



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0145341
(43) 공개일자 2022년10월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/00 (2006.01) A61K 35/17 (2014.01)
A61P 35/02 (2006.01) C07K 14/725 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 39/0011 (2021.08)
A61K 35/17 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7028973
(22) 출원일자(국제) 2021년01월22일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년08월22일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/014775
(87) 국제공개번호 WO 2021/151008
국제공개일자 2021년07월29일
- (30) 우선권주장
62/965,774 2020년01월24일 미국(US)
(뒷면에 계속)
- (71) 출원인
주노 셰리퓨티크스 인코퍼레이티드
미국 워싱턴 98109 시애틀 스위트 1200 텍스터 애
비뉴 노스 400
- (72) 발명자
파라지, 탈리아
미국, 워싱턴 98109, 시애틀 스위트 1200 텍스터
애비뉴 노스 400
- (74) 대리인
특허법인이름리온

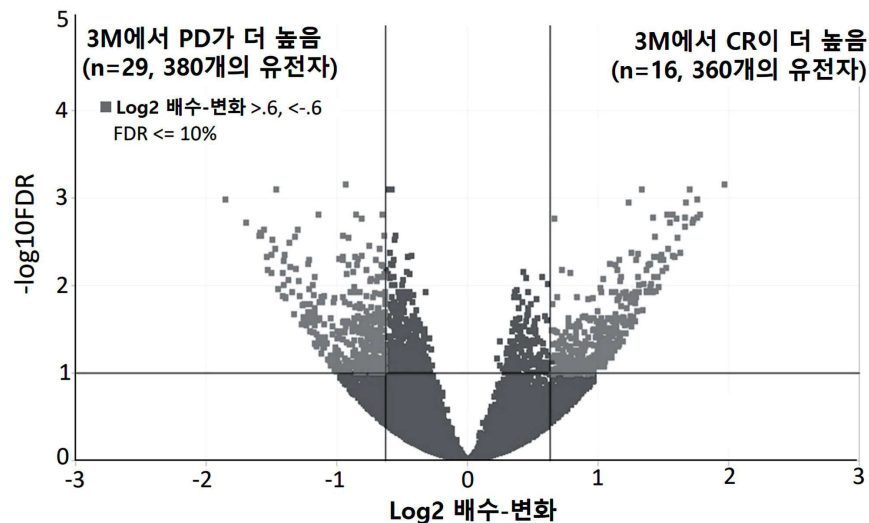
전체 청구항 수 : 총 82 항

(54) 발명의 명칭 입양 세포 요법에서 여포성 림프종 및 변연부 림프종의 투여 및 치료 방법

(57) 요약

본원에서는 무통성 비호지킨 림프종(NHL)이 있는 대상체를 치료하기 위해 T 세포의 투여량을 투여하는 방법, 및 관련 방법, 조성물, 용도 및 제조 물품이 제공된다. 세포는 CD19와 같은 림프종의 항원을 표적화하기 위한 키메라 항원 수용체(CAR)와 같은 제조합 수용체를 발현한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 과도하게 사전 치료되거나 예후가 불량한 대상체, 예를 들어 하나 이상의 선행 요법을 사용한 치료 후 재발하였거나 또는 그 치료에 불응성인 대상체를 포함하는 1-3A 등급 여포성 림프종(FL 1-3A) 또는 변연부 림프종(MZL)을 치료하기 위한 것이다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61K 39/001112 (2018.08)

A61P 35/02 (2018.01)

C07K 14/7051 (2013.01)

C07K 16/2803 (2013.01)

C12N 5/0636 (2013.01)

A61K 2039/5156 (2013.01)

A61K 2039/54 (2013.01)

A61K 2039/545 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

(30) 우선권주장

63/037,542 2020년06월10일 미국(US)

63/068,975 2020년08월21일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

무통성(indolent) 여포성 림프종(follicular lymphoma; FL) 등급 1, 2 또는 3A를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 재발성/불응성(r/r) 여포성 림프종(FL) 등급 1, 2 또는 3A인 질환을 갖거나 가질 것으로 의심되는 대상체에게 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 투여량(dose)을 투여하는 것을 포함하되,

상기 투여량의 T 세포는 CD19에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor; CAR)를 포함하고,

상기 대상체는 FL 등급 1, 2 또는 3A를 치료하기 위한 하나 이상의 선행 라인의 요법(prior line of therapy) 후에 재발하였거나 치료에 불응성(refractory)이 되되, 상기 하나 이상의 선행 라인의 요법 중의 하나 이상은 항-CD20 항체 및 알킬화제를 사용한 치료를 포함하고;

상기 T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 1.5×10^8 개의 CAR-발현 T 세포(경계 포함, inclusive)를 포함하며;

상기 T 세포의 투여량은 대략 1:1 비율의 CAR을 발현하는 $CD4^+$ T 세포 대 CAR을 발현하는 $CD8^+$ T 세포를 포함하고;

상기 투여는 복수의 개별 조성물을 투여하는 것을 포함하되, 상기 복수의 개별 조성물은 상기 $CD8^+$ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 1 조성물 및 상기 $CD4^+$ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 2 조성물을 포함하는, 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 하나 이상의 선행 라인의 요법은 항-CD20 항체 및 알킬화제를 포함하는 하나의 선행 라인의 요법인, 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 대상체는, FL 등급 1, 2 또는 3A를 치료하기 위한 하나의 선행 라인의 요법 후에 재발하였거나 치료에 불응성이 되며, 항-CD20 항체 및 알킬화제를 포함하는 하나의 선행 라인의 요법 개시의 24개월 이내에 질환이 진행(progression) (POD24)된 것인, 방법.

청구항 4

제 2 항 또는 제 3 항에 있어서,

상기 대상체는, FL 등급 1, 2 또는 3A를 치료하기 위한 하나의 선행 라인의 요법 후에 재발하였거나 치료에 불응성이 되며, 항-CD20 항체 및 알킬화제를 포함하는 하나의 선행 라인의 요법을 완료한 후 진단(diagnosis)의 24개월 이내에 질환이 진행(progression)(POD24)된 것인, 방법.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중의 어느 한 항에 있어서,

항-CD20 항체 및 알킬화제를 포함하는 상기 하나 이상의 선행 라인의 요법은 리툭시맙(rituximab), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 빈크리스틴(vincristine), 독소루비신(doxorubicin) 및 프레드니솔론(prednisolone)을 포함하는 화학면역요법 조합 요법(chemoimmunotherapeutic combination therapy)(R-CHOP)인, 방법.

청구항 6

제 2 항 내지 제 5 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 대상체는 처음 FL 진단(original FL diagnosis)의 6개월 이내에 하나의 선행 라인의 요법을 투여 받는 것인, 방법.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 대상체는, FL 등급 1, 2 또는 3A를 치료하기 위한 하나의 선행 라인의 요법 후에 재발하였거나 치료에 불응성이 되며, FL에 기인하는 증후; 위협된 말단-기관 기능(threatened end-organ function), 림프종에 따른 혈구 감소증(cytopenia secondary), 또는 벌기 질환(bulky disease); 비장종대(splenomegaly); 및 선행 6개월 이상 동안 질환의 꾸준한 진행; 중의 하나 이상을 갖는 것인, 방법.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 선행 라인의 요법은 2개의 선행 라인의 요법인, 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

상기 2개의 선행 라인의 요법 중의 다른 것은 리툭시맙; 오비누투주맙(obinutuzumab); 벤다무스틴 + 리툭시맙(bendamustine plus rituximab; BR); 벤다무스틴 + 오비누투주맙(bendamustine plus obinutuzumab; BO); R-CHOP; 리툭시맙, 사이클로포스파미드, 빈크리스틴 및 프레드니손(R-CVP); HSCT(선택적으로 자가 또는 동종 HSCT); 리툭시맙과 조합된 레날리도마이드(lenalidomide); 또는 PI3K 억제제(PI3Ki)를 사용한 치료로부터 선택되되, 선택적으로 상기 PI3Ki는 이데랄리십(idelalisib), 코판리십(copanlisib) 또는 두벨리십(duvelisib)인, 방법.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 대상체는, 치료에 불응성이거나 선행 라인의 요법 완료의 12개월 이내에 재발되었으되, 선택적으로 선행 라인의 요법은 조합 요법 또는 PI3Ki를 포함하는 단독 요법(monotherapy)인, 방법.

청구항 11

제 1 항 내지 제 10 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 대상체는 HSCT 후 재발된 것인, 방법.

청구항 12

제 1 항 내지 제 11 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 선행 라인의 요법은 3개의 선행 라인의 요법인, 방법.

청구항 13

제 12 항에 있어서,

상기 3개의 선행 라인의 요법 중의 다른 2개는 각각 독립적으로 리툭시맙; 오비누투주맙; 벤다무스틴 + 리툭시맙(BR); 벤다무스틴 + 오비누투주맙(BO); R-CHOP; 리툭시맙, 사이클로포스파미드, 빈크리스틴 및 프레드니손(R-CVP); HSCT(선택적으로 자가 또는 동종 HSCT); 리툭시맙과 조합된 레날리도마이드; 또는 PI3K 억제제(PI3Ki)를 사용한 치료로부터 선택되되, 선택적으로 상기 PI3Ki는 이데랄리십, 코판리십 또는 두벨리십인, 방법.

청구항 14

제 1 항 내지 제 13 항 중의 어느 한 항에 있어서,
상기 대상체는 항-CD20 항체를 사용한 치료에 불응성인, 방법.

청구항 15

제 1 항 내지 제 14 항 중의 어느 한 항에 있어서,
상기 대상체는 항-CD20 항체 및 알킬화제를 포함하는 선행 라인의 요법에 불응성인, 방법.

청구항 16

제 1 항 내지 제 15 항 중의 어느 한 항에 있어서,
상기 대상체는 항-CD20 항체를 사용한 치료 완료의 6개월 이내에 재발된 것인, 방법.

청구항 17

제 1 항 내지 제 16 항 중의 어느 한 항에 있어서,
상기 대상체는 항-CD20 항체 및 알킬화제를 포함하는 선행 라인의 요법 완료의 6개월 이내에 재발된 것인, 방법.

청구항 18

제 1 항 내지 제 17 항 중의 어느 한 항에 있어서,
상기 대상체는 2개 이상의 라인의 요법 후 항-CD20 항체 유지 요법(anti-CD20 antibody maintenance therapy) 동안 또는 항-CD20 항체 유지 요법의 완료 후 6개월 이내에 재발된 것인, 방법.

청구항 19

제 1 항 내지 제 18 항 중의 어느 한 항에 있어서,
상기 대상체는 하나 이상의 PET-양성 병변(PET-positive lesion) 및 하나 이상의 측정가능한 결절 병변(nodal lesion) 또는 결절외 병변(extranodal lesion)을 가지되, 선택적으로 상기 측정가능한 결절 병변은 단축(short axis)과 무관하게 장축(long axis)에서 1.5 cm 초과이고 측정가능한 결절외 병변은 장축 및 단축에서 1.0 cm 초과인, 방법.

청구항 20

변연부 림프종(marginal zone lymphoma; MZL)을 치료하는 방법으로서,
상기 방법은 재발성/불응성(r/r) 변연부 림프종(MZL)을 갖거나 가질 것으로 의심되는 대상체에게 $CD4^{+}$ 및 $CD8^{+}$ T 세포의 투여량을 투여하는 것을 포함하되,
상기 투여량의 T 세포는 CD19에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하고;
상기 대상체는 MZL을 치료하기 위한 2개 이상의 선행 라인의 요법 후에 재발하였거나 치료에 불응성이 되며;
상기 T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 1.5×10^8 개의 CAR-발현 T 세포(경계 포함, inclusive)를 포함하며;
상기 T 세포의 투여량은 대략 1:1 비율의 CAR을 발현하는 $CD4^{+}$ T 세포 대 CAR을 발현하는 $CD8^{+}$ T 세포를 포함하고;
상기 투여는 복수의 개별 조성물을 투여하는 것을 포함하되, 상기 복수의 개별 조성물은 상기 $CD8^{+}$ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 1 조성물 및 상기 $CD4^{+}$ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 2 조성물을 포함하는, 방법.

청구항 21

제 20 항에 있어서,

상기 MZL은 결절외(extra-nodal) MZL(ENMZL, 주로 위), 비장 MZL(SMZL), 및 결절(nodal) MZL(NMZL) 중에서 선택되는 서브타입(subtype)인, 방법.

청구항 22

제 20 항 또는 제 21 항에 있어서,

상기 2개 이상의 선행 라인의 요법 중의 하나 이상은 MZL을 치료하기 위한 조합 전신 요법(combination systemic therapy)이거나 조혈 줄기 세포 이식(hematopoietic stem cell transplant; HSCT)인, 방법.

청구항 23

제 20 항 내지 제 22 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 2개 이상의 선행 라인의 요법 중의 하나 이상은 MZL을 치료하기 위한 조합 전신 요법이고, 상기 조합 전신 요법은 리툭시맙 + 사이클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴 및 프레드니손(R-CHOP)으로부터 선택되거나, 또는 항-CD20 항체 및 알킬화제를 사용한 요법인, 방법.

청구항 24

제 20 항 내지 제 23 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 2개 이상의 선행 라인의 요법 중의 하나 이상은 항-CD20 항체 및 알킬화제인 조합 전신 요법인, 방법.

청구항 25

제 20 항 내지 제 24 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 대상체는 비장(Splenic) MZL(SMZL)을 갖고, 상기 2개 이상의 선행 라인의 요법 중의 하나 이상은 비장절제술(splenectomy)인, 방법.

청구항 26

제 20 항 내지 제 24 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 대상체는 결절외 MZL(ENMZL)을 갖고, 항생제는 상기 2개 이상의 선행 라인의 요법 중의 하나가 아닌 것인, 방법.

청구항 27

제 20 항 내지 제 26 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 대상체는 장축에서 2.0 cm 초과인 하나 이상의 측정가능한 결절 병변 또는 하나 이상의 측정가능한 결절외 병변을 갖는 PET 비열성 질환(PET non-avid disease)을 갖는 것인, 방법.

청구항 28

제 1 항 내지 제 27 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 대상체는 FL 등급 3B(FL3B)를 갖지 않는 것인, 방법.

청구항 29

제 1 항 내지 제 28 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 대상체는 복합 DLBCL 및 FL, 또는 형질전환된 FL(tFL)의 증거를 갖지 않는 것인, 방법.

청구항 30

제 1 항 내지 제 29 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 대상체는 십이지장형 FL의 세계보건기구(WHO) 하위분류(subclassification)를 갖지 않는 것인, 방법.

청구항 31

제 1 항 내지 제 30 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 대상체는 하나 이상의 선행 라인의 요법에 대해 재발된 것이고, 상기 재발은 상기 하나 이상의 선행 라인의 요법에 대해 완전 반응(complete response; CR) 또는 부분 반응(partial response; PR)의 초기 반응 후인, 방법.

청구항 32

제 1 항 내지 제 31 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 대상체는 하나 이상의 선행 라인의 요법에 불응성이고, 상기 불응성 치료는 상기 하나 이상의 선행 라인의 요법에 대해 안정 질환(stable disease; SD) 또는 진행성 질환(progressive disease; PD)의 최상의 대응(best response)인, 방법.

청구항 33

제 1 항 내지 제 32 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 대상체는 미 동부 종양학 그룹 협회(Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG)의 0 또는 1의 수행 상태를 갖는 것인, 방법.

청구항 34

제 1 항 내지 제 33 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 항-CD20 항체는 모노클로날 항-CD20 항체인, 방법.

청구항 35

제 1 항 내지 제 34 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 항-CD20 항체는 리툭시맙 또는 오비누투주맙인, 방법.

청구항 36

제 1 항 내지 제 35 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 항-CD20 항체는 리툭시맙인, 방법.

청구항 37

제 1 항 내지 제 36 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 알킬화제는 벤다무스틴 또는 클로람부실(chlorambucil)인, 방법.

청구항 38

제 1 항 내지 제 37 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 투여량의 투여 전에 상기 대상체에 림프구 고갈 요법(lymphodepleting therapy)을 투여하는 것을 더 포함하는, 방법.

청구항 39

제 38 항에 있어서,

상기 림프구 고갈 요법은 상기 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 투여량의 투여 개시 전 약 7일 이내에 완료되는 것인, 방법.

청구항 40

제 38 항 또는 제 39 항에 있어서,

상기 림프구 고갈 요법은 상기 $CD4^{+}$ 및 $CD8^{+}$ T 세포의 투여량의 투여 개시 전 약 2 내지 7일 이내에 완료되는 것인, 방법.

청구항 41

제 38 항 내지 제 40 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 림프구 고갈 요법은 플루다라빈 및/또는 사이클로포스파미드의 투여를 포함하는 것인, 방법.

청구항 42

제 38 항 내지 제 41 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 림프구 고갈 요법은 2 내지 4일, 선택적으로는 3일 동안 매일 (약) 200 mg/m^2 , 선택적으로는 (약) 300 mg/m^2 (경계 포함)으로 사이클로포스파미드의 투여 및/또는 (약) $20 \text{ 내지 } 40 \text{ mg/m}^2$, 선택적으로는 30 mg/m^2 으로 플루다라빈의 투여를 포함하는 것인, 방법.

청구항 43

제 38 항 내지 제 42 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 림프구 고갈 요법은 3일 동안 매일 동시에 (약) 300 mg/m^2 으로 사이클로포스파미드의 투여 및/또는 (약) 30 mg/m^2 로 플루다라빈의 투여를 포함하는 것인, 방법.

청구항 44

제 1 항 내지 제 43 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 CD19는 인간 CD19인, 방법.

청구항 45

제 1 항 내지 제 44 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 키메라 항원 수용체(CAR)는, 항체 FMC63의 가변 중쇄 영역(variable heavy chain region) 및 가변 경쇄 영역(variable light chain region)을 포함하는 scFv, 15개 미만의 아미노산이고 면역글로불린 힌지 영역(immunoglobulin hinge region) 또는 그의 변형된 버전을 함유하는 스페이서(spacer), 막관통 도메인(transmembrane domain), 및 CD3-제타($CD3\zeta$) 사슬의 신호전달 도메인 및 4-1BB의 신호전달 도메인인 공자극 신호전달 영역(costimulatory signaling region)을 포함하는 세포내 신호전달 영역(intracellular signaling domain)을 포함하는, 방법.

청구항 46

제 45 항에 있어서,

상기 면역글로불린 힌지 영역 또는 그의 변형된 버전은 식 X_1PPX_2P 을 포함하되, 상기 X_1 는 글리신, 시스테인 또는 아르기닌이고 상기 X_2 는 시스테인 또는 또는 트레오닌(서열번호 58)인, 방법.

청구항 47

제 45 항 또는 제 46 항에 있어서,

상기 면역글로불린 힌지 영역 또는 그의 변형된 버전은 IgG1 힌지 또는 그의 변형된 버전인, 방법.

청구항 48

제 45 항 또는 제 46 항에 있어서,

상기 면역글로불린 힌지 영역 또는 그의 변형된 버전은 IgG4 힌지 또는 그의 변형된 버전인, 방법.

청구항 49

제 45 항 내지 제 48 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 스페이서는 서열번호 1, 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 또는 서열번호 34에 제시된 서열, 또는 서열번호 1, 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 또는 서열번호 34에 제시된 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 전술한 것들 중의 임의의 것의 변이체를 포함하는, 방법.

청구항 50

제 45 항 내지 제 49 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 스페이서는 서열번호 1, 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 또는 서열번호 34에 제시된 서열, 또는 서열번호 1, 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 또는 서열번호 34에 제시된 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 전술한 것들 중의 임의의 것의 변이체로 구성되는, 방법.

청구항 51

제 45 항 내지 제 50 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 스페이서는 길이가 (약) 12개의 아미노산인, 방법.

청구항 52

제 45 항 내지 제 51 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 스페이서는 서열번호 1에 제시된 서열을 포함하는, 방법.

청구항 53

제 45 항 내지 제 52 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 스페이서는 서열번호 1에 제시된 서열로 구성되는, 방법.

청구항 54

제 45 항 내지 제 53 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 막관통 도메인은 CD28의 막관통 도메인인, 방법.

청구항 55

제 45 항 내지 제 54 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 막관통 도메인은 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열, 또는 서열번호 8과 적어도 (약) 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 56

제 45 항 내지 제 55 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 공자극 도메인은 서열번호 12에 제시된 서열을 포함하거나, 또는 서열번호 12에 제시된 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 그의 변이체인, 방법.

청구항 57

제 45 항 내지 제 56 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 CD3-제타(CD3 ζ) 사슬의 신호전달 도메인은 서열번호 13, 14, 또는 15에 제시된 서열을 포함하거나, 또는

서열번호 13, 14, 또는 15에 제시된 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 그의 변이체인, 방법.

청구항 58

제 45 항 내지 제 57 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 scFv는 서열번호 35의 CDRL1 서열, 서열번호 55의 CDRL2 서열, 및 서열번호 56의 CDRL3 서열; 및 서열번호 38의 CDRH1 서열, 서열번호 39의 CDRH2 서열, 및 서열번호 54의 CDRH3 서열을 포함하는, 방법.

청구항 59

제 45 항 내지 제 57 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 scFv는 RASQDISKYLN(서열번호 35)의 CDRL1 서열, SRLHSGV(서열번호 36)의 CDRL2 서열, 및 GNTLPYTFG(서열번호 37)의 CDRL3 서열; 및 DYGV(서열번호 38)의 CDRH1 서열, VIWGSETTYNSALKS(서열번호 39)의 CDRH2 서열, 및 YAMDYWG(서열번호 40)의 CDRH3 서열을 포함하는, 방법.

청구항 60

제 45 항 내지 제 59 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 scFv는, N-말단에서 C-말단으로의 순서대로, 서열번호 42에 제시된 서열을 포함하는 V_L , 및 서열번호 41에 제시된 서열을 포함하는 V_H 를 포함하는, 방법.

청구항 61

제 45 항 내지 제 60 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 scFv는 서열번호 43에 제시된 서열을 포함하는, 방법.

청구항 62

제 1 항 내지 제 61 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 CAR은, N-말단에서 C-말단으로의 순서대로, 서열번호 43에 제시된 scFv인 세포의 항원-결합 도메인, 서열번호 1에 제시된 스페이서, 서열번호 8에 제시된 막관통 도메인, 서열번호 12에 제시된 4-1BB 공자극 신호전달 도메인, 및 서열번호 13에 제시된 CD3-제타(CD3 ζ) 사슬의 신호전달 도메인을 함유하는, 방법.

청구항 63

제 1 항 내지 제 62 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 투여량은 약 5×10^7 개의 CAR+ T 세포 내지 약 1.1×10^8 개의 CAR+ T 세포(각각의 경계 포함)인, 방법.

청구항 64

제 1 항 내지 제 63 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 투여량은 5×10^7 개의 CAR+ T 세포인, 방법.

청구항 65

제 1 항 내지 제 63 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 투여량은 1×10^8 개의 CAR+ T 세포인, 방법.

청구항 66

제 1 항 내지 제 65 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 제 1 조성물 및 상기 제 2 조성물은 0 내지 12시간 간격, 0 내지 6시간 간격 또는 0 내지 2시간 간격으로 투여되거나, 또는 상기 제 1 조성물의 투여 및 상기 제 2 조성물의 투여는 같은 날(same day)에, 약 0 내지 약 12시간 간격, 약 0 내지 약 6시간 간격, 또는 약 0 내지 약 2시간 간격으로 수행되고/되거나;

상기 제 1 조성물의 투여 개시 및 상기 제 2 조성물의 투여 개시는 약 1분 내지 약 1시간 간격 또는 약 5분 내지 약 30분 간격으로 수행되는, 방법.

청구항 67

제 1 항 내지 제 66 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 제 1 조성물 및 상기 제 2 조성물은 2시간 이하, 1시간 이하, 30분 이하, 15분 이하, 10분 이하, 또는 5분 이하의 간격으로 투여되는, 방법.

청구항 68

제 1 항 내지 제 67 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 제 1 조성물 및 상기 제 2 조성물은 2시간 미만의 간격으로 투여되는, 방법.

청구항 69

제 1 항 내지 제 68 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 $CD8^+$ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 1 조성물은 상기 $CD4^+$ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 2 조성물 이전에 투여되는, 방법.

청구항 70

제 1 항 내지 제 69 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 $CD4^+$ T 세포 및 상기 $CD8^+$ T 세포의 투여량은 정맥내 투여되는, 방법.

청구항 71

제 1 항 내지 제 70 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 T 세포는 상기 대상체로부터의 샘플로부터 수득된 1차 T 세포이되, 선택적으로 상기 샘플은 전혈 샘플(whole blood sample), 성분채집 샘플(apheresis sample) 또는 백혈구 성분채집 샘플(leukapheresis sample)인, 방법.

청구항 72

제 71 항에 있어서,

상기 샘플은 상기 대상체에 림프구 고갈 요법을 투여하기 전에 상기 대상체로부터 수득되는, 방법.

청구항 73

제 1 항 내지 제 72 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 T 세포는 상기 대상체에 대해 자가(autoologous)인, 방법.

청구항 74

제 1 항 내지 제 73 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 대상체는 인간인, 방법.

청구항 75

제 1 항 내지 제 74 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 방법에 따라 치료된 복수의 대상체 중에서 완전 반응률(complete response rate; CRR)은 (약) 50% 초과,

(약) 60% 초과, (약) 70% 초과, 또는 (약) 80% 초과인, 방법.

청구항 76

제 75 항에 있어서,

상기 CRR은 최대 24개월의 완전 반응(CR)까지 최상의 전체 반응(best overall response; BOR)을 갖는 대상체의 백분율인, 방법.

청구항 77

제 75 항 또는 제 76 항에 있어서,

상기 대상체는 FL 등급 1, 2 또는 3A이고, 상기 CRR은 PET-CT에 의해 평가되는 것인, 방법.

청구항 78

제 75 항 또는 제 76 항에 있어서,

상기 대상체는 MZL을 갖고, 상기 CRR은 CT에 의해 평가되는 것인, 방법.

청구항 79

재발성/불응성(r/r) 여포성 림프종(FL) 등급 1, 2 또는 3A인 질환을 갖거나 가질 것으로 의심되는 대상체를 치료하는 $CD4^{+}$ 및 $CD8^{+}$ T 세포의 투여량의 용도로서,

상기 투여량의 T 세포는 CD19에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하고;

상기 대상체는 FL 등급 1, 2 또는 3A를 치료하기 위한 하나 이상의 선행 라인의 요법 후에 재발하였거나 치료에 불응성이 되되, 상기 하나 이상의 선행 라인의 요법 중의 하나 이상은 항-CD20 항체 및 알킬화제를 사용한 치료를 포함하고;

상기 T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 1.5×10^8 개의 CAR-발현 T 세포(경계 포함, inclusive)를 포함하며;

상기 T 세포의 투여량은 대략 1:1 비율의 CAR을 발현하는 $CD4^{+}$ T 세포 대 CAR을 발현하는 $CD8^{+}$ T 세포를 포함하고;

상기 투여량은 복수의 개별 조성물로서 투여하기 위한 것으로 제형화되되, 상기 복수의 개별 조성물은 상기 $CD8^{+}$ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 1 조성물 및 상기 $CD4^{+}$ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 2 조성물을 포함하는 것인, 용도.

청구항 80

재발성/불응성(r/r) 여포성 림프종(FL) 등급 1, 2 또는 3A인 질환을 갖거나 가질 것으로 의심되는 대상체의 치료용 약제의 제조에서 $CD4^{+}$ 및 $CD8^{+}$ T 세포의 투여량의 용도로서,

상기 투여량의 T 세포는 CD19에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하고;

상기 대상체는 FL 등급 1, 2 또는 3A를 치료하기 위한 하나 이상의 선행 라인의 요법 후에 재발하였거나 치료에 불응성이 되되, 상기 하나 이상의 선행 라인의 요법 중의 하나 이상은 항-CD20 항체 및 알킬화제를 사용한 치료를 포함하고;

상기 T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 1.5×10^8 개의 CAR-발현 T 세포(경계 포함)를 포함하며;

상기 T 세포의 투여량은 대략 1:1 비율의 CAR을 발현하는 $CD4^{+}$ T 세포 대 CAR을 발현하는 $CD8^{+}$ T 세포를 포함하고;

상기 투여량은 복수의 개별 조성물로서 투여하기 위한 것으로 제형화되되, 상기 복수의 개별 조성물은 상기 $CD8^+$ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 1 조성물 및 상기 $CD4^+$ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 2 조성물을 포함하는 것인, 용도.

청구항 81

재발성/불응성(r/r) 변연부 림프종(marginal zone lymphoma; MZL)을 갖거나 가질 것으로 의심되는 대상체를 치료하는 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 투여량의 용도로서,

상기 투여량의 T 세포는 CD19에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하고;

상기 대상체는 MZL을 치료하기 위한 2개 이상의 선행 라인의 요법 후에 재발하였거나 치료에 불응성이 되며;

상기 T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 1.5×10^8 개의 CAR-발현 T 세포(경계 포함)를 포함하며;

상기 T 세포의 투여량은 대략 1:1 비율의 CAR을 발현하는 $CD4^+$ T 세포 대 CAR을 발현하는 $CD8^+$ T 세포를 포함하고;

상기 투여량은 복수의 개별 조성물의 투여용으로 제형화되되, 상기 복수의 개별 조성물은 상기 $CD8^+$ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 1 조성물 및 상기 $CD4^+$ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 2 조성물을 포함하는 것인, 용도.

청구항 82

재발성/불응성(r/r) 변연부 림프종(MZL)을 갖거나 가질 것으로 의심되는 대상체의 치료용 약제의 제조에서 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 투여량의 용도로서,

상기 투여량의 T 세포는 CD19에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하고;

상기 대상체는 MZL을 치료하기 위한 2개 이상의 선행 라인의 요법 후에 재발하였거나 치료에 불응성이 되며;

상기 T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 1.5×10^8 개의 CAR-발현 T 세포(경계 포함)를 포함하며;

상기 T 세포의 투여량은 대략 1:1 비율의 CAR을 발현하는 $CD4^+$ T 세포 대 CAR을 발현하는 $CD8^+$ T 세포를 포함하고;

상기 투여량은 복수의 개별 조성물의 투여용으로 제형화되되, 상기 복수의 개별 조성물은 상기 $CD8^+$ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 1 조성물 및 상기 $CD4^+$ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 2 조성물을 포함하는 것인, 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호-참조

[0002] 본원은, "입양 세포 요법에서 여포성 림프종 및 변연부 림프종의 투여 및 치료 방법"이라는 명칭으로 2020년 1월 24일자로 출원된 미국 가출원 제62/965,774호, "입양 세포 요법에서 여포성 림프종 및 변연부 림프종의 투여 및 치료 방법"이라는 명칭으로 2020년 6월 10일자로 출원된 미국 가출원 제63/037,542호, 및 "입양 세포 요법에서 여포성 림프종 및 변연부 림프종의 투여 및 치료 방법"이라는 명칭으로 2020년 8월 21일자로 출원된 미국 가출원 제63/068,975호에 대한 우선권을 주장하며, 그 내용은 그 전문이 참조로 포함된다.

[0003] 서열 목록의 참조에 의한 편입

[0004] 본원은 전자 형식의 서열목록과 함께 제출된다. 서열목록은 크기가 35,356bytes이며, 2021년 1월 13일에 생성된 735042023440SeqList.TXT라는 파일로 제공된다. 서열 목록의 전자적 형식의 정보는 그 전체가 참조로 포함된다.

[0005] 분야

[0006] 본 개시는 일부 측면에서 고위험 대상체를 포함하는 무통성 비호지킨 림프종(indolent non-Hodgkin's lymphoma; NHL)을 갖는 대상체를 치료하기 위한, 세포 투여량의 투여를 포함하는 입양 세포 요법, 및 관련 방법, 조성물, 용도 및 제조 물품에 관한 것이다. 세포는 일반적으로 림프종의 세포에서 CD19와 같은 항원을 표적화하기 위한 키메라 항원 수용체(CAR)와 같은 재조합 수용체를 발현한다. 일부 구현예에서, 무통성 림프종은 여포성 림프종 등급 1-3A(FL 1-3A), 예를 들어 재발성 또는 불응성 FL이다. 일부 구현예에서, 질환 또는 병태는 변연부 림프종(MZL), 예를 들어 재발성 또는 불응성 MZL이다. 일부 구현예에서, 대상체는 FL 1-3A 또는 MZL 대상체의 특정 그룹 또는 서브세트, 예를 들어 과도하게 사전 치료된 대상체 또는 불량한 예후 대상체이다.

배경 기술

[0007] 무통성 비호지킨 림프종(NHL) 서브타입(subtype)은 일반적으로 화학면역치료제(chemoimmunotherapeutics), 예를 들어 항-CD20 표적 요법(anti-CD20 targeted therapies) 또는 알킬화제로 치료되는 느리게 성장하는 림프종 질환이다. 여포성 림프종은 가장 흔한 서브타입으로 전체 림프종의 10~20%를 차지한다. 변연부 림프종은 모든 B 세포 NHL 사례의 약 8~12%를 차지한다. 많은 환자들이 결국 재발하거나 이용 가능한 치료법에 불응하게 되며, 2차, 3차, 특히 4차 치료가 제한된다. 하나 이상의 선행 요법에 실패한 FL 1-3A 및 MZL 환자를 위한 효과적인 요법이 필요하다. 이러한 요구를 충족시키는 방법 및 용도가 제공된다.

발명의 내용

[0008] 본원에서는 여포성 림프종(follicular lymphoma; FL) 등급 1, 2 또는 3A인 질환 또는 병태를 갖거나 가질 것으로 의심되는 대상체를 치료하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 대상체에게 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 투여량(dose)을 투여하는 것을 포함하되, 상기 투여량의 T 세포는 CD19에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor; CAR)를 포함하고, 상기 대상체는 FL 등급 1, 2 또는 3A를 치료하기 위한 하나 이상의 선행 라인의 요법(prior line of therapy) 후에 재발하였거나 치료에 불응성이 되며, 상기 하나 이상의 선행 라인의 요법 중의 하나 이상은 항-CD20 항체 및 알킬화제를 사용한 치료를 포함하고; 상기 T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 1.5×10^8 개의 CAR-발현 T 세포(경계 포함, inclusive)를 포함하며; 상기 T 세포의 투여량은 대략 1:1 비율의 CAR을 발현하는 CD4+ T 세포 대 CAR을 발현하는 CD8+ T 세포를 포함하고; 상기 투여는 복수의 개별 조성물을 투여하는 것을 포함하되, 상기 복수의 개별 조성물은 상기 CD8+ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 1 조성물 및 상기 CD4+ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 2 조성물을 포함한다.

[0009] 본원에서는 또한 재발성/불응성(r/r) 여포성 림프종(FL) 등급 1, 2 또는 3A인 질환을 갖거나 가질 것으로 의심되는 대상체를 치료하는 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 투여량의 용도가 제공되며, 상기 투여량의 T 세포는 CD19에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하고; 상기 대상체는 FL 등급 1, 2 또는 3A를 치료하기 위한 하나 이상의 선행 라인의 요법 후에 재발하였거나 치료에 불응성이 되며, 상기 하나 이상의 선행 라인의 요법 중의 하나 이상은 항-CD20 항체 및 알킬화제를 사용한 치료를 포함하고; 상기 T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 1.5×10^8 개의 CAR-발현 T 세포를 함유하며, 경계 포함(inclusive); 상기 T 세포의 투여량은 대략 1:1 비율의 CAR을 발현하는 CD4+ T 세포 대 CAR을 발현하는 CD8+ T 세포를 가지고; 상기 투여량은 복수의 개별 조성물로서 투여하기 위한 것으로 제형화되되, 상기 복수의 개별 조성물은 상기 CD8+ CAR-발현 T 세포를 함유하는 제 1 조성물 및 상기 CD4+ CAR-발현 T 세포를 함유하는 제 2 조성물을 포함한다.

[0010] 본원에서는 또한 재발성/불응성(r/r) 여포성 림프종(FL) 등급 1, 2 또는 3A인 질환을 갖거나 가질 것으로 의심되는 대상체의 치료용 약제의 제조에서 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 투여량의 용도가 제공되며, 상기 투여량의 T 세포는 CD19에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하고; 상기 대상체는 FL 등급 1, 2 또는 3A를 치료하기 위한 하나 이상의 선행 라인의 요법 후에 재발하였거나 치료에 불응성이 되며, 상기 하나 이상의 선행 라인의 요법 중의 하나 이상은 항-CD20 항체 및 알킬화제를 사용한 치료를 포함하고; 상기 T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 1.5×10^8 개의 CAR-발현 T 세포를 함유하며, 경계 포함(inclusive); 상기 T 세포의 투여량은 대략 1:1 비율의 CAR을 발현하는 CD4+ T 세포 대 CAR을 발현하는 CD8+ T 세포를 가지고; 상기 투여량은 복수의 개별 조성물로서 투여하기 위한 것으로 제형화되되, 상기 복수의 개별 조성물은 상기 CD8+ CAR-발현 T 세포를 함유하는 제 1 조성물 및 상기 CD4+ CAR-발현 T 세포를 함유하는 제 2 조

성물을 포함한다.

- [0011] 일부 구현예에서, 하나 이상의 선행 라인의 요법은 하나의 선행 라인의 요법이다.
- [0012] 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 하나의 선행 라인의 요법을 완료한 후 진단 24개월 이내에 질환이 진행(POD24)되었다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 하나의 선행 라인의 요법을 완료한 후 상기 하나의 선행 라인의 요법의 개시 24개월 이내에 질환이 진행(POD24)되었다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 질환을 치료하기 위한 화학면역요법 조합 요법을 완료한 후 진단 24개월 이내에 질환이 진행(POD24)되었다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 질환을 치료하기 위한 화학면역치료 조합 요법을 완료한 후 치료의 개시 24개월 이내에 질환이 진행(POD24)되었다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 화학면역요법 조합 요법은 리톡시맙, 사이클로포스파미드, 빈크리스틴, 독소루비신 및 프레드니솔론(R-CHOP)을 포함한다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 R-CHOP를 사용한 치료를 완료한 후 진단의 24개월 이내에 질환이 진행(POD24)되었다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 R-CHOP에 의한 치료의 개시 후 24개월 이내에 질환이 진행(POD24)되었다.
- [0013] 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 화학면역요법 조합 요법은 항-CD20 모노클로날 항체 및 알킬화제를 포함한다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 항-CD20 항체 및 알킬화제를 사용한 치료를 완료한 후 진단의 24개월 이내에 질환이 진행(POD24)되었다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 항-CD20 항체 및 알킬화제를 사용한 치료의 개시 후 24개월 이내에 질환이 진행(POD24)되었다.
- [0014] 일부 구현예에서, 대상체는 FL 등급 1, 2 또는 3A를 치료하기 위한 하나의 선행 라인의 요법 후에 재발하였거나 치료에 불응성이고, 항-CD20 항체 및 알킬화제인 상기 하나의 선행 라인의 요법의 개시 24시간 이내에 질환이 진행(POD24)되었다. 일부 구현예에서, 대상체는 FL 등급 1, 2 또는 3A를 치료하기 위한 하나의 선행 라인의 요법 후에 재발하였거나 치료에 불응성이고, 항-CD20 항체 및 알킬화제를 포함하는 하나의 선행 라인의 요법을 완료한 후 진단의 24개월 이내에 질환이 진행(POD24)되었다.
- [0015] 일부 구현예에서, 대상체는 FL 등급 1, 2 또는 3A를 치료하기 위한 하나의 선행 라인의 요법 후에 재발하였거나 치료에 불응성이고, FL에 기인하는 증후; 위협된 말단-기관 기능(threatened end-organ function), 림프종에 따른 혈구 감소증(cytopenia secondary), 또는 벌키 질환(bulky disease); 비장종대(splenomegaly); 및 선행 6개월 이상 동안 질환의 꾸준한 진행(steady progression of disease over the preceding six months or more); 중의 하나 이상을 갖는다. 일부 구현예에서, 대상체는 FL에 기인하는 증후를 갖는다. 일부 구현예에서, 대상체는 위협된 말단-기관 기능을 갖는다. 일부 구현예에서, 대상체는 FL에 기인하는 증후를 갖는다. 일부 구현예에서, 대상체는 림프종에 이차적인 혈구감소증을 갖는다. 일부 구현예에서, 대상체는 벌키 질환을 갖는다. 일부 구현예에서, 벌키 질환은 단일 종괴(single mass) > 7 cm 또는 3개 이상의 종괴 > 3 cm이다. 일부 구현예에서, 대상체는 비장종대를 갖는다. 일부 구현예에서, 대상체는 선행 6개월 이상 동안 질환의 꾸준한 진행을 갖는다.
- [0016] 일부 구현예에서, 하나 이상의 선행 라인의 요법은 2개의 선행 라인의 요법이다. 일부 구현예에서, 2개의 선행 라인의 요법 중의 다른 것은 리톡시맙; 오비누투주맙(obinutuzumab); 벤다무스틴 + 리톡시맙(bendamustine plus rituximab; BR); 벤다무스틴 + 오비누투주맙(bendamustine plus obinutuzumab; BO); R-CHOP; 리톡시맙, 사이클로포스파미드, 빈크리스틴 및 프레드니손(R-CVP); HSCT(선택적으로 자가 또는 동종 HSCT); 리톡시맙과 조합된 레날리도마이드(lenalidomide); 또는 PI3K 억제제(PI3Ki)를 사용한 치료로부터 선택된다. 일부 구현예에서, PI3Ki는 이데랄리십(idelalisib), 코판리십(copanlisib) 또는 두벨리십(duvelisib)이다.
- [0017] 일부 구현예에서, 대상체는 치료에 불응성이거나 선행 라인의 요법 완료의 12개월 이내에 재발되었다. 일부 구현예에서, 선행 라인의 요법은 조합 요법 또는 PI3Ki를 포함하는 단독 요법(monotherapy)이다. 일부 구현예에서, 2개의 선행 라인의 요법 중의 다른 것은 조혈모세포 이식(hematopoietic stem cell transplant; HSCT)이고, 대상체는 HSCT 후에 재발하였다.
- [0018] 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 항-CD20 요법(항-CD20 불응성)을 사용한 치료에 불응성이거나, 치료 동안 또는 치료 완료 후 6개월까지 재발하였다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 항-CD20 요법(항-CD20 불응성)을 사용한 치료에 대해 불응성이다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 항-CD20 요법(항-CD20 불응성)을 사용한 치료를 완료하는 동안 또는 그 후 6개월까지 재발하였다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 항-CD20 항체를 사용한 치료에 불응성이거나, 또는 항-CD20 항체로 치료하는 동안 또는 치료를 완료한 후 최대 6개월까지 재발하였다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 항-CD20 항체를 사용한 치료에 대해 불응성이다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 항-CD20 항체를 사용한 치료를 완료하는 동안 또

는 그 후 6개월까지 재발하였다.

- [0019] 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 항-CD20 요법 및 알킬화제를 사용한 치료에 불응성이거나 치료 동안 또는 치료 완료 후 최대 6개월까지 재발하였다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 항-CD20 요법 및 알킬화제를 포함하는 선행 라인의 요법에 대해 난치성이다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 항-CD20 요법 및 알킬화제를 포함하는 선행 라인의 요법을 완료한 지 6개월 이내에 재발하였다.
- [0020] 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 2개 이상의 요법 후 또는 유지 완료(maintenance completion) 후 6개월 이내에 항-CD20 항체 유지 동안 재발하였다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 2개 이상의 라인의 요법 후에 항-CD20 항체 유지 요법 동안 재발하였다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 항-CD20 항체 유지 요법의 완료 후 6개월 이내에 재발하였다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 2회의 선행 라인의 요법 후에 항-CD20 항체 유지 요법으로 치료되었고, 대상체는 항-CD20 유지 요법 동안 재발하였다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 항-CD20 항체 유지 요법으로 치료되었고, 대상체는 항-CD20 항체 유지 요법을 완료한 후 6개월 이내에 재발하였다.
- [0021] 일부 구현예에서, 항-CD20 항체는 모노클로날 항체이다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 항-CD20 모노클로날 항체는 리툭시맙 또는 오비누투주맙이다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 항-CD20 모노클로날 항체는 리툭시맙이다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 항-CD20 항체는 오비누투주맙이다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 알킬화제는 벤다무스틴 또는 클로람부실이다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 알킬화제는 벤다무스틴이다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 알킬화제는 클로람부실이다.
- [0022] 제공된 구현예 중의 일부에서, 대상체는 조혈 줄기 세포 이식, 선택적으로는 동종이계(allogeneic) 또는 자가(autologous) HSCT 후에 재발하였다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 조혈 줄기 세포 이식(HSCT) 후에 재발하였다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 조혈 줄기 세포 이식은 동종이계 HSCT이다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 조혈 줄기 세포 이식은 자가 HSCT이다.
- [0023] 임의의 제공된 구현예 중의 일부에서, 하나 이상의 선행 요법은 2개의 선행 요법이다. 임의의 이러한 구현예에서, 2개의 선행 라인의 요법 중의 다른 것은 리툭시맙; 오비누투주맙; 벤다무스틴 + 리툭시맙(BR); 벤다무스틴 + 오비누투주맙(BO); R-CHOP; 리툭시맙, 사이클로포스파미드, 빈크리스틴 및 프레드니손(R-CVP); HSCT(선택적으로 자가 또는 동종 HSCT); 리툭시맙과 조합된 레날리도마이드; 또는 PI3K 억제제를 사용한 치료로부터 선택되고, 선택적으로는 상기 PI3K 억제제는 이데랄리십, 코판리십 또는 두벨리십이다. 임의의 이러한 구현예에서, 2개의 선행 라인의 요법 중의 다른 것은 리툭시맙; 오비누투주맙; 벤다무스틴 + 리툭시맙(BR); 벤다무스틴 + 오비누투주맙(BO); R-CHOP; 리툭시맙, 사이클로포스파미드, 빈크리스틴 및 프레드니손(R-CVP); HSCT(선택적으로 자가 또는 동종 HSCT); 리툭시맙과 조합된 레날리도마이드; 또는 PI3K 억제제를 사용한 치료로부터 선택된다. 일부 구현예에서, PI3K 억제제는 이데랄리십, 코판리십 또는 두벨리십이다. 일부 구현예에서, PI3K 억제제는 이데랄리십이다. 일부 구현예에서, PI3K 억제제는 코판리십이다. 일부 구현예에서, PI3K 억제제는 두벨리십이다.
- [0024] 임의의 제공된 구현예 중의 일부에서, 하나 이상의 선행 요법은 3개의 선행 요법이다. 임의의 이러한 구현예에서, 3개의 선행 라인의 요법 중의 다른 2개는 각각 독립적으로 리툭시맙; 오비누투주맙; 벤다무스틴 + 리툭시맙(BR); 벤다무스틴 + 오비누투주맙(BO); R-CHOP; 리툭시맙, 사이클로포스파미드, 빈크리스틴 및 프레드니손(R-CVP); HSCT(선택적으로 자가 또는 동종 HSCT); 리툭시맙과 조합된 레날리도마이드; 또는 PI3K 억제제를 사용한 치료로부터 선택되고, 선택적으로는 상기 PI3K 억제제는 이데랄리십, 코판리십 또는 두벨리십이다. 임의의 이러한 구현예에서, 3개의 선행 라인의 요법 중의 다른 2개는 각각 독립적으로 리툭시맙; 오비누투주맙; 벤다무스틴 + 리툭시맙(BR); 벤다무스틴 + 오비누투주맙(BO); R-CHOP; 리툭시맙, 사이클로포스파미드, 빈크리스틴 및 프레드니손(R-CVP); HSCT(선택적으로 자가 또는 동종 HSCT); 리툭시맙과 조합된 레날리도마이드; 또는 PI3K 억제제를 사용한 치료로부터 선택된다. 일부 구현예에서, PI3K 억제제는 이데랄리십, 코판리십 또는 두벨리십이다. 일부 구현예에서, PI3K 억제제는 이데랄리십이다. 일부 구현예에서, PI3K 억제제는 코판리십이다. 일부 구현예에서, PI3K 억제제는 두벨리십이다.
- [0025] 일부 구현예에서, 대상체는 항-CD20 항체를 사용한 치료에 대해 불응성이다. 일부 구현예에서, 대상체는 항-CD20 항체 및 알킬화제를 포함하는 선행 라인의 요법에 대해 불응성이다. 일부 구현예에서, 대상체는 항-CD20 항체를 사용한 치료를 완료한 지 6개월 이내에 재발하였다. 일부 구현예에서, 대상체는 항-CD20 항체 및 알킬화제를 포함하는 선행 라인의 요법을 완료한 후 6개월 이내에 재발하였다. 일부 구현예에서, 대상체는 2개의 선행 라인의 요법 후에 항-CD20 항체 유지 요법으로 치료되었고, 대상체는 항-CD20 유지 요법 동안 또는 항-CD20 항

체 유지 요법을 완료한 후 6개월 이내에 재발하였다.

- [0026] 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 임의로 PI3Ki를 사용한 조합 요법 또는 단독 요법을 사용한 치료 후, 선행 라인의 요법의 완료 후 12개월 이내에 재발하였거나 치료에 불응성이다. 제공된 구현예 중 어느 것에서, 대상체는 조합 요법 완료 후 12개월 이내에 재발하였거나 치료에 불응성이다. 제공된 구현예 중의 일부에서, 대상체는 PI3Ki를 사용한 단독 요법 완료 후 12개월 이내에 재발하였거나 치료에 불응성이다.
- [0027] 제공된 구현예 중의 일부에서, 대상체는 선행 라인의 요법의 완료 후 12개월 이내에 재발하였거나 치료에 불응성이다. 일부 구현예에서, 대상체는 1차 요법 완료 후 12개월 이내에 재발하였거나 치료에 불응성이다. 일부 구현예에서, 대상체는 2차 요법 완료 후 12개월 이내에 재발하였거나 치료에 불응성이다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 선행 라인의 요법의 완료 후 12개월 이내에 재발하였다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 1차 요법의 완료 후 12개월 이내에 재발하였다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 2차 요법의 완료 후 12개월 이내에 재발하였다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 선행 라인의 요법의 완료 후 12개월 이내에 치료에 불응성이다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 1차 요법의 완료 후 12개월 이내에 치료에 불응성이다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 2차 요법의 완료 후 12개월 이내에 치료에 불응성이다. 일부 구현예에서, 선행 라인의 요법은 PI3Ki를 사용한 조합 요법 또는 단독 요법을 사용한 치료이다. 일부 구현예에서, 선행 라인의 요법은 PI3Ki를 사용한 단독 요법이다. 일부 구현예에서, 선행 요법은 조합 요법을 사용한 치료이다.
- [0028] 일부 구현예에서, 항-CD20 항체는 모노클로날 항체이다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 항-CD20 항체는 리툭시맙 또는 오비누투주맙이다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 항-CD20 항체는 리툭시맙이다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 항-CD20 항체는 오비누투주맙이다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 알킬화제는 벤다무스틴 또는 클로람부실이다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 알킬화제는 벤다무스틴이다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 알킬화제는 클로람부실이다.
- [0029] 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 하나 이상의 선행 라인의 요법에 대해 재발하고, 재발은 선행 라인의 요법에 대한 완전 반응(CR) 또는 부분 반응(PR)의 초기 반응 후이다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 재발은 선행 라인의 요법에 대한 완전 반응(CR)의 초기 반응 후이다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 재발은 선행 라인의 요법에 대한 부분 반응(PR)의 초기 반응 후이다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 하나 이상의 선행 요법에 의한 치료에 불응성이 되며, 불응성 치료는 선행 라인의 요법 후 안정 질환(SD) 또는 진행성 질환(PD)의 최상의 대응이다. 일부 구현예에서, 불응성 치료는 선행 라인의 요법 후 안정 질환(SD)의 최상의 대응이다. 일부 구현예에서, 불응성 치료는 선행 라인의 요법 후 진행성 질환(PD)의 최상의 대응이다.
- [0030] 일부 구현예에서, 대상체는 하나의 선행 라인의 요법에 대해 재발하였다. 일부 구현예에서, 대상체는 2개의 선행 라인의 요법에 대해 재발하였다. 일부 구현예에서, 대상체는 3개의 선행 라인의 요법에 대해 재발하였다. 일부 구현예에서, 대상체는 3개 초과 선행 라인의 요법에 대해 재발하였다. 일부 구현예에서, 대상체는 하나의 선행 라인의 요법에 대해 불응성이다. 일부 구현예에서, 대상체는 2개의 선행 라인의 요법에 대해 불응성이다. 일부 구현예에서, 대상체는 3개의 선행 라인의 요법에 대해 불응성이다. 일부 구현예에서, 대상체는 3개 이상의 선행 라인의 요법에 대해 불응성이다.
- [0031] 제공된 구현예 중의 어느 것의 일부에서, 대상체는 하나 이상의 PET-양성 병변 및 하나 이상의 측정가능한 결절 병변 또는 결절외 병변을 갖고, 선택적으로 여기서 측정가능한 결절 병변은 단축과 무관하게 장축에서 1.5 cm 초과이다. 축 및 측정 가능한 결절외 병변이 장축 및 단축에서 1.0cm 초과이다. 제공된 구현예 중의 어느 것 중의 일부에서, 대상체는 하나 이상의 PET-양성 병변 및 하나 이상의 측정가능한 결절 병변 또는 결절외 병변을 갖는다. 임의의 제공된 구현예 중의 일부에서, 측정가능한 결절 병변은 단축과 무관하게 장축에서 1.5 cm 초과이고 측정가능한 결절외 병변은 장축 및 단축에서 1.0 cm 초과이다.
- [0032] 본원에서는 또한 변연부 림프종(marginal zone lymphoma; MZL)을 치료하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 재발성/불응성(r/r) 변연부 림프종(MZL)을 갖거나 가질 것으로 의심되는 대상체에게 $CD4^{+}$ 및 $CD8^{+}$ T 세포의 투여량을 투여하는 것을 포함하되, 상기 투여량의 T 세포는 CD19에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하고; 상기 대상체는 MZL을 치료하기 위한 2개 이상의 선행 라인의 요법 후에 재발하였거나 치료에 불응성이 되며; 상기 T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 1.5×10^8 개의 CAR-발현 T 세포(경계 포함, inclusive)를 포함하며; 상기 T 세포의 투여량은 대략 1:1 비율의 CAR을 발현하는 $CD4^{+}$ T 세포 대 CAR

을 발현하는 $CD8^+$ T 세포를 포함하고; 상기 투여는 복수의 개별 조성물을 투여하는 것을 포함하되, 상기 복수의 개별 조성물은 상기 $CD8^+$ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 1 조성물 및 상기 $CD4^+$ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 2 조성물을 포함한다.

[0033] 본원에서는 또한 재발성/불응성(r/r) 변연부 림프종(marginal zone lymphoma; MZL)을 갖거나 가질 것으로 의심되는 대상체를 치료하는 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 투여량의 용도가 제공되되, 상기 투여량의 T 세포는 CD19에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하고; 상기 대상체는 MZL을 치료하기 위한 2개 이상의 선행 라인의 요법 후에 재발하였거나 치료에 불응성이 되며; 상기 T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 1.5×10^8 개의 CAR-발현 T 세포를 함유하며, 경계 포함; 상기 T 세포의 투여량은 대략 1:1 비율의 CAR을 발현하는 $CD4^+$ T 세포 대 CAR을 발현하는 $CD8^+$ T 세포를 갖고; 상기 투여량은 복수의 개별 조성물의 투여용으로 제형화되되, 상기 복수의 개별 조성물은 상기 $CD8^+$ CAR-발현 T 세포를 함유하는 제 1 조성물 및 상기 $CD4^+$ CAR-발현 T 세포를 함유하는 제 2 조성물을 포함한다.

[0034] 본원에서는 또한 재발성/불응성(r/r) 변연부 림프종(MZL)을 갖거나 가질 것으로 의심되는 대상체의 치료용 약제의 제조에서 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 투여량의 용도가 제공되되, 상기 투여량의 T 세포는 CD19에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하고; 상기 대상체는 MZL을 치료하기 위한 2개 이상의 선행 라인의 요법 후에 재발하였거나 치료에 불응성이 되며; 상기 T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 1.5×10^8 개의 CAR-발현 T 세포를 함유하며, 경계 포함; 상기 T 세포의 투여량은 대략 1:1 비율의 CAR을 발현하는 $CD4^+$ T 세포 대 CAR을 발현하는 $CD8^+$ T 세포를 함유하고; 상기 투여량은 복수의 개별 조성물의 투여용으로 제형화되되, 상기 복수의 개별 조성물은 상기 $CD8^+$ CAR-발현 T 세포를 함유하는 제 1 조성물 및 상기 $CD4^+$ CAR-발현 T 세포를 함유하는 제 2 조성물을 포함한다.

[0035] 제공된 구현예 중의 어느 것에서, MZL은 결절의 MZL(ENMZL, 주로 위(gastric)), 비장 MZL(SMZL) 및 결절 MZL(NMZL) 중에서 선택되는 서브타입이다. 일부 구현예에서, MZL은 결절 MZL(ENMZL, 주로 위). 일부 구현예에서, MZL은 비장 MZL(SMZL)이다. 일부 구현예에서, MZL은 결절 MZL(NMZL)이다.

[0036] 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 2개 이상의 선행 요법 중의 하나 이상은 MZL을 치료하기 위한 조합 전신 요법이거나 조혈 줄기 세포 이식(HSCT)이다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 2개 이상의 선행 요법 중의 하나 이상은 MZL을 치료하기 위한 조합 전신 요법이다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 2개 이상의 선행 라인의 요법 중의 하나 이상은 조혈 줄기 세포 이식(HSCT)이다.

[0037] 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 2개 이상의 선행 라인의 요법 중의 하나 이상은 조합 전신 요법이고 조합 전신 요법은 리툭시맙 + 사이클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴 및 프레드니손(R-CHOP)으로부터 선택되거나, 또는 항-CD20 항체 및 알킬화제를 사용한 요법이다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 2개 이상의 선행 라인의 요법 중의 하나 이상은 리툭시맙 + 사이클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴 및 프레드니손(R-CHOP)이다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 2개 이상의 선행 라인의 요법 중의 하나 이상은 항-CD20 항체 및 알킬화제인 조합 전신 요법이다.

[0038] 일부 구현예에서, 항-CD20 항체는 모노클로날 항체이다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 항-CD20 항체는 리툭시맙 또는 오비누투주맙이다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 항-CD20 항체는 리툭시맙이다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 항-CD20 항체는 오비누투주맙이다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 알킬화제는 벤다무스틴 또는 클로람부실이다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 알킬화제는 벤다무스틴이다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 알킬화제는 클로람부실이다.

[0039] 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 2개 이상의 선행 요법 중의 하나 이상은 리툭시맙 및 벤다무스틴 또는 리툭시맙 및 클로람부실이다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 2개 이상의 선행 요법 중의 하나 이상은 리툭시맙 및 벤다무스틴이다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 2개 이상의 선행 요법 중의 하나 이상은 리툭시맙 및 클로람부실이다.

[0040] 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 비장 MZL(SMZL)을 갖고 2개 이상의 선행 라인의 요법 중의 하나 이상은 비장절제술이다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 결절의 MZL(ENMZL)을 갖고 항생제는 2개 이상

의 선행 라인의 요법 중의 하나가 아니다.

- [0041] 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 장축에서 2.0 cm 초과와 하나 이상의 측정가능한 결절 병변 또는 하나 이상의 측정가능한 결절외 병변을 갖는 PET 비열성 질환을 갖는다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 장축에서 2.0 cm 초과와 하나 이상의 측정가능한 결절 병변을 갖는 PET 비열성 질환을 갖는다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 하나 이상의 측정가능한 결절외 병변을 갖는 PET 비열성 질환을 갖는다.
- [0042] 제공된 구현예 중의 일부에서, 대상체는 FL 등급 3B(FL3B)를 갖지 않는다. 제공된 구현예 중의 일부에서, 대상체는 복합 DLBCL 및 FL, 또는 형질전환된 FL의 증거를 갖지 않는다. 제공된 구현예 중의 일부에서, 대상체는 복합 DLBCL 및 FL의 증거를 갖지 않는다. 제공된 구현예 중의 일부에서, 대상체는 변환된 FL의 증거를 가지 않는다. 제공된 구현예 중의 일부에서, 대상체는 십이지장형 FL의 세계보건기구(WHO) 하위분류를 갖지 않는다.
- [0043] 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 하나 이상의 선행 라인의 요법에 대해 재발하고, 재발은 선행 라인의 요법에 대한 완전 반응(CR) 또는 부분 반응(PR)의 초기 반응 후이다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 재발은 선행 라인의 요법에 대한 완전 반응(CR)의 초기 반응 후이다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 재발은 선행 라인의 요법에 대한 부분 반응(PR)의 초기 반응 후이다. 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 하나 이상의 선행 라인의 요법에 의한 치료에 불응성이 되며, 불응성 치료는 선행 라인의 요법 후 안정 질환(SD) 또는 진행성 질환(PD)의 최상의 대응이다. 일부 구현예에서, 불응성 치료는 선행 라인의 요법 후 안정 질환(SD)의 최상의 대응이다. 일부 구현예에서, 불응성 치료는 선행 라인의 요법 후 진행성 질환(PD)의 최상의 대응이다.
- [0044] 일부 구현예에서, 대상체는 하나의 선행 라인의 요법에 대해 재발하였다. 일부 구현예에서, 대상체는 2개의 선행 라인의 요법에 대해 재발하였다. 일부 구현예에서, 대상체는 3개의 선행 라인의 요법에 대해 재발하였다. 일부 구현예에서, 대상체는 3개 초과와 선행 라인의 요법에 대해 재발하였다. 일부 구현예에서, 대상체는 하나의 선행 라인의 요법에 대해 불응성이다. 일부 구현예에서, 대상체는 2개의 선행 라인의 요법에 대해 불응성이다. 일부 구현예에서, 대상체는 3개의 선행 라인의 요법에 대해 불응성이다. 일부 구현예에서, 대상체는 3개 이상의 선행 라인의 요법에 대해 불응성이다.
- [0045] 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 대상체는 ECOG(미 동부 종양학 그룹 협회(Eastern Cooperative Oncology Group))의 0 또는 1의 수행 상태를 갖는다. 제공된 임의의 구현예 중의 일부에서, 대상체는 ECOG의 0의 수행 상태를 갖는다. 제공된 구현예에서, 대상체는 ECOG의 1의 수행 상태를 갖는다.
- [0046] 제공된 구현예 중의 어느 것에서, CD4+ 및 CD8+ T 세포의 투여량을 투여하기 전에 대상체에게 림프구 고갈 요법을 투여하였다. 임의의 제공된 구현예 중의 일부에서, 림프구고갈 요법은 투여량의 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 투여를 개시하기 전 약 7일 이내에 완료된다. 임의의 제공된 구현예 중의 일부에서, 림프구 고갈 요법은 투여량의 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 투여 개시 전 약 2 내지 7일에 완료된다.
- [0047] 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 림프구 고갈 요법은 플루다라빈 및/또는 사이클로포스파미드의 투여를 포함한다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 림프구 고갈 요법은 플루다라빈의 투여를 포함한다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 림프구 고갈 요법은 사이클로포스파미드의 투여를 포함한다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 림프구 고갈 요법은 플루다라빈 및 사이클로포스파미드의 투여를 포함한다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 림프구 고갈 요법은 2 내지 4일 동안 매일, 선택적으로는 3일 동안 (약) 200 내지 400 mg/m^2 , 선택적으로는 (약) 300 mg/m^2 (경계 포함)의 사이클로포스파미드 및/또는 (약) 20 내지 40 mg/m^2 의, 선택적으로는 (약) 30 mg/m^2 의 플루다라빈 투여를 포함한다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 림프구 고갈 요법은 3일 동안 매일 (약) 300 mg/m^2 (경계 포함)의 사이클로포스파미드 및/또는 (약) 30 mg/m^2 의 플루다라빈 투여를 포함한다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 림프구 고갈 요법은 3일 동안 매일 (약) 300 mg/m^2 의 사이클로포스파미드 및 (약) 30 mg/m^2 의 플루다라빈을 동시에 투여하는 것을 포함한다.
- [0048] 제공된 구현예 중의 어느 것에서, CD19는 인간 CD19이다.
- [0049] 제공된 구현예 중의 어느 것에서, 키메라 항원 수용체(CAR)는 항체 FMC63의 가변 중쇄 영역 및 가변 경쇄 영역을 포함하는 scFv, 15개 미만의 아미노산이고 면역글로불린 힌지 영역 또는 이의 변형된 버전을 함유하는 스페이서, 막관통 도메인, 및 CD3-제타(CD3 ζ) 사슬의 신호전달 도메인 및 4-1BB의 신호전달 도메인인 공자극 신호전달 영역을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0050] 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 면역글로불린 힌지 영역 또는 그의 변형된 버전은 식 X₁PPX₂P를 포함하고,

여기서 X_1 은 글리신, 시스테인 또는 아르기닌이고 X_2 는 시스테인 또는 트레오닌(서열번호 58)이다. 일부 구현예에서, X_1 은 글리신이다. 일부 구현예에서, X_1 은 시스테인이다. 일부 구현예에서, X_1 은 아르기닌이다. 일부 구현예에서, X_2 는 시스테인이다. 일부 구현예에서, X_2 는 트레오닌이다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 면역글로불린 힌지 또는 그의 변형된 버전은 IgG1 힌지 또는 그의 변형된 버전이다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 면역글로불린 힌지 또는 그의 변형된 버전은 IgG1 힌지이다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 면역글로불린 힌지 또는 그의 변형된 버전은 IgG1 힌지의 변형된 버전이다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 면역글로불린 힌지 또는 그의 변형된 버전은 IgG4 힌지 또는 그의 변형된 버전이다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 면역글로불린 힌지 또는 그의 변형된 버전은 IgG4 힌지이다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 면역글로불린 힌지 또는 그의 변형된 버전은 IgG4 힌지의 변형된 버전이다.

[0051] 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 스페이서는 서열번호 1, 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34에 제시된 서열, 또는 그와 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 전술한 것들 중의 임의의 것의 변이체를 포함하거나 또는 그들로 구성된다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 스페이서는 길이가 (약) 12개의 아미노산이다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 스페이서는 서열번호 1, 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34에 제시된 서열, 또는 서열번호 1, 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 또는 서열번호 34에 제시된 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 전술한 것 중의 임의의 것의 변이체를 포함한다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 스페이서는 서열번호 1, 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34에 제시된 서열, 또는 서열번호 1, 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 또는 서열번호 34에 제시된 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 전술한 것 중의 임의의 것의 변이체로 구성된다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 스페이서는 길이가 (약) 12개의 아미노산이다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 스페이서는 서열번호 1에 제시된 서열로 구성된다.

[0052] 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 막관통 도메인은 CD28의 막관통 도메인이다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 막관통 도메인은 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 8과 적어도 (약) 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 막관통 도메인은 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 막관통 도메인은 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열로 구성된다.

[0053] 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 공자극 도메인은 서열번호 12에 제시된 서열을 포함하거나 또는 서열번호 12에 제시된 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 변이체이다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 공자극 도메인은 서열번호 12에 제시된 서열을 포함한다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, 공자극 도메인은 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열로 구성된다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, CD3-제타(CD3 ζ) 사슬의 신호전달 도메인은 서열번호 13, 14, 또는 15에 제시된 서열을 포함하거나 또는 서열번호 13, 14, 또는 15에 제시된 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 변이체이다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, CD3-제타(CD3 ζ) 사슬의 신호전달 도메인은 서열번호 13에 제시된 서열을 포함한다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, CD3-제타(CD3 ζ) 사슬의 신호전달 도메인은 서열번호 14에 제시된 서열을 포함한다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, CD3-제타(CD3 ζ) 사슬의 신호전달 도메인은 서열번호 15에 제시된 서열을 포함한다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, CD3-제타(CD3 ζ) 사슬의 신호전달 도메인은 서열번호 13에 제시된 서열로 구성된다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, CD3-제타(CD3 ζ) 사슬의 신호전달 도메인은 서열번호 14에 제시된 서열로 구성된다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, CD3-제타(CD3 ζ) 사슬의 신호전달 도메인은 서열번호 15에 제시된 서열로 구성된다.

[0054] 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, scFv는 서열번호 35의 CDRL1 서열, 서열번호 55의 CDRL2 서열, 및/또는 서열번호 56의 CDRL3 서열 및 서열번호 38의 CDRH1 서열, 서열번호 39의 CDRH2 서열, 및/또는 서열번호 54의 CDRH3 서열을 포함한다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, scFv는 서열번호 35의 CDRL1 서열, 서열번호 55의 CDRL2 서열, 및 서열번호 56의 CDRL3 서열 및 서열번호 38의 CDRH1 서열, 서열번호 39의 CDRH2 서열, 및 서열번호 54의 CDRH3 서열을 포함한다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, scFv는 RASQDISKYLN의 CDRL1 서열

(서열번호 35), SRLHSGV의 CDRL2 서열(서열번호 36), 및/또는 GNTLPYTFG의 CDRL3 서열(서열번호 37) 및 DYGVSV의 CDRH1 서열(서열번호 38), VIWGSETTYNSALKS의 CDRH2 서열(서열번호 39), 및/또는 YAMDYWG의 CDRH3 서열(서열번호 40)을 포함한다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, scFv는 RASQDISKYLN의 CDRL1 서열(서열번호 35), SRLHSGV의 CDRL2 서열(서열번호 36), 및/또는 GNTLPYTFG의 CDRL3 서열(서열번호 37) 및 DYGVSV의 CDRH1 서열(서열번호 38), VIWGSETTYNSALKS의 CDRH2 서열(서열번호 39), 및 YAMDYWG의 CDRH3 서열(서열번호 40)을 포함한다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, scFv는 서열번호 41에 제시된 서열을 포함하는 V_H , 및 서열번호 42에 제시된 서열을 포함하는 V_L 을 순서대로 포함한다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, scFv는 서열번호 43에 제시된 서열을 포함한다. 임의의 이러한 구현예 중의 일부에서, scFv는 N-말단에서 C-말단까지 순서대로, 서열번호 42에 제시된 서열을 포함하는 V_L , 및 서열번호 41에 제시된 서열을 포함하는 V_H 를 포함한다.

[0055]

제공된 구현예 중의 어느 것에서, CAR은 N-말단에서 C-말단까지 순서대로 서열번호 43에 제시된 scFv인 세포의 항원 결합 도메인, 서열번호 1에 제시된 스페이서, 서열번호 8에 제시된 막관통 도메인, 서열번호 12에 제시된 4-1BB 공자극 신호전달 도메인, 및 서열번호 13에 제시된 CD3-제타(CD3 ζ) 사슬의 신호전달 도메인을 함유한다.

[0056]

일부 구현예에서, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 투여량은 약 5×10^7 개의 CAR+ T 세포 내지 약 1.1×10^8 개의 CAR+ T 세포(각각의 경계 포함)이다. 임의의 제공된 구현예 중의 일부에서, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 투여량은 5×10^7 개의 CAR+ T 세포이다. 임의의 제공된 구현예 중의 일부에서, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 투여량은 6×10^7 개의 CAR+ T 세포이다. 임의의 제공된 구현예 중의 일부에서, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 투여량은 7×10^7 개의 CAR+ T 세포이다. 임의의 제공된 구현예 중의 일부에서, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 투여량은 8×10^7 개의 CAR+ T 세포이다. 임의의 제공된 구현예 중의 일부에서, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 투여량은 9×10^7 개의 CAR+ T 세포이다. 임의의 제공된 구현예 중의 일부에서, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 투여량은 1×10^8 개의 CAR+ T 세포이다. 임의의 제공된 구현예 중의 일부에서, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 투여량은 1.1×10^8 개의 CAR+ T 세포이다. 임의의 제공된 구현예 중의 일부에서, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 투여량은 1.2×10^8 개의 CAR+ T 세포이다. 임의의 제공된 구현예 중의 일부에서, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 투여량은 1.3×10^8 개의 CAR+ T 세포이다. 임의의 제공된 구현예 중의 일부에서, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 투여량은 1.4×10^8 개의 CAR+ T 세포이다. 임의의 제공된 구현예 중의 일부에서, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 투여량은 1.5×10^8 개의 CAR+ T 세포이다.

[0057]

임의의 제공된 구현예 중의 일부에서, 제 1 조성물 및 제 2 조성물은 0 내지 12시간 간격, 0 내지 6시간 간격 또는 0 내지 2시간 간격으로 투여되거나, 또는 제 1 조성물의 투여 및 제 2 조성물의 투여는 같은 날(same day)에 수행되고, 약 0 내지 약 12시간 간격, 약 0 내지 약 6시간 간격, 또는 약 0 내지 약 2시간 간격으로 수행되고/되거나; 제 1 조성물의 투여 개시 및 제 2 조성물의 투여 개시는 약 1분 내지 약 1시간 간격 또는 약 5분 내지 약 30분 간격으로 수행된다. 임의의 제공된 구현예 중의 일부에서, 제 1 조성물 및 제 2 조성물은 0 내지 12시간 간격으로 투여된다. 임의의 제공된 구현예 중의 일부에서, 제 1 조성물 및 제 2 조성물은 0 내지 6시간 간격으로 투여된다. 임의의 제공된 구현예 중의 일부에서, 제 1 조성물 및 제 2 조성물은 0 내지 2시간 간격으로 투여된다. 임의의 제공된 구현예 중의 일부에서, 제 1 조성물 및 제 2 조성물은 같은 날에 투여된다. 임의의 제공된 구현예 중의 일부에서, 제 1 조성물의 투여 및 제 2 조성물의 투여는 약 0 내지 약 12시간 간격으로 수행된다. 임의의 제공된 구현예 중의 일부에서, 제 1 조성물 및 제 2 조성물은 같은 날에 투여된다. 임의의 제공된 구현예 중의 일부에서, 제 1 조성물의 투여 및 제 2 조성물의 투여는 약 0 내지 약 6시간 간격으로 수행된다. 임의의 제공된 구현예 중의 일부에서, 제 1 조성물의 투여 및 제 2 조성물의 투여는 약 0 내지 약 2시간 간격으로 수행된다. 일부 구현예에서, 제 1 조성물의 투여의 개시 및 제 2 조성물의 투여의 개시는 약 1분 내지 약 1시간 간격으로 수행된다. 일부 구현예에서, 제 1 조성물의 투여의 개시 및 제 2 조성물의 투여의 개시는 약 5분 내지 약 30분 간격으로 수행된다. 임의의 제공된 구현예 중의 일부에서, 제 1 조성물 및 제 2 조성물은 2시간 이하, 1시간 이하, 30분 이하, 15분 이하, 10분 이하 또는 5분 이하의 간격으로 투여된다. 임의의 제공된 구현예 중의 일부에서, 제 1 조성물 및 제 2 조성물은 2시간 이하의 간격으로 투여된다. 임의의 제공된 구현예 중의 일부에서, 제 1 조성물 및 제 2 조성물은 2시간 미만의 간격으로 투여된다. 임의의 제공된 구현예 중의 일부에서, 제 1 조성물 및 제 2 조성물은 1시간 미만의 간격으로 투여된다. 임의의 제공된 구현예 중의 일부에서, 제 1 조성물 및 제 2 조성물은 30분 이하의 간격으로 투여된다. 임의의 제공된 구현예 중의 일부에서, 제

1 조성물 및 제 2 조성물은 15분 이하의 간격으로 투여된다. 임의의 제공된 구현에 중의 일부에서, 제 1 조성물 및 제 2 조성물은 10분 이하의 간격으로 투여된다. 임의의 제공된 구현에 중의 일부에서, 제 1 조성물 및 제 2 조성물은 5분 이하의 간격으로 투여된다. 임의의 제공된 구현에 중의 일부에서, 제 1 조성물은 제 2 조성물 전에 투여된다. 일부 구현예에서, 제 1 조성물은 CD8⁺ CAR-발현 T 세포를 포함하고 제2 조성물은 CD4⁺ T CAR-발현 세포를 포함한다.

[0058] 임의의 제공된 구현에 중의 일부에서, CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포의 투여량은 정맥내 투여된다. 임의의 제공된 구현에 중의 일부에서, T 세포는 대상체로부터의 샘플로부터 수득된 1차 T 세포이다. 임의의 제공된 구현에 중의 일부에서, T 세포는 대상체에 대해 자가(autologous)이다. 일부 구현예에서, 세포가 유래되거나 단리되는 샘플은 혈액 또는 혈액-유래된 샘플이다. 일부 구현예에서, 세포가 유래되거나 단리되는 샘플은 성분채집(apheresis) 또는 백혈구 성분채집(leukapheresis) 생성물이거나 또는 그로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 샘플은 대상체에게 림프구 고갈 요법의 투여 전에 대상체로부터 수득된다. 일부 구현예에서, 백혈구 성분채집 샘플은 대상체에게 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포의 투여량의 투여 전에 대략 4 또는 5주에 대상체로부터 수득된다. 임의의 이러한 구현에 중의 일부에서, 대상체는 인간이다.

[0059] 임의의 제공된 구현에 중의 일부에서, 상기 방법에 따라 치료된 복수의 대상체 중에서 완전 반응률(complete response rate; CRR)은 (약) 50% 초과, (약) 60% 초과, (약) 70% 초과, 또는 (약) 80% 초과이다. 임의의 제공된 구현에 중의 일부에서, 상기 방법에 따라 치료된 복수의 대상체 중에서 완전 반응률(CRR)은 (약) 50% 초과이다. 임의의 제공된 구현에 중의 일부에서, 상기 방법에 따라 치료된 복수의 대상체 중에서 완전 반응률(CRR)은 (약) 60% 초과이다. 임의의 제공된 구현에 중의 일부에서, 상기 방법에 따라 치료된 복수의 대상체 중에서 완전 반응률(CRR)은 (약) 70% 초과이다. 임의의 제공된 구현에 중의 일부에서, 상기 방법에 따라 치료된 복수의 대상체 중에서 완전 반응률(CRR)은 (약) 80% 초과이다. 임의의 제공된 구현에 중의 일부에서, CRR은 최대 24개월의 완전 반응(CR)까지 최상의 전체 반응(best overall response; BOR)을 갖는 대상체의 백분율이다.

[0060] 임의의 제공된 구현에 중의 일부에서, 대상체는 FL 등급 1, 2 또는 3A이고, CRR은 PET-CT에 의해 평가된다. 임의의 제공된 구현에 중의 일부에서, 대상체는 FL 등급 1이고, CRR은 PET-CT에 의해 평가된다. 임의의 제공된 구현에 중의 일부에서, 대상체는 FL 등급 2이고, CRR은 PET-CT에 의해 평가된다. 임의의 제공된 구현에 중의 일부에서, 대상체는 FL 등급 3A이고, CRR은 PET-CT에 의해 평가된다. 임의의 제공된 구현에 중의 일부에서, 대상체는 MZL을 갖고, CRR은 CT에 의해 평가된다. 임의의 제공된 구현에 중의 일부에서, 대상체는 MZL을 갖고, CRR은 MRI에 의해 평가된다. 임의의 제공된 구현에 중의 일부에서, 대상체는 MZL을 갖고, CRR은 CT 및 MRI 스캔(scan)에 의해 평가된다.

도면의 간단한 설명

[0061] 도 1a는 초기 코호트의 환자들 중에서 치료 후 3개월에 완전 반응(CR) 또는 진행성 질환(PD)을 나타내는 대상체에서 치료 전 종양 생검에서 차등 유전자 발현 프로파일을 나타낸다.

도 1b는, 여포성 림프종 세포주 샘플(FL; FL_DLBC_LDN)에 비해 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL) 세포주 샘플에서 더 많이 발현된 유전자를 포함하는, 초기 코호트에서 환자 중의 3개월 치료 후 PD와 연관된 다양한 농축된 유전자 세트를 나타낸다.

도 2a는 더 큰 코호트의 환자들 중에서 치료 후 3개월에 완전 반응(CR) 또는 진행성 질환(PD)을 나타내는 대상체에서 치료전 종양 생검에서 차등 유전자 발현 프로파일을 나타낸다.

도 2b는, 여포성 림프종(FL; DLBCL_LIKE_vs_FL 및 SHIPP_DLBC_LVS_FOLLICULAR_LYMPHOMA_UP)과 비교하여 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL)에서 더 높게 발현되는 유전자를 포함하는, 더 큰 코호트의 환자들 사이에서 치료 후 3개월에 PD와 관련된 다양한 농축 유전자 세트를 나타낸다.

도 2c는, 여포성 림프종(FL; DLBCL_LIKE_vs_FL 및 SHIPP_DLBC_LVS_FOLLICULAR_LYMPHOMA_UP)과 비교하여 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL)에서 더 높게 발현되는 유전자를 포함하는, 매칭된 치료 전 및 치료 후 11일째 샘플 중에서 T 세포 배제와 연관된 다양한 농축 유전자 세트를 나타낸다.

도 3은 FL 종양 생검과 DLBCL 종양 생검 사이의 차등 유전자 발현을 나타낸다.

도 4a 및 4b는 FL 및 DLBCL 종양 사이의 예시적인 유전자 EZH2(도 4a) 및 CD3ζ(도 4b)의 차등 유전자 발현을 나타낸다.

도 5a 및 5b(초기 코호트) 및 도 5C(더 큰 코호트)는 DLBCL("DLBCL-유사 유전자 세트"로 지칭됨; 도 5a)에서 대 FL("FL-유사 유전자 세트"로 지칭됨)에서 상승된 것으로 밝혀진 유전자와, CR을 나타내는 대상체 또는 PD를 나타내는 대상체 사이의 단일 샘플 유전자 세트 농축 분석(ssGSEA) 점수를 나타내고, DLBCL에서 관찰된 것과 비교하여 FL에서 관찰된 것과 더 유사한 종양 유전자 발현 프로필을 갖는 대상체는 치료 후 3개월에 CR을 나타낼 가능성이 더 높았다는 것을 설명한다.

도 5d는 가장 높은 FL-유사 유전자 발현을 갖는 15명의 대상체와 다른 59명의 대상체 사이를 비교한, 74명의 DLBCL 대상체 사이의 무진행 생존(PFS) 곡선을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0062] 일반적으로 암 또는 종양, 예를 들어 백혈병 또는 림프종, 가장 특히 B 세포 악성종양 또는 비호지킨 림프종(NHL)이거나 그를 포함하는 질환 또는 병태를 갖는 대상체의 치료 방법 및 그를 위한 조작된 세포(예를 들어 T 세포)의 용도 및/또는 그의 조성물이 제공된다. 제공된 방법 중의 임의의 것의 특정 구현예에서, T 세포는 CD19에 대해 지시되는 키메라 항원 수용체(CAR)로 조작된다. 일부 측면에서, 질환 또는 병태는 B 세포 림프종이다. 일부 측면에서, 질환 또는 병태는 등급 1-3A의 여포성 림프종(FL)이다. 일부 측면에서, 질환 또는 병태는 변연부 림프종(MZL)이다. 일부 측면에서, 방법 및 용도는 특정 대안적 방법과 비교하여, 예를 들어 특정 대상체 그룹에서, 예를 들어 치료되는 대상체의 특정 그룹에서 개선된 반응 및/또는 보다 지속적인 반응 또는 효능 및/또는 감소된 위험을 제공하거나 달성한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 조작된 세포의 지정된 수 또는 상대적 수의 투여, 정의된 비율의 특정 유형의 세포의 투여, 병기 및/또는 선행 치료 이력, 및/또는 이들의 조합과 같은 특정 위험 프로파일을 갖는 것과 같은 특정 환자 집단의 치료로 인해 유리하다.
- [0063] 일부 구현예에서, 상기 방법 및 용도는 입양 세포 요법에서 유전적으로 조작된 (재조합) 세포 표면 수용체를 발현하는 대상 세포에 투여하는 것을 포함하며, 이는 일반적으로 림프종 및/또는 그것이 유래된 세포 유형과 연관되고/되거나 그에 특이적인 것에 의해서 발현된 항원을 인식하는, 키메라 수용체 예를 들어 키메라 항원 수용체(CAR)이다. 상기 세포는 일반적으로 투여용으로 제형화된 조성물로 투여되며; 상기 방법은 일반적으로 하나 이상의 투여량의 세포를 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 이 투여량(들)은 특정 수 또는 상대적 수의 세포 또는 조작된 세포, 및/또는 상기 조성물 내에 둘 이상의 서브-타입의 정의된 비율 또는 조성물, 예를 들어 CD4 대 CD8 T 세포를 포함할 수 있다.
- [0064] 일부 구현예에서, 세포, 집단 및 조성물은 입양 세포 요법 예를 들어 입양 T 세포 요법을 통해 치료될 특정 질환 또는 병태를 갖는 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 림프종 또는 B 세포 악성종양, 예를 들어 무통성 비호지킨 림프종(NHL)을 갖는 대상체를 항원 수용체-발현 세포(예를 들어 CAR-발현 세포)의 투여량으로 치료하는 것을 포함한다.
- [0065] 일부 구현예에서, 제공된 방법은 특정 그룹 또는 대상체의 서브세트, 예를 들어 고위험 질환을 갖는 것으로 확인된 대상체를 치료하는 것을 포함한다. 일부 측면에서, 상기 방법은 재발하거나 표준 요법에 대해 불응성(R/R)이고/거나 불량한 예후를 갖는 NHL과 같은 불량한 예후 무통성 NHL을 갖는 대상체를 치료한다. 일부 측면에서, 상기 방법은 FL G1-3A 또는 MZL과 같은 NHL을 갖는 대상체를 치료하며, 이는 재발하였거나 표준 요법에 대해 불응성(R/R)이다. 일부 측면에서, 제공된 방법, 조성물, 용도 및 제조 물품은 이용가능한 요법에 대한 개선되고 우수한 반응을 달성한다. 일부 구현예에서, 개선된 또는 우수한 반응은 현재 치료 표준(SOC)과 비교된다.
- [0066] CD19는 초기 발달부터 형질 세포로의 분화까지 B 세포에 존재하는 95kDa 당단백질이다[문헌 「Stamenkovic et al., J Exp Med. 1988; 168(3):1205-10」 참조]. 이는 면역글로불린 슈퍼패밀리의 구성원이며 B 세포 활성화에 대한 신호 역치를 낮춤으로써 B 세포 수용체의 양성 조절자로서 기능한다[문헌 「Brentjens et al., Blood. 2011; 118(18):4817-28; LeBien et al., Blood. 2008; 112(5):1570-80」 참조]. CD19는 B 세포 NHL을 포함한 대부분의 B 세포 악성 종양에서 발현되기 때문에 매력적인 치료 표적이다[문헌 「Davila et al., Oncoimmunology. 2012; (9):1577-83」 참조]. 중요하게는, CD19는 조혈 줄기 세포 또는 B 세포 계통을 제외한 모든 정상 조직에서 발현되지 않는다. 또한 CD19는 순환계에서 배출되지 않아 표적 외 부작용이 제한된다[문헌 「Shank et al., Pharmacotherapy. 2017; 37(3):334-45」 참조].
- [0067] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 CAR이 CD19-지시된 scFv 항원 결합 도메인(예를 들어 FMC63 유래)을 함유하는 CD19-지시된 CAR T 세포 요법의 투여를 기반으로 한다. CAR은 CD3제타의 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 더 포함하고, 또한 4-1BB 공자극 도메인을 도입하며, 이는 CD28-함유 구조체와 비교하

여 사이토카인 방출 증후군(CRS) 및 신경독성(NT, 예를 들어 신경학적 사건(NE)의 낮은 발병률과 관련된 4-1BB 공자극 도메인도 포함)의 낮은 발병률과 관련된다[문헌 「Lu et al. J Clin Oncol. 2018;36:3041」 참조]. 일부 구현예에서, 본원에서 제공되는 방법은 시험관 내에서 별도로 형질도입 및 확장되고 동일한 표적 투여량(약 1:1)으로 투여되는 CD8+ 및 CD4+ T-세포 서브세트를 포함한다. 일부 구현예에서, 투여된 총 CD4+ 및 CD8+ CAR+ T-세포 투여량에서 낮은 변동성이 있으며, 이전 연구에서 증가된 독성과 관련된 2개의 매개변수가 있다[문헌 「Neelapu et al., N Engl Med. 2017. 377;2531-44; Turtle et al., Sci Transl Med. 2016;8:355ra116; Hay et al., Blood. 2017;130:2295-306」 참조]

[0068] 일부 구현예에서, 상기 방법은 B 세포 악성종양, 예를 들어 NHL, 예를 들어 FL G1-3A 또는 MZL의 특정 예후 또는 위험을 갖는 것으로 선택되거나 확인된 대상체에 세포를 투여하는 것을 포함한다. NHL을 갖는 일부 대상체는 치료 없이 생존할 수 있지만 다른 대상체는 즉각적인 개입이 필요할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 방법, 용도 및 제조 물품은 예를 들어 특정 유형의 질환, 진단 기준, 선행 치료 및/또는 선행 치료에 대한 반응에 기초하여 대상체의 특정 그룹 또는 서브세트를 선택하거나 확인하는 것을 포함하거나 이를 포함하는 대상체의 치료를 포함하거나 이를 위해 사용된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 하나 이상의 선행 요법으로 치료하거나 이에 대해 불응성이 된 후 완화 후 재발된 대상체, 또는 하나 이상의 선행 요법, 예를 들어 하나 이상의 라인의 표준 요법에 대해 재발하였거나 불응성(R/R)인 대상체를 치료하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 2개 이상의 선행 요법, 예를 들어 2개 이상 라인의 표준 요법에 대해 재발하였거나 불응성(R/R)인 대상체를 치료하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 3개 이상의 선행 요법으로 치료하거나 이에 대해 불응성이 된 후 완화 후 재발된 대상체, 또는 3개 이상의 선행 요법, 예를 들어 3개 이상 라인의 표준 요법에 대해 재발하였거나 불응성(R/R)인 대상체를 치료하는 것을 포함한다.

[0069] 일부 구현예에서, 대상체는 재조합 수용체를 발현하는 세포의 투여 전에 질환 또는 병태, 예를 들어 NHL, 예를 들어 FL G1-3A 또는 MZL을 표적으로 하는 요법 또는 치료제로 이전에 치료받은 적이 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 이전에 조혈 줄기 세포 이식(HSCT), 예를 들어 동종이계 HSCT 또는 자가 HSCT로 치료받은 적이 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 표준 요법으로 치료한 후 불량한 예후를 가졌거나 및/또는 하나 이상의 라인의 선행 요법에 실패한 적이 있다. 일부 구현예에서, 대상체는, 림프구 고갈 요법 및/또는 항원 수용체를 발현하는 세포의 투여량과는 다른, 질환 또는 장애, 예를 들어 FL G1-3A 또는 MZL를 치료하기 위한 적어도 (약) 1, 2, 3, 4, 또는 그 이상의 다른 요법으로 치료받았거나 이전에 받은 적이 있다. 보다 일부 구현예에서, 대상체는 CD20 표적화 제제(예를 들어 항-CD20 항체) 및 알킬화제를 포함하는 요법을 투여 받았거나 이전에 받은 적이 있다.

[0070] 액시카브타젠(axicabtagene ciloleucel)(액시-셀(aksi-cel)) 및 티사젠렉레우셀(tisagenlecleucel)을 포함한 특정 CD19-지시된 CAR-T 세포 요법은 B 세포 림프종의 치료에 사용할 수 있다. 한 예시적 연구에서 액시-셀 치료 대상자는 54%의 CR 비율을 달성하였으며 40%는 지속적 완화를 나타냈다(중양값 추적 관찰, 15.4개월)[문헌 「Neelapu et al., N Engl Med. 2017. 377;2531-44」 참조]. 대부분의 대상체에서 CRS(93%) 및 NE(64%)가 발생하였으며, 발병까지의 시간 중양값은 각각 2일 및 5일이었고 등급 $\geq$ 3CRS(Lee 등급 기준[문헌 「Lee et al., Blood. 2014;124:188-95」 참조] 및 NE는 각각 13% 및 28%에서 발생하였으며 43%는 토실리주맙을 투여받았다(27%는 코르티코스테로이드 투여 받음). 또 다른 예시적인 연구에서, 티사젠렉레우셀을 투여받은 환자의 대략 1/3이 1년에 지속적 완화를 유지하였다[문헌 「Schuster et al., N Engl J Med. 2019. 380:45-56」 참조]. 대부분의 대상체(58%)는 CRS를 발달시킨(develop) 반면, 21%는 NE를 가졌다. 등급 $\geq$ 3 CRS(Penn 등급 기준[문헌 「Porter et al., J Hematol Oncol. 2018;11:35」 참조]) 및 NE는 각각 환자의 22% 및 12%에서 보고되었다[문헌 「Schuster et al., N Engl J Med. 2019 380:45-56」 참조]. 이러한 적응증 치료에 대해 유리한 반응 결과가 관찰되었지만 독성 비율은 높게 유지한다. 또한, 현재 FL G1-3A 또는 MZL 환자, 특히 이중 불응성 상태 또는 초기 진단 및/또는 치료 개시 후 24개월 이내에 질환 진행(POD24)을 갖는 것과 같은 고위험 특징을 갖는 환자를 포함하는 특정 림프종 서브타입을 앓는 환자를 치료하기 위한 승인된 CAR T-세포 요법은 존재하지 않는다.

[0071] FL은 무통성 비호지킨 림프종(NHL)의 가장 흔한 서브타입으로, 서방 국가의 모든 림프종 사례의 약 10%~20%를 차지한다[문헌 「Union for International Cancer Control [UICC], 2014; Miranda-Filho et al., Cancer Causes Control. 2010; 30(5):489-99」 참조]. 2차-라인(2L)의 치료에는 가장 일반적으로 일선에서 사용되는 것과 동일한 치료, 주로 화학면역요법이 포함된다. FL에서 2L 요법 후, r/r FL 환자에 대한 옵션이 제한된다. National Comprehensive Cancer Network(NCCN, 2019) 및 European Society for Medical Oncology(ESMO)(Dreyling, 2016) 가이드라인은 모두 최전선 환경에서 장기간 완화가 달성된 경우 2L 치료에서 동일한 요법이 반복되는 경우가 많다고 제안한다. 최전선에서 벤다무스틴과 리톡시맙(BR)을 함께 투여받는 환자에게 가장 빈번하게, 심장독성에 대한 우려로 인해 리톡시맙, 사이클로포스파미드, 빈크리스틴, 독소루비신 및

프레드니솔론(R-CHOP)을 투여받는 환자에게 덜 빈번하게 투여한다. 고도로 선택된 환자에 대한 2차 치료에는 자가 또는 동종 조혈 모세포 이식(HSCT)도 포함될 수 있다[문헌 「NCCN, 2019; Dreyling et al., 2016 Ann Oncol. 2016;27(83-v90」 참조]. 현재 4차-라인 FL 및 그 이상(4L+)에서의 치료 표준은 존재하지 않는다. 현재 이러한 설정에서 승인된 약제가 없다. 또한, 4차-라인에 의해 환자는 일반적으로 사용 가능한 치료 옵션을 소진하였다. 질환의 진행으로 인해 각 치료와 실패 사이의 간격이 더 단축되며, 이것은 질환 재발 또는 진행 시점에 이전에 3가지 전신 요법을 투여 받은 환자는 충족되지 않은 요구가 높은 환자 집단을 구성할 수 있음을 시사한다. 불응성 설정에서 이용가능한 치료 옵션의 부족은 특히 3차-라인 이상(3L+)에서 충족되지 않은 상당한 요구를 나타낸다[문헌 「Kahl et al., Blood. 2016 Apr 28;127(17):2055-63」 참조].

[0072] 변연부 림프종(MZL)은 모든 B 세포 NHL 사례의 8~12%를 차지하는 세 번째로 흔한 NHL 조직학(histology)이다[문헌 「Swerdlow et al., 2016; Blood, 30:84-91; Al-Hamadani et al., Am J Hematol., 2015;90(9):790-5」 참조]. 3가지 서브타입이 기술된다: 결절외(extra-nodal) MZL(ENMZL, 주로 위), 비장 MZL(SMZL) 및 결절 MZL(NMZL). MZL 환자는 이질성을 감안할 때 종종 다른 나태한 NHL 연구에서 과소 대표되거나 제외된다. 더욱이, 치료 관련 독성은 고령 환자(중앙값 67세)에 대한 선택권을 제한할 수 있으며 MZL의 임상 경과도 이질적이며 결절 과종 MZL은 다른 서브타입에 비해 더 나쁜 예후와 관련된다[문헌 「Denlinger et al., Cancer Manag Res. 2018;10:615-24」 참조]. 이브루티닙은 3차-라인 요법(3L)에 의해 많은 MZL 환자가 이브루티닙으로 치료되었을 가능성이 있으므로 MZL에 대한 일반적인 요법이며, 따라서 2가지 선행 요법에 실패한 환자는 충족되지 않은 높은 수요 집단으로 간주된다. 다른 치료 옵션에는 2L+ MZL의 레날리도마이드 및 리툽시맙 조합이 포함된다.

[0073] 사용 가능한 증거는 유리한 이점/위험 프로파일 및 지속적인 반응을 제공하는 추가 치료 옵션에 대한 충족되지 않은 높은 수요를 나타내며, 이는 2차-라인(2L), 3차-라인(3L) 또는 4차-라인 이상(4L+) 무통성(indolent) 등급 1-3A를 갖는 대상체를 위한 이용가능한 요법과 부합하지 않는다. 또한, MZL을 포함하여 NHL의 더 희귀한 서브타입에 대해 제한된 치료 옵션을 사용할 수 있다. 이러한 발견은 R/R NHL, 특히 FL G1-3A 또는 MZL의 고위험 특징을 갖는 대상체 사이에 중요한 치료 격차와 기존 치료의 개선이 필요함을 보여준다. 이러한 요구를 충족할 수 있는 실שי예가 본원에 제공된다.

[0074] 특정 구현예에서, 제공된 방법은 특정 NHL 서브타입 또는 고위험군, 예를 들어 치료에 이중 불응성이거나 POD24를 갖는 환자와 같이 이용가능한 치료 옵션이 제한적으로 남아 있는 환자를 치료하는 데 사용될 수 있다. 어떤 경우에는 다른 CAR T 세포 요법을 포함한 이용 가능한 요법이 높은 독성 위험과 관련될 수 있다. 일부 측면에서, CRS 및 신경독성과 같은 사이토카인 관련 독성이 CAR T 세포 요법에서 관찰되었다[문헌 「Bonifant et al., Mol Ther Oncolytics. 2016;3:16011; Turtle et al., J Clin Invest. 2016;126(6):2123-38」 참조]. 예를 들어, 기존 CAR T 세포 요법은 사이토카인 방출 증후군(CRS) 및 신경학적 사건(NE)을 포함한 심각한 CAR T 세포 관련 독성과 관련되어 전문 치료 센터[문헌 「Yescarta Risk Evaluation and Mitigation Strategy (REMS) Gilead Pharma September 10, 2019; Kymriah Risk Evaluation and Mitigation Strategy (REMS) Novartis September 10, 2019」 참조] 및 치료가 어려운 환자의 사용에 미치는 영향에 대해 투여를 제한할 수 있다. 유리한 이점/위험 프로파일을 가진 CAR T 세포 요법은 고위험 환자 집단을 포함한 대상 하위 그룹을 더 광범위하게 포함할 수 있다.

[0075] 본원의 관찰은 제공된 방법에 따라 CD19-지시된 CAR T-세포 요법으로 고위험 질환을 가진 대상체를 치료하는 것을 뒷받침한다. 예를 들어, FL 등급 1-3A 또는 MZL을 갖는 대상체 및 초기 진단 및/또는 치료 개시 후 24개월 이내에 이중 불응성 상태 또는 질환이 진행(POD24)된 것과 같은 특정 고위험 특징을 갖는 환자는 제공된 방법에 따라 치료될 수 있다. 일부 구현예에서, 제공된 방법은 (예를 들어, 질환을 치료하기 위한 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 선행 요법으로) 과도하게 사전 치료된 대상체를 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0076] 따라서, 일부 구현예에서, 제공된 방법, 제조 물품 및/또는 조성물은 입양 세포 요법과 같은 치료를 위한 다른 이용가능한 방법 또는 해결책 또는 접근법에 비해 이점을 제공할 수 있다. 특히, 제공된 구현예 중에는 R/R FL G1-3A 및 R/R MZL을 갖는 대상체에 대한 치료를 제공하는 구현예가 있다. 특정 구현예에서, 초기 진단 및/또는 치료 개시 후 24개월 이내에 이중 불응성 상태 또는 질환이 진행(POD24)된 R/R FL G1-3A를 갖는 대상체 중에서.

[0077] 본원에서 언급된 특허 문서, 과학 논문 및 데이터베이스를 포함한 모든 출판물은 각각의 개별 출판물이 별도로 참조에 의해 통합된 것과 동일한 정도로 모든 목적을 위해 전체적으로 참고로 포함된다. 본원에 기재된 정의가 본원에 참조로 포함된 특허, 출원, 공개된 출원 및 기타 공개에 기재된 정의와 상반되거나 다른 정의와 일치하지 않는 경우, 본원에 기재된 정의는 본원에 참조로 포함된 정의보다 우선한다.

[0078] 본원에 사용된 섹션의 제목은 단지 조직적 목적을 위한 것이며 기술된 주제를 한정하는 것으로 해석되어서는 안

된다.

- [0079] **I. 무통성 여포성 림프종(FL) 등급 1-3A 및 변연부 림프종(MZL)에서 CD19 표적화된 세포 요법의 방법 및 용도**
- [0080] 본원에서는 조작된 세포, 예를 들어 조작된 T 세포를 함유하는 조작된 세포 또는 조성물을 투여하는 것을 포함하는 치료 방법이 제공된다. 또한, 조작된 세포 및/또는 /또는 이의 조성물의 투여를 포함하고, R/R FL G1-3A 또는 R/R MZL을 갖는 대상체의 치료 방법을 포함하는 조작된 세포(예를 들어 T 세포) 및/또는 이의 조성물의 방법 및 용도가 제공된다. 일부 측면에서, R/R FL G1-3A 또는 R/R MZL의 치료를 위한 조작된 T 세포와 같은, 조작된 세포 또는 조작된 세포를 함유하는 조성물의 용도가 또한 제공된다. 일부 측면에서, 조작된 T 세포와 같은 조작된 세포 또는 조작된 세포를 함유하는 조성물의 용도는 본원에 기재된 임의의 방법에 따른다.
- [0081] 일부 구현예에서, 상기 방법 및 용도는 입양 세포 요법에서 유전적으로 조작된(재조합) 세포 표면 수용체를 발현하는 대상 세포에 투여하는 것을 포함하며, 이는 일반적으로 키메라 항원 수용체(CAR)와 같은 키메라 수용체이고, 및/또는 림프종 및/또는 그것이 유래된 세포 유형에 특이적인 것이다. 세포는 일반적으로 투여용으로 제형화된 조성물로 투여된다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 특정 수 또는 상대적 수의 세포 또는 조작된 세포, 예를 들어 조성물 내에 정의된 비 또는 조성의 2개 이상의 서브-타입, 예를 들어 CD4 대 CD8 T 세포를 포함하는 세포의 하나 이상의 투여량을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기를 포함하는 조작된 세포 또는 조성물은 질환 또는 장애의 치료를 수행하는 유효량으로 투여된다. 용도는 상기 치료 방법을 수행하기 위해 상기 방법 및 치료에서, 및 약제의 제조에서 조작된 세포 또는 조성물의 용도를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 질환 또는 병태를 갖거나 또는 갖는 것으로 의심되는 대상체에게 조작된 세포, 또는 상기를 포함하는 조성물을 투여함으로써 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 그에 의해서 대상체의 질환 또는 병태 또는 장애를 치료한다.
- [0082] 입양 세포 요법을 위한 세포의 일반적인 투여 방법은 공지되어 있으며 제공된 방법 및 조성물과 관련하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 입양 T 세포 치료 방법은 예를 들어 Gruenberg 등의 미국특허출원공개번호 제 2003/0170238호; Rosenberg의 미국특허 제4,690,915호; 문헌 「Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol. 8(10):577-85」에 기술되어 있다. 예를 들어 문헌 「Themeli et al. (2013) Nat Biotechnol. 31(10): 928-933; Tsukahara et al. (2013) Biochem Biophys Res Commun 438(1): 84-9; Davila et al. (2013) PLoS ONE 8(4): e61338」을 참조한다.
- [0083] 일부 구현예에서, 세포, 집단 및 조성물은 입양 세포 요법 예를 들어 입양 T 세포 요법을 통해 치료될 무통성 NHL을 갖는 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, NHL은 Lugano 분류에 기초한 단계일 수 있다(예를 들어 Cheson 등, (2014) JCO 32(27):3059-3067; Cheson, B.D. (2015) Chin Clin Oncol 4(1):5 참조한다.). 일부 경우에, 병기는 로마 숫자 I에서 IV(1-4)로 설명되며, 림프계 외부 기관(절외 기관)에 영향을 미치는 제한된 병기(I 또는 II) 림프종은 E로 표시된다. 단계 I은 하나의 결절 또는 인접한 결절 그룹의 관여 또는 결절 관여가 없는 단일 결절 외 병변(IE)을 나타낸다. 단계 II는 횡격막의 같은 쪽에 있는 2 이상의 노드 그룹 또는 제한된 인접하는 결절의 관여(IIe)를 갖는 노드 규모에 의한 I 또는 II 단계의 관여를 나타낸다. 단계 III은 비장 관여와 함께 횡격막 위의 노드 또는 횡격막 양쪽에 있는 노드의 관여를 나타낸다. 단계 IV는 추가의 비인접한 림프절 외 개입의 관여를 나타낸다. 또한, "부피가 큰 질환(bulky disease)"은 특히 단계 II에 관한 가슴의 거대 종양을 설명하는데 사용될 수 있다. 질환의 정도는 열성 림프종에 대해서는 양전자 방출 단층 촬영(positron emission tomography, PET)-컴퓨터 단층 촬영(computed tomography, CT) 및 비열성 조직 구조에 대해서는 CT에 의해 결정된다. 임의의 구현예 중의 일부에서, 세포 투여량을 투여할 때 또는 투여하기 전에, 제공된 구현예에 따라 치료될 대상체는 양전자 방출 단층촬영(PET)-양성 질환을 갖는다.
- [0084] 일부 구현예에서, 상기 방법은 R/R FL G1-3A 또는 R/R MZL을 갖는 대상체를 항원 수용체-발현 세포(예를 들어, CAR-발현 세포)의 투여량으로 치료하는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 투여량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 각 투여량의 T 세포는 CD19에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함한다.
- [0085] 일부 구현예에서, 대상체는 18세 이상이다. 일부 구현예에서, 대상체가 이전에 CD19-표적화 요법을 투여 받은 적이 있는 경우, 대상체는 선행 CD19-표적화 요법을 완료한 이후 CD19-양성 림프종이 있는 것으로 확인되어야 한다. 일부 구현예에서, 대상체는 스크리닝 6개월 이내에 조직학적으로 확인된 질환을 갖는다. 일부 구현예에서, 대상체는 적절한 기관 기능 및 혈관 접근을 갖는다.
- [0086] 일부 구현예에서, 대상체는 미 동부 종양학 그룹 협회(ECOG)의 0 또는 1의 수행 상태를 갖는다. 일부 구현예에

서, 미 동부 종양학 그룹 협회(ECOG)의 수행 상태 지표는 치료를 위한 대상체, 예를 들어 선행 요법으로부터 수행도가 좋지 않았던 대상체를 평가하거나 선택하기 위해 사용될 수 있다(예를 들어 문헌[Oken 등 (1982) Am J Clin Oncol. 5:649-655] 참조한다.). 수행 상태의 ECOG 척도는 스스로를 돌보는 능력, 일상 활동 및 신체 능력(예를 들어 걷기, 일하기 등)의 관점에서 환자의 기능 수준을 설명한다. 일부 구현예에서, 0의 ECOG 수행 상태는 대상체가 정상적인 활동을 수행할 수 있음을 나타낸다. 일부 측면에서, 1의 ECOG 수행 상태를 갖는 대상체는 신체 활동에 일부 제한을 보이거나 대상체는 완전히 보행할 수 있다. 일부 측면에서, 2의 ECOG 수행 상태를 갖는 환자는 50% 이상 보행할 수 있다. 일부 경우에, 2의 ECOG 수행 상태를 갖는 대상체는 스스로를 돌볼 수도 있다; 예를 들어 문헌[Sørensen 등, (1993) Br J Cancer 67(4) 773-775]을 참조한다. ECOG 성능 상태를 반영하는 기준은 아래 표 1에 설명되어 있다:

[표 1]

ECOG 수행 상태 기준	
등급	ECOG 수행 상태
0	제한 없이 모든 질병 전 수행을 수행할 수 있는, 완전히 활동적임
1	육체적으로 격렬한 활동에서 제한되나 걸을 수 있고 가법거나 앉아서 일하는 성질의 일, 예를 들어 가벼운 집안 일, 사무실 작업을 수행할 수 있음
2	걸을 수 있고 모든 자기 관리가 가능하나 어떠한 작업 활동도 수행할 수 없음; 깨어있는 시간의 50 % 이상
3	제한된 자가 관리만 가능함; 깨어있는 시간의 50% 이상을 침대나 의자에 국한
4	완전히 지체 부자유함; 어떠한 자기 관리도 수행할 수 없음; 침대나 의자에 완전히 국한
5	죽음

제공된 방법은 선행 요법에 재발하였거나(R/R) 불응성인 대상체의 치료를 위한 것이다. 일부 측면에서, 대상체는 선행 요법에 대한 완전 반응(CR) 또는 부분 반응(PR)의 초기 반응 후에 재발하였다. 일부 구현예에서, 대상체는 하나 이상의 선행 요법에 의한 치료에 불응성이 되며, 불응성 치료는 선행 요법 후 안정 질환(SD) 또는 진행성 질환(PD)의 최상의 대응이다.

일부 구현예에서, 대상체는 18세 이상이다. 특정 구현예에서, 제공된 방법은 60세 이상의 대상체를 포함하여 보다 고령의 대상체 그룹에서 유리한 결과 및 낮은 독성 비율을 초래할 수 있다.

일부 구현예에서, 제공된 방법은 예를 들어, CAR+ 세포의 총 수, CAR+CD8+ T 세포 및/또는 CAR+CD4+ T 세포의 총 수를 균일 투여를 실시하여 예를 들어 정확한 또는 고정 투여량을, 가변 중량의 대상체를 포함하는 치료된 대상체의 그룹 각각에 투여한다. 따라서, 제공된 방법은 세포의 투여량이 대상체의 체표면적 또는 체중과 연관되거나 이에 기초하지 않도록 세포의 투여량이 세포의 균일 투여량 또는 고정 투여량인 방법을 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 방법은 CAR-T 세포의 투여와 관련된 독성 결과의 위험을 증가시킬 수 있는 너무 많은 세포를 대상체에게 투여할 가능성을 최소화하거나 감소시킨다.

일부 구현예에서, T 세포의 투여량은 약 5×10^7 개의 재조합 수용체(예를 들어 CAR)-발현 T 세포 및 약 1.1×10^8 개의 재조합 수용체(예를 들어 CAR)-발현 T 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 재조합 수용체(예를 들어 CAR)-발현 T 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포의 투여량은 (약) 6×10^7 개의 재조합 수용체(예를 들어 CAR)-발현 T 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포의 투여량은 (약) 7×10^7 개의 재조합 수용체(예를 들어 CAR)-발현 T 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포의 투여량은 (약) 0.75×10^8 개의 재조합 수용체(예를 들어 CAR)-발현 CD8+ T 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포의 투여량은 (약) 8×10^7 개의 재조합 수용체(예를 들어 CAR)-발현 T 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포의 투여량은 (약) 9×10^7 개의 재조합 수용체(예를 들어 CAR)-발현 T 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포의 투여량은 (약) 1×10^8 개의 재조합 수용체(예를 들어 CAR)-발현 T 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포의 투여량은 (약) 1.1×10^8 개의 재조합 수용체(예를 들어 CAR)-발현 T 세포를

포함한다. 일부 구현예에서, T 세포의 투여량은 (약) 1.5×10^8 개의 재조합 수용체(예를 들어 CAR)-발현 T 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 투여량의 T 세포는 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 수는 생존 가능한 세포인 이러한 세포의 수이다.

[0093] 입양 세포 요법의 맥락에서, 주어진 "투여량(dose)"의 투여는 단일 조성물 및/또는 단일 비중단 투여, 예를 들어 단일 주사 또는 연속 주입으로서 주어진 세포의 양 또는 수의 투여를 포괄하며 또한 다중 개별 조성물 또는 주입제로 제공된 경우 명시된 기간에 걸쳐, 예를 들어 3일 이내에 걸쳐 분할된 단위 투여량 또는 복수의 조성물로서 주어진 세포의 양 또는 수의 투여를 포괄한다. 따라서, 일부 맥락에서, 투여량은 단일 시점에서 주어진 또는 개시된, 명시된 세포 수의 단일 또는 연속 투여이다. 그러나, 일부 맥락에서, 투여량은 3일 동안 또는 2일 동안 하루에 한 번 또는 하루의 기간에 걸쳐 다중 주입에 의한 것과 같이 3일 이내의 기간에 걸쳐 다중 주사 또는 주입으로 투여된다.

[0094] 따라서, 일부 측면에서, 투여량의 세포는 단일 약학 조성물로 투여된다. 일부 구현예에서, 투여량의 세포는 총체적으로 단위 투여량의 세포를 함유하는 복수의 조성물로 투여된다.

[0095] 일부 구현예에서, 용어 "분할 투여량(split dose)"은 1일 이상에 걸쳐 투여되도록 분할된 단위 투여량을 지칭한다. 상기 유형의 투약은 본 방법에 포괄되고 단일 투여량으로 간주된다.

[0096] 따라서, 단위 투여량의 세포는 분할 투여량, 예를 들어 시간에 걸쳐 투여되는 분할 단위 투여량으로 투여될 수 있다. 예를 들어 일부 구현예에서, 단위 투여량은 2일 또는 3일에 걸쳐 대상체에 투여될 수 있다. 분할 투약에 대한 예시적인 방법은 첫 날에 투여량의 25%를 투여하고 두 번째 날에 투여량의 나머지 75%를 투여하는 것을 포함한다. 다른 구현예에서, 투여량의 33%가 첫 날에 투여되고 두 번째 날에 나머지 67%가 투여될 수 있다. 일부 측면에서, 투여량의 10%가 첫 날에 투여되고, 단위 투여량의 30%가 두 번째 날에 투여되며, 투여량의 60%가 셋째 날에 투여된다. 일부 구현예에서, 분할 투여량은 3일을 초과하는 기간에 걸쳐 나뉘지는 않는다.

[0097] 일부 구현예에서, 투여량의 세포는 복수의 조성물 또는 용액, 예를 들어 제 1 및 제 2, 임의적으로 그 이상의 투여로 투여될 수 있고, 각각은 투여량의 세포를 일부 함유한다. 일부 측면에서, 각각이 상이한 세포의 집단 및/또는 서브타입의 세포를 함유하는 복수의 조성물이 임의적으로 특정 기간 내에 별도로 또는 독립적으로 투여된다. 예를 들어 세포의 집단 및/또는 서브타입의 세포는 각각 CD8⁺ 및 CD4⁺ T 세포 및/또는 각각 CD8⁺ 및 CD4⁺ 농축 집단, 예를 들어 CD4⁺ 및/또는 CD8⁺ T 세포를 포함할 수 있고 각각은 개별적으로 재조합 수용체를 발현하도록 유전자 조작된 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 투여량의 투여는 CD8⁺ T 세포의 투여량 또는 CD4⁺ T 세포의 단위 투여량을 포함하는 제 1 조성물의 투여 및 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포의 다른 투여량을 포함하는 제 2 조성물의 투여를 포함한다.

[0098] 일부 구현예에서, 조성물 또는 투여량의 투여, 예를 들어 복수의 세포 조성물의 투여는 세포 조성물의 별도 투여를 수반한다. 일부 측면에서, 별도 투여는 동시든 순차적이든 임의의 순서로 수행된다. 특정 구현예에서, 별도의 투여는 일정량의 CD8⁺ T 세포 또는 일정량의 CD4⁺ T 세포를 포함하는 제 1 조성물 및 일정량의 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포를 포함하는 제 2 조성물을 임의의 순서로 투여함으로써 순차적으로 수행된다. 일부 구현예에서, 투여량은 제 1 조성물 및 제 2 조성물을 포함하고, 제 1 조성물 및 제 2 조성물은 서로 48시간 이내, 예를 들어 서로 36시간 이내 또는 서로 24시간 이내 투여된다. 일부 구현예에서, 제 1 조성물 및 제 2 조성물은 0 내지 12 시간 간격, 0 내지 6시간 간격 또는 0 내지 2시간 간격으로 투여된다. 일부 구현예에서, 제 1 조성물의 투여 개시 및 제 2 조성물의 투여 개시는 2시간 이내, 1시간 이내 또는 30분 이내의 간격, 15분 이내, 10분 이내 또는 5분 이내의 간격으로 수행된다. 일부 구현예에서, 제 1 조성물의 투여 개시 및/또는 완료 및 제 2 조성물의 투여 개시 및/또는 완료는 2시간 이내, 1시간 이내 또는 30분 이내의 간격, 15분 이내, 10분 이내 또는 5분 이내의 간격으로 수행된다. 일부 구현예에서, 제 1 조성물 및 제 2 조성물은 2시간 미만의 간격으로 투여된다.

[0099] 일부 조성물에서, 제 1 조성물, 예를 들어 투여량의 제 1 조성물은 CD4⁺ T 세포를 포함한다. 일부 조성물에서, 제 1 조성물, 예를 들어 투여량의 제 1 조성물은 CD8⁺ T 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 제 1 조성물은 제 2 조성물 전에 투여된다. 특정 구현예에서, CD8⁺ T 세포는 CD4⁺ T 세포보다 먼저 투여된다.

[0100] 일부 구현예에서, 투여량의 세포 또는 세포 조성물은 재조합 수용체(예를 들어 CAR)를 발현하는 CD4⁺ 세포 대 재조합 수용체(예를 들어 CAR)를 발현하는 CD8⁺ 세포 및/또는 CD4⁺ 세포 대 CD8⁺ 세포의 정의된 비율 또는 표적 비율을 포함하고, 상기 비율은 임의적으로 대략 1:1이거나 대략 1:3 내지 대략 3:1, 예를 들어 대략 1:1이다.

일부 측면에서, 표적 비율 또는 원하는 비율의 상이한 세포의 집단(예를 들어 $CD4^+ : CD8^+$ 비율 또는 $CAR^+ CD4^+ : CAR^+ CD8^+$ 비율, 예를 들어 1:1)을 갖는 조성물 또는 투여량의 투여는 집단들 중 하나를 함유하는 세포 조성물의 투여 후 집단들 중 다른 것을 포함하는 별도의 세포 조성물의 투여를 수반하고, 상기 투여는 표적 비율 또는 원하는 비율이거나 대략적인 표적 비율 또는 원하는 비율로 수행된다. 일부 측면에서, 정의된 비율로 투여량의 세포 또는 세포 조성물의 투여는 T 세포 요법의 증폭, 지속성 및/또는 항종양 활성의 향상으로 이어진다.

[0101] **A. 무통성 여포성 림프종(FL) 등급 1-3A**

[0102] 일부 구현예에서, 제공된 방법은 여포성 림프종(FL)을 갖는 대상체의 특정 그룹 또는 서브세트를 치료하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 대상체는 재발성/불응성 FL G1-3A를 갖는 대상체를 포함하여 등급 1-3A인 FL을 갖는다. 일부 구현예에서, 제공된 방법은 무통성 여포성 림프종(FL)인 질환을 갖는 대상체를 포함한다. 일부 구현예에서, 대상체는 FL 등급 1인 질환을 갖는다. 일부 구현예에서, 대상체는 FL 등급 2인 질환을 갖는다. 일부 구현예에서, 대상체는 FL 등급 3A인 질환을 갖는다.

[0103] 특정 측면에서, 본원에 제공된 방법은 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 투여량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 각 투여량의 T 세포는 CD19에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함한다. 이러한 CAR-T 세포 및 그 제조 방법은 섹션 II에 설명되어 있다.

[0104] 일부 구현예에서, 제공된 방법은 (약) 2.5×10^7 개 내지 (약) 1.5×10^8 개, 예를 들어 (약) 5×10^7 개 내지 (약) 1×10^8 개의 전체 제조함 수용체-발현 T 세포(예를 들어 CAR^+ T 세포)의 투여, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같이 정의된 비율, 예를 들어 (약) 1:1의 비율로 투여된 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포를 포함하는 T 세포의 투여량의 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 1.5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포의 투여량(경계 포함)을 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 1.4×10^8 개의 CAR-발현 T 세포의 투여량(경계 포함)을 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 1.3×10^8 개의 CAR-발현 T 세포의 투여량(경계 포함)을 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 1.2×10^8 개의 CAR-발현 T 세포의 투여량(경계 포함)을 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 1.1×10^8 개의 CAR-발현 T 세포의 투여량(경계 포함)을 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 1.0×10^8 개의 CAR-발현 T 세포의 투여량(경계 포함)을 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 9×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 사이의 투여량(경계 포함)을 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 8×10^7 개의 CAR-발현 T 세포의 투여량(경계 포함)을 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 7×10^7 개의 CAR-발현 T 세포의 투여량(경계 포함)을 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 6×10^7 개의 CAR-발현 T 세포의 투여량(경계 포함)을 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포의 투여량은 CAR을 발현하는 $CD8^+$ T 세포에 대한 CAR을 발현하는 대략 1:1의 $CD4^+$ T 세포의 비율을 포함한다. 특정 구현예에서, 투여되는 투여량은 CAR^+ T 세포의 정확하거나 균일하거나 고정된 수, 또는 특정 유형의 CAR^+ T 세포, 예를 들어 $CD4^+ CAR^+$ T 세포 및/또는 $CD8^+ CAR^+$ T 세포의 정확하거나 균일하거나 고정된 수, 및/또는 정확하거나 균일하거나 고정된 수와 비해 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15% 이하, + 또는 -(플러스 또는 마이너스, 어떤 경우에는 $\pm$ 로 표시됨)인 특정 분산도(a specified degree of variance) 이내인 상기 세포들의 임의의 수이다. 일부 구현예에서, 이러한 균일하거나 고정된 수의 세포는 약 2.5×10^7 개의 총 CAR^+ T 세포 또는 $CD8^+$ 및/또는 $CD4^+ CAR^+$ T 세포, 5×10^7 개의 총 CAR^+ T 세포 또는 $CD8^+$ 및/또는 $CD4^+ CAR^+$ T 세포, 또는 1×10^8 개의 총 CAR^+ T 세포 또는 $CD8^+$ 및/또는 $CD4^+ CAR^+$ T 세포이다.

[0105] 일부 구현예에서, 투여량의 세포는 CAR^+ T 세포로 구성되거나 필수적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 투

여량의 세포는 CD3+ CAR+ T 세포로 구성되거나 필수적으로 구성된다. 일부 구현예에서, 투여량의 세포는 CD4+CAR+ T 세포 및 CD8+CAR+ T 세포로 구성되거나 필수적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 투여량의 세포는 CD3-세포가 없거나 필수적으로 없다. 일부 구현예에서, 투여량의 세포는 CAR-세포가 없거나 필수적으로 없다. 일부 구현예에서, 투여량의 세포는 CD3-CAR-세포가 없거나 필수적으로 없다.

[0106] 일부 구현예에서, 투여량 내 세포 수는 2.5×10^7 개의 CAR+ T 세포, 예를 들어 1.25×10^7 개의 CD4+CAR+ T 세포 및 1.25×10^7 개의 CD8+CAR+ T 세포를 포함하거나 또는 이로 구성되거나 또는 이로 필수적으로 구성된다. 일부 구현예에서, 투여량은 5×10^7 개의 CAR+ T 세포, 예를 들어 2.5×10^7 개의 CD4+CAR+ T 세포 및 2.5×10^7 개의 CD8+CAR+ T 세포를 포함하거나 또는 이로 구성되거나 또는 이로 필수적으로 구성된다. 일부 구현예에서, 투여량은 1×10^8 개의 CAR+ T 세포, 예를 들어 0.5×10^8 개의 CD4+CAR+ T 세포 및 0.5×10^8 개의 CD8+CAR+ T 세포를 포함하거나 또는 이로 구성되거나 또는 이로 필수적으로 구성된다. 일부 측면에서, 투여되는 세포 수는, 상기 구현예에서 세포의 수와 비교하여 상기 수의 특정 변동량 정도 이내, 예를 들어 플러스 또는 마이너스 ($\pm$) 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10% 이내, 예를 들어 플러스 또는 마이너스 8% 이내이다. 일부 측면에서, 이러한 투여량은 상기 세포의 (예를 들어, 전체 CAR+ T 세포의, 또는 CD8+ 및/또는 CD4+ CAR+ T 세포의) 수와, 치료적 반응, 또는 이의 지속 (예를 들어, 완화 달성 가능성, 완전 완화, 및/또는 완화의 특정 지속) 및/또는 임의의 전술한 지속을 나타내는 하나 이상의 결과 사이에 상관관계 (선택적으로 선형 관계)가 관찰되는 범위 내에 있다.

[0107] 일부 구현예에서, 투여는 복수의 개별 조성물을 투여하는 것을 포함하며, 여기서 복수의 개별 조성물은 상기 구현예들 중의 어느 것에서의 투여량에 따라 CD8+ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 1 조성물 및 CD4+ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 2 조성물을 포함한다.

[0108] 일부 구현예에서, 대상체가 여포성 림프종(FL) 등급 1-3A를 갖는 경우 치료를 위해 대상체가 선택된다. 일부 구현예에서, 2개의 수직 치수에서 하나 이상의 PET-양성 병변 및 하나 이상의 측정 가능한 결절 또는 결절외 병변을 갖는 PET-양성 질환이 있는 경우 대상체가 치료를 위해 선택된다. 일부 구현예에서, 결절 병변은 장축에서 1.5 cm 초과이다. 일부 구현예에서, 결절외 병변은 장축 및 단축에서 > 1.0 cm이다. 일부 구현예에서, FL은 약화된 맨틀 구역, 분극 손실, 및/또는 유형체 대식세포의 부재를 나타내는 신생물 소낭을 나타내거나 그와 연관된다. 일부 구현예에서, FL은 중심세포 및 중심아세포의 혼합물과 회합된다. 일부 구현예에서, FL은 중심세포와 연관되지 않는다.

[0109] 일부 구현예에서, FL은 림프절 및/또는 비장, 골수, 말초혈 및 기타 림프절외 부위를 포함한다. 일부 구현예에서, FL은 림프절을 포함한다. 일부 측면에서, FL과 관련된 예시적인 특징은 문헌 「Choi et al. (2018) Arch Pathol Lab Med 142:1330-1340; Luminari et al., (2012) Rev. Brad. Hematol. Hemoter., 34:54-59 and Salles (2007) ASH Education Book, 2007:216-25」에 기술된 것들을 포함한다. 일부 측면에서, FL의 경우, 질환 부담 정도를 평가하는 데 사용되는 예시적인 매개변수는 헤모글로빈 수준(예를 들어 $<12\text{g/dL}$ 또는 $<10\text{g/dL}$), 적혈구 침강 속도(ESR), 락트산탈수소효소(lactic dehydrogenase; LDH) 수준 및 $\beta 2$ -마이크로글로불린(microglobulin)(B2M) 값, 유전자 발현, 단일 염기 다형성(SNP, 예를 들어 IL-8, IL-2, IL-12B 및 IL1RN), miRNA 발현 및 단백질 발현(예를 들어 CD68, STAT1, FOXP3, CD57)과 같은 매개변수를 포함한다[문헌 「Sales(2007) ASH Education Book, 2007:216-25」 참조]. FL의 경우 질환의 정도 또는 부담은 Ann Arbor 스테이지 시스템(Ann Arbor staging system), 중앙 부담, 벌키 질환, 결절 또는 결절외 질환 부위의 수 및/또는 골수 침범에 의해 평가될 수 있다.

[0110] 일부 구현예에서, FL은 등급 1이다. 일부 구현예에서, 등급 1 FL은 고출력 필드(HPF)당 5개 초과와 중심모세포를 나타내거나 이와 연관된다. 일부 구현예에서, FL은 등급 2이다. 일부 구현예에서, 등급 2 FL은 고출력 필드(HPF)당 6개 초과 15개 미만의 중심모세포를 나타내거나 이와 연관된다. 일부 구현예에서, FL은 등급 3A이다. 일부 구현예에서, 등급 3A FL은 고출력 필드(HPF)당 15개 초과와 중심모세포를 나타내거나 이와 연관된다. 일부 구현예에서, FL은 소낭 내 CD10, BCL6 및 BCL2의 공-발현과 연관된다. 일부 구현예에서, FL은 t(14;18)/IGH-BCL2 및/또는 BCL6 재배열과 연관되거나 이를 특징으로 한다. 일부 구현예에서, FL은 t(14;18)(q32;q21) 전위와 연관된다. 일부 측면에서, t(14;18)(q32;q21) 전위는 BCL2 발현을 면역글로불린(Ig) 중위좌(IGH) 인핸서의 제어 하에 둔다. 일부 측면에서, t(14;18)은 1등급 및 2등급 FL의 대략 90% 및 3등급의 60 내지 70%에서 검출된다.

[0111] FL 환자의 임상 과정의 이질성으로 인해 FL 치료의 과제 중 하나는 대체 치료 옵션이 필요한 고위험 환자를 식

별하는 것이다. 고위험 질환과 관련된 여러 환자 요인이 확인되었다. R-CHOP와 같은 화학면역치료 요법으로 새로 진단된 환자의 초기 치료 후, 환자의 약 25%가 24개월 이내에 진행된다[문헌 「Casulo et al. Blood. 2015;125(1):40-7」 참조]. 24개월 이내에 질환이 진행(POD24)된 환자는 5년 전체 생존률(OS)이 50%인 반면, 비 POD24 환자의 5년 전체 생존률(OS)은 90%이다. POD24는 중요한 예후 생존 인자이다[문헌 「Casulo, Br J Haematol. 2019;186(4):513-23」 참조]. 충족되지 않을 필요가 있는 추가 2L 집단에는 일부 주요 FL 치료, 즉 항-CD20 항체 및/또는 알킬화제에 불응성인 환자가 포함된다. 특히 고위험 환자에는 항-CD20 항체와 알킬화제 둘 다에 이중 불응성인 환자가 포함된다. 리툽시맵 기반 요법이 치료의 표준이기 때문에 항-CD20 요법에 불응성 또는 조기 재발하는 환자는 좋지 않은 결과를 보여준다. 진행 시간 및 이전에 받은 요법(예를 들어 조합 요법, HSCT)도 FL에서 치료 실패 위험을 정의하는 요소이다. 제공된 방법은 고위험 환자 대상의 치료를 포함한다. 제공된 방법의 일부 구현예에서, 2L 및 후속 요법 라인의 고위험 무휴 FL 등급 1-3A 환자 그룹은 POD24, 리툽시맵 불응성 및 이중 불응성 집단을 포함한다.

- [0112] 일부 구현예에서, 대상체는 하나 이상의 선행 요법, 예를 들어 2개 이상의 선행 요법, 3개 이상의 선행 요법 또는 4개 이상의 선행 요법 후에 재발하였거나 치료에 불응성이다. 일부 구현예에서, 대상체는 하나 이상의 선행 요법, 2개의 선행 요법, 3개의 선행 요법 또는 4개의 선행 요법과 같은 1종 이상의 다른 선행 요법 후에 재발하였거나 치료에 불응이다. 재발성/불응성(r/r) 또는 진행성 질환의 치료에 대한 고려 사항 및 적응증에는, FL에 기인하는 증후(B 증후에 국한되지 않음); 위험된 말단 기관 기능; 림프종에 따른 혈구감소증; 벌키 질환(단일 종괴 > 7 cm 또는 3개 이상의 종괴 > 3 cm); 비장종대; 최소 6개월 이상 꾸준한 진행이 포함된다[문헌 「National Comprehensive Cancer Network(NCCN)(NCCN, 2019)」 참조].
- [0113] 일부 구현예에서, 대상체는 조혈 줄기 세포 이식 후에 재발하였다. 일부 구현예에서, 이식은 동종이계 또는 자가 HSCT이다.
- [0114] 일부 구현예에서, 대상체는 질환을 치료하기 위한 화학면역치료제 조합 요법인 하나 이상의 선행 라인의 요법을 완료한 후 6개월 동안 또는 그 동안 또는 그 후 6개월까지 치료에 불응성이거나 재발하였다. 일부 구현예에서, 화학면역요법 조합 요법은 리툽시맵을 사용한 치료로부터 독립적으로 선택되고; 오비누투주맵; 벤다무스틴 + 리툽시맵(BR); 벤다무스틴 + 오비누투주맵(BO); R-CHOP; 리툽시맵, 사이클로포스파미드, 빈크리스틴 및 프레드니손(R-CVP); 리툽시맵과 조합된 레날리도마이드; 또는 PI3K 억제제를 사용한 치료로부터 독립적으로 선택되되, 예를 들어 여기서 PI3K 억제제는 이텔라리십, 코판리십, 또는 두벨리십이다. 일부 구현예에서, 선행 라인의 요법은 항-CD20 모노클로날 항체 및 알킬화제를 포함하는 화학면역요법 조합 요법이다.
- [0115] 일부 구현예에서 대상체는 질환을 치료하기 위한 하나 이상의 이전 요법 후에 재발하였거나 치료에 불응성이 되며, 여기서 하나 이상의 선행 라인의 요법 중 하나 이상은 항-CD20 항체 및 알킬화제를 사용한 치료를 포함한다. 일부 구현예에서, 대상체는 질환을 치료하기 위한 1개의 선행 요법 후에 재발하였거나 치료에 불응성이 되며, 여기서 1개의 선행 라인의 요법은 항-CD20 항체 및 알킬화제를 사용한 치료를 포함한다. 일부 구현예에서, 대상체는 질환을 치료하기 위한 2개 이상의 선행 요법 후에 재발하였거나 치료에 불응성이 되며, 여기서 2개 이상의 선행 라인의 요법 중의 하나 이상은 항-CD20 항체 및 알킬화제를 사용한 치료를 포함한다. 일부 구현예에서, 대상체는 질환을 치료하기 위한 2개의 선행 라인의 요법 후에 재발하였거나 치료에 불응성이 되며, 여기서 2개의 선행 라인의 중의 하나 이상은 항-CD20 항체 및 알킬화제를 사용한 치료를 포함한다. 일부 구현예에서, 대상체는 질환을 치료하기 위한 3개 이상의 선행 라인의 요법 후에 재발하거나 치료에 불응성이 되며, 여기서 3개 이상의 선행 라인의 요법 중 하나 이상은 항-CD20 항체 및 알킬화제를 사용한 치료를 포함한다. 일부 구현예에서, 대상체는 질환을 치료하기 위한 3개의 선행 라인의 요법 후에 재발하였거나 치료에 불응성이 되며, 여기서 3개의 선행 라인의 요법 중 하나 이상은 항-CD20 항체 및 알킬화제를 사용한 치료를 포함한다.
- [0116] 일부 구현예에서, 대상체는 항-CD20 요법 및 알킬화제를 사용한 치료에 불응성이거나, 치료 동안 또는 치료 완료 후 최대 6개월까지 재발한다. 일부 구현예에서, 대상체는 항-CD20 요법 및 알킬화제를 포함하는 선행 라인의 요법을 완료한 후 최대 6개월 동안 또는 이를 사용한 치료에 불응성이거나 재발한다. 일부 구현예에서, 대상체는 항-CD20 요법 및 알킬화제를 포함하는 선행 라인의 요법을 완료한 후 최대 6개월 동안 또는 이를 사용한 치료에 불응성이거나 재발한다. 일부 구현예에서, 대상체는 항-CD20 요법을 사용한 치료에 불응성이거나, 항-CD20 요법으로 치료하는 동안 또는 치료를 완료한 후 최대 6개월까지 재발하였다. 일부 구현예에서, 대상체는 일련의 요법 완료 후 항-CD20 항체 유지 요법을 수여받는다. 일부 구현예에서, 대상체는 2개 이상의 요법 후 또는 유지 완료 후 6개월 이내에 항-CD20 항체 유지 동안 재발하였다. 일부 구현예에서, 대상체는 선행 라인의 요법 후 항-CD20 항체 유지 동안 또는 유지 완료 후 6개월 이내에 재발하였다.

- [0117] 전술한 구현예에서 예시적인 항-CD20 항체는 리툭시맙, 오파투무맙, 오크렐리주맙(GA101 또는 R05072759로도 공지됨), 벨투주맙, 오비누투주맙, TRU-015(트루비온 파마슈티컬스), 오키라투주맙(또한 GA101 또는 R05072759로 공지됨), 오키라투주맙(AME-133v 또는 오키라투주맙으로도 공지됨) 및 Pro131921(Genentech)을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 항-CD20 항체는 모노클로날 항체이다. 일부 구현예에서, 항-CD20 항체는 리툭시맙을 포함한다. 일부 구현예에서, 항-CD20 항체는 오비누투주맙을 포함한다. 전술한 구현예에서 예시적인 알킬화제는 사이클로포스파미드, 데카르바진, 멜팔란, 이포스파미드, 테모졸로미드 및 벤다무스틴을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 일부 구현예에서, 알킬화제는 벤다무스틴이다.
- [0118] 일부 구현예에서, 대상체는 진단 후 24개월 이내에 그리고 화학면역치료 요법과 같은 선행 라인의 요법을 완료한 후 질병의 진행을 가졌다. R-CHOP와 같은 화학 면역 요법으로 새로 진단된 환자의 초기 치료 후 환자의 대략 25%가 24개월 이내에 진행된다(Casulo, 2015). 24개월 이내에 질환이 진행(POD24)된 환자는 5년 전체 생존률(OS)이 50%인 반면, 비 POD24 환자의 5년 전체 생존률(OS)은 90%이다. POD24는 중요한 예후 생존 인자이다[문헌 「Casulo, Br J Haematol. 2019;186(4):513-23」 참조]. 일부 구현예에서, 대상체는 질환을 치료하기 위한 화학면역요법 조합 요법을 완료한 후 초기 치료의 24개월 이내에 질환이 진행(POD24)되었다. 일부 구현예에서, 대상체는 질환을 치료하기 위한 화학면역치료 조합 요법을 완료한 후 진단 후 24개월 이내에 질환이 진행(POD24)되었다.
- [0119] 일부 구현예에서, FL 대상체의 코호트는 본원에 제공된 임의의 방법에 따라 치료된다. 일부 구현예에서, FL 코호트는 FL 등급 1, 2 또는 3A를 치료하기 위한 하나의 선행 라인의 요법에 재발하였거나 불응성인 대상체를 포함하며, 여기서 하나의 선행 라인의 요법은 항-CD20 항체 및 알킬화제를 사용한 치료를 포함한다. 일부 구현예에서, FL 코호트는 (i) FL 진단 후 24개월 이내(POD24)의 선행 라인의 요법 개시 후 24개월 이내(POD24), 또는 둘 다를 갖는 진행성 질환을 갖고, (ii) 대상체의 원래 FL 진단 후 6개월 이내의 하나의 선행 라인의 요법을 투여 받은 대상체를 포함한다. 일부 구현예에서, FL 코호트는 하기 중 하나 이상을 갖는 대상체를 포함한다: (i)에 기인하는 증후; (ii) 말단 기관 기능의 위협, 림프종에 따른 혈구 감소증, 또는 벌키 질환; (iii) 비장종대; 및 (iv) 적어도 6개월에 걸쳐 질환의 꾸준한 진행. 따라서, 일부 구현예에서, FL 코호트는 FL 등급 1, 2 또는 3A를 치료하기 위한 하나의 선행 라인의 요법이 재발하였거나 이에 대해 불응성인 대상체를 포함하되, 여기서 하나의 선행 라인의 요법은 항-CD20 항체 및 알킬화제를 사용한 치료를 포함하고; (i) FL 진단 후 24개월 이내(POD24)에, 하나의 선행 라인의 요법 개시 후 24개월 이내(POD24)에, 또는 둘 다에 진행성 질환이 갖고, 대상체의 원래 FL 진단 후 6개월 이내에 하나의 선행 라인의 요법을 투여 받았거나; 또는 (ii) FL에 기인하는 하나 이상의 증후가 있거나; 위협된 말단 기관 기능, 림프종에 이차적인 혈구 감소증, 또는 벌키 질환; 비장종대; 및 적어도 6개월에 걸쳐 질병의 꾸준한 진행을 갖는다. 일부 구현예에서, FL에 기인하는 증후는 B 증후로 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 벌키 질환은 단일 종괴 > 7 cm 또는 3개 이상의 종괴 > 3 cm이다.
- [0120] 일부 구현예에서, FL 대상체의 코호트는 본원에 제공된 임의의 방법에 따라 치료된다. 일부 구현예에서, FL 코호트는 FL 등급 1, 2 또는 3A를 치료하기 위한 2개의 선행 라인의 요법에 재발하였거나 불응성인 대상체를 포함하며, 여기서 2개의 선행 라인의 요법 중의 하나는 항-CD20 항체 및 알킬화제를 사용한 치료를 포함한다. 일부 구현예에서, FL 코호트는, (i) 선행 라인의 요법(예를 들어 제 1 선행 라인의 요법 또는 제 2 선행 라인의 요법) 완료 후 12개월 이내에 재발성 또는 불응성 질환이 있고 선행 조합 요법을 투여 받았고; (ii) HSCT 후 재발하고/하거나; (iii) 이중 불응성의 정의를 충족하는, 대상체를 포함한다. 따라서, 일부 구현예에서, FL 코호트는, (i) FL 등급 1, 2 또는 3A를 치료하기 위한 2개의 선행 라인의 요법에 재발하였거나 불응성이되, 여기서 2개의 선행 라인의 요법 중의 하나는 항-CD20 항체 및 알킬화제를 사용한 치료를 포함하고; (ii) 선행 라인의 요법(예를 들어 제 1 선행 라인의 요법 또는 제 2 선행 라인의 요법) 완료 후 12개월 이내에 재발성 또는 불응성 질환이 있고 선행 조합 요법을 투여 받았고; HSCT 후 재발하고/하거나 이중 불응성의 정의를 충족하는, 대상체를 포함한다. 일부 구현예에서, PI3Ki를 사용한 단독 요법은 선행 라인의 요법이다. 일부 구현예에서, 대상체는, (i) 항-CD20 항체 및 알킬화제를 포함하는 전신 라인의 요법(systemic line of therapy)에 불응성이고; (ii) 항-CD20 항체 및 알킬화제를 포함하는 선행 라인의 전신 요법의 완료 후 6개월 이내에 재발하고/하거나; (iii) 2개의 선행 라인 또는 요법 후에 제공된 항-CD20 항체 유지 요법 동안 또는 2개의 선행 라인 또는 요법 후에 제공된 항-CD20 항체 유지 요법을 완료한 후 6개월 이내에 재발하는 경우, 이중 불응성(double refractory)이다.
- [0121] 일부 구현예에서, FL 대상체의 코호트는 본원에 제공된 임의의 방법에 따라 치료된다. 일부 구현예에서, FL 코호트는 FL 등급 1, 2 또는 3A를 치료하기 위한 3개 이상(예를 들어 3개)의 선행 라인의 요법에 재발하였거나 불응성인 대상체를 포함하며, 여기서 3개 이상의 선행 라인의 요법 중의 하나는 항-CD20 항체 및 알킬화제를 사용

한 치료를 포함한다. 일부 구현예에서, HSCT는 3개 이상의 선행 라인의 요법 중의 하나이다. 일부 구현예에서, FL 코호트는 이중 불응성인 대상체를 포함한다. 일부 구현예에서, 대상체는, (i) 항-CD20 항체 및 알킬화제를 포함하는 전신 라인의 요법(systemic line of therapy)에 불응성이고; (ii) 항-CD20 항체 및 알킬화제를 포함하는 선행 라인의 전신 요법의 완료 후 6개월 이내에 재발하고/하거나; (iii) 2개의 선행 라인 또는 요법 후에 제공된 항-CD20 항체 유지 요법 동안 또는 2개의 선행 라인 또는 요법 후에 제공된 항-CD20 항체 유지 요법을 완료한 후 6개월 이내에 재발하는 경우, 이중 불응성이다.

[0122] 일부 구현예에서, 대상체는 FL 등급 3B(FL3B)를 갖지 않는다. 일부 구현예에서, 대상체는 복합 DLBCL 및 FL, 또는 형질전환된 FL의 증거를 갖지 않는다. 일부 구현예에서, 대상체는 십이지장형 FL의 세계보건기구(WHO) 하위 분류를 갖지 않는다.

[0123] B. 변연부 림프종(MZL)

[0124] 일부 구현예에서, 제공된 방법은 변연부 림프종(MZL)을 갖는 대상체의 특정 그룹 또는 서브세트를 치료하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 대상체는 재발성/불응성 MZL을 갖는다.

[0125] MZL은 MALT(점막 관련 림프 조직), 비장 또는 림프절의 변연부로 이동하기 전에 2차 림프 여포에서 성숙하는 B 세포의 변형으로 인해 발생하는 이질적인 B 세포 악성 종양이다. 일부 구현예에서, MZL은 과돌연변이된 IgV 유전자를 특징으로 하는 변연부 림프구를 나타내거나 이와 연관된다. 일부 구현예에서, 변연부 림프구는 pan-B+를 나타내거나 CD5-/+; CD10-; CD23-; CD11c+/-; cyIg + (세포의 40%), sIgM+ 브라이트(bright); sIgD-면역 표현형과 연관된다.

[0126] 3가지 서브타입이 기술된다: 결절의 MZL(ENMZL, 주로 위), 비장 MZL(SMZL) 및 결절 MZL(NMZL). 일부 측면에서, 대상체는 결절의 MZL을 갖는다. 일부 측면에서, 결절의 MZL은 위장관, 갑상선, 유방, 폐, 비장 및/또는 기타 MALT 부위의 MALT에서 검출될 수 있다. 일부 구현예에서, 결절의 MZL은 위에서 검출될 수 있다. 일부 측면에서, 결절의 MZL은 전위 t(11:18)(q21;q21)/API2/MLT 융합을 나타내거나 이와 연관된다. 일부 측면에서, 결절의 MZL은 전위 t(14:18)(q32;q21)/IgH/MLT1 융합을 나타내거나 이와 연관된다. 일부 측면에서, 결절의 MZL은 t(3:14)/IgH/FOXP1 융합을 나타내거나 이와 연관된다. 일부 구현예에서, 대상체는 비장 MZL을 갖고, 여기서 질환은 초기에 비장, 골수 및/또는 혈액에서만 검출된다. 일부 구현예에서, 비장 MZL은 순환 용모 림프구(circulating villous lymphocyte)와 관련된 비종대(splenomegaly)를 나타내거나 이와 연관된다. 일부 측면에서, 비장 MZL은 7q 결실을 나타내거나 이와 연관된다. 일부 측면에서, 결실은 7q32.1 내지 7q32-3 사이의 영역에 걸쳐 있다. 일부 측면에서, 비장 MZL은 7q 전위를 나타내거나 이와 연관된다. 일부 측면에서, 전위는 7q22-q32 영역을 중심으로 한다. 일부 측면에서, 비장 MZL은 삼중염색체(trisomy) 3을 나타내거나 이와 연관된다. 일부 측면에서, 비장 MZL은 삼중염색체 12를 나타내거나 이와 연관된다. 일부 구현예에서, 대상체는 결절 MZL을 지되, 여기서 림프종은 먼저 림프절, 골수 및/또는 혈액으로 제한된다[문헌 「Swerdlow et al., (2016) *Blood*, 30:84-91」 참조].

[0127] 특정 측면에서, 본원에 제공된 방법은 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 투여량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 각 투여량의 T 세포는 CD19에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함한다. 이러한 CAR-T 세포 및 그 제조 방법은 섹션 II에 설명되어 있다.

[0128] 일부 구현예에서, 제공된 방법은 (약) 2.5×10^7 개 내지 (약) 1.5×10^8 개, 예를 들어 (약) 5×10^7 개 내지 (약) 1×10^8 개의 전체 제조합 수용체-발현 T 세포(예를 들어 CAR+ T 세포)의 투여, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같이 정의된 비율, 예를 들어 (약) 1:1의 비율로 투여된 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 포함하는 T 세포의 투여량의 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 1.5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포의 투여량(경계 포함)을 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 1.1×10^8 개의 CAR-발현 T 세포의 투여량(경계 포함)을 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 1.0×10^8 개의 CAR-발현 T 세포의 투여량(경계 포함)을 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 9×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 사이의 투여량(경계 포함)을 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 8×10^7 개의 CAR-발현 T 세포의 투여량(경계 포함)을 포함한다.

다. 일부 구현예에서, T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 7×10^7 개의 CAR-발현 T 세포의 투여량(경계 포함)을 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 6×10^7 개의 CAR-발현 T 세포의 투여량(경계 포함)을 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포의 투여량은 CAR을 발현하는 CD8+ T 세포에 대한 CAR을 발현하는 대략 1:1의 CD4+ T 세포의 비율을 포함한다. 특정 구현예에서, 투여되는 투여량은 CAR+ T 세포의 정확하거나 균일하거나 고정된 수, 또는 특정 유형의 CAR+ T 세포, 예를 들어 CD4+CAR+ T 세포 및/또는 CD8+CAR+ T 세포의 정확하거나 균일하거나 고정된 수, 및/또는 정확하거나 균일하거나 고정된 수와 비해 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15% 이하, + 또는 -(플러스 또는 마이너스, 어떤 경우에는 $\pm$ 로 표시됨)인 특정 분산도(a specified degree of variance) 이내인 상기 세포들의 임의의 수이다. 일부 구현예에서, 이러한 균일하거나 고정된 수의 세포는 약 2.5×10^7 개의 총 CAR+ T 세포 또는 CD8+ 및/또는 CD4+ CAR+ T 세포, 5×10^7 개의 총 CAR+ T 세포 또는 CD8+ 및/또는 CD4+ CAR+ T 세포, 또는 1×10^8 개의 총 CAR+ T 세포 또는 CD8+ 및/또는 CD4+ CAR+ T 세포이다. 일부 구현예에서, 투여량 내 세포 수는 2.5×10^7 개의 CAR+ T 세포, 예를 들어 1.25×10^7 개의 CD4+CAR+ T 세포 및 1.25×10^7 개의 CD8+CAR+ T 세포를 포함하거나 또는 이로 구성되거나 또는 이로 필수적으로 구성된다. 일부 구현예에서, 투여량은 5×10^7 개의 CAR+ T 세포, 예를 들어 2.5×10^7 개의 CD4+CAR+ T 세포 및 2.5×10^7 개의 CD8+CAR+ T 세포를 포함하거나 또는 이로 구성되거나 또는 이로 필수적으로 구성된다. 일부 구현예에서, 투여량은 1×10^8 개의 CAR+ T 세포, 예를 들어 0.5×10^8 개의 CD4+CAR+ T 세포 및 0.5×10^8 개의 CD8+CAR+ T 세포를 포함하거나 또는 이로 구성되거나 또는 이로 필수적으로 구성된다. 일부 측면에서, 투여되는 세포 수는, 상기 구현예에서 세포의 수와 비교하여 상기 수의 특정 변동량 정도 이내, 예를 들어 플러스 또는 마이너스 ($\pm$) 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10% 이내, 예를 들어 플러스 또는 마이너스 8% 이내이다. 일부 측면에서, 이러한 투여량은 상기 세포의 (예를 들어, 전체 CAR+ T 세포의, 또는 CD8+ 및/또는 CD4+ CAR+ T 세포의) 수와, 치료적 반응, 또는 이의 지속 (예를 들어, 완화 달성 가능성, 완전 완화, 및/또는 완화의 특정 지속) 및/또는 임의의 전술한 지속을 나타내는 하나 이상의 결과 사이에 상관관계 (선택적으로 선형 관계)가 관찰되는 범위 내에 있다.

[0129] 일부 구현예에서, 투여는 복수의 개별 조성물을 투여하는 것을 포함하며, 여기서 복수의 개별 조성물은 상기 구현예들 중의 어느 것에서의 투여량에 따라 CD8+ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 1 조성물 및 CD4+ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 2 조성물을 포함한다.

[0130] 일부 구현예에서, 대상체는 대상체가 MZL을 갖는 경우 치료를 위해 선택된다. 일부 구현예에서, 대상체는 조직학적으로 확인된 질병이 있는 경우 치료를 위해 선택된다. 일부 구현예에서, 대상체는 CT 확인된 질환이 있는 경우 치료를 위해 선택된다. 일부 구현예에서, 대상체는 PET 확인 질환이 있는 경우 치료를 위해 선택된다. 일부 구현예에서, 대상체는 PET 비열성 질환이 있는 경우 치료를 위해 선택된다. 일부 구현예에서, 대상체는 대상체가 장축에서 2.0 cm 초과인 하나 이상의 측정 가능한 결절 병변을 갖는 경우 치료를 위해 선택된다. 일부 구현예에서, 환자는 하나 이상의 측정 가능한 결절 병변을 갖는다. 일부 구현예에서, 환자는 하나 이상의 측정 가능한 결절의 병변을 갖는다.

[0131] 일부 구현예에서, 대상체는 MZL을 치료하기 위한 2개 이상의 선행 라인의 요법 후에 재발하였거나 치료에 불응성이다. 일부 구현예에서, 대상체는 MZL을 치료하기 위한 2개의 선행 라인의 요법 후에 재발하였거나 치료에 불응성이다. 선행 라인의 요법(들)은 MZL 치료에 사용되는 모든 요법을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 선행 라인의 요법은 CD20-표적화 요법(예를 들어 항-CD20 항체, 예를 들어 리툭시맙 또는 오비누투주맙), 이브루티닙, 또는 조혈 줄기 세포 이식(HSCT)을 사용한 치료로부터 선택된다. 어떤 경우에는 HSCT가 동종이다. 어떤 경우에는 HSCT가 자가 조직이다.

[0132] 특정 구현예에서, 대상체는 CD20-표적화 요법(예를 들어 항-CD20 항체)을 포함하는 조합 화학면역요법 요법인 선행 요법의 요법을 투여받은 적이 있다. 일부 구현예에서, 조합은 조합 전신 요법이다. 치료된 대상체 중에는 MZL을 치료하기 위한 조합 전신 요법을 사용한 치료에 대해 재발하였거나 불응성인 대상체가 있다. 일부 구현예에서, 조합 전신 요법은 항-CD20 항체 및 알킬화제를 포함한다. 일부 구현예에서, 항-CD20 항체는 모노클로날 항체이다. 일부 구현예에서, 항-CD20 항체는 리툭시맙이다. 일부 구현예에서, 항-CD20 항체는 오비누투주맙이다. 예시적인 알킬화제는 사이클로포스파미드, 클로람부실, 데카르바진, 펠팔란, 이포스파미드, 테모졸로미드 및 벤다무스틴을 포함하되, 이로써 제한되지는 않는다. 일부 구현예에서, 알킬화제는 벤다무스틴

이다. 일부 구현예에서, 알킬화제는 클로람부실이다. 일부 구현예에서, 대상체는 사전에 리툭시맵 및 벤다무스틴으로 치료받은 적이 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 사전에 리툭시맵 및 클로람부실로 치료를 받은 적이 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 사전에 오비누투주맵 및 벤다무스틴으로 치료받은 적이 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 사전에 오비누투주맵 및 클로람부실로 치료를 받은 적이 있다.

[0133] 일부 구현예에서, 선행 라인의 요법은 리툭시맵 + 사이클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴 및 프레드니손(R-CHOP)이다. 일부 구현예에서, 대상체는 리툭시맵 + 사이클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴 및 프레드니손(R-CHOP)을 사용한 치료에 재발하였거나 불응성이다. 일부 구현예에서, 대상체는 레날리도마이드 및 리툭시맵을 사용한 치료에 재발하였거나 불응성이다.

[0134] 일부 구현예에서, 선행 라인의 요법은 조혈 줄기 세포 이식(HSCT)이다. 일부 구현예에서, 대상체는 조혈 줄기 세포 이식(HSCT)에 재발하였거나 불응성이다. 일부 구현예에서, 대상체는 사전에 동종 HSCT를 받았고, 그에 대해 재발하였거나 불응성이다. 일부 구현예에서, 대상체는 사전에 자가 HSCT를 받았고, 그에 대해 재발하였거나 불응성이다.

[0135] 일부 구현예에서, MZL 대상체의 코호트는 본원에 제공된 임의의 방법에 따라 치료된다. 일부 구현예에서, MZL 코호트는 MZL을 치료하기 위한 2개의 선행 라인의 요법에 대해 재발하였거나 불응성인 대상체를 포함하되, 여기서 선행 라인의 요법 중의 하나 이상은 조합 전신 요법, 항-CD20 항체 및 알킬화제를 사용한 요법, 또는 HSCT이었다. 일부 구현예에서, 대상체는 HSCT 후에 재발된다. 일부 구현예에서, MZL은 비장 MZL이고 2개의 선행 라인의 요법 중의 하나는 비장절제술이다. 일부 구현예에서, MZL은 결절외 MZL이고 항생제는 2개의 선행 라인의 요법 중의 하나가 아니다.

[0136] 일부 구현예에서, 대상체는 비장 MZL을 갖고 2개 이상의 선행 라인의 요법 중의 하나 이상은 비장절제술이다. 일부 구현예에서, 대상체는 비장 MZL을 갖고 2개의 선행 라인의 요법 중의 하나 이상은 비장절제술이다. 일부 구현예에서, 대상체는 결절외 MZL(ENMZL)을 갖고 항생제는 2개 이상의 선행 라인의 요법 중의 하나가 아니다. 일부 구현예에서, 대상체는 결절외 MZL(ENMZL)을 갖고 항생제는 2개의 선행 라인의 요법 중의 하나가 아니다.

[0137] C. 반응, 효능 및 생존

[0138] 일부 구현예에서, 제공된 방법에 따른 투여는 대상체가 또 다른 요법에 내성을 가지게 됨에도 불구하고, 대상체를 효과적으로 치료한다. 일부 구현예에서, 상기 방법에 따라 치료되는 대상체의 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 또는 80% 이상은 완전 완화(CR)를 달성한다. 일부 구현예에서, 상기 방법에 따라 치료되는 대상체의 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 80% 이상, 또는 90% 이상은 객관적 반응(OR)을 달성한다. 일부 구현예에서, 상기 방법에 따라 치료되는 대상체의 (약) 50% 이상, 대상체의 (약) 60% 이상, 대상체의 (약) 70% 이상, 대상체의 (약) 80% 이상 또는 대상체의 (약) 90% 이상은 CR을 달성하고/하거나 객관적 반응(OR)을 달성한다. 일부 구현예에서, 효과적인 치료를 위해 평가되는 기준은 전체 반응률(ORR; 또한 일부 경우에 객관적 반응률로도 알려짐), 완전 반응(CR; 또한 일부 경우에 완전 완화(complete remission)으로도 알려짐), 반응의 지속(DOR) 무진행 생존(PFS), 및/또는 전체 생존(OS)을 포함한다.

[0139] 일부 구현예에서, 제공되는 방법에 따라 치료되는 대상체의 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상 또는 70% 이상은 완전 완화(CR; 또한 일부 경우에 완전 반응으로도 알려짐)를 달성하고, (약) 3 개월, 6 개월 또는 12 개월 또는 13개월 이상 또는 대략 14개월 이상을 위한 무진행 생존(PFS) 및/또는 전체 생존(OS)을 나타낸다. 일부 구현예에서, 평균적으로, 상기 방법에 따라 치료되는 대상체는 (약) 6 개월, 12 개월, 또는 18개월의 중간 PFS 또는 OS를 나타낸다. 일부 구현예에서, 대상체는 요법 이후 (약) 6, 12, 18 개월 이상 동안 PFS 또는 OS를 나타낸다.

[0140] 일부 구현예에서, 제공된 방법에 따라 치료된 대상체는 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 또는 90% 이상의 CRR을 나타낸다. 일부 구현예에서, 완전 반응률(CRR)은 최대 12개월, 최대 18개월, 최대 24개월, 최대 36개월 또는 그 이상의 최상의 전체 반응(BOR)을 갖는 대상체의 백분율로서 계산된다.

[0141] 일부 측면에서, 대상체, 예를 들어 NHL을 가지는 대상체에서의 반응률은 Lugano 기준에 기초한다[문헌 「Cheson et al., Blood. 2016;128(21):2489-96」 참조]. 일부 측면에서, 반응 평가는 임상, 혈액, 및/또는 분자 방법 중 임의의 방법을 이용한다. 일부 측면에서 Lugano 기준을 사용하여 평가된 반응은 양전자 방출 단층 촬영(PET)-컴퓨터 단층 촬영(CT) 및/또는 CT를 적절하게 사용하는 것을 포함한다. PET-CT 평가는 FDG-친화성 림프종(FDG-avid lymphoma)에 대한 플루오로디옥시글루코스(FDG)의 사용을 더 포함할 수 있다. PET-CT가 FDG-친화성 조직학에서의 반응을 평가하는 데 사용되는 일부 측면에서, 5-점 스케일이 사용될 수 있다. 어떤 면에서, 상기 5-점 스케일은 다음 기준을 포함한다: 1, 백그라운드를 넘는 어떠한 흡수도 없음; 2, 흡수 ≤ 중격(mediastinum);

3, 흡수>종격, 그러나 $\leq$ 간; 중등도의 흡수>간; 5, 간 및/또는 새로운 병변보다 매우 높은 흡수; X, 림프종과 관련된 것 같지 않은 새로운 흡수 영역.

[0142] 일부 측면에서, 루가노 기준을 사용하여 기재된 바와 같은 완전한 반응은 다양한 측정 가능한 부위에서의 완전한 대사 반응 및 완전한 방사선 반응을 포함한다. 일부 측면에서, 상기 부위는 림프절(lymph nodes) 및 림프의 부위(extralymphatic sites)를 포함하며, 여기서 CR은 PET-CT가 사용될 경우 5점 척도에서 잔류 질량을 갖거나 갖지 않는 1, 2 또는 3의 점수로 기재된다. 일부 측면에서, 생리학적인 흡수가 많거나 비장 또는 골수 내 활성화(예를 들어 화학 요법 또는 골수성 콜로니 자극 인자 사용)가 있는 결절 외 부위에서, 흡수가 정상 종격막 및/또는 간에서보다 더 많을 수 있다. 상기 상황에서, 조직이 많은 생리적 흡수를 하더라도 초기 관여 부위에서의 흡수가 주변 정상 조직보다 더 많지 않으면 완전한 대사 반응이 유추될 수 있다.

[0143] 일부 측면에서, 반응은 CT를 사용하여 림프절에서 평가되며, 여기서 CR은 질환 및 표적 결절/결절의 집합체의 림프 외 부위가 병변의 가장 긴 횡방향 직경(LDi)에서 ≤ 1.5 cm까지 퇴화해서는 안되는 것으로 설명된다. 추가 평가 부위는 골수를 포함하며, 여기서 PET-CT 기반 평가는 골수에서 FDG-친화성 질환의 증거가 부족함을 나타내야 하고, CT 기반 평가는 정상적인 형태를 나타내야 한다. 추가 부위는 정상으로 회귀해야 하는 기관 확대의 평가를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 측정되지 않은 병변 및 새로운 병변이 평가되며, 이는 CR의 경우 없어야 한다 (Cheson 등의 문헌[Blood. 2016 Nov 24;128(21):2489-96] 참조).

[0144] 일부 측면에서, 루가노 기준을 사용하여 기재된 바와 같은 부분 반응(PR; 어떤 경우에는 '부분 완화'라고도 함)은 다양한 측정 가능한 부위에서의 부분적인 대사 반응 및/또는 방사선 반응을 포함한다. 일부 측면에서, 상기 부위는 림프절 및 림프 외 부위를 포함하며, 여기서 PR은 PET-CT가 사용될 경우 기준선 및 잔류 질량(들)의 임의의 크기와 비교하여 섭취가 감소된 4 또는 5의 점수로 기재된다. 잠정적으로, 상기 발견은 반응하는 질환을 나타낼 수 있다. 치료 말기에, 상기 발견은 잔류 질환을 나타낼 수 있다.

[0145] 일부 측면에서, 반응은 CT를 사용하여 림프절에서 평가되며, 여기서 PR은 최대 6개의 표적 측정 가능한 노드 및 림프절 외 부위의 SPD가 50% 이상 감소하는 것으로 설명된다. 병변이 너무 작아 CT에서 측정할 수 없는 경우 $5\text{mm} \times 5\text{mm}$ 가 기본값으로 지정되며; 병변이 더 이상 보이지 않으면 값은 $0\text{mm} \times 0\text{mm}$; $5\text{mm} \times 5\text{mm}$ 를 초과하지만 정상보다 작은 노드의 경우 실제 측정값이 계산에 사용된다. 추가 평가 부위는 골수를 포함하며, 여기서 PET-CT 기반 평가는 기준선(허용된 화학 요법으로부터의 반응 변화와 양립 가능한 확산 흡수)과 비교하여 감소되거나 정상 골수에서의 흡수보다 더 많은 잔류 흡수를 나타내야 한다. 일부 측면에서, 결절 반응의 맥락에서 골수에서 지속적인 병소의 변화가 있는 경우, MRI 또는 생검법 또는 간격 검사로 추가 평가를 하는 것이 고려되어야 한다. 일부 측면에서, 추가 부위는 기관 확대의 평가를 포함할 수 있으며, 비장은 길이에 있어 정상 이상으로 $>50\%$ 까지 퇴화되었어야 한다. 일부 측면에서, 비측정 병변 및 새로운 병변이 평가되고, PR의 경우 부재/정상, 퇴화되어야 하나 증가해서는 안된다. 무반응/안정 질환(SD) 또는 진행성 질환(PD)도 PET-CT 및/또는 CT 기반 평가를 사용하여 측정할 수 있다(Cheson 등의 문헌[Blood. 2016 Nov 24;128(21):2489-96] 참조).

[0146] 일부 측면에서, 무진행 생존(progression-free survival, PFS)은 대상체가 질환을 갖고 살지만 악화되지 않는 암과 같은 질환의 치료 중 및 치료 후의 시간 길이로 설명된다. 일부 측면에서, 객관적인 반응(objective response, OR)은 측정 가능한 반응으로 설명된다. 일부 측면에서, 객관적인 반응율(objective response rate, ORR; 경우에 따라 전체 응답률이라고도 함)은 CR 또는 PR을 달성한 환자의 비율로 설명된다. 일부 측면에서, 전반적인 생존(overall survival, OS)은 질환으로 진단된 대상체가 여전히 살아 있는, 암과 같은 질환에 대한 치료 시작 또는 진단일 중 하나로부터의 시간 길이로 설명된다. 일부 측면에서, 이벤트 없는 생존(event-free survival, EFS)은 치료가 방해 또는 지연되도록 의도된 특정 합병증 또는 이벤트 없는 채로 대상체가 존속하는 치료 후 암 말기 동안 시간의 길이로 설명된다. 상기 이벤트는 뼈까지 퍼지는 암으로부터의 뼈 통증과 같은 특정 증후의 개시 또는 암의 재발 또는 죽음을 포함할 수 있다.

[0147] 일부 구현예에서, 반응 기간(duration of response, DOR)의 측정은 종양 반응의 문서화에서 질환 진행까지의 시간을 포함한다. 일부 구현예에서, 반응을 평가하기 위한 파라미터에는 지속적인 반응, 예를 들어 요법 개시로부터 기간 후에 지속되는 반응이 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, 지속적인 반응은 요법 개시 후 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18 또는 24개월에서의 반응율로 표시된다. 일부 구현예에서, 반응은 3개월 또는 6개월보다 더 오랫동안 지속된다.

[0148] 일부 구현예에서, 상기 방법은 질환이나 상태의 부담, 예를 들어 종양 세포의 수, 종양의 크기, 환자 생존 기간 또는 무사건 생존 기간을 대체 투여 요법을 사용하는 비교 가능한 방법으로 관찰되는 감소와 비교하여 더 큰 정도 및/또는 더 긴 기간 동안, 예를 들어 대상체가 하나 이상의 대체 치료제를 받는 경우 및/또는 제공된 방법

및/또는 제공된 물품에 따라 대상체가 세포 및/또는 림프구 고갈제의 투여량을 받지 않는 경우 제조 또는 구성보다 줄인다. 일부 측면에서, 대상체의 생존, 특정 기간 내의 생존, 생존의 정도, 무사건 또는 무증후 생존의 존재 또는 기간, 또는 무재발 생존이 평가된다. 일부 구현예에서, 질환이나 상태의 모든 증후가 평가된다. 일부 구현예에서, 질환 또는 병태 부담의 척도가 특정된다.

[0149] 일부 구현예에서, 상기 방법에 의해 대상체의 무사건 생존율 또는 전체 생존율이, 다른 방법, 예를 들어 대상체가 하나 이상의 대체 치료제를 받는 방법 및/또는 제공된 방법 및/또는 제공된 물품에 따라 대상체가 세포 및/또는 림프구 고갈제의 투여량을 받지 않는 방법 제조 또는 구성에 비해, 개선된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 투여 후 6개월에 상기 방법에 의해 치료된 대상체에 대한 무사건 생존율 또는 확률은 약 40% 초과, 약 50% 초과, 약 60%초과, 약 70%초과, 약 80% 초과, 약 90%초과, 약 95% 초과이다. 일부 측면에서, 전체 생존율은 약 40% 초과, 약 50% 초과, 약 60% 초과, 약 70% 초과, 약 80% 초과, 약 90% 초과, 또는 약 95% 초과이다. 일부 구현예에서, 상기 방법으로 치료된 대상체는 무사건 생존, 무재발 생존, 또는 적어도 6개월까지, 또는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10년까지의 생존을 나타낸다. 일부 구현예에서, 약 6개월 이상, 또는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10년의 진행까지의 시간과 같은 진행까지의 시간이 개선된다.

[0150] 일부 구현예에서, 방법에 따른 치료 후 재발 가능성이, 다른 방법 예를 들어 대상체가 하나 이상의 대체 치료제를 받는 방법 및/또는 제공된 방법 및/또는 제공된 물품 또는 조성에 따라 대상체가 세포 및/또는 림프구 고갈제의 투여량을 받지 않는 방법에 비해, 개선된다. 예를 들어 일부 구현예에서, 제 1 투여 후 6개월에 재발 확률은 약 80% 미만, 약 70% 미만, 약 60% 미만, 약 50% 미만, 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 20% 미만, 또는 약 10% 미만이다.

[0151] 일부 경우에, 투여된 세포, 예를 들어 입양 전달된 세포의 약동학은 투여된 세포의 가용성, 예를 들어 생체이용률을 평가하기 위해 결정된다. 입양 전달된 세포의 약동학을 결정하는 방법에는 조작된 세포가 투여된 대상체로부터 말초 혈액을 채취하고 말초 혈액에서 조작된 세포의 수 또는 비율을 결정하는 것이 포함될 수 있다. 세포 선택 및/또는 분리를 위한 접근 방식은, 키메라 항원 수용체(CAR) 특이적 항체(예를 들어, Brentjens 등, Sci. Transl. Med. 2013 Mar; 5(177): 177ra38) 단백질 L(Zheng 등, J. Transl. Med. 2012 Feb; 10:29), CAR의 특정 부위에 직접 도입되어 Strep-Tag에 대한 결합 시약을 사용하여 CAR을 직접 평가하는 Strep-Tag 서열과 같은 에피토프 태그(Liu 등 (2016) Nature Biotechnology, 34:430; 국제 특허 출원 공개 번호 W02015095895), 및 CAR 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체의 용도를 포함할 수 있다. 외인성 표지 유전자는 일부 경우에 세포의 검출 또는 선택을 가능하게 하도록, 일부 경우에 또한 세포 자살을 촉진하도록, 조작된 세포 요법과 관련하여 사용될 수 있다. 일부 경우에 절단된 표피 성장 인자 수용체(EGFRt)는 형질도입된 세포에서 관심 있는 이식유전자(CAR 또는 TCR)와 공동-발현될 수 있다(예를 들어 미국특허 8,802,374 참조한다.). EGFRt는 항체 세톡시맵(Erbix®) 또는 다른 치료용 항-EGFR 항체 또는 결합 분자에 의해 인식되는 에피토프를 함유할 수 있으며, 이는 EGFRt 구조체 및 또 다른 재조합 수용체, 예를 들어 키메라 항원 수용체(CAR)로 조작된 세포를 확인 또는 선택하기 위해 및/또는 수용체를 발현하는 세포를 제거 또는 분리하기 위해 사용될 수 있다. 문헌[미국특허 8,802,374 및 Liu 등, Nature Biotech. 2016 April; 34(4): 430-434]을 참조한다.

[0152] 일부 구현예에서, 환자로부터 수득한 생물학적 샘플, 예를 들어 혈액 내 $CAR^{+} T$ 세포의 수는, 세포 요법의 투여 이후 결정되어, 예를 들어 세포의 약동학을 결정할 수 있다. 일부 구현예에서, 대상체의 혈액에서, 또는 상기 방법에 의해 치료되는 대부분의 대상체에서 감지될 수 있는, $CAR^{+} T$ 세포, 선택적으로 $CAR^{+} CD8^{+} T$ 세포 및/또는 $CAR^{+} CD4^{+} T$ 세포의 수는, μL 당 1개 초과인 세포, μL 당 5개 초과인 세포 또는 μL 당 10개 초과인 세포이다. 일부 구현예에서, 환자, 예를 들어 혈액으로부터 수득된 생물학적 샘플 중 $CAR^{+} T$ 세포의 수는 CAR 이식유전자에 대한 PCR을 통해 결정될 수 있다.

[0153] D. 독성

[0154] 일부 구현예에서, 제공된 방법 중의 어느 것에 따라 치료된 대상체는 투여된 세포와 연관될 수 있는 독성의 하나 이상의 징후 또는 증후에 대해 평가된다. 키메라 항원 수용체를 발현하는 T 세포로 치료하는 것과 같은 입양 T 세포 요법의 투여는 사이토카인 방출 증후군 및 신경독성과 같은 독성 효과 또는 결과를 유발할 수 있다. 일부 예에서, 그러한 효과 또는 결과는 관찰된 독성의 기초가 될 수 있는 높은 수준의 순환 사이토카인과 평행을 이룬다.

[0155] 일부 측면에서, 독성 결과는 사이토카인 방출 증후군(CRS) 또는 중증 CRS(sCRS)와 연관되거나 이를 나타낸다.

CRS(예를 들어 sCRS)는 입양 T 세포 치료 및 다른 생물학적 제제의 대상체에게 투여한 후 일부 경우에 발생할 수 있다. 문헌 [Davila 등, Sci Transl Med 6, 224ra25 (2014); Brentjens 등, Sci. Transl. Med. 5, 177ra38 (2013); Grupp 등, N. Engl. J. Med. 368, 1509-1518 (2013)]을 참조한다.

- [0156] 일반적으로 CRS는 예를 들어 T 세포, B 세포, NK 세포, 단핵구 및/또는 대식세포에 의해 매개되는 과장된 전신 면역 반응에 의해 유발된다. 이러한 세포는 사이토카인 및 케모카인과 같은 염증 매개체를 다량으로 방출할 수 있다. 사이토카인은 급성 염증 반응을 유발하고/거나 내피 기관 손상을 유발하여 미세혈관 누출, 심부전 또는 사망을 초래할 수 있다. 생명을 위협하는 중증 CRS는 폐 침윤 및 폐 손상, 신부전 또는 파종성 혈관내 응고를 유발할 수 있다. 생명을 위협하는 다른 중증 독성에는 심장 독성, 호흡 곤란, 신경학적 독성 및/또는 간부전이 포함될 수 있다. 일부 측면에서, 열, 특히 높은 열 ($\geq 38.5^{\circ}\text{C}$ 또는 $\geq 101.3^{\circ}\text{F}$)은 CRS 또는 그의 위험과 연관된다. 일부 경우에, CRS 모방 감염의 특징 또는 증후. 일부 구현예에서, 감염은 또한 CRS 증후를 제시하는 대상체에서 고려되고, 배양물 및 비임 항생제 요법에 의한 모니터링이 투여될 수 있다. CRS와 연관된 다른 증후는 심장 기능장애, 성인 호흡 곤란 증후군, 신부전 및/또는 간부전, 응고병증, 파종성 혈관내 응고, 및 모세관 누출 증후군을 포함할 수 있다.
- [0157] CRS는 항-IL-6 요법과 같은 항염증 요법, 예를 들어 항-IL-6 항체, 예를 들어 토실리주맙, 또는 설명된 바와 같은 항생제 또는 기타 제제를 사용하여 치료될 수 있다. CRS의 결과, 징후 및 증후는 알려져 있으며 본원에 설명된 것들을 포함한다. 일부 구현예에서, 특정 투여가 주어진 CRS 관련 결과, 징후 또는 증후에 영향을 미치거나 영향을 미치지 않는 경우, 특정 결과, 징후 및 증후 및/또는 이의 양 또는 정도가 명시될 수 있다.
- [0158] CAR-발현 세포를 투여하는 맥락에서, CRS는 일반적으로 CAR을 발현하는 세포의 주입 후 6-20일에 발생한다. Abramson 등, J Clin Onc. 2018;36(15_suppl):7505를 참조한다. 일부 경우에, CRS가 CAR T 세포 주입 후 3일 미만 또는 21일 이후에 발생한다. CRS의 발생 정도 및 시기는 기준 사이토카인 수준 또는 주입 시점의 종양 부담과 관련될 수 있다. 일반적으로 CRS는 인터페론(IFN)- γ , 종양 괴사 인자(TNF)- α 및/또는 인터루킨(IL)-2의 혈청 수준 상승을 포함한다. CRS에서 빠르게 유래될 수 있는 다른 사이토카인은 IL-1 β , IL-6, IL-8 및 IL-10이다.
- [0159] CRS와 관련된 예시적인 결과는 발열, 경직, 오한, 저혈압, 호흡곤란, 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS), 뇌병증, ALT/AST 상승, 신부전, 심장 장애, 저산소증, 신경 장애 및 사망을 포함한다. 신경학적 합병증에는 섬망, 발작과 같은 활동, 혼란, 단어 찾기 어려움, 실어증 및/또는 둔해짐이 포함된다. 다른 CRS 관련 결과에는 피로, 메스꺼움, 두통, 발작, 빈맥, 근육통, 발진, 급성 혈관 누출 증후군, 간 기능 손상 및 신부전이 포함된다. 일부 측면에서, CRS는 혈청-페리틴, d-이량체, 아미노트랜스퍼라제, 젖산 탈수소효소 및 트리글리세리드와 같은 하나 이상의 인자의 증가, 또는 저섬유소원혈증 또는 간비장종대와 관련이 있다. CRS와 관련된 다른 예시적인 징후 또는 증후는 혈액학적 불안정성, 열성 호중구감소증, 혈청 C-반응성 단백질(CRP)의 증가, 응고 매개변수의 변화(예를 들어 국제 표준화 비율(INR), 프로트롬빈 시간(PTI) 및/또는 피브리노겐), 심장 및 기타 장기 기능의 변화, 및/또는 절대 호중구 수(ANC)를 포함한다.
- [0160] 일부 구현예에서, CRS와 관련된 결과에는 다음 중 하나 이상이 포함된다: 지속적인 발열, 예를 들어 2일 이상, 예를 들어 3일 이상, 예를 들어 4일 이상 또는 연속 3일 이상 동안 특정 온도의 열, 예를 들어 섭씨 약 38°C 이상; 섭씨 약 38°C 이상의 열; 2개 이상의 사이토카인(예를 들어 인터페론 감마(IFN γ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, 프랙탈킨 및 IL-5로 구성된 군 중의 2개 이상, 및/또는 종양 괴사 인자 알파(TNF α))의 전처리 수준과 비교하여 적어도 (약) 75%의 최대 배수 변화 또는 이러한 사이토카인 중 하나 이상의 최대 배수 변화, 예를 들어 적어도 (약) 250; 및/또는 하나 이상의 독성 임상 징후, 예를 들어 저혈압(예를 들어 하나 이상의 정맥내 혈관활성 승압기에 의해 측정됨); 저산소증(예를 들어 약 90% 이하의 혈장 산소(PO_2) 수준); 및/또는 하나 이상의 신경학적 장애(정신 상태 변화, 둔함 및 발작 포함). 일부 구현예에서, 신경독성(NT)은 CRS와 동시에 관찰될 수 있다.
- [0161] 예시적인 CRS-관련 결과는 사이토카인 및 케모카인 및 CRS와 관련된 기타 인자를 포함하는 하나 이상의 인자의 증가되거나 높은 혈청 수준을 포함한다. 예시적인 결과는 이러한 인자 중 하나 이상의 합성 또는 분비의 증가를 추가로 포함한다. 이러한 합성 또는 분비는 T 세포 또는 T 세포와 상호작용하는 세포, 예를 들어 선천성 면역 세포 또는 B 세포에 의한 것일 수 있다.
- [0162] sCRS 발병 위험이 더 높은 환자를 예측하기 위해 CRS 발병과 상관관계가 있는 것으로 보이는 CRS 기준이 개발되었다(Davilla 등의 문헌[Science translational medicine. 2014;6(224):224Ra25; Abramson et al., J Clin Onc. 2018;36(15_suppl):7505] 참조). 요인으로는 발열, 저산소증, 저혈압, 신경학적 변화, 염증성 사이토카인

의 혈청 수준 상승(예를 들어 치료로 인한 상승이 치료 전 중앙 부담 및 sCRS 증후과 잘 관련될 수 있는 7가지 사이토카인 세트(IFN γ , IL-5, IL-6, IL-10, Flt-3L, 프랙탈카인, 및 GM-CSF))이 포함된다. 일부 구현예에서, CRS 등급을 반영하는 기준은 아래 표 2와 같다.

[표 2]

사이토카인 방출 증후에 대한 등급 기준					
	증후(symptom)/징후(sign)	사이토카인 방출 증후(CRS) 등급 1(경증)	CRS 등급 2(중간)	CRS 등급 3(중증)	CRS 등급 4(생명-위협)
			CRS 등급은 가장 심한 증후로 정의됨(발열은 제외)		
생활 징후(vital sign)	온도 $\geq 38.5^{\circ}\text{C}/101.3^{\circ}\text{F}$ 여부	예	임의적	임의적	임의적
	수축기 혈압(SBP) $\leq 90\text{mmHg}$ 여부	N/A	정맥주사(IV) 수액 또는 단일 저용량 승압제에 반응함.	고용량 또는 다중 승압제가 필요함	생명-위협
	산소 포화도(SaO_2) $>90\%$ 에 도달하기 위한 산소 필요 여부	N/A	흡기 비율(FiO_2) $<40\%$	산소 $\text{FiO}_2 \geq 40\%$	인공호흡기 지원 필요
장기 독성(organ toxicity)		N/A	등급 2	등급 3 또는 등급 4 경추염	등급 4(아미노전이염 제외함)

일부 구현예에서, 고용량 승압 요법은 하기 표 3에 기재된 것을 포함한다.

[표 3]

고용량 승압제(모든 복용량은 3시간 이상(≥ 3 시간) 필요)	
승압제	복용량
노르에피네프린 단독요법제	$\geq 20 \mu\text{g}/\text{min}$
도파민 단독요법제	$\geq 10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$
페닐에프린 단독요법제	$\geq 200 \mu\text{g}/\text{min}$
에피네프린 단독요법제	$\geq 10 \mu\text{g}/\text{min}$
바소프레신을 복용하는 경우	$\geq 10 \mu\text{g}/\text{min}^*$ 의 바소프레신+노르에피네프린 등가물(ME)
복합 승압제(바소프레신 +아님)를 사용하는 경우	$\geq 20 \mu\text{g}/\text{min}^*$ 의 노르에피네프린 등가물
* VASST 시험 승압기 등가 방정식: 노르에피네프린 등가물 복용량= [노르에피네프린($\mu\text{g}/\text{min}$)] + [도파민($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) $\times 2$] + [에피네프린($\mu\text{g}/\text{min}$)] + [페닐에프린($\mu\text{g}/\text{min}$) $\times 10$]	

일부 구현예에서, 독성 결과는 중증 CRS이다. 일부 구현예에서, 독성 결과는 중증 CRS(예를 들어 중간(moderate) 또는 경증 CRS)의 부재이다.

일부 구현예에서, 발열 및/또는 C-반응성 단백질(CRP)의 수준이 측정될 수 있다. 일부 구현예에서, CRS-관련 혈청 인자 또는 CRS-관련 결과는, Flt-3L, 프랙탈카인, 과립구 대식세포 집락 자극 인자(GM-CSF), 인터루킨-1 베타(IL-1 α , IL-2, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, 인터페론 감마(IFN- γ , 대식세포 염증성 단백질(MIP)-1, MIP-1, sIL-2R α 또는 종양 괴사 인자 알파(TNF α))를 포함하는, 염증성 사이토카인 및/또는 케모카인의 수준 및/또는 농도의 증가를 포함한다. 일부 구현예에서, 인자 또는 결과는 C 반응성 단백질(CRP)을 포함한다. 일부 구현예에서, 높은 수준의 CRP를 갖는 것으로 측정된 대상체는 CRS를 갖지 않는다. 일부 구현예에서, CRS의 측정은 CRP 및 CRS를 나타내는 다른 인자의 측정을 포함한다.

일부 구현예에서, 중증 CRS 또는 3등급 CRS 이상(예를 들어 4등급 이상)과 관련된 결과에는 다음 중 하나 이상이 포함된다: 지속적인 발열, 예를 들어 2일 이상, 예를 들어 3일 이상, 예를 들어 4일 이상 또는 연속 3일 이상 동안 특정 온도의 열, 예를 들어 섭씨 약 38°C 이상; 섭씨 약 38°C 이상의 열; 2개 이상의 사이토카인(예를 들어 인터페론 감마(IFN γ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, 프랙탈카인 및 IL-5로 구성된 군 중의 2개 이상, 및/또는 종양 괴사 인자 알파(TNF α))의 전처리 수준과 비교하여 적어도 (약) 75%의 최대 배수 변화 또는 이러한 사이토카인 중 하나 이상의 최대 배수 변화, 예를 들어 적어도 (약) 250; 및/또는 하나 이상의 독성 임상 징후, 예를 들어 저혈압(예를 들어 하나 이상의 정맥내 혈관확장 승압기에 의해 측정됨); 저산소증(예를 들어 약 90% 이하의 혈장 산소(PO_2) 수준); 및/또는 하나 이상의 신경학적 장애(정신 상태 변화, 둔함 및 발작 포함). 일부 구현예에서, 중증 CRS에는 중환자실(ICU)에서 관리 또는 치료가 필요한 CRS가 포함된다.

일부 구현예에서, 중증 CRS와 같은 CRS는 (1) 지속적인 발열(최소 3일 동안 섭씨 38°C 이상) 및 (2) CRP의 혈청

수준이 약 20mg/dL 이상인 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, CRS는 2개 이상의 증압제를 사용해야 하는 저혈압 또는 기계적 환기가 필요한 호흡부전을 포함한다. 일부 구현예에서, 두 번째 또는 후속 투여에서 증압제의 투여량이 증가한다.

[0172] 일부 구현예에서, 중증 CRS 또는 3등급 CRS는 알라닌 아미노전이효소 증가, 아스파르테이트 아미노전이효소 증가, 오한, 열성 호중구감소증, 두통, 좌심실 기능장애, 뇌병증, 수두증 및/또는 떨림을 포함한다. 일부 구현예에서, 중증 CRS는 사이클로포스파미드와 같은 추가 T 세포 고갈 요법으로 치료된다(Brudno et al., Blood, 2016;127(26):3321-30).

[0173] 다양한 결과를 측정하거나 감지하는 방법은 지정할 수 있다.

[0174] 일부 측면에서, 독성 결과는 신경 독성이거나 이와 관련이 있다. 일부 구현예에서, 신경독성의 임상적 위험과 관련된 증후는 착란, 섬망, 실어증, 표현형 실어증, 둔감, 근육간대경련, 혼수, 정신 상태 변화, 경련, 발작 유사 활동, 발작(선택적으로 뇌파검사(EEG)로 확인됨), 베타 아밀로이드(Aβ) 수치 상승, 글루타메이트 수치 상승 및 산소 라디칼 수치 상승을 포함한다. 일부 구현예에서, 신경 독성은 심각도에 따라 등급이 매겨진다(예를 들어, 1-5 등급 척도를 사용) (예를 들어 National Cancer Institute-Common Toxicity Criteria version 5.00 (NCI CTCAE version 5.0) 참조).

[0175] 어떤 경우에는 신경학적 증후가 sCRS의 초기 증후일 수 있다. 일부 구현예에서, 신경학적 증후는 세포 요법 주입 후 5 내지 7일에 시작되는 것으로 보인다. 일부 구현예에서, 신경학적 변화의 지속 기간은 3일에서 23일 사이이다. 일부 경우에, 신경학적 변화의 회복은 sCRS의 다른 증후가 해결된 후에 발생한다. 일부 구현예에서, 항-IL-6 및/또는 스테로이드(들)로의 치료로 신경학적 변화의 시간 또는 해결 정도가 빨라지지 않는다.

[0176] 일부 구현예에서, 중증 신경독성은 하기 표 4에 제시된 바와 같이 3등급 이상의 신경독성을 포함한다.

[0177] [표 4]

신경 독성에 대한 예시적인 등급 기준	
등급	증상 설명
1 무증상 또는 경증	일시적 또는 경미한 불편함; 활동에 제한 없음, 의료 개입/치료가 필요하지 않음
2 중간(Moderate)	식사 준비, 식료품이나 옷 쇼핑, 전화 사용, 금전 관리와 같은 일상 생활의 도구적 활동(ADL)을 제한하는 증상의 존재
3 중증(Severe)	목욕, 옷 입기 및 옷벗기, 스스로 식사하기, 화장실 이용, 약물 복용 등 자기 관리 ADL을 제한하는 증상의 존재
4 생명-위협(Life-threatening)	긴급한 개입이 필요한 생명을 위협하는 증상
5 치명적인(Fatal)	죽음(death)

[0178]

[0179] 일부 구현예에서, 독성 표적 요법과 같은 독성 치료를 위한 하나 이상의 중재 또는 작용제는, 예를 들어 전술한 구현예 중의 어느 것에 따라 측정된 바와 같이, 대상체가 지속된 발열을 나타내는 것으로 결정되거나 확인된 (예를 들어 처음으로 결정되거나 확인된) 시간 또는 직후에 투여된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 독성 표적 치료제는 그러한 확인 또는 결정의 특정 기간, 예를 들어 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 6시간 또는 8시간 이내에 투여된다.

[0180] 일부 구현예에서, 제공된 방법 및/또는 제공된 제조 물품 또는 조성물에 따른 치료되는 대상체에서 관찰된 결과 반응은 치료 대상의 대다수에서 독성 위험이 낮거나 중증 독성 위험이 낮다. 일부 구현예에서, 제공된 방법에 따라 및/또는 제공된 제조 물품 또는 조성물로 치료된 대상체의 약 30%, 35%, 40%, 50%, 55%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 이상은, 어떤 등급의 CRS 또는 어떤 등급의 신경독성(NT)도 나타내지 않는다. 일부 구현예에서, 제공된 방법 및/또는 제공된 제조 물품 또는 조성물에 따라 치료된 대상체의 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 이상은, 중증 CRS 또는 3등급 이상의 CRS를 나타내지 않는다. 일부 구현예에서, 제공된 방법에 따라 및/또는 제공된 제조 물품 또는 조성물로 치료된 대상체의 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 이상은, 중증 신경독성 또는 4등급 또는 5등급 신경독성과 같은 3등급 이상의 신경독성을 나타내지 않는다.

[0181] 일부 구현예에서, 제공된 방법에 따라 및/또는 제공된 제조 물품 또는 조성물로 치료된 대상체의 약 45%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95% 이상은, 초기 발병 CRS 또는 신경독성을 나타내지 않고/하거나 투여 개시 후 1일, 2일, 3일 또는 4일 이전에 CRS의 발병을 나타내지 않는다. 일부 구현예에서, 제공된 방법에 따라 및/또는 제공된 제조 물품 또는 조성물로 치료된 대상체의 약 45%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%,

90%, 또는 95% 이상은, 투여 개시 후 3일, 4일, 5일, 6일 또는 7일 이전에 신경독성의 발병을 나타내지 않는다. 일부 측면에서, 방법에 따라 및/또는 제공된 제조 물질 또는 조성물로 치료된 대상체 간의 신경독성 발병 중앙값은 방법에 따라 치료된 대상체에서 CRS의 중앙값 피크 또는 소실까지의 시간 중앙값 또는 그 이후이다. 일부 경우에, 방법에 따라 치료된 대상체 사이의 신경독성 발병 중앙값은 약 8, 9, 10, 또는 11일째 또는 그 이상이다.

[0182] II. 세포 요법 및 조작 세포

[0183] 일부 구현예에서, 제공된 조합 요법에 따라 사용하기 위한 세포 요법(예를 들어 T 세포 요법)은 질환 또는 병태, 예를 들어 고위험 특징들을 나타내는 질환 또는 병태를 포함한, r/r/ FL 등급(Grade) 1-3A 또는 r/r/MZL과 관련된 항원을 인식 및/또는 특이적으로 결합하도록 설계된 재조합 수용체(예를 들어 CAR)를 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서 상기 재조합 수용체(예를 들어 CAR)에 의해 결합 또는 인식되는 항원은 CD19이다. 수용체는 키메라 수용체, 예를 들어 키메라 항원 수용체(CAR), 및 다른 트랜스제닉 T 세포수용체(TCR)을 포함하는 다른 트랜스제닉 항원 수용체를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 재조합 수용체, 예를 들어 키메라 항원 수용체(CAR)를 함유하거나 또는 그를 함유하도록 조작된다. 상기 재조합 수용체, 예를 들어 CAR은 일반적으로, 일부 측면에서는 링커 및/또는 막관통 도메인(들)(transmembrane domain(s))을 통해서 하나 이상의 세포내 신호 전달 구성요소에 연결된 항원에 특이적인 세포외 항원(또는 리간드)를 포함한다. 일부 측면에서, 상기 조작된 세포는 예를 들어 입양 세포 요법을 위한, 대상체에게 투여하는데 적합한 약학 조성물 및 제형으로 제공된다. 또한 상기 세포 및 조성물을 대상체, 예를 들어 환자에게 투여하기 위한 치료방법이 제공된다.

[0184] 일부 구현예에서, 세포는 유전자 조작을 통해 도입된 하나 이상의 핵산을 포함하고, 이에 의해 그러한 핵산의 재조합 또는 유전자 조작된 생성물을 발현한다. 일부 구현예에서, 예를 들어 사이토카인 또는 활성화 마커의 발현에 의해 측정될 때, 증식, 생존 및/또는 활성화와 같은 반응을 유래하는 자극과 결합시킴으로써 세포를 먼저 자극함으로써 유전자 전달을 수행하고, 이어서 활성화된 세포의 형질 도입 및 배양물의 임상적 적용을 위한 충분한 수의 증폭을 포함한다.

[0185] A. 키메라 항원 수용체

[0186] 제공된 방법 및 용도의 일부 구현예에서, 조작된 세포, 예를 들어 T 세포는, 원하는 항원(예를 들어 종양 항원)에 대한 특이성을 제공하는 항원 또는 리간드 결합 도메인(예를 들어 항체 또는 항체 단편)을 세포내 신호전달 도메인과 결합하는 하나 이상의 도메인을 함유하는 키메라 수용체, 예를 들어 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현한다. 일부 구현예에서, 세포내 신호전달 도메인은 1차 활성화 신호를 제공하는 활성화 세포내 도메인 부분을 제공하는 T 세포 활성화 도메인이다. 일부 구현예에서, 세포내 신호전달 도메인은 효과기 기능을 촉진하기 위해 공자극 신호전달 도메인을 포함하거나 추가로 포함한다. 분자, 예를 들어 항원에 대한 특이적 결합 시, 수용체는 일반적으로 ITAM-형질도입된 신호와 같은 면역자극 신호를 세포 내로 전달함으로써 질환 또는 병태를 표적으로 하는 면역 반응을 촉진한다. 일부 구현예에서, 면역 세포에 유전적으로 조작된 키메라 수용체는 T 세포 활동을 조절할 수 있으며, 어떤 경우에는 T 세포 분화 또는 항상성을 조절할 수 있어, 입양 세포 치료 방법에서와 같이 생체 내에서 수명, 생존 및/또는 지속성이 개선된 유전자 조작된 세포를 생성할 수 있다.

[0187] CAR을 포함하는 예시적 항원 수용체 및 상기 수용체를 조작하고 세포 내로 도입하는 방법은 예를 들어 문헌[국제공개공보 W0200014257, W02013126726, W02012/129514, W02014031687, W02013/166321, W02013/071154, W02013/123061, 미국특허출원공개공보 US2002131960, US2013287748, US20130149337, 미국특허 6,451,995, 7,446,190, 8,252,592, 8,339,645, 8,398,282, 7,446,179, 6,410,319, 7,070,995, 7,265,209, 7,354,762, 7,446,191, 8,324,353, 및 8,479,118, 및 유럽 특허출원 EP2537416, 및/또는 those described by Sadelain 등, Cancer Discov. 2013 April; 3(4): 388-398; Davila 등 (2013) PLoS ONE 8(4): e61338; Turtle 등, Curr. Opin. Immunol., 2012 October; 24(5): 633-39; Wu 등, Cancer, 2012 March 18(2): 160-75]에 기재된 것들을 포함한다. 일부 측면에서, 항원 수용체는 문헌[미국특허 7,446,190]에 기재된 바와 같은 CAR 및 문헌[국제공개공보 W0/2014055668 A1]에 기재된 것을 포함한다. CAR의 예로는 전술한 간행물 중 어느 하나, 예를 들어 문헌[국제공개공보 W02014031687 A1, 미국특허 8,339,645, 7,446,179, 미국특허출원공개공보 2013/0149337, 미국특허 7,446,190, 8,389,282, Kochenderfer 등, (2013) Nature Reviews Clinical Oncology, 10, 267-276; (2013); Wang 등 (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701; 및 Brentjens 등, Sci Transl Med. 2013 5(177)]에 개시된 바와 같은 CAR이 포함된다. 또한 문헌[국제공개공보 W02014031687, 미국특허 8,339,645, 7,446,179, 2013/0149337, 7,446,190, 및 8,389,282]을 참조한다.

[0188] 일부 구현예에서, 조작된 세포, 예를 들어 T 세포는 특정 항원(또는 마커 또는 리간드), 예를 들어 특정 세포

유형의 표면 상에 발현된 항원에 대한 특이성을 갖는 재조합 수용체 예를 들어 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현한다. 일부 구현예에서, 수용체에 의해 표적화되는 항원은 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, 이는 탄수화물 또는 다른 분자이다. 일부 구현예에서, 항원은 정상 또는 비-표적화 세포 또는 조직과 비교하여 질환 또는 병태의 세포 상에서, 예를 들어 종양 또는 병원성 세포 상에서 선택적으로 발현되거나 과발현된다. 다른 구현예에서, 항원은 정상 세포 상에서 발현되고/거나 조작된 세포 상에서 발현된다.

[0189] 일부 구현예에서, 수용체에 의해 표적화된 항원은 다수의 공지된 B 세포 마커 중의 어느 것과 같은 B 세포 악성 종양과 관련된 항원을 포함한다. 일부 구현예에서, 수용체에 의해 표적화되는 항원은 CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig카파, Ig람다, CD79a, CD79b 또는 CD30이다.

[0190] 상기 키메라 수용체, 예를 들어 CAR은 일반적으로 항체 분자의 항원-결합 부분(들)인 세포외 항원 결합 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 항원-결합 도메인은 항체 분자의 일부, 일반적으로는 상기 항체의 가변 중쇄(V_H) 영역 및/또는 가변 경쇄(V_L) 영역, 예를 들어 scFv 항체 단편이다. 일부 구현예에서, 상기 항원-결합 도메인은 단일 도메인 항체(sdAb), 예를 들어 sdFv, 나노바디, V_{HH} 및 V_{NAR} 이다. 일부 구현예에서, 항원-결합 단편은 유연성 링커에 의해서 결합된 항체 가변 영역을 포함한다.

[0191] 일부 구현예에서, 상기 항체 또는 항원-결합 단편(예를 들어 scFv 또는 V_H 도메인)은 항원, 예를 들어 CD19를 특이적으로 인식한다. 일부 구현예에서, 상기 항체 또는 항원-결합 단편은 CD19를 특이적으로 인식하는 항체 또는 항원-결합 단편으로부터 유래되거나 그의 변이체이다. 일부 구현예에서, 상기 항원은 CD19이다. 일부 구현예에서, scFv는 CD19에 특이적인 항체 또는 항체 단편으로부터 유래된 V_H 및 V_L 을 함유한다. 일부 구현예에서, CD19에 결합하는 항체 또는 항체 단편은 FMC63 및 SJ25C1과 같은 마우스 유래 항체이다. 일부 구현예에서, 항체 또는 항체 단편은 예를 들어 미국공개특허공보 제US2016/0152723호에 서술된 바와 같은, 인간 항체이다.

[0192] 일부 구현예에서, 상기 항원-결합 도메인은, 일부 측면에서 scFv일 수 있는, FMC63으로부터 유래된 V_H 및/또는 V_L 을 포함한다. FMC63은 일반적으로 인간 기원의 CD19를 발현하는 Nalm-1 및 -16 세포에 대하여 만들어진 마우스 모노클로날 IgG1 항체를 지칭한다[문헌 「Ling, N. R., et al. (1987). *Leucocyte typing III*. 302」 참조]. 일부 구현예에서, 상기 FMC63 항체는 각각, 서열번호 38 및 39에 제시된 CDR-H1 및 CDR-H2 및 서열번호 40 또는 54에 제시된 CDR-H3 및 서열번호 35에 제시된 CDR-L1 및 서열번호 36 또는 55에 제시된 CDR-L2 및 서열번호 37 또는 56에 제시된 CDR-L3을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 FMC63 항체는 서열번호 41의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H) 및 서열번호 42의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함한다.

[0193] 일부 구현예에서, 상기 scFv는 서열번호 35의 CDR-L1 서열, 서열번호 36의 CDR-L2 서열, 및 서열번호 37의 CDR-L3 서열을 포함하는 가변 경쇄 및/또는 서열번호 38의 CDR-H1 서열, 서열번호 39의 CDR-H2 서열 및 서열번호 40의 CDR-H3 서열을 포함하는 가변 중쇄, 또는 그와 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 상기 임의의 것의 변이체를 포함한다. 일부 구현예에서, scFv는 서열번호 41에 기재된 FMC63의 가변 중쇄 영역 및 서열번호 42에 기재된 FMC63의 가변 경쇄 영역, 또는 그와 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 상기 임의의 것의 변이체를 포함한다. 일부 구현예에서, 가변 중쇄 및 가변 경쇄는 링커에 의해 연결된다. 일부 구현예에서, 링커는 서열번호 59에 제시된다. 일부 구현예에서, scFv는, 순서대로, V_H , 링커, 및 V_L 을 포함한다. 일부 구현예에서, scFv는, 순서대로, V_L , 링커, 및 V_H 을 포함한다. 일부 구현예에서, scFc는 서열번호 57에 제시된 뉴클레오티드 서열 또는 서열번호 57와 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 서열에 의해 암호화된다. 일부 구현예에서, scFv는 서열번호 43에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 43과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 서열을 포함한다.

[0194] 일부 구현예에서, 상기 항원-결합 도메인은, 일부 측면에서 scFv일 수 있는, SJ25C1로부터 유래된 V_H 및/또는 V_L 을 포함한다. SJ25C1은 인간 기원의 CD19를 발현하는 Nalm-1 및 -16 세포에 대하여 만들어진 마우스 모노클로날 IgG1 항체이다[문헌 「Ling, N. R., et al. (1987). *Leucocyte typing III*. 302」 참조]. 일부 구현예에서, 상기 SJ25C1 항체는 서열번호 47-49로 각각 제시되는 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3, 서열번호 44-46으로 각각 제시되는 CDR-L1, L2 및 L3를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 SJ25C1 항체는 서열번호 50의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H) 및 서열번호 51의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함한다. 일부 구

현예에서, 상기 svFv는 서열번호 44의 CDR-L1 서열, 서열번호 45의 CDR-L2 서열, 및 서열번호 46의 CDR-L3 서열을 포함하는 가변 경쇄 및/또는 서열번호 47의 CDR-H1 서열, 서열번호 48의 CDR-H2 서열 및 서열번호 49의 CDR-H3 서열을 포함하는 가변 중쇄, 또는 그와 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 상기 임의의 것의 변이체를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 scFv는 서열번호 50에 기재된 SJ25C1의 가변 중쇄 영역 및 서열번호 51에 기재된 SJ25C1의 가변 경쇄 영역, 또는 그와 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 상기 임의의 것의 변이체를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 가변 중쇄 및 가변 경쇄는 링커에 의해 연결된다. 일부 구현예에서, 상기 링커는 서열번호 52에 제시된다. 일부 구현예에서, 상기 scFv는, 순서대로, V_H , 링커, 및 V_L 를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 scFv는, 순서대로, V_L , 링커, 및 V_H 를 포함한다. 일부 구현예에서, scFv는 서열번호 53에 기재된 아미노산 서열 또는 서열번호 53과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 서열을 포함한다.

[0195] 본원에서 용어 "항체(antibody)"는 가장 넓은 의미로 사용되며, 온전한 항체 및 기능성(항원-결합) 항체 단편을 포함하는 다클론 및 모노클로날 항체를 포함하며, 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 단편 항원 결합(Fab) 단편, F(ab')₂ 단편, Fab' 단편, Fv 단편, 제조합 IgG(rIgG) 단편, 가변 중쇄(VH) 영역, 단일 사슬 가변 단편(scFv)을 포함한 단일 사슬 항체 단편 및 단일 도메인 항체(예를 들어 sdAb, sdFv, 나노바디(nanobody), V_{HH} 또는 V_{NAR}) 단편을 포함한다. 상기 용어는 유전자 조작된 및/또는 달리 변형된 형태의 면역글로불린, 예를 들어 인트라바디(intrabodies), 펩티바디(peptibodies), 키메라 항체, 완전한 인간 항체, 인간화된 항체 및 이중 접합 항체, 다중 특이적(예를 들어 이중 특이적) 항체, 디아바디(diabodies), 트리아바디(triabodies) 및 테트라바디(tetrabodies), 탠덤 디-scFv, 탠덤 트리-scFv를 포괄한다. 달리 언급되지 않는 한, 용어 "항체"는 본원에서 이의 기능성 항체 단편을 포괄하는 것으로 이해되어야 한다. 상기 용어는 또한 IgG 및 이의 하위 클래스, IgM, IgE, IgA 및 IgD를 포함하는 임의의 클래스 또는 하위 클래스의 항체를 포함하는 온전한 또는 전장 항체를 포괄한다. 일부 측면에서, CAR은 이중특이적 CAR, 예를 들어 상이한 특이성을 갖는 2개의 항원 결합 도메인을 함유한다.

[0196] 일부 구현예에서, 항원-결합 단백질, 항체 및 그의 항원 결합 단편은 전장 항체의 항원을 특이적으로 인식한다. 일부 구현예에서, 항체의 중쇄 및 경쇄는 전장일 수 있거나 항원-결합 부분(Fab, F(ab')₂, Fv 또는 단일쇄 Fv 단편(scFv))일 수 있다. 다른 구현예에 있어서, 항체 중쇄 불변 영역은 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD 및 IgE로부터 선택되고, 특히 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4로부터 선택되며, 더욱 특히 IgG1(예를 들어 인간 IgG1)이다. 또 다른 구현예에 있어서, 항체 경쇄 불변 영역은 예를 들어 카파 또는 람다로부터 선택되고, 특히 카파이다.

[0197] "초가변 영역(hypervariable region)" 또는 "HVR"과 동의어인 용어 "상보성 결정 영역(complementarity determining region)" 및 "CDR"은 항원 특이성 및/또는 결합 친화도를 부여하는 항체 가변 영역 내의 비인접한 아미노산 서열을 지칭하는 것으로 일부 경우에 공지되어 있다. 일반적으로, 각각의 중쇄 가변 영역에 3개의 CDR(CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) 및 각각의 경쇄 가변 영역에 3개의 CDR(CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3)이 존재한다. "프레임워크 영역(framework region)" 및 "FR"은 중쇄 및 경쇄의 가변 영역의 CDR이 아닌 부분을 지칭하는 것으로 일부 경우에 공지되어 있다. 일반적으로, 각각의 전장 중쇄 가변 영역에 4 개의 FR(FR-H1, FR-H2, FR-H3 및 FR-H4) 및 각각의 전장 경쇄 가변 영역에 4 개의 FR(FR-L1, FR-L2, FR-L3 및 FR-L4)이 존재한다.

[0198] 주어진 CDR 또는 FR의 정확한 아미노산 서열 경계는 하기 다수의 잘 알려진 임의의 체계를 이용하여 쉽게 결정될 수 있다: Kabat 외 (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD ("Kabat" 넘버링 체계); Al-Lazikani 외, (1997) JMB 273,927-948 ("Chothia" 넘버링 체계); MacCallum 외, J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996), "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography," J. Mol. Biol. 262, 732-745. ("Contact" 넘버링 체계); Lefranc MP 외, "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains," Dev Comp Immunol., 2003 Jan; 27(1): 55-77 ("IMGT" 넘버링 체계); Honegger A 및 Pluckthun A, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: automatic modeling and analysis tool," J Mol Biol, 2001 Jun 8;309(3): 657-70, ("Aho" 넘버링 체계); 및 Martin 등의 "Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm," PNAS, 1989, 86(23):9268-9272, ("AbM" 넘버링 체계).

[0199] 주어진 CDR 또는 FR의 경계는 확인을 위해 사용되는 체계에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어 상기 Kabat 체계는 구조적 정렬을 기반으로 하는 반면, 상기 Chothia 체계는 구조적 정보를 기반으로 한다. Kabat 및 Chothia 체계 모두에 대한 넘버링은 삽입 문자, 예를 들어 "30a"로 설명되는 삽입 및 일부 항체에서 나타나는 결실을 갖는, 가장 일반적인 항체 영역 서열 길이를 기반으로 한다. 상기 2 개의 체계는 특정 삽입 및 결실("indel")을 상이한 위치에 배치하여, 차별적인 넘버링을 생성한다. 상기 Contact 체계는 복합체 결정 구조 분석을 기반으로 하고 Chothia 넘버링 체계와 여러 측면에서 유사하다. AbM 체계는 Oxford Molecular의 AbM 항체 모델링 소프트웨어에서 사용하는 것을 기반으로 Kabat와 Chothia 정의 간의 절충안이다.

[0200] 하기 표 5는 Kabat, Chothia, AbM 및 Contact 체계 각각에 의해 확인된 바와 같은 CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 및 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3의 예시적인 위치 경계를 열거한다. CDR-H1에서, Kabat 및 Chothia 넘버링 체계 모두를 이용하여 잔기 번호가 나열된다. FR들은 CDR들 사이에 배치되는데, 예를 들어 FR-L1은 CDR-L1 앞에 배치되고, FR-L2는 CDR-L1과 CDR-L2 사이에 배치되며, FR-L3은 CDR-L2와 CDR-L3 사이에 배치되는 식이다. 도시된 Kabat 넘버링 체계는 삽입을 H35A 및 H35B에 배치하기 때문에, Chothia CDR-H1 루프의 말단이 도시된 Kabat 넘버링 관례를 이용할 경우 루프의 길이에 따라 H32와 H34 사이에서 변하는 점이 주목된다

[0201] [표 5]

다양한 넘버링 방식에 따른 CDR의 경계				
CDR	Kabat	Chothia	AbM	Contact
CDR-L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
CDR-L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
CDR-L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
CDR-H1 (Kabat 넘버링 ¹)	H31--H35B	H26--H32...34	H26--H35B	H30--H35B
CDR-H1 (Chothia 넘버링 ²)	H31--H35	H26--H32	H26--H35	H30--H35
CDR-H2	H50--H55	H52--H56	H50--H58	H47--H58
CDR-H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

[0202]

[0203] 1 - Kabat 외 (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD

[0204] 2 - Al-Lazikani 외, (1997) JMB 273, 927-948.

[0205] 따라서, 달리 특정되지 않는 한, 주어진 항체 또는 이의 영역, 예를 들어 이의 가변 영역의 "CDR" 또는 "상보적 결정 영역" 또는 개별적인 특정 CDR(예를 들어 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3)은 상기 임의의 체계, 또는 다른 공지된 체계로 정의된 바와 같이 (또는 특정) 상보적 결정 영역을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어 특정 CDR(예를 들어 CDR-H3)이 주어진 V_H 또는 V_L 영역 아미노산 서열에 있는 대응 CDR의 아미노산 서열을 함유한다고 할 경우, 상기 CDR은 상기 임의의 체계, 또는 다른 공지된 체계로 정의된 바와 같이, 가변 영역 내의 대응 CDR(예를 들어 CDR-H3) 서열을 갖는 것으로 이해된다. 일부 구현예에서, 특정 CDR 서열이 특정된다. 제공된 항체의 예시적인 CDR 서열은 다양한 넘버링 방식을 사용하여 기재되지만, 제공된 항체는 임의의 다른 전술한 넘버링 방식 또는 당업자에게 공지된 다른 넘버링 방식에 따라 기재된 바와 같은 CDR을 포함할 수 있는 것으로 이해되어 한다.

[0206] 유사하게, 달리 특정되지 않는 한, 주어진 항체 또는 이의 영역, 예를 들어 이의 가변 영역의 FR 또는 개별적인 특정 FR(들)(예를 들어 FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4)은 공지된 임의의 체계에 의해 정의된 바와 같이 (또는 특정) 프레임워크 영역을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 일부 경우에, Kabat, Chothia, AbM 또는 Contact 방법에 의해 정의된 바와 같이 CDR 예를 들어 특정 CDR, FR 또는 FR들 또는 CDR들의 확인을 위한 체계, 또는 다른 공지된 체계가 특정된다. 다른 경우에, CDR 또는 FR의 특정 아미노산 서열이 제공된다.

[0207] 용어 "가변 영역(variable region)" 또는 "가변 도메인(variable domain)"은 항체가 항원에 결합하는데 관여하는 항체의 중쇄 또는 경쇄 도메인을 지칭한다. 천연 항체의 중쇄 및 경쇄(각각 V_H 및 V_L)의 가변 영역은 일반적으로 각각의 도메인이 4 개의 보존된 프레임워크 영역(FR) 및 3 개의 CDR을 포함하는 유사한 구조를 갖는다(예를 들어 참조: Kindt 외 Kuby Immunology, 6th ed. W.H. Freeman and Co., 91 페이지 (2007)). 단일 V_H 또는 V_L 도메인이 항원-결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다. 또한, 상보적 V_L 또는 V_H 도메인의 각각의 라이브러리를 스크리닝하기 위해 항원에 결합하는 항체로부터 V_H 또는 V_L 도메인을 이용하여 특정 항원에 결합하는 항체

가 분리될 수 있다. 예를 들어 참조[Portolano 외, J. Immunol., 150: 880-887 (1993); Clarkson 외, Nature 352: 624-628 (1991)].

[0208] 상기 제공된 항체 중에는 항체 단편이 있다. "항체 단편(antibody fragment)"은 온전한 항체가 결합하는 항원에 결합하는 온전한 항체의 일부를 포함하는 온전한 항체 이외의 분자를 지칭한다. 항체 단편의 예는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; 디아바디; 선형 항체; 중쇄 가변(V_H) 영역, scFv와 같은 단일 사슬 항체 분자 및 단일 도메인 V_H 항체; 및 항체 단편들로 형성된 다중 특이적 항체를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 특정 구현예에서, 항체는 scFv와 같은 가변 중쇄 영역 및/또는 가변 경쇄 영역을 포함하는 단일 사슬 항체 단편이다.

[0209] 용어 "가변 영역(variable region)" 또는 "가변 도메인(variable domain)"은 항체가 항원에 결합하는데 관여하는 항체의 중쇄 또는 경쇄 도메인을 지칭한다. 천연 항체의 중쇄 및 경쇄(각각 V_H 및 V_L)의 가변 도메인은 일반적으로 각각의 도메인이 4 개의 보존된 프레임워크 영역(FR) 및 3 개의 CDR을 포함하는 유사한 구조를 갖는다(예를 들어 참조: Kindt 외 Kuby Immunology, 6th ed. W.H. Freeman and Co., 91 페이지 (2007)). 단일 V_H 또는 V_L 도메인이 항원-결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다. 또한, 상보적 V_L 또는 V_H 도메인의 각각의 라이브리리를 스크리닝하기 위해 항원에 결합하는 항체로부터 V_H 또는 V_L 도메인을 이용하여 특정 항원에 결합하는 항체가 분리될 수 있다. 예를 들어 참조[Portolano 외, J. Immunol., 150: 880-887 (1993); Clarkson 외, Nature 352: 624-628 (1991)].

[0210] 단일-도메인 항체(sdAb)는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부 또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함하는 항체 단편이다. 특정 구현예에서, 단일-도메인 항체는 인간 단일-도메인 항체이다. 일부 구현예에서, CAR은 항원, 예를 들어, 암 마커 또는 종양 세포 또는 암 세포와 같은 표적화될 세포 또는 질환, 예를 들어, 본원에 기술되거나 공지된 임의의 표적 항원에 특이적으로 결합하는 항체 중쇄 도메인을 포함한다. 예시적인 단일-도메인 항체는 sdFv, 나노바디, V_HH 또는 V_{NAR}를 포함한다.

[0211] 항체 단편은 비제한적으로 온전한 항체의 단백질 가수 분해 소화뿐만 아니라 재조합 숙주 세포에 의한 생산을 포함하여 다양한 기술로 제조될 수 있다. 일부 구현예에서, 항체는 재조합 생산 단편, 예를 들어 자연적으로 발생하지 않는 배열, 예를 들어 합성 링커, 예를 들어 펩티드 링커에 의해 연결된 사슬 또는 2 개 이상의 항체 영역을 갖는 것을 포함하는 단편이고/거나 자연적으로 발생하는 온전한 항체의 효소 분해에 의해 생산되지 않을 수 있다. 일부 구현예에서, 항체 단편은 scFv이다.

[0212] "인간화(humanized)" 항체는 전부 또는 실질적으로 모든 CDR 아미노산 잔기가 비인간 CDR로부터 유래하고 전부 또는 실질적으로 모든 FR 아미노산 잔기가 인간 FR로부터 유래한 항체이다. 인간화 항체는 선택적으로 인간 항체로부터 유래한 항체 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 비인간 항체의 "인간화 형태(humanized form)"는 인간화를 경험하여 전형적으로 인간에 대한 면역원성이 감소한 반면, 모체 비인간 항체의 특이성 및 친화도를 유지하는 비인간 항체의 변이체를 지칭한다. 일부 구현예에서, 인간화 항체에 있는 일부 FR 잔기는 비인간 항체로부터 대응하는 잔기(예를 들어 CDR 잔기가 유래된 항체)로 치환되어, 예를 들어 항체 특이성 또는 친화도를 개선하거나 회복시킨다.

[0213] 일부 측면에서, 상기 재조합 수용체, 예를 들어 키메라 항원 수용체는 하나 이상의 리간드-(예를 들어 항원-) 결합 도메인, 예를 들어 그의 항체 또는 단편, 및 하나 이상의 세포내 신호 전달 영역 또는 도메인(세포질 신호 도메인 또는 영역으로도 불리워짐)을 포함한다. 일부 측면에서, 상기 재조합 수용체, 예를 들어 CAR은 스페이서 및/또는 막관통 도메인 또는 부분을 더 포함한다. 일부 측면에서, 상기 스페이서 및/또는 막관통 도메인은 상기 리간드-(예를 들어 항원-) 결합 도메인 및 상기 세포내 신호 전달 영역(들) 또는 도메인(들)을 포함한다.

[0214] 일부 구현예에서, 상기 재조합 수용체 예를 들어 상기 CAR은 스페이서를 더 포함하고, 이것은 힌지 영역, 예를 들어 IgG4 힌지 영역, 및/또는 CH1/CL 및/또는 Fc 영역과 같은 면역 글로불린 불변 영역(immunoglobulin constant region) 또는 이의 변이체 또는 변형된 버전의 적어도 일부일 수 있거나 이를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 재조합 수용체는 스페이서 및/또는 힌지 영역을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 불변 영역 또는 부분은 인간 IgG, 예를 들어 IgG4 또는 IgG1의 영역이다. 일부 측면에서, 불변 영역의 일부는 항원-인식 성분, 예를 들어 scFv 및 막관통 도메인 사이의 스페이서 영역으로 작용한다. 상기 스페이서는 상기 스페이서가 없을 때와 비교하여 항원 결합 후 상기 세포의 반응성을 증가시키는 길이를 가질 수 있다. 일부 예에서 상기 스페이서는 길이가 약 12개 아미노산들(amino acids)이거나 길이가 12개 이하인 아미노산들이다. 예시적인 스페이서들은 약 10 내지 229개 이상의 아미노산들, 약 10 내지 200개의 아미노산들, 약 10 내지 175개의 아미

노산들, 약 10 내지 150개의 아미노산들, 약 10내지 125개의 아미노산들, 약 10 내지 100개의 아미노산들, 약 10 내지 75개의 아미노산들, 약 10 내지 50개의 아미노산들, 약 10 내지 40개의 아미노산들, 약 10 내지 30개의 아미노산들, 약 10 내지 20개의 아미노산들 또는 약 10 내지 15개의 아미노산들을 가지는 스페이서들을 포함하고, 임의의 상기 나열된 범위들의 상기 종점들 사이에 있는 임의의 정수를 포함한다. 일부 구현예에서, 스페이서 영역은 약 12개 이하의 아미노산들, 약 119개 이하의 아미노산들 또는 약 229개 이하의 아미노산들을 가진다. 예시적인 스페이서들은 IgG4 힌지 단독, CH2 및 CH3 도메인들에 연결되는 IgG4 힌지 또는 CH3 도메인에 연결되는 IgG4 힌지를 포함한다. 예시적인 스페이서들은 문헌 「Hudecek *et al.* (2013) *Clin. Cancer Res.*, 19:3153, Hudecek *et al.* (2015) *Cancer Immunol Res.* 3(2): 125-135」 또는 국제공개공보 제W02014/031687호에 기재된 것들을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0215] 일부 구현예에서, 상기 스페이서는 단지 IgG의 힌지 영역, 예를 들어 단지 IgG4 또는 IgG1의 힌지 영역, 서열번호 1에 제시되고 서열번호 2에 제시된 서열에 의해서 암호화된 스페이서의 힌지만을 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 스페이서는 Ig 힌지, 예를 들어 C_H2 및 C_H3 도메인에 연결되고, 예를 들어 서열번호 3에 제시된 IgG4 힌지이다. 일부 구현예에서, 상기 스페이서는 Ig 힌지, 예를 들어 단지 C_H3 도메인에 연결되고, 예를 들어 서열번호 4에 제시된 IgG4 힌지이다. 일부 구현예에서, 상기 스페이서는 글리신-세린 농축 서열 또는 다른 유연성 링커(flexible linker) 예를 들어 공지의 유연성 링커이거나 또는 그를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 일정한 영역 또는 부분은 IgD의 것이다. 일부 구현예에서, 상기 스페이서는 서열번호 1, 3, 4 및 5 중의 어느 것과 적어도 (약) 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산의 서열을 갖는다.

[0216] 일부 측면에서, 상기 스페이서는, (a) 면역글로불린 힌지(immunoglobulin hinge)의 전부 또는 일부 또는 그의 변형된 버전을 포함하거나 또는 그것들로 구성되거나 또는 약 15개 또는 그 미만의 아미노산을 포함하고 CD28 세포의 영역 또는 CD8 세포의 영역을 포함하지 않으며, (b) 면역글로불린 힌지의 전부 또는 일부, 선택적으로 IgG4 힌지, 또는 그의 변형된 버전을 포함하거나 또는 그것들로 구성되고/되거나 약 15개 또는 그 미만의 아미노산을 포함하고 CD28 세포의 영역 또는 CD8 세포의 영역을 포함하지 않거나, 또는 (c) 길이가 (약) 12개의 아미노산이고/이거나 면역글로불린 힌지의 전부 또는 일부, 선택적으로 IgG4, 또는 그의 변형된 버전을 포함하거나 또는 그것들로 구성되거나; 또는 (d) 서열번호 1, 3-5, 27-34 또는 58에 제시된 아미노산의 서열, 또는 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 전술한 것들의 임의의 변이체로 구성되거나 또는 그들을 포함하거나, 또는 (e) 일반식 X₁PPX₂P(서열번호 58)[여기서, X₁은 글리신, 시스테인 또는 아르기닌이고 X₂는 시스테인 또는 트레오닌(threonine)임]로 구성되거나 또는 그들을 포함하는 폴리펩티드 스페이서이다.

[0217] 일부 구현예에서, 항원 수용체는 세포의 도메인에 직접 또는 간접적으로 연결된 세포내 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 세포의 도메인과 세포내 신호 전달 도메인을 연결하는 막관통 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포내 신호전달 도메인은 ITAM을 포함한다. 예를 들어 일부 측면에서 항원 인식 도메인(예를 들어 세포의 도메인)은 일반적으로 CAR의 경우에 TCR 복합체와 같은 항원 수용체 복합체를 통한 활성화 및/또는 다른 세포 표면 수용체를 통한 신호를 모방하는 신호 전달 성분과 같은 하나 이상의 세포내 신호 전달 성분에 연결된다. 일부 구현예에서, 키메라 수용체는 세포의 도메인(예를 들어 scFv)과 세포내 신호전달 도메인 사이에 연결되거나 융합된 막관통 도메인을 포함한다. 따라서, 일부 구현예에서, 항원 결합 성분(예를 들어 항체)은 하나 이상의 막관통 도메인 및 세포내 신호 전달 도메인에 연결된다.

[0218] 일 구현예에서, 수용체, 예를 들어 CAR에 있는 도메인 중 하나와 자연적으로 회합하는 막관통 도메인이 사용된다. 일부 경우에, 막관통 도메인은 동일하거나 상이한 표면 막 단백질의 막관통 도메인에 대한 상기 도메인의 결합을 피하도록 아미노산 치환에 의해 변형되거나 선택되어 수용체 복합체의 다른 멤버와의 상호 작용이 최소화된다.

[0219] 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 천연 또는 합성 소스로부터 유래된다. 소스가 천연인 경우, 일부 측면에서, 도메인은 임의의 막-결합 또는 막관통 단백질로부터 유래된다. 막 관통 영역은 T 세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 사슬, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154로부터 유래된 것을 포함한다(즉 적어도 이들의 막관통 영역(들)을 포함한다). 대안적으로 일부 구현예에서 막관통 도메인은 합성이다. 일부 측면에서, 합성 막관통 도메인은 주로 류신 및 발린과 같은 소수성 잔기를 포함한다. 일부 측면에서, 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의 트리플렛(triplet)이 합성 막관통 도메인의 각 말단에서 발견될 것이다. 일부 구현예에서, 연결은 링커, 스페이서 및/또는 막관통 도메인

(들)에 의한 것이다. 일부 측면에서, 막관통 도메인은 CD28의 막관통 부분 또는 그의 변이체를 함유한다. 세포 외 도메인 및 막관통 부분은 직접 또는 간접적으로 연결될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 외 도메인 및 막관통 부분은 본원에 기재된 임의의 것과 같은 스페이스에 의해 연결된다.

[0220] 일부 구현예에서, 상기 수용체, 예를 들어 상기 CAR의 막관통 도메인은 인간 CD28 또는 그의 변이체의 막관통 도메인, 예를 들어 인간 CD28(수탁번호: P10747.1)의 27-아미노산 막관통 도메인이거나, 또는 서열번호 8에 제시된 아미노산의 서열 또는 서열번호 8과 적어도 (약) 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산의 서열을 포함하는 막관통 도메인이다. 일부 구현예에서, 상기 재조합 수용체의 상기 막관통-도메인 함유 부분은 서열번호 9에 제시된 아미노산의 서열 또는 그와 적어도 (약) 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산의 서열을 포함한다.

[0221] 일부 구현예에서, 상기 재조합 수용체, 예를 들어 CAR은 하나 이상의 세포내 신호 전달 구성요소(들), 예를 들어 세포내 신호 전달 영역 또는 도메인을 포함한다. T 세포 활성화는 일부 측면에서는 2가지 부류의 세포질 신호 전달 서열, 즉 TCR(1차 세포질 신호 전달 서열)을 통해 항원 의존적 1차 활성화를 시작하는 것 및 2차 또는 공동 자극 신호를 제공하기 위해 항원 독립적 방식으로 작용하는 것(2차 세포질 신호 전달 서열)에 의해서 매개되는 것으로 기술된다. 일부 측면에서, 상기 CAR은 상기 신호 전달 구성요소들 중의 하나 또는 둘 다를 포함한다. 세포내 신호 전달 영역 중에는 천연 항원 수용체를 통한 신호, 공자극 수용체와 조합된 상기 수용체를 통한 신호 및/또는 공자극 수용체 단독을 통한 신호를 모방하거나 근사하는 것들이 있다. 일부 구현예에서, 짧은 올리고-또는 폴리펩티드 링커, 예를 들어 길이가 2 내지 10 개 사이의 아미노산인 링커, 예를 들어 글리신 및 세린을 함유하는 것, 예를 들어 글리신-세린 이중체를 함유하는 링커가 존재하며, 막관통 도메인과 CAR의 세포질 신호 전달 도메인과의 연결을 형성한다.

[0222] 일부 구현예에서, CAR의 연결(ligation)에 따라, CAR의 세포질 도메인 또는 세포내 신호 전달 영역은 면역 세포, 예를 들어 CAR를 발현하도록 조작된 T 세포의 정상적인 효과기 기능 또는 반응 중 적어도 하나를 활성화시킨다. 예를 들어 일부 관점에서는, CAR은 T 세포의 기능, 예를 들어 세포 용해 활성 또는 T-헬퍼 활성, 예를 들어 사이토카인 또는 다른 인자의 분비를 유래한다. 일부 구현예에 있어서, 항원 수용체 성분 또는 공자극 분자의 세포내 신호 전달 영역의 절단된 부분 또는 영역은 온전한 면역자극 세포를 대신하여 사용되는데, 예를 들어 그것이 효과기 기능 신호를 전달하는 경우에 그러하다. 일부 구현예에 있어서, 세포내 신호 전달 영역, 세포내 도메인 또는 도메인들을 함유하는 영역은 T 세포 수용체(TCR)의 세포질 서열을 포함하고, 일부 측면에서는 천연의 상황에서 항원 수용체 결합 다음에 그러한 수용체와 협력하여 작용하고 신호 전달을 개시하는 공-수용체의 서열을 포함하며, 및/또는 이러한 분자의 임의의 유래체 또는 변이체 및/또는 동일한 기능적 능력을 갖는 임의의 합성 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 예를 들어 세포내 도메인(들)을 포함하는 상기 세포내 신호 전달 영역은 공자극 신호를 제공하는 데 관여하는 영역 또는 도메인의 세포질 서열을 포함한다.

[0223] 일부 측면에서, CAR은 TCR 복합체의 1차 활성화를 조절하는 1차 세포질 신호 전달 서열을 포함한다. 자극 방식으로 작용하는 1차 세포질 신호 전달 서열은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로 공지된 신호 전달 모티프를 함유할 수 있다. 1차 세포질 신호 전달 서열을 함유하는 ITAM의 예에는 CD3 제타 사슬, FcR 감마, CD3 감마, CD3 델타 및 CD3 엡실론으로부터 유래된 것이 포함된다. 일부 구현예에서, CAR의 세포질 신호 전달 분자(들)은 CD3 제타로부터 유래된 세포질 신호 전달 도메인, 이의 부분, 또는 서열을 함유한다.

[0224] 일부 구현예에서, 수용체는 T-세포 활성화 및 세포 독성을 매개하는 TCR CD3 사슬, 예를 들어 CD3 제타 사슬과 같은 TCR 복합체의 세포내 성분을 포함한다. 따라서, 일부 측면에서, 항원 결합 부분은 하나 이상의 세포 신호 전달 모듈에 연결된다. 일부 구현예에서, 세포 신호 전달 모듈은 CD3 막관통 도메인, CD3 세포내 신호 전달 도메인 및/또는 기타 CD 막관통 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 수용체, 예를 들어 CAR은 또한 Fc 수용체 γ , CD8CD8알파, CD8베타, CD4, CD25 또는 CD16과 같은 하나 이상의 추가 분자의 일부를 포함한다. 예를 들어 일부 측면에서, CAR 또는 다른 키메라 수용체는 CD3-제타(CD3- ζ) 또는 Fc 수용체 γ 및 CD8CD8알파, CD8베타, CD4, CD25 또는 CD16 사이에 키메라 분자를 포함한다.

[0225] 일부 구현예에서, 세포내(또는 세포질) 신호 전달 영역 및/또는 도메인은 인간 CD3 사슬, 선택적으로 CD3 제타 자극성 신호 전달 도메인 또는 그의 기능적 변이체, 예를 들어 인간 CD3 ζ (수탁번호: P20963.2)의 이소폼 3의 112 AA 세포질 도메인 또는 CD3 제타 신호 전달 도메인을 포함하며 이는 미국특허 제7,446,190호 또는 미국특허 제8,911,993호에 설명되어 있다. 일부 구현예에서, 세포내 신호 전달 영역은 서열번호 13, 14, 또는 15에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 13, 14, 또는 15에 대해 적어도 (약) 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%,

92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다.

- [0226] 천연 TCR의 맥락에서, 완전한 활성화는 일반적으로 TCR을 통한 신호 전달뿐만 아니라 공자극 신호가 필요하다. 따라서, 일부 구현예에서, 완전한 활성화를 촉진하기 위해, 2차 또는 공자극 신호를 생성하기 위한 성분이 CAR에 또한 포함된다. 다른 구현예에서, CAR은 공자극 신호를 생성하기 위한 성분을 포함하지 않는다. 일부 측면에서, 추가의 CAR이 동일한 세포에서 발현되고 2차 또는 공자극 신호를 생성하기 위한 성분을 제공한다.
- [0227] 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 T 세포 공자극 분자의 세포내 도메인을 함유한다. 일부 구현예에서, CAR은 CD28, 4-1BB, OX40 (CD134), CD27, DAP10, DAP12, ICOS와 같은 공자극 수용체 및/또는 다른 공자극 수용체의 신호 전달 도메인 및/또는 막관통 부분을 포함한다. 일부 측면에서, 상기 CAR은 CD28 또는 4-1BB, 예를 들어 인간 CD28 또는 인간 4-1BB의 공자극 영역 또는 도메인을 포함한다.
- [0228] 일부 구현예에서, 세포내 신호 전달 영역 또는 도메인은 인간 CD28의 세포내 공자극 신호 전달 도메인 또는 그의 기능적 변이체 또는 부분, 예를 들어 그의 41 아미노산 도메인 및/또는 천연 CD28 단백질의 186-187 위치에서 LL이 GG로 치환된 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포내 신호 전달 영역은 서열번호 10 또는 11에 제시된 아미노산 서열, 또는 서열번호 10 또는 11에 대해 적어도 (약) 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포내 영역은 4-1BB의 세포내 공자극 신호 전달 도메인 또는 그의 기능적 변이체 또는 부분, 예를 들어 인간 4-1BB(수탁번호 Q07011.1)의 42-아미노산 세포질 도메인, 또는 그의 기능적 변이체 또는 부분, 예를 들어 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열, 또는 서열번호 12에 대해 적어도 (약) 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0229] 일부 측면에서, 동일한 CAR은 1차(또는 활성화) 세포질 신호전달 영역 및 공자극 신호전달 성분 둘 다를 포함한다.
- [0230] 일부 구현예에서, 활성화 도메인은 하나의 CAR 내에 포함되는 반면, 공자극 성분은 다른 항원을 인식하는 다른 CAR에 의해 제공된다. 일부 구현예에서, CAR은 활성화 또는 자극성 CAR, 공자극 CAR을 포함하며, 둘 다 동일한 세포 상에서 발현된다(WO2014/055668 참조한다.). 일부 측면에서, 세포는 하나 이상의 자극성 또는 활성화 CAR 및/또는 공자극 CAR을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 억제성 CAR(iCAR, Fedorov 등 Sci. Transl. Medicine, 5(215) (December, 2013) 참조한다.), 예를 들어 질환 또는 병태에 특이적이고/거나 이와 관련된 것 외의 항원을 인식하고, 이로써 질환 표적화 CAR을 통해 전달된 활성화 신호가 예를 들어 표적의 효과를 감소시키도록 이의 리간드에 대한 억제성 CAR의 결합에 의해 감소 또는 억제되는, CAR을 추가로 포함한다.
- [0231] 일부 구현예에서, 두 수용체는 각각 세포에 활성화 및 억제성 신호를 유래하고, 그래서 상기 수용체 중 하나에 의한 그의 항원에 대한 결합(ligation)은 상기 세포를 활성화시키거나 반응을 유래하지만, 상기 제2 억제성 수용체의 그의 항원에 대한 결합은 그 반응을 억제하거나 완충하는 신호를 유래한다. 예시로는 활성화 CAR 및 억제 CAR(iCAR)의 조합이 있다. 그러한 전략을 사용하여 예를 들어 그와 관련된 표적 외 효과를 감소시키며, 여기서 활성화 CAR은 질환 또는 병태에서 발현되지만 정상 세포 상에서도 발현되는 항원에 결합하고, 억제성 수용체가 정상 세포에서 발현되지만 질환이나 질환 상태의 세포에서는 발현되지 않는 별개의 항원에 결합한다.
- [0232] 일부 측면에서, 키메라 수용체는 억제 CAR (예를 들어 iCAR)이거나 또는 이를 포함하고 세포에서의 ITAM- 및/또는 공자극 촉진 반응과 같은 면역 반응을 약화시키거나 억제하는 세포내 성분을 포함한다. 이러한 세포내 신호 전달 성분의 예로는 PD-1, CTLA4, LAG3, BTLA, OX2R, TIM-3, TIGIT, LAIR-1, PGE2 수용체, A2AR을 비롯한 EP2/4 아데노신 수용체를 포함하여, 면역 관문 분자에서 발견되는 것들을 들 수 있다. 일부 측면에서, 조작된 세포는 이러한 억제 분자의 신호 전달 도메인을 포함하거나 그로부터 유래된 억제 CAR을 포함하여, 예를 들어 활성화 및/또는 공자극 CAR에 의해 유래된 세포의 반응을 약화시키는 역할을 한다.
- [0233] 일부 경우에, CAR은 제 1, 제 2 및/또는 제 3 세대 CAR로 지칭된다. 일부 측면에서, 제 1 세대 CAR은 항원 결합 시 CD3-사슬 유래 시그널을 단독으로 제공하는 것이고; 일부 측면에서, 제 2-세대 CAR은 그러한 시그널 및 공자극 시그널을 제공하는 것으로서, 예를 들어 CD28 또는 CD137과 같은 하나의 공자극 수용체로부터의 세포내 신호 전달 도메인을 포함하는 것이고; 일부 측면에서, 제 3 세대 CAR은 상이한 공자극 수용체들의 복수의 공자극 도메인을 포함하는 것이다.
- [0234] 일부 구현예에서, CAR은 세포질 부분에서 하나 이상의, 예를 들어 2개 이상의 공자극 도메인 및 활성화 도메인, 예를 들어 1차 활성화 도메인을 포함한다. 예시적인 CAR에는 CD3-제타, CD28 및 4-1BB의 세포내 성분이 포함된

다.

- [0235] 일부 구현예에서, 항원 수용체는 마커 및/또는 CAR을 발현하는 세포를 추가로 포함하거나 다른 항원 수용체는 수용체를 발현하기 위한 세포의 형질도입 또는 조작을 확인하는 데 사용될 수 있는 대리 마커, 예를 들어 세포 표면 마커를 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 마커는 CD34, NGFR, 또는 이러한 세포 표면 수용체(예를 들어 tEGFR)의 절단된 버전과 같은 표피 성장 인자 수용체의 전부 또는 일부(예를 들어 절단된 형태)를 포함한다. 일부 구현예에서, 마커를 암호화하는 핵산은 절단 가능한 링커 서열(예를 들어 T2A)과 같은 링커 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결된다. 예를 들어 마커 및 임의적으로 링커 서열은 문헌[특히 출원 번호 WO2014031687]에 개시된 바와 같은 어느 하나일 수 있다. 예를 들어 마커는 선택적으로 링커 서열, 예를 들어 T2A 절단 가능한 링커 서열에 연결된 절단형 EGFR(tEGFR)일 수 있다.
- [0236] 절단된 EGFR(예를 들어 tEGFR)에 대한 예시적인 폴리펩티드는 서열번호 7 또는 16에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 7 또는 16에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다. 예시적인 T2A 링커 서열은 서열번호 6 또는 17에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 6 또는 17에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0237] 일부 구현예에서, 마커는 T 세포에서 자연적으로 발견되지 않거나 또는 T 세포 표면에서 자연적으로 발견되지 않는 분자(예를 들어 세포 표면 단백질) 또는 이의 부분이다. 일부 구현예에서, 분자는 비자기 분자, 예를 들어 비자기 단백질, 즉 세포가 입양으로 전달될 숙주의 면역 시스템에 의해 "자기(self)"로 인식되지 않는 분자이다.
- [0238] 일부 구현예에서, 마커는 치료 기능을 제공하지 않고/거나 유전자 조작, 예를 들어 성공적으로 조작된 세포를 선택하기 위한 마커로서 사용되는 것 외에 다른 효과를 생성하지 않는다. 기타 구현예에서, 마커는 치료적 분자 또는 달리 일부 원하는 효과를 나타내는 분자, 예를 들어 생체 내에서 세포가 조우하게 될 리간드, 예를 들어 입양 전달 및 리간드와의 조우 시 세포의 반응을 강화하고/거나 약화시키는 공자극 또는 면역 관문 분자일 수 있다.
- [0239] 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 본원에서 기술된 항체 또는 단편을 함유하는 세포의 부분을 포함한다. 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 본원에서 기술된 항체 또는 단편을 함유하는 세포의 부분 및 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 항체 또는 단편은 scFv 또는 단일-도메인 VH 항체를 포함하고 세포내 도메인은 ITAM을 함유한다. 일부 측면에서, 상기 세포내 신호 전달 도메인은 CD3-제타(CD3ζ) 쌍의 제타 쌍의 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에 있어서, 키메라 항원 수용체는 세포 도메인과 세포내 신호 전달 영역 사이에 배치된 막관통 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 세포내 신호 전달 영역은 CD3 제타 세포내 도메인에 연결된 CD28 및 CD137(4-1BB, TNFRSF9) 공동-자극 도메인을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 CD28은 인간 CD28이다. 일부 구현예에서, 상기 4-1BB는 인간 4-1BB이다. 일부 구현예에서, 상기 키메라 항원 수용체는 상기 세포의 도메인과 상기 세포내 신호 전달 도메인 사이에 위치한 막관통 도메인을 포함한다. 일부 측면에서, 상기 막관통 도메인은 CD28의 막관통 부분을 함유한다. 상기 세포의 도메인 및 막관통은 직접 또는 간접적으로 연결될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 세포의 도메인 및 막관통은 스페이서, 예를 들어 본 명세서에 기재된 바와 같이 스페이서에 의해 연결된다.
- [0240] 일부 구현예에서, 상기 CAR은 항체, 예를 들어 항체 단편, CD28의 막관통 부분 또는 이의 기능적 변이체이거나 이를 함유하는 막 횡단 도메인, 및 CD28의 신호 전달 부분 또는 이의 기능적 변이체를 함유하는 세포 내 신호 전달 도메인, 및 CD3 제타의 신호 전달 부분 또는 이의 기능적 변이체를 함유한다. 예를 들어 일부 구현예에서, 상기 CAR은 예를 들어 전술한 것 중의 어느 것인 CD19에 특이적인 scFv, 스페이서, 예를 들어 면역글로불린 분자의 일부, 예를 들어 힌지 영역 및/또는 중쇄 분자의 하나 이상의 불변 영역, 예를 들어 Ig-힌지 함유 스페이서, CD28-유래된 막관통 도메인, CD28-유래된 세포내 신호 전달 도메인 및 CD3 제타 신호 전달 도메인의 전부 또는 일부를 함유하는 막관통 도메인을 포함한다.
- [0241] 일부 구현예에서, 상기 CAR은 항체, 예를 들어 항체 단편, CD28의 막관통 부분 또는 이의 기능적 변이체이거나 이를 함유하는 막관통 도메인, 및 CD28의 신호 전달 부분 또는 이의 기능적 변이체를 함유하는 세포 내 신호 전달 도메인, 및 CD3 제타의 신호 전달 부분 또는 이의 기능적 변이체를 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 수용체는 Ig 분자의 일부, 예를 들어 인간 Ig 분자, 예를 들어 Ig 힌지, 예를 들어 IgG4 힌지, 예를 들어 힌지-전용 스페이서를 함유하는 스페이서를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 CAR은 항체 또는 단편, 예를 들어 전술한 것 중의 어느 것인 CD19에 특이적인 scFv, 상기 Ig-힌지 함유 스페이스 중의 임의의 것과 같은 스페이서, CD-

28-유도된 막관통 도메인, 4-1BB-유도된 세포내 신호 전달 도메인, 및 CD3 제타-유도된 신호 전달 도메인을 포함한다.

[0242] 제공된 방법 중의 어느 것의 특정 구현예에서, CAR은 N-말단에서 C-말단까지 순서대로 서열번호 43에 제시된 scFv인 세포외 항원 결합 도메인, 서열번호 1에 제시된 스페이서, 서열번호 8에 제시된 막관통 도메인, 서열번호 12에 제시된 4-1BB 공자극 신호전달 도메인, 및 서열번호 13에 제시된 CD3-제타(CD3ζ) 사슬의 신호전달 도메인을 포함한다.

[0243] B. 핵산, 벡터 및 유전자 조작방법

[0244] 일부 구현예에서, 세포, 예를 들어 T 세포는 재조합 수용체를 발현하도록 유전자 조작된다. 일부 구현예에서, 상기 조작은 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 도입함으로써 수행된다. 또한 재조합 수용체를 암호화하는 뉴클레오티드, 및 상기 핵산 및/또는 뉴클레오티드를 함유하는 벡터 또는 구조체(construct)가 제공된다.

[0245] 일부 경우에서, 재조합 수용체를 암호화하는 핵산 서열은 신호 펩티드를 암호화하는 신호 서열을 함유한다. 일부 측면에서, 신호 서열은 천연 폴리펩티드로부터 유도된 신호 펩티드를 암호화할 수 있다. 다른 측면에서, 신호 서열은 서열번호 24에 제시된 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되고 서열번호 25에 제시된 GMCSFR 알파 사슬의 예시적인 신호 펩티드와 같은 이중성 또는 비-고유 신호 펩티드를 암호화할 수 있다. 일부 경우에, 재조합 수용체, 예를 들어 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 핵산 서열은 신호 펩티드를 암호화하는 신호 서열을 함유한다. 신호 펩티드의 비제한적인 예로는, 예를 들어 서열번호 25에 제시되고 서열번호 24에 기재된 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 GMCSFR 알파 사슬 신호 펩티드, 또는 서열번호 26에 제시된 CD8 알파 신호 펩티드를 들 수 있다.

[0246] 일부 구현예에서, 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 재조합 수용체의 발현을 조절하기 위해 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 프로모터를 함유한다. 일부 예에서, 폴리뉴클레오티드는 재조합 수용체의 발현을 조절하기 위해 작동 가능하게 연결된 2 개, 3 개 또는 그 이상의 프로모터를 함유한다.

[0247] 핵산 분자가 2 개 이상의 상이한 폴리펩티드 사슬, 예를 들어 재조합 수용체 및 마커를 암호화하는 특정 경우에, 폴리펩티드 사슬의 각각은 별도의 핵산 분자에 의해 암호화될 수 있다. 예를 들어 2 개의 분리된 핵산이 제공되고, 각각은 세포내에서 발현을 위해 세포내로 개별적으로 전달되거나 도입될 수 있다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체를 암호화하는 핵산 및 마커를 암호화하는 핵산은 동일한 프로모터에 작동 가능하게 연결되고, 내부 리보솜 진입 부위(internal ribosome entry site; IRES) 또는 자가 절단 펩티드 또는 선택적으로 T2A, P2A, E2A 또는 F2A인 리보솜 스킵핑을 일으키는 펩티드를 암호화하는 핵산에 의해 선택적으로 분리된다. 일부 구현예에서, 마커를 암호화하는 핵산 및 재조합 수용체를 암호화하는 핵산은 두 개의 상이한 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 마커를 암호화하는 핵산 및 재조합 수용체를 암호화하는 핵산은 세포의 게놈 내의 상이한 위치에 존재하거나 삽입된다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 레트로바이러스 형질도입, 형질감염(transfection) 또는 형질전환에 의해 배양된 세포를 함유하는 조성물로 도입된다.

[0248] 폴리뉴클레오티드가 제 1 및 제 2 핵산 서열을 함유하는 일부 구현예에서, 상이한 폴리펩티드 사슬 각각을 암호화하는 암호화 서열들(coding sequences)은 동일하거나 상이한 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 2 이상의 상이한 폴리펩티드 사슬의 발현을 유도하는 프로모터를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 핵산 분자는 멀티시스템론(바이시스템론 또는 트리시스템론, 예를 들어 미국특허 제 6,060,273호 참조)일 수 있다. 일부 구현예에서, 전사 단위는 단일 프로모터로부터의 메시지에 의해 유전자 산물(예를 들어 마커를 암호화하고 재조합 수용체를 암호화하는 것)의 동시 발현을 허용하는, IRES(내부 리보솜 진입 부위)를 함유하는 바이시스템론 유닛으로서 조작될 수 있다. 별법으로, 일부 경우에서, 단일 프로모터는 자가-절단 펩티드(예를 들어 2A 서열들) 또는 프로테아제 인식 부위(예를 들어 퓨린)를 암호화하는 서열에 의해 서로 분리된 2 또는 3개의 유전자들(예를 들어 마커 암호화 및 재조합 수용체 암호화)을 하나의 오픈 리딩 프레임(ORF)에 함유하는, RNA의 발현을 지시할 수 있다. ORF는 따라서 번역 도중(2A의 경우) 또는 번역 후에 개별적인 단백질로 가공되는, 단일 폴리펩티드를 암호화한다. 일부 경우에서, T2A와 같은 펩티드는, 리보솜으로 하여금 2A 요소의 C-말단에서 펩티드 결합 합성을 생략하도록(리보솜 스킵핑) 할 수 있는데 이에 의해, 2A 서열의 말단과 다음 펩티드의 하류 사이가 분리된다[예를 들어 문헌 「de Felipe, Genetic Vaccines and Ther. 2:13 (2004)」 및 「de Felipe et al. Traffic 5:616-626 (2004)」 참조]. 다양한 2A 요소가 알려져 있다. 본원에 개시된 방법 및 시스템에 사용가능한 2A 서열의 비제한적인 예로는, 구제역 바이러스(F2A, 예를 들어 서열번호

21), 말의 A형 비염 바이러스(E2A, 예를 들어 서열번호 20), 토세아 아시그나 바이러스(Thosea asigna virus)(T2A, 예를 들어 서열번호 6 또는 17), 및 돼지의 테스코바이러스-1(P2A, 예를 들어 서열번호 18 또는 19)을 들 수 있으며 이에 관해서는 미국특허출원공개공보 제US2007/0116690호에 기재되어 있다.

[0249] 본원에 기재된 임의의 재조합 수용체는 임의의 조합 또는 배열로 재조합 수용체를 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열을 함유하는 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화될 수 있다. 예를 들어 1개, 2개, 3개 또는 그 이상의 폴리뉴클레오타이드는 1개, 2개, 3개 또는 그 이상의 상이한 폴리펩티드, 예를 들어 재조합 수용체를 암호화할 수 있다. 일부 구현예에서, 하나의 벡터 또는 구조물은 마커를 암호화하는 핵산 서열을 함유하고, 별도의 벡터 또는 구조물은 재조합 수용체, 예를 들어 CAR을 암호화하는 핵산 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, 마커를 암호화하는 핵산 및 재조합 수용체를 암호화하는 핵산은 두 개의 상이한 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체를 암호화하는 핵산은 마커를 암호화하는 핵산의 하류에 존재한다.

[0250] 일부 구현예에서, 벡터 골격은 하나 이상의 마커(들)를 암호화하는 핵산 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 마커(들)는 형질도입 마커, 대리 마커 및/또는 선별 마커이다.

[0251] 일부 구현예에서, 마커는 형질도입 마커 또는 대리 마커이다. 형질도입 마커 또는 대리 마커는 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 도입된 세포를 검출하는데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 형질도입 마커는 세포의 변형을 나타낼 수 있거나 또는 세포의 변형을 확인할 수 있다. 일부 구현예에서, 대리 마커는 세포 표면에서 재조합 수용체, 예를 들어 CAR과 세포 표면에서 동시 발현되도록 만들어진 단백질이다. 특정 구현예에서 그러한 대리 마커는 거의 또는 전혀 활성을 갖지 않도록 변형된 표면 단백질이다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체를 암호화하는 핵산 서열은 마커를 암호화하는 핵산에 작동가능하게 연결되고, T2A, P2A, E2A 또는 F2A와 같은 2A 서열과 같은 리보솜 스킵을 야기하는 펩티드 또는 자가-절단 펩티드를 암호화하는 핵산 또는 내부 리보솜 진입 부위(IRES)에 의해 선택적으로 분리된다. 외래 마커 유전자는 어떤 경우에는 조작된 세포와 관련하여 세포의 검출 또는 선별을 가능하게 하고 경우에 따라 세포 자살을 촉진시킬 수 있다.

[0252] 예시적인 대리 마커는 절단된 형태의 세포 표면 폴리펩티드 예를 들어 비-작용성이고 신호 또는 전장 형태의 세포 표면 폴리펩티드에 의해서 통상적으로 형질도입된 신호를 형질도입하지 않거나 형질도입할 수 없고/없거나 내재화할 수 없는 절단된 형태를 포함할 수 있다. 예시적인 절단된 세포 표면 폴리펩티드는 절단된 형태의 성장 인자 또는 다른 수용체, 예를 들어 절단된 인간 표피 성장 인자 수용체 2(예시적인 절단된 세포 표면 폴리펩티드(tHER2), 절단된 인간 표피 성장 인자 수용체(tEGFR, 서열번호 7 또는 16에 제시된 예시적인 tEGFR 서열) 또는 전립선 특이적 막 항원(PSMA) 또는 그의 변형된 형태를 포함한다. tEGFR는 항체 세톡시맵(Erbix®) 또는 기타 치료용 항-EGFR 항체 또는 결합 분자에 의해 인식되는 에피토프를 포함할 수 있으며, 이는 tEGFR 구조물에 의해 조작된 세포를 확인 또는 선별하고/하거나 상기 암호화된 외인성 단백질을 발현하는 세포들을 제거 또는 분리하는데 이용될 수 있다[미국특허 제8,802,374호 및 문헌 「Liu et al., Nature Biotech. 2016 April; 34(4): 430-434」 참조]. 일부 측면에서, 예를 들어 대리 마커와 같은 마커는, CD34, NGFR, CD19 또는 절단된 CD19, 예를 들어 절단된 비-인간 CD19, 또는 표피 성장 인자 수용체(예를 들어 tEGFR)의 전부 또는 일부(예를 들어 절단된 형태)를 포함한다.

[0253] 일부 구현예에서, 마커는 형광 단백질, 예를 들어 녹색 형광 단백질(GFP), 강화된 녹색 형광 단백질(EGFP), 예를 들어 슈퍼-폴드 GFP (sfGFP), 적색 형광 단백질(RFP), 예를 들어 tdTomato, mCherry, mStrawberry, AsRed2, DsRed 또는 DsRed2, 시안 형광 단백질(CFP), 청록색 형광 단백질(BFP), 강화 청색 형광 단백질(EBFP), 및 황색 형광 단백질(YFP), 및 형광 단백질의 중 변이체, 단량체 변이체 및 코돈-최적화 및/또는 강화된 변이체를 포함하는 그의 변이체이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 마커는 루시페라아제, *E. coli*로부터 lacZ 유전자, 알칼리성 포스파타아제, 분비된 배아 알칼리성 포스파타아제(SEAP), 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라아제(CAT)와 같은, 효소이거나 이를 포함한다. 예시적인 발광 리포터 유전자는 루시페라아제(luc), β-갈락토시다아제, 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라아제(CAT), β-글루쿠로니다아제(GUS) 또는 그의 변이체를 포함한다.

[0254] 일부 구현예에서, 마커는 선택 마커이다. 일부 구현예에서, 선택 마커는 외인성 제제 또는 약물에 내성을 부여하는 폴리펩티드이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 선택 마커는 항생제 내성 유전자이다. 일부 구현예에서, 선택 마커는 항생제 내성 유전자이고, 포유동물 세포에 항생제 내성을 부여한다. 일부 구현예에서, 선택 마커는 퓨로마이신 내성 유전자, 하이그로마이신 내성 유전자, 블라스티시딘 내성 유전자, 네오마이신 내성 유전자, 제네티신 내성 유전자 또는 제오신 내성 유전자 또는 그의 변형된 형태이거나 이를 포함한다.

[0255] 일부 구현예에서, 상기 분자는 비-자기 분자, 예를 들어 비-자기 단백질, 즉 세포가 입양으로 전달하게 될 숙주

의 면역 시스템에 의해서 "자기"로 인식되지 않는 분자이다.

- [0256] 일부 구현예에서, 마커는 치료 기능을 제공하지 않고/않거나 유전자 조작용, 예를 들어 성공적으로 조작된 세포를 선택하기 위한 마커로서 사용되는 것 이외의 다른 효과를 생성하지 않는다. 다른 구현예에서, 마커는 세포의 반응을 향상시키고/시키거나 약화시키기 위한 공자극 또는 면역 체크 포인트 분자와 같이 생체 내에서 만날 세포에 대한 리간드와 같은 원하는 효과를 발휘하는 치료 분자 또는 분자일 수 있다.
- [0257] 일부 구현예에서, 마커를 암호화하는 핵산은 절단 가능한 링커 서열, 예를 들어 T2A와 같은 링커 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결된다. 예를 들어 마커, 및 선택적으로 링커 서열은 국제공개공보 제W02014031687호에 개시된 임의의 것일 수 있다. 예를 들어 마커는 T2A 절단가능한 링커 서열과 같은 링커 서열에 선택적으로 연결된 절단된 EGFR(tEGFR)일 수 있다. 절단된 EGFR(예를 들어 tEGFR)에 대한 예시적인 폴리펩티드는 서열번호 7 또는 16에 제시된 아미노산 서열 또는 서열번호 7 또는 16에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0258] 일부 구현예에서, 마커는 녹색 형광 단백질(GFP), 증강된 녹색 형광 단백질(EGFP), 예를 들어 수퍼-폴드 GFP(sfGFP), 적색 형광 단백질(RFP)과 같은 형광 단백질, 예를 들어 tdTomato, mCherry, mStrawberry, AsRed2, DsRed 또는 DsRed2, 시안 형광 단백질(CFP), 청색 녹색 형광 단백질(BFP), 증강된 청색 형광 단백질(EBFP), 및 황색 형광 단백질(YFP)과 같은 형광 단백질 및 상기 형광 단백질의 중 변이체, 단량체 변이체, 및 코돈-최적화되고/되거나 증강된 변이체를 비롯한, 변이체들이거나 또는 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 마커는 루시퍼라제, 대장균 유래의 lacZ 유전자, 알칼라인 포스파타제, 분비된 배아 알칼리성 포스파타제(SEAP), 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제(CAT)이거나 이를 포함한다. 예시적인 발광 리포터 유전자에는 루시퍼라제(luc), β -갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제(CAT), β -글루쿠로니다제(GUS) 또는 그의 변이체가 포함된다.
- [0259] 일부 구현예에서, 마커는 선별 마커이다. 일부 구현예에서, 선별 마커는 외인성 제제 또는 약물에 내성을 부여하는 폴리펩티드이거나 또는 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 선별 마커는 항생제 내성 유전자이다. 일부 구현예에서, 선별 마커는 항생제 내성 유전자로서 포유동물 세포에 대해 항생제 내성을 부여한다. 일부 구현예에서, 선별 마커는 푸로마이신 내성 유전자, 하이그로 마이신 내성 유전자, 블라스티시딘 (Blasticidin) 내성 유전자, 네오마이신 내성 유전자, 제네티신 내성 유전자 또는 제오신 내성 유전자 또는 이의 변형된 형태이거나 또는 이를 포함한다.
- [0260] 일부 구현예에서, 재조합 핵산은, 예를 들어 유인원 바이러스 40(SV40), 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(AAV)로부터 유래한 벡터와 같은 재조합 감염성 바이러스 입자를 사용하여, 세포내로 전달된다. 일부 구현예에서, 재조합 핵산은 재조합 렌티바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터, 예를 들어 감마-레트로바이러스 벡터를 사용하여, T 세포내로 전달된다[예를 들어 문헌 「Koste et al. (2014) Gene Therapy 2014 Apr 3. doi: 10.1038/gt.2014.25」; 「Carlens et al. (2000) Exp Hematol 28(10): 1137-46」; 「Alonso-Camino et al. (2013) Mol Ther Nucl Acids 2, e93」; 「Park et al., Trends Biotechnol. 2011 November 29(11): 550-557」 참조].
- [0261] 일부 구현예에서, 상기 바이러스 벡터는 아데노-관련 바이러스(AAV)이다.
- [0262] 일부 구현예에서, 레트로바이러스 벡터는 긴 말단 반복부 서열(LTR), 예를 들어 모로니 뮤린 백혈병 바이러스(MoMLV), 골수 증식성 육종 바이러스(MPSV), 뮤린 배아 줄기세포 바이러스(MESV), 뮤린 줄기세포 바이러스(MSCV) 또는 비장 병소 형성 바이러스(SFFV)로부터 유래한 레트로바이러스 벡터를 가질 수 있다. 대부분의 레트로바이러스 벡터는 뮤린 레트로바이러스로부터 유래한다. 일부 구현예에서, 레트로바이러스는 임의의 조류 또는 포유류 세포 소스으로부터 유래한 것을 포함한다. 레트로바이러스는 통상적으로 양쪽성이며, 이는 이들이 인간을 포함하는 여러 종의 숙주 세포를 감염시킬 수 있음을 의미한다. 하나의 구현예에서, 발현될 유전자는 레트로바이러스 gag, pol 및/또는 env 서열을 대체한다. 다수의 예시적 레트로바이러스 시스템이 기재된 바 있다[예를 들어 미국특허 제5,219,740호; 제6,207,453호; 제5,219,740호; 문헌 「Miller and Rosman (1989) BioTechniques 7:980-990; Miller, A. D. (1990) Human Gene Therapy 1:5-14」; 「Scarpa et al. (1991) Virology 180:849-852」; 「Burns et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-8037」; 및 「Boris-Lawrie and Temin (1993) Cur. Opin. Genet. Develop. 3:102-109」 참조].
- [0263] 렌티바이러스 형질도입 방법은 공지되어 있다. 예시적 방법은, 예를 들어 문헌 「Wang et al. (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701」; 「Cooper et al. (2003) Blood. 101:1637-1644」; 「Verhoeven et al. (2009)

Methods Mol Biol. 506: 97-114」 및 「Cavalieri et al. (2003) Blood. 102(2): 497-505」에 기재되어 있다.

[0264] 일부 구현예에서, 재조합 핵산은 전기천공을 통해 T 세포내로 전달된다[예를 들어 문헌 「Chicaybam et al., (2013) *PLoS ONE* 8(3): e60298」 및 「Van Tedeloo et al., (2000) *Gene Therapy* 7(16): 1431-1437」 참조]. 일부 구현예에서, 재조합 핵산은 트랜스포지션(transposition)을 통해 T 세포내로 전달된다[예를 들어 문헌 「Manuri et al. (2010) *Hum Gene Ther* 21(4): 427-437」; 「Sharma et al. (2013) *Molec Ther Nucl Acids* 2, e74」; 및 「Huang et al., (2009) *Methods Mol Biol* 506: 115-126」 참조]. 면역 세포에서 유전 물질을 도입 하여, 발현시키는 다른 방법으로는 인산칼륨 형질감염[예를 들어 문헌 「Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y.」에 기재된 바와 같음], 원형질체 융합, 양이온성 리포솜 매개 형질감염; 텅스텐 입자 촉진 미립자 충격[문헌 「Johnston, *Nature*, 346: 776-777(1990)」]; 및 스트론튬 인산 염 DNA 공-침전[문헌 「Brash et al., *Mol Cell Biol*, 7: 2031-2034(1987)」 참조]을 포함한다.

[0265] 재조합 산물을 암호화하는 핵산의 전달을 위한 다른 접근법 및 벡터에는, 예를 들어 국제공개공보 제 WO2014/055668호 및 미국특허 제7,446,190호에 기재된 것들이 있다.

[0266] 일부 구현예에서, 세포, 예를 들어 T 세포는 증식 도중 또는 증식 후에 예를 들어 T 세포 수용체(TCR) 또는 키 메라 항원 수용체(CAR)로 형질감염될 수 있다. 원하는 수용체 유전자의 도입을 위한 이러한 형질감염은 예를 들어 임의의 적합한 레트로바이러스 벡터로 수행될 수 있다. 그 후, 유전적으로 변형된 세포 집단은 초기 자극(예를 들어 항-CD3/항-CD28 자극)으로부터 유리될 수 있고, 이어서, 예를 들어 새로 도입된 수용체를 통하여 제 2 유형의 자극으로 자극될 수 있다. 이 제 2 유형의 자극은 펩티드/MHC 분자 형태의 항원 자극, 유전적으로 도입 된 수용체의 동족(가교성) 리간드(예를 들어 CAR의 천연 리간드) 또는(예를 들어 수용체 내 불변 영역을 인식함으로써) 새로운 수용체의 구조 내에 직접 결합하는 기타 리간드(항체 등)를 포함할 수 있다. 예를 들어 문헌 「Cheadle et al, "Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy" *Methods Mol Biol*. 2012; 907:645-66」 또는 「Barrett et al., *Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine* Vol. 65: 333-347 (2014).」를 참조한다.

[0267] 일부 경우에, 세포, 예를 들어 T 세포가 활성화되는 것을 요하지 않는 벡터가 사용될 수 있다. 이러한 일부 경우에서, 세포는 활성화 전에 선별 및/또는 형질도입될 수 있다. 따라서, 세포는, 세포의 배양 전에 또는 후에, 그리고 경우에 따라서는 상기 배양과 동시에 적어도 일부의 상기 배양도중에 조작될 수 있다.

[0268] 부가적인 핵산들 중에서도, 예를 들어 도입을 위한 유전자로는 예를 들어 전달된 세포의 생존능 및/또는 기능을 촉진함으로써 치료 효능을 향상시키는 것들; 예를 들어 생체내 생존 또는 국소화를 위해, 세포의 선별 및/또는 평가를 위한 유전자 마커를 제공하기 위한 유전자; 문헌 「Lupton S. D. et al., *Mol. and Cell Biol.*, 11:6 (1991)」에 설명된 바와 같이 생체내 음성 선별에 민감한 세포; 및 T2A, P2A, E2A를 만들어냄으로써, 안정성을 향상시키는 유전자를 들 수 있다. 예를 들어 우세한(dominant) 양성 선별가능한 마커와 음성 선별가능한 마커를 융합시켜 유도된 이중기능성 선별가능한 융합 유전자의 사용에 대해 설명한 문헌 「Lupton S. D. et al., *Mol. and Cell Biol.*, 11:6 (1991)」에 설명된 바와 같이 생체내 음성 선별에 민감한 세포; 및 T2A, P2A, E2A를 만들어냄으로써, 안정성을 향상시키는 유전자를 들 수 있다. 또한 예를 들어 Lupton 등의 국제출원 제 PCT/US91/08442호 및 제PCT/US94/05601호를 참조한다. 또한 Riddell 등의 미국특허 제6,040,177호의 칼럼 14-17를 참조한다.

[0269] 유전자 조작을 위한 세포 및 세포의 준비

[0270] 일부 구현예에서, 핵산은 이중성이며, 즉 예를 들어 조작되는 세포 및/또는 그러한 세포가 유도된 유기체에서 통상적으로 발견되지 않는 것 같은 다른 생물 또는 세포로부터 얻은 것과 같은 세포 또는 세포로부터 수득된 샘플에 통상적으로 존재하지 않는다. 일부 구현예에서, 핵산은 여러 상이한 세포 유형으로부터의 다양한 도메인을 암호화하는 핵산의 키메라 조합물을 포함하여 자연계에서 발견되지 않는 핵산과 같이 자연 발생적 핵산은 아니다.

[0271] 상기 세포는 일반적으로 포유동물 세포와 같은 진핵 세포이고, 일반적으로 인간 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 혈액, 골수, 림프 또는 림프 기관으로부터 유래되고, 면역계의 세포, 예를 들어 선천성 또는 후천성 면역의 세포, 예를 들어 림프구, 전형적으로 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함하는 골수성 또는 림프성 세포이다. 다른 예시적인 세포는 유래 만능 줄기 세포(iPSC)를 포함하는 다능 및 만능 줄기 세포와 같은 줄기 세포를 포함한다. 상기 세포는 전형적으로 대상체로부터 직접 분리되고/거나 대상체로부터 분리되고 동결된 것과 같은 1 차 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 T 세포 또는 기타 세포 유형, 예를 들어 전체 T 세포 집단, CD4+

세포, CD8+ 세포 및 이의 하위집단, 예를 들어 기능, 활성화 상태, 성숙도, 분화, 증폭, 재순환, 국소화에 대한 가능성 및/또는 지속 투여량, 항원-특이성, 항원 수용체의 유형, 특정 기관 또는 구획에의 존재, 마커 또는 사이토카인 분비 프로파일 및/또는 분화 정도로 정의된 것의 하나 이상의 서브세트를 포함한다. 처리될 대상체와 관련하여, 상기 세포는 동종 이계 및/또는 자가 조직일 수 있다. 방법들 중에는 기성품 방법이 포함된다. 일부 측면에서, 예를 들어 기성품 기술에 대해, 상기 세포는 다능성 및/또는 다분화능, 예를 들어 줄기 세포, 예를 들어 유래 다능성 줄기 세포(iPSCs)이다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 동결보존 전 또는 후에 대상체로부터 세포를 분리하고, 세포를 제조, 처리, 배양 및/또는 조작하고 동일한 대상체에 재도입하는 것을 포함한다.

[0272] T 세포 및/또는 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포의 하위-유형 및 하위 집단 중에는 나이브 T(T_N) 세포, 이펙터 T 세포(T_{EFF}), 기억 T 세포 및 이의 하위-유형, 예를 들어 줄기 세포 기억 T(T_{SCM}), 중앙 기억 T(T_{CM}), 이펙터 기억 T(T_{EM}) 또는 말단 분화된 이펙터 기억 T 세포, 종양-침윤 림프구(TIL), 미성숙 T 세포, 성숙 T 세포, 보조 T 세포, 세포 독성 T 세포, 점막-관련 불변 T(MAIT) 세포, 자연 발생 및 적응 조절T(Treg) 세포, 보조 T 세포, 예를 들어 TH1 세포, TH2 세포, TH3 세포, TH17 세포, TH9 세포, TH22 세포, 여포성 보조 T 세포, 알파/베타 T 세포 및 델타/감마 T 세포가 존재한다.

[0273] 일부 구현예에서, 세포는 천연 킬러(NK) 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 단핵구 또는 과립성 백혈구, 예를 들어 골수성 세포, 대식 세포, 호중구, 수지상 세포, 비만 세포, 호산구 및/또는 호염구이다.

[0274] 일부 구현예에서, 세포는 유전자 조작을 통해 도입된 하나 이상의 핵산을 포함하고, 이에 의해 그러한 핵산의 재조합 또는 유전자 조작된 생성물을 발현한다. 일부 구현예에서, 핵산은 이중성이며, 즉 예를 들어 조작되는 세포 및/또는 그러한 세포가 유도된 유기체에서 통상적으로 발견되지 않는 세포는 다른 유기체 또는 세포로부터 얻어진 것과 같이 세포 또는 세포로부터 수득된 샘플에 통상적으로 존재하지 않는다. 일부 구현예에서, 핵산은 여러 상이한 세포 유형으로부터 다양한 도메인을 암호화하는 핵산의 키메라 조합물을 포함하여 자연계에서 발견되지 않는 핵산과 같이 자연 발생적 핵산은 아니다.

[0275] 일부 구현예에서, 조작된 세포의 제조는 하나 이상의 배양 및/또는 제조단계를 포함한다. CAR과 같은 형질전환 수용체를 암호화하는 핵산 도입용 세포는 생물학적 샘플, 예를 들어 대상으로부터 수득되거나 이로부터 유도된 샘플과 같은 샘플로부터 분리 될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포가 단리된 대상체는 질환 또는 증후를 가지거나 세포 치료가 필요하거나 세포 치료가 투여될 대상이다. 일부 구현예에서 환자는 세포가 분리, 가공 및/또는 조작되는 적용 세포 치료와 같은 특정 치료적 개입이 필요한 인간이다.

[0276] 따라서, 한 구현예에서 세포는 일차 세포, 예를 들어 일차 인간 세포이다. 샘플에는 분리, 원심 분리, 유전자 조작(예를 들어 바이러스 벡터를 이용한 형질 도입), 세척 및/또는 배양과 같은 하나 이상의 처리 단계에서 생성되는 샘플뿐만 아니라 조직에서 추출한 조직, 유체 및 기타 샘플이 포함된다. 상기 생물학적 샘플은 생물학적 소스로부터 직접 수득된 샘플 또는 처리된 샘플일 수 있다. 생물학적 샘플은 체액들(body fluid), 예를 들어 혈액(blood), 혈장(plasma), 혈청(serum), 뇌척수액(cerebrospinal fluid), 활막액(synovial fluid), 소변 및 땀, 조직 및 기관 샘플들(이로부터 유래된 처리된 샘플들 포함)이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다.

[0277] 일부 측면에서, 상기 세포가 유래되거나 격리되는 상기 샘플은 혈액 또는 혈액 유래 샘플이거나, 아페레시스(apheresis) 또는 루카페레시스(leukapheresis) 제품이거나 이로부터 유래된 제품이다. 예시적인 샘플들은 전혈, 말초 혈액 단핵 세포들(PBMC), 백혈구, 골수, 흉선, 조직 생검, 종양, 백혈병, 림프종, 림프절, 장 관련 림프 조직, 점막 관련 림프 조직, 비장, 기타 림프 조직, 간, 폐, 위, 장, 결장, 신장, 췌장, 유방, 뼈, 전립선, 자궁 경부, 고환, 난소, 편도선 또는 다른 기관 및/또는 그로부터 유래된 세포들을 포함한다. 샘플들은 세포 치료의 맥락에서, 예를 들어 입양 세포 치료와 관련하여 자가(autologous) 및 동종 이계(allogeneic) 소스들의 샘플들을 포함한다.

[0278] 일부 구현예에서, 세포는 세포주, 예를 들어 T 세포주에서 유래한다. 일부 구현예에서 세포는 이종의 소스, 예를 들어 마우스, 래트, 비인간 영장류 및 돼지로부터 수득된다.

[0279] 일부 구현예에서, 세포의 단리는 하나 이상의 제조 및/또는 비친화성에 기초한 세포 분리 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 세포를 세척, 원심 분리 및/또는 하나 이상의 시약의 존재하에, 예를 들어 원하지 않는 성분을 제거하고, 원하는 성분을 농축되게 하고, 특정 시약에 민감한 세포를 용해 시키거나 제거하기 위해 배양한다. 일부 구체예에서, 세포는 밀도, 부착 성질, 크기, 민감성 및/또는 특정 성분에 대한 내성과 같은 하나 이상의 특성에 기초하여 분리된다.

- [0280] 일부 예에서, 대상체의 상기 순환 혈액으로부터의 세포들은 예를 들어 아페레시스(apheresis) 또는 루카페레시스(leukapheresis)에 의해 수득된다. 일부 측면에서, 상기 샘플들은 T 세포들, 단핵구들(monocytes), 과립구들(granulocytes), B 세포들, 다른 유핵 형성 백혈구들, 적혈구들 및/또는 혈소판들(platelets)을 비롯한 림프구들(lymphocytes)을 함유하고, 일부 측면에서 적혈구들 및 혈소판들 이외의 세포들을 함유한다.
- [0281] 일부 구현예에서, 상기 대상체로부터 수집된 상기 혈액 세포들은 예를 들어 상기 혈장 분획(plasma fraction)을 제거하고, 상기 세포들을 후속 처리 단계들에 적합한 완충제(buffer) 또는 배지(media)에 배치하기 위해 세척된다. 일부 구현예에서, 상기 세포들은 인산염 완충 용액(PBS)로 세척된다. 일부 구현예에서, 상기 세척액은 칼슘 및/또는 마그네슘 및/또는 다수 또는 모든 2가 양이온들(divalent cations)이 결여되어 있다. 일부 측면에서, 세척 단계는 상기 제조자의 지침들에 따라 반-자동 "플로우-쓰루(flow-through)" 원심 분리기 (예를 들어 the Cobe 2991 세포 처리기, Baxter)를 달성한다. 일부 측면에서 세척 단계는 상기 제조자의 지침들에 따라 접선 유동 여과(tangential flow filtration)(TFF)에 의해 달성된다. 일부 구현예에서, 상기 세포들은 세척 후 다양한 생체 적합성 완충제들(biocompatible buffers), 예를 들어 $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ 비 함유(free) PBS에 재 현탁된다(resuspended). 특정 구현예에서, 혈액 세포 샘플의 성분들을 제거하고, 상기 세포들은 배양 배지(culture media)에 직접 재 현탁된다.
- [0282] 일부 구현예에서, 상기 방법들은 밀도-기반 세포 분리 방법들, 예를 들어 적혈구들(red blood cells)을 용해시켜(lysing) 말초 혈액(peripheral blood)으로부터 백혈구들(white blood cells)을 제조하고, Percoll® 또는 Ficoll® 구배를 통한 원심 분리를 포함한다.
- [0283] 일부 구현예에서, 분리 방법은 표면 마커, 예를 들어 표면 단백질, 세포내 마커 또는 핵산과 같은 하나 이상의 특정 분자의 세포에서의 발현 또는 존재에 기초한 상이한 세포 유형의 분리를 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 마커에 기초한 임의의 공지된 분리 방법이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 분리는 친화도 또는 면역 친화성-기체분리이다. 예를 들어 일부 측면에서 분리는 세포의 예를 들어 그러한 마커에 특이적으로 결합하는 항체 또는 결합 파트너와의 배양에 의해, 전형적으로 세포 표면 마커의 세포 발현 또는 발현 수준에 기초한 세포 및 세포 집단의 분리를 포함하며, 일반적으로 세척 단계 및 항체 또는 결합 파트너에 결합한 세포를 항체 또는 결합 파트너에 결합하지 않은 세포로부터 분리하는 단계를 포함한다.
- [0284] 이러한 분리 단계는 항체 또는 결합 파트너에 결합하지 않은 세포가 보유되는 시약에 결합된 세포가 추가 사용을 위해 보유된 양성 선택 및/또는 음성 선택에 기초할 수 있다. 일 예에서, 두 분획은 추후 사용을 위해 보유된다. 일부 측면에서, 음성 선택은 이중 집단에서 세포 유형을 특이적으로 식별하는 항체가 이용 가능하지 않은 경우에 특히 유용할 수 있어, 원하는 집단 이외의 세포에 의해 발견된 마커에 기초하여 분리가 가장 잘 수행된다.
- [0285] 분리는 특정 세포 집단 또는 특정 마커를 발현하는 세포의 100% 농축 또는 제거를 수반할 필요는 없다. 예를 들어 마커를 발현하는 세포와 같은 특정 유형의 세포에 대한 양성 또는 농축화는 그러한 세포의 수 또는 백분율을 증가시키는 것을 말하지만, 마커를 발현하지 않는 세포가 완전히 없게 할 필요는 없다. 마찬가지로, 마커를 발현하는 것과 같은 특정 유형의 세포의 음성 선별, 제거 또는 고갈은 그러한 세포의 수 또는 백분율을 감소시키는 것을 의미하지만 그러한 모든 세포를 완전히 제거할 필요는 없다.
- [0286] 일부 구체예에서, 한 번의 단계로부터 양 또는 음으로 선택된 분획이 후속적인 양성 또는 음성의 선택과 같은 다른 분리 단계를 거치는 다중 단계의 분리 단계가 수행된다. 일부 구체예에서, 단일 분리 단계는 복수의 항체 또는 결합 파트너와 함께 세포를 향한 처리함으로써, 복수의 마커를 동시에 발현하는 세포를 고갈시킬 수 있으며, 각각은 음성 선택을 목표로 하는 마커에 특이적이다. 마찬가지로, 여러 세포 유형은 다양한 세포 유형에서 발현되는 복수의 항체 또는 결합 파트너와 함께 세포를 배양함으로써 동시에 양성으로 선택될 수 있다.
- [0287] 예를 들어 일부 측면에서, 양성이거나 하나 이상의 표면 마커, 예를 들어 $\text{CD}28^{+}$, $\text{CD}62\text{L}^{+}$, $\text{CCR}7^{+}$, $\text{CD}27^{+}$, $\text{CD}127^{+}$, $\text{CD}4^{+}$, $\text{CD}8^{+}$, $\text{CD}45\text{RA}^{+}$, 및/또는 $\text{CD}45\text{RO}^{+}$ T 세포의 높은 수준을 발현하는 세포와 같은 T 세포의 하위 집단은 양성 또는 음성 선별 기술에 의해 분리된다.
- [0288] 예를 들어 $\text{CD}3^{+}$, $\text{CD}28^{+}$ T 세포는 항-CD3/항-CD28 콘쥬게이트된 자성 비드(conjugated magnetic bead)(예를 들어 DYNABEADS®M-450 CD3/CD28 T 세포 확장기)를 사용하여 적극적으로 선택될 수 있다.
- [0289] 일부 구현예에서, 분리는 음성 선택에 의한 양성 선별 또는 특정 세포군의 고갈에 의해 특정 세포 집단에 대한 농축에 의해 수행된다. 일부 구현예에서, 양성 또는 음성 선별은 양성 또는 음성으로 선택된 세포 상에 상대적

으로 높은 수준(마커^{high})으로 발현되거나 발현되는 하나 이상의 표면 마커(마커⁺)에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체 또는 다른 결합제와 세포를 인큐베이션시킴으로써 달성된다.

[0290] 일부 구현예에서, T 세포는 B 세포, 단구 또는 CD14와 같은 다른 백혈구와 같은 비 T 세포에서 발현된 마커의 음성 선택에 의해 PBMC 샘플로부터 분리된다. 일부 측면에서, CD4⁺ 또는 CD8⁺ 선별 단계는 CD4⁺ 헬퍼 및 CD8⁺ 세포 독성 T 세포를 분리하는데 사용된다. 이러한 CD4⁺ 및 CD8⁺ 모집단은 하나 이상의 순진, 메모리 및/또는 효과기 T 세포 하위 집단에서 상대적으로 높은 정도로 발현되거나 표현된 마커에 대한 양성 또는 음성 선택에 의해 하위 집단으로 추가 분류될 수 있다.

[0291] 일부 구현예에서, CD8⁺ 세포는 각각의 부분 집단과 관련된 표면 항원에 기초한 양성 또는 음성 선택에 의해서, 네이비(naive), 센트럴 메모리, 효과기 메모리(effector memory) 및/또는 센트럴 메모리 줄기 세포(central memory stem cell)를 추가로 농축하게 하거나 고갈시킨다. 일부 구현예에서, 센트럴 메모리 T(T_{CM}) 세포에 대한 농축은 증폭 및/또는 생체내 투여를 개선하는 것과 같은 효능을 증가시키기 위해 수행되며, 일부 측면에서는 특히 이러한 하위 집단에서 강건하다[문헌 「Terakura *et al.* (2012) *Blood*,1:72-82; Wang *et al.* (2012) *J Immunother.* 35(9):689-701」 참조]. 일부 구현예에서, T_{CM}-농축 CD8⁺ T 세포 및 CD4⁺ T 세포를 결합시키는 것은 효능을 추가로 강화시킨다.

[0292] 일부 구현예에서, 기억 T 세포는 CD8+ 말초 혈액 림프구의 CD62L⁺ 및 CD62L⁻ 서브세트 모두에 존재한다. PBMC는 예를 들어 항-CD8 및 항-CD62L 항체를 사용하여 CD62L-CD8⁺ 및/또는 CD62L+CD8⁺ 분획에 대해 농축되거나 고갈될 수 있다.

[0293] 일부 구현예에서, 중앙 기억 T(T_{CM}) 세포의 농축은 CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 및/또는 CD127의 양성 또는 고도의 표면 발현에 기초하고; 일부 측면에서, 이는 CD45RA 및/또는 그랜자임 B를 발현하거나 고도로 발현하는 세포에 대한 음성 선택에 기초한다. 일부 측면에서, TCM 세포에 대해 농축된 CD8⁺ 집단의 단리는 CD4, CD14, CD45RA를 발현하는 세포의 고갈 및 CD62L을 발현하는 세포에 대한 양성 선택 또는 농축에 의해 수행된다. 일 측면에서, 중앙 기억 T(TCM) 세포의 농축은 CD4 발현에 기초하여 선택된 세포의 음성 분획으로 시작하여 수행되며, 이는 CD14 및 CD45RA의 발현에 기초한 음성 선택 및 CD62L에 기초한 양성 선택을 거친다. 일부 측면에서, 상기 선택은 동시에 수행되며 다른 측면에서, 순차적으로, 어떠한 순서로든 수행된다. 일부 측면에서, CD8⁺ 세포의 집단 또는 하위 집단을 제조하는 데 사용된 동일한 CD4 발현 기반 선택 단계가 CD4⁺ 세포의 집단 또는 하위 집단을 생성하는 데 또한 사용되어, CD4 기반 분리로부터의 양성 및 음성 분획 모두가 유지되고, 선택적으로 하나 이상의 추가적인 양성 또는 음성 선택 단계 후에 방법의 후속 단계에서 사용된다.

[0294] 특정 예에서, PBMC 샘플 또는 다른 백혈구 샘플은, 음성 및 양성 분획 모두가 유지되는 CD4⁺ 세포의 선택을 거친다. 이어서 음성 분획은 CD14 및 CD45RA 또는 CD19의 발현에 기초한 음성 선택 및 CD62L 또는 CCR7과 같은 중앙 기억 T 세포의 특유한 마커에 기초한 양성 선택을 거치고, 양성 및 음성 선택은 어느 순서로든 수행된다.

[0295] CD4⁺ T 헬퍼 세포는 세포 표면 항원을 갖는 세포 집단을 식별하여 나이브, 중앙 기억 및 효과기 세포(effector cell)로 분류된다. CD4⁺ 림프구는 표준 방법으로 획득될 수 있다. 일부 구현예에서, 나이브 CD4⁺ T 림프구는 CD45RO⁻, CD45RA⁺, CD62L⁺, CD4⁺ T 세포이다. 일부 구현예에서, 중앙 기억 CD4⁺ 세포는 CD62L⁺ 및 CD45RO⁺이다. 일부 구현예에서, 주효인자 CD4⁺ 세포는 CD62L⁻ 및 CD45RO⁻이다.

[0296] 일 예에서, 음성 선택에 의해 CD4⁺ 세포를 농축하기 위해, 모노클로날 항체 콕테일은 통상적으로 CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR 및 CD8에 대한 항체를 포함한다. 일부 구현예에서, 항체 또는 결합 파트너는 양성 및/또는 음성 선택을 위한 세포의 분리가 가능하도록 자성 비드 또는 상자성 비드와 같은 고체 지지체 또는 매트릭스에 결합된다. 예를 들어 일부 구현예에서, 세포 및 세포의 집단은 면역자성(또는 자성친화도) 분리 기법을 사용하여 분리되거나 단리된다(문헌[Methods in Molecular Medicine, vol. 58: Metastasis Research Protocols, Vol. 2: Cell Behavior In Vitro and In Vivo, p 17-25 Edited by: S. A. Brooks and U. Schumacher © Humana Press Inc., Totowa, NJ]에서 검토됨).

[0297] 일부 측면에서, 분리될 세포 샘플 또는 세포 조성물은 작고, 자화 가능한 또는 자성 반응 물질, 예를 들어 자성 반응 입자 또는 미세입자, 예를 들어 상자성 비드(예를 들어 Dynalbeads® 또는 MACS® 비드)와 함께 인큐베이션된다. 자기 반응성 물질(예를 들어 입자)은 일반적으로 분리가 바람직한, 예를 들어 음성 또는 양성 선택이 바람직한 세포 또는 세포의 집단에 존재하는 분자(예를 들어 표면 마커)에 특이적으로 결합하는 결합 파트너(예

를 들어 항체)에 직접 또는 간접적으로 부착된다.

- [0298] 일부 구현예에서, 자성 입자 또는 비드는 항체 또는 다른 결합 파트너와 같은 특이적인 결합 부재에 결합되는 자기 반응성 물질을 포함한다. 자성 분리 방법에 사용되는 널리 공지된 많은 자성 반응 물질이 있다. 적합한 자성 입자에는 본원에 참조로 통합된 문헌[Molday, 미국특허 4,452,773 및 유럽 특허 명세서 EP 452342 B]에 기재된 것이 포함된다. 콜로이드 크기의 입자, 예를 들어 문헌[Owen 미국특허 4,795,698 및 Liberti 등, 미국특허 5,200,084]에 기재된 것이 다른 예이다.
- [0299] 인큐베이션은 일반적으로 항체 또는 결합 파트너 또는 분자, 예를 들어 자성 입자 또는 비드에 부착된 상기 항체 또는 결합 파트너에 특이적으로 결합하는 2차 항체 또는 다른 시약이 샘플 내의 세포 상에 존재하는 경우 세포 표면 분자에 특이적으로 결합하는 조건하에서 수행된다.
- [0300] 일부 측면에서, 샘플은 자기장에 배치되고, 이에 부착된 자기 반응성 또는 자화 가능 입자를 갖는 상기 세포는 자석에 끌려당겨지고 표지되지 않은 세포로부터 분리될 것이다. 양성 선택의 경우, 자석에 끌려당겨진 세포가 유지되고; 음성 선택의 경우, 끌려당겨지지 않은 세포(비표지 세포)가 유지된다. 일부 측면에서, 양성 및 음성 선택의 조합이 동일한 선택 단계 동안 수행되며, 상기 양성 및 음성 분획은 유지되고 추가적으로 가공되거나 추가적인 분리 단계를 거친다.
- [0301] 특정 구현예에서, 자기 반응성 입자는 1차 항체 또는 다른 결합 파트너, 2차 항체, 렉틴, 효소 또는 스트렙타비딘으로 코팅된다. 특정 구현예에서, 자성 입자는 하나 이상의 마커에 특이적인 1차 항체의 코팅을 통해 세포에 부착된다. 특정 구현예에서, 비드보다는 세포가 1차 항체 또는 결합 파트너로 표지되고, 이어서 세포 유형 특이적 2차 항체- 또는 다른 결합 파트너(예를 들어 스트렙타비딘)-코팅된 자성 입자가 첨가된다. 특정 구현예에서, 스트렙타비딘 코팅된 자성 입자는 비오틴이 부착된 1차 또는 2차 항체와 함께 사용된다.
- [0302] 일부 구현예에서, 자기 반응성 입자는 후속적인 인큐베이션, 배양 및/또는 조작될 세포에 부착되어 남아있고; 일부 측면에서, 상기 입자는 환자에게 투여하기 위한 세포에 부착되어 남아있다. 일부 구현예에서, 자화 가능 또는 자기 반응성 입자는 세포로부터 제거된다. 세포에서 자화 가능 입자를 제거하는 방법은 공지되어 있고, 예를 들어 경쟁 비-표지 항체 및 절단 가능한 링커에 접합된 자화 가능 입자 또는 항체 등의 사용을 포함한다. 일부 구현예에서, 자화 가능 입자는 생분해성이다.
- [0303] 일부 구현예에서, 친화성-기반 선택은 자기 활성 세포 선별(Magnetic Activated Cell Sorting)(MACS®)(Miltenyi Biotec, Auburn, CA)을 통해 이루어진다. 자기 활성 세포 선별(MACS®) 시스템들은 자화된 입자들이 부착된 세포들을 고순도로 선택할 수 있다. 특정 구현예에서, MACS®는 상기 외부 자기장의 적용 후에 상기 비-표적 및 표적 종들이 순차적으로 용출되는(eluted) 모드에서 작동한다. 즉, 자화 입자들에 부착된 상기 세포들은 상기 부착되지 않은 종들이 용출되는 동안 제자리에 유지된다. 그런 다음이 제 1 용출 단계가 완료된 후, 상기 자기장에 갇히고 용출되는 것이 방지된 상기 종들은 용출 및 회수될 수 있도록 어떤 방식으로든 자유로워진다. 특정 구현예에서, 비-표적 세포는 상기 이질적인 세포 집단으로부터 표지되고(labelled), 고갈된다(depleted).
- [0304] 특정 구현예에서, 단리 또는 분리는 상기 방법의 단리, 세포 제조, 분리, 프로세싱, 인큐베이션, 배양 및/또는 제형화 단계 중 하나 이상을 수행하는 시스템, 장치 또는 장치를 이용하여 수행된다. 일부 측면에서, 시스템은 예를 들어 오류, 사용자 취급 및/또는 오염을 최소화하기 위해 폐쇄 또는 멸균 환경에서 상기 단계 각각을 수행하는데 사용된다. 하나의 실시예에서, 상기 시스템은 문헌[국제 특허 출원, 공개 번호 W02009/072003 또는 미국 특허 출원 20110003380 A1]에 기재된 바와 같은 시스템이다.
- [0305] 일부 구현예에서, 시스템 또는 장치는 통합 또는 독립 언어 시스템 및/또는 자동화되거나 프로그램 가능한 방식으로 단리, 가공, 조작 및 제형화 단계 중 하나 이상, 예를 들어 모두를 수행한다. 일부 측면에서, 시스템 또는 장치는 사용자가 가공, 단리, 조작 및 제형화 단계의 결과를 프로그램, 제어, 산정하고/거나 가공, 단리, 조작 및 제형화 단계의 다양한 측면을 조정할 수 있게 하는, 상기 시스템 또는 장치와 통신하는 컴퓨터 및/또는 컴퓨터 프로그램을 포함한다.
- [0306] 일부 측면에서, 분리 및/또는 다른 단계는 ClinMACS® 시스템(Miltenyi Biotec)을 사용하여, 예를 들어 밀폐된 및 멸균 시스템에서 임상 규모의 세포의 자동화된 분리를 위해 수행된다. 구성 요소로는 통합 마이크로컴퓨터, 자기 분리 장치, 연동 펌프 및 다양한 핀치 밸브가 포함될 수 있다. 일부 측면에서 통합 컴퓨터는 계측기의 모든 구성요소를 제어하고 표준화된 순서로 반복적인 절차를 수행하도록 시스템에서 지시한다. 일부 측면에서 자기 분리 유닛은 이동 가능한 영구 자석 및 선택 컬럼용 홀더를 포함한다. 연동 펌프는 배관 세트 전체의 유속을

제어하며 핀치 밸브와 함께 시스템을 통한 완충액의 제어된 흐름과 세포의 지속적인 정지를 보장한다.

- [0307] CliniMACS® 시스템은 일부 측면에서 멸균 비 발열성 용액으로 공급되는 항체 결합 자성 입자를 사용한다. 일부 구현예에서, 자성 입자로 세포를 표지한 후, 세포를 세척하여 과량의 입자를 제거한다. 이어서 세포 준비 백을 튜빙 세트에 연결하고, 버퍼 세트 및 세포수집 백을 연결한다. 튜빙 세트는 프리-컬럼과 분리 컬럼을 포함하여 미리 조립된 무균 튜빙으로 구성되어 있으며 일회용으로만 사용된다. 분리 프로그램을 시작한 후, 상기 시스템은 세포 샘플을 자동으로 분리 컬럼에 적용한다. 표지된 세포는 컬럼 내에 보유되는 반면, 표지되지 않는 세포는 일련의 세척 단계에 의해 제거된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 방법과 함께 사용하기 위한 세포 집단은 표지되지 않고 컬럼에 보유되지 않는다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 방법과 함께 사용하기 위한 세포 집단은 표지되고 컬럼에 보유된다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 방법과 함께 사용하기 위한 세포 집단은 자기장의 제거 후 컬럼으로부터 용리되어 세포수집 백 내에 수집된다.
- [0308] 특정 구현예에서, 분리 및/또는 다른 단계는 CliniMACS Prodigy® 시스템(Miltenyi Biotec)을 사용하여 수행된다. 상기 CliniMACS Prodigy® 시스템은 원심 분리에 의한 세포의 자동화된 세척 및 분별을 가능하게 하는 세포 처리 단일체를 갖추고 있다. 상기 CliniMACS Prodigy® 시스템에는 소스 세포 생성물의 거시적 층(macroscopic layer)을 식별하여 최적의 세포 분획 종말점을 결정하는 온보드 카메라 및 이미지 인식 소프트웨어가 포함될 수 있다. 예를 들어 말초 혈액은 적혈구, 백혈구 및 혈장 층으로 자동 분리된다. 상기 CliniMACS Prodigy® 시스템은 또한 세포 분화 및 증폭, 항원 로딩 및 장기 세포 배양과 같은 세포 배양 프로토콜을 수행하는 일체형 세포 배양 챔버를 포함할 수 있다. 입력 포트는 멸균 제거 및 매체의 보충을 허용할 수 있으며, 통합 현미경을 사용하여 세포를 모니터링할 수 있다[문헌 예를 들어 「Klebanoff et al. (2012) J Immunother. 35(9): 651-660, Terakura et al. (2012) Blood.1:72-82, and Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701」 참조].
- [0309] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 세포 집단은 유세포 계측법을 통해 수집 및 농축(또는 고갈)되며, 여기서 다수의 세포 표면 마커에 대해 염색된 세포는 유체 스트림으로 운반된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 세포 집단은 예비 스케일(형광 활성화된 세포 분류, FACS)-분류를 통해 수집 및 농축(또는 고갈)된다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 세포 집단은 FACS-기반 검출 시스템과 조합된 마이크로 전자 기계 시스템(MEMS) 칩의 사용에 의해 수집 및 농축(또는 고갈)된다[예를 들어 국제공개공보 제WO2010/033140호, 문헌 「Cho et al. (2010) Lab Chip 10, 1567-1573」; 및 「Godin et al. (2008) J Biophoton. 1(5):355-376」 참조]. 두 경우 모두 세포를 여러 마커로 분류하여 잘 정의된 T 세포 하위 세트를 고순도로 분리 할 수 있다.
- [0310] 일부 구현예에서, 항체 또는 결합 파트너는 하나 이상의 검출 가능한 카로 표지되어 양성 및/또는 음성 선택을 위한 분리를 용이하게 한다. 예를 들어 분리는 형광 표지된 항체와의 결합에 기초할 수 있다. 예를 들어 하나 이상의 세포 표면 마커에 특이적 항체 또는 다른 결합 파트너의 결합에 기초한 세포의 분리는 형광-활성 세포 분류(FACS)를 포함하는 분취용(FACS) 및/또는 미세 전자 기계 시스템(MEMS) 칩, 예를 들어 유세포 계측 탐지 시스템과 조합하여 사용될 수 있다. 이러한 방법은 동시에 여러 마커를 기반으로 긍정적인고 부정적인 선택을 허용한다.
- [0311] 일부 구현예에서, 제조 방법은 단리, 항온 처리 및/또는 조작 전 또는 후에 세포를 동결, 예를 들어 냉동 보존하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 동결 및 후속 행동 단계는 파립구 및 어는 정도는 세포 집단 내의 단핵구를 제거한다. 일부 구현예에서, 세포는 예를 들어 혈장 및 혈소판을 제거하기 위한 세척 단계 후에 냉동 용액에 현탁된다. 임의의 다양한 공지된 동결 용액 및 파라미터가 사용될 수 있다. 일례로 20% DMSO 및 8% 인간 혈청 알부민(HSA) 또는 다른 적합한 세포 동결 배지를 함유하는 PBS를 사용하는 것을 포함한다. 그런 다음 DMSO와 HSA의 최종 농도가 각각 10%와 4%가 되도록 배지로 1 : 1로 희석한다. 이어서, 세포를 일반적으로 분당 1℃의 속도로 -80℃로 동결시키고 액체 질소 저장 탱크의 증기 상에 저장한다.
- [0312] 일부 구현예에서, 세포는 유전자 조작 전에 또는 유전자 조작과 관련하여 인큐베이션 및/또는 배양된다. 인큐베이션 단계는 배양(culture), 배양(cultivation), 자극, 활성화 및/또는 증식을 포함할 수 있다. 인큐베이션 및/또는 조작은 배양 용기 또는 세포 배양을 위한 유닛, 챔버, 웰, 컬럼, 튜브, 튜빙 세트, 밸브, 바이알, 배양 접시, 백 또는 기타 용기와 같은 배양 용기에서 수행 될 수 있다. 일부 구현예에서, 조성물 또는 세포는 자극 조건 또는 자극제의 존재하에 인큐베이션된다. 그러한 조건은 집단 내에서 세포의 증식, 증폭, 활성화 및/또는 생존을 유도하고, 항원 노출을 모방하고, 및/또는 재조합 항원 수용체의 도입과 같은 유전자 조작을 위해 세포를 준비하는 것을 포함한다.
- [0313] 조건은 하나 이상의 특정 매질, 온도, 산소 함량, 이산화탄소 함량, 시간, 영양제, 아미노산, 항생제, 이온 및/또는 자극 인자, 예를 들어 사이토카인, 케모카인, 항원, 결합 파트너, 융합 단백질, 재조합 용해성 수용체, 및

세포를 활성화 시키도록 고안된 임의의 다른 제제를 포함한다.

- [0314] 일부 구현예에서, 자극 조건 또는 작용제는 TCR 복합체의 세포내 신호 전달 영역을 활성화시키거나 또는 자극시킬 수 있는 하나 이상의 약제, 예를 들어 리간드를 포함한다. 일부 측면에서, 상기 약제는 T 세포에서 TCR/CD3 세포내 신호 전달 계통을 작동시키거나 개시시킨다. 이러한 제제는 항체, 예를 들어 TCR에 특이적인 항체, 예를 들어 항-CD3을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 자극 조건은 하나 이상의 제제, 예를 들어 공자극 수용체를 자극할 수 있는 리간드, 예를 들어 항-CD28을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 제제 및/또는 리간드는 고형 지지체 예를 들어 비드, 및/또는 하나 이상의 사이토카인에 결합될 수 있다. 선택적으로 상기 확장 방법은 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체를 배양 배지에 (예를 들어 적어도 약 0.5ng/mL 농도로) 첨가하는 단계를 더 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 자극제는 IL-2, IL-15 및/또는 IL-7을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 IL-2 농도는 적어도 약 10 유닛/mL이다.
- [0315] 일부 측면에서, 인큐베이션은 리델(Riddell) 등의 미국특허 제6,040,177호, 문헌 「Klebanoff *et al.*(2012) *J Immunother.* 35(9): 651-660, Terakura *et al.* (2012) *Blood*.1:72-82, and/or Wang *et al.* (2012) *J Immunother.* 35(9):689-701」에 기재된 기법에 따라 수행된다.
- [0316] 일부 구현예에서, 상기 T 세포는 비분할 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)와 같은 배양-개시 조성물(culture-initiating composition)에 피더 세포(feeder cell)를 (예를 들어 결과적인 세포 집단이 확대될 초기 집단에서 각 T 림프구에 대해 적어도 약 5, 10, 20 또는 40 이상의 PBMC 공급 세포를 포함하도록) 첨가하고; 상기 배양물을 (예를 들어 T 세포의 수를 확장시키기에 충분한 시간동안) 인큐베이션함으로써 확대시킨다. 일부 측면에서는, 비분할 피더 세포는 감마-조사 PBMC 피더 세포를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, PBMC는 세포 분열을 방지하기 위해 약 3000 내지 3600 rad 범위의 감마선으로 조사된다. 일부 측면에서, 피더 세포는 T 세포 집단을 첨가하기 전에 배양 배지에 첨가된다.
- [0317] 일부 측면에서, 자극 조건은 인간 T 림프구의 성장에 적합한 온도, 예를 들어 적어도 약 25°C, 일반적으로는 약 30°C, 일반적으로는 약 37°C의 온도를 포함한다. 선택적으로, 인큐베이션은 피더 세포로서 비분할 EBV-형질 전환 림프구 세포(LCL)를 첨가하는 것을 추가로 포함할 수 있다. LCL은 약 6000 내지 10,000 rad의 범위의 감마선으로 조사될 수 있다. 일부 측면에서, LCL 피더 세포는 적당한 양으로, 예를 들어 약 10:1의 LCL 피더 세포 대 초기 T 림프구 비율의 양으로 제공된다.
- [0318] 일부 구현예에서, 항원-특이적 CD4⁺ 및/또는 CD8⁺ T 세포와 같은 항원 특이적 T 세포는 항원으로 순수 또는 항원 특이적 T 림프구를 자극함으로써 획득된다. 예를 들어 항원 특이적 T 세포주 또는 클론은 감염된 대상체로부터 T 세포를 분리하고 시험관내에서 동일한 항원으로 세포를 자극함으로써 사이토메갈로바이러스 항원(cytomegalovirus antigen)에 생성될 수 있다.
- [0319] **C. 세포 조작 방법**
- [0320] 특정 구현예에서, 조작된 세포는 하나 이상의 입력 조성물 및/또는 단일 생물학적 샘플로부터 농축 T 세포의 출력 조성물을 생성하는 프로세스에 의해 생성된다. 특정 구현예에서, 출력 조성물은 재조합 수용체, 예를 들어 CAR, 예를 들어 항-CD19 CAR을 발현하는 세포를 함유한다. 특정 구현예에서, 출력 조성물의 세포는 요법, 예를 들어 자가 세포 요법으로서 대상체에게 투여하기에 적합하다. 일부 구현예에서, 출력 조성물은 농축 CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포의 조성물이다.
- [0321] 일부 구현예에서, 조작된 세포를 생성하거나 생산하는 공정은 다음 단계 중 일부 또는 전부를 포함하는 공정에 의한 것이다: 생물학적 샘플을 수집하거나 획득; 생물학적 샘플에서 입력 세포를 분리, 선택 또는 농축; 입력 세포를 냉동 보존하고 저장; 자극 조건하에서 입력 세포를 해동 및/또는 인큐베이션; 재조합 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 CAR과 같은 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 발현하거나 함유하도록 자극된 세포를 조작; 예를 들어 임계 값, 밀도 또는 확장까지 조작된 세포를 배양; 배양된 세포를 출력 조성물로 제형화; 및/또는 세포가 주입을 위해 방출되고/되거나 대상체에게 투여하기에 적합할 때까지 제형화된 출력 세포를 동결보존 및 저장. 특정 구현예에서, 프로세스는 별도의 CD4⁺ 조성물 및 별도의 CD8⁺ 조성물과 같은 농축 T 세포의 2개 이상의 입력 조성물로 수행되며, 이는 동일한 시작 또는 초기 생물학적 샘플에서 별도로 처리 및 조작되고 정의된 비율(예를 들어 CD4⁺ 대 CD8⁺ T 세포의 1:1 비율)로 대상체에게 다시 주입된다. 일부 구현예에서, 농축 T 세포는 조작된 T 세포, 예를 들어 재조합 수용체를 발현하도록 형질도입된 T 세포이거나 이를 포함한다.
- [0322] 특정 구현예에서, 재조합 수용체(예를 들어 항-CD19 CAR)를 발현하는 조작된 세포의 출력 조성물은 세포의 초기 및/또는 입력 조성물로부터 생성된다. 일부 구현예에서, 입력 조성물은 농축 T 세포, 농축 CD4⁺ T 세포 및/또는

농축 CD8+ T 세포의 조성물이다 (이하에서 농축 T 세포의 조성물, 농축 CD4+ T 세포의 조성물 및 농축 CD8+ T 세포의 조성물로도 각각 지칭됨). 일부 구현예에서, CD4+ T 세포가 농축된 조성물은 적어도 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% 또는 99.9%의 CD4+ T 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 농축 CD4+ T 세포의 조성물은 100%의 CD4+ T 세포를 포함하고 약 100% CD4+ T 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 농축 T 세포의 조성물은 20% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 1% 미만, 0.1% 미만 또는 0.01% 미만의 CD8+ T 세포를 포함하거나 함유하고/하거나 CD8+ T 세포를 함유하지 않고/하거나 CD8+ T 세포를 함유하지 않거나 실질적으로 함유하지 않는다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 필수적으로 CD4+ T 세포로 구성된다. 일부 구현예에서, CD8+ T 세포가 농축된 조성물은 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% 또는 99.9%의 CD8+ T 세포를 함유하거나, 또는 약 100% CD8+ T 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 농축 CD8+ T 세포의 조성물은 20% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 1% 미만, 0.1% 미만 또는 0.01% 미만의 CD4+ T 세포를 포함하거나 함유하고/하거나 CD4+ T 세포를 함유하지 않고/하거나 CD4+ T 세포를 함유하지 않거나 실질적으로 함유하지 않는다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 필수적으로 CD8+ T 세포로 구성된다.

[0323] 특정 구현예에서, 조작된 세포를 생산하는 방법은 다음 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다: 세포, 예를 들어 입력 조성물의 세포를 활성화 및/또는 자극; 활성화 및/또는 자극된 세포를 유전적으로 조작하여, 예를 들어 형질도입 또는 형질감염에 의해 재조합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 도입; 및/또는 예를 들어 증식 및/또는 확장을 촉진하는 조건 하에 조작된 세포를 배양. 특정 구현예에서, 제공된 방법은 세포가 인큐베이션, 활성화, 자극, 조작, 형질도입, 형질감염 및/또는 배양된 후에 생성된 출력 조성물을 수확, 수집 및/또는 제형화하는 것과 관련하여 사용될 수 있다.

[0324] 일부 구현예에서, 제공된 방법 및 용도에 따라 사용되는 기술된 바와 같은 항-CD19 CAR을 발현하는 것과 같은 조작된 세포는 세포를 선택, 단리, 활성화, 자극, 확장, 배양 및/또는 제형화하는 과정에 의해 생산되거나 생성된다. 일부 구현예에서, 이러한 방법에는 설명된 방법이 포함된다.

[0325] 일부 구현예에서, 제공된 방법 및 용도에 따라 사용되는, 기재된 바와 같은 항-CD19 CAR을 발현하는 것과 같은 조작된 세포는 예를 들어 WO 2019/089855 및 WO 2015/164675에 기재된 바와 같은 예시적인 공정에 의해 생산 또는 생성된다.

[0326] 일부 구현예에서, 기술된 바와 같은 항-CD19 CAR을 발현하는 것과 같은, 조작된 세포 또는 이러한 세포를 포함하는 조성물(예를 들어 동일한 항-CD19 키메라 항원 수용체(CAR)를 각각 발현하는 조작된 CD4+ T 세포 및 조작된 CD8+ T 세포를 포함하는 조성물)을 생성, 생산 또는 제조하기 위한 예시적인 공정은, 농축 CD4+ 및 농축 CD8+ 세포 집단을 개별적으로 처리 단계에 적용하는 것을 포함한다. 조작된 세포를 생성 또는 제조하기 위한 예시적인 공정의 일부 측면에서, CD4+ 및 CD8+ 세포는 인간 말초혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 개별적으로 선택되며, 예를 들어 백혈구 성분채집술에 의해 수득되어 별도의 농축 CD4+ 및 농축 CD8+ 세포 조성물을 생성한다. 일부 측면에서, 이러한 세포는 동결 보존될 수 있다. 일부 측면에서, CD4+ 및 CD8+ 조성물은 이후에 해동될 수 있고 개별적으로 자극, 형질도입 및 확장 단계를 거칠 수 있다.

[0327] 조작된 세포를 생성 또는 제조하기 위한 예시적인 공정의 일부 측면에서, 해동된 CD4+ 및 CD8+ 세포는 예를 들어 항-CD3 및 항-CD28 항체에 결합된 상자성 폴리스티렌 코팅 비드의 존재 하에 개별적으로 자극된다(예를 들어 1:1 비드 대 세포 비율). 일부 측면에서, 자극은 인간 재조합 IL-2, 인간 재조합 IL-15 및 N-아세틸 시스테인(NAC)을 포함하는 배지에서 수행된다. 일부 측면에서, CD4+ 세포용 세포 배양 배지는 또한 인간 재조합 IL-7을 포함할 수 있다.

[0328] 조작된 세포를 생성 또는 제조하기 위한 예시적인 공정의 일부 측면에서, 비드 도입 후 CD4+ 및 CD8+ 세포는 동일한 항-CD19 CAR과 같은 동일한 CAR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터로 별도로 형질도입된다. 일부 측면에서, CAR은 뮤린 항체로부터 유래된 항-CD19 scFv, 면역글로불린 스페이스, CD28로부터 유래된 막관통 도메인, 4-1BB로부터 유래된 공자극 영역, 및 CD3-제타 세포내 신호전달 도메인을 함유할 수 있다. 일부 측면에서, 벡터는 T2A 서열에 의해 CAR 구축물에 연결된 CAR 발현에 대한 대리 마커 역할을 하는 절단된 수용체를 암호화할 수 있다. 예시적인 방법의 일부 측면에서, 세포는 10 μ g/ml 황산프로타민의 존재하에 형질도입된다.

[0329] 조작된 세포를 생성 또는 제조하기 위한 예시적인 공정의 일부 측면에서, 형질도입 후, 자기장에 노출시켜 비드는 세포 조성물로부터 제거된다. 일부 측면에서, CD4+ 및 CD8+ 세포 조성물은 생물반응기(예를 들어 XuriTM W25 생물반응기)에 의한 지속적인 혼합 및 산소 전달과 함께 확장을 위해 별도로 배양된다. 일부 측면에서, 폴록사머가 배지에 추가된다. 일부 측면에서, CD4+ 및 CD8+ 세포 조성물 모두는 IL-2 및 IL-15의 존재 하에 배양된다. 일부 측면에서, CD4+ 세포 배지는 IL-7도 포함한다. 일부 경우에, CD4+ 및 CD8+ 세포는 각각 수확 전에 4배 증

쪽으로 배양된다. 일부 측면에서, 임계값에 도달한 후 하루가 지나면 각 조성물의 세포를 별도로 수확하고 제형화하고 동결 보존할 수 있다. 일부 구현예에서, 기술된 바와 같이 항-CD19 CAR을 발현하는 것과 같은, 조작된 세포 또는 이러한 세포를 포함하는 조성물(예를 들어 동일한 항-CD19 키메라 항원 수용체(CAR)를 각각 발현하는 조작된 CD4+ T 세포 및 조작된 CD8+ T 세포를 포함하는 조성물)을 생성, 생산 또는 제조하기 위한 예시적인 방법은 아래 표 6에 설명된 것들을 포함한다.

[표 6]

CD4+ 및 CD8+ CAR-T 세포를 생성하기 위한 예시적인 과정		
단계	CD4+ 세포	CD8+ 세포
자극(1-2일차)	·항-CD3/CD28 항체 접합 비드 ·1:1 비드 대 세포 비율 ·배지: IL-2, IL-7, IL-15 및 NAC	·항-CD3/CD28 항체 접합 비드 ·1:1 비드 대 세포 비율 ·배지: IL-2, IL-15 및 NAC
형질도입(2-5일차)	·형질도입 아류변트(예를 들어, 10 µg/ml 프로타민 설페이트)	·형질도입 아류변트(예를 들어, 10 µg/ml 프로타민 설페이트)
비드 제거(5일차*)	·자성 비드 제거	·자성 비드 제거
확장(5일차*~수확)	·흔들림 동작(rocking motion) ·생물반응기 및/또는 연속 혼합 ·배지: IL-2, IL-7, IL-15 및 풀록사머	·흔들림 동작(rocking motion) ·생물반응기 및/또는 연속 혼합 ·배지: IL-2, IL-15 및 풀록사머

*대략

다른 측면에서, 조작된 세포 또는 이러한 세포를 포함하는 조성물을 생성, 생산 또는 제조하기 위한 상이한 예시적 공정은 다음과 같은 점에서 상기 예시적 공정과 상이한 공정을 포함한다: NAC는 자극하는 동안 배지에 추가되지 않음; CD4+ 세포 배지에는 IL-2가 포함되어 있지 않음; 세포는 3:1의 비드 대 세포 비율로 자극됨; 세포는 더 높은 농도의 항산 프로타민으로 형질도입됨; 비드 제거는 약 7일째에 발생함; 및 증폭은 정적 설정, 즉 연속 혼합 또는 관류(예를 들어 반연속 및/또는 단계적 관류) 없이, 그리고 풀록사머 없이 수행됨.

일부 구현예에서, 농축 CD4+ T 세포의 하나 이상의 개별 조성물 및 농축 CD8+ T 세포의 하나 이상의 개별 조성물은 단일 생물학적 샘플, 예를 들어 환자 또는 건강한 개인과 같은 동일한 공여자로부터의 PBMC 또는 기타 백혈구의 샘플로부터 분리, 선택, 농축되거나 획득된다. 일부 구현예에서, 농축 CD4+ T 세포의 별도 조성물 및 농축 CD8+ T 세포의 별도 조성물은, 예를 들어 단일 대상체로부터 획득, 수집 및/또는 채취한 단일 생물학적 샘플과 같은 동일한 생물학적 샘플로부터 초기에 분리, 선택 및/또는 농축되었다. 일부 구현예에서, 생물학적 샘플은 먼저 CD4+ T 세포의 선택을 받고, 여기서 음성 및 양성 분획은 모두 유지되고 음성 분획은 추가로 CD8+ T 세포의 선택을 받는다. 다른 구현예에서, 생물학적 샘플은 먼저 CD8+ T 세포의 선택을 받고, 여기서 음성 및 양성 분획은 모두 유지되고 음성 분획은 추가로 CD4+ T 세포의 선택을 받는다. 일부 구현예에서, 선택 방법은 국제 PCT 공개 번호 W02015/164675에 설명된 대로 수행된다. 일부 구현예에서, 선택 방법은 국제 PCT 공개 번호 W02019/089855에 설명된 대로 수행된다. 일부 측면에서, 생물학적 샘플은 먼저 CD8+ T 세포에 대해 양성적으로 선택되어 농축 CD8+ T 세포의 하나 이상의 조성물을 생성하고, 음성 분획은 CD4+ T 세포에 대해 양성적으로 선택되어 농축 CD4+ T 세포의 하나 이상의 조성물을 생성하여, 농축 CD8+ T 세포의 하나 이상의 조성물 및 농축 CD4+ T 세포의 하나 이상의 조성물이 동일한 생물학적 샘플, 예를 들어 동일한 공여자 환자 또는 건강한 개체로부터의 개별 조성물이 되도록 한다. 일부 측면에서, 농축 T 세포의 2개 이상의 개별 조성물 (예를 들어 적어도 하나는 농축 CD4+ T 세포의 조성물이고 적어도 하나는 동일한 공여자로부터의 농축 CD8+ T 세포의 개별 조성물)은 예를 들어 동결 보호 또는 동결 보존 배지에 동결 보존되어 별도로 동결된다.

일부 측면에서, 농축 T 세포의 2개 이상의 개별 조성물 (예를 들어 적어도 하나는 농축 CD4+ T 세포의 조성물이고 적어도 하나는 동일한 생물학적 샘플로부터 농축 CD8+ T 세포의 별도의 조성물)은, 자극 시약과의 접촉에 의해 활성화 및/또는 자극된다 (예를 들어 T 세포 활성화를 위한 CD3/CD28 접합 자기 비드와의 인큐베이션에 의해). 일부 측면에서, 각각의 활성화/자극된 세포 조성은, 각 세포 조성물의 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포에서 동일한 재조합 단백질을 발현하도록 재조합 단백질(예를 들어 CAR)을 암호화하는 바이러스 벡터를 사용하여 조작, 형질도입 및/또는 형질감염된다. 일부 측면에서, 상기 방법은 자극 시약, 예를 들어 자기 비드를 세포 조성물로부터 제거하는 것을 포함한다. 일부 측면에서, 조작된 CD4+ T 세포를 함유하는 세포 조성물 및 조작된 CD8+ T 세포를 함유하는 세포 조성물은 예를 들어 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포 집단의 개별 증폭을 위해 별도로 배양된다. 특정 구현예에서, 배양물로부터의 세포 조성물은, 예를 들어 제제 완충액에서 세포 조성물을 세척함으로써

써 수확 및/또는 수집 및/또는 제제화된다. 특정 구현예에서, CD4+ T 세포를 포함하는 제형화된 세포 조성물 및 CD8+ T 세포를 포함하는 제형화된 세포 조성물은 동결, 예를 들어 동결보존 배지에서 동결보호되거나 동결보존된다. 일부 측면에서, 각 제형의 조작된 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포는 동일한 공여자 또는 생물학적 샘플에서 유래하고 동일한 재조합 단백질(예를 들어 CAR, 예를 들어 항-CD19 CAR)을 발현한다. 일부 측면에서, 별도의 조작된 CD4+ 제제 및 별도의 조작된 CD8+ 제제는 동일한 공여자와 같이 이를 필요로 하는 대상에게 정의된 비율(예를 들어, 1:1)로 투여된다.

[0335] **1. 유전자 조작을 위한 세포 및 세포 제조**

[0336] 일부 구현예에서, 제공된 방법, 용도, 제조 물품 또는 조성물과 관련하여 사용되는 T 세포와 같은 세포는 재조합 수용체, 예를 들어 본원에 기재된 CAR 또는 TCR을 발현하도록 유전자 조작된 세포이다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 세포 요법, 예를 들어 입양 세포 요법의 맥락에서 사용된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 면역 세포이다. 일부 예에서, 조작된 세포는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포와 같은 T 세포이다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 T 세포, 예를 들어 CD4+ 및 CD8+ T 세포이다.

[0337] 일부 구현예에서, 핵산, 예를 들어 재조합 수용체를 암호화하는 핵산은 이중 기원이다, 즉 예를 들어 조작된 세포 및/또는 상기 세포가 유래한 유기체에서 보통 발견되지 않는 다른 유기체 또는 세포로부터 획득된 것과 같이 세포 또는 세포로부터 획득된 샘플에는 정상적으로 존재하지 않는다. 일부 구현예에서, 핵산은 천연 발생이 아니고, 예를 들어 다수의 상이한 세포 유형으로부터 다양한 도메인을 암호화하는 핵산의 키메라 조합을 포함하는 것을 포함해, 자연계에서 발견되지 않는 핵산이다.

[0338] 세포는 일반적으로 포유류 세포와 같은 진핵 세포이며, 통상적으로 인간 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 혈액, 골수, 림프, 또는 림프성 기관으로부터 유래되며, 선천성 또는 적응성 면역 세포와 같은 면역 계통의 세포, 예를 들어 림프구, 통상적으로 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함한 골수성 또는 림프성 세포이다. 다른 예시적인 세포에는 유래된 다능성 줄기세포(induced pluripotent stem cell: iPSC)를 포함한, 다분화능 및 다능성 줄기세포와 같은 줄기세포가 포함된다. 세포는 통상적으로 대상체로부터 직접 단리되고/거나 대상체로부터 단리되고 동결된 세포와 같은 1차 세포이다. 일부 구현예에서, 세포에는 T 세포 또는 다른 세포 유형의 하나 이상의 서브 세트, 예를 들어 전체 T 세포의 집단, CD4+ 세포, CD8+ 세포 및 이의 하위 집단, 예를 들어 기능, 활성화 상태, 성숙도, 분화 가능성, 팽창, 재순환, 국소화 및/또는 지속성 투여량, 항원 특이성, 항원 수용체 유형, 특정 기관 또는 구획에의 존재, 마커 또는 사이토카인 분비 프로파일 및/또는 분화 정도에 의해 정의되는 것이 포함된다. 치료될 대상체와 관련하여, 세포는 동종이계 및/또는 자가일 수 있다. 일부 측면에서, 세포는 자가조직이다. 일부 측면에서, 세포는 동종이계이다. 상기 방법 중에는 기성 방법이 포함된다. 일부 측면에서, 예를 들어 기성 기술에 대해, 세포는 유래된 다능성 줄기세포(iPSC)와 같은 줄기세포 등과 같은 다능성 및/또는 다분화능이다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 대상체로부터 세포를 단리하고, 세포를 제조, 가공, 배양 및/또는 조작하고, 냉동 보존 전 또는 후에 동일한 대상체에 이 세포를 재도입하는 것을 포함한다.

[0339] T 세포 및/또는 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포의 서브타입 및 하위 집단 중에는 나이브 T(naive T, T_N) 세포, 효과기 T 세포(effector T cell, T_{EFF}), 기억 T 세포 및 이들의 하위-유형, 예를 들어 줄기세포 기억 T(stem cell memory T, T_{SCM}), 중앙 기억 T(central memory T, T_{CM}), 효과기 기억 T(effector memory T, T_{EM}) 또는 말단 분화된 효과기 기억 T 세포, 종양 침윤성 림프구(tumor-infiltrating lymphocytes, TIL), 미성숙 T 세포, 성숙 T 세포, 헬퍼 T 세포, 세포 독성 T 세포, 점막 연관 불변 T(mucosa-associated invariant T, MAIT) 세포, 천연 발생 및 적응성 조절 T(regulatory T, Treg) 세포, 헬퍼 T 세포, 예를 들어 TH1 세포, TH2 세포, TH3 세포, TH17 세포, TH9 세포, TH22 세포, 여포성 헬퍼 T 세포, 알파/베타 T 세포 및 델타/감마 T 세포가 있다.

[0340] 일부 구현예에서, 세포는 자연 살생(natural killer, NK) 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 단핵구 또는 과립구, 예를 들어 골수성 세포, 대식 세포, 호중구, 수지상 세포, 비만 세포, 호산구 및/또는 호염기구이다.

[0341] 일부 구현예에서, 세포는 유전자 조작을 통해 도입된 하나 이상의 핵산을 포함하고 이로써 상기 핵산의 재조합 또는 유전자 조작된 산물을 발현한다. 일부 구현예에서, 핵산은 이중 기원이다, 즉, 다른 유기체 또는 세포로부터 획득된 것과 같이 세포 또는 세포로부터 획득된 샘플에는 정상적으로 존재하지 않으며, 예를 들어 이는 조작되는 세포 및/또는 상기 세포가 유래한 유기체에서 보통 발견되지 않는다. 일부 구현예에서, 핵산은 천연 발생이 아니고, 예를 들어 다수의 상이한 세포 유형으로부터 다양한 도메인을 암호화하는 핵산의 키메라 조합을 포함하는 것을 포함해, 자연계에서 발견되지 않는 핵산이다.

[0342] 일부 구현예에서, 조작된 세포의 제조는 하나 이상의 배양 및/또는 제조 단계를 포함한다. CAR과 같은 트랜스제

닉 수용체를 암호화하는 핵산의 도입을 위한 세포는 예를 들어 생물학적 샘플, 예를 들어 대상체로부터 유래하거나 이로부터 수득된 샘플로부터 분리될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포가 분리된 대상체는 세포 요법이 투여되거나 세포 요법이 필요하거나 질환 또는 병태를 가진 대상체이다. 일부 구현예에서 대상체는 세포가 분리, 프로세싱 및/또는 조작되는 양자 세포 요법과 같은 특정 치료적 개입이 필요한 인간이다.

[0343] 따라서, 일부 구현예에서 세포는 1 차 세포, 예를 들어 1 차 인간 세포이다. 샘플은 하나 이상의 공정 단계, 예를 들어 선별, 원심분리, 유전적 조작(예를 들어 바이러스 벡터로 형질 도입), 세척 및/또는 인큐베이션으로부터 생성된 샘플뿐만 아니라 대상체로부터 직접 채취한 조직, 체액 및 기타 샘플을 포함한다. 생물학적 샘플은 생물학적 출처로부터 직접 수득된 샘플이거나 또는 프로세싱된 샘플일 수 있다. 생물학적 샘플은 체액, 예를 들어 혈액, 혈장, 혈청, 뇌척수액, 윤활액, 소변 및 땀, 이로부터 유래한 프로세싱된 샘플을 포함하여 조직 및 기관 샘플을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0344] 일부 측면에서, 세포가 유래되거나 단리된 샘플은 혈액 또는 혈액 유래 샘플이거나, 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 산물이거나 이로부터 유래된다. 예시적인 샘플에는 전혈, 말초 혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 백혈구, 골수, 흉선, 조직 생검, 종양, 백혈병, 림프종, 림프절, 장 관련 림프 조직, 점막 관련 림프 조직, 비장, 기타 림프 조직, 간, 폐, 위, 창자, 결장, 신장, 췌장, 유방, 뼈, 전립선, 자궁경부, 고환, 난소, 편도 또는 기타 장기 및/또는 이로부터 유래된 세포가 포함된다. 샘플에는 세포 요법, 예를 들어 입양 세포 요법의 맥락에서 자가 및 동종이계 소스로부터의 샘플이 포함된다.

[0345] 일부 구현예에서, 세포는 세포주, 예를 들어 T 세포주로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 세포는 이종성 소스, 예를 들어 마우스, 랫트, 비인간 영장류 및 돼지로부터 수득된다.

[0346] 일부 구현예에서, 세포의 단리는 하나 이상의 조제 및/또는 비친화도 기반 세포 분리 단계를 포함한다. 일부 실시예에서, 세포는 예를 들어 원치 않는 성분의 제거, 원하는 성분의 농축, 특정 시약에 민감한 세포를 용해하거나 제거하기 위해, 하나 이상의 시약의 존재 하에 세척, 원심분리 및/또는 인큐베이션된다. 일부 실시예에서, 세포는 하나 이상의 특성, 예를 들어 밀도, 부착 특성, 크기, 특정 성분에 대한 민감성 및/또는 내성에 기초하여 분리된다.

[0347] 일부 실시예에서, 대상체의 순환 혈액으로부터의 세포는 예를 들어 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술에 의해 수득된다. 일부 측면에서, 샘플은 T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포, 기타 유핵 백혈구, 적혈구 및/또는 혈소판을 포함한 림프구를 함유하고, 일부 측면에서 적혈구 및 혈소판 이외의 세포를 함유한다.

[0348] 일부 구현예에서, 대상체로부터 수집된 혈액 세포는, 예를 들어 혈장 분획을 제거하고 후속 가공 단계를 위한 적절한 완충제 또는 배지에 세포를 배치하기 위해 세척한다. 일부 구현예에서, 세포는 인산 완충 식염수(phosphate buffered saline, PBS)로 세척된다. 일부 구현예에서, 세척 용액에는 칼슘 및/또는 마그네슘 및/또는 많은 또는 모든 2가 양이온이 결여되어 있다. 일부 측면에서, 세척 단계는 제조업체의 지침에 따라 반자동 "플로우-쓰루(flow-through)" 원심 분리기(예를 들어 Cobe 2991 세포 프로세서, Baxter)로 달성된다. 일부 측면에서, 세척 단계는 제조업체의 지침에 따라 접선 유동 여과(tangential flow filtration, TFF)에 의해 달성된다. 일부 구현예에서, 세포는 세척 후 다양한 생체 적합성 완충제, 예를 들어 Ca^{++}/Mg^{++} 이 없는 PBS에 재현탁된다. 특정 구현예에서, 혈액 세포 샘플의 성분이 제거되고 이 세포는 배양 배지에서 직접 재현탁된다.

[0349] 일부 구현예에서, 상기 방법들은 밀도-기반 세포 분리 방법들, 예를 들어 적혈구들(red blood cells)을 용해시켜(lysing) 말초 혈액(peripheral blood)으로부터 백혈구들(white blood cells)을 제조하고, Percoll® 또는 Ficoll® 구배를 통한 원심 분리를 포함한다.

[0350] 일부 구현예에서, 선택 단계의 적어도 일부는, 선택 시약과 함께 세포를 인큐베이션하는 것을 포함한다. 예를 들어 선택 방법의 일부로서, 선택 시약 또는 시약과의 인큐베이션은 하나 이상의 특정 분자, 예를 들어 표면 단백질, 세포내 마커 또는 핵산과 같은 표면 마커의 표현 또는 존재에 기초한, 하나 이상의 상이한 세포 유형의 선택을 위해 하나 이상의 선택 시약을 사용하여 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 선택 시약 또는 시약을 사용하는 임의의 공지된 방법이 이러한 마커에 기초한 분리를 위해 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 선택 시약 또는 시약들은 친화성 또는 면역 친화성-기반 분리인 분리를 초래한다. 예를 들어 상기 선택은 일부 측면에서, 하나 이상의 마커, 전형적으로 세포 표면 마커, 예를 들어 항체 또는 이러한 마커에 특이적으로 결합하는 결합 파트너와의 인큐베이션에 의한 세포의 발현 또는 발현 수준에 기초하여 세포 및 세포 집단의 분리를 위한 시약 또는 시약과의 인큐베이션을 포함하고, 이어서 일반적으로 항체 또는 결합 파트너에 결합하지 않은 세포로부터 항체 또는 결합 파트너에 결합된 세포의 세척 단계 및 분리가 이어진다.

- [0351] 이러한 공정의 일부 측면에서, 다량의 세포를 원하는 양의 친화성-기반 선택 시약과 혼합한다. 면역 친화성-기반 선택은 분리되는 세포와 세포상의 마커에 특이적으로 결합하는 분자, 예를 들어 항체 또는 고체 표면의 다른 결합 파트너, 예를 들어 입자, 사이에 유리한 에너지 상호 작용을 야기하는 임의의 시스템 또는 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 방법은 비드, 예를 들어 세포의 마커에 특이적인 선택 작용제(예를 들어 항체)로 코팅된 자기 비드와 같은 입자를 사용하여 수행된다. 상기 입자(예를 들어 비드)는 에너지가 요구되는 상호작용의 촉진을 돕기 위해 일정한 세포 밀도 대 입자(예를 들어 비드)비로 흔들거나 혼합하면서 튜브 또는 백과 같은 용기에서 세포와 인큐베이션 또는 혼합될 수 있다. 다른 경우에, 상기 방법은 선택의 전부 또는 일부가 원심 챔버의 내부 공동(cavity)에서, 예를 들어 원심 회전 하에, 수행되는 세포의 선택을 포함한다. 일부 구현예에서, 면역 친화성-기반 선택 시약과 같은 선택 시약과 함께하는 세포의 인큐베이션은 원심 챔버에서 수행된다. 특정 구현예에서, 분리(isolation, separation)는 국제 특허 출원, 공개 번호 W02009/072003 또는 US20110003380 A1에 기재된 시스템, 장비(device) 또는 장치(apparatus)를 사용하여 수행된다. 일 구현예에서, 상기 시스템은 국제 공개 번호 W02016/073602에 기술된 시스템이다.
- [0352] 일부 구현예에서, 상기 선택 단계 또는 이의 일부(예를 들어 항체 코팅된 입자, 예를 들어 자성 비드와의 인큐베이션)를 원심분리 챔버의 공동에서 수행함으로써, 사용자는 다양한 용액의 부피, 가공 중 용액의 첨가 및 이의 타이밍과 같은 특정 매개변수를 제어할 수 있으며, 이는 다른 이용 가능한 방법에 비해 이점을 제공할 수 있다. 예를 들어 인큐베이션 중 공동의 액체 부피를 감소시키는 능력은 선택에 사용되는 입자(예를 들어 비드 시약)의 농도를 증가시킬 수 있어서 공동 내 세포의 총 수에는 영향을 주지 않고 용액의 화학적 전위를 증가시킬 수 있다. 이는 결국 가공되는 세포와 선택에 사용되는 입자 사이의 쌍 방향 상호작용을 증진할 수 있다. 일부 구현예에서, 예를 들어 본원에 기술된 바와 같은 시스템, 회로 및 제어와 연관된 경우, 챔버에서의 인큐베이션 단계 수행은 사용자가 인큐베이션 중에 원하는 시간에 용액의 교반에 영향을 미칠 수 있게 하고, 이는 또한 상호작용을 향상시킬 수 있다.
- [0353] 일부 구현예에서, 선택 단계의 적어도 일부는 원심분리 챔버에서 수행되고, 이는 선택 시약과 세포의 인큐베이션을 포함한다. 상기 공정의 일부 측면에서, 일정 부피의 세포를 제조 업체의 지침에 따라 동일한 수의 세포 및/또는 동일한 부피의 세포의 선택을 위해 튜브 또는 용기에서 유사한 선택을 수행할 때 일반적으로 사용되는 것보다 훨씬 적은 원하는 친화도 기반 선택 시약의 양과 혼합한다. 일부 구현예에서, 제조사의 지침에 따라 동일한 수의 세포 및/또는 동일한 부피의 세포에 대해 튜브 또는 용기 기반 인큐베이션에서 세포의 선택을 위해 사용되는 동일한 선택 시약(들)의 양의 5% 이내, 10% 이내, 15% 이내, 20% 이내, 25% 이내, 50% 이내, 60% 이내, 70% 이내 또는 80% 이내 양의 선택 시약 또는 시약들의 양이 사용된다.
- [0354] 일부 구현예에서, 세포의 선택, 예를 들어 면역 친화도 기반 선택을 위해, 세포는 선택 시약, 예를 들어 농축 및/또는 고갈이 바람직한 세포 상에는 있으나 임의적으로 지지체(scaffold) 예를 들어 중합체 또는 표면, 예를 들어 비드, 예를 들어 자성 비드, 예를 들어 CD4 및 CD8에 대해 특이적인 모노클로날 항체에 결합된 자성 비드에 결합된 항체와 같은 조성물 중의 다른 세포 상에는 없는 표면 마커에 특이적으로 결합하는 분자와 같은 선택 시약을 갖는 선택 완충제를 또한 함유하는 챔버의 공동 내 조성물에서 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 기술된 바와 같이, 선택이 흔들거나 회전하는 튜브에서 수행될 경우 같은 수의 세포 또는 같은 부피의 세포와 대략 동일하거나 유사한 선택 효율을 달성하기 위해 전형적으로 사용되거나 필요한 선택 시약의 양과 비교하여 실질적으로 보다 적은 양(예를 들어 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 또는 80% 이내의 양)으로 챔버의 공동에 있는 세포에 선택 시약을 첨가한다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 예를 들어 10 mL 내지 200 mL, 예를 들어 적어도 또는 적어도 약 10 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL, 60 mL, 70 mL, 80 mL, 90 mL, 100 mL, 150 mL 또는 200 mL의 시약의 인큐베이션을 갖는 표적 부피를 달성하기 위해 선택 완충제에 세포 및 선택 시약의 첨가로 수행된다. 일부 구현예에서, 선택 완충제 및 선택 시약은 세포에 첨가되기 전에 미리 혼합된다. 일부 구현예에서, 선택 완충제 및 선택 시약은 세포에 별도로 첨가된다. 일부 구현예에서, 선택 인큐베이션은 주기적으로 부드럽게 혼합하는 조건으로 수행되며, 이는 양호한 상호작용을 활발하게 촉진하는 데 도움이 될 수 있으며, 이로써 높은 선택 효율을 달성하면서 전반적으로 선택 시약을 보다 적게 사용하는 것이 가능할 수 있다.
- [0355] 일부 구현예에서, 선택 시약을 가진 인큐베이션의 총 지속 기간은 (약) 30분 내지 3시간, 예를 들어 적어도 또는 적어도 약 30분, 60분, 120분 또는 180분과 같이 약 5분 내지 6시간이다.
- [0356] 일부 구현예에서, 인큐베이션은 일반적으로 스피닝(spinning)이 존재하는 것과 같은 혼합 조건 하에서 수행되며, 일반적으로 이는 상대적으로 낮은 힘 또는 속도, 예를 들어 세포를 펠릿화하기 위해 사용되는 것보다 더 낮은 속도, 예를 들어 (약) 600rpm 내지 (약) 1700rpm(예를 들어 (약) 600rpm, 1000rpm 또는 1500rpm 또는 1700rpm 또는 600rpm, 1000rpm 또는 1500rpm 또는 1700rpm 이상)에서, 예를 들어 (약) 80g 내지 100g(예를 들어

어 (약) 80g, 85g, 90g, 95g 또는 100g 또는 80g, 85g, 90g, 95g 또는 100g 이상)의 챔버 또는 다른 용기의 벽 또는 샘플에서 RCF로 수행된다. 일부 구현예에서, 스핀은 상기와 같은 낮은 속도의 스핀과 이어지는 휴지 기간 (rest period), 예를 들어 스핀 및/또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10초 동안의 휴지, 예를 들어 대략 1 또는 2초의 스핀과 이어지는 대략 5, 6, 7 또는 8초 동안의 휴지의 구간을 반복하여 수행된다.

[0357] 일부 구현예에서, 상기 공정은 챔버와 일체형인 완전히 폐쇄된 시스템 내에서 수행된다. 일부 구현예에서, 본 공정(및 일부 측면에서 또한 하나 이상의 추가 단계, 예를 들어 성분채집술 샘플과 같은 세포를 함유하는 샘플을 세척하는 사전 세척 단계)은 자동화된 방식으로 수행되어, 자동화 프로그램을 이용하여 단일 폐쇄 시스템에서 세척 및 결합 단계를 완료하기 위해 세포, 시약 및 기타 성분이 적절한 시간 및 달성된 원심분리에서 챔버로 유입되고 챔버 밖으로 밀어내어진다.

[0358] 일부 구현예에서, 세포 및 선택 시약 및/또는 시약들의 인큐베이션 및/또는 혼합 후, 인큐베이션된 세포는 특정 시약 또는 시약들의 존재 또는 부재에 기초하여 세포 선택을 위한 분리를 거친다. 일부 구현예에서, 분리는 선택 시약과 세포의 인큐베이션이 수행되었던 동일한 폐쇄 시스템에서 수행된다. 일부 구현예에서, 선택 시약과 함께 인큐베이션 후, 선택 시약이 결합된 세포를 포함하는 인큐베이션된 세포는 세포의 면역 친화도 기반 분리를 위한 시스템으로 전달된다. 일부 구현예에서, 면역 친화도 기반 분리를 위한 시스템은 자성 분리 칼럼이거나 이를 함유한다.

[0359] 일부 구현예에서, 단리 방법은 표면 마커, 예를 들어 표면 단백질, 세포내 마커 또는 핵산과 같은 하나 이상의 특정 분자의 세포에서의 발현 또는 존재에 기초한 상이한 세포 유형의 분리를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 마커에 기초한 분리를 위한 임의의 공지된 방법이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 분리는 친화도- 또는 면역 친화도-기반 분리이다. 예를 들어 일부 측면에서 단리에는 하나 이상의 마커, 통상적으로 세포 표면 마커의 세포 발현 또는 발현 수준에 기초하여, 예를 들어 상기 마커에 특이적으로 결합하는 항체 또는 결합 파트너와의 인큐베이션 후 일반적으로 세척 단계 및 항체 또는 결합 파트너와 결합하지 않은 세포로부터 항체 또는 결합 파트너와 결합한 세포의 분리에 의한 세포 및 세포의 집단의 분리가 포함된다.

[0360] 상기 분리 단계는 시약에 결합된 세포가 추가 사용을 위해 유지되는 양성 선택 및/또는 항체 또는 결합 파트너에 결합하지 않은 세포가 유지되는 음성 선택에 기초할 수 있다. 일부 실시예에서, 두 분획 모두 추가 사용을 위해 유지된다. 일부 측면에서, 음성 선택은 이중 집단에서 세포 유형을 특이적으로 식별하는 항체가 이용 가능하지 않은 경우에 특히 유용할 수 있어서, 분리는 원하는 집단 이외의 세포에 의해 발현된 마커에 기초하여 가장 잘 수행된다.

[0361] 분리는 특정 마커를 발현하는 특정 세포의 집단 또는 세포의 100% 농축 또는 제거로 귀결될 필요는 없다. 예를 들어 마커를 발현하는 것과 같은 특정 유형의 세포에 대한 양성 선택 또는 농축은 상기 세포의 수 또는 백분율을 증가시키는 것을 지칭하나, 상기 마커를 발현하지 않는 세포의 완전한 부재로 귀결될 필요는 없다. 마찬가지로, 마커를 발현하는 것과 같은 특정 유형의 세포의 음성 선택, 제거 또는 고갈은 상기 세포의 수 또는 백분율을 감소시키는 것을 지칭하나, 상기 모든 세포의 완전한 제거로 귀결될 필요는 없다.

[0362] 일부 예에서, 다수 라운드의 분리 단계가 수행되고, 여기서 한 단계에서 양성 또는 음성 선택된 분획은 후속 양성 또는 음성 선택과 같은 또 다른 분리 단계를 거친다. 일부 예에서, 단일 분리 단계는 예를 들어 각각 음성 선택을 위해 표적화된 마커에 대해 특이적인 다수의 항체 또는 결합 파트너와 세포를 인큐베이션함으로써 동시에 다수의 마커를 발현하는 세포를 고갈시킬 수 있다. 마찬가지로, 다수의 세포 유형이 다양한 세포 유형에서 발현되는 복수의 항체 또는 결합 파트너와 세포를 인큐베이션함으로써 동시에 양성 선택될 수 있다.

[0363] 예를 들어 일부 측면에서, 예를 들어 하나 이상의 표면 마커를 높은 수준으로 발현하거나 양성인 세포와 같은 T 세포, 예를 들어 CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ 및/또는 CD45RO+ T 세포의 특정 하위 집단은 양성 또는 음성 선택 기술에 의해 단리된다.

[0364] 예를 들어 CD3+, CD28+ T 세포는 항-CD3/항-CD28 접합 자성 비드(예를 들어 DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T Cell Expander)를 사용하여 양성 선택될 수 있다.

[0365] 일부 구현예에서, 단리는 양성 선택에 의한 특정 세포의 집단에 대한 농축 또는 음성 선택에 의한 특정 세포의 집단의 고갈에 의해 수행된다. 일부 구현예에서, 양성 또는 음성 선택은 각각 양성 또는 음성 선택된 세포 상에서 발현(마커+)되거나 상대적으로 보다 높은 수준으로 발현(마커high)된 하나 이상의 표면 마커에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체 또는 다른 결합제와 세포를 인큐베이션함으로써 달성된다.

[0366] 특정 구현예에서, 생물학적 샘플, 예를 들어 PBMC 샘플 또는 다른 백혈구 샘플은 음성 및 양성 분획이 모두 유

지되는 CD4⁺ T 세포의 선택의 대상이된다. 특정 구현예에서, CD8⁺ T 세포는 음성 분획으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 생물학적 샘플은 음성 및 양성 분획이 모두 유지되는 CD8⁺ T 세포의 선택의 대상이 된다. 특정 구현예에서, CD4⁺ T 세포는 음성 분획으로부터 선택된다.

[0367] 일부 구현예에서, T 세포는 B 세포, 단핵구 또는 다른 백혈구, 예를 들어 CD14와 같은 비-T 세포 상에서 발견되는 마커의 음성 선택에 의해 PBMC 샘플로부터 분리된다. 일부 측면에서, CD4⁺ 또는 CD8⁺ 선택 단계는 CD4⁺ 헬퍼 및 CD8⁺ 세포 독성 T 세포를 분리하는 데 사용된다. 상기 CD4⁺ 및 CD8⁺ 집단은, 하나 이상의 나이브(naive), 기억 및/또는 효과기(effector) T 세포 하위 집단 상에서 발견되거나 상대적으로 보다 높은 정도로 발견되는 마커에 대한 양성 또는 음성 선택에 의해 하위 집단으로 추가 분류될 수 있다.

[0368] 일부 구현예에서, CD8⁺ 세포는 예를 들어 각각의 하위 집단과 관련된 표면 항원에 기초한 양성 또는 음성 선택에 의해 나이브, 중앙 기억, 효과기 기억 및/또는 중앙 기억 줄기세포에 대해 추가로 농축되거나 고갈된다. 일부 구현예에서, 중앙 기억 T(T_{CM}) 세포의 농축은 효능을 증가시키기 위해, 예를 들어 투여 후의 장기간 생존, 팽창 및/또는 생착을 향상하기 위해 수행되며, 이는 일부 측면에서 상기 하위 집단에서 특히 견고하다. 문헌 [Terakura 등 (2012) Blood.1:72-82; Wang 등 (2012) 35(9):689-701]을 참조한다. 일부 구현예에서, TCM-농축 CD8⁺ T 세포 및 CD4⁺ T 세포의 조합은 효능을 더욱 증진시킨다.

[0369] 일부 구현예에서, 기억 T 세포들은 CD8⁺ 말초 혈액 림프구들의 CD62L⁺ 및 CD62L⁻ 서브셋 둘 다에 존재한다. PBMC는, 예를 들어 항-CD8 및 항-CD62L 항체들을 사용하는 것과 같이 CD62L⁻CD8⁺ 및/또는 CD62L⁺CD8⁺ 분획들로 농축되거나 고갈될 수 있다.

[0370] 일부 구현예에서, 중앙 기억 T (T_{CM}) 세포의 상기 농축은 CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 및/또는 CD127의 양성 또는 높은 표면 발현에 기초하고; 일부 측면에서, CD45RA 및/또는 그랜자임(granzyme) B를 발현 또는 높이 발현하는 세포들에 대한 음성 선택에 기초한다. 일부 측면에서, TCM 세포들에 대해 농축된 CD8⁺ 집단의 격리는 CD4, CD14, CD45RA를 발현하는 세포들의 고갈 및 CD62L을 발현하는 세포들에 대한 양성 선택 또는 농축에 의해 수행된다. 일부 측면에서, 중앙 기억 T (T_{CM}) 세포들에 대한 농축은 CD4 발현에 기초하여 선택된 세포들의 음성 분획으로 시작하여 수행되며, CD14 및 CD45RA의 발현에 기초한 음성 선택 및 CD62L에 기초한 양성 선택이 수행된다. 일부 측면에서, 이러한 선택들은 동시에 수행되고 다른 측면에서는 순서대로 순차적으로 수행된다. 일부 측면에서, 상기 CD8⁺ 세포 집단 또는 부분 모집단을 제조하는데 사용된 동일한 CD4 발현-기반 선택 단계는 또한 상기 CD4⁺ 세포 집단 또는 부분 모집단을 생성하는데 사용되며, 상기 CD4 기반 분리로부터의 상기 양성 및 음성 분획들이 하나 이상의 추가적인 양성 또는 음성 선택 단계들 선택적으로 따르는 상기 방법들의 후속 단계들에서 유지되고 사용된다.

[0371] 특정 구현예에서, PBMC 샘플 또는 다른 백혈구 샘플은 CD4⁺ 세포의 선택에 적용되며, 여기서 음성 및 양성 분획 모두가 유지된다. 그런 다음, 음성 분획은, CD14 및 CD45RA 또는 CD19의 발현에 기초하여 음성 선택, CD62L 또는 CCR7과 같은 중앙 기억 T 세포의 마커 특성에 기초하여 양성 선택이 적용되고, 여기서 양성 및 음성 선택은 임의의 순서로 수행된다.

[0372] CD4⁺ T 헬퍼(helper) 세포는 세포 표면 항원을 갖는 세포 집단을 식별함으로써 나이브(naive), 중앙 기억 및 이펙터(effector) 세포로 분류된다. CD4⁺ 림프구는 표준 방법으로 얻을 수 있다. 일부 구현예에서, 나이브(naive) CD4⁺ T 림프구는 CD45RO⁻, CD45RA⁺, CD62L⁺ 또는 CD4⁺ T 세포이다. 일부 구현예에서, 중앙 기억 CD4⁺ 세포는 CD62L⁺ 및 CD45RO⁺이다. 일부 구현예에서, 이펙터(effector) CD4⁺ 세포는 CD62L⁻ 및 CD45RO⁻이다.

[0373] 일례로, 음성 선택에 의해 CD4⁺ 세포들을 농축하기 위해, 모노클로날 항체 칵테일(monoclonal antibody cocktail)은 전형적으로 CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR 및 CD8에 대한 항체들을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 항체 또는 결합 파트너는 자성 비드(magnetic bead) 또는 상자성 비드(paramagnetic bead)와 같은 고체 지지체(solid support) 또는 매트릭스(matrix)에 결합되어 양성 및/또는 음성 선택을 위해 세포들을 분리할 수 있다. 예를 들어 일부 실시 예에서, 상기 세포들 및 세포 집단들은 문헌[Methods in Molecular Medicine, vol. 58: Metastasis Research Protocols, Vol. 2: Cell Behavior In Vitro and In Vivo, p 17-25 Edited by: S.A. Brooks and U. Schumacher © Humana Press Inc., Totowa, NJ]에서 검토된 면역 자성

(immunomagnetic)(또는 친화성) 분리 기술들을 사용하여 분리 또는 격리된다.

- [0374] 일부 측면에서, 분리될 세포들의 샘플 또는 조성물은 자기 반응성 입자들 또는 상자성 비드들과 같은 미세 입자들과 같이 작고(small), 자화 가능하거나(magnetizable) 또는 자기 반응성 재료(magnetically responsive material)로 인큐베이션된다(가령, Dynalbeads® 또는 MACS® 비드들). 상기 자기 반응성 재료 가령, 입자는 예를 들어 음성으로 또는 양성으로 선택되는 것이 바람직하여 분리하고자 하는 상기 세포, 세포들 또는 세포 집단에 존재하는 분자 가령, 표면 마커에 특이적으로 결합하는 결합 파트너(binding partner) 가령, 항체에 일반적으로 직접 또는 간접적으로 부착된다.
- [0375] 일부 구현예에서, 상기 자성 입자 또는 비드는 항체 또는 다른 결합 파트너와 같은 특정 결합 부위에 결합된 자기 반응성 재료를 포함한다. 자기 분리 방법들(magnetic separation methods)에 사용하기 위해 많이 공지된 자기 반응성 재료들이 공지되어 있다. 적당한 샘플은 문헌[Molday, USP 4,452,773 및 유럽 특허 명세서 EP 452342 B]에 기재된 재료들을 포함하며, 이는 본원에 참조로 포함된다. 문헌[Owen의 USP 4,795,698, 및 Liberti 외의 USP 5,200,084]에 기재된 콜로이드 크기의 입자들(colloidal sized particles)이 다른 예들이다.
- [0376] 일반적으로, 상기 인큐베이션은 상기 항체들 또는 결합 파트너들, 또는 2차 항체들 또는 다른 시약들과 같은 분자들에 의해 수행되는데, 이러한 분자들은 자기 입자 또는 비드에 부착된 항체들 또는 결합 파트너들에 특이적으로 결합하며, 상기 샘플 내의 세포들 상에 존재하는 경우 세포 표면 분자들에 특이적으로 결합한다.
- [0377] 일부 측면에서, 샘플은 자기장에 놓이며, 자기적으로 반응하는 또는 자화 가능한 입자가 부착된 세포는 자석에 끌려가서 표지가 없는(unlabeled) 세포로부터 분리될 것이다. 긍정적인 선택의 경우, 자석에 끌리는 세포는 유지된다; 음성 선택의 경우 끌리지 않는 세포(표지가 없는 세포)은 유지된다. 일부 구현예에서, 양성 및 음성 선별의 조합은 양성 및 음성 분획이 보유하고 추가 처리되거나 추가 분리 단계에 종속되는 동일한 선별 단계에서 수행된다.
- [0378] 특정 구현예에서, 상기 자기 반응성 입자들은 1차 항체들 또는 다른 결합 파트너들, 2차 항체들, 렉틴들(lectins), 효소들(enzymes) 또는 스트렙타아비딘(streptavidin)으로 코팅된다. 특정 구현예에서, 상기 자성 입자들은 하나 이상의 마커들에 특이적인 1차 항체들의 코팅을 통해 세포에 부착된다. 특정 구현예에서, 상기 비드들이 아닌 상기 세포들은 1차 항체 또는 결합 파트너로 표시되고, 이어서 세포-유형 특이적 2차 항체- 또는 다른 결합 파트너(예를 들어 스트렙타아비딘)-코팅된 자성 입자들이 첨가된다. 특정 구현예에서, 스트렙타아비딘-코팅된 자성 입자들은 비오틴화된(biotinylated) 1차 또는 2차 항체들과 함께 사용된다.
- [0379] 일부 구현예에서, 자기 반응성 입자는 후속 배양, 배양 및/또는 조작되는 세포에 부착된 채로 남게 된다; 일부 구현예에서 입자는 환자에게 투여하기 위해 세포에 부착된 채로 남는다. 일부 구현예에서, 자화가능하거나 또는 자기 반응성 입자는 세포로부터 제거된다. 세포로부터 자화 가능한 입자를 제거하는 방법은 공지되어 있으며, 예를 들어 경쟁하는 비 표지된 항체 및 자화 가능한 입자 톤 절단 가능한 리어에 결합된 항체를 포함한다. 일부 구현예에서, 자화 가능한 입자는 생분해성이다.
- [0380] 일부 구현예에서, 친화성-기반 선택은 자기 활성화 세포 선별(Magnetic Activated Cell Sorting)(MACS®)(Miltenyi Biotec, Auburn, CA)을 통해 이루어진다. 자기 활성화 세포 선별(MACS®) 시스템들은 자화된 입자들이 부착된 세포들을 고순도로 선택할 수 있다. 특정 구현예에서, MACS®는 상기 외부 자기장의 적용 후에 상기 비-표적 및 표적 종들이 순차적으로 용출되는(eluted) 모드에서 작동한다. 즉, 자화 입자들에 부착된 상기 세포들은 상기 부착되지 않은 종들이 용출되는 동안 제자리에 유지된다. 그런 다음이 제 1용출 단계가 완료된 후, 상기 자기장에 갇히고 용출되는 것이 방지된 상기 종들은 용출 및 회수될 수 있도록 어떤 방식으로든 자유로워진다. 특정 구현예에서, 비-표적 세포는 상기 이질적인 세포 집단으로부터 표지되고(labelled), 고갈된다(depleted).
- [0381] 특정 구현예에서, 단리 또는 분리는 상기 방법의 단리, 세포 제조, 분리, 프로세싱, 인큐베이션, 배양 및/또는 제형화 단계 중 하나 이상을 수행하는 시스템, 장치 또는 장치를 이용하여 수행된다. 일부 측면에서, 시스템은 예를 들어 오류, 사용자 취급 및/또는 오염을 최소화하기 위해 폐쇄 또는 멸균 환경에서 상기 단계 각각을 수행하는데 사용된다. 하나의 실시예에서, 상기 시스템은 문헌[국제 특허 출원, 공개 번호 W02009/072003 또는 미국 특허 출원 20110003380 A1]에 기재된 바와 같은 시스템이다.
- [0382] 일부 구현예에서, 시스템 또는 장치는 자동화된 또는 프로그래밍 가능한 방식으로, 하나 이상의, 예를 들어 모든 분리, 처리, 엔지니어링 및 제형 단계를 수행한다. 일부 측면에서, 시스템 또는 장치는 사용자가 처리, 격리, 엔지니어링 및 제형 단계의 결과를 프로그램, 제어, 평가 및/또는 조정할 수 있게 하는 시스템 및/또는

장치와 통신하는 컴퓨터 및/또는 컴퓨터 프로그램을 포함한다.

- [0383] 일부 측면에서, 분리 및/또는 기타 단계는 예를 들어 폐쇄 및 멸균 시스템에서 임상 규모 수준에서 세포의 자동 분리를 위해 CliniMACS® 시스템(Miltenyi Biotec)을 사용하여 수행된다. 구성 요소에는 통합 마이크로 컴퓨터, 자기 분리 유닛, 연동 펌프 및 다양한 핀치 밸브가 포함될 수 있다. 일부 측면에서 통합 컴퓨터는 기기의 모든 구성 요소를 제어하고 시스템이 표준화된 순서로 반복되는 절차를 수행하도록 지시한다. 일부 측면에서 자기 분리 유닛은 이동 가능한 영구 자석 및 선택 칼럼을 위한 홀더를 포함한다. 연동 펌프는 배관 세트 전체의 유량을 제어하고 핀치 밸브와 함께 시스템을 통한 완충액의 제어된 흐름과 세포의 지속적인 현탁을 보장한다.
- [0384] 일부 측면에서 CliniMACS® 시스템은 멸균 비 발열성 용액으로 공급되는 항체 결합 자화성 입자를 사용한다. 일부 구현예에서, 자성 입자로 세포를 표지한 후 세포를 세척하여 과량의 입자를 제거한다. 이어서, 세포 제조 백을 튜브 세트에 연결하고, 이어서 완충액을 함유하는 백 및 세포 수집 백에 연결한다. 튜브 세트는 사전 칼럼 및 분리 칼럼을 포함하여 사전 조립된 멸균 튜브로 구성되며 일회용이다. 분리 프로그램이 시작된 후, 시스템은 세포 샘플을 분리 칼럼에 자동으로 적용한다. 표지된 세포는 칼럼 내에 보유되고, 표지되지 않은 세포는 일련의 세척 단계에 의해 제거된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 방법과 함께 사용하기 위한 세포 집단은 표지되지 않고 칼럼에 보유되지 않는다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 방법과 함께 사용하기 위한 세포 집단은 표지되고 칼럼에 보유된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 방법과 함께 사용하기 위한 세포 집단은 자기장 제거 후 칼럼으로부터 용리되고, 세포 수집 백 내에 수집된다.
- [0385] 특정 구현예에서, 분리 및/또는 기타 단계는 CliniMACS Prodigy® 시스템(Miltenyi Biotec)을 사용하여 수행된다. 일부 측면에서 상기 CliniMACS Prodigy® 시스템은 원심 분리에 의해 세포의 자동 세척 및 분획을 가능하게 하는 세포 프로세싱 유닛을 갖추고있다. CliniMACS Prodigy® 시스템은 출처 세포 산물의 거시적 층을 식별하여 최적의 세포 분획 중점을 결정하는 온보드 카메라 및 이미지 인식 소프트웨어도 포함할 수 있다. 예를 들어 말초 혈액은 적혈구, 백혈구 및 혈장 층으로 자동 분리된다. 상기 CliniMACS Prodigy 시스템은 또한 예를 들어 세포 분화 및 증폭, 항원 로딩 및 장기 세포 배양과 같은 세포 배양 프로토콜을 달성하는 통합 세포 배양 챔버를 포함할 수 있다. 입력 포트는 배지의 멸균 제거 및 보충을 가능하게 할 수 있고 통합된 현미경을 사용하여 세포를 모니터링 할 수 있다. 예를 들어 문헌[Klebanoff 외 (2012) *J Immunother.* 35(9): 651-660, Terakura 외 (2012) *Blood*. 1:72-82 및 Wang 외 (2012) *J Immunother.* 35(9):689-701] 참조.
- [0386] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 세포 집단은 유동 세포 측정법을 통해 수집 및 농축(또는 고갈)되는데, 여기서 다중 세포 표면 마커에 대해 염색된 세포는 유체 흐름으로 운반된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 세포 집단은 분취 규모(FACS) 분류를 통해 수집 및 농축(또는 고갈)된다. 특정 구현예에서, 본원에 기재된 세포 집단은 FACS 기반 검출 시스템과 조합된 MEMS(microelectromechanical systems) 칩을 사용하여 수집 및 농축(또는 고갈)된다(예를 들어 문헌[WO 2010/033140, Cho 외 (2010) *Lab Chip* 10, 1567-1573; 및 Godin 외 (2008) *J Biophoton.* 1(5):355-376] 참조.) 두 경우 모두, 세포는 다수의 마커로 표지될 수 있어서, 고순도로 잘 정의된 T 세포 서브세트를 분리할 수 있다.
- [0387] 일부 구현예에서, 항체 또는 결합 파트너는 양성 및/또는 음성 선택을 위한 분리를 용이하게 하기 위해 하나 이상의 검출 가능한 마커로 표지된다. 예를 들어 분리는 형광 표지된 항체에 대한 결합에 기초할 수 있다. 일부 실시예에서, 하나 이상의 세포 표면 마커에 특이적인 항체 또는 다른 결합 파트너의 결합에 기초한 세포의 분리는 분취 규모(FACS) 및/또는 MEMS 칩, 예를 들어 유동 세포 분석 검출 시스템과의 조합을 포함하는 형광-활성화 세포 분류(FACS)와 같은 유체 흐름에서 수행된다. 상기 방법은 다수의 마커에 기초하여 양성 및 음성 선택을 동시에 가능하게 한다.
- [0388] 일부 구현예에서, 제조 방법은 단리, 인큐베이션 및/또는 조작 전이든 후이든 세포를 동결하는 단계, 예를 들어 냉동 보존하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 동결 및 후속 해동 단계는 세포의 집단에서 과립구 및 어느 정도 단핵구를 제거한다. 일부 구현예에서, 세포는 예를 들어 혈장 및 혈소판을 제거하기 위한 세척 단계 이후에 동결 용액에서 현탁된다. 일부 측면에서, 공지된 임의의 다양한 동결 용액 및 매개변수가 사용될 수 있다. 일 예는 20% DMSO 및 8% 인간 혈청 알부민(HSA)을 함유하는 PBS 또는 다른 적합한 세포 동결 배지를 사용하는 것을 포함한다. 이어서, 상기를 DMSO 및 HSA의 최종 농도가 각각 10% 및 4%가 되도록 배지로 1:1로 희석시킨다. 일부 구현예에서, 세포 조성물은 약 5%, 6%, 7%, 7.5%, 8%, 9% 또는 10% 디메틸설폭사이드, 또는 약 7.5% DMSO에서 상기 중의 어느 것으로 정의된 범위로 함유하는 제형으로 저장된다. 일부 측면에서, 조성물은 약 0.5%, 1%, 2% 또는 2.5%(v/v)의 25% 인간 알부민, 또는 예를 들어 또는 약 1%(v/v) 25% 인간 알부민에서 상기 중의 어느 것으로 정의된 범위로 함유하는 제형으로 저장된다. 그런 다음 세포는 일반적으로 분당 1°의 속도로 -80

℃로 동결되고 액체 질소 저장 탱크의 기상(vapor phase)에서 저장한다.

- [0389] 일부 구현예에서, 분리 및/또는 선택은 농축된 T 세포, 예를 들어 CD3+ T 세포, CD4+ T 세포 및/또는 CD8+ T 세포의 하나 이상의 입력 조성물을 생성한다. 일부 구현예에서, 둘 이상의 분리된 입력 조성물은 단 하나의 생물학적 샘플로부터 분리, 선택, 농축 또는 수득된다. 일부 구현예에서, 별도의 입력 조성물은 동일한 개체로부터 수집, 채취 및/또는 수득된 별도의 생물학적 샘플로부터 분리, 선택, 농축 및/또는 수득된다.
- [0390] 특정 구현예에서, 하나 이상의 입력 조성물은 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 적어도 99.9%, 또는 100% 또는 약 100%의 CD3+ T 세포를 포함하는 농축된 T 세포의 조성물이거나 이를 포함한다. 특정 구현예에서, 농축된 T 세포의 입력 조성물은 필수적으로 CD3+ T 세포로 구성된다.
- [0391] 특정 구현예에서, 하나 이상의 입력 조성물은 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 적어도 99.9%, 또는 100% 또는 약 100%의 CD4+ T 세포를 포함하는 농축된 CD4+ T 세포의 조성물이거나, 이를 포함한다. 특정 구현예에서, CD4+ T 세포의 입력 조성물은 40% 미만, 35% 미만, 30% 미만, 25% 미만, 20% 미만, 15% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 1% 미만, 0.1% 미만 또는 0.01% 미만의 CD8+ T 세포를 포함하고/하거나 CD8+ T 세포를 함유하지 않으며/거나 CD8+ T 세포가 없거나 또는 실질적으로 없다. 일부 구현예에서, 농축된 T 세포의 조성물은 필수적으로 CD4+ T 세포로 구성된다.
- [0392] 특정 구현예에서, 하나 이상의 조성물은 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 적어도 99.9%, 또는 100% 또는 약 100%의 CD8+ T 세포인 CD8+ T 세포의 조성물이거나, 이를 포함한다. 특정 구현예에서, CD8+ T 세포의 조성물은 40% 미만, 35% 미만, 30% 미만, 25% 미만, 20% 미만, 15% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 1% 미만, 0.1% 미만 또는 0.01% 미만 CD4+ T 세포를 포함하고/하거나 CD4+ T 세포를 포함하지 않으며/거나 CD4+ T 세포가 없거나 실질적으로 없다. 일부 구현예에서, 농축된 T 세포의 조성물은 필수적으로 CD8+ T 세포로 구성된다.
- [0393] **2. 활성화 및 자극**
- [0394] 일부 구현예에서, 세포는 유전자 조작과 관련하여 또는 그 전에 인큐베이션 및/또는 배양된다. 인큐베이션 단계는 배양, 양성, 자극, 활성화 및/또는 번식(propagation)을 포함할 수 있다. 인큐베이션 및/또는 조작은 배양 용기, 예를 들어 유닛, 챔버, 웰(well), 칼럼, 관, 배관 세트, 밸브, 바이알(vial), 배양 접시, 백(bag) 또는 세포 배양 또는 양성을 위한 다른 용기에서 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 조성물 또는 세포는 자극 조건 또는 자극제의 존재 하에 인큐베이션된다. 상기 조건은 집단에서 세포의 증식, 팽창, 활성화 및/또는 생존을 유래하고, 항원 노출을 모방하고, 및/또는 재조합 항원 수용체의 도입과 같은 유전자 조작을 위해 세포를 프라이밍하도록 설계된 것을 포함한다.
- [0395] 일부 구현예에서, 상기 조건들은 예를 들어 상기 세포들을 활성화시키도록 고안된 사이토카인들(cytokines), 케모카인들(chemokines), 항원들, 결합 파트너들, 융합 단백질들, 재조합 가용성 수용체들 및 임의의 다른 제제들과 같은 특정 배지, 온도, 산소 함량, 이산화탄소 함량, 시간, 제제들, 가용 영양소들, 아미노산들, 항생제들, 이온들 및/또는 자극 인자들을 하나 이상 포함할 수 있다.
- [0396] 일부 구현예에서, 자극 조건 또는 작용제는 TCR 복합체의 세포내 신호전달 도메인을 자극하거나 활성화할 수 있는 하나 이상의 작용제, 예를 들어 리간드를 포함한다. 일부 측면에서, 제제는 T 세포에서 TCR/CD3 세포 내 신호 전달 캐스케이드를 켜거나 개시한다. 상기 제제는 TCR에 특이적인 예를 들어 항-CD3과 같은 항체를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 자극 조건은 공자극 수용체, 예를 들어 항-CD28을 자극할 수 있는 하나 이상의 제제, 예를 들어 리간드를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 제제 및/또는 리간드는 비드와 같은 고체 지지체 및/또는 하나 이상의 사이토카인에 결합되거나 결합될 수 있다. 선택적으로, 증폭 방법은 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체를 배양 배지에 첨가(예를 들어 약 0.5 ng/ml 이상의 농도)하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 자극제는 IL-2, IL-15 및/또는 IL-7을 포함한다. 일부 측면에서, IL-2 농도는 약 10 단위/mL 이상이다.
- [0397] 일부 측면에서, 인큐베이션은 문헌[USP 6,040,177 to Riddel 외, Klebanoff 외 (2012) J Immunother. 35(9): 651-660, Terakura 외 (2012) Blood. 117: 72-82, 및/또는 Wang 외 (2012) J Immunother. 35(9): 689-701.]에 기재된 것과 같은 기술에 따라 수행된다.
- [0398] 일부 구현예에서, T 세포는 배양 개시 조성물 배양보조 세포, 예를 들어 비분할 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에

첨가하고(예를 들어 생성된 세포 집단은 증폭될 초기 집단 중 각각의 T 림프구에 대해 적어도 약 5, 10, 20 또는 40 이상의 PBMC 배양보조 세포를 함유하도록); 상기 배양물을 인큐베이션(예를 들어 T 세포 수를 증폭하기에 충분한 시간 동안)하여 증폭된다. 일부 측면에서, 비분할 배양보조 세포는 감마-조사된(gamma-irradiated) PBMC 배양보조 세포를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, PBMC에 약 3000 내지 3600 라드(rad) 범위의 감마선을 조사하여 세포 분열을 방지한다. 일부 측면에서, 배양보조 세포는 T 세포의 집단의 첨가 전에 배양 배지에 첨가된다.

[0399] 일부 구현예에서, 자극 조건은 인간 T 림프구의 성장에 적합한 온도, 예를 들어 적어도 약 25℃ 이상, 일반적으로 적어도 약 30℃ 이상 및 일반적으로 (약) 37℃를 포함한다. 선택적으로, 인큐베이션은 배양보조 세포로서 비분할 EBV 형질전환 림프아구 세포(LCL)를 첨가하는 것을 더 포함할 수 있다. LCL은 약 6000 내지 10,000 라드 범위의 감마선으로 조사될 수 있다. 일부 측면에서, LCL 배양보조 세포는 임의의 적합한 양으로 제공되며, 예를 들어 LCL 배양보조 세포 대 초기 T 림프구의 비율이 적어도 약 10:1 이상으로 제공된다.

[0400] 구현예에서, 항원 특이적 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포와 같은 항원 특이적 T 세포는 항원으로 나이트 또는 항원 특이적 T 림프구를 자극하여 수득된다. 예를 들어 항원 특이적 T 세포주 또는 클론은 감염된 대상체로부터 T 세포를 단리하고 시토크롬 b 바이러스 항원으로 시험관 내에서 세포를 자극함으로써 같은 항원에 대해 생성될 수 있다.

[0401] 일부 구현예에서, 하나 이상의 자극 조건 또는 자극 시약이 존재하는 경우의 인큐베이션의 적어도 일부는, 예를 들어 국제 공개 번호 WO2016/073602에 기술된 것과 같은 원심 회전 하에 원심 챔버의 내부 공동(cavity)에서 수행된다. 일부 구현예에서, 원심 챔버에서 수행되는 인큐베이션의 적어도 일부는 자극 및/또는 활성화를 유래하기 위해 시약 또는 시약들과 혼합하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 선택된 세포와 같은 세포는 원심 챔버에서 자극 조건 또는 자극 시약과 혼합된다. 이러한 과정의 일부 측면에서, 다량의 세포는, 세포 배양 플레이트(plate) 또는 다른 시스템에서 유사한 자극을 수행될 때 일반적으로 사용되는 것보다 훨씬 적은 양의 하나 이상의 자극 조건 또는 작용제와 혼합된다.

[0402] 일부 구현예에서, 원심 챔버에서 혼합하지 않고 선택하는 경우 자극제는 실질적으로, 동일한 수 또는 동일한 부피의 세포의 선택의 대략 동일하거나 유사한 선택 효율을 달성하는데 필요한 자극제의 양과 비교하여 더 적은 양(예를 들어 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 또는 80% 이하의 양)으로 챔버의 공동 내의 세포에 첨가되며, 예를 들어 주기적으로 흔들거나 회전하는 튜브 또는 백에 넣는다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은, 예를 들어 10 mL 내지 200 mL, 적어도 또는 적어도 약 또는 약 또는 10 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL, 60 mL, 70 mL, 80 mL, 90 mL, 100 mL, 150 mL 또는 200 mL의 시약의 인큐베이션으로 표적 부피를 달성하기 위해, 세포 및 자극 시약에 인큐베이션 완충제를 첨가하여 수행된다. 일부 구현예에서, 인큐베이션 완충제 및 자극 시약은 세포에 첨가하기 전에 예비 혼합된다. 일부 구현예에서, 인큐베이션 완충제 및 자극 시약은 세포에 별도로 첨가된다. 일부 구현예에서, 자극 인큐베이션은 주기적으로 온화한 혼합 조건으로 수행되며, 이는 에너지적으로 선호되는 상호 작용을 촉진시켜 세포의 자극 및 활성화를 달성하면서, 전반적으로 자극 시약을 덜 사용할 수 있다.

[0403] 일부 구현예에서, 인큐베이션은 혼합 조건, 예를 들어 일반적으로 비교적 낮은 힘 또는 속도에서의 스핀닝(spinning)의 존재 하에서, 예를 들어 세포를 펠렛(pellet)화하기 위해 사용된 것보다 낮은 속도에서, 예를 들어 약 600rpm 내지 1700rpm(예를 들어 600rpm 또는 1000rpm 또는 1500rpm 또는 1700rpm 또는 약 또는 적어도 600rpm 또는 1000rpm 또는 1500rpm 또는 1700rpm)에서, 약 80g 내지 100g(예를 들어 80g, 85g, 90g, 95g 또는 100g 또는 약 또는 적어도 80g, 85g, 90g, 95g 또는 100g)의 챔버의 샘플 또는 벽(wall) 또는 다른 용기의 RCF에서, 일반적으로 수행된다. 일부 구현예에서, 스핀(spin)은, 이러한 저속에서 스핀의 반복된 간격에 이어서, 1초, 2초, 3초, 4초, 5초, 6초, 7초, 8초, 9초 또는 10초에 대한 스핀 및/또는 휴식과 같은 휴식 기간을 사용하여 수행되며, 예를 들어 약 1초 또는 2초 회전 후 약 5초, 6초, 7초 또는 8초 동안 휴식하는 것과 같다.

[0404] 일부 구현예에서, 예를 들어 자극제와 함께하는, 인큐베이션의 총 지속 시간은, 1시간 내지 96시간, 1시간 내지 72시간, 1시간 내지 48시간, 4시간 내지 36시간, 8시간 내지 30시간, 또는 12시간 내지 24시간 사이 또는 약 1시간 내지 96시간, 1시간 내지 72시간, 1시간 내지 48시간, 4시간 내지 36시간, 8시간 내지 30시간, 또는 12시간 내지 24시간 사이, 예를 들어 적어도 또는 적어도 약 6시간, 12시간, 18시간, 24시간, 36시간 또는 72시간이다. 일부 구현예에서, 추가 인큐베이션은 1시간 내지 48시간, 4시간 내지 36시간, 8시간 내지 30시간 또는 12시간 내지 24시간 사이 또는 약 1시간 내지 48시간, 4시간 내지 36시간, 8시간 내지 30시간 또는 12시간 내지 24시간 사이 시간 동안이다.

[0405] 특정 구현예에서, 자극 조건은 하나 이상의 사이토카인의 존재 하에 및/또는 농축된 T세포의 조성물을 인큐베이션

선, 배양(culturing 및/또는 cultivating)하는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 재조합 사이토카인이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 인간 재조합 사이토카인이다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 T세포에 의해 발현되고/되거나 내인성(endogenous) 수용체에 결합하고/하거나 결합할 수 있다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 사이토카인의 4-알파-헬릭스(4-alpha-helix bundle) 다발 패밀리의 구성원이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 사이토카인의 4-알파-헬릭스(4-alpha-helix bundle) 다발 패밀리의 구성원은 인터루킨-2(IL-2), 인터루킨-4(IL-4), 인터루킨-7(IL-7), 인터루킨-9(IL-9), 인터루킨 12(IL-12), 인터루킨 15(IL-15), 과립구 콜로니-자극 인자(G-CSF) 및 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF)를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0406] 일부 구현예에서, 상기 자극은 예를 들어 형질도입(transduction) 전에 세포의 활성화 및/또는 증식을 초래한다.

[0407] 3. 유전자 조작을 위한 벡터 및 방법

[0408] 일부 구현예에서, 제공된 방법, 용도, 제조 물품 또는 조성물과 관련하여 사용되는 T 세포와 같은 조작된 세포는 재조합 수용체, 예를 들어 CAR, 예를 들어 본원에 기재된 TCR을 발현하도록 유전자 조작된 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 재조합 수용체 및/또는 기타 분자를 암호화하는 핵산 서열의 도입, 전송 또는 전달에 의해 조작된다.

[0409] 일부 구현예에서, 조작된 세포를 생산하는 방법은 재조합 수용체(예를 들어 항-CD19 CAR)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 세포, 예를 들어 자극된 또는 활성화된 세포 내로 도입하는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 재조합 단백질은 기재된 것과 같은 재조합 수용체이다. 세포에서 재조합 단백질, 예를 들어 재조합 수용체를 암호화하는 핵산 분자의 도입은 다수의 공지된 벡터 중의 어느 것을 사용하여 수행될 수 있다. 이러한 벡터에는 렌티바이러스(lentiviral) 및 감마레트로바이러스(gammaretroviral) 시스템을 비롯한 바이러스 및 비바이러스 시스템뿐만 아니라 PiggyBac 또는 Sleeping Beauty-기반 유전자 전달 시스템과 같은 전이인자(transposon)-기반 시스템이 포함된다. 예시적인 방법은 바이러스, 예를 들어 레트로바이러스(retroviral) 또는 렌티바이러스(lentiviral)를 통한 수용체를 암호화하는 핵산의 전달, 형질도입, 전이인자(transposons) 및 전기천공법(electroporation)을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 조작은 농축된 T 세포의 하나 이상의 조작된 조성물을 생성한다.

[0410] 특정 구현예에서, 자극된 T 세포의 하나 이상의 조성물은 농축된 T 세포의 2개의 별개의 자극된 조성물이거나 이를 포함한다. 특정 구현예에서, 농축된 T 세포의 2개의 분리된 조성물, 예를 들어 동일한 생물학적 샘플로부터 선택, 분리 및/또는 농축된, 농축된 T 세포의 2개의 분리된 조성물은 별도로 조작된다. 특정 구현예에서, 2개의 개별 조성물은 농축된 CD4⁺ T 세포의 조성물을 포함한다. 특정 구현예에서, 2개의 개별 조성물은 농축된 CD8⁺ T 세포의 조성물을 포함한다. 일부 구현예에서, 농축된 CD4⁺ T 세포 및 농축된 CD8⁺ T 세포의 2개의 개별 조성물은 유전적으로 별도로 조작된다.

[0411] 일부 구현예에서, 유전자 전이는, 예를 들어 사이토카인 또는 활성화 마커의 발현에 의해 측정된 바와 같이 증식, 생존 및/또는 활성화와 같은 반응을 유래하는 자극과 조합하는 것과 같이, 세포를 먼저 자극하고, 이어서 활성화된 세포의 형질도입, 및 임상 적용에 충분한 수의 배양으로의 팽창함으로써 달성된다. 특정 구현예에서, 유전자 전이(gene transfer)는 자극 조건 하에서, 예를 들어 기재된 임의의 방법에 의해 세포를 먼저 인큐베이션함으로써 달성된다.

[0412] 일부 구현예에서, 유전자 조작 방법은, 조성물의 하나 이상의 세포를, 재조합 단백질을 암호화하는 핵산 분자, 예를 들어 재조합 수용체와 접촉함으로써 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 접촉은 원심 분리, 예를 들어 스피노클레이션(spinoculation)(예를 들어 원심 접종(centrifugal inoculation))으로 수행될 수 있다. 이러한 방법은 국제 공개 번호 W02016/073602에 기재된 바와 같은 방법을 포함한다. 예시적인 원심 챔버는, A-200/F 및 A-200 원심 챔버 및 그러한 시스템과 함께 사용하기 위한 다양한 키트를 포함하여 Sepax® 및 Sepax®2 시스템과 함께 사용하기 위한 것을 포함하여 Biosafe SA에 의해 생산되고 판매되는 것들을 포함한다. 예시적인 챔버, 시스템 및 처리기구 및 캐비닛은 예를 들어 미국특허 6,123,655호, 미국특허 6,733,433 및 공개된 미국 특허 출원, 공개 번호 US 2008/0171951 및 국제 특허 출원 공개 번호 WO 00/38762, 공개에 기재되어있으며, 이들 각각의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 이러한 시스템과 함께 사용하기 위한 예시적인 키트는 BioSafe SA에 의해 판매되는 일회용 키트인 제품명 CS-430.1, CS-490.1, CS-600.1 또는 CS-900.2를 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.

- [0413] 일부 구현예에서, 접촉은 원심 분리, 예를 들어 스피노콜레이션(예를 들어 원심 접종(centrifugal inoculation))으로 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포, 벡터, 예를 들어 바이러스 입자 및 시약을 함유하는 조성물은 세포를 펠렛화하기 위해 사용된 것보다 낮은 속도, 예를 들어 또는 600 rpm 내지 1700 rpm 또는 약 600 rpm 내지 1700 rpm(예를 들어 600 rpm, 1000 rpm, 또는 1500 rpm 또는 1700 rpm 또는 약 또는 적어도 600 rpm, 1000 rpm, 또는 1500 rpm 또는 1700 rpm)와 같이 비교적 낮은 힘 또는 속도로 회전될 수 있다. 일부 구현예에서, 회전은 챔버 또는 공동의 내부 또는 외부 벽에서 측정될 때, 100g 내지 3200g 또는 약 100g 내지 3200g(예를 들어 100 g, 200 g, 300 g, 400), g, 500 g, 1000 g, 1500 g, 2000 g, 2500 g, 3000 g 또는 3200 g 또는 약 또는 적어도 또는 적어도 약 100 g, 200 g, 300 g, 400), g, 500 g, 1000 g, 1500 g, 2000 g, 2500 g, 3000 g 또는 3200 g)의 힘, 예를 들어 상대 원심력으로 수행된다. "상대 원심력"또는 RCF라는 용어는 일반적으로 지구의 중력과 관련하여 회전축에 비해 공간의 특정 지점에서 물체나 물질(예를 들어 세포, 샘플 또는 펠렛 및/또는 챔버 또는 다른 용기의 회전 점)에 부여된 유효력으로 이해된다. 이 값은 중력, 회전 속도 및 회전 반경(회전축과 물체, 물질 또는 RCF가 측정되는 입자로부터의 거리)을 고려하여 공지된 공식을 사용하여 결정될 수 있다.
- [0414] 일부 구현예에서, 상기 시스템은 상기 시스템에서 수행되는 형질 도입 단계 및 하나 이상의 다양한 다른 처리 단계, 가령, 본원 또는 국제 공개 번호 W02016/073602에 기재된 상기 원심 챔버 시스템과 함께 또는 이와 관련하여 수행될 수 있는 하나 이상의 처리 단계들을 작동, 자동화, 제어 및/또는 모니터링하기 위한 기기를 포함하여 다른 기기에 포함되고, 및/또는 다른 기기와 관련되어 배치된다. 일부 실시 예에서, 이러한 기기는 캐비닛 내에 포함된다. 일부 구현예에서, 상기 기기는 제어 회로, 원심 분리기, 커버, 모터들, 펌프들, 센서들, 디스플레이들 및 사용자 인터페이스를 포함하는 하우징을 포함하는 캐비닛을 포함한다. 예시적인 장치는 문헌[USP 6,123,655, USP 6,733,433 및 US2008/0171951]에 기재되어 있다.
- [0415] 일부 구현예에서, 상기 시스템은 일련의 용기들, 예를 들어 백들(bags), 튜빙(tubing), 스톱콕들(stopcock), 클램프들(clamps), 커넥터들(connectors) 및 원심 분리 챔버를 포함한다. 일부 구현예에서, 백들과 같은 용기는 동일한 백 또는 별개의 백들과 같은 동일한 용기 또는 별개의 용기에 형질 도입될 세포들 및 상기 바이러스 벡터 입자들을 함유하는 백들과 같은 하나 이상의 컨테이너들을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 시스템은 희석액(diluent solution) 및/또는 세척액(wash solution)과 같은 배지를 함유하는 백들과 같은 하나 이상의 컨테이너들을 추가로 포함하며, 이는 상기 방법들 동안 상기 챔버 및/또는 다른 성분들로 당겨져 성분들 및/또는 조성물들을 희석, 재현탁 및/또는 세척한다. 상기 컨테이너들은 입력 라인, 희석 라인, 세척 라인, 폐기물 라인 및/또는 출력 라인에 대응하는 위치에서와 같이 상기 시스템에서 하나 이상의 위치들에 연결될 수 있다.
- [0416] 일부 구현예에서, 상기 챔버는 회전 축 주위와 같이 상기 챔버의 회전을 수행할 수 있는 원심 분리기와 관련될 수 있다. 상기 세포들의 형질도입 및/또는 하나 이상의 다른 처리 단계들에서 회전은 상기 인큐베이션 이전, 동안 및/또는 이후에 발생할 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 다양한 처리 단계들 중 하나 이상은 예를 들어 특정 힘에서 회전하에 수행된다. 상기 챔버는 전형적으로 수직 또는 일반적으로 수직 회전할 수 있어서, 원심 분리 동안 상기 챔버가 수직으로 앉아 있고 상기 측벽 및 축은 수직 또는 일반적으로 수직이고, 상기 단부 벽(들)은 수평 또는 일반적으로 수평이다.
- [0417] 일부 구현예에서, 상기 유전자 조작의 적어도 일부 동안, 예를 들어 형질 도입 및/또는 상기 세포들의 유전자 조작 후, 상기 유전자 조작된 세포들의 배양을 위해, 상기 세포들의 배양 또는 증폭을 위해, 생물 반응기 백 조립체(bioreactor bag assembly)와 같은 용기로 이송된다.
- [0418] 일부 구현예에서, 재조합 핵산은 재조합 감염성 바이러스 입자, 예를 들어 시미안 바이러스40(simian virus 40)(SV40), 아데노 바이러스, 아데노-관련 바이러스 (AAV)로부터 유래 된 벡터를 사용하여 세포내로 전달된다. 일부 구현예에서, 재조합 핵산은 재조합 렌티바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터, 예를 들어 감마-레트로 바이러스 벡터를 사용하여 T 세포 내로 전달된다(예를 들어 Koste et al. (2014) Gene Therapy 2014 Apr 3. doi: 10.1038/gt.2014.25; Carlens et al. (2000) Exp Hematol 28(10): 1137-46; Alonso-Camino et al. (2013) Mol Ther Nucl Acids 2, e93; Park et al., Trends Biotechnol. 2011 November 29(11): 550-557 참조).
- [0419] 일부 구현예에서, 상기 레트로바이러스 벡터는 긴 말단 반복 서열(long terminal repeat sequence)(LTR), 예를 들어 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스(Moloney murine leukemia virus)(MoMLV), 골수 증식 육종 바이러스(myeloproliferative sarcoma virus)(MPSV), 마우스 배아 줄기 세포 바이러스(myeloproliferative sarcoma virus)(MESV), 마우스 줄기 세포 바이러스(murine stem cell virus)(MSCV) 또는 비장 초점 형성 바이러스

(spleen focus forming virus)(SFFV)로부터 유래된 레트로바이러스 벡터를 가진다. 가장 바람직한 레트로바이러스 벡터는 뮤린 레트로바이러스(murine retroviruses)이다. 일부 구현예에서, 상기 레트로바이러스는 임의의 조류 또는 포유 동물 세포 소스로부터 유래된 것을 포함한다. 상기 레트로바이러스들은 전형적으로 양쪽 이온성(amphotropic)이며, 이는 인간들을 포함하여 여러 종의 숙주 세포들(host cells)을 감염시킬 수 있음을 의미한다. 일 실시 예에서, 상기 발현될 유전자는 상기 레트로바이러스 gag, pol 및/또는 env 서열을 대체한다. 다수의 예시적인 레트로바이러스 시스템들이 (가령, 문헌[USP 5,219,740; 6,207,453; 5,219,740; Miller and Rosman (1989) BioTechniques 7:980-990; Miller, A. D. (1990) Human Gene Therapy 1:5-14; Scarpa 외(1991) Virology 180:849-852; Burns 외 (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-8037; 및 Boris-Lawrie and Temin (1993) Cur. Opin. Genet. Develop. 3:102-109] 참조)에서 설명되었다.

[0420] 렌티 바이러스 형질 도입 방법들이 공지되어 있다. 예시적인 방법들은, 가령, 문헌[Wang 외 (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701; Cooper 외 (2003) Blood. 101:1637-1644; Verhoeven 외 (2009) Methods Mol Biol. 506: 97-114; 및 Cavalieri 외 (2003) Blood. 102(2): 497-505]에서 설명되고 있다.

[0421] 일부 구현예에서, 바이러스 벡터 입자는, 렌티바이러스 게놈 기반 벡터(lentiviral genome based vector)로부터 유래된 것과 같은, 레트로바이러스 게놈 기반 벡터(retroviral genome based vector)로부터 유래된 게놈을 함유한다. 제공된 바이러스 벡터의 일부 측면에서, CAR과 같은, 항원 수용체와 같은, 재조합 수용체를 암호화하는 이중(heterologous) 핵산은, 벡터 게놈의 5' LTR 및 3' LTR 서열 사이에 포함 및/또는 위치된다.

[0422] 일부 구현예에서, 바이러스 벡터 게놈은 렌티바이러스(lentivirus) 게놈, 예를 들어 HIV-1 게놈 또는 SIV 게놈이다. 예를 들어 렌티바이러스 벡터는 병독성 유전자(virulence genes)를 배로(multiply) 약화(attenuating)시킴으로써 생성되었으며, 예를 들어 유전자 env, vif, vpr 및 nef는 결실되어 치료 목적을 위해 벡터를 더 안전하게 만든다. 렌티바이러스 벡터가 알려져 있다. Naldini et al. (1996 및 1998); Zufferey et al. (1997); Dull et al., 1998, 미국 특허 제 6,013,516호; 및 5,994,136호 참조). 일부 구현예에서, 이들 바이러스 벡터는 플라스미드 기반 또는 바이러스 기반이며, 외래 핵산을 통합(incorporating)하고, 선택하고, 핵산을 숙주 세포내로 전달하기 위해 필수 서열을 보유하도록 구성된다. 공지의 렌티바이러스는 American Type Culture Collection ("ATCC"; 10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110-2209)과 같은 보관소 또는 수집물로부터 쉽게 입수할 수 있거나, 일반적으로 이용 가능한 기술을 사용하여 알려진 소스로부터 분리할 수 있다.

[0423] 렌티바이러스 벡터의 한정적인 예시는 렌티바이러스(lentivirus)에서 유래된 것을 포함하며, 예를 들어 인간 면역결핍 바이러스 1(HIV-1), HIV-2, 시미안(Simian) 면역결핍 바이러스 (SIV), 인간 T-림프구 바이러스 1(Human T-lymphotropic virus 1)(HTLV- 1), HTLV-2 또는 말 감염 빈혈 바이러스(equine infection anemia virus)(E1AV)이다. 예를 들어 렌티바이러스 벡터는 HIV 독성 유전자(virulence genes)를 배로(multiply) 약화(attenuating)시킴으로써 생성되었으며, 예를 들어 유전자 env, vif, vpr, vpu 및 nef는 결실되어 치료 목적으로 벡터를 더 안전하게 만든다. 렌티바이러스 벡터(Lentiviral vectors)는 당업계에 공지되어 있다. Naldini et al. (1996 및 1998); Zufferey et al., (1997); Dull et al., 1998, 미국 특허 제 6,013,516 호; 및 5,994,136호 참조). 일부 구현예에서, 이들 바이러스 벡터는 플라스미드 기반 또는 바이러스 기반이며, 외래 핵산을 통합하고, 선택하고, 핵산을 숙주 세포 내로 전달하기 위해 필수 서열을 보유하도록 구성된다. 공지의 렌티바이러스는 American Type Culture Collection ("ATCC"; 10801 University Blvd., Manassas, VA. 20110-2209)과 같은 보관소 또는 수집물로부터 쉽게 입수할 수 있거나, 일반적으로 이용 가능한 기술을 사용하여 알려진 소스로부터 분리할 수 있다.

[0424] 일부 구현예에서, 바이러스 게놈 벡터는 렌티바이러스(lentivirus)와 같은 레트로바이러스(retrovirus)의 5' 및 3' LTRs의 서열을 함유할 수 있다. 일부 측면에서, 바이러스 게놈 구조는, 렌티바이러스(lentivirus)의 5' 및 3' LTRs로부터의 서열을 함유할 수 있고, 특히 렌티바이러스(lentivirus)의 5' LTR로부터의 R 및 U5 서열, 및 렌티바이러스(lentivirus)으로부터의 불활성화 또는 자가-불활성화 3' LTR을 포함할 수 있다. 상기 LTR 서열은 임의의 종(species)으로부터의 임의의 렌티바이러스(lentivirus)로부터의 LTR 서열일 수 있다. 예를 들어 이들은 HIV, SIV, FIV 또는 BIV의 LTR 서열일 수 있다. 전형적으로, LTR 서열은 HIV LTR 서열이다.

[0425] 일부 구현예에서, HIV 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터의 핵산에는 추가적인 전사 단위(transcriptional units)가 결여되어 있다. 벡터 게놈은 불활성화 또는 자가-불활성화 3' LTR을 포함할 수 있다(Zufferey et al. J Virol 72:9873, 1998; Miyoshi et al., J Virol 72:8150, 1998). 예를 들어 바이러스 벡터 RNA를 생성하는데 사용된 핵산의 3' LTR의 U3 영역에서의 결실은 자가-불활성화(SIN) 벡터를 생성하는데 사용될 수 있다. 이 결실은 역전사 동안 프로바이러스(proviral) DNA의 5' LTR로 전달될 수 있다. 자가-불활성화 벡터는 일반적으로 3'

긴 말단 반복(LTR)으로부터 인핸서(enhancer) 및 프로모터(promoter) 서열의 결실을 가지며, 이는 벡터 통합(integration) 동안 5'LTR로 복사된다. 일부 구현예에서, LTR의 전사 활성을 제거하기 위해 TATA 박스의 제거를 포함하여 충분한 서열이 제거될 수 있다. 이것은 형질도입된 세포에서 전장(full-length) 벡터 RNA의 생성을 방지할 수 있다. 일부 측면에서, 3'LTR의 U3 요소는 그의 인핸서(enhancer) 서열, TATA 박스, Sp1 및 NF-κB 부위(NF-kappa B sites)의 결실(deletion)을 포함한다. 자가-불활성화 3' LTR의 결실, 진입(entry) 및 역전사 후에 생성된 프로바이러스는 불활성화된 5' LTR을 함유한다. 이는 벡터 계놈의 동원(mobilization) 위험 및 근처의 세포 프로모터에 대한 LTR의 영향을 감소시킴으로써 안전성을 향상시킬 수 있다. 자가-불활성화 3' LTR은 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 구성될 수 있다. 일부 구현예에서, 이것은 벡터 역가(titers) 또는 벡터의 in vitro 또는 in vivo 특성에 영향을 미치지 않는다.

[0426] 선택적으로, 렌티바이러스 5' LTR로부터의 U3 서열은 이종성(heterologous) 프로모터 서열과 같은 바이러스 구축물(construct)에서 프로모터 서열로 대체될 수 있다. 이는 패키징(packaging) 세포주로부터 회수된(recovered) 바이러스의 역가(titer)를 증가시킬 수 있다. 인핸서 서열(enhancer)이 또한 포함될 수 있다. 패키징 세포주에서 바이러스 RNA 계놈의 발현을 증가시키는 임의의 인핸서(enhancer)/프로모터(promoter) 조합이 사용될 수 있다. 일 구현예에서, CMV 인핸서(enhancer)/프로모터(promoter) 서열이 사용된다(미국특허 5,385,839호 및 미국특허 5,168,062호).

[0427] 특정 구현예에서, 삽입(insertional) 돌연변이 유발(mutagenesis)의 위험은 통합 결함이 되도록 렌티바이러스 벡터 계놈과 같은 레트로바이러스 벡터 계놈을 구축함으로써 최소화될 수 있다. 비-통합 벡터 계놈을 생성하기 위해 다양한 접근법이 추구될 수 있다. 일부 구현예에서, 돌연변이(들)는 pol 유전자의 인테그레이즈(integrase) 효소 성분으로 조작되어 불활성 인테그레이즈(integrase)를 갖는 단백질을 암호화할 수 있다. 일부 구현예에서, 벡터 계놈 자체는 예를 들어 하나 또는 두 개의 부착 부위를 돌연변이 또는 결실 시키거나, 결실 또는 변형을 통해 3' LTR-근위 폴리푸린관(3' LTR-proximal polypurine tract)(PPT)을 기능하지 않게함으로써, 통합(integration)을 방지하도록 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 비-유전적 접근법이 이용 가능하다; 이들은 하나 이상의 통합(integrase) 기능을 억제하는 약리학적 제제를 포함한다. 이 접근법은 상호 배타적이지 않다; 즉, 한 번에 둘 이상을 사용할 수 있다. 예를 들어 통합 사이트와 부착 사이트가 모두 작동하지 않거나, 통합 사이트와 PPT 사이트가 작동하지 않거나, 부착 사이트와 PPT 사이트가 작동하지 않거나, 그들 모두가 작동하지 않을 수 있다. 이러한 방법 및 바이러스 벡터 계놈은 공지되어 있으며 이용 가능하다(Philpott and Thrasher, *Human Gene Therapy* 18:483, 2007; Engelman et al. *J Virol* 69:2729, 1995; Brown et al *J Virol* 73:9011 (1999); WO 2009/076524; McWilliams et al., *J Virol* 77:11150, 2003; Powell and Levin *J Virol* 70:5288, 1996 참조).

[0428] 일부 구현예에서, 벡터는, 원핵 생물 숙주 세포와 같은 숙주 세포에서의 증식(propagation)을 위한 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터의 핵산은 박테리아 세포와 같은 원핵 세포에서 증식을 위한 하나 이상의 복제 기점을 포함한다. 일부 구현예에서, 원핵 생물 복제 기점을 포함하는 벡터는 또한 발현이 약물 내성과 같은 검출 가능하거나 선택 가능한 마커를 부여하는 유전자를 포함할 수 있다.

[0429] 바이러스 벡터 계놈은 전형적으로 패키징 또는 생산자 세포주로 형질감염될 수 있는 플라스미드 형태로 구축된다. 계놈이 바이러스 벡터 계놈의 RNA 카피를 포함하는 레트로바이러스 입자를 생성하기 위해 임의의 공지된 다양한 방법을 사용할 수 있다. 일부 구현예에서, 바이러스-기반 유전자 전달 시스템을 만드는데 적어도 두 가지 성분이 관여한다: 첫째, 바이러스성 벡터 입자를 생성하는데 필요한 효소뿐만 아니라 구조 단백질을 포괄(encompassing)하는 패키징 플라스미드(packaging plasmids), 둘째, 바이러스 벡터 자체, 즉, 전달될 유전 물질. 이러한 구성 요소 중 하나 또는 둘 다를 설계할 때 생물 안전 보호 장치를 도입할 수 있다.

[0430] 일부 구현예에서, 패키징 플라스미드는, 외피 단백질(envelope proteins) 이외의 단백질인 HIV-1과 같은, 모든 레트로바이러스를 포함할 수 있다(Naldini et al., 1998). 다른 구현예에서, 바이러스 벡터는, 독성과 관련된 추가적인 바이러스 유전자, 예를 들어 vpr, vif, vpu 및 nef, 및/또는 HIV의 1 차 트랜스활성제(transactivator)인 Tat가 결합될 수 있다. 일부 구현예에서, HIV-기반 렌티바이러스 벡터와 같은, 렌티바이러스 벡터는, 모 바이러스의 3 가지 유전자로 구성된다: 이는 재조합을 통한 야생형 바이러스의 재구성 가능성을 감소시키거나 제거하는 gag, pol 및 rev.

[0431] 일부 구현예에서, 바이러스 벡터 계놈은, 바이러스 벡터 계놈으로부터 전사된 바이러스 계놈 RNA를 바이러스 입자로 패키징하는데 필요한 모든 성분을 포함하는, 패키징(packaging) 세포주 내로 도입된다. 대안적으로, 바이러스 벡터 계놈은, 관심있는 하나 이상의 서열, 예를 들어 재조합 핵산 이외에 바이러스 성분을 암호화하는 하

나 이상의 유전자를 포함할 수 있다. 그러나 일부 측면에서, 표적 세포에서 게놈의 복제를 방지하기 위해, 복제에 필요한 내인성 바이러스 유전자가 제거되고, 패키징(packaging) 세포주에서 별도로 제공된다.

- [0432] 일부 구현예에서, 패키징(packaging) 세포주는 입자를 생성하는데 필요한 성분을 포함하는 하나 이상의 플라스미드 벡터로 형질감염된다. 일부 구현예에서, 패키징(packaging) LTR, 시스-작용(cis-acting) 패키징(packaging) 서열 및 관심 서열을 포함하는, 바이러스 벡터 게놈을 포함하는, 플라스미드, 즉 CAR과 같은 항원 수용체를 암호화하는 핵산; 및 바이러스 효소 및/또는 구조적 성분, 예를 들어 Gag, pol 및/또는 rev를 암호화하는 하나 이상의 헬퍼(helper) 플라스미드로 형질감염된다. 일부 구현예에서, 레트로바이러스 벡터 입자를 생성하는 다양한 유전자 성분을 분리하기 위해 다수의 벡터가 이용된다. 이러한 일부 구현예에서, 패키징(packaging) 세포에 별도의 벡터를 제공하는 것은 달리 복제 능력있는(competent) 바이러스를 생성할 수 있는 재조합 사건의 가능성을 감소시킨다. 일부 구현예에서, 모든 레트로바이러스 성분을 갖는 단일 플라스미드 벡터가 사용될 수 있다.
- [0433] 일부 구현예에서, 렌티바이러스(lentiviral) 벡터 입자와 같은 레트로바이러스(retroviral) 벡터 입자는 슈도타입화(pseudotyped) 숙주 세포의 형질도입 효율을 증가시킨다. 예를 들어 일부 구현예에서 렌티바이러스(lentiviral) 벡터 입자와 같은 레트로바이러스(retroviral) 벡터 입자는, VSV-G 당단백질로 슈도타입화되어(pseudotyped), 형질도입 될 수 있는 세포 유형을 확장시키는 넓은 세포 숙주 범위를 제공한다. 일부 구현예에서, 패키징 세포주는, 비-천연(non-native) 외피(envelope) 당단백질을 암호화하는 플라스미드 또는 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 신드비스(Sindbis) 바이러스 외피(envelope), GALV 또는 VSV-G와 같은 제노트로픽(xenotropic), 다방성(polytropic) 또는 양쪽성(amphotropic) 외피(envelope)를 포함하도록 형질감염된다.
- [0434] 일부 구현예에서, 패키징 세포주는, 바이러스 게놈 RNA를 렌티바이러스(lentiviral) 벡터 입자로 패키징(packaging)을 위해 운송(trans)에 필요한 바이러스 조절 및 구조 단백질을 포함하는 성분을 제공한다. 일부 구현예에서, 패키징 세포주는 렌티바이러스(lentiviral) 단백질을 발현하고 기능성 렌티바이러스(lentiviral) 벡터 입자를 생성할 수 있는 임의의 세포주일 수 있다. 일부 측면에서, 적합한 패키징 세포주는 293 (ATCC CCL X), 293T, HeLA (ATCC CCL 2), D17 (ATCC CCL 183), MDCK (ATCC CCL 34), BHK (ATCC CCL-10) 및 Cf2Th (ATCC CRL 1430) 세포를 포함한다.
- [0435] 일부 구현예에서, 패키징 세포주는 바이러스 단백질(들)을 안정적으로 발현한다. 예를 들어 일부 측면에서, gag, pol, rev 및/또는 다른 구조적 유전자를 포함하지만 LTR 및 패키징 성분이 없는 패키징 세포주가 구축될 수 있다. 일부 구현예에서, 패키징 세포주는, 이종(heterologous) 단백질을 암호화하는 핵산 분자 및/또는 외피(envelope) 당단백질을 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 바이러스 벡터 게놈과 함께 하나 이상의 바이러스 단백질(들)을 암호화하는 핵산 분자로 일시적으로 형질감염될 수 있다.
- [0436] 일부 구현예에서, 바이러스 벡터 및 패키징(packaging) 및/또는 헬퍼(helper) 플라스미드는 형질감염 또는 감염을 통해 패키징(packaging) 세포주 내로 도입된다. 패키징(packaging) 세포주는 바이러스 벡터 게놈을 포함하는 바이러스 벡터 입자를 생성한다. 형질감염 또는 감염 방법은 잘 알려져 있다. 비제한적인 예에는 인산 칼슘(calcium phosphate), DEAE- 텍스트란(DEAE-dextran) 및 리포펙션(lipofection) 방법, 전기 천공법(electroporation) 및 미세주입법(microinjection)이 포함된다.
- [0437] 재조합 플라스미드 및 레트로바이러스 LTR 및 패키징(packaging) 서열이 특별한 세포주 (예를 들어 인산 칼슘 침전에 의해)에 도입될 때, 패키징(packaging) 서열은 재조합 플라스미드의 RNA 전사체가 바이러스 입자로 패키징(packaging)될 수 있게 하고, 이어서 배양 배지 내로 분비될 수 있다. 이어서 일부 구현예에서, 재조합 레트로바이러스를 포함하는 배지를 수집하고, 임의로 농축시키고, 유전자 전이에 사용한다. 예를 들어 일부 측면에서, 패키징(packaging) 플라스미드 및 전달(transfer) 벡터를 패키징(packaging) 세포주에 공동 형질감염(cotransfection)시킨 후, 바이러스 벡터 입자는 배양 배지로부터 회수되고, 당업자에 의해 사용되는 표준 방법에 의해 적정된다.
- [0438] 일부 구현예에서, 렌티바이러스(lentiviral) 벡터와 같은 레트로(retroviral) 바이러스 벡터는 렌티바이러스(lentiviral) 입자의 생성을 허용하는 플라스미드의 도입에 의해 예시적인 HEK 293T 세포주와 같은 패키징(packaging) 세포주에서 생산될 수 있다. 일부 구현예에서, 패키징(packaging) 세포는 형질감염되고/되거나, gag 및 pol을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 및 재조합 수용체, 예를 들어 항원 수용체, 예를 들어 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 함유한다. 일부 구현예에서, 패키징(packaging) 세포주는 선택적으로 및/또는 추가로 rev 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드로 형질감염되고/되거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 패키징(packaging) 세포주는 선택적으로 및/또는 추가로 VSV-G와 같은 비-천연(non-native) 외피(envelope) 당단백질

을 암호화하는 폴리뉴클레오티드로 형질감염되고/되거나 이를 포함한다. 이러한 일부 구현예에서, 세포, 예를 들어 HEK 293T 세포의 형질감염 대략 2일 후, 세포 상청액(supernatant)은 재조합 렌티바이러스(lentiviral) 벡터를 포함하고, 이는 회수되고 적정될 수 있다.

- [0439] 회수 및/또는 생성된 레트로바이러스 벡터 입자는 기재된 바와 같은 방법을 사용하여 표적 세포를 형질도입(transduce)하는데 사용될 수 있다. 일단 표적 세포에서, 바이러스 RNA는 역전사되고, 핵으로 유입(imported)되고, 숙주 게놈에 안정적으로 통합된다. 바이러스 RNA의 통합(integration) 후 1 일 또는 2 일 후에, 재조합 단백질, 예를 들어 CAR과 같은 항원 수용체의 발현이 검출될 수 있다.
- [0440] 일부 구현예에서, 제공된 방법은, 복수의 세포를 포함하는 세포 조성물을 바이러스 입자와 접촉, 예를 들어 인큐베이션함으로써 세포를 형질도입시키는 방법을 포함한다. 일부 구현예에서, 형질감염 또는 형질도입될 세포는 개체로부터 수득된 1 차 세포, 예를 들어 개체에서 농축되고/거나 선택된 세포이거나 이를 포함한다.
- [0441] 일부 구현예에서, 조성물의 형질도입될 세포의 농도는 1.0×10^5 cells/mL 내지 1.0×10^8 cells/mL 또는 약 1.0×10^5 cells/mL 내지 1.0×10^8 cells/mL, 예를 들어 적어도 또는 적어도 약 또는 약 1.0×10^5 cells/mL, 5×10^5 cells/mL, 1×10^6 cells/mL, 5×10^6 cells/mL, 1×10^7 cells/mL, 5×10^7 cells/mL 또는 1×10^8 cells/mL 이다.
- [0442] 일부 구현예에서, 바이러스 입자는, 형질도입될 세포의 총 수(IU/cell)당 바이러스 벡터 입자 또는 그의 감염성 단위(IU)의 특정 비율의 카피(copies)로 제공된다. 예를 들어 일부 구현예에서, 바이러스 입자는, 세포 중 하나당 바이러스 벡터 입자의 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 또는 60IU 또는 약 또는 적어도 또는 적어도 약 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 또는 60IU에서 접촉하는 동안 존재한다.
- [0443] 일부 구현예에서, 바이러스 벡터 입자의 역가(titer)는 1×10^6 IU/mL 및 1×10^8 IU/mL 사이 또는 약 1×10^6 IU/mL 및 1×10^8 IU/mL 사이이고, 예를 들어 5×10^6 IU/mL 내지 5×10^7 IU/mL 사이 또는 약 5×10^6 IU/mL 내지 5×10^7 IU/mL 사이, 예를 들어 적어도 6×10^6 IU/mL, 7×10^6 IU/mL, 8×10^6 IU/mL, 9×10^6 IU/mL, 1×10^7 IU/mL, 2×10^7 IU/mL, 3×10^7 IU/mL, 4×10^7 IU/mL 또는 5×10^7 IU/mL 이다.
- [0444] 일부 구현예에서, 형질도입은, 100 미만, 예를 들어 일반적으로 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5 이하의 감염다중도(MOI)에서 달성될 수 있다.
- [0445] 일부 구현예에서, 상기 방법은 세포를 바이러스 입자와 접촉(contacting) 또는 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 접촉(contacting)은 30분 내지 72시간, 예를 들어 30분 내지 48시간, 30분 내지 24시간, 또는 1시간 내지 24시간, 예를 들어 적어도 또는 약 30분, 1시간, 2 시간, 6시간, 12시간, 24시간, 36시간 이상이다.
- [0446] 일부 구현예에서, 접촉(contacting)은 용액에서 수행된다. 일부 구현예에서, 세포 및 바이러스 입자는 0.5mL 내지 500mL 또는 약 0.5mL 내지 500mL, 예를 들어 0.5mL 내지 200mL, 0.5mL 내지 100mL, 0.5mL 내지 50mL, 0.5mL 내지 10mL, 0.5mL 내지 5mL, 5mL 내지 500mL, 5mL 내지 200mL, 5mL 내지 100mL, 5mL 내지 50mL, 5mL 내지 10mL, 10mL 내지 500mL, 10mL 내지 200mL, 10mL 내지 100mL, 10mL 내지 50mL, 50mL 내지 500mL, 50mL 내지 200mL, 50mL 내지 100mL, 100mL 내지 500mL, 100mL 내지 200mL, 또는 200mL 내지 500mL 또는 약 0.5mL 내지 200mL, 0.5mL 내지 100mL, 0.5mL 내지 50mL, 0.5 mL 내지 10mL, 0.5mL 내지 5mL, 5mL 내지 500mL, 5mL 내지 200mL, 5mL 내지 100mL, 5mL 내지 50mL, 5mL 내지 10mL, 10mL 내지 500mL, 10mL 내지 200mL, 10mL 내지 100mL, 10mL 내지 50mL, 50mL 내지 500mL, 50mL 내지 200mL, 50mL 내지 100mL, 100mL 내지 500mL, 100mL 내지 200mL, 또는 200mL 내지 500mL의 부피로 접촉(contacting)된다.
- [0447] 특정 구현예에서, 입력 세포는, 바이러스 DNA에 의해 암호화되는 재조합 수용체에 결합하거나 이를 인식하는 결합 분자를 포함하는 입자로 처리(treat), 인큐베이션 또는 접촉된다.
- [0448] 일부 구현예에서, 바이러스 벡터 입자와 세포의 인큐베이션은, 바이러스 벡터 입자로 형질도입된 세포를 포함하는 출력 조성물을 생성하거나 초래한다.
- [0449] 일부 구현예에서, 재조합 핵산은 전기 천공법을 통해 T 세포로 전달된다(예를 들어 Chicaybam et al, (2013) PLoS ONE 8(3): e60298 및 Van Tedeloo 등 (2000) Gene Therapy 7(16): 1431-1437. 참조한다.). 일부 구현예에

서, 재조합 핵산은 전위(transposition)를 통해 T 세포로 전달된다(예를 들어 Manuri 등 (2010) Hum Gene Ther 21(4): 427-437; Sharma 등 (2013) Molec Ther Nucl Acids 2, e74; 및 Huang 등 (2009) Methods Mol Biol 506: 115-126. 참조한다.). 면역 세포에서 유전 물질을 도입하고 발현시키는 다른 방법에는 인산칼슘 형질감염(예를 들어 Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y.에 기재된 바와 같음), 원형질체 융합, 양이온성 리포솜-매개 형질감염; 텅스텐 입자 촉진 미세 입자 충격(Johnston, Nature, 346: 776-777 (1990)); 및 인산스트론튬 DNA 공동 침전(Brash 등, Mol. Cell Biol., 7: 2031-2034 (1987))이 포함된다.

[0450] 재조합 산물을 암호화하는 핵산 전달을 위한 다른 접근법 및 벡터는 예를 들어 문헌[국제공개공보 W02014055668 및 미국특허 7,446,190]에 기재된 것이다.

[0451] 일부 구현예에서, 세포, 예를 들어 T 세포는 예를 들어 T 세포 수용체(TCR) 또는 키메라 항원 수용체(CAR)로 증폭 동안 또는 후에 형질도입될 수 있다. 원하는 수용체의 유전자 도입을 위한 상기 형질 감염은 예를 들어 임의의 적합한 레트로바이러스 벡터로 수행될 수 있다. 이어서 유전자 변형 세포의 집단은 초기 자극(예를 들어 항-CD3/항-CD28 자극)으로부터 유리될 수 있으며, 후속적으로 제 2 유형의 자극으로, 예를 들어 새로이 도입된 수용체를 통해 자극될 수 있다. 상기 제 2 유형의 자극은 새로운 수용체의 프레임워크 내에서 직접 결합하는(예를 들어 수용체 내의 불변 영역을 인지함으로써) 유전자 도입된 수용체의 펩티드/MHC 분자, 즉 동종(교차 결합) 리간드(예를 들어 CAR의 천연 리간드) 또는 임의의 리간드(예를 들어 항체) 형태의 항원 자극을 포함할 수 있다. 예를 들어 문헌[Cheadle et al, "Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy" Methods Mol Biol. 2012; 907:645-66 또는 Barrett 등, Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine Vol. 65: 333-347 (2014)]을 참조한다.

[0452] 일부 경우에, 세포, 예를 들어 T 세포가 활성화되는 것이 필요하지 않은 벡터를 사용할 수 있다. 일부 상기의 경우에, 세포는 활성화되기 전에 선택 및/또는 형질도입될 수 있다. 따라서, 세포는 세포 배양 이전에 또는 이후에 조작될 수 있고, 일부 경우에는 배양의 적어도 일부와 동시에 또는 그 동안에 조작될 수 있다.

[0453] 추가 핵산 중에서, 예를 들어 도입을 위한 유전자는, 예를 들어 전달된 세포의 생존력 및/또는 기능을 촉진함으로써 요법의 효능을 개선하기 위한 유전자; 예를 들어 생체 내에서 생존 또는 국소화를 평가하기 위한 세포의 선택 및/또는 평가를 위한 유전자 마커를 제공하기 위한 유전자; 문헌[Lupton S. D. 등, Mol. and Cell Biol., 11:6 (1991); and Riddell 등, Human Gene Therapy 3:319-338 (1992)]에 기재된 바와 같이 예를 들어 생체 내에서 음성 선택에 세포를 예민하게 만들어 안정성을 개선하기 위한 유전자가 있고; 또한 음성 양성 선택 가능한 마커를 음성 선택 가능한 마커와 융합시켜 유래된 2작용성 선택 가능한 융합 유전자의 용도를 기술하는 문헌[국제 출원 공보 PCT/US91/08442 및 PCT/US94/05601 by Lupton 등]을 참조한다. 예를 들어 문헌[Riddell 등, 미국 특허 번호 6,040,177의 14-17열]을 참조한다.

[0454] 4. 조작된 세포의 배양, 증폭 및 제형

[0455] 일부 구현예에서, 예를 들어 제공된 방법, 용도, 제조 물품 또는 조성물 중의 어느 것에 따른 세포 치료를 위한 조작된 세포를 생성하는 방법은 예를 들어 증식 및/또는 증폭을 촉진하는 조건 하에 세포를 배양하는 것과 같은 세포 배양을 위한 하나 이상의 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 유전자 조작 단계 이후에, 예를 들어 형질도입 또는 형질감염에 의해 재조합 폴리펩티드를 세포에 도입하는 단계 이후에 증식 및/또는 팽창을 촉진하는 조건 하에서 배양된다. 특정 구현예에서, 세포가 자극 조건 하에서 인큐베이션되고 재조합 폴리뉴클레오티드(예를 들어 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드)로 형질도입되거나 형질감염된 후, 세포가 배양된다. 일부 구현예에서, CAR을 암호화하는 재조합 폴리뉴클레오티드로 형질도입 또는 형질감염에 의해 조작된 CAR-양성 T 세포의 조성물은 증식 및/또는 증폭을 촉진하는 조건 하에 배양된다.

[0456] 특정 구현예에서, 조작된 T 세포의 하나 이상의 조성물은 농축 T 세포, 예를 들어 재조합 수용체, 예를 들어 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드로 조작된 농축 T 세포의 2개의 개별 조성물과 같이, 2개의 개별 조성물이거나 이를 포함한다. 특정 구현예에서, 농축 T 세포의 2개의 개별 조성물, 예를 들어 동일한 생물학적 샘플로부터 선택, 단리 및/또는 농축된 농축 T 세포의 2개의 개별 조성물은 예를 들어 형질도입 또는 형질감염에 의해 세포에 재조합 폴리펩티드를 도입하는 것과 같은 유전적 조작 단계 이후에 같이 자극 조건 하에 개별적으로 배양된다. 특정 구현예에서, 2개의 개별 조성물은 농축 CD8+ T 세포의 조성물, 예를 들어 재조합 수용체, 예를 들어 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드로 조작된 농축 CD4+ T 세포의 조성물을 포함한다. 특정 구현예에서, 2개의 개별 조성물은 농축 CD8+ T 세포의 조성물, 예를 들어 재조합 수용체, 예를 들어 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드로 조작된 농축 CD4+ T 세포의 조성물을 포함한다. 일부 구현예에서, 농축 CD4+ T 세포 및 농축 CD8+ T

세포의 2개의 개별 조성물, 예를 들어 재조합 수용체, 예를 들어 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드로 각각 개별적으로 조작된 농축 CD4+ T 세포의 조성물 및 농축 CD8+ T 세포의 조성물은, 예를 들어 증식 및/또는 증폭을 촉진하는 조건에서 별도로 배양된다.

[0457] 일부 구현예에서, 배양은 증식 및/또는 증폭을 촉진하는 조건에서 수행된다. 일부 구현예에서, 이러한 조건은 집단에서 세포의 증식, 증폭, 활성화 및/또는 생존을 유래하도록 설계될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 자극 조건은 특정 배지, 온도, 산소 함량, 이산화탄소 함량, 시간, 제제(agents), 예를 들어 영양소, 아미노산, 항생제, 이온 및/또는 자극 인자, 예를 들어 사이토카인, 케모카인(chemokines), 항원, 결합 파트너, 융합 단백질, 재조합 가용성 수용체 및 세포를 성장, 분열 및/또는 증폭을 촉진하도록 설계된 임의의 기타 제제 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0458] 특정 구현예에서, 세포는 하나 이상의 사이토카인의 존재 하에 배양된다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 재조합 사이토카인이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 인간 재조합 사이토카인이다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 T 세포 대해 내인성이고/거나 T 세포에 의해 발현되는 수용체에 결합하고/거나 결합할 수 있다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인, 예를 들어 재조합 사이토카인은 사이토카인의 4-알파-헬릭스 번들 패밀리의 멤버이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 사이토카인의 4-알파-헬릭스 번들 패밀리의 멤버는 인터루킨-2(IL-2), 인터루킨-4(IL-4), 인터루킨-7(IL-7), 인터루킨-9 (IL-9), 인터루킨 12(IL-12), 인터루킨 15(IL-15), 과립구 콜로니 자극 인자(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF) 및 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)를 포함하되 이에 국한되지 않는다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 재조합 사이토카인은 IL-2, IL-7 및/또는 IL-15를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포, 예를 들어 조작된 세포는 1 IU/mL 내지 2,000 IU/mL, 10IU/mL 내지 100IU/mL, 50IU/mL 내지 200IU/mL, 100IU/mL 내지 500IU/mL, 100IU/mL 내지 1,000IU/mL, 500IU/mL 내지 2,000IU/mL 또는 100IU/mL 내지 1,500IU/mL의 농도에서 사이토카인, 예를 들어 재조합 인간 사이토카인의 존재 하에 배양된다.

[0459] 일부 구현예에서, 배양은 일반적으로 1차 면역 세포들(primary immune cells), 예를 들어 인간 T 림프구들(human T lymphocytes)의 성장에 적합한 온도, 예를 들어 약 25℃ 이상, 일반적으로 약 30℃ 이상, 및 일반적으로 (약) 37℃를 포함하는 조건 하에 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 농축된 T 세포들의 조성물은 25 내지 38℃, 예를 들어 30 내지 37℃, 예를 들어 (약) 37℃ ± 2℃에서 인큐베이션된다(incubated). 일부 구현예에서, 상기 인큐베이션(incubation)은, 상기 배양(culture) 가령, 배양(cultivation) 또는 증폭까지의 시간 동안 수행되어 원하는 또는 임계치 밀도, 수 또는 투여량의 세포들을 초래한다. 일부 구현예에서, 상기 인큐베이션은 24 시간 이상, 48 시간 이상, 72 시간 이상, 96 시간 이상, 5 일 이상, 6 일 이상, 7 일 이상, 8 일 이상, 9 일 이상 또는 그 보다 더 많은 시간 이상, 또는 약 24 시간 이상, 약 48 시간 이상, 약 72 시간 이상, 약 96 시간 이상, 약 5 일 이상, 약 6 일 이상, 약 7 일 이상, 약 8 일 이상, 약 9 일 이상 또는 약 그 보다 더 많은 시간 이상, 또는 약 24 시간, 약 48 시간, 약 72 시간, 약 96 시간, 약 5 일, 약 6 일, 약 7 일, 약 8 일, 약 9 일 또는 약 그 보다 더 많은 시간 동안, 또는 24 시간, 48 시간, 72 시간, 96 시간, 5 일, 6 일, 7 일, 8 일, 9 일 또는 그 보다 더 많은 시간 동안 수행된다.

[0460] 특정 구현예에서, 상기 배양은 폐쇄 시스템에서 수행된다. 특정 구현예에서, 상기 배양은 멸균 조건들 하에서 폐쇄 시스템에서 수행된다. 특정 구현예에서, 상기 배양은 상기 제공된 시스템들의 하나 이상의 단계들과 동일한 폐쇄 시스템에서 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 농축된 T 세포의 조성물은 폐쇄 시스템으로부터 제거되고, 상기 배양을 위한 생물 반응기(bioreactor)에 배치 및/또는 생물 반응기에 연결된다. 상기 배양에 적합한 생물 반응기들의 예는 GE Xuri W25, GE Xuri W5, Sartorius BioSTAT RM 20 | 50, Finesse SmartRocker Bioreactor Systems 및 Pall XRS Bioreactor Systems을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 생물 반응기는 상기 배양 단계의 적어도 일부 동안 세포들을 관류시키고(perfuse) 및/또는 혼합하는데(mix) 사용된다.

[0461] 일부 구현예에서, 상기 혼합은 흔들림(rocking) 및/또는 움직임(motioning)이거나 및/또는 흔들림 및/또는 움직임을 포함한다. 일부 경우에, 상기 생물 반응기는 일부 측면에서 산소 이동을 증가시킬 수 있는 움직임 또는 흔들림에 영향을 받을 수 있다. 상기 생물 반응기의 움직임은 상기 생물 반응기의 수평 축을 따라 회전하는 것, 수직 축을 따라 회전하는 것, 틸트 또는 경사진 수평 축을 따라 흔들림 움직이는 것 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다. 일부 구현예에서, 상기 인큐베이션의 적어도 일부는 흔들림(rocking)으로 수행된다. 상기 흔들림 속도 및 흔들림 각도는 원하는 교반(agitation)을 달성하도록 조정될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 흔들림 각도는 20°, 19°, 18°, 17°, 16°, 15°, 14°, 13°, 12°, 11°, 10°, 9°, 8°, 7°, 6°, 5°, 4°, 3°, 2° 또는 1°, 또는 약 20°, 약 19°, 약 18°, 약 17°, 약

16° , 약 15° , 약 14° , 약 13° , 약 12° , 약 11° , 약 10° , 약 9° , 약 8° , 약 7° , 약 6° , 약 5° , 약 4° , 약 3° , 약 2° 또는 약 1° 이다. 특정 구현예에서, 상기 흔들림 각도는 6-16° 이다. 다른 구현예에서, 상기 흔들림 각도는 7-16° 이다. 다른 구현예에서, 상기 흔들림 각도는 8-12° 이다. 일부 구현예에서, 상기 흔들림 속도는 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, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 rpm 이다. 일부 구현예에서, 상기 흔들림 속도는 4 내지 12 rpm, 예를 들어 4 내지 6 rpm이다. 상기 세포 배양 증폭(cell culture expansion)의 적어도 일부는 5° 내지 10° , 예를 들어 6° 의 각도에서 5 RPM 내지 15 RPM의 속도, 예를 들어 6 RMP 또는 10 RPM의 속도와 같은 일정한 흔들림 속도에서와 같은 흔들림 움직임으로 수행된다.

[0462] 일부 구현예에서, 생물 반응기는 약 또는 적어도 0.01 L/min, 0.05 L/min, 0.1 L/min, 0.2 L/min, 0.3 L/min, 0.4 L/min, 0.5 L/min, 1.0 L/min, 1.5 L/min 또는 2.0 L/min 또는 2.0 L/min 초과와 안정적인 공기 흐름을 가지면서 37 ° C 또는 근방의 온도 및 5% 또는 근방의 CO2 수준을 유지한다. 특정 구현예에서, 배양의 적어도 일부는 예를 들어 배양 세포의 배양 개시 및/또는 밀도와 관련한 타이밍에 따라, 관류, 예를 들어 290 ml/일, 580 ml/일 및/또는 1160 ml/일의 속도로 수행된다. 일부 구현예에서, 세포 배양 팽창의 적어도 일부는 흔들림 동작, 예를 들어 5° 내지 10° 사이, 예를 들어 6° 의 각도에서, 일정한 흔들림 속도, 예를 들어 5 내지 15RPM 사이, 예를 들어 6RMP 또는 10RPM의 속도로 수행된다.

[0463] 일부 구현예에서, 제공된 방법, 용도 또는 제조 물품에 따라, 세포 요법 및/또는 조작된 세포를 제조, 생성 또는 생산하는 방법은 기재된 바와 같은 인큐베이션, 조작 및 배양 및/또는 하나 이상의 다른 공정 단계 전 또는 후의 공정 단계에서 초래된 유전자 조작 세포의 제형과 같은 세포의 제형을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 제형을 포함하는 하나 이상의 공정 단계는 폐쇄 시스템에서 수행될 수 있다. 일부 경우에, 세포는 세포 요법 및/또는 조작된 세포를 제조, 생성 또는 생산하기 위한 하나 이상의 단계로 가공(예를 들어 원심분리 챔버 및/또는 폐쇄 시스템에서 수행)되고, 기재된 바와 같은 배양, 예를 들어 육성 및 증폭 및/또는 하나 이상의 다른 공정 단계 전 또는 후의 형질 도입 공정 단계에서 초래된 유전자 조작 세포의 제형과 같은 세포의 제형을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자 조작된 세포는 주어진 투여량 또는 이의 분획으로 투여하기 위한 세포의 수를 포함하는 단위 투여량 형태 조성물로서 제형화된다.

[0464] 일부 구현예에서, 제조할 항원 수용체, 예를 들어 CAR 또는 TCR로 조작된 세포를 포함하는 세포의 단위 투여량은 약학 조성물 또는 제형과 같은 조성물 또는 제형으로 제공된다. 이러한 조성물은 제공된 방법, 예를 들어 질환, 상태 및 장애의 치료, 또는 검출, 진단 및 예후 방법, 용도 및 제조 물품에 따라 사용될 수 있다. 일부 경우에, 세포는 단일 단위 투여량 투여 또는 다중 투여량 투여를 위한 것과 같은 투여량 투여를 위한 양으로 제형화될 수 있다.

[0465] 일부 구현예에서, 세포는 백 또는 바이알과 같은 용기로 제형화될 수 있다. 일부 구현예에서, 바이알은 주입 바이알일 수 있다. 일부 구현예에서, 바이알은 주어진 투여량 또는 이의 분획에서 투여를 위한 세포의 수를 포함하는 것과 같이 조작된 세포의 단위 단위 투여량으로 제형화된다.

[0466] 일부 구현예에서, 상기 세포들은 약학적으로 허용되는 완충액으로 제형화되는데, 이는 일부 측면에서 약학적으로 허용되는 담체(carrier) 또는 부형제(excipient)를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 처리는 배지를 대상체에게 투여하기 위해 약학적으로 허용되거나 바람직한 배지 또는 제형 완충액으로 교환하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 처리 단계들은 하나 이상의 임의의 약학적으로 허용되는 담체들 또는 부형제들을 포함할 수 있는 약학적으로 허용되는 완충액에서 상기 세포들을 대체하기 위해 형질 도입 및/또는 증폭된 세포들을 세척하는 것을 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체들 또는 부형제들을 포함하는 이러한 약학적 형태의 예는 상기 세포들 및 조성물들을 대상체에게 투여하기에 허용되는 형태들과 관련하여 하기에 기술될 수 있다. 일부 구현예에서 상기 약학적 조성물은 질환 또는 증후를 치료 또는 예방하는데 효과적인 양들, 예를 들어 치료적 유효 또는 예방적 유효량으로 상기 세포들을 함유한다.

[0467] 일부 구현예에서, 제형화 완충제는 냉동 보존제를 함유한다. 일부 구현예에서, 세포는 1.0% 내지 30% DMSO 용액, 예를 들어 5% 내지 20% DMSO 용액 또는 5% 내지 10% DMSO 용액을 함유하는 냉동 보존 용액으로 제형화된다. 일부 구현예에서, 냉동보존 용액은 예를 들어 20% DMSO 및 8% 인간 혈청 알부민(HSA) 또는 기타 적합한 세포 동결 배지를 함유하는 PBS이거나 이를 함유한다. 일부 구현예에서, 냉동보존 용액은 예를 들어 7.5% DMSO 이상 또는 약 7.5% DMSO이거나 이를 함유한다. 일부 구현예에서, 공정 단계는 냉동보존 용액에서 세포를 교체하기 위해 형질 도입된 및/또는 증폭된 세포를 세척하는 것을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 최종농도가 (약) 12.5%, 12.0%, 11.5%, 11.0%, 10.5%, 10.0%, 9.5%, 9.0%, 8.5%, 8.0%, 7.5%, 7.0%, 6.5%, 6.0%, 5.5%,

또는 5.0% DMSO, 또는 1% 내지 15%, 6% 내지 12%, 5% 내지 10%, 또는 6% 내지 8% DMSO인 배지 및/또는 용액에서 동결, 예를 들어 동결보호 또는 동결보존된다. 특정 구현예에서, 세포는 최종 농도가 (약) 5.0%, 4.5%, 4.0%, 3.5%, 3.0%, 2.5%, 2.0%, 1.5%, 1.25%, 1.0%, 0.75%, 0.5%, 또는 0.25% HSA, 또는 0.1% 내지 5%, 0.25% 내지 4%, 0.5% 내지 2%, 또는 1% 내지 2% HSA인 배지 및/또는 용액에서 동결, 예를 들어 동결보호 또는 동결보존된다.

[0468] 일부 구현예에서, 제형은 배양 또는 증폭된 세포와 같은 세포를 세척, 회석 또는 농축시키는 것을 포함하는 하나 이상의 공정 단계를 사용하여 수행된다. 일부 구현예에서, 공정은 주어진 단위 투여량 또는 이의 분획으로 투여를 위한 세포의 수를 포함하는 단위 투여 투여량 형태 조성물과 같은 원하는 농도 또는 수로 세포의 회석 또는 농축을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 공정 단계는 원하는 대로 세포의 농도를 증가시키기 위해 부피 감소를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 공정 단계는 원하는 대로 세포의 농도를 감소시키기 위해 부피 첨가를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 공정은 형질 도입 및/또는 증폭된 세포에 제형 완충액의 부피를 추가하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제형 완충제의 부피는 (약) 10 mL 내지 1000 mL, 예를 들어 적어도 (약) 또는 (약) 50 mL, 100 mL, 200 mL, 300 mL, 400 mL, 500 mL, 600 mL, 700 mL, 800 mL, 900 mL 또는 1000 mL이다.

[0469] 일부 구현예에서, 세포 조성물을 제형화하기 위한 상기 공정 단계는 폐쇄된 시스템에서 수행된다. 예시적인 상기 공정 단계는 Sepax® 또는 Sepax 2® 세포 처리 시스템과 사용하기 위한 것을 포함하여 Biosafe SA에 의해 생산 및 판매되는 원심분리 챔버와 같은 세포 처리 시스템과 관련된 하나 이상의 시스템 또는 키트와 함께 원심분리 챔버를 사용하여 수행 될 수 있다. 예시적인 시스템 및 공정이 문헌[국제 공개 번호 WO2016/073602]에 기재되어 있다. 일부 구현예에서, 방법은 기재된 바와 같이, 상기 구현예 중 어느 하나에서 제형 완충제, 예를 들어 약학적으로 허용 가능한 완충제에서 제형화된 세포의 생성된 조성물인 제형화된 조성물을 원심분리 챔버의 내부 공동에서 발현을 달성하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제형화된 조성물의 발현은 원심 분리 챔버를 가진 폐쇄 시스템의 일부로서 작동적으로 연결된 본원에 기재된 생물 의학 재료 용기의 바이알과 같은 용기이다. 일부 구현예에서, 생물 의학 재료 용기는 하나 이상의 공정 단계를 수행하는 폐쇄 시스템 또는 디바이스에 통합 및 작동 가능한 연결을 위해 구성되고/거나 이에 통합되거나 작동 가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 생물 의학 재료 용기는 출력 라인 또는 출력 위치에서 시스템에 연결된다. 일부 경우에, 폐쇄 시스템은 입구 튜브에서 생물 의학 재료 용기의 바이알에 연결된다. 본원에 기재된 생물 의학 재료 용기와 함께 사용하기 위한 예시적인 폐쇄 시스템은 Sepax® 및 Sepax® 2 시스템을 포함한다.

[0470] 일부 구현예에서, 원심 챔버 또는 세포 처리 시스템과 관련된 폐쇄 시스템은 제형화된 조성물의 발현을 위해 하나 또는 복수의 용기가 연결될 수 있는 포트가 있는 튜브 라인의 각 끝에 결합된 다방향 튜브 매니폴드를 포함하는 다중 포트 출력 키트를 포함한다. 일부 측면에서, 원하는 수 또는 다수의 바이알은 다중 포트 출력 중 하나 이상, 일반적으로 2 이상, 예를 들어 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8 이상의 포트에 멸균적으로 연결될 수 있다. 예를 들어 일부 구현예에서, 하나 이상의 용기, 예를 들어 생물의학 재료 용기는 포트에 부착되거나 모든 포트보다 적은 수에 부착될 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 시스템은 생물의학 재료 용기의 복수의 바이알 내로 출력 조성물의 발현에 영향을 미칠 수 있다.

[0471] 일부 측면에서, 세포는 단일 단위 투여량 투여 또는 다중 투여량 투여와 같은 투여량 투여를 위한 양으로 복수의 출력 용기, 예를 들어 바이알 중 하나 이상에 발현될 수 있다. 예를 들어 일부 구현예에서, 바이알은 각각 주어진 투여량 또는 이의 분획으로 투여하기 위한 세포의 수를 함유할 수 있다. 따라서, 일부 측면에서, 각각의 바이알은 투여를 위한 단일 단위 투여량을 함유할 수 있거나, 복수의 바이알 중 하나 이상, 예를 들어 2개의 바이알 또는 3개의 바이알이, 함께 투여를 위한 투여량을 구성하도록 원하는 투여량의 일부를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 4개의 바이알이 함께 투여를 위한 투여량을 구성한다.

[0472] 따라서 용기, 예를 들어 백 또는 바이알은 일반적으로 투여될 세포, 예를 들어 이의 하나 이상의 단위 투여량을 함유한다. 단위 투여량은 대상체에게 투여될 세포의 양 또는 수 또는 투여될 세포의 수의 2배(또는 그 이상)일 수 있다. 이는 대상체에게 투여될 세포의 최저 투여량 또는 가능한 최저 투여량일 수 있다. 일부 측면에서, 제공된 제조 물품은 복수의 출력 용기 중 하나 이상을 포함한다.

[0473] 일부 구현예에서, 각 용기, 예를 들어 백 또는 바이알은 개별적으로 단위 투여량의 세포를 포함한다. 따라서, 일부 구현예에서, 각각의 용기는 동일하거나 대략적으로 또는 실질적으로 동일한 수의 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 각 단위 투여량은 약 또는 적어도 (약) 1×10^6 , 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 또는 1×10^8 의 조작된 세포, 총 세포, T 세포 또는 PBMC를 포함한다. 일부 구현예에서, 각 단위 투여량은 CD3+인 약

또는 적어도 (약) 1×10^6 , 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 또는 1×10^8 개의 CAR+ T 세포, 예를 들어 CD4+ 또는 CD8+, 또는 이의 실행 가능한 서브세트를 포함한다.

[0474] 일부 구현예에서, 각 용기, 예를 들어 백 또는 바이알에서 제형화된 세포 조성물의 부피는 (약) 10 mL 내지 (약) 100 mL, 예를 들어 적어도 (약) 또는 (약) 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL, 60 mL, 70 mL, 80 mL, 90 mL 또는 100 mL이다. 일부 구현예에서, 각 용기, 예를 들어 백 또는 바이알의 제형화된 세포 조성물의 부피는 약 1mL 내지 약 10mL, 예를 들어 약 1mL 내지 약 5mL이다. 일부 구현예에서, 각 용기, 예를 들어 백 또는 바이알의 제형화된 세포 조성물의 부피는 약 4mL 내지 약 5mL 이다. 일부 구현예에서, 각 용기, 예를 들어 백 또는 바이알의 제형화된 세포 조성물의 부피는 (약) 4.4 mL 이다. 일부 구현예에서, 각 용기, 예를 들어 백 또는 바이알의 제형화된 세포 조성물의 부피는 (약) 4.5 mL 이다. 일부 구현예에서, 각 용기, 예를 들어 백 또는 바이알의 제형화된 세포 조성물의 부피는 (약) 4.6 mL 이다. 일부 구현예에서, 각 용기, 예를 들어 백 또는 바이알의 제형화된 세포 조성물의 부피는 (약) 4.7 mL 이다. 일부 구현예에서, 각 용기, 예를 들어 백 또는 바이알의 제형화된 세포 조성물의 부피는 (약) 4.8 mL 이다. 일부 구현예에서, 각 용기, 예를 들어 백 또는 바이알의 제형화된 세포 조성물의 부피는 (약) 4.9 mL 이다. 일부 구현예에서, 각 용기, 예를 들어 백 또는 바이알의 제형화된 세포 조성물의 부피는 (약) 5.0 mL 이다.

[0475] 일부 구현예에서, 제형화된 세포 조성물은, mL당 (약) 0.5×10^6 재조합 수용체-발현(예를 들어 CAR+)/CD3+ 세포 또는 이러한 생존 세포 이상, mL당 (약) 1.0×10^6 재조합 수용체-발현(예를 들어 CAR+)/CD3+ 세포 또는 이러한 생존 세포 이상, mL당 (약) 1.5×10^6 재조합 수용체-발현(예를 들어 CAR+)/CD3+ 세포 또는 이러한 생존 세포 이상, mL당 (약) 2.0×10^6 재조합 수용체-발현(예를 들어 CAR+)/CD3+ 세포 또는 이러한 생존 세포 이상, mL당 (약) 2.5×10^6 재조합 수용체-발현(예를 들어 CAR+)/CD3+ 세포 또는 이러한 생존 세포 이상, mL당 (약) 2.6×10^6 재조합 수용체-발현(예를 들어 CAR+)/CD3+ 세포 또는 이러한 생존 세포 이상, mL당 (약) 2.7×10^6 재조합 수용체-발현(예를 들어 CAR+)/CD3+ 세포 또는 이러한 생존 세포 이상, mL당 (약) 2.8×10^6 재조합 수용체-발현(예를 들어 CAR+)/CD3+ 세포 또는 이러한 생존 세포 이상, mL당 (약) 2.9×10^6 재조합 수용체-발현(예를 들어 CAR+)/CD3+ 세포 또는 이러한 생존 세포 이상, mL당 (약) 3.0×10^6 재조합 수용체-발현(예를 들어 CAR+)/CD3+ 세포 또는 이러한 생존 세포 이상, mL당 (약) 3.5×10^6 재조합 수용체-발현(예를 들어 CAR+)/CD3+ 세포 또는 이러한 생존 세포 이상, mL당 (약) 4.0×10^6 재조합 수용체-발현(예를 들어 CAR+)/CD3+ 세포 또는 이러한 생존 세포 이상, mL당 (약) 4.5×10^6 재조합 수용체-발현(예를 들어 CAR+)/CD3+ 세포 또는 이러한 생존 세포 이상, 또는 mL당 (약) 5×10^6 재조합 수용체-발현(예를 들어 CAR+)/CD3+ 세포 또는 이러한 생존 세포 이상의 농도를 갖는다. 일부 구현예에서, CD3+ 세포는 CD4+ T 세포이다. 일부 구현예에서, CD3+ 세포는 CD8+ T 세포이다. 일부 구현예에서, CD3+ T 세포는 CD4+ 및 CD8+ T 세포이다.

[0476] 일부 구현예에서, 용기, 예를 들어 백 또는 바이알의 세포는 냉동 보존될 수 있다. 일부 구현예에서, 용기, 예를 들어 바이알은 나중에 사용할 때까지 액체 질소에 보관할 수 있다.

[0477] 일부 구현예에서, 상기 방법에 의해 생성된 이러한 세포, 또는 이러한 세포를 포함하는 조성물은, 예를 들어 본원에 기재된 방법, 용도 및 제조 물품에 따라 질환 또는 병태를 치료하기 위해 대상체에게 투여된다.

[0478] III. 조성물 및 제형

[0479] 일부 구현예에서, 재조합 항원 수용체, 예를 들어 CAR 또는 TCR로 조작된 세포를 포함하는 세포들의 투여량이 약학적 조성물 또는 제형과 같은 조성물 또는 제형으로 제공된다. 세포를 조작하는 방법과 관련하여 생성된 것을 포함하는 예시적인 조성물 및 제형이 상기에 기재되어 있다. 이러한 조성물은 질환, 병태, 및 장애의 예방 또는 치료에서, 또는 검출, 진단, 및 예후 방법에서와 같이 제공된 방법 또는 용도, 및/또는 제공된 제조 물품 또는 조성물에 따라 사용될 수 있다.

[0480] 용어 "약학적 제형(pharmaceutical formulation)"은 그 안에 함유된 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적일 수 있도록 하는 형태이고, 상기 제형이 투여되는 대상체에 허용 가능하지 않을 정도로 독성인 추가 성분을 함유하지 않는 제제(preparation)를 지칭한다.

- [0481] "약학적으로 허용되는 담체"는 활성 성분 이외의 약학적 제형의 성분을 나타내며, 이는 대상체에게 무독성이다. 약제학적으로 허용되는 담체는 완충제, 부형제, 안정제 또는 보존제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0482] 일부 측면에서, 상기 담체의 선택은 상기 특정 세포 또는 제제 및/또는 투여 방법에 의해 부분적으로 판단된다. 따라서, 다양한 적합한 제형들이 존재한다. 예를 들어 상기 약학적 조성물은 보존제들을 함유할 수 있다. 적합한 보존제들은 예를 들어 메틸파라벤(methylparaben), 프로필파라벤(propylparaben), 벤조산나트륨(sodium benzoate) 및 벤잘코늄 염화물(benzalkonium chloride)을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 둘 이상의 보존제들의 혼합물이 사용된다. 상기 보존제 또는 이들의 혼합물들은 전형적으로 상기 총 조성물의 중량을 기준으로 약 0.0001% 내지 약 2%의 양으로 존재한다. 담체들은 예를 들어 Remington 's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)에 기술되어 있다. 약학적으로 허용되는 담체들은 일반적으로 사용된 상기 투여량 및 농도들에서 수용자들에게 무독성이며, 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산과 같은 완충제들; 아스코르브 산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제들; 보존제들 (예를 들어 옥타데실디메틸벤질암모늄 클로라이드); 헥사메토늄 염화물(hexamethonium chloride); 벤즈알코늄 염화물(benzalkonium chloride); 벤제토늄 염화물(benzethonium chloride); 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 메틸 또는 프로필 파라벤과 같은 알킬 파라벤들(alkyl parabens); 카테콜(catechol); 레조르시놀(resorcinol); 사이클로헥산올; 3- 펜탄올; 및 m- 크레졸; 저 분자량 (약 10 잔기 미만) 폴리펩티드; 혈청알부민, 젤라틴 또는 면역 글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신과 같은 아미노산들(amino acids); 당당류, 이당류 및 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함한 다른 탄수화물들(carbohydrates); 킬레이트제들(chelating agents), 예를 들어 EDTA; 슈 크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨과 같은 당들; 나트륨과 같은 염-형성 반대-이온들; 금속 착물들(예 : Zn- 단백질 착물); 및/또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 비이온성 계면 활성제를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0483] 일부 측면에서, 완충제들이 상기 조성물들에 포함된다. 적합한 완충제는 예를 들어 시트르산, 시트르산 나트륨, 인산, 인산 칼륨 및 다양한 다른 산들 및 염들을 포함한다. 일부 측면에서, 둘 이상의 완충제들의 혼합물이 사용된다. 상기 완충제 또는 이의 혼합물들은 전형적으로 총 조성물의 약 0.001 중량% 내지 약 4 중량%의 양으로 존재한다. 투여 가능한 약학적 조성물의 제조 방법이 공지되어 있다. 예시적인 방법들은 예를 들어 Remington 에 보다 상세하게 기술되어 있다: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins, Lippincott Williams & Wilkins; 21판 (2005년 5월 1일).
- [0484] 상기 제제 또는 조성물은 또한 상기 세포들로 치료되는 특정 적응증, 질환 또는 증후에 유용한 하나 이상의 활성 성분, 바람직하게는 상기 세포들에 상보적인 활성들을 가지는 상기 활성 성분(여기서 각각의 활성들은 서로 약영향을 미치지 않는다.)을 함유할 수 있다. 이러한 활성 성분들은 상기 의도된 목적에 효과적인 양들로 조합하여 적합하게 존재한다. 따라서, 일부 실시 예에서, 약제학적 조성물은 화학 치료제들과 같은 다른 약학적 활성제들 또는 약물들, 예를 들어 아스파라기나아제, 부술판, 카보플라틴, 시스플라틴, 다우노루비신, 독소루비신, 플루오로우라실, 겐시타빈, 하이드록시우레아, 메토트렉세이트, 파클리탁셀, 리톡시맵, 빈블라스틴, 및/또는 빈크리스틴 등을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 작용제 또는 세포는 염, 예를 들어 약학적으로 허용되는 염의 형태로 투여된다. 적합한 제약상 허용되는 산 부가염은 무기산, 예를 들어 염산, 브롬산, 인산, 메타인산, 질산 및 황산으로부터 유래된 것, 및 유기산, 예를 들어 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 말산, 락트산, 푸마르산, 벤조산, 글리콜산, 글루콘산, 숙신산 및 아릴설폰산, 예를 들어 p-톨루엔설폰산을 포함한다.
- [0485] 일부 구현예에서 약학 조성물은 치료적 유효량 또는 예방적 유효량과 같이 질환 또는 병태를 치료 또는 예방하기에 효과적인 양으로 제제 또는 세포를 함유한다. 일부 구현예에서 치료적 또는 예방적 효능은 치료된 대상체의 주기적인 평가에 의해 모니터링된다. 병태에 따라 며칠 또는 그 이상에 걸쳐 반복 투여되는 경우, 질환 증후의 바람직한 억제가 발생할 때까지 치료가 반복된다. 그러나, 다른 투여 요법이 유용할 수 있고, 결정될 수 있다. 바람직한 투여량이 조성물의 단일 볼루스 투여, 조성물의 다중 볼루스 투여 또는 조성물의 지속적인 주입 투여에 의해 전달될 수 있다.
- [0486] 상기 제제 또는 세포는 볼루스 주입, 주사, 예를 들어 정맥내 또는 피하 주사, 안내 주사, 눈 주위 주사, 망막하 주사, 유리체내 주사, 경 중격 주사, 공막하 주사, 맥락막내 주사, 전방내 주사, 결막하 주사(subconjunctival injection), 결막하 주사(subconjunctival injection), 안각건하 주사, 안구후 주사, 안구 주위 주사 또는 후방 공막 부근 전달에 의한 임의의 적절한 수단에 의해 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 그것들은 비경구, 폐내 및 비내, 및 국소 치료가 필요한 경우, 병변내 투여에 의해 투여된다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 주어진 투여량은 세포 또는 제제의 단일 일시 투여에

의해 투여된다. 일부 구현예에서, 그것은 예를 들어 3일 이하의 기간에 걸쳐 세포의 다중 일시 투여에 의해, 또는 세포 또는 제제의 연속 주입 투여에 의해 투여된다.

- [0487] 질환의 예방 또는 치료를 위한, 적절한 투여량은 치료될 질환의 유형, 제제 또는 제제들의 유형, 세포 또는 재조합 수용체의 유형, 질환의 중증도 및 진행 경과, 제제 또는 세포가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지 여부, 선행 요법, 대상체의 임상 이력과 제제 또는 세포에 대한 반응, 및 주치의의 재량에 따라 달라질 수 있다. 일부 구현예에서 조성물은 한 번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 대상체에 적합하게 투여된다.
- [0488] 세포 또는 제제는 표준 투여 기술, 제형 및/또는 장치들 사용하여 투여될 수 있다. 조성물의 저장 및 투여를 위해 주사기 및 바이알과 같은 제형 및 장치가 제공된다. 세포의 경우, 투여는 자가 또는 이종 기원일 수 있다. 예를 들어 면역 반응성 세포 또는 전구체(progenitor)는 하나의 대상체로부터 수득될 수 있고, 동일한 대상체 또는 상이한, 거부 반응을 일으키지 않는 대상체에 투여될 수 있다. 말초 혈액 유래 면역 반응성 세포 또는 이의 자손(예를 들어 생체 내(in vivo), 생체 외(ex vivo) 또는 시험관 내(in vitro) 유래)은 카테터 투여, 전신 주사, 국소 주사, 정맥 주사 또는 비경구 투여를 포함하는 국소 주사를 통해 투여될 수 있다. 치료학적 조성물(예를 들어 유전자 변형 면역 반응성 세포 또는 신경독성의 증후를 치료하거나 개선하는 제제를 함유하는 약학 조성물)을 투여할 때, 일반적으로 단위 투여량의 주사가 가능한 형태(용액, 현탁액, 에멀전)로 제형화될 것이다.
- [0489] 제형에는 경구, 정맥내, 복강내, 피하, 폐, 경피, 근육내, 비강내, 입 안(buccal), 설하 또는 좌약 투여를 위한 것이 포함된다. 일부 구현예에서, 제제 또는 세포 집단은 비경구적으로 투여된다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "비경구(parenteral)"는 정맥내, 근육내, 피하, 직장, 질 및 복강내 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 제제 또는 세포 집단은 정맥내, 복강내 또는 피하 주사에 의한 말초 전신 전달을 사용하여 대상체에 투여된다.
- [0490] 일부 구현예에서 조성물은 멸균 액체 제제로서, 예를 들어 등장성 수용액, 현탁액, 에멀전, 분산액 또는 점성 조성물로 제공되며, 이는 일부 측면에서 선택된 pH로 완충될 수 있다. 액상 조제품은 일반적으로 겔, 다른 점성 조성물 및 고체 조성물보다 제조가 더욱 용이하다. 또한, 액상 조성물은 특히 주사에 의해 투여하기가 다소 더 편리하다. 반면에, 점성 조성물은 적절한 점도 범위 내에서 제형화되어 특정 조직과의 보다 긴 접촉 기간을 제공할 수 있다. 액상 또는 점성 조성물은, 예를 들어 물, 식염수, 인산 완충 식염수, 폴리올(예를 들어 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액상 폴리에틸렌 글리콜) 및 이의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매체일 수 있는 담체를 포함할 수 있다.
- [0491] 멸균의 주사가 가능한 용액은 적합한 담체, 희석제, 또는 멸균수, 생리 식염수, 글루코스, 텍스트로스 등과 같은 부형제와의 혼합에서와 같은 용매에 제제 또는 세포를 통합함으로써 제조될 수 있다.
- [0492] 생체 내(in vivo) 투여에 사용되는 제형은 일반적으로 무균이다. 무균 상태는, 예를 들어 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성될 수 있다.
- [0493] 일부 구현예에서, 투여되는 세포의 투여량은 동결보존된 조성물이다. 일부 측면에서, 조성물은 동결보존된 조성물을 해동한 후에 투여된다. 일부 구현예에서, 조성물은 해동 후 또는 약 30분, 45분, 60분, 90분, 120분, 150분 또는 180분 이내에 투여된다. 일부 구현예에서, 조성물은 해동 후 또는 약 120분 이내에 투여된다.
- [0494] 일부 구현예에서, 세포의 투여량은 주사기로 투여된다. 일부 구현예에서, 주사기는 약 0.5, 1, 2, 2.5, 3, 4, 5, 7.5, 10, 20 또는 25 mL, 또는 상기 중의 어느 것에 의해 정의된 범위의 부피를 갖는다.
- [0495] 또한, 제공된 방법에 따라 재조합 수용체를 발현하는 조작된 세포 또는 그의 조성물을 함유하는 제조 물품 및 키트, 그리고 임의적으로 사용 지침서, 예를 들어 투여 지침서가 제공된다. 일부 구현예에서, 지침서는 제공된 방법 중의 어느 것에 따라 치료를 위한 대상체의 선택 또는 식별을 위한 기준을 명시한다.
- [0496] 일부 구현예에서, 치료적 유효량의 본원에 기재된 조작된 세포 중의 임의의 것을 포함하는 조성물, 및 질환 또는 병태를 치료하기 위해 대상체에게, 투여를 위한 지침서를 포함하는 제조 물품 및/또는 키트가 제공된다. 일부 구현예에서, 지침서는 본원에 제공된 방법 및 용도의 구성 요소의 일부 또는 전부를 명시할 수 있다. 일부 구현예에서, 지침서는 세포 요법을 위한 세포의 투여에 대한 특정 지침, 예를 들어 투여량, 시기, 선택 및/또는 투여를 위한 대상체의 식별 및 투여에 대한 조건을 명시한다. 일부 구현예에서, 제조 물품 및/또는 키트는 요법, 예를 들어 림프구 고갈 요법 및/또는 조합 요법, 예를 들어 본원에 기재된 임의의 것을 위한 하나 이상의 추가 제제를 더 포함하고 요법을 위한 추가 제제를 투여하기 위한 지침서를 임의로 더 포함한다. 일부 구현예에서, 제조 물품 및/또는 키트는 림프구 고갈 요법을 위한 제제를 더 포함하고, 임의로 림프구 고갈 요법을 투여하기 위한 지침서를 임의로 더 포함한다. 일부 구현예에서, 지침서는 투여용 조성물을 수반하는 라벨 또는 패키

지 삽입물로서 포함될 수 있다.

IV. 정의

달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술의 용어, 표기법 및 다른 기술 및 과학 용어 또는 전문용어는 청구된 주제가 속하는 기술 분야에서 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지는 것으로 의도된다. 일부 경우에, 공통적으로 이해되는 의미를 가진 용어는 명확성 및/또는 준비된 참조를 위해 본원에서 정의되며, 본원에서 그러한 정의의 포함은 기술 분야에서 일반적으로 이해되는 것과 실질적으로 차이가 있는 것으로 반드시 해석되는 것은 아니다.

용어 "폴리펩티드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 가르키기 위해 상호교환적으로 사용되며, 최소 길이로 한정되지 않는다. 제공된 수용체 및 다른 폴리펩티드, 예를 들어 링커 또는 펩티드를 포함하는 폴리펩티드는 천연 및/또는 비-천연 아미노산 잔기를 포함하는 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 또한, 용어는 폴리펩티드의 발현 후 변형, 예를 들어 글리코실화, 시알 킬화, 아세틸화 및 인산화 등을 포함한다. 일부 측면에서, 폴리펩티드는 단백질이 원하는 활성을 유지하는 한, 네이티브 또는 천연 서열에 대한 변형을 함유할 수 있다. 이들 변형은 부위-지정 돌연변이 유발을 통해 고의적일 수 있거나, 단백질을 생성하는 숙주의 돌연변이 또는 PCR 증폭으로 인한 오차를 통해 우발적일 수 있다.

본원에 사용된 바와 같은, "대상체"는 인간 또는 다른 동물과 같은, 포유 동물이고, 전형적으로 인간이다. 일부 구현예에서, 작용제 또는 작용제들, 세포, 세포 집단, 또는 조성물이 투여되는 대상체, 예를 들어 환자는 포유 동물, 전형적으로 인간과 같은, 영장류이다. 일부 구현예에서, 영장류는 원숭이 또는 유인원이다. 대상체는 남성 또는 여성일 수 있고, 유아, 소아, 청소년, 성인 및 노인 대상체를 포함한 임의의 적합한 연령일 수 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 설치류와 같은, 비-원시 포유 동물이다.

본원에 사용된 바와 같은, "치료"(및 "치료하다" 또는 "치료하는"과 같은, 그의 문법적 변형)는 질환 또는 병태 또는 장애의 완전한 또는 부분적 개선 또는 감소, 또는 증후, 효과 또는 결과의 부작용, 또는 관련된 표현형을 가리킨다. 치료의 바람직한 효과는 질환의 발생 또는 재발 방지, 증후의 완화, 질환의 임의의 직접 또는 간접 병리학적 결과의 감소, 전이 예방, 질환 진행률 감소, 질환 상태의 개선 또는 일시적 완화, 및 차도 및 개선된 예후를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 용어는 질환의 완전한 치료 또는 모든 증후나 결과에 대한 임의의 증후 또는 효과(들)의 완전한 제거를 의미하지 않는다.

본원에 사용된 "질환의 발달 지연"은 질환(암과 같은)의 발달을 지연, 방해, 지연, 지연, 안정화, 억제 및/또는 연기하는 것을 의미한다. 이러한 지연은 질환의 이력 및/또는 치료되는 개체에 따라 다양한 시간이 될 수 있다. 일부 구현예에서, 개체가 질환을 발병하지 않는다는 점에서 충분하거나 유의미한 지연은 사실상 예방을 포함할 수 있다. 예를 들어 전이의 발달과 같은 말기 암은 지연될 수 있다.

본원에 사용된 "예방"은 질환에 걸리기 쉽지만 아직 질환으로 진단되지 않은 대상체에서 질환의 발생 또는 재발에 대한 예방을 제공하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제공된 세포 및 조성물은 질환의 발달을 지연시키거나 질환의 진행을 늦추기 위해 사용된다.

본원에 사용된 바와 같이, 기능 또는 활성을 "억제"하는 것은 관심있는 조건 또는 파라미터를 제외하고 동일한 조건과 비교되거나, 또는 대안적으로, 다른 조건과 비교될 때, 기능 또는 활성을 감소시키는 것이다. 예를 들어 종양 성장을 억제하는 세포는 세포의 부재시 종양의 성장 속도와 비교하여 종양의 성장 속도를 감소시킨다.

투여의 경우, 작용제, 예를 들어 약학적 제형, 세포 또는 조성물의 "유효량"은 치료 또는 예방 결과와 같은 원하는 결과를 달성하기 위해, 투여량/양 및 필요 기간 동안, 효과적인 양을 가리킨다.

작용제, 예를 들어 약학적 제형 또는 세포의 "치료 유효량"은 질환, 상태, 또는 장애와 같은 치료를 위한 것과 같은, 원하는 치료 결과, 및/또는 치료의 약동학적 또는 약력학적 효과를 달성하기 위해, 투여량 및 필요 기간 동안, 효과적인 양을 의미한다. 치료 유효량은 대상체의 질환 상태, 연령, 성별, 및 체중, 및 투여된 세포의 집단과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 일부 구현예에서, 제공된 방법은 세포 및/또는 조성물을 유효량, 예를 들어 치료 유효량으로 투여하는 단계를 포함한다.

"예방 유효량"은 원하는 예방 결과를 달성하기 위해 투여량 및 필요한 시간 동안 효과적인 양을 가리킨다. 전형적으로, 반드시 아니지만, 예방 투여량이 질환의 이전 또는 초기 단계의 대상체에서 사용되기 때문에, 예방 유효량은 치료 유효량보다 적을 것이다. 낮은 종양 부담과 관련하여, 일부 측면에서 예방 유효량은 치료 유효량보다 더 높을 것이다.

- [0508] 본원에 사용된 용어 "약"은 이 기술 분야의 당업자에게 쉽게 알려진 각각의 값에 대한 일반적인 오차 범위를 가리킨다. 본원에서 "약"의 값 또는 파라미터에 대한 언급은 그 값 또는 파라미터 자체에 관한 실시 형태를 포함하고 설명한다.
- [0509] 본원에 사용된 바와 같이, 단수 형태("a", "an" 및 "the")는 문맥 상 명백하게 다르게 지시되지 않는 한 복수의 지시 대상을 포함한다. 예를 들어 단수 형태는 "적어도 하나"또는 "하나 이상"을 의미한다.
- [0510] 본 개시 전반에 걸쳐, 청구된 주제의 다양한 측면은 범위 포맷으로 제시된다. 범위 포맷의 설명은 단지 편의 및 간결성을 위한 것이며 청구된 주제의 범위에 대한 융통성있는 한정으로 해석되어서는 안된다는 것을 이해해야 한다. 따라서, 범위의 설명은 모든 가능한 서브-범위 및 그 범위 내의 개별 수치를 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어 값의 범위가 제공되는 경우, 그 범위의 상한 및 하한과 언급된 범위의 임의의 다른 언급되거나 개재된 값 사이의 각각의 개재 값은 청구된 주제 내에 포함되는 것으로 이해된다. 이들 보다 작은 범위의 상한 및 하한은 독립적으로 보다 작은 범위에 포함될 수 있고, 또한 언급된 범위에서 임의의 구체적으로 배제된 한계에 따라 청구된 주제 내에 포함된다. 언급된 범위가 한계 중 하나 또는 둘 다를 포함하는 경우, 이들 포함된 한계 중 하나 또는 둘 다를 제외한 범위가 또한 청구된 주제에 포함된다. 이는 범위의 폭에 관계 없이 적용된다.
- [0511] 본원에 사용된 바와 같이, 조성물은 세포를 포함하여, 둘 이상의 생성물, 물질 또는 화합물의 임의의 혼합물을 가르킨다. 용액, 현탁액, 액체, 분말, 페이스트, 수성, 비-수성 또는 그들의 임의의 조합일 수 있다.
- [0512] 본원에 사용된 바와 같이, 하나 이상의 특정 세포 타입 또는 세포 집단을 언급할 때, "농축"은, 집단 또는 세포에 의해 발현된 마커에 기반한 양성 선택에 의한, 또는 걸쭉될 세포 집단 또는 세포 상에 존재하지 않는 마커에 기반한 음성 선택에 의한 것과 같은, 예를 들어 조성물 내 총 세포의 수 또는 부피와 비교하여 또는 다른 세포 타입에 대하여, 세포 타입 또는 집단의 수 또는 퍼센트를 증가시키는 것을 가리킨다. 용어는 조성물로부터 다른 세포, 세포 타입, 또는 집단의 완전한 제거를 요구하지 않으며, 그렇게 농축된 세포가 농축된 조성물에서 100% 또는 심지어 100% 근처에 존재할 것을 요구하지 않는다.
- [0513] 본원에 사용된 바와 같이, 세포 또는 세포 집단이 특정 마커에 대해 "양성"이라는 진술은 특정 마커, 전형적으로, 표면 마커의 세포 상에서 또는 세포 내에 실질적으로 검출가능한 존재를 가리킨다. 표면 마커를 언급할 때, 용어는 예를 들어 마커에 특이적으로 결합하는 항체로 염색하고 상기 항체를 검출함으로써, 유세포 분석에 의해 검출된 바와 같은 표면 발현의 존재를 가리키며, 상기 염색은 달리 동일한 조건 하에 이소타입-매칭 대조군 또는 형광-마이너스 원(FMO) 게이팅 대조군으로 동일한 절차를 수행하여 검출된 염색보다 실질적으로 높은 수준에서, 및/또는 마커에 대해 양성인 것으로 공지된 세포에 비해 실질적으로 유사한 수준에서, 및/또는 마커에 대해 음성인 것으로 알려진 세포에 비해 실질적으로 높은 수준에서 유세포 분석에 의해 검출가능하다.
- [0514] 본원에 사용된 바와 같이, 세포 또는 세포 집단이 특정 마커에 대해 "음성"이라는 진술은 특정 마커, 전형적으로, 표면 마커의 세포 상에서 또는 세포 내에 실질적으로 검출가능한 존재의 부재를 가리킨다. 표면 마커를 언급할 때, 용어는 예를 들어 마커에 특이적으로 결합하는 항체로 염색하고 상기 항체를 검출함으로써, 유세포 분석에 의해 검출된 바와 같은 표면 발현의 부재를 가리키며, 상기 염색은 달리 동일한 조건 하에 이소타입-매칭 대조군 또는 형광-마이너스 원(FMO) 게이팅 대조군으로 동일한 절차를 수행하여 검출된 염색보다 실질적으로 높은 수준에서, 및/또는 마커에 대해 양성인 것으로 공지된 세포에 비해 실질적으로 낮은 수준에서, 및/또는 마커에 대해 음성인 것으로 알려진 세포에 비해 실질적으로 유사한 수준에서 유세포 분석에 의해 검출되지 않는다.
- [0515] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "벡터"는 그것이 연결된 다른 핵산을 전파할 수 있는 핵산 분자를 가리킨다. 용어는 자기-복제 핵산 구조로서의 벡터 및 그것이 도입된 숙주 세포의 게놈에 포함된 벡터를 포함한다. 특정 벡터는 그들이 작동 가능하게 연결된 핵산의 발현을 지시할 수 있다. 그러한 벡터는 본원에서 "발현 벡터"로 지칭된다.
- [0516] **V. 예시적 구현예**
- [0517] 상기 제공된 구현예들 중에는 하기의 것들이 있다:
- [0518] 1. 무통성 여포성 림프종(follicular lymphoma; FL) 등급 1, 2 또는 3A를 치료하는 방법으로서,
- [0519] 상기 방법은 재발성/불응성(r/r) 여포성 림프종(FL) 등급 1, 2 또는 3A인 질환을 갖거나 가질 것으로 의심되는 대상체에게 $CD4^{+}$ 및 $CD8^{+}$ T 세포의 투여량(dose)을 투여하는 것을 포함하되,

- [0520] 상기 투여량의 T 세포는 CD19에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor; CAR)를 포함하고,
- [0521] 상기 대상체는 FL 등급 1, 2 또는 3A를 치료하기 위한 하나 이상의 선행 라인의 요법(prior line of therapy) 후에 재발하였거나 치료에 불응성(refractory)이 되되, 상기 하나 이상의 선행 라인의 요법 중의 하나 이상은 항-CD20 항체 및 알킬화제를 사용한 치료를 포함하고;
- [0522] 상기 T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 1.5×10^8 개의 CAR-발현 T 세포(경계 포함, inclusive)를 포함하며;
- [0523] 상기 T 세포의 투여량은 대략 1:1 비율의 CAR을 발현하는 $CD4^+$ T 세포 대 CAR을 발현하는 $CD8^+$ T 세포를 포함하고;
- [0524] 상기 투여는 복수의 개별 조성물을 투여하는 것을 포함하되, 상기 복수의 개별 조성물은 상기 $CD8^+$ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 1 조성물 및 상기 $CD4^+$ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 2 조성물을 포함하는, 방법.
- [0525] 2. 구현예 1에 있어서,
- [0526] 상기 하나 이상의 선행 라인의 요법은 항-CD20 항체 및 알킬화제를 포함하는 하나의 선행 라인의 요법인, 방법.
- [0527] 3. 구현예 2에 있어서,
- [0528] 상기 대상체는, FL 등급 1, 2 또는 3A를 치료하기 위한 하나의 선행 라인의 요법 후에 재발하였거나 치료에 불응성이 되며, 항-CD20 항체 및 알킬화제를 포함하는 하나의 선행 라인의 요법 개시의 24개월 이내에 질환이 진행(progression) (POD24)된 것인, 방법.
- [0529] 4. 구현예 2 또는 3에 있어서,
- [0530] 상기 대상체는, FL 등급 1, 2 또는 3A를 치료하기 위한 하나의 선행 라인의 요법 후에 재발하였거나 치료에 불응성이 되며, 항-CD20 항체 및 알킬화제를 포함하는 하나의 선행 라인의 요법을 완료한 후 진단(diagnosis)의 24개월 이내에 질환이 진행(progression)(POD24)된 것인, 방법.
- [0531] 5. 구현예 1 내지 4 중의 어느 하나에 있어서,
- [0532] 항-CD20 항체 및 알킬화제를 포함하는 상기 하나 이상의 선행 라인의 요법은 리툭시맙(rituximab), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 빈크리스틴(vincristine), 독소루비신(doxorubicin) 및 프레드니솔론(prednisolone) (R-CHOP)을 포함하는 화학면역요법 조합 요법(chemoimmunotherapeutic combination therapy)인, 방법.
- [0533] 6. 구현예 1 내지 5 중의 어느 하나에 있어서,
- [0534] 상기 대상체는 처음 FL 진단(original FL diagnosis)의 6개월 이내에 하나의 선행 라인의 요법을 투여 받는 것인, 방법.
- [0535] 7. 구현예 1 내지 6 중의 어느 하나에 있어서,
- [0536] 상기 대상체는, FL 등급 1, 2 또는 3A를 치료하기 위한 하나의 선행 라인의 요법 후에 재발하였거나 치료에 불응성이 되며, FL에 기인하는 증후; 위협된 말단-기관 기능(threatened end-organ function), 림프종에 따른 혈구 감소증(cytopenia secondary), 또는 벌키 질환(bulky disease); 비장종대(splenomegaly); 및 선행 6개월 이상 동안 질환의 꾸준한 진행; 중의 하나 이상을 갖는 것인, 방법.
- [0537] 8. 구현예 1 내지 7 중의 어느 하나에 있어서,
- [0538] 상기 하나 이상의 선행 라인의 요법은 2개의 선행 라인의 요법인, 방법.
- [0539] 9. 구현예 8에 있어서,
- [0540] 상기 2개의 선행 라인의 요법 중의 다른 것은 리툭시맙; 오비누투주맙(obinutuzumab); 벤다무스틴 + 리툭시맙(bendamustine plus rituximab; BR); 벤다무스틴 + 오비누투주맙(bendamustine plus obinutuzumab; BO); R-CHOP; 리툭시맙, 사이클로포스파미드, 빈크리스틴 및 프레드니손(R-CVP); HSCT(선택적으로 자가 또는 동종 HSCT); 리툭시맙과 조합된 레날리도마이드(lenalidomide); 또는 PI3K 억제제(PI3Ki)를 사용한 치료로부터 선택

되되, 선택적으로 상기 PI3Ki는 이데랄리십(idelalisib), 코판리십(copanlisib) 또는 두벨리십(duvelisib)인, 방법.

- [0541] 10. 구현예 1 내지 9 중의 어느 하나에 있어서,
- [0542] 상기 대상체는, 치료에 불응성이거나 선행 라인의 요법 완료의 12개월 이내에 재발되었으되, 선택적으로 선행 라인의 요법은 조합 요법 또는 PI3Ki를 포함하는 단독 요법(monotherapy)인, 방법.
- [0543] 11. 구현예 1 내지 10 중의 어느 하나에 있어서,
- [0544] 상기 대상체는 HSCT 후 재발된 것인, 방법.
- [0545] 12. 구현예 1 내지 11 중의 어느 하나에 있어서,
- [0546] 상기 하나 이상의 선행 라인의 요법은 3개의 선행 라인의 요법인, 방법.
- [0547] 13. 구현예 12에 있어서,
- [0548] 상기 3개의 선행 라인의 요법 중의 다른 2개는 각각 독립적으로 리툭시맙; 오비누투주맙; 벤다무스틴 + 리툭시맙(BR); 벤다무스틴 + 오비누투주맙(BO); R-CHOP; 리툭시맙, 사이클로포스파미드, 빈크리스틴 및 프레드니손(R-CVP); HSCT(선택적으로 자가 또는 동종 HSCT); 리툭시맙과 조합된 레날리도마이드; 또는 PI3K 억제제(PI3Ki)를 사용한 치료로부터 선택되되, 선택적으로 상기 PI3Ki는 이데랄리십, 코판리십 또는 두벨리십인, 방법.
- [0549] 14. 구현예 1 내지 13 중의 어느 하나에 있어서,
- [0550] 상기 대상체는 항-CD20 항체를 사용한 치료에 불응성인, 방법.
- [0551] 15. 구현예 1 내지 14 중의 어느 하나에 있어서,
- [0552] 상기 대상체는 항-CD20 항체 및 알킬화제를 포함하는 선행 라인의 요법에 불응성인, 방법.
- [0553] 16. 구현예 1 내지 15 중의 어느 하나에 있어서,
- [0554] 상기 대상체는 항-CD20 항체를 사용한 치료 완료의 6개월 이내에 재발된 것인, 방법.
- [0555] 17. 구현예 1 내지 16 중의 어느 하나에 있어서,
- [0556] 상기 대상체는 항-CD20 항체 및 알킬화제를 포함하는 선행 라인의 요법 완료의 6개월 이내에 재발된 것인, 방법.
- [0557] 18. 구현예 1 내지 17 중의 어느 하나에 있어서,
- [0558] 상기 대상체는 2개 이상의 라인의 요법 후 항-CD20 항체 유지 요법(anti-CD20 antibody maintenance therapy) 동안 또는 항-CD20 항체 유지 요법의 완료 후 6개월 이내에 재발된 것인, 방법.
- [0559] 19. 구현예 1 내지 18 중의 어느 하나에 있어서,
- [0560] 상기 대상체는 하나 이상의 PET-양성 병변(PET-positive lesion) 및 하나 이상의 측정가능한 결절 병변(nodal lesion) 또는 결절외 병변(extranodal lesion)을 가지되, 선택적으로 상기 측정가능한 결절 병변은 단축과 무관하게 장축에서 1.5 cm 초과이고 측정가능한 결절외 병변은 장축 및 단축에서 1.0 cm 초과인, 방법.
- [0561] 20. 변연부 림프종(marginal zone lymphoma; MZL)을 치료하는 방법으로서,
- [0562] 상기 방법은 재발성/불응성(r/r) 변연부 림프종(MZL)을 갖거나 가질 것으로 의심되는 대상체에게 $CD4^{+}$ 및 $CD8^{+}$ T 세포의 투여량을 투여하는 것을 포함하되,
- [0563] 상기 투여량의 T 세포는 CD19에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하고;
- [0564] 상기 대상체는 MZL을 치료하기 위한 2개 이상의 선행 라인의 요법 후에 재발하였거나 치료에 불응성이 되며;
- [0565] 상기 T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 1.5×10^8 개의 CAR-발현 T 세포(경계 포함, inclusive)를 포함하며;
- [0566] 상기 T 세포의 투여량은 대략 1:1 비율의 CAR을 발현하는 $CD4^{+}$ T 세포 대 CAR을 발현하는 $CD8^{+}$ T 세포를 포함하

고;

- [0567] 상기 투여는 복수의 개별 조성물을 투여하는 것을 포함하되, 상기 복수의 개별 조성물은 상기 $CD8^+$ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 1 조성물 및 상기 $CD4^+$ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 2 조성물을 포함하는, 방법.
- [0568] 21. 구현예 20에 있어서,
- [0569] 상기 MZL은 결절외(extra-nodal) MZL(ENMZL, 주로 위), 비장 MZL(SMZL), 및 결절 MZL(NMZL) 중에서 선택되는 서브타입(subtype)인, 방법.
- [0570] 22. 구현예 20 또는 21에 있어서,
- [0571] 상기 2개 이상의 선행 라인의 요법 중의 하나 이상은 MZL을 치료하기 위한 조합 전신 요법(combination systemic therapy)이거나 조혈 줄기 세포 이식(hematopoietic stem cell transplant; HSCT)인, 방법.
- [0572] 23. 구현예 20 내지 22 중의 어느 하나에 있어서,
- [0573] 상기 2개 이상의 선행 라인의 요법 중의 하나 이상은 MZL을 치료하기 위한 조합 전신 요법이고, 상기 조합 전신 요법은 리툭시맙 + 사이클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴 및 프레드니손(R-CHOP)으로부터 선택되거나, 또는 항-CD20 항체 및 알킬화제를 사용한 요법인, 방법.
- [0574] 24. 구현예 20 내지 23 중의 어느 하나에 있어서,
- [0575] 상기 2개 이상의 선행 라인의 요법 중의 하나 이상은 항-CD20 항체 및 알킬화제인 조합 전신 요법인, 방법.
- [0576] 25. 구현예 20 내지 24 중의 어느 하나에 있어서,
- [0577] 상기 대상체는 비장(Splenic) MZL(SMZL)을 갖고 상기 2개 이상의 선행 라인의 요법 중의 하나 이상은 비장절제술(splenectomy)인, 방법.
- [0578] 26. 구현예 20 내지 24 중의 어느 하나에 있어서,
- [0579] 상기 대상체는 결절외 MZL(ENMZL)을 갖고, 항생제는 상기 2개 이상의 선행 라인의 요법 중의 하나가 아닌 것인, 방법.
- [0580] 27. 구현예 20 내지 26 중의 어느 하나에 있어서,
- [0581] 상기 대상체는 장축에서 2.0 cm 초과와 하나 이상의 측정가능한 결절 병변 또는 하나 이상의 측정가능한 결절외 병변을 갖는 PET 비열성 질환(PET non-avid disease)을 갖는 것인, 방법.
- [0582] 28. 구현예 20 내지 27 중의 어느 하나에 있어서,
- [0583] 상기 대상체는 FL 등급 3B(FL3B)를 갖지 않는 것인, 방법.
- [0584] 29. 구현예 1 내지 28 중의 어느 하나에 있어서,
- [0585] 상기 대상체는 복합 DLBCL 및 FL, 또는 형질전환된 FL(tFL)의 증거를 갖지 않는 것인, 방법.
- [0586] 30. 구현예 1 내지 29 중의 어느 하나에 있어서,
- [0587] 상기 대상체는 십이지장형 FL의 세계보건기구(WHO) 하위분류(subclassification)를 갖지 않는 것인, 방법.
- [0588] 31. 구현예 1 내지 30 중의 어느 하나에 있어서,
- [0589] 상기 대상체는 하나 이상의 선행 라인의 요법에 대해 재발된 것이고, 상기 재발은 상기 하나 이상의 선행 라인의 요법에 대해 완전 반응(complete response; CR) 또는 부분 반응(partial response; PR)의 초기 반응 후인, 방법.
- [0590] 32. 구현예 1 내지 31 중의 어느 하나에 있어서,
- [0591] 상기 대상체는 하나 이상의 선행 라인의 요법에 불응성이고, 상기 불응성 치료는 상기 하나 이상의 선행 라인의 요법에 대해 안정 질환(stable disease; SD) 또는 진행성 질환(progressive disease; PD)의 최상의 대응(best response)인, 방법.
- [0592] 33. 구현예 1 내지 32 중의 어느 하나에 있어서,

- [0593] 상기 대상체는 미 동부 종양학 그룹 협회(Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG)의 0 또는 1의 수행 상태를 갖는 것인, 방법.
- [0594] 34. 구현예 1 내지 33 중의 어느 하나에 있어서,
- [0595] 상기 항-CD20 항체는 모노클로날 항-CD20 항체인, 방법.
- [0596] 35. 구현예 1 내지 34 중의 어느 하나에 있어서,
- [0597] 상기 항-CD20 항체는 리툭시맙 또는 오비누투주맙인, 방법.
- [0598] 36. 구현예 1 내지 35 중의 어느 하나에 있어서,
- [0599] 상기 항-CD20 항체는 리툭시맙인, 방법.
- [0600] 37. 구현예 1 내지 36 중의 어느 하나에 있어서,
- [0601] 상기 알킬화제는 벤다무스틴 또는 클로람부실(chlorambucil)인, 방법.
- [0602] 38. 구현예 1 내지 37 중의 어느 하나에 있어서,
- [0603] 상기 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 투여량의 투여 전에 상기 대상체에 림프구 고갈 요법(lymphodepleting therapy)을 투여하는 것을 더 포함하는, 방법.
- [0604] 39. 구현예 38에 있어서,
- [0605] 상기 림프구 고갈 요법은 상기 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 투여량의 투여 개시 전 약 7일 이내에 완료되는 것인, 방법.
- [0606] 40. 구현예 38 또는 39에 있어서,
- [0607] 상기 림프구 고갈 요법은 상기 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 투여량의 투여 개시 전 약 2 내지 7일 이내에 완료되는 것인, 방법.
- [0608] 41. 구현예 38 내지 40 중의 어느 하나에 있어서,
- [0609] 상기 림프구 고갈 요법은 플루다라빈 및/또는 사이클로포스파미드의 투여를 포함하는 것인, 방법.
- [0610] 42. 구현예 38 내지 41 중의 어느 하나에 있어서,
- [0611] 상기 림프구 고갈 요법은 2 내지 4일, 선택적으로는 3일 동안 매일 (약) 200 내지 400 mg/m^2 , 선택적으로는 (약) 300 mg/m^2 (경계 포함)으로 사이클로포스파미드의 투여 및/또는 (약) 20 내지 40 mg/m^2 , 선택적으로는 30 mg/m^2 으로 플루다라빈의 투여를 포함하는 것인, 방법.
- [0612] 43. 구현예 38 내지 42 중의 어느 하나에 있어서,
- [0613] 상기 림프구 고갈 요법은 3일 동안 매일 동시에 (약) 300 mg/m^2 으로 사이클로포스파미드의 투여 및/또는 (약) 30 mg/m^2 로 플루다라빈의 투여를 포함하는 것인, 방법.
- [0614] 44. 구현예 1 내지 43 중의 어느 하나에 있어서,
- [0615] CD19는 인간 CD19인, 방법.
- [0616] 45. 구현예 1 내지 44 중의 어느 하나에 있어서,
- [0617] 상기 키메라 항원 수용체(CAR)는, 항체 FMC63의 가변 중쇄 영역(variable heavy chain region) 및 가변 경쇄 영역(variable light chain region)을 포함하는 scFv, 15개 미만의 아미노산이고 면역글로불린 힌지 영역(immunoglobulin hinge region) 또는 그의 변형된 버전을 함유하는 스페이서(spacer), 막관통 도메인(transmembrane domain), 및 CD3-제타(CD3 ζ) 사슬의 신호전달 도메인 및 4-1BB의 신호전달 도메인인 공자극 신호전달 영역(costimulatory signaling region)을 포함하는 세포내 신호전달 영역(intracellular signaling domain)을 포함하는, 방법.

- [0618] 46. 구현예 45에 있어서,
- [0619] 상기 면역글로불린 힌지 영역은 식 X_1PPX_2P 을 포함하되, 상기 X_1 은 글리신, 시스테인 또는 아르기닌이고 상기 X_2 는 시스테인 또는 또는 트레오닌(서열번호 58)인, 방법.
- [0620] 47. 구현예 45 또는 46에 있어서,
- [0621] 상기 면역글로불린 힌지 영역 또는 그의 변형된 버전은 IgG1 힌지 또는 그의 변형된 버전인, 방법.
- [0622] 48. 구현예 45 또는 46에 있어서,
- [0623] 상기 면역글로불린 힌지 영역 또는 그의 변형된 버전은 IgG4 힌지 또는 그의 변형된 버전인, 방법.
- [0624] 49. 구현예 45 내지 48 중의 어느 하나에 있어서,
- [0625] 상기 스페이서는 서열번호 1, 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 또는 서열번호 34에 제시된 서열, 또는 서열번호 1, 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 또는 서열번호 34에 제시된 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열들 중의 임의의 것의 변이체를 포함하는, 방법.
- [0626] 50. 구현예 45 내지 49 중의 어느 하나에 있어서,
- [0627] 상기 스페이서는 서열번호 1, 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 또는 서열번호 34에 제시된 서열, 또는 서열번호 1, 서열번호 30, 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 또는 서열번호 34에 제시된 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열들 중의 임의의 것의 변이체로 구성되는, 방법.
- [0628] 51. 구현예 45 내지 50 중의 어느 하나에 있어서,
- [0629] 상기 스페이서는 길이가 (약) 12개의 아미노산인, 방법.
- [0630] 52. 구현예 45 내지 51 중의 어느 하나에 있어서,
- [0631] 상기 스페이서는 서열번호 1에 제시된 서열을 포함하는, 방법.
- [0632] 53. 구현예 45 내지 52 중의 어느 하나에 있어서,
- [0633] 상기 스페이서는 서열번호 1에 제시된 서열로 구성되는, 방법.
- [0634] 54. 구현예 45 내지 53 중의 어느 하나에 있어서,
- [0635] 상기 막관통 도메인은 CD28의 막관통 도메인인, 방법.
- [0636] 55. 구현예 45 내지 54 중의 어느 하나에 있어서,
- [0637] 상기 막관통 도메인은 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열, 또는 서열번호 8과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는, 방법.
- [0638] 56. 구현예 45 내지 55 중의 어느 하나에 있어서,
- [0639] 상기 공자극 도메인은 서열번호 12에 제시된 서열을 포함하거나, 또는 서열번호 12에 제시된 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 그의 변이체인, 방법.
- [0640] 57. 구현예 45 내지 56 중의 어느 하나에 있어서,
- [0641] 상기 CD3-제타(CD3 ζ) 사슬의 신호전달 도메인은 서열번호 13, 14, 또는 15에 제시된 서열을 포함하거나, 또는 서열번호 13, 14, 또는 15에 제시된 서열과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 그의 변이체인, 방법.
- [0642] 58. 구현예 45 내지 57 중의 어느 하나에 있어서,
- [0643] 상기 scFv는 서열번호 35의 CDRL1 서열, 서열번호 55의 CDRL2 서열, 및 서열번호 56의 CDRL3 서열; 및 서열번호 38의 CDRH1 서열, 서열번호 39의 CDRH2 서열, 및 서열번호 54의 CDRH3 서열을 포함하는, 방법.

- [0644] 59. 구현예 45 내지 57 중의 어느 하나에 있어서,
- [0645] 상기 scFv는 RASQDISKYLN(서열번호 35)의 CDRL1 서열, SRLHSGV(서열번호 36)의 CDRL2 서열, 및 GNTLPYTFG(서열번호 37)의 CDRL3 서열; 및 DYGV(서열번호 38)의 CDRH1 서열, VIWGSETTYNSALKS(서열번호 39)의 CDRH2 서열, 및 YAMDYWG(서열번호 40)의 CDRH3 서열을 포함하는, 방법.
- [0646] 60. 구현예 45 내지 59 중의 어느 하나에 있어서,
- [0647] 상기 scFv는, N-말단에서 C-말단으로의 순서대로, 서열번호 42에 제시된 서열을 포함하는 VL, 및 서열번호 41에 제시된 서열을 포함하는 VH를 함유하는, 방법.
- [0648] 61. 구현예 45 내지 60 중의 어느 하나에 있어서,
- [0649] 상기 scFv는 서열번호 43에 제시된 서열을 포함하는, 방법.
- [0650] 62. 구현예 1 내지 61 중의 어느 하나에 있어서,
- [0651] 상기 CAR은, N-말단에서 C-말단으로의 순서대로, 서열번호 43에 제시된 scFv인 세포의 항원-결합 도메인, 서열번호 1에 제시된 스페이서, 서열번호 8에 제시된 막관통 도메인, 서열번호 12에 제시된 4-1BB 공자극 신호전달 도메인, 및 서열번호 13에 제시된 CD3-제타(CD3 ζ) 사슬의 신호전달 도메인을 함유하는, 방법.
- [0652] 63. 구현예 1 내지 62 중의 어느 하나에 있어서,
- [0653] 상기 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 투여량은 약 5×10^7 개의 CAR+ T 세포 내지 약 1.1×10^8 개의 CAR+ T 세포(각각의 경계 포함)인, 방법.
- [0654] 64. 구현예 1 내지 63 중의 어느 하나에 있어서,
- [0655] 상기 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 투여량은 5×10^7 개의 CAR+ T 세포인, 방법.
- [0656] 65. 구현예 1 내지 63 중의 어느 하나에 있어서,
- [0657] 상기 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 투여량은 1×10^8 개의 CAR+ T 세포인, 방법.
- [0658] 66. 구현예 1 내지 65 중의 어느 하나에 있어서,
- [0659] 상기 제 1 조성물 및 상기 제 2 조성물은 0 내지 12시간 간격, 0 내지 6시간 간격 또는 0 내지 2시간 간격으로 투여되거나, 또는 상기 제 1 조성물의 투여 및 상기 제 2 조성물의 투여는 같은 날(same day)에, 약 0 내지 약 12시간 간격, 약 0 내지 약 6시간 간격, 또는 약 0 내지 약 2시간 간격으로 투여되고/되거나;
- [0660] 상기 제 1 조성물의 투여 개시 및 상기 제 2 조성물의 투여 개시는 약 1분 내지 약 1시간 간격 또는 약 5분 내지 약 30분 간격으로 수행되는, 방법.
- [0661] 67. 구현예 1 내지 66 중의 어느 하나에 있어서,
- [0662] 상기 제 1 조성물 및 상기 제 2 조성물은 2시간 이하, 1시간 이하, 30분 이하, 15분 이하, 10분 이하, 또는 5분 이하의 간격으로 투여되는, 방법.
- [0663] 68. 구현예 1 내지 67 중의 어느 하나에 있어서,
- [0664] 상기 제 1 조성물 및 상기 제 2 조성물은 2시간 미만의 간격으로 투여되는, 방법.
- [0665] 69. 구현예 1 내지 68 중의 어느 하나에 있어서,
- [0666] 상기 CD8⁺ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 1 조성물은 상기 CD4⁺ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 2 조성물 이전에 투여되는, 방법.
- [0667] 70. 구현예 1 내지 69 중의 어느 하나에 있어서,
- [0668] 상기 CD4⁺ T 세포 및 상기 CD8⁺ T 세포의 투여량은 정맥내 투여되는, 방법.
- [0669] 71. 구현예 1 내지 70 중의 어느 하나에 있어서,
- [0670] 상기 T 세포는 상기 대상체로부터의 샘플로부터 수득된 1차 T 세포이되, 선택적으로 상기 샘플은 전혈 샘플

(whole blood sample), 성분채집 샘플(apheresis sample) 또는 백혈구 성분채집 샘플(leukapheresis sample)인, 방법.

- [0671] 72. 구현예 71에 있어서,
- [0672] 상기 샘플은 상기 대상체에 림프구 고갈 요법을 투여하기 전에 상기 대상체로부터 수득되는, 방법.
- [0673] 73. 구현예 1 내지 72 중의 어느 하나에 있어서,
- [0674] 상기 T 세포는 상기 대상체에 대해 자가(autoologous)인, 방법.
- [0675] 74. 구현예 1 내지 73 중의 어느 하나에 있어서,
- [0676] 상기 대상체는 인간인, 방법.
- [0677] 75. 구현예 1 내지 74 중의 어느 하나에 있어서,
- [0678] 상기 방법에 따라 치료된 복수의 대상체 중에서 완전 반응률(complete response rate; CRR)은 (약) 50% 초과, (약) 60% 초과, (약) 70% 초과, 또는 (약) 80% 초과인, 방법.
- [0679] 76. 구현예 75에 있어서,
- [0680] 상기 CRR은 최대 24개월의 완전 반응(CR)까지 최상의 전체 반응(best overall response; BOR)을 갖는 대상체의 백분율인, 방법.
- [0681] 77. 구현예 75 또는 76에 있어서,
- [0682] 상기 대상체는 FL 등급 1, 2 또는 3A이고, 상기 CRR은 PET-CT에 의해 평가되는 것인, 방법.
- [0683] 78. 구현예 75 또는 76에 있어서,
- [0684] 상기 대상체는 MZL을 갖고, 상기 CRR은 CT에 의해 평가되는 것인, 방법.
- [0685] 79. 재발성/불응성(r/r) 여포성 림프종(FL) 등급 1, 2 또는 3A인 질환을 갖거나 가질 것으로 의심되는 대상체를 치료하는 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 투여량의 용도로서,
- [0686] 상기 투여량의 T 세포는 CD19에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하고;
- [0687] 상기 대상체는 FL 등급 1, 2 또는 3A를 치료하기 위한 하나 이상의 선행 라인의 요법 후에 재발하였거나 치료에 불응성이 되되, 상기 하나 이상의 선행 라인의 요법 중의 하나 이상은 항-CD20 항체 및 알킬화제를 사용한 치료를 포함하고;
- [0688] 상기 T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 1.5×10^8 개의 CAR-발현 T 세포(경계 포함, inclusive)를 포함하며;
- [0689] 상기 T 세포의 투여량은 대략 1:1 비율의 CAR을 발현하는 $CD4^+$ T 세포 대 CAR을 발현하는 $CD8^+$ T 세포를 포함하고;
- [0690] 상기 투여량은 복수의 개별 조성물로서 투여하기 위한 것으로 제형화되되, 상기 복수의 개별 조성물은 상기 $CD8^+$ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 1 조성물 및 상기 $CD4^+$ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 2 조성물을 포함하는 것인, 용도.
- [0691] 80. 재발성/불응성(r/r) 여포성 림프종(FL) 등급 1, 2 또는 3A인 질환을 갖거나 가질 것으로 의심되는 대상체의 치료용 약제의 제조에서 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포의 투여량의 용도로서,
- [0692] 상기 투여량의 T 세포는 CD19에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하고;
- [0693] 상기 대상체는 FL 등급 1, 2 또는 3A를 치료하기 위한 하나 이상의 선행 라인의 요법 후에 재발하였거나 치료에 불응성이 되되, 상기 하나 이상의 선행 라인의 요법 중의 하나 이상은 항-CD20 항체 및 알킬화제를 사용한 치료를 포함하고;
- [0694] 상기 T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 1.5×10^8 개의 CAR-발현 T 세포(경계

포함)를 포함하며;

- [0695] 상기 T 세포의 투여량은 대략 1:1 비율의 CAR을 발현하는 $CD4^{+}$ T 세포 대 CAR을 발현하는 $CD8^{+}$ T 세포를 포함하고;
- [0696] 상기 투여량은 복수의 개별 조성물로서 투여하기 위한 것으로 제형화되되, 상기 복수의 개별 조성물은 상기 $CD8^{+}$ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 1 조성물 및 상기 $CD4^{+}$ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 2 조성물을 포함하는 것인, 용도.
- [0697] 81. 재발성/불응성(r/r) 변연부 림프종(marginal zone lymphoma; MZL)을 갖거나 가질 것으로 의심되는 대상체를 치료하는 $CD4^{+}$ 및 $CD8^{+}$ T 세포의 투여량의 용도로서,
- [0698] 상기 투여량의 T 세포는 CD19에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하고;
- [0699] 상기 대상체는 MZL을 치료하기 위한 2개 이상의 선행 라인의 요법 후에 재발하였거나 치료에 불응성이 되며;
- [0700] 상기 T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 1.5×10^8 개의 CAR-발현 T 세포(경계 포함)를 포함하며;
- [0701] 상기 T 세포의 투여량은 대략 1:1 비율의 CAR을 발현하는 $CD4^{+}$ T 세포 대 CAR을 발현하는 $CD8^{+}$ T 세포를 포함하고;
- [0702] 상기 투여량은 복수의 개별 조성물의 투여용으로 제형화되되, 상기 복수의 개별 조성물은 상기 $CD8^{+}$ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 1 조성물 및 상기 $CD4^{+}$ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 2 조성물을 포함하는 것인, 용도.
- [0703] 82. 재발성/불응성(r/r) 변연부 림프종(MZL)을 갖거나 가질 것으로 의심되는 대상체의 치료용 약제의 제조에서 $CD4^{+}$ 및 $CD8^{+}$ T 세포의 투여량의 용도로서,
- [0704] 상기 투여량의 T 세포는 CD19에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하고;
- [0705] 상기 대상체는 MZL을 치료하기 위한 2개 이상의 선행 라인의 요법 후에 재발하였거나 치료에 불응성이 되며;
- [0706] 상기 T 세포의 투여량은 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 1.5×10^8 개의 CAR-발현 T 세포(경계 포함)를 포함하며;
- [0707] 상기 T 세포의 투여량은 대략 1:1 비율의 CAR을 발현하는 $CD4^{+}$ T 세포 대 CAR을 발현하는 $CD8^{+}$ T 세포를 포함하고;
- [0708] 상기 투여량은 복수의 개별 조성물의 투여용으로 제형화되되, 상기 복수의 개별 조성물은 상기 $CD8^{+}$ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 1 조성물 및 상기 $CD4^{+}$ CAR-발현 T 세포를 포함하는 제 2 조성물을 포함하는 것인, 용도.
- [0709] **VI. 실시예**
- [0710] 다음의 실시예는 오직 설명의 목적으로 제공되는 것이며 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것이 아니다.
- [0711] **실시예 1: 치료 전 생검 유전자 발현 프로파일 및 임상 반응 분석**
- [0712] CD19에 특이적인 키메라 항원-수용체 (CAR)를 발현하는 자가 T 세포를 함유하는 치료적 CAR⁺ T 세포 조성물을 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL)을 갖는 대상체에게 투여하였다.
- [0713] 투여되는 치료적 T 세포 조성물은 치료되는 개별 대상체로부터 백혈구성분채집술 샘플로부터의 $CD4^{+}$ 및 $CD8^{+}$ 세포의 면역친화성-기반 (예를 들어, 면역자성 선별) 농축을 포함하는 공정에 의해 생성되었다. 단리된 $CD4^{+}$ 및 $CD8^{+}$ T 세포는 항-CD3/항-CD28 자기 비드로 개별적으로 활성화시키고, 항-CD19 CAR를 암호화하는 바이러스 벡터 (예를 들어, 렌티바이러스 벡터)로 독립적으로 형질도입한 다음, 소량으로 조각된 세포 집단을 개별적으로 증식 및 냉동 보존하였다. CAR은 쥐과 항체로부터 유래된 항-CD19 scFv (FMC63으로부터 유래한 가변 영역, VL-링커-VH 배향), 면역글로불린-유래 스페이스, CD28 유래 막관통 도메인, 4-1BB 유래 공자극 영역, 및 CD3-제타 세포 내 신호전달 도메인을 포함하였다. 바이러스 벡터는 절단된 수용체를 암호화하는 서열을 추가로 포함하였으며,

이는 CAR 발현에 대한 대리 마커로서 기능하고; T2A 리보솜 스킵 서열에 의해 CAR 서열로부터 분리된다.

- [0714] 동결보존된 세포 조성물을 정맥내 투여 전에 해동시켰다. 대략 1:1의 표적 비율로 투여된 제형화된 CD4+ CAR+ 세포 집단 및 제형화된 CD8+ CAR+ 집단을 투여함으로써 치료적 T 세포 투여량을 정의된 세포 조성물로서 투여하였다.
- [0715] CAR T 세포 조성물의 투여 후, 대상체는 투여 후 3개월을 포함하여 임상 반응에 대해 모니터링되었고, CAR T 세포 조성물에 대한 반응은 대상체가 진행성 질환(PD) 또는 완전 반응(CR)을 가졌는지 여부를 평가함으로써 결정되었다. 치료 받은 환자 중 53%는 CAR T 세포 조성물로 치료한 후 지속성 CR을 달성하였으며, 고위험 공격성 재발/불응성 거대 B 세포 림프종 환자에서 중증 사이토카인 방출 증후군(CRS) 및 신경학적 사건의 발생률이 낮았다. 환자 중 일부는 CAR T 세포 치료 후 1년에 CR에 도달하지 못하였다.
- [0716] 50명의 치료 받은 대상체의 초기 코호트로부터 종양 생검을 림프구고갈 화학요법의 투여 전 및 CAR T 세포 투여 후 대략 11일에 수집하고, 유전자 발현에 대해 RNA 시퀀싱(RNA-seq)에 의해 분석하였다. 구체적으로, 종양 생검에서 분리된 RNA로부터 상보적 DNA(cDNA) 샘플을 준비하고 RNA-seq로 분석하였다. 샘플은 치료 후 CR 또는 PD를 나타내는 환자 그룹으로 나뉘었으며, 안정 질환(SD) 또는 부분 반응(PR)을 나타내는 대상체의 샘플은 분석에 포함되지 않았다. 전처리 종양 생검으로부터 RNA-seq를 사용하여 결정된 유전자 발현 수준은 자가 치료 CAR T 세포 조성물의 투여 후 반응과 사후 상관관계가 있었다.
- [0717] 도 1a는 치료 후 3개월에 CR 또는 PD를 나타내는 대상체에서 치료 전 종양 생검에서 차등 유전자 발현 프로파일을 나타낸다. Log2 배수 변화 컷오프를 0.6보다 크거나 -0.6 미만으로 설정하고 실패 발견률(false discovery rate; FDR)을 10% 이하로 설정하면 치료 후 3개월에 CR을 나타내는 대상체의 치료 전 생검에서 높게 발현된 유전자 360개(n = 16) 및 치료 후 3개월에 PD가 있는 대상체의 치료 전 생검에서 높게 발현된 유전자 380개(n = 29)를 나타냈다. 차등적으로 발현된 유전자 중에서, T 세포와 관련된 유전자의 발현은 치료 후 3개월에 CR을 나타낸 대상체의 치료 전 생검에서 더 높았다. 제스테 상동체 2의 히스톤 라이신 메틸트랜스퍼라제 인핸서를 암호화하는 유전자인 EZH2 및 EZH2의 표적인 유전자의 발현은 치료 후 3개월에 PD를 나타낸 대상체에 대한 치료 전 생검에서 더 높았다.
- [0718] 도 1b에 도시된 바와 같이, FL에 비해 DLBCL에서 더 높은 수준으로 발현된 유전자로 확인된 유전자 세트("FL_DLCL_DN" 유전자 세트로 지칭됨; 75개의 이용 가능한 DLBCL 세포주 샘플 및 하기 실시예 2에 기술됨)는 또한 치료 후 3개월에 PD를 나타내는 대상체로부터의 생검과 관련된 유전자에 대해 고도로 농축된 것으로 밝혀졌다.
- [0719] 동일한 연구(총 74명의 대상체; "더 큰 코호트")로부터의 추가 24명의 환자가 있는 더 큰 코호트의 분석에서, 유사한 결과가 관찰되었다. 이와 유사하게, 이러한 대상체 세트에서 종양 생검 샘플은 74명의 대상체에 대한 치료 전, 56명의 대상체에 대한 치료 후 약 11일에 채취되었으며, 일치하는 생검은 28명의 대상체에 대한 치료 전 및 치료 후 약 11일에 채취되었다. 위에서 설명한 바와 같이 RNA-seq 분석(RNA-seq analysis)을 위해 이들 대상체의, 더 큰 코호트 중에서, 치료 전 생검 환자의 46%가 치료 후 3개월에 CR을 나타내었고, 생검 11일차 환자의 56%가 치료 후 3개월에 CR을 나타내었다. RNA-seq 샘플을 얻지 못한 대상체 모집단과 비교하여 RNA-seq 연구 모집단의 반응 결과에 편향이 있는지 확인하기 위해 CR, PD, 부분 반응(PR) 및 무진행 생존(PFS) 결과를 두 모집단 간에 비교하였다. 유의미한 차이는 관찰되지 않았다.
- [0720] 치료 후 3개월에 CR을 나타내는 대상체에서 더 많이 발현되는 유전자와 치료 후 3개월에 PD를 나타내는 대상체에서 더 많이 발현되는 유전자를 확인하기 위해 더 큰 코호트의 치료 전 종양 생검에 대해 차등 유전자 발현 분석을 수행하였다. 이러한 대상체 그룹에서 Log2 배수 변화 컷오프를 0.6보다 크거나 -0.6 미만으로 설정하고 FDR 비율을 10% 이하로 설정하면 치료 후 3개월에 CR을 나타내는 대상체의 치료 전 생검에서 더 높게 발현된 230개의 유전자(n=22) 및 치료 후 3개월에 PD를 나타내는 대상체의 치료 전 생검에서 더 높게 발현된 271개의 유전자(n=40)를 나타내었다(도 2a).
- [0721] 더 큰 코호트에 대한 추가 분석에서, 도 2b에 도시된 바와 같이, 치료 전 종양 생검의 유전자 발현 분석은 FL(DLBCL_LIKE_vs_FL)과 비교하여 DLBCL에서 더 높게 발현된 유전자를 포함하는 유전자 세트 및 FL에서 DLBCL을 구별하는 가장 상향조절된 유전자(SHIPD_DLCL_VS_FOLLICULAR_LYMPHOMA_UP)가 치료 후 3개월에 PD를 나타내는 환자에서 농축됨을 보여주었다. 대조적으로, DLBCL(FL_LIKE_vs_DLCL)에 비해 FL에서 더 많이 발현되는 유전자 및 FL과 DLBCL을 구별하는 가장 하향 조절된 유전자(SHIPD_DLCL_VS_FOLLICULAR_LYMPHOMA_DN)를 포함하는 유전자 세트는 치료 후 3개월에 CR을 나타내는 환자에서 농축되었다.

- [0722] 이러한 결과는, 유전자가 FL에 비해 DLBCL에서 더 높은 수준으로 발현하였고 EZH2 표적 유전자는 CAR-T 세포 투여 후 3개월에 대상체에서 PD와 관련된 유전자 중 처리 전 생검 샘플에서 농축되었다는 것을 뒷받침한다.
- [0723] 위에서 기술한 28개의 매칭된 전처리 및 11일 후처리 샘플의 경우, CAR 전사체(transcript)를 포함하는 여러 T 세포 유전자의 평균을 사용하여 처리 후 11일에서의 면역 침윤(immune infiltration)을 추정하였다. 이러한 침윤 수준의 중앙값을 사용하여 대상체를 두 그룹, 즉 침윤이 높은 그룹(n=14)과 침윤이 낮은 그룹(n=14)으로 나누었다. 28개의 전처리 샘플에 대해 그들의 매칭일(matching day) 11 "높은" 또는 "낮은" 침윤 수준에 따라 차등적 유전자 발현 분석을 수행하여 항-CD19 CAR T 세포의 투여 후 T-세포 침윤과 관련된 전처리 생검에서 유전자 발현을 확인하였다. 도 2c에 도시된 바와 같이, "높은" 침윤 그룹의 대상체는 DLBCL(FL_LIKE_vs_DLBCL) 및 FL과 DLBCL을 구별하는 가장 하향조절된 유전자(SHIPD_DLBCL_VS_FOLLICULAR_LYMPHOMA_DN)에 비해 FL에서 더 많이 발현되는 유전자를 포함하는 유전자 세트의 농축을 나타내었다. "낮은" 침윤 그룹의 대상체 중에서 FL(DLBCL_LIKE_vs_FL)과 DLBCL을 구별하는 가장 상향 조절된 유전자(SHIPD_DLBCL_VS_FOLLICULAR_LYMPHOMA_UP)에 비해 DLBCL에서 더 많이 발현되는 유전자를 포함하는 유전자 세트의 농축이 관찰되었다.
- [0724] 이들 데이터는 FL-유사 유전자 발현이 증가된 T 세포 침윤뿐만 아니라 치료에 대한 개선된 반응과 관련되어 있음을 나타낸다.
- [0725] **실시예 2: 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL) 대 여포성 림프종(FL)의 유전자 발현 분석**
- [0726] 내부 데이터 세트를 사용하여 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL)과 여포성 림프종(FL) 간의 생물학적 차이점을 조사하기 위한 연구가 수행되었다.
- [0727] 유전자 발현을 위한 RNA-seq는, 상기 실시예 1에 기술된, 약 75개의 여포성 림프종(Follicular Lymphoma, FL) 및 약 75개의 미만성 거대 B세포 림프종(Diffuse Large B-cell lymphoma, DLBCL)에서 분리된 RNA로부터 조제된 상보적 DNA(complementary DNA, cDNA) 샘플(포르말린-고정된 종양 생검)에 대해 수행하였다. 분석된 종양 세포 샘플은 야생형 또는 돌연변이된 EZH2를 보유하고, DLBCL의 배종심 B 세포 유사(GCB) 및 활성화된 B 세포(ABC) 서브타입을 모두 포함하였다. 도 3에 도시된 바와 같이, DLBCL("DLBCL-유사") 및 FL("FL-유사") 종양 세포 샘플에서 상승된 상이한 유전자 세트를 갖는 DLBCL 및 FL 종양 세포 샘플에서 차등적 유전자 발현이 관찰되었다. FL과 DLBCL 종양 세포 샘플 사이에 차등 발현을 나타내는 유전자 중에는 EZH2(도 4a; 체스테 상동체 2의 인헨서, 히스톤 라이신 메틸트랜스퍼라제를 암호화함) 및 CD3E(도 4b; T-세포 표면 당단백질 CD3 입실론 사슬을 암호화함, CD3-TCR 복합체의 엡실론 폴리펩티드)가 있었다. 나타난 바와 같이, FL 종양 세포 샘플은 DLBCL 종양 세포 샘플과 비교하여 EZH2의 더 낮은 발현 수준 및 CD3E의 더 높은 발현 수준을 나타내었다.
- [0728] 실시예 1에 기재된 항-CD19 치료 T 세포 조성물을 투여 받은 대상체의 초기 코호트로부터 치료전 종양 생검에 대한 RNA-seq에 의한 유전자 발현 프로파일은, FL과 비교하여 DLBCL에서 상승되거나("DLBCL-유사" 또는 "DLBCL_LIKE_vs_FL" 유전자 세트로 지칭됨) 또는 DLBCL과 비교하여 FL에서 상승된("FL-유사" 또는 "FL_LIKE_vs_DLBCL" 유전자 세트로 지칭됨) 도 3에 기술된 연구로부터 유전자의 발현에 대해 분석되었다. 단일 샘플 유전자 세트 농축 분석(ssGSEA)을 수행하여 샘플과 해당 유전자 세트의 각 쌍에 대한 개별 농축 점수를 계산하였다. 도 5a에 도시된 바와 같이, 실시예 1에 기술된 연구에서 CR을 계속 나타내는 대상체는 PD를 나타내는 대상체에 비해 DLBCL-유사 유전자 세트(DLBCL_LIKE_vs_FL)에 대해 더 낮은 ssGSEA 점수를 가졌다. 반대로, 도 5b에 도시된 바와 같이, 실시예 1에 기술된 연구에서 CR을 계속 나타내는 대상체는 PD를 나타내는 대상체에 비해 FL-유사 유전자 세트(FL_LIKE_vs_DLBCL)에 대해 더 높은 ssGSEA 점수를 가졌다.
- [0729] 실시예 1에 기술된 더 큰 코호트의 대상체들 사이에서 유사한 분석에서 유사한 결과가 관찰되었다. 치료 후 3개월에 CR을 나타낸 대상체는 FL-유사 유전자 세트에 대해 상당히 더 높은 농축 점수를 가졌다(도 5c; n=62). 또한 환자 중 8명은 분명히 "FL-유사" 유전자 발현 점수를 보였다. 가장 높은 "FL-유사" 유전자 발현을 갖는 이들 대상체는 비-"FL-유사" 대상체(CR=22%)와 비교하여 치료 후 3개월(CR=100%)에서 높은 CR 비율을 나타냈다. FL 유사 점수가 높은 DLBCL 대상체 중 일부는 여포 림프종(tFL) 조직학을 변형시켰지만 FL 유사 점수가 낮은 다른 tFL 대상체도 있었다. 유사하게, 일부 비 tFL 대상체들은 FL 유사 점수가 높았다. 더 큰 코호트의 대상체 중에서, FL 유사 점수가 가장 높은 15명의 대상체와 나머지 59명의 대상체에 대해 무진행 생존(PFS) 곡선을 비교하였으며, FL 유사 유전자 발현이 높은 대상체는 유의하게 더 높은 PFS를 나타낸다(도 5d).
- [0730] 이들 데이터는 DLBCL과 FL을 가진 대상체의 유전자 발현 프로파일 다르다는 것을 보여준다. 특히, DLBCL과 FL 종양 생검 간의 유전자 발현 차이는 면역 또는 기질 함량 또는 종양 세포 상태의 양과 관련이 있다. 이러한 데이터는 DLBCL이 있는 대상체 또는 DLBCL 대상체에서 상승된 것으로 밝혀진 유전자 발현이 더 높은 대상체에 비

해 FL 대상체 또는 FL 대상체에서 상승된 것으로 밝혀진 유전자의 더 높은 발현을 가진 대상체가 종양 환경으로의 T 세포 침윤에 대해 덜 저항할 수 있다는 관찰과 일치한다. 또한, FL 종양과 더 유사한 것으로 보이는 DLBCL 종양을 가진 대상체는 CAR T 세포 치료 후 개선된 PFS 결과를 가질 수 있다.

[0731] 실시예 3: 여포성 림프종(FL) 또는 변연부 림프종(MZL)이 있는 대상체에 대한 항-CD19 CAR-발현 세포의 투여

[0732] CD4+ CAR-발현 T 세포 조성물 및 CD8+ CAR-발현 T 세포 조성물의 정의된 조성(~1:1 비율)을 함유하는 항-CD19 CAR-발현 치료 T 세포 조성물을 재발성/불응성(R/R) 무통성 여포성 림프종(FL) 등급 1-3A 및 변연부 림프종(MZL)을 포함하는 무통성 B 세포 비호지킨 림프종(NHL)을 갖는 대상체에게 투여하였다.

[0733] 대상체들은 다음과 같이 4개의 코호트로 나누었다: 코호트 1, 제 4 라인 이상(4L+) r/r FL, 이중 불응성 대상체 포함; 코호트 2, 제 3 라인(3L) r/r FL, 이중 불응성 대상체 포함; 코호트 3, 제 2 라인(2L) r/r FL, 진단 및/또는 치료 개시 후 24개월 이내에 질환이 진행(POD24)된 대상체 포함; 및 코호트 4, 제 3 라인 이상(3L+) MZL. 따라서, 이중 불응성 대상체와 진단 후 24개월 이내에 질환이 진행(POD24)된 대상체를 포함하여 고위험 기능을 가진 대상체 그룹이 기록되었다. 이중 불응성 대상체는 다음 기준 중 하나 이상을 충족하는 대상체였다: (i) 항-CD20 모노클로날 항체 및 알킬화제(예를 들어 벤다무스틴)를 포함하는 선행 요법의 치료를 완료한 후 (즉, 6개월 동안 또는 최대 6개월까지), 또는 (iii) 치료 또는 유지 관리 완료 후 6개월 이내. POD24 대상체는 항-CD20 항체 및 알킬화제(예를 들어 벤다무스틴)와 같은 화학면역요법 조합 요법으로 치료한 후 진단 또는 치료 개시 후 24개월 이내에 진행한 대상체였다. 다른 고위험 기능으로는 선행 조합 요법 완료 후 12개월 이내 재발 및 조혈모세포 이식 후 실패가 포함되었다. 3B FL(FL3B) 등급을 가진 대상체는 기록에서 제외되었다. 또한 복합 DLBCL 및 FL의 증거가 있거나 변형된 FL의 증거가 있는 대상체도 기록에서 제외되었다. 모든 대상체는 ECOG(미 동부 종양학 그룹 협회)의 0 또는 1의 상태를 가졌다. 예시적인 코호트가 하기 표 E1에 제시된다:

[0734] [표 E1]

예시적 코호트	
코호트	설 명
코호트 1 (4L+r/r FL)	대상체는 사전에 3 개 이상의 전신 요법제를 투여 받았고, 여기서 이들 라인 중의 하나 이상은 항-CD20 항체(예를 들어 리툽시맵, 오비누투주맵) 및 알킬화제를 포함하는 조합이었다. 선행 HSCT는 선행 요법으로 허용된다. 이러한 요구 사항에 추가하여, 4L+ 이종 불응성 대상체 그룹은 또한 하기 기준 중의 하나를 충족하여야 한다: (i) 항-CD20 항체 및 알킬화제를 포함하는 전신 라인의 요법에 불응성인 경우; (ii) 항-CD20 항체 및 알킬화제를 포함하는 선행 라인의 전신 요법 완료 후 6 개월 이내에 재발한 경우; 및/또는 (iii) 2 개 이상의 요법 후 또는 유지 완료 후 6 개월 이내에 항-CD20 항체 유지 기간 동안 재발한 경우
코호트 2 (3L r/r FL)	대상체는 사전에 2개의 전신 요법제를 투여 받았고, 여기서 이들 중의 하나 이상은 항-CD20 항체(예를 들어 리툽시맵, 오비누투주맵) 및 알킬화제를 포함하는 조합이었다. 이 요구 사항에 추가하여, 대상체는 하기 고위험 기준 중의 하나를 충족하여야 한다: (i) 선행 라인의 요법의 완료 12개월 이내에 재발하였거나 또는 불응성 질환을 갖는 경우, PI3Ki를 사용한 단일 요법은 허용되는 라인의 요법 계열임, (ii) HSCT 후 재발한 경우, 및/또는 (iii) 이종 불응성의 경의를 충족하는 경우. 3L 이종 불응성 대상체는 하기 기준 중의 하나를 충족하여야 한다: (i) 항-CD20 항체 및 알킬화제를 포함하는 전신 라인의 요법에 불응성인 경우; (ii) 항-CD20 항체 및 알킬화제를 포함하는 선행 라인의 전신 요법 완료 후 6개월 이내에 재발한 경우, 및/또는 (iii) 항-CD20 항체 유지 동안 2개 이상의 라인의 요법 후 또는 유지 완료 후 6개월 이내에 재발한 경우
코호트 3 (2L r/r FL)	대상체는 항-CD20 항체(예를 들어 리툽시맵, 오비누투주맵) 및 알킬화제를 포함하는 1개의 선행 라인의 조합 전신 요법을 받았다. 진단 및/또는 치료 개시 후 24개월 이내에 진행성 질환이 있는 것으로 정의되고 원래의 FL 진단 후 6개월 이내에 치료를 받은 POD24 대상체의 그룹이 이 코호트에 기록된다. 이 POD24 정의를 충족하지 못하는 2L 피험자는 변형된 GELF* 기준 중의 하나를 충족하여야 한다: (i) FL 에 기인하는 증후가 있는 경우(B 증후에 국한되지 않음); (ii) 위험된 말단 기관 기능, 림프종에 이차적인 혈구 감소증, 또는 별기 질환(단일 종괴 > 7 cm 또는 3 개 이상의 종괴 > 3 cm)를 갖는 경우; (iii) 비장 비대를 갖는 경우; 및/또는 (iv) 적어도 6 개월에 걸친 꾸준한 진행이 있는 경우.
코호트 4 (3L+MZL)	대상체는 2 개의 선행 전신 요법제를 투여 받았으며, 여기서 하나 이상의 라인의 요법제는 조합 전신 요법제, 항-CD20 항체(예를 들어 리툽시맵, 오비누투주맵) 및 알킬화제를 사용한 요법제이거나 HSCT 후 재발한 것이다. 비장 MZL(SMZL)에 대한 비장 절제술은 일련의 요법으로 간주된다. 결절외 MZL(ENMZL)에 대한 항생제는 선행 라인의 요법제로 간주되지 않는다.
* National Comprehensive Cancer Network, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines): B-세포 림프종; V4. 2019	

[0735]

[0736] 투여된 항-CD19 CAR-발현 치료 T 세포 조성물은 치료된 개별 대상체로부터의 백혈구 성분채집 샘플로부터의 CD4+ 및 CD8+ 세포의 면역친화성 기반(예를 들어 면역자기 선택) 농축을 포함하는 과정에 의해 생성되었다. 분리된 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 별도로 활성화하고 항-CD19 CAR을 암호화하는 바이러스 벡터(예를 들어 렌티바이러스 벡터)로 독립적으로 형질도입한 다음, 소량의 조작된 세포 집단의 개별 확장 및 동결보존을 수행하였다. CAR은 무린 항체로부터 유래된 항-CD19 scFv(FMC63으로부터 유래된 가변 영역, V_L-링커-V_H 배향), 면역글로불린-유래된 스페이서, CD28로부터 유래된 막관통 도메인, 4-1BB로부터 유래된 공자극 영역, 및 CD3-제타 세포내 신호 전달 도메인을 함유하였다. 바이러스 벡터는 T2A 리보솜 스킵 서열에 의해 CAR 서열로부터 분리된 절단된 수용체를 암호화하는 서열을 추가로 함유하였고, 이는 CAR 발현에 대한 대리 마커 역할을 하였다.

[0737] CD4+ 및 CD8+ 동결보존된 세포 조성물을 정맥내 투여 전에 해동시켰다. 약 1:1의 표적 비율로 투여된 제형화된 CD4+ CAR+ 세포 집단 및 제형화된 CD8+ CAR+ 집단을 투여함으로써 치료적 T 세포 용량을 정의된 세포 조성물로서 투여하였다.

[0738] CAR+ T 세포 주입에 앞서 대상체들은 3일 동안 플루다라빈(플루(flu), 30 mg/m²/day) 및 사이클로포스파미드(Cy, 300 mg/m²/day)로 림프구 고갈 화학요법을 투여 받았다. 일부 경우에는 림프구 고갈 화학요법을 시행하기 전에 FL 대상체에 대해 PET 양성 질환이 재확인되었고 MZL 대상체에 대해 CT 양성 질환이 재확인되었다.

[0739] 대상체는 림프구 고갈 2-7일 후에 CAR-발현 T 세포를 투여 받았다. 대상체에게 1 × 10⁸(100 × 10⁶)개의 CAR-발현 T 세포의 단일 용량이 투여되었다(각각 1:1 비율의 CD4+ CAR-발현 T 세포 및 CD8+ CAR-발현 T 세포의 별도

의 주입을 통한 단일 투여량).

- [0740] 치료에 대한 반응은 치료 전 및 치료 후 다양한 시간에 양전자 방출 단층촬영(PET) 및/또는 컴퓨터 단층촬영(CT) 및/또는 자기공명영상(MRI) 스캔에 의한 방사선학적 종양 평가를 기반으로 평가되었다(예를 들어 Lugano 분류를 기반으로 함, 예를 들어 문헌 「Cheson et al., (2014) JCO 32(27):3059-3067」 참조). FL 피험자는 주로 PET 스캔을 사용하여 평가된 반면 MZL 피험자는 주로 CT/MRI 스캔을 사용하여 평가되었다. 평가된 응답 결과에는 완전 응답률(CRR) 및 전체 응답률(ORR)도 포함되었다. 일부 경우에는 반응 기간(DOR), 무진행 생존(PFS) 및 전체 생존(OS)도 평가되었다.
- [0741] 안전성 평가도 모니터링되었으며 유해 사례(AE)/심각한 유해 사례(SAE) 수집, 병용 약물 및 절차 평가, 실험실 평가, 신체 검사 및 활력 징후 평가가 포함되었다. 이상 반응에 대한 국립 암 연구소 공통 용어 기준(NCI CTCAE 버전 5.0)에 따라 AE 및 실험실 이상(유형, 빈도 및 중증도)을 수집하고 등급을 매기고 보고하였다. 문헌 「Department of Health and Human Services, Published: November 27, 017」을 참조한다. 특별한 관심 대상의 이상 반응(AESI)에는 사이토카인 방출 증후군(CRS), 신경독성(NT), 주입 반응, 대식세포 활성화 증후군(MAS), 종양 용해 증후군(TLS), 저감마글로불린혈증, 연장된 혈구감소증, 감염, 2차 원발성 악성종양(SPM) 및 자가면역 사건. 사이토카인 방출 증후군(CRS) 및 신경 독성(NT)은 미국 이식 세포 치료 학회(The American Society for Transplantation and Cellular Therapy; ASTCT) 합의 등급 시스템에 따라 등급이 매겨졌다[문헌 「Lee et al. Biol Blood Marrow Transplant. 2019 Apr; 25(4):625-38」 참조]. CRS 및 신경독성의 징후 및 증후도 모니터링 하였다.
- [0742] 평가된 다른 종점(endpoint)으로는 최대 농도(C_{max}), 최대 농도까지의 시간(T_{max}), 곡선 아래 면적(AUC) 및 CAR-발현 T 세포의 지속성(예를 들어 PCR에 의해 평가됨),을 포함하는 약동학(pharmacokinetics; PK); 말초 B 세포 무형성의 측정을 포함한 약력학(pharmacodynamics); EORTC QLQ-C30 및/또는 FACT-LymS에 의해 평가된 건강 관련 삶의 질(HRQoL);을 포함하였다.
- [0743] 일부 경우에는 치료 후 최소 또는 최대 약 24개월 동안 반응, 안전성 및 기타 평가변수가 평가되었다.
- [0744] 본 발명은 특정 개시된 구현예로 범위가 한정되도록 의도되지 않고, 이는 예를 들어 본 발명의 다양한 측면을 예시하기 위해 제공된다. 조성물 및 방법에 대한 다양한 변형은 본원의 설명 및 교시로부터 명백해질 것이다. 그러한 변형은 본 개시의 진정한 범위 및 사상을 벗어나지 않고 실시 될 수 있으며 본 개시의 범위 내에 속하도록 의도된다.

[0745] 서열

#	서열	ANNOTATION
1	ESKYGPPCPFCF	스페이서 (IgG4 힌지) (aa)
2	GAATCTAAGTACGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCT	스페이서 (IgG4 힌지) (nt)
3	ESKYGPPCPFCFPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVRGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	힌지-CH3 스페이서
4	ESKYGPPCPFCFPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTRPREEQFNSTYRVVSVLTVHLQDNLNG KEYCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVRGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	힌지-CH2-CH3 스페이서
5	RWPESPKAQASSVPTAQPAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEERKKKEKE KEEQEERETKTPECPSTHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSD LKDAHLTWEVAGKVPVTPGGVEEGLLRHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNGT SVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAPVKLSLNLLASSDPPEASWLLC EVSGFSFPNILLMWLEDQREVTNSGFAPARPPPPQGSTTFWANSVLRVP APSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYVTDH	IgD-힌지-Fc
6	LEGGEGRGSLLTCGDVEENFGPR	T2A
7	MLLVTSLLLCPLPFAFLIPRVKNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFK NCTSIGDLHLIPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQA WPNRTDLHAFENLEIIRGRTRQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISD GDVVISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGOVCH ALCSPGCGWGPFRDCVSCRNVSRGECVDKCNLLEGEPRFVENSECI QCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCFAGVMGENNT LVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKIPSIATGMVGAL LLLLVVALGIGLFM	tEGFR
8	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (평가번호 P10747 의 아미노산 153- 179)
9	IEVMYPPPYLDNEKSGTIIHVKGKHLCPSPFLFPGPSKP FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (평가번호 P10747 의 아미노산 114- 179)
10	RSKRSRLLSHDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 (P10747 의 아미노산 180- 220)
11	RSKRSRGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 (LL to GG)
12	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEGGCEL	4-1BB (Q07011.1 의 아미노산 214- 255)
13	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDRRRGRDPFMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATK DTYDALHMQALPPR	CD3 제타

[0746]

#	서열	ANNOTATION
14	RVKFSRSAPAYQQGQNLNELNLGRREYDVLDRRGRDPFEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATK DTYDALHMQALPFR	CD3 제타
15	RVKFSRSADAPAYKQGQNLNELNLGRREYDVLDRRGRDPFEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATK DTYDALHMQALPFR	CD3 제타
16	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSIISGDLHILFVAFRGDSFT HTPPLDPQLDILKTVKEITGFLLIQWPNRTDLHAFENLEIIRGRTK QHGGQSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNCYANTINWKKL FGTSGQKTRIIISNRGENSCRATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNV SRGRECVDKCNLLEGEPRFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDN CIQCAHYIDGPHCVKTCFAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYG CTGPGLEGCPGTNGKIPSIATGMVGAALLLVVALGIGLFM	tEGFR
17	EGRGSLITCGDVEENPGP	T2A
18	GGGATNFSLKQAGDVEENPGP	P2A
19	ATNFSLKQAGDVEENPGP	P2A
20	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
21	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
22	-PGGG-(SGGGG) _s -P- wherein P is proline, G is glycine and S is serine	링크
23	GSADDAKDAARKDGKS	링크
24	atgcttctctctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacaccag cattcctcctgatccca	GMCSFR 압파 사슬 신호 서열
25	MLLLVTSLLLCPLPFAFLIP	GMCSFR 압파 사슬 신호 서열
26	MAFPVTALLPLALLHA	CD8 압파 신호 펩티드
27	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro	한지
28	Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro	한지
29	ELKTFPLGDTHTCPRCFEPKSCDTFPFCPRCFEPKSCDTFPFCPRCFEPK SCDTFPFCPRCP	한지
30	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro	한지
31	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	한지
32	Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	한지
33	Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	한지
34	Glu Val Val Val Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	한지
35	RASQDISKYLN	CDR L1
36	SRLHSGV	CDR L2
37	GNTLPYTFG	CDR L3
38	DYGVS	CDR H1
39	VIWGSETTYNSALKS	CDR H2
40	YAMDYWG	CDR H3

[0747]

#	서열	ANNOTATION
41	EVKLQESGPGPLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLG VIWGSSETTYNSALKSRLTIKDNKSQVFLKMNSLQTDITAIYYCAKH YYYGGSYAMDYWGQGSTVTSS	VH
42	DIQMTQTSSLSASLGDVRTISCRASQDISKYLNWYQQRPDGTVKLLIY HTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTF GGGTRLEIT	VL
43	DIQMTQTSSLSASLGDVRTISCRASQDISKYLNWYQQRPDGTVKLLIY HTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTF GGGTRLEITGSTSGSGKPGSGEGSTRKGEVKLQESGPGPLVAPSQSLSVTC TVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSSETTYNSALKSRLTIK DNKSQVFLKMNSLQTDITAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGSTVTSS	scFv
44	KASQNVGTNVA	CDR L1
45	SATYRNS	CDR L2
46	QQYNRYPYT	CDR L3
47	SYWMN	CDR H1
48	QIYPGDGDTNYNGKFKG	CDR H2
49	KTISVVDFYFDY	CDR H3
50	EVKLQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKRPGQGLEWIG QIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCAR KTISVVDFYFDYWGQGSTVTSS	VH
51	DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCRASQNVGTNVAWYQQRPGQSPKPLIY SATYRNSGVPRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTS GGGTRLEIKR	VL
52	GGGSGGGSGGGGS	링커
53	EVKLQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKRPGQGLEWIG QIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCAR KTISVVDFYFDYWGQGSTVTSSGGGSGGGSGGGSGGGSDIELTQSPKF MSTSVGDRVSVTCRASQNVGTNVAWYQQRPGQSPKPLIYSATYRNSGV PRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTRLEIKR	scFv
54	HYYYGGSYAMDY	HC-CDR3
55	HTSRLHS	LC-CDR2
56	QQGNTLPYT	LC-CDR3
57	gacatccagatgacccagaccacctccagcctgagcgccagcctgggcg accgggtgaccatcagctgccgggccagccaggacatcagcaagtacct gaactggtatcagcagaagcccgacggcaccgtcaagctgctgatctac cacaccagccggctgcacagcgcggtgccagccgggttagcggcagcg gctccggcacccgactacagcctgacctctccaacctggaacaggaaga tatcgccacctacttttgcagcagggcaacacactgcctacaccttt ggcgcggaacaaagctggaatcacccggcagcacctccggcagcgga agcctggcagcgcgagggcagcaccaggcgaggtgaagctgcagga aagcgccctggcctggtggccccagccagagcctgagcgtgacctgc accgtgagcgcggtgagcctgcccactacggcgtgagctggatccggc agccccccaggaagggcctggaatggctggcgctgatctggggcagcga gaccacctactacaacagcgccctgaagagccggctgacctcatcaag gacaacagcaagagccaggtgttcctgaagatgaacagcctgcagaccg acgacaccccatctactactgcgccaagcactactactacggcggcag ctacgccatggactactggggccagggcaccagcgtgacctgagcagc	scFv를 암화화하는 서열

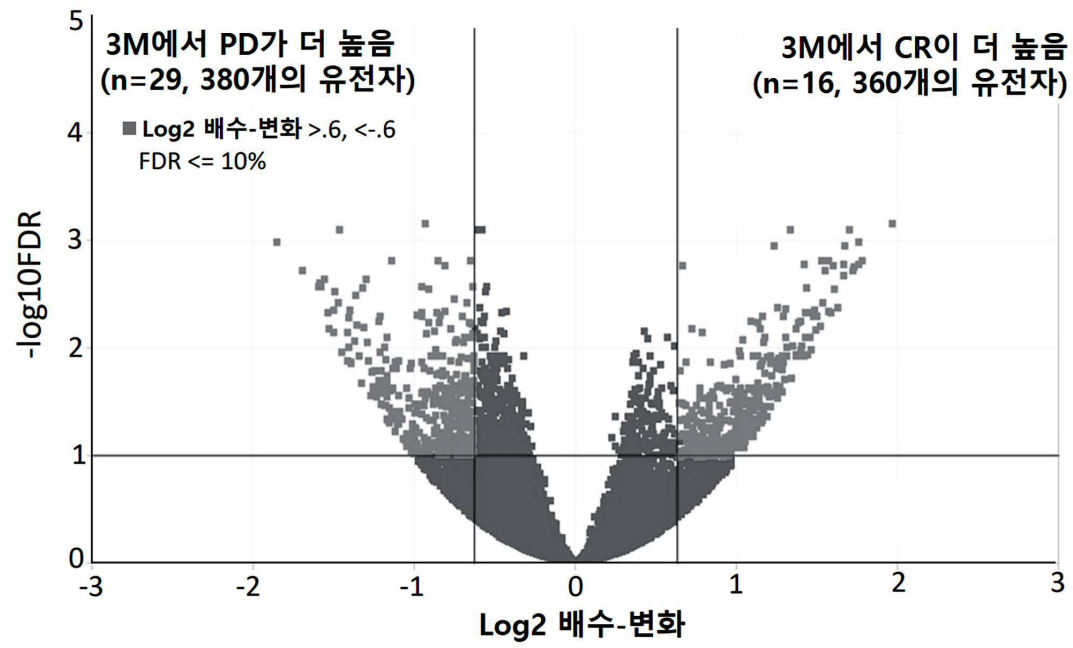
[0748]

#	서열	ANNOTATION
58	X ₁ FPX ₂ P X ₁ 는 글리신, 시스테인 또는 아르기닌임. X ₂ 는 시스테인 또는 트레오닌임.	힌지
59	GSTSGSGKPGSGEGSTRG	링커

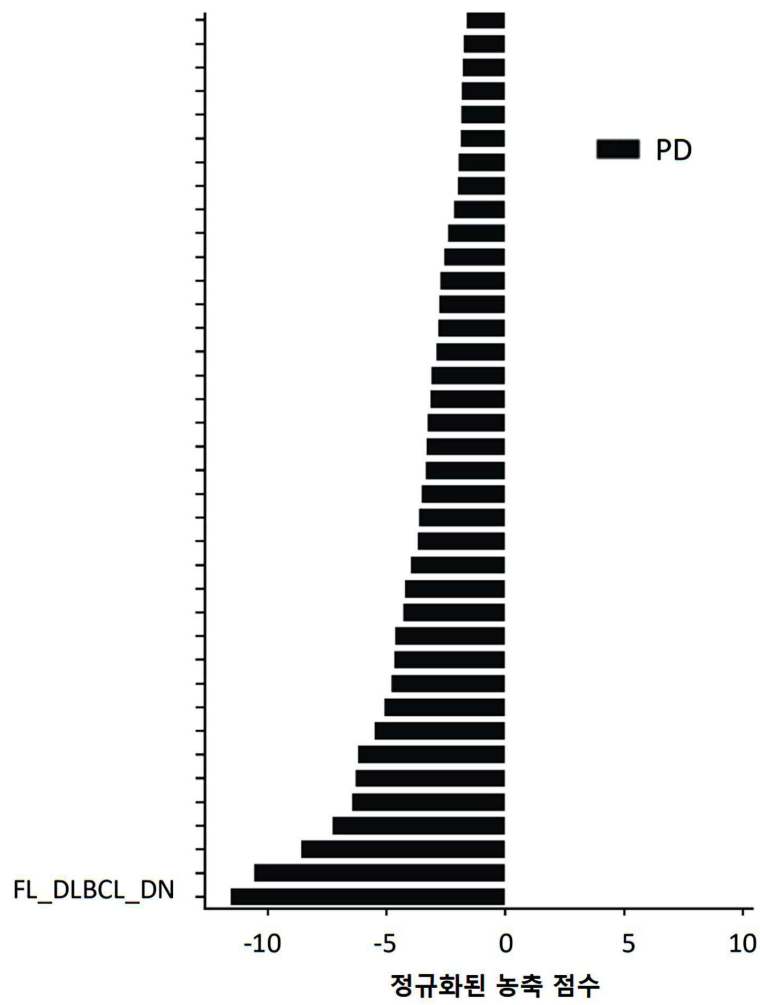
[0749]

도면

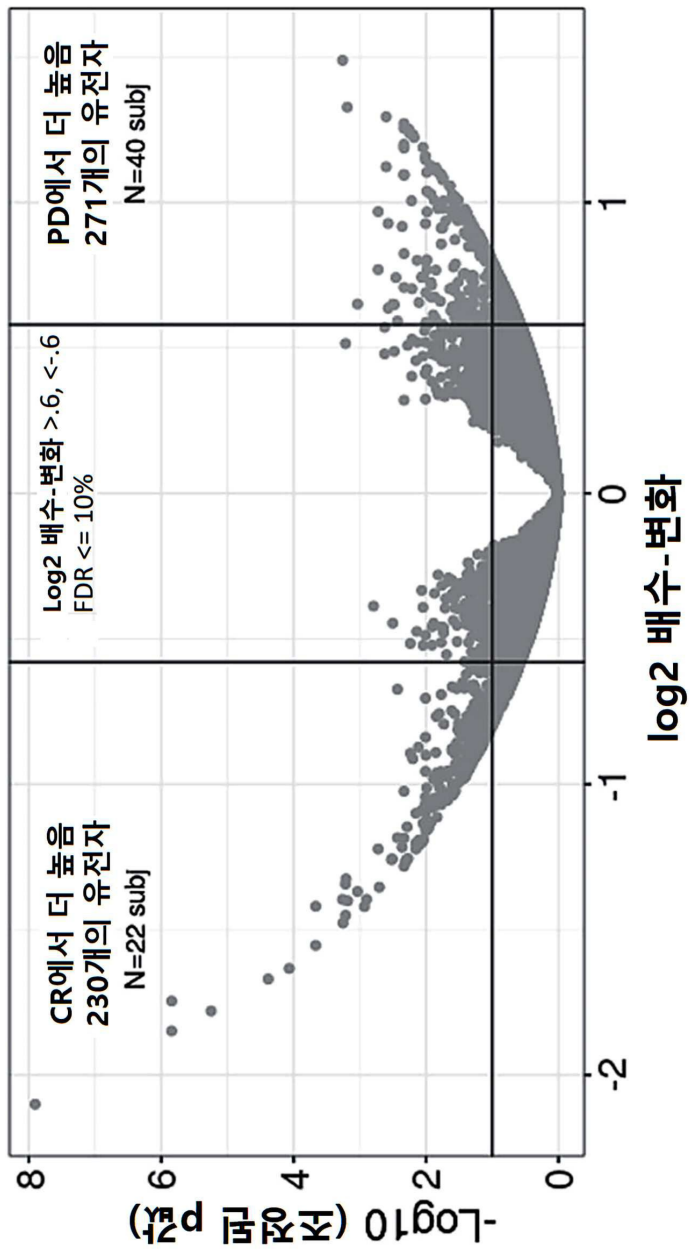
도면1a



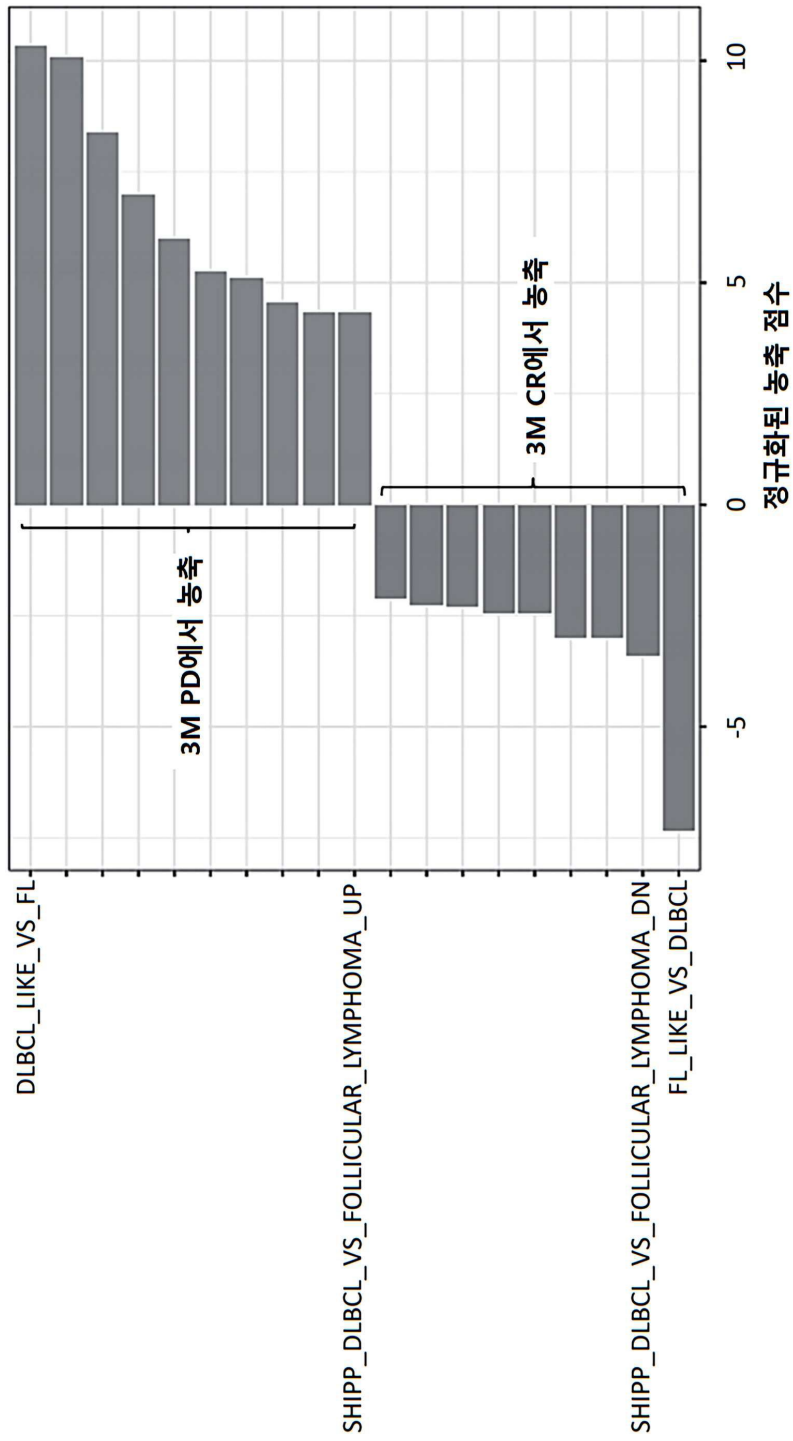
도면1b



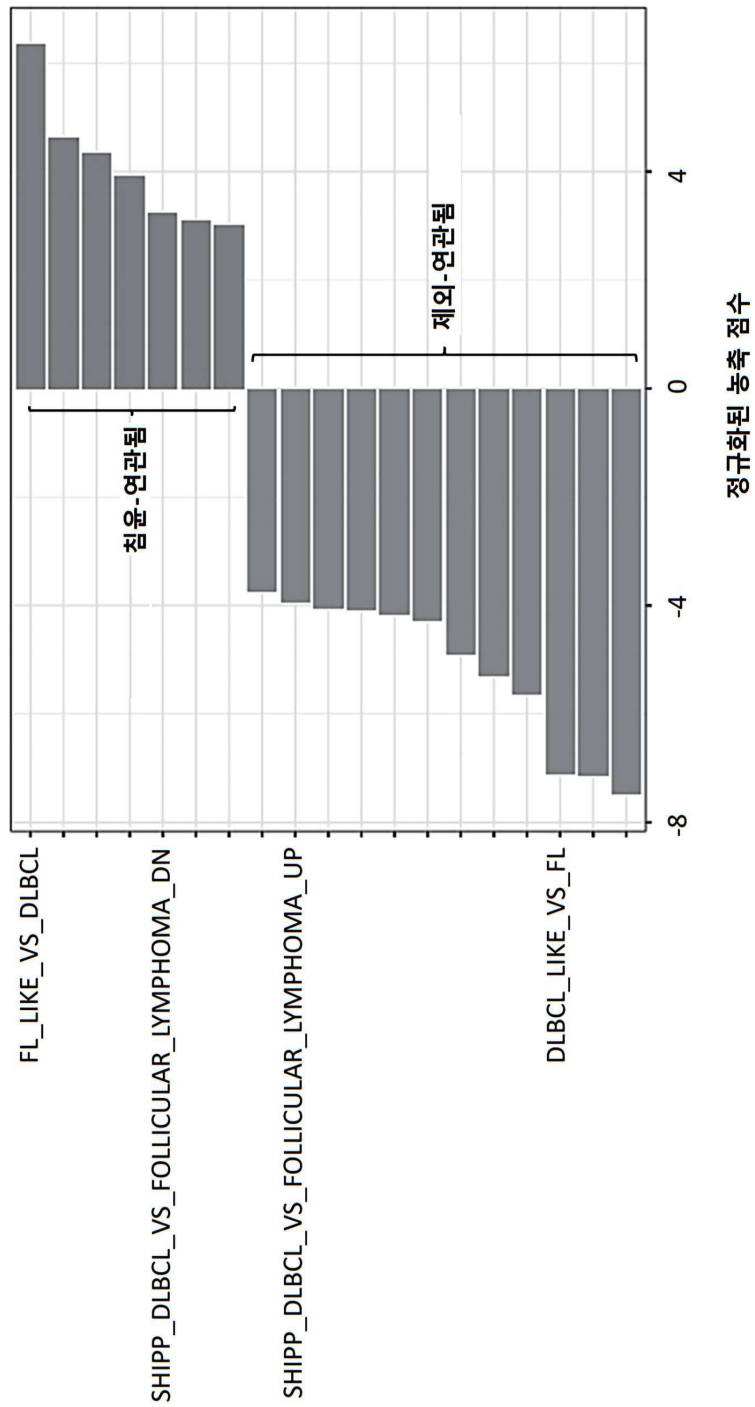
도면2a



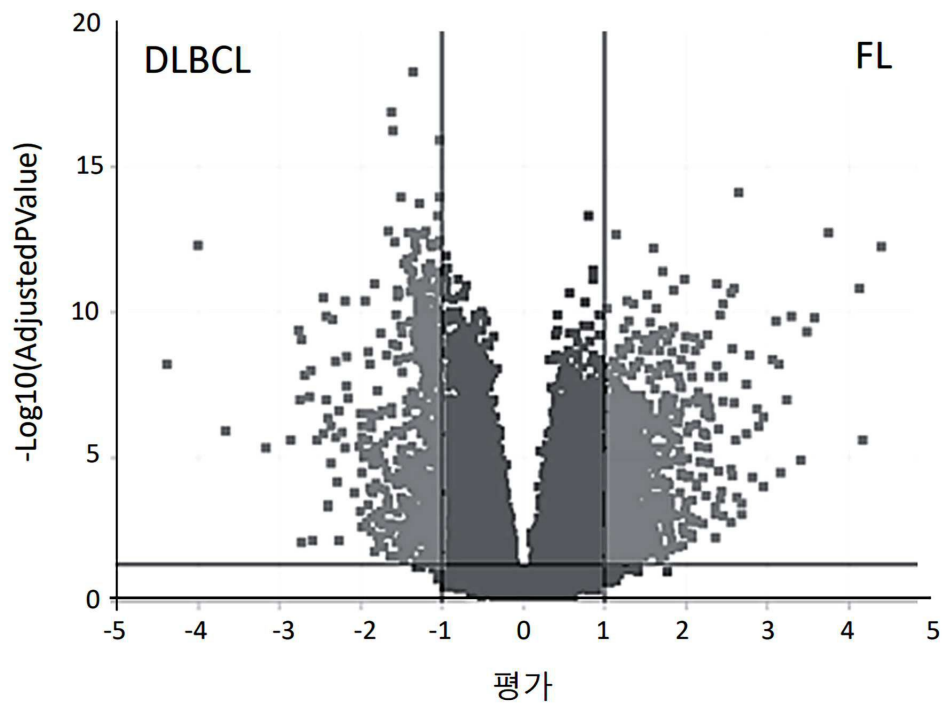
도면2b



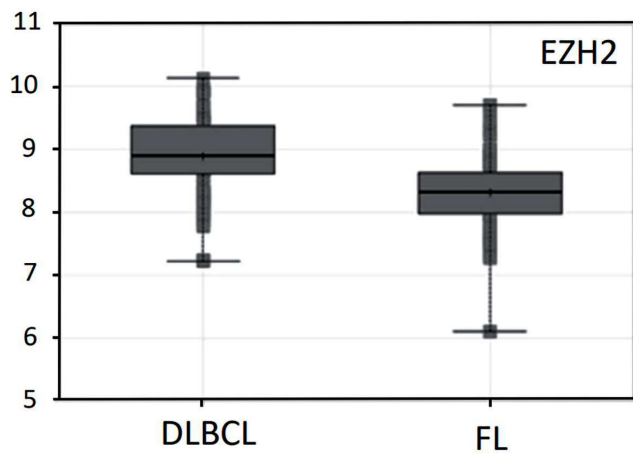
도면2c



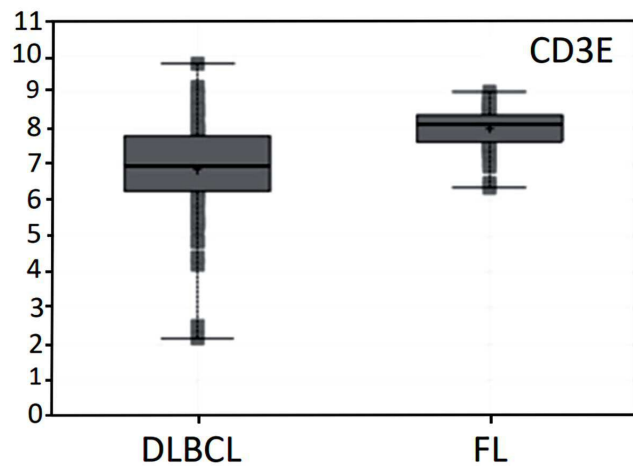
도면3



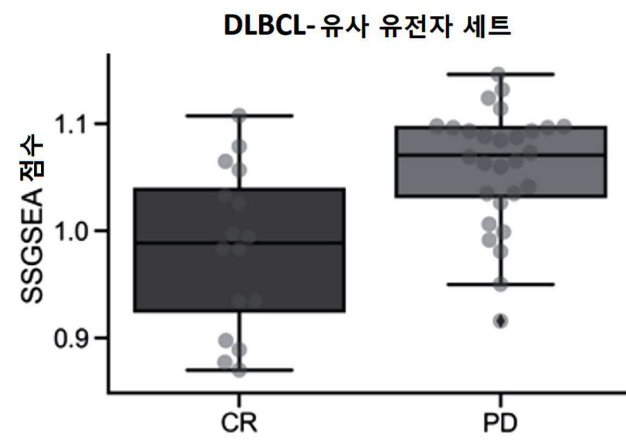
도면4a



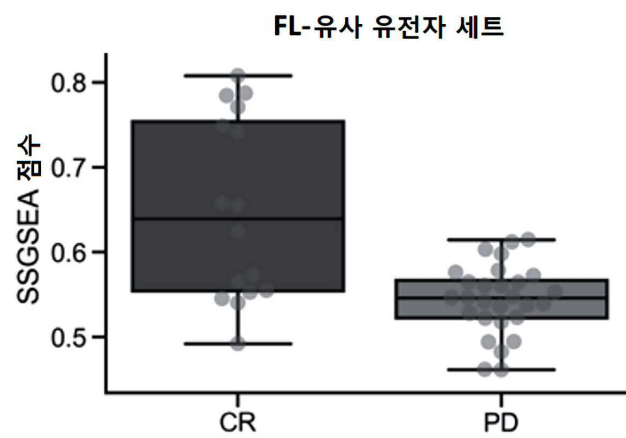
도면4b



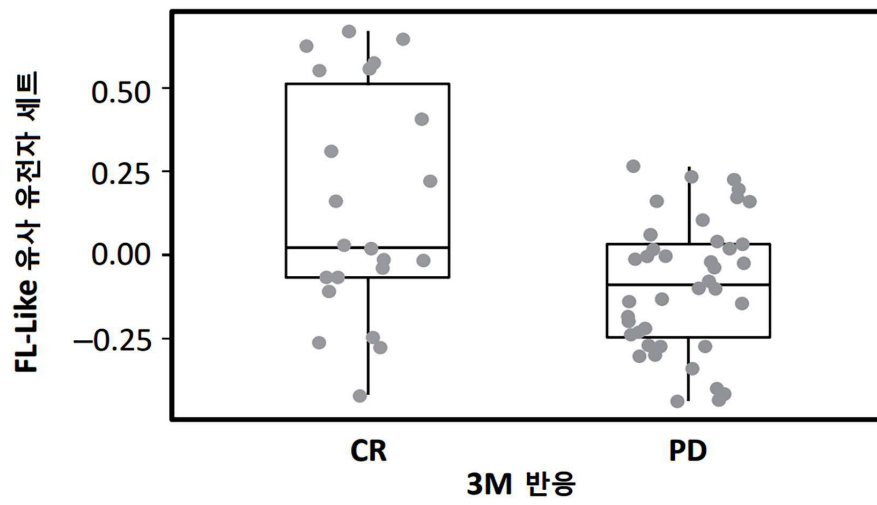
도면5a



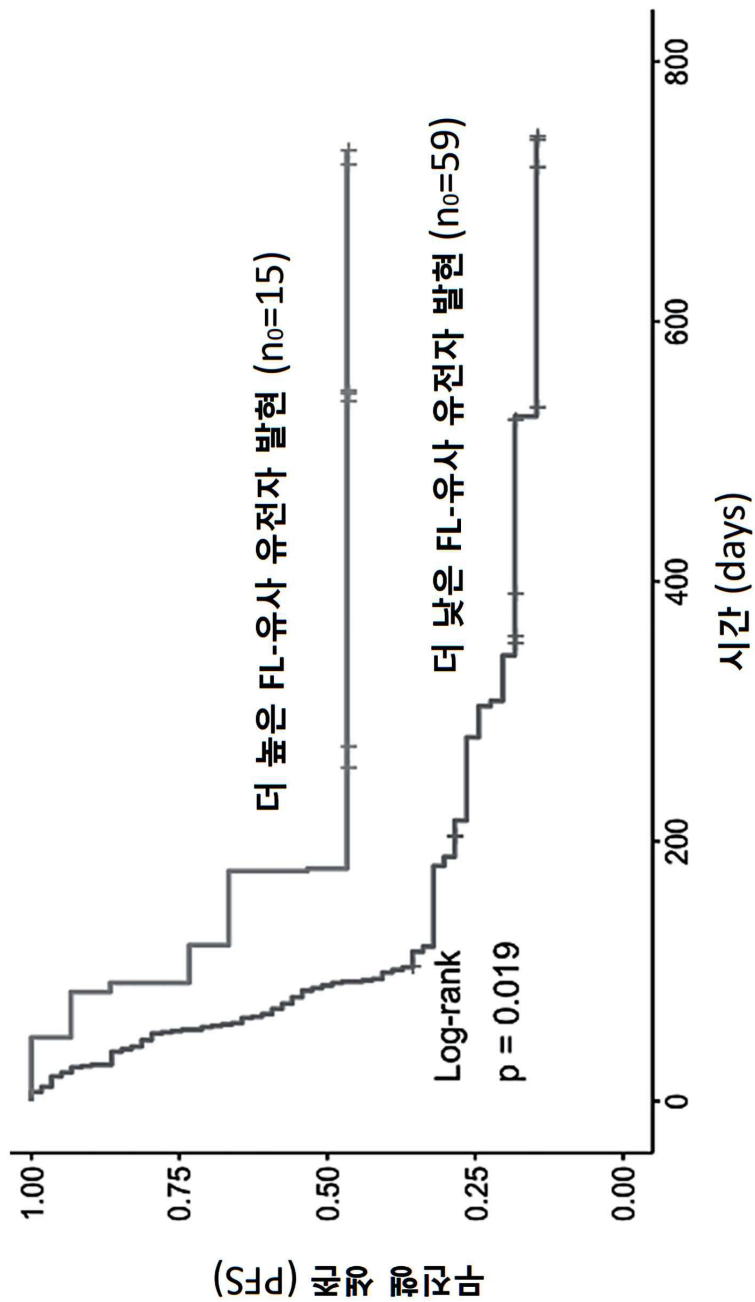
도면5b



도면5c



도면5d



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Juno Therapeutics, Inc.

<120> METHODS FOR DOSING AND TREATMENT OF FOLLICULAR LYMPHOMA AND
MARGINAL ZONE LYMPHOMA IN ADOPTIVE CELL THERAPY

<130> 735042023440

<140> Not yet assigned

<141> Concurrently herewith

<150> 62/965,774

<151> 2020-01-24

<150> 63/037,542

<151> 2020-06-10

<150> 63/068,975

<151> 2020-08-21

<160> 59

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<223> spacer (IgG4hinge)

<400> 1

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 2

<211> 36

<212> DNA

<213> homo sapiens

<220>

<223> spacer (IgG4hinge)

<400> 2

gaatctaagt acggaccgcc ctgccccct tgcct 36

<210> 3

<211> 119

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<223> Hinge-CH3 spacer

<400> 3

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Gly Gln Pro Arg

1 5 10 15

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 20 25 30
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 35 40 45
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 50 55 60
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 65 70 75 80

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 85 90 95
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 100 105 110
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 115

<210> 4

<211> 229

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<223> Hinge-CH2-CH3 spacer

<400> 4

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
 1 5 10 15

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 20 25 30
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 35 40 45
 Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 50 55 60
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

85 90 95
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
 100 105 110
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 115 120 125
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 145 150 155 160
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 165 170 175
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
 180 185 190
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys

225

<210> 5

<211> 282

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<223> IgD-hinge-Fc

<400> 5

Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala
 1 5 10 15
 Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala
 20 25 30

Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys
 35 40 45

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

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

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

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

<210> 6

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> T2A

<400> 6

Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp

1 5 10 15

Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg

20

<210> 7

<211> 357

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> tEGFR

<400> 7

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly

20 25 30

Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe

35 40 45

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

50 55 60

Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu

130 135 140

Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr

145 150 155 160

Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys

165 170 175

Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly

180 185 190

Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu

195 200 205

Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys

210 215 220

Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu

225 230 235 240

Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met

245 250 255

Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala

260 265 270

His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val

275 280 285

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

290 295 300

Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro

305 310 315 320

Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala

325 330 335

Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly

340 345 350

Ile Gly Leu Phe Met

355

<210> 8

<211> 27

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<223> CD28 (amino acids 153-179 of Accession No. P10747)

<400> 8

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val

20 25

<210> 9

<211> 66

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<223> CD28 (amino acids 114-179 of Accession No. P10747)

<400> 9

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly

35 40 45

Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe

50 55 60

Trp Val

65

<210> 10

<211> 41

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<223> CD28 (amino acids 180-220 of P10747)

<400> 10

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
 1 5 10 15
 Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
 20 25 30
 Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 35 40

<210> 11

<211> 41

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<223> CD28 (LL to GG)

<400> 11

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
 1 5 10 15
 Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
 20 25 30
 Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 35 40

<210> 12

<211> 42

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<223> 4-1BB (amino acids 214-255 of Q07011.1)

<400> 12

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 1 5 10 15
 Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 20 25 30
 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
 35 40

<210> 13

<211> 112

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<223> CD3 zeta

<400> 13

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly

1	5	10	15
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr			
20	25	30	
Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys			
35	40	45	
Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys			
50	55	60	
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg			

65	70	75	80
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala			
85	90	95	
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
100	105	110	

<210> 14

<211> 112

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<223> CD3 zeta

<400> 14

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Glu Pro Pro Ala Tyr Gln Gln Gly

1	5	10	15
Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr			
20	25	30	

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 35 40 45
 Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 50 55 60
 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 85 90 95
 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 100 105 110

<210> 15

<211> 112

<212> PRT

<213> homo sapiens

<220>

<223> CD3 zeta

<400> 15

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly
 1 5 10 15
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

20 25 30
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 35 40 45
 Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 50 55 60
 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 65 70 75 80
 Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala

85 90 95
 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 100 105 110

<210> 16

<211> 335

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> tEGFR

<400> 16

Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu

1 5 10 15

Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile

20 25 30

Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe

35 40 45

Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr

50 55 60

Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn

65 70 75 80

Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg

85 90 95

Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile

100 105 110

Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val

115 120 125

Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp

130 135 140

Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn

145 150 155 160

Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu

165 170 175

Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser

180 185 190

Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu

195 200 205

Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln
210 215 220

Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly
225 230 235 240

Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro
245 250 255

His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr
260 265 270

Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His
275 280 285

Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro
290 295 300

Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala
305 310 315 320

Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met
325 330 335

<210> 17

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> T2A

<400> 17

Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro

1 5 10 15
Gly Pro

<210> 18

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> P2A

<400> 18

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val

1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 19

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> P2A

<400> 19

Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn

1 5 10 15

Pro Gly Pro

<210> 20

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> E2A

<400> 20

Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser

1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro

20

<210> 21

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> F2A

<400> 21

Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val

1 5 10 15

Glu Ser Asn Pro Gly Pro

20

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> linker

<220>

<221> REPEAT

<222> (5)...(9)

<223> SGGGG is repeated 5 times

<400> 22

Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro

1 5 10

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> linker

<400> 23

Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Gly Lys

1 5 10 15

Ser

<210> 24

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> GMCSFR alpha chain signal sequence

<400> 24

atgcttctcc tggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacaccacgc attcctcctg 60
atccca 66

<210> 25

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> GMCSFR alpha chain signal sequence

<400> 25

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15
Ala Phe Leu Leu Ile Pro
20

<210> 26

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD8 alpha signal peptide

<400> 26

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15
His Ala

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge

<400> 27

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

<210> 28

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge

<400> 28

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 29

<211> 61

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge

<400> 29

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro

1 5 10 15

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu

20 25 30

Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro

35 40 45

Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro

50 55 60

<210> 30

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge

<400> 30

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro

1 5 10

<210> 31

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge

<400> 31

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge

<400> 32

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge

<400> 33

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 34

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge

<400> 34

Glu Val Val Val Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR L1

<400> 35

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR L2

<400> 36

Ser Arg Leu His Ser Gly Val

1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR L3

<400> 37

Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly

1 5

<210> 38

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H1

<400> 38

Asp Tyr Gly Val Ser

1 5

<210> 39

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H2

<400> 39

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

1 5 10 15

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H3

<400> 40

Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly

1 5

<210> 41

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VH

<400> 41

Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln

1 5 10 15

Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20 25 30

Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 42

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VL

<400> 42

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr

100

105

<210> 43

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> scFv

<400> 43

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr

20

25

30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln

65

70

75

80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Ser Thr Ser Gly

100

105

110

Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Glu Val Lys

115

120

125

Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser

130

135

140

Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser

145

150

155

160

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile

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

225 230 235 240
 Val Thr Val Ser Ser
 245

<210> 44

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR L1

<400> 44

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala

1 5 10

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR L2

<400> 45

Ser Ala Thr Tyr Arg Asn Ser

1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR L3

<400> 46

Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 47

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H1

<400> 47

Ser Tyr Trp Met Asn

1 5

<210> 48

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H2

<400> 48

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

1 5 10 15

Gly

<210> 49

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H3

<400> 49

Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 50

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VH

<400> 50

Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Gln Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 51

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VL

<400> 51

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Thr Tyr Arg Asn Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Lys Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 52

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> linker

<400> 52

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 53

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> scFv

<400> 53

Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45
 Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Gln Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser
 130 135 140

Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys
 145 150 155 160
 Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 165 170 175
 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ser Ala Thr Tyr Arg Asn
 180 185 190
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 195 200 205

Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser Lys Asp Leu Ala Asp Tyr Phe
 210 215 220
 Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys
 225 230 235 240
 Leu Glu Ile Lys Arg

245

<210> 54

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HC-CDR3

<400> 54

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210>

55

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LC-CDR2

<400> 55

His Thr Ser Arg Leu His Ser

1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LC-CDR3

<400> 56

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 57

<211> 735

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence encoding scFv

<400> 57

gacatccaga tgaccagac cacctccagc ctgagcgcca gcctgggcga ccgggtgacc 60

atcagctgcc gggccagcca ggacatcagc aagtacctga actggtatca gcagaagccc 120

gacggcaccg tcaagctgct gatctaccac accagccggc tgcacagcgg cgtgcccagc 180

cggtttagcg gcagcggctc cggcaccgac tacagcctga ccattctcaa cctggaacag 240

gaagatatcg ccacctactt ttgccagcag ggcaacacac tgcctacac ctttggcggc 300
 ggaacaaagc tggaatcac cggcagcacc tccggcagcg gcaagcctgg cagcggcgag 360
 ggcagcacca agggcgaggt gaagctgcag gaaagcggcc ctggcctggt ggcccccagc 420
 cagagcctga gcgtgacctg caccgtgagc ggcgtagacc tgcccgaacta cggcgtgagc 480
 tggatccggc agccccccag gaagggcctg gaatggctgg gcgtgatctg gggcagcgag 540
 accacctact acaacagcgc cctgaagagc cggctgacca tcataagga caacagcaag 600

agccaggtgt tcctgaagat gaacagcctg cagaccgacg acaccgcat ctactactgc 660
 gccaaagcact actactacgg cggcagctac gccatggact actggggcca gggcaccagc 720
 gtgaccgtga gcagc 735

<210> 58

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(1)

<223> Xaa is glycine, cysteine or arginine

<220>

<221> VARIANT

<222> (4)...(4)

<223> Xaa is cysteine or threonine

<400> 58

Xaa Pro Pro Xaa Pro

1 5

<210> 59

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<400> 59

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
1 5 10 15
Lys Gly