(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년11월02일
(11) 등록번호 10-2461926
(24) 등록일자 2022년10월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/85 (2006.01) *A61K 35/17* (2014.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 14/005* (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01) *C07K 14/705* (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) *C12N 5/0783* (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/85 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7037984
(22) 출원일자(국제) 2017년06월30일
심사청구일자 2020년05월18일
(85) 번역문제출일자 2018년12월28일
(65) 공개번호 10-2019-0058389
(43) 공개일자 2019년05월29일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/040448
(87) 국제공개번호 WO 2018/006054
국제공개일자 2018년01월04일
(30) 우선권주장
62/357,265 2016년06월30일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
JP2013176373 A*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
더 유나이티드 스테이츠 오브 어메리카, 애즈 리프리젠티드 바이 더 세크러테리, 디파트먼트 오브 헬쓰 앤드 휴먼 서비씨즈
미국, 메릴랜드 20892, 베서스다, 엠에스 7788, 스위트 700, 6701 록리지 드라이브, 내셔널 인스티튜즈 오브 헬스, 오피스 오브 테크놀로지 트랜스퍼
로욜라 유니버시티 오브 시카고
미국, 60153 일리노이, 메이우드, 사우스 퍼스트 애비뉴 2160
(72) 발명자
차일즈, 리차드 더블유.
미국, 20892 메릴랜드, 베데스다, 룸 3이-3532, 10 센터 드라이브, 엔에이치엘비아이/엔아이에이치
니시무라, 마이클 아이.
미국, 60153 일리노이, 메이우드, 2160 사우스 퍼스트 애비뉴. 씨비씨씨 룸 301, 로욜라 유니버시티 시카고
체르카소바, 엘레나 에이.
미국, 20892 메릴랜드, 베데스다, 룸 5이-5264, 10 센터 드라이브, 엔에이치엘비아이/엔아이에이치
(74) 대리인
이원희

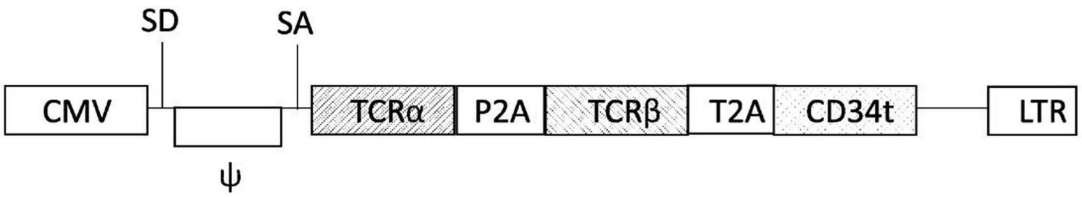
전체 청구항 수 : 총 35 항 심사관 : 최성호

(54) 발명의 명칭 **HERV-E 반응성 T 세포 수용체 및 이의 사용 방법**

(57) 요 약

본 발명은 신세포암 세포에서 발현되는 항원과 결합할 수 있는 T 세포 수용체(TCRs)를 제공한다. 일부 실시예에서, 상기 TCR은 α 사슬 (서열번호 2) 및 β 사슬 (서열번호 3)을 포함한다. 또한, 본 발명은 상기 TCR α 및/또는 β 사슬을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다. 본 발명은 또한 상기 TCR을 발현하는 변형된 T 세포를 제공한다. 일부 실시예에서, 상기 변형된 T 세포는 TCR α 사슬 및 TCR β 사슬을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터로 T 세포를 형질도입 시킴으로써 제조된다. 아울러, 본 발명은 T 세포 집단을 수득하고, 상기 T 세포 집단을 TCR α 사슬 및 TCR β 사슬을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터로 형질도입 시키고, 상기 변형된 T 세포 집단을 생산하고, 및 상기 변형된 T 세포 집단을 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, RCC를 가진 개체를 치료하는 방법을 제공한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/005 (2013.01)
C07K 14/4748 (2013.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 14/70596 (2013.01)
C12N 5/0636 (2013.01)
C12N 2501/2302 (2013.01)
C12N 2501/2315 (2013.01)
C12N 2501/51 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌
J Clin Invest.,118(3):1099-1109(2008.3.)*
US2013195819
WO2012038055 A1
US 2015/152384
Semin Immunol.,28(1):10-21(2016.)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 2의 핵산 서열을 포함하는 T 세포 수용체 α 사슬을 코딩하는 핵산 분자 **및** 서열번호 3의 핵산 서열을 포함하는 T 세포 수용체 β 사슬을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 것을 특징으로 하는, 벡터.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 T 세포 수용체 α 사슬을 코딩하는 핵산, T 세포 수용체 β 사슬을 코딩하는 핵산 또는 이 둘 모두는 프로모터에 작동 가능하게 연결된 것을 특징으로 하는, 벡터.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 벡터는 세포 내 도메인이 없는 절단된(truncated) CD34 단백질을 코딩하는 핵산 분자를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 벡터.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 벡터는 레트로바이러스 벡터인 것을 특징으로 하는, 벡터.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 벡터는 SAMEN 레트로바이러스 벡터인 것을 특징으로 하는, 벡터.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 벡터는 서열번호 6의 핵산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 벡터.

청구항 9

제1항의 벡터를 포함하는 분리된 것을 특징으로 하는, 숙주 세포.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 세포가 바이러스 Gag 단백질, 바이러스 Pol 단백질 또는 바이러스 Env 단백질을 코딩하는 핵산, 또는 상기 핵산의 둘 이상의 조합을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 숙주 세포.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 세포는 PG13 세포인 것을 특징으로 하는, 숙주 세포.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 숙주 세포는 림프구(lymphocyte)인 것을 특징으로 하는, 숙주 세포.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 림프구는 T 세포인 것을 특징으로 하는, 숙주 세포.

청구항 14

서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 T 세포 수용체 α 사슬을 코딩하는 이종(heterologous) 핵산, 및 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 T 세포 수용체 β 사슬을 코딩하는 이종 핵산 분자를 포함하는 것을 특징으로 하는, 변형된 T 세포.

청구항 15

제14항에 있어서, T 세포 수용체 α 사슬을 코딩하는 이종 핵산은 서열번호 4의 아미노산 서열로 구성되는 단백질을 코딩하고, T 세포 수용체 β 사슬을 코딩하는 이종 핵산은 서열번호 5의 아미노산 서열로 구성되는 단백질을 코딩하는 것을 특징으로 하는, 변형된 T 세포.

청구항 16

제14항 또는 제15항에 있어서, T 세포 수용체 α 사슬을 코딩하는 이종 핵산은 서열번호 2의 핵산 서열을 포함하거나 상기 서열로 구성되고, T 세포 수용체 β 사슬을 코딩하는 이종 핵산은 서열 번호 3의 핵산 서열을 포함하거나 상기 서열로 구성되는 것을 특징으로 하는, 변형된 T 세포.

청구항 17

제14항에 있어서, 상기 변형된 T 세포는 세포 내 도메인이 없는 절단된(truncated) CD34 단백질을 코딩하는 이종 핵산을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 변형된 T 세포.

청구항 18

제1항의 벡터로 형질도입된(transduced) 것을 특징으로 하는, 변형된 T 세포.

청구항 19

제14항에 있어서, 상기 T 세포는 신세포암(renal cell carcinoma)을 갖는 개체의 자가(autologous) 게놈(genome)을 포함하는 것을 특징으로 하는, 변형된 T 세포.

청구항 20

제14항의 변형된 T 세포 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 신세포암 (renal cell carcinoma, RCC)의 치료 또는 억제용 약학적 조성물.

청구항 21

제14항의 변형된 T 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는, 신세포암(renal cell carcinoma, RCC) 치료 또는 억제용 약학적 조성물.

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

제20항 또는 제21항에 있어서, 상기 T 세포 집단은 개체에 투여하기 전에 확장되는(expanded) 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 30

삭제

청구항 31

제20항 또는 제21항에 있어서, 상기 RCC는 투명 세포(clear cell) RCC인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

개체로부터 림프구 집단을 수득하는 단계;

상기 림프구 집단을 항-CD3 항체 및 인터루킨-2(interleukin-2)와 접촉시켜 활성화된 T 세포 집단을 생산하는 단계;

상기 활성화된 T 세포 집단을 제1항 및 제4항 내지 제8항 중 어느 한 항의 벡터로 형질도입시켜 형질도입된 T 세포 집단을 생산하는 단계; 및

상기 형질도입된 T 세포의 집단을 확장시켜(expanding) 변형된 T 세포를 생산하는 단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는, 신세포암 항원 특이적 T 세포 수용체를 발현하는 변형된 T 세포를 생산하는 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 형질도입된 T 세포 집단을 확장시키는 단계는 형질도입된 T 세포를 항-CD3 항체, 항-CD28 항체, IL-2(interleukin-2) 및 IL-15(interleukin-15)와 접촉시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 형질도입된 T 세포를 항-CD3 항체, 항-CD28 항체, IL-2 및 IL-15와 접촉시키는 단계는 상기 세포를 항-CD3 항체, 항-CD28 항체, IL-2 및 IL-15와 9 내지 11일 동안 접촉시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 38

제35항에 있어서, 상기 방법은 형질도입된 T 세포를 항-CD34 항체와 접촉시킴으로써 형질도입된 T 세포 집단을 농축(enriching)시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 39

제35항에 있어서, 상기 림프구 집단은 RCC를 가진 개체로부터 수득된 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 40

제35항에 있어서, 상기 림프구 집단은 신세포암을 가진 개체로부터 수득되고, 상기 개체는 HLA-A11에 대해 양성인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 41

서열번호 2의 핵산 서열을 포함하는 T 세포 수용체 α 사슬 및 서열번호 3의 핵산 서열을 포함하는 T 세포 수용체 β 사슬을 코딩하는 것을 특징으로 하는, 분리된 핵산.

청구항 42

제41항에 있어서, T 세포 수용체 α 사슬을 코딩하는 상기 핵산은 서열번호 2의 핵산 서열로 구성되는 것을 특징으로 하는, 핵산.

청구항 43

제41항 또는 제42항에 있어서, T 세포 수용체 α 사슬을 코딩하는 상기 핵산은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하거나 그 서열로 구성된 단백질을 코딩하는 것을 특징으로 하는, 핵산.

청구항 44

삭제

청구항 45

제41항에 있어서, T 세포 수용체 β 사슬을 코딩하는 상기 핵산은 서열번호 3의 핵산 서열로 구성되는 것을 특징으로 하는, 핵산.

청구항 46

제41항 또는 제45항에 있어서, T 세포 수용체 β 사슬을 코딩하는 상기 핵산은 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하거나 그 서열로 구성된 단백질을 코딩하는 것을 특징으로 하는, 핵산.

청구항 47

서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 T 세포 수용체 α 사슬 폴리펩타이드 및 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 T 세포 수용체 β 사슬 폴리펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는, 분리된 T 세포 수용체 폴리펩티드.

청구항 48

제47항에 있어서, 상기 T 세포 수용체 α 사슬 폴리펩타이드는 서열번호 4의 아미노산 서열로 구성되는 것을 특징으로 하는, 폴리펩타이드.

청구항 49

삭제

청구항 50

제47항에 있어서, 상기 T 세포 수용체 β 사슬 폴리펩타이드는 서열번호 5의 아미노산 서열로 구성되는 것을 특징으로 하는, 폴리펩타이드.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2016년 6월 30일자로 출원된 미국 가출원 번호 62/357,265의 우선권을 주장하며, 이는 본 명세서에 참조로 통합된다.

[0003] **분야**

[0004] 본 발명은 항암 면역 요법, 특히 신세포암(renal cell carcinoma, RCC) 반응성 T 세포 수용체를 발현하는 T 세포, 및 상기 T 세포의 제조 및 사용 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] 신세포암(RCC)은 매년 미국에서만 약 12,000 명의 사망을 초래한다. 대부분의 암과 마찬가지로 상기 암은 초기 단계에서 발견되는 경우, 외과적 수술이 매우 효과적이다. 표적 억제제 및 면역관문 억제제(항-CTLA-4 및 항-PD-1 단일클론 항체와 같은)를 이용한 치료에도 불구하고, 전이성 RCC는 일반적으로 치명적이며 평균 생존 기간은 1년 미만이다. 따라서, RCC에 대한 보다 효과적인 치료법이 필요하다.

발명의 내용

[0006] 본 발명은 RCC 세포에서 발현되는 항원을 인식하는 T 세포 수용체(TCR)를 제공한다. T 세포는 TCR(예를 들어, TCR α 및 β 사슬)을 코딩하는 핵산으로 형질도입될 수 있고, 개체에서 RCC를 치료 또는 억제하기 위해 RCC를 갖는 개체에 투여될 수 있다.

[0007] 본 발명은 RCC 세포에 의해 발현되는 인간 내인성 레트로바이러스-E(human endogenous retrovirus-E, HERV-E) 항원에 결합할 수 있는 TCR(예를 들어, ATFLGSLTWK; 서열번호 1의 서열을 갖는 펩타이드)을 제공한다. 일부 실시예에서, 상기 TCR은 투명 세포 신세포암(clear cell RCC, ccRCC) 세포에 의해 발현되는 HLA-A11 제한 TCR이다. 일부 실시예에서, 상기 TCR은 α 사슬(예를 들어, 서열번호 4와 95% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 α 사슬) 및 β 사슬(예를 들어, 서열번호 5와 95% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 β 사슬)을 포함한다. 일부 실시예에서, 상기 TCR α 사슬은 서열번호 2와 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 핵산에 의해 코딩되고, 상기 TCR β 사슬은 서열번호 3과 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 핵산에 의해 코딩된다.

[0008] 본 발명은 또한 발현 조절 서열(예, 프로모터)에 작동 가능하게 연결된, 상기 TCR α 및/또는 β 사슬을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터(예, 바이러스 벡터)를 제공한다. 일부 실시예에서, 상기 벡터는 또한 세포 외 및 막횡단 도메인을 포함하지만 세포 내 도메인은 없는 CD34 단백질과 같은 절단된(truncated) CD34 단백질을 코딩하는 핵산을 포함한다. 비제한적인 일 실시예에서, 상기 벡터는 TCR α 사슬을 코딩하는 핵산(예, 서열번호 2), TCR β 사슬을 코딩하는 핵산(예, 서열번호 3) 및 절단된 CD34를 코딩하는 핵산을 포함하는 레트로바이러스 벡터(예, SAMEN 벡터)이다.

[0009] 본 발명은 또한 TCR α 사슬을 코딩하는 핵산(예, 서열번호 2) 및 TCR β 사슬을 코딩하는 핵산(예, 서열번호 3)과 같은, RCC 세포(예, ccRCC 세포)에 의해 발현되는 HERV-E 항원에 결합할 수 있는 TCR을 발현하는 변형된 T 세포를 제공한다. 일부 실시예에서, 상기 변형된 T 세포는 TCR α 사슬, TCR β 사슬, 및 선택적으로 절단된 CD34 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터로 T 세포(예를 들어, RCC를 가진 개체 또는 공여자로부터 수득한 T 세포)를 형질도입(transducing)시켜서 준비하였다.

[0010] 본 발명은 또한 개체 또는 공여자로부터 T 세포 집단을 수득하고, 상기 T 세포 집단을 TCR α 사슬(예, 서열번호 2) 및 TCR β 사슬(예, 서열번호 3)을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터로 형질도입 시키고, 변형된 T 세포 집단을 생산하고, 및 상기 변형된 T 세포 집단을 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, RCC(예를 들어, ccRCC 또는 전이성 ccRCC)를 가진 개체를 치료하는 방법을 제공한다. 다른 실시예에서, 상기 변형된 T 세포의 집단은 개체에 투여하기 전에 확장(expanded) 및/또는 농축(enriched)된다.

[0011] 본 명세서에 개시된 상기 및 다른 특징들은 첨부된 도면을 참조하여 진행되는 하기의 상세한 설명으로 더욱 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 본 명세서에 기술된 TCRα 및 β 사슬의 발현을 위한 예시적인 레트로바이러스 벡터의 개략도이다(CMV, 인간 사이토메갈로바이러스(human cytomegalovirus) 프로모터/인핸서; Ψ, 패키징 신호(packaging signal); SD, 스플라이스 도너(splice donor); SA, 스플라이스 억셉터(splice acceptor); TCRα, HERV-E 항원 특이적 TCR α 사슬(예, 서열번호 2); P2A, 돼지 테스코바이러스(porcine teschovirus)로부터 유래된 자가-절단(self-

cleaving) 2A 펩타이드; TCRβ, HERV-E 항원 특이적 TCR β 사슬(예, 서열번호 3); T2A, *Thosea asigna* 바이러스의 자가-절단 2A 펩타이드; CD34t, 단백질의 세포외 및 막횡단 영역을 갖는 절단된 CD34; LTR, 3' LTR).

도 2는 RCC를 갖는 개체를 치료하기 위한 변형된 T 세포를 수집 및 생산하기 위한 예시적인 프로토콜의 개략도이다.

도 3a 및 3b는 두 공여자(도 3a) 및 한 공여자(도 3b)로부터 수득한 ccRCC 세포에 대한 HLA-A11 제한 TCR을 코딩하는 레트로바이러스 벡터로 형질도입된 T 세포의 반응성을 나타내는 그래프이다.

도 4a 내지 4c는 CD34 선별 단계 전후의 형질도입된 T 세포에서의 CD34 발현(도 4a), CD34 선별된 형질도입된 T 세포에서의 CD3 발현(도 4b) 및 HERV-E 테트라머(tetramer) 발현(도 4c)을 나타내는 일련의 플롯이다.

도 5a 및 5b는 $CD34^{+}$-HERV-E 테트라머$^{+}$ 형질도입된 T 세포에서 CD8(도 5a) 및 CD4(도 5b) 세포를 나타내는 플롯이다.

도 6a 및 6b는 두 공여자로부터 얻은 ccRCC 세포에 대한 HLA-A11 제한 TCR을 코딩하는 레트로바이러스 벡터로 형질도입된 T 세포의 크롬(chromium) 세포독성을 나타내는 그래프이다. 공여자 1로부터 얻은 T 세포 집단은 39.9%의 $CD8^{+}$(도 6a)을 보였고, 공여자 2로부터 얻은 T 세포 집단은 52.8%의 $CD8^{+}$(도 6b)을 보였다.

도 7은 두 상이한 공여자로부터 얻은 RCC 또는 LCL 세포 및 HLA-A11 음성 공여자로부터 얻은 T 세포 및 활성화된 T 세포에 대한 HLA-A11 제한 TCR을 코딩하는 레트로바이러스 벡터로 형질도입된 T 세포의 크롬 방출 세포독성을 나타내는 그래프이다.

도 8은 다양한 세포주와 접촉한 HLA-A11 제한 TCR을 코딩하는 레트로바이러스 벡터로 형질도입된 건강한 공여자로부터 얻은 $CD8^{+}CD34^{+}$ T 세포를 이용한 인터페론-γ(interferon-γ, IFNγ) 분비를 나타내는 그래프이다. 각 세포주의 HERV-E/HLA-A11 상태는 다음과 같다: SAUJ: HERV-E^{+}/ HLA-$A11^{+}$; LYO WT: HERV-E^{+}/ HLA-A11 neg; SNY $A11^{+}$: HERV-E neg/ HLA-A11-형질도입; URB $A11^{+}$: HERV-E neg/ HLA-A11-형질도입; WHI $A11^{+}$: HERV-E neg/ HLA-A11-형질도입; ORT $A11^{+}$: HERV-E neg/ HLA-A11-형질도입; ORT WT: HERV-E neg/ HLA-A11 neg; SEA WT: HERV-E neg/ HLA-A11 neg. 표준곡선은 삽입도에 나타내었다.

도 9는 진행된 ccRCC를 갖는 HLA-A11 양성 환자에서 HERV-E TCR로 형질도입된 자가 T 세포의 안전성 및 내약성을 결정하기 위한 예시적인 제 1 상 임상시험을 나타내는 개략도이다.

도 10은 HERV-E TCR로 형질도입된 T 세포로 전이성 ccRCC 환자를 치료하기 위한 프로토콜의 일례를 나타내는 개략도이다.

[서열목록]

본 명세서 또는 첨부된 서열 목록에 열거된 임의의 핵산 및 아미노산 서열은 37 C.F.R. § 1.822 에 정의된 바와 같은 뉴클레오타이드 및 아미노산에 대한 표준 문자 약어를 사용하여 나타내었다. 적어도 일부의 경우, 각각의 핵산 서열의 단지 하나의 가닥만을 나타냈지만, 상보적 가닥은 표시된 가닥에 대한 임의의 언급에 의해 포함되는 것으로 간주된다.

서열번호 1은 HLA-A11 RCC-특이적 HERV-E 항원 펩타이드의 아미노산 서열이다.

서열번호 2는 예시적 RCC HERV-반응성 TCR 알파 사슬의 핵산 서열이다.

서열번호 3은 예시적 RCC HERV-반응성 TCR 베타 사슬의 핵산 서열이다.

서열번호 4는 예시적 RCC HERV-반응성 TCR 알파 사슬의 아미노산 서열이다.

서열번호 5는 예시적 RCC HERV-반응성 TCR 베타 사슬의 아미노산 서열이다.

서열번호 6은 RCC HERV-반응성 TCR 및 절단된 CD34의 발현을 위한 예시적 SAMEN 벡터의 핵산 서열이다.

서열번호 7은 예시적인 절단된 CD34(CD34t) 단백질의 아미노산 서열이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 동종이식 후 장기적 종양 퇴행을 보이는 RCC 환자로부터 동종 이계의 T 세포 클론이 분리되었다(Takahashi *et*

al., J. Clin. Invest. 118:1099-1109, 2008). 이 HLA-A11 제한된 $CD8^+$ T 세포 클론은 HLA-A11 양성인 ccRCC 세포주에 대해 높은 세포독성을 보였지만, 비-악성 세포는 죽이지 않았다(Takahashi *et al.*, 2008). 내인성 레트로바이러스 타입 E(HERV-E)에 의해 코딩되는 상기 클론에 의해 인식되는 항원을 cDNA 발현 클로닝을 이용하여 확인하였다(Takahashi *et al.*, 2008). 상기 항원은 ccRCC에서 발현되었지만 정상 조직 또는 다른 종양 유형에서는 관찰되지 않았고 ccRCC 종양의 약 80%에서 발현되었다.

[0014] 본 발명자들은 RCC 환자로부터 분리된 T 세포 클론에 의해 발현된 T 세포 수용체를 확인하였다. 본 명세서에 기술된 바와 같이, 상기 TCR은 RCC 환자를 치료하기 위한 유전자 전달 면역 요법에 사용될 수 있다. T 세포는 TCR α 및 β 사슬을 코딩하는 유전자로 형질도입되고, 정상적인 T 세포의 특이성을 RCC 세포로 재 지정하기 위해 RCC를 갖는 개체에 투여된다.

[0015] **I. 약어**

[0016] **ccRCC:** 투명 세포 신세포암(clear cell renal cell carcinoma)

[0017] **CD34t:** 절단된 CD34(truncated CD34)

[0018] **CTL:** 세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte)

[0019] **HERV:** 인간 내인성 레트로바이러스(human endogenous retrovirus)

[0020] **HLA:** 인간 백혈구 항원(human leukocyte antigen)

[0021] **LTR:** 긴 말단 반복(long terminal repeat)

[0022] **MMLV:** 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스(Moloney murine leukemia virus)

[0023] **PBMC:** 말초 혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cells)

[0024] **RCC:** 신세포암(renal cell carcinoma)

[0025] **TCR:** T 세포 수용체(T cell receptor)

[0026] **II. 용어**

[0027] 달리 명시하지 않는 한, 기술 용어는 일반적인 사용법에 따라 사용된다. 분자 생물학의 일반적인 용어에 대한 정의는 *Lewin's Genes X*, ed. Krebs *et al.*, Jones and Bartlett Publishers, 2009 (ISBN 0763766321); Kendrew *et al.* (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, published by Blackwell Publishers, 1994 (ISBN 0632021829); Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, published by Wiley, John & Sons, Inc., 1995 (ISBN 0471186341); 및 George P. Rιdei, *Encyclopedic Dictionary of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics,* 3rd Edition, Springer, 2008 (ISBN: 1402067534); 및 다른 유사한 참조문헌에서 찾을 수 있다.

[0028] 달리 설명하지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 개시 내용이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 단수의 용어 "하나(a, an)" 및 "그(the)"는 문맥에 달리 명시되어 있지 않는 한 복수의 대상을 포함한다. 유사하게, "또는" 이라는 단어는 문맥에 달리 명시되어 있지 않는 한 "및" 을 포함한다. 따라서 "A 또는 B를 포함"은 A, 또는 B, 또는 A 및 B를 포함하는 것을 의미한다. 핵산 또는 폴리펩타이드에 대해 주어진 모든 기본 크기 또는 아미노산 크기 및 모든 분자량 또는 분자량 값은 근사치이며 설명을 위해 제공되는 것으로 이해되어야 한다.

[0029] 본 명세서에 기술된 것들과 유사하거나 동등한 방법 및 재료가 본 개시의 실행 또는 테스트에 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 재료는 하기에 기술된다. 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허 및 기타 참고 문헌은 그 전체가 참고 문헌으로 인용된다. 유전자은행 등록번호(GenBank Accession Numbers)와 관련된 서열은 달리 명시되지 않는 한, 2016 년 6 월 30일 현재 유전자은행에 참고 문헌으로 수록되어 있다. 충돌이 있는 경우, 용어의 설명을 포함하여 본 명세서가 우선한다. 또한, 재료, 방법 및 실시예는 단지 예시적인 것이며 제한하려는 것은 아니다.

[0030] 본 명세서의 다양한 실시예들의 검토를 용이하게 하기 위해, 특정 용어에 대한 설명이 다음과 같이 제공된다:

[0031] **항원:** 개체에서 항체 또는 T 세포 반응의 생성을 자극할 수 있는 화합물, 조성물 또는 물질. 항원은 이종 면역원에 의해 유도된 것을 포함하여 특정한 체액성 또는 세포성 면역의 산물과 반응한다. 용어 "항원"은 모든 관련

된 항원 에피토프를 포함한다. "에피토프" 또는 "항원 결정기"는 B 및/또는 T 세포가 반응하는 항원상의 부위를 지칭한다. 일 구현예에서, 에피토프가 MHC 분자와 함께 제시될 때, T 세포는 상기 에피토프에 반응한다. 에피토프는 단백질의 3차 접힘에 의해 인접한 아미노산 또는 인접하지 않은 아미노산 모두로부터 형성될 수 있다. 인접한 아미노산들로 형성된 에피토프는 변성 용매에 노출시 유지되지만, 3차 접힘에 의해 형성된 에피토프는 변성 용매로 처리시 소실된다. 에피토프는 전형적으로 독특한 공간적 형태로 적어도 3개, 보다 통상적으로는 적어도 5개, 약 9개, 약 7 내지 11개 또는 약 8 내지 10개의 아미노산을 포함한다. 에피토프의 공간적 형태를 결정하는 방법은 예를 들어, x-선 결정학 및 2차원 핵자기공명을 포함한다. 항원은 조직 특이 항원 또는 질병 특이 항원 일 수 있다. 이러한 용어는 조직 특이 항원이 질병 특이 항원 일 수도 있기 때문에 독점적이지는 않다. 조직 특이 항원은 단일 조직과 같은 제한된 수의 조직에서 발현된다. 질병 특이 항원은 질병 진행과 동시에 발현된다. 질병 특이 항원의 비제한적 예는 그의 발현이 예를 들어 RCC와 같은 종양의 형성과 관련되거나 종양의 형성을 예견하는 항원이다.

[0032] **자가유래(autologous)**: 이는 개인의 자기 조직에서 추출한 조직, 세포 또는 핵산을 의미한다. 예를 들어, T 세포의 자가 이동 또는 이식에서 공여자와 수혜자는 같은 사람이다. 자가유래(또는 "자기(autogenic)" 또는 "자생(autogenous)")는 자아 또는 유기체 자체 내에서 유래되는 것이다.

[0033] **CD34**: 세포-세포 접착 분자로서 기능하는 세포 표면의 당단백질. CD34는 고도의 글리코실화된 세포 외 도메인, 막횡단 도메인 및 세포 내 신호 도메인을 갖는 단일 막횡단 단백질이다. CD34는 조혈세포에서 발현되며 세포 이동에 중요한 역할을 한다. 예시적인 인간 CD34 서열은 유전자은행 등록번호 NM_001025109 및 NM_001773(핵산 서열), 및 NP_001020280 및 NP_001764(아미노산 서열)를 포함하며, 이들 모두는 2016 년 6 월 30 현재 유전자은행에 개시되어 있으며, 본 명세서에 참조문헌으로 포함되어 있다.

[0034] **HLA-A11**: 인간 백혈구 항원(human leukocyte antigen, HLA) A 그룹내의 HLA 혈청형(serotype). HLA-A11은 MHC 클래스 I 분자로서 HLA-A*11 대립유전자 군에 의해 코딩되는 α 사슬 및 β2-마이크로글로불린(microglobulin)에 의해 코딩되는 β 사슬을 포함한다. HLA-A11과 같은 MHC 클래스 I 분자는 전형적으로 7 내지 11 아미노산 길이이고 TCR과 결합을 통해 T 세포에 항원을 제시하는데 관여하는 펩타이드(항원)에 결합한다.

[0035] **인간 내인성 레트로바이러스 E (Human endogenous retrovirus E, HERV-E)**: HERV는 인간 게놈에 통합된 고대 외인성(exogenous) 레트로바이러스의 잔재이다. HERV는 인간 게놈의 5-8%를 차지하는 것으로 추정된다. 대부분의 HERV는 축적된 돌연변이를 가지며 전사적으로 불활성이며 전장 단백질을 생성하지 않는다. 그러나, 일부 HERV는 종양과 같은 상황에서 전사 활성을 보인다. HERV-E는 인간 염색체 6q에 위치하는 HERV 아형이다. HERV-E(예를 들어, 유전자은행 등록번호. EU137846, EU137847 및 JQ733905)로부터의 적어도 3 개의 전사물이 확인되었으며 이들은 RCC 세포에서 발현되지만, 다른 종양 또는 비-종양 세포에서는 발현되지 않는다 (Takahashi *et al., J. Clin. Oncol.* 118:1099-1109, 2008).

[0036] **작동 가능하게 연결된(Operably linked)**: 제 1 핵산이 제 2 핵산과 기능적 관계에 놓일 때, 제 1 핵산은 제 2 핵산과 작동 가능하게 연결되었다고 한다. 예를 들어, 프로모터가 코딩 서열의 전사 또는 발현에 영향을 주면 프로모터는 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 것이다. 일반적으로, 작동 가능하게 연결된 핵산들은 인접해 있으며, 필요하다면 2 개의 단백질 코딩 영역을 연결하기 위해, 개방형 해독 (open reading frames)이 정렬된다.

[0037] **재조합체(Recombinant)**: 재조합 핵산 분자는 자연 발생적이지 않은 서열 또는 분리된 두 서열의 인위적인 조합에 의해 만들어진 서열을 갖는 것이다. 이러한 인위적 조합은 화학적 합성 또는 유전자 공학 기술과 같은 핵산 분자의 분리된 단편에 대한 인공적 조작에 의해 달성될 수 있다. 유사하게는, 재조합 바이러스는 자연적으로 발생하지 않는(상기 바이러스로부터 유래하지 않은 이종 서열을 포함하는) 핵산 서열을 갖는 바이러스 또는 상이한 기원의 적어도 2개의 서열의 인위적 조합에 의해 만들어진 바이러스이다. 용어 "재조합체"는 또한 천연 핵산 분자, 단백질 또는 바이러스의 일부의 첨가, 치환 또는 결실에 의해서만 변경된 핵산, 단백질 및 바이러스를 포함한다.

[0038] **신세포암(RCC)**: 신장 세포에서 발생한 종양. RCC는 성인에서 가장 흔한 유형의 신장암이다. RCC의 60-70%를 차지하고 근위 세뇨관의 세포에서 유래되는 투명세포 신세포암(ccRCC)을 비롯한 RCC의 여러 조직학적 아형이 있다. ccRCC 세포는 소엽성 또는 육종성 성장 패턴으로 명확한 세포질을 나타낸다. 추가적인 아형으로는 유두(papillary) RCC(근위 세뇨관의 세포에서도 기원됨), 색소혐성(chromophobic) RCC(피질 집합관의 세포에서 유래), 종양 용해성(oncolytic) RCC(피질 집합관의 세포에서 유래하는 양성 신생물) 및 집합관(collecting duct) RCC(수질 집합관의 세포에서 유래) 등이 있으나 이에 한정되지는 않는다.

[0039] **T 세포:** 면역 반응의 중요한 중재자인 백혈구(림프구). T 세포는 $CD4^+$ T 세포 및 $CD8^+$ T 세포를 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. $CD4^+$ T 림프구는 표면에 "분화 클러스터(cluster of differentiation) 4" (CD4)라고 알려진 마커를 가지고 있는 면역세포이다. 헬퍼(helper) T 세포라고도 하는 상기 세포는 항체 반응 및 킬러 T 세포 반응을 비롯한 면역 반응을 조율하는데 도움을 준다. $CD8^+$ T 세포는 "분화 클러스터 8" (CD8) 마커를 가지고 있는 세포이다. 일 실시예에서, $CD8^+$ T 세포는 세포 독성 T 림프구(CTL)이다. 다른 실시예에서, $CD8^+$ 세포는 억제(suppressor) T 세포이다.

[0040] 활성화된 T 세포는 세포 증식의 증가 및/또는 하나 이상의 사이토카인(IL-2, IL-4, IL-6, IFNγ 또는 TNFα)의 발현 또는 분비에 의해 검출될 수 있다. $CD8^+$ T 세포의 활성화는 또한 항원에 대한 반응으로 세포 용해 활성의 증가에 의해 검출될 수 있다.

[0041] 일부 실시예에서, "**변형된(modified) T 세포**"는 이종 핵산(본 명세서에 개시된 하나 이상의 핵산 또는 벡터와 같은)으로 형질도입된 또는 하나 이상의 이종 단백질을 발현하는 T 세포이다. 용어 "변형된 T 세포" 및 "형질도입된 T 세포"는 본 명세서의 일부 실시예에서 상호 교환적으로 사용된다.

[0042] **T 세포 수용체 (TCR):** 항원(예를 들어, 항원 제시 세포상의 MHC 분자에 결합된 항원)에 결합하는 T 세포 표면의 이종이량체(heterodimeric) 단백질. TCR은 α 및 β 사슬을 포함하며, 이들 각각은 막횡단 당단백질이다. 각 사슬은 면역글로불린 가변 및 불변 도메인, 힌지 영역, 막횡단 도메인 및 세포질 꼬리와 상동성을 갖는 가변 및 불변 영역을 포함한다. 면역글로블린과 유사하게, TCR 유전자 단편들은 완전한 가변 도메인을 생성하기 위해 발생 중에 재배치된다.

[0043] T 세포는 항원과 TCR 및 공동 자극 신호의 결합에 의해 활성화된다. 예를 들어, $CD8^+$ T 세포는 세포의 특정 HLA 분자가 제시될 때 특정 에피토프를 인식하는 T 세포 수용체를 가지고 있다. 항원 제시 세포에 의해 자극되어 세포독성 T 림프구가 된 CTL 전구체가 이러한 HLA-펩타이드 복합체를 지닌 세포와 접촉하면, CTL은 상기 세포와 접합체를 형성하여 이를 파괴한다.

[0044] **형질도입(transduce):** 이종 핵산을 숙주 세포 내로 전달하는 것과 같이 세포 내로 핵산을 전달하는 것. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 형질도입(또는 형질감염(transfect) 또는 형질전환(transform))은 플라스미드 벡터에 의한 형질전환, 바이러스 벡터에 의한 감염 및 일렉트로포레이션, 뉴클레오펙션, 리포펙션 또는 입자총 가속에 의한 네이키드 DNA의 도입 등을 포함하는, 핵산을 세포로 도입하는 모든 기술을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.

[0045] "이종(heterologous)" 핵산 또는 단백질은 상이한 유전자 소스로부터 유래된 핵산 또는 단백질을 지칭한다. 예를 들어, 세포에 이종인 핵산 또는 단백질은 그것이 발현되는 세포 이외의 유기체 또는 개체로부터 비롯된다. 다른 실시예에서, 이종 핵산 또는 단백질은 그것이 발현되는 세포 이외의 세포 유형으로부터 기원한다.

[0046] **벡터:** 숙주세포 내에서 복제 및/또는 통합하는 벡터의 능력을 파괴하지 않으면서 외래 핵산의 삽입을 허용하는 핵산 분자. 벡터는 복제 기점과 같은 숙주세포에서 복제를 허용하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 벡터는 하나 이상의 선택 가능한 마커 유전자 및 다른 유전적 요소를 또한 포함할 수 있다. 발현 벡터는 삽입된 유전자 또는 유전자들의 전사 및 번역을 허용하기 위해 필요한 조절 서열을 함유하는 벡터이다. 일부 비 제한적인 실시예에서, 상기 벡터는 레트로바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터이다.

[0047] **III. T 세포 수용체, 벡터, 및 숙주세포**

[0048] 본 명세서에는 RCC HERV-E 반응성 T 세포주에서 클로닝된 T 세포 수용체 (예, TCR α 및 β 사슬)가 기재되어 있다. 본 명세서에는 또한 상기 TCR 및 TCR α 및/또는 β 사슬을 코딩하는 적어도 하나의 이종 핵산을 포함하는 숙주세포를 포함하는 벡터(발현벡터와 같은)도 기재되어 있다.

[0049] **A. TCRs**

[0050] 일부 구현예에서, 상기 TCR은 ATFLGSLTWK (서열번호 1)와 같은 RCC 세포 상에 발현된 HERV-E 펩타이드를 인식한다. 상기 TCR은 α 및 β 사슬 핵산 또는 폴리펩타이드를 포함한다. 일부 실시예에서, 상기 TCRα 사슬은 서열번호 2의 핵산서열을 포함하거나 이로 이루어진 핵산에 의해 코딩된다. 일부 실시예에서, 상기 TCRβ 사슬은 서열번호 3의 핵산서열을 포함하거나 이로 이루어진 핵산에 의해 코딩된다. 일부 실시예에서, 상기 TCRα 사슬 폴리펩타이드는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하거나 그 서열로 구성된다. 일부 실시예에서, 상기 TCRβ 사

슬 폴리펩타이드는 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하거나 그 서열로 구성된다.

[0051] 일부 구현예에서, 상기 TCR-코딩 핵산은 서열번호 2 또는 서열번호 3의 핵산 서열과 적어도 90%(예를 들어, 적어도 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%, 또는 100%)의 동일성을 보이는 서열을 갖는다. 다른 구현예에서, 상기 TCR 폴리펩타이드는 서열번호 4 또는 서열번호 5의 아미노산 서열과 적어도 95%(예를 들어, 적어도 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%) 의 동일성을 보이는 아미노산 서열을 가진다. 예시적인 서열은 인터넷상에서 용이하게 입수할 수 있는 컴퓨터 프로그램 및 본 명세서에서 제시된 핵산 및 아미노산 서열을 사용하여 수득할 수 있다. 한 실시예에서, 상기 폴리펩타이드는 개시된 TCR 폴리펩타이드의 적어도 하나의 활성, 예를 들어 TCR α 및 β 사슬 둘 다의 맥락에서 T 세포에 의해 발현되는 경우 RCC-특이적 항원 에피토프(예를 들어, 서열번호 1)에 대한 결합과 같은 적어도 하나의 활성을 보유한다.

[0052] 핵산 또는 일차 아미노산 서열을 코딩하는 TCR α 및/또는 β 사슬의 사소한 변형은 본 명세서에 기술된 변형되지 않은 대응 폴리펩타이드와 비교하여 실질적으로 동일한 활성을 갖는 폴리펩타이드를 초래할 수 있다. 이러한 변형은 부위 특이적 돌연변이 유도(site-directed mutagenesis) 에 의해 의도적으로 일어나거나 또는 자발적으로 일어날 수 있다. TCR α 또는 β 사슬 폴리펩타이드의 특정 비 제한적 예는 TCR α 또는 β 사슬 폴리펩타이드의 보존적 변이체(단일 보존적 아미노산 치환, 예를 들어 하나 이상의 보존적 아미노산 치환, 예를 들어 1-10 개의 보존적 치환, 2-5 개의 보존적 치환, 4-9 개의 보존적 치환, 1, 2, 5 또는 10 개의 보존적 치환) 이다. 보존적 치환을 나타내는 표가 본 명세서에서 제공된다(표 1). 이 표에 기초하여 서열번호 4 및 5에 나타난 아미노산 서열의 치환을 행할 수 있다. 그러나, 상기 폴리펩타이드의 활성을 크게 변화시키지 않고 비-보존적 아미노산 치환 또한 수행할 수 있다. 당업자는 서열 정렬(sequence alignments) 및 다른 이용 가능한 서열 분석 툴에 기초하여 치환될 수 있는 아미노산을 선택할 수 있다.

표 1

[0053] 예시적인 보존적 아미노산 치환

원래의 잔기	보존적 치환(들)
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
His	Asn; Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

[0054] **B. 벡터**

[0055] 본 발명은 또한 HERV-E 반응성 TCR을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다. 상기 벡터는 하나 이상의 발현 조절 요소와 작동 가능하게 연결된 TCR의 α 및 β 사슬 중 하나 또는 둘 모두를 코딩하는 핵산(서열번호 2 및/또는 서열번호 3과 적어도 90%의 동일성을 보이는 핵산)을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 벡터는 TCR α 사슬(예, 서열번호 2와 같은 서열번호 4를 코딩하는 핵산) 및 TCR β 사슬(예, 서열번호 3과 같은 서열번호 5를 코딩하는 핵산) 모두를 코딩하는 핵산을 포함한다. 그러나, 다른 실시예에서, 상기 TCR α 및 TCR β 사슬은 별개의 벡터로부터 발현될 수 있다. 발현 조절 요소는 프로모터, 인핸서, 리더 서열, 전사 종결자, 개시 및/또는 정지 코돈, 내부 리보솜 진입 부위(internal ribosome entry sites, IRES), 스플라이싱 시그널 (splicing signals) 및 아데닐산중합반응 신호(polyadenylation signals)와 같은 핵산의 전사 및/또는 번역을 제한 또는

조절하는 서열이다. 상기 벡터에는 복제의 기원 및 선택 가능한 마커와 같은 벡터의 전달 및 후속 복제를 위한 추가 요소가 포함될 수도 있다.

[0056] 일부 실시예에서, 상기 벡터는 TCR α 및 β 사슬 중 하나 이상을 코딩하는 핵산(서열번호 2 및/또는 서열번호 3과 적어도 90%의 동일성을 보이는 핵산)을 포함하는 바이러스 벡터이다. 특정 구현예에서, 상기 벡터는 레트로바이러스 벡터이다. T 세포로의 유전자 전달에 적합한 추가 바이러스 벡터로는 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 우두바이러스(vaccinia virus), 알파바이러스, 헤르페스바이러스(herpes virus) 및 계두바이러스(fowlpox virus) 벡터 등이 있다. 다른 실시예에서, 상기 벡터는 플라스미드 또는 바큘로바이러스(baculovirus) 벡터이다. 당업자는 적절한 벡터를 선택할 수 있는데, 예를 들어 T 세포를 본 명세서에 기재된 TCR로 안정적으로 또는 일시적으로 형질도입 할 수 있다.

[0057] 일부 구현예에서, 상기 벡터는 본 명세서에 개시된 TCR α 및 β 사슬 폴리펩타이드 중 하나 또는 둘 모두를 코딩하는 핵산을 포함하는 레트로바이러스 벡터이다. 특정 실시예에서, 상기 벡터는 바이러스로 코딩된 단백질이 결실된(예를 들어, 복제 가능 바이러스의 생성을 방지하고, 원치 않는 면역원성을 감소시키며 및/또는 관심 유전자의 삽입을 위해) 변형된 레트로바이러스 벡터이다. 예시적인 레트로바이러스 백본은 LXSN 및 SAMEN 벡터와 같은 멀로니 뮤린 백혈병 바이러스(MMLV)에 기반한 것들을 포함한다(Clay *et al.*, *Pathol. Oncol. Res.* 5:3-15, 1999). 일 실시예에서, 상기 벡터는 서열번호 4와 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 TCR α 사슬을 코딩하는 핵산(예를 들어, 서열번호 2와 적어도 90%의 서열 동일성을 보이는 핵산과 같은)을 함유하는 SAMEN 레트로바이러스 벡터이다. 또 다른 실시예에서, 상기 벡터는 서열번호 5와 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 TCR β 사슬을 코딩하는 핵산(예를 들어, 서열번호 3과 적어도 90%의 서열 동일성을 보이는 핵산과 같은)을 포함하는 SAMEN 레트로바이러스 벡터이다. 또 다른 실시예에서, 상기 벡터는 서열번호 4와 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 TCR α 사슬을 코딩하는 핵산(예를 들어, 서열번호 2와 적어도 90%의 서열 동일성을 보이는 핵산과 같은) 및 서열번호 5와 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 TCR β 사슬을 코딩하는 핵산(예를 들어, 서열번호 3과 적어도 90%의 서열 동일성을 보이는 핵산과 같은)을 포함하는 SAMEN 레트로바이러스 벡터이다. 하나의 비 제한적 실시예에서, 상기 벡터는 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 TCR α 사슬을 코딩하는 핵산(서열번호 2의 핵산 서열과 같은) 및 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 TCR β 사슬을 코딩하는 핵산(서열번호 3의 핵산 서열과 같은)을 포함하는 SAMEN 레트로바이러스 벡터이다. TCR α 사슬 및 β 사슬 핵산 모두가 존재하는 벡터에서, 상기 α 사슬 및 β 사슬 핵산은 IRES 또는 프로모터에 의해 분리되어 상기 α 사슬 및 β 사슬 핵산 모두가 전사 및/또는 번역될 수 있다. 또 다른 실시예에서, 상기 α 사슬 및 β 사슬 핵산은 펩타이드 절단 부위 또는 바이러스 2A 펩타이드, 예를 들어, 돼지 테스코바이러스-1 2A 또는 *Thosea asigna* 바이러스 자체-절단 펩타이드와 같은 "자체-절단" 펩타이드를 코딩하는 핵산에 의해 분리된다(Kim *et al.*, *PLoS One* 6:e18556, 2011 참조).

[0058] 추가의 구현예에서, 상기 벡터는 벡터로 형질도입된 세포의 동정 및/또는 농축을 가능하게 하는 선별 마커를 코딩하는 핵산을 포함한다. 예시적인 선별 마커는 항생제 내성 유전자(네오마이신(neomycin) 내성과 같은), 티미딘 키나아제(thymidine kinase), 형광 단백질 (녹색 형광 단백질과 같은) 또는 β- 갈락토시다제(β-galactosidase)를 포함한다. 또 다른 실시예에서, 상기 선별 마커는 형질도입된 세포를 확인하는데(예를 들어, 유동 세포 계측법 또는 면역 자기 분리법을 사용하여) 사용될 수 있는 세포 표면 발현 단백질을 포함한다. 하나의 비 제한적인 실시예에서, 본 명세서에 개시된 벡터는 세포내 신호전달 도메인이 없는 절단된 CD34 단백질(CD34t)을 코딩하는 핵산을 포함한다. 상기 CD34t 단백질은 CD34의 세포외 및 막관통 영역을 포함하며, 그 결과 세포 표면 상에 발현되지만 상기 절단된 단백질을 발현하는 세포의 활성에는 영향을 미치지 않는다(Norell *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* 59:851-862, 2010). 상기 CD34t를 발현하는 세포는 항-CD34 항체로 확인할 수 있으며, 유동 세포 계측법 또는 면역-자기 방법을 사용하여 분리할 수 있다.

[0059] 한 실시예에서, 상기 CD34t를 코딩하는 핵산은 서열번호 6의 4028-4975 뉴클레오타이드 또는 서열번호 6의 4028-4975 뉴클레오타이드와 95% 이상(95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상)의 동일성을 보이는 서열을 포함하거나 또는 그 서열로 구성된다. 특정 실시예에서, 상기 CD34t 단백질은 서열번호 7의 아미노산 서열과 95% 이상(95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 또는 100%)의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그 서열로 구성된다.

[0060] 상기 TCR α 및 β 사슬의 발현을 위한 예시적인 레트로바이러스 벡터 (SAMEN vector와 같은)를 도 1에 나타내었다. 상기 벡터는 프로모터/인핸서(MMLV 5'LTR에 융합된 인간 사이토메갈로바이러스 프로모터/인핸서 같은)를 포함하는5'LTR , 패키징 시그널(Ψ), TCR α 사슬을 코딩하는 핵산(예를 들어, 서열번호 2), 제 1 자가-절단 2A 펩타이드(돼지 테스코바이러스 자가-절단 2A (P2A) 펩타이드 같은), TCR β 사슬을 코딩하는 핵산(예를 들어,

서열번호 3), 제 2 자가-절단 2A 펩타이드(*Thosea asigna* 자가-절단 2A (T2A) 펩타이드 같은), 절단된 CD34 단백질을 코딩하는 핵산, 및 3'LTR로 구성된다.

[0061] 일부 실시예에서, 상기 벡터는 서열번호 6의 핵산 서열을 포함하거나 그 서열로 구성된다. 다른 실시예에서, 상기 벡터는 서열번호 6의 핵산 서열과 95% 이상 (95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 또는 100%)의 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하거나 또는 그 서열로 구성된다. 본 명세서에서 제공되는 예시적인 벡터에서, 상기 TCR α 사슬은 서열번호 6의 뉴클레오타이드 2165-2971에 의해 코딩되고, 상기 P2A 펩타이드는 서열번호 6의 뉴클레오타이드 2972-3037에 의해 코딩되고, 상기 TCR β 사슬은 서열번호 6의 뉴클레오타이드 3038-3958에 의해 코딩되고, 상기 T2A 펩타이드는 서열번호 6의 뉴클레오타이드 3959-4027에 의해 코딩되고, 및 상기 CD34t 수용체는 서열번호 6의 뉴클레오타이드 4028-4975에 의해 코딩된다.

[0062] **C. 숙주세포**

[0063] 본 발명은 또한 TCR α 사슬, TCR β 사슬, 또는 이 둘 모두를 코딩하는 벡터와 같은, TCR α 사슬 및/또는 TCR β 사슬을 코딩하는 핵산을 포함하는 숙주세포를 제공한다. 일부 실시예에서, 상기 숙주세포는 벡터를 포함하는 재조합 바이러스를 생산할 수 있는 세포(예를 들어, 생산자 세포)이다. 다른 실시예에서, 상기 숙주세포는 림프구(예를 들어, T 세포)이다. 벡터를 숙주세포에 도입하는 방법은 당업자에게 공지되어 있으며 그 예로는 형질전환(예를 들어, 플라스미드 벡터로), 감염(예를 들어, 바이러스 벡터로) 및 일렉트로포레이션(electroporation), 뉴클레오펙션(nucleofection), 리포펙션(lipofection) 또는 입자총 가속(particle gun acceleration)(예를 들어, 네이키드 DNA) 등이 있다.

[0064] 상기 TCR α 및/또는 β 사슬이 레트로바이러스 벡터(SAMEN 벡터 등)로부터 발현되는 경우, 재조합 바이러스의 생산에는 헬퍼 바이러스 또는 패키징 세포주에서 발현되는 바이러스 단백질이 요구된다. 따라서, 일부 실시예에서, 본 명세서에 개시된 바이러스 벡터는 바이러스 단백질 (Gag, Pol 및/또는 Env)을 발현하는 헬퍼 바이러스와 함께 숙주 세포(293 세포주)에 도입된다. 다른 실시예에서, 본 명세서에 개시된 바이러스 벡터는 바이러스의 Gag, Pol 및 Env 단백질을 안정하게 발현하는 패키징 세포주 내로 형질 도입된다. 상기 패키징 세포주의 예로는 GP&E 86, PG13 및 PA317 세포와 같은 NIH-3T3 세포주(Markowitz *et al., J. Virol.* 62:1120-1124, 1988; Miller *et al., J. Virol.* 65:2220-2224, 1991; Miller *et al., Mol. Cell Biol.* 6:2895-2902, 1986) 또는 293GPG 및 GP2-293 세포와 같은 293 세포주 등이 있다. 하나의 비 제한적인 실시예에서, 상기 바이러스 벡터는 HERV-E 특이적 TCR α 사슬, β 사슬, 및 절단된 CD34 단백질을 코딩하는 SAMEN 벡터(서열번호 6의 핵산을 갖는 벡터와 같은)이다. 일부 실시예에서, 상기 생산자 세포주는 GMP 인증을 받은 것이다. 한 실시예에서, 상기 생산자 세포주는 HERV-E 특이적 TCR α 사슬 및 â 사슬, 그리고 절단된 CD34 단백질을 코딩하는 SAMEN 벡터(서열번호 6의 핵산을 갖는 벡터와 같은)를 포함하는 PG13 패키징 세포주이다.

[0065] 일부 실시예에서, 상기 숙주세포는 T 세포와 같은 림프구이다. 일부 구현예에서, 상기 림프구는 TCR α 및 β 사슬 중 하나 이상을 코딩하는 이종 핵산을 포함하는 T 세포(농축된 또는 확장된 T 세포의 집단)이다. 일부 실시예에서, 상기 림프구는 서열번호 4와 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 TCR α 사슬을 코딩하는 이종 핵산(서열번호 2와 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 핵산)을 포함한다. 다른 실시예에서, 상기 림프구는 서열번호 5와 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 TCR β 사슬을 코딩하는 이종 핵산(서열번호 3과 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 핵산)을 포함한다. 또 다른 실시예에서, 상기 림프구는 서열번호 4와 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 TCR α 사슬을 코딩하는 이종 핵산(서열번호 2와 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 핵산) 및 서열번호 5와 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 TCR β 사슬을 코딩하는 핵산(서열번호 3과 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 핵산)을 포함한다. 하나의 비 제한적인 실시예에서, 상기 림프구는 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 TCR α 사슬을 코딩하는 이종 핵산(서열번호 2의 핵산 서열) 및 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 TCR β 사슬을 코딩하는 핵산(서열번호 3의 핵산 서열)을 포함한다. 추가의 실시예에서, 상기 림프구는 절단된 CD34 단백질(예를 들어, 세포내 또는 신호 도메인이 결여된 CD34 단백질)을 코딩하는 이종 핵산을 또한 포함한다.

[0066] 일부 구현예에서, 상기 림프구 (림프구의 집단)는 본 명세서에 개시된 벡터로 형질도입된다. 형질도입 후, 상기 TCRα 사슬 및/또는 β 사슬의 발현은 표지된 항체를 사용하는 유동 세포 계측법 또는 동족체 펩타이드(서열번호 1)에 대한 반응성을 검출하는 것과 같은 당업자에게 공지된 방법으로 확인이 가능하다. 일부 실시예에서, 상기 TCR α 및/또는 β 사슬이 CD34t와 함께 발현되는 경우, 형질도입된 세포는 항-CD34 항체를 사용하여, 예를 들면 유동 세포 계측법 또는 면역-자기 기법(예를 들어, CliniMACS® CD34 시약 시스템, Miltenyi Biotec Inc., San Diego, CA or Isolex® 300 자기세포 선택 시스템, Nexell Therapeutics Inc., Irvine, CA)을 이용

하여, 검출 및/또는 농축될 수 있다.

[0067] 일부 구현예에서, 상기 TCR α 및 β 사슬을 발현하는 변형된(예를 들어, 형질도입된) T 세포는 개체로부터 분리반출법으로 림프구 집단(PBMC 집단)을 수득함으로써 얻을 수 있다. 상기 림프구 집단의 비활성 또는 불응성 T 세포는 형질도입 전에 하나 이상의 사이토카인(IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, 및 IL-23 중 하나 이상)과 접촉시켜 활성화 시킨다. 일부 실시예에서, 활성화된 T 세포를 얻기 위하여 상기 림프구를 1-4 일(1 일, 약 2 일, 약 3 일 또는 약 4 일) 동안 항-CD3 항체 및 IL-2와 접촉시킨다. 일부 실시예에서, 상기 림프구를 2 일 또는 3 일 동안 30 ng/ml 의 항-CD3 항체 및 300 IU/ml의 IL-2와 접촉시켰다.

[0068] 상기 활성화된 T 세포를 예를 들어 감염(바이러스 벡터의 경우) 또는 형질감염 또는 형질전환(플라스미드 또는 네이키드 DNA 벡터의 경우)에 의해 본 명세서에 개시된 벡터로 형질도입시켰다. 일부 실시예에서, 상기 형질전환된 T 세포는 농축 및/또는 확장된다. 예를 들어, 벡터가 절단된 CD34 분자를 코딩하는 핵산을 포함하는 경우, 형질도입된 T 세포의 집단을 형질도입 후 2-4 일 동안 항-CD34 항체와 접촉시키고 CD34 발현 세포를 정제함으로써(예를 들어, 유세포 분석기 또는 면역-자기 비드를 이용하여) 상기 형질도입된 T 세포를 선택하거나 농축할 수 있다. 또한, 형질도입된 T 세포를 항-CD3 (약 30 ng/ml), 항-CD28 (약 30 ng/ml) 및/또는 IL-2 (약 300 IU/mℓ)와 함께 일정 기간(약 7-14 일 또는 9-11 일) 동안 배양함으로써 상기 형질도입된 T 세포를 확장시킬 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 형질도입된 T 세포는 방사선 조사된 PBMC 세포에서의 배양에 의해 확장될 수 있다.

[0069] **IV. 신세포암의 치료 또는 억제 방법**

[0070] 본 발명은 또한 RCC세포에 의해 발현되는 항원 또는 에피토프에 결합하는 TCR(예를 들어, TCR α 및 β 사슬)을 발현하는 T 세포(또는 T 세포 집단)를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 RCC의 치료 또는 억제 방법을 제공한다. 일부 실시예에서, 상기 방법은 본 명세서에 기술된 변형된 T 세포를 RCC(ccRCC, 진행성 ccRCC, 또는 전이성 ccRCC와 같은)를 갖는 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 특정 실시예에서, 상기 개체는 HLA-A11 양성이고 ccRCC를 갖는다.

[0071] 상기 변형된 림프구(예, 변형된 또는 형질도입된 T 세포)는 약학적 조성물에 혼입될 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 조성물은 약 10^4 내지 10^{12} 개의 변형된 T 세포를 포함한다(약 10^4-10^7 세포, 약 10^6-10^9 세포, 또는 약 10^8-10^{12} 세포). 예를 들어, 상기 조성물은 변형된 T 세포가 약 $5x10^6$ 내지 $5x10^8$ 세포/kg의 용량으로 환자에게 투여되도록 제조될 수 있다. 상기 조성물은 변형된 T 세포의 집단 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다. 상기 "약학적으로 허용 가능한 담체"는 약제학적으로 투여가 가능한 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 항균 및 항진균제, 등장액 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 이러한 담체 또는 희석제의 예로는 물, 식염수, 링거액, 덱스트로스 용액 및 5% 인간 혈청 알부민 등이 있으나 이에 한정되지는 않는다. 리포좀 및 고정유와 같은 비수성 비히클이 또한 사용될 수 있다. 보충 활성 화합물 또한 상기 조성물에 포함될 수 있다. 투여 가능한 조성물을 제조하기 위한 실제 방법은 당업자에게 공지되어 있으며 하기 참고 문헌에 상세히 기재되어 있다: *Remington, The Science and Practice of Pharmacy*, The University of the Sciences in Philadelphia, Editor, Lippincott, Williams, & Wilkins, Philadelphia, PA, 21st Edition (2005).

[0072] 개체의 생체 내 처리는 본 명세서에 개시된 변형된 T 세포의 투여에 의해 개시된다. 고형 종양 또는 다른 주요 병변으로의 직접 주사가 사용될 수도 있지만, 투여는 전형적으로 정맥내 또는 복강내 주입을 통해 이루어진다. 치료의 효능은 일반적으로 병변 감소/제거(RECIST 기준을 사용하여)로 평가한다. 병변의 크기와 수는 MRI, PET 및/또는 CT 이미징과 같은 이미징을 통해 평가할 수 있다. 일부 실시예에서 스테이징은 매월, 3개월마다 또는 6개월마다 수행된다. 일부 실시예에서, 개체의 혈액 샘플은 또한 존재하는 변형된 T 세포의 수를 정량화하기 위해 주입 후 하나 이상의 시점에서 분석된다(예를 들어, CD34t를 발현하는 변형된 T 세포의 경우, CD34를 발현하는 $CD3^+$ 세포의 수(absolute number) 및/또는 백분율을 평가).

[0073] 상기 변형된 T 세포의 집단은 여러번 투여가 가능하다. 예를 들어, 상기 변형된 T 세포의 집단은 매일, 격일로, 주 2회, 매주, 격주마다, 3주마다, 매달 또는 덜 빈번하게 투여 될 수 있다. 한 특정 실시예에서, 상기 변형된 T 세포는 단일 투여되었다. 그러나 숙련된 임상의는 개체, 치료되는 상태, 이전의 치료 이력 및 기타 요인에 따라 대체 일정을 선택할 수 있다.

[0074] 일부 구현예에서, 개체는 ccRCC와 같은 RCC를 갖는다. RCC 또는 ccRCC를 갖는 개체를 확인하는 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 구체적으로 방사선 영상학적 증거(초음파, MRI, CT 스캔 또는 PET 스캔에 의한 이미징) 및/또는 생검(미세 바늘 흡인 또는 바늘 코어 생검)으로 RCC의 존재를 확인할 수 있다. 일부 실시예에서, 개체는

전이성 RCC를 갖는다. 추가의 실시예에서, 상기 RCC를 갖는 개체는 또한 HLA A11$^+$ 이고 상기 종양은 HERV-E 프로 바이러스를 발현한다(예를 들어, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 발현한다). 일부 구현예에서, 상기 방법은 변형된 T 세포로 치료하기 위해 HLA A11$^+$ 이고 서열번호 1을 포함하는 단백질을 발현하는 RCC(ccRCC)를 갖는 환자를 선택하는 단계를 포함한다.

[0075] 특정 구현예에서, 상기 방법은 RCC를 갖는 개체(HLA A11$^+$ 이고 서열번호 1을 포함하는 단백질과 같은 HERV-E 프로바이러스를 발현하는 ccRCC를 갖는 환자)로부터 림프구를 포함하는 세포 집단을 얻는 단계를 포함한다. 다른 실시예에서, 상기 림프구를 포함하는 세포 집단은 HLA-매치된 공여자로부터 또는 치료하고자 하는 개체(HLA A11$^+$ 이고 서열번호 1을 포함하는 단백질과 같은 HERV-E 프로바이러스를 발현하는 ccRCC 를 갖는 개체)로부터 얻을 수 있다. 개체로부터 T 세포를 수득하고 형질도입 시키는 예시적인 프로토콜을 도면에 나타내었다.

[0076] 림프구(PBMC와 같은)를 포함하는 세포의 집단은 분리반출법을 포함하나 이에 한정되지 않는 임의의 방법에 의해 얻을 수 있다. 상기 세포 집단의 전부 또는 일부는 즉시 이용되거나, 전부 또는 일부를 장래의 사용을 위해 동결 보존시킬 수 있다. 사용 준비가 되면 상기 세포 집단 전체 또는 일부를 해동시키고(이전에 동결 보존된 경우) T 세포는 항-CD3 항체(OKT3)와 함께 배양하여 활성화 시킨다. 일부 실시예에서, 약 10^7-10^9 개의 PBMC를 항-CD3 단클론 항체(약 30 ng/ml) 및 IL-2(약 300 IU/ml) 및/또는 IL-15(약10-100 ng/ml)와 함께 배양한다. 한 특정 실시예에서, 약 6x10^8 PBMC를 약 1-5일(약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일 또는 약 5일) 동안 항-CD3 항체 OKT3 및 IL-2와 함께 배양한다. 다른 특정 실시예에서, 약 6x10^8 PBMC를 항-CD3 항체 OKT3, IL-2 및 IL-15와 함께 약 1-5 일 (약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 또는 약 5일) 동안 배양한다.

[0077] 일부 실시예에서, T 세포를 활성화시킨 후, 선택적으로 CD4$^+$ 세포를 제거한다. 일부 실시예에서, 유세포 분석 또는 면역-자기 기법(예를 들어, CliniMACS® CD4 reagent system, Miltenyi Biotec Inc., San Diego, CA)을 이용하는 항-CD4 항체를 사용하여 CD4$^+$ 세포를 제거하거나, 또는 항-CD4 항체에 결합된 CD4$^+$ T 세포의 적혈구 재조정을 사용하여 CD4가 결핍된 세포군을 생산한다. 다른 실시예에서, CD4의 제거는 형질도입 후 또는 형질도입된 T 세포의 확장 후에 수행될 수 있다. 일부 실시예에서, 상기 CD4-결핍 세포 집단은 T 세포의 CD8$^+$ 집단이다(예를 들어, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 이상의 CD8$^+$ T 세포를 포함하는 T 세포의 집단).

[0078] T 세포 활성화(및 선택적인 CD4$^+$ 세포 제거) 후, 상기 세포는 HERV-E 반응성 TCR α 사슬, β 사슬 또는 둘 다를 암호화하는 이종 핵산을 포함하는 벡터(상기 IIIB 에 기재된 하나 이상의 벡터와 같은)로 형질도입된다. 특정 실시예에서, 약 10^7-10^9 개의 세포가 형질도입된다(예를 들어, 약 1x10^7, 5x10^7, 1x10^8, 5x10^8, 또는 1x10^9 개의 세포). 하나의 비 제한적 실시예에서, 약 2x10^8 개의 세포가 형질도입된다. 일부 실시예에서, 상기 벡터는 절단된 CD34 단백질을 코딩하는 이종 핵산을 또한 포함한다. 일부의 실시예에서, 상기 형질도입된 T 세포는 CD34-특이적 항체를 사용하여 농축된다 (유세포 분석 또는 면역-자기 정제).

[0079] 형질도입된 T 세포(또는 선택적으로 CD34가 풍부한 형질도입된 T 세포 및/또는 CD34가 풍부하고 CD4는 결여된 형질도입된 T 세포)는 생체 외에서 확장되며 확장 후에는 적절한 투여량(예를 들어, 약 10^6-10^{12} 세포)으로 동결 보존될 수 있다. 하나의 특정 실시예에서, 상기 형질도입된 T 세포는 300 IU/ml의 IL-2, 30 ng/ml의 항-CD3 및 30 ng/ml의 항-CD28을 함유하는 배지에서 방사선 조사된 동종 PBMC 피더(feeder) 세포(250,000 T 세포 당 4 천만 개의 세포) 에서 확장된다. 상기 확장은 원하는 수의 T 세포를 얻기 위해 충분한 시간 동안, 예를 들어 약 4-14 일(4-9 일, 7-10 일, 8-12 일, 9-14 일, 또는 9-11 일) 동안 수행된다. 일부 실시예에서, 상기 T 세포는 5 일, 8 일 및 11 일에 신선한 IL-2로 보충된다. 일부 비 제한적 실시예에서, 상기 확장은 확장 프로토콜의 9-14 일로부터 1-5 일 동안 WAVE 생물반응기 (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA) 에서 선택적으로 수행될 수 있다. 당업자는 본 명세서에 기재된 형질도입된 T 세포에 적용될 수 있는, 다른 생체외 T 세포의 확장 방법을 확인할 수 있다(U.S. Pat. No. 5,827,642 and Riddell and Greenberg, *J. Immunol. Meth.* 128:189-201, 1990, incorporated herein by reference in their entirety 참조).

[0080] 상기 형질도입된 (변형된) T 세포는 개체에 투여되기 전에 해동된다(이전에 동결된 경우). 상기 개체는 변형된 T 세포를 투여하기 전에 면역억제요법(예를 들어, 림프구제거요법)을 겪을 수 있다. 일 실시예에서, 상기 변형된 T 세포를 투여하기 전에 개체에게 사이클로포스파마이드 및/또는 플루다라빈을 투여한다. 비 제한적인 한 실

시예에서, -5 일째 및 -4 일째에 사이클로포스파마이드(예, 60 mg/kg) 및/또는 -5 일 내지 -1 일째에 플루다라빈(예, 25 mg/m^2) 을 개체에 투여한다(여기서 0 일은 상기 변형된 T 세포의 투여 시점이다). 또 다른 비 제한적 실시예에서, 개체에 -5 일째에 사이클로포스파마이드(1,000 mg/m^2 IV)를 투여하고, -5 일 내지 -3 일째에는 플루다라빈(30 mg/m^2)을 투여한다(여기서 0 일은 상기 변형된 T 세포의 투여 시점이다). 상기 변형된 T 세포는 예를 들어 주입에 의해 개체에게 투여된다. 일부 실시예에서, 상기 변형된 T 세포는 약 10^4 내지 10^{12}의 용량(예를 들어, 약 10^4-10^7 세포, 약 10^6-10^9 세포, 또는 약 10^8-10^{12} 세포 또는 약 1x10^6 내지 1x10^9 개의 변형된 T 세포/kg(약 1x10^6, 5x10^6, 1x10^7, 5x10^7, 1x10^8, 5x10^8 또는 1x10^9 세포/kg))으로 투여된다. 개체에서 상기 변형된 T 세포의 확장을 촉진시키고 및/또는 호중구의 회복을 지원하기 위해, 면역계보조요법을 시행할 수 있다. 하나의 비 제한적 실시예에서, 상기 개체에 10 일 동안 IL-2를 투여(예를 들어, 8 시간마다 72,000 iu/kg, iv) 및/또는 +1일째부터 절대 호중구 수가 500 이상이 될 때까지 매일 G-CSF를 투여한다(예를 들어, 300-480 ㎍, sc). 또 다른 실시예에서, 상기 면역계보조요법은 변형된 T 세포의 투여 후 7일 동안 12시간마다 2x10^6 i.u./m^2 를 투여하는 것을 포함한다.

[0081] 치료 효능은 종양 크기, 병변의 수, 종양 단계, 반응 속도 또는 당 업자에게 공지된 기준과 같은 표준 방법에 의해 관찰된다. 일부 실시예에서, 원발성 종양의 크기 또는 전이의 감소는(예를 들어, 표준 RECIST 또는 irRECIST 기준에 의해 정의된 바와 같은) 개체에서 RCC가 억제되었음을 의미한다(Eisenhauer *et al., Eur. J. Cancer* 45:228-247, 2009; Wolchock *et al., Clin. Cancer Res.* 15:7412-7420 참조; 이들 모두는 본 명세서에 참고 문헌으로 인용된다). 다른 실시예에서, 무진행 생존율 및/또는 전체 생존율(예를 들어, 1 개월, 3 개월, 6 개월, 9 개월, 12 개월, 18 개월, 2 년 또는 그 이상, 1-12 개월, 6-18 개월, 1-2 년 또는 그 이상)은 개체에서 RCC가 억제되었음을 의미한다. 다른 실시예에서, 순환 HERV-E TCR이 형질도입된 CD34+ 또는 CD8+/CD34+ T 세포의 지속성, 면역세포 서브세트의 변화 및 T 세포의 활성화 상태 그리고 다른 면역학적 결정자의 하나 이상의 증상이 치료 중 다른 시점에서, 그리고 병의 진행시에 평가된다.

[0082] 일부 실시예에서, 상기 개체에는 또한 형질도입된 T 세포로 치료하기 전, 동시에 또는 후에, 하나 이상의 치료제, 외과적 절제술 및/또는 방사선 요법과 같은 하나 이상의 추가 적인 치료를 수행한다. 당업자는 RCC를 갖는 개체에게 본 명세서에 개시된 변형된 T 세포와 함께 투여하기 위한 치료제를 선택할 수 있다. 상기 치료제는 항-VEGF 제제(파조파닙, 소라페닙, 수니티닙, 엑시티닙, 카보잔티닙, 소라페닙, 렌바티닙 및/또는 베바시주맙 등), mTOR 억제제(템시롤리무스 및/또는 에베롤리무스 등), 면역관문 억제제(니볼루맙 등), 및/또는 사이토카인 요법제(IFNα 및/또는 IL-2 등) 등을 포함한다.

[0083] **실시예**

[0084] 하기 실시예는 특정 특징 및/또는 양태를 설명하기 위해 제공된다. 단 본 발명의 내용이 하기 실시예에 개시된 특정 특징 또는 양태에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0085] **실시예 1**

[0086] **HERV-E CT-RCC1 반응성 CD8$^+$ T 세포로부터 T 세포 수용체의 클로닝**

[0087] CD8+ HLA-A11 제한된 RCC 반응성 T 세포 클론은 이전에 확인되었다 (Takahashi *et al., J. Clin. Invest.* 118:1099-1109, 2008). 상기 RCC 반응성 CTL은 HERV-E 펩타이드 ATFLGSLTWK(서열번호 1)를 인식한다(Takahashi *et al.*, 2008). 총 RNA는 ccRCC 세포 HLA-A11를 제한적으로 인식하는 T 세포 클론으로부터 추출되었고, 전장 TCR 사슬은 5 'RACE에 의해 동정되었다. TCR α 및 β 사슬을 코딩하는 핵산은 각각 서열번호 2 및 3으로 본 명세서에 기재되어 있다. 상기 TCR α 및 β 사슬의 아미노산 서열은 각각 서열번호 4 및 5로서 본 명세서에 기재되어있다.

[0088] 상기 TCR α 및 β 사슬을 코딩하는 핵산(서열번호 2 및 3)을 β 사슬에 연결된 절단된 CD34 분자를 포함하는 레트로바이러스 구조물에 클로닝하였다(도 1). 상기 절단된 CD34의 카세트는 세포외 및 막횡단 도메인을 포함하지만 세포 내 신호전달 영역이 없으므로 세포에서는 기능하지 않지만 그의 발현은 CD34의 표면 발현에 기초하여 형질도입된 T 세포를 농축하도록 한다. 상기 벡터의 서열은 서열번호 6으로 제공된다.

[0089] **실시예 2**

[0090] **ccRCC 세포에 대한 HLA-A11 제한 TCR로 형질도입된 T 세포의 반응성**

[0091] 2명의 건강한 공여자로부터 수득한 PBMC를 실시예 1에 기술된 벡터로 형질 도입시켰다. 상기 형질도입된 T 세포는 $HLA\text{-}A11^+$ 및 $HERV\text{-}E^+$ ccRCC 세포를 특이적으로 사멸시켰다(도 3a 및 3b). CT-RCC-1 펩타이드(서열번호 1)의 첨가는 HERV-E 음성 및 HERV-E 양성 세포 모두에 대해 예상대로 반응성을 증가시켰다(도 3a 및 3b).

[0092] **실시예 3**

[0093] **생산자 클론(producer clones) 개발**

[0094] 실시예 1에 기술된 TCR을 함유하는 레트로바이러스 벡터를 PG13 패키징 세포주에 도입하여 임상적 용도를 위한 고역가의 레트로바이러스 생산자 클론을 분리하였다. 상기 PG13 생산자 세포주를 제한희석으로 클로닝하여 고역가 클론을 생성시켰다. 그 후, 상기 클론이 인간 T 세포에 효과적으로 형질도입되어 항-HERV-E 반응성을 전달하는지를 스크리닝 하였다. 추가 테스트를 위해 2개의 클론(7G1 및 27A7)을 선택하였다.

[0095] 상기 목적을 위해, 각 클론으로부터 레트로바이러스를 제조하고 전체 규모의 검증 작업을 2회 수행하였다. 2명의 건강한 기증자로부터 얻은 T 세포를 클론 7G1 또는 27A7의 레트로바이러스로 형질도입 시켰다. 상기 세포의 63.2% 및 67.5% ($\bar{X}$=65.4%) 또는 65.2% 및 61.6% ($\bar{X}$=63.4%)가 각각 $CD34^+$ 였으며, 이는 두 클론 모두 동일한 효율로 T 세포를 형질도입 시켰음을 의미한다. 면역-자기 비드(immune-magnetic beads)를 사용한 상기 형질도입된 세포의 CD34 정제 이후, 그 배양물은 각각 99.3% 및 98.4% ($\bar{X}$=98.9%) 또는 99.4% 및 99.7%($\bar{X}$=99.6%)가 $CD34^+$ 였으며, 이는 T 세포가 순수한 TCR로 형질도입 되었음을 의미한다. 두 클론에 대해 바이알 당 $5x10^6$ 세포로 마스터 세포 은행을 만들었다(7G1의 경우 212 개의 바이알 및 27A7의 경우 220 개의 바이알). 7G1 클론으로부터 바이러스를 대형 3 리터 배치(batch)로 준비하고 7G1 클론과 7G1 바이러스를 인디아나 대학(Vector Production Facility/National Gene Vector Biorepository at Indiana University)에 보내 GMP 인증을 취득하였다.

[0096] **실시예 4**

[0097] **HERV-E TCR로 형질도입된 T 세포의 평가**

[0098] PG13 레트로바이러스 생산자 클론 7G1의 상등액을 사용하여 정상 PBL 유래 T 세포를 형질도입 시켰다. 형질도입 3일 후, 상기 세포를 항-CD34로 코팅된 면역 자기 입자와 함께 배양하고 CliniMACS를 사용하여 정제한 후 CD34 발현 관찰을 위해 염색 하였다. 선별 전에는 상기 세포의 63.2%가 CD34를 발현하였다; 이는 선별 후 99.3%로 증가하였다(도 4a). 상기 $CD34^+$ 세포는 CD3을 발현하였으며(도 4b), HERV-E 사량체에 양성으로 염색되었다(도 4c). 상기 CD34-선별된 세포는 주로 $CD8^+$ 세포였으며(도 5a), $CD4^+$ 세포는 적었다(도 5b).

[0099] 실시예 2에 기재된 바와 같이 형질도입된 T 세포를 평가하였다. 크롬 방출 세포 독성에 의해 결정된 바와 같이, 상기 형질도입된 T 세포는 $HLA\text{-}A11^+$ 및 $HERV\text{-}E^+$ ccRCC 세포를 특이적으로 사멸시켰다(도 6a 및 6b). CT-RCC-1 펩타이드(서열번호 1)의 첨가는 HERV-E 음성 세포에 대한 반응성을 증가시켰다(도 6a 및 6b). 공여자 1로부터 수득한 T 세포 집단은 39.9%가 $CD8^+$이었고(도 6a), 공여자 2로부터 수득한 T 세포 집단은 52.8%가 $CD8^+$이었다(도 6b).

[0100] 건강한 공여자로부터 수득하고 실시예 1에 기재된 벡터로 형질도입된 PBMC의 RCC 세포 및 T 세포에 대한 특이적 사멸에 대해 시험 하였다. $HLA\text{-}A11^+$ 및 HERV-E 발현 SAUJ-RCC 세포는 특이적으로 사멸하였으나 $HLA\text{-}A11^-$ HERV-E 음성세포(SAUJ-LCL)는 그렇지 않았다(도 7). $HLA\text{-}A11^-$ 세포는 또한 HERV-E를 발현하든(LYO-RCC) 발현하지 않든(LYO-LCL) 사멸하지 않았다. 마지막으로, $HLA\text{-}A11^+$ 공여자로부터 수득한 T 세포는 사멸하지 않았다(도 7).

[0101] HERV-E TCR로 형질도입된 T 세포의 항원 특이성을 ccRCC 세포주 패널을 표적으로 사용한 효소-결합 면역흡착분석법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)으로 인터페론-γ(INF-γ) 분비를 측정하여 평가하였다. 도 8은 형질도입된 T 세포가 HLA-A11-양성 및 CT-RCC HERV-E-발현 ccRCC 세포와 함께 배양하는 경우에만 INF-γ를 생성한다는 것을 보여준다(>배경값의 2배 및 >1 ng/ml).

[0102] **실시예 5**

[0103] **HERV-E TCR로 형질도입된 T 세포의 안전성 및 내약성 결정**

[0104] 이 실시예에서는 HERV-E TCR로 형질도입된 T 세포로 ccRCC를 치료하는 경우, 그 안전성과 내약성을 결정하는 데 사용할 수 있는 방법을 설명한다. 그러나, 당업자에게는 HERV-E TCR로 형질도입된 T 세포의 안전성 및 내약성을 성공적으로 결정하기 위해 하기 특정 방법 이외의 방법도 사용할 수 있음이 자명하다.

[0105] 도 9는 HERV-E TCR로 형질도입된 T 세포의 안전성 및 내약성을 결정하기 위한(임상적 이행 전에) 예시적인 프로토콜을 나타내는 개략도이다.

[0106] 외과적 절제를 시행하기 어려우며 임상적 또는 방사선 영상학적으로 점진적으로 2 차원적으로 평가할 수 있고 HLA-A11 양성인 전이성 HERV-E 양성 ccRCC를 지닌 개체를 선택한다. 개체로부터 15-20 리터의 백혈구 분리반출법으로 $1x10^{10}$ 개 정도의 PBMC를 수득하였다(선택적으로 냉동보존 한다). 이어서, PBMC ($6x10^8$ - $2x10^9$ 세포)를 해동시키고 항-CD3(예, 50 ng/ml OKT3) 및 IL-2 (300 IU/ml, 선택적으로 100 ng/ml의 IL-15)를 포함하는 배지에서 2-3일 동안 활성화시킨 후, 면역 자기성 방법을 사용하여 CD4 발현 세포를 고갈시켰다. HLA-A11 제한 HERV-E TCR 및 CD34t(실시예 1에 기술된 것과 같은)를 코딩하는 레트로바이러스로 약 $200x10^6$ T 세포를 형질도입 시켰다. 형질도입 후, kg 당 $0.5-1x10^6$ 개의 형질도입된 T 세포를 $CD34^+$ 면역-자기 비드 선택을 수행하여 농축한 다음, IL-2/IL-15를 포함한 배지 (300 IU/ml의 IL-2 및 100 ng/ml의 IL-15)에서 방사선 조사된 동종이계의 PBMC 피더 세포(건강한 3명의 공여자로부터 모아진)를 사용하여 9-11 일 동안 체외에서 확장시켰다.

[0107] 일부 구현예에서, 양성으로 선택된 $CD34^+$ T 세포는 주입에 필요한 수의 세포를 신속하게 생성하기 위해 REP에 위치시킨다. REP에 위치된 형질도입된 세포의 수는 환자의 체중과 주입 코호트(infusion cohort)에 의해 결정된다. REP를 개시하기 위해 $1x10^6$ 개의 HERV-E TCR로 형질도입된 세포를 30 ng/mL의 수용성 항-hCD3 항체 (OKT3)가 포함된 150 ml의 완전한 사이토카인 배지(rhIL2/rhIL15)가 들어있는 직립형 T175 cm^2 플라스크에서 $200x10^6$ 개의 피더 세포와 결합시킨다. 상기 피더 세포는 최소 3 명의 정상 공여자의 PBMC로 구성되어 함께 혼합되고 5000 RAD의 조사량으로 조사된다. 상기 플라스크를 가습된 5% CO_2 배양기에서 5 ~ 6 일 동안 똑바로 세워서 배양한다. 상기 플라스크를 배양기에서 꺼내어 세포를 수확하고 그 수를 카운트하고 300 IU/mL의IL2 및 100 ng/mL의 IL15가 함유 된 신선한 배지에 재현탁 시킨다. 상기 세포 현탁액은 추가 확장을 위해 웨이브 바이오리액터 백(Wave bioreactor bag)으로 옮겨진다. 상기 배양배지는 웨이브 바이오리액터 관류 시스템을 이용하여 사이토카인을 함유하는 새로운 배지로 매일 보충되었다.

[0108] 상기 형질도입 및 확장된 T 세포는 개별 개체에게 면역억제 화학요법으로 후속 주입하기 위해 적절한 용량 수준(아래 참조)으로 동결 보존된다.

[0109] 3 개체는 4 가지의 T 세포 용량 증가 코호트 ($5x10^6$ T 세포/kg, $5x10^6$ T 세포/kg, $1x10^7$ T 세포/kg, 또는 $5x10^7$ T 세포/kg)의 각각에 순차적으로 등록된다. 상기 개체들은 시이클로포스파마이드(1,000 mg/m^2 IV, -5 일)와 플루다라빈(30 mg/m^2 i.v.)으로 매일 30 분 이상 3 일간 (-5 일 내지 -3 일) 골수 비파괴성 면역억제 전처치를 수행하였다. 0 일 째에 HERV-E TCR로 형질도입된 T 세포를 주입하여 표적화된 T 세포를 투여하였다. 주입 전에, 상기 T 세포를 최종 계수하고, 생존력 및 불임 평가를 수행하였다. T 세포 주입 후, 상기 개체는 주입 관련 독성의 징후를 관찰하기 위해 최대 4시간 동안 모니터링된다. T 세포 주입 전의 전처치에는 아세트아미노펜 및 베나드릴(i.v.)을 이용하였다. T 세포 주입 후, 상기 개체에 2,000,000 IU/m^2 의 IL-2 (i.v.)를 7 일 동안 (0 일부터 6 일째까지), 300 ㎍의 G-CSF 를 1 일째부터 호중구 회복시 (ANC> 500)까지 매일 투여한다. 상기 개체들은 호중구 회복후 퇴원하여 6 ~ 8 주간 일주일 간격으로 방문하여 신체 검사 및 체중을 포함한 표준 평가를 받으며 정기적인 임상 실험 (혈액학 및 전해질)을 받는다. T 세포 주입 30 일 후, RECIST 기준을 사용한 PET 및 CT 영상을 이용하여 리스테이징을 수행하였으며, 이후 첫 1 년 동안 3 개월마다 그 후에는 종양 진행에 대한 증거가 나타날 때까지 6 개월마다 수행하였다.

[0110] 투여량의 증가, 감소 또는 중단의 결정은 표 2에 요약된 규칙을 따른다.

표 2

[0111]

결과: 주어진 용량 수준에서 전체 환자 수 중 DLT 수	결정 규칙
3명의 환자 중 0 DLT	다음 용량 수준에서 최대 3명의 환자를 넣는다.
2-3명의 환자 중 2 DLT	용량 증가 중지: 이 용량에서 3명의 환자만 치료받은 경우 이전 용량 수준에서 최대 3명의 환자를 더 넣는다.
3명의 환자 중 1 DLT	같은 용량 수준에서 최대 3명의 환자를 더 넣는다.
6명의 환자 중 1 DLT	다음 용량 수준에서 최대 3명의 환자를 넣는다.
4-6명의 환자 중 2 DLT	용량 증가 중지: 이 용량에서 3명의 환자만 치료받은 경우 이전 용량 수준에서 최대 3명의 환자를 더 넣는다.

[0112] DLT: 용량 제한 독성(dose-limiting toxicity)

[0113] 적응(adoptive) T 세포 전이와 관련된 이상 반응은 일반적으로 T 세포 주입 후 21 일 이내에 발생하므로 코호트의 다음 대상 또는 다음 코호트의 첫 번째 대상이 치료되기 전에 각 개체는 T 세포 주입 후 21 일 동안 관찰된다. 그러므로, 등록된 다음 환자가 컨디셔닝 화학요법을 시작하기 전에 각 환자에 대한 HERV-E TCR로 형질도입된 T 세포 주입 사이에 최소 21 일 간의 간격이 있다. 용량 제한 독성(dose-limiting toxicity, DLT)은 HERV-E TCR로 형질도입된 $CD8^+/CD34^+$ T 세포 주입과 관련이 있다고 판단되는 T 세포 주입의 중단 및/또는 모든 등급 3 및 4 독성을 유발하는, 하기를 제외한 임의의 이상 작용으로 정의된다:

[0114] - 림프구 감소증, 호중구 감소증 및 혈소판 감소증으로 정의되는 골수 억제.

[0115] - IL-2 예상 독성 (14.3 절에서 설명).

[0116] - 플루다라빈 및 사이클로포스파마이드 예상 독성.

[0117] - 세포 주입 2 시간 이내에 발생하는 즉각적인 과민 반응 (증상이 있는 기관지 경련 및 등급 4저혈압 제외), 이는 표준 지지요법으로 세포 투여 24 시간 이내에 등급 2또는 그 이하가 될 수 있는 가역적인 것이다.

[0118] - 등급 3의 발열.

[0119] - 10 일 이내에 등급 2 의 자가면역 독성보다 작아지거나 같아질 수 있는 등급 3의 자가면역.

[0120] - 7 일 이내에 등급 2가 될 수 있는, 심각한 임상 후유증이 없는 등급3의 대사 검사 이상.

[0121] 순환하는 HERV-E TCR로 형질도입된 T 세포를 평가하기 위해 혈액 샘플을 T 세포 주입 후의 여러 시점에서 추출하고, CD34를 발현하는 $CD3^+$ 세포의 백분율 및 절대수를 정량적으로 분석하였다. 생검이 용이한 종양을 가진 환자에서는 전이성 종양 병변의 미세 바늘 흡인을 선택하여 HERV-E TCR로 형질도입된 T 세포를 상기와 동일한 방법으로 평가하였다. 개체는 최대 5 년까지 추적 관찰하며 질병 진행이 기록된 경우 연구에서 제외된다.

[0122] **실시예 6**

[0123] **HERV-E TCR로 형질도입된 T 세포를 이용한 신세포암 치료**

[0124] 이 실시예에서는 HERV-E TCR로 형질도입된 T 세포를 RCC 환자의 치료에 사용할 수 있는 방법을 설명한다. 그러나, 당업자에게는 HERV-E TCR로 형질도입된 T 세포로 RCC 환자를 성공적으로 치료하기 위해 하기 특정 방법 이외의 방법도 사용할 수 있음은 자명하다.

[0125] 도 10은 RCC 환자를 치료하기 위한 프로토콜의 일례를 나타내는 개략도이다.

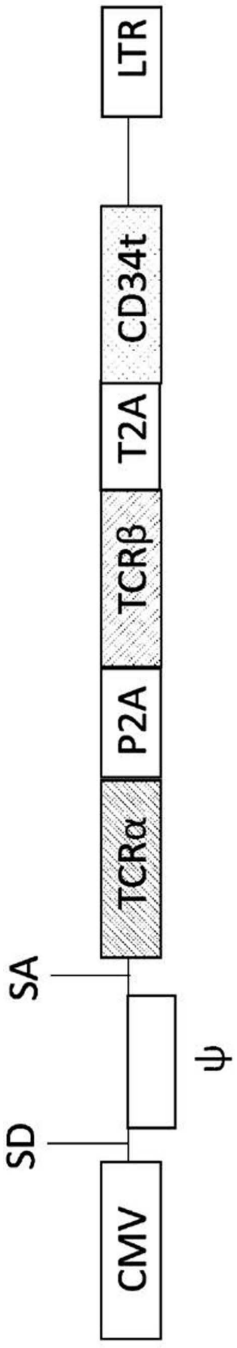
[0126] HLA-A11 양성이고 HERV-E 양성인 RCC (전이성 ccRCC) 환자에게서 T 림프구를 수득하기 위해 분리 출 을 시행하였다. T 세포는 2 일 동안 시험관 내에서 30 ng/ml의 항-CD3 항체 및 300 IU/ml의 IL-2로 활성화시켰다. 상기 T 세포를 본 명세서에 기술된 HERV-E 특이적 TCR (예, 서열번호 6)을 포함하는 레트로바이러스 벡터로 형질도입시켰다. 림프구를 7 ~ 14 일 동안 30 mg/ml의 항-CD3 및 30 ng/ml의 항-CD28을 이용하여 확장시켰다. 개체에서 화학요법으로 림프구 고갈을 유도하고 (실시예 3에서 기술된 바와 같이), 상기 형질도입된 T 세포를 MTD(예를 들어, 실시예 5에 기재된 바와 같이 결정됨)에서 IL-2 지지체와 함께 주입하였다.

[0127] 본 발명의 원리가 적용될 수 있는 다수의 가능한 구현예에서, 설명된 구현예는 단지 예시일 뿐이며, 본 발명의

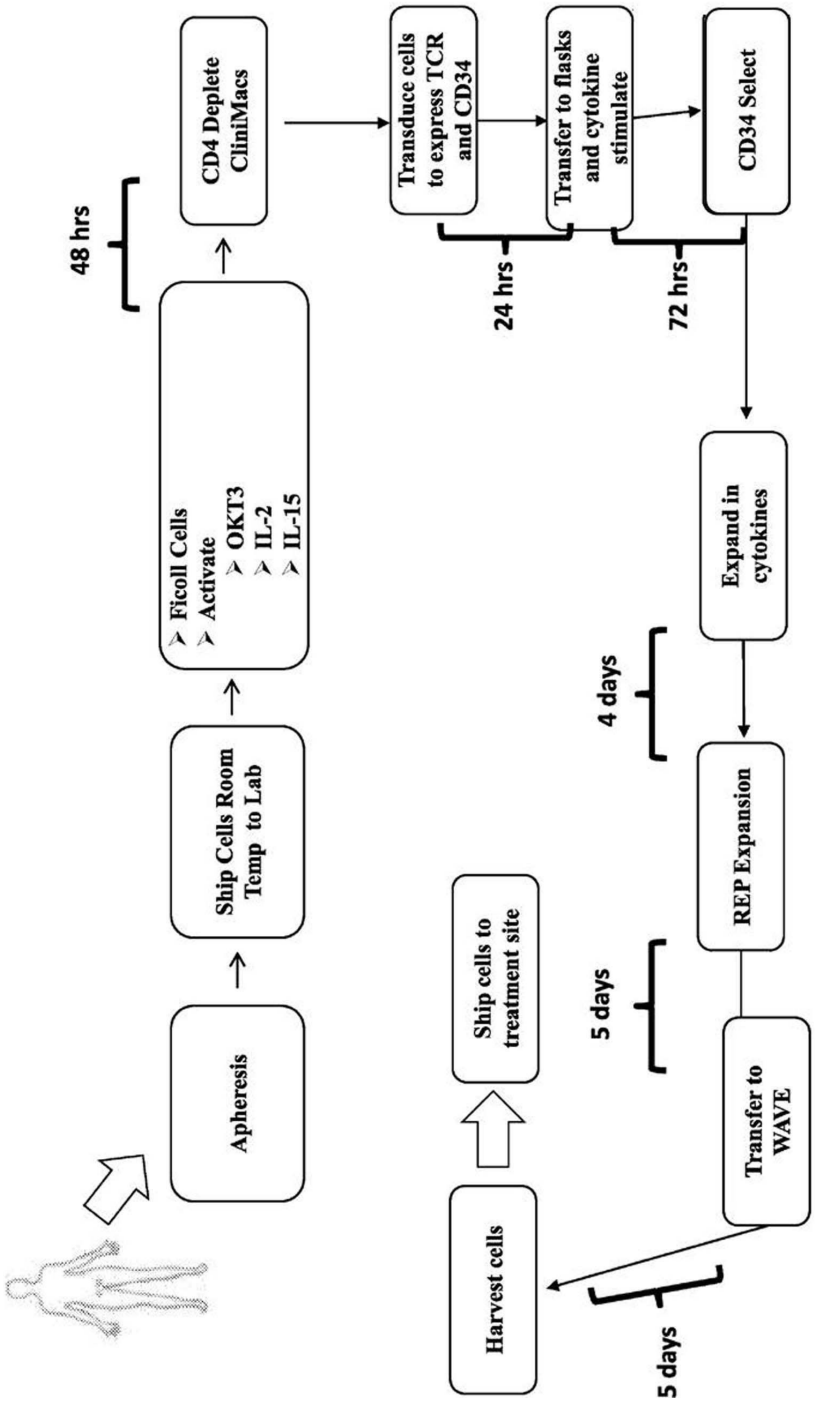
범주를 제한하는 것은 아니다. 오히려, 본 발명의 범주는 하기의 청구항에 의해 한정된다. 따라서 본 발명자들은 하기 청구항의 범위 및 의미(spirit) 안에서 나오는 모든 것을 본 발명으로 주장하는 바이다.

도면

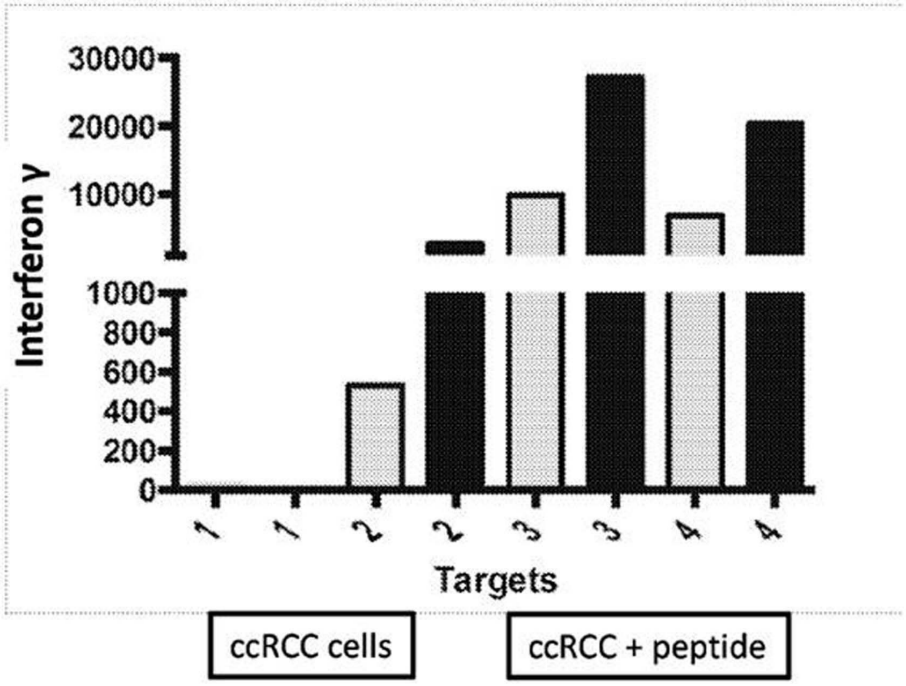
도면1



도면2


Apheresis
Ship Cells Room Temp to Lab
Ficoll Cells
Activate
OKT3
IL-2
IL-15
48 hrs
CD4 Deplete CliniMacs
Transduce cells to express TCR and CD34
24 hrs
Transfer to flasks and cytokine stimulate
72 hrs
CD34 Select
Expand in cytokines
4 days
REP Expansion
5 days
Transfer to WAVE
5 days
Harvest cells
Ship cells to treatment site

도면3a



Donor 1 – grey columns
Donor 2 – black columns

Targets:

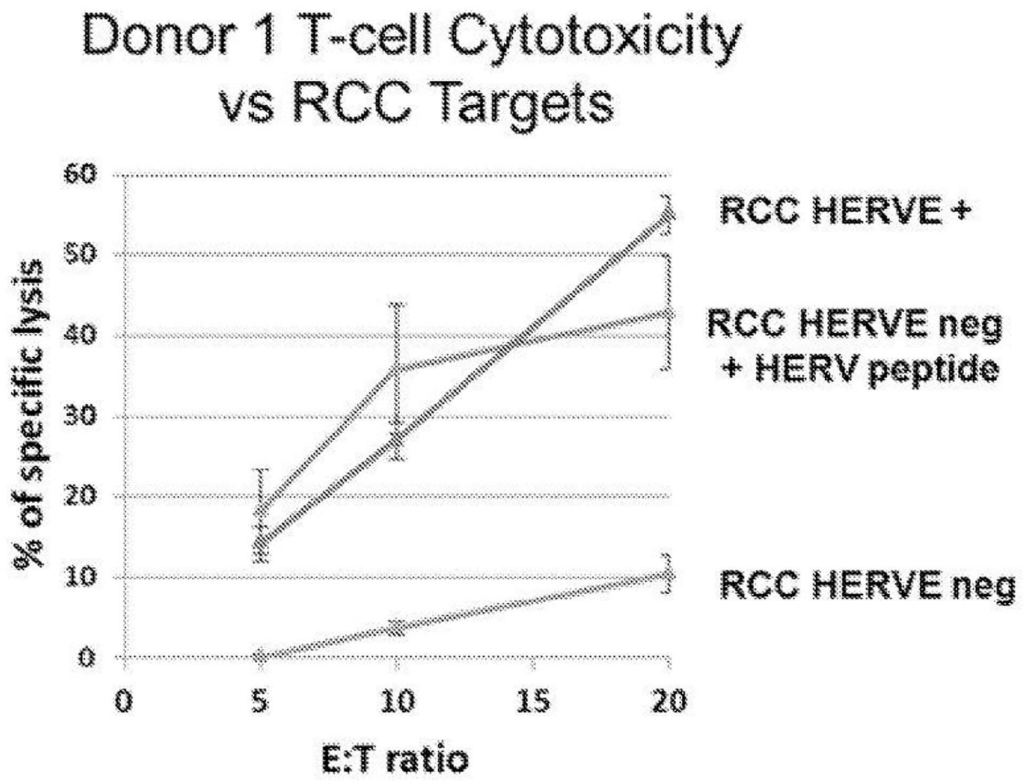
1 – ccRCC HERV-E neg/ HLA-A11+

2 – ccRCC HERV-E +/ HLA-A11+

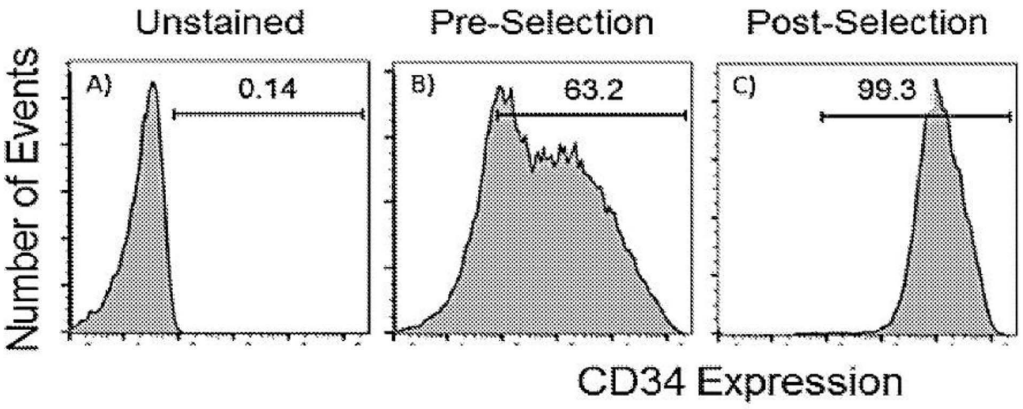
3 – ccRCC HERV-E neg/ HLA-A11+
+ CT-RCC-1 peptide

4 – ccRCC HERV-E +/ HLA-A11+
+ CT-RCC-1 peptide

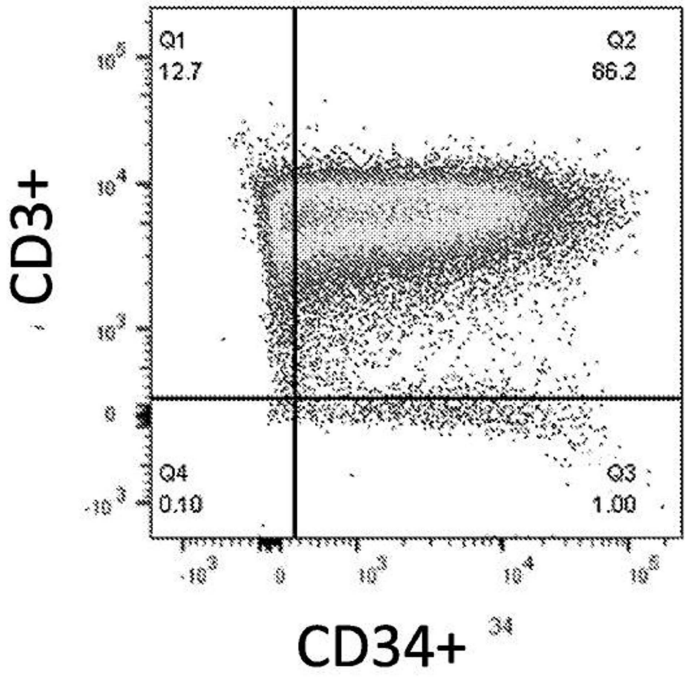
도면3b


Donor 1 T-cell Cytotoxicity
vs RCC Targets
% of specific lysis
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
20
E:T ratio
RCC HERVE +
RCC HERVE neg
+ HERV peptide
RCC HERVE neg

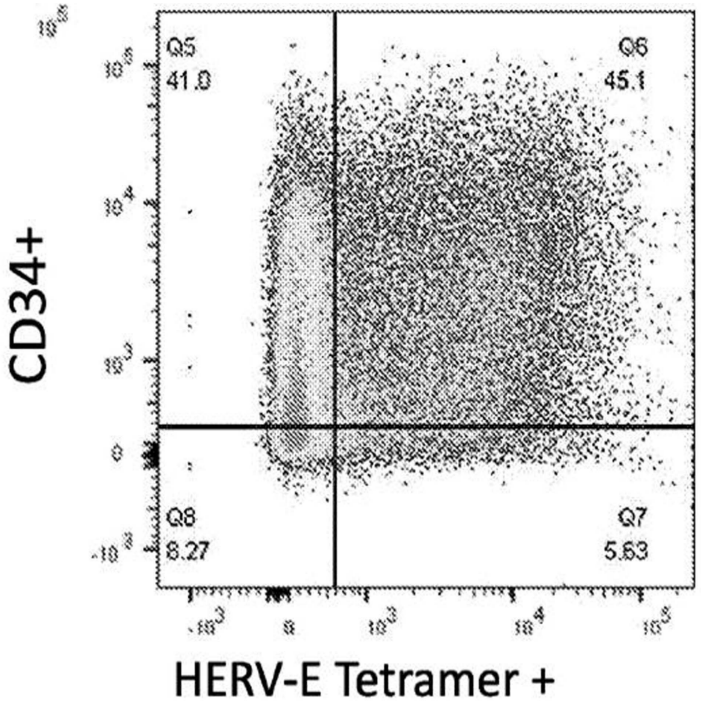
도면4a


Unstained
Pre-Selection
Post-Selection
Number of Events
A)
0.14
B)
63.2
C)
99.3
CD34 Expression

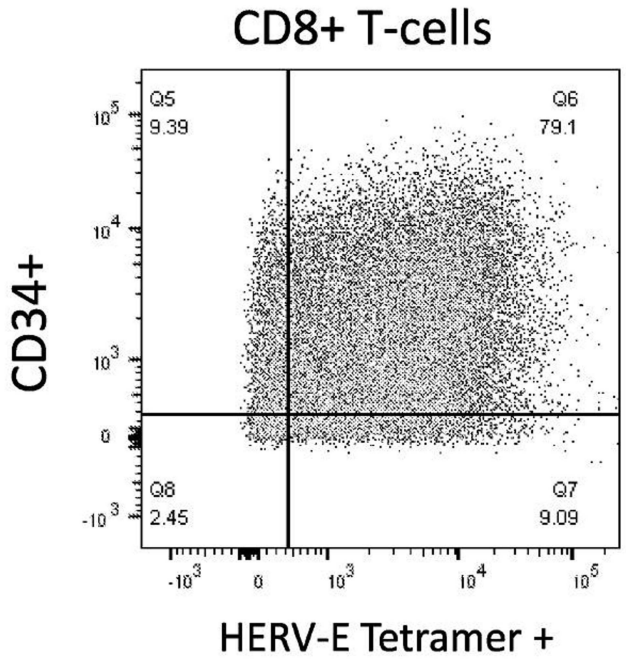
도면4b


Q1
12.7
Q2
86.2
Q4
0.10
Q3
1.00
CD3+
CD34+

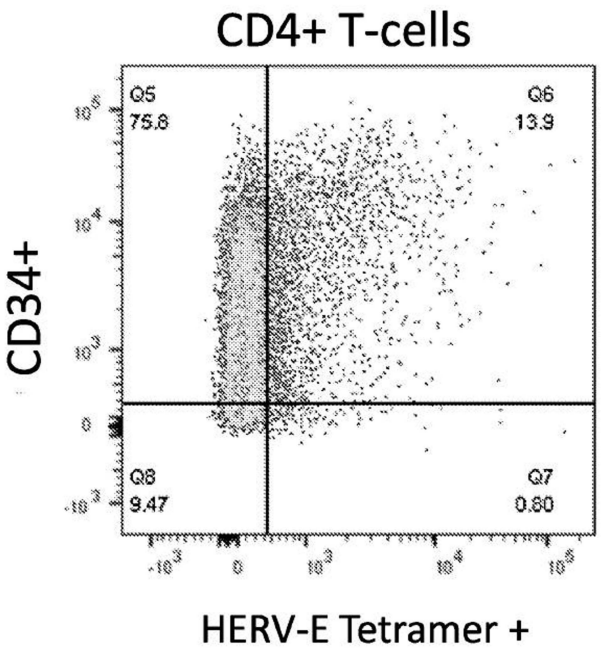
도면4c


Q5
41.0
Q6
45.1
Q8
8.27
Q7
5.63
CD34+
HERV-E Tetramer +

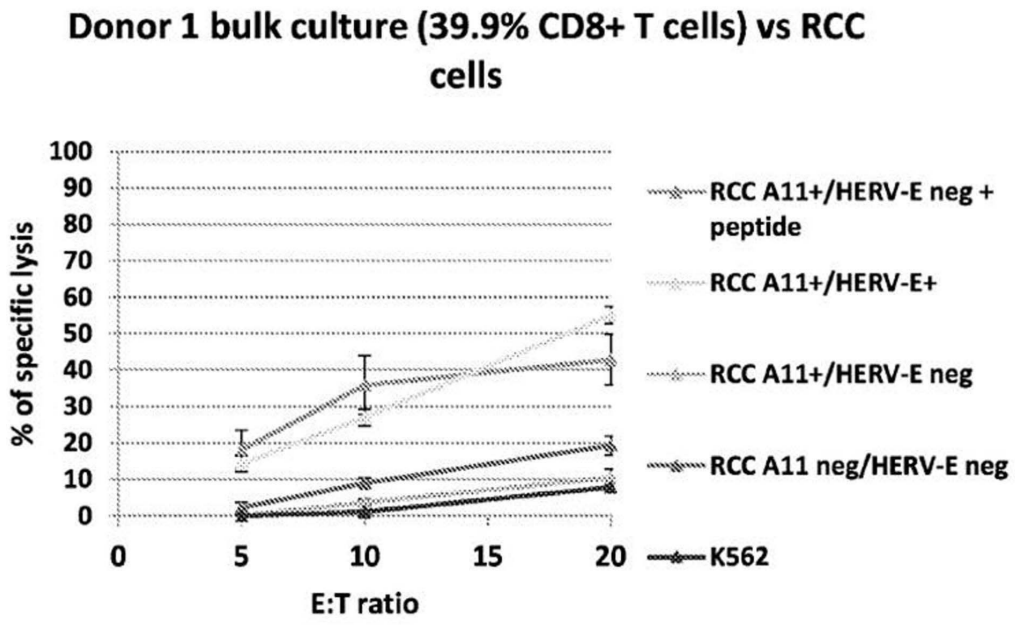
도면5a


CD8+ T-cells
Q5
9.39
Q6
79.1
Q8
2.45
Q7
9.09
CD34+
HERV-E Tetramer +

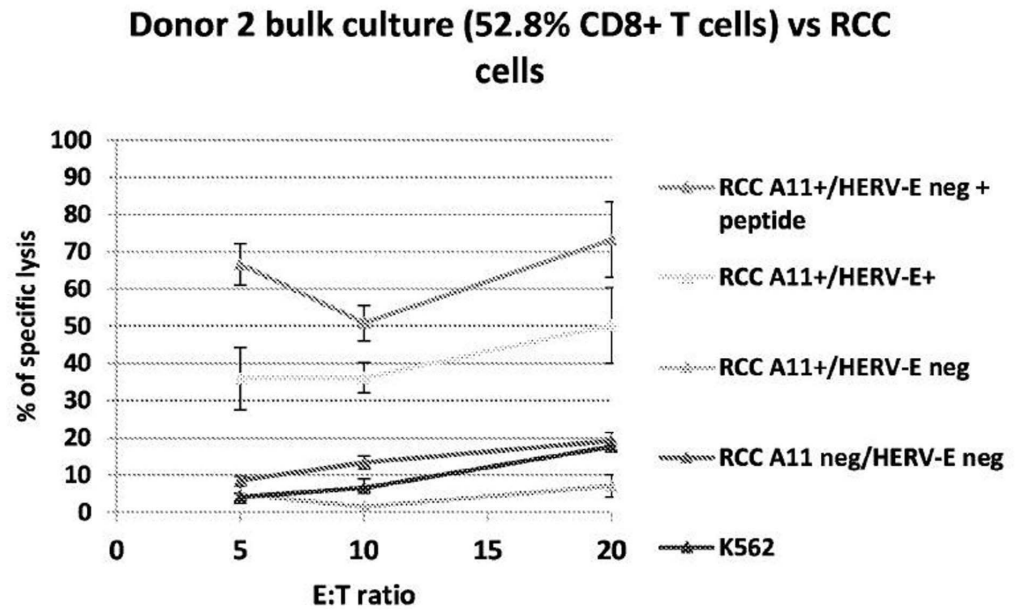
도면5b


CD4+ T-cells
Q5
75.8
Q6
13.9
Q8
9.47
Q7
0.80
CD34+
HERV-E Tetramer +

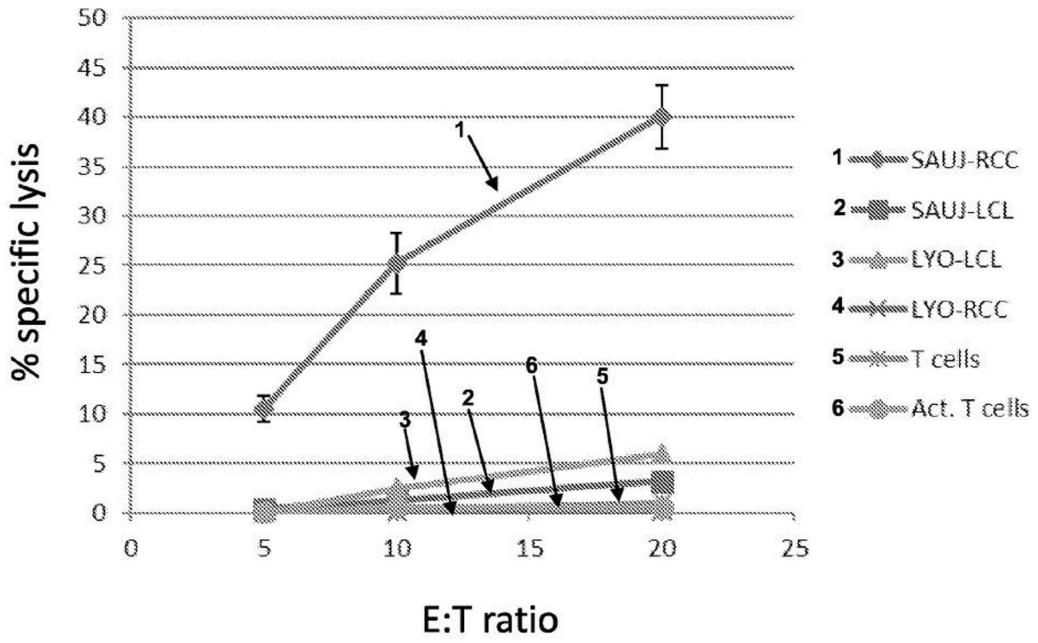
도면6a


Donor 1 bulk culture (39.9% CD8+ T cells) vs RCC cells
% of specific lysis
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
20
E:T ratio
RCC A11+/HERV-E neg + peptide
RCC A11+/HERV-E+
RCC A11+/HERV-E neg
RCC A11 neg/HERV-E neg
K562

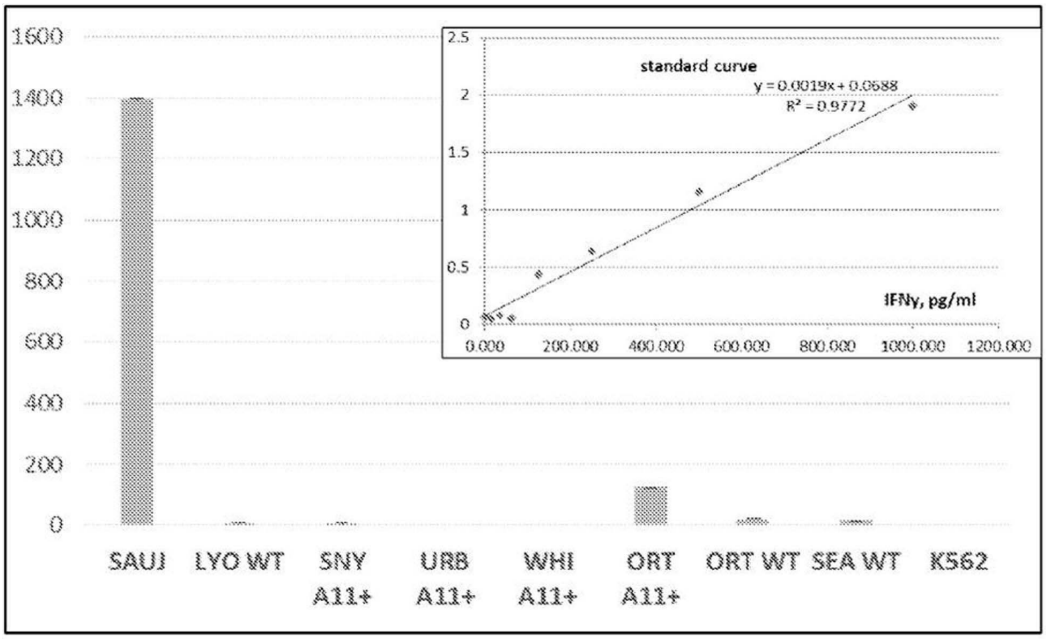
도면6b


Donor 2 bulk culture (52.8% CD8+ T cells) vs RCC cells
% of specific lysis
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
20
E:T ratio
RCC A11+/HERV-E neg + peptide
RCC A11+/HERV-E+
RCC A11+/HERV-E neg
RCC A11 neg/HERV-E neg
K562

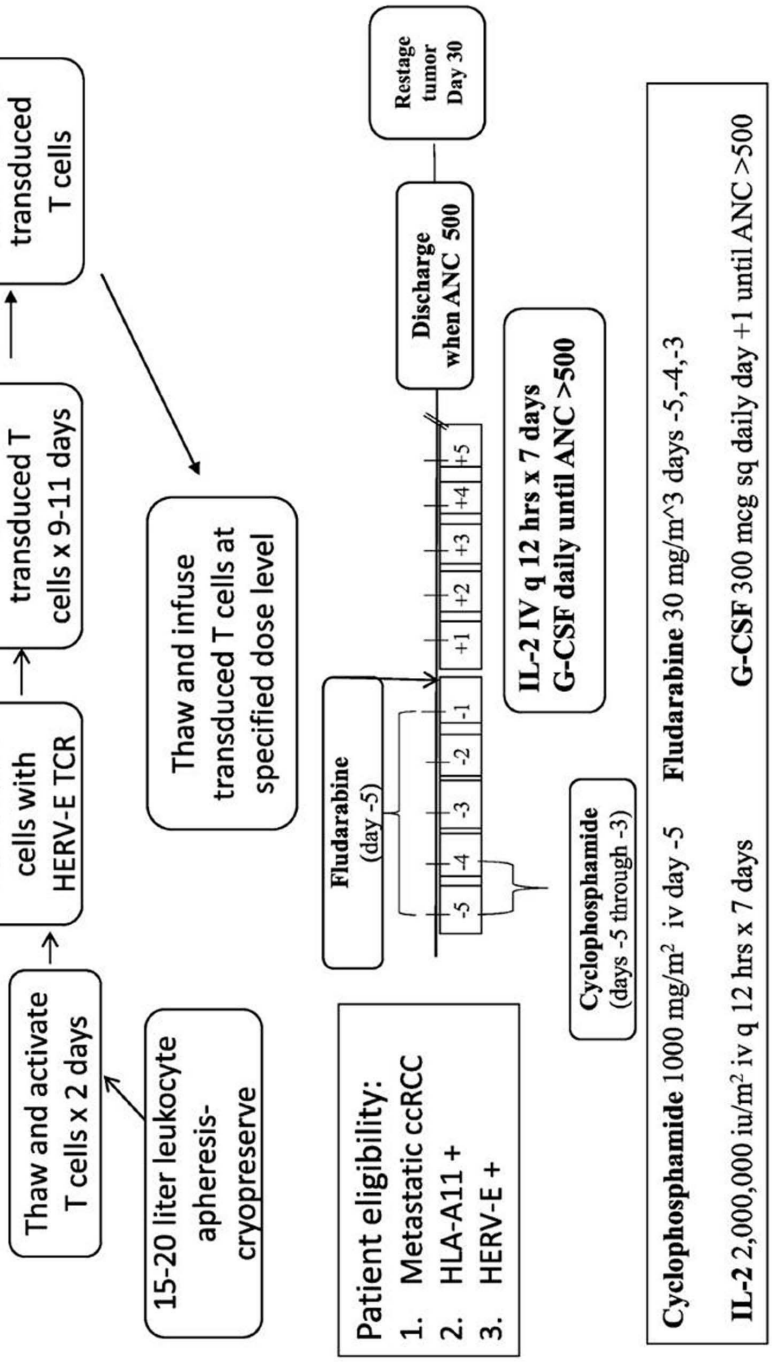
도면7


% specific lysis
E:T ratio
1 SAUJ-RCC
2 SAUJ-LCL
3 LYO-LCL
4 LYO-RCC
5 T cells
6 Act. T cells

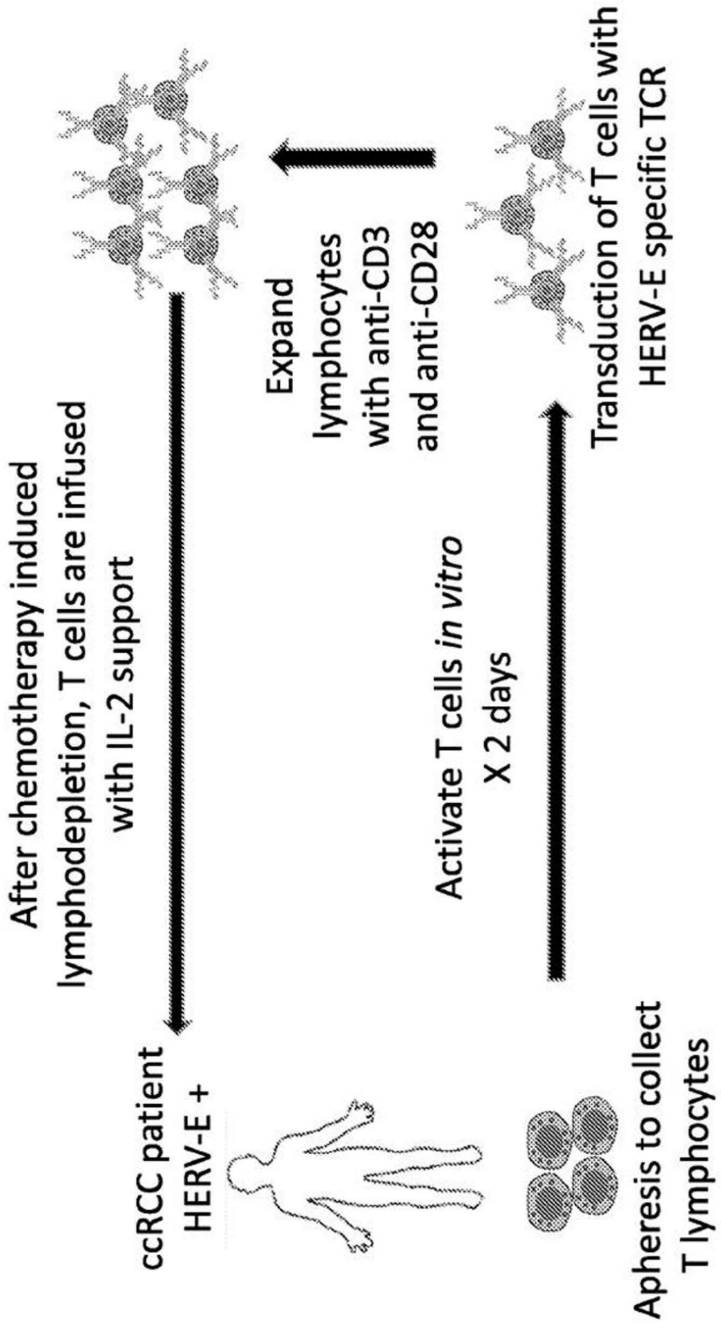
도면8


standard curve
y = 0.0019x + 0.0688
R² = 0.9772
IFNγ, pg/ml
SAUJ
LYO WT
SNY A11+
URB A11+
WHI A11+
ORT A11+
ORT WT
SEA WT
K562

도면9


Cryopreserve transduced T cells
Expand transduced T cells x 9-11 days
Transduce T cells with HERV-E TCR
Thaw and activate T cells x 2 days
15-20 liter leukocyte apheresis-cryopreserve
Thaw and infuse transduced T cells at specified dose level
Patient eligibility:
1. Metastatic ccRCC
2. HLA-A11 +
3. HERV-E +
Fludarabine (day -5)
Cyclophosphamide (days -5 through -3)
-5 -4 -3 -2 -1 +1 +2 +3 +4 +5
IL-2 IV q 12 hrs x 7 days
G-CSF daily until ANC >500
Discharge when ANC 500
Restage tumor Day 30
Cyclophosphamide 1000 mg/m2 iv day -5 Fludarabine 30 mg/m^3 days -5,-4,-3
IL-2 2,000,000 iu/m2 iv q 12 hrs x 7 days G-CSF 300 mcg sq daily day +1 until ANC >500

도면10



서 열 목 록

<110> The United States of America, as represented by the Loyola University Chicago

<120> HERV-E REACTIVE T CELL RECEPTORS AND METHODS OF USE

<130> 2018FPI-11-007/US

<150> US 62/357,265

<151> 2016-06-30

<160> 7

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HERV-E peptide

<400> 1

Ala Thr Phe Leu Gly Ser Leu Thr Trp Lys

1 5 10

<210> 2

<211> 807

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgaagagga tattgggagc tctgctgggg ctcttgagtg cccaggtttg ctgtgtgaga 60

ggaatacaag tggagcagag tcctccagac ctgattctcc aggagggagc caattccacg 120

ctgcggtgca atttttctga ctctgtgaac aatttgcagt ggtttcatca aaacccttgg 180

ggacagctca tcaacctgtt ttacattccc tcagggacaa aacagaatgg aagattaagc 240

gccacgactg tcgctacgga acgctacagc ttattgtaca tttcctcttc ccagaccaca 300

gactcaggcg tttatttctg tgctgtgcga ggaggtgctg acggactcac ctttggcaaa 360

gggactcatc taatcatcca gccctatatc cagaaccctg accctgccgt gtaccagctg 420

agagactcta aatccagtga caagtctgtc tgcctattca ccgattttga ttctcaaaca 480

aatgtgtcac aaagtaagga ttctgatgtg tatatcacag acaaaactgt gctagacatg 540

aggtctatgg acttcaagag caacagtgct gtggcctgga gcaacaaatc tgactttgca 600

tgtgcaaacg ccttcaacaa cagcattatt ccagaagaca ccttcttccc cagcccagaa 660

agttcctgtg atgtcaagct ggtcgagaaa agctttgaaa cagatacgaa cctaaacttt 720

caaaacctgt cagtgattgg gttccgaatc ctcctcctga aagtggccgg gtttaatctg 780

ctcatgacgc tgcggctgtg gtccagc 807

<210> 3

<211> 921

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

atgggctgca ggctgctctg ctgtgcggtt ctctgtctcc tgggagcagt tcccatagac 60

actgaagtta cccagacacc aaaacacctg gtcatgggaa tgacaaataa gaagtctttg 120

aaatgtgaac aacatatggg gcacagggct atgtattggt acaagcagaa agctaagaag 180

ccaccggagc tcatgtttgt ctacagctat gagaaactct ctataaatga aagtgtgcca 240

agtcgcttct cacctgaatg ccccaacagc tctctcttaa accttcacct acacgccctg 300

cagccagaag actcagccct gtatctctgc gccagcagcc ctcccaatga aaaactgttt 360

tttggcagtg gaacccagct ctctgtcttg gaggacctga acaaggtgtt cccacccgag 420

gtcgctgtgt ttgagccatc agaagcagag atctcccaca cccaaaaggc cacactggtg 480

tgcctggcca caggcttctt ccctgaccac gtggagctga gctggtgggt gaatgggaag 540

gaggtgcaca gtggggtcag cacggacccg cagcccctca aggagcagcc cgccctcaat 600

gactccagat actgcctgag cagccgcctg agggtctcgg ccaccttctg gcagaacccc 660

cgcaaccact tccgctgtca agtccagttc tacgggctct cggagaatga cgagtggacc 720

caggataggg ccaaacccgt cacccagatc gtcagcgccg aggcctgggg tagagcagac 780

tgtggcttta cctcggtgtc ctaccagcaa ggggtcctgt ctgccaccat cctctatgag 840

atcctgctag ggaaggccac cctgtatgct gtgctggtca gcgcccttgt gttgatggca 900

atggtcaaga gaaaggattt c 921

<210> 4

<211> 269

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val
1 5 10 15

Cys Cys Val Arg Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile
20 25 30

Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser
35 40 45

Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile
50 55 60

Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser

65 70 75 80

Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser

85 90 95

Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Arg Gly Gly

100 105 110

Ala Asp Gly Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr His Leu Ile Ile Gln Pro

115 120 125

Tyr Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys

130 135 140

Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr

145 150 155 160

Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr

165 170 175

Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala

180 185 190

Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser

195 200 205

Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp

210 215 220

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

225 230 235 240

Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala

245 250 255

Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser

260 265

<210> 5

<211> 307

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Gly Cys Arg Leu Leu Cys Cys Ala Val Leu Cys Leu Leu Gly Ala

1 5 10 15

Val Pro Ile Asp Thr Glu Val Thr Gln Thr Pro Lys His Leu Val Met
20 25 30
Gly Met Thr Asn Lys Lys Ser Leu Lys Cys Glu Gln His Met Gly His

35 40 45
Arg Ala Met Tyr Trp Tyr Lys Gln Lys Ala Lys Lys Pro Pro Glu Leu
50 55 60
Met Phe Val Tyr Ser Tyr Glu Lys Leu Ser Ile Asn Glu Ser Val Pro
65 70 75 80
Ser Arg Phe Ser Pro Glu Cys Pro Asn Ser Ser Leu Leu Asn Leu His
85 90 95
Leu His Ala Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser
100 105 110

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

180 185 190
Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser
195 200 205
Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe
210 215 220
Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr
225 230 235 240
Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp
245 250 255

Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly Val

260 265 270

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

275 280 285

Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg

290 295 300

Lys Asp Phe

305

<210> 6

<211> 7948

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recombinant retroviral vector

<400

> 6

aggcgtatca cgaggccctt tcgtcttcaa gaattcatac cagatcaccg aaaactgtcc 60

tccaaatgtg tccccctcac actcccaaat tcgcgggctt ctgcctctta gaccactcta 120

ccctattccc cacactcacc ggagccaaag ccgcggagcg cgttgacatt gattattgac 180

tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg 240

cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt 300

gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca 360

atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc 420

aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta 480

catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac 540

catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg 600

atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg 660

ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt 720

acggtgggag gtctatataa gcagagctca ataaaagagc ccacaacccc tcactcggcg 780

cgccagtctt ccgatagact gcgtcgcccg ggtacccgta ttcccaataa agcctcttgc 840

tgtttgcatc cgaatcgtgg tctcgctgtt ccttgggagg gtctcctctg agtgattgac 900

tacccacgac gggggtcttt catttggggg ctcgtccggg atttggagac ccctgcccag 960

ggaccaccga cccaccaccg ggaggtaagc tggccagcaa cttatctgtg tctgtccgat 1020

tgtctagtgt ctatgtttga tgttatgcgc ctgcgtctgt actagttagc taactagctc 1080

tgtatctggc ggacccgtgg tggaactgac gagttctgaa cacccggccg caaccctggg 1140

agacgtccca gggactttgg gggccgtttt tgtggcccga cctgaggaag ggagtcgatg 1200

tggaatccga ccccgtcagg atatgtggtt ctggtaggag acgagaacct aaaacagttc 1260

ccgcctccgt ctgaattttt gctttcggtt tggaaccgaa gccgcgcgtc ttgtctgctg 1320

cagcgctgca gcatcgttct gtgttgtctc tgtctgactg tgtttctgta tttgtctgaa 1380

aattagggcc agactgttac cactccctta agtttgacct taggtcactg gaaagatgtc 1440

gagcggatcg ctcacaacca gtcggtagat gtcaagaaga gacgttgggt taccttctgc 1500

tctgcagaat ggccaacctt taacgtcgga tggccgcgag acggcacctt taaccgagac 1560

ctcatcaccc aggttaagat caaggtcttt tcacctggcc cgcatggaca cccagaccag 1620

gtcccctaca tcgtgacctg ggaagccttg gcttttgacc cccctccctg ggtcaagccc 1680

tttgtacacc ctaagcctcc gcctcctctt cctccatccg ccccgtctct ccccttgaa 1740

cctcctcgtt cgaccccgcc tcgatcctcc ctttatccag ccctcactcc ttctctaggc 1800

gccggaattc gcggccgtga caagagttac taacagcccc tctctccaag ctcacttaca 1860

ggctctctac ttagtccagc acgaagtctg gagacctctg gcggcagcct accaagaaca 1920

actggaccga ccggtggtac ctcaccctta ccgagtcggc gacacagtgt gggtccgccg 1980

acaccagact aagaacctag aacctcgctg gaaaggacct tacacagtcc tgctgaccac 2040

ccccaccgcc ctcaaagtag acggcatcgc agcttggata cacgccgccc acgtgaaggc 2100

tgccgacccc gggggtggac catcctctag actgacgcgg ccgcgagcaa gaaggcaaag 2160

catcatgaag aggatattgg gagctctgct ggggctcttg agtgcccagg tttgctgtgt 2220

gagaggaata caagtggagc agagtcctcc agacctgatt ctccaggagg gagccaattc 2280

cacgctgcgg tgcaattttt ctgactctgt gaacaatttg cagtggtttc atcaaaaccc 2340

ttggggacag ctcatcaacc tgttttacat tccctcaggg acaaaacaga atggaagatt 2400

aagcgccacg actgtcgcta cggaacgcta cagcttattg tacatttcct cttcccagac 2460

cacagactca ggcgtttatt tctgtgctgt gcgaggaggt gctgacggac tcacctttgg 2520

caaagggact catctaatca tccagcccta tatccagaac cctgaccctg ccgtgtacca 2580

gctgagagac tctaaatcca gtgacaagtc tgtctgccta ttcaccgatt ttgattctca 2640

aacaaatgtg tcacaaagta aggattctga tgtgtatatc acagacaaaa ctgtgctaga 2700

catgaggtct atggacttca agagcaacag tgctgtggcc tggagcaaca aatctgactt 2760

tgcatgtgca aacgccttca acaacagcat tattccagaa gacaccttct tccccagccc 2820

agaaagttcc tgtgatgtca agctggtcga gaaaagcttt gaaacagata cgaacctaaa 2880

ctttcaaaac ctgtcagtga ttgggttccg aatcctcctc ctgaaagtgg ccgggtttaa 2940

tctgctcatg acgctgcggc tgtggtccag cgggtccgga gccacgaact tctctctgtt 3000
aaagcaagca ggagacgtgg aggagaaccc cggtcctatg ggctgcaggc tgctctgctg 3060
tgcggttctc tgtctcctgg gagcagttcc catagacact gaagttaccc agacaccaaa 3120
acacctggtc atgggaatga caaataagaa gtctttgaaa tgtgaacaac atatggggca 3180
cagggctatg tattggtaca agcagaaagc taagaagcca ccggagctca tgtttgtcta 3240
cagctatgag aaactctcta taaatgaaag tgtgccaagt cgcttctcac ctgaatgccc 3300
caacagctct ctcttaaacc ttcacctaca cgccctgcag ccagaagact cagccctgta 3360

tctctgcgcc agcagccctc ccaatgaaaa actgtttttt ggcagtggaa cccagctctc 3420
tgtcttggag gacctgaaca aggtgttccc acccgaggtc gctgtgtttg agccatcaga 3480
agcagagatc tcccacaccc aaaaggccac actggtgtgc ctggccacag gcttcttccc 3540
tgaccacgtg gagctgagct ggtgggtgaa tgggaaggag gtgcacagtg gggtcagcac 3600
ggacccgcag cccctcaagg agcagcccgc cctcaatgac tccagatact gcctgagcag 3660
ccgcctgagg gtctcggcca ccttctggca gaaccccccgc aaccacttcc gctgtcaagt 3720
ccagttctac gggctctcgg agaatgacga gtggacccag gatagggcca aacccgtcac 3780

ccagatcgtc agcgccgagg cctggggtag agcagactgt ggctttacct cggtgtccta 3840
ccagcaaggg gtcctgtctg ccaccatcct ctatgagatc ctgctaggga aggccaccct 3900
gtatgctgtg ctggtcagcg cccttgtgtt gatggcaatg gtcaagagaa aggatttcga 3960
attcggctca ggcgagggca gaggcagtct gctaacatgc ggtgatgtcg aagaaaatcc 4020
tggcccaccg cggggctgga ccgcgctttg cttgctgagt ttgctgcctt ctgggttcat 4080
gagtcttgac aacaacggta ctgctacccc agagttacct acccagggaa cattttcaaa 4140
tgtttctaca aatgtatcct accaagaaac tacaacacct agtacccttg gaagtaccag 4200

cctgcaccct gtgtctcaac atggcaatga ggccacaaca aacatcacag aaacgacagt 4260
caaattcaca tctacctctg tgataacctc agtttatgga aacacaaact cttctgtcca 4320
gtcacagacc tctgtaatca gcacagtgtt caccacccca gccaacgttt caactccaga 4380
gacaaccttg aagcctagcc tgtcacctgg aaatgtttca gacctttcaa ccactagcac 4440
tagccttgca acatctccca ctaaacccta tacatcatct tctcctatcc taagtgacat 4500
caaggcagaa atcaaatgtt caggcatcag agaagtgaaa ttgactcagg gcatctgcct 4560
ggagcaaaat aagacctcca gctgtgcgga gtttaagaag gacaggggag agggcctggc 4620

ccgagtgctg tgtggggagg agcaggctga tgctgatgct ggggcccagg tatgctccct 4680

gctccttgcc cagtctgagg tgagacctca gtgtctactg ctggtcttgg ccaacagaac 4740

agaaatttcc agcaaactcc aacttatgaa aaagcaccaa tctgacctga aaaagctggg 4800

catcctagat ttcactgagc aagatgttgc aagccaccag agctattccc aaaagaccct 4860

gattgcactg gtcacctcgg gagccctgct ggctgtcttg ggcatcactg gctatttcct 4920

gatgaatcgc cgcagctgga gccccacagg agaaaggctg gaactagaac catgaggatc 4980

cgataaaata aaagatttta tttagtctcc agaaaaaggg gggaatgaaa gaccccacct 5040

gtaggtttgg caagctagct taagtaacgc cattttgcaa ggcatggaaa aatacataac 5100

tgagaataga gaagttcaga tcaaggtcag gaacagatgg aacagctgaa tatgggccaa 5160

acaggatatc tgtggtaagc agttcctgcc ccggctcagg gccaagaaca gatggaacag 5220

ctgaatatgg gccaaacagg atatctgtgg taagcagttc ctgccccggc tcagggccaa 5280

gaacagatgg tccccagatg cggtccagcc ctcagcagtt tctagagaac catcagatgt 5340

ttccagggtg ccccaaggac ctgaaatgac cctgtgcctt atttgaacta accaatcagt 5400

tcgcttctcg cttctgttcg cgcgcttctg ctccccgagc tcaataaaag agcccacaac 5460

ccctcactcg gggcgccagt cctccgattg actgagtcgc ccgggtaccc gtgtatccaa 5520

taaaccctct tgcagttgca tccgacttgt ggtctcgctg ttccttggga gggtctcctc 5580

tgagtgattg actacccgtc agcgggggtc tttcatttgg gggctcgtcc gggatcggga 5640

gacccctgcc cagggaccac cgacccacca ccgggaggta agctggctgc ctcgcgcgtt 5700

tcggtgatga cggtgaaaac ctctgacaca tgcagctccc ggagacggtc acagcttgtc 5760

tgtaagcgga tgccgggagc agacaagccc gtcagggcgc gtcagcgggt gttggcgggt 5820

gtcggggcgc agccatgacc cagtcacgta gcgatagcgg agtgtatact ggcttaacta 5880

tgcggcatca gagcagattg tactgagagt gcaccatatg cggtgtgaaa taccgcacag 5940

atgcgtaagg agaaaatacc gcatcaggcg ctcttccgct tcctcgctca ctgactcgct 6000

gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcggt atcagctcac tcaaaggcgg taatacggtt 6060

atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc 6120

caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga 6180

gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata 6240

ccaggcgttt ccccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgaccc tgccgcttac 6300

cggatacctg tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg 6360

taggtatctc agttcggtgt aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc 6420

cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggtaag 6480

acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt 6540

aggcggtgct acagagttct tgaagtggtg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt 6600

atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg 6660

atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggtttttt gtttgcaagc agcagattac 6720

gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca 6780

gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac 6840

ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac 6900

ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt 6960

tcgttcatcc atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggctt 7020

accatctggc cccagtgctg caatgatacc gcgagaccca cgctcaccgg ctccagattt 7080

atcagcaata aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga agtggtcctg caactttatc 7140

cgcctccatc cagtctatta attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa 7200

tagtttgcgc aacgttgttg ccattgctgc aggcatcgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg 7260

tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat cccccatgtt 7320

gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcggtcc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc 7380

agtgttatca ctcatggtta tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatccgt 7440

aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg 7500

gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaac acgggataat accgcgccac atagcagaac 7560

tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc 7620

gctgttgaga tccagttcga tgtaacccac tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt 7680

tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg 7740

aataagggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag 7800

catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa 7860

acaaataggg gttccgcgca catttccccg aaaagtgcca cctgacgtct aagaaaccat 7920

tattatcatg acattaacct ataaaaat 7948

<210> 7

<211> 315

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Truncated CD34 polypeptide

<400> 7

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

50 55 60
His Gly Asn Glu Ala Thr Thr Asn Ile Thr Glu Thr Thr Val Lys Phe
65 70 75 80
Thr Ser Thr Ser Val Ile Thr Ser Val Tyr Gly Asn Thr Asn Ser Ser
85 90 95
Val Gln Ser Gln Thr Ser Val Ile Ser Thr Val Phe Thr Thr Pro Ala
100 105 110
Asn Val Ser Thr Pro Glu Thr Thr Leu Lys Pro Ser Leu Ser Pro Gly
115 120 125

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

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

Leu Gly Ile Leu Asp Phe Thr Glu Gln Asp Val Ala Ser His Gln Ser
260 265 270

Tyr Ser Gln Lys Thr Leu Ile Ala Leu Val Thr Ser Gly Ala Leu Leu
275 280 285

Ala Val Leu Gly Ile Thr Gly Tyr Phe Leu Met Asn Arg Arg Ser Trp
290 295 300

Ser Pro Thr Gly Glu Arg Leu Glu Leu Glu Pro
305 310 315