



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0012754
(43) 공개일자 2018년02월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) **A61K 35/17** (2014.01)
C07K 14/725 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0638 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7032986
- (22) 출원일자(국제) 2016년04월14일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2017년11월14일
- (86) 국제출원번호 PCT/GB2016/051050
- (87) 국제공개번호 WO 2016/166544
 국제공개일자 2016년10월20일
- (30) 우선권주장
 1506423.1 2015년04월15일 영국(GB)
 PCT/GB2015/051985 2015년07월08일 영국(GB)

- (71) 출원인
티씨 바이오팜 리미티드
 영국 로디언 이에이치26 0피제트 페니퀴 부시 론
- (72) 발명자
리크 마이클 데이비드
 영국 에든버러 로디언 이에이치15 3피큐 밀턴 크
 레센트 53
해니건 아델
 영국 클래스고 스트래스클라이드 지43 2이와이 킨
 토어 로드 69
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인아주김장리

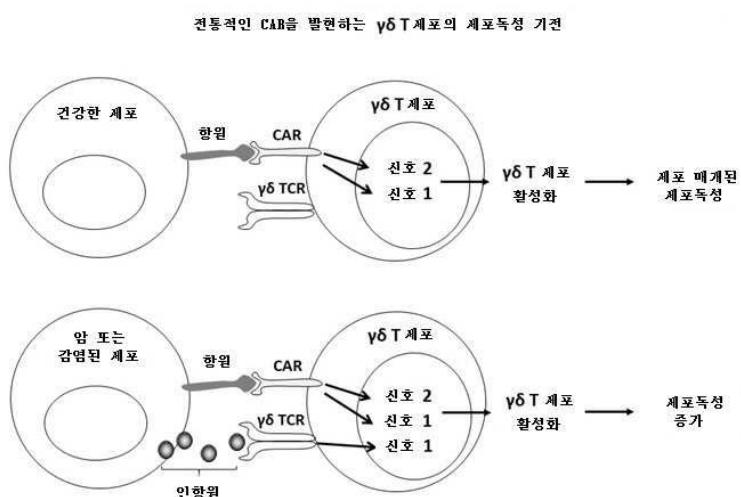
전체 청구항 수 : 총 54 항

(54) 발명의 명칭 **변형된 감마 렐타 T 세포 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 인간에서 암 또는 감염성 질환의 치료를 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 본 발명은, CD3 제타 신호 전달 도메인을 포함하거나 포함하지 않으면서, 항원 결합 도메인, 헌지 도메인, 막관통 도메인, 동시자극 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 감마 렐타 T 세포의 생성 및 투여를 포함한다. 감마 렐타 T 세포에서 CD3 제타 신호전달 도메인이 생략된 CAR 서열의 발현은 생체내 CAR-T 치료를 제공하고, 이것은 감마 렐타 T 세포 수용체(TCR)의 활성화를 위한 리간드를 제공하는 오직 표적 세포에서 세포용해에 영향을 미칠 것이다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류

C07K 14/7051 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2319/03 (2013.01)

C12N 2501/2302 (2013.01)

C12N 2510/00 (2013.01)

(72) 발명자

파타카스 아가피토스

영국 클래스고 스트래스클라이드 지46 6엔티 포레

스 게이트 4

페루지나 다리아

영국 에든버러 로디언 이에이치3 9디엑스 스페탈
스트리트 6/3

명세서

청구범위

청구항 1

키메라 항원 수용체를 포함하는 변형된 $\gamma\delta$ T 세포로서,

상기 키메라 항원 수용체는 질환 항원에 대한 결합 특이성을 가지는 세포외 항원 결합 도메인, 힌지, 막관통 도메인, 및

- (i) CD3 제타 도메인이 부재하는(absent), 1개 이상의 동시자극 신호전달 영역(동조 가능(tunable)), 또는
- (ii) 1개 이상의 동시자극 신호전달 영역 및 비기능적 CD3 제타 도메인(동조 가능), 또는
- (iii) CD3 제타 도메인, 또는
- (iv) 1개 이상의 동시자극 신호전달 영역 및 기능적 CD3 제타 도메인을 포함하는, 변형된 $\gamma\delta$ T 세포.

청구항 2

키메라 항원 수용체를 포함하는 변형된 $\gamma\delta$ T 세포로서,

상기 키메라 항원 수용체는 질환 항원에 대한 결합 특이성을 가지는 세포외 항원 결합 도메인, 힌지, 막관통 도메인, 1개 이상의 동시자극 신호전달 영역 및 비기능적 CD3 제타 도메인을 포함하는, 변형된 $\gamma\delta$ T 세포.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 비기능적 CD3 제타 도메인은 상기 키메라 항원 수용체 내에 CD3 제타 도메인의 부재에 의해 제공된, 변형된 $\gamma\delta$ T 세포.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 2개의 키메라 항원 수용체를 포함하고, 상기 키메라 항원 수용체는 상이한 질환 항원에 대한 결합 특이성을 가지는, 변형된 $\gamma\delta$ T 세포.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 저해성 키메라 항원 수용체(inhibitory chimeric antigen receptor: ICAR)를 추가로 포함하고, 상기 저해성 키메라 항원 수용체에 의한 항원의 결합은, 오프 표적(off-target) 세포에서 상기 $\gamma\delta$ T 세포의 활성화를 최소화하는 것이 저해되도록, 질환 항원에 대한 결합 특이성을 가지는 세포외 항원 결합 도메인, 힌지, 막관통 도메인, 및

- (i) 1개 이상의 동시자극 신호전달 영역으로서, CD3 제타 도메인은 부재한, 영역(동조 가능), 또는
- (ii) 1개 이상의 동시자극 신호전달 영역 및 비기능적 CD3 제타 도메인(동조 가능), 또는
- (iii) CD3 제타 도메인, 또는
- (iv) 1개 이상의 동시자극 신호전달 영역 및 기능적 CD3 제타 도메인을 포함하는, 키메라 항원 수용체의 질환 항원에 대한 임의의 결합에 의해 제공된 신호를 발생시키는, 변형된 $\gamma\delta$ T 세포.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 $\gamma\delta$ 쌍 자음은 V γ 1 내지 9 및 V δ 1 내지 8인, 변형된 $\gamma\delta$ T 세포.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 $\gamma\delta$ T 세포는 V γ 9V δ 2 하위유형인, 변형된 $\gamma\delta$ T 세포.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체의 항원 인식 도메인은 세포 감염, 박테리아 감염, 진균 감염 또는 원생동물 감염에서 발견되거나 이것과 연관된 세포 표면 표적 또는 천연 리간드; 활성 또는 불활화 바이러스 단편; 웹타이드; 단백질; 바이러스로부터의 항원 분절; 종양 특이적 항원 또는 종양 연관 항원에 결합할 수 있는, 변형된 $\gamma\delta$ T 세포.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 암 또는 감염의 치료에서 사용하기 위한, 변형된 $\gamma\delta$ T 세포.

청구항 10

제2항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 암 또는 감염의 치료에서 사용하기 위한, 변형된 $\gamma\delta$ T 세포.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 변형된 $\gamma\delta$ T 세포는 동종이계 전달(allogeneic transfer)에 의해 대상체에게 제공되는, 암 또는 감염의 치료에서 사용하기 위한, 변형된 $\gamma\delta$ T 세포.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 변형된 $\gamma\delta$ T 세포는 동종이계 전달에 의해 대상체에게 제공되는, 암 또는 감염의 치료에서 사용하기 위한, 변형된 $\gamma\delta$ T 세포.

청구항 13

제9항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 감염은 바이러스, 박테리아, 진균 또는 원생동물 감염으로부터 선택된, 암 또는 감염의 치료에서 사용하기 위한, 변형된 $\gamma\delta$ T 세포.

청구항 14

제9항에 있어서, 상기 변형된 $\gamma\delta$ T 세포는 자가유래 전달(autologous transfer)에 의해 대상체에게 제공되는, 암 또는 감염의 치료에서 사용하기 위한, 변형된 $\gamma\delta$ T 세포.

청구항 15

제10항에 있어서, 상기 변형된 $\gamma\delta$ T 세포는 자가유래 전달에 의해 대상체에게 제공되는, 암 또는 감염의 치료에서 사용하기 위한, 변형된 $\gamma\delta$ T 세포.

청구항 16

제14항 또는 제15항에 있어서, 상기 감염은 바이러스, 박테리아, 진균 또는 원생동물 감염으로부터 선택된, 감염의 치료에서 사용하기 위한, 변형된 $\gamma\delta$ T 세포.

청구항 17

제9항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 $\gamma\delta$ T 세포는 아미노비스포스포네이트, 또는 이의 대체물에 의해 대상체에게 동시투여되고, 상기 대체물은 생리학적 메발로네이트 경로의 이상조절을 통해 표적 세포에 존재하는 인항원(phosphoantigen)의 수준을 증대시킬 수 있는, 암 또는 감염의 치료에서 사용하기 위한, 변형된 $\gamma\delta$ T 세포.

청구항 18

키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩하는 핵산 서열로서, 상기 CAR은 세포외 항원 인식 도메인, 헌지, 막관통 도메인, 및

(i) CD3 제타 도메인이 부재하는, 1개 이상의 동시자극 신호전달 영역(동조 가능), 또는

(ii) 1개 이상의 동시자극 신호전달 영역 및 비기능적 CD3 제타 도메인 (동조 가능), 또는

(iii) CD3 제타 도메인, 또는

(iv) 1개 이상의 동시자극 신호전달 영역 및 기능적 CD3 제타 도메인을 포함하는, 핵산 서열.

청구항 19

제18항에 있어서, 질환 항원에 대한 결합 특이성을 가지는 세포외 항원 결합 도메인, 헌지, 막관통 도메인, 1개 이상의 동시자극 신호전달 영역 및 비기능적 CD3 제타 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩하는, 핵산 서열.

청구항 20

제18항 또는 제19항에 있어서, 상기 비기능적 CD3 제타 도메인은 상기 키메라 항원 수용체에서 CD3 제타 도메인의 부재에 의해 제공된, 핵산 서열.

청구항 21

제18항에 있어서, 서열 번호 2 내지 6의 아미노산 서열을 코딩할 수 있는, 서열 번호 1의 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 이것으로 이루어진, 핵산 서열.

청구항 22

제18항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩하고, 상기 CAR은 세포외 항원 인식 도메인을 포함하고, 상기 세포외 항원 인식 도메인은 B 세포 단백질 CD19, 헌지, 막관통 도메인, 1개 이상의 동시자극 신호전달 영역을 인식하지만, 기능적 CD3 제타 도메인이 부재한 scFv인, 핵산 서열.

청구항 23

제18항에 있어서, 서열 번호 8 내지 11의 아미노산 서열을 코딩할 수 있는 서열 번호 7의 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 이것으로 이루어진, 핵산 서열.

청구항 24

CAR 변형된 $\gamma\delta$ T 세포를 제공하기 위한 방법으로서, $\gamma\delta$ T 세포를 유전적으로 변형시키도록 제18항 내지 제20항 중 어느 한 항의 핵산을 $\gamma\delta$ T 세포로 혼입하거나 형질도입하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 형질도입하는 단계는 렌티바이러스 CAR 작제물을 사용하는, 방법.

청구항 26

제24항 또는 제25항에 있어서, 제18항 내지 제23항 중 어느 한 항의 핵산을 세포로 동시에 형질도입하고, CAR 형질도입된 $\gamma\delta$ T 세포를 선택적으로 증식시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 27

1개 이상의 동시자극 신호전달 영역 및 CD3 제타 도메인을 포함하는 CAR과 CD3 제타 도메인이 부재한 CAR 사이를 검출하는 방법으로서, 시험되는 CAR을 코딩하는 핵산에 서열 번호 12 및 서열 번호 13, 및 서열 번호 14 및 서열 번호 15의 군으로부터 선택된 프라이머 쌍을 결합시키는 단계를 포함하는, 방법:

정방향(서열 번호 12)	5'-GCTCCTGCACAGTGACTACAT-3'
역방향(서열 번호 13)	5'-GGAGTTCTTCTGCCCGT-3'

정방향(서열 번호 14)	5'-CTGTAGCTGCCGATTCAGA-3'
역방향(서열 번호 15)	5'-CATCGTACTCCTCTTCGTCC-3'

청구항 28

공여자 대상체로부터 수집되고 수혜자 대상체에게 치료학적 유효량의 $\gamma\delta$ T 세포의 동종이계 투여를 처리하도록 처리된 공여자 세포를 이를 요하는 수혜자 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 치료 방법으로서, 상기 처리는 키메라 항원 수용체를 혼입하도록 상기 $\gamma\delta$ T 세포를 변형시키는 단계를 포함하는, 치료 방법.

청구항 29

공여자 대상체로부터 수집되고 상기 공여자 대상체에게 치료학적 유효량의 $\gamma\delta$ T 세포의 투여를 허용하도록 처리된 공여자 세포를 이를 요하는 공여자 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 치료 방법으로서, 상기 처리는 키메라 항원 수용체를 혼입하도록 상기 $\gamma\delta$ T 세포를 변형시키는 단계를 포함하고, 상기 키메라 항원 수용체는 질환 항원에 대한 결합 특이성을 가지는 세포외 항원 결합 도메인, 헌지, 막관통 도메인, 1개 이상의 동시자극 신호전달 영역 및 비기능적 CD3 제타 도메인을 포함하는, 치료 방법.

청구항 30

제28항에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체는 질환 항원에 대한 결합 특이성을 가지는 세포외 항원 결합 도메인, 헌지, 막관통 도메인, 1개 이상의 동시자극 신호전달 영역 및 비기능적 CD3 제타 도메인을 포함하는, 치료 방법.

청구항 31

제29항 또는 제30항에 있어서, 상기 비기능적 CD3 제타 도메인은 상기 키메라 항원 수용체에서 CD3 제타 도메인의 부재에 의해 제공된, 치료 방법.

청구항 32

제28항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, $\gamma\delta$ T 세포가 투여된 상기 대상체는 바이러스, 박테리아, 진균 또는 원생동물 감염 또는 암을 가지는, 치료 방법.

청구항 33

제28항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, $\gamma\delta$ T 세포가 투여되는 상기 대상체는 면역억제 약물과 동시에, 순차적으로 또는 별개로 투여되는, 치료 방법.

청구항 34

자가유래 또는 동종이계 전달에 의해 대상체를 치료하기 위해 병용하여 사용하기 위한, 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 $\gamma\delta$ T 세포 및 피로포스페이트/포스포네이트 약물을 포함하는 키트.

청구항 35

자가유래 또는 동종이계 전달에 의해 대상체를 치료하기 위해 병용하여 사용하기 위한, 제2항 내지 제8항 중 어느 한 항의 $\gamma\delta$ T 세포 및 피로포스페이트/포스포네이트 약물을 포함하는 키트.

청구항 36

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 $\gamma\delta$ T 세포를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 37

제2항 내지 제8항 중 어느 한 항의 $\gamma\delta$ T 세포를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 38

제36항 또는 제37항에 있어서, 상기 조성물은 치료학적 효과를 제공하도록 개체에게 제공하기에 적합한 $\gamma\delta$ T 세포의 통합된 용량을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 39

암의 치료에서 사용하기 위한, 제36항 내지 제38항 중 어느 한 항의 약제학적 조성물 및 항체 면역치료제.

청구항 40

암의 치료에서 사용하기 위한, 제36항 내지 제39항 중 어느 한 항의 약제학적 조성물 및 사이토카인, 인터페론 감마, IL-2, 화학치료제, 생물제 또는 이들의 조합물.

청구항 41

바이러스의 치료에서 사용하기 위한, 제36항 내지 제39항 중 어느 한 항의 약제학적 조성물 및 치료제.

청구항 42

치료제의 제조 방법으로서,

수혜자 대상체에게 치료학적 유효량의 $\gamma\delta$ T 세포의 동종이계 투여를 허용하도록 공여자 대상체로부터 수집된 공여자 세포를 처리하는 단계를 포함하되, 상기 처리하는 단계는 키메라 항원 수용체를 혼입하도록 상기 $\gamma\delta$ T 세포를 변형시키는 단계 및 임의로 상기 수혜자 대상체에 대한 상기 $\gamma\delta$ T 세포의 투여 단계를 포함하는, 치료제의 제조 방법.

청구항 43

치료제의 제조 방법으로서,

공여자 대상체에게 치료학적 유효량의 $\gamma\delta$ T 세포의 투여를 허용하도록 공여자 대상체로부터 수집된 공여자 세포를 처리하는 단계를 포함하되, 상기 처리하는 단계는 키메라 항원 수용체를 혼입하도록 상기 $\gamma\delta$ T 세포를 변형시키는 단계 및 임의로 상기 공여자 대상체에 대한 상기 $\gamma\delta$ T 세포의 투여 단계를 포함하고, 상기 키메라 항원 수용체는 질환 항원에 대한 결합 특이성을 가지는 세포의 항원 결합 도메인, 힌지, 막관통 도메인, 1개 이상의 동시자극 신호전달 영역 및 비기능적 CD3 제타 도메인을 포함하는, 치료제의 제조 방법.

청구항 44

제42항 또는 제43항에 있어서, 상기 비기능적 CD3 제타 도메인은 상기 키메라 항원 수용체에서 CD3 제타 도메인의 부재에 의해 제공된, 치료제의 제조 방법.

청구항 45

제18항 내지 제23항 중 어느 한 항에 청구된 바와 같은 핵산을 포함하는 렌티바이러스 CAR 작제물.

청구항 46

1개 이상의 동시자극 신호전달 영역 및 CD3 제타 도메인을 포함하는 CAR과 CD3 제타 도메인이 부재하는 CAR 사이를 겹출하기 위한 키트로서,

서열 번호 12 및 서열 번호 13, 및 서열 번호 14 및 서열 번호 15의 군으로부터 선택된 적어도 하나의 프라이머 쌍을 포함하는, 키트:

정방향(서열 번호 12)	5'-GCTCCTGCACAGTGACTACAT-3'
역방향(서열 번호 13)	5'-GGAGTTCTTCTGCCCGT-3'

정방향(서열 번호 14)	5'-CTGTAGCTGCCGATTCAGA-3'
역방향(서열 번호 15)	5'-CATCGTACTCCTCTTCGTCC-3'

청구항 47

키메라 항원 수용체를 포함하는 변형된 $\gamma\delta$ T 세포로서,

상기 키메라 항원 수용체는 질환 항원에 대한 결합 특이성을 가지는 세포외 항원 결합 도메인, 힌지, 막관통 도메인, 1개 이상의 동시자극 신호전달 영역 및 기능적 신호 1 제공 도메인의 부재를 포함하는, 변형된 $\gamma\delta$ T 세포.

청구항 48

$\gamma\delta$ T 유사 세포로서,

상기 $\gamma\delta$ T 유사 세포는 키메라 항원 수용체를 포함하는 기능적 감마 렐타 T 세포 수용체를 발현하도록 유전적으로 조작된 T 세포이고, 상기 키메라 항원 수용체는 질환 항원에 대한 결합 특이성을 가지는 세포외 항원 결합 도메인, 힌지, 막관통 도메인, 및

- (i) CD3 제타 도메인이 부재하는 1개 이상의 동시자극 신호전달 영역(동조 가능), 또는
- (ii) 1개 이상의 동시자극 신호전달 영역 및 비기능적 CD3 제타 도메인(동조 가능), 또는
- (iii) CD3 제타 도메인, 또는
- (iv) 1개 이상의 동시자극 신호전달 영역 및 기능적 CD3 제타 도메인을 포함하는, $\gamma\delta$ T 유사 세포.

청구항 49

제48항에 있어서, 상기 $\gamma\delta$ T 유사 세포는 기능적 감마 렐타 T 세포 수용체를 발현하도록 유전적으로 조작된 $\alpha\beta$ T 세포인, $\gamma\delta$ T 유사 세포.

청구항 50

키메라 항원 수용체를 포함하는, 한정된 항원 특이성의 T 세포 또는 T 세포 유사 세포로서,

상기 키메라 항원 수용체는 질환 항원에 대한 결합 특이성을 가지는 세포외 항원 결합 도메인, 힌지, 막관통 도메인, 및

- (i) CD3 제타 도메인이 부재하는 1개 이상의 동시자극 신호전달 영역(동조 가능), 또는
- (ii) 1개 이상의 동시자극 신호전달 영역 및 비기능적 CD3 제타 도메인(동조 가능), 또는
- (iii) CD3 제타 도메인, 또는
- (iv) 1개 이상의 동시자극 신호전달 영역 및 기능적 CD3 제타 도메인을 포함하는, 한정된 항원 특이성의 T 세포 또는 T 세포 유사 세포.

청구항 51

제50항에 있어서, α -GalCer에 대한 특이성을 가지는 NKT 세포, 및 비타민 B 관련 항원에 대한 특이성을 가지는 점막 연관 비변이체 T(mucosal-associated invariant T: MAIT) 세포로부터 선택된, 한정된 항원 특이성의 T 세포 또는 T 세포 유사 세포.

청구항 52

제1항 내지 제8항 또는 제47항 내지 제51항 중 어느 한 항의 세포를 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 치료 방법.

청구항 53

제52항에 있어서, 상기 투여는 자가유래 전달에 의한, 치료 방법.

청구항 54

제52항에 있어서, 상기 투여는 동종이계 전달에 의한, 치료 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 출원은 감마 렘타 T 세포($\gamma\delta$ T 세포)를 제조하고 사용하는 방법, 적합하게는 병태, 예컨대 바이러스 감염, 진균 감염, 원생동물 감염 및 암의 치료를 위한 동종이계 또는 자가유래 수혜자 대상체에서의 감마 렘타 T 세포의 용도, 구체적으로 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor: CAR) 변형된 $\gamma\delta$ T 세포의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 키메라 항원 수용체를 발현하는 $\gamma\delta$ T 세포의 생성 및 CAR 발현을 검출하기 위한 공정에 관한 것이다. 게다가, 본 발명은 질환, 예컨대 암 및 감염성 질환의 치료에서의 본 명세서에 기재된 공정에 의해 생성된 세포의 약제학적 용도에 관한 것이다.

[0002]

감마 렘타 T 림프구는 인간에서 말초 혈액의 작은 하위집단(10% 미만)을 나타낸다. V γ 9V δ 2(감마 9 렘타 2) T 세포 수용체를 발현하는 감마 렘타 T 세포는 이상조절된 메발로네이트 경로의 결과로서 암 세포에서 과생성된 내인성 아이소펜테닐 피로포스페이트(isopentenyl pyrophosphate: IPP)를 인식한다. 풍부한 전염증성 사이토카인 유사 IFN-감마를 생성하는 감마 렘타 T 림프구의 능력, 이의 강력한 세포독성 이펙터 기능 및 항원의 MHC 독립적 인식은 이것을 암 면역치료의 중요한 층이 되게 만든다. 감마 렘타 T 세포는 시험관내 많은 상이한 유형의 종양 세포주 및 종양, 예컨대 백혈병, 신경아세포종 및 다양한 암종을 사멸할 수 있다는 것으로 나타났다. 추가로, 감마 렘타 T 세포가 자발적으로 또는 상이한 비스포스포네이트, 예컨대 콜레드로네이트에 의한 치료 후 많은 상이한 분화된 종양 세포를 인식하고 사멸할 수 있다는 것이 입증되었다. 인간 종양 세포는 이의 증식 및 IFN-감마 생성을 유도하는 감마 렘타 T 세포에 아미노비스포스포네이트 및 피로포스포모노에스터 화합물을 효과적으로 제시할 수 있다.

[0003]

감마 렘타 T 세포의 자가유래 이식 전략은 동종이계 줄기 세포 이식과 연관된 단점을 극복하도록 사용된다. 이러한 자가유래 이식 기법의 일부로서, 자가유래로 치료학적 효과를 발휘하기 위한 충분한 수의 감마 렘타 T 세포를 유도하고 배양하는 방법이 예를 들어 US 2002/0107392에 개시되었다. 그러나, 자가유래 치료 전략은 다수의 단점을 겪는다.

[0004]

따라서, 감마 렘타 T 세포를 사용한 대안적인 및/또는 개선된 치료 전략이 필요하다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0005]

암 특이적 T 세포 클론을 확인하고 증식시키는 것의 어려움은 키메라 항원 수용체(CAR)의 개발을 발생시켰다. CAR은 TCR-MHC/펩타이드 인식과 독립적인 표적 항원에 대한 T 세포 특이성을 재지향시키기 위해 단클론성 항체를 사용한다. 현재까지 다수의 임상 연구는 알파 베타($\alpha\beta$) T 세포의 CAR 형질도입을 사용하는 한편, 어느 것도 감마 렘타($\gamma\delta$) T 세포/림프구를 사용하여 그렇게 하지 않았다. 본 발명자들은 감마 렘타 T 세포/림프구의 CAR 형질도입이 유리할 수 있다고 결정하였다.

[0006]

상기 기재된 바대로, 말초 혈액 내의 대부분의 $\gamma\delta$ T 림프구는 V감마9 V렘타2 아이소타입이다. V감마9 V렘타2 T 세포 수용체를 발현하는 $\gamma\delta$ T 세포는 이상조절된 메발로네이트 경로의 결과로서 암 세포에서 과생성된 내인성 아이소펜테닐 피로포스페이트(IPP)를 인식한다. 본 발명자들은 풍부한 전염증성 사이토카인 유사 IFN-감마를 생성하는 감마 렘타($\gamma\delta$) T 림프구의 능력, 이의 강력한 세포독성 이펙터 기능 및 항원의 이의 MHC 독립적 인식이 암 면역치료에서 이것이 중요한 참가자가 되게 한다고 생각한다.

[0007]

감마 렘타($\gamma\delta$) T 세포의 효력을 증가시키는 CAR의 능력을 조사하도록 제한된 시험관내 연구를 수행하였다

(Rischer *et al.*, 2004, Deniger *et al.*, 2013). 그러나, 이러한 연구는 제2 상이한 대상체에게 치료제를 제공하기 위해 일 대상체로부터의 CAR 변형된 $\gamma\delta$ T 세포를 사용하는 가능성(동종이계 사용)을 실현하지 않았다. 이러한 연구는, '동조 가능(tunable)' 반응이 제공되도록, CAR 변형된 $\gamma\delta$ T 세포가 제공될 수 있는 방식을 추가로 실현하지 않았다.

- [0008] 따라서, 본 발명의 제1 양태는 키메라 항원 수용체를 발현하는 변형된 $\gamma\delta$ T 세포를 제공하고, 키메라 항원 수용체는 질환 항원에 대한 결합 특이성을 가진다.
- [0009] 적합하게, 변형된 $\gamma\delta$ T 세포는 키메라 항원 수용체를 포함할 수 있고, 키메라 항원 수용체는 질환 항원에 대한 결합 특이성을 가지는 세포외 항원 결합 도메인, 헌지, 막관통 도메인, 및
- [0010] (i) 1개 이상의 동시자극 신호전달 영역 및 비기능적 CD3 제타 활성화/신호전달 도메인(동조 가능 CAR), 또는
- [0011] (ii) CD3 제타 활성화/신호전달 도메인, 또는
- [0012] (iii) 1개 이상의 동시자극 신호전달 영역 및 기능적 CD3 제타 활성화/신호전달 도메인을 포함한다.
- [0013] 실시형태에서, 변형된 $\gamma\delta$ T 세포는 키메라 항원 수용체를 포함할 수 있고, 키메라 항원 수용체는 질환 항원에 대한 결합 특이성을 가지는 세포외 항원 결합 도메인, 헌지, 막관통 도메인, 1개 이상의 동시자극 신호전달 영역 및 비기능적 CD3 제타 활성화 도메인을 포함한다.
- [0014] 실시형태에서, 변형된 $\gamma\delta$ T 세포는 키메라 항원 수용체에서 CD3 제타 활성화 도메인의 부재(absent)에 의해 제공된 비기능적 CD3 제타 활성화 도메인을 포함할 수 있다.
- [0015] 적합하게, 실시형태에서, $\gamma\delta$ T 세포는 V γ 1 내지 9 및 V δ 1 내지 8의 임의의 감마 델타 TCR 쌍 자음의 TCR을 발현한다. 실시형태에서, $\gamma\delta$ T 세포는 V γ 9V δ 2 하위유형이다.
- [0016] 본 발명의 제2 양태에 따라, 암 또는 감염과 같은 병태의 치료에서 사용하기 위한, 본 발명의 제1 양태의 변형된 $\gamma\delta$ T 세포가 제공된다.
- [0017] 본 발명의 제3 양태에 따라, 키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩하는 핵산 서열이 제공되고, CAR은 세포외 항원 인식 도메인, 예컨대 단쇄 가변 단편(scFv), 헌지 및 막관통 도메인, 1개 이상의 동시자극 신호전달 영역 및 임의로 CD3 제타 활성화 도메인으로 이루어진다. 적합한 CD3 제타 도메인은 CD3 제타 활성화 또는 신호전달 도메인으로도 생각될 수 있다. 비기능적 CD3 제타 도메인이란, 신호전달이 제공되지 않거나 활성화를 발생시키도록 충분히 제공되지 않는다고 생각된다.
- [0018] 실시형태에서, 핵산 서열은 키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩할 수 있고, CAR은 세포외 항원 인식 도메인, 헌지, 막관통 도메인, 및
- [0019] (i) 1개 이상의 동시자극 신호전달 영역 및 비기능적 CD3 제타 활성화 도메인, 또는
- [0020] (ii) CD3 제타 활성화 도메인, 또는
- [0021] (iii) 1개 이상의 동시자극 신호전달 영역 및 CD3 제타 활성화 도메인을 포함한다.
- [0022] 실시형태에서, 비기능적 CD3 제타 활성화 도메인은 키메라 항원 수용체에서 CD3 제타 활성화 도메인의 부재에 의해 제공될 수 있다.
- [0023] 상기 기재된 바대로, 키메라 항원 수용체(CAR) T-세포 치료는 면역치료 기법이고, T 세포는, HLA 제한과 독립적으로, 특정한 항원 또는 단백질(세포 표면 표적)을 인식하고 표적화하도록 합성 수용체에 의해 유전적으로 조작된다.
- [0024] 통상적으로, "전통적인" 2세대 또는 3세대 CAR은, 세포외 표적 결합 도메인, 보통 단쇄 가변 단편(scFv), 헌지 영역, CAR을 세포막에 고정하는 막관통 도메인 및 1개 이상의 세포내 신호전달 도메인을 통상적으로 포함하는, 모듈 방식으로 설계된다. 신호전달 도메인은 보통 TCR 유사 자극(신호 1이라 칭함)을 제공하는 CD3 제타(CD3 ζ) 사슬 활성화 도메인의 유전요소 및 동시자극 신호(신호 2라 칭함)를 제공하는 CD28, CD137(4-1BB), CD134 (OX40), CD244 또는 ICOS 신호전달 모이어티의 유전요소로 이루어진다. 이러한 통상적인 CAR을 발현하는 T 세포에서, 휴지 상태로부터 T 세포를 방출하기 위해 신호 1 및 신호 2 둘 다가 필요하다. 추가적인 동시자극 신호(신호 2)의 부재 하에, 신호 1 단독의 존재는 T 세포를 활성화하기에 충분하지 않고, 이것이 비반응성/아네르기 가 되게 만들 수 있다. 따라서, T 세포 활성화를 유도하기 위해 신호 둘 다의 존재가 필요하다.

- [0025] CAR을 발현하는 T 세포(CAR-T)를 사용한 임상 실험은 CAR-T 접근법을 입증하였고, 2014년에 항-CD19 CAR T 세포 치료는 미국 FDA에 의해 승인되었다. 임상적인 반응률이 CAR-T 실험에서 관찰되었지만, 현재 기술은 건강한 세포에서가 아니라 진정한 질환 항원, 즉 질환 상태 세포에서 오직 발현된 항원의 부족에 의해 다소 제한된다. 현재까지, 매우 대부분의 CAR-T 치료는 CD19 표적화되었다. CD19는 B 세포 악성종양에서 발현되지만, 이것은 또한 건강한 B 세포에서 발현된다. 이 맵락에서, CD19 표적화된 CAR-T 치료가 관용성일 수 있지만, 환자는 이의 면역계가 상당히 손상되므로 증가한 감염 위험을 겪는다. 이것은 대부분의 다른 종양 유형, 구체적으로 고형 종양(여기서, 건강한 조직의 표적화가 불관용성일 것임)에 대한 경우가 아니다.
- [0026] 현재까지 임상적으로 실험된 CAR-T 치료의 추가의 제한은 CAR-T 치료에 대한 내성의 발달로 인한 재발의 발생이다. 이것은 CD19-표적화 CAR-T 치료의 임상 실험에서 관찰되었고, 대안적인 스플라이싱 및/또는 표적(CD19) 유전자의 해로운 돌연변이를 나타내는, 암 세포의 출현에 의해 달성된다. 이 '이탈 변이체(escape variant)'는 (유전자의 기능의 충분함을 보유하면서) CAR의 scFv 부분에 의해 인식 가능하지 않은 변형된 표적(CD19) 단백질을 발생시킨다. 이것은 임의의 단일 표적화 접근법의 제한이고, 증식하는 세포, 즉 암의 상황에서, 이것은 표적 항원 발현을 무효화하는 양성 선택적 압력을 제공한다.
- [0027] 본 발명은, 키메라 항원 수용체 기술의 강력한 항원 지향된 세포독성 이펙터 기능과 조합되어, 스트레스가 있는 /이환된 세포(즉, 암 세포 또는 감염된 세포)를 특이적으로 인식하는 $\gamma\delta$ T 세포의 자연 능력을 조사하였다. 전통적인 CAR에 의해 형질도입된 $\gamma\delta$ T 세포는 생체내 CAR 촉발 항원을 발현하는 표적 세포에 대한 증대된 이펙터 기능 및 증대된 지속성을 나타낸다. 본 발명자들은 CAR 변형된 감마 텔타 T 세포가, 정상 $\gamma\delta$ T 세포에 내성일 수 있는, 암성 또는 감염된 세포가, $\gamma\delta$ T 세포 매개된 사멸에 감수성이 되게 할 수 있다고 생각한다. 적합하게, 이론에 구속되고자 함이 없이, 본 발명자들은 전통적인 CAR을 동시발현하는 $\gamma\delta$ T 세포가 세포용해를 인식할 수 있고, 이에 따라 이를 표적화할 수 있어서, 세포가 인항원(phosphoantigen) 또는 CAR 지향된 항원을 발현하고, 이에 따라 이러한 변형된 감마 텔타 T 세포에 의해 표적화될 수 있는 세포의 범위를 증가시킨다고 생각한다. 기존의 CAR-T 치료제의 제한, CAR 항원을 발현하지 않는 암 세포의 양성 선택으로 인한 내성의 발생이, 이중 항원 특이성을 가지는 CAR을 발현하는 $\gamma\delta$ T 세포에 의해 완화될 것으로 추가로 생각된다. 적합하게, 이러한 CAR 변형된 감마 텔타 T 세포는 동종이계 대상체, 즉 감마 텔타 T 세포가 처음에 얻어진 것과 다른 대상체에게 제공될 수 있다.
- [0028] 당해 분야의 당업자에 의해 이해되는 것처럼, $\gamma\delta$ T 세포에 대한 CAR 서열(들)의 제공에 의해 얻어진 효과 및 본 명세서에 기재된 바와 같은 이의 용도는 $\gamma\delta$ T 유사 세포에 대한 CAR 서열의 제공에 의해 적합하게 얻어질 수 있다. 적합하게, $\gamma\delta$ T 유사 세포는 기능적 $\gamma\delta$ TCR을 발현하도록 유전적으로 조작된 임의의 세포를 포함할 수 있다. 예를 들어, $\alpha\beta$ T 세포 또는 NKT 세포는 기능적 $\gamma\delta$ TCR을 발현하도록 유전적으로 조작되어서, 한정된 $\gamma\delta$ TCR 항원, 예컨대 V감마9V델타2 TCR의 상황에서 IPP에 대해 세포의 특이성을 재지향시킨다.
- [0029] 종래의 CAR-T 기술은, 건강한 조직에 대한 CAR 촉발 항원의 발현으로 인해, 생체내 적용될 때 접근법의 성공을 막는 다수의 안전성 문제, 즉 "온 표적(on-target)", 그러나 "오프 종양(off-tumour)" 독성에 의해 지장을 받는 것으로 생각된다. 실시형태에서, (예를 들어, scFv를 통한) MHC 독립적 항원 인식 기능 및 (1개 이상의 동시자극 도메인을 통한) 동시자극 기능을 보유하면서, 비기능적이 되도록 CD3 ζ 도메인이 제거된 CAR 변형된 감마 텔타 T 세포가 제공된다.
- [0030] 실시형태에서, 비기능적 또는 불활성 CD3제타 도메인은 본 명세서에 기재된 바대로 신호 1을 제공할 수 없다. 적합하게, 키메라 항원 수용체를 포함하는 변형된 $\gamma\delta$ T 세포가 제공될 수 있고, 키메라 항원 수용체는 질환 연관 항원에 대한 결합 특이성을 가지는 세포의 항원 결합 도메인, 헌자, 막판통 도메인, 1개 이상의 동시자극 신호전달 영역 및 기능적 신호 1 제공 도메인의 부재를 포함한다. 당해 분야의 당업자에 의해 이해되는 바대로, 신호 1은 CD3 제타 도메인 등에 의해 제공될 수 있다.
- [0031] 이러한 실시형태에서, CAR은, 1개 이상의 동시자극 도메인의 존재로부터 신호 2 기능을 보유하면서, 신호 1을 제공할 수 없다. 유리하게는, 이것은 TCR 신호/신호 1의 부재 하의, CAR의, 세포독성 이펙터 기능의 유발의 불능을 발생시킨다. 이론에 구속되고자 함이 없이, 본 발명자들은, CAR 설계가 신호 1의 결여로 인해 다중클론 $\alpha\beta$ T 세포 집단에서 비효과적이지만, $\gamma\delta$ TCR이 활성화될 때, 시험관내 증식된 $\gamma\delta$ T 세포 집단에서의 이러한 CAR의 발현이 효과적인 CAR을 제공한다고 생각한다. 실시형태에서, V γ 9V δ 2 아이소타입의, CAR을 발현하는 $\gamma\delta$ T 세포(여기서, CAR CD3 ζ 도메인은 제거되거나 불활성 또는 비기능적이 됨)가 제공될 수 있다. 이러한 실시형태에서, 신호 1은 V γ 9V δ 2 TCR의 인항원 자극에 의해 제공될 수 있다. 이러한 실시형태에서, 적합하게 오직 인항원의 존재 하에 CAR은 세포 매개된 세포용해 및 사이토카인 생성을 유발할 수 있다. 적합하게, 이러한 CAR

설계는 (스트레스가 있는 세포에 오직 존재하는) 인항원에 대한 $\text{V}\gamma\text{9V}\delta\text{2 T}$ 세포의 한정된 특이성을 이용할 수 있고, T 세포 수용체 신호전달에 의해 동조될 수 있는 활성화를 허용한다.

[0032] 실시형태에서, 본 발명의 감마 델타 T 세포, 특히 $\text{V}\gamma\text{9V}\delta\text{2}$ 세포 또는 감마 델타 T 세포의 세포 집단이 특정한 항원 또는 단백질(세포 표면 표적(들)(여기서, 세포 표면 표적(들)은 특정한 세포 환경(즉, 종양 환경)에서 발견된 리간드(들)를 포함할 수 있지만, 표적 세포에 연결되지 않음))에 대해 감마 델타 T 세포를 자향시키도록 키메라 항원 수용체를 포함하도록 변형될 수 있다고 제안된다. 실시형태에서, 세포 표면 표적은 표적 세포에 연결될 수 있다. 이것은 키메라 항원 수용체(CAR) 감마 T 세포가 표적 세포, 특히 세포 표면 표적을 포함하는 표적 세포와 근접하게 하고, 감마 델타 T 세포의 활성화를 촉발하게 허용한다. 이러한 키메라 항원 수용체(CAR) 감마 T 세포는 본 발명의 양태를 형성한다.

[0033] 실시형태에서, CAR 작제물의 항원 인식 도메인은, 세포 표면 표적 또는 표적 세포 상에 동족 수용체를 관련짓는 천연 리간드를 특이적으로 인식하고 이에 결합할 수 있는 라이브러리로부터 선택된, 단쇄 가변 단편(ScFv) 또는 단편-항원 결합(Fab) 도메인일 수 있다.

[0034] 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 키메라 항원 수용체에 의해 결합한 질환 항원은, 예를 들어 $\gamma\delta$ T 세포가 표적화되는 상기 세포를 표적화할 수 있도록, $\gamma\delta$ T 세포에 의해 표적화되는 세포 상에 또는 그 근처에서 질환 연관 항원이 있을 수 있는, 암 또는 감염에서, 세포 표면 표적, 질환 연관 항원, 예를 들어 질환 상태와 연관된 항원일 수 있다. 실시형태에서, 세포 표면 표적은 세포 감염, 박테리아 감염, 진균 감염 또는 원생동물 감염에서 발견되는 항원일 수 있거나, 이러한 바이러스로부터의 활성 또는 불활화 바이러스 단편, 웨타이드, 단백질, 항원 분절 등일 수 있다. 대안적으로, 세포 표면 표적은 종양 특이적 항원 및/또는 종양 연관 항원을 포함할 수 있다.

[0035] 실시형태에서, 감마 델타 T 세포의 세포외 표면에 제공된 CAR, 예를 들어 ScFv는, 세포막을 획단하고 세포내 신호전달 도메인에 연결하는, 막관통 도메인에 스페이서를 통해 연결되거나 이것에 직접 융합될 수 있다.

[0036] 실시형태에서, CAR, 예를 들어 ScFv는 막관통 도메인을 통해 CD3 제타(신호 1 제공) 및 동시자극 면역수용체 타이로신 기반 활성화 모티프(co-stimulatory immunoreceptor tyrosine-based activation motif: ITAM)(신호 2)에 융합될 수 있다.

[0037] CAR은 세포 표면 표적에 T 세포 특이성을 재지향시키는 것으로 일반적으로 생각되고, T 세포 관용성에 관한 논제를 극복한다. 이해되는 것처럼, 세포 표면 표적은 건강한 세포에 우선하여 관심 있는 세포, 예를 들어 종양 세포 또는 바이러스로 감염된 세포에 대한 감마 델타 T 세포의 표적화를 보장하도록 통상적으로 선택될 수 있다.

[0038] 이해되는 것처럼, 예를 들어 표적 종양 세포 및 정상 조직(여기서, 세포 표면 표적이 발현됨)에서 둘 다, 키메라 항원 수용체 기술은, 매우 강력하면서, "온 표적, 오픈 종양 독성"에 감수성일 수 있다.

[0039] 상기 기재된 바대로, 키메라 항원 수용체가 신호 1 및 신호 2 성분을 단일 작제물로 융합하는 CAR 표적화 시스템에서, 이것은 매우 강력하고 감수성이 표적 의존적 이펙터 반응을 제공할 수 있다. 그러나, 이러한 CAR 표적화 시스템은 표적 세포에서 발현된 세포 표면 표적의 수준으로 동조 가능하지 않다.

[0040] CAR로부터의 자극 신호가 오직 $\text{V}\gamma\text{9V}\delta\text{2 TCR}$ 자극의 상황에서 기능적 반응으로 번역되도록, CAR 반응이 "동조" 되도록 허용하는, 추가의 CAR 독립적 표적화 전략을 $\text{V}\gamma\text{9V}\delta\text{2 TCR}$ 매개된 인식이 제공하는 것으로 생각된다. 이것은 예를 들어 광범위한 종양 표적(HMBPP/IPP 스트레스 관련된 경로 표적)이 CAR 변형된 감마 델타 T 세포에 의한 추가적인 세포 표면 표적에 의해 표적화되게 허용한다. 본 발명의 이 CAR 변형된 감마 델타 T 세포는 동조 가능한 반응을 제공하고, 소정의 종양 연관 항원, 피로포스페이트/포스포네이트(약물) 용량에 대해, 특이적 "동시자극 CAR"로부터의 신호 2와 상승작용하는 능력으로, 준최적 신호 1 강도 반응이 생성된다.

[0041] 실시형태에서, 시험관내 활성화 검정은 최적 "동조 반응"에 대한 관련 약물 용량을 결정하도록 이용될 수 있어서, 높은 수준의 종양 연관 항원을 발현하는 표적 종양 세포주(더 높은 신호 2 강도)와 더 낮은 수준을 발현하는 관련 비형질전환된 세포(더 낮은 신호 강도를 생성) 사이에 최대 구별을 허용한다. 실시형태에서, 상이한 종양/세포 유형을 표적화하도록 다수의 CAR을 사용할 수 있다. 이러한 다수의 CAR은 하나의 감마 델타 T 세포, 특히 $\text{V}\gamma\text{9V}\delta\text{2}$ 세포, 또는 다수의 감마 델타 T 세포, 특히 $\text{V}\gamma\text{9V}\delta\text{2}$ 세포(각각의 세포 상의 상이한 CAR(치료 응행)이 생성될 수 있음), 및 특정한 종양 및/또는 세포 유형에 사용된 각각의 CAR 감마 델타 세포 상에 제공될 수 있다.

- [0042] MHC 분자를 인식하지 않는 감마 렘타 T 세포 상의 이종이합체 γ 8 TCR의 발현이 이러한 감마 렘타 세포가 강력한 이펙터 반응을 시작할 수 있다는 것을 의미한다고 생각된다. 특히 이러한 세포(예를 들어, V γ 9V δ 2)는 매우 세포독성일 수 있어서, 1FN γ 및 TNF α 를 포함하는 높은 수준의 Th1 사이토카인을 생성한다.
- [0043] 실시형태에서, 감마 렘타 T 세포는 저해성 키메라 항원 수용체(inhibitory chimeric antigen receptor: ICAR)를 추가로 포함할 수 있고, ICAR은 오프 표적 세포, 예를 들어 비종양 세포에서 활성화를 최소화하고, 세포 표면 표적은 종양 특이적 항원이 아니라 종양 연관이다. 예를 들어, 이러한 "온 표적, 오프 종양 독성"을 최소화하기 위해, 저해성 CAR이 결합할 수 있는 오프 표적 세포 상의 제2 항원의 존재는 저해되는 세포 표면 표적에 대한 CAR의 임의의 결합에 의해 제공된 신호를 발생시킬 것이다.
- [0044] 실시형태에서, 감마 렘타 세포는 표적 세포에 존재하는 상이한 항원 또는 예를 들어 종양 또는 바이러스로 감염된 세포 환경에 존재하는 가용성 신호전달 단백질, 예를 들어 감마 렘타 T 세포 활성화 및 동원을 자극할 수 있는 IL-12에 결합할 수 있는 추가의 CAR을 포함할 수 있다.
- [0045] 실시형태에서, 적어도 제1 키메라 항원 수용체 및 임의로 적어도 제1 저해성 키메라 항원 수용체를 가지는 감마 렘타 T 세포는 V γ 9V δ 2 T 세포이다.
- [0046] 감마 렘타 T 세포에 대한 키메라 항원 수용체의 제공은 T 세포에 키메라 항원 수용체를 제공하도록 당해 분야에 공지된 수단에 의할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 제4 양태에 따라서, CAR 변형된 γ 8 T 세포를 제공하는 공정이 제공되고, 제3 양태의 핵산은, γ 8 T 세포를 유전적으로 변형시키도록, γ 8 T 세포로 혼입/형질도입된다. 적합하게, 상기 공정은 렌티바이러스 CAR 작제물을 사용할 수 있다. 적합하게, 상기 공정은 동시에 CAR 작제물을 세포로 형질도입하고, CAR 형질도입된 γ 8 T 세포를 선택적으로 증식시킨다.
- [0048] 상기 공정의 실시형태가 'TCR-동조 가능' 또는 '동시자극' CAR이 제공되게 할 수 있다고 생각된다.
- [0049] 상기 기재된 바대로, 이러한 실시형태에서, 동시자극 CAR을 발현하는 γ 8 T 세포는, 건강한 세포에 의해서가 아니라, (감염 또는 암 동안에 세포 표면에 존재하는) 인항원의 존재 하에 오직 활성화될 것이다. 이것이 종래의 CAR-T 치료에서 관찰된 "온 표적" 그러나 "오프 종양" 독성을 회피할 것이라고 생각된다. 이러한 실시형태에서, 동시자극 CAR의 활성이 γ 8 T 세포 수용체를 통해 동시발생하는 TCR 신호전달에 의해 동조될 수 있다고 생각된다.
- [0050] 본 발명의 제3 양태의 실시형태에서, CAR을 코딩하는 핵산 서열은 단백질을 세포막으로 지향시키는 리더 서열(예컨대, GMCSF-R 분비성 신호 또는 CD8), 항원 결합 도메인, 힌지 및 막판통 도메인, 1개 이상의 동시자극 신호전달 영역 및 CD3 제타 신호전달 도메인의 존재 또는 부재를 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 바대로, CD3 제타 신호전달 도메인의 부재는 불활성 또는 비기능적 CD3 제타 도메인에 의해 제공될 수 있다.
- [0051] CD3 제타 도메인을 포함하는 핵산의 실시형태에서, CAR은 '전통적인' 또는 '동조 불가'로 생각된다. CD3 제타 도메인이 생략된 실시형태에서, CAR은 '동시자극' 또는 'TCR-동조 가능' CAR이다.
- [0052] 실시형태에서, '전통적인' 또는 '동조 불가' CAR을 코딩하는 핵산 서열은 B 세포 단백질 CD19를 인식하는 scFv를 포함할 수 있다. 구체적인 실시형태에서, "전통적인" CAR은 서열 번호 1의 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있고, 이것은 서열 번호 2 내지 6의 아미노산 서열을 적합하게 코딩할 수 있다.
- [0053] 핵산 서열이 '동시자극' 또는 'TCR-동조 가능' CAR을 코딩하는 실시형태에서, 핵산은 B 세포 단백질 CD19를 인식하는 scFv를 포함할 수 있다. 구체적인 실시형태에서, 핵산 서열은 서열 번호 7의 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있고, 이것은 서열 번호 8 내지 11의 아미노산 서열을 코딩할 수 있다.
- [0054] 실시형태에서, 핵산은 세포 표면 표적을 특이적으로 인식하고 이것에 결합할 수 있는 단일 scFv인 세포외 항원 결합 도메인을 코딩할 수 있다. 적합하게, 실시형태에서, 세포외 항원 결합 도메인, 바람직하게는 scFv는 FMC63으로서 공지된 이전에 기재된 클론인 B 세포 항원 CD19를 인식하고 이에 결합한다(Nicholson IC *et al.*, 1997).
- [0055] 실시형태에서, CAR의 항원 결합 도메인은 세포 표면 표적, 종양 항원 및/또는 종양 연관 항원에 결합한다. 실시형태에서, 세포 표면 표적은 세포 감염, 박테리아 감염, 진균 감염, 원생동물 감염 또는 바이러스 감염에서 발견되는 항원일 수 있거나, 이러한 바이러스로부터의 활성 또는 불활화 바이러스 단편, 펩타이드, 단백질, 항원 분절 등일 수 있다.
- [0056] 적합하게, 본 발명의 실시형태에서, 세포외 항원 결합 도메인은, 몇몇 종양 세포 및 또한 몇몇 정상 세포에 존

재하는 임의의 다른 세포 및/또는 종양 연관 항원이 아니라, 종양 세포에 오직 존재하는 종양 특이적 항원을 인식하고 이에 결합할 수 있다. 이러한 종양 특이적 항원은 CD19, EGFRvRIII, ErbB2, GM3, GD2, GD3, CD20, CD22, gp100, NY-ESO-1, 탄산무수화효소 IX, WT1, 암태아성 항원, CA-125, MUC-1, MUC-3, 상피 종양 항원 및 MAGE-유형 항원, 예컨대 MAGEA1, MAGEA3, MAGEA4, MAGEA12, MAGEC2, BAGE, GAGE, XAGE1B, CTAG2, CTAG1, SSX2, 또는 LAGE1 또는 바이러스 항원 또는 이들의 조합, 또는 카바밀화 및 시트루닐화 단백질(이들로 제한되지는 않음)을 포함할 수 있는 변역 후 변형된 단백질을 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지는 않는다.

- [0057] 실시형태에서, 세포 표면 항원은 면역 관문 리간드, 예를 들어 PD-L1일 수 있다.
- [0058] 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 세포 표면 수용체의 세포외 부분일 수 있고, 이것은 이후 상기 기재된 바대로 막관통 및 동시자극 도메인에 융합된다.
- [0059] 실시형태에서, CAR의 막관통 도메인은 CD3 또는 CD4 또는 CD8 또는 CD28의 하나 이상의 막관통 도메인을 포함할 수 있다.
- [0060] 실시형태에서, CAR의 동시자극 신호전달 영역은 CD28, CD137(4-1BB), ICOS, CD27, OX40, LFA1, PD-1, CD150, CD244, NKG2D의 하나 이상의 세포내 도메인을 포함할 수 있다.
- [0061] 적합하게, 본 발명에서 사용하기 위한 $\gamma\delta$ T 세포는 암 또는 감염된 조직으로부터의 생검 또는 혈액 단핵 세포(blood mononuclear cell: BMC)로부터 생성될 수 있다. 적합하게, BMC는 전혈, 백혈구성분체집술(leukapheresis) 재료 또는 제대혈(umbilical cord blood: UCB)로부터 당해 분야의 당업자에게 공지된 임의의 밀도 원심분리 방법을 통해 얻어질 수 있다. 밀도 원심분리 방법은 피콜 구배(ficoll gradient) 또는 림포프렙(lymphoprep)을 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지는 않는다. 게다가, 세포 단리는 자기 활성화 세포 분류(magnetic-activated cell sorting: MACS) 또는 형광 활성화 세포 분류(fluorescence-activated cell sorting: FACS)에 의해 수행될 수 있다.
- [0062] 적합하게, 실시형태에서, $\gamma\delta$ T 세포는 RPMI, TexMACS, IMDM, CTS OpTmizer 또는 AIM-V 배지(이들로 제한되지는 않음)를 포함할 수 있는 화학적으로 한정된 배양 배지 중에 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 제대혈 단핵 세포(CBMC) 또는 조직 유래 세포로부터 증식될 수 있다. 세포 배양 배지는 예를 들어 태반혈청(foetal calf serum: FCS), 인간 AB 혈청, 자가유래 혈장, 인간 혈소판 용해물 또는 화학적으로 한정된 혈청 대체 치환물에 의해 보충될 수 있다. 추가로, 혈청/혈장/치환물은 배양 용액에 0.1 내지 20% (v/v)의 양으로 첨가된다.
- [0063] 적합하게, 실시형태에서, V감마9 하위유형의 $\gamma\delta$ T 세포는 아미노비스포스포네이트, 예컨대 콜레드론산의 제공에 의해 화학적으로 한정된 배양 배지, 예컨대 IL-2, 혈청/혈장 및 활성화에서 PBMC 또는 CBMC 또는 조직 유래 세포로부터 선택적으로 증식될 수 있다. 다수의 $\gamma\delta$ TCR 아이소타입은 V γ 1-9 및 V δ 1-8의 임의의 감마 엘타 TCR 쌍 자음으로부터 사용될 수 있다. 배양 조건, 구체적으로 TCR 활성화의 방법이 증식되는 아이소타입을 한정할 것이라는 것이 당해 분야의 당업자에 의해 이해될 것이다. 예로서, δ 2 T 세포가 아미노비스포스포네이트 등에 의해 활성화되고 증식되는 한편, δ 1 T 세포는 NKG2D 리간드, 예컨대 MICA 또는 MICB를 사용하여 우선적으로 증식될 수 있다. 단리된 PBMC/CBMC는 배양 중의 증식 전에 새로 단리되거나 저온보존될 수 있다.
- [0064] 비스포스포네이트는 피로인산의 유사체이고, 피로인산 골격 P-O-P의 O(산소 원자)가 C(탄소 원자)에 의해 치환된(P-C-P) 화합물이다. 이것은 일반적으로 골다공증에 대한 치료학적 약물로서 사용된다. 아미노비스포스포네이트는 비스포스포네이트 중에 N(질소 원자)를 가지는 화합물을 의미한다. 예를 들어, 본 발명에서 사용된 아미노비스포스포네이트는 특별히 제한되지 않고, 이의 예는 팔미드론산, 이의 염 및/또는 이의 수화물, 알렌드론산, 이의 염 및/또는 이의 수화물, 및 콜레드론산, 이의 염 및/또는 이의 수화물을 포함한다. 아미노비스포스포네이트의 농도는 바람직하게는 팔미드론산, 이의 염 및/또는 이의 수화물에 대해 1 내지 30 μ M, 알렌드론산, 이의 염 및/또는 이의 수화물에 대해 1 내지 30 μ M, 및 콜레드론산, 이의 염 및/또는 이의 수화물에 대해 0.1 내지 10 μ M이다. 여기서, 5 μ M 콜레드론산은 예로서 첨가된다.
- [0065] 적합하게, 사이토카인 IL-2는 50IU/ml 내지 2000IU/ml, 더 바람직하게는 400IU/ml 내지 1000IU/ml에서 또한 포함될 수 있다. 적합하게, 배양물은 50IU/ml 내지 2000IU/ml에서 1종 이상의 사이토카인, 예컨대 IL-15, IL-18 또는 IL-21이 또한 보충될 수 있다.
- [0066] 적합하게, 아미노비스포스포네이트를 통한 항원 제공은 합성 항원, 예컨대 아이소펜테닐 피로포스페이트(IPP), 포스포스팀/브로모하이드린 피로포스페이트(BrHPP), (E)-4-하이드록시-3-메틸-뷰트-2-엔일 피로포스페이트(HMBPP) 또는 DMAPP에 의해 치환될 수 있다. 항원 자극은 조사된 및/또는 인공 항원 제시 세포(aAPC)와 동시배양함으로써 또한 제공될 수 있다. 이러한 성분의 첨가는 배양 샘플에서 전체 세포의 수를 기준으로 통상적으로

70%-100%에서 감마 뎔타 T 세포의 양성 선택을 허용하는 배양 환경을 제공한다.

[0067] $\gamma\delta$ T 세포의 종식은 CD3, 감마 뎔타 TCR, CD28 및 CD137에 대한 하나 이상의 항체에 의해 또한 자극될 수 있다. 이것은 적절한 비드, 예컨대 다이나비드(dynabead) 또는 MACSi비드에 결합되거나 접합된, 가용성 플레이트일 수 있다. $\gamma\delta$ T 세포는 이전에 개시된 임의의 방법론을 이용하여 전파되고 증식될 수 있다.

[0068] 적합하게, CAR을 발현하는 세포는, CD19 표적화된 CAR의 경우에, 재조합 CD19-Fc 키메라 또는 재조합 CD19와 같은 CAR에 의해 인식된 재조합 단백질의 사용에 의해 선택적으로 증식될 수 있다. 이것은 적절한 비드, 예컨대 다이나비드 또는 MACSi비드 상에 결합된 가용성 플레이트일 수 있다. 임의의 아이소타입의 $\gamma\delta$ T 세포는 적어도 7일, 더 바람직하게는 14일의 시간 기간 동안 선택적으로 증식될 수 있다. 적합하게, 배양 기간은 실질적으로 정제된 CAR을 발현하는 감마 뎔타 T 세포 집단의 높은 수를 달성하도록 약 9일 이상 동안 수행될 수 있다. $\gamma\delta$ T 세포는 TCR 항원 또는 NKG2D 리간드, 예컨대 MICA 또는 MICB를 사용하여 증식될 수 있다. 단리된 PBMC는 배양 중의 증식 전에 새로 단리되거나 저온보존될 수 있다. 증식된 $\gamma\delta$ T 세포는 배양 중의 추가의 증식을 위해 차후 시점에서 저온보존되고 소생될 수 있다.

[0069] CAR 설계를 코딩하는 핵산을 도입하기 위해 $\gamma\delta$ T 세포를 유전적으로 변형시키는 방법은 당해 분야의 당업자에게 공지된 임의의 기법을 포함할 수 있다. 적합한 방법론은 렌티바이러스/레트로바이러스/아데노바이러스에 의한 바이러스 형질도입, 전기천공에 의한 세포 형질감염, 지질 기반 형질감염 시약, 나노입자, 염화칼슘 기반 형질감염 방법 또는 박테리아로 유도된 전이인자를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0070] 실시형태에서, 렌티바이러스/레트로바이러스/아데노바이러스가 형질도입에 사용될 수 있을 때, 이 공정을 중대시키기 위해 당해 분야의 당업자에게 이해되는 바대로 화학 시약의 포함이 사용될 수 있다. 이것은 예를 들어 헥사다이메트린 브로마이드(폴리브렌), 재조합 인간 피브로넥틴(예컨대, 레트로넥틴-타카라 클론테크(RetroNectin-Takara Clontech)) 및 트랜스플러스(TransPlus) 바이러스 형질도입 인핸서(ALSTEM Cell Advancements)를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0071] 적합하게, CAR을 코딩하는 핵산의 혼입은 배양 기간에 걸쳐 임의의 시점에 PBMC, CBMC 또는 조직 유래 증식된 $\gamma\delta$ T 세포로 도입될 수 있다.

[0072] $\gamma\delta$ T 세포에 의한 CAR 작제물의 형질도입 및 발현의 효율의 검출은 당해 분야의 당업자에게 공지된 임의의 기법을 포함할 수 있고, 정량적 PCR 및 항체 기반 검출 방법, 예컨대 유세포계수법 또는 웨스턴 블로팅을 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0073] 본 발명의 양태에 따라, 서열 번호 12 및 서열 번호 13, 및 서열 번호 14 및 서열 번호 15의 군으로부터 선택된 적어도 하나의 프라이머 쌍을 사용하여 전통적인 CAR과 동시자극 CAR 사이를 검출하는 방법이 제공된다:

정방향(서열 번호 12)	5'-GCTCCTGCACAGTGACTACAT-3'
역방향(서열 번호 13)	5'-GGAGTTCTTCTGCCCGT-3'

정방향(서열 번호 14)	5'-CTGTAGCTGCCGATTCCAGA-3'
역방향(서열 번호 15)	5'-CATCGTACTCCTCTTGTCC-3'

[0074] 적합하게, 상기 방법은 전통적인 CAR 및 동시자극 CAR의 정량적 검출을 허용할 수 있다. 적합하게, 상기 방법은 전통적인 CAR과 동시자극 CAR 사이에 구별을 허용한다.

[0075] 일 실시형태에서, 유세포계수법을 이용할 수 있고, 예를 들어 2차 시약, 예컨대 형광 표지된 스트렙타비딘에 의해 검출될 수 있는 항원 또는 형광색소에 접합된 scFv의 이디오타입에 대한 항체를 사용할 수 있다. 실시형태에서, CAR을 검출하기 위해 사용된 시약은 포유류 항체 Fc 분획과 융합된, CAR에 의해 인식된, 재조합 단백질, 예를 들어 CD19-Fc 키메라를 포함하는 키메라 단백질일 수 있다. 이것은 단백질의 Fc 부분에 대한 항체에 의해 검출될 수 있다. 이 시약은 V감마9, CD3, 감마 뎔타 TCR, 알파 베타 TCR, CD4, CD8 및 CD56(이들로 제한되지는 않음)을 포함할 수 있는 면역표현형 마커에 대한 형광색소 접합된 항체와 조합될 수 있다.

- [0077] CAR 변형된 감마 델타 세포를 사용한 치료 방법
- [0078] 본 발명의 제2 양태의 실시형태에서, 동조 가능/동시자극 CAR 또는 전통적인 CAR을 발현하는 $\gamma\delta$ T 세포는 질환, 예컨대 바이러스, 박테리아, 진균 또는 원생동물 감염 또는 암을 치료하기 위해 환자에게 투여될 수 있다.
- [0079] 실시형태에서, 동조 가능/동시자극 CAR을 발현하는 $\gamma\delta$ T 세포(들)는 아미노비스포스포네이트, 또는 이의 대체물과 함께 대상체에게 동시투여될 수 있고, 대체물은 생리학적 메발로네이트 경로의 이상조절을 통해 표적 세포에 존재하는 인항원의 수준을 중대시킬 수 있다. 이러한 동시투여는, 인항원 관련된 $\gamma\delta$ TCR로부터의 신호 1 강도의 '약물-동조 가능' 적정이 가능하게 하도록, 레버리지 V γ 9V δ 2 TCR 인식에 유리할 수 있는 것으로 생각된다. 동조 가능/동시자극 CAR은 CAR 표적화된 질환 연관 항원에 기초하여 세포에 2-제한된 새로운 신호를 제공할 수 있다.
- [0080] 구체적인 실시형태에서, 소정의 질환 연관 항원의 경우, 아미노비스포스포네이트 용량 또는 이의 대체물은 특정한 동조 가능/동시자극 CAR로부터 신호 2와 상승작용하도록 준최적 신호 1 강도를 생성하도록 조정될 수 있다. 시험관내 활성화는 최적 '동조'를 위한 관련 약물 용량을 예측하도록 사용될 수 있어서, 높은 수준의 항원을 발현하는 세포주를 발현하는 질환 연관 항원(더 높은 신호 2 강도)과 더 낮은 수준을 발현하는 비형질전환된 세포(더 낮은 신호 2 강도를 생성) 사이에 최대 구별을 허용한다. 예를 들어, 본 발명에서 사용된 동시투여된 아미노비스포스포네이트는 콜레드론산, 이의 염 및/또는 이의 수화물, 알렌드론산, 이의 염 및/또는 이의 수화물, 및 팔미드론산, 이의 염 및/또는 이의 수화물을 포함할 수 있다.
- [0081] 치료에서 본 발명의 감마 델타 T 세포의 동종이계 사용(여기서, 상기 감마 델타 세포는 본 발명의 CAR 변형된 감마 델타 T 세포를 사용함)이 통상적으로 면역계 매개된 거부와 연관된 잠재적 문제로 인한 것으로 생각되지 않는다고 고려된다. 본 발명자들은 감마 델타 T 세포가 통상적으로 이식편 대 숙주 질환을 발생시키지 않고, 동종이계 이식에 대한 감마 델타 T 세포의 선택이, 이식편 대 숙주 질환의 최소 위험으로, T 세포가 수혜자에게 제공되게 허용할 것이라고 생각한다. 감마 델타 T 세포가 MHC 제한되지 않으면서, 동종이계 이식이 실행 가능한 치료라고 생각되고, 여기서 감마 델타 T 세포는 MHC-단상형과 독립적으로 세포용해를 위해 세포를 표적화할 수 있다. 감마 델타 T 세포에 의한 MHC 제시된 항원의 인식의 결여의 관점에서, 본 발명자들은 다른 백혈구, 예컨대 B 세포 및 알파 베타 T 세포 수용체(TCR) T 세포로부터 충분히 정제된 감마 델타 T 세포의 고순도 동종이계 전달에서 GVHD의 위험이 최소화될 것이라고 생각한다. 추가적으로, 소정의 질환 상태에서의 수혜자, 예컨대 중증 바이러스 감염, 예를 들어 에볼라, HIV 및 인플루엔자를 가지는 환자, 및 PTLD-EBV 환자 및 다른 암 유형을 가지는 환자(이들로 제한되지는 않음)의 면역 손상 상태로 인해 이식편 거부의 낮은 기회가 있을 것이라고 생각된다.
- [0082] 기재된 바대로, 이전의 치료 전략은, 동종이계 줄기 세포 이식 전에, 음성 선택 또는 양성 선택 방법론을 이용하여 공여자 혈액, 특히 말초 혈액으로부터 T 세포 제거를 포함한다.
- [0083] 공여자 대상체로부터 세포를 수집하는 단계를 포함하는 치료 방법이 제공되고, 이러한 공여자 세포의 처리는 수혜자 대상체에게 동종이계로 충분한 수의 감마 델타 T 세포를 제공하는 것을 허용하고, 여기서 상기 처리는, 수혜자 대상체에게 치료학적 효과를 발휘하도록, 변형된 감마 델타 T 세포가 동종이계 대상체에게 제공될 수 있도록, 키메라 항원 수용체를 혼입시키도록 감마 델타 T 세포를 변형시키는 단계를 포함한다.
- [0084] 예로서, 감마 델타 T 세포 증식 방법은 밀도 구배 원심분리를 이용한 백혈구성분채집술 재료 또는 혈액으로부터의 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)의 단리를 포함할 수 있다. 단리된 PBMC는 배양 중 증식 전에 저온보존될 수 있는 한편, 혈장은 후속하는 감마 델타 T 세포 배양 단계에서 사용하기 위한 자가유래 부형체로서 동시추출되고 보유된다. 실시형태에서, 새로 단리된 PBMC(또는 저온보존으로부터 소생된 것)는 인간 재조합 IL-2(예를 들어, 1000U/ml 이하의 농도에서) 및 콜레드론산(예를 들어, 5 μ M)을 함유하는 성장 배지로 접종될 수 있다. $\gamma\delta$ T 림프구 집단은 콜레드론산의 첨가(0일) 및 14일 배양 기간에 걸친 IL-2의 연속 포함을 통해 활성화되고 PBMC로부터 선택적으로 증식될 수 있다. 세포 혼탁액은 이 시간 기간에 걸쳐 (통상적으로 1:2 분할 비율로) 연속하여 증식될 수 있다. 배양 개시 후 14일에, 100ml 식염수 용액을 함유하는 주입 병으로 옮기기 전에 세포를 수화하고 락트산염 링거 용액 및 HSA 중에 재현탁시킬 수 있다. 대안적으로, 차후 시간에 소생을 위해 세포를 저온보존할 수 있다.
- [0085] 증식 이후, 실시형태에서, 감마 델타 T 세포 생성률은 하기 최소 사양을 만족시킨다; 80% 초과의 전체 세포는 T 림프구(CD3 양성)이고, 감마 델타 T 림프구는 60% 이상의 전체 T 림프구 집단(V감마9 양성)을 포함하고, NK 세포는 25% 미만의 전체 T 림프구 집단(CD3 음성/CD56 양성)이고, 세포독성 T 세포는 10% 미만의 전체 T 림프구

집단(CD3/CD8 양성)이고, T 헬퍼 세포는 5% 미만의 전체 T 림프구 집단(CD3/CD4 양성)이다. 실시형태에서, 이 사양을 만족시키는 세포 집단은, 99% 초파의 감마 뎔타 T 세포를 가지는 것을 목표로 하는, 고순도 동종이계 세포 은행의 생성을 위한 출발 재료로서 사용될 수 있다.

[0086] 따라서, 하기 단계를 포함하는 제2 대상체에게 동종이계로 감마 뎔타 T 세포를 제공하는 공정이 제공된다:

- 제1 대상체로부터의 감마 뎔타 T 세포의 샘플의 제공;

- 제2 대상체에게 투여되게 허용되는, 감마 뎔타 T 세포의 배양(여기서, 감마 뎔타 T 세포는 CAR 변형된 감마 뎔타 T 세포를 제공하도록 변형됨).

[0089] 실시형태에서, 제공하는 단계는 제1 대상체로부터 감마 뎔타 T 세포를 수집하는 단계를 포함할 수 있다. 수집은 공여자 대상체로부터 얻어질 수 있고, 여기서 공여자 대상체는 즉각적인 인지된 건강 병태를 가지지 않는다. 적합하게, 수혜자 대상체는 척추동물, 예를 들어 포유류, 예를 들어 인간, 또는 상업적으로 가치 있는 가축, 조사동물, 말, 소, 염소, 랙트, 마우스, 토끼, 돼지 등일 수 있다. 실시형태에서, 제1 및 제2 대상체는 인간일 수 있다. 이해되는 것처럼, 본 발명의 맥락에서, 제1 대상체는 감마 뎔타 T 세포가 수집되는 공여자 대상체이고, 세포는 상이한 제2 (수혜자) 대상체의 동종이계 치료에서 사용된다. 적합하게, 제1 대상체는 질환전 상태를 가진다. 용어 "질환전" 상태는, 본 명세서에 사용된 바대로, "건강한", "질환 무"의 절대 용어, 및 이환된 상태 후 "질환 잠재적 진행의 출입", "더 건강한" 또는 "덜 이환된"의 상대 용어를 포함한다. "질환전"이 질환으로 진단된 제1 대상체 전의 시간에 의해 정의될 수 있으므로, 제1 대상체는 절대 용어에서 건강할 수 있거나, 이미 질환을 가질 것이고, 여기서 질환은 아직 자체 표출되거나 진단 또는 검출되지 않는다. 실시형태에서, 상기 공정은, 감마 뎔타 T 세포가 제2 대상체에게 제공되도록 허용하도록, 제1 대상체로부터 얻은 감마 뎔타 T 세포를 배양하는 단계를 포함할 수 있다.

[0090] 실시형태에서, 감마 뎔타 T 세포는 성분채집술 또는 백혈구성분채집술 후 또는 제대혈로부터 얻어진 말초 혈액 또는 말초 혈액 단핵 세포로부터 수집될 수 있다. 말초 혈액으로부터의 감마 뎔타 T 세포의 생체외 증식은, 인 항원 또는 아미노비스포스포네이트에 의해 활성화될 때, V γ 9V δ 2 표현형의 감마 뎔타 T 세포를 우선적으로 발생시킬 것이다. 생체외 증식에 대한 출발 재료로서의 제대혈의 사용은 활성화 항원에 따라 몇몇 T 세포 수용체 (TCR) 하위유형의 선택적 증식을 허용한다. 이 TCR 아이소타입은 V γ 1-9 및 V δ 1-8의 임의의 감마 뎔타 TCR 쌍지음, 예를 들어 V δ 1, V δ 2 및 V δ 3 TCR 변이체(이들로 제한되지는 않음)를 포함할 수 있다. 별개의 하위유형의 감마 뎔타 T 세포는 구별되는 항원을 인식하고, 따라서 표적 세포에 의해 제시된 항원에 따라 세포독성의 다른 수준을 나타낼 것이다. 각각의 뎔타 TCR 하위유형의 상대 풍부도는 배양 조건 및 제시된 특이적 항원에 따라 주로 의존적이다. 배양 조건은 제대혈로부터 원하는 TCR 아이소타입을 우선적으로 증식시키도록 조정될 수 있다. 예를 들어, 단일 TCR 아이소타입을 발현하는 감마 뎔타 T 세포는 특정한 암 유형의 치료에서 또는 특정한 바이러스 감염의 치료에 대해 더 효과적일 수 있다.

[0091] 실시형태에서, 수집 단계는, 제1 대상체로부터 감마 뎔타 T 세포를 수집하기 전에, 제1 대상체에게 감마 뎔타 T 세포 강화제를 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0092] 실시형태에서, 감마 뎔타 T 세포를 수집하는 방법은 강화제, 예컨대 골수로부터 백혈구 가동화를 유도하는 성장인자, 예컨대 G-CSF, 아미노비스포스포네이트, 특히 팔미드론산, 알렌드론산, 콜레드론산, 리세드론산, 이반드론산, 인카드론산, 이의 염 및/또는 이의 수화물을 제1 대상체에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0093] 실시형태에서, 처리 또는 공정은 하기 중 임의의 하나 이상을 포함할 수 있다:

- 제1 대상체(공여자)로부터 혈액, 예를 들어 제대혈 또는 성분채집술/백혈구성분채집술 유래 세포를 제공하는 단계,

- 혈액으로부터 말초 혈액 단핵 세포를 분리하는 단계,

- 말초 혈액 단핵 세포에 아미노 비스포스포네이트 및 표적 항원을 첨가하는 단계, 및

- 표적 항원 특이적 세포독성 T 세포(CTL) 및 감마 뎔타 T 세포를 증식시키도록/유도하도록 말초 혈액 단핵 세포를 배양하는 단계,

- 본 명세서에 기재된 바와 같은 CAR 변형된 감마 뎔타 T 세포를 제공하도록 감마 뎔타 T 세포를 변형시키고, 표적 항원 특이적 세포독성 T 세포(CTL) 및 감마 뎔타 T 세포를 증식시키도록/유도하도록 임의로 PBMC 또는 CBMC 또는 T 세포를 인공 항원 제시 세포(aAPC)와 동시배양하는 단계.

- [0099] 본 발명자들은 전혈의 다른 성분으로부터 실질적으로 단리된 감마 텔타 T 세포를 제공하는 것이, 이 실질적으로 단리된 감마 텔타 T 세포가 제2 대상체에게 동종이계로 투여될 때, 이식 실패를 감소시킬 것이라고 생각한다. 결과적으로, 본 발명의 공정은 전혈, 또는 이의 성분으로부터 감마 텔타 T 세포를 정제하는 단계를 포함할 수 있다. 세포의 전체 수를 기준으로 10% 미만의 말초 혈액이 감마 텔타 T 세포로 이루어지므로, 샘플의 질량 기준으로 10% 초과가 감마 텔타 T 세포로 이루어지도록, 예를 들어 항-감마 텔타 T 세포 항체를 사용하여 전혈, 또는 이의 성분의 샘플을 정제하는 것은 수혜자 대상체를 동종이계로 치료하는 것의 효과를 증대시킨다고 생각된다. 결과적으로, 본 발명에 대한 공정은, 감마 텔타 T 세포인 정제된 샘플에서의 전체 수의 10% 초과, 25%, 50%, 75%, 85%, 90%, 95% 또는 98%를 달성하도록 전혈, 또는 이의 성분의 샘플을 정제하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0100] 전혈, 제대혈 또는 이의 성분으로부터 감마 텔타 T 세포를 정제할 수 있는 숙련자에게 공지된 임의의 방법은 본 발명의 일부를 형성할 수 있다. 명확하게, 정제 단계는 감마 텔타 T 세포의 생존능력에 영향을 미치지 않거나 최소로 영향을 미쳐야 한다. 예를 들어, 하기 단계는 감마 텔타 T 세포의 상기 언급된 정제를 달성하도록 조합으로 또는 단독으로 사용될 수 있다: 투석(예를 들어, 성분채집술 및/또는 백혈구성분채집술); 분별 원심분리; 배양 중의 감마 텔타 T 세포의 성장(예를 들어, 배양 중의 우선적 성장)의 공정.
- [0101] 정제의 단계는, 적어도 부분적으로, 배양 단계 동안 수행될 수 있다. 예를 들어, 배양 단계 동안, 특정한 성분, 예컨대 아미노비스포스포네이트, 특히 팔미드론산, 알렌드론산, 졸레드론산, 리세드론산, 이반드론산, 인카드론산, 이의 염 및/또는 이의 수화물의 적어도 하나의 또는 조합의 첨가는 감마 텔타 T 세포가 배양 중에 증식되게 허용한다. 세포 배양 동안 정제는 합성 항원, 예컨대 포스포스팀/브로모할로아이드린 피로포스페이트(BrHPP), 합성 아이소펜테닐 피로포스페이트(IPP), (E)-4-하이드록시-3-메틸-뷰트-2-엔일 피로포스페이트(HMB-PP)의 첨가 또는 인공 항원 제시 세포(aAPC)와의 동시배양에 의해 또한 달성될 수 있다(Wang *et al.*, 2011). 이러한 성분의 첨가는 정제된 샘플에서 전체 세포의 수를 기준으로 통상적으로 70% 이상에서 감마 텔타 T 세포의 양성 선택을 허용하는 배양 환경을 제공한다. 이러한 성분의 첨가는 정제된 샘플에서 전체 세포의 수를 기준으로 통상적으로 70% 이상에서 감마 텔타 T 세포의 양성 선택을 허용하는 배양 환경을 제공한다.
- [0102] 아미노비스포스포네이트는 감마 텔타 T 세포를 배양하는 제1 일로부터의 임의의 시간에 첨가될 수 있다. 아미노비스포스포네이트는 말초 혈액 단핵 세포에 0.05 내지 100 마이크로몰, 바람직하게는 0.1 내지 30 마이크로몰의 농도로 첨가될 수 있다. 적합하게, 비스포스포네이트는 피로인산의 유사체이고, 피로인산 골격 P-O-P의 O(산소 원자)가 C(탄소 원자)에 의해 치환된(P-C-P) 화합물이다. 이것은 일반적으로 골다공증에 대한 치료학적 약물로서 사용된다. 아미노비스포스포네이트는 비스포스포네이트 중에 N(질소 원자)를 가지는 화합물을 의미한다. 예를 들어, 본 발명에서 사용된 아미노비스포스포네이트는 특별히 제한되지 않고, WO 2006/006720 및 WO 2007/029689에 개시된 바와 같은 아미노비스포스포네이트 등을 사용할 수 있다. 이의 특정한 예는 팔미드론산, 이의 염 및/또는 이의 수화물, 알렌드론산, 이의 염 및/또는 이의 수화물, 및 졸레드론산, 이의 염 및/또는 이의 수화물을 포함한다. 아미노비스포스포네이트의 농도는 바람직하게는 팔미드론산, 이의 염 및/또는 이의 수화물에 대해 1 내지 30 μ M, 알렌드론산, 이의 염 및/또는 이의 수화물에 대해 1 내지 30 μ M, 및 졸레드론산, 이의 염 및/또는 이의 수화물에 대해 0.1 내지 10 μ M이다. 여기서, 5 μ M 졸레드론산은 예로서 첨가된다.
- [0103] 적합하게, 배양 기간이 7일 이상일 때, 감마 텔타 T 세포를 포함하는 세포 그룹은 높은 순도로 얻어질 수 있지만, 감마 텔타 T 세포의 수를 추가로 증가시키도록 배양은 바람직하게는 약 14일 동안 수행된다.
- [0104] 실시형태에서, 배양 기간은 약 7일 이상일 수 있다. 적합하게, 배양 기간은 높은 수의 실질적으로 정제된 감마 텔타 T 세포 집단을 달성하도록 약 14일 이상 동안 수행될 수 있다. 배양은 통상적으로 14일 동안 수행되고, 이 시간 후 감마 텔타 T 세포는 기하급수적 증식을 계속하는 것을 멈춘다. 그러나, 소정의 실시형태는 더 높은 수로의 감마 텔타 T 세포의 증대된 배양 및 선택적 증식을 제공한다. 이러한 실시형태는 배양 중의 합성 항원(예를 들어, 합성 IPP, DMAPP, Br-HPP, HMB-PP)의 제공, 인공 또는 조사된 항원 제시 세포에 대한 주기적인 노출, 부동화된 항원 또는 항체의 제공 또는 세포 배양을 위한 출발 재료로서 제대혈의 사용을 포함한다.
- [0105] 적합하게, 세포는 최소 적어도 2의 집단 배가 후 이의 세포 표면 수용체 프로파일을 리셋하도록 적어도 7일의 기간 동안 이 환경에서 배양될 수 있다.
- [0106] 임의로, 감마 텔타 T 세포를 배양하는 단계는 감마 텔타 T 세포 표면 수용체 프로파일을 변경하기 위한 단계를 포함할 수 있다.
- [0107] 예를 들어, 배양 단계는 제1 대상체로부터 샘플에 제공된 감마 텔타 T 세포에 존재하는 하나 이상의 감마 텔타

T 세포 표면 수용체 유형을 감소시키거나 제거하는 하나 이상의 하위단계를 수반할 수 있다. 이 단계는 다시 나아브 또는 부분적으로 나아브 형태로 감마 텔타 T 세포의 수용체 프로파일을 "리셋" 또는 "부분적으로 리셋"하는 것으로 보일 수 있다. 이러한 리셋은 암 및 바이러스 감염을 치료하는 감마 텔타 T 세포의 능력을 증대시키는 것으로 고안된다. T 세포가 유래한 대상체에서 암 또는 바이러스의 존재에 의해 몇몇 T 세포 수용체가 유도될 수 있는 것으로 공지되어 있고, 이를 수용체가 몇몇 경우에 T 세포에 의한 종양 또는 바이러스 감염에 대한 반응성을 저해할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 결과적으로, 이러한 수용체를 제거하는 것은 본 발명의 감마 텔타 T 세포의 효과를 증가시킬 수 있다.

[0108] 하나 이상의 감마 텔타 T 세포 수용체 유형의 감소 또는 제거는 여러 일자에 걸쳐 제1 대상체로부터 유래한 감마 텔타 T 세포를 배양함으로써 본 발명의 공정에 의해 달성될 수 있고, 세포 집단은 여러 회차에 크기가 증가하였다. 예를 들어, 세포는 최소 적어도 2의 집단 배가 후 이의 세포 표면 수용체 프로파일을 리셋하도록 적어도 7일의 기간 동안 배양될 수 있다.

[0109] 감마 텔타 T 세포 표면 수용체 프로파일이 리셋되는 경우에, 1차 비배양된 감마 텔타 세포, 예컨대 종양 특이적 세포 표면 수용체 B7-H1/PD-L1, B7-DC/PD-L2, PD-1 및 CTLA-4에 존재하는 세포 표면 수용체는 배양 증식 기간 동안 부재하거나 수가 실질적으로 감소하게 할 수 있다.

[0110] 배양 단계는, 선택된 감마 텔타 T 세포 표면 수용체(예를 들어, 상기 기재된 수용체의 임의의 하나 또는 임의의 조합)를 상당히 감소시키거나 제거하도록 필요한 배양 단계의 적절한 기간을 결정하기 위해, 감마 텔타 T 세포의 표면 수용체 프로파일을 모니터링하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 감마 텔타 T 세포 수용체를 모니터링하는 공정은, 예를 들어, 유세포계수 기법, 예컨대 문헌[Chan *et al.*, *Genes and Immunity* (2014) 15, 25 내지 32]에 기재된 것을 이용하여 수행될 수 있다. 간단히 말하면, 면역 관문 저해제 수용체 및/또는 리간드에 특이적인 항체는 세포 표면 상에 면역 관문 저해제를 발현하는 (예를 들어 항-V감마9와 동시염색된) 감마 텔타 T 세포의 하위집단을 확인하도록 사용될 것이다.

[0111] 추가적으로, 또는 임의로, 본 발명의 배양 단계는, 제1 대상체로부터 추출될 때, 비배양된 감마 텔타 세포의 표면에 존재하지 않은 감마 텔타 T 세포 표면 수용체 유형의 감마 텔타 T 세포의 발현을 유도하는 단계, 또는, 제1 대상체로부터 추출될 때, 비배양된 감마 텔타 세포의 표면에 존재하는 세포 표면 수용체 유형의 발현의 양의 증가를 유도하는 단계를 포함할 수 있다. 이것은 암, 박테리아, 진균, 원생동물 또는 바이러스로부터 유래한 항원에 의해 감마 텔타 T 세포를 시험감염함으로써 달성될 수 있다. 이 항원은 효율, 항원 제시 가능성 및 증식된 감마 텔타 T 세포의 세포독성을 증가시키기 위해 배양 증식 배지에 첨가될 수 있다. 적합하게, 항원은 부동화된 항원 또는 항체, 조사된 종양 세포주, 인공 항원 제시 세포 및 합성 가용성 항원의 첨가(이들로 제한되지는 않음)를 포함하는 다양한 포맷으로 제공될 수 있다. 항원은 배양의 제1 일에 배양 증식 배지에 첨가될 수 있다. 실시형태에서, 바이러스는 인플루엔자, HIV, C형 간염, B형 간염, 헤르페스 변이체, 사이토메갈로바이러스(CMV), 앱스타인 바 바이러스, 수두, 유두종 바이러스, 에볼라, 바리셀라 조스터 바이러스 또는 천연두로부터 선택될 수 있다. 대안적으로, 항원은 세포 감염, 박테리아 감염, 진균 감염 또는 원생동물 감염에서 발현된 항원일 수 있다. 특히, 표적 항원은 인플루엔자, HIV, C형 간염, B형 간염, 헤르페스 변이체, 사이토메갈로바이러스(CMV), 에볼라 바이러스, 앱스타인 바 바이러스, 수두, 유두종 바이러스, 바리셀라 조스터 바이러스 또는 천연두 유래일 수 있다.

[0112] 적합하게, 항원은 이러한 바이러스 유기체로부터 활성 또는 불활화 바이러스 단편, 펩타이드, 단백질, 항원 분절 등을 포함할 수 있다.

[0113] 적합하게, 항원은, 몇몇 종양 세포 및 또한 몇몇 정상 세포 상에 제시된 임의의 다른 세포 및/또는 종양 연관 항원이 아니라, 오직 종양 세포 상에 제시된 종양 특이적 항원을 포함할 수 있다. 이러한 종양 특이적 항원은 암태아성 항원, CA-125, MUC-1, 상피 종양 항원 및 MAGE-유형 항원, 예컨대 MAGEA1, MAGEA3, MAGEA4, MAGEA12, MAGEC2, BAGE, GAGE, XAGE1B, CTAG2, CTAG1, SSX2, 또는 LAGE1 또는 이들의 조합을 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0114] 적합하게, 적합한 항원을 제공하도록 감염된 세포, 고사 세포 또는 암 세포의 용해물을 사용할 수 있다. 실시형태에서, 항원은 합성된 항원, 예를 들어 합성 펩타이드일 수 있다. 대안적으로, 항원은 대상체로부터 수확될 있다. 적합한, 항원 1ml당 대략 0.02-2 마이크로그램은 배양 단계 동안 세포에 제공될 수 있다.

[0115] 실시형태에서, 감마 텔타 T 세포의 증식 및 세포 표현형의 유지를 장려하는 인자, 예컨대 IL-2, IL-15 또는 IL-18(Garcia V. *et al.*, 1998, Nussbaumer O. *et al.*, 2013)은 말초 혈액 단핵 세포를 배양하는 단계에 제공될

수 있다. 적합하게, 이러한 실시형태에서, IL-2, IL-15 또는 IL-18 또는 이들의 조합은 50-2000U/ml, 더 바람직하게는 400-1000U/ml의 범위로 배양 배지에 제공될 수 있다. 배양은 통상적으로 2 내지 10%, 더 바람직하게는 5% CO₂의 존재 하에 34 내지 38°C, 더 바람직하게는 37°C에서 수행된다. 배양 배지는 배양된 세포의 수에 따라 첨가될 수 있다. 적합하게, 혈청은 배양 용액에 0.1 내지 20%의 양으로 첨가될 수 있다. 혈청으로서, 예를 들어 소 태아 혈청 AB 혈청, 또는 자가혈장을 사용할 수 있다. 적합하게, 혈청 또는 혈장 대신에 화학적으로 한정된 혈청 대체물을 사용할 수 있다.

[0116] 실시형태에서, 소실된 또는 아네르기 감마 뎔타 T 세포의 소생을 장려하는 인자가 배양 배지에 첨가될 수 있다. 적합하게, 이 인자는 사이토카인, 예컨대 IL-15 또는 IL-18 또는 항체 표적화 특이적 면역 판문 저해제 수용체 또는 리간드, 예를 들어 항-PD-L1 항체를 포함할 수 있지만(Chang K. et al., 2014), CTLA-4, PD-1, PD-2, LAG3, CD80, CD86, B7-H3, B7-H4, HVEM, BTLA, KIR, TIM3 또는 A2aR에 지향된 항체를 또한 포함할 수 있다.

[0117] 실시형태에서, 제공 단계는 공여자 대상체로부터의 혈액 또는 제대혈의 수집을 포함할 수 있다. 이러한 혈액 수집은 공여자 대상체로부터 예를 들어 대략 15-25ml의 혈액일 수 있다. 실시형태에서, 제공 단계는 수집 단계를 포함할 수 있고, 수집 단계는 단일 수집 공정에서 제1 대상체로부터의 적어도 감마 뎔타 T 세포의 수집이다. 실시형태에서, 수집 단계는 다수의 수집 세션 초과일 수 있다.

[0118] 본 발명의 실시형태에서, 감마 뎔타 T 세포를 제공하기 위한 공정은 제1 대상체로부터 수집된 세포의 적어도 하나의 특징을 결정하는 분석 단계를 포함할 수 있다. 실시형태에서, 세포의 적어도 하나의 특징은 세포의 DNA 또는 RNA 서열 또는 아미노산 서열, 세포의 프로테오솜 또는 세포 표면 마커일 수 있다. 실시형태에서, 상기 공정은 감마 뎔타 T 세포를 조직 타이핑하는 단계를 포함할 수 있다. 감마 뎔타 세포 표면 마커 특징은 CD3, CD4, CD8, CD69, CD56, CD27 CD45RA, CD45, TCR-Vg9, TCR-Vd2, TCR-Vd1, TCR-Vd3, TCR-pan g/d, NKG2D, 단일 클론 케모카인 수용체 항체 CCR5, CCR7, CXCR3 또는 CXCR5 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다(이들로 제한되지는 않음). 이 타이핑은 유전자형 또는 표현형 정보를 포함할 수 있다. 표현형 정보는 미시적, 세포 또는 분자 수준에서 관찰 가능한 또는 측정 가능한 특징을 포함할 수 있다. 유전자형 정보는 예를 들어 인간 백혈구 항원(공여자의 HLA 유형)의 특정한 유전적 변종 또는 돌연변이에 관한 것일 수 있다.

[0119] 적합하게, 본 발명의 감마 뎔타 T 세포는 많은 수의 환자에서 사용하기 위해 증식되고 분화될 수 있는 임상 등급 세포주의 은행을 제공할 수 있다. 실시형태에서, 감마 뎔타 T 세포는 제대혈 출발 재료로부터 생체외 증식되고, 세포 은행을 집단화하기 위해 충분한 수의 감마 뎔타 T 세포를 생성하기 위해 다수의 공여자로부터 조합될 수 있다. 이러한 세포 은행은 본 발명의 별개의 양태를 형성하고, 내부에 단리된 세포도 그렇다. 실시형태에서, 이러한 은행은, 인간 백혈구 항원(HLA) 일치에 대한 기회를 최대화하도록, 선택된 0 혈액형의 건강한 지원자 공여자로부터 얻은, 감마 뎔타 T 세포에 의해 적합하게 집단화될 것이고, 이로써 면역억제 약물의 실질적인 사용에 대한 수요 또는 동종이식 거부의 위험을 최소화한다. 예를 들어, UK/EU 환자에 대한 이러한 은행은 하기를 포함할 수 있고, 이것은, 감소한 거부 위험으로, 상당한 백분율의 UK/EU 집단의 치료를 허용한다:

HLA-A	HLA-B	HLA-DR
A1	B8	DR17(3)
A2	B44(12)	DR4
A3	B7	DR15(2)
A2	B7	DR15(2)
A2	B44(12)	DR7
A2	B62(15)	DR4
A1	B57(17)	DR7
A3	B35	DR1
A29(19)	B44(12)	DR7
A2	B60(40)	DR4
A2	B8	DR17(3)
A2	B27	DR1
A2	B44(12)	DR13(6)
A3	B7	DR4
A1	B8	DR4
A2	B57(17)	DR7
A2	B60(40)	DR13(6)
A11	B35	DR4
A2	B44(12)	DR11(5)
A24(9)	B7	DR15(2)
A30(19)	B13	DR7
A31(19)	B60(40)	DR4
A3	B7	DR1
A11	B35	DR1
A3	B65(14)	DR13(6)

[0120]

실시형태에서, 본 발명의 수집되고 처리된 감마 델타 T 세포는 세포 응행 또는 기탁에서 미래의 사용을 위해 뱡킹될 수 있다. 따라서, 세포는 저온보호제, 예컨대 DMSO 또는 CryoStor(상표명)에서 저장되고, 액체 질소 중의 동결 및 저장의 제어된 속도로 처리될 수 있다. 감마 델타 T 세포는, 단일 또는 다수의 치료 단계를 위해 필요한 바대로, 한정된 단위 또는 용량의 단위화된 저장 중에 저장될 수 있다.

[0122]

실시형태에서, 상기 공정은, 수집된 샘플 내의 감마 델타 T 세포의 저장, 생존능력 또는 치료학적 능력을 증대시키기 위해, 제1 대상체로부터 수집된 세포의 집단을 물질에 의해 처리하는 단계를 포함할 수 있다. 실시형태에서, 상기 공정은 보존 단계를 포함할 수 있고, 저온보존 물질은 감마 델타 T 세포의 샘플에서 감마 델타 T 세포에 제공된다.

[0123]

실시형태에서, 감마 델타 T 세포는 인향원 아이소펜테닐 피로포스페이트(IPP) 증대된 인간 V γ 9V δ 2 T 세포일 수 있다.

[0124]

주요 말초 혈액 V γ 8 T 세포 하위집단은 작은 분자량(약 350Da)의 피로포스페이트 항원의 증대된 수준의 감지를 통해 메발로네이트 경로의 이상조절에 기초하여, TCR 의존적 방식으로 표적 세포를 인식하는, 전형적 V γ 9V δ 2 TCR을 발현한다. 이것은 외인성으로 유도되거나(박테리아 감염(예컨대, HMBPP)을 나타냄), 내인성(종양형성(IPP) 동안 증대된 아이소프레노이드 합성을 나타냄)일 수 있다.

[0125]

V γ 9V δ 2 세포는 세포 표면 당단백질 BTN3A1을 인식하는 것으로 보이고, 이것은, BTN3A1 클러스터링 및 생산적 TCR 인식을 발생시키는, 피로포스페이트 항원에 특이적으로 결합하는, 세포질 B30.2 도메인을 함유하는, 매우 넓은 범위의 표적 세포에서 발현된다. 중요하게는, V γ 9V δ 2 활성화가 CD3제타 및 ZAP-70을 통해 매개된 TCR 신호전달에 의존적이지만, 이것은, 동시자극 수용체, 예컨대 CD28, 또는 "스트레스 포커싱된" 수용체, 예컨대 NKG2D(TCR 매개된 신호전달과 궁극적으로 통합되는, PI3-키나제 경로 신호를 증대시킴)에 의해 매개될 수 있는, 동시자극 경로에 의해 강하게 영향받는다.

[0126]

실시형태에서, 감마 델타 T 세포는 증식된 인간 V δ 1 T, V δ 2 T 또는 V δ 3 T 세포일 수 있다.

[0127]

개체에서 감염 또는 암을 치료하는 방법이 또한 제공되고, 상기 방법은 상이한 개체로부터 얻은 감마 델타 T 세

포를 상기 개체에게 제공하는 단계를 포함한다. 따라서, 공여자 감마 엘타 T 세포는 예를 들어 바이러스, 박테리아, 진균 또는 원생동물의 감염의 치료, 또는 수혜자 대상체에서의 암의 치료를 위해 사용되고, 공여자 및 수혜자는 동일한 개체가 아니다. 이해되는 것처럼, 제2 대상체에게 감마 엘타 T 세포를 제공하기 전에, 이 감마 엘타 T 세포는 CAR 변형된 감마 엘타 T 세포를 제공하도록, 본 명세서에 기재된 바대로 변형된다.

- [0128] 적합하게, 수혜자 대상체에게 감마 엘타 T 세포를 제공하기 위한 투여 방법은 정맥내, 피내 또는 피하 주사를 포함할 수 있다. 투여는 이환된 부위에 또는 개체에게 전신적일 수 있다. 적합하게, 투여 방법은 예방적일 수 있고, 개체에게 이익을 보여주기에 충분한 감마 엘타 T 세포의 "예방학적 유효량" 또는 "치료학적 유효량"(사례가 그럴 수 있으므로, 예방이 치료로 생각될 수 있음)이 제공된다. 투여된 실제 양, 및 투여 속도 및 시간 기간은 무엇이 치료되는 지의 성질 및 중증도에 따라 달라질 것이다. 치료의 처방, 예를 들어 용량 등에 대한 결정은 일반 실행자 및 다른 의학 의사의 책임 내에 있다.
- [0129] 실시형태에서, 바이러스, 박테리아, 진균 또는 원생동물에 의해 영향을 받은 제2 상이한 대상체의 치료에서 사용하기 위해 제1 대상체로부터의 감마 엘타 T 세포가 제공되고, 대상체의 상기 치료는 동종이계이다.
- [0130] 실시형태에서, 바이러스에 의해 영향을 받은 제2의 상이한 대상체의 치료에서 사용하기 위해 제1 대상체로부터의 감마 엘타 T 세포가 제공되고, 상기 바이러스는 HIV, 인플루엔자 또는 간염으로부터 선택되고, 상기 치료는 동종이계이다. 실시형태에서, 바이러스는 B형 간염 또는 C형 간염, 인플루엔자, 헤르페스 변이체, 사이토메갈로바이러스(CMV), 앱스타인 바 바이러스, 수두, 유두종 바이러스, 바리셀라 조스터 바이러스 또는 천연두일 수 있다.
- [0131] 실시형태에서, 인플루엔자 바이러스는 인플루엔자 A(Flu A) 바이러스일 수 있다. 실시형태에서, 인플루엔자 바이러스는 조류 또는 돼지류 기원 유행병 인플루엔자 바이러스, 예를 들어 H5N1, H7N3, H7N7, H7N9 및 H9N2(조류 하위유형) 또는 H1N1, H1N2, H2N1, H3N1, H3N2 H2N3(돼지과 하위유형)일 수 있다.
- [0132] 실시형태에서, 암을 가지는 대상체의 치료를 위한 감마 엘타 T 세포가 제공되고, 상기 치료는 동종이계이다.
- [0133] 실시형태에서, 제2 대상체의 치료에서 사용하기 위한 제1 대상체로부터의 감마 엘타 T 세포가 제공되고, 제2 대상체는 바이러스, 박테리아, 진균 또는 원생동물 감염 중 적어도 하나를 겪는다. 실시형태에서, 감마 엘타 T 세포가 제공된 대상체는 면역억제 약물이 동시에, 순차적으로 또는 별개로 투여될 수 있다. 면역억제 약물의 투여는 감마 엘타 T 세포에 대한 임의의 해로운 시스템 반응을 완화시키는 것을 도울 수 있다.
- [0134] 실시형태에서, 앱스타인 바 바이러스 유도된 림프구증식성 질환(EBV-LPD)을 가지는 대상체의 치료를 위한 감마 엘타 T 세포가 제공된다.
- [0135] 앱스타인 바 바이러스(EBV)는 감마 헤르페스 바이러스 패밀리의 구성원이고, 서구 집단에서 우세하다(성인의 90% 초과가 혈청 반응 양성임). EBV는, 바이러스 재활성화를 막는, 숙주의 세포독성 T 세포(CTL)에 의한 감복 감염으로서 유지되어서, 숙주 β 세포에서 감복 감염으로서 EBV가 무증상으로 지속하도록 허용한다.
- [0136] EBV는, 상피 기원의 암, 예컨대 비인두 암종(UPC) 및 위암 이외에, β 세포 기원의 다수의 악성종양, 예컨대 베켓 림프종(BL), 호지킨 림프종 (HL) 및 이식 후 림프구증식성 질환(PTLD)과 연관된다.
- [0137] PTLD는 고령 장기 이식 및 조혈 줄기 세포 이식과 연관된 흔한 위험이다.
- [0138] 실시형태에서, EBV 연관 악성종양을 가지는 제2 대상체의 치료에서 사용하기 위한, 제1 대상체로부터의 감마 엘타 T 세포가 제공된다.
- [0139] 실시형태에서, 자가유래로 또는 동종이계로 대상체의 치료에서 사용하기 위한, 감마 엘타 T 세포, 특히 적어도 하나의 동시자극 CAR을 포함하는 V γ 9V δ 2 세포가 제공된다.
- [0140] 실시형태에서, 상이한 바이러스 표시의 치료를 위한 하나 이상의 특이적 감마 엘타 TCR 아이소타입의 감마 엘타 T 세포가 제공된다. 예를 들어, V δ 2^{pos} 하위유형이 HIV 및 인플루엔자 감염의 치료에서 가장 효율적일 수 있는 한편(Wallace M. et al., 1996, Tu W. et al. 2011), EBV 감염된 세포; V δ 1^{pos}(Farnault L, et al., 2013) 및 V δ 2^{pos} 세포(Xiang Z. et al., 2014)의 제어 하에 적어도 2개의 감마 엘타 T 세포 하위유형의 역할에 대한 증거가 존재한다. 적합하게, 감마 엘타 T 세포 치료의 효과를 증가시키도록, 감마 엘타 T 세포 하위유형의 조합이 선택되고 환자에게 투여될 수 있다. 적합하게, 이것은 명확한 배양 조건을 이용하여 생성된 단일 아이소타입 감마 엘타 T 세포 집단 또는 세포 배양 매개변수의 한정된 단일 세트를 이용하여 수반하여 생성된 다가 감마 엘타

T 세포 집단을 포함할 수 있다.

[0141] 실시형태에서, 자가유래로 또는 동종이계로 대상체를 치료하는 데 사용하기 위한, 감마 델타 T 세포, 특히 Vg9Vd2 세포 및 피로포스페이트/포스포네이트 약물이 제공된다.

[0142] 하기 단계를 포함하는 대상체에게 자가유래로 감마 델타 T 세포를 제공하기 위한 공정이 또한 제공된다:

[0143] - 대상체로부터 감마 델타 T 세포의 샘플을 제공하는 단계;

[0144] - 대상체에게 다시 투여되게 허용되도록, 감마 델타 T 세포를 배양하는 단계, 상기 배양 단계는 CAR 변형된 감마 델타 T 세포, 바람직하게는 본 명세서에 기재된 바대로 '동시자극' 또는 'TCR-동조 가능' CAR을 제공하도록 감마 델타 T 세포를 변형시키는 단계를 포함한다.

[0145] 상기 기재된 제공하고 배양하는 임의의 단계는 본 발명의 감마 델타 T 세포에 적용될 수 있다. 예를 들어, 감마 델타 T 세포를 배양하는 단계는 상기 기재된 바대로 감마 델타 T 세포 표면 수용체 프로파일을 변경하는 단계를 포함할 수 있다.

[0146] 개체에서 감염 또는 암을 치료하는 방법이 또한 제공되고, 상기 방법은 그 개체로부터 얻은 감마 델타 T 세포를 상기 개체에게 제공하는 단계를 포함하고, 감마 델타 T 세포는 본 발명에 의해 기재된 바와 같은 공정에 의해 제공된다.

[0147] 실시형태에서, 암은 골수종 또는 흑색종일 수 있다. 실시형태에서, 암은 종양 유형, 예컨대 위암, 신장 세포 암 종, 간세포 암종, 췌장 암, 급성 골수성 백혈병, 다수의 골수종 및 급성 림프아구성 백혈병, 비소세포 폐암, EBV-LPD, 벼킷 림프종 및 호지킨 질환을 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0148] 본 발명의 추가의 양태에 따라, 본 발명에서 사용되는 바와 같은 단리된 감마 델타 T 세포, 특히 적어도 하나의 동시자극 CAR을 포함하는 Vg9Vd2 세포가 제공된다. 실시형태에서, 자가유래로 또는 동종이계로 대상체를 치료하기 위해 병용하여 사용하기 위한 키트로서, 적어도 하나의 동시자극 CAR 및 피로포스페이트/포스포네이트 약물을 포함하는 단리된 감마 델타 T 세포, 특히 Vg9Vd2 세포, 구체적으로 감마 델타 T 세포, 예를 들어 Vg9Vd2 세포가 제공된다.

[0149] 본 발명의 추가의 양태에 따라, 본 발명의 또는 본 발명의 임의의 공정의 감마 델타 T 세포를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.

[0150] 실시형태에서, 조성물은 치료학적 효과를 제공하도록 개체에게 제공하기에 적합한 감마 델타 T 세포의 통일된 용량을 제공한다.

[0151] 실시형태에서, 약제학적 조성물은 사람마다 25×10^9 개 초파의 감마 델타 T 세포의 전체 용량을 포함할 수 있다.

[0152] 실시형태에서, 암의 치료에서 사용하기 위한, 본 발명의 감마 델타 T 세포 및 항체 면역치료제를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.

[0153] 실시형태에서, 항체 면역치료제는, 예를 들어 Roche 및 Bristol Myers Squibb가 개발한 것과 같은, PD-1, PDL-1 및/또는 CTLA-4 저해제, PD-1, PDL-1 및 CTLA-4 저해제와 같은 면역 캐스케이드 차단제일 수 있다.

[0154] 실시형태에서, 약제학적 조성물은 CTLA-4 저해 신호를 차단할 수 있는 항체를 포함할 수 있다. CTLA-4 신호의 차단은 T 림프구가 세포를 인식하고 파괴하도록 허용한다. 실시형태에서, 이러한 항체는 이필리무맙(MDX-010, MDX-101)일 수 있다.

[0155] 실시형태에서, 항체는 프로그래밍된 사멸-리간드 1(PDL-1)을 저해할 수 있다. 실시형태에서, 이러한 항체는 MPDL3280A(Roche) 또는 MDX-1105로부터 선택될 수 있다.

[0156] 실시형태에서, 약제학적 조성물은 사이토카인, 예를 들어 IL-2 또는 IL-12와 조합될 수 있다. 실시형태에서, 약제학적 조성물은 인터페론 감마를 포함한다.

[0157] 실시형태에서, 암의 치료에서 사용하기 위한, 본 발명의 감마 델타 T 세포 및 화학치료제를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.

[0158] 실시형태에서, 바이러스의 치료에서 사용하기 위한, 본 발명의 감마 델타 T 세포 및 치료제를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.

- [0159] 실시형태에서, 약제학적 조성물은 암 또는 감염을 위한 치료학적 또는 예방학적 물질로서 사용될 수 있다.
- [0160] 본 발명의 실시형태에서, 감마 델타 T 세포는 $\gamma\delta$ T 세포일 수 있다.
- [0161] 적합하게, 실시형태에서, 본 발명은 한정된 항원 특이성의 T 세포 또는 T 세포 유사 세포, 예를 들어 α -GalCer에 대한 특이성을 가지는 NKT 세포, 또는 예를 들어, 비타민 B 관련 항원에 대한 특이성을 가지는 점막 연관 비변이체 T(mucosal-associated invariant T: MAIT) 세포에 대한 동시자극 CAR 서열의 제공을 포함할 수 있다. 실시형태에서, (전통적인(기능적 CD3 제타 도메인을 포함하는) 또는 동시자극(비기능적/부재한(즉, 존재하지 않는) CD3 제타 도메인을 가지는)) CAR은 $\gamma\delta$ T 유사 세포에 제공될 수 있고, 여기서 $\gamma\delta$ T 유사 세포는 기능적 감마 델타 T 세포 수용체를 발현하도록 유전적으로 조작된 $\alpha\beta$ T 세포이다. 적합하게, 이러한 변형된 세포는 본 발명의 양태를 형성한다. 실시형태에서, (전통적인 또는 동시자극) CAR은 $\gamma\delta$ T 유사 세포에 제공될 수 있고, 여기서 $\gamma\delta$ T 유사 세포는 기능적 감마 델타 T 세포 수용체를 발현하도록 유전적으로 조작된 임의의 T 세포이다. 적합하게, 이러한 변형된 세포는 본 발명의 양태를 형성한다.
- [0162] 실시형태에서, (비기능적/부재한 CD3 제타 도메인을 가지는) 동시자극 CAR은 한정된 항원 특이성을 가지는 T 세포 수용체가 (종래의 또는 비종래의) 임의의 T 세포에 제공될 수 있다. 이러한 변형된 세포는 본 발명의 양태를 형성한다. 적합하게, 본 발명의 제1 양태와 관련하여 기재된 실시형태는 본 발명의 추가의 양태인 이 변형된 세포에 적용될 수 있다. 적합하게, 이러한 변형된 세포는 본 발명의 제1 양태 및 이 실시형태의 세포와 관련하여 본 명세서에 기재된 바대로 사용될 수 있다.
- [0163] 본 발명의 각각의 양태의 바람직한 특징 및 실시형태는, 달리 요구하지 않는 한, 필요한 부분만 약간 수정하여 다른 양태의 각각에 대해서 그렇다.
- [0164] 본문에서 인용된 각각의 문헌, 참고문헌, 특히 출원 또는 특허는 그 전문이 참고문헌으로 본 명세서에 명확히 포함되고, 이것은 본문의 일부로서 독자가 이것을 판독하고 생각해야 한다는 것을 의미한다. 본문에서 인용된 그 문헌, 참고문헌, 특히 출원 또는 특허는 단지 간결의 이유로 본문에서 반복되지 않는다.
- [0165] 문헌에 함유된 인용 자료 또는 정보의 언급은 그 자료 또는 정보가 일반 상식의 일부이거나 임의의 나라에서 공지된다는 인정으로서 이해되지 않아야 한다.
- [0166] 본 명세서에 걸쳐, 달리 요구하지 않는 한, 용어 '포함한다' 또는 '함유한다', 또는 변형, 예컨대 '포함' 또는 '함유', '포함하는' 또는 '함유하는'은, 임의의 다른 정수 또는 정수의 군의 배제가 아니라, 기재된 정수 또는 정수의 군의 포함을 의미하도록 이해될 것이다.
- [0167] 본 발명의 실시형태는 첨부한 도면을 참조하여 오직 예로서 이제 기재될 것이고, 여기서
- [0168] **도 1.** (1a) 전통적인 CAR을 발현하는 V감마9 하위유형의 $\gamma\delta$ T 세포의 이점 및 단점의 도식적 표시를 제공한다. 이 $\gamma\delta$ T 세포는 CAR 촉발 항원을 발현하는 건강한 세포에 의해 활성화될 것이고, 이에 따라 "온 표적, 오프 종양" 특성이 놓이기 쉽다(상부 패널). 그러나, 이 세포는 CAR 및 $\gamma\delta$ TCR을 통한 이중 신호전달로 인해 CAR 표적화된 항원을 발현하는 감염된 또는 암 세포에 대한 증가한 활성화를 입증할 수 있다(하부 패널). (1b) 동시자극 CAR을 발현하는 V감마9 유형의 $\gamma\delta$ T 세포의 이점의 도식적 표시를 제공한다. 동시자극 CAR을 발현하는 $\gamma\delta$ T 세포는 (CD3제타 도메인/신호 1의 결여로 인해) "온 표적, 오프 종양" 특성이 없을 것이지만, 높은 수준의 인항원을 발현하는(따라서 $\gamma\delta$ TCR을 통해 신호 1을 제공) 감염된 또는 형질전환된 세포 및 CAR 촉발 항원에 대한 증가한 세포독성 활성을 유발할 것이다.
- [0169] **도 2.** 전통적인 및 동시자극 작제물 설계의 예시적인 실시형태를 제공한다. (A) GMCSF-R 분비 신호 도메인, CD19에 대해 표적화된 scFv, CD28 헌지, 막관통 및 활성화 도메인, CD137(4-1BB) 활성화 도메인 및 CD3ζ 활성화 도메인을 포함하는 전통적인 CAR 작제물 설계가 예시된다. (B) GMCSF-R 분비 신호 도메인, CD19에 대한 scFv, CD28 헌지, 막관통 및 활성화 도메인 및 CD137(4-1BB) 활성화 도메인을 포함하는 동시자극 CAR 작제물이 예시된다.
- [0170] **도 3.** 본 발명에서 사용된 전통적인 CAR 작제물의 서열을 제공한다. "전통적인"/"동조 불가" CAR의 뉴클레오타이드 서열(a) 및 아미노산 서열(b)이 제공된다. 기능적 도메인의 각각은 아미노산 서열 내에 주석이 달리고, 이것은 항-CD19 scFv 서열, CD28 헌지, 막관통, 세포내 활성화 도메인, CD137(4-1BB) 활성화 도메인 및 CD3ζ 세포내 활성화 도메인을 포함한다.
- [0171] **도 4.** 본 발명에서 사용된 동시자극 CAR 작제물의 서열을 제공한다. "동시자극"/"TCR-동조 가능" CAR의 뉴클레오타이드 서열(a) 및 아미노산 서열(b)이 제공된다. 기능적 도메인의 각각은 아미노산 서열 내에 주석이

달리고, 이것은 항-CD19 scFv 서열, CD28 헌지, 막관통, 세포내 활성화 도메인 및 CD137(4-1BB) 활성화 도메인을 포함한다.

[0172] **도 5.** 전통적인 및 동시자극 CAR 둘 다에 존재하는 CD28 서열 및 CD137(4-1BB) 서열에 걸친 표적을 증폭시키도록 설계된 보편적 프라이머 쌍을 예시한다. 차별적 프라이머 쌍은 CD137(4-1BB) 서열 및 CD3 ε 활성화 도메인을 함유하는 서열로부터 앰플리콘을 생성하도록 설계되었고, 따라서 동시자극 CAR 뉴클레오타이드 서열이 아닌 전통적인 CAR로부터의 생성물을 증폭시킬 수 있다. (A) 전통적인 CAR 및 동시자극 CAR 서열을 검출하기 위해 사용된 2개의 프라이머 쌍의 뉴클레오타이드 서열이 제공된다. (B) 전통적인 CAR 설계에 대한 보편적 및 차별적 프라이머에 대한 어닐링 위치의 확대된 예시. (C) 동시자극 CAR 설계에 대한 보편적 프라이머에 대한 어닐링 위치의 확대된 예시.

[0173] **도 6.** 전통적인 CAR 플라스미드($r^2 = 0.998$)(A) 및 동시자극 CAR 플라스미드($r^2 = 0.987$)의 표준 곡선을 생성하도록 보편적 프라이머를 사용한 연속 회석된 플라스미드 DNA의 qPCR 증폭을 예시한다. (C) 따라서, 보편적 프라이머 쌍은 qPCR에 의해 서열 둘 다의 수준을 정량적으로 검출하도록 사용될 수 있다. 바이러스에 의해 형질도입된 세포에서 qPCR을 수행하였다. PCR 증폭의 40회 사이클 후 수행된 용융 곡선 분석은, 프라이머 쌍 둘 다가 전통적인 CAR 형질도입된 세포로부터 유래한 RNA로부터의 단일 앰플리콘을 생성하는 한편(B), 오직 보편적 프라이머 쌍(연한 회색)이 동시자극 CAR 형질도입된 세포로부터 추출된 RNA로부터의 앰플리콘을 생성할 수 있다(D)는 것을 입증한다. 이 데이터는 프라이머 쌍 둘 다가 오직 하나의 생성물을 증폭시킨다는 점에서 특이적이고, 차별적 프라이머 쌍(어두운 회색)이 2개의 전사체 사이에 구별될 수 있다는 것을 입증한다.

[0174] **도 7.** 유세포계수법에 의해 CD19 표적 항원 발현에 대한 2개의 β 세포 림프종 세포주; Daudi(상부 패널) 및 Ramos(하부 패널) 버킷 림프종 세포를 평가하였다. 각각의 세포주 내의 98%의 세포는, MFI에 의해 결정된 바대로, 더 높은 강도/발현 수준을 디스플레이하는 Daudi 세포에 의해 CD19를 발현했다(A). 비형질도입된 $\gamma\delta$ T 세포와 비교하여, CD19⁺ 암 세포주에 대한 전통적인 CAR 작제물을 발현하는 V감마9 $\gamma\delta$ T 세포의 증가한 세포독성 능력이 관찰되었다. 콜레드론산에 의한 이의 자극 후 48시간에, 전통적인 CAR 서열을 함유하는 렌티바이러스 백터에 의해 PBMC를 형질도입하였다. 형질도입된 세포를 추가 7일 동안 증식시키고, 유세포계수법에 의해 CD19 양성 세포주 Daudi(상부 패널) 및 Ramos(하부 패널)에 대한 이의 세포용해 능력을 조사하였다. Daudi 및 Ramos 세포를 비독성 세포막 마커 PKH67에 의해 형광 표지하고, 이것은 유세포계수법에 의한 이의 검출을 허용한다. 형광성 표적 세포를 형질도입된 전통적인 CAR(오른손 측)(또는 비형질도입된) $\gamma\delta$ T 세포(왼손 측)에 의해 4.5시간 동안 동시배양하였다. 아넥신 V 및 PI 염색에 의해 표적 암 세포주의 생존능력을 평가하였다(B). 아넥신 V 또는 아넥신 V 및 PI를 발현하는 암 세포는 각각 초기 및 후기 아폽토시스로 생각된다. Daudi 세포는 $\gamma\delta$ T 세포 매개된 사멸에 대한 더 높은 상대 감수성(76.4%의 특정 세포 사멸)을 나타내고, Daudi 세포가 전통적인 CAR $\gamma\delta$ T 세포(86.4%의 특정 세포 사멸)와 동시배양될 때, 이것은 추가로 증가하였다. Ramos 세포는 $\gamma\delta$ T 세포 매개된 사멸(39%의 특정 세포 사멸)에 대해 비교적 덜 감수성이지만, Ramos 세포가 전통적인 CAR $\gamma\delta$ T 세포와 동시배양될 때 이것은 현저히 증대되었다. 상당히 더 높은 수준의 세포용해(55%의 특정 세포 사멸)가 관찰되었다. 이 데이터는, 전통적인 CAR을 발현하는 $\gamma\delta$ T 세포는, 비형질도입된 $\gamma\delta$ T 세포와 비교할 때, CD19 양성 암 세포주에 대해 증가한 세포용해 능력을 가진다는 것을 명확히 입증한다. 전통적인 CAR $\gamma\delta$ T 세포에 의한 특정 세포 사멸의 백분율 증가는, Daudi 세포주(약 13%)에서보다, Ramos 세포주(약 46%)에서 더 높았다(C). 이 데이터는 전통적인 CAR에 의해 형질도입된 $\gamma\delta$ T 세포가 세포용해에 대한 내성 세포주의 감수성을 증가시킬 수 있다는 것을 입증한다.

[0175] **도 8.** 백혈구성분채집술 재료로부터 단리된, PBMC를 5 μ M 콜레드론산 및 1000IU/ml IL-2에 의해 배양물로 개시시켰다. 배양 중 48시간 후, 바이러스 형질도입 효율을 증대시키기 위해 전통적인 CAR 작제물을 함유하고 5 μ g/ml 폴리브렌의 포함하는 렌티바이러스에 의해 10의 MOI로 세포를 형질도입하였다. 렌티바이러스 형질도입을 24시간 후 반복하였다(3일). 10일에, 항-CD3 및 항-V감마9 항체를 사용하여 $\gamma\delta$ T 세포의 순도에 대해 유세포계수법에 의해 세포를 평가하였다. 일치하게, 형질도입된 작제물과 무관하게 모든 세포 집단; 비형질도입된 대조군(81%의 $\gamma\delta$ T 세포), 전통적인 CAR(86%의 $\gamma\delta$ T 세포), 동시자극-CAR(89%의 $\gamma\delta$ T 세포)에서, 높은 순도의 $\gamma\delta$ T 세포 집단이 제조되었다(a). 5일에, RNA를 1x10⁵개 세포로부터 추출하고, 랜덤 육합체 및 역전사효소를 사용하여 cDNA를 합성하고, 이전에 기재된 SYBR 녹색 및 보편적 프라이머를 사용하여 qPCR을 수행하였다. 형질도입 후 5일에 형질도입된 세포에서 전통적인 CAR mRNA 및 동시자극 CAR mRNA의 CAR 전사체 발현의 상대 정량화는, CAR 전사체 발현의 동등한 수준이 작제물과 무관하게 형질도입된 세포에서 검출된다는 것을 입증한다(데이터는 18S 리보솜 RNA 수준으로 정규화되고, 레트로넥틴 기반 형질도입에서 CAR 발현에 대해 발현됨) (b). CD19

양성 세포주 Daudi 및 Ramos에 대해 이의 세포용해 능력에 대해 형질도입된 세포를 시험하였다. Daudi 및 Ramos 세포를 24시간 동안 $\pm 5\mu\text{M}$ 콜레드론산에 의해 전처리하고, 이후 유세포계수법에 의한 검출을 허용하는 비독성 세포막 마커 PKH67에 의해 형광으로 표지하였다. 형광성 표적 세포를 형질도입된 전통적인 CAR, 동시자극-CAR(또는 비형질도입된) $\gamma\delta\text{T}$ 세포와 4.5시간 동안 동시배양하였다. 아넥신 V 및 PI 염색에 의해 표적 암 세포주의 생존능력을 평가하였다. Daudi 세포는 $\gamma\delta\text{T}$ 세포 매개된 세포용해에 감수성이었고(36%의 특정 세포 사멸), 이것은 콜레드론산 전처리에 의해 상승하였다(48%의 특정 세포 사멸). Daudi 세포가 전통적인 CAR(64%의 특정 세포 사멸) 또는 동시자극 CAR(54%의 특정 세포 사멸)을 발현하는 $\gamma\delta\text{T}$ 세포와 동시항온처리될 때 아폽토시스의 수준이 추가로 증대되었다(c). 이것은, 단리 시 신호 둘 다를 제공할 수 없는, 동시자극 CAR이, 활성화된 $\gamma\delta\text{T}$ 세포의 상황에서 발현될 때 상가 효과를 나타낼 수 있다는 것을 입증한다. 이 관찰을 연장하기 위해, 덜 감수성인 Ramos 세포주를 사용하였다. $\gamma\delta\text{T}$ 세포가 이 세포에서 더 낮은 수준의 아폽토시스를 매개하는 한편(11%의 특정 세포 사멸), 콜레드론산 전처리는 효과가 없었다(10%의 특정 세포 사멸). 그러나, $\gamma\delta\text{T}$ 세포가 전통적인 CAR(25%의 특정 세포 사멸) 또는 동시자극 CAR(30%의 특정 세포 사멸)에서 발현될 때 아폽토시스의 수준은 현저히 증대되었다(d). 이 데이터는 활성화된 $\gamma\delta\text{T}$ 세포의 상황에서 항원 관련될 때 CD3 ζ 결합된 CAR(즉, 동시자극 CAR)의 기능에 대한 추가의 지원을 제공한다.

[0176] 실시예

[0177] 실시예 1

PBMC를 백혈구성분채집술 재료로부터 밀도 원심분리(림포프렙)에 의해 단리하고 저온보존하였다. PBMC를 소생시키고, 콜레드론산($5\mu\text{M}$) 자극된 PBMC를 성장 배지 중에 IL-2(1000IU/ml) 및 5% 인간 AB 혈청의 존재 하에 배양하였다. 배양(37°C , 5% CO_2 , 습한 대기) 중 48시간 후, 세포를 10의 MOI에서 전통적인 CAR 서열(항-CD19 scFv-CD28-CD137-CD3 ε) 또는 동시자극 CAR 서열(항-CD19 scFv-CD28-CD137)을 가지는 렌티-CMV-MCS-EF1a-퓨로 작제물 및 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 폴리브렌을 함유하는 렌티바이러스에 의해 형질도입하였다. 형질도입을 24시간 후 반복하였다. 5일에 작제물 둘 다의 발현을 검출한 보편적 프라이머를 사용하여 QPCR에 의해 CAR mRNA 발현을 검증하였다. (도 5, 도 6에 따라) 차별적 프라이머 및 보편적 프라이머의 조합을 이용하여 각각의 작제물의 특이적 발현이 확인되었다.

[0179] 실시예 2

세포를 전통적인 CAR 서열을 함유하는 렌티바이러스에 의해 형질도입하고, 실시예 1에 기재된 바대로 증식시켰다. 형질도입 후 7일에, 형질도입된 또는 비형질도입된 $\gamma\delta\text{T}$ 세포를 CD19 양성 표적 세포주, Daudi 또는 Ramos와 동시배양함으로써 세포독성 활성을 평가하였다. 유세포계수법을 이용하여 CD19 표적 집단의 특정한 가시화를 위해 표적 세포주를 비독성 막 염료 PKH67($5\mu\text{M}$)에 의해 염색하였다. $\gamma\delta\text{T}$ 세포 또는 전통적인 CAR을 발현하는 $\gamma\delta\text{T}$ 세포와 4.5시간 동시항온처리 후, 동시배양물을 아넥신 V 및 프로파이드 요오다이드(PI)에 의해 염색하여 아폽토시스 세포를 가시화하였다. 오직 표적 세포 집단에서 특정 세포 사멸(%)을 계산하였다. CAR 형질도입된 $\gamma\delta\text{T}$ 세포는, 비형질도입된 $\gamma\delta\text{T}$ 세포와 비교하여, CD19 양성 표적 세포에서 증가한 효력을 유발하였다(도 7).

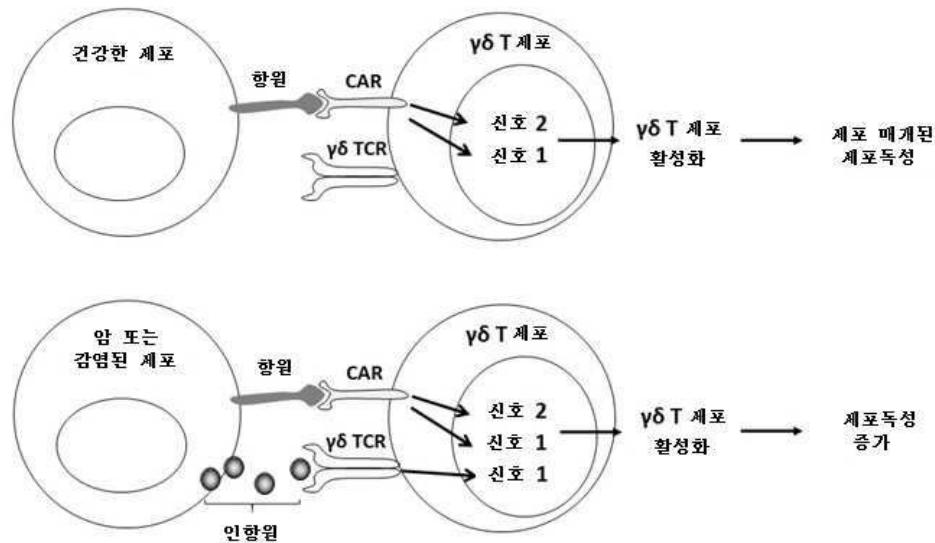
[0181] 실시예 3

세포를 전통적인 CAR 또는 동시자극 CAR 서열을 함유하는 렌티바이러스에 의해 형질도입하고, 실시예 1에 기재된 바대로 증식시켰다. CD19 양성 표적 세포주 Daudi 및 Ramos를 $\pm 5\mu\text{M}$ 콜레드론산에 의해 24시간 동안 전처리하였다. 세포독성 활성을 실시예 2에 기재된 바대로 평가하였다. PKH67 염색된 표적 세포(\pm 조메타 전처리)를 형질도입된 또는 비형질도입된 $\gamma\delta\text{T}$ 세포와 동시배양하였다. 동시자극 CAR을 발현하는 $\gamma\delta\text{T}$ 세포는, CD3 ζ 활성화 도메인의 부재에도 불구하고, 전통적인 CAR을 발현하는 $\gamma\delta\text{T}$ 세포로서 CD19 양성 표적 세포에 대해 유사한 세포독성을 나타냈고, 신호 1은 대신에 IPP 감지에 의해 $\gamma\delta\text{T}$ TCR을 통해 활성화를 통해 제공되었다. CAR 둘 다는, 비형질도입된 $\gamma\delta\text{T}$ 세포와 비교할 때, $\gamma\delta\text{T}$ 세포에 대해 증대된 세포독성을 제공하였다(도 8).

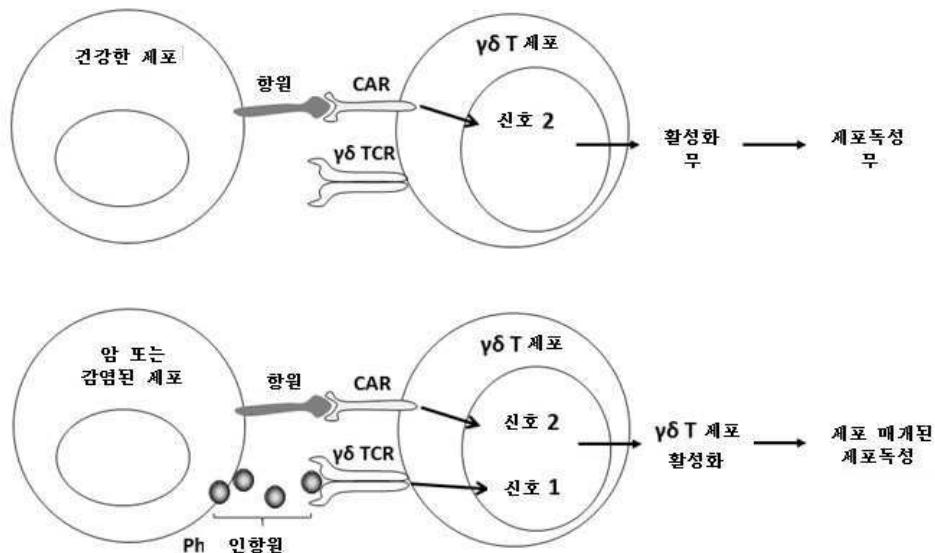
[0183] 본 발명이 특정한 실시예를 참조하여 특별히 도시되고 기재되어 있지만, 본 발명의 범위로부터 벗어남이 없이 형태 및 설명의 다양한 변화가 이루어질 수 있는 것으로 당해 분야의 당업자에 의해 이해될 것이다.

도면

도면1a

전통적인 CAR을 발현하는 $\gamma\delta$ T 세포의 세포독성 기전

도면1b

동시자극 CAR을 발현하는 $\gamma\delta$ T 세포의 세포독성 기전

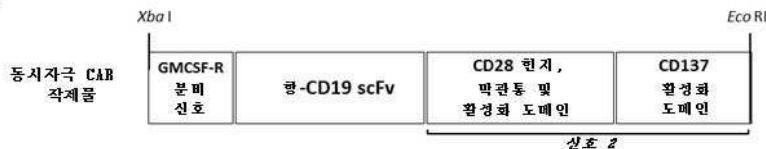
도면2

전통적인 및 동자자극 CAR 설계의 예시적인 비교

A



B



도면3a

'동조 불가'/'전통적인' CAR의 핵산 서열

ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTCTGCTCTGAGATTACACACCCAGCATTCCCTGATCCCAGACATCCAGATG
 ACACAGACTACATCCTCCCTGCTGCTCTGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGAGGGCAAGTCAGGACATTAGT
 AAATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACAGAGTGGAACTTAACTCCCTGATCTACCATACATCAAGATTACACTCA
 GGAGTCCCACCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTGGGAACAGATTATTCTCTCACATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGAT
 ATTGCCACTTACTTTGCCAACAGGTAATAGCCTTCGTAACGTTGGAGGGGACTAAGTGGAAATAACAGGC
 TCCACCTCTGGATCCGGCAAGCCGGATCTGGCAGGGATCACCAGGGCAGGGTGAAACTGCAGGAGTCAGGACCT
 GGCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCGTACATGCACTGTCTCAGGGGCTCATTACCCGACTATGGTGAAGC
 TGGATTGGCACGCTCCACAGAAAGGGTCTGGAGTGGAGTGGAGTAAATGGGGTAGTGAAACACACATACTAATTCA
 GCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACAATCTAACAGAGCCAAGTTCTTAAATGAACAGTCTGCAAAC
 GATGACACAGCCTTACTACTGTGCCAACATTAACTACGGTGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGTCAAGGA
 ACCTAGTCACCGTCTCCCTAGCGGCCGAATTGAGTTATGCTCTCTACCTAGACAATGAGAACAGCAAT
 GGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTGCTCAAGTCCCTATTCCGGACCTCTAAAGCCCTTTGGGTG
 CTGGTGGTGGTGGGGAGTCTGGCTTAGCTAGCTAGTAAACAGTGGCTTATTATTTCTGGGTGAGGAGT
 AAGAGGAGCAGGCTCCACAGCAGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCA
 CCCTATGCCAACACGGGACTTCGAGCTATGCCAAACAGGGGAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAA
 CCATTATGAGACCAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGAGCTGGCGATTCCAGAAGAAGAAGGAGGAGGA
 TGTGACTGAGAGTGAAGTCAAGCAGGGAGCAGCAGCCCCCGCTACAGCAGGGCAGAACAGCTCTAAACGAG
 CTCATCTAGGAGCAAGAGAGGAGTACGATGTTGGACAAGAGACGTGGGGGGACCTGAGATGGGGGAAAGCCG
 AGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCGTACAATGAACATGCAAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGG
 ATGAAAGGCAGCGCCGGAGGGCAAGGGGACGATGGCTTACAGGGCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTAC
 GACGCCCTCACATGCAGGCCCTGCCCTCGCTAATGA (서열 번호 1)

도면3b

'동조 불가'/'전통적인' CAR의 변역된 단백질 서열

<분비 신호> (서열 번호 2)
 MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP

<항-CD19 scFv> (서열 번호 3)
 DIQMKTQTSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGTDYSLTISNL
 EQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSKPGSGEGSTKGEVKLQESGPLVAPSQSLSVTCSVGSVSLPD
 YGVSWIRQPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIDNSKSQVFLKMNSLQTDATIYYCAKHYYYGGSYAMDY
 WGQGTSVTVSSAAA

<CD28 헌자, 막관통 도메인, 동자자극 도메인> (서열 번호 4)
 IEVMYPPYLDEKNSNTIIVHKGHLCPSPLFPGPSKPFVWLVVGGVLACYSLLVTVAIFIIFWVRSKRSRLHSYD
 MNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS

<CD137 (4-1BB) 동자자극 도메인> (서열 번호 5)
 KRGRKKLLYIFKQPFMRPVTTQEEDGCSRFPEEEEGGCEL

<CD3 제타 활성화 도메인> (서열 번호 6)
 RVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMMAEAYSEIGMKG
 ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

도면4a

'TCR 동조 가능'/'동시자극' CAR의 핵산 서열

ATGCTTCTCCTGGTACAAGCCTCTGCTCTGTGAGTTACCACCCAGCATTCCCTGATCCCAGACATCCAGATG
 ACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGT
 AAATATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAAGATGAACTGTTAAACTCCTGATCTACCATACTCAAGATTACACTCA
 GGAGTCCCACATCAAGGTTAGTGGCAGTGGAACAGATTATTCCTCACCATAGCAACCTGGAGCAAGAAGAT
 ATTGCCACTTACCTTGCACAGGGTAACAGCTTCCGTACACGTTGGAGGGGACTAAGTTGGAAATAACAGGC
 TCCACCTCTGGGACGGGATCTGGCAGGGAGTCAAGGGCAGGGACTAAGTTGGAAATAACAGGC
 GGCTGGTGGCCCTCACAGAGGGTCTGGAGTGGCTGGAGTAATATGGGTAGTGAACACACATACTATAATTCA
 GCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCAAGAGCCAAGTTCTTAAAGAACAGTCTGCAAAC
 GATGACACAGCCATTACTACTGTGCAAACATTATTACTACGGTTGAGCTATGCTATGGACTACTGGGTCAAGGA
 ACCTCAGTCACCGTCTCTCAGCGGCCGAATTGAAGTTATGTATCCTCCTTACCTAGACAAATGAGAAGAGCAAT
 GGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTGTCCAAGTCCCTATTCGGGACCTTCTAAGCCCTTGGGT
 CTGGTGGTGGTTGGGGAGTCCTGGCTTGTAGCTAGTAACAGTGGCTTATTATTTCTGGGTAGGAGT
 AAGAGGAGCAGGCTCTGCACAGTGAACATGACTCCCCGCCGGGCCACCCGAAGCATTACAG
 CCCTATGCCACCACCGCAGCTCGCAGCCTATCGCTCAAACGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAA
 CCATTATGAGACAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGAGCTGCCATTCCAGAAGAAGAAGAGGAGGA
 TGTGAACGTAAATGA (서열 번호 7)

도면4b

'TCR 동조 가능'/'동시자극' CAR의 변역된 단백질 서열

<분비 진호> (서열 번호 8)
 MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIP

<항 - CD19 scFv> (서열 번호 9)

DIQMTQTSSLASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSQTDYSLTISNL
 EQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKEITGSTSGSKPGSSEGSTKGEVKLQESGPLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPD
 YGVSWIRQPPRKGLEWLGLVIGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDIAIYYCAKHYYYGGSYAMDY
 WQQGTSVTVSSAAA

<CD28 헌지, 막관통 도메인, 동시자극 도메인> (서열 번호 10)

IEVMPYPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAIFIIFWVRSKRSRLHSDY
 MNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS

<CD137 (4-1BB) 활성화/동시자극 도메인> (서열 번호 11)
 KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEEDGCSRPFEEEEGGCEL

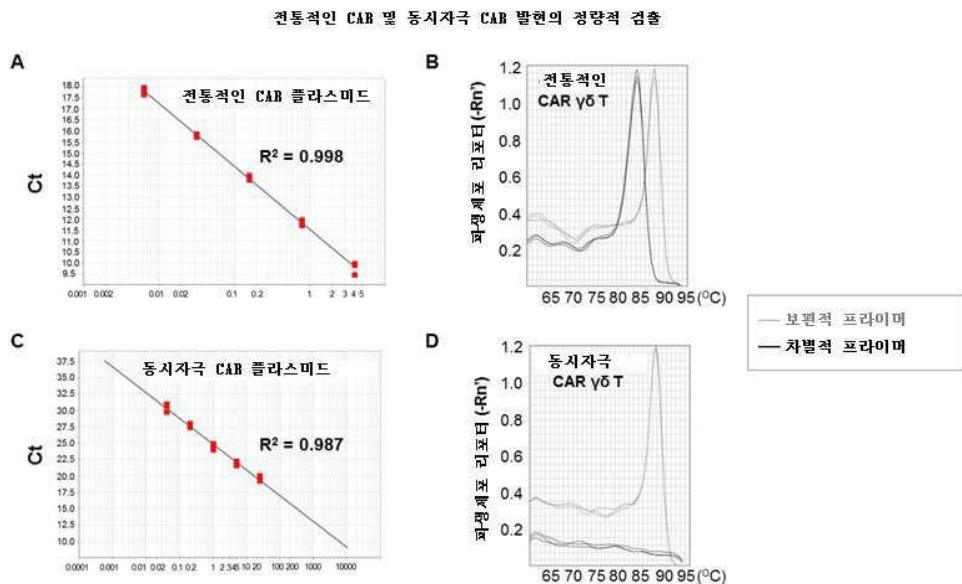
도면5

정량적 PCR에 의한 CAR 발현을 검출하기 위해 사용된 프라이머

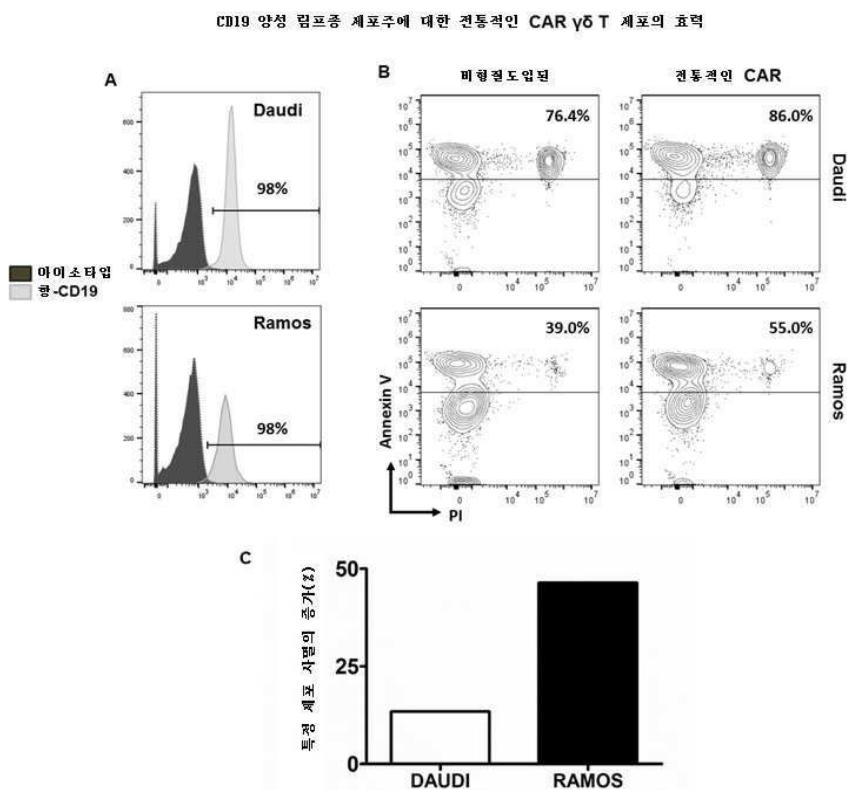
A	보편적 프라이머	정방향	5'-GCTCCTGCACAGTGACTACAT-3'	서열 번호 12
		역방향	5'-GGAGTTCTTCTGCCCCGT-3'	서열 번호 13
B	차별적 프라이머	정방향	5'-CTGTAGCTGCCGATTTCCAGA-3'	서열 번호 14
		역방향	5'-CATCGTACTCCTCTCTCGTCC-3'	서열 번호 15



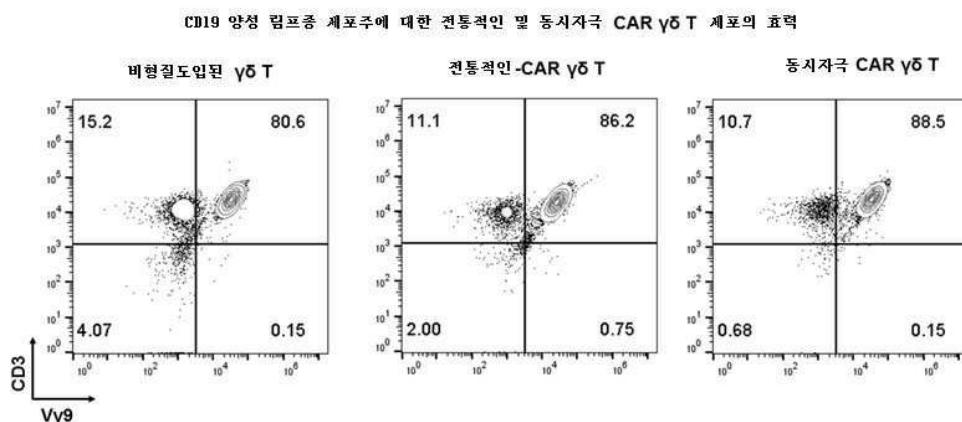
도면6



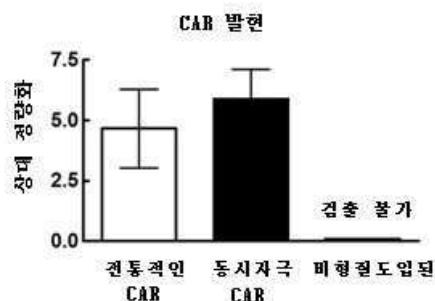
도면7



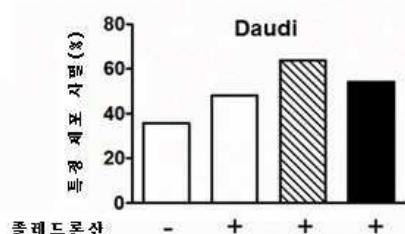
도면8a



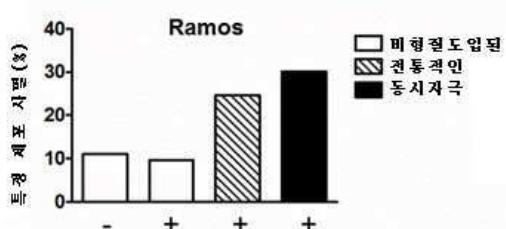
도면8b



도면8c



도면8d



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> TC BIOPHARM LTD

<120> MODIFIED GAMMA DELTA T CELLS AND USES THEREOF

<130> WO2016/166544

<140> PCT/GB2016/051050

<141> 2016-04-14

<150> GB1506423.1

<151> 2015-04-15

<150> PCT/GB2015/051985

<151> 2015-07-08

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1599

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid sequence of non-tunable / classical CAR

<400> 1

atgcttcctcc tggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacaccaggc attcctctg 60

atcccaagaca tccagatgac acagactaca tcctccctgt ctgcctctct gggagacaga 120

gtcaccatca gtgcaggc aagtctggc attagtaat atttaaattt gtatcaggc 180

aaaccaggatg gaactgttaa actcctgtatc taccatacat caagattaca ctcaggagtc 240

ccatcaaggat tcagtggcag tgggtctgga acagattatt ctctcaccat tagcaacctg 300

gagcaagaag atattttccat ttacttttgc caacagggtt atacgcttcc gtacacgttc 360

ggagggggga ctaagttgga aataacaggc tccacctctg gatccggcaa gcccggatct 420

ggcgaggat ccaccaaggg cgaggtgaaa ctgcaggagt caggacctgg cctggtgccg 480

ccctcacaga gcctgtccgt cacatgcact gtctcagggt tctcattacc cgactatgg 540

gtaagctgga ttgcgcagcc tccacgaaag ggtctggagt ggctgggagt aatatgggt 600

agtgaaacca catactataa ttcaagcttc aaatccagac tgaccatcat caaggacaac 660

ttccaagagcc aagttttctt aaaaatgaac agtctgaaa ctgatgacac agccattac 720

tactgtgcca aacattatta ctacgggtt agctatgcta tggactactg gggtaagga 780

acctcagtca ccgtctccctc agcggccgca attgaagttt tgcattctcc tccttaccta 840

gacaatgaga agagcaatgg aaccattatc catgtgaaag gaaacacctt ttgtccaagt 900

cccttatttc ccggaccccttc taagcccttt tgggtgctgg tgggtggttgg gggagtcctg 960
 gcttgctata gcttgctagt aacagtggcc tttattat tctgggtgag gagtaagagg 1020
 agcaggctcc tgcacagtga ctacatgaac atgactcccc gccgccccgg gcccacccgc 1080
 aagcattacc agccctatgc cccaccacgc gacttcgcag cctatcgctc caaacggggc 1140
 agaaagaaac tcctgtatat attcaaaca ccattatga gaccagtaca aactactcaa 1200
 gaggaagatg gctgttagctg ccgatttcca gaagaagaag aaggaggatg tgaactgaga 1260
 gtgaagttca gcaggagcgc agacgcccc gcgtaccagc agggccagaa ccagcttat 1320

aacgagctca atctaggacg aagagaggag tacgtgttt tggacaagag acgtggccgg 1380
 gaccctgaga tgggggaaa gccgagaagg aagaaccctc aggaaggcct gtacaatgaa 1440
 ctgcagaaag ataagatggc ggaggcctac agttagatg gatgaaagg cgagcggcgg 1500
 agggcaagg ggcacgatgg ctttaccag ggtctcagta cagccaccaa ggacacctac 1560
 gaccccttc acatgcagggc cctgccccct cgctaatga 1599

<210> 2

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Secretion Signal

<400> 2

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

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro

20

<210> 3

<211> 248

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-CD19 scFv

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20	25	30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile		
35	40	45
Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln		
65	70	75
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr		
85	90	95
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Ser Thr Ser Gly		
100	105	110
Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Glu Val Lys		
115	120	125
Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser		
130	135	140
Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser		
145	150	155
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile		
165	170	175
Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu		
180	185	190
Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn		
195	200	205
Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr		
210	215	220
Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser		
225	230	235
Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala		
245		
<210> 4		
<211> 107		

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 hinge transmembrane domain co-stimulatory domain

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn

65 70 75 80

Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr

85 90 95

Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

100 105

<210> 5

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD137 4-1BB co-stimulatory domain

<400> 5

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met

1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe

20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Cys Glu Leu

35 40

<210> 6

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3 zeta activation domain

<400> 6

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

1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys

35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys

50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

100 105 110

<210> 7

<211> 1263

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid sequence of TCR-tuneable / co-stimulatory CAR

<400> 7

atgcttcctcc	tggtgacaag	ccttctgctc	tgtgagttac	cacaccagc	attccctctg	60
atcccaagaca	tccagatgac	acagactaca	tcctccctgt	ctgcctctct	gggagacaga	120
gtcaccatca	gttgcagggc	aagtcaaggac	attagtaaat	atttaaattt	gtatcagcag	180
aaaccagatg	gaactgttaa	actcctgatc	taccatacat	caagattaca	ctcaggagtc	240
ccatcaaggt	tcaagtggcag	tgggtctgga	acagattatt	ctctcaccat	tagcaacctg	300

gagcaagaag	atattgccac	ttactttgc	caacaggta	atacgcttcc	gtacacgttc	360
ggagggggga	ctaagttgga	aataacaggc	tccacctctg	gatccggcaa	gcccgatct	420
ggcgaggat	ccaccaaggg	cgaggtgaaa	ctgcaggagt	caggacctgg	cctgggtggcg	480

ccctcacaga gcctgtccgt cacatgcact gtctcagggg tctcattacc cgactatggt	540
gtaagctgga ttcgcagcc tccacgaaag ggtctggagt ggctgggagt aatatgggt	600
agtgaaacca catactataa ttcaagtcctc aaatccagac tgaccatcat caaggacaac	660
tccaaagagcc aagtttctt aaaaatgaac agtctgaaa ctgatgacac agccattac	720

tactgtgcca aacattatta ctacgggtggt agctatgcta tggactactg gggtaagga	780
acctcagtca ccgtctcctc agcggccgca attgaagtta tgtatccctc tccttaccta	840
gacaatgaga agagcaatgg aaccattatc catgtgaaag gaaacacct ttgtccaagt	900
cccttatttc ccggacccccc taagccctt tgggtgctgg tgggtgtgg gggagtcctg	960
gcttgctata gcttgttagt aacagtggcc tttattat tctgggttagt gagtaagagg	1020
agcaggctcc tgacagtga ctacatgaac atgactcccc gcccacccgc	1080
aaggattacc agecctatgc cccaccacgc gacttcgag cctatcgctc caaacgggc	1140

agaaagaaac tcctgtatat attcaaacaa ccatttatga gaccagtaca aactactcaa	1200
gaggaagatg gctgttagctg ccgatttcca gaagaagaag aaggaggatg tgaactgtaa	1260
tga	1263

<210> 8

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Secretion signal

<400> 8

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

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro

20

<210> 9

<211> 248

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Anti-CD19 scFv

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu

180 185 190

Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn

195 200 205

Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr

210 215 220

Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

225 230 235 240

Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala

245

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 hinge transmembrane domain co-stimulatory domain

<400> 10

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn

65 70 75 80

Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr

85 90 95

Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

100 105

<210> 11

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD137 4-1BB co-stimulatory domain

<400> 11

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met

1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe

20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Cys Glu Leu

35 40

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Universal primer - forward

<400> 12

gctcctgcac agtgactaca t 21

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Universal primer - reverse

<400> 13

ggagtttctt tctgccccgt 20

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Discriminatory primer - forward

<400> 14

ctgttagctgc cgatttccag a 21

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Discriminatory primer - reverse

<400> 15

catcgtaactc ctctttcggt cc 22