(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년01월09일
(11) 등록번호 10-2485855
(24) 등록일자 2023년01월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) *A61K 31/4745* (2006.01)
A61K 31/5377 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2013.01)
A61K 31/4745 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7000417
(22) 출원일자(국제) 2015년06월05일
심사청구일자 2020년05월20일
(85) 번역문제출일자 2017년01월05일
(65) 공개번호 10-2017-0007527
(43) 공개일자 2017년01월18일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/034515
(87) 국제공개번호 WO 2015/188119
국제공개일자 2015년12월10일
(30) 우선권주장
62/008,957 2014년06월06일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Nat Rev Immunol. 2006, 6(5):383-393.
Blood. 2013, 122(21):3269.*
Trends Biotechnol. 2011, 29(11):550-557.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
2세븐티 바이오, 인코포레이티드
미국, 매사추세츠 02142, 캠브리지, 60 비니 스트리트
(72) 발명자
프리드먼, 케빈
미국, 매사추세츠 02141, 캠브리지, #1123, 10 뮤지엄 웨이
(74) 대리인
특허법인한얼

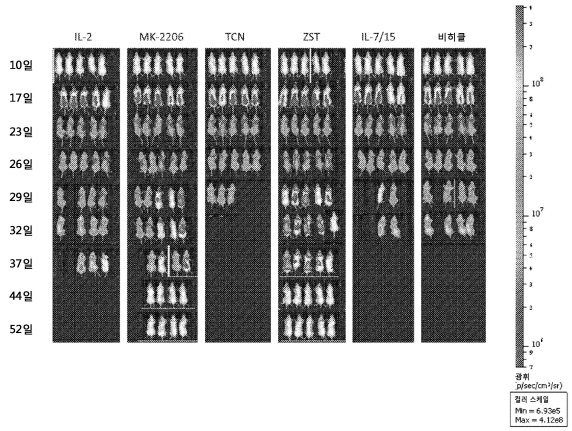
전체 청구항 수 : 총 16 항 심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 **개선된 T 세포 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 개선된 T 세포 조성물, 및 T 세포를 제조하는 방법을 제공한다. 보다 특히, 본 발명은 생체내에서 개선된 생존률, 확장 및 지속성을 갖는 양자 T 세포 면역요법을 제공하는 T 세포 제조 방법을 제공한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 31/5377 (2013.01)
C12N 2501/51 (2013.01)
C12N 2501/515 (2013.01)
C12N 2501/999 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

T 세포의 제조방법으로서,

(a) T 세포의 모집단을 활성화시키고 T 세포의 모집단을 자극시켜 증식시키는 단계;

(b) T 세포를, 조작된 T 세포 수용체(TCR) 또는 키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터로 형질도입시키는 단계;

(c) 형질도입된 T 세포를 배양하여 증식시키는 단계를 포함하고,

여기서, 상기 단계 (a)-(c)는 포스파티딜이노시톨-3 키나제 (PI3K) 억제제의 존재 하에 수행되고,

PI3K 억제제의 부재 하에 수행된 단계 (a)-(c)에 따라 제조된 T 세포에서의 T 세포 분화와 비교하여 PI3K 억제제의 존재 하에 수행된 단계 (a)-(c)에 따라 제조된 T 세포에서 T 세포 분화가 감소되는, T 세포의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 세포가 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 CAR이

a) 알파 폴레이트 수용체, 5T4, $\alpha_v\beta_6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FRα, GD2, GD3, 글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11Rα, IL-13Rα2, 람다, 르위스-Y, Kappa, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 수르비빈(Survivin), TAG72, TEM, 및 VEGFR2로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항원에 결합하는 세포외 도메인;

b) CD8α; CD4, CD28, CD45, PD-1 및 CD152로 이루어진 그룹으로부터 선택된 폴리펩티드로부터 유래되는 막관통 도메인;

c) CD28, CD54(ICAM), CD134(OX40), CD137(41BB), CD152(CTLA4), CD273(PD-L2), CD274(PD-L1) 및 CD278(ICOS)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 세포내 공자극 시그날전달 도메인; 및

d) CD3ζ 시그날전달 도메인을 포함하는, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 세포외 도메인이 항원에 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는, 방법.

청구항 5

T 세포의 제조방법으로서,

(a) T 세포의 모집단을 활성화시키고 T 세포의 모집단을 자극시켜 증식시키는 단계;

(b) T 세포를, 항-B 세포 성숙 항원(BCMA) 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터로 형질도입시키는 단계;

(c) 형질도입된 T 세포를 배양하여 증식시키는 단계를 포함하고,

여기서, 상기 단계 (a)-(c)는 포스파티딜이노시톨-3 키나제 (PI3K) 억제제의 존재 하에 수행되고,

PI3K 억제제의 부재 하에 수행된 단계 (a)-(c)에 따라 제조된 T 세포에서의 T 세포 분화와 비교하여 PI3K 억제

제의 존재 하에 수행된 단계 (a)-(c)에 따라 제조된 T 세포에서 T 세포 분화가 감소되는, T 세포의 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 CAR는 BCMA에 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 세포외 도메인, 힌지 도메인, 막관통 도메인, 하나 이상의 공자극 도메인, 및 일차 시그날전달 도메인을 포함하는, 방법.

청구항 7

T 세포의 제조방법으로서,

(a) T 세포의 모집단을 활성화시키고 T 세포의 모집단을 자극시켜 증식시키는 단계;

(b) T 세포를, 항-BCMA CAR를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터로 형질도입시키는 단계로서, 상기 CAR는 BCMA에 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편; IgG1, CD28 또는 CD8α 힌지 도메인; CD28 또는 CD8α 막관통 도메인; CD28, OX40, 또는 4-1BB 공자극 도메인; 및 CD3ζ 일차 시그널전달 도메인을 포함하는, 단계; 및

(c) 형질도입된 T 세포를 배양하여 증식시키는 단계를 포함하고,

여기서, 상기 단계 (a)-(c)는 포스파티딜이노시톨-3 키나제 (PI3K) 억제제의 존재 하에 수행되고,

PI3K 억제제의 부재 하에 수행된 단계 (a)-(c)에 따라 제조된 T 세포에서의 T 세포 분화와 비교하여 PI3K 억제제의 존재 하에 수행된 단계 (a)-(c)에 따라 제조된 T 세포에서 T 세포 분화가 감소되는, T 세포의 제조방법.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 단편은 낙타 Ig (낙타과 항체(VHH)), Ig NAR, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab)'2 단편, F(ab)'3 단편, Fv, 단일쇄 Fv 항체("scFv"), 비스-scFv, (scFv)2, 미니바디, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 디설파이드 안정화된 Fv 단백질("dsFv"), 및 단일-도메인 항체(sdAb, 나노바디)로 이루어진 군에서 선택되는, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 말초혈 단핵 세포를 T 세포의 공급원으로서 단리하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 세포의 활성화가 T 세포를 항-CD3 항체 또는 이의 CD3-결합 단편과 접촉시키는 것을 포함하는, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 세포의 자극이 T 세포를 항-CD28 항체 또는 이의 CD28-결합 단편, B7-1 또는 이의 CD28-결합 단편, 또는 B7-2 또는 이의 CD28-결합 단편과 접촉시키는 것을 포함하는, 방법.

청구항 12

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 벡터가 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터인, 방법.

청구항 13

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PI3K 억제제가 BEZ235, LY294002, GDC-0941, BYL719, GSK2636771, TGX-221, AS25242, CAL-101, IPI-145, 및 ZSTK474로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 14

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PI3K 억제제가 ZSTK474인, 방법.

청구항 15

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, PI3K 억제제의 존재 하에 활성화 및 자극된 T 세포의 모집단이, PI3K 억제제의 부재 하에 활성화 및 자극된 T 세포의 모집단과 비교하여, CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122 및 CD127로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 마커를 발현하는 증가된 수의 T 세포를 갖는, 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, PI3K 억제제의 존재 하에 활성화 및 자극된 T 세포의 모집단이, PI3K 억제제의 부재 하에 활성화 및 자극된 T 세포의 모집단과 비교하여, CD57 또는 KLRG1을 발현하지 않거나 보다 적은 CD57 또는 KLRG1을 발현하는, 방법.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

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

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원의 상호 참조

[0002] 본 출원은, 이의 전체가 본원에서 참조로서 도입되는, 2014년 6월 6일자로 출원된 미국 가출원 제62/008,957호의 35 U.S.C. §119(e)하에서의 이익을 주장한다.

[0003] 기술 분야

[0004] 본 발명은 개선된 T 세포 조성물, 및 T 세포를 제조하는 방법을 제공한다. 보다 특히, 본 발명은 생체내에서 개선된 생존률, 확장 및 지속성을 갖는 양자 T 세포 면역요법(adoptive T cell immunotherapy)을 제공하는 T 세포 제조 방법을 제공한다.

배 경 기 술

[0005] 관련 기술의 설명

[0006] 양자 면역요법은 질환의 치료를 위해 T 림파구를 대상체에게 전이시키는 것이다. 양자 면역요법은 암, 감염성 질환, 자가면역 질환, 염증 질환 및 면역결핍증을 포함하는 광범위한 질환을 치료하는 잠재성을 아직 실현하지 못했다. 그러나, 전부는 아니지만, 대부분의 양자 면역요법 전략은 T 세포의 임상적으로 효과적인 치료 용량을 생성하기 위해 T 세포 활성화 및 확장을 필요로 한다. 조작된 T 세포를 포함하는 T 세포의 치료 용량을 생성하는 현재의 기술은 번거로운 T 세포 제조 프로세스에 의해 제한된 상태이다. 예를 들면, T 세포 확장은 종종 치료학적 관련 T 세포 수를 달성하기 위해 노동 집약적 및 고가의 클로닝 및/또는 복수회의 활성화/확장을 필요로 한다. 또한, 기존의 T 세포 활성화/확장 방법은 통상 실질적 T 세포 분화와 커플링되고, 통상 단명 생존을 포함하는 단명 효과, 및 전이된 T 세포의 지속성의 결여 및 생체내 확장의 결여를 제공한다. 따라서, 기존의 T 세포 제조 프로세스는 작동 면역 세포 기능의 피로 및 상실이 쉬운 열성 T 세포 생성물을 생성한다.

[0007] 현재까지, 조작된 T 세포 양자 면역요법의 임상 유효성은 환자 내로 주입된 후에 불량한 T 세포 확장 및 지속성에 의해 제한된다. 따라서, 이러한 요법은 광범위한 임상 용도에 적합하지 않다. 따라서, 생체내에서 생존, 확장 및 지속하는 T 세포 제조 및 치료학적 T 세포 조성물의 개선을 위해 영속적인 충족되지 않은 요구가 있다.

발명의 내용

[0008] 본 발명은 일반적으로 지속적 및 강력한 항-종양 T 세포 조성물 및 이의 제조 방법을 포함하는 양자 T 세포 면역요법을 제공한다.

[0009] 본 발명은 개선된 T 세포 조성물 및 T 세포의 제조 방법에 관한 것이다. 보다 특히, 본 발명은 생체내에서 개선된 생존률, 확장 및 지속성을 제공하는 T 세포 제조 방법에 관한 것이다.

[0010] 다양한 실시형태에서, T 세포의 제조 방법으로서, (a) 대상체로부터 T 세포의 모집단, 예를 들면, 종양 침윤 세포독성 T 림파구(TIL)을 단리하는 단계; (b) T 세포의 모집단을 활성화시키고 T 세포의 모집단을 자극시켜 증식시키는 단계로서, 상기 활성화 및 자극 단계로 인해 AKT/mTOR 경로의 억제제의 존재하에 수행되는 단계; (c) T 세포를 배양하여 증식시키는 단계를 포함하고, PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제의 존재하에 수행된 상기 활성화 및 자극 단계로 인해, PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제의 부재하에 활성화되고 자극된 T 세포의 증식과 비교하여, T 세포의 증식을 유지하는, T 세포의 제조 방법이 제공된다.

[0011] 다양한 실시형태에서, T 세포의 제조 방법으로서, (a) T 세포의 모집단을 활성화시키고 T 세포의 모집단을 자극시켜 증식시키는 단계(여기서, 상기 활성화 및 자극 단계는 AKT/mTOR 경로의 억제제의 존재하에 수행된다); (b) T 세포를, 조작된 T 세포 수용체(TCR) 또는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 바이러스 벡터로 형질도입시키는 단계; (c) 형질도입된 T 세포를 배양하여 증식시키는 단계를 포함하고, PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제의 존재하에 수행된 상기 활성화 및 자극 단계가, PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제의 부재하에 활성화되고 자극된 형질도입된 T 세포의 증식과 비교하여, 형질도입된 T 세포의 증식을 유지하는, 상기 T 세포의 제조방법이 제공된다.

[0012] 특정 실시형태에서, 본원에서 의도된 상기 방법은 말초혈 단핵 세포를 T 세포의 공급원으로서 단리하는 것을 포함한다.

[0013] 특정 실시형태에서, 상기 T 세포의 활성화는 T 세포를 항-CD3 항체 또는 이의 CD3-결합 단편과 접촉시키는 것을 포함한다.

[0014] 추가의 실시형태에서, 상기 T 세포의 자극은 T 세포를 항-CD28 항체 또는 이의 CD28-결합 단편, B7-1 또는 이의 CD28-결합 단편, 또는 B7-2 또는 이의 CD28-결합 단편과 접촉시키는 것을 포함한다.

[0015] 일부 실시형태에서, 상기 세포는 T 세포 증식 전에 바이러스 벡터로 형질도입된다.

[0016] 특정 실시형태에서, 상기 세포는 T 세포 증식 후에 바이러스 벡터로 형질도입된다.

[0017] 특정 실시형태에서, 상기 벡터는 레트로바이러스 벡터이다.

[0018] 추가의 실시형태에서, 상기 벡터는 렌티바이러스 벡터이다.

[0019] 다른 특정 실시형태에서, 상기 세포는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함한다.

[0020] 특정 실시형태에서, 상기 CAR은 알파 폴레이트 수용체, 5T4, $\alpha_v\beta_6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, CMV, EBV, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FRα, GD2, GD3, 글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, HPV, IL-11Rα, IL-13Rα2, 람다, 르위스-Y, Kappa, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 수르비빈(Survivin), TAG72, TEM, 및 VEGFR2로 이루어진 그룹으로부터 선택된 세포외 도메인; CD8α; CD4, CD28, CD45, PD-1 및 CD152로 이루어진 그룹으로부터 선택된 폴리펩티드로부터 유래되는 막관통 도메인; CD28, CD54(ICAM), CD134(OX40), CD137(41BB), CD152(CTLA4), CD273(PD-L2), CD274(PD-L1) 및 CD278(ICOS)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 세포내 공자극 시그날전달 도메인; 및 CD3ζ 시그날전달 도메인을 포함한다.

[0021] 추가의 실시형태에서, 상기 세포외 도메인은 항원에 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편을 포함한다.

[0022] 특정 실시형태에서, 상기 막관통 도메인은 CD8α 또는 CD28로부터 유래된다.

[0023] 추가의 실시형태에서, 하나 이상의 공자극 시그날전달 도메인은 CD28, CD134 및 CD137로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0024] 추가의 실시형태에서, 상기 CAR은 힌지 영역 폴리펩티드를 포함한다.

[0025] 특정 실시형태에서, 상기 힌지 영역 폴리펩티드는 IgG1 또는 CD8α의 힌지 영역을 포함한다.

[0026] 특정 실시형태에서, 상기 CAR은 시그날 펩티드를 포함한다.

[0027] 일부 실시형태에서, 상기 시그날 펩티드는 IgG1 중쇄 시그날 폴리펩티드 또는 CD8α 시그날 폴리펩티드를 포함한다.

[0028] 일부 실시형태에서, 상기 PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제는 BEZ235, LY294002, GDC-0941, BYL719, GSK2636771,

TGX-221, AS25242, CAL-101, IPI-145, MK-2206, GSK690693, GDC-0068, A-674563, CCT128930, AZD8055, INK128, 라파마이신, PF-04691502, 에베로리무스, BI-D1870, H89, PF-4708671, FMK, AT7867, NU7441, PI-103, NU7026, PIK-75, ZSTK474 및 PP-121로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0029] 특정 실시형태에서, 상기 PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제는 BEZ235, LY294002 및 GDC-0941로 이루어진 그룹으로부터 선택된 pan-PI3K 억제제이다.

[0030] 기타 특정 실시형태에서, 상기 PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제는 BYL719, GSK2636771, TGX-221, AS25242, CAL-101 및 IPI-145로 이루어진 그룹으로부터 선택된 선택적 PI3K 억제제이다.

[0031] 기타 특정 실시형태에서, 상기 PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제는 PI3K 억제제 ZSTK474이다.

[0032] 특정 실시형태에서, 상기 PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제는 MK-2206, GSK690693 및 GDC-0068로 이루어진 그룹으로부터 선택된 pan-AKT 억제제이다.

[0033] 추가의 실시형태에서, 상기 PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제는 선택적 AKT1 억제제 A-674563이다.

[0034] 특정 실시형태에서, 상기 PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제는 선택적 AKT2 억제제 CCT128930이다.

[0035] 특정 실시형태에서, 상기 PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제는 AKT의 DNA-PK 활성화를 억제한다.

[0036] 추가의 실시형태에서, 상기 PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제는 AKT의 PDK-1 활성화를 억제한다.

[0037] 특정 실시형태에서, 상기 PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제는 AKT의 mTORC2 활성화를 억제한다.

[0038] 추가의 실시형태에서, 상기 PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제는 AKT의 HSP 활성화를 억제한다.

[0039] 기타 특정 실시형태에서, 상기 PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제는 AZD8055, INK128 및 라파마이신으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 pan-mTOR 억제제이다.

[0040] 특정 실시형태에서, 상기 PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제는 PF-04691502 및 에베로리무스로 이루어진 그룹으로부터 선택된 선택적 mTORC1 억제제이다.

[0041] 특정 실시형태에서, 상기 PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제는 BI-D1870, H89, PF-4708671, FMK 및 AT7867로 이루어진 그룹으로부터 선택된 s6 키나제 억제제이다.

[0042] 특정 실시형태에서, 상기 PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제는 NU7441, PI-103, NU7026, PIK-75 및 PP-121로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DNA-PK 억제제이다.

[0043] 일부 실시형태에서, PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제의 존재하에 활성화 및 자극된 T 세포의 모집단은, PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제의 부재하에 활성화 및 자극된 T 세포의 모집단과 비교하여, CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122 및 CD127로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 마커를 발현하는 증가된 수의 T 세포를 갖는다.

[0044] 추가의 실시형태에서, PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제의 존재하에 활성화 및 자극된 T 세포의 모집단은, PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제의 부재하에 활성화 및 자극된 T 세포의 모집단과 비교하여, CD57 또는 KLRG1을 발현하지 않거나 보다 적은 CD57 또는 KLRG1을 발현한다.

[0045] 다양한 실시형태에서, 조작된 TCR 또는 CAR을 발현하는 재자극된 T 세포의 증식을 유지하고 분화를 감소시키는 방법으로서, (a) 조작된 TCR 또는 CAR을 포함하는 증식된 T 세포 모집단의 전부 또는 일부를 항-CD3 항체 또는 이의 CD3-결합 단편 및 항-CD28 항체 또는 이의 CD28-결합 단편과 접촉시켜 T 세포의 표면 상에서 CD28 부속 분자(accessory molecule)를 자극시키고, 이에 의해 활성화된 T 세포를 재자극시켜 증식시키는 단계를 포함하고, 상기 재자극된 T 세포가, PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제의 부재하에 자극 또는 재자극된 T 세포의 증식과 비교하여, 증식을 유지하고 분화를 감소시키는, 방법이 제공된다.

[0046] 특정 실시형태에서, 상기 세포는 조작된 TCR를 포함한다.

[0047] 특정 실시형태에서, 상기 세포는 CAR를 포함한다.

[0048] 다른 특정 실시형태에서, 상기 세포는 조작된 TCR 또는 CAR을 코딩하는 바이러스 벡터를 포함한다.

[0049] 추가의 실시형태에서, 상기 벡터는 레트로바이러스 벡터이다.

[0050] 추가의 실시형태에서, 상기 벡터는 렌티바이러스 벡터이다.

[0051] 특정 실시형태에서, 상기 CAR은 알파 폴레이트 수용체, 5T4, $\alpha_v\beta_6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FRα, GD2, GD3, 글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11Rα, IL-13Rα2, 람다, 르위스-Y, Kappa, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 수르비빈, TAG72, TEM 및 VEGFR2로 이루어진 그룹으로부터 선택된 항원에 결합하는 세포외 도메인; CD8α; CD4, CD28, CD45, PD-1 및 CD152로 이루어진 그룹으로부터 선택된 폴리펩티드로부터 유래되는 막관통 도메인; CD28, CD54(ICAM), CD134(OX40), CD137(41BB), CD152(CTLA4), CD273(PD-L2), CD274(PD-L1) 및 CD278(ICOS)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 세포내 공자극 시그날전달 도메인; 및 CD3ζ 시그날전달 도메인을 포함한다.

[0052] 일부 실시형태에서, 상기 세포외 도메인은 항원에 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편을 포함한다.

[0053] 특정 실시형태에서, 상기 막관통 도메인은 CD8α 또는 CD28로부터 유래된다.

[0054] 추가의 실시형태에서, 상기 하나 이상의 공자극 시그날전달 도메인은 CD28, CD134 및 CD137로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0055] 특정 실시형태에서, 상기 CAR은 힌지 영역 폴리펩티드를 추가로 포함한다.

[0056] 추가의 실시형태에서, 상기 힌지 영역 폴리펩티드는 IgG1 또는 CD8α의 힌지 영역을 포함한다.

[0057] 추가의 실시형태에서, 상기 CAR은 시그날 펩티드를 포함한다.

[0058] 기타 특정 실시형태에서, 상기 시그날 펩티드는 IgG1 중쇄 시그날 폴리펩티드 또는 CD8α 시그날 폴리펩티드를 포함한다.

[0059] 특정 실시형태에서, 상기 PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제는 BEZ235, LY294002, GDC-0941, BYL719, GSK2636771, TGX-221, AS25242, CAL-101, IPI-145, MK-2206, GSK690693, GDC-0068, A-674563, CCT128930, AZD8055, INK128, 라파마이신, PF-04691502, 에베로리무스, BI-D1870, H89, PF-4708671, FMK, AT7867, NU7441, PI-103, NU7026, PIK-75, ZSTK474 및 PP-121로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0060] 추가의 실시형태에서, 상기 PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제는 BEZ235, LY294002 및 GDC-0941로 이루어진 그룹으로부터 선택된 pan-PI3K 억제제이다.

[0061] 기타 특정 실시형태에서, 상기 PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제는 BYL719, GSK2636771, TGX-221, AS25242, CAL-101 및 IPI-145로 이루어진 그룹으로부터 선택된 선택적 PI3K 억제제이다.

[0062] 기타 특정 실시형태에서, 상기 PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제는 PI3K 억제제 ZSTK474이다.

[0063] 특정 실시형태에서, 상기 PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제는 MK-2206, GSK690693 및 GDC-0068로 이루어진 그룹으로부터 선택된 pan-AKT 억제제이다.

[0064] 특정 실시형태에서, 상기 PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제는 선택적 AKT1 억제제 A-674563이다.

[0065] 추가의 실시형태에서, 상기 PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제는 선택적 AKT2 억제제 CCT128930이다.

[0066] 일부 실시형태에서, 상기 PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제는 AKT의 DNA-PK 활성화를 억제한다.

[0067] 특정 실시형태에서, 상기 PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제는 AKT의 PDK-1 활성화를 억제한다.

[0068] 특정 실시형태에서, 상기 PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제는 AKT의 mTORC2 활성화를 억제한다.

[0069] 특정 실시형태에서, 상기 PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제는 AKT의 HSP 활성화를 억제한다.

[0070] 추가의 실시형태에서, 상기 PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제는 AZD8055, INK128 및 라파마이신으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 pan-mTOR 억제제이다.

[0071] 추가의 실시형태에서, 상기 PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제는 PF-04691502 및 에베로리무스로 이루어진 그룹으로부터 선택된 선택적 mTORC1 억제제이다.

[0072] 일부 실시형태에서, 상기 PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제는 BI-D1870, H89, PF-4708671, FMK 및 AT7867로 이루어진 그룹으로부터 선택된 s6 키나제 억제제이다.

[0073] 기타 특정 실시형태에서, 상기 PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제는 NU7441, PI-103, NU7026, PIK-75 및 PP-121로 이루어진 그룹으로부터 선택된 DNA-PK 억제제이다.

[0074] 특정 실시형태에서, PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제의 존재하에 재자극된 활성화 T 세포의 모집단은, PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제의 부재하에 활성화 및 자극된 T 세포의 모집단과 비교하여, CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122 및 CD127로 이루어진 그룹 중에서 선택된 하나 이상의 마커를 발현하는 증가된 수의 T 세포를 갖는다.

[0075] 추가의 실시형태에서, PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제의 존재하에 재자극된 활성화 T 세포의 모집단은, PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제의 부재하에 활성화 및 자극된 T 세포의 모집단과 비교하여, CD57 또는 KLRG1을 발현하지 않거나 보다 적은 CD57 또는 KLRG1을 발현한다.

[0076] 다양한 실시형태에서, 조작된 TCR 또는 CAR을 포함하는 벡터를 포함하는 T 세포의 모집단으로서, 상기 세포가 PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제의 존재하에 증식하도록 활성화 및 자극되는, T 세포의 모집단이 제공된다.

[0077] 다양한 특정 실시형태에서, 조작된 TCR 또는 CAR을 포함하는 벡터를 포함하는 T 세포의 모집단으로서, 상기 세포는 PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제의 존재하에 증식하도록 활성화 및 자극되고, 증식된 면역 작동 세포(immune effector cell)의 모집단의 전부 또는 일부를 항-CD3 항체 또는 이의 CD3-결합 단편 및 항-CD28 항체 또는 이의 CD28-결합 단편과 접촉시킴으로써 재자극시키고, 이에 의해 면역 작동 세포의 표면 상에서 CD28 부속 분자를 자극시키는, T 세포의 모집단이 제공된다.

[0078] 특정 실시형태에서, 상기 면역 작동 세포는 T 세포를 포함한다.

[0079] 한 가지 실시형태에서, 면역 작동 세포는 TIL이다.

[0080] 다양한 실시형태에서, 본원에서 의도된 면역 작동 세포의 모집단 및 생리학적으로 허용되는 부형제를 포함하는, 조성물이 제공된다.

[0081] 다양한 특정 실시형태에서, 치료학적 유효량의 본원에서 의도된 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법이 제공된다.

[0082] 특정 실시형태에서, 상기 암은 빌름 종양, 유윙 육종, 신경내분비 종양, 교모세포종, 신경아세포종, 흑색종, 피부암, 유방암, 결장암, 직장암, 전립선암, 간암, 신장암, 췌장암, 폐암, 담도암, 자궁경부암, 자궁내막암, 식도암, 위암, 두경부암, 갑상선 수질암, 난소암, 신경교종, 림프종, 백혈병, 골수종, 급성 림파구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종 및 방광암으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0083] 한 가지 실시형태에서, 상기 암은 바이러스 감염, 예를 들면, CMV, HPV 또는 EBV에 의한 감염과 연관되거나 이의 의해 유발된다.

[0084] 추가의 실시형태에서, 상기 암은 췌장암이고, 상기 세포외 결합 도메인은 PSCA 또는 MUC1의 에피토프에 결합한다.

[0085] 일부 실시형태에서, 상기 암은 방광암이고, 상기 세포외 결합 도메인이 PSCA 또는 MUC1의 에피토프에 결합한다.

[0086] 추가의 실시형태에서, 상기 암은 다형성 교모세포종이고, 상기 세포외 결합 도메인은 EPHA2, EGFRvIII 또는 CSPG4의 에피토프에 결합한다.

[0087] 특정 실시형태에서, 상기 암은 폐암이고, 상기 세포외 결합 도메인은 PSCA 또는 GD2의 에피토프에 결합한다.

[0088] 특정 실시형태에서, 상기 암은 유방암이고, 상기 세포외 결합 도메인은 CSPG4 또는 HER2의 에피토프에 결합한다.

[0089] 추가의 실시형태에서, 상기 암은 흑색종이고, 상기 세포외 결합 도메인은 CSPG4 또는 GD2의 에피토프에 결합한다.

[0090] 특정 실시형태에서, 상기 암은 B-세포 악성종양이고, 상기 결합 도메인은 BCMA의 에피토프에 결합한다.

[0091] 다양한 실시형태에서, 치료학적 유효량의 본원에서 의도되는 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 이

를 필요로 하는 대상체에서 혈액학적 악성종양을 치료하는 방법이 제공된다.

[0092] 특정 실시형태에서, 상기 혈액학적 악성종양은 다발성 골수종(MM), 만성 림프구성 백혈병(CLL) 또는 비-호지킨 림프종(NHL)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 B-세포 악성종양이다.

[0093] 특정 실시형태에서, 상기 MM은 현성 다발성 골수종, 무증상 다발성 골수종, 형질 세포 백혈병, 비-분비성 골수종, IgD 골수종, 골경화성 골수종, 골의 고립성 형질세포종 및 수질외 형질세포종으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0094] 특정 실시형태에서, 상기 NHL은 버킷 림프종, 만성 림프구성 백혈병/소림프구성 림프종(CLL/SLL), 광범위 큰 B-세포 림프종, 여포성 림프종, 면역모 대세포 림프종, 전구체 B-림프아구성 림프종 및 맨틀 세포 림프종으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

도면의 간단한 설명

[0095] **도 1**은 AKT 억제제로 처리된 T 세포에서 T 세포 증식의 유지의 대표적 예를 나타낸다. T 세포를 다양한 농도의 AKT 억제제, MK-22067과 함께 최대 7일 동안 배양했다. 최우측 패널은 6개 정상 공여체 PBMC 샘플로부터 개시된 T 세포 배양물로부터 분화된 T 세포 퍼센트를 나타낸다. 최우측 패널에서 각각의 심볼은 적정된 MK-2206 용량과 병행하여 수행된 독자의 배양을 나타낸다. 최좌측 패널은 이들 실험의 대표적 예를 나타낸다. A) MK-2206과 함께 배양 3일 후, T 세포 증식은 무처리 대조군과 비교할 때에 약간만 감소했다. B) MK-2206과 함께 배양 7일 후, T 세포 증식은 무처리 대조군과 비교하여 실질적으로 상이하지 않았다.

도 2는 AKT 억제제로 처리된 T 세포의 CD62L 발현의 대표적 예를 나타낸다. T 세포를 다양한 농도의 AKT 억제제, MK-22067과 함께 최대 7일 동안 배양했다. 최우측 패널은 6개 정상 공여체 PBMC 샘플로부터 개시된 T 세포 배양물로부터 CD62L 발현 T 세포 퍼센트를 나타낸다. 최우측 패널에서 각각의 심볼은 적정 MK-2206 용량과 병행하여 수행된 독자의 배양을 나타낸다. 최좌측 패널은 이들 실험으로부터의 대표적 예를 나타낸다. A) MK-2206과 함께 배양 3일 후, MK-2206 처리된 T 세포 상에서 CD62L 발현은 무처리 대조군과 비교할 때 실질적으로 상이하지 않았다. B) 배양 7일 후, MK-2206 처리된 T 세포는 무처리 대조군과 비교하여 현저히 높은 수준의 CD62L 발현을 나타냈다.

도 3은 MK-2206, TCN 또는 ZSTK474와 함께 배양 말기에 유동 세포계수에 의해 평가된 항-BCMA CAR T 세포 상에서 CD62L의 발현을 나타낸다. MK-2206 및 ZSTK474는 IL-2 단독 또는 TCN으로 처리된 CAR T 세포 배양물과 비교하여 현저히 높은 CD62L 발현을 가졌다.

도 4는 IL-2, IL-7 및 IL-15, MK-2206, ZST747 또는 TCN과 함께 배양된 항-BCMA CAR T 세포로 처리된 마우스에서 다발성 골수종 종양의 평균 종양 용적을 나타낸다. IL-7 및 IL-15, MK-2206 또는 ZST747과 함께 배양된 항-BCMA CAR T 세포는 표준 IL-2와 함께 배양된 항-BCMA CAR T 세포와 비교하여 유사한 수준의 항-종양 활성을 나타냈다. TCN과 함께 배양된 항-BCMA CAR T 세포는 항-종양 반응을 나타내지 않았다.

도 5는 다우디 종양 모델에서 IL-2, IL-7/15, MK-2206, TCN 또는 ZSTK474로 처리된 항-BCMA CAR T 세포의 항-종양 활성을 나타낸다. 다우디 종양 진행은 IL-2- 또는 IL7/15-배양된 항-BCMA CAR T 세포로 처리한 후에 영향을 받지 않았다. MK-2206 또는 ZST474와 함께 배양된 항-BCMA CAR T 세포는 완전한 종양 퇴행을 유발했다.

도 6은, 완전히 퇴행된 100mm^3 RPMI-8226 종양을 갖는, IL-2-, MK-2206- 또는 ZSTK474-배양된 항-BCMA CAR T 세포로 처리된 동물에서 ZSTK474-배양된 항-BCMA CAR T 세포의 지속성을 나타낸다. 동물은 13일 후 반대측 옆구리에 RPMI-8226으로 재공격했다(rechallenged). IL-2 배양된 CAR T 세포로 처리된 동물은 종양 증식을 방지할 수 없었다. ZSTK474-배양된 항-BCMA CAR T 세포로 처리된 모든 동물은 종양 생착(tumor engraftment)의 어떠한 증거도 갖지 않았다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0096] **A. 개요**

[0097] 본 발명은 일반적으로 T 세포 조성물을 제조하는 개선된 방법에 관한 것이다. 어떠한 특정 이론에 구속시키고자 하는 것은 아니지만, 본원에서 의도된 본 발명의 방법은, 당해 기술분야에서 기존의 T 세포 조성물과 비교하여, 분화의 동시 감소와 함께 우수한 특성, 예를 들면, 생체내에서 증가된 생존률, 확장 및 지속성을 갖는 T 세포를 생성하기 위해 T 세포 증식을 분화로부터 분리한다(uncoupled). 따라서, 본원에서 의도되는 T 세포 조성

물은 강력한 T 세포를 포함하고, 이는 어린 또는 천연(naive) T 세포 모집단의 특성을 갖고, 보다 적은 분화와 함께 복수회의 확장이 가능하다. 더욱이, 확장된 세포는 후속적으로 분화하고 면역 작동 세포 기능을 제공할 수 있다.

[0098] 다양한 실시형태에서, T 세포 증식을 유지하거나 최소한으로 감소시키고 T 세포 확장 동안 T 세포 분화를 감소, 저하 또는 완화시키는 T 세포를 제조하는 방법이 제공된다. 특히 바람직한 실시형태에서, 조작된 T 세포 조성물은 본원에서 의도된 방법에 의해 제조되고, 이는 T 세포 양자 면역요법의 유효성을 추가로 증가시킬 수 있다. 본원에서 의도되는 제조된 T 세포 조성물은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 암, 감염 질환, 자가면역 질환, 염증 질환 및 면역결핍증을 포함하는 다수의 상태의 치료 또는 예방에 유용하다. 어떠한 특정 이론에 구속시키고자 하는 것은 아니지만, 본 발명자들은 T 세포에서 세포 시그날전달 경로의 조절(이러한 경로는 암 세포에서 증식과 통상 연관된다)이, 세포 시그날전달 경로가 조절되지 않은 T 세포와 비교하여, T 세포 증식을 실질적으로 유지 또는 비현실적으로 감소시키고 T 세포 확장 동안 T 세포 분화를 감소시키는 것을 놀랍게도 및 예상치 않게 밝혀냈다.

[0099] 한 가지 실시형태에서, 조작된 T 세포를 제조하는 방법은 T 세포를, 세포에서 PI3K/AKT/mTOR 경로를 억제하는 제제(agent)와 접촉시키는 것을 포함한다. 상기 세포는 활성화 및 확장 전에, 동안 및/또는 후에 접촉될 수 있다. 조작된 T 세포 조성물은 이들이 분화의 실질적 증가 없이 복수회의 확장을 겪을 수 있도록 충분한 T 세포 효력을 보유한다.

[0100] 따라서, 본원에서 의도된 방법 및 조성물은 기존의 양자 세포 면역요법과 비교하여 양적 개선을 나타낸다.

[0101] 본 발명의 실시는, 반대로 명확하게 지시하지 않는 한, 당해 기술분야의 숙련가의 범위 내에 있는 화학, 생화학, 유기 화학, 분자 생물학, 미생물학, 재조합 DNA 기술, 유전학, 면역학 및 세포 생물학의 통상의 방법을 사용할 것이고, 이들 중 다수는 예시의 목적을 위해 하기에 기재되어 있다[참조: Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(3rd Edition, 2001); Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(2nd Edition, 1989); Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(1982); Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*(John Wiley and Sons, updated July 2008); *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover, *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II(IRL Press, Oxford, 1985); Anand, T*echniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, New York, 1992); T*ranscription and Translation*(B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*(1984); Harlow and Lane, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998) *Current Protocols in Immunology* Q. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober, eds., 1991); *Annual Review of Immunology*; as well as monographs in journals such as *Advances in Immunology*].

[0102] 본원에서 인용된 모든 공보, 특허 및 특허원은 이의 전체가 참조로서 본원에 도입된다.

[0103] **B. 정의**

[0104] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 숙련가에 의해 통상 이해되는 의미와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것들과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 재료가 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있고, 조성물, 방법 및 재료의 바람직한 실시형태는 본원에 기재되어 있다. 본 발명의 목적을 위해, 하기 용어가 이하에 정의된다.

[0105] 관사 "a", "an" 및 "the"는 관사의 문법상 목적어의 하나 또는 하나 이상(즉, 적어도 하나)를 지칭하기 위해 본원에서 사용된다. 예를 들면, "요소"는 하나의 요소 또는 하나 이상의 요소를 의미한다.

[0106] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "약" 또는 "대략"은 기준 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1% 만큼 상이한 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 지칭한다. 특정 실시형태에서, 용어 "약" 또는 "대략"은, 수치를 선행하는 경우, 당해 값 ± 15%, 10%, 5% 또는 1% 범위를 나타낸다.

[0107] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "실질적으로"는 기준 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상인 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 지칭한다. 한 가지 실시형태에서, "실질적으로 동일한"은, 기준 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이와 대략 동일한 효과, 예를

들면, 생리학적 효과를 생성하는 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 지칭한다.

[0108] 본 명세서 전체에 걸쳐, 당해 문맥이 별도로 요구하지 않는 한, 단어 "포함하다", "포함한다" 및 "포함하는"은 언급된 단계 또는 요소, 또는 단계 또는 요소의 그룹을 포함하지만, 어떤 다른 단계 또는 요소, 또는 단계 또는 요소의 그룹을 배제하지는 않는 것을 의미하는 것으로 이해될 것이다. "~로 이루어진"은 문구 "~로 이루어진"에 후속하는 것이 모든 것을 포함하며, 이들로 제한되는 것을 의미한다. 따라서, 문구 "~로 이루어진"은 열거된 요소가 필요하거나 필수적인 것이고, 존재할 수 있는 다른 요소가 없음을 나타낸다. "본질적으로 ~로 이루어진"은 문구 다음에 열거된 임의의 요소를 포함하고, 열거된 요소의 개시에 명시된 활성 또는 작용을 저해하지 않거나 명시된 활성 또는 작용에 기여하는 기타 요소들로 제한되는 것을 의미한다. 따라서, 문구 "본질적으로 ~로 이루어진"은 열거된 요소가 필요하거나 필수적이지만, 임의적이고 열거된 요소의 활성 또는 작용에 영향을 미치는지 아닌지의 여부에 따라 존재할 수 있거나 존재하지 않을 수 있는 기타 요소가 없음을 나타낸다.

[0109] 본 명세서 전체에 걸쳐 "하나의 실시형태" 또는 "실시형태", "특정한 실시형태", "관련 실시형태", "특정 실시형태", "추가의 실시형태" 또는 "추가 실시형태" 또는 이들의 조합에 대한 언급은 실시형태와 관련하여 기재된 특정한 양상, 구조 또는 특징이 본 발명의 적어도 하나의 실시형태에 포함되는 것을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸쳐 다양한 위치에서 상기 문구의 출현은 반드시 모두가 동일한 실시형태를 지칭하는 것은 아니다. 더욱이, 특정한 특색, 구조 또는 특징은 하나 이상의 실시형태에서 모든 적합한 방식으로 조합될 수 있다.

[0110] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "T 세포 제조" 또는 "T 세포의 제조 방법" 또는 동등한 용어는 T 세포의 치료 조성물을 생성하는 방법을 지칭하고, 제조 방법은 하기 단계 중의 하나 이상 또는 전부를 포함할 수 있다: 수거, 자극, 활성화 및 확장.

[0111] 용어 "T 세포" 또는 "T 림파구"는 당해 기술분야에서 인식되고, 흉선세포, 천연 T 림파구, 미성숙 T 림파구, 성숙 T 림파구, 휴지 T 림파구 또는 활성화된 T 림파구를 포함하는 것으로 의도된다. T 세포는 T 헬퍼(Th) 세포, 예를 들면, T 헬퍼 1(Th1) 또는 T 헬퍼 2(Th2) 세포일 수 있다. T 세포는 헬퍼 T 세포(HTL; $CD4^+$ T 세포) $CD4^+$ T 세포, 세포독성 T 세포(CTL; $CD8^+$ T 세포), 종양 침윤 세포독성 T 세포(TIL; $CD8^+$ T 세포), $CD4^+CD8^+$ T 세포, $CD4^-CD8^-$ T 세포, 또는 T 세포의 임의의 기타 서브세트일 수 있다. 특정 실시형태에서 사용하기에 적합한 T 세포의 기타 예시적 모집단은 천연 T 세포 및 기억 T 세포를 포함한다.

[0112] "강력한 T 세포" 및 "어린 T 세포"는 특정 실시형태에서 상호 교대로 사용하고, T 세포가 증식 및 분화의 동시 감소를 가능하게 하는 T 세포 표현형을 지칭한다. 특정 실시형태에서, 어린 T 세포는 "천연 T 세포"의 표현형을 갖는다. 다양한 실시형태에서, 본원에서 의도된 제조 방법은 어린 T 세포, 즉 T 세포 증식이 T 세포 자극, 활성화 및 확장 동안 T 세포 분화로부터 탈커플링된(uncoupled) 세포를 생성한다. 임의의 특정 이론에 구속시키고자 하는 것은 아니지만, 조성물 및 방법으로 제조된 강력한 T 세포는 양자 전이 후에 높은 항종양 효과를 갖는 것을 의도한다. 특정 실시형태에서, 어린 T 세포는 하기 생물학적 마커: CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122 및 CD127 중의 하나 이상 또는 전부를 포함한다. 한 가지 실시형태에서, 어린 T 세포는 하기 생물학적 마커: CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122 및 CD127 중의 하나 이상 또는 전부를 포함하고, CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, TIM3 및 LAG3의 발현을 결여한다.

[0113] 본원에 사용된 바와 같이, "증식"은 세포 분열, 세포의 대칭적 또는 비대칭적 분열의 증가를 지칭한다. 특정 실시형태에서, "증식"은 T 세포의 대칭적 또는 비대칭적 분열을 지칭한다. "증가된 증식"은, 무처리 샘플 중의 세포와 비교하여 처리된 샘플에서 세포 수가 증가하는 경우에 발생한다.

[0114] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "분화"는 세포의 효력 또는 증식을 감소시키거나 세포를 보다 발달적으로 제한된 상태로 이동시키는 방법을 지칭한다. 특정 실시형태에서, 분화된 T 세포는 면역 작동 세포 기능을 획득한다.

[0115] "면역 작동 세포"는 하나 이상의 작동 기능(예: 세포독성 세포 사멸 활성, 사이토킨의 분비, ADCC 및/또는 CDC의 유도)을 갖는 면역계의 임의의 세포이다. 본원에서 의도된 예시적 면역 작동 세포는 림파구, 특히 세포독성 T 세포(CTL; $CD8^+$ T 세포), TIL 및 헬퍼 T 세포(HTL; $CD4^+$ T 세포)이다.

[0116] "변형된 T 세포"는 본원에서 의도되는 조작된 TCR 또는 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 도입에 의해 변형된

T 세포를 지칭한다. 변형된 T 세포는 유전적 및 비-유전적 변형(예: 에피좀 또는 염색체외) 둘 다를 포함한다.

[0117] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "유전적으로 조작된" 또는 "유전적으로 변형된"은 세포 중의 전체 유전 물질에 DNA 또는 RNA의 형태로 추가 외부 물질의 부가를 지칭한다.

[0118] 용어 "유전적으로 변형된 세포", "변형된 세포" 및 "재지시된 세포"는 상호 교대로 사용된다.

[0119] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "유전자 요법"은, 유전자의 발현을 회복, 수정 또는 변형시키거나 치료 폴리펩티드, 예를 들면, TCR 또는 CAR 및/또는 하나 이상의 사이토킨을 발현시킬 목적으로 세포 중의 전체 유전 물질에 DNA 또는 RNA의 형태로 추가 유전 물질의 도입을 지칭한다. 특정 실시형태에서, T 세포는, 예를 들면, TCR 또는 CAR을 발현하는 에피좀 벡터를 세포에 도입함으로써 세포의 게놈을 변형시키지 않고서 조작된 TCR 또는 CAR을 발현하도록 조작된다.

[0120] 용어 "생체외"는 일반적으로 생물체 외부에서 발생하는 활성, 예를 들면, 바람직하게는 천연 조건의 최소 변형과 함께, 생물체 외부의 인공 환경에서 살아있는 조직에서 또는 살아있는 조직에 대해 수행된 실험 또는 측정을 지칭한다. 특정 실시형태에서, "생체외" 절차는 생물체로부터 채취하고 실험 장치에서 통상 멸균 조건하에, 환경에 따라, 통상 수시간 또는 최대 약 24시간, 그러나 최대 48시간 또는 72시간 동안 배양 또는 조절한 생세포 또는 조직을 수반한다. 특정 실시형태에서, 이러한 조직 또는 세포는 수집하고 동결시킬 수 있고, 차후에 생체외 처리를 위해 해동시킬 수 있다. 살아있는 세포 또는 조직을 사용하여 수일 이상 지속하는 조직 배양 실험 또는 절차는 통상 "시험관내"인 것으로 간주되며, 특정 실시형태에서, 이러한 용어는 생체외와 상호 교대로 사용될 수 있다.

[0121] 용어 "생체내"는 일반적으로 생물체 내부에서 발생하는 활성, 예를 들면, 세포 자가-복제 및 세포의 확장을 지칭한다. 한 가지 실시형태에서, 용어 "생체내 확장"은 생체내에서 수를 증가시키는 세포 모집단의 능력을 지칭한다.

[0122] 용어 "자극"은, 이의 동족 리간드와 자극 분자를 결합(예: TCR/CD3 복합체)시켜, 이로써 한정되는 것은 아니지만, TCR/CD3 복합체를 통해 시그날 형질도입을 포함하는 시그날 형질도입 사상을 매개함으로써 유도된 일차 반응을 지칭한다.

[0123] "자극 분자"는 동족 자극 리간드와 특이적으로 결합하는 T 세포 상의 분자를 지칭한다.

[0124] "자극 리간드"는, 본원에서 사용된 바와 같이, 항원 제시 세포(예: aAPC, 수지사 세포, B-세포 등) 상에 존재하는 경우, T 세포 상에서 동족 결합 파트너(본원에서 "자극 분자"로서 지칭됨)와 특이적으로 결합하여, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 활성화, 면역 반응의 개시, 증식 등을 포함하는 T 세포에 의한 일차 반응을 매개할 수 있는 리간드를 지칭한다. 자극 분자는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, CD3 리간드, 예를 들면, 항-CD3 항체 및 CD2 리간드, 예를 들면, 항-CD2 항체 및 펩티드, 예를 들면, CMV, HPV, EBV 펩티드를 포함한다.

[0125] 용어 "활성화"는 검출가능한 세포 증식을 유도하도록 충분히 자극된 T 세포의 상태를 지칭한다. 특정 실시형태에서, 활성화는 또한 유도된 사이토킨 생성 및 검출가능한 작동 기능과 연관될 수 있다. 용어 "활성화된 T 세포"는, 그 중에서도, 증식하고 있는 T 세포를 지칭한다. TCR 단독에 의해 생성된 시그날은 T 세포의 충분한 활성화에 불충분하고, 하나 이상의 이차 또는 공자극 시그날이 또한 요구된다. 따라서, T 세포 활성화는 TCR/CD3 복합체 및 하나 이상의 이차 공자극 시그날을 통한 일차 자극 시그날을 포함한다. 공자극은 일차 활성화 시그날, 예를 들면, CD3/TCR 복합체 또는 CD2를 통한 자극을 제공받은 T 세포에 의한 증식 및/또는 사이토킨 생성에 의해 입증될 수 있다.

[0126] "공자극 시그날"은, 일차 시그날과 조합, 예를 들면, TCR/CD3 연결과 조합하여, T 세포 증식, 사이토킨 생성, 및/또는 특정 분자(예: CD28)의 상향조절 또는 하향 조절을 유도하는 시그날을 지칭한다.

[0127] "공자극 리간드"는 공자극 분자에 결합하는 분자를 지칭한다. 공자극 리간드는 가용성일 수 있거나, 표면 상에 제공될 수 있다. "공자극 분자"는 공자극 리간드(예: 항-CD28 항체)와 특이적으로 결합하는 T 세포 상의 동족 결합 파트너를 지칭한다.

[0128] 본원에서 사용되는 "자기"는 동일한 대상체로부터의 세포를 지칭한다.

[0129] 본원에서 사용되는 "동종"은 비교하는 세포와 유전적으로 상이한 동일한 종의 세포를 지칭한다.

[0130] 본원에서 사용되는 "동계"는 비교하는 세포와 유전적으로 동일한 상이한 대상체의 세포를 지칭한다.

[0131] 본원에서 사용되는 "이종"은 비교하는 세포와 상이한 종의 세포를 지칭한다. 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 세포는 동종이계이다.

[0132] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "개체" 및 "대상체"는 종종 상호 교대로 사용되며, 본원의 다른 개소에 기재된 유전자 치료 벡터, 세포 기반 치료제 및 방법에 의해 치료될 수 있는 암의 증상을 나타내는 임의의 동물을 지칭한다. 적합한 대상체(예: 환자)는 실험실 동물(예: 마우스, 랫트, 래빗 또는 기니아 피그), 농장 동물 및 가축 또는 애완동물(예: 고양이 또는 개)을 포함한다. 비-인간 영장류 및, 바람직하게는, 인간 환자가 포함된다. 전형적인 대상체는, 암을 갖거나, 암으로 진단되거나, 암을 가질 위험에 있는 인간를 포함한다.

[0133] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "환자"는 본원의 다른 개소에 개시된 유전자 치료 벡터, 세포-기반 치료제 및 방법으로 치료될 수 있는 특정 징후로 진단된 대상체를 지칭한다.

[0134] 본원에 사용된 바와 같이, "치료" 또는 "치료하는"은 질환 또는 병리학적 상태의 증상 또는 병리학에 대한 모든 유익하거나 바람직한 효과를 포함하며, 치료될 질환 또는 상태(예: 암)의 하나 이상의 측정가능한 마커의 최소 감소도 포함할 수 있다. 치료는 임의로, 질환 또는 상태의 증상의 감소 또는 개선, 또는 질환 또는 상태의 진행의 지연을 포함할 수 있다. "치료"는 질환 또는 상태, 또는 이의 연관된 증상을 반드시 완전히 근절하거나 치유하는 것을 나타내는 것은 아니다.

[0135] 본원에서 사용된 바와 같이, "예방하다", 및 "예방된", "예방하는" 등의 유사한 단어들은 질환 또는 상태(예: 암)의 출현 또는 재발의 가능성을 방지, 억제 또는 감소시키는 접근법을 나타낸다. 또한, 이는 질환 또는 상태의 발현 또는 재발을 지연시키거나, 질환 또는 상태의 증상의 출현 또는 재발을 지연시키는 것을 나타낸다. 본원에서 사용된 바와 같이, "예방" 및 유사한 단어들은 또한 질환 또는 상태의 발현 또는 재발 전에 질환 또는 상태의 강도, 영향, 증상 및/또는 부담을 감소시키는 것을 포함한다.

[0136] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "양"은 임상 결과를 포함하여 유리한 또는 목적하는 예방적 또는 치료적 결과를 달성하기 위한 유전적으로 치료 세포(예: T 세포)의 "효과적 양" 또는 "유효량"을 지칭한다.

[0137] "예방적 유효량"은 목적하는 예방적 결과를 달성하기에 효과적인 유전적으로 변형된 치료 세포의 양을 지칭한다. 전형적으로, 그러나 반드시 필요한 것은 아니지만, 예방적 용량은 질환의 초기 단계 전에 또는 초기 단계에 대상체에서 사용되기 때문에, 예방적 유효량은 치료적 유효량보다 적다.

[0138] 유전적으로 변형된 치료 세포의 "치료학적 유효량"은 개체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 개체에서 목적하는 반응을 유발하는 T 세포의 능력 등의 요인에 따라 달라질 수 있다. 치료적 유효량은 또한 바이러스 또는 형질도입된 치료 세포의 임의의 독성 또는 유해 효과보다 치료학적으로 유리한 효과가 상회하는 것이다. 용어 "치료학적 유효량"은 대상체(예: 환자)를 "치료"하는데 효과적인 양을 포함한다. 치료적 유효량이 지시되는 경우, 투여되는 본 발명의 조성물의 정확한 양은 환자(대상체)의 연령, 체중, 종양 크기, 감염 또는 대사 정도 및 상태를 고려하여 주치의에 의해 결정될 수 있다.

[0139] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "암"은 일반적으로 비정상 세포가 조절 없이 분열하고 부근 조직으로 침입할 수 있는 질환 또는 상태의 부류에 관한 것이다.

[0140] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "악성"은 종양 세포의 그룹이 하나 이상의 비조절된 성장(즉, 정상 한계를 초과하는 분열), 침윤(즉, 인접 조직으로의 침입 및 파괴) 및 전이(즉, 림프 또는 혈액을 통해 신체 중의 다른 장소로의 확산)를 나타내는 암이다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "전이"는 신체의 한 부분으로부터 다른 부분으로의 암의 확산을 지칭한다. 확산된 세포에 의해 형성된 종양은 "전이성 종양" 또는 "전이"라 불리운다. 전이성 종양은 본래(원발) 종양의 것과 유사한 세포를 함유한다.

[0141] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "양성" 또는 "비-악성"은 보다 크게 성장할 수 있지만 신체의 한 부분으로부터 다른 부분으로 확산하지 않는 종양을 지칭한다. 양성 종양은 자체-제한되고, 전형적으로 침입 또는 전이하지 않는다.

[0142] "암 세포" 또는 "종양 세포"는 암 성장의 개개 세포 또는 조직을 지칭한다. 종양은 일반적으로 세포의 비정상 성장에 의해 형성된 팽윤 또는 병변을 지칭하고, 이는 양성, 프리-악성 또는 악성일 수 있다. 대부분의 암은 종양을 형성하지만, 일부, 예를 들면, 백혈병은 반드시 종양을 형성하는 것은 아니다. 종양을 형성하는 이들 암의 경우, 용어 암(세포) 및 종양(세포)는 상호 교대로 사용된다. 개체에서 종양의 양은 종양의 수, 용적 또는 중량으로 측정될 수 있는 "종양 양"이다.

[0143] "감염성 질환"은 인간에서 인간으로 또는 생물체에서 생물체로 전달될 수 있고 미생물제(예: 감기)에 의해 유발

되는 질환을 지칭한다. 감염성 질환은 당해 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들면, 간염, 성 전달 질환(예: 클라미디아, 임질), 결핵, HIV/AIDS, 디프테리아, B형 간염, C형 간염, 콜레라 및 인플루엔자를 포함한다.

[0144] "자가면역 질환"은 신체가 이의 자신의 조직의 일부 구성분에 대한 면역원성(즉, 면역계) 반응을 생성하는 질환을 지칭한다. 달리 말하면, 면역계는 신체 내의 일부 조직 또는 시스템을 "자가"로서 인식하는 이의 능력을 상실하고, 이것이 외래인 것과 같이 이를 표적화하고 공격한다. 자가면역 질환은 주로 하나의 기관이 발병(예: 용혈성 빈혈 및 항-면역 갑상선염)되는 것들, 및 자가면역 질환 프로세스가 다수의 조직(예: 전신성 루프스 에리트네마토수스)을 통해 확산되는 것들로 분류할 수 있다. 예를 들면, 다발성 경화증은 뇌 및 척수의 신경 섬유를 둘러싸는 시스(sheath)에 의해 유발되는 것으로 생각된다. 이는 조정, 약한 및 시력 장애의 상실을 제공한다. 자가면역 질환은 당해 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들면, 하시모토 갑상선염, 그레이브 질환, 루푸스, 다발성 경화증, 류마티스성 관절염, 용혈성 비혈, 항-면역 갑상선염, 전신성 루프 에리테마토수스, 셀리아 질환, 크론병, 대장염, 당뇨병, 강피증, 건선 등을 포함한다.

[0145] "면역결핍증"은 면역계가 질환 또는 화학물질의 투여에 의해 절충되는 환자의 상태를 의미한다. 이 상태는 당해 시스템을 외래 물질에 대해 방어하는데 필요한 혈액 세포의 수 및 유형이 부족하게 한다. 면역결핍 상태 또는 질환은 당해 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들면, AIDS(후천성 면역결핍 증후군), SCID(중증 복합 면역결핍 질환), 선택적 IgA 결핍증, 공통의 가변 면역결핍, X-연쇄 무감마글로불린혈증, 만성 육아종 질환, 고-IgM 증후군 및 당뇨병을 포함한다.

[0146] "증강" 또는 "촉진" 또는 "증가" 또는 "확장"이란 일반적으로, 비히클 또는 대조군 분자/조성물에 의해 유발된 반응과 비교하여, 보다 많은 생리학적 반응(즉, 하류 효과)를 생성, 유도 또는 유발하는 본원에서 의도된 조성물의 능력을 지칭한다. 측정가능한 생리학적 반응은, 당해 기술분야에서의 이해 및 본원의 기재로부터 명백한 것들 중에서, T 세포 확장, 활성화, 지속성의 증가 및/또는 암 세포 사멸 능력에서의 증가를 포함할 수 있다. "증가된" 또는 "증강된" 양은 통상 "통계학적으로 유의한" 양이고, 비히클 또는 대조군 조성물에 의해 형성된 반응과 비교하여 1.1, 1.2, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30배 이상(예: 500, 1000배)(1 사이 및 1 초과의 모든 정수 및 소수점, 예를 들면, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8 등을 포함함)인 증가를 포함할 수 있다.

[0147] "감소" 또는 "저하" 또는 "저감" 또는 "경감" 또는 "완화"란, 비히클 또는 대조군 분자/조성물에 의해 유발된 반응과 비교하여 보다 적은 생리학적 반응(즉, 하류 효과)을 생성, 유도 또는 유발하는 본원에서 의도된 조성물의 능력을 일반적으로 지칭한다. "저하" 또는 "감소된" 양은 통상 "통계학적으로 유의한" 양이고, 비히클, 대조군 조성물 또는 특정 세포 계통에서의 반응에 의해 생성된 반응과 비교하여 1.1, 1.2, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30배 이상(예: 500, 1000배)(1 사이 및 1 초과의 모든 정수 및 소수점, 예를 들면, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8 등을 포함함)인 감소를 포함할 수 있다.

[0148] "유지하다" 또는 "보존하다" 또는 "유지" 또는 "변화 없는" 또는 "실질적 변화 없는" 또는 "실질적 감소 없는"이란 비히클, 대조군 분자/조성물에 의해 유발된 반응 또는 특정 세포 계통에서의 반응과 비교하여 세포에서 보다 적은 생리학적 반응(즉, 하류 효과)을 생성, 유도 또는 유발하는 본원에서 의도된 조성물의 능력을 일반적으로 지칭한다. 필적하는 반응은 기준 반응으로부터 유의적 차이 또는 측정가능한 차이가 없는 것이다.

[0149] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "특이적 결합 친화성" 또는 "특이적으로 결합하는" 또는 "특이적으로 결합된" 또는 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 표적화하는"은 배경 결합보다 큰 결합 친화성으로 또 다른 분자에 대한 한 분자의 결합을 기재한다. 결합 도메인(또는 결합 도메인을 포함하는 CAR 또는 결합 도메인을 함유하는 융합 단백질)은, 예를 들면, 약 10^5 M^{-1} 이상의 친화성 또는 Ka(즉, 1/M의 단위를 갖는 특정 결합 상호작용의 평형 해리 상수)로 표적 분자에 결합하거나 이와 연합하는 경우, 표적 분자에 대해 "특이적으로 결합한다". 특정 실시형태에서, 결합 도메인(또는 이의 융합 단백질)은 약 10^6 M^{-1}, 10^7 M^{-1}, 10^8 M^{-1}, 10^9 M^{-1}, 10^{10} M^{-1}, 10^{11} M^{-1}, 10^{12} M^{-1} 또는 10^{13} M^{-1} 이상의 Ka로 표적에 결합한다. "고도 친화성" 결합 도메인(또는 이의 단일쇄 융합 단백질)은 적어도 10^7 M^1, 적어도 10^8 M^{-1}, 적어도 10^9 M^{-1}, 적어도 10^{10} M^{-1}, 적어도 10^{11} M^{-1}, 적어도 10^{12} M^{-1}, 적어도 10^{13} M^{-1} 또는 그 이상의 K_a를 갖는 결합 도메인을 지칭한다.

[0150] 또는, 친화성은 M의 단위를 갖는 특정 결합 상호작용의 평형 해리 상수(K_d)(예: 10^{-5} M 내지 10^{-13} M 또는 그 이하)로서 정의될 수 있다. 본 개시에 따른 결합 도메인 폴리펩티드 및 CAR 단백질의 친화성은 통상의 기술, 예를 들면, 경쟁 ELISA(효소-결합된 면역흡착 검정)에 의해, 또는 표지된 리간드를 사용하거나 바이아코어

(Biacore) T100(이는 뉴저지주 피스카타웨이 바이아코어 인코포레이티드로부터 이용가능함) 등의 표면-플라스몬 공명 장치 또는 각각 코닝(Corning) 및 퍼킨 엘머(Perkin Elmer)로부터 이용가능한 EPIC 시스템 또는 EnSpire 등의 광학 바이오센서 기술을 사용하는 결합 회합 또는 치환 분석에 의해 용이하게 측정할 수 있다[참조: Scatchard *et al.*(1949) Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660; 및 미국 특허 제5,283,173호; 제5,468,614호, 또는 그 등가물].

[0151] 한 가지 실시형태에서, 특이적 결합의 친화성은 배경 결합보다 약 2배 크거나, 배경 결합보다 약 5배 크거나, 배경 결합보다 약 10배 크거나, 배경 결합보다 약 20배 크거나, 배경 결합보다 약 50배 크거나, 배경 결합보다 약 100배 크거나, 배경 결합보다 약 1000배 크다.

[0152] "항원(Ag)"은, 동물 내로 주입되거나 흡수되는 조성물(예: 종양-특이적 단백질을 포함하는 것)을 포함하는, 동물에서 항체 또는 T 세포 반응의 생성을 자극할 수 있는 화합물, 조성물 또는 물질을 지칭한다. 항원은, 개시된 항원 등의 이종성 항원에 의해 유도된 것들을 포함하여 특정의 체액성 또는 세포 면역성의 생성물과 반응한다. "표적 항원" 또는 "목적하는 표적 항원"은, 본원에서 의도되는 CAR의 결합 도메인이 결합하도록 설계되어 있는 항원이다.

[0153] "에피토프" 또는 "항원성 결정기"는 결합제가 결합하는 항원의 영역을 지칭한다.

[0154] "단리된 펩티드" 또는 "단리된 폴리펩티드" 등은, 본원에서 사용된 바와 같이, 세포 환경으로부터 및 세포의 다른 성분과의 회합으로부터 펩티드 또는 폴리펩티드 분자의 시험관내 단리 및/또는 정제를 지칭하고, 즉 이는 생체내 물질과 현저하게 회합하지 않는다. 유사하게는, "단리된 세포"는 생체내 조직 또는 기관으로부터 수득되고 세포외 매트릭스를 실질적으로 포함하지 않는 세포를 지칭한다.

[0155] 본원에 사용된 바와 같이, "단리된 폴리뉴클레오티드"는 천연-발생 상태에서 이에 인접하는 서열로부터 정제된 폴리뉴클레오티드, 예를 들면, 통상 단편에 인접하는 서열로부터 제거된 DNA 단편을 지칭한다. "단리된 폴리뉴클레오티드"는 또한 천연에 존재하지 않고 인간의 손에 의해 제조된 상보성 DNA(cDNA), 재조합 DNA 또는 기타 폴리뉴클레오티드를 지칭한다.

[0156] **C. T 세포 제조 방법**

[0157] 본원에서 의도된 방법에 의해 제조된 T 세포는 개선된 양자 면역요법 조성물을 제공한다. 임의의 특정 이론에 구속시키고자 하는 것은 아니지만, 본원에서 의도된 방법에 의해 제조된 T 세포 조성물은 생체내에서 증가된 생존률, 분화의 상대적 부재하에 확장 및 지속성을 포함하는 우수한 특성을 충족시키는 것으로 생각된다. 한 가지 실시형태에서, T 세포의 제조 방법은 세포를, PI3K/Akt/mTOR 세포 시그날전달 경로를 조절하는 하나 이상의 제제와 접촉시키는 것을 포함한다. 다양한 실시형태에서, T 세포는 임의의 공급원으로부터 수득할 수 있고, 제조 프로세스의 활성화 및/또는 확장기 동안 제제와 접촉시킬 수 있다. 수득되는 T 세포 조성물은 하기 생물마커: CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122 및 CD127 중의 하나 이상을 증식 및 발현시키는 능력을 갖는 발달적으로 강력한 T 세포가 농후하다.

[0158] 한 가지 실시형태에서, 유지된 수준의 증식 및 감소된 분화를 포함하는 변형된 T 세포가 제조된다. 특정 실시형태에서, T 세포는 T 세포를 자극하여, 하나 이상의 자극 시그날 및 PI3K/Akt/mTOR 세포 시그날전달 경로의 억제제인 제제의 존재하에 활성화 및 증식되도록 함으로써 제조된다.

[0159] 이어서, T 세포를 변형시켜 하나 이상의 조작된 TCR 또는 CAR을 발현시킬 수 있다. 한 가지 실시형태에서, T 세포는 T세포를, 조작된 TCR 또는 CAR을 포함하는 바이러스 벡터로 형질도입시킴으로써 변형된다. 특정 실시형태에서, T 세포는 PI3K/Akt/mTOR 세포 시그날전달 경로의 억제제의 존재하에 자극 및 활성화시키기 전에 변형된다. 특정 실시형태에서, T 세포는 PI3K/Akt/mTOR 세포 시그날전달 경로의 억제제의 존재하에 자극 및 활성화 12시간, 24시간, 36시간 또는 48시간 이내에 변형된다.

[0160] T 세포가 활성화된 후, 세포는 배양하여 증식시킨다. T 세포는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10회 또는 그 이상의 확장으로 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7일, 적어도 2주, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개월 또는 그 이상 동안 배양할 수 있다.

[0161] 다양한 실시형태에서, T 세포 조성물은 PI3K/AKT/mTOR 경로의 하나 이상의 억제제의 존재하에 제조된다. 억제제는 경로에서 하나 이상의 활성 또는 단일 활성을 표적화할 수 있다. 어떠한 특정 이론에 구속시키고자 하는 것은 아니지만, 제조 프로세스의 자극, 활성화 및/또는 확장기 동안 PI3K/AKT/mTOR 경로의 하나 이상의 억제제를 사용한 T 세포의 치료 또는 접촉은 어린 T 세포를 우선적으로 증가시키고, 이에 의해 우수한 치료학적 T 세

포 조성물을 생성한다.

[0162] 특정 실시형태에서, 조작된 T 세포 수용체를 발현하는 T 세포의 증식을 증가시키는 방법이 제공된다. 이러한 방법은, 예를 들면, 대상체로부터 T 세포의 공급원을 수거하는 단계, PI3K/AKT/mTOR 경로의 하나 이상의 억제제의 존재하에 T 세포를 자극 및 활성화시키는 단계, T 세포를 변형시켜 조작된 TCR 또는 CAR을 발현시키는 단계 및 배양물에서 T 세포를 확장시키는 단계를 포함한다.

[0163] 특정 실시형태에서, T 세포의 모집단을 생성하는 방법은 하기 생물마커: CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122 및 CD127 중의 하나 이상의 발현을 위해 농후화시킨다. 관련 실시형태에서, CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122 및 CD127를 발현시키고 CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, TIM3 및 LAG3을 발현시키지 않거나 낮은 수준으로 발현시키는 T 세포를 증가시키는 방법이 제공된다. 본원의 다른 개소에서 언급된 바와 같이, 어린 T 세포 생물마커의 발현 수준은 보다 분화된 T 세포 또는 면역 작동 세포 모집단에서 이러한 마커의 발현 수준과 비교된다.

[0164] 한 가지 실시형태에서, 말초혈 단핵 세포(PBMC)는 본원에서 의도된 T 세포 제조 방법에서 T 세포의 공급원으로 사용된다. PBMC는 $CD4^+$, $CD8^+$, 또는 $CD4^+$ 및 $CD8^+$일 수 있고 단핵구, B 세포, NK 세포 및 NKT 세포 등의 기타 단핵 세포를 포함할 수 있는 T 림파구의 이종성 모집단을 형성한다. 본원에서 의도된 조작된 TCR 또는 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터는 인간 공여체 T 세포, NK 세포 또는 NKT 세포의 모집단으로 도입될 수 있다. 발현 벡터를 포함하는 성공적으로 형질도입된 T 세포는 유동 세포계수를 사용하여 분류하여 CD3 양성 T 세포를 단리하고, 이어서 추가로 전파시켜, 항-CD3 항체 및/또는 항-CD28 항체 및 IL-2, IL-7 및/또는 IL-15 또는 본원의 다른 개소에 기재된 바와 같이 당해 기술분야에 공지된 임의의 기타 방법을 사용한 세포 활성화에 추가하여, 변형된 T 세포의 수를 증가시킨다.

[0165] 본원에서 의도된 제조 방법은 인간 대상체에서 사용하기 위한 저장 및/또는 제조를 위한 변형된 T 세포의 동결보존을 추가로 포함할 수 있다. T 세포는 세포가 해동시 생존가능한 상태로 유지되도록 동결보존된다. 필요한 경우, 동결보존된 형질전환된 면역 작동 세포는 보다 많은 이러한 세포를 위해 해동, 성장 및 확장시킬 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "동결보존"은 빙점하 온도, 예를 들면, (전형적으로) 77K 또는 -196℃(액체 질소의 비등점)로 냉각시킴으로써 세포의 유지를 지칭한다. 동결보호제를 종종 빙점하 온도에서 사용하여, 저온에서의 동결 또는 실온으로의 가온에 기인하여 세포가 손상으로부터 보존되는 것을 방지한다. 동결보존제 및 최적 냉각 속도는 세포 손상으로부터 보호할 수 있다. 사용될 수 있는 동결보호제는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 디메틸 설폭사이드(DMSO)[참조: Lovelock and Bishop, Nature, 1959; 183: 1394-1395; Ashwood-Smith, Nature, 1961; 190: 1204-1205], 글리세롤, 폴리비닐피롤리딘[참조: Rinfret, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1960; 85: 576] 및 폴리에틸렌 글리콜[참조: Sloviter and Ravdin, Nature, 1962; 196: 48]을 포함한다. 바람직한 냉각 속도는 1℃ 내지 3℃/분이다. 적어도 2시간 후, T 세포는 -80℃의 온도에 도달하고, 장기간 극저온 저장 용기 등과 같이 영구적 저장을 위해 액체 질소(-196℃)에 직접 배치할 수 있다.

[0166] *1. T 세포*

[0167] 본 발명은 개선된 T 세포 조성물의 제조를 의도한다. T 세포는 자기/자가("자가") 또는 비-자가("비-자가", 예를 들면, 동종이계, 동계 또는 이종)일 수 있다. 바람직한 실시형태에서, T 세포는 포유동물 세포로부터 수득된다. 보다 바람직한 실시형태에서, T 세포는 영장류 대상체로부터 수득된다. 가장 바람직한 실시형태에서, T 세포는 인간 대상체로부터 수득된다.

[0168] T 세포는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 말초혈 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 문제, 감염 부위 조직, 복수, 흉수, 비장 조직 또는 종양으로부터 수득된다. 특정 실시형태에서, T 세포는 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 임의 수의 기술, 예를 들면, 침강, 예를 들면, FICOLL™ 분리를 사용하여 대상체로부터 수집된 혈액 유닛으로부터 수득할 수 있다. 한 가지 실시형태에서, 개체의 순환 혈액으로부터의 세포는 분리반출법(apheresis)에 의해 수득된다. 분리반출 생성물은 전형적으로, T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포, 기타 핵화 백혈구 세포, 적혈구 세포 및 혈소판을 포함하는 림파구를 함유한다. 한 가지 실시형태에서, 분리반출법에 의해 수집된 세포는 세척하여 혈장 분획을 제거하고 후속 처리를 위해 적적한 완충제 또는 매질에 세포를 위치시킬 수 있다. 세포는 PBS, 또는 칼슘, 마그네슘 및 대부분(그러나 전부는 아님) 이가 양이온을 결여하는 또 다른 적합한 용액으로 세척할 수 있다. 당해 기술분야의 숙련가에 의해 이해되는 바와 같이, 세척 단계는 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 방법에 의해, 예를 들면, 반자동 유동 원심분리를 사용하여 달성할 수 있다(예를 들면, Cobe 2991 세포 프로세서, Baxter CytoMate, 등). 세척 후, 세포는 완충제의 존재 또는 부재하에 다양한 생물혼화성 완충제 또는 기타 식염수 용액에 재현탁시킬 수 있다. 특정 실시형태에서, 분리반출 샘플의 바람직

하지 않은 성분은 세포가 직접 재현탁된 배양 배지에서 제거할 수 있다.

[0169] 특정 실시형태에서, T 세포, 예를 들면, PBMC를 포함하는 세포의 모집단은 본원에서 의도된 제조 방법에 사용된다. 다른 실시형태에서, 단리된 또는 정제된 T 세포의 모집단은 본원에서 의도된 제조 방법에 사용된다. 세포는 적혈구 세포를 용해시키고, 예를 들면, PERCOLL™ 구배를 통한 원심분리에 의해 단핵구를 고갈시킴으로써 말초혈 단핵 세포(PBMC)로부터 단리할 수 있다. 일부 실시형태에서, PBMC의 단리 후, 세포독성 및 헬퍼 T 림파구를 활성화, 확장 및/또는 유전자 변형 전 또는 후에 천연, 기억 및 작동 T 세포 서브모집단으로 분류할 수 있다.

[0170] 하기 마커: CD3, CD4, CD8, CD28, CD45RA, CD45RO, CD62, CD127 및 HLA-DR 중의 하나를 발현하는 T 세포의 특정한 서브모집단은 양성 또는 음성 선별 기술에 의해 추가로 단리할 수 있다. 한 가지 실시형태에서, CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122 및 CD127로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 마커를 발현하는 T 세포의 특정한 서브모집단은 양성 또는 음성 선별 기술에 의해 추가로 단리된다. 다양한 실시형태에서, 제조된 T 세포 조성물은 하기 마커: CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, TIM3 및 LAG3 중의 하나 이상을 발현하지 않거나 실질적으로 발현하지 않는다.

[0171] 한 가지 실시형태에서, CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122 및 CD127로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 마커의 발현은, PI3K/AKT/mTOR 억제제의 부재하에 활성화 및 확장된 T 세포의 모집단과 비교하여, 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 적어도 25배 또는 그 이상 증가한다.

[0172] 한 가지 실시형태에서, CD57, CD244, CD160, PD-1, CTLA4, TIM3 및 LAG3로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 마커의 발현은, PI3K/AKT/mTOR 억제제로 활성화 및 확장된 T 세포의 모집단과 비교하여, 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 적어도 25배 또는 그 이상 감소한다.

[0173] 한 가지 실시형태에서, 본원에서 의도된 제조 방법은 천연 또는 발달적으로 강력한 T 세포의 하나 이상의 마커를 포함하는 T 세포의 수를 증가시킨다. 어떠한 특정 이론에 구속시키고자 하는 것은 아니지만, 본 발명자들은 T 세포를 포함하는 세포의 모집단을 하나 이상의 PI3K/AKT/mTOR 억제제로 처리하는 것이 T 세포 증식 및 분화 시그날을 분리시키고, 이에 의해 발달적으로 강력한 T 세포의 확장을 증가시키고, 기존의 T 세포 요법보다 더욱 강력하고 효율적인 양자 면역요법을 제공한다고 생각한다.

[0174] 본원에서 의도된 방법을 사용하여 제조된 T 세포에서 증가된 천연 또는 발달적으로 강력한 T 세포의 마커의 예시적 예는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD95, CD122 및 CD127을 포함한다. 특정 실시형태에서, 천연 T 세포는 하기 마커: CD57, CD244, CD160, PD-1, BTLA, CD45RA, CTLA4, TIM3 및 LAG3 중의 하나 이상을 발현하지 않거나 실질적으로 발현하지 않는다.

[0175] T 세포와 관련하여, 본원에서 의도된 다양한 확장 방법으로부터 발생하는 T 세포 모집단은 사용된 상태에 따라 다양한 특정의 표현형 특성을 가질 수 있다. 다양한 실시형태에서, 확장된 T 세포 모집단은 하기 표현형 마커: CCR7, CD3, CD4, CD8, CD27, CD28, CD62L, CD95, CD122, CD127 및 HLA-DR 중의 하나 이상을 포함한다.

[0176] 한 가지 실시형태에서, 이러한 표현형 마커는 CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122 및 CD127 중의 하나 이상 또는 전부의 증강된 발현을 포함한다. 특정 실시형태에서, CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122 및 CD127을 포함하는 천연 T 세포의 표현형 마커의 발현을 특징으로 하는 $CD8^+$ T 림파구가 확장된다.

[0177] 특정 실시형태에서, CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122 및 CD127을 포함하는 중앙 기억 T 세포의 표현형 마커의 발현을 특징으로 하고 그랜자임 B에 대해 음성인 T 세포가 확장된다. 일부 실시형태에서, 중앙 기억 T 세포는 $CD45RO^+$, $CD62L^+$, $CD8^+$ T 세포이다.

[0178] 특정 실시형태에서, CD62L을 포함하는 천연 $CD4^+$ 세포의 표현형 마커의 발현을 특징으로 하고 CD45RA 및/또는 CD45RO의 발현에 대해 음성인 $CD4^+$ T 림파구가 확장된다. 일부 실시형태에서, $CD4^+$ 세포는 CD62L 및 CD45RO 양성을 포함하는 중앙 기억 $CD4^+$ 세포의 표현형 마커의 발현을 특징으로 한다. 일부 실시형태에서, 작동 $CD4^+$ 세포는 CD62L 양성이고 CD45RO 음성이다.

[0179] 특정 실시형태에서, T 세포는 개체로부터 단리되고, 생체외 또는 시험관내에서 추가의 조작 없이 변형된다. 이

어서, 이러한 세포는 개체에게 직접 재투여할 수 있다. 추가의 실시형태에서, T 세포는 조작된 TCR 또는 CAR을 발현하도록 유전적으로 변형되기 전에 먼저 활성화 및 자극시켜 시험관내에서 증식시킨다. 이와 관련하여, T 세포는 유전적으로 변형되기 전 및/또는 후(즉, 본원에서 의도된 조작된 TCR 또는 CAR을 발현하도록 형질도입 또는 형질감염)에 배양할 수 있다.

[0180] ***2. 활성화 및 확장***

[0181] 충분한 치료 용량의 T 세포 조성물을 달성하기 위해, T 세포는 종종 1회 이상의 자극, 활성화 및/또는 확장으로 처리한다. T 세포는, 예를 들면, 문헌[참조: 미국 특허 제6,352,694호; 제6,534,055호; 제6,905,680호; 제6,692,964호; 제5,858,358호; 제6,887,466호; 제6,905,681호; 제7,144,575호; 제7,067,318호; 제7,172,869호; 제7,232,566호; 제7,175,843호; 제5,883,223호; 제6,905,874호; 제6,797,514호; 및 제6,867,041호; 각각은 이의 전체가 본원에서 참조로서 도입됨]에 기재된 방법을 사용하여 일반적으로 활성화 및 확장시킬 수 있다. 조작된 TCR 또는 CAR을 발현하도록 변형된 T 세포는 T 세포를 변형시키기 전 및/또는 후에 활성화 및 확장시킬 수 있다. 또한, T 세포는 활성화 및/또는 확장 전, 동안 및/또는 후에 PI3K/AKT/mTOR 세포 시그날전달 경로를 조절하는 하나 이상의 제제와 접촉시킬 수 있다. 한 가지 실시형태에서, 본원에서 의도된 방법에 의해 제조된 T 세포는 1, 2, 3, 4 또는 5회 또는 그 이상의 활성화 및 확장을 겪고, 각각은 PI3K/AKT/mTOR 세포 시그날전달 경로를 조절하는 하나 이상의 제제를 포함할 수 있다.

[0182] 한 가지 실시형태에서, 공자극 리간드는, T 세포 상에서 동족 공자극 분자에 특이적으로 결합하는 항원 제시 세포(예: aAPC, 수지상 세포, B 세포 등) 상에 제시되고, 이에 의해, 예를 들면, TCR/CD3 복합체의 결합에 의해 제공된 일차 시그날 이외에, 목적하는 T 세포 반응을 매개하는 시그날을 제공한다. 적합한 공자극 리간드는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, CD7, B7-1(CD80), B7-2(CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, 유도성 공자극 리간드(ICOS-L), 세포내 부착 분자(ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, 림포톡신 베타 수용체, ILT3, ILT4, Toll 리간드 수용체에 결합하는 작동제 또는 항체 및 B7-H3에 특이적으로 결합하는 리간드를 포함한다.

[0183] 특정 실시형태에서, 공자극 리간드는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, CD27, CD28, 4-IBB, OX40, CD30, CD40, PD-1, 1COS, 림파구 기능-연관 항원-1(LFA-1), CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 및 CD83에 특이적으로 결합하는 리간드를 포함하는, T 세포 상에 존재하는 공자극 분자에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.

[0184] 적합한 공자극 리간드는 추가로 표적 항원을 포함하고, 이는 가용성 형태로 제공되거나 APC 또는 aAPC 상에서 발현되고, 변형된 T 세포 상에서 발현되는 조작된 TCR 또는 CAR에 결합한다.

[0185] 다양한 실시형태에서, 본원에서 의도된 T 세포를 제조하는 방법은 T 세포를 포함하는 세포의 모집단을 활성화시키고 T 세포의 모집단을 확장시키는 것을 포함한다. T 세포 활성화는 T 세포 TCR/CD3 복합체를 통한 또는 CD2 표면 단백질의 자극에 의해 일차 자극 시그날을 제공하고 부속 분자(예: CD28)를 통해 이차 공자극 시그날을 제공함으로써 달성할 수 있다.

[0186] TCR/CD3 복합체는 T 세포를 적합한 CD3 결합제, 예를 들면, CD3 리간드 또는 항-CD3 모노클로날 항체와 접촉시킴으로써 자극시킬 수 있다. CD3 항체의 예시적 예는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, OKT3, G19-4, BC3 및 64.1을 포함한다.

[0187] 또 다른 실시형태에서, CD2 결합제는 일차 자극 시그날을 T 세포에 제공하기 위해 사용될 수 있다. CD2 결합제의 예시적 예는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, CD2 리간드 및 항-CD2 항체, 예를 들면, T11.1 또는 T11.2 항체와 조합된 T11.3 항체[참조: Meuer, S. C. *et al.*(1984) *Cell* 36:897-906] 및 9-1 항체와 조합된 9.6 항체(이는 TI 1.1과 동일한 에피토프를 인식한다)[참조: Yang, S. Y. *et al.*(1986) *J. Immunol.* 137:1097-1100]를 포함한다. 상기 기재된 임의의 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 다른 항체를 또한 사용할 수 있다. 추가의 항체 또는 항체의 조합물은 본원의 다른 개소에 개시된 표준 기술에 의해 제조 및 동정할 수 있다.

[0188] TCR/CD3 복합체를 통해 또는 CD2에 의해 제공된 일차 자극 시그날에 추가하여, T 세포 반응의 유도는 이차 공자극 시그날을 필요로 한다. 특정 실시형태에서, CD28 결합제는 공자극 시그날을 제공하기 위해 사용될 수 있다. CD28 결합제의 예시적 예는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 천연 CD28 리간드, 예를 들면, CD28에 대한 천연 리간드(예: 단백질의 B7 계열의 멤버), 예를 들면, B7-1(CD80) 및 B7-2(CD86); 및 CD28 분자와 가교결합할 수 있는 항-CD28 모노클로날 항체 또는 이의 단편, 예를 들면, 모노클로날 항체 9.3, B-T3, XR-CD28, KOLT-2, 15E8, 248.23.2 및 EX5.3D10을 포함한다.

[0189] 한 가지 실시형태에서, 일차 자극 시그날을 제공하는 분자, 예를 들면, TCR/CD3 복합체 또는 CD2 및 공자극 분자를 통해 자극을 제공하는 분자는 동일한 표면에 커플링된다.

[0190] 특정 실시형태에서, 자극 및 공자극 시그날을 제공하는 결합제는 세포의 표면 상에 국재화된다. 이는, 세포 표면 상에서 이의 발현에 적합한 형태로 세포를 결합제 코딩 핵산으로 형질감염 또는 형질도입시키거나 달리는 결합제를 세포 표면에 커플링시킴으로써 달성할 수 있다.

[0191] 또 다른 실시형태에서, 일차 자극 시그날을 제공하는 분자, 예를 들면, TCR/CD3 복합체 또는 CD2 및 공자극 분자를 통해 자극을 제공하는 분자는 항원 제시 세포 상에 표시된다.

[0192] 한 가지 실시형태에서, 일차 자극 시그날을 제공하는 분자, 예를 들면, TCR/CD3 복합체 또는 CD2 및 공자극 분자를 통해 자극을 제공하는 분자는 분리된 표면 상에 제공된다.

[0193] 특정한 실시형태에서, 자극 및 공자극 시그날을 제공하는 결합제 중의 하나는 가용성(용액으로 제공)이고, 다른 제제(들)는 하나 이상의 표면 상에 제공된다.

[0194] 특정 실시형태에서, 자극 및 공자극 시그날을 제공하는 결합제는 둘 다 가용성 형태(용액으로 제공)로 제공된다.

[0195] 다양한 실시형태에서, 본원에서 의도된 T 세포를 제조하는 방법은 T 세포를 항-CD3 및 항-CD28 항체로 활성화시키는 것을 포함한다.

[0196] 본원에서 의도된 방법에 의해 제조된 T 세포 조성물은, PI3K/AKT/mTOR 세포 시그날전달 경로를 억제하는 하나 이상의 제제의 존재하에 활성화 및/또는 확장된 T 세포를 포함한다. 조작된 TCR 또는 CAR을 발현하도록 변형된 T 세포는 T 세포를 변형시키기 전 및/또는 후에 활성화 및 확장시킬 수 있다. 특정 실시형태에서, T 세포의 모집단은 활성화되고, 조작된 TCR 또는 CAR을 발현하도록 변형된 다음, 확장을 위해 배양된다.

[0197] 한 가지 실시형태에서, 본원에서 의도된 방법에 의해 제조된 T 세포는 고도의 증식 가능성 및 자가 재생하는 능력을 나타내는 마커를 발현시키지만 T 세포 분화의 검출불가능한 마커를 발현시키지 않거나 실질적으로 발현시키지 않는 증가된 수의 T 세포를 포함한다. 이들 T 세포는 견고한 방식으로 반복적으로 활성화 및 확장시킬 수 있고, 이에 의해 개선된 치료학적 T 세포 조성물을 제공한다.

[0198] 한 가지 실시형태에서, PI3K/AKT/mTOR 세포 시그날전달 경로를 억제하는 하나 이상의 제제의 존재하에 활성화 및 확장된 T 세포의 모집단은, PI3K/AKT/mTOR 억제제의 부재하에 활성화 및 확장된 T 세포의 모집단과 비교하여, 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 적어도 25배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 250배, 적어도 500배, 적어도 1000배 또는 그 이상 확장된다.

[0199] 한 가지 실시형태에서, 어린 T 세포가 PI3K/AKT/mTOR 세포 시그날전달 경로를 억제하는 하나 이상의 제제의 존재하에 활성화 및 확장되는 마커의 발현을 특징으로 하는 T 세포의 모집단은, PI3K/AKT/mTOR 억제제의 부재하에 활성화 및 확장된 T 세포의 모집단과 비교하여, 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 적어도 25배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 250배, 적어도 500배, 적어도 1000배 또는 그 이상 확장된다.

[0200] 한 가지 실시형태에서, 본원에서 의도된 방법에 의해 활성화된 T 세포의 확장은 T 세포를 포함하는 세포의 모집단을 수시간(약 3시간) 내지 약 7일 내지 약 28일 또는 이들 사이의 임의의 시간 정수 값 동안 배양하는 것을 추가로 포함한다. 또 다른 실시형태에서, T 세포 조성물은 14일 동안 배양할 수 있다. 특정 실시형태에서, T 세포는 약 21일 동안 배양된다. 또 다른 실시형태에서, T 세포 조성물은 약 2 내지 3일 동안 배양된다. 자극/활성화/확장의 몇몇 사이클은 또한 T 세포의 배양 시간이 60일 또는 그 이상일 수 있도록 하는 것이 바람직할 수 있다.

[0201] 특정 실시형태에서, T 세포 배양에 적절한 조건은 적절한 배지(예: 최소 필수 배지 또는 RPMI 배지 1640 또는 X-vivo 15, (Lonza)), 및 이로써 한정되는 것은 아니지만, 혈청(예: 태소 또는 인간 혈청), 인터류킨-2(IL-2), 인슐린, IFN-γ, IL-4, IL-7, IL-21, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGFβ 및 TNF-α, 또는 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 세포의 성장에 적합한 임의의 기타 첨가제를 포함하는 증식 및 생존성에 필요한 하나 이상의 인자를 포함한다.

[0202] 세포 배양 배지의 추가의 예시적 예는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 혈청-비함유 또는 적절한 양의 혈청(또

는 혈장) 또는 규정된 세트의 호르몬 및/또는 T 세포의 성장 및 확장에 충분한 양의 사이토킨(들)이 보충된, 첨가된 아미노산, 나트륨 피루베이트 및 비타민과 함께, RPMI 1640, 클릭(Clicks), AIM-V, DMEM, MEM, a-MEM, F-12, X-Vivo 1 5 및 X-Vivo 20, 옵티마이저(Optimizer)를 포함한다.

[0203] T 세포 확장을 위한 기타 첨가제의 예시적 예는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 계면활성제, 피아스마네이트, pH 완충제, 예를 들면, HEPES 및 환원제, 예를 들면, N-아세틸-시스테인 및 2-머캅토에탄올을 포함한다.

[0204] 항생물질, 예를 들면, 페니실린 및 스트렙토마이신은 실험 배양물에만 포함되고, 대상체 내로 주입되는 세포 배양물에는 포함되지 않는다. 표적 세포는 성장을 뒷받침하기에 필요한 조건, 예를 들면, 적절한 온도(예: 37℃) 및 분위기(예: 공기 + 5% CO2)하에 유지된다.

[0205] 특정 실시형태에서, PBMC 또는 단리된 T 세포는 자극제 및 공자극제, 예를 들면, 적절한 사이토킨, 예를 들면, IL-2, IL-7 및/또는 IL-15를 갖는 배양 배지에서 비드 또는 기타 표면에 일반적으로 부착된 항-CD3 및 항-CD28 항체와 접촉된다.

[0206] 기타 실시형태에서, 인공 APC(aAPC)는 다양한 공자극 분자 및 사이토킨의 안정한 발현 및 분비를 지시하도록 K562, U937, 721.221, T2 및 C1R 세포를 조작함으로써 제조된다. 특정 실시형태에서, K32 또는 U32 aAPC는 AAPC 세포 표면 상에서 하나 이상의 항체-기반 자극 분자의 표시를 지시하기 위해 사용된다. T 세포의 모집단은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, CD137L(4-1BBL), CD134L(OX40L) 및/또는 CD80 또는 CD86을 포함하는 다양한 공자극 분자를 발현하는 aAPC에 의해 확장시킬 수 있다. 마지막으로, aAPC는 유전적으로 변형된 T 세포를 확장시키고 CD8 T 세포 상에서 CD28 발현을 유지하는 효율적인 플랫폼을 제공한다. 국제공개공보 제WO 03/057171호 및 US2003/0147869호에 제공된 aAPC는 이의 전체가 본원에서 참조로서 도입된다.

[0207] ***3. 제제***

[0208] 다양한 실시형태에서, T 세포를, 세포에서 PI3K/AKT/mTOR 경로를 조절하는 제제와 접촉시키는 것을 포함하여 미분화되거나 발달적으로 강력한 T 세포를 확장시키는 T 세포의 제조 방법이 제공된다. 세포는 활성화 및 확장 전, 동안 및/또는 후에 접촉시킬 수 있다. T 세포 조성물은 이들이 분화시에 실질적 증가 없이 복수회의 확장을 겪을 수 있도록 충분한 T 세포 능력을 유지한다.

[0209] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "조절하다", "조절인자" 또는 "조절제" 또는 동등의 용어는 세포 시그날전달 경로에서 변화를 유발하는 제제의 능력을 지칭한다. 조절제는 경로 성분의 양, 즉 활성을 증가시키거나 감소시킬 수 있거나, 세포 시그날전달 경로의 목적하는 효과 또는 결과를 증가시키거나 감소시킬 수 있다. 한 가지 실시형태에서, 조절인자는 억제제이다. 또 다른 실시형태에서, 조절인자는 활성화인자이다.

[0210] "제제"는 PI3K/AKT/mTOR 경로의 조절에 사용된 화합물, 소분자, 예를 들면, 유기 소분자, 핵산, 폴리펩티드, 또는 이의 단편, 이소형, 변이체, 유사체 또는 유도체를 지칭한다.

[0211] "소분자"는 분자량이 약 5kD 미만, 약 4kD 미만, 약 3kD 미만, 약 2kD 미만, 약 1kD 미만 또는 약 0.5kD 미만인 조성물을 지칭한다. 소분자는 핵산, 펩티드, 폴리펩티드, 펩티드유사체, 펩토이드, 탄수화물, 지질, 이의 성분 또는 기타 유기 또는 무기 분자를 포함할 수 있다. 화학적 및/또는 생물학적 혼합물의 라이브러리, 예를 들면, 진균, 세균 또는 조류 추출물은 당해 기술분야에 공지되어 있고, 본 발명의 임의의 검정으로 스크리닝할 수 있다. 분자 라이브러리의 합성을 위한 방법의 예는 문헌[참조: Carell *et al.*, 1994a; Carell *et al.*, 1994b; Cho *et al.*, 1993; DeWitt *et al.*, 1993; Gallop *et al.*, 1994; Zuckermann *et al.*, 1994]에 기재되어 있다.

[0212] "유사체"는, 화합물, 뉴클레오티드, 단백질 또는 폴리펩티드 또는 본 발명의 목적하는 활성을 갖는 화합물과 유사하거나 동일한 활성 또는 기능(들)을 보유하지만, 바람직한 실시형태의 서열 또는 구조와 유사하거나 동일한 서열 또는 구조를 반드시 포함할 필요는 없는, 작은 유기 화합물, 뉴클레오티드, 단백질 또는 폴리펩티드를 지칭한다.

[0213] "유도체"는, 아미노산 잔기 치환, 결실 또는 부가의 도입에 의해 변경된 모친(parent) 단백질 또는 폴리펩티드의 아미노산 서열, 또는 뉴클레오티드 치환 또는 결실, 부가 또는 돌연변이의 도입에 의해 변형된 핵산 또는 뉴클레오티드를 포함하는 화합물, 단백질 또는 폴리펩티드를 지칭한다. 유도체 핵산, 뉴클레오티드, 단백질 또는 폴리펩티드는 모친 폴리펩티드와 유사하거나 동일한 기능을 보유한다.

[0214] 다양한 실시형태에서, PI3K/AKT/mTOR 경로를 조절하는 제제는 경로의 성분을 활성화시킨다. "활성제" 또는 "작동제"는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, PI3K, Akt 또는 mTOR(또는 mTORC1, mTORC2 복합체)의 하나 이상의 활

성을 억제하는 분자를 포함하는 PI3K/AKT/mTOR 경로에서 분자의 하나 이상의 활성을 촉진, 증가 또는 유도하는 제제를 지칭한다.

[0215] 다양한 실시형태에서, PI3K/AKT/mTOR 경로를 조절하는 제제는 경로의 성분을 억제한다. "억제제" 또는 "길항제"는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, PI3K, Akt 또는 mTOR(또는 mTORC1, mTORC2 복합체)를 포함하는 PI3K/AKT/mTOR 경로에서 분자의 하나 이상의 활성을 억제, 저하 또는 감소시키는 제제를 지칭한다. 한 가지 실시형태에서, 억제제는 이중 분자 억제제이다. 한 가지 실시형태에서, 억제제는 mTORC1 또는 관련 복합체 등의 단백질 복합체의 형성을 방지한다. 특정 실시형태에서, 억제제는 동일하거나 실질적으로 유사한 활성(pan-억제제)을 갖는 분자의 부류를 억제할 수 있거나, 분자의 활성을 특이적으로 억제할 수 있다(선택적 또는 특이적 억제제). 억제제는 또한 비가역적 또는 가역적일 수 있다.

[0216] 한 가지 실시형태에서, 억제제는 적어도 1nM, 적어도 2nM, 적어도 5nM, 적어도 10nM, 적어도 50nM, 적어도 100nM, 적어도 200nM, 적어도 500nM, 적어도 1μM, 적어도 10μM, 적어도 50μM 또는 적어도 100μM의 IC50을 갖는다. IC50 결정은 당해 기술분야에 공지된 임의의 종래 기술을 사용하여 달성할 수 있다. 예를 들면, IC50은 연구하에 억제제의 소정 농도 범위의 존재하에 소정 효소의 활성을 측정함으로써 결정할 수 있다. 이어서, 효소 활성의 실험적으로 수득된 값을 사용된 억제제 농도에 대해 플롯팅한다. 50% 효소 활성(임의의 억제제 부재하의 활성과 비교하여)을 나타내는 억제제의 농도를 "IC50" 값으로 취한다. 동일하게는, 기타 억제 농도는 활성의 적절한 결정을 통해 정의할 수 있다.

[0217] 다양한 실시형태에서, T 세포는 적어도 1nM, 적어도 2nM, 적어도 5nM, 적어도 10nM, 적어도 50nM, 적어도 100nM, 적어도 200nM, 적어도 500nM, 적어도 1μM, 적어도 10μM, 적어도 50μM, 적어도 100μM 또는 적어도 1M의 농도에서 PI3K/AKT/mTOR 경로의 하나 이상의 조절인자와 접촉 또는 처리 또는 배양한다.

[0218] 특정 실시형태에서, T 세포는 적어도 12시간, 18시간, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7일, 적어도 2주, 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개월 또는 그 이상 동안 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10회 또는 그 이상의 확장으로 PI3K/AKT/mTOR 경로의 하나 이상의 조절인자와 접촉 또는 처리 또는 배양할 수 있다.

[0219] *a. PI3K/AKT/mTOR 경로*

[0220] 라파마이신의 포스파티딜-이노시톨-3 키나제/Akt/포유동물 표적(PI3K/Akt/mTOR) 경로는 성장 인자 시그날전달을 세포 증식, 분화, 대사 및 생존과 통합하는 도관으로서 기능한다. PI3K는 고도로 보존된 세포내 지질 키나제의 계열이다. 부류 IA PI3K는 직접 또는 어댑터 분자의 인슐린 수용체 기질 계열과의 상호작용을 통해 성장 인자 수용체 티로신 키나제(RTK)에 의해 활성화된다. 이러한 활성은 포스파티딜-이노시톨-3,4,5-트리스포스페이트(PIP3), 세린/트레오닌 키나제 Akt의 조절인자의 생성을 제공한다. mTOR은 2개의 독특한 복합체에 의해 표준 PI3K 경로를 통해 작용하고, 각각은 독특한 활성을 부여하는 상이한 결합 파트너를 특징으로 한다. mTORC1(PRAS40, 라프터 및 mLST8/GbL과의 복합체에서 mTOR)은, 성장 인자 시그날을 단백질 번역, 세포 성장, 증식 및 생존과 연결시키는, PI3K/Akt 시그날전달의 하류 작동제로서 작용한다. mTORC2(릭터, mSIN1, 프로터 및 mLST8과의 복합체에서 mTOR)은 Akt의 상류 활성화제로서 작용한다.

[0221] PI3K의 성장 인자 수용체-매개된 활성화시, Akt는 IPI3과의 플렉스트린(pleckstrin) 상동성 도메인의 상호작용을 통해 막에 동원되고, 따라서 이의 활성화 루프를 노출시켜 구성적 활성 포스포이노시티드-의존성 단백질 키나제 1(PDK1)에 의해 트레오닌 308(Thr308)에서 포스포릴화를 가능하게 한다. 최대 활성화를 위해, Akt는 또한 이의 C-말단 소수성 모티브의 세린 473(Ser473)에서 mTORC2에 의해 포스포릴화된다. DNA-PK 및 HSP는 또한 Akt 활성의 조절에 중요한 것으로 밝혀졌다. Akt는 TSC2의 억제 포스포릴화를 통해 mTORC1을 활성화시키고, 이는, TSC1과 함께, Rheb GTPase, mTORC1의 양성 조절인자를 억제함으로써 mTORC1을 음성적으로 조절한다. mTORC1은 2개의 명확하게 정의된 기질, p70S6K(이하 S6K1으로 지칭됨) 및 4E-BP1을 갖고, 이들 둘 다는 단백질 합성을 임계적으로 조절한다. 따라서, mTORC1은, 성장 인자 시그날전달을 단백질 번역 및 세포 증식과 연결시키는 PI3K의 중요한 하류 작동제이다.

[0222] *b. mTOR 억제제*

[0223] 용어 "mTOR 억제제" 또는 "mTOR을 억제시키는 제제"는 이의 기질(예: p70S6 키나제 1, 4E-BP1, AKT/PKB 및 eEF2) 중의 적어도 하나에 대해 mTOR 단백질의 적어도 하나의 활성, 예를 들면, 세린/트레오닌 단백질 키나제 활성을 억제하는 핵산, 펩티드, 화합물 또는 유기 소분자를 지칭한다. mTOR 억제제는 mTORC1, mTORC2 또는 mTORC1 및 mTORC2 둘 다에 직접 결합할 수 있고 이를 억제시킬 수 있다.

[0224] mTORC1 및/또는 mTORC2 활성의 억제는 PI3K/Akt/mTOR 경로의 시그날 형질도입의 감소에 의해 결정될 수 있다.

광범위한 판독은 이러한 시그날 전달 경로의 결과의 감소를 확립하기 위해 이용할 수 있다. 일부 비제한적 예시적 판독은, (1) 이로써 한정되는 것은 아니지만, 5473 및 T308을 포함하는 잔기에서 Akt의 포스포릴화의 감소; (2) 예를 들면, 이로써 한정되는 것은 아니지만, Fox01/03a T24/32, GSK3a/β; S21/9 및 TSC2 T1462를 포함하는 Akt 기질의 포스포릴화의 감소에 의해 입증된 바와 같이 Akt 활성화의 감소; (3) 이로써 한정되는 것은 아니지만, 리보솜 S6 S240/244, 70S6K T389 및 4EBP1 T37/46을 포함하는 mTOR 하류의 시그날전달 분자의 포스포릴화의 감소; 및 (4) 암 세포 증식의 억제를 포함한다.

[0225] 한 가지 실시형태에서, mTOR 억제제는 활성 부위 억제제이다. 이들은, mTOR의 ATP 결합 부위(또한 ATP 결합 포켓으로 지칭됨)에 결합하고 mTORC1 및 mTORC2 둘 다의 촉매적 활성을 억제하는 mTOR 억제제이다. 본원에서 의도된 T 세포 제조 방법에서 사용하기에 적합한 활성 부위 억제제의 한 가지 부류는, PI3K 및 mTOR 둘 다를 표적화하고 직접 억제하는 이중 특이성 억제제이다. 이중 특이성 억제제는 mTOR 및 PI3K의 ATP 결합 부위 둘 다에 결합한다. 이러한 억제제의 예시적 예는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 이미다조퀴나졸린, 워르트만닌, LY294002, PI-103(Cayman Chemical), SF1126(Semafore), BGT226(Novartis), XL765(Exelixis) 및 NVP-BEZ235(Novartis)를 포함한다.

[0226] 본원에서 의도된 방법에서 사용하기에 적합한 또 다른 부류의 mTOR 활성 부위 억제제는 하나 이상의 유형 I 포스파티딜이노시톨 3-키나제, 예를 들면, PI3 키나제 α, β, γ 또는 δ에 대하여 mTORC1 및 mTORC2 활성을 선택적으로 억제한다. 이들 활성 부위 억제제는 mTOR의 활성 부위에 결합하지만, PI3K에는 결합하지 않는다. 이러한 억제제의 예시적 예는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 피라졸로피리미딘, Torin1(Guertin 및 Sabatini), PP242(2-(4-아미노-1-이소프로필-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-3-일)-1H-인돌-5-올), PP30, Ku-0063794, WAY-600(Wyeth), WAY-687(Wyeth), WAY-354(Wyeth) 및 AZD8055[참조: Liu *et al.*, Nature Review, 8, 627-644, 2009]를 포함한다.

[0227] 한 가지 실시형태에서, 선택적 mTOR 억제제는 mTORC1 및/또는 mTORC2에 대하여 50% 억제 농도(IC50)를 나타내는 제제를 지칭하고, 이는 1, 2, 3개 또는 그 이상의 유형 I PI3-키나제 또는 유형 I PI3-키나제에 대하여 억제제의 IC50보다 적어도 10배, 적어도 20배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 1000배 또는 그 이상 낮다.

[0228] 본 발명에서 사용하기 위한 또 다른 부류의 mTOR 억제제는 "라파로그(rapalog)"로서 본원에서 지칭된다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "라파로그"는, mTOR FRB 도메인(FKBP 라파마이신 결합 도메인)에 특이적으로 결합하고 라파마이신과 구조적으로 관련되고 mTOR 억제 특성을 보유하는 화합물을 지칭한다. 용어 라파로그는 라파마이신을 제외한다. 라파로그는 라파마이신의 에스테르, 에테르, 옥심, 하이드라존 및 하이드록실아민, 뿐만 아니라 라파마이신 코어 구조 상의 관능기가, 예를 들면, 환원 또는 산화에 의해 변형된 화합물을 포함한다. 이러한 화합물의 약제학적으로 허용되는 염은 라파마이신 유도체인 것으로 또한 간주된다. 본원에서 의도된 방법에서 사용하기에 적합한 라파로그의 예시적 예는, 제한 없이, 템시롤리무스(TEMirolimus)(CC1779), 에베로리무스(RAD001), 데포롤리무스 (deforolimus)(AP23573), AZD8055(AstraZeneca) 및 OSI-027(OSI)을 포함한다.

[0229] 한 가지 실시형태에서, 제제는 mTOR 억제제 라파마이신(sirolimus)이다.

[0230] 특정 실시형태에서, 본 발명에서 사용하기 위한 예시적 mTOR 억제제는, 약 200nM 이하, 바람직하게는 약 100nm 이하, 보다 더 바람직하게는 약 60nM 이하, 약 25nM, 약 10nM, 약 5nM, 약 1nM, 100 μM, 50 μM, 25 μM, 10 μM, 1 μM 이하의 IC50(활성의 50%를 억제하는 농도)로 mTORC1, mTORC2 또는 mTORC1과 mTORC2 둘 다를 억제한다. 한 가지 양태에서, 본 발명에서 사용하기 위한 mTOR 억제제는, 약 2nM 내지 약 100nm, 보다 바람직하게는 약 2nM 내지 약 50nM, 보다 더 바람직하게는 약 2nM 내지 약 15nM의 IC50으로 mTORC1, mTORC2 또는 mTORC1과 mTORC2 둘 다를 억제한다.

[0231] 한 가지 실시형태에서, 예시적 mTOR 억제제는, 약 200nM 이하, 바람직하게는 약 100nm 이하, 보다 더 바람직하게는 약 60nM 이하, 약 25nM, 약 10nM, 약 5nM, 약 1nM, 100 μM, 50 μM, 25 μM, 10 μM, 1 μM 이하의 IC50(활성의 50%를 억제하는 농도)로 PI3K 및 mTORC1 또는 mTORC2 또는 mTORC1과 mTORC2 및 PI3K 둘 다를 억제한다. 한 가지 양태에서, 본 발명에서 사용하기 위한 mTOR 억제제는 약 2nM 내지 약 100nm, 보다 바람직하게는 약 2nM 내지 약 50nM, 보다 더 바람직하게는 약 2nM 내지 약 15nM의 IC50으로 PI3K 및 mTORC1 또는 mTORC2 또는 mTORC1과 mTORC2 및 PI3K 둘 다를 억제한다.

[0232] 본원에서 의도된 특정 실시형태에서 사용하기에 적합한 mTOR 억제제의 추가의 예시적 예는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, AZD8055, INK128, 라파마이신, PF-04691502 및 에베로리무스를 포함한다.

[0233] mTOR은, 웨스턴 블롯팅에서 인-특이적 항체에 의해 측정된 바와 같이, 생리학적 기질 단백질, p70 S6 리보솜 단

백질 키나제 I(p70S6K1) 및 eIF4E 결합 단백질 1(4EBP1)에 대해 강력하고 특이적 촉매 활성을 입증하는 것으로 밝혀졌다.

[0234] 한 가지 실시형태에서, PI3K/AKT/mTOR 경로의 억제제는 BI-D1870, H89, PF-4708671, FMK 및 AT7867로 이루어진 그룹으로부터 선택된 S6 키나제 억제제이다.

[0235] *c. PI3K 억제제*

[0236] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "PI3K 억제제"는, PI3K의 적어도 하나의 활성에 결합하고 이를 억제하는 핵산, 펩티드, 화합물 또는 유기 소분자를 지칭한다. PI3K 단백질은 3개 부류, 부류 1 PI3K, 부류 2 PI3K 및 부류 3 PI3K으로 구분할 수 있다. 부류 1 PI3K은 4개의 p110 촉매 아단위(p110α, p110β, p110δ 및 p110γ) 및 조절 아단위의 2개 계열 중의 하나로 이루어진 헤테로이량체로서 존재한다. 본 발명의 PI3K 억제제는 바람직하게는 부류 1 PI3K 억제제를 표적화한다. 한 가지 실시형태에서, PI3K 억제제는 부류 1 PI3K 억제제의 하나 이상의 이소형에 대해 선택성을 나타낼 것이다(즉, p110α, p110β, p110δ 및 p110γ 또는 하나 이상의 p110α, p110β, p110δ 및 p110γ에 대한 선택성). 또 다른 양태에서, PI3K 억제제는 이소형 선택성을 나타내지 않을 것이고, "pan-PI3K 억제제"로서 간주될 것이다. 일부 실시형태에서, PI3K 억제제는 ATP와의 결합을 위해 PI3K 촉매 도메인과 경쟁할 것이다.

[0237] 특정 실시형태에서, PI3K 억제제는, 예를 들면, PI3K-AKT-mTOR 경로에서 추가 단백질 뿐만 아니라 PI3K를 표적화할 수 있다. 특정 실시형태에서, mTOR 및 PI3K 둘 다를 표적화하는 PI3K 억제제는 mTOR 억제제 또는 PI3K 억제제로서 지칭될 수 있다. PI3K만을 표적화하는 PI3K 억제제는 선택적 PI3K 억제제로서 지칭될 수 있다. 한 가지 실시형태에서, 선택적 PI3K 억제제는, 경로에서 mTOR 및/또는 기타 단백질에 대해 억제제의 IC50보다 적어도 10배, 적어도 20배, 적어도 30배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 1000배 또는 그 이상 낮은 PI3K에 대한 50% 억제 농도를 나타내는 제제를 지칭하는 것으로 이해될 수 있다.

[0238] 특정 실시형태에서, 예시적 PI3K 억제제는, 약 200nM 이하, 바람직하게는 약 100nm 이하, 보다 더 바람직하게는 약 60nM 이하, 약 25nM, 약 10nM, 약 5nM, 약 1nM, 100μM, 50μM, 25μM, 10μM, 1μM 이하의 IC50(활성의 50%를 억제하는 농도)로 PI3K를 억제한다. 한 가지 실시형태에서, PI3K 억제제는, 약 2nM 내지 약 100nm, 보다 바람직하게는 약 2nM 내지 약 50nM, 보다 더 바람직하게는 약 2nM 내지 약 15nM의 IC50으로 PI3K를 억제한다.

[0239] 본원에서 의도된 T 세포 제조 방법에 사용하기에 적합한 PI3K 억제제의 예시적 예는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, BKM120(부류 1 PI3K 억제제, Novartis), XL147(부류 1 PI3K 억제제, Exelixis),(pan-PI3K 억제제, GlaxoSmithKline) 및 PX-866(부류 1 PI3K 억제제; p110α, p110β 및 p110γ 이소형, Oncothyreon)을 포함한다.

[0240] 선택적 PI3K 억제제의 기타 예시적 예는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, BYL719, GSK2636771, TGX-221, AS25242, CAL-101, ZSTK474 및 IPI-145를 포함한다.

[0241] pan-PI3K 억제제의 추가 예시적 예는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, BEZ235, LY294002, GSK1059615 및 GDC-0941을 포함한다.

[0242] *d. AKT 억제제*

[0243] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "AKT 억제제"는, AKT의 적어도 하나의 활성을 억제하는 핵산, 펩티드, 화합물 또는 유기 소분자를 지칭한다. AKT 억제제는, 지질계 억제제(예를 들면, AKT가 혈장 막으로 국재화하는 것을 방지하는 AKT의 플렉스트린 상동성 도메인을 표적화하는 억제제), ATP-경쟁 억제제 및 알로스테릭 억제제를 포함하는 몇가지 부류로 그룹화될 수 있다. 한 가지 실시형태에서, AKT 억제제는 AKT 촉매 부위에 결합함으로써 작용한다. 특정 실시형태에서, Akt 억제제는 mTOR 등의 하류 AKT 표적의 포스포릴화를 억제함으로써 작용한다. 또 다른 실시형태에서, AKT 활성은, 예를 들면, Akt의 DNA-PK 활성화, AKT의 PDK-1 활성화 및/또는 Akt의 mTORC2 활성화를 억제함으로써 Akt를 Akt를 활성화하는 투입 시그날을 억제함으로써 억제된다.

[0244] AKT 억제제는 모두 3개 AKT 이소형, AKT1, AKT2, AKT3을 표적화할 수 있거나 이소형 선택적일 수 있고, AKT 이소형의 1개 또는 2개만 표적화할 수 있다. 한 가지 실시형태에서, AKT 억제제는 PI3K-AKT-mTOR 경로에서 추가 단백질 뿐만 아니라 AKT를 표적화할 수 있다. AKT만을 표적화하는 AKT 억제제는 선택적 AKT 억제제로서 지칭될 수 있다. 한 가지 실시형태에서, 선택적 AKT 억제제는, 경로에서 기타 단백질에 대하여 억제제의 IC50보다 적어도 10배, 적어도 20배, 적어도 30배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 1000배 또는 그 이상 낮은 AKT에 대해 50% 억제 농도를 나타내는 제제를 지칭하는 것으로 이해될 수 있다.

[0245] 특정 실시형태에서, 예시적 AKT 억제제는, 약 200nM 이하, 바람직하게는 약 100nm 이하, 보다 더 바람직하게는 약 60nM 이하, 약 25nM, 약 10nM, 약 5nM, 약 1nM, 100 μM, 50 μM, 25 μM, 10 μM, 1 μM 이하의 IC50(활성의 50%를 억제하는 농도)으로 AKT을 억제한다. 한 가지 실시형태에서, AKT는 약 2nM 내지 약 100nm, 보다 바람직하게는 약 2nM 내지 약 50nM, 보다 더 바람직하게는 약 2nM 내지 약 15nM의 IC50으로 AKT를 억제한다.

[0246] 오리스타틴계(auristatin-based) 항체-약물 접합체와 조합하여 사용하기 위한 AKT 억제제의 예시적 예는, 예를 들면, 페리포신(perifosine)(Keryx), MK2206(Merck), VQD-002(VioQuest), XL418(Exelixis), GSK690693, GDC-0068 및 PX316(PROLX Pharmaceuticals)를 포함하다.

[0247] 선택적 AKT1 억제제의 예시적, 비제한적 예는 A-674563이다.

[0248] 선택적 Akt2 억제제의 예시적, 비제한적 예는 CCT128930이다.

[0249] 특정 실시형태에서, Akt는 Akt의 DNA-PK 활성화, Akt의 PDK-1 활성화, Akt의 mTORC2 활성화 또는 Akt의 HSP 활성화를 억제한다.

[0250] DNA-PK 억제제의 예시적 예는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, NU7441, PI-103, NU7026, PIK-75 및 PP-121을 포함한다.

[0251] **D. 조작된 T 세포 수용체 및 키메라 항원 수용체**

[0252] 의도된 T 세포 제조 방법은 이들 변형된 T 세포의 분화의 동시 증가 없이 고친화성 T 세포 수용체(조작된 TCR) 또는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 변형된 T 세포를 확장시키는데 특히 유용하다. 한 가지 실시형태에서, T 세포는 하나 이상의 조작된 TCR 또는 CAR을 발현하도록 유전적으로 변형된다. 본원에 사용된 바와 같이, 본원에서 의도된 조작된 TCR 또는 CAR을 발현하도록 변형된 T 세포는 "항원-특이적 재지시된 T 세포"로서 지칭된다.

[0253] ***1. 조작된 TCR***

[0254] 천연 발생 T 세포 수용체는 2개의 아단위, α-아단위 및 β-아단위를 포함하고, 각각은 각각의 T 세포 게놈에서 재조합 사상에 의해 생성된 고유한 단백질이다. TCR의 라이브러리는 특정 표적 항원에 대한 이들의 선택성에 대해 스크리닝할 수 있다. 이러한 방식에서, 표적 항원에 대해 고도의 활성 및 반응성을 갖는 천연 TCR을 선별하고, 클로닝하고, 후속적으로 양자 면역요법에 사용된 T 세포 모집단에 도입할 수 있다.

[0255] 한 가지 실시형태에서, T 세포는, 표적 항원을 발현하는 종양 세포에 대한 T 세포에 특이성을 부여하는 TCR을 형성하는 능력을 갖는 TCR의 아단위를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 도입하여 변형시킨다. 특정 실시형태에서, 아단위는, 아단위가 형질감염된 T 세포에 대해 제자리 능력을 표적 세포에 부여하고 면역학적-관련 사이토킨 시그날전달에 관여하는 한, 천연 발생 아단위와 비교하여 하나 이상의 아미노산 치환, 결실, 삽입 또는 변형을 갖는다. 조작된 TCR은 바람직하게는 또한 고도의 친화성을 갖는 관련 종양-연관된 펩티드를 나타내는 표적 세포에 결합하고, 임의로 생체내에서 관련 펩티드를 제시하는 표적 세포의 효율적인 사멸을 매개한다.

[0256] 조작된 TCR을 코딩하는 핵산은 바람직하게는 T 세포의 (천연 발생) 염색체에서 천연 문맥으로부터 단리되고, 본원의 다른 개소에 기재된 바와 같이 적합한 벡터에 도입될 수 있다. 이들을 포함하는 핵산 및 벡터 둘 다는 유용하게는 세포 내로 도입될 수 있고, 세포는 바람직하게는 T 세포이다. 이어서, 변형된 T 세포는 형질도입된 핵산 또는 핵산들에 의해 코딩된 TCR의 하나 이상의 쇄(및 바람직하게는 2개의 쇄)를 발현할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 조작된 TCR은 외인성 TCR인데, 이는 특정 TCR을 정상적으로 발현하지 않는 T 세포에 도입되기 때문이다. 조작된 TCR의 중요한 측면은 이것이 주요 조직적합성 복합체(MHC) 또는 유사한 면역학적 성분에 의해 제시된 종양 항원에 대해 고도의 친화성을 갖는다는 것이다. 조작된 TCR과 대조적으로, CAR은 MHC 독립적 방식으로 표적 항원에 결합하도록 조작된다.

[0257] 본 발명의 핵산에 의해 코딩된 단백질은, 부착된 추가의 폴리펩티드가 기능적 T 세포 수용체를 형성하는 α-쇄 또는 β-쇄의 능력 및 MHC 의존성 항원 인식을 간섭하지 않는 한, TCR의 본 발명의 α-쇄 또는 β-쇄의 아미노-말단 또는 카복실-말단에 부착된 추가의 폴리펩티드와 함께 발현될 수 있다.

[0258] 본원에서 의도된 조작된 TCR에 의해 인식되는 항원은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 혈액암 및 충실성(solid) 종양 둘 다의 항원을 포함하는 암 항원을 포함한다. 예시적 항원은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 알파 폴레이트 수용체, 5T4, $\alpha_v\beta_6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)을 포함

하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FRα, GD2, GD3, 글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11Rα, IL-13Rα2, Lambda, 르위스-Y, Kappa, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 수르비빈, TAG72, TEM 및 VEGFR2를 포함한다.

[0259] *2. 키메라 항원 수용체(CAR)*

[0260] 본원에서 의도된 T 세포 제조 방법은 본원에서 의도된 하나 이상의 CAR을 발현하도록 T 세포를 변형시키는 것을 포함한다. 다양한 실시형태에서, 본 발명은 종양 세포에 대해 세포독성을 재지시하는 CAR을 발현하도록 설계된 벡터로 유전적으로 변형된 T 세포를 제공한다. CAR은 표적 항원(예: 종양 항원)에 대한 항체-기반 특이성을, 특정의 항-종양 세포 면역 활성을 나타내는 키메라 단백질을 생성하기 위해 T 세포 수용체-활성화 세포내 도메인과 조합하는 분자이다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "키메라"는 상이한 단백질의 일부 또는 상이한 기원의 DNA로 구성되는 것을 기재한다.

[0261] 본원에서 의도되는 CAR은 특정의 표적 항원에 결합하는 세포외 도메인(또한 결합 도메인 또는 항원-특이적 결합 도메인으로 지칭됨), 막관통 도메인 및 세포내 시그날전달 도메인을 포함한다. CAR의 주요 특성은 면역 작동 세포 특이성을 재지시하는 이들의 능력이고, 증식, 사이토킨 생성, 식세포작용, 또는 표적 항원 발현 세포의 세포사를 주요 조직적합성(MHC) 독립적 방식으로 매개할 수 있는 분자의 생성을 유발하고, 모노클로날 항체, 가용성 리간드 또는 세포 특이적 공-수용체의 세포 특이적 표적화 능력을 개발하는 것이다.

[0262] 특정 실시형태에서, CAR은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 계류 리간드, 공-수용체의 세포외 도메인을 포함하는 세포외 결합 도메인을 포함하고, 이는, 알파 폴레이트 수용체, 5T4, $\alpha_v\beta_6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FRα, GD2, GD3, 글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11Rα, IL-13Rα2, Lambda, 르위스-Y, Kappa, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 수르비빈, TAG72, TEM 및 VEGFR2; 하나 이상의 힌지 도메인 또는 스페이서 도메인; 이로써 한정되는 것은 아니지만, CD8α, CD4, CD45, PD-1 및 CD152로부터의 막관통 도메인을 포함하는 막관통 도메인; 이로써 한정되는 것은 아니지만, CD28, CD54(ICAM), CD134(OX40), CD137(41BB), CD152(CTLA4), CD273(PD-L2), CD274(PD-L1) 및 CD278(ICOS)로부터의 세포내 공자극 시그날전달 도메인을 포함하는 하나 이상의 세포내 공자극 시그날전달 도메인; 및 CD3ζ 또는 FcRγ로부터의 일차 시그날전달 도메인으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 표적 항원에 특이적으로 결합한다.

[0263] *a. 결합 도메인*

[0264] 특정 실시형태에서, 본원에서 의도된 CAR은, 종양 세포 상에서 발현된, 표적 폴리펩티드(예: 표적 항원)에 특이적으로 결합하는 세포외 결합 도메인을 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "결합 도메인", "세포외 도메인", "세포외 결합 도메인", "항원-특이적 결합 도메인" 및 "세포외 항원 특이적 결합 도메인"은 상호 교대로 사용되고, 목적하는 표적 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는 CAR을 제공한다. 결합 도메인은, 생물학적 분자(예: 세포 표면 수용체 또는 종양 단백질, 지질, 다당류, 또는 기타 세포 표면 표적 분자, 또는 이의 성분)을 특이적으로 인식하고 이에 결합하는 능력을 보유하는 임의의 단백질, 폴리펩티드, 올리고펩티드 또는 펩티드를 포함할 수 있다. 결합 도메인은 목적하는 생물학적 분자를 위한 임의의 천연 발생, 합성, 반합성 또는 재조합에 의해 생성된 결합 파트너를 포함한다.

[0265] 특정 실시형태에서, CAR의 세포외 결합 도메인은 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. "항체"는, 펩티드, 지질, 다당류 또는 항원 결정기를 함유하는 핵산, 예를 들면, 면역 세포에 의해 인식되는 것들 등의 표적 항원의 에피토프를 특이적으로 인식하고 이에 결합하는 경쇄 또는 중쇄 면역글로불린 가변 영역을 적어도 포함하는 폴리펩티드인 결합제를 지칭한다. 항체는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 이 용어는 또한 유전적으로 조작된 형태, 예를 들면, 키메라 항체(예를 들면, 인간화 뮤린 항체), 이종접합체 항체(예: 이중특이적 항체) 및 이의 항원 결합 단편을 포함한다[참조: Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995(Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., W. H. Freeman & Co., New York, 1997].

[0266] 특정 실시형태에서, 표적 항원은 알파 폴레이트 수용체, 5T4, $\alpha_v\beta_6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA,

CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FRα, GD2, GD3, 글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11Rα, IL-13Rα2, Lambda, 르위스-Y, Kappa, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 수르비빈, TAG72, TEM 또는 VEGFR2 폴리펩티드의 에피토프이다.

[0267] 경쇄 및 중쇄 가변 영역은, 또한 "상보성-결정 영역" 또는 "CDR"로 불리우는 3개의 초가변 영역에 의해 차단된 "프레임워크" 영역을 함유한다. CDR은 카바트(Kabat)[참조: Wu, TT and Kabat, E. A., J Exp Med. 132(2):211-50,(1970); Borden, P. and Kabat E. A., PNAS, 84: 2440-2443(1987)] 등에 따른 서열[참조: Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991, 이는 참조로서 본원에 도입된다], 또는 코티아 등(Chothia) 등에 따른 구조[참조: Choithia, C. and Lesk, A.M., J Mol. Biol., 196(4): 901-917(1987), Choithia, C. et al, Nature, 342: 877 - 883(1989)] 등의 통상의 방법에 의해 정의 또는 동정될 수 있다.

[0268] 상이한 경쇄 또는 중쇄의 프레임워크 영역의 서열은 인간 등의 종 내에 비교적 보존되어 있다. 구성적 경쇄 및 중쇄의 조합된 프레임워크 영역인 항체의 프레임워크 영역은 3차원 공간으로 CDR을 위치결정 및 정렬하도록 작용한다. CDR은 주로 항원의 에피토프에 대한 결합에 관여한다. 각 쇄의 CDR은 N-말단으로부터 순차로 출발하여 넘버링되는 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 통상 지칭되고, 또한 전형적으로 특정 CDR이 배치되어 있는 쇄에 의해 동정된다. 따라서, 항체의 중쇄의 가변 도메인에 위치된 CDR은 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3로 지칭되는 반면, 항체의 경쇄의 가변 도메인에 위치된 CDR은 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3으로 지칭된다. 상이한 특이성을 갖는 항체(즉, 상이한 항원에 대한 상이한 조합 부위)는 상이한 CDR을 갖는다. 항체마다 상이한 CDR이 있지만, CDR 내의 아미노산 위치의 제한된 수만이 항원 결합에 직접 관여한다. CDR 내의 이들 위치는 특이성 결정 잔기(SDR)라 한다.

[0269] "V_H" 또는 "VH"에 대한 언급은 본원에 개시된 바와 같이 항체, Fv, scFv, dsFv, Fab 또는 기타 항체 단편의 것을 포함하여 면역글로불린 중쇄의 가변 영역을 지칭한다. "V_L" 또는 "VL"에 대한 언급은 본원에 개시된 바와 같이 항체, Fv, scFv, dsFv, Fab 또는 기타 항체 단편의 것을 포함하여 면역글로불린 경쇄의 가변 영역을 지칭한다.

[0270] "모노클로날 항체"는 B 림파구의 단일 클론, 또는 단일 항체의 경쇄 및 중쇄 유전자가 형질감염되는 세포에 의해 생성된 항체이다. 모노클로날 항체는, 예를 들면, 골수종 세포와 면역 비장 세포와의 융합으로부터 하이브리드 항체-형성 세포를 제조함으로써 당해 기술분야의 숙련가에게 공지된 방법에 의해 생성된다. 모노클로날 항체는 인간화 모노클로날 항체를 포함한다.

[0271] "키메라 항체"는 하나의 종, 예를 들면, 인간으로부터의 프레임워크 잔기, 및 또 다른 종, 예를 들면, 마우스로부터의 CDR(이는 일반적으로 항원 결합을 제공한다)를 갖는다. 특히 바람직한 실시형태에서, 본원에서 의도되는 CAR은 키메라 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 항원-특이적 결합 도메인을 포함한다.

[0272] 특정의 바람직한 실시형태에서, 항체는 종양 세포 상의 표면 단백질에 특이적으로 결합하는 인간화 항체(예: 인간화 모노클로날 항체)이다. "인간화" 항체는 인간 프레임워크 영역, 및 비-인간(예: 마우스, 랫트, 또는 합성) 면역글로불린으로부터의 하나 이상의 CDR을 포함하는 면역글로불린이다. 인간화 항체는 유전자 조작(참조: 미국 특허 제5,585,089호)에 의해 작제할 수 있다.

[0273] 특정한 실시형태에서, CAR의 세포외 결합 도메인은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 낙타 Ig(a 낙타과 항체(VHH)), Ig NAR, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab)'2 단편, F(ab)'3 단편, Fv, 단일쇄 Fv 항체("scFv"), 비스-scFv,(scFv)2, 미니바디, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 디설파이드 안정화된 Fv 단백질("dsFv") 및 단일-도메인 항체(sdAb, 나노바디)를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다.

[0274] 본원에서 사용된 "낙타 Ig" 또는 "낙타과 VHH"는 중쇄 항체의 최소 공지된 항원-결합 단위를 지칭한다[참조: Koch-Nolte, et al, FASEB J., 21: 3490-3498(2007)]. "중쇄 항체" 또는 "낙타과 항체"는 2개의 VH 도메인을 함유하고 경쇄를 함유하지 않는 항체를 지칭한다[참조: Riechmann L. et al, J. Immunol. Methods 231:2538(1999); WO94/04678; WO94/25591; 미국 특허 제6,005,079호].

[0275] "면역글로불린 신규 항원 수용체"의 "IgNAR"는 1개의 가변 신규 항원 수용체(VNAR) 도메인 및 5개의 불변 신규 항원 수용체(CNAR) 도메인의 호모이량체로 이루어진 상어 면역 레퍼토리로부터의 항체 부류를 지칭한다.

[0276] 항체의 파파인 소화는, 각각 단일 항원-결합 부위를 갖는, "Fab" 단편으로 불리우는, 2개의 동일한 항원-결합

단편 및 잔류 "Fc" 단편을 생성하고, 이의 명칭은 용이하게 결정화하는 이의 능력을 반영한다. Fab 단편은 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 함유하고, 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인(CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카복시 말단에 몇몇 잔기의 부가에 의해 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 유리 티올 그룹을 포함하는 Fab'에 대한 본원에서의 명명이다. F(ab')2 항체 단편은 본질적으로, 이들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로서 생성되었다. 항체 단편의 기타 화학적 결합도 또한 공지되어 있다.

[0277] "Fv"는 완전한 항원-결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 단일쇄 Fv(scFv) 종에서, 하나의 중쇄 및 하나의 경쇄 가변 도메인은, 경쇄 및 중쇄가 2개쇄 Fv 종의 것과 유사한 "이량체성" 구조로 회합할 수 있도록, 가요성 펩티드 링커에 의해 공유 연결될 수 있다.

[0278] 용어 "디아바디"는, 단편이 동일한 폴리펩티드 쇄(VH-VL) 중의 경쇄 가변 도메인(VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인(VH)를 포함하는, 2개의 항원-결합 부위를 갖는 항체 단편을 지칭한다. 너무 짧아서 동일한 쇄 상의 2개 도메인 사이의 쌍을 이루는 것을 가능하게 하지 않는 링커를 사용함으로써, 도메인은 또 다른 쇄의 상보성 도메인과 강제로 쌍을 이루고 2개의 항원-결합 부위를 생성한다. 디아바디는 이가 또는 이중특이적이다. 디아바디는, 예를 들면, 문헌[참조: EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134(2003); and Hollinger et al., PNAS USA 90: 6444-6448(1993)]에 보다 상세히 기재되어 있다. 트리아바디 및 테트라바디는 또한 문헌[참조: Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134(2003)]에 기재되어 있다.

[0279] "단일 도메인 항체" 또는 "sdAb" 또는 "나노바디"는 항체 중쇄의 가변 영역(VH 도메인) 또는 항체 경쇄의 가변 영역(VL 도메인)으로 이루어진 항체 단편을 지칭한다[참조: Holt, L., et al, Trends in Biotechnology, 21(11): 484-490].

[0280] "단일쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하고, 여기서 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 쇄에 어느 하나의 배향(예: VL-VH 또는 VH-VL)으로 존재한다. 일반적으로, scFv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위한 목적하는 구조를 형성하는 것을 가능하게 하는 VH 및 VL 사이에 폴리펩티드 링커를 추가로 포함한다. scFv의 개설에 대해서는 문헌[참조: Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp. 269-315]을 참조한다.

[0281] 바람직한 실시형태에서, 본원에서 의도되는 CAR은 암 세포 상에서 발현된 항원에 결합하는 scFv(뮤린, 인간 또는 인간화 scFv)인 항원-특이적 결합 도메인을 포함한다. 특정 실시형태에서, scFv는 알파 폴레이트 수용체, 5T4, $\alpha_v\beta_6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FRα, GD2, GD3, 글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11Rα, IL-13Rα2, 람다, 르위스-Y, Kappa, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 수르비빈, TAG72, TEM 및 VEGFR2에 결합한다.

[0282] ***b. 링커***

[0283] 특정 실시형태에서, 본원에서 의도되는 CAR은, 분자의 적절한 간격 및 형태를 위해 부가된, 다양한 도메인, 예를 들면, V_H 및 V_L 사이에 링커 잔기를 포함할 수 있다. 본원에서 의도된 CAR은 1, 2, 3, 4 또는 5개 또는 그 이상의 링커를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 링커의 길이는 약 1 내지 약 25개 아미노산, 약 5 내지 약 20개 아미노산 또는 약 10 내지 약 20개 아미노산, 또는 이들 아미노산의 임의의 개재하는 길이이다. 일부 실시형태에서, 링커는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 또는 그 이상의 아미노산 길이이다.

[0284] 링커의 예시적 예는 글리신 폴리머$(G)_n$; 글리신-세린 폴리머$(G_{1-5}S_{1-5})_n$(여기서, n은 적어도 1, 2, 3, 4 또는 5의 정수이다); 글리신-알라닌 폴리머; 알라닌-세린 폴리머; 및 당해 기술분야에 공지된 기타 가요성 링커를 포함한다. 글리신 및 글리신-세린 폴리머는 비교적 비구조화되어 있고, 따라서 본원에 기재된 CAR 등의 융합 단백질의 도메인 사이에서 중립적 테더로서 작용할 수 있다. 글리신은 알라닌보다 현저히 많게 파이-사이(phi-psi) 공간에 접근하고, 보다 긴 측쇄를 갖는 잔기보다 훨씬 덜 제한된다[참조: Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142(1992)]. 당해 기술분야의 숙련가는, 특정 실시형태에서 CAR의 설계가 전부 또는 부분적으로 가요성인 링커를 포함할 수 있고, 이에 의해 상기 링커가 목적하는 CAR 구조를 제공하기 위해 보다 덜 가요성 구조를

제공하는 하나 이상의 부분 뿐만 아니라 가요성 링커를 포함할 수 있음을 인지할 것이다.

[0285] 다른 예시적 링커는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 하기 아미노산 서열을 포함한다: GGG; DGGGS(서열번호 X); TGEKP(서열번호 X)[참조: Liu et al., PNAS 5525-5530(1997)]; GGRR(서열번호 X)[참조: Pomerantz et al. 1995, supra]; $(GGGGS)_n$(여기서, n = 1, 2, 3, 4 또는 5)(서열번호 X)[참조: Kim et al., PNAS 93, 1156-1160(1996.)]; EGKSSGSGSESKVD(서열번호 X)[참조: Chaudhary et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:1066-1070]; KESGSVSSEQLAQFRSLD(서열번호 X)[참조: Bird et al., 1988, Science 242:423-426], GGRRGGGS(서열번호 X); LRQRDGERP(서열번호 X); LRQKDGGGSERP(서열번호 X); LRQKd$(GGGS)_2$ ERP(서열번호 X). 대안적으로, 가요성 링커는 DNA-결합 부위 및 펩티드 자체 둘 다를 모델링할 수 있는 컴퓨터 프로그램[참조: Desjarlais & Berg, PNAS 90:2256-2260(1993), PNAS 91:11099-11103(1994)] 또는 상 디스플레이 방법을 사용하여 합리적으로 설계할 수 있다.

[0286] 특정 실시형태에서, CAR은, 가변 영역 연결 서열을 추가로 포함하는 scFv를 포함한다. "가변 영역 연결 서열"은, 생성되는 폴리펩티드가 동일한 경쇄 및 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 동일한 표적 분자에 대해 특이적 결합 친화성을 보유하도록, 중쇄 가변 영역을 경쇄 가변 영역에 연결하고 2개 부-결합 도메인의 상호작용과 화합성인 스페이서 기능을 제공하는 아미노산 서열이다. 한 가지 실시형태에서, 가변 영역 연결 서열은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 또는 그 이상의 아미노산 길이이다. 특정 실시형태에서, 가변 영역 연결 서열은 글리신-세린 폴리머$(G_{1-5}S_{1-5})_n$(여기서, n은 적어도 1, 2, 3, 4 또는 5의 정수이다)를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 가변 영역 연결 서열은 $(G_4S)_3$ 아미노산 링커를 포함한다.

[0287] *c. 스페이서 도메인*

[0288] 특정 실시형태에서, CAR의 결합 도메인은 하나 이상의 "스페이서 도메인"이 후속하고, 이는 적절한 세포/세포 접촉, 항원 결합 및 활성화를 가능하게 하도록 작동 세포 표면으로부터 떨어져 항원 결합 도메인을 이동시키는 영역을 지칭한다[참조: Patel et al., Gene Therapy, 1999; 6: 412-419]. 스페이서 도메인은 천연, 합성, 반합성 또는 재조합 공급원으로부터 유래할 수 있다. 특정 실시형태에서, 스페이서 도메인은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 하나 이상의 중쇄 불변 영역(예: CH2 및 CH3)을 포함하는 면역글로불린의 일부이다. 스페이서 도메인은 천연 발생 면역글로불린 힌지 영역 또는 변화된 면역글로불린 힌지 영역의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0289] 한 가지 실시형태에서, 스페이서 도메인은 IgG1의 CH2 및 CH3을 포함한다.

[0290] *d. 힌지 도메인*

[0291] CAR의 결합 도메인은 일반적으로 하나 이상의 "힌지 도메인"이 후속하고, 이는 적절한 세포/세포 접촉, 항원 결합 및 활성화를 가능하게 하도록 작동 세포 표면으로부터 떨어져 항원 결합 도메인의 위치결정에 중요한 역할을 담당한다. CAR은 일반적으로 결합 도메인과 막관통 도메인(TM) 사이에 하나 이상의 힌지 도메인을 포함한다. 힌지 도메인은 천연, 합성, 반-합성 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다. 힌지 도메인은 천연 발생 면역글로불린 힌지 영역 또는 변화된 면역글로불린 힌지 영역의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0292] 본원에 기재된 CAR에서 사용하기에 적합한 예시적 힌지 도메인은 CD8α, CD4, CD28 및 CD7 등의 유형 1 막 단백질의 세포외 영역으로부터 유래하는 힌지 영역을 포함하고, 이는 이들 분자로부터의 야생형 힌지 영역일 수 있거나 변화될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 힌지 도메인은 CD8α 힌지 영역을 포함한다.

[0293] *e. 막관통(TM) 도메인*

[0294] "막관통 도메인"은 세포외 결합 부분 및 세포내 시그날전달 도메인을 융합시키고 면역 작동 세포의 원형질 막에 CAR을 고정시키는 CAR의 일부이다. TM 도메인은 천연, 합성, 반합성 또는 재조합 공급원으로부터 유래할 수 있다.

[0295] 예시적 TM 도메인은 T-세포 수용체의 알파, 베터 또는 제타 쇄, CD3 엡실론, CD3 제타, CD4, CD5, CD9, CD16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD152 및 CD154로부터 유래할 수 있다(즉, 이들의 적어도 막관통 영역(들)을 포함한다).

[0296] 한 가지 실시형태에서, 본원에서 의도되는 CAR은 CD8α로부터 유래된 TM 도메인을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 본원에서 의도되는 CAR은 CD8α로부터 유래하는 TM 도메인, 및 바람직하게는 TM 도메인과 CAR의 세포내

시그날전달 도메인을 연결하는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산 길이의 짧은 올리고- 또는 폴리펩티드 링커를 포함한다. 글리신-세린 링커는 특히 적합한 링커를 제공한다.

[0297] ***f. 세포내 시그날전달 도메인***

[0298] 특정 실시형태에서, 본원에서 의도되는 CAR은 세포내 시그날전달 도메인을 포함한다. "세포내 시그날전달 도메인"은, 작동 세포 기능, 예를 들면, CAR-결합된 표적 세포에 대한 세포독성 인자의 방출을 포함하는 활성화, 사이토킨 생성, 증식 및 세포독성 활성, 또는 세포외 CAR 도메인에 대한 항원 결합으로 유발된 기타 세포 반응을 유발하기 위해 면역 작동 세포의 내부로 표적 항원에 대한 효과적 CAR 결합의 메시지의 전달에 관여하는 CAR의 부분을 지칭한다.

[0299] 용어 "작동 기능"은 세포의 특수한 기능을 지칭한다. T 세포의 작동 기능은, 예를 들면, 세포용해 활성일 수 있거나, 사이토킨의 분비를 포함하는 활성을 지원할 수 있거나 활성일 수 있다. 따라서, 용어 "세포내 시그날전달 도메인"은 작동 기능 시그날을 전달하고 세포가 특수한 기능을 수행하도록 지시하는 단백질의 일부를 지칭한다. 통상적으로 전체 세포내 시그날전달 도메인이 사용될 수 있지만, 대부분의 경우에 전체 도메인을 사용할 필요는 없다. 세포내 시그날전달 도메인의 절단된 부분이 사용되는 한, 이러한 절단된 부분은 작동 기능 시그날을 전달하면 전체 도메인 대신에 사용될 수 있다. 용어 세포내 시그날전달 도메인은 작동 기능 시그날을 전달하기에 충분한 세포내 시그날전달 도메인의 임의의 절단된 부분을 포함하는 것을 의미한다.

[0300] TCR 단독을 통해 생성된 시그날은 T 세포의 충분한 활성화에 불충분하고 이차 또는 공-자극 시그날이 또한 요구되는 것으로 공지되어 있다. 따라서, T 세포 활성화는 세포내 시그날전달 도메인의 2개 상이한 부류에 의해 매개되는 것으로 말할 수 있다: TCR을 통한 항원-의존성 일차 활성화를 개시하는 일차 시그날전달 도메인(예: TCR/CD3 복합체) 및 이차 또는 공-자극 시그날을 제공하기 위해 항원-독립적 방식으로 작용하는 공-자극 시그날전달 도메인. 바람직한 실시형태에서, 본원에서 의도되는 CAR은, 하나 이상의 "공-자극 시그날전달 도메인" 및 "일차 시그날전달 도메인"을 포함하는 세포내 시그날전달 도메인을 포함한다.

[0301] 일차 시그날전달 도메인은 TCR 복합체의 일차 활성화를 자극 방식으로 또는 억제 방식으로 조절한다. 자극 방식으로 작용하는 일차 시그날전달 도메인은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티브 또는 ITAM으로 공지되어 있는 시그날전달 모티브를 함유할 수 있다.

[0302] 본 발명에서 특히 유용한 일차 시그날전달 도메인을 함유하는 ITAM의 예시적 예는 TCRζ, FcRγ, FcRβ, CD3γ, CD3δ, CD3ε, CD3ζ, CD22, CD79a, CD79b 및 CD66d로부터 유래된 것들을 포함한다. 특히 바람직한 실시형태에서, CAR은 CD3ζ 일차 시그날전달 도메인 및 하나 이상의 공-자극 시그날전달 도메인을 포함한다. 세포내 일차 시그날전달 및 공-자극 시그날전달 도메인은 임의의 순서로 나란히 막관통 도메인의 카복시 말단에 연결될 수 있다.

[0303] 본원에서 의도되는 CAR은 CAR 수용체를 발현하는 T 세포의 유효성 및 확장을 증강시키기 위해 하나 이상의 공-자극 시그날전달 도메인을 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "공-자극 시그날전달 도메인" 또는 "공-자극 도메인"은 공-자극 분자의 세포내 시그날전달 도메인을 지칭한다.

[0304] 이러한 공-자극 분자의 예시적 예는 CD27, CD28, 4-1BB(CD137), OX40(CD134), CD30, CD40, PD-1, ICOS(CD278), CTLA4, LFA-1, CD2, CD7, LIGHT, TRIM, LCK3, SLAM, DAP10, LAG3, HVEM 및 NKD2C 및 CD83을 포함한다. 한 가지 실시형태에서, CAR은 CD28, CD137 및 CD134로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 공-자극 시그날전달 도메인 및 CD3ζ 일차 시그날전달 도메인을 포함한다.

[0305] 한 가지 실시형태에서, CAR은, 알파 폴레이트 수용체, 5T4, $\alpha_v\beta_6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FRα, GD2, GD3, 글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11Rα, IL-13Rα2, 람다, 르위스-Y, Kappa, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 수르비빈, TAG72, TEM 또는 VEGFR2폴리펩티드; CD8α; CD4, CD45, PD-1 및 CD152로 이루어진 그룹으로부터 선택된 폴리펩티드로부터 유래하는 막관통 도메인; 및 CD28, CD54, CD134, CD137, CD152, CD273, CD274 및 CD278로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 세포내 공-자극 시그날전달 도메인; 및 CD3ζ 일차 시그날전달 도메인에 결합하는, scFv를 포함한다.

[0306] 또 다른 실시형태에서, CAR은, 알파 폴레이트 수용체, 5T4, $\alpha_v\beta_6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19,

CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FR α, GD2, GD3, 글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11Rα, IL-13Rα2, 람다, 르위스-Y, Kappa, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 수르비빈, TAG72, TEM 또는 VEGFR2; IgG1 힌지/CH2/CH3 및 CD8α로 이루어진 그룹으로부터 선택된 힌지 도메인 및 CD8α; CD8α; CD4, CD45, PD-1 및 CD152로 이루어진 그룹으로부터 선택된 폴리펩티드로부터 유래하는 막관통 도메인; 및 CD28, CD134 및 CD137로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 세포내 공-자극 시그날전달 도메인; 및 CD3ζ 일차 시그날전달 도메인에 결합하는, scFv를 포함한다.

[0307] 또 다른 실시형태에서, CAR은, 알파 폴레이트 수용체, 5T4, $\alpha_v\beta_6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FR α, GD2, GD3, 글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11Rα, IL-13Rα2, 람다, 르위스-Y, Kappa, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 수르비빈, TAG72, TEM 또는 VEGFR2폴리펩티드; IgG1 힌지/CH2/CH3 및 CD8α로 이루어진 그룹으로부터 선택된 힌지 도메인 및 CD8α; CD8α; CD4, CD45, PD-1 및 CD152로 이루어진 그룹으로부터 선택된 폴리펩티드로부터 유래하는 TM 도메인을 포함하는 막관통 도메인, 및 바람직하게는 TM 도메인을 CAR의 세포내 시그날전달 도메인에 연결하는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산 길이의 아미노산 및 짧은 올리고- 및 폴리펩티드 링커; 및 CD28, CD134 및 CD137로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 세포내 공-자극 시그날전달 도메인; 및 CD3ζ 일차 시그날전달 도메인에 결합하는, 링커를 추가로 포함하는, scFv를 포함한다.

[0308] 특정 실시형태에서, CAR은, 알파 폴레이트 수용체, 5T4, $\alpha_v\beta_6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FR α, GD2, GD3, 글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, IL-11Rα, IL-13Rα2, 람다, 르위스-Y, Kappa, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 수르비빈, TAG72, TEM 및 VEGFR2 폴리펩티드; CD8α 폴리펩티드를 포함하는 힌지 도메인; 약 3개 아미노산의 폴리펩티드 링커를 포함하는 CD8α 막관통 도메인; CD28, CD134 및 CD137로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 세포내 공-자극 시그날전달 도메인; 및 CD3ζ 일차 시그날전달 도메인에 결합하는, scFv를 포함한다.

[0309] **E. 폴리펩티드**

[0310] 본 발명은, 부분적으로, 조작된 TCR 및 CAR 폴리펩티드 및 이의 단편, 이를 함유하는 세포 및 조성물, 및 폴리펩티드를 발현하는 벡터를 의도한다. "폴리펩티드", "폴리펩티드 단편", "펩티드" 및 "단백질"은, 달리 명시되지 않는 한, 통상의 의미에 따라, 즉 아미노산의 서열로서, 상호 교대로 사용된다. 폴리펩티드는 특정 길이로 한정되지 않고, 예를 들면, 이들은 전장 단백질 서열 또는 전장 단백질의 단편을 포함할 수 있고, 폴리펩티드의 번역후 변형, 예를 들면, 천연 발생 또는 비-천연 발생의 당해 기술분야에 공지된 다른 변형 뿐만 아니라, 글리코실화, 아세틸화, 포스포릴화 등을 포함할 수 있다. 다양한 실시형태에서, 본원에서 의도되는 폴리펩티드는 단백질의 N-말단에 시그날(또는 리더) 서열을 포함하고, 이는 번역과 동시에 또는 번역후 단백질의 전이를 지시한다. 본원의 개시에 유용한 적합한 시그날 서열의 예시적 예는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, IgG1 중쇄 시그날 서열 및 CD8α 시그날 서열을 포함한다. 폴리펩티드는 임의의 다양한 공지된 재조합 및/또는 합성 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 본원에서 의도되는 폴리펩티드는 구체적으로는 본 명세서의 CAR, 또는 본원에 의도된 폴리펩티드의 하나 이상의 아미노산의 결실, 부가 및/또는 치환을 갖는 서열을 포함한다.

[0311] 폴리펩티드는 "폴리펩티드 변이체"를 포함한다. 폴리펩티드 변이체는 하나 이상의 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입의 점에서 천연 발생 폴리펩티드와 상이할 수 있다. 이러한 변이체는 천연 발생일 수 있거나, 예를 들면, 상기 폴리펩티드 서열의 하나 이상을 변형시킴으로써 합성적으로 생성할 수 있다. 예를 들면, 특정 실시형태에서, 하나 이상의 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입을 도입함으로써 조작된 TCR 또는 CAR의 결합 친화성 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 폴리펩티드는 이와 적어도 약 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다.

[0312] 폴리펩티드는 "폴리펩티드 단편"을 포함한다. 폴리펩티드 단편은, 단량체성 또는 다량체성일 수 있고 천연-발생 또는 재조합-생성된 폴리펩티드의 아미노-말단 결실, 카복실-말단 결실 및/또는 내부 결실 또는 치환을 갖는 폴리펩티드를 지칭한다. 특정 실시형태에서, 폴리펩티드 단편은 적어도 5 내지 약 500개 아미노산 길이의 아미노산 쇄를 포함할 수 있다. 특정한 실시형태에서, 단편은 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 또는 450개 아미노산 길이인 것으로 이해된다.

[0313] 폴리펩티드는 또한 프레임 내에서 융합될 수 있거나, 링커, 또는 폴리펩티드의 합성, 정제 또는 동정을 용이하게 하거나 고체 지지체에 대한 폴리펩티드의 결합을 증강시키기 위한 기타 서열에 접합될 수 있다.

[0314] 상술한 바와 같이, 본 발명의 폴리펩티드는 아미노산 치환, 결실, 절단 및 삽입을 포함하는 다양한 방식으로 변화시킬 수 있다. 이러한 조작 방법은 일반적으로 당해 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들면, 참조 폴리펩티드의 아미노산 서열 변이체는 DNA의 돌연변이에 의해 제조할 수 있다. 돌연변이유발 및 뉴클레오티드 서열 변화 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다[참조: Kunkel(1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 488-492), Kunkel et al.,(1987, Methods in Enzymol, 154: 367-382), 미국 특허 제4,873,192호, Watson, J. D. et al.,(Molecular Biology of the Gene, Fourth Edition, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1987) 및 본원에 인용된 참조문헌]. 목적하는 단백질의 생물학적 활성에 영향을 미치지 않는 적절한 아미노산 치환에 대한 지침은 문헌[참조: Dayhoff et al., (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.)]의 모델에서 발견할 수 있다.

[0315] 특정 실시형태에서, 변이체는 보존적 치환을 함유할 것이다. "보존적 치환"은 아미노산이 유사한 특성을 갖는 또 다른 아미노산으로 치환되어 있는 것이고, 펩티드 화학 분야의 숙련가는 폴리펩티드의 이차 구조 및 소수성 성질이 실질적으로 변화되지 않는 것으로 기대할 것이다. 변형은 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드의 구조에서 이루어질 수 있고, 또한 목적하는 특성을 갖는 변이체 또는 유도성 폴리펩티드를 코딩하는 기능적 분자를 수득한다.

[0316] 폴리펩티드 변이체는 추가로 글리코실화 형태, 다른 분자와의 응집성 접합체, 및 비관련 화학적 잔기와의 공유 접합체(예: 페길화된 분자)를 추가로 포함한다. 공유 변이체는, 당해 기술분야에 공지된 바와 같이 관능기를, 아미노산 쇄 또는 N- 또는 C-말단 잔기에서 발견되는 그룹에 연결시킴으로써 제조할 수 있다. 변이체는 또한 대립유전자 변이체, 종 변이체 및 돌연변이 단백질을 포함한다. 단백질의 기능적 활성에 영향을 미치지 않는 영역의 절단 또는 결실은 또한 변이체이다.

[0317] 한 가지 실시형태에서, 2개 이상의 폴리펩티드의 발현이 요구되는 경우, 이들을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 본원의 다른 개소에서 언급된 IRES 서열에 의해 분리될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 2개 이상의 폴리펩티드는 하나 이상의 자가-절단 폴리펩티드 서열을 포함하는 융합 단백질로서 발현될 수 있다.

[0318] 본 발명의 폴리펩티드는 융합 폴리펩티드를 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 융합 폴리펩티드, 및 융합 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 융합 폴리펩티드 및 융합 단백질은 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 또는 그 이상의 폴리펩티드 세그먼트를 갖는 폴리펩티드를 지칭한다. 융합 폴리펩티드는 전형적으로, 이들이 또한 C-말단을 C-말단에, N-말단을 N-말단에 또는 N-말단을 C-말단에 연결시킬 수 있지만, C-말단을 N-말단에 연결시킨다. 융합 단백질의 폴리펩티드는 임의의 순서로 또는 지정된 순서로 존재할 수 있다. 융합 폴리펩티드 또는 융합 단백질은, 융합 폴리펩티드의 목적하는 전사 활성이 보존되는 한, 보존적 변형된 변이체, 다형태 변이체, 대립유전자, 돌연변이체, 서브서열 및 종간 상동체를 또한 포함할 수 있다. 융합 폴리펩티드는 화학적 합성 방법 또는 2개 잔기 사이의 화학적 연결에 의해 생성할 수 있거나, 일반적으로 다른 표준 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 융합 폴리펩티드를 포함하는 연결 DNA 서열은 본원의 다른 개소에서 언급된 바와 같이 적합한 전사 또는 번역 조절 요소에 작동적으로 연결된다.

[0319] 한 가지 실시형태에서, 융합 파트너는 천연 재조합 단백질 보다 높은 수율로 단백질의 발현을 보조하는 서열(발현 인핸서)을 포함한다. 다른 융합 파트너는 단백질의 용해도를 증가시키거나 단백질이 목적하는 세포 구획으로 표적화되는 것을 가능하게 하거나 세포 막을 통해 융합 단백질의 수송을 용이하게 하도록 선택될 수 있다.

[0320] 융합 폴리펩티드는 본원에 기재된 각각의 폴리펩티드 도메인 사이에 폴리펩티드 절단 시그날을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 폴리펩티드 부위는 임의의 링커 펩티드 서열에 도입될 수 있다. 예시적 폴리펩티드 절단 시그날은 프로테아제 절단 부위, 뉴클레아제 절단 부위(예: 드문 제한 효소 인식 부위, 자가-절단 리보자임 인식 부

위) 및 자가-절단 바이러스 올리고펩티드 등의 폴리펩티드 절단 인식 부위를 포함한다[참조: deFelipe and Ryan, 2004. Traffic, 5(8); 616-26].

[0321] 적합한 프로테아제 절단 부위 및 자가-절단 펩티드는 당해 기술분야의 숙련가에게 공지되어 있다[참조: Ryan et al., 1997. J. Gener. Virol. 78, 699-722; Scymczak et al.(2004) Nature Biotech. 5, 589-594]. 예시적 프로테아제 절단 부위는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 포티바이러스 Nia 프로테아제(예: 담배 에치 바이러스 프로테아제), 포티바이러스 HC 프로테아제, 포티바이러스 P1(P35) 프로테아제, 비오바이러스 NIa 프로테아제, 비오바이러스 RNA-2-코딩된 프로테아제, 아프토바이러스 L 프로테아제, 엔테로바이러스 2A 프로테아제, 리노바이러스 2A 프로테아제, 피코르나 3C 프로테아제, 코모바이러스 24K 프로테아제, 네포바이러스 24K 프로테아제, RTSV(벼 툰그로 구형 바이러스) 3C-형 프로테아제, PYVF(파스닙 황색 플렉 바이러스) 3C-형 프로테아제, 헤파린, 트롬빈, 인자 Xa 및 엔테로키나제를 포함한다. 이의 높은 절단 엄격성에 기인하여, TEV(담배 에치 바이러스) 프로테아제 부위, 예를 들면, EXXYXQ(G/S)(서열번호:), 예를 들면, ENLYFQG(서열번호:) 및 ENLYFQS(서열번호:)(여기서, X는 임의의 아미노산(TEV에 의한 절단은 Q와 G 사이 또는 Q와 S 사이에서 발생한다)을 나타낸다)가 한 가지 양태에서 바람직하다.

[0322] 특정 실시형태에서, 자가-절단 펩티드는 포티바이러스 및 카디오바이러스 2A 펩티드, FMDV(족구 질환 바이러스), 우마 비염 A 바이러스, 토세아 아시그나 바이러스 및 돼지 테스초바이러스로부터 수득된 폴리펩티드 서열을 포함한다.

[0323] 특정 실시형태에서, 자가-절단 폴리펩티드 부위는 2A 또는 2A-형 부위, 서열 또는 도메인을 포함한다[참조: Donnelly et al., 2001. J. Gen. Virol. 82:1027-1041].

[0324] **F. 폴리뉴클레오티드**

[0325] 특정 실시형태에서, 본원에서 의도된 하나 이상의 조작된 TCR 또는 CAR 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산"은 메신저 RNA(mRNA), RNA, 게놈 RNA(gRNA), 플러스 사슬 RNA(RNA(+)), 마이너스 사슬 RNA(RNA(-)), 게놈 DNA(gDNA), 상보적 DNA(cDNA) 또는 재조합 DNA를 지칭한다. 폴리뉴클레오티드는 단일 사슬 및 이중 사슬 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는, 전형적으로 변이체가 참조 서열의 적어도 하나의 생물학적 활성을 유지하는 경우에, 본원에 기재된 임의의 참조 서열(참조: 서열 목록)에 대해서 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 또는 변이체를 포함한다. 다양한 예시적 실시양태에서, 본 발명은, 부분적으로, 발현 벡터, 바이러스 벡터 및 전이 플라스미드, 및 이들을 포함하는 조성물 및 세포를 의도한다.

[0326] 특정 실시형태에서, 본 발명의 폴리펩티드의 적어도 약 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 1000, 1250, 1500, 1750 또는 2000개 또는 그 이상의 연속 아미노산 잔기, 뿐만 아니라 모든 중간 길이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 본 발명에 의해 제공된다. 이러한 맥락에서, "중간 길이"는 6, 7, 8, 9 등; 101, 102, 103 등; 151, 152, 153 등; 201, 202, 203 등과 같이 인용된 값 사이의 임의의 길이를 의미하는 것으로 용이하게 이해될 것이다.

[0327] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "폴리뉴클레오티드 변이체" 및 "변이체" 등은 참조 폴리뉴클레오티드 서열 또는, 이하에 정의된 엄격한 조건하에서 참조 서열과 하이브리드화하는 폴리뉴클레오티드와 실질적 서열 동일성을 나타내는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 이들 용어는 하나 이상의 뉴클레오티드가 부가 또는 결실되거나, 참조 폴리뉴클레오티드와 비교하여 상이한 뉴클레오티드로 대체된 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 이와 관련하여, 돌연변이, 부가, 결실 및 치환을 포함하는 특정의 변화가 참조 폴리뉴클레오티드에 대해 이루어지고, 이에 의해 변화된 폴리뉴클레오티드가 참조 폴리뉴클레오티드의 생물학적 기능 또는 활성을 보유할 수 있음은 당해 기술분야에서 잘 이해된다.

[0328] 인용 "서열 동일성" 또는, 예를 들면, "와 50% 동일한 서열"은, 본원에 사용된 바와 같이, 서열이 비교 윈도우에 걸쳐 뉴클레오티드 단위끼리 또는 아미노산 단위끼리의 동일한 정도를 지칭한다. 따라서, "서열 동일성의 퍼센트"는, 비교 윈도우에 걸쳐 2개의 최적으로 정렬된 서열을 비교하고, 동일한 핵산 염기(예: A, T, C, G, I) 또는 동일한 아미노산 잔기(예: Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys 및 Met)이 두 서열에서 발생하는 위치의 수를 측정하여 정합된 위치의 수를 수득하고, 정합된 위치의 수를 비교 윈도우(예: 윈도우 크기)에서 전체 위치 수로 나누고, 그 결과에 100을 곱하여 서열 동일성의 퍼센트를 수득함으로써 계산할 수 있다. 전형적으로, 폴리펩티드 변이체가 참조 폴리펩티드의 적어도

하나의 생물학적 활성을 유지하는 경우, 본원에 기재된 임의의 참조 서열 중의 어느 하나에 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 및 폴리펩티드가 포함된다.

[0329] 2개 이상의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 사이의 서열 관계를 기재하기 위해 사용된 용어는 "참조 서열", "비교 윈도우", "서열 동일성", "서열 동일성 퍼센트" 및 "실질적 동일성"을 포함한다. "참조 서열"은 길이가 적어도 12개, 그러나 종종 15 내지 18개 및 종종 뉴클레오티드 및 아미노산 잔기를 포함하는 적어도 25개 단량체 단위이다. 2개 폴리뉴클레오티드는 각각 (1) 2개 폴리뉴클레오티드 사이에서 유사한 서열(즉, 완전 폴리뉴클레오티드 서열의 일부만), 및 (2) 2개 폴리뉴클레오티드 사이에서 상이한 서열을 각각 포함하기 때문에, 2개 (또는 이상) 폴리뉴클레오티드 사이의 서열 비교는 전형적으로 서열 유사성의 국소 영역을 동정하고 비교하기 위해 "비교 윈도우"에 걸쳐 2개 폴리뉴클레오티드의 서열을 비교함으로써 수행된다. "비교 윈도우"는 적어도 6개 연속 위치, 통상 약 50 내지 약 100개, 보다 통상적으로 약 100 내지 150개의 개념적 세그먼트를 지칭하고, 여기서 서열은 2개 서열을 최적으로 정렬한 후에 연속 위치의 동일한 수의 참조 서열과 비교한다. 비교 윈도우는 2개 서열의 최적 정렬을 위해 참조 서열과 비교하여(이는 부가 또는 결실을 포함하지 않는다) 약 20% 이하의 부가 또는 결실(즉, 갭)을 포함할 수 있다. 비교 윈도우를 정렬하는 서열의 최적 정렬은 알고리즘의 컴퓨터 실행(GAP, BESTFIT, FASTA 및 TFASTA, the Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USA)에 의해 또는 선택된 임의의 다양한 방법에 의해 생성된 검사 및 최상 정렬(즉, 비교 윈도우에 걸쳐 최고 퍼센트 상동성을 생성)에 의해 수행할 수 있다. 참조는 또한, 예를 들면, 문헌[참조: Altschul *et al.*, 1997, Nucl. Acids Res. 25:3389]에 개시된 바와 같은 프로그램의 BLAST 계열로 수행할 수 있다. 서열 분석의 상세 언급은 문헌[참조: Unit 19.3 of Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Chapter 15]에서 발견할 수 있다.

[0330] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는, 코딩 서열 자체의 길이와 무관하게, 본원의 다른 개소에 개시되거나 당해 기술분야에 공지된 바와 같이, 다른 DNA 서열, 예를 들면, 프로모터 및/또는 인핸서, 비번역된 영역(UTR), 코작 서열, 폴리아데닐화 시그날, 추가의 제한 효소 부위, 다중 클로닝 부위, 내부 리보솜 도입 부위(IRES), 리컴비나제 인식 부위(예: LoxP, FRT 및 Att 부위), 종결 코돈, 전사 종결 시그날 및 자가-절단 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 에피토프 태그와 조합되어, 이의 전체 길이는 상당히 달라질 수 있다. 따라서, 거의 모든 길이의 폴리뉴클레오티드 단편이 사용될 수 있는 것으로 의도되며, 전체 길이는 바람직하게는 의도된 재조합 DNA 프로토콜에서 제조 및 사용 용이성에 의해 제한된다.

[0331] 폴리뉴클레오티드는 당해 기술분야에 공지되고 이용가능한 임의의 다양한 잘 확립된 기술을 사용하여 제조, 조작 및/또는 발현시킬 수 있다. 목적하는 폴리펩티드를 발현시키기 위해, 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 적절한 벡터에 삽입할 수 있다. 벡터의 예는 플라스미드, 자가 복제 서열 및 전이 요소이다. 추가의 예시적 벡터는, 제한 없이, 플라스미드, 파게미드, 코스미드, 인공 염색체, 예를 들면, 효모 인공 염색체(YAC), 세균 인공 염색체(BAC), 또는 P1-유래된 인공 염색체(PAC), 박테리오파지, 예를 들면, 람다 파지 또는 M13 파지 및 동물 바이러스를 포함한다. 벡터로서 유용한 동물 바이러스 범주의 예는, 제한 없이, 레트로바이러스(렌티바이러스 포함), 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 헤르페스바이러스(예: 헤르페스 심플렉스 바이러스), 폭스바이러스, 바큘로바이러스, 파필로마바이러스 및 파보바바이러스(예: SV40)를 포함한다. 발현 벡터의 예는 포유동물 세포에서 발현시키기 위한 pCIneo 벡터(Promega); 포유동물 세포에서 렌티바이러스-매개된 유전자 전이 및 발현을 위한 pLenti4/V5-DEST™, pLenti6/V5-DEST™ 및 pLenti6.2/V5-GW/lacZ(Invitrogen)를 포함한다. 특정 실시형태에서, 본원에 개시된 키메라 단백질의 코딩 서열은 포유동물 세포에서 키메라 단백질의 발현을 위해 이러한 발현 벡터에 연결될 수 있다.

[0332] 발현 벡터에 존재하는 "조절 요소" 또는 "조절 서열"은, 전사 및 번역을 수행하기 위해 숙주 세포 단백질과 상호작용하는 벡터의 비-번역된 영역(복제 기원, 선별 카세트, 프로모터, 인핸서, 번역 개시 시그날(Shine Dalgarno 서열 또는 Kozak 서열) 인트론, 폴리아데닐화 서열, 5' 및 3' 비번역된 영역)이다. 이러한 요소는 이들의 강도 및 특이성이 상이할 수 있다. 사용된 벡터 시스템 및 숙주에 따라, 편재성 프로모터 및 유도가능한 프로모터를 포함하는 임의 수의 적합한 전사 및 번역 요소가 사용될 수 있다.

[0333] 특정 실시형태에서, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 발현 벡터 및 바이러스 벡터를 포함하는, 본 발명의 실시에 사용하기 위한 벡터는 프로모터 및/또는 인핸서와 같은 외인성, 내인성 또는 이종성 조절 서열을 포함한다. "내인성" 조절 서열은 게놈 내에서 소정 유전자와 자연적으로 연결된 것이다. "외인성" 조절 서열은 당해 유전자의 전사가 연결된 인핸서/프로모터에 의해 지시되도록 유전자 조작(즉, 분자 생물학 기술)의 방법에 의해 유전자에 병렬로 배치된 것이다. "이종성" 조절 서열은 유전적으로 조작된 세포와 상이한 종으로부터 유래하는

외인성 서열이다.

[0334] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "프로모터"는 RNA 폴리머라제가 결합하는 폴리뉴클레오티드(DNA 또는 RNA)의 인식 부위를 지칭한다. RNA 폴리머라제는 프로모터에 작동적으로 연결된 폴리뉴클레오티드를 개시하고 전사한다. 특정 실시형태에서, 포유동물 세포에서 작동하는 프로모터는 전사가 개시되는 부위로부터 대략 25 내지 30개 염기 상류에 위치하는 AT-풍부 영역 및/또는 전사 개시로부터 70 내지 80개 염기 상류에서 발견되는 또 다른 서열, N이 임의의 뉴클레오티드일 수 있는 CNCAAT 영역을 포함한다.

[0335] 용어 "인핸서"는, 증강된 전사를 제공할 수 있는 서열을 함유하고 일부의 경우에 또 다른 조절 서열에 대해 이들의 배향과는 독립적으로 기능할 수 있는 DNA의 세그먼트를 지칭한다. 인핸서는 프로모터 및/또는 기타 인핸서 요소와 협동적으로 또는 부가적으로 기능할 수 있다. 용어 "프로모터/인핸서"는 프로모터 및 인핸서 기능 둘 다를 제공할 수 있는 서열을 함유하는 DNA의 세그먼트를 지칭한다.

[0336] 용어 "작동적으로 연결된"은 기재된 성분이 이들을 이들의 의도된 방식으로 기능하도록 하는 관계로 존재하는 병렬관계를 지칭한다. 한 가지 실시형태에서, 상기 용어는 핵산 발현 조절 서열(예를 들면, 프로모터 및/또는 인핸서)과 제2 폴리뉴클레오티드 서열, 예를 들면, 목적하는 폴리뉴클레오티드 사이의 기능적 연결을 지칭하고, 여기서 발현 조절 서열은 제2 서열에 상응하는 핵산의 전사를 지시한다.

[0337] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "구성적 발현 조절 서열"은 작동적으로 연결된 서열의 전사를 계속해서 또는 연속적으로 가능하게 하는 프로모터, 인핸서 또는 프로모터/인핸서를 지칭한다. 구성적 발현 조절 서열은 광범위한 종류의 세포 및 조직 유형에서 발현을 가능하게 하는 "편재성(ubiquitous)" 프로모터, 인핸서 또는 프로모터/인핸서, 또는 제한된 종류의 세포 및 조직 유형에서 각각 발현을 가능하게 하는 "세포 특이적", "세포 유형 특이적", "세포 계통 특이적" 또는 "조직 특이적" 프로모터, 인핸서 또는 프로모터/인핸서일 수 있다.

[0338] 본 발명의 특정 실시형태에서 사용하기에 적합한 예시적인 편재성 발현 조절 서열에는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 사이토메갈로바이러스(CMV) 즉시 초기 프로모터, 바이러스성 유인원 바이러스 40(SV40)(예를 들면, 초기 또는 후기), 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스(MoMLV) LTR 프로모터, 라우스 육종 바이러스(RSV) LTR, 헤르페스 심플렉스 바이러스(HSV)(티미딘 키나제) 프로모터, 백시니아 바이러스로부터의 H5, P7.5 및 P11 프로모터, 신장 인자(elongation factor) 1-알파(EF1a) 프로모터, 초기 성장 반응 1(EGR1), 페리틴 H(FerH), 페리틴 L(FerL), 글리세르알데히드 3-포스페이트 데하이드로게나제(GAPDH), 진핵성 번역 개시 인자 4A1(EIF4A1), 열 쇼크 70kDa 단백질 5(HSPA5), 열 쇼크 단백질 90kDa 베타, 구성원 1(HSP90B1), 열 쇼크 단백질 70kDa(HSP70), β-키네신(β-KIN), 인간 ROSA 26 유전자좌[참조: Irions *et al.*, (2007) *Nature Biotechnology* 25, 1477-1482], 유비퀴틴 C 프로모터(UBC), 포스포글리세레이트 키나제-1(PGK) 프로모터, 사이토메갈로바이러스 인핸서/닭 β-액틴(CAG) 프로모터 및 β-액틴 프로모터, 및 골수증식성 육종 바이러스 인핸서, 음성 조절 영역 결실된, d1587rev 프라이머-결합 부위 치환된(MND) 프로모터를 포함한다[참조: Challita *et al.*, *J Virol*. 69(2):748-55(1995)].

[0339] 특정 실시형태에서, 이는 표적 항원을 발현하는 세포에 T 세포를 재지시하는 충분한 수준으로 T 세포에서 안정한 및 장기간 발현을 제공하는 프로모터로부터 조작된 TCR 또는 CAR을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 것이 바람직할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 프로모터는 EF1α 프로모터 또는 MND 프로모터이다.

[0340] 본원에서 사용된 바와 같이, "조건적 발현(conditional expression)"은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 유도성 발현; 억제성 발현; 특정한 생리학적, 생물학적 또는 질환 상태를 갖는 세포 또는 조직에서의 발현 등을 포함하는 모든 유형의 조건적 발현을 지칭할 수 있다. 이 정의는 세포 유형 또는 조직 특이적 발현을 배제하도록 의도된 것은 아니다. 본 발명의 특정한 실시형태는 목적하는 폴리뉴클레오티드의 조건적 발현을 제공하고, 예를 들면, 발현은 세포, 조직, 생물체 등을, 폴리뉴클레오티드가 발현되도록 야기하거나 목적하는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된 폴리뉴클레오티드의 발현의 증가 또는 감소를 야기하는 처리 또는 조건에 적용함으로써 조절된다.

[0341] 유도성 프로모터/시스템의 예시적 예로는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 글루코코르티코이드 또는 에스트로겐 수용체를 코딩하는 유전자에 대한 프로모터와 같은 스테로이드-유도성 프로모터(상응하는 호르몬으로 처리함으로써 유도가능), 메탈로티오닌 프로모터(다양한 중금속으로 처리함으로써 유도가능), MX-1 프로모터(인터페론에 의해 유도가능), "진스위치" 미페프리스톤-조절가능한 시스템("GeneSwitch" mifepristone-regulatable system)[참조: Sirin *et al.*, (2003) *Gene*, 323:67], 쿠메이트 유도성 유전자 스위치(WO 2002/088346), 테트라사이클린-의존성 조절 시스템 등을 포함한다.

[0342] 조건적 발현은 또한 부위-특이적 DNA 재조합효소를 사용함으로써 달성될 수 있다. 본 발명의 특정한 실시형태에 따르면, 벡터는 부위-특이적 재조합효소에 의해 매개된 재조합을 위한 적어도 하나(통상 2개)의 부위(들)를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "재조합효소" 또는 "부위-특이적 재조합효소"는 야생형 단백질[참조: Landy, (1993), Current Opinion in Biotechnology 3:699-707], 또는 이의 돌연변이체, 유도체(예를 들면, 재조합 단백질 서열 또는 이의 단편을 함유하는 융합 단백질), 단편 및 변이체일 수 있는, 하나 이상의 재조합 부위(예를 들면, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 12, 15, 20, 30, 50개 등)를 수반하는 재조합 반응에 관여하는 소화성 또는 통합성 단백질, 효소, 보조-인자(co-factors) 또는 연관된 단백질을 포함한다. 본 발명의 특정한 실시형태에서 사용하기에 적합한 재조합효소의 예시적 예로는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, Cre, Int, IHF, Xis, Flp, Fis, Hin, Gin, ΦC31, Cin, Tn3 리졸바제(resolvase), TndX, XerC, XerD, TnpX, Hjc, Gin, SpCCE1 및 ParA가 포함된다.

[0343] **G. 바이러스 벡터**

[0344] 특정 실시형태에서, 세포(T 세포)는 본원에서 의도된 조작된 TCR 또는 CAR을 코딩하는 레트로바이러스 벡터, 예를 들면, 렌티바이러스 벡터로 형질도입된다. 형질도입된 T 세포는 안정한 장기간 지속성 T-세포 반응을 유도한다.

[0345] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "레트로바이러스"는 이의 게놈 RNA를 선형 이중 사슬 DNA 카피로 역전사시키고, 이어서 이의 게놈 DNA를 숙주 게놈 내에 공유적으로 통합시키는 RNA 바이러스를 지칭한다. 특정 실시형태에서 사용하기에 적합한 예시적 레트로바이러스는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 몰로니 뮤린(Moloney murine) 백혈병 바이러스(M-MuLV), 몰로니 뮤린 육종 바이러스(MoMSV), 하베이(Harvey) 뮤린 육종 바이러스(HaMuSV), 뮤린 유방 종양 바이러스(MuMTV), 지본 유인원(gibbon ape) 백혈병 바이러스(GaLV), 고양이 백혈병 바이러스(FLV), 스푸마바이러스(spumavirus), 프렌드(Friend) 뮤린 백혈병 바이러스, 뮤린 줄기 세포 바이러스(MSCV) 및 라우스(Rous) 육종 바이러스(RSV) 및 렌티바이러스를 포함한다.

[0346] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "렌티바이러스"는 복잡한 레트로바이러스의 그룹(또는 속)을 지칭한다. 예시적 레트로바이러스는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, HIV(인간 면역결핍 바이러스; HIV 유형 1 및 HIV 유형 2 포함); 비스나-메디(visna-maedi) 바이러스(VMV); 염소 관절염-뇌염 바이러스(CAEV); 말 감염성 빈혈 바이러스(EIAV); 고양이 면역결핍 바이러스(FIV); 소 면역결핍 바이러스(BIV); 및 유인원(simian) 면역결핍 바이러스(SIV)를 포함한다. 한 가지 실시형태에서, HIV 기반 벡터 골격(즉, HIV 시스-작용 서열 요소)이 바람직하다.

[0347] 용어 "벡터"는 본원에서 또 다른 핵산 분자를 전이시키거나 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭하기 위해서 사용된다. 전이된 핵산은 일반적으로 벡터 핵산 분자에 연결되는데, 예를 들면, 벡터 핵산 분자 내에 삽입된다. 벡터는 세포에서의 자율적 복제를 지시하는 서열을 포함할 수 있거나, 숙주 세포 DNA 내로의 통합을 가능하게 하는데 충분한 서열을 포함할 수 있다. 유용한 벡터는, 예를 들면, 플라스미드(예를 들면, DNA 플라스미드 또는 RNA 플라스미드), 트랜스포손, 코스미드, 세균 인공 염색체 및 바이러스 벡터를 포함한다. 유용한 바이러스 벡터는, 예를 들면, 복제 결함 레트로바이러스 및 렌티바이러스를 포함한다.

[0348] 당해 기술분야의 숙련가에게 명백한 바와 같이, 용어 "바이러스 벡터"는, 전형적으로 핵산 분자의 전이 또는 세포의 게놈 내로의 통합을 용이하게 하는 바이러스-유래된 핵산 요소를 포함하는 핵산 분자(예를 들면, 전이 플라스미드), 또는 핵산 전이를 매개하는 바이러스 입자를 지칭하기 위해서 광범위하게 사용된다. 바이러스 입자는 전형적으로 핵산(들) 이외에도 다양한 바이러스 성분 및 종종 또한 숙주 세포 성분들을 포함할 것이다.

[0349] 용어 바이러스 벡터는 핵산을 세포 내로 전이시킬 수 있는 바이러스 또는 바이러스 입자, 또는 전이된 핵산 그 자체를 지칭할 수 있다. 바이러스 벡터 및 전이 플라스미드는 주로 바이러스로부터 유래된 구조적 및/또는 기능적 유전자 요소를 함유한다. 용어 "레트로바이러스 벡터"는 주로 레트로바이러스로부터 유래된 구조적 및 기능적 유전자 요소 또는 이의 일부를 함유하는 바이러스 벡터 또는 플라스미드를 지칭한다. 용어 "렌티바이러스 벡터"는 주로 렌티바이러스로부터 유래된 LTR을 포함하는 구조적 및 기능적 유전자 요소 또는 이의 일부를 함유하는 바이러스 벡터 또는 플라스미드를 지칭한다. 용어 "하이브리드"는 레트로바이러스, 예를 들면, 렌티바이러스 서열 및 비-렌티바이러스 바이러스 서열 둘 다를 함유하는 벡터, LTR 또는 기타 핵산을 지칭한다. 한 가지 실시형태에서, 하이브리드 벡터는 역전사, 복제, 통합 및/또는 팩키징을 위한 레트로바이러스, 예를 들면, 렌티바이러스 서열을 포함하는 벡터 또는 전이 플라스미드를 지칭한다.

[0350] 특정한 실시형태에서, 용어 "렌티바이러스 벡터", "렌티바이러스 발현 벡터"는 렌티바이러스 전이 플라스미드

및/또는 감염성 렌티바이러스 입자를 지칭하기 위해서 사용될 수 있다. 본원에서 클로닝 부위, 프로모터, 조절 요소, 이종성 핵산 등과 같은 요소들을 언급하는 경우에, 이들 요소의 서열은 본 발명의 렌티바이러스 입자에서 RNA 형태로 존재하고 본 발명의 DNA 플라스미드에서 DNA 형태로 존재하는 것으로 이해되어야 한다.

[0351] 프로바이러스의 각각의 말단에는 "긴 말단 반복체(long terminal repeat)" 또는 "LTR"로 불리우는 구조가 존재한다. 용어 "긴 말단 반복체(LTR)"는 이들의 천연 서열 환경에서 직접적인 반복체이고 U3, R 및 U5 영역을 함유하는 레트로바이러스 DNA의 말단에 위치하는 염기쌍의 도메인을 지칭한다. LTR는 일반적으로 레트로바이러스 유전자의 발현(예를 들면, 촉진, 개시 및 유전자 전사물의 폴리아데닐화) 및 바이러스 복제에 기본적인 기능을 제공한다. LTR은 전사 조절 요소, 폴리아데닐화 시그날 및 바이러스 게놈의 복제 및 통합에 필요한 서열을 포함하는 다수의 조절 시그날을 함유한다. 바이러스 LTR은 U3, R 및 U5로 불리우는 3개 영역으로 구분된다. U3 영역은 인핸서 및 프로모터 요소를 함유한다. U5 영역은 프라이머 결합 부위와 R 영역 사이의 서열이고, 폴리아데닐화 서열을 함유한다. R(반복체) 영역은 U3 및 U5 영역에 인접하여 있다. U3, R 및 U5 영역으로 구성된 LTR은 바이러스 게놈의 5' 및 3' 말단 둘 다에서 나타난다. 5' LTR에 인접한 것은 게놈의 역전사(tRNA 프라이머 결합 부위)를 위해서, 및 바이러스 RNA의 입자 내로의 효율적 팩키징(Psi 부위)을 위해서 필요한 서열이다.

[0352] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "팩키징 시그날" 또는 "팩키징 서열"은 바이러스 RNA를 바이러스 캡시드 또는 입자 내로 삽입하는데 요구되는 레트로바이러스 게놈 내에 위치한 서열을 지칭한다[참조: Clever *et al.*, 1995. *J. of Virology*, Vol. 69, No. 4; pp. 2101-2109]. 몇 가지의 레트로바이러스 벡터는 바이러스 게놈의 캡시드화에 필요한 최소 팩키징 시그날(또한 psi[Ψ] 서열로도 지칭됨)을 사용한다. 따라서, 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "팩키징 서열", "팩키징 시그날", "프사이(psi)" 및 기호 "Ψ"는 바이러스 입자 형성 중에 레트로바이러스 RNA 사슬의 캡시드화에 필요한 비-코딩 서열과 관련하여 사용된다.

[0353] 다양한 실시형태에서, 벡터는 변형된 5' LTR 및/또는 3' LTR을 포함한다. LTR 중의 하나 또는 둘 다는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 하나 이상의 결실, 삽입 또는 치환을 포함하는 하나 이상의 변형을 포함할 수 있다. 3' LTR의 변형은 종종, 바이러스를 복제-결함성으로 되도록 함으로써 렌티바이러스 또는 레트로바이러스 시스템의 안전성을 개선시키기 위해서 이루어진다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "복제-결함"은 감염성 비리온이 생산되지 않도록 완전하고 효과적인 복제를 할 수 없는 바이러스를 지칭한다(예를 들면, 복제-결함성 렌티바이러스 자손). 용어 "복제-적격(replication-competent)"은 바이러스의 바이러스 복제가 감염성 비리온(예를 들면, 복제-적격 렌티바이러스 자손)을 생산할 수 있도록 복제할 수 있는 야생형 바이러스 또는 돌연변이 바이러스를 지칭한다.

[0354] "자가-불활성화"(SIN) 벡터는, U3 영역으로 알려진 우측(3') LTR 인핸서-프로모터 영역이 바이러스 복제의 일차 라운드를 초과하는 바이러스 전사를 방지하도록 변형(예를 들면, 결실 및/또는 치환에 의해)되어 있는 복제-결함 벡터, 예를 들면, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터를 지칭한다. 이것은 우측(3') LTR U3 영역이 바이러스 복제 중에 좌측(5') LTR U3 영역에 대한 주형으로 사용되고, 이에 따라 바이러스 전사체가 U3 인핸서-프로모터의 부재하에 제조될 수 없기 때문이다. 본 발명의 추가의 실시형태에서, 3' LTR은 U5 영역이, 예를 들면, 이상적 폴리(A) 서열로 대체되도록 변형된다. 3' LTR, 5' LTR, 또는 3' 및 5' LTR 둘 다에 대한 변형과 같은 LTR에 대한 변형도 또한 본 발명에 포함되는 것에 유의해야 한다.

[0355] 추가의 안전성 증강은 5' LTR의 U3 영역을 이종성 프로모터로 대체하여 바이러스 입자의 생성 중에 바이러스 게놈의 전사를 유도시킴으로써 제공된다. 사용될 수 있는 이종성 프로모터의 예는, 예를 들면, 바이러스성 유인원 바이러스 40(SV40)(예를 들면, 초기 또는 후기), 사이토메갈로바이러스(CMV)(예를 들면, 즉시 초기), 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스(MoMLV), 라우스 육종 바이러스(RSV) 및 헤르페스 심플렉스 바이러스(HSV)(티미딘 키나제) 프로모터를 포함한다. 전형적인 프로모터는 Tat-독립적 방식으로 높은 수준의 전사를 유도할 수 있다. 이러한 대체는 복제-적격 바이러스를 생성시키는 재조합의 가능성을 감소시키는데, 이는 바이러스 생성 시스템 내에 완전한 U3 서열이 없기 때문이다. 특정한 실시형태에서, 이종성 프로모터는 유도 인자가 존재하는 경우에만 바이러스 게놈의 전부 또는 일부의 전사가 발생하도록 유도될 수 있다. 유도 인자는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 하나 이상의 화학적 화합물, 또는 숙주 세포가 배양되는 생리학적 조건, 예를 들면, 온도 또는 pH를 포함한다.

[0356] 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 TAR 요소를 포함한다. 용어 "TAR"은 렌티바이러스(예를 들면, HIV) LTR의 R 영역 내에 위치한 "트랜스-활성화 반응" 유전자 요소를 지칭한다. 이 요소는 렌티바이러스 트랜스-활성화인자(tat) 유전자 요소와 상호작용하여 바이러스 복제를 증강시킨다. 그러나, 이 요소는 5' LTR의 U3 영역이 이종성 프로모터에 의해 대체되는 실시형태에서 필요하지 않다.

[0357] "R 영역"은 캡핑 그룹의 개시점(즉, 전사의 개시)에서 시작하여 폴리 A 트랙의 개시점 직전에서 종결하는 레트로바이러스 LTR 내의 영역을 지칭한다. R 영역은 또한 U3 및 U5 영역에 인접하는 것으로 정의된다. R 영역은 역전사 중에 게놈의 한 말단으로부터 다른 말단으로 신생 DNA의 전이를 가능하게 하는데 중요한 역할을 한다.

[0358] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "FLAP 요소"는 이의 서열이 레트로바이러스, 예를 들면, HIV-1 또는 HIV-2의 중앙 폴리퓨린 트랙 및 중앙 종결 서열(cPPT 및 CTS)을 포함하는 핵산을 지칭한다. 적합한 FLAP 요소는 미국 특허 제6,682,907호, 및 문헌[참조: Zennou, *et al.*, 2000, *Cell*, 101:173]에 기재되어 있다. HIV-1 역전사 중에, 중앙 폴리퓨린 트랙(cPPT)에서의 플러스-사슬 DNA의 중앙 개시 및 중앙 종결 서열(CTS)에서의 중앙 종결은 3-사슬 DNA 구조: HIV-1 중앙 DNA 플랩의 형성을 유도한다. 어떠한 이론에 구속시키고자 하는 것은 아니지만, DNA 플랩은 렌티바이러스 게놈 핵 수입의 시스-활성 결정인자로 작용할 수 있고/있거나 바이러스의 역가를 증가시킬 수 있다. 특정한 실시형태에서, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터 골격은 벡터 내의 목적하는 이종성 유전자의 상류 또는 하류에 하나 이상의 FLAP 요소를 포함한다. 예를 들면, 특정한 실시형태에서, 전이 플라스미드는 FLAP 요소를 포함한다. 한 가지 실시형태에서, 본 발명의 벡터는 HIV-1로부터 단리된 FLAP 요소를 포함한다.

[0359] 한 가지 실시형태에서, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 전이 벡터는 하나 이상의 수출 요소를 포함한다. 용어 "수출 요소"는 핵으로부터 세포의 세포질로 RNA 전사체의 수송을 조절하는 시스-작용성 전사-후 조절 요소를 지칭한다. RNA 수출 요소의 예는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 인간 면역결핍 바이러스(HIV) rev 반응 요소(RRE)[참조: Cullen *et al.*, 1991. *J. Virol*. 65: 1053; and Cullen *et al.*, 1991. *Cell* 58: 423], 및 간염 B 바이러스 전사-후 조절 요소(HPRE)를 포함한다. 일반적으로, RNA 수출 요소는 유전자의 3' UTR 내에 배치되며, 하나 또는 다수의 카피로서 삽입될 수 있다.

[0360] 특정한 실시형태에서, 바이러스 벡터 내의 이종성 서열의 발현은 벡터 내에 전사-후 조절 요소, 효율적인 폴리아데닐화 부위 및 임의로 전사 종결 시그날을 도입시킴으로써 증가된다. 다양한 전사-후 조절 요소, 예를 들면, 우드척 간염 바이러스 전사-후 조절 요소[참조: WPRE; Zufferey *et al.*, 1999, *J. Virol.*, 73:2886]; 간염 B 바이러스에 존재하는 전사-후 조절 요소(HPRE)[참조: Huang and Yen, 1995, *Mol. Cell. Biol.*, 5:3864] 및 기타[참조: Liu *et al.*, 1995, *Genes Dev.*, 9:1766]는 단백질에서 이종성 핵산의 발현을 증가시킬 수 있다. 특정한 실시형태에서, 본 발명의 벡터는 WPRE 또는 HPRE와 같은 전사-후 조절 요소를 포함한다.

[0361] 특정 실시형태에서, 본 발명의 벡터는 WPRE 또는 HPRE와 같은 전사-후 조절 요소를 결여하거나 포함하지 않는데, 이는 일부 경우에 이들 요소가 세포 형질전환의 위험을 증가시키고/시키거나 mRNA 전사체의 양 또는 mRNA의 안정성을 실질적으로 또는 상당히 증가시키지 않기 때문이다. 따라서, 일부 실시형태에서, 본 발명의 벡터는 부가된 안전성 척도로서 WPRE 또는 HPRE를 결여하거나 포함하지 않는다.

[0362] 이종성 핵산 전사체의 효율적인 종결 및 폴리아데닐화를 지시하는 요소는 이종성 유전자 발현을 증가시킨다. 전사 종결 시그날은 일반적으로 폴리아데닐화 시그날의 하류에서 발견된다. 특정 실시형태에서, 벡터는 발현되는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 폴리아데닐화 서열 3'를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "폴리 A 부위" 또는 "폴리 A 서열"은 RNA 폴리머라제 II에 의한 신생 RNA 전사체의 종결 및 폴리아데닐화 둘 다를 지시하는 DNA 서열을 나타낸다. 폴리아데닐화 서열은 코딩 서열의 3' 말단에 폴리 A 테일을 부가하여 mRNA 안정성을 촉진시킬 수 있고, 따라서 증가된 번역 유효성에 기여할 수 있다. 재조합 전사체의 효율적인 폴리아데닐화가 바람직한데, 이는 폴리 A 테일을 결여하는 전사체가 불안정하고 신속하게 분해되기 때문이다. 본 발명의 벡터에서 사용될 수 있는 폴리 A 시그날의 예시적 예는 이상적 폴리 A 서열(예를 들면, AATAAA, ATTAAA AGTAAA), 소 성장 호르몬 폴리 A 서열(BGHpA), 래빗 β-글로빈 폴리 A 서열(rβgpA), 또는 당해 기술분야에서 공지된 또 다른 적합한 이종성 또는 내인성 폴리 A 서열을 포함한다.

[0363] 다양한 실시형태에서, 본 발명의 벡터는 조작된 TCR 또는 CAR 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함한다. 벡터는 하나 이상의 LTR을 가질 수 있고, 여기서 LTR은 하나 이상의 변형, 예를 들면, 하나 이상의 뉴클레오티드 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 벡터는 형질도입 유효성(예: cPPT/PLAP), 바이러스 팩키징(예: Psi(Ψ) 팩키징 시그날, RRE)을 증가시키기 위해 하나 이상의 보조 요소, 및/또는 치료 유전자 발현을 증가시키는 기타 요소(예: 폴리(A) 서열)를 추가로 포함할 수 있고, 임의로 WPRE 또는 HPRE를 포함할 수 있다. 당해 기술분야의 숙련가는 다수의 기타 상이한 실시형태가 본원의 기존의 실시형태로부터 이루어질 수 있음을 이해할 것이다.

[0364] "숙주 세포"는 본 발명의 재조합 벡터 또는 폴리뉴클레오티드에 의해 생체내, 생체외 또는 시험관내에서 형질감염되거나 감염되거나 형질도입된 세포를 포함한다. 숙주 세포는 팩키징 세포, 생산자 세포, 및 바이러스 벡터

로 감염된 세포를 포함할 수 있다. 특정한 실시형태에서, 본 발명의 바이러스 벡터로 감염된 숙주 세포는 치료가 필요한 대상체에게 투여된다. 특정한 실시형태에서, 용어 "표적 세포"는 숙주 세포와 상호 교대로 사용되고, 목적하는 세포 유형의 형질감염된, 감염된 또는 형질도입된 세포를 지칭한다. 바람직한 실시형태에서, 표적 세포는 T 세포이다.

[0365] 대규모 바이러스 입자 생성은 종종 합리적인 바이러스 역가를 달성하기 위해서 필요하다. 바이러스 입자는 전이 벡터를, 바이러스 구조 및/또는 보조 유전자, 예를 들면, gag, pol, env, tat, rev, vif, vpr, vpu, vpx 또는 nef 유전자 또는 기타 레트로바이러스 유전자를 포함하는 팩키징 세포주 내로 형질감염시킴으로써 생산된다.

[0366] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "팩키징 벡터"는, 팩키징 시그날을 결여하고 1, 2, 3, 4개 또는 그 이상의 바이러스 구조 및/또는 보조 유전자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터 또는 바이러스 벡터를 지칭한다. 전형적으로, 팩키징 벡터는 팩키징 세포 내에 포함되고, 형질감염, 형질도입 또는 감염을 통해 세포 내로 도입된다. 형질감염, 형질도입 또는 감염의 방법은 당해 기술분야의 숙련가에게 공지되어 있다. 본 발명의 레트로바이러스/렌티바이러스 전이 벡터는 형질감염, 형질도입 또는 감염에 의해 팩키징 세포주 내로 도입되어 생산자 세포 또는 세포주를 생성시킬 수 있다. 본 발명의 팩키징 벡터는, 예를 들면, 칼슘 포스페이트 형질감염, 리포펙션 또는 전기천공을 포함하는 표준 방법에 의해 인간 세포 또는 세포주 내로 도입될 수 있다. 일부 실시형태에서, 팩키징 벡터는 네오마이신, 하이그로마이신, 퓨로마이신, 블라스토시딘, 제오신, 티미딘 키나제, DHFR, Gln 신세타제 또는 ADA와 같은 우성 선별가능한 마커와 함께 세포 내로 도입되고, 이어서 적절한 약물의 존재하에서의 선별 및 클론의 단리가 수행된다. 선별가능한 마커 유전자는 팩키징 벡터에 의해, 예를 들면, IRES 또는 자가 절단성 바이러스 펩티드에 의해 코딩하는 유전자에 물리적으로 연결될 수 있다.

[0367] 바이러스 외피 단백질(env)은 세포주로부터 생성된 재조합 레트로바이러스에 의해 궁극적으로 감염 및 형질전환될 수 있는 숙주 세포의 범위를 결정한다. HIV-1, HIV-2, SIV, FIV 및 EIV와 같은 렌티바이러스의 경우에, env 단백질은 gp41 및 gp120을 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 팩키징 세포에 의해 발현된 바이러스 env 단백질은 전술한 바와 같이 바이러스 gag 및 pol 유전자로부터 별개의 벡터 상에서 코딩된다.

[0368] 본 발명에서 사용될 수 있는 레트로바이러스-유래된 env 유전자의 예시적 예는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, MLV 외피, 10A1 외피, BAEV, FeLV-B, RD114, SSAV, 에볼라(Ebola), 센다이(Sendai), FPV(조류 독감(Fowl plague) 바이러스) 및 인플루엔자 바이러스 외피를 포함한다. 유사하게는, RNA 바이러스[예를 들면, 피코르나비리다에(Picornaviridae), 칼시비리다에(Calciviridae), 아스트로비리다에(Astroviridae), 토가비리다에(Togaviridae), 플라비비리다에(Flaviviridae), 코로나비리다에(Coronaviridae), 파라믹소비리다에(Paramyxoviridae), 라브도비리다에(Rhabdoviridae), 필로비리다에(Filoviridae), 오르토믹소비리다에(Orthomyxoviridae), 분야비리다에(Bunyaviridae), 아레나비리다에(Arenaviridae), 레오비리다에(Reoviridae), 버나비리다에(Birnaviridae), 레트로비리다에(Retroviridae)의 RNA 바이러스 계열]로부터 뿐만 아니라 DNA 바이러스[헤파드나비리다에(Hepadnaviridae), 서코비리다에(Circoviridae), 파르보비리다에(Parvoviridae), 파포바비리다에(Papovaviridae), 아데노비리다에(Adenoviridae), 헤르페스비리다에(Herpesviridae), 폭시이리다에(Poxyiridae) 및 이리도비리다에(Iridoviridae) 과]로부터의 외피를 코딩하는 유전자가 사용될 수 있다. 대표적인 예는 FeLV, VEE, HFVW, WDSV, SFV, 래비스(Rabies), ALV, BIV, BLV, EBV, CAEV, SNV, ChTLV, STLV, MPMV, SMRV, RAV, FuSV, MH2, AEV, AMV, CT10 및 EIAV를 포함한다.

[0369] 다른 실시형태에서, 본 발명의 바이러스를 슈도타이핑(pseudotyping)하기 위한 외피 단백질은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 다음의 바이러스들을 포함한다: H1N1, H1N2, H3N2 및 H5N1(조류 독감)과 같은 인플루엔자 A, 인플루엔자 B, 인플루엔자 C 바이러스, A형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, D형 간염 바이러스, E형 간염 바이러스, 로타바이러스, 노르워크(Norwalk) 바이러스 그룹의 임의의 바이러스, 장 아데노바이러스(adenoviruses), 파르보바이러스(parvovirus), 뎅기열(Dengue fever) 바이러스, 원숭이 두창(Monkey pox), 모노네가비랄레스(Mononegavirales), 광견병 바이러스, 라고스 배트(Lagos bat) 바이러스, 모콜라(Mokola) 바이러스, 두벤하게(Duvenhage) 바이러스, 유로피안 배트(European bat) 바이러스 1 및 2 및 오스트랄리안 배트(Australian bat) 바이러스와 같은 리사바이러스(Lyssavirus), 에페메로바이러스(Ephemerovirus), 베시큘로바이러스(Vesiculovirus), 수포성 구내염(Vesicular Stomatitis) 바이러스(VSV), 단순 포진 바이러스 유형 1 및 2, 수두 대상포진(varicella zoster), 사이토메갈로바이러스, 엡스타인-바르(Epstein-Bar) 바이러스(EBV), 인간 헤르페스바이러스(HHV), 인간 헤르페스바이러스 유형 6 및 8, 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 파필로마 바이러스(papilloma virus), 쥐 감마헤르페스바이러스와 같은 헤르페스바이러스, 아레나바이러스(Arenaviruses), 예를 들면, 아르헨티나 출혈열(Argentine hemorrhagic fever) 바이러스, 볼리비아 출혈열 바이러스, 사비아(Sabia)-연관된 출혈열 바이러스, 베네주엘라 출혈열 바이러스, 라사열(Lassa fever) 바이러스,

마쿠포(Machupo) 바이러스, 림프구성 맥락수막염(Lymphocytic choriomeningitis) 바이러스(LCMV), 분야비리다에, 예를 들면, 크리미언-콩고(Crimean-Congo) 출혈열 바이러스, 한타바이러스(Hantavirus), 신장 증후군 야기 바이러스에 의한 출혈열, 리프트 밸리열(Rift Valley fever) 바이러스, 에볼라 출혈열 및 마르버그(Marburg) 출혈열을 포함하는 필로비리다에(필로바이러스), 케이사누르 산림병(Kaysanur Forest disease) 바이러스를 포함하는 플라비비리다에, 옴스크(Omsk) 출혈열 바이러스, 진드기-매개 뇌염 야기 바이러스 및 파라믹소비리다에, 예를 들면, 헨드라(Hendra) 바이러스 및 니파(Nipah) 바이러스, 바리올라 메이저(variola major) 및 바리올라 마이너(variola minor)(천연두), 알파바이러스, 예를 들면, 베네주엘라 말 뇌염 바이러스, 동부형 말 뇌염(eastern equine encephalitis) 바이러스, 서부형(western) 말 뇌염 바이러스, SARS-연관된 코로나바이러스(SARS-CoV), 웨스트 나일(West Nile) 바이러스, 임의의 뇌염-야기 바이러스.

[0370] 한 가지 실시형태에서, 본 발명은 VSV-G 당단백질로 슈도타입화된 재조합 레트로바이러스, 예를 들면, 렌티바이러스를 생성하는 팩키징 세포를 제공한다.

[0371] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "슈도타입" 또는 "슈도타이핑"은 이의 바이러스 외피 단백질이 바람직한 특징을 갖는 다른 바이러스의 것으로 치환된 바이러스를 지칭한다. 예를 들면, HIV 외피 단백질(env 유전자에 의해 코딩됨)은 통상적으로 바이러스를 CD4+ 제시 세포에 대해서 표적화하기 때문에, HIV는 HIV가 더 넓은 범위의 세포를 감염시키도록 하는 소포성 구내염 바이러스 G-단백질(VSV-G) 외피 단백질로 슈도타입화될 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 렌티바이러스 외피 단백질은 VSV-G에 의해 슈도타입화된다. 한 가지 실시형태에서, 본 발명은 VSV-G 외피 당단백질로 슈도타입화된 재조합 레트로바이러스, 예를 들면, 렌티바이러스를 생성하는 팩키징 세포를 제공한다.

[0372] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "팩키징 세포주"는 팩키징 시그날을 함유하지 않지만, 바이러스 입자의 정확한 팩키징에 필요한 바이러스 구조 단백질 및 복제 효소(예를 들면, gag, pol 및 env)를 안정적으로 또는 일시적으로 발현하는 세포주와 관련하여 사용된다. 임의의 적합한 세포주는 본 발명의 팩키징 세포를 제조하기 위해서 사용될 수 있다. 일반적으로, 세포는 포유동물 세포이다. 특정한 실시형태에서, 팩키징 세포주를 생성하기 위해 사용된 세포는 인간 세포이다. 사용될 수 있는 적합한 세포주는, 예를 들면, CHO 세포, BHK 세포, MDCK 세포, C3H 10T1/2 세포, FLY 세포, Psi-2 세포, BOSC 23 세포, PA317 세포, WEHI 세포, COS 세포, BSC 1 세포, BSC 40 세포, BMT 10 세포, VERO 세포, W138 세포, MRC5 세포, A549 세포, HT1080 세포, 293 세포, 293T 세포, B-50 세포, 3T3 세포, NIH3T3 세포, HepG2 세포, Saos-2 세포, Huh7 세포, HeLa 세포, W163 세포, 211 세포 및 211A 세포를 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 팩키징 세포는 293 세포, 293T 세포 또는 A549 세포이다.

[0373] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "생산자 세포주"는, 팩키징 세포주 및 팩키징 시그날을 포함하는 전이 벡터를 포함하는, 재조합 레트로바이러스 입자를 생성할 수 있는 세포주를 지칭한다. 감염성 바이러스 입자 및 바이러스 저장 용액의 생성은 통상적인 기술을 사용하여 수행될 수 있다. 바이러스 저장 용액을 제조하는 방법은 당해 기술분야에서 공지되어 있으며, 예를 들면, 문헌[참조: Y. Soneoka *et al.*(1995) *Nucl. Acids Res.* 23:628-633, 및 N. R. Landau *et al.*(1992) *J. Virol.* 66:5110-5113]에 예시되어 있다. 감염성 바이러스 입자는 통상적인 기술을 사용하여 팩키징 세포로부터 수집될 수 있다. 예를 들면, 감염성 입자는 당해 기술분야에서 공지된 바와 같이 세포 용해, 또는 세포 배양물의 상청액의 수집에 의해 수집될 수 있다. 임의로, 수집된 바이러스 입자는 필요에 따라 정제될 수 있다. 적합한 정제 기술은 당해 기술분야의 숙련가에게 공지되어 있다.

[0374] 형질감염이 아닌 바이러스 감염에 의해 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터를 사용한 유전자(들) 또는 기타 폴리뉴클레오티드 서열의 전달은 "형질도입"으로 지칭된다. 한 가지 실시형태에서, 레트로바이러스 벡터는 감염 및 프로바이러스 통합을 통해 세포 내로 형질도입된다. 특정한 실시형태에서, 표적 세포(예: T 세포)는, 바이러스 또는 레트로바이러스 벡터를 사용한 감염에 의해 세포에 전달된 유전자 또는 기타 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 경우, "형질도입"된다. 특정 실시형태에서, 형질도입된 세포는 이의 세포 게놈에 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터에 의해 전달된 하나 이상의 유전자 또는 기타 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0375] 특정 실시형태에서, 하나 이상의 폴리펩티드를 발현하는 본 발명의 바이러스 벡터로 형질도입된 숙주 세포는 B-세포 악성종양을 치료하고/하거나 예방하기 위해 대상체에게 투여된다. 본 발명의 특정 실시형태에 따라 이용될 수 있는, 유전자 요법에서 바이러스 벡터의 사용에 관한 기타 방법은 문헌[참조: Kay, M. A.(1997) *Chest* 111(6 Supp.):138S-142S; Ferry, N. and Heard, J. M.(1998) *Hum. Gene Ther.* 9:1975-81; Shiratory, Y. *et al.*(1999) Liver 19:265-74; Oka, K. *et al.*(2000) *Curr. Opin. Lipidol.* 11:179-86; Thule, P. M. and Liu, J. M.(2000) *Gene Ther.* 7:1744-52; Yang, N. S.(1992) *Crit. Rev. Biotechnol.* 12:335-56; Alt, M.(1995) *J.*

Hepatol. 23:746-58; Brody, S. L. and Crystal, R. G.(1994) *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 716:90-101; Strayer, D. S.(1999) *Expert Opin. Investig. Drugs* 8:2159-2172; Smith-Arica, J. R. and Bartlett, J. S.(2001) *Curr. Cardiol. Rep*. 3:43-49; and Lee, H. C. *et al.*(2000) *Nature* 408:483-8]에서 발견할 수 있다.

[0376] **H. 조성물 및 제형**

[0377] 본원에서 의도된 조성물은, 본원에서 의도된 바와 같이, 하나 이상의 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 이를 포함하는 벡터 및 T 세포 조성물을 포함할 수 있다. 조성물은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 약제학적 조성물을 포함한다. "약제학적 조성물"은, 단독으로 또는 하나 이상의 기타 양식의 요법과 조합하여, 세포 또는 동물에게 투여하기 위한 약제학적으로 허용되는 또는 생리학적으로 허용되는 용액에서 제형화된 조성물을 지칭한다. 또한, 필요한 경우, 본 발명의 조성물은 다른 제제, 예를 들면, 사이토킨, 성장 인자, 호르몬, 소분자, 화학요법제, 프로-드러그, 항체 또는 기타 다양한 약제학적 활성제와 조합하여 투여할 수 있는 것으로 이해된다. 조성물에 또한 포함될 수 있는 다른 성분에는 실질적으로 제한이 없지만, 단 추가의 제제는 의도된 요법을 전달하는 조성물의 능력에 역으로 영향을 미치지 않아야 한다.

[0378] 문구 "약제학적으로 허용되는"은, 건전한 의학적 판단의 범위 내에서, 합리적인 이익/위험 비에 비례하여, 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 기타 문제 또는 합병증 없이 인간 또는 동물과 접촉하여 사용하기에 적합한 화합물, 물질, 조성물 및/또는 용량형을 지칭하기 위해 본원에서 사용된다.

[0379] 본원에 사용된 바와 같이, "약제학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제"는, 제한 없이, 인간 또는 가축 동물에서 사용하기 위해 허용되는 것으로 미국 식품의약청에 의해 승인된 임의의 보조제, 담체, 부형제, 활주제, 감미제, 희석제, 보존제, 염료/착색제, 향미 증강제, 계면활성제, 습윤제, 분산제, 현탁제, 안정화제, 등장성제, 용매, 계면활성제 또는 유화제를 포함한다. 예시적 약제학적으로 허용되는 담체는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 당(예: 락토즈, 글루코즈 및 슈크로즈); 전분(예: 옥수수 전분 및 감자 전분); 셀룰로즈 및 이의 유도체(예: 나트륨 카복실메틸 셀룰로즈, 에틸 셀룰로즈 및 셀룰로즈 아세테이트); 트라가칸트; 맥아; 젤라틴; 탈크; 코코아 버터, 왁스, 동물 및 식물 지방, 파라핀, 실리콘, 벤토나이트, 실릭산, 산화아연; 오일(예: 땅콩유, 면실유, 해바라기유, 참기름, 올리브유, 옥수수유 및 대두유); 글리콜(예: 프로필렌 글리콜); 폴리올(예: 글리세린, 솔비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜); 에스테르(예: 에틸 올레에이트 및 에틸 라우레이트); 아가; 완충제(예: 수산화망간 및 수산화알루미늄); 알긴산; 피로겐-비함유 물; 등장성 식염수; 링거액; 에틸 알콜; 인산염 완충 용액; 및 약제학적 제형에 사용된 임의의 기타 호환성 물질을 포함한다.

[0380] 특정 실시형태에서, 본 발명의 조성물은 본원에서 의도된 방법에 의해 제조된 양의 변형된 T 세포를 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 약제학적 T 세포 조성물은 하기 마커: CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122 및 CD127 중의 하나 이상 또는 전부를 갖는 강력한 T 세포를 포함한다.

[0381] 이는 일반적으로 본원에서 의도된 방법으로 제조한 T 세포를 포함하는 약제학적 조성물이, 이들 범위 내의 모든 정수를 포함하여, 10^2 내지 10^{10} 세포/체중 kg, 10^5 내지 10^9 세포/체중 kg, 10^5 내지 10^8 세포/체중 kg, 10^5 내지 10^7 세포/체중 kg, 10^7 내지 10^9 세포/체중 kg 또는 10^7 내지 10^8 세포/체중 kg의 용량으로 투여될 수 있음을 말한다. 세포의 수는, 그 안에 포함된 세포 유형과 같이 조성물이 의도되는 궁극적 용도에 의존할 것이다. 본원에 제공된 용도를 위해, 세포는 일반적으로 1리터 이하의 용적으로 존재하고, 500mL 이하, 심지어 250mL 또는 100mL 이하일 것이다. 따라서, 목적하는 세포의 밀도는 전형적으로 10^6 세포/ml 초과이고, 일반적으로 10^7 세포/ml 초과, 일반적으로 10^8 세포/ml 이상이다. 면역 세포의 임상적으로 관련되는 수는 점증적으로 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10}, 10^{11} 또는 10^{12} 세포와 동등하거나 이를 초과하는 다중 주입으로 배분될 수 있다. 본 발명의 일부 양태에서, 특히 모든 주입된 세포는 특정 표적 항원(예: BCMA)에 대해 재지시될 것이기 때문에, 10^6/kg(환자당 10^6-10^{11}) 범위의 보다 적은 수의 세포가 투여될 수도 있다. 조작된 TCR 또는 CAR을 발현하도록 변형된 T 세포는 이들 범위 내의 용량으로 복수회 투여될 수 있다. 세포는 치료를 받는 환자에 대해 동종이계, 동계, 이종 또는 자가일 수 있다. 필요한 경우, 치료는 또한 주입된 T 세포의 접종 및 기능을 증강시키기 위해 본원에 기재된 바와 같이 미토겐(예: PHA) 또는 림포카인, 사이토킨 및/또는 케모킨(예: IFN-γ, IL-2, IL-15, IL-12, TNF-알파, IL-18 및 TNF-베타, GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3-L, RANTES, MIP1α 등)의 투여를 포함할 수 있다.

[0382] 일반적으로, 본원에 기재된 바와 같이 활성화 및 확장된 세포를 포함하는 조성물은 면역절충되는(immunocompromised) 개체에서 발생하는 질환의 치료 및 예방에 사용할 수 있다. 특히, 본원에서 의도된 방법

으로 제조된 변형된 T 세포를 포함하는 조성물은 암의 치료에 사용된다. 본 발명의 변형된 T 세포는 단독으로, 또는 담체, 희석제, 부형제 및/또는 IL-2, IL-7 및/또는 IL-15 또는 기타 사이토킨 또는 세포 모집단 등의 다른 성분과 조합하여 투여할 수 있다. 특정 실시형태에서, 본원에서 의도된 약제학적 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 또는 생리학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 조합하여 유전적으로 변형된 T 세포의 양을 포함한다.

[0383] 본원에서 의도된 변형된 T 세포를 포함하는 약제학적 조성물은 완충제(예: 중성 완충된 식염수, 인산염 완충된 식염수 등); 탄수화물(예: 글루코즈, 만노즈, 슈크로즈 또는 덱스트란, 만니톨); 단백질; 폴리펩티드 또는 아미노산(예: 글리신); 항산화제; 킬레이트제(예: EDTA 또는 글루타티온); 보조제(예: 수산화알루미늄); 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 바람직하게는 비경구 투여, 예를 들면, 혈관내(정맥내 또는 동맥내), 복강내 또는 근육내 투여를 위해 제형화된다.

[0384] 액체 약제학적 조성물은, 이들이 용액, 현탁액 또는 기타 유사 형태이든지, 하나 이상의 하기 성분들을 포함할 수 있다: 멸균 희석제(예: 주사용수, 식염수 용액, 바람직하게는 생리학적 식염수, 링거액, 등장성 염화나트륨, 고정유, 예를 들면, 용매 또는 현탁 매질로서 사용될 수 있는 합성 모노 또는 디글리세라이드, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 기타 용매); 항균제(예: 벤질 알콜 또는 메틸 파라벤); 항산화제(예: 아스코르브산 또는 아황산나트륨); 킬레이트제(예: 에틸렌디아민테트라아세트산); 완충제(예: 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트) 및 등장성 조절제(예: 염화나트륨 또는 덱스트로즈).

[0385] 비경구 제제는 앰플, 휴대가능한 시린지 또는 유리 또는 플라스틱으로 제조된 다중 용기 바이알에 봉입될 수 있다. 주사가능한 약제학적 조성물은 바람직하게는 멸균성이다.

[0386] 특정 실시형태에서, 본원에서 의도된 조성물은 단독으로 또는 하나 이상의 치료제와 조합하여 유효량의 확장된 변형된 T 세포 조성물을 포함한다. 따라서, T 세포 조성물은 단독으로 또는 기타 공지된 암 치료제, 예를 들면, 방사선 요법, 화학요법, 이식, 면역요법, 호르몬 요법, 광선역학 요법 등과 조합하여 투여할 수 있다. 조성물은 또한 항생물질과 조합하여 투여할 수 있다. 이러한 치료제는 특정 암 등의 본원에 기재된 특정 질환 상태에 대한 표준 치료로서 당해 기술분야에서 허용될 수 있다. 의도되는 예시적 치료제는 사이토킨, 성장 인자, 스테로이드, NSAID, DMARD, 항-염증제, 화학요법, 방사선요법, 치료학적 항체 또는 기타 활성제 및 보조제를 포함한다.

[0387] 특정 실시형태에서, 본원에서 의도된 T 세포를 포함하는 조성물은 임의 수의 화학요법제와 조합하여 투여할 수 있다. 화학요법제의 예시적 예는 알킬화제(예: 티오테파 및 사이클로포스파미드(CYTOXAN™)); 알킬 설포네이트(예: 부설판, 임프로설판 및 피포설판); 아지리딘(예: 벤조도파, 카보쿠온, 메투레도파 및 우레도파); 알트레트아민을 포함하는 에틸렌이민 및 메틸라멜라민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스파오르아미드 및 트리메틸올멜라민 레슘; 질소 머스타드(예: 클로람부틸, 클로르나파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벰비친, 페네스테린, 프로드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드); 니트로스우레아(예: 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 라니무스틴); 항생물질(예: 아클라시노마이신, 악티노마이신, 오트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 카크티노마이신, 칼리케아미신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르퓨신, 독소루비신, 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 펩로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 조니스타틴, 조루비신); 항-대사물질(예: 메토트렉세이트 및 5-플루오로우라실(5-FU)); 엽산 유사체(예: 데노프테린, 메토트렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트); 퓨린 유사체(예: 플루다라빈, 6-머캅토퓨린, 티아미프린, 티오구아닌); 피리미딘 유사체(예: 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록스우리딘, 5-FU); 안드로겐(예: 칼루스테론, 드로모스탈로론 프로피오네이트, 에피티오스탄올, 메피티오스탄, 테스톨락톤); 항-아드레날린(예: 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄); 엽산 보충제(예: 프롤린산); 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코사이드; 아미노레불린산; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트라세이트; 데포프아민; 데메콜킨; 디아지쿠온; 엘포르미틴; 엘리프티니움 아세테이트; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 하이드록시우레아; 레티난; 로니다민; 미토구아존; 미토크산트론; 모피다몰; 니트라크린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 포도필린산; 2-에틸하이드라지드; 프로카르바진; PSK®; 라족산; 시조피란; 스피로게르마니움; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미톨락톨; 피포브로만; 가사이토신; 아라비노사이드("Ara-C"); 사이클로포스파미드; 티오테파; 탁소이드(예: 파클리탁셀(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology,

Princeton, N.J.) 및 도세탁셀(TAXOTERE®., Rhne-Poulenc Rorer, Antony, France)); 클로람부실; 겜시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토푸린; 메토트렉세이트; 백금 유사체(예: 시스플라틴 및 카보플라틴); 빈블라스틴; 백금; 에토포사이드(VP-16); 이포스파미드; 미토마이신 C; 미토크산트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 나벨빈; 노반트론; 테니포사이드; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; CPT-11; 토이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸로미틴(DMFO); 레틴산 유도체(예: Targretin™(벡사로텐), Panretin™(알리트레티노인)); ONTAK™(데니류킨 디프티톡스); 에스페라미신; 카페시타빈; 및 상기 임의의 약제학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함한다. 또한, 이 정의에는 종양에 대해 호르몬 작용을 조절하거나 억제하도록 작용하는 항-호르몬제(예: 타목시펜, 랄록시펜, 아로마타제 억제제 4(5)-이미다졸, 4-하이드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤 및 토레미펜(Fareston)); 항-안드로겐제(예: 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드 및 고세렐린); 및 상기 임의의 약제학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체가 포함된다.

[0388] 다양한 기타 치료제가 본원에 기재된 조성물과 조합하여 사용될 수 있다. 한 가지 실시형태에서, T 세포를 포함하는 조성물은 항-염증제와 함께 투여된다. 항-염증제 또는 약물은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 스테로이드 및 글루코코르티코이드(베타메타손, 부데소니드, 덱사메타손, 하이드로코르티손 아세테이트, 하이드로코르티손, 하이드로코르티손, 메틸프레드니솔론, 프레드니솔론, 프레드니손, 트리암시놀론 포함), 아스피린, 이부프로펜, 나프록센, 메토트렉세이트, 설파살라진, 레플루노미드, 항-TNF 의약, 사이클로포스파미드 및 마이코페놀레이트를 포함하는 비스테로이드 항-염증 약물(NSAIDS)을 포함한다.

[0389] 기타 예시적 NSAID는 이부프로펜, 나프록센, 나프록센 나트륨, Cox-2 억제제(예: VIOXX®(로페콕시브) 및 CELEBREX®(셀레콕시브)) 및 시알릴레이트로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 예시적 진통제는 아세트아미노펜, 옥시코돈, 프로포르지펜 하이드로클로라이드의 트라마돌로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 예시적 글루코코르티코이드는 코르티손, 덱사메타손, 하이드로코르티손, 메틸프레드니솔론, 프레드니솔론 또는 프레드니손으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 예시적 생물학적 반응 변형제는 세포 표면 마커에 대해 지시된 분자(예: CD4, CD5 등), 사이토킨 억제제, 예를 들면, TNF 길항제(예: 에타네르셉트(ENBREL®), 아달리무맵(HUMIRA®) 및 인플릭시맵(REMICADE®)), 케모킨 억제제 및 부착 분자 억제제로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 생물학적 반응 변형제는 재조합 형태의 분자 뿐만 아니라 모노클로날 항체를 포함한다. 예시적 DMARD는 아자티오프린, 사이클로포스파미드, 사이클로스포린, 메토트렉세이트, 페니실라민, 레플루노미드, 설파살라진, 하이드록시클로로퀸, 골드(경구(오라노핀) 및 근육내) 및 미노사이클린을 포함한다.

[0390] 본원에서 의도된 CAR 변형된 T 세포와 조합하기에 적합한 치료학적 항체의 예시적 예는, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 아바고보맵, 아데카투무맵, 아푸투주맵, 알렘투주맵, 알투모맵, 아마툭시맵, 아나투모맵, 아르시투모맵, 바비툭시맵, 베크투모맵, 베바시주맵, 비바투주맵, 블리나투모맵, 브렌툭시맵, 칸투주맵, 카투막소맵, 세툭시맵, 시타투주맵, 식수투무맵, 클리바투주맵, 코나투무맵, 다라투무맵, 드로지투맵, 둘리고투맵, 두시지투맵, 데투모맵, 다세투주맵, 달로투주맵, 에크로멕시맵, 엘로투주맵, 엔시툭시맵, 에르투막소맵, 에타라시주맵, 파리에투주맵, 필클라투주맵, 피지투무맵, 플란보투맵, 푸툭시맵, 가니투맵, 겜투주맵, 기렌툭시맵, 글렘바투무맵, 이브리투모맵, 이고보맵, 임가투주맵, 인다툭시맵, 이노투주맵, 인테투무맵, 이필리무맵, 이라투무맵, 라베투주맵, 렉사투무맵, 린투주맵, 로르보투주맵, 루카투무맵, 마파투무맵, 마투주맵, 밀라투주맵, 민레투모맵, 미투모맵, 목세투모맵, 나르나투맵, 나프투모맵, 네시투모맵, 니모투주맵, 노페투모맵, 오카라투주맵, 오파투무맵, 올라라투맵, 오나르투주맵, 오포르투주맵, 오레고보맵, 파니투무맵, 파르사투주맵, 파트리투맵, 펨투모맵, 퍼투주맵, 핀투모맵, 프리투무맵, 라코투모맵, 라드레투맵, 릴로투무맵, 리툭시맵, 로바투무맵, 사투모맵, 시브로투주맵, 실룩시맵, 심투주맵, 솔리토맵, 타카투주맵, 타플리투모맵, 테나투모맵, 테프로투무맵, 티가투주맵, 토시투모맵, 트라스투주맵, 투코투주맵, 우빌리툭시맵, 벨투주맵, 보르세투주맵, 보투무맵, 잘루투무맵, CC49 및 3F8을 포함한다.

[0391] 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 조성물은 사이토킨과 조합하여 투여된다. 본원에서 사용된 바와 같이 "사이토킨"이란 세포내 매개인자로서 또 다른 세포에 작용하는 한 세포 모집단에 의해 방출된 단백질에 대한 일반 용어를 의미한다. 이러한 사이토킨의 예는 림포카인, 모노카인, 케모킨, 및 종래의 폴리펩티드 호르몬이다. 사이토킨 중에서는 성장 호르면(예: 인간 성장 호르몬, N-메티오닐 인간 성장 호르몬 및 소 성장 호르몬); 파라티로이드 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린; 렉락신; 프로렐락신; 당단백질 호르몬(예: 난포 자극 호르면(FSH), 갑상선 자극 호르몬(TSH) 및 황체형성 호르몬(LH)); 간 성장 인자; 섬유아세포 성장 인자; 프로락틴; 태반 락토겐; 종양 괴사 인자-알파 및 -베타; 뮐러관-억제 물질; 마우스 고나도트로핀-연관 펩티드; 인히빈; 액티빈; 혈관 내피 성장 인자; 인테그린; 트롬보포이에틴(TPO); 신경 성장 인자(예: NGF-베타); 혈소판-성장 인자; 형질전환 성장 인자(TGF)(예: TGF-알파 및 TGF-베타); 인슐린-양 성장 인자-I 및 -II; 에리트로포이에틴(EPO);

골유도성 인자; 인터페론(예: 인터페론-알파, 베타 및 -감마); 콜로니 자극 인자(CSF)(예: 마크로파지-CSF(M-CSF)); 과립구-마크로파지-CSF(GM-CSF); 및 과립구-CSF(G-CSF); 인터류킨(IL)(예: IL-1, IL-1알파, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15); 종양 괴사 인자(예: TNF-알파 또는 TNF-베타); 및 LIF 및 키트 리간드(KL)를 포함하는 기타 폴리펩티드 인자가 포함된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 사이토킨은 천연 공급원으로부터 또는 재조합 세포 배양물로부터의 단백질, 및 천연 서열 사이토킨의 생물학적 활성 등가물을 포함한다.

[0392] **I. 표적 세포 및 항원**

[0393] 본 발명은, 부분적으로, 표적 세포(예: 종양 또는 암 세포)에 대해 재지시되고, 세포 상의 표적 항원에 결합하는 결합 도메인을 갖는 조작된 T 세포 수용체 또는 CAR을 포함하는 유전적으로 변형된 면역 작동 세포를 의도한다. 암 세포는 또한 혈액 또는 림프 시스템을 통해 신체의 다른 부분으로 확산할 수 있다. 암의 몇몇 주요 유형이 있다. 암종은 내부 기관을 배열하거나 커버하는 피부 또는 조직에서 개시하는 암이다. 육종은 골, 연골, 지방, 근육, 혈관 또는 기타 결합 또는 지지 조직에서 개시하는 암이다. 백혈병은 혈액-형성 조직, 예를 들면, 골수에서 개시하고 다수의 비정상 혈액 세포가 생성되어 혈액으로 유입되도록 하는 암이다. 림프종 및 다발성 골수종은 면역계의 세포에서 개시하는 암이다. 중추신경계 암은 뇌 및 척수의 조직에서 개시하는 암이다.

[0394] 한 가지 실시형태에서, 표적 세포는 다른 정상(목적하는) 세포의 표면에서 실질적으로 발견되지 않는 항원, 예를 들면, 표적 항원을 발현한다. 한 가지 실시형태에서, 표적 세포는 췌장실질 세포, 췌관 세포, 간세포, 심근 세포, 골격근 세포, 골아 세포, 골격 근아세포, 신경세포, 혈관 내피 세포, 색소 세포, 평활근 세포, 글리아 세포, 지방 세포, 골 세포, 연골세포, 췌도 세포, CNS 세포, PNS 세포, 간 세포, 지방 세포, 신장 세포, 폐 세포, 피부 세포, 난소 세포, 여포 세포, 상피 세포, 면역 세포 또는 내피 세포이다.

[0395] 특정 실시형태에서, 표적 세포는 췌장 조직, 신경 조직, 심장 조직, 골수, 근육 조직, 골 조직, 피부조직, 간 조직, 모낭, 혈관 조직, 지방 조직, 폐 조직 및 신장 조직의 일부이다.

[0396] 특정 실시형태에서, 표적 세포는 종양 세포이다. 또 다른 특정 실시형태에서, 표적 세포는 암 세포, 예를 들면, 암을 갖는 환자의 세포이다. 개시된 방법으로 사멸시킬 수 있는 예시적 세포는 하기 종양의 세포를 포함한다: 액체 종양, 예를 들면, 급성 백혈병(예: 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병 및 골수아구, 전골수구, 골수단구성, 단구 및 적백혈병), 만성 백혈병(예: 만성 골수성(과립구) 백혈병 및 만성 림프구성 백혈병)을 포함하는 백혈병, 진성다혈증, 림프종, 호지킨 질환, 비-호지킨 림프종, 다발형 골수종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 중쇄 질환).

[0397] 또 다른 실시형태에서, 세포는 충실성 종양 세포, 예를 들면, 육종 및 암종, 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골원성육종 및 기타 육종, 활막종, 중피종, 유잉 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결장암, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 간세포 암종, 폐암, 결직장암, 편평상피암, 기저 세포암, 선암(예: 췌장, 결장, 난소, 폐, 유방, 위장, 전립선, 자궁경부 또는 식도의 선암), 한선암, 피지선암, 유두상암, 유두상 선암, 수양암, 기관지암, 신장 세포암, 담즙관암, 흉모막암, 빌름 종양, 자궁경부암, 정소 종양, 방광암, CNS 종양(예: 신경교종, 성상세포종, 수아종, 두개인두종, 상의종, 송과체종, 혈관아종, 청신경종, 핍지돌기신경교종, 수막종, 흑색종, 신경아세포종 및 망막아세포종)이다.

[0398] 한 가지 실시형태에서, 암은 다음으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 청구항 제1항의 방법에서 암은 빌름 종양, 유윙 육종, 신경내분비 종양, 교모세포종, 신경아세포종, 흑색종, 피부암, 유방암, 결장암, 직장암, 전립선암, 간암, 신장암, 췌장암, 폐암, 담도암, 자궁경부암, 자궁내막암, 식도암, 위암, 두경부암, 갑상선 수질암, 난소암, 신경교종, 림프종, 백혈병, 골수종, 급성 림파구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종 및 방광암으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0399] 한 가지 실시형태에서, 표적 세포는 간, 췌장, 폐, 유방, 방광, 뇌, 골, 갑상선, 신장, 피부 및 조혈 시스템의 악성 세포이다. 또 다른 실시형태에서, 표적 세포는 간암, 췌장암, 폐암, 유방암, 방광암, 뇌암, 골암, 갑상선암, 신장암, 피부암 또는 혈액암의 세포이다.

[0400] 한 가지 실시형태에서, 표적 세포는 세포, 이로써 한정되는 것은 아니지만, CMV, HPV 및 EBV를 포함하는 바이러스에 의해 감염된 암 세포이다.

[0401] 한 가지 실시형태에서, 표적 항원은 알파 폴레이트 수용체, 5T4, $\alpha_v\beta_6$ 인테그린, BCMA, B7-H3, B7-H6, CAIX,

CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD138, CD171, CEA, CSPG4, CMV, EBV, EGFR, ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, EGFRvIII, EGP2, EGP40, EPCAM, EphA2, EpCAM, FAP, 태아 AchR, FRα, GD2, GD3, 글리피칸-3(GPC3), HLA-A1+MAGE1, HLA-A2+MAGE1, HLA-A3+MAGE1, HLA-A1+NY-ESO-1, HLA-A2+NY-ESO-1, HLA-A3+NY-ESO-1, HPV, IL-11Rα, IL-13Rα2, 람다, 르위스-Y, Kappa, 메소텔린, Muc1, Muc16, NCAM, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, PRAME, PSCA, PSMA, ROR1, SSX, 수르비빈, TAG72, TEM 또는 VEGFR2의 에피토프이다.

[0402] **J. 치료 방법**

[0403] 본원에서 의도된 방법으로 제조된 변형된 T 세포는, 제한 없이, 감염성 질환, 자가면역 질환, 염증 질환 및 면역결핍증을 포함하는 다양한 상태의 치료에서 사용하기 위한 개선된 양자 면역요법을 제공한다. 특정 실시형태에서, 일차 T 세포의 특이성은 본원에서 의도된 조작된 TCR 또는 CAR을 갖는 일차 T 세포를 유전적으로 변형시켜 종양 또는 암 세포에 대해 재지시된다. 한 가지 실시형태에서, 본 발명은 세포 요법의 유형을 포함하고, T 세포는 표적 항원을 발현하는 암 세포를 표적화하는 조작된 TCR 또는 CAR을 발현시키기 위해 유전적으로 변형되고, 변형된 T 세포는 이를 필요로 하는 수용자에게 주입된다. 주입된 세포는 수용자에서 종양 세포를 사멸시킬 수 있다. 항체 요법과 달리, 조작된 TCR 또는 CAR 변형된 T 세포는 생체내에서 복제할 수 있고, 따라서 지속된 암 요법을 유도할 수 있는 장기간 지속성에 기여한다.

[0404] 한 가지 실시형태에서, 본 발명의 조작된 TCR 및 CAR T 세포는 강력한 생체내 T 세포 확장을 겪을 수 있고, 연장된 시간 동안 지속할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 조작된 TCR 또는 CAR T 세포는 임의의 추가 종양 형성 또는 성장을 억제하기 위해 재활성화될 수 있는 특이적 기억 T 세포로 진화한다.

[0405] 특정 실시형태에서, CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함하는 벡터로 유전적으로 변형된 면역 작동 세포를 포함하는 조성물은, 제한 없이, 간암, 췌장암, 폐암, 유방암, 방광암, 뇌암, 골암, 갑상선암, 신장암 또는 피부암을 포함하는 충실성 종양 또는 암의 치료에 사용된다.

[0406] 특정 실시형태에서, PSCA 또는 MUC1의 에피토프에 결합하는 항원-특이적 결합 도메인을 포함하는 조작된 TCR 또는 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함하는 벡터로 유전적으로 변형된 면역 작동 세포를 포함하는 조성물은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 췌장, 방광 및 폐를 포함하는 다양한 암의 치료에 사용된다.

[0407] 특정 실시형태에서, TCR 또는 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함하는 벡터로 유전적으로 변형된 면역 작동 세포를 포함하는 조성물은, 액체 종양, 예를 들면, 급성 백혈병(예: ALL, AML 및 골수아구, 전골수구, 골수단구성, 단구 및 적백혈병), 만성 백혈병(예: CLL, SLL, CML, HCL)을 포함하는 백혈병, 진성다혈증, 림프종, 호지킨 질환, 비-호지킨 림프종, 다발형 골수종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증 및 중쇄 질환의 치료에 사용된다.

[0408] 특정 실시형태에서, 조작된 TCR 또는 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함하는 벡터로 유전적으로 변형된 면역 작동 세포를 포함하는 조성물은, 이로써 한정되는 것은 아니지만, 다발성 골수종(MM), 비-호지킨 림프종(NHL) 및 만성 림프구성 백혈병(CLL)을 포함하는 B-세포 악성종양의 치료에 사용된다.

[0409] 다발성 골수종은 이들 세포 유형의 단일 클론의 종양성 형질전환을 특징으로 하는 성숙 형질 세포 형태의 B-세포 악성종양이다. 이들 형질 세포는 BM에서 증식하고, 인접한 골 및 종종 혈액으로 침입한다. 변이체 형태의 다발성 골수종은 현성 다발성 골수종, 무증상 다발성 골수종, 형질 세포 백혈병, 비-분비성 골수종, IgD 골수종, 골경화성 골수종, 골의 고립성 형질세포종 및 수질외 형질세포종을 포함한다[참조: 예를 들면, Braunwald, *et al.*(eds), *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 15th Edition(McGraw-Hill 2001)].

[0410] 비-호지킨 림프종은 림파구(백혈구 세포)의 거대 그룹의 암을 포함한다. 비-호지킨 림프종은 모든 연령에서 발생할 수 있고, 종종 정상보다 큰 림프절, 발열 및 체중 감소로 나타난다. 다수의 상이한 유형의 비-호지킨 림프종이 있다. 예를 들면, 비-호지킨 림프종은 적극적(신속-성장) 및 무통성(느린-성장) 유형으로 나뉠 수 있다. 비-호지킨 림프종은 B-세포 및 T-세포로부터 유래할 수 있고, 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "비-호지킨 림프종" 및 "B-세포 비-호지킨 림프종"은 상호 교대로 사용된다. B-세포 비-호지킨 림프종(NHL)은 버킷 림프종, 만성 림프구성 백혈병/소림프구성 림프종(CLL/SLL), 광범위 큰 B-세포 림프종, 여포성 림프종, 면역모 대세포 림프종, 전구체 B-림프아구성 림프종 및 맨틀 세포 림프종을 포함한다. 골수 또는 줄기 세포 이식 후에 발생하는 림프종은 통상 B-세포 비-호지킨 림프종이다.

[0411] 만성 림프구성 백혈병(CLL)은, B 림파구로 불리우는 미성숙 백혈구 세포 또는 B 세포에서 느린 증가를 유발하는 완만한(느린-성장) 암이다. 암 세포는 혈액 및 골수를 통해 확산하고, 또한 림프절 또는 간 및 비장 등의 다른 기관에 영향을 미칠 수 있다. CLL은 결국 골수의 실패를 유발한다. 종종, 질환의 후기 단계에서, 상기 질환은 소림프구성 림프종으로 불리운다.

[0412] 특정 실시형태에서, 본원에서 의도된 치료학적 유효량의 변형된 T 세포 또는 이를 포함하는 조성물을, 단독으로 또는 하나 이상의 치료제와 조합하여, 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 방법이 제공된다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 세포는 암을 발증할 위험에 있는 환자의 치료에 사용된다. 따라서, 본 발명은, 치료학적 유효량의 본 발명의 변형된 T 세포를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.

[0413] 한 가지 실시형태에서, 이를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하는 방법은 본원에서 의도된 유전적으로 변형된 면역 작동 세포를 포함하는 유효량, 예를 들면, 치료학적 유효량의 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 투여 양 및 빈도는, 적절한 용량이 임상 시험에 의해 결정될 수 있지만, 환자의 상태 및 환자 질환의 유형 및 중증도와 같은 인자에 의해 결정될 것이다.

[0414] 한 가지 실시형태에서, 대상체에게 투여된 조성물 중의 T 세포의 양은 적어도 0.1×10^5 세포, 적어도 0.5×10^5 세포, 적어도 1×10^5 세포, 적어도 5×10^5 세포, 적어도 1×10^6 세포, 적어도 0.5×10^7 세포, 적어도 1×10^7 세포, 적어도 0.5×10^8 세포, 적어도 1×10^8 세포, 적어도 0.5×10^9 세포, 적어도 1×10^9 세포, 적어도 2×10^9 세포, 적어도 3×10^9 세포, 적어도 4×10^9 세포, 적어도 5×10^9 세포 또는 적어도 1×10^{10} 세포이다. 특정한 실시형태에서, 약 1×10^7 CAR T 세포 내지 약 1×10^9 CAR T 세포, 약 2×10^7 CAR T 세포 내지 약 0.9×10^9 CAR T 세포, 약 3×10^7 CAR T 세포 내지 약 0.8×10^9 CAR T 세포, 약 4×10^7 CAR T 세포 내지 약 0.7×10^9 CAR T 세포, 약 5×10^7 CAR T 세포 내지 약 0.6×10^9 CAR T 세포, 또는 약 5×10^7 CAR T 세포 내지 약 0.5×10^9 CAR T 세포가 대상체에게 투여된다.

[0415] 한 가지 실시형태에서, 대상체에게 투여되는 조성물 중의 T 세포의 양은 적어도 0.1×10^4 세포/체중 kg, 적어도 0.5×10^4 세포/체중 kg, 적어도 1×10^4 세포/체중 kg, 적어도 5×10^4 세포/체중 kg, 적어도 1×10^5 세포/체중 kg, 적어도 0.5×10^6 세포/체중 kg, 적어도 1×10^6 세포/체중 kg, 적어도 0.5×10^7 세포/체중 kg, 적어도 1×10^7 세포/체중 kg, 적어도 0.5×10^8 세포/체중 kg, 적어도 1×10^8 세포/체중 kg, 적어도 2×10^8 세포/체중 kg, 적어도 3×10^8 세포/체중 kg, 적어도 4×10^8 세포/체중 kg, 적어도 5×10^8 세포/체중 kg, 또는 적어도 1×10^9 세포/체중 kg이다. 특정 실시형태에서, 약 1×10^6 CAR T 세포/체중 kg 내지 약 1×10^8 CAR T 세포/체중 kg, 약 2×10^6 CAR T 세포/체중 kg 내지 약 0.9×10^8 CAR T 세포/체중 kg, 약 3×10^6 CAR T 세포/체중 kg 내지 약 0.8×10^8 CAR T 세포/체중 kg, 약 4×10^6 CAR T 세포/체중 kg 내지 약 0.7×10^8 CAR T 세포/체중 kg, 약 5×10^6 CAR T 세포/체중 kg 내지 약 0.6×10^8 CAR T 세포/체중 kg, 또는 약 5×10^6 CAR T 세포/체중 kg 내지 약 0.5×10^8 CAR T 세포/체중 kg이 대상체에게 투여된다.

[0416] 당해 기술분야의 숙련가는 본 발명의 조성물의 복수의 투여가 목적하는 치료를 수행하기 위해 요구될 수 있음을 인지할 것이다. 예를 들면, 조성물은 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 1년, 2년, 5년, 10년 또는 그 이상의 기간에 걸쳐 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10회 또는 그 이상 투여할 수 있다.

[0417] 특정 실시형태에서, 활성화된 T 세포를 대상체에게 투여한 다음 후속적으로 혈액(또는 아페레시스 수행)을 교체하고, 본 발명에 따라 T 세포를 이로부터 활성화시키고, 이들 활성화된 및 확장된 T 세포를 환자에게 재주입하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 프로세스는 몇 주마다 복수회 수행할 수 있다. 특정 실시형태에서, T 세포는 10cc 내지 400cc의 혈액 교체(blood draw)로부터 활성화될 수 있다. 특정 실시형태에서, T 세포는 20cc, 30cc, 40cc, 50cc, 60cc, 70cc, 80cc, 90cc, 100cc, 150cc, 200cc, 250cc, 300cc, 350cc 또는 400cc 이상의 혈액 교체로부터 활성화된다. 이론에 구속시키고자 하는 것은 아니지만, 이러한 복수 혈액 교체/복수 재주입 프로토콜을 사용하는 것은 T 세포의 특정 모집단을 선별하도록 작동할 수 있다.

[0418] 본원에서 의도된 조성물의 투여는 에어로졸 흡입, 주사, 경구섭취, 수액, 주입 또는 이식을 포함하는 임의의 통

상의 방법으로 수행할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 조성물은 비경구 투여된다. 본원에서 사용된 바와 같은 문구 "비경구 투여" 및 "비경구 투여된"은 통상 주사에 의한, 장용 및 국소 투여를 제외한 투여 방식을 지칭하고, 제한 없이, 혈관내, 정맥내, 근육내, 동맥내, 척추강내, 낭내, 안와내, 종양내, 심장내, 피내, 복강내, 경기관, 피하, 관절내, 피막내, 지주막하, 척수내 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다. 한 가지 실시형태에서, 본원에서 의도된 조성물은 종양, 림프절 또는 감염 부위 내로 직접 주사에 의해 대상체에게 투여된다.

[0419] 한 가지 실시형태에서, 이를 필요로 하는 대상체는 대상체에서 암에 대한 세포 면역 반응을 증가시키기 위해 유효량의 조성물이 투여된다. 면역 반응은 감염된 세포를 사멸시킬 수 있는 세포독성 T 세포에 의해 매개된 세포 면역 반응, 조절 T 세포 및 헬퍼 T 세포 반응을 포함한다. B 세포를 활성화시켜 항체 생성을 유도할 수 있는 헬퍼 T 세포에 의해 주로 매개된 체액성 면역 반응이 또한 유도될 수 있다. 본 발명의 조성물에 의해 유도된 면역 반응의 유형을 분석하기 위해 다양한 기술이 사용될 수 있고, 이는 당해 기술분야에 잘 기재되어 있다[참조: Current Protocols in Immunology, Edited by: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober(2001) John Wiley & Sons, NY, N.Y.].

[0420] T 세포-매개된 사멸의 경우에, CAR-리간드 결합은 T 세포에 대한 CAR 시그날전달을 개시하여, T 세포가 다양한 메카니즘에 의한 표적 세포 아폽토시스를 유도할 수 있는 단백질을 생성 또는 방출하는 것을 유도하는 다양한 T 세포 시그날전달 경로의 활성화를 제공한다. 이들 T 세포-매개된 메카니즘은 (이로써 한정되는 것은 아니지만) T 세포로부터 표적 세포로 세포내 세포독성 과립의 전이, 직접 표적 세포 사멸(또는 다른 킬러 작동 세포의 동원을 통해 간접적으로)을 유도할 수 있는 프로-염증 사이토킨의 T 세포 분비, 및 표적 세포 아폽토시스를 유도하는 T 세포 표면 상에서 사멸 수용체 리간드(예: FasL)의 상향 조절, 이어서 표적 세포 상에서 이들의 동족 사멸 수용체(예: Fas)에 대한 결합을 포함한다.

[0421] 한 가지 실시형태에서, 본 발명은, 대상체로부터 면역 작동 세포를 제거하고, 상기 면역 작동 세포를 본원에서 의도되는 조작된 TCR 또는 CAR을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터로 유전적으로 변형시키고, 이에 의해 변형된 면역 작동 세포의 모집단을 생성하고, 변형된 면역 작동 세포의 모집단을 동일한 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암으로 진단된 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 바람직한 실시형태에서, 면역 작동 세포는 T 세포를 포함한다.

[0422] 특정 실시형태에서, 본 발명은 또한, 조작된 TCR 또는 CAR 분자를 코딩하는 핵산 작제물을 발현하는 면역 작동 세포 모집단을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 표적 세포 모집단에 대한 면역 작동 세포 매개된 면역 조절인자 반응을 자극하는 방법을 제공한다.

[0423] 본원에 기재된 세포 조성물을 투여하는 방법은, 대상체에서 조작된 TCR 또는 CAR을 직접 발현하는 생체외 유전적으로 변형된 면역 작동 세포의 재도입, 또는 대상체 내로 도입시에 조작된 TCR 또는 CAR을 발현하는 성숙 면역 작동 세포로 분화하는 면역 작동 세포의 유전적으로 변형된 전구세포를 제공하는데 효과적인 모든 방법을 포함한다. 한 가지 방법은 말초혈 T 세포를 생체외에서 본 발명에 따라 핵산 작제물로 형질도입시키고 형질도입된 세포를 대상체에게 반송하는 것을 포함한다.

[0424] 본 명세서에 인용된 모든 간행물, 특허원 및 허여된 특허는, 각각의 개개 간행물, 특허원 또는 허여된 특허가 구체적 및 개별적으로 참조로서 도입되는 것을 나타내는 것과 같이, 본원에서 참조로서 도입된다.

[0425] 상기 본 발명이 이해의 명확성을 목적으로 예시 및 실시예에 의해 일부 상세하게 기재되었지만, 특정한 변화 및 변형이 첨부된 특허청구범위의 정신 또는 범위로부터 벗어나지 않고서 이루어질 수 있음은 본 발명의 교시에 비추어 당해 기술분야의 숙련가에게 용이하게 명백할 것이다. 하기 실시예는 한정하는 것이 아닌 예시를 위해서만 제공된다. 당해 기술분야의 숙련가는 본질적으로 유사한 결과를 수득하기 위해 변화 또는 변형될 수 있는 다양한 중요하지 않은 파라미터를 용이하게 인식할 것이다.

[0426] **실시예**

[0427] 실시예 1

[0428] *AKT 억제제와 함께 배양된 T 세포의 증식*

[0429] 이 실험의 목적은 T 세포 증식에 대한 Akt 억제제의 효과를 결정하는 것이다. T 세포 증식에 대한 MK-2206(Selleckchem)의 영향은 T 세포 분열을 측정함으로써 평가했다.

[0430] 말초혈 단핵 세포(PBMC)는 T 세포를 함유하는 이종성 세포 모집단이다. PBMC는 정상 공여체로부터 수거하고, 형광 염료(CellTrace® Violet, Molecular Probes)로 표지하고, 이의 강도는 각각의 세포 분열로 2배로 점차

희석된다. 표지된 PBMC를 T 세포 확장용 세포 공급원으로 사용했다. T 세포를 활성화시키고, 표지된 PBMC를 IL-2(CellGenix) 함유 배지에서 CD3 및 CD28 항체(Miltenyi Biotec)와 함께 배양함으로써 확장시켰다.

[0431] 세포 분열에 대한 MK-2206에 대한 영향은 0일차에 T 배양물에 0.025μM, 0.074μM, 0.222μM, 0.67μM 또는 2.0 μM MK-2206의 첨가후 유동 세포계수로 셀트레이스 바이올렛(CellTrace Violet) 희석을 평가함으로써 검정했다. IL-2 및 MK-2206을 함유하는 신선한 XVIVO-15 기반 배양 배지를 총 7일 동안 2 내지 3일마다 T 세포 배양물에 첨가하여 T 세포의 증식 및 확장을 가능하게 했다. MK-2206 처리는 배양 개시 3일후 T 세포 분열을 실질적으로 감소시키지 않았다(도 1A). 또한, 7일 동안 MK-2206의 존재하에 배양된 T 세포는 비히클 또는 무처리 대조군과 비교하여 T 세포 분열의 통계학적 유의차를 나타내지 않았다(도 1B). 대응(pairwise) t 시험은 전체 7일 배양물에 대해 수행했다(각 농도의 MK-2206을 0μM MK-2206과 비교하고; 배양물은 $p \leq 0.05$ 수준에서 통계학적으로 차이가 없었다).

[0432] 실시예 2

[0433] *MK-2206으로 처리된 T 세포 상에서 CD62L 발현*

[0434] 이 실험의 목적은 T 세포 효력에 대해 T 세포 마커에 대한 Akt 억제제의 효과를 결정하는 것이었다. T 세포 효력에 대한 MK-2206(Selleckchem)의 영향은 실시예 1에서 제조된 T 세포 배양물에서 CD62L 발현을 측정함으로써 검정했다.

[0435] 마우스 모델은 CD62L 발현이 강력한 T 세포, 양자 전이 후에 보다 큰 항-종양 효과를 갖는 T 세포를 동정하는 것을 나타냈다. 그러나, 시험관내에서 IL-2와 함께 배양한 T 세포는 CD62L 발현을 감소시키고 따라서 종양-특이적 T 세포의 감소된 항-종양 효력과 상관하는 것으로 밝혀졌다. 놀랍게도, 본 발명자들은 AKT 억제제 MK-2206이, 배양 7일 후 및 IL-2의 존재하에 시험된 모든 농도의 MK-2206에서 CD62L 발현을 현저히 증가시키는 것을 발견했다. 도 2. 대응(pairwise) t 시험은 전체 7일 배양물에 대해 수행했다(각 농도의 MK-2206을 0μM MK-2206와 비교했다: *p<.05, **p<.01).

[0436] 실시예 3

[0437] *Mk-2206 또는 ZSTK 474로 처리된 CAR T 세포 상에서 CD62L 발현*

[0438] CAR T 세포를 MK-2206 또는 트리시리빈 포스페이트 - TCN(AKT 억제제) 또는 ZSTK474(PI3K 억제제)와 함께 배양했다. B 세포 성숙 항원(BCMA)에 특이적인 CAR T 세포를 이들 실험 세트에서 사용했다. CAR T 세포 배양물은 대규모 임상 제조 프로세스로 직접 확장가능한 시스템을 사용하여 수행했다. 요약하면, 말초혈 단핵 세포(PBMC)는 IL-2(CellGenix) 및 CD3 및 CD28에 특이적인 항체(Miltenyi Biotec)를 함유하는 배지 중의 정적 플라스크(static flask)에서 배양했다. 항-BCMA CAR을 코딩하는 렌티바이러스 2×10^8 형질도입 단위를 배양 개시 1일 후에 첨가했다. 항-BCMA CAR T 세포는 IL-2 및 최적 용량의 억제제를 함유하는 신선한 배지를 전체 10일 배양 동안 첨가하여 대수-상(log-phase)으로 유지했다. 배양 말기에, 항-BCMA CAR T 세포는 표현형에 대해 질문했다.

[0439] 항-BCMA CAR T 세포 상에서 CD62L의 발현은 배양 말기에 유동 세포계수에 의해 평가했다. 항-BCMA CAR T 세포는 PE에 접합된 재조합 인간 BCMA-IgG Fc를 사용하여 특이적으로 동정되었다. CD62L 발현은 CD62L에 특이적인 항체를 사용하여 공-염색으로 결정했다. IL-2 및 MK2206과 함께 배양한 3개 정상 공여체로부터 항-BCMA CAR T 세포는 IL-2 단독을 사용한 배양물과 비교하여 현저히 높은 CD62L 발현을 가졌다. 항-BCMA CAR을 발현하는 렌티바이러스 형질도입은 개선된 표현형 유발된 MK2206을 감소시키지 않았다. 유사한 개선은 배양 동안 ZST474를 사용하여 관찰되었지만, TCN으로는 관찰되지 않았다(도 3).

[0440] 실시예 4

[0441] *Mk-2206 및 ZSTK474로 처리된 CAR T 세포는 개선된 치료학적 활성을 나타낸다.*

[0442] 실시예 3에 기재된 MK-2206, TCN 또는 ZSTK474로 처리된 항-BCMA CAR T 세포는 증가된 CD62L 발현이 증가된 항-종양 활성과 연관되는지를 평가하기 위해 시험했다. 항-BCMA CAR을 발현하는 T 세포는 IL-2 및 MK2206, TCN 또는 ZSTK474와 함께 배양한 후에 생성되었다. CAR T 세포의 치료학적 효과를 개선하는 것으로 이미 입증된 양으로 IL-7 및 IL-15가 보충된 배지에서 CAR T 세포의 분취량을 또한 배양했다. $100mm^3$ 피하 다발성 골수종을 갖는 동물(RPMI-8226)에게 동등한 CAR T 세포 용량(1×10^6 CAR-양성 세포)를 주입했다.

[0443] IL-2와 함께 배양된 항-BCMA CAR T 세포는 완전한 종양 퇴행을 유발하기에 충분했다. IL-7 및 IL-15, MK-2206 또는 ZST747과 함께 배양된 항-BCMA CAR T 세포는 이러한 다발성 골수종 동물 모델에서 표준 IL-2와 함께 배양된 항-BCMA CAR T 세포와 비교하여 유사한 수준의 항-종양 활성을 나타냈다. 대조적으로, TCN과 함께 배양된 항-BCMA CAR T 세포는 임의의 항-종양 반응을 완전히 폐지했다. 이들 실험의 결과는 도 4에 제시되어 있다.

[0444] 실시예 5

[0445] *Mk-2206 또는 ZSTK474로 처리된 CAR T 세포는 적극적(aggressive)종양 모델에서 개선된 치료 활성을 나타낸다.*

[0446] 치료가 보다 적극적 및 곤란한 종양 모델은 IL-2, MK-2206, TCN, ZSTK474, IL7/15 또는 비히클로 처리된 CAR T 세포의 항-종양 활성을 확인하기 위해 사용했다. 다우디 종양 세포는 낮은 수준의 BCMA 단백질을 발현하고, 항-BCMA CAR T 세포를 사용하여 효과적으로 처리할 수 있다. 다우디 종양 발현은 IL-2- 또는 IL7/15-배양된 항-BCMA CAR T 세포에 의한 치료 후에 영향을 받지 않았다. 놀랍게도, MK-2206 또는 ZST474와 함께 배양된 항-BCMA CAR T 세포는 완전한 종양 퇴행을 유발했다. 이들 실험 결과는 도 5에 제시되어 있다.

[0447] 실시예 6

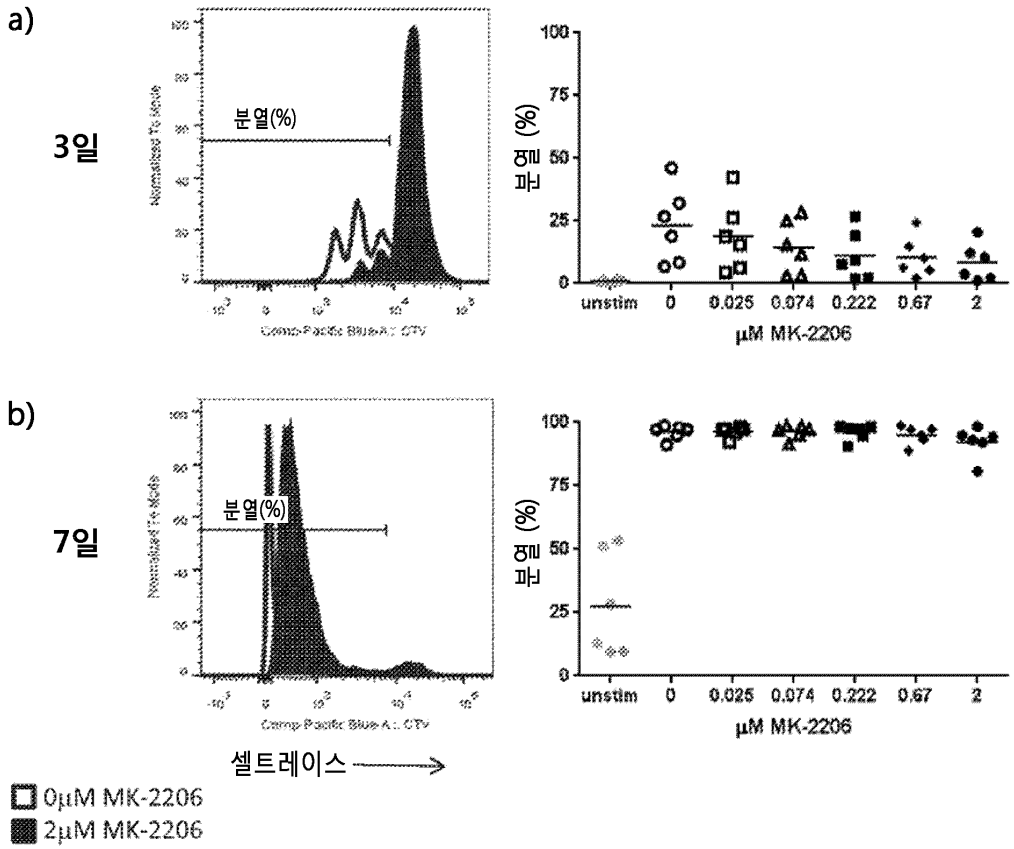
[0448] *Mk-2206 또는 ZSTK474로 처리된 CAR T 세포는 개선된 지속성을 나타낸다.*

[0449] CAR T 세포로 치료된 환자에서 임상 데이터는 지속성이 객관적 종양 반응과 연관됨을 시사한다. 항-BCMA CAR T 세포의 지속성은 완전한 퇴행을 갖는 마우스에서 종양을 재-공격함으로써 평가했다. $100mm^3$ RPMI-8226 종양을 완전히 퇴행시킨 IL-2-, MK-2206- 또는 ZSTK474-배양된 항-BCMA CAR T 세포로 치료된 동물은 반대측 옆구리에 RPMI-8226으로 13일 후에 재공격했다. IL-2 배양된 CAR T 세포로 치료된 동물은 종양 성장을 방지할 수 없었다. 대조적으로, ZSTK474-배양된 항-BCMA CAR T 세포로 치료된 모든 동물은 종양 생착의 어떠한 증거도 없었다. 이들 데이터는 치료학적 활성 항-BCMA CAR T 세포가 ZSTK474-배양된 항-BCMA CAR T 세포에서 지속하는 것을 나타낸다. 이들 실험 결과는 도 6에 제시되어 있다.

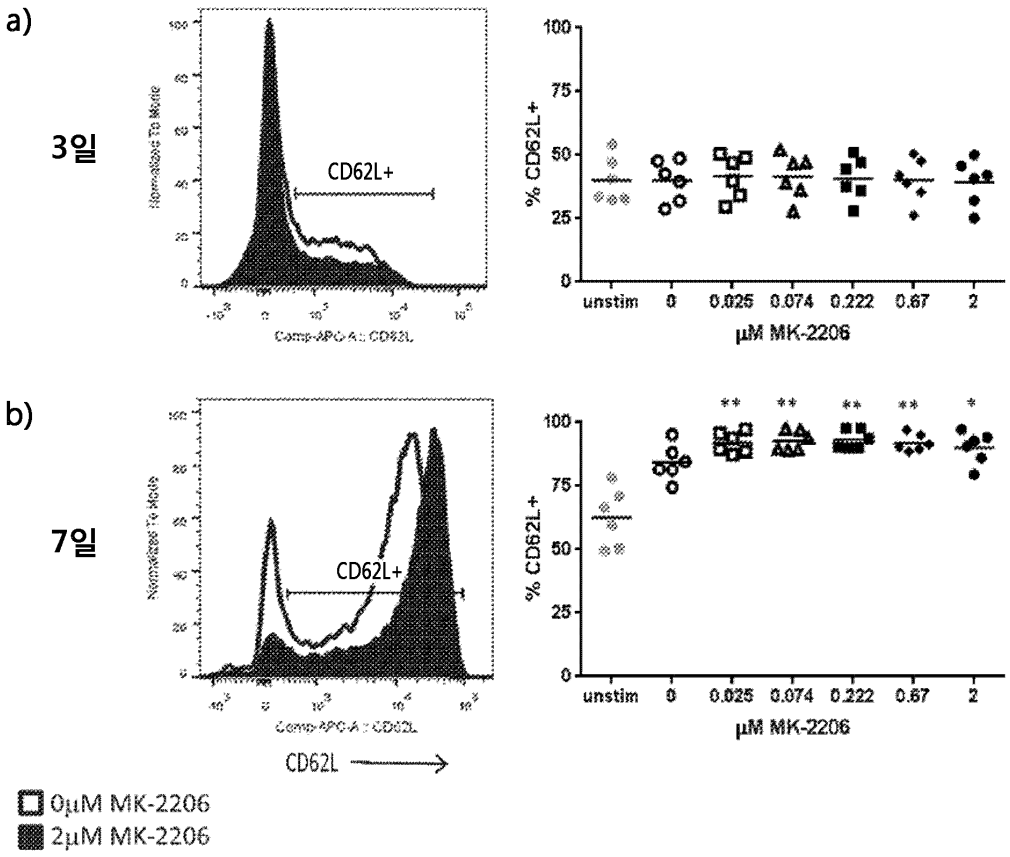
[0450] 일반적으로, 하기 특허청구범위에서, 사용된 용어는 특허청구범위를 명세서 및 특허청구범위에 개시된 특정의 실시형태로 한정하는 것으로 해석되는 것은 아니며, 이러한 특허청구범위가 권한을 부여한 등가물의 전체 범위와 함께 모든 가능한 실시형태를 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 따라서, 특허청구범위는 본 개시에 의해 한정되지 않는다.

도면

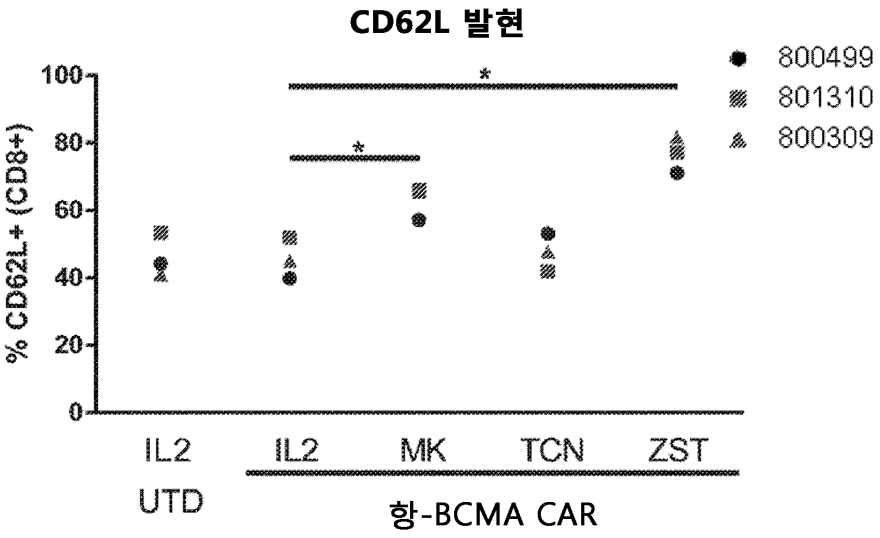
도면1


a)
3일
분열(%)
100
75
50
25
0
분열 (%)
unstim
0
0.025
0.074
0.222
0.67
2
μM MK-2206
b)
7일
분열(%)
100
75
50
25
0
분열 (%)
unstim
0
0.025
0.074
0.222
0.67
2
μM MK-2206
셀트레이스
0μM MK-2206
2μM MK-2206

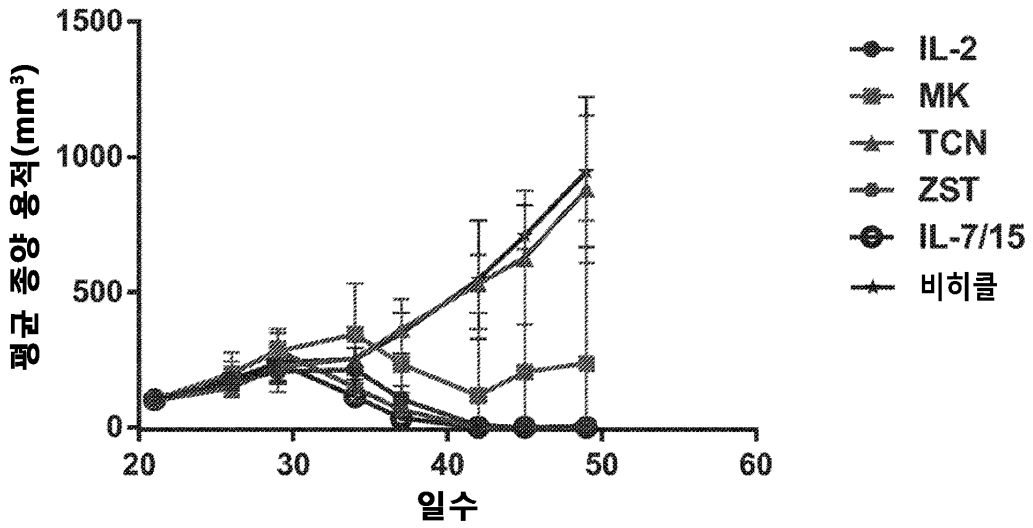
도면2


a)
3일
CD62L+
% CD62L+
100
75
50
25
0
unstim
0
0.025
0.074
0.222
0.67
2
μM MK-2206
b)
7일
CD62L+
**
*
CD62L
0μM MK-2206
2μM MK-2206

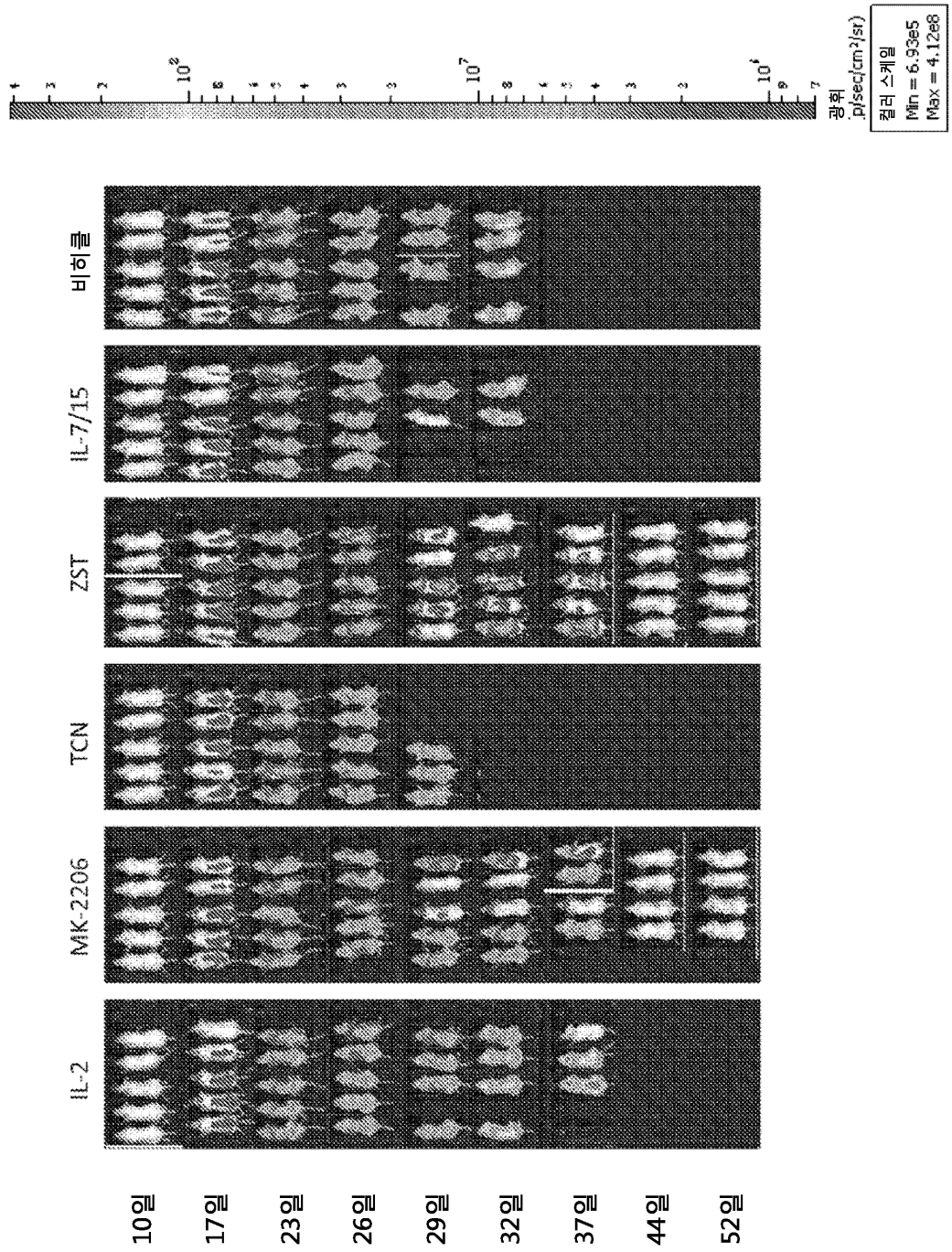
도면3


CD62L 발현
800499
801310
800309
% CD62L+ (CD8+)
100
80
60
40
20
0
*
*
IL2
UTD
IL2
MK
TCN
ZST
항-BCMA CAR

도면4


1500
1000
500
0
20
30
40
50
60
일수
평균 종양 용적(mm³)
IL-2
MK
TCN
ZST
IL-7/15
비히클

도면5


IL-2
MK-2206
TCN
ZST
IL-7/15
비히클
10일
17일
23일
26일
29일
32일
37일
44일
52일
광휘
(p/sec/cm²/sr)
컬러 스케일
Min = 6.93e5
Max = 4.12e8

도면6

