



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0133732  
(43) 공개일자 2019년12월03일

- |   |  |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/>C12N 5/0783 (2010.01) A61K 35/17 (2014.01)<br/>A61K 38/00 (2006.01) A61P 31/00 (2006.01)<br/>A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/54 (2006.01)<br/>C07K 16/28 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/>C12N 5/0646 (2013.01)<br/>A61K 35/17 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2019-7031746</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2018년03월27일<br/>심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2019년10월25일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/SG2018/050138</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2018/182511<br/>국제공개일자 2018년10월04일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>62/477,311 2017년03월27일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인<br/>싱가포르국립대학교<br/>싱가포르 119077, 싱가포르 로어 켄트리지로드 21</p> <p>(72) 발명자<br/>카미야, 타카히로<br/>싱가포르, 119077 싱가포르, 로어 켄트 리지 로드 21, 싱가포르국립대학교, 용루 린 의과대학 내<br/>캄파나, 다리오<br/>싱가포르, 119077 싱가포르, 로어 켄트 리지 로드 21, 싱가포르국립대학교, 용루 린 의과대학 내</p> <p>(74) 대리인<br/>이희숙, 김석만</p> |
|---|--|

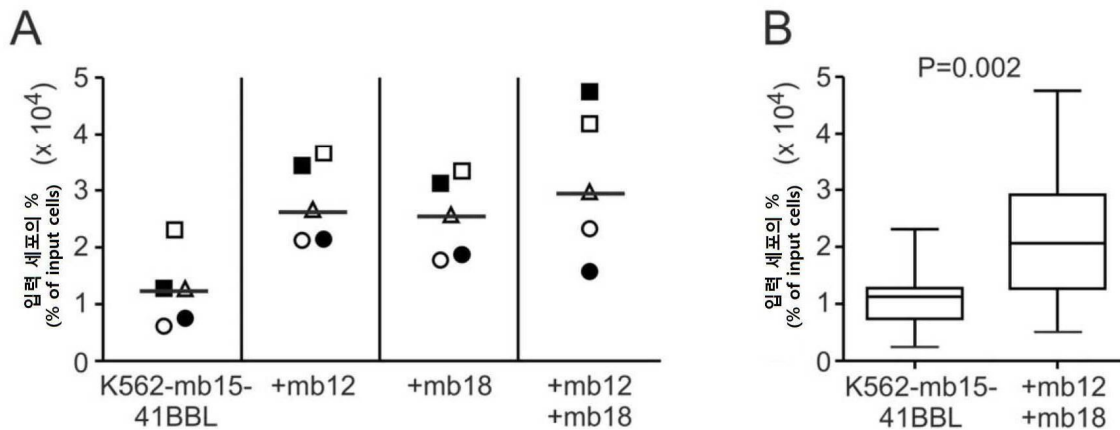
전체 청구항 수 : 총 102 항

(54) 발명의 명칭 자연 살해 세포의 EX VIVO 확장 및 활성화를 위한 자극성 세포주

(57) 요약

본원에 기재된 몇몇 실시양태는 NK 세포 및 T 세포를 포함하는 혼합된 세포 배양물에서 자연 살해(Natural Killer, NK) 세포를 우선적으로 확장시키도록 조작된 자극성 세포주에 관한 것이다. 혼합된 세포 배양물과 자극성 세포주의 공동-배양으로부터 유래된 NK 세포 집단은 또한 몇몇 실시양태에서 제공된다. 혼합된 세포 배양물에서 NK 세포를 우선적으로 확장시키기 위한 자극성 세포주의 용도는 또한 몇몇 실시양태에서 제공된다.

대표도



(52) CPC특허분류

*A61K 38/00* (2013.01)

*A61P 31/00* (2018.01)

*A61P 35/00* (2018.01)

*C07K 14/54* (2013.01)

*C07K 14/5434* (2013.01)

*C07K 16/2809* (2013.01)

*C07K 2317/622* (2013.01)

*C12N 2502/30* (2013.01)

*C12N 2510/00* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

주요 조직 적합성 복합체(major histocompatibility complex, MHC) I 분자를 발현하지 않는 유전자-조작된 세포 집단으로서,

불멸성 세포(immortalized cell)로부터 유래하며,

상기 조작된 세포 집단은 막-결합된 인터루킨-15(membrane-bound interleukin-15, mbIL15)를 발현하도록 변형되고,

상기 조작된 세포 집단은 막-결합된 4-1BB 리간드(membrane-bound 4-1BB ligand, 4-1BBL)를 발현하도록 변형되고,

상기 조작된 세포 집단은 면역 세포 활성화를 자극하는 적어도 하나 이상의 추가적인 막-결합된 인터루킨을 발현하도록 변형되고,

상기 조작된 세포 집단은 주요 조직 적합성 복합체(MHC) I 분자를 발현하지 않으며,

상기 조작된 세포 집단과 면역 세포 집단의 공동-배양(co-culture)은 면역 세포의 적어도 하나의 서브집단의 활성화 및 확장을 야기하는, 주요 조직 적합성 복합체(MHC) I 분자를 발현하지 않는 유전자-조작된 세포 집단.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 mbIL15는 서열번호 1로 표시되는 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩되는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 4-1BBL은 서열번호 13으로 표시되는 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩되는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 각각의 막 결합 분자는 인간 CD8 α의 막전위 도메인(transmembrane domain)에 커플링되는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

#### 청구항 5

제4항에 있어서, 상기 인간 CD8 α의 막전위 도메인은 서열번호 18의 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조작된 세포 집단은 K562 세포, Wilms 종양 세포주(Wilms tumor cell line) HFWT, 자궁내막 종양 세포주(endometrial tumor cell line) HHUA, 흑색종 세포주(melanoma cell line) HMV-II, 간 모세포종 세포주(hepatoblastoma cell line) HuH-6, 폐 소세포성폐암 세포주(lung small cell carcinoma cell lines) Lu-130 또는 Lu-134-A, 신경모세포종 세포주(neuroblastoma cell lines) NB19 또는 NB69, 배아 암종 교환 세포

주(embryonal carcinoma testis cell line) NEC14, 자궁경부암 세포주(cervical carcinoma cell line) TCO-2, 및 신경모세포종 세포주(neuroblastoma cell line) TNB1로 이루어진 군에서 선택된 세포주로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, 상기 조작된 세포 집단은 MHCII 분자의 발현이 결핍된 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, 상기 조작된 세포 집단은 K562 세포에서 유래된 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

#### 청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인터루킨은 IL12A 또는 이의 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, 상기 IL12A는 서열번호 4로 표시되는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

#### 청구항 11

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인터루킨은 IL12B 또는 이의 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

#### 청구항 12

제11항에 있어서, 상기 IL12B는 서열번호 6으로 표시되는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

#### 청구항 13

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인터루킨은 IL12A 및 IL12B, 또는 이의 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

#### 청구항 14

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 세포 집단은 막 결합된 IL18(mbIL18) 또는 이의 단편을 추가로 발현시키는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

#### 청구항 15

제14항에 있어서, 상기 IL18은 서열번호 8로 표시되는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 16**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 세포 집단은 막 결합된 IL21(mbIL21), 또는 이의 단편을 추가로 발현시키는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 17**

제16항에 있어서, 상기 IL21은 서열번호 10으로 표시되는 서열 또는 이의 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 18**

제1항에 있어서, 상기 세포는 막 결합된 IL22(mbIL22) 또는 이의 단편을 발현시키는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 19**

제18항에 있어서, 상기 IL22는 서열번호 12로 표시되는 서열 또는 이의 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 20**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 막 결합 항-CD 항체(mb α-CD3), 이의 항체 단편 또는 scFv를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 21**

제20항에 있어서, 상기 mb α-CD3는 모노클로날 항체인 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 22**

제21항에 있어서, 상기 mb α-CD3는 서열번호 15의 CD3 앵실론(epsilon)의 핵산 서열 내의 에피토프(epitope)를 표적으로 하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 23**

제20항에 있어서, 상기 mb α-CD3는 scFv인 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 24**

제23항에 있어서, 상기 scFv는 서열번호 17로 표시되는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 25**

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 조작된 세포 집단과 면역 세포를 포함하는 혈액 샘플을 공동-배양하는 것을 포함하는 면역 세포를 확장하는 방법.

**청구항 26**

제25항에 있어서, 상기 면역 세포는 자연 살해(Natural Killer, NK) 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 27**

주요 조직 적합성 복합체(major histocompatibility complex, MHC) I 분자를 발현하지 않는 유전자-조작된 세포 집단으로서,

상기 조작된 세포 집단은 암 세포(cancerous cell)로부터 유래되고,

상기 조작된 세포 집단은 막-결합된 인터루킨-15(membrane-bound interleukin-15, mbIL15)를 발현하도록 변형되고,

상기 조작된 세포 집단은 막-결합된 4-1BB 리간드(membrane-bound 4-1BB ligand, 4-1BBL)를 발현하도록 변형되고,

상기 조작된 세포 집단은 면역 세포 활성화를 자극하는 적어도 하나 이상의 추가적인 막-결합된 인터루킨을 발현하도록 변형되고,

상기 조작된 세포 집단과 면역 세포의 집단의 공동-배양(co-culture)은 면역 세포의 적어도 하나의 서브집단의 활성화 및 확장을 야기하는, 주요 조직 적합성 복합체(MHC) I 분자를 발현하지 않는 유전자-조작된 세포 집단.

**청구항 28**

제27항에 있어서, 상기 인터루킨은 IL12A 또는 이의 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 29**

제28항에 있어서, 상기 IL12A는 서열번호 4로 표시되는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 30**

제28항에 있어서, 상기 인터루킨은 IL12B 또는 이의 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 31**

제30항에 있어서, 상기 IL12B는 서열번호 6으로 표시되는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 32**

제27항에 있어서, 상기 인터루킨은 IL12A 및 IL12B 또는 이의 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 33**

제27항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 세포 집단은 막 결합된 IL18(mbIL18), 또는 이의 단

편을 추가로 발현하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 34**

제33항에 있어서, 상기 IL18은 서열번호 8로 표시되는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 35**

제27항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 세포 집단은 막 결합된 IL21(mbIL21), 또는 이의 단편을 발현하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 36**

제35항에 있어서, 상기 IL21은 서열번호 10으로 표시되는 서열 또는 이의 단편을 발현하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 37**

제27항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 세포 집단은 막 결합된 IL22(mbIL22) 또는 이의 단편을 발현하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 38**

제37항에 있어서, 상기 IL22는 서열번호 12로 표시되는 서열 또는 이의 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 39**

제27항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 세포 집단은 막 결합된 항-CD3 항체(mb  $\alpha$ -CD3), 항체 단편 또는 scFv를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 40**

제39항에 있어서, 상기 mb  $\alpha$ -CD3는 모노클로날 항체인 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 41**

제39항 또는 제40항에 있어서, 상기 mb  $\alpha$ -CD3는 서열번호 15의 CD3 앵실론의 핵산 서열 내의 에피토프를 표적으로 하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 42**

제39항에 있어서, 상기 mb  $\alpha$ -CD3는 scFv인 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 43**

제42항에 있어서, 상기 scFv는 서열번호 17로 표시되는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 44**

제27항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, K562 세포, Wilms 종양 세포주(Wilms tumor cell line) HFWT, 자궁 내막 종양 세포주(endometrial tumor cell line) HHUA, 흑색종 세포주(melanoma cell line) HMV-II, 간 모세포종 세포주(hepatoblastoma cell line) HuH-6, 폐 소세포성폐암 세포주(lung small cell carcinoma cell lines) Lu-130 또는 Lu-134-A, 신경모세포종 세포주(neuroblastoma cell lines) NB19 또는 NB69, 배아 암종 고환 세포주(embryonal carcinoma testis cell line) NEC14, 자궁경부암 세포주(cervical carcinoma cell line) TCO-2, 및 신경모세포종 세포주(neuroblastoma cell line) TNB1로 이루어진 군에서 선택된 세포주로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 45**

제27항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 세포가 MHC II 분자의 발현이 결핍된 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 46**

제45항에 있어서, 상기 조작된 세포는 K562 세포로부터 유래된 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 47**

제27항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 각각의 막 결합 분자는 인간 CD8 α의 막전위 도메인(transmembrane domain)에 커플링된 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 48**

제47항에 있어서, 상기 인간 CD8 α의 막전위 도메인은 서열번호 18로 표시되는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 49**

제27항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 mbIL15는 서열번호 1로 표시되는 핵산 서열에 코딩되는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 50**

제27항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 mb4-1BBL은 서열번호 13을 포함하는 핵산 서열에 코딩되는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 51**

주요 조직 적합성 복합체(major histocompatibility complex, MHC) I 분자를 발현하지 않는 유전자-조작된 세

포 집단으로서,

상기 조작된 세포 집단은 암 세포(cancerous cell)로부터 유래되고,

상기 조작된 세포 집단은 막-결합된 인터루킨-15(membrane-bound interleukin-15, mbIL15)를 발현하도록 변형되고,

상기 조작된 세포 집단은 막-결합된 4-1BB 리간드(membrane-bound 4-1BB ligand, 4-1BBL)를 발현하도록 변형되고,

상기 조작된 세포 집단은 면역 세포 활성화를 자극하는 막-결합된 항-CD3 항체(mb  $\alpha$ -CD3)을 발현하도록 변형되고,

상기 조작된 세포 집단과 면역 세포의 집단의 공동-배양(co-culture)은 면역 세포의 적어도 하나의 서브집단의 활성화 및 확장을 야기하는, 주요 조직 적합성 복합체(MHC) I 분자를 발현하지 않는 유전자-조작된 세포 집단.

#### 청구항 52

제51항에 있어서, 상기 mb  $\alpha$ -CD3은 모노클로날 항체인 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

#### 청구항 53

제51항 또는 제52항에 있어서, 상기 mb  $\alpha$ -CD3은 서열번호 15의 CD3 앵실론의 핵산 서열 내의 에피토프를 표적으로 하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

#### 청구항 54

제51항에 있어서, 상기 mb  $\alpha$ -CD3은 scFv인 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

#### 청구항 55

제54항에 있어서, 상기 scFv는 서열번호 17로 표시되는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

#### 청구항 56

제51항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 적어도 하나 이상의 막-결합된 인터루킨 또는 이의 단편을 추가로 발현하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

#### 청구항 57

제56항에 있어서, 상기 인터루킨은 IL12A 또는 이의 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

#### 청구항 58

제57항에 있어서, 상기 IL12A는 서열번호 4로 표시되는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

#### 청구항 59

제56항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나 이상의 막-결합된 인터루킨 또는 이의 단편은

IL12B 또는 이의 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 60**

제59항에 있어서, 상기 IL12B는 서열번호 6으로 표시되는 적어도 하나 이상의 막-결합된 인터루킨 또는 이의 단편인 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 61**

제56항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나 이상의 막-결합된 인터루킨 또는 이의 단편은 IL12A 및 IL12B, 또는 이의 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 62**

제56항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 막 결합된 IL18(mbIL18), 또는 이의 단편을 추가로 발현하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 63**

제62항에 있어서, 상기 IL18은 서열번호 8로 표시되는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 64**

제56항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 막 결합된 IL21(mbIL21), 또는 이의 단편을 발현하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 65**

제64항에 있어서, 상기 IL21은 서열번호 10으로 표시되는 서열 또는 이의 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 66**

제56항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 막 결합된 IL22(mbIL22), 또는 이의 단편을 발현하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 67**

제66항에 있어서, 상기 IL22는 서열번호 12로 표시되는 서열, 또는 이의 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 68**

제25항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조작된 세포는 면역 세포의 확장에 적합한 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 69**

제68항에 있어서, 상기 확장된 면역 세포는 NK 세포인 것을 특징으로 하는 조작된 세포 집단.

**청구항 70**

제25항 내지 제69항 중 어느 한 항의 조작된 세포 집단과 NK 세포를 포함하는 샘플을 공동-배양하는 단계를 포함하는 NK 세포를 확장시키는 방법.

**청구항 71**

제25항 내지 제69항 중 어느 한 항의 조작된 세포 집단을 제조하는 방법으로서,  
 mbIL15를 코딩하는 제1 작제물을 세포에 형질도입하여, 제1 형질도입된 세포 집단을 생성하는 단계;  
 상기 제1 형질도입된 세포 집단을 확장시키는 단계;  
 4-1BBL을 코딩하는 제2 작제물을 상기 제1 형질도입된 세포 집단에 형질도입하여, 제2 형질도입된 세포 집단을 생성하는 단계;  
 면역 세포를 자극할 수 있는 적어도 하나 이상의 추가적인 분자를 코딩하는 제3 작제물을 상기 제2 형질도입된 세포 집단에 형질도입하여, 제3 형질 도입된 세포 집단을 생성하는 단계; 및  
 상기 제3 형질도입된 세포 집단을 확장시키는 단계를 포함하는, 제25항 내지 제69항 중 어느 한 항의 조작된 세포 집단을 제조하는 방법.

**청구항 72**

제25항 내지 제69항 중 어느 한 항의 조작된 세포 집단을 제조하는데 사용하기 위한 복수의 핵산으로서,  
 mbIL15를 코딩하는 핵산,  
 4-1BBL을 코딩하는 핵산,  
 mbIL12A를 코딩하는 핵산,  
 mbIL12B를 코딩하는 핵산,  
 mbIL18을 코딩하는 핵산,  
 mbIL21을 코딩하는 핵산,  
 mbIL22를 코딩하는 핵산, 및  
 mb a-CD3을 코딩하는 핵산 중 적어도 3개 이상을 포함하는 복수의 핵산.

**청구항 73**

제72항에 있어서, 상기 복수의 핵산은 단일 작제물로서 구성되는 것을 특징으로 하는 복수의 핵산.

**청구항 74**

제72항에 있어서, 상기 mbIL15는 서열번호 1을 포함하는 핵산 서열로 코딩되는 것을 특징으로 하는 복수의 핵산.

**청구항 75**

제72항에 있어서, 상기 4-1BBL은 서열번호 13을 포함하는 핵산 서열로 코딩되는 것을 특징으로 하는 복수의 핵산.

**청구항 76**

제72항에 있어서, 상기 mbIL12A는 서열번호 3을 포함하는 핵산 서열로 코딩되는 것을 특징으로 하는 복수의 핵산.

**청구항 77**

제72항에 있어서, 상기 mbIL12B는 서열번호 5를 포함하는 핵산 서열로 코딩되는 것을 특징으로 하는 복수의 핵산.

**청구항 78**

제72항에 있어서, 상기 mbIL18은 서열번호 7을 포함하는 핵산 서열로 코딩되는 것을 특징으로 하는 복수의 핵산.

**청구항 79**

제72항에 있어서, 상기 mbIL21은 서열번호 9를 포함하는 핵산 서열로 코딩되는 것을 특징으로 하는 복수의 핵산.

**청구항 80**

제72항에 있어서, 상기 mbIL22는 서열번호 11을 포함하는 핵산 서열 또는 이의 단편으로 코딩되는 것을 특징으로 하는 복수의 핵산.

**청구항 81**

제72항에 있어서, 상기 mb  $\alpha$ -CD3은 서열번호 16을 포함하는 핵산 서열로 코딩되는 것을 특징으로 하는 복수의 핵산.

**청구항 82**

제72항에 있어서, 상기 각각의 복수의 서열은 GFP 태그를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 복수의 핵산.

**청구항 83**

NK 세포를 확장시키는 방법으로서,

- a) NK 세포 및 T 세포를 포함하는 혼합된 면역 세포 집단을 포함하는 말초 혈액 샘플을 수득하는 단계;
- b) i) 막-결합된 인터루킨-15(membrane-bound interleukin-15, mbIL15),

ii) 4-1BB 리간드(4-1BB ligand, 4-1BBL) 및

iii) 면역 세포 활성화를 자극하는 적어도 하나 이상의 추가적인 분자가 발현되도록 변형되고, MHC I의 발현이 감소된 조작된 세포 집단에 혼합된 세포 집단을 접촉시키는 단계; 및

c) 상기 면역 세포의 혼합된 집단의 NK 세포를 확장시키기에, 충분한 시간 동안 상기 혼합된 세포 집단과 조작된 세포를 공동-배양하여, 상기 NK 세포를 확장시키는 단계를 포함하는, NK 세포를 확장시키는 방법.

#### 청구항 84

제83항에 있어서, 선택적으로, 공동-배양 전 또는 후에 상기 혼합된 집단으로부터 T 세포를 제거하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 85

주요 조직 적합성 복합체 I 분자가 결핍된 K562 골수성 백혈병 세포 (myeloid leukemia cells)를 포함하는 변형된 세포주로서, 상기 K562 골수성 백혈병 세포는 막-결합된 인터루킨-15, 4-1BB 리간드, 및 막-결합된 항-CD3 항체를 발현하도록 유전적으로 변형된 것인 변형된 세포주.

#### 청구항 86

주요 조직 적합성 복합체 I 분자가 결핍된 K562 골수성 백혈병 세포를 포함하는 변형된 세포주로서, 상기 K562 골수성 백혈병 세포는 막-결합된 인터루킨-15, 막결합된 4-1BB 리간드, 및 적어도 하나 이상의 추가적인 막-결합된 인터루킨을 발현하도록 유전적으로 변형된 것인 변형된 세포주.

#### 청구항 87

제86항에 있어서, 상기 발현된 추가적인 막-결합된 인터루킨은 인터루킨-12인 것을 특징으로 하는 변형된 세포주.

#### 청구항 88

제86항에 있어서, 상기 발현된 추가적인 막-결합된 인터루킨은 인터루킨-18인 것을 특징으로 하는 변형된 세포주.

#### 청구항 89

제86항에 있어서, 상기 발현된 추가적인 막-결합된 인터루킨은 인터루킨-12 및 인터루킨-18인 것을 특징으로 하는 변형된 세포주.

#### 청구항 90

제86항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, 추가로 막-결합된 항-CD3 항체를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 변형된 세포주.

#### 청구항 91

제86항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, mbIL12A, mbIL12B, mbIL18, mbIL21, mbIL22, 및 mb  $\alpha$ -CD3 중 하나 이상을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 변형된 세포주.

#### 청구항 92

주요 조직 적합성 복합체 I 분자가 결핍된 K562 골수성 백혈병 세포를 포함하는 변형된 세포주로서, 상기 K562 골수성 백혈병 세포는 막-결합된 인터루킨-15, 막결합된 4-1BB 리간드, 막-결합된 항-CD3 항체 및 적어도 하나 이상의 추가적인 막-결합된 인터루킨을 발현하도록 유전적으로 변형된 것인 변형된 세포주.

#### 청구항 93

제92항에 있어서, 상기 발현된 추가적인 막-결합된 인터루킨은 인터루킨-12인 것을 특징으로 하는 변형된 세포주.

#### 청구항 94

제92항에 있어서, 상기 발현된 추가적인 막-결합된 인터루킨은 인터루킨-18인 것을 특징으로 하는 변형된 세포주.

#### 청구항 95

제92항에 있어서, 상기 발현된 추가적인 막-결합된 인터루킨은 인터루킨-12 및 인터루킨-18인 것을 특징으로 하는 변형된 세포주.

#### 청구항 96

제92항에 있어서, mbIL12A, mbIL12B, mbIL18, mbIL21 및 mbIL22 중 하나 이상을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 변형된 세포주.

#### 청구항 97

제85항 또는 제86항의 변형된 세포주와 NK 세포 및 T 림프구를 포함하는 혼합된 세포 배양물을 배양함으로써 확장된 NK 세포 집단.

#### 청구항 98

암 또는 감염성 질환의 치료를 위한 제97항의 NK 세포 집단의 용도.

#### 청구항 99

면역 세포 집단의 확장에 사용하기 위한 제25항 내지 제69항 중 어느 한 항에 따른 조작된 세포 집단의 용도로서,

상기 면역 세포 집단은 암 또는 감염성 질환의 치료에 사용하기에 적합하며, 상기 면역세포의 집단은 NK 세포를 포함하는 것인, 제25항 내지 제69항 중 어느 한 항에 따른 조작된 세포 집단의 용도.

**청구항 100**

암 또는 감염성 질환을 치료하는 방법으로서,  
 암 또는 감염성 질환이 있는 개체에 확장된 면역 세포 집단을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하며,  
 상기 면역 세포는 조작된 세포 집단과 면역 세포를 공동-배양함으로써 확장되고,  
 상기 조작된 세포 집단은 암 세포(cancerous cell)로부터 유래되고,  
 상기 조작된 세포 집단은 막-결합된 인터루킨-15(mbIL15)를 발현시키도록 변형되었고,  
 상기 조작된 세포 집단은 막-결합된 4-1BB 리간드(4-1BBL)를 발현시키도록 변형되었고,  
 상기 조작된 세포 집단은 면역 세포 활성화를 자극하는 적어도 하나 이상의 추가적인 막 결합된 인터루킨을 발현시키도록 변형되었고,  
 상기 조작된 세포 집단과 면역 세포 집단의 공동-배양은 적어도 하나 이상의 면역 세포 소집단(subpopulation of immune cells)의 활성화 및 확장을 야기하며,  
 상기 적어도 하나 이상의 면역 세포 소집단이 상기 개체에 투여되는 것인, 암 또는 감염성 질환을 치료하는 방법.

**청구항 101**

제100항에 있어서, 상기 투여된 세포 소집단은 NK 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 102**

암 또는 감염성 질환을 치료하는 방법으로서,  
 암 또는 감염성 질환이 있는 개체에 확장된 면역 세포 집단을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하며,  
 상기 면역 세포는 조작된 세포 집단과 면역 세포를 공동-배양함으로써 확장되고,  
 상기 조작된 세포 집단은 암 세포로부터 유래되고,  
 상기 조작된 세포 집단은 막-결합된 인터루킨-15(mbIL15)를 발현시키도록 변형되었고,  
 상기 조작된 세포 집단은 막-결합된 4-1BB 리간드(4-1BBL)를 발현시키도록 변형되었고,  
 상기 조작된 세포 집단은 항 CD3 항체를 발현하도록 변형되었고,  
 상기 조작된 세포 집단과 면역 세포 집단의 공동-배양은 적어도 하나 이상의 면역 세포 소집단(subpopulation of immune cells)의 활성화 및 확장을 야기하며,  
 상기 적어도 하나 이상의 면역 세포 소집단이 상기 개체에 투여되는 것인, 암 또는 감염성 질환을 치료하는 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 출원은 2017년 3월 27일에 출원된 미국 특허출원 제62/477,311호를 우선권으로 주장한다.

**배경 기술**

[0002] 많은 질병의 발생 및 지속성은 악성 및 바이러스 감염된 세포를 포함하는 비정상 세포에 대한 불충분한 면역 반응을 특징으로 한다. 면역요법은 다양한 질병의 치료를 위해 환자의 면역 시스템의 사용 및 조작이다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0003] 면역 요법(Immunotherapy)은 질병의 치료에 새로운 기술적 발전이 존재하며, 여기서 면역 세포는 질병 또는 손상된 세포를 특이적으로 확인하고 반응하는 특정 표적화 및/또는 이펙터 분자(effector molecules)를 발현하도록 조작된다. 이는 모든 세포가 영향을 받는 화학적 치료와 같은 보다 전통적인 접근과는 반대로 질병 또는 손상된 세포를 특이적으로 표적화 할 가능성으로 인해 약속된 발전을 나타내며, 상기 요구된 결과는 충분히 건강한 세포가 환자가 살 수 있도록 생존하는 것이다. 환자에게 자연 살해(Natural Killer, NK) 세포의 도입 전달(adoptive transfer)을 이용하는 면역 요법 접근은 현재 개발중에 있다. 그러나, 이러한 치료는 유전자 조작(genetic manipulation) 및 임상 적용에 적합한 다수의 ex vivo 순수한 NK 세포를 필요로 한다. 혼합된 세포 배양물로부터 NK 세포의 활성화 및 ex vivo 확장에 대한 방법 및 조성물(및 이의 용도)는 본원에 기재되어 있다.
- [0004] 다양한 조작된 세포 유형, DNA 작제물 및 NK 세포를 확장 및 활성화시키기 위한 방법이 본원에 제공된다. 예를 들어, 몇몇 실시양태에서, 주요 조직 적합성 복합체(major histocompatibility complex, MHC) I 분자를 발현하지 않는 유전자-조작된 세포 집단이 제공되며, 상기 조작된 세포 집단과 면역 세포 집단의 공동-배양(co-culture)은 면역 세포의 적어도 하나의 서브집단의 활성화 및 확장을 야기한다. 몇몇 실시양태에서, 상기 조작된 세포 집단은 불멸성 세포(immortalized cell)로부터 유래된다. 예를 들어, 세포주는 배양 중에 불멸성 세포의 하나 이상의 특성을 나타낸다. 몇몇 실시양태에서, 상기 조작된 세포 집단은 자연적으로 불명성인 세포주(예를 들어, 줄기 세포주)로부터 유래된다. 몇몇 실시양태에서, 상기 조작된 세포 집단은 불멸화된(예를 들어, 암 세포) 라인으로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 상기 조작된 세포 집단은 조작을 통해 불멸화된(예를 들어, 텔로머라아제(telomerase) 발현을 변경하도록 유전자 조작된) 세포로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 상기 조작된 세포 집단은 암으로부터 유래된다. 몇몇 실시양태에서, 상기 조작된 세포 집단은 NK 세포의 활성화 및/또는 확장을 촉진 및/또는 향상시키는 하나 이상의 막-결합된 인자를 발현하도록 변형된다. 예를 들어, 몇몇 실시양태에서, 상기 조작된 세포는 막-결합된 인터루킨-15(mbIL15)를 발현한다. 추가적인 실시양태에서, 상기 조작된 세포 집단은 추가 또는 mbIL15 대신에, 막-결합된 4-1BB 리간드(4-1BBL)를 발현하도록 변형된다. 추가 실시양태에서, 상기 조작된 세포 집단은 추가, 또는 mbIL15, 4-1BBL, 및/또는 활성화/확장 촉진 인자 대신에 면역 세포 활성화를 자극하는 적어도 하나 이상의 추가적인 막 결합된 인터루킨을 발현하도록 변형된다.
- [0005] 일부 실시양태에서, 상기 조작된 세포 집단은 mbIL15를 발현하는 적어도 제1 복수의 세포 및 4-1BBL을 발현하는 제2 복수의 세포를 포함하여, 전체적으로 mbIL15 및 4-1BBL을 발현한다. 다른 실시양태에서, 상기 조작된 세포 집단은 mbIL15 및 4-1BBL을 발현하는 복수의 세포를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 조작된 세포 집단은 mbIL15를 발현하는 일부 세포, 4-1BBL을 발현하는 일부 세포 및 모두를 발현하는 일부 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 다른 리간드 및/또는 활성화 인자는 추가 또는 mbIL15 및/또는 4-1BBL 대신에 추가적으로 발현된다.
- [0006] 몇몇 실시양태에서, 상기 조작된 세포 집단에 의해 발현된 mbIL15는 서열번호 1로 표시되는 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 몇몇 실시양태에서, 상기 조작된 세포 집단에 의해 발현된 4-1BBL은 서열번호 13으로 표시되는 서열을 포함하는 핵산 서열에 의해 코딩된다.
- [0007] 실시양태에 따라, 각각의 막 결합된 분자는 막전위 도메인(transmembrane domain)에 커플링된다. 몇몇 실시양태에서, 상기 인간 CD8 α의 막전위 도메인은 분자를 막에 링크하는데 사용된다. 몇몇 실시양태에서, 상기 인간 CD8 α의 막전위 도메인은 서열번호 18로 표시되는 서열을 포함한다. 실시양태에 따라, 다른 막전위 도메인이 또한 사용되며, 예를 들어, 세포 막 내에 또는 이를 가로질러 존재하는 것으로 알려진 다른 수용체 또는 신호 도메인(선택적으로 절단)이 사용될 수 있다.
- [0008] 몇몇 실시양태에서, 상기 조작된 세포 집단은 K562 세포, Wilms 종양 세포주(Wilms tumor cell line) HFWT, 자궁 내막 종양 세포주(endometrial tumor cell line) HHUA, 흑색종 세포주(melanoma cell line) HMV-II, 간 모세포종 세포주(hepatoblastoma cell line) HuH-6, 폐 소세포성폐암 세포주(lung small cell carcinoma cell lines) Lu-130 또는 Lu-134-A, 신경모세포종 세포주(neuroblastoma cell lines) NB19 또는 NB69, 배아 암종 고환 세포주(embryonal carcinoma testis cell line) NEC14, 자궁경부암 세포주(cervical carcinoma cell line) TCO-2, 및 신경모세포종 세포주(neuroblastoma cell line) TNB1로 이루어진 군에서 선택된 세포주로부터 유래된다. 몇몇 실시양태에서, 상기 전체 집단은 두 개 이상의 상기 세포주(또는 다른)로부터 유래되고 조합되어 NK 세포와 같은 면역 세포의 예상치못하게 향상된 활성화/확장을 가능하게 하는 세포 집단을 생성한다.

- [0009] 몇몇 실시양태에서, 상기 조작된 세포 집단은 MHC II 분자의 발현이 결핍되어 있다. 몇몇 실시양태에서, 상기 조작된 세포 집단은 K562 세포로부터 유래된다.
- [0010] 실시양태에 따르면, 본원에 기재된 바와 같이 조작된 세포 집단은 하나 이상의 인터루킨 분자를 발현한다. 몇몇 실시양태에서, 상기 인터루킨은 IL12A 또는 이의 단편을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 상기 IL2A는 서열번호 3으로 표시되는 서열(또는 이의 단편)을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 상기 인터루킨은 IL12B 또는 이의 단편을 포함한다. 하나의 실시양태에서 상기 IL12B는 서열번호 6으로 표시되는 서열(또는 이의 단편)을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 상기 인터루킨은 IL12A 및 IL12B, 또는 이의 단편을 포함한다. 이러한 실시양태에서, 상기 IL12A 및 IL12B는 폴리뉴클레오티드에서 A-B, B-A, A-B-A-B, A-B-B-A, B-A-A-B 배양으로 이중, 삼중 또는 더 큰 반복으로 배향될 수 있다.
- [0011] 몇몇 실시양태에서, 상기 조작된 세포 집단을 막 결합된 IL18(mbIL18) 또는 이의 단편을 추가로 발현한다. 몇몇 실시양태에서, 상기 IL18은 서열번호 8로 표시되는 서열을 포함한다. 추가 실시양태에서, 상기 조작된 세포 집단은 막 결합된 IL21(mbIL21) 또는 이의 단편을 추가로 발현한다. 하나의 실시양태에서, 상기 IL21을 서열번호 10으로 표시되는 서열 또는 이의 단편을 포함한다.
- [0012] 몇몇 실시양태에서, 상기 세포는 막 결합된 IL22(mbIL22) 또는 이의 단편을 발현한다. 하나의 실시양태에서, 상기 IL22는 서열번호 12로 표시되는 서열 또는 이의 단편을 포함한다. 상기 기재된 바와 같이, 다양한 인터루킨의 조합은 다양한 조합, 반복, 삼중 등으로 발현될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드에서 발현의 반복된 패턴은 NK 세포의 예상치 못하게 향상된 활성화 및/또는 확장을 제공한다.
- [0013] 몇몇 실시양태에서, 상기 조작된 세포는 막 결합된 항-CD3 항체(mb $\alpha$ -CD3), 이의 항체 단편, 또는 scFv를 추가로 포함할 수 있다. 하나의 실시양태에서, 상기 mb $\alpha$ -CD3는 모노클로날 항체이다. 이러한 몇몇 실시양태에서, 상기 mb $\alpha$ -CD3는 서열번호 15의 CD3 엡실론(epsilon)의 핵산 서열 내의 에피토프를 표적으로 한다. 추가적인 실시양태에서, 상기 mb $\alpha$ -CD3는 scFv이다. 하나의 실시양태에서, 상기 scFv는 서열번호 17로 표시되는 서열을 포함한다.
- [0014] 하기에 더 상세하게 설명된 바와 같이, 본원에 기재된 임의의 조작된 세포 집단과 면역세포를 포함하는 혈액 샘플을 공동-배양하는 것을 포함하는 면역 세포를 확장시키는 방법이 또한 제공된다. 몇몇 실시양태에서, 상기 면역 세포는 자연 살해(NK) 세포이다.
- [0015] 몇몇 실시양태에 따르면, 이는 암 세포로부터 유래된 유전자-조작된 세포 집단을 제공하며, 상기 조작된 세포 집단은 하나, 둘 또는 그 이상, 막-결합된 인터루킨-15(mbIL15), 막-결합된 4-1BB 리간드(4-1BBL)로 변형되고, 면역 세포 활성화를 자극하는 적어도 하나 이상의 추가적인 막-결합된 인터루킨을 발현하도록 변형되고, 상기 조작된 세포 집단과 면역 세포의 집단의 공동-배양(co-culture)은 면역 세포의 적어도 하나의 서브집단의 활성화 및 확장을 야기한다. 몇몇 실시양태에서, 상기 유전자-조작된 세포 집단은 주요 조직 적합성 복합체(MHC) I 분자를 발현하지 않는다.
- [0016] 또한 몇몇 실시양태에서 제공된 것은 주요 조직 적합성 복합체(MHC) I 분자, 암 세포로부터 유래된 조작된 세포 집단, mbIL15, 4-1BBL, 면역 세포 활성화를 자극하는 막 결합된 항-CD3 항체(mb $\alpha$ -CD3)를 발현하도록 변형된 조작된 세포 집단을 발현하지 않는 유전자-조작된 세포 집단이며, 조작된 세포 집단과 면역 세포 집단의 공동-배양은 면역 세포의 적어도 하나의 서브집단의 활성화 및 확장을 야기한다.
- [0017] 몇몇 실시양태에서, 상기 조작된 세포는 IL12, 또는 이의 단편을 포함하는 추가적인 막-결합된 인터루킨을 발현하도록 변형된다. 하나의 실시양태에서, 상기 막 결합된 IL12A는 서열번호 4로 표시되는 서열을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 상기 막 결합된 IL12A는 서열번호 4로 표시되는 서열을 갖는다. 몇몇 실시양태에서, 상기 추가적인 막-결합된 인터루킨은 IL12B 또는 이의 단편을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 상기 막 결합된 IL12B는 서열번호 6으로 표시되는 서열을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 상기 막 결합된 IL12B는 서열번호 6으로 표시되는 서열을 갖는다. 몇몇 실시양태에서, 상기 추가적인 막 결합된 인터루킨은 막 결합된 IL12A 및 막 결합된 IL12B 또는 이의 단편을 포함한다. 추가적으로, 조작된 세포의 임의의 이러한 실시양태에서 막 결합된 IL18(mbIL18), 또는 이의 단편의 발현을 추가로 포함할 수 있다. 하나의 실시양태에서, 상기 막 결합된 IL18은 서열번호 8로 표시되는 서열을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 상기 막 결합된 IL18은 서열번호 8로 표시되는 서열을 갖는다. 여전히 추가적인 실시양태에서, 상기 조작된 세포는 막 결합된 IL21(mbIL21), 또는 이의 단편을 발현한다. 몇몇 실시양태에서, 상기 막 결합된 IL21은 서열번호 10으로 표시되는 서열 또는 이의 단편을 갖는다. IL21과 조합 또는 단독으로, 몇몇 실시양태는 막 결합된 IL22(mbIL22), 또는 이의 단편을 발현하는 조

작된 세포를 제공한다. 몇몇 실시양태에서, 상기 막 결합된 IL22는 서열번호 12로 표시되는 서열 또는 이의 단편을 갖는다.

[0018] 추가적으로, 몇몇 실시양태는 막 결합된 항-CD3 항체(mb α-CD3), 항체 단편 또는 이의 단일 사슬 단편 가변(scFv) 작제물을 발현하는 조작된 세포를 제공한다. 하나의 실시양태에서, 상기 mb α-CD3는 모노클로날 항체이다. 몇몇 실시양태에서, 상기 mb α-CD3는 T 세포 수용체의 CD3 부분의 핵산 서열 내의 에피토프를 표적으로 한다. 예를 들어, 하나의 실시양태에서, CD3 수용체의 감마 서브유닛(gamma subunit), 엡실론(epsilon) 또는 하나 이상의 델타(delta)는 막 결합된 항-CD3 항체에 의해 표적화된다. 하나의 실시양태에서, 서열번호 15의 CD3 수용체 엡실론 서브집단유닛은 상기 조작된 세포로 발현된 막 결합된 항체에 의해 표적화 된다. 몇몇 실시양태에서, 상기 mb α-CD3는 scFv이다. 하나의 실시양태에서, 상기 scFv는 서열번호 17로 표시되는 서열을 포함하거나, 필수적으로 구성되거나, 구성된다. 하나의 실시양태에서, 상기 scFv는 서열번호 17로 표시되는 서열을 갖는다.

[0019] 추가적으로, 몇몇 실시양태에서, IL15에 대한 높은 친화도를 갖는 IL15 수용체의 알파 서브유닛을 발현하도록 조작된 자극 세포가 제공되며, 상기 세포의 표면에 가용성 IL15를 감싸고 존재할 수 있게 한다. 실시양태에 따라, 임의의 추가적인 인터루킨 또는 항체의 조합은 또한 NK 세포의 예상치 못한 우수한 확장 및 활성화를 제공하는 자극 세포의 모듈 조작(modular engineering)을 필수적으로 가능하게 하는데 사용될 수 있다.

[0020] 몇몇 실시양태에서 상기 조작된 세포 집단은 이에 제한되지는 않으나, 하기의 세포주를 포함한다: K562 세포, Wilms 종양 세포주 HFWT, 자궁 내막 종양 세포주 HHUA, 흑색종 세포주 HMV-II, 간 모세포종 세포주 HuH-6, 폐 소세포성폐암 세포주 Lu-130 또는 Lu-134-A, 신경모세포종 세포주 NB19 또는 NB69, 배아 암종 고환 세포주 NEC14, 자궁경부암 세포주 TCO-2, 및 신경모세포종 세포주 TNB1. 몇몇 실시양태에서, 상기 조작된 세포는 MHC II 분자의 발현이 결핍된다. 몇몇 실시양태에서, 상기 조작된 세포는 K562 세포로부터 유래된다.

[0021] 실시양태에 따라, 상기 막 결합된 분자는 막전위 도메인에 커플링됨으로서 세포 표면에 결합될 수 있는 능력이 부여된다. 상기 용어 “막전위(transmembrane)”는 이의 일반적인 의미를 가지며 세포막에 포매된 폴리펩타이드(예를 들어, 도메인)의 최소 부위를 의미해야 한다. 추가적인 실시양태에서, 적어도 하나 이상의 막 결합된 분자는 단일 막전위 도메인에 커플링될 수 있다. 추가적으로, 몇몇 실시양태에서, 막 결합된 분자의 다중 유형 또는 다중 카피는 막전위 도메인에 커플링될 수 있다. 추가적으로, 몇몇 실시양태에서, 막전위 도메인의 다중 유형 또는 다중 카피는 막 결합된 분자에 커플리될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 상기 막 결합된 분자는 인간 CD8 α의 막전위 도메인에 커플링된다. 몇몇 실시양태에서, 상기 인간 CD8 α의 막전위 도메인은 서열번호 18로 표시되는 서열을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 인간 CD8 α의 막전위 도메인은 서열번호 18로 표시되는 서열을 갖는다. 몇몇 실시양태에서, mbIL15는 서열번호 1로 표시되는 핵산에 의해 코딩된다. 몇몇 실시양태에서, mb4-1BBL은 서열번호 13으로 표시되는 핵산에 의해 코딩된다. 몇몇 실시양태에서, mbIL15는 서열번호 1로 표시되는 서열을 포함하거나, 필수적으로 구성되거나, 구성되는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 몇몇 실시양태에서, mb4-1BBL은 서열번호 13으로 표시되는 서열을 포함하거나, 필수적으로 구성되거나, 구성되는 핵산 서열에 의해 코딩된다.

[0022] 몇몇 실시양태에서, 본원에서 제공된 조작된 세포 집단은 면역 세포의 확장 및/또는 활성화에 적합하다. 본원에 사용된 바와 같이, 세포의 “확장(Expansion)”은 이의 일반적인 의미를 가지며, 동일하거나 동일하지 않을 수 있는 초기 세포 집단으로부터 특징적인 세포 유형 또는 세포 유형의 수의 증가를 의미한다. 확장에 사용된 초기 세포는 확장으로부터 생성된 세포와 같을 필요는 없다. 예를 들어 상기 확장된 세포는 초기 조작된 세포 집단의 성장 및 분화에 의해 생성될 수 있다. 면역 세포의 “활성화(Activation)”는, 본원에 사용된 바와 같이, 당업자에게 공지된 상응하는 세포의 면역 기능을 측정 가능한 수준으로 반응하고 나타내는 면역 세포의 능력을 의미한다. 면역 세포의 활성을 측정하는 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 본원에 사용된 바와 같이, “면역 세포(immune cell)”는 이의 일반적인 의미를 가지며, B 세포라고도 불리는 B 림프구(B lymphocytes), T 세포라고도 불리는 T 림프구(T lymphocytes), 자연 살해(natural killer, NK) 세포, 림포카인 활성화 킬러(lymphokine-activated killer, LAK) 세포, 단핵구(monocytes), 대식세포(macrophages), 호중구(neutrophils), 과립구(granulocytes), 비만 세포(mast cells), 혈소판(platelets), 랑게르한스 세포(Langerhans cells), 줄기 세포(stem cells), 수지상 세포(dendritic cells), 말초 혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 종양-침윤(tumor-infiltrating, TIL) 세포, 하이브리도마(hybridoma)를 포함하는 유전자 변형된 면역 세포, 약물 변형된 면역 세포, 및 상기 세포 유형의 유도체, 전구체(precursors), 또는 전구세포(progenitors)를 포함하나, 이에 제한되지 않는 분석될 수 있는 면역 시스템의 임의의 세포를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 상기 확장된 및/또는 활성화된 면역 세포는 NK 세포이다.

- [0023] 본원에 사용된 바와 같이, 상기 용어 “자연 살해 세포(Natural Killer Cells, NK cells)”은 이의 일반적인 의미를 가지며 바이러스 감염된 세포에 대한 빠른 방을 제공하고 형질전환된 세포에 반응하는 면역 시스템의 세포 독성 림프구의 유형을 의미한다. 일반적으로, 면역 세포는 감염된 세포의 표면에 주요 조직 적합성 복합체(MHC) 분자에 의해 존재하는 병원체로부터 펩타이드를 검출하여, 사이토카인 방출을 유발하고 용해 또는 아포토시스를 일으킨다. 그러나, NK 세포는 병원체로부터의 펩타이드가 MHC 분자에 존재하는지에 관계없이 스트레스 받은 세포를 인식할 수 있는 능력이 있어서 독특하다. 일부 양태에서, 상기 NK 세포는 포유동물 NK 세포이다. “포유동물(mammalian)” 또는 “포유류(mammals)”의 예는 영장류(예를 들어, 인간), 개과(canines), 고양이과(felines), 설치류(rodents), 돼지류(porcine), 반추 동물(ruminants) 등을 포함한다. 특정한 예는 인간, 개, 고양이, 말, 소, 양, 염소, 토끼, 기니피그, 랫 및 마우스를 포함한다. 특정 양태에서, 상기 포유동물 NK 세포는 인간 NK 세포이다.
- [0024] 몇몇 실시양태에서, 상기 확장 및/또는 활성화는 본원에 제공된 조작된 세포 집단 중 하나와 NK 세포를 포함하는 말초 혈액 샘플과 같은 혈액 샘플을 공동-배양하는 것을 포함한다.
- [0025] 몇몇 실시양태에서, 본원에 제공된 조작된 세포 집단은 mbIL15를 코딩하는 제1 작제물을 세포에 형질도입하여, 제1 형질도입된 세포 집단을 생성하는 단계, 상기 제1 형질도입된 세포 집단을 확장시키는 단계, 4-1BBL을 코딩하는 제2 작제물을 상기 제1 형질도입된 세포 집단에 형질도입하여, 제2 형질도입된 세포 집단을 생성하는 단계, 면역 세포를 자극할 수 있는 적어도 하나 이상의 추가적인 분자를 코딩하는 제3 작제물을 상기 제2 형질도입된 세포 집단에 형질도입하여, 제3 형질도입된 세포 집단을 생성하는 단계; 및 상기 제3 형질도입된 세포 집단을 확장시키는 단계를 포함하는 방법으로 제조된다. 몇몇 실시양태에서, 본원에 제공된 조작된 세포 집단은 mbIL15를 코딩하는 제1 작제물, 4-1BBL을 코딩하는 제2 작제물, 및 면역세포를 자극할 수 있는 적어도 하나 이상의 추가 분자를 코딩하는 제3 작제물로 세포 집단에 동시에 형질도입함으로써 제조될 수 있다. 또 다른 추가의 실시양태에서, 본원에 제공된 조작된 세포 집단은 mbIL15, 4-1BBL, 및 면역세포를 자극할 수 있는 적어도 하나 이상의 추가 분자를 코딩하는 단일 작제물을 세포 집단에 형질도입함으로써 제조될 수 있다.
- [0026] 추가로, 몇몇 실시양태에서, 조작된 세포 집단은 mbIL15, 4-1BB, 및 mbIL12A, mbIL12B, mbIL18, mbIL21, mbIL22, 및 mb  $\alpha$ -CD3 또는 이의 단편 중 하나 이상을 코딩하는 작제물을 세포에 형질도입하는 단계를 포함하는 방법으로 제조될 수 있다.
- [0027] 본원에 기재된 조작된 세포 집단을 제조하는데 사용하기 위하여, mbIL15를 코딩하는 핵산, 4-1BBL을 코딩하는 핵산, mbIL12A를 코딩하는 핵산, mbIL12B를 코딩하는 핵산, mbIL18을 코딩하는 핵산, mbIL21을 코딩하는 핵산, mbIL22를 코딩하는 핵산, 및 mb  $\alpha$ -CD3을 코딩하는 핵산을 포함하는 그룹으로부터 적어도 3개 이상을 포함하는 복수의 핵산을 또한 제공한다. 몇몇 실시양태에서, 상기 복수의 핵산은 선택적으로 단일 작제물(예를 들어, 코딩되거나 작동적으로 링크됨)로 구성된다. 몇몇 실시양태에서, 상기 복수의 핵산은 하나 이상의 작제물의 부분으로 구성된다. 몇몇 실시양태에서, mbIL15는 서열번호 1로 코딩된다. 몇몇 실시양태에서, 4-1BBL은 서열번호 13으로 코딩된다. 몇몇 실시양태에서, mbIL12A는 서열번호 3으로 코딩된다. 몇몇 실시양태에서, mbIL23B는 서열번호 5로 코딩된다. 몇몇 실시양태에서, mbIL18은 서열번호 7로 코딩된다. 몇몇 실시양태에서, mbIL21은 서열번호 9 또는 이의 단편으로 코딩된다. 몇몇 실시양태에서, mbIL22는 서열번호 11 또는 이의 단편으로 코딩된다. 몇몇 실시양태에서, mb  $\alpha$ -CD3은 서열번호 16으로 코딩된다. 실시양태에 따라, 하나 이상의 복수의 핵산은 선택적으로 FLAG 태그(tag), HIS 태그, GFP 또는 다른 태그와 같은 태그 및/또는 당업자에게 알려진 마커를 포함한다.
- [0028] 몇몇 실시양태에서, NK 세포 및 T 세포를 포함하는 혼합된 면역 세포 집단을 포함하는 말초 혈액 샘플을 수득하는 단계, 막-결합된 인터루킨-15(membrane-bound interleukin-15, mbIL15), 4-1BB 리간드(4-1BB ligand, 4-1BBL) 및 면역 세포 활성화를 자극하는 적어도 하나 이상의 추가적인 분자가 발현되도록 변형되고, MHC I의 발현이 감소된 조작된 세포 집단에 혼합된 세포 집단을 접촉시키는 단계, 및 상기 면역 세포의 혼합된 집단의 NK 세포를 확장시키기, 충분한 시간 동안 상기 혼합된 세포 집단과 조작된 세포를 공동-배양하여, 상기 NK 세포를 확장시키는 단계를 포함하는 NK 세포를 확장시키는 방법이 본원에서 제공된다. 몇몇 실시양태에서, 상기 방법은 선택적으로 공동-배양에 사용된 배지에 IL2를 첨가하는 단계를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 상기 방법은 선택적으로, 공동-배양 전 또는 후에 상기 혼합된 집단으로부터 T 세포를 제거하는 단계를 추가로 포함한다. NK 세포 및 T 세포를 포함하는 혼합된 면역 세포 집단을 제거 및/또는 분리하는 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다.
- [0029] 하나의 실시양태에서, 주요 조직 적합성 복합체 I 분자가 결핍된 K562 골수성 백혈병 세포 (myeloid leukemia

cells)를 포함하는 변형된 세포주로서, 상기 K562 골수성 백혈병 세포는 막-결합된 인터루킨-15, 4-1BB 리간드, 및 막-결합된 항-CD3 항체를 발현하도록 유전적으로 변형된 세포주가 제공된다. 상기 용어 “유전적으로 변형된 (genetically modified)” 및 “유전자 조작된 (genetically engineered)” 은 일반적인 의미를 가지며, 상호 교환가능하게 사용되며, 유기체 게놈(organism's genome)의 적어도 한 부분의 하나이상의 양태를 조작하기 위해 생명 공학을 사용하는 것을 의미한다.

[0030] 하나의 실시양태에서, 주요 조직 적합성 복합체 I 분자가 결핍된 K562 골수성 백혈병 세포를 포함하는 변형된 세포주로서, 상기 K562 골수성 백혈병 세포는 막-결합된 인터루킨-15, 막-결합된 4-1BB 리간드, 및 적어도 하나 이상의 추가적인 막-결합된 인터루킨을 발현하도록 유전적으로 변형된 세포주가 제공된다. 몇몇 실시양태에서, 상기 적어도 하나 이상의 추가 막-결합된 인터루킨은 인터루킨-12, 인터루킨-18, 및 인터루킨-12 및 인터루킨-18의 조합 중 하나 이상이다. 몇몇 실시양태에서, 상기 변형된 세포는 막-결합된 항-CD3 항체를 추가로 포함한다. 이들 추가적으로 막 결합된 신호 분자의 조합은 몇몇 실시양태에서 사용된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 상기 용어 “신호 분자(signaling molecules)” 는 일반적인 의미를 가지며, 인터루킨, CD3, 4-1BB 등을 포함하나 이제 제한되지는 않는다.

[0031] 하나의 실시양태에서, 주요 조직 적합성 복합체 I 분자가 결핍된 K562 골수성 백혈병 세포를 포함하는 변형된 세포주로서, 상기 K562 골수성 백혈병 세포는 막-결합된 인터루킨-15, 막-결합된 4-1BB 리간드, 막-결합된 항-CD3 항체 및 적어도 하나 이상의 추가적인 막-결합된 인터루킨을 발현하도록 유전적으로 변형된 세포주가 제공된다.

[0032] 본원에 기재된 임의의 변형된 세포주와 NK 세포 및 T 림프구를 포함하는 혼합된 세포 배양물을 배양함으로써 확장 및/또는 활성화된 NK 세포 집단이 본원에서 제공된다. 이러한 NK 세포 집단은 암 또는 감염성 질환의 치료를 위해 사용될 수 있고/있거나 이러한 치료를 위한 약제의 제조에 사용될 수 있다. 암 또는 감염성 질환의 치료에 사용하기 위한 활성화된 NK 세포와 같이, 본원에 기재된 조작된 세포 집단은 NK 세포의 활성화에 사용하기에 적합하다.

[0033] 확장 및/또는 활성화된 NK 세포를 사용하여 질환을 치료하는 방법이 또한 본원에서 제공된다. 예를 들어, 몇몇 실시양태에서, 암 또는 감염성 질환을 치료하는 방법이 제공되며, 암(예를 들어, 고형 또는 현탁액인 종양) 또는 감염성 질환이 있는 개체에 확장된 면역 세포 집단을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 상기 면역된 세포는 막-결합된 인터루킨-15(mbIL15) 및 막-결합된 4-1BB 리간드(4-1BBL)를 발현시키도록 변형된 조작된 세포 집단과 면역 세포를 공동-배양함으로써 확장되고, 상기 조작된 세포 집단은 면역 세포 활성화를 자극하는 적어도 하나 이상의 추가적인 막 결합된 인터루킨을 발현시키도록 변형되었다. 몇몇 실시양태에서, 상기 공동-배양은 적어도 하나 이상의 면역 세포 서브집단(subpopulation of immune cells)의 활성화 및 확장을 야기하며, 상기 적어도 하나 이상의 면역 세포 서브집단이 상기 개체에 투여된다. 몇몇 실시양태에서, 상기 조작된 세포 집단은 암세포, 예를 들어 불멸화된 세포주로부터 유래된다. 몇몇 실시양태에서, 상기 투여된 면역세포 서브집단은 NK 세포를 포함한다.

### 과제의 해결 수단

[0034] 많은 질병의 기초가 되는 비정상 세포 (바이러스 감염 및 악성 세포 포함)의 출현 및 지속성은 상기 비정상 세포에 대한 불충분한 면역 반응에 의해 가능하다. 면역 요법의 목표는 예를 들어, 자연 살해 (NK) 세포와 같은 면역 세포의 손상 또는 질환 세포를 손상, 사멸 또는 억제하는 능력을 향상시키기 위해 환자의 면역 시스템의 반응을 개시 또는 증강시키는 것이다. 질환 또는 손상된 세포를 특이적으로 식별하고 반응하는 특정 표적화 및/또는 이펙터 분자로 조작된 면역 세포의 임상 전달은 특히 유망한 면역 요법 접근법(immunotherapy approach)이다. 이 접근법의 하나의 변형은 키메라 수용체를 발현하도록 조작된 T 세포를 환자에게 투여하여 관심있는 비정상 세포의 표적화된 인식 및 파괴를 유도하는 것을 포함한다. 그러나, 이 접근법의 단점은 환자에서 이식-대-숙주-질환(graft-versus-host-disease)의 유도를 방지하기 위해 자가 세포(autologous cell)(또는 MHC-호환성 기증자 세포)의 사용을 선호할 수 있는 것이다. 추가로, 암 환자의 자가 T 세포(autologous T cell)의 검색 및 사용은 몇몇 잠재적으로 불리한 문제(adverse issue)를 제기한다. 그러나, NK 세포는 본원에 기재된 몇몇 실시양태에 따라 자가 또는 기증자-유래 동종 이계 세포(donor-derived allogeneic cell)가 사용될 수 있다는 점에서 유리하다. NK 세포가 면역 세포 집단에서 전체 세포의 작은 분율을 나타내기 때문에, NK 세포 기반 면역 요법과 관련된 하나의 도전은 유전자 조작(genetic manipulation) 및 주입(infusion)을 위해 적절히 크고 충분히 순수한 (예를 들어, 다른 세포 유형이 없는) 양의 NK 세포를 얻는 것이다.

[0035] 따라서, NK 세포-기반 면역 요법(NK cell-based immunotherapy)에 사용하기 위한 NK 세포의 더 큰 확장에 대

한 요구가 남아있다. 이와 같이, 몇몇 실시양태에서, 본원에 기재된 변형된 세포주를 면역 세포 시작 집단과 공동-배양으로부터 유래된 확장 및 활성화된 NK 세포 집단이 제공된다. 몇몇 실시양태에서, 상기 면역 세포 시작 집단은 NK 세포 및 T 세포를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, NK 세포 및 T 세포를 포함하는 혼합된 세포 배양물에서 NK 세포를 우선적으로 확장시키는 방법이 제공되며, 이는 상기 혼합 세포 배양 물을 본원에 기재된 변형된 세포주와 공동 배양하는 것을 포함한다. 실시양태에 따라, 우선적인 확장은 다른 면역 세포와 비교하여 NK 세포의 2 배, 3 배, 5 배, 10 배 또는 그 이상으로의 확장을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 추가의 실시양태에서, 우선적 확장은 다른 면역 세포 유형의 확장보다 적어도 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 50% 이상인 NK 세포 확장을 의미한다. 몇몇 실시양태에서, NK 세포 및 T 세포를 포함하는 혼합된 세포 배양물에서 NK 세포를 확장시키기 위해 본원에 기재된 임의의 변형된 세포주를 사용하는 방법이 또한 제공된다.

[0036] 면역 세포 확장에 사용하기 위한 세포

[0037] 몇몇 실시양태에서, 세포주는 확장될 면역 세포 집단과의 공동-배양에 사용된다. 이러한 세포주는 본원에서 "자극 세포(stimulatory cell)"를 의미하며, 이는 "피더 세포(feeder cells)"라고도 의미할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 면역 세포의 전체 집단이 확장되어야 하는 반면, 몇몇 실시양태에서, 선택된 면역 세포 서브집단이 우선적으로 확장된다. 예를 들어, 몇몇 실시양태에서, NK 세포는 다른 면역 세포 서브집단에 비해 우선적으로 확장된다. 일부 실시양태에서, 자극성 세포는 야생형 세포(wild type cells)이지만, 몇몇 실시양태에서, 상기 자극성 세포는 이들이 면역 세포를 확장 및/또는 활성화시키는데 특히 적합하도록 유전자 변형된다. 하기에 보다 상세하게 논의되는 바와 같이, 다양한 세포주는 유전자 변형을 처리하여 NK 활성화를 자극하는 특정 분자의 표면 발현을 초래할 수 있다. 특정 세포주는 예를 들어, NK 세포에 대한 억제 효과를 갖는 MHC I 분자를 발현하지 않는 NK 세포를 확장시키는 것이 특히 가능하다. 일부 실시양태에서, 상기 세포는 MHC I 발현이 완전히 결핍될 필요는 없지만, 야생형 세포보다 낮은 레벨에서 MHC I 분자를 발현할 수 있다. 예를 들어, 몇몇 실시양태에서, 야생형 세포가 X 레벨에서 MHC를 발현하는 경우, 사용된 세포주는 X의 95% 미만, X의 90% 미만, X의 85% 미만, X의 80% 미만, X의 70% 미만, X의 50% 미만, X의 25% 미만, 및 열거된 것들 사이(및 포함하는)에서 임의의 발현 수준에서 MHC를 발현할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 상기 자극 세포는 불멸화된, 예를 들어, 암 세포주이다. 그러나, 몇몇 실시양태에서, 상기 자극성 세포는 1차 세포(primary cell)이다.

[0038] MHC I 발현이 결여되거나 감소된 세포 유형은, K562 세포, 특정 Wilm 's 종양 세포주(certain Wilm' s Tumor cell lines)(예를 들어, Wilms 종양 세포주 HFWT), 자궁 내막 종양 세포(endometrial tumor cells)(예를 들어, HHUA), 흑색종 세포(melanoma cells)(예를 들어, HMV-II), 간 모세포종 세포(hepatoblastoma cells)(예를 들어, HuH-6), 폐 소세포성 암종 세포(lung small cell carcinoma cells)(예를 들어, Lu-130 및 Lu-134-A), 신경 모세포종 세포(neuroblastoma cells)(예를 들어, NB19 및 NB69), 배아 암종 고환 세포 (embryonal carcinoma testis cells)(예를 들어, NEC14), 자궁 경부 암종 세포(cervical carcinoma cells, TCO-2), 신경 모세포종 세포(neuroblastoma cells)(예를 들어, TNB1), 721.221 EBV 형질 전환 된 B 세포주(EBV transformed B cell line) 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 몇몇 실시양태에서, 상기 자극 세포는 또한 감소된(또는 결핍된) MHC II 발현뿐만 아니라, 감소된(또는 결핍된) MHC I 발현을 갖는다. 일부 실시양태에서, MHC I 발현을 감소시키거나 녹아웃시키기 위해 이들 세포의 유전자 변형과 함께 컨주게이션에서, MHC 클래스 I 분자를 처음 발현할 수 있는 다른 세포주가 사용될 수 있다. 유전자 변형은 유전자 편집 기술(예를 들어, crispr/cas-9 시스템), 억제 RNA(예를 들어, siRNA) 또는 상기 세포의 표면 상에 MHC I 분자의 발현을 방해 및/또는 감소시키는 다른 분자 방법을 사용하여 달성할 수 있다. 추가적으로, 또는 대안적으로, MHC I 분자와의 결합 또는 다른 상호작용을 블로킹하기 위한 다른 접근법이 사용될 수 있다 (예를 들어, 항체 블로킹(blocking antibodies), 간섭 리간드(interfering ligands) 등).

[0039] 몇몇 실시양태에서, 확장/자극된 자극 세포 대 세포의 특정 비율이 사용된다. 예를 들어, 몇몇 실시양태에서, 자극성 세포: "표적(target)" 세포는 약 5:1의 비율이 사용된다. 몇몇 실시양태에서, 1:1 비가 사용되는 반면, 추가 실시양태에서 약 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:1,000, 1:10,000, 1:50,000, 1:100,000, 100,000:1, 50,000:1, 10,000:1, 1,000:1, 100:1, 50:1, 20:1, 10:1 및 엔드포인트를 포함하여 상기 열거된 것 사이에서 임의의 비의 범위일 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 유형의 조합이 사용되며 (예를 들어, 하나 이상의 추가 세포 유형을 갖는 K562), 그 결과로 NK 세포의 활성화 및/또는 확장이 임의의 단일 세포 유형 단독의 사용으로 달성될 수 있는 것보다(예를 들어, 세포 유형 사이의 상승 작용의 결과로서) 더 크다. 일부 실시양태에서, MHC I 발현은 조합하여 사용되는 각각의 세포주에서 반드시 감소 및/또는 부존재할 필요는 없다. 일부 실시양태에서, 요구된 면역 세포 집단의 확장 및 활성화를 최대화하기 위해 조합에서 하나의 세포 유형 대 다른 세포 유형의 상대적인 빈도(relative frequency)를 변화시킬 수 있다. 예를 들어, 2 개의 세포 집단이 사용되는

경우, 상대적인 빈도는 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:1,000, 1:10,000, 1:50,000, 1:100,000, 100,000:1, 50,000:1, 10,000:1, 1,000:1, 100:1, 50:1, 20:1, 10:1 및 엔드포인트를 포함하여 상기 열거된 것 사이에서 임의의 비의 범위일 수 있다.

[0040] 하기에 보다 상세하게 논의된 바와 같이, 특정 자극 분자(예를 들어, 인터루킨, CD3, 4-1BBL 등)는 면역 세포 확장 및 활성화(예를 들어, 자극 세포)를 촉진하는 세포 상에서 또는 그에 의해 발현될 수 있다. 그러나, 몇몇 실시양태에서, 면역 세포 확장을 촉진시키기 위해 세포와 함께 컨주게이션 또는 세포 대신에, 고체 지지체가 사용된다. 예를 들어, 고체 지지체는 금속, 유리, 플라스틱, 중합체 물질, 입자(예를 들어, 비드 또는 마이크로스피어(microspheres)) 및/또는 지질(천연 또는 합성)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 표면에 분자가 부착될 수 있는 표면이다. 일부 실시양태에서, 요구된 면역 세포 집단의 확장을 용이하게 하기 위해 배양 배지 내로, 본원에 기재된 바와 같이, 자극 분자를 용출시킬 수 있는 조성물이 사용된다.

[0041] 자극 분자

[0042] 상기에서 간략하게 논의된 바와 같이, 특정 분자는 면역 세포의 확장을 촉진한다. 실시양태에 따라, 상기 자극 분자, 또는 분자는 면역 집단을 확장시키도록 사용되는 자극 세포의 표면에서 발현될 수 있는 반면, 일부 실시양태에서 상기 자극 세포는 하나 이상의 자극 분자를 배양 배지 내에서 발현시키고 분비하도록 조작될 수 있다. 또 다른 추가적인 실시양태에서, 하나 이상의 자극 분자가 세포 배양 배지를 보충하는데 사용된다. 일부 실시양태에서, 상기 면역 세포 집단은 비교적 균일하게 확장된다(예를 들어, 특정 서브집단이 우선적으로 확장되지 않음). 일부 실시양태에서, 모든 면역 세포 집단의 확장 후, 요구된 서브집단이 추가로 사용하기 위해 선택적으로 분리된다(예를 들어, NK 세포는 T 세포에서 분리되거나 그 반대). 몇몇 실시양태에서, NK 세포와 같은 특정한 특이적 면역 세포 서브집단이 우선적으로 확장된다.

[0043] 몇몇 실시양태에서, 막 결합된 분자를 발현하기 위해 자극 세포주를 조작하기 위한 일반적인 작 제물은 막 결합된 분자, 막 결합된 분자를 코딩하는 핵산 서열, 선택적 링커 및 막전위 도메인의 발현을 궁극적으로 유도하는 신호 펩티드를 사용한다. 이러한 일반적인 작제물은 주어진 막 결합된 분자를 발현하는 복잡성(complexity), 크기 또는 능력에, 적어도 부분적으로 기초하여 실시양태에 따라 달라질 수 있다.

[0044] 일부 실시양태에서, 인터루킨 15(IL15)는 NK 세포의 확장을 촉진시키기 위해 사용된다. 일부 실시양태에서, 상기 IL15는 자극 세포 상에 막 결합되어 있다(본원에서 "mbIL15"로 지칭됨). 일부 실시양태에서, IL15는 막전위 분자 또는 내재성 막 단백질(integral membrane protein)에 커플링되거나 컨주게이트되는 것에 의해서 막 결합된다. 몇몇 실시양태에서, CD8 α의 막전위 도메인이 사용된다(서열번호 18). 일부 실시양태에서, 야생형(예를 들어, 전장(full-length)) IL15는 자극 세포상에서 또는 자극성 세포에 의해 발현된다. 일부 실시양태에서, 상기 IL15는 전장 IL15와 적어도 70% 이상, 적어도 75% 이상, 적어도 80% 이상, 적어도 85% 이상, 적어도 90% 이상, 적어도 95% 이상 상동성이다. 일부 실시양태에서, 절단된 형태의 IL15가 사용된다. 일부 실시양태에서, mbIL15는 서열번호 1로 표시되는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 몇몇 실시양태에서, mbIL15는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열에 의해 코딩된다. 몇몇 실시양태에서, 상기 자극 분자는 서열번호 1 또는 2로부터 하나 이상의 추가 돌연변이를 가질 수 있으나, 유지되거나, 일부 실시양태에서, 향상된 자극 활성을 갖는다.

[0045] 몇몇 실시양태에서, 상기 자극 세포는 IL15 수용체의 전부 또는 일부를 발현하도록 조작된다. 몇몇 실시양태에서, 상기 IL15 수용체의 일부는 IL15 수용체의 기능적 일부분이다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 상기 자극 세포는 IL15 수용체 알파 서브 유닛(IL15 receptor alpha subunit)을 발현하도록 조작된다. 몇몇 실시양태에서, 상기 세포는 가용성 IL15를 생성하거나 생성하도록 조작(예를 들어, 분비)된다. 이에 의해 상기 가용성 IL15는 자극 세포에 의해 발현된 이의 수용체에 결합하고 이어서 내재화되고(예를 들어, 엔도사이토시스) 다른 세포에 존재할 수 있다. 본질적으로, 일부 실시양태에서, 조작된 mbIL15를 발현하도록 자극 세포를 조작하는 대신에, 상기 자극 세포는 IL15 수용체 알파 서브유닛을 발현시키도록 조작될 수 있고, 이는 IL15에 결합하여(남아있는 IL15 수용체 CD122 및 CD132 서브유닛의 부존재의 경우), 이를 세포 표면 상에 제시하여 mbIL15에 대한 대안적인 방식으로 IL15 발현을 초래한다.

[0046] 일부 실시양태에서, 인터루킨 12A(IL12A) 및/또는 12B(IL12B)는 NK 세포의 확장을 용이하게 하기 위해 사용된다. 일부 실시양태에서, 상기 IL12는 자극 세포(본원에서 "mbIL12"를 의미함) 상에 막 결합되어 있다. 일부 실시양태에서, IL12A 및 IL12B의 조합이 사용된다(본원에서 "IL12A/IL12B", 및 막 결합된 경우 "mbIL12A/12B"). 일부 실시양태에서, IL15는 막전위 단백질 또는 내재성 막 단백질에 커플링되거나 컨주게이트되어 막 결합된다. 몇몇 실시양태에서, CD8 α의 막전위 도메인이 사용된다. 몇몇 실시양태에서, 야생형(예를 들어 전장(full-length)) IL12A 및/또는 12B는 자극 세포상 또는 자극 세포에 의해 발현된다. 일부 실시양태에서,

IL12A 및/또는 12B는 각각 전장 IL12A 또는 12B와 적어도 70% 이상, 적어도 75% 이상, 적어도 80% 이상, 적어도 85% 이상, 적어도 90% 이상, 적어도 95% 이상의 상동성이다. 일부 실시양태에서, IL12A 및/또는 12B의 절단된 형태가 사용된다. 몇몇 실시양태에서, mbIL12A는 서열번호 3으로 표시되는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 몇몇 실시양태에서, mbIL12A는 서열번호 4로 표시되는 아미노산에 의해 코딩된다. 몇몇 실시양태에서, 상기 자극 분자는 서열번호 3 또는 4로부터 하나 이상의 추가 돌연변이를 가질 수 있으나, 일부 실시양태에서, 향상된 자극 활성을 유지한다. 몇몇 실시양태에서, mbIL12B는 서열번호 5로 표시되는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 몇몇 실시양태에서, mbIL12B는 서열번호 6으로 표시되는 아미노산에 의해 코딩된다. 몇몇 실시양태에서, 상기 자극 분자는 서열번호 5 또는 6으로부터 하나 이상의 추가 돌연변이를 가질 수 있으나, 일부 실시양태에서, 향상된 자극 활성을 유지한다. 일부 실시양태에서, IL12A 및 IL12B의 혼합물이 사용된다. 몇몇 실시양태에서, IL12A:IL12B의 특정 발현 비, 예를 들어, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10,000, 10,000:1, 1000:1, 100:1, 10:1 및 엔드포인트를 포함하여 상기 열거된 것 사이에서 임의의 비가 사용된다. 일부 실시양태에서, IL12A 및 IL12B는 예를 들어, 융합 단백질(fusion protein)으로서 발현된다. 일부 실시양태에서, 단편, 또는 IL12A의 단편은 단편, 또는 IL12B의 단편과 컨주게이션하여 발현된다. 몇몇 실시양태에서, 자극 세포에서 IL12(A 및/또는 B)의 발현은 상기 확장된 세포의 표현형(phenotype) 및 기능에 영향을 미치는 능력을 세포에 부여한다. 다시 말해서, IL12A 및/또는 B의 발현(단독 또는 본원에 기재된 다른 자극 분자와의 조합)은 몇몇 실시양태에서, NK 세포 서브집단의 선택적 확장을 야기한다. 몇몇 실시양태에서, 특정 서브 집단은 NK 세포의 특정 표현이 특히 효과적인 특정한 치료 효과에 유리할 수 있다.

[0047] 일부 실시양태에서, 인터루킨 18(IL18)은 NK 세포의 확장을 촉진시키기 위해 사용된다. 일부 실시양태에서, 상기 IL18은 자극 세포(본원에서 “mbIL18”을 의미함)에 막 결합되어 있다. 일부 실시양태에서, IL18는 막전위 분자 또는 내재성 막 단백질과 커플링되거나 컨주게이트되어 막 결합된다. 몇몇 실시양태에서, CD8 $\alpha$ 의 막전위 도메인이 사용된다. 몇몇 실시양태에서, 야생형(예를 들어, 전장) IL18은 자극 세포 상에서 또는 자극 세포에 의해 발현된다. 일부 실시양태에서, 상기 IL18은 전장 IL18과 적어도 70% 이상, 적어도 75% 이상, 적어도 80% 이상, 적어도 85% 이상, 적어도 90% 이상, 적어도 95% 이상의 상동성이다. 일부 실시양태에서, IL18의 절단된 형태가 사용된다. 몇몇 실시양태에서, mbIL18은 서열번호 7로 표시되는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 몇몇 실시양태에서, mbIL18은 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열에 의해 코딩된다. 몇몇 실시양태에서, 상기 자극 분자는 서열번호 7 또는 8의 하나 이상의 추가 분자를 가질 수 있으나, 일부 실시양태에서, 향상된 자극 분자를 갖거나 유지한다. 몇몇 실시양태에서, 상기 자극 세포에서 IL18의 발현은 확장된 세포의 표현형 및 기능에 영향을 미치는 능력을 세포에 부여한다. 다시 말해서, IL18의 발현(단독 또는 본원에 기재된 다른 자극 분자와의 조합)은 몇몇 실시양태에서 NK 세포 서브 집단의 선택적 확장을 야기한다. 몇몇 실시양태에서, 특정 서브집단은 NK 세포의 특정 표현형이 특히 효과적인 경우 특정한 치료 영향에 유리할 수 있다.

[0048] 일부 실시양태에서, 인터루킨 21(IL21)은 NK 세포의 확장을 촉진시키기 위해 사용된다. 일부 실시양태에서, 상기 IL21은 자극 세포상에 막 결합된다(본원에서 “mbIL21”을 의미함). 일부 실시양태에서, 상기 IL21은 막전위 분자 또는 내재성 막 단백질에 커플링되거나 컨주게이트되어 막 결합된다. 몇몇 실시양태에서, CD8 $\alpha$ 의 막전위 도메인이 사용된다. 몇몇 실시양태에서, 야생형(예를 들어, 전장) IL21은 자극 세포 상 또는 자극 세포에 의해 발현된다. 일부 실시양태에서, 상기 IL21은 전장 IL21과 적어도 70% 이상, 적어도 75% 이상, 적어도 80% 이상, 적어도 85% 이상, 적어도 90% 이상, 적어도 95% 이상이 상동성이다. 일부 실시양태에서, IL21의 절단된 형태가 사용된다. 몇몇 실시양태에서, NK 세포를 자극하는데 사용되는 mbIL21은 서열번호 9로 표시되는 핵산 서열로부터 유래된다. 본원에 기재된 바와 같이, 몇몇 실시양태에서, 상기 CD8 $\alpha$  막전위 도메인은 자극 세포의 막에 서열번호 9의 IL21(또는 이의 단편)을 고정시키기 위해 사용된다. 몇몇 실시양태에서, NK 세포를 자극하는데 사용되는 mbIL21은 서열번호 10의 아미노산 서열로부터 유래된다. 몇몇 실시양태에서, 상기 자극 분자는 서열번호 9 또는 10으로부터 하나 이상의 추가 돌연변이를 가질 수 있으나, 일부 실시양태에서, 강화된 자극 활성을 갖거나 유지한다.

[0049] 일부 실시양태에서, 인터루킨 22(IL22)는 NK 세포의 확장을 촉진시키기 위해 사용된다. 일부 실시양태에서, 상기 IL22는 자극 세포상에 막 결합된다(본원에서 “mbIL22”를 의미함). 일부 실시양태에서, IL22는 막전위 분자 또는 내재성 막 단백질에 커플링되거나 컨주게이트되어 막 결합된다. 몇몇 실시양태에서, CD8 $\alpha$ 의 막전위 도메인이 사용된다. 몇몇 실시양태에서, 야생형(예를 들어, 전장) IL22는 자극 세포 상에서 또는 자극 세포에 의해 발현된다. 일부 실시양태에서, 상기 IL22는 전장 IL22와 적어도 70% 이상, 적어도 75% 이상, 적어도 80% 이상, 적어도 85% 이상, 적어도 90% 이상, 적어도 95% 이상 상동성이다. 일부 실시양태에서, 절단된 형태의 IL22가 사용된다. 몇몇 실시양태에서, mbIL22는 서열번호 11로 표시되는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 몇몇 실시양태에서, mbIL22는 서열번호 12로 표시되는 아미노산 서열에 의해 코딩된다. 몇몇 실시양태에서, 상기 자극 분자는 서열

번호 11 또는 12로부터 하나 이상의 추가 돌연변이를 가질 수 있으나, 일부 실시양태에서, 향상된 자극 활성을 갖거나 유지한다.

[0050] 일부 실시양태에서, 4-1 BB 리간드(4-1BBL)은 면역 세포의 확장을 촉진시키기 위해 사용된다. 4-1 BBL은 4-1BB, T 세포에서 이의 수용체와 상호작용하는 세포의 도메인(extracellular domain)을 가지며, 생존, 증식 및 분화에 대한 T 세포 공동-자극 신호(co-stimulatory signal)를 제공한다. 몇몇 실시양태에서, 야생형(예를 들어, 전장) 4-1BBL은 자극 세포 상에서 또는 자극 세포에 의해 발현된다. 일부 실시양태에서, 상기 4-1BBL은 막전위 단백질 또는 내재성 막 단백질에 커플링되거나 컨주게이트이다. 몇몇 실시양태에서, 상기 4-1 BBL은 전장 4-1BBL과 적어도 70% 이상, 적어도 75% 이상, 적어도 80% 이상, 적어도 85% 이상, 적어도 90% 이상, 적어도 95% 이상 상동성이다. 일부 실시양태에서, IL18의 절단된 형태가 사용된다. 몇몇 실시양태에서, mb4-1BBL은 서열번호 13으로 표시되는 핵산 서열에 코딩된다. 몇몇 실시양태에서, mb4-1BBL은 서열번호 14로 표시되는 아미노산 서열에 코딩된다. 몇몇 실시양태에서, 상기 자극 분자는 서열번호 13 또는 14로부터 하나 이상의 추가 돌연변이를 가질 수 있으나, 일부 실시양태에서, 향상된 자극 활성을 갖거나 유지한다.

[0051] 일부 실시양태에서, 항-CD3 항체(anti-CD3 antibody)는 면역 세포의 확장을 촉진시키기 위해 사용된다. 일부 실시양태에서, 상기 항-CD3 항체는 자극 세포 상에 막 결합된다(본원에서 “mbantiCD3” 또는 “mb α-CD3”를 의미함). 몇몇 실시양태에서, 전장 항-CD3 항체는 자극 세포에서 발현된다. 일부 실시양태에서, 상기 항-CD3 항체는 단일 사슬 단편 가변 영역(single chain fragment variable region, scFv)단편을 포함한다. 실시양태에 따라, 상기 항체는 모노클로날(monoclonal) 또는 폴리클로날(polyclonal)일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 항-CD3 항체는 Fab', F(ab')<sub>2</sub>, 단일 도메인 항체(예를 들어, 디아바디(diabody), 나노바디(nanobody))로부터 선택된 다양한 항원 단편 및/또는 융합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 무로모납-CD3(muromonab-CD3), 오텔릭시주맵(otelixizumab), 테플리주맵(teplizumab) 및 비실리주맵(visilizumab)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 상기 항체는 하나 이상의 무로모납-CD3, 오텔릭시주맵, 테플리주맵 및 비실리주맵과 적어도 70% 이상, 적어도 75% 이상, 적어도 80% 이상, 적어도 85% 이상, 적어도 90% 이상, 적어도 95% 이상 상동성이다. 몇몇 실시양태에서, T 세포 수용체의 CD3 부분의 하나 이상의 서브 유닛에 결합하는 항체는 자극 세포에 의해 발현된다. 몇몇 실시양태에서, 상기 발현된 항체는 감마, 엡실론, 또는 델타 CD3 서브유닛에 대해 지시된다. 몇몇 실시양태에서, 상기 자극 세포에 의해 발현된 항체는 서열번호 15의 CD3 엡실론 핵산 서열로부터 유래된 에피토프(epitope)에 대해 지시된다. 몇몇 실시양태에서, 상기 항-CD3 항체는 단일 사슬 단편 가변영역(single chain fragment variable, scFv)이다. 몇몇 실시양태에서, mbantiCD3 scFv는 서열번호 16으로 표시되는 핵산 서열에 의해 코딩된다. 이러한 일부 실시양태에서, 상기 항체는 서열번호 17로 표시되는 아미노산 서열을 갖는다. 몇몇 실시양태에서, 자극 분자는 서열번호 16 또는 17로부터 하나 이상의 추가 돌연변이를 가질 수 있으나, 일부 실시양태에서, 향상된 자극 활성을 갖거나 유지한다.

[0052] 몇몇 실시양태에서, K562 세포와 같은 자극 세포는 다양한 자극 세포의 조합을 발현하도록 유전자 변형된다. 실시양태에 따라, 본원에 기재된 자극 부자의 임의의 조합이 사용될 수 있다. 예를 들어, 몇몇 실시양태에서, mbIL15, 4-1BBL 및 mb α-CD3는 자극 세포 상에서 공동-발현된다. 몇몇 실시양태에서, mbIL15, 4-1BBL 및 mbIL12A/12B는 자극 세포 상에서 공동-발현된다. 몇몇 실시양태에서, mbIL15, 4-1BBL 및 mbIL18은 자극 세포 상에서 공동-발현된다. 몇몇 실시양태에서, mbIL15, 4-1BBL, mbIL18, 및 mbIL12A/12B는 자극 세포상에서 공동-발현된다. 몇몇 실시양태에서, mbIL15, 4-1BBL, mbIL12A/12B 및 mbantiCD3는 자극 세포 상에서 공동-발현된다. 몇몇 실시양태에서, mbIL15, 4-1BBL, mbIL18 및 mbantiCD3는 자극 세포 상에서 공동-발현된다. 몇몇 실시양태에서, mbIL15, 4-1BBL, mbIL12A/12B, mbIL18 및 mbantiCD3는 자극 세포 상에서 공동-발현된다. 일부 실시양태에서, mbIL21 및/또는 mbIL22는 상기 열거된 임의의 자극 분자에 추가하거나 대신하여 발현될 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 분자들 각각은 개별 플라스미드로 형질 감염을 통해 자극 세포에서 발현된다, 대안적으로, 두 개 이상의 자극 분자는 단일 플라스미드로 코딩될 수 있다.

[0053] 실시양태 및 해당 자극 분자에 따라, 자극 분자는 면역 세포 집단과의 공동-배양 과정 동안 특정 시간에 발현될 수 있다. 예를 들어, 본질적으로 발현되는 대신에, 하나 이상의 마커는 유도성 또는 달리 조절 가능한 프로모터의 조절 하에 있을 수 있다. 이와 같이, 트리거링 분자(triggering molecule) 또는 자극이 원하는 시간에 공동-배양에 첨가될 수 있어, 확장 및 활성화 프로토콜 동안에 특정 포인트에서 원하는 자극 분자의 발현을 초래할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 상기 용어 “유도성 프로모터(inducible promotor)” 및 “조절 가능한 프로모터(regulatable promotor)”는 이들의 통상적인 의미를 가지며, 특정 생물학적 또는 비생물학적 요인의 존재에 의해 조절(예를 들어, 자극 또는 억제)되는 전사 활성(transcriptional activity)인 프로모터를 의미한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 상기 용어 “트리거링 분자(triggering molecule)” 또는 “트리거링 자극

(triggering stimulus)”은 이들의 일반적인 의미를 가지며, 높거나 낮은 배양 온도에서 작용하는 알코올, 테트라사이클린(tetracycline), 스테로이드(steroids), 금속(metal) 및 다른 화합물을 포함하나, 이에 제한되지 않는 유도성 또는 조절 가능한 프로모터에 작용하는 화학적 또는 물리적 물질 또는 조건을 의미한다. 추가로, 자극 분자의 조절 가능한 발현은 배양 과정 동안 특정한 자극 분자의 발현을 감소 및/또는 제거하는데 사용될 수 있다. 이러한 실시양태는 예를 들어 NK 세포가 이러한 신호에 특히 민감한 경우에 활성화 및 확장 프로세스 동안 시점에 특정 자극을 제공하는 것으로서, NK 세포와 같은 면역 세포의 특정 서브집단의 우선적인 확장을 촉진할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 이러한 접근은 예상치 못한 강력한 NK 세포의 활성화 및 확장을 야기할 수 있다. 또 추가적인 실시양태에서, NK 세포의 증식 기간이 연장되어, 궁극적으로, 예를 들어, 암 면역 요법에 사용하기 위한 더 큰 집단의 활성화된 NK 세포를 수득할 수 있다.

[0054] 일부 실시양태에서, 서열번호 1-17에 의해 코딩된, 본원에 기재된 자극 분자의 각각의 핵산 또는 아미노산과 비교하여 적어도 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상(및 본원의 범위의 상동성을 갖는 핵산 및 아미노산 서열이 본원에 제공되며, 각각 서열번호 1-17과 비교하여 하나 이상의 기능을 나타내고, (i) NK 세포 활성화(activation), (ii) NK 세포 민감화(sensitizing), (iii) 향상된 NK 세포 증식, (iv) 향상된 NK 세포 표적 친화도, (v) 상향 조절되거나 향상된 신호 변환, (vi) 향상된 NK 세포 독성, (vii) T 세포 자극(예를 들어, 증식, 유용한 서브 집단의 선택적 확장 등), (viii) 특정 NK 세포 서브-집단의 선택적 확장, 및 (ix) 이들의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0055] 공동-배양 및 면역 세포 확장 방법

[0056] 몇몇 실시양태에서, 자극 세포는 다중 작제물(각각 발현되도록 하나 이상의 자극 분자)로 형질 도입될 수 있거나, 대안적으로 단일 작제물이 사용될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 자극 세포는 형광 태그(예를 들어, 녹색 형광 단백질, GFP 또는 다른 형광 모이어티(moiety))와 같은 식별 가능한 마커에 커플링된 자극 분자로 먼저 형질 도입된다. 추가 실시양태에서, 다른 태그가 사용될 수 있다. 예를 들어, 몇몇 실시양태에서, FLAG 태그(DYKDDDDK, 서열번호 19)가 사용된다. 또한 폴리히스티딘 태그(polyhistidine tag, His-tag)(HHHHHH, 서열번호 20), HA-tag 또는 myc-tag와 같은 다른 태그 서열도 이용 가능하다. 태그 유형의 조합이 또한 특정 실시양태에서 사용될 수 있다. 형질 도입 후, 자극 세포는 관련된 자극 분자의 발현과 관련되는 태그의 존재 및 발현의 정도에 대해 질문할 수 있다. 높은 수준의 태그 발현(따라서 높은 수준의 자극 분자 발현)을 갖는 이들 세포(또는 개별 세포)는 선택되고 확장(단일 세포가 선택된 경우 클론으로)될 수 있다. 이 후, 하나 이상의 추가 자극 분자로 추가 형질 도입을 수행한 다음, 자극 분자의 조합의 원하는 발현이 달성될 때까지 추가적인 질의 및 확장이 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 각각의 후속 형질도입과 관련된 태그는 선행 형질 도입의 태그와 다르므로, 각각의 자극 분자의 발현을 독립적으로 확인할 수 있다.

[0057] 일부 실시양태에서, 자극 세포는 배양 용기에 시딩되고 거의 합류(confluence)에 도달하도록 허용된다. 그 다음, 몇몇 실시양태에서, 면역 세포는 엔드포인트를 포함하여 나열된 것 사이의 임의의 밀도를 포함하여, 약  $0.5 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup> 내지 약  $5 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup> 범위의 원하는 농도로 배양물에 첨가할 수 있다. 면역 세포는 실시양태에 따라, 말초 혈액, 면역 세포의 분리된 물질, 분리된 NK 세포 집단 등과 같은 시작 샘플에 존재할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 혈액 샘플은 특정 집단, 예를 들어 NK 세포가 확장되도록 특정 집단을 분리하기 위해 전-처리된다. 일부 실시양태에서, 말초 혈액 샘플은 자극 세포와 공동-배양하고, 확장된 면역 세포, 예를 들어 NK 세포의 원하는 서브-집단은 확장된 세포의 혼합된 집단으로부터 선택적으로 분리된다. 확장 후, 세포는 적합한 배지, 예를 들어, RPMI-1640, 10% FCS 및 10 IU/mL IL-2에서 유지될 수 있다.

[0058] 상기 논의된 바와 같이, 몇몇 실시양태에서 면역 세포 집단을 활성화 및/또는 확장시키기에 적합한 조작된 세포 집단(본원에서 자극 세포로도 지칭함)이 제공된다. 몇몇 실시양태에서, 상기 조작된 집단은 암 세포로부터 유래되고 mbIL 15, mb4-1BBL, 면역 세포 활성화를 자극하는 적어도 하나 이상의 추가 막 결합된 분자를 발현하도록 변형되어, 면역 세포 집단과 조작된 세포의 공동-배양은 NK 세포와 같은 면역 세포의 적어도 하나 이상의 서브 집단의 활성화 및/또는 확장을 초래한다. 몇몇 실시양태에서, 추가 분자는 IL12A, IL12B, IL18, IL21, 및/또는 IL22와 같은 하나 이상의 인터루킨(또는 이의 단편)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 추가 분자는 항체를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 상기 항체는 막 결합된 항-CD3 항체(mb α-CD3), 항체 또는 scFv, 또는 이의 단편을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 상기 항체는 모노클로날이다. 몇몇 실시양태에서, 상기 항체는 적어도 하나 이상의 인터루킨, 또는 이의 단편과 공동-발현된다. 실시양태에 따라, 하나 이상의 막 결합된 분자는 인간 CD8 α의 막 통과 도메인에 커플링된다. 예를 들어, 몇몇 실시양태에서, NK 세포 및 T 세포를 포함하는 혼합된 면역 세포 집단을 포함하는 말초 혈액 샘플을 수득하는 단계, 조작된 세포 집단과 상기 혼합된 세포 집단과 접촉시키

는 단계, 및 상기 혼합된 집단의 NK 세포를 확장시키기에 충분한 시간 동안 혼합된 세포 집단과 조작된 세포를 공동-배양하는 단계를 포함하는 NK 세포를 확장시키는 방법이 제공된다. 몇몇 실시양태에서, T 세포는 선택적으로 제거되어, 보다 순수한 NK 세포집단을 초래한다.

[0059] 몇몇 실시양태에서, 상기 세포 집단은 하기의 하나 이상의 세포주로부터 유래된다: K562 세포, Wilms 종양 세포주(Wilms tumor cell line) HFWT, 자궁 내막 종양 세포주(endometrial tumor cell line) HHUA, 흑색종 세포주(melanoma cell line) HMV-II, 간 모세포종 세포주(hepatoblastoma cell line) HuH-6, 폐 소세포성폐암 세포주(lung small cell carcinoma cell lines) Lu-130 또는 Lu-134-A, 신경모세포종 세포주(neuroblastoma cell lines) NB19 또는 NB69, 배아 암종 고환 세포주(embryonal carcinoma testis cell line) NEC14, 자궁경부암 세포주(cervical carcinoma cell line) TCO-2, 및 신경모세포종 세포주(neuroblastoma cell line) TNB1. 몇몇 실시양태에서, 상기 세포 집단은 MHC I 및/또는 MHC II 분자의 발현이 부족하다.

[0060] 몇몇 실시양태에서, 면역 세포를 확장하기 위해 조작된 세포 집단을 생성하는데 사용하기 위한 복수의 핵산을 포함하는 키트가 또한 제공되며, 상기 키트는 mbIL15를 코딩하는 핵산, 4-1BBL을 코딩하는 핵산, mbIL12A를 코딩하는 핵산, mbIL12B를 코딩하는 핵산, mbIL18을 코딩하는 핵산, mbIL21을 코딩하는 핵산, mbIL22를 코딩하는 핵산, 및 mb $\alpha$ -CD3을 코딩하는 핵산 중 적어도 3개 이상을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 하나 이상의 핵산은 GFP, FLAG 태그 또는 HIS 태그와 같은 태그를 포함할 수 있다.

[0061] 본원에 기재된 유전자 조작된 세포 및/또는 본원에 기재된 유전자 조작된 세포와 공동-배양된 면역 세포의 확장된 집단을 포함하는 조성물을 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 또는 감염성 질환을 갖는 개체를 치료하는 방법이 본원에 추가로 제공된다. 본원에 사용된 바와 같이, 개체에 요법을 투여하는 것과 관련하여 상기 용어 “치료하다(treat)”, “치료하는(treating)” 및 “치료(treatment)”는 통상적인 의미를 가지며, 개체가 요법으로부터 유래하는 유의한 효과를 의미한다.

[0062] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 유전자 조작된 세포를 포함하는 조성물 및/또는 본원에 기재된 유전자 조작된 세포와 공동-배양된 면역 세포의 확장된 집단을 포함하는 조성물의 투여에 의한 개체의 치료는 하기의 효과들 중 한 가지, 두 가지, 세 가지 네 가지 또는 그 이상을 달성한다. 예를 들어, (i) 이와 관련된 질환 또는 증상의 중증도의 감소 또는 개선; (ii) 질환과 관련된 증상 지속 기간의 감소; (iii) 이와 관련된 질환 또는 증상의 진행에 대한 보호; (iv) 이와 관련된 질환 또는 증상의 퇴행; (v) 질환과 관련된 증상의 발생 또는 발병에 대한 보호; (vi) 질환과 관련된 증상의 재발에 대한 보호; (vii) 개체의 입원 감소; (viii) 입원 기간의 감소; (ix) 질환을 가진 개체의 생존 증가; (x) 질환과 관련된 증상의 수의 감소; (xi) 다른 요법의 예방 또는 치료 효과(들)의 향상, 개선, 보충, 보완 또는 증강.

[0063] 투여는 정맥 내, 동맥 내, 피하, 근육 내, 간 내, 복강 내 및/또는 영향 받은 조직으로의 국소 전달을 포함하거나 이에 제한되지 않는 다양한 경로에 의해 이루어질 수 있다. 본원에 기재된 유전자 조작된 세포와 공동-배양된 확장된 면역 세포 집단 및/또는 유전자 조작된 세포의 투여량은 이의 체질량, 질환 유형 및 상태 및 원하는 치료의 공격성에 기초하여 주어진 개체에 대해 용이하게 결정될 수 있으며, 실시양태에 따라, kg 당 약  $10^5$  세포 내지 kg 당 약  $10^{12}$  세포(예를 들어,  $10^5 - 10^7$ ,  $10^7 - 10^{10}$ ,  $10^{10} - 10^{12}$  및 이의 중첩 범위)의 범위이다. 하나의 실시양태에서, 투여량 증가 요법(dose escalation regimen)이 사용된다. 몇몇 실시양태에서, 본원에 기재된 유전자 조작된 세포와 공동-배양된 확장된 면역 세포 집단의 범위는 예를 들어 약  $1 \times 10^6$  cells/kg 내지 약  $1 \times 10^8$  cells/kg이 투여된다. 실시양태에 따르면, 다양한 유형의 암 또는 감염 질환이 치료될 수 있다. 본원에 제공된 다양한 실시양태는, 급성 림프구성 백혈병(acute lymphoblastic leukemia, ALL), 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia, AML), 부신 피질 암종(adrenocortical carcinoma), 카포시 육종(Kaposi sarcoma), 림프종(lymphoma), 위장암(gastrointestinal cancer), 맹장암(appendix cancer), 중추신경계 암(central nervous system cancer), 기저세포암(basal cell carcinoma), 담도암(bile duct cancer), 방광암(bladder cancer), 골암(bone cancer), 뇌종양(brain tumors) (성상세포종(astrocytomas), 척수 종양(spinal cord tumors), 뇌간신경교종(brain stem glioma), 두개인두종(craniopharyngioma), 뇌실막모세포종(ependymoblastoma), 뇌실막세포종(ependymoma), 수모세포종(medulloblastoma), 수질상피종(medulloepithelioma)을 포함하거나 이에 제한되지 않음), 유방암(breast cancer), 기관지암(bronchial tumors), 버킷림프종(Burkitt lymphoma), 자궁경부암(cervical cancer), 대장암(colon cancer), 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia, CLL), 만성 골수성 백혈병(chronic myelogenous leukemia, CML), 만성 척수증식성 질병(chronic myeloproliferative disorders), 관암종(ductal carcinoma), 자궁내막암(endometrial cancer), 식도암(esophageal cancer), 위암(gastric cancer), 호지킨 림프종(Hodgkin lymphoma), 비-호지킨 림프종(non-Hodgkin lymphoma), 털세포 백혈

병(hairy cell leukemia), 신장암(renal cell cancer), 백혈병(leukemia), 구강암(oral cancer), 비인두암(nasopharyngeal cancer), 간암(liver cancer), 폐암(lung cancer) (비-소세포성폐암(non-small cell lung cancer, NSCLC) 및 소세포성폐암(small cell lung cancer)을 포함하나 이에 제한되지 않음), 췌장암(pancreatic cancer), 대장암(bowel cancer), 림프종(lymphoma), 악성흑색종(melanoma), 안구암(ocular cancer), 난소암(ovarian cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 전립선암(prostate cancer), 뇌하수체암(pituitary cancer), 자궁암(uterine cancer), 및 질암(vaginal cancer)을 포함하나, 이제 제한되지는 않는 암의 비-제한적인 실시예의 치료 또는 예방을 포함한다.

[0064] 추가로, 본원에 제공된 다양한 실시양태는 박테리아 기원의 감염을 포함하나 이에 제한되지 않는 감염성 질병의 하기 비-제한적인 예의 치료 또는 예방을 포함하며, 예를 들어, 하나 이상의 하기 박테리아의 감염을 포함할 수 있다: 보르데텔라속(*Bordetella*), 보렐리아속(*Borrelia*), 브루셀라속(*Brucella*), 캄필로박터속(*Campylobacter*), 클라미디아속(*Chlamydia*) 및 클라미도필라속(*Chlamydomydia*), 클로스트리듐속(*Clostridium*), 코리네박테리움속(*Corynebacterium*), 엔테로코커스속(*Enterococcus*), 에스케리키아(*Escherichia*), 프란시셀라속(*Francisella*), 헤모필루스속(*Haemophilus*), 헬리코박서속(*Helicobacter*), 레지오넬라속(*Legionella*), 렙토스피라속(*Leptospira*), 리스테리아속(*Listeria*), 미코박테리움속(*Mycobacterium*), 미코플라스마속(*Mycoplasma*), 나이세리아속(*Neisseria*), 슈도모나스속(*Pseudomonas*), 리케차속(*Rickettsia*), 살모넬라속(*Salmonella*), 시겔라속(*Shigella*), 스타필로코커스속(*Staphylococcus*), 스트렙토코커스속(*Streptococcus*), 트레포네마속(*Treponema*), 비브리오속(*Vibrio*), 및 예르시니아(*Yersinia*), 및 돌연변이 또는 이의 조합. 몇몇 실시양태에서, 아데노 바이러스(adenovirus), 콕사키바이러스(Coxsackievirus), 엡스타인-바 바이러스(Epstein-Barr virus), A형간염바이러스(hepatitis a virus), B형간염바이러스(hepatitis b virus), C형간염바이러스(hepatitis c virus), 단순포진바이러스 1형(herpes simplex virus, type 1), 단순포진바이러스 2형(herpes simplex virus, type 2), 거대세포바이러스(cytomegalovirus), 에볼라 바이러스(ebolavirus), 인간 헤르페스 바이러스 8형(human herpesvirus, type 8), HIV, 인플루엔자 바이러스(influenza virus), 홍역 바이러스(measles virus), 뎀프스 바이러스(mumps virus), 인간 파필로마바이러스(human papillomavirus), 파라인플루엔자 바이러스(parainfluenza virus), 폴리오바이러스(poliovirus), 광견병 바이러스(rabies virus), 호흡기 세포융합 바이러스(respiratory syncytial virus), 풍진 바이러스(rubella virus), 및 수두-대상포진 바이러스(varicella-zoster virus)와 같은 하나 이상의 바이러스에 의해 야기된 것과 같은 바이러스 감염을 치료하기 위한 다양한 치료 방법이 제공된다.

[0065] 몇몇 실시양태에서, 상기 확장된 및/또는 활성화된 세포는 치료 유효량(예를 들어, 암과 관련된 증상을 개선하여 암을 치료하기에 충분한 양, 암 발병 예방 또는 지연시키기에 충분한 양, 또한 암 증상의 중증도 또는 빈도를 감소시키기에 충분한 양 및/또는 암 전이의 예방, 지연 또는 극복하기에 충분한 양)으로 투여된다. 특정 개인의 치료에 치료학적으로 효과적인 양은 상태(예를 들어, 암)의 증상 및 중증도에 따라 것이고, 표준 임상 기술에 의해 결정될 수 있다. 또한, 최적의 투여량 범위를 식별하는 것을 돕기 위해 시험관 내(in vitro) 또는 생체 내(in vivo) 분석이 임의로 사용될 수 있다. 제제(formulation)에 사용되는 정확한 용량은 또한 투여 경로, 및 암의 심각성에 의존할 것이며, 의사의 판단 및 각 환자의 상황에 따라 결정되어야 한다. 유효량은 시험관 내 또는 동물 모델 실험 시스템으로부터 유도된 용량-반응 곡선(dose-response curve)으로부터 추정될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 상기 확장된 면역 세포는 하나 이상의 자극 세포와 공동-투여되는 반면, 일부 실시양태에서, 상기 자극 세포(또는 자극 세포에 의해 생성, 분비 또는 수확된 하나 이상의 인자)는 내인성 면역 세포 집단(endogenous immune cell populations)을 활성화시키기 위해 투여된다.

[0066] 투여 방법은 피부내, 근육 내, 복강 내, 정맥 내, 피하, 국소, 경구 및 비강내 투여를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 다른 적합한 도입 방법은 또한 유전자 요법(gene therapy), 재충전 또는 생분해성 장치(rechargeable or biodegradable devices), 입자 가속 장치(예를 들어, “유전자 총(gene guns)”) 및 서방형 중합체 장치(slow release polymeric devices)를 포함할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 또한 몇몇 실시양태에서, 다른 화합물과의 혼합치료 요법(combinatorial therapy)의 일부로서 투여될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0067] 하기 도면의 설명은 본원에 기재된 발명의 비-제한적인 실시양태를 나타내는 실험 및 결과에 관한 것이다. 도 1A-1G는 본원에 기재된 몇몇 실시양태에 따라 면역 세포를 확장시키는데 사용하기 위한 조작된 세포의 비-제한적인 실시예를 나타낸다. 막 결합된 IL12A/12B(mbIL12A/12B; 도 1A), 막 결합된 IL18 (mbIL18; 도 1B), 또는 이들의 조합(도 1C)과 같이, 상기 K562 세포(실시예로서)가 다른 사이토카인과 함께 4-1BB에 대한 리간드(4-

1BBL) 및 막 결합된 IL15(mbIL15)를 발현하는 작제물이 제공된다. 또한 상기 세포(실시예로서 K562를 사용)가 사이토카인의 조합(mbIL12A/12B 및/또는 mbIL18, 도 1D-1F) 및 항체(예를 들어 막 결합된 항-CD3(mbantiCD3, 도 1G))와 함께 4-1BBL 및 mbIL15를 공동-발현하는 작제물이 제공된다.

도 2A-2F는 본원에 기재된 몇몇 실시양태에 따라 K562에 의한 다양한 유전자의 발현의 유세포 분석 측정(flow cytometry measurements)을 나타낸다. 도 2A는 mbIL15의 발현을 나타내고, 도 2B는 4-1BBL의 발현을 나타내고, 도 2C는 mbIL18의 발현을 나타내고, 도 2D는 mbIL12A의 발현을 나타내고, 도 2E는 mbIL12B의 발현을 나타내고, 도 2F는 mb-anti-CD3의 발현을 나타낸다.

도 3A-3B는 본원에 기재된 몇몇 실시양태에 따라 다양한 K562 작제물에 의한 NK 세포의 확장과 관련한 데이터를 나타낸다. 도 3A는 초기에 시딩된 말초 혈액 단핵구 세포의 수와 비교하여, 다양한 K562 세포주( IL-2와 함께) 7일 배양 후 회수된 NK 세포의 백분율과 관련된 데이터를 나타낸다. 도 3B는 초기에 시딩된 PBMC의 수와 비교하여, 다양한 K562 세포주 7일 배양후 회수된 NK 세포의 백분율과 관련된 데이터를 나타낸다(P 값은 페어링된 t 테스트(paired t test)에 의해 계산됨).

도 4A-4F는 다양한 유전자-변형된 K562 세포로 자극된 NK 세포의 장기 확장 및 기능과 관련된 데이터를 나타낸다.

도 4A는 기재된 K562 변이체와 공동-배양될 때 시간에 따른 NK 세포의 확장과 관련된 데이터를 나타낸다. PBMC는 mbIL15 및 4-1BBL(K562-mb15-41BBL)를 발현하는 조사된 K562 세포(도 4A)와 공동-배양하거나, mbIL12(+mb12)(도 4B), mbIL18(+mb18)(도 4C), 또는 mbIL12 및 MbIL18(+mb12+mb18)(도 4D)를 발현하는 K562 mb15-41BBL 세포와 공동-배양하였다. 도 4E는 기재된 이펙터(effector):표적(target)(E:T) 비율에서 K562 세포에 대하여 확장된 NK 세포의 세포 독성(cytotoxicity)에 관련된 데이터를 나타낸다. 도 4F는 기재된 E:T 비율에서 K562 세포에 대하여 확장된 NK 세포의 세포독성에 관한 것이다. 세 번 반복 실험의 평균(±SD)를 나타낸다. P 값은 페어링된 t 테스트에 의해 계산된다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0068] 다음은 하기 기재된 실시예에서 사용된 실험 방법 및 재료의 비-제한적인 설명이다.
- [0069] 실시예 1 - K562 유도체의 준비, NK 세포의 확장
- [0070] 말초 혈액 샘플은 싱가포르 국립 대학 병원 혈액 은행(National University Hospital Blood Bank, Singapore)에서 건강한 성인 기증자로부터의 혈소판 기증 중 폐기된 익명화된 부산물로부터 수득되었다.
- [0071] 단핵구 세포(Mononucleated cell)는 Lymphoprep density step (Nycomed, Oslo, Norway)으로 원심분리하여 분리하였고 RPMI-1640으로 두 번 세척하였다. 말초 혈액 단핵구 세포로부터 초기 NK 세포를 정제하기 위해 Miltenyi(Bergisch Gladbach, Germany)의 NK 세포 분리 키트를 사용하였다.
- [0072] K562-mb15-4BBL 세포주(도 1)는 하기 기재된 바와 같이 제조되었다(Imai C, Iwamoto S, Campana D. Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells. Blood. 2005;106:376-383; Fujisaki H, Kakuda H, Shimasaki N, et al. Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. Cancer Res. 2009;69(9):4010-4017.).
- [0073] 다른 K562 변이체는 막-결합된 인터루킨(IL)-12, IL-18 또는 IL-12 및 IL-18, 또는 막-결합된 항-인간 CD3 scFv를 코딩하는 cDNA 서열을 함유하는 레트로바이러스 벡터(retroviral vector)로 K562-mb15-41BBL 세포를 형질도입함으로써 생성된다. 상기 클로닝 작제물에 대한 서열번호 21(mbIL15), 서열번호 23(mbIL12A), 서열번호 24(mbIL12B), 서열번호 25(mbIL18), 및 서열번호 26(mb-anti-CD3 scFv)로 제공된다. 상기 상응하는 cDNA를 함유하는 RD144-슈도형 MSCV 레트로 바이러스를 사용하여 K562-mb15-41BBL 세포를 형질전환시켰다. 레트로 바이러스 벡터-조건 배지를 RetroNectin (Takara, Otsu, Japan)-코팅된 폴리프로필렌(polypropylene) 튜브에 첨가하였고; 원심분리하여 상층액을 제거한 후, K562-mb15-41BBL 세포를 튜브에 첨가하였고 12시간 동안 37 °C에서 방치하였으며; 신선한 바이러스 상층액을 2일 연속으로 추가하였다. 그 다음 세포는 FBS 및 항체와 함께 RPMI-1640에서 유지하였다.
- [0074] IL-12a, IL-12b 및 IL18의 표면 발현은 알로피코시아닌(allophycocyanin)(APC; Miltenyi) 또는 피코에리트린(phycoerythrin)(PE; R&D Systems, Minneapolis, MN)이 접합된 항체 anti-12a, anti-IL12b APC (Biolegend,

San Diego, CA), anti-IL18 (MBL; Woburn, MA) 염소-항-마우스 IgG1 PE (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL)를 사용하여 유세포 분석(flow cytometry)로 분석하였다. Anti-CD3는 스트렙타비딘 APC(Jackson Immunoresearch (West Grove, PA)으로부터 모두)로 비오틴(biotin)에 접합된 염소-항-마우스 Fab2를 사용하여 검출되었다. 높은 수준의 전이 유전자를 발현하는 서브클론(subclone)을 유세포 분석으로 풍부화하였고 NK 세포 확장을 자극하는데 사용하였다.

[0075] 인간 NK 세포 확장

[0076] NK 세포를 확장시키기 위해, PBMC 및 유전자 변형된 K562 세포를 공동-배양하였다. 간단히 말하면, 말초 혈액 단핵구 세포( $3 \times 10^6$ )는 10% FBS 및 40IU/mL 인간 인터루킨(IL)-2(Novartis, Basel, Switzerland)를 함유하는 SCGM 배지(CellGenix, Freiburg, Germany)에서  $2 \times 10^6$  조사된(100Gy) K562-변형된 세포와 함께 6-웰 조직 배양 플레이트에서 배양되었다. 2-3일마다, 신선한 조직 배양 배지 및 IL-2를 첨가하였다. 공동-배양 7일 후, 잔여 T 세포는 Dynabeads CD3 (Thermo Fisher)를 사용하여 제거되었고, >90% CD56+ CD3-NK 세포를 함유하는 세포 집단을 생성하였다.

[0077] 결과

[0078] 상기 작제물을 생성하고 각각의 레트로 바이러스 벡터로 K562-mb15-41BBL 세포에 형질도입한 후, 다양한 막 결합된 분자의 발현에 대하여 유세포 분석을 사용하여 상기 K562 세포를 평가하였다. 도 2A-2F는 상기 평가의 결과를 나타낸다. 나타낸 바와 같이, 발현될 각각의 6개의 분자는 생성된 K562 세포주의 거의 100%가 상기 표시된 분자(2A - mbIL15, 2B - 41BBL, 2C - mbIL18, 2D - mbIL12A, 2E - mbIL12B, 및 2F - mb-anti-CD3)를 발현하는 것을 보여준다. 이러한 데이터는 상기 생성된 다양한 작제물이 상기 K562 세포(또는 다른 유형의 자극 세포)에 의해 요구된 자극성 분자의 발현으로 성공적으로 번역되는 것을 입증한다.

[0079] 상기 원하는 자극성 분자의 발현을 확인하여, NK 세포를 확장시키는 다양한 K562 변이체의 능력을 평가하였다. 상기 기재된 바와 같이, PBMC는 mbIL15 및 4-1BBL을 공동-발현하는 조사된 K562 세포(K562-mb15-4BBL)와 공동-배양되었다. 이 K562 작제물을 mbIL12 (+mb12), mbIL18 (+mb18), 또는 mbIL12 및 mbIL18 (+mb12+mb18)을 추가적으로 발현하는 작제물과 비교하였다. 초기에 시딩된 것과 비교하여 배양 7일 후 회수된 NK 세포(CD5의 확장 및 CD3의 결핍에 의해 정의됨)의 수를 계산하였고 도 3A에 나타내었다. 모든 배양에서, IL-2 40 IU/mL(Aldeuskin, Novartis)를 첨가하였다. 4명의 건강한 기증자로부터의 세포에 대한 5회 실험 결과를 나타내었다. 수평 막대는 중앙값에 상응한다. 이러한 데이터는 mbIL12, mbIL18, 및 이의 조합물의 추가하여 향상된 NK 세포 확장을 향한 명확한 트렌드를 나타낸다. 이는 mbIL15-41BBL을 발현하는 K562 세포의 자극적 성질을 보충하는 것은 본원에서 몇몇 실시양태에 따른 작제물을 사용하여 이루어진다는 것을 시사한다.

[0080] 도 3B는 배양 7일 동안 K562-mb15-41BBL 세포와 PBMC의 공동-배양 또는 mb12 및 mb18을 발현하는 K562-mb15-41BBL 세포와 PBMC의 공동-배양을 통하여 NK 세포를 비교하는 추가 실험을 보여준다. 이 데이터는 8 명의 기증자로부터 말초 혈액 단핵구 세포에 대한 12 회 실험으로부터 얻은 것이다. P 값은 페어링된 t 테스트에 의해 계산되었다. 이러한 데이터는 (시작 집단과 비교하여) NK 세포의 정도의 현저한 증가를 입증한다. 따라서, 본원에 기재된 몇몇 실시양태에 따른 작제물은 NK 세포 집단의 상당한 확장을 초래한다. 상기 K562 세포 발현 다중 자극성 분자가 예상치 않게 NK 세포의 탄탄한 확장을 초래하여, 치료적 적용에 사용될 수 있는 상당한 크기의 집단을 야기하기 때문에, 몇몇 실시양태에서, 이러한 확장은 특히 유리하다,

[0081] 실시예 2 - K562 변이체로 자극된 NK 세포의 기능 및 장기 확장

[0082] 장기 확장(Long-term Expansion)

[0083] 지속적으로 확장하는 NK 세포의 능력을 평가하였다. PBMC는 mbIL15 및 4-1BBL(K562-mb15-41BBL)(도 4A)를 발현하는 조사된 K562 세포 또는 mbIL12 (+mb12) (도 4B), mbIL18 (+mb18) (도 4C), 또는 mbIL12 및 mbIL18 (+mb12+mb18) (도 4D)를 모두 발현하는 K562-mb15-41BBL 세포와 공동-배양되었다. 세포 집단 더블링(doubling)을 계산하기 위해 최초 시딩된 것에 비하여 각각의 배양에서 상이한 시간 간격 후 회수된 NK 세포의 수(CD56의 확장 및 CD3의 결핍에 의해 정의됨)를 계산하였다. NK 세포의 잠재적인 확장을 갱신하는데, 신선한 유전자-변형된 K562 세포는 K562:NK 비율 5:1에서 2주마다 첨가하였고, IL-2 농도는 T 세포 고갈 후, 첫 번째 주 동안 40 IU/mL 및 그 이후 400 IU/mL에서 유지된다. 화살표는 K562 세포의 첨가에도 불구하고 NK 세포가 확장을 멈추는 시점을 나타내며, 노화를 나타낸다.

[0084] 상기 기재된 확장 데이터와 같이, 이러한 데이터는 mbIL15-41BBL의 발현이 임계 수준의 확장을 초래하는 반면,

추가 자극성 분자의 발현은 몇몇 실시양태에서, 확장의 현저한 향상을 초래한다는 것을 나타낸다. 특히, mbIL12 단독 발현은 mbIL15-41BBL 발현 세포를 사용하여 달성된 것 이상으로 NK 세포의 능력이 지속적으로 확장되는 것을 변화시키는 것으로 나타나지 않는다. 그러나, mbIL18 및 mbIL12-mbIL18 조합물을 모두 발현하는 K562 세포는 NK 세포 확장의 지속 기간을 상당히 연장시켰으며, 각각의 작제물은 거의 20주 동안 NK 세포 확장을 자극하였다(mbIL15-41BBL을 발현하는 K562 세포보다 ~3배 더 큼). 이는 본원에 기재된 몇몇 실시양태에 따르면, 특정 자극성 분자의 발현이 예기치 않게 NK 세포 확장을 향상시킬 수 있다는 것을 입증한다. 추가적으로, 몇몇 실시양태에 따르면, 다중 자극성 분자를 공동-발현하는 것은 상승적인 자극 효과를 초래할 수 있다.

- [0085] 세포 독성 분석(Cytotoxicity assays)
- [0086] NK 세포의 확장에 더하여, 상기 확장된 세포의 독성은 특정 조작된 자극 세포의 변이체가 확장된 NK 세포에 더 큰 정도의 독성을 부여했는지를 결정하였다.
- [0087] 표적 세포는 10% FBS와 함께 RPMI-1640에 현탁하고, 칼세인 AM(Sigma)로 표지되고, 96-웰 평평한 바닥 플레이트(Costar, Corning, NY)에 플레이팅하였다. 10% FBS와 함께 RPMI-1640에 현탁된 확장된 NK 세포를 지시된 바와 같이 다양한 E:T 비율로 4시간 동안 표적 세포와 공동-배양된다. 그 다음, 세포는 프로피디움 아이오드(propidium iodide)로 염색하였고 Accuri 유세포 분석기(BD Bioscience)를 사용한 유세포 분석으로 측정되었고, 생존 가능한 표적 세포(칼세인 AM-양성, 프로피디움-아이오드 음성, 및 광 산란 특성)를 나열한다.
- [0088] 도 4E는 배양 8일 및 15일 후에, 이펙터: 표적(E:T) 비율에서 4-시간 분석 중 K562 세포에 대한 NK 세포 독성의 측정 데이터를 나타낸다. 초기 8일 시점에서, E:T 비율에서, 상기 상이한 작제물로 자극받은 NK 세포는 상이한 세포독성을 나타냈다. 나타난 바와 같이, mbIL15-41BBL+mbIL18 작제물 및 상기 mbIL15-41BBL과 함께 8일 동안 확장된 NK 세포는 가장 큰 세포 독성을 보였다. 흥미롭게, 배양 중 추가 7일 동안 배양된 그룹에서(2주 동안 4400 IU/mL에서 IL-2로 총 15일), 세포 독성의 차이가 감소하였고, 모든 그룹은 거의 100%에서 세포 독성 효과를 나타내었다.
- [0089] 도 4F는 나타난 E:T 비율을 사용하여, 배양 64일 후(9주 배양), NK 세포 세포독성에 관련된 데이터를 나타낸다. 이러한 데이터는 배양에서 상당한 시간이 지난 후에도, 세포 독성이 여전히 나타난다는 것을 입증한다. 1:1 E:T에서, 상기 mbIL15-41BBL+mbIL18을 발현하는 K562 세포를 사용하여 확장된 NK 세포는 대략적으로 30% 세포 독성을 나타낸 반면, mbIL15-41BBL+mbIL12+mbIL18을 발현하는 K562 세포를 사용하여 확장된 NK 세포는 거의 80% 세포 독성을 나타낸다. 표적 세포(1:2의 E:T)에 의해 수가 더 많을 때, 상기 각각의 NK 세포는 1:1 비에 의해 감소되었음에도 불구하고 세포 독성을 나타냈다. 대조적으로, 표적 세포(2:1의 E:T)보다 더 많은 양으로 존재할 때, 상기 NK 세포는 더 큰 세포 독성을 나타냈다. 이들 데이터는, 장기간 동안 배양될 때, NK 세포(수의 증가에도 불구하고)의 효능이 감소될 수 있음을 시사한다. 따라서, 일부 실시양태에 따르면, 공동-배양의 증가된 기간은 NK 세포 로우 수(raw number)를 증가시킬 뿐만 아니라, 각 NK 세포의 세포독성 효과를 증가시킨다. 따라서, 일부 실시양태는 더 큰 NK 세포 수를 초래할 뿐만 아니라, 확장된 NK 세포 집단의 각 멤버의 효능이 증가되어, 전체적으로 임상적 효능이 더 커진다. 몇몇 실시양태에 따르면, 배양 기간 vs. 효능은 세포 수와 세포독성 효과 사이의 최적의 균형을 맞추도록 균형을 이룬다.
- [0090] 몇몇 실시양태에서, 4-1BBL을 코딩하는 핵산은 하기의 서열번호 22의 핵산 서열을 포함하거나, 필수적으로 구성되거나 구성된다.
- [0091] gaattcgccc ttcacatg gaatacgcct ctgacgctt actggacccc gaagccccgt
- [0092] ggcctcccgc gccccgcgct cgcgcctgcc gcgtactgcc ttgggcctg gtcgcggggc
- [0093] tgctgctgct gctgctgctc gctgccgct gcgcccgtt cctcgctgc cctgggccc
- [0094] tgtccggggc tcgcccctcg cccgctccg cggccagccc gagactccgc gagggtccc
- [0095] agctttcgcc cgacgatccc gccgcctct tggacctgcg gcaggcatg tttgcgcage
- [0096] tggtgcccca aaatgttctg ctgatgatg ggcccctgag ctggtacagt gaccagggc
- [0097] tggcaggcgt gtcctgacg gggggcctga gctacaaaga ggacacgaag gagctggtgg
- [0098] tggccaagge tggagtctac tatgtcttct ttcaactaga gctgcggcgc gtggtggccc
- [0099] gcgagggctc aggtccggtt tcacttgcgc tgcacctgca gccactgccc tetgctgctg

- [0100] gggccgccc cctggctttg accgtggacc tgccacccgc ctctccgag gctcggaaact
- [0101] cggccttcgg tttccagggc cgcttgctgc acctgagtg cggccagcgc ctggcgctcc
- [0102] atcttcacac tgaggccagg gcacgccatg cctggcagct taccagggc gccacagtct
- [0103] tgggactctt ccgggtgacc cccgaaatcc cagccggact cccttcaccg aggtcggaaat
- [0104] aactcgag (서열번호 22)

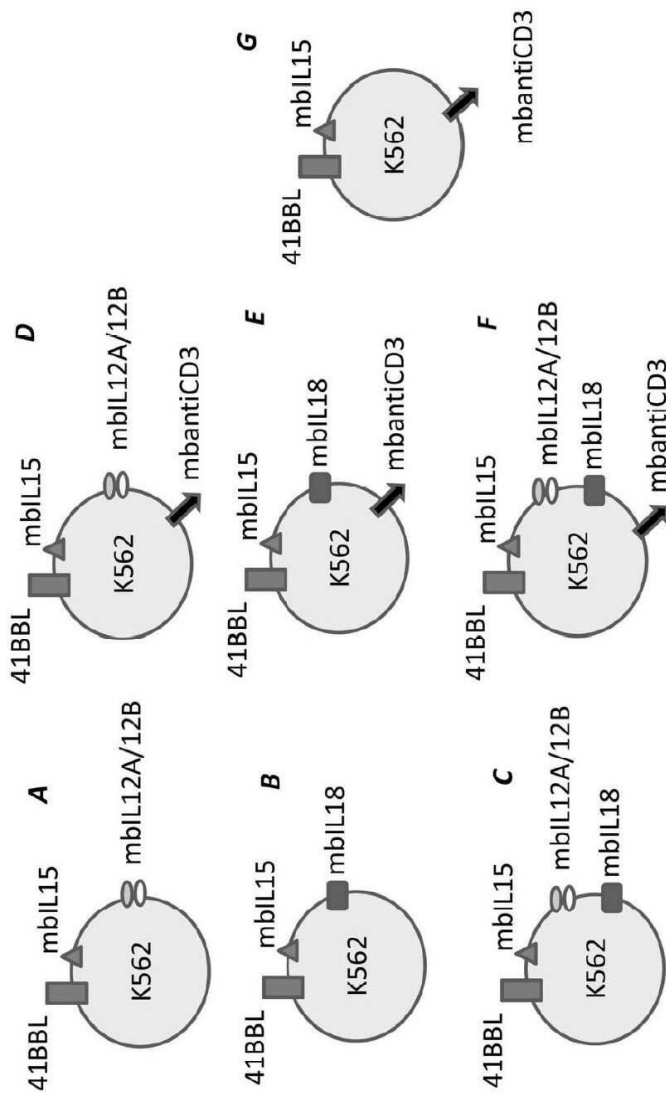
[0105] 상기 기재된 실시양태의 특정한 특징 및 양상의 다양한 조합 또는 서브조합이 이루어질 수 있으며 여전히 하나 이상의 본 발명에 속한다는 것으로 고려된다. 추가로, 실시양태와 관련하여 임의의 특정한 특징, 양상, 방법, 속성(property), 특성(characteristic), 품질, 속성, 구성요소 등의 본원의 기재는 본원에 제시된 다른 모든 실시양태에서 사용될 수 있다. 따라서, 상기 기재된 실시양태의 다양한 특징 및 양상은 상기 기재된 본 발명의 다양한 모드를 형성하기 위해 서로 조합되거나 대체될 수 있음을 이해해야 한다. 따라서, 본원에 기재된 본 발명의 범위는 상기 기재된 특정 기재된 실시양태 의해 제한되지 않아야 한다. 게다가, 본 발명은 다양한 변형 및 대안적인 형태가 가능하지만, 그 구체적인 실시예가 도면에 도시되어 있고 본원에서 상세하게 설명된다. 그러나, 본 발명은 기재된 특정 형태 또는 방법으로 제한되는 것이 아니라 반대로, 본 발명은 기재된 다양한 실시양태 및 첨부된 청구 범위의 사상 및 범위 내에 속하는 모든 변형, 균등물 및 대안을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본원에 기재된 임의의 방법은 인용된 순서대로 수행될 필요는 없다. 본원에 기재된 방법은 의사가 취한 특정한 행동을 포함하며; 그러나 또한 명시적 또는 암시적으로 해당 행동에 대한 임의의 3자-지시(third-party instruction)를 포함할 수 있다. 예를 들어, “확장된 NK 세포 집단을 투여하는 단계”와 같은 활성화는 “확장된 NK 세포 집단의 투여를 지시하는 단계”를 포함한다. 또한 본 기재의 특징 또는 양태가 마쿠시 그룹(Markush group)의 관점에서 설명되는 경우에, 당업자는 마쿠시 그룹의 임의의 개별적인 구성원 또는 서브그룹의 구성원의 관점에서 설명된다는 것을 인식할 것이다.

[0106] 본원에 기재된 범위는 또한 임의의 및 모든 중첩, 서브-범위(sub-range) 및 이의 조합을 포함한다. “~까지(up to)”, “적어도(at least)”, “보다 큰(greater than)”, “보다 작은(less than)”, “사이에(between)” 등과 같은 언어는 인용된 숫자를 포함한다. “약(about)”, “대략적으로(approximately)”와 같은 용어 전에 나오는 숫자는 인용된 숫자를 포함한다. 예를 들어, “90%”는 “90%”를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 95% 이상의 상동성은 기준 서열에 대해 96%, 97%, 98%, 99% 및 100% 상동성을 포함한다. 또한, 서열이 뉴클레오티드 또는 핵산 서열을 “포함하는(comprising)” 것으로 기재되는 경우, 그러한 언급은 달리 지시되지 않는 한, 서열이 상기 언급된 서열을 “포함하는(comprises)”, “구성되는(consists of)” 또는 “필수적으로 구성되는(consists essentially of)” 것으로 포함해야 한다.

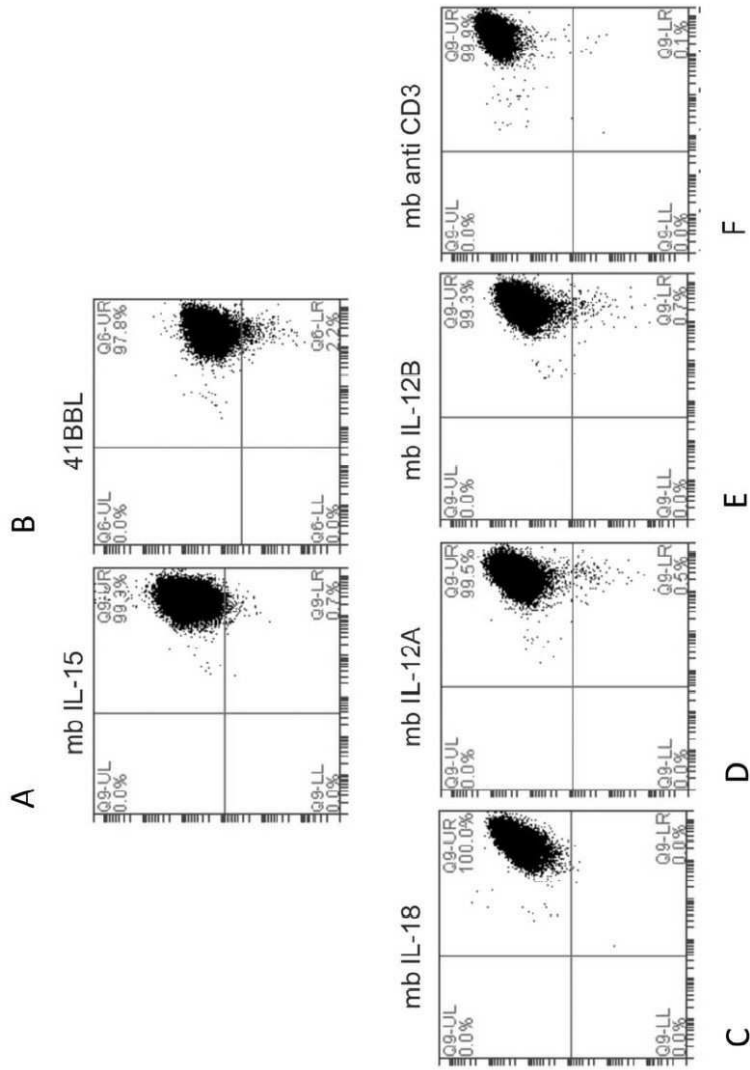
[0107] “a”, “an”, “the” 등과 같은 문자는 달리 지시되거나 문맥상 명백하게 제시하지 않는 한 하나 이상을 의미할 수 있다. 본 명세서 및 청구 범위에서 사용된 어구 “및(and)/또는(or)”은 결합된 구성 요소의 “하나 또는 둘 모두(either or both)”를 의미하는 것으로 이해되어야 한다. “및/또는”으로 열거된 다중 구성 요소는 동일한 방식으로, 즉, 이와 같이 결합된 구성 요소 중 “하나 이상(one or more)”으로 해석되어야 한다. “및/또는” 절에 의해 구체적으로 식별된 구성 요소 이외의 다른 요소가 선택적으로 존재할 수 있다. 본 명세서 및 청구범위에 사용된 바와 같이, “또는(or)”은 상기 정의된 “및/또는”과 같은 동일한 의미를 갖는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 구성 요소 목록에서 사용될 때, “또는” 또는 “및/또는”은 포괄적인 것, 즉, 적어도 하나 이상을 포함하나, 선택적으로 구성 요소 목록의 하나 이상 및 선택적으로 추가적인 미등록 구성 요소를 포함하는 것으로 해석되어야 한다. “중 하나만(only one of)” 또는 “중 정확하게 하나(exactly one of)”와 같이 반대를 명확하게 나타내는 용어만이 숫자 또는 구성 요소의 목록의 정확하게 하나 구성 요소를 포함하는 것을 의미할 것이다. 따라서, 그룹의 하나 이상의 구성원들 사이에 “또는”을 포함하는 청구 범위는, 하나, 하나 이상, 또는 모두의 그룹 구성원이 존재하거나 제시되거나 달리 언급되지 않는 한, 주어진 제품 또는 공정에 채용되거나 관련되는 것 경우에 충족된 것으로 간주된다. 상기 그룹의 정확하게 하나의 구성원이 주어진 제품 또는 공정에 존재하거나, 채용되거나, 또는 이와 관련이 있는 실시양태가 제공된다. 하나 이상의 또는 모든 그룹 구성원이 주어진 제품 또는 공정에 존재하거나 채용되거나 또는 이와 관련이 있는 실시양태가 제공된다. 임의의 하나 이상의 청구범위는 임의의 실시양태, 양상, 특징, 구성 요소 또는 특성, 또는 이의 임의의 조합을 명시적으로 제외하도록 수정될 수 있다. 임의의 하나 이상의 청구범위는 임의의 제제, 조성물, 양(amount), 용량(dose), 투여 경로(administration route), 세포 유형, 표적, 세포 마커, 항원, 표적 모이어티(targeting moiety) 또는 이들의 조합을 제외하도록 수정될 수 있다.

도면

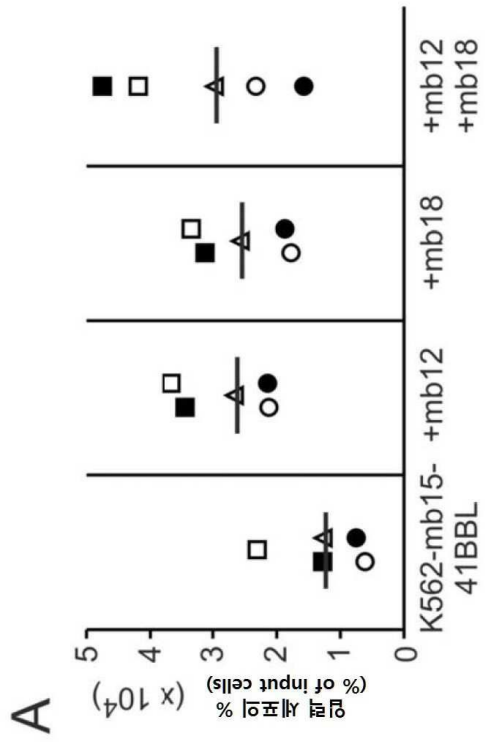
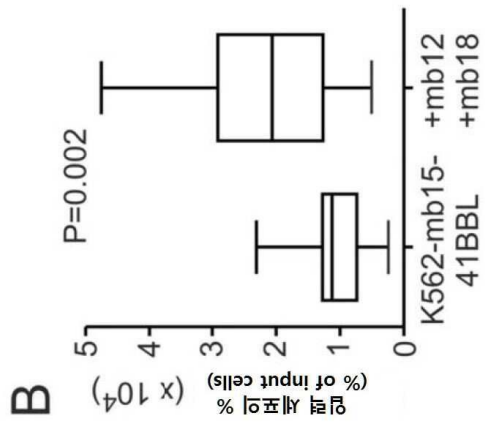
도면1



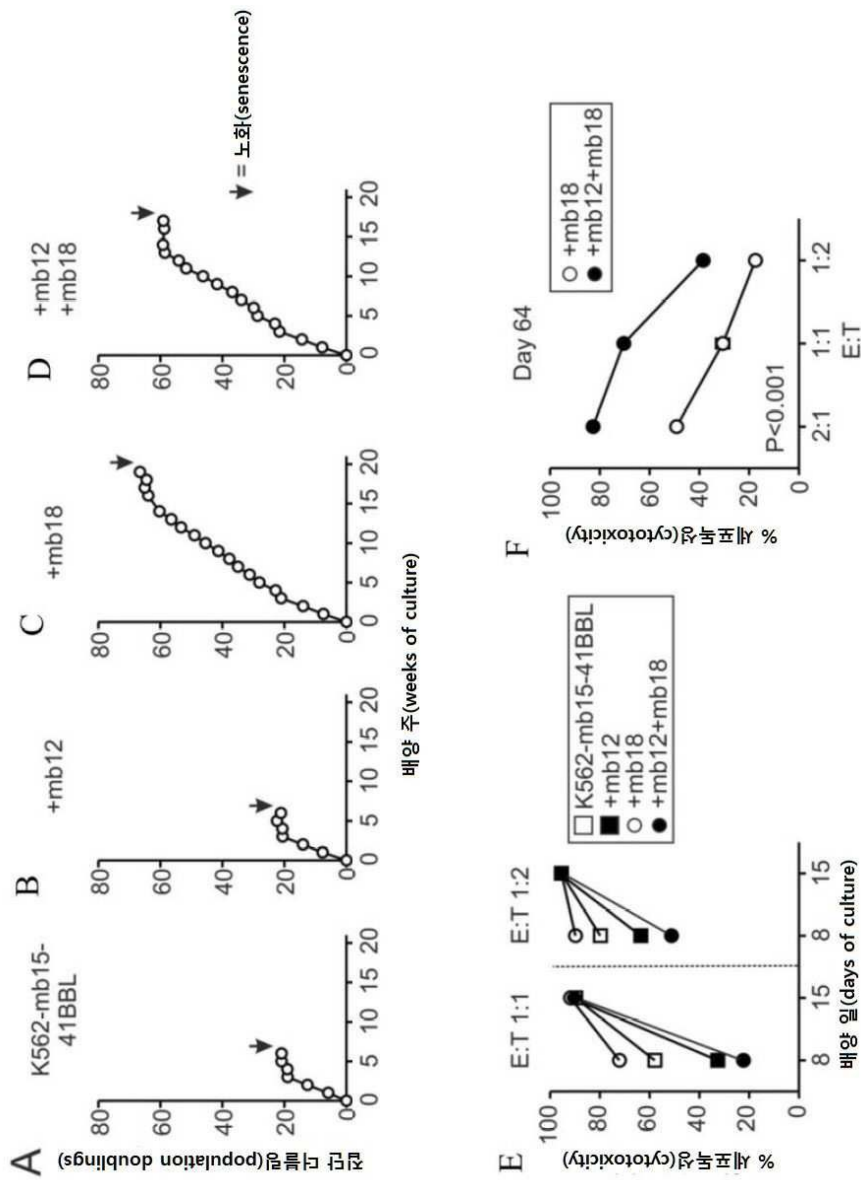
도면2



도면3



도면4



서열목록

- <110> National University of Singapore
- <120> STIMULATORY CELL LINES FOR EX VIVO EXPANSION AND ACTIVATION OF
- <130> IP19-0034
- <150> US 62/477,311
- <151> 2017-03-27
- <150> PCT/SG 2018/050138
- <151> 2018-03-27
- <160> 26
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1

<211> 615

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic Acid sequence for mbIL15

<400> 1

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60  
 ccgaactggg tgaatgtaat aagtgatttg aaaaaaattg aagatcttat tcaatctatg 120

catattgatg ctactttata tacggaaagt gatgttcacc ccagttgcaa agtaacagca 180  
 atgaagtgct ttctcttggg gttacaagtt atttcaacttg agtccggaga tgcaagtatt 240  
 catgatacag tagaaaaatc gatcacccta gcaacaaca gtttgtcttc taatgggaat 300  
 gtaacagaat ctggatgcaa agaattgag gaactggagg aaaaaaatat taaagaattt 360  
 ttgcagagtt ttgtacatat tgtccaaatg ttcataca cttctaccac gacgccagcg 420  
 ccgcgaccac caacaccggc gccaccatc gcgtcgcagc ccctgtccct gcgccagag 480  
 gcgtgccggc cagcggcggg gggcgcagtg cacacgaggg ggctggactt cgctgtgat 540

atctacatct gggcgcctt ggccgggact tgtgggtcc ttctcctgtc actggttate 600  
 accctttact gctaa 615

<210> 2

<211> 204

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino Acid sequence for mbIL15

<400> 2

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

His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser  
 85 90 95  
 Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu  
 100 105 110  
 Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val  
 115 120 125  
 Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro  
 130 135 140  
 Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu  
 145 150 155 160  
 Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp  
 165 170 175

Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly  
 180 185 190  
 Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys  
 195 200

<210> 3

<211> 867

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic Acid sequence for mbIL12A

<400> 3

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60  
 ccgagaaacc tcccctggc cactccagac ccaggaatgt tccatgcct tcaccactcc 120  
  
 caaaacctgc tgagggccgt cagcaacatg ctccagaagg ccagacaaac tetagaattt 180  
 tacccttgca ctctgaaga gattgatcat gaagatatca caaaagataa aaccagcaca 240  
 gtggaggcct gtttaccatt ggaattaacc aagaatgaga gttgcctaaa ttccagagag 300  
 acctctttca taactaatgg gagttgcctg gcctccagaa agacctcttt tatgatggcc 360  
 ctgtgcctta gtagtattta tgaagacttg aagatgtacc aggtggagtt caagaccatg 420  
 aatgcaaagc ttctgatgga tccaaagagg cagatctttc tagatcaaaa catgctggca 480  
 gttattgatg agctgatgca ggccctgaat ttcaacagtg agactgtgcc acaaaaatcc 540

tccttgaag aaccgattt ttataaaact aaaatcaagc tctgcatact tcttcatgct 600  
 ttcaggattc gggcagtgac tattgataga gtgatgagct atctgaatgc ttccaagccc 660  
 accacgacgc cagcgcgcg accaccaaca ccggcgccca ccatcgctc gcagcccctg 720  
 tccttgcgc cagaggcgtg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg 780  
 gacttcgct gtgatatcta catctggcg cccttgccg ggacttgtgg ggtccttctc 840  
 ctgtcactgg ttatcacct ttactaa 867

<210> 4  
 <211> 288  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino Acid sequence for mbIL12A

<400> 4

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro Gly

20 25 30

Met Phe Pro Cys Leu His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val Ser

35 40 45

Asn Met Leu Gln Lys Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys Thr

50 55 60

Ser Glu Glu Ile Asp His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser Thr

65 70 75 80

Val Glu Ala Cys Leu Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys Leu

85 90 95

Asn Ser Arg Glu Thr Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala Ser

100 105 110

Arg Lys Thr Ser Phe Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr Glu

115 120 125

Asp Leu Lys Met Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys Leu

130 135 140

Leu Met Asp Pro Lys Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala

145 150 155 160

Val Ile Asp Glu Leu Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr Val  
 165 170 175

Pro Gln Lys Ser Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys Ile  
 180 185 190

Lys Leu Cys Ile Leu Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile  
 195 200 205

Asp Arg Val Met Ser Tyr Leu Asn Ala Ser Lys Pro Thr Thr Thr Pro  
 210 215 220

Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu  
 225 230 235 240

Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His  
 245 250 255

Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu  
 260 265 270

Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr  
 275 280 285

<210> 5

<211> 1194

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic Acid sequence for mbIL12B

<400> 5

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60  
 ccgatatggg aactgaagaa agatgtttat gtcgtagaat tggattgta tccgatgcc 120  
 cctggagaaa tgggtgctct cacctgtgac acccctgaag aagatggtat cacctggacc 180  
 ttggaccaga gcagtgaggt cttaggctct ggcaaaacc tgaccatcca agtcaaagag 240  
  
 ttggagatg ctggccagta cacctgtcac aaaggaggcg aggttctaag ccattcgtc 300  
 ctgctgcttc acaaaaagga agatggaatt tggccactg atattttaa ggaccagaaa 360  
 gaacccaaaa ataagacctt tctaagatgc gaggccaaga attattctgg acgtttcacc 420  
 tgctggtggc tgacgacaat cagtactgat ttgacattca gtgtcaaaag cagcagaggc 480  
 tcttctgacc cccaaggggt gacgtgcgga gctgctacac tctctgcaga gagagtcaga 540  
 ggggacaaca aggagtatga gtactcagtg gactgccagg aggacagtgc ctgccagct 600

gctgaggaga gtctgcccatt tgaggtcatg gtggatgccg ttcacaagct caagtatgaa 660

aactacacca gcagcttctt catcagggac atcatcaaac ctgaccacc caagaacttg 720

cagctgaage cattaagaa ctctcggcag gtggaggtca gctgggagta cctgacacc 780

tggagtactc cacattccta cttctccctg acattctgcg ttcaggtcca gggcaagagc 840

aagagagaaa agaaagatag agtcttcacg gacaagacct cagccacggt catctgccgc 900

aaaaatgccg gcattagcgt gcgggcccag gaccgctact atagctcacc ttggagcga 960

tgggcatctg tgcctgcag taagcccacc acgacgccag cgccgcgacc accaacaccg 1020

gcgccacca tcgcgtcgca gccctgtcc ctgcgccag aggcgtgccg gccagcggcg 1080

gggggcgcag tgcacacgag ggggctggac ttcgcctgtg atatctacat ctgggcgccc 1140

ttggccggga cttgtgggt cttctcctg tcaactgtta tcacccttta ctaa 1194

<210> 6

<211> 397

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino Acid sequence for mbIL12B

<400> 6

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

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val Val

20 25 30

Glu Leu Asp Trp Tyr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu Thr

35 40 45

Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln Ser

50 55 60

Ser Glu Val Leu Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys Glu

65 70 75 80

Phe Gly Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val Leu

85 90 95

Ser His Ser Leu Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp Ser

100 105 110

Thr Asp Ile Leu Lys Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe Leu





Ile Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg

35 40 45

Pro Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro

50 55 60

Arg Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly

65 70 75 80

Met Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser

85 90 95

Cys Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn

100 105 110

Ile Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro

115 120 125

Gly His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr

130 135 140

Phe Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys

145 150 155 160

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

165 170 175

Glu Asp Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala

180 185 190

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

195 200 205

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys

210 215 220

Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu

225 230 235 240

Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr

245

<210> 9

<211> 706

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic Acid sequence for mbIL21, IL21

<400> 9

gctgaagtga aaacgagacc aaggctagc tctactgttg gtacttatga gatccagtcc 60  
 tggcaacatg gagaggattg tcatctgtct gatggtcac tcttggggac actggtccac 120  
 aaatcaagct cccaaggcca agatgccac atgattagaa tgcgtcaact tatagatatt 180  
 gttgatcagc tgaaaaatta tgtgaatgac ttggtccctg aatttctgcc agctccagaa 240  
 gatgtagaga caaactgtga gtggtcagct ttttctgct ttcagaaggc ccaactaaag 300  
 tcagcaata caggaaacaa tgaaaggata atcaatgtat caattaataa gctgaagagg 360  
  
 aaaccacctt ccacaaatgc agggagaaga cagaaacaca gactaacatg cccttcatgt 420  
 gattcttatg agaaaaaac acccaaagaa ttctagaaa gattcaaatc actttccaa 480  
 aaggtatcta ccttaagttt catttgattt tctgctttat ctttacctat ccagatttgc 540  
 ttcttagtta ctcacggtat actatttcca cagatgattc atcagcatct gtctctaga 600  
 acacacggaa gtgaagattc ctgaggatct aacttgcagt tggacactat gttacatact 660  
 ctaatatagt agtgaagtc atttctttgt attccaagtg gaggag 706

<210> 10

<211> 155

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino Acid sequence for mbIL21, IL21

<400> 10

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

	85	90	95	
Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr Asn Ala Gly Arg Arg Gln Lys His Arg				
	100	105	110	
Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu				
	115	120	125	
Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His				
	130	135	140	
Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser Glu Asp Ser				
	145	150	155	
<210> 11				
<211> 1147				
<212> DNA				
<213> Artificial Sequence				
<220><223> Nucleic Acid sequence for IL22				
<400> 11				
cgaccagggtt ctccttcccc agtcaccagt tgctcgagtt agaattgtct gcaatggccc				60
ccctgcagaa atctgtgagc tctttcctta tggggaccct ggccaccagc tgcctccttc				120
tcttggccct ctigtgtacag ggaggagcag ctgcgcccat cagctccac tgcaggcttg				180
acaagtccaa cttccagcag ccctatatca ccaaccgcac cttcatgctg gctaaggagg				240
ctagcttggc tgataacaac acagacgttc gtctcattgg ggagaaactg ttccacggag				300
tcagtatgag tgagcgtgc tatctgatga agcagggtct gaacttcacc cttgaagaag				360
tgctgttccc tcaatctgat aggttccagc cttatatgca ggaggtggtg ccttctctgg				420
ccaggctcag caacaggcta agcacatgic atattgaagg tgatgacctg catatccaga				480
ggaatgtgca aaagctgaag gacacagtga aaaagcttgg agagagtgga gagatcaaag				540
caattggaga actggatttg ctgtttatgt ctctgagaaa tgctgcatt tgaccagagc				600
aaagctgaaa aatgaataac taaccacctt tcctgctag aaataacaat tagatgcccc				660
aaagcgattt ttttaacca aaaggaagat gggaagccaa actccatcat gatgggtgga				720
ttccaaatga acccctgctg tagttacaaa ggaaccaat gccacttttg tttataagac				780
cagaaggtag actttctaag catagatatt tattgataac atttcattgt aactggtgtt				840
ctatacacag aaaacaattt atttttaaa taattgtctt tttccataaa aaagattact				900
ttccattcct ttaggggaaa aaaccctaa atagcttcat gtttccataa tcagtacttt				960

atattataa atgtattat tattattata agactgcatt ttatttatat cattttatta 1020

atatgattt atttatagaa acatcattcg atattgctac ttgagtgtaa ggctaatatt 1080

gatatttatg acaataatta tagagctata acatgtttat ttgacctcaa taaacacttg 1140

gatatcc 1147

<210> 12

<211> 179

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence for IL22

<400> 12

Met Ala Ala Leu Gln Lys Ser Val Ser Ser Phe Leu Met Gly Thr Leu

1 5 10 15

Ala Thr Ser Cys Leu Leu Leu Leu Ala Leu Leu Val Gln Gly Gly Ala

20 25 30

Ala Ala Pro Ile Ser Ser His Cys Arg Leu Asp Lys Ser Asn Phe Gln

35 40 45

Gln Pro Tyr Ile Thr Asn Arg Thr Phe Met Leu Ala Lys Glu Ala Ser

50 55 60

Leu Ala Asp Asn Asn Thr Asp Val Arg Leu Ile Gly Glu Lys Leu Phe

65 70 75 80

His Gly Val Ser Met Ser Glu Arg Cys Tyr Leu Met Lys Gln Val Leu

85 90 95

Asn Phe Thr Leu Glu Glu Val Leu Phe Pro Gln Ser Asp Arg Phe Gln

100 105 110

Pro Tyr Met Gln Glu Val Val Pro Phe Leu Ala Arg Leu Ser Asn Arg

115 120 125

Leu Ser Thr Cys His Ile Glu Gly Asp Asp Leu His Ile Gln Arg Asn

130 135 140

Val Gln Lys Leu Lys Asp Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu

145 150 155 160

Ile Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu Arg Asn

165

170

175

Ala Cys Ile

<210> 13

<211> 765

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic Acid sequence for 4-1BB ligand

<400> 13

atggaatacg cctctgacgc ttcactggac cccgaagccc cgtggcctcc cgcgccccgc 60

gctcgcgcct gccgcgtact gccttgggcc ctggtcgcgg ggctgctgct gctgctgctg 120

ctcgtgccc cctgcgccgt ctctctgcc tccccctggg ccgtgtccgg ggctcgcgcc 180

tgcgccggct ccgcggccag cccgagactc cgcgagggtc ccgagcttcc gcccgacgat 240

ccccccggcc tcttggacct gcggcagggc atgtttgcgc agctggtggc ccaaaatggt 300

ctgctgatcg atggcccct gagctggtac agtgaccag gcctggcagg cgtgtccctg 360

acggggggcc tgagctacaa agaggacacg aaggagctgg tggcggccaa ggctggagtc 420

tactatgtct tctttcaact agagctgcgg cgcgtggtgg ccggcagagg ctccaggctcc 480

gtttcacttg cgctgcacct gcagccactg cgctctgctg ctggggccgc cgcctggct 540

ttgaccgtgg acctgccacc cgcctctcc gaggtcggga actcggcctt cggtttccag 600

ggccgcttgc tgcacctgag tgccggccag cgctggggcg tccatcttca cactgaggcc 660

agggcacgcc atgcctggca gcttaccag ggcgccacag tcttgggact cttccgggtg 720

acccccgaaa tccagccgg actcccttca ccgaggtcgg aataa 765

<210> 14

<211> 254

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino Acid sequence for 4-1BB ligand

<400> 14

Met Glu Tyr Ala Ser Asp Ala Ser Leu Asp Pro Glu Ala Pro Trp Pro

1 5 10 15

Pro Ala Pro Arg Ala Arg Ala Cys Arg Val Leu Pro Trp Ala Leu Val

20 25 30

Ala Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Cys Ala Val Phe  
 35 40 45

Leu Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser  
 50 55 60

Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp  
 65 70 75 80

Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val  
 85 90 95

Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp  
 100 105 110

Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu  
 115 120 125

Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe  
 130 135 140

Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser  
 145 150 155 160

Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala  
 165 170 175

Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala  
 180 185 190

Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala  
 195 200 205

Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His  
 210 215 220

Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val  
 225 230 235 240

Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu  
 245 250

- <210> 15
- <211> 1534
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic Acid sequence for CD3 Receptor epsilon subunit

<400> 15

tattgtcaga gtcctcttgt ttggccttct aggaaggctg tgggaccag ctttcttcaa	60
ccagtccagg tggaggcctc tgccttgaac gtttccaagt gaggtaaaac cgcgaggccc	120
agaggcctct ctacttctgt tgtggggttc agaaaccctc ctcccctccc agcctcaggt	180
gcctgcttca gaaaatgaag tagtaagtct gctggcctcc gccatcttag taaagtaaca	240
gtcccatgaa acaaagatgc agtcgggcac tactggaga gttctgggcc tctgcctctt	300
atcagttggc gtttgggggc aagatggtaa tgaagaaatg ggtggtatta cacagacacc	360
atataaagtc tccatctctg gaaccacagt aatattgaca tgcctcagc atcctggatc	420
tgaaatacta tggcaacaca atgataaaaa cataggcggg gatgaggatg ataaaaacat	480
aggcagtgat gaggatcacc tgtcactgaa ggaattttca gaattggagc aaagtggtta	540
ttatgtctgc taccccagag gaagcaaacc agaagatgcg aacttttacc tctacctgag	600
ggcaagagtg tgtgagaact gcatggagat ggatgtgatg tcggtggcca caattgtcat	660
agtggacatc tgcatcactg ggggettgtc gctgctggtt tactactgga gcaagaatag	720
aaaggccaag gccaaagcctg tgacacgagg agcgggtgct ggcggcaggc aaaggggaca	780
aaacaaggag aggccaccac ctgttcccaa cccagactat gagcccatcc ggaaaggcca	840
gcgggacctg tattctggcc tgaatcagag acgcatctga ccctctggag aacactgcct	900
cccgtggcc caggtctcct ctccagtcct cctgcgactc cctgtttcct gggctagtct	960
tggacccac gagagagaat cgttctcag cctcatggtg aactcgcgcc ctccagcctg	1020
atccccgcct cctcctccc tgccttctct gctggtaccc agtcctaaaa tattgctgct	1080
tcctcttctt tgaagcatc atcagtagtc acaccctcac agctggcctg ccctcttgcc	1140
aggatattta tttgtgetat tcactccctt ccttttggat gtaacttctc cgttcagttc	1200
cctccttttc ttgcatgtaa gttgtcccc atcccaaagt attcatcta cttttctatc	1260
gccgtccct tttgcagccc tctctgggga tggactgggt aaatgttgac agaggccctg	1320
ccccgttca agatcctggc cctgagccag cctgtgctc ctcctcctcc caaacctccc	1380
taccaacccc ctaatccct actccctcca cccccctcc actgtaggcc actggatggt	1440
catttgcatc tccgtaaat tgcctctctc ctgagctgag agagaaaaaa ataaactgta	1500
tttggctgca agaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa	1534

<210> 16

<211> 1017

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic Acid sequence for mb-anti-CD3 scFv

<400> 16

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60  
 ccgcaaattg ttctcaccca gtctccagca atcatgtctg catctccagg ggagaaggtc 120  
 accatgacct gcagtgccag ctcaagtgta agttacatga actggtacca gcagaagtea 180  
 ggcacctccc caaaagatg gatttatgac acatccaaac tggcttctgg agtccctgct 240

cattcaggg gcagtgggtc tgggacctct tactctctca caatcagcgg catggaggct 300  
 gaagatgctg ccaattatta ctgccagcag tggagtagta acccattcac gttcggctcg 360  
 gggacaaaagt tggaaataaa ccgggggtgtt ggtggttctg gtggtggtgg ttctggcggc 420  
 ggcggctccg gtggtggtgg atccgaggtc cagctgcagc agtctggggc tgaactggca 480  
 agacctgggg cctcagttaa gatgtcctgc aaggcttctg gctacacctt tactaggtac 540  
 acgatgactt gggtaaaaca gaggcctgga cagggtctgg aatggattgg atacattaat 600  
 cctagccgtg gttatactaa ttacaatcag aagttcaagg acaaggccac attgactaca 660

gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcaa ctgagcagcc tgacatctga ggactctgca 720  
 gtctattact gtgcaagata ttatgatgat cattaactgcc ttgactactg gggccaaggc 780  
 accactctca cagtctctc agccaagccc accacgacgc cagcgcgcgcg accaccaaca 840  
 ccggcgccca ccatcgctc gcagcccctg tcctgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg 900  
 gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg gacttcgctt gtgatatcta catctgggcg 960  
 cccttggcgg ggacttgggg ggtccttctc ctgtcactgg ttatcacctt ttactaa 1017

<210> 17

<211> 338

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino Acid sequence for mb-anti-CD3 scFv

<400> 17

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 1 5 10 15  
 His Ala Ala Arg Pro Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met  
 20 25 30  
 Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser  
 35 40 45

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



His His His His His His

1 5

<210> 21

<211> 638

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid cloning construct for mbIL15

<400> 21

gaattcgccc ttccacatg gccttaccag tgaccgcctt gctcctgccc ctggccttgc 60  
 tgctccacgc cgccaggccg aactgggtga atgtaataag tgatttgaaa aaaattgaag 120  
 atcttattca atctatgat attgatgcta ctttatatac ggaaagtgat gttcacccca 180  
 gttgcaaagt aacagcaatg aagtgctttc tcttggagtt acaagttatt tcaattgagt 240  
 ccggagatgc aagtattcat gatacagtag aaaatctgat catcctagca aacaacagtt 300  
 tgtcttctaa tgggaatgta acagaatctg gatgcaaaga atgtgaggaa ctggaggaaa 360  
 aaaatattaa agaatTTTTG cagagTTTTG tacatattgt ccaaatgttc atcaacactt 420

ctaccacgac gccagcgcgc cgaccaccaa caccggcgcc caccatcgcg tcgcagcccc 480  
 tgtcctcgcg ccagagagcg tgccggccag cggcgggggg cgcaagtgcac acgagggggc 540  
 tggacttcgc ctgtgatata tacatctggg cgcccttggc cgggacttgt ggggtccttc 600  
 tcctgtcaact ggttatcacc ctttactgct aactcgag 638

<210> 22

<211> 788

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid cloning construct for 4-1BB ligand

<400> 22

gaattcgccc ttccacatg gaatacgcct ctgacgcttc actggacccc gaagccccgt 60  
 ggccctcccgc gccccgcgt cgcgectgcc gcgtactgcc ttgggccctg gtcgcggggc 120  
 tgctgctgct gctgctgctc gctgcccct gcgccgtctt cctcgctgc cctgggccc 180  
 tgtccggggc tcgcgcctcg cccggctccg cggccagccc gagactccgc gaggggtccc 240  
 agctttgcc cgacgatccc gccggcctct tggacctgcg gcagggcatg tttgcccagc 300  
 tggtagccca aaatgttctg ctgatcgatg ggcccctgag ctggtacagt gacccaggcc 360  
 tggcaggcgt gtcctgacg gggggcctga gctacaaga ggacacgaag gagctggtgg 420

tggccaaggc tggagtctac tatgtcttct ttcaactaga gctgcggcgc gtggtggccg 480

gcgagggctc aggetccgtt tcaattgcgc tgcacctgca gccactgcgc tctgtctgtg 540

gggcccgcgc cctggctttg accgtggacc tgccaccgcg ctectccgag getcggaaact 600

cggccttcgg ttccagggc cgcttgctgc acctgagtgc cggccagcgc ctgggcgtcc 660

atcttcacac tgaggccagg gcacgccatg cctggcagct taccagggc gccacagtct 720

tgggactctt cggggtgacc cccgaaatcc cagccggact cccttcaccg aggtcggaat 780

aactcgag 788

<210> 23

<211> 889

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid cloning construct for mbIL12A

<400> 23

gaattcgct tcaccatgg ccttaccagt gaccgcttg ctectgccgc tggccttget 60

gctccacgcc gccaggcca gaaacctccc cgtggccact ccagaccag gaatgtccc 120

atgccttcac cactccaaa acctgctgag ggccgtcagc aacatgctcc agaaggccag 180

acaaactcta gaattttacc cttgcacttc tgaagagatt gatcatgaag atatacaaaa 240

agataaaacc agcacagtgg aggcctgttt accattggaa ttaaccaaga atgagagttg 300

cttaaattcc agagagacct ctttcataac taatgggagt tgcttggcct ccagaaagac 360

ctcttttatg atggccctgt gccttagtag tatttatgaa gacttgaaga tgtaccaggt 420

ggagttcaag accatgaatg caaagcttct gatggatcct aagaggcaga tctttctaga 480

tcaaaacatg ctggcagtta ttgatgagct gatgcaggcc ctgaatttca acagtgagac 540

tgtgccacaa aaatcctccc ttgaagaacc ggatTTTTat aaaactaaaa tcaagctctg 600

catacttctt catgctttca ggattcgggc agtgactatt gatagagtga tgagctatct 660

gaatgcttcc aagcccacca cgacccagc gccgcgacca ccaacaccgg cgcccacat 720

cgcgtcgag ccctgtccc tgcgcccaga ggcgtgccgg ccagcggcgg ggggcgcagt 780

gcacacgagg gggetggact tcgctgtga tatctacatc tgggcgcctt tggccgggac 840

ttgtggggtc ctctcctgt cactggttat caccctttac taactcgag 889

<210> 24

<211> 1216

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid cloning construct for mbIL12B

<400> 24

```

gaattcggct tccaccatgg ccttaccagt gaccgccttg ctctgccgc tggccttgct      60
gctccacgcc gccagccga tatgggaact gaagaaagat gtttatgtcg tagaattgga      120
ttggtatccg gatgccctg gagaaatggt ggtcctcacc tgtgacaccc ctgaagaaga      180

tggatcacc tggaccttgg accagagcag ttaggtctta ggctctggca aaacctgac      240
catccaagtc aaagagttg gagatgctgg ccagtacacc tgtcacaag gaggcgaggt      300
tctaagccat tcgctcctgc tgcttcacaa aaaggaagat ggaatttggc cactgatat      360
tttaaggac cagaaagaac caaaaataa gacctttcta agatgcgagg ccaagaatta      420
ttctggacgt ttcacctgt ggtggctgac gacaatcagt actgatttga cattcagtg      480
caaaagcagc agaggctctt ctgaccccc aaggggtgacg tgcggagctg ctacactctc      540
tgcagagaga gtcagagggg acaacaagga gtatgagtac tcagtgaggt gccaggagga      600

cagtgcctgc ccagctgctg aggagagtct gccattgag gtcatggtgg atgccttca      660
caagctcaag tatgaaaact acaccagcag cttcttcac agggacatca tcaaacctga      720
cccaccaag aacttgacgc tgaagccatt aaagaactct cggcaggtgg aggtcagctg      780
ggagtacct gacacctgga gtactccaca ttctacttc tccctgacat tetgcttca      840
ggtccagggc aagagcaaga gagaaaagaa agatagagtc ttcacggaca agacctcagc      900
cacggtcacc tgcgcacaaa atgccagcat tagcgtgcgg gccaggacc gctactatag      960
ctcatcttgg agcgaatggg catctgtgcc ctgcagtaag cccaccacga cgccagcgcc      1020

gcgaccacca acaccggcgc ccaccatcgc gtcgcagccc ctgtccctgc gccagaggc      1080
gtgccggcca gggcggggg gcgcagtgca cacgaggggg ctggacttgc cctgtgatat      1140
ctacatctgg gcgcccttgg ccgggacttg tggggtcctt ctctgtcac tggttatcac      1200
cctttactaa ctcgag      1216

```

<210> 25

<211> 769

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid cloning construct for mbIL18

<400> 25

```

gaattcggct tccaccatgg ccttaccagt gaccgccttg ctctgccgc tggccttgct      60

```

gctccacgcc gccaggccgt actttggcaa gcttgaatct aaattatcag tcataagaaa 120  
 ttggaatgac caagttctct tcattgacca aggaaatcgg cctctatttg aagatatgac 180  
 tgattctgac tgtagagata atgcaccccg gaccatattt attataagta tgtataaaga 240  
 tagccagcct agaggtatgg ctgtaactat ctctgtgaag tgtgagaaaa tttcaactct 300  
 ctctgtgag aacaaaatta tttcctttaa ggaatgaat cctctgata acatcaagga 360  
 tacaaaaagt gacatcatat tctttcagag aagtgtccca ggacatgata ataagatgca 420  
 atttgaatct tcatcatacg aaggatactt tctagcttgt gaaaaagaga gagacctttt 480

taaactcatt ttgaaaaag aggatgaatt gggggataga tctataatgt tcaactgttca 540  
 aaacgaagac aagcccacca cgacgccagc gccgcgacca ccaacaccgg cgcccacat 600  
 cgcgtcgcag ccctgtccc tgcgcccaga ggcgtgccgg ccagcggcgg ggggcgcagt 660  
 gcacacgagg gggctggact tgcctgtga tatctacatc tgggcgcctt tggccgggac 720  
 ttgtggggtc ctctcctgt cactggttat caccctttac taactcgag 769

<210> 26

<211> 1039

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid cloning construct for mb-anti CD3 scFv

<400> 26

gaattcggct tccacatgg ccttaccagt gaccgccttg ctctgccgc tggccttget 60  
 gctccacgcc gccaggccgc aaattgttct caccagtct ccagcaatca tgtctgcatc 120  
 tccaggggag aaggtcacca tgacctgacg tgcagctca agtgaagt acatgaactg 180  
 gtaccagcag aagttagcga cctccccaa aagatggatt tatgacacat ccaaactggc 240  
 ttctggagtc cctgctcact tcaggggcag tgggtctggg acctcttact ctctcacaat 300  
 cagcggcatg gaggtgaag atgtgccac ttattactgc cagcagtgga gtagtaacce 360  
 attcacgttc ggcctgggga caaagttaga aataaaccgg ggtggtggtg gtctctggtg 420

tggtggttct ggcggcggcg gctccggtgg tggatgatcc gaggtccagc tgcagcagtc 480  
 tggggctgaa ctggcaagc ctggggcctc agtgaagatg tctgcaagg ctcttggtca 540  
 cacccttact aggtacacga tgcaactggg aaaacagagg cctggacagg gtctggaatg 600  
 gattggatac attaactcta gccgtggtta tactaattac aatcagaagt tcaaggacaa 660  
 ggccacattg actacagaca aatcctccag cacagcctac atgcaactga gcagcctgac 720  
 atctgaggac tctgagctct attactgtgc aagatattat gatgatcatt actgccttga 780

ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctctcagcc aagccacca cgacgccagc	840
gccgcgacca ccaacaccgg cgcccacat cgcgtcgcag cccctgtccc tgcgccaga	900
ggcgtgccgg ccagcggcgg ggggcgcagt gcacacgagg ggctggact tgcctgtga	960
tatctacatc tgggcgcct tggccgggac ttgtggggtc cttctcctgt cactggttat	1020
caccctttac taactcgag	1039