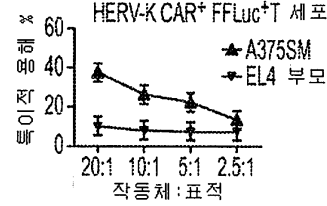
도면27a



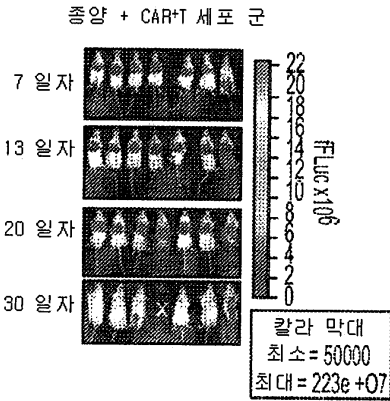
도면27b



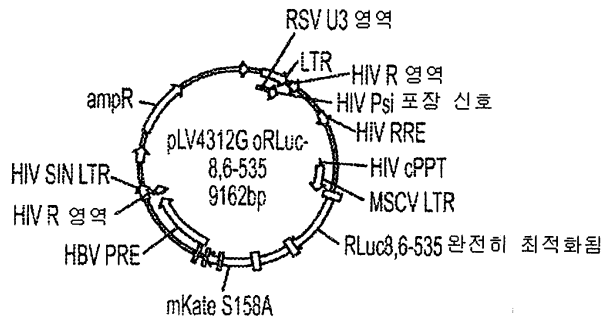
도면27c



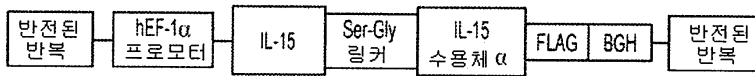
도면27d



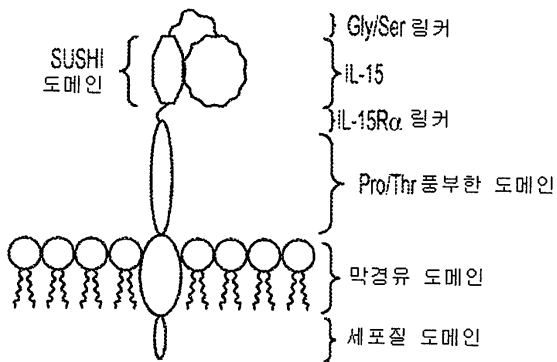
도면27e



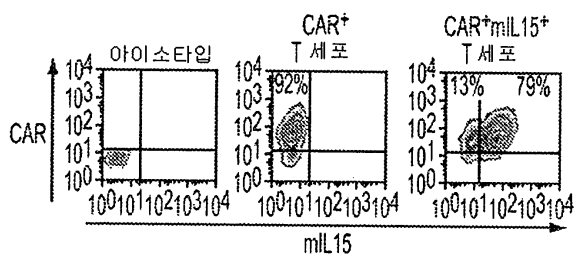
도면28a



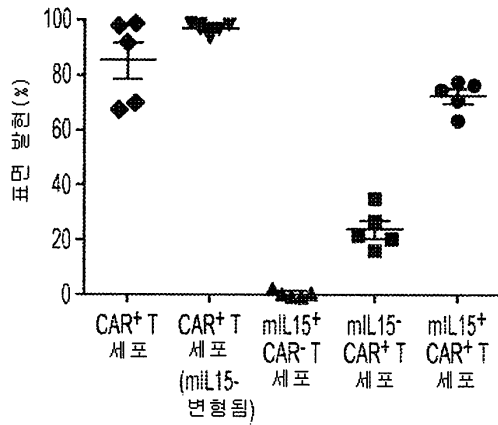
도면28b



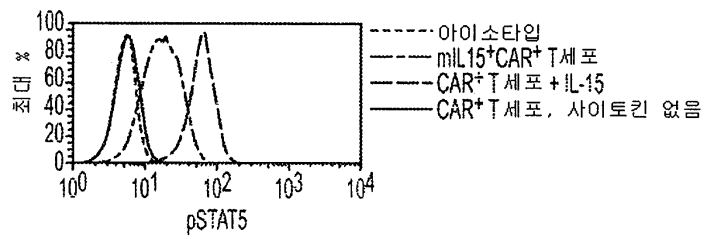
도면29a



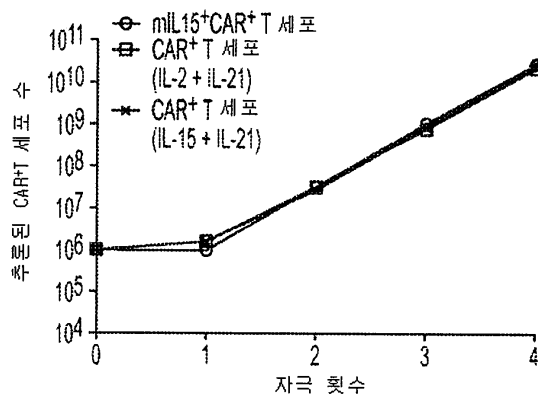
도면29b



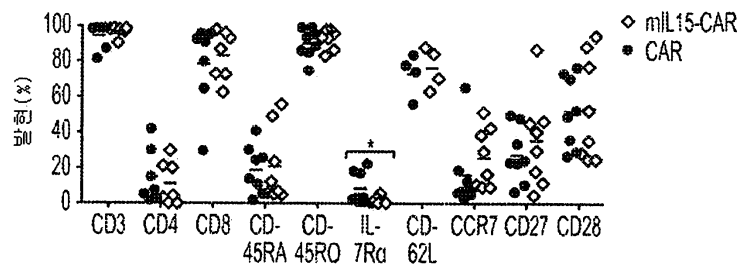
도면30



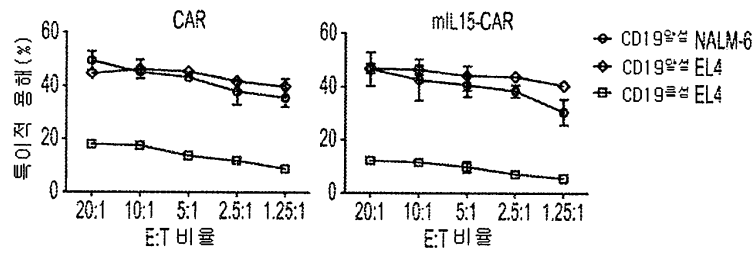
도면31



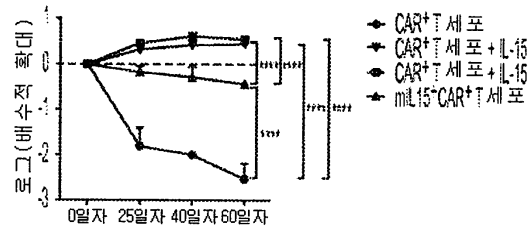
도면32a



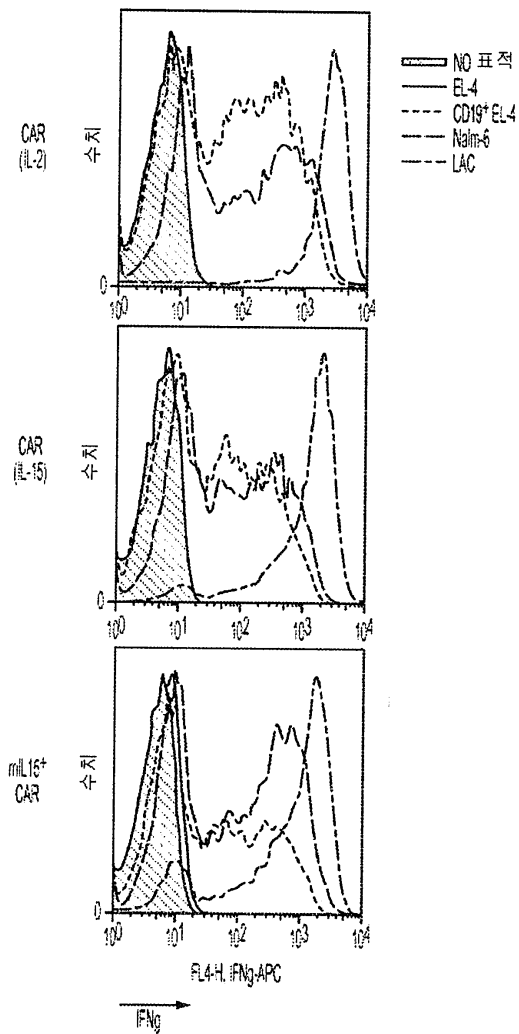
도면32b



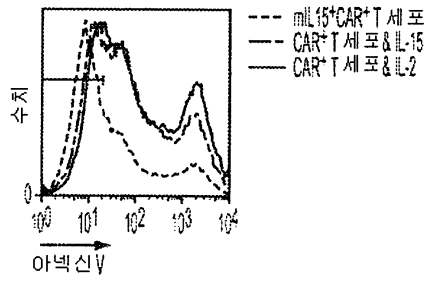
도면33a



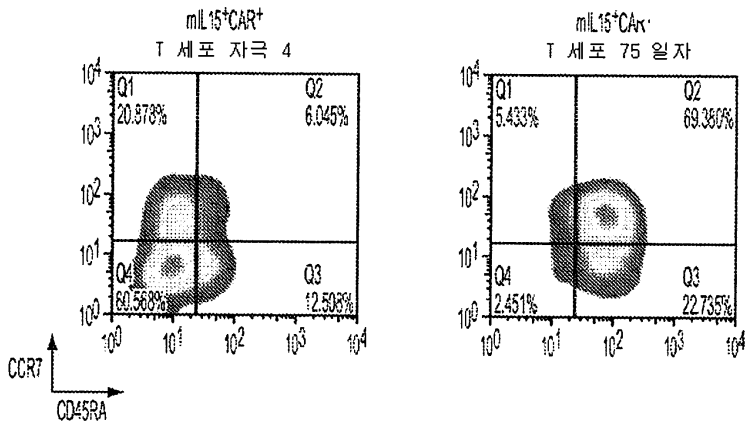
도면33b



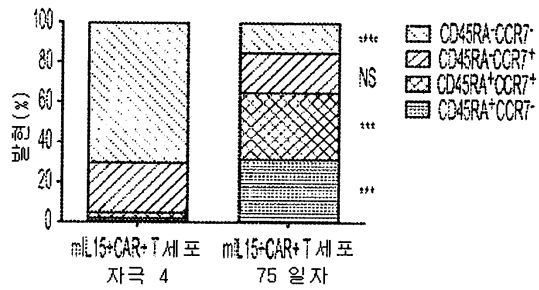
도면33c



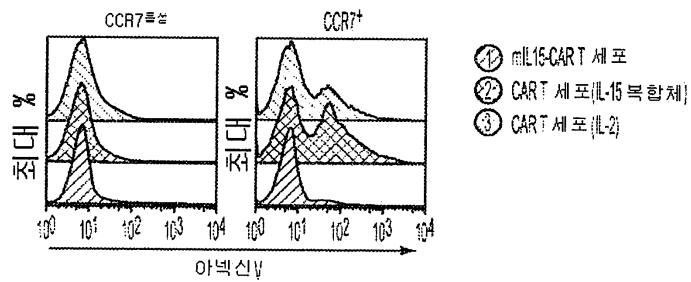
도면34a



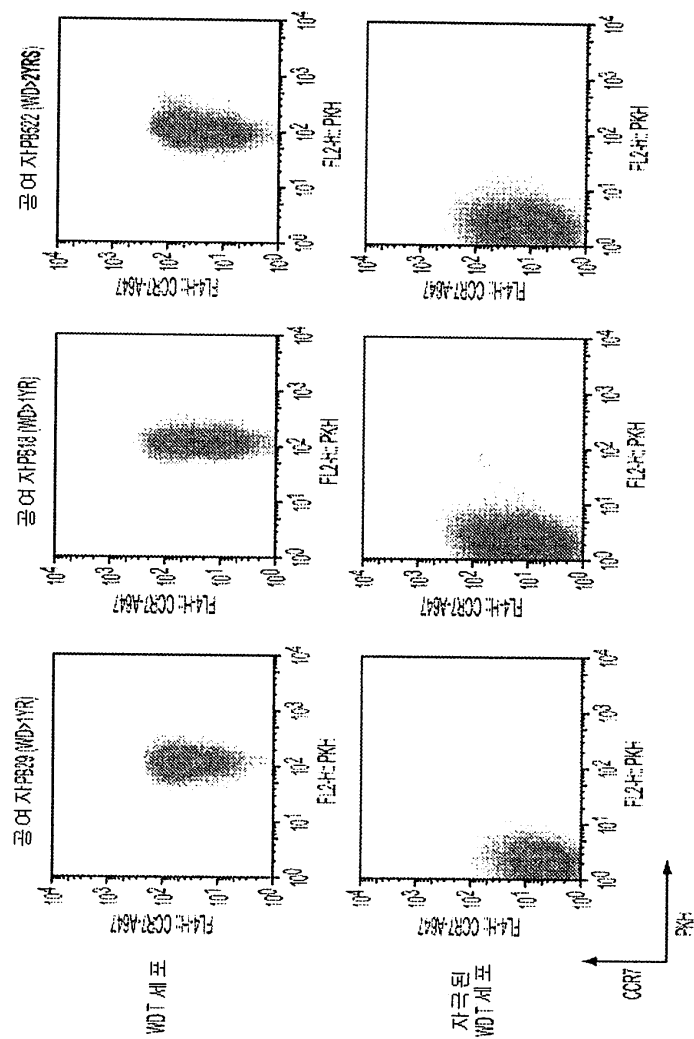
도면34b



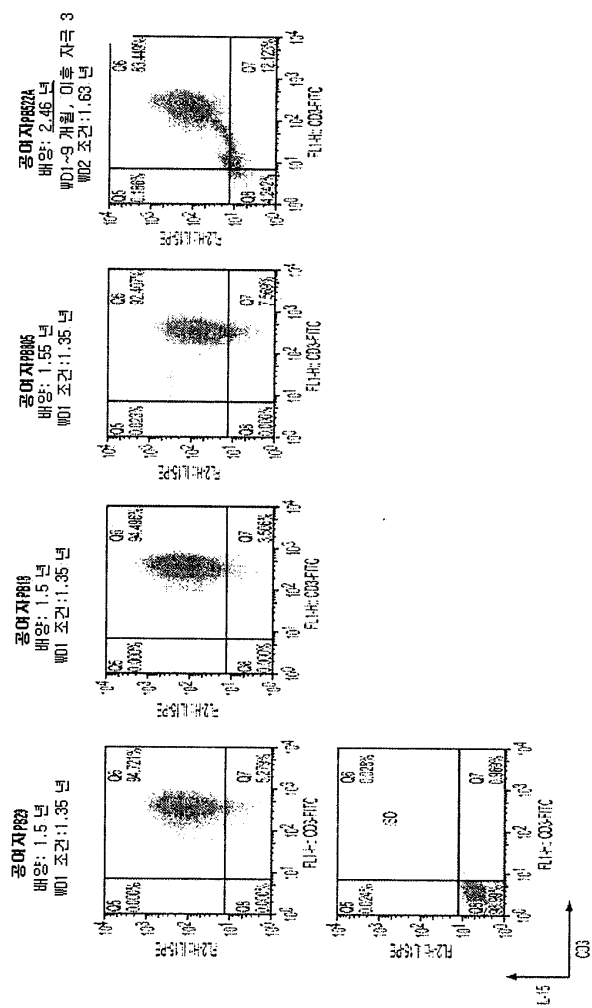
도면34c



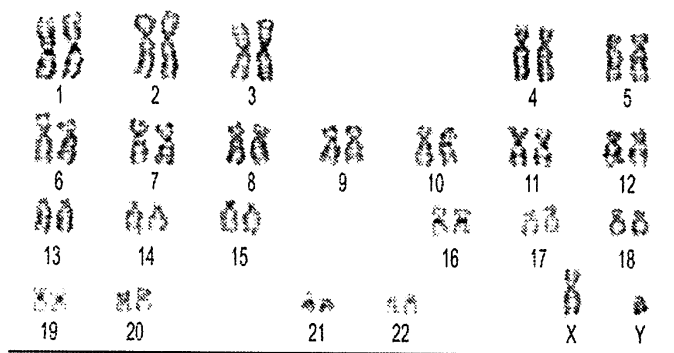
도면35a



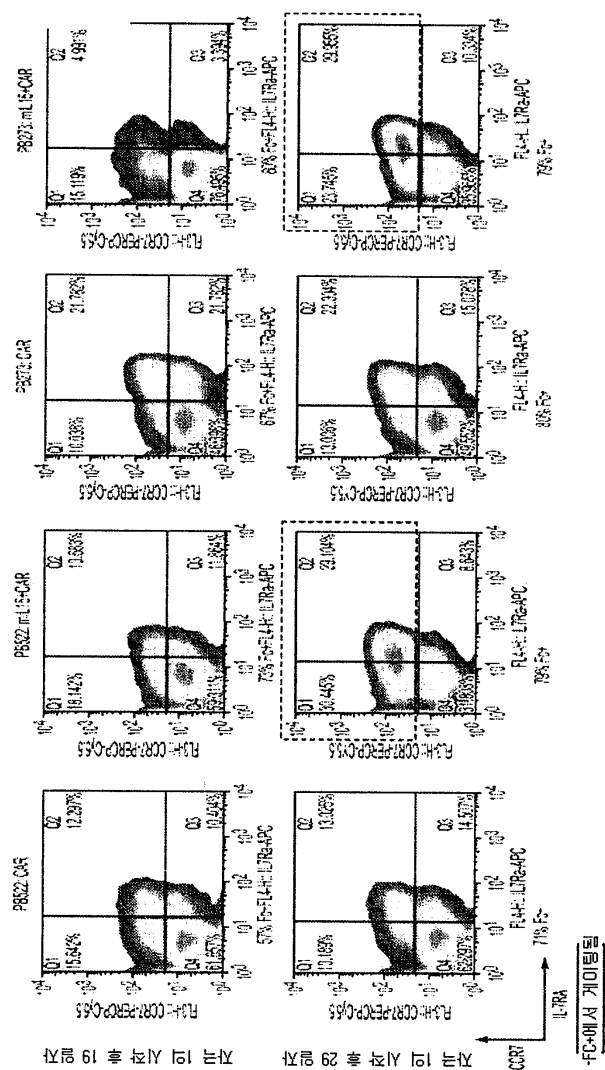
도면35b



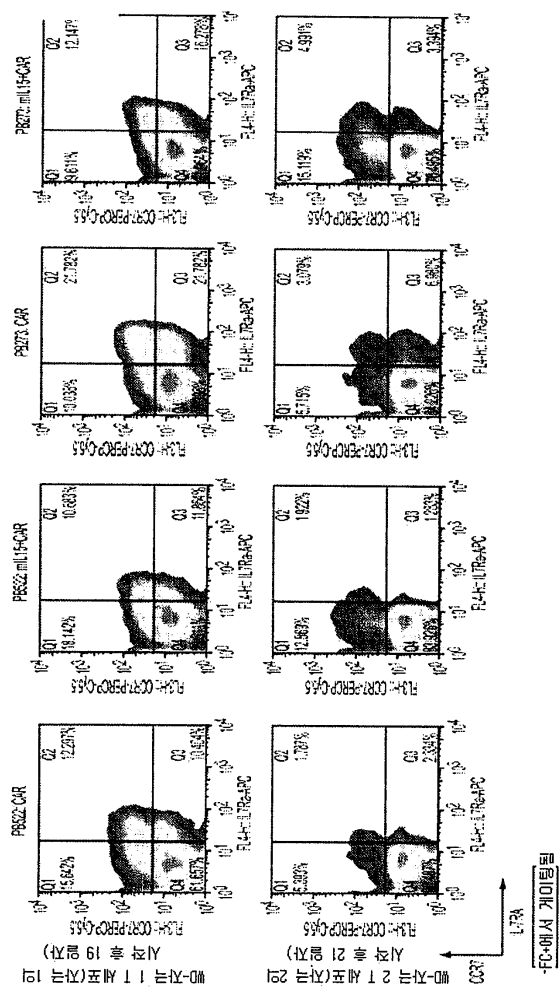
도면35c



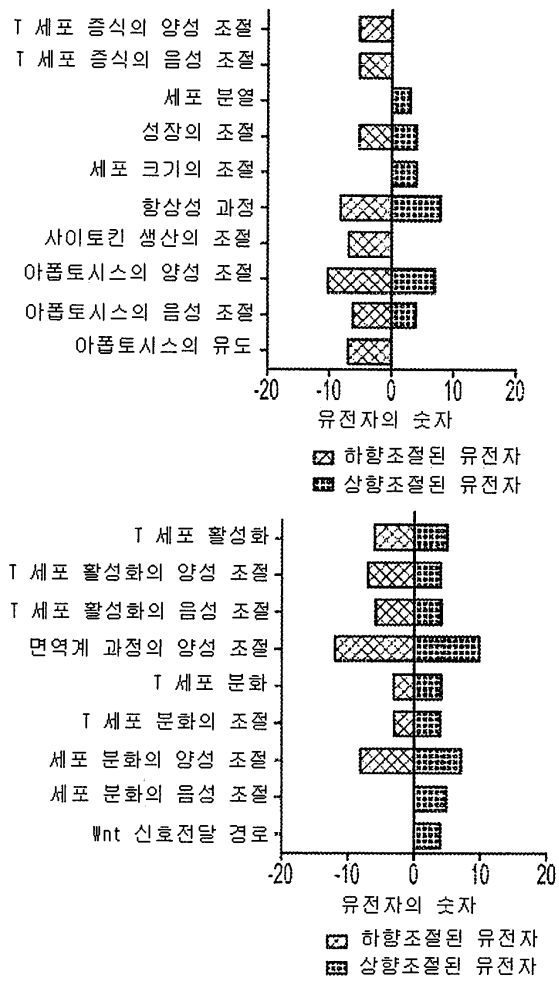
도면35d



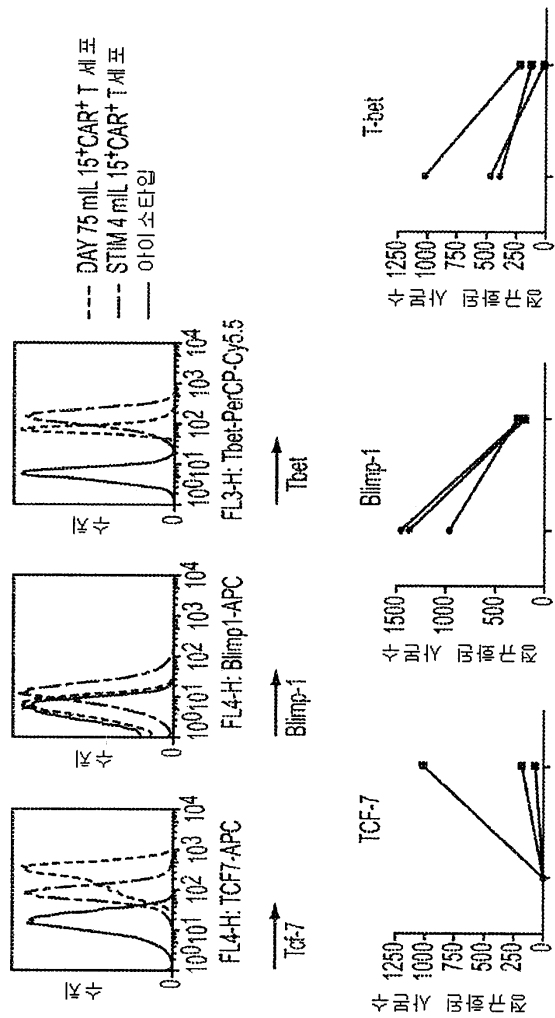
도면35e



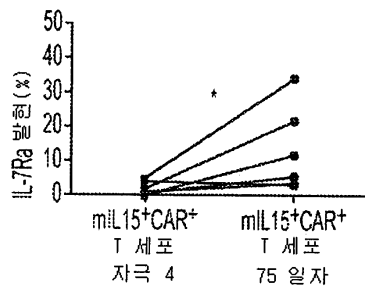
도면36



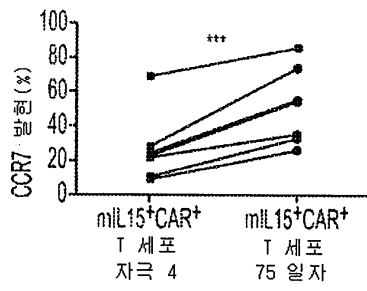
도면37



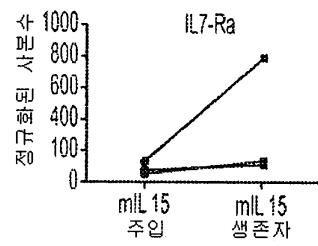
도면38a



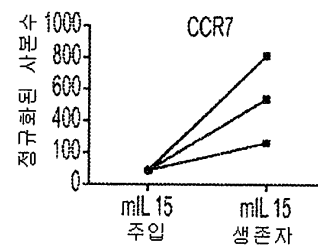
도면38b



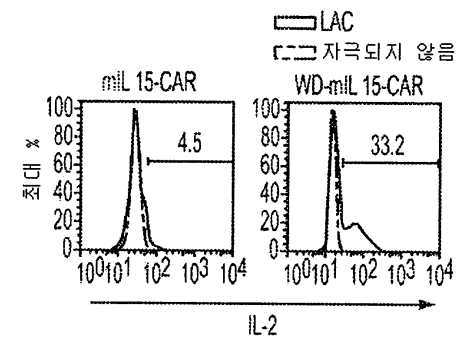
도면38c



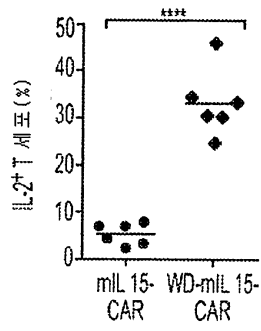
도면38d



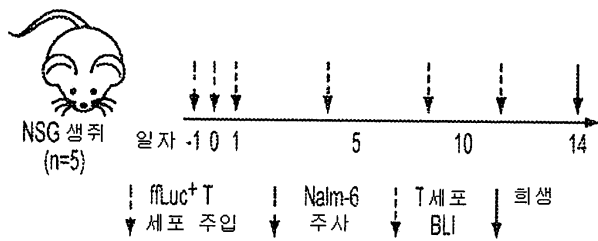
도면39a



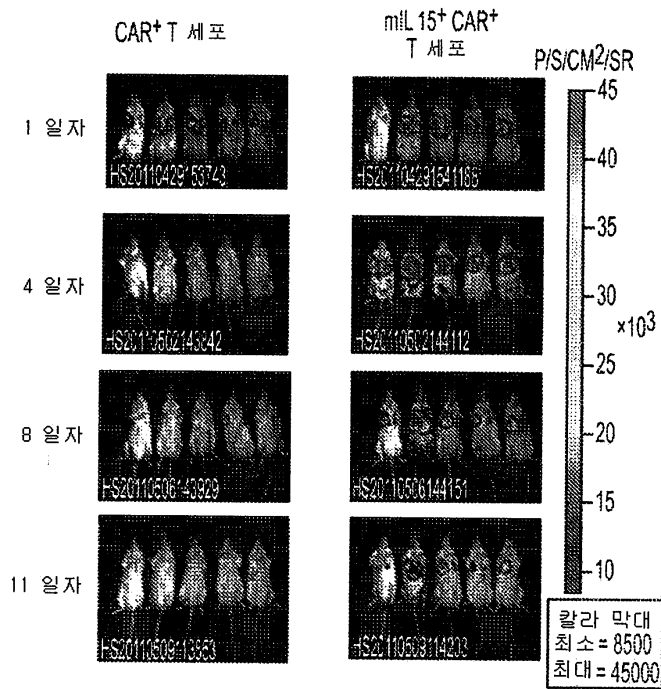
도면39b



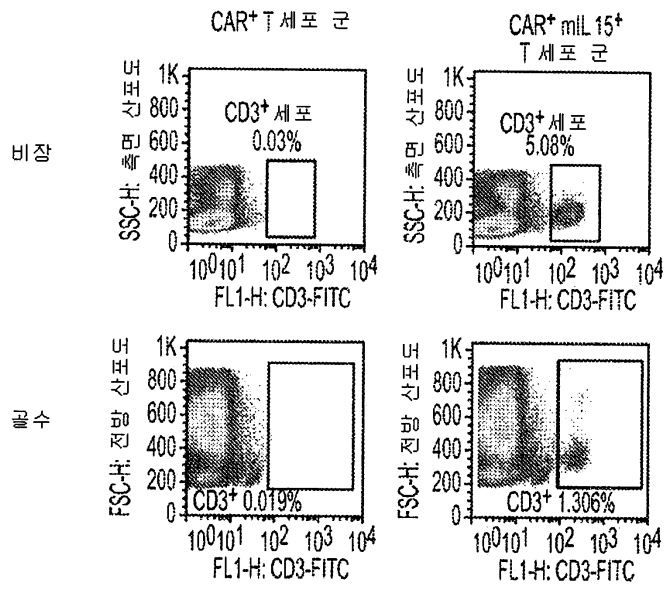
도면40a



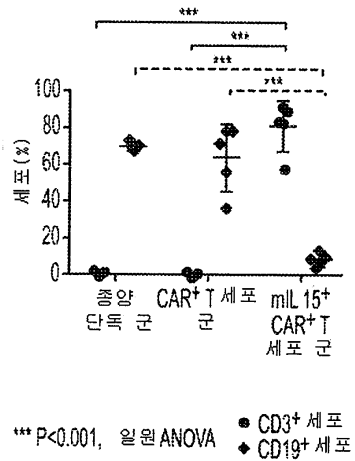
도면40b



도면40c

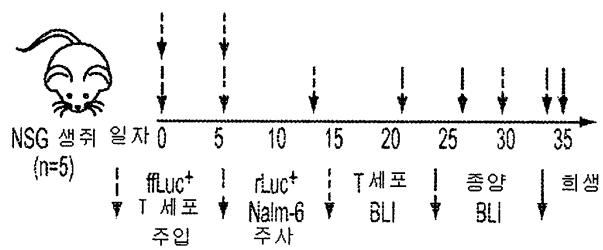


도면40d

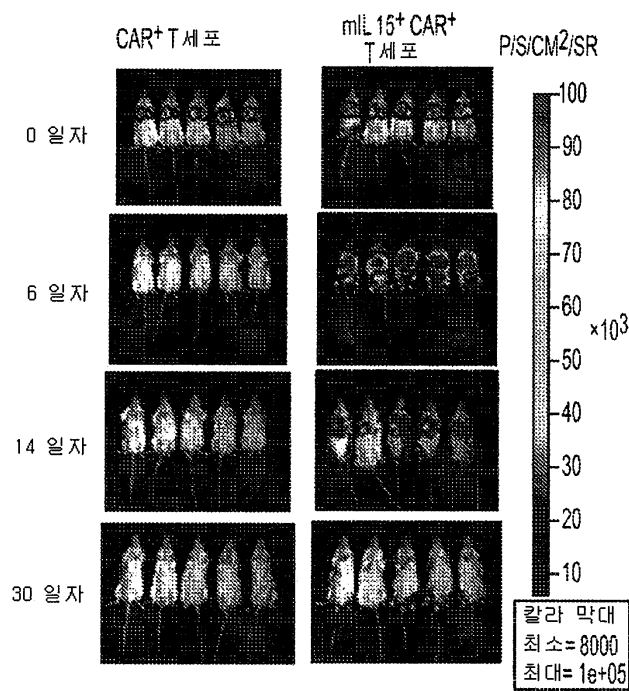


*** P<0.001, 일원 ANOVA
● CD3⁺ 세포
◆ CD19⁺ 세포

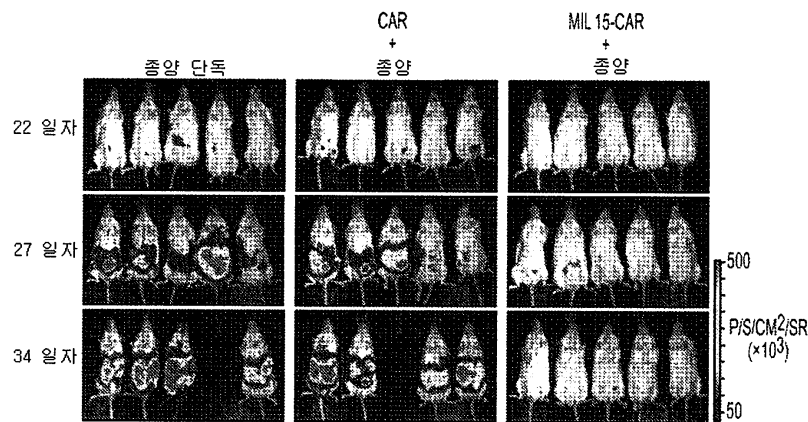
도면41a



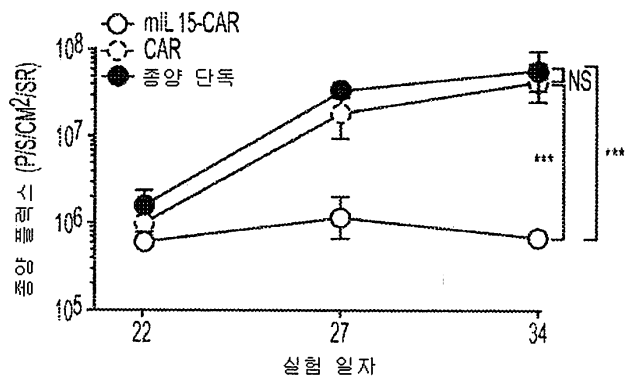
도면41b



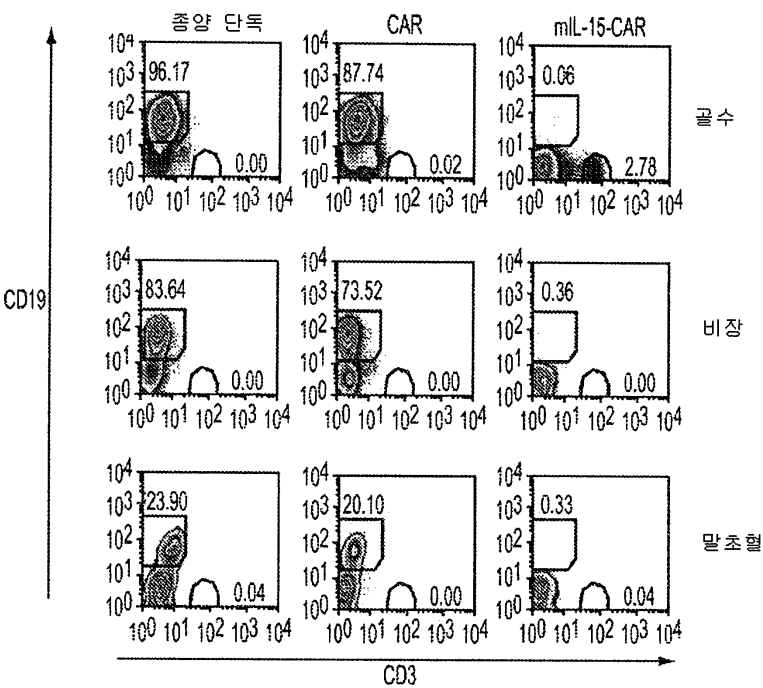
도면41c



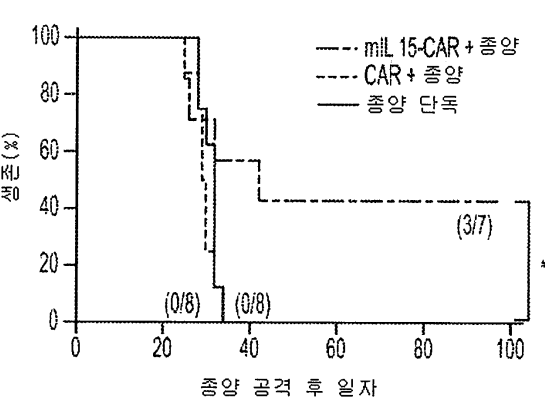
도면41d



도면41e



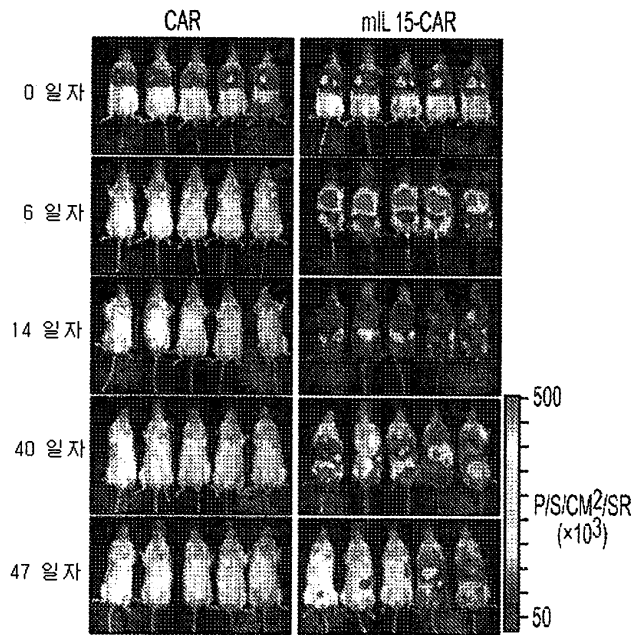
도면41f



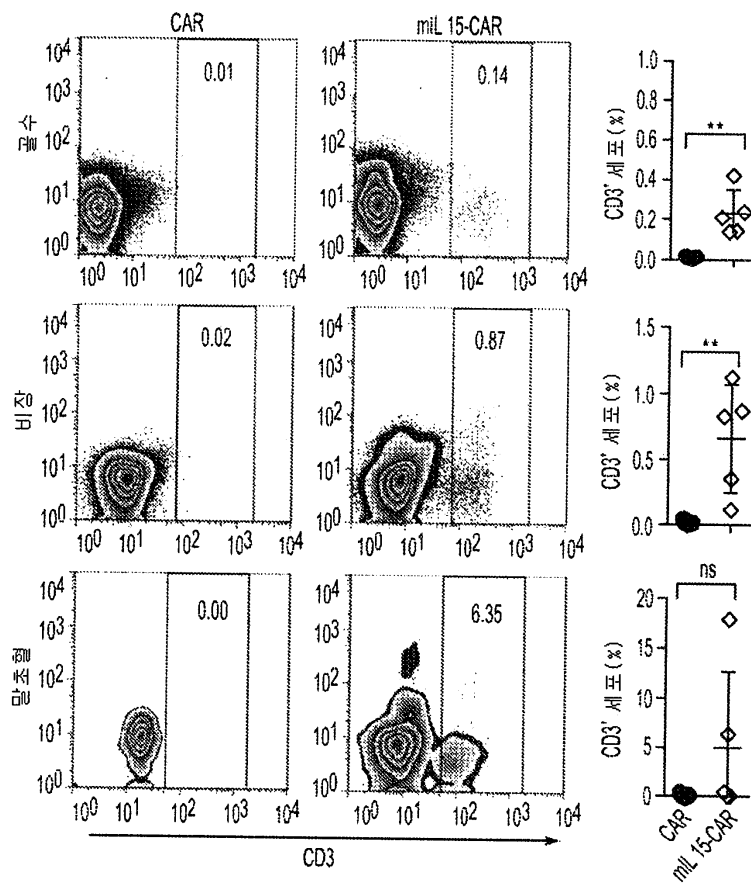
도면42a



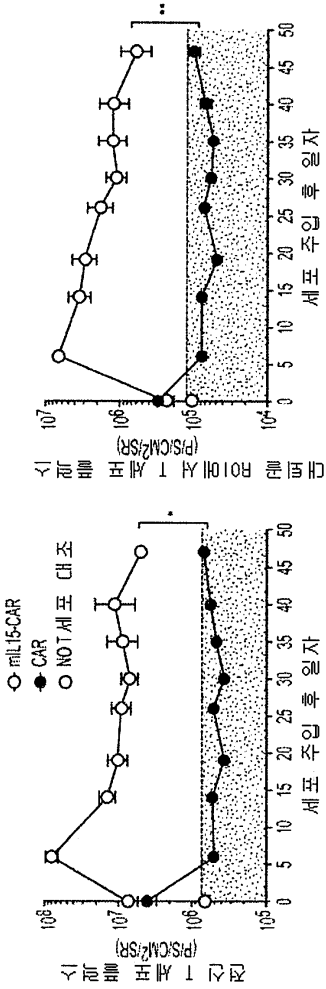
도면42b



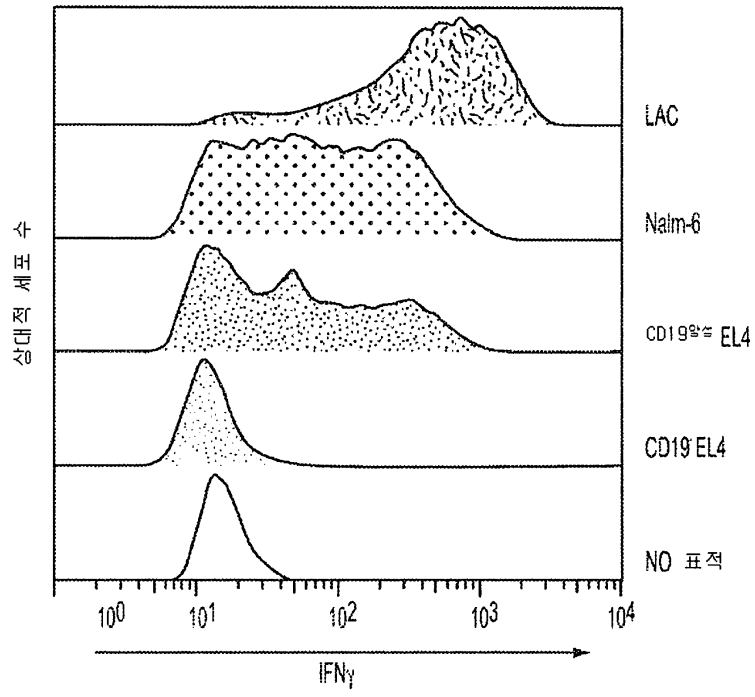
도면42c



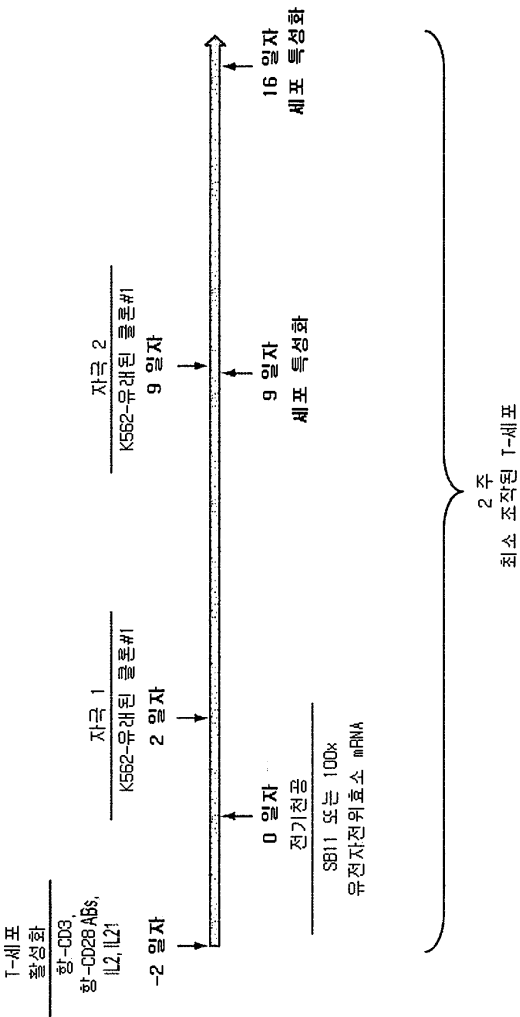
도면42d



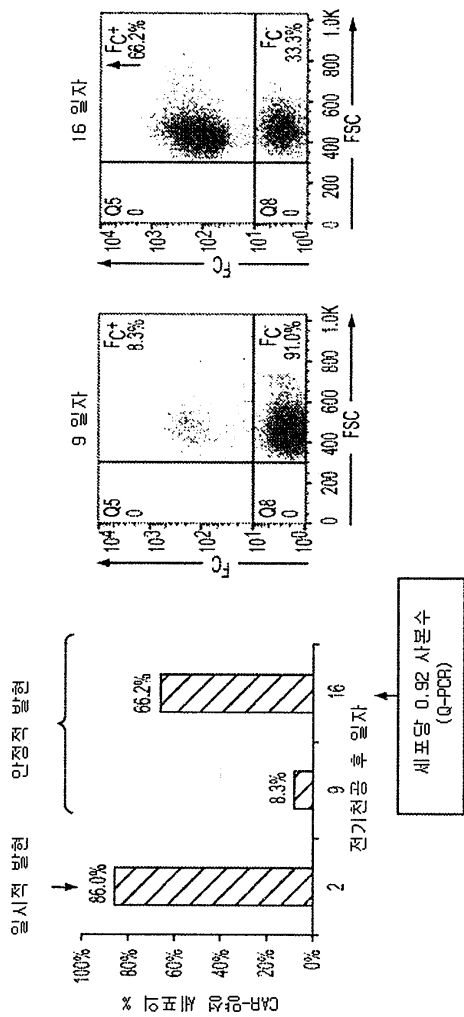
도면42e



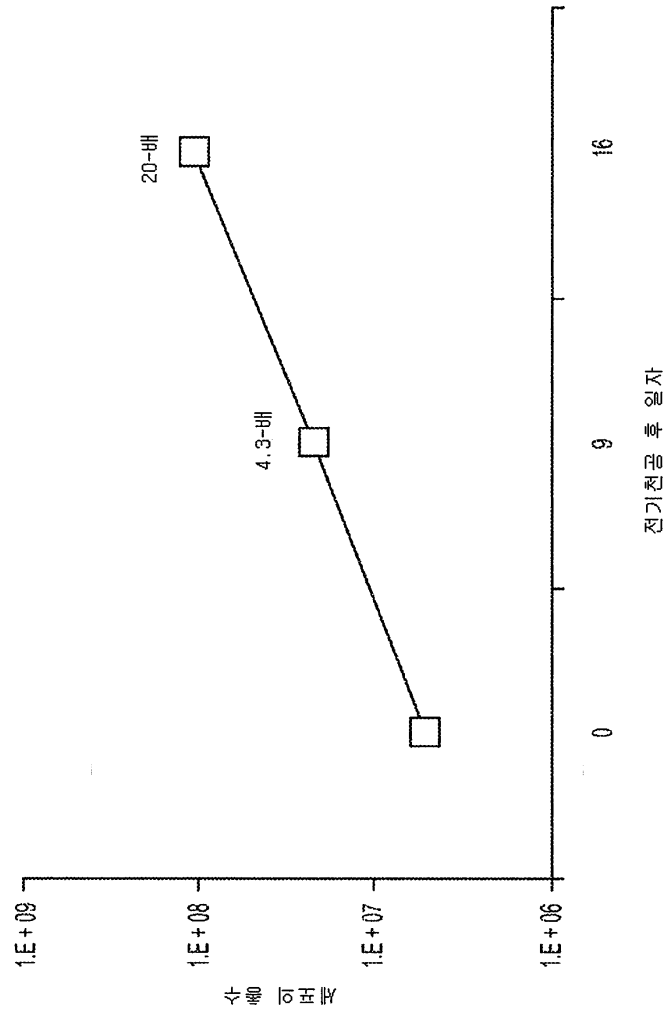
도면43



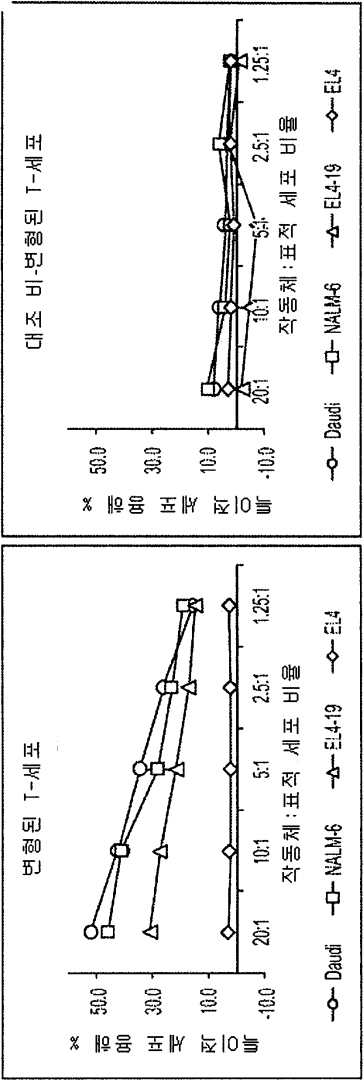
도면44a



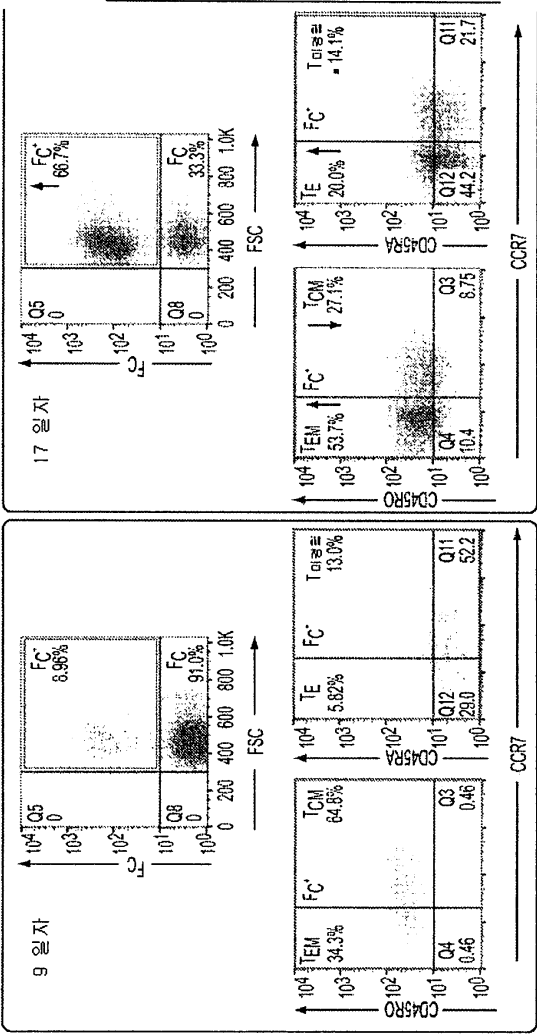
도면44b



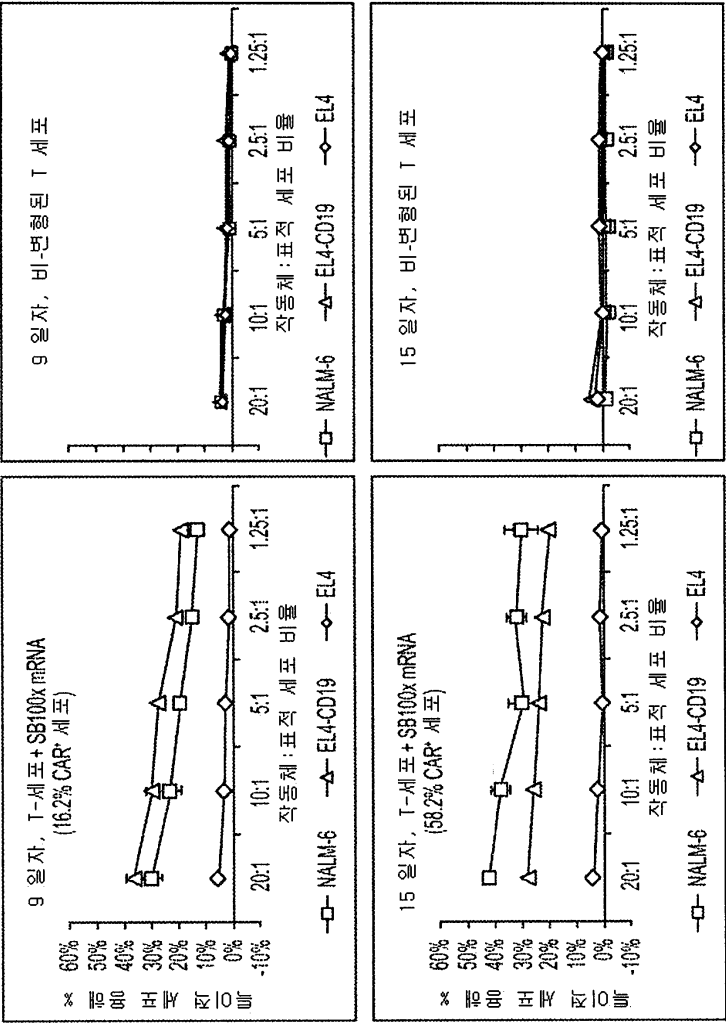
도면44c



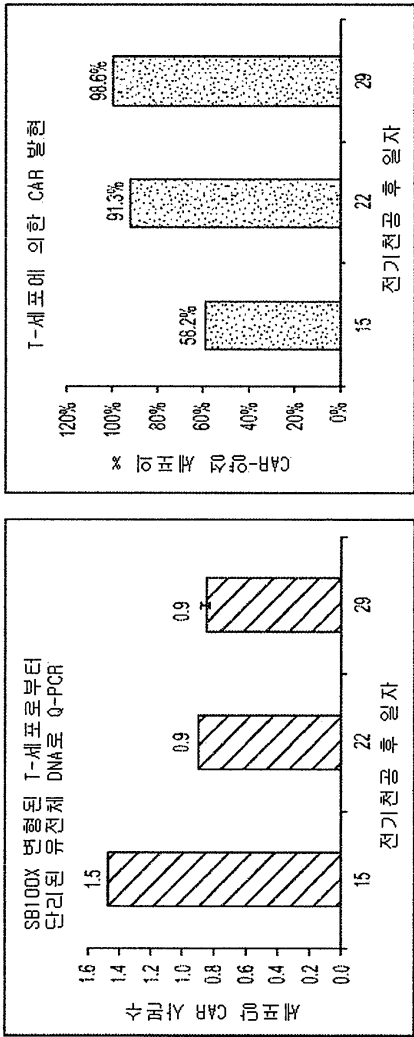
도면44d



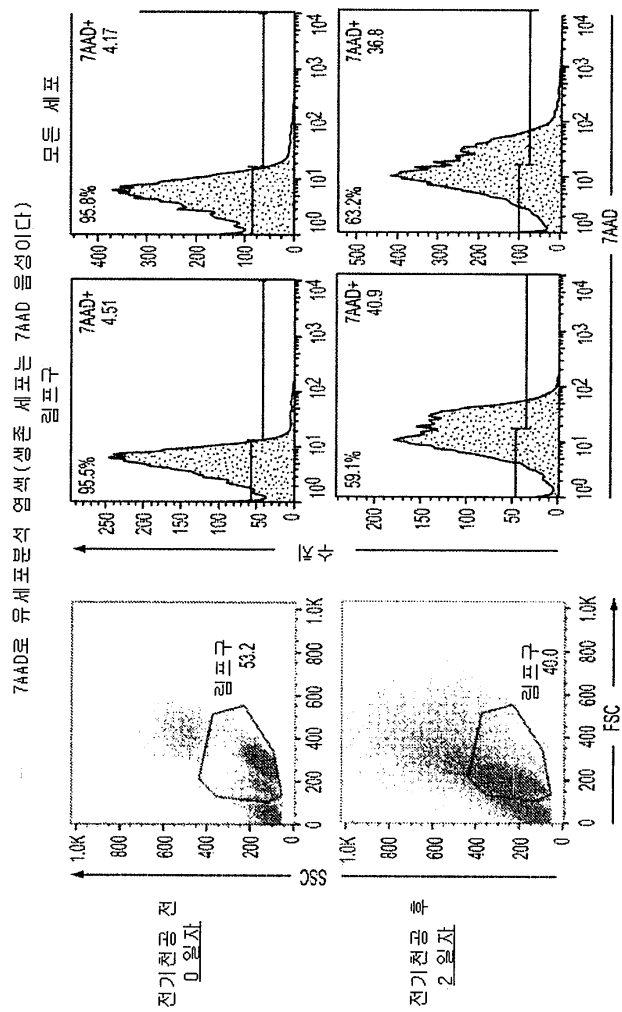
도면45a



도면45b



도면46



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM

<120> HUMAN APPLICATION OF ENGINEERED CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR (CAR) T-CELLS

<130> UTFC.P1222W0

<150> US 61/823,253

<151> 2013-05-14

<160> 17

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 711

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> fusion protein

<400> 1

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

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

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

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

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

His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Gly Ser Gly Thr
85 90 95

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

Tyr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly
115 120 125

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Ile Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys
130 135 140

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

Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Val Thr
165 170 175

Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser Trp
180 185 190

Ile Arg Gln Pro Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile
195 200 205

Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ser Ala Leu Lys Ser Arg
210 215 220

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

225 230 235 240
 Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys
 245 250 255
 His Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 260 265 270

 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Glu Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
 275 280 285
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Ser Val
 290 295 300
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 305 310 315 320
 Pro Glu Val Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 325 330 335

 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 340 345 350
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Thr Tyr Arg
 355 360 365
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 370 375 380
 Glu Tyr Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
 385 390 395 400

 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 405 410 415
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Thr Lys Asn Gln
 420 425 430
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 435 440 445
 Val Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 450 455 460

 Thr Pro Pro Val Leu Asp Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 465 470 475 480

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Glu Gly Asn Val Phe
485 490 495

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
500 505 510

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Met Phe Trp Val Leu Val Val
515 520 525

Val Gly Gly Val Leu Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala
530 535 540

Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Arg Ser Arg Gly Gly His
545 550 555 560

Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Arg
565 570 575

Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg
580 585 590

Ser Arg Val Lys Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln
595 600 605

Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
610 615 620

Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Pro Glu
625 630 635 640

Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
645 650 655

Glu Leu Gln Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly
660 665 670

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr
675 680 685

Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Ala Leu His
690 695 700

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
705 710

<210> 2

<211> 2034

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide sequence

<400> 2

atgtctgtgc tggtagaccag cctgtctgtg tgtgagctgc cccacccgc ctttctgtg	60
atccccgaca tccagatgac ccagaccacc tccagcctga gcgccagcct gggcgaccgg	120
gtgaccatca gctgccgggc cagccaggac atcagcaagt acctgaactg gtatcagcag	180
aagccccgacg gcaccgtcaa gctgtctgac taccacacca gccggctgca cagcggcgtg	240
cccagccggt ttagcggcag cggctccggc accgactaca gcctgacat ctccaacctg	300
gagcaggagg acatcgccac ctacttttgc cagcaggga acacactgcc ctacacctt	360
ggcggcggaa caaagctgga gataccggc agcacctccg gcagcggcaa gcctggcagc	420
ggcgagggca gcaccaaggc cgaggtgaag ctgcaggaga gcggccctgg cctgggtggc	480
cccagccaga gcctgagcgt gacctgtacc gtgtccggcg tgtccctgcc cgactacggc	540
gtgtcctgga tccggcagcc ccctaggaag ggcctggagt ggctgggctg gatctggggc	600
agcgagacca cctactaaa cagcgccttg aagagccggc tgaccatcat caaggacaac	660
agcaagagcc aggtgttctt gaagatgaac agcctgcaga ccgacgacac cgccatctac	720
tactgtgcca agcactacta ctacggcggc agctacgcca tggactactg gggccagggc	780
accagcgtga ccgtgtccag cgagagcaag tacggccctc cctgcccccc ttgccctgcc	840
cccagattcc tgggcggacc cagcgtgttc ctgttcccc ccaagcccaa ggacaccctg	900
atgatcagcc ggacccccga ggtgacctgt gtggtggtgg acgtgtccca ggaggacccc	960
gaggtccagt tcaactgcta cgtggacggc gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagccc	1020
cgggaggagc agttcaatag cacctaccgg gtggtgtccg tgctgacctg gctgcaccag	1080
gactggctga acggcaagga atacaagtgt aaggtgtcca acaaggcct gccagcagc	1140
atcgagaaaa ccatcagcaa ggccaagggc cagcctcggg agccccaggt gtacaccctg	1200
ccccctagcc aagaggagat gaccaagaat caggtgtccc tgacctgcct ggtgaagggc	1260
ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaacg gccagcccga gaacaactac	1320
aagaccaccc cccctgtgct ggacagcgac ggcagcttct tectgtacag caggctgacc	1380
gtggacaaga gccgggtggca ggagggaac gtcttttagt gctccgtgat gcacagggcc	1440
ctgcacaacc actacacca gaagagcctg tccttagacc tgggcaagat gttctgggtg	1500
ctggtcgtgg tgggtggcgt gctggcctgc tacagcctgc tgggtgacagt ggccttcac	1560

atcttttggg tgaggagcaa gcggagcaga ggcgccaca gcgactacat gaacatgacc 1620

ccccggaggc ctggccccac ccggaagcac taccagccct acgcccctcc cagggacttc 1680

gccgcctacc ggagccgggt gaagttcagc cggagcgccg acgcccctgc ctaccagcag 1740

ggccagaacc agctgtataa cgagctgaac ctgggcccga gggaggagta cgacgtgctg 1800

gacaagcggg gaggccggga ccctgagatg ggcggaagc cccggagaaa gaaccctcag 1860

gagggcctgt ataacgaact gcagaaagac aagatggccg aggcctacag cgagatcggc 1920

atgaaggcgc agcgccggag gggcaagggc cagcagggcc tgtaccaggc cctgagcacc 1980

gccaccaagg atacctacga cgccctgcac atgcaggccc tgccccccag atga 2034

<210> 3

<211> 4246

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide sequence

<400> 3

agttgaagtc ggaagtttac atacacttaa gttggagtca ttaaaactcg tttttcaact 60

actccacaaa tttcttgta acaacaata gttttgcaa gtcagttagg acatctactt 120

tgtgcatgac acaagtcatt tttccaacaa ttgtttacag acagattatt tcacttataa 180

ttcactgtat cacaattcca gtgggtcaga agtttacata cactaagttg actgtgcctt 240

taaacagctt ggaaaattcc agaaaatgat gtcattgctt tagaagcttc tgatagacta 300

attgacatca tttagtcaa ttggagggtg acctgtggat gtatttcaag gaattctgtg 360

gaatgtgtgt cagttagggt gtggaagtc cccaggtcc ccagcaggca gaagtatgca 420

aagcatcgag cggccgcaat aaaatatctt tattttcatt acatctgtgt gttggttttt 480

tgtgtgaatc gtaactaaca tacgtctcc atcaaaaca aacgaaaca aacaaactag 540

caaaataggc tgtccccagt gcaagtgcag gtgccagaac atttctctat cgaaggatct 600

gcgatcgctc cggtgccgt cagtgggcag agcgcacatc gccacagtc cccgagaagt 660

tggggggagg ggtcggcaat tgaaccgtg cctagagaag gtggcgcggg gtaaaactggg 720

aaagtgatgt cgtgtactgg ctccgccttt ttcccagggg tgggggagaa ccgtatataa 780

gtgcagtagt cgccgtgaac gttctttttc gcaacgggtt tgccgccaga acacagctga 840

agcttcgagg ggctcgcatc tctccttcac gcggccgccc ccctacctga ggccgccatc 900

cacgccggtt gactcgctt ctgccgctc ccgctgtgg tgctctctga actgcgtccg 960

ccgtctaggt aagtttaag ctcaggtcga gaccgggcct ttgtccggcg ctcccttggg 1020

gcctacctag acicagccgg ctctccacgc ttgacctgac cctgcttgct caactctacg	1080
tctttgtttc gttttctgtt ctgcgccgtt acagatccaa gctgtgaccg ggccttacct	1140
gagatcaccg gcgaaggagg cctatcatga agatctatcg attgtacagc tagccgccac	1200
catgctgctg ctggtgacca gcctgctgct gtgtgagctg cccacccccg cttttctgct	1260
gatccccgac atccagatga cccagaccac ctccagcctg agcgccagcc tgggcgaccg	1320
ggtgaccatc agctgccggg ccagccagga catcagcaag tacctgaact ggtatcagca	1380
gaagccccgac ggcaccgtca agctgctgat ctaccacacc agccggctgc acagcggcgt	1440
gccccgccgg tttagcggca gcggctccgg caccgactac agcctgacca tctccaacct	1500
ggagcaggag gacatcgcca cctacttttg ccagcagggc aacacactgc cctacacctt	1560
tggcggcgga acaaagctgg agatcaccgg cagcacctcc ggcagcggca agcctggcag	1620
cggcgagggc agcaccaagg gcgaggtgaa gctgcaggag agcgccctg gcctggtggc	1680
ccccagccag agcctgagcg tgacctgtac cgtgtccggc gtgtccctgc ccgactacgg	1740
cgtgtcctgg atccggcagc cccctaggaa gggcctggag tggctgggag tgatctgggg	1800
cagcgagacc acctactaca acagcgccct gaagagccgg ctgaccatca tcaaggacaa	1860
cagcaagagc caggtgttcc tgaagatgaa cagcctgcag accgacgaca ccgccatcta	1920
ctactgtgcc aagcactact actacggcgg cagctacgcc atggactact ggggccaggg	1980
caccagcgtg accgtgtcca gcgagagcaa gtacggccct cctgcccc cttgccctgc	2040
ccccgagtgc ctgggcggac ccagcgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacacct	2100
gatgatcagc cggacccccg aggtgacctg tgtggtggtg gacgtgtccc aggaggacct	2160
cgaggtccag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggt cacaacgcca agaccaagcc	2220
ccgggaggag cagttcaata gcacctaccg ggtggtgtcc gtgtgaccg tgctgcacca	2280
ggactggctg aacggcaagg aatacaagtg taaggtgtcc aacaagggcc tgcccagcag	2340
catcgagaaa accatcagca aggccaaggg ccagcctcgg gagccccagg tgtacacct	2400
gccccctagc caagaggaga tgaccaagaa tcaggtgtcc ctgacctgcc tgggtgaagg	2460
cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagcccg agaacaacta	2520
caagaccacc cccctgtgc tggacagcga cggcagcttc ttcctgtaca gcaggtgac	2580
cgtggacaag agccggtggc aggagggcaa cgtcttttagc tgctccgtga tgcacgaggc	2640
cctgcacaac cactacccc agaagagcct gtccctgagc ctgggcaaga tgttctgggt	2700
gctggtcgtg gtgggtggcg tgctggcctg ctacagcctg ctggtgacag tggccttcat	2760
catcttttgg gtgaggagca agcggagcag aggcggccac agcgactaca tgaacatgac	2820

cccccggagg cctggcccca cccggaagca ctaccagccc tacgcccctc ccagggactt 2880

 cgccgcctac cggagccggg tgaagttcag ccggagcgcc gacgcccctg cctaccagca 2940
 gggccagaac cagctgtaca acgagctgaa cctgggccgg agggaggagt acgacgtgct 3000
 ggacaagcgg agaggccggg accctgagat gggcggcaag ccccgagaa agaaccctca 3060
 ggagggcctg tataacgaac tgcagaaaga caagatggcc gaggcctaca gcgagatcgg 3120
 catgaagggc gagcggcgga ggggcaaggg ccacgacggc ctgtaccagg gcctgagcac 3180
 cgccaccaag gatacctacg acgcccctgca catgcaggcc ctgccccca gatgactacg 3240
 acccgggtga tcagcgggat ctgctgtgcc ttctagtgc cagccatctg ttgtttgcc 3300

 ctccccctg ccttccttga ccctggaagg tgccactccc actgtccttt cctaataaaa 3360
 tgaggaaatt gcatcgatt gtctgagtag gtgtcattct attctggggg gtgggtggg 3420
 gcaggacagc aagggggagg attgggaaga caatagcagg catgctgggg atgcggtggg 3480
 ctctatgggt acccaggtgc tgaagaattg acccggttcc tctgggcca gaaagaagca 3540
 ggcacatccc cttctctgtg acacaccctg tccacgccc tggttcttag ttccagcccc 3600
 actcatagga cactcatagc tcaggagggc tccgcttca atccaccgg ctaaagtact 3660
 tggagcggtc tctccctccc tcatcagccc accaaaccaa acctagcctc caagagtggg 3720

 aagaaattaa agcaagatag gctattaagt gcagagggag agaaaatgcc tccaacatgt 3780
 gaggaagtaa tgagagaaat catagaattia tcgggccgct gcattctagt tgtggtttgt 3840
 ccaaactcat caatgtatct tatcatgtct ggatcccatc acaaagctct gacctcaatc 3900
 ctatagaaag gaggaatgag caaaaattca ccaacttat tgtgggaagc ttgtggaagg 3960
 ctactcgaaa tgtttgacct aagttaaaca atttaaaggc aatgctacca aatactaatt 4020
 gagtgtatgt taacttctga cccactggga atgtgatgaa agaaataaaa gctgaaatga 4080
 atcattctct ctactattat tctgatattt cacattctta aaataaagtg gtgaccta 4140

 ctgaccttaa gacagggaat ctttactcgg attaaatgtc aggaattgtg aaaaagtgag 4200
 tttaaagtga ttggctaag gtgtatgtaa acttccgact tcaact 4246

 <210> 4
 <211> 680
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Fusion protein
 <400> 4
 Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1	5	10	15
Ala Phe Leu Leu Ile Pro Met Ala Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly			
	20	25	30
Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala			
	35	40	45
Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser			
	50	55	60
His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Arg Val Asn Pro Asn Ser Gly			
65	70	75	80
Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val			
	85	90	95
Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser			
	100	105	110
Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Lys Gly Asn Tyr Phe			
	115	120	125
Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser			
	130	135	140
Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp			
145	150	155	160
Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln			
	165	170	175
Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser His Gly			
	180	185	190
Thr Ser Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys			
	195	200	205
Phe Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala Arg			
	210	215	220
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Pro			
225	230	235	240
Val Glu Thr Asp Asp Val Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu			
	245	250	255

Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Glu Ser
 260 265 270
 Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly
 275 280 285

 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 290 295 300
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
 305 310 315 320
 Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 325 330 335
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
 340 345 350

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

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

 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 485 490 495
 Leu Gly Lys Met Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala

500	505	510	
Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg			
515	520	525	
Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro			
530	535	540	
Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro			
545	550	555	560
Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala			
565	570	575	
Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu			
580	585	590	
Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly			
595	600	605	
Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu			
610	615	620	
Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser			
625	630	635	640
Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly			
645	650	655	
Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu			
660	665	670	
His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
675	680		
<210>	5		
<211>	4255		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	Synthetic polynucleotide sequence		
<400>	5		
agttgaagtc ggaagtttac atacacttaa gttggagtca ttaaaactcg tttttcaact		60	
actccacaaa tttcttggtta acaacaata gttttggcaa gtcagttagg acatctactt		120	
tgtgcatgac acaagtcatt tttccaacaa ttgtttacag acagattatt tcacttataa		180	

ttcactgtat cacaattcca gtgggtcaga agtttacata cactaagttg actgtgcctt	240
taaacagctt ggaaaattcc agaaaatgat gtcattggctt tagaagcttc tgatagacta	300
attgacatca tttgagtcaa ttggagggtg acctgtggat gtatttcaag gaattctgtg	360
gaatgtgtgt cagttagggt gtggaaagtc cccaggctcc ccagcaggca gaagtatgca	420
aagcatcgag cgcccgcaat aaaatatctt tattttcatt acatctgtgt gttggttttt	480
tgtgtgaatc gtaactaaca tacgtctctc atcaaaacaa aacgaaacaa aacaaactag	540
caaatagggc tgtccccagt gcaagtgcag gtgccagaac atttctctat cgaaggatct	600
gcgatcgctc cggtgcccgt cagtgggcag agcgcacatc gccacagtc cccgagaagt	660
tggggggagg ggtcggcaat tgaaccggtg cctagagaag gtggcgcggg gtaaacagg	720
aaagtgatgt cgtgtactgg ctccgccttt ttcccagggt tgggggagaa ccgtatataa	780
gtgcagtagt cgccgtgaac gttctttttc gcaacgggtt tgccgccaga acacagctga	840
agcttcgagg ggctcgcatc tctcttcac gcgcccgcg ccctacctga ggccgccatc	900
cacgccggtt gattcgctt ctgccgctc ccgctgtgg tgccctctga actgcgtccg	960
ccgtctaggt aagtttaag ctccagtcga gaccggcct ttgtccggcg ctcccttga	1020
gcctacctag actcagccg ctctccacgc ttgcctgac cctgcttgct caactctacg	1080
tctttgttc gttttctgt ctgcgccgtt acagatccaa gctgtgaccg gcgctacct	1140
gagatcaccg gcgaaggagg cctatcatga agatctatcg attgtacagc tagccgccac	1200
catgtctgt ctggtgacca gcctgtgtgt gtgtgagctg cccaccccg cttttctgt	1260
gatcccatg gccaggtga agctgcagca gagcgccct gatctggtga agcctggcg	1320
cagcgtgaag atcagctga aggccagcgg ctacagctt accggctact acatgcactg	1380
ggtgaaacag agccacgga agagcctgga atggatcggc agagtgaacc ccaatagcgg	1440
cggcaccagc tacaaccaga agttcaagga caaggccatc ctgaccgtgg acaagagcag	1500
cagcaccgcc tacatggaac tgcggagcct gaccagcag gacagcgccg tgtactactg	1560
cgcccggtcc aagggaact acttctacgc catggactac tggggccagg gcaccaccgt	1620
gaccgtgtct agcagcgcg gaggaagcgg agggggagga tctggcgag gcggcagcga	1680
tatcgagctg acccagagcc ctacgacct ggccgtgtca ctgggccaga gagccacat	1740
cagctgcaga gcctccgaga gcgtggatag ccacggcacc agcctgatgc actggtatca	1800
gcagaagccc ggccagcccc ccaagttcct gatctaccgg gccagcaacc tggaaagcgg	1860
catccccgcc agattttccg gcagcggcag cagaaccgac ttcacctga ccatcaaccc	1920

cgtaggagaca gacgacgtgg ccatctacta ctgccagcag agcaacgagg accctcccac	1980
ctttggcggga ggcaccaagc tggaactgaa ggagagcaag tacggccctc cctgcccccc	2040
ttgccctgcc cccgagttcc tgggcgggacc cagcgtgttc ctgttcccc ccaagcccaa	2100
ggacaccctg atgatcagcc ggacccccga ggtgacctgt gtggtggtgg acgtgtccca	2160
ggaggacccc gaggtccagt tcaactggtg cgtggacggc gtggaggtgc acaacgccaa	2220
gaccaagccc cgggaggagc agttcaatag cacctaccgg gtggtgtccg tgctgaccgt	2280
gctgcaccag gactggctga acggcaagga atacaagtgt aaggtgtcca acaaggccct	2340
gcccagcagc atcgagaaaa ccatcagcaa ggccaagggc cagcctcggg agccccaggt	2400
gtacaccctg cccctagcc aagaggagat gaccaagaat caggtgtccc tgacctgcct	2460
ggtgaagggc ttctaccca gcgacatgc cgtggagtgg gagagcaacg gccagcccga	2520
gaacaactac aagaccacce cccctgtgct ggacagcgac ggcagcttct tctgtacag	2580
caggctgacc gtggacaaga gccggtggca ggagggcaac gtctttagct gctccgtgat	2640
gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagagcctg tccctgagcc tgggcaagat	2700
gttctgggtg ctggtctggg tgggtggcgt gctggcctgc tacagcctgc tgggtgacagt	2760
ggccttcac atcttttggg tgaggagcaa gcggagcaga ggcggccaca gcgactacat	2820
gaacatgacc ccccgaggc ctggccccac ccggaagcac taccagccct acgcccctcc	2880
cagggacttc gccgcctacc ggagccgggt gaagttcagc cggagcgccg acgcccctgc	2940
ctaccagcag ggccagaacc agctgtacaa cgagctgaac ctgggccgga gggaggagta	3000
cgacgtgctg gacaagcgga gaggccggga cctgagatg ggccgcaagc cccggagaaa	3060
gaaccctcag gagggcctgt ataacgaact gcagaaagac aagatggccg aggcctacag	3120
cgagatcggc atgaaggcg agcggcggag gggcaagggc cacgacggcc tgtaccaggg	3180
cctgagcacc gccaccaagg atacctacga cgcctgcac atgcaggccc tgccccccag	3240
atgactacga cccgggtgat cagcgggatc tgctgtgcct tctagtggc agccatctgt	3300
tgtttcccc tccccgtgc ctctcttgac cctggaaggt gccactccca ctgtccttc	3360
ctaataaaat gaggaaattg catcgattg tctgagtagg tgtcattcta ttctgggggg	3420
tgggtgggg caggacagca agggggagga ttgggaagac aatagcaggc atgctgggga	3480
tgccgtgggc tctatggta cccaggtgct gaagaattga cccgttccct cctgggccag	3540
aaagaagcag gcacatcccc ttctctgtga cacaccctgt ccacgccct ggttcttagt	3600
tccagcccca ctcataggac actcatagct caggagggt cgccttcaa tcccaccgc	3660

taaagtactt ggagcgggtct ctccctccct catcagccca ccaaaccaaa ctagcctcc 3720
aagagtggga agaaattaaa gcaagatagg ctattaagtg cagagggaga gaaaatgcct 3780
ccaacatgtg aggaagtaat gagagaaatc atagaattat cgggccgctg cattctagtt 3840
gtggtttgtc caaactcatc aatgtatctt atcatgtctg gatcccatca caaagctctg 3900
acctcaatcc tatagaaagg aggaatgagc caaaattcac ccaacttatt gtgggaagct 3960
tgtggaaggc tactcgaaat gtttgacca agttaaaca tttaaaggca atgctaccaa 4020
atactaattg agtgtatgtt aacttctgac ccactgggaa tgtgatgaaa gaaataaaag 4080

ctgaaatgaa tcattctctc tactattatt ctgatatttc acattcttaa aataaagtgg 4140
tgatcctaac tgaccttaag acagggaatc ttactcgga ttaaatgtca ggaattgtga 4200
aaaagtgagt ttaaatgtat ttggctaagg tgtatgtaaa cttccgactt caact 4255

<210> 6

<211> 422

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fusion protein

<400> 6

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val

1 5 10 15

His Ser Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp

20 25 30

Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp

35 40 45

Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu

50 55 60

Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr

65 70 75 80

Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly

85 90 95

Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys

100 105 110

Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe

115 120 125

Ile Asn Thr Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Leu Gln Ile Thr
145 150 155 160
Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser
165 170 175
Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys
180 185 190
Arg Lys Ala Gly Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala
195 200 205
Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg Asp
210 215 220
Pro Ala Leu Val His Gln Arg Pro Ala Pro Pro Ser Thr Val Thr Thr
225 230 235 240
Ala Gly Val Thr Pro Gln Pro Glu Ser Leu Ser Pro Ser Gly Lys Glu
245 250 255
Pro Ala Ala Ser Ser Pro Ser Ser Asn Asn Thr Ala Ala Thr Thr Ala
260 265 270
Ala Ile Val Pro Gly Ser Gln Leu Met Pro Ser Lys Ser Pro Ser Thr
275 280 285
Gly Thr Thr Glu Ile Ser Ser His Glu Ser Ser His Gly Thr Pro Ser
290 295 300
Gln Thr Thr Ala Lys Asn Trp Glu Leu Thr Ala Ser Ala Ser His Gln
305 310 315 320
Pro Pro Gly Val Tyr Pro Gln Gly His Ser Asp Thr Thr Val Ala Ile
325 330 335
Ser Thr Ser Thr Val Leu Leu Cys Gly Leu Ser Ala Val Ser Leu Leu
340 345 350
Ala Cys Tyr Leu Lys Ser Arg Gln Thr Pro Pro Leu Ala Ser Val Glu
355 360 365
Met Glu Ala Met Glu Ala Leu Pro Val Thr Trp Gly Thr Ser Ser Arg

370	375	380	
Asp Glu Asp Leu Glu Asn Cys Ser His His Leu Ser Arg Met Asp Tyr			
385	390	395	400
Lys Asp Asp Asp Asp Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Asp Tyr			
	405	410	415
Lys Asp Asp Asp Asp Lys			
	420		
<210> 7			
<211> 3499			
<212> DNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Synthetic polynucleotide sequence			
<400> 7			
agttgaagtc ggaagtttac atacacttaa gttggagtca ttaaaactcg tttttcaact	60		
actccacaaa ttctttgtta acaacaata gttttggcaa gtcagttagg acatctactt	120		
tgtgcatgac acaagtcatt tttccaaca ttgtttacag acagattatt tcacttataa	180		
ttcactgtat cacaattcca gtgggtcaga agtttacata cactaagttg actgtgcctt	240		
taaacagctt ggaaaattcc agaaaatgat gtcatggctt tagaagcttc tgatagacta	300		
attgacatca tttagtcaa ttggagggtg acctgtggat gtatttcaag gaattctgtg	360		
gaatgtgtgt cagttagggt gtggaaagtc cccaggctcc ccagcaggca gaagtatgca	420		
aagcatcgag cggccgcaat aaaatatctt tattttcatt acatctgtgt gttggttttt	480		
tgtgtgaatc gtaactaaca tacgtctctc atcaaaacaa aacgaaacaa aacaaactag	540		
caaaataggc tgiccccgagt gcaagtgcag gtgccagaac atttctctat cgaaggatct	600		
gcgatcgctc cggtgcccgt cagtgggcag agcgcacatc gccacagtc cccgagaagt	660		
tggggggagg ggtcggcaat tgaaccgtg cctagagaag gtggcgcggt gtaaaactggg	720		
aaagtgatgt cgtgtactgg ctccgccttt ttcccagggt tgggggagaa ccgtatataa	780		
gtgcagtagt cggcgtgaac gttctttttc gcaacgggtt tgccgccaga acacagctga	840		
agcttcgagg ggetcgcatc tctctttcac ggcggccg ccctacctga ggccgccatc	900		
cacgccggtt gaggcgtt ctgccgctc ccgctgtgg tgcctcctga actgcgtccg	960		
ccgtctaggt aagtttaaag ctcaggtcga gaccgggctt ttgtccggcg ctcccttggg	1020		
gcctacctag actcagccgg ctctccacgc ttgcctgac cctgcttgc caactctacg	1080		

tctttgtttc gttttctgtt ctgcgccgtt acagatccaa gctgtgaccg ggccttacct	1140
gagatcaccc gcgaaggagg cctatcatga agatctatcg attgtacagc tagccgccac	1200
catggattgg acctggattc tgtttctggt ggccgctgcc acaagagtgc acagcaactg	1260
ggtgaatgtg atcagcgacc tgaagaagat cgaggatctg atccagagca tgcacattga	1320
tgccaccctg tacacagaat ctgatgtgca cctagctgt aaagtgaccg ccatgaagtg	1380
ttttctgctg gagctgcagg tgatttctct ggaaagcgga gatgcctcta tccacgacac	1440
agtggagaat ctgatcatcc tggccaacaa tagcctgagc agcaatggca atgtgacaga	1500
gtctggctgt aaggagtgtg aggagctgga ggagaagaac atcaaggagt ttctgcagag	1560
ctttgtgcac atcgtgcaga tgttcatcaa tacaagctct ggcgagggat ctggaggagg	1620
cggatctgga ggaggaggca gtggaggcgg aggatctggc ggaggatctc tgcagattac	1680
atgccctcct ccaatgtctg tggagcacgc cgatatttgg gtgaagtcct acagcctgta	1740
cagcagagag agatacatct gcaacagcgg cttaagaga aaggccggca cctcttctct	1800
gacagagtgc gtgctgaata aggccacaaa tgtggccac tggacaacac ctacgtgaa	1860
gtgcattaga gatcctgccc tggtcacca gaggcctgcc cctccatcta cagtgacaac	1920
agccggagtg acacctcagc ctgaatctct gagcccttct ggaaaagaac ctgccgccag	1980
ctctcctagc tctaataata ccgccgccac aacagccgcc attgtgcctg gatctcagct	2040
gatgcctagc aagtctcta gcacaggcac aacagagatc agcagccacg aatcttctca	2100
cggaacacct tctcagacca ccgcaagaa ttgggagctg acagcctctg ccttcacca	2160
gcctccagga gtgtatcctc agggccactc tgatacaaca gtggccatca gcacatctac	2220
agtgtgtctg tgtggactgt ctgccgtgtc tctgtggcc tgttacctga agtctagaca	2280
gacacctcct ctggcctctg tggagatgga ggccatggaa gccctgcctg tgacatgggg	2340
aacaagcagc agagatgagg acctggagaa ttgttctcac cacctgtcgc gaatggacta	2400
caaggacgat gacgacaagg attataaaga tgatgatgat aaagattata aagacgacga	2460
tgataagtgc cgatgatgat gactcgagac tagtcccggg tgatcagcgg gatctgctgt	2520
gccttctagt tgccagccat ctgttgtttg cccctcccc gtgccttctt tgacctgga	2580
aggtgccact cccactgtcc ttctctaata aaatgaggaa attgcatcgc attgtctgag	2640
taggtgtcat tctattctgg ggggtgggt ggggcaggac agcaaggggg aggattggga	2700
agacaatagc aggcattctg gggatgcggt gggctctatg ggtaccagg tgctgaagaa	2760
ttgaccgggt tctcctggg ccagaaagaa gcaggcacat ccccttctct gtgacacacc	2820
ctgtccacgc cctgtgtct tagttccagc cccactcata ggacactcat agctcaggag	2880
ggctccgct tcaatccac ccgctaagat acttgagcgt gtctctcct cctcatcag	2940

cccaccaaac caaacctagc ctccaagagt gggaagaaat taaagcaaga taggctatta 3000
 agtgcagagg gagagaaaat gcctccaaca tgtgaggaag taatgagaga aatcatagaa 3060
 ttatcgggcc gctgcattct agttgtggtt tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg 3120
 tctggatccc atcacaaga tctgacctca atcctataga aaggaggaat gagccaaaat 3180

tcaccaact tattgtggga agcttgtgga aggtactcg aaatgtttga cccaagttaa 3240
 acaattttaa ggcaatgcta ccaaatacta attgagtga tgtaacttc tgaccactg 3300
 ggaatgtgat gaaagaaata aaagctgaaa tgaatcattc tctctactat tattctgata 3360
 ttacacattc ttaaaataaa gtggtgatcc taactgacct taagacaggg aatctttact 3420
 cggattaaat gtcaggaatt gtgaaaaagt gagtttaa atgtttggct aaggtgtatg 3480
 taaacttccg acttcaact 3499

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 8

cagcgacggc agcttctt 18

<210> 9

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 9

tgcacacgg agctaaa 17

<210> 10

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic primer

<400> 10

agagccggtg gcagg 15

<210> 11

<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic primer	
<400> 11	
atgggaaaat caaaagaaat c	21
<210> 12	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic primer	
<400> 12	
ctagtatttg gtagcattgc	20
<210> 13	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic primer	
<400> 13	
tctccagaac atcatccctg ccac	24
<210> 14	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic primer	
<400> 14	
tgggccatga ggtccaccac cctg	24
<210> 15	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic primer	
<400> 15	

gagggcaacg tctttagctg	20
<210> 16	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic primer	
<400> 16	
gatgatgaag gccactgtca	20
<210> 17	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic primer	
<400> 17	
agatgttctg ggtgctggtc	20