



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년01월20일

(11) 등록번호 10-2757789

(24) 등록일자 2025년01월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) **A61K 35/17** (2025.01)
A61P 31/12 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) **C12N 15/62** (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2025.01)
A61K 35/17 (2025.01)

(21) 출원번호 10-2020-7012314

(22) 출원일자(국제) 2018년09월24일

심사청구일자 2021년09월24일

(85) 번역문제출일자 2020년04월28일

(65) 공개번호 10-2020-0064107

(43) 공개일자 2020년06월05일

(86) 국제출원번호 PCT/US2018/052432

(87) 국제공개번호 WO 2019/070435

국제공개일자 2019년04월11일

(30) 우선권주장
 62/568,339 2017년10월05일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2016079333 A1

US20160152681 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

더 유나이티드 스테이츠 오브 어메리카, 애즈 리
 프리젠티드 바이 더 세크레터리, 디파트먼트 오브
 헬쓰 앤드 휴먼 서비스즈

미국, 메릴랜드 20892, 베서스다, 엠에스 7788,
 스위트 700, 6701 록리지 드라이브, 내셔널 인스
 티튜트 오브 헬쓰, 오피스 오브 테크놀로지 트랜
 스퍼

(72) 발명자

데니저 드루 씨

미국 텍사스주 77005 휴스턴 말로 스트리트 4020

펠드펜 스티븐 에이

미국 캘리포니아주 94062 레드우드 시티 듀안 스
 트리트 196

로젠버그 스티븐 에이

미국 메릴랜드주 20854 포토맥 아이언 게이트 로
 드 10104

(74) 대리인

제일특허법인(유)

전체 청구항 수 : 총 18 항

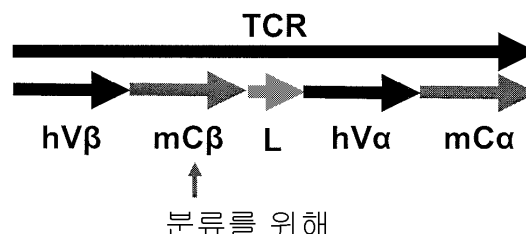
심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 쥐 불변 영역을 갖는 TCR을 발현하는 세포를 선택적으로 확대시키는 방법

(57) 요약

T 세포의 수를 선택적으로 확대시키는 방법을 개시한다. 상기 방법은 쥐 불변 영역을 포함하는 TCR을 발현하도
 록 인간 T 세포를 변형시키는 단계; 상기 TCR을 발현하는 다수의 인간 T 세포 및 상기 TCR을 발현하지 않는 다수
 의 인간 T 세포를 포함하는 세포 집단을 생성시키는 단계; 상기 세포 집단을 (i) 방사선조사된 배양보조 세포,
 (ii) 하나 이상의 사이토카인, 및 (iii) 상기 TCR의 쥐 불변 영역에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원-
 결합 부분의 존재하에 배양하여, 상기 TCR을 발현하지 않는 T 세포의 수보다 상기 TCR을 발현하는 T 세포의 수를
 선택적으로 확대시키는 단계를 포함할 수 있다. 또한 관련된 세포 집단, 약학 조성물, 및 암의 치료 또는 예방
 방법을 개시한다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61P 31/12 (2018.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 14/7051 (2013.01)

C12N 15/62 (2013.01)

C12N 2510/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

T 세포의 수를 선택적으로 확대시키는 방법으로서,

쥐 불변 영역을 포함하는 T 세포 수용체(TCR)를 발현하도록 인간 T 세포를 변형시키는 단계;

상기 TCR을 발현하는 다수의 인간 T 세포 및 상기 TCR을 발현하지 않는 다수의 인간 T 세포를 포함하는 세포 집단을 생성시키는 단계; 및

상기 세포 집단을 (i) 방사선조사된 배양보조 세포, (ii) 하나 이상의 사이토카인, 및 (iii) 상기 TCR의 쥐 불변 영역에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 존재하에 배양하여, 상기 TCR을 발현하지 않는 T 세포의 수보다 상기 TCR을 발현하는 T 세포의 수를 선택적으로 확대시키는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

항체 또는 그의 항원-결합 부분을 사용하여, TCR을 발현하는 T 세포를, 상기 TCR을 발현하지 않는 T 세포로부터 분리시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

TCR이 암 항원에 대한 항원 특이성을 갖는 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서,

TCR이 바이러스 항원에 대한 항원 특이성을 갖는 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서,

하나 이상의 사이토카인이 IL-2, IL7, IL-12, IL-15 및 IL-21 중 하나 이상을 포함하는 방법.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서,

인간 T 세포를 (i) 방사선조사된 동종이계 배양보조 세포 및 방사선조사된 자기유래 배양보조 세포 중 하나 또는 둘 다, (ii) 하나 이상의 사이토카인, 및 (iii) 인간 CD3 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 존재하에 배양하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서,

항체가 TCR의 β 쇄의 쥐 불변 영역에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서,

TCR을 발현하도록 인간 T 세포를 변형시키는 것이, 메가뉴클레아제, 아연 집게 뉴클레아제, 전사 활성화제-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 또는 군집화되어 규칙적으로 산재된 짧은 회문구조 반복부(CRISPR)-Cas 시스템을 사용하여 TCR을 발현하도록 인간 T 세포를 변형시킴을 포함하는 방법.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서,

항체가 서열번호 1의 아미노산 서열의 아미노산 잔기 D2, R4, N5, T7, E101, D103, K104, W105, P106, E107, G108, S109 및 P110에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서,

항체가 서열번호 3 및 서열번호 4 둘 다의 아미노산 서열을 포함하는 방법.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서,

선택적으로 확대된 세포 집단을 생성시키고, 상기 선택적으로 확대된 세포 집단 중 세포의 10% 내지 75%가 쥐 불변 영역을 포함하는 TCR을 발현하는 방법.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서,

선택적으로 확대된 세포 집단을 생성시키고, 상기 선택적으로 확대된 세포 집단 중 세포의 20% 내지 99%가 쥐 불변 영역을 포함하는 TCR을 발현하는 방법.

청구항 13

제1항 또는 제2항에 있어서,

쥐 불변 영역을 포함하는 TCR을 발현하는 T 세포의 수를 10배 내지 1000배 증가시킴을 포함하는 방법.

청구항 14

제1항 또는 제2항에 있어서,

TCR이 쥐 가변 영역을 포함하는 방법.

청구항 15

제1항 또는 제2항에 있어서,

TCR이 인간 가변 영역을 포함하는 방법.

청구항 16

T 세포의 수를 제1항 또는 제2항에 따른 방법에 따라 선택적으로 확대시키고, 상기 T 세포를 약학 조성물로 제형화시키는, 단계

를 포함하는, 포유동물에서 암을 치료 또는 예방하기 위한 약학 조성물을 제조하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

질환이 바이러스 질환인 방법.

청구항 18

제16항에 있어서,
질환이 암인 방법.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원에 대한 상호참조
- [0002] 본 특허 출원은 2017년 10월 5일자로 출원된 미국 가 특허 출원 62/568,339호(그의 내용 전체가 본 명세서에 참고로 인용됨)를 우선권 주장한다.
- [0003] 연방 지원 연구 또는 개발에 관한 진술
- [0004] 본 발명은 국립 보건원 국립 암 연구소에 의해 프로젝트 번호 Z1A BC 010985하에서 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에 특정 권리를 갖는다.
- [0005] 전자 제출된 자료의 참조에 의한 포함
- [0006] 2018년 9월 24일자의 "740358_ST25.txt"란 명칭의 하나의 8,876 바이트 ASCII(텍스트) 파일로서 식별되어 본 출원과 동반하여 제출된 컴퓨터-판독 가능한 뉴클레오타이드/아미노산 서열 목록은 본 명세서에 내용 전체가 참조에 의해 포함된다.

배경 기술

- [0007] 외인성 T 세포 수용체(TCR)를 발현하도록 변형된 세포의 투여에 의한 암 치료는 일부 환자에서 긍정적인 임상 결과를 생성시켰다. 그럼에도 불구하고, 상기와 같은 치료법의 보다 광범위한 성공에는 여전히 장애가 있다. 예를 들면, 상기 외인성 TCR을 암호화하는 유전자의 낮은 전달 효율은 상기 외인성 TCR 발현 세포를 낮은 수로 생성시킬 수 있다. 따라서, 외인성 TCR을 발현하는 세포를 생성시키는 개선된 방법이 충족되지 못한 채 여전히 필요하다.

발명의 내용

- [0008] 본 발명의 하나의 실시양태는 T 세포의 수를 선택적으로 확대시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은 인간 T 세포를 TCR을 발현하도록 변형시키고, 여기에서 상기 TCR은 쥐 불변 영역을 포함하며; 상기 TCR을 발현하는 다수의 인간 T 세포 및 상기 TCR을 발현하지 않는 다수의 인간 T 세포를 포함하는 세포 집단을 생성시키고; 상기 세포 집단을 (i) 방사선조사된 배양보조 세포, (ii) 하나 이상의 사이토카인, 및 (iii) 상기 TCR의 쥐 불변 영역에 대한 항원 특이성을 갖는 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 존재하에서 배양하여, 상기 TCR을 발현하지 않는 T 세포의 수보다 상기 TCR을 발현하는 T 세포의 수를 선택적으로 확대시킴을 포함한다.
- [0009] 본 발명의 추가의 실시양태는 본 발명의 방법에 따라 제조된 선택적으로 확대된 수의 T 세포를 포함하는 관련된 세포 집단 및 상기 세포 집단을 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0010] 본 발명의 더욱 또 다른 실시양태는 포유동물에서 암을 치료하거나 예방하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본 발명의 방법에 따라 T 세포의 수를 선택적으로 확대시키고 상기 선택적으로 확대된 수의 T 세포를 상기 포유동물에서 암을 치료하거나 예방하기에 유효한 양으로 상기 포유동물에게 투여함을 포함한다.

도면의 간단한 설명

- [0011] 도 1a는 인간 TCR α 쇄 가변 영역(hV α), 쥐 TCR α 쇄 불변 영역(mC α), 합성 링커 서열(L), 인간 TCR β 쇄 가변 영역(hV β), 및 쥐 TCR β 쇄 불변 영역(mC β)을 암호화하는 뉴클레오타이드 구조물을 예시하는 도식이다.

도 1b는 본 발명의 하나의 실시양태에 따라 mTCR을 발현하는 T 세포의 수를 선택적으로 확대시키는 방법을 예시하는 도식이다.

도 2는 OKT3 Ab를 사용하는 표준 고속 확대 프로토콜(REP) 또는 H57 Ab를 사용하는 선택적 확대를 겪은 돌연변이-방지된 ERBB2 mTCR 또는 돌연변이-방지된 ERBB2IP mTCR-전기천공된 세포(ERBB2mutTCR 또는 ERBB2IPmutTCR)에서 FACS에 의해 검출된 (i) CD3, CD4 또는 CD8 발현 및 (ii) mTCR β 발현을 예시하는 실험 데이터(도트 플롯)를 도시한다. 전기천공 완충제만으로 전기천공된 T 세포(모의; DNA/TCR 없음)가 음성 대조용으로서 제공되었다. 상기 도트 플롯 중의 숫자는 검출된 mTCR $^{+}$ 세포의 백분율이다.

도 3a 및 3b는 다양한 농도(ng/ml)의 H57 Ab에 의한 선택적 확대에 이어서 검출된 CD3, CD4 또는 CD8을 또한 발현하는 돌연변이-방지된 ERBB2IP mTCR β^{+} (ERBB2IPmutTCR)(A) 또는 돌연변이-방지된 ERBB2(ERBB2mutTCR) mTCR β^{+} (B) 세포의 백분율(%)을 나타내는 그래프이다. 전기천공 완충제만으로 전기천공된 T 세포(모의; DNA/TCR 없음)가 음성 대조용으로서 제공되었다. H57 Ab에 의한 선택적 확대 대신에 OKT3 Ab에 의한 표준 REP를 겪은 전기천공된 세포는 비-특이적 T 세포 성장에 대한 양성 대조용으로서 제공되었다.

도 4a는 본 발명의 하나의 실시양태에 따라 쥐 불변 영역을 포함하는 TCR(mTCR)을 발현하는 T 세포의 수를 선택적으로 확대시키는 방법을 예시하는 도식이다.

도 4b는 H57 Ab의, TCR의 쥐 TCR β 쇄 불변 영역(mC β)에의 결합을 예시하는 도식이다. 상기 TCR의 다른 성분은 인간 TCR α 쇄 가변 영역(hV α), 쥐 TCR α 쇄 불변 영역(mC α), 합성 링커 서열(L), 및 인간 TCR β 쇄 가변 영역(hV β)을 포함한다.

도 5A 내지 5D는 형질감염되지 않은, 염색되지 않은 세포(A), 형질감염되지 않은, 염색된 세포(B), 전기천공 완충제만으로 전기천공된 세포(모의)(TCR/트랜스포손(Tn) 없음)(C), 및 mTCR을 암호화하는 SBTS 플라스미드(4149-TCRa2b2/pSBSO) 및 실시예 3에 기재된 트랜스포사제를 암호화하는 SBTS 플라스미드(pKan-CMV-SB11)로 전기천공된 세포(D)에서 FACS에 의해 검출된 CD3 발현 및 쥐 TCR β 쇄(mTCR β) 발현을 예시하는 실험 데이터(도트 플롯)를 도시한다. 상기 도트 플롯에서 숫자는 CD3 $^{+}$ /mTCR β^{+} (상부 우측 사분면), CD3 $^{+}$ /mTCR β^{-} (하부 우측 사분면), CD3 $^{-}$ /mTCR β^{-} (하부 좌측 사분면), 및 CD3 $^{-}$ /mTCR β^{+} 세포(상부 좌측 사분면)의 백분율이다.

도 6은 표시된 초기 숫자의 전기천공된 세포(REP에서 mTCR $^{+}$ 세포)에서 표시된 농도의 H57 Ab(ng/ml)에 의해 선택적 확대를 겪은 mTCR-전기천공된 세포에서의 FACS에 의해 검출된 CD3 발현 및 mTCR β 발현을 예시하는 실험 데이터(도트 플롯)를 도시한다. 전기천공 완충제만으로 전기천공된 세포(모의)(TCR 없음)가 음성 대조용으로서 제공되었다. 상기 도트 플롯에서 숫자는 CD3 $^{+}$ /mTCR β^{+} (상부 우측 사분면), CD3 $^{+}$ /mTCR β^{-} (하부 우측 사분면), CD3 $^{-}$ /mTCR β^{-} (하부 좌측 사분면), 및 CD3 $^{-}$ /mTCR β^{+} 세포(상부 좌측 사분면)의 백분율이다.

도 7은 H57 Ab 또는 OKT3 Ab에 의한 2차 확대를 겪고 염색되었거나 염색되지 않은 mTCR-전기천공된 세포에서 FACS에 의해 검출된 CD3 발현 및 mTCR β 발현을 예시하는 실험 데이터(도트 플롯)를 도시한다. 또한 OKT3 Ab에 의한 2차 확대를 겪은 mTCR-전기천공된 세포에서 FACS에 의해 검출된 CD4 및 CD8 발현을 예시하는 실험 데이터(도트 플롯)를 도시한다.

도 8A 및 8B는 확대(예비-고속 확대 프로토콜(REP)) 전에 형질도입되지 않은(UT)(도 8B) 및 형질도입된(도 8A) 세포에 대한 FACS에 의해 검출된 CD8 발현 및 항-MART-1 TCR 발현을 예시하는 실험 데이터(도트 플롯)를 도시한다.

도 8C는 확대(예비-REP) 전 및 대략 5% mTCRb $^{+}$ 세포로의 회색에 따른, 도 8A의 형질도입된 세포에 대한 FACS에 의해 검출된 CD8 발현 및 항-MART-1 TCR 발현을 예시하는 실험 데이터(도트 플롯)를 도시한다.

도 9는 (i) 50 CU 또는 500 CU의 IL-2 및 (ii) OKT3 Ab 또는 H57 Ab("mTCRb")에 의한 확대에 따른, UT 세포 또는 도 8C의 회색된 형질도입된 세포에 대한 FACS에 의해 검출된 CD8 발현 및 항-MART-1 TCR 발현을 예시하는 실험 데이터(도트 플롯)를 도시한다.

도 10A는 (i) 50 CU 또는 500 CU의 IL-2 및 (ii) OKT3 Ab 또는 H57 Ab("mTCRb")에 의한 확대에 따른, UT 세포 또는 도 8C의 회색된 형질도입된 세포에 대해 검출된 형질도입된 세포의 백분율을 도시하는 그래프이다.

도 10B는 (i) 50 CU 또는 500 CU의 IL-2 및 (ii) OKT3 Ab 또는 H57 Ab("mTCRb")에 의한 확대에 따른, UT 세포

또는 도 8C의 회석된 형질도입된 세포에 대해 성취된 확대 배수를 도시하는 그래프이다.

도 11A 내지 11C는 UT 세포(도 11A) 또는 4배 회석 전(도 11B) 및 후(도 11C)의 항-MART-1 TCR로 형질도입된 세포의 확대 전 FACS에 의해 검출된 CD8 발현 및 mTCRb 발현을 예시하는 실험 데이터(도트 플롯)를 도시한다.

도 12A 내지 12E는 OKT3 및 500 CU IL-2(도 12A), H57(mTCRb) 및 500 CU IL-2(도 12B), H57(mTCRb) 및 50 CU IL-2(도 12C), 또는 H57(mTCRb) 및 무 IL-2(도 12D)에 의한 UT 세포(도 12E) 또는 도 11C의 회석된 TCR-형질도입된 세포의 확대에 따른, FACS에 의해 검출된 CD8 발현 및 mTCRb 발현을 예시하는 실험 데이터(도트 플롯)를 도시한다.

도 13A는 (i) 0 CU, 50 CU 또는 500 CU의 IL-2 및 (ii) OKT3 Ab 또는 H57 Ab("mTCRb")에 의한 확대에 따른, UT 세포 또는 도 11C의 회석된 형질도입된 세포에 대해 검출된 형질도입된 세포의 백분율을 도시하는 그래프이다.

도 13B는 (i) 0 CU, 50 CU 또는 500 CU의 IL-2 및 (ii) OKT3 Ab 또는 H57 Ab("mTCRb")에 의한 확대에 따른, UT 세포 또는 도 11C의 회석된 형질도입된 세포에 대해 성취된 확대 배수를 도시하는 그래프이다.

도 14A 내지 14F는 확대 전(도 14A) 또는 OKT3(30 ng/ml)(도 14B) 또는 H57(mTCRb)(5 ng/ml)(도 14F), 10 ng/ml(도 14E), 50 ng/ml(도 14D), 또는 500 ng/ml(도 14C)에 의한 형질도입된 세포의 확대에 따른, FACS에 의해 검출된 CD8 발현 및 mTCRb 발현을 예시하는 실험 데이터(도트 플롯)를 도시한다.

도 15는 OKT3(30 ng/ml) 또는 H57(mTCRb)(5, 10, 50 또는 500 ng/ml)에 의한 확대에 따른, mTCR-형질도입된 세포에 대해 성취된 확대 배수를 도시하는 그래프이다.

도 16A 내지 16E는 H57에 의한 제1 라운드의 확대를 겪은 mTCR-형질도입된 세포의 제2 라운드의 확대에 따른, FACS에 의해 검출된 CD8 발현 및 mTCRb 발현을 예시하는 실험 데이터(도트 플롯)를 도시한다. 상기 제2 라운드의 확대는 OKT3(30 ng/ml)(도 16A) 또는 H57(mTCRb)(5 ng/ml)(도 16E), 10 ng/ml(도 16D), 50 ng/ml(도 16C), 또는 500 ng/ml(도 16B)로 수행되었다.

도 17은 H57에 의한 제1 라운드의 확대를 겪은 mTCR-형질도입된 세포의 제2 라운드의 확대에 따른, mTCR-형질도입된 세포에 대해 성취된 확대 배수를 도시하는 그래프이다. 상기 제2 라운드의 확대는 OKT3(30 ng/ml) 또는 H57(mTCRb)(5, 10, 50 또는 500 ng/ml)로 수행되었다.

도 18은 4149-HUWE1-TCR1 또는 4149-TP53-TCRa2b2에 의한 공여자 1 및 2로부터의 PBMC의 전기천공 다음날 FACS에 의해 검출된 CD3 발현 및 mTCRb 발현을 예시하는 실험 데이터(도트 플롯)를 도시한다. 염색되지 않은 PBMC, 형질감염되지 않은 PBMC, 및 전기천공 완충제만으로 전기천공된 PBMC(모의)(TCR 없음)가 음성 대조용으로서 제공되었다.

도 19A 및 19B는 4149-HUWE1-TCR1 또는 4149-TP53-TCRa2b2로 트랜스포즈(transpose)되고 H57에 의한 1 라운드의 확대(도 19B)를 겪은 공여자 1 및 2로부터의 PBMC에 의한 CD3 발현 및 mTCRb 발현을 예시하는 실험 데이터(도트 플롯)를 도시한다. 염색되지 않은 PBMC(도 19A) 및 전기천공 완충제만으로 전기천공된 PBMC(모의)(TCR 없음)(도 19B)가 음성 대조용으로서 제공되었다.

도 20A 및 20B는 4149-HUWE1-TCR1 또는 4149-TP53-TCRa2b2로 트랜스포즈되고 H57에 의한 1 라운드의 확대(도 20B)에 이어서 표준 REP을 사용한 확대를 겪은 공여자 1 및 2로부터의 PBMC에 의한 CD3 발현 및 mTCRb 발현을 예시하는 실험 데이터(도트 플롯)를 도시한다. 염색되지 않은 PBMC(도 20A) 및 전기천공 완충제만으로 전기천공된 PBMC(모의)(TCR 없음)(도 20B)가 음성 대조용으로서 제공되었다.

도 21A는 (i) DMSO, WT HUWE1 펩타이드, 또는 돌연변이된(mut) HUWE1 펩타이드로 펄스화된 DC와 (ii) 4149-HUWE1-TCR1으로 트랜스포즈된 공여자 1로부터의 세포와의 공-배양에 따라 분비된 IFN- γ 의 농도를 나타내는 그래프이다. 단독으로 배양된 DC가 대조용으로서 제공되었다. 평균 \pm SEM; n=3 기술적 복제물.

도 21B는 (i) DMSO, WT TP53 펩타이드, 또는 mut TP53 펩타이드로 펄스화된 DC와 (ii) 4149-TP53-TCRa2b2로 트랜스포즈된 공여자 1로부터의 세포와의 공-배양에 따라 분비된 IFN- γ 의 농도를 나타내는 그래프이다. 단독으로 배양된 DC가 대조용으로서 제공되었다. 평균 \pm SEM; n=3 기술적 복제물.

도 21C는 (i) DMSO, WT HUWE1 펩타이드, mut HUWE1 펩타이드로 펄스화된 DC와 (ii) 4149-HUWE1-TCR1으로 트랜스포즈된 공여자 2로부터의 세포와의 공-배양에 따라 분비된 IFN- γ 의 농도를 나타내는 그래프이다. 단독으로 배양된 DC가 대조용으로서 제공되었다. 평균 \pm SEM; n=3 기술적 복제물.

도 21D는 (i) DMSO, WT TP53 펩타이드, 또는 mut TP53 펩타이드로 펄스화된 DC와 (ii) 4149-TP53-TCRa2b2로 트랜스포즈된 공여자 2로부터의 세포와의 공-배양에 따라 분비된 IFN- γ 의 농도를 나타내는 그래프이다. 단독으로 배양된 DC가 대조용으로서 제공되었다. 평균 \pm SEM; n=3 기술적 복제물.

도 22는 본 발명의 하나의 실시양태에 따른, 쥐 불변 영역(mTCR)을 포함하는 TCR을 발현하는 T 세포의 수를 선택적으로 확대시키는 방법을 예시하는 도식이다.

도 23A는 실시예 14에 기재된 방법 중 4개의 시점에서 측정된 하나의 큐벳 중의 세포의 총수를 도시하는 그래프이다: 전기천공(빈 막대)에 이어서, H57에 의한 선택적인 확대(줄무늬 막대)에 이어서, H57-접합된 비드에 의한 농축(회색 막대)에 이어서, 및 OKT3에 의한 표준 REP(검은색 막대)에 이어서. 세포를 4149-HUWE1-TCR1 또는 4149-TP53-TCRa2b2로 전기천공시켰다. 도시된 데이터가 평균 \pm SEM(n=3)이도록 3회 중복 큐벳을 나란히 순방향으로 채취하였다.

도 23B는 실시예 14에 기재된 방법 중 4개의 시점에서 측정된 하나의 큐벳 중의 CD3+mTCR+ 세포의 백분율을 도시하는 그래프이다: 전기천공(빈 막대)에 이어서, H57에 의한 선택적인 확대(줄무늬 막대)에 이어서, H57-접합된 비드에 의한 농축(회색 막대)에 이어서, 및 OKT3에 의한 표준 REP(검은색 막대)에 이어서. 세포를 4149-HUWE1-TCR1 또는 4149-TP53-TCRa2b2로 전기천공시켰다. 도시된 데이터가 평균 \pm SEM(n=3)이도록 3회 중복 큐벳을 나란히 순방향으로 채취하였다.

도 23C 및 23D는 실시예 14에 기재된 방법의 28일째에(OKT3 REP-후) 측정된 4149-HUWE1-TCR1-트랜스포즈된(mTCR+)(도 23C) 또는 4149-TP53-TCRa2b2-트랜스포즈된(mTCR+)(도 23D) 세포의 백분율을 도시하는 그래프이다. 전기천공 완충제만으로 전기천공된 PBMC(모의)(TCR 없음)가 음성 대조용으로서 제공되었다. 모의는 (1)로 표시하고 TCR-트랜스포즈된 세포는 (2)로 표시한다. 도시된 데이터가 평균 \pm SEM(n=3)이도록 3회 중복 큐벳을 나란히 순방향으로 채취하였다.

도 23E는 실시예 14에 기재된 방법의 28일째에(OKT3 REP-후) 측정된 CD4+mTCR β + 세포(빈 막대) 또는 CD8+mTCR β + 세포(색칠된 막대)의 백분율을 도시하는 그래프이다. 상기 TCR은 4149-HUWE1-TCR1 또는 4149-TP53-TCRa2b2였다. 도시된 데이터가 평균 \pm SEM(n=3)이도록 3회 중복 큐벳을 나란히 순방향으로 채취하였다.

도 24A는 세포수의 확대 전(1일째)(빈 막대) 또는 후(28일째)(색칠된 막대)에 측정된 표시된 마커에 대해 양성인 세포의 백분율을 도시하는 그래프이다. 상기 세포를 4149-HUWE1-TCR1로 트랜스포즈하였다.

도 24B는 세포수의 확대 전(1일째)(빈 막대) 또는 후(28일째)(색칠된 막대)에 측정된 표시된 표현형을 갖는 mTCR β + 세포의 백분율을 도시하는 그래프이다. 상기 세포를 4149-HUWE1-TCR1로 트랜스포즈하였다. 상기 표현형은 중심 기억 T(T_{CM}) 세포, 기억 줄기 T 세포(T_{SCM} 세포), 미경험 T 세포(T_N), 효과기 기억 T 세포(T_{EM}), 및 효과기 기억 RA T 세포(T_{EMRA})이다.

도 24C는 세포수의 확대 전(1일째)(빈 막대) 또는 후(28일째)(색칠된 막대)에 측정된 표시된 마커에 대해 양성인 세포의 백분율을 도시하는 그래프이다. 상기 세포를 4149-TP53-TCRa2b2로 트랜스포즈하였다.

도 24D는 세포수의 확대 전(1일째)(빈 막대) 또는 후(28일째)(색칠된 막대)에 측정된 표시된 표현형을 갖는 mTCR β + 세포의 백분율을 도시하는 그래프이다. 상기 세포를 4149-TP53-TCRa2b2로 트랜스포즈하였다.

도 25A는 (i) DMSO 또는 10, 1 또는 0.1 μ g/ml의 WT HUWE1 펩타이드(빈 막대) 또는 mut HUWE1 펩타이드(색칠된 막대)로 펄스화된 DC와 (ii) 4149-HUWE1-TCR1로 트랜스포즈된 세포와의 공-배양에 따라 분비된 IFN- γ 의 농도를 나타내는 그래프이다.

도 25B는 (i) DMSO 또는 10, 1 또는 0.1 μ g/ml의 WT TP53 펩타이드(빈 막대) 또는 mut TP53 펩타이드(색칠된 막대)로 펄스화된 DC와 (ii) 4149-TP53-TCRa2b2로 트랜스포즈된 세포와의 공-배양에 따라 분비된 IFN- γ 의 농도를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 발명의 하나의 실시양태는 T 세포의 수를 선택적으로 확대시키는 방법을 제공한다. 상기 방법은 인간 T 세포를 TCR을 발현하도록 변형시킴을 포함할 수 있으며, 여기에서 상기 TCR은 쥐 불변 영역을 포함한다(본 명세서에서 이후부터 "mTCR"). 본 발명의 방법은 다양한 장점 중 임의의 하나 이상을 제공할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 방법은 mTCR을 발현하지 않는 세포의 수보다 상기 mTCR을 발현하는 T 세포의 수의 선택적인 확대를

[0012]

제공할 수 있다. 본 발명의 방법은 본 명세서에 기재된 바와 같이 T 세포의 수를 선택적으로 확대시키지 않는 방법에 의해 제조된 세포 집단에 비해, 상기 mTCR을 발현하는 세포를 보다 큰 비율로 갖는 세포 집단을 제공할 수 있다. 특정한 이론이나 기전에 얽매하고자 하는 것은 아니지만, mTCR을 발현하는 세포를 보다 큰 비율로 갖는 세포 집단은 상기 mTCR을 발현하는 세포를 보다 적은 비율로 갖는 세포 집단에 비해, 표적 암 세포의 개선된 파괴 및 암 치료 중 하나 또는 둘 다를 제공할 수 있다.

- [0013] TCR은 일반적으로 2개의 폴리펩타이드(즉 폴리펩타이드 쇠), 예를 들어 TCR의 α -쇄, TCR의 β -쇄, TCR의 γ -쇄, TCR의 δ -쇄, 또는 이들의 조합을 포함한다. 상기과 같은 TCR의 폴리펩타이드 쇠들은 당해 분야에 공지되어 있다. mTCR은, 상기 mTCR이 쥐 불변 영역을 포함하고 항원, 예를 들어 질환-관련 항원 또는 그의 에피토프에 특이적으로 결합하여 상기를 면역학적으로 인식할 수 있는 한, 임의의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0014] mTCR은 외인성 TCR, 즉 T 세포에 고유하지 않은(천연이지 않은) TCR일 수 있다. 외인성 TCR은 재조합 TCR일 수 있다. 재조합 TCR은 하나 이상의 외인성 TCR α -, β -, γ -, 및/또는 δ -쇄 암호화 유전자의 재조합 발현을 통해 생성된 TCR이다. 재조합 TCR의 제조 방법은 당해 분야에 공지되어 있다.
- [0015] 본 발명의 하나의 실시양태에서, mTCR은 2개의 폴리펩타이드 쇠를 포함하며, 이들은 각각 TCR의 상보성 결정 영역(CDR)1, CDR2, 및 CDR3을 포함하는 가변 영역을 포함한다. 바람직하게, 상기 mTCR은 α 쇠의 CDR1, α 쇠의 CDR2, α 쇠의 CDR3, β 쇠의 CDR1, β 쇠의 CDR2, 및 β 쇠의 CDR3를 포함한다.
- [0016] 하나의 실시양태에서, mTCR은 상기 제시된 CDR을 포함하는 TCR의 가변 영역의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 이에 관하여, 상기 TCR은 α 쇠 가변 영역 및 β 쇠 가변 영역을 포함할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 하나의 실시양태에서, mTCR은 상술한 가변 영역 또는 CDR 외에 쥐 불변 영역을 추가로 포함한다. 바람직하게, 상기 mTCR은 α 쇠 쥐 불변 영역 및 β 쇠 쥐 불변 영역을 모두 포함한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "쥐"란 용어는 본 명세서에 기재된 TCR 또는 TCR의 임의의 성분(예를 들어 상보성 결정 영역(CDR), 가변 영역, 불변 영역, 알파쇄 및/또는 베타쇄)을 언급할 때 쥐로부터 유래된 TCR(또는 그의 성분), 즉 마우스 T 세포로부터 기원하였거나, 한때 마우스 T 세포에 의해 발현되었던 TCR(또는 그의 성분)을 의미한다.
- [0018] mTCR은 가변 영역 및 불변 영역을 포함하는 TCR α 쇠 및 가변 영역 및 불변 영역을 포함하는 TCR β 쇠를 포함할 수 있다. 상기 α 쇠 가변 영역 및 상기 β 쇠 가변 영역을 본 명세서에서 이후부터 TCR의 "가변 영역"이라 총칭한다. 상기 α 쇠 불변 영역 및 상기 β 쇠 불변 영역을 본 명세서에서 이후부터 TCR의 "불변 영역"이라 총칭한다.
- [0019] 본 발명의 하나의 실시양태에서, mTCR은 쥐 TCR이다. 쥐 TCR은 전적으로 마우스로부터 유래된 폴리펩타이드 쇠를 포함할 수 있다. 이에 관하여, 상기 쥐 TCR은 쥐 가변 영역 및 쥐 불변 영역을 포함할 수 있다. 쥐 TCR의 예는 비제한적으로 미국특허 제8,216,565호 및 미국특허 제9,487,573호 및 미국특허 출원 제5/528,813호에 개시된 것들을 포함한다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, mTCR은 2개의 상이한 포유동물 종, 즉 마우스 및 비-마우스 종으로부터의 TCR로부터 유래된 아미노산 서열로 구성된 키메라 또는 하이브리드 TCR이다. 예를 들어, 상기 mTCR은 인간 가변 영역 및 쥐 불변 영역을 포함할 수 있다. 인간 가변 영역 및 쥐 불변 영역을 포함하는 키메라 TCR의 예는 특허출원 PCT/US2016/050875, PCT/US2017/044615, PCT/US2017/027865, 미국특허 출원 제2013/0274203호, 미국특허출원 제2017/0145070호, 및 미국특허 출원 제2016/0152681호; 및 미국특허 제8,785,601호에 개시된다.
- [0021] 본 발명의 하나의 실시양태에서, mTCR은 항원-특이적 TCR이다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "항원-특이적" 및 "항원 특이성"이란 어구는 상기 mTCR의, 항원 또는 그의 에피토프에의 결합이 면역 반응을 이끌어내도록, 상기 mTCR이 상기 항원 또는 그의 에피토프에 특이적으로 결합하고 면역학적으로 인식할 수 있음을 의미한다.
- [0022] 항원-특이적 mTCR에 의해 인식되는 항원은 질환의 특징인 임의의 항원일 수 있다. 예를 들어, 상기 항원은 비제한적으로 암 항원(또한 종양 항원 또는 종양 관련 항원이라 칭한다) 또는 바이러스 항원일 수 있다. 바이러스 항원은 당해 분야에 공지되어 있으며, 예를 들어 임의의 바이러스 단백질, 예를 들어 env, gag, pol, gp120, 티미딘 키나제 등을 포함한다.
- [0023] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "암 항원"이란 용어는 종양 세포 또는 암 세포에 의해 단독으로 또는 우세하게 발현되거나 과-발현된 임의의 분자(예를 들어 단백질, 폴리펩타이드, 펩타이드, 지질, 탄수화물 등)를 지칭하며, 따라서 상기 항원은 상기 종양 또는 상기 암과 관련된다. 상기 암 항원은 정상, 비-종양, 또는 비-암성 세포에 의해 추가로 발현될 수 있다. 그러나, 상기과 같은 경우에, 상기 정상, 비-종양 또는 비-암성 세

포에 의한 상기 암 항원의 발현은 종양 또는 암 세포에 의한 발현만큼 확고하지 않다. 이에 관하여, 상기 종양 또는 암 세포는 정상, 비-종양, 또는 비-암성 세포에 의한 상기 항원의 발현에 비해, 상기 항원을 과-발현하거나 현저하게 더 높은 수준으로 발현할 수 있다. 또한, 상기 암 항원은 상이한 발생 또는 성숙화 상태의 세포에 의해 추가로 발현될 수 있다. 예를 들어, 상기 암 항원은 배아 또는 태아 단계의 세포(상기 세포는 성체 숙주에서 통상적으로 발견되지 않는다)에 의해 추가로 발현될 수 있다. 한편으로, 상기 암 항원은 줄기세포 또는 전구 세포(상기 세포는 성체 숙주에서 통상적으로 발견되지 않는다)에 의해 추가로 발현될 수 있다. 암 항원은 당해 분야에 공지되어 있으며, 예를 들면 메소텔린, CD19, CD22, CD276 (B7H3), gp100, MART-1, 상피 성장인자 수용체 변체 III(EGFRVIII), TRP-1, TRP-2, 타이로시나제, 돌연변이된 KRAS, NY-ESO-1(또한 CAG-3로서 공지됨), MAGE-1, MAGE-3 등을 포함한다.

[0024] 하나의 실시양태에서, 암 항원은 신생항원이다. 신생항원은 신생물 형질전환 중에 종양 세포 또는 암 세포에서 발생하는 유전자 돌연변이로부터 생성되는 종양-특이적 또는 암-특이적 항원이다. 신생항원은 환자에 특유할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 상기 신생항원은 면역원성 신생항원이다.

[0025] 암 항원은 본 명세서에 기재된 암 및 종양을 포함하여, 임의의 암 또는 종양 중 임의의 세포에 의해 발현되는 항원일 수 있다. 상기 암 항원은 단지 한 가지 유형의 암 또는 종양의 암 항원일 수 있으며, 따라서 상기 암 항원은 단지 한 가지 유형의 암 또는 종양과 관련되거나 이들의 특징이다. 한편으로, 상기 암 항원은 한 가지 유형보다 많은 암 또는 종양의 암 항원일 수 있다(예를 들어 이들의 특징일 수 있다). 예를 들어, 상기 암 항원은 유방 및 전립선암 세포에 의해 발현될 수 있고, 정상, 비-종양 또는 비-암 세포에 의해서는 전혀 발현되지 않을 수 있다.

[0026] 항원-특이적 mTCR에 의해 인식된 항원과 관련되거나 상기 항원에 의해 특성화되는 질환은 임의의 질환일 수 있다. 예를 들면, 상기 질환은 본 명세서에서 논의되는 바와 같은 암 또는 바이러스 질환일 수 있다.

[0027] 암은 급성 림프구성 암, 급성 골수성 백혈병, 포상 횡문근육종, 골암, 뇌암, 유방암, 항문, 항문관 또는 항문직장의 암, 눈암, 간내담관암, 관절암, 목, 쓸개 또는 흉막의 암, 코, 비강 또는 중이의 암, 구강암, 외음부암, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 암, 결장암, 식도암, 자궁경부암, 위장 유암종, 호지킨 림프종, 하인두암, 신장암, 후두암, 간암, 폐암, 악성 중피종, 흑색종, 다발성 골수종, 비인두암, 비-호지킨 림프종, 난소암, 췌장암, 복막, 장막 및 장간막암, 인두암, 전립선암, 직장암, 신장암(예를 들어 신세포 암종(RCC)), 소장암, 연조직암, 위암, 고환암, 갑상선암, 요관암 및 방광암 중 어느 하나를 포함한 임의의 암일 수 있다.

[0028] 본 명세서의 목적을 위해서, "바이러스 질환"은 사람에서 사람으로 또는 유기체에서 유기체로 전염될 수 있고 바이러스에 의해 야기되는 질환을 의미한다. 본 발명의 하나의 실시양태에서, 상기 바이러스 질환은 헤르페스 바이러스, 폭스 바이러스, 헤파드나바이러스, 유두종 바이러스, 아데노바이러스, 코로나바이러스, 오쏘믹소바이러스, 파라믹소바이러스, 플라비바이러스, 및 칼리시바이러스로 이루어지는 그룹 중에서 선택된 바이러스에 의해 야기된다. 예를 들어, 상기 바이러스 질환은 호흡기 세포융합 바이러스(RSV), 인플루엔자 바이러스, 헤르페스 단순 바이러스, 엡스타인 바 바이러스, 수두 바이러스, 거대세포바이러스, A형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 인간 T-림프친화성 바이러스, 칼리시바이러스, 아데노바이러스 및 아레나 바이러스로 이루어지는 그룹 중에서 선택된 바이러스에 의해 야기될 수 있다.

[0029] 바이러스 질환은 예를 들어 인플루엔자, 폐렴, 헤르페스, 간염, A형 간염, B형 간염, C형 간염, 만성 피로 증후군, 중증 급성 호흡기 증후군(SARS), 위장염, 장염, 심장염, 뇌염, 기관지염, 호흡기 유두종증, 뇌수막염, HIV/AIDS, 및 단핵증일 수 있다.

[0030] 본 발명의 하나의 실시양태에서, 상기 방법은 인간 T 세포를 mTCR을 발현하도록 변형시킴을 포함한다. 상기 T 세포를 단리하거나 정제할 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "단리된"이란 용어는 그의 자연 환경으로부터 제거되었음을 의미한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "정제된"이란 용어는 순도가 증가되었음을 의미하며, 여기에서 "순도"는 상대적인 용어로 반드시 절대적인 순도로서 해석되지는 않는다. "정제된" T 세포는 다른 자연적인 성분, 예를 들어 조직, 세포, 단백질, 핵산 등으로부터 분리된 T 세포를 지칭한다.

[0031] T 세포는 임의의 T 세포, 예를 들어 배양된 T 세포, 예를 들어 1차 T 세포, 또는 배양된 T 세포주, 예를 들어 주르캣(Jurkat), SupT1 등으로부터의 세포, 또는 비-마우스 포유동물로부터 수득된 T 세포일 수 있다. 상기 T 세포는 비-마우스 포유동물로부터 수득되는 경우, 다수의 공급원, 예를 들어 비제한적으로 혈액, 골수, 림프절, 흉선, 비장, 또는 다른 조직 또는 체액으로부터 수득될 수 있다. 세포를 또한 농축시키거나 정제시킬 수 있다. 바람직하게, 상기 T 세포는 인간 T 세포이다. 상기 T 세포는 임의의 유형의 T 세포일 수 있으며 임의의 발생

단계를 가질 수 있다, 예를 들어 비제한적으로 $CD4^+/CD8^+$ 이중 양성 T 세포, $CD4^+$ 헬퍼 T 세포, 예를 들어 Th_1 및 Th_2 세포, $CD4^+$ T 세포, $CD8^+$ 세포(예를 들어 세포독성 T 세포), 말초 혈액 단핵세포(PBMC), 말초 혈액 백혈구(PBL), 종양 침윤성 세포(TIL), 기억 T 세포, 미경험 T 세포 등일 수 있다.

[0032] 상기 방법은 인간 T 세포를, mTCR 또는 상기 mTCR을 암호화하는 핵산을 상기 인간 T 세포에 도입시키고 상기 인간 T 세포에 의한 상기 mTCR의 발현을 획득하기에 적합한 임의의 기법을 사용하여 상기 mTCR을 발현하도록 변형 시킴을 포함할 수 있다. 상기와 같은 기법은 예를 들어 문헌[Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012)]에 기재되어 있다. 인간 T 세포를 TCR을 발현하도록 변형시키기에 유용할 수 있는 기법의 예는 비제한적으로 형질감염, 형질전환, 형질도입, 전기천공, 및 유전자 편집 기법을 포함한다. 본 발명의 하나의 실시양태에서, 상기 인간 T 세포를 트랜스포손, 렌티바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터를 사용하여 변형시킨다. 트랜스포손의 예는 비제한적으로 슬리핑 뷰티(SLEEPING BEAUTY) 트랜스포손 시스템(SBTS)(인트렉손(Intrexon)(미국 메릴랜드주 저먼타운 소재) 및 지오팜(Ziopharm)(미국 메사추세츠주 보스턴 소재)으로부터 입수할 수 있다), 피기백(PIGGYBAC) 트랜스포손 시스템(트랜스포사젠(Transposagen, 미국 켄터키주 렉싱턴 소재)으로부터 입수할 수 있다), 및 Tol2 트랜스포손 시스템을 포함한다. 유전자 편집 기법의 예는 군집화되어 규칙적으로 산재된 짧은 회문구조 반복부(CRISPR)/Cas 시스템(문헌[Cheng et al., *Cell Res.*, 23: 1163-71 (2013)]), 메가뉴클레아제, 아연 집게 뉴클레아제(ZFN), 및 전사 활성제-유사 효과기-기반 뉴클레아제(TALEN)를 포함할 수 있다.

[0033] 상기 방법은 mTCR을 발현하는 다수의 인간 T 세포 및 상기 mTCR을 발현하지 않는 다수의 인간 T 세포를 포함하는 세포 집단을 생성시킴을 추가로 포함할 수 있다. 상기 mTCR을 발현하도록 인간 T 세포를 변형시킴은 가변적인 효율로 수행될 수 있다. 상응하게, 상기 mTCR을 발현하도록 인간 T 세포를 변형시킨 결과, 상기 mTCR을 발현하는 세포뿐만 아니라 상기 mTCR을 발현하지 않는 세포를 포함하는 혼합된 세포 집단을 생성시킬 수 있다.

[0034] 상기 방법은 상기 세포 집단을 (i) 방사선조사된 배양보조 세포, (ii) 하나 이상의 사이토카인, 및 (iii) 상기 mTCR의 쥐 불변 영역에 특이적으로 결합 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 존재하에서 배양하여, 상기 mTCR을 발현하지 않는 T 세포의 수보다 상기 mTCR을 발현하는 T 세포의 수를 선택적으로 확대시킴(또한 본 명세서에서 "선택적 확대"라 칭한다)을 추가로 포함할 수 있다.

[0035] 상기 방사선조사된 배양보조 세포는 T 세포의 수를 확대시키기에 적합한 임의의 방사선조사된 배양보조 세포를 포함할 수 있다. 본 발명의 하나의 실시양태에서, 상기 방사선조사된 배양보조 세포는 (i) 방사선조사된 동종이계 배양보조 세포; (ii) 방사선조사된 자기유래 배양보조 세포; 또는 (ii) (i)과 (ii) 모두를 포함한다. 사용되는 방사선조사된 배양보조 세포의 수는 제한되지 않으며 다양한 인자, 예를 들어 용도 및 수득하고자 하는 세포의 목적하는 수에 따라 숙련가에 의해 선택될 수 있다. 예를 들어, 2×10^7 의 배수의 방사선조사된 배양보조 세포는 소규모 조사 연구에서 확대에 유용할 수 있다. 1×10^8 의 배수의 방사선조사된 배양보조 세포는 중간 규모 확대에 유용할 수 있다. 5×10^8 의 약 2 내지 약 30배의 방사선조사된 배양보조 세포는 대규모 확대(예를 들어 임상적 생산)(전형적으로 약 1.5×10^{10})에 유용할 수 있다. 예를 들어, 상기 방법은 약 1×10^9 내지 약 4×10^9 의 동종이계 배양보조 세포 및/또는 자기유래 배양보조 세포, 바람직하게는 약 2×10^9 내지 약 3×10^9 의 동종이계 배양보조 세포 및/또는 자기유래 배양보조 세포를 사용할 수 있다.

[0036] 하나 이상의 사이토카인은 T 세포의 수를 확대시키기에 적합한 임의의 하나 이상의 사이토카인을 포함할 수 있다. 본 발명의 하나의 실시양태에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 인터류킨(IL)-2, IL-7, IL-12, IL-15, 및 IL-21 중 임의의 하나 이상을 포함한다.

[0037] 상기 방법은 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 존재하에서 세포 집단을 배양함을 추가로 포함할 수 있으며, 여기에서 상기 항체는 mTCR의 쥐 불변 영역에 특이적으로 결합한다. 상기 항체는 당해 분야에 공지된 임의의 유형의 면역글로불린일 수 있다. 예를 들어, 항체는 제조합 항체일 수 있다. 상기 항체는 임의의 아이소타입, 예를 들어 IgA, IgD, IgE, IgG(예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4), IgM 등을 가질 수 있다. 상기 항체는 단클론성 또는 다클론성일 수 있다. 상기 항체는 천연 항체, 예를 들어 포유동물, 예를 들어 토끼, 염소, 말, 닭, 햄스터, 인간 등으로부터 단리 및/또는 정제된 항체일 수 있다. 한편으로, 상기 항체는 유전자-조작된 항체, 예를 들어 인간화된 항체 또는 키메라 항체일 수 있다. 상기 항체는 단량체 또는 중합체 형태일 수 있다. 또한, 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 상기 mTCR의 쥐 불변 영역에 대한 임의의 수준의 친화성

또는 결합활성을 가질 수 있다.

- [0038] 본 발명의 하나의 실시양태에서, 상기 항체는 2개의 폴리펩타이드 체(중쇄 및 경쇄)를 포함하며, 이들은 각각 항체의 상보성 결정 영역(CDR)1, CDR2 및 CDR3를 포함하는 가변 영역을 포함한다. 상기 항체는 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2, 중쇄 CDR3, 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2 및 경쇄 CDR3를 포함할 수 있다. 본 발명의 하나의 실시양태에서, 상기 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0039] 항체의 항원-결합 부분은 적어도 하나의 항원-결합 부위를 갖는 임의의 부분일 수 있다. 본 발명의 하나의 실시양태에서, 상기 항원-결합 부분은 상기 항체의 중쇄 CDR1, 중쇄 CDR2, 중쇄 CDR3, 경쇄 CDR1, 경쇄 CDR2 및 경쇄 CDR3를 포함할 수 있다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 상기 항원-결합 부분은 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 상기 항체의 항원-결합 부분은 Fab 단편(Fab), F(ab')₂ 단편, Fab' 단편, Fv 단편, 단쇄 가변 영역 단편(scFv), 다이설파이드-안정화된 가변 영역 단편(dsFv), scFv2CH3, scFv4, scFv3, scFv2, scFv-Fc, 또는 (scFv)₂일 수 있다. 합성 펩타이드를 통해 항체 경쇄의 V 도메인에 연결된 항체 중쇄의 가변(V) 도메인을 포함하는 융합 단백질인 단쇄 가변 영역 단편(scFv)을 통상적인 재조합 DNA 기술 기법을 사용하여 생성시킬 수 있다. 유사하게, 다이설파이드-안정화된 가변 영역 단편(dsFv)을 재조합 DNA 기술에 의해 제조할 수 있다. 그러나, 상기 항체의 항원-결합 부분은 이들 예시적인 유형의 항원-결합 부분으로 제한되지 않는다. 항체, 및 그의 항원-결합 부분을 본 명세서에서 이후부터, 달리 명시되지 않는 한, 집합적으로 "항체"라 칭한다.
- [0040] 상기 항체는 mTCR의 쥐 불변 영역에 특이적으로 결합하는 임의의 항체일 수 있다. 본 발명의 하나의 실시양태에서, 상기 항체는 mTCR의 쥐 불변 영역에 특이적으로 결합하고 인간 TCR의 임의의 부분, 예를 들어 인간 TCR 불변 영역 또는 인간 TCR 복합체의 임의의 부분에 결합하지 않는다. 상기 TCR 복합체는 3개의 이량체형 신호전달 체: CD3 δ/ϵ , CD3 γ/ϵ 및 CD247 ζ/ζ 또는 ζ/η 와 함께 TCR α 및 TCR β 를 포함한다. 상기 CD3 δ/ϵ 및 CD3 γ/ϵ 체를 집합적으로 CD3 복합체라 칭한다.
- [0041] 상기 항체는 mTCR의 α 체의 쥐 불변 영역 또는 mTCR의 β 체의 쥐 불변 영역에 특이적으로 결합할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 상기 항체는 mTCR의 β 체의 쥐 불변 영역에 특이적으로 결합한다. 상기 항체가 특이적으로 결합하는 mTCR β 체의 쥐 불변 영역은 서열번호 1의 아미노산 서열(상기 mTCR β 체의 완전길이 쥐 불변 영역의 아미노산 서열)을 포함하거나 상기 서열로 이루어질 수 있다. 상기 항체는 mTCR β 체의 쥐 불변 영역의 임의의 부분에 특이적으로 결합할 수 있다. 예를 들어, 상기 항체는 서열번호 2의 아미노산 서열(상기 mTCR β 체의 완전길이 쥐 불변 영역의 예시적인 최소 에피토프의 아미노산 서열)에 특이적으로 결합할 수 있다. 본 발명의 하나의 실시양태에서, 상기 항체는 서열번호 1의 아미노산 서열의 아미노산 잔기 D2, R4, N5, T7, E101, D103, K104, W105, P106, E107, G108, S109, 및 P110에 특이적으로 결합한다.
- [0042] mTCR의 쥐 불변 영역에 특이적으로 결합하는 항체를 상업적으로 입수할 수 있다. 예를 들어, 상기 mTCR의 β 체의 쥐 불변 영역에 특이적으로 결합하는 항체는 H57 항체(또한 H57-597이라 칭한다)(바이오레전드(Biolegend, 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재)로부터 입수할 수 있다)이다. H57은 아르메니아 햄스터 IgG 항체이며 예를 들어 문헌[Kubo et al., *J. Immunol.*, 142(8): 2736-42 (1989)] 및 문헌[Grégoire et al., *PNAS*, 88: 8077-81 (1991)]에 기재되어 있다. 상기 H57 항체의 에피토프는 예를 들어 문헌[Wang et al., *EMBO J.*, 17(1): 10-26 (1998)]에 기재되어 있다. 상기 H57 항체는 서열번호 1의 아미노산 서열의 아미노산 잔기 D2, R4, N5, T7, E102, D104, K105, W106, P107, E108, G109, S110, 및 P111에 특이적으로 결합한다.
- [0043] 본 발명의 하나의 실시양태에서, 상기 항체는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함한다. 예를 들어, 상기 항체(Ab)는 서열번호 3(H57 Ab 중쇄의 가변 영역) 또는 서열번호 4(H57 Ab 경쇄의 가변 영역), 또는 서열번호 3 및 4 모두의 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 서열로 이루어지거나, 상기 서열로 필수적으로 이루어질 수 있다. 바람직하게, 상기 항체는 서열번호 3 및 4 모두의 아미노산 서열을 포함한다. 본 발명의 하나의 실시양태에서, 상기 항체는 서열번호 3의 H57 Ab 중쇄의 상보성 결정 영역(CDR)1, CDR2 및 CDR3, 및 서열번호 4의 H57 Ab 경쇄의 CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함한다.
- [0044] 본 발명의 하나의 실시양태에서, 상기 항체는 상기에 제시된 가변 영역들을 포함하는 중쇄 및 경쇄를 포함한다. 예를 들어, 상기 항체는 서열번호 5(H57 Ab 중쇄) 또는 서열번호 6(H57 Ab 경쇄), 또는 서열번호 5 및 6 모두의 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 서열로 이루어지거나, 상기 서열로 필수적으로 이루어질 수 있다. 바람직하게, 상기 항체는 서열번호 5 및 6 모두의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0045] 본 명세서에 기재된 바와 같이, (i) 방사선조사된 배양보조 세포, (ii) 하나 이상의 사이토카인, 및 (iii) 항체

의 존재하에서 세포 집단의 배양은 유리하게는 mTCR을 발현하는 T 세포의 수를 상기 mTCR을 발현하지 않는 T 세포의 수보다 선택적으로 확대시킨다. 이에 관하여, 본 발명의 방법은 유리하게는, TCR의 쥐 불변 영역에 특이적으로 결합하는 항체를 사용하지 않는 세포 집단의 확대 방법에 비해 상기 mTCR을 발현하는 세포를 보다 많은 비율로 갖는 세포 집단을 제공할 수 있다. 본 발명의 하나의 실시양태에서, 상기 방법은 상기 mTCR을 발현하는 T 세포의 수를 약 5배 이하 내지 약 4,000배 이상까지 증가시킨다. 예를 들어, 본 발명의 방법은 mTCR-발현 세포의 수를 약 5배 내지 약 4,000배, 약 100배 내지 약 3,500배, 약 1,000배 내지 약 3,000배, 약 1,500배 내지 약 2,500배, 약 10배 내지 약 1,000배, 약 50배 내지 약 850배, 약 100배 내지 약 900배, 약 150배 내지 약 850배, 약 200배 내지 약 800배, 약 250배 내지 약 750배, 약 300배 내지 약 700배, 약 350배 내지 약 650배, 또는 약 400배 내지 약 600배까지 증가시킬 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 방법은 mTCR-발현 세포의 수를 약 10배, 약 50배, 약 100배, 약 150배, 약 200배, 약 250배, 약 300배, 약 350배, 약 400배, 약 450배, 약 500배, 약 550배, 약 600배, 약 650배, 약 700배, 약 750배, 약 800배, 약 850배, 약 900배, 약 950배, 약 1,000배, 또는 상기 값들 중 임의의 2개의 범위까지 증가시킬 수 있다. 상기 배수의 확대는 약 10 내지 약 14 일, 바람직하게는 약 14일의 기간에 걸쳐 성취될 수 있다. 본 발명의 방법에 의해 성취되는 확대 배수는 고도로 가변적일 수 있으며 공여자-의존적일 수 있다.

[0046] 본 발명의 하나의 실시양태에서, 상기 방법은 선택적으로 확대된 세포 집단을 생성시키며, 여기에서 상기 선택적으로 확대된 집단 중 세포의 약 10% 내지 약 95%가 쥐 불변 영역을 포함하는 TCR을 발현한다. 이에 관하여, 상기 방법은 선택적으로 확대된 세포 집단을 생성시킬 수 있으며, 여기에서 상기 선택적으로 확대된 집단 중 세포의 약 10% 내지 약 95%, 약 15% 내지 약 90%, 약 20% 내지 약 85%, 약 25% 내지 약 80%, 약 30% 내지 약 75%, 약 35% 내지 약 70%, 또는 약 40% 내지 약 65%가 상기 mTCR을 발현한다. 상기 방법은 선택적으로 확대된 세포 집단을 생성시킬 수 있으며, 여기에서 상기 선택적으로 확대된 집단 중 세포의 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 또는 상기 값들 중 임의의 2개의 범위가 상기 mTCR을 발현한다.

[0047] 본 발명의 방법은 유리하게는, 다양한 용도 중 어느 하나에 적합할 수 있는 임의의 수의 mTCR-발현 T 세포를 생성시킬 수 있다. 본 발명의 하나의 실시양태에서, 상기 방법은 약 1×10^6 내지 약 1×10^{11} 또는 그 이상의, 상기 mTCR을 발현하는 T 세포를 생성시킬 수 있다. 예를 들어, 작은 용기(예를 들어 T25 플라스크) 중에서, 본 발명의 방법은 약 1×10^6 내지 약 1×10^7 의, 상기 mTCR을 발현하는 T 세포를 생성시킬 수 있다. 보다 큰 용기(예를 들어 T175 플라스크) 중에서, 본 발명의 방법은 약 5×10^6 내지 약 3×10^7 의, 상기 mTCR을 발현하는 T 세포를 생성시킬 수 있다. 다른 용기(예를 들어 GREX 플라스크, 윌슨 울프 매뉴팩처어링(Wilson Wolf Manufacturing, 미국 미네소타주 뉴 브라이언트 소재)으로부터 입수할 수 있다) 중에서, 본 발명의 방법은 약 1×10^9 내지 약 1×10^{10} 의, 상기 mTCR을 발현하는 T 세포를 생성시킬 수 있다. 약 1×10^6 내지 약 1×10^{10} 의, 상기 mTCR을 발현하는 T 세포의 집단은 소규모 선별 실험에 유용할 수 있다. 상기 mTCR을 발현하는 보다 많은 수의 세포, 예를 들어 약 1.5×10^{10} 또는 그 이상의 세포를 또한, 예를 들어 임상적 용도를 위해 본 발명의 방법을 사용하여 수득할 수 있다. 본 발명의 방법에 의해 생성되는 mTCR-발현 T 세포의 수는 고도로 가변적일 수 있으며 공여자-의존적일 수 있다.

[0048] 상기 방법은 단지 단일 라운드의 mTCR-발현 세포 수의 선택적 확대 또는 수회 라운드의 mTCR-발현 세포 수의 선택적 확대를 수행함을 포함할 수 있다. 본 발명의 하나의 실시양태에서, 상기 방법은 본 발명의 다른 양태에 관하여 본 명세서에 기재된 바와 같은 1회 라운드 이상의 선택적 확대에 이어서, 1회 라운드 이상의 세포 수의 비-선택적 확대를 수행함을 포함한다. 이에 관하여, 상기 방법은 인간 T 세포를 (i) 방사선조사된 동종이계 배양보조 세포 및 방사선조사된 자기유래 배양보조 세포 중 하나 또는 둘 다, (ii) 하나 이상의 사이토카인, 및 (iii) 인간 CD3 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 부분의 존재하에서 배양함을 추가로 포함할 수 있다(또한 본 명세서에서 "비-선택적 확대"라 칭한다). 상기 T 세포 수의 확대를 예를 들어 미국특허 제8,034,334호; 미국특허 제8,383,099호; 미국특허 출원 공보 제2012/0244133호; 문헌[Dudley et al., *J. Immunother.*, 26:332-42 (2003)]; 및 문헌[Riddell et al., *J. Immunol. Methods*, 128:189-201 (1990)]에 기재된 바와 같은 다수의 방법 중 어느 하나에 의해 수행할 수 있다. 예를 들어, 상기 T 세포의 수를 배양보조 림프구 및 인터류킨-2(IL-2) 또는 인터류킨-15(IL-15)(이때 IL-2가 바람직하다)의 존재하에서 인간 CD3 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 사용하여 비-선택적으로 확대시킬 수 있다. 상기 인간 CD3 복합체에 특이적으로 결합하는 항체의 일례는 OKT3(오쏘 맥네일(Ortho-McNeil, 미국 뉴저지주 래리턴 소

제)로부터 입수할 수 있다)이다.

- [0049] 수회 라운드의 선택적 확대, 또는 1회 라운드 이상의 선택적 확대에 이은 1회 라운드 이상의 비-선택적 확대는 mTCR의 수를 약 100,000배 이상까지 증가시킬 수 있다. 본 발명의 하나의 실시양태에서, 상기 방법은 세포 집단을 생성시키며, 여기에서 상기 집단 중 세포의 약 20% 내지 약 99%는 쥐 불변 영역을 포함하는 TCR을 발현한다. 수회 라운드의 선택적 확대, 또는 1회 라운드 이상의 선택적 확대에 이은 1회 라운드 이상의 비-선택적 확대는 세포 집단을 생성시킬 수 있으며, 여기에서 상기 집단 중 세포의 약 25% 내지 약 95%, 약 30% 내지 약 90%, 약 35% 내지 약 85%, 약 40% 내지 약 80%, 약 45% 내지 약 75%, 또는 약 50% 내지 약 70%가 상기 mTCR을 발현한다. 상기 방법은 세포 집단을 생성시킬 수 있으며, 여기에서 상기 집단 중 세포의 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99%, 또는 상기 값들 중 임의의 2개의 범위가 상기 mTCR을 발현한다.
- [0050] 본 발명의 하나의 실시양태에서, 상기 방법은 TCR의 쥐 불변 영역에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 부분을 사용하여 상기 TCR을 발현하지 않는 T 세포로부터 상기 TCR을 발현하는 T 세포를 분리시킴을 추가로 포함한다. 이에 관하여, 상기 방법은 항체가 상기 TCR의 쥐 불변 영역에 특이적으로 결합하도록 상기 항체를, mTCR을 발현하는 세포 및 상기 mTCR을 발현하지 않는 세포를 포함하는 혼합된 세포 집단과 물리적으로 접촉시킴을 포함할 수 있다. 상기 항체를 지지체, 예를 들어 비드에 부착시킬 수 있다. 상기 방법은 mTCR을 발현하지 않는 세포의 일부 또는 전부가 상기 mTCR을 발현하는 세포로부터 제거되도록 상기 항체와 상기 세포를 세척함을 추가로 포함할 수 있다. 상기 방법은 상기 항체로부터 상기 mTCR-발현 세포를 용출시킴을 추가로 포함할 수 있다. T 세포의 분리 기법의 예는 예를 들어 문헌[Deniger et al., *Mol. Ther.*, 24(6):1078-89 (2016)] 및 문헌[Field et al., *PLoS One*, 8(6):e68201 (2013)]에 기재되어 있다.
- [0051] 본 발명의 방법은 유리하게는, mTCR을 발현하는 세포가 농축된 세포 집단을 제공한다. 상응하게, 본 발명의 실시양태는 본 명세서에 기재된 방법 중 어느 하나에 의해 제조된 선택적으로 확대된 수의 T 세포를 포함하는 세포 집단을 제공한다. 상기 세포 집단은 상기 mTCR-발현 세포를 적어도 하나의 다른 세포, 예를 들어 상기 mTCR을 발현하지 않는 T 세포, 또는 T 세포 이외의 세포, 예를 들어 B 세포, 대식세포, 호중구, 적혈구, 간세포, 내피세포, 상피세포, 근세포, 뇌세포 등과 함께 포함하는 이종 집단일 수 있다. 한편으로, 상기 세포 집단은 주로 mTCR-발현 T 세포를 포함하는(예를 들어 상기 세포로 필수적으로 이루어지는), 실질적으로 동종의 집단일 수 있다. 상기 집단은 또한 세포의 클론 집단일 수 있으며, 여기에서 상기 집단의 모든 세포는 상기 mTCR을 발현하는 단일 T 세포의 클론이며, 따라서 상기 집단의 모든 세포는 상기 mTCR을 발현한다. 본 발명의 하나의 실시양태에서, 상기 세포 집단은 상기 mTCR을 발현하는 T 세포를 포함하는 클론 집단이다.
- [0052] 본 발명의 세포 집단을 단리 및/또는 정제할 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "단리된"이란 용어는 그의 자연 환경으로부터 제거되었음을 의미한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "정제된"이란 용어는 순도가 증가되었음을 의미하며, 여기에서 "순도"는 상대적인 용어이고 반드시 절대적인 순도로서 해석되지는 않는다. 예를 들어, 상기 순도는 적어도 약 50%일 수 있으며, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 95%를 초과할 수 있거나 약 100%일 수 있다.
- [0053] 본 발명의 세포 집단을 조성물, 예를 들어 약학 조성물로 제형화할 수 있다. 이에 관하여, 본 발명은 본 명세서에 기재된 세포 집단 중 어느 하나 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 본 발명의 약학 조성물은 본 발명의 세포 집단 중 어느 하나를 또 다른 약학적으로 활성인 작용제(들) 또는 약물(들), 예를 들어 화학요법제, 예를 들어 아스파라기나제, 부설판, 카보플라틴, 시스플라틴, 다우노루비신, 독소루비신, 플루오로우라실, 젬시타빈, 하이드록시우레아, 메토트렉세이트, 패클리탁셀, 리톡시맵, 빈블라스틴, 빈크리스틴 등과 함께 포함할 수 있다.
- [0054] 바람직하게, 상기 담체는 약학적으로 허용 가능한 담체이다. 약학 조성물에 관하여, 상기 담체는 T 세포에 통상적으로 사용되는 것들 중 어느 하나일 수 있다. 투여 가능한 조성물의 제조 방법은 당해 분야의 숙련가들에게 공지되거나 자명하며, 예를 들어 문헌[*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 22nd Ed., Pharmaceutical Press (2012)]에 보다 상세히 기재되어 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 사용 조건 하에서 유해한 부작용이나 독성이 없는 것이 바람직하다.
- [0055] 담체의 선택은 본 발명의 세포 집단을 투여하는데 사용되는 특정 방법에 의해 결정될 수 있다. 상응하게, 본 발명의 약학 조성물의 다양한 적합한 제형이 존재한다. 적합한 제형은 비경구, 피하, 정맥내, 근육내, 동맥내, 척추강내, 종양내, 또는 복강내 투여용 제형 중 어느 하나를 포함할 수 있다. 하나 초과와 경로를 본 발명의 세포 집단의 투여에 사용할 수 있으며, 몇몇 경우에, 특정한 경로가 또 다른 경로보다 더 즉각적이고 더 유효한

반응을 제공할 수 있다.

- [0056] 바람직하게, 본 발명의 세포 집단을 주사에 의해, 예를 들어 정맥내로 투여한다. 주사를 위한 세포의 약학적으로 허용 가능한 담체는 임의의 등장성 담체, 예를 들어 생리식염수(수 중 약 0.90% w/v의 NaCl, 수 중 약 300 mOsm/L의 NaCl, 또는 수 리터당 약 9.0 g NaCl), NORMOSOL R 용해질 용액(애보트(Abbott, 미국 일리노이주 시카고 소재)), PLASMA-LYTE A(박스터(Baxter, 미국 일리노이주 디어필드 소재)), 수 중 약 5% 텍스트로스, 또는 링거 락테이트를 포함할 수 있다. 하나의 실시양태에서, 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 인간 혈청 알부민이 보충된다. 주입용 약학 조성물은 IL-2를 함유할 수도, 또는 함유하지 않을 수도 있다. 상기 약학 조성물이 IL-2를 함유하는 경우, 약 300 IU/ml의 농도가 사용될 수 있다.
- [0057] 본 발명의 목적을 위해서, 투여되는 양 또는 용량(예를 들어 세포 수)은 합당한 시간 틀에 걸쳐 포유동물에서 효과, 예를 들어 치료학적 또는 예방학적 효과에 충분해야 한다. 예를 들어, 상기 용량(예를 들어 세포 수)은 투여 시간으로부터 약 2 시간 이상, 예를 들어 12 내지 24시간 이상의 기간 동안 질환-관련 항원에 결합하거나, 질환을 검출하거나, 치료하거나 예방하기에 충분해야 한다. 몇몇 실시양태에서, 상기 기간은 훨씬 더 길 수 있다. 상기 용량은 세포 집단의 효능 및 포유동물(예를 들어 인간)의 질환뿐만 아니라 치료되는 포유동물(예를 들어 인간)의 체중에 의해 결정될 것이다.
- [0058] 투여되는 용량을 결정하기 위한 다수의 분석이 당해 분야에 공지되어 있다. 본 발명의 목적을 위해서, 상이한 용량의 mTCR 발현 T 세포가 각각 제공되는 포유동물들의 집합 중에서, 포유동물에게 주어진 용량의 상기와 같은 T 세포를 투여할 때 표적 세포가 용해되거나 INF- γ 가 상기 T 세포에 의해 분비되는 정도를 비교함을 포함하는 분석을 사용하여, 포유동물에게 투여되는 출발 용량을 결정할 수 있다. 일정 용량의 투여시 표적 세포가 용해되거나 INF- γ 가 분비되는 정도를 당해 분야에 공지된 방법에 의해 분석할 수 있다.
- [0059] 본 발명의 세포 집단의 용량을 또한, 특정한 세포 집단의 투여가 동반할 수도 있는 임의의 부작용의 존재, 성질 및 정도에 의해 결정할 수 있다. 전형적으로, 주치의는 각 개인 환자를 치료하기 위해, 다양한 인자, 예를 들어 연령, 체중, 일반적인 건강, 식이, 성별, 투여되는 본 발명의 세포 집단, 투여 경로, 및 치료되는 질환의 중증도를 고려하여 상기 세포 집단의 투여량을 결정할 것이다. 하나의 실시양태에서 주입당 투여되는 세포 수는 예를 들어 약 1×10^6 내지 약 1×10^{12} 세포 이상으로 다양할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 적어도 약 1.5×10^{10} 세포가 투여될 수 있다.
- [0060] 본 발명의 방법에 의해 생성된 세포 집단은 질환, 예를 들어 암의 치료 또는 예방에 유용할 수 있다. 상응하게, 본 발명의 또 다른 실시양태는 포유동물에서 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 본 발명의 다른 양태에 관하여 본 명세서에 기재된 방법 중 어느 하나에 따라 T 세포의 수를 선택적으로 확대시키고 상기 선택적으로 확대된 수의 T 세포를 포유동물에게, 상기 포유동물에서 질환을 치료하거나 예방하기에 유효한 양으로 투여함을 포함한다.
- [0061] 세포 집단을 투여하는 본 발명의 방법의 목적을 위해서, 상기 세포는 포유동물에게 동종이계이거나 자기유래인 세포일 수 있다. 바람직하게, 상기 세포는 포유동물에게 자기유래이다.
- [0062] 본 발명의 하나의 실시양태에서, 상기 질환은 암이다. 상기 암은 본 발명의 다른 양태에 관하여 본 명세서에 기재된 암 중 어느 하나일 수 있다.
- [0063] 본 발명의 하나의 실시양태에서, 상기 질환은 바이러스 질환이다. 상기 바이러스 질환은 본 발명의 다른 양태에 관하여 본 명세서에 기재된 바이러스 질환 중 어느 하나일 수 있다.
- [0064] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "포유동물"이란 용어는 임의의 포유동물, 예를 들어 비제한적으로 쥐목의 포유동물, 예를 들어 마우스 및 햄스터, 및 토끼목의 포유동물, 예를 들어 토끼를 지칭한다. 상기 포유동물은 고양이과(고양이) 및 개과(개)를 포함한 식육목으로부터 유래하는 것이 바람직하다. 상기 포유동물은 소과(소) 및 돼지과(돼지)를 포함한 우제목 또는 말과(말)를 포함한 기제목으로부터 유래하는 것이 보다 바람직하다. 상기 포유동물은 영장류, 세보이드(Ceboid) 또는 시모이드(Simoid)(원숭이)목 또는 유인원목(인간 및 유인원)의 것이 가장 바람직하다.
- [0065] 본 명세서에 사용되는 바와 같이 "치료하다" 및 "예방하다"란 용어뿐만 아니라 상기 어간의 단어들은 100% 또는 완전한 치료 또는 예방을 반드시 의미하는 것은 아니다. 오히려, 당해 분야의 통상적인 숙련가가 잠재적인 이득 또는 치료학적 효과를 갖는 것으로서 인식하는 다양한 정도의 치료 또는 예방이 존재한다. 이에 관하여, 본 발명의 방법은 포유동물에서 임의의 크기의 임의의 수준의 치료 또는 예방을 제공할 수 있다. 더욱 또한, 본

발명의 방법에 의해 제공되는 치료 또는 예방은 치료되거나 예방되는 하나 이상의 질환, 예를 들어 암, 또는 그의 증상의 치료 또는 예방을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 방법에 의해 제공되는 치료 또는 예방은 종양의 퇴행을 촉진함을 포함할 수 있다. 또한, 본 명세서의 목적을 위해서, "예방"은 질환의 개시, 또는 그의 증상 또는 상태를 지연시킴을 포함할 수 있다.

[0066] 하기 실시예들은 본 발명을 추가로 예시하지만, 당연히 본 발명의 범위를 어떠한 식으로도 제한하는 것으로서 해석되어서는 안 된다.

[0067] 실시예 1

[0068] 본 실시예는 쥐 불변 영역을 포함하는 TCR(mTCR)을 발현하는 T 세포의 수의 선택적 확대가 상기 mTCR을 발현하는 세포의 수를 증가시킴을 입증한다.

[0069] 2개의 TCR, 즉 암-특이적인, 돌연변이된 ERBB2 신생항원에 대한 항원 특이성을 갖는 하나, 및 암 특이적인, 돌연변이된 ERBB2IP 신생항원에 대한 항원 특이성을 갖는 다른 하나를 암호화하는 RNA를 암 환자로부터 분리된 중앙 침윤성 림프구(TIL)로부터 분리하였다. cDNA를 역전사를 통해 상기 RNA로부터 증폭시킨 다음 상기 cDNA 사본을 PCR 증폭시켰다. mTCR 구조물(각각의 TCR에 대한 것)을 문헌[Deniger et al., *Mol. Ther.*, 24(6):1078-89 (2016)]에 기재된 바와 같이 제조하였다. 간단히, 알파(α) 및 베타(β)쇄 사이에 위치한 합성 링커 서열을 사용하여, 인간 TCR- α -V-J 영역을 마우스 TCR- α 불변 쇄에 융합시키고, 인간 TCR- β -V-D-J 영역을 마우스 TCR- β 불변 쇄에 융합시켰다(도 1a). 문헌[Deniger et al., *PLoS One*, 10(6):e0128151 (2015)] 및 문헌[Singh et al., *Cancer Res.*, 71(10): 3516-27 (2011)]에 기재된 바와 같이 2개의 mTCR 구조물을 모두 합성하고 슬리핑 뷰티 트랜스포존 시스템(SBTS) 플라스미드(인트렉손(미국 메릴랜드주 저먼타운 소재) 및 지오팜(미국 메사추세츠주 보스턴 소재)으로부터 입수할 수 있다)내에 클로닝하였다.

[0070] 본 발명의 하나의 실시양태에 따라 mTCR로 말초 혈액 단핵세포(PBMC)를 전기천공시키고 mTCR⁺ T 세포의 수를 선택적으로 확대시키는 방법을 예시하는 도식을 도 1b에 도시한다. 도 1b에 도시된 바와 같이, 각각 2개의 mTCR 중 하나를 암호화하는 SBTS 플라스미드(15 μ g) 및 트랜스포사제를 암호화하는 SBTS 플라스미드(5 μ g)를 각각 아막사 뉴클레오펙터(AMAXA NUCLEOFECTOR) II 장치 및 키트(론자(Lonza), 스위스 바젤 소재)를 사용하여 자기유래 PBMC(2×10^7)내로 전기천공시켰다. 24시간 후에, 상기 mTCR을 발현한 세포 및 상기 mTCR을 발현하지 않은 세포를 포함하는 전기천공된 세포의 혼합 집단을 수득하였다.

[0071] 도 1b에 도시된 바와 같이, 상기 혼합 집단 중 쥐 TCR 불변 영역을 발현하는 T 세포(mTCR⁺ T 세포)의 수를 선택적으로 확대시켰다. 상기 mTCR⁺ T 세포를 선택적으로 확대시키기 위해서, 상기 전기천공된 세포의 혼합 집단으로부터의 세포(2×10^6)를 (i) H57 항체(Ab)(바이오레전드, 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재) 또는 OKT3 항체, (ii) IL-2 및 (iii) IL-21의 존재하에서 방사선조사된 말초 혈액 림프구(PBL)(2×10^7)와 공-배양하였다.

[0072] 상기 mTCR⁺ T 세포 수의 선택적 확대에 이어서, 상기 세포를 (i) 항-CD3 Ab, 항-CD4 Ab, 또는 항-CD8 Ab 및 (ii) 항-mTCR β 항체(H57)로 염색하였다. 전기천공 완충제만으로 전기천공된 PBMC(모의)(TCR 없음)가 음성 대조용으로서 제공되었다.

[0073] 상기 염색된 세포를 형광 활성화된 세포 분류(FACS)에 의해 카운트하였다. 결과를 도 2에 도시한다. 도 2에 도시된 바와 같이, 상기 H57 Ab에 의한 선택적 확대는 OKT3에 비해 돌연변이-방지된 ERBB2 mTCR⁺ T 세포의 수 및 돌연변이-방지된 ERBB2IP mTCR⁺ T 세포의 수를 증가시켰다.

[0074] 실시예 2

[0075] 본 실시예는 보다 높은 수의 mTCR⁺이 보다 높은 농도의 H57 Ab에 의해 수득됨을 입증한다.

[0076] PBMC를 실시예 1에 기재된 바와 같이 항-ERBB2IP mTCR 또는 항-ERBB2 mTCR 구조물로 전기천공시켰다. 혼합 집단 중 쥐 TCR 불변 영역을 발현하는 T 세포(mTCR⁺ T 세포)의 수를 다양한 농도의 H57 Ab(0 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml, 또는 500 ng/ml)로 실시예 1에 기재된 바와 같이 선택적으로 확대시켰다.

- [0077] 상기 mTCR⁺ T 세포 수의 선택적 확대에 이어서, 상기 세포를 (i) 항-CD3 Ab, 항-CD4 Ab, 또는 항-CD8 Ab 및 (ii) 항-mTCR β 항체(H57)로 염색하였다. 전기천공 완충제만으로 전기천공된 PBMC(모의)(TCR 없음)가 음성 대조용으로서 제공되었다. H57 Ab에 의한 선택적 확대 대신에 OKT3 Ab(30 ng/ml)에 의한 표준 REP를 겪은 전기천공된 세포가 비-특이적인 T 세포 성장에 대한 양성 대조용으로서 제공되었다.
- [0078] 상기 염색된 세포를 FACS에 의해 카운트하였다. 결과를 도 3a 및 3b에 도시한다. 도 3a 및 3b에 도시된 바와 같이, 보다 높은 농도의 H57 Ab에 의해 보다 높은 수의 돌연변이-방지된 ERBB2 mTCR⁺ 및 돌연변이-방지된 ERBB2IP mTCR⁺ 세포가 수득되었다.
- [0079] **실시예 3**
- [0080] 본 실시예는 mTCR을 발현하는 T 세포의 수를 선택적으로 확대시키는 방법을 입증한다.
- [0081] 암-특이적인 p53-Y220C 신생항원에 대한 항원 특이성을 갖는 TCR을 암호화하는 RNA를 난소암 환자 4149로부터 분리된 종양 침윤성 림프구로부터 분리하였다. cDNA를 역전사를 통해 상기 RNA로부터 증폭시킨 다음 상기 cDNA 사본을 PCR 증폭시켰다. mTCR 구조물을, α 및 β 쇄 사이에 위치한 합성 링커 서열을 사용하여, 인간 TCR- α -V-J 영역을 마우스 TCR- α 불변쇄에 융합시키고, 인간 TCR- β -V-D-J 영역을 마우스 TCR- β 불변쇄에 융합시킴으로써 제조하였다(도 4b). mTCR 구조물을 합성하고 SBTS 플라스미드내에 클로닝하였다.
- [0082] 본 발명의 하나의 실시양태에 따라 mTCR로 PBMC를 전기천공시키고 mTCR⁺ T 세포의 수를 선택적으로 확대시키는 방법을 예시하는 도식을 도 4a에 도시한다. 도 4a에 도시된 바와 같이, 자기유래 PBMC를 환자로부터 수득하고 동결보존하였다. 동결보존된 PBMC(200 g)를 20 내지 23°C에서 10분간 해동시켰다. 상기 PBMC를 50/50 배지 (3×10^6 세포/ml)에 넣고 37°C에서 2시간 동안 배양하였다. 상기 mTCR을 암호화하는 SBTS 플라스미드 및 트랜스포사제를 암호화하는 SBTS 플라스미드를 야마사 뉴클레오펙터 II 장치 및 키트(론자, 스위스 바젤 소재)를 사용하여 자기유래 PBMC내로 전기천공시켰다. 인간 T 세포 뉴클레오펙터 용액(300 μ l)은 상기 mTCR을 암호화하는 SBTS 플라스미드(45 μ g) 및 트랜스포사제를 암호화하는 SBTS 플라스미드(15 μ g)를 함유하였다. 상기 인간 T 세포 뉴클레오펙터 용액을 큐벳에 가하였다(큐벳당 100 μ l). 전기천공된 세포를 37°C에서 밤새 웰(5 ml 50/50 배지/웰)에서 배양하였다. >18시간 후에, 50 U/ml 벤조나제를 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 상기 mTCR을 발현한 세포 및 상기 mTCR을 발현하지 않은 세포를 포함하는 전기천공된 세포의 혼합 집단을 수득하였다.
- [0083] 도 4a에 도시된 바와 같이, 37°C에서 18시간 넘게 배양 후에, 상기 혼합 집단 중 쥐 TCR 불변 영역을 발현하는 T 세포(mTCR⁺ T 세포)의 수를 선택적으로 확대시켰다. 상기 mTCR⁺ T 세포를 선택적으로 확대시키기 위해서, 상기 mTCR⁺ T 세포(5×10^5)를 H57 Ab(바이오레전드, 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재)(250 ng/ml), IL-2(50 IU/ml), 및 IL-21(30 ng/ml)의 존재하에서 방사선조사된 말초 혈액 림프구(PBL)(1×10^8)와 공-배양하였다.
- [0084] 상기 mTCR⁺ T 세포 수의 선택적 확대에 이어서, 상기 mTCR⁺ T 세포의 수를 표준 고속 확대 프로토콜(REP)을 사용하여 추가로 확대시켰다(실시예 5 참조). 상기 표준 REP에서, 선택적으로 확대된 mTCR⁺ T 세포(5×10^6)를 방사선 조사된 PBL(5×10^8), OKT3 항체(30 ng/ml), 및 IL-2(3000 IU/ml)와 공-배양하였다. 상기 OKT3 항체는 상기 인간 CD3 복합체내의 입실론-서브유닛상의 에피토프와 반응한다.
- [0085] **비교 실시예 1**
- [0086] 본 실시예는 선택적 확대의 부재하에서 mTCR을 발현하는 전기천공된 세포의 수를 입증한다.
- [0087] 자기유래 PBMC를 실시예 4에 기재된 바와 같이 mTCR을 암호화하는 SBTS 플라스미드 및 트랜스포사제를 암호화하는 SBTS 플라스미드로 전기천공시켰다. 음성 대조용은 형질감염되지 않은 자기유래 PBMC 및 전기천공 완충제만으로 전기천공된 PBMC(모의)를 포함하였다. 전기천공된 세포를 항-CD3 항체 및 항-mTCR β 항체(H57)로 염색하였다. 염색되지 않은, 형질감염되지 않은 자기유래 PBMC가 더욱 또 다른 음성 대조용으로서 제공되었다.
- [0088] 전기천공 다음날, 상기 염색된 세포를 실시예 4에 기재된 바와 같은 선택적 확대 없이, FACS에 의해 카운트하였다. 상기 FACS를 림프구/PI^(neg) 세포상에서 게이팅하였다. PI는 죽은세포에 대한 착색제이다. PI^(neg) 세포는 살아있는 세포이다.

[0089] 결과를 도 5A 내지 5D에 도시한다. 도 5A 내지 5D에 도시된 바와 같이 전체 집단 중 약간의 세포(전체 세포의 약 5%)가, 선택적 확대 없이 전기천공에 이어서 mTCR을 발현하였다.

[0090] **실시예 4**

[0091] 본 실시예는 H57 항체에 의한 전기천공된 T 세포의 선택적 확대가 혼합 집단 중에서 쥐 불변 영역을 포함하는 TCR을 발현하는 세포의 수를 선택적으로 증가시켰음을 입증한다.

[0092] 자기유래 PBMC를 실시예 3에 기재된 바와 같이, mTCR을 암호화하는 SBTS 플라스미드 및 트랜스포사제를 암호화하는 SBTS 플라스미드로 전기천공시켰다. 다양한 출발 수(1×10^5 , 5×10^5 , 또는 10×10^5)의 mTCR+ T 세포를 다양한 농도의 H57 Ab(250 ng/ml, 500 ng/ml 또는 750 ng/ml)를 사용하여 실시예 3에 기재된 바와 같이 선택적으로 확대시켰다. 실험은 초기 빈도를 기준으로 투입을 5×10^5 mTCR+ T 세포로 표준화하였다. 예를 들어, 5% mTCR 발현은 총 1×10^7 의 세포가 상기 확대 프로토콜을 시작하여 5×10^5 mTCR+ T 세포를 성취하였음을 의미한다. 전기천공 완충제만으로 전기천공된 PBMC(모의)가 음성 대조용으로서 제공되었다. 전기천공된, 선택적으로 확대된 세포를 항-CD3 항체 및 항-mTCR β 항체(H57)로 염색하였다.

[0093] 상기 염색된 세포를 FACS에 의해 카운트하였다. 상기 FACS를 림프구/PI^(neg) 세포상에서 게이팅하였다. 결과를 도 6 및 표 1 내지 2에 나타낸다. 도 6 및 표 1 내지 2에 나타낸 바와 같이, H57 Ab에 의한 선택적 확대는 집단 중 mTCR⁺ T 세포의 수를 증가시켰다.

표 1

mTCR+ T 세포의 초기 수	선택적 확대에 따른 세포의 총 수		
	250 ng/ml H57 Ab	500 ng/ml H57 Ab	750 ng/ml H57 Ab
1×10^5	1.59×10^7	2.02×10^7	2.96×10^7
5×10^5	4.34×10^7	4.94×10^7	4.89×10^7
10×10^5	4.76×10^7	6.02×10^7	6.06×10^7

표 2

전기천공된 세포의 초기 수	선택적 확대에 따른 mTCR ⁺ T 세포의 수		
	250 ng/ml H57 Ab	500 ng/ml H57 Ab	750 ng/ml H57 Ab
1×10^5	5.84×10^6	6.31×10^6	8.32×10^6
5×10^5	2.18×10^7	2.08×10^7	1.84×10^7
10×10^5	2.06×10^7	2.22×10^7	2.21×10^7

[0096] **실시예 5**

[0097] 본 실시예는 H57 Ab에 의한 1차 확대에 이은 OKT3 Ab에 의한 2차 확대가 mTCR⁺ T 세포의 수를 추가로 증가시켰음을 입증한다.

[0098] 이미, 실시예 4에 기재된 바와 같이 (i) 5×10^5 mTCR⁺ T 세포의 초기 수에서 (ii) 250 ng/ml의 H57 Ab에 의한 선택적 확대(본 실시예에서 "1차 확대"라 칭한다)를 겪은 전기천공된 세포를, (i) 실시예 3에 기재된 바와 같은 OKT3 Ab에 의한 표준 REP 또는 (ii) 실시예 4에 기재된 바와 같은 H57 Ab를 사용하여 GREX 플라스크(윌슨 올프 매트릭스케어링, 미국 미네소타주 세인트 폴 소재)에서 추가로 확대시켰다(본 실시예에서 "2차 확대"라 칭한다).

[0099] 상기 2차 확대에 이어서, 상기 세포를 항-CD3 항체 및 항-mTCR β 항체(H57)로 염색하였다. 상기 염색된 세포를

FACS에 의해 카운트하였다. 상기 FACS를 림프구/PI(neg) 세포상에서 게이팅하였다. 결과를 도 7에 도시한다.

[0100] 도 7에 도시된 바와 같이, H57 Ab에 의한 1차 확대에 이은 OKT3 Ab에 의한 2차 확대는 mTCR⁺ T 세포의 수를 추가로 증가시킨다. 상기 OKT3 Ab에 의한 2차 확대는 상기 mTCR⁺ T 세포의 수를 상기 H57 Ab에 의한 2차 확대에 비해 더 큰 정도로 증가시켰다.

[0101] 생육성 세포의 백분율, 세포의 총 수, 상기 2차 확대에 의해 성취된 세포 수의 변화 배수, mTCR⁺ T 세포의 수 및 상기 2차 확대에 의해 성취된 mTCR⁺ T 세포의 변화 배수를 또한, 상기 OKT3 Ab 및 H57 Ab에 의한 2차 확대를 겪은 세포에서 측정하고 비교하였다. 결과를 표 3에 나타낸다. 표 3에 나타난 바와 같이, H57 Ab에 의한 1차 확대에 이은 OKT3 Ab에 의한 2차 확대는 mTCR⁺ 세포의 수를 추가로 증가시킨다. 상기 OKT3 Ab에 의한 2차 확대는 상기 mTCR⁺ 세포의 수를 상기 H57 Ab에 의한 2차 확대에 비해 더 큰 정도로 증가시켰다.

표 3

	H57에 의한 2차 확대	OKT3에 의한 2차 확대
생육률(%)	97.7	98.3
세포의 총 수	3.31×10^9	6.33×10^9
세포의 총 수의 변화 배수	331	1266
mTCR ⁺ 세포의 수	6.38×10^8	2.40×10^9
mTCR ⁺ 세포 수의 변화 배수	128	480

[0103] 실시예 6

[0104] 본 실시예는 mTCR을 발현하는 T 세포 수의 선택적인 확대가 상기 mTCR을 발현하는 세포의 수를 증가시킴을 입증한다.

[0105] PBL을 0일째에 표준 방법을 사용하여 쥐 F5(mF5) 항-MART-1 TCR을 암호화하는 감마레트로바이러스 벡터로 형질도입시켰다. 10일째에, 형질도입된 세포를 2차 확대를 위해 제조하였다. 확대를 표 4에 제시된 바와 같이, (i) 변화하는 농도의 IL-2, (ii) 변화하는 비의 배양보조 세포, 및 (iii) OKT3 Ab(30 ng/ml) 또는 H57 Ab(50 ng/ml)를 사용하여 수행하였다.

표 4

세포	Mab	[IL-2](CU)	배양보조 세포 비
mF5	sOKT3	500	200:1
mF5	sOKT3	50	200:1
mF5	mTCRb	500	200:1
mF5	mTCRb	50	200:1
UTD	sOKT3	500	200:1
UTD	sOKT3	50	200:1
UTD	mTCRb	500	200:1
UTD	mTCRb	50	200:1

[0107] 도 8A 및 8B의 FACS 플롯은 OKT3 Ab 또는 H57 Ab에 의한 확대(예비-고속 확대 프로토콜(REP)) 이전의 형질도입되지 않은, 및 CD8 및 쥐 F5(mF5) 항-MART-1 TCR을 발현하는 형질도입된 세포의 백분율을 도시한다. 확대 이전의 형질도입 효율은 83.9%였다. 상기 형질도입된 집단을 확대 이전에 세포 배양 배지에서 대략 5% 쥐 TCR 베타쇄 양성(mTCRb⁺) 세포로 희석하였다(도 8C).

[0108] (ii) 500 또는 50 CU/IL-2 하에서 (i) OKT3(50 ng/ml) 또는 H57(50 ng/ml)에 의한 도 8C의 5% mTCRb⁺ 출발 집단 중 세포 수의 확대에 따른 결과를 도 9 및 10A 내지 10B에 도시한다. 상기 세포 수는 OKT3에 의해 대략 1500 내지 2300 배 확대되었지만, mTCRb⁺ 세포 집단 중 세포 수의 선택적인 확대는 보이지 않았다. 한편으로, 상기 세포 수는 H57에 의해 덜 확대되었지만(500 내지 800배), mTCRb⁺ 세포의 백분율에서 4 내지 8배의 증가를 보였다. 종합적으로, 확대에서 H57의 사용은 보다 많은 mTCRb⁺ 세포를 생성시켰다.

[0109] **실시예 7**

[0110] 본 실시예는 mTCR을 발현하는 T 세포 수의 선택적인 확대가 상기 mTCR을 발현하는 세포의 수를 증가시킴을 입증한다.

[0111] PBL을 실시예 6에 기재된 바와 같이 쥐 F5 TCR을 암호화하는 레트로바이러스 벡터로 형질도입시켰다. H57 또는 OKT3에 의한 확대 이전의 형질도입된 세포(출발 세포 집단)에 의한 CD8 및 mTCRb의 발현을 도 11A 내지 11C에 도시한다. 상기 출발 mTCR+ 집단은 원래 64.7%의 mTCRb+ 세포를 가졌다(도 11B). 상기 출발 mTCR+ 집단을 14% mTCRb+로 4배 희석하였다(도 11C).

[0112] 형질도입된 및 UT 세포의 수를 (i) IL-2 없이, 50 CU IL-2, 또는 500 CU IL-2 하에서 (ii) OKT3 Ab 또는 H57 Ab를 사용하여 확대시켰다. 결과를 도 12A 내지 12E 및 13A 내지 13B에 도시한다.

[0113] 확대 후에, 상기 OKT3 집단은 대략 동일한 백분율(5%)의 CD8+ 및 CD8- 형질도입된 세포를 갖는 전체적인 mTCRb+ 세포 집단의 선택적인 확대를 보이지 않았다. 비교에서, 2개의 H57-확대된 집단(각각 500 또는 50 CU/IL-2)은 모두, 각각 31.2% 및 59.1%의 선택적인 mTCRb+ 확대를 보였다. 50 CU/IL-2를 사용하는 H57 확대는 500 CU/IL-2 하에서 성장한 세포에 비해 거의 2배 더 큰 mTCRb+ 세포 확대를 보였다.

[0114] 도 13A 및 13B에 도시된 바와 같이, OKT3 또는 H57에 의해 확대된 세포의 수는 500 CU/IL-2의 존재하에서 대략 1400 내지 1600배 확대되었다. 그러나, H57 확대 + 50 CU/IL-2는 약 3500배 확대시켰고, 이는 시험된 다른 조건의 경우의 2배가 넘었다.

[0115] **실시예 8**

[0116] 본 실시예는 mTCR을 발현하는 T 세포 수의 선택적인 확대가 상기 mTCR을 발현하는 세포의 수를 증가시킴을 입증한다.

[0117] PBL을 실시예 6에 기재된 바와 같이 쥐 F5 TCR을 암호화하는 레트로바이러스 벡터로 형질도입시켰다. H57 또는 OKT3에 의한 확대 이전의 형질도입된 세포(예비-REP)에 의한 CD8 및 mTCRb의 발현을 도 14A 내지 14F에 도시한다.

[0118] 형질도입된 세포의 수를 (i) 50 CU IL-2 및 (ii) OKT3 Ab(30 ng/ml) 또는 H57 Ab(500, 50, 10, 5 ng/ml)를 사용하여 확대시켰다. 결과를 도 14A 내지 14F 및 도 15에 도시한다. 도 14A 내지 14F 및 도 15에 도시된 바와 같이, H57 항체의 농도를 선택적인 mTCRb+ 확대에 대한 어떠한 유해 영향 없이 10배 이하로 적정할 수 있다. 또한, 전체적인 확대 배수는 시험된 모든 그룹간에 유사하였다. H57에 의한 확대에 이은 CD8- 세포의 우선적인 확대가 또한 관찰되었다.

[0119] **실시예 9**

[0120] 본 실시예는 실시예 8에서 H57에 의한 제1 라운드의 확대와 OKT3 또는 H57에 의한 제2 라운드의 확대를 겪은 세포 수의 추가적인 확대를 입증한다.

[0121] 실시예 8에서 H57 Ab에 의한 확대를 겪은 mTCR-형질도입된 세포에 OKT3 또는 H57에 의한 2차 확대를 수행하여 mTCRb+ 세포의 추가적인 농축이 성취될 수 있는지의 여부를 측정하였다. 상기 확대 조건은 실시예 8에 기재된 바와 동일하였다.

[0122] 결과를 도 16A 내지 16E 및 도 17에 도시한다. OKT3에 의한 2차 확대는 mTCRb+ 세포를 추가로 농축시키지 않았지만 세포 수를 추가로 1000배 확대시켰다. H57에 의한 2차 확대는 mTCRb+ 세포의 어떠한 추가적인 농축도 더하지 않았으며 500 및 50 ng/ml에서 mTCRb+의 약간의 감소를 생성시켰을 수도 있다. H57에 의한 2차 확대를 겪은 집단의 확대 배수는 200 내지 500배의 범위로, 낮았다.

[0123] **실시예 10**

[0124] 본 실시예는 돌연변이-특이적 TCR이 전기천공 다음날 트랜스포손에 의해 발현됨을 입증한다.

[0125] 도 4a에 도시된 바와 같이, 자기유래 PBMC를 건강한 공여자 1 및 건강한 공여자 2로부터 수득하고 동결보존하였다. 동결보존된 PBMC를 해동시키고 20 내지 23℃에서 10분간 회전시켰다(200 g). 상기 PBMC를 50/50 배지 (3×10^6 세포/ml)에 넣고 37℃에서 2시간 동안 배양하였다. 2개의 TCR 중 하나를 암호화하는 SBTS 플라스미드 및 트랜스포사제를 암호화하는 SBTS 플라스미드를 야막사 뉴클레오펙터 II 장치 및 키트(론자, 스위스 바젤 소재)를 사용하여 자기유래 PBMC내로 전기천공시켰다. 상기 2개의 mTCR은 (1) 4149-HUWE1-TCR1(부류-I) 및 (2)

4149-TP53-TCRa2b2(부류-II)이었다. 인간 T 세포 뉴클레오펙터 용액(300 μl)은 상기 mTCR을 암호화하는 SBTS 플라스미드(45 μg) 및 트랜스포사제를 암호화하는 SBTS 플라스미드(15 μg)를 함유하였다. 2시간의 휴지 기간 후에, 비-흡착성 PBMC를 20 내지 23°C에서 10분간 회전(200 g)에 의해 수집하고, 배지를 제거하고 SBTS 플라스미드를 갖는 인간 T 세포 뉴클레오펙터 용액으로 교체하였다(큐벳당 100 μl 를 가하였다). 전기천공된 세포를 37°C에서 밤새 웰(5 ml 50/50 배지/웰)에서 배양하였다. >18시간 후에, 50 U/ml 벤조나제를 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 상기 mTCR을 발현한 세포 및 상기 mTCR을 발현하지 않은 세포를 포함하는 전기천공된 세포의 혼합 집단을 수득하였다.

[0126] 전기천공 다음날, 상기 전기천공된 세포를 (i) 항-CD3 Ab 및 (ii) 항-mTCR β Ab로 염색하였다. 염색되지 않은 PBMC, 형질감염되지 않은 PBMC, 및 전기천공 완충제만으로 전기천공된 PBMC(모의)(TCR 없음)가 음성 대조용으로서 제공되었다. 상기 전기천공된 세포에 의한 CD3 및 mTCR의 발현을 FACS에 의해 측정하였다(게이트: 림프구 \ 생(PI-)). 결과를 도 18에 도시한다. 도 18에 도시된 바와 같이, 돌연변이-특이적 TCR이 전기천공 다음날 트랜스포손에 의해 발현되었다.

[0127] 실시예 11

[0128] 본 실시예는 H57에 의한 1회 라운드의 확대가 mTCR⁺ T 세포 수의 선택적인 증식을 유도함을 입증한다.

[0129] 공여자 1 및 2로부터의 PBMC를 실시예 10에 기재된 바와 같이 전기천공시켰다. 도 4a에 도시된 바와 같이, 37°C에서 18시간 넘게 배양 후에, 혼합 집단 중의 쥐 TCR 불변 영역을 발현하는 T 세포(mTCR⁺ T 세포)의 수를 선택적으로 확대시켰다. mTCR⁺ T 세포의 수를 선택적으로 확대시키기 위해서, 상기 mTCR⁺ T 세포(5×10^5)를 H57 Ab(메인 바이오테크놀로지 서비스(Maine Biotechnology Services, 미국 메인주 포틀랜드 소재))(250 ng/ml), IL-2(50 IU/ml) 및 IL-21(30 ng/ml)의 존재하에서 방사선조사된 PBL(1×10^8)과 공-배양하였다.

[0130] 상기 선택적으로 확대된 세포를 염색하고 실시예 10에 기재된 바와 같이 FACS에 의해 평가하였다. 염색되지 않은 PBMC(도 19A) 및 전기천공 완충제만으로 전기천공된 PBMC(모의)(TCR 없음)(도 19B)가 음성 대조용으로서 제공되었다. 결과를 도 19A 내지 19B에 도시한다. 도 19A 내지 19B에서, 하나의 T175 플라스크로부터의 H57에 의한 1회 라운드의 확대 후 14일째에 세포수를 측정하였다. 도 19A 내지 19B에 도시된 바와 같이, H57에 의한 1회 라운드의 확대는 mTCR⁺ T 세포 수의 선택적인 증식을 유도하였다.

[0131] 실시예 12

[0132] 본 실시예는 기체 투과성 플라스크에서 OKT3에 의한 제2 라운드의 확대와 함께 H57에 의한 제1 라운드의 확대를 겪은 세포 수의 추가적인 확대가 TCR-트랜스포즈된 T 세포 수의 대규모 확대를 생성시킴을 입증한다.

[0133] 공여자 1 및 2로부터의 PBMC를 실시예 10에 기재된 바와 같이 전기천공시켰다. 상기 트랜스포즈된 세포의 수를 실시예 11에 기재된 바와 같이 H57 항체에 의해 선택적으로 확대시켰다. mTCR⁺ T 세포 수의 선택적인 확대에 이어서, 상기 mTCR⁺ T 세포의 수를 표준 REP를 사용하여 추가로 확대시켰다. 표준 REP에서, 상기 선택적으로 확대된 mTCR⁺ T 세포(5×10^6)를 방사선조사된 PBL(5×10^8), OKT 항체(30 ng/ml) 및 IL-2(3000 IU/ml)와 공-배양하였다.

[0134] 상기 선택적으로 확대된 세포를 염색하고 실시예 10에 기재된 바와 같이 FACS에 의해 평가하였다. 염색되지 않은 PBMC(도 20A) 및 전기천공 완충제만으로 전기천공된 PBMC(모의)(TCR 없음)(도 20B)가 음성 대조용으로서 제공되었다. 하나의 GREX-100 기체 투과성 플라스크(윌슨 울프 코포레이션, 미국 미네소타주 세인트 폴 소재)로부터 표준 REP 후 14일째의 세포수를 표 5에 나타낸다. H57에 의한 선택적 확대 후 14일째에 mTCR⁺ 세포의 백분율을 표 6에 나타낸다.

표 5

[0135]	4149-HUWE1-TCR1 세포수	4149-TP53-TCRa2b2 세포수
공여자 1	1.2×10^{10} 세포	1.2×10^{10} 세포
공여자 2	9.3×10^9 세포	8.9×10^9 세포

표 6

[0136]

	4149-HUWE1-TCR1 % mTCR+	4149-TP53-TCRa2b2 % mTCR+
공여자 1	35.2%	32.4%
공여자 2	76.8%	84.3%

[0137]

결과를 도 20A 및 20B에 도시한다. 도 20A 및 20B에 도시된 바와 같이, 기체 투과성 플라스크에서 OKT3에 의한 제2 라운드의 확대와 함께 H57에 의한 제1 라운드의 확대를 겪은 세포 수의 추가적인 확대는 TCR-트랜스포즈된 T 세포 수의 대규모 확대를 생성시켰다.

[0138]

실시예 13

[0139]

본 실시예는 H57 항체에 의해 선택적으로 확대된 TCR-트랜스포즈된 T 세포가 동족의 돌연변이된 신생항원에 특이적임을 입증한다.

[0140]

공여자 1 및 2로부터의 PBMC를 실시예 10에 기재된 바와 같이 전기천공시켰다. 상기 전기천공된 세포의 수를 실시예 11에 기재된 바와 같이 H57 항체로 선택적으로 확대시켰다. 4149-HUWE1-TCR1은 돌연변이된 HUWE1을 인식한다. 4149-TP53-TCRa2b2는 돌연변이된 TP53(Y220C)을 인식한다.

[0141]

미성숙 DC를 야생형(WT) HUWE1 펩타이드, 돌연변이된 HUWE1 펩타이드, WT TP53, 또는 돌연변이된 TP53으로 펄스화시켰다. HUWE1 펩타이드를 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 펄스화하였다. TP53 펩타이드를 10 ng/mL 에서 펄스화하였다. 5×10^4 펩타이드-펄스화된 미성숙 DC 및 10^5 T 세포의 공-배양물을 37°C에서 밤새 배양하였다. 단독으로 배양된 DC 및 DMSO로 펄스화된 DC가 대조용으로 제공되었다. IFN- γ 분비를 ELISA(효소-연결 면역흡수 분석)에 의해 측정하였다.

[0142]

결과를 도 21A 내지 21D에 도시한다. 도 21A 내지 21D에 도시된 바와 같이, H57 항체에 의해 선택적으로 확대된 TCR-트랜스포즈된 T 세포는 동족의 돌연변이된 신생항원을 인식하였다.

[0143]

실시예 14

[0144]

본 실시예는 mTCR을 발현하는 T 세포의 수를 선택적으로 확대시키는 방법을 입증한다.

[0145]

본 발명의 하나의 실시양태에 따라 mTCR로 PBMC를 전기천공시키고 mTCR⁺ T 세포의 수를 선택적으로 확대시키는 방법을 예시하는 도식을 도 22에 도시한다. 도 22에 도시된 바와 같이, 자기유래 PBMC를 환자로부터 수득하고 동결보존하였다. 상기 PBMC 중 일부는 LD 컬럼에 의해 CD4⁺ 세포가 고갈되었다. 상기 동결보존된 PBMC를 완전 배지(CM)에서 해동시키고 약 22°C에서 10분간 175 g에서 회전시켰다. 상기 세포를 행크의 균형 염 용액(HBSS)에서 세척하고 카운트하였다. 세포수는 6×10^7 이었다.

[0146]

도 22에 도시된 바와 같이, mTCR(4149-HUWE1-TCR1 또는 4149-TP53-TCRa2b2)을 암호화하는 SBTS 플라스미드 및 트랜스포사제를 암호화하는 SBTS 플라스미드를 아막사 뉴클레오펙터 II 장치 및 키트(론자, 스위스 바젤 소재)를 사용하여 자기유래 PBMC내로 전기천공시켰다. 인간 T 세포 뉴클레오펙터 용액(300 μL)은 상기 mTCR을 암호화하는 SBTS 플라스미드(45 μg) 및 트랜스포사제를 암호화하는 SBTS 플라스미드(15 μg)를 함유하였다. 상기 인간 T 세포 뉴클레오펙터 용액을 상기 세포에 가하고 이어서 세포 및 DNA의 혼합물을 큐벳에 가하였다(큐벳당 100 μL).

[0147]

도 22에 도시된 바와 같이, 전기천공된 세포를 37°C에서 밤새 웰 중에서 배양하였다(CM(5 mL), IL-2(50 IU/mL) 및 IL-21(30 ng/mL)/웰). >18 시간 후에, 50 U/mL 벤조나제를 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 세포를 수확하고, 염색하고 mTCR 발현을 FACS에 의해 측정하였다. 상기 mTCR을 발현한 세포(mTCR⁺>1%) 및 상기 mTCR을 발현하지 않은 세포를 포함하는 전기천공된 세포의 혼합 집단을 수득하였다.

[0148]

도 22에 도시된 바와 같이, 37°C에서 18시간 넘게 배양 후에, 상기 혼합 집단 중의 쥐 TCR 불변 영역(mTCR⁺ T 세포)을 발현하는 T 세포의 수를 선택적으로 확대시켰다. mTCR⁺ T 세포의 수를 선택적으로 확대시키기 위해서, 상기 전기천공된 세포(5×10^6)를 H57 Ab(메인 바이오테크놀로지 서비스, 미국 메인주 포틀랜드 소재)(250 $\text{ng}/$

mℓ), IL-2(50 IU/mℓ) 및 IL-21(30 ng/mℓ)의 존재하에서 방사선조사된 PBL(1×10^8)과 공-배양하였다.

[0149] 도 22에 도시된 바와 같이, 세포를 13일 동안 배양하였다. 상기 13-일의 기간 동안, 상기 세포를 2 내지 3일마다 IL-2(50 IU/mℓ) 및 IL-21(30 ng/mℓ)과 함께 50/50 CM으로 공급하였다.

[0150] 도 22에 도시된 바와 같이, mTCR+ 세포를, LS 컬럼(밀테니 바이오텍(Miltenyi Biotec))에서 항-비오틴 항체 및 비오틴화된 H57 항체와 접합된 미세비드(밀테니 바이오텍, 독일 베르기쉬 글래드바하 소재)와 접촉시킴으로써 추가로 농축시켰다.

[0151] 상기 H57-접합된 비드에 의한 상기 mTCR+ 세포의 농축에 이어서, 상기 mTCR⁺ T 세포의 수를 표준 REP를 사용하여 추가로 확대시켰다. 표준 REP에서, 선택적으로 확대된 mTCR⁺ T 세포(5×10^6)를 방사선조사된 PBL(5×10^8), OKT 항체(30 ng/mℓ) 및 IL-2(3000 IU/mℓ)와 공-배양하였다.

[0152] 추적된 타임라인은 하기와 같았다:

[0153] · 0일째 = 전기천공(2×10^7 종 PBMC(TP53-TCR) 또는 CD4-고갈된 PBMC(HUWE1-TCR))

[0154] · 1일째 = H57 REP(T175 플라스크; 5×10^6 세포, 1×10^8 방사선조사된 PBMC, 250 ng/mℓ H57, 50 IU/mℓ IL-2, 30 ng/mℓ IL-21)

[0155] · 14일째 = H57 비드 농축(H57-비오틴 mAb(GMP), CliniMACS 비오틴 비드, LS 컬럼)

[0156] · 15일째 = OKT3 REP(GREX-100 플라스크; 5×10^6 세포, 5×10^8 방사선조사된 PBMC, 30 ng/mℓ OKT3, 3000 IU/mℓ IL-2)

[0157] · 28일째 = 수확, 표현형, 공-배양.

[0158] 실시예 15

[0159] 본 실시예는 실시예 14에 기재된 방법 중 4개의 시점에서 수득된 세포의 총 수 및 CD3+mTCR+ 세포의 백분율을 입증한다.

[0160] 실시예 14에 기재된 방법을 수행하였다. 하나의 큐벳 중 총 세포수 및 하나의 큐벳 중 CD3+mTCR+ 세포의 백분율을 실시예 14에 기재된 방법 중 4개의 시점에서 측정하였다: 전기천공에 이어서, H57에 의한 선택적 확대에 이어서, H57-접합된 비드에 의한 농축에 이어서, 및 OKT3에 의한 표준 REP에 이어서.

[0161] 세포를 상기 전기천공 및 H57-접합된 비드 농축 후에 남겨두었다. 이론적 수율, 그러나 오히려 실제 수율을 반영하기 위해 수를 조절하지 않았다.

[0162] 결과를 도 23A(총 세포수) 및 도 23B(CD3+mTCR+ 세포의 백분율)에 도시한다.

[0163] 실시예 16

[0164] 본 실시예는 실시예 14에 기재된 방법의 28일째(OKT3 REP-후)에 측정된 mTCRβ+ 세포의 백분율을 입증한다.

[0165] 실시예 14에 기재된 방법을 수행하였다. mTCRβ+ 세포의 백분율을 28일째(OKT3 REP-후)에 FACS에 의해 측정하였다. 결과를 도 23C 내지 23D에 도시한다. 전기천공 완충제만으로 전기천공된 PBMC(모의)(TCR 없음)가 도 23C 내지 23D에서 음성 대조용으로서 제공되었다.

[0166] CD4+mTCRβ+ 또는 CD8+mTCRβ+ 세포의 백분율을 28일째(OKT3 REP-후)에 FACS에 의해 측정하였다. 결과를 도 23E에 도시한다.

[0167] 실시예 17

[0168] 본 실시예는 실시예 14에 기재된 바와 같은 세포 수의 확대 전(1일째) 및 후(28일째)의 세포의 기억 세포 표현형을 입증한다.

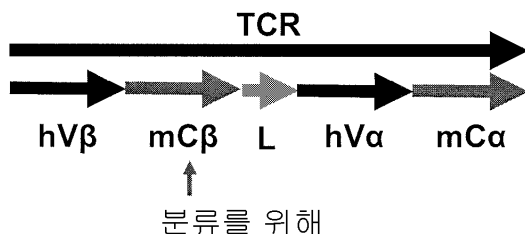
[0169] 실시예 14에 기재된 방법을 수행하였다. 기억 표현형 마커의 발현을 세포 수의 확대 전(1일째) 및 후(28일째)에 측정하였다. 결과를 도 24A 내지 24D에 도시한다.

[0170] 실시예 18

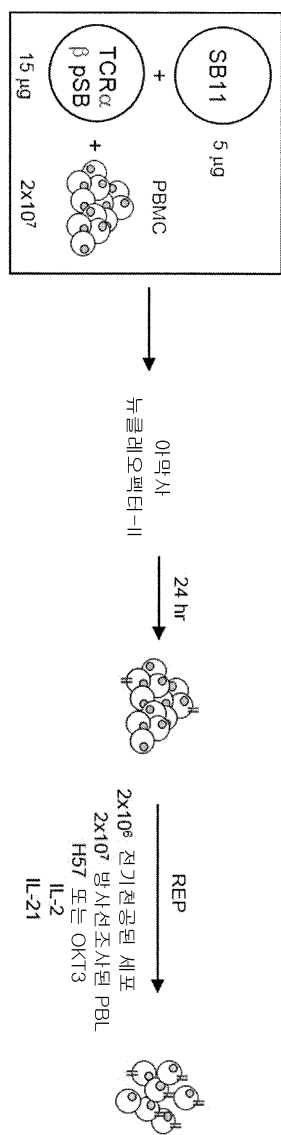
- [0171] 본 실시예는 실시예 14에 기재된 바와 같은 세포 수의 확대에 따른 T 세포의 특이성을 입증한다.
- [0172] 실시예 14에 기재된 방법을 수행하였다. 미성숙 DC를 10, 1 또는 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 WT HUWE1 펩타이드, 돌연변이된 HUWE1 펩타이드, WT TP53 펩타이드, 또는 돌연변이된 TP53 펩타이드로 펄스화하였다. 펩타이드-펄스화된 미성숙 DC 및 트랜스포즈된 T 세포의 공-배양물을 37°C에서 밤새 배양하였다. DMSO로 펄스화된 DC가 대조용으로서 제공되었다. IFN- γ 분비를 ELISA에 의해 측정하였다. 결과를 도 25A 및 25B에 도시한다.
- [0173] 본 명세서에 인용된 공보, 특허 출원 및 특허를 포함한 모든 참고문헌은, 각각의 참고문헌이 개별적이고 구체적인 참조에 의한 포함임을 나타내는 바와 동일한 정도로 본 명세서에 참고로 인용되며 내용 전체가 본 명세서에 제시되었다.
- [0174] 본 발명을 기재하는 상황에서(특히 하기 청구항의 상황에서) 단수형 및 "적어도 하나"의 용어 및 유사한 지시대상의 사용은 본 명세서에서 달리 나타내거나 문맥에 의해 명백히 반박되지 않는 한, 단수 및 복수를 모두 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 하나 이상의 항목의 목록이 이어지는 "적어도 하나"란 용어(예를 들어, "A 및 B 중 적어도 하나")의 사용은 본 명세서에서 달리 나타내거나 문맥에 의해 명백히 반박되지 않는 한, 나열된 항목 중에서 선택된 하나의 항목(A 또는 B) 또는 나열된 항목 중 2개 이상의 임의의 조합(A 및 B)을 의미하는 것으로 해석되어야 한다. "포함하는", "갖는", "내포하는" 및 "함유하는"이란 용어는 달리 나타내지 않는 한, 개방형 용어(즉 "비제한적으로 포함하는"을 의미하는)로서 해석되어야 한다. 본 명세서에서 값의 범위의 인용은 본 명세서에서 달리 나타내지 않는 한, 단지 상기 범위내에 있는 각각의 별도의 값을 개별적으로 지칭하는 약기법으로서 제공되고자 하며, 각각의 별도의 값은 상기가 본 명세서에 개별적으로 인용되는 것처럼 명세서에 인용된다. 본 명세서에 기재된 모든 방법을 본 명세서에서 달리 나타내거나 문맥에 의해 명백히 반박되지 않는 한, 임의의 적합한 순서로 수행할 수 있다. 본 명세서에 제공된 모든 예, 또는 예시적인 말(예를 들어 "와 같은")의 사용은 단지 본 발명을 보다 양호하게 예시하고자 하는 것이며 달리 청구되지 않는 한 본 발명의 범위에 대한 제한을 제기하지 않는다. 본 명세서의 말을, 임의의 청구되지 않은 요소를 본 발명의 실시예 필수적인 것을 가리키는 것으로서 해석해서는 안 된다.
- [0175] 본 발명을 수행하기 위해 본 발명자에게 공지된 최선의 방식을 포함하여 본 발명의 바람직한 실시양태를 본 명세서에 기재한다. 상기 바람직한 실시양태의 변화는 상기 기재의 관독시 당해 분야의 통상적인 숙련자에게 자명해질 수 있다. 본 발명자는 숙련가들이 상기와 같은 변화를 적합하게 사용할 것으로 예상하며, 본 발명자는 본 발명을 본 명세서에 구체적으로 기재된 바와 달리 실시하고자 한다. 상응하게, 본 발명은 적용 가능한 법에 의해 허용되는 바와 같이 본 발명에 첨부된 청구항에 인용된 발명의 요지의 모든 변형 및 균등물을 포함한다. 더욱이, 상술한 요소의 임의의 조합이 그의 모든 가능한 변화로, 본 명세서에서 달리 나타내거나 문맥에 의해 명백히 반박되지 않는 한, 본 발명에 의해 포함된다.

도면

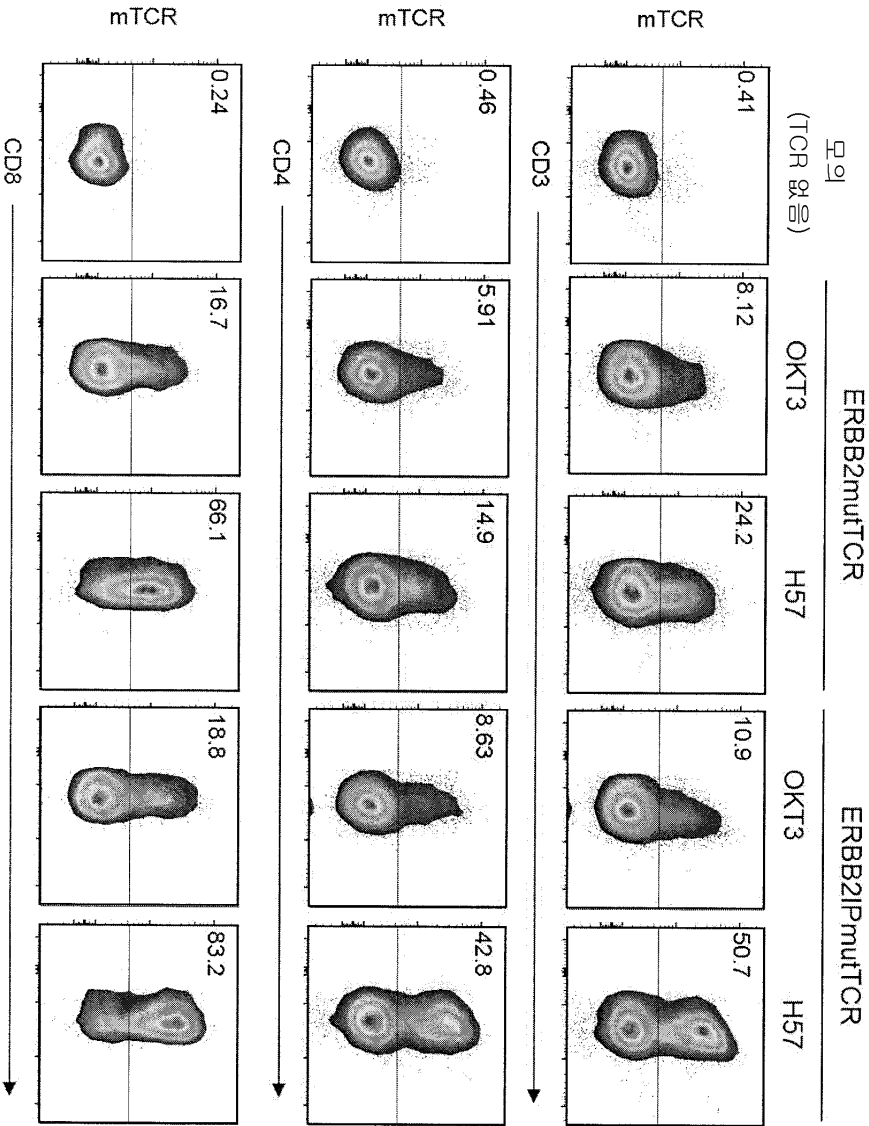
도면1a



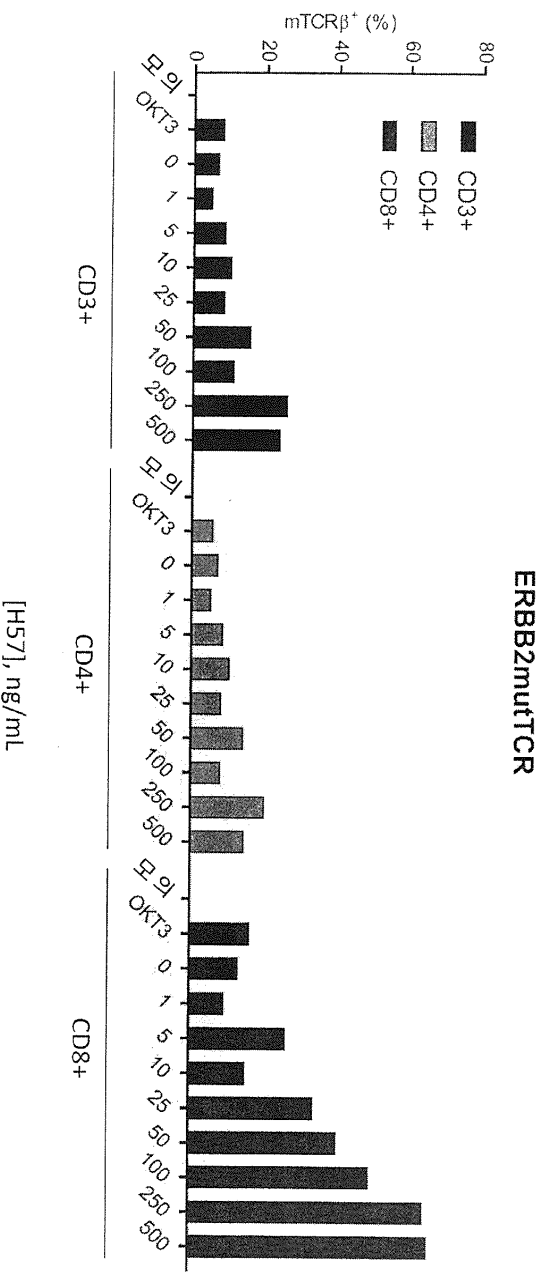
도면1b



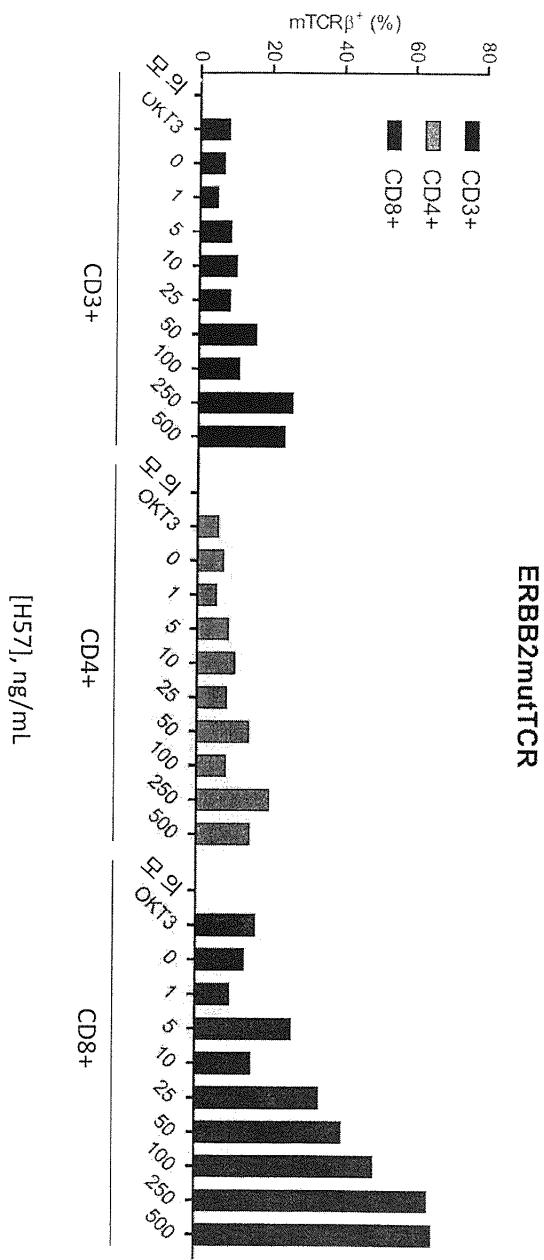
도면2



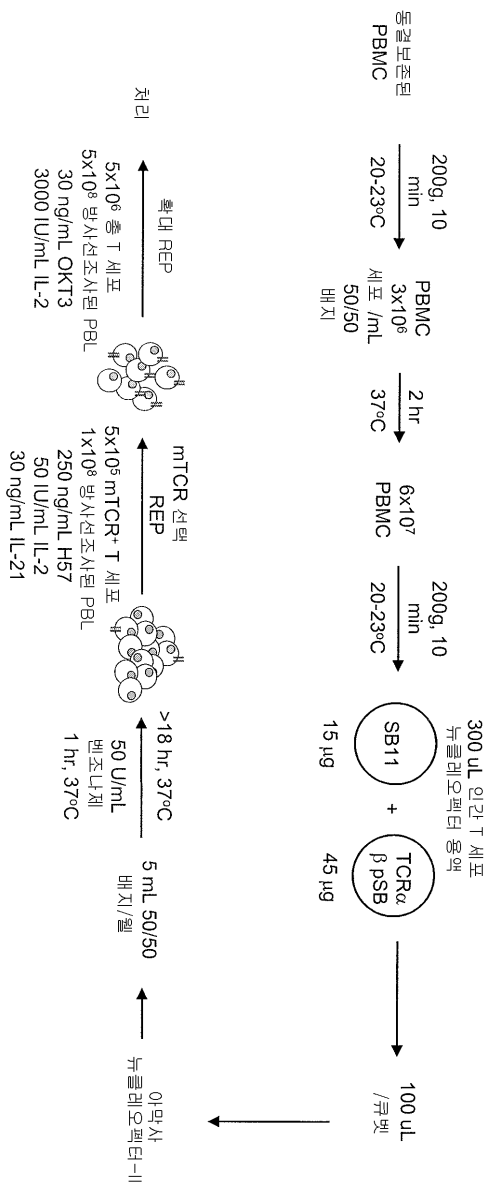
도면3a



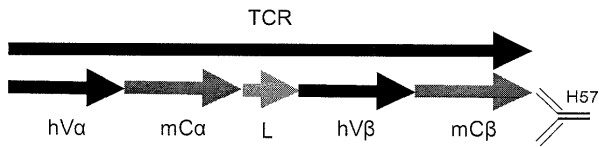
도면3b



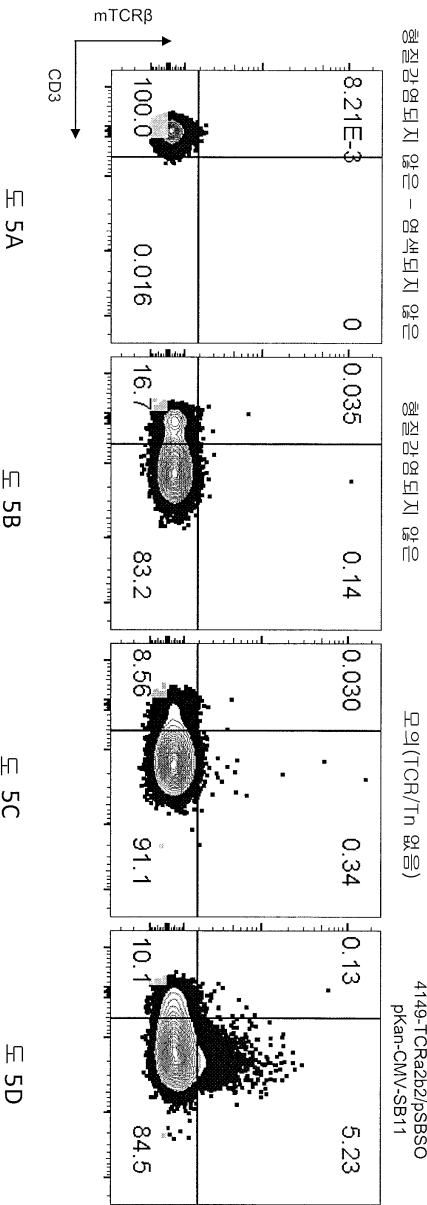
도면4a



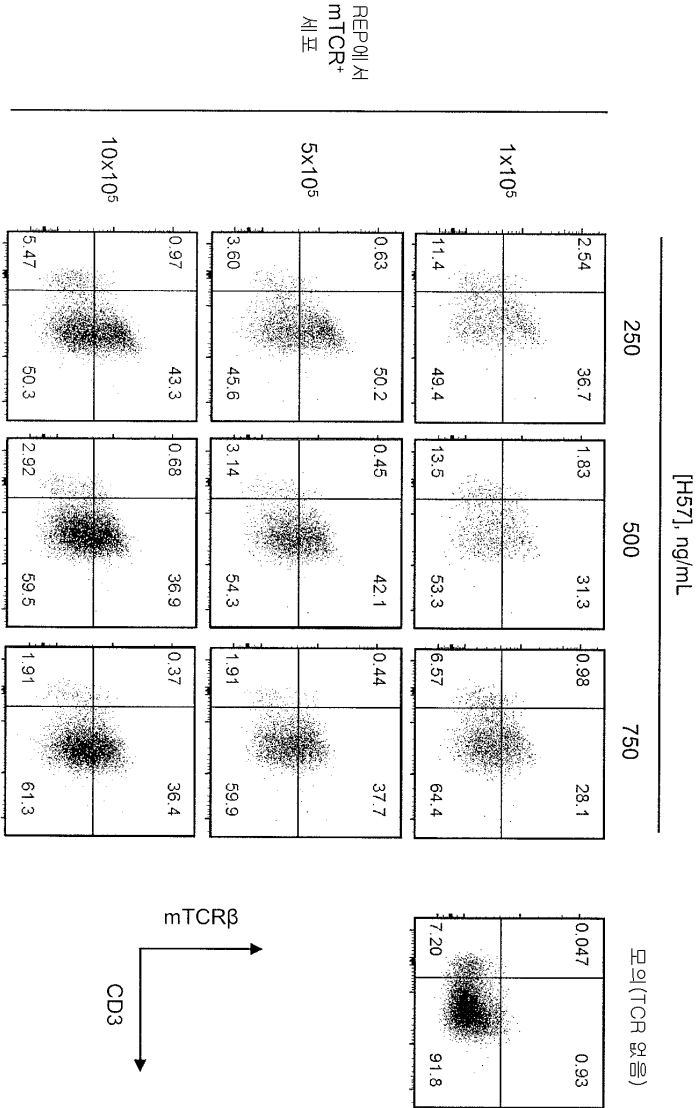
도면4b



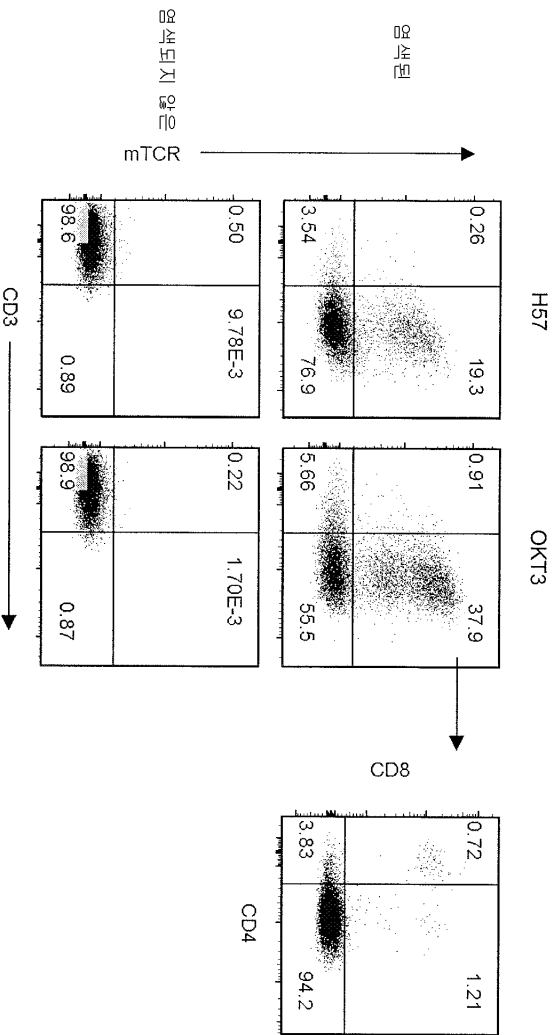
도면5



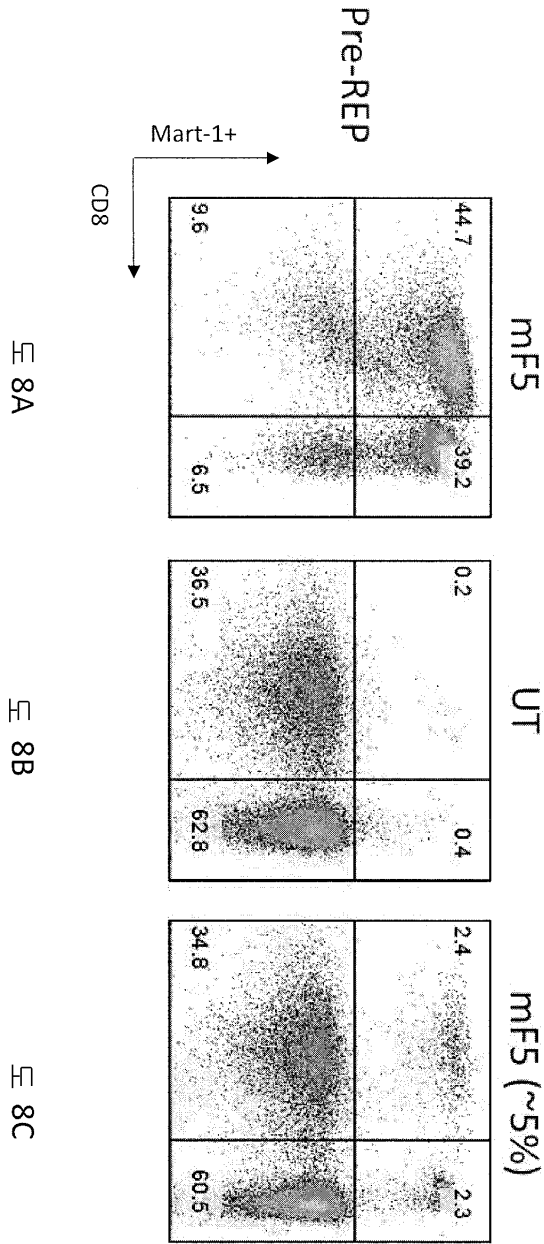
도면6



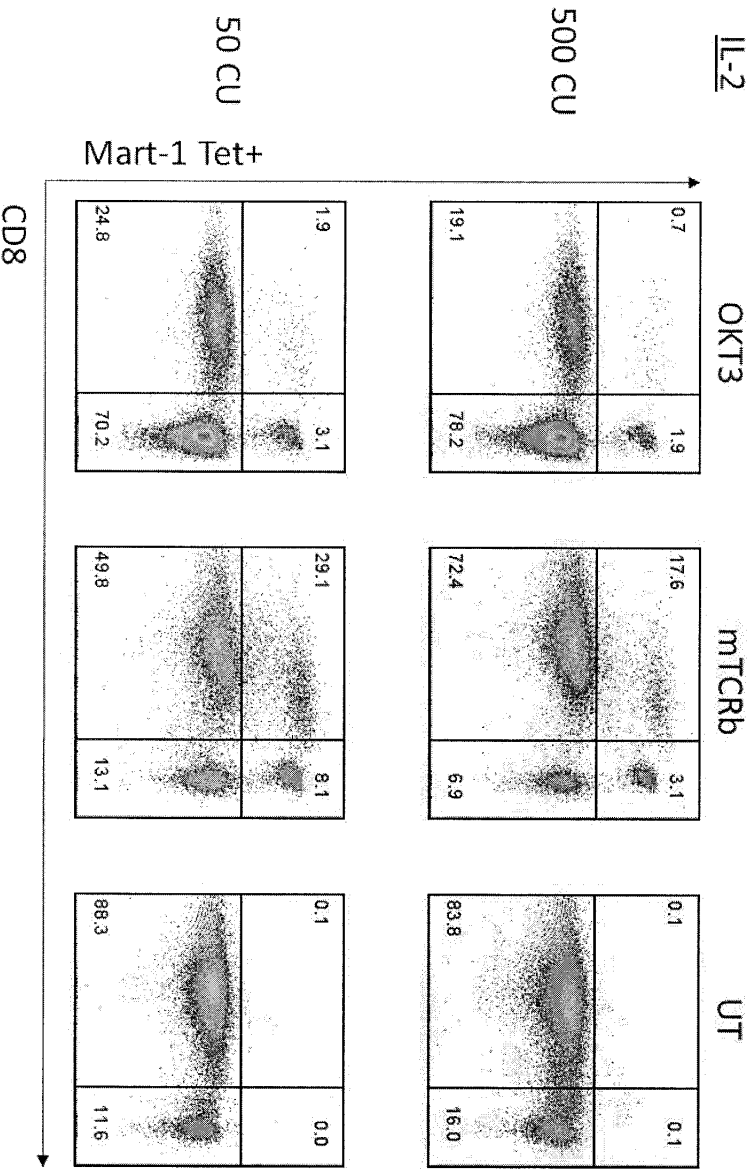
도면7



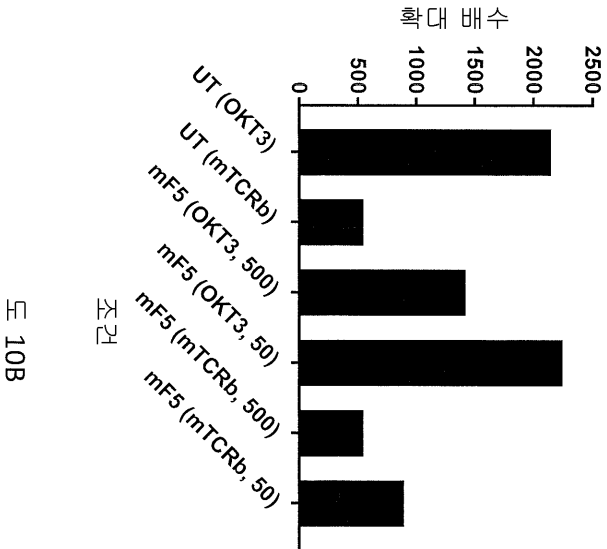
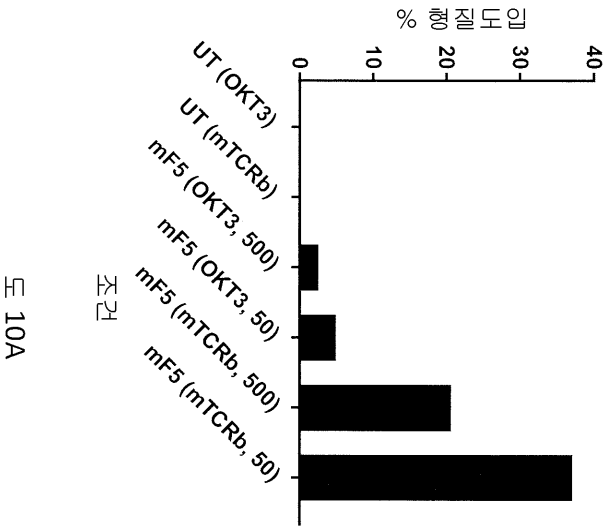
도면8



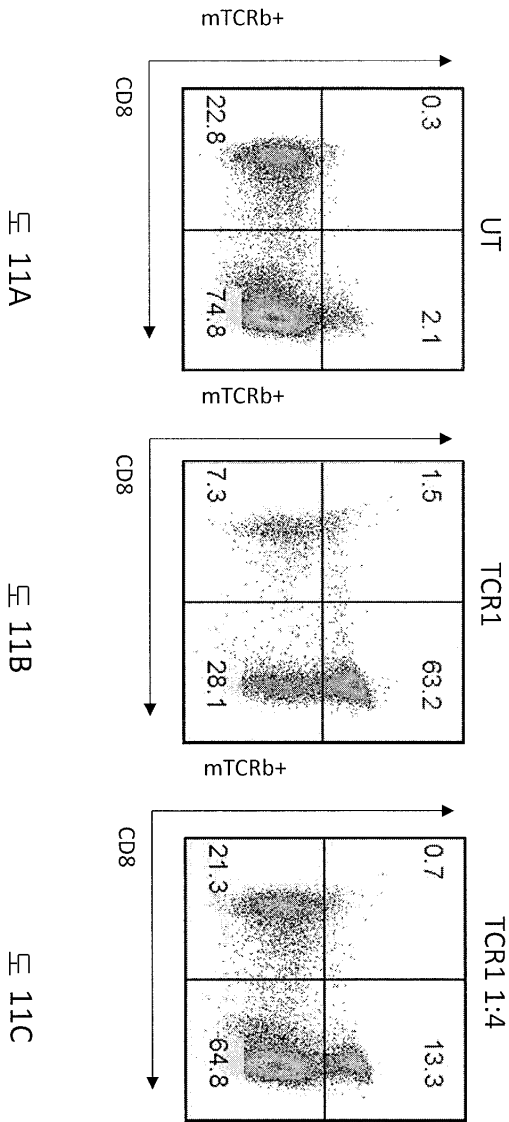
도면9



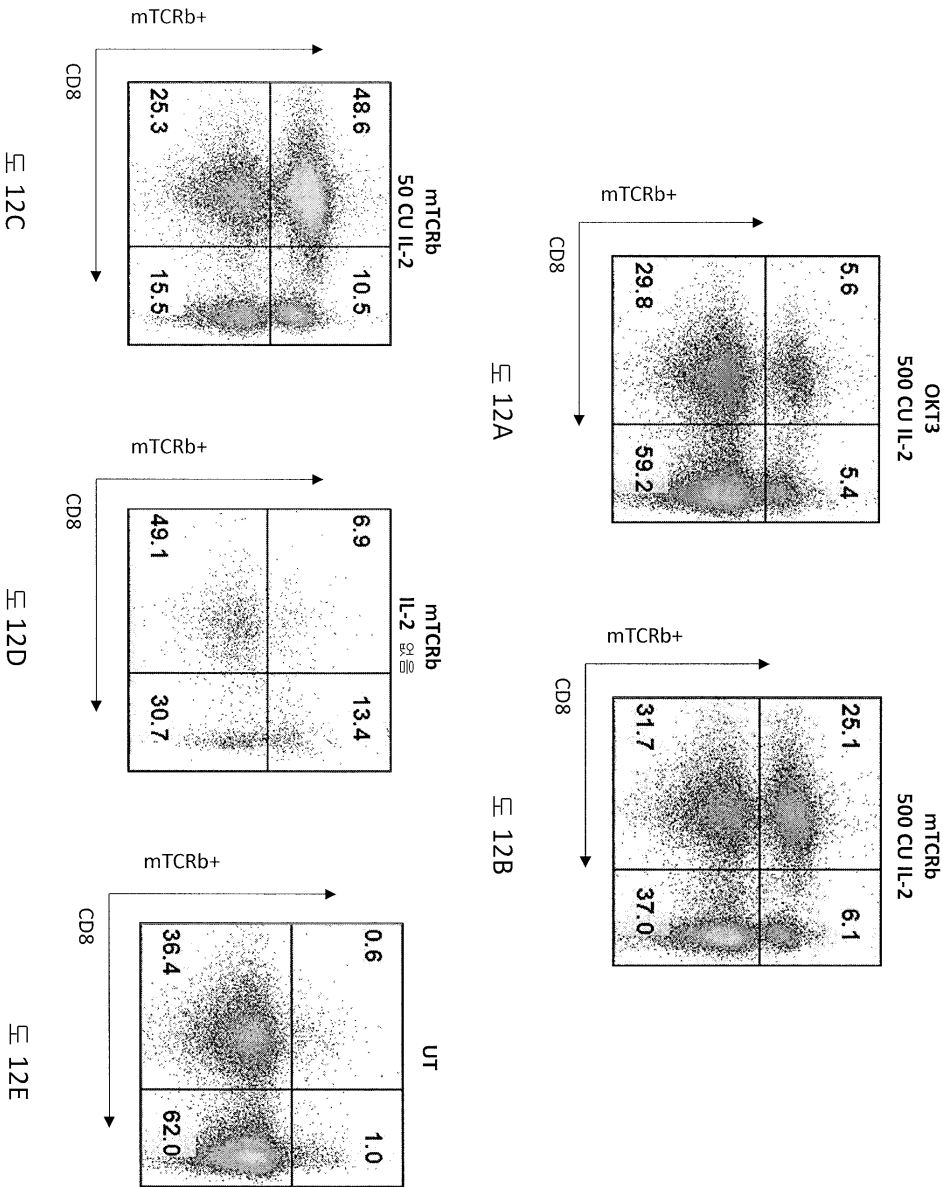
도면10



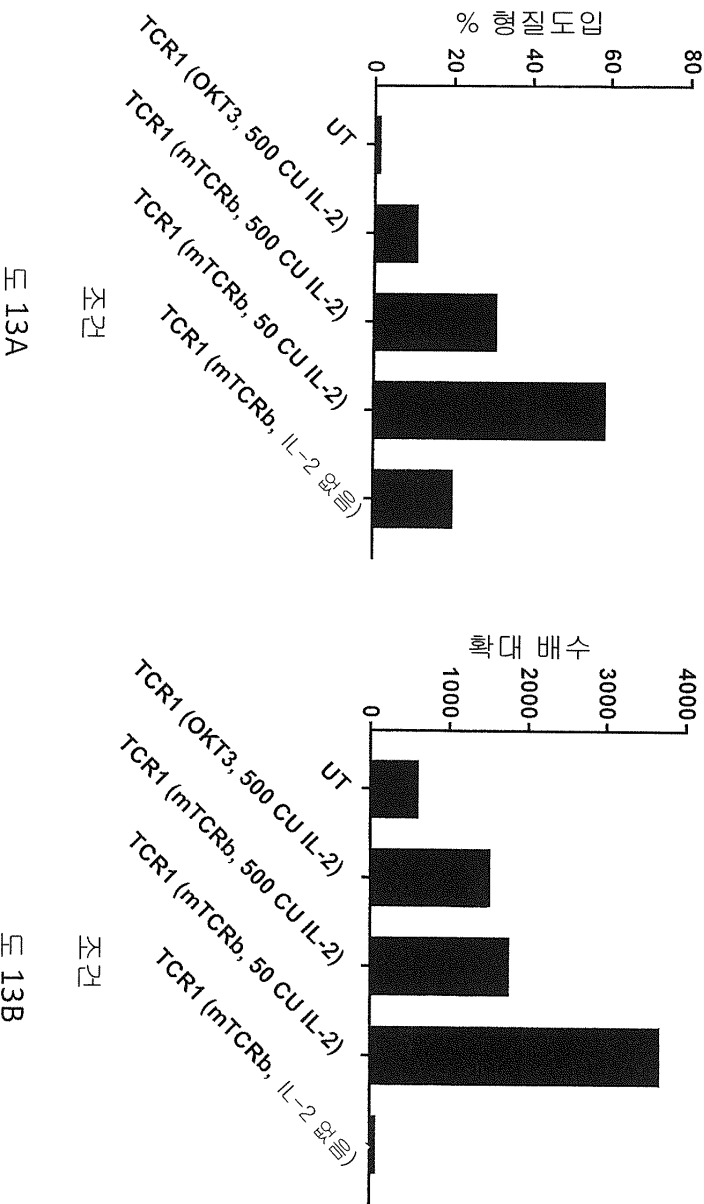
도면11



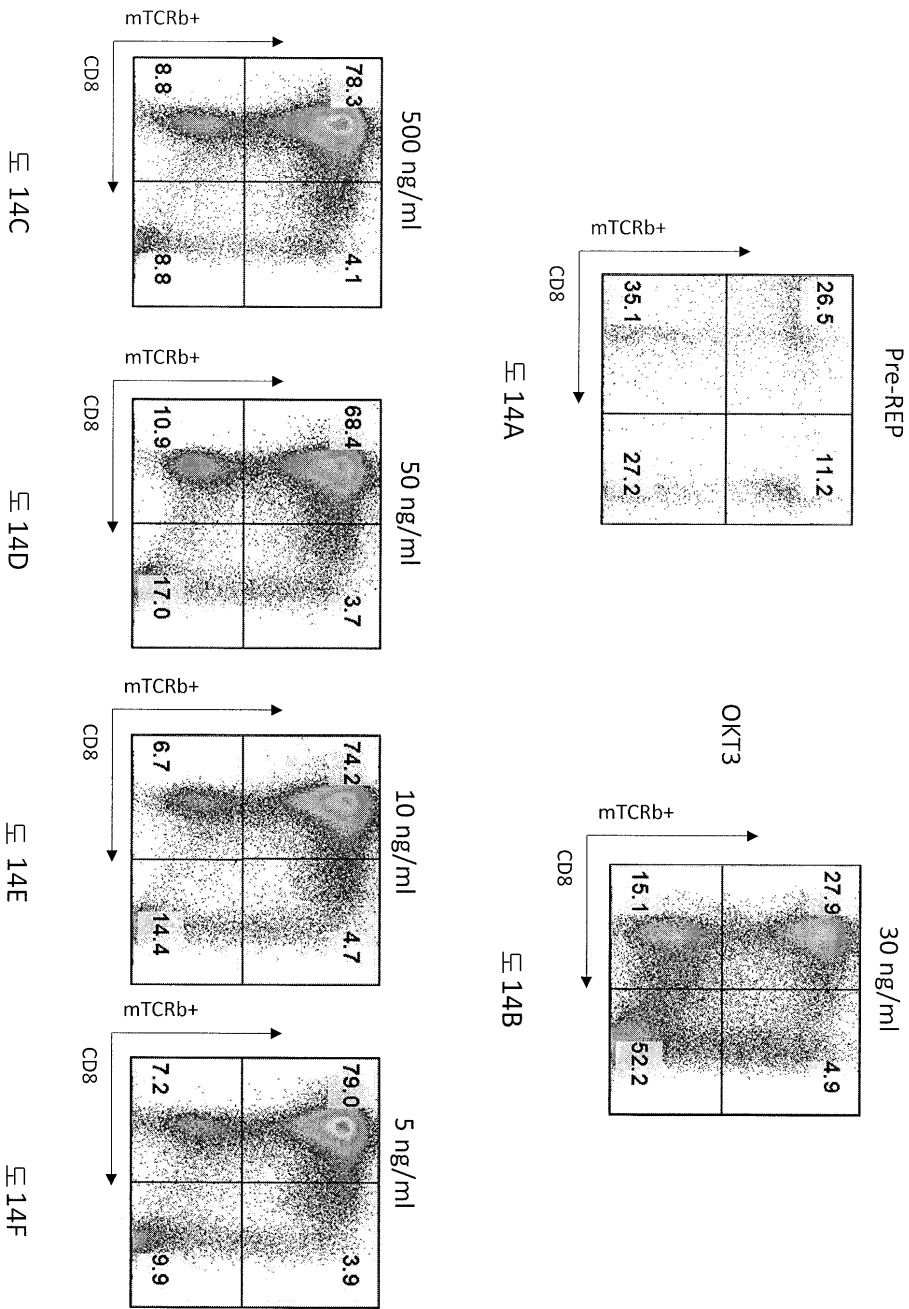
도면12



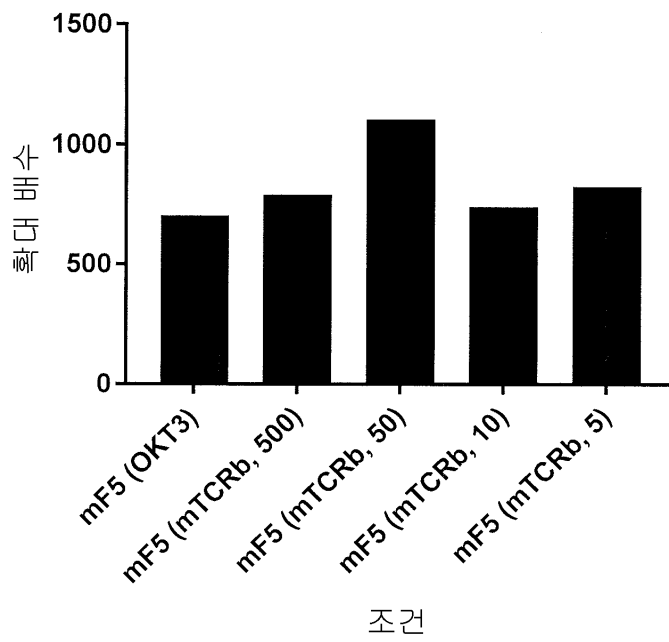
도면13

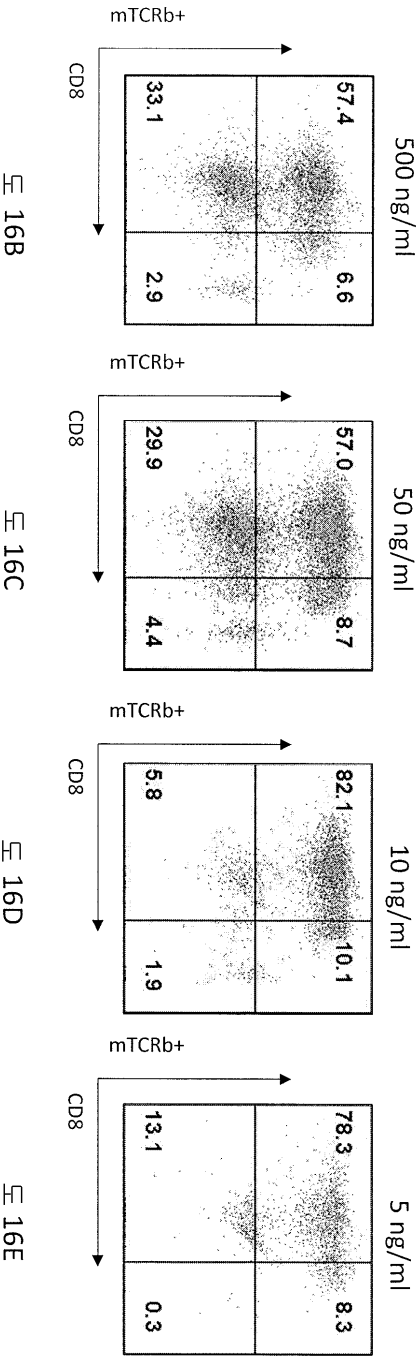
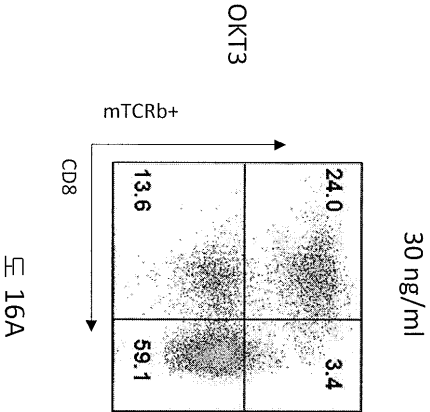


도면14



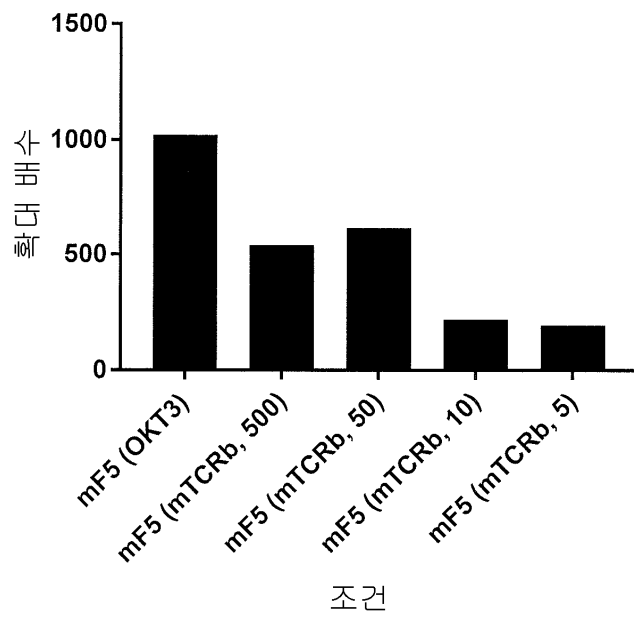
도면15



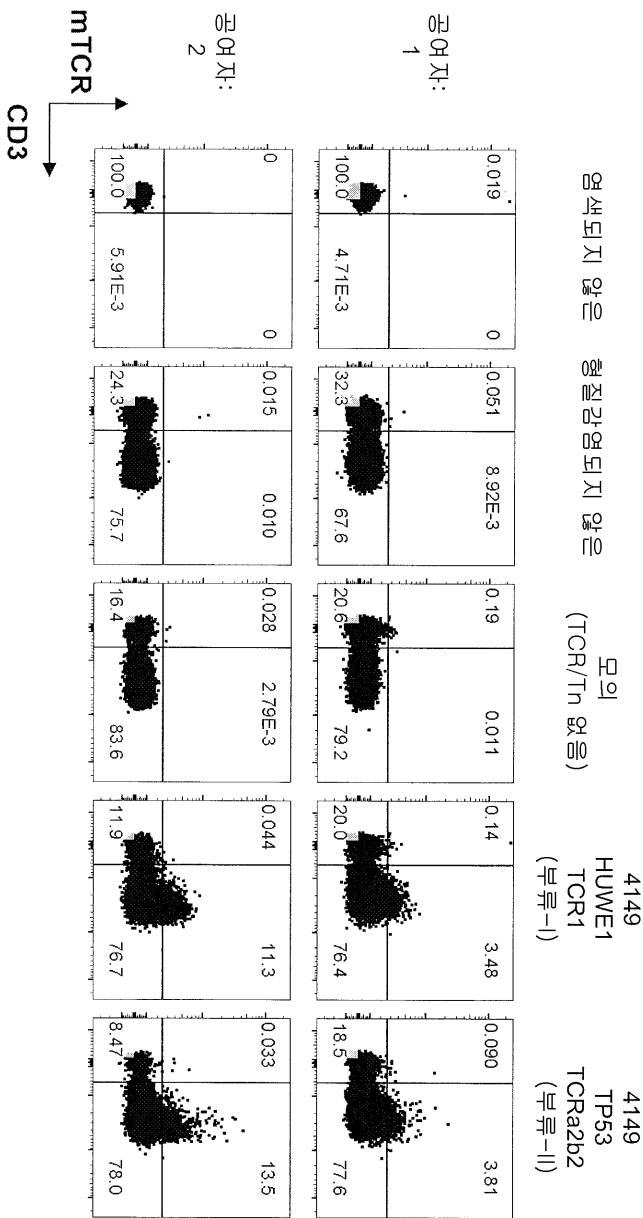


도면16

도면17

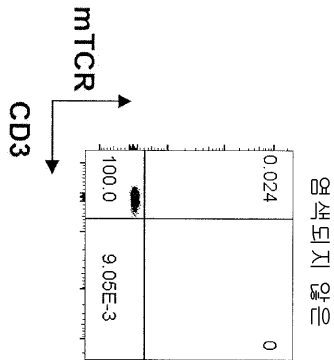


도면18

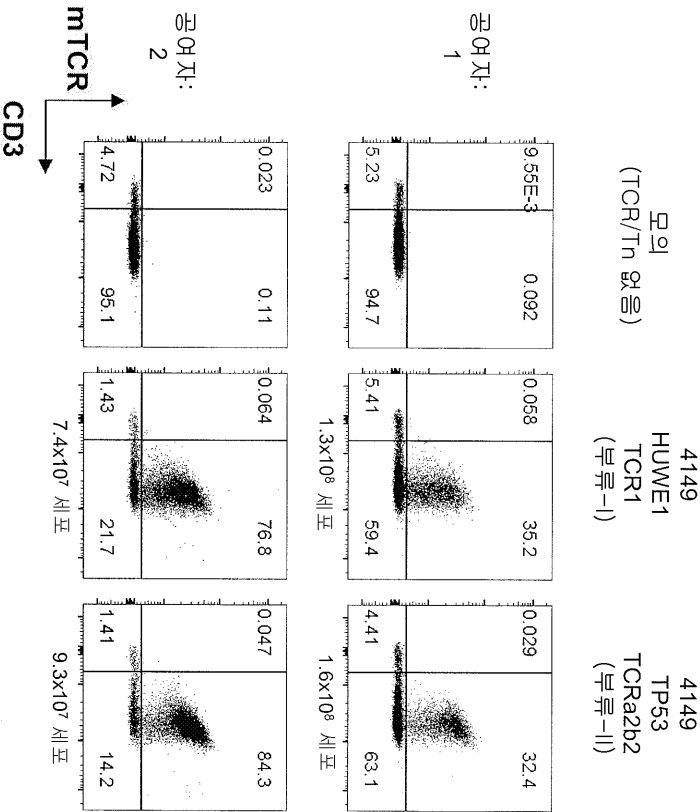


도면19

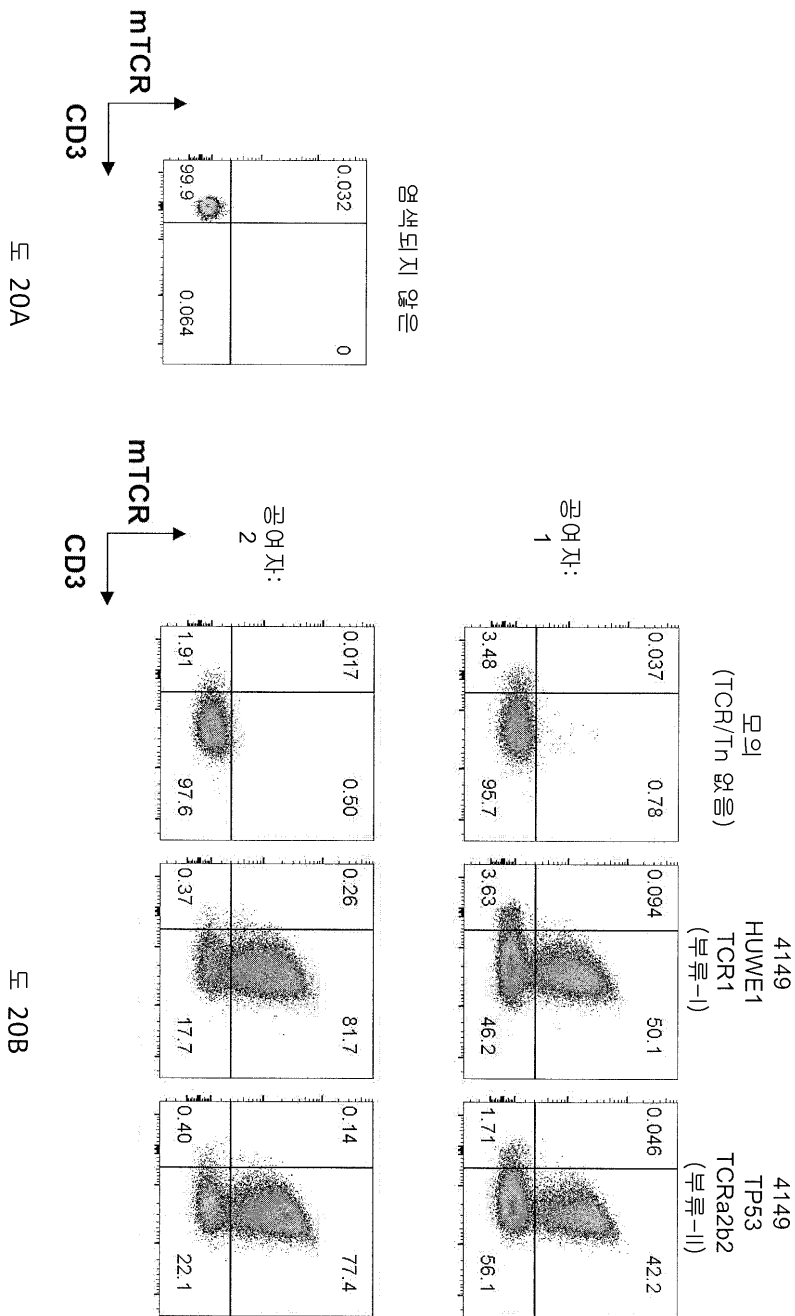
도 19A



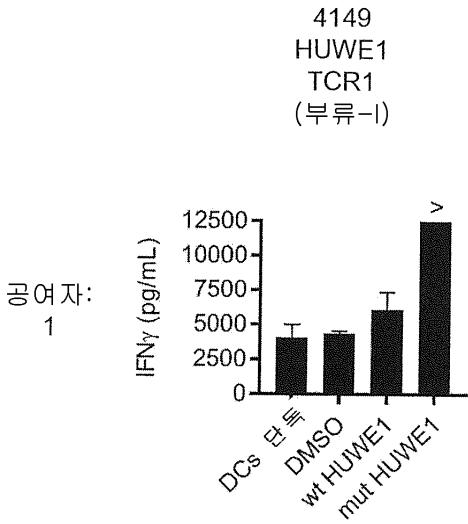
도 19B



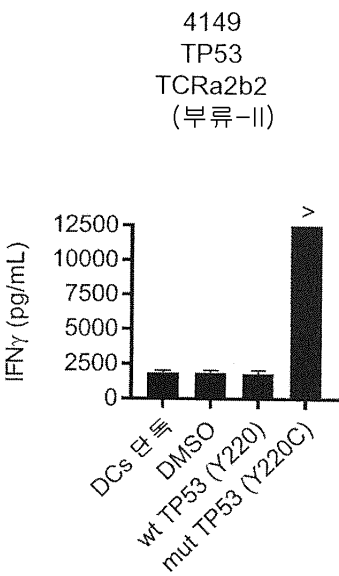
도면20



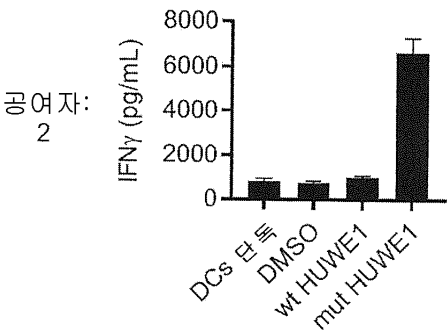
도면21



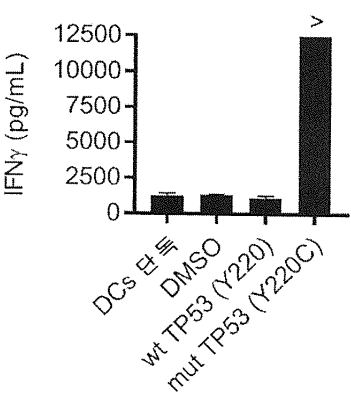
도 21A



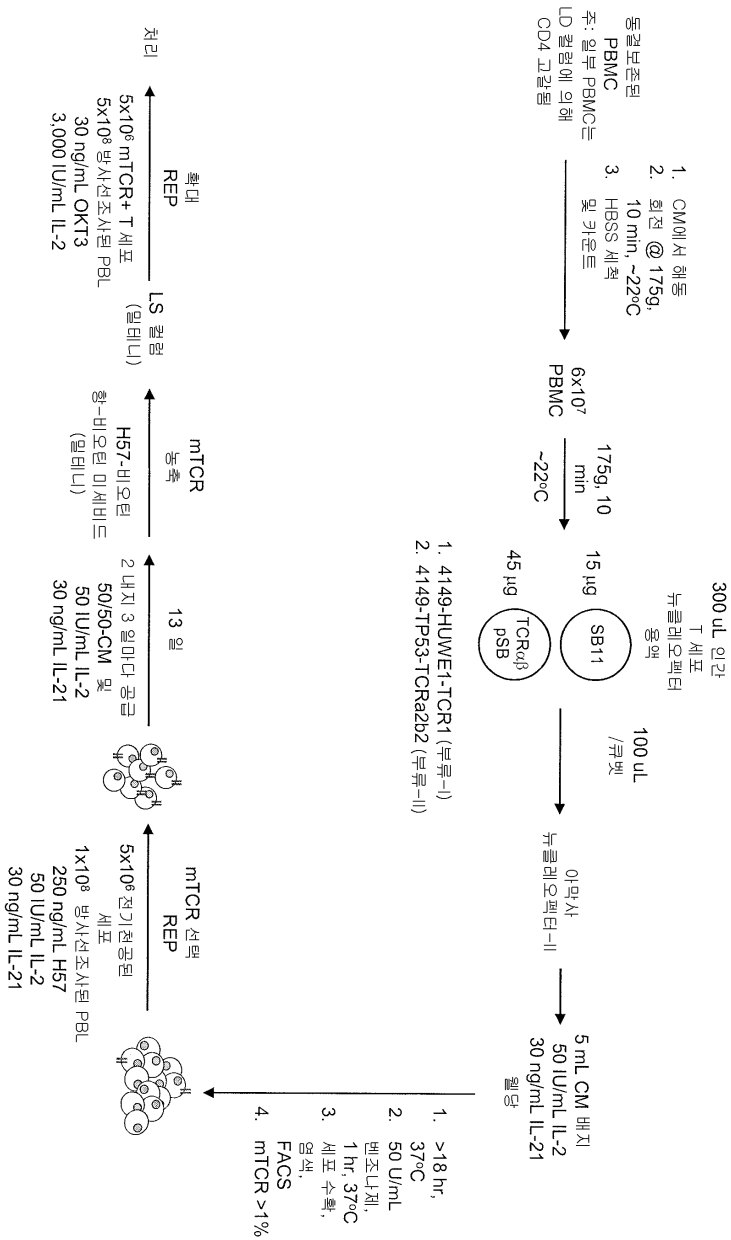
도 21B

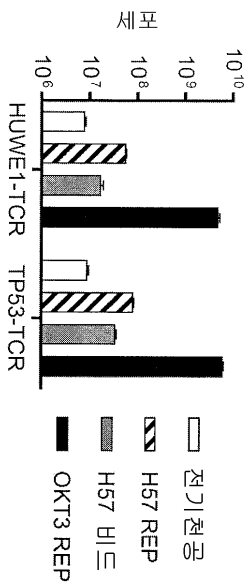


도 21C

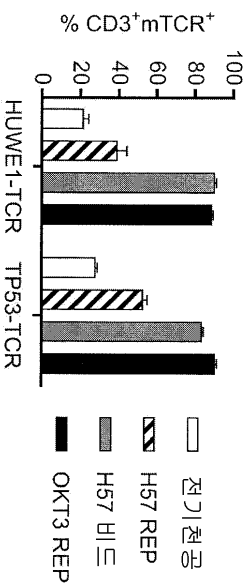


도 21D

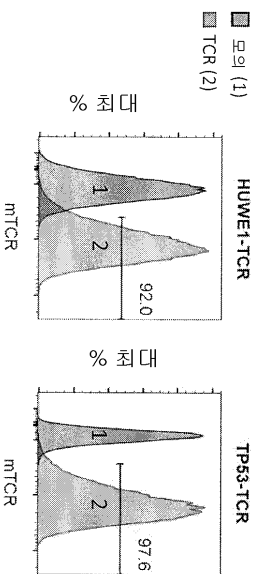




도 23A

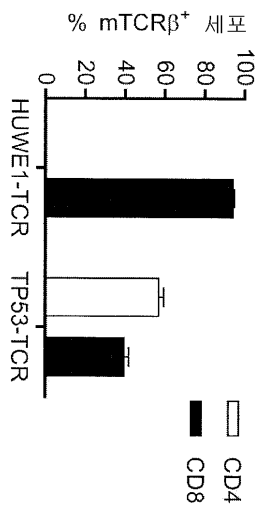


도 23B



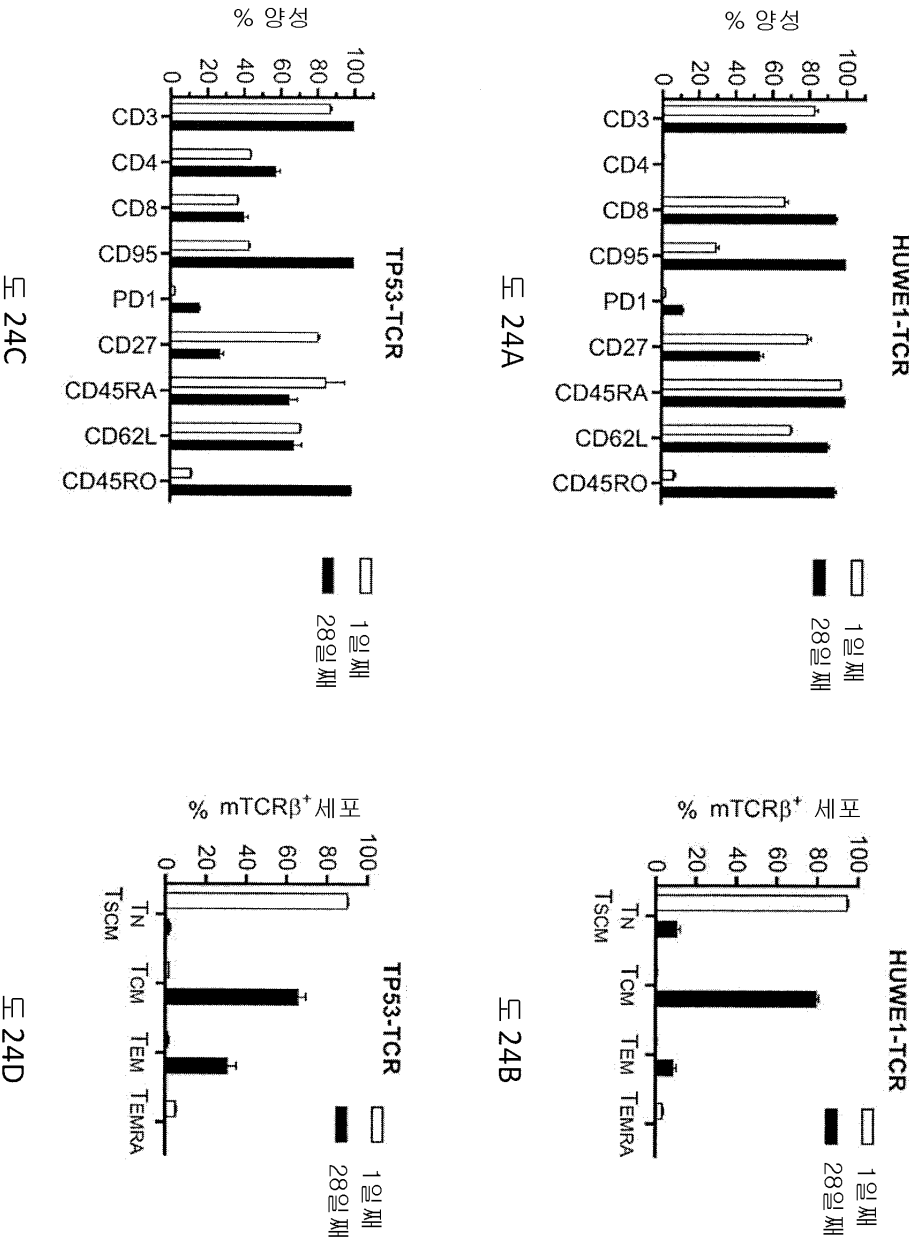
도 23C

도 23D

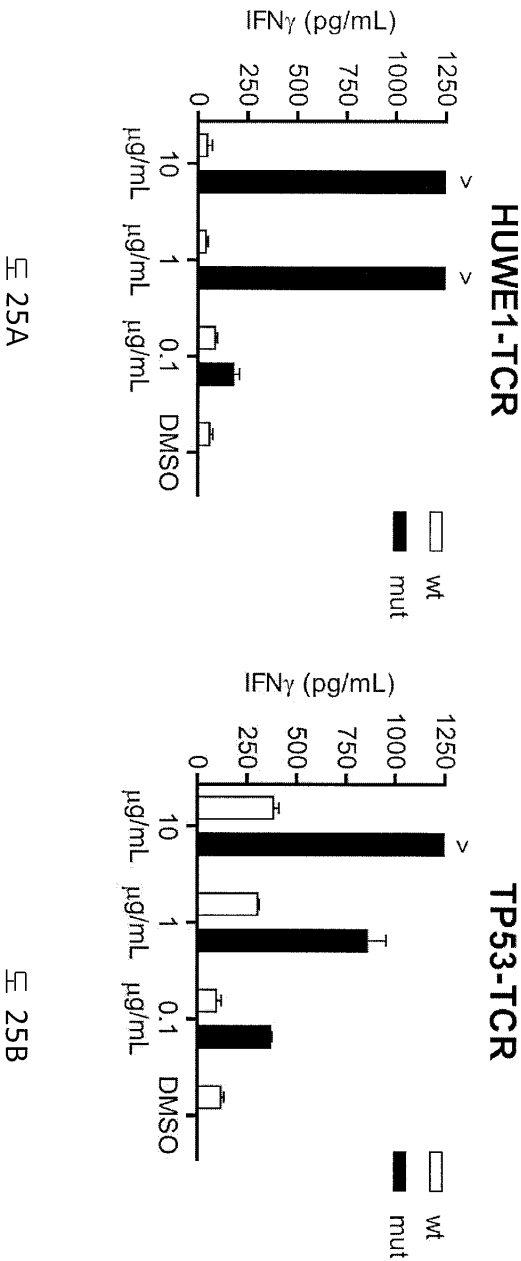


도 23E

도면24



도면25



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE
SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES
- <120> METHODS FOR SELECTIVELY EXPANDING CELLS EXPRESSING A TCR WITH A
MURINE CONSTANT REGION
- <130> 740358
- <140> PCT/US2018/052432
- <141> 2018-09-24

<150> US 62/568,339

<151> 2017-10-05

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 173

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro

1 5 10 15

Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu

20 25 30

Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn

35 40 45

Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys

50 55 60

Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala

65 70 75 80

Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe

85 90 95

His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro

100 105 110

Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly

115 120 125

Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu

130 135 140

Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser

145 150 155 160

Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asn Ser

165 170

<210> 2

<211> 109

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro Ser

1 5 10 15

Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala

20 25 30

Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly

35 40 45

Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys Glu

50 55 60

Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr

65 70 75 80

Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe His

85 90 95

Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro

100 105

<210> 3

<211> 121

<212> PRT

<213> Armenian hamster

<400> 3

Glu Val Tyr Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Leu Lys Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Phe

20 25 30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Arg Ile Lys Asn Ile Pro Asn Asn Tyr Ala Thr Glu Tyr Ala Asp

50 55 60

Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Arg Asn Ser

65 70 75 80
Ile Tyr Leu Gln Met Asn Arg Leu Arg Val Asp Asp Thr Ala Ile Tyr
85 90 95

Tyr	Cys	Thr	Arg	Ala	Gly	Arg	Phe	Asp	His	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala							
			115				120								

<210> 4

 $\langle 211 \rangle$ 110

<212> PRT

<213> Armenian hamster

 $\langle 400 \rangle$ 4

Tyr Glu Leu Ile Gln Pro Ser Ser Ala Ser Val Thr Val Gly Glu Thr
1 5 10 15
Val Lys Ile Thr Cys Ser Gly Asp Gln Leu Pro Lys Asn Phe Ala Tyr
20 25 30

Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Ser	Asp	Lys	Asn	Ile	Leu	Leu	Leu	Ile	Tyr	Met
35				40				45							
Asp	Asn	Lys	Arg	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Thr
50				55				60							
Ser	Gly	Thr	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Ala	Gln	Pro	Glu	Asp
65				70				75				80			
Glu	Ala	Ala	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Ser	Ser	Tyr	Gly	Asp	Asn	Asn	Asp	Leu
85				90				95							

Val Phe Gly Ser Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Arg Gly Pro
100 105 110

<210> 5

 $\langle 211 \rangle$ 222

<212> PRT

<213> Armenian hamster

<400> 5

Glu Val Tyr Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Ser

1 5 10 15
 Ser Leu Lys Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Phe
 20 25 30
 Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

 35 40 45
 Gly Arg Ile Lys Asn Ile Pro Asn Asn Tyr Ala Thr Glu Tyr Ala Asp
 50 55 60
 Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Arg Asn Ser
 65 70 75 80
 Ile Tyr Leu Gln Met Asn Arg Leu Arg Val Asp Asp Thr Ala Ile Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Arg Ala Gly Arg Phe Asp His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

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

 165 170 175
 Ser Val Leu His Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Ser Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Thr Trp Pro Lys Gln Pro Ile Thr Cys Asn Val Ala His
 195 200 205
 Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg
 210 215 220
 <210> 6
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> Armenian hamster

<400> 6

Tyr Glu Leu Ile Gln Pro Ser Ser Ala Ser Val Thr Val Gly Glu Thr
1 5 10 15

Val Lys Ile Thr Cys Ser Gly Asp Gln Leu Pro Lys Asn Phe Ala Tyr
20 25 30

Trp Phe Gln Gln Lys Ser Asp Lys Asn Ile Leu Leu Leu Ile Tyr Met
35 40 45

Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Thr
50 55 60

Ser Gly Thr Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp
65 70 75 80

Glu Ala Ala Tyr Tyr Cys Leu Ser Ser Tyr Gly Asp Asn Asn Asp Leu
85 90 95

Val Phe Gly Ser Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu Arg Gly Pro Lys Ser
100 105 110

Ser Pro Lys Val Thr Val Phe Pro Pro Ser Pro Glu Glu Leu Arg Thr
115 120 125

Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Val Asn Asp Phe Tyr Pro Gly Ser
130 135 140

Ala Thr Val Thr Trp Lys Ala Asn Gly Ala Thr Ile Asn Asp Gly Val
145 150 155 160

Lys Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Gly Gln Asn Tyr Met Thr Ser Ser
165 170 175

Tyr Leu Ser Leu Thr Ala Asp Gln Trp Lys Ser His Asn Arg Val Ser
180 185 190

Cys Gln Val Thr His Glu Gly Glu Thr Val Glu Lys Ser Leu Ser Pro
195 200 205

Ala Glu Cys Leu
210