



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0000616
(43) 공개일자 2024년01월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/725 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0637 (2023.05)
A61K 39/4611 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2023-7042980(분할)
(22) 출원일자(국제) 2017년04월14일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2022-7029151
원출원일자(국제) 2017년04월14일
심사청구일자 2022년09월22일
(85) 번역문제출일자 2023년12월12일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/027601
(87) 국제공개번호 WO 2017/180989
국제공개일자 2017년10월19일
(30) 우선권주장
62/323,623 2016년04월15일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
메모리얼 슬로안 케터링 캔서 센터
미국, 뉴욕 10065, 뉴욕, 요크 애비뉴 1275
(72) 발명자
사텔라인, 마이클, 더블유., 제이.
미국 뉴욕주 10025 뉴욕 센트럴 파크 웨스트 444
#8에이치
에캠, 저스틴, 가브리엘, 안드레, 프랑수와
미국 뉴욕주 10065 뉴욕 이스트 66 스트리트 310
에이피티. 2에이
만실라-소토, 조르즈
미국 뉴욕주 11375 포레스트 힐스 112 스트리트
72-72 에이피티. 3에이
(74) 대리인
특허법인 광장리앤코

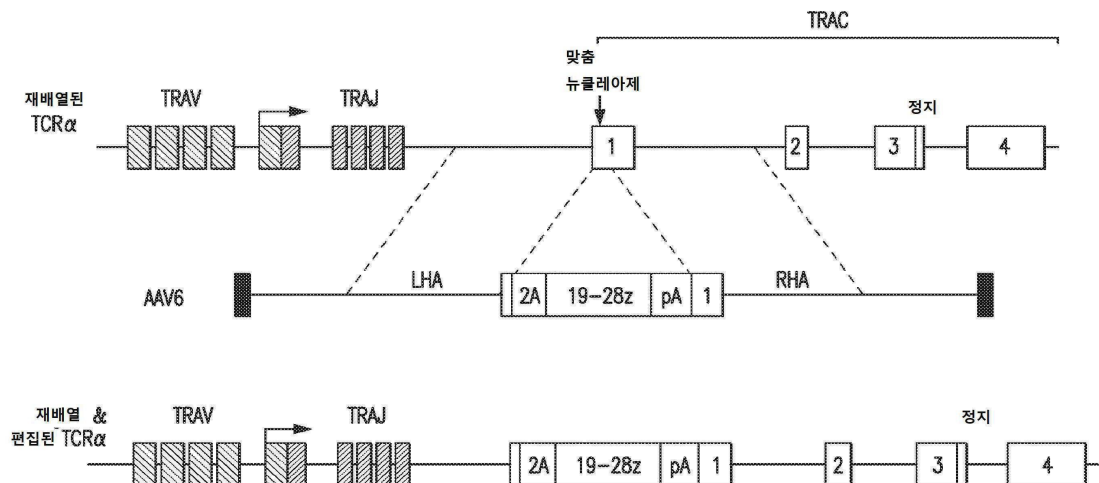
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 유전자이식 T 세포 및 키메라 항원 수용체 T 세포 조성물 및 관련 방법

(57) 요약

본 발명은 전이유전자의 발현이 T 세포의 내인성 프로모터의 제어하에 있도록 하나 이상의 치료 전이유전자가 세포의 게놈 내에 통합되는 T 세포를 제공한다. 본 발명은 추가로 T 세포 치료법을 이용하여 대상을 치료하기 위하여 그러한 세포를 제조하고 이용하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 재조합 핵산 서열이 CAR이 세포의 표면에서 세포에 의해 발현되도록 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되며, 제1 부위에서 CAR을 인코딩하는 핵산의 통합이 세포의 표면에서 기능성 T 세포 수용체(TCR)의 발현을 감소시키거나 방지하는 T 세포를 제공한다. 본 발명은 추가로 CAR 치료법을 이용하여 대상을 치료하기 위하여 그러한 세포를 제조하고 이용하는 방법을 제공한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 39/4631 (2023.05)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 16/2803 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)
C12N 2740/10043 (2013.01)

(30) 우선권주장

62/323,675	2016년04월16일	미국(US)
62/461,677	2017년02월21일	미국(US)
62/462,243	2017년02월22일	미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

핵산의 발현이 T 세포 수용체 (TCR) 복합체의 단백질을 인코딩하는 유전자의 내인성 프로모터의 제어 하에 있도록

(i) 무-프로모터 재조합 핵산 서열인, 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 핵산 서열, 및

(ii) T 세포의 계능 내의 부위에서 핵산 서열의 표적화된 통합을 위해 적합한 상동성 재조합 시스템

을 T 세포 내로 도입하는 단계로서,

T 세포의 표면에서 CAR을 생산하기 위하여, 상기 단백질은 TCR 알파쇄이고, 상기 부위는 CAR이 TCR 알파쇄를 인코딩하는 유전자의 내인성 프로모터의 제어 하에서 발현되도록, TCR 알파쇄를 인코딩하는 유전자의 제1 엑손인 단계, 및

상기 부위에서의 핵산 서열의 통합이 T 세포의 표면에서 기능성 TCR 알파쇄의 발현을 방지하도록 상동성 재조합 시스템이 상기 부위에 상기 핵산 서열을 통합시켜, CAR을 발현하고 기능성 TCR 알파쇄가 결핍된 T 세포를 생성하는 단계

를 포함하는,

CAR을 발현하고 기능성 TCR 복합체가 결핍된 T 세포를 생성하는 시험관내(in vitro) 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, CAR은 암 항원에 결합하는, 시험관내 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 암 항원은 암종, 육종, 혈액암, 백혈병, 림프종, 다발성 골수종, 흑색종, 뇌종양, 척수종양, 생식세포종양, 신경내분비종양, 및 유암종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암의 암 항원인, 시험관내 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 암은 혈액암인, 시험관내 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 암은 림프종 또는 백혈병인, 시험관내 방법.

청구항 6

제3항에 있어서, CAR은 CD19에 결합하고, 암은 백혈병인, 시험관내 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, CAR은 감염성 질병의 병원균의 항원에 결합하는, 시험관내 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, CAR은 자가면역 질환의 자가면역 항원에 결합하는, 시험관내 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, T 세포는 조절 T 세포인, 시험관내 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 자가면역 질환은 류마티스 관절염, 전신 루푸스 홍반, 셀리악 스프루 질병, 악성 빈혈, 백반증, 피부경화증, 건선, 염증성 장 질병, 하시모토병, 애디슨병, 그레이브병, 반응성 관절염, 쇼그렌 증후군, 또는 타입 1 당뇨병인, 시험관내 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 자가면역 질환은 류마티스 관절염, 전신 루푸스 홍반, 셀리악 스프루 질병, 악성 빈혈, 백반증, 피부경화증, 건선, 염증성 장 질병, 하시모토병, 애디슨병, 그레이브병, 반응성 관절염, 쇼그렌 증후군, 또는 타입 1 당뇨병인, 시험관내 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, CAR은 이식물의 항원에 결합하는, 시험관내 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, T 세포는 조절 T 세포인, 시험관내 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 이식물은 폐, 신장, 심장, 장, 간, 또는 췌장의 이식물인, 시험관내 방법.

청구항 15

제13항에 있어서, 이식물은 폐, 신장, 심장, 장, 간, 또는 췌장의 이식물인, 시험관내 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포는 인간으로부터 유래되는, 시험관내 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 1. 관련 출원에 대한 교차-참조

[0002] 본 출원은 2016년 4월 15일에 출원된 미국 가출원 62/323,623호, 2016년 4월 16일에 출원된 미국 가출원 62/323,675호, 2017년 2월 21일에 출원된 미국 가출원 62/461,677호, 및 2017년 2월 22일에 출원된 미국 가출원 62/462,243호의 우선권을 주장하며, 그 각각은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0003] 2. 전자적으로 제출된 서열 목록에 대한 참조

[0004] 본 출원은 2017년 4월 7일에 생성되고 크기가 76,426 바이트이며 명칭이 "13542-043-228_SL.txt"인 ASCII text 파일로서 본 출원과 함께 제출된 서열 목록을 참고로 포함한다.

[0005] 3. 기술 분야

[0006] 본 발명은 일반적으로 면역요법, 그리고 보다 구체적으로 T 세포와 같은 조작된 면역 세포를 이용하는 면역요법에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] 4. 배경기술

[0008] 표적화된 면역요법은 암, 감염성 및 자가면역 질환을 비롯한 다양한 질병을 치료하기 위하여 면역 세포 또는 면역 세포를 관련시키는 분자의 사용에 의존한다(Miller & Sadelain, *Cancer Cell*, 27(4):439-49 (2015); Sabatos-Peyton et al., *Curr. Opin. Immunol.* 22(5):609-615 (2010); McLeod & Anderton, *Curr. Opin. Pharmacol.* 23:1-108 (2015)). 최근에는, 중앙 항원을 표적화하는 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor)(CAR)를 발현하기 위한 T 세포의 유전적 변형이 인간에서 백혈병 세포의 성공적인 박멸이 가능하도록

하였다(Brentjens et al., *Sci. Transl. Med.* 5(177):177ra38. doi: 10.1126/scitranslmed.3005930 (2013)). 후자의 방법에서는, CAR를 인코딩하는 상보성 DNA(cDNA)가 통합-수용성(integration-competent) 감마-레트로바이러스 또는 렌티바이러스를 통해 T 세포로 전달된다. 이들 재조합 바이러스 벡터는 반-무작위 방식으로 인간 게놈 내로의 바이러스 DNA의 통합을 촉매하는 바이러스 인테그라제(integrase) 효소를 요구한다(Schroder et al., *Cell* 110(4):521-529 (2002); Wu et al., *Science* 300(5626):1749-1751 (2003)). 세번째 방법은 DNA 전위 기전을 이용하며, 이 기전의 성분은 바이러스 입자의 필요없이 세포내로 전달될 수 있다. 이 경우에, DNA 트랜스포사제(transposase)는 역시 반-무작위 방식으로, 인간 게놈내로 DNA 트랜스포존(관심 유전자(들)를 함유함)의 통합을 수행한다(Yant et al., *Mol. Cell. Biol.* 25(6):2085-2094 (2005)). 모든 상술한 유전자 전달 방법은 통합된 벡터의 상이한 게놈 위치로 인하여 이질성 CAR 발현을 나타내는 T 세포 집단을 생산한다. 이러한 "다양화된 발현(variegated expression)"은 표적 세포 상호작용을 위해 그리고 T 세포 활성화 강도를 위해 적절한 CAR 발현을 가진 세포의 수를 제한한다. 또한, 이러한 제어되지 않은 DNA 통합은 삽입 돌연변이유발을 잠재적으로 야기할 수 있으며, 이것은 원종양유전자를 활성화시키거나 종양 억제자 유전자를 불활성화시킬 수 있다. 이들 유전적 변형 방법의 다른 한계는 T 세포가 TCR로 알려진 그들의 항원 수용체를 여전히 발현하며, 이들은 여전히 항원 인식에 참여할 수 있어서, CAR T 세포를 활성화시킬 수 있다는 것이다. 이러한 잠재적인 부작용은 자가면역 질환을 가진 환자에서 자가조직 CAR T 세포의 사용, 또는 임의의 수용체에서 동종이계 CAR T 세포의 사용을 제한하며, 이 두 가지 환경에서는 T 세포가 수용체의 조직을 공격할 수 있다(첫번째 경우에는 자가면역을 그리고 후자에서는 이식편 대 숙주병(GvHD)을 야기함).

[0009] 상동성 재조합을 통한 세포의 유전적 변형은 선택된 게놈 부위에서의 외인성 DNA의 정확한 통합을 허용한다(Cappechi et al., *Nat. Rev. Genet.* 6(6):507-512 (2005)). 프로모터-함유 CAR 구조체가 인간 일차 T 세포에서 CCR5 유전자좌내로 표적화된 그러한 표적화된 전달이 최근에 개시되었으며, 이것은 변형된 T 세포가 종양 세포를 시험관내(*in vitro*)에서 사멸시키도록 하였다(Sather et al., *Sci. Transl. Med.* 7(307):307ra156. doi: 10.1126/scitranslmed.aac5530 (2015)). 흥미롭지만, 저자들은 MND 프로모터에 의해 추진된 CAR 발현이 CCR5 유전자좌에서 일정하게 유지될 수 있는지 보여주지 못했으며, 더욱 중요하게는, 그들은 CAR 발현의 수준이 생체내(*in vivo*)에서 종양 세포를 박멸시키기에 적절함을 보여주지 못했다. 또한, CCR5 파괴는 웨스트 나일 바이러스(West Nile virus) 감염에 대한 증가된 민감성에 연관되었다(Lim et al., *Trends Immunol.* 27(7):308-312 (2006)).

[0010] 키메라 항원 수용체(CAR)를 이용하는 적응 면역요법(Adoptive immunotherapy)은 백혈병의 치료에서 주목할만한 임상 결과를 나타냈으며 암을 치료하기 위한 가장 전도있는 새로운 전략 중 하나이다. 현재의 임상 프로토콜은 분리반출법에 의해 수집되고 CAR을 안정하게 발현하도록 레트로바이러스 벡터로 조작된 자가조직 T 세포를 이용하며, CAR은 세포의 종양 분자의 인식 및 조작된 T 세포의 활성화를 책임진다. 이 접근법은 환자-특이적 세포 제조를 요구하며, 이것은 피할수없이 최종 세포 산물에서 환자-대-환자 가변성을 야기한다. 이 접근법의 광범위한 실시는 CAR T 세포에 대한 수요를 충족하기 위하여 세포 제조의 자동화 및 소형화에서의 진전을 더 요구할 것이다. 또한, 현재의 접근법은 감마-레트로바이러스, 렌티바이러스 및 트랜스포존을 비롯한 무작위로 통합하는 벡터를 이용하며, 이것은 모두 반-무작위 통합 및 전이유전자 다양성으로 인한 CAR의 가변적 발현을 야기한다. 위치 효과는 이질성 T 세포 기능, 전이유전자 사일런싱(silencing) 및, 잠재적으로는, 삽입 종양형성을 야기할 수 있다. 따라서, 자가조직 세포 공급과 무작위 벡터 통합의 결합은 가변적 효능을 가진 세포 산물을 생성하기 쉽다.

[0011] CRISPR/Cas9 시스템, 징크 핑거 뉴클레아제(Zinc Finger Nuclease) 또는 TAL 이펙터 뉴클레아제(TALEN)를 비롯한 상이한 맞춤형 뉴클레아제가 이전에 일차 T 세포를 비롯한 광범위한 인간 세포에서 유전자 파괴를 위해 사용되었다. 일부 경우에, 이들 뉴클레아제는 T 세포 수용체(TCR) 또는 HLA 클래스 I 발현을 파괴함으로써, 동종이계 투여를 위한 소위 "범용(universal) T 세포"를 생성하기 위해 이용되었으나, 바이러스 벡터 또는 슬리핑 뷰티 트랜스포존(sleeping beauty transposon)이 CAR cDNA를 전달하기 위해 이용되었으며, 이들 모두는 반-무작위 전이유전자 통합 및 그의 다운스트림 결과를 야기한다.

[0012] TCR 발현이 CAR T 세포의 동종이계반응성에 대해 가질 수 있는 부정적 영향을 해결하기 위하여, 많은 실험실이 TCR 알파 또는 베타 채의 불변 영역의 5' 말단을 특이적으로 표적화하고 절단하는 맞춤형 뉴클레아제(징크-핑거 뉴클레아제, TALE 뉴클레아제 및 CRISPR/Cas9 뉴클레아제)를 설계하였다(Provasi et al., *Nat. Med.* 18(5):807-815 (2012); Poirot et al., *Cancer Res.* 75(18):3853-3864 (2015); Osborn et al., *Mol. Ther.* 24(3):570-581 (2016)). 어느 한 부위에서의 절단은 비-상동성 말단 접합(non-homologous end joining)(NHEJ)으로 불리는 DNA 복구 기전을 통해 통합된 DNA 변형을 야기한다. 돌연변이된 영역은 그들의 각 불변 영역을 가진 재배열된

V(D)J 유전자 사이의 정확한 스플라이싱을 막아서, 세포 표면에서 TCR 복합체의 적절한 조립을 방해한다. GVHD를 야기할 수 없게 된 이들 TCR 음성 세포는 그 후 트랜스포존 또는 렌티바이러스를 이용하여 전달된 CAR을 발현하기 위해 이용되었다(Torikai et al., *Blood* 119(24):5697-5705 (2012); Poirrot et al., *Cancer Res.* 75(18):3853-3864 (2015)). 이들 CAR T 세포가 GVHD를 야기할 수 있는 TCR을 발현하지 않는 이점을 가짐에도 불구하고, 그들은 CAR 유전자의 반-무작위 통합으로 인한 상술한 위험(다양화된 발현, 삽입 돌연변이유발)을 여전히 나타낸다.

[0013] T 세포와 같은 세포를 유전적으로 조작하기 위해 이전에 개시된 접근법은 바이러스 벡터 내에 유도성 프로모터(예를 들어, 레트로바이러스 벡터 내의 NFAT 프로모터 또는 synNotch 구조체)의 사용, 또는 전사 또는 단백질 응집을 제어하는 소분자의 사용을 포함한다(Ponomarev et al., *Neoplasia* 3(6):480-488 (2001); Zhang et al., *Mol. Ther.* 19(4): 751-759 (2011); Roybal et al., *Cell* 167(2):419-432, e16 (2016); Wu et al., *Science* 16;350(6258):aab4077 (2015); Juillerat et al., *Sci. report* 18950 (2016)). 이들 접근법은 무작위로 통합된 전이유전자의 다양화된 발현, 정맥내 약물 주입의 필요성 및 이들 약물의 약동학적 한계, 및 이들 접근법의 일부에서 사용되는 단백질 성분 중 일부(예를 들어, 키메라 전사 인자, 면역원성 단백질 도메인)의 면역원성을 비롯한, 많은 문제와 장벽에 취약하다.

[0014] 키메라 항원 수용체(CAR)는 종양 거부를 매개하도록 T 세포를 전용하고 재프로그래밍하는 합성 수용체이다(Jensen et al., *Curr. Opin. Immunol.* 33:9-15 (2015)). 현재까지 사용되는 가장 성공적인 CAR은 CD19를 표적화하는 것이며(Brentjens et al., *Nat. Med.* 9:279-286 (2003)), 이것은 화학요법이 듣지 않는/재발 B 세포 종양을 가진 환자에서 완전 관해의 전망을 제안한다(Sadelain, *J. Clin. Invest.* 125:3392-3400 (2015)). CAR은 전형적으로 γ -레트로바이러스(Sadelain et al., *Ninth International Immunology Congress, Budapest*, 88:34 (1992)) 또는 다른 무작위 통합 벡터(Wang et al., *Mol. Ther. Oncolytics* 3:16015 (2016))를 이용하여 환자 T 세포내로 형질도입되며, 이것은 클론 증식, 발암 형질전환, 다양화된 전이유전자 발현 및 전사 사일런싱을 야기할 수 있다(Ellis, *Hum. Gene. Ther.* 16:1241-1246 (2005); Riviere et al., *Blood* 119:1107-1116 (2012); von Kalle et al., *Hum. Gene. Ther.* 25:475-481 (2014)). 게놈 편집에서의 최근의 진전은 CCR5 및 AAVS1 유전자좌에의 표적화된 유전자 전달을 비롯한(Lombardo et al., *Nat. Methods* 8:861-869 (2011); Sather et al., *Sci. Transl. Med.* 7:307ra156 (2015)), 인간 세포에서 효율적인 서열-특이적 개입을 가가능하게 한다(Wright et al., *Cell* 164:29-44 (2016); Tsai et al., *Nat. Rev. Genet.* 17:300-312 (2016)).

[0015] 따라서, 암 또는 다른 질병의 치료와 같은, 면역요법을 이용한 개선된 치료를 제공하기 위한 치료법이 필요하다. 본 발명은 이러한 필요를 충족시킨다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0016] 5. 발명의 개요

[0017] 본 발명은 본원에서 제시되고 하기에 개시된 청구범위에 의해 반영된다. 본 발명은 전이유전자의 발현이 내인성 프로모터의 제어하에 있도록 T 세포의 게놈 내에 전이유전자가 통합되는 T 세포, 및 그러한 세포를 이용하는 방법에 관한 것이다.

[0018] 일 양태에서, 본원은 전이유전자의 발현이 T 세포의 내인성 프로모터의 제어하에 있도록 전이유전자가 T 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되는 T 세포를 제공하되, 전이유전자는 치료 단백질 또는 치료 핵산을 인코딩한다. 특정 실시양태에서, 전이유전자는 치료 단백질을 인코딩한다. 특정 실시양태에서, 전이유전자는 치료 핵산을 인코딩한다. 특정 실시양태에서, 전이유전자는 게놈 내의 단일 부위에 통합된다. 특정 실시양태에서, 전이유전자는 세포의 게놈 내의 두 부위에 통합된다. 특정 실시양태에서, 제1 부위는 내인성 프로모터의 제어하에 있는 내인성 유전자의 엑손이다. 특별한 실시양태에서, 제1 부위는 내인성 유전자의 제1 엑손 내에 있다.

[0019] 상기한 대로 전이유전자가 T 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되는 T 세포의 특정 실시양태에서, 내인성 프로모터는 구성적이다. 특정 실시양태에서, 구성적인 내인성 프로모터는 CD4 프로모터, CD8a 프로모터, CD8b 프로모터, TCRa 프로모터, TCRb 프로모터, CD3d 프로모터, CD3g 프로모터, CD3e 프로모터, 및 CD3z 프로모터로 이루

어진 군으로부터 선택된다.

- [0020] 상기한 대로 전이유전자가 T 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되는 T 세포의 특정 실시양태에서, 내인성 프로모터는 T 세포의 서브세트에서 활성이다. 특정 실시양태에서, T 세포의 서브세트에서 활성인 내인성 프로모터는 CD4 프로모터, CD8a 프로모터, CD8b 프로모터, TCRa 프로모터, TCRb 프로모터, CD3d 프로모터, CD3g 프로모터, CD3e 프로모터, CD3z 프로모터, 액틴 프로모터, CD25 프로모터, IL2 프로모터, CD69 프로모터, GzmB 프로모터, T-bet 프로모터, IFN γ 프로모터, TIM3 프로모터, IL4 프로모터, GATA3 프로모터, IL5 프로모터, IL13 프로모터, IL10 프로모터, IL17A 프로모터, IL6 프로모터, IL21 프로모터, IL23R 프로모터, FoxP3 프로모터, CTLA4 프로모터, CD25 프로모터, PD1 프로모터, CD45RO 프로모터, CCR7 프로모터, CD28 프로모터, CD95 프로모터, CD28 프로모터, CD27 프로모터, CD127 프로모터, PD-1 프로모터, CD122 프로모터, CD132 프로모터, KLRG-1 프로모터, HLA-DR 프로모터, CD38 프로모터, CD69 프로모터, Ki-67 프로모터, CD11a 프로모터, CD58 프로모터, CD99 프로모터, CD62L 프로모터, CD103 프로모터, CCR4 프로모터, CCR5 프로모터, CCR6 프로모터, CCR9 프로모터, CCR10 프로모터, CXCR3 프로모터, CXCR4 프로모터, CLA 프로모터, 그랜자임(Granzyme) A 프로모터, 그랜자임 B 프로모터, 페르포린(Perforin) 프로모터, CD57 프로모터, CD161 프로모터, IL-18Ra 프로모터, c-Kit 프로모터, 및 CD130 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0021] 상기한 대로 전이유전자가 T 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되는 T 세포의 특정 실시양태에서, 내인성 프로모터는 유도성이다.
- [0022] 특정 실시양태에서, 유도성인 내인성 프로모터는 T 세포의 활성화에 의해 유도된다. 특정 실시양태에서, 유도성인 내인성 프로모터는 T 세포에 의해 발현된 키메라 항원 수용체(CAR), 키메라 공자극 수용체(CCR), T 세포 수용체(TCR), CD28, CD27, 또는 4-1BB의 그의 각각의 결합 파트너에의 결합에 의해 유도된다. 특정 실시양태에서, 프로모터는 T 세포에 의해 발현된 CAR, CCR 또는 TCR의 그의 각각의 결합 파트너에의 결합에 의해 유도된다. 특정 실시양태에서, T 세포에 의해 발현된 CAR, CCR 또는 TCR의 그의 각각의 결합 파트너에의 결합에 의해 유도된 프로모터는 활성화 T 세포의 핵 인자(NFAT) 프로모터, 프로그래밍된 사멸 1(PD-1) 프로모터, T 세포 면역글로불린 뮤신(mucin)-3(TIM-3) 프로모터, 세포독성 T 림프구 항원-4(CTLA4) 프로모터, 림프구-활성화 단백질 3(LAG-3) 프로모터, 종양 괴사 인자(TNF)-관련 어파토시스-유도 리간드(TRAIL) 프로모터, B- 및 T-림프구 감쇠자(attenuator)(BTLA) 프로모터, CD25 프로모터, CD69 프로모터, Fas 리간드(FasL) 프로모터, TIGIT 프로모터, 및 2B4 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0023] 특정 실시양태에서, 유도성인 내인성 프로모터는 T 세포에 의해 발현된 억제성 수용체에서의 리간드의 결합에 의해 유도된다. 프로모터가 T 세포에 의해 발현된 억제성 수용체에서의 리간드의 결합에 의해 유도되는 특정 실시양태에서, 억제성 수용체는 PD-1, CTLA4, TRAIL, LAG-3, BTLA, TIM-3, Fas, TIGIT, 및 2B4로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 프로모터가 T 세포에 의해 발현된 억제성 수용체에서의 리간드의 결합에 의해 유도되는 특정 실시양태에서, 프로모터는 CPT1a 프로모터 및 ATGL 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0024] 특정 실시양태에서, 유도성인 내인성 프로모터는 T 세포에 의해 발현되는 사이토카인 수용체에서의 사이토카인의 결합에 의해 유도된다. 프로모터가 T 세포에 의해 발현되는 사이토카인 수용체에서의 사이토카인의 결합에 의해 유도되는 특정 실시양태에서, 사이토카인은 인터류킨 2(IL2), 인터류킨 7(IL7), 인터류킨 15(IL15), 및 인터류킨 21(IL21)으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 프로모터가 T 세포에 의해 발현되는 사이토카인 수용체에서의 사이토카인의 결합에 의해 유도되는 특정 실시양태에서, 사이토카인은 인터류킨 10(IL10) 및 형질전환 성장 인자 β (TGF β)로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 프로모터가 T 세포에 의해 발현되는 사이토카인 수용체에서의 사이토카인의 결합에 의해 유도되는 특정 실시양태에서, 프로모터는 T-bet 프로모터, Eomes 프로모터, GATA3 프로모터, 및 CD45RA 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0025] 특정 실시양태에서, 유도성인 내인성 프로모터는 핵산과 세포의 접촉에 의해 유도된다. 프로모터가 핵산과 세포의 접촉에 의해 유도되는 특정 실시양태에서, 핵산은 바이러스 DNA, 바이러스 RNA, 및 세포내 마이크로RNA로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 프로모터가 바이러스 DNA, 바이러스 RNA, 및 세포내 마이크로RNA로 이루어지는 군으로부터 선택되는 핵산과의 접촉에 의해 유도될 경우, 프로모터는 타입 I 인터페론(IFN) 알파, 타입 I IFN 베타, IRF3, IRF7, NF κ B, AP-1, TNF-알파, IL1, 및 IL6로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0026] 특정 실시양태에서, 유도성인 내인성 프로모터는 세포와 대사물의 접촉에 의해 유도된다. 특정 실시양태에서, 대사물은 피루베이트, 글루타민 및 베타-하이드록시부티레이트로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0027] 특정 실시양태에서, 유도성인 내인성 프로모터는 세포에서의 대사적 변화 또는 세포에서 대사적 변화를 야기하

는 물질과 세포의 접촉에 의해 유도된다. 특별한 실시양태에서, 세포에서의 대사적 변화 또는 세포에서 대사적 변화를 야기하는 물질과 세포의 접촉에 의해 유도되는 프로모터는 PKM2 프로모터이다.

- [0028] 특정 실시양태에서, 유도성인 내인성 프로모터는 세포내의 특정 이온 농도 또는 특정 이온 농도와 세포의 접촉에 의해 유도된다. 특정 실시양태에서, 이온은 칼륨 또는 칼슘이다. 특정 실시양태에서, 세포내의 특정 이온 농도 또는 특정 이온 농도와 세포의 접촉에 의해 유도되는 프로모터는 IL2 프로모터, TNF알파 프로모터, 및 IFN감마 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0029] 상술한 대로 전이유전자가 T 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되는 T 세포의 특정 실시양태에서, 전이유전자는 CAR, CCR, 사이토카인, 우성 음성(dominant negative), 미세환경 조절자(microenvironment modulator), 항체, 바이오센서, 키메라 수용체 리간드(CRL), 키메라 면역 수용체 리간드(CIRL), 가용성 수용체, 용질 수송자, 효소, 리보자임, 유전자 회로(genetic circuit), 후생적 개질자, 전사 활성화자, 전사 억제자, 및 비-코딩 RNA로 이루어지는 군으로부터 선택된 분자를 인코딩한다.
- [0030] 특정 실시양태에서, 전이유전자는 사이토카인을 인코딩한다. 일 실시양태에서, 선택적으로 사이토카인은 면역자극성이다. 특정 실시양태에서, 면역자극성인 사이토카인은 IL2, IL12, IL15, 및 IL18로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 다른 실시양태에서, 선택적으로 사이토카인은 면역억제성이다. 특정 실시양태에서, 면역억제성인 사이토카인은 TGF베타 및 IL10으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0031] 특정 실시양태에서, 전이유전자는 항체를 인코딩한다. 특정 실시양태에서, 선택적으로 항체는 면역글로불린, 이중-특이적 T-세포 관여항체(Bi-specific T-cell engager)(BiTE), 디아바디(diabody), 이중 친화성 재-표적화(dual affinity re-targeting)(DART), Fab, F(ab'), 단일쇄 가변 단편(scFv), 및 나노바디(nanobody)로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0032] 특정 실시양태에서, 전이유전자는 CAR을 인코딩한다. 특별한 실시양태에서, CAR은 암 항원에 결합한다.
- [0033] 상술한 대로 전이유전자가 T 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되는 T 세포의 특정 실시양태에서, T 세포는 표적 항원에 민감화된다.
- [0034] 상술한 대로 전이유전자가 T 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되는 T 세포의 특정 실시양태에서, 리포터 분자를 인코딩하는 전이유전자(이하에서 "리포터 전이유전자")는 리포터 전이유전자의 발현이 프로모터, 바람직하게는 T 세포의 내인성 프로모터의 제어하에 있도록 T 세포의 게놈 내에 통합된다.
- [0035] 상술한 대로 전이유전자가 T 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되는 T 세포의 특정 실시양태에서, T 세포는 인간으로부터 유래된다. 인간으로부터 유래되는 T 세포의 특정 실시양태에서, T 세포는 일차 인간 T 세포, CD34 조혈 줄기 세포로부터 유래된 T 세포, 배아 줄기 세포로부터 유래된 T 세포, 또는 유도된 다능성 줄기 세포로부터 유래된 T 세포이다.
- [0036] 상술한 대로 전이유전자가 T 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되는 T 세포의 특정 실시양태에서, 전이유전자는 표적화된 상동성 재조합에 의해 제1 부위로 통합된다. 특정 실시양태에서, 표적화된 상동성 재조합은 징크-핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화자-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN), 군집화된 규칙적-산재 짧은 회문구조 반복물(clustered regularly-interspersed short palindromic repeats)(CRISPR) 연관 단백질 9(Cas9), Cpf1, 발열원, 아우레우스(Aureus), 메가뉴클레아제(Meganuclease) 또는 Mega-Tal을 이용하는 것을 포함하는 방법에 의해 수행된다.
- [0037] 상술한 대로 전이유전자가 T 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되는 T 세포의 특정 실시양태에서, 전이유전자는 T 세포의 게놈 내의 다수의 부위에 통합되며, 다수의 부위에서의 전이유전자의 발현은 상이한 내인성 프로모터의 제어하에 있게 된다.
- [0038] 다른 양태에서, 본원은 제1 전이유전자는 제1 전이유전자의 발현이 T 세포의 제1 내인성 프로모터의 제어하에 있도록 T 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되고, 제2 전이유전자는 제2 전이유전자의 발현이 제2 내인성 프로모터의 제어하에 있도록 T 세포의 게놈 내의 제2 부위에 통합되며, 제1 및 제2 내인성 프로모터는 상이한 프로모터이고, 제1 전이유전자는 제1 치료 단백질 또는 제1 치료 핵산을 인코딩하고, 제2 전이유전자는 제2 치료 단백질 또는 제2 치료 핵산을 인코딩하며, 바람직하게는 제1 치료 단백질 또는 제1 치료 핵산은 제2 치료 단백질 또는 제2 치료 핵산과 각각 상이한, T 세포를 제공한다. 특정 실시양태에서, 제1 전이유전자는 제1 치료 단백질을 인코딩한다. 특정 실시양태에서, 제1 전이유전자는 제1 치료 핵산을 인코딩한다. 특정 실시양태에서, 제2 전이유전자는 제2 치료 단백질을 인코딩한다. 특정 실시양태에서, 제2 전이유전자는 제2 치료 핵산을 인코딩한다.

- [0039] 제1 전이유전자가 게놈 내의 제1 부위에 통합되고 제2 전이유전자가 세포의 게놈 내의 제2 부위에 통합되는 T 세포의 특정 실시양태에서, 제1 내인성 프로모터는 구성적이며, 제2 내인성 프로모터는 유도성이다. 특정 실시양태에서, 구성적 프로모터는 CD4 프로모터, CD8a 프로모터, CD8b 프로모터, TCRa 프로모터, TCRb 프로모터, CD3d 프로모터, CD3g 프로모터, CD3e 프로모터, 및 CD3z 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0040] 제1 전이유전자가 게놈 내의 제1 부위에 통합되고 제2 전이유전자가 세포의 게놈 내의 제2 부위에 통합되며, 제1 내인성 프로모터는 구성적이며, 제2 내인성 프로모터는 유도성인 T 세포의 특정 실시양태에서, 제1 내인성 프로모터 및/또는 제2 내인성 프로모터는 T 세포의 서브세트에서 활성이다. 특정 실시양태에서, 제1 내인성 프로모터 및/또는 제2 내인성 프로모터는 독립적으로 CD4 프로모터, CD8a 프로모터, CD8b 프로모터, TCRa 프로모터, TCRb 프로모터, CD3d 프로모터, CD3g 프로모터, CD3e 프로모터, CD3z 프로모터, 액틴 프로모터, CD25 프로모터, IL2 프로모터, CD69 프로모터, GzmB 프로모터, T-bet 프로모터, IFN γ 프로모터, TIM3 프로모터, IL4 프로모터, GATA3 프로모터, IL5 프로모터, IL13 프로모터, IL10 프로모터, IL17A 프로모터, IL6 프로모터, IL21 프로모터, IL23R 프로모터, FoxP3 프로모터, CTLA4 프로모터, CD25 프로모터, PD1 프로모터, CD45RO 프로모터, CCR7 프로모터, CD28 프로모터, CD95 프로모터, CD28 프로모터, CD27 프로모터, CD127 프로모터, PD-1 프로모터, CD122 프로모터, CD132 프로모터, KLRG-1 프로모터, HLA-DR 프로모터, CD38 프로모터, CD69 프로모터, Ki-67 프로모터, CD11a 프로모터, CD58 프로모터, CD99 프로모터, CD62L 프로모터, CD103 프로모터, CCR4 프로모터, CCR5 프로모터, CCR6 프로모터, CCR9 프로모터, CCR10 프로모터, CXCR3 프로모터, CXCR4 프로모터, CLA 프로모터, 그랜자임 A 프로모터, 그랜자임 B 프로모터, 페르포린 프로모터, CD57 프로모터, CD161 프로모터, IL-18Ra 프로모터, c-Kit 프로모터, 및 CD130 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0041] 제1 전이유전자가 게놈 내의 제1 부위에 통합되고 제2 전이유전자가 세포의 게놈 내의 제2 부위에 통합되며, 제1 내인성 프로모터는 구성적이며, 제2 내인성 프로모터는 유도성인 T 세포의 특정 실시양태에서, 유도성 프로모터는 T 세포의 활성화에 의해 유도된다.
- [0042] 제1 전이유전자가 게놈 내의 제1 부위에 통합되고 제2 전이유전자가 세포의 게놈 내의 제2 부위에 통합되며, 제1 내인성 프로모터는 구성적이며, 제2 내인성 프로모터는 유도성인 T 세포의 특정 실시양태에서, 유도성 프로모터는 T 세포에 의해 발현되는 키메라 항원 수용체(CAR), 키메라 공자극 수용체(CCR), T 세포 수용체(TCR), CD28, CD27, 및 4-1BB의 그의 각 결합 파트너에의 결합에 의해 유도된다. 특정 실시양태에서, 유도성 프로모터는 T 세포에 의해 발현되는 CAR, CCR 또는 TCR의 그의 각 결합 파트너에의 결합에 의해 유도된다. 유도성 프로모터가 T 세포에 의해 발현되는 CAR, CCR 또는 TCR의 그의 각 결합 파트너에의 결합에 의해 유도되는 특정 실시양태에서, 유도성 프로모터는 활성화 T 세포의 핵 인자(NFAT) 프로모터, 프로그래밍된 사멸 1(PD-1) 프로모터, T 세포 면역글로불린 유신-3(TIM-3) 프로모터, 세포독성 T 림프구 항원-4(CTLA4) 프로모터, 림프구-활성화 단백질 3(LAG-3) 프로모터, 종양 괴사 인자(TNF)-관련 어ପ토시스-유도 리간드(TRAIL) 프로모터, B- 및 T-림프구 감쇠자(BTLA) 프로모터, CD25 프로모터, CD69 프로모터, Fas 리간드(FasL) 프로모터, TIGIT 프로모터, 및 2B4 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0043] 제1 전이유전자가 게놈 내의 제1 부위에 통합되고 제2 전이유전자가 세포의 게놈 내의 제2 부위에 통합되며, 제1 내인성 프로모터는 구성적이며, 제2 내인성 프로모터는 유도성인 T 세포의 특정 실시양태에서, 유도성 프로모터는 T 세포에 의해 발현되는 억제성 수용체-의 리간드의 결합에 의해 유도된다. 특정 실시양태에서, 억제성 수용체는 PD-1, CTLA4, TRAIL, LAG-3, BTLA, TIM-3, Fas, TIGIT, 및 2B4로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 유도성 프로모터는 CPT1a 프로모터 및 ATGL 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0044] 제1 전이유전자가 게놈 내의 제1 부위에 통합되고 제2 전이유전자가 세포의 게놈 내의 제2 부위에 통합되며, 제1 내인성 프로모터는 구성적이며, 제2 내인성 프로모터는 유도성인 T 세포의 특정 실시양태에서, 유도성 프로모터는 T 세포에 의해 발현되는 사이토카인 수용체-의 사이토카인의 결합에 의해 유도된다. 특정 실시양태에서, 사이토카인은 인터류킨 2(IL2), 인터류킨 7(IL7), 인터류킨 15 (IL15), 및 인터류킨 21(IL21)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 사이토카인은 인터류킨 10(IL10) 및 형질전환 성장 인자 β (TGF β)로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 유도성 프로모터는 T-bet 프로모터, Eomes 프로모터, GATA3 프로모터 및 CD45RA 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0045] 제1 전이유전자가 게놈 내의 제1 부위에 통합되고 제2 전이유전자가 세포의 게놈 내의 제2 부위에 통합되며, 제1 내인성 프로모터는 구성적이며, 제2 내인성 프로모터는 유도성인 T 세포의 특정 실시양태에서, 유도성 프로모터는 핵산과 세포의 접촉에 의해 유도된다. 특정 실시양태에서, 핵산은 바이러스 DNA, 바이러스 RNA, 및 세포내 마이크로RNA로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 유도성 프로모터가 바이러스 DNA, 바이러스 RNA, 또는 세포내

마이크로RNA와 세포의 접촉에 의해 유도되는 특정 실시양태에서, 유도성 프로모터는 타입 I 인터페론(IFN) 알파, 타입 I IFN 베타, IRF3, IRF7, NFkB, AP-1, TNF-알파, IL1, 및 IL6로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0046] 제1 전이유전자가 게놈 내의 제1 부위에 통합되고 제2 전이유전자가 세포의 게놈 내의 제2 부위에 통합되며, 제1 내인성 프로모터는 구성적이며, 제2 내인성 프로모터는 유도성인 T 세포의 특정 실시양태에서, 유도성 프로모터는 대사물과 세포의 접촉에 의해 유도된다. 특정 실시양태에서, 대사물은 피루베이트, 글루타민 및 베타-하이드록시부티레이트로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0047] 제1 전이유전자가 게놈 내의 제1 부위에 통합되고 제2 전이유전자가 세포의 게놈 내의 제2 부위에 통합되며, 제1 내인성 프로모터는 구성적이며, 제2 내인성 프로모터는 유도성인 T 세포의 특정 실시양태에서, 유도성 프로모터는 세포에서의 대사적 변화 또는 세포에서 대사적 변화를 야기하는 물질과 세포의 접촉에 의해 유도된다. 특정 실시양태에서, 그러한 유도성 프로모터는 PKM2 프로모터이다.

[0048] 제1 전이유전자가 게놈 내의 제1 부위에 통합되고 제2 전이유전자가 세포의 게놈 내의 제2 부위에 통합되며, 제1 내인성 프로모터는 구성적이며, 제2 내인성 프로모터는 유도성인 T 세포의 특정 실시양태에서, 유도성 프로모터는 세포내의 특정 이온 농도 또는 특정 이온 농도와 세포의 접촉에 의해 유도된다. 특정 실시양태에서, 이온은 칼륨 또는 칼슘이다. 유도성 프로모터가 세포내의 특정 이온 농도 또는 특정 이온 농도와 세포의 접촉에 의해 유도되는 특정 실시양태에서, 유도성 프로모터는 IL2 프로모터, TNF알파 프로모터, 및 IFN감마 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0049] 상술한 대로 제1 전이유전자가 게놈 내의 제1 부위에 통합되고 제2 전이유전자가 세포의 게놈 내의 제2 부위에 통합되는 T 세포의 특정 실시양태에서, 제1 전이유전자 및/또는 제2 전이유전자는 각각 CAR, CCR, 사이토카인, 우성 음성, 미세환경 조절자, 항체, 바이오센서, 키메라 수용체 리간드(CRL), 키메라 면역 수용체 리간드(CIRL), 가용성 수용체, 용질 수송자, 효소, 리보자임, 유전자 회로, 후생적 개질자, 전사 활성화자, 전사 억제자, 및 비-코딩 RNA로 이루어지는 군으로부터 독립적으로 선택된 분자를 인코딩한다.

[0050] 상술한 대로 제1 전이유전자가 게놈 내의 제1 부위에 통합되고 제2 전이유전자가 세포의 게놈 내의 제2 부위에 통합되는 T 세포의 특정 실시양태에서, 제1 전이유전자 및/또는 제2 전이유전자는 사이토카인을 인코딩한다. 제1 및/또는 제2 전이유전자가 사이토카인을 인코딩하는 특정 실시양태에서, 사이토카인은 바람직하게는 면역자극성이다. 사이토카인이 면역자극성인 특정 실시양태에서, 사이토카인은 IL2, IL12, IL15, 및 IL18으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 제1 전이유전자 및/또는 제2 전이유전자가 사이토카인을 인코딩하는 특정 실시양태에서, 사이토카인은 바람직하게는 면역억제성이다. 사이토카인이 면역억제성인 특정 실시양태에서, 사이토카인은 TGF베타 및 IL10으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0051] 상술한 대로 제1 전이유전자가 게놈 내의 제1 부위에 통합되고 제2 전이유전자가 세포의 게놈 내의 제2 부위에 통합되는 T 세포의 특정 실시양태에서, 제1 전이유전자 및/또는 제2 전이유전자는 항체를 인코딩한다. 특정 실시양태에서, 항체는 면역글로불린, 이중-특이적 T-세포 관여항체(BiTE), 디아바디, 이중 친화성 재-표적화(DART), Fab, F(ab'), 단일쇄 가변 단편(scFv), 및 나노바디이다.

[0052] 상술한 대로 제1 전이유전자가 게놈 내의 제1 부위에 통합되고 제2 전이유전자가 세포의 게놈 내의 제2 부위에 통합되는 T 세포의 특정 실시양태에서, 제1 전이유전자 및/또는 제2 전이유전자는 CAR을 인코딩한다. 특별한 실시양태에서, CAR은 암 항원에 결합한다.

[0053] 상술한 대로 제1 전이유전자가 게놈 내의 제1 부위에 통합되고 제2 전이유전자가 세포의 게놈 내의 제2 부위에 통합되는 T 세포의 특정 실시양태에서, T 세포는 표적 항원에 민감화된다.

[0054] 상술한 대로 제1 전이유전자가 게놈 내의 제1 부위에 통합되고 제2 전이유전자가 세포의 게놈 내의 제2 부위에 통합되는 T 세포의 특정 실시양태에서, 리포터 분자를 인코딩하는 전이유전자(이하에서 "리포터 전이유전자")는 리포터 전이유전자의 발현이 프로모터, 바람직하게는 T 세포의 내인성 프로모터의 제어하에 있도록 T 세포의 게놈 내에 통합된다.

[0055] 상술한 대로 제1 전이유전자가 게놈 내의 제1 부위에 통합되고 제2 전이유전자가 세포의 게놈 내의 제2 부위에 통합되는 T 세포의 특정 실시양태에서, T 세포는 인간으로부터 유래된다. 인간으로부터 유래되는 T 세포의 특정 실시양태에서, T 세포는 일차 인간 T 세포, CD34 조혈 줄기 세포로부터 유래된 T 세포, 배아 줄기 세포로부터 유래된 T 세포, 또는 유도된 다능성 줄기 세포로부터 유래된 T 세포이다.

[0056] 상술한 대로 제1 전이유전자가 게놈 내의 제1 부위에 통합되고 제2 전이유전자가 세포의 게놈 내의 제2 부위에

통합되는 T 세포의 특정 실시양태에서, 제1 전이유전자가 제1 부위에 통합되고 제2 전이유전자가 세포의 게놈 내의 제2 부위에 통합되는 T 세포의 특정 실시양태에서, 표적화된 상동성 재조합은 징크-핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화자-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN), 군집화된 규칙적-산재 짧은 회문구조 반복물(CRISPR) 연관 단백질 9(Cas9), Cpf1, 발열원, 아우레우스, 메가뉴클레아제 또는 Mega-Tal을 이용하는 것을 포함하는 방법에 의해 수행된다.

[0057] 상술한 대로 제1 전이유전자가 게놈 내의 제1 부위에 통합되고 제2 전이유전자가 세포의 게놈 내의 제2 부위에 통합되는 T 세포의 특정 실시양태에서, 제1 치료 단백질 또는 제1 치료 핵산은 각각 상기 제2 치료 단백질 또는 제2 치료 핵산과 상이하다.

[0058] 제1 전이유전자가 게놈 내의 제1 부위에 통합되고 제2 전이유전자가 세포의 게놈 내의 제2 부위에 통합되며, 제1 내인성 프로모터는 구성적이며, 제2 내인성 프로모터는 유도성인 T 세포의 특정 실시양태에서, 제2 내인성 프로모터는 T 세포의 활성화에 의해 유도된다.

[0059] 제1 전이유전자가 게놈 내의 제1 부위에 통합되고 제2 전이유전자가 세포의 게놈 내의 제2 부위에 통합되며, 제1 내인성 프로모터는 구성적이며, 제2 내인성 프로모터는 유도성인 T 세포의 특정 실시양태에서, 제1 전이유전자는 CAR을 인코딩한다. 제1 전이유전자가 CAR을 인코딩하는 구체적 실시양태에서, 제1 내인성 프로모터는 T 세포 수용체 프로모터이다. 특정 실시양태에서, T 세포 수용체 프로모터는 T 세포 수용체 알파쇄 프로모터, T 세포 수용체 베타쇄 프로모터, CD3 감마쇄 프로모터, CD3 델타쇄 프로모터, CD3 입실론쇄 프로모터, 및 CD3 제타쇄 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 구체적 실시양태에서, 프로모터는 T 세포 수용체 알파쇄 프로모터이다.

[0060] 상술한 T 세포의 특정 실시양태에서, 전술한 실시양태가 면역억제성인 사이토카인, 예를 들어, TGF베타 또는 IL10을 인코딩하는 전이유전자에 관련되는 한은 제외하고, T 세포는 면역자극성 T 세포이다. T 세포가 면역억제성 T 세포인 특정 실시양태에서, T 세포는 세포독성 T 림프구(CTL), CD4+ 서브타입, CD8+ 서브타입, 중앙 기억 T 세포(TCM), 줄기 기억 T 세포(TSCM), 이펙터 기억 T 세포, 이펙터 T 세포, Th1 세포, Th2 세포, Th9 세포, Th17 세포, Th22 세포, 및 Tfh(여포성(follicular) 헬퍼) 세포로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 구체적 실시양태에서, T 세포는 CD4+이다. 구체적 실시양태에서, T 세포는 CD8+이다.

[0061] 상술한 T 세포의 특정 실시양태에서, 전술한 실시양태가 면역자극성인 사이토카인, 예를 들어, IL2, IL12, IL15, 및 IL18로 이루어지는 군으로부터 선택되는 사이토카인을 인코딩하는 전이유전자에 관련되는 한은 제외하고, T 세포는 면역억제성 T 세포이다. 구체적 실시양태에서, T 세포는 조절 T 세포이다.

[0062] 다른 양태에서, 본원은 상기에 개시된 실시양태의 T 세포 다수를 포함하는, T 세포의 분리된 집단을 제공한다. 특정 실시양태에서, T 세포의 분리된 집단은 상기에 개시된 면역자극성 T 세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, T 세포의 분리된 집단은 상기에 개시된 면역억제성 T 세포를 포함한다.

[0063] 다른 양태에서, 본원은 상기에 개시된 실시양태의 T 세포의 치료적 유효량; 및 약학적 허용 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 다른 양태에서, 본원은 상기에 개시된 실시양태의 T 세포 다수를 포함하는 T 세포 집단의 치료적 유효량; 및 약학적 허용 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0064] 다른 양태에서, 본원은 상기에 개시된 실시양태의 T 세포의 치료적 유효량; 및 약학적 허용 담체를 포함하며, T 세포는 상기에 개시된 면역자극성 T 세포인 약학 조성물을 제공한다. 다른 양태에서, 본원은 T 세포 집단의 치료적 유효량; 및 약학적 허용 담체를 포함하며, 상기 집단은 상기에 개시된 실시양태의 T 세포 다수를 포함하며, T 세포는 상기에 개시된 면역자극성 T 세포인 약학 조성물을 제공한다.

[0065] 다른 양태에서, 본원은 상기에 개시된 실시양태의 T 세포의 치료적 유효량; 및 약학적 허용 담체를 포함하며, T 세포는 상기에 개시된 면역억제성 T 세포인 약학 조성물을 제공한다. 다른 양태에서, 본원은 T 세포 집단의 치료적 유효량; 및 약학적 허용 담체를 포함하며, 상기 집단은 상기에 개시된 실시양태의 T 세포 다수를 포함하며, T 세포는 상기에 개시된 면역억제성 T 세포인 약학 조성물을 제공한다.

[0066] 다른 양태에서, 본원은 상기에 개시된 실시양태의 T 세포의 치료적 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법을 제공한다. 다른 양태에서, 본원은 또한 상기에 개시된 실시양태의 T 세포 집단의 치료적 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법을 제공한다. 또 다른 양태에서, 본원은 상기에 개시된 실시양태의 약학 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료

하는 방법을 제공한다.

- [0067] 상기에 개시된 본 발명의 방법의 특정 실시양태에서, 대상은 인간이고, T 세포는 인간으로부터 유래된다. 상기에 개시된 본 발명의 방법의 특정 실시양태에서, T 세포는 대상에게 자가조직이다. 상기에 개시된 본 발명의 방법의 특정 실시양태에서, T 세포는 대상에게 비-자가조직이다.
- [0068] 다른 양태에서, 본원은 대상이 자극된 면역 반응을 필요로 하며, 세포 또는 세포의 집단의 치료적 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법을 제공한다. 세포는 T 세포이고, 전이유전자의 발현이 T 세포의 내인성 프로모터의 제어하에 있도록 전이유전자가 T 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되고, 전이유전자는 치료 단백질 또는 치료 핵산을 인코딩한다. 특정 실시양태에서, 세포 또는 세포 집단은 약학 조성물로서 대상에게 투여된다. 특정 실시양태에서, 전이유전자는 치료 단백질을 인코딩한다. 특정 실시양태에서, 전이유전자는 치료 핵산을 인코딩한다.
- [0069] T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는, 상기에 개시된 자극된 면역 반응을 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 전이유전자는 게놈 내의 단일 부위에 통합된다. 특정 실시양태에서, 전이유전자는 세포의 게놈 내의 두 부위에 통합된다. 특정 실시양태에서, 제1 부위는 내인성 프로모터의 제어 하의 내인성 유전자의 엑손이다. 구체적 실시양태에서, 제1 부위는 내인성 유전자의 제1 엑손 내이다.
- [0070] T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는, 상기에 개시된 자극된 면역 반응을 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 내인성 프로모터는 구성적이다. 특정 실시양태에서, 구성적 프로모터는 CD4 프로모터, CD8a 프로모터, CD8b 프로모터, TCRa 프로모터, TCRb 프로모터, CD3d 프로모터, CD3g 프로모터, CD3e 프로모터, 및 CD3z 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0071] T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는, 상기에 개시된 자극된 면역 반응을 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 내인성 프로모터는 T 세포의 서브세트에서 활성이다. 내인성 프로모터가 T 세포의 서브세트에서 활성인 특정 실시양태에서, 내인성 프로모터는 CD4 프로모터, CD8a 프로모터, CD8b 프로모터, TCRa 프로모터, TCRb 프로모터, CD3d 프로모터, CD3g 프로모터, CD3e 프로모터, CD3z 프로모터, 액틴 프로모터, CD25 프로모터, IL2 프로모터, CD69 프로모터, GzmB 프로모터, T-bet 프로모터, IFN감마 프로모터, TIM3 프로모터, IL4 프로모터, GATA3 프로모터, IL5 프로모터, IL13 프로모터, IL10 프로모터, IL17A 프로모터, IL6 프로모터, IL21 프로모터, IL23R 프로모터, FoxP3 프로모터, CTLA4 프로모터, CD25 프로모터, PD1 프로모터, CD45RO 프로모터, CCR7 프로모터, CD28 프로모터, CD95 프로모터, CD28 프로모터, CD27 프로모터, CD127 프로모터, PD-1 프로모터, CD122 프로모터, CD132 프로모터, KLRG-1 프로모터, HLA-DR 프로모터, CD38 프로모터, CD69 프로모터, Ki-67 프로모터, CD11a 프로모터, CD58 프로모터, CD99 프로모터, CD62L 프로모터, CD103 프로모터, CCR4 프로모터, CCR5 프로모터, CCR6 프로모터, CCR9 프로모터, CCR10 프로모터, CXCR3 프로모터, CXCR4 프로모터, CLA 프로모터, 그랜자임 A 프로모터, 그랜자임 B 프로모터, 페르포린 프로모터, CD57 프로모터, CD161 프로모터, IL-18Ra 프로모터, c-Kit 프로모터, 및 CD130 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0072] T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는, 상기에 개시된 자극된 면역 반응을 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 내인성 프로모터는 유도성이다.
- [0073] 상기에 개시된, 대상이 자극된 면역 반응을 필요로 하며 내인성 프로모터가 유도성인, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 내인성 프로모터는 T 세포의 활성화에 의해 유도된다. 내인성 프로모터가 T 세포의 활성화에 의해 유도되는 특정 실시양태에서, 프로모터는 T 세포에 의해 발현된 키메라 항원 수용체(CAR), 키메라 공자극 수용체(CCR), T 세포 수용체(TCR), CD28, CD27, 또는 4-1BB의 그의 각 결합 파트너에의 결합에 의해 유도된다. 특정 실시양태에서, 프로모터는 T 세포에 의해 발현되는 CAR, CCR 또는 TCR의 그의 각 결합 파트너에의 결합에 의해 유도된다. 프로모터가 T 세포에 의해 발현되는 CAR, CCR 또는 TCR의 그의 각 결합 파트너에의 결합에 의해 유도되는 특정 실시양태에서, 프로모터는 활성화 T 세포의 핵 인자(NFAT) 프로모터, 프로그래밍된 사멸 1(PD-1) 프로모터, T 세포 면역글로불린 뮤신-3(TIM-3) 프로모터, 세포독성 T 림프구 항원-4(CTLA4) 프로모터, 림프구-활성화 단백질 3(LAG-3) 프로모터, 종양 괴사 인자(TNF)-관련 어파토시스-유도 리간드(TRAIL) 프로모터, B- 및 T-림프구 감쇠자(BTLA) 프로모터, CD25 프로모터, CD69 프로모터, Fas 리간드(FasL) 프로모터, TIGIT 프로모터, 및 2B4 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0074] 상기에 개시된, 대상이 자극된 면역 반응을 필요로 하며 내인성 프로모터가 유도성인, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 프로모터는 T 세포에 의해 발현되는 억제성 수용체(예)의 리간드의 결합에 의해 유도된다. 특정 실시양태에서, 억제성 수용체는 PD-1, CTLA4, TRAIL, LAG-3,

BTLA, TIM-3, Fas, TIGIT, 및 2B4로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 프로모터가 T 세포에 의해 발현되는 억제성 수용체와의 리간드의 결합에 의해 유도되는 특정 실시양태에서, 프로모터는 CPT1a 프로모터 및 ATGL 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0075] 상기에 개시된, 대상이 자극된 면역 반응을 필요로 하며 내인성 프로모터가 유도성인, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 프로모터는 T 세포에 의해 발현되는 사이토카인 수용체와의 사이토카인의 결합에 의해 유도된다. 특정 실시양태에서, 사이토카인은 인터류킨 2(IL2), 인터류킨 7(IL7), 인터류킨 15(IL15), 및 인터류킨 21(IL21)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 프로모터가 T 세포에 의해 발현되는 사이토카인 수용체와의 사이토카인의 결합에 의해 유도되는 특정 실시양태에서, 프로모터는 T-bet 프로모터, Eomes 프로모터, GATA3 프로모터 및 CD45RA 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0076] 상기에 개시된, 대상이 자극된 면역 반응을 필요로 하며 내인성 프로모터가 유도성인, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 프로모터는 핵산과 세포의 접촉에 의해 유도된다. 특정 실시양태에서, 핵산은 바이러스 DNA, 바이러스 RNA, 및 세포내 마이크로RNA로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 프로모터가 바이러스 DNA, 바이러스 RNA, 및 세포내 마이크로RNA로 이루어지는 군으로부터 선택되는 핵산과의 세포 접촉에 의해 유도되는 특정 실시양태에서, 프로모터는 타입 I 인터페론(IFN) 알파, 타입 I IFN 베타, IRF3, IRF7, NFkB, AP-1, TNF-알파, IL1, 및 IL6로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0077] 상기에 개시된, 대상이 자극된 면역 반응을 필요로 하며 내인성 프로모터가 유도성인, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 프로모터는 대사물과 세포의 접촉에 의해 유도된다. 특정 실시양태에서, 대사물은 피루베이트, 글루타민, 및 베타-하이드록시부티레이트로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0078] 상기에 개시된, 대상이 자극된 면역 반응을 필요로 하며 내인성 프로모터가 유도성인, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 프로모터는 세포에서의 대사적 변화 또는 세포에서 대사적 변화를 야기하는 물질과 세포의 접촉에 의해 유도된다. 프로모터가 세포에서의 대사적 변화 또는 세포에서 대사적 변화를 야기하는 물질과 세포의 접촉에 의해 유도되는 구체적 실시양태에서, 프로모터는 PKM2 프로모터이다.

[0079] 상기에 개시된, 대상이 자극된 면역 반응을 필요로 하며 내인성 프로모터가 유도성인, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 프로모터는 세포내의 특정 이온 농도 또는 특정 이온 농도와 세포의 접촉에 의해 유도된다. 특정 실시양태에서, 이온은 칼륨 또는 칼슘이다. 프로모터가 세포내의 특정 이온 농도 또는 특정 이온 농도와 세포의 접촉에 의해 유도되는 특정 실시양태에서, 프로모터는 IL2 프로모터, TNF알파 프로모터, 및 IFN감마 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0080] 상기에 개시된, 대상이 자극된 면역 반응을 필요로 하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 전이유전자는 CAR, CCR, 사이토카인, 우성 음성, 미세환경 조절자, 항체, 바이오센서, 키메라 수용체 리간드(CRL), 키메라 면역 수용체 리간드(CIRL), 가용성 수용체, 용질 수송자, 효소, 리보자임, 유전자 회로, 후생적 개질자, 전사 활성화자, 전사 억제자, 및 비-코딩 RNA로 이루어지는 군으로부터 선택된 분자를 인코딩한다.

[0081] 상기에 개시된, 대상이 자극된 면역 반응을 필요로 하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 전이유전자는 사이토카인을 인코딩한다. 특정 실시양태에서, 선택적으로 사이토카인은 면역자극성이다. 사이토카인이 면역자극성인 특정 실시양태에서, 사이토카인은 IL2, IL12, IL15, 및 IL18으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0082] 상기에 개시된, 대상이 자극된 면역 반응을 필요로 하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 전이유전자는 항체를 인코딩한다. 특정 실시양태에서, 선택적으로 항체는 면역글로불린, 이중-특이적 T-세포 관여항체(BiTE), 디아바디, 이중 친화성 재-표적화(DART), Fab, F(ab'), 단일쇄 가변 단편(scFv), 및 나노바디로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0083] 상기에 개시된, 대상이 자극된 면역 반응을 필요로 하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 전이유전자는 CAR을 인코딩한다. 구체적 실시양태에서, CAR은 암 항원에 결합한다.

[0084] 상기에 개시된, 대상이 자극된 면역 반응을 필요로 하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을

치료하는 방법의 특정 실시양태에서, T 세포는 표적 항원에 민감화된다.

- [0085] 상기에 개시된, 대상이 자극된 면역 반응을 필요로 하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 리포터 분자를 인코딩하는 전이유전자(이하에서 "리포터 전이유전자")는 리포터 전이유전자의 발현이 프로모터의 제어하에 있도록 T 세포의 게놈 내에 통합된다. 바람직하게는, 그러한 프로모터는 T 세포의 내인성 프로모터이다.
- [0086] 상기에 개시된, 대상이 자극된 면역 반응을 필요로 하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, T 세포는 인간으로부터 유래된다. 특정 실시양태에서, T 세포는 일차 인간 T 세포, CD34 조혈 줄기 세포로부터 유래된 T 세포, 배아 줄기 세포로부터 유래된 T 세포, 또는 유도된 다능성 줄기 세포로부터 유래된 T 세포이다.
- [0087] 상기에 개시된, 대상이 자극된 면역 반응을 필요로 하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 전이유전자는 표적화된 상동성 재조합에 의해 제1 부위내로 통합된다. 특정 실시양태에서, 표적화된 상동성 재조합은 징크-핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화자-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN), 군집화된 규칙적-산재 짧은 회문구조 반복물(CRISPR) 연관 단백질 9(Cas9), Cpf1, 발열원, 아우레우스, 메가뉴클레아제 또는 Mega-Tal을 이용하는 것을 포함하는 방법에 의해 수행된다.
- [0088] 상기에 개시된, 대상이 자극된 면역 반응을 필요로 하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 전이유전자는 T 세포의 게놈 내의 다수의 부위에서, 그리고 다수의 부위에서의 전이유전자의 발현이 상이한 내인성 프로모터의 제어하에 있도록, 통합된다.
- [0089] 상기에 개시된, 대상이 자극된 면역 반응을 필요로 하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, T 세포는 면역자극성 T 세포이다. 특정 실시양태에서, T 세포는 세포독성 T 림프구(CTL), CD4+ 서브타입, CD8+ 서브타입, 중앙 기억 T 세포(TCM), 줄기 기억 T 세포(TSCM), 이펙터 기억 T 세포, 이펙터 T 세포, Th1 세포, Th2 세포, Th9 세포, Th17 세포, Th22 세포, 및 Tfh(여포성 헬퍼) 세포로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 구체적 실시양태에서, T 세포는 CD4+이다. 다른 구체적 실시양태에서, T 세포는 CD8+이다.
- [0090] 상기에 개시된, 대상이 자극된 면역 반응을 필요로 하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 개체는 암을 갖는다. 구체적 실시양태에서, 암은 백혈병이다.
- [0091] 상기에 개시된, 대상이 자극된 면역 반응을 필요로 하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 개체는 종양을 갖는다.
- [0092] 상기에 개시된, 대상이 자극된 면역 반응을 필요로 하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 대상은 인간이며, T 세포는 인간으로부터 유래된다.
- [0093] 상기에 개시된, 대상이 자극된 면역 반응을 필요로 하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, T 세포는 대상에게 자가조직이다. 상기에 개시된, 대상이 자극된 면역 반응을 필요로 하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, T 세포는 대상에게 비-자가조직이다.
- [0094] 다른 양태에서, 본원은 대상이 억제된 면역 반응을 필요로 하며, 세포 또는 세포 집단의 치료적 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법을 제공하되, 세포는 T 세포이고, 전이유전자의 발현이 T 세포의 내인성 프로모터의 제어하에 있도록 전이유전자가 T 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되고, 전이유전자는 치료 단백질 또는 치료 핵산을 인코딩한다. 특정 실시양태에서, 세포 또는 세포 집단은 약학 조성물로서 투여된다. 특정 실시양태에서, 전이유전자는 치료 단백질을 인코딩한다. 특정 실시양태에서, 전이유전자는 치료 핵산을 인코딩한다.
- [0095] 상기에 개시된, 대상이 억제된 면역 반응을 필요로 하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 전이유전자는 게놈 내의 단일 부위에 통합된다. 특정 실시양태에서, 전이유전자는 세포의 게놈 내의 두 부위에 통합된다. 특정 실시양태에서, 제1 부위는 내인성 프로모터의 제어 하의 내인성 유전자의 엑손이다. 특별한 실시양태에서, 제1 부위는 내인성 유전자의 제1 엑손 내이다.
- [0096] 상기에 개시된, 대상이 억제된 면역 반응을 필요로 하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 내인성 프로모터는 구성적이다. 특정 실시양태에서, 구성적 프로모터는 CD4 프로모터, CD8a 프로모터, CD8b 프로모터, TCRa 프로모터, TCRb 프로모터, CD3d 프로모터, CD3g 프로모터,

CD3e 프로모터, 및 CD3z 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0097] 상기에 개시된, 대상이 억제된 면역 반응을 필요로 하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 내인성 프로모터는 T 세포의 서브세트에서 활성이다. 특정 실시양태에서, T 세포의 서브세트에서 활성인 내인성 프로모터는 CD4 프로모터, CD8a 프로모터, CD8b 프로모터, TCRA 프로모터, TCRb 프로모터, CD3d 프로모터, CD3g 프로모터, CD3e 프로모터, CD3z 프로모터, 액틴 프로모터, CD25 프로모터, IL2 프로모터, CD69 프로모터, GzmB 프로모터, T-bet 프로모터, IFN감마 프로모터, TIM3 프로모터, IL4 프로모터, GATA3 프로모터, IL5 프로모터, IL13 프로모터, IL10 프로모터, IL17A 프로모터, IL6 프로모터, IL21 프로모터, IL23R 프로모터, FoxP3 프로모터, CTLA4 프로모터, CD25 프로모터, PD1 프로모터, CD45RO 프로모터, CCR7 프로모터, CD28 프로모터, CD95 프로모터, CD28 프로모터, CD27 프로모터, CD127 프로모터, PD-1 프로모터, CD122 프로모터, CD132 프로모터, KLRG-1 프로모터, HLA-DR 프로모터, CD38 프로모터, CD69 프로모터, Ki-67 프로모터, CD11a 프로모터, CD58 프로모터, CD99 프로모터, CD62L 프로모터, CD103 프로모터, CCR4 프로모터, CCR5 프로모터, CCR6 프로모터, CCR9 프로모터, CCR10 프로모터, CXCR3 프로모터, CXCR4 프로모터, CLA 프로모터, 그랜자임 A 프로모터, 그랜자임 B 프로모터, 페르포린 프로모터, CD57 프로모터, CD161 프로모터, IL-18Ra 프로모터, c-Kit 프로모터, 및 CD130 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0098] 상기에 개시된, 대상이 억제된 면역 반응을 필요로 하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 내인성 프로모터는 유도성이다.

[0099] 상기에 개시된, 대상이 억제된 면역 반응을 필요로 하며 내인성 프로모터가 유도성인, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 내인성 프로모터는 T 세포의 활성화에 의해 유도된다. 내인성 프로모터가 T 세포의 활성화에 의해 유도되는 특정 실시양태에서, 프로모터는 T 세포에 의해 발현된 키메라 항원 수용체(CAR), 키메라 공자극 수용체(CCR), T 세포 수용체(TCR), CD28, CD27, 또는 4-1BB의 그의 각 결합 파트너에의 결합에 의해 유도된다. 특정 실시양태에서, 프로모터는 T 세포에 의해 발현되는 CAR, CCR 또는 TCR의 그의 각 결합 파트너에의 결합에 의해 유도된다. 프로모터가 T 세포에 의해 발현되는 CAR, CCR 또는 TCR의 그의 각 결합 파트너에의 결합에 의해 유도되는 특정 실시양태에서, 프로모터는 활성화 T 세포의 핵 인자(NFAT) 프로모터, 프로그래밍된 사멸 1(PD-1) 프로모터, T 세포 면역글로불린 뮤신-3(TIM-3) 프로모터, 세포독성 T 림프구 항원-4(CTLA4) 프로모터, 림프구-활성화 단백질 3(LAG-3) 프로모터, 종양 괴사 인자(TNF)-관련 어파토시스-유도 리간드(TRAIL) 프로모터, B- 및 T-림프구 감쇠자(BTLA) 프로모터, CD25 프로모터, CD69 프로모터, Fas 리간드(FasL) 프로모터, TIGIT 프로모터, 및 2B4 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0100] 상기에 개시된, 대상이 억제된 면역 반응을 필요로 하며 내인성 프로모터가 유도성인, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 프로모터는 T 세포에 의해 발현되는 억제성 수용체(예: 리간드의 결합에 의해 유도된다. 특정 실시양태에서, 억제성 수용체는 PD-1, CTLA4, TRAIL, LAG-3, BTLA, TIM-3, Fas, TIGIT, 및 2B4로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 프로모터가 T 세포에 의해 발현되는 억제성 수용체(예: 리간드의 결합에 의해 유도되는 특정 실시양태에서, 프로모터는 CPT1a 프로모터 및 ATGL 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0101] 상기에 개시된, 대상이 억제된 면역 반응을 필요로 하며 내인성 프로모터가 유도성인, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 프로모터는 T 세포에 의해 발현되는 사이토카인 수용체(예: 사이토카인의 결합에 의해 유도된다. 특정 실시양태에서, 사이토카인은 인터류킨 10(IL10), 및 형질전환 성장 인자 β (TGF β)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 프로모터가 T 세포에 의해 발현되는 사이토카인 수용체(예: 사이토카인의 결합에 의해 유도되는 특정 실시양태에서, 프로모터는 T-bet 프로모터, Eomes 프로모터, GATA3 프로모터, 및 CD45RA 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0102] 상기에 개시된, 대상이 억제된 면역 반응을 필요로 하며 내인성 프로모터가 유도성인, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 프로모터는 핵산과 세포의 접촉에 의해 유도된다. 특정 실시양태에서, 핵산은 바이러스 DNA, 바이러스 RNA, 및 세포내 마이크로RNA로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 프로모터가 바이러스 DNA, 바이러스 RNA, 및 세포내 마이크로RNA로 이루어지는 군으로부터 선택되는 핵산과 세포 접촉에 의해 유도되는 특정 실시양태에서, 프로모터는 타입 I 인터페론 (IFN) 알파, 타입 I IFN 베타, IRF3, IRF7, NFkB, AP-1, TNF-알파, IL1, 및 IL6로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0103] 상기에 개시된, 대상이 억제된 면역 반응을 필요로 하며 내인성 프로모터가 유도성인, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 프로모터는 대사물과 세포의 접촉에 의해 유도된다. 특정 실시양태에서, 대사물은 피루베이트, 글루타민 및 베타-하이드록시부티레이트로 이루어지는 군

로부터 선택된다.

- [0104] 상기에 개시된, 대상이 억제된 면역 반응을 필요로 하며 내인성 프로모터가 유도성인, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 프로모터는 세포에서의 대사적 변화 또는 세포에서 대사적 변화를 야기하는 물질과 세포의 접촉에 의해 유도된다. 프로모터가 세포에서의 대사적 변화 또는 세포에서 대사적 변화를 야기하는 물질과 세포의 접촉에 의해 유도되는 특정 실시양태에서, 프로모터는 PKM2 프로모터이다.
- [0105] 상기에 개시된, 대상이 억제된 면역 반응을 필요로 하며 내인성 프로모터가 유도성인, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 프로모터는 세포내의 특정 이온 농도 또는 특정 이온 농도와 세포의 접촉에 의해 유도된다. 특정 실시양태에서, 이온은 칼륨 또는 칼슘이다. 프로모터가 세포내의 특정 이온 농도 또는 특정 이온 농도와 세포의 접촉에 의해 유도되는 특정 실시양태에서, 프로모터는 IL2 프로모터, TNF알파 프로모터, 및 IFN감마 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0106] 상기에 개시된, 대상이 억제된 면역 반응을 필요로 하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 전이유전자는 CAR, CCR, 사이토카인, 우성 음성, 미세환경 조절자, 항체, 바이오센서, 키메라 수용체 리간드(CRL), 키메라 면역 수용체 리간드(CIRL), 가용성 수용체, 용질 수송자, 효소, 리보자임, 유전자 회로, 후생적 개질자, 전사 활성화자, 전사 억제자, 및 비-코딩 RNA로 이루어지는 군으로부터 선택된 분자를 인코딩한다.
- [0107] 상기에 개시된, 대상이 억제된 면역 반응을 필요로 하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 전이유전자는 사이토카인을 인코딩한다. 특정 실시양태에서, 선택적으로 사이토카인은 면역억제성이다. 특정 실시양태에서, 면역억제성인 사이토카인은 TGF베타 및 IL10으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0108] 상기에 개시된, 대상이 억제된 면역 반응을 필요로 하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 전이유전자는 항체를 인코딩한다. 특정 실시양태에서, 선택적으로 항체는 면역글로불린, 이중-특이적 T-세포 관여항체(BiTE), 디아바디, 이중 친화성 재-표적화(DART), Fab, F(ab'), 단 일쇄 가변 단편(scFv), 및 나노바디로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0109] 상기에 개시된, 대상이 억제된 면역 반응을 필요로 하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 전이유전자는 CAR을 인코딩한다. 구체적 실시양태에서, CAR은 암 항원에 결합한다.
- [0110] 상기에 개시된, 대상이 억제된 면역 반응을 필요로 하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, T 세포는 표적 항원에 민감화된다.
- [0111] 상기에 개시된, 대상이 억제된 면역 반응을 필요로 하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 리포터 분자를 인코딩하는 전이유전자(이하에서 "리포터 전이유전자")는 리포터 전이유전자의 발현이 프로모터의 제어하에 있도록 T 세포의 게놈 내에 통합된다. 바람직하게는, 리포터는 T 세포의 내인성 프로모터의 제어하에 있다.
- [0112] 상기에 개시된, 대상이 억제된 면역 반응을 필요로 하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, T 세포는 인간으로부터 유래된다. 특정 실시양태에서, T 세포는 일차 인간 T 세포, CD34 조혈 줄기 세포로부터 유래된 T 세포, 배아 줄기 세포로부터 유래된 T 세포, 또는 유도된 다능성 줄기 세포로부터 유래된 T 세포이다.
- [0113] 상기에 개시된, 대상이 억제된 면역 반응을 필요로 하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 전이유전자는 표적화된 상동성 재조합에 의해 제1 부위내로 통합된다. 특정 실시양태에서, 표적화된 상동성 재조합은 징크-핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화자-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN), 군집화된 규칙적-산재 짧은 회문구조 반복물(CRISPR) 연관 단백질 9(Cas9), Cpf1, 발열원, 아우레우스, 메가뉴클레아제 또는 Mega-Tal을 이용하는 것을 포함하는 방법에 의해 수행된다.
- [0114] 상기에 개시된, 대상이 억제된 면역 반응을 필요로 하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 전이유전자는 T 세포의 게놈 내의 다수의 부위에서, 그리고 상기 다수의 부위에서의 전이유전자의 발현이 상이한 내인성 프로모터의 제어하에 있도록, 통합된다.
- [0115] 상기에 개시된, 대상이 억제된 면역 반응을 필요로 하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을

치료하는 방법의 특정 실시양태에서, T 세포는 면역억제성 T 세포이다. 구체적 실시양태에서, 면역억제성 T 세포는 조절 T 세포이다.

[0116] 상기에 개시된, 대상이 억제된 면역 반응을 필요로 하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 대상은 인간이며, T 세포는 인간으로부터 유래된다.

[0117] 상기에 개시된, 대상이 억제된 면역 반응을 필요로 하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 세포는 대상에게 자가조직이다. 상기에 개시된, 대상이 억제된 면역 반응을 필요로 하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법의 특정 실시양태에서, 세포는 대상에게 비-자가조직이다.

[0118] 다른 양태에서, 본원은 (i) 전이유전자, 및 (ii) 세포의 게놈 내의 부위에서 전이유전자의 표적화된 통합을 위해 적합한 상동성 재조합 시스템을 T 세포내로 도입하여, 상동성 재조합 시스템이 세포의 게놈 내의 부위에 전이유전자를 통합시키는 것을 포함하며, 전이유전자의 발현은 내인성 프로모터의 제어하에 있고, 전이유전자는 치료 단백질 또는 치료 핵산을 인코딩하는, 치료 전이유전자를 발현하는 T 세포를 생성하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 전이유전자는 치료 단백질을 인코딩한다. 특정 실시양태에서, 전이유전자는 치료 핵산을 인코딩한다.

[0119] 상기에 개시된, 치료 전이유전자를 발현하는 T 세포를 생성하는 방법의 특정 실시양태에서, 내인성 프로모터는 구성적이다. 특정 실시양태에서, 내인성 구성적 프로모터는 CD4 프로모터, CD8a 프로모터, CD8b 프로모터, TCRa 프로모터, TCRb 프로모터, CD3d 프로모터, CD3g 프로모터, CD3e 프로모터, 및 CD3z 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0120] 상기에 개시된 치료 전이유전자를 발현하는 T 세포를 생성하는 방법의 특정 실시양태에서, 내인성 프로모터는 T 세포의 서브세트에서 활성이다. 내인성 프로모터가 T 세포의 서브세트에서 활성인 특정 실시양태에서, 내인성 프로모터는 CD4 프로모터, CD8a 프로모터, CD8b 프로모터, TCRa 프로모터, TCRb 프로모터, CD3d 프로모터, CD3g 프로모터, CD3e 프로모터, CD3z 프로모터, 액틴 프로모터, CD25 프로모터, IL2 프로모터, CD69 프로모터, GzmB 프로모터, T-bet 프로모터, IFN감마 프로모터, TIM3 프로모터, IL4 프로모터, GATA3 프로모터, IL5 프로모터, IL13 프로모터, IL10 프로모터, IL17A 프로모터, IL6 프로모터, IL21 프로모터, IL23R 프로모터, FoxP3 프로모터, CTLA4 프로모터, CD25 프로모터, PD1 프로모터, CD45RO 프로모터, CCR7 프로모터, CD28 프로모터, CD95 프로모터, CD28 프로모터, CD27 프로모터, CD127 프로모터, PD-1 프로모터, CD122 프로모터, CD132 프로모터, KLRG-1 프로모터, HLA-DR 프로모터, CD38 프로모터, CD69 프로모터, Ki-67 프로모터, CD11a 프로모터, CD58 프로모터, CD99 프로모터, CD62L 프로모터, CD103 프로모터, CCR4 프로모터, CCR5 프로모터, CCR6 프로모터, CCR9 프로모터, CCR10 프로모터, CXCR3 프로모터, CXCR4 프로모터, CLA 프로모터, 그랜자임 A 프로모터, 그랜자임 B 프로모터, 페르포린 프로모터, CD57 프로모터, CD161 프로모터, IL-18Ra 프로모터, c-Kit 프로모터, 및 CD130 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0121] 상기에 개시된 치료 전이유전자를 발현하는 T 세포를 생성하는 방법의 특정 실시양태에서, 내인성 프로모터는 유도성이다.

[0122] 상기에 개시된, 치료 전이유전자를 발현하며 내인성 프로모터가 유도성인 T 세포를 생성하는 방법의 특정 실시양태에서, 내인성 프로모터는 T 세포의 활성화에 의해 유도된다.

[0123] 상기에 개시된, 치료 전이유전자를 발현하며 내인성 프로모터가 유도성인 T 세포를 생성하는 방법의 특정 실시양태에서, 프로모터는 T 세포에 의해 발현된 키메라 항원 수용체(CAR), 키메라 공자극 수용체(CCR), T 세포 수용체(TCR), CD28, CD27, 및 4-1BB의 그의 각 결합 파트너에의 결합에 의해 유도된다. 특정 실시양태에서, 프로모터는 T 세포에 의해 발현되는 CAR, CCR 또는 TCR의 그의 각 결합 파트너에의 결합에 의해 유도된다. 프로모터가 T 세포에 의해 발현되는 CAR, CCR 또는 TCR의 그의 각 결합 파트너에의 결합에 의해 유도되는 특정 실시양태에서, 프로모터는 활성화 T 세포의 핵 인자(NFAT) 프로모터, 프로그래밍된 사멸 1(PD-1) 프로모터, T 세포 면역글로불린 뮤신-3(TIM-3) 프로모터, 세포독성 T 림프구 항원-4(CTLA4) 프로모터, 림프구-활성화 단백질 3(LAG-3) 프로모터, 종양 괴사 인자(TNF)-관련 어파토시스-유도 리간드(TRAIL) 프로모터, B- 및 T-림프구 감쇠자(BTLA) 프로모터, CD25 프로모터, CD69 프로모터, Fas 리간드(FasL) 프로모터, TIGIT 프로모터, 및 2B4 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0124] 상기에 개시된, 치료 전이유전자를 발현하며 내인성 프로모터가 유도성인 T 세포를 생성하는 방법의 특정 실시양태에서, 프로모터는 T 세포에 의해 발현되는 억제성 수용체와의 리간드의 결합에 의해 유도된다. 특정 실시양

태에서, 억제성 수용체는 PD-1, CTLA4, TRAIL, LAG-3, BTLA, TIM-3, Fas, TIGIT, 및 2B4로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 프로모터가 T 세포에 의해 발현되는 억제성 수용체와의 리간드의 결합에 의해 유도되는 특정 실시양태에서, 프로모터는 CPT1a 프로모터 및 ATGL 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0125] 상기에 개시된, 치료 전이유전자를 발현하며 내인성 프로모터가 유도성인 T 세포를 생성하는 방법의 특정 실시양태에서, 프로모터는 T 세포에 의해 발현되는 사이토카인 수용체와의 사이토카인의 결합에 의해 유도된다. 프로모터가 T 세포에 의해 발현되는 사이토카인 수용체와의 사이토카인의 결합에 의해 유도되는 특정 실시양태에서, 사이토카인은 인터류킨 2(IL2), 인터류킨 7(IL7), 인터류킨 15 (IL15), 및 인터류킨 21(IL21)으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 프로모터가 T 세포에 의해 발현되는 사이토카인 수용체와의 사이토카인의 결합에 의해 유도되는 특정 실시양태에서, 사이토카인은 인터류킨 10(IL10), 및 형질전환 성장 인자 β (TGF β)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 프로모터가 T 세포에 의해 발현되는 사이토카인 수용체와의 사이토카인의 결합에 의해 유도되는 특정 실시양태에서, 프로모터는 T-bet 프로모터, Eomes 프로모터, GATA3 프로모터 및 CD45RA 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0126] 상기에 개시된, 치료 전이유전자를 발현하며 내인성 프로모터가 유도성인 T 세포를 생성하는 방법의 특정 실시양태에서, 프로모터는 핵산과 세포의 접촉에 의해 유도된다. 특정 실시양태에서, 핵산은 바이러스 DNA, 바이러스 RNA, 및 세포내 마이크로RNA로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 프로모터가 바이러스 DNA, 바이러스 RNA, 및 세포내 마이크로RNA로 이루어지는 군으로부터 선택되는 핵산과 세포의 접촉에 의해 유도되는 특정 실시양태에서, 프로모터는 타입 I 인터페론(IFN) 알파, 타입 I IFN 베타, IRF3, IRF7, NFkB, AP-1, TNF-알파, IL1, 및 IL6로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0127] 상기에 개시된, 치료 전이유전자를 발현하며 내인성 프로모터가 유도성인 T 세포를 생성하는 방법의 특정 실시양태에서, 프로모터는 대사물과 세포의 접촉에 의해 유도된다. 특정 실시양태에서, 대사물은 피루베이트, 글루타민 및 베타-하이드록시부티레이트로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0128] 상기에 개시된, 치료 전이유전자를 발현하며 내인성 프로모터가 유도성인 T 세포를 생성하는 방법의 특정 실시양태에서, 프로모터는 세포에서의 대사적 변화 또는 세포에서 대사적 변화를 야기하는 물질과 세포의 접촉에 의해 유도된다. 프로모터가 세포에서의 대사적 변화 또는 세포에서 대사적 변화를 야기하는 물질과 세포의 접촉에 의해 유도되는 특정 실시양태에서, 프로모터는 PKM2 프로모터이다.

[0129] 상기에 개시된, 치료 전이유전자를 발현하며 내인성 프로모터가 유도성인 T 세포를 생성하는 방법의 특정 실시양태에서, 프로모터는 세포내의 특정 이온 농도 또는 특정 이온 농도와 세포의 접촉에 의해 유도된다. 특정 실시양태에서, 이온은 칼륨 또는 칼슘이다. 프로모터가 세포내의 특정 이온 농도 또는 특정 이온 농도와 세포의 접촉에 의해 유도되는 특정 실시양태에서, 프로모터는 IL2 프로모터, TNF알파 프로모터, 및 IFN감마 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0130] 상기에 개시된, 치료 전이유전자를 발현하는 T 세포를 생성하는 방법의 특정 실시양태에서, 전이유전자는 CAR, CCR, 사이토카인, 우성 음성, 미세환경 조절자, 항체, 바이오센서, 키메라 수용체 리간드(CRL), 키메라 면역 수용체 리간드(CIRL), 가용성 수용체, 용질 수송자, 효소, 리보자임, 유전자 회로, 후생적 개질자, 전사 활성화자, 전사 억제자, 및 비-코딩 RNA로 이루어지는 군으로부터 선택된 분자를 인코딩한다.

[0131] 상기에 개시된, 치료 전이유전자를 발현하는 T 세포를 생성하는 방법의 특정 실시양태에서, 전이유전자는 사이토카인을 인코딩한다. 특정 실시양태에서, 선택적으로 사이토카인은 면역자극성이다. 특정 실시양태에서, 면역자극성 사이토카인은 IL2, IL12, IL15, 및 IL18으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 선택적으로 사이토카인은 면역억제성이다. 특정 실시양태에서, 면역억제성 사이토카인은 TGF베타 및 IL10으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0132] 상기에 개시된, 치료 전이유전자를 발현하는 T 세포를 생성하는 방법의 특정 실시양태에서, 전이유전자는 항체를 인코딩한다. 특정 실시양태에서, 선택적으로 항체는 면역글로불린, 이중-특이적 T-세포 관여항체(BiTE), 디아바디, 이중 친화성 재-표적화(DART), Fab, F(ab'), 단일쇄 가변 단편(scFv), 및 나노바디로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0133] 상기에 개시된, 치료 전이유전자를 발현하는 T 세포를 생성하는 방법의 특정 실시양태에서, 전이유전자는 CAR을 인코딩한다. 구체적 실시양태에서, CAR은 암 항원에 결합한다.

[0134] 상기에 개시된 치료 전이유전자를 발현하는 T 세포를 생성하는 방법의 특정 실시양태에서, T 세포는 표적 항원

에 민감화된다.

- [0135] 상기에 개시된 치료 전이유전자를 발현하는 T 세포를 생성하는 방법의 특정 실시양태에서, 리포터 분자를 인코딩하는 전이유전자(이하에서 "리포터 전이유전자")는 리포터 전이유전자의 발현이 프로모터, 바람직하게는 T 세포의 내인성 프로모터의 제어하에 있도록 T 세포의 게놈 내에 통합된다.
- [0136] 상기에 개시된 치료 전이유전자를 발현하는 T 세포를 생성하는 방법의 특정 실시양태에서, T 세포는 인간으로부터 유래된다. 특정 실시양태에서, T 세포는 일차 인간 T 세포, CD34 조혈 줄기 세포로부터 유래된 T 세포, 배아 줄기 세포로부터 유래된 T 세포, 또는 유도된 다능성 줄기 세포로부터 유래된 T 세포이다.
- [0137] 상기에 개시된 치료 전이유전자를 발현하는 T 세포를 생성하는 방법의 특정 실시양태에서, 전이유전자는 표적화된 상동성 재조합에 의해 제1 부위내로 통합된다. 특정 실시양태에서, 표적화된 상동성 재조합은 징크-핑거 뉴클레아제 (ZFN), 전사 활성화-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN), 군집화된 규칙적-산재 짧은 회문구조 반복물 (CRISPR) 연관 단백질 9(Cas9), Cpf1, 발열원, 아우레우스, 메가뉴클레아제 또는 Mega-Tal을 이용하는 것을 포함하는 방법에 의해 수행된다.
- [0138] 상기에 개시된 치료 전이유전자를 발현하는 T 세포를 생성하는 방법의 특정 실시양태에서, 전이유전자는 T 세포의 게놈 내의 다수의 부위에서, 그리고 상기 다수의 부위에서의 전이유전자의 발현이 상이한 내인성 프로모터의 제어하에 있도록, 통합된다.
- [0139] 상기에 개시된 치료 전이유전자를 발현하는 T 세포를 생성하는 방법의 특정 실시양태에서, 세포내로 도입되는 전이유전자는 표적화 구조체에 함유된다. 특정 실시양태에서, 표적화 구조체는 바이러스 핵산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 표적화 구조체는 천연 또는 재조합 아데노-연관 바이러스(AVV) 바이러스 입자내로 패키징된다. 구체적 실시양태에서, AAV 입자는 AAV6 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 표적화 구조체는 비-통합 감마-레트로바이러스내로 패키징된다.
- [0140] 상기에 개시된 치료 전이유전자를 발현하는 T 세포를 생성하는 방법의 특정 실시양태에서, 표적화 구조체 내의 전이유전자는 프로모터에 작동가능하게 연결되지 않는다.
- [0141] 상기에 개시된 치료 전이유전자를 발현하는 T 세포를 생성하는 방법의 특정 실시양태에서, 본 방법은 T 세포내로 제2 전이유전자를 도입하는 것을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 제1 전이유전자는 내인성 구성적 프로모터의 제어하에 있으며 제2 전이유전자는 내인성 유도성 프로모터의 제어하에 있다. 특정 실시양태에서, 제1 전이유전자는 CAR이다. 전이유전자가 CAR인 특정 실시양태에서, 내인성 구성적 프로모터는 T 세포 수용체 프로모터이다. 프로모터가 T 세포 수용체 프로모터인 특정 실시양태에서, 프로모터는 T 세포 수용체 알파 쉘 프로모터, T 세포 수용체 베타 쉘 프로모터, CD3 감마 쉘 프로모터, CD3 델타 쉘 프로모터, CD3 입실론 쉘 프로모터, 및 CD3 제타 쉘 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 구체적 실시양태에서, 프로모터는 T 세포 수용체 알파 쉘 프로모터이다.
- [0142] 다른 양태에서, 본원은 비-통합 감마-레트로바이러스를 포함하는 벡터를 제공한다. 특정 실시양태에서, 비-통합 감마-레트로바이러스는 돌연변이된 인테그라제를 포함한다. 특정 실시양태에서, 돌연변이된 인테그라제는 DDE 모티프에서 돌연변이된다. 특정 실시양태에서, 돌연변이된 인테그라제는 D124A, D124E, D124N, D124V, D183A, D183N, D124A 및 D183A, D124A 및 D183N, D124E 및 D183A, D124E 및 D183N, D124N 및 D183A, D124N 및 D183N, D124V 및 D183A, 및 D124V 및 D183N으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 돌연변이를 갖는다.
- [0143] 다른 양태에서, 본원은 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 재조합 핵산 서열이, CAR이 세포의 표면에서 세포에 의해 발현되도록 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되며, 제1 부위에서의 CAR을 인코딩하는 핵산의 통합이 세포의 표면에서 기능성 T 세포 수용체(TCR) 복합체의 발현을 감소시키거나 방지하는, T 세포를 제공한다. 특정 실시양태에서, CAR을 인코딩하는 핵산 서열은 게놈 내의 단일 부위에서 통합된다. 특정 실시양태에서, CAR을 인코딩하는 핵산 서열은 세포의 게놈 내의 두 부위에서 통합된다. 특정 실시양태에서, 제1 부위는 TCR 복합체의 단백질을 인코딩하는 유전자의 엑손이다.
- [0144] 상기에 개시된, CAR을 인코딩하는 재조합 핵산 서열이 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되는 T 세포의 특정 실시양태에서, 제1 부위에서의 CAR을 인코딩하는 핵산 서열의 통합은 T 세포 수용체 알파 쉘, T 세포 수용체 베타 쉘, CD3 감마 쉘, CD3 델타 쉘, CD3 입실론 쉘, 및 CD3 제타 쉘로 이루어지는 군으로부터 선택되는 단백질의 발현을 감소시키거나 방지한다.
- [0145] 상기에 개시된, CAR을 인코딩하는 재조합 핵산 서열이 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되는 T 세포의 특정 실

시양태에서, T 세포에서 통합된 핵산 서열의 발현은 내인성 프로모터의 제어하에 있다. 특정 실시양태에서, 내인성 프로모터는 T 세포 수용체 복합체 프로모터이다. 특정 실시양태에서, 내인성 프로모터는 T 세포 수용체 알파쇄, T 세포 수용체 베타쇄, CD3 감마쇄, CD3 델타쇄, CD3 입실론쇄, 또는 CD3 제타쇄를 인코딩하는 유전자의 프로모터이다.

- [0146] 상기에 개시된, CAR을 인코딩하는 재조합 핵산 서열이 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되는 T 세포의 특정 실시양태에서, CAR은 암 항원에 결합한다.
- [0147] 상기에 개시된, CAR을 인코딩하는 재조합 핵산 서열이 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되는 T 세포의 특정 실시양태에서, T 세포는 세포독성 T 림프구(CTL), CD4+ 서브타입, CD8+ 서브타입, 중앙 기억 T 세포(TCM), 줄기 기억 T 세포(TSCM), 이펙터 기억 T 세포, 이펙터 T 세포, Th1 세포, Th2 세포, Th9 세포, Th17 세포, Th22 세포, Tfh(여포성 헬퍼) 세포 및 T 조절 세포로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0148] 상기에 개시된, CAR을 인코딩하는 재조합 핵산 서열이 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되는 T 세포의 특정 실시양태에서, T 세포는 인간으로부터 유래된다. 특정 실시양태에서, T 세포는 일차 인간 T 세포, CD34 조혈 줄기 세포로부터 유래된 T 세포, 배아 줄기 세포로부터 유래된 T 세포, 또는 유도된 다능성 줄기 세포로부터 유래된 T 세포이다.
- [0149] 상기에 개시된, CAR을 인코딩하는 재조합 핵산 서열이 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되는 T 세포의 특정 실시양태에서, CAR을 인코딩하는 핵산 서열은 표적화된 상동성 재조합에 의해 제1 부위로 통합된다. 특정 실시양태에서, 표적화된 상동성 재조합은 징크-핑거 뉴클레아제(ZFN), 전자 활성화자-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN), 군집화된 규칙적-산재 짧은 회문구조 반복물(CRISPR) 연관 단백질 9(Cas9), Cpf1, 메가뉴클레아제 또는 Mega-Tal을 이용하여 수행된다.
- [0150] 상기에 개시된, CAR을 인코딩하는 재조합 핵산 서열이 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되는 T 세포의 특정 실시양태에서, CAR을 인코딩하는 핵산 서열은 세포의 게놈 내의 다수의 부위에서, 그리고 상기 다수의 부위에서의 CAR을 인코딩하는 핵산 서열의 발현이 상이한 내인성 프로모터의 제어하에 있도록, 통합된다.
- [0151] 상기에 개시된, CAR을 인코딩하는 재조합 핵산 서열이 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되는 T 세포의 특정 실시양태에서, CAR을 인코딩하는 핵산 서열은 또한 CAR이 세포의 표면에서 세포에 의해 발현되도록 세포의 게놈 내의 제2 부위에 통합된다. 특정 실시양태에서, 제2 부위에서의 CAR을 인코딩하는 핵산의 통합은 또한 세포의 표면에서의 기능성 TCR 복합체의 발현을 감소시키거나 방지하며, 제1 부위와 제2 부위는 상이한 유전자내에 있다.
- [0152] 상기에 개시된, CAR을 인코딩하는 재조합 핵산 서열이 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되는 T 세포의 특정 실시양태에서, 제2 CAR을 인코딩하는 제2 핵산 서열은 제2 CAR이 세포의 표면에서 세포에 의해 발현되도록 그리고 제2 핵산 서열의 발현이 제2 부위에서 내인성 프로모터의 제어하에 있도록 세포의 게놈 내의 제2 부위에서 통합되며, 제1 부위와 제2 부위는 상이한 유전자내에 있다.
- [0153] 다른 양태에서, 본원은 세포의 표면에서 CAR을 생산하기 위하여, CAR을 인코딩하는 무-프로모터(promotor-less) 재조합 핵산 서열이 세포의 게놈 내의 부위에 통합되며, 이 부위는 CAR이 내인성 TCR 알파쇄 프로모터의 제어하에서 발현되도록 TCR 알파쇄의 제1 엑손이며, 이 부위에서 CAR의 통합은 기능성 TCR 알파쇄의 발현을 감소시키거나 방지하는, 인간 T 세포를 제공한다. 특정 실시양태에서, CAR은 CD19에 결합한다.
- [0154] 다른 양태에서, 본원은 CAR을 인코딩하는 재조합 핵산 서열이 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되는 상기에 개시된 세포 다수, 또는 CAR을 인코딩하는 무-프로모터 재조합 핵산 서열이 세포의 게놈 내의 부위에 통합되는 인간 T 세포인 상기에 개시된 세포 다수를 포함하는, T 세포의 단리된 집단을 제공한다.
- [0155] 다른 양태에서, 본원은 CAR을 인코딩하는 재조합 핵산 서열이 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되는 상기에 개시된 세포, 또는 CAR을 인코딩하는 무-프로모터 재조합 핵산 서열이 세포의 게놈 내의 부위에 통합되는 인간 T 세포인 상기에 개시된 세포의 치료적 유효량; 및 약학적 허용 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0156] 다른 양태에서, 본원은 CAR을 인코딩하는 재조합 핵산 서열이 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되는 상기에 개시된 세포, 또는 CAR을 인코딩하는 무-프로모터 재조합 핵산 서열이 세포의 게놈 내의 부위에 통합되는 인간 T 세포인 상기에 개시된 세포의 다수를 포함하는 T 세포 집단의 치료적 유효량; 및 약학적 허용 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0157] 다른 양태에서, 본원은 CAR을 인코딩하는 재조합 핵산 서열이 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되는 상기에 개

시된 세포, 또는 CAR을 인코딩하는 무-프로모터 재조합 핵산 서열이 세포의 게놈 내의 부위에 통합되는 인간 T 세포인 상기에 개시된 세포의 치료적 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상을 CAR 치료법으로 치료하는 방법을 제공한다.

- [0158] 다른 양태에서, 본원은 CAR을 인코딩하는 재조합 핵산 서열이 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되는 상기에 개시된 세포, 또는 CAR을 인코딩하는 무-프로모터 재조합 핵산 서열이 세포의 게놈 내의 부위에 통합되는 인간 T 세포인 상기에 개시된 세포의 치료적 유효량을 포함하는 상기에 개시된 약학 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상을 CAR 치료법으로 치료하는 방법을 제공한다.
- [0159] 다른 양태에서, 본원은 CAR을 인코딩하는 재조합 핵산 서열이 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되는 상기에 개시된 세포 다수, 또는 CAR을 인코딩하는 무-프로모터 재조합 핵산 서열이 세포의 게놈 내의 부위에 통합되는 인간 T 세포인 상기에 개시된 세포 다수를 포함하는 상기에 개시된 세포 집단의 치료적 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상을 CAR 치료법으로 치료하는 방법을 제공한다.
- [0160] 다른 양태에서, 본원은 CAR을 인코딩하는 재조합 핵산 서열이 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되는 상기에 개시된 세포, 또는 CAR을 인코딩하는 무-프로모터 재조합 핵산 서열이 세포의 게놈 내의 부위에 통합되는 인간 T 세포인 상기에 개시된 세포 다수를 포함하는 T 세포의 집단의 치료적 유효량을 포함하는 상기에 개시된 약학 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상을 CAR 치료법으로 치료하는 방법을 제공한다.
- [0161] 이를 필요로 하는 대상을 CAR 치료법으로 치료하기 위한 상기에 개시된 방법의 특정 실시양태에서, 대상은 암을 가지며, CAR은 암의 암 항원에 결합한다. 구체적 실시양태에서, 암은 백혈병이다.
- [0162] 이를 필요로 하는 대상을 CAR 치료법으로 치료하기 위한 상기에 개시된 방법의 특정 실시양태에서, 대상은 종양을 갖는다.
- [0163] 이를 필요로 하는 대상을 CAR 치료법으로 치료하기 위한 상기에 개시된 방법의 특정 실시양태에서, 대상은 인간이며, 세포는 인간으로부터 유래된다.
- [0164] 이를 필요로 하는 대상을 CAR 치료법으로 치료하기 위한 상기에 개시된 방법의 특정 실시양태에서, 세포는 대상에게 자가조직이다. 이를 필요로 하는 대상을 CAR 치료법으로 치료하기 위한 상기에 개시된 방법의 특정 실시양태에서, 세포는 대상에게 비-자가조직이다.
- [0165] 다른 양태에서, 본원은 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하고 T 세포 수용체(TCR) 복합체가 결합된 T 세포를 생성하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 (i) CAR을 인코딩하는 핵산 서열, 및 (ii) 세포의 게놈 내의 부위에서 핵산 서열의 표적화된 통합을 위해 적합한 상동성 재조합 시스템을 T 세포내로 도입하여, 그 부위에서 CAR의 통합이 세포의 표면에서 기능성 T 세포 수용체 복합체의 발현을 감소시키거나 방지하도록 상동성 재조합 시스템이 세포의 게놈 내의 부위에 CAR을 인코딩하는 핵산 서열을 통합하여, CAR을 발현하고 기능성 TCR 복합체가 결합된 T 세포를 생성하는 것을 포함한다.
- [0166] 상기에 개시된, CAR을 발현하고 기능성 TCR 복합체가 결합된 T 세포를 생성하는 방법의 특정 실시양태에서, CAR의 발현은 내인성 프로모터의 제어하에 있다. 특정 실시양태에서, 내인성 프로모터는 T 세포 수용체 알파 체, T 세포 수용체 베타 체, CD3 감마 체, CD3 델타 체, CD3 입실론 체, 또는 CD3 제타 체를 인코딩하는 유전자의 프로모터이다.
- [0167] 상기에 개시된, CAR을 발현하고 기능성 TCR 복합체가 결합된 T 세포를 생성하는 방법의 특정 실시양태에서, 상동성 재조합 시스템은 징크-핑거 뉴클레아제 (ZFN), 전사 활성화자-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN), 또는 군집화된 규칙적-산재 짧은 회문구조 반복물(CRISPR) 연관 단백질 9(Cas9), Cpf1, 메가뉴클레아제 또는 Mega-Tal을 포함한다.
- [0168] 상기에 개시된, CAR을 발현하고 기능성 TCR 복합체가 결합된 T 세포를 생성하는 방법의 특정 실시양태에서, 세포내로 도입되는 CAR을 인코딩하는 핵산 서열은 표적화 구조체내에 함유된다. 특정 실시양태에서, 표적화 구조체는 아데노-연관 바이러스 2(AAV2) 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 표적화 구조체는 천연 또는 재조합 아데노-연관 바이러스(AVV) 바이러스 입자내로 패키징된다. 특정 실시양태에서, AAV 입자는 AAV6 서열을 포함한다.
- [0169] 상기에 개시된, CAR을 발현하고 기능성 TCR 복합체가 결합된 T 세포를 생성하는 방법의 특정 실시양태에서, 표적화 구조체 내의 CAR을 인코딩하는 핵산 서열은 프로모터에 작동가능하게 연결되지 않는다.

[0170] 상기에 개시된, CAR을 발현하고 기능성 TCR 복합체가 결합된 T 세포를 생성하는 방법의 특정 실시양태에서, 표적화 구조체는 5'에서 3'의 순서로, 제1 바이러스 서열, 좌측 상동성 암(arm), 자가-절단 돼지 테스초바이러스(teschovirus) 2A를 인코딩하는 핵산 서열, CAR을 인코딩하는 핵산 서열, 폴리아데닐화 서열, 우측 상동성 암, 및 제2 바이러스 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 제1 또는 제2 바이러스 서열은 아데노-연관 바이러스(AAV)로부터 온다. 특정 실시양태에서, AAV는 AAV2, AAV5 또는 AAV6이다.

[0171] 다른 양태에서, 본원은 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 재조합 핵산 서열이, CAR이 세포의 표면에서 세포에 의해 발현되도록 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되며, 제1 부위에서 CAR을 인코딩하는 핵산의 통합은 세포의 표면에서 기능성 T 세포 수용체(TCR) 복합체의 발현을 감소시키거나 방지하는, 유도된 다능성 줄기 세포를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0172] 6.도면의 간단한 설명

도 1a-1e는 TCR 알파 불변(TRAC) 유전자좌내로의 CAR의 표적화된 통합의 분석을 보여준다. 도 1a는 TCR 알파 불변(TRAC) 유전자좌 내로의 맞춤형 뉴클레아제(TALEN 또는 CRISPR/Cas9)-유도된 표적화된 통합의 도식을 보여준다. 표적화 구조체(AAV6)는 상동성 서열(LHA 및 RHA)에 의해 인접된 CAR 유전자를 함유한다. 일단 통합되면 CAR 발현은 내인성 TCRA 프로모터에 의해 추진되는 한편, TRAC 유전자좌는 파괴된다. TRAV: TCR 알파 가변 영역. TRAJ: TCR 알파 연결 영역. 2A: 자가 절단 돼지 테스초바이러스 2A 서열. pA: 소 성장 호르몬 폴리A 서열. 도 1b는 TRAC TALEN mRNA를 이용한 T 세포의 형질감염 및 표시된 MOI(감염 다중도)로 AAV6의 첨가 후 5일에 대표적인 TCR/CAR 유동 플롯을 보여준다. 도 1c는 AAV6 MOI에 따라 TCR 파괴(KO: 녹아웃) 및 표적화된 통합(KI: 녹인)의 백분율의 막대-그래프를 보여준다. 백분율은 FACS 분석에 의해 평가하였다. 도 1d는 T 세포내로 CAR 벡터화(vectorization)(CAR을 발현하기 위한 적응된 벡터의 선택, 세포내로 CAR 코딩의 통합) 후 5일에 평균 CAR 발현 평균 형광 강도(MFI)를 보여준다(n= 6 내지 8회 독립 실험). 도 1e는 CAR 발현에서의 분산(평균에 대한 표준 편차의 비율)을 측정하는 CAR+ T 세포의 변동 계수를 보여준다. TRAC-P2A-1928z: TRAC내로의 표적화된 통합. SFG-1928z: SFG 레트로바이러스를 이용한 반-무작위 통합. **** $P < 0.0001$ (언페어드(unpaired) T-테스트).

도 2a-2e는 TCR 알파 불변(TRAC) 유전자좌내로의 CAR의 표적화된 통합의 분석을 보여준다. 도 2a는 CAR 및 TCR 발현을 보여주는 유세포분석법 분석을 보여준다. TRAC-P2A-1928z는 도 1에서처럼 생성되었다; TALEN-생성된 TCR- 세포를 SFG-1928z 레트로바이러스로 형질도입시키고; TCR+ 세포를 SFG-1928z 또는 SGF-P28z 레트로바이러스로 형질도입시켰다. 도 2b는 CD19+ 표적 세포를 이용하여 매주 자극시 표시된 CAR T 세포의 축적 세포 카운트를 보여준다. 화살표는 자극 시점을 나타낸다. 도 2c는 표적 세포로서 반딧불이 루시페라제(FFL)-발현 NALM6을 이용한, 18 hr 생물발광 분석을 이용한 세포독성 활성을 보여준다. 데이터는 평균 \pm SD이다. 도 2d 및 2e는 2×10^5 CAR T 세포로 처리된 FFL-NALM6 보유 마우스를 보여준다. 종양 크기(tumor burden)는 40-일 기간에 걸쳐 매주 동물 당 정량된 생물발광 시그널로서 나타난다. 정량은 모든 주어진 시점에서 동물 당 등 및 배 획득의 평균 광자 카운트이며, 라디언스(radiance)로서 표현된다. 각 선은 한 마리의 마우스를 나타낸다. n = 7마리 마우스/그룹이다. 하부 우측 도면은 도 2d 및 2e에서 마우스 생존의 카프란-메이어르(Kaplan-Meier) 분석이다.

도 3a-3j는 TRAC-CAR T 세포가 생체내에서 기능소실(exhaustion)을 방지함으로써 통상적 CAR T 세포를 능가함을 보여준다. 도 3a는 TRAC 유전자좌내로의 CRISPR/Cas9-표적화된 CAR 유전자 통합을 보여준다. 상부, TRAC 유전자좌; 중간, 상동성 암에 의해 인접된 CAR 카세트를 함유하는 rAAV6; 하부, 편집된 TRAC 유전자좌. 도 3b는 TRAC 표적화 후 4일에 대표적인 TCR/CAR 유동 플롯을 보여준다. 도 3c 및 3d는 CAR+ T 세포의 CAR 평균 형광 강도(MFI)(도 3c) 및 CAR MFI 변동 계수(도 3d)를 보여준다(n = 12회 독립 실험, 6 공여체). 도 3e는 마우스 생존의 카프란-메이어르 분석을 보여준다. 도 3f-3j는 1×10^5 CAR T 세포로 처리되고(n = 7/그룹; 점 = 마우스 1마리), 주입 후 제10일 및 제17일에 안락사된 NALM-6-보유 마우스를 보여주며; 골수 CAR T 세포 및 NALM-6 세포를 FACS에 의해 분석하고 계수하였다(TRAC-1928z, 원; RV-1928z-TCR-, 사각형; RV-1928z, 삼각형). 도 3f는 CAR T 세포를 보여준다. 도 3g는 종양(GFP+CD19+) 세포를 보여준다. 도 3h는 CAR T 세포 대 종양 비율을 보여준다. 도 3i는 제17일에 CAR T 세포에서 이펙터 기억(CD62L-CD45RA-) 및 이펙터(CD62L-CD45RA+)의 백분율을 보여준다. 도 3j는 제17일에 FACS에 의해 정량된, 기능소실 마커를 발현하는 CAR T 세포의 백분율을 보여준다(각각 내부에서 외부 고리로 나타난 억제성 수용체 발현 TIM3, LAG3 및 PD1). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ (웰치스(Welch's) 2 샘플 t-테스트(도 3c 및 3d); 로그-랭크 만텔-콕스(log-rank Mantel-Cox) 테스트(도 3e); 맨-윌트니(Mann-Whitney)(도 3f-3i)). 모든 데이터는 평균 \pm s.d이다. 또한, 도

7-10을 참고한다.

도 4a-4e는 *TRAC*-CAR T 세포가 감소된 구성적 시그널링 및 항원-유도된 분화를 나타냄을 보여준다. 도 4a는 T 세포에서 활성화, 기억 및 기능소실 마커의 FACS 분석을 보여준다(주입 후 제5일; 3 공여체를 나타냄; CD62L/D45RA 발현을 위한 파이(pie) 차트($n = 3$, 3 공여체). 도 4b는 CAR 발현 및 CD3 ζ ITAM 인산화를 보여준다(3 공여체를 나타냄). RV-19De1, 시그널링 도메인이 결핍된, 레트로바이러스로 발현된 CD19-특이적 CAR. 도 4c는 CAR+ 집단에서 포스포-CD3 ζ MFI를 보여준다($n = 3$, 3 공여체; * * $P < 0.05$ 맨-윌트니 테스트). 도 4d는 1, 2 또는 4회 자극된 CAR T 세포에서 CD62L/CD45RA 발현을 보여준다. 파이 차트는 CAR+ T 세포의 표현형을 보여준다($n =$ 상이한 공여체에서 3-5)(A, CD45RA+ CD62L+; B, CD45RA- CD62L+; C, CD45RA- CD62L-; D, CD45RA+ CD62L-). 도 4e는 도 4d에서처럼 수집된 CAR T 세포에서의 T-bet, EOMES 및 GATA3 발현의 열 지도를 보여주며; 1의 배수-증가 값은 *TRAC*-1928z, 1 자극을 나타낸다($n = 2$, 2 공여체). 모든 데이터는 평균 \pm s.d이다. 또한 도 12를 참고한다.

도 5a-5g는 내인성 *TRAC* 프로모터가 *생체내*에서 다른 유전자좌/프로모터 조합을 능가함을 보여준다. 도 5a는 *TRAC* 유전자좌내로의 CRISPR/Cas9-표적화된 프로모터-CAR 통합의 도식을 보여준다. 상부: *TRAC* 유전자좌; 하부: 상동성 암에 의해 인접된 프로모터-CAR-폴리아 카세트를 함유한 rAAV6. 도 5b는 *B2M* 유전자좌내로의 CRISPR/Cas9-표적화된 무-프로모터 CAR 통합의 도식을 보여준다. 상부: *B2M* 유전자좌; 하부: 상동성 암에 의해 인접된 무-프로모터 CAR 카세트를 함유한 rAAV6. 도 5c는 T 세포의 벡터화 후 4일에 대표적인 B2M/CAR 또는 TCR/CAR 유동 플롯을 보여준다. 도 5d는 제4일에 CAR 평균 형광 강도(MFI)를 보여준다($n=4-7$ 회 독립 실험; 4 공여체)(*TRAC*-LTR-1928z, B2M-1928z, *TRAC*-1928z 및 *TRAC*-EF1 α -1928z, 각각 좌측에서 우측으로). 도 5e는 CAR 발현을 보여준다. 좌측 패널: 제4일에 CAR 발현(대표적 히스토그램). 우측: 제5일에 CAR T 세포의 활성화, 기억 및 기능소실 마커의 FACS 분석(3 공여체를 나타냄). 도 5f는 CD19+ 표적 세포에서 0, 1, 2 또는 4회 자극된 CAR T 세포를 보여준다. 파이 차트는 CAR+ T 세포의 CD62L/CD45RA 표현형을 보여준다($n=$ 상이한 공여체에서 3-5회 독립 실험)(A, CD45RA+ CD62L+; B, CD45RA- CD62L+; C, CD45RA- CD62L-; D, CD45RA+ CD62L-). 도 5g는 1×10^5 CAR T 세포로 처리된 NALM-6-보유 마우스의 종양 크기(평균 래디언스)를 보여준다($n=6$; 선= 마우스 1마리). 종양 크기는 생물발광 영상화(BLI)를 이용하여 50-일 기간에 걸쳐 매주 정량하였다. 정량은 모든 주어진 시점에서 동물 당 등 및 배 획득의 평균 광자 카운트이다. 각 선은 한 마리의 마우스를 나타낸다. 도 5h는 마우스 생존의 카프란-메이에르 분석을 보여준다. (A): *TRAC*-EF1 α -1928z CAR T 세포, (B): B2M-1928z CAR T 세포, (C): *TRAC*-LTR-1928z CAR T 세포, (D): *TRAC*-1928z CAR T 세포, 표시된 대로 라벨링된 *TRAC*-1928z. * * $P < 0.01$, * * * $P < 0.001$, * * * * $P < 0.0001$ (도 5d를 위한 웰치스 2 샘플 t-테스트; 도 5g를 위한 로그-랭크 만텔-콕스 테스트; 도 5h를 위한 맨-윌트니 테스트). 모든 데이터는 평균 \pm SD이다. 또한, 도 14 및 15를 참고한다.

도 6a-6f는 *TRAC* 유전자좌가 세포-표면 CAR 발현의 적절한 조절을 수용함을 보여준다. 도 6a는 CD19+ 표적 세포와의 공동-배양 전과 후에 CAR 발현의 대표적 히스토그램을 보여준다. 도 6b는 *TRAC* 유전자좌내로의 CAR-GFP 융합 유전자의 CRISPR/Cas9-표적화된 통합을 보여준다. 도 6c: 상부, CD19+ 표적 세포와의 공동-배양 전과 후에 바이시스트론성(bicistronic) CAR-P2A-LNGFR CAR T 세포의 LNGFR/CAR 발현. 하부, *TRAC* 유전자좌내로 표적화된, 또는 RV 벡터를 이용하여 무작위로 통합된 CAR-GFP 융합의 GFP/CAR 발현(3 공여체에서의 3회 독립 실험을 나타냄). 도 6d는 CAR 발현을 보여준다. 좌측 패널: 벡터화후 5일에 CAR 발현의 대표적 히스토그램. 우측 패널: 1, 2 또는 4회 자극 후(화살표에 의해 나타냄; $n=$ 상이한 공여체에서의 3-7회 독립 실험) CAR T 세포의 상대적 CAR MFI(0h에서 MFI=1). 도 6e는 벡터화 후 5일에 상대적 CAR RNA 수준(1=*TRAC* RNA 수준)을 나타낸다. 도 6f는 CD19+ 표적 세포에서 한번 자극된 CAR T 세포에서의 CAR RNA 수준(1= 0h에서의 RNA 수준)의 시간 과정 분석을 보여준다($n= 3$ 공여체에서의 3회 독립 실험; 도 6d에서처럼 CAR T 세포, 상부에서 하부로). 모든 데이터는 평균 \pm SD이다. * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$, * * * $P < 0.001$ (본페로니(Bonferroni) 보정을 가진 아노바(ANOVA) F-테스트(도 6d), 및 맨-윌트니 테스트(도 6e)). 또한, 도 16을 참고한다. 하부 선은 *TRAC*-1928z CAR T 세포에서 CAR 표면 수준(도 6d) 또는 CAR RNA 수준(도 6f)을 나타낸다.

도 7a-7g는 *TRAC* 유전자좌내로의 CRISPR/Cas9-매개된 CAR 유전자 표적화를 보여준다. 도 7a, 상부, *TRAC* 제1 엑손의 5' 말단(회색), *TRAC* gRNA(TGT...GAC, 하부 색) 및 상응하는 PAM 서열(GGG, TGT...GAC의 바로 좌측)을 가진 *TRAC* 유전자좌(서열 번호 41). 두 화살표는 예측된 Cas9 이중체 브레이크를 나타낸다. 하부, *TRAC* 유전자좌내로의 CRISPR/Cas9-표적화된 통합. 표적화 구조체(AAV)는 P2A 코딩 서열, 1928z CAR 유전자 및 폴리아 서열이 이어지고, *TRAC* 유전자좌에 상동성인 서열(LHA 및 RHA, 좌측 및 우측 상동성 암)에 의해 인접된, 스플라이스 수용체(SA)를 함유한다. 일단 통합되면, 내인성 TCR α 프로모터가 CAR 발현을 추진하는 한편, *TRAC* 유전자좌는 파괴된다. TRAV, TCR α 가변 영역; TRAJ, TCR α 연결 영역; 2A, 자가-절단 돼지 테스코바이러스 2A 서열. pA: 소

성장 호르몬 폴리A 서열. 도 7b는 일차 T 세포로의 CAR 표적화의 시각표를 보여준다. 도 7c는 Cas9 mRNA 및 TRAC gRNA를 이용한 T 세포의 형질감염 및 표시된 감염다중도로 AAV6의 첨가 후 4일에 대표적인 TCR/CAR 유동 플롯을 보여준다. 도 7d는 TCR 발현의 FACS 분석에 의해 측정된 Cas9 mRNA 및 TRAC gRNA의 형질감염 후 4일에 TCR 파괴의 백분율을 보여준다(n = 5). 도 7e는 CAR 발현의 FACS 분석에 의해 측정된 AAV6 감염 다중도에 따른 핵-인의 백분율을 보여준다(n = 4). 도 7f는 TCR-음성 집단에서 CAR+ 세포의 백분율을 보여준다(n = 4). 도 7g는 FACS에 의해 분석된 CAR+ 집단에서의 TCR-양성(하부 막대) 및 TCR-음성(상부 막대)의 백분율을 보여준다(n = 4).

도 8a-8e는 TLA 기술을 이용한 AAV6 TRAC-1928z 통합의 전체-게놈 맵핑을 보여준다. 도 8a는 TLA 기술의 도식적 표현을 보여준다(de Vree et al., *Nat. Biotechnol.* 32:1019-1025 (2014)). 이 연구를 위하여, CAR을 표적화하는 두 세트의 프라이머와 좌측 상동성 암이 이용되었다. 도 8b는 TLA 분석을 위해 사용된 TRAC-1928z CAR T 세포의 TCR/CAR FACS 플롯을 보여준다. CAR T 세포는 도 7b에서처럼 처리되었으며 2주동안 증식되었다. 도 8c는 1928z CAR 특이적 프라이머(CD28-특이적 전방: 5' -ACAATGAGAAGAGCAATGGA-3' (서열 번호 39) 및 scFV-특이적 역방: 5' -GAGATTGTCCTGGTTTCTGT-3' (서열 번호 40))를 이용한 인간 게놈에 걸친 TLA 서열 커버리지를 보여준다. 염색체는 y 축에 표시되고, 염색체 위치는 x 축에 표시된다. TRAC-인코딩된 CAR T 세포는 도 3에서처럼 생산되었으며 분석을 위해 처리하기 전에 10일동안 증식시켰다. 프라이머 세트가 개별 TLA 증폭에서 이용되었다. PCR 산물을 정제하고 일루미나 넥스테라엑스티(Illumina NexteraXT)TM 프로토콜을 이용하여 라이브러리를 제조하고 일루미나 미세크(Miseq)TM 시퀀서에서 시퀀싱하였다. 스미스-워터맨(Smith-Waterman) 배열 틀인 BWA-SW를 이용하여 판독값(read)을 맵핑하였다. 이것은 부분 맵핑을 가능하게 하며, 이것은 선택적으로 브레이크-스패닝(break-spanning) 판독값을 확인하는데 적합하다. 인간 게놈 버전 hg19를 맵핑을 위해 이용하였다. 도 8d는 AAV-TRAC-1928z 서열(ITR에 의해 인접된 표적화 서열)상에 배열된 TLA 서열 커버리지를 보여준다. 상부의 회색 수직 막대는 나타난 위치에서의 커버리지를 나타낸다. 커버리지는 판독값의 일부에서 AAV ITR의 통합을 보여주었다. TRAC 상동성 암 유전자좌의 5' 및 3' 말단에서의 ITR 및 CAR 통합 사이의 커버리지 비교는 도 8e에 나타난 충실한 및 충실하지 못한 상동성 재조합의 측정을 가능하게 한다. 도 8e는 TLA 분석으로부터의 최종 결과를 보여준다.

도 9a-9c는 TRAC-CAR T 세포의 시험관내 세포독성 활성 및 증식 반응을 보여준다. 도 9a는 CAR 및 TCR 발현을 보여주는 대표적인 유세포분석법 분석을 보여준다. TRAC-1928z CAR T 세포를 도 3b에서처럼 생성하였으며; CRISPR/Cas9-생성된 TCR- T 세포를 RV-1928z 레트로바이러스 벡터로 형질도입시키고; TCR+ 세포를 RV-1928z 또는 RV-P28z(PSMA-특이적 CAR)로 형질도입시켰다. TCR-음성 T-세포 정제는 컬럼상에서 자기 비드를 이용하여 수행하였다. 도 9b는 표적 세포로서 반딧불이 루시페라제(FFL)-발현 NALM-6을 이용하는 18h 생물발광 분석을 이용한 세포독성 활성을 보여준다(n = 3 건강한 공여체에서의 3회 독립 실험). 도 9c는 CD19+ 표적 세포로 매주 자극시 CAR T 세포의 대표적인 측정 세포 카운트를 보여준다. 화살표는 자극 시점을 나타낸다(n = 3 건강한 공여체에서의 3회 독립 실험).

도 10a-10i는 TRAC-CAR T 세포가 생체내에서 통상적 CAR T 세포를 능가함을 보여준다. 도 10a는 2×10^5 (좌측), 1×10^5 (중간) 또는 5×10^4 (우측) CAR T 세포로 처리된 NALM-6-보유 마우스를 보여준다. 종양 크기는 BLI를 이용하여 100-일 기간에 걸쳐 매주 정량하였다. 정량은 모든 주어진 시점에서 동물 당 등 및 배 획득의 평균 광자 카운트이다. 각 선은 한 마리의 마우스를 나타낸다. 일부 그룹은 상이한 건강한 공여체로부터의 2 내지 3 독립 실험으로부터 모집되며, n = 6-20마리 마우스/그룹을 나타낸다. 하부, 마우스 생존의 카프란-메이어 분석. 도 10b-10f는 1×10^5 표시된 CAR T 세포로 처리된 NALM-6-보유 마우스를 보여준다. CAR T-세포 주입 후 10 및 17일에, 그룹 당 7마리 마우스를 안락사시키고 골수 세포를 수집하였다. CAR T 세포 및 NALM-6 세포를 유세포분석기로 분석하고 계수하였다. 도 10b는 제17일에 골수에서 종양 세포(CD19+GFP+)의 대표적인 FACS 분석을 보여준다. 도 10c는 제17일에 골수 CAR T 세포에서 기능소실 마커 PD1 및 TIM3의 대표적인 FACS 분석을 보여준다. 도 10d는 제17일에 골수 CAR T 세포에서 기능소실 마커 PD1 및 LAG3의 대표적인 FACS 분석을 보여준다. 도 10e는 골수에서 CAR+ 세포의 CAR MFI를 보여준다(각 점은 마우스 한 마리를 나타냄). 도 10f는 CAR+ 집단의 CAR 발현에서의 분산을 측정하는 변동 계수를 보여준다(평균에 대한 표준 편차의 비율; 각 점은 마우스 한 마리를 나타냄). 도 10g는 RV-1928z CAR 설계가 자가-절단 P2A 서열을 이용함으로써 동일한 LTR 프로모터로부터 CAR과 LNGFR의 공동-발현을 가능하게 함을 보여준다. LTR, 긴 말단 반복물, SD, 스플라이스 공여체 부위; SA, 스플라이스 수용체 부위; 2A, 돼지 테스초바이러스 자가-절단 2A 서열. 도 10h는 시험관내 또는 생체내에서 배양되고 (골수에서 추출됨) CAR 및 LNGFR 발현을 검출하기 위하여 라벨링된, RV-1928z 형질도입된 T 세포의 대표적인 유

세포분석 플롯을 보여준다. 도 10i는 RV-1928z T 세포에서 CAR MFI와 골수에서의 종양 크기(NALM-6 카운트) 사이의 비교를 보여준다.

도 11a-11j는 TRAC-19BBz CAR T 세포가 생체내에서 기능소실을 방지함으로써 통상적인 19BBz CAR T 세포를 능가함을 보여준다. 도 11a 및 11b는 세 가지 독립적인 형질감염 또는 형질도입으로부터 수득된 CAR+ T 세포의 평균 CAR MFI(도 11a) 및 변동계수(도 11b)로부터 수집된 결과를 보여준다. 이들 세 가지 실험을 위해 이용된 T 세포는 상이한 건강한 3 공여체로부터 단리되었다. 도 11c: 좌측, 유전자 전달 후 5일에 유세포분석에 의해 분석된 CAR T 세포의 활성화, 기억 및 기능소실 마커. 우측, 플롯은 CAR 벡터화 후 5일에 CD62L 및 CD45RA 발현의 유세포분석법 분석에 의해 측정된 CAR+ T 세포의 표현형을 나타낸다; A: CD45RA+ CD62L+; B: CD45RA- CD62L+; C: CD45RA- CD62L-; D: CD45RA+ CD62L-. 도 11d는 CAR T 세포가 48h 기간에 걸쳐 CD19+ 표적 세포에서 1, 2 또는 4회 활성화된 후 상대적 CAR MFI(0 h에서의 MFI=1)를 보여준다(n = 3회 독립 실험, 화살표는 자극 시점을 나타낸다)(TRAC-19bbz 하부 선, RV-19bbz 상부 선). 도 11e는 유세포분석에 의해 분석된, 48 h 기간내에 1, 2 또는 4회 CD19+ 표적 세포에서 자극된 CAR T 세포를 보여준다. 플롯은 CD62L 및 CD45RA 발현의 유세포분석에 의해 측정된 CAR+ T 세포의 표현형을 나타낸다(3회 독립 실험으로부터의 평균 비율). 도 11f는 1×10^5 CAR T 세포로 처리된 FFL-NALM-6-보유 마우스를 보여준다. 종양 크기는 21-일 기간에 걸쳐 매주 동물당 정량된 생물발광 시그널로서 나타낸다. n = 6마리 마우스/그룹이다. 도 11g-11j는 1×10^5 CAR T 세포로 처리된 NALM-6-보유 마우스를 보여준다. CAR T-세포 주입 후 10일 및 17일에, 7마리 마우스/그룹을 안락사시키고 골수 세포를 수집하였다. CAR T 세포 및 NALM-6 세포를 유세포분석으로 분석하고 계수하였다. 각 점은 마우스 한 마리를 나타낸다. 도 11g는 골수에서 CAR T 세포 카운트를 보여준다(n = 7). 도 11h는 골수에서 종양 (CD19+GFP+ NALM-6) 세포 카운트를 보여준다(n = 7). 도 11i는 골수에서 이펙터/종양 비율을 보여준다(n = 7). 도 11j는 제17일에 수집되고 유세포분석에 의해 분석된 골수 T 세포로부터의 기능소실 마커 분석을 보여준다(각각 내부에서 외부 고리로 나타난 억제성 수용체 발현 TIM3, LAG3 및 PD1). 표시된 마커를 발현하는 세포의 평균 백분율로서 나타내짐(n = 7). * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001(맨-위트니 테스트(도 11a 및 11b) 아노바 F-테스트(도 11d)).

도 12a-12d는 TRAC-CAR T 세포가 시험관내에서 감소된 토닉 시그널링(tonic signalling) 및 항원-유도된 분화를 나타냄을 보여준다. 도 12a는 CAR 유전자 전달 후 5일에 T 세포 분화 마커의 대표적인 FACS 분석을 보여준다. 도 12b는 CD19+ 표적 세포에서 1, 2 또는 4회 자극 후 CAR T 세포 분화 마커의 대표적인 FACS 분석을 보여준다. 도 12c는 48 h 기간에 걸쳐 CD19+ 표적 세포에서 1, 2 또는 4회 자극될 때 CAR T 세포 증식을 보여준다. 세 가지 1928z CAR T 세포 조건 사이에 증식에서 어떤 눈에 띄는 차이도 발견되지 않았다. 도 12d는 도 4d에서의 프로토콜의 마지막에 세포내 염색 후 IFN γ , TNF α 또는 IL-2의 양성 발현을 가진 CAR T 세포의 백분율을 보여준다(n = 2 공여체에서 2회 독립 실험)(각각 좌측에서 우측으로 막대의 그룹은 TRAC-1928z, RV1928z 및 RV-P28z).

도 13a-13f는 TRAC-CAR T 세포가 낮게 또는 높게 형질도입된 RV-CAR T 세포에 비하여 지연된 시험관내 항원-유도된 분화를 나타냄을 보여준다. 도 13a는 μ l 단위의 상이한 부피의 레트로바이러스 상등액의 형질도입 후 5일에 CAR 발현의 대표적 히스토그램을 보여준다(3회 독립 실험을 나타냄; 전체 형질도입 부피 2 ml). 도 13b는 형질도입 후 5일에 FACS에 의해 분석된 레트로바이러스 상등액의 부피의 함수로서 CAR+ T 세포의 백분율을 보여준다(n = 3 공여체). 도 13c는 형질도입 후 5일에 FACS에 의해 분석된 레트로바이러스 상등액의 부피의 함수로서 T 세포의 CAR 평균 형광 강도(MFI)를 보여준다(n = 3 공여체). 도 13d는 형질도입 후 5일에 FACS에 의해 분석된 레트로바이러스 상등액의 부피의 함수로서 CAR 변동계수를 보여준다(n = 3 공여체). 도 13e는 형질도입 후 5일에 CAR T 세포의 평균 CAR MFI를 보여준다(n = 3 공여체). 고 = 1,000 μ l, 및 저 = 30 μ l. 도 13f는 유세포분석에 의해 분석된, 48 h 기간내에 1, 2 또는 4회 CD19+ 표적 세포에서 자극된 CAR T 세포를 보여준다. 플롯은 CD62L 및 CD45RA 발현의 유세포분석에 의해 측정된 CAR-양성 T 세포의 표현형을 나타낸다(3회 독립 실험의 평균 비율)(A, CD45RA+ CD62L+; B, CD45RA- CD62L+; C, CD45RA- CD62L-; D, CD45RA+ CD62L-).

도 14a-14f. 구별되는 유전자좌에서의 상이한 프로모터를 이용한 CAR 유전자 발현이 시험관내에서 토닉 시그널링 수준에 영향을 준다. 도 14a는 TRAC 유전자좌내로의 CRISPR/Cas9-표적화된 통합의 다이어그램을 보여준다. 표적화 구조체(AAV)는 P2A 코딩 서열, 1928z CAR 유전자 및 폴리A 서열이 이어지고, TRAC 유전자좌에 상동성인 서열(LHA 및 RHA: 좌측 및 우측 상동성 암)에 의해 인접된, 스플라이스 수용체(SA)를 함유한다. 일단 통합되면, 내인성 TCR α 프로모터가 CAR 발현을 추진하는 한편, TRAC 유전자좌는 파괴된다. TRAV: TCR알파 가변 영역. TRAJ: TCR알파 연결 영역; 2A: 자가-절단 돼지 테스토스테론 2A 서열. 도 14b는 TRAC 유전자좌내로의 CRISPR/Cas9-표적화된 프로모터 통합의 다이어그램을 보여준다. 표적화 구조체(AAV)는 TRAC 유전자좌에 상동성

인 서열(LHA 및 RHA: 좌측 및 우측 상동성 암)에 의해 인접된, 인간 신장 인자 1 알파 프로모터(EF1 α)의 긴 버전, 도 3 및 4에서 사용된 감마 레트로바이러스로부터의 인헨서 서열(Mo-MLV LTR, 여기서 LTR로 불림) 또는 포스포글리세레이트 키나제(PGK) 프로모터인 외인성 프로모터의 제어하의 역 배향의 1928z CAR 코딩 서열 및 폴리 A 서열을 함유한다. TRAV: TCR 알파 가변 영역. TRAJ: TCR 알파 연결 영역. 도 14c는 B₂M 유전자좌내로의 맞춤형 CRISPR/Cas9-유도된 표적화된 통합의 도식을 보여준다. 표적화 구조체(AAV)는 상동성 서열(LHA 및 RHA)에 의해 인접된 CAR 유전자를 함유한다. 일단 통합되면, 내인성 B₂M 프로모터는 CAR 발현을 추진한다. 도 14d는 B₂M 유전자좌내로의 CRISPR/Cas9-표적화된 프로모터 통합의 도식을 보여준다. 표적화 구조체(AAV)는 B₂M 유전자좌에 상동성인 서열(LHA 및 RHA: 좌측 및 우측 상동성 암)에 의해 인접된, 인간 신장 인자 1 알파 프로모터(EF1 α), 포스포글리세레이트 키나제(PGK) 프로모터 또는 PGK의 절단된 버전(PGK100)인 외인성 프로모터의 제어하의, 역 배향의 1928z CAR 유전자 및 폴리A 서열을 함유한다. 도 14e는 형질도입 후 4일에 FACS에 의해 분석된 평균 CAR 평균 형광 강도(MFI)를 보여준다(n = 3 내지 7회 독립 실험 및 상이한 4 공여체). pA: 모든 표적화 구조체를 위한 소 성장 호르몬 폴리A 서열. 도 14f는 벡터화 후 5일에 CAR T 세포의 분석을 보여준다. 좌측 패널: T 세포내로의 그의 벡터화 후 5일에 CAR 발현의 대표적 히스토그램. 중간 패널: CAR의 벡터화 후 5일에 유세포분석에 의해 분석된 CAR T 세포의 활성화, 기억 및 기능소실 마커. 우측 패널: 플롯은 CAR의 벡터화 후 5일에 CD62L 및 CD45RA 발현의 유세포분석에 의해 측정된 CAR 양성 T 세포의 표현형을 나타낸다(A, CD45RA+ CD62L+; B, CD45RA- CD62L+; C, CD45RA- CD62L-; D, CD45RA+ CD62L-).

도 15a-15g는 구별되는 유전자좌에서 상이한 프로모터를 이용한 CAR 유전자 발현이 생체내에서 항원-유도된 분화 및 기능소실에 영향을 미침을 보여준다. 도 15a는 CD19+ 표적 세포에서 1, 2 또는 4회 자극 후 CAR T-세포 분화 마커의 대표적 FACS 분석을 보여준다. 도 15b는 48 h 기간에 걸쳐 CD19+ 표적 세포에서 1, 2 또는 4회 자극될 때 CAR T-세포 증식을 보여준다(점의 그룹은 좌측에서 우측으로 각각 TRAC-LTR-1928z, B2M-1928z, TRAC-1928z 및 TRAC-EF1a-1928z). 네 가지 1928z CAR T 세포 조건 사이에 증식에서 어떤 명백한 차이도 발견되지 않았다. 도 15c-15e는 1 x 10⁵ CAR T 세포로 처리된 NALM-6-보유 마우스를 보여준다. CAR T 세포 주입 후 10 일 및 17일에, 7마리 마우스/그룹을 안락사시키고 골수 세포를 수집하였다. CAR T 세포 및 NALM-6 세포를 유세포분석으로 분석하고 계수하였다. 각 점은 마우스 한 마리를 나타낸다. 도 15f는 제17일에 골수 CAR T 세포에서 이펙터 기억('Eff mem', CD62L-CD45RA-) 및 이펙터('Eff', CD62L-CD45RA+)의 백분율을 보여준다(n = 7마리 마우스). 도 15g는 제17일에 수집되고 유세포분석에 의해 분석된 골수 T 세포로부터의 기능소실 마커 분석을 보여준다. 표시된 마커를 발현하는 세포의 평균 백분율로서 나타내진다(n = 7마리 마우스)(각각 내부에서 외부 고리로 나타난 억제성 수용체 발현 TIM3, LAG3 및 PD1).

도 16a-16b는 유전자좌-프로모터 구성이 CAR T 세포 활성화시에 CAR 단백질 발현과 전사 반응을 제어함을 보여준다. 도 16a: 좌측 패널: T 세포내로의 그의 벡터화 후 5일에 CAR 발현의 대표적 히스토그램. 우측 패널: 48h 기간에 걸쳐 CD19+ 표적 세포에서 1, 2 또는 4회 CAR T 세포가 활성화된 후 상대적인 CAR MFI(0h에서의 MFI = 1). 도 16b는 자극 전 CAR MFI와 CAR RNA 상대적 수준 사이의 비교를 보여준다(n=3 공여체에서 3회 독립 실험). 하부 선은 TRAC-1928z CAR T 세포에서 CAR 표면 수준을 나타낸다.

도 17은 CD8+ T 세포의 활성화 및 기억 형성과 연관된 유전자-발현 프로파일을 보여준다. 미자극 OT-I 세포에서 그들의 발현에 비교하여 감염-노출된 OT-I 세포에서 상향조절(Up) 또는 하향조절(Down)되는 유전자를 감염동안 다양한 시점에서 정량하였다. K-평균 군집화 분석에 의해 가장 동적인 발현을 가진 10개 군집이 나타나며, 1.4-배 이상의 발현에서의 변화를 갖는다. 각 선은 단일 프로브를 나타내며; 하부 우측 코너의 수는 프로브의 수를 나타내며; 플롯 위는 각 클러스터에서 관심 유전자이다(Best et al., *Nature Immunol.* 14:404-413 (2013)으로 부터 취함).

도 18은 인테그라제 야생형(서열 번호 1) 및 돌연변이 D124A(서열 번호 2), D124E(서열 번호 3), D124N(서열 번호 4), D124V(서열 번호 5), D183A(서열 번호6), D183N(서열 번호 7), D124A 및 D183A(서열 번호 8), D124A 및 D183N(서열 번호 9), D124E 및 D183A(서열 번호 10), D124E 및 D183N(서열 번호 11), D124N 및 D183A(서열 번호 12), D124N 및 D183N(서열 번호 13), D124V 및 D183A(서열 번호 14), 및 D124V 및 D183N(서열 번호 15)의 몰로니 쥐 백혈병 바이러스(MLV) 아미노산 서열을 보여준다.

도면의 설명에서 색을 참조하는 경우, 도면은 그레이스케일(grayscale)로 변환되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0173] 7. 발명의 상세한 설명

[0174] 본 발명은, 소망하는 조건 하에서 치료 전이유전자를 발현하도록 T 세포를 유전적으로 조작함에 기반한, 면역치료 및 구체적으로 표적화 세포 치료에 관한 것이다. 본원에는, 전이유전자가 내인성 프로모터의 제어 하에 배치되도록 T 세포의 게놈내로의 치료 전이유전자의 통합을 표적화함으로써 면역치료용 T 세포를 생성하기 위한 방법을 개시한다. 본원에서 기술한 바와 같이 전이유전자(단수형)를 지칭하는 것은, 다르게 언급되지 않은 한, 하나 이상의 전이유전자들(복수형)도 적용됨이 이해될 것이다. 본 발명은 하나 이상의 내인성 프로모터들의 제어 하에 하나 또는 몇몇의 치료 전이유전자를 배치하여 치료 T 세포에서의 제어된 시공간적 발현을 제공하도록, 게놈 편집을 사용하는 T 세포 치료용 전략을 제공한다. 본 발명은, 치료 전이유전자 또는 여러 가지의 치료 전이유전자를 발현하도록 조작된 T 세포를 제공하되, 상기 전이유전자의 발현은 이렇게 발현을 제공하는 내인성 프로모터들을 사용함으로써 T 세포의 위치(예를 들어, 단지 종양과 근접할 때에만 전이유전자의 발현) 또는 한정된 시점(예를 들어, 종양 세포의 관여 이전 또는 이후)에 좌우될 수 있다. 따라서, 본 발명의 세포 및 방법은 치료 T 세포의 효능 및 안정성을 높이도록 사용될 수 있다.

[0175] 본 발명은 T 세포에서 소망하는 전이유전자 발현 프로파일을 달성하도록 내인성 프로모터의 제어 하에 치료 전이유전자를 배치함에 관한 것이다. 내인성 프로모터는 전이유전자의 발현 특성, 예를 들어 전이유전자 발현의 타이밍 및/또는 전이유전자 발현의 수준을 조절하도록 선택된다. 전이유전자를 내인성 프로모터의 제어 하에 배치함으로써 전이유전자의 발현을 조절하면, 내부 프로모터 및 전이유전자를 인코딩하는 바이러스 벡터, 면역 성분들, 및 전이유전자의 발현을 유도하는 저분자 약물의 투여에 대한 요구가 제거된다. 내인성 프로모터를 사용함으로써, T 세포는 전이유전자의 발현을 자체적으로 조절하도록 조작되어서, 전이유전자 발현(예를 들어, 전이유전자 발현이 언제 및 어디서 활성화되는지)은, 바람직하게는, 환경적 계기(예를 들어 표적 항원, 사이토카인 및/또는 공자극 리간드와의 근접성)에 대한 T 세포의 공동작용 내인성 반응에 좌우되는 제한된 프로그램에서 발생한다. 따라서, 구체적 실시양태에서, 미세환경 신호에 반응하는 내인성 프로모터가 사용되어서, 내인성 프로모터에 의해 지배되는 시공간적으로 예측가능한 전이유전자 발현을 유발하도록, T 세포가 조작된다.

[0176] 구체적 실시양태에서, 치료 전이유전자는 치료 단백질을 인코딩한다. 다른 구체적 실시양태에서, 치료 전이유전자는 치료 RNA를 인코딩한다.

[0177] 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 면역치료, 및 구체적으로는 T 세포 특이성 및 기능을 재프로그램하는 CAR을 인코딩하는 서열과 T 세포 수용체(TCR) 복합체의 성분의 유전적 재배치에 기반한 표적화 세포 치료에 관한 것이다. 본원의 실시예에 의해 개시된 바와 같이, 유전자 편집을 사용하여 안정하고 균일한 CAR 발현을 갖는 조직적합성 T 세포 제품을 생성하였다. 추가로, 유전자 편집 접근법은, TCR 복합체에 의해, 매개되어 온 이식편 대 숙주의 반응성을 감소시킴으로써, CAR-T 세포의 기능을 증진하는, TCR 복합체의 성분을 인코딩하는 표적화 유전자의 파괴를 유발한다. 이것은 또한 일반적으로 임상실험에 포함되지 않은 자가면역 질환 환자를 위해서 사용될 수 있다. 이들의 TCR의 불활성화가 이러한 환자들을 위한 안전성을 개선하도록 사용될 수 있다.

[0178] 구체적 실시양태에서, 본원은 T 세포 수용체(TCR) 복합체의 기능적 발현을 위해 요구되는 폴리펩티드를 인코딩하는 유전자로의 CAR 유전자 카세트, 바람직하게는 무-프로모터의 통합을 표적화함으로써 범용 CAR T 세포의 1-단계 생성을 위한 방법을 개시한다. 용어 "범용"은 T 세포가 자가조직 용도 뿐만 아니라 비-자가조직으로도 사용될 수 있음을 의미한다. 일 실시양태에서, 이러한 접근법은 세포 내 CAR의 발현을 구동하도록 TCR 복합체의 성분의 발현 조절을 이점으로 할 수 있다. 추가로, CAR 카세트의 통합은, 예를 들어 세포 표면에서 TCR 복합체의 적합한 조립을 방지함으로써, 기능성 TCR 복합체를 위해 요구되는 폴리펩티드의 발현을 파괴하거나 감소시켜 TCR 음성 세포를 유도한다. 상기 방법은 일반적으로 사용된 게놈 편집 플랫폼, 예를 들어 징크-핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화자-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN), 및 군집화된 규칙적-산재 짧은 회문구조 반복물(CRISPR) 연관 단백질 9(Cas9), Cpf1, 메가뉴클레아제 또는 Mega-Tal과 함께 적합하며, 세포의 게놈 내 표적 부위에서 상동성 재조합을 유발한다. 본원에 개시된 바와 같이, 최대 50%의 범용 CAR T 세포를 수득하는 조건이 확립되어서, 단일-단계로 표적 유전자 파괴 및 CAR 표적화된 삽입을 조합한다. 본원에 개시된 결과는 내인성 TCR 프로모터를 사용하는 본 방법이 일관성 있고 예측가능한 발현 뿐만 아니라 단일 통합의 장점을 제공하였음을 보여준다. 추가로, 상기 방법은 개선된 T 세포 기능 및 지속성의 예상치 못한 장점을 제공하였다. 가장 중요하게는, TCR 유전자좌로부터 CAR을 발현하는 T 세포는, 레트로바이러스로-형질도입된 CAR T 세포에 비해 보다 높은 시험관내 및 생체내 종양 용해(lysis) 활성, 증가된 증식 및 지속성을 나타내는 반면, 이들 이식편 대 숙주병의 잠재력을 제거한다. 게다가, 이러한 새로운 방법론은 자가면역 질환을 앓는 환자를 위해 자가조직 CAR T 세포를 생성할 가능성을 열었다. 표적화 CAR 유전자 통합의 균일성 및 안정성과 함께 범용 T 세포 제조의 확장성을 조합하는 본원에 개시된 방법은, CAR 치료를 위해 및 기성품(off-the-shelf) CAR 치료법의 개발을 위해서

유용하다.

[0179] 7.1 T 세포

[0180] 일 실시양태에서, 본 발명은 치료 전이유전자가 세포의 게놈 내부의 부위에 통합되어서, 전이유전자의 발현이 T 세포의 내인성 프로모터의 제어 하에 있는 T 세포를 제공한다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명은, 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 재조합 핵산 서열이 세포의 게놈 내부의 부위에 통합되어서, 상기 CAR이 상기 세포의 표면에서 상기 세포에 의해 발현되고, 이 부위에서 CAR을 인코딩하는 핵산의 통합이 상기 세포의 표면에서 기능성 T 세포 수용체(TCR) 복합체의 발현을 감소 또는 방지하는 T 세포를 제공한다. 바람직한 실시양태에서, 재조합 세포는 소망하는 표적에 대하여 면역 반응을 증진 또는 제공하기 위해서 사용될 수 있다. 다른 실시양태에서, 재조합 세포는 소망하지 않는 면역 반응을 억제하기 위해서 사용될 수 있다. 바람직하게, 세포는 인간으로부터 유래된다(재조합되기 이전에 인간 기원이다)(인간-유래 세포는 본 발명의 치료 방법에서 인간에게 투여되기에 특히 바람직하다).

[0181] 구체적 실시양태에서, 본 발명은, 조작된 T 세포의 기능을 증진하고 전이유전자 발현을 최적화하기 위해서 내인성 프로모터를 이용하도록, T 세포 내, 바람직하게는 인간 T 세포 내에서 염색체 전사 단위내로의 무-프로모터 발현 카세트의 표적화 통합에 관한 것이며, 상기 전이 유전자는 CAR 또는 다른 치료 전이유전자이다. 바람직한 실시양태에서, 이러한 방식으로 T 세포를 조작함으로써, 안정하고 균일한 CAR 발현이 수득되고, T 세포 기능 및 지속성은 CAR 치료를 위한 이전의 방법에 비해 증진된다. 카세트 디자인에 따라, 상기 방법은 내인성 유전자의 발현을 파괴하거나 하지 않도록 사용될 수 있다. 내인성 유전자 발현이 파괴되는 경우에, 내인성 유전자는 비-필수 유전자, 즉 세포의 증식 또는 세포의 생존에 필수적이지 않은 유전자이다. 특별한 실시양태에서, 치료 전이유전자는 CAR이다. 바람직한 실시양태에서, CAR-인코딩 핵산 서열의 통합은 기능성 T 세포 수용체 복합체를 위해 요구되는 단백질을 인코딩하는 내인성 유전자의 발현을 파괴한다. 이러한 접근법은 안정성, 공간적 및/또는 시간적 조절된 발현을 갖는 임의의 유전자에 적용될 수 있다. 구체적 실시양태에서, 단지 하나의 대립형질로부터 발현되는 유전자, 예를 들어 TCR 알파, TCR 베타, γ 또는 δ 염색체-특이적 유전자의 표적화는 세포 당 단지 하나의 전이유전자 복제가 발현됨을 보장하기 위해서 사용될 수 있다. 각각의 T 세포는 하나의 재조합 TCR 알파 및 하나의 재조합 TCR 베타 쌍들의 회합으로부터 유발되는 독특한 T 세포 수용체를 발현한다. TCR 다양성을 생성하는 과정은 흉선 내 림프구 생성 동안 발생하며, TCR 알파 및 베타 유전자 둘 모두는 재조합되고(각각 VJ와 VDJ 재조합), 각각의 유전자의 단지 하나의 대립형질만 대립형질 배제(allele exclusion)로 지칭되는 과정을 통해 발현된다(Honey, *Nat. Rev. Immunol.* 5, 95 doi:10.1038/nri1560 (2005)). 재조합된 TCR 알파 또는 베타 쌍들을 표적화하는 경우에, 이러한 과정은 통합된 CAR의 단지 하나의 복제가 발현될 것임을 제공한다. 다른 대립형질은 표적화될 수 있지만 CAR 발현을 유발하지는 않을 것이다.

[0182] 본 발명의 T 세포는 림프구 혈통의 면역 세포이다. T 세포는 T 세포 수용체 (TCR)를 발현하고, 대부분의 세포들은 α 및 β 쌍 및 보다 작은 세포군은 γ 및 δ 쌍을 발현한다. 본 발명의 면역 세포로서 유용한 T 세포는 $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ 일 수 있지만, 비-제한적으로서 T 헬퍼 세포($CD4^+$), 세포독성 T 세포(또한 세포독성 T 림프구, CTL; $CD8^+$ T 세포로도 지칭됨), 및 기억 T 세포, 예를 들어 중앙 기억 T 세포(TCM), 줄기 기억 T 세포(TSCM), 줄기-세포-유사 기억 T 세포(또는 줄기-유사 기억 T 세포), 및 이펙터 기억 T 세포, 예를 들어, T_{EM} 세포 및 $T_{EMRA}(CD45RA^+)$ 세포, 이펙터 T 세포, Th1 세포, Th2 세포, Th9 세포, Th17 세포, Th22 세포, Tfh(여포성 헬퍼) 세포, T 조절 세포, 천연 킬러 T 세포, 점막 연관 불변 T 세포(MAIT), 및 $\gamma\delta$ T 세포일 수 있다. 주요(major) T 세포 서브타입은 T_N (미자극), T_{SCM} (줄기 세포 기억), T_{CM} (중앙 기억), T_{TM} (전이 기억), T_{EM} (이펙터 기억), 및 T_{TE} (최종 이펙터)를 포함할 수 있다. 일 실시양태에서, 본 발명의 T 세포는 면역자극 세포, 즉 면역 반응을 매개하는 세포이다. 면역자극성인 예시적인 T 세포는, 비제한적으로, T 헬퍼 세포($CD4^+$), 세포독성 T 세포(세포독성 T 림프구, CTL; $CD8^+$ T 세포로도 지칭됨), 및 기억 T 세포, 예컨대 중앙 기억 T 세포(TCM), 줄기 기억 T 세포(TSCM), 줄기-세포-유사 기억 T 세포(또는 줄기-유사 기억 T 세포), 및 이펙터 기억 T 세포, 예를 들어, T_{EM} 세포 및 $T_{EMRA}(CD45RA^+)$ 세포, 이펙터 T 세포, Th1 세포, Th2 세포, Th9 세포, Th17 세포, Th22 세포, Tfh(여포성 헬퍼) 세포, 천연 킬러 T 세포, 점막 연관 불변 T 세포(MAIT), 및 $\gamma\delta$ T 세포를 포함한다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 T 세포는 면역억제성 세포, 즉 면역반응을 억제하는 세포이다. 면역억제성인 예시적인 T 세포는 조절 T 세포(T 조절 세포, Treg) 및 여포성 조절 T 세포(Tfh)를 포함한다. T 세포는 선택적으로 배아 줄기 세포 또는

유도된 다능성 줄기 세포(iPSC)로부터 생성될 수 있다(예를 들어, Themeli et al., *Nat. Biotechnol.* 31(10):928-933 (2013) 참고). 선택적으로, 재조합적으로 전이유전자, 바람직하게는 CAR을 발현하는, 사용될 수 있는 T 세포의 전구체 세포는, 예를 들어 조혈 줄기 세포 및/또는 프로제니터(progenitor) 세포이다. 조혈 줄기 세포 및/또는 프로제니터 세포는, 당업계의 공지된 방법에 의해 골수, 제대혈, 사이토카인 이동 후 성인 말초 혈액 등으로부터 유래될 수 있고, 그다음 전이유전자, 바람직하게는 CAR을 재조합적으로 발현하도록 유전적으로 조작된다. 특히 유용한 전구체 세포는 림프구 혈통으로 분화될 수 있는, 예를 들어 T 세포로 분화될 수 있는 림프구 혈통의 프로제니터 세포 또는 조혈 줄기 세포이다. 다른 실시양태에서, iPSC는 전이유전자의 발현을 위한 세포로서 사용될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, iPSC는 CAR의 발현을 위한 세포로서 사용될 수 있으며, CAR을 인코딩하는 재조합 핵산은 세포의 게놈 내 부위로 통합되어서 CAR이 세포의 표면에서 세포에 의해 발현되고, 이 부위에서 CAR을 인코딩하는 핵산의 통합은 세포의 표면에서 기능성 T 세포 수용체 복합체의 발현을 줄이거나 억제한다. 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 바와 같이, T 세포, 바람직하게는 CAR T 세포를 사용하여 iPSC를 생산할 수 있다. T-세포와 연관된 본원에서 개시된 실시양태는 문맥에서 허용하는 바와 같이 iPSC 또는 줄기 세포에 적용가능한 것으로 보임이 이해되어야 한다. iPSC는 본 발명의 T 세포를 생산하기 위해서 사용될 수 있고 iPSC는 또한 이로부터 유도될 수 있다.

[0183] 전이유전자를 발현하기 위해서 선택된 T 세포의 유형은, 면역 반응을 자극하거나 면역 반응을 억제하는 것을 목적으로 하는지 여부에 대해 고려할 것이다. 예를 들어, 조절 T 세포(CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺)는 자가면역 질환을 앓는 누군가와 같은 억제된 면역 반응을 필요로 하는 대상을 치료하기 위해서 사용되어 예를 들어 T 세포가 면역-억제 사이토카인을 인코딩하는 전이유전자를 발현할 것인 반면, CD4⁺(Treg 제외)/CD8⁺ T 세포는 자극된 면역 반응을 필요로 하는 대상, 예를 들어 암을 앓는 대상을 치료하기 위해 사용되어 예를 들어 T 세포가 면역자극성 사이토카인을 발현할 것이다.

[0184] T 세포는 당업계에 잘 알려진 방법, 예컨대 상업적으로 유용한 단리 방법에 의해 단리될 수 있다(예를 들어, Rowland-Jones et al., *Lymphocytes: A Practical Approach*, Oxford University Press, New York (1999) 참고). T 세포를 위한 공급원은, 비제한적으로, 말초 혈액, 제대혈, 골수 또는 조혈 세포의 다른 공급원을 포함한다. 다양한 기술이 T 세포와 같은 소망하는 면역 세포를 단리하거나 강화하도록 세포를 분리하기 위해서 사용될 수 있다. 예를 들어, 음성 선택 방법은 소망하는 면역 세포가 아닌 세포들을 제거하기 위해서 사용될 수 있다. 추가로, 양성 선택 방법은 소망하는 T 세포를 단리하거나 강화하기 위해서 사용될 수 있거나, 양성 및 음성 선택 방법의 조합이 사용될 수 있다. 단일클론성 항체(MAbs)는 양성 및 음성 둘 다의 선택을 위한 분화의 상태 및/또는 특정한 세포 혈통과 연관된 마커를 확인하는데 특히 유용하다. T 세포의 특정 유형이 단리되는 경우에, 다양한 세포 표면 마커 또는 마커들의 조합이, 예컨대 비제한적으로, CD3, CD4, CD8, CD34(조혈 줄기 세포 및 프로제니터 세포) 등이 세포들을 분리하기 위해서 사용될 수 있으며, 이는 당업계에 잘 알려진 바와 같다(Kearse, *T cell Protocols: Development and Activation*, Humana Press, Totowa NJ (2000); De Libero, *T cell Protocols*, Vol. 514 of *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa NJ(2009)).

[0185] 조절 T 세포를 단리하고 확장하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, Su et al., *Methods Mol. Biol.* 806:287-299 (2012); Bluestone et al., *Sci. Transl. Med.* 7(315) (doi: 10.1126/scitranslmed.aad4134)(2015); Miyara et al., *Nat. Rev. Rheumatol.* 10:543-551 (2014); Liu et al., *J. Exp. Med.* 203:1701-1711 (2006); Seddiki et al., *J. Exp. Med.* 203:1693-1700 (2006); Ukena et al., *Exp. Hematol.* 39:1152-1160 (2011); Chen et al., *J. Immunol.* 183:4094-4102 (2009); Putnam et al., *Diabetes* 58:652-662 (2009); Putnam et al., *Am. J. Transplant.* 13:3010-3020 (2013); Lee et al., *Cancer Res.* 71:2871-2881 (2011); MacDonald et al., *J Clin. Invest.* 126:1413-1424 (2016) 참고). 조절 T 세포(iTreg)의 시험관내 생성도 기술되어 있다(예를 들어, Lan et al., *J. Mol. Cell. Biol.* 4:22-28 (2012); Yamagiwa et al., *J. Immunol.* 166:7282-7289 (2001); Zheng et al., *J. Immunol.* 169:4183-4189 (2002) 참고). 일반적으로, 본 발명의 조절 T 세포는 CD4⁺, 예를 들어, CD4⁺CD25⁺, 보다 구체적으로 CD4⁺CD127^{low/-}CD25⁺이다. 이러한 조절 T 세포는, 전사 인자들의 포크헤드/날개달린-나선 부류 내에 있는 Foxp3(포크헤드 박스 P3)을 발현한다(Bluestone et al., *J. Clin. Invest.* 125:2250-2260 (2015); Riley et al., *Immunity* 30:656-665 (2009)). 본 발명의 면역억제성 세포인 조절 T 세포는 또한 CD8⁺ 조절 T 세포일 수 있다(Guillonnet et al., *Curr. Opin. Organ Transplant.* 15:751-756 (2010)). 조절 T 세포를 단리하고 확장하기 위한 방법은 또한 상업적으로 입수가능하다(예를 들어, 비디 바이오사이언시즈(BD biosciences), 캘리포니아주 샌호세; 스템셀 테크놀로지스 인크(STEMCELL Technologies Inc.), 밴쿠버, 캐나다; 이바이오사이언시즈(eBiosciences)(캘리포니아주 샌디에고); 인비트로젠(Invitrogen), 캘리포니아주 칼스바드). 본 발명의 면역억제성 T 세포는 여포성 조절 T

세포(T(FR))일 수 있다(Sage et al., *Nat. Immunol.* 14:152-161 (2013)). 특별한 실시양태에서, 본 발명의 세포성 조절 T 세포는 $CD4^+CXCR5^+$ 이고 Foxp3을 발현한다(Sage et al., *supra*, 2013).

[0186] 세포의 분리를 위한 절차는, 비제한적으로, 밀도 구배 원심분리법(density gradient centrifugation), 세포 밀도를 개질하는, 입자로의 커플링, 항체-코팅된 자기 비드를 이용한 자성 분리, 친화도 크로마토그래피; 단일클론성 항체(mAb), 예를 들어 비제한적으로 보체 및 세포독소와 연결되거나 이들과 함께 사용되어 고체 매트릭스, 예를 들어 플레이트 또는 칩에 부착된 항체로 패닝(panning) 세포독성제, 세정, 유세포분석법, 또는 임의의 다른 편리한 기술을 포함한다(예를 들어, Recktenwald et al., *cell Separation Methods and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York (1998) 참고).

[0187] T 세포는, 이들이 본 발명의 치료 방법에 투여되는 대상에게 자가조직 또는 비-자가조직일 수 있다. 자가조직 세포는 조작된 T 세포가 투여되는 대상으로부터 단리된다. 바람직한 실시양태에서, 자가조직 세포는 CAR을 재조합적으로 발현하는 조작된 세포가 투여될 대상체로부터 단리된다. 선택적으로, 세포는, 빼낸 혈액으로부터 백혈구를 선택적으로 제거하는 백혈구성분채집술에 의해 수득되고, 재조합을 수행하고, 그다음 공여체로 재수혈될 수 있다. 다르게는, 대상이 아닌 비-자가조직 공여체로부터의 동종 이계 세포가 사용될 수 있다. 비-자가조직 공여체인 경우에, 당업계에 잘 알려진 바와 같이, 적절한 수준의 적합성을 결정하기 위해서 세포는 인간 백혈구 항원(HLA)에 대해 유형화되고 매칭된다. 자가조직 및 비-자가조직 세포 둘 모두의 경우에, 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 유전자 조작 및/또는 대상으로의 투여를 위해 사용될 준비가 될 때까지 세포들은 선택적으로 저온보존될 수 있다.

[0188] CAR의 재조합 발현을 위해 사용될 수 있는 T 세포를 단리하기 위한 다양한 방법이 이전에 기술되어 왔으며 사용될 수 있고, 비제한적으로, 말초 공여체 림프구의 사용(Sadelain et al., *Nat. Rev. Cancer* 3:35-45 (2003); Morgan et al., *Science* 314:126-129 (2006)), 종양 생체검사에서 종양 침윤 림프구(TIL)로부터 유래된 림프구 배양액의 사용(Panelli et al., *J. Immunol.* 164:495-504 (2000); Panelli et al., *J. Immunol.* 164:4382-4392 (2000)), 및 인공 항원-제시 세포(AAPC) 또는 수지상 세포를 이용하는, 선택적으로 시험관내-확장된 항원-특이적말초 혈액 백혈구의 사용(Dupont et al., *Cancer Res.* 65:5417-5427 (2005); Papanicolaou et al., *Blood* 102:2498-2505 (2003))을 포함할 수 있다. 줄기 세포를 사용하는 경우에, 세포는 당업계에 잘 알려진 방법에 의해 단리될 수 있다(예를 들어, Klug et al., *Hematopoietic Stem Cell Protocols*, Humana Press, New Jersey (2002); Freshney et al., *Culture of Human Stem Cells*, John Wiley & Sons (2007) 참고).

[0189] 구체적 실시양태에서, 단리된 T 세포는 전이유전자의 재조합 발현을 위해 생체외(ex vivo)에서 유전적으로 조작된다. 바람직한 실시양태에서, 단리된 T 세포는 CAR의 재조합 발현을 위해 생체외에서 유전적으로 조작된다. 세포는 당업계에 잘 알려진 방법에 의해 재조합 발현을 위해 유전적으로 조작될 수 있다.

[0190] 다른 실시양태에서, 본 발명은, 표적 항원을 인식하고 이에 대해 민감화된 후 전이유전자의 재조합 발현을 위해 유전적으로 조작되는 T 세포를 제공한다. 그러나, 이러한 T 세포는 표적 항원에 결합되는 CAR을 발현할 필요가 없을 수 있으며, 그 이유는 이 세포가 이미 표적 항원-특이성이어서, 이들의 면역 반응(예를 들어, 세포독성)이 이러한 표적 항원에 의해 특이적으로 자극되기 때문이다. 표적 항원을 인식하고 민감화되는 이러한 T 세포는 공지된 방법, 예를 들어 미자극 T 세포(예를 들어, Wolf1 et al., *Nat. Protocols* 9:950-966 (2014)) 또는 조절의 프로제니터 세포(van Lent et al., *J. Immunol.* 179:4959-4968 (2007) 참고)를 사용하는 시험관내 민감화 방법에 의해 수득될 수 있거나; 표적 항원에 대항하여 면역반응(즉, 생체내 민감화된 T 세포)에 노출되고 상기 면역 반응을 마운팅하는 대상으로부터 수득될 수 있다. 대상으로부터 항원-특이적 T 세포를 단리하기 위한 방법이 당업계에 잘 알려져 있다. 이러한 방법은, 비제한적으로, 사이토카인 포획 시스템 또는 사이토카인 분비 분석(이는 항원-특이적 세포를 확인 및 단리하기 위해 사용될 수 있는 항원 자극 T 세포로부터의 사이토카인의 분비에 기반한다) 및 세포의 시험관 내 확장을 포함한다(Assemmacher et al., *Cytometric Cytokine Secretion Assay*, in *Analyzing T Cell Responses: How to Analyze Cellular Immune Responses Against Tumor Associated Antigens*, Nagorsen et al., eds., Chapter 10, pp. 183-195, Springer, The Netherlands (2005); Haney et al., *J. Immunol. Methods* 369:33-41 (2011); Bunos et al., *Vox Sanguinis* DOI: 10.1111/vox.12291 (2015); Montes et al., *Clin. Exp. Immunol.* 142:292-302 (2005); Adusumilli et al., *Sci Transl Med.* 6:261ra151 (2014) 참고). 이러한 사이토카인은 비제한적으로, 인터페론- γ 및 종양 괴사 인자- α 를 포함한다. 대상으로부터 항원-특이적 조절 T 세포를 단리하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, Noyan et al., *Eur. J. Immunol.* 44:2592-2602 (2014); Brusko et al., *PLoS One* 5(7) e11726 (doi: 10.1371) (2010); Bacher et al., *Mucosal Immunol.* 7:916-928 (2014); Koenen et al., *J. Immunol.* 174:7573-7583 (2005)

참고). 항원-특이적 T 세포는 T 세포를 단리하기 위한, 전술한 바와 같은 잘 알려진 기술을 사용함으로써 단리될 수 있고, 이들 방법은 비제한적으로, 유세포분석법, 자기 비드, 고체 상으로의 패닝 등을 포함한다. 항원-특이적 T 세포 단리 기술은 또한 상업적으로 이용가능하고, 이는 임상적 용도를 위해 사용되거나 조정될 수 있다(예를 들어, 밀테니 바이오테크(Miltenyi Biotech), 매사추세츠주 캠브리지; 프로이문(Proimmune), 영국 옥스포드; 등 참고).

- [0191] T 세포는 세포의 유지 또는 확장을 선호하는 조건에 놓일 수 있다(Kearse, *T cell Protocols: Development and Activation*, Humana Press, Totowa NJ (2000); De Libero, *T Cell Protocols*, Vol. 514 of *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa NJ (2009); Parente-Pereira et al., *J. Biol. Methods* 1(2) e7 (doi 10.14440/jbm.2014.30) (2014); Movassagh et al., *Hum. Gene Ther.* 11:1189-1200 (2000); Rettig et al., *Mol. Ther.* 8:29-41 (2003); Agarwal et al., *J. Virol.* 72:3720-3728 (1998); Pollok et al., *Hum. Gene Ther.* 10:2221-2236 (1999); Quinn et al., *Hum. Gene Ther.* 9:1457-1467 (1998); Su et al., *Methods Mol. Biol.* 806:287-299 (2012); Bluestone et al., *Sci. Transl. Med.* 7(315) (doi: 10.1126/scitranslmed.aad4134)(2015); Miyara et al., *Nat. Rev. Rheumatol.* 10:543-551 (2014); Liu et al., *J. Exp. Med.* 203:1701-1711 (2006); Seddiki et al., *J. Exp. Med.* 203:1693-1700 (2006); Ukena et al., *Exp. Hematol.* 39:1152-1160 (2011); Chen et al., *J. Immunol.* 183:4094-4102 (2009); Putnam et al., *Diabetes* 58:652-662 (2009); Putnam et al., *Am. J. Transplant.* 13:3010-3020 (2013); Lee et al., *Cancer Res.* 71:2871-2881 (2011); MacDonald et al., *J. Clin. Invest.* 126:1413-1424 (2016) 참고; 또한, 상업적으로 입수가능한 방법, 예를 들어 DynabeadsTM 인간 T 세포 활성화제 제품, 써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific), 매사추세츠주 월덤)). 세포는 생체의 유전적 조작 이전 또는 이후에 선택적으로 확장될 수 있다. 세포의 확장은 대상으로의 투여를 위해 세포의 갯수를 증가시키기 위해서 특히 유용하다. 면역 세포, 예를 들어 T 세포들의 확장을 위한 이러한 방법이 당업계에 공지되어 있다(Kaiser et al., *Cancer Gene Therapy* 22:72-78 (2015); Wolf1 et al., *Nat. Protocols* 9:950-966 (2014) 참고). 게다가, 세포들은 단리 및/또는 유전적 조작, 및/또는 유전적으로 조작된 세포들의 확장 이후에 선택적으로 저온보존될 수 있다(Kaiser et al., *supra*, 2015 참고)). 세포의 저온보존의 방법은 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, Freshney, *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques*, 4th ed., Wiley-Liss, New York (2000); Harrison and Rae, *General Techniques of Cell Culture*, Cambridge University Press (1997) 참고).

[0192] 7.2 표적화 통합 방법

- [0193] 내인성 T 세포 프로모터의 제어 하에서 전이유전자를 재조합적으로 발현하는 세포들의 생성과 연관하여, 전이유전자는 T 세포의 게놈으로 도입된다. 바람직한 실시양태에서, CAR을 재조합적으로 발현하는 세포들의 생성과 연관하여, CAR을 인코딩하는 핵산이 T 세포내에 도입된다. 통상적으로, 이러한 방법은 적합한 발현 벡터를 사용하되, 이러한 경우에 T 세포가 전이유전자, 예를 들어 CAR을 인코딩하는 핵산에 의해 형질도입된다. 본 발명에서, 전이유전자는, 게놈 내부의 부위에서 전이유전자의 표적화된 통합을 위해 제공되는, 표적화 구조체로 클로닝된다. 바람직한 실시양태에서, CAR을 인코딩하는 핵산은, 게놈 내부의 부위에, 특별한 실시양태에서는 세포 내 기능성 TCR 복합체의 발현을 위해 요구되는 단백질을 인코딩하는 유전자의 발현을 파괴하는 부위에, CAR을 인코딩하는 핵산 서열의 표적화 통합을 제공하는 표적화 구조체로 클로닝된다. 예를 들어, 전이유전자, 예를 들어, 본 발명의, CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 적합한 표적화 구조체 또는 적합한 벡터, 예를 들어 레트로바이러스 벡터로 클로닝되고 잘 알려진 분자 생물학 기술을 사용하여 T 세포로 도입될 수 있다(Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999) 참고).

- [0194] 본 발명의 세포, 특히 인간 T 세포의 발현에 적합한 임의의 적합한 표적화 구조체가 사용될 수 있다. 특별한 실시양태에서, 표적화 구조체는 세포의 게놈 내의 부위에서 핵산 서열(전이유전자)의 표적화 통합에 적합한 상동성 재조합 시스템과 함께 사용하기에 양립가능하다. 예시적인 상동성 재조합 시스템은 당업계에 잘 알려져 있고, 비제한적으로, 뉴클레아제, 예를 들어, 전사 활성화자-유사 이펙터 뉴클레아제(TALENs), 징크-핑거 뉴클레아제(ZFNs), 군집화된 규칙적-산재 짧은 회문구조 반복물(CRISPR) 시스템, 예를 들어 CRISPR 연관 단백질 9(Cas9) 및 Cpf1, 및/또는 메가뉴클레아제 또는 Mega-Tal(Tal 도메인과 메가뉴클레아제의 융합) 등(이는 상동성 재조합, 예를 들어 세포의 게놈 내부의 소망하는 표적 부위를 제공함)을 포함한다(실시예 참조; 또한 미국특허 제8,697,359호; US 공개공보 제20140068797호; Gaj et al., *Trends Biotechnol.* 31:397-405 (2013); Gersbach et al., *Nucl. Acids Res.* 39:7868-7878 (2011); Vasileva, et al. *Cell Death Dis.* 6:e1831. (Jul 23 2015); Sonthier, *Hum. Gene Ther.* 26(7):413-424 (2015); Osborn et al., *Mol. Ther.* 24(3):570-581 (2016))참고). 이러한 방법은 당업계에 잘 알려져 있고 상업적으로 입수가능하다(써모피셔, 캘리포니아주 칼스바드; 젠스

크립트(GenScript), 뉴저지주 피스카타웨이); 클론테크(Clontech), 캘리포니아주 마운틴 뷰). 기타 CRISPR-기반 시스템은 발원 및 아우레우스를 포함한다. 이러한 방법은 상동성 재조합을 수행하거나 촉진하기 위해서 사용될 수 있다.

[0195] **7.3 벡터 및 표적화 구조체**

[0196] 적합한 표적화 구조체는 본 발명에 사용되는 상동성 재조합 시스템과 양립가능한 임의의 핵산 서열을 포함할 수 있다. 일 실시양태에서, 표적화 구조체는 아데노-연관 바이러스(AAV) 서열을 포함한다. 표적화 구조체는 하나 이상의 AAV 항원형으로부터의 핵산 서열을 가질 수 있다. 예를 들어, 표적화 구조체는 AAV2 서열 또는 기타 항원형 서열, 예를 들어 AAV5를 포함할 수 있다. 표적화 구조체의 일부로서 기능하는 AAV 핵산 서열은 몇몇의 천연 또는 재조합 AAV 캡시드 또는 입자 내에 포장될 수 있다. 특별한 실시양태에서, AAV 입자는 AAV6이다. 특별한 실시양태에서, AAV2-기반 표적화 구조체는 AAV6 바이러스 입자를 사용하여 표적 세포로 전달된다. 특별한 실시양태에서, AAV 서열은 AAV2, AAV5 또는 AAV6 서열이다. 특별한 실시양태에서, AAV 서열은 AAV2로부터의 것이다. 다른 특별한 실시양태에서, AAV 서열은 AAV6으로부터의 것이다. 다른 특별한 실시양태에서, 표적화 구조체는 5'로부터 3'으로의 순서로: 제1 바이러스 서열, 좌측 상동성 압, 자가-절단 돼지 테스초바이러스 2A를 인코딩하는 핵산 서열, 전이유전자, 폴리아데닐화 서열, 우측 상동성 압 및 제2 바이러스 서열을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 표적화 구조체는 5'로부터 3'의 순서로: 제1 바이러스 서열, 좌측 상동성 압, 자가-절단 돼지 테스초바이러스 2A를 인코딩하는 핵산 서열, CAR을 인코딩하는 핵산 서열, 폴리아데닐화 서열, 우측 상동성 압 및 제2 바이러스 서열을 포함한다. 다른 적합한 표적화 구조체는 통합-결핍 렌티바이러스로부터의 서열을 포함할 수 있다(예를 들어, Wanisch et al., *Mol. Ther.* 17(8):1316-1332 (2009) 참고). 특별한 실시양태에서, 바이러스 핵산 서열은 통합-결핍 렌티바이러스의 서열을 포함한다. 사용은 상동성 재조합 시스템과 양립가능한 임의의 적합한 표적화 구조화가 사용될 수 있음이 이해될 것이다.

[0197] 표적화 구조체 내에 포함될 수 있는 바이러스 벡터 서열은, 비제한적으로, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 렌티바이러스, 및 아데노-연관 바이러스 벡터, 우두종 바이러스, 소 유두종 바이러스 과생 벡터, 및 헤르페스 바이러스 벡터, 예를 들어 엡스타인-바 바이러스(Epstein-Barr Virus)를 포함한다(예를 들어, Miller, *Hum. Gene Ther.* 1(1):5-14 (1990); Friedman, *Science* 244:1275-1281 (1989); Eglitis et al., *BioTechniques* 6:608-614 (1988); Tolstoshev et al., *Current Opin. Biotechnol.* 1:55-61 (1990); Sharp, *Lancet* 337:1277-1278 (1991); Cornetta et al., *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 36:311-322 (1989); Anderson, *Science* 226:401-409 (1984); Moen, *Blood cells* 17:407-416 (1991); Miller et al., *Biotechnology* 7:980-990 (1989); Le Gal La Salle et al., *Science* 259:988-990 (1993); and Johnson, *Chest* 107:77S- 83S (1995); Rosenberg et al., *N. Engl. J. Med.* 323:370 (1990); Anderson et al., 미국 특허 제5,399,346호; Scholler et al., *Sci. Transl. Med.* 4:132-153 (2012); Parente-Pereira et al., *J. Biol. Methods* 1(2):e7 (1-9)(2014); Lamers et al., *Blood* 117(1):72-82 (2011); Reviere et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6733-6737 (1995); Wang et al., *Gene Therapy* 15:1454-1459 (2008) 참고).

[0198] 상동성 재조합-매개 표적화를 위한 전이유전자 벡터화를 제공하는 표적화 구조체를 생성하기 위해 특히 유용한 벡터는, 비제한적으로, 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV), 재조합 비-통합 렌티바이러스(rNILV), 재조합 비-통합 감마-레트로바이러스(rNIGRV), 단일선(single-stranded) DNA(선형 또는 원형) 등을 포함한다. 이러한 벡터는 전술한 바와 같이 표적화 구조체를 재조합으로써 본 발명의 T 세포내로 전이유전자를 도입하기 위해서 사용될 수 있다.

[0199] 일 실시양태에서, 벡터는 재조합 비-통합 감마-레트로바이러스(rNIGRV)이다. 일 실시양태에서, rNIGRV는 인테그라제 활성을 없애는, DDE 모티프에서 돌연변이되는 감마-레트로바이러스 인테그라제를 사용하여 수득된다. 따라서, 감마-레트로바이러스는 이의 인테그라제의 불활성에 의해 비-통합 감마-레트로바이러스로 전환된다(실시예 4 및 도 18 참고). 특별한 실시양태에서, 인테그라제는 D164A, D164E, D164N, D164V, D183A, D183N, D164A와 D168A, D164A와 D183N, D164N과 D183A, D164N과 D183N, D164V와 D168A, D164V와 D183N, D164V와 D183A, 및 D164V와 D183N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 DDE 돌연변이를 포함한다. 이러한 rNIGRV 벡터는 통상적으로 사용되는 벡터보다 생산하기에 보다 저렴하고 용이하기 때문에, 유리하다.

[0200] rNIGRV 벡터를 사용하여 임의의 세포내로 임의의 소망하는 DNA를 도입하는 것은 용이하게 이해될 것이다. 따라서, rNIGRV는 벡터가 기능하는 임의의 유형의 세포내로 임의의 유형의 소망하는 DNA를 도입하기 위해 사용될 수 있다

[0201] 세포의 게놈 내 부위 내부에서 통합되는 전이유전자의 발현을 제어하기 위해서 내인성 프로모터를 사용하는 본

발명의 방법에서, 표적화 구조체는 바람직하게는 무-프로모터이다. 세포의 게놈 내 부위 내부에서 통합되는 CAR을 인코딩하는 핵산 서열의 발현을 제어하기 위해 내인성 프로모터를 사용하는 본 발명의 방법의 바람직한 실시양태에서, 표적화 구조체는 바람직하게는 무-프로모터이다. 이러한 구조체는 전이유전자, 예를 들어 CAR을 인코딩하는 핵산 서열의, 게놈 내부의 부위로의 통합을 허용하여, 통합된 핵산 서열(전이유전자)이 내인성 프로모터의 제어 하에 있다. 일 실시양태에서, 내인성 프로모터는 TCR 프로모터이다. 특별한 실시양태에서, 내인성 프로모터는 T 세포 수용체 알파쇄, T 세포 수용체 베타쇄, CD3 감마쇄, CD3 델타쇄, CD3 입실론쇄, 또는 CD3 제타쇄를 인코딩하는 유전자의 프로모터이다. 구체적 실시양태에서, CAR을 인코딩하는 핵산 서열이 통합되어 있다.

[0202] 본 발명의 방법은 바람직하게는 재조합 전이유전자, 예를 들어 CAR을 인코딩하는 핵산 서열의 발현을 제어하기 위해서 내인성 프로모터를 사용하지만, 특정 숙주 세포에서의 발현을 위한 적합한 프로모터를 사용하는 벡터, 예를 들어 내인성 프로모터, 예를 들어 TCR 프로모터를 도입한 벡터가 사용될 수 있음이 이해된다. 이러한 벡터는 내인성 프로모터, 예를 들어 TCR 프로모터에 의해 제공되는 것과 유사한 방식으로 발현을 제공할 수 있다. 예를 들어, 통합의 부위가 전이유전자의 효율적인 발현을 제공하지 않거나 내인성 프로모터에 의해 제어되는 내인성 유전자의 파괴가 T 세포에 해로울 수 있거나 T 세포 치료에서의 그의 효과의 감소를 유발한다면, 이러한 벡터가 유용할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 통합 부위가 CAR을 인코딩하는 핵산 서열의 효율적인 발현을 제공하지 않는다면, 이러한 벡터는 유용할 수 있다. 프로모터는 유도성 프로모터 또는 구성적 프로모터일 수 있다. 내인성 또는 벡터-연관 프로모터의 제어 하에서의 핵산 서열의 발현은, 세포가 핵산을 발현하는 적합한 조건, 예를 들어 성장 조건 하에서, 또는 유도성 프로모터와 함께 유도인자의 존재하에서 등에서 발생한다. 이러한 조건은 당업자에 의해 이해된다.

[0203] 표적화 구조체는 전이유전자를 인코딩하는 핵산 서열의 바로 상류에 P2A 서열을 포함하도록 선택적으로 설계될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 표적화 구조체는 CAR을 인코딩하는 핵산 서열의 바로 상류에 P2A 서열을 포함하도록 선택적으로 설계될 수 있다. P2A는 자가-절단 펩티드 서열이며, 이는 단백질 서열의 바이시스트론성(bicistronic) 또는 멀티시스트론성 발현을 위해 사용될 수 있다(Szymczak et al., *Expert Opin. Biol. Therapy* 5(5):627-638 (2005) 참고). 소망하는 경우, 표적화 구조체는 리포터, 예를 들어 형질도입된 세포의 확인을 제공하는 리포터 단백질을 포함하도록 선택적으로 설계될 수 있다. 예시적인 리포터 단백질은, 비제한적으로, 형광 단백질, 예를 들어 mCherry, 녹색 형광 단백질(GFP), 청색 형광 단백질, 예를 들어, EBFP, EBFP2, Azurite와 mKalama1, 시안 형광 단백질, 예를 들어, ECFP, Cerulean과 CyPet, 및 황색 형광 단백질, 예를 들어, YFP, 시트린(Citrine), 베누스(Venus), 및 YPet을 포함한다.

[0204] 바람직하게, 표적화 구조체는 전이유전자의 폴리아데닐화(폴리 A) 서열 3'을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 표적화 구조체는 CAR을 인코딩하는 핵산 서열의 폴리아데닐화(폴리 A) 서열 3'을 포함한다.

[0205] 본원에서 개시된 바와 같이, 구체적 실시양태에서, CAR을 인코딩하는 핵산은 세포의 게놈 내부의 부위에서 통합되어서, CAR이 세포 내에서 발현되어 세포 표면에서 생산될 수 있다. 통합의 부위는 세포의 표면에서 기능성 T 세포 수용체(TCR) 복합체의 발현을 감소시키거나 억제한다. 따라서, 세포는 TCR 음성 세포가 될 수 있다. 이러한 TCR 음성 세포는 예를 들어 비-자가조직 T 세포를 사용하는 경우에, 수용체에서 이식편 대 숙주병(GVHD)을 감소시키기 위해서 유용할 수 있다. TCR 음성 세포의 생성은 또한 자가조직 세포와의 자가면역 질환을 앓는 대상을 치료하기 위해서 사용될 수 있는데, 그 이유는 대상의 자체 T 세포에 의해 제공되는 자가면역 반응이 자가항원을 표적화하는 기능성 TCR 복합체의 발현을 감소시키거나 억제함으로써 감소시킬 수 있기 때문이다.

[0206] T 세포 수용체 (TCR)는 TCR- α 와 TCR- β 쇄의 헤테로2량체이다. TCR 복합체는 TCR과 CD3 감마(γ), CD3 델타(δ), CD3 입실론(ϵ), 및 CD3 제타(ζ)에 의해 형성된다(예를 들어, Call et al., *Cell* 111:967-979 (2002) 참고). T 세포 수용체 알파쇄, T 세포 수용체 베타쇄, CD3 감마쇄, CD3 델타쇄, CD3 입실론쇄, 또는 CD3 제타쇄 중 하나 이상의 파괴 또는 감소된 발현은 기능성 T 세포 수용체(TCR) 복합체의 형성을 감소 또는 방지하기 위해 사용될 수 있다. 기능성 TCR 복합체의 형성의 감소 또는 방지에 의해서, T 세포는 그의 TCR 복합체를 통한 면역 반응을 더 이상 매개하지 않는다. 일 실시양태에서, CAR을 인코딩하는 핵산은 T 세포 수용체 알파쇄, T 세포 수용체 베타쇄, CD3 감마쇄, CD3 델타쇄, CD3 입실론쇄, 또는 CD3 제타쇄의 발현을 파괴 또는 감소시키는 게놈 내부의 부위에서 통합된다. TCR 복합체 단백질 중 하나의 감소가 충분하면, 소망하는 경우에 TCR 복합체의 하나 조파의 성분이 감소될 수 있음이 이해된다.

[0207] 세포의 게놈 내 통합의 부위가 내인성 프로모터의 제어 하에 전이유전자를 놓도록 표적화됨이 이해된다. 통합은, 예를 들어, 비제한적으로, 엑손내로의 통합, 인트론내로의 통합, 또는 유전자의 5' 말단에서의 통합일 수

있다. 일 실시양태에서, 전이유전자의 통합은 통합의 부위에서 내인성 유전자의 파괴를 유발한다. 바람직한 실시양태에서, 세포의 게놈 내의 통합의 부위는 TCR 복합체의 성분, 예를 들어, T 세포 수용체 알파쇄, T 세포 수용체 베타쇄, CD3 감마쇄, CD3 델타쇄, CD3 입실론쇄, 또는 CD3 제타쇄의 발현을 감소시키거나 파괴하도록 표적화됨이 이해된다. 당업자는 T 세포 수용체 알파쇄, T 세포 수용체 베타쇄, CD3 감마쇄, CD3 델타쇄, CD3 입실론쇄, 또는 CD3 제타쇄의 발현을 감소시키거나 파괴하도록 CAR 인코딩 핵산을 통합하기 위해서 T 세포 수용체 알파쇄, T 세포 수용체 베타쇄, CD3 감마쇄, D3 델타쇄, CD3 입실론쇄, 또는 CD3 제타쇄를 인코딩하는 유전자 내에 적합한 위치를 용이하게 결정할 수 있다. 이러한 방법은 당업계에 잘 알려져 있고, 비제한적으로, 엑손내로의 통합, 인트론내로의 통합, 유전자의 5' 말단에서의 통합 등을 포함할 수 있다. 유전자의 임의의 인트론 또는 엑손은 표적화 구조체를 지지할 수 있음이 이해된다. 당업자는 소망하는 경우에, 통합의 부위에서 내인성 프로모터의 제어 하에 내인성 유전자의 발현을 감소 또는 파괴할 전이유전자의 표적화 통합을 위한 적합한 부위를 용이하게 결정할 수 있음이 이해된다. 특별한 실시양태에서, 통합의 부위는 제1 엑손 내부이다. 전이유전자의 통합을 위한 부위를 선택할 때, 통합 부위는 비-필수 유전자 내, 즉 세포의 증식 또는 세포 생존을 위해서, 특히 내인성 유전자의 발현이 파괴될 경우에 필수적이지 않은 유전자 내부에서 발생함이 이해된다. 바람직한 실시양태에서, 당업자는 TCR 복합체 성분을 인코딩하는 개별적인 유전자의 내인성 프로모터의 제어 하에서 TCR 복합체 단백질, 예를 들어 T 세포 수용체 알파쇄, T 세포 수용체 베타쇄, CD3 감마쇄, CD3 델타쇄, CD3 입실론쇄, 또는 CD3 제타쇄의 발현을 감소하거나 파괴하고/하거나 CAR 인코딩 핵산을 배치할 것인, CAR을 인코딩하는 핵산 서열의 표적화 통합을 위한 적합한 부위를 용이하게 결정할 수 있다. 일 실시양태에서, 통합 부위는 제1 엑손의 내부이다(실시에 참고). 특별한 실시양태에서, 통합의 부위는 TCR 알파 불변쇄(TRAC)의 제1 엑손 내부에 있다. 바람직한 실시양태에서, 전이유전자, 예를 들어 CAR을 인코딩하는 핵산은 내인성 TCR 프로모터의 제어 하에 배치된다. 이들의 세부사항은 본원에서 그 전체를 참고로 포함하는, 2016년 4월 15일자로 출원된 미국 가특허출원 제 62/323,623 호 및 2016년 4월 16일자로 출원된 미국 가특허출원 제 62/323,675 호에 기술되어 있다.

[0208] 소망하는 경우, 통합 부위 및 표적화 구조체는, 내인성 유전자와 인 프레임으로 전이유전자의 통합을 제공하도록 설계되어서, 내인성 유전자와 전이유전자의 융합 단백질의 발현을 유발할 수 있다(또한, US20130280222 참고). 바람직한 실시양태에서, 통합 부위 및 표적화 구조체는 내인성 유전자와의 인 프레임 통합을 제공하도록 설계될 수 있어서, TCR 복합체 단백질과 CAR의 융합 단백질의 발현을 유발할 수 있다. 선택적으로, 이러한 구조체는 전이 유전자의 5'에 직접 P2A를 함유할 수 있어서, 내인성 유전자의 유전자 산물로의 융합 없이 세포 내의 소망하는 위치에서 전이유전자의 발현을 허용할 수 있다. 이러한 구조체는 통합 부위에서 전이유전자 및 내인성 유전자 둘 다의 발현을 제공하고, 이러한 구조체는, 내인성 유전자의 파괴가 T 세포에 해를 입히는 경우에 또는 T 세포 치료에서 그의 효율의 감소를 유발하는 경우에, 사용될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 이러한 구조체는 CAR을 인코딩하는 핵산 서열의 5'에서 직접 P2A를 함유할 수 있어서, TCR 복합체 단백질로의 융합 없이, 세포의 표면에서의 CAR 발현을 허용할 수 있다. 다른 유전자, 예를 들어 제2 CAR을 인코딩하는 유전자, 또는 안전스위치(예를 들어, 유도성 카스파제 9(iCasp9) 또는 헤르페스 단순 바이러스 리미딘 키나제(HSVtk), Tey, *Clin. Transl. Immunology* 3(6):e17 참고), 또는 면역조절 분자 등이 게놈내로 통합될 수 있음이 이해된다. 일 실시양태에서, 동일하거나 상이한 유전자(전이유전자)의 통합은 각각 상이한 표적 유전자에서 발생한다. 구체적 양태에서, 상이한 유전자(전이유전자)는 각각 상이한 통합 부위에서 통합된다.

[0209] 상동성 재조합 시스템은, 당업계에 알려진 바와 같이, 게놈 내부의 소망하는 부위, 예를 들어 T 세포 수용체 알파쇄(염색체 14, NC_000014.9 (22547506..22552132)), T 세포 수용체 베타쇄(염색체 7, NC_000007.14 (142299011..142813287)), CD3 감마쇄(염색체 11, NC_000011.10(118344316..118353782)), CD3 델타쇄(염색체 11, NC_000011.10(118339074..118342744)), CD3 입실론쇄(염색체 11, NC_000011.10(118304580..118316175)), 또는 CD3 제타쇄(염색체 1, NC_000001.11 (167430640..167518616))를 인코딩하는 유전자 내부의 부위를 표적화하도록 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 설계된다(염색체 위치 번호는 현 어셈블리: GRCh38.p2에 해당함).

[0210] 본원에서 전술한 바와 같이, 일 실시양태에서, 통합 부위는 단지 하나의 대립형질, 예를 들어 TCR 알파, TCR 베타, Y 또는 X 염색체-특이적 유전자로부터 발현되는 유전자를 표적화할 수 있다. 이러한 경우에, 게놈 내부의 단일 부위에 전이유전자를 통합하는 것이 충분할 수 있다. 이러한 경우에, 전이유전자가 CAR을 인코딩하는 바람직한 실시양태에서, 게놈 내부의 단일 부위에 CAR을 인코딩하는 핵산을 통합하는 것이 충분할 수 있다. 이러한 전략은 세포 당 단지 하나의 전이유전자가 발현됨을 보장하도록 사용될 수 있다. 선택적으로, 통합을 위해 표적화될 유전자가 2개의 대립형질 위에 존재하는 경우에, 표적화 상동성 재조합은 2개의 대립형질에서 발생할 수

있다. 이러한 경우에, 표적화 통합은 하나의 유전자좌 또는 2개의 유전자좌에서 발생할 수 있다.

[0211] 분석법은, 일상적인 분자 생물학 기술을 사용하여 전이유전자, 바람직하게는 CAR을 인코딩하는 전이유전자의 형질도입 효율을 측정하기 위해서 사용될 수 있다. 유전자 전달 효율은 형질도입된 T 세포의 분획을 정량하기 위해서 형광 활성화 세포 분류(FACS) 분석에 의해 및/또는 정량적 PCR에 의해 모니터링될 수 있다. 잘-확립된 공동-배양 시스템(Gade et al., *Cancer Res.* 65:9080-9088 (2005); Gong et al., *Neoplasia* 1:123-127 (1999); Latouche et al., *Nat. Biotechnol.* 18:405-409 (2000))을 사용하면, 암 항원을 발현하는 섬유아세포 AAPC(vs 대조군)가 CAR-발현 형질도입된 T 세포로부터의 사이토카인 방출(IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , TNF- α , 및 GM-CSF에 대한 세포 상등액 루미넥스(LUMINEX)(텍사스주 오스틴) 분석법), T 세포 증식(카복시플루오레세인 숙신이 미틸 에스터(carboxyfluorescein succinimidyl ester; CFSE) 라벨링에 의한), 및 T 세포 생존(아넥신(Annexin) V 염색에 의한)을 총괄하는지 여부를 결정할 수 있다. CAR을 발현하는 T 세포는 표적 항원 양성 세포에 의한 반복된 자극에 노출될 수 있고, T 세포 증식 및 사이토카인 반응이 반복된 자극에 의해 유사하게 남아있는지 또는 감소되는지 결정될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, CAR을 발현하는 T 세포는 암 항원 양성 표적 세포에 의해 반복 자극에 노출될 수 있고, T 세포 증식 및 사이토카인 반응이 반복 자극과 유사하게 남아있는지 또는 감소되는지 여부를 측정할 수 있다. 다중 E:T 비율을 갖는 세포독성 분석법은 크롬-방출 분석을 사용하여 수행될 수 있다.

[0212] 7.4 내인성 T 세포 프로모터

[0213] 본 발명은 전이유전자가 T 세포의 내인성 프로모터의 제어 하에서 놓이도록 T 세포의 게놈 내부의 부위에서 전이유전자를 통합함으로써 T 세포 내 치료 전이유전자를 발현하는 것에 관한 것이다. 내인성 프로모터를 사용함으로써, T 세포는 상이한 내인성 프로모터의 제어 하에서 치료 전이유전자 또는 여러 가지의 치료 전이유전자를 발현하도록 조작된다. 구체적인 실시양태에서, 전이유전자의 발현은 T 세포의 미세환경에 좌우된다. 예를 들어, 치료 전이유전자의 발현은, T 세포가 특정 위치에 존재하는 경우에 유도되는 내인성 프로모터를 사용함으로써, T 세포의 위치(예를 들어, 전이유전자가 단지 종양과 근접할 때만 발현함)에 좌우될 수 있거나(예를 들어, T 세포가 종양의 위치에 있고 종양 항원과의 결합에 의해 활성화되는 경우에, 내인성 프로모터를 유도함), 또는 한정된 시점에 있을 수 있다(예를 들어, 한정된 시점에서 유도되는 내인성 프로모터를 사용함으로써, 예를 들어 종양 세포와 만날 때 T 세포의 활성화에 의해). 프로모터는, 예를 들어 항원과 T 세포의 만남 이후에 얼마나 자주 활성화되거나 억제되는지, 얼마나 강하게 발현되는지, 및 얼마나 길게 발현되는지에 기초하여 선택된다. 프로모터는 이것이 발현을 조절하는 전이유전자에 대한 약리학을 수용하도록 선택된다(예를 들어, 일부 전이유전자는 낮은 수준에서 보다 효과적이고, 다른 전이유전자는 높은 수준의 발현에서 보다 효과적이다). T 세포 내에서의 전이유전자의 발현을 제어하는 내인성 프로모터(단수형)의 사용과 관련하여 본 명세서에서의 기술은, 문맥 상 다른 언급이 없으면, T 세포에서 전이유전자의 발현을 각각 제어하는 하나 초과 내인성 프로모터(다른 전이유전자들과 동일하거나 상이할 수 있음)의 사용에 동등하게 적용될 것임을 이해할 것이다. 당업자는 T 세포 치료법에서의 사용을 위해 T 세포의 유효성을 향상시키기 위해서 하나 이상의 전이유전자의 소망하는 발현 및/또는 조절을 제공하도록 적절한 내인성 프로모터를 용이하게 선택할 수 있다.

[0214] 내인성 T 세포 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 내인성 프로모터는 T 세포의 서브세트에 대해 특이적이다. 하나 초과 전이유전자가 T 세포에서 발현되는 경우에, 전이유전자들(이는 서로 상이할 수 있음)은 각각 구성적 프로모터 및 유도성 프로모터의 조합의 제어 하에 배치될 수 있되, 이들 중 하나 이상은 예를 들어 T-세포의 서브세트에 특이적일 수 있다.

[0215] 본원에 기술된 실시양태의 일 양태에서, 내인성 프로모터는 인터류킨 4(IL4) 프로모터가 아니다.

[0216] 일 실시양태에서, 내인성 T 세포 프로모터는 구성적이다. 다른 실시양태에서, 내인성 T 세포 프로모터는 유도성이다. 구체적인 실시양태에서, 내인성 T 세포 프로모터는 T 세포의 서브세트에서 활성화된다. 일 실시양태에서, 2종 이상의 전이유전자가 T 세포의 게놈내로 통합되어서, 각각의 전이유전자의 발현이 T 세포의 상이한 내인성 프로모터의 제어 하에 있다. 구체적인 실시양태에서, 따라서 2종의 전이유전자가 통합된다. 특별한 실시양태에서, 2종의 전이유전자들 각각의 발현이, 구성적인 상이한 내인성 프로모터들의 제어 하에 있다. 다른 특별한 실시양태에서, 2종 이상의 전이유전자들 각각의 발현이 유도성인 상이한 내인성 프로모터들의 제어 하에 있다. 다른 특별한 실시양태에서, 제1 전이유전자의 발현이 구성적 내인성 프로모터의 제어 하에 있고 제2 전이유전자의 발현이 유도성 내인성 프로모터의 제어 하에 있다. 다른 특별한 실시양태에서, 3종의 전이유전자들이 T 세포의 게놈에 통합되어서, 각각의 전이유전자의 발현이 T 세포의 상이한 내인성 프로모터의 제어 하에 있되, 제1 전이유전자의 발현은 구성적 내인성 프로모터의 제어 하에 놓이고 제2 및 제3 전이유전자들의 발현은 각각 2종의 상이한

유도성, 내인성 프로모터들의 제어 하에 있다. T 세포에서 발현되는 전이유전자에 따라, 프로모터는 적절한 발현 수준, 발현 시간, T 세포가 특정 미세환경에 있는 경우의 발현 등을 제공하도록 선택될 수 있음이 이해된다. 예를 들어, 전이유전자 1의 발현은 구성적 프로모터의 제어 하에 있을 수 있고, 전이유전자 2의 발현은 T 세포에 의해 인식되는 항원과의 접촉 이후에 곧 활성화되는 유도성 프로모터의 제어 하에 있을 수 있고, 전이유전자 3의 발현은 전이유전자 2의 경우와는 상이한 수준에서 또는 그 이후의 시간에 활성화되는 상이한 유도성 프로모터의 제어 하에 있을 수 있다. 이 특별한 예에서, 전이유전자 1은 구성적으로 발현되고, 전이유전자 2 및 3은 개별적인 특성을 갖는 유도성 프로모터들의 제어 하에 있다.

[0217]

내인성 T 세포 프로모터로부터 전이유전자를 발현하도록 본 발명의 T 세포를 조작하는 것은 T 세포에 의한 전이유전자 발현의 자율적 조절을 제공한다. 따라서, T 세포의 미세환경은, 특히 하나 이상의 유전자가 유도성 프로모터의 제어 하에 있는 경우에, 유전자이식 T 세포의 최적화된 활성을 제공하도록 여러 개의 전이유전자들의 발현을 조화롭게 하도록 사용될 수 있다. 예를 들어, T 세포 치료법은 T 세포 자극 사이토카인의 투여에 의해 달성될 수 있다(Sadelain et al., *Cancer Disc.* 3:388-398 (2013) 참고). 일 실시양태에서, 본 발명의 T 세포는 CAR 및 제2 전이유전자, 예를 들어 T 세포 활성화 사이토카인을 공동-발현하도록 조작될 수 있다. 예를 들어, CAR은 구성적 프로모터의 제어 하에 놓일 수 있고, 제2 전이유전자, 예를 들어 T 세포 활성화 사이토카인(예를 들어, 인터류킨 12(IL 12))은 유도성 프로모터의 제어 하에 놓일 수 있어서, 제2 전이유전자를 제어하는 유도성 프로모터의 활성화는, T 세포가 CAR에 의해 인식되는 항원, 예를 들어 종양에 근접하는 경우에, 예를 들어 T 세포가 CAR에 결합됨으로서 표적 종양 항원에 관여하는 경우에 발생할 수 있다. 이러한 예에서, 이러한 구조체는 독성을 유발할 수 있는 T 세포 활성화 사이토카인의 전신 또는 국부 투여에 대한 요구를 제거한다. 추가로, T 세포가 약물의 투여에 의해 조절될 수 있는 유도성 프로모터의 제어 하에 T 세포 활성화 사이토카인을 발현하도록 조작되는 경우에, 이러한 구조체는 약물을 투여할 요구를 제거한다. 이러한 경우에, 전이유전자의 발현을 유도하도록 약물을 투여할 필요 대신에, 전이유전자 발현의 조절이 전이유전자의 발현을 제공하는 내인성 프로모터의 제어 하에 있다. 대신에, T 세포 자체는, 표적 항원의 관여 시에, T 세포 활성화 사이토카인의 발현을 활성화하여, 사이토카인의 국소화된 발현을 제공하고 따라서 전이유전자의 발현의 시공간적 조절을 제공하여서 면역치료를 위해 사용되는 T 세포의 유효성을 최적화한다.

[0218]

다른 실시양태에서, CAR을 발현하는 T 세포는 종종 독성을 방출할 수 있다. 이러한 독성을 감소시키기 위해서, 구체적 실시양태에서, CAR을 인코딩하는 전이유전자는, 따라서 유도성 프로모터의 제어 하에 놓여서, 상기 프로모터가 유도되지 않고, T 세포가 CAR에 의해 인식된 표적, 예를 들어 표적 종양과 관여할 때까지 CAR의 발현이 발생하지 않는다. 또 다른 실시양태에서, T 세포는 특정 표적에 대한 보다 높은 선택도를 갖도록 조작될 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에, 종양 위의 표적 항원이 단지 종양 위에서만 발현되지 않을 수도 있다. 따라서, 표적 항원으로서의 T 세포의 표적화는 동일한 항원을 발현하는 조직 또는 비-표적 세포에 대한 면역 반응을 유발할 수 있다. 따라서, 일 실시양태에서, 본 발명의 T 세포는 표적 종양에 대한 보다 높은 선택성을 제공하는, 표적 종양 위의 2개의 항원을 인식하도록 조작된다. 예를 들어, T 세포는 2개의 상이한 종양 항원에 대해 특이적인 2개의 CAR을 발현하도록 조작될 수 있다. 이러한 경우에, 2개의 표적 항원을 보유하는 표적으로서의 T 세포의 선택적 결합은, 유도성 내인성 프로모터, 예를 들어 전술한 바와 같은 T 세포 활성화 사이토카인의 제어 하에서 제3의 전이유전자와 커플링되어서, 단지 표적과의 선택적 관여시에 사이토카인에 의해 T 세포의 활성화가 자극된다. 당업자는 구성적이거나, T 세포의 서브타입에 대해 특이적이거나, 유도성이거나, 또는 이들의 조합인, 적합한 내인성 T 세포 프로모터의 제어 하에서 발현되는 적합한 치료 전이유전자의 선택이, 전이유전자의 자체적으로 조절된 발현을 일으켜서 보다 효율적인 T 세포 치료를 제공기 위해 사용될 수 있음이 이해될 것이다. 일 실시양태에서, 하나의 항원을 표적화하는 완전히 책임인(competent) CAR을 사용한 것 대신에, 2개의 상이한 항원들을 표적화하는 2개의 차선의 CAR은 완전한 항암 반응을 위해 관여될 필요가 있다. 건강한 조직이 하나 또는 다른 항원을 발현하는 경우, 이들, 건강한 조직은 CAR T 세포 반응에 완전히 관여하지 않을 것이다. 종양이 2개의 항원을 발현시키는 경우에, 이것은 완전한 CAR T 세포 활성을 촉발할 것이다.

[0219]

본 발명은 선택적으로 구성적 및 유도성 프로모터들 둘 다의 사용에 관한 것인데, 그 이유는 T 세포는 선택된 위치 및 시간에서 신규한 치료 분자들을 생산하는 특정한 분자의 신호에 대해 특이적으로 응답하도록 조작될 수 있기 때문이다. 예를 들어, 항원-특이적 세포-표면 수용체를 인코딩하는 전이유전자는 구성적 프로모터로부터 발현될 수 있고 그 특정 항원과의 상호작용 시에만 신호를 줄 것이다. 그다음, 이러한 상호작용은 치료 분자의 발현을 제어하는 특이적 프로모터의 활성을 유도한다. 이러한 특정한 조작된 T 세포의 치료 장점은 구성적 및 유도성 프로모터 둘 다의 기능에 좌우된다. 특별한 실시양태에서, CAR은 구성적 프로모터(예를 들어, TRAC, CD3s, B2M...)의 제어 하에 있을 수 있다. 특별한 실시양태에서, 다른 치료 전이유전자(단일클론성 항체(체크포인트 억제제 등) 또는 사이토카인(예를 들어, IL 12, IL 18 등)이 CAR 관여(예를 들어, IL2, IFNg, CD69 ...)

에 의해 활성화되는 프로모터의 제어 하에 있다. 이러한 경우에, 전이유전자는 CAR 활성화시에 발현되며 구체적으로 종양에서 발현될 것이다.

[0220] 일 실시양태에서, 본 발명은 3종의 전이유전자 또는 그 이상의 발현에 관한 것이다. 예를 들어, 전이유전자 1은 구성적일 수 있고, 전이유전자 2는 항원과의 접촉 직후에 나올 수 있고, 전이유전자 3은 전이유전자 2 이후에 또는 전이유전자 2와 상이한 수준으로 나올 수 있다. 이러한 예에서, 전이유전자 1의 발현은 내인성 구성적 프로모터의 제어 하에 있고, 전이유전자 2의 발현은 항원 관여에 의해 유도되는 내인성 프로모터에 의해 제어된 덕분에 항원과의 접촉 직후에 시작되고, 전이유전자 3의 발현은, 전이유전자 2를 조절하는 내인성 프로모터와는 상이한 발현 수준을 제공하거나 또는 이후에 유도되는 내인성 프로모터에 의해 제어된 덕분에, 전이유전자 2 이후에 또는 전이유전자 2와는 상이한 수준으로 시작된다. 이러한 예에서, 전이유전자 1은 구성적이고 전이유전자 2 및 3은 유도성이다(각각 뚜렷한 동적(kinetic) 특성을 가짐). 특별한 실시양태에서, 전이유전자 1은 예를 들어 종양 세포 위의, 항원 A에 대해 특이적인 CAR을 인코딩하되, 상기 전이유전자 1은 구성적으로 발현된다. 항원 A에 결합한 이후에, 전이유전자 2가 발현되는데, 전이유전자 2는 항원 B(예를 들어, 또한 종양 세포 위 또는 종양 미세환경 내의 다른 세포 위에서 발현됨)에 특이적인 다른 CAR을 인코딩한다. 전이유전자 3은 예를 들어 제3의 CAR일 수 있되; 이 제3의 CAR은 예를 들어 종양 세포의 위 또는 종양 미세환경 내의 다른 세포 위의, 항원 C를 인식할 수 있다. 이러한 예는 동일한 T 세포에 의한 상이한 CAR의 일시적/순차적 발현을 사용하는 "조합적 표적화"의 형태이다. 다른 특별한 실시양태에서, 전이유전자 1은 항원 A에 대해 특이적인 CAR(또는 TCR)을 인코딩하고; 전이유전자 B는 사이토카인을 인코딩하고, 전이유전자 3은 다른 사이토카인 또는 공자극 리간드 또는 scFv(예를 들어, 동일한 미세환경 내 세포들 또는 항원 A를 발현하는 동일한 세포들(예를 들어 종양 세포) 위의 항원을 인식함)을 인코딩한다. 이것은 종양 미세환경과 같은 미세환경에 유전자 발현을 국한시킴으로써 안전성 및 T 세포 잠재성을 증가시키도록 설계된 순차적인 유전자 활성화의 예이다. 따라서, 당업자는 전이유전자의 소망하는 발현 특성들을 제공하기 위해서 소망하는 전이유전자의 배치를 위한 내인성 T 세포 프로모터를 선택할 수 있다.

[0221] 특정 전이유전자(예를 들어, 면역자극성 전이유전자 - 발현하면, 면역자극성 효과를 제공하는 것)는 면역자극성인 T 세포 내에서 발현되는 것이 바람직한 반면, 다른 전이유전자(예를 들어, 면역억제성 전이유전자 - 발현되면, 면역억제성 효과를 제공하는 것)는 면역억제성인 T 세포 내에서 발현되는 것이 바람직함이 추가로 이해된다. 당업자는 이것이 면역반응을 자극하는 것 또는 면역반응을 억제하는 것을 목적으로 하는지 여부에 따라, T 세포 내에서 발현되는 적합한 전이유전자를 용이하게 결정할 수 있음이 이해된다. 명백해질 것 같고, 바람직한 실시양태에서, 면역자극성 전이유전자는 면역자극성 T 세포에서 발현되어서, T 세포가 투여된 대상에서 면역 반응을 자극하고, 면역억제성 전이유전자는 면역억제성 T 세포에서 발현되어서 T 세포가 투여되는 대상에서 면역 반응을 억제한다.

[0222] 구성적 프로모터. 일 실시양태에서, 치료 전이유전자는 T 세포의 게놈 내부의 부위에 통합되어서, 전이유전자의 발현이 구성적인 내인성 프로모터의 제어 하에 배치된다. 구성적 프로모터는 면역 반응을 활성화하기 위해서 전이유전자, 예를 들어 CAR 또는 CCR를 발현하도록 사용될 수 있다. 구성적 프로모터는 또한 PD1 및/또는 cTLA4 세포내 도메인 등을 포함하는 억제성 CAR(iCAR)의 발현을 제어한다면, 면역 반응을 억제하기 위해서 사용될 수 있다.

[0223] 일 실시양태에서, 구성적 프로모터는 TCR 프로모터, 즉 T 세포 수용체 복합체(TCR)의 단백질의 프로모터이다(실시에 참고). 특별한 실시양태에서, 내인성 프로모터는 T 세포 수용체 알파쇄, T 세포 수용체 베타쇄, CD3 감마쇄, CD3 델타쇄, CD3 입실론쇄, 또는 CD3 제타쇄를 인코딩하는 유전자의 프로모터이다.

[0224] 다른 실시양태에서, 구성적 프로모터는, 비제한적으로, 프로모터, 예를 들어 CD4 프로모터, CD8a 프로모터, CD8b 프로모터, TCRa 프로모터, TCRb 프로모터, CD3d 프로모터, CD3g 프로모터, CD3e 프로모터, 및 CD3z 프로모터 등(또한 표 1 참고, 구성적으로 표시한 프로모터들)일 수 있다.

표 1

표 1. 예시적인 구성적 및 유도성 프로모터, 및 해당 유도인자.

T 세포 서브세트	프로모터	유도인자	면역반응	참고
CD4	CD4	구성적	활성화/억제	
CD8	CD8a	구성적	활성화/억제	
	CD8b	구성적	활성화/억제	
CD3	TCRa	구성적	활성화/억제	
	TCRb	구성적	활성화/억제	
	CD3d	구성적	활성화/억제	
	CD3g	구성적	활성화/억제	
	CD3e	구성적	활성화/억제	
	CD3z	구성적		
CD3	액틴	NFAT/AP1/NFkb 활성화 (Ca ²⁺ 의존성 - CAR/TCR + CD28)		
	CD25	NFAT/AP1/NFkb 활성화 (Ca ²⁺ 의존성 - CAR/TCR + CD28)		
	IL2	NFAT/AP1/NFkb 활성화 (Ca ²⁺ 의존성 - CAR/TCR + CD28)		1
	CD69	NFAT/AP1/NFkb 활성화 (Ca ²⁺ 의존성 - CAR/TCR + CD28)		2
	GzmB	NFAT/AP1/NFkb 활성화 (Ca ²⁺ 의존성 - CAR/TCR + CD28)		
Th1	T-bet	IFNg-IFNg-R - (STAT1) + TCR 활성화 (NFAT, AP-1, NFkb)		3
	IFNg	T-bet + IL2 (STAT5)		
	TIM3	T-bet		4
Th2	IL4	IL4-IL4R (STAT6) + TCR 활성화 (NFAT, AP-1, NFkb) + Th2 수입 (GATA-3, c-MAF)		5
	GATA3	IL4-IL4R (STAT6)		
	IL5	Th2 수입 (GATA-3, c-MAF) + NFAT1		
	IL13	Th2 수입 (GATA-3, c-MAF) + NFAT1		
	IL10	NFAT + IRF4		6
Th17	IL27	IL27 (STAT 1/3) - IL6 (STAT3)		7
	IL17A	IL6-IL6R (STAT3 - ROR) + IL23- IL23R + TGFB-TGFB		
	IL6	IL6-IL6R (STAT3 - ROR) - TCR		8

[0225]

		활성화 (NFAT, AP-1, NFkb)		
	IL21	IL6-IL6R (STAT3 - ROR) - TCR 활성화 (NFAT, AP-1, NFkb) - IL21- IL21R		9
	IL23R	IL21-IL21R - IL23-IL23R - TGFB- TGFB		10
iTregs	FoxP3	TGFB-TGFB (SMAD), IL2/15 (STAT5) + 낮은 친화도 항원 TCR 활성화 (NFAT 그러나 API 없음)		11
	CTLA4	NFAT + FoxP3		12
	CD25	NFAT + FoxP3		
	PD1	NFAT/API/NFkb 활성화 (Ca ²⁺ 의존성 - CAR/TCR + CD28)		13

1. Jain, J., C. Loh, and A. Rao. 1995. Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr. Opin. Immunol.* 7: 333-342. + Kim HP, Leonard WJ. The basis for TCR-mediated regulation of the IL-2 receptor alpha chain gene: role of widely separated regulatory elements. *EMBO J* 2002;21:3051-3059.
2. Ziegler SF, Ramsdell F, Alderson MR (1994) The activation antigen CD69. *Stem Cells* 12: 456-465.
3. Afkarian M, Sedy JR, Yang J, et al. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4⁺ T cells. *Nat Immunol* 2002;3:549-557
4. Anderson AC1, Lord GM, Dardalhon V, Lee DH, Sabatos-Peyton CA, Glimcher LH, Kuchroo VK.. 2010. Th1 transcription factor T-bet regulates the expression of Tim-3. *Eur J Immunol.* 2010 Mar;40(3):859-66. doi: 10.1002/eji.200939842.
5. Chuvpilo S, Schomberg C, Gerwig R, et al. Multiple closely-linked NFAT/octamer and HMG I(Y) binding sites are part of the interleukin-4 promoter. *Nucleic Acids Res* 1993;21:5694-5704.
6. Lee CG, Kang KH, So JS, et al. A distal cis-regulatory element, CNS-9, controls NFAT1 and IRF4-mediated IL-10 gene activation in T helper cells. *Mol Immunol* 2009;46:613-621
7. Iyer SS, Cheng G. 2012. Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease - *Crit Rev Immunol.* 2012;32(1):23-63.
8. Macian F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* 2005;5:472-484.
9. Mehta DS, Wurster AL, Weinmann AS, Grusby MJ. NFATc2 and T-bet contribute to T-helper-cell-subset-specific regulation of IL-21 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005
10. Zhou L, Lopes JE, Chong MM, et al. TGFβ induced Foxp3 inhibits Th17 cell differentiation by antagonizing RORγt function. *Nature* 2008;453:236-240.
11. Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. Cutting edge: TGFβ induces a regulatory phenotype in CD4⁺CD25⁻ T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol* 2004;172:5149-5153.
12. Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, et al. Foxp3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* 2006;126:375-387.
13. Oestreich KJ, Yoon H, Ahmed R, Boss JM. 2008. NFATc1 Regulates PD-1 Expression upon T Cell Activation. *J Immunol.* 181(7):4832-9.

[0226]

[0227]

T 세포 서브세트-특이적 프로모터. 일 실시양태에서, 치료 전이유전자가 T 세포의 게놈 내부의 부위에 통합되어서, 전이유전자의 발현은 T 세포의 서브세트에서 활성인 내인성 프로모터의 제어 하에 배치된다. T 세포의 서브세트에서 활성인 이러한 프로모터는 다른 T 세포에서 불활성이거나 낮은 활성을 가짐이 이해된다. T 세포의 서브세트에서 활성인 예시적인 프로모터는, 비제한적으로, 프로모터, 예를 들어 CD4 프로모터, CD8a 프로모터, CD8b 프로모터, TCRa 프로모터, TCRb 프로모터, CD3d 프로모터, CD3g 프로모터, CD3e 프로모터, CD3z 프로모터, 액틴 프로모터, CD25 프로모터, IL2 프로모터, CD69 프로모터, GzmB 프로모터, T-bet 프로모터, IFN 감마 프로모터, TIM3 프로모터, IL4 프로모터, GATA3 프로모터, IL5 프로모터, IL13 프로모터, IL10 프로모터, IL17A 프로모터, IL6 프로모터, IL21 프로모터, IL23R 프로모터, FoxP3 프로모터, CTLA4 프로모터, CD25 프로모터, PD1 프로모터, CD45RO 프로모터, CCR7 프로모터, CD28 프로모터, CD95 프로모터, CD28 프로모터, CD27 프로모터, CD127 프로모터, PD-1 프로모터, CD122 프로모터, CD132 프로모터, KLRG-1 프로모터, HLA-DR 프로모터, CD38 프로모터, CD69 프로모터, Ki-67 프로모터, CD11a 프로모터, CD58 프로모터, CD99 프로모터, CD62L 프로모터, CD103 프로모터, CCR4 프로모터, CCR5 프로모터, CCR6 프로모터, CCR9 프로모터, CCR10 프로모터, CXCR3 프로모터, CXCR4 프로모터, CLA 프로모터, 그랜자임 A 프로모터, 그랜자임 B 프로모터, 페르포린 프로모터, CD57 프로모터, CD161 프로모터, IL-18Ra 프로모터, c-Kit 프로모터, 및 CD130 프로모터를 포함한다(표 1 및 2를 참고한다).

[0228]

표 2에서, 발현 수준은 Mahnke et al., *Eur. J. Immunol.* 43(11):2797-809. doi: 10.1002/eji.201343751 (2013)에서 보고된 바와 같이, 상이한 T 세포 분화 서브세트에서의 미 자극 T 세포에 대비된다. TCR 또는 CAR에

의한 활성화 이후에, T 세포는 분화를 겪고 특이적 유전자는 활성화되거나 억눌려진다. 유도인자는 TCR 또는 CAR에 의한 초기 활성화이지만, 시그널링은 또한 T 세포의 분화에 영향을 미칠 공자극을 계속한다(또한, Mahnke et al., *Eur. J. Immunol.* 43(11):2797-809. doi: 10.1002/eji.201343751 (2013) 참고).

표 2

표 2. T 세포 서브세트에 대해 특이적인 예시적인 프로모터(Mahnke et al., *Eur. J. Immunol.* 43(11):2797-809. doi: 10.1002/eji.201343751 (2013) 참고).

		미자극	줄기 세포 기억	중양 기억	전이 기억	이펙터 기억	최종 이펙터
CD45RO		-	-	+	+	+	-
CCR7		+	+	+	-	-	-
CD28		+	+	+	+	-	-
CD95		-	+	+	+	+	+
CD28		+	++	++	++	-	-
CD27		++	+	+	+	-/+	-
CD127		++	+++	+++	++	-/+	-
PD-1		-	-/+	+	++	+	+
CD122		-	+	++	+++	+++	+++
CD132		+	+	+	+	+	+
KLRG-1		-	ND	-/+	+	++	+++
HLA-DR		-	-	-/+	-/+	+	-
CD38		+	-/+	-	-	-	-
CD69		-	-	-	-	-	-
Ki-67		-	-	-/+	-/+	-/+	-
CD11a		+	++	++	+++	+++	+++
CD58		-	+	++	+++	+++	+++
CD99		-/+	+	++	++	++	++
CD62L		+	+	+	-	-	-
CD103		-	-	-	-	+	-
CCR4		-/+	+	++	+++	+++	-/+
CCR5		-	-	+	++	+++	++
CCR6		-	-	++	+++	+++	-
CCR9	CD4	-	ND	+	-	-	-
	CD8	-	ND	+	++	++	-
CCR10		-	-	+	ND	++	-
CXCR3	CD4	-	-/+	+	++	+++	+++
	CD8	++	+++	+++	++	+	+
CXCR4		+	++	+++	+++	++	++
CLA		-	ND	+	ND	++	ND
그랜자임 A	CD4	-	-	-	-	-/+	+
	CD8	-	-	-/+	++	+++	+++
그랜자임 B	CD4	-	-	-	-	-/+	-/+
	CD8	-	-	-	+	++	+++
페로틴	CD4	-	-	-	-	-/+	-/+
	CD8	-	-	-/+	+	++	+++
CD57		-	-	-	-/+	++	+++

CD161		-	-	-/+	+	+++	+++
IL-18Ra		-	-/+	+	++	+++	+++
c-Kit		-	-	-	ND	+++	ND
CD130		++	+	-/+	-	-	-

일반적으로, 단일 프로모터를 위한 단일 유도인자는 존재하지 않지만, 프로모터 활성화를 유도하는 시그널 경로 관여 및 활성화/억제 루프가 존재한다. 이러한 시그널링 경로는 다중 유도인자에 의해 촉발되고 T 세포의 서브 세트 또는 표현형으로의 수임(commitment)이 유발된다. 그러나, 특정 유전자 발현 패턴은 서브세트 및 표현형에 매우 특이적이고; 이들의 프로모터, 예를 들어 Th1에서의 T-bet 및 INF감마; Th2에서의 GATA3, IL4 및 IL10; Th17에서의 IL6; Treg에서의 FoxP3는 표적화될 수 있다. 따라서, 내인성 프로모터는 전이유전자의 통합을 위해

선택되어서, 특정한 T 세포 서브타입에서의 전이유전자의 발현을 제공할 수 있다.

- [0232] 유도성 프로모터. 일 실시양태에서, 치료 전이유전자는 T 세포의 게놈 내부의 부위에 통합되어서, 전이유전자의 발현이 유도성인 내인성 프로모터의 제어 하에 배치된다. 유도성 프로모터는 핵으로의 신호를 전파하는 유도인자에 반응성이어서, 유도성 프로모터의 활성화를 유발한다(예를 들어, 표 1 참고). 일반적으로, 유도인자는 T 세포에 의해 발현되는 분자의 결합 파트너이다. 예를 들어, 수용체의 경우에, 결합 파트너는 그의 동족 리간드일 수 있거나 CAR, CCR 또는 TCR의 경우에는 결합 파트너가 표적 항원일 수 있다.
- [0233] 일 실시양태에서, 내인성 유도성 프로모터는 T 세포의 활성화에 의해 유도된다. 일 실시양태에서, 내인성 유도성 프로모터는, 예를 들어 상응하는 항원과의 상호작용 시에, T 세포에 의해 발현되는 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 키메라 공자극 수용체(CCR)의 그의 각 결합 파트너와의 결합에 의해 유도된다. CAR 및 CCR의 보다 세부적인 설명은 치료 전이유전자를 설명하는 하기 섹션에서 제공된다. 간단하게, CAR 및 CCR 둘 다는 세포내 시그널링 도메인을 포함한다. CAR의 경우에, 세포내 시그널링 도메인은 T 세포를 활성화하고 선택적으로 공자극 도메인을 포함한다(제2 및 제3 세대 CAR의 경우)(Sadelain et al., *Cancer Discov.* 3(4):388-398 (2013) 참고). CCR의 경우에, 이것은 공자극 시그널을 포함하지만 T 세포 활성화 시그널을 갖지는 않는다(Sadelain et al., *supra*, 2013). CAR 또는 CCR로의 해당 항원의 결합은 T 세포 시그널링 도메인 및/또는 공자극 도메인의 활성화를 유발한다. 이들 시그널링 도메인의 활성화는 T 세포에서 핵으로의 시그널의 진행 및 특정 내인성 프로모터의 활성화를 유발한다. CAR 또는 CCR의 세포내 시그널링 도메인은, 비제한적으로, CD28, 4-1BB, CD27, ICOS, CD3z 등의 세포내 도메인뿐만 아니라 본원에 개시된 다른 세포내 시그널링 도메인을 포함한다. 시그널링은 또한 이들 도메인의 돌연변이된(예를 들어, 돌연변이 ITAM), 절단된 또는 융합된 버전과도 함께 발생할 수 있다.
- [0234] 다른 실시양태에서, 내인성 유도성 프로모터는 T 세포에 의해 발현되는 T 세포 수용체(TCR), CD28, CD27, 4-1BB 등의 그의 각각의 결합 파트너에 결합함으로써 유도된다. 이들 분자는 세포내 시그널링 도메인을 함유한다. 활성화 시에, 시그널링 도메인은 T 세포 내에서 핵으로의 시그널의 진행 및 특정 내인성 프로모터의 활성화를 야기한다. 다른 실시양태에서, 내인성 유도성 프로모터는 iCAR(억제성 세포내 도메인을 갖는 CAR, 예컨대 PD1, CTLA4) 또는 절단된 CAR(어떠한 세포내 도메인도 없음)의 결합에 의해 유도된다. 일 실시양태에서, iCAR은 CTLA4 또는 PD1 세포내 도메인의 시그널링을 통한 표적 접촉 후 T 세포 활성화에 대한 '브레이크'로서 기능한다. 따라서, PD1 또는 CTLA4에 의해 조절되는 프로모터는 항원과 iCAR 접촉 시에 전이유전자를 발현하기 위해서 사용될 수 있다. 예를 들어, 전이유전자는 T 세포 활성화를 추가로 제어하기 위한 면역억제성 분자일 수도 있다.
- [0235] 본 발명자들은 절단된 CAR이 T 세포를 이의 표적이 발현되는 특정 위치로 보내도록 할 것이라고 여긴다. 본 발명자들은 또한 CAR T 세포와 표적 세포 사이에 생성된 접촉이 결국 프로모터를 조절할 것이므로, 전이유전자 발현에 대해 표적화될 수 있다고 여긴다.
- [0236] 특별한 실시양태에서, CAR, CCR 또는 TCR에 의해 유도되는 프로모터는 활성화 T 세포(NFAT) 프로모터, PD-1 프로모터, TIM-3 프로모터, CTLA4 프로모터, LAG3 프로모터, TRAIL 프로모터, BTLA 프로모터, CD25 프로모터, CD69 프로모터, FasL 프로모터, TIGIT 프로모터, 및 2B4 프로모터의 핵 인자로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특별한 실시양태에서, CAR 및 TCR은 둘 다 CD3 ITAM 인산화의 시그널 경로 내에 있으며, Ca²⁺-의존성 전사 인자(예를 들어, NFAT, NFkB, AP1 또는 CREB 조절된 유전자, 예컨대 IL2)에 의해 조절되는 프로모터를 조절할 수 있다. 이러한 프로모터는 경로로부터의 시그널링 시에 발현 증가를 야기한다. 도메인에 따라 항원 접촉시에 조절되는 유전자인 CAR 및 CCR에 대해, 예를 들어 CD28 공자극 도메인으로 구성된 CAR 및 CCR은 각각 PI3K 경로에 의해 활성화되는 프로모터를 유도하는 한편, 41BB 공자극 도메인 활성화는 TRAF 경로에 의해 활성화되는 프로모터를 유도한다. 예를 들어, TCR/CD28(및 CD28 및 CD3제타로 구성된 CAR) 활성화에 대한 응답시 프로모터의 시기 적절한 조절은 전이유전자의 발현의 타이밍을 조절하기 위해 사용될 수 있다(도 17; Best et al., *Nat. Immunol.* 14:404-413 (2013) 참고). 예를 들어, CD8⁺ T 세포의 활성화 및 기억 형성 시에, 군집 1(12-24 시간)에서의 프로모터는 예를 들어, CTLA4 프로모터, IFN감마 프로모터, Gzmb 프로모터, IL2ra 프로모터, IL2 프로모터 등을 포함하고; 군집 2(12-48 시간)에서의 프로모터는 예를 들어, CD69 프로모터 및 Pkm2 프로모터 등을 포함하며; 군집 3(24 시간 내지 하루)에서의 프로모터는 예를 들어, Id2 프로모터, KLRg1 프로모터, Cxcr3 프로모터, Cxcr3r1 프로모터, Itgam 프로모터 등을 포함한다(또한, 추가의 예시적 프로모터에 대해 도 17 Best et al., *supra*, 2013 참고). 예시적 유도성 프로모터는 4-1BB 프로모터이다. 다른 예시적 유도성 프로모터는 저산소증에 대한 대사적 반응에 관여하는 HIF1알파이다.
- [0237] 다른 실시양태에서, 내인성 유도성 프로모터는 T 세포 상에 발현된 억제성 수용체와의 리간드의 결합에 의해 유

도된다. 예시적 억제성 수용체는, 비제한적으로, 수용체 프로그래밍된 사멸 1(PD-1), 세포독성 T 림프구 항원-4(CTLA-4), B- 및 T-림프구 감쇠자(BTLA), T 세포 면역글로불린 뮤신-3(TIM-3), 림프구-활성화 단백질 3(LAG-3), 종양 괴사 인자(TNF)-관련 어파토시스-유도 리간드(TRAIL, 수용체 1 및 2), Fas, Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T-세포 면역수용체(T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domain)(TIGIT), 및 2B4(CD244)를 포함한다. 이들 억제성 수용체에 대해 상응하는 리간드는 예를 들어, PD-L1(PD-1에 대해); PD-L2(PD-1에 대해); CD80, CD86(CTLA-4에 대해); HVEM(BTLA에 대해); 갈렉틴-9, HMGB1(TIM-3에 대해); MHC II(LAG-3에 대해); TRAIL(TRAIL 수용체 1 및 TRAIL 수용체 2에 대해); Fas 리간드(FasL)(Fas에 대해) 등을 포함한다(Chen et al., *Nat. Rev. Immunol.* 13(4):227-242 (2013); Tollefson et al., *J. Virol.* 75:8875-8887 (2001); Waring et al., *Immunol. Cell Biol.* 77:312-317 (1999) 참고).

[0238] 특별한 실시양태에서, 억제성 수용체와의 리간드의 결합에 의해 유도되는 프로모터는 CPT1a 프로모터 및 ATGL 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0239] 다른 실시양태에서, 내인성 유도성 프로모터는 T 세포에 의해 발현되는 사이토카인 수용체와의 사이토카인의 결합에 의해 유도된다. 일 실시양태에서, 사이토카인은 인터류킨 2(IL2), 인터류킨 7(IL7), 인터류킨 15(IL15), 및 인터류킨 21(IL21)로 이루어진 군으로부터 선택되는 면역자극성 사이토카인이다. 다른 실시양태에서, 사이토카인은 면역억제성 사이토카인, 예컨대 인터류킨 10(IL10), 형질전환 성장 인자 β (TGF β); IL4, IL9, 또는 흉선 기질 림프단백질(Thymic stromal lymphopoietin)(TSLP)이다.

[0240] 특별한 실시양태에서, 프로모터는 T-bet 프로모터, Eomes 프로모터, GATA3 프로모터, 및 CD45RA 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택되는 사이토카인에 의해 유도된다.

[0241] 다른 실시양태에서, 내인성 유도성 프로모터는 세포와 핵산의 접촉에 의해 유도된다. 특별한 실시양태에서, 핵산은 바이러스 DNA, 바이러스 RNA, 및 세포내 마이크로RNA로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 세포와 핵산의 접촉에 의해 유도되는 예시적 프로모터는, 비제한적으로, 타입 I 인터페론(IFN)(알파 및 베타)의 프로모터, IRF3 및 IRF7 전사 인자, NF κ B 및 AP-1 전사 인자, 전염증성 사이토카인(TNF-알파, IL1, IL6) 등을 포함한다.

[0242] 다른 실시양태에서, 내인성 유도성 프로모터는 대사물에 의해 유도된다. 특별한 실시양태에서, 대사물은 피루베이트, 글루타민, 베타-하이드록시부티레이트, 락테이트, 및 세린으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 이들 대사물은 T 세포 내의 대사적 변화로 번역되는 T 세포 활성화 동안 생성되거나 개시된다. 대사물에 의해 유도되는 예시적 프로모터는 c-Myc, HIF-1 α , ER α , CD98, SLC1A5, Psat1, Phgdh, psph, Mthfd2, Mthfd1, Mat2a, Mtrr, Mtr, Shmt1, Shmt2의 것들이다(Wang et al., *Immunity* 35:871-882 (2011); Chang et al., *Nat. Immunol.* 17: 364-368 (2016); Ma et al., *Cell Metab.* 25:345-357 (2017) 참고).

[0243] 다른 실시양태에서, 내인성 유도성 프로모터는 대사적 변화에 의해 유도된다. 이는 세포의 대사 상태를 지칭한다. 예를 들어, 미작극 T 세포가 에너지를 생성하기 위해 산화적 인산화에 의지할 때, 및 이들이 이펙터 T 세포로 활성화 및 분화될 때, 이들은 에너지를 생성하기 위한 해당과정으로 전환된다. 저산소증 및 낮은 pH가 또한 대사적 변화를 유도한다(Chang et al., *Nat. Immunol.* 17:364-368 (2016); McNamee et al., *Immunol. Res.* 55: 58-70 (2013)).

[0244] 특별한 실시양태에서, 대사 변화에 의해 유도된 프로모터는 PKM2 프로모터이다. PKM2 프로모터는 PKM1에 대한 것과 동일하다. PKM2는 세포가 산화적 인산화에서 해당과정으로 전환될 때 대안적 스플라이싱을 통해 생성된다.

[0245] 다른 실시양태에서, 내인성 유도성 프로모터는 이온, 예컨대 특정 이온 농도에 의해 유도된다. 일 실시양태에서, 이온은 칼륨 또는 칼슘이다. 이온에 의해 유도된 예시적 프로모터는, 비제한적으로, NFAT-의존성 방식으로 활성화되는, IL2, TNF알파, 및 IFN γ 의 프로모터이다. NFAT는 세포내 칼슘의 수준 증가에 의해 활성화된다.

[0246] 7.5 치료 전이유전자

[0247] 본 발명은 전이유전자의 발현이 T 세포의 내인성 프로모터의 제어하에 있도록 T 세포의 게놈 내의 부위에 전이유전자가 통합됨으로써 T 세포에서 치료 전이유전자를 발현시키는 것에 관한 것이다. 치료 전이유전자는 치료 단백질 또는 치료 핵산을 인코딩하는 뉴클레오타이드(예를 들어, DNA 또는 이의 변형된 형태) 서열이다. 치료 단백질 또는 치료 핵산은 T 세포에 의해 발현될 때, 인간 또는 수의과 질병 또는 질환을 치료하는데 용도를 갖는다. 치료 핵산은 바람직하게는 치료 RNA이다. 치료 단백질은 펩티드 또는 폴리펩티드일 수 있다.

[0248] 본원에 개시된 실시양태의 일 양태에서, 치료 전이유전자는 인터류킨 4(IL4)의 막-결합 형태를 인코딩하지 않는

다.

- [0249] 치료 전이유전자는, 비제한적으로, CAR, 키메라 공자극 수용체(CCR), TRC, 사이토카인, 우성 음성, 미세환경 조절자, 항체, 바이오센서, 키메라 수용체 리간드(CRL), 키메라 면역 수용체 리간드(CIRL), 가용성 수용체, 효소, 리보자임, 유전자 회로, 리포터, 후생적 개질자, 전사 활성화자 또는 억제자, 비-코딩 RNA 등을 포함한다.
- [0250] 전이유전자는 예를 들어, cDNA, 유전자, miRNA 또는 lncRNA 등을 인코딩할 수 있음이 이해된다. 또한, 전이유전자는 폴리시스트론 정보, 즉 배열된 cDNA 또는 배열된 miRNA일 수 있다. 하나의 예시적 폴리시스트론성 전이유전자는 TCR 쉐이다. 폴리시스트론 정보는 동일한 내인성 프로모터의 제어 하에서 다중 전이유전자를 발현하도록 T 세포 내에서 조작될 수 있다. 따라서, 3개의 바이시스트론성 전이유전자를 3개의 선택된 유전자좌에서 너킹(knocking)시킴으로써, 하나는 조작된 T 세포에서 6개의 유전자 산물을 발현할 수 있다. 따라서, 전이유전자의 수는 T 세포 내에서 발현될 수 있으며(소망하는 바에 따라 1, 2, 3, 4, 5, 6개 등), 각각은 별도의 내인성 프로모터의 제어 하에 있거나, 일부 전이유전자(즉, 폴리시스트론성 전이유전자)는 동일한 내인성 프로모터의 제어 하에 있다. 다중 전이유전자는 구성적 프로모터 또는 유도성 프로모터의 제어 하에서 독립적으로 배치될 수 있다. 따라서, 동일한 세포에서 다중 전이유전자를 발현하기 위해 구성적 및/또는 유도성 프로모터의 조합이 T 세포에서 사용될 수 있다.
- [0251] 구체적 실시양태에서, 전이유전자는 폴리시스트론성, 예를 들어 바이시스트론성이다. 구체적 실시양태에서, 전이유전자는 폴리시스트론성이고 하나를 초과하는 치료 단백질 또는 치료 RNA를 인코딩하며, 둘 모두의 발현은 T 세포의 동일한 내인성 프로모터의 제어 하에 있다. 구체적 실시양태에서, 전이유전자는 바이시스트론성이고 2개의 치료 단백질(예를 들어, scFv)을 인코딩하며, scFv의 발현은 둘 모두 T 세포의 동일한 내인성 프로모터의 제어 하에 있다.
- [0252] 일 실시양태에서, 치료 전이유전자는 TCR을 인코딩한다. 하나를 초과하는 폴리펩티드 쉐에서 인코딩되는 전이유전자의 경우에, 전이유전자는 하나를 초과하는 폴리뉴클레오티드로부터 발현될 수 있으며, 즉 2개의 인코딩 핵산(예를 들어, cDNA)은 T 세포에서 공동발현된다. 따라서, 다중-서브유닛 단백질이 발현되기를 소망하는 경우, 상이한 폴리펩티드 서브유닛이 상이한 전이유전자로부터 발현될 수 있으며, 즉 2개의 인코딩 뉴클레오티드 서열(예를 들어, cDNA 서열)은 상이한 내인성 T 세포 프로모터에 의해 조절되는 상이한 전이유전자로부터의 T 세포에서 공동발현된다. 일 실시양태에서, TCR의 α 및 β 쉐가 발현된다.
- [0253] 키메라 항원 수용체(CAR). 키메라 항원 수용체(CAR)는 본 발명의 치료 전이유전자에 의해 인코딩되는 예시적 산물이다. 본 발명의 세포에 의해 재조합적으로 발현된 CAR은 항원에 결합하는 항원 결합 도메인을 갖는다. 상기 항원은 대상에 존재하거나 T 세포가 투여되는 대상에서 방지되기를 소망하는 질병 또는 질환과 연관되어 있다.
- [0254] 구체적 실시양태에서, CAR은 "제1 세대", "제2 세대" 또는 "제3 세대" CAR일 수 있다(예를 들어, Sadelain et al., *Cancer Discov.* 3(4):388-398 (2013); Jensen et al., *Immunol. Rev.* 257:127-133 (2014); Sharpe et al., *Dis. Model Mech.* 8(4):337-350 (2015); Brentjens et al., *Clin. Cancer Res.* 13:5426-5435 (2007); Gade et al., *Cancer Res.* 65:9080-9088 (2005); Maher et al., *Nat. Biotechnol.* 20:70-75 (2002); Kershaw et al., *J. Immunol.* 173:2143-2150 (2004); Sadelain et al., *Curr. Opin. Immunol.* (2009); Hollyman et al., *J. Immunother.* 32:169-180 (2009) 참고).
- [0255] "제1 세대" CAR은 전형적으로 T 세포 수용체 쉐의 세포질/세포내 도메인에 융합되는, 경막(transmembrane) 도메인에 융합된 세포의 항원 결합 도메인, 예를 들어 단일쇄 가변 단편(scFv)으로 구성된다. "제1 세대" CAR은 전형적으로 내인성 T 세포 수용체(TCR)로부터의 시그널의 1차 전송자인, CD3 ξ -쉐로부터의 세포내 도메인을 갖는다(도 1a의 예시적 제1 세대 CAR 참고). "제1 세대" CAR은 HLA-매개 항원 제시와 독립적으로, 단일 융합 분자에서 CD3 ξ 쉐 시그널링 도메인을 통해 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 둘 다의 활성화를 야기하고, 드 노보 항원 인식을 제공한다. 본 발명에서 사용하기 위한 "제2 세대" CAR은 T 세포를 활성화시킬 수 있는 세포내 시그널링 도메인 및 T 세포 성능 및 지속성을 증가시키도록 설계된 공자극 도메인에 융합된 항원-결합 도메인을 포함한다(Sadelain et al., *Cancer Discov.* 3:388-398 (2013)). 따라서, CAR 설계는 2개의 별도 복합체인 TCR 헤테로2량체 및 CD3 복합체에 의해 생리학적으로 보유되는 2개의 기능인 항원 인식과 시그널 형질도입을 조합할 수 있다. "제2 세대" CAR은 CAR의 세포질 꼬리에 다양한 공자극 분자, 예를 들어 CD28, 4-1BB, ICOS, OX40 등으로부터의 세포내 도메인을 포함하여, 세포에 대한 추가 시그널을 제공한다(도 1a의 예시적 제2 세대 CAR 참고). "제2 세대" CAR은 예를 들어, CD28 또는 4-1BB 도메인에 의한 공자극, 및 예를 들어, CD3 ξ 시그널링 도메인에 의한 활성화 둘 다를 제공한다. 임상전 연구는 "제2 세대" CAR이 T 세포의 항-종양 활성을 개선할 수 있음을 나타내었다. 예를 들어, "제2 세대" CAR 변형된 T 세포의 강한 효능은 만성 림프아구성 백혈병(CLL) 및 급성 림프아구성 백혈

병(ALL)을 앓는 환자에서 CD19 분자를 표적화하는 임상 시험에서 입증되었다(Davila et al., *Oncoimmunol.* 1(9):1577-1583 (2012)). "제3 세대" CAR은 예를 들어, CD28 및 4-1BB 도메인 둘 다를 포함함으로써 다중 공 자극을, 또한 예를 들어, CD3 ξ 활성화 도메인을 포함함으로써 활성화를 제공한다.

[0256] 본원에 개시된 실시양태에서, CAR은 일반적으로 상기 개시된 바와 같은 세포의 항원 결합 도메인, 경막 도메인 및 세포내 도메인을 포함하며, 상기 세포의 항원 결합 도메인은 관심 항원, 예컨대 암 항원 또는 감염성 병원균의, 또는 자가면역 질환의, 또는 이식된 조직의 항원에 결합한다. 특별한 비제한적 실시양태에서, 세포의 항원-결합 도메인은 scFv이다.

[0257] 상기 개시된 바와 같이, 본 발명의 방법은 CAR을 발현하도록 조작된 세포를 투여하는 것을 포함한다. CAR의 세포의 항원-결합 도메인은 보통 단일클론성 항체(mAb) 또는 수용체 또는 이의 리간드로부터 유래된다.

[0258] CAR의 설계는 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, Sadelain et al., *Cancer Discov.* 3(4):388-398 (2013); Jensen et al., *Immunol. Rev.* 257:127-133 (2014); Sharpe et al., *Dis. Model Mech.* 8(4):337-350 (2015), 및 이에 인용된 참고문헌의 검토를 참고). 소망하는 항원에 대해 지향된 CAR은 본원에 개시된 것들을 비롯하여, CAR을 설계하기 위해 잘 알려진 방법을 사용하여 생성될 수 있다. CAR은 제1, 제2 또는 제3 세대 CAR이든지, 표적 항원 결합 활성, 예를 들어 암 항원 결합 활성, 예컨대 항원에 대해 지향된 scFv 항체를 면역 세포 시그널링 도메인, 예컨대 T 세포 수용체 세포질/세포내 도메인에 융합함으로써 용이하게 설계될 수 있다. 상기 개시된 바와 같이, CAR은 일반적으로 T 세포에서 세포 시그널링 활성을 갖는 세포내 도메인에 융합되는, 경막 도메인에 융합된 세포의 도메인의 적어도 일부로서 scFv와 같은 항원 결합 활성을 갖는 세포 표면 수용체의 구조를 갖는다. CAR은 본원에 개시된 바와 같은 공 자극 분자를 포함할 수 있다. 당업자는 T 세포에서 소망하는 시그널링 용량을 제공하기 위해 본원에 개시되고 당업계에 알려진 바와 같은 적절한 경막 도메인, 및 세포내 도메인을 용이하게 선택할 수 있다.

[0259] 본 발명에서 사용하기 위한 CAR은 항원에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 세포의 도메인을 포함한다. 구체적인 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 표적 암 세포 또는 조직 상의 항원에 결합한다. 이러한 항원 결합 도메인은 일반적으로 항체로부터 유래된다. 일 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 scFv 또는 Fab, 또는 항체의 임의의 적합한 항원 결합 단편일 수 있다(Sadelain et al., *Cancer Discov.* 3:38-398 (2013) 참고). 항원, 예컨대 암 항원에 결합하는 항체로부터 유래된 많은 항체 또는 항원 결합 도메인이 당업계에 알려져 있다. 대안적으로, 이러한 항체 또는 항원 결합 도메인은 일상적 방법에 의해 생산될 수 있다. 단일클론 항체를 생산하거나 인간 Fab의 라이브러리를 스크리닝하는 것을 비롯하여, 항원 결합 폴리펩티드를 얻기 위해 라이브러리를 스크리닝하는 방법을 포함하는, 항체를 생성하는 방법이 당업계에 잘 알려져 있다(Winter and Harris, *Immunol. Today* 14:243-246 (1993); Ward et al., *Nature* 341:544-546 (1989); Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); Hilyard et al., *Protein Engineering: A practical approach* (IRL Press 1992); Borrabeck, *Antibody Engineering*, 2nd ed. (Oxford University Press 1995); Huse et al., *Science* 246:1275-1281 (1989)). CAR에 대해, 항체로부터 유래된 항원 결합 도메인은 소망하는 바와 같은 인간, 인간화, 키메라, CDR-이식 등일 수 있다. 예를 들어, 마우스 단일클론성 항체가 CAR의 항원 결합 도메인을 생성하기 위한 공급 항체인 경우, 이러한 항체는 인간 프레임워크 상에 마우스 항체의 CDR을 이식함으로써 인간화될 수 있으며(Borrabeck, *supra*, 1995 참고), 이는 인간 대상에게 CAR을 투여하기 위해 유익할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 scFv이다. scFv의 생성은 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, Huston, et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988); Ahmad et al., *Clin. Dev. Immunol.* 2012: ID980250 (2012); 미국 특허 제5,091,513호, 제5,132,405호 및 제4,956,778호; 및 미국 특허 공개공보 제20050196754호 및 제20050196754호 참고).

[0260] 항원 결합 활성을 얻는 것에 관하여, 당업자는 CAR에서 특히 유용한, 항원에 결합하는 scFv의 생성을 포함하여, 본원에 개시된 바와 같은 소망하는 항원에 결합하는 항체에 대한 생성 및 스크리닝을 위하여 잘 알려진 방법 중 임의의 것을 사용하여, 적합한 항원 결합 활성, 예컨대 항체를 용이하게 얻을 수 있다. 또한, 다수의 항원 항체, 특히 단일클론성 항체, 예컨대 암 항원 또는 다른 항원은 상업적으로 입수가능하며, 또한 scFv와 같은 항원 결합 활성을 위한 공급원으로서 사용되어, CAR을 생성할 수 있다.

[0261] 대안적으로, 항체로부터 유래된 항원 결합 도메인을 사용하기 위해, CAR 세포의 도메인은 수용체의 리간드 또는 세포의 리간드 결합 도메인을 포함할 수 있다(Sadelain et al., *Cancer Discov.* 3:388-398 (2013); Sharpe et al., *Dis. Model Mech.* 8:337-350 (2015) 참고). 이 경우에, 수용체의 리간드 또는 세포의 리간드 결합 도메인은 CAR을 발현하는 세포를 상응하는 수용체 또는 리간드에 대해 표적화하는 능력을 CAR에게 제공한다. 구체적인

실시양태에서, 리간드 또는 세포의 리간드 결합 도메인은 CAR을 발현하는 세포가 암 세포 또는 종양에 대해 표적화되도록 선택된다(Sadelain et al., *Cancer Discov.* 3:388-398 (2013); Sharpe et al., *Dis. Model Mech.* 8:337-350 (2015), 및 이에 인용된 참고문헌 참고). 본 발명의 실시양태에서, 리간드 또는 세포의 리간드 결합 도메인은 상응하는 수용체 또는 리간드인 항원에 결합하기 위해 선택된다(Sadelain et al, *Cancer Discov.* 3:388-398 (2013) 참고).

[0262] 항원에 대해 지향된 CAR에 대해, CAR의 항원 결합 도메인은 표적 항원(표적 세포 상에 발현된 항원)에 결합하기 위해 선택된다. 이러한 표적 항원은 표적 세포 상에 독특하게 발현되거나, 표적 항원은 비-표적 세포 또는 조직에 비하여 표적 세포에서 과잉발현될 수 있다. CAR에 의해 결합되는 표적 항원은 비-표적 세포 또는 조직에 대하여 CAR을 발현하는 세포의 표적화를 제공하기 위해 선택된다. 바람직한 실시양태에서, 암 항원에 대해 지향된 CAR에 대하여, CAR의 항원 결합 도메인은 암 세포 상에 발현된 항원에 결합하기 위해 선택된다. 이러한 암 항원은 암 세포 상에 독특하게 발현되거나, 비암성 세포 또는 조직에 비하여 암 세포에서 과잉발현될 수 있다. CAR에 의해 결합되는 암 항원은 비암성 세포 또는 조직에 대하여 CAR을 발현하는 세포의 표적화를 제공하기 위해 선택된다. 암을 치료하기 위한 본 발명의 방법의 일 실시양태에서, T 세포는 세포에서 본원에 개시된 바와 같은 환자의 암에 적합한 암 항원에 결합하는 CAR을 발현함으로써 암 환자를 치료하도록 설계된다. 유사하게는, CAR이 감염성 질환 병원균, 또는 자가면역 질환, 또는 이식된 조직의 항원을 표적화하기 위해 사용되는 경우, 항원은 비-표적 조직 또는 비-표적 부위에 비하여 표적 상에서 또는 표적 부위에서 독특하게 발현되거나 과잉발현될 수 있다.

[0263] 암 항원은 종양 항원일 수 있다. 임의의 적합한 암 항원은 치료되는 대상(암 환자)에 의해 나타나는 암의 유형을 기초로 하여 선택될 수 있다. 선택된 암 항원은 암 항원이 CAR에 의한 결합을 위해 접근할 수 있는 방식으로 발현된다는 점이 이해된다. 일반적으로, CAR을 발현하는 세포에 의해 표적화되는 암 항원은 암 세포의 세포 표면 상에서 발현된다. 그러나, CAR에 결합하기 위해 접근할 수 있는 임의의 암 항원은 암 세포에 대해 CAR 발현 세포를 표적화하기 위해 적합하다는 점이 이해된다. 예시적 암 항원 및 예시적 암은 하기 표 3에서 제공된다.

표 3

표 3. 표적화된 암 항원 및 상응하는 암 표적.

표적화된 항원	조사된 종양	참고
B7-H3 <i>CD276</i>	흑색종 및 신경아세포종	(1)
B7-H6 <i>Nkp30</i>	난소 및 여러 고형암	(2-4)
CAIX 탄산 무수화효소 IX	신세포암	(5)
CEA 암배 항원	결장암으로부터의 간 전이, 결장, 췌장, 위 및 폐암	(6-20)
CSPG4 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸4	흑색종, 중피종, 교모세포종, 골육종, 유방, 두경부암	(21-24)
DNAM-1 DNAX부속 분자	흑색종	(25)
EpHA2 에프린 타입 A 수용체 2	교모세포종 및 폐암	(26, 27)
EpCAM 상피세포 부착 분자	전립선암	(28, 29)
ERBB 부류	두경부 및 유방암	(30, 31)
ERBB2	전립선, 유방, 난소 및 췌장암, 교모세포종, 수모세포종, 골육종, 유잉 육종, 신경외배엽 종양, 결합조직성 소원형세포종양 및 섬유육종	(32-48)
EGFRvIII 표피 성장 인자 수용체 vIII	신경교종/교모세포종	(49-56)
FAP 섬유아세포 연관 단백질	폐암, 중피종, 유방 및 췌장암에서의 종양 연관 섬유아세포	(27, 57-59)
FRα and β 엽산 수용체	난소암	(60-64)
GD2 다시알로강글리오시드	신경아세포종, 유잉 육종, 흑색종	(65-71)
GD3	흑색종 및 다른 신경외배엽 종양	(72, 73)
Gp100/HLA-A2	흑색종	(74, 75)
GPC3 글리피칸 3	간세포암종	(76)
HERK-V	흑색종	(77)
MAGE-1/HLA-A1 흑색종 항원 E	흑색종	(78, 79)
IL-11Rα	골육종	(80)
IL-13Rα2	신경교종/교모세포종 수모세포종	(81-87)
Lewis-Y	난소	(88) (89, 90)
LMP1 내재막 단백질 1	비인두암	(91)
L1-CAM <i>CD271 L1-세포 부착 분자</i>	교모세포종, 신경아세포종, 난소, 폐 및 신장암종	(92, 93)
Muc-1 뮤신-1	전립선 및 유방암	(43, 94-96)
Muc-16 뮤신-16	난소암	(97, 98)
MSLN	난소, 중피종, 폐암	(99-107)

[0264]

메소텔린		
N-cam CD56 신경 세포-분화 분자1	신경아세포종	(108)
NKG2DL NKG2D 리간드	난소	(109, 110)
PSCA 전립선 줄기 세포 항원	전립선암	(111-113)
PSMA 전립선 특이적 막 항원	전립선	(114-117)
ROR1 수용체 티로신 키나제-유사 회귀 수용체	상피 고정 종양	(117, 118)
TAG72 종양 연관 당단백질 72	위장, 결장 및 유방암	(119-122)
TRAIL R 트레일 수용체	다양한 유형의 암	(123)
VEGFR2 혈관 내피 성장 인자 수용체-2	종양 관련 혈관	(124-127)
CD166 CCR4 Lewis A NYESO CD19	폐암 (Teicher, Biochemical Pharmacology, 2014); T regs (Sugiyama et al. PNAS 2014); 췌장암 (Tempero et al. Cancer Research, 1987); 다발성 암 (Nicholaou et al. Imm & Cell Biol 2006); 백혈병 CD166 (Teicher B.A., Biochemical Pharmacology, 87(2):211-9 (2014)); CCR (Sugiyama D., Proc Natl Acad Sci U.S.A., 110(44):17945-50 (2013)); Lewis A (Tempero M.A., Cancer Res, 47(20):5501-3 (1987)); NY-ESO-1 (Nicholaou et al., Immunol Cell Biol., 84: 303-17 (2006)); CD19 (Sadelain M., J Clin Invest., 125:3392-400 (2015))	

1. Cheung et al., *Hybrid Hybridomics*, 22:209-18 (2003); 2. Zhang et al., *J Immunol.*, 189:2290-9 (2012); 3. Wu et al., *Gene Ther.*, 22:675-684 (2015); 4. Wu et al., *J Immunol.*, 194:5305-11 (2015); 5. Lamers et al., *Mol Ther.*, 21:904-12 (2013); 6. Darcy et al., *Eur J Immunol.*, 28:1663-72 (1998); 7. Nolan et al., *Clin Cancer Res.*, 5:3928-41 (1999); 8. Darcy et al., *J Immunol.*, 164:3705-12 (2000); 9. Hombach et al., *Gene Ther.*, 6:300-4 (1999); 10. Haynes et al., *J Immunol.*, 166:182-7 (2001); 11. Haynes et al., *J Immunol.*, 169:5780-6 (2002); 12. Schirrmann et al., *Cancer Gene Ther.*, 9:390-8 (2002); 13. Arakawa et al., *Anticancer Res.*, 2002;22:4285-9. 14. Gyobu et al., *Cancer Res.*, 64:1490-5 (2004); 15. Shibaguchi et al., *Anticancer Res.*, 26:4067-72 (2006); 16. Emtage et al., *Clin Cancer Res.* 14:8112-22 (2008); 17. Chmielewski et al., *Gastroenterology*, 143:1095-107 e2 (2012); 18. Chmielewski et al., *Gene Ther.*, 20:177-86 (2013); 19. Burga et al., *Cancer Immunol Immunother.*, 64:817-29 (2015); 20. Katz et al., *Clin Cancer Res.*, 21:3149-59 (2015); 21. Beard et al., *J Immunother Cancer*, 2:25 (2014); 22. Burns et al., *Cancer Res.*, 70:3027-33 (2010); 23. Geldres et al., *Clin Cancer Res.*, 20:962-71 (2014); 24. Schmidt et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108:2474-9(2011); 25. Wu et al., *Cancer Immunol Immunother.*, 64:409-18 (2015); 26. Chow et al., *Mol Ther.*, 21:629-37 (2013); 27. Kakarla et al., *Mol Ther.*, 21:1611-20 (2013); 28. Shirasu et al., *J Biomed Biotechnol.*, 2012:853879 (2012); 29. Deng et al., *BMC Immunol.*, 16:1 (2015); 30. Davies et al., *Mol Med.*, 18:565-76 (2012); 31. Papa et al., *Methods Mol Biol.*, 1317:365-82

[0265]

(2015); 32. Stancovski et al., *J Immunol.*, 151:6577-82 (1993); 33. Moritz et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91:4318-22 (1994); 34. Haynes et al., *Cancer Immunol Immunother.*, 47:278-86 (1999); 35. Pinthus et al., *Cancer Res.*, 63:2470-6 (2003); 36. Ahmed et al., *Cancer Res.*, 67:5957-64 (2007); 37. Li et al., *Cancer Gene Ther.*, 15:382-92 (2008); 38. Wang et al., *Clin Cancer Res.*, 15:943-50 (2009); 39. Ahmed et al., *Mol Ther.*, 17:1779-87 (2009); 40. Zhao et al., *J Immunol.*, 183:5563-74 (2009); 41. Ahmed et al., *Clin Cancer Res.*, 16:474-85 (2010); 42. Duong et al., *Immunotherapy*, 3:33-48 (2011); 43. Wilkie et al., *J Clin Immunol.*, 32:1059-70 (2012); 44. Lanitis et al., *PLoS One*, 7:e49829 (2012); 45. Maliar et al., *Gastroenterology*, 143:1375-84 e1-5 (2012); 46. Rainusso et al., *Cancer Gene Ther.*, 19:212-7 (2012); 47. Sun et al., *Breast Cancer Res.*, 16:R61 (2014); 48. Ahmed et al., *J Clin Oncol.*, 33:1688-96 (2015); 49. Ohno et al., *Cancer Sci.*, 101:2518-24 (2010); 50. Morgan et al., *Hum Gene Ther.*, 23:1043-53 (2012); 51. Choi et al., *J Clin Neurosci.*, 21:189-90 (2014); 52. Ohno et al., *J Immunother Cancer*, 1:21 (2013); 53. Shen et al., *J Hematol Oncol.*, 6:33 (2013); 54. Sampson et al., *Clin Cancer Res.*, 20:972-84 (2014); 55. Miao et al., *PLoS One*, 9:e94281 (2014); 56. Johnson et al., *Sci Transl Med.*, 7:275ra22 (2015); 57. Petrausch et al., *BMC Cancer*, 12:615 (2012); 58. Schubert et al., *J Transl Med.*, 11:187 (2013); 59. Wang et al., *Cancer Immunol Res.*, 2:154-66 (2014); 60. Parker et al., *Hum Gene Ther.*, 11:2377-87 (2000); 61. Kershaw et al., *Clin Cancer Res.*, 12:6106-15 (2006); 62. Song et al., *Cancer Res.*, 71:4617-27 (2011); 63. Kandalaft et al., *J Transl Med.*, 10:157 (2012); 64. Song et al., *Oncotarget*, (2015); 65. Krause et al., *J Exp Med.*, 188:619-26 (1998); 66. Rossig et al., *Int J Cancer*, 94:228-36 (2001); 67. Pule et al., *Nat Med.*, 14:1264-70 (2008); 68. Yvon et al., *Clin Cancer Res.*, 15:5852-60 (2009); 69. Louis et al., *Blood*, 118:6050-6 (2011); 70. Kailayangiri et al., *Br J Cancer*, 106:1123-33 (2012); 71. Singh et al., *Cancer Immunol Res.*, 2:1059-70 (2014); 72. Yun et al., *Neoplasia*, 2:449-59 (2000); 73. Lo et al., *Clin Cancer Res.*, 16:2769-80 (2010); 74. Zhang et al., *Immunol Cell Biol.*, 91:615-24 (2013); 75. Zhang et al., *Sci Rep.*, 4:3571 (2014); 76. Gao et al., *Clin Cancer Res.*, 20:6418-28 (2014); 77. Krishnamurthy et al., *Clin Cancer Res.*, 21:3241-51 (2015); 78. Willemsen et al., *Gene Ther.*, 8:1601-8 (2001); 79. Willemsen et al., *J Immunol.*, 174:7853-8 (2005); 80. Huang et al., *Cancer Res.*, 72:271-81 (2012); 81. Stastny et al., *J Pediatr Hematol Oncol.*, 29:669-77 (2007); 82. Chang et al., *Cytotherapy*, 9:771-84 (2007); 83. Lazovic et al., *Clin Cancer Res.*, 14:3832-9 (2008); 84. Kong et al., *Clin Cancer Res.*, 18:5949-60 (2012); 85. Hegde et al., *Mol Ther.*, 21:2087-101 (2013); 86. Krebs et al., *Cytotherapy*, 16:1121-31 (2014); 87. Brown et al., *Clin Cancer Res.*, (2015); 88. Westwood et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102:19051-6 (2005); 89. Westwood et al., *J Immunother.*, 32:292-301 (2009); 90. Neeson et al., *Gene Ther.*, 17:1105-16 (2010); 91. Tang et al., *J Biomed Res.*, 28:468-75 (2014); 92. Park et al., *Mol Ther.*, 15:825-33 (2007); 93. Hong et al., *J Immunother.*, 37:93-104 (2014); 94. Wilkie et al., *J Immunol.*, 180:4901-9 (2008); 95. Bakhtiari et al., *Hybridoma (Larchmt.)*, 28:85-92 (2009); 96. Sanchez et al., *Prostate Cancer Prostatic Dis.*, 16:123-31, S1 (2013); 97. Chekmasova et al., *Discov Med.*, 9:62-70 (2010); 98. Koneru et al., *Oncoimmunology*, 4:e994446 (2015); 99. Carpenito et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106:3360-5 (2009); 100. Zhao et al., *Cancer Res.*, 70:9053-61 (2010); 101. Lanitis et al., *Mol Ther.*, 20:633-43 (2012); 102. Riese et al., *Cancer Res.*, 73:3566-77 (2013); 103. Moon et al., *Clin Cancer Res.*, 20:4262-73 (2014); 104. Guedan et al., *Blood*, 124:1070-80 (2014); 105. Beatty, *Oncoimmunology*, 3:e28327 (2014); 106. Adusumilli et al., *Sci Transl Med.*, 6:261ra151 (2014); 107. Wang et al., *Cancer Immunol Res.*, 3:815-26 (2015); 108. Gilham et al., *J Immunother.*, 25:139-51 (2002); 109. Barber et al., *J Immunol.*, 183:6939-47 (2009); 110. Song et al., *Hum Gene Ther.*, 24:295-305 (2013); 111. Morgenroth et al., *Prostate*, 67:1121-31 (2007); 112.

[0266]

Hillerdal et al., *BMC Cancer*, 14:30 (2014); 113. Abate-Daga et al., *Hum Gene Ther.*, 25:1003-12 (2014); 114. Maher et al., *Nat Biotechnol.*, 20:70-5 (2002); 115. Ma et al., *Prostate*, 61:12-25 (2004); 116. Gade et al., *Cancer Res.*, 65:9080-8 (2005); 117. Hudecek et al., *Clin Cancer Res.*, 19:3153-64 (2013); 118. Deniger et al., *PLoS One*, 10:e0128151 (2015); 119. Hombach et al., *Gastroenterology*, 113:1163-70 (1997); 120. McGuinness et al., *Hum Gene Ther.*, 10:165-73 (1999); 121. Patel et al., *Cancer Gene Ther.*, 7:1127-34 (2000); 122. Sharifzadeh et al., *Cancer Lett.*, 334:237-44 (2013); 123. Kobayashi et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, 453:798-803 (2014); 124. Chinnasamy et al., *Clin Cancer Res.*, 18:1672-83 (2012); 125. Kanagawa et al., *Cancer Gene Ther.*, 20:57-64 (2013); 126. Chinnasamy et al., *Cancer Res.*, 73:3371-80 (2013); 127. Wang et al., *Gene Ther.*, 20:970-8 (2013); 128. Ordonez, *Am J Surg Pathol.*, 27:1418-28 (2003); 129. Dennis et al., *Clin Cancer Res.*, 11:3766-72 (2005); 130. Alvarez et al., *Nanomedicine*, 4:295-301 (2008); 131. Rizk et al., *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 21:482-6 (2012); 132. Ordonez, *Mod Pathol.*, 16:192-7 (2003); 133. Frierson et al., *Hum Pathol.*, 34:605-9 (2003); 134. Tchou et al., *Breast Cancer Res Treat.*, 33:799-804 (2012); 135. Parinyanitikul et al., *Clin Breast Cancer*, 13:378-84 (2013); 136. Wang et al., *J Int Med Res.*, 40:909-16 (2012); 137. Li et al., *Breast Cancer Res Treat.*, 147:675-84 (2014); 138. Ordonez et al., *Hum Pathol.*, 45:1529-40 (2014); 139. Tozbikian et al., *PLoS One*, 9:e114900 (2014); 140. Bayoglu et al., *Biomed Pharmacother.*, 70:190-5 (2015); 141. Einama et al., *Br J Cancer*, 107:137-42 (2012); 142. Baba et al., *J Surg Oncol.*, 105:195-9 (2012); 143. Ito et al., *Oncol Rep.*, 31:27-33 (2014); 144. Hassan et al., *Am J Clin Pathol.*, 124:838-45 (2005); 145. Yu et al., *J Cancer*, 1:141-9 (2010); 146. Kawamata et al., *Int J Oncol.*, 41:2109-18 (2012); 147. Nomura et al., *Int Surg.*, 98:164-9 (2013); 148. Argani Pedram et al., *Clin Cancer Res.*, 7:3862-8 (2001); 149. Swierczynski et al., *Hum Pathol.*, 35:357-66 (2004); 150. Inami et al., *Oncol Rep.*, 20:1375-80 (2008); 151. Frank et al., *Am J Clin Pathol.*, 142:313-9 (2014); 152. Scales et al., *Mol Cancer Ther.*, 13:2630-40 (2014); 153. Liebig et al., *Cancer Lett.*, 223:159-67 (2005); 154. Kawamata et al., *J Gastroenterol.*, 49:81-92 (2014); 155. Miettinen et al., *Am J Surg Pathol.*, 27:150-8 (2003); 156. Ordonez, *Am J Surg Pathol.*, 27:1031-51 (2003); 157. Ordonez, *Mod Pathol.*, 19:417-28 (2006); 158. Kushitani et al., *Pathol Int.*, 57:190-9 (2007); 159. Pu et al., *Diagn Cytopathol.*, 36:20-5 (2008); 160. Kachala et al., *Clin Cancer Res.*, 20:1020-8 (2014); 161. Anish et al., *Oncotarget*, (2015); 162. Pan et al., *Hum Pathol.*, 34:1155-62 (2003); 163. Yuanbin et al., *2014 ASCO Annual Meeting*, (2014); 164. Ordonez, *Hum Pathol.*, 35:697-710 (2004); 165. Galloway et al., *Histopathology*, 48:767-9 (2006); 166. Roe et al., *Lung Cancer*, 61:235-43 (2008); 167. Tan et al., *Hum Pathol.*, 41:1330-8 (2010); 168. Servais et al., *Clin Cancer Res.*, 18:2478-89 (2012); 169. Drapkin et al., *Hum Pathol.*, 35:1014-21 (2004); 170. Rosen et al., *Gynecol Oncol.*, 99:267-77 (2005); 171. Hassan et al., *Appl Immunohistochem Mol Morphol.*, 13:243-7 (2005); 172. Cao et al., *Int J Gynecol Pathol.*, 24:67-72 (2005); 173. Yen et al., *Clin Cancer Res.*, 12:827-31 (2006); 174. Dainty et al., *Gynecol Oncol.*, 105:563-70 (2007); 175. Obulhasim et al., *Eur J Gynaecol Oncol.*, 31:63-71 (2010).

[0267]

[0268]

적합한 암 항원은, 비제한적으로, 메소텔린(MSLN), 전립선 특이적 막 항원(PSMA), 전립선 줄기 세포 항원(PCSA), 탄산 무수화효소 IX(CAIX), 암배 항원(CEA), CD5, CD7, CD10, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD34, CD38, CD41, CD44, CD49f, CD56, CD74, CD123, CD133, CD138, 상피 당단백질2(EGP 2), 상피 당단백질-40(EGP-40), 상피세포 부착 분자(EpCAM), 염산-결합 단백질(FBP), 태아 아세틸콜린 수용체(AChR), 염산 수용체- α 및 β (FR α 및 β), 강글리오시드 G2(GD2), 강글리오시드 G3(GD3), 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER-2/ERB2), 표피 성장 인자 수용체 vIII (EGFRvIII), ERB3, ERB4, 인간 텔로머라제 역전사효소(hTERT), 인터류킨-13 수용체 서브유닛 알파-2(IL-13R α 2), κ -경쇄, 키나제 삽입 도메인 수용체(KDR), Lewis A(CA19.9), Lewis Y(LeY), L1 세포 부착 분자(L1CAM), 흑색종-관련 항원 1(흑색종 항원 부류 A1, MAGE-A1), 뮤신 16(Muc-16), 뮤신 1(Muc-1), NKG2D 리간드, 고환암 항원 NY-ESO-1, 종양태아 항원(h5T4), 종양-연관 당단백질 72(TAG-72), 혈관 내피 성장 인자 R2(VEGF - R2), 윌름스(Wilms) 종양 단백질(WT-1), 타입 1 티로신-단백질 키나제 경막 수용체(ROR1), B7-H3(CD276), B7-H6(Nkp30), 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸-4(CSPG4), DNAX 부속 분자(DNAM-1), 에프린 타입 A 수용체 2(EpHA2), 섬유아세포 연관 단백질(FAP), Gp100/HLA-A2, 글리피칸 3(GPC3), HA-1H, HERK-V, IL-11R α , 내재막 단백질 1(LMP1), 신경 세포-부착 분자(N-CAM/CD56), 및 트레일 수용체(TRAIL R)를 포함한다. 이들 또는 다른 암 항원은 암 항원 CAR에 의해 표적화하기 위해 사용될 수 있음이 이해된다.

[0269]

상기 개시된 바와 같이, CAR은 또한 CAR을 발현하는 T 세포에서 작용하는 시그널링 도메인을 함유한다. 이러한 시그널링 도메인은 예를 들어, CD ζ 또는 Fc 수용체 γ 로부터 유래될 수 있다(Sadelain et al., *Cancer Discov.* 3:288-298 (2013) 참고). 일반적으로, 시그널링 도메인은 형질도입된 T 세포, 또는 이의 전구체 세포에서 지속성, 수송 및/또는 이펙터 기능을 유도할 것이다(Sharpe et al., *Dis. Model Mech.* 8:337-350 (2015); Finney et al., *J. Immunol.* 161:2791-2797 (1998); Krause et al., *J. Exp. Med.* 188:619-626 (1998)). CD ζ 또는 Fc 수용체 γ 의 경우에, 시그널링 도메인은 각각의 폴리펩티드의 세포내 도메인, 또는 시그널링을 위해 충분한 세포내 도메인의 단편에 상응한다. 예시적 시그널링 도메인이 하기에서 더욱 상세히 개시된다.

[0270]

예시적 폴리펩티드는 젠뱅크 번호, GI 번호 및/또는 서열 번호를 참고하여 본원에 개시된다. 당업자는 비제한적으로, 젠뱅크(ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) 및 EMBL(embl.org/)을 포함하여, 서열 공급원을 참고하여 상동성 서

열을 용이하게 확인할 수 있다.

[0271]

CD ζ . 비제한적 실시양태에서, CAR은 CD ζ 폴리펩티드로부터 유래된 시그널링 도메인, 예를 들어 T 세포를 활성화시키거나 자극할 수 있는 CD ζ 의 세포내 도메인으로부터 유래된 시그널링 도메인을 포함할 수 있다. CD ζ 는 3면역-수용체-티로신-게-활성화-모티프(ITAM)를 포함하고, 항원이 결합된 후에, 세포, 예를 들어 T 세포와 같은 림프구 혈통의 세포에 활성화 시그널을 전송한다. CD ζ 폴리펩티드는 젠뱅크 번호 NP_932170(GI:37595565; 하기 참고)을 갖는 서열에 상응하는 아미노산 서열, 또는 이의 단편을 가질 수 있다. 일 실시양태에서, CD ζ 폴리펩티드는 하기 제공되는 CD ζ 폴리펩티드 서열의 아미노산 52 내지 164의 아미노산 서열, 또는 시그널링 활성을 위해 충분한 이의 단편을 갖는다. CD ζ 내의 도메인, 예를 들어 시그널 펩티드, 아미노산 1 내지 21; 세포의 도메인, 아미노산 22 내지 30; 경막 도메인, 아미노산 31 내지 51; 세포내 도메인, 아미노산 52 내지 164에 대한 참고를 위해 젠뱅크 NP_932170를 참고한다. "CD ζ 핵산 분자"는 CD ζ 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다.

```
1   MKWKALFTAA ILQAQLPITE AQSFGLLDPK LCYLLDGILF IYGVILTALF LRVKFSRSAD
61  APAYQQGQNO LYNELNLGRR EYDVLDKRR GRDPEMGKPK QRRKNPQEGY YNELQKDKMA
121 EAYSEIGMKG ERRRGKGHDG LYQGLSTATK DTYDALHMQA LPPR (NP_932170; 서열
번호 16)
```

[0272]

[0273]

특정 비제한적 실시양태에서, CAR의 세포내 도메인은 적어도 하나의 공자극 시그널링 도메인을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 공자극 시그널링 도메인은 T 세포의 증가된 활성화를 제공할 수 있다. 공자극 시그널링 도메인은 CD28 폴리펩티드, 4-1BB 폴리펩티드, OX40 폴리펩티드, ICOS 폴리펩티드, DAP10 폴리펩티드, 2B4 폴리펩티드 등으로부터 유래될 수 있다. 4-1BB, ICOS 또는 DAP-10을 포함하는 공자극 시그널링 영역을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 CAR은 이전에 개시되었다(본원에 참고로 포함되고, 또한 4-1BB, ICOS 및 DAP-10에 대한 대표적인 서열을 개시하는 미국 특허 제7,446,190호 참고). 일부 실시양태에서, CAR의 세포내 도메인은 2개의 공자극 분자, 예컨대 CD28 및 4-1BB(Sadelain et al., *Cancer Discov.* 3(4):388-398 (2013) 참고), 또는 CD28 및 OX40, 또는 본원에 개시된 바와 같은 공자극 리간드의 다른 조합을 포함하는 공자극 시그널링 영역을 포함할 수 있다.

[0274]

CD28. 분화 클러스터 28(CD28)은 T 세포 활성화 및 생존을 위해 공자극 시그널을 제공하는 T 세포 상에 발현되는 단백질이다. CD28은 CD80(B7.1) 및 CD86(B7.2) 단백질에 대한 수용체이다. 일 실시양태에서, CAR은 CD28로부터 유래된 공자극 시그널링 도메인을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시된 바와 같이, CAR은 CD28의 세포내/세포질 도메인, 예를 들어 공자극 시그널링 도메인으로서 기능할 수 있는 세포내/세포질 도메인의 적어도 일부를 포함할 수 있다(도 1b 참고). CD28 폴리펩티드는 하기에서 제공되는 바와 같은 젠뱅크 번호 P10747 또는 NP_006130(GI:5453611)을 갖는 서열에 상응하는 아미노산 서열, 또는 이의 단편을 가질 수 있다. 소망하는 경우, CD28 서열은 세포내 도메인에 더하여 본 발명의 CAR 내에 포함될 수 있다. 예를 들어, CAR은 CD28 폴리펩티드의 경막을 포함할 수 있다. 일 실시양태에서, CAR은 CD28의 아미노산 180 내지 220에 상응하는 CD28의 세포내 도메인을 포함하는 아미노산 서열, 또는 이의 단편을 가질 수 있다. 다른 실시양태에서, CAR은 아미노산 153 내지 179에 상응하는 CD28의 경막 도메인을 포함하는 아미노산 서열, 또는 이의 단편을 가질 수 있다. CD28 내의 도메인, 예를 들어 시그널 펩티드, 아미노산 1 내지 18; 세포의 도메인, 아미노산 19 내지 152; 경막 도메인, 아미노산 153 내지 179; 세포내 도메인, 아미노산 180 내지 220에 대한 참고를 위해 젠뱅크 NP_006130을 참고한다. 소망하는 경우, 구체적인 서술된 도메인보다 짧거나 긴 CD28의 서열이 CAR 내에 포함될 수 있음이 이해된다. "CD28 핵산 분자"는 CD28 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다.

```
1   MLRLLLALNL FPSIQVTGNK ILVKQSPMLV AYDNAVNLSK KYSYNLFSRE FRASLHKGLD
61  SAVEVCVVYQ NYSQQQLQVYS KTGFCNDGKL GNESVTFYLO NLYVNQTDIY FCKIEVMYPP
121 PYLDNEKSNG TIIHVKGKHL CPSPLEFGPS KPFVWLVVVG GVLACYSLIV TVAFIIFWVR
181 SKRSRLHSD YNMTPTRRPG PTRKHYQPYA PPRDFAAYRS (NP_006130; 서열번호 17)
```

[0275]

[0276]

4-1BB. 종양 괴사 인자 수용체 수퍼패밀리 멤버9로도 지칭되는 4-1BB는 종양 괴사 인자(TNF) 리간드로서 작용할 수 있으며, 자극 활성을 가질 수 있다. 실시양태에서, CAR은 4-1BB로부터 유래된 공자극 시그널링 도메인을 포함할 수 있다. 4-1BB 폴리펩티드는 젠뱅크 번호 P41273 또는 NP_001552(GI:5730095)를 갖는 서열에 상응하는 아미노산 서열, 또는 이의 단편을 가질 수 있다. 일 실시양태에서, CAR은 아미노산 214 내지 255에 상응하는 4-1BB의 세포내 도메인을 포함하는 공자극 도메인, 또는 이의 단편을 가질 수 있다. 다른 실시양태에서, CAR은 아미노산 187 내지 213에 상응하는 4-1BB의 경막 도메인, 또는 이의 단편을 가질 수 있다. 4-1BB 내의 도메인, 예

를 들어 시그널 펩티드, 아미노산 1 내지 17; 세포의 도메인, 아미노산 18 내지 186; 경막 도메인, 아미노산 187 내지 213; 세포내 도메인, 아미노산 214 내지 255에 대한 참고를 위해 젠뱅크 NP_001552를 참고한다. 소망하는 경우, 구체적인 서술된 도메인보다 짧거나 긴 4-1BB의 서열이 CAR 내에 포함될 수 있음이 이해된다. "4-1BB 핵산 분자"는 4-1BB 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다.

```
1  MGNSCYNIVA TLLLVNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDDN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR
61  TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC
121 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE
181 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR FVQTTQEEDG
241 CSCRFPEEEE GGCEL (NP_001552; 서열번호 18)
```

[0277]

[0278]

OX40. 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버4 전구체 또는 CD134로도 지칭되는 OX40은 수용체의 TNFR-수퍼패밀리의 멤버이다. 일 실시양태에서, CAR은 OX40으로부터 유래된 공자극 시그널링 도메인을 포함할 수 있다. OX40 폴리펩티드는 하기에 제공되는 바와 같은 젠뱅크 번호 P43489 또는 NP_003318(GI:4507579)을 갖는 서열에 상응하는 아미노산 서열, 또는 이의 단편을 가질 수 있다. 일 실시양태에서, CAR은 아미노산 236 내지 277에 상응하는 OX40의 세포내 도메인, 또는 이의 단편을 포함하는 공자극 도메인을 가질 수 있다. 다른 실시양태에서, CAR은 OX40의 아미노산 215 내지 235에 상응하는 OX40의 경막도메인을 포함하는 아미노산 서열, 또는 이의 단편을 가질 수 있다. OX40 내의 도메인, 예를 들어 시그널 펩티드, 아미노산 1 내지 28; 세포의 도메인, 아미노산 29 내지 214; 경막 도메인, 아미노산 215 내지 235; 세포내 도메인, 아미노산 236 내지 277에 대한 참고를 위해 젠뱅크 NP_003318을 참고한다. 소망하는 경우, 구체적인 서술된 도메인보다 짧거나 긴 OX40의 서열이 CAR 내에 포함될 수 있음이 이해된다. "OX40 핵산 분자"는 OX40 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다.

```
1  MCVGARRLGR GPCAAALLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ
61  NTVCRPCGPG FYNDVVSCKP CKPCTWCNLR SGSEKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK
121 PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQFQETQ
181 GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL
241 RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI (NP_003318; 서열번호 19)
```

[0279]

[0280]

ICOS. CD278로도 지칭되는 유도성 T-세포 공자극 전구체(ICOS)는 활성화된 T 세포 상에서 발현되는 CD28-수퍼패밀리 공자극 분자이다. 일 실시양태에서, CAR은 ICOS로부터 유래된 공자극 시그널링 도메인을 포함할 수 있다. ICOS 폴리펩티드는 하기 제공된 젠뱅크 번호 NP_036224(GI:15029518)를 갖는 서열에 상응하는 아미노산 서열, 또는 이의 단편을 가질 수 있다. 일 실시양태에서, CAR은 ICOS의 아미노산 162 내지 199에 상응하는 ICOS의 세포내 도메인을 포함하는 공자극 도메인을 가질 수 있다. 다른 실시양태에서, CAR은 ICOS의 아미노산 141 내지 161에 상응하는 ICOS의 경막 도메인을 포함하는 아미노산 서열, 또는 이의 단편을 가질 수 있다. ICOS 내의 도메인, 예를 들어 시그널 펩티드, 아미노산 1 내지 20; 세포의 도메인, 아미노산 21 내지 140; 경막 도메인, 아미노산 141 내지 161; 세포내 도메인, 아미노산 162 내지 199에 대한 참고를 위해 젠뱅크 NP_036224를 참고한다. 소망하는 경우, 구체적인 서술된 도메인보다 짧거나 긴 ICOS의 서열이 CAR 내에 포함될 수 있음이 이해된다. 또한, "ICOS 핵산 분자"는 ICOS 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다는 것이 이해된다.

```
1  MCVGARRLGR GPCAAALLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ
61  NTVCRPCGPG FYNDVVSCKP CKPCTWCNLR SGSEKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK
121 PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQFQETQ
181 GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL
241 RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI (NP_003318; 서열번호 19)
```

[0281]

[0282]

DAP10. 조혈 세포 시그널 형질도입인자로도 지칭되는 DAP10은 조혈 세포 내의 수용체의 큰 패밀리와 연관된 시그널링 서브유닛이다. 일 실시양태에서, CAR은 DAP10으로부터 유래된 공자극 도메인을 포함할 수 있다. DAP10 폴리펩티드는 하기 제공된 젠뱅크 번호 NP_055081.1(GI:15826850)을 갖는 서열에 상응하는 아미노산 서열, 또는 이의 단편을 가질 수 있다. 일 실시양태에서, CAR은 아미노산 70 내지 93에 상응하는 DAP10의 세포내 도메인을 포함하는 공자극 도메인, 또는 이의 단편을 가질 수 있다. 다른 실시양태에서, CAR은 아미노산 49 내지 69에 상응하는 DAP10의 경막 도메인, 또는 이의 단편을 가질 수 있다. DAP10 내의 도메인, 예를 들어 시그널 펩티드, 아미노산 1 내지 19; 세포의 도메인, 아미노산 20 내지 48; 경막 도메인, 아미노산 49 내지 69; 세포내 도메인, 아미노산 70 내지 93에 대한 참고를 위해 젠뱅크 번호 NP_055081.1을 참고한다. 소망하는 경우, 구체적인 서술

된 도메인보다 짧거나 긴 DAP10의 서열이 CAR 내에 포함될 수 있음이 이해된다. 또한, "DAP10 핵산 분자"는 DAP10 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다.

1 MIHLGHILFL LLLPVAAQT TPGERSSLPA FYPGTSGSCS GCGSLSLPLL AGLVAADAVA
61 SLLIVGAVFL CARPRRSPAQ EDGKVYINMP GRG (NP_055081.1; 서열번호 21)

[0283]

[0284]

CAR의 세포외 도메인은 초기 단백질을 소포체로 유도하고, 이어서 세포 표면으로 전좌시키는 리더 또는 시그널 펩티드에 융합될 수 있다. 시그널 펩티드를 함유하는 폴리펩티드가 세포 표면에서 발현되면, 시그널 펩티드는 일반적으로 소포체 내의 폴리펩티드의 가공 및 세포 표면으로의 전좌 동안 단백질 가수분해로 제거되었던 것으로 이해된다. 따라서, CAR과 같은 폴리펩티드는 일반적으로 시그널 펩티드가 결핍된 성숙한 단백질로서 세포 표면에서 발현되는 반면에, 폴리펩티드의 전구체 형태는 시그널 펩티드를 포함한다. 시그널 펩티드 또는 리더는 CAR이 세포막에서 글리코실화되고/되거나 고정되어야 하는 경우 필수적일 수 있다. 시그널 서열 또는 리더는 이들 전체를 분비 경로로 유도하는 새롭게 합성된 단백질의 N-말단에 일반적으로 존재하는 펩티드 서열이다. 시그널 펩티드는 융합 단백질로서 CAR의 세포외 항원-결합 도메인의 N-말단에 공유적으로 연결된다. 당업계에 잘 알려진 바와 같은 임의의 적합한 시그널 펩티드가 T 세포에서 세포 표면 발현을 제공하기 위해 CAR에 적용될 수 있다(Gierasch *Biochem.* 28:923-930 (1989); von Heijne, *J. Mol. Biol.* 184 (1):99-105 (1985) 참고). 특히 유용한 시그널 펩티드는 본원에 개시된 폴리펩티드의 시그널 펩티드 중 임의의 것을 포함하여, 이의 T 세포에서 천연적으로 발현되는 세포 표면 단백질로부터 유래될 수 있다. 따라서, CAR이 T 세포의 세포 표면에서 발현되도록 유도하기 위해 임의의 적합한 시그널 펩티드가 사용될 수 있다.

[0285]

특정 비제한적 실시양태에서, CAR의 세포외 항원-결합 도메인은 세포외 항원-결합 도메인의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 연결하는 링커 서열 또는 펩티드 링커를 포함할 수 있다. 특정 비제한적 실시양태에서, CAR은 또한 CAR의 도메인을 서로 연결하는 스페이스 영역 또는 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 스페이스는 시그널 펩티드와 항원 결합 도메인 사이, 항원 결합 도메인과 경막 도메인 사이, 경막 도메인과 세포내 도메인 사이, 및/또는 세포내 도메인 내의 도메인들 사이, 예를 들어 자극 도메인과 공자극 도메인 사이에 포함될 수 있다. 스페이스 영역은 다양한 도메인과 다른 폴리펩티드의 상호작용을 허용하도록, 예를 들어 항원 결합 도메인이 항원 인식을 가능하게 하기 위해 배향에서 유연성을 갖도록 허용하기 위해 충분히 유연할 수 있다. 스페이스 영역은 예를 들어, IgG로부터의 힌지 영역, 면역글로불린의 CH₂CH₃(불변) 영역, 및/또는 CD3(분화 클러스터 3)의 일부 또는 스페이스로서 적합한 일부 다른 서열일 수 있다.

[0286]

CAR의 경막도메인은 일반적으로 막의 적어도 일부에 걸친 소수성 알파 나선을 포함한다. 상이한 경막 도메인은 상이한 수용체 안정성을 야기한다. 항원 인식 후에, 수용체 클러스터 및 시그널은 세포로 전송된다. 실시양태에서, CAR의 경막 도메인은 T 세포에서 천연적으로 발현되는 다른 폴리펩티드로부터 유래될 수 있다. 일 실시양태에서, CAR은 CD8, CD28, CD3ζ, CD4, 4-1BB, OX40, ICOS, CTLA-4, PD-1, LAG-3, 2B4, BTLA, 또는 본원에 개시되거나 당업계에 잘 알려진 바와 같은 다른 것을 포함하여, 경막 도메인을 갖는 T 세포 내에서 발현되는 다른 폴리펩티드로부터 유래된 경막 도메인을 가질 수 있다. 선택적으로, 경막 도메인은 경막 도메인이 CAR에 결합된 항원으로부터 세포내 시그널링 및/또는 공자극 도메인으로 시그널을 전달도입하는데 기능할 수 있는 한, T 세포에서 천연적으로 발현되지 않는 폴리펩티드로부터 유래될 수 있다. 폴리펩티드의 경막 도메인을 포함하는 폴리펩티드의 일부가 폴리펩티드로부터의 추가 서열, 예를 들어 경막 도메인의 N-말단 또는 C-말단 종결부, 또는 소망하는 바와 같은 폴리펩티드의 다른 영역에 인접한 추가 서열을 포함할 수 있다는 것이 이해된다.

[0287]

CD8. 분화 클러스터 8(CD8)은 T 세포 수용체(TCR)에 대한 공동-수용체로서 제공되는 경막 당단백질이다. CD8은 주요 조직적합성 복합체(MHC) 분자에 결합하고 클래스 I MHC 단백질에 대해 특이적이다. 실시양태에서, CAR은 CD8로부터 유래된 경막 도메인을 포함할 수 있다. CD8 폴리펩티드는 하기 제공되는 바와 같은 젠뱅크 번호 NP_001139345.1(GI:225007536)을 갖는 서열에 상응하는 아미노산 서열, 또는 이의 단편을 가질 수 있다. 일 실시양태에서, CAR은 아미노산 183 내지 203에 상응하는 CD8의 경막 도메인을 포함하는 아미노산 서열, 또는 이의 단편을 가질 수 있다. CD8 내의 도메인, 예를 들어 시그널 펩티드, 아미노산 1 내지 21; 세포외 도메인, 아미노산 22 내지 182; 경막 도메인 아미노산, 183 내지 203; 세포내 도메인, 아미노산 204 내지 235에 대한 참고를 위해 젠뱅크 NP_001139345.1을 참고한다. 소망하는 경우, 아미노산 183 내지 203의 경막 도메인 외부의 CD8의 추가 서열이 CAR 내에 포함될 수 있음이 이해된다. 소망하는 경우, 구체적인 서술된 도메인보다 짧거나 긴 CD8의 서열이 CAR 내에 포함될 수 있음이 추가로 이해된다. 또한, "CD8 핵산 분자"는 CD8 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다.

1 MALPVTALLL PLALLLHAAR PSQFRVSPLD RTWNLGETVE LKQVLLSNP TSGCSWLFQP
61 RGAASPTFL LYLSQNKPKA AEGLDTQRF S GKRLGDTFVL TLSDFRRENE GYYFCSALS
121 SIMYFSHFVP VFLPAKPTTT PAPRPPTAP TIASQPLSLR PEACRPAAGG AVHTRGLDFA
181 CDIYIWAPLA GTCGVLLLSL VITLYCNHRN RRRVCKCPRP VVKSGDKPSL SARYV
(NP_001139345.1; **서열번호** 22)

[0288]

[0289]

CD4. T-세포 표면 당단백질 CD4로도 지칭되는 분화 클러스터 4(CD4)는 T 헬퍼 세포, 단핵구, 대식세포, 및 수지상 세포와 같은 면역 세포의 표면 상에서 발견되는 당단백질이다. 일 실시양태에서, CAR은 CD4로부터 유래된 경막 도메인을 포함할 수 있다. CD4는 다양한 이소형(isoform)으로 존재한다. 임의의 이소형이 소망하는 기능을 달성하기 위해 선택될 수 있음이 이해된다. 예시적 이소형은 이소형 1(NP_000607.1, GI:10835167), 이소형 2(NP_001181943.1, GI:303522479), 이소형 3(NP_001181944.1, GI:303522485; 또는 NP_001181945.1, GI:303522491; 또는 NP_001181946.1, GI:303522569) 등을 포함한다. 하나의 예시적 이소형 서열인 이소형 1이 하기에 제공된다. 일 실시양태에서, CAR은 아미노산 397 내지 418에 상응하는 CD4의 경막 도메인을 포함하는 아미노산 서열, 또는 이의 단편을 가질 수 있다. CD4 내의 도메인, 예를 들어 시그널 펩티드, 아미노산 1 내지 25; 세포의 도메인, 아미노산 26 내지 396; 경막 도메인 아미노산, 397 내지 418; 세포내 도메인, 아미노산 419 내지 458에 대한 참고를 위해 첼뱅크 NP_000607.1을 참고한다. 소망하는 경우, 아미노산 397 내지 418의 경막 도메인 외부의 CD4의 추가 서열이 CAR 내에 포함될 수 있음이 이해된다. 소망하는 경우, 구체적인 서술된 도메인보다 짧거나 긴 CD4의 서열이 CAR 내에 포함될 수 있음이 추가로 이해된다. 또한, "CD4 핵산 분자"는 CD8 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다.

1 MNRGVPFRHL LLVLQLALLP AATQGGKVV L GKKGDTVELT CTASQKKS I Q FHWKNSNQIK
61 ILGNQGSFLT KGPSKLNDR A DSRRLWDQ G NFPLIIKNL K IEDSDTYICE VEDQKEEVQL
121 LVFGLTANS D THLLQGQSLT LTLESPPGSS PSVQCRSPRG KNIQGGKTL S VSQLELQDSG
181 LWTCTVLQ N Q KKVEFKIDIV VLAFAQKASSI VYKKEGEQVE FSFPLAFTVE KLTGSGELWW
241 QAERASSSKS WITFDLNKNE VSVKRVTD P KLQMGKKLPL HLTLPQALP Q YAGSGNLTLA
301 LEAKTKGLH Q EVNLVVMRAT QLQKNLTCEV WGPTSPKLML SLKLENKEAK VSKREKAVWV
361 LNPEAGMWQ C LLSDSGQVLL ESNIKVLP T W STPVQPMALI VLGGVAGLL L FIGLGIFFCV
421 RCRHRRRQAE RMSQIKRLLS EKKTQC P HR FQKTCSP I (NP_000607.1; **서열번호** 23)

[0290]

[0291]

본원에 개시된 폴리펩티드의 도메인, 예컨대 시그널 펩티드, 항원 결합 도메인, 경막 도메인, 세포내 시그널링 도메인 및/또는 공자극 도메인은 소망하는 기능을 제공하기 위해 유용한 것으로서 암 항원 CAR에서 사용될 수 있음이 이해된다. 예를 들어, 도메인, 예컨대 소망하는 바와 같은 시그널 펩티드, 경막 도메인, 세포내 시그널링 도메인, 또는 다른 도메인이 본 발명의 CAR에 특별한 기능을 제공하기 위해 선택될 수 있다. 가능한 바람직한 기능은, 비제한적으로, 시그널 펩티드 및/또는 경막 도메인을 제공하는 것을 포함할 수 있다.

[0292]

키메라 공자극 수용체(CCR). 키메라 공자극 수용체(CCR)는 본 발명의 치료 전이유전자에 의해 인코딩되는 예시적 산물이다. 키메라 공자극 수용체(CCR)는 CAR과 유사한, 항원-결합 세포의 도메인, 경막 도메인 및 세포내 시그널링 도메인을 포함하는 키메라 수용체이다(Sadelain et al., *Cancer Discov.* 3(4):388-398 (2013)). CCR은 T 세포 활성화 도메인을 갖지 않지만, 공자극 도메인, 예컨대 CAR에 대해 상기 개시된 공자극 도메인 중 하나, 예를 들어 CD28, 4-1BB, OX40, ICOS, DAP10, 2B4, CD70 등을 포함한다. CCR은 T 세포 수용체 또는 CAR과 함께 사용되어, T 세포를 발현하는 이중-항원에 대한 T 세포 반응성을 향상시킬 수 있다(Sadelain et al., *supra*, 2013). CCR은 또한 선택적 종양 표적화를 향상시키기 위해 사용될 수 있다(Sadelain et al., *supra*, 2013). CCR은 항원-특이적 공자극 수용체이며, 이의 결합 파트너, 즉 표적 항원에 결합시에, 4-1BB, OX40, ICOS 또는 CD70의 영향(CCR의 공자극 도메인에 따름)을 모방한다.

[0293]

치료 전이유전자에 의해 인코딩될 수 있는 산물로서 유용한 예시적 공자극 리간드(CL)는, 비제한적으로, 공자극 리간드 4-1BBL; OX40L; ICOSL; CD70 등을 포함한다. 치료 전이유전자에 의해 인코딩될 수 있는 예시적 키메라 공자극 수용체(CCR)는, 비제한적으로, 표적 항원에 결합시에, 4-1BB, OX40, ICOS 또는 CD70의 효과를 모방하는 항원-특이적 공자극 수용체이다.

[0294]

사이토카인. 사이토카인은 본 발명의 치료 전이유전자에 의해 인코딩되는 예시적 산물이다. 치료 전이유전자에 의해 인코딩될 때 특히 유용한 사이토카인은 본 발명의 T 세포의 활성화를 자극하거나 지속하는 것들을 포함한다. 면역 반응을 자극하기 위해 치료 전이유전자에 의해 인코딩되는 산물로서 유용한 예시적 사이토카인은, 비제한적으로, IL2, IL12, IL15, IL18 등을 포함한다. 면역 반응을 억제하기 위해 치료 전이유전자에 의해 인코딩되는 산물로서 유용한 예시적 사이토카인은, 비제한적으로, TGF베타, IL10 등을 포함한다.

- [0295] 우성 음성. 우성 음성은 본 발명의 치료 전이유전자에 의해 인코딩되는 예시적 산물이다. 치료 전이유전자에 의해 인코딩될 때 특히 유용한 우성 음성은 본 발명의 T 세포의 활성화를 자극하거나 지속하는 것들을 포함한다. 예시적 우성 음성은, 비제한적으로, 억제성 키메라 항원 수용체(iCAR), 분비성 가용성 사이토카인 수용체(예를 들어, TGFβ, IL10에 대해), 분비성 가용성 T-세포 억제성 수용체(예를 들어, PD1, CTLA4, LAG3, 또는 TIM-3로부터 유래됨) 등을 포함한다. 억제성 키메라 항원 수용체는 억제성 T-세포 수용체(예컨대, PD1, CTLA4)로부터 유래된 세포내 시그널링 도메인에 융합된 세포외 scFV 도메인(표적 T 세포에서 세포-표면 분자에 결합함)으로 구성된 세포-표면 수용체이다. 조작된 T 세포는 표적 T 세포와 상호작용 시에 억제된다.
- [0296] 미세환경 조절자. 미세환경 조절자는 본 발명의 치료 전이유전자에 의해 인코딩되는 예시적 산물이다. 미세환경 조절자는 치료 조작된 T 세포 부근에서 세포의 활성을 조절하는 분자를 지칭한다. 치료 전이유전자에 의해 인코딩될 때 특히 유용한 미세환경 조절자는 본 발명의 T 세포의 활성화를 자극하거나 지속하는 것들을 포함한다. 예시적 미세환경 조절자는, 비제한적으로, 헤파리나제, TNFRSF14로도 지칭되는 헤르페스 바이러스 출입 매개자 (HVEM) 등을 포함한다.
- [0297] 항체. 항체는 본 발명의 치료 전이유전자에 의해 인코딩되는 예시적 산물이다. 예시적 항체는, 비제한적으로, T-세포 억제성 리간드, 예컨대 PD1L, CD80, CD86, 갈렉틴-9, Fas 리간드 등에 대한 항체를 포함한다.
- [0298] 항체는 면역글로불린, 예를 들어 IgG로서, 또는 이중-특이적 T-세포 관여항체(BiTE), 디아바디, 이중 친화성 재-표적화 항체(DART), Fab, F(ab'), 단일쇄 가변 단편(scFv), 나노바디, 이중-특이적 항체, 또는 이와 유사한 것으로서 발현될 수 있다(예를 들어, Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); Chames et al., *Br. J. Pharmacol.* 157:220-233 (2009); Rader, *Blood*, 117:4403-4404 (2011) 참고).
- [0299] 바이오센서. 바이오센서는 본 발명의 치료 전이유전자에 의해 인코딩되는 예시적 산물이다. 바이오센서는 리간드 결합 시에 특정 효과를 생산하도록 세포에게 시그널을 보내는 생물학적 분자(단백질, DNA, 또는 RNA)이다. 바이오센서는 예를 들어, 단백질, DNA, RNA, 마이크로RNA, 대사물, 이온 등에 대한 바이오센서일 수 있다. 예시적 바이오센서는, 비제한적으로, DNA, RNA, 독소에 대한 바이오센서, 및 이온, 예를 들어 칼슘-감지 칼모듈린 (CaM)-칼모듈린-결합 펩티드에 대한 바이오센서인 톨-유사 수용체(TLR)를 포함한다. 특정 TLR의 발현은 조작된 T 세포가 세포질 내의 표적 분자(예컨대, RNA, 독소)의 존재에 반응하여, 세포가 치료 분자의 발현을 활성화시키기 위해 사용할 수 있는 소정의 시그널을 촉발시키도록 한다. 유사한 전략이 CaM-칼모듈린 결합 단백질(세포내 칼슘을 감지함)에 적용된다. 이들 바이오센서는 치료 분자의 생산 동안 중간물로서 작용할 수 있으며, 이들은 이러한 효과를 갖도록 요구되는 때에만 그렇게 작용한다. 예를 들어, 바이오센서는 세포의 상태를 감지한 다음, 다른 전이유전자의 발현을 활성화시키기 위해 사용될 수 있다. 특별한 실시양태 또는 예에서, 특정 HIV RNA 서열을 특이적으로 검출하는 바이오센서가 사용될 수 있다. 결합 시에, 바이오센서는 키메라 전사 억제자의 방출을 야기한 다음, 핵으로 전좌하여 HIV 게놈 전사를 특이적으로 억제하는 입체구조 변화를 겪는다.
- [0300] 키메라 수용체 리간드(CRL). 키메라 수용체 리간드(CRL)는 본 발명의 치료 전이유전자에 의해 인코딩되는 예시적 산물이다. CRL은 표적-세포 수용체(예컨대, 사이토카인 수용체)에 의해 인식되고, 이의 특정 수용체와 상호작용 시에 T-세포 반응을 촉발시킬 세포-표면 리간드이다. CRL은 표적 세포에서 이의 특정 수용체와의 상호작용 시에 T-세포 반응을 개시할 세포내 도메인을 함유한다.
- [0301] 키메라 면역 수용체 리간드(CIRL). 키메라 면역 수용체(CIRL)는 본 발명의 치료 전이유전자에 의해 인코딩되는 예시적 산물이다. CIRL은 면역-세포 수용체(예컨대, TCR 또는 면역글로불린)에 의해 인식되고, 이의 특정 수용체와 상호작용 시에 T-세포 반응을 촉발시킬 세포-표면 리간드이다. CIRL은 표적 세포에서 이의 특정 수용체와의 상호작용 시에 T-세포 반응을 개시할 세포내 도메인을 함유한다.
- [0302] 가용성 수용체. 가용성 수용체는 본 발명의 치료 전이유전자에 의해 인코딩되는 예시적 산물이다. 이러한 가용성 수용체는 세포내 또는 세포외일 수 있다. 예시적 가용성 수용체는, 비제한적으로, IL4R, IL10R, PD1, CTLA4, TIM-3, LAG3 등을 포함한다. 이러한 가용성 수용체는 일반적으로 면역 반응에 대한 자극 효과를 갖는다.
- [0303] 가용성 수송자. 가용성 수송자는 본 발명의 치료 전이유전자에 의해 인코딩되는 예시적 산물이다. 예시적 가용성 수송자는, 비제한적으로, 글루코스 수송자, 예컨대 Glut1 또는 Glut3를 포함한다. 이펙터 T 세포는 에너지를 생성하기 위해 글루코스의 증가된 섭취를 요구하는 것으로 알려져 있다. 글루코스 수송자를 발현하는 조작된 T 세포는, 종양 세포(일반적으로 많은 수로)가 글루코스를 소비하는 경쟁적 미세환경에 T 세포가 있을 때, 글루코스 수송자의 증가된 수로부터 이득을 얻을 수 있다.

- [0304] 효소. 효소는 본 발명의 치료 전이유전자에 의해 인코딩되는 예시적 산물이다. 예시적 치료 효소는, 비제한적으로, PKM2를 포함한다. 피루베이트 키나제 근육 동질효소 2(PKM2)는 높은 해당과정 속도 및 생합성 전구체의 높은 수요를 이용해 세포, 예컨대 이펙터 T 세포를 분열시키는데 필요한 효소이다. PKM2의 과잉발현은 생합성 전구체를 증가시키도록 보존하여, 조작된 T 세포의 증식을 개선한다.
- [0305] 리보자임. 리보자임은 본 발명의 치료 전이유전자에 의해 인코딩되는 예시적 산물이다. 치료 전이유전자의 산물인 예시적 리보자임은, 비제한적으로, 각각 병원균 또는 바이러스 게놈을 절단하는 병원균-특이적 또는 바이러스-특이적 리보자임을 포함한다. 바이러스 병원균의 경우에, 리보자임은 따라서 바이러스 도입 동안 바이러스 RNA 역전사 및 바이러스 조립 동안 바이러스 RNA 게놈 패키징 둘 다를 억제한다. 바이러스 게놈을 표적화하는 것을 포함하여, 다양한 병원균에 대해 리보자임은 치료 전이유전자의 산물로서 발현될 수 있음이 용이하게 나타난다. 구체적 실시양태에서, 전이유전자는 HIV RNA 게놈을 절단하는 HIV-특이적 리보자임을 인코딩하여, 바이러스 도입 동안 바이러스 RNA 역전사 및 바이러스 조립 동안 바이러스 RNA 게놈 패키징 둘 다를 억제한다.
- [0306] 유전자 회로. 유전자 회로는 본 발명의 치료 전이유전자에 의해 인코딩되는 예시적 산물이다. 유전자 회로는 기능적으로 연결된 유전자 발현 단위의 세트이다.
- [0307] 유전자 회로의 일 실시양태는 리간드 결합 시에 TF 모이어티가 방출되고 핵으로 전좌하는 세포-표면 리간드-특이적 합성 전사 인자(TF)를 발현하는 구성적 전사 단위이다. 이어서, TF는 미세환경 내로 분비되는 억제성 리간드-특이적 가용성 수용체의 발현을 활성화시켜, 이러한 억제성 리간드를 포획하는, 제2 전사 단위(정의에 의해 유도가능함) 내에서 이의 동족 DNA에 결합한다. 다른 실시양태에서, 표적-세포 인식 시에 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 구성적 전사 단위는, NFAT-반응 요소를 통해 분비성 종양 억제자(예컨대, 림프종-특이적 soIHEVM)의 발현을 유도하며; 이러한 실시양태에서, 구성적 내인성 프로모터의 제어하에서 제1 전이유전자에 의해 CAR이 인코딩되고, CAR은 표적-세포 인식 시에 NFAT-반응성 유도성 내인성 프로모터의 제어하에서 전이유전자로부터 분비성 종양 억제자(예컨대, 림프종-특이적 soIHEVM)의 발현을 유도한다. 특별한 실시양태에서, 합성 TF는 하나의 전사 단위(하나의 위치에서 통합된 단일 전이유전자)로부터 발현되며; 가용성 수용체는 제2 전사 단위(동일하거나 상이한 위치에서 통합된 단일 유전자이식 발현 카세트)로부터 발현되고 발현은 TF가 이 제2 전사 단위에 결합할 때 발생한다.
- [0308] 유전자 회로의 특별한 실시양태에서, CAR-발현 T 세포는 HIF1a-의존성 및 TALE-VP64-의존성 전사 단위로 구성된 유전자 회로를 함유한다. CAR T 세포가 낮은 산소 수준을 갖는 종양 미세환경 내에 있을 때, HIF1알파 전사 인자는 T 세포에서 활성화되고, HIF1a-의존성 전사 단위에 결합하고 키메라 전사 인자 TALE-VP64의 발현을 유도한다. 다음에, 그 다음 TALE-VP64-의존성 전사 단위에 결합하고 PDIL 또는 CD80과 같은 미세환경 내의 억제성 분자를 표적화하는 분비성 scFv의 발현을 자극한다. 이 제2 전사 단위로부터, 재조합 HIF1a는 또한 발현되어, 제1 전사 단위에 대한 양성 피드백을 야기할 것이다. 전술한 구체적 실시양태에서, 제1 전이유전자의 발현은 HIF1 알파 전사 인자에 의해 유도된 내인성 유도성 프로모터의 제어하에 있고, 제2 전이유전자의 발현은 TALE-VP64에 의해 유도된 내인성 유도성 프로모터의 제어하에 있으며, 제1 전이유전자는 TALE-VP64를 인코딩하고, 제2 전이유전자는 분비성 scFv를 인코딩한다. 선택적으로, 제3 전이유전자가 HIF1a를 인코딩하는 제3 전이유전자의 발현은, TALE-VP64에 의해서 또한 유도되는 상이한 내인성 유도성 프로모터의 제어하에 있다. 일 실시양태에서, 전사 인자는 하나 또는 다중 유전자 산물의 발현을 구동할 수 있으며, 후자는 폴리시스트론성 정보의 경우에 발생한다. 바이시스트론성 전사 단위의 예: TCR을 조립하는 알파 및 베타 체; 탠덤 내의 2개의 scFv 등. 일 실시양태에서, 단일 TALE-VP64-반응성 전사 단위는 scFv 및 HIF1a 둘 다를 함유할 것이며; 이는 바이시스트론성 구조체이고: 2개의 유전자는 단일 프로모터로부터 발현될 것이다.
- [0309] 다른 특별한 실시양태에서, B 세포에 결합시에 NFAT 모이어티가 방출되고 핵으로 전좌하는 세포-표면 CD19-특이적 scFv-NFAT 융합 단백질을 발현하는 구성적 전사 단위는, 제2 전사 단위에서 이의 동족 DNA 서열에 결합하고, 이로부터 키메라 면역 수용체 리간드가 발현된다. 이 제2 유전자는 세포외 항원(표적 B 세포 상의 특정 면역글로불린 수용체에 의해 인식됨) 및 세포내 시그널링 도메인(들)으로 구성된 융합 단백질을 인코딩하고, 이는 조작된 T 세포를 활성화시켜, 표적 B-세포 사멸을 야기한다. 따라서, 이 특별한 실시양태에서, 제1 전이유전자의 발현은 내인성 구성적 프로모터의 제어하에 있으며, 제1 전이유전자는 세포-표면 CD19-특이적 scFv-NFAT 융합 단백질을 인코딩하고, 제2 전이유전자의 발현은 B 세포에 대한 세포-표면 CD19-특이적 scFv-NFAT 융합 단백질의 결합에 의해 유도되는 내인성 유도성 프로모터의 제어하에 있고, 제2 전이유전자는 (i) 세포외 항원(표적 B 세포 상의 면역글로불린 수용체에 의해 인식됨), 및 (ii) 조작된 T 세포를 활성화시키는 적어도 하나의 세포내 시그널링 도메인을 포함하는 융합 단백질을 인코딩하여, 표적 B-세포 사멸(예를 들어, 활성화된 T 세포의 세포용

해 활성화에 의함)을 야기한다.

- [0310] 후생적 개질자. 후생적 개질자는 본 발명의 치료 전이유전자에 의해 인코딩되는 예시적 산물이다. 후생적 개질자는 특정 게놈 위치에서 히스톤 단백질 또는 DNA인 염색질의 특이적 변형을 촉매하는 단백질/효소이다. 이들 변형은 유전자 발현 활성화 또는 억제인 특이적 변화를 야기한다. 예시적 후생적 개질자는, 비제한적으로, 표적 유전자 발현을 활성화하는, p300 아세틸트랜스퍼라제 도메인(히스톤 H3 아세틸라제)에 융합된 키메라 프로그램 작동가능 서열-특이적 DNA 결합 도메인; 및 표적 유전자 발현을 억제하는, KRAB 억제자 도메인(이질염색질-형성 복합체를 모집하는 단백질)에 융합된 키메라 프로그램 작동가능 서열-특이적 DNA 결합 도메인을 포함한다.
- [0311] 전사 활성화자 또는 억제자. 전사 활성화자 또는 억제자(전사 인자)는 본 발명의 치료 전이유전자에 의해 인코딩되는 예시적 산물이다. 전사 활성화자 또는 억제자는 천연적으로 발생하거나 키메라일 수 있다. 일부 경우에, 하나의 유전자에 대한 활성화자는 다른 유전자에 대해 억제자이거나, 그 반대일 수 있다. 치료 전이유전자에 의해 발현될 수 있는 예시적 전사 인자는, 비제한적으로, Foxp3, NFAT, HIF-1알파 등을 포함한다.
- [0312] 예시적 키메라 전사 활성화자는, 비제한적으로, DNA 결합 도메인(예컨대, TAL, 징크-핑거, CRISPR/비활성화된 Cas9) 및 전사촉진 도메인(예컨대, VP16, VP64, p65, Rta, 또는 이의 조합)으로 구성된 융합 단백질을 포함하고, 이는 하나 이상의 유전자를 특이적으로 발현하도록 설계될 수 있다. 따라서, 구체적 실시양태에서, 치료 전이유전자는 DNA 결합 도메인 및 전사촉진 도메인을 포함하는 융합 단백질을 인코딩한다.
- [0313] 예시적 키메라 전사 억제자는, 비제한적으로, DNA 결합 도메인(예컨대, TAL, 징크-핑거, CRISPR/비활성화된 Cas9) 및 억제자 도메인(예컨대, KRAB)으로 구성된 융합 단백질을 포함하고, 이는 하나 이상의 유전자를 특이적으로 억제하도록 설계될 수 있다. 따라서, 구체적 실시양태에서, 치료 전이유전자는 DNA 결합 도메인 및 억제자 도메인을 포함하는 융합 단백질을 인코딩한다.
- [0314] 비-코딩 RNA. 비-코딩 RNA는 본 발명의 치료 전이유전자에 의해 인코딩되는 예시적 산물이다. 예시적 비-코딩 RNA(마이크로RNA 또는 소간섭 RNA)는 PD1, TIM-3, LAG3, CTLA-4 등과 같은 억제성 수용체 유전자 메신저 RNA를 표적화하는 것들을 포함한다. 따라서, 구체적 실시양태에서, 치료 전이유전자는 마이크로RNA(miRNA), 소간섭 RNA(siRNA), 안티센스 RNA와 같은 비-코딩 RNA를 인코딩한다. 조작된 T 세포의 활성화의 자극을 소망하는 구체적 실시양태에서, 비-코딩 RNA는 예를 들어, 표적 억제성 수용체 유전자 메신저 RNA, 예컨대 PD1, TIM-3, LAG3, CTLA-4 등의 메신저 RNA를 표적화할 수 있다.
- [0315] 면역 반응의 자극을 소망하는 경우에, 치료 전이유전자는 바람직하게는 면역 반응을 자극하는 산물을 인코딩하기 위해 선택된다. 면역 반응을 자극하는 이러한 산물은, 비제한적으로, IL12, IL15, IL18, 또는 이들 인자 중 임의의 것으로부터 유래된 기능성 도메인일 수 있다. 면역 반응의 억제제의 억제를 소망하는 경우에, 치료 전이유전자는 바람직하게는 면역 반응의 억제자를 억제하는 산물을 인코딩하도록 선택된다. 면역 반응의 억제자를 억제하는 이러한 산물은, 비제한적으로, T-세포 억제성 수용체(예를 들어, PD1, CTLA4, LAG3, 또는 TIM3)에 결합하는 리간드(예를 들어, PD1L, CD80, CD86, 또는 갈렉틴-9)에 특이적인 항체; TGF베타, TNF알파, IL1, IL4, IL6, 또는 IL10과 같은 인자에 결합하여, 상기 인자의 세포-표면 수용체의 활성화를 방지하는 가용성 수용체; B 또는 T 세포 상의 특정 자가면역 면역 수용체에 결합하여 면역학적 내성 또는 세포 사멸을 유도하는 항원 또는 이의 기능성 유도체 등일 수 있다. 일 실시양태에서, 예를 들어 PD1L, CD80, CD86, 갈렉틴-9 리간드는 T 세포 상의 특정 수용체에 결합함으로써 T-세포 활성화는 억제하는 것으로 알려져 있다. 치료 항체는 T-세포 억제성 수용체가 아닌 리간드에 결합하고; 항체는 리간드와 이의 상응하는 T-세포 억제성 수용체 사이의 상호작용을 차단할 것이다. 따라서, 이들 항체를 분비하는 조작된 T 세포는 이들 리간드에 의해 억제되지 않을 것이다. 일 실시양태에서, 예를 들어 TGF베타는 T-세포 활성을 또한 억제하는 사이토카인이다. 이 사이토카인에 대해 특이적인 치료 가용성 수용체는 T 세포 상에 발현된 수용체에 대한 이의 결합을 방지함으로써 이의 활성화를 차단할 것이다. 따라서, TGF베타 가용성 수용체를 분비하는 조작된 T 세포는 이 사이토카인에 의해 억제되지 않을 것이다.
- [0316] 다른 실시양태에서, T 세포는 선택적으로 리포터를 생산하는 전이유전자를 발현할 수 있다. 리포터는 T 세포에서 치료 전이유전자와 함께 공동-발현될 수 있는 본 발명의 예시적 전이유전자이다. 이러한 전이유전자의 예는 필요한 경우, 치료 T 세포의 검출 및 제거 둘 다를 허용하는(즉, 세포 자살 스위치로서 기능할 수 있는), 절단된 EGF 리포터(EGFRt)이다. 이 리포터를 인식하고 생체내에서 항체-매개 표적-세포 사멸을 촉발시키는 특이적 항체(예를 들어, 세톡시맵)가 있다(미국 특허 제8,802,374호 참고). 따라서, 구체적 실시양태에서, 조작된 T 세포(치료 전이유전자의 발현이 내인성 프로모터의 제어하에 있음)는 리포터 전이유전자, 검출가능한 마커(바람직하게는 세포-표면) 단백질을 인코딩하는 전이유전자인 리포터 전이유전자를 추가로 포함하고, 리포터 전이유전자의 발현은 T 세포의 내인성 프로모터(상기 본원에 개시된 내인성 프로모터 중 임의의 것)의 제어하에 있다.

구체적 실시양태에서, 리포터 전이유전자는 IL4 또는 IL4의 막-결합 형태를 인코딩하지 않는다. 다른 구체적 실시양태에서, 리포터 전이유전자는 세포 자살 스위치를 인코딩한다. 구체적 실시양태에서, 세포 자살 스위치는 EGFRt 이고; 이러한 실시양태에서, 치료 목적을 위해 대상에게 조작된 T 세포의 투여 이후에, 대상은 EGFRt를 인식하고 조작된 T 세포의 세포 사멸을 촉발시켜, 소망하는 치료 후에 T 세포 활성을 정지시키는 항체를 투여받을 수 있다.

[0317] **7.6. 치료 방법**

[0318] 본 발명은 또한 T 세포 치료법을 이용하여 대상을 치료하는 방법에 관한 것이며, 대상은 그러한 치료법을 필요로 한다. T 세포 치료법이 면역 반응을 촉진하기 위한(즉, 자극된 면역 반응을 필요로 하는 대상의 치료) 것인 실시양태에서, 예를 들어, 치료되는 대상은 암 또는 감염성 질병을 가질 수 있으며, 본 발명의 재조합 T 세포의 투여는 각각 암 또는 감염성 질병을 치료하기 위한 것이다. T 세포는 암 또는 감염성 질병과 연관된 표적 항원에 대한 결합 파트너(예를 들어, CAR 또는 항체 또는 수용체)(치료 전이유전자에 의해 인코딩될 수 있음)를 재조합적으로 발현함으로써, 또는 암 또는 감염성 질병과 연관된 표적 항원에 민감화됨으로써, 암 또는 감염성 질병에 표적화될 수 있다. 민감화된 T 세포를 이용하는 구체적 실시양태에서, T 세포는 각각 암 또는 감염성 질병의 항원에 민감화된다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 또한 CAR 치료법을 이용하여 대상을 치료하는 방법에 관한 것이며, 대상은 그러한 치료법을 필요로 한다. CAR 치료법이 면역 반응을 촉진하기 위한 것이며, 예를 들어, 치료되는 대상이 암 또는 감염성 질병을 가질 수 있는 실시양태에서, 본 발명의 재조합 T 세포의 투여는 암 또는 감염성 질병을 치료하기 위한 것이며, CAR은 각각 암 또는 감염성 질병 병원균의 항원에 결합한다. 그러한 실시양태에서, T 세포는 CD8+, CD4+, TSCM, TCM, 이펙터 기억 T 세포, 이펙터 T 세포, Th1 세포, Th2 세포, Th9 세포, Th17 세포, Th22 세포, Tfh(여포성 헬퍼) 세포, 또는 본 명세서에 개시된 다른 T 세포일 수 있다.

[0319] T 세포 치료법이 면역 반응을 억제(즉, 억제된 면역 반응을 필요로 하는 대상의 치료)하기 위한 것인 실시양태에서, 예를 들어, 치료되는 대상은 자가면역 질병을 갖거나 또는 이식 거부 위험이 있으며, 본 발명의 재조합 T 세포의 투여는 각각 자가면역 질병을 치료하거나 이식 용인을 촉진하기 위한 것이다. 다른 예로서, T 세포 치료법이 면역 반응을 억제하는 것일 경우, 치료되는 대상은 이식편 대 숙주병의 위험이 있거나 이 병을 가질 수 있으며, 본 발명의 재조합(본원에서 "조작된"과 상호교환되어 사용됨) T 세포의 투여는 이식편 대 숙주병을 방지하거나 감소시키기 위한 것이다. T 세포는 자가면역 질병(예를 들어, 자가항원), 이식물, 또는 이식편과 연관된 표적 항원에 대한 결합 파트너(예를 들어, CAR 또는 항체 또는 수용체)(치료 전이유전자에 의해 인코딩될 수 있음)를 재조합적으로 발현함으로써, 또는 자가면역 질병, 이식물, 또는 이식편과 연관된 표적 항원에 민감화됨으로써, 자가면역 질병, 이식물, 또는 이식편에 표적화될 수 있다. 민감화된 T 세포를 이용하는 구체적 실시양태에서, T 세포는 각각 자가면역 반응의 부위 또는 이식된 세포 또는 이식편(또는 그로부터 유래된 세포)에서 항원에 민감화된다. 그러한 실시양태에서, T 세포는 T 조절 세포(Treg)일 수 있다. CAR 치료법이 면역 반응을 억제하기 위한 것이며 예를 들어, 치료되는 대상이 자가면역 질병을 가질 수 있거나 이식 거부 위험이 있는 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 재조합 T 세포의 투여는 자가면역 질병을 치료하거나 이식 용인을 촉진하기 위한 것이며, CAR은 각각 자가면역 반응 부위 또는 이식된 세포에서 항원에 결합한다. 다른 예로서, 치료되는 대상은 이식편 대 숙주병(GVHD)을 갖거나 그 위험이 있을 수 있으며, 본 발명의 재조합 T 세포의 투여는 GVHD를 치료하거나 방지하거나 위험을 감소시키기 위한 것이며, CAR은 GVHD와 연관된 항원에 결합한다. 그러한 실시양태에서, T 세포는 T 조절 세포(Treg)일 수 있다. 그러한 자가면역 질환은, 비제한적으로, 류마티스 관절염, 전신 루푸스 홍반, 셀리악 스프루 질병(celiac sprue disease), 악성 빈혈, 백반증, 피부경화증, 건선, 염증성 장 질환, 하시모토병(Hashimoto's disease), 애디슨병(Addison's disease), 그레이브병(Graves' disease), 반응성 관절염, 쇼그렌 증후군(Sjögren's syndrome), 및 타입 1 당뇨병을 포함한다. 이식물은 장기 또는 조직 이식물, 예를 들어, 폐, 신장, 심장, 장, 간, 및 췌장 등의 이식물일 수 있다. GVHD를 치료하거나 방지하는 것은 대상의 조혈 줄기 세포 이식후일 수 있다.

[0320] 일 실시양태에서, 대상은 암을 갖는다. 그러한 실시양태에서, T 세포 치료법은 암을 표적화한다. 특별한 실시양태에서, T 세포는 CAR을 발현한다. (따라서 치료 전이유전자는 CAR을 인코딩한다). 바람직한 실시양태에서, CAR은 암 항원에 결합한다. 암 항원은 대상의 암을 표적화하기 위해 선택된다.

[0321] 본 발명은 전이유전자를 발현하는 T 세포를 이용하는 다양한 방법에 관한 것이다. 구체적 실시양태에서, 세포는 전이유전자를 발현하는 세포의 집단으로서 투여된다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 CAR을 발현하는 T 세포를 이용하는 다양한 방법에 관한 것이다(전이유전자가 CAR을 인코딩함). 구체적 실시양태에서, 세포는 CAR을 발현하는 세포의 집단으로서 투여된다. 선택적으로, 투여될 세포는 정제되거나 본 발명의 세포에 대해 농축될 수

있다.

- [0322] 일 실시양태에서, 본 발명의 방법은 암을 치료하기 위하여 이용된다. 일 실시양태에서, T 세포는 CAR을 발현한다. 따라서, 전이유전자는 CAR을 인코딩한다. 일 실시양태에서, CAR은 암 항원-특이적 CAR이다.
- [0323] 암을 치료하는 방법은 암과 연관된 징후 또는 증상을 개선하는 임의의 효과를 포함할 수 있음이 이해된다. 그러한 징후 또는 증상은, 비제한적으로, 백혈병 세포 수의 감소, 종양의 성장 억제, 종양의 성장 속도 늦춤, 종양의 크기 감소, 종양의 수 감소, 종양의 제거를 비롯한 종양 크기 감소를 포함하며, 이들 모두는 당업계에 잘 알려진 일상적인 종양 영상화 기술을 이용하여 측정될 수 있다. 암과 연관된 다른 징후 또는 증상은, 비제한적으로, 피로, 통증, 체중 감소, 및 다양한 암과 연관된 다른 징후 또는 증상을 포함한다. 따라서, 본 발명의 세포의 투여는 대상에서 종양 세포의 수를 감소시키거나, 종양 크기를 감소시키거나, 및/또는 종양을 박멸할 수 있다. 종양은 혈액암 또는 고형 종양일 수 있다. 본 발명의 방법은 또한 암을 가진 대상의 증가되거나 연장된 생존을 제공할 수 있다. 부가적으로, 본 발명의 방법은 대상에서 증가된 면역 반응, 예를 들어, 암에 대한 증가된 면역 반응을 제공할 수 있다.
- [0324] 본 발명의 방법에서, T 세포는 T 세포 치료법을 필요로 하는 대상, 예를 들어, 치료, 예를 들어, 암, 감염성 질병, 자가면역 질환, 이식 거부 및 본원에 개시된 기타의 치료를 필요로 하는 대상에게 투여된다. 본 발명의 방법의 바람직한 실시양태에서, T 세포는 CAR 치료법을 필요로 하는 대상, 예를 들어, 치료, 예를 들어, 암, 감염성 질병, 자가면역 질환, 이식 거부 및 본원에 개시된 기타의 치료를 필요로 하는 대상에게 투여된다. 대상은 포유동물, 특히 인간일 수 있다. 바람직하게는, 대상은 인간이다. 본 발명의 세포를 포함하는 약학 조성물은 대상의 병태를 완화시킬 목적으로, 면역 반응을 유발하기 위하여 대상에게 투여된다. 임상적 개선은 T 세포 치료법으로 치료되는 질환, 예를 들어, 암의, 진행 위험 또는 속도 감소 또는 병리학적 결과에서의 감소를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 임상적 개선은 CAR 치료법으로 치료되는 질환, 예를 들어, 암의, 진행 위험 또는 속도 감소 또는 병리학적 결과에서의 감소를 포함한다.
- [0325] 대상은 질병의 진행된 형태를 가질 수 있으며, 이 경우에 치료 목적은 질병 진행의 완화 또는 역전, 및/또는 부작용의 개선을 포함할 수 있다. 대상은 이미 치료된 병태의 이력을 가질 수 있으며, 이 경우에 치료 목적은 재발 위험을 감소 또는 지연시키는 것일 수 있다. 암 치료의 경우에, 치료하기 어렵거나 재발한 종양이 본 발명의 세포를 이용하여 치료될 수 있다. 선택적으로, 본 발명의 세포는 예를 들어, 가족력 및/또는 유전자 시험에 기초하여, 질병 또는 병태의 소인을 가진 것으로 의심되는 대상에서 질병 또는 병태의 발생을 방지하기 위하여 예방적으로 치료하기 위하여 투여될 수 있다.
- [0326] 본 발명의 세포는 T 세포 치료법, 예를 들어, 암, 감염성 질병, 자가면역 질환, 이식 거부 등의 치료를 필요로 하는, 인간 대상과 같은 대상에게 투여된다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 세포는 CAR 치료법, 예를 들어, 암, 감염성 질병, 자가면역 질환, 이식 거부 등의 치료를 필요로 하는, 인간 대상과 같은 대상에게 투여된다. 암의 경우에, 암은 고형 종양 또는 고형 종양에 관련되지 않는 혈액암에 관련될 수 있다. 본 발명의 세포를 이용하여 치료될 암은 전형적으로 면역치료에 반응성인 암을 포함한다. 암의 예시적인 타입은, 비제한적으로, 암종, 육종, 백혈병, 림프종, 다발성 골수종, 흑색종, 뇌 및 척수 종양, 생식세포 종양, 신경내분비 종양, 유암종 등을 포함한다. 암은 고형 종양 또는 고형 종양을 형성하지 않는 혈액암일 수 있다. 고형 종양의 경우에, 종양은 원발성 종양 또는 전이성 종양일 수 있다.
- [0327] 본 발명의 방법을 이용하여 치료될 수 있는 다른 종양 또는 암의 예는 골암, 장암, 간암, 피부암, 머리 또는 목의 암, 흑색종(피부 또는 안내 악성 흑색종), 신장암(예를 들어, 투명 세포 암종), 인후암, 전립선암(예를 들어, 호르몬 불응성 전립선 선암종), 혈액암(예를 들어, 백혈병, 림프종, 및 골수종), 자궁암, 직장암, 항문부암, 방광암, 뇌암, 위암, 고환암, 나팔관의 암종, 자궁내막의 암종, 자궁경부의 암종, 질의 암종, 외음부의 암종, 백혈병(예를 들어, 급성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 급성 골수아구성 백혈병, 급성 전골수성 백혈병, 급성 골수단핵구 백혈병, 급성 단핵구 백혈병, 급성 적백혈병, 만성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병), 진성 다혈증, 림프종(호지킨병(Hodgkin's disease), 비-호지킨 병, 발덴스트롬 거대글로불린혈증(Waldenstrom's macroglobulinemia)), 소장의 암, 내분비계의 암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직의 육종, 요도의 암, 음경의 암, 아동의 고형 종양, 림프구성 림프종, 신장 또는 요관의 암, 신우의 암종, 중추신경계(CNS)의 신생물, 원발성 CNS 림프종, 종양 혈관신생, 척추 축(spinal axis) 종양, 뇌간 교종, 뇌하수체 선종, 카포시 육종(Kaposi's sarcoma), 표피모양 암(epidermoid cancer), 편평세포암, T-세포 림프종, 석면에 의해 유도된 것을 비롯한 환경적으로 유도된 암, 중쇄 질병, 및 고형 종양, 예를 들어, 육종 및 암종, 예를 들어, 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 척색종, 혈관육종, 내피육종, 림프관육종,

림프관내피육종(lymphangioendotheliosarcoma), 활막종, 증피종, 유잉 종양(Ewing's tumor), 평활근육종, 횡문근육종, 편평세포 암종, 기질 세포 암종, 선암종, 땀샘 암종, 피지선 암종, 유두상 암종, 유두상 선암종, 낭샘 암종, 수질암종, 기관지원성 암종, 간세포암, 담관 암종, 융모막암종, 정상피종, 배아 암종, 윌름 종양(Wilm's tumor), 자궁경부암, 자궁암, 고환암, 방광 암종, 상피 암종, 신경교종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 상의세포종, 송과체부종양, 혈관아세포종, 청신경종양, 핏지교종, 신경초종, 뇌수막종, 흑색종, 신경아세포종, 망막모세포종, 악성 홍막 질환, 증피종, 폐암(예를 들어, 비-소세포 폐암), 췌장암, 난소암, 유방암(예를 들어, 전이성 유방암, 전이성 삼중-음성 유방암), 결장암, 홍막 종양, 교모세포종, 식도암, 위암, 및 활막 육종을 포함한다. 고형 종양은 원발성 종양 또는 전이 상태의 종양일 수 있다.

[0328] 구체적 실시양태에서, 대상에게 투여되는 전이유전자를 재조합적으로 발현하는 세포는 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포 둘 모두를 포함하며, 대상에서 헬퍼 및 세포독성 T 림프구(CTL) 반응 둘 모두를 생성하는 것을 목표로 한다. CAR이 전이유전자에 의해 인코딩되는 바람직한 실시양태에서, 대상에게 투여되는 CAR을 재조합적으로 발현하는 세포는 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포 둘 모두를 포함하며, 대상에서 헬퍼 및 세포독성 T 림프구(CTL) 반응 둘 모두를 생성하는 것을 목표로 한다.

[0329] 일 실시양태에서, 본 발명은 면역억제성 세포인 본 발명의 T 세포를 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상을 T 세포 치료법으로 치료하는 방법을 제공하며, 대상은 억제된 면역 반응을 필요로 한다. 일 실시양태에서, 대상은 자가면역 질병을 갖는다. T 세포가 (전이유전자에 의해 인코딩된) CAR을 발현하는 경우인 특별한 실시양태에서, CAR은 자가면역 질환의 자가면역 항원에 결합한다. 자가면역 질환은, 비제한적으로, 류마티스 관절염, 전신 루푸스 홍반, 셀리악 스프루 질병, 악성 빈혈, 백반증, 피부경화증, 건선, 염증성 장 질병, 하시모토병, 애디슨병, 그레이브병, 반응성 관절염, 쇼그렌 증후군, 및 타입 1 당뇨병을 포함한다.

[0330] 다른 실시양태에서, 면역억제성 세포를 이용한 치료를 필요로 하는 대상은 장기 이식물을 갖는다. 그러한 방법에서, 면역억제성인 본 발명의 T 세포는 이식된 장기에 대한 면역 용인을 향상시키기 위하여 대상에게 투여된다. T 세포가 (전이유전자에 의해 인코딩된) CAR을 발현하는 경우인 특별한 실시양태에서, CAR은 이식된 장기의 항원에 결합한다. 이식물은 폐, 신장, 심장, 장, 간, 및 췌장 등의 이식물일 수 있다.

[0331] 다른 실시양태에서, 면역억제성 세포를 이용한 치료를 필요로 하는 대상은, 예를 들어, 대상이 조혈 줄기 세포 이식물을 가졌던 경우에, GVHD를 감소시키거나 방지하는 것을 필요로 한다. 그러한 방법에서, 면역억제성인 본 발명의 T 세포는 대상의 항원의 줄기 세포 이식물 또는 그로부터 유래된 세포에 의한 면역 용인을 향상시키기 위하여 대상에게 투여된다. T 세포가 (전이유전자에 의해 인코딩된) CAR을 발현하는 경우인 특별한 실시양태에서, CAR은 이식된 세포의 항원에 결합한다.

[0332] 치료를 위하여, 투여되는 양은 소망하는 효과를 생산하기에 효과적인 양이다. 유효량 또는 치료적 유효량은 치료시에 유익한 또는 소망하는 임상적 결과를 제공하기에 충분한 양이다. 유효량은 단일 투여로 또는 투여 시리즈(하나 이상의 용량)로 제공될 수 있다. 유효량은 볼루스(bolus)로 또는 연속 관류에 의해 제공될 수 있다. 치료의 면에서, 유효량은 질병의 진행을 완화시키거나, 개선하거나, 안정시키거나, 역전시키거나 늦추기에, 또는 다르게는 질병의 병리학적 결과를 감소시키기에 충분한 양이다. 유효량은 구체적 대상을 위해 의사에 의해 결정될 수 있다. 유효량을 이루기 위하여 적절한 투여량을 결정할 때 몇가지 인자가 전형적으로 고려된다. 이들 인자는 대상의 연령, 성별 및 체중, 치료되는 병태, 병태의 심각성 및 투여되는 본 발명의 세포의 형태 및 유효농도를 포함한다.

[0333] 본 발명의 세포는 일반적으로 체중 킬로그램 당 세포(세포/kg)에 기초한 용량으로 투여된다. 일반적으로 세포 용량은 투여 방식 및 위치에 따라, 약 10^4 내지 약 10^{10} 세포/kg 체중의 범위, 예를 들어, 약 10^5 내지 약 10^9 , 약 10^5 내지 약 10^8 , 약 10^5 내지 약 10^7 , 또는 약 10^5 내지 10^6 범위이다. 일반적으로, 전신 투여의 경우에, 본 발명의 T 세포가 영역, 장기 또는 종양에 투여되는 국부 투여에서보다 더 높은 용량이 이용된다. 예시적인 용량 범위는, 비제한적으로, 1×10^4 내지 1×10^8 , 2×10^4 내지 1×10^8 , 3×10^4 내지 1×10^8 , 4×10^4 내지 1×10^8 , 5×10^4 내지 1×10^8 , 6×10^4 내지 1×10^8 , 7×10^4 내지 1×10^8 , 8×10^4 내지 1×10^8 , 9×10^4 내지 1×10^8 , 1×10^5 내지 1×10^8 , 예를 들어, 1×10^5 내지 5×10^7 , 1×10^5 내지 4×10^7 , 1×10^5 내지 3×10^7 , 1×10^5 내지 2×10^7 , 1×10^5 내지 1×10^7 , 1×10^5 내지 9×10^6 , 1×10^5 내지 8×10^6 , 1×10^5 내지 7×10^6 , 1×10^5 내지 6×10^6 , 1×10^5 내지 5×10^6 , 1×10^5 내지 4×10^6 , 1×10^5 내지 3×10^6 , 1×10^5 내지 2×10^6 , 2×10^5 내지 7×10^6 , 2×10^5 내지 6×10^6 , 2×10^5 내지 5×10^6 , 2×10^5 내지 4×10^6 , 3×10^5 내지 3×10^6 ,

등을 포함한다. 그러한 용량 범위는 국부 투여를 위해 특히 유용할 수 있다. 특별한 실시양태에서, 세포는 국부 투여, 예를 들어, 늑막내 투여를 위해 1×10^5 내지 5×10^6 , 특히 1×10^5 내지 3×10^6 또는 3×10^5 내지 3×10^6 세포/kg의 용량으로 제공된다. 예시적인 용량 범위는 또한, 비제한적으로, 5×10^5 내지 1×10^8 , 예를 들어, 6×10^5 내지 1×10^8 , 7×10^5 내지 1×10^8 , 8×10^5 내지 1×10^8 , 9×10^5 내지 1×10^8 , 1×10^6 내지 1×10^8 , 1×10^6 내지 9×10^7 , 1×10^6 내지 8×10^7 , 1×10^6 내지 7×10^7 , 1×10^6 내지 6×10^7 , 1×10^6 내지 5×10^7 , 1×10^6 내지 4×10^7 , 1×10^6 내지 3×10^7 등을 포함할 수 있다. 그러한 용량은 전신 투여를 위해 특히 유용할 수 있다. 특별한 실시양태에서, 세포는 전신 투여를 위해 1×10^6 내지 3×10^7 세포/kg의 용량으로 제공된다. 예시적인 세포 용량은, 비제한적으로, 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 , 7×10^4 , 8×10^4 , 9×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 및 약 10^4 내지 약 10^{10} 범위내의 기타의 용량을 포함한다. 또한, 용량은 또한 단일 용량이 투여되는지 또는 다수 용량이 투여되는지 여부를 고려하여 조정될 수 있다. 유효 용량으로 간주될 것의 정확한 결정은 상기에 개시된 대로, 구체적인 대상의 크기, 연령, 성별, 체중, 및 병태를 비롯한, 각 대상에 개별적인 인자에 기초할 수 있다. 투여량은 본원의 내용 및 당업계의 지식에 기초하여 당업자가 쉽게 결정할 수 있다.

[0334] 본 발명의 세포는, 비제한적으로, 늑막 투여, 정맥내 투여, 피하 투여, 절내(intranodal) 투여, 종양내 투여, 척추강내 투여, 늑막내 투여, 복강내 투여, 두개내 투여, 및 흉선내의 직접 투여를 포함하는 당업계에 알려진 임의의 방법에 의해 투여될 수 있다. 일 실시양태에서, 본 발명의 세포는, 비제한적으로, 간 또는 대동맥 펌프; 사지, 폐 또는 간 관류; 간문맥내; 정맥 문합을 통해; 종양 근처의 강 또는 정맥 내, 등을 포함하는 잘 알려진 방법을 이용하여 장기, 종양 또는 자가면역 질병의 부위 또는 감염성 질병의 부위에 국부적으로 전달될 수 있다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 세포는 전신적으로 투여될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 세포는 소망하는 치료 부위에서, 예를 들어, 종양 부위에서 국부적으로 투여된다. 종양의 경우에, 세포는 또한 종양내로, 예를 들어, 종양 부위에 있는 세포 및/또는 종양 혈관내로 직접 주사에 의해 투여될 수 있다. 당업자는 표적 조직 또는 표적 영역의 타입 및/또는 치료될 표적 조직 또는 표적 영역의 위치에 기초하여 적합한 투여 방식을 선택할 수 있다. 세포는 주사 또는 카테터에 의해 도입될 수 있다. 선택적으로, 증식 및/또는 분화 제제는 *생체내*에서 본 발명의 세포의 생산을 증가시키기 위하여 세포의 투여 전, 그동안 또는 그 후에 대상에게 투여될 수 있다.

[0335] 본 발명의 세포의 증식은 일반적으로 대상에게 투여하기 전에 *생체외*에서 이루어지며, 대상에게 투여 후 *생체내*에서 바람직할 수 있다(Kaiser et al., *Cancer Gene Therapy* 22:72-78 (2015) 참고). 세포 증식은 T 세포에서와 같이, 세포 확장 및 지속성을 허용하기 위하여 세포 생존이 수반되어야 한다. 따라서, T 세포는 소망하는 대로, *생체외* 또는 *생체내*에서 증식할 수 있다.

[0336] 본 발명의 방법은 본 발명의 세포를 이용한 치료 전에, 그동안 또는 그 후에, 이와 조합하여 아췌반트 치료법을 추가로 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명의 세포 치료법은 본 발명의 세포의 투여와 양립가능한 다른 표준 케어 및/또는 치료법과 사용될 수 있다.

[0337] 7.7. 약학 조성물

[0338] 본 발명은 부가적으로 본 발명의 세포를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 약학 조성물은 유효량의 본 발명의 세포 및 약학적 허용 담체를 포함한다. 본 발명의 세포 및 세포를 포함하는 조성물은 전형적으로 선택된 pH로 완충되는, 멸균 액체 제제로, 예를 들어, 전형적으로 세포 현탁액을 가진 등장성 수성 용액으로, 또는 선택적으로 에멀전, 분산액 등으로 편리하게 제공될 수 있다. 조성물은 세포의 온전함과 생존능을 위해 그리고 세포 조성물의 투여를 위해 적합한, 담체, 예를 들어, 물, 염수, 포스페이트 완충 염수 등을 포함할 수 있다.

[0339] 멸균 주사용 용액은 본 발명의 세포를 소망하는 대로, 다양한 양의 다른 성분을 가진 적절한 용매의 적합한 양 내에 포함시킴으로써 제조될 수 있다. 그러한 조성물은 세포 조성물에서 사용하기 위해 그리고 인간과 같은 대상에게 투여하기 위해 적합한, 약학적 허용 담체, 희석제, 또는 부형제, 예를 들어, 멸균수, 생리학적 염수, 글루코스, 텍스트로스 등을 포함할 수 있다. 세포 조성물을 제공하기 위해 적합한 버퍼는 당업계에 잘 알려져 있다. 사용되는 임의의 비히클, 희석제, 또는 첨가제는 본 발명의 세포의 온전함 및 생존능의 보존과 양립성이다.

[0340] 조성물은 일반적으로 등장성일 것이며, 즉, 그들은 혈액 및 눈물과 동일한 삼투압을 갖는다. 본 발명의 세포 조

성물의 소망하는 등장성은 소듐 클로라이드, 또는 텍스트로스, 붕산, 소듐 타르트레이트, 또는 다른 무기 또는 유기 용질과 같은 다른 약학적 허용 제제를 이용하여 이루어질 수 있다. 소듐 클로라이드는 소듐 이온을 함유한 버퍼를 위해 특히 바람직하다. 한 가지 특히 유용한 버퍼는 염수, 예를 들어, 생리식염수이다. 당업자는 조성물의 성분이 화학적으로 불활성이고 본 발명의 세포의 생존능 또는 효능에 영향을 주지 않을 것이며 인간과 같은 대상에의 투여를 위해 양립성이어야 할 것임을 인식할 것이다. 당업자는 본 발명의 방법에서 투여될 조성물 내의 세포 및 선택적 첨가제, 비히클, 및/또는 담체의 양을 쉽게 결정할 수 있다.

[0341] 본 발명의 세포는 임의의 생리학적 허용 비히클내에서 투여될 수 있다. 투여를 위한 적합한 용량은 본원에 개시된다. 본 발명의 세포를 포함하는 세포 집단은 정제된 세포 집단을 포함할 수 있다. 당업자는 본원에 개시된 대로, 다양한 잘 알려진 방법을 이용하여 세포 집단 내의 세포의 백분율을 쉽게 결정할 수 있다. 본 발명의 유전적으로 변형된 세포를 포함하는 세포 집단에서 순도의 범위는 약 25% 내지 약 50%, 약 30% 내지 약 50%, 약 30% 내지 약 40%, 약 40% 내지 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 약 65% 내지 약 70%, 약 70% 내지 약 75%, 약 75% 내지 약 80%, 약 80% 내지 약 85%, 약 85% 내지 약 90%, 약 90% 내지 약 95%, 또는 약 95 내지 약 100%일 수 있다. 그러한 집단은 본원에 개시된 본 발명의 방법에 따라 효율적으로 생성될 수 있거나, 또는 선택적으로는 본원에 개시된 전이유전자를 발현하는 유전적으로 변형된 세포에 대해 농축될 수 있음이 이해된다. 전이유전자가 CAR을 인코딩하는 바람직한 실시양태에서, 그러한 집단은 본원에 개시된 본 발명의 방법에 따라 효율적으로 생성될 수 있거나, 또는 선택적으로는 본원에 개시된 CAR을 발현하는 유전적으로 변형된 세포에 대해 농축될 수 있음이 이해된다. 투여량은 당업자에 의해 쉽게 조정될 수 있으며; 예를 들어, 순도 감소는 투여량 증가를 요구할 수 있다.

[0342] 본 발명은 또한 본 발명의 세포의 제조를 위한 키트를 제공한다. 일 실시양태에서, 키트는 전이유전자의 발현이 T 세포의 내인성 프로모터의 제어하에 있도록 그 게놈 내에 통합된 전이유전자를 함유하는 유전적으로 조작된 T 세포를 생성하기 위한 하나 이상의 벡터를 하나 이상의 용기내에 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 전이유전자는 CAR이며, 특별한 실시양태에서, 키트는 CAR을 발현하는 유전적으로 조작된 T 세포를 생성하기 위한 하나 이상의 벡터를 포함한다. 특별한 실시양태에서, 키트는 본원에 개시된 대로, 재조합 비-통합 감마 레트로바이러스를 용기내에 포함한다. 키트는 또한 징크-핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화자-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN), 군집화된 규칙적-산재 짧은 회문구조 반복물(CRISPR) 연관 단백질 9(Cas9), Cpf1, 메가뉴클레아제 또는 Mega-Tal과 같은 적합한 상동성 재조합 시스템을, 바람직하게는 별도의 용기내에 함유할 수 있다. 키트는 대상으로부터 유래된 자가조직 세포로부터 또는 양립가능한 대상에게 투여될 비-자가조직 세포로부터 유전적으로 조작된 T 세포를 생성하기 위해 이용될 수 있다. 다른 실시양태에서, 키트는 대상에게 자가조직 또는 비-자가조직 투여를 위해 본 발명의 세포를 포함할 수 있다. 구체적 실시양태에서, 키트는 하나 이상의 용기내에 본 발명의 T 세포를 포함한다.

[0343] 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 개시된 대로, 재조합 비-통합 감마 레트로바이러스를 포함하는 키트를 제공한다. 구체적 실시양태에서, 키트는 하나 이상의 용기내에 본 발명의 비-통합 감마 레트로바이러스를 포함한다.

[0344] 7.8. 리포터 전이유전자에 관련된 대안적 실시양태

[0345] 본 발명의 대안적인 구체적 실시양태에서, T 세포는 그 게놈내에 리포터 전이유전자(선택적으로는 치료 전이유전자 대신)를 통합시켰으며, 리포터 전이유전자의 발현은 본원에서 상기에 개시한 프로모터 중 어느 것일 수 있는 내인성 프로모터의 제어하에 있다. 리포터 전이유전자는 검출가능한 마커(바람직하게는 세포-표면) 단백질을 인코딩하는 전이유전자이다. 구체적 실시양태에서, 리포터 전이유전자는 IL4 또는 IL4의 막-결합 형태를 인코딩하지 않는다. 다른 구체적 실시양태에서, 리포터 전이유전자는 세포 자살 스위치를 인코딩한다. 구체적 실시양태에서, 세포 자살 스위치는 절단된 EGF 수용체(EGFRt)이며, 이것은 필요하다면 치료 T 세포의 검출 및 제거 둘 모두를 가능하게 한다. 이 리포터를 인식하며 *생체내*에서 항체-매개 표적-세포 사멸을 촉발하는 특이적 항체(예를 들어, 세톡시맵)가 있다(미국 특허 8,802,374호 참고). 따라서, 예를 들어, EGFRt를 인코딩하는 전이유전자는 내인성의 구성적 또는 유도성 프로모터의 제어하에 있을 수 있으며, 치료 목적을 위하여 대상에게 조작된 T 세포의 투여 후, 대상은 EGFRt를 인식하고 조작된 T 세포의 세포 사멸을 촉발하는 항체가 투여되어, 치료 후 소망할 때 T 세포 활성을 중단시킬 수 있다.

[0346] 7.9. 예시적 실시양태

[0347] 본 발명은 하기의 예시적 실시양태를 제공한다.

- [0348] 실시양태 1. 전이유전자의 발현이 T 세포의 내인성 프로모터의 제어하에 있도록 전이유전자가 T 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되며, 전이유전자는 치료 단백질을 인코딩하는 T 세포.
- [0349] 실시양태 2. 실시양태 1에 있어서, 전이유전자는 치료 단백질을 인코딩하는 T 세포.
- [0350] 실시양태 3. 실시양태 1에 있어서, 전이유전자는 치료 단백질을 인코딩하는 T 세포.
- [0351] 실시양태 4. 실시양태 1-3 중 어느 하나에 있어서, 전이유전자는 게놈 내의 단일 부위에 통합되는 T 세포.
- [0352] 실시양태 5. 실시양태 1-3 중 어느 하나에 있어서, 전이유전자는 세포의 게놈 내의 두 부위에 통합되는 T 세포.
- [0353] 실시양태 6. 실시양태 1-5 중 어느 하나에 있어서, 제1 부위는 내인성 프로모터의 제어하에 있는 내인성 유전자의 엑손인 T 세포.
- [0354] 실시양태 7. 실시양태 6에 있어서, 제1 부위는 내인성 유전자의 제1 엑손 내에 있는 T 세포.
- [0355] 실시양태 8. 실시양태 1-7 중 어느 하나에 있어서, 내인성 프로모터는 구성적인 T 세포.
- [0356] 실시양태 9. 실시양태 8에 있어서, 프로모터는 CD4 프로모터, CD8a 프로모터, CD8b 프로모터, TCRa 프로모터, TCRb 프로모터, CD3d 프로모터, CD3g 프로모터, CD3e 프로모터, 및 CD3z 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택되는 T 세포.
- [0357] 실시양태 10. 실시양태 1-7 중 어느 하나에 있어서, 내인성 프로모터는 T 세포의 서브세트에서 활성화된 T 세포.
- [0358] 실시양태 11. 실시양태 10에 있어서, 내인성 프로모터는 CD4 프로모터, CD8a 프로모터, CD8b 프로모터, TCRa 프로모터, TCRb 프로모터, CD3d 프로모터, CD3g 프로모터, CD3e 프로모터, CD3z 프로모터, 액틴 프로모터, CD25 프로모터, IL2 프로모터, CD69 프로모터, GzmB 프로모터, T-bet 프로모터, IFN γ 프로모터, TIM3 프로모터, IL4 프로모터, GATA3 프로모터, IL5 프로모터, IL13 프로모터, IL10 프로모터, IL17A 프로모터, IL6 프로모터, IL21 프로모터, IL23R 프로모터, FoxP3 프로모터, CTLA4 프로모터, CD25 프로모터, PD1 프로모터, CD45RO 프로모터, CCR7 프로모터, CD28 프로모터, CD95 프로모터, CD28 프로모터, CD27 프로모터, CD127 프로모터, PD-1 프로모터, CD122 프로모터, CD132 프로모터, KLRG-1 프로모터, HLA-DR 프로모터, CD38 프로모터, CD69 프로모터, Ki-67 프로모터, CD11a 프로모터, CD58 프로모터, CD99 프로모터, CD62L 프로모터, CD103 프로모터, CCR4 프로모터, CCR5 프로모터, CCR6 프로모터, CCR9 프로모터, CCR10 프로모터, CXCR3 프로모터, CXCR4 프로모터, CLA 프로모터, 그랜자임 A 프로모터, 그랜자임 B 프로모터, 페르포린 프로모터, CD57 프로모터, CD161 프로모터, IL-18Ra 프로모터, c-Kit 프로모터, 및 CD130 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택되는 T 세포.
- [0359] 실시양태 12. 실시양태 1-7 중 어느 하나에 있어서, 내인성 프로모터는 유도성인 T 세포.
- [0360] 실시양태 13. 실시양태 12에 있어서, 내인성 프로모터는 T 세포의 활성화에 의해 유도되는 T 세포.
- [0361] 실시양태 14. 실시양태 12에 있어서, 프로모터는 T 세포에 의해 발현된 키메라 항원 수용체(CAR), 키메라 공작극 수용체(CCR), T 세포 수용체(TCR), CD28, CD27, 또는 4-1BB의 그의 각각의 결합 파트너에의 결합에 의해 유도되는 T 세포.
- [0362] 실시양태 15. 실시양태 14에 있어서, 프로모터는 T 세포에 의해 발현된 CAR, CCR 또는 TCR의 그의 각각의 결합 파트너에의 결합에 의해 유도되는 T 세포.
- [0363] 실시양태 16. 실시양태 15에 있어서, 프로모터는 활성화 T 세포의 핵 인자(NFAT) 프로모터, 프로그래밍된 사멸 1(PD-1) 프로모터, T 세포 면역글로불린 뮤신-3(TIM-3) 프로모터, 세포독성 T 림프구 항원-4(CTLA4) 프로모터, 림프구-활성화 단백질 3(LAG-3) 프로모터, 종양 괴사 인자(TNF)-관련 어파토시스-유도 리간드(TRAIL) 프로모터, B- 및 T-림프구 감쇠자(BTLA) 프로모터, CD25 프로모터, CD69 프로모터, Fas 리간드(FasL) 프로모터, TIGIT 프로모터, 및 2B4 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택되는 T 세포.
- [0364] 실시양태 17. 실시양태 12에 있어서, 프로모터는 T 세포에 의해 발현된 억제성 수용체에의 리간드의 결합에 의해 유도되는 T 세포.
- [0365] 실시양태 18. 실시양태 17에 있어서, 억제성 수용체는 PD-1, CTLA4, TRAIL, LAG-3, BTLA, TIM-3, Fas, TIGIT, 및 2B4로 이루어지는 군으로부터 선택되는 T 세포.
- [0366] 실시양태 19. 실시양태 17에 있어서, 프로모터는 CPT1a 프로모터 및 ATGL 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택되는 T 세포.

- [0367] 실시양태 20. 실시양태 12에 있어서, 프로모터는 T 세포에 의해 발현되는 사이토카인 수용체체의 사이토카인의 결합에 의해 유도되는 T 세포.
- [0368] 실시양태 21. 실시양태 20에 있어서, 사이토카인은 인터류킨 2(IL2), 인터류킨 7(IL7), 인터류킨 15(IL15), 및 인터류킨 21(IL21)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 T 세포.
- [0369] 실시양태 22. 실시양태 20에 있어서, 사이토카인은 인터류킨 10(IL10) 및 형질전환 성장 인자 β (TGF β)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 T 세포.
- [0370] 실시양태 23. 실시양태 20에 있어서, 프로모터는 T-bet 프로모터, Eomes 프로모터, GATA3 프로모터 및 CD45RA 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택되는 T 세포.
- [0371] 실시양태 24. 실시양태 12에 있어서, 프로모터는 핵산과 세포의 접촉에 의해 유도되는 T 세포.
- [0372] 실시양태 25. 실시양태 24에 있어서, 핵산은 바이러스 DNA, 바이러스 RNA, 및 세포내 마이크로RNA로 이루어지는 군으로부터 선택되는 T 세포.
- [0373] 실시양태 26. 실시양태 25에 있어서, 프로모터는 타입 I 인터페론(IFN) 알파, 타입 I IFN 베타, IRF3, IRF7, NFkB, AP-1, TNF-알파, IL1, 및 IL6로 이루어지는 군으로부터 선택되는 T 세포.
- [0374] 실시양태 27. 실시양태 12에 있어서, 프로모터는 세포와 대사물의 접촉에 의해 유도되는 T 세포.
- [0375] 실시양태 28. 실시양태 27에 있어서, 대사물은 피루베이트, 글루타민, 및 베타-하이드록시부티레이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 T 세포.
- [0376] 실시양태 29. 실시양태 12에 있어서, 프로모터는 세포에서의 대사적 변화 또는 세포에서 대사적 변화를 야기하는 물질과 세포의 접촉에 의해 유도되는 T 세포.
- [0377] 실시양태 30. 실시양태 29에 있어서, 프로모터는 PKM2 프로모터인 T 세포.
- [0378] 실시양태 31. 실시양태 12에 있어서, 프로모터는 세포내의 특정 이온 농도 또는 특정 이온 농도와 세포의 접촉에 의해 유도되는 T 세포.
- [0379] 실시양태 32. 실시양태 31에 있어서, 이온은 칼슘 또는 칼슘인 T 세포.
- [0380] 실시양태 33. 실시양태 31에 있어서, 프로모터는 IL2 프로모터, TNF알파 프로모터, 및 IFN감마 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택되는 T 세포.
- [0381] 실시양태 34. 실시양태 1-33 중 어느 하나에 있어서, 전이유전자는 CAR, CCR, 사이토카인, 우성 음성, 미세환경 조절자, 항체, 바이오센서, 키메라 수용체 리간드(CRL), 키메라 면역 수용체 리간드(CIRL), 가용성 수용체, 용질 수송자, 효소, 리보자임, 유전자 회로, 후생적 개질자, 전사 활성화자, 전사 억제자, 및 비-코딩 RNA로 이루어지는 군으로부터 선택된 분자를 인코딩하는 T 세포.
- [0382] 실시양태 35. 실시양태 34에 있어서, 전이유전자는 사이토카인을 인코딩하며, 선택적으로 사이토카인은 면역자극성인 T 세포.
- [0383] 실시양태 36. 실시양태 35에 있어서, 사이토카인은 면역자극성이며, 사이토카인은 IL2, IL12, IL15, 및 IL18으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 T 세포.
- [0384] 실시양태 37. 실시양태 34에 있어서, 전이유전자는 사이토카인을 인코딩하고, 선택적으로 사이토카인은 면역억제성인 T 세포.
- [0385] 실시양태 38. 실시양태 37에 있어서, 사이토카인은 면역억제성이며, 사이토카인은 TGF베타 및 IL10으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 T 세포.
- [0386] 실시양태 39. 실시양태 34에 있어서, 전이유전자는 항체를 인코딩하고, 선택적으로 항체는 면역글로불린, 이중-특이적 T-세포 관여항체(BiTE), 디아바디, 이중 친화성 재-표적화(DART), Fab, F(ab'), 단일체 가변 단편(scFv), 및 나노바디로 이루어지는 군으로부터 선택되는 T 세포.
- [0387] 실시양태 40. 실시양태 34에 있어서, 전이유전자는 CAR을 인코딩하는 T 세포.
- [0388] 실시양태 41. 실시양태 40에 있어서, CAR은 암 항원에 결합하는 T 세포.

- [0389] 실시양태 42. 실시양태 1-39 중 어느 하나에 있어서, T 세포는 표적 항원에 민감화되는 T 세포.
- [0390] 실시양태 43. 실시양태 1-42 중 어느 하나에 있어서, 리포터 분자를 인코딩하는 전이유전자(이하에서 "리포터 전이유전자")는 리포터 전이유전자의 발현이 프로모터, 바람직하게는 T 세포의 내인성 프로모터의 제어하에 있도록 T 세포의 게놈 내에 통합되는 T 세포.
- [0391] 실시양태 44. 실시양태 1-43 중 어느 하나에 있어서, 인간으로부터 유래되는 T 세포.
- [0392] 실시양태 45. 실시양태 44에 있어서, T 세포는 일차 인간 T 세포, CD34 조혈 줄기 세포로부터 유래된 T 세포, 배아 줄기 세포로부터 유래된 T 세포, 또는 유도된 다능성 줄기 세포로부터 유래된 T 세포인 T 세포.
- [0393] 실시양태 46. 실시양태 1-45 중 어느 하나에 있어서, 전이유전자는 표적화된 상동성 재조합에 의해 제1 부위내로 통합되는 T 세포.
- [0394] 실시양태 47. 실시양태 46에 있어서, 표적화된 상동성 재조합은 징크-핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화자-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN), 군집화된 규칙적-산재 짧은 회문구조 반복물(CRISPR) 연관 단백질 9(Cas9), Cpf1, 발열원, 아우레우스, 메가뉴클레아제 또는 Mega-Tal을 이용하는 것을 포함하는 방법에 의해 수행되는 T 세포.
- [0395] 실시양태 48. 실시양태 1-47 중 어느 하나에 있어서, 전이유전자는 T 세포의 게놈 내의 다수의 부위에서, 그리고 상기 다수의 부위에서의 전이유전자의 발현은 상이한 내인성 프로모터의 제어하에 있도록 통합되는 T 세포.
- [0396] 실시양태 49. 제1 전이유전자는 제1 전이유전자의 발현이 T 세포의 제1 내인성 프로모터의 제어하에 있도록 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되고, 제2 전이유전자는 제2 전이유전자의 발현이 제2 내인성 프로모터의 제어하에 있도록 세포의 게놈 내의 제2 부위에 통합되며, 상기 제1 및 제2 내인성 프로모터는 상이한 프로모터이고, 제1 전이유전자는 제1 치료 단백질 또는 제1 치료 핵산을 인코딩하고, 제2 전이유전자는 제2 치료 단백질 또는 제2 치료 핵산을 인코딩하며, 바람직하게는 제1 치료 단백질 또는 제1 치료 핵산은 제2 치료 단백질 또는 제2 치료 핵산과 각각 상이한, T 세포.
- [0397] 실시양태 50. 실시양태 49에 있어서, 제1 전이유전자는 제1 치료 단백질을 인코딩하는 T 세포.
- [0398] 실시양태 51. 실시양태 49에 있어서, 제1 전이유전자는 제1 치료 핵산을 인코딩하는 T 세포.
- [0399] 실시양태 52. 실시양태 49에 있어서, 제2 전이유전자는 제2 치료 단백질을 인코딩하는 T 세포.
- [0400] 실시양태 53. 실시양태 49에 있어서, 제2 전이유전자는 제2 치료 핵산을 인코딩하는 T 세포.
- [0401] 실시양태 54. 실시양태 49-53 중 어느 하나에 있어서, 제1 내인성 프로모터는 구성적이며, 제2 내인성 프로모터는 유도성인 T 세포.
- [0402] 실시양태 55. 실시양태 54에 있어서, 구성적 프로모터는 CD4 프로모터, CD8a 프로모터, CD8b 프로모터, TCRa 프로모터, TCRb 프로모터, CD3d 프로모터, CD3g 프로모터, CD3e 프로모터, 및 CD3z 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택되는 T 세포.
- [0403] 실시양태 56. 실시양태 54에 있어서, 제1 내인성 프로모터 및/또는 제2 내인성 프로모터는 T 세포의 서브세트에서 활성인 T 세포.
- [0404] 실시양태 57. 실시양태 56에 있어서, 제1 내인성 프로모터 및/또는 제2 내인성 프로모터는 CD4 프로모터, CD8a 프로모터, CD8b 프로모터, TCRa 프로모터, TCRb 프로모터, CD3d 프로모터, CD3g 프로모터, CD3e 프로모터, CD3z 프로모터, 액틴 프로모터, CD25 프로모터, IL2 프로모터, CD69 프로모터, GzmB 프로모터, T-bet 프로모터, IFN감마 프로모터, TIM3 프로모터, IL4 프로모터, GATA3 프로모터, IL5 프로모터, IL13 프로모터, IL10 프로모터, IL17A 프로모터, IL6 프로모터, IL21 프로모터, IL23R 프로모터, FoxP3 프로모터, CTLA4 프로모터, CD25 프로모터, PD1 프로모터, CD45RO 프로모터, CCR7 프로모터, CD28 프로모터, CD95 프로모터, CD28 프로모터, CD27 프로모터, CD127 프로모터, PD-1 프로모터, CD122 프로모터, CD132 프로모터, KLRG-1 프로모터, HLA-DR 프로모터, CD38 프로모터, CD69 프로모터, Ki-67 프로모터, CD11a 프로모터, CD58 프로모터, CD99 프로모터, CD62L 프로모터, CD103 프로모터, CCR4 프로모터, CCR5 프로모터, CCR6 프로모터, CCR9 프로모터, CCR10 프로모터, CXCR3 프로모터, CXCR4 프로모터, CLA 프로모터, 그랜자임 A 프로모터, 그랜자임 B 프로모터, 페르포린 프로모터, CD57 프로모터, CD161 프로모터, IL-18Ra 프로모터, c-Kit 프로모터, 및 CD130 프로모터로 이루어지는 군으로부터 독립적으로 선택되는 T 세포.
- [0405] 실시양태 58. 실시양태 54에 있어서, 유도성 프로모터는 T 세포의 활성화에 의해 유도되는 T 세포.

- [0406] 실시양태 59. 실시양태 54에 있어서, 유도성 프로모터는 T 세포에 의해 발현된 키메라 항원 수용체(CAR), 키메라 공자극 수용체(CCR), T 세포 수용체(TCR), CD28, CD27, 및 4-1BB의 그의 각각의 결합 파트너에의 결합에 의해 유도되는 T 세포.
- [0407] 실시양태 60. 실시양태 59에 있어서, 유도성 프로모터는 T 세포에 의해 발현된 CAR, CCR 또는 TCR의 그의 각각의 결합 파트너에의 결합에 의해 유도되는 T 세포.
- [0408] 실시양태 61. 실시양태 60에 있어서, 유도성 프로모터는 활성화 T 세포의 핵 인자(NFAT) 프로모터, 프로그래밍된 사멸 1(PD-1) 프로모터, T 세포 면역글로불린 뮤신-3(TIM-3) 프로모터, 세포독성 T 림프구 항원-4(CTLA4) 프로모터, 림프구-활성화 단백질 3(LAG-3) 프로모터, 종양 괴사 인자(TNF)-관련 어ପ토시스-유도 리간드(TRAIL) 프로모터, B- 및 T-림프구 감쇠자(BTLA) 프로모터, CD25 프로모터, CD69 프로모터, Fas 리간드(FasL) 프로모터, TIGIT 프로모터, 및 2B4 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택되는 T 세포.
- [0409] 실시양태 62. 실시양태 54에 있어서, 유도성 프로모터는 T 세포에 의해 발현된 억제성 수용체에의 리간드의 결합에 의해 유도되는 T 세포.
- [0410] 실시양태 63. 실시양태 62에 있어서, 억제성 수용체는 PD-1, CTLA4, TRAIL, LAG-3, BTLA, TIM-3, Fas, TIGIT, 및 2B4로 이루어지는 군으로부터 선택되는 T 세포.
- [0411] 실시양태 64. 실시양태 62에 있어서, 유도성 프로모터는 CPT1a 프로모터 및 ATGL 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택되는 T 세포.
- [0412] 실시양태 65. 실시양태 54에 있어서, 유도성 프로모터는 T 세포에 의해 발현되는 사이토카인 수용체에의 사이토카인의 결합에 의해 유도되는 T 세포.
- [0413] 실시양태 66. 실시양태 65에 있어서, 사이토카인은 인터류킨 2(IL2), 인터류킨 7(IL7), 인터류킨 15(IL15), 및 인터류킨 21(IL21)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 T 세포.
- [0414] 실시양태 67. 실시양태 65에 있어서, 사이토카인은 인터류킨 10(IL10) 및 형질전환 성장 인자 β (TGF β)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 T 세포.
- [0415] 실시양태 68. 실시양태 65에 있어서, 유도성 프로모터는 T-bet 프로모터, Eomes 프로모터, GATA3 프로모터, 및 CD45RA 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택되는 T 세포.
- [0416] 실시양태 69. 실시양태 54에 있어서, 유도성 프로모터는 핵산과 세포의 접촉에 의해 유도되는 T 세포.
- [0417] 실시양태 70. 실시양태 69에 있어서, 핵산은 바이러스 DNA, 바이러스 RNA, 및 세포내 마이크로RNA로 이루어지는 군으로부터 선택되는 T 세포.
- [0418] 실시양태 71. 실시양태 70에 있어서, 유도성 프로모터는 타입 I 인터페론 (IFN) 알파, 타입 I IFN 베타, IRF3, IRF7, NF κ B, AP-1, TNF-알파, IL1, 및 IL6로 이루어지는 군으로부터 선택되는 T 세포.
- [0419] 실시양태 72. 실시양태 54에 있어서, 유도성 프로모터는 세포와 대사물의 접촉에 의해 유도되는 T 세포.
- [0420] 실시양태 73. 실시양태 72에 있어서, 대사물은 피루베이트, 글루타민, 및 베타-하이드록시부티레이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 T 세포.
- [0421] 실시양태 74. 실시양태 54에 있어서, 유도성 프로모터는 세포에서의 대사적 변화 또는 세포에서 대사적 변화를 야기하는 물질과 세포의 접촉에 의해 유도되는 T 세포.
- [0422] 실시양태 75. 실시양태 74에 있어서, 유도성 프로모터는 PKM2 프로모터인 T 세포.
- [0423] 실시양태 76. 실시양태 54에 있어서, 유도성 프로모터는 세포내의 특정 이온 농도 또는 특정 이온 농도와 세포의 접촉에 의해 유도되는 T 세포.
- [0424] 실시양태 77. 실시양태 76에 있어서, 이온은 칼륨 또는 칼슘인 T 세포.
- [0425] 실시양태 78. 실시양태 76에 있어서, 유도성 프로모터는 IL2 프로모터, TNF알파 프로모터, 및 IFN감마 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택되는 T 세포.
- [0426] 실시양태 79. 실시양태 49-78 중 어느 하나에 있어서, 제1 전이유전자 및/또는 제2 전이유전자는 각각 CAR, CCR, 사이토카인, 우성 음성, 미세환경 조절자, 항체, 바이오센서, 키메라 수용체 리간드(CRL), 키메라 면역 수

용체 리간드(CIRL), 가용성 수용체, 용질 수송자, 효소, 리보자임, 유전자 회로, 후생적 개질자, 전사 활성화자, 전사 억제자, 및 비-코딩 RNA로 이루어지는 군으로부터 독립적으로 선택된 분자를 인코딩하는 T 세포.

- [0427] 실시양태 80. 실시양태 79에 있어서, 제1 전이유전자 및/또는 제2 전이유전자는 사이토카인을 인코딩하며, 바람직하게는 사이토카인은 면역자극성인 T 세포.
- [0428] 실시양태 81. 실시양태 80에 있어서, 사이토카인은 면역자극성이며 IL2, IL12, IL15, 및 IL18으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 T 세포.
- [0429] 실시양태 82. 실시양태 79에 있어서, 제1 전이유전자 및/또는 제2 전이유전자는 사이토카인을 인코딩하고, 바람직하게는 사이토카인은 면역억제성인 T 세포.
- [0430] 실시양태 83. 실시양태 82에 있어서, 사이토카인은 면역억제성이며, TGF베타 및 IL10으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 T 세포.
- [0431] 실시양태 84. 실시양태 79에 있어서, 제1 전이유전자 및/또는 제2 전이유전자는 항체를 인코딩하고, 항체는 면역글로불린, 이중-특이적 T-세포 관여항체(BiTE), 디아바디, 이중 친화성 재-표적화(DART), Fab, F(ab'), 단일쇄 가변 단편(scFv), 및 나노바디인 T 세포.
- [0432] 실시양태 85. 실시양태 79에 있어서, 제1 전이유전자 및/또는 제2 전이유전자는 CAR을 인코딩하는 T 세포.
- [0433] 실시양태 86. 실시양태 85에 있어서, CAR은 암 항원에 결합하는 T 세포.
- [0434] 실시양태 87. 실시양태 49-84 중 어느 하나에 있어서, T 세포는 표적 항원에 민감화되는 T 세포.
- [0435] 실시양태 88. 실시양태 49-87 중 어느 하나에 있어서, 리포터 분자를 인코딩하는 전이유전자(이하에서 "리포터 전이유전자")는 리포터 전이유전자의 발현이 프로모터, 바람직하게는 T 세포의 내인성 프로모터의 제어하에 있도록 T 세포의 게놈 내에 통합되는 T 세포.
- [0436] 실시양태 89. 실시양태 49-88 중 어느 하나에 있어서, 인간으로부터 유래되는 T 세포.
- [0437] 실시양태 90. 실시양태 89에 있어서, T 세포는 일차 인간 T 세포, CD34 조혈 줄기 세포로부터 유래된 T 세포, 배아 줄기 세포로부터 유래된 T 세포, 또는 유도된 다능성 줄기 세포로부터 유래된 T 세포인 T 세포.
- [0438] 실시양태 91. 실시양태 49-90에 있어서, 제1 전이유전자 및/또는 제2 전이유전자는 표적화된 상동성 재조합에 의해 제1 부위내로 통합되는 T 세포.
- [0439] 실시양태 92. 실시양태 91에 있어서, 표적화된 상동성 재조합은 징크-핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화자-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN), 군집화된 규칙적-산재 짧은 회문구조 반복물(CRISPR) 연관 단백질 9(Cas9), Cpf1, 발열원, 아우레우스, 메가뉴클레아제 또는 Mega-Tal을 이용하는 것을 포함하는 방법에 의해 수행되는 T 세포.
- [0440] 실시양태 93. 실시양태 49-92 중 어느 하나에 있어서, 제1 치료 단백질 또는 제1 치료 핵산은 각각 상기 제2 치료 단백질 또는 제2 치료 핵산과 상이한 T 세포.
- [0441] 실시양태 94. 실시양태 54에 있어서, 제2 내인성 프로모터는 T 세포의 활성화에 의해 유도되는 T 세포.
- [0442] 실시양태 95. 실시양태 54에 있어서, 제1 전이유전자는 CAR을 인코딩하는 T 세포.
- [0443] 실시양태 96. 실시양태 95에 있어서, 제1 내인성 프로모터는 T 세포 수용체 프로모터인 T 세포.
- [0444] 실시양태 97. 실시양태 96에 있어서, 프로모터는 T 세포 수용체 알파쇄 프로모터, T 세포 수용체 베타쇄 프로모터, CD3 감마쇄 프로모터, CD3 델타쇄 프로모터, CD3 입실론쇄 프로모터, 및 CD3 제타쇄 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택되는 T 세포.
- [0445] 실시양태 98. 실시양태 97에 있어서, 프로모터는 T 세포 수용체 알파쇄 프로모터인 T 세포.
- [0446] 실시양태 99. 실시양태 1-36, 39-81 또는 84-98 중 어느 하나에 있어서(전술한 실시양태가 실시양태 37-38에 직접 또는 간접적으로 종속되는 한은 제외하고), T 세포는 면역자극성 T 세포인 T 세포.
- [0447] 실시양태 100. 실시양태 99에 있어서, T 세포는 세포독성 T 림프구(CTL), CD4+ 서브타입, CD8+ 서브타입, 중앙기억 T 세포(TCM), 줄기 기억 T 세포(TSCM), 이펙터 기억 T 세포, 이펙터 T 세포, Th1 세포, Th2 세포, Th9 세포, Th17 세포, Th22 세포, 및 Tfh(여포성 헬퍼) 세포로 이루어지는 군으로부터 선택되는 T 세포.

- [0448] 실시양태 101. 실시양태 100에 있어서, T 세포는 CD4+인 T 세포.
- [0449] 실시양태 102. 실시양태 100에 있어서, T 세포는 CD8+인 T 세포.
- [0450] 실시양태 103. 실시양태 1-34, 37-79 또는 82-98 중 어느 하나에 있어서(전술한 실시양태가 실시양태 35-36에 직접 또는 간접적으로 종속되는 한은 제외하고), T 세포는 면역억제성 T 세포인 T 세포.
- [0451] 실시양태 104. 실시양태 103에 있어서, T 세포는 조절 T 세포인 T 세포.
- [0452] 실시양태 105. 실시양태 1-98 중 어느 하나의 T 세포 다수를 포함하는 T 세포의 단리된 집단.
- [0453] 실시양태 106. 실시양태 99-102 중 어느 하나의 T 세포 다수를 포함하는 T 세포의 단리된 집단.
- [0454] 실시양태 107. 실시양태 103 또는 104의 T 세포 다수를 포함하는 T 세포의 단리된 집단.
- [0455] 실시양태 108. 실시양태 1-98 중 어느 하나의 T 세포의 치료적 유효량; 및 약학적 허용 담체를 포함하는 약학 조성물.
- [0456] 실시양태 109. 실시양태 1-98 중 어느 하나의 T 세포 다수를 포함하는 T 세포 집단의 치료적 유효량; 및 약학적 허용 담체를 포함하는 약학 조성물.
- [0457] 실시양태 110. 실시양태 99-102 중 어느 하나의 T 세포의 치료적 유효량; 및 약학적 허용 담체를 포함하는 약학 조성물.
- [0458] 실시양태 111. 실시양태 99-102 중 어느 하나의 T 세포 다수를 포함하는 T 세포 집단의 치료적 유효량 및 약학적 허용 담체를 포함하는 약학 조성물.
- [0459] 실시양태 112. 실시양태 103 또는 104의 T 세포의 치료적 유효량; 및 약학적 허용 담체를 포함하는 약학 조성물.
- [0460] 실시양태 113. 실시양태 103 또는 104의 T 세포 다수를 포함하는 T 세포 집단의 치료적 유효량; 및 약학적 허용 담체를 포함하는 약학 조성물.
- [0461] 실시양태 114. 실시양태 1-98 중 어느 하나의 T 세포의 치료적 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법.
- [0462] 실시양태 115. 실시양태 105의 T 세포 집단의 치료적 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법.
- [0463] 실시양태 116. 실시양태 108 또는 109의 약학 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법.
- [0464] 실시양태 117. 실시양태 114-116 중 어느 하나에 있어서, 대상은 인간이고, 세포는 인간으로부터 유래되는 방법.
- [0465] 실시양태 118. 실시양태 114-117 중 어느 하나에 있어서, T 세포는 대상에게 자가조직인 방법.
- [0466] 실시양태 119. 실시양태 114-117 중 어느 하나에 있어서, T 세포는 대상에게 비-자가조직인 방법.
- [0467] 실시양태 120. T 세포의 치료적 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하며, 대상은 자극된 면역 반응을 필요로 하며, 전이유전자의 발현이 T 세포의 내인성 프로모터의 제어하에 있도록 전이유전자가 T 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되고, 전이유전자는 치료 단백질을 인코딩하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법.
- [0468] 실시양태 121. 실시양태 116에 있어서, 세포 또는 세포 집단은 약학 조성물로서 대상에게 투여되는 방법.
- [0469] 실시양태 122. 실시양태 120에 있어서, 전이유전자는 치료 단백질을 인코딩하는 방법.
- [0470] 실시양태 123. 실시양태 120에 있어서, 전이유전자는 치료 단백질을 인코딩하는 방법.
- [0471] 실시양태 124. 실시양태 116-123 중 어느 하나에 있어서, 전이유전자는 게놈 내의 단일 부위에 통합되는 방법.
- [0472] 실시양태 125. 실시양태 116-123 중 어느 하나에 있어서, 전이유전자는 세포의 게놈 내의 두 부위에 통합되는 방법.

- [0473] 실시양태 126. 실시양태 116-125 중 어느 하나에 있어서, 제1 부위는 내인성 프로모터의 제어 하의 내인성 유전자의 엑손인 방법.
- [0474] 실시양태 127. 실시양태 126에 있어서, 제1 부위는 내인성 유전자의 제1 엑손 내에 있는 방법.
- [0475] 실시양태 128. 실시양태 116-127 중 어느 하나에 있어서, 내인성 프로모터는 구성적인 방법.
- [0476] 실시양태 129. 실시양태 128에 있어서, 프로모터는 CD4 프로모터, CD8a 프로모터, CD8b 프로모터, TCRa 프로모터, TCRb 프로모터, CD3d 프로모터, CD3g 프로모터, CD3e 프로모터, 및 CD3z 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.
- [0477] 실시양태 130. 실시양태 116-127 중 어느 하나에 있어서, 내인성 프로모터는 T 세포의 서브세트에서 활성인 방법.
- [0478] 실시양태 131. 실시양태 130에 있어서, 내인성 프로모터는 CD4 프로모터, CD8a 프로모터, CD8b 프로모터, TCRa 프로모터, TCRb 프로모터, CD3d 프로모터, CD3g 프로모터, CD3e 프로모터, CD3z 프로모터, 액틴 프로모터, CD25 프로모터, IL2 프로모터, CD69 프로모터, GzmB 프로모터, T-bet 프로모터, IFN감마 프로모터, TIM3 프로모터, IL4 프로모터, GATA3 프로모터, IL5 프로모터, IL13 프로모터, IL10 프로모터, IL17A 프로모터, IL6 프로모터, IL21 프로모터, IL23R 프로모터, FoxP3 프로모터, CTLA4 프로모터, CD25 프로모터, PD1 프로모터, CD45RO 프로모터, CCR7 프로모터, CD28 프로모터, CD95 프로모터, CD28 프로모터, CD27 프로모터, CD127 프로모터, PD-1 프로모터, CD122 프로모터, CD132 프로모터, KLRG-1 프로모터, HLA-DR 프로모터, CD38 프로모터, CD69 프로모터, Ki-67 프로모터, CD11a 프로모터, CD58 프로모터, CD99 프로모터, CD62L 프로모터, CD103 프로모터, CCR4 프로모터, CCR5 프로모터, CCR6 프로모터, CCR9 프로모터, CCR10 프로모터, CXCR3 프로모터, CXCR4 프로모터, CLA 프로모터, 그랜자임 A 프로모터, 그랜자임 B 프로모터, 페르포린 프로모터, CD57 프로모터, CD161 프로모터, IL-18Ra 프로모터, c-Kit 프로모터, 및 CD130 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.
- [0479] 실시양태 132. 실시양태 116-127 중 어느 하나에 있어서, 내인성 프로모터 는 유도성인 방법.
- [0480] 실시양태 133. 실시양태 132에 있어서, 내인성 프로모터는 T 세포의 활성화에 의해 유도되는 방법.
- [0481] 실시양태 134. 실시양태 132에 있어서, 프로모터는 T 세포에 의해 발현된 키메라 항원 수용체(CAR), 키메라 공 자극 수용체(CCR), T 세포 수용체(TCR), CD28, CD27, 또는 4-1BB의 그의 각각의 결합 파트너에의 결합에 의해 유도되는 방법.
- [0482] 실시양태 135. 실시양태 134에 있어서, 프로모터는 T 세포에 의해 발현된 CAR, CCR 또는 TCR의 그의 각각의 결합 파트너에의 결합에 의해 유도되는 방법.
- [0483] 실시양태 136. 실시양태 135에 있어서, 프로모터는 활성화 T 세포의 핵 인자(NFAT) 프로모터, 프로그래밍된 사멸 1(PD-1) 프로모터, T 세포 면역글로불린 뮤신-3(TIM-3) 프로모터, 세포독성 T 림프구 항원-4(CTLA4) 프로모터, 림프구-활성화 단백질 3(LAG-3) 프로모터, 종양 괴사 인자(TNF)-관련 어파토시스-유도 리간드(TRAIL) 프로모터, B- 및 T-림프구 감쇠자(BTLA) 프로모터, CD25 프로모터, CD69 프로모터, Fas 리간드(FasL) 프로모터, TIGIT 프로모터, 및 2B4 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.
- [0484] 실시양태 137. 실시양태 132에 있어서, 프로모터는 T 세포에 의해 발현된 억제성 수용체에의 리간드의 결합에 의해 유도되는 방법.
- [0485] 실시양태 138. 실시양태 137에 있어서, 억제성 수용체는 PD-1, CTLA4, TRAIL, LAG-3, BTLA, TIM-3, Fas, TIGIT, 및 2B4로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.
- [0486] 실시양태 139. 실시양태 137에 있어서, 프로모터는 CPT1a 프로모터 및 ATGL 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.
- [0487] 실시양태 140. 실시양태 132에 있어서, 프로모터는 T 세포에 의해 발현되는 사이토카인 수용체에의 사이토카인의 결합에 의해 유도되는 방법.
- [0488] 실시양태 141. 실시양태 140에 있어서, 사이토카인은 인터류킨 2(IL2), 인터류킨 7(IL7), 인터류킨 15(IL15), 및 인터류킨 21(IL21)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.
- [0489] 실시양태 142. 실시양태 140에 있어서, 프로모터는 T-bet 프로모터, Eomes 프로모터, GATA3 프로모터, 및 CD45RA 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

- [0490] 실시양태 143. 실시양태 132에 있어서, 프로모터는 핵산과 세포의 접촉에 의해 유도되는 방법.
- [0491] 실시양태 144. 실시양태 143에 있어서, 핵산은 바이러스 DNA, 바이러스 RNA, 및 세포내 마이크로RNA로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.
- [0492] 실시양태 145. 실시양태 144에 있어서, 프로모터는 타입 I 인터페론(IFN) 알파, 타입 I IFN 베타, IRF3, IRF7, NFkB, AP-1, TNF-알파, IL1, 및 IL6로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.
- [0493] 실시양태 146. 실시양태 132에 있어서, 프로모터는 세포와 대사물의 접촉에 의해 유도되는 T 세포.
- [0494] 실시양태 147. 실시양태 146에 있어서, 대사물은 피루베이트, 글루타민, 및 베타-하이드록시부티레이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.
- [0495] 실시양태 148. 실시양태 132에 있어서, 프로모터는 세포에서의 대사적 변화 또는 세포에서 대사적 변화를 야기하는 물질과 세포의 접촉에 의해 유도되는 T 세포.
- [0496] 실시양태 149. 실시양태 148에 있어서, 프로모터는 PKM2 프로모터인 방법.
- [0497] 실시양태 150. 실시양태 132에 있어서, 프로모터는 세포내의 특정 이온 농도 또는 특정 이온 농도와 세포의 접촉에 의해 유도되는 방법.
- [0498] 실시양태 151. 실시양태 150에 있어서, 이온은 칼륨 또는 칼슘인 방법.
- [0499] 실시양태 152. 실시양태 150에 있어서, 프로모터는 IL2 프로모터, TNF알파 프로모터, 및 IFN감마 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.
- [0500] 실시양태 153. 실시양태 120-152 중 어느 하나에 있어서, 전이유전자는 CAR, CCR, 사이토카인, 우성 음성, 미세 환경 조절자, 항체, 바이오센서, 키메라 수용체 리간드(CRL), 키메라 면역 수용체 리간드(CIRL), 가용성 수용체, 용질 수송자, 효소, 리보자임, 유전자 회로, 후생적 개질자, 전사 활성화자, 전사 억제자, 및 비-코딩 RNA로 이루어지는 군으로부터 선택된 분자를 인코딩하는 방법.
- [0501] 실시양태 154. 실시양태 153에 있어서, 전이유전자는 사이토카인을 인코딩하며, 선택적으로 사이토카인은 면역 자극성인 방법.
- [0502] 실시양태 155. 실시양태 154에 있어서, 사이토카인은 면역자극성이며, 사이토카인은 IL2, IL12, IL15, 및 IL18 으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.
- [0503] 실시양태 156. 실시양태 153에 있어서, 전이유전자는 항체를 인코딩하고, 선택적으로 항체는 면역글로불린, 이중-특이적 T-세포 관여항체(BiTE), 디아바디, 이중 친화성 재-표적화(DART), Fab, F(ab'), 단일쇄 가변 단편(scFv), 및 나노바디로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.
- [0504] 실시양태 157. 실시양태 153에 있어서, 전이유전자는 CAR을 인코딩하는 방법.
- [0505] 실시양태 158. 실시양태 157에 있어서, CAR은 암 항원에 결합하는 방법.
- [0506] 실시양태 159. 실시양태 120-156 중 어느 하나에 있어서, T 세포는 표적 항원에 민감화되는 방법.
- [0507] 실시양태 160. 실시양태 120-159 중 어느 하나에 있어서, 리포터 분자를 인코딩하는 전이유전자(이하에서 "리포터 전이유전자")는 리포터 전이유전자의 발현이 프로모터, 바람직하게는 T 세포의 내인성 프로모터의 제어하에 있도록 T 세포의 게놈 내에 통합되는 방법.
- [0508] 실시양태 161. 실시양태 120-160 중 어느 하나에 있어서, 인간으로부터 유래되는 방법.
- [0509] 실시양태 162. 실시양태 161에 있어서, T 세포는 일차 인간 T 세포, CD34 조혈 줄기 세포로부터 유래된 T 세포, 배아 줄기 세포로부터 유래된 T 세포, 또는 유도된 다능성 줄기 세포로부터 유래된 T 세포인 방법.
- [0510] 실시양태 163. 실시양태 120-162 중 어느 하나에 있어서, 전이유전자는 표적화된 상동성 재조합에 의해 제1 부위내로 통합되는 방법.
- [0511] 실시양태 164. 실시양태 163에 있어서, 표적화된 상동성 재조합은 징크-핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화자-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN), 군집화된 규칙적-산재 짧은 회문구조 반복물(CRISPR) 연관 단백질 9(Cas9), Cpf1, 발열원, 아우레우스, 메가뉴클레아제 또는 Mega-Tal을 이용하는 것을 포함하는 방법에 의해 수행되는 방법.

- [0512] 실시양태 165. 실시양태 120-164 중 어느 하나에 있어서, 전이유전자는 T 세포의 게놈 내의 다수의 부위에서, 상기 다수의 부위에서의 전이유전자의 발현이 상이한 내인성 프로모터의 제어하에 있도록 통합되는 T 세포.
- [0513] 실시양태 166. 실시양태 120-165 중 어느 하나에 있어서, T 세포는 면역자극성 T 세포인 T 세포.
- [0514] 실시양태 167. 실시양태 166에 있어서, T 세포는 세포독성 T 림프구(CTL), CD4+ 서브타입, CD8+ 서브타입, 중앙 기억 T 세포(TCM), 줄기 기억 T 세포(TSCM), 이펙터 기억 T 세포, 이펙터 T 세포, Th1 세포, Th2 세포, Th9 세포, Th17 세포, Th22 세포, 및 Tfh(여포성 헬퍼) 세포로 이루어지는 군으로부터 선택되는 T 세포.
- [0515] 실시양태 168. 실시양태 167에 있어서, T 세포는 CD4+인 T 세포.
- [0516] 실시양태 169. 실시양태 167에 있어서, T 세포는 CD8+인 T 세포.
- [0517] 실시양태 170. 실시양태 120-169 중 어느 하나에 있어서, 대상은 암을 갖는 방법.
- [0518] 실시양태 171. 실시양태 170에 있어서, 암은 백혈병인 방법.
- [0519] 실시양태 172. 실시양태 120-170 중 어느 하나에 있어서, 대상은 종양을 갖는 방법.
- [0520] 실시양태 173. 실시양태 120-172 중 어느 하나에 있어서, 대상은 인간이며 세포는 인간으로부터 유래되는 방법.
- [0521] 실시양태 174. 실시양태 120-173 중 어느 하나에 있어서, 세포는 대상에게 자가조직인 방법.
- [0522] 실시양태 175. 실시양태 120-173 중 어느 하나에 있어서, 세포는 대상에게 비-자가조직인 방법.
- [0523] 실시양태 176. 세포 또는 세포의 집단의 치료적 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하며, 대상은 억제된 면역 반응을 필요로 하며 세포는 전이유전자의 발현이 T 세포의 내인성 프로모터의 제어하에 있도록 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되는 T 세포이며, 전이유전자는 치료 단백질을 인코딩하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법.
- [0524] 실시양태 177. 실시양태 176에 있어서, 세포 또는 세포 집단은 약학 조성물로서 투여되는 방법.
- [0525] 실시양태 178. 실시양태 176에 있어서, 전이유전자는 치료 단백질을 인코딩하는 방법.
- [0526] 실시양태 179. 실시양태 176에 있어서, 전이유전자는 치료 핵산을 인코딩하는 방법.
- [0527] 실시양태 180. 실시양태 176-179 중 어느 하나에 있어서, 전이유전자는 게놈 내의 단일 부위에 통합되는 방법.
- [0528] 실시양태 181. 실시양태 176-179 중 어느 하나에 있어서, 전이유전자는 세포의 게놈 내의 두 부위에 통합되는 방법.
- [0529] 실시양태 182. 실시양태 176-181 중 어느 하나에 있어서, 제1 부위는 내인성 프로모터의 제어 하의 내인성 유전자의 엑손인 방법.
- [0530] 실시양태 183. 실시양태 182에 있어서, 제1 부위는 내인성 유전자의 제1 엑손 내에 있는 방법.
- [0531] 실시양태 184. 실시양태 176-183 중 어느 하나에 있어서, 내인성 프로모터는 구성적인 방법.
- [0532] 실시양태 185. 실시양태 184에 있어서, 프로모터는 CD4 프로모터, CD8a 프로모터, CD8b 프로모터, TCRa 프로모터, TCRb 프로모터, CD3d 프로모터, CD3g 프로모터, CD3e 프로모터, 및 CD3z 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.
- [0533] 실시양태 186. 실시양태 176-183 중 어느 하나에 있어서, 내인성 프로모터는 T 세포의 서브세트에서 활성인 방법.
- [0534] 실시양태 187. 실시양태 186에 있어서, 내인성 프로모터는 CD4 프로모터, CD8a 프로모터, CD8b 프로모터, TCRa 프로모터, TCRb 프로모터, CD3d 프로모터, CD3g 프로모터, CD3e 프로모터, CD3z 프로모터, 액틴 프로모터, CD25 프로모터, IL2 프로모터, CD69 프로모터, GzmB 프로모터, T-bet 프로모터, IFN감마 프로모터, TIM3 프로모터, IL4 프로모터, GATA3 프로모터, IL5 프로모터, IL13 프로모터, IL10 프로모터, IL17A 프로모터, IL6 프로모터, IL21 프로모터, IL23R 프로모터, FoxP3 프로모터, CTLA4 프로모터, CD25 프로모터, PD1 프로모터, CD45RO 프로모터, CCR7 프로모터, CD28 프로모터, CD95 프로모터, CD28 프로모터, CD27 프로모터, CD127 프로모터, PD-1 프로모터, CD122 프로모터, CD132 프로모터, KLRG-1 프로모터, HLA-DR 프로모터, CD38 프로모터, CD69 프로모터, Ki-67 프로모터, CD11a 프로모터, CD58 프로모터, CD99 프로모터, CD62L 프로모터, CD103 프로모터, CCR4

프로모터, CCR5 프로모터, CCR6 프로모터, CCR9 프로모터, CCR10 프로모터, CXCR3 프로모터, CXCR4 프로모터, CLA 프로모터, 그랜자임 A 프로모터, 그랜자임 B 프로모터, 페르포린 프로모터, CD57 프로모터, CD161 프로모터, IL-18Ra 프로모터, c-Kit 프로모터, 및 CD130 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.

- [0535] 실시양태 188. 실시양태 176-183 중 어느 하나에 있어서, 내인성 프로모터는 유도성인 방법.
- [0536] 실시양태 189. 실시양태 188에 있어서, 내인성 프로모터는 T 세포의 활성화에 의해 유도되는 방법.
- [0537] 실시양태 190. 실시양태 188에 있어서, 프로모터는 T 세포에 의해 발현된 키메라 항원 수용체(CAR), 키메라 공자극 수용체(CCR), T 세포 수용체(TCR), CD28, CD27, 또는 4-1BB의 그의 각각의 결합 파트너에의 결합에 의해 유도되는 방법.
- [0538] 실시양태 191. 실시양태 190에 있어서, 프로모터는 T 세포에 의해 발현된 CAR, CCR 또는 TCR의 그의 각각의 결합 파트너에의 결합에 의해 유도되는 방법.
- [0539] 실시양태 192. 실시양태 191에 있어서, 프로모터는 활성화 T 세포의 핵 인자(NFAT) 프로모터, 프로그래밍된 사멸 1(PD-1) 프로모터, T 세포 면역글로불린 유신-3(TIM-3) 프로모터, 세포독성 T 림프구 항원-4(CTLA4) 프로모터, 림프구-활성화 단백질 3(LAG-3) 프로모터, 종양 괴사 인자(TNF)-관련 어ପଟ시스-유도 리간드(TRAIL) 프로모터, B- 및 T-림프구 감쇠자(BTLA) 프로모터, CD25 프로모터, CD69 프로모터, Fas 리간드(FasL) 프로모터, TIGIT 프로모터, 및 2B4 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.
- [0540] 실시양태 193. 실시양태 188에 있어서, 프로모터는 T 세포에 의해 발현된 억제성 수용체체의 리간드의 결합에 의해 유도되는 방법.
- [0541] 실시양태 194. 실시양태 193에 있어서, 억제성 수용체는 PD-1, CTLA4, TRAIL, LAG-3, BTLA, TIM-3, Fas, TIGIT, 및 2B4로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.
- [0542] 실시양태 195. 실시양태 193에 있어서, 프로모터는 CPT1a 프로모터 및 ATGL 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.
- [0543] 실시양태 196. 실시양태 188에 있어서, 프로모터는 T 세포에 의해 발현되는 사이토카인 수용체체의 사이토카인의 결합에 의해 유도되는 방법.
- [0544] 실시양태 197. 실시양태 196에 있어서, 사이토카인은 인터류킨 10(IL10) 및 형질전환 성장 인자 β (TGF β)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.
- [0545] 실시양태 198. 실시양태 196에 있어서, 프로모터는 T-bet 프로모터, Eomes 프로모터, GATA3 프로모터, 및 CD45RA 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.
- [0546] 실시양태 199. 실시양태 188에 있어서, 프로모터는 핵산과 세포의 접촉에 의해 유도되는 방법.
- [0547] 실시양태 200. 실시양태 199에 있어서, 핵산은 바이러스 DNA, 바이러스 RNA, 및 세포내 마이크로RNA로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.
- [0548] 실시양태 201. 실시양태 200에 있어서, 프로모터는 타입 I 인터페론(IFN) 알파, 타입 I IFN 베타, IRF3, IRF7, NFkB, AP-1, TNF-알파, IL1, 및 IL6로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.
- [0549] 실시양태 202. 실시양태 188에 있어서, 프로모터는 세포와 대사물의 접촉에 의해 유도되는 방법.
- [0550] 실시양태 203. 실시양태 202에 있어서, 대사물은 피루베이트, 글루타민, 및 베타-하이드록시뷰티레이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.
- [0551] 실시양태 204. 실시양태 188에 있어서, 프로모터는 세포에서의 대사적 변화 또는 세포에서 대사적 변화를 야기하는 물질과 세포의 접촉에 의해 유도되는 방법.
- [0552] 실시양태 205. 실시양태 204에 있어서, 프로모터는 PKM2 프로모터인 방법.
- [0553] 실시양태 206. 실시양태 188에 있어서, 프로모터는 세포내의 특정 이온 농도 또는 특정 이온 농도와 세포의 접촉에 의해 유도되는 방법.
- [0554] 실시양태 207. 실시양태 206에 있어서, 이온은 칼륨 또는 칼슘인 방법.
- [0555] 실시양태 208. 실시양태 206에 있어서, 프로모터는 IL2 프로모터, TNF알파 프로모터, 및 IFN감마 프로모터로 이

루어지는 군으로부터 선택되는 방법.

- [0556] 실시양태 209. 실시양태 176-208 중 어느 하나에 있어서, 전이유전자는 CAR, CCR, 사이토카인, 우성 음성, 미세 환경 조절자, 항체, 바이오센서, 키메라 수용체 리간드(CRL), 키메라 면역 수용체 리간드(CIRL), 가용성 수용체, 용질 수송자, 효소, 리보자임, 유전자 회로, 후생적 개질자, 전사 활성화자, 전사 억제자, 및 비-코딩 RNA로 이루어지는 군으로부터 선택된 분자를 인코딩하는 방법.
- [0557] 실시양태 210. 실시양태 209에 있어서, 전이유전자는 사이토카인을 인코딩하며, 선택적으로 사이토카인은 면역 억제성인 방법.
- [0558] 실시양태 211. 실시양태 210에 있어서, 사이토카인은 면역억제성이며 사이토카인은 TGF베타 및 IL10으로 이루어 지는 군으로부터 선택되는 방법.
- [0559] 실시양태 212. 실시양태 209에 있어서, 전이유전자는 항체를 인코딩하고, 선택적으로 항체는 면역글로불린, 이중-특이적 T-세포 관여항체(BiTE), 디아바디, 이중 친화성 재-표적화(DART), Fab, F(ab'), 단일쇄 가변 단편 (scFv), 및 나노바디로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.
- [0560] 실시양태 213. 실시양태 209에 있어서, 전이유전자는 CAR을 인코딩하는 방법.
- [0561] 실시양태 214. 실시양태 213에 있어서, CAR은 암 항원에 결합하는 방법.
- [0562] 실시양태 215. 실시양태 176-212 중 어느 하나에 있어서, T 세포는 표적 항원에 민감화되는 방법.
- [0563] 실시양태 216. 실시양태 176-215 중 어느 하나에 있어서, 리포터 분자를 인코딩하는 전이유전자(이하에서 "리포 터 전이유전자")는 리포터 전이유전자의 발현이 프로모터, 바람직하게는 T 세포의 내인성 프로모터의 제어하에 있도록 T 세포의 게놈 내에 통합되는 방법.
- [0564] 실시양태 217. 실시양태 176-216 중 어느 하나에 있어서, 인간으로부터 유래되는 방법.
- [0565] 실시양태 218. 실시양태 217에 있어서, T 세포는 일차 인간 T 세포, CD34 조혈 줄기 세포로부터 유래된 T 세포, 배아 줄기 세포로부터 유래된 T 세포, 또는 유도된 다능성 줄기 세포로부터 유래된 T 세포인 방법.
- [0566] 실시양태 219. 실시양태 176-218 중 어느 하나에 있어서, 전이유전자는 표적화된 상동성 재조합에 의해 제1 부 위내로 통합되는 방법.
- [0567] 실시양태 220. 실시양태 219에 있어서, 표적화된 상동성 재조합은 징크-핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화자-유 사 이펙터 뉴클레아제(TALEN), 군집화된 규칙적-산재 짧은 회문구조 반복물(CRISPR) 연관 단백질 9(Cas9), Cpf1, 발열원, 아우레우스, 메가뉴클레아제 또는 Mega-Tal을 이용하는 것을 포함하는 방법에 의해 수행되는 방 법.
- [0568] 실시양태 221. 실시양태 176-220 중 어느 하나에 있어서, 전이유전자는 T 세포의 게놈 내의 다수의 부위에서, 상기 다수의 부위에서의 전이유전자의 발현이 상이한 내인성 프로모터의 제어하에 있도록 통합되는 방법.
- [0569] 실시양태 222. 실시양태 176-221 중 어느 하나에 있어서, T 세포는 면역억제성 T 세포인 방법.
- [0570] 실시양태 223. 실시양태 222에 있어서, T 세포는 조절 T 세포인 방법.
- [0571] 실시양태 224. 실시양태 176-223 중 어느 하나에 있어서, 대상은 인간이며 세포는 인간으로부터 유래되는 방법.
- [0572] 실시양태 225. 실시양태 176-224 중 어느 하나에 있어서, 세포는 대상에게 자가조직인 방법.
- [0573] 실시양태 226. 실시양태 176-224 중 어느 하나에 있어서, 세포는 대상에게 비-자가조직인 방법.
- [0574] 실시양태 227. (i) 전이유전자, 및
- [0575] (ii) 세포의 게놈 내의 부위에서 전이유전자의 표적화된 통합을 위해 적합한 상동성 재조합 시스템을 T 세포내 로 도입하여, 상동성 재조합 시스템이 세포의 게놈 내의 상기 부위에 전이유전자를 통합시키는 것을 포함하며, 전이유전자의 발현이 내인성 프로모터의 제어하에 있고 전이유전자는 치료 단백질 또는 치료 핵산을 인코딩하는, 치료 전이유전자를 발현하는 T 세포를 생성하는 방법.
- [0576] 실시양태 228. 실시양태 227에 있어서, 전이유전자는 치료 단백질을 인코딩하는 방법.
- [0577] 실시양태 229. 실시양태 227에 있어서, 전이유전자는 치료 핵산을 인코딩하는 방법.

- [0578] 실시양태 230. 실시양태 227에 있어서, 내인성 프로모터는 구성적인 방법.
- [0579] 실시양태 231. 실시양태 230에 있어서, 프로모터는 CD4 프로모터, CD8a 프로모터, CD8b 프로모터, TCRa 프로모터, TCRb 프로모터, CD3d 프로모터, CD3g 프로모터, CD3e 프로모터, 및 CD3z 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.
- [0580] 실시양태 232. 실시양태 227에 있어서, 내인성 프로모터는 T 세포의 서브세트에서 활성인 방법.
- [0581] 실시양태 233. 실시양태 232에 있어서, 내인성 프로모터는 CD4 프로모터, CD8a 프로모터, CD8b 프로모터, TCRa 프로모터, TCRb 프로모터, CD3d 프로모터, CD3g 프로모터, CD3e 프로모터, CD3z 프로모터, 액틴 프로모터, CD25 프로모터, IL2 프로모터, CD69 프로모터, GzmB 프로모터, T-bet 프로모터, IFN감마 프로모터, TIM3 프로모터, IL4 프로모터, GATA3 프로모터, IL5 프로모터, IL13 프로모터, IL10 프로모터, IL17A 프로모터, IL6 프로모터, IL21 프로모터, IL23R 프로모터, FoxP3 프로모터, CTLA4 프로모터, CD25 프로모터, PD1 프로모터, CD45RO 프로모터, CCR7 프로모터, CD28 프로모터, CD95 프로모터, CD28 프로모터, CD27 프로모터, CD127 프로모터, PD-1 프로모터, CD122 프로모터, CD132 프로모터, KLRG-1 프로모터, HLA-DR 프로모터, CD38 프로모터, CD69 프로모터, Ki-67 프로모터, CD11a 프로모터, CD58 프로모터, CD99 프로모터, CD62L 프로모터, CD103 프로모터, CCR4 프로모터, CCR5 프로모터, CCR6 프로모터, CCR9 프로모터, CCR10 프로모터, CXCR3 프로모터, CXCR4 프로모터, CLA 프로모터, 그랜자임 A 프로모터, 그랜자임 B 프로모터, 페르포린 프로모터, CD57 프로모터, CD161 프로모터, IL-18Ra 프로모터, c-Kit 프로모터, 및 CD130 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.
- [0582] 실시양태 234. 실시양태 227에 있어서, 내인성 프로모터는 유도성인 방법.
- [0583] 실시양태 235. 실시양태 234에 있어서, 내인성 프로모터는 T 세포의 활성화에 의해 유도되는 방법.
- [0584] 실시양태 236. 실시양태 234에 있어서, 프로모터는 T 세포에 의해 발현된 키메라 항원 수용체(CAR), 키메라 공 자극 수용체(CCR), T 세포 수용체(TCR), CD28, CD27, 및 4-1BB의 그의 각각의 결합 파트너에의 결합에 의해 유도되는 방법.
- [0585] 실시양태 237. 실시양태 236에 있어서, 프로모터는 T 세포에 의해 발현된 CAR, CCR 또는 TCR의 그의 각각의 결합 파트너에의 결합에 의해 유도되는 방법.
- [0586] 실시양태 238. 실시양태 237에 있어서, 프로모터는 활성화 T 세포의 핵 인자(NFAT) 프로모터, 프로그래밍된 사멸 1(PD-1) 프로모터, T 세포 면역글로불린 유신-3(TIM-3) 프로모터, 세포독성 T 림프구 항원-4(CTLA4) 프로모터, 림프구-활성화 단백질 3(LAG-3) 프로모터, 종양 괴사 인자(TNF)-관련 어파토시스-유도 리간드(TRAIL) 프로모터, B- 및 T-림프구 감쇠자(BTLA) 프로모터, CD25 프로모터, CD69 프로모터, Fas 리간드(FasL) 프로모터, TIGIT 프로모터, 및 2B4 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.
- [0587] 실시양태 239. 실시양태 234에 있어서, 프로모터는 T 세포에 의해 발현된 억제성 수용체체의 리간드의 결합에 의해 유도되는 방법.
- [0588] 실시양태 240. 실시양태 239에 있어서, 억제성 수용체는 PD-1, CTLA4, TRAIL, LAG-3, BTLA, TIM-3, Fas, TIGIT, 및 2B4로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.
- [0589] 실시양태 241. 실시양태 239에 있어서, 프로모터는 CPT1a 프로모터 및 ATGL 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.
- [0590] 실시양태 242. 실시양태 234에 있어서, 프로모터는 T 세포에 의해 발현되는 사이토카인 수용체체의 사이토카인의 결합에 의해 유도되는 방법.
- [0591] 실시양태 243. 실시양태 242에 있어서, 사이토카인은 인터류킨 2(IL2), 인터류킨 7(IL7), 인터류킨 15(IL15), 및 인터류킨 21(IL21)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.
- [0592] 실시양태 244. 실시양태 242에 있어서, 사이토카인은 인터류킨 10(IL10) 및 형질전환 성장 인자 β (TGF β)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.
- [0593] 실시양태 245. 실시양태 242에 있어서, 프로모터는 T-bet 프로모터, Eomes 프로모터, GATA3 프로모터, 및 CD45RA 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.
- [0594] 실시양태 246. 실시양태 234에 있어서, 프로모터는 핵산과 세포의 접촉에 의해 유도되는 방법.

- [0595] 실시양태 247. 실시양태 246에 있어서, 핵산은 바이러스 DNA, 바이러스 RNA, 및 세포내 마이크로RNA로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.
- [0596] 실시양태 248. 실시양태 247에 있어서, 프로모터는 타입 I 인터페론(IFN) 알파, 타입 I IFN 베타, IRF3, IRF7, NFkB, AP-1, TNF-알파, IL1, 및 IL6로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.
- [0597] 실시양태 249. 실시양태 234에 있어서, 프로모터는 세포와 대사물의 접촉에 의해 유도되는 방법.
- [0598] 실시양태 250. 실시양태 249에 있어서, 대사물은 피루베이트, 글루타민, 및 베타-하이드록시부티레이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.
- [0599] 실시양태 251. 실시양태 234에 있어서, 프로모터는 세포에서의 대사적 변화 또는 세포에서 대사적 변화를 야기하는 물질과 세포의 접촉에 의해 유도되는 방법.
- [0600] 실시양태 252. 실시양태 251에 있어서, 프로모터는 PKM2 프로모터인 방법.
- [0601] 실시양태 253. 실시양태 234에 있어서, 프로모터는 세포내의 특정 이온 농도 또는 특정 이온 농도와 세포의 접촉에 의해 유도되는 방법.
- [0602] 실시양태 254. 실시양태 253에 있어서, 이온은 칼륨 또는 칼슘인 방법.
- [0603] 실시양태 255. 실시양태 253에 있어서, 프로모터는 IL2 프로모터, TNF알파 프로모터, 및 IFN감마 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.
- [0604] 실시양태 256. 실시양태 227-255 중 어느 하나에 있어서, 전이유전자는 CAR, CCR, 사이토카인, 우성 음성, 미세환경 조절자, 항체, 바이오센서, 키메라 수용체 리간드(CRL), 키메라 면역 수용체 리간드(CIRL), 가용성 수용체, 용질 수송자, 효소, 리보자임, 유전자 회로, 후생적 개질자, 전사 활성화자, 전사 억제자, 및 비-코딩 RNA로 이루어지는 군으로부터 선택된 분자를 인코딩하는 방법.
- [0605] 실시양태 257. 실시양태 256에 있어서, 전이유전자는 사이토카인을 인코딩하며, 선택적으로 사이토카인은 면역 자극성인 방법.
- [0606] 실시양태 258. 실시양태 257에 있어서, 사이토카인은 면역자극성이며 사이토카인은 IL2, IL12, IL15, 및 IL18으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.
- [0607] 실시양태 259. 실시양태 256에 있어서, 전이유전자는 사이토카인을 인코딩하며, 선택적으로 사이토카인은 면역 억제성인 방법.
- [0608] 실시양태 260. 실시양태 259에 있어서, 사이토카인은 면역억제성이며 사이토카인은 TGF베타 및 IL10으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.
- [0609] 실시양태 261. 실시양태 256에 있어서, 전이유전자는 항체를 인코딩하고, 선택적으로 항체는 면역글로불린, 이중-특이적 T-세포 관여항체(BiTE), 디아바디, 이중 친화성 재-표적화(DART), Fab, F(ab'), 단일쇄 가변 단편(scFv), 및 나노바디로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.
- [0610] 실시양태 262. 실시양태 256에 있어서, 전이유전자는 CAR을 인코딩하는 방법.
- [0611] 실시양태 263. 실시양태 262에 있어서, CAR은 암 항원에 결합하는 방법.
- [0612] 실시양태 264. 실시양태 227-263 중 어느 하나에 있어서, T 세포는 표적 항원에 민감화되는 방법.
- [0613] 실시양태 265. 실시양태 227-264 중 어느 하나에 있어서, 리포터 분자를 인코딩하는 전이유전자(이하에서 "리포터 전이유전자")는 리포터 전이유전자의 발현이 프로모터, 바람직하게는 T 세포의 내인성 프로모터의 제어하에 있도록 T 세포의 게놈 내에 통합되는 방법.
- [0614] 실시양태 266. 실시양태 227-265 중 어느 하나에 있어서, 인간으로부터 유래되는 방법.
- [0615] 실시양태 267. 실시양태 266에 있어서, T 세포는 일차 인간 T 세포, CD34 조혈 줄기 세포로부터 유래된 T 세포, 배아 줄기 세포로부터 유래된 T 세포, 또는 유도된 다능성 줄기 세포로부터 유래된 T 세포인 방법.
- [0616] 실시양태 268. 실시양태 227-267에 있어서, 전이유전자는 표적화된 상동성 재조합에 의해 제1 부위내로 통합되는 방법.

- [0617] 실시양태 269. 실시양태 268에 있어서, 표적화된 상동성 재조합은 징크-핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화자-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN), 군집화된 규칙적-산재 짧은 회문구조 반복물(CRISPR) 연관 단백질 9(Cas9), Cpf1, 발열원, 아우레우스, 메가뉴클레아제 또는 Mega-Tal을 이용하는 것을 포함하는 방법에 의해 수행되는 방법.
- [0618] 실시양태 270. 실시양태 227-269 중 어느 하나에 있어서, 전이유전자는 T 세포의 게놈 내의 다수의 부위에서, 상기 다수의 부위에서의 전이유전자의 발현이 상이한 내인성 프로모터의 제어하에 있도록 통합되는 방법.
- [0619] 실시양태 271. 실시양태 227-270 중 어느 하나에 있어서, 세포내로 도입되는 전이유전자는 표적화 구조체내에 함유되는 방법.
- [0620] 실시양태 272. 실시양태 271에 있어서, 표적화 구조체는 바이러스 핵산 서열을 포함하는 방법.
- [0621] 실시양태 273. 실시양태 271 또는 272에 있어서, 표적화 구조체는 천연 또는 재조합 아데노-연관 바이러스(AVV) 바이러스 입자내로 패키징되는 방법.
- [0622] 실시양태 274. 실시양태 273에 있어서, AAV 입자는 AAV6 서열을 포함하는 방법.
- [0623] 실시양태 275. 실시양태 271 또는 272에 있어서, 표적화 구조체는 비-통합 감마-레트로바이러스내로 패키징되는 방법.
- [0624] 실시양태 276. 실시양태 227-275 중 어느 하나에 있어서, 표적화 구조체내의 전이유전자는 프로모터에 작동가능하게 연결되지 않는 방법.
- [0625] 실시양태 277. 실시양태 227-276 중 어느 하나에 있어서, T 세포내로 제2 전이유전자를 도입하는 것을 추가로 포함하는 방법.
- [0626] 실시양태 278. 실시양태 277에 있어서, 제1 전이유전자는 내인성 구성적 프로모터의 제어하에 있으며 제2 전이유전자는 내인성 유도성 프로모터의 제어하에 있는 방법.
- [0627] 실시양태 279. 실시양태 278에 있어서, 제1 전이유전자는 CAR인 방법.
- [0628] 실시양태 280. 실시양태 279에 있어서, 내인성 구성적 프로모터는 T 세포 수용체 프로모터인 방법.
- [0629] 실시양태 281. 실시양태 280에 있어서, 프로모터는 T 세포 수용체 알파쇄 프로모터, T 세포 수용체 베타쇄 프로모터, CD3 감마쇄 프로모터, CD3 델타쇄 프로모터, CD3 입실론쇄 프로모터, 및 CD3 제타쇄 프로모터로 이루어지는 군으로부터 선택되는 방법.
- [0630] 실시양태 282. 실시양태 281에 있어서, 프로모터는 T 세포 수용체 알파쇄 프로모터인 방법.
- [0631] 실시양태 283. 비-통합 감마-레트로바이러스를 포함하는 벡터.
- [0632] 실시양태 284. 실시양태 283에 있어서, 비-통합 감마-레트로바이러스는 돌연변이된 인테그라제를 포함하는 벡터.
- [0633] 실시양태 285. 실시양태 284에 있어서, 돌연변이된 인테그라제는 DDE 모티프에서 돌연변이되는 벡터.
- [0634] 실시양태 286. 실시양태 285에 있어서, 돌연변이된 인테그라제는 D124A, D124E, D124N, D124V, D183A, D183N, D124A 및 D183A, D124A 및 D183N, D124E 및 D183A, D124E 및 D183N, D124N 및 D183A, D124N 및 D183N, D124V 및 D183A, 및 D124V 및 D183N으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 돌연변이를 가지는 벡터.
- [0635] 실시양태 287. 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 재조합 핵산 서열이, CAR이 세포의 표면에서 세포에 의해 발현되도록 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되며, 상기 제1 부위에서의 CAR을 인코딩하는 핵산의 통합이 세포의 표면에서 기능성 T 세포 수용체(TCR) 복합체의 발현을 감소시키거나 방지하는 T 세포.
- [0636] 실시양태 288. 실시양태 287에 있어서, CAR을 인코딩하는 핵산 서열은 게놈 내의 단일 부위에서 통합되는 T 세포.
- [0637] 실시양태 289. 실시양태 287에 있어서, CAR을 인코딩하는 핵산 서열은 세포의 게놈 내의 두 부위에서 통합되는 T 세포.
- [0638] 실시양태 290. 실시양태 289에 있어서, 제1 부위는 TCR 복합체의 단백질을 인코딩하는 유전자의 엑손인 T 세포.

- [0639] 실시양태 291. 실시양태 287-290 중 어느 하나에 있어서, 제1 부위에서의 CAR을 인코딩하는 핵산 서열의 통합은 T 세포 수용체 알파쇄, T 세포 수용체 베타쇄, CD3 감마쇄, CD3 델타쇄, CD3 입실론쇄, 및 CD3 제타쇄로 이루어지는 군으로부터 선택되는 단백질의 발현을 감소시키거나 방지하는 T 세포.
- [0640] 실시양태 292. 실시양태 287-291 중 어느 하나에 있어서, T 세포에서 통합된 핵산 서열의 발현은 내인성 프로모터의 제어하에 있는 T 세포.
- [0641] 실시양태 293. 실시양태 292에 있어서, 내인성 프로모터는 T 세포 수용체 복합체 프로모터인 T 세포.
- [0642] 실시양태 294. 실시양태 292에 있어서, 내인성 프로모터는 T 세포 수용체 알파쇄, T 세포 수용체 베타쇄, CD3 감마쇄, CD3 델타쇄, CD3 입실론쇄, 또는 CD3 제타쇄를 인코딩하는 유전자의 프로모터인 T 세포.
- [0643] 실시양태 295. 실시양태 287-294 중 어느 하나에 있어서, CAR은 암 항원에 결합하는 T 세포.
- [0644] 실시양태 296. 실시양태 287-295 중 어느 하나에 있어서, T 세포는 세포독성 T 림프구(CTL), CD4+ 서브타입, CD8+ 서브타입, 중앙 기억 T 세포(TCM), 줄기 기억 T 세포(TSCM), 이펙터 기억 T 세포, 이펙터 T 세포, Th1 세포, Th2 세포, Th9 세포, Th17 세포, Th22 세포, Tfh(여포성 헬퍼) 세포, 및 T 조절 세포로 이루어지는 군으로부터 선택되는 T 세포.
- [0645] 실시양태 297. 실시양태 287-296 중 어느 하나에 있어서, 인간으로부터 유래되는 T 세포.
- [0646] 실시양태 298. 실시양태 297에 있어서, T 세포는 일차 인간 T 세포, CD34 조혈 줄기 세포로부터 유래된 T 세포, 배아 줄기 세포로부터 유래된 T 세포, 또는 유도된 다능성 줄기 세포로부터 유래되는 T 세포.
- [0647] 실시양태 299. 실시양태 287-298 중 어느 하나에 있어서, CAR을 인코딩하는 핵산 서열은 표적화된 상동성 재조합에 의해 제1 부위내로 통합되는 T 세포.
- [0648] 실시양태 300. 실시양태 299에 있어서, 표적화된 상동성 재조합은 징크-핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화자-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN), 군집화된 규칙적-산재 짧은 회문구조 반복물(CRISPR) 연관 단백질 9(Cas9), Cpf1, 메가뉴클레아제 또는 Mega-Tal을 이용하여 수행되는 T 세포.
- [0649] 실시양태 301. 실시양태 287에 있어서, CAR을 인코딩하는 핵산 서열은 세포의 게놈 내의 다수의 부위에서, 그리고 상기 다수의 부위에서의 CAR을 인코딩하는 핵산 서열의 발현이 상이한 내인성 프로모터의 제어하에 있도록, 통합되는 T 세포.
- [0650] 실시양태 302. 실시양태 287-301 중 어느 하나에 있어서, CAR을 인코딩하는 상기 핵산 서열은 또한 CAR이 세포의 표면에서 세포에 의해 발현되도록 세포의 게놈 내의 제2 부위에 통합되는 T 세포.
- [0651] 실시양태 303. 실시양태 302에 있어서, 상기 제2 부위에서의 CAR을 인코딩하는 핵산의 통합은 또한 세포의 표면에서의 기능성 TCR 복합체의 발현을 감소시키거나 방지하며, 상기 제1 부위 및 상기 제2 부위는 상이한 유전자 내에 있는 T 세포.
- [0652] 실시양태 304. 실시양태 287-303 중 어느 하나에 있어서, 제2 CAR을 인코딩하는 제2 핵산 서열은 제2 CAR이 세포의 표면에서 세포에 의해 발현되도록 그리고 제2 핵산 서열의 발현이 상기 제2 부위에서 내인성 프로모터의 제어하에 있도록 세포의 게놈 내의 제2 부위에서 통합되며, 상기 제1 부위와 상기 제2 부위는 상이한 유전자 내에 있는 T 세포.
- [0653] 실시양태 305. 세포의 표면에서 CAR을 생산하기 위하여, CAR을 인코딩하는 무-프로모터 재조합 핵산 서열이 세포의 게놈 내의 부위에 통합되며, 상기 부위는 CAR이 내인성 TCR 알파쇄 프로모터의 제어하에서 발현되도록 TCR 알파쇄의 제1 엑손이며, 상기 부위에서 CAR의 통합은 기능성 TCR 알파쇄의 발현을 감소시키거나 방지하는, 인간 T 세포.
- [0654] 실시양태 306. 실시양태 305에 있어서, CAR은 CD19에 결합하는 인간 T 세포.
- [0655] 실시양태 307. 실시양태 287-306 중 어느 하나의 세포 다수를 포함하는, T 세포의 단리된 집단.
- [0656] 실시양태 308. 실시양태 287-306 중 어느 하나의 세포의 치료적 유효량; 및 약학적 허용 담체를 포함하는 약학 조성물.
- [0657] 실시양태 309. 실시양태 287-306 중 어느 하나의 세포 다수를 포함하는 T 세포 집단의 치료적 유효량; 및 약학적 허용 담체를 포함하는 약학 조성물.

- [0658] 실시양태 310. 실시양태 287-306 중 어느 하나의 세포의 치료적 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, CAR 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법.
- [0659] 실시양태 311. 실시양태 308의 약학 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, CAR 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법.
- [0660] 실시양태 312. 실시양태 307의 세포 집단의 치료적 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, CAR 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법.
- [0661] 실시양태 313. 실시양태 309의 약학 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, CAR 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법.
- [0662] 실시양태 314. 실시양태 310-313 중 어느 하나에 있어서, 대상이 암을 가지며, CAR은 암의 암 항원에 결합하는 방법.
- [0663] 실시양태 315. 실시양태 314에 있어서, 암은 백혈병인 방법.
- [0664] 실시양태 316. 실시양태 310-314 중 어느 하나에 있어서, 대상은 종양을 갖는 방법.
- [0665] 실시양태 317. 실시양태 310-316 중 어느 하나에 있어서, 대상은 인간이며, 세포는 인간으로부터 유래되는 방법.
- [0666] 실시양태 318. 실시양태 310-317 중 어느 하나에 있어서, 세포는 대상에게 자가조직인 방법.
- [0667] 실시양태 319. 실시양태 310-317 중 어느 하나에 있어서, 세포는 대상에게 비-자가조직인 방법.
- [0668] 실시양태 320. (i) 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 핵산 서열, 및
- [0669] (ii) 세포의 게놈 내의 부위에서 핵산 서열의 표적화된 통합을 위해 적합한 상동성 재조합 시스템을 T 세포내로 도입하여, 상동성 재조합 시스템이 세포의 게놈 내의 상기 부위에 CAR을 인코딩하는 핵산 서열을 통합시켜 상기 부위에서 CAR의 통합이 세포의 표면에서 기능성 T 세포 수용체 복합체의 발현을 감소시키거나 방지하여, CAR을 발현하고 기능성 TCR 복합체가 결핍된 T 세포를 생성하는 것을 포함하는, 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하고 기능성 T 세포 수용체(TCR) 복합체가 결핍된 T 세포를 생성하는 방법.
- [0670] 실시양태 321. 실시양태 320에 있어서, CAR의 발현이 내인성 프로모터의 제어하에 있는 방법.
- [0671] 실시양태 322. 실시양태 321에 있어서, 내인성 프로모터는 T 세포 수용체 알파쇄, T 세포 수용체 베타쇄, CD3 감마쇄, CD3 델타쇄, CD3 입실론쇄, 또는 CD3 제타쇄를 인코딩하는 유전자의 프로모터인 방법.
- [0672] 실시양태 323. 실시양태 320-322 중 어느 하나에 있어서, 상동성 재조합 시스템은 징크-핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화자-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN), 또는 군집화된 규칙적-산재 짧은 회문구조 반복물(CRISPR) 연관 단백질 9(Cas9), Cpf1, 메가뉴클레아제 또는 Mega-Tal을 포함하는 방법.
- [0673] 실시양태 324. 실시양태 320-323 중 어느 하나에 있어서, 세포내로 도입되는 CAR을 인코딩하는 핵산 서열은 표적화 구조체내에 함유되는 방법.
- [0674] 실시양태 325. 실시양태 324에 있어서, 표적화 구조체는 아데노-연관 바이러스 2(AAV2) 서열을 포함하는 방법.
- [0675] 실시양태 326. 실시양태 324 또는 325에 있어서, 표적화 구조체는 천연 또는 재조합 아데노-연관 바이러스(AVV) 바이러스 입자내로 패키징되는 방법.
- [0676] 실시양태 327. 실시양태 326에 있어서, AAV 입자는 AAV6 서열을 포함하는 방법.
- [0677] 실시양태 328. 실시양태 320-327 중 어느 하나에 있어서, 표적화 구조체 내의 CAR을 인코딩하는 핵산 서열은 프로모터에 작동가능하게 연결되지 않는 방법.
- [0678] 실시양태 329. 실시양태 320-328 중 어느 하나에 있어서, 표적화 구조체는 5'에서 3'의 순서로, 제1 바이러스 서열, 좌측 상동성 암, 자가-절단 돼지 테스초바이러스 2A를 인코딩하는 핵산 서열, CAR을 인코딩하는 핵산 서열, 폴리아데닐화 서열, 우측 상동성 암, 및 제2 바이러스 서열을 포함하는 방법.
- [0679] 실시양태 330. 실시양태 329에 있어서, 제1 또는 제2 바이러스 서열은 아데노-연관 바이러스(AAV)로부터 오는 방법.

- [0680] 실시양태 331. 실시양태 330에 있어서, AAV는 AAV2, AAV5 또는 AAV6인 방법.
- [0681] 실시양태 332. 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 재조합 핵산 서열이, CAR이 세포의 표면에서 세포에 의해 발현되도록 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되며, 상기 제1 부위에서 CAR을 인코딩하는 핵산의 통합은 세포의 표면에서 기능성 T 세포 수용체(TCR) 복합체의 발현을 감소시키거나 방지하는, 유도된 다능성 줄기 세포.
- [0682] 본 발명의 다양한 실시양태의 활성화에 실질적으로 영향을 주지 않는 변형 또한 본원에서 제공되는 발명의 정의 내에 제공됨이 이해된다. 따라서, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것이며 제한하는 것이 아니다.
- [0683] **8.실시예**
- [0684] **8.1 실시예 1: 범용 CAR T 세포의 1-단계 생성.**
- [0685] 범용 CAR T 세포의 1-단계 생성을 위한 전략이 하기에 개시된다.
- [0686] 본 방법은 TCR 알파 프로모터의 제어하에 CAR을 가진 범용 CAR T 세포를 생성하기 위한 투-인-원(two-in-one) 게놈 편집 전략에 관련된다. 그렇게 하기 위하여, TCR 알파 불변 채 유전자내로 CAR을 표적화함으로써 TCR 발현을 파괴하였으며 내인성 프로모터를 이용하여 CAR을 발현시켰다. *TRAC* 유전자의 제1 엑손을 표적화하도록 맞춤형 뉴클레아제(TALEN 및 CRISPR/cas9)를 설계하였으며, 상동성 지시된 복구(HDR)에 의해 *TRAC* 유전자와 인 프레임(in frame)으로 CAR의 통합을 촉진하기 위하여 AAV 벡터를 이용하였다.
- [0687] 맞춤형 뉴클레아제: *TRAC* 유전자 상의 제1 엑손을 표적화하기 위하여 TALEN 및 gRNA를 설계하였다. 표적화된 서열은 TCR 알파의 경막 도메인의 업스트림에 위치된다. 이 도메인은 TCR 알파 및 베타 조립 및 세포 표면으로 보내기 위해 요구된다. 이 유전자좌에서 HDR에 의한 CAR의 비-상동성 말단 연결(NHEJ) 또는 통합은 TCR 복합체를 효율적으로 파괴한다.
- [0688] *TRAC*-gRNA 서열 :
- C*A*G*GGUUCUG GAUAUCUGUG UUUUAGAGCU AGAAAUAGCA
AGUUAAAAUA AGGCUAGUCC GUUAUCAACU UGAAAAAGUG GCACCGAGUC
GGUGCU*U*U*U (서열 번호 24)
- [0689]
- [0690] 2'-O-메틸 3' 포스포로티오에이트
- [0691] TALEN 표적 서열(스페이서는 밑줄그음):
- TTGTCCCACAGATATCC AGAACCCTGACCCTG
CCGTGTACCAGCTGAGA (서열 번호 25)
- [0692]
- [0693] 메신저 RNA: TALEN을 코딩하는 플라스미드를 트랜스포사겐(Transposagen)에 의해 합성하고 AgeI으로 선형화하였다. 엠메세지 엠머신(mMessage mMachine) T7 울트라(Ultra) 키트(라이프 테크놀로지스(Life Technologies); 캘리포니아주 칼사바드)를 이용하여 TALEN mRNA를 전사시키고 시험관내에서 폴리아데닐화하였다. 알엔이지(RNeasy) 컬럼(퀴아젠(Qiagen)); 캘리포니아주 발렌시아)을 이용하여 RNA를 정제하고 나노드롭(Nanodrop) 기계를 이용하여 정량하였다. RNA의 품질을 변성 포름알데히드/MOPS 아가로스 젤에서 확인하였다. 변형된 가이드 RNA(gRNA) 및 Cas9 mRNA를 트리링크 바이오테크놀로지스(TriLink Biotechnologies)에 의해 합성하였다. gRNA를 사이토포레이션(cytoporation) T 버퍼(하버드 어퍼레이터스(Harvard Apparatus); 매사추세츠주 홀리스트론)에서 1 ug/uL로 재구성하였다.
- [0694] AAV: *TRAC* 표적화를 위하여(도 1a 참고), pAAV-GFP 백본(셀바이오랩스(Cellbiolabs); 캘리포니아주 샌디에고)을 기초로, TALEN 및 gRNA 표적화 서열에 인접한 게놈 *TRAC*의 1.9 kb(PCR에 의해 증폭됨), *TRAC*의 제1 엑손과 인 프레임인 자가-절단 P2A 펩티드, 이어서 임상 시험에서 사용된 1928z CAR을 함유하는 pAAV-*TRAC*-P2A-1928z를 설계하고 클로닝하였다(Brentjens et al., *Sci. Transl. Med.* 5(177):177ra38. doi: 10.1126/scitranslmed.3005930 (2013)). 요약하면, CAR은 CD8a 리더 펩티드에 의해 선행되며 CD28 힌지-경막-세포내 영역 및 CD3ζ 세포내 도메인이 이어지는 인간 CD19에 대해 특이적인, 단일쇄 가변 단편 19scFV를 포함한다. 카세트는 소 성장 호르몬 폴리A 시그널(BGHpA)에 의해 종결된다.
- [0695] 세포: 건강한 지원 공여체로부터의 연막을 뉴욕 혈액 센터로부터 수득하였다. 말초 혈액 단핵 세포를 밀도 구배 원심분리에 의해 분리하였으며, 이어서 팬(Pan) T 세포 분리 키트(밀테니 바이오테크; 캘리포니아주 샌디에고)

를 이용하여 T 림프구를 정제하였다. 세포를 10^6 세포/ml의 밀도로 200 U/ml IL-2(밀테니 바이오텍)를 가진 인간 혈청(제미니 바이오프로덕츠(Gemini Bioproducts); 캘리포니아주 웨스트 새크라멘토)으로 보충된 엑스-비보(X-vivo) 15 배지(론자(Lonza); 스위스 바젤)에서 디나비드(Dynabeads(1:1 비드:세포) 인간 T-활성자 CD3/CD28(썬코퍼서; 캘리포니아주 칼스바드)로 활성화시켰다. 배지를 2일마다 교환하고, 세포를 10^6 세포/ml로 재도말하였다.

[0696] 유전자 표적화: 48h-활성화 후, CD3/CD28 비드를 자기적으로 제거하고, 12-16 시간 동안 비드의 부재하에서 세포를 배양하였다. T 림프구를 아질펄스 맥스(AgilePulse MAX) 시스템(하버드 어패러터스)을 이용하여 TALEN 또는 Cas9/gRNA RNA의 전기전달(electrotransfer)에 의해 형질감염시켰다. 요약하면, 세포를 사이토포레이션 배지 T(하버드 어패러터스)에서 세척하였다. 그 후 세포를 펠렛화하고, 30×10^6 세포/ml로 사이토포레이션 배지 T에서 재현탁시켰다. 3×10^6 세포를 0.2 cm 큐벳 내로 맞춤 뉴클레아제를 인코딩하는 각 mRNA의 표시된 용량과 혼합하였다. 전기천공은 600 V에서 2회 0.1 ms 펄스 및 이어서 100V에서 4회 0.2ms 펄스로 이루어졌다. 전기천공 후, 세포를 배양 배지내로 회석시키고 37°C, 5% CO₂에서 항온처리하였다. AAV를 전기천공 후 2 내지 4 시간에 배양액에 첨가하고, 추가 20 시간 동안 30°C 항온처리를 계속하였다. AAV 공여체를 표시된 MOI(1e5 내지 1e6 MOI)로 추가하였다. 이어서, 편집된 세포를 표준 조건을 이용하여 배양하였다(37°C 및 T 세포 성장 배지에서 증식되고, 2 내지 3일 마다 $\sim 1e6$ 세포/ml의 밀도를 유지하기 위하여 필요한 대로 보충함).

[0697] 이들 조건은 공여체 간에 매우 재현가능하며 TALEN 및 CRISPR 둘 모두에서 1단계로 최대 50%의 TCR-/CAR+ T 세포를 야기하였다.

[0698] TCR-음성 T 세포를 수득하기 위하여, TCR-양성 T 세포를 자기 PE-항-TCRab 및 항-PE 마이크로비드 및 LS 컬럼(밀테니 바이오텍)을 이용하여 배양액으로부터 제거하였다.

[0699] 레트로바이러스 벡터 구조체 및 레트로바이러스 생산: SFG γ -레트로바이러스 벡터를 인코딩하는 플라스미드(Riviere et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(15):6733-6737 (1995))를 표준 분자 생물학 기술을 이용하여 준비하였다. SFG-1928z 및 SFG-P28z의 합성은 이전에 개시되었다(Brentjens et al., *Nat Med.* 9(3):279-286 (2003), Brentjens et al., 2007 *Clin. Cancer Res.* 13(18 Pt 1):5426-5435 (2007); Maher et al., *Nat. Biotechnol.* 20(1):70-5 (2002)). 형질도입된 gpg29 섬유아세포(H29)로부터 유래된 VSV-G 슈도타입의 레트로바이러스 상등액을 이용하여 이전에 개시된 대로 안정한 레트로바이러스-생산 세포주를 제작하였다(Gong et al., *Neoplasia* 1:123-127 (1999)).

[0700] 레트로바이러스 형질도입: T 세포를 레트로벡틴(Retronectin)(타카라(Takara); 캘리포니아주 마운틴뷰)-코팅된 암관련레트로바이러스(oncoretrovirus) 벡터-결합 플레이트에서의 원심분리에 의해 연속 2일 형질도입시켰다.

[0701] 세포독성 분석: CAR로 형질도입된 T 세포의 세포독성은 표준 루시퍼라제계 분석에 의해 결정하였다. 요약하면, 반딧불이 루시퍼라제-GFP를 발현하는 NALM6가 표적 세포로서 작용하였다. 이펙터(E) 및 종양 표적(T) 세포를 NALM6 배지에서 100 μ l/웰의 총 부피내에 1×10^5 표적 세포로, 흑색벽의 96 웰 플레이트를 이용하여 표시된 E/T 비율로 세벌씩 공동-배양하였다. 표적 세포 단독을 동일한 세포 밀도로 도말하여 최대 루시퍼라제 발현(상대적 광 단위; RLUMax)을 결정하였다. 18 hr 후, 100 μ l 루시퍼라제 기질(브라이트-글로(Bright-Glo), 프로메가(Promega); 위스콘신주 매디슨)을 각 웰에 직접적으로 첨가하였다. 방출 광을 발광 플레이트 판독기 또는 제노젠(Xenogen) IVIS 영상화 시스템(제노젠(Xenogen); 캘리포니아주 아라메다)에서 검출하고, 리빙 이미지(Living Image) 소프트웨어(제노젠)를 이용하여 정량하였다. 용해를 $[1 - (RLUsample)/(RLUMax)] \times 100$ 으로 결정하였다.

[0702] 마우스 전신 종양 모델: 이용된 마우스 모델은 MSKCC 실험동물윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)에 의해 승인된 프로토콜하의, 8- 내지 12-주령 NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgtm1Wjl/SzJ (NSG) 마우스(잭슨 래보라토리(Jackson Laboratory); 메인주 바 하버)였다. 마우스에게 꼬리 정맥 주사에 의해 0.5×10^6 FFLuc-GFP NALM6 세포를 접종한 후, 4일 후에 2×10^5 CAR T 세포를 주사하였다. NALM6는 매우 균일한 종양 크기를 생산하며 치료 전에 어떤 마우스로 제외되지 않았다. 맹검법은 이용되지 않았다. 생물발광 영상화는 영상화 데이터세트의 획득을 위한 리빙 이미지 소프트웨어(제노젠)를 가진 제노젠 IVIS 영상화 시스템(제노젠)을 이용하였다. 종양 크기는 이전에 개시된 대로 평가하였다(Gade et al., *Cancer Res.* 65(19):9080-9088 (2005)).

[0703] 도 1a는 TCR 알파 불변(TRAC) 유전자좌내로의 맞춤 뉴클레아제(TALEN 또는 CRISPR/Cas9)-유도된 표적화된 통합

의 도식을 보여준다. 표적화 구조체(AAV6)는 상동성 서열(좌측 상동성 압, LHA 및 우측 상동성 압, RHA)에 의해 인접된 CAR 유전자를 함유한다. 일단 통합되면 CAR 발현은 내인성 TCR α 프로모터에 의해 추진되는 한편, TRAC 유전자좌는 파괴된다(TRA ν : TCR 알파 가변 영역; TRA β : TCR 알파 연결 영역; 2A: 자가 절단 돼지 테스토스테론 2A 서열; pA: 소 성장 호르몬 폴리A 서열). 도 1b는 TRAC TALEN mRNA를 이용한 T 세포의 형질감염 및 표시된 MOI로 AAV6의 첨가 후 5일에 대표적인 TCR/CAR 유동 플롯을 보여준다. 도 1b에 나타난 대로, CAR의 발현은 증가하였으며 증가하는 AAV MOI에서 TCR의 발현은 감소하였다. 도 1c는 AAV6 MOI에 따라 TCR 파괴(KO: 녹아웃) 및 표적화된 통합(KI: 녹인)의 백분율의 막대-그래프를 보여준다. 백분율은 FACS 분석에 의해 평가하였다. 도 1d는 T 세포내로 CAR 벡터화 후 5일에 평균 CAR 발현 평균 형광 강도(MFI)를 보여준다($n = 6$ 내지 8회 독립 실험). 결과는 TRAC 유전자좌에서의 CAR의 표적화된 통합이 유사한 CAR 발현 수준을 가진 T 세포의 균질한 집단을 생성하였음을 보여준다. 도 1e는 CAR 발현에서의 분산(평균에 대한 표준 편차의 비율)을 측정하는 CAR+ T 세포의 변동 계수를 보여준다. TRAC-P2A-1928z: TRAC내로의 표적화된 통합. SFG-1928z: SFG 레트로바이러스를 이용한 반-무작위 통합. **** $P < 0.0001$ (언페어드 T-테스트). 이들 결과는 TRAC 유전자좌에서의 CAR의 표적화된 통합이 유사한 발현을 가진 균질한 T 세포 집단을 생성하였음을 보여준다.

[0704] 도 2a는 CAR 및 TCR 발현을 보여주는 유세포분석법 분석을 보여준다. TRAC-P2A-1928z는 도 1에서처럼 생성되었다. TALEN-생성된 TCR-세포를 SFG-1928z 레트로바이러스로 형질도입시켰다. TCR+ 세포를 SFG-1928z 또는 SFG-P28z 레트로바이러스로 형질도입시켰다. 도 2b는 CD19+ 표적 세포를 이용하여 매주 자극시 표시된 CAR T 세포의 축적 세포 카운트를 보여주며, 1928z를 발현하는 세포가 시험관내 증식을 나타냈음을 보여준다. 도 2c는 표적 세포로서 반딧불이 루시페라제(FFL)-발현 NALM6을 이용한, 18 hr 생물발광 분석을 이용한 세포독성 활성을 보여준다. 1928z를 발현하는 세포는 세포독성 활성을 나타냈다. 도 2d 및 2e는 2×10^5 CAR T 세포로 처리된 FFL-NALM6 보유 마우스를 보여준다. 종양 크기는 40-일 기간에 걸쳐 매주 동물 당 정량된 생물발광 시그널로서 나타난다. 정량은 모든 주어진 시점에서 동물 당 등 및 배 획득의 평균 광자 카운트이며, 래디언스로서 표현된다. 도 2e에서 각 선은 한 마리의 마우스를 나타낸다. $n = 7$ 마리 마우스/그룹이다. 하부 우측 도면은 도 2d 및 2e에서 마우스의 생존의 카프란-메이어 분석이다. 이들 결과는 TRAC 내로의 CAR의 표적화된 통합이 SFG 레트로바이러스를 이용한 반-무작위 통합보다 유의하게 더 긴 생존을 야기하였음을 입증한다.

[0705] 함께 고려할 때 이들 결과는 주사된 CAR T 세포의 동등 용량에서, TRAC 유전자좌내로 표적화된 CAR을 가진 세포는 레트로바이러스를 이용하여 CAR로 형질도입된 세포보다 훨씬 더 강력함을 보여준다.

[0706] 상기에 개시한 대로, 범용 CAR T 세포의 1-단계 생성을 위한 전략은 TCR 알파 불변 체(TRAC) 제1 엑손내에 무-프로모터 CAR 유전자 카세트의 통합을 표적화함으로써 개발되었다. 이것은 TCR 알파 유전자 발현의 파괴를 수반하면서 내인성 TCR 알파 프로모터의 제어하의 CAR 발현을 야기한다. TCR 복합체의 모든 성분이 세포질막으로의 그의 국소화를 위해 요구되므로, TCR 알파 파괴는 TCR 음성 세포를 유도한다. 이 접근법은 일반적으로 이용되는 게놈 편집 플랫폼에서 적합하며(예를 들어, TALEN, CRISPR/Cas9, ZFN) T 세포에서 AAV 공여체 주형을 이용하여 TRAC 표적 부위에서의 상동성 재조합을 야기한다. T 세포에서 AAV 공여체 주형을 이용한 상동성 재조합을 촉진하기 위한 TALEN 및 CRISPR/Cas9의 효율을 비교하였다. 단일 단계에서 표적 유전자 파괴와 CAR 표적화된 삽입을 결합하는 범용 CAR T 세포 최대 50%를 생성하는 조건이 확립되었다. CAR 전이유전자의 표적화된 통합은 분자적으로 확인되었으며, 이것은 인간 말초 혈액 T 세포에서 매우 균질하고 안정한 CAR 발현을 야기한다. 이들 T 세포는 레트로바이러스로 형질도입된 CAR T 세포와 동일한 시험관내 증양 용해 활성 및 증식을 나타냈으며, 이것은 생체내 항-종양 활성에서 그들의 유용성을 지지한다. 내인성 TCR 알파 프로모터는 예상치 못한 이득을 제공하였다. 이 방법은 인간 말초 혈액 T 세포에서 매우 균질하고 안정한 CAR 발현을 제공하였으며, 또한 T 세포 지속성을 개선하였다. 가장 중요하게도, 이들 T 세포는 레트로바이러스로 형질도입된 CAR T 세포보다 더 높은 시험관내 및 생체내 증양 용해 활성, 증식 및 지속을 나타낸 한편, 그들의 이식편 대 숙주 질병 가능성은 세포의 표면에서 기능성 T 세포 수용체 복합체의 발현을 감소시키거나 방지함으로써 제거되었다. 범용 T 세포 제조의 확장성과 표적화된 CAR 유전자 통합의 균일성과 안전성을 결합하는 상기에 개시된 과정은 확장될 수 있고 필요에 따라 환자에게 쉽게 제공될 수 있는 기성품 CAR 치료법의 개발을 위해 유용하다.

[0707] **8.2 실시예 2: CRISPR/Cas9를 이용한 TRAC 유전자좌에의 CAR의 표적화는 증양 거부를 향상시킨다.**

[0708] 이 실시예는 전이유전자에 의해 인코딩된 CAR의 T 세포에 의한 발현이 수행되었음을 보여주되, 전이유전자의 발현은 내인성 T 세포 프로모터, 특히 인간 T 세포 수용체 α 체(TRAC) 프로모터의 제어하에 있었다. 인간 T 세포 수용체 α 체(TRAC) 유전자좌에 CD19-특이적 CAR을 보내는 것은 인간 말초 혈액 T 세포에서 균일한 CAR 발현을 야기할 뿐만 아니라, T 세포 성능을 향상시켜, 편집된 세포가 급성 림프아구성 백혈병의 마우스 모델에서 통상

적으로 생성된 CAR T 세포를 크게 능가함을 보여주는 실험이 하기에 개시된다. *TRAC* 유전자좌에 CAR을 표적화하는 것은 토닉 CAR 시그널링을 피하고, 단일 또는 반복된 항원에의 노출 후 CAR의 효과적인 내부화 및 재발현을 확립하여, 이펙터 T 세포 분화 및 기능소실을 지연시킴이 추가로 입증된다. 이들 발견은 CAR 면역생물학의 측면을 밝히며 면역요법을 진전시키기 위한 CRISPR/Cas9 게놈 편집의 방대한 잠재력을 강조한다.

[0709] **방법.** 가이드-RNA: 가이드 RNA(gRNA) gRNA는 TCR α 유전자의 불변 채(*TRAC*)의 제1 엑손을 표적화하기 위해 설계하였다. 표적화된 서열은 TCR 알파의 경막 도메인의 업스트림에 위치한다. 이 도메인은 TCR 알파 및 베타 조립 및 세포-표면으로 보내기 위해 요구된다. 이 유전자좌에서 HDR에 의한 CAR의 비-상동성 말단 연결(NHEJ) 및 통합 둘 모두는 그 후 TCR 복합체를 효율적으로 파괴할 것이다.

[0710] *B2M*을 위하여, *B2M* 유전자의 제1 엑손을 표적화하는 gRNA 및 TALEN(전사 활성화자-유사 이펙터 뉴클레아제) 둘 모두를 설계하였으며, TALEN으로 더 높은 절단 효율이 획득되었다. 동일한 프로토콜을 이용하였으며, 두 방법에 대해 유사한 세포독성과 특이성이 획득되었으며, 획득된 CAR T 세포는 활성과 증식면에서 구별할 수 없었다. 제조 이유로 *B2M* TALEN을 이 연구에서 주로 이용하였다.

[0711] *TRAC*-gRNA 서열:

C*A*G*GGUUCUG GAUAUCUGUG UUUUAGAGCU AGAAAUAGCA
AGUUA AAAUA AGGCUAGUCC GUUAUCAACU UGAAAAAGUG GCACCGAGUC
GGUGCU*U*U*U (서열 번호 26)

[0712]

[0713] *B2M*-gRNA 서열:

G*G*C*CACGGAG CGAGACAUCU UUUUAGAGCU AGAAAUAGCA
AGUUA AAAUA AGGCUAGUCC GUUAUCAACU UGAAAAAGUG GCACCGAGUC
GGUGCU*U*U*U (서열 번호 27)

[0714]

[0715] 2'-O-메틸 3' 포스포로티오에이트

[0716] *B2M*-TALEN 표적화 서열:

[0717] TTAGCTGTGCTCGCGC (TACTCTCTTTCTG) GCCTGGAGGCTATCCA (서열 번호 28). 좌측 TAL 이펙터(스페이서) 우측 TAL 이펙터.

[0718] **메신저 RNA:** 변형된 가이드 RNA(gRNA) 및 Cas9 mRNA를 트리링크 바이오테크놀로지스(캘리포니아주 샌디에고)에 의해 합성하였다. 가이드 RNA는 사이토포레이션 T 버퍼(하버드 어패러터스; 매사주세츠주 홀리스트)에서 1 μ g/ μ L로 재구성하였다.

[0719] **AAV:** pAAV-GFP 백본(셀 바이오랩스; 캘리포니아주 샌디에고)에 기초하여, gRNA 표적화 서열에 인접한 게놈 *TRAC*의 1.9 kb(PCR에 의해 증폭됨), *TRAC*의 제1 엑손과 인 프레임인 자가-절단 P2A 펩티드, 이어서 임상 시험에서 사용된 1928z CAR을 함유하는 pAAV-*TRAC*-1928z를 설계하고 클로닝하였다(Brentjens et al., *Sci. Trans. Med.* 5:177ra138 (2013)). 요약하면, CAR은 CD8a 리더 펩티드에 의해 선행되며 CD28 힌지-경막-세포내 영역 및 CD3 ζ 세포내 도메인이 이어지는 인간 CD19에 대해 특이적인, 단일쇄 가변 단편 19scFV를 포함한다. CAR cDNA는 소 성장 호르몬 폴리아 시그널(bGHpA)이 이어진다. *B2M* 유전자좌를 표적화할 때는, 1928z-pA 서열이 *B2M* 유전자의 ATG에서 인 프레임으로 위치되기 때문에 P2A 서열이 요구되지 않는 것을 제외하고는, 유사한 전략을 따랐다. 외 인성 프로모터(EF1 α , LTR, PGK, 또는 PGK100)를 이용할 경우, 프로모터-1928z-pA 카세트는 동일한 *TRAC* 또는 *B2M* 진입 지점에서 역 배향으로 위치되었다.

[0720] **세포:** 건강한 지원 공여체로부터의 연막을 뉴욕 혈액 센터로부터 획득하였다. 말초 혈액 단핵 세포를 밀도 구배 원심분리에 의해 분리하였으며, 이어서 팬 T 세포 분리 키트(밀테니 바이오텍; 캘리포니아주 샌디에고)를 이용하여 T 림프구를 정제하였다. 세포를 10⁶ 세포/ml의 밀도로 200 U/ml IL-2(밀테니 바이오텍)를 가진 5% 인간 혈청(제미니 바이오프로덕츠; 캘리포니아주 웨스트 새크라멘토)으로 보충된 엑스-비보 15 배지(론자; 스위스 바젤)에서 디나비드(1:1 비드:세포) 인간 T-활성자 CD3/CD28(써모피셔; 캘리포니아주 칼스바드)로 활성화시켰다. 배지를 2일마다 교환하고, 세포를 10⁶ 세포/ml로 재도말하였다.

- [0721] 유전자 표적화: T 세포 활성화를 시작한 후 48 시간에, CD3/CD28 비드를 자기적으로 제거하고, T 세포를 아질 펄스 맥스 시스템(하버드 어패러터스)을 이용하여 Cas9 mRNA 및 gRNA의 전기전달에 의해 형질감염시켰다. 3×10^6 세포를 0.2 cm 큐벳 내로 5 μ g Cas9 및 5 μ g gRNA와 혼합하였다. 전기천공 후, 세포를 배양 배지내로 희석시키고 37°C/5% CO₂에서 항온처리하였다. 재조합 AAV6 공여체 벡터(시그나젠(SignaGen)에 의해 제조됨; 메틸렌드주 게이너스버그))를 전기천공 후 2 내지 4 시간에 표시된 MOI(1×10^5 내지 1×10^6 범위)로 배양에 첨가하였다. 이어서, 편집된 세포를 표준 조건을 이용하여 배양하였다(37°C 및 T 세포 성장 배지에서 증식되고, 2 내지 3일 마다 $\sim 1 \times 10^6$ 세포/ml의 밀도를 유지하기 위하여 필요한 대로 보충함).
- [0722] TCR-음성 T 세포를 수득하기 위하여, TCR-양성 T 세포를 자기 비오틴-항-TCR $\alpha \beta$ 및 항-비오틴 마이크로비드 및 LS 컬럼(밀테니 바이오택)을 이용하여 배양액으로부터 제거하였다. 표적화 구조체와 전략의 상세사항을 위해서는, 도 7과 14를 참고한다.
- [0723] 레트로바이러스 벡터 구조체, 레트로바이러스 생산 및 형질도입: SFG γ -레트로바이러스(RV) 벡터를 인코딩하는 플라스미드(Rivière et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6733-6737 (1995))를 이전에 개시된 대로 준비하였다(Brentjens et al., *Nat. Med.* 9, 279-286, (2003); Maher et al., *Nat. Biotechnol.* 20:70-75 (2002)). 형질도입된 gpg29 섬유아세포(H29)로부터 유래된 VSV-G 슈도타입의 레트로바이러스 상등액을 이용하여 이전에 개시된 대로 안정한 레트로바이러스-생산 세포주를 제작하였다(Gong et al., *Cancer patient T cells genetically targeted to prostate-specific membrane antigen specifically lyse prostate cancer cells and release cytokines in response to prostate-specific membrane antigen. Neoplasia* 1:123-127 (1999)). 레트로벡터(타카라)-코팅된 플레이트에서의 원심분리에 의해 T 세포를 형질도입시켰다.
- [0724] 세포주: NALM-6 및 NIH/3T3을 ATCC로부터 수득하였으며 미코알러트 마이코플라즈마(MycoAlert Mycoplasma) 검출 키트(론자)를 이용하여 마이코플라즈마 오염에 대해 규칙적으로 시험하였다. 반딧불이 루시퍼라제-GFP를 발현하기 위하여 NALM-6 세포를 형질도입시키고 인간 CD19를 발현하기 위하여 NIH/3T3 세포를 형질도입시켰다(Brentjens et al., *Nat. Med.* 9, 279-286, (2003); Zhao et al., *Cancer Cell* 28:415-428 (2015)).
- [0725] 세포독성 분석: CAR로 형질도입된 T 세포의 세포독성은 표준 루시퍼라제에 분석에 의해 결정하였다. 요약하면, 반딧불이 루시퍼라제-GFP를 발현하는 NALM6가 표적 세포로서 작용하였다. 이펙터(E) 및 종양 표적(T) 세포를 NALM6 배지에서 100 μ l/웰의 총 부피내에 1×10^5 표적 세포로, 흑색벽의 96 웰 플레이트를 이용하여 표시된 E/T 비율로 세벌씩 공동-배양하였다. 표적 세포 단독을 동일한 세포 밀도로 도말하여 최대 루시퍼라제 발현(상대적 광 단위; RL_{Umax})을 결정하였다. 18 hr 후, 100 μ l 루시퍼라제 기질(브라이트-글로, 프로메가; 위스콘신주 매디슨)을 각 웰에 직접적으로 첨가하였다. 방출 광을 발광 플레이트 판독기 또는 제노젠 IVIS 영상화 시스템(제노젠; 캘리포니아주 아라메다)에서 검출하고, 리빙 이미지 소프트웨어(제노젠)를 이용하여 정량하였다. 용해를 $[1 - (RL_{U\text{sample}})/(RL_{U\text{max}})] \times 100$ 으로 결정하였다.
- [0726] 항원 자극 및 증식 분석: 인간 CD19를 발현하는 NIH/3T3을 인공 항원-제시 세포로서 이용하였다(Brentjens et al., *Nat. Med.* 9, 279-286, (2003)). 매주 자극을 위하여, 3×10^5 조사된(Irradiated) CD19+ AAPC를 24웰 플레이트에 도말하고 12시간 후에 엑스-비보(X-vivo) 15 + 인간 혈청 + 50U IL-2/mL 내의 5×10^5 CAR T 세포를 첨가하였다. 이틀마다, 세포를 계수하고 1×10^6 T 세포/mL의 농도에 도달하도록 배지를 추가하였다. 반복된 근위 자극(proximal stimulation)(도 6d)을 위하여, 24h(2 자극) 후 또는 12h(4 자극)마다 3T3-CD19가 도말된 새로운 웰로 세포를 옮겼다. 각 조건에 대하여, T 세포를 계수하고 12h 마다 CAR, 표현형 및 기능소실 마커 발현에 대해 FACS에 의해 분석하였다.
- [0727] 항체 및 세포내 염색: CAR을 염소 항-마우스 Fab(잭슨 이뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch), 115-606-003; 펜실베이니아주 웨스트그로브)로 라벨링하였다. T 세포 표현형결정을 위하여, 하기 항체를 이용하였다: 비디 바이오사이언시즈(캘리포니아주 샌호세)로부터의 마우스 항-인간 BUV-395CD4 (563552), APC-cy7-CD8(557834), BV-421-CD62L(563862), BV-510-CD279(PD1, 563076); 이바이오사이언시즈(캘리포니아주 칼스바드)로부터의 마우스 항-인간 APC-CD25(17-0259-42), FITC-CD45RA(11-0458-42), PerCP-eFluor710 CD223(LAG-3, 46-2239-42) 및 바이오레젠트(Biolegend)(캘리포니아주 샌디에고)로부터의 FITC 마우스 항-인간 CD366(TIM-3, 345032). 세포내 염색을 위하여, 제조사의 추천에 따라 비디 사이토폭스/사이토펙 플러스(BD Cytofix/Cytoperm Plus) 키트(비디 바이오사이언시즈)를 이용하여 T 세포를 고정시키고 투과화시켰다. 항-CD8-FITC(클론 HIT8a, 이바이오사이언스)

및 항-CD4-BUV-395(클론 SK3, 비디 호라이즌(BD Horizon); 비디 바이오사이언시즈)를 세포의 염색을 위해 이용하였다. 항 TNF-Alexa Fluor 700(클론 MAb11, 비디 파밍젠(BD pharmingen); 비디 바이오사이언시즈), 항-IL2-BV421(클론 5344.111, 비디 호라이즌) 및 항-IFN γ -BV510(클론 B27, 비디 호라이즌)을 세포내 염색을 위하여 이용하였다.

[0728] 마우스 전신 종양 모델: MSKCC 실험동물운영위원회에 의해 승인된 프로토콜하에서, 8- 내지 12-주령 NOD/SCID/IL-2R γ -null(NSG) 수컷 마우스(잭슨 래보라토리)를 이용하였다. 마우스에게 꼬리 정맥 주사에 의해 0.5×10^6 FFLuc-GFP NALM-6 세포를 접종한 후, 4일 후에 2×10^5 , 1×10^5 또는 5×10^4 CAR T 세포를 주사하였다. NALM-6는 매우 균일한 종양 크기를 생산하며 치료 전에 어떤 마우스도 제외되지 않았다. 무작위화 또는 맹검법은 이용되지 않았다. 생물발광 영상화는 영상화 데이터세트의 획득을 위한 리빙 이미지 소프트웨어(제노젠)를 가진 제노젠 IVIS 영상화 시스템(제노젠)을 이용하였다. 종양 크기는 이전에 개시된 대로 평가하였다(Gade et al., *Cancer Res.* 65(19):9080-9088 (2005)).

[0729] RNA 추출 및 실시간 정량적 PCR: 퀴아슈레더(QIAshredder)(퀴아젠)와 결합된 알엔이지 키트(퀴아젠; 독일 힐덴)를 이용하여 제조사의 설명서에 따라 T 세포로부터 총 RNA를 추출하였다. RNA 농도 및 품질은 나노드롭(NanoDrop) 분광광도계(써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific); 캘리포니아주 칼스바드)를 이용하여 UV 분광학에 의해 평가하였다. 100 내지 200 ng 총 RNA를 이용하여, 1:1 부피비의 무작위 육량체(random hexamer) 및 올리고 dT를 가지고, 수퍼스크립트(SuperScript) III 제1-쇄 합성 수퍼믹스(First-Strand Synthesis SuperMix)(인비트로젠; 캘리포니아주 칼스바드)를 이용하여 cDNA를 제조하였다. 완료된 cDNA 합성 반응을 20분동안 37°C에서 2U RNase H로 처리하였다. 앵솔루트 블루(ABSolute Blue) qPCR SYBR 그린 로우(Green Low) ROX 믹스(써모 피셔 사이언티픽) 및 하기 프라이머 세트를 이용하여 정량적 PCR을 수행하였다: 리보솜 18S: 전방 5'-aacccgttgacccatt(서열 번호 29), 역방 5'-ccatccaatcggtagtagcg(서열 번호 30); 1928z: 전방 5'-cgtgcagtctaaagacttgg(서열 번호 31), 역방 5'-ataggggacttggacaaagg(서열 번호32); T-bet: 전방 5' - gaaaccagttcattgccgt(서열 번호 33), 역방 5'- cccaaggaattgacagttg(서열 번호 34); EOMES: 전방 5'- actggttccactggatgag(서열 번호 35), 역방 5'- ccacgccatcctctgtaact(서열 번호 36); GATA3: 전방 5' - cacaaccacactctggagga(서열 번호 37), 역방 5'- ggtttctggtctggatgcct(서열 번호 38). PCR 분석을 콰트스튜디오(QuantStudio)TM 7 플렉스 시스템(Flex System)(써모 피셔 사이언티픽)에서 수행하였으며, Ct 값을 콰트스튜디오 실시간 PCR 소프트웨어로 획득하였다. 유전자 발현에서의 상대적 변화를 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법으로 분석하였다. RNA 발현 수준을 분석된 T 세포의 각 그룹에 대해 CAR+ T 세포의 백분율에 정규화시켰다.

[0730] 통계학: 모든 실험 데이터는 평균 \pm s.e.m으로 제시된다. 샘플 크기를 미리결정하기 위해 통계적 방법이 이용되지 않았다. 그룹들은 파라미터 데이터를 위해서는 웰치스 2-샘플 t-테스트를(샘플 크기 > 10) 또는 비-파라미터 데이터를 위해서는 맨-윌트니 테스트(샘플 크기 < 10)를 이용하여 비교하였다. 분산이 동일하지 않았으므로, 웰치 보정을 이용하였다. CAR 자극시 CAR MFI 및 RNA 수준의 비교를 위하여, 아노바 F-테스트를 이용하였다. 통계 분석을 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 7 소프트웨어(그래프패드 소프트웨어; 캘리포니아주 라올라)에서 수행하였다.

[0731] TRAC 유전자좌를 파괴하고 그의 전사 제어하에 1928z CAR(Brentjens et al., *Sci. Transl. Med.* 5, 177ra138 (2013))를 두기 위하여(TRAC-CAR), TRAC의 제1 엑손의 5' 말단 및 자가-절단 P2A 펩티드 및 이어지는 CAR cDNA를 인코딩하는 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터 복구 매트릭스를 표적화하는 가이드 RNA를 설계하였다 (도 3a 및 도 7a). Cas9 mRNA 및 gRNA의 T 세포 전기천공은 제한된 세포 사멸없이 높은 넉-아웃(KO) 빈도를 생성하였다 (~70%, 도 3b 및 도 7d). 넉-인(KI)은 AAV 투여량에 비례하여, 106의 감염다중도(MOI)에서 40%를 초과하였다 (도 3b 및 도 7c 및 7e). 본원에서 처음으로 보고된 TRAC 유전자좌에서 이러한 효율적인 표적화는 AAVS1, CCR5 또는 CD40L 유전자좌에서 T 세포에서 도달된 수준에 견줄만한다(Sather et al., *Sci. Transl. Med.* 7:307ra156 (2015); Wang et al., *Nucleic Acids Res.* 44:e30 (2016); Hubbard et al., *Blood* 127:2513-2522 (2016)). 대략 95%의 CAR+ 세포가 T-세포 수용체(TCR)-음성이어서(도 7g), 투-인-원 TCR-넉아웃 및 CAR-넉인 전략을 검증한다. 관찰된 5%의 CAR+/TCR+ 세포는 이중-TCR α 발현 T 세포의 전형적인 빈도와 일치한다(Corthay et al., *J. Autoimmun.* 16:423-429 (2001)). 표적화 특이성은 전체 게놈에 걸친 AAV 벡터 통합을 맵핑함으로써 확인하였으며(de Vree et al., *Nat. Biotechnol.* 32:1019-1025 (2014)), 이것은 TRAC 통합에 대한 높은 선택성과 오프-표적(off-target) 핫스팟의 부재를 확인하였다(도 8). 이들 결과는 CRISPR/Cas9에 의해 제공되는 유전자 표적화의 높은 효율성 및 정확함 및 최대 50×10^6 의 TRAC-CAR T 세포를 재현가능하게 생성하는 본 발명자의 능력을 입증한다. TRAC-CAR의 균질하고 일관된 발현은 다수 공여체에서 발견되었으며, 이것은 2배 더 높은 평균

발현으로 다양화된 발현을 나타낸 레트로바이러스로 인코딩된 CAR(RV-CAR)과 대조적이다(도 3c 및 3d).

[0732] 시험관내 기능 연구는 CD19+ 항원-제시 세포를 이용한 매주 자극에 대한 반응에서 세포독성 또는 T 세포 증식의 면에서, TRAC-인코딩 및 무작위로 통합된 1928z 사이에서 어떤 주목할만한 차이도 밝히지 않았다(Brentjens et al., *Nat. Med.* 9:279-286 (2003))(도 9a 및 9c). 이들 실험은 대조군을 포함하였으며 레트로바이러스로 형질 도입된 CAR을 발현하는 TCR-파괴된 T 세포가(RV-CAR-TCR-) RV-CAR TCR+ T 세포와 유사하게 반응하였다(도 9a). 하지만, *생체내*에서, 상이한 T-세포 집단의 기능적 한계를 밝히기 위하여 CAR T-세포 투여량이 점진적으로 낮아지는 "CAR 스트레스 테스트"를 이용하는 프리-B 급성 림프아구성 백혈병 NALM-6 마우스 모델에서(Brentjens et al., *Nat. Med.* 9:279-286 (2003); Zhao et al., *Cancer Cell* 28:415-428 (2015)), TRAC-CAR, RV-CAR 및 RV-CAR-TCR- T 세포는 그들의 항-종양 활성에서 주목할만하게 상이하였다. TRAC-CAR T 세포는 훨씬 더 큰 반응을 유도하였으며 모든 T-세포 용량에서 중앙값 생존을 주목할만하게 연장시켰다(도 3e 및 도 10a). TCR 파괴는 RV-CAR T 세포의 성능에 대해 구별되는 효과를 갖지 않았다. 1×10^5 CAR T 세포로 주사된 마우스에서의 골수 연구는 10일 후에 종양 부위에서 유사한 T-세포 축적을 보여주었다(도 3f). 하지만, TRAC-CAR T 세포만이 종양 제어를 이루었다(도 3g 및 3h). 제17일에, TRAC-CAR T 세포는 수에 있어서 RV-CAR T 세포를 초과하였으며, CD19+ 종양 세포의 계속된 존재에도 불구하고, 후자는 제10일에 비하여 감소하였다(도 3f-3g 및 도 10b). 더욱이, CAR T-세포 그룹은, 각각 최종 이펙터 세포의 비율(CD45RA+CD62L-) 및 공동-발현된 PD1, LAG3 및 TIM3의 축적에서 반영된 대로(Blackburn et al., *Nat. Immunol.* 10:29-37 (2009)), T-세포 분화 및 기능소실의 정도에서 상이하였다. 따라서, 통상적 CAR T 세포는, 더 큰 이펙터 기억 조성을 보유한 TRAC-CAR T 세포의 2% 미만과 대조적으로, 제17일에 기능소실 마커의 최대 50% 양성 발현을 나타냈다(도 3i-3j 및 도 10c-10d). 최종 분화 및 이러한 기능소실 표현형의 획득은 감소된 항-종양 활성과 일치한다(Gattinoni et al., *Nat. Med.* 17:1290-1297 (2011)). 아주 흥미롭게, 골수 T 세포에서의 CAR 발현은 TRAC-CAR T 세포를 위한 주입-전(pre-infusion) 수준에 유사하였지만 RV-CAR 그룹 둘 모두에서는 감소하였다(도 10e). 중요하게도, 돌연변이 LNGFR 리포터의 세포-표면 발현(Gallardo et al., *Gene Ther.* 4:1115-1119 (1997))(자가-절단 2A 요소를 통해 공동-발현됨)은 감소되지 않아서, 감소된 CAR 발현에 대한 설명으로 백터 사일런싱을 제외시킨다(도 10g-10h). RV-CAR T 세포에서 측정된 CAR 발현 수준은 종양 크기와 부정적으로 상관되어(도 10i), 세포-표면 CAR이 종양 항원에 비례하여 하향-조절되었음을 제안한다. 따라서 이들 *생체내* 발견은 TRAC-CAR T 세포의 월등한 항-종양 활성을 입증할 뿐만 아니라, 종양 제어, T 세포 분화와 기능소실, 및 CAR 발현 수준 사이의 연결을 구축하였다. 이들 동일한 패턴은 그의 공자극 모이어티로서 4-1BB 세포질 도메인을 이용하는 다른 CAR, 19BBz에서 관찰되었다(도 11).

[0733] T-세포 기능에 대한 CAR 발현 수준의 영향을 더 분석하기 위하여, 본 발명자들은 항원의 부재 또는 존재하에서 배양될 때 T-세포 표현형을 먼저 검사하였다(도 4). 형질도입 후 5일에, RV-CAR T 세포는 이전에 개시된 레트로 바이러스로 전달된 CAR22에서 수득한 결과와 유사하게, 활성화, 기능소실 및 분화의 증거를 이미 나타냈다(도 4a 및 도 12a). 대조적으로, TRAC-CAR T 세포는 더 큰 *생체내* 항-종양 활성과 연관된 표현형인, 미자극 및 중심 기억 세포(CD62L+ 세포)로 주로 이루어진, 미형질도입된 T 세포와 유사한 표현형을 유지하였다(도 4a)(Gattinoni et al., *Nat. Med.* 17:1290-1297 (2011); Sommermeyer et al., *Leukemia* 30:492-500 (2016)). 구성적인 활성화 시그널링과 일치하게, 본 발명자들은 TRAC-CAR이 아닌, RV-CAR이 인산화된 면역계 티로신 활성화 모티프를 가졌음을 발견하였다(Long et al., *Nat. Med.* 21:581-590 (2015))(도 4b 및 4c). 항원예의 노출시에 추가의 차이가 주목되었다. TRAC-CAR T 세포와 대조적으로, 48h 기간내에 1, 2 또는 4회 자극된 RV-CAR T 세포는 표현형(CD62L의 소실), 사이토카인 분비(증가된 IFN γ , IL2 및 TNF α), 및 마스터 전사 인자의 발현(증가된 T-bet, EOMES 및 GATA3)에 기초하여 확인된, 이펙터 T 세포로 분화한다(도 4d-4e 및 도 12b-12d). 이들 결과는 TRAC-CAR T 세포의 개선된 효능이, 자극시에 토닉 시그널링을 감소시키고 T 세포 분화를 지연시킴으로써 그의 CAR 발현 수준에 관련됨을 나타냈다.

[0734] CAR 발현을 제어하기 위하여, 레트로바이러스 벡터 카피수를 변화시키는 것을 먼저 시도하였다. 낮아진 유전자 전달 효율은 단지 온건하게 CAR 발현 수준에 영향을 주었다(도 13). 흥미롭게도, 평균 RV-CAR 발현이 TRAC-CAR의 발현에 매치되었을 때조차도, 전자는 여전히 다중 자극시에 가속화된 분화를 나타내어, 단지 기준선 발현이 아니라 CAR 발현의 동적인 조절이 뚜렷한 기능적 특징을 촉진함을 제안한다.

[0735] CAR 발현 수준의 중요성을 더 정의하기 위하여, 상이한 계놈 유전자좌 및 프로모터로부터 CAR을 발현한 T 세포를 생성하였다. TRAC 유전자좌 및 그의 프로모터의 구체적인 기여를 검사하기 위하여, 내인성 또는 외인성 프로모터를 이용하여, TRAC 또는 β 2-마이크로글로불린(B2M) 유전자좌(모든 T 세포에서 발현되는 것으로 알려진 MHC-I 관련된 유전자)에 1928z CAR을 표적화하는 추가 7개 구조체를 설계하였다(도 5a-5b 및 도 14a-14e). 조작된 CAR T 세포는 두 유전자좌에서 성공적으로 조작되어, TRAC-CAR 내인성 프로모터보다 7배 낮음에서부터(B2M-

PGK100) 그의 두배 초과(TRAC-EF1 α)까지 범위의 평균 수준으로 균질한 CAR 발현을 이루었다(도 5c-5e 및 도 14).

[0736] TRAC-CAR보다 더 높은 CAR 발현을 부여한 모든 조합은, 더 낮은 발현을 제공하는 것과 극명히 대조적으로, 토닉 시그널링 특징을 나타내어, 항원-독립적 시그널링에 발현 수준을 연관시키는 이전 연구와 일치한다(Frigault et al., *Cancer Immunol Res.* 3:356-367 (2015))(도 5e 및 도 14f). 이들 중 셋인 고-발현 TRAC-EF1 α 및 저-발현 B2M-CAR 및 TRAC-LTR(RV 인핸서-프로모터)은 깊이 있는 분석을 위해 선택되어, TRAC-CAR에 대한 그들의 시험관 내 및 생체내 효능을 비교하였다. 시험관내에서, 반복된 항원 자극 후, TRAC-EF1 α CAR T 세포는 신속하게 이펙터 프로파일을 획득한 반면, B2M 및 TRAC-CAR T 세포는 중심 기억 표현형을 보유하였다(도 5f 및 도 15a). 흥미롭게도, TRAC-LTR이 RV-CAR보다 낮은 기준선 CAR 발현을 지시하였으며 토닉 시그널링을 피하였음에도 불구하고, LTR은 여전히 TRAC 유전자좌내로부터 RV-CAR과 동일한 분화 패턴을 촉진하였다. NALM-6 스트레스 테스트 모델에서, 3 유전자좌-프로모터 조합 중 어느 것도 TRAC-CAR과 동일한 항-종양 효능을 나타내지 않았다(도 5g-5h). 1×10^5 CAR T 세포의 주입 후 10일 및 17일에, 골수에 축적된 CAR T 세포의 수는 TRAC-CAR T 세포와 유사하거나 더 높았지만; TRAC-CAR T 세포만이 효율적으로 종양 진행을 제어할 수 있었다(도 15c-15e). B2M-CAR T 세포가 TRAC-CAR T 세포와 유사한 이펙터/이펙터-기억 비율을 보존한 것으로 보였지만, 그들 역시 우세한 기능소실 특징을 획득하여(도 15f-15g), 지연된 분화가 기능소실과 무관할 수 있음을 제안한다. 다함께 이들 결과는 CAR 표적화의 효과를 강조하였으며 추가로 기준선 전사 제어를 넘어서 확장되는 CAR 발현의 조절을 제안하였다.

[0737] CAR 발현을 항원과 마주칠 때 상세히 분석하였다. 이를 위하여, CAR T 세포를 CD19+ 항원-제시 세포와 혼합하고 세포-표면 CAR 발현을 규칙적인 시간 간격으로 검사하였다(도 6a). CAR 발현은 표적화된 그리고 무작위로 통합된 CAR T 세포 둘 모두에서 CD19에의 노출 후 몇 시간 내에 감소하였으며, 초기 수준이 더 낮을 때 더 큰 하락 및 더 긴 회복 지체가 수반되었다. 기준선 발현으로의 후속 회복은 상이한 T-세포 집단을 가장 눈에 띄게 구별하였다.

[0738] CAR 세포-표면 발현에서의 하락의 기전을 더 잘 연구하기 위하여, 본 발명자들은 CAR-GFP 융합 단백질을 설계하여 세포-표면 및 세포내 CAR 발현을 분석하고, 그것을 공동-번역되지만 절단된 LNGFR 리포터를 가진 CAR을 발현하는 세포에 비교하였다(도 6b-6c). 본 발명자들은 CAR 발현이 LNGFR과 독립적으로 하향조절되었음을 관찰하였으며, 전사 과정보다는 물리적 내부화를 제안한다. 항원 직면 후 CAR 및 GFP 시그널의 공동-감소는 CAR 내부화에 이어 그의 분해가 이어졌음을 나타냈다. 항원에의 노출 후 CAR 분해의 발생은 CAR mRNA로부터 드 노보(de novo) CAR 합성이 CAR 발현을 정확하게 그리고 시간에 맞게 회복하기 위해 그리고 이펙터 T-세포 기능을 지원하기 위해 필요함을 제안하였다. 반복된 항원 자극 후 CAR 세포-표면 발현의 주의깊은 분석(도 6d 및 도 16a)은 회복 단계(항원 노출 후 12-48h)에서 두 가지 주요 패턴을 확인하였다. TRAC-EF1 α , TRAC-LTR 및 RV-CAR T 세포에서, CAR 세포-표면 발현은 각 자극 후에, 24h 이내에 기준선 보다 2- 내지 4-배로 증가하였다. TRAC- 및 B2M-CAR T 세포 둘 모두에서, CAR 발현은 반복 자극시에 감소하였으며 48 시간 후에 기준선 미만에 남아 있었다(도 6d). 정상-상태 mRNA 분석은 세포-표면 단백질 수준(도 6e 및 도 16b)과 CAR T 세포 활성화에 대한 전사 반응(도 6f) 사이의 선형 상관성을 나타내어, 세포-표면 CAR 발현의 적절한 자극후 보충을 가능하게 하는 프로모터 강도 및 조절의 필수 역할을 나타낸다.

[0739] 이러한 CAR 단백질/RNA 하향조절 및 후속 재-발현은 인간 T 세포의 자극시에 TCR 조절(Schrum et al., *Immunol Rev.* 196:7-24, (2003)) 및 마우스 T 세포에서 항원-유도된 TCR 재순환(Liu et al., *Immunity* 13, 665-675, (2000); Call et al., *Annu. Rev. Immunol.* 23, 101-125, (2005); Allison et al., *Elife.* 5, (2016))을 기억나게 한다. 유사하게, 가속화된 분화 및 기능소실이 TCR의 과다하고 연속적인 활성화의 상황에서 보고되었다(Schietinger et al., *Trends Immunol.* 35, 51-60, (2014); Wherry et al., *Nat. Rev. Immunol.* 15, 486-499, (2015)). 다함께, 이들 수렴하는 발견들은 TRAC가 두 가지 중요한 방식으로 CAR 발현의 제어에서 역할을 가짐을 지지한다. 한 가지는 최적의 기준선 발현을 촉진하는 것으로서, 이것은 항원의 부재하에서 토닉 시그널링을 방지하고 항원과 단일 또는 다중 접촉시에 효과적인 CAR 내부화를 가능하게 하였다. 다른 하나는 균형을 맞춘 전사 반응을 지시하여 항원 접촉 후 기준선 CAR 발현의 동력학적으로 적절한 회복을 야기하는 것이다. 더 높은 CAR 발현을 가진 T 세포와 대조적으로, TRAC-CAR 프로파일은 감소된 T-세포 분화 및 기능소실과 상관되어, 월등한 종양 박멸을 야기한다. 8가지 상이한 전사 구성에서 CAR을 무작위로 통합하는 것과 두 유전자좌에 CAR을 표적화하는 것을 비교한 본 발명자들의 연구는 CAR 조절의 강한 민감성을 보여준다. 따라서, 내인성 B2M 프로모터가 CAR 자극시에 TRAC에 유사하게 반응하였지만, B2M-CAR은 생체내에서 TRAC-CAR만큼 잘 수행하지 못하여, 그것이 제공한 더 낮은 기본 발현 수준이 효과적인 CAR 활성을 위해 불충분함을 나타낸다. TRAC-LTR은 유사하게 TRAC에 견줄만한 기준선 발현을 제공하였으나, 활성화 후 그것의 즉각적인 만회는 열등한 T-세포 성능 및 가속

화된 분화와 연관되었다. 따라서 본 발명자들은 기본 및 동적 CAR 발현 수준 둘 모두가 T-세포 기능을 지속하는데 기여하는 것으로 결론내린다.

[0740] 요약하면, 결과는 CAR 코딩 서열을 TCR 유전자좌에 표적화하여 그것을 내인성 조절 요소의 제어하에 두는 것이 토닉 시그널링을 감소시키고, 가속화된 T-세포 분화 및 기능소실을 피하고, 조작된 T 세포의 치료 성능을 증가시킴을 입증한다. 항원-유도된 CAR 내부화 및 분해의 동적 측정은 CAR 발현을 추진하는 인핸서/프로모터 요소에 따라 세포-표면 CAR의 차등적 회복을 밝혔다. 이들 발견은 CAR 발현의 엄격한 전사 조절이 효과적인 종양 박멸을 위해 중요함을 입증한다. 따라서 TCR 유전자좌에의 CAR의 표적화는 안전한 치료 T 세포(삽입 종양형성 및 TCR-유도된 자가면역 및 동종이계반응성의 위험을 최소화함으로써), 더 나은 정의된 T-세포 산물(일정한 CAR 발현을 생성하고 위치-효과 다양성 및 백터 카피수 변화를 피함으로써) 및 더욱 강력한 T 세포(구성적 시그널링을 감소시키고 T-세포 기능소실을 지연시킴으로써)를 제공할 수 있다. 마지막으로, 결과는 T-세포 치료법을 진전시키기 위하여 CAR 면역생물학 연구의 관련성과 게놈 편집의 방대한 잠재성을 입증한다.

[0741] 8.3 실시예 3. 내인성 프로모터의 제어하에서 치료 전이유전자의 발현.

[0742] 일 예에서, 치료 키메라 항원 수용체(CAR)가 *TRAC* 유전자좌에서 (내인성 프로모터/인핸서 요소의 제어하에) 통합되며; NFAT-반응성 전사 단위가 T 세포 수용체 베타쇄 불변(TRBC) 유전자좌에서 통합되며, 그로부터 두 가지 치료 PD1L-특이적 및 -CTLA4 scFv가 발현된다. 이 설정에서, 조작된 T 세포는 CAR을 통해 활성화되고, 이것은 NFAT 활성화 및 이어서 치료 scFv의 발현을 유도한다. 대안적으로, 이들 전이유전자는 NFAT-반응성 CD69 유전자좌에서 통합될 수 있다. 구체적 실시양태에서, 키메라 세포 표면 리간드-전사 인자는 CD19-NFAT이다. 따라서, 일 실시양태에서, CAR은 제1 전이유전자에 의해 인코딩되며, PD1L scFv 및 CTLA4 scFv는 바이시스트론성인 제2 전이유전자에 의해 인코딩되며, 제2 전이유전자의 발현은 NFAT에 의해 유도되는 내인성 TRBC 프로모터의 제어하에 있다. 대안적 실시양태에서, PD1L 및 CTLA4 scFv는 별도의 전이유전자(즉, 제2 및 제3 전이유전자)로부터 발현된다. 구체적 실시양태에서, PD1L 및 CTLA4 scFv는 단일의 폴리시스트론성 전이유전자로부터 발현된다. 그러한 구조체는 선택적으로 절단가능한 서열, 예를 들어, P2A 서열을 포함하여, 분리된 분자로서 PD1L과 CTLA4 scFv의 발현을 제공할 수 있다.

[0743] 다른 예에서, 키메라 세포-표면 리간드(세포외)-전사 인자(TF; 세포내) 융합 유전자는 B 세포에서 CD19 분자와 특이적으로 상호작용하는 *TRAC* 유전자좌에서(내인성 프로모터/인핸서 요소의 제어하에) 통합되며; TF-반응성 전사 단위는 TRBC 유전자좌에서 통합되며, 이로부터 치료 키메라 면역 수용체 리간드(CIRL)가 발현된다. 이 설계는 조작된 T 세포가 TF를 방출함으로써 B 세포와의 상호작용에 반응하도록 하며, 그 후 CIRL의 발현을 활성화하며, CIRL은 특이적 자가면역 B-세포 면역글로불린 수용체(IgR)와 상호작용한다. 후자 상호작용은 세포독성 T-세포 반응을 시그널/활성화하여 자가면역 B-세포 사멸을 유도한다. 일 실시양태에서, 키메라 세포-표면 리간드(세포외)-전사 인자(TF; 세포내) 융합 유전자는 제1 전이유전자에 의해 인코딩된다. 일 실시양태에서, CIRL은 제2 전이유전자에 의해 인코딩된다.

[0744] 다른 예에서, HIV-특이적 리보자임을 인코딩하는 DNA 서열이 CD4 유전자좌에서 통합되며; 인터페론-반응성 전사 단위는 HIV Rev 단백질과 상호작용하는 세포내 scFv를 발현하는 CCR5 유전자좌에서 통합된다. 이 치료 T 세포는 리보자임을 통해 HIV 게놈을 절단하고, CCR5 발현을 제거하여 HIV 감염을 방지하고, HIV Rev 활성을 차단하여 HIV 패키징을 억제함으로써 HIV 복제를 세배 억제할 것이다. 일 실시양태에서, HIV-특이적 리보자임은 제1 전이유전자에 의해 인코딩된다. 일 실시양태에서, 세포내 scFv는 제2 전이유전자, 예를 들어, HIV rev 단백질과 상호작용하는 scFv에 의해 인코딩된다.

[0745] 8.4 실시예 4. 비-통합 감마-레트로바이러스의 생성

[0746] 재조합 비-통합(또는 통합-결합) 감마-레트로바이러스(rNigRV 또는 IDgRV)는 숙주 세포 게놈내로의 바이러스 DNA 통합을 촉매할 수 없는 돌연변이 인테그라제 단백질을 함유하는 레트로바이러스 벡터이다. 이 돌연변이 레트로바이러스 벡터를 만들기 위하여, 돌연변이 인테그라제 단백질(앞서 나타난 돌연변이를 가짐)을 인코딩하는 플라스미드 DNA가 외피-인코딩 및 레트로바이러스 게놈-인코딩 플라스미드 DNA와 조합되어 사용된다. 이들 세 가지 플라스미드는 생산자 포유동물 세포내로 형질감염되고, 재조합 돌연변이 바이러스 벡터는 배지내로 방출되며, 이것은 나중에 수집되어 인간 말초 혈액 T 세포를 형질도입하기 위해 이용된다.

[0747] 도 18에 나타난 대로, 돌연변이 인테그라제는 DDE 모티프에서 아미노산을 돌연변이시킴으로써 생성되었다(Andrake and Skalka (2015). Retrovirus Integrase: Then and Now. Ann. Rev. Virol. 2:241-264 참고). DDE 아미노산 위치는 D124, D183, E219이다(잔기 번호는 젠뱅크 기탁 번호 NP_955592 (NP_955592.1)에 기초해 넘버

링됨). 생성된 돌연변이는 D124A, D124E, D124N, D124V, D183A, D183N, D124A 및 D183A, D124A 및 D183N, D124E 및 D183A, D124E 및 D183N, D124N 및 D183A, D124N 및 D183N, D124V 및 D183A, 및 D124V 및 D183N이었다. 돌연변이는 표준 분자 생물학 기술을 이용하여 생성되었다. 물론니 쥐 백혈병 바이러스(MLV) Gag-Pol 서열을 함유한 플라스미드는 표준 분자 기술을 이용하여 변형하였다. 돌연변이는 DDE 모티프를 함유한 DNA 서열 영역을, 특정 코돈(들)이 각 특정 돌연변이를 생성하기 위하여 돌연변이된 새로운 DNA 서열로 치환함으로써 생성하였다. 생성되는 플라스미드를 이용하여 NiGRV를 생산하였다.

[0748] 표적 세포 내에서의 그의 일시적 특성을 이용하여, rNiGRV는 상이한 용도를 위해 이용될 수 있다. 예를 들어, 소정의 세포 표현형-유사 기억 T 세포를 유지하는 유전자를 일시적으로 발현하기 위하여; 특정 DNA 서열을 파괴하기 위하여 키메라 뉴클레아제 또는 CRISPR/Cas 성분을 일시적으로 발현하기 위하여; 특정 게놈 위치에 상동성인 DNA 서열로 인접된 외인성 DNA를 전달하여, 인접된 DNA 서열을 상동성 재조합을 통해 T 세포 게놈내로 통합시키기 위하여; 인테그라제-독립적 NHEJ-의존성 방식으로 특정 DNA 브레이크에서 유전자이식 레트로바이러스 DNA를 전달하고 통합시키기 위해.

[0749] 9. 인용된 참고문헌

[0750] 본원에서 인용된 모든 참고문헌은 각 개별 간행물 또는 특허 또는 특허 출원이 구체적으로 그리고 개별적으로 모든 목적을 위해 그 전체가 참고로 포함되는 것으로 나타내진 것처럼 동일한 정도로 모든 목적을 위하여 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0751] 당업자에게 명백할 것처럼, 본 발명의 많은 변형과 변화가 그 사상과 범위를 벗어나지 않고서 만들어질 수 있다. 본원에 개시된 구체적 실시양태는 단지 예시로서 제공되며, 본 발명은 첨부된 청구범위에 부여되는 등가물의 전체 범위와 함께 청구범위에 의해서만 제한된다.

[0752] 본 발명은 다음과 같은 실시양태로 나타내어진다.

[0753] [실시양태 1]

[0754] 전이유전자의 발현이 T 세포의 내인성 프로모터의 제어하에 있도록 전이유전자가 T 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되며, 전이유전자가 치료 단백질 또는 치료 핵산을 인코딩하는, T 세포.

[0755] [실시양태 2]

[0756] 제1 전이유전자는 제1 전이유전자의 발현이 T 세포의 제1 내인성 프로모터의 제어하에 있도록 T 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되고, 제2 전이유전자는 제2 전이유전자의 발현이 제2 내인성 프로모터의 제어하에 있도록 T 세포의 게놈 내의 제2 부위에 통합되며, 상기 제1 및 제2 내인성 프로모터가 상이한 프로모터이고, 제1 전이유전자가 제1 치료 단백질 또는 제1 치료 핵산을 인코딩하고, 제2 전이유전자가 제2 치료 단백질 또는 제2 치료 핵산을 인코딩하며, 바람직하게는 제1 치료 단백질 또는 제1 치료 핵산이 상기 제2 치료 단백질 또는 제2 치료 핵산과 각각 상이한, T 세포.

[0757] [실시양태 3]

[0758] 제1항 또는 제2항에 있어서,

[0759] T 세포가 면역자극성 T 세포인 T 세포.

[0760] [실시양태 4]

[0761] 제1항 또는 제2항에 있어서,

[0762] T 세포가 면역억제성 T 세포인 T 세포.

[0763] [실시양태 5]

[0764] 제1항 또는 제2항의 T 세포 다수를 포함하는 T 세포의 단리된 집단.

[0765] [실시양태 6]

[0766] 제3항의 T 세포 다수를 포함하는 T 세포의 단리된 집단.

[0767] [실시양태 7]

[0768] 제4항의 T 세포 다수를 포함하는 T 세포의 단리된 집단.

- [0769] [실시양태 8]
- [0770] 제1항 또는 제2항의 T 세포의 치료적 유효량; 및 약학적 허용 담체를 포함하는 약학 조성물.
- [0771] [실시양태 9]
- [0772] 제1항 또는 제2항의 T 세포 다수를 포함하는 T 세포 집단의 치료적 유효량; 및 약학적 허용 담체를 포함하는 약학 조성물.
- [0773] [실시양태 10]
- [0774] 제3항의 T 세포의 치료적 유효량; 및 약학적 허용 담체를 포함하는 약학 조성물.
- [0775] [실시양태 11]
- [0776] 제3항의 T 세포 다수를 포함하는 T 세포 집단의 치료적 유효량; 및 약학적 허용 담체를 포함하는 약학 조성물.
- [0777] [실시양태 12]
- [0778] 제4항의 T 세포의 치료적 유효량; 및 약학적 허용 담체를 포함하는 약학 조성물.
- [0779] [실시양태 13]
- [0780] 제4항의 T 세포 다수를 포함하는 T 세포 집단의 치료적 유효량; 및 약학적 허용 담체를 포함하는 약학 조성물.
- [0781] [실시양태 14]
- [0782] 제1항 또는 제2항의 T 세포의 치료적 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법.
- [0783] [실시양태 15]
- [0784] 제5항의 T 세포 집단의 치료적 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법.
- [0785] [실시양태 16]
- [0786] 제8항 또는 제9항의 약학 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법.
- [0787] [실시양태 17]
- [0788] 대상이 자극된 면역 반응을 필요로 하고, 세포 또는 세포 집단의 치료적 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하며, 세포가 T 세포이며, 전이유전자의 발현이 T 세포의 내인성 프로모터의 제어하에 있도록 전이유전자가 T 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되고, 전이유전자가 치료 단백질 또는 치료 핵산을 인코딩하는, T 세포 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법.
- [0789] [실시양태 18]
- [0790] 제17항에 있어서,
- [0791] T 세포가 면역자극성 T 세포인 T 세포.
- [0792] [실시양태 19]
- [0793] 제18항에 있어서,
- [0794] T 세포가 세포독성 T 림프구(CTL), CD4+ 서브타입, CD8+ 서브타입, 중앙 기억 T 세포(TCM), 줄기 기억 T 세포(TSCM), 이펙터 기억 T 세포, 이펙터 T 세포, Th1 세포, Th2 세포, Th9 세포, Th17 세포, Th22 세포, 및 Tfh (여포성(follicular) 헬퍼) 세포로 이루어지는 군으로부터 선택되는 T 세포.
- [0795] [실시양태 20]
- [0796] 대상이 억제된 면역 반응을 필요로 하고, 세포 또는 세포 집단의 치료적 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하며, 세포가 T 세포이며, 전이유전자의 발현이 T 세포의 내인성 프로모터의 제어하에 있도록 전이유전자가 T 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되고, 전이유전자가 치료 단백질 또는 치료 핵산을 인코딩하는, T 세포 치료

법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법.

- [0797] [실시양태 21]
- [0798] 제20항에 있어서,
- [0799] T 세포가 면역억제성 T 세포인 방법.
- [0800] [실시양태 22]
- [0801] 제21항에 있어서,
- [0802] T 세포가 조절 T 세포인 방법.
- [0803] [실시양태 23]
- [0804] (i) 전이유전자, 및
- [0805] (ii) 세포의 게놈 내의 부위에서 전이유전자의 표적화된 통합을 위해 적합한 상동성 재조합 시스템을 T 세포내로 도입하여, 상동성 재조합 시스템이 세포의 게놈 내의 상기 부위에 전이유전자를 통합시키는 것을 포함하며, 전이유전자의 발현이 내인성 프로모터의 제어하에 있고, 전이유전자가 치료 단백질 또는 치료 핵산을 인코딩하는, 치료 전이유전자를 발현하는 T 세포를 생성하는 방법.
- [0806] [실시양태 24]
- [0807] 비-통합 감마-레트로바이러스를 포함하는 벡터.
- [0808] [실시양태 25]
- [0809] 제24항에 있어서,
- [0810] 비-통합 감마-레트로바이러스가 돌연변이된 인테그라제(integrase)를 포함하는 벡터.
- [0811] [실시양태 26]
- [0812] 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 재조합 핵산 서열이, CAR이 세포의 표면에서 세포에 의해 발현되도록 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되며, 상기 제1 부위에서의 CAR을 인코딩하는 핵산의 통합이 세포의 표면에서 기능성 T 세포 수용체(TCR) 복합체의 발현을 감소시키거나 방지하는, T 세포.
- [0813] [실시양태 27]
- [0814] 세포의 표면에서 CAR을 생산하기 위하여, CAR을 인코딩하는 무-프로모터(promotor-less) 재조합 핵산 서열이 세포의 게놈 내의 부위에 통합되며, 상기 부위는 CAR이 내인성 TCR 알파쇄 프로모터의 제어하에서 발현되도록 TCR 알파쇄의 제1 엑손이며, 상기 부위에서 CAR의 통합이 기능성 TCR 알파쇄의 발현을 감소시키거나 방지하는, 인간 T 세포.
- [0815] [실시양태 28]
- [0816] 제26항 또는 제27항의 세포 다수를 포함하는 T 세포의 단리된 집단.
- [0817] [실시양태 29]
- [0818] 제26항 또는 제27항의 세포의 치료적 유효량; 및 약학적 허용 담체를 포함하는 약학 조성물.
- [0819] [실시양태 30]
- [0820] 제26항 또는 제27항의 세포 다수를 포함하는 T 세포 집단의 치료적 유효량; 및 약학적 허용 담체를 포함하는 약학 조성물.
- [0821] [실시양태 31]
- [0822] 제26항 또는 제27항의 세포의 치료적 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, CAR 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법.
- [0823] [실시양태 32]
- [0824] 제29항의 약학 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, CAR 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치

료하는 방법.

[0825] [실시양태 33]

[0826] 제28항의 세포 집단의 치료적 유효량을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, CAR 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법.

[0827] [실시양태 34]

[0828] 제30항의 약학 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함하는, CAR 치료법을 이용하여 이를 필요로 하는 대상을 치료하는 방법.

[0829] [실시양태 35]

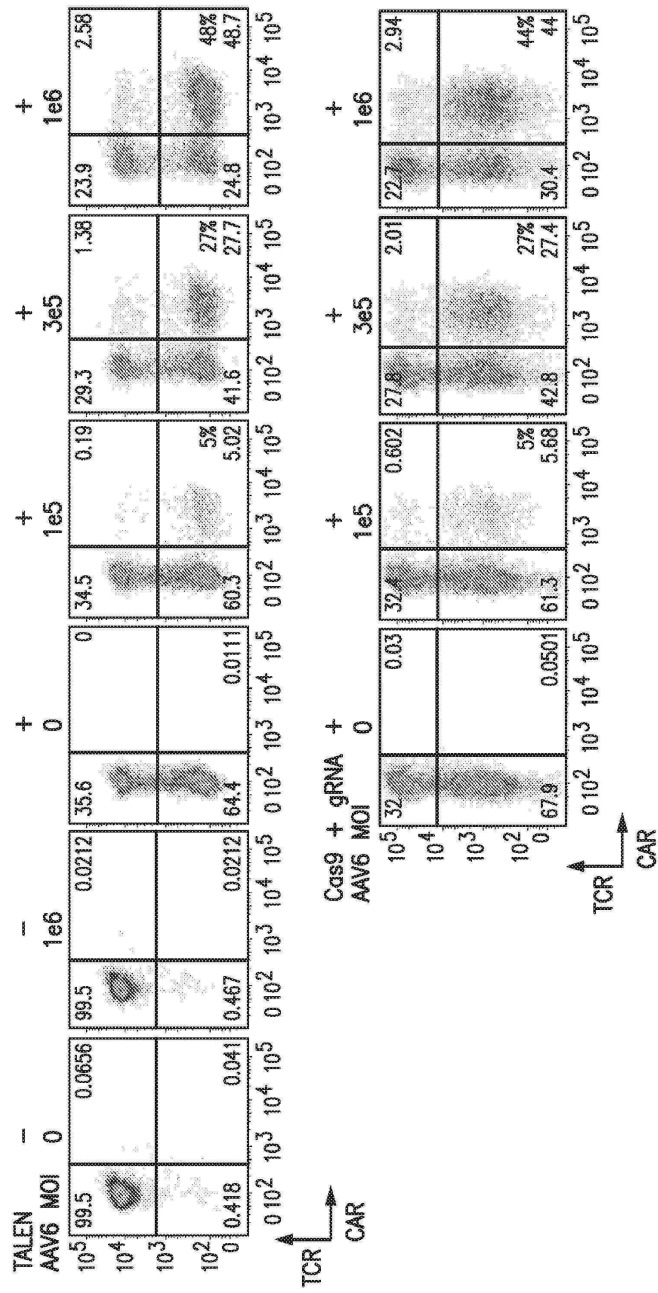
[0830] (i) 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 핵산 서열, 및

[0831] (ii) 세포의 게놈 내의 부위에서 핵산 서열의 표적화된 통합을 위해 적합한 상동성 재조합 시스템을 T 세포내로 도입하여, 상동성 재조합 시스템이 세포의 게놈 내의 상기 부위에 CAR을 인코딩하는 핵산 서열을 통합시켜 상기 부위에서 CAR의 통합이 세포의 표면에서 기능성 T 세포 수용체 복합체의 발현을 감소시키거나 방지하여, CAR을 발현하고 기능성 TCR 복합체가 결핍된 T 세포를 생성하는 것을 포함하는, 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하고 기능성 T 세포 수용체(TCR) 복합체가 결핍된 T 세포를 생성하는 방법.

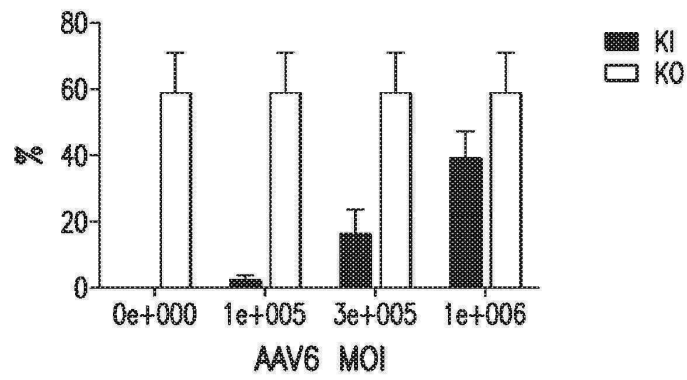
[0832] [실시양태 36]

[0833] 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 재조합 핵산 서열이, CAR이 세포의 표면에서 세포에 의해 발현되도록 세포의 게놈 내의 제1 부위에 통합되며, 상기 제1 부위에서 CAR을 인코딩하는 핵산의 통합이 세포의 표면에서 기능성 T 세포 수용체(TCR) 복합체의 발현을 감소시키거나 방지하는, 유도된 다능성 줄기 세포.

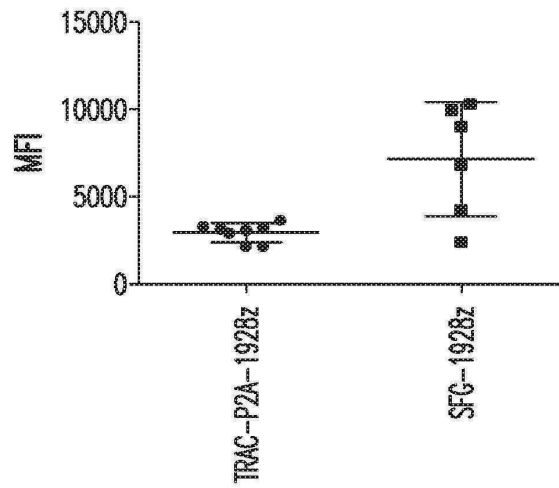
도면1b



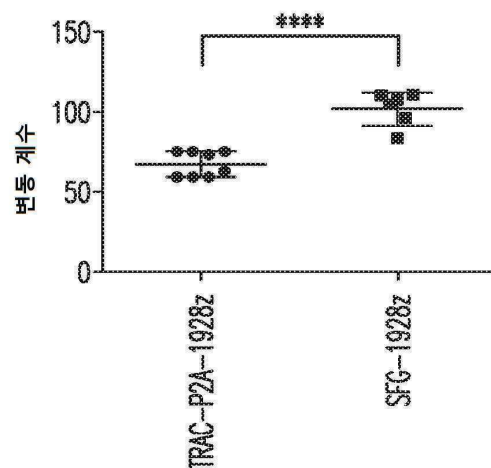
도면1c



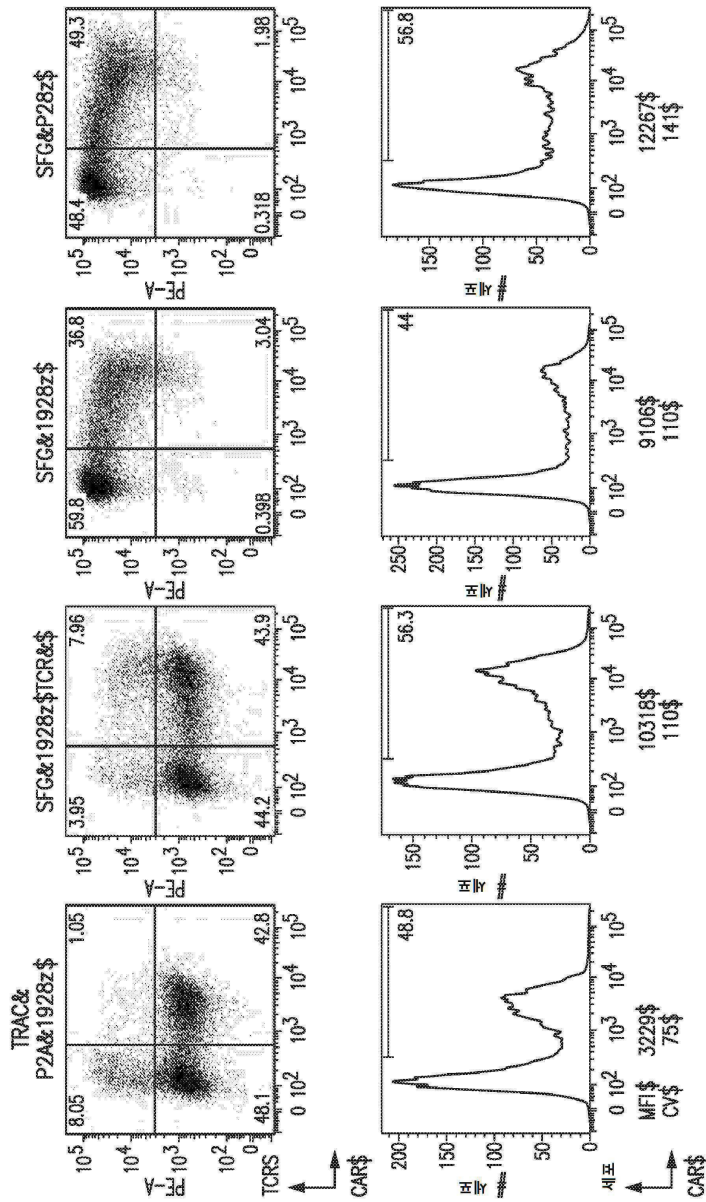
도면1d



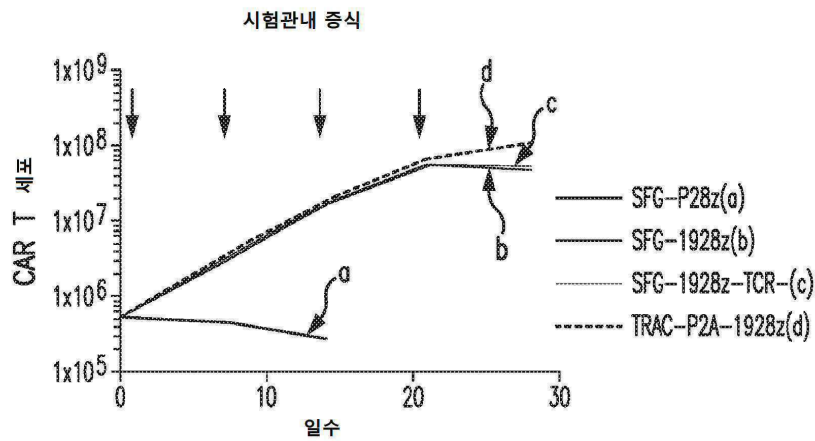
도면1e



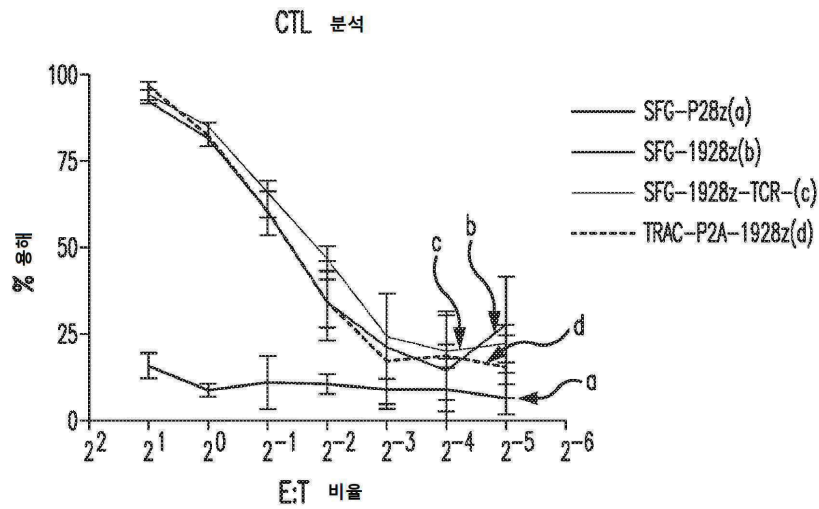
도면2a



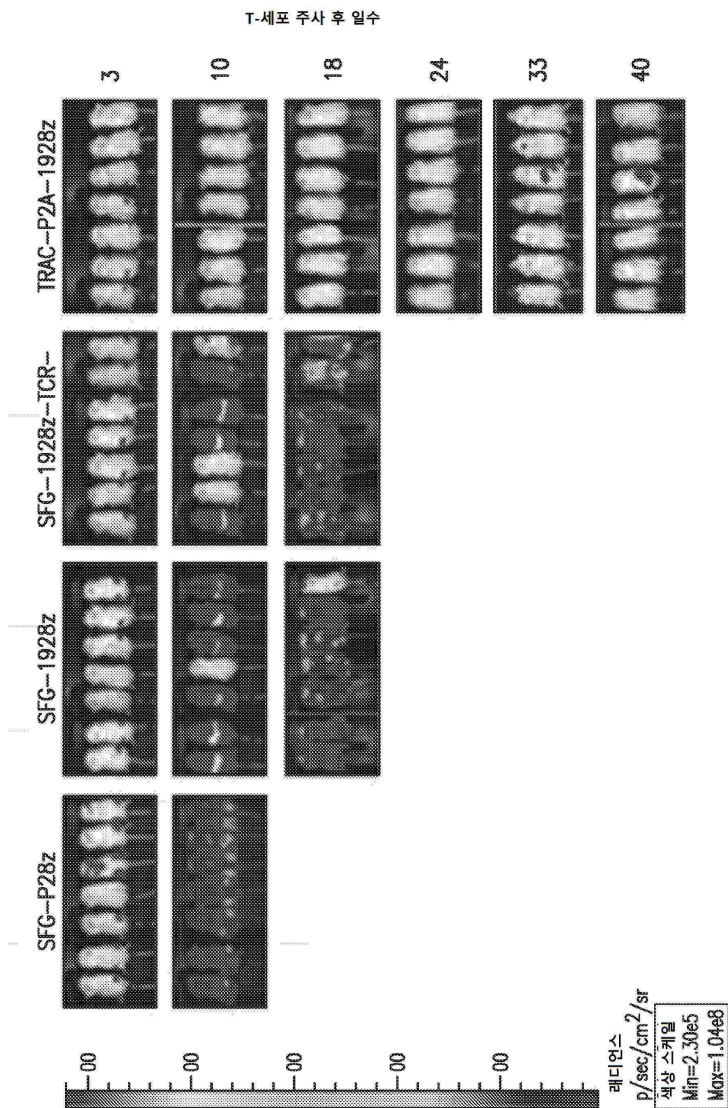
도면2b



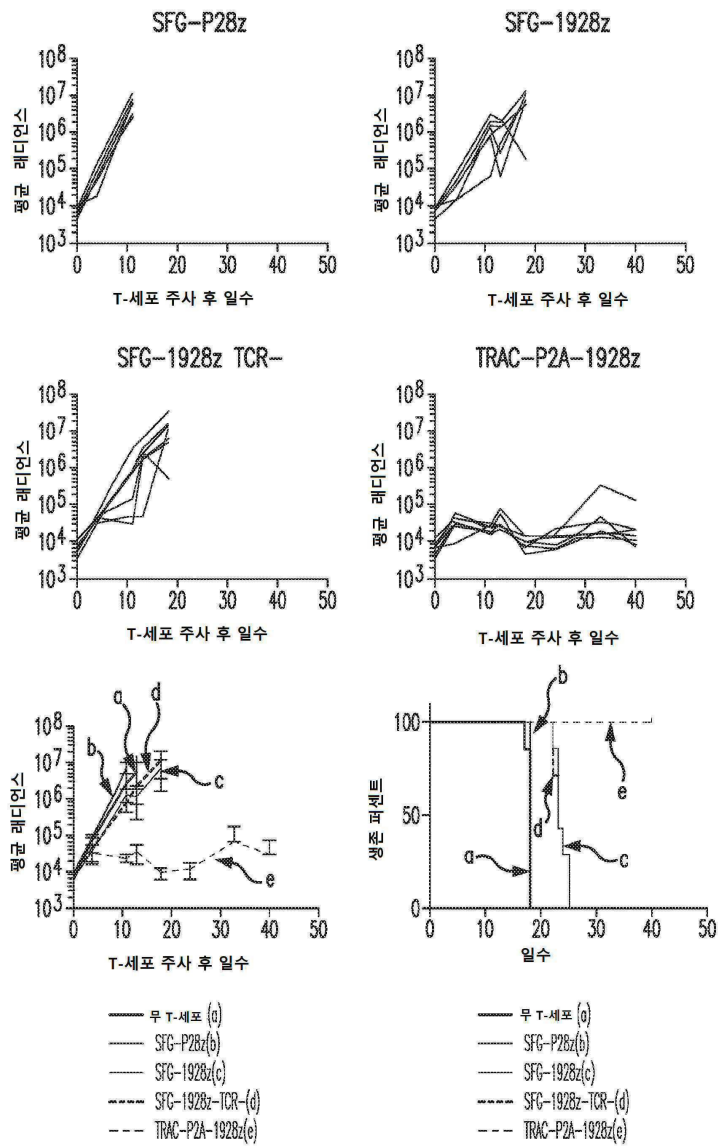
도면2c



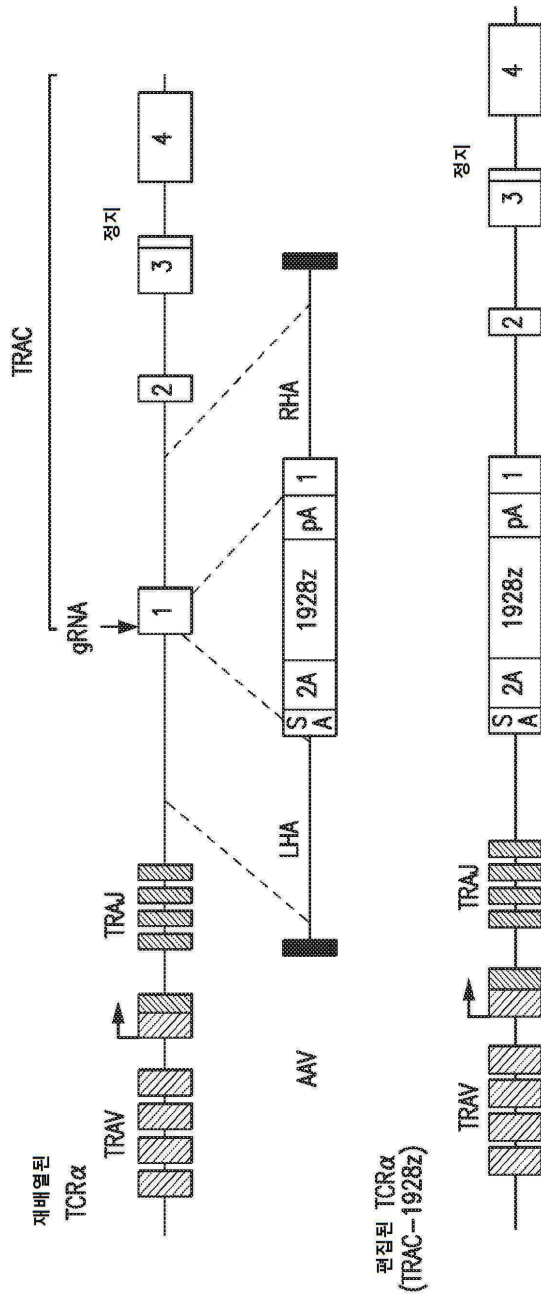
도면2d



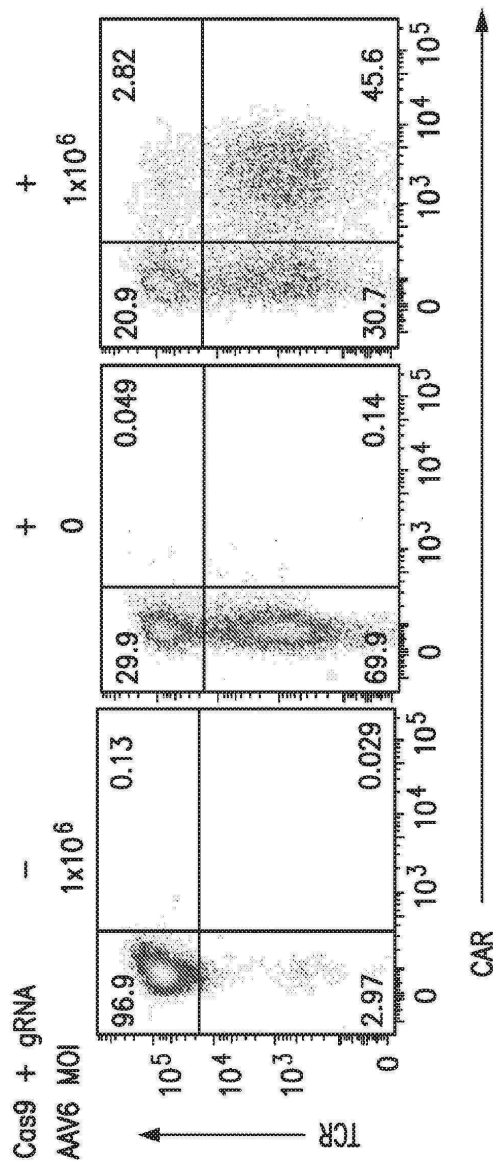
도면2e



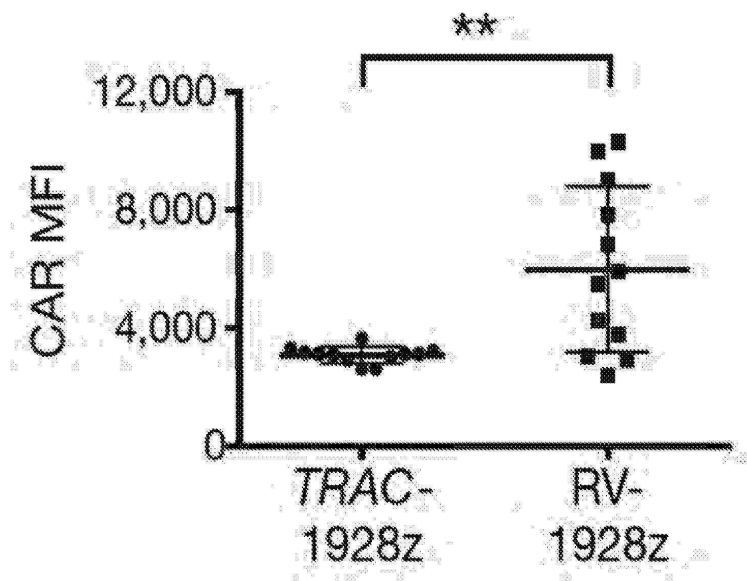
도면3a



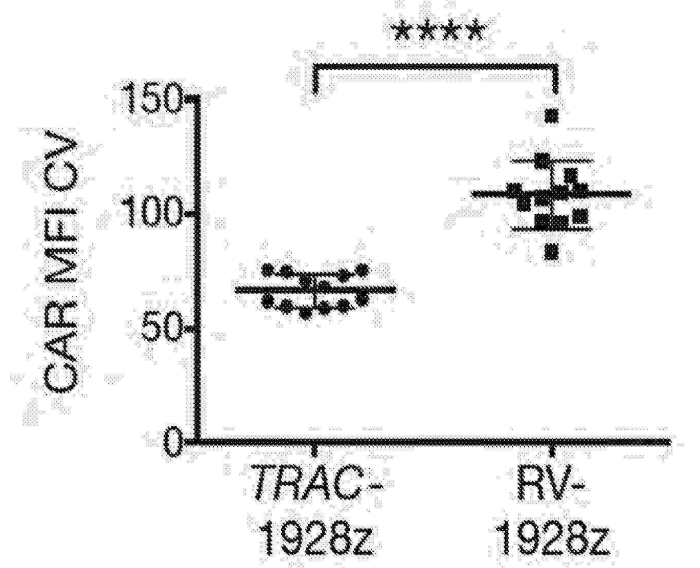
도면3b



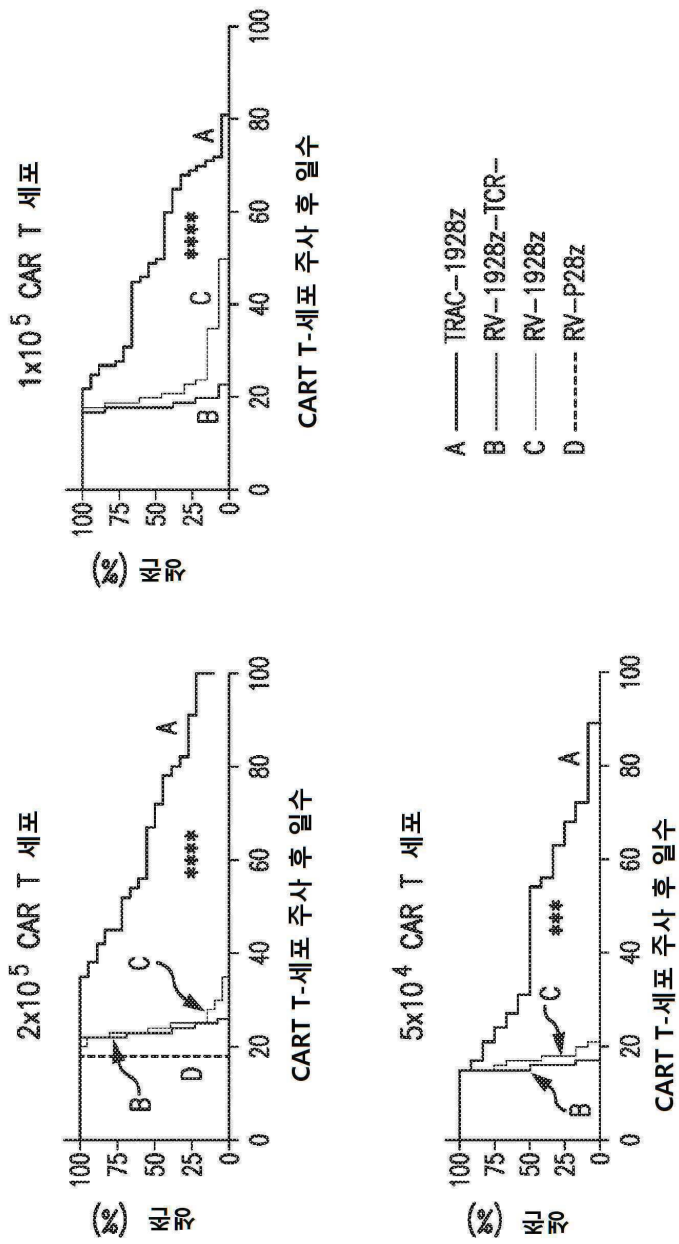
도면3c



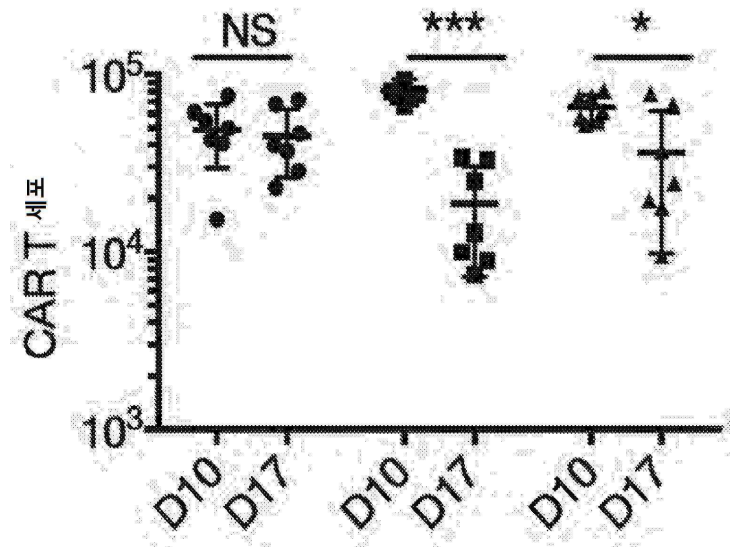
도면3d



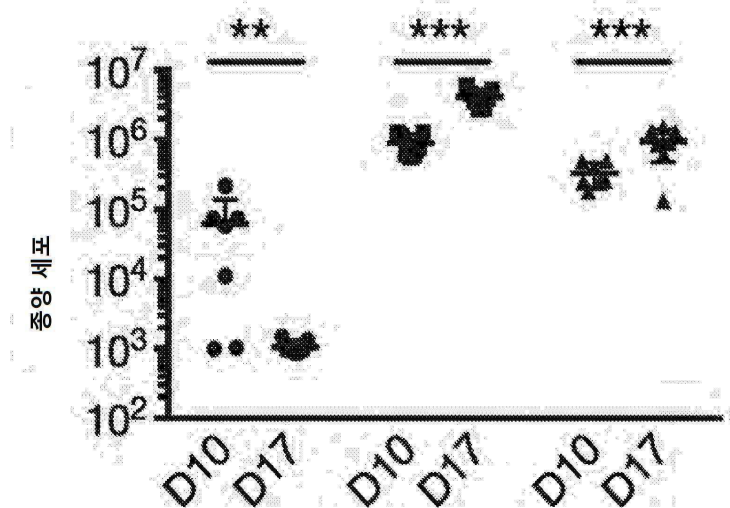
도면3e



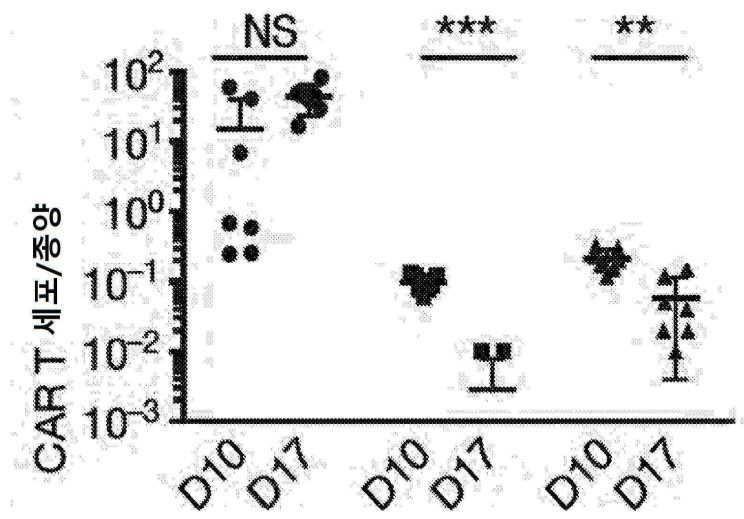
도면3f



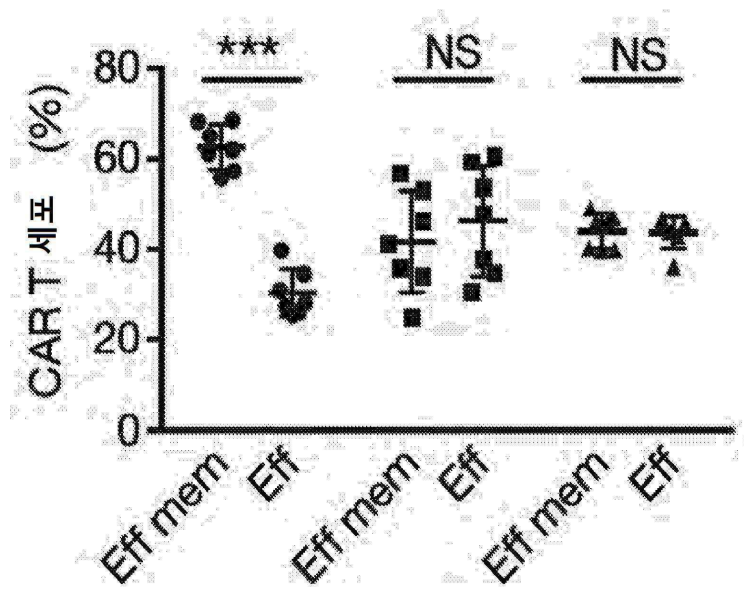
도면3g



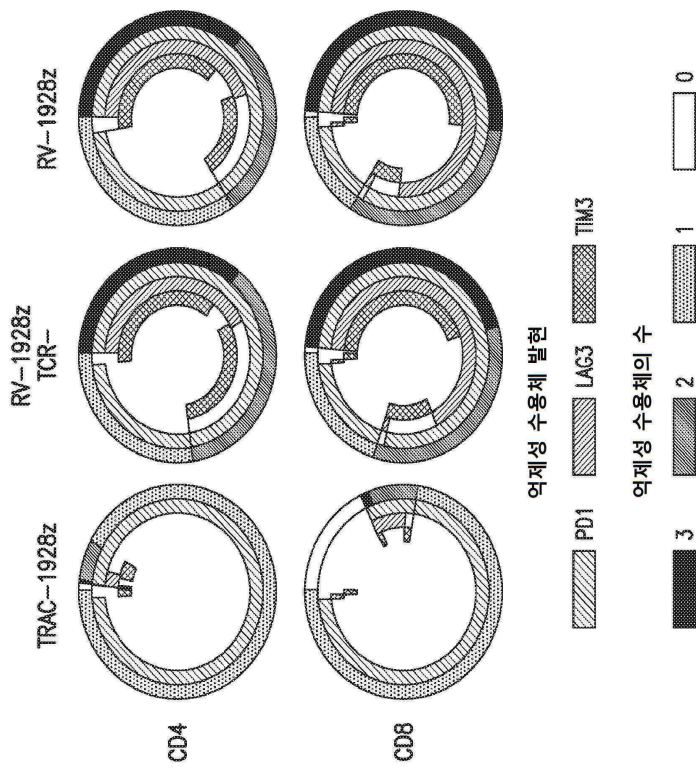
도면3h



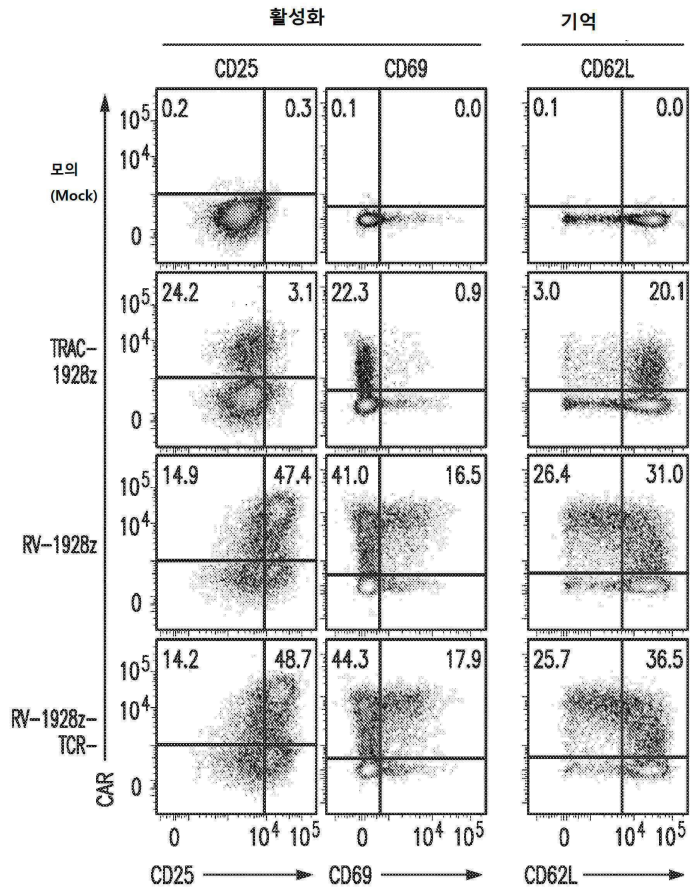
도면3i



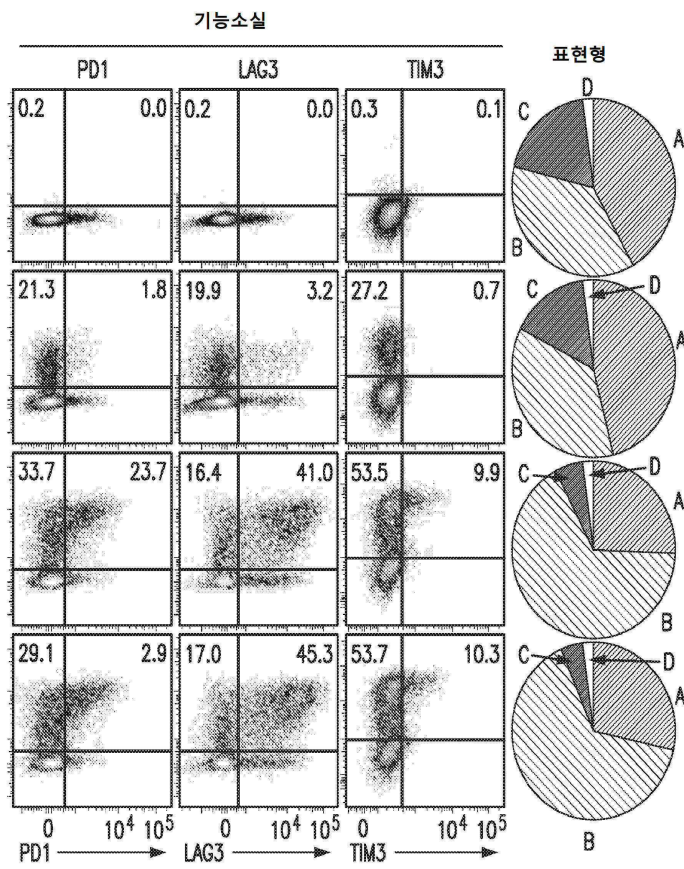
도면3j



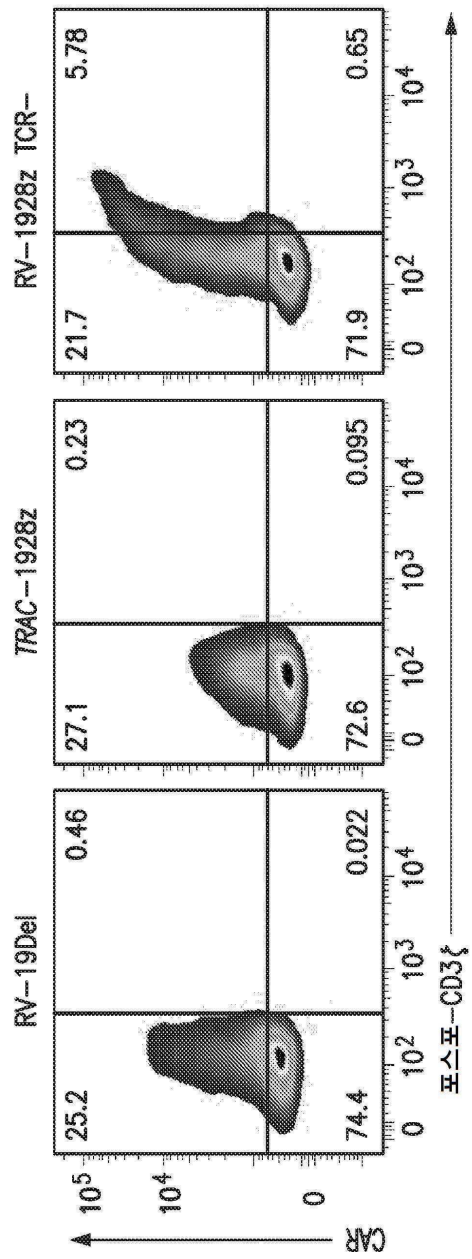
도면4aa



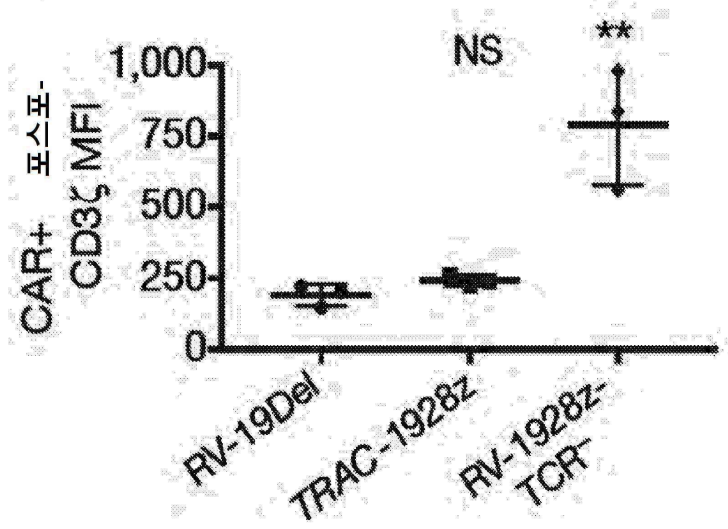
도면4ab



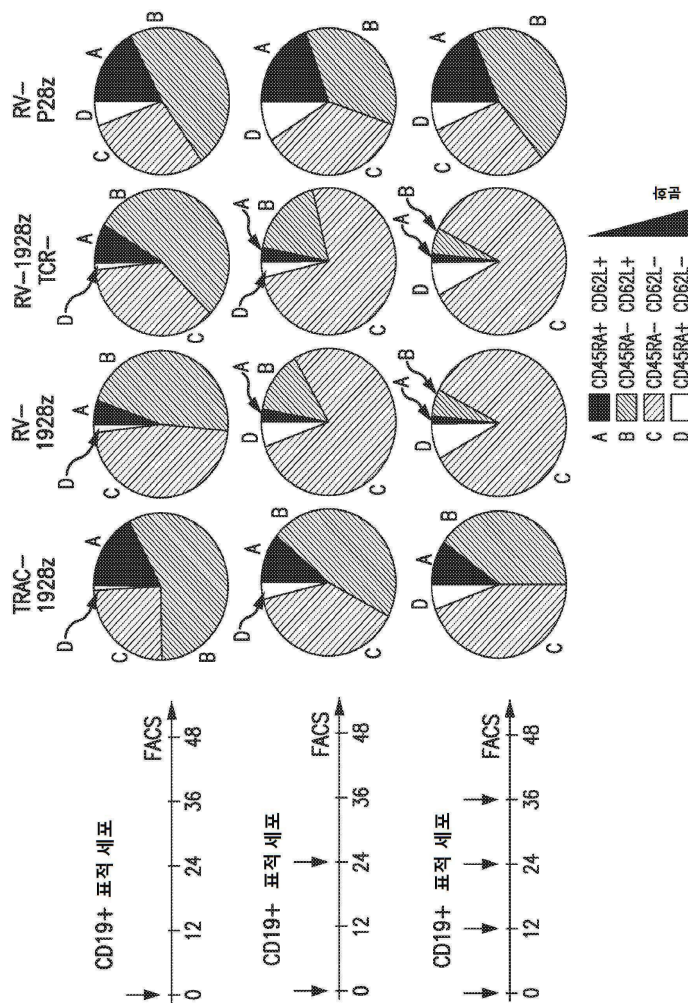
도면4b



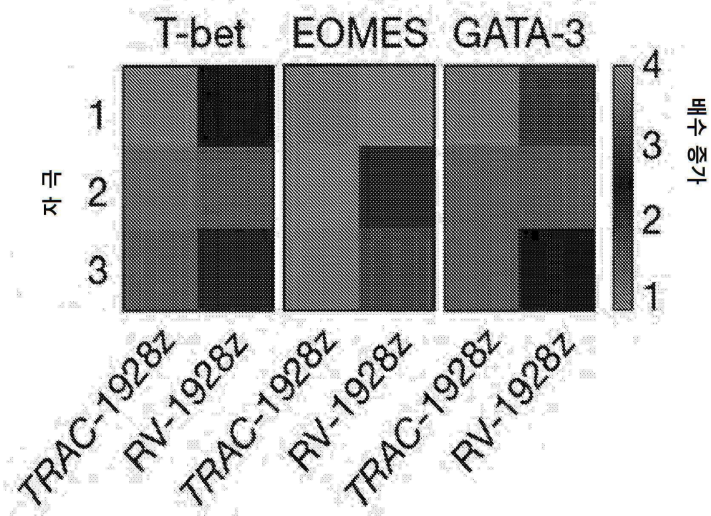
도면4c



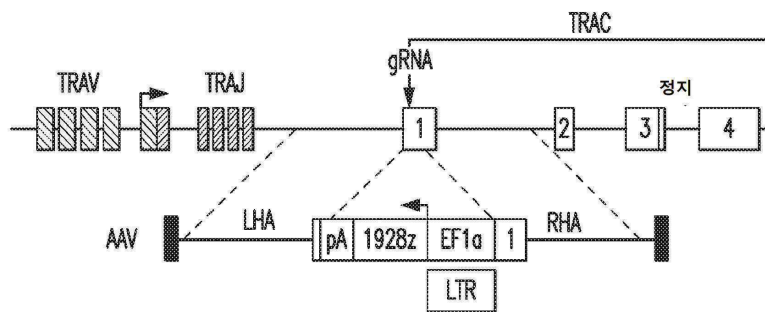
도면4d



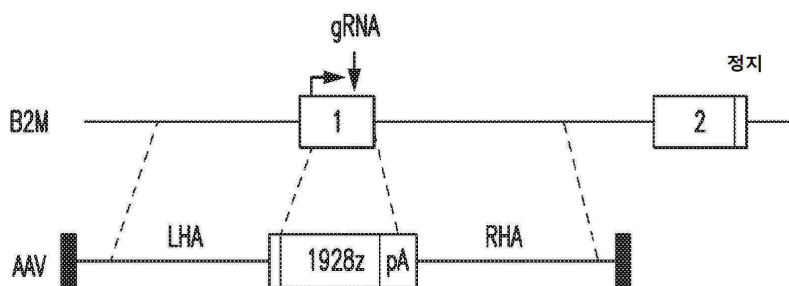
도면4e



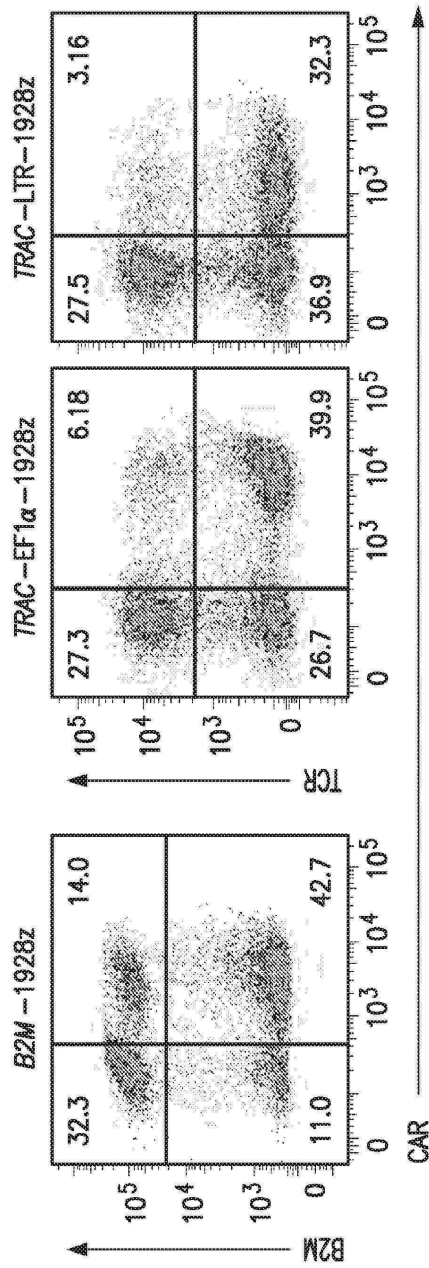
도면5a



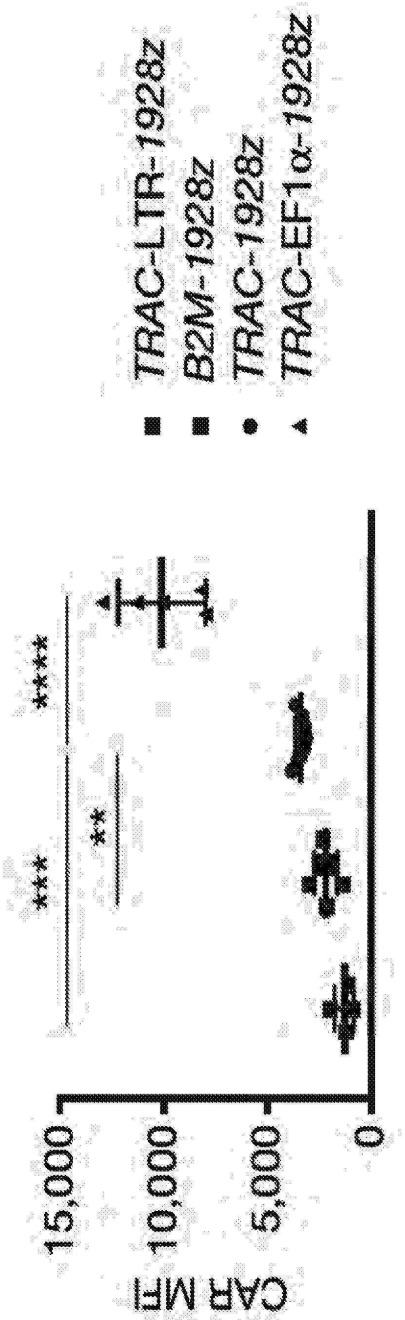
도면5b



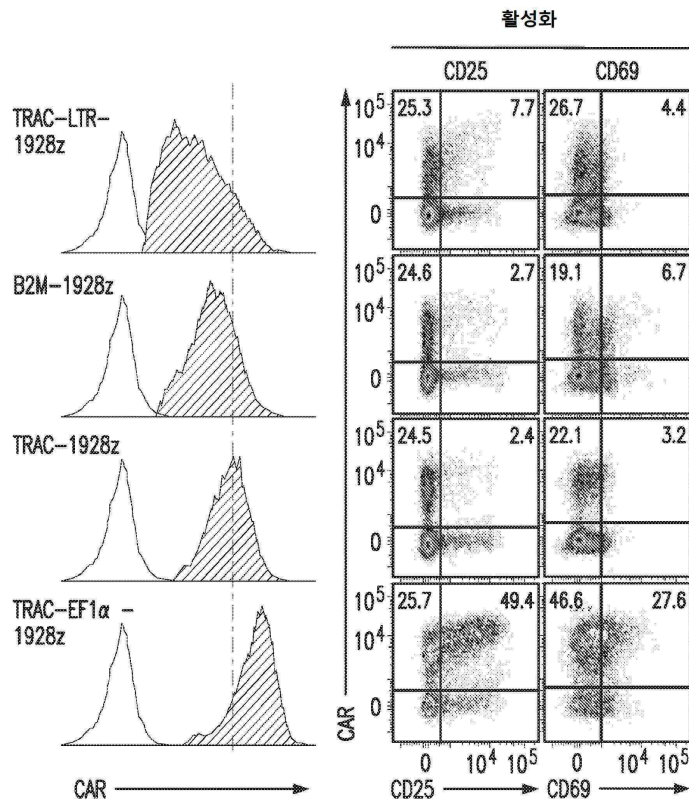
도면5c



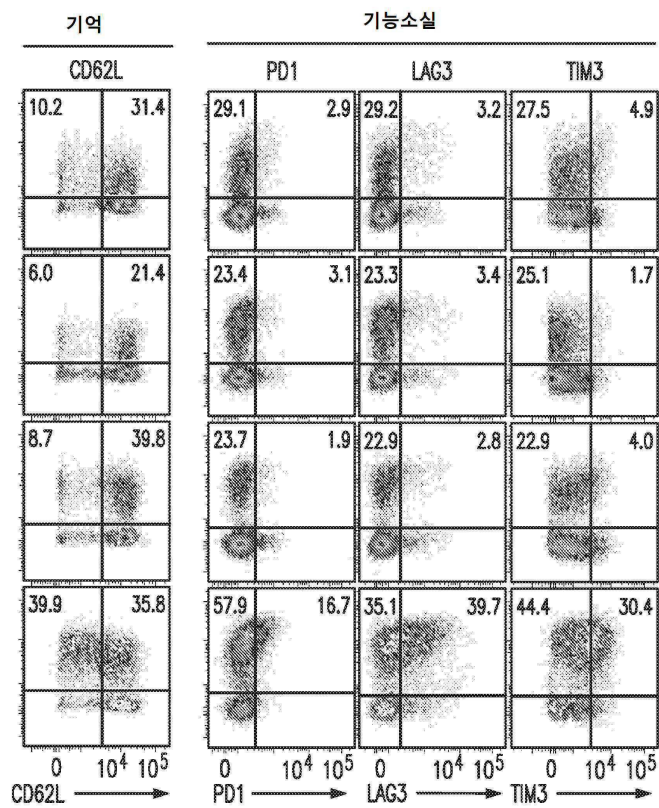
도면5d



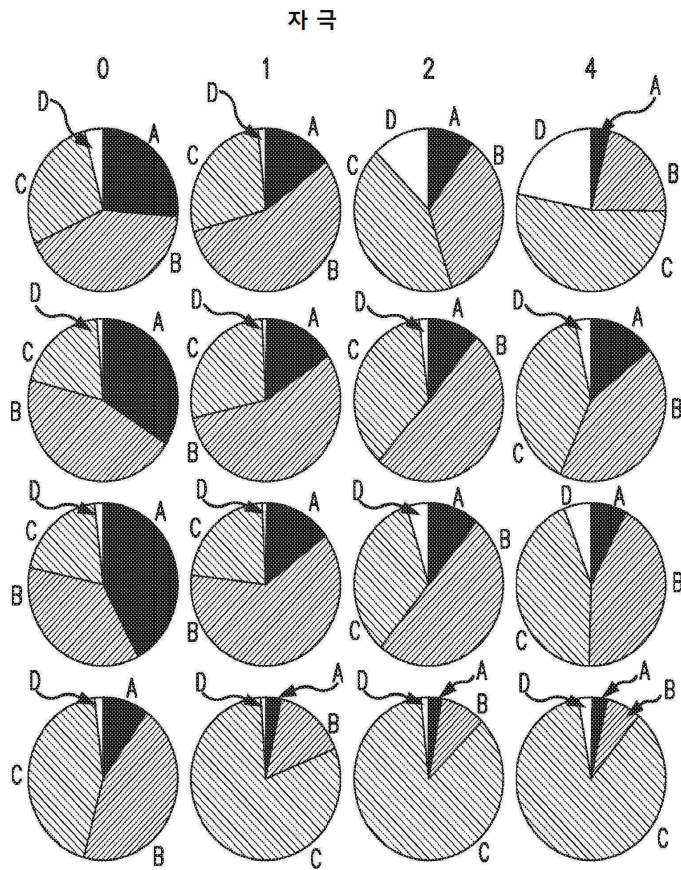
도면5ea



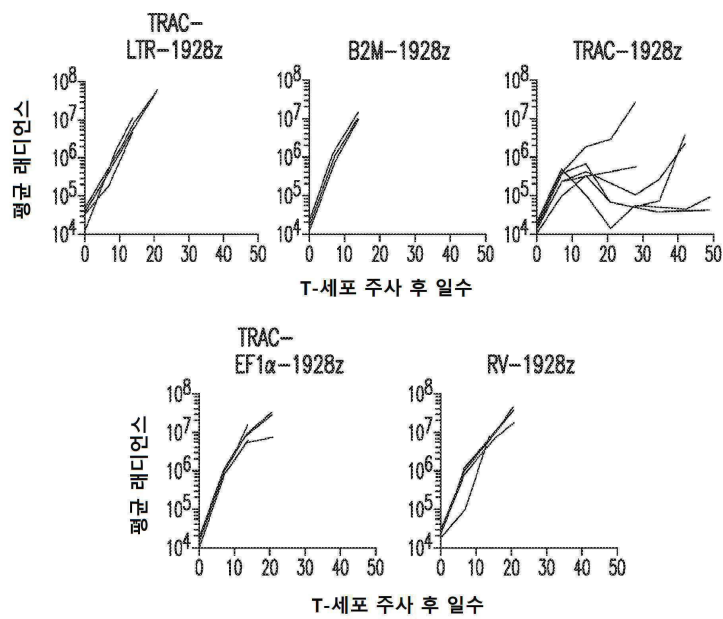
도면5eb



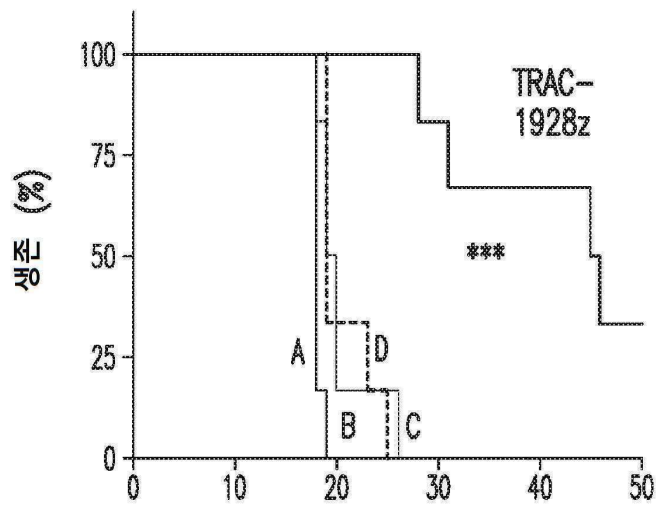
도면5f



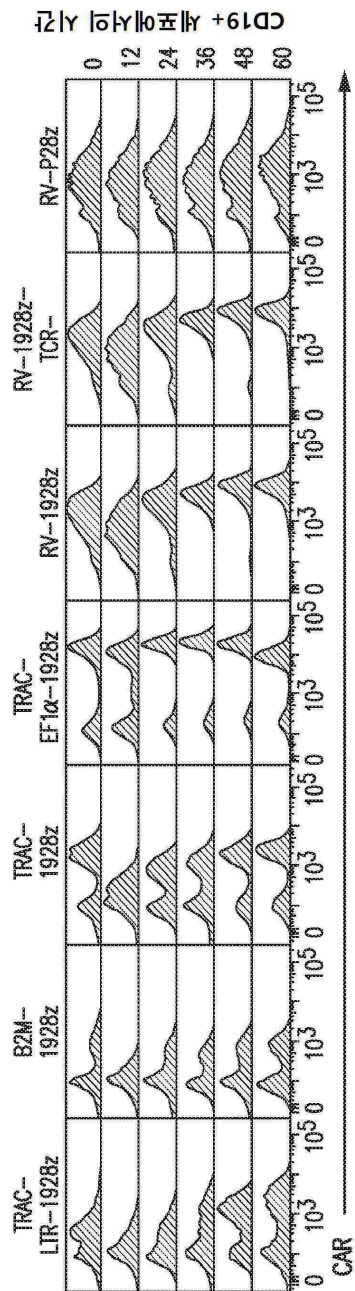
도면5g



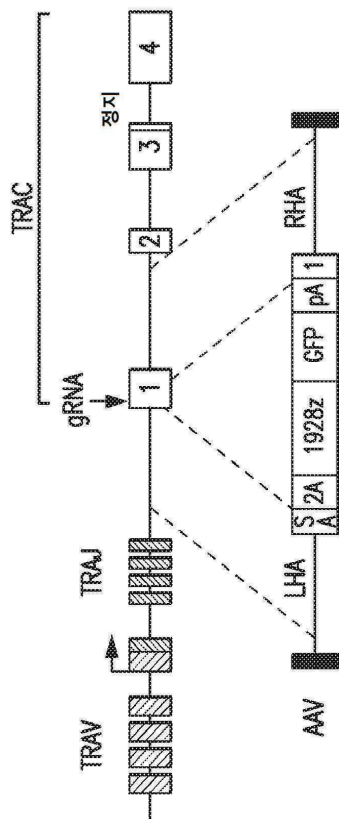
도면5h



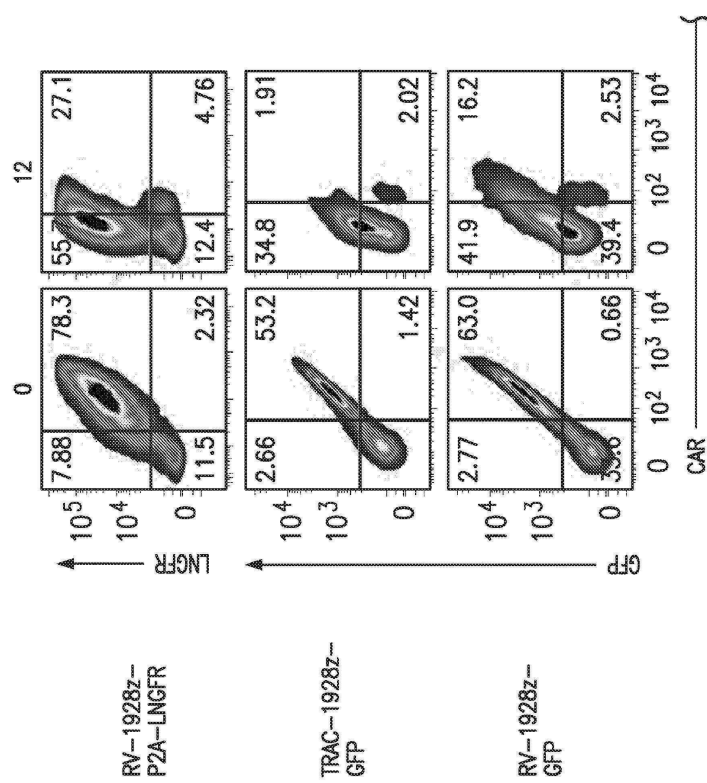
도면6a



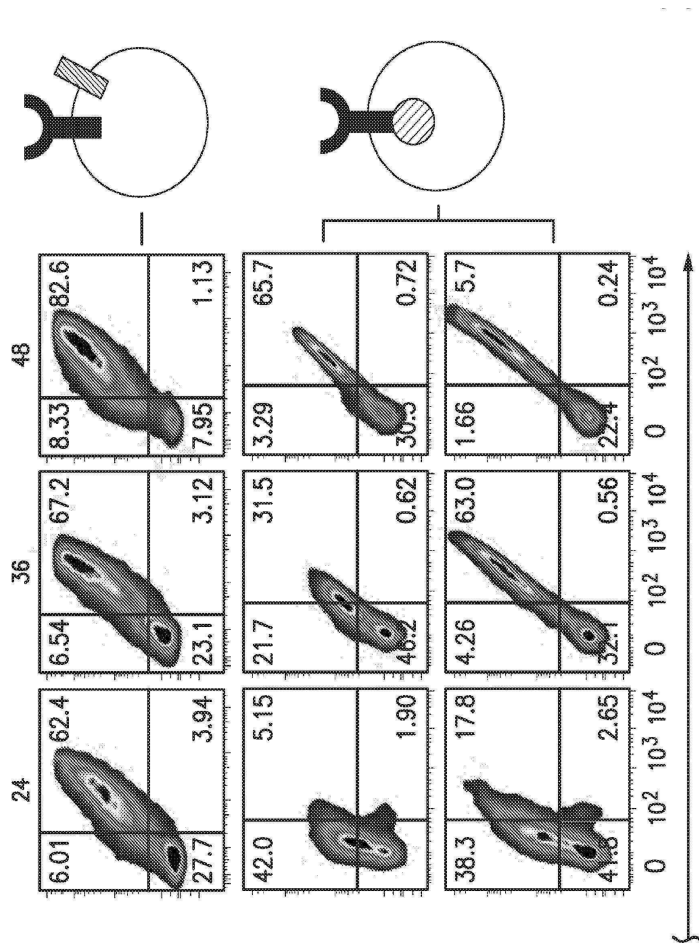
도면6b



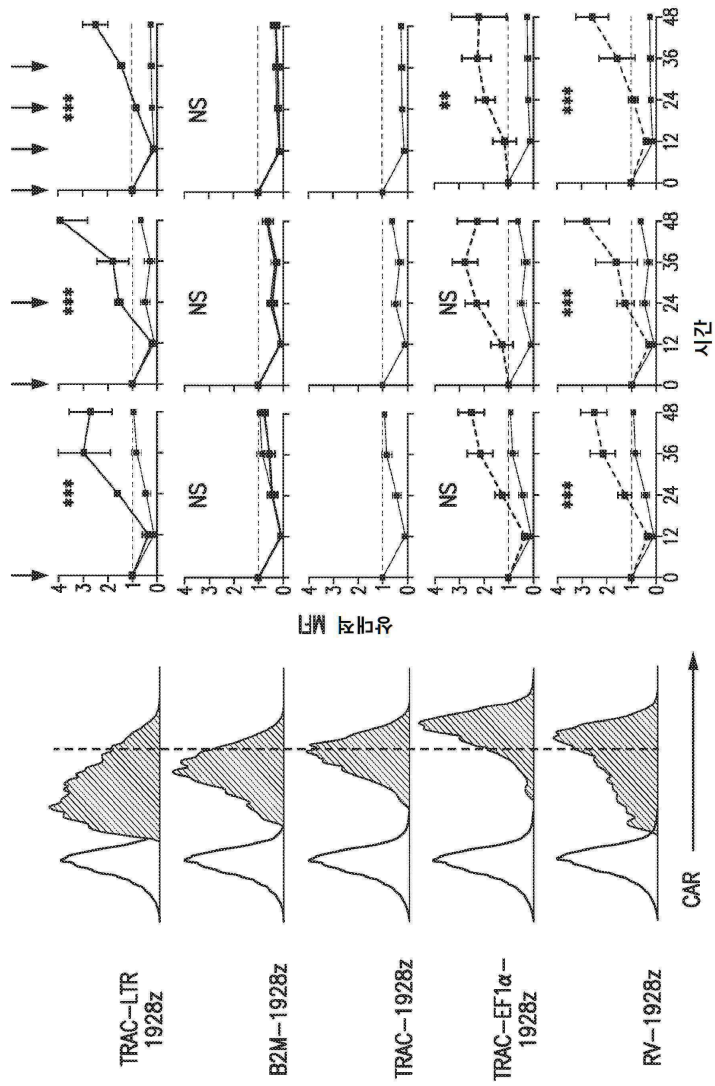
도면6ca



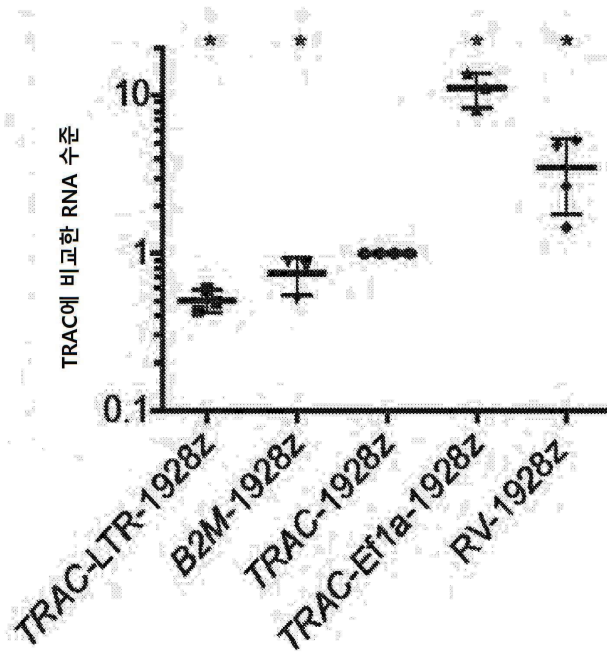
도면6cb



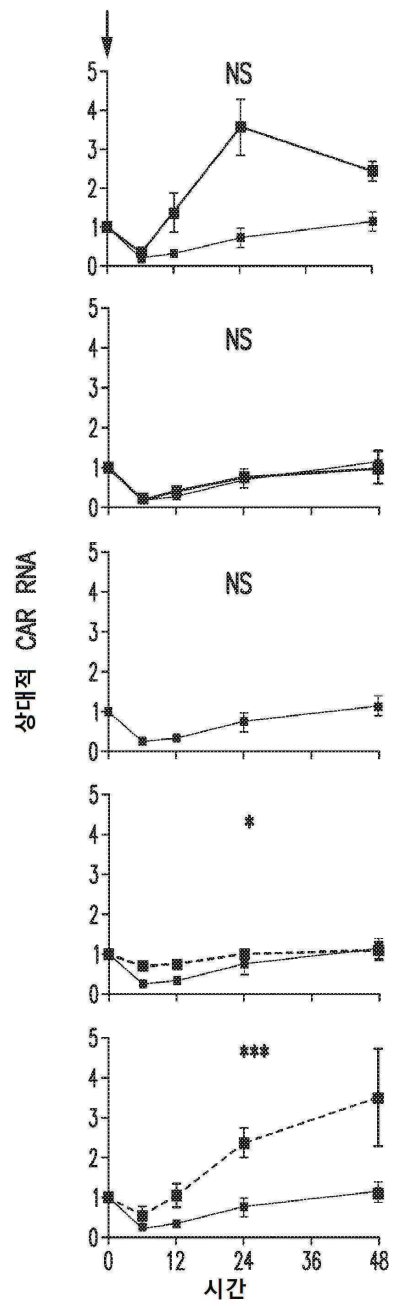
도면6d



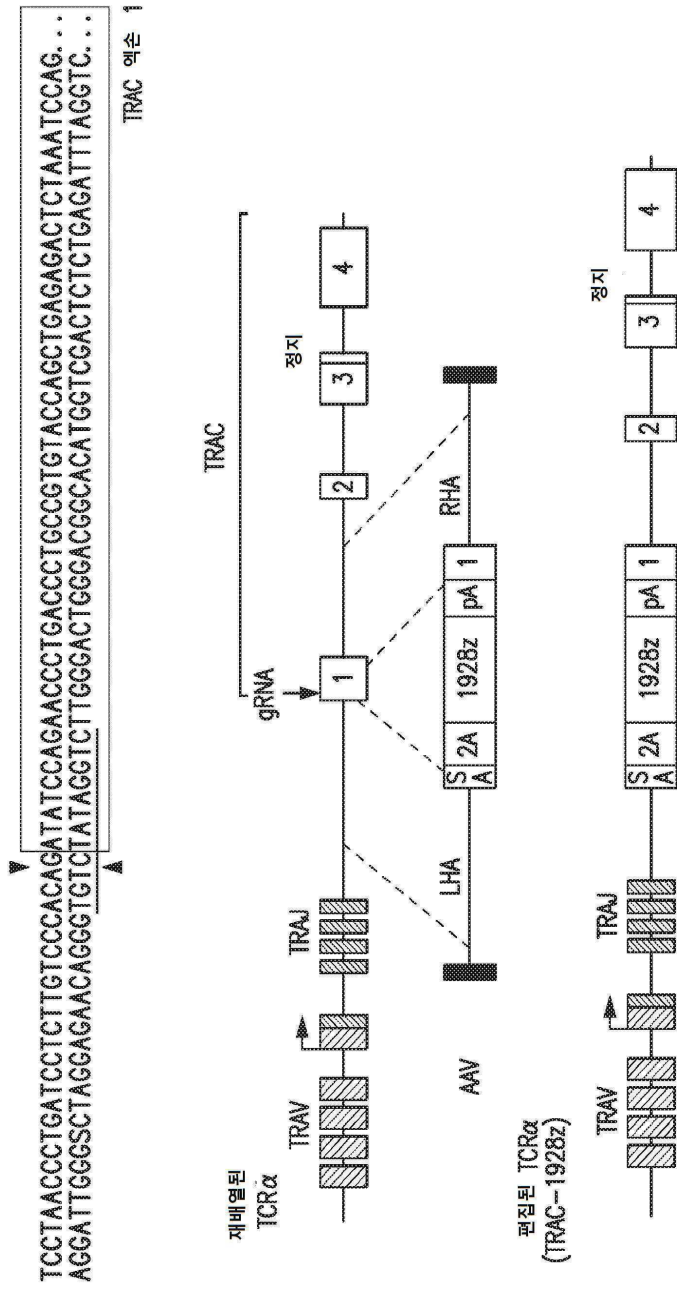
도면6e



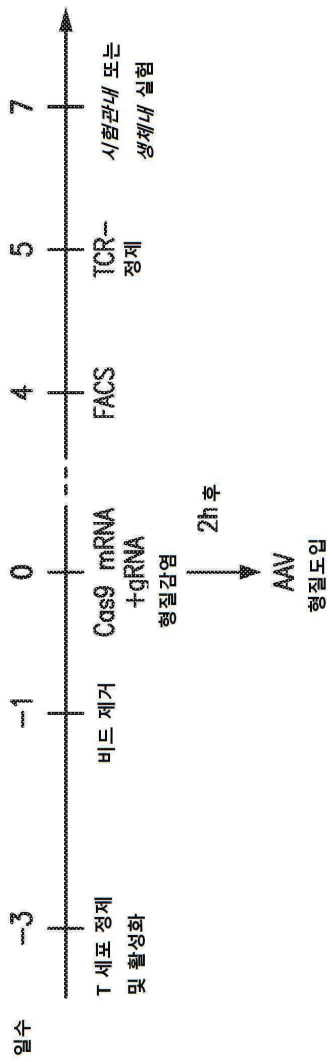
도면6f



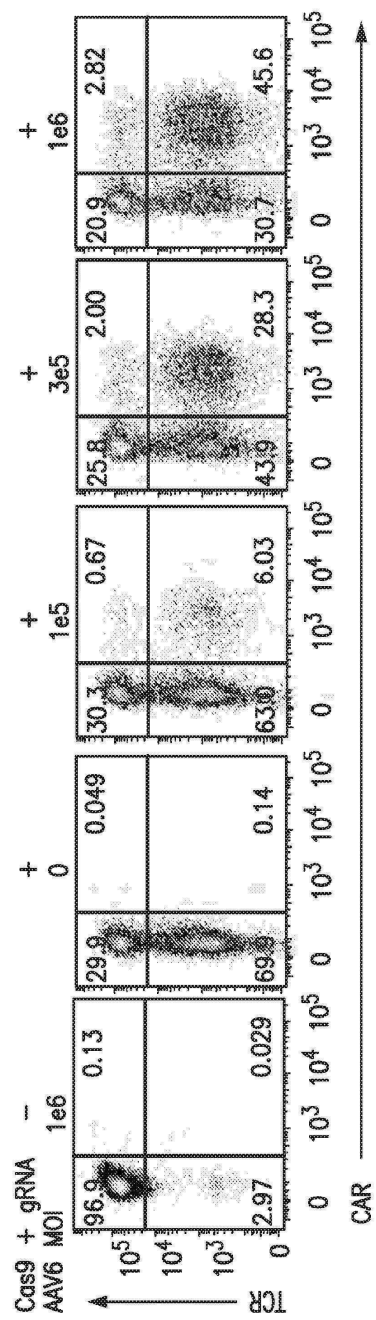
도면7a



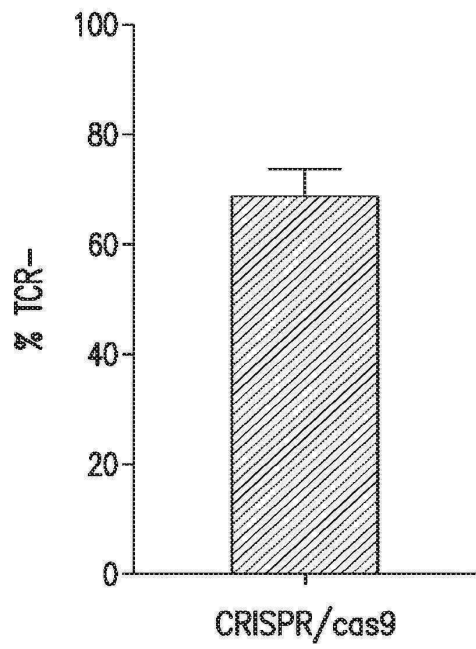
도면7b



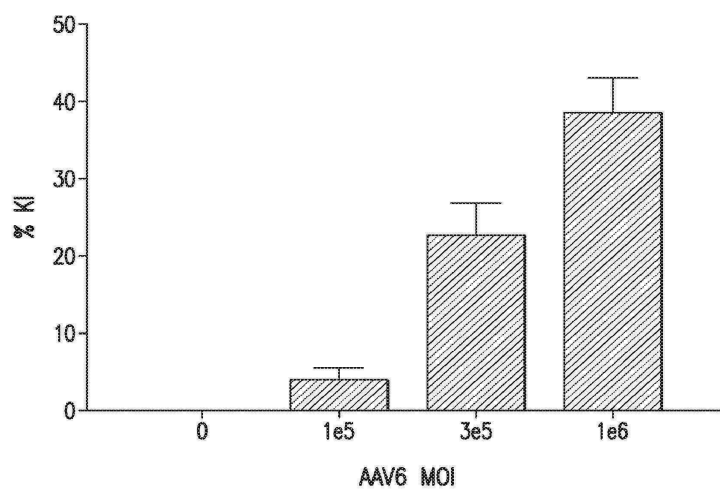
도면7c



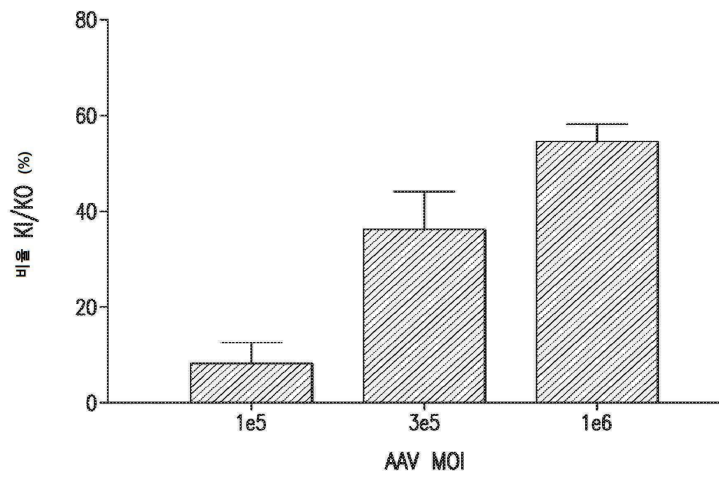
도면7d



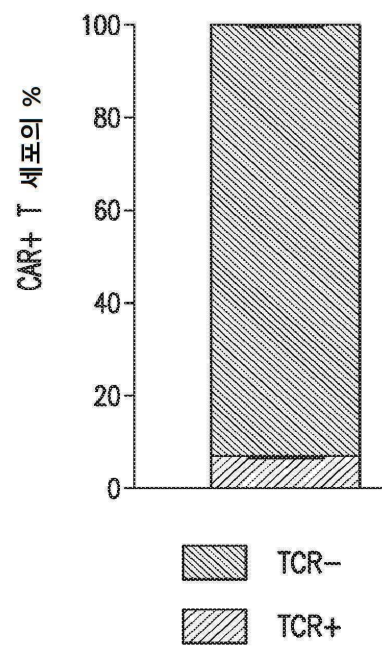
도면7e



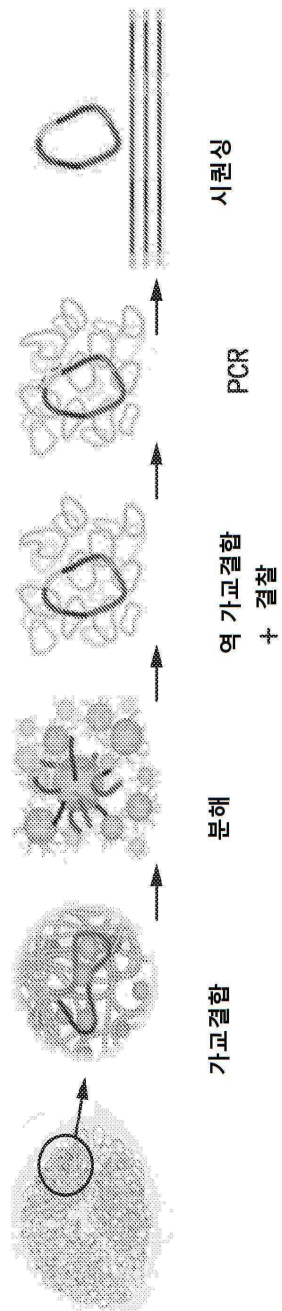
도면7f



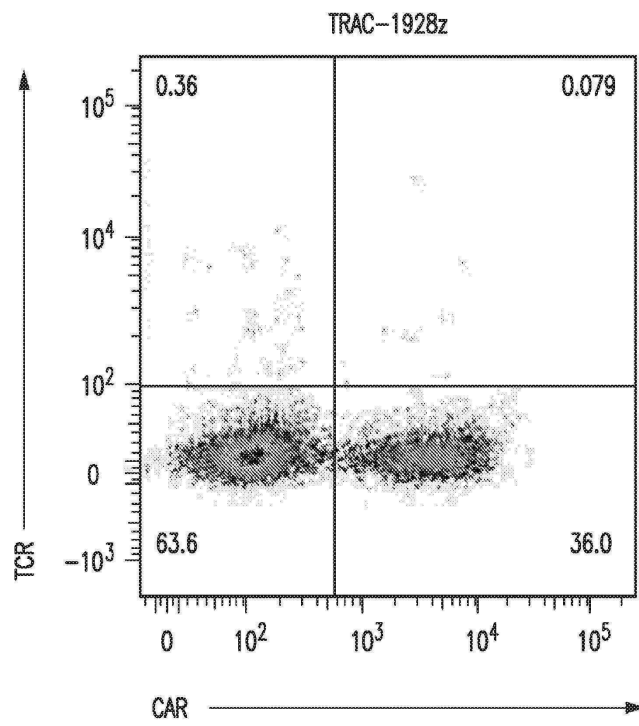
도면7g



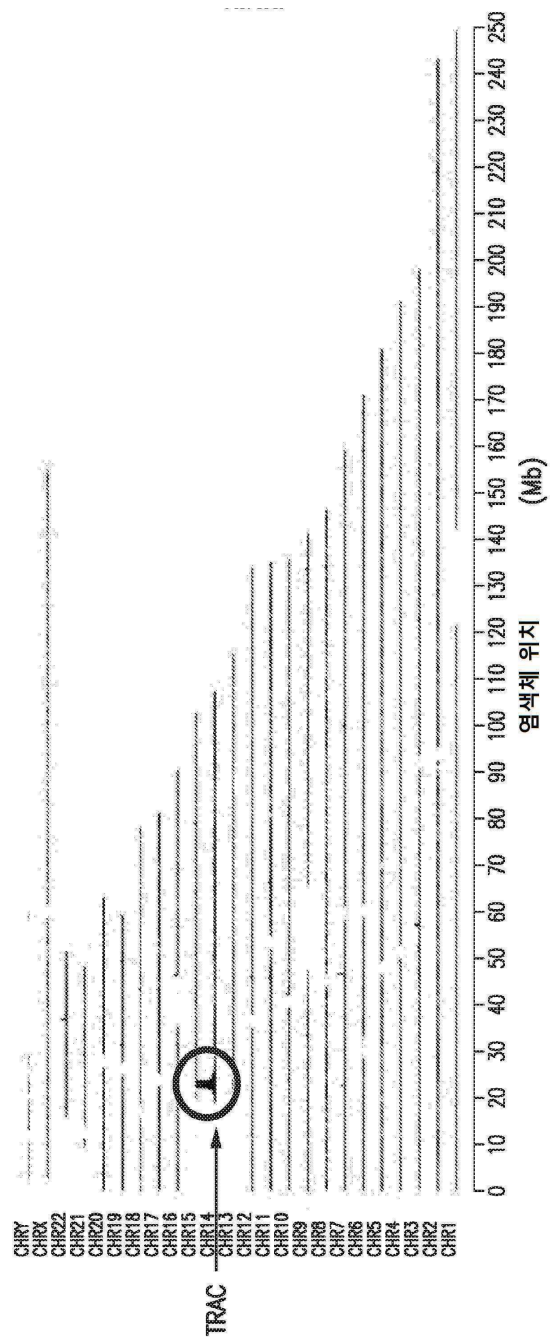
도면8a



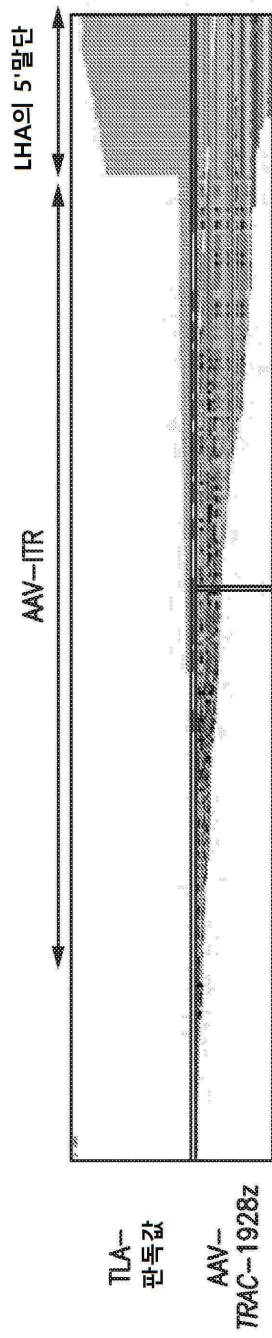
도면 8b



도면8c



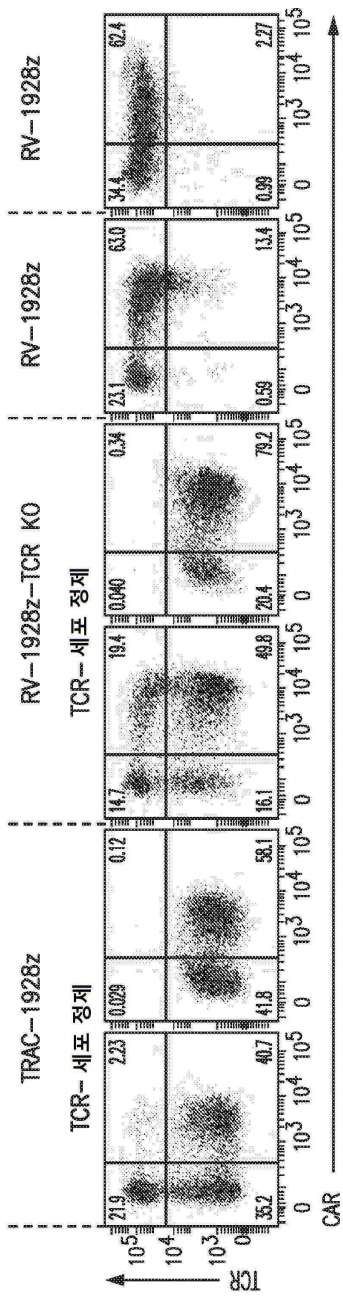
도면8d



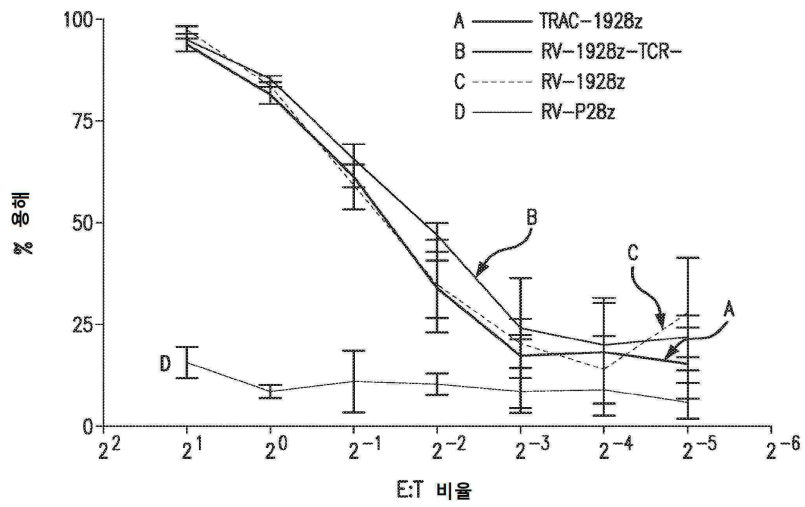
도면8e

완벽한 HR을 가진 TRAC 대립유전자 %	15
완벽하지 않은 HR을 가진 TRAC 대립유전자 %	5
검출된 무작위 통합 (TLA의 민감성 - 5%)	0

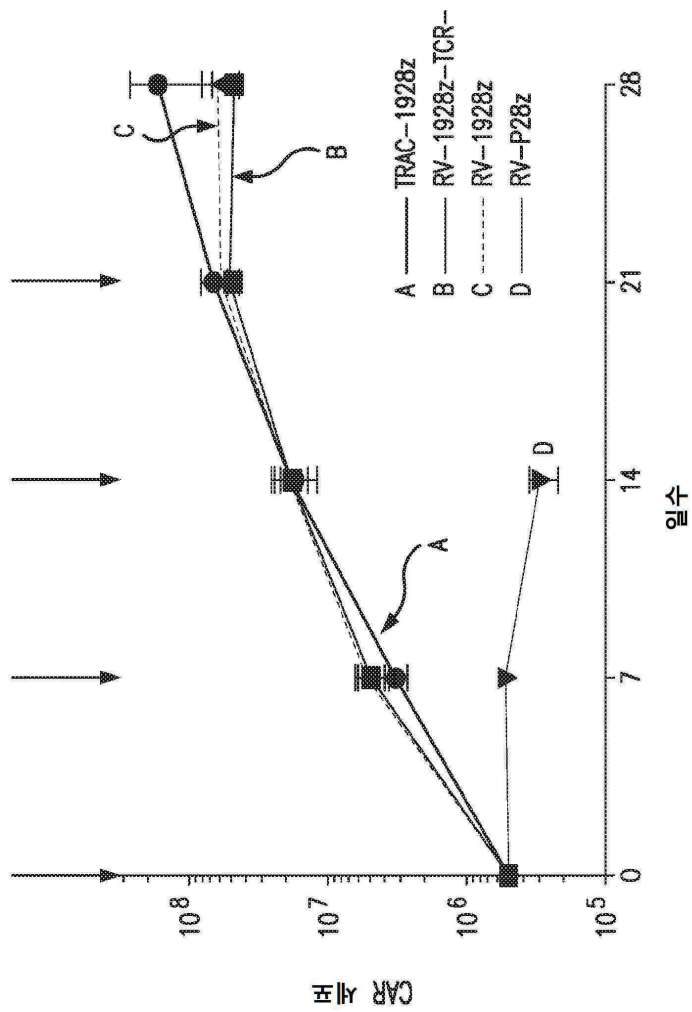
도면9a



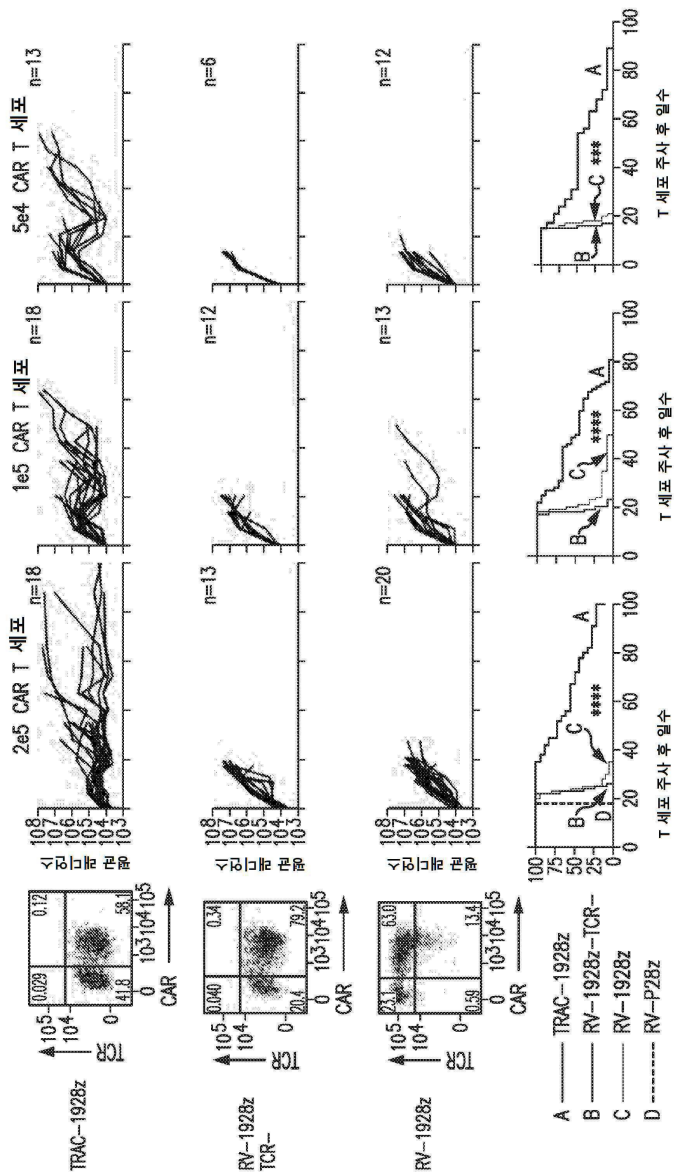
도면9b



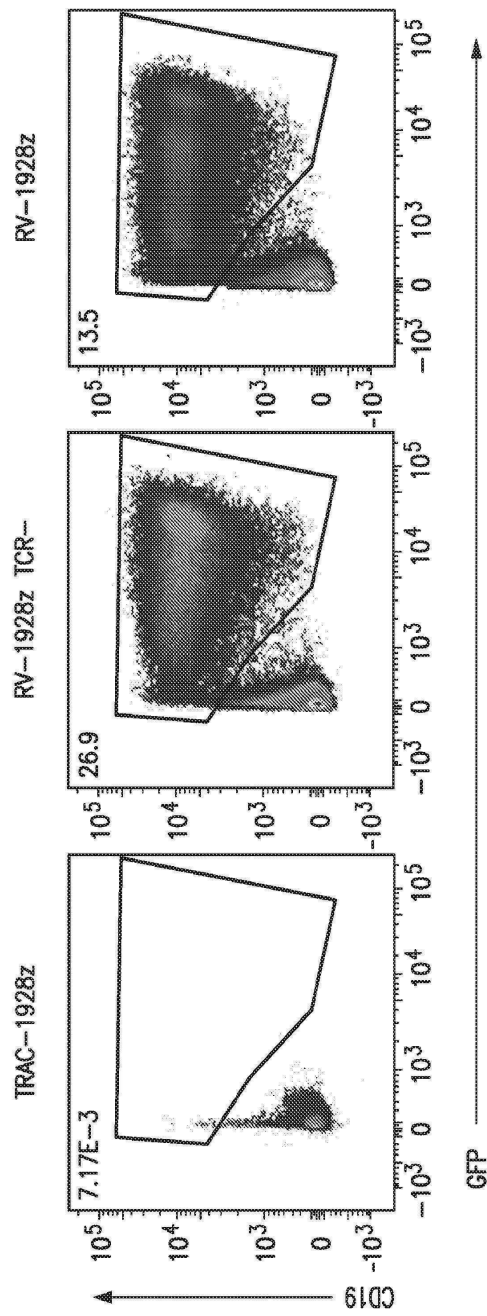
도면9c



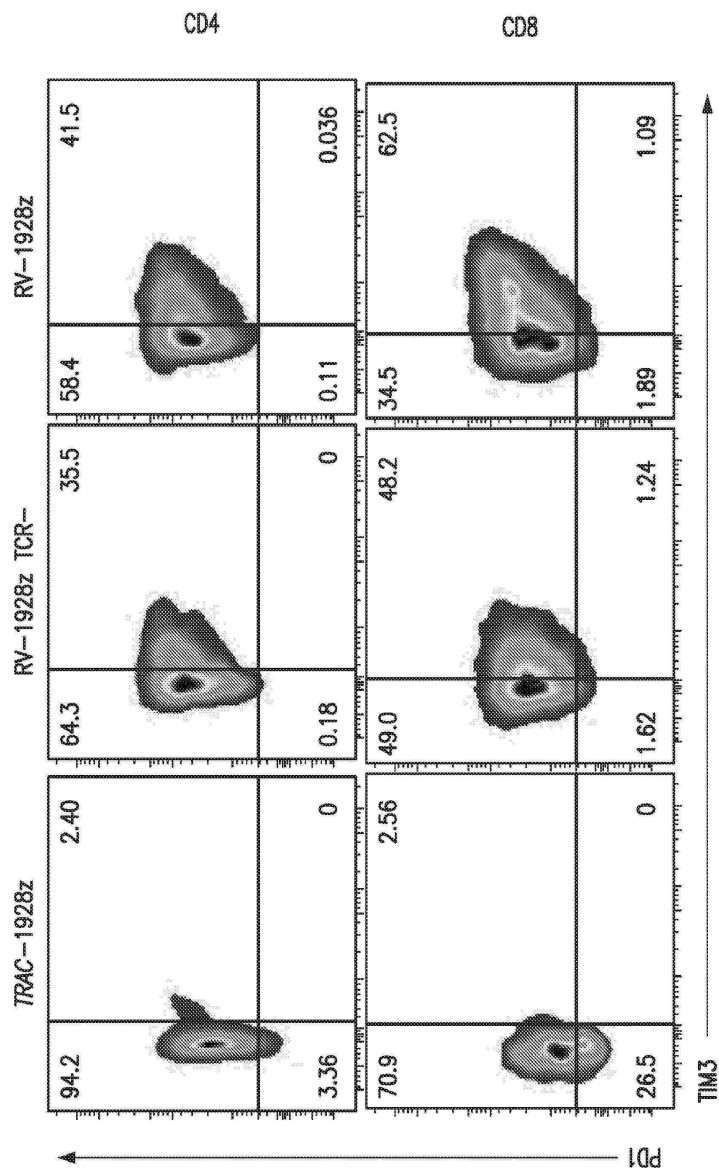
도면10a



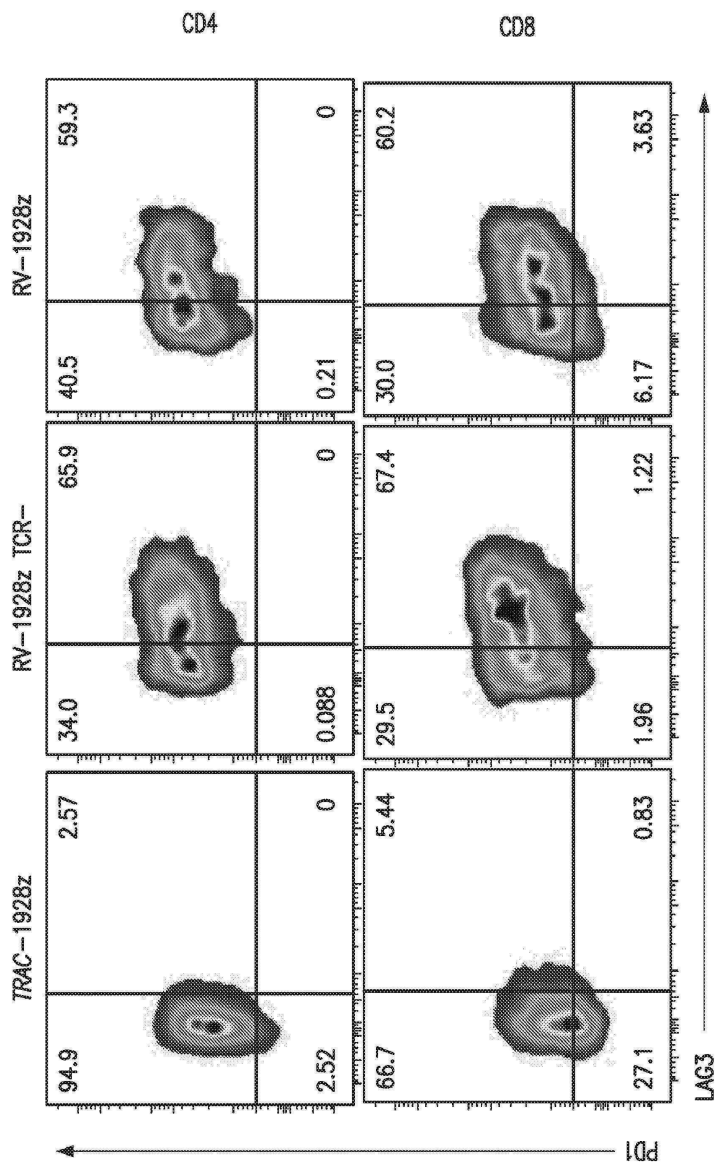
도면10b



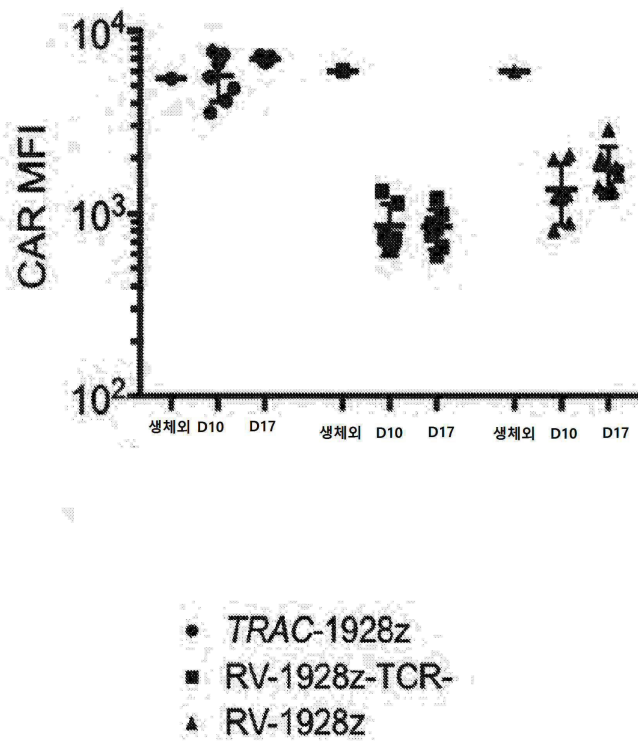
도면10c



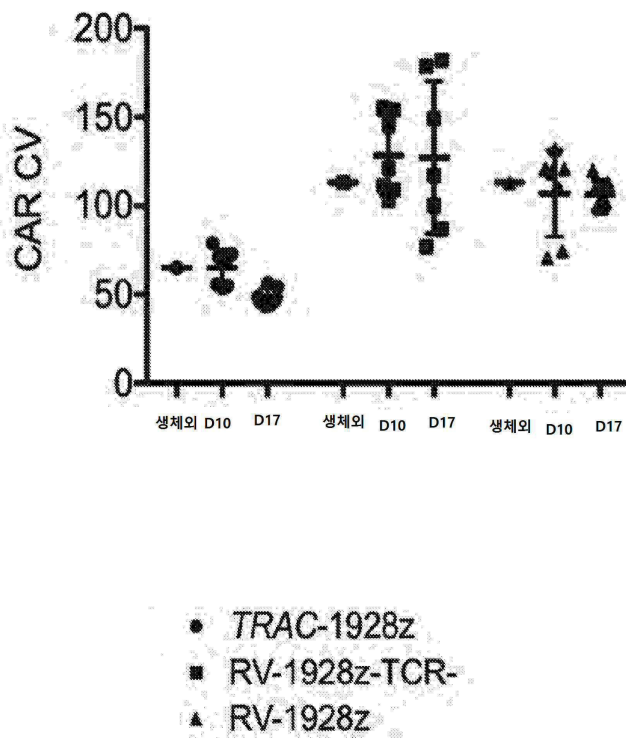
도면10d



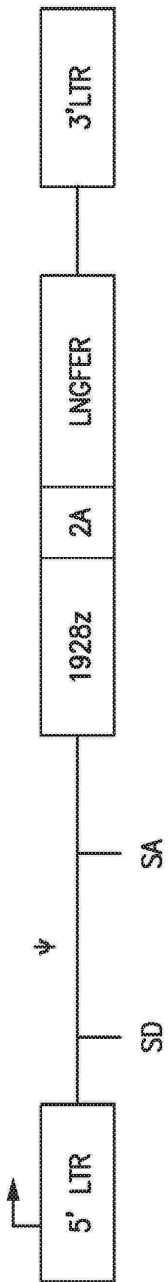
도면10e



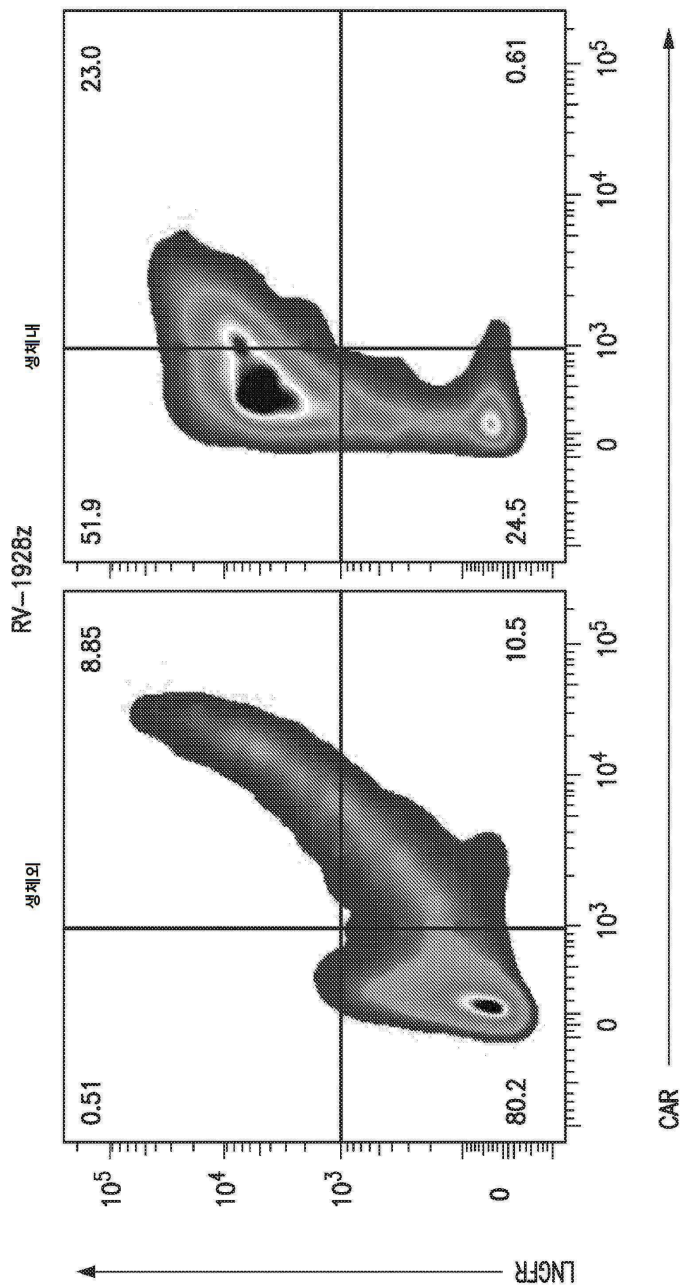
도면10f



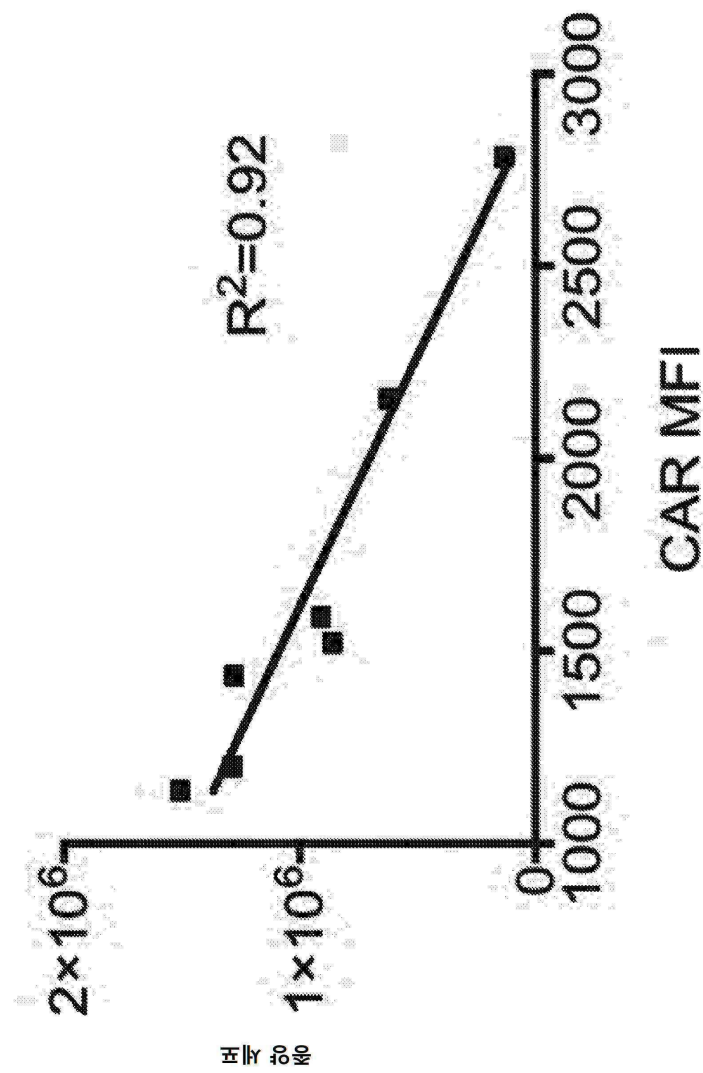
도면10g



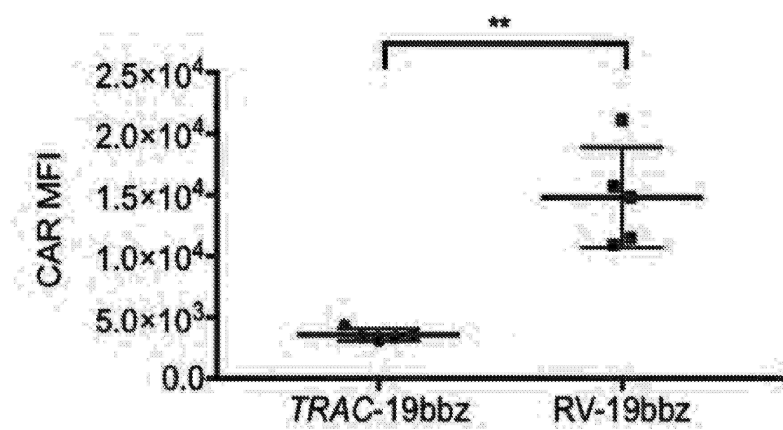
도면10h



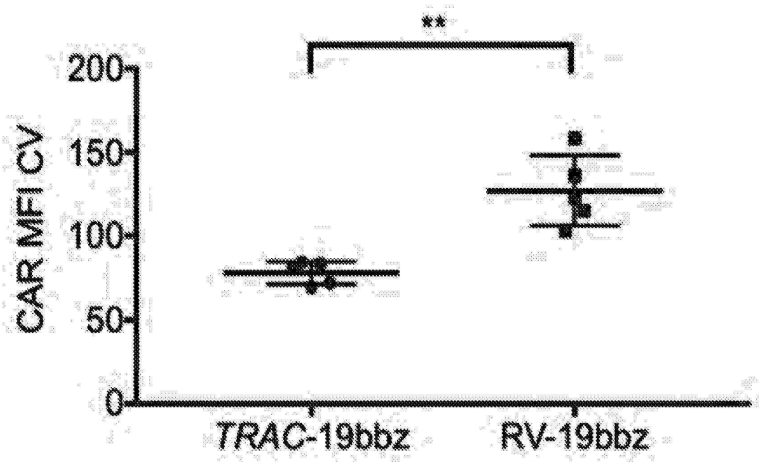
도면10i



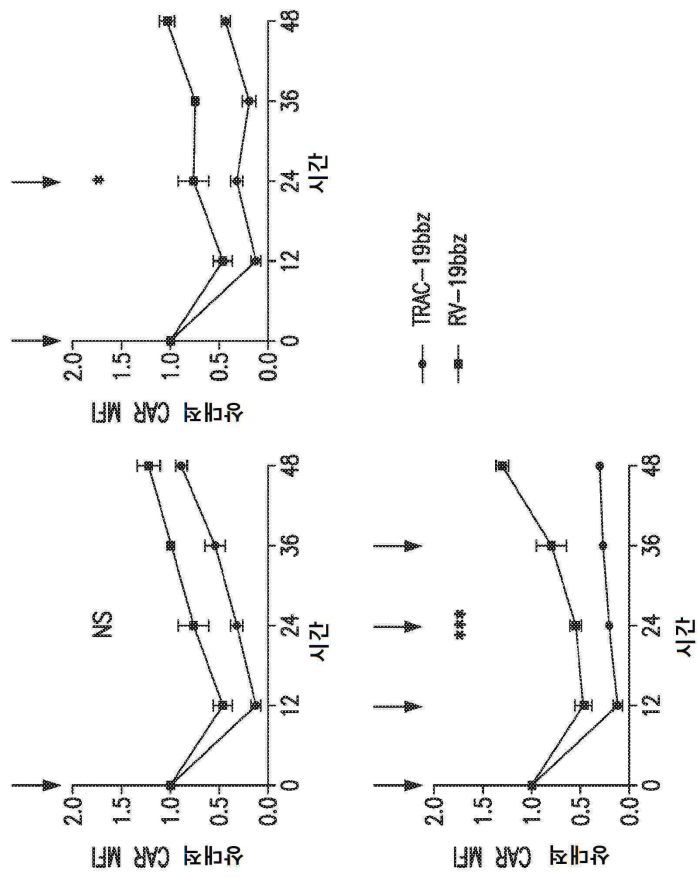
도면11a



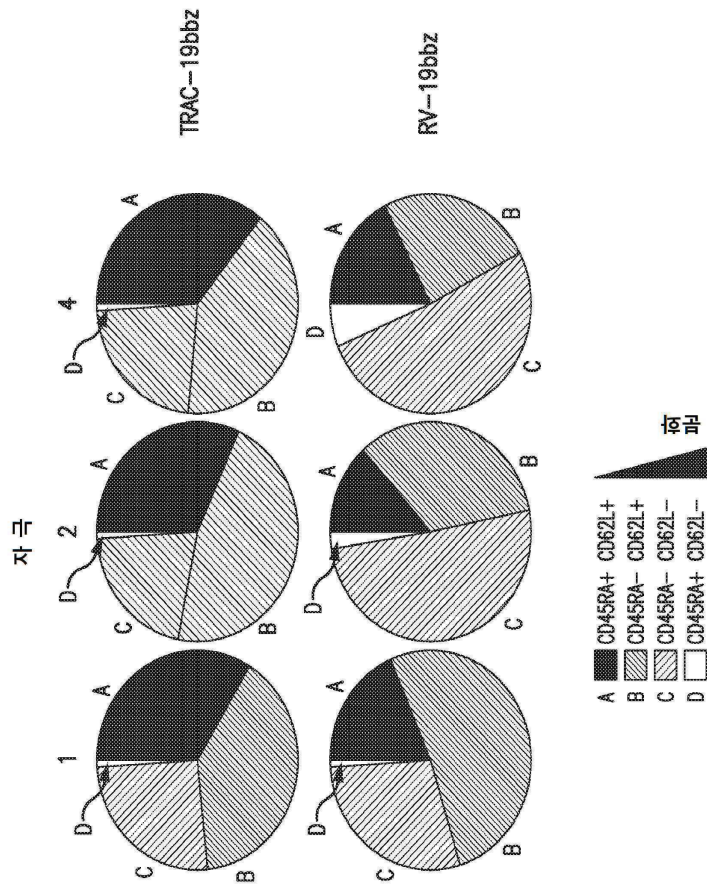
도면11b



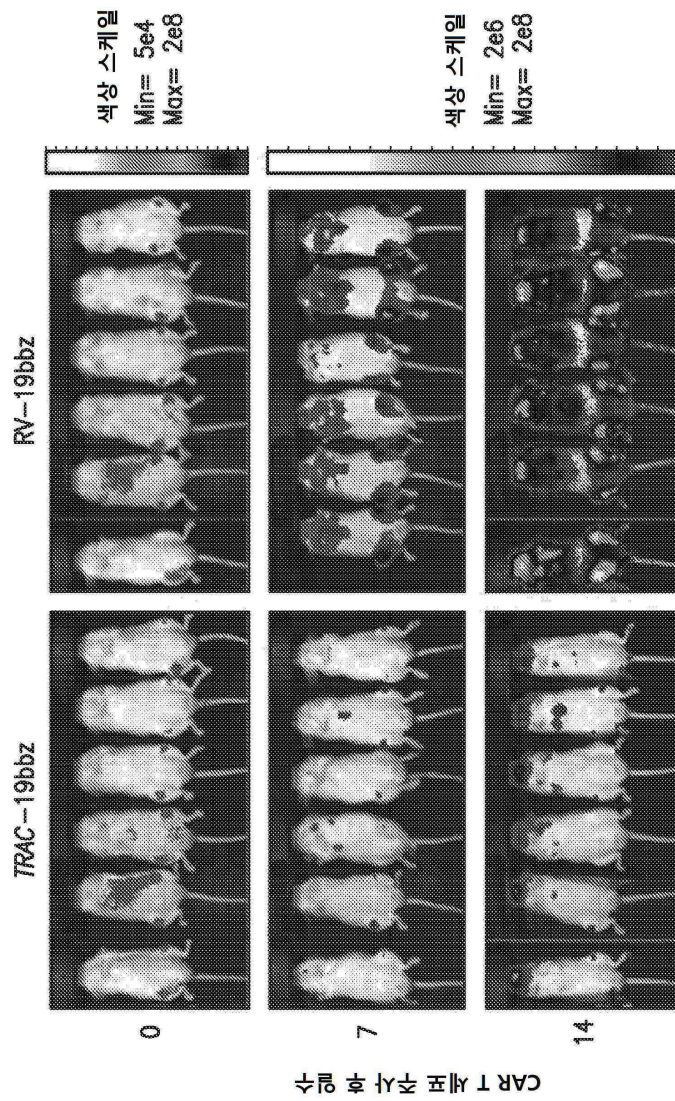
도면11d



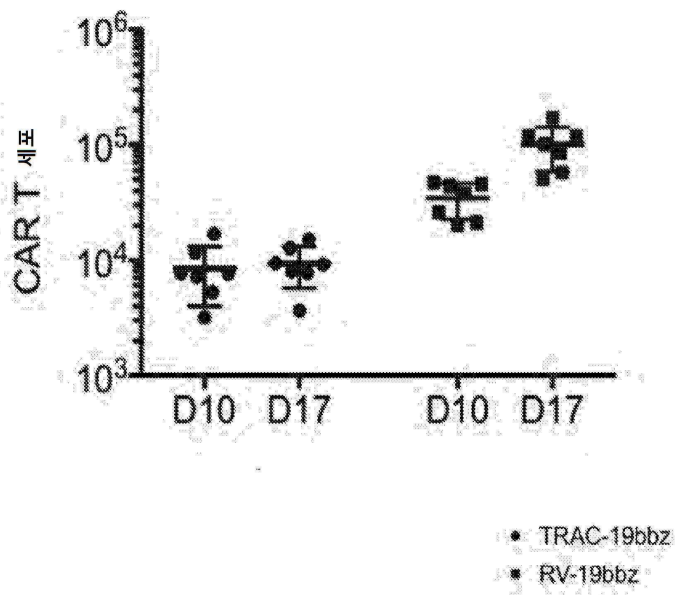
도면11e



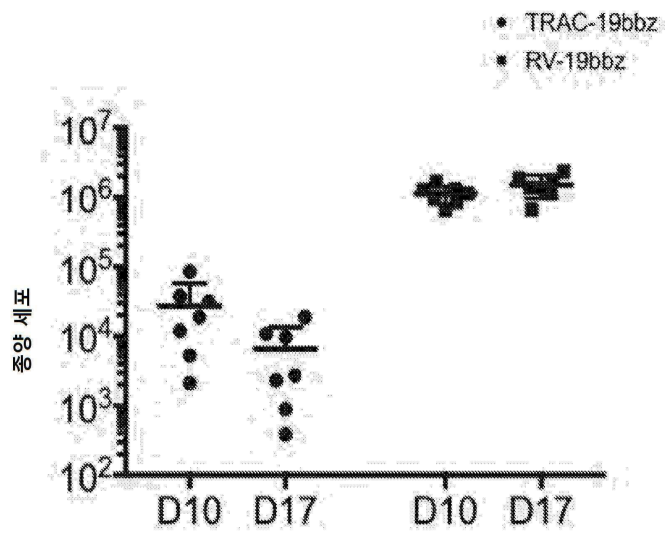
도면11f



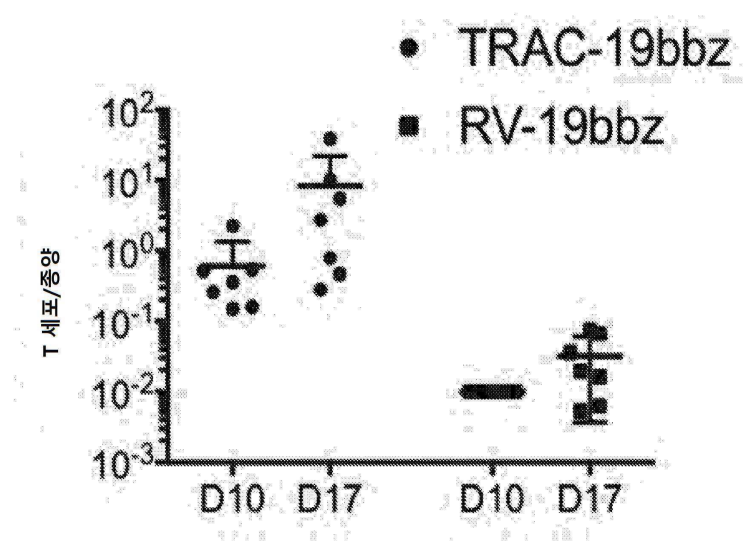
도면11g



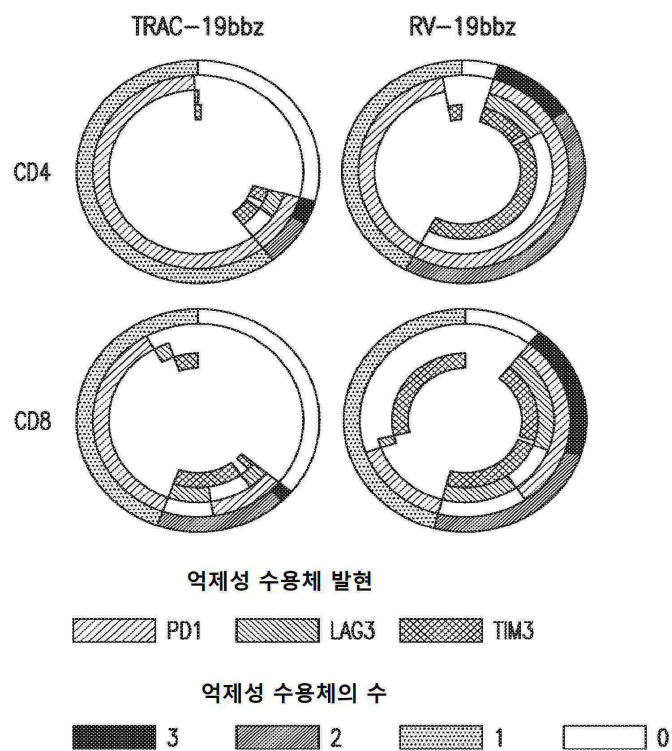
도면11h



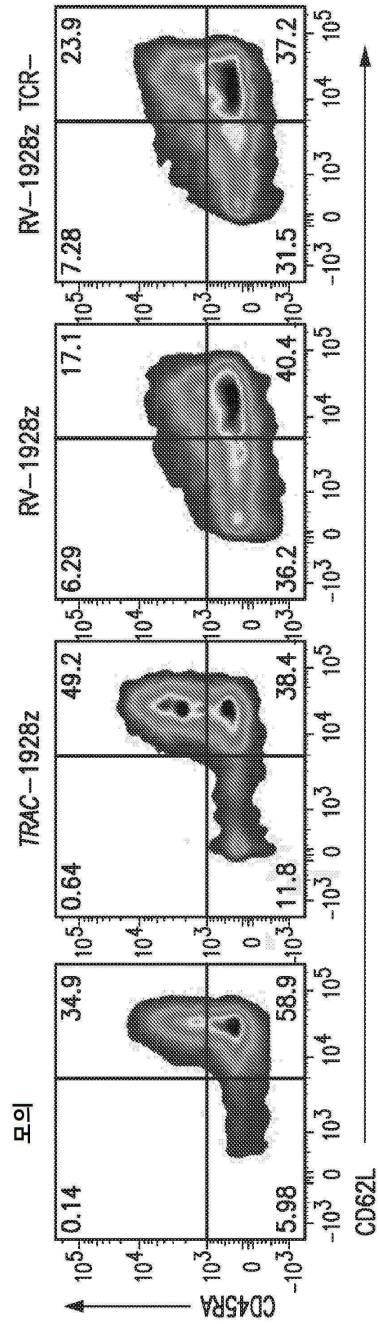
도면11i



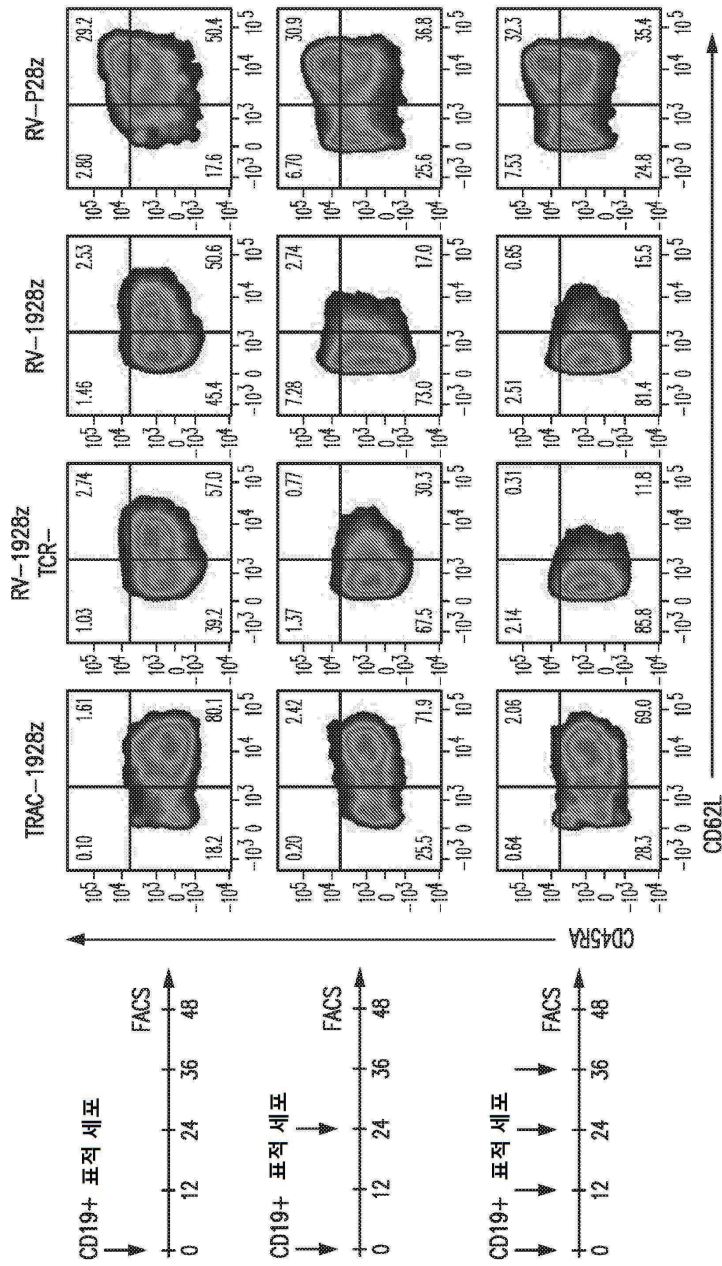
도면11j



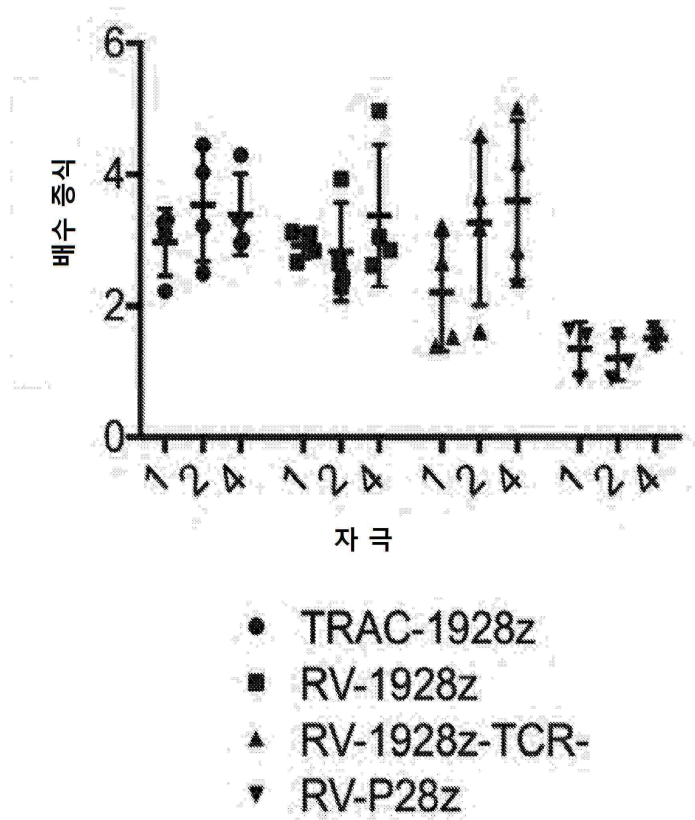
도면12a



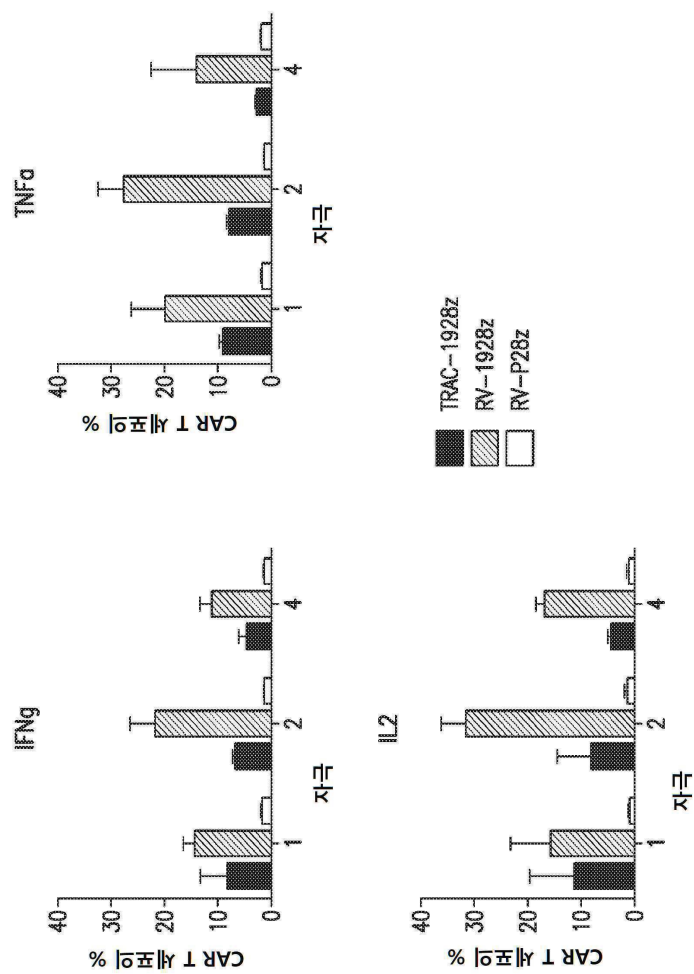
도면12b



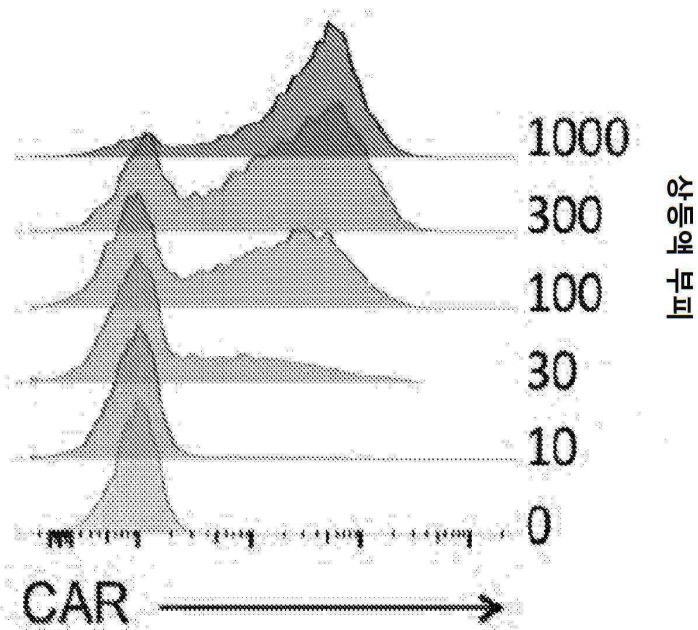
도면12c



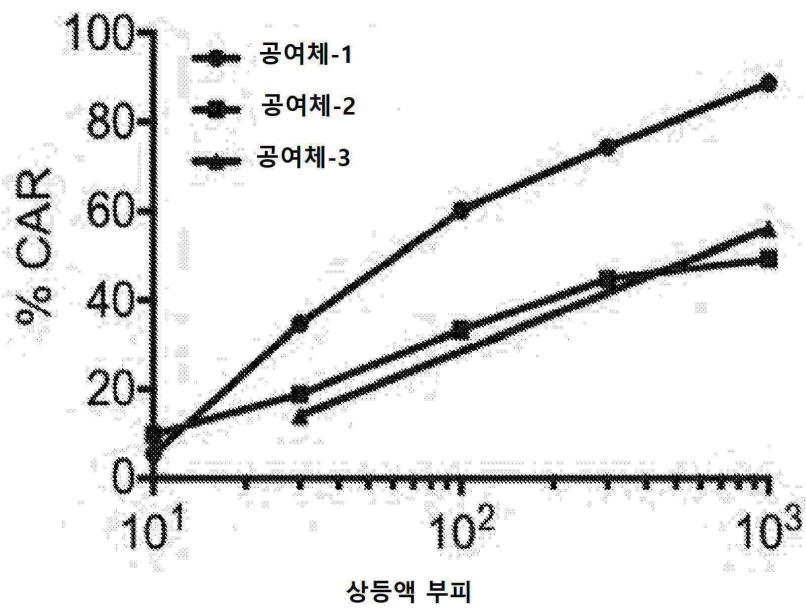
도면12d



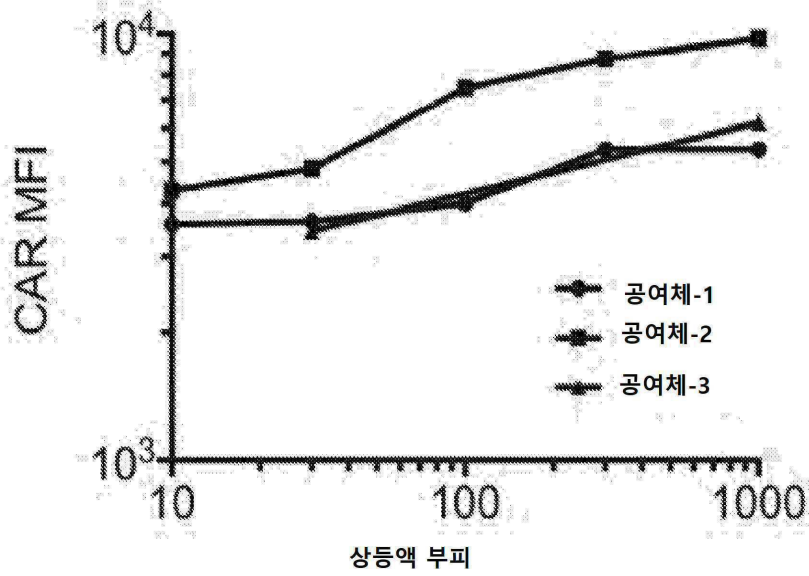
도면13a



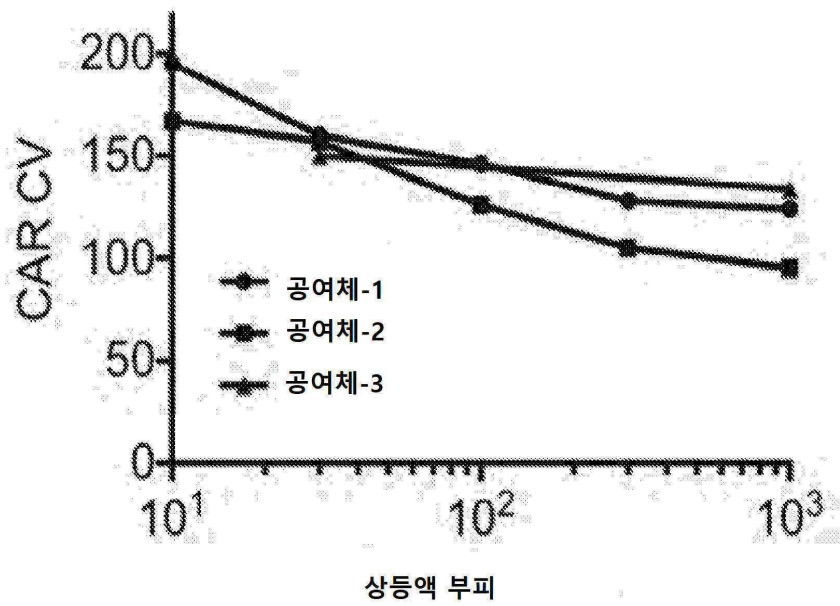
도면13b



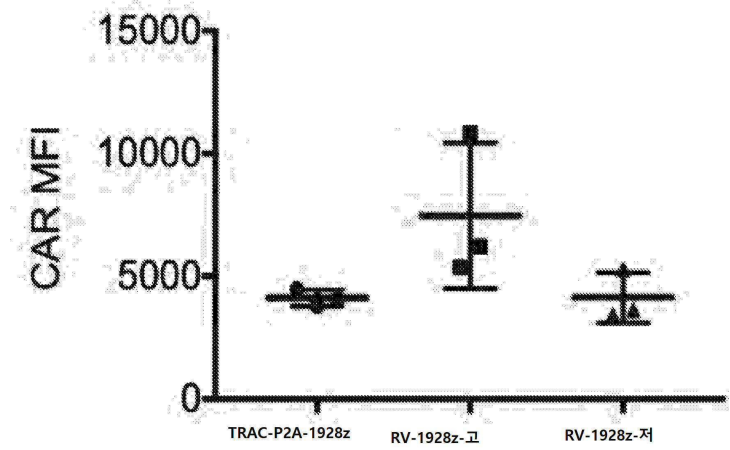
도면13c



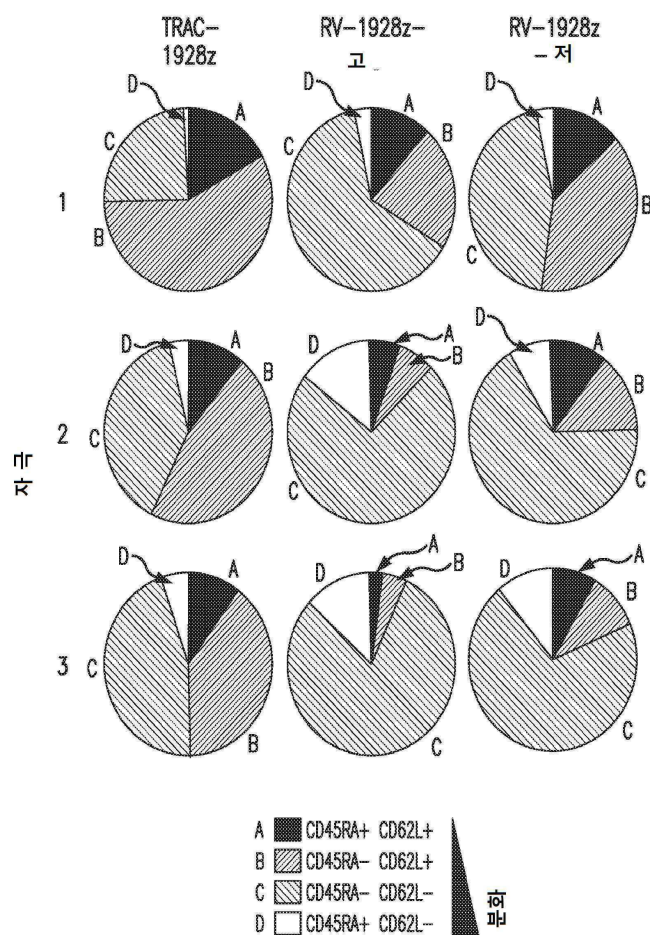
도면13d



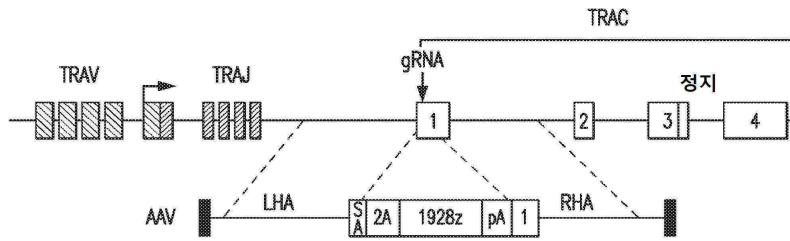
도면13e



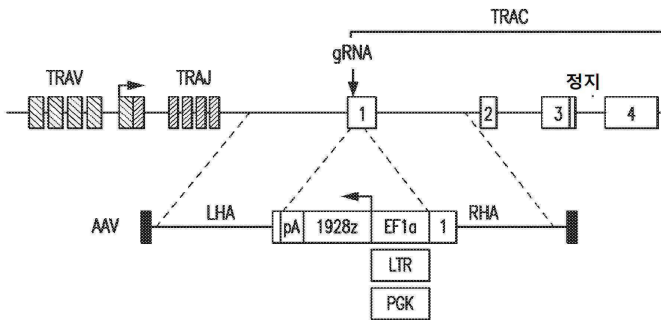
도면13f



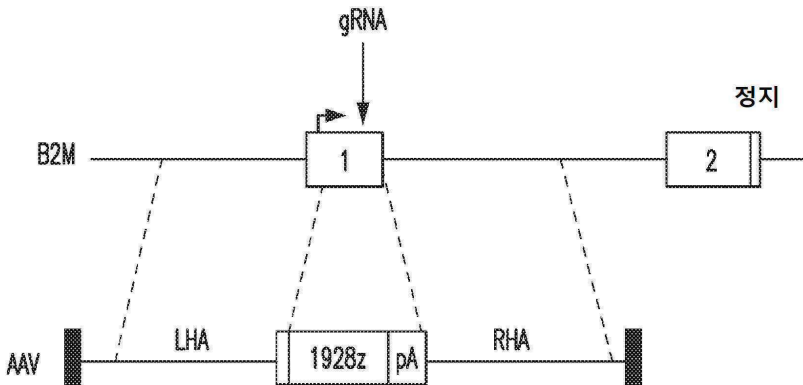
도면14a



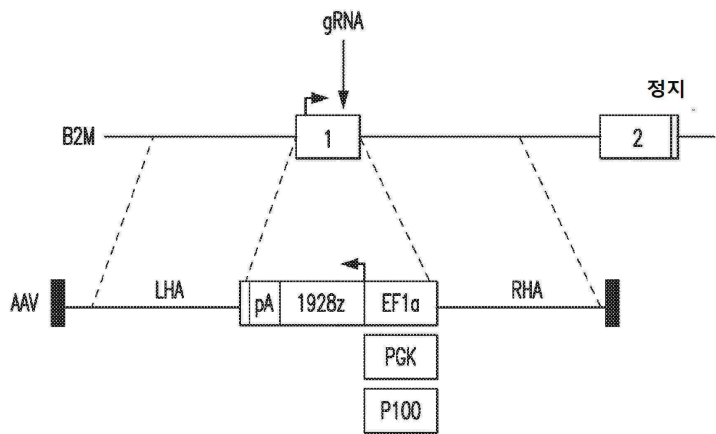
도면14b



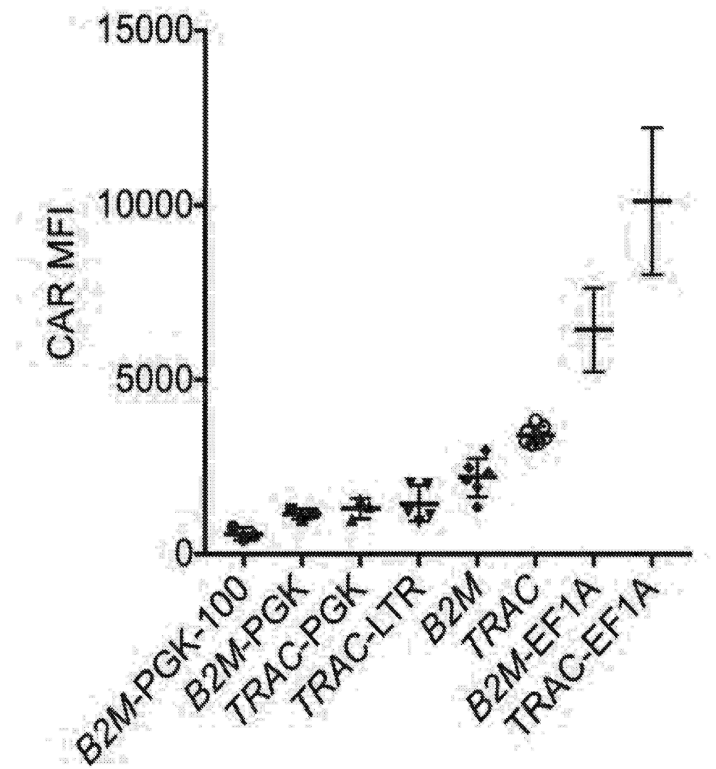
도면14c



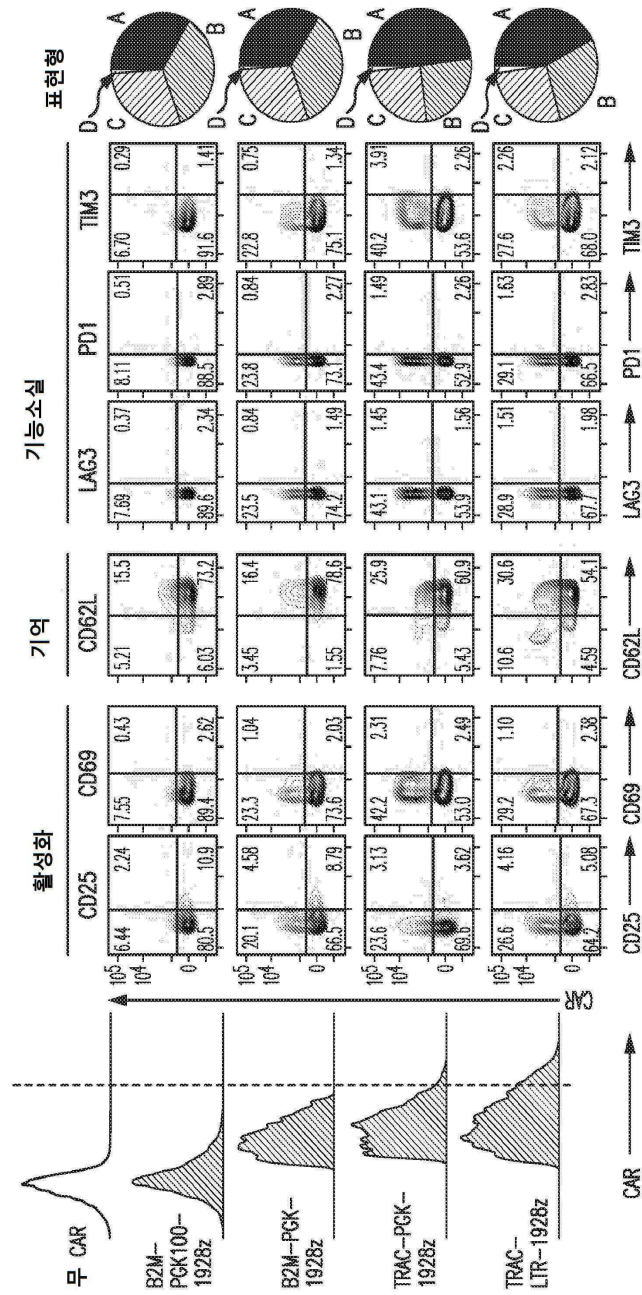
도면14d



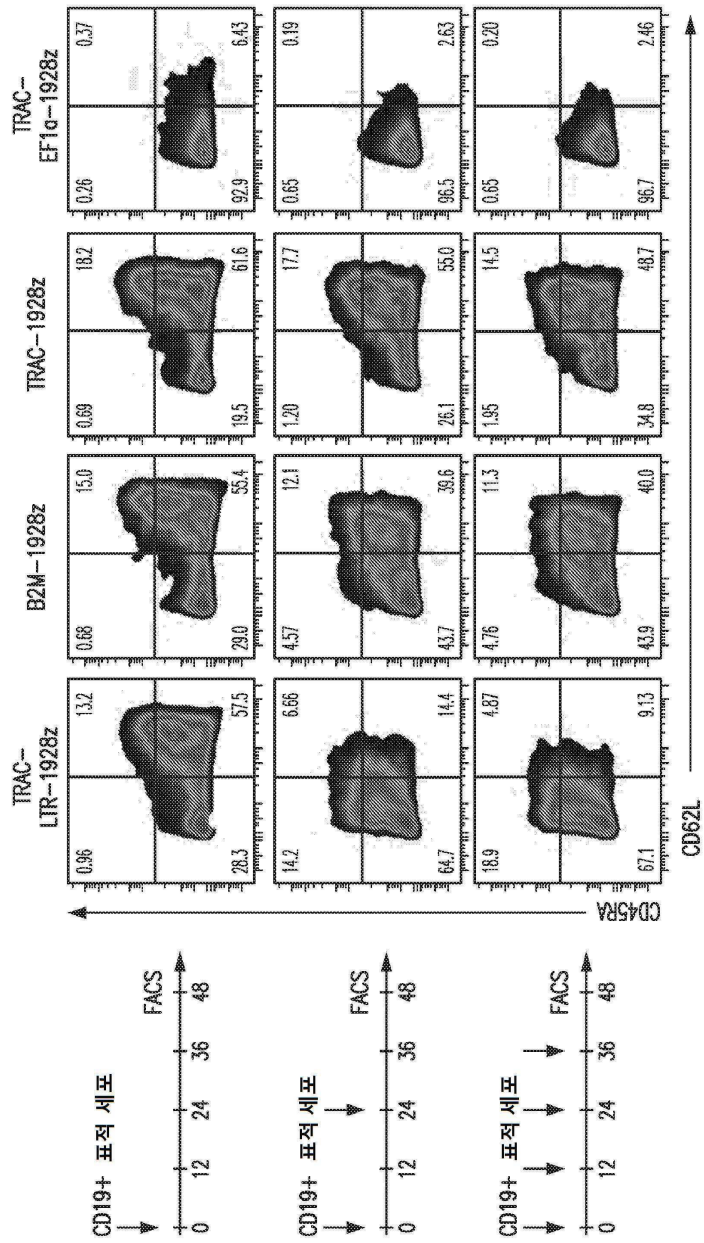
도면14e



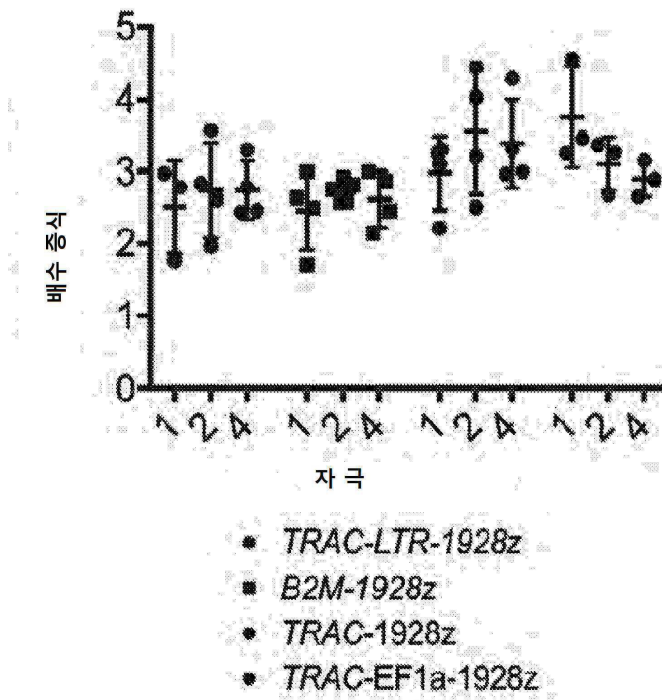
도면14fa



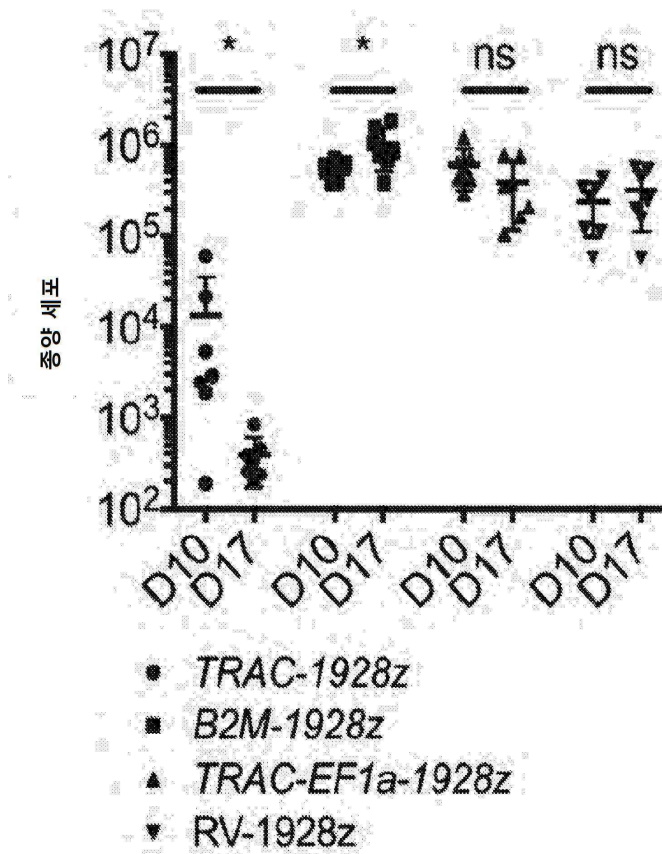
도면15a



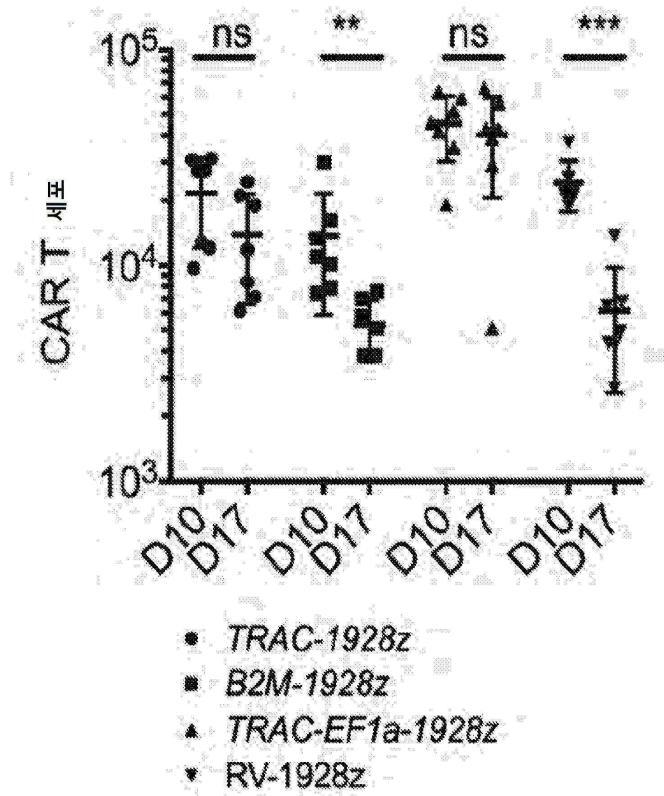
도면15b



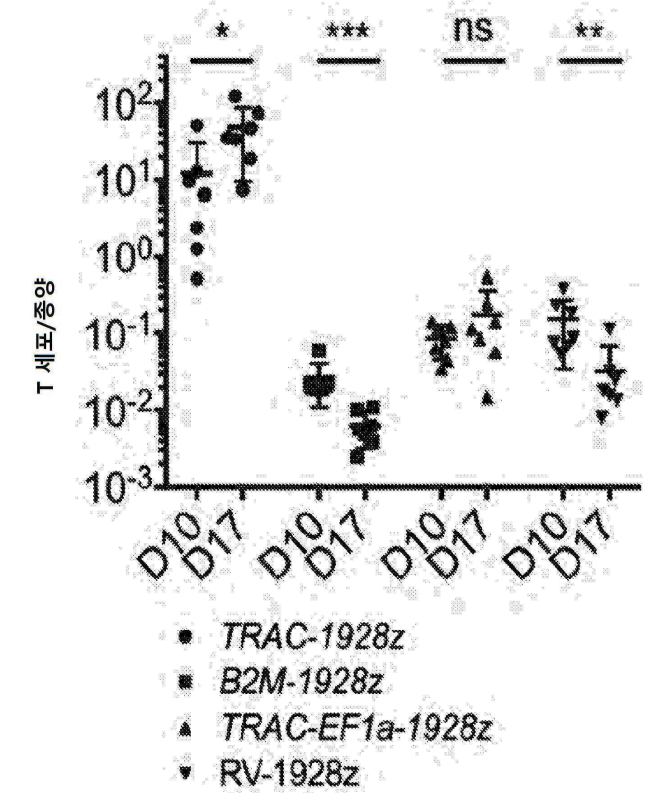
도면15c



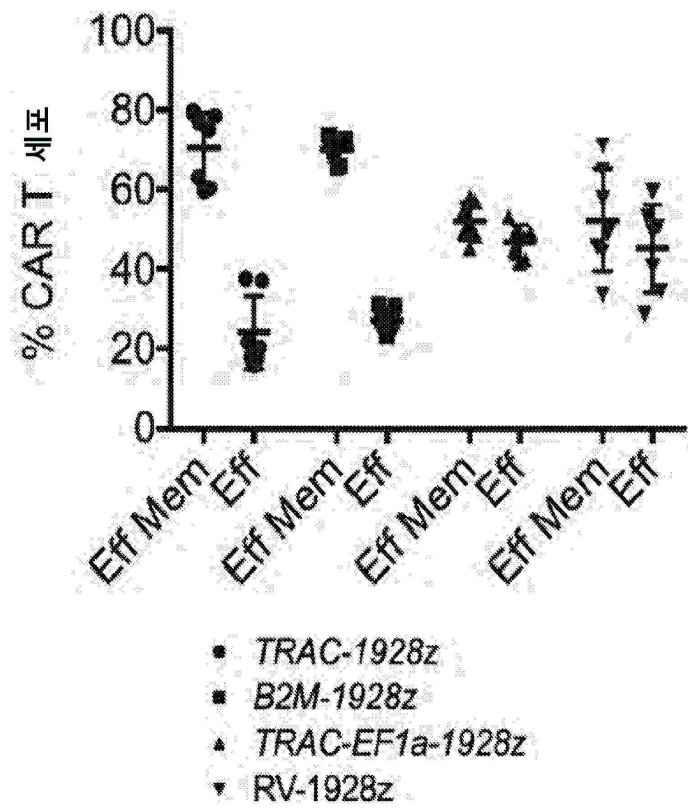
도면15d



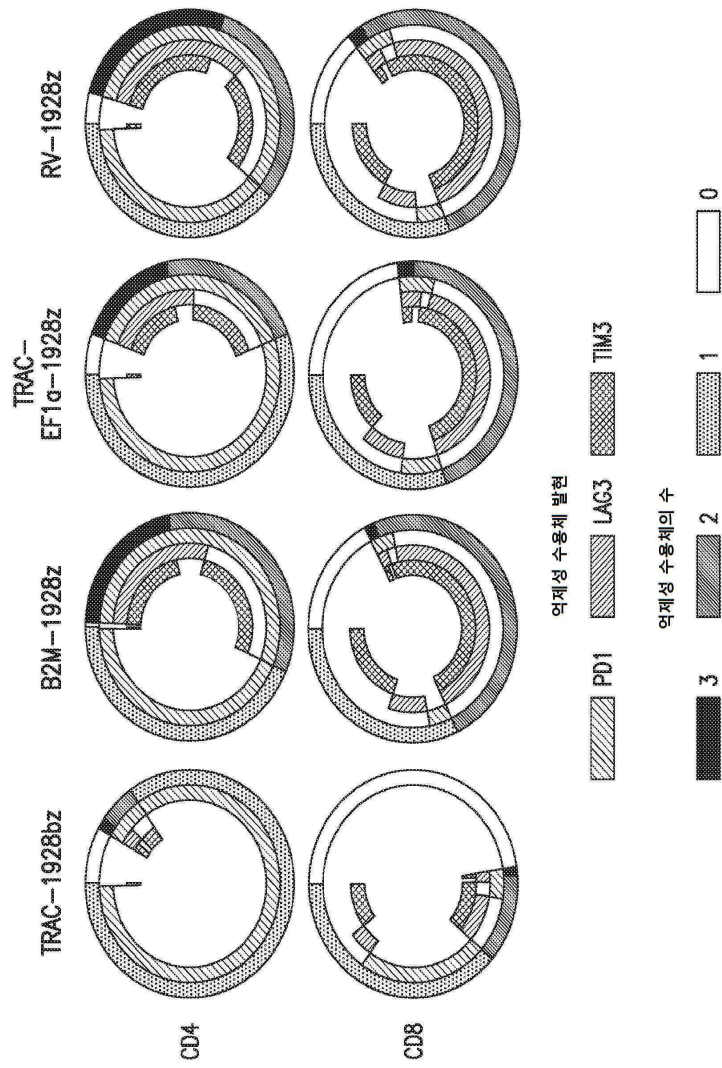
도면15e



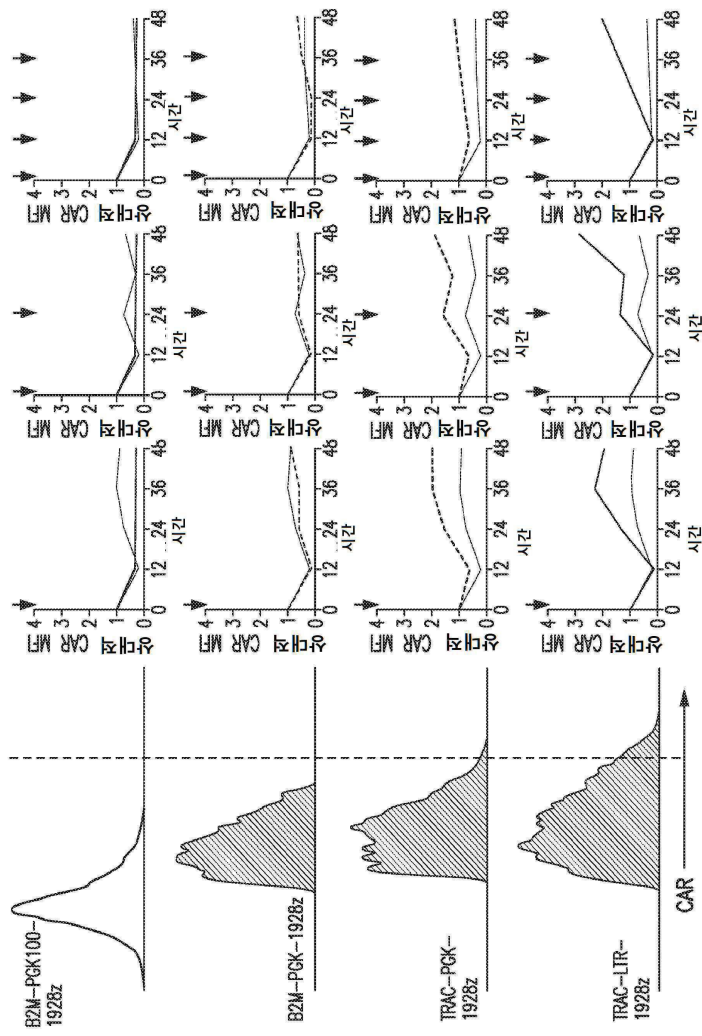
도면15f



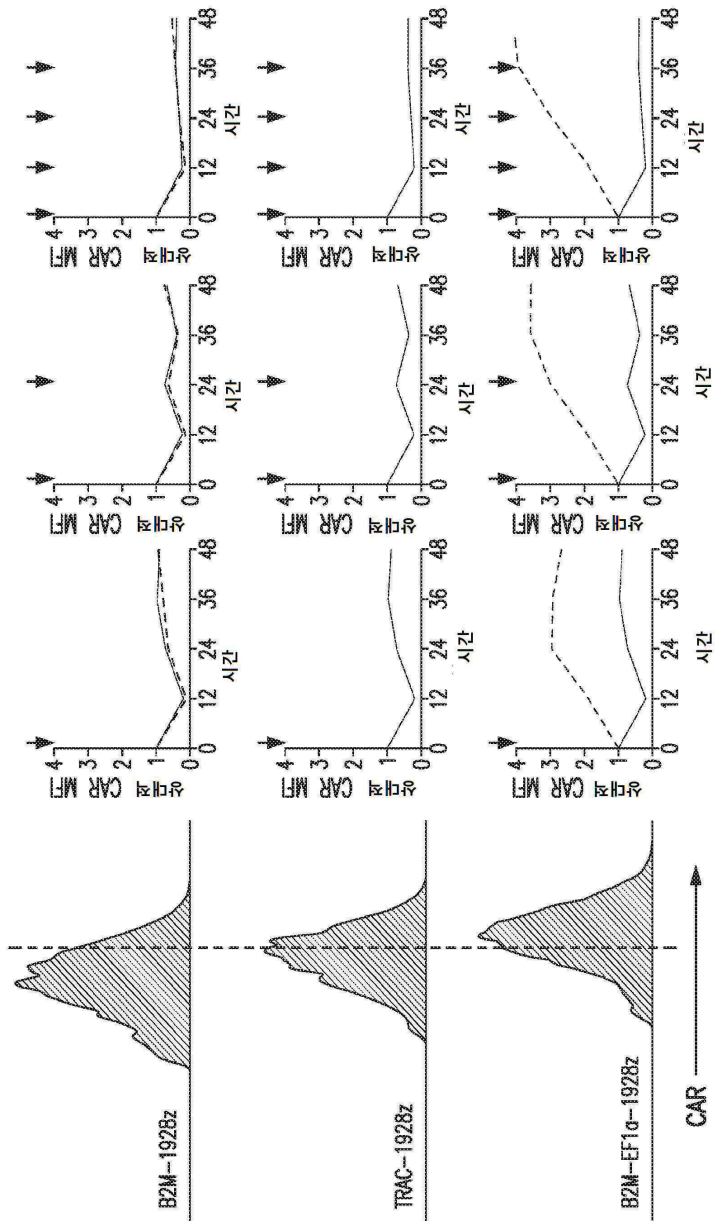
도면15g



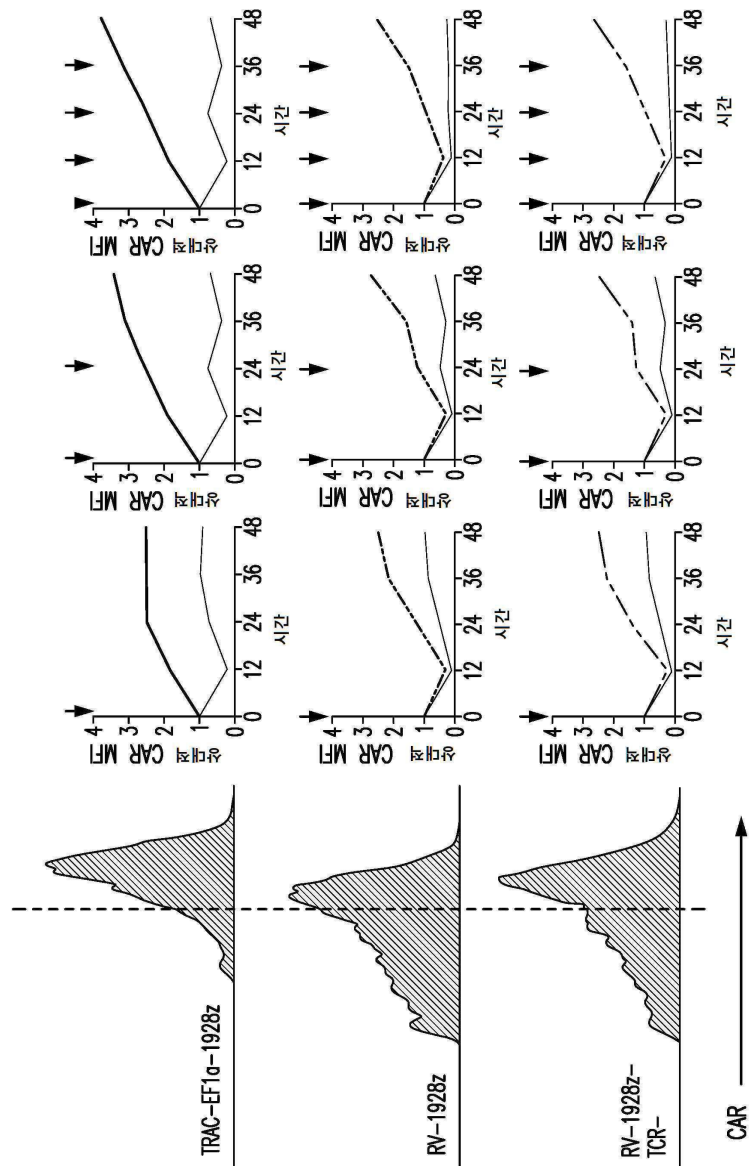
도면16aa



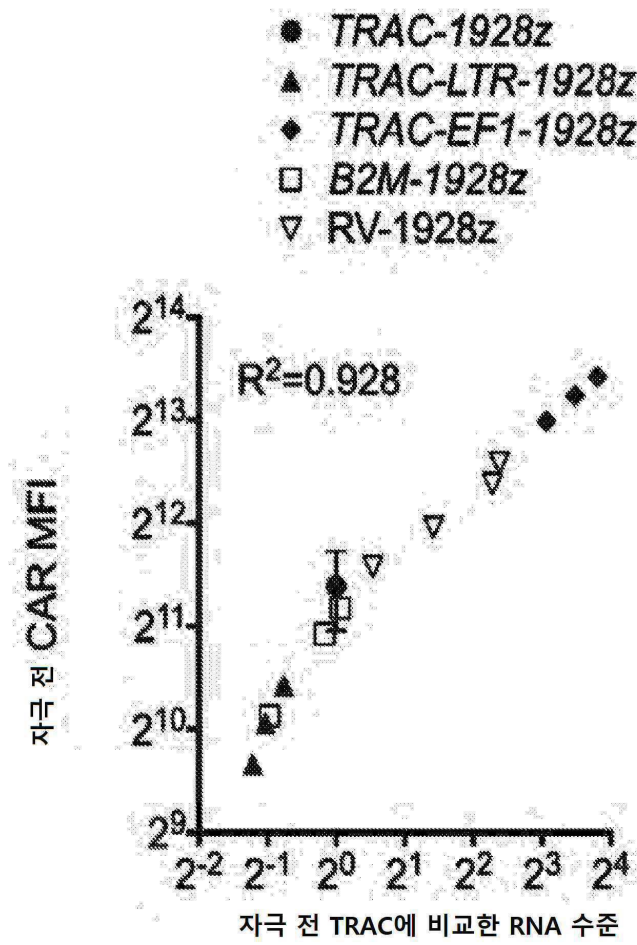
도면16ab



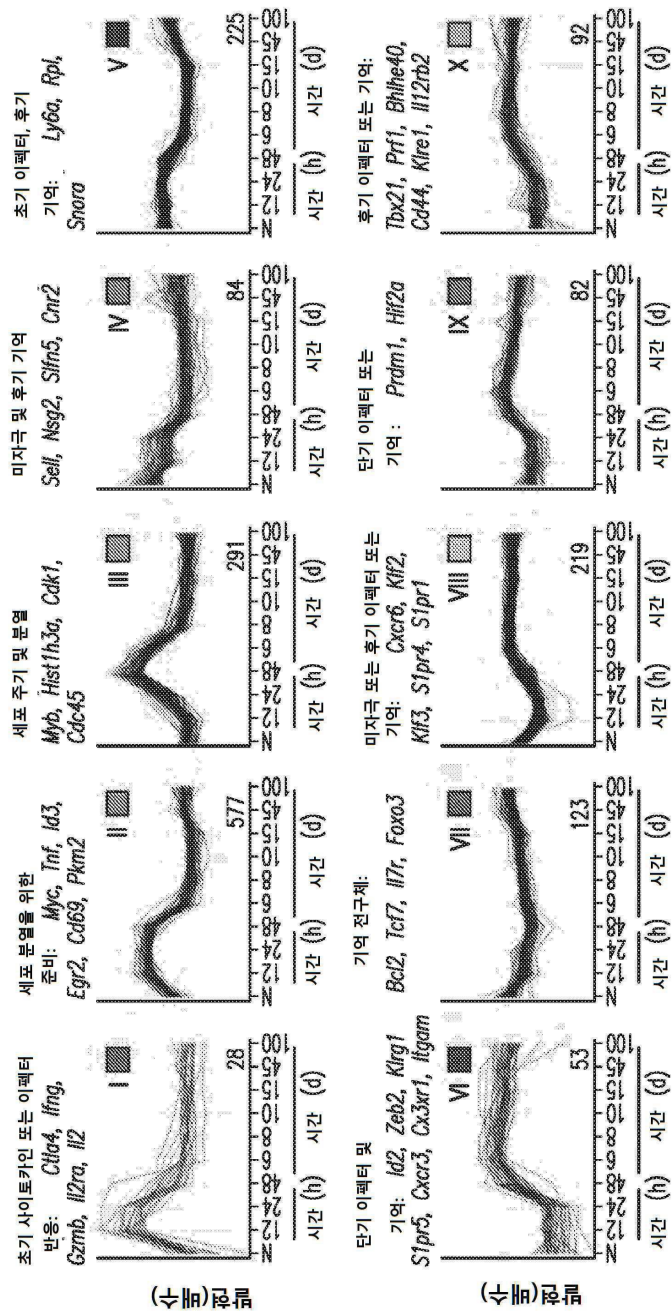
도면16ac



도면16b



도면17



도면18a

```

> 야생형 MLV IN 서열
1  ensspytseh fhytvdikd ltklgaiyd tkkywvyqgk pvmpdqftfe lldflhqlth
61  lsfskmkall ershsyyml nrdrilknit etckacaqvn asksavkagt rvrghrpgth
121 weidfteikp glygykyllv fidtfsgwie afptkktak vvtkklleei fprfgmpqvl
181 gtdngpafvs kvsqivadll gidwklhcay rpqssggver mnrtiketlt kltilatgsrd
241 wvlllpalaly rarntpgphg ltpyeilyga ppplvnfpdp dmtrvtnsps lqahlqalyl
301 vqhevwrpla aayqeqldrp vvphpyrvgd tvwvrrhqt nleprwkgy tvllttptal
361 kvdgiaawih aahvkaadpg ggpssrltwr vqrsqnpiki ritreap

>D124A IN
1  ensspytseh fhytvdikd ltklgaiyd tkkywvyqgk pvmpdqftfe lldflhqlth
61  lsfskmkall ershsyyml nrdrilknit etckacaqvn asksavkagt rvrghrpgth
121 weidfteikp glygykyllv fidtfsgwie afptkktak vvtkklleei fprfgmpqvl
181 gtdngpafvs kvsqivadll gidwklhcay rpqssggver mnrtiketlt kltilatgsrd
241 wvlllpalaly rarntpgphg ltpyeilyga ppplvnfpdp dmtrvtnsps lqahlqalyl
301 vqhevwrpla aayqeqldrp vvphpyrvgd tvwvrrhqt nleprwkgy tvllttptal
361 kvdgiaawih aahvkaadpg ggpssrltwr vqrsqnpiki ritreap

>D124E IN
1  ensspytseh fhytvdikd ltklgaiyd tkkywvyqgk pvmpdqftfe lldflhqlth
61  lsfskmkall ershsyyml nrdrilknit etckacaqvn asksavkagt rvrghrpgth
121 weidfteikp glygykyllv fidtfsgwie afptkktak vvtkklleei fprfgmpqvl
181 gtdngpafvs kvsqivadll gidwklhcay rpqssggver mnrtiketlt kltilatgsrd
241 wvlllpalaly rarntpgphg ltpyeilyga ppplvnfpdp dmtrvtnsps lqahlqalyl
301 vqhevwrpla aayqeqldrp vvphpyrvgd tvwvrrhqt nleprwkgy tvllttptal
361 kvdgiaawih aahvkaadpg ggpssrltwr vqrsqnpiki ritreap

>D124N IN
1  ensspytseh fhytvdikd ltklgaiyd tkkywvyqgk pvmpdqftfe lldflhqlth
61  lsfskmkall ershsyyml nrdrilknit etckacaqvn asksavkagt rvrghrpgth
121 weidfteikp glygykyllv fidtfsgwie afptkktak vvtkklleei fprfgmpqvl
181 gtdngpafvs kvsqivadll gidwklhcay rpqssggver mnrtiketlt kltilatgsrd
241 wvlllpalaly rarntpgphg ltpyeilyga ppplvnfpdp dmtrvtnsps lqahlqalyl
301 vqhevwrpla aayqeqldrp vvphpyrvgd tvwvrrhqt nleprwkgy tvllttptal
361 kvdgiaawih aahvkaadpg ggpssrltwr vqrsqnpiki ritreap

>D124V IN
1  ensspytseh fhytvdikd ltklgaiyd tkkywvyqgk pvmpdqftfe lldflhqlth
61  lsfskmkall ershsyyml nrdrilknit etckacaqvn asksavkagt rvrghrpgth
121 weidfteikp glygykyllv fidtfsgwie afptkktak vvtkklleei fprfgmpqvl
181 gtdngpafvs kvsqivadll gidwklhcay rpqssggver mnrtiketlt kltilatgsrd
241 wvlllpalaly rarntpgphg ltpyeilyga ppplvnfpdp dmtrvtnsps lqahlqalyl
301 vqhevwrpla aayqeqldrp vvphpyrvgd tvwvrrhqt nleprwkgy tvllttptal
361 kvdgiaawih aahvkaadpg ggpssrltwr vqrsqnpiki ritreap

>D183A IN
1  ensspytseh fhytvdikd ltklgaiyd tkkywvyqgk pvmpdqftfe lldflhqlth
61  lsfskmkall ershsyyml nrdrilknit etckacaqvn asksavkagt rvrghrpgth
121 weidfteikp glygykyllv fidtfsgwie afptkktak vvtkklleei fprfgmpqvl
181 gtdngpafvs kvsqivadll gidwklhcay rpqssggver mnrtiketlt kltilatgsrd
241 wvlllpalaly rarntpgphg ltpyeilyga ppplvnfpdp dmtrvtnsps lqahlqalyl
301 vqhevwrpla aayqeqldrp vvphpyrvgd tvwvrrhqt nleprwkgy tvllttptal
361 kvdgiaawih aahvkaadpg ggpssrltwr vqrsqnpiki ritreap

```

도면18b

```
>D183N IN
1  ensspytseh fhytvtidkd ltklgaiydk tkkywvyqgk pvmpdqftfe lldflhqlth
61 lsfskmlall ershspyyml nrdrllknit etckacaqvn asksavkqgt rvrghrpgth
121 weidfteikp glygykyllv fidtfsqwie afptkktak vvtkklleei fprfgmpqvl
181 gtNngpafvs kvsqtvadll gidwklhcay rpqssggver mnrtiketlt kltlatgsrd
241 wllllplaly rarntpgphg ltpyeilyga ppplvnfpdp dmtrvtnsps lqahlqalyl
301 vqhevwrpla aayqeqldrp vvphpyrvgd tvwvrrhqt nleprwkgy pytvlittptal
361 kvdgiaawih aahvkaadpg ggpssrltwr vqrsqnpiki rltreap
```

```
>D124A + D183A IN
1  ensspytseh fhytvtidkd ltklgaiydk tkkywvyqgk pvmpdqftfe lldflhqlth
61 lsfskmlall ershspyyml nrdrllknit etckacaqvn asksavkqgt rvrghrpgth
121 weiAfteikp glygykyllv fidtfsqwie afptkktak vvtkklleei fprfgmpqvl
181 gtAngpafvs kvsqtvadll gidwklhcay rpqssggver mnrtiketlt kltlatgsrd
241 wllllplaly rarntpgphg ltpyeilyga ppplvnfpdp dmtrvtnsps lqahlqalyl
301 vqhevwrpla aayqeqldrp vvphpyrvgd tvwvrrhqt nleprwkgy pytvlittptal
361 kvdgiaawih aahvkaadpg ggpssrltwr vqrsqnpiki rltreap
```

```
>D124A + D183N IN
1  ensspytseh fhytvtidkd ltklgaiydk tkkywvyqgk pvmpdqftfe lldflhqlth
61 lsfskmlall ershspyyml nrdrllknit etckacaqvn asksavkqgt rvrghrpgth
121 weiAfteikp glygykyllv fidtfsqwie afptkktak vvtkklleei fprfgmpqvl
181 gtNngpafvs kvsqtvadll gidwklhcay rpqssggver mnrtiketlt kltlatgsrd
241 wllllplaly rarntpgphg ltpyeilyga ppplvnfpdp dmtrvtnsps lqahlqalyl
301 vqhevwrpla aayqeqldrp vvphpyrvgd tvwvrrhqt nleprwkgy pytvlittptal
361 kvdgiaawih aahvkaadpg ggpssrltwr vqrsqnpiki rltreap
```

```
>D124E + D183A IN
1  ensspytseh fhytvtidkd ltklgaiydk tkkywvyqgk pvmpdqftfe lldflhqlth
61 lsfskmlall ershspyyml nrdrllknit etckacaqvn asksavkqgt rvrghrpgth
121 weiEfteikp glygykyllv fidtfsqwie afptkktak vvtkklleei fprfgmpqvl
181 gtAngpafvs kvsqtvadll gidwklhcay rpqssggver mnrtiketlt kltlatgsrd
241 wllllplaly rarntpgphg ltpyeilyga ppplvnfpdp dmtrvtnsps lqahlqalyl
301 vqhevwrpla aayqeqldrp vvphpyrvgd tvwvrrhqt nleprwkgy pytvlittptal
361 kvdgiaawih aahvkaadpg ggpssrltwr vqrsqnpiki rltreap
```

```
>D124E + D183N IN
1  ensspytseh fhytvtidkd ltklgaiydk tkkywvyqgk pvmpdqftfe lldflhqlth
61 lsfskmlall ershspyyml nrdrllknit etckacaqvn asksavkqgt rvrghrpgth
121 weiEfteikp glygykyllv fidtfsqwie afptkktak vvtkklleei fprfgmpqvl
181 gtNngpafvs kvsqtvadll gidwklhcay rpqssggver mnrtiketlt kltlatgsrd
241 wllllplaly rarntpgphg ltpyeilyga ppplvnfpdp dmtrvtnsps lqahlqalyl
301 vqhevwrpla aayqeqldrp vvphpyrvgd tvwvrrhqt nleprwkgy pytvlittptal
361 kvdgiaawih aahvkaadpg ggpssrltwr vqrsqnpiki rltreap
```

```
>D124N + D183A IN
1  ensspytseh fhytvtidkd ltklgaiydk tkkywvyqgk pvmpdqftfe lldflhqlth
61 lsfskmlall ershspyyml nrdrllknit etckacaqvn asksavkqgt rvrghrpgth
121 weiNfteikp glygykyllv fidtfsqwie afptkktak vvtkklleei fprfgmpqvl
181 gtAngpafvs kvsqtvadll gidwklhcay rpqssggver mnrtiketlt kltlatgsrd
241 wllllplaly rarntpgphg ltpyeilyga ppplvnfpdp dmtrvtnsps lqahlqalyl
301 vqhevwrpla aayqeqldrp vvphpyrvgd tvwvrrhqt nleprwkgy pytvlittptal
361 kvdgiaawih aahvkaadpg ggpssrltwr vqrsqnpiki rltreap
```


도면18c

```
>D124N + D183N IN
1  ensspytseh fhytvtidkd ltklgaiydk tkkywvyqgk pvmpdqftfe lldflhqlth
61  lsfsknkall ershspyyml nrdrflknit etckacaqvn asksavkqgt rvrghrpgth
121 weiNfteikp glygykyllv fidtfsqwie afptkktak vvtkkillei fprfgmpqvl
181 gtNngpafvs kvsqtvadll gidwklhcay rpqssgqver mnrtiketlt kltlatgsrd
241 wlllplaly rarntpgphg ltpyeilyga ppplvnfpdp dmtrvtnsps lqahlqalyl
301 vqhevwrpla aayqeqldrp vvpnpyrvgd lvwvrrhqt nleprwkgy tvllttptal
361 kvdgiaawih aahvkaadpg ggpssrltwr vqrsqnpki rltreap

>D124V + D183A IN
1  ensspytseh fhytvtidkd ltklgaiydk tkkywvyqgk pvmpdqftfe lldflhqlth
61  lsfsknkall ershspyyml nrdrflknit etckacaqvn asksavkqgt rvrghrpgth
121 weiVfteikp glygykyllv fidtfsqwie afptkktak vvtkkillei fprfgmpqvl
181 gtAngpafvs kvsqtvadll gidwklhcay rpqssgqver mnrtiketlt kltlatgsrd
241 wlllplaly rarntpgphg ltpyeilyga ppplvnfpdp dmtrvtnsps lqahlqalyl
301 vqhevwrpla aayqeqldrp vvpnpyrvgd lvwvrrhqt nleprwkgy tvllttptal
361 kvdgiaawih aahvkaadpg ggpssrltwr vqrsqnpki rltreap

>D124V + D183N IN
1  ensspytseh fhytvtidkd ltklgaiydk tkkywvyqgk pvmpdqftfe lldflhqlth
61  lsfsknkall ershspyyml nrdrflknit etckacaqvn asksavkqgt rvrghrpgth
121 weiVfteikp glygykyllv fidtfsqwie afptkktak vvtkkillei fprfgmpqvl
181 gtNngpafvs kvsqtvadll gidwklhcay rpqssgqver mnrtiketlt kltlatgsrd
241 wlllplaly rarntpgphg ltpyeilyga ppplvnfpdp dmtrvtnsps lqahlqalyl
301 vqhevwrpla aayqeqldrp vvpnpyrvgd lvwvrrhqt nleprwkgy tvllttptal
361 kvdgiaawih aahvkaadpg ggpssrltwr vqrsqnpki rltreap
```

서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER CENTER
- <120> TRANSGENIC T CELL AND CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR T CELL
COMPOSITIONS AND RELATED METHODS
- <130> 13542-043-228
- <140><141><150> 62/462,243
- <151> 2017-02-22
- <150> 62/461,677
- <151> 2017-02-21
- <150> 62/323,675
- <151> 2016-04-16
- <150> 62/323,623
- <151> 2016-04-15
- <160> 41
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 407
- <212> PRT

<213> Moloney murine leukemia virus

<400> 1

Glu Asn Ser Ser Pro Tyr Thr Ser Glu His Phe His Tyr Thr Val Thr

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

65 70 75 80
Asn Arg Asp Arg Thr Leu Lys Asn Ile Thr Glu Thr Cys Lys Ala Cys
 85 90 95
Ala Gln Val Asn Ala Ser Lys Ser Ala Val Lys Gln Gly Thr Arg Val
 100 105 110
Arg Gly His Arg Pro Gly Thr His Trp Glu Ile Asp Phe Thr Glu Ile
 115 120 125
Lys Pro Gly Leu Tyr Gly Tyr Lys Tyr Leu Leu Val Phe Ile Asp Thr

130 135 140
Phe Ser Gly Trp Ile Glu Ala Phe Pro Thr Lys Lys Glu Thr Ala Lys
145 150 155 160
Val Val Thr Lys Lys Leu Leu Glu Glu Ile Phe Pro Arg Phe Gly Met
 165 170 175
Pro Gln Val Leu Gly Thr Asp Asn Gly Pro Ala Phe Val Ser Lys Val
 180 185 190
Ser Gln Thr Val Ala Asp Leu Leu Gly Ile Asp Trp Lys Leu His Cys

195 200 205
Ala Tyr Arg Pro Gln Ser Ser Gly Gln Val Glu Arg Met Asn Arg Thr
210 215 220
Ile Lys Glu Thr Leu Thr Lys Leu Thr Leu Ala Thr Gly Ser Arg Asp

225 230 235 240
 Trp Val Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Tyr Arg Ala Arg Asn Thr Pro
 245 250 255
 Gly Pro His Gly Leu Thr Pro Tyr Glu Ile Leu Tyr Gly Ala Pro Pro

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

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

385 390 395 400
 Arg Leu Thr Arg Glu Ala Pro

405

<210> 2

<211> 407

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 2

Glu Asn Ser Ser Pro Tyr Thr Ser Glu His Phe His Tyr Thr Val Thr

1 5 10 15
 Asp Ile Lys Asp Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ile Tyr Asp Lys Thr Lys
 20 25 30

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

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

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

 Ile Lys Glu Thr Leu Thr Lys Leu Thr Leu Ala Thr Gly Ser Arg Asp
 225 230 235 240
 Trp Val Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Tyr Arg Ala Arg Asn Thr Pro
 245 250 255

Gly Pro His Gly Leu Thr Pro Tyr Glu Ile Leu Tyr Gly Ala Pro Pro
260 265 270

Pro Leu Val Asn Phe Pro Asp Pro Asp Met Thr Arg Val Thr Asn Ser
275 280 285

Pro Ser Leu Gln Ala His Leu Gln Ala Leu Tyr Leu Val Gln His Glu
290 295 300

Val Trp Arg Pro Leu Ala Ala Ala Tyr Gln Glu Gln Leu Asp Arg Pro
305 310 315 320

Val Val Pro His Pro Tyr Arg Val Gly Asp Thr Val Trp Val Arg Arg
325 330 335

His Gln Thr Lys Asn Leu Glu Pro Arg Trp Lys Gly Pro Tyr Thr Val
340 345 350

Leu Leu Thr Thr Pro Thr Ala Leu Lys Val Asp Gly Ile Ala Ala Trp
355 360 365

Ile His Ala Ala His Val Lys Ala Ala Asp Pro Gly Gly Gly Pro Ser
370 375 380

Ser Arg Leu Thr Trp Arg Val Gln Arg Ser Gln Asn Pro Leu Lys Ile
385 390 395 400

Arg Leu Thr Arg Glu Ala Pro
405

<210> 3

<211> 407

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 3

Glu Asn Ser Ser Pro Tyr Thr Ser Glu His Phe His Tyr Thr Val Thr
1 5 10 15

Asp Ile Lys Asp Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ile Tyr Asp Lys Thr Lys
20 25 30

Lys Tyr Trp Val Tyr Gln Gly Lys Pro Val Met Pro Asp Gln Phe Thr
 35 40 45
 Phe Glu Leu Leu Asp Phe Leu His Gln Leu Thr His Leu Ser Phe Ser
 50 55 60
 Lys Met Lys Ala Leu Leu Glu Arg Ser His Ser Pro Tyr Tyr Met Leu
 65 70 75 80
 Asn Arg Asp Arg Thr Leu Lys Asn Ile Thr Glu Thr Cys Lys Ala Cys
 85 90 95
 Ala Gln Val Asn Ala Ser Lys Ser Ala Val Lys Gln Gly Thr Arg Val
 100 105 110
 Arg Gly His Arg Pro Gly Thr His Trp Glu Ile Glu Phe Thr Glu Ile
 115 120 125
 Lys Pro Gly Leu Tyr Gly Tyr Lys Tyr Leu Leu Val Phe Ile Asp Thr
 130 135 140
 Phe Ser Gly Trp Ile Glu Ala Phe Pro Thr Lys Lys Glu Thr Ala Lys
 145 150 155 160
 Val Val Thr Lys Lys Leu Leu Glu Glu Ile Phe Pro Arg Phe Gly Met
 165 170 175
 Pro Gln Val Leu Gly Thr Asp Asn Gly Pro Ala Phe Val Ser Lys Val
 180 185 190
 Ser Gln Thr Val Ala Asp Leu Leu Gly Ile Asp Trp Lys Leu His Cys
 195 200 205
 Ala Tyr Arg Pro Gln Ser Ser Gly Gln Val Glu Arg Met Asn Arg Thr
 210 215 220
 Ile Lys Glu Thr Leu Thr Lys Leu Thr Leu Ala Thr Gly Ser Arg Asp
 225 230 235 240
 Trp Val Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Tyr Arg Ala Arg Asn Thr Pro
 245 250 255
 Gly Pro His Gly Leu Thr Pro Tyr Glu Ile Leu Tyr Gly Ala Pro Pro
 260 265 270
 Pro Leu Val Asn Phe Pro Asp Pro Asp Met Thr Arg Val Thr Asn Ser

275 280 285
Pro Ser Leu Gln Ala His Leu Gln Ala Leu Tyr Leu Val Gln His Glu
290 295 300
Val Trp Arg Pro Leu Ala Ala Ala Tyr Gln Glu Gln Leu Asp Arg Pro

305 310 315 320
Val Val Pro His Pro Tyr Arg Val Gly Asp Thr Val Trp Val Arg Arg
325 330 335
His Gln Thr Lys Asn Leu Glu Pro Arg Trp Lys Gly Pro Tyr Thr Val
340 345 350
Leu Leu Thr Thr Pro Thr Ala Leu Lys Val Asp Gly Ile Ala Ala Trp
355 360 365
Ile His Ala Ala His Val Lys Ala Ala Asp Pro Gly Gly Gly Pro Ser

370 375 380
Ser Arg Leu Thr Trp Arg Val Gln Arg Ser Gln Asn Pro Leu Lys Ile
385 390 395 400
Arg Leu Thr Arg Glu Ala Pro
405

<210> 4

<211> 407

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 4

Glu Asn Ser Ser Pro Tyr Thr Ser Glu His Phe His Tyr Thr Val Thr
1 5 10 15

Asp Ile Lys Asp Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ile Tyr Asp Lys Thr Lys
20 25 30
Lys Tyr Trp Val Tyr Gln Gly Lys Pro Val Met Pro Asp Gln Phe Thr
35 40 45
Phe Glu Leu Leu Asp Phe Leu His Gln Leu Thr His Leu Ser Phe Ser

50					55					60									
Lys	Met	Lys	Ala	Leu	Leu	Glu	Arg	Ser	His	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Met	Leu				
65					70					75					80				
Asn	Arg	Asp	Arg	Thr	Leu	Lys	Asn	Ile	Thr	Glu	Thr	Cys	Lys	Ala	Cys				
85					90					95									
Ala	Gln	Val	Asn	Ala	Ser	Lys	Ser	Ala	Val	Lys	Gln	Gly	Thr	Arg	Val				
100					105					110									
Arg	Gly	His	Arg	Pro	Gly	Thr	His	Trp	Glu	Ile	Asn	Phe	Thr	Glu	Ile				
115					120					125									
Lys	Pro	Gly	Leu	Tyr	Gly	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Leu	Val	Phe	Ile	Asp	Thr				
130					135					140									
Phe	Ser	Gly	Trp	Ile	Glu	Ala	Phe	Pro	Thr	Lys	Lys	Glu	Thr	Ala	Lys				
145					150					155					160				
Val	Val	Thr	Lys	Lys	Leu	Leu	Glu	Glu	Ile	Phe	Pro	Arg	Phe	Gly	Met				
165					170					175									
Pro	Gln	Val	Leu	Gly	Thr	Asp	Asn	Gly	Pro	Ala	Phe	Val	Ser	Lys	Val				
180					185					190									
Ser	Gln	Thr	Val	Ala	Asp	Leu	Leu	Gly	Ile	Asp	Trp	Lys	Leu	His	Cys				
195					200					205									
Ala	Tyr	Arg	Pro	Gln	Ser	Ser	Gly	Gln	Val	Glu	Arg	Met	Asn	Arg	Thr				
210					215					220									
Ile	Lys	Glu	Thr	Leu	Thr	Lys	Leu	Thr	Leu	Ala	Thr	Gly	Ser	Arg	Asp				
225					230					235					240				
Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Tyr	Arg	Ala	Arg	Asn	Thr	Pro				
245					250					255									
Gly	Pro	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Tyr	Glu	Ile	Leu	Tyr	Gly	Ala	Pro	Pro				
260					265					270									
Pro	Leu	Val	Asn	Phe	Pro	Asp	Pro	Asp	Met	Thr	Arg	Val	Thr	Asn	Ser				
275					280					285									
Pro	Ser	Leu	Gln	Ala	His	Leu	Gln	Ala	Leu	Tyr	Leu	Val	Gln	His	Glu				
290					295					300									

Val Trp Arg Pro Leu Ala Ala Ala Tyr Gln Glu Gln Leu Asp Arg Pro
 305 310 315 320
 Val Val Pro His Pro Tyr Arg Val Gly Asp Thr Val Trp Val Arg Arg
 325 330 335

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

Arg Leu Thr Arg Glu Ala Pro
 405

<210> 5

<211> 407

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 5

Glu Asn Ser Ser Pro Tyr Thr Ser Glu His Phe His Tyr Thr Val Thr
 1 5 10 15
 Asp Ile Lys Asp Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ile Tyr Asp Lys Thr Lys
 20 25 30
 Lys Tyr Trp Val Tyr Gln Gly Lys Pro Val Met Pro Asp Gln Phe Thr
 35 40 45
 Phe Glu Leu Leu Asp Phe Leu His Gln Leu Thr His Leu Ser Phe Ser
 50 55 60
 Lys Met Lys Ala Leu Leu Glu Arg Ser His Ser Pro Tyr Tyr Met Leu
 65 70 75 80

Asn Arg Asp Arg Thr Leu Lys Asn Ile Thr Glu Thr Cys Lys Ala Cys
 85 90 95
 Ala Gln Val Asn Ala Ser Lys Ser Ala Val Lys Gln Gly Thr Arg Val
 100 105 110
 Arg Gly His Arg Pro Gly Thr His Trp Glu Ile Val Phe Thr Glu Ile
 115 120 125
 Lys Pro Gly Leu Tyr Gly Tyr Lys Tyr Leu Leu Val Phe Ile Asp Thr
 130 135 140
 Phe Ser Gly Trp Ile Glu Ala Phe Pro Thr Lys Lys Glu Thr Ala Lys
 145 150 155 160
 Val Val Thr Lys Lys Leu Leu Glu Glu Ile Phe Pro Arg Phe Gly Met
 165 170 175
 Pro Gln Val Leu Gly Thr Asp Asn Gly Pro Ala Phe Val Ser Lys Val
 180 185 190
 Ser Gln Thr Val Ala Asp Leu Leu Gly Ile Asp Trp Lys Leu His Cys
 195 200 205
 Ala Tyr Arg Pro Gln Ser Ser Gly Gln Val Glu Arg Met Asn Arg Thr
 210 215 220
 Ile Lys Glu Thr Leu Thr Lys Leu Thr Leu Ala Thr Gly Ser Arg Asp
 225 230 235 240
 Trp Val Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Tyr Arg Ala Arg Asn Thr Pro
 245 250 255
 Gly Pro His Gly Leu Thr Pro Tyr Glu Ile Leu Tyr Gly Ala Pro Pro
 260 265 270
 Pro Leu Val Asn Phe Pro Asp Pro Asp Met Thr Arg Val Thr Asn Ser
 275 280 285
 Pro Ser Leu Gln Ala His Leu Gln Ala Leu Tyr Leu Val Gln His Glu
 290 295 300
 Val Trp Arg Pro Leu Ala Ala Ala Tyr Gln Glu Gln Leu Asp Arg Pro
 305 310 315 320
 Val Val Pro His Pro Tyr Arg Val Gly Asp Thr Val Trp Val Arg Arg

325 330 335
His Gln Thr Lys Asn Leu Glu Pro Arg Trp Lys Gly Pro Tyr Thr Val
340 345 350
Leu Leu Thr Thr Pro Thr Ala Leu Lys Val Asp Gly Ile Ala Ala Trp

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

<210> 6

<211> 407

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 6

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

Lys Met Lys Ala Leu Leu Glu Arg Ser His Ser Pro Tyr Tyr Met Leu
65 70 75 80
Asn Arg Asp Arg Thr Leu Lys Asn Ile Thr Glu Thr Cys Lys Ala Cys
85 90 95
Ala Gln Val Asn Ala Ser Lys Ser Ala Val Lys Gln Gly Thr Arg Val

100 105 110
 Arg Gly His Arg Pro Gly Thr His Trp Glu Ile Asp Phe Thr Glu Ile
 115 120 125

 Lys Pro Gly Leu Tyr Gly Tyr Lys Tyr Leu Leu Val Phe Ile Asp Thr
 130 135 140
 Phe Ser Gly Trp Ile Glu Ala Phe Pro Thr Lys Lys Glu Thr Ala Lys
 145 150 155 160
 Val Val Thr Lys Lys Leu Leu Glu Glu Ile Phe Pro Arg Phe Gly Met
 165 170 175
 Pro Gln Val Leu Gly Thr Ala Asn Gly Pro Ala Phe Val Ser Lys Val
 180 185 190

 Ser Gln Thr Val Ala Asp Leu Leu Gly Ile Asp Trp Lys Leu His Cys
 195 200 205
 Ala Tyr Arg Pro Gln Ser Ser Gly Gln Val Glu Arg Met Asn Arg Thr
 210 215 220
 Ile Lys Glu Thr Leu Thr Lys Leu Thr Leu Ala Thr Gly Ser Arg Asp
 225 230 235 240
 Trp Val Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Tyr Arg Ala Arg Asn Thr Pro
 245 250 255

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

 Val Val Pro His Pro Tyr Arg Val Gly Asp Thr Val Trp Val Arg Arg
 325 330 335
 His Gln Thr Lys Asn Leu Glu Pro Arg Trp Lys Gly Pro Tyr Thr Val
 340 345 350

Leu Leu Thr Thr Pro Thr Ala Leu Lys Val Asp Gly Ile Ala Ala Trp
 355 360 365
 Ile His Ala Ala His Val Lys Ala Ala Asp Pro Gly Gly Gly Pro Ser
 370 375 380

Ser Arg Leu Thr Trp Arg Val Gln Arg Ser Gln Asn Pro Leu Lys Ile
 385 390 395 400
 Arg Leu Thr Arg Glu Ala Pro
 405

<210> 7

<211> 407

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 7

Glu Asn Ser Ser Pro Tyr Thr Ser Glu His Phe His Tyr Thr Val Thr
 1 5 10 15
 Asp Ile Lys Asp Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ile Tyr Asp Lys Thr Lys

20 25 30
 Lys Tyr Trp Val Tyr Gln Gly Lys Pro Val Met Pro Asp Gln Phe Thr
 35 40 45

Phe Glu Leu Leu Asp Phe Leu His Gln Leu Thr His Leu Ser Phe Ser
 50 55 60

Lys Met Lys Ala Leu Leu Glu Arg Ser His Ser Pro Tyr Tyr Met Leu
 65 70 75 80
 Asn Arg Asp Arg Thr Leu Lys Asn Ile Thr Glu Thr Cys Lys Ala Cys

85 90 95
 Ala Gln Val Asn Ala Ser Lys Ser Ala Val Lys Gln Gly Thr Arg Val
 100 105 110

Arg Gly His Arg Pro Gly Thr His Trp Glu Ile Asp Phe Thr Glu Ile
 115 120 125

Lys Pro Gly Leu Tyr Gly Tyr Lys Tyr Leu Leu Val Phe Ile Asp Thr
 130 135 140
 Phe Ser Gly Trp Ile Glu Ala Phe Pro Thr Lys Lys Glu Thr Ala Lys

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

 210 215 220
 Ile Lys Glu Thr Leu Thr Lys Leu Thr Leu Ala Thr Gly Ser Arg Asp
 225 230 235 240
 Trp Val Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Tyr Arg Ala Arg Asn Thr Pro
 245 250 255
 Gly Pro His Gly Leu Thr Pro Tyr Glu Ile Leu Tyr Gly Ala Pro Pro
 260 265 270
 Pro Leu Val Asn Phe Pro Asp Pro Asp Met Thr Arg Val Thr Asn Ser

 275 280 285
 Pro Ser Leu Gln Ala His Leu Gln Ala Leu Tyr Leu Val Gln His Glu
 290 295 300
 Val Trp Arg Pro Leu Ala Ala Tyr Gln Glu Gln Leu Asp Arg Pro
 305 310 315 320
 Val Val Pro His Pro Tyr Arg Val Gly Asp Thr Val Trp Val Arg Arg
 325 330 335
 His Gln Thr Lys Asn Leu Glu Pro Arg Trp Lys Gly Pro Tyr Thr Val

 340 345 350
 Leu Leu Thr Thr Pro Thr Ala Leu Lys Val Asp Gly Ile Ala Ala Trp
 355 360 365
 Ile His Ala Ala His Val Lys Ala Ala Asp Pro Gly Gly Gly Pro Ser

370 375 380
 Ser Arg Leu Thr Trp Arg Val Gln Arg Ser Gln Asn Pro Leu Lys Ile
 385 390 395 400
 Arg Leu Thr Arg Glu Ala Pro
 405

<210> 8

<211> 407

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 8

Glu Asn Ser Ser Pro Tyr Thr Ser Glu His Phe His Tyr Thr Val Thr

1 5 10 15

Asp Ile Lys Asp Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ile Tyr Asp Lys Thr Lys

20 25 30

Lys Tyr Trp Val Tyr Gln Gly Lys Pro Val Met Pro Asp Gln Phe Thr

35 40 45

Phe Glu Leu Leu Asp Phe Leu His Gln Leu Thr His Leu Ser Phe Ser

50 55 60

Lys Met Lys Ala Leu Leu Glu Arg Ser His Ser Pro Tyr Tyr Met Leu

65 70 75 80

Asn Arg Asp Arg Thr Leu Lys Asn Ile Thr Glu Thr Cys Lys Ala Cys

85 90 95

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

100 105 110

Arg Gly His Arg Pro Gly Thr His Trp Glu Ile Ala Phe Thr Glu Ile

115 120 125

Lys Pro Gly Leu Tyr Gly Tyr Lys Tyr Leu Leu Val Phe Ile Asp Thr

130 135 140

Phe Ser Gly Trp Ile Glu Ala Phe Pro Thr Lys Lys Glu Thr Ala Lys

145 150 155 160
 Val Val Thr Lys Lys Leu Leu Glu Glu Ile Phe Pro Arg Phe Gly Met
 165 170 175

 Pro Gln Val Leu Gly Thr Ala Asn Gly Pro Ala Phe Val Ser Lys Val
 180 185 190
 Ser Gln Thr Val Ala Asp Leu Leu Gly Ile Asp Trp Lys Leu His Cys
 195 200 205
 Ala Tyr Arg Pro Gln Ser Ser Gly Gln Val Glu Arg Met Asn Arg Thr
 210 215 220
 Ile Lys Glu Thr Leu Thr Lys Leu Thr Leu Ala Thr Gly Ser Arg Asp
 225 230 235 240

 Trp Val Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Tyr Arg Ala Arg Asn Thr Pro
 245 250 255
 Gly Pro His Gly Leu Thr Pro Tyr Glu Ile Leu Tyr Gly Ala Pro Pro
 260 265 270
 Pro Leu Val Asn Phe Pro Asp Pro Asp Met Thr Arg Val Thr Asn Ser
 275 280 285
 Pro Ser Leu Gln Ala His Leu Gln Ala Leu Tyr Leu Val Gln His Glu
 290 295 300

 Val Trp Arg Pro Leu Ala Ala Ala Tyr Gln Glu Gln Leu Asp Arg Pro
 305 310 315 320
 Val Val Pro His Pro Tyr Arg Val Gly Asp Thr Val Trp Val Arg Arg
 325 330 335
 His Gln Thr Lys Asn Leu Glu Pro Arg Trp Lys Gly Pro Tyr Thr Val
 340 345 350
 Leu Leu Thr Thr Pro Thr Ala Leu Lys Val Asp Gly Ile Ala Ala Trp
 355 360 365

 Ile His Ala Ala His Val Lys Ala Ala Asp Pro Gly Gly Gly Pro Ser
 370 375 380
 Ser Arg Leu Thr Trp Arg Val Gln Arg Ser Gln Asn Pro Leu Lys Ile
 385 390 395 400

Arg Leu Thr Arg Glu Ala Pro

405

<210> 9

<211> 407

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 9

Glu Asn Ser Ser Pro Tyr Thr Ser Glu His Phe His Tyr Thr Val Thr

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

65	70	75	80
Asn Arg Asp Arg Thr Leu Lys Asn Ile Thr Glu Thr Cys Lys Ala Cys			
	85	90	95
Ala Gln Val Asn Ala Ser Lys Ser Ala Val Lys Gln Gly Thr Arg Val			
	100	105	110
Arg Gly His Arg Pro Gly Thr His Trp Glu Ile Ala Phe Thr Glu Ile			
	115	120	125
Lys Pro Gly Leu Tyr Gly Tyr Lys Tyr Leu Leu Val Phe Ile Asp Thr			

130	135	140
Phe Ser Gly Trp Ile Glu Ala Phe Pro Thr Lys Lys Glu Thr Ala Lys		
145	150	155
Val Val Thr Lys Lys Leu Leu Glu Glu Ile Phe Pro Arg Phe Gly Met		
	165	170
		175

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

180

185

190

Ser Gln Thr Val Ala Asp Leu Leu Gly Ile Asp Trp Lys Leu His Cys

195

200

205

Ala Tyr Arg Pro Gln Ser Ser Gly Gln Val Glu Arg Met Asn Arg Thr

210

215

220

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

225

230

235

240

Trp Val Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Tyr Arg Ala Arg Asn Thr Pro

245

250

255

Gly Pro His Gly Leu Thr Pro Tyr Glu Ile Leu Tyr Gly Ala Pro Pro

260

265

270

Pro Leu Val Asn Phe Pro Asp Pro Asp Met Thr Arg Val Thr Asn Ser

275

280

285

Pro Ser Leu Gln Ala His Leu Gln Ala Leu Tyr Leu Val Gln His Glu

290

295

300

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

305

310

315

320

Val Val Pro His Pro Tyr Arg Val Gly Asp Thr Val Trp Val Arg Arg

325

330

335

His Gln Thr Lys Asn Leu Glu Pro Arg Trp Lys Gly Pro Tyr Thr Val

340

345

350

Leu Leu Thr Thr Pro Thr Ala Leu Lys Val Asp Gly Ile Ala Ala Trp

355

360

365

Ile His Ala Ala His Val Lys Ala Ala Asp Pro Gly Gly Gly Pro Ser

370

375

380

Ser Arg Leu Thr Trp Arg Val Gln Arg Ser Gln Asn Pro Leu Lys Ile

385

390

395

400

Arg Leu Thr Arg Glu Ala Pro

405

<210> 10

<211> 407

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 10

Glu Asn Ser Ser Pro Tyr Thr Ser Glu His Phe His Tyr Thr Val Thr

1 5 10 15

Asp Ile Lys Asp Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ile Tyr Asp Lys Thr Lys

20 25 30

Lys Tyr Trp Val Tyr Gln Gly Lys Pro Val Met Pro Asp Gln Phe Thr

35 40 45

Phe Glu Leu Leu Asp Phe Leu His Gln Leu Thr His Leu Ser Phe Ser

50 55 60

Lys Met Lys Ala Leu Leu Glu Arg Ser His Ser Pro Tyr Tyr Met Leu

65 70 75 80

Asn Arg Asp Arg Thr Leu Lys Asn Ile Thr Glu Thr Cys Lys Ala Cys

85 90 95

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

100 105 110

Arg Gly His Arg Pro Gly Thr His Trp Glu Ile Glu Phe Thr Glu Ile

115 120 125

Lys Pro Gly Leu Tyr Gly Tyr Lys Tyr Leu Leu Val Phe Ile Asp Thr

130 135 140

Phe Ser Gly Trp Ile Glu Ala Phe Pro Thr Lys Lys Glu Thr Ala Lys

145 150 155 160

Val Val Thr Lys Lys Leu Leu Glu Glu Ile Phe Pro Arg Phe Gly Met

165 170 175

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

180 185 190

Ser Gln Thr Val Ala Asp Leu Leu Gly Ile Asp Trp Lys Leu His Cys

195 200 205
 Ala Tyr Arg Pro Gln Ser Ser Gly Gln Val Glu Arg Met Asn Arg Thr
 210 215 220

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

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

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

 <210> 11
 <211> 407
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 11

Glu Asn Ser Ser Pro Tyr Thr Ser Glu His Phe His Tyr Thr Val Thr

1 5 10 15

Asp Ile Lys Asp Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ile Tyr Asp Lys Thr Lys

20 25 30

Lys Tyr Trp Val Tyr Gln Gly Lys Pro Val Met Pro Asp Gln Phe Thr

35 40 45

Phe Glu Leu Leu Asp Phe Leu His Gln Leu Thr His Leu Ser Phe Ser

50 55 60

Lys Met Lys Ala Leu Leu Glu Arg Ser His Ser Pro Tyr Tyr Met Leu

65 70 75 80

Asn Arg Asp Arg Thr Leu Lys Asn Ile Thr Glu Thr Cys Lys Ala Cys

85 90 95

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

100 105 110

Arg Gly His Arg Pro Gly Thr His Trp Glu Ile Glu Phe Thr Glu Ile

115 120 125

Lys Pro Gly Leu Tyr Gly Tyr Lys Tyr Leu Leu Val Phe Ile Asp Thr

130 135 140

Phe Ser Gly Trp Ile Glu Ala Phe Pro Thr Lys Lys Glu Thr Ala Lys

145 150 155 160

Val Val Thr Lys Lys Leu Leu Glu Glu Ile Phe Pro Arg Phe Gly Met

165 170 175

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

180 185 190

Ser Gln Thr Val Ala Asp Leu Leu Gly Ile Asp Trp Lys Leu His Cys

195 200 205

Ala Tyr Arg Pro Gln Ser Ser Gly Gln Val Glu Arg Met Asn Arg Thr

210 215 220

Ile Lys Glu Thr Leu Thr Lys Leu Thr Leu Ala Thr Gly Ser Arg Asp
 225 230 235 240
 Trp Val Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Tyr Arg Ala Arg Asn Thr Pro

245 250 255
 Gly Pro His Gly Leu Thr Pro Tyr Glu Ile Leu Tyr Gly Ala Pro Pro
 260 265 270
 Pro Leu Val Asn Phe Pro Asp Pro Asp Met Thr Arg Val Thr Asn Ser
 275 280 285
 Pro Ser Leu Gln Ala His Leu Gln Ala Leu Tyr Leu Val Gln His Glu
 290 295 300
 Val Trp Arg Pro Leu Ala Ala Ala Tyr Gln Glu Gln Leu Asp Arg Pro

305 310 315 320
 Val Val Pro His Pro Tyr Arg Val Gly Asp Thr Val Trp Val Arg Arg
 325 330 335
 His Gln Thr Lys Asn Leu Glu Pro Arg Trp Lys Gly Pro Tyr Thr Val
 340 345 350
 Leu Leu Thr Thr Pro Thr Ala Leu Lys Val Asp Gly Ile Ala Ala Trp
 355 360 365
 Ile His Ala Ala His Val Lys Ala Ala Asp Pro Gly Gly Gly Pro Ser

370 375 380
 Ser Arg Leu Thr Trp Arg Val Gln Arg Ser Gln Asn Pro Leu Lys Ile
 385 390 395 400
 Arg Leu Thr Arg Glu Ala Pro
 405

<210> 12

<211> 407

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 12

Glu Asn Ser Ser Pro Tyr Thr Ser Glu His Phe His Tyr Thr Val Thr
1 5 10 15

Asp Ile Lys Asp Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ile Tyr Asp Lys Thr Lys
20 25 30

Lys Tyr Trp Val Tyr Gln Gly Lys Pro Val Met Pro Asp Gln Phe Thr
35 40 45

Phe Glu Leu Leu Asp Phe Leu His Gln Leu Thr His Leu Ser Phe Ser
50 55 60

Lys Met Lys Ala Leu Leu Glu Arg Ser His Ser Pro Tyr Tyr Met Leu
65 70 75 80

Asn Arg Asp Arg Thr Leu Lys Asn Ile Thr Glu Thr Cys Lys Ala Cys
85 90 95

Ala Gln Val Asn Ala Ser Lys Ser Ala Val Lys Gln Gly Thr Arg Val
100 105 110

Arg Gly His Arg Pro Gly Thr His Trp Glu Ile Asn Phe Thr Glu Ile
115 120 125

Lys Pro Gly Leu Tyr Gly Tyr Lys Tyr Leu Leu Val Phe Ile Asp Thr
130 135 140

Phe Ser Gly Trp Ile Glu Ala Phe Pro Thr Lys Lys Glu Thr Ala Lys
145 150 155 160

Val Val Thr Lys Lys Leu Leu Glu Glu Ile Phe Pro Arg Phe Gly Met
165 170 175

Pro Gln Val Leu Gly Thr Ala Asn Gly Pro Ala Phe Val Ser Lys Val
180 185 190

Ser Gln Thr Val Ala Asp Leu Leu Gly Ile Asp Trp Lys Leu His Cys
195 200 205

Ala Tyr Arg Pro Gln Ser Ser Gly Gln Val Glu Arg Met Asn Arg Thr
210 215 220

Ile Lys Glu Thr Leu Thr Lys Leu Thr Leu Ala Thr Gly Ser Arg Asp
225 230 235 240

Trp Val Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Tyr Arg Ala Arg Asn Thr Pro

245 250 255
 Gly Pro His Gly Leu Thr Pro Tyr Glu Ile Leu Tyr Gly Ala Pro Pro
 260 265 270

Pro Leu Val Asn Phe Pro Asp Pro Asp Met Thr Arg Val Thr Asn Ser
 275 280 285

Pro Ser Leu Gln Ala His Leu Gln Ala Leu Tyr Leu Val Gln His Glu
 290 295 300

Val Trp Arg Pro Leu Ala Ala Ala Tyr Gln Glu Gln Leu Asp Arg Pro
 305 310 315 320

Val Val Pro His Pro Tyr Arg Val Gly Asp Thr Val Trp Val Arg Arg
 325 330 335

His Gln Thr Lys Asn Leu Glu Pro Arg Trp Lys Gly Pro Tyr Thr Val
 340 345 350

Leu Leu Thr Thr Pro Thr Ala Leu Lys Val Asp Gly Ile Ala Ala Trp
 355 360 365

Ile His Ala Ala His Val Lys Ala Ala Asp Pro Gly Gly Gly Pro Ser
 370 375 380

Ser Arg Leu Thr Trp Arg Val Gln Arg Ser Gln Asn Pro Leu Lys Ile
 385 390 395 400

Arg Leu Thr Arg Glu Ala Pro
 405

<210> 13

<211> 407

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 13

Glu Asn Ser Ser Pro Tyr Thr Ser Glu His Phe His Tyr Thr Val Thr
 1 5 10 15

Asp Ile Lys Asp Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ile Tyr Asp Lys Thr Lys

20 25 30
 Lys Tyr Trp Val Tyr Gln Gly Lys Pro Val Met Pro Asp Gln Phe Thr

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

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

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

 225 230 235 240
 Trp Val Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Tyr Arg Ala Arg Asn Thr Pro
 245 250 255
 Gly Pro His Gly Leu Thr Pro Tyr Glu Ile Leu Tyr Gly Ala Pro Pro
 260 265 270

Pro Leu Val Asn Phe Pro Asp Pro Asp Met Thr Arg Val Thr Asn Ser
275 280 285

Pro Ser Leu Gln Ala His Leu Gln Ala Leu Tyr Leu Val Gln His Glu

290 295 300

Val Trp Arg Pro Leu Ala Ala Ala Tyr Gln Glu Gln Leu Asp Arg Pro
305 310 315 320

Val Val Pro His Pro Tyr Arg Val Gly Asp Thr Val Trp Val Arg Arg
325 330 335

His Gln Thr Lys Asn Leu Glu Pro Arg Trp Lys Gly Pro Tyr Thr Val
340 345 350

Leu Leu Thr Thr Pro Thr Ala Leu Lys Val Asp Gly Ile Ala Ala Trp

355 360 365

Ile His Ala Ala His Val Lys Ala Ala Asp Pro Gly Gly Gly Pro Ser
370 375 380

Ser Arg Leu Thr Trp Arg Val Gln Arg Ser Gln Asn Pro Leu Lys Ile
385 390 395 400

Arg Leu Thr Arg Glu Ala Pro
405

<210> 14

<211> 407

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 14

Glu Asn Ser Ser Pro Tyr Thr Ser Glu His Phe His Tyr Thr Val Thr
1 5 10 15

Asp Ile Lys Asp Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ile Tyr Asp Lys Thr Lys
20 25 30

Lys Tyr Trp Val Tyr Gln Gly Lys Pro Val Met Pro Asp Gln Phe Thr
35 40 45

Phe Glu Leu Leu Asp Phe Leu His Gln Leu Thr His Leu Ser Phe Ser
50 55 60

Lys Met Lys Ala Leu Leu Glu Arg Ser His Ser Pro Tyr Tyr Met Leu
65 70 75 80

Asn Arg Asp Arg Thr Leu Lys Asn Ile Thr Glu Thr Cys Lys Ala Cys
85 90 95

Ala Gln Val Asn Ala Ser Lys Ser Ala Val Lys Gln Gly Thr Arg Val
100 105 110

Arg Gly His Arg Pro Gly Thr His Trp Glu Ile Val Phe Thr Glu Ile
115 120 125

Lys Pro Gly Leu Tyr Gly Tyr Lys Tyr Leu Leu Val Phe Ile Asp Thr
130 135 140

Phe Ser Gly Trp Ile Glu Ala Phe Pro Thr Lys Lys Glu Thr Ala Lys
145 150 155 160

Val Val Thr Lys Lys Leu Leu Glu Glu Ile Phe Pro Arg Phe Gly Met
165 170 175

Pro Gln Val Leu Gly Thr Ala Asn Gly Pro Ala Phe Val Ser Lys Val
180 185 190

Ser Gln Thr Val Ala Asp Leu Leu Gly Ile Asp Trp Lys Leu His Cys
195 200 205

Ala Tyr Arg Pro Gln Ser Ser Gly Gln Val Glu Arg Met Asn Arg Thr
210 215 220

Ile Lys Glu Thr Leu Thr Lys Leu Thr Leu Ala Thr Gly Ser Arg Asp
225 230 235 240

Trp Val Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Tyr Arg Ala Arg Asn Thr Pro
245 250 255

Gly Pro His Gly Leu Thr Pro Tyr Glu Ile Leu Tyr Gly Ala Pro Pro
260 265 270

Pro Leu Val Asn Phe Pro Asp Pro Asp Met Thr Arg Val Thr Asn Ser
275 280 285

Pro Ser Leu Gln Ala His Leu Gln Ala Leu Tyr Leu Val Gln His Glu

290 295 300
Val Trp Arg Pro Leu Ala Ala Ala Tyr Gln Glu Gln Leu Asp Arg Pro
305 310 315 320

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

Ser Arg Leu Thr Trp Arg Val Gln Arg Ser Gln Asn Pro Leu Lys Ile
385 390 395 400
Arg Leu Thr Arg Glu Ala Pro
405

<210> 15

<211> 407

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 15

Glu Asn Ser Ser Pro Tyr Thr Ser Glu His Phe His Tyr Thr Val Thr
1 5 10 15
Asp Ile Lys Asp Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ile Tyr Asp Lys Thr Lys

20 25 30
Lys Tyr Trp Val Tyr Gln Gly Lys Pro Val Met Pro Asp Gln Phe Thr
35 40 45
Phe Glu Leu Leu Asp Phe Leu His Gln Leu Thr His Leu Ser Phe Ser
50 55 60
Lys Met Lys Ala Leu Leu Glu Arg Ser His Ser Pro Tyr Tyr Met Leu

65						70						75						80
Asn	Arg	Asp	Arg	Thr	Leu	Lys	Asn	Ile	Thr	Glu	Thr	Cys	Lys	Ala	Cys			
					85						90						95	
Ala	Gln	Val	Asn	Ala	Ser	Lys	Ser	Ala	Val	Lys	Gln	Gly	Thr	Arg	Val			
					100						105						110	
Arg	Gly	His	Arg	Pro	Gly	Thr	His	Trp	Glu	Ile	Val	Phe	Thr	Glu	Ile			
					115						120						125	
Lys	Pro	Gly	Leu	Tyr	Gly	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Leu	Val	Phe	Ile	Asp	Thr			
					130						135						140	
Phe	Ser	Gly	Trp	Ile	Glu	Ala	Phe	Pro	Thr	Lys	Lys	Glu	Thr	Ala	Lys			
145						150						155						160
Val	Val	Thr	Lys	Lys	Leu	Leu	Glu	Glu	Ile	Phe	Pro	Arg	Phe	Gly	Met			
					165						170						175	
Pro	Gln	Val	Leu	Gly	Thr	Asn	Asn	Gly	Pro	Ala	Phe	Val	Ser	Lys	Val			
					180						185						190	
Ser	Gln	Thr	Val	Ala	Asp	Leu	Leu	Gly	Ile	Asp	Trp	Lys	Leu	His	Cys			
					195						200						205	
Ala	Tyr	Arg	Pro	Gln	Ser	Ser	Gly	Gln	Val	Glu	Arg	Met	Asn	Arg	Thr			
					210						215						220	
Ile	Lys	Glu	Thr	Leu	Thr	Lys	Leu	Thr	Leu	Ala	Thr	Gly	Ser	Arg	Asp			
					225						230						240	
Trp	Val	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Tyr	Arg	Ala	Arg	Asn	Thr	Pro			
					245						250						255	
Gly	Pro	His	Gly	Leu	Thr	Pro	Tyr	Glu	Ile	Leu	Tyr	Gly	Ala	Pro	Pro			
					260						265						270	
Pro	Leu	Val	Asn	Phe	Pro	Asp	Pro	Asp	Met	Thr	Arg	Val	Thr	Asn	Ser			
					275						280						285	
Pro	Ser	Leu	Gln	Ala	His	Leu	Gln	Ala	Leu	Tyr	Leu	Val	Gln	His	Glu			
					290						295						300	
Val	Trp	Arg	Pro	Leu	Ala	Ala	Ala	Tyr	Gln	Glu	Gln	Leu	Asp	Arg	Pro			
					305						310						320	

Val Val Pro His Pro Tyr Arg Val Gly Asp Thr Val Trp Val Arg Arg
325 330 335
His Gln Thr Lys Asn Leu Glu Pro Arg Trp Lys Gly Pro Tyr Thr Val
340 345 350
Leu Leu Thr Thr Pro Thr Ala Leu Lys Val Asp Gly Ile Ala Ala Trp
355 360 365
Ile His Ala Ala His Val Lys Ala Ala Asp Pro Gly Gly Gly Pro Ser
370 375 380
Ser Arg Leu Thr Trp Arg Val Gln Arg Ser Gln Asn Pro Leu Lys Ile
385 390 395 400
Arg Leu Thr Arg Glu Ala Pro
405

<210> 16

<211> 164

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu
1 5 10 15
Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys
20 25 30
Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala
35 40 45
Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
50 55 60
Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
65 70 75 80
Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
85 90 95
Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
100 105 110

Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met

115 120 125
Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
130 135 140
Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
145 150 155 160
Leu Pro Pro Arg

<210> 17

<211> 220

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Met Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro Ser Ile Gln Val
1 5 10 15

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

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

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

Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 210 215 220

<210> 18

<211> 255

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Met Gly Asn Ser Cys Tyr Asn Ile Val Ala Thr Leu Leu Leu Val Leu
 1 5 10 15
 Asn Phe Glu Arg Thr Arg Ser Leu Gln Asp Pro Cys Ser Asn Cys Pro
 20 25 30
 Ala Gly Thr Phe Cys Asp Asn Asn Arg Asn Gln Ile Cys Ser Pro Cys
 35 40 45

Pro Pro Asn Ser Phe Ser Ser Ala Gly Gly Gln Arg Thr Cys Asp Ile
 50 55 60
 Cys Arg Gln Cys Lys Gly Val Phe Arg Thr Arg Lys Glu Cys Ser Ser
 65 70 75 80
 Thr Ser Asn Ala Glu Cys Asp Cys Thr Pro Gly Phe His Cys Leu Gly
 85 90 95
 Ala Gly Cys Ser Met Cys Glu Gln Asp Cys Lys Gln Gly Gln Glu Leu
 100 105 110

Thr Lys Lys Gly Cys Lys Asp Cys Cys Phe Gly Thr Phe Asn Asp Gln
 115 120 125
 Lys Arg Gly Ile Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Lys

130 135 140
 Ser Val Leu Val Asn Gly Thr Lys Glu Arg Asp Val Val Cys Gly Pro
 145 150 155 160
 Ser Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala
 165 170 175

 Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu
 180 185 190
 Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu
 195 200 205
 Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
 210 215 220
 Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly
 225 230 235 240

 Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
 245 250 255

 <210> 19
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 19

 Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val
 20 25 30
 Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro

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

Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly

100 105 110

Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys

115 120 125

Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp

130 135 140

Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn

145 150 155 160

Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro

165 170 175

Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr

180 185 190

Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu

195 200 205

Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val

210 215 220

Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu

225 230 235 240

Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly

245 250 255

Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser

260 265 270

Thr Leu Ala Lys Ile

275

<210> 20

<211> 199

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Lys Ser Gly Leu Trp Tyr Phe Phe Leu Phe Cys Leu Arg Ile Lys

1 5 10 15

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

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

Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu
145 150 155 160
Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro
165 170 175
Asn Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser
180 185 190
Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu
195
<210> 21
<211> 93
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21
Met Ile His Leu Gly His Ile Leu Phe Leu Leu Leu Leu Pro Val Ala
1 5 10 15
Ala Ala Gln Thr Thr Pro Gly Glu Arg Ser Ser Leu Pro Ala Phe Tyr

20 25 30
 Pro Gly Thr Ser Gly Ser Cys Ser Gly Cys Gly Ser Leu Ser Leu Pro
 35 40 45
 Leu Leu Ala Gly Leu Val Ala Ala Asp Ala Val Ala Ser Leu Leu Ile
 50 55 60

 Val Gly Ala Val Phe Leu Cys Ala Arg Pro Arg Arg Ser Pro Ala Gln
 65 70 75 80
 Glu Asp Gly Lys Val Tyr Ile Asn Met Pro Gly Arg Gly
 85 90
 <210> 22
 <211> 235
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 22
 Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Ser Gln Phe Arg Val Ser Pro Leu Asp Arg Thr
 20 25 30

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

 Thr Phe Val Leu Thr Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr
 100 105 110
 Tyr Phe Cys Ser Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe
 115 120 125
 Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg
 130 135 140

Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg
145 150 155 160

Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly
165 170 175

Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr
180 185 190

Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His
195 200 205

Arg Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Lys Ser
210 215 220

Gly Asp Lys Pro Ser Leu Ser Ala Arg Tyr Val
225 230 235

<210> 23

<211> 458

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Met Asn Arg Gly Val Pro Phe Arg His Leu Leu Leu Val Leu Gln Leu
1 5 10 15

Ala Leu Leu Pro Ala Ala Thr Gln Gly Lys Lys Val Val Leu Gly Lys
20 25 30

Lys Gly Asp Thr Val Glu Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Lys Lys Ser
35 40 45

Ile Gln Phe His Trp Lys Asn Ser Asn Gln Ile Lys Ile Leu Gly Asn
50 55 60

Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro Ser Lys Leu Asn Asp Arg Ala
65 70 75 80

Asp Ser Arg Arg Ser Leu Trp Asp Gln Gly Asn Phe Pro Leu Ile Ile
85 90 95

Lys Asn Leu Lys Ile Glu Asp Ser Asp Thr Tyr Ile Cys Glu Val Glu
100 105 110

Asp Gln Lys Glu Glu Val Gln Leu Leu Val Phe Gly Leu Thr Ala Asn
 115 120 125
 Ser Asp Thr His Leu Leu Gln Gly Gln Ser Leu Thr Leu Thr Leu Glu
 130 135 140
 Ser Pro Pro Gly Ser Ser Pro Ser Val Gln Cys Arg Ser Pro Arg Gly
 145 150 155 160
 Lys Asn Ile Gln Gly Gly Lys Thr Leu Ser Val Ser Gln Leu Glu Leu
 165 170 175

 Gln Asp Ser Gly Thr Trp Thr Cys Thr Val Leu Gln Asn Gln Lys Lys
 180 185 190
 Val Glu Phe Lys Ile Asp Ile Val Val Leu Ala Phe Gln Lys Ala Ser
 195 200 205
 Ser Ile Val Tyr Lys Lys Glu Gly Glu Gln Val Glu Phe Ser Phe Pro
 210 215 220
 Leu Ala Phe Thr Val Glu Lys Leu Thr Gly Ser Gly Glu Leu Trp Trp
 225 230 235 240

 Gln Ala Glu Arg Ala Ser Ser Ser Lys Ser Trp Ile Thr Phe Asp Leu
 245 250 255
 Lys Asn Lys Glu Val Ser Val Lys Arg Val Thr Gln Asp Pro Lys Leu
 260 265 270
 Gln Met Gly Lys Lys Leu Pro Leu His Leu Thr Leu Pro Gln Ala Leu
 275 280 285
 Pro Gln Tyr Ala Gly Ser Gly Asn Leu Thr Leu Ala Leu Glu Ala Lys
 290 295 300

 Thr Gly Lys Leu His Gln Glu Val Asn Leu Val Val Met Arg Ala Thr
 305 310 315 320
 Gln Leu Gln Lys Asn Leu Thr Cys Glu Val Trp Gly Pro Thr Ser Pro
 325 330 335
 Lys Leu Met Leu Ser Leu Lys Leu Glu Asn Lys Glu Ala Lys Val Ser
 340 345 350
 Lys Arg Glu Lys Ala Val Trp Val Leu Asn Pro Glu Ala Gly Met Trp

355 360 365

Gln Cys Leu Leu Ser Asp Ser Gly Gln Val Leu Leu Glu Ser Asn Ile
370 375 380

Lys Val Leu Pro Thr Trp Ser Thr Pro Val Gln Pro Met Ala Leu Ile
385 390 395 400

Val Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu Leu Phe Ile Gly Leu Gly Ile
405 410 415

Phe Phe Cys Val Arg Cys Arg His Arg Arg Arg Gln Ala Glu Arg Met
420 425 430

Ser Gln Ile Lys Arg Leu Leu Ser Glu Lys Lys Thr Cys Gln Cys Pro
435 440 445

His Arg Phe Gln Lys Thr Cys Ser Pro Ile
450 455

<210> 24
<211> 99
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 24
caggguucug gauaucugug uuuuagagcu agaaauagca aguuaaaaua aggcuaagucc 60
guuaucaacu ugaaaaagug gcaccgaguc ggugcuuuu 99

<210> 25
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 25
ttgtcccaca gatattcaga accctgaccc tgccgtgtac cagctgaga 49

<210> 26

<211> 99

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 26

cagggguucug gauaucugug uuuuagagcu agaaauagca aguuaaaaua aggcuaagucc	60
guuaucaacu ugaaaaagug gcaccgaguc ggugcuuuu	99

<210> 27

<211> 99

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 27

ggccacggag cgagacaucu uuuuagagcu agaaauagca aguuaaaaua aggcuaagucc	60
guuaucaacu ugaaaaagug gcaccgaguc ggugcuuuu	99

<210> 28

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 28

ttagctgtgc tcgcgtact ctctctttct ggcttgagg ctatcca	47
---	----

<210> 29

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 29

aaccggttga accccatt 18

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 30

ccatccaatc ggtagtagcg 20

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 31

cgtgcagtct aaagacttgg 20

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 32

ataggggact tggacaaagg 20

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 33

gaaacccagt tcattgccgt

20

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 34

ccccaaggaa ttgacagttg

20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 35

actggttccc actggatgag

20

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 36

ccacgccatc ctctgtaact 20

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 37

cacaaccaca ctctggagga 20

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 38

ggtttctggt ctggatgcct 20

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400>

> 39

acaatgagaa gagcaatgga 20

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

```

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        primer"
<400> 40
gagattgtcc tggtttctgt                20
<210> 41
<211> 80
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        oligonucleotide"
<400> 41
tcctaaccct gatcctcttg tcccacagat atccagaacc ctgaccctgc cgtgtaccag        60

ctgagagact ctaaattccag                80

```