



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0077272
(43) 공개일자 2008년08월21일

(51) Int. Cl.

A61K 39/00 (2006.01) *C07K 14/705* (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01) *C12N 5/06* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7016698

(22) 출원일자 2008년07월09일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2008년07월09일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2006/069549

국제출원일자 2006년12월11일

(87) 국제공개번호 WO 2007/065957

국제공개일자 2007년06월14일

(30) 우선권주장

05111928.7 2005년12월09일

유럽특허청(EPO)(EP)

60/779,588 2006년03월06일 미국(US)

(71) 출원인

아르고스 셰라퓨텍스 인코포레이티드

미국 27704 노스캐롤라이나주 더그램 테크놀로지
드라이브 4233

(72) 발명자

스컬러 제롤드

독일 91080 스파도르프 암 베일켄베르그 25

도에리 잔

독일 90409 네베르그 호페슈트라세 5

스카프트 니엘스

독일 91074 헤르조겐나우라크 아달버트-스티프터
-슈트라세 15

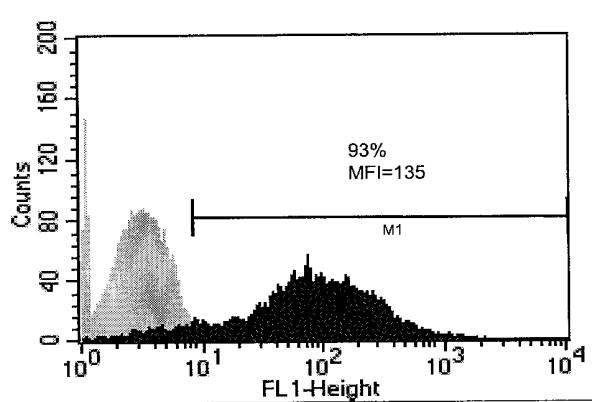
(74) 대리인

유미특허법인

전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 항원-특이적 작동자 T 세포의 제조 방법**(57) 요약**

본 발명은 RNA 특히 T 세포 수용체 및/또는 FoxP3을 코딩하는 RNA에 의해 일시적으로 형질감염된 T 세포, 및 전기천공투입에 의해 T 세포를 RNA로 형질감염시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 항원에 특이적인 T 세포 수용체(TCR)을 코딩하는 RNA에 의해 일시적으로 형질감염된 작동자 T 세포를 포함하며, 상기 T 세포는 MHC 분자와 복합체 형태로 항원 제시 세포에 특이적인 작동자 기능을 나타낸다. FoxP3를 코딩하는 외인성 RNA를 포함하는 T_{reg} 세포도 제공한다. 형질감염된 T 세포는 면역치료, 특히 종양, 병원체 감염, 자가 질환, 이식 거부반응 및 이식 편대 숙주 질환의 치료에 이용가능하다.

대표도 - 도1A

특허청구의 범위

청구항 1

항원에 특이적인 T 세포 수용체(TCR)를 코딩하는 RNA에 의해 일시적으로 형질감염된 작동자(effector) T 세포를 포함하며, 상기 T 세포는 MHC 분자와 복합체 형태로 항원을 제시하는 세포에 특이적인 작동자 기능을 나타내는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 항원은 종양 항원, 병원체 항원 또는 자가-항원인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서,

(i) 상기 항원은 종양 항원이고, 바람직하기로는 상기 종양은 신장 세포 종양, 흑색종, 만성 립프성 백혈병, 유방암, 폐암, 전립선암, 난소암 또는 대장암이고, 및/또는 상기 항원은 MART-1, MAGE-1, MAGE-3, gp75, MDM2, 티로시나제(tyrosinase), 텔로머라제(telomerase), gp100, 서비빈(survivin), α-1 폐토단백질(fetoprotein), G250 또는 NY-ESO-1이고;

(ii) 상기 항원은 병원체 항원이고, 바람직하기로는 상기 병원체는 HIV 또는 HCV인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

(i) 상기 작동자 기능은 IL-2 분비, TNF α 분비, TNF β 분비, 인터페론- γ (IFN γ) 분비, 세포독성 및 조절성 작동자 기능으로 이루어진 군으로부터 선택되는 한가지 이상의 기능이거나;

(ii) 상기 T 세포는 CD8 $^+$ 이고, 바람직하기로는 TCR은 MHC 클래스 I 제한형이(MHC I restricted)거나, TCR은 MHC 클래스 II 제한형이거나, 또는 작동자 기능은 세포독성이거나;

(iii) 상기 T 세포는 CD4 $^+$ 이고, 바람직하기로는 TCR은 MHC 클래스 I 제한형이거나, TCR은 MHC 클래스 II 제한형이거나, 또는 작동자 기능은 대식세포의 활성화 및/또는 B 세포의 활성화이거나, 또는 상기 T 세포는 FoxP3를 코딩하는 RNA에 의해 일시적으로 형질감염되거나; 또는

(iv) 상기 T 세포는 전기천공투입 이후에 동결보존되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 CD4 $^+$ T 세포는

(i) 조절성 T 세포(T_{reg})이고, 바람직하기로는 상기 작동자 기능은 조절성 작동자 기능이고, 가장 바람직하기로는 상기 조절성 기능은 IL-10 분비 및/또는 TGF-β 분비이고, 또는 T_{reg}는 CD4 $^+$ CD25 $^+$ 이고, 또는 T 세포는 FoxP3 $^+$ 이고, 또는 상기 TCR은 자가 항원에 특이적이거나;

(ii) T_{H1} 세포; 또는

(iii) T_{H2} 세포인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

면역치료용 약제 제조용으로서의, 제 1항 내지 제 5항 중 어느 한항에 따른 조성물의 용도.

청구항 7

정제된 CD8 $^+$ T 세포 또는 정제된 CD4 $^+$ T 세포를 포함하는 조성물에 항원 특이적인 TCR을 코딩하는 RNA를 전기천

공투입하는 단계를 포함하는, T 세포에 새로운 항원 특이성을 부여하는 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서,

- (i) 상기 T 세포는 자기 분류(magnetic sorting)에 의해 정제되거나;
- (ii) 상기 정제된 T 세포는 조성물에 존재하는 모든 T 세포의 75% 이상이고, 바람직하기로는 조성물에 존재하는 모든 T 세포의 90% 이상이거나;
- (iii) 상기 정제된 T 세포는 전기천공투입하는 단계 이전에 피토헤마글루티닌(phytohemagglutinin, PHA) 또는 OKT3에 의해 시험관내에서 자극되지 않았거나;
- (iv) 상기 정제된 T 세포는 전기천공투입하는 단계 이전에 증식되도록 자극되거나, 바람직하기로는 상기 정제된 T 세포는 PHA 및/또는 OKT3로 자극되거나;
- (v) 상기 T 세포는 조절성 T 세포로부터의 분리에 의해 정제되거나;
- (vi) 상기 T 세포에 전계 강도 100V/mm-150V/mm으로 2-10 ms동안 사각파 펄스로 전기천공투입이 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

휴지기 T 세포에 항원에 특이적인 TCR을 코딩하는 RNA를 전기천공투입하는 단계를 포함하는, 새로운 항원 특이성을 T 세포에 부여하는 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서,

- (i) 상기 휴지기 T 세포는 정제된 CD8⁺ T 세포 또는 정제된 CD4⁺ T 세포 중 어느 하나이거나;
- (ii) 상기 세포는 자기 세포 분류(magnetic cell sorting)에 의해 정제되거나; 또는
- (iii) 상기 T 세포는 사각파 펄스를 이용하여 전계 강도 100V/mm-150V/mm로 2- 10 ms동안 전기천공투입되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

사각파 펄스를 이용하여 전계 강도 100V/mm-150V/mm로 2- 10 ms동안 T 세포에 RNA를 전기천공투입하는 단계를 포함하며, 상기 T 세포는 전기천공투입하는 단계 이전에 PHA 또는 OKT3에 의해 자극되지 않은 것을 특징으로 하는, T 세포를 일시적으로 형질감염시키는 방법.

청구항 12

제 11항에 있어서,

- (i) 상기 T 세포는 정제된 CD8⁺ T 세포이거나;
- (ii) 상기 T 세포는 정제된 CD4⁺ T 세포이고, 바람직하기로는 상기 T 세포는 정제된 조절성 T 세포이거나; 또는
- (iii) RNA는 FoxP3을 코딩하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 9항 내지 제 12항중 어느 한항에 따른 방법에 의해 제조된 T 세포.

청구항 14

면역치료용 약제 제조용으로서의 제 13항의 T 세포의 용도.

청구항 15

항원에 특이적인 TCR을 코딩하는 RNA에 의해 일시적으로 형질감염된 T 세포를 투여하는 단계를 포함하며, 상기 T 세포는 MHC 분자와 복합체 형태로 항원을 제시하는 세포에 대해 작동자 기능을 나타내는 것을 특징으로 하는, 개체에게 항원-특이적인 T 세포 작동자 기능을 제공하는 방법.

청구항 16

제 15항에 있어서,

- (i) 상기 작동자 기능은 세포독성이거나;
- (ii) 상기 항원은 종양-특이적이고, 바람직하기로는 상기 투여는 종양내 주입이거나;
- (iii) 상기 항원은 병원체-특이적이거나; 또는
- (iv) 상기 T 세포는 개체의 자가 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

FoxP3를 코딩하는 핵산에 의해 CD4⁺ T 세포를 형질감염시키는 단계를 포함하는 T_{reg} 세포의 제조 방법.

청구항 18

제 17항에 있어서, 상기 핵산은 mRNA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

FoxP3를 코딩하는 외인성 RNA를 포함하거나 및/또는 제 17항 또는 제 18항의 방법에 의해 제조되되는 T_{reg} 세포.

청구항 20

면역치료용 약제 제조용으로서의 제 19항에 따른 T_{reg} 세포의 용도.

명세서

기술분야

<1>

본 발명은 RNA, 특히 T 세포 수용체 및/또는 FoxP3을 코딩하는 RNA에 의해 일시적으로 형질감염된 T 세포, 및 전기천공투입(electroporation)에 의해 T 세포를 RNA로 형질감염시키는 방법에 관한 것이다. 형질감염된 T 세포는 면역치료, 특히 종양, 병원체 감염, 자가면역 질환, 이식 거부반응 및 이식 편대 숙주 질환의 치료에 이용 가능하다.

배경기술

<2>

세포독성 T 림프구(CTL)는 종양 성장의식 제어에 중요한 역할을 하므로, 따라서 암의 면역요법에서 세포를 이용한 전략에 매우 중요하다(19). 종양이 침윤된 림프구(TIL)를 임양 전달(adoptive transfer)하고자하는 초기 시도는, 아마도 TIL이 면역 무력성 표현형을 가지거나 종양 부위로 회귀할 수 없다는 이유로 인해, 전달된 세포가 흔히 비-특이적이고 오랫동안 존속되지 않기 때문에, 만족스럽지 않았다(10, 11). 시험관내에서 증식시킨 자가 종양-특이적인 CLT의 임양 전달은 전이성 흑색종 환자의 종양 근절에 효과적인 것으로 확인되었다(9, 13, 18, 20, 31). 그러나, 불행하게도, 모든 환자들에서 자신의 종양에 대해 검출가능한 정도로 생체내 세포독성 T 세포 반응이 나타나는 것은 아니다. 실제, 세포 용해성 종양-특이적인 T 세포의 분리 및/또는 증식은 일부 환자들에서만 가능한데, 그 이유는 아마도, 특히 종양 환자에서, 말초 T 세포 레퍼토리에 일반적으로 흥선 선택(28) 또는 그외 허용성 메카니즘(30)으로 인해 고-친화성(avidity) 종양-특이적인 CTL이 결핍되어 있기 때문이다. 게다가, 이들 세포와 시험관내에서 준비한 종양-특이적인 T 세포들만 한정된 수명을 가지고 있어서, 이러한 T 세포가 치료적 투여량으로 증폭되기가 불가능한 경우가 흔하다(2, 3, 30).

<3>

또 다른 방법으로, CTL 특이성은 전적으로 T 세포 수용체(TCR)에 의해서만 결정되기 때문에, 종양-특이적인 TCR 이 레트로바이러스를 통해 전이된 자가 T 세포가 임양 전달에 사용되었다. 레트로바이러스 전이에 의해 종양 특이성을 지니게 된 T 세포의 리프로그래밍(reprogramming)은 이미 수종의 항원, 예컨대 MART-1(7), MAGE-1(29), MDM2(27), gp100(16, 24) 및 티로시나제(21)에 대해 시험관내에서 확인되었다. 이들 자가 T 세포는 치

료적 투여량으로 쉽게 증폭되었다. 그러나, 레트로바이러스 전이는, 전이된 세포의 계놈에 프로바이러스가 무작위 삽입될 수 있기 때문에, 자가 세포의 비가역적인 유전자 조작의 위험성을 안고 있다. 따라서, 이것은 또한 세포 주기 조절에 참여하는 유전자에 삽입되어, 이후 세포 성장을 교란(즉, 삽입에 의한 돌연변이 유발)시킬 수 있다. 중증 복합성 면역부전증(severe combined immunodeficiency, SCID) 환자에서 결함이 있는 공통 γ 체인을 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 레트로바이러스에 의해 자가 조혈 줄기 세포에 전이시키는, SCID의 유전자 치료 방법의 임상 실험 데이터에 의해, 프로바이러스가 LMO-2 온코진에 삽입되어 백혈병과 비슷한 증상을 유발하는 것으로 확인되었다(6, 12, 15). 또한, 레트로바이러스 전이는 휴지기의 비-분열성 T 세포에 의해 수행할 수 없으며(30), 오히려 전이하기 전에 수 일간의 T 세포 자극이 필요할 수 있다.

<4> 따라서, 레트로바이러스 벡터 또는 숙주 계놈에 변이를 초래할 수 있는 다른 형태의 형질감염의 필요없이, T 세포에 항원-특이적인 TCR 기능을 효과적으로 전달하기 위한 방법이 오랫동안 절실히 요구되고 있다. 본 발명은 이러한 요구를 충족시킬 뿐만 아니라 추가적인 이점을 제공한다.

발명의 상세한 설명

발명의 개요

<6> 본 발명자들은 T 세포, 특히 정제된 CD8⁺ 또는 CD4⁺ 세포에 대한 개선된 RNA 전기천공투입 방법을 개발하였다. 상기 개선된 방법은 RNA 전기천공투입 및 이후의 냉동보존에 의해 분리된 T 세포에 TCR의 기능적인 전달을 가능하게 한다. 본 발명의 방법은 레트로바이러스 전이와 관련된 문제점을 해결하며, 암, 병원체 감염, 자가면역, 이식 및 이식 편대 숙주 질환에 대한 새로운 전략을 제공한다.

<7> 일 측면으로, 본 발명은 항원에 특이적인 T 세포 수용체(TCR)를 코딩하는 RNA에 의해 일시적으로 형질감염된 작동자 T 세포를 포함하는 조성물을 제공하며, 상기 T 세포는 MHC 분자와의 복합체 형태로 항원을 제시하는 세포에 대해 특이적인 작동자 기능을 보인다. 바람직한 예에서, 상기 작동자 기능은 세포독성이다. 본 발명의 작동자 T 세포 조성물은 면역치료용 약제 생산에 사용할 수 있다.

<8> 다른 측면으로, 본 발명은 정제된 CD8⁺ 또는 정제된 CD4⁺ T 세포를 포함하는 조성물에 항원에 특이적인 TCR 수용체를 코딩하는 RNA를 전기천공투입하는 단계를 포함하는, T 세포에 새로운 항원 특이성을 부여하는 방법을 제공한다.

<9> 또다른 측면으로, 본 발명은 휴지기 T 세포에 항원에 특이적인 TCR 수용체를 코딩하는 RNA를 전기천공투입하는 단계를 포함하는, T 세포에 새로운 항원 특이성을 부여하는 방법을 제공한다.

<10> 다른 측면으로, 본 발명은 사각파 펄스를 이용하여 2-10 ms 동안 100V/mm-150V/mm의 전계 강도(field strength)에서 T 세포에 RNA를 전기천공투입하는 단계를 포함하며, 전기천공투입하는 단계 이전에 T 세포를 PHA 또는 OKT3로 시험관내에서 자극하지 않는 것을 특징으로 하는, T 세포를 일시적으로 형질감염시키는 방법을 제공한다.

<11> 다른 측면으로, 본 발명은 항원 특이적인 TCR을 코딩하는 RNA에 의해 일시적으로 형질감염된 T 세포를 투여하는 단계를 포함하며, T 세포는 MHC 분자와의 복합체 형태로 항원을 제시하는 항원에 대해 작동자 기능을 보이는 것을 특징으로 하는, 개체에 항원-특이적인 T 세포 작동자 기능을 부여하는 방법을 제공한다.

<12> 다른 측면으로, 본 발명은 FoxP3을 코딩하는 외인성 RNA를 포함하는 T_{reg} 세포를 제공한다. 본 발명은 CD4⁺ T 세포를 FoxP3를 코딩하는 핵산에 의해 형질감염시키는 단계를 포함하는 T_{reg} 세포의 제조 방법을 제공한다. FoxP3에 의해 형질감염된 T 세포는 면역치료용 약제 제조에 사용할 수 있으며, 유효량을 환자에게 투여할 수 있다.

본 발명을 수행하기 위한 방식

<14> 본 발명의 다양한 예의 제조 및 이용방법이 하기에서 상세하게 논의되어 있지만, 본 발명은 매우 다양한 구체적인 내용으로 구체화할 수 있는 이용가능한 많은 발명 컨셉을 제공함을 인정하여야 한다. 본원에서 논의된 구체적인 예는 주로 본 발명의 제조 및 이용의 구체적인 예로 예시되어 있을 뿐, 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

<15> 본 발명에 대한 이해를 돋기 위해, 하기에 다수 용어에 대한 정의를 기재한다. 본원에서 정의된 용어는 본 발

명과 관련된 분야의 당업자에게 일반적으로 이해되는 의미를 가진다. "하나(a)", "하나(an)" 및 "그(the)"는 오직 하나의 물질을 의미하는 것은 아니며, 예로 사용될 수 있는 구체적인 예의 포함적인 클래스를 포함한다. 본원에서 전문 용어는 본 발명의 구체적인 예를 설명하기 위해 사용되며, 이의 사용은 청구항에서 약술된 바를 제외하고는 본 발명을 한정하는 것은 아니다. 예컨대, 용어 "세포(a cell)"는 복수 개의 세포와 이들의 혼합을 포함한다. 또한, 항상 명시되어 있지는 않더라도 본원에 기재된 시약은 단순히 예시적이며, 이의 등가물이 당업계에 공지된 것으로 이해된다.

- <16> T 세포의 활성화 상태는, T 세포가 "휴지기"(즉, 세포 주기에서 G₀ 단계)이거나, 또는 특이적인 항원 인지와 같은 적절한 자극 후 또는 OKT3 항체, PHA 또는 PMA 등의 자극에 의해, 활성화되었는지를 규정한다. T 세포의 "표현형"(예. 미노출(naive), 주 기억, 작동자 기억, 세포용해 작동자, 헬프 작동자(T_H1 및 T_H2 세포), 및 조절 성 작동자)는 활성화되었을 때 세포에서 나타나는 기능이다. 건강한 공여체는 이러한 표현형을 가진 각각의 T 세포를 가지고 있으며, 주로 휴지기 상태에 있다. 미노출 T 세포는 활성화시 증식되어, 기억 T 세포나 작동자 T 세포로 분화될 것이다. 이후, 다시 활성화되어 새로운 기능을 보일 때까지 다시 휴지기 상태를 취할 수 있으며, 표현형은 다시 바뀔 수 있다. 작동자 T 세포는 활성화될 때 및 항원-특이적인 작동자 기능시에 분열될 것이다.
- <17> 용어 "항원"은 당업계에서 잘 공지되어 있으며, 항체에 결합할 수 있는 모든 문자 뿐만 아니라 에피토프, MHC 분자에 결합할 수 있는 항원의 웨타이드 단편, 및 면역원을 포함한다. 본 발명에서의 사용에 고려될 수 있는 항원으로는, 자가-항체(정상 또는 질환성), 종양 항원, 병원체 항원(예, 미생물 항원, 바이러스 항원 등) 또는 일부 그외 외부 항원(예, 식품 성분, 꽃가루 등)을 열거할 수 있으며, 이들로만 제한되는 것은 아니다. T 세포 수용체는 MHC 분자에 결합된 항원의 웨타이드 단편 또는 항원에 결합한다. 본원에서, 항원에 특이적인 TCR 수용체는 항원의 웨타이드 단편에 특이적인 T 세포 수용체를 포함한다.
- <18> 용어 "종양 관련 항원(tumor associated antigen)" 또는 "TAA"는 종양과 관련있는 항원을 의미한다. 잘 알려져 있는 TAA의 예로 서비빈(survivin), gp100, MART, MAGE-1 및 MAGE-3을 포함한다. MHC 분자에 결합하는 TAA의 일부 웨타이드 단편의 서열은 MAGE 1 노나웨타이드(EADPTGHSY), MART-APL 웨타이드(LAGIGILTV) 또는 천연 웨타이드(AAGIGILTV) 및 PSA-1 웨타이드(FLTPKKLQCV)를 포함한다. 추가적인 종양 관련 웨타이드 및 항원의 서열은 당업자들에게 공지되어 있다.
- <19> 용어 "항원 제시 세포(antigen presenting cell: APC)"는 면역계의 특이적인 작동자 세포에 의해 인지가능한 웨타이드-MHC 복합체 형태로 하나 이상의 항원을 제시하여, 제시된 항원 또는 항원들에 대한 효과적인 세포성 면역 반응을 유도할 수 있는 세포 클래스를 의미한다. APC는 대식세포, B 세포, 내피 세포, 활성화된 T 세포 및 수지상 세포와 같은 무손상 전체 세포; 또는 β2-마이크로글로불린과 복합체를 이룬 정제된 MHC 클래스 I 문자와 같은 천연 또는 합성의, 기타 문자일 수 있다. 많은 종류의 세포는 T 세포 인지를 위해 세포 표면에 항원을 제시할 수 있지만, 수지상 세포만 세포독성 T 림프구(CTL) 반응에서 미노출 T 세포를 활성화시키는 유효량으로 항원을 제시할 수 있는 능력을 지니고 있다.
- <20> 암 또는 종양은 비교적 자율적인 증식을 보이는 세포의 비정상적인 존재를 의미하며, 암 세포는 세포 증식 제어력이 상당히 감소된 비정상적인 증식 표현형을 나타낸다. 암 세포는 양성 또는 악성일 수 있다. 다양한 예에서, 암은 방광, 혈액, 뇌, 유방, 결장, 소화관, 폐, 난소, 췌장, 전립선 또는 피부의 세포에 침범한다. 암 또는 종양 세포의 정의는, 본원에서 원발성 암 세포 뿐만 아니라 암 세포 선조로부터 유래된 모든 세포를 포함한다. 이는 전이된 암세포 및 시험관내 배양물 및 암 세포 유래 세포주를 포함한다. 암 또는 종양은, 비제한적으로 고형암, 액형 종양(liquid tumor), 혈액 종양, 신장 세포 암, 흑색종, 유방암, 전립선암, 고환암, 방광암, 난소암, 경부암, 위암, 식도암, 췌장암, 폐암, 신경모세포종(neuroblastoma), 신경교모세포종(glioblastoma), 망막모세포종, 백혈병, 골수종, 림프종, 간암, 선암, 육종, 악성 종양(carcinoma), 모세포종(blastoma) 등을 포함한다.
- <21> "공동-자극성 분자(co-stimulatory molecule)"는 항원 제시 세포의 표면에 발현된 수용체-리간드 쌍과 T 세포 간의 상호작용에 참여한다. 과거 수년간 축적된 연구를 통해 사이토카인 유전자 발현 및 증식 유도를 위해 휴지기 T 세포에 적어도 2 이상의 신호가 필요하다는 것이 설득력 있게 입증되었다(Schwartz, R.H. (1990) Science 248: 1349-1356 및 Jenkins, M.K. (1992) Immunol. Today 13:69-73). 특이성을 부여하는 한가지 신호는 적절한 MHC/웨타이드 복합체와 TCR/CD3 복합체의 상호작용에 의해 생성될 수 있다. 두번째 신호는 항원 비 특이적이며, "공동-자극성" 신호라고 한다. 이 신호는 원래 대식세포 및 수지상 세포 등의 골수 유래 보조 세포에 의해 제공되는 활성으로서 규정되었으며, 또한 "프로페셔널" APC라고도 한다. 수종의 분자들이 공동-자극

활성을 강화시키는 것으로 입증되었다. 이것으로는 열안정성 항원(HSA)(Liu, Y. et al. (1992) *J. Exp. Med.* 175:437-445), 콘드로이틴 솔레이트-수식된 MHC 불변체인(1i-CS)(Naujokas, M.F. et al. (1993) *Cell* 74:257-268), 세포내 부착 분자(intracellular adhesion molecule) 1(ICAM-1)(Van Seventer, G.A. (1990). *Immunol.* 144:4579- 4586), B7-1, 및 B7-2/B70(Schwartz, R.H. (1992) *Cell* 71:1065-1068)이 있다. 이들 분자들은 각각 T 세포상에서 이의 동계 리간드와 상호작용함으로써 공동-자극을 보조하는 것으로 보인다. 공동-자극성 분자는 정상적인 생리 조건하에서 필요한 공동-자극 신호(들)를 매개하여, 미노출 T 세포의 완전한 활성화를 수행한다. 수용체-리간드 쌍의 일 예는 APC 표면의 B7 패밀리의 공동-자극성 분자와 T 세포 상의 이의 한쪽 수용체인 CD28 또는 CTLA-4가 있다(Freeman, et al. (1993) *Science* 262:909-911; Young, et al. (1992). *Clin. Invest.* 90:229 및 Nabavi, et al. (1992) *Nature* 360:266-268). 그외 중요한 공동-자극성 분자로는 CD40과 CD54가 있다. 용어 "공동-자극성 분자"는 T 세포의 표면에서 TCR에 의해 결합된 MHC/펩타이드 복합체와 함께 작용하였을 때 펩타이드에 결합하는 T 세포의 활성화를 수행하는 공동-자극 효과를 제공하는, 임의의 단일 분자 또는 분자들의 조합을 포함한다. 따라서, 상기 용어는 B7 또는 APC와 같은 항원 제시 매트릭스 상의 그외 공동-자극성 분자(들), MHC 복합체와 함께 T 세포 표면의 TCR이 특이적으로 펩타이드와 결합하였을 때 동계 리간드에 결합하여 T 세포를 활성화시키는, 이들의 단편(단독, 다른 분자(들)와의 복합체화, 또는 융합 단백질의 일부분으로서)을 포함한다. 항상 명시되어 있지는 않더라도, 야생형 또는 정제된 공동-자극성 분자(예, 재조합으로 제조된 것 또는 이의 돌연변이체)와 유사한 생물학적 활성을 가진 분자는 본 발명의 사상 및 범위내에서 사용되는 것으로 의도된다.

- <22> 용어 "배양(culturing)"은 적정 배지에서의 세포의 시험관내 유지, 분화, 및/또는 증식(propagation)을 의미한다. "농화(enriched)"는 유기체에 존재하는 조직에서 발견되는 것 보다 총 세포율%이 증가된 형태로 존재하는 세포를 포함하는 조성을 의미한다.
- <23> 본원에서, 용어 "사이토카인"은 세포에 다양한 작용을 발휘하는, 예컨대 생장 또는 증식을 유도하는 수많은 인자들 중 임의의 것을 의미한다. 본 발명의 실시에 단독으로 또는 조합으로 사용될 수 있는 사이토카인의 비제한적인 예로는, 인터루킨-2(IL-2), 줄기 세포 인자(SCF), 인터루킨-3(IL-3), 인터루킨-6(IL-6), 인터루킨-12(IL-12), G-CSF, 과립구 대식세포-콜로니 자극 인자(GM-CSF), 인터루킨-1α(IL-1α), 인터루킨-11(IL-11), MIP-11, 백혈병 저해 인자(LIF), c-kit 리간드, 트롬보포이에틴(TPO) 및 flt3 리간드를 포함한다. 사이토카인은 예컨대 Genzyme (Framingham, MA), Genentech (South San Francisco, CA), Amgen (Thousand Oaks, CA), R&D Systems (Minneapolis, MN) 및 Immunex (Seattle, WA)와 같은 여러 공급업체로부터 상업적으로 구입 가능하다. 항상 명시되어 있지는 않더라도, 야생형 또는 정제된 공동-자극성 분자(예, 재조합으로 제조된 것 또는 이의 돌연변이체)와 유사한 생물학적 활성을 가진 분자는 본 발명의 사상 및 범위내에서 사용되는 것으로 의도된다.
- <24> 용어 "수지상 세포(DC)"는 다양한 림프계 및 비-림프계 조직에서 발견되는 형태가 유사한 다양한 세포 타입 개체군을 의미한다(Steinman (1991) *Ann. Rev. Immunol.* 9:271-296). 수지상 세포는 유기체에서 가장 강력하고 선호적인 APC를 구성한다. 수지상 세포는 단핵구로부터 분화될 수 있지만, 이들은 독특한 표현형을 가진다. 예로, 특정 분화 마커, CD14 항원은 수지상 세포에서는 발견되지 않지만 단핵구가 지니고 있는 것이다. 또한, 성숙한 수지상세포는 식세포성이 아닌 반면, 단핵구는 상당이 식세포성이다. 성숙한 DC가 T 세포 활성 및 증식에 필요한 모든 신호를 제공할 수 있는 것으로 나타났다.
- <25> "유효량"은 의학적 상태(예, 질병, 감염 등)의 면역 반응, 치료, 예방 또는 완화의 증진과 같이 이롭거나 원하는 결과를 발휘하기에 충분한 양이다. 유효량은 1회 이상의 투여, 적용 또는 투여량으로 처리될 수 있다. 적정 투여량은 체중, 나이, 건강, 치료할 질병이나 상태 및 투여 경로에 따라 변경될 것이다.
- <26> 본원에서, "발현"은 시험관내에서 전사된(IVT) mRNA에 의해 형질감염된 세포에서 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질로 번역되는 프로세스를 의미한다. 발현에 필요한 조절 요소로는 리보솜 결합 서열, 번역 개시 서열, 리보솜 탈착을 위한 종결 코돈을 포함한다. RNA의 시험관내 전사를 위한 백터는 상업적으로 구입하거나, 또는 당업계에 공지된 방법에 개시된 서열로 조합할 수 있다.
- <27> 용어 "유전자 변형된"은 순차적으로 세포 및 그 자손의 유전자형이나 표현형을 변형시키는 외래 유전자 또는 핵산 서열의 함유 및/또는 발현을 의미한다. 즉, 세포의 내인성 뉴클레오타이드에 모든 부가, 결손 또는 파괴를 의미한다. 예를 들면, 레트바이러스 전이로 세포 계놈의 유전자 변형이 이루어진다. 반대로, mRNA에 의한 일시적 형질감염은 유전자 변형을 발생시키진 않는다.
- <28> 용어 "작동자 T 세포"는 본원에서 항원에 특이적으로 결합하여 면역 반응(작동자 기능)을 매개할 수 있으며 이

후 분화할 필요가 없는 T 세포를 의미한다. 작동자 T 세포의 예로는 CTL, T_H1 세포, T_H2 세포 및 조절성 T 세포 (T_{reg})가 있다. 작동자 T 세포와는 반대로, 미노출 T 세포는 특이적인 항원:MHC 복합체를 만나지 않은 것으로, 증식 및 작동자 T 세포로의 분화에 의해 반응하지 않는다. 작동자 T 세포는 휴지기(세포 주기의 G₀ 단계) 또는 활성화(증식)될 수 있다.

<29> "면역 반응"은 광의적으로는 외래 또는 자가 물질에 대한 램프구의 항원-특이적 반응을 의미한다. 면역 반응을 도출할 수 있는 모든 물질은 "면역원성"이라고 하며, "면역원"이라고 한다. 모든 면역원은 항원이지만, 모든 항원이 면역원인 것은 아니다. 면역 반응은 체액성 반응(항체 활성을 통한) 및 세포성 반응(T 세포 활성화를 통한)을 포함한다.

<30> 용어 "분리된"은 구성물, 세포 및 폴리뉴클레오타이드, 웨타이드, 폴리웨타이드, 단백질, 항체 또는 이들의 단편이 자연 상태에서 정상적으로 조합되어 있는 상태에서의 분리를 의미한다. 예컨대, 폴리뉴클레오타이드의 경우, 분리된 폴리뉴클레오타이드는 염색체에서 정상적으로 조합된 5' 및 3' 서열로부터 분리된 것이다. 당업자들에게 자명한 바와 같이, 비천연적으로 형성되는 폴리뉴클레오타이드, 웨타이드, 폴리웨타이드, 단백질, 항체 또는 이들의 단편(들)은 이들의 천연적으로 형성되는 카운터파트로부터 이를 구별하기 위해 "분리"할 필요가 없다. 또한, "농축된", "분리된" 또는 "회석된" 폴리뉴클레오타이드, 웨타이드 폴리웨타이드, 단백질, 항체 또는 이들의 단편(들)은 부피당 분자 농도나 수를 천연적으로 형성되는 카운터파트 보다 높게 또는 낮게 "농축된" 또는 "분리된" 측면에서 천연적으로 형성되는 카운터파트와 구별가능하다. 폴리뉴클레오타이드, 웨타이드, 폴리웨타이드, 단백질, 항체 또는 이들의 단편(들)은 일차 서열, 또는 예컨대 이의 당화 패턴 측면에서 천연적으로 형성되는 카운터파트와 상이하며, 일차 서열에 의해 또는 대안적으로 이의 당화 패턴과 같은 다른 특징들에 의해 천연적으로 형성되는 카운터파트와는 구별가능하므로 분리된 형태로 존재될 필요가 없다. T 세포와 같은 포유류 세포는 유기체에서 발견되는 해부학적 부위로부터 취해질 때 분리된다.

<31> 용어 "주 조직적합성 복합체(major histocompatibility complex)" 또는 "MHC"는 T 세포에 항원 제시 및 빠른 이식 거부 반응에 필요한 세포-표면 분자를 코딩하는 유전자의 복합체이다. 인간에서, MHC는 또한 "인간 백혈구 항원" 또는 "HLA" 복합체라고도 한다. MHC에 의해 코딩된 단백질은 "MHC 분자"라고 하며, 클래스 I 및 클래스 II MHC 분자로 분류된다. 클래스 I MHC 분자는 β₂-마이크로글로불린과 비공유결합으로 연결된 MHC에 코딩된 α 체인으로 구성된 이형이량성 막 단백질을 포함한다. 클래스 I MHC 분자는 거의 모든 유핵 세포에서 발현되며, CD8⁺ T 세포에 항원을 제시하는 기능을 하는 것을 확인되었다. 클래스 I 분자로는 인간의 경우 HLA-A, B, 및 C가 있다. 클래스 II MHC 분자는 또한 비공유결합으로 조합된 α 및 β 체인으로 구성된 이형이량성 막 단백질을 포함한다. 클래스 II MHC 분자는 CD4⁺ T 세포에서 기능하는 것으로 알려져 있으며, 인간의 경우 HLA-DP, -DQ, 및 -DR이 있다.

<32> "병원체"는 본원에서 모든 질환을 초래하는 유기체 또는 바이러스 뿐만 아니라 이들의 약독화된 유도체를 의미한다. 용어 병원체는 질환의 발생에 관여하는 임의의 바이러스 또는 유기체, 및 그의 약독화된 유도체를 의미한다. 이러한 병원체로는 박테리아, 원생동물, 곰팡이 및 바이러스 병원체, 예컨대 헬리코박터, 예컨대 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*), 살모넬라 균(*Salmonella sp.*), 시겔라 균(*Shigella sp.*), 엔터로박터 균(*Enterobacter sp.*), 캄필로박터 균(*Campylobacter sp.*), 다양한 마이코박테리아, 예컨대 마이코박테리움 레프레(*Mycobacterium leprae*), 마이코박테리움 투베르콜로시스(*Mycobacterium tuberculosis*), 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 예르시니아 페스티스(*Yersinia pestis*), 프란시셀라 툴라렌시스(*Francisella tularensis*), 브루셀라 균(*Brucella sp.*), 웨토스파리 인테로간스(*Leptospira interrogans*), 스타필로코커스 균(*Staphylococcus sp.*), 예컨대 스타필로코커스 아우레우스(*S. aureus*), 스트렙토코커스 균(*Streptococcus sp.*), 클로스트리디움 균(*Clostridium sp.*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 플라스모디움 균(*Plasmodium sp.*), 레쉬마니아 균(*Leishmania sp.*), 트리파노조마 균(*Trypanosoma sp.*), 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), C 형 간염 바이러스(HCV), 인간 유두종 바이러스(HPV), 사이토메갈로바이러스(CMV), HTLV, 헤르페스 바이러스(예, 1형 헤르페스 심플렉스 바이러스, 2형 헤르페스 심플렉스 바이러스, 코로나바이러스, 바리셀라-조스터 바이러스, 및 앱스타인-바 바이러스), 유두종 바이러스, 인플루엔자 바이러스, B형 간염 바이러스, 소아마비 바이러스, 홍역 바이러스, 볼거리 바이러스, 및 루멜라 바이러스를 포함하나, 이로 제한하는 것은 아니다.

<33> 용어 "웨타이드"는 광의적으로는 2 이상의 서브유닛 아미노산, 아미노산 유사체 또는 웨타이드모방체 화합물을 언급하기 위해 사용된다. 서브유닛은 웨타이드 결합에 의해 연결될 수 있다. 다른 예로, 서브유닛은 다른 결합, 예컨대 에스테르, 에테르 등에 의해 연결될 수 있다. 본원에서, 용어 "아미노산"은 글리신 및 D와 L 광학

이성체, 아미노산 유사체 및 웨타이드 모방체를 포함하여, 천연 및/또는 비천연이거나 합성 아미노산 중 어느 하나를 의미한다. 3개 이상의 아미노산으로 구성된 웨타이드는 웨타이드 체인이 짧다면 일반적으로 올리고웨타이드라고 한다. 웨타이드 체인이 긴 경우, 웨타이드는 폴리웨타이드 또는 단백질이라고 일반적으로 지칭한다.

<34> 용어 "폴리뉴클레오타이드", "핵산" 및 "핵산 분자"는 서로 호환적으로 사용되며 임의 길이의 뉴클레오타이드의 폴리머 형태를 의미한다. 폴리뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드 및/또는 이들의 유사체를 포함할 수 있다. 뉴클레오타이드는 임의의 3차 구조를 가질 수 있으며 공지된 또는 미확인된 임의 기능을 수행할 수 있다. 용어 "폴리뉴클레오타이드"는 예컨대 단일 가닥, 이중 가닥 및 삼중 나선 분자, 유전자 또는 유전자 단편, 엑손, 인트론, mRNA, tRNA, rRNA, 라이보자임, cDNA, 재조합 폴리뉴클레오타이드, 분지형의 폴리뉴클레오타이드, 플라스미드, 벡터, 임의 서열의 분리된 DNA, 임의의 분리된 RNA 서열, 핵산 프로브 및 프라이머를 포함한다. 본 발명의 핵산 분자는 천연 핵산 분자 이외에도 변형된 핵산 분자도 포함할 수 있다.

<35> 용어 "RNA"는 리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 유사체가 포스포다이에스테르 결합에 의해 함께 연결된, 임의 길이의 리보뉴클레오타이드의 폴리머 형태를 의미한다. 용어 "RNA"는 단일 가닥, 이중 가닥 및 삼중 나선 분자, 일차 전사체, mRNA, tRNA, rRNA, 시험관내 전사체, 시험관내 합성 RNA, 분지형의 폴리리보뉴클레오타이드, 임의 서열의 분리된 RNA 등을 포함한다. mRNA는 세포에서 번역가능한 RNA를 의미한다. 이러한 mRNA는 전형적으로 캡핑(capping)되어 있으며, 리보솜 결합부(Kozak sequence) 및 번역 개시 코돈을 가지고 있다. 예를 들면, 본 발명의 일측면은 형질감염된 T 세포에서 번역될 수 있는 mRNA에 의해 T 세포 형질감염에 관한 것이다.

<36> "약학적 조성물"은 시험관내, 생체내 또는 생체외에서 진단적 또는 치료적 용도에 적합한 조성물을 이루는, 활성 물질과, 무활성 또는 활성 담체와의 조합을 포함하는 것으로 의도된다.

<37> 본원에서, 용어 "약학적으로 허용가능한 담체"는 인산 완충화된 염수 용액, 인간 혈청 알부민(HSA) 등의 혈청 알부민, 재조합 인간 알부민(rHA), 젤라틴, 카세인 등을 포함하는 단백질 부형제와 같이, T 세포와 혼용가능한 임의의 약학적 담체를 포함한다. 담체, 안정화제 및 보강제의 예는, Martin REMINGTON'S PHARM. SCI, 18th Ed.(Mack Publ. Co., Easton (1995)) 및 the "PHYSICIAN'S DESK REFERENCE", 58nd Ed., Medical Economics, Montvale, NJ. (2004)를 참조한다. 용어 "담체"는 완충액 또는 pH 조정제를 포함할 수 있으며, 전형적으로 완충액은 유기산 또는 염기로부터 제조된 염이다. 대표적인 완충액으로는 시트르산의 염, 아스코르브산의 염, 글루콘산의 염, 카본산의 염, 타르타르산의 염, 숙신산의 염, 아세트산의 염 또는 프탈산의 염 등의 유기산 염; 트리스, 트로메타민 하이드로클로라이드 또는 포스페이트 완충액을 포함한다. 추가적인 담체로, 폴리비닐파롤리돈, 피콜(폴리머 당), 텍스트레이트(예, 사이클로텍스트린, 예컨대 2-하이드록시프로필-쿼드러서(quadrature).-사이클로텍스트린), 폴리에틸렌 글리콜, 항산화제, 항-대전제, 계면활성제(예, "TWEEN 20" 및 "TWEEN 80" 등의 폴리소르베이트), 지질(예, 인지질, 지방산), 스테로이드(예, 콜레스테롤) 및 칼레이트제(예, EDTA) 등의 폴리머성 부형제/첨가제를 포함한다. 빙결 방지제 또는 강하제도 포함될 수 있다.

<38> T 세포에 TCR 기능의 효과적인 전달은 이전에는 TCR을 코딩하는 레트로바이러스 벡터를 이용한 안정적인 전이에 의해서만 가능하였다. 그러나, 레트로바이러스 전이는 자가 세포의 비가역적인 유전자 조작이 발생될 위험성이 있다. 이에, 본 발명자들은 T 세포의 일시적인 RNA에 의해 형질감염을 위한 최적 조건을 개발하였다. EGFP-RNA 및 최적화된 조건을 이용한 형질감염 효율은 >90%였다. 혈액에서 분리한 일차 T 세포의 TCR-코딩 RNA의 전기천공투입으로, 모체 CTL 클론과 동일한 HLA-A2/gp100-특이성을 가진 기능성 CTL(작동자 사멸율 >60%; 타겟비 20:1)가 만들어졌다. TCR에 의해 형질감염된 T 세포는 IFN γ -분비 분석에서 웨타이드- 월스된 T2 세포나 gp100-코딩 RNA로 전기천공투입된 수지상 세포를 특이적으로 인지하였으며, 동결보존한 후에도 3일간 그 능력을 유지하였다. 중요한 점은, TCR RNA로 전기천공투입된 CD8 $^{+}$ T 세포가 세포독성을 나타내며, 적어도 72시간 동안 웨타이드-주입된 T2 세포 및 HLA-A2+/gp100+ 흑색종 세포를 특이적으로 용해시키는 것이 최초라는 것이다. 아는 한, 이것은 TCR-RNA에 의한 T 세포의 형질감염에 의해 세포용해 능력의 전달을 최초로 개시하는 것이다. 웨타이드-적정 연구를 통해, RNA에 의해 형질감염된 T 세포의 세포용해 효과는 레트로바이러스가 형질전이된 T 세포와 유사하며, 모체 CTL 클론과 거의 유사한 것으로 확인되었다. 동결보존된 TCR-RNA-전기천공투입된 CD8 $^{+}$ T 세포의 IFN γ 생성 능력 및 세포독성 발휘 능력은, 면역치료에 있어 임상적으로 실현가능성이 있는 효과적인 형질감염된 T 세포의 대규모 배치(large batch) 생산에 필수적이다.

<39> 이러한 전략은 레트로바이러스 전이의 문제점(예, 삽입 돌연변이 유발 가능성)을 극복할 수 있어, 암의 면역 치료, 병원체 감염 및 자가면역 질환 뿐만 아니라 이식 거부 반응 치료에 있어 항원-특이적인 T 럼프구를 제조하기 위한 새롭고 보다 우수한 방법을 제공한다. 삽입 돌연변이 유발 가능성으로 인한 문제점은 RNA를 세포로 전

기천공투입하였을 때 완전히 해소되며, 특정 분자의 단지 일시적인 발현이 필요한 경우에, RNA 전기천공투입은 우수한 대안책이다. RNA는 형질감염된 세포에서 단지 일시적으로만 존재하고 계로으로 통합되지 않기 때문에, 이러한 과정은 유전자 치료법으로 분류될 수 없다. 따라서, T 세포의 TCR RNA에 의해 형질감염은 T 세포로의 TCR 유전자의 레트로바이러스를 통한 형질전이 보다 훨씬 더 안전적이다. 다른 중요한 측면은, (기술적 및 조절 관점 모두에서) RNA에 의해 형질감염의 안전성 및 단순성으로 인해, 치료적 유용성에 대한 TCR 후보물질의 신속한 스크리닝이 가능하다. 입양 전이(adoptive transfer)에 사용함에 있어 레트로바이러스 형질전이된 T 세포 보다 월등한 이러한 TCR RNA에 의해 형질감염된 T 세포의 장점과는 별도로, TCR RNA에 의해 형질감염된 T 세포는 보고에 따르면 불안정한 인간 T 세포 클론에 대한 "반응제" 및 대체물로서 사용하여, 시험관내에서 APC 상의 특이적이 MHC/펩타이드 복합체 및 타겟 세포를 모니터링할 수 있다. 하나의 증식에 대한 수개의 배치를 동결건조할 가능성은 오랜기간에 걸친 실험을 통해 일정한 품질을 제공할 수 있다.

<40> 많은 수의 T 세포에 전기천공투입 가능하지만, 일시적으로 형질감염된 T 세포를 종양에 주입하였을 때에는 필요하지 않다. 수개의 T 세포는 종양 부분들의 파괴를 야기할 수 있으며, 이후 항원 제시 세포에 의한 항원의 효과적인 제시로 인해 에피토프 유포(spread)가 초래될 수 있다. 또한, 병용-요법, 즉 먼저 TCR에 의해 형질감염된 T 세포를 주입하여 에피토프-유포를 유도한 다음 항원이 탐색되거나 탐색전 수지상 세포를 주입하는 병용요법을 이용할 수 있다. 이러한 경우에, 수많은 T 세포 및/또는 특이적인 TCR의 장기 발현은 필요하지 않다. 게다가, TCR에 의해 형질감염된 CD4⁺ 세포는 종양 거부에 있어 T 세포 도움을 제공할 수 있다.

<41> 전장 TCR α 및 β(또는 γ 및 δ) 체인을 코딩하는 RNA의 전기천공투입은 레트로바이러스에 의해 형질전이된 내인성 TCR 체인들의 페어링에 의해 초래된 오랜 기간 문제가되었던 자가반응성을 해결하기 위한 대안책으로서 이용할 수 있다. 이러한 대안적인 페어링은 일시적인 형질감염 전략에서 이루어지지만, 도입된 TCR α 및 β 체인은 단지 일시적으로 발현되기 때문에, 자가반응성 T 세포의 생성 가능성은 얼마 후 이러한 자가반응성을 느슨하게 할 것이다. 도입된 TCR α 및 β 체인의 발현이 없어지면, 정상적인 자가 T 세포만 남게된다. 이는 전장 TCR 체인이 안정적인 레트로바이러스 형질전이에 의해 도입되어 도입된 TCR 체인이 결코 느슨하게되지 않아, 환자에서 일정한 자가반응성이 초래되는 경우는 아니다.

<42> GFP(green fluorescent protein)의 T 세포 전기천공투입에 성공한 사례 몇건이 이전에 보고되었다. 그러나, GFP RNA 및 단백질 모두 매우 안정적이며, 다른 RNA에서 관찰된 형질감염 효율이 GFP RNA에 의한 효율 보다 일 반적으로 낮다. 본 발명 이전에는, 막 단백질, 특히 이형이량성 막 단백질을 코딩하는 RNA에 의한 T 세포의 형질감염 효율을 매우 충분히 달성하여 기능적 발현을 수행할 수 있음을 생각하지 못하였다. 본 발명은 T 세포에 RNA의 전기천공투입에 대한 최적화된 방법을 제공하며, 이러한 방법은 일시적으로 형질감염된 T 세포에서의 TCR RNA 및 그외 RNA의 기능적 발현을 허용한다. 이 방법을 사용하여 임의 타입의 T 세포를 RNA에 의해 형질감염시킬 수 있다. 바람직한 예에서, RNA는 TCR을 코딩한다. T 세포에서의 TCR RNA 발현은 TCR과 항원:MHC 복합체와의 연결 반응에서 항원-특이적인 작동자 기능을 보인다.

<43> 따라서, 본 발명은 항원 특이적인 T 세포 수용체(TCR)을 코딩하는 RNA에 의해 일시적으로 형질감염된 작동자 T 세포를 포함하는 조성물을 제공하며, 상기 T 세포는 MHC 분자와의 복합체에서 항원을 제시하는 세포에 특이적인 작동자 기능을 가진다.

<44> "T 세포"는 T 림프구를 의미하며, 비체한적으로, γ : δ⁺ T 세포, NK T 세포, CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포를 포함한다. CD4⁺ T 세포는 T_H0, T_H1 및 T_H2 세포 뿐만 아니라 조절성 T 세포(T_{reg})를 포함한다. 조절성 T 세포는 적어도 3 가지 타입이 있다: CD4⁺ CD25⁺ T_{reg}, CD25⁻ T_H3 T_{reg}, 및 CD25⁻ T_R1 T_{reg}. "세포독성 T 세포"는 다른 세포를 죽일 수 있는 T 세포이다. 대부분의 세포독성 T 세포는 CD8⁺ MHC 클래스 I-제한성 T 세포이지만, 일부 세포독성 T 세포는 CD4⁺이다. 모든 타입의 T 세포는 본 방법을 이용하여 형질감염시킬 수 있다. 바람직한 예에서, T 세포는 CD4⁺ 또는 CD8⁺이다. 일 예에서, T 세포는 T_{reg} 세포이다.

<45> 대부분의 T 세포 수용체(TCR)는 MHC 분자(MHC: 항원 복합체)에 결합된 웹타이드 항원(또는 항원의 웹타이드 단편)의 복합체를 인지한다. TCR은 각 T 세포의 항원 특이성을 담당할 뿐만 아니라 MHC 클래스 I 분자 대 MHC 클래스 II 분자에 의해 나열된 항원의 인지에 대한 제한을 담당한다. CD4⁺ T 세포로부터 기원한 TCR은 MHC 클래스 II 제한적인데, 이는 CD4⁺ T 세포로부터 기원한 TCR이 오직 MHC 클래스 II 분자에 의해 나열된 항원만을 인

지함을 의미한다. $CD8^+$ T 세포로부터 기원한 TCR은 MHC 클래스 I 제한적이며, MHC 클래스 I 분자에 의해 나열된 항원만 인지한다. 일 예에서, $CD8^+$ T 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 I 제한형 TCR을 코딩하는 RNA로 형질감염된다. 다른 예에서, $CD4^+$ T 세포는 하나 이상의 MHC 클래스 II 제한형 TCR을 코딩하는 RNA로 형질감염된다.

<46>

놀랍게도, 본 발명자들은 MHC 클래스 I 특이적인 항원 인지가 MHC 클래스 I 특이적인 TCR을 코딩하는 핵산의 형질감염에 의해 $CD4^+$ T 세포에 부여될 수 있음을 발견하였다. 이와 유사하게, MHC 클래스 II 특이적인 항원 인지가 MHC 클래스 II 특이적인 TCR을 코딩하는 핵산의 형질감염에 의해 $CD8^+$ T 세포에 부여될 수 있다. 본원에서, TCR은, 이 TCR을 가지고 있는 T 세포가 (MHC 분자와의 복합체 형태의) 특정 항원으로 자극되었을 때 무관련 항원으로 자극되었을 때에 비하여 현저하게($p<0.05$) 우수한 면역학적 기능(예, 사이토카인 분비, 자극 세포의 용해 등)을 나타낸다면, 상기 항원에 "특이적인" 것으로 간주된다. 따라서, 일 예에서, $CD8^+$ T 세포는 핵산, 바람직하기로는 하나 이상의 MHC 클래스 II 제한형 TCR을 코딩하는 RNA에 의해 형질감염된다. 다른 예에서, $CD4^+$ T 세포는 핵산, 바람직하기로는 하나 이상의 MHC 클래스 I 제한형 TCR을 코딩하는 RNA로 형질감염된다. 또한, $CD8^+$ T 세포는 핵산, 바람직하기로는 MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 II 제한형 TCR 둘다를 코딩하는 RNA로 형질감염될 수 있다. 이와 유사하게, $CD4^+$ T 세포는 핵산, 바람직하기로는 MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 II 제한형 TCR 둘다를 코딩하는 RNA로 형질감염될 수 있다. 본 발명에서 이용가능한 TCR은 또한 항원이 MHC 분자와 복합체를 이루거나 이루지 않던지 항원을 인지할 수 있는 키메라 MHC-비제한성 TCR을 포함한다. MHC-비제한성 TCR은 이 TCR을 가지는 T 세포가 (MHC 분자와의 복합체 형태이거나 또는 아닌) 특정 항원으로 자극되었을 때 무관련 항원으로 자극되었을 때에 비하여 현저하게($p<0.05$) 우수한 면역학적 기능(예, 사이토카인 분비, 자극 세포의 용해 등)을 나타낸다면, 상기 항원에 "특이적인" 것으로 간주된다. 따라서, $CD4^+$ T 세포 및 $CD8^+$ T 세포 둘다 핵산, 바람직하기로는 MHC-비제한성 TCR을 코딩하는 RNA 단독으로, 또는 MHC 제한성 TCR과 조합하여 형질감염될 수 있다.

<47>

천연적으로 형성되는 TCR은 α 및 β 체인(TCR α 및 TCR β) 또는 γ 및 δ 체인(TCR γ 및 TCR δ) 중 어느 하나인 2개의 폴리펩타이드 체인으로 구성된 이형이량체성 당단백질이다. $\alpha:\beta$ TCR은 $CD8^+$ T 세포와 $CD4^+$ T 세포에서 천연적으로 발현되지만, $\gamma:\delta$ TCR은 $\gamma:\delta + T$ 세포라고 하는 T 세포 서브세트에서 천연적으로 발현된다. TCR 다양성은 흥선에서 T 세포 발생 동안에 가변부 유전자 단편의 일련의 재배열에 의해 이루어진다. 각 체인은 세포의 가변부, 세포의 불변부, 2개의 체인간의 이황화 결합을 형성하기 위한 시스테인 잔기가 있는 힌지 영역, 트랜스막 영역 및 세포질 테일(cytoplasmic tail)을 가진다. 이형이량체의 2곳의 가변부는 하나의 항원 결합부를 형성한다. α 및 β TCR 체인의 가변부의 CDR(complementarity determining region) 3은 펩타이드와 상호작용한다. α 및 β TCR 체인의 가변부의 CDR1 및 2는 MHC 분자와 상호작용한다.

<48>

본 발명은 항원에 특이적인 T 세포 수용체를 코딩하는 RNA에 의해 일시적으로 형질감염된 T 세포를 제공한다. TCR은 MHC 클래스 I 제한형, MHC 클래스 II 제한형, 또는 MHC 비-제한성(MHC 독립적)이다. 이들 타입의 TCR 각각은 당업자들에게 공지되어 있다. MHC 비-제한성 키메라 수용체의 예는 Bolhuis et al. Adv Exp Med Biol. 1998;451:547-55; Weijtens et al. Gene Ther. 1998 Sep;5(9):1 195-203; Weijtens et al. Int J Cancer. 1998 Jul 17;77(2):181-7; Eshhar et al. J Immunol Methods. 2001 Feb 1;248(1-2):67-76; Hombach et al. Int J Cancer. 2000 Oct 1;88(1):115-20; 및 Daly et al. Cancer Gene Ther. 2000 Feb;7(2):284-91에 기재되어 있으며, 이들 문헌은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포 둘다 임의 타입의 TCR로 형질감염될 수 있다. 또한, T 세포는 사이토카인, 전사 조절자(예, FoxP3), 공동-자극 분자 등의 다른 대상 폴리펩타이드를 코딩하는 추가적인 RNA로 공동-형질감염될 수 있다. 그러나, 본원에서, T 세포 수용체 코딩 RNA에 의해 형질감염은, TCR을 코딩하는 RNA의 비율이 정상적인 총 RNA 또는 총 mRNA에 비해 농화된 것이 아니라면, T 세포 또는 T 세포 유도체(예, T 세포 종양)의 총 RNA 또는 총 mRNA에 의해 형질감염은 배제한다.

<49>

"T 세포 수용체를 코딩하는 RNA"는, 발현된 T 세포 수용체가 특이적으로 항원에 결합하여, 항원이 TCR에 의해 인지되는 MHC 클래스 분자와 복합체를 이루었을 때 (또는 TCR이 MHC 비-제한성 TCR이라면 MHC 분자와의 복합체 형성 없이) 정상적으로 인지하는, 기능성 T 세포 수용체를 코딩하는 하나 이상의 RNA를 의미한다. 대부분의 경우에서, 상기 RNA는 TCR α 체인을 코딩하는 RNA 및 TCR의 해당 β 체인을 코딩하는 RNA(또는 대안적으로 TCR의 δ 체인을 코딩하는 RNA 및 TCR의 해당 γ 체인을 코딩하는 RNA)를 포함할 것이다. 대안적으로, 키메라 수용체

를 사용하여, 미스페어링을 방지하고, HLA 제한을 빠져나갈 수 있다. 키메라 TCR 폴리펩타이드는 여러가지 단백질로부터 유래된 도메인을 함께 융합함으로써 만들 수 있다. 예를 들어, 세포내 도메인은 일반적으로 TCR-복합체의 세포내 시그널링 도메인, 예컨대 CD3 zeta-체인, 또는 유사한 양상으로 기능하는 시그널링 도메인, 예컨대 Fc 수용체의 시그널링 도메인을 포함할 것이다. MHC에서 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 세포외 도메인, 예컨대 TCR α 및 β 체인의 세포외 도메인, 또는 MHC 독립적인 항원에 결합할 수 있는 세포외 도메인, 예컨대 항원 특이적인 scFv를 선택할 수 있다. 트랜스멤브레인 도메인은 단백질로부터 취하거나 단백질로부터 유래될 수 있으며, 세포내 도메인 또는 세포외 도메인 중에서 취할 수 있으며 또는 그외 트랜스멤브레인 단백질로부터 취하거나 유래될 수 있다.

<50>

TCR 유전자가 T 세포에 레트로바이러스를 통해 형질전이된 대부분의 경우에, 전장 TCR α 및 β 체인 유전자를 사용하여 이들 T 세포를 재표적화할 수 있다. 그러나, 이론상 도입된 체인이 내인성 TCR 체인과 쌍을 이룰 수 있기 때문에, 전장 TCR 체인 유전자를 이용하는데 좋지 않을 가능성이 있다(8, 30, 32). 이러한 대안적인 쌍형성은 자가반응성일 수 있는 예측불가능한 특이성을 도출할 수 있다. 이러한 자가-반응성 TCR의 생성은 유전자 치료 조절 위원회에서 인지하고 있는 문제이다. 대안적인 쌍이 형성은 gp100 또는 MDM-2에 특이적인 전장 TCR 체인이 T 세포에 레트로바이러스에 의해 형질전이된 연구에서 확인되었다. 도입된 TCR β 체인(즉, 각각 50-60% 및 30-50%)를 발현하는 T 세포의 분획만 각각의 MHC/펩타이드 사량체에 결합할 수 있다(24, 27).

<51>

대안적인 쌍 형성 문제점에 대한 해결 방법은 전장 TCR과는 구조적으로 상이한 단쇄 또는 2쇄 변형된 TCR계 수용체를 도입하는 것으로, 그 결과, 도입된 TCR 체인 사이에 독점적인 쌍이 형성된다(8). 단쇄 TCR(scTCR)을 구축하는 방법은 Lake et al. (1999) Int Immunol 11:745-751 및 Nitta et al. (1990) Science 249:672에 기재되어 있으며, 이들 문헌은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 수종의 흑색종 항원에 특이적인 이러한 수용체, 예컨대 MAGE-1(29), gp100(23)은 레트로바이러스 형질전이에 의해 T 세포에 기능적으로 도입된다. 그러나, OVA 펩타이드에 특이적인 전장 및 변형된 단쇄 TCR의 세심한 비교를 통해, 전장 TCR 형질전이된 T 세포에 비해 단쇄 TCR이 형질전이된 T 세포가 OVA 펩타이드-펄스된 타겟 T 세포(즉, 특히 저농도 펩타이드가 사용되었을 때) 및 자연적으로 발현되는 타겟 T 세포로의 자극에 대한 반응에 효과가 낮은 것으로 확인되었다(32). 따라서, 가장 효과적인 T 세포를 만들기 위해, TCR 전달에 전장 TCR 체인을 이용하는 것이 바람직하다.

<52>

바람직하기로는, TCR 체인은 포유류 유래이며, 더 바람직하기로는 영장류 유래이며, 가장 바람직하기로는 인간 유래이다. 바람직한 예에서, TCR은 종양 또는 병원체 유해 항원이나 자가-항원을 특이적으로 인지한다. 바람직하기로는, 항원은 종양-특이적인 항원이거나 병원체 특이적인 항원이다. 바람직한 종양 항원은 하기 타입의 종양 유래의 항원을 포함한다: 신장 세포암, 흑색종, 만성 림프성 백혈병, 유방암, 폐암, 전립선암, 난소암 및 대장암. 종양 특이적인 항체의 예로는, MART-1, MAGE-1, MAGE-3, gp75, MDM2, 티로시나제, 텔로머라제, gp100, 서비빈(survivin), α-1 폐토단백질(fetoprotein), G250 및 NY-ESO-1을 포함하나, 이로 한정되는 것은 아니다. 바람직한 병원체 항원은 HIV 및 HCV 유래의 항원이다.

<53>

수많은 α, β, γ 및 δ TCR 체인의 서열이 당업계에 공지되어 있다(예, Arden et al. (1995) Immunogenetics 42:455-500, 이는 원용에 의해 본 명세서에 포함됨). 현재, GenBank에는 다양한 척추동물 종의 T 세포 수용체 서열로 12,000건 이상이 포함되어 있다. TCR 라이브러리의 제조 및 스크리닝 방법이 미국 특허 공개번호 2003/0082719에 기재되어 있으며, 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 추가적인 TCR 체인을 클로닝하는 방법은 당업자들에게 공지되어 있다. 예컨대, TCR 체인은 원하는 특이성의 TCR을 발현하는 T 세포를 동정하고 이의 RNA를 DNA로 역전사함으로써, 클로닝할 수 있다. 그 다음에, TCR α 및 β 체인의 서브타입을 PCR로 결정할 수 있다. 서브타입의 동정으로 이 둘 체인의 전장 코딩 서열을 증폭시킬 수 있는 특이 프라이머를 선정할 수 있다. PCR을 이용하여 TCR α 및 β 체인의 서브타입을 결정하고, TCP 체인의 RT-PCR용 프라이머를 선정하는 방법은 Lake et al. (1999) Int Immunol 11:745-751 및 Nitta et al. (1990) Science 249:672에 기재되어 있으며, 이들은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. TCR γ 및 δ 체인의 RT-PCR에 의한 클로닝 하는 방법과 프라이머는 Kapp et al. (2004) Immunology 111:155-164; Weber-Arden et al. J Immunol Methods. 1996 197(1-2):187-92; 및 Olive (1995) Neuroimmunol 62:1-7에 기재되어 있으며, 이들 문헌은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. TCR α 및 β 체인의 서브타입 동정으로 시작되는 초기 방법에 대한 대안책은, TCR RNA의 보존적인 영역에 혼성화하는 역전사용 프라이머를 이용하여 TCR RNA의 cDNA 카피를 역전사 프라이머를 이용하여 대신 역전사한 다음 cDNA의 3' 말단에 (예, 말단 트랜스퍼라제 또는 개선된 캡스위치 기법에 의해(WO 2005/052128 참조, 이 문헌은 원용에 의해 본 명세서에 포함됨) 규명된 서열을 부착시키는 것이다. 임의 세포(예, T 세포)에서 추출한 RNA의 RT-PCR 방법은 및 시험관내 전사 방법은 WO 2005/052128 및 PCT/US05/32710에 기재되어 있으며, 이들 문헌은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

- <54> TCR RNA의 cDNA 카피는 시험관내 전사용 발현 카세트로 삽입시킬 수 있다. 대안적으로, TCR cDNA는 시험관내 전사 뿐만 아니라 전기천공투입된 T 세포내에서 시험관내 전사된(IVT) RNA의 번역에 있어 적절한 전사 및 번역 신호를 포함하는 프라이머를 이용하여 증폭할 수 있다. T 세포에서의 최적 번역을 보장하기 위해, TCR 체인을 코딩하는 IVT RNA는 캡핑되고 폴리아데닐화된 것이 바람직하다. 또한 mRNA의 안정성 및/또는 번역 효율은 5' 및 3' UTR과 같은 추가적인 비코딩 서열을 조합함으로써 높일 수 있다.
- <55> 시험관내 전사 방법은 당업자들에게 공지되어 있다(예, U.S. 2003/0194759, 이들 문헌은 원용에 의해 본 명세서에 포함됨). 전형적인 시험관내 전사 반응에서, DNA 주형은 4종의 리보뉴클레오시드 트리포스페이트와 $\text{m}^7\text{G}(5')\text{ppp}(5')\text{G}$ 와 같은 캡 다이뉴클레오타이드나 ARCA와 같은 캡 유사체의 존재 하에 박테리오파지 RNA 중합효소를 이용하여 전사한다. 이러한 방법은 당업계에 일반적이며, 하기 공개문헌들에 기재되어 있다: Sambrook et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd edition (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Ausubel et al. eds. (1987)); the series METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.); PCR: A PRACTICAL APPROACH (M. MacPherson et al. IRL Press at Oxford University Press (1991)); 및 PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (MacPherson, Hames and Taylor eds. (1995)).
- <56> T 세포에 일시적인 TCR IVT mRNA에 의해 형질감염으로 RNA 번역 및 TCR 이형이량체(또는 키메라 TCR)의 세포 막 위치화가 이루어진다. MHC 분자와의 복합체 형태로의 상기 TCR에 항원 결합은 활성화된 T 세포에 의한 작동자 기능을 발생시킨다. 일시적인 형질감염은 세포에 형질감염된 RNA가 숙주 세포에 삽입되지 않거나 세포내에서 독립적으로 복제됨을 의미한다. 이와는 반대로 레트로바이러스 형질전이는 레트로바이러스 벡터의 숙주 염색체로의 삽입에 달려있다.
- <57> 바람직한 예에서, 휴지기 T 세포, 바람직하기로는 휴지기 작동자 T 세포에 RNA, 바람직하기로는 TCR을 코딩하는 RNA 및/또는 FoxP3 RNA가 전기천공투입된다. 흉선세포는 흉선에서 성숙형 T 세포로 분화되고, 미노출 표현형을 가진 상태로 혈류 및 말초로 이동하여 휴지기 상태로 있게 된다. 이들은 특이적인 항원:MHC 복합체와 이들이 활성화되게 하는 공동-자극 신호를 함께 마주치게 되면, 분열되기 시작하여 새로운 표현형을 습득, 예컨대 작동자 T 세포 또는 주 기억 T 세포가 된다. 이들은 항원이 제거되면 다시 휴지기 상태가 될 수 있다. 항원:MHC 복합체와 다시 만나게 되면, 이때에는 공동-자극이 필요하지 않으며, T 세포는 신속하게 다시 활성화된다. 이것은 다시 분열하고, 기억 T 세포는 작동자 T 세포로 추가적으로 분열될 수 있을 것이다. 그러나, 다시 휴지기 상태로 접어들 수도 있다. 건강한 공여체의 말초 T 세포는 일반적으로 미노출, 기억 및 대부분이 작동자 T 세포의 혼합으로 구성되어 있으며, 대부분은 휴지기 상태이다. 이들 휴지기 T 세포는 드물게 분열하며, 일반적으로 응축된 염색질 및 작은 세포질을 가지며, 크기가 작다. 활성화시, 이들은 신속하게 증폭하며, 크기도 증가 한다. 휴지기 T 세포는 또한 전형적으로 IL-2의 존재시에 PHA, PMA 또는 OKT3로의 자극화에 의해 시험관내에서도 활성화될 수 있다. 놀랍게도, 본 발명자들은 TCR RNA의 휴지기 T 세포내 전기천공투입이 PHA, PMA 또는 OKT3 Ab을 이용한 자극 없이도 형질감염된 TCR에 특이적인 작동자 기능을 부여한다는 사실을 발견하였다.
- <58> 휴지기 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포는 전형적으로 CD25⁻ HLA DR⁻ 및 L-셀렉틴⁺이며, 분열하거나 사이토카인을 발현하지 않는다. 활성화된 T 세포는 전형적으로 L-셀렉틴⁻, CD25⁺, HLA DR⁺이며, 빠르게 분열하며, IL2, IFNy 및 TNF 등의 다양한 사이토카인을 생산한다. 말초 혈액으로부터 T 세포를 분리하는 방법은 당업자들에게 공지되어 있으며, 또한, 본원에 기술되어 있다.
- <59> T 세포 작동자 기능으로는, 비제한적으로, 1종 이상의 IL-2 분비, 종양 괴사 인자(TNF- α) 분비, 인터페론- γ (IFN γ) 분비, 세포독성, 헬퍼 기능(예, 대식세포의 활성화 및/또는 B 세포의 활성화) 및 조절 기능이 있다. 작동자 기능은 형질감염된 T 세포의 타입에 따라 결정된다. 활성화된 CD8⁺ T 세포의 작동자 기능으로는 세포독성 및 IFN γ 분비를 포함한다. 활성화된 CD4⁺ T_{H1} 세포의 작동자 기능으로는 대식세포의 활성화를 포함한다. 활성화된 CD4⁺ T_{H2} 세포의 작동자 기능으로는 B 세포를 증식시키고 항체를 생산하기 위한 B 세포의 활성화를 포함한다. 조절성 작동자 기능으로는, 비제한적으로, IL-10 분비, 및/또는 TGF- β 분비를 포함한다. 작동자 기능의 검출 및/또는 측정 방법은 당업자들에게 공지되어 있다.
- <60> T 세포의 작동자 기능은 이의 TCR이 타겟 T 세포상에서 항원:MHC 복합체와의 특이적인 결합에 반응하여 분비하는 작동자 분자에 의해 결정된다. 세포독성 CD8⁺ T 세포에 의해 분비될 수 있는 세포용해성 과립구에 저장된 세포독성 작동자 분자는 퍼포린(perforin), 그랜자임(granzyme), 그레눌라이신(granulysin) 및 Fas 리간드를

포함한다. 퍼포린은 타겟 세포에 트랜스멤브레인 포어를 형성한다. 그랜자임은 세포자살을 촉발시킬 수 있는 세린 프로테아제이다. 그래서 라이신은 타겟 세포에 세포자살을 유도한다. 또한, Fas 리간드는 타겟 세포에 세포자살을 유도할 수 있다. 세포독성 T 세포가 분비할 수 있는 그외 작동자 분자로는 IFN-γ, TNF-β 및 TNF-α가 있다. IFN-γ는 바이러스 복제를 저해하고, 대식세포를 활성화시킨다. TNF-β 및 TNF-α는 대식세포 활성화 및 일부 타겟 세포 사멸에 참여할 수 있다. CD8⁺ T 세포에 CD8⁺ T 세포 유래 TCR RNA의 형질감염시, MHC 클래스 I 제한형 항원-특이적인 세포독성(즉, 항원:MHC 클래스 I 복합체를 표시하는 타겟 세포에 대한 세포독성)이 형성된다. 반대로, CD8⁺ T 세포에 CD4⁺ T 세포 유래의 TCR RNA의 형질감염시, MHC 클래스 II 제한형 항원-특이적인 세포독성(즉, 항원:MHC 클래스 II 복합체를 표시하는 타겟 세포에 대한 세포독성)이 형성된다. 세포내 병원체(예, 마이코박테리아, 결핵 원인체 및 나병 원인체) 유래 항원은 전형적으로 MHC 클래스 II 분자에 나열된다. 따라서, 마이코박테리아 항원에 특이적인 TCR을 코딩하는 RNA에 의해 CD8⁺ T 세포를 형질감염시키면, 마이코플라스마가 감염된 세포에 대해 MHC 클래스 II 제한형 항원 특이적인 세포독성이 형성될 수 있다.

<61> CD4⁺ T_H1 세포에 의해 분비될 수 있는 대식세포 활성화 작동자 분자로는 IFN-γ, TNF-α, GM-CSF, CD40 리간드(CD 154) 및 Fas 리간드를 포함한다. CD4⁺ T_H1 세포의 서브세트는 또한 B 세포 활성화를 보조할 수 있으며, IFN-γ 및 CD40 리간드는 대식세포를 활성화시켜 포식된 박테리아를 파괴시킨다. 그외 T_H1 세포에 의해 분비될 수 있는 작동자 분자들로는 IL-3, TNF-β(B 세포를 저해함), IL-2, CXCL2 및 GROβ가 있다. Fas 리간드와 TNF-β는 세포내 박테리아로 만성적으로 감염된 세포를 사멸시킬 수 있다. IL-2는 T 세포 증식을 유도한다. IL-3 및 GM-CSF는 대식세포 분화를 유도한다. CCL2는 대식세포의 주화성을 유도한다. CD4⁺ T 세포 유래의 TCR RNA의 CD4⁺ T_H1 세포 형질감염 결과 MHC 클래스 II 제한형 작동자 기능(즉, 항원:MHC 클래스 II 복합체를 표시하는 타겟 T 세포의 항원-특이적인 결합에 대한 반응으로 대식세포의 활성화)이 형성된다. 반면, CD8⁺ T 세포 유래의 TCR RNA의 CD4⁺ T_H1 세포 형질감염 결과, MHC 클래스 I 제한형 작동자 기능(즉, 항원:MHC 클래스 I 복합체를 표시하는 타겟 T 세포에 항원-특이적인 결합에 대한 반응으로 고 IL-2, TNF 및 IFN 분비)이 형성된다.

<62> B 세포를 활성화시키는 T_H2 세포로부터 분비될 수 있는 작동자 분자로는 IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 IL-15 및 CD40 리간드를 포함한다. 그외 T_H2 세포에 의해 분비될 수 있는 작동자 분자로는 IL-3, GM-CSF, IL-10(대식세포 활성화를 저해함), TGF-β, IL-2, CCL11(eotaxin) 및 CCL17(TARC)을 포함한다. 활성화된 T_H2 세포(및 일부 T_H1 세포)는 B 세포를 자극하여, 이들이 B 세포가 나열한 특이적인 항원:MHC 클래스 II 복합체를 인지하였을 때 증식 및 분화시킨다. CD4⁺ T 세포 유래의 TCR RNA로 CD4⁺ T_H2 세포를 형질감염시키면, MHC 클래스 II 제한형 작동자 기능(즉, 항원:MHC 클래스 II 복합체를 표시하는 타겟 T 세포의 항원-특이적인 결합에 대한 반응으로 B 세포의 활성화)이 형성된다. 반면, CD8⁺ T 세포 유래의 TCR RNA에 의해 CD4⁺ T_H1 세포가 형질감염되면, MHC 클래스 I 제한형 작동자 기능(즉, 항원:MHC 클래스 I 복합체를 표시하는 타겟 T 세포에 항원-특이적인 결합에 대한 반응으로 B 세포의 활성화)이 형성된다.

<63> CD4⁺ 조절성 T 세포는 면역 반응을 하향 조절한다. T_R1 조절성 T 세포는 면역억제성 작동자 분자, 예컨대 IL-10 및 TGF-β를 분비한다. IL-10은 T 세포에 의한 IL-2, TNF-α 및 IL-5의 생산을 감소시킴으로써 T 세포 반응을 하향 조절한다. TGF-β는 T 세포 증식, 사멸 및 사이토카인 발현을 감소시킨다. T_R3 조절성 T 세포는 면역억제성 작동자 분자 TGF-β의 분비에 의해 면역 반응을 하향 조절한다. CD4⁺ CD25⁺ 조절성 T 세포는 면역억제성이며, 그들의 TCR에 항원 특이적 결합에 의해 활성화된다. 일단 활성화되면, CD4⁺ CD25⁺ 조절성 T 세포는 항원-독립적인 방식으로 면역억제성 작동자 기능을 나타낸다.

<64> 일시적으로 형질감염된 작동자 T 세포는 종양, 병원체 감염, 자가면역 질환, GVHD의 치료 및 이식 거부 반응 예방에 사용할 수 있다. 본 발명의 바람직한 예에서 TCR은 종양 항원, 병원체 항원 또는 자가-항원에 특이적이다. 바람직하기로는 항원은 종양 항원 또는 병원체 항원이다. 항원은 임의 타입의 종양으로부터 형성될 수 있으며, 상기 종양으로는 비제한적으로 신장 세포 종양 흑색종 만성 림프성 백혈병 유방암, 폐암 전립선암, 난소암 또는 대장암을 포함한다. 바람직한 흑색종 항원으로는 MART-1, MAGE-1, MART-1 및 gp 100이 있다. 그외

바람직한 종양 항원으로는 gp75, MDM2, 티로시나제, 서비빈, α1 폐토단백질, CA125, CA15-3, CA19-9, PSA, G250 및 NY-ESO-1이 있다. 추가적인 종양 관련 항원 및 TAA의 동정 방법은 Nicolette and Miller (2003) Drug Discovery Today 8:31-38; Kawakami and Rosenberg (1997) Immunol Res 16:313 및 Slingluff et al. (1994) Curr Opin Immunol 6:733에 개시되어 있으며, 이들 문헌은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 바람직한 병원체 항원은 HIV 및 HCV 항원이다. 암 치료에서, 종양 특이적인 TCR의 소스는 림프구 침윤성 종양일 수 있다. 아네르기한 상태임에도 불구하고, 이들은 기능성 TCR을 발현한다. 다른 가능성은 환자 유래 T 세포의 시험관내 자극이다. 조절 메카니즘이 없는 경우, TAA 특이적 T 세포는 확장될 수 있다. TCR 어레이가 형성되고 나면, MHC 타입과 종양의 항원 발현에 따라 각 환자에서 개별적으로 이들의 유형을 선택할 수 있다. HIV 치료에서, 일부 면역성 웹타이드는 잘 특성화되어 있다. 그러나, 대부분 환자의 면역 시스템은 이미 너무 약하여, 바이러스에 대항하는 효과적인 면역 반응을 형성하지 못한다. TCR은 효과적인 면역 반응을 보이는 HIV 감염 환자(예, 초기 또는 후기 장기 비-진행성 환자)나 백신 주사를 받은 건강한 공여체로부터 준비 할 수 있다.

<65> 전술한 바와 같이, MHC 클래스 I 제한형 TCR, MHC 클래스 II 제한형 TCR 및/또는 MHC 비-제한형 TCR 중 어느 하나를 코딩하는 RNA는 전기천공투입에 의해 임의 타입의 T 세포를 형질감염시킬 수 있다. 일 예로, T 세포는 조절성 T 세포(T_{reg})이다. 바람직하기로는, T_{reg} 는 $CD4^+ CD25^+$ 이다. 자가-항원에 특이적인 TCR RNA에 의해 형질감염된 조절성 T 세포는 자가면역 질환 치료에 유용하다. 이식 항원에 특이적인 TCR RNA에 의해 형질감염된 조절성 T 세포는 이식 거부 반응 예방 및 이식 편대 숙주 질환(GVHD)의 치료에 유용할 수 있다.

<66> FoxP3는 $CD4^+$ T 세포의 조절성 T 세포로의 분화에 참여하는 전사 인자이다. FoxP3의 레트로바이러스 발현은 $CD4^+$ T 세포를 조절성 T 세포로 변환시키기에 충분하다(Sakaguchi et al. (2003) Science 299:1057-61). 따라서, 일 예에서, 본 발명은 FoxP3를 코딩하는 내인성 RNA을 포함하는 T_{reg} 세포를 제공한다. 인간 FoxP3 아미노산 서열 및 cDNA 서열은 유전자은행 등록번호 NM_014009 (VERSION NMJH4009.2 GI:31982942)에 기재되어 있다. 내인성 RNA는 RNA의 형질감염에 의해 또는 내인성 발현 카세트의 전사에 의해 직접 도입된 RNA를 의미한다. 따라서, $CD4^+$ T 세포는 FoxP3를 코딩하는 RNA나 또는 FoxP3에 대한 발현 카세트로 형질감염될 수 있다. 바람직한 예에서, T 세포는 FoxP3를 코딩하는 RNA으로 일시적으로 형질감염된다. 또한, T 세포는 FoxP3 RNA 및 TCR RNA로 공동-형질감염될 수 있다.

<67> 본 발명자들은 T 세포에 RNA를 전기천공투입시키는 방법을 최적화하였다. 바람직하기로는, 정제된 $CD8^+$ T 세포 또는 정제된 $CD4^+$ T 세포가 전기천공투입된다. TCR을 코딩하는 RNA의 T 세포로의 전기천공투입은 형질감염된 T 세포에 새로운 항원-특이성을 부여한다. 따라서, 일 측면으로, 본 발명은 T 세포에 새로운 항원 특이성을 부여하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 정제된 $CD8^+$ T 세포나 정제된 $CD4^+$ T 세포를 포함하는 조성물에 항원 특이적인 TCR 수용체를 코딩하는 RNA를 전기천공투입하는 단계를 포함한다.

<68> 정제된 $CD8^+$ T 세포는, 정제된 $CD8^+$ T 세포 조성물에서 $CD8^+ T$ 세포: $CD8^- T$ 세포의 비가 말초 혈액에서의 $CD8^+ T$ 세포: $CD8^- T$ 세포 비 보다 높은 것을 의미한다. 이와 유사하게, 정제된 $CD4^+$ T 세포는, 정제된 $CD4^+$ T 세포 조성물에서 $CD4^+ T$ 세포: $CD4^- T$ 세포의 비가 말초 혈액에서의 $CD4^+ T$ 세포: $CD4^- T$ 세포 비 보다 높은 것을 의미한다. 바람직하기로는, 정제된 T 세포($CD8^+$ 또는 $CD4^+$)는 상기 조성물에 존재하는 총 T 세포의 75% 이상, 더 바람직하기로는 90% 이상, 가장 바람직하기로는 95% 이상 또는 심지어 99% 이상을 차지한다. $CD4^+$ T 세포 또는 $CD8^+$ T 세포를 정제하는 방법은 당업자들에게 공지되어 있다. 바람직한 예에서 T 세포는 자기 분류에 의해 정제한다. 일 예에서, T_{reg} 는 $CD8^+ T$ 세포 또는 $CD4^+ T$ 헬퍼 세포로부터 분리 또는 제거된다.

<69> 전기천공투입 이전에, T 세포는 비자극되거나(및 대개 휴지기) 또는 시험관내에서 (예컨대 OKT3 Ab, PHA, PMA 등에 의해) 자극될 수 있다. 바람직하기로는, 정제된 $CD8^+$ T 세포 또는 $CD4^+$ T 세포는 피토헤마글루티닌(PHA) 또는 OKT3에 의해 전기천공투입을 수행하기 전에 시험관내에서 자극되지 않는다. 따라서, 다른 측면에서, 본 발명은 T 세포에 새로운 항원 특이성을 투여하는 방법을 제공하며, 이 방법은 휴지기 T 세포에 항원 특이적인 TCR을 코딩하는 RNA를 전기천공투입하는 단계를 포함한다.

- <70> 그러나, 전기천공투입하는 단계 이전에 T 세포의 수를 늘리는 것이 바람직한 경우에는, T 세포는 증식하도록 (예컨대, PHA, PMA 및/또는 OKT3와 배양에 의해, 바람직하기로는 IL-2 존재하에 배양에 의해) 자극한 다음 RNA를 전기천공투입할 수 있다.
- <71> 본 발명자들은 휴지기 또는 자극받은 T 세포 중 어느 하나의 최적 전기천공투입 조건은 2-10 millisecond(ms) 동안 전계 강도 100-150 Volts/mm 간격(gap width)(예, 4 mm 갭 동안 400- 600V)이며, 사각파 펄스를 이용한다. 바람직하기로는 전계 강도는 110-140V/mm이며, 더 바람직하기로는 120-130V/mm, 가장 바람직하기로는 약 125V/mm이다. 예컨대, 2 mm 큐벳을 이용하는 경우, 가장 바람직한 전압은 250V이다. 바람직하기로는, 전압은 3 - 7 ms 간, 더 바람직하기로는 4-6 ms 간, 가장 바람직하기로는 5 ms 간 적용된다. 바람직한 예에서 세포는 OptiMEM 배지 중에서 또는 유사한 전도성의 배지중에서 실온에서 전기천공투입된다.
- <72> 일 예에서, 본 발명은 사각파 펄스를 이용한 2-10 ms 동안 전계 강도 100-150V/mm에서, T 세포에 RNA를 전기천공투입하는 단계를 포함하며, 상기 T 세포는 전기천공투입하는 단계 이전에 PHA 또는 OKT3에 의해 시험관내에서 자극되지 않은 것을 특징으로 하는 T 세포의 일시적인 형질감염 방법을 제공한다. 바람직하기로는, T 세포는 전기천공투입 전에 정제된다(예, 정제된 CD8⁺ T 세포, 정제된 CD4⁺ T 세포 또는 정제된 조절성 T 세포). 다른 예에서, T 세포는 전기천공투입 이후에 정제된다.
- <73> T 세포에 일시적인 TCR RNA의 형질감염은 종양, 병원체 감염, 자가면역 질환, 이식 거부 반응 및 GVHD의 치료에 유용하다. 따라서, 일 예에서, 본 발명은 면역요법용 약제 제조에 있어 본 발명의 방법에 의해 제조된 T 세포의 용도를 제공한다. 다른 측면으로, 본 발명은 항원에 특이적인 TCR을 코딩하는 RNA에 의해 일시적으로 형질감염된 T 세포를 투여하는 단계를 포함하며, 상기 T 세포는 MHC 분자와의 복합체 상태에서 항원을 제시하는 세포에 대한 작동자 기능을 나타내는 것을 특징으로 하는, 개체에게 항원-특이적인 T 세포 작동자 기능을 제공하는 방법을 제공한다. 바람직하기로는, 상기 작동자 기능은 세포독성이며, 상기 항원은 종양-특이적이거나 또는 병원체-특이적이다. 바람직한 예에서, T 세포는 개체의 본인의 것이다.
- <74> 본 발명의 T 세포 조성물은 이들과 연결 또는 연결되지 않거나 동일한 투약으로 투여되는 다른 치료제 및 세포 독성제와 함께 병용-투여할 수 있다. 이는 상기 제제와 (예, 하나의 조성물로 또는 개별 조성물로) 동시에 투여하거나 또는 상기 제제를 투여하기 전이나 후에 투여할 수 있다. 상기 제제는 IL-2와 같은 면역 자극성 사이토카인, 사이토스타티카(cytostatic)와 같은 화학치료 약물, 항바이러스제, 백신 또는 치료를 부추기거나 개선시키는 다른 유형의 치료제를 포함할 수 있다.
- <75> **시험관내 전사된 RNA의 제조 방법**
- <76> 본 발명의 특정 예는 IVT RNA의 제조 및 이용이 필요하다. IVT RNA는 당업계에 공지된 임의 방법을 이용하여 제조할 수 있다. 바람직한 예에서, 밸런 카세트는 시험관내 전사에 적합한 프로모터, 예컨대 T7 프로모터 또는 SP6 프로모터를 포함한다. 바람직하기로는, 시험관내에서 전사된 mRNA는 안정성 및 번역 효율 측면에서 최적화되어 있다. 예컨대, mRNA 안정성 및/또는 번역 효율은 mRNA에서 3' UTR 및/또는 5' UTR을 포함시킴으로써 증가시킬 수 있다. 3' UTR의 바람직한 예로는 인간 β -액틴(Qin and Gunning (1997) Journal of Biochemical and Biophysical Methods 36 pp. 63-72) 및 로타바이러스 유전자 6(Yang et. al., 2004 Archives of Virology 149:303-321)의 3'UTR이 있다. 5' UTR의 바람직한 예로는 Hsp70(Vivinus, et al, 2001 European Journal of Biochemistry 268:1908-1917), VEGF(Stein et al, 1998 Molecular and Cellular Biology 18:3112-3119), 비장 괴사 바이러스 RU5(Roberts and Boris-Lawrie 2000 Journal of Virology 74:8111-8118), 및 담배 etch 바이러스(Gallie et al (1995) Gene 165:233-238; Niepel and Gallie (1999) Journal of Virology 73:9080-9088. Gallie, Journal of Virology (2001) 75:12141-12152)의 5' UTR내 번역 인핸서가 있다.
- <77> **T 세포의 분리와 증폭**
- <78> 휴지기 T 세포 및 활성화된 T 세포를 포함한 T 세포는 당업자들에게 공지된 방법에 의해 포유류로부터 분리할 수 있다. 비제한적인 한가지 방법으로, 확립된 과정에 따라 Ficoll-Hypaque 밀도 구배 원심분리를 이용하여 적혈구 세포 및 호중구로부터 PBMC를 분리한다. 세포는 1% 소태아 혈청(FBS)가 보충된 변형된 AIM-V(AIM-V(GIBCO), 2 mM 글루타민, 10 μ g/ml 젠타마이신 세페이트, 50 μ g/ml 스트렙토마이신)로 행군다. 표준 기법에 따라 컬럼 또는 자기 비드와 연결된 적정 단일클론 항체를 이용한 음성 또는 양성 선별에 의해, T 세포를 농화한다. 세포 분주물은 CD4, CD8, CD3 및 CD14를 포함한 세포 표면 표현형에 대해 분석한다. 단지 예시할 목적으로, 세포를 행군 다음 5% FBS 및 100 U/ml 재조합 IL-2 (rIL-2)을 포함하는 상기와 같은 변형된 AIM-V(보충된 AIM-V) 1 ml 당 약 5×10^5 세포 농도로 혼탁한다. 세포를 분리한 HIV⁺ 환자에서, 25 nM CD4-PE40(슈도모나

스 에어루지노사 외독소 A의 번역 및 ADP-리보스화(ribosylation) 도메인에 연결된 HIV-1-결합성 CD4 도메인으로 구성된 재조합 단백질) 또는 HIV에 선택적으로 혼성화하는 그외 유사 재조합 세포독성 분자를 나머지 세포 증폭을 위해 세포 배양물에 첨가하여, 배양물로부터 HIV 감염된 세포를 선택적으로 제거한다. CD4-PE40는 HIV 감염된 세포 배양물에서의 p24 생산을 저해하며 선택적으로 HIV-1에 감염된 세포를 죽이는 것으로 확인되었다. T 세포의 분리, 배양 및 증폭에 있어 바람직한 방법은 실험 부분에 기재되어 있다.

<79> 증식을 자극하기 위해, OKT3 단일클론 항체(Ortho Diagnostics)를 10 ng/ml 농도로 첨가하고, 세포는 월 당 0.5 ml씩 24월 플레이트에 접종할 수 있다. 세포는 습윤 배양기에서 약 37 °C, 5% CO₂ 조건으로 48시간 배양한다. 세포에서 배지를 흡입제거하고, 5 µl/ml 프로타민 설페이트, 100 U/ml rIL-2, 100 U/ml 페니실린, 0.25 µg/ml 암포테리신 B/ml 및 추가적인 100 µg/ml 스트렙토마이신(25 nM CD4-PE40을 첨가할 수 있음)이 첨가된 백터 함유성 상충액(하기 참조) 1 ml을 첨가하였다. T 세포의 증식을 PHA로 자극하는 방법은 실험 부분에 개시되어 있다.

세포 분리 및 특성화

<81> 다른 측면에서, 세포 표면 마커를 이용하여 본 발명의 방법 실시에 필수적인 세포를 분리 또는 특성화할 수 있다. 예컨대, 인간 줄기 세포는 전형적으로 CD34 항원을 발현하지만, DC는 MHC 분자와 공동-자극 분자(예, B7-1 및 B7-2)를 발현하며, 과립구, NK 세포, B 세포 및 T 세포에 특이적인 마커는 없다. 표면 마커의 발현은 이들 세포의 동정 및 정제를 용이하게 한다. 이러한 동정 및 분리 방법은 FACS, 컬럼 크로마토그래피, 자가 비드를 이용한 패닝(panning), 웨스턴 블롯, 방사선그래피, 전기천공투입, 모세관 전기천공투입, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC), 박막 크로마토그래피(TLC), 과학산 크로마토그래피(hyperdiffusion chromatography) 등과, 유체 또는 젤 침강소(gel precipitin) 반응, 면역확산(단일 또는 이중), 면역전기천공투입, 방사면역분석(RIA), 효소 관련 면역흡착 분석(ELISA), 면역형광 분석 등의 다양한 면역학적 방법을 포함한다. 면역학적 및 면역분석학적 방법에 대한 일반적인 검토로, Stites 및 Terr (eds.) 1991 Basic and Clinical Immunology (7th ed.) 및 상기 Paul을 참조한다. 선택된 항원에 대한 항체를 만드는 방법에 대한 논의는, 전술한 Harlow and Lane (1989)을 참조한다.

<82> 세포 분리 또는 세포를 정제하는 동안에 세포를 검출하기 위한 면역분석은 임의의 여러가지 형태로 수행할 수 있으며, 예로 Maggio (ed.) (1980) Enzyme Immunoassay CRC Press, Boca Raton, FL; Tijan (1985) "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays," Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam; Harlow and Lane, supra; Chan (ed.) (1987) Immunoassay: A Practical Guide Academic Press, Orlando, FL; Price and Newman (eds.) (1991) Principles and Practice of Immunoassays Stockton Press, NY; and Ngo (ed.) (1988) Non-isotopic Immunoassays Plenum Press, NY를 참조한다.

<83> 세포는 FACS 분석 등의 유세포측정 방법으로 분리 및 특성화할 수 있다. 매우 다양한 유세포측정 방법들이 알려져 있다. 형광 활성화된 유세포 측정에 대한 전반적인 검토는, 예컨대 Abbas et al. (1991) Cellular and Molecular Immunology W.B. Saunders Company, particularly chapter 3, and Kuby (1992) Immunology W.H. Freeman and Company, 특히 6장을 참조한다. FACS 장치는 예컨대 Becton Dickinson으로부터 구입 가능하다.

<84> 세포 항원을 표지하는데 사용할 수 있는 표지 물질로는, 비제한적으로, 단일클론 항체, 다클론 항체, 단백질 또는 친화성 매트릭스, 탄수화물 또는 지질과 같은 그외 중합체가 있다. 공지된 방법, 예컨대 면역블로팅, 웨스턴 블롯 분석, 방사능 또는 생발광 마커의 트랙킹, 모세관 전기천공투입 또는 분자의 크기, 전하나 친화성을 기초로 분자를 추적하는 그외 방법에 의해 검출을 진행한다.

치료학적 용도

<86> 일시적으로 형질감염된 CD8⁺ T 세포를 이에 대응하는 항원성 웹타이드를 가지고 있는 타겟 세포에 대해 세포독성인 포유류에 도입할 수 있으며, T 세포는 클래스 I MHC 분자 상에서 도입된 TCR를 인지하도록 조작된다. MHC 클래스 II 제한형 TCR을 코딩하는 RNA에 의해 CD8⁺ T 세포를 형질감염시키면, 항원:MHC 클래스 II 복합체의 항원-특이적 인지를 가능하게 한다. 이와 유사하게, CD4⁺ 헬퍼 T 세포는 MHC 클래스 II에서 항원성 웹타이드를 인지하지만 또한 MHC 클래스 I 제한형 TCR을 코딩하는 RNA에 의해 형질감염시키면 웹타이드:MHC 클래스 I 복합체도 인지할 수 있다. 또한, 헬퍼 T 세포는 타겟 세포에 대한 면역 반응을 자극할 수 있다. 타겟 세포는 전형적으로 암 세포 또는 병원체 감염된 세포이다.

- <87> T 세포는 활성화된 T 세포가 투여되는 포유류로부터 분리할 수 있다. 대안적으로, 세포는 공여체로부터 제공받은 다른 동종 세포이거나 세포 은행(예, 혈액 은행)에 보관된 다른 동종 세포일 수 있다.
- <88> 본 발명의 방법에 의해 제조된 T 세포는 개체에게 직접 투여하여 선택된 항원에 대해 활성인 T 세포를 생산할 수 있다. 투여는 당업계에 공지된 방법에 의해 세포를 가장 적절한 조직(들)과 궁극적으로 접촉되게 성공적으로 전달하는 것일 수 있다. 세포는 종종 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 임의의 적합한 방식으로 투여한다. 본 발명에서 세포를 개체에 투여하는 적절한 방법을 이용할 수 있으며, 2가지 이상의 경로로 독특한 세포 조성물을 투여할 수 있지만, 흔히 특정 경로가 다른 경로에 비해 보다 직접적이고 보다 효과적인 반응을 제공할 수 있다. 바람직한 투여 경로로는, 비제한적으로, 진피내, 정맥내 투여, 림프절 투여 및 종양내 투여를 포함한다. 일 예에서, T 세포는 케모카인 수용체를 코딩하는 RNA, 또는 전이 부위(예, 장, 간, 폐 등), 자가면역 질환에 걸린 조직 등과 같이 면역치료학적 치료가 필요한 부위에 세포를 안내하는 그외 회귀 분자(homing molecule)를 코딩하는 RNA와 함께 공동-형질감염된다. 케모카인 수용체 및 회귀 분자에 대한 사항으로, Salimi et al. Immunol Rev. 2005 206:100-13; Kim, Curr Opin Hematol. 2005 Jul;12(4):298-304; Kucia et al. Stem Cells. 2005 Aug;23(7):879-94; Ebert et al. Mol Immunol. 2005 May;42(7):799-809; Cambi et al. Cell Microbiol. 2005 Apr;7(4):481-8; Uhlig et al. Novartis Found Symp. 2004;263: 179-88; discussion 188-92, 211-8; Kim et al. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord. 2004 Dec;4(4):343-61; Zocchi et al. Leuk Lymphoma. 2004 Nov;45(11):2205-13; Sackstein J Investig Dermatol Symp Proc. 2004 Sep;9(3):215-23; Morris et al. Curr Mol Med. 2004 Jun;4(4):431-8; Marhaba et al. J Mol Histol. 2004 Mar;35(3):211-31; Campbell et al. Semin Immunol. 2003 Oct;15(5):277-86; Cyster et al. Immunol Rev. 2003 Aug; 194:48-60; Ley Trends Mol Med. 2003 Jun;9(6):263-8; Ono et al. J Allergy Clin Immunol. 2003 Jun;11(6): 1185-99을 참조하며; 이들 문현은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.
- <89> 약학적으로 허용가능한 담체는 투여중인 특정 조성물 뿐만 아니라 조성물 투여하기위해 사용되는 특정 방법에 의해 부분적으로 결정된다. 따라서, 본 발명의 약학적 조성물의 매우 다양한 적정 제형들이 있다. 가장 일반적으로, 품질 관리(미생물학, 클론원성 분석(clonogenic assay), 생존 테스트)가 수행되며, 다이펜하이드라민 및 하이드로코르티손을 투여한 다음 다시 세포는 개체에 주입된다. 예로, Korbling et al. (1986) Blood 67:529-532 and Haas et al. (1990) Exp. Hematol. 18:94-98을 참조한다.
- <90> 예를 들면, 종양내, 동맥내(관절에서), 정맥내, 근육내, 피내, 복강내, 결절내(intranodal) 및 피하 경로와 같은 비경구 투여에 적합한 제형과 담체는 항산화제, 완충액, 정균제, 및 제형을 목적하는 수용자의 혈액과 등장으로 만들어 줄 용질, 및 혼탁제, 용해제, 증점제, 안정화제, 및 방부제를 포함할 수 있는 수성 및 비수성의 멸균 혼탁액을 포함한다. 정맥내 또는 복강 투여가 본 발명의 T 세포의 투여에 바람직한 방법이다.
- <91> 개체에게 투여된 세포의 투여량(예, 활성화된 T 세포 또는 수지상 세포)은 시간의 경과에 따라 개체에서 목적하는 유익한 치료적 반응을 달성하기에 유효한 양, 또는 암세포의 성장 억제에 유효한 양 또는 감염의 억제에 유효한 양이다.
- <92> 본 발명의 예시를 위하여, 본 방법은 주입 전에 개체로부터 혈액시료를 수득한 후 보관하여 후속적인 분석 및 비교에 사용하는 방식으로 실시될 수 있다. 일반적으로, 적어도 약 10^4 내지 10^6 및 전형적으로 1×10^8 내지 1×10^{10} 개의 세포를 70 kg의 환자에게 대략 60분 내지 120분에 걸쳐 정맥내 또는 복강내로 주입한다. 일 측면에서, 투여는 근육내 주입이다. 활력 징후(vital sign) 및 맥박산소측정법에 의한 산소포화도를 세밀하게 모니터 한다. 혈액 시료는 주입 후 5분 및 1시간에 취하여 분석용으로 보관한다. 세포의 재주입은 일년의 기간에 걸쳐 대략 매달, 총 10 내지 12회의 치료를 반복한다. 제1차 치료 후에는 임상의의 관리하에 외래환자 상태로서 주입을 수행한다. 재주입이 외래환자의 상태에서 수행되는 경우, 상기 치료받는 사람을 치료 후 적어도 4시간마다 모니터링한다.
- <93> 투여의 경우, 개체의 전반적 건강상태 및 체중을 고려하면서, 본 발명의 세포를 세포의 유형에 따른 LD-50 (또는 기타 독성 측정 방법) 및 다양한 농도에서의 세포의 유형에 따른 부작용에 의해 결정된 비율로 투여한다. 투여는 한번에 또는 여러 회 나누어 투여할 수 있다. 본 발명의 세포는, 세포독성제, 뉴클레오파이드 유사체 및 생물학적 반응 변형제를 포함하는 공지된 통상의 치료법을 사용하여 다른 특정 증상에 대한 치료를 보충할 수 있다. 유사하게, 생물학적 반응 변형제는 본 발명의 활성화된 T 세포에 의한 치료에 선택적으로 추가될 수 있다. 예를 들면, 상기 세포는 선택적으로 보강제와 함께 또는 예컨대 GM-CSF, IL-12 또는 IL-2와 같은 사이토카인과 함께 투여된다.

<94> 면역원성의 분석 방법

<95> 본 발명에 따른 방법에 의해 생산된 T 세포는 하기의 주지된 방법에 의해 결정될 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다:

<96> ⁵¹Cr-방출 세포용해(lysis) 분석. 항원-특이적 T 세포에 의한, 웨타이드-펄스된 ⁵¹Cr-표지된 표적의 세포용해를 비교할 수 있다. "보다 활성인" 조성물은 시간의 함수로서 보다 강력한 세포용해를 나타낼 것이다. 특정 시간 지점(예를 들면, 4시간)에서의 전반적인 표적 세포용해 및 세포용해 카이네틱스(kinetics)를 사용하여 성능을 평가할 수 있다. 또한, 사멸에 필요한 타겟 세포상의 항원 밀도는 T 세포 친화성을 나타낸다. Ware et al. (1983) 3. Immunol. 131:1312

<97> 사이토카인-방출 분석. 변형된 APC의 접촉시 T 세포에 의해 분비된 사이토카인의 유형 및 양 분석은 기능적 활성의 척도일 수 있다. 사이토카인은 ELISA 또는 ELISPOT 분석법으로 측정하여, 사이토카인 생산의 속도 및 총 양을 결정할 수 있다. Fujihashi et al. (1993) J. Immunol. Meth. 160:181; Tanquay and Killion (1994) Lymphokine Cytokine Res. 13:259.

<98> 증식 분석. T 세포는 반응성 조성물에 반응하여 증식할 것이다. 증식은 예컨대 ³H-티미딘 수득 측정에 의해 정량적으로 모니터링할 수 있다. Caruso et al. (1997) Cytometry 27:71.

<99> 트랜스제닉 동물 모델. HLA 트랜스제닉 마우스를 본 발명의 조성물로 백신접종하고, 유도된 면역반응의 성질 및 정도를 결정함으로써, 면역원성을 생체내에서 평가할 수 있다. 대안적으로, hu-PBL-SCID 마우스 모델은 인간 PBL의 입양(adoptive) 전달에 의해 마우스에 인간 면역 시스템의 재구성을 가능하게 한다. 이러한 동물을 hirai et al. (1995) J. Immunol. 154:2733; Mosier et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2443과 같이 이전에 언급된 바와 같이 조성물로 백신화될 수 있다. 되어 Shirai et al., 1995; Mosier et al., 1993에 기술된 바대로 분석될 수 있다.

<100> 영장류 모델. 비인간 영장류(침팬지) 모델 시스템을 사용하여 생체내 HLA- 제한된 리간드의 면역원성을 모니터링할 수 있다. 침팬지는 인간의 MHC 분자와 중첩되는 MHC-리간드 특이성을 공유하는 것으로 나타났으며, 이에 따라 상대적 생체내 면역원성에 대한 HLA-제한된 리간드의 테스트를 가능하게 한다. Bertoni et al. (1998) Immunol. 161:4447.

<101> TCR 신호전달 이벤트의 모니터링. 수 개의 신호전달 이벤트(예를 들면, 인산화)는 MHC-리간드 복합체에 의한 성공적인 TCR 채용과 연관되어 있다. 이러한 이벤트의 질적 및 양적 분석은 조성물의 TCR 채용을 통한 작동자 세포를 활성화시키는 능력과 상호 관련있다. Salazar et al. (2000) Tnt. J. Cancer 85:829; Isakov et al. (1995) J. Exp. Med. 181:375).

<102> 전술한 바에 따라, 하기 실시예는 본 발명의 다양한 측면을 비제한적으로 예시하는 것으로 의도된다.

실시예

<116> 재료 및 방법

<117> 세포 및 시약

<118> 건강한 공여체의 전 혈액으로부터 (고지된 동의(informed consent) 이후에 수득하여 제도적인 검토 위원회로부터 승인받은) Lymphoprep(Axis-Shield, Oslo, Norway)를 이용한 밀도 원심분리에 의해 PBMC를 준비하였다. 수지상 세포(DC)와 비유착성 분획(NAF)를 제조하기 위해, PBMC를 1% 올에 의해 불활성화시킨 자가 혈장, 2 mM L-글루타민(BioWhittaker), 20 mg/L 젠타마이신(Sigma-Aldrich)이 첨가된 RPMI 1640 (Cambrex)으로 이루어진 자가 매질에 재현탁하고, 이를 조직 배양 디쉬(BD Falcon)에 30×10^6 cells/dish로 옮겼다. 세포는 부착되도록 37 °C에서 1-2시간 동안 배양하였고, 비유착성 분획은 제거하고, 성숙형 DC를 이전에 공지된 바와 같이 유착성 T 세포부터 준비하였다(22). 성숙형 DC를 수확하고 이전에 공지된 바와 같이 gp100 RNA를 전기천공투입하였다 (22). CD8⁺ T 세포를 항-CD8 MACS 비드(Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany)를 이용하여 제조사의 설명서에 따라 분리하였다. T 세포를 RPMI 1640, 10% 인간 혈청, 2 mM L-글루타민, 20mg/L 젠타마이신, 10 mM HEPES, 1 mM 소듐 피루베이트(Sigma-Aldrich), 1% MEM 비필수 아미노산(100x)로 이루어지며 20 U/ml IL-7가 보강된 MLPC 배지에서 배양하였다. 20IU/ml IL-2 및 20 U/ml IL-7을 2일 및 4일째에 첨가하였다. 피토헤마글루

티닌(PHA)로 자극된 T 세포 배양물을 제조하기 위해, $2 \times 10^6/\text{ml}$ NAF를 10% 인간 혈청, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PHA (Sigma), 20 U/ml IL-7 및 20 IU/ml IL-2가 보강된 AIM-V 배지(Invitrogen) 중에 T25 배양 플라스크에서 배양하였다. IL-2 및 IL-7을 이틀마다 첨가하였다.

<119> 흑색종 세포주 SK-MEL526(HLA-A2 $^+$ /gp100 $^+$), Colo 829(HLA-A1 $^+$ /A2 $^-$ /gp100 $^+$) 및 NEMA(HLA-A2 $^+$ /gp100 $^-$), 및 T 세포(TAP-결손 T x B 세포 하이브리드 T2- A1(HLA-A1 $^+$ /A2 $^+$; ATCC# CRL-1992)를 RPMI 1640, 2 mM L-글루타민, 폐니실린-스트렙토마이신, 10% 소태아 혈청, 2 mM HEPES 및 2-βME로 이루어진 R10 배지에서 배양하였다. 흑색종 세포주의 gp100 발현은 마우스 항-gp100 mAb HMB45 (DAKO, Glostrup, Denmark) 및 당나귀 항-마우스-PE(RDI, Concord, MA, USA)를 이용한 세포내 염색으로 검증하였다. 특히, 세포를 Cytofix/Cytoperm 용액(BD Biosciences, Heidelberg, Germany)으로 투과화한 다음 제조사의 설명서에 따라 1차 및 2차 항체로 염색하였다.

<120> TCR에 의해 형질감염된 T 세포는 PE-접합된 항-TCRVβ14 mAb(즉, gp100/A2-특이적 TCR 인지), 또는 PE-표지된 gp100/HLA-A2 사량체(Proimmune, Oxford, UK)를 이용한 유세포 측정에 의해 TCR 발현을 분석하였다.

<121> 본 실험에 사용된 웹타이드는 HLA-A2-결합성 gp100₂₀₉₋₂₁₇ 유사체 IMDQVPFSV와 gp100₂₈₀₋₂₈₈ YLEPGPVTA이었다.

TCR 유전자의 클로닝

<123> gp100-특이적 296 TCR 유전자의 레트로바이러스 pBullet 벡터로의 클로닝은 이전에 개시되어 있다(24). TCR 296 α 체인의 코딩 서열은 레트로바이러스 pBullet 벡터에서 pGEM4Z-5'UTR-sig-MAGE-A3-DC.LAMP-3'UTR 벡터로 NcoI 및 XhoI로 절단하여 다시 클로닝하였다(4)(Dr. R. Debets, ErasmusMC, Rotterdam로부터 제공받음). pGEM4Z-5'UTR-sig-MAGE-A3-DC.LAMP-3' UTR 벡터는 제노푸스 레비스 β-글로빈 유전자의 5' 및 3' 비변역 영역 및 폴리 A 테일을 포함한다. 폴리 A 테일의 3' 말단에, 독특한 NotI 및 SpeI 부위가 있어 시험관내 전사를 수행하기 전에 플라스미드의 선형화를 가능하게 한다. 박테리오파지 T7 프로모터는 mRNA의 시험관내 제조를 가능하게 한다. TCR β 296 체인의 코딩 서열은 하기 프라이머를 이용한 PCR에 의해 먼저 증폭하였다:

-TCRB296BamHI

<125> 5'-CTC TGG ATC C _{BamHI} AT GGG CCC CCA GCT CCT TGG CTA TG-3'

-HCB

<127> 5'CTC TCT CGA G _{XhoI} GG ATC GCT AGC CTC TGG AAT CCT TTC TC-3'.

<128> PCR 산물은 BamHI 및 XhoI으로 절단하여 BgIII 및 XhoI으로 자른 pGEM4Z-5' UTR-sig-MAGE-A3-DC.LAMP-3' UTR 벡터에 클로닝하였다.

시험관내 TCR RNA 전사

<130> gp100 유전자를 pGEM4Z-64A 벡터(1)에 클로닝하고 부위 특이적 돌연변이화에 의해 SphI 부위(대안적인 개시 코돈)를 삭제하여, pGEM4Z-gp 100-64A 벡터를 만들었다. 시험관내 전사로, pGEM4Z-강화된 GFP 벡터, pGEM4Z-TCRcc296, pGEM4Z-TCR β 296, 및 pGEM4Z-gp100를 SpeI 효소로 선형화하고, 폐놀/클로로포름 추출로 정제하고, 에탄올 침전하고, 이를 DNA 주형으로서 이용하였다(14). 시험관내 전사는 T7 RNA 중합효소(mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra kit; Ambion)를 이용하여 제조사의 설명서에 따라 수행하였다. 시험관내에서 전사한(IVT) RNA를 제조사의 설명서에 따라 RNeasy 컬럼(Qiagen)에서 DNase1(Ambion) 절단한 다음 회수하였다. RNA 품질은 아가로즈 젤 전기영동으로 확인하고, RNA 농도는 분광광도계로 측정하고, RNA는 소량씩 -80 °C에 보관하였다.

T 림프구에 RNA의 전기천공투입

<132> 디쉬로부터 CD8 $^+$ T 세포를 회수하여 순수 RPMI 1640로 한번, 폐놀 레드(Invitrogen Life Technologies) 첨가없이 OptiMEM로 한번(모두 실온에서) 행구었다. 세포는 $8 \times 10^7/\text{ml}$ 농도로 OptiMEM에 재현탁하였다. IVT RNA를 4-mm 큐벳(PeqLab)(150 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 최종 농도)로 옮겼다. 세포 혼탁물 100-600 μl 를 첨가하고, Genepulser Xcell (Bio-Rad)에서 펄스하기 전에 3분간 인큐베이션하였다. 펄스 조건은 사각파 펄스, 500 V, 5 ms이다. 전기천공 투입한 다음 바로 세포를 미리 정해진 농도의 IL-7 및 IL-2가 첨가된 MLPC 배지로 이동시켰다.

T 세포의 동결보존

<134> 동결보존은 다음과 같이 수행하였다: 세포를 $20\text{--}50 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ 농도로 20% HSA (Pharmacia & Upjohn) 중에 취하여 10분간 얼음 위에 보관하였다. 동량의 동결보존 매질, 즉 55% HSA(20%), 20% DMSO(Sigma-Aldrich) 및 25% 글루코스(Glucosteri140; Fresenius)을 세포 혼탁물에 첨가하였다. 이후, 세포는 동결 용기(Nalgene)에서 -80°C 가 될때까지 $-1^\circ\text{C}/\text{분}$ 의 속도로 냉동시켰다. 해동은 세포 탈착이 보일때까지 37°C 수조에 동결튜브를 두어 수행하였다. 이후 세포는 10 ml의 RPMI 1640에 부어, 헹구고, 미리 가온한 20 U IL-7/ml의 MLPC 배지가 있는 세포 배양 디쉬에 가하였다. 세포는 추가적인 실험을 수행하기 전에 0.5시간 동안 37°C 배양기에 두었다.

<135> TCR에 의해 형질감염된 T 세포의 유세포 측정

<136> 항-TCRV β mAb를 이용한 표면 염색을 위해, T 세포를 헹구고, 0.1% 소듐 아자이드(Sigma-Aldrich) 및 0.2% HSA(Octapharma)가 포함된 차가운 FACS 용액(Dulbecco'sPBS; BioWhittaker) $100 \mu\text{l}$ 에 1×10^5 세포로 혼탁한 다음, 30분간 mAb와 함께 인큐베이션하였다. 염색된 세포는 FACStar 세포 분석기(BD Biosciences)를 이용하여 2색 면역형광을 분석하였다. 전방 및 측면 광 스캐터상의 게이트를 이용한 분석으로 세포 과편을 제거하였다. 최소 10^4 개의 세포가 각 샘플에서 분석되었다. 결과는 CellQuest 소프트웨어(BD Biosciences)를 이용하여 분석하였다.

<137> 사량체 염색으로, 총 10^6 T 세포를 5% 혼주 혈청(pooled-serum), 10 mM HEPES, 1 mM 소듐 피루베이트, 1% MEM 비필수 아미노산(100x), 2 mM L-글루타민 및 20 mg/L 젠타마이신이 보강된 RPMI 1640 $90 \mu\text{l}$ 에 혼탁하였다. 사량체 500 mg을 첨가하였다. T 세포 표현형은 항-CCR7 FITC 및 항-CD45RA ECD (phycoerythrin-Texas Red)를 이용하여 유세포 측정에 의해 분석하였다. 세포는 37°C , 5% CO_2 에서 20분간 인큐ベ이션한 다음 4 °C로 냉각시켰다. 세포를 헹군 다음 Beckman Coulter의 CYTOMICS FC500에서 분석하였다.

<138> TCR에 의해 형질감염된 T 립프구에 의한 IFN- γ 생산 유도 및 측정

<139> TCR RNA가 전기천공투입된 T 세포를, 관련없는 웨타이드(gp100/A2₂₀₉₋₂₁₇ 유사체 IMDQVPFSV) 또는 TCR에 의해 인지되는 웨타이드(gp100/A2₂₈₀₋₂₈₈ YLEPGPVT A)(모두 10 μM)가 탑재된 조사된 ($0,005\text{J/cm}^2$) T2 세포와 함께 1시간 동안 37°C 에서 공배양하였다. 15,000 T 세포를 10% 혼주 혈청(열에 의해 불활성화되었고, 멸균-여과한 건강한 공여체 유래의 혈장), 10 mM HEPES(Sigma-Aldrich), 1 mM 소듐 피루베이트(Sigma-Aldrich), 1% MEM 비필수 아미노산 100x(Sigma-Aldrich), 2 mM L-글루타민(Cambrex), 20 mg/L 젠타마이신 (Sigma-Aldrich), 및 20 IU/ml IL-2가 보충된 RPMI 1640 (Cambrex) $100 \mu\text{l}$ 중에 15,000 T2 세포와 공배양하였다. 상청액을 16시간 후에 수득하여, 시판되는 ELISA 키트(DPC Biermann)를 제조사의 프로토콜에 따라 이용하여 IFN- γ 생산을 측정하였다.

<140> 세포독성 분석.

<141> 세포독성은 표준적인 4–6 h ^{51}Cr 방출 분석으로 테스트하였다. 간략하게는, T2 타겟 세포를 한시간동안 37°C /5% CO_2 에서 $100 \mu\text{Ci}$ 의 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4/10^6$ 세포로 표지하고, 세정한 다음 한시간동안 $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ 에서 웨타이드를 적가하고, 다시 작동자 T 세포와 공배양하기 전에 다시 세정하였다. 웨타이드는 10 μM 나 또는 지정된 농도로 첨가하였다. 대안적인 타겟 세포로서, gp100 RNA로 형질감염된, HLA-A2 $^+$ DC, 또는 흑색종 세포주인 SK-MEL562, Colo829 및 NEMA을 사용하였다. 타겟 세포는 96웰 플레이트에 1000 cells/well로 두었다. 작동자 세포, 즉, TCR에 의해 형질감염된 T 세포를 E:T 60:1, 20:1, 7:1 및 3:1 비율로 첨가하였다. 세포용해율, 즉 ^{51}Cr 방출은 다음과 같이 계산하였다: [(방출 측정값 - 백그라운드 방출)]/[(최대 방출 - 백그라운드 방출)] x 100%.

<142> 결과

<143> T 세포는 RNA로 효율적으로 형질감염된다.

<144> CD8 $^+$ T 세포의 최적화되고 재현가능한 형질감염은, 모델로서 EGFP RNA를 이용하여 2단계 전기천공투입 프로토콜에 의해 달성되었다. 최적화된 프로토콜에 따라, 수종의 공여체의 CD8 $^+$ T 세포를, HLA-A2-제시성 gp100 웨타이드에 특이적인 CTL 클론(296 CTL 클론)으로부터 기원되는 TCR의 α 및 β 체인, 또는 EGFP를 코딩하는 RNA에 의해 형질감염시켰다. EGFP 및 TCR 체인의 발현 수준은 유세포 측정으로 결정하였다. 전기천공투입한 T 세포의

약 93%가 전기천공투입 4시간 후에 EGFP를 발현하였으며(도 1), 이는 T 세포의 형질전환율이 매우 높음을 의미 한다.

<145> 전기천공투입 4시간($p=0,0027$) 및 24시간($p=0,0025$) 후에 세포막 상의 항-TCRV β 14 mAb를 이용하여 gp100-특이 적 TCR의 TCR β 체인 발현이 낮지만 유의한 것으로 검출되었다(도 1b). 그러나, TCR에 의해 형질감염된 T 세포를 염색하였을 때에는(데이터 미기재), 동일한 조건에서의 EGFP RNA의 형질간염 효율이 >90% (도 1a 및 b)임에도 불구하고, HLA-A2/gp100₂₈₀₋₂₈₈ 사량체의 결합은 관찰되지 않았다. 그럼에도 불구하고, 비-활성화된 TCR-RNA-전기천공투입된 CD8 $^{+}$ T 세포는 IFN γ 분비 및 세포독성 분석 모두에서 기능하였다. 사량체 결합의 미검출은, 사량체가 T 세포 막에 단단히 유착하기 위한 동일한 시간에 수종의 TCR에 의해 결합되어야 하기 때문에, TCR-RNA-전기천공투입된 T 세포의 세포 막에서의 낮은 수용체 밀도가 원인일 수 있다. TCR 분자들이 너무 멀리 떨어져 있다면, 사량체의 단일가 결합만 가능하며, 그 결과 낮은 결합(avidity)이 이루어진다(17). 그러나, 일시적으로 형질감염된 T 세포에서의 TCR 빌현은 타겟을 세포용해하고 IFN γ 를 생산하도록 촉발시키는데에는 충분하였다.

<146> Mock-형질감염된 T 세포에서는 어떠한 EGFP 발현도 관찰되지 않았으며, 단지 TCR β 체인의 내인성 발현만 관찰되었다(도 1a 및 b). 아울러, 비-전기천공투입 T 세포, mock-전기천공투입 T 세포 및 TCR RNA-전기천공투입 T 세포는 CCR7 및 CD45RA에 대한 FACS 염색으로 확인하였다. 도 1c에 나타낸 바와 같이, 벌크(bulk) 전기천공투입한 T 세포의 표현형은 비-전기천공투입 T 세포와 비교하여 전기천공투입 효과가 없었다.

<147> 항원 양성의 타겟 세포는 TCR에 의해 형질감염된 T 세포가 IFN γ 를 생산하도록 특이적으로 자극한다.

<148> 측정된 TCR 발현은 낮았지만, TCR RNA로 형질감염된 CD8 $^{+}$ T 세포를 전기천공투입 4시간, 24시간 및 48시간 후에 gp100₂₈₀₋₂₈₈ 웨타이드가 탑재된 타겟 T 세포에 대한 반응으로 사이토카인을 생산하는 능력이 있는지에 대해 조사하였다. 도 2에 나타낸 바와 같이, gp100/A2 특이적인 TCR을 코딩하는 RNA로 형질감염된 T 세포만 gp100₂₈₀₋₂₈₈ 웨타이드가 탑재된 T2 세포에 반응하여 IFN γ 를 생산하였고, EGFP RNA가 전기천공투입된 T 세포는 IFN γ 를 생산하지 못하였다. 더욱이, 대조군 웨타이드(즉, gp100₂₀₉₋₂₁₇ 유사체)가 탑재된 T2 세포는 RNA에 의해 형질감염된 T 세포에 의해 IFN γ 생산을 유도할 수 없었다(도 2). 전기천공투입 48시간 이후에도, gp100/A2 특이적인 TCR을 코딩하는 RNA로 형질감염된 T 세포에 의한 특이적인 IFN γ 생산은 명확하지 않았다(도 2). 다음으로, TCR에 의해 형질감염된 T 세포가 IFN γ 생산력 감소 없이 동결보존가능한지를 테스트하였다. 도 3a에서, gp100/A2 특이적인 TCR을 코딩하는 RNA로 형질감염시킨 다음 4시간 후에 냉동한 T 세포가 해동한 후 직접 gp100₂₈₀₋₂₈₈ 웨타이드가 탑재된 T2 세포로 자극하였을 때에도 여전히 IFN γ 를 생산하였다. 또한, TCR에 의해 형질감염된 T 세포에 의한 IFN γ 생산은 RNA-전기천공투입된 DC와 인큐베이션한 이후에 검출되었다. mock-전기천공투입된 DC가 아닌 gp100 RNA가 전기천공투입된 DC만 TCR에 의해 형질감염된 T 세포가 IFN γ 를 생산하도록 자극할 수 있었다(도 3b).

<149> 웨타이드 탑재된 타겟과 혼색종 세포는 TCR에 의해 형질감염된 T 세포에 의해서 특이적으로 세포용해된다.

<150> TCR RNA에 의해 형질감염된 CD8 $^{+}$ T 세포를, 전기천공투입 24h, 48h 및 72h 이후에 gp100₂₈₀₋₂₈₈ 웨타이드가 탑재된 타겟 T 세포에 대한 세포용해력을 테스트하였다. 도 4a에 나타낸 바와 같이(48시간의 대표도), gp100₂₈₀₋₂₈₈ 웨타이드가 탑재된 T2 세포만 TCR RNA에 의해 형질감염된 T 세포에 의해 세포용해되었다. 대조군 웨타이드가 탑재된 T2 세포는 용해되지 않았으며, EGFP RNA에 의해 형질감염된 T 세포는 어떠한 타겟도 세포용해시키지 않았다(도 4a). RNA에 의해 형질감염된 T 세포에 의한 경시적인 세포 용해를 수행하였다(도 4b). 세포독성 시간-경과 측정에서, T 세포는 전기천공투입 한지 3일 후에 모든 측정 타겟 : 작동자 비율에 있어 여전히 높은 세포 용해성을 보였다. 타겟 : 작동자 비가 1:20에서 gp100₂₈₀₋₂₈₈ 웨타이드가 탑재된 T2 세포의 특이적인 세포용해는 모든 시간에서 관찰되었다(도 4b). 그외 모든 측정된 타겟 : 작동자 비율에서, 특이적인 세포용해가 나타났다(데이터 미기재). 또한, 최고 타겟 : 작동자 비(즉, 1:60)에서, 특이적인 세포용해가 T 세포의 전기천공투입 1 주일후에도 여전히 관찰되었는데(데이터 미기재), 이는 TCR RNA-전기천공투입된 T 세포의 특이적 세포용해의 장기 유지를 나타낸다. 타겟 T 세포의 특이적인 세포용해가 수일간 안정적이라는 점은 암의 면역치료에 TCR에 의해 형질감염된 CD8 $^{+}$ T 세포를 사용하는데 있어 매우 중요하다. IFN γ 분비 및 세포독성 분석에서의 비슷한 결과를 PHA/IL-2/IL-7-자극된 T 세포로 얻었으며, 이는 3일간 자극한 후 CD8에 대해 자기적으로 선별한 다음 RNA를 전기천공투입한 것이다. PHA/IL-2/IL-7 자극은 T 세포 증식을 야기하며, 암의 면역 치료를 위한 TCR RNA-전

기천공투입된 T 세포의 대량 생산에 유용하다.

<151> 또한, TCR RNA-전기천공투입된 T 세포의 세포용해력은 동결보존 이후에도 유지되었고, 전기천공투입하는 단계 이전에 PHA로 자극하여 증식시킨 T 세포는 웨타이드가 탑재된 타겟 T 세포에 대해 반응하여 IFN γ 를 생산할 수 있었으며, 또한 이들 세포를 용해시킬 수 있었다(데이터 미기재). 동결보존 이후의 TCR RNA-전기천공투입된 T 세포의 세포용해력의 안정성은, 환자에게 반복 투여하기 위한 다중 투여분의 T 백신의 제조를 단일 프로세스로 (및 단일 백혈구 성분 채집(leukopheresis)으로) 가능하게 한다.

<152> 중요한 점은, TCR RNA-전기천공투입된 T 세포(전기천공투입 후 4h)는 또한 p100⁺ 및 HLA⁻ A2⁺(도 5, SK-MEL526)인 종양 세포를 특이적으로 인지하여 세포용해시킬 수 있었다. gp100⁻이지만 HLA- A2⁺(NEMA)이거나, 또는 gp100⁺이지만 HLA- A2⁻(Colo829)인 종양 세포주는 TCR RNA-전기천공투입된 T 세포에 의해 인지되지 않았다(도 5). EGFP RNA-전기천공투입된 T 세포는 어떠한 타겟 T 세포도 세포용해시키지 않았다(도 5).

<153> TCR RNA에 의해 형질감염된 T 세포의 세포용해 효율은 레트로바이러스로 형질전이된 T 세포와 모체 CTL 클론의 근사치와 유사하다.

<154> 이전에 공개된 연구에서, 모체 296 CTL 클론의 세포용해 효율이 TCR 유전자를 T 세포에 레트로바이러스에 의한 형질전이 이후에 보존됨을 알았다(24). TCR RNA에 의해 형질감염된 T 세포의 결합성(avidity)을 테스트하기 위해, T2 타겟 T 세포상에서 gp100₂₈₀₋₂₈₈ 웨타이드를 적정하는 세포독성 분석(전기천공투입 24시간 후)을 수행하였다(도 6). TCR RNA에 의해 형질감염된 T 세포의 최대 세포용해의 50%(즉, ED₅₀)에 해당되는 웨타이드 농도는 3 번의 독립적인 실험에서 300-1000 pM이다(도 6). 이는 레트로바이러스에 의해 형질전이된 T 세포의 세포독성 효율(ED₅₀=300 pM)과 동일한 범위이다. 모체 296 CTL 클론의 대략적인 세포독성 효율은 ED₅₀ 50 pM이다(24). EGFP RNA에 의해 형질감염된 T 세포는 gp100₂₈₀₋₂₈₈ 웨타이드(10 μ M)가 탑재된 T2 세포를 용해시키지 않았고(도 6), 웨타이드 미탑재 T2 세포는 TCR RNA에 의해 형질감염된 T 세포에 의해 세포용해되지 않았다(데이터 미기재). 종합하면, TCR RNA에 의해 형질감염된 T 세포는 높은 결합성(avidity)으로 타겟을 세포용해하며, 이는 레트로바이러스에 의해 형질전이된 T 세포와 비슷하다. 높은 세포용해 효율로 인해, TCR RNA에 의해 형질감염된 CD8⁺ T 세포는 증폭된 종양-특이적 CTL(TIL) 클론의 입양 전달에 실시 가능한 대안책이 된다.

<155> 본 결과는 HLA-A2/gp100₂₈₀₋₂₈₈-특이적 CTL 클론으로부터 기원하는 TCR α 및 β 체인을 코딩하는 RNA가 전기천공 투입된 CD8⁺ T 세포는 세포용해성 작동자 기능을 수득함을 나타낸다. 이들 TCR에 의해 형질감염된 T 세포의 기능성(functionality)은 수종의 세포주에서 테스트하였다: 1) 웨타이드가 탑재된 타겟 T 세포를 이용한 자극에 대해 전기천공투입 4h, 24h 및 48h 이후에, 특이적인 IFN γ 생산(도 2), 2) 웨타이드가 탑재된 타겟 T 세포를 이용한 자극에 대해 동결건조 이후에(즉, 해동 후 0h, 24h, 및 48h에) 특이적인 IFN γ 생산(도 3a), 3) gp100-RNA-전기천공투입된 수지상 세포를 이용한 자극에 반응하여 특이적인 IFN γ 생산(도 3b), 4) 전기천공투입 24h, 48h, 72h(도 4) 및 1주일(데이터 미기재) 이후에 웨타이드 탑재 타겟 세포의 특이적 세포용해, 5) HLA-A2⁺/gp100⁺ 흑색종 세포주의 특이적 세포용해(도 5), 및 6) 웨타이드 탑재 표적 T 세포를 이용한 세포용해 효율(도 6). 이는 T 세포의 TCR-코딩 RNA에 의해 형질감염에 의한 세포용해 기능의 전달에 대한 최초의 기술이다.

<156> TCR을 코딩하는 RNA의 CD4⁺ T 세포 전기천공투입으로 상기 TCR의 특이성을 취득한다.

<157> 본 실험의 목적은 TCR을 코딩하는 RNA가 전기천공투입된 CD4⁺ T 세포가 상기 TCR의 특이성의 취함을 입증하기 위한 것이다. CD4⁺ T 세포에 2가지 다른 TCR 중 어느 하나를 코딩하는 RNA를 전기천공투입하였다. 제1 TCR은 종양-고환 항원 Mage3(M3-DP4) 유래의 MHC 클래스 II DP4 제한성 웨타이드에 특이적이며, CD4⁺ T 세포 클론으로부터 클로닝하였다. 제2 TCR은 흑색종 항원 gp100(gp100-A2) 유래의 MHC 클래스 I A2 제한성 웨타이드이며, CD8⁺ T 세포 클론으로부터 전술한 바와 같이 클로닝하였다. 제1 TCR에서는 자가 성숙형 DNA를 타겟으로 이용하였고, 제 2 TCR에서는 T2 세포를 이용하였다. 이들 2종의 타겟에 해당 웨타이드를 탑재하였다. 3- DP4 TCR에 의해 형질감염된 T 세포는 특이적으로 IFN- γ , TNF, 및 IL-2를 특이적으로 생산하였으며, 일부 IL-4 및 소량의 IL-10을 생산하였다. gp100 TCR에 의해 형질감염된 T 세포는 IFN- γ , TNF 및 IL-2를 다량, IL-4 및 IL-10을 일부 생산하였다. 이러한 결과는, 정제된 CD4⁺ T 세포에 TCR 코딩 RNA의 전기천공투입으로 TCR의 타겟을 특이

적으로 인지하는 T 세포가 제조됨을 최초로 나타낸다. 이는 치료 및 연구에서 T 세포의 조작을 효율적이고 용이하게 도울 수 있을 것이다.

<158> 정보 판독(readout)으로서 BD의 Cytometric Bead Array (CBA)를 선택하였으며, 이는 한번에 6종의 사이토카인을 측정할 수 있다(도 7). IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, 및 IFN- γ 를 선택하였다. 2종의 상이한 TCR을 본 실험에 사용하였다: 1st - 암-고환 항원 Mage3 (M3-DP4) 유래의 MHC 클래스 II DP4 제한성 펫타이드에 특이적인 TCR이며, CD4⁺ T 세포 클론으로부터 클로닝됨. 2nd - 흑색종 항원 gp100 (gp100-A2) 유래의 MHC 클래스 I A2 제한성 펫타이드에 특이적인 고친화성의 TCR이며, CD8⁺ T 세포 클론으로부터 제조되며, CD8⁺ 세포에 이미 성공적으로 사용되었다.

<159> 또한, 동일 조제물의 3차 배치 T 세포에 사이토카인 분비에 대한 음성 대조군으로서 EGFP로 형질감염하여, 형질감염 효율을 측정하였다. M3-DP4 TCR 전기천공투입된 T 세포의 타겟으로서 자가 성숙형(칵테일) DC를 사용하였고, T2 세포는 gp100-A2에 대해 사용하였다. 작동자와 타겟을 공배양하고, 20시간 및 44시간 후에 시료로부터 상청액을 취하여 사이토카인 함량에 대해 측정하였다. 20시간에, 수행한 첫번째 CD4⁺ 실험이므로 표준 곡선을 그리지 않았고, 어떤 일이 발생되는지를 보고자 하였다. 44시간에는 표준 곡선을 그렸다. 그러나, 일부 사이토카인은 매우 효율적으로 생산되어, 곡선 범위 밖이었다.

<160> 형질감염 효율은 GFP-RNA를 전기천공투입하고 24시간 이후에 FACS 분석하여 테스트하였다(도 8). 형질감염 효율은 86%였고, 평균 형광은 127이었다. 세포의 FSC SSC로 판단컨대, 생존력은 라이프 게이트(life gate)에서 95%로 매우 높았다.

<161> TCR 특이적인 Mage3 DP4가 전기천공투입된 CD4⁺ T 세포를 해당 Mage3 DP4 펫타이드가 탑재된 자가 성숙형 DC와 공배양하였다. 대조군으로서, 펫타이드가 탑재되지 않은 동일한 DC를 사용하였다. 또한, EGFP에 의해 형질감염된 CD4⁺ T 세포를 음성 대조군으로 사용하였다. 샘플은 20시간 및 44시간 후에 취하고, CBM에 의해 분석하였다. 20시간대에는, 단지 사이토카인-결합성 비드의 MFI이기에, 표준 곡선을 그리지 않았고, 반-정량 데이터만 제공하였다. 그럼에도 불구하고, 상기 데이터에서 TCR-RNA가 전기천공투입된 CD4⁺ 세포가 특이적으로 그 타겟을 인지하고 대조군 타겟은 인지하지 못하며, 또한 대조군 작동자는 아무것도 인지하지 못한다는 것이 명확해졌다(도 9). CD4⁺ 세포는 IFN- γ , TNF 및 IL-2를 다량, IL-4를 소량(로그값으로 나타냄) 생산하였다. 이들 스스로에 의한 DC는 일부 IL-6을 분비함을 유의하여야 한다. 이는, T 세포가 첨가되지 않은 DC도 동일하였기에(미기재), T 세포의 비특이적인 반응은 아니다.

<162> 44시간 후에, 상청물로부터 다른 샘플을 취하여 다시 CBI로 분석하였다. 이 시간대의 표준 곡선을 그려, 절대 수 아이디어(idea of the absolute number)를 구하였다. 상청물을 1:2로 희석하였다. IFN- γ 는 최고 표준값보다 높아, MFI가 시사되었다(도 10). 이러한 데이터는, 여전히 특이적인 반응을 관찰할 수 있음을 나타내지만, 수치는 20시간 이후만큼 좋지는 않았다. 특이적인 IL-2 분비 감소로 연결되는 일부 비특이적인 반응이 아마도 발생되며, 일부 사이토카인은 다시 분해되기 시작할 수 있다.

<163> gp100 특이적 TCR이 전기천공투입된 CD4⁺ T 세포를, HLA A2를 발현하지만 내인성 펫타이드가 전혀 또는 거의 없으며 외인성 펫타이드가 효과적으로 탑재될 수 있는 T2 세포와, 공배양하였다. 이들 세포에 gp100-A2 펫타이드를 탑재하였다. 대조군으로 펫타이드 미탑재 T2 세포를 사용하였다. 또한, EGFP로 형질감염된 CD4⁺ T 세포를 추가적인 음성 대조군으로 사용하였다. 20시간 및 44시간 후에 샘플을 취하여, CBM로 분석하였다. 다시, 20시간째의 데이터는 단지 반-정량 데이터이다. 그렇지만, 이 데이터에서, TCR-RNA에 의해 형질감염된 CD4⁺ T 세포가 특이적으로 타겟을 인지하지만 대조군 타겟은 인지 못하며, 또한 대조군 작동자는 아무것도 인지하지 않는다는 것이 매우 명확해졌다(도 11). 제조된 CD4⁺ T 세포는 M3-DP4 TCR에 비해 매우 많은 양의 IFN- γ , TNF 및 IL-2를 생산하였고, IL-4 및 IL-10은 조금 생산하였다(로그값으로 기재).

<164> 44시간 후에, 상청물로부터 다른 샘플을 취하여 다시 CBI로 분석하였다. 이 시간대의 표준 곡선을 그려, 절대 수 아이디어(idea of the absolute number)를 구하였다. 상청물을 1:2로 희석하였다. gp100-A2 TCR에 의해 형질감염된 CD4⁺ T 세포에서, 특이적인 타겟 상의 IFN- γ 와 IL-2는 최고 표준값보다 높아, MFI가 시사되었다(도 12). 이러한 데이터는, 여전히 강력하고 확실한 특이적인 반응을 관찰할 수 있음을 나타내지만, 20시간 대와

실질적으로 다르지 않았다. 아마도 T2 세포는 공동-자극성 분자를 발현하지 않아, 비특이적인 반응은 이루어지지 않았다.

<165> 이들 데이터를 종합하면, 정제된 CD4⁺ T 세포에 RNA를 고효율로 전기천공투입할 수 있으며, 보다 중요한 점은 HLA 클래스 I 및 II 제한형 TCR이 RNA 전기천공투입 방법을 이용하여 이들 세포에서 기능적으로 발현될 수 있음을 최초로 나타낸다는 것이다. 본 발명은 면역치료 뿐만 아니라 연구와 개발에 있어 T 세포 보조를 제공 또는 조작할 수 있는 새로운 가능성을 연다.

<166> 참조문헌

<167> 1. Boczkowski D, Nair SK, Nam JH, Lyerly HK, Gilboa E (2000) Induction of tumor immunity and cytotoxic T lymphocyte responses using dendritic cells transfected with messenger RNA amplified from tumor cells. *Cancer Res.* 4:1028-34

<168> 2. Bolhuis RL, Gratama JW (1998) Genetic re-targeting of T lymphocyte specificity. *Gene Ther.* 9:1153-55

<169> 3. Bolhuis RL, Willemsen RA, Gratama JW (2000) Clinical applications of redirected cytotoxicity. Sitkovsky MV, Henkart PA (eds) *Cytotoxic cells*. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia

<170> 4. Bonehill A, Heirman C, Tuyaerts S, Michiels A, Breckpot K, Brasseur F, Zhang Y, Van Der BP, Thielemans K (2004) Messenger RNA-electroporated dendritic cells presenting MAGE -A3 simultaneously in HLA class I and class II molecule. *J. Immunol.* 11:6649-57

<171> 5. Bonini C, Grez M, Traversari C, Ciceri F, Marktel S, Ferrari G, Dinauer M, Sadat M, Aiuti A, Deola S, Radrizzani M, Hagenbeek A, Apperley J, Ebeling S, Martens A, Kolb HJ, Weber M, Lotti F, Grande A, Weissinger E, Bueren JA, Lamana M, Falkenburg JH, Heemskerk MH, Austin T, Kornblau S, Marini F, Benati C, Magnani Z, Cazzaniga S, Toma S, Gallo- Stampino C, Intronà M, Slavin S, Greenberg PD, Bregni M, Mavilio F, Bordignon C (2003) Safety of retroviral gene marking with a truncated NGF receptor. *Nat. Med.* 4:367-69

<172> 6. Buckley RH (2002) Gene therapy for SCID-a complication after remarkable progress. *Lancet* 9341:1185-86

<173> 7. Clay TM, Custer MC, Sachs J, Hwu P, Rosenberg SA, Nishimura MI (1999) Efficient transfer of a tumor antigen-reactive TCR to human peripheral blood lymphocytes confers anti-tumor reactivity. *J. Immunol.* 1:507-13

<174> 8. Debets R, Willemsen R, Bolhuis R (2002) Adoptive transfer of T-cell immunity: gene transfer with MHC-restricted receptors. *Trends Immunol.* 9:435-36

<175> 9. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Sherry R, Restifo NP, Hubicki AM, Robinson MR, Raffeld M, Duray P, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE, Mavroukakis SA, White DE, Rosenberg SA (2002) Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 5594:850-854

<176> 10. Economou JS, Belldegrun AS, Glaspy J, Toloza EM, Figlin R, Hobbs J, Meldon N, Kaboo R, Tso CL, Miller A, Lau R, McBride W, Moen RC (1996) In vivo trafficking of adoptively transferred interleukin-2 expanded tumor-infiltrating lymphocytes and peripheral blood lymphocytes. Results of a double gene marking trial. *J.Clin.Invest* 2:515-21

<177> 11. Figlin RA, Thompson JA, Bukowski RM, Vogelzang NJ, Novick AC, Lange P, Steinberg GD, Belldegrun AS (1999) Multicenter, randomized, phase III trial of CD8(+) tumor-infiltrating lymphocytes in combination with recombinant interleukin2 in metastatic renal cell carcinoma. *J.Clin.Oncol.* 8:2521-29

<178> 12. Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, Bouneaud C, Hue C, De Villartay JP, Thrasher AJ, Wulffraat N, Sorensen R, Dupuis-Girod S, Fischer A, Davies EG, Kuis W, Leiva L, Cavazzana-Calvo M (2002) Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy.

N Engl J Med. 16:1185-93

<179> 13. Hanson HL, Donermeyer DL, Ikeda H, White JM, Shankaran V, Old LJ, Shiku H, Schreiber RD, Allen PM (2000) Eradication of established tumors by CD8⁺ T cell adoptive immunotherapy. Immunity. 2:265-76

<180> 14. Heiser A, Dahm P, Yancey DR, Maurice MA, Boczkowski D, Nair SK, Gilboa E, Vieweg J (2000) Human dendritic cells transfected with RNA encoding prostate-specific antigen stimulate prostate-specific CTL responses in vitro. J Immunol. 10:5508-14

<181> 15. Marshall E (2002) Clinical research. Gene therapy a suspect in leukemia-like disease. Science 5591:34-35

<182> 16. Morgan RA, Dudley ME, Yu YY, Zheng Z, Robbins PF, Theoret MR, Wunderlich JR, Hughes MS, Restifo NP, Rosenberg SA (2003) High efficiency TCR gene transfer into primary human lymphocytes affords avid recognition of melanoma tumor antigen glycoprotein 100 and does not alter the recognition of autologous melanoma antigens. J Immunol. 6:3287-95

<183> 17. Ogg GS, McMichael AJ (1998) HLA-peptide tetrameric complexes. Curr Opin Immunol. 4:393-96

<184> 18. Parmiani G, Castelli C, Rivoltini L, Casati C, Tully GA, Novellino L, Patuzzo A, Tosi D, Anichini A, Santinami M (2003) Immunotherapy of melanoma. Semin Cancer Biol. 6:391-400

<185> 19. Restifo NP, Wunderlich JR (1996) Principles of tumor immunity: biology of cellular immune responses. DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds) Biologic Therapy of Cancer. Lippincott Co, Philadelphia

<186> 20. Rosenberg SA (1999) A new era of cancer immunotherapy: converting theory to performance. CA Cancer J Clin. 2:70-3, 65

<187> 21. Roszkowski JJ, Lyons GE, Kast WM, Yee C, Van Besien K, Nishimura MI (2005) Simultaneous generation of CD8⁺ and CD4⁺ melanoma-reactive T cells by retroviral-mediated transfer of a single T-cell receptor. Cancer Res. 4:1570-1576

<188> 22. Schaft N, Dorrie J, Thumann P, Beck VE, Muller I, Schultz ES, Kampgen E, Dieckmann D, Schuler G (2005) Generation of an optimized polyvalent monocyte-derived dendritic cell vaccine by transfecting defined RNAs after rather than before maturation. J Immunol. 5:3087-97

<189> 23. Schaft N, Lankiewicz B, Gratama JW, Bolhuis RL, Debets R (2003) Flexible and sensitive method to functionally validate tumor-specific receptors via activation of NFAT. J Immunol Methods 1-2:13-24

<190> 24. Schaft N, Willemse RA, de Vries J, Lankiewicz B, Essers BW, Gratama JW, Fidgor CG, Bolhuis RL, Debets R, Adema GJ (2003) Peptide Fine Specificity of Anti-Glycoprotein 100 CTL Is Preserved Following Transfer of Engineered TCRalpha/beta Genes Into Primary Human T Lymphocytes. J Immunol. 4:2186-94

<191> 25. Scheel B, Teufel R, Probst J, Carralot JP, Geginat J, Radsak M, Jarrossay D, Wagner H, Jung G, Rammensee HG, Hoerr I, Pascolo S (2005) Toll-like receptor-dependent activation of several human blood cell types by protamine-condensed mRNA. Eur J Immunol. 35:1557-66

<192> 26. Smits E, Ponsaerts P, Lenjou M, Nijs G, Van Bockstaele DR, Berneman ZN, Van Tendeloo VF (2004) RNA-based gene transfer for adult stem cells and T cells. Leukemia 11:1898-902

<193> 27. Stanislawska T, Voss RH, Lotz C, Sadovnikova E, Willemse RA, Kuball J, Ruppert T, Bolhuis RL, Melief CJ, Huber C, Stauss HJ, Theobald M (2001) Circumventing tolerance to a human MDM2-derived tumor antigen by TCR gene transfer. Nat Immunol. 10:962-70

<194> 28. Theobald M, Biggs J, Hernandez J, Lustgarten J, Labadie C, Sherman LA (1997) Tolerance to p53 by A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes. J Exp Med. 5:833-41

<195> 29. Willemse RA, Weijtens ME, Ronteltap C, Eshhar Z, Gratama JW, Chames P, Bolhuis RL (2000) Grafting

primary human T lymphocytes with cancer-specific chimeric single chain and two chain TCR. Gene Ther. 16:1369-77

<196> 30. Xue S, Gillmore R, Downs A, Tsallios A, Holler A, Gao L, Wong V, Morris E, Stauss HJ (2005) Exploiting T cell receptor genes for cancer immunotherapy. Clin.Exp. Immunol. 2: 167-72

<197> 31. Yee C, Thompson JA, Byrd D, Riddell SR, Roche P, Celis E, Greenberg PD (2002) Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8⁺ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 25: 16168-73

<198> 32. Zhang T, He X, Tsang TC, Harris DT (2004) Transgenic TCR expression: comparison of single chain with full-length receptor constructs for T-cell function. Cancer Gene Ther. 7:487-96

<199> 서열목록

<200> TCR α 체인

ATGGCATCCATTGAGCTGTATTATTCCTGTGGCTGCAGCTGGACTTGGTAATGGAGA
GAATGTGGAGCAGCATTCAACCTGAGTGTCCAGGAGGGAGACAGCGCTGTTATCAAG
TGTACTTATTCAAGACAGTCCTCAAACACTTCCCTGGTATAAGCAAGAACTTGGAAAAGG
ACCTCAGCTTATTATAGACATTGTTCAAATGTGGCGAAAAGAAAGACCAACGAATTGCTG
TTACATTGAACAAGACAGCCAACATTCTCCCTGCACATCACAGAGACCCAACCTGAAGAC
TCGGCTGTCTACTTGTGCAGCAAGTACTTCGGTGGTACTAGCTATGGAAAGCTGACATT
TGGACAAGGGACCCTTGACTGTCCATCCAAATATCCAGAACCTGACCTGCCGTGTACC
AGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTACCGATTGATTCTCAA
ACAAATGTGTACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAAGTGTCTAGACAT
GAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCAT
GTGCAAACGCCCTCAACAAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTCCCCAGCCCAGAAAGT
TCCTGTGATGTCAGCTGGTCGAGAAAAGCTTGAAACAGATACGAACCTAAACTTCAAAA
CCTGTCAGTGATTGGGTTCCGAATCCTCCTGAAAGTGGCCGGTTAACCTGCTCATGAC
GCTCGGGCTGTGGTCCAGCTGAggatccctcgagagag

MASIRAVFIFLWLQLDLVNGENVEQHPSTLSVQEGDSAVIKCTYSDSASN 50
YFPWYKQELGKGPKQLIIDIRSNVGEKKDQRIAVTLNKTAKHFLSHITETQ 100
PEDSAVYFCAASTSGGTSYKGKLTFGQGTILTVPNIQNPDPAVYQLRDSK 150
SSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKNSAVAWS 200
NKSDFACANAFNSIIPEDTFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNL 250
VIGFRILLKVAGFNLLMTLRLWSS*GSLER

<202> TCR β 체인

ATGGGCCCCCAGCTCCTTGGCTATGTGGTCCCTTGCCTTCTAGGAGCAGGCCCCCTGGAAGGCCA
AGTACCCAGAACCCAAAGATACCTCATCACAGTGACTGGAAAGAAGTTAACAGTGACTTGT
TCTCAGAATATGAACCCTGAGTATATGTCCTGGTATCGACAAGACCCAGGGCTGGCTTAAG
GCAGATCTACTATTCAATGAATGTTGAGGTGACTGATAAGGGAGATGTTCTGAAGGGTACA
AAGTCTCTCGAAAAGAGAAGAGGAATTCCCCCTGATCCTGGAGTCGCCAGCCCCAACCA
GACCTCTCTGTACTTCTGTGCCAGCAGTTGGGAGCTCCTACGAGCAGTACTTCGGCCGG
GCACCCAGGCTCACGGTCACAGAGGACCTGAAAAACGTGTTCCCACCCGAGGTCGCTGTGTT
GAGCCATCAGAACAGAGATCTCCCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGTGCCAGCAG
GCTTCTACCCCGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTGGTGAATGGGAAGGAGGTGCACAGTGG
GGTCAGCACAGACCCACAGCCCCCTCAAGGAGCAGCCGCCCTCAATGACTCCAGATACTGC
CTGAGCAGCCGCTGAGGGTCTCGGCCACCTCTGGCAGAACCCCCGCAACCACCTCCGCTG
TCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTGGAGAATGACGAGTGGACCAAGGATAGGGCCAAACCT
GTCACCCAGATCGTCAGCGCCGAGGCCCTGGGTAGAGCAGACTGTGGCTCACCTCGAGTC
TTACCAAGGGGTCCCTGTCGCCACCATCCTCTATGAGATCTGCTAGGGAAAGGCCACCT
TGTATGCCGTGCTGGTCAGTGCCTCGTGATGGCCATGGTCAAGAGAAAGGATTCCAGAGG
CTAGcgatccctcgagagag

**MPGPQLLGYYVLCLLGAGPLEAQVTQNPRLITVTGKKLTVCNMQHEY 50
 MSWYRQDPGLGLRQIYYSMNVEVTDKGDVPEGYKVSKEKRNFPLILESP 100
 SPNQTSLYFCASSLGSSYEQYFGPGTRLTVDLKNVFPPEVAVFEPSEA 150
 EISHTQKATLVCLATGFYFDPDHVELSWVNGKEVHSGVSTDPPQPLKEQPAL 200
 NDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQ 250
 IVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLM 300
 AMVKRKDSRG*RSLER**

<205>

도면의 간단한 설명

<103>

본 발명의 특성 및 장점을 보다 완전하게 이해하기 위해, 본 발명의 상세한 설명과 첨부된 도면을 참조한다.

<104>

도 1은 RNA에 의해 형질감염된 CD8⁺ T 세포의 EGFP 발현을 나타낸 것이다. a) CD8⁺ T 세포는 EGFP RNA로 전기천공투입하고, 이들 세포에서의 EGFP 발현은 전기천공 4시간 후에 FACS 분석으로 결정하였다(검정 그래프). RNA없이 전기천공투입을 실시한 CD8⁺ T 세포는 음성 대조군으로 사용하였다(회색 그래프). b) CD8⁺ T 세포에 TCR α 및 β 체인 RNA(TCR RNA)를 전기천공투입하고, 이 세포에서의 TCR Vβ 14 표면 발현을 전기천공투입(EP) 4시간 및 24시간 후에 FACS 분석으로 결정하였다. RNA없이 전기천공투입을 실시한 CD8⁺ T 세포는 음성 대조군(Mock)으로 사용하였다. c) T 세포 표현형에 대한 전기천공투입 및 TCR 발현의 효과를 전기천공투입 24시간 후에 CCR7 및 CD45RA로 염색하여 조사하였다. T 세포 표현형의 구균은 다음과 같다: 세포용해성 작동자(LE): CD45RA⁺/CCR7⁻, 작동자 기억(EM): CD45RA⁻/CCR7⁻, 주 기억(CM): CD45RA⁻/CCR7⁺, 미노출(N): CD45RA⁺/CCR7⁺. 모든 데이터는 표준적인 3번의 독립된 실험 결과이다.

<105>

도 2는 TCR RNA에 의해 형질감염된 T 세포가 웹타이드 탑재된 타겟 세포에 의해 자극된 후 특이적으로 IFN γ를 생산함을 나타낸다. CD8⁺ T 세포에 EGFP RNA(EGFP) 또는 TCR α 및 β 체인을 코딩하는 RNA를 전기천공투입하고, 전기천공투입(EP)한 지 4h, 24h 및 48h 이후에 IFN γ 생산 분석에 작동자 세포로 사용하였다. 대조군 웹타이드(백색 막대) 또는 gp100₂₈₀₋₂₈₈ 웹타이드(YLE -웹타이드, 검정색 막대) 중 어느 하나가 탑재된 조사된 T2 세포를 자극 세포로 사용하고, IFN γ 생산은 ELISA로 상청액에서 측정하여 pg/ml로 표시하였다. 3회 실험값의 평균 ± SD를 나타낸다. 작동자 : 자극 세포의 비는 1:1이었다. 대표적인 T 세포 공여체의 (3가지 중) 하나의 결과를 나타낸다.

<106>

도 3은 TCR RNA에 의해 형질감염된 T 세포를 IFN γ 생산력 감소없이 동결보존할 수 있음을 나타낸다. CD8⁺ T 세포에 EGFP RNA (EGFP) 또는 TCR α 및 β 체인(TCR)을 코딩하는 RNA를 전기천공투입하고, 4시간 후에 동결보존하였다. 이들 T 세포는 해동하여, 해동 후 0h (a 및 b), 24h (a) 및 48h (a)에 IFN γ-생산 분석에 작동자 세포로 사용하였다. 대조군 웹타이드(백색 막대) 또는 gp100₂₈₀₋₂₈₈ 웹타이드(YLE -웹타이드, 검정색 막대) 중 어느 하나가 탑재된 조사된 T2 세포와, mock-전기천공투입된 DC(Mock, 회색 막대) 또는 gp100 RNA가 전기천공투입된 DC(GP100, 대각 줄무늬 막대)(b)를 자극 세포로 사용하고, FN γ 생산을 ELISA로 상청액에서 측정하여 pg/ml로 표시하였다. 3회 실험값의 평균 ± SD를 나타낸다. 작동자 : 자극 세포의 비는 1:1이었다. 대표적인 T 세포 공여체의 (3가지 중) 하나의 결과를 나타낸다.

<107>

도 4는 TCR RNA에 의해 형질감염된 T 세포가 웹타이드 탑재된 타겟 T 세포를 특이적으로 세포용해시킴을 나타낸다. CD8⁺ T 세포에 EGFP RNA(EGFP, 사각형) 또는 TCR α 및 β 체인을 코딩하는 RNA(TCR, 삼각형)를 전기천공투입(EP)하고, 4h, 24h, 48h 및 72h 이후에 표준 세포독성 분석의 작동자 세포로 사용하였다. 대조군 웹타이드(검정 기호) 또는 gp100₂₈₀₋₂₈₈ 웹타이드(YLE -웹타이드, 속빈 기호) 중 어느 하나가 탑재된 T2 세포를 타겟 세포로 사용하여, 세포용해율%를 계산하였다(상세한 사항은 재료 및 방법 부분 참조). 타겟 : 작동자 세포 비는 1:60, 1:20, 1:6 및 1:2 (a, 48h 시간), 또는 1:20 (b, 경시적으로 나타냄)이었다. 3회 실험의 평균값 ± SD로 나타낸다. 대표적인 T 세포 공여체의 (3가지 중) 하나의 결과를 나타낸다.

<108>

도 5는 TCR RNA에 의해 형질감염된 T 세포가 특이적으로 흑색종 세포주를 세포용해시킴을 나타낸다. 3가지 공여체의 CD8⁺ T 세포에 EGFP RNA(EGFP, 속빈 기호) 또는 TCR α 및 β 체인을 코딩하는 RNA(TCR, 검정 기호)를 전기천공투입하고, 4h, 24h 이후에 표준 세포독성 분석의 작동자 세포로 사용하였다. 흑색종 세포주 SK-MEL526(HLA-A2⁺/gp100⁺), NEMA(HLA-A2⁺/gp100⁻), 및 Colo829(HLA-A1⁺/A2⁻/gp100⁺)를 타겟 세포로 사용하여, 세포

용해율%을 계산하였다. 3회 실험의 평균값 ± SD로 나타낸다. 타겟 : 작동자 세포 비는 1:60, 1:20, 1:6 및 1:2이다.

<109> 도 6은 TCR RNA에 의해 형질감염된 T 세포가 레트로바이러스에 의해 형질전이된 T 세포와 유사한 세포용해력을 가짐을 나타낸 것으로, 모체 CLT 클론의 세포용해 효율과 비슷하다. CD8⁺ T 세포에 EGFP RNA(Neg) 또는 TCR α 및 β 체인을 코딩하는 RNA를 전기천공투입하고, 이를 24시간 후 세포독성 분석에 작동자 세포로 사용하였다. 여러가지 농도(기재되어 있음)의 gp100₂₈₀₋₂₈₈ 웨بت아이드가 탑재된 T2 세포를 타겟 세포로 사용하여, 세포용해율%을 계산하였다. 타겟 : 작동자 세포 비는 1:15였다. 세포용해 효율을 측정하기 위해 사용한 최대 세포용해의 50%(ED₅₀)에 해당되는 웨بت아이드 농도는 점선으로 나타낸다. 3회 실험의 평균값 ± SD로 나타낸다. 대표적인 T 세포 공여체의 (3가지 중) 하나의 결과를 나타낸다.

<110> 도 7은 BD 비드 어레이를 이용하여 한번에 6종류의 사이토카인 측정을 나타낸다. 각각에 사이토카인을 표시한다. 우측으로 갈수록(FL2 신호가 클수록), 사이토카인 농도는 증가한다. A: 대조군 DC 상에서 TCR에 의해 형질감염된 CD4⁺ T 세포로부터 유래된 상청액. B: 해당 웨بت아이드로 펄스된 DC 상에서의 TCR에 의해 형질감염된 CD4⁺ T 세포 유래의 상청액. 주의: IL-6은 T 세포가 아닌 DC에 의해 생산된다. 정확한 농도 측정을 위해, 표준 곡선을 그려야 한다.

<111> 도 8은 전기천공투입 24시간 후 RNA에 의해 형질감염된 CD4⁺ T 세포의 FACS 분석 결과를 나타낸다. A: CD4⁺ 세포를 GFP-RNA로 형질감염시켰다(검정 분포도). 여기서, TCR-RNA에 의해 형질감염된 세포는 음성 대조군으로서 제공하였다(회색 분포도). B: 세포의 FSC/SSC를 이용하여 세포 상태를 나타내었고, 세포의 95% 이상이 "라이프 게이트(life gate)"로 확인되었다(R1).

<112> 도 9는 GFP-RNA (A) 또는 Mage3-DP4 특이적인 TCR을 코딩하는 RNA(B)의 CD4⁺ T 세포의 형질감염 결과를 나타낸다. 음성 대조군 타겟으로서, 미탑재 자가 DC를 사용하였다. 특이적인 타겟으로서, Mage3-DP4 웨بت아이드를 DC 상에 탑재하였다. 20시간 후에, 상청액에서의 사이토카인 농도를 CBA에 의해 측정하였다. 비드의 MFI만 검출되었으며, 이는 농도의 반-정량적 비교를 가능하게 한다(그러나, 거의 비례함). IL-6이 T 세포가 아닌 DC에 의해 생산됨을 유념하여야 한다.

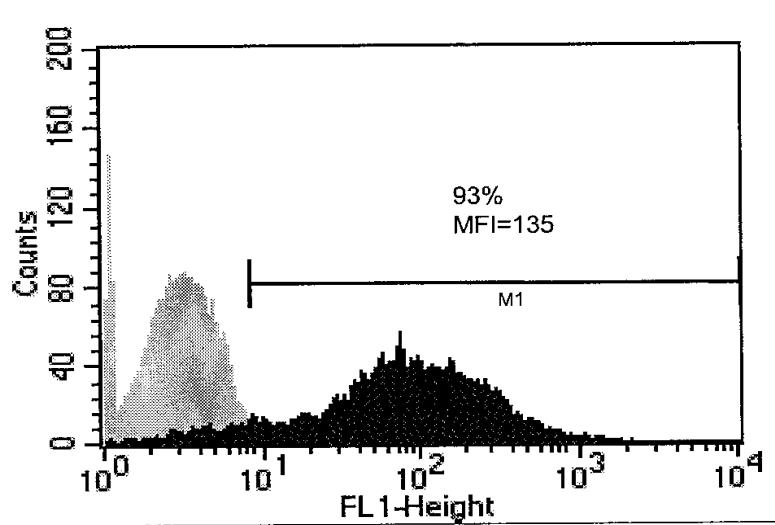
<113> 도 10: CD4⁺ T 세포를 GFP-RNA 또는 Mage3-DP4 특이적 TCR를 코딩하는 RNA에 의해 형질감염시켰다. 음성 대조군 타겟으로서, 미탑재 자가 DC를 사용하였다. 특이적인 타겟으로서, Mage3-DP4 웨بت아이드를 DC 상에 탑재하였다. 44시간 후에, 상청액에서의 사이토카인 농도를 CBA에 의해 측정하였다(A). IFN γ 농도가 범위 밖이어서(*), 비드의 MFI도 나타내었다(B),

<114> 도 11: CD4⁺ T 세포를 GFP-RNA(A) 또는 gp100-A2 특이적 TCR를 코딩하는 RNA(B)에 의해 형질감염시켰다. 음성 대조군 타겟으로서, 미탑재 T2 세포를 사용하였다. 특이적인 타겟으로서, gp100-A2 웨痍아이드를 T2 상에 탑재하였다. 20시간 후에, 상청액에서의 사이토카인 농도를 CBA에 의해 측정하였다. 비드의 MFI만 검출되었으며, 이는 농도의 반-정량적 비교를 가능하게 한다(그러나, 거의 비례함).

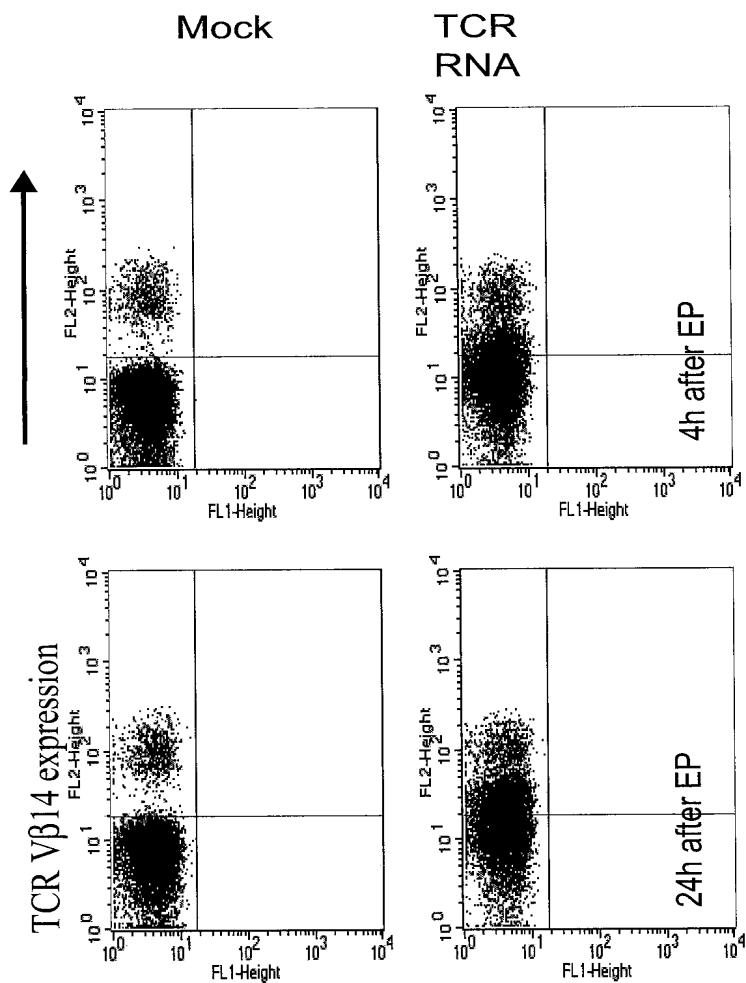
<115> 도 12: CD4+ T 세포를 GFP-RNA 또는 Mage3-DP4 특이적 TCR를 코딩하는 RNA에 의해 형질감염시켰다. 음성 대조군 타겟으로서, 미탑재 DC를 사용하였다. 특이적인 타겟으로서, Mage3-DP4 웨痍아이드를 DC 상에 탑재하였다. 44시간 후에, 상청액에서의 사이토카인 농도를 CBA에 의해 측정하였다(A). IFN γ 농도가 범위 밖이어서(*), 비드의 MFI도 나타내었다(B).

도면

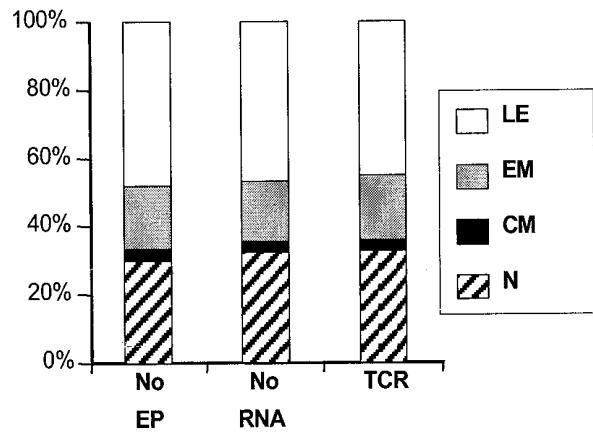
도면1A



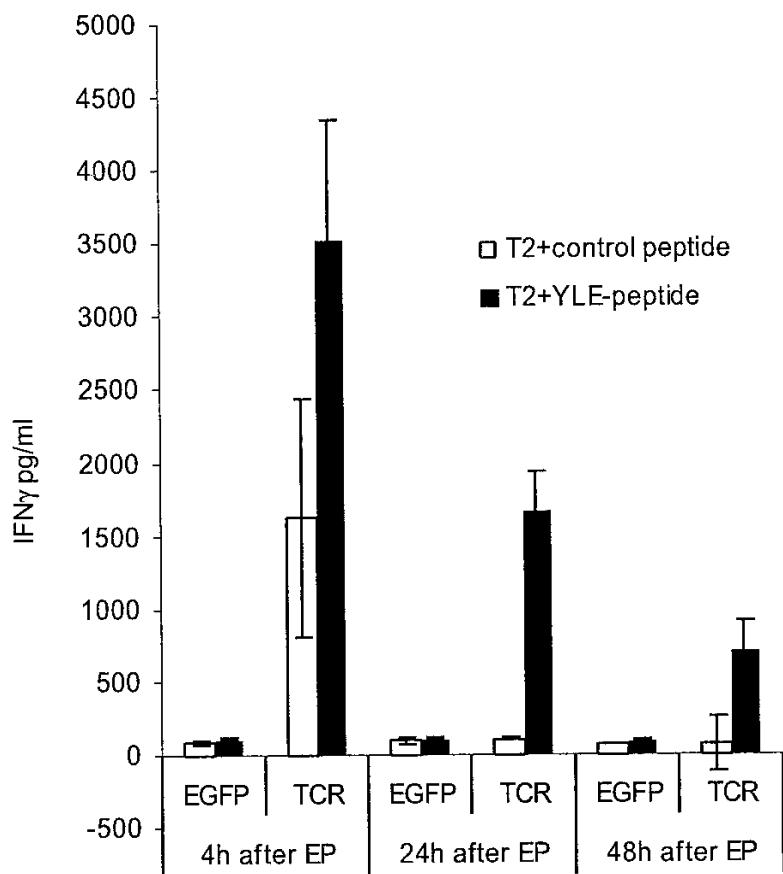
도면1B



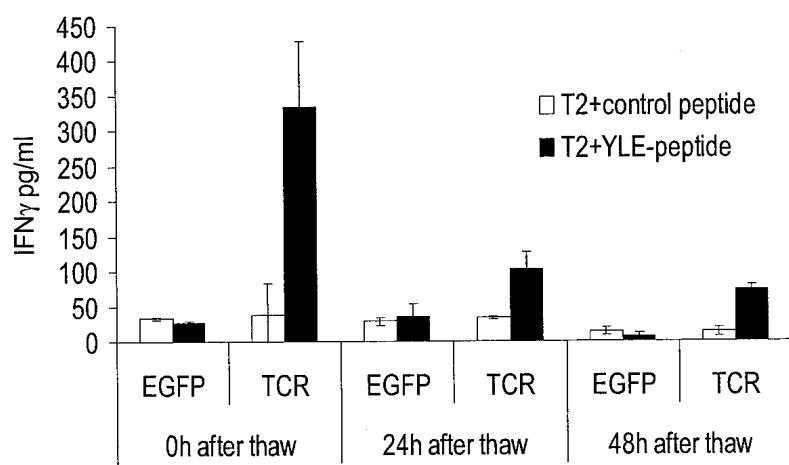
도면1C



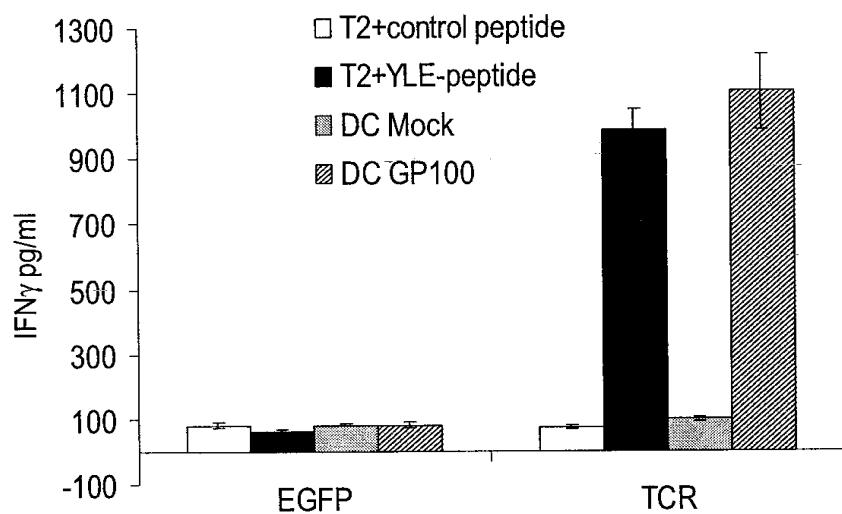
도면2



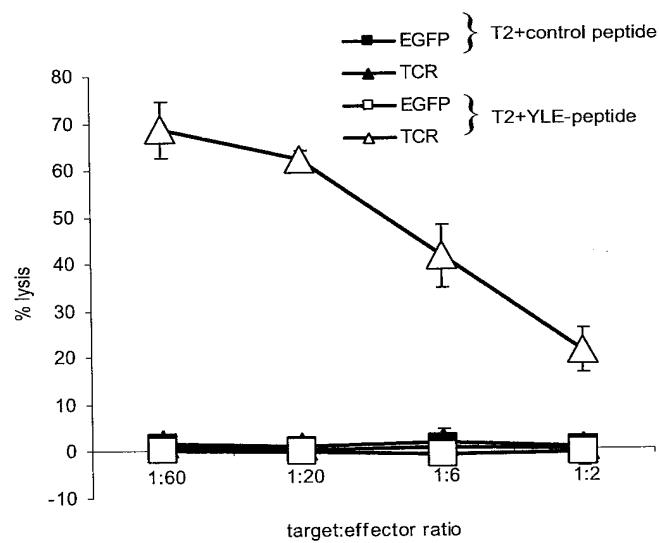
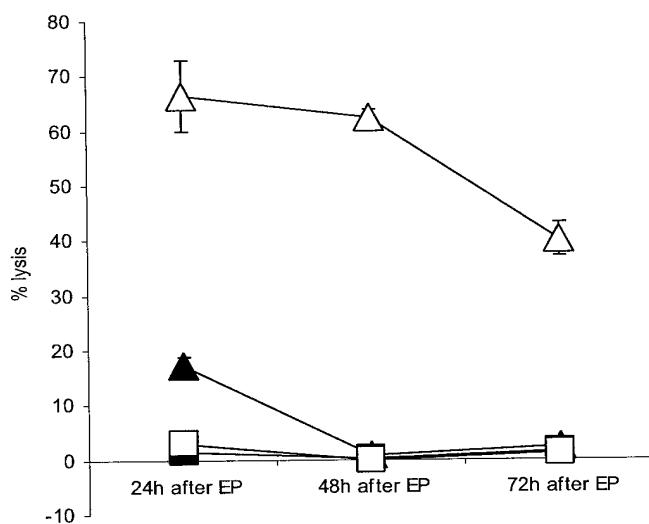
도면3A



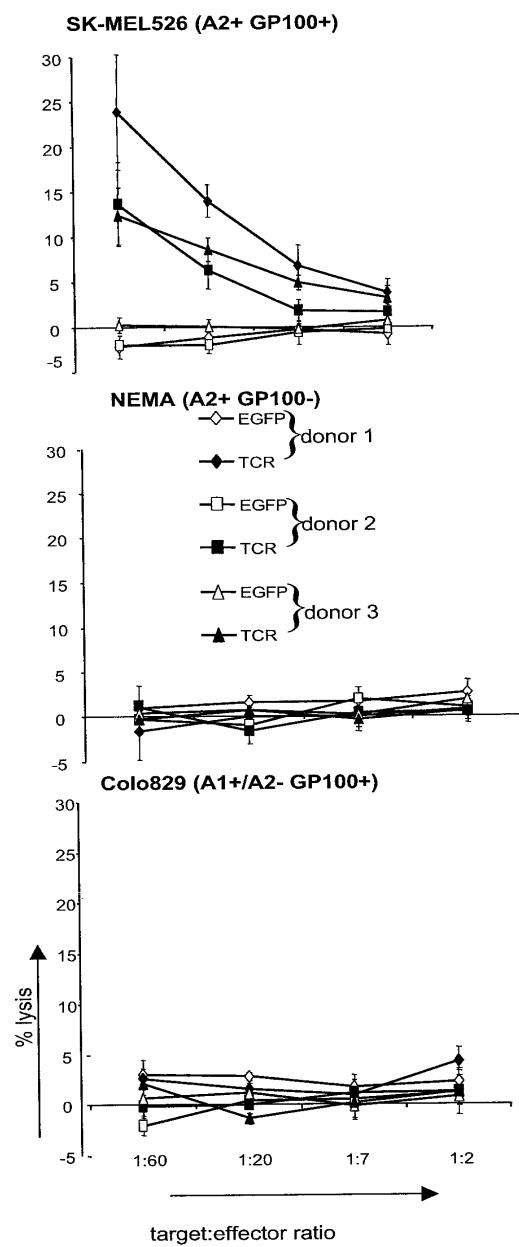
도면3B



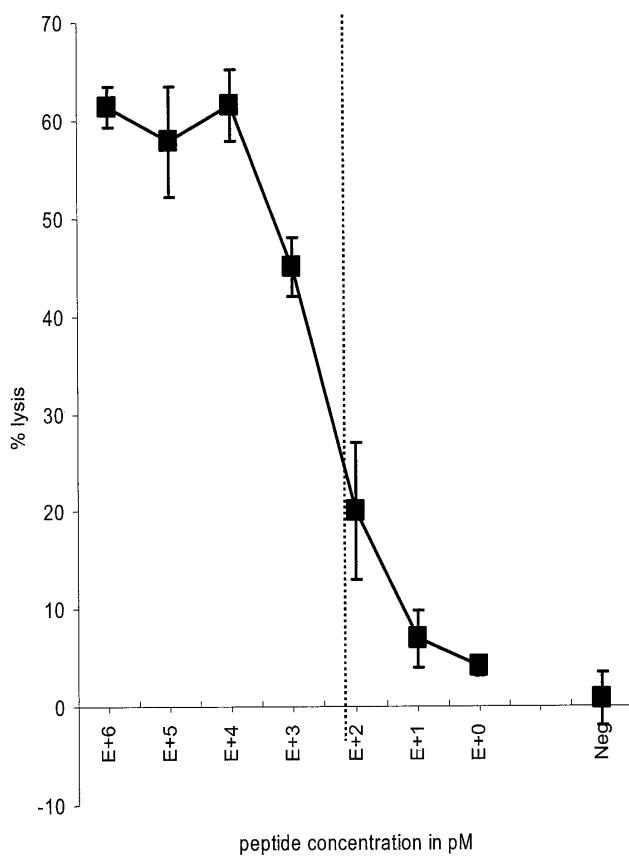
도면4

a**b**

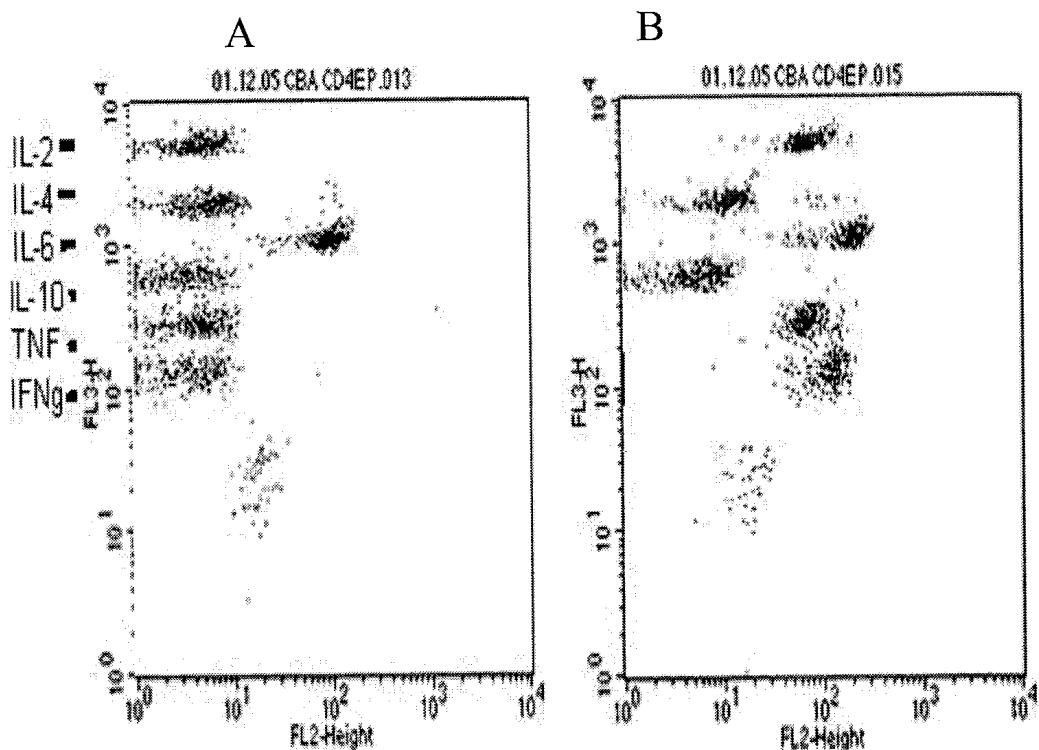
도면5



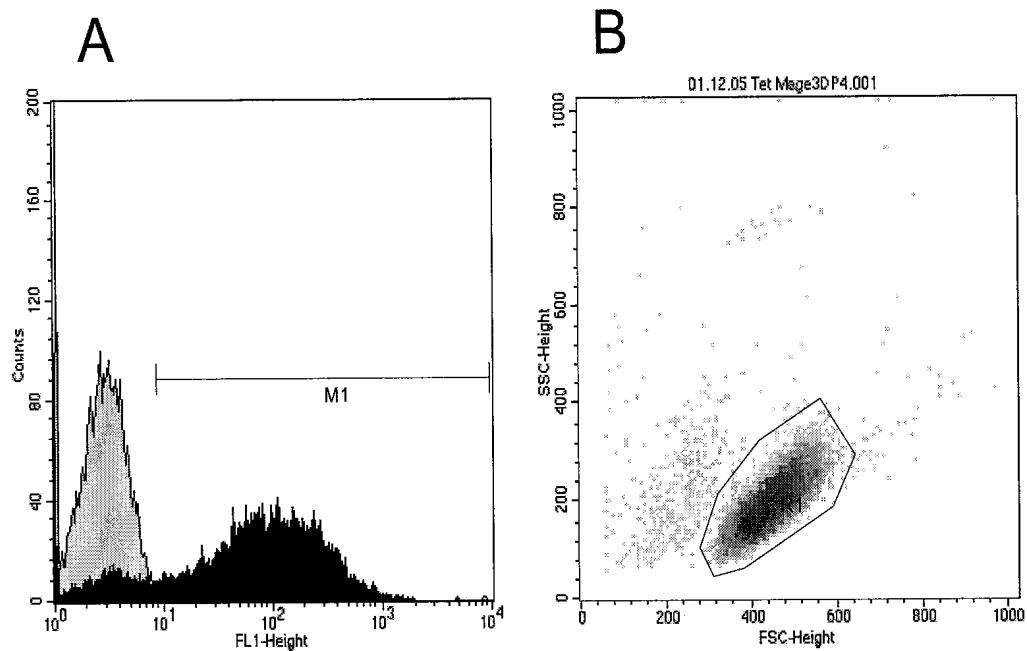
도면6



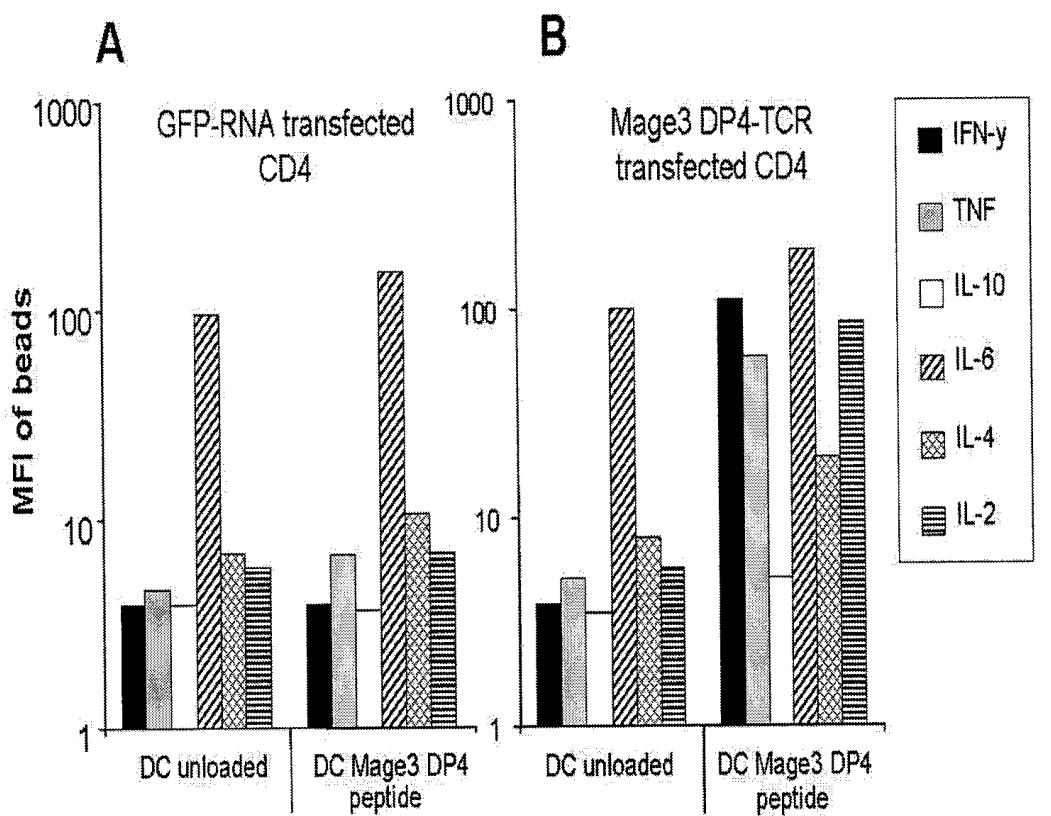
도면7



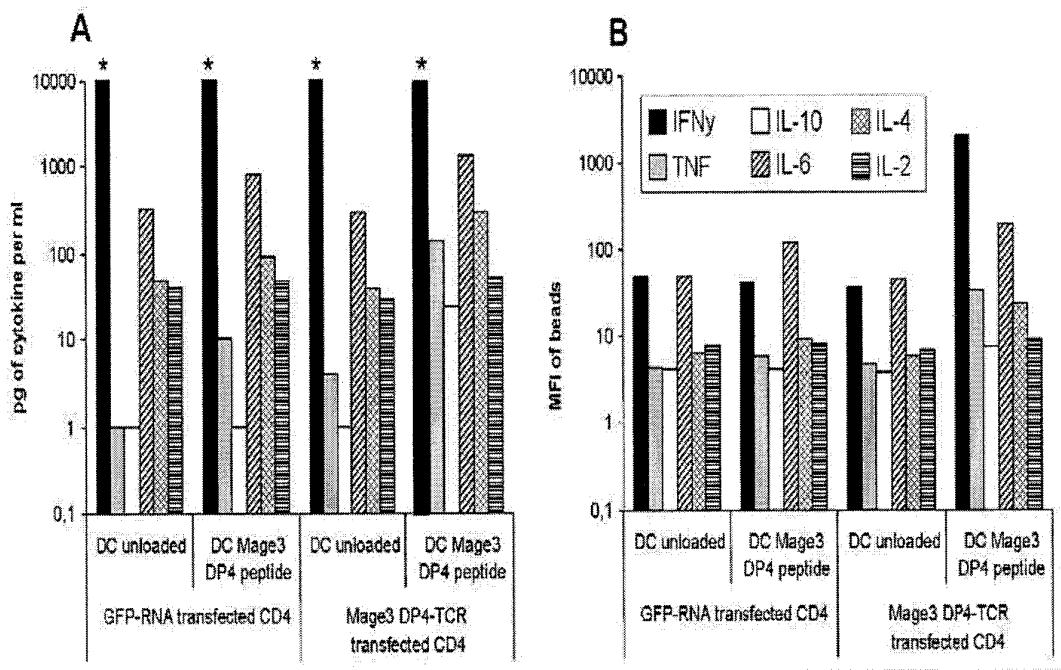
도면8



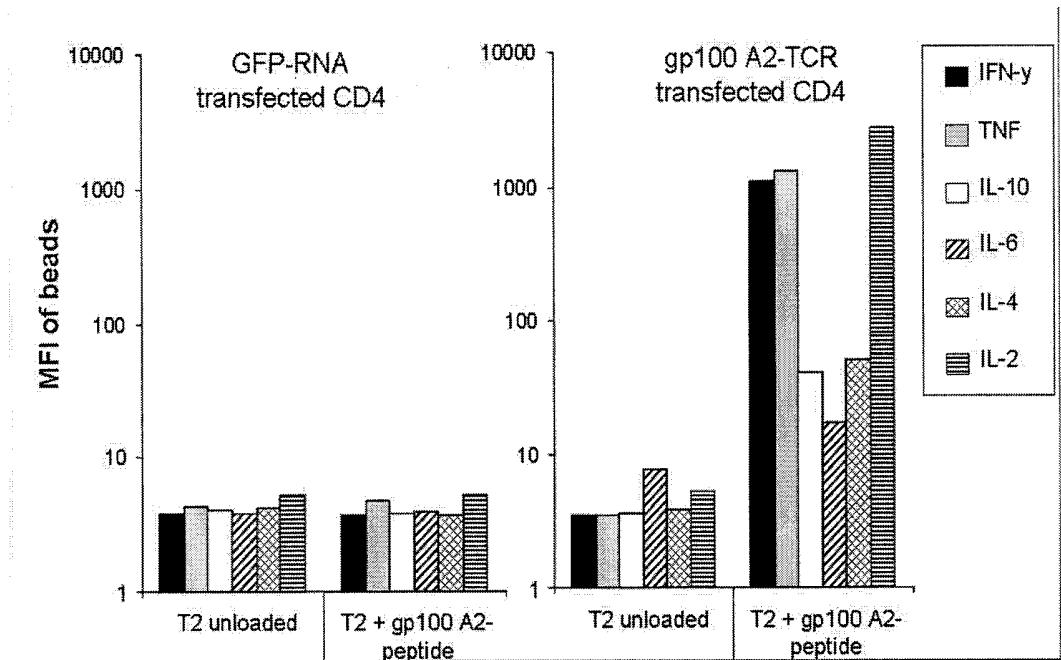
도면9



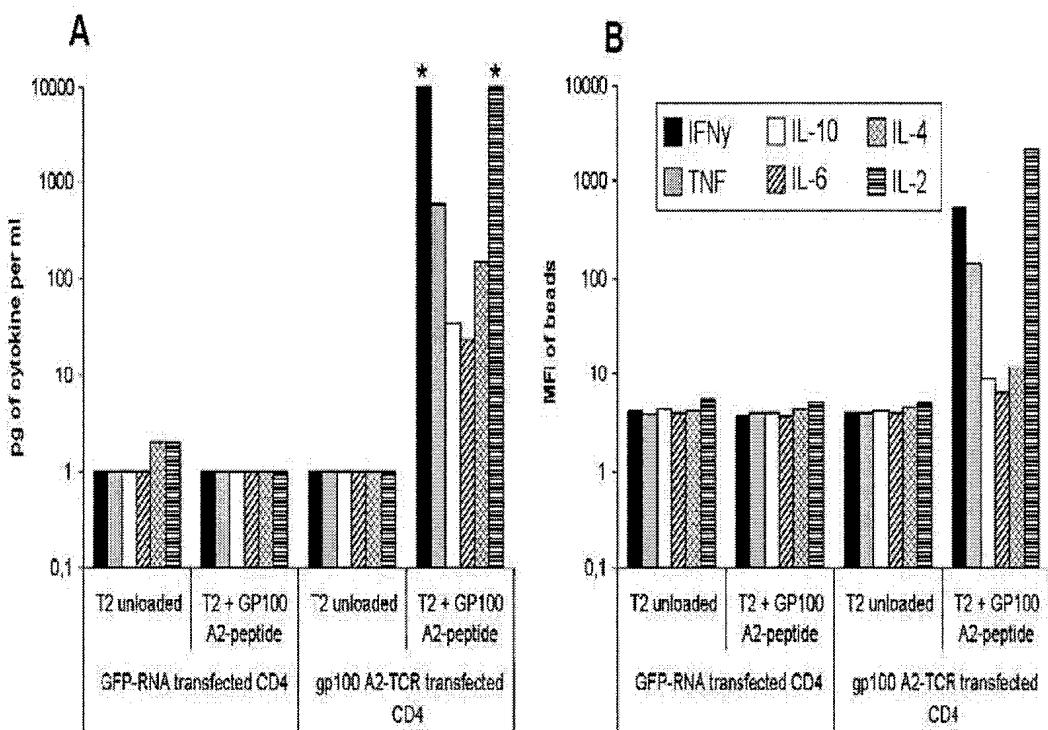
도면10



도면11



도면12



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> SCHULER, Gerold

<120> Method for Generating Antigen-Specific Effector T Cells

<130> 052954ep

<140> EP 05111928.7

<141> 2005-12-09

<160> 10

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 844

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atggcatcca ttcgagctgt atttatattc ctgtggctgc agctggactt ggtgaatgga 60

gagaatgtgg agcagcatcc ttcaaccctg agtgtccagg agggagacag cgctgttac 120
 aagtgtactt attcagacag tgcctcaaac tacttccctt ggtataagca agaacttgga 180
 aaaggacctc agtttattat agacattcg tcaaatgtgg gcgaaaagaa agaccaacga 240
 attgctgtta cattgaacaa gacagccaaa catttctccc tgcacatcac agagacccaa 300
 cctgaagact cggctgtcta cttctgtgca gcaagtactt cgggtggtagctatgga 360
 aagctgacat ttggacaagg gaccatctt actgtccatc caaatatcca gaaccctgac 420
 cctgccgtgt accagcttag agactctaaa tccagtgaca agtctgtctg cctattcacc 480
 gatttgatt ctcaaacaaa tgtgtcacaa agtaaggatt ctgatgtgta tatcacagac 540
 aaaactgtgc tagacatgag gtctatggac ttcaagagca acagtgtgt ggcctggagc 600
 aacaaatctg acttgcatttgc tgcacaaacgc ttcaacaaca gcattattcc agaagacacc 660
 ttctccccca gcccagaaag ttccctgtat gtcaagctgg tcgagaaaag ctttcaaaca 720
 gatacgaacc taaactttca aaacctgtca gtgattgggt tccgaatcct ctcctgaaa 780
 gtggccgggt ttaatctgct catgacgctg cggctgtgg ccagctgagg atccctcgag 840
 agag 844

<210> 2
 <211> 280
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Ser Ile Arg Ala Val Phe Ile Phe Leu Trp Leu Gln Leu Asp
 1 5 10 15

Leu Val Asn Gly Glu Asn Val Glu Gln His Pro Ser Thr Leu Ser Val
 20 25 30

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

Ser Asn Tyr Phe Pro Trp Tyr Lys Gln Glu Leu Gly Lys Gly Pro Gln
 50 55 60

Leu Ile Ile Asp Ile Arg Ser Asn Val Gly Glu Lys Lys Asp Gln Arg
 65 70 75 80

Ile Ala Val Thr Leu Asn Lys Thr Ala Lys His Phe Ser Leu His Ile
 85 90 95

Thr Glu Thr Gln Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ala Ser
 100 105 110

Thr Ser Gly Gly Thr Ser Tyr Gly Lys Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

Ile Leu Thr Val His Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr
 130 135 140

Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr
 145 150 155 160

Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val
 165 170 175

Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys
 180 185 190

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

195

200

205

Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser
 210 215 220

Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr
 225 230 235 240

Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile
 245 250 255

Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu
 260 265 270

Trp Ser Ser Gly Ser Leu Glu Arg
 275 280

<210> 3
<211> 949
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
atggccccc agtccttgg ctagtggtc cttgccttc taggagcagg cccctggaa 60

gcccaagtga cccagaaccc aagataacctc atcacagtga ctggaaagaa gttAACAGTG 120

acttgttctc agaatatgaa ccatgagtt atgtcctggt atcgacaaga cccaggcgt 180

ggcttaaggc agatctacta ttcaatgaat gttgaggtga ctgataaggg agatgttcct 240

gaagggtaca aagtctctcg aaaagagaag aggaatttcc ccctgatctt ggagtccccc 300

agcccccaacc agacctctct gtacttctgt gccagcagg tggggagctc ctacgagcag 360

tactcggc cggcaccag gtcacggtc acagaggacc tgaaaaacgt gttcccaccc 420

gaggctcgctg tggggagctc atcagaagca gagatctccc acacccaaaa ggccacactg 480

gtgtgcctgg ccacaggctt ctaccccgac cacgtggagc tgagctggtg ggtgaatggg 540
 aaggagggtgc acagtgggt cagcacagac ccacagcccc tcaaggagca gcccgcctc 600
 aatgactcca gatactgcct gagcagccgc ctgagggtct cgccacacct ctggcagaac 660
 ccccgcaacc acttccgctg tcaagtccag ttctacggc tctcgagaa tgacgagtgg 720
 acccaggata gggccaaacc tgtcacccag atcgtcagcg ccgaggcctg gggtagagca 780
 gactgtggct tcaccccgta gtcttaccag caaggggtcc tgtctgccac catccttat 840
 gagatcttgc taggaaaggc caccttgtat gccgtgctgg tcagtccct cgtgctgatg 900
 gccatggtca agagaaagga ttccagaggc tagcgatccc tcgagagag 949

<210> 4
 <211> 315
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met	Gly	Pro	Gln	Leu	Leu	Gly	Tyr	Val	Val	Leu	Cys	Leu	Leu	Gly	Ala
1															

Gly	Pro	Leu	Glu	Ala	Gln	Val	Thr	Gln	Asn	Pro	Arg	Tyr	Leu	Ile	Thr

Val	Thr	Gly	Lys	Lys	Leu	Thr	Val	Thr	Cys	Ser	Gln	Asn	Met	Asn	His

Glu	Tyr	Met	Ser	Trp	Tyr	Arg	Gln	Asp	Pro	Gly	Leu	Gly	Leu	Arg	Gln

Ile	Tyr	Tyr	Ser	Met	Asn	Val	Glu	Val	Thr	Asp	Lys	Gly	Asp	Val	Pro

Glu Gly Tyr Lys Val Ser Arg Lys Glu Lys Arg Asn Phe Pro Leu Ile
 85 90 95

Leu Glu Ser Pro Ser Pro Asn Gln Thr Ser Leu Tyr Phe Cys Ala Ser
 100 105 110

Ser Leu Gly Ser Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu
 115 120 125

Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val
 130 135 140

Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu
 145 150 155 160

Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp
 165 170 175

Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln
 180 185 190

Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser
 195 200 205

Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His
 210 215 220

Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp
 225 230 235 240

Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala
 245 250 255

Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly
 260 265 270

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

275

280

285

Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys
 290 295 300

Arg Lys Asp Ser Arg Gly Arg Ser Leu Glu Arg
 305 310 315

<210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

Glu Ala Asp Pro Thr Gly His Ser Tyr
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
 1 5

<210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7

Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
 1 5

<210> 8
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Phe Leu Thr Pro Lys Lys Leu Gln Cys Val
1 5 10

<210> 9

<211> 35

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Primer

<400> 9

ctctggatcc atgggcccc agtccttgg ctatg 35

<210> 10

<211> 38

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Primer

<400> 10

ctctctcgag ggatcgctag cctctggaat cctttctc 38

1