(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0075792
(43) 공개일자 2017년07월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) *A61K 48/00* (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7014806
(22) 출원일자(국제) 2015년10월30일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2017년05월30일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/058228
(87) 국제공개번호 WO 2016/069993
국제공개일자 2016년05월06일
(30) 우선권주장
62/073,268 2014년10월31일 미국(US)

(71) 출원인
더 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 펜실바니아
미국 19104 펜실바니아주 필라델피아 슈트 200 케스트너트 스트리트 3160
(72) 발명자
자오, 양빙
미국, 뉴저지 08048, 럼버턴, 6 글래디올라 래인
리우, 샤오준
미국, 펜실베니아 19081, 스워스모어, 아파트 809, 801 예일 애비뉴
준, 칼 에이치.
미국, 펜실베니아 19066, 메리언 스테이션, 409 베어드 로드
(74) 대리인
손민

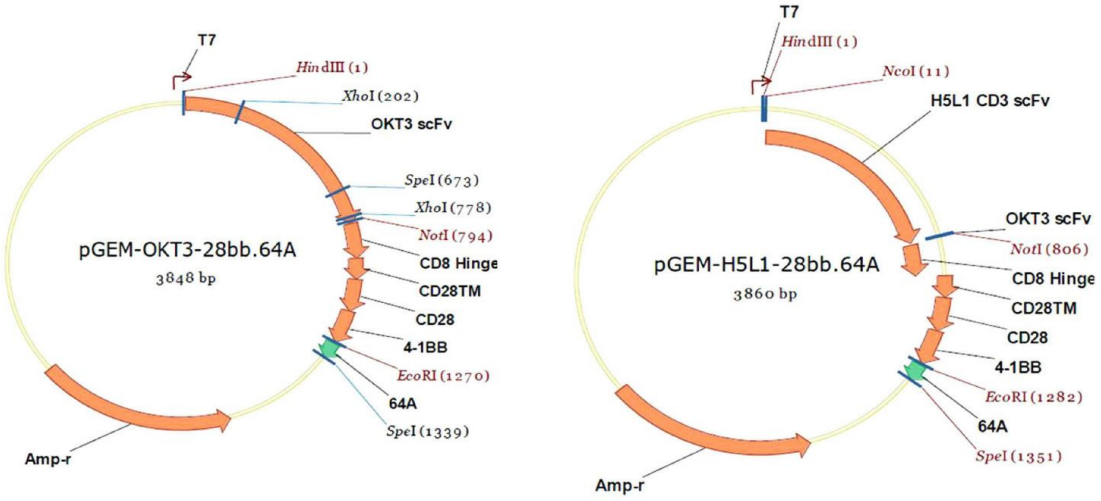
전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 **T 세포를 자극 및 증대시키는 조성물 및 방법**

(57) 요 약

본 발명은 전기천공된 T 세포군을 증대시키기 위한 방법을 포함한다. 상기 방법은, 분자에 대한 항원 결합 도메인 및 공자극 분자의 세포내 도메인을 포함하는 키메라 막 단백질을 코딩하는 mRNA와 함께 T 세포를 포함하는 세포군을 전기천공하는 단계를 포함하며, 여기서 배양된 T 세포는 적어도 10배 증대된다. 본 발명은 증대된 T 세포군, 상기 세포를 포함하는 조성물 및 치료 방법을 추가로 포함한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
C07K 14/705 (2013.01)
C07K 16/2809 (2013.01)
C07K 16/2818 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)
C12N 2501/51 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

T 세포군을 증대시키는 방법으로서, 상기 방법이

T 세포를 포함하는 세포군을 키메라 막 단백질을 코딩하는 mRNA와 함께 전기천공하는 단계로서, 상기 키메라 막 단백질이 분자에 대한 항체 또는 이의 단편을 포함하는 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인 및 CD28 및 4-1BB의 세포내 도메인의 단편을 포함하는 세포내 도메인을 포함하고, 여기서 상기 mRNA가 상기 세포군의 세포 중 적어도 하나의 세포에 도입되고 상기 세포의 표면상에 발현되는, 단계; 및

상기 전기천공된 세포군을 배양하는 단계로서, 여기서 이에 함유된 T 세포가 적어도 10배 증대되는, 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 전기천공되는 세포군이 말초 혈액 단핵구, 제대혈 세포, 정제된 T 세포군, 및 T 세포주로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 것인, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 전기천공되는 세포군이 말초 혈액 단핵구를 포함하는 것인, 방법.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 전기천공되는 세포군이 정제된 T 세포를 포함하는 것인, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 mRNA가 시험관내 전사된 RNA 또는 합성 RNA를 포함하는 것인, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 항체가 합성 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 단일 도메인 항체, 단일쇄 가변 단편, 및 이의 항원-결합 단편으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 것인, 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 항원 결합 도메인이 항-CD3, 항-TCR, 항-CD28, 및 이의 조합으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 것인, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 키메라 막 단백질을 코딩하는 mRNA가 막관통 도메인을 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 키메라 막 단백질을 코딩하는 mRNA가 힌지 도메인을 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 세포군 중 적어도 하나의 세포가 CD3를 발현하는 것인, 방법.

청구항 11

제2항에 있어서,

상기 키메라 막 단백질을 발현하는 적어도 하나의 세포가 CD3를 발현하는 또 다른 세포와 상호작용하는 것인, 방법.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 T 세포가 약 20배 내지 약 50배의 범위로 증대되는 것인, 방법.

청구항 13

제1항에 있어서,

작용제를 코딩하는 mRNA를 상기 증대된 T 세포군 내로 전기천공하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 작용제 mRNA가 상기 키메라 막 단백질 mRNA와 함께 동시-전기천공되는 것인, 방법.

청구항 15

제1항에 있어서,

상기 증대된 T 세포군을 CD27, CD28, CD83, CD86, CD127, 4-1BBL IL2, IL21, IL-15, IL-7, PD1-CD28 및 PD1로 이루어진 그룹 중에서 선택된 적어도 하나의 분자 또는 시토카인으로 자극하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 16

제1항에 있어서,

상기 배양된 T 세포를 냉동보존하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 17

전기천공된 T 세포군을 증대시키는 방법으로서, 상기 방법이

T 세포를 포함하는 세포군을 키메라 막 단백질을 코딩하는 mRNA와 함께 전기천공하는 단계로서, 상기 키메라 막 단백질이 CD3에 대해 지시된 단일쇄 가변 단편 (scFv) 및 CD28 및 4-1BB의 세포내 도메인의 단편을 포함하는 세포내 도메인을 포함하고, 여기서 상기 mRNA가 상기 세포군의 세포 중 적어도 하나의 세포에 도입되고 상기 세포의 표면상에 발현되는, 단계; 및

상기 전기천공된 세포군을 배양하는 단계로서, 여기서 이에 함유된 T 세포가 적어도 10배 증대되는, 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 증대된 T 세포군.

청구항 19

CD3에 대해 지시된 단일쇄 가변 단편 (scFv) 및 CD28 및 4-1BB의 세포내 도메인의 단편을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 키메라 막 단백질을 코딩하는 전기천공된 mRNA를 포함하는, T 세포.

청구항 20

분자에 대한 항체 또는 이의 단편을 포함하는 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인, 및 CD28 및 4-1BB의 세포내 도메인의 단편을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 키메라 막 단백질을 코딩하는 전기천공된 mRNA를 포함하는, 전기천공된 T 세포군.

청구항 21

입양 세포 전달 요법을 위한 방법으로서, 입양 세포 전달 요법을 필요로 하는 대상체에게 불리하게 작용하는 면역 반응의 예방 또는 치료를 위해 상기 대상체에게 T 세포를 포함하는 증대된 세포군을 투여하는 단계를 포함하고,

여기서 상기 증대된 세포군이, T 세포를 포함하는 세포군을 CD3에 대해 지시된 단일쇄 가변 단편 (scFv) 및 CD28 및 4-1BB의 세포내 도메인의 단편을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 키메라 막 단백질을 코딩하는 mRNA와 함께 전기천공하는 단계로서, 여기서 상기 세포군의 세포 중 적어도 하나의 세포가 상기 키메라 막 단백질을 발현하는, 단계; 및 상기 세포군을 배양하는 단계로서, 여기서 이에 함유된 T 세포가 적어도 10배 증대되는, 단계를 포함하는 방법에 따라 증대된 것인, 방법.

청구항 22

대상체에서 증진된 면역성과 관련된 질환 또는 병증을 치료하는 방법으로서, 이를 필요로 하는 상기 대상체에게 T 세포를 포함하는 증대된 세포군을 투여하는 단계를 포함하고,

여기서 상기 증대된 세포군이, T 세포를 포함하는 세포군을 CD3에 대해 지시된 단일쇄 가변 단편 (scFv) 및 CD28 및 4-1BB의 세포내 도메인의 단편을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 키메라 막 단백질을 코딩하는 mRNA와 함께 전기천공하는 단계로서, 여기서 상기 세포군의 세포 중 적어도 하나의 세포가 상기 키메라 막 단백질을 발현하는, 단계; 및 상기 세포군을 배양하는 단계로서, 여기서 이에 함유된 T 세포가 적어도 10배 증대되는, 단계를 포함하는 방법에 따라 증대된 것인, 방법.

청구항 23

대상체에서 병증을 치료하는 방법으로서, 상기 대상체에게 제1항의 방법으로 생산된 변형된 T 세포를 포함하는 치료학적 유효량의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 24

제23항에 있어서,

상기 면역 반응이 자가면역 질환인 것인, 방법.

청구항 25

제24항에 있어서,

상기 자가면역 질환이 후천성 면역결핍 증후군 (AIDS), 원형 탈모, 강직성 척추염, 항인지질 증후군, 자가면역 애디슨병, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 자가면역 내이 질환 (AIED), 자가면역 림프구증식 증후군 (ALPS), 자가면역 혈소판감소 자색반 (ATP), 베체트병, 심근병증, 복강스프루-포진성 피부염; 만성피로 면역 기능장애 증후군 (CFIDS), 만성 염증성 탈수초성 다발성 신경병증 (CIPD), 흉터 유사천포창, 저온 응집병, 크레스트 증후군, 크론병, 데고스병 (Degos' disease), 소아 피부근염, 원판상 루푸스, 본태성 혼합 한랭글로불린혈증, 섬유근통-섬유근염, 그레이브스 병, 길랑-바레 증후군, 하시모토 갑상선염, 특발성 폐섬유화증, 특발성 혈소판감소 자반증 (ITP), IgA 신장병증, 인슐린-의존성 당뇨병, 소아 만성 관절염 (스틸병), 소아 류마티스 관절염, 메니에르병, 혼합 결합 조직병, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 악성 빈혈, 결절다발 동맥염,

다발성 연골염, 다분비선 증후군, 류마티스 다발성 근육통, 다발근염 및 피부근염, 원발성 무감마글로불린혈증, 원발성 담즙성 간경변, 건선, 건선 관절염, 레이노 증후군, 라이터 증후군, 류마티스 열, 류마티스 관절염, 사르코이드증, 피부경화증 (진행성 전신 경화증 (PSS), 전신 경화증 (SS)으로도 알려짐), 쇼그렌 증후군, 강직 증후군, 전신 홍반 루푸스, 타카야수 동맥염, 측두 동맥염/거대 세포 동맥염, 궤양성 대장염, 포도막염, 백반증, 베게너 육아종증, 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 것인, 방법.

청구항 26

제23항에 있어서,

상기 면역 반응이 암인 것인, 방법.

청구항 27

제26항에 있어서,

상기 암이 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 피부암, 췌장암, 직장결장암, 신장암, 간암, 뇌암, 림프종, 백혈병, 폐암, 및 갑상선암종으로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 것인, 방법.

청구항 28

면역 반응의 치료를 필요로 하는 대상체에서 면역 반응의 치료를 위한 약제 생산에 있어서 제19항에 따른 T 세포의 용도.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원의 상호 참조

[0002] 본 출원은 2014년 10월 31에 출원된 미국 가출원 제 62/073,268호를 35 U.S.C. § 119(e) 하에서 우선권으로 주장하며, 이는 전체가 본 출원에 참고로 인용된다.

[0003] 연방정부 후원 연구 또는 개발에 관한 진술

[0004] 본 발명은 국립 보건원 (National Institute of Health)이 수여한 CA120409에 따른 정부 지원으로 이뤄졌다. 정부는 본 발명에 대해 특정한 권리를 가진다.

배 경 기 술

[0005] 유전적으로 조작된 T 세포의 입양 세포 전달은 암치료의 매력적인 대안책으로 입증되었다. 그러나, T 세포는 일반적으로 충분한 수의 세포가 치료용으로 조작될 수 있기 전에 증대되어야 한다. 항-CD3/CD28 비드로의 자극, 항-CD28 항체의 존재 또는 부재 하에 항-CD3으로의 자극, 및 항원 제시 세포로의 세포 기반 인공 자극을 비롯하여, T 세포를 자극 및 증대시키기(expand) 위한 임상 설정에 사용될 수 있는 여러 방법이 존재한다. 이러한 상이한 방법으로 생성된 T 세포는 상이한 표현형 및 시험관내/생체내 기능을 나타낸다.

[0006] 생체내에서 T 세포 기반 입양 면역요법을 위한 이들의 효과기 기능을 최대로 발휘할 수 있는, T 세포를 생성하기 위한 목적으로 T 세포군을 유도하는 개선된 방법이 당업계에 필요하다.

발명의 내용

[0007] 본원에 기재된 바와 같이, 본 발명은 T 세포를 자극 및 증대시키기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

[0008] 본 발명의 일 양태는 T 세포군을 증대시키는 방법을 포함하며, 상기 방법은 T 세포를 포함하는 세포군을 키메라 막 단백질을 코딩하는 mRNA와 함께 전기천공하는 (electroporating) 단계로서, 상기 키메라 막 단백질이 분자에 대한 항체 또는 이의 단편을 포함하는 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인 및 CD28 및 4-1BB의 세포내 도메인의 단편을 포함하는 세포내 도메인을 포함하고, 여기서 상기 mRNA가 상기 세포군의 세포 중 적어도 하나의 세포에 도입되고 상기 세포의 표면상에 발현되는, 단계; 및 상기 전기천공된 세포군을 배양하는 단계로서,

여기서 이에 함유된 T 세포가 적어도 10배 증대되는, 단계를 포함한다.

[0009] 또 다른 양태에서, 본 발명은 전기천공된 T 세포군을 증대시키는 방법을 포함하며, 상기 방법은 T 세포를 포함하는 세포군을 키메라 막 단백질을 코딩하는 mRNA와 함께 전기천공하는 단계로서, 상기 키메라 막 단백질이 CD3에 대해 지시된 단일쇄 가변 단편 (scFv) 및 CD28 및 4-1BB의 세포내 도메인의 단편을 포함하는 세포내 도메인을 포함하고, 여기서 상기 mRNA가 상기 세포군의 세포 중 적어도 하나의 세포에 도입되고 상기 세포의 표면상에 발현되는, 단계; 및 상기 전기천공된 세포군을 배양하는 단계로서, 여기서 이에 함유된 T 세포가 적어도 10배 증대되는, 단계를 포함한다.

[0010] 또 다른 양태에서, 본 발명은, CD3에 대해 지시된 단일쇄 가변 단편 (scFv) 및 CD28 및 4-1BB의 세포내 도메인의 단편을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 키메라 막 단백질을 코딩하는 전기천공된 mRNA를 포함하는 T 세포를 포함한다.

[0011] 또 다른 양태에서, 본 발명은, 분자에 대한 항체 또는 이의 단편을 포함하는 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인, 및 CD28 및 4-1BB의 세포내 도메인의 단편을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 키메라 막 단백질을 코딩하는 전기천공된 mRNA를 포함하는 전기천공된 T 세포군을 포함한다.

[0012] 본 발명의 또 다른 양태는, 입양 세포 전달 요법 (adoptive cell transfer therapy)을 필요로 하는 대상체에게 불리하게 작용하는 (adverse to) 면역 반응의 예방 또는 치료를 위해 상기 대상체에게 T 세포를 포함하는 증대된 세포군을 투여하는 단계를 포함하는 입양 세포 전달 요법을 위한 방법을 포함하며, 여기서 증대된 세포군은, T 세포를 포함하는 세포군을 CD3에 대해 지시된 단일쇄 가변 단편 (scFv) 및 CD28 및 4-1BB의 세포내 도메인의 단편을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 키메라 막 단백질을 코딩하는 mRNA와 함께 전기천공하는 단계로서, 여기서 상기 세포군의 세포 중 적어도 하나의 세포가 상기 키메라 막 단백질을 발현하는, 단계; 및 상기 세포군을 배양하는 단계로서, 여기서 이에 함유된 T 세포가 적어도 10배 증대되는, 단계를 포함하는 방법에 따라 증대된다.

[0013] 본 발명의 또 다른 양태는, 증진된 면역성 (enhanced immunity)과 관련된 질환 또는 병증의 치료를 필요로 하는 대상체에게 T 세포를 포함하는 증대된 세포군을 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 증진된 면역성과 관련된 질환 또는 병증을 치료하는 방법을 포함하며, 여기서 상기 증대된 세포군은, T 세포를 포함하는 세포군을 CD3에 대해 지시된 단일쇄 가변 단편 (scFv) 및 CD28 및 4-1BB의 세포내 도메인의 단편을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 키메라 막 단백질을 코딩하는 mRNA와 함께 전기천공하는 단계로서, 여기서 상기 세포군의 세포 중 적어도 하나의 세포가 키메라 막 단백질을 발현하는, 단계; 및 상기 세포군을 배양하는 단계로서, 여기서 이에 함유된 T 세포가 적어도 10배 증대되는, 단계를 포함하는 방법에 따라 증대된다.

[0014] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 방법에 따라 제조된 증대된 T 세포군을 포함한다.

[0015] 또 다른 양태에서, 본 발명은 상기 대상체에게 본원에 기재된 방법으로 생산된 변형된 T 세포를 포함하는 치료학적 유효량의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 병증을 치료하는 방법을 포함한다.

[0016] 또 다른 양태에서, 본 발명은 면역 반응의 치료를 필요로 하는 대상체에서 면역 반응의 치료를 위한 약제 생산에 있어서 본원에 기재된 T 세포의 용도를 포함한다.

[0017] 상기 양태들 또는 본원에 묘사된 발명의 또 다른 양태의 다양한 실시형태에서, 상기 전기천공되는 세포군은 말초 혈액 단핵구, 제대혈 세포, 정제된 T 세포군, 및 T 세포주로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 또 다른 실시형태에서, 상기 전기천공되는 세포군은 말초 혈액 단핵구를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 상기 전기천공되는 세포군은 정제된 T 세포를 포함한다.

[0018] 일 실시형태에서, 상기 mRNA는 시험관내 전사된 또는 합성 RNA를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 상기 키메라 막 단백질을 코딩하는 mRNA는 막관통 도메인을 추가로 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 상기 키메라 막 단백질을 코딩하는 mRNA는 힌지 도메인을 추가로 포함한다.

[0019] 또 다른 실시형태에서, 상기 항체는 합성 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 단일 도메인 항체, 단일쇄 가변 단편, 및 이의 항원-결합 단편으로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 또 다른 실시형태에서, 상기 항원 결합 도메인은 항-CD3, 항-TCR, 항-CD28, 및 이의 조합으로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.

[0020] 또 다른 실시형태에서, 상기 세포군 중 적어도 하나의 세포는 CD3를 발현한다. 또 다른 실시형태에서, 상기 키메라 막 단백질을 발현하는 적어도 하나의 세포는 CD3를 발현하는 또 다른 세포와 상호작용한다.

[0021] 또 다른 실시형태에서, 상기 T 세포는 약 20배 내지 약 50배의 범위로 증대된다.

[0022] 일 실시형태에서, 본원에 기재된 방법은 작용제를 코딩하는 mRNA를 상기 증대된 T 세포군 내로 전기천공하는 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 상기 작용제 mRNA는 상기 키메라 막 단백질 mRNA와 함께 동시-전기천공된다. 또 다른 실시형태에서, 본원에 기재된 방법은 상기 증대된 T 세포군을 CD27, CD28, CD83, CD86, CD127, 4-1BBL IL2, IL21, IL-15, IL-7, PD1-CD28 및 PD1로 이루어진 그룹 중에서 선택된 적어도 하나의 분자 또는 시토카인으로 자극하는 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 본원에 기재된 방법은 상기 배양된 T 세포를 냉동보존 (cryopreserving)하는 단계를 추가로 포함한다.

[0023] 또 다른 실시형태에서, 상기 면역 반응은 자가면역 질환이다. 또 다른 실시형태에서, 자가면역 질환은 후천성 면역결핍 증후군 (AIDS), 원형 탈모, 강직성 척추염, 항인지질 증후군, 자가면역 애디슨병, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 자가면역 내이 질환 (AIED), 자가면역 림프구증식 증후군 (ALPS), 자가면역 혈소판감소 자색반 (ATP), 베체트병, 심근병증, 복강스프루-포진성 피부염; 만성피로 면역기능장애 증후군 (CFIDS), 만성 염증성 탈수초성 다발성 신경병증 (CIPD), 흉터 유사천포창, 저온 응집병, 크레스트 증후군, 크론병, 데고스병 (Degos' disease), 소아 피부근염, 원판상 루푸스, 본태성 혼합 한랭글로불린혈증, 섬유근통-섬유근염, 그레이브스 병, 길랑-바레 증후군, 하시모토 갑상선염, 특발성 폐섬유화증, 특발성 혈소판감소 자반증 (ITP), IgA 신장병증, 인슐린-의존성 당뇨병, 소아 만성 관절염 (스틸병), 소아 류마티스 관절염, 메니에르병, 혼합 결합 조직병, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 악성 빈혈, 결절다발 동맥염, 다발성 연골염, 다분비선 증후군, 류마티스 다발성 근육통, 다발근염 및 피부근염, 원발성 무감마글로불린혈증, 원발성 담즙성 간경변, 건선, 건선 관절염, 레이노 증후군, 라이터 증후군, 류마티스 열, 류마티스 관절염, 사르코이드증, 피부경화증 (진행성 전신 경화증 (PSS), 전신 경화증 (SS)으로도 알려짐), 쇼그렌 증후군, 강직 증후군, 전신 홍반 루푸스, 타카야수 동맥염, 측두 동맥염/거대 세포 동맥염, 궤양성 대장염, 포도막염, 백반증, 베게너 육아종증, 및 이의 임의의 조합으로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.

[0024] 또 다른 실시형태에서, 상기 면역 반응은 암이다. 또 다른 실시형태에서, 상기 암은 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 피부암, 췌장암, 직장결장암, 신장암, 간암, 뇌암, 림프종, 백혈병, 폐암, 및 갑상선암종으로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.

도면의 간단한 설명

[0025] 본 발명의 바람직한 실시형태에 대한 하기의 상세한 설명은, 첨부된 도면과 함께 볼 때 보다 더 잘 이해될 것이다. 본 발명을 예시하려는 목적으로, 현재 바람직한 실시형태의 도면이 도시된다. 그러나, 본 발명은 도면에 도시된 실시형태의 정확한 배열 및 수단에 제한되지 않는다는 것을 이해해야 한다.

도 1은 항-CD3-H5L1-28BB 및 항-CD3-OKT3-28BB의 벡터 맵 패널이다. 두 작제물 모두에서, CD8 힌지 영역에 이어서 CD28 막관통, CD28 세포내 및 4-1BB 세포내 영역과 함께 항-CD3 scFv가 융합되었다.

도 2는 OKT-28BB RNA의 전기천공으로 자극된 T 세포의 증대를 도시하는 그래프이다.

도 3은 증대된 T 세포의 표현형 분석을 도시하는 그래프 패널이다. 자극 10일 후, OKT-28BB 또는 H5L1-28BB RNA 전기천공된 T 세포로 증대된 T 세포의 표현형이 OKT3 자극 (OKT3) 또는 CD28/CD3 비드 (Beads) 자극으로 증대된 T 세포의 표현형과 비교되었다.

도 4는 상기 증대된 T 세포의 기능을 강조한 그래프 패널이다. 지시된 바와 같이 상이한 방법을 사용하여 10일 동안 T 세포가 증대되었다. OKT3: OKT3 항체를 PBMC에 직접 첨가함 (OKT3); OKT-28BB: OKT3-28BB와 함께 PBMC를 전기천공함; H5L1-28BB: H5L1-28BB와 함께 PBMC를 전기천공함; 또는 Beads: OKT3-28BB 비드를 PBMC에 직접 첨가함. CD19 양성 종양 Nalm6으로 자극함으로써 T 세포 기능을 시험하기 위하여, 모든 그룹이 CD19 키메라 항원 수용체 (CAR) RNA와 함께 전기천공되었다. RNA 전기천공 18시간 후, CD19 CAR RNA 전기천공된 T 세포의 CD19 CAR 발현이 측정되었다.

도 5A-B를 포함한 도 5는 CD19 CAR RNA와 함께 전기천공된 증대된 T 세포의 기능을 추가로 도시한다. 증대된 세포는 상이한 비율의 T 세포:Nalm6 세포의 Nalm6으로 자극되었다 (도 5A). CD107a 양성 T 세포의 백분율이 플롯팅되었다 (도 5B).

도 6은 증대된 T 세포의 표현형 분석을 도시하는 그래프 패널이다. 10일 동안 OKT-28BB 또는 다른 것과 조합된 RNA 전기천공된 T 세포로 증대된 T 세포의 표현형이 OKT3 자극으로 증대된 T 세포 (OKT3)의 표현형과 비교되었

다.

도 7은 다른 분자를 코딩하는 RNA와 함께 OKT-28BB의 동시-전기천공으로 증대되고 CD19 CAR RNA와 함께 전기천공되고, CD19 양성 세포주로 18시간 동안 자극된, T 세포의 인터페론-감마 (IFN-γ) 생성 수준을 도시하는 막대 그래프이다. IFN-γ 수준이 ELISA로 측정되었다.

도 8은 다른 분자를 코딩하는 RNA와 함께 OKT-28BB의 동시-전기천공으로 증대되고 CD19 CAR RNA와 함께 전기천공되고, CD19 양성 세포주로 18시간 동안 자극된, T 세포의 IL-2 생성 수준을 도시하는 막대 그래프이다. IL-2 수준이 ELISA로 측정되었다.

도 9는 다른 분자를 코딩하는 RNA와 함께 OKT-28BB의 동시-전기천공으로 증대되고 CD19 CAR RNA와 함께 전기천공되고, CD19 양성 종양인 Nalm6; PDL1로 발현된 Nalm6; 또는 HVEM로 발현된 Nalm6으로 자극된, T 세포에 대해 세포독성 T 림프구 (CTL) 검정으로 시험한 T 세포 용해 활성을 예시하는 그래프 패널이다.

도 10은 상기 RNA 동시-전기천공을 열거한 표이다. OKT-28BB-1:PBMC를 OKT-28BB RNA 단독과 함께 전기천공하여 증대된 T 세포. OKT-28BB-2 내지 OKT-28BB-6: PBMC를 OKT-28BB 및 도시된 다른 분자를 코딩하는 RNA의 상이한 조합과 함께 동시-전기천공하여 증대된 T 세포.

도 11은 0일에 1E6 Nalm6-ESO-CBG 정맥내 주사된 NSG 마우스를 도시하는 이미지 패널이다. 7일에, $1x10^6$ NY-ESO-T TCR (1G4 TCR) RNA 전기천공된 OKT3-28BB RNA T 세포 (RNA-T) 또는 CD3/CD28 비드 T 세포 (Beads)가 정맥내 주사되었다. 생체발광 영상화로 종양 부하가 모니터링 되었다. 결과는, Beads 자극된 T 세포보다 TCR과 함께 전달된 RNA-T 세포에서 보다 양호한 종양 조절을 나타냈다.

도 12는 렌티바이러스의 RNA-T 세포로의 형질도입 효율을 도시하는 그래프 패널이다. 1일 또는 2일에 RNA T 세포가 수거되고, 0.5ml, 1ml 또는 2ml/웰로 구성된 24 웰 플레이트에 $1.5x10^6$/ml의 세포 농도로 분액되었다. 0.1ml의 농축된 4D5.BBZ 렌티바이러스 벡터 ($5x10^6$/ml의 역가)가 각 웰에 첨가되었다. 1일 또는 2일에 대조군으로 4D5.BBZ 렌티바이러스 벡터가 지시된 바와 같이 감염 다중도 (MOI)로 CD3/CD28 비드 자극된 T 세포에 첨가되었다. 자극 9일 후, 증대된 T 세포가 형질도입된 CAR 발현의 검출을 위하여 유세포 분석 염색되었다.

도 13은 렌티바이러스로 형질도입된 RNA T 세포의 T 세포 증대를 도시하는 그래프이다. 결과는, 렌티바이러스로 형질도입되거나 비-형질도입된 RNA T 세포 둘 모두가 CD3/CD28 비드 자극된 T 세포에서 만큼 효과적으로 증대되었다는 것을 나타냈다.

도 14는 렌티바이러스로 형질도입된 RNA-T 세포에서의 CD107a 상향 조절을 도시하는 그래프이다. 렌티바이러스로 형질도입된 RNA T 세포, 또는 Beads 자극된 T 세포가 Her2 양성 세포주인 SK-OV3, MCF7 및 MDA231, 또는 Her2 음성 종양 세포주인 MDA468로 4시간 동안 자극되었고, 유세포 분석으로 CD107a 발현이 검출되었다.

도 15는 렌티바이러스로 형질도입된 RNA-T 세포에서의 시토카인 생산을 도시하는 그래프 패널이다. 렌티바이러스로 형질도입된 RNA T 세포, 또는 Beads 자극된 T 세포가 Her2 양성 세포주인 SK-OV3, MCF7 및 MDA231, 또는 Her2 음성 종양 세포주인 MDA468로 자극되었고, 밤새 인큐베이션한 후 ELISA로 시토카인 생산을 검출하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 정의

[0027] 달리 정의되지 않는다면, 본 명세서에 사용되는 모든 기술과학 용어들은 본 발명이 속하는 분야의 통상적인 숙련가에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 개시된 바와 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 물질을 본 발명의 시험을 위한 실시에 사용할 수 있지만, 바람직한 물질 및 방법을 본 명세서에 기재한다. 본 발명의 기재 및 청구에서, 하기의 용어가 사용될 것이다.

[0028] 본 명세서에 사용되는 용어는 단지 특정한 실시형태을 기재하기 위한 것이며, 제한을 의도하지 않음을 또한 알아야 한다.

[0029] 단수 형태는 하나 또는 하나보다 많은(즉 적어도 하나) 대상을 지칭하는데 사용된다. 예로서, 하나의 "요소"는 하나의 요소 또는 하나보다 많은 요소를 의미한다.

[0030] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "약"은 양, 시간적 지속 등과 같은 측정 가능한 값을 언급할 때 명시된 값의 ±20% 또는 ±10%, 보다 바람직하게는 ±5%, 훨씬 더 바람직하게는 ±1%, 및 더욱 더 바람직하게는 ±0.1%의 변

화를 포함함을 의미하며, 상기와 같은 변화는 개시된 방법을 수행하기에 적합하다.

[0031] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "항체"란 용어는 항원과 특이적으로 결합하는 면역글로불린 분자를 지칭한다. 항체는 천연 공급원 또는 재조합 공급원으로부터 수득된 완전한 면역글로불린일 수 있으며 완전한 면역글로불린의 면역반응성 부분들일 수 있다. 항체는 전형적으로 면역글로불린 분자의 사량체이다. 사량체는 천연이거나 또는 단일쇄 항체 또는 항체 단편으로부터 재구성될 수 있다. 항체는 또한 천연이거나 단일쇄 항체 또는 항체 단편으로부터 재구성될 수 있는 이량체를 포함한다. 본 발명에서 항체는 다양한 형태들, 예를 들어 다클론 항체, 단클론 항체, Fv, Fab 및 $F(ab')_2$뿐만 아니라 단일쇄 항체(scFv), 인간화된 항체, 및 인간 항체로 존재할 수 있다(Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426).

[0032] "항체 단편"이란 용어는 완전 항체의 한 영역을 지칭하며 완전 항체의 항원 결정 가변 영역을 지칭한다. 항체 단편의 예는 비제한적으로 Fab, Fab', $F(ab')_2$, 및 Fv 단편, 선형 항체, scFv 항체, 단일-도메인 항체, 예를 들어 표적에 대해 충분한 친화성을 나타내는 VL 또는 VH 도메인으로 구성된 카멜리드 항체(Riechmann, 1999, Journal of Immunological Methods 231:25-38), 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이성 항체를 포함한다. 상기 항체 단편은 또한 인간 항체 또는 인간화된 항체 또는 그의 인간 항체 또는 인간화된 항체의 단편을 포함한다.

[0033] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "항체 중쇄"는 천연 입체형태로 모든 항체 분자 중에 존재하는 폴리펩티드 쇄의 2가지 유형 중 보다 큰 것을 지칭한다.

[0034] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "항체 경쇄"는 천연 입체형태로 모든 항체 분자 중에 존재하는 폴리펩티드 쇄의 2가지 유형 중 보다 작은 것을 지칭한다. α 및 β 경쇄는 2가지 주요 항체 경쇄 아이소타입들을 지칭한다.

[0035] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "합성 항체"란 용어는 재조합 DNA 기술을 사용하여 생성되는 항체, 예를 들어 본 명세서에 기재된 바와 같은 박테리오파지에 의해 발현된 항체를 의미한다. 상기 용어는 또한, 항체를 코딩하고 항체 단백질을 발현하는 DNA 분자 또는 상기 항체를 명시하는 아미노산 서열의 합성에 의해 생성된 항체를 의미하는 것으로 해석되어야 하며, 여기에서 상기 DNA 또는 아미노산 서열은 당해 분야에서 입수할 수 있고 주지되어 있는 합성 DNA 또는 아미노산 서열 기술을 사용하여 획득되었다.

[0036] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "항원" 또는 "Ag"란 용어는 면역 반응을 일으키는 분자로서 정의된다. 상기 면역 반응은 항체 생성, 또는 특정한 면역학적으로-적격인 (immunologically-competent) 세포의 활성화, 또는 이 둘 모두를 포함할 수 있다. 숙련가는 실질적으로 모든 단백질 또는 펩티드를 포함한 임의의 거대분자가 항원으로서 작용할 수 있음을 알 것이다. 더욱 또한, 항원은 재조합 또는 게놈 DNA로부터 생성될 수 있다. 따라서 숙련가는 면역 반응을 이끌어내는 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 부분 뉴클레오티드 서열을 포함하는 임의의 DNA가 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "항원"을 코딩함을 알 것이다. 더욱 또한, 당해 분야의 숙련가는 항원이 오직 유전자의 전장 핵산 서열에 의해서만 코딩될 필요는 없음을 알 것이다. 본 발명이 비제한적으로 하나 초과의 유전자의 부분 뉴클레오티드 서열의 용도 및 이들 뉴클레오티드 서열을 목적하는 면역 반응을 이끌어내기 위해서 다양한 조합들로 배열함을 포함함은 쉽게 자명하다. 더욱이, 숙련가는 항원이 전혀 "유전자"에 의해 코딩될 필요가 없음을 알 것이다. 항원이 생물학적 샘플로부터 생성되거나, 합성되거나 기원할 수 있음은 쉽게 자명하다. 상기와 같은 생물학적 샘플은 비제한적으로 조직 샘플, 종양 샘플, 세포 또는 생물학적 유체를 포함할 수 있다.

[0037] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "자기유래 (autologous)"란 용어는 동일한 개체로부터 기원하여 나중에 다시 상기 개체로 재-도입되는 임의의 물질을 지칭하고자 한다.

[0038] "동종이계 (allogeneic)"는 동일한 종의 상이한 동물로부터 유래된 이식편을 지칭한다.

[0039] "이종발생성 (xenogeneic)"은 상이한 종의 동물로부터 유래된 이식편을 지칭한다.

[0040] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "암"이란 용어는 빠르고 통제되지 않는 이상 세포의 성장을 특징으로 하는 질병으로서 정의된다. 암 세 포는 국소적으로 또는 혈류 및 림프계를 통해 신체의 다른 부분으로 확산될 수 있다. 다양한 암의 예는 비제한적으로 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 피부암, 췌장암, 직장결장암, 신장암, 간암, 뇌암, 림프종, 백혈병, 폐암, 갑상선암종 등을 포함한다.

[0041] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR"이란 용어는 면역 효과기 세포상에서 발현되도록 조작되고 항원에 특이적으로 결합하는 인공 T 세포 수용체를 지칭한다. CAR은 입양 세포 전달에 의한 요법으로서 사용될 수 있다. T 세포를 환자로부터 제거하고 특정한 형태의 항원에 특이적인 수용체를 발현하도록 변형시킨다. 일부 실시형태에서, 상기 CAR은 예를 들어 종양 관련 항원에 대해 특이적으로 발현되었다. CAR은 또한 세포내 활성화 도메인, 막관통 도메인 및 종양 관련 항원 결합 영역을 포함하는 세포외 도메인을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, CAR은 CD3-제타 막관통 및 세포내 도메인에 융합된, 단일쇄 가변 단편(scFv) 유래된 단클론 항체의 융합물을 포함한다. CAR 설계의 특이성은 수용체의 리간드(예: 펩티드)로부터 유래될 수 있다. 일부 실시형태에서, CAR은 종양 관련 항원에 특이적인 CAR을 발현하는 T 세포의 특이성을 재지시함으로써 암을 표적화할 수 있다.

[0042] "키메라 막 단백질"이란 용어는 하나 이상의 신호전달 및/또는 수용체 분자로부터 유래하거나 상기를 활성화할 수 있는 세포외 도메인 및 세포내 도메인을 갖는 조작된 막 단백질을 지칭한다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 키메라 막 단백질은 CD3에 대해 지시된 단일쇄 가변 단편(scFv) 및 CD28 및 4-1BB의 세포내 도메인의 단편을 포함하는 세포내 도메인을 포함한다.

[0043] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "보존적 서열 변형"이란 용어는 아미노산 서열을 함유하는 항체의 결합 특징에 현저하게 영향을 미치거나 상기 특징을 변경시키지 않는 아미노산 변형을 지칭하고자 한다. 상기와 같은 보존적 변형은 아미노산 치환, 부가 및 결실을 포함한다. 변형을 당해 분야에 공지된 표준 기법, 예를 들어 부위-지향된 변이도입 및 PCR-매개된 변이도입에 의해 본 발명의 항체에 도입시킬 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 치환된 것이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기들의 계열이 당해 분야에서 정의되었다. 이들 계열은 염기성 측쇄 (예: 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄 (예: 아스파트산, 글루탐산), 하전되지 않은 극성 측쇄 (예: 글리신, 아스파라진, 글루타민, 세린, 쓰레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측쇄 (예: 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타-분지된 측쇄 (예: 쓰레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄 (예: 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 갖는 아미노산들을 포함한다. 따라서, 항체의 CDR 영역내의 하나 이상의 아미노산 잔기들을 동일한 측쇄 계열로부터의 다른 아미노산 잔기들로 치환시킬 수 있으며 상기 변경된 항체를 본 명세서에 기재된 기능 분석을 사용하여 항원에 결합하는 능력에 대해 시험할 수 있다.

[0044] 본 명세서에 사용되는 용어로서 "공자극(co-stimulatory) 리간드"는 T 세포상의 동족 공자극 분자에 특이적으로 결합하여, 예를 들어 TCR/CD3 복합체와 펩티드가 로딩된 MHC 분자와의 결합에 의해 제공된 1차 신호 외에, T 세포 반응, 예를 들어 비제한적으로 증식, 활성화, 분화 등을 매개하는 신호를 제공하는 항원 제시 세포 (예: APC, 수지상 세포, B 세포 등) 상의 분자를 포함한다. 공자극 리간드는 비제한적으로 CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, 유도성 보조자극 리간드(ICOS-L), 세포내 부착 분자(ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, 림프독소 베타 수용체, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, 톨 리간드 수용체에 결합하는 작용물질 또는 항체 및 B7-H3와 특이적으로 결합하는 리간드를 포함할 수 있다. 공자극 리간드는 또한 특히, T 세포상에 존재하는 공자극 분자와 특이적으로 결합하는 항체, 예를 들어 비제한적으로 CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능-관련 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 및 CD83에 특이적으로 결합하는 리간드를 포함한다.

[0045] "공자극 분자"는 공자극 리간드와 특이적으로 결합하여, T 세포에 의한 공자극 반응, 예를 들어 비제한적으로 증식을 매개하는 T 세포상의 동족 결합 파트너를 지칭한다. 공자극 분자는 비제한적으로 MHC I 부류 분자, BTLA 및 톨 리간드 수용체를 포함한다.

[0046] "로부터 유래된"이란 용어는 특정 공급원으로부터 생성되거나, 합성되거나 기원함을 지칭하며, 따라서 유래된 물질은 공급원과 관련된다. 상기 유래된 물질은 상기 특정한 공급원과 일치할 필요는 없다. 일 실시형태에서, 항원은 단백질로부터 유래된다. 또 다른 실시형태에서, 단일쇄 가변 단편은 단클론 항체로부터 유래된다.

[0047] 용어 "전기천공하다 (electroporate)", "전기천공", "전기천공된"은 세포 원형질막에 전기장을 적용하여 이의 투과성을 증가시키는 과정을 지칭한다. 특정한 지속시간 및 모양의 펄스를 세포의 세포 막에 적용하여 핵산을 상기 세포에 도입한다.

[0048] "유효량" 또는 "치료 유효량"은 본 명세서에서 호환적으로 사용되며, 특정한 생물학적 결과를 성취하기에 유효한 본 명세서에 기재된 바와 같은 화합물, 제형, 물질 또는 조성물의 양을 지칭한다. 상기와 같은 결과는 비제한적으로 당해 분야에 적합한 임의의 수단에 의해 측정될 수 있는 바이러스 감염 억제를 포함할 수 있다.

[0049] "코딩"는 뉴클레오티드(즉 rRNA, tRNA 및 mRNA)의 한정된 서열 또는 아미노산의 한정된 서열을 갖는 생물학적 과정에서 다른 중합체 및 거대분자의 합성을 위한 주형으로서 작용하기 위한, 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 유전자, cDNA, 또는 mRNA 중의 뉴클레오티드의 특정 서열의 본래적인 성질 및 상기로부터 생성되는 생물학적 성질을 지칭한다. 따라서, 유전자는 상기 유전자에 상응하는 mRNA의 전사 및 번역이 세포 또는 다른 생물계에서 단백질을 생성시키는 경우 상기 단백질을 코딩한다. 코딩 가닥(그의 뉴클레오티드 서열은 mRNA 서열에 일치하고 대개는 서열 목록에 제공된다), 및 유전자 또는 cDNA의 전사에 대한 주형으로서 사용되는 비-코딩 가닥을 모두 상기 유전자 또는 cDNA의 단백질 또는 다른 생성물을 코딩하는 것으로서 지칭할 수 있다.

[0050] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "내인성"은 유기체, 세포, 조직 또는 계 내부로부터 또는 상기 내부에서 생성되는 임의의 물질을 지칭한다.

[0051] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "외인성"은 유기체, 세포, 조직 또는 계로부터 도입되거나 또는 상기 밖에서 생성되는 임의의 물질을 지칭한다.

[0052] 본원에서 사용되는 용어 "증대시키다 (expand)" 및 "증대"는 세포, 예컨대, T 세포의 증식 또는 증가를 지칭한다.

[0053] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "발현"이란 용어는 그의 프로모터에 의해 구동된 특정 뉴클레오티드 서열의 전사 및/또는 번역으로서 정의된다.

[0054] "발현 벡터"는 발현시키고자 하는 뉴클레오티드 서열에 작동적으로 연결된 발현 조절 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 지칭한다. 발현 벡터는 발현에 충분한 시스-작용 요소를 포함하며; 다른 발현 요소들은 숙주 세포에 의해 또는 시험관내 발현 시스템에서 공급될 수 있다. 발현 벡터는 당해 분야에 공지된 모든 것들, 예를 들어 코스미드, 플라스미드 (예: 네이키드 또는 리포솜 중에 함유된) 및 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 (예: 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 및 아데노-관련 바이러스)를 포함한다.

[0055] 본원에서 사용되는 "상동성"은 2개 중합체 분자, 예를 들어, 2개 핵산 분자, 예컨대, 2개 DNA 분자 또는 2개 RNA 분자 간의 아단위 서열 동일성을 지칭한다. 상기 2개 분자 모두의 아단위 위치가 동일한 단량체 아단위로 점유되는 경우; 예를 들어, 만일 각각의 2개 DNA 분자의 위치가 아데닌으로 점유되는 경우, 이들은 그 위치에서 상동성이다. 두 서열 간의 상동성은 일치 또는 상동성 위치의 수의 직접적인 함수이다; 예를 들어, 2개 서열내 위치 중 절반 (예: 중합체의 5개 위치는 10개의 아단위 길이를 가짐)이 상동성이면, 두 서열은 50% 동종이며; 위치의 90% (예: 10 중 9 개)가 일치되거나 상동이면, 2개 서열은 90% 상동이다.

[0056] 비-인간 (예: 뮤린) 항체의 "인간화된" 형태는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 면역글로불린, 그의 면역글로불린 쇄 또는 단편 (예: Fv, Fab, Fab', F(ab')2 또는 항체의 다른 항원-결합 하위서열들)이다. 대개, 인간화된 항체는 수용자의 상보성-결정 영역(CDR)으로부터의 잔기가 목적하는 특이성, 친화성 및 능력을 갖는 비-인간 종(공여자 항체), 예를 들어 마우스, 래트 또는 토끼의 CDR로부터의 잔기에 의해 대체된 인간 면역글로불린(수용자 항체)이다. 일부 예에서, 상기 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 영역 (FR) 잔기는 상응하는 비-인간 잔기에 의해 대체된다. 더욱 또한, 인간화된 항체는 상기 수용자 항체 중에서도 유입된 CDR 또는 프레임워크 서열 중에서도 발견되지 않는 잔기들을 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체 수행성능을 더욱 다듬고 최적화하기 위해 수행된다. 일반적으로, 상기 인간화된 항체는 적어도 하나, 및 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 전부 포함할 것이며, 여기에서 상기 CDR 영역 전부 또는 실질적으로 전부는 비-인간 면역글로불린의 영역에 상응하고 상기 FR 영역의 전부 또는 실질적으로 전부는 인간 면역글로불린 서열의 영역들이다. 상기 인간화된 항체는 또한 최적으로, 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부, 전형적으로는 인간 면역글로불린의 적어도 일부를 포함할 것이다. 추가의 상세한 내용에 대해서, 문헌[Jones et al., Nature, 321: 522-525, 1986]; 문헌[Reichmann et al., Nature, 332: 323-329, 1988]; 문헌[Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596, 1992]을 참조한다.

[0057] "완전 인간"은 전체 분자가 인간 기원이거나 또는 항체의 인간형과 일치하는 아미노산 서열로 이루어지는 면역글로불린, 예를 들어 항체를 지칭한다.

[0058] "면역학적 유효량", "항-면역 반응 유효량", "면역 반응-억제 유효량", 또는 "치료량"이란 어구는 대상체(환자)에서 목적하는 결과를 획득하도록 의사에 의해, 임의로 과학자와의 상담에서, 연령, 체중, 면역 반응, 질병/상태의 유형, 및 상기 대상체(환자)의 건강의 개인적인 차이를 고려하여 대상체에게 투여되는 본 발명의 조성물의 양을 지칭한다.

[0059] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "교재"는 본 발명의 조성물 및 방법의 유용성을 연통하는데 사용될 수 있는 간행물, 기록물, 도해, 또는 임의의 다른 표현 매체를 포함한다. 본 발명의 키트의 교재를 예를 들어 본 발명의 핵산, 펩티드 및/또는 조성물을 함유하는 용기에 부착시키거나 또는 상기 핵산, 펩티드 및/또는 조성물을 함유하는 용기와 함께 발송할 수 있다. 한편으로, 상기 교재를, 상기 교재 및 화합물을 수령자가 협력하여 사용하도록 상기 용기와 별도로 발송할 수도 있다.

[0060] "단리된"은 자연 상태로부터 변경되거나 제거됨을 의미한다. 예를 들어, 살아있는 동물 중에 자연적으로 존재하는 핵산 또는 펩티드는 "단리된" 것이 아니고, 그의 자연 상태의 공존하는 물질로부터 부분적으로 또는 완전히 분리된 동일한 핵산 또는 펩티드가 "단리된" 것이다. 단리된 핵산 또는 단백질은 실질적으로 정제된 형태로 존재하거나, 또는 비-천연 환경, 예를 들어 숙주 세포 중에 존재할 수 있다.

[0061] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "변형된"이란 용어는 본 발명의 분자 또는 세포의 변화된 상태 또는 구조를 의미한다. 분자를 다수의 방식으로, 예를 들어 화학적으로, 구조적으로 및 기능적으로 변형시킬 수 있다. 세포를 핵산의 도입을 통해 변형시킬 수 있다.

[0062] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "조절"이란 용어는 치료 또는 화합물 부재하에서의 대상체의 반응 수준에 비해, 및/또는 달리 동일하지만 치료되지는 않은 대상체에서의 반응 수준에 비해, 상기 대상체에서 반응 수준의 검출 가능한 증가 또는 감소를 매개함을 의미한다. 상기 용어는 고유 신호 또는 반응을 동요시키고/시키거나 영향을 미침으로써 대상체, 바람직하게는 인간에서 이로운 치료 반응을 매개함을 포함한다.

[0063] 본 발명과 관련하여, 하기의 통상적으로 존재하는 핵산 염기에 대한 약어들이 사용된다. "A"는 아데노신을 지칭하고, "C"는 시토신을 지칭하고, "G"는 구아노신을 지칭하고, "T"는 티미딘을 지칭하고, "U"는 유리딘을 지칭한다.

[0064] 달리 명시되지 않는 한, "아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열"은, 서로 축퇴 버전이고 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 모든 뉴클레오티드 서열들을 포함한다. 단백질 또는 RNA를 코딩하는 뉴클레오티드 서열이란 어구는 상기 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 일부 버전에서 인트론(들)을 함유할 수 있는 정도로 인트론을 또한 포함할 수 있다.

[0065] "작동적으로 연결된"이란 용어는 이종핵산 서열의 발현을 생성시키는 조절 서열과 상기 이종 핵산 서열간의 기능적 결합을 지칭한다. 예를 들어, 제1 핵산 서열은, 상기 제1 핵산 서열이 제2 핵산 서열과 기능적 관계로 놓일 때 상기 제2 핵산 서열과 작동적으로 연결된다. 예를 들어, 프로모터는, 상기 프로모터가 코딩 서열의 전사 또는 발현에 영향을 미치는 경우 상기 코딩 서열에 작동적으로 연결된다. 일반적으로, 작동적으로 연결된 DNA 서열은 연속적이며, 필요한 경우 동일한 판독 프레임 중의 2개의 단백질 코딩 영역에 결합된다.

[0066] 면역원성 조성물의 "비경구" 투여는 예를 들어 피하(s.c.), 정맥내(i.v.), 근육내(i.m.) 또는 흉골내 주사, 또는 주입 기법을 포함한다.

[0067] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "폴리뉴클레오티드"란 용어는 뉴클레오티드의 쇄로서 정의된다. 더욱 또한, 핵산은 뉴클레오티드의 중합체이다. 따라서, 본 명세서에 사용되는 바와 같은 핵산 및 폴리뉴클레오티드는 호환 가능하다. 당해 분야의 숙련가는 핵산이 폴리뉴클레오티드이고, 이는 단량체성 "뉴클레오티드"로 가수분해될 수 있다는 일반적인 지식을 갖는다. 상기 단량체성 뉴클레오티드는 뉴클레오시드로 가수분해될 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이 폴리뉴클레오티드는 비제한적으로 당해 분야에서 입수할 수 있는 임의의 수단, 예를 들어 비제한적으로 재조합 수단, 즉 통상적인 클로닝 기술 및 PCR™ 등을 사용하여 재조합 라이브러리 또는 세포 게놈으로부터 핵산 서열의 클로닝에 의해, 및 합성 수단에 의해 획득되는 모든 핵산 서열을 포함한다.

[0068] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "펩티드", "폴리펩티드" 및 "단백질"이란 용어들은 호환 가능하게 사용되며, 펩티드 결합에 의해 공유적으로 결합된 아미노산 잔기들로 구성된 화합물을 지칭한다. 단백질 또는 펩티드는 적어도 2개의 아미노산을 함유해야 하며, 단백질 또는 펩티드의 서열을 포함할 수 있는 아미노산의 최대수에 대한 제한은 없다. 폴리펩티드는 서로 펩티드 결합에 의해 결합된 2개 이상의 아미노산을 포함하는 임의의 펩티드 또는 단백질을 포함한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 상기 용어는 단일쇄(또한 당해 분야에서 예를 들어 펩티드, 올리고펩티드 및 올리고머라 통상적으로 지칭됨) 및 보다 긴 쇄(일반적으로 당해 분야에서 단백질이라 지칭되며, 다수의 유형이 존재함) 모두를 지칭한다. "폴리펩티드"는 특히 예를 들어 생물학적으로 활성인 단편, 실질적으로 동종 폴리펩티드, 올리고펩티드, 동종이량체, 이종이량체, 폴리펩티드의 변이체, 변형된 폴리펩티드, 유도체, 유사체, 융합 단백질을 포함한다. 상기 폴리펩티드는 천연 펩티드, 재조합 펩티드, 합성 펩티드, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0069] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "프로모터"란 용어는 폴리뉴클레오티드 서열의 특정한 전사를 개시시키는데 필요한 세포의 합성 기구, 또는 도입된 합성 기구에 의해 인식되는 DNA 서열로서 정의된다.

[0070] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "프로모터/조절 서열"이란 용어는 상기 프로모터/조절 서열에 작동적으로 연결된 유전자 산물의 발현에 필요한 핵산 서열을 의미한다. 일부 예에서, 상기 서열은 코어 프로모터 서열일 수 있으며, 다른 예에서 상기 서열은 또한 인핸서 서열 및 상기 유전자 산물의 발현에 필요한 다른 조절 요소를 포함할 수 있다. 상기 프로모터/조절 서열은 예를 들어 조직 특이적인 방식으로 상기 유전자 산물을 발현하는 것일 수 있다.

[0071] "구성" 프로모터는 유전자 산물을 코딩하거나 명시하는 폴리뉴클레오티드와 작동적으로 연결될 때, 상기 유전자 산물이 세포의 대부분 또는 모든 생리학적 조건하에서 상기 세포에서 생성되도록 하는 뉴클레오티드 서열이다.

[0072] "유도성" 프로모터는 유전자 산물을 코딩하거나 명시하는 폴리뉴클레오티드와 작동적으로 연결될 때, 상기 유전자 산물이, 실질적으로 오직 상기 프로모터에 상응하는 유도물질이 세포 중에 존재하는 경우에만 상기 세포에서 생성되도록 하는 뉴클레오티드 서열이다.

[0073] "조직-특이성" 프로모터는 유전자 산물을 코딩하거나 명시하는 폴리뉴클레오티드와 작동적으로 연결될 때, 상기 유전자 산물이, 실질적으로 오직 세포가 상기 프로모터에 상응하는 조직 유형의 세포인 경우에만 상기 세포에서 생성되도록 하는 뉴클레오티드 서열이다.

[0074] "신호변환(signal transduction) 경로"는 세포의 한 영역으로부터 세포의 또 다른 영역으로의 신호의 전달에 한 역할을 하는 다양한 신호변환 분자들간의 생화학적 관계를 지칭한다. "세포 표면 수용체"란 어구는 신호를 받아 세포의 원형질막을 가로질러 신호를 전달할 수 있는 분자 및 분자들의 복합체를 포함한다. "세포 표면 수용체"의 일례는 인간 CD3 또는 CD28이다.

[0075] "단일쇄 항체"는 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 단편을 조작된 아미노산의 스팬을 통해 Fv 영역에 연결시키는 재조합 DNA 기법에 의해 형성되는 항체를 지칭한다. 단일쇄 항체의 다양한 생성 방법은 공지되어 있다, 예를 들어 미국특허 제 4,694,778 호; 문헌[Bird (1988) Science 242:423-442]; 문헌[Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883]; 문헌[Ward et al. (1989) Nature 334:54454]; 문헌[Skerra et al. (1988) Science 242:1038-1041]에 기재되어 있다.

[0076] 본원에서 사용되는 용어 "특이적으로 결합하다"는, 샘플 중에 존재하는 동족 결합 파트너 (예: T 세포 상에 존재하는 자극 및/또는 공자극 분자) 단백질을 인식하고 이와 결합하나, 상기 샘플 중 다른 분자를 실질적으로 인식하거나 이와 결합하지 않는, 항체 또는 리간드를 의미한다.

[0077] "자극"이란 용어는 그의 동족 리간드와 자극 분자 (예: TCR/CD3 복합체)의 결합(이에 의해 신호변환 사건, 예를 들어 비제한적으로 TCR/CD3 복합체를 통한 신호변환을 매개한다)에 의해 유도되는 1차 반응을 의미한다. 자극은 몇몇 분자의 변경된 발현, 예를 들어 TGF-베타의 하향조절, 및/또는 세포골격 구조의 재구성 등을 매개할 수 있다.

[0078] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "자극 분자"란 용어는 항원 제시 세포상에 존재하는 동족 자극 리간드와 특이적으로 결합하는 T 세포상의 분자를 의미한다.

[0079] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "자극 리간드"는 항원 제시 세포 (예: aAPC, 수지상 세포, B-세포 등)상에 존재할 때 T 세포상의 동족 결합 파트너(본 명세서에서 "자극 분자"라 칭함)와 특이적으로 결합하여, 상기 T 세포에 의한 1차 반응, 예를 들어 비제한적으로 면역 반응의 활성화, 개시, 증식 등을 매개할 수 있는 리간드를 의미한다. 자극 리간드는 당해 분야에 주지되어 있으며, 특히 펩티드, 항-CD3 항체, 과작용물질 항-CD28 항체, 및 과작용물질 항-CD2 항체가 로딩된 MHC I 부류 분자를 포함한다.

[0080] "대상체"란 용어는 면역 반응이 유도될 수 있는 살아있는 유기체 (예: 포유동물)를 포함하고자 한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "대상체" 또는 "환자"는 인간 또는 비-인간 포유동물일 수 있다. 비-인간 포유동물은 예를 들어 가축 및 애완동물, 예를 들어 양, 소, 돼지, 개, 고양이 및 뮤린과 포유동물들을 포함한다. 바람직하게, 상기 대상체는 인간이다.

[0081] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "실질적으로 정제된" 세포는 다른 세포 유형이 필수적으로 없는 세포이다. 실질적으로 정제된 세포는 또한 자연 상태에서 통상적으로 관련되는 다른 세포 유형들로부터 분리된 세포를 지칭한다. 일부 예에서, 실질적으로 정제된 세포군은 균질한 세포군을 지칭한다. 다른 예에서, 상기 용어는 단순히 자연 상태에서 자연적으로 관련되는 다른 세포 유형들로부터 분리된 세포를 지칭한다. 일부

실시형태에서, 상기 세포는 시험관내에서 배양된다. 다른 실시형태에서, 상기 세포는 시험관내에서 배양되지 않는다.

[0082] "표적 부위" 또는 "표적 서열"은 결합이 발생하기에 충분한 조건하에서 결합 분자가 특이적으로 결합할 수 있는 핵산의 영역을 한정하는 게놈 핵산 서열을 지칭한다.

[0083] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "T 세포 수용체" 또는 "TCR"이란 용어는 항원의 제시에 반응하여 T 세포의 활성화에 관여하는 막 단백질의 복합체를 지칭한다. 상기 TCR은 주조직적합성 복합체 분자에 결합된 항원의 인식을 담당한다. TCR은 알파(α) 및 베타(β) 쇄의 이종이량체로 구성되지만, 일부 세포에서 상기 TCR은 감마 및 델타(γ/δ)쇄로 이루어진다. TCR은 알파/베타 및 감마/델타 형태로 존재할 수 있으며, 이들 형태는 구조적으로 유사하나 별개의 해부학적 위치 및 기능을 갖는다. 각각의 쇄는 2개의 세포외 도메인, 가변 및 불변 도메인으로 구성된다. 일부 실시형태에서, 상기 TCR은 TCR을 포함하는 임의의 세포, 예를 들어 헬퍼 T 세포, 세포독성 T 세포, 기억 T 세포, 조절 T 세포, 천연 킬러 T 세포, 및 감마 델타 T 세포상에서 변형될 수 있다.

[0084] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "치료학적"이란 용어는 치료 및/또는 예방을 의미한다. 치료 효과는 질병 상태의 억제, 경감, 또는 근절에 의해 획득된다.

[0085] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "형질감염된 (transfected)" 또는 "형질전환된 (transformed)" 또는 "형질도입된 (transformed)"이란 용어는 외인성 핵산이 숙주 세포로 전달되거나 도입되는 과정을 지칭한다. "형질감염된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된" 세포는 외인성 핵산으로 형질감염되거나, 형질전환되거나 또는 형질도입된 것이다. 상기 세포는 1차 대상체 세포 및 그의 자손을 포함한다.

[0086] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "전사 조절하에서" 또는 "작동적으로 연결된"이란 어구는 프로모터가 폴리뉴클레오티드와 관련하여 정확한 위치 및 배향으로 RNA 폴리머라제에 의한 전사의 개시 및 상기 폴리뉴클레오티드의 발현을 조절함을 의미한다.

[0087] "벡터"는, 단리된 핵산을 포함하고 상기 단리된 핵산을 세포의 내부로 전달하는데 사용될 수 있는 물질의 조성물이다. 다수의 벡터들, 예를 들어 비제한적으로 선형 폴리뉴클레오티드, 이온성 또는 양친성 화합물과 결합된 폴리뉴클레오티드, 플라스미드 및 바이러스가 당해 분야에 공지되어 있다. 따라서, "벡터"란 용어는 자율적으로 복제하는 플라스미드 또는 바이러스를 포함한다. 상기 용어는 또한 핵산의 세포내로의 전달을 촉진하는 비-플라스미드 및 비-바이러스 화합물, 예를 들어 폴리리신 화합물, 리포솜 등을 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 바이러스 벡터의 예는 비제한적으로 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 등을 포함한다.

[0088] 범위: 본 명세서 전체를 통해, 본 발명의 다양한 양태들을 범위 포맷으로 제공할 수 있다. 범위 포맷의 기재는 단지 편의성 및 간략성을 위한 것이며 본 발명의 범위에 대한 완고한 제한으로서 해석해서는 안 됨은 물론이다. 상응하게, 범위에 대한 기재는 모든 가능한 하위범위뿐만 아니라 상기 범위내의 개별적인 수치들을 구체적으로 개시하는 것으로 간주해야 한다. 예를 들어, 1 내지 6과 같은 범위의 기재는 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6 등과 같은 구체적으로 개시된 하위범위뿐만 아니라 상기 범위내의 개별적인 숫자, 예를 들어 1, 2, 2.7, 3, 4, 5, 5.3, 및 6을 갖는 것으로 간주되어야 한다. 이를 상기 범위의 폭과 관계없이 적용한다.

[0089] 설명

[0090] 본 발명은 전기천공된 T 세포군을 증대시키는 방법을 포함한다. 상기 방법은 키메라 막 단백질을 코딩하는 mRNA와 함께 T 세포를 포함하는 세포군 예컨대, 말초 혈액 단핵구를 전기천공하는 것을 포함하며, 여기서 상기 mRNA는 상기 세포군의 세포 중 적어도 하나의 세포에 도입되고 상기 세포의 표면상에 발현된다. 일 실시형태에서, 상기 키메라 막 단백질은 분자, 예컨대 TCR/CD3에 결합하는 항원 결합 도메인, 및 공자극 분자의 세포내 도메인을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 상기 전기천공된 세포군이 배양되고, 여기서 이에 함유된 T 세포는 적어도 10배 증대된다. 따라서, 본 발명은 세포군으로부터 T 세포의 증대 및 치료적 적용, 예컨대 입양 세포 전달을 위한 세포군의 제조를 허용한다.

[0091] 방법

[0092] 일 양태에서, 본 발명은 T 세포군을 증대시키는 방법을 포함하며, 여기서 상기 방법은 키메라 막 단백질을 코딩하는 mRNA와 함께 T 세포를 포함하는 세포군, 예컨대, 말초 혈액 단핵구를 전기천공하는 단계를 포함한다. 상기 키메라 막 단백질은 분자, 예컨대 TCR/CD3에 대한 항체 또는 이의 단편을 포함하는 항원 결합 도메인, 및

CD28 및 4-1BB의 세포내 도메인의 단편을 포함하는 세포내 도메인을 포함한다. 상기 mRNA는 상기 세포군의 세포 중 적어도 하나의 세포에 도입되고 상기 세포의 표면상에 발현되며, 상기 전기천공된 세포군은 배양되고, 여기서 이에 함유된 T 세포는 적어도 10배 증대된다.

[0093] 또 다른 양태에서, 본 발명은 전기천공된 T 세포군을 증대시키는 방법을 포함하며, 여기서 상기 방법은 키메라 막 단백질을 코딩하는 mRNA와 함께 T 세포를 포함하는 세포군을 전기천공하는 단계를 포함한다. 상기 키메라 막 단백질은 CD3에 대해 지시된 단일쇄 가변 단편 (scFv) 및 CD28 및 4-1BB의 세포내 도메인의 단편을 포함하는 세포내 도메인을 포함한다. 상기 mRNA는 상기 세포군의 세포 중 적어도 하나의 세포에 도입되고 상기 세포의 표면상에 발현된다. 상기 전기천공된 세포군은 배양되고, 여기서 이에 함유된 T 세포는 적어도 10배 증대된다.

[0094] 일 실시형태에서, 상기 세포는 말초 혈액 단핵구, 제대혈 세포, 정대된 T 세포군 및 T 세포주로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.

[0095] 또 다른 실시형태에서, 본원에 기재된 방법은 작용제를 코딩하는 mRNA를 상기 증대된 T 세포군 내로 전기천공하는 단계, 예컨대, 상기 작용제를 코딩하는 핵산을 상기 키메라 막 단백질을 코딩하는 핵산과 함께 동시-전기천공하는 단계를 추가로 포함한다.

[0096] 또 다른 실시형태에서, 본원이 기재된 방법은 상기 증대된 T 세포군을 CD27, CD28, CD83, CD86, CD127, 4-1BBL, IL21, IL15, IL-7, PD1-CD28 및 PD1으로 이루어진 그룹 중에서 선택된 적어도 하나의 분자 또는 시토카인으로 자극하는 단계를 추가로 포함한다.

[0097] 또 다른 실시형태에서, 본원에 기재된 방법은 상기 배양된 T 세포를 냉동보존하는 단계를 추가로 포함한다.

[0098] 핵산의 도입

[0099] 핵산을 세포내에 도입시키는 방법은 물리적, 생물학적 및 화학적 방법을 포함한다. 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 RNA를 숙주 세포내에 도입시키는 물리적 방법은 칼슘 포스페이트 침전, 리포펙션, 유전자총, 미세주입, 전기천공 등을 포함한다. RNA를 전기천공(아막사 뉴클레오펙터(Amaxa Nucleofector)-II(아막사 바이오시스템스(Amaxa Biosystems), 독일 쾰른 소재)), (ECM 830 (BTX) (하바드 인스트루먼츠(Harvard Instruments) 미국 매사추세츠주 보스톤 소재) 또는 진 펄서(Gene Pulser) II(바이오래드(BioRad), 미국 콜로라도주 덴버 소재), 멀티포레이터(Multiporator)(에펜도르프(Eppendort), 독일 함부르크 소재)을 포함하는 상업적으로 입수할 수 있는 방법들을 사용하여 표적 세포내에 도입시킬 수 있다. RNA를 또한 리포펙션을 사용하는 양이온성 리포솜 매개된 형질감염을 사용하거나, 중합체 캡슐화를 사용하거나, 펩티드 매개된 형질감염을 사용하거나, 또는 유전자총법 입자 전달 시스템, 예를 들어 "유전자 총"을 사용하여 세포에 도입시킬 수 있다 (예를 들어, 문헌[Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12(8):861-70 (2001)]을 참조하시오).

[0100] 관심 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포내에 도입시키기 위한 생물학적 방법은 DNA 및 RNA 벡터의 사용을 포함한다. 바이러스 벡터, 및 특히 레트로바이러스 벡터가 유전자를 포유동물, 예를 들어 인간 세포에 삽입하기 위해 가장 널리 사용되는 방법이 되고 있다. 다른 바이러스 벡터는 렌티바이러스, 폭스바이러스, 헤르페스 단순 바이러스 I, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스 등으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어 미국특허 제 5,350,674 호 및 미국특허 제 5,585,362 호를 참조한다.

[0101] 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포내에 도입시키기 위한 화학적 수단은 콜로이드성 분산 시스템, 예를 들어 거대분자 복합체, 나노캡슐, 미소구, 비드, 및 수중 유적형 유화액, 미셀, 혼합 미셀 및 리포솜을 포함한 지질-기반 시스템을 포함한다. 시험관내 및 생체내 전달 비히클로서 사용하기 위한 예시적인 콜로이드성 시스템은 리포솜 (예: 인공 멤브레인 소낭)이다.

[0102] 사용에 적합한 지질을 상업적인 출처로부터 수득할 수 있다. 예를 들어, 디미리스틸 포스파티딜콜린("DMPC")을 시그마(Sigma)(미국 미주리주 세인트 루이스 소재)로부터 수득할 수 있고; 디세틸 포스페이트("DCP")를 K&K 레보라토리즈(미국 뉴욕주 플레인뷰 소재)로부터 수득할 수 있고; 콜레스테롤("Choi")을 칼바이오켐-베링(Calbiochem-Behring)으로부터 수득할 수 있고; 디미리스틸 포스파티딜글리세롤("DMPG") 및 다른 지질들을 아반티 폴라 리피즈 인코포레이티드(Avanti Polar Lipids, Inc.)(미국 알라바마주 버밍햄 소재)로부터 수득할 수 있다. 클로로포름 또는 클로로포름/메탄올 중의 지질의 모액을 약 -20 ℃에서 보관할 수 있다. 클로로포름은 메탄올보다 더 쉽게 증발되기 때문에 유일한 용매로서 사용된다. "리포솜"은 둘러싸고 있는 지질 2층 또는 응집체의 생성에 의해 형성된 다양한 단층 및 다층 지질 비히클을 포함하는 일반적인 용어이다. 리포솜은 인지질 2층 막 및 내부 수성 매질을 갖는 소낭 구조를 가짐을 특징으로 할 수 있다. 다층 리포솜은 수성 매질에 의해 분리된 다수의 지질층을 갖는다. 상기는 인지질이 과잉의 수용액 중에 현탁될 때 자발적으로 형성된다. 상기

지질 성분은 폐쇄된 구조의 형성 전에 자기-재배열을 겪고 상기 지질 2층 사이에 물 및 용해된 용질을 포집한다(Ghosh et al, 1991 Glycobiology 5:505-10). 그러나, 통상적인 소낭 구조보다 용액 중에 상이한 구조를 갖는 조성이 또한 포함된다. 예를 들어, 상기 지질은 미셀 구조를 띠거나 또는 단지 지질 분자의 불균일 응집체로서 존재한다. 또한 리포펙타민-핵산 복합체가 고려된다.

[0103] 외인성 핵산의 숙주 세포내로의 도입 또는 달리 본 발명의 억제제에의 세포의 노출에 사용되는 방법과 관계 없이, 상기 숙주 세포 중의 핵산의 존재를 확인하기 위해서, 다양한 검정들을 수행할 수 있다. 상기와 같은 검정은 예를 들어 당해 분야의 숙련가들에게 주지된 "분자 생물학적" 검정, 예를 들어 서던 및 노던 블럿팅, RT-PCR 및 PCR; "생화학적" 검정, 예를 들어 면역학적 수단(ELISA 및 웨스턴 블럿)에 의한 또는 본 발명의 범위내에 속하는 작용제들을 확인하기 위해 본 명세서에 기재된 검정들에 의한 특정 펩티드의 존재 또는 부재의 검출을 포함한다.

[0104] RNA

[0105] 일 실시형태에서, RNA는 표적 세포내로 도입된다. 또 다른 실시형태에서, 상기 RNA는 시험관내 전사된 RNA 또는 합성 RNA를 포함하는 mRNA이다. 상기 RNA를, 폴리머라제 쇄 반응(PCR)-생성된 주형을 사용하여 시험관내 전사에 의해 생성시킨다. 임의의 공급원으로부터의 관심 DNA를 적합한 프라이머 및 RNA 폴리머라제를 사용하여 PCR에 의해 시험관내 mRNA 합성을 위한 주형으로 직접 전환시킬 수 있다. 상기 DNA의 공급원은 예를 들어 게놈 DNA, 플라스미드 DNA, 파지 DNA, cDNA, 합성 DNA 서열 또는 DNA의 임의의 다른 적합한 공급원일 수 있다. 시험관내 전사에 바람직한 주형은 키메라 막 단백질이다. 예로서, 상기 주형은 항체, 항체의 단편 또는 항체의 일부를 코딩한다. 또 다른 예로서, 상기 주형은 항체의 단일쇄 가변 도메인, 예를 들어 항-CD3을 포함하는 세포외 도메인, 및 공자극 분자의 세포내 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 상기 RNA 키메라 막 단백질에 대한 주형은 분자에 대한 항체 또는 단편을 포함하는 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인, 및 CD28 및 4-1BB의 세포내 도메인의 단편을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 키메라 막 단백질을 코딩한다.

[0106] PCR을 사용하여 mRNA의 시험관내 전사를 위한 주형을 생성시키고, 이어서 상기를 세포내에 도입시킨다. PCR을 수행하는 방법은 당해 분야에 주지되어 있다. PCR에 사용하기 위한 프라이머를, 상기 PCR을 위한 주형으로서 사용되는 상기 DNA의 영역들에 실질적으로 상보성인 영역들을 갖도록 설계한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "실질적으로 상보성"은 상기 프라이머 서열 중 염기의 대부분 또는 전부가 상보성이거나, 또는 하나 이상의 염기가 비-상보성이거나, 또는 오합치되는 경우의 뉴클레오티드의 서열을 지칭한다. 실질적으로 상보성인 서열은 PCR에 사용되는 어닐링 조건하에서 의도된 DNA 표적과 어닐링하거나 하이브리드화할 수 있다. 상기 프라이머를, 상기 DNA 주형의 임의의 부분에 실질적으로 상보성이도록 설계할 수 있다. 예를 들어, 상기 프라이머를 5' 및 3' UTR을 포함하여, 세포에서 통상적으로 전사되는 유전자 부분(개방 판독 프레임)을 증폭시키도록 설계할 수 있다. 상기 프라이머를 또한 특정한 관심 도메인을 코딩하는 유전자의 일부를 증폭시키도록 설계할 수 있다. 일 실시형태에서, 상기 프라이머는 5' 및 3' UTR의 전부 또는 일부를 포함하여, 인간 cDNA의 코딩 영역을 증폭시키도록 설계된다. PCR에 유용한 프라이머는 당해 분야에 주지된 합성 방법에 의해 생성된다. "순방향 프라이머"는 증폭시키고자 하는 DNA 서열의 상류인 상기 DNA 주형상의 뉴클레오티드에 실질적으로 상보성인 뉴클레오티드의 영역을 함유하는 프라이머이다. "상류"는 본 명세서에서 코딩 가닥에 비해 증폭되는 DNA 서열에 대한 5 위치를 지칭하는데 사용된다. "역방향 프라이머"는 증폭시키고자 하는 DNA 서열의 하류인 이중-가닥 DNA 주형에 실질적으로 상보성인 뉴클레오티드의 영역을 함유하는 프라이머이다. "하류"는 본 명세서에서 코딩 가닥에 비해 증폭되는 DNA 서열에 대한 3' 위치를 지칭하는데 사용된다.

[0107] 상기 RNA의 안정성 및/또는 번역 효율을 증진시키는 능력을 갖는 화학적 구조들을 또한 사용할 수 있다. 상기 RNA는 바람직하게는 5' 및 3' UTR을 갖는다. 일 실시형태에서, 상기 5' UTR은 길이가 0 내지 3000 뉴클레오티드이다. 상기 코딩 영역에 부가되는 5' 및 3' UTR 서열의 길이를 상이한 방법들, 예를 들어 비제한적으로 상기 UTR의 상이한 영역들에 어닐링하는 PCR용 프라이머의 설계에 의해 변경시킬 수 있다. 상기 접근법을 사용하여, 당해 분야의 통상적인 숙련가는 상기 전사된 RNA의 형질감염에 따른 최적의 번역 효율을 성취하는데 필요한 5' 및 3' UTR 길이를 변형시킬 수 있다.

[0108] 상기 5' 및 3' UTR은 관심 유전자에 대한 천연의 내인성 5' 및 3' UTR일 수 있다. 한편으로, 상기 관심 유전자에 내인성이 아닌 UTR 서열을 상기 순방향 및 역방향 프라이머내에 통합시키거나 또는 상기 주형의 임의의 다른 변형에 의해 부가할 수 있다. 관심 유전자에 내인성이 아닌 UTR 서열의 사용이 상기 RNA의 안정성 및/또는 번역 효율을 변형시키기에 유용할 수 있다. 예를 들어, 3' UTR 서열 중의 AU-풍부 요소는 mRNA의 안정성을 감소시킬 수 있는 것으로 공지되어 있다. 따라서, 3' UTR을 당해 분야에 주지된 UTR의 성질에 기반하여 전사된 RNA

의 안정성을 증가시키도록 선택하거나 설계할 수 있다.

[0109] 일 실시형태에서, 상기 5' UTR은 상기 내인성 유전자의 코작 서열을 함유할 수 있다. 한편으로, 관심 유전자에 내인성이 아닌 5' UTR을 상술한 바와 같이 PCR에 의해 부가하는 경우, 컨센서스 코작 서열을 상기 5' UTR 서열의 부가에 의해 재설계할 수 있다. 코작 서열은 일부 RNA 전사물의 번역 효율을 증가시킬 수 있지만, 효율적인 번역을 가능하게 하기 위해 모든 RNA가 필요한 것 같지는 않다. 다수 mRNA에 대한 코작 서열의 요구는 당해 분야에 공지되어 있다. 다른 실시형태에서 상기 5' UTR은 세포에서 안정한 RNA 게놈을 갖는 RNA 바이러스로부터 유래될 수 있다. 다른 실시형태에서 다양한 뉴클레오티드 유사체들을 상기 mRNA의 엑소뉴클레아제 분해를 방해하기 위해서 상기 3' 또는 5' UTR에 사용할 수 있다.

[0110] 유전자 클로닝의 필요 없이 DNA 주형으로부터 RNA의 합성을 가능하게 하기 위해서, 전사 프로모터를 전사시킬 서열의 DNA 주형 상류에 부착시켜야 한다. RNA 폴리머라제에 대한 프로모터로서 기능하는 서열을 순방향 프라이머의 5' 단부에 부가하는 경우, 상기 RNA 폴리머라제 프로모터는 전사시키고자 하는 개방 판독 프레임의 PCR 산물 상류에 통합되게 된다. 일 실시형태에서, 상기 프로모터는 본 명세서의 달리 어딘가에 기재된 바와 같은 T7 폴리머라제 프로모터이다. 다른 유용한 프로모터는 비제한적으로 T3 및 SP6 RNA 폴리머라제 프로모터를 포함한다. T7, T3 및 SP6 프로모터에 대한 컨센서스 뉴클레오티드 서열들이 당해 분야에 공지되어 있다.

[0111] 일 실시형태에서, 상기 mRNA는 리보솜 결합, 번역의 개시 및 세포에서 mRNA 안정성을 결정하는 5' 단부 및 3' 폴리(A) 꼬리상의 캡을 모두 갖는다. 환상 DNA 주형, 예를 들어 플라스미드 DNA상에서, RNA 폴리머라제는 진핵생물 세포에서의 발현에 적합하지 않은 긴 연쇄체성 생성물을 생성시킨다. 상기 3' UTR의 단부에서 선형화된 플라스미드 DNA의 전사는 통상적인 크기의 mRNA를 생성시키며, 이는 전사후 폴리아데닐화된다 하더라도 진핵생물 형질감염에 유효하지 않다.

[0112] 선형 DNA 주형상에서, 파지 T7 RNA 폴리머라제는 전사물의 3' 단부를 상기 주형의 마지막 염기 이상으로 연장시킬 수 있다(Schenborn and Mierendorf, Nuc Acids Res., 13:6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, Eur. J. Biochem., 270:1485-65 (2003).

[0113] DNA 주형내로 폴리A/T 신장부의 통상적인 통합 방법은 분자 클로닝이다. 그러나, 플라스미드 DNA에 통합된 폴리A/T 서열은 플라스미드 불안정성을 야기할 수 있으며, 이는 세균 세포로부터 획득된 플라스미드 DNA 주형이 종종 결실 및 다른 이상으로 매우 오염되는 이유이다. 이는 클로닝 과정을 힘들고 시간 소모적이게 할 뿐만 아니라 종종 신뢰할 수 없게 한다. 이것이 클로닝 없이 폴리A/T 3' 신장부를 갖는 DNA 주형의 구성을 허용하는 방법이 매우 바람직한 이유이다.

[0114] 상기 전사 DNA 주형의 폴리A/T 분절을, 폴리T 꼬리, 예를 들어 100T 꼬리(크기는 50-5000 T일 수 있다)를 함유하는 역 프라이머를 사용함으로써 PCR 도중에, 또는 임의의 다른 방법, 예를 들어 비제한적으로 DNA 결찰 또는 시험관내 재조합에 의해 PCR 후에 생성시킬 수 있다. 폴리(A) 꼬리는 또한 RNA에 안정성을 제공하며 그의 분해를 감소시킨다. 일반적으로, 폴리(A) 꼬리의 길이는 전사된 RNA의 안정성과 양의 상관성을 갖는다. 일 실시형태에서, 상기 폴리(A) 꼬리는 100 내지 5000 아데노신이다.

[0115] RNA의 폴리(A) 꼬리를 폴리(A) 폴리머라제, 예를 들어 이 콜라이 폴리A 폴리머라제(E-PAP)의 사용으로 시험관내 전사에 따라 추가로 연장시킬 수 있다. 일 실시형태에서, 폴리(A) 꼬리의 길이를 100 뉴클레오티드에서 300 내지 400 뉴클레오티드로 증가시키는 것은 상기 RNA의 번역 효율을 약 2배 증가시킨다. 추가로, 상기 3' 단부에 대한 상이한 화학 그룹들의 부착은 mRNA 안정성을 증가시킬 수 있다. 상기와 같은 부착은 변형된/인공 뉴클레오티드, 앱타머 및 다른 화합물을 함유할 수 있다. 예를 들어, ATP 유사체를 폴리(A) 폴리머라제를 사용하여 상기 폴리(A) 꼬리에 통합시킬 수 있다. APT 유사체가 상기 RNA의 안정성을 추가로 증가시킬 수 있다.

[0116] 5' 캡은 또한 RNA 분자에 안정성을 제공한다. 바람직한 실시형태에서, 본 명세서 개시된 방법에 의해 생성된 RNA는 5' 캡을 포함한다. 상기 5' 캡은 당해 분야에 공지되고 본 명세서에 기재된 기법들을 사용하여 제공된다(Cougot, et al., Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., RNA, 7:1468-95 (2001); Elango, et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005)).

[0117] 본 명세서에 개시된 방법에 의해 생성된 RNA는 또한 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 서열을 함유할 수 있다. 상기 IRES 서열은 mRNA에 대한 캡-독립적인 리보솜 결합을 개시시키고 번역의 개시를 촉진하는 임의의 바이러스, 염색체 또는 인공 설계된 서열일 수 있다. 세포 전기천공에 적합한 임의의 용질(세포 투과성 및 생육성을 촉진하는 인자들을 함유할 수 있다), 예를 들어 당, 펩티드, 지질, 단백질, 산화방지제, 및 계면활성제를 포함시킬 수 있다.

[0118] 일부 실시형태에서, 키메라 막 단백질을 코딩하는 상기 mRNA는 상기 세포 내로 전기천공된다. 일 실시형태에서, 키메라 막 단백질을 코딩하는 mRNA는 시험관내 전사된 mRNA이다.

[0119] 상기 개시된 방법들을 표적 암세포를 살해하는 유전자 변형된 T 세포의 능력의 평가를 포함하여, 기본적인 연구 및 치료법, 암, 줄기세포, 급성 및 만성 감염, 및 자가면역 질병의 분야에서 T 세포 활성의 조절에 적용할 수 있다.

[0120] 상기 방법들은 또한 예를 들어 프로모터 또는 투입 RNA의 양을 변화시켜 발현 수준을 개별적으로 조절할 수 있게 함으로써 상기 발현 수준을 광범위하게 조절하는 능력을 제공한다. 더욱 또한, PCR-기반 mRNA 생성 기법은 상이한 구조 및 도메인들의 조합을 갖는 키메라 수용체 mRNA의 설계를 매우 용이하게 한다. 예를 들어, 동일한 세포 중의 다수 키메라 수용체상의 상이한 세포내 효과기/보조자극제 도메인의 다양성은, 다중-항원 표적에 대한 세포독성의 최고 수준, 및 동시에 정상 세포에 대한 최저 세포독성을 평가하는 수용체 조합들의 구조를 결정할 수 있게 한다.

[0121] 본 발명의 RNA 전사 방법의 한 가지 장점은 RNA 형질감염이 필수적으로 일시적이고 무-벡터라는 것이다. RNA 트랜스유전자는 림프구로 전달되어 거기에서 임의의 추가적인 바이러스 서열의 필요 없이 최소 발현 카세트로서 간단한 시험관내 세포 활성화에 따라 발현될 수 있다. 이러한 조건하에서, 상기 트랜스유전자의 숙주세포 게놈 내로의 통합은 일어나지 않을 듯하다. 세포의 클로닝은, 상기 RNA의 형질감염 효율 및 전체 림프구 집단을 균질하게 변형시키는 그의 능력으로 인해 필요하지 않다.

[0122] 시험관내-전사된 RNA(IVT-RNA)에 의한 T 세포의 유전자 변형은 2가지 상이한 전략을 사용할 수 있게 하는데, 이들 전략은 모두 다양한 동물 모델에서 성공적으로 시험되었다. 세포를 리포펙션 또는 전기천공에 의해 시험관내-전사된 RNA로 형질감염시킨다. 전달된 IVT-RNA의 연장된 발현을 성취하기 위해서 IVT-RNA를 다양한 변형을 사용하여 안정화시키는 것이 바람직할 수 있다.

[0123] 시험관내 전사를 위한 주형으로서 표준화된 방식으로 사용되고 안정화된 RNA 전사물을 생성시키는 방식으로 유전자 변형된 일부 IVT 벡터들이 문헌에 공지되어 있다. 당해 분야에 사용되는 현행 프로토콜들은 하기의 구조를 갖는 플라스미드 벡터를 기본으로 한다: RNA 전사를 가능하게 하는 5' RNA 폴리머라제 프로모터에 이어서, 번역되지 않은 영역(UTR)이 3' 및/또는 5'에 인접한 관심 유전자, 및 50-70 A 뉴클레오티드를 함유하는 3' 폴리아데닐 카세트. 시험관내 전사에 앞서, 상기 환상 플라스미드는 II형 제한 효소(인식 서열은 절단 부위에 상응한다)에 의해 상기 폴리아데닐 카세트의 하류에서 선형화된다. 따라서 상기 폴리아데닐 카세트는 상기 전사물 중의 나중의 폴리(A) 서열에 상응한다. 상기 과정의 결과로서, 일부 뉴클레오티드는 선형화 후 상기 효소 절단 부위의 부분으로서 남아있고 상기 3' 단부에서 폴리(A) 서열을 연장시키거나 가린다. 상기 비생리학적 오버행이 상기와 같은 구조물로부터 세포내적으로 생성되는 단백질의 양에 영향을 미치는지의 여부는 명확하지 않다.

[0124] RNA는 보다 전통적인 플라스미드 또는 바이러스 접근법보다 다수의 장점들을 갖는다. mRNA 공급원으로부터의 유전자 발현은 전사를 필요로하지 않으며 단백질 생성물이 형질감염 후 빠르게 생성된다. 더욱이, 상기 RNA는 핵보다는 단지 세포질에 대한 통로를 획득해야 하기 때문에, 전형적인 형질감염 방법들은 매우 높은 형질감염 속도를 생성시킨다. 또한, 플라스미드 기반 접근법은 관심 유전자의 발현을 구동하는 프로모터가 연구 중인 세포에서 활성일 것을 요한다.

[0125] 또 다른 양태에서, 상기 RNA 구조물을 전기천공에 의해 세포내로 전달될 수 있다. 예를 들어 US 2004/0014645, US 2005/0052630A1, US 2005/0070841A1, US 2004/0059285A1, US 2004/0092907A1에 교시된 바와 같이 포유동물 세포내로의 핵산 구조물의 전기천공 제형 및 방법을 참조한다. 임의의 공지된 세포 유형의 전기천공에 필요한 전장 강도를 포함한 다양한 매개변수들이 관련 연구 문헌뿐만 아니라 당해 분야의 다수의 특허 및 출원들에 일반적으로 공지되어 있다. 예를 들어 미국특허 제 6,678,556 호, 미국특허 제 7,171,264 호, 및 미국특허 제 7,173,116 호를 참조한다. 전기천공의 치료학적 적용을 위한 기구들은 상업적으로 입수할 수 있으며 (예를 들어 MedPulser™ DNA 전기천공 쎄라피 시스템(Electroporation Therapy System)(이노비오/제네트로닉스(Inovio/Genetronics), 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재), 미국특허 제 6,567,694 호; 미국특허 제 6,516,223 호, 미국특허 제 5,993,434 호, 미국특허 제 6,181,964 호, 미국특허 제 6,241,701 호, 및 미국특허 제 6,233,482 호와 같은 특허들에 기재되어 있고; 전기천공을 또한 US20070128708A1에 기재된 바와 같이 시험관내에서 세포의 형질감염에 사용할 수 있다. 전기천공을 또한 시험관내에서 세포내에 핵산을 전달하는데 사용할 수 있다. 상응하게, 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 다수의 이용 가능한 장치 및 전기천공 시스템 중 어느 하나를 사용하는, 발현 구조물을 포함하는 핵산의 세포내로의 전기천공-매개된 투여는 관심 RNA의 표적 세포로

의 전달에 흥분되는 새로운 수단을 제공한다.

[0126] T 세포의 공급원

[0127] 증대에 앞서, T 세포의 공급원을 대상체로부터 획득한다. 대상체의 비제한적인 예는 인간, 개, 고양이, 마우스, 래트, 및 그들의 트랜스제닉 종을 포함한다. 바람직하게, 상기 대상체는 인간이다. T 세포를 다수의 공급원, 예를 들어 말초 혈액 단핵구, 골수, 림프절 조직, 비장 조직, 탯줄, 및 종양으로부터 수득할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 당해 분야에서 입수할 수 있는 임의의 수의 T 세포를 사용할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, T 세포를 숙련가에게 공지된 임의의 수의 기법, 예를 들어 피콜 분리를 사용하여 대상체로부터 수집된 혈액의 단위로부터 수득할 수 있다. 일 실시형태에서, 개인의 순환 혈액으로부터의 세포를 성분채집술 또는 백혈구성분채집술에 의해 수득한다. 상기 성분채집술 생성물은 전형적으로 T 세포를 포함한 림프구, 단핵세포, 과립구, B 세포, 다른 유핵 백혈구, 적혈구, 및 혈소판을 함유한다. 상기 성분채집술에 의해 수집된 세포를 후속 가공 단계를 위해서, 세척하여 혈장 분획을 제거하고 상기 세포를 적합한 완충제 또는 매질, 예를 들어 포스페이트 완충 염수(PBS), 또는 칼슘이 없고 마그네슘이 없거나 다수(전부는 아니더라도)의 2가 양이온이 없을 수도 있는 세척액 중에 넣을 수 있다. 세척 후에, 상기 세포를 다양한 생체적합성 완충제, 예를 들어 무-Ca, 무-Mg PBS 중에 재현탁시킬 수 있다. 한편으로, 상기 성분채집 샘플의 바람직하지 못한 성분들을 제거하고 상기 세포를 직접 배양 배지에 재현탁시킬 수 있다.

[0128] 또 다른 실시형태에서, T 세포를, 적혈구를 용해시키고 단핵세포를 고갈시킴으로써, 예를 들어 PERCOLL™ 구배를 통한 원심분리에 의해 말초 혈액으로부터 단리시킨다. 한편으로, T 세포를 탯줄로부터 단리할 수 있다. 어쨌든, T 세포의 특정한 하위집단을 양성 또는 음성 선택 기법에 의해 추가로 단리할 수 있다.

[0129] 그렇게 단리된 제대혈 단핵세포에서 몇몇 항원, 예를 들어 비제한적으로 CD34, CD8, CD14, CD19 및 CD56을 발현하는 세포를 고갈시킬 수 있다. 상기 세포의 고갈은 단리된 항체, 항체를 포함하는 생물학적 샘플, 예를 들어 복수, 물리적 지지체에 결합된 항체, 및 세포 결합된 항체를 사용하여 수행될 수 있다.

[0130] 음성 선택에 의한 T 세포군의 농축을 상기 음성적으로 선택된 세포 특유의 표면 마커에 대한 항체들의 조합을 사용하여 수행할 수 있다. 바람직한 방법은 상기 음성적으로 선택된 세포상에 존재하는 세포 표면 마커에 대한 단클론 항체들의 칵테일을 사용하는 유식 세포측정 또는 음성 자기 면역부착을 통한 세포 분류 및/또는 선택이다. 예를 들어, 음성 선택에 의해 CD4+ 세포를 농축시키기 위해서, 단클론 항체 칵테일은 전형적으로 CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR 및 CD8에 대한 항체를 포함한다.

[0131] 양성 또는 음성 선택에 의한 목적하는 세포군의 단리를 위해서, 세포 및 표면 (예: 비드와 같은 입자)의 농도를 변화시킬 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 비드 및 세포를 함께 혼합시키는 부피를 현저하게 감소시켜(즉 세포의 농도를 증가시켜) 세포 및 비드의 최대 접촉을 보장하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 일 실시형태에서 20억 세포/㎖의 농도가 사용된다. 일 실시형태에서 10억 세포/㎖의 농도가 사용된다. 추가의 실시형태에서, $100x10^6$ 세포/㎖ 초과가 사용된다. 추가의 실시형태에서, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 $50x10^6$ 세포/㎖의 세포 농도가 사용된다. 더욱 또 다른 실시형태에서, 75, 80, 85, 90, 95 또는 $100x10^6$ 세포/㎖의 농도가 사용된다. 추가의 실시형태에서, 125 또는 $150x10^6$ 세포/㎖의 농도가 사용될 수 있다. 고농도의 사용은 세포 수율, 세포 활성화 및 세포 증대를 증가시킬 수 있다.

[0132] T 세포를 또한 상기 세척 단계 후에 동결시킬 수 있으며, 이는 단핵세포-제거 단계를 필요로 하지 않는다. 이론에 얽매이고자 하는 것은 아니지만, 상기 동결 및 후속의 해동 단계는 과립구 및 어느 정도는 단핵구를 상기 세포군에서 제거함으로써 보다 균질한 생성물을 제공한다. 혈장 및 혈소판을 제거하는 상기 세척 단계 후에, 상기 세포를 동결 용액 중에 현탁시킬 수 있다. 다수의 동결 용액 및 매개변수들이 당해 분야에 공지되어 있으며 상기 상황에 유용할 것이지만, 비-제한적인 예에서 하나의 방법은 20% DMSO 및 8% 인간 혈청 알부민을 함유하는 PBS, 또는 다른 적합한 세포 동결 매질을 수반한다. 이어서 상기 세포를 -80 ℃까지 분당 1° 의 속도로 동결시키고 액체 질소 저장 탱크의 증기상 중에 보관한다. 다른 조절된 동결 방법뿐만 아니라 -20 ℃ 또는 액체 질소 중에서 즉각적인 조절되지 않은 동결을 사용할 수도 있다.

[0133] 일 실시형태에서, 상기 세포군은 말초 혈액 단핵구, 제대혈 세포, 정제된 T 세포군, 및 T 세포주를 포함할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 상기 전기천공되는 세포군은 말초 혈액 단핵구를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 상기 전기천공되는 세포군은 정제된 T 세포를 포함한다.

[0134] 키메라 막 단백질

[0135] 본 발명의 키메라 막 단백질은 세포외 및 세포내 도메인을 포함한다. 상기 세포외 도메인은 표적-특이적 결합 요소, 예컨대, 항체를 포함한다. 일 실시형태에서, 상기 키메라 막 단백질의 세포외 도메인은 TCR, CD3 및 CD28 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 T 세포상의 분자를 표적화한다.

[0136] 세포외 도메인

[0137] 본 발명은 T 세포상의 분자에 대한 항체 또는 그의 단편을 포함하는 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인을 포함한다. 상기 분자는 T 세포를 공자극하는 임의의 분자, 예를 들어 비제한적으로 TCR, CD3, CD28 또는 그의 조합을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 상기 세포외 도메인은 항-CD3 항체의 CD3 결합 도메인, 항-TCR 항체, 항-CD28 항체, 또는 이의 조합을 포함할 수 있다.

[0138] 또 다른 실시형태에서, 상기 세포외 도메인은 비제한적으로 합성 항체, 인간 항체, 인간화된 항체, 단일 도메인 항체, 단일쇄 가변 단편, 및 이들의 단편의 항원 결합 도메인을 포함하는 항원에 결합하는 항체의 임의의 단편을 포함할 수 있다. 일부의 예에서, 상기 세포외 도메인은 상기 키메라 막 단백질이 최종적으로 사용되는 동일한 종으로부터 유래되는 것이 이롭다. 예를 들어 인간에서의 사용을 위해, 상기 키메라 막 단백질의 세포외 도메인은 인간 항체 또는 그의 단편을 포함하는 것이 이로울 수 있다. 따라서, 일 실시형태에서, 상기 세포외 도메인은 인간 항체 또는 그의 단편을 포함한다.

[0139] 일 실시형태에서, 상기 항체는 합성 항체, 인간 항체, 인간화된 항체, 단일 도메인 항체, 단일쇄 가변 단편, 및 이들의 항원-결합 단편이다.

[0140] 세포내 도메인

[0141] 상기 세포내 도메인 또는 세포질 도메인은 보조자극 신호전달 영역을 포함한다. 상기 보조자극 신호전달 영역은 보조자극 분자의 세포내 도메인을 지칭한다. 보조자극 분자는 항원에 대한 림프구의 효율적인 반응에 필요한 항원 수용체 또는 그의 리간드 외의 세포 표면 분자이다.

[0142] 상기 키메라 막 단백질의 세포질 도메인 또는 세포내 신호전달 도메인은 상기 T 세포의 효과기 기능 중 적어도 하나의 활성화를 담당한다. "효과기 기능"이란 용어는 세포의 특수 기능을 지칭한다. T 세포의 효과기 기능은 예를 들어 시토카인의 분비를 포함한 세포용해 활성 또는 헬퍼 활성일 수 있다. 따라서 "세포내 신호전달 도메인"이란 용어는 상기 효과기 기능 신호를 전달하고 상기 세포를 특수 기능을 수행하도록 지시하는 단백질의 부분을 지칭한다. 대개는 전체 세포내 신호전달 도메인을 사용할 수 있지만, 다수의 경우 상기 전체 쇄를 사용할 필요는 없다. 상기 세포내 신호전달 도메인의 절두된 부분을 사용하는 한, 상기와 같은 절두된 부분은 상기가 효과기 기능 신호를 전달하는 한 완전한 쇄 대신에 사용될 수 있다. 따라서 세포내 신호전달 도메인이란 용어는 상기 효과기 기능 신호를 전달하기에 충분한 세포내 신호전달 도메인의 임의의 절두된 부분을 포함함을 의미한다.

[0143] 상기 키메라 막 단백질에 사용하기 위한 세포내 신호전달 도메인의 비제한적인 예는 CD28, 4-1BB, T 세포 수용체(TCR)의 세포내 도메인의 임의의 단편, 공자극 분자, 이들 서열의 임의의 유도체 또는 변이체, 동일한 기능상 능력을 갖는 임의의 합성 서열, 및 이들의 임의의 조합을 포함한다.

[0144] 키메라 막 단백질의 다른 도메인

[0145] 상기 키메라 막 단백질의 세포외 도메인과 막관통 도메인 사이, 또는 상기 키메라 막 단백질의 세포질 도메인과 막관통 도메인 사이에 스페이서 (spacer) 도메인이 통합될 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "스페이서 도메인"이란 용어는 일반적으로 폴리펩티드 쇄 중의 세포외 도메인 또는 세포질 도메인에 막관통 도메인을 연결시키는 기능을 하는 임의의 올리고- 또는 폴리펩티드를 의미한다. 스페이서 도메인은 300 아미노산 이하, 바람직하게는 10 내지 100 아미노산 및 가장 바람직하게는 25 내지 50 아미노산을 포함할 수 있다.

[0146] 일부 실시형태에서, 상기 키메라 막 단백질은 막관통 도메인을 또한 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 키메라 막 단백질은 힌지 도메인을 또한 포함한다. 일 실시형태에서, 상기 키메라 막 단백질을 코딩하는 mRNA는 막관통 및 힌지 도메인, 예를 들어 CD28 막관통 도메인 및 CD8-알파 힌지 도메인을 또한 포함한다.

[0147] 인간 항체

[0148] 인간에서 항체의 생체내 용도를 위해서, 인간 항체를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 완전 인간 항체는 인간 대상체의 치료학적 치료에 특히 바람직하다. 인간 항체를 인간 면역글로불린 서열로부터 유래된 항체 라이브러리를 사용하는 파지 디스플레이 방법을 포함하여 당해 분야에 공지된 다양한 방법들(이들 기법에 대한 개선 포

함)에 의해 제조할 수 있다. 또한, 미국특허 제 4,444,887 호 및 미국특허 제 4,716,111 호; 및 PCT 공보 WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, 및 WO 91/10741을 참조하시오; 이들은 각각 내용 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다. 인간 항체는 또한, 중쇄 및 경쇄가 인간 DNA의 하나 이상의 공급원으로부터 유래된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 항체일 수 있다.

[0149] 인간 항체를 또한, 기능성 내인성 면역글로불린을 발현할 수 없지만 인간 면역글로불린 유전자를 발현할 수 있는 트랜스제닉 마우스를 사용하여 생성시킬 수 있다. 예를 들어, 인간 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자 복합체를 마우스 배아 줄기 세포내에 무작위로 또는 상동성 재조합에 의해 도입시킬 수 있다. 한편으로, 상기 인간 가변 영역, 불변 영역 및 다양성 영역을 인간 중쇄 및 경쇄 유전자 외에 마우스 배아 줄기 세포내에 도입시킬 수 있다. 상기 마우스 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자는 상동성 재조합에 의해 인간 면역글로불린 유전자좌의 도입과 별도로 또는 상기 도입과 동시에 비-기능성으로 될 수 있다. 예를 들어, 키메라 및 생식세포 계열 돌연변이 마우스 중의 항체 중쇄 결합 영역(JH) 유전자의 동종접합 결실은 내인성 항체 생성의 완전한 억제를 발생시킴이 개시되었다. 상기 변형된 배아 줄기 세포를 증대시키고 배반포에 미세주입하여 키메라 마우스를 생성시킨다. 이어서 상기 키메라 마우스를 번식시켜 인간 항체를 발현하는 동종접합 새끼를 생성시킨다. 상기 트랜스제닉 마우스를 선택된 항원, 예를 들어 본 발명의 폴리펩티드의 전부 또는 일부로 통상적인 방식으로 면역시킨다. 선택 표적에 대한 항체를 통상적인 하이브리도마 기술을 사용하여 면역된, 트랜스제닉 마우스로부터 획득할 수 있다. 상기 트랜스제닉 마우스가 갖는 인간 면역글로불린 트랜스유전자는 B 세포 분화 중에 재배열하고, 후속으로 부류 변환 및 체세포 돌연변이를 겪는다. 따라서, 상기와 같은 기법을 사용하여, 치료학적으로 유용한 IgG, IgA, IgM 및 IgE 항체(비제한적으로 IgG1(감마1) 및 IgG3을 포함한다)를 생성시킬 수 있다. 인간 항체의 상기 생성 기법에 대한 개관에 대해서, 문헌[Lonberg and Huszar, Int. Rev. Immunol., 13:65-93 (1995)]을 참조한다. 인간 항체 및 인간 단클론 항체의 상기 생성 기법 및 상기와 같은 항체의 생성 프로토콜에 대한 상세한 논의에 대해서, 예를 들어 PCT 공보 WO 98/24893, WO 96/34096, 및 WO 96/33735; 및 미국특허 제 5,413,923 호; 미국특허 제 5,625,126 호; 미국특허 제 5,633,425 호; 미국특허 제 5,569,825 호; 미국특허 제 5,661,016 호; 미국특허 제 5,545,806 호; 미국특허 제 5,814,318 호; 및 미국특허 제 5,939,598 호(이들은 각각 내용 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다)를 참조한다. 또한, 아브제닉스 인코포레이티드(Abgenix, Inc.)(미국 캘리포니아주 프리몬트 소재) 및 젠팜(Genpharm)(미국 캘리포니아 산호세 소재)과 같은 회사들이 상술한 바와 유사한 기술을 사용하여 선택된 항원에 대한 인간 항체를 제공하는데 참여할 수 있다. 항원 공격시 인간 항체를 생성시키는 생식세포 계열 돌연변이 마우스에서 인간 생식세포 계열 면역글로불린 유전자 배열의 전달에 대한 구체적인 논의에 대해서, 예를 들어 하기 문헌들을 참조하시오: Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993); 및 Duchosal et al., Nature, 355:258 (1992).

[0150] 인간 항체는 또한 파지-디스플레이 라이브러리로부터 유래될 수 있다(Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Vaughan et al., Nature Biotech., 14:309 (1996)). 파지 디스플레이 기술(McCafferty et al., Nature, 348:552-553 (1990))을 사용하여 시험관내에서 면역되지 않은 공여체로부터의 면역글로불린 가변(V) 도메인 유전자 레퍼터리로부터 인간 항체 및 항체 단편을 생성시킬 수 있다. 상기 기법에 따라, 항체 V 도메인 유전자를 섬유성 박테리오파지, 예를 들어 M13 또는 fd의 주요 또는 소수 외피 단백질 유전자내로 인-프레임 클로닝시키며, 상기 유전자는 파지 입자의 표면상에 기능성 항체 단편으로서 나타난다. 상기 섬유성 입자는 상기 파지 게놈의 단일-가닥 DNA 사본을 함유하기 때문에, 상기 항체의 기능성 성질에 근거한 선택은 또한 상기 성질을 나타내는 항체를 코딩하는 유전자를 선택하게 한다. 따라서, 상기 파지는 상기 B 세포의 성질들 중 일부를 모방한다. 파지 디스플레이를 다양한 포맷으로 수행할 수 있다; 그의 재고찰을 위해서 예를 들어, 문헌[Johnson, Kevin S, and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993)]을 참조한다. V-유전자 분절의 다수의 공급원들을 파지 디스플레이에 사용할 수 있다. 클락슨(Clackson) 등(Nature, 352:624-628 (1991))은 면역되지 않은 마우스의 비장으로부터 유래된 V 유전자의 작은 랜덤 조합 라이브러리로부터 항-옥사졸론 항체의 다양한 배열을 단리하였다. 면역되지 않은 인간 공여체로부터 V 유전자의 레퍼토리를 구성하고 항원(자기-항원 포함)의 다양한 배열에 대한 항체들을 필수적으로 하기 문헌에 기재된 기법에 따라 단리할 수 있다: Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991), 또는 Griffith et al., EMBO J., 12:725-734 (1993). 또한 미국특허 제 5,565,332 호 및 미국특허 제 5,573,905 호(이들은 각각 내용 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다)를 참조한다.

[0151] 인간 항체를 또한 시험관내 활성화된 B 세포에 의해 생성시킬 수 있다(미국특허 제 5,567,610 호 및 미국특허 제 5,229,275 호(이들은 각각 내용 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다)를 참조하시오). 인간 항체를 또한 하

이브리도마 기법, 예를 들어 비제한적으로 문헌[Roder et al., Methods Enzymol., 121:140-167 (1986)]에 기재된 기법을 사용하여 시험관내에서 생성시킬 수 있다.

[0152] 인간화된 항체

[0153] 한편으로, 일부 실시형태에서, 비-인간 항체를 인간화시키며, 이때 상기 항체의 특정한 서열 또는 영역들을, 인간에서 자연적으로 생성된 항체에 대한 유사성을 증가시키기 위해 변형시킨다. 일 실시형태에서, 상기 항원 결합 도메인을 인간화시킨다.

[0154] "인간화된" 항체는 원래 항체와 유사한 항원 특이성을 유지한다. 그러나, 몇몇 인간화 방법을 사용하는 경우, 인간 CD3 항원에 대한 항체의 결합 친화성 및/또는 특이성을 문헌[Wu et al., J. Mol. Biol., 294:151 (1999)](이의 내용은 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다)에 기재된 바와 같이, "지시된 진화 (directed evolution)" 방법을 사용하여 증가시킬 수 있다.

[0155] 인간화된 항체는 비인간 공급원으로부터 상기 내로 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이들 비인간 아미노산 잔기를 종종 "유입" 잔기라 칭하며, 전형적으로는 "유입" 가변 도메인으로부터 취한다. 따라서, 인간화된 항체는 비인간 면역글로불린 분자로부터의 하나 이상의 CDR 및 인간으로부터의 프레임워크 영역을 포함한다. 항체의 인간화는 당해 분야에 주지되어 있으며 필수적으로, 윈터(Winter)와 동료의 방법에 따라(Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)), 인간 항체의 상응하는 서열 대신 설치류 CDR 또는 CDR 서열을 치환시킴으로써, 즉 CDR-이식에 의해(EP 239,400; PCT 공보 WO 91/09967; 및 미국특허 제 4,816,567 호; 미국특허 제 6,331,415 호; 미국특허 제 5,225,539 호; 미국특허 제 5,530,101 호; 미국특허 제 5,585,089 호; 미국특허 제 6,548,640 호(내용 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다)) 수행될 수 있다. 상기와 같은 인간화된 키메라 항체에서, 실질적으로 완전 미만의 인간 가변 도메인을 비인간 종으로부터의 상응하는 서열에 의해 치환시켰다. 실제로, 인간화된 항체는 전형적으로 일부 CDR 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체 중의 유사한 부위로부터의 잔기에 의해 치환된 인간 항체이다. 항체의 인간화를 또한 베니어링(veneering) 또는 리설피싱(resurfacing)(EP 592,106; EP 519,596; Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., Protein Engineering, 7(6):805-814 (1994); 및 Roguska et al., PNAS, 91:969-973 (1994)) 또는 쇄 셔플링(미국특허 제 5,565,332 호)(이들 내용은 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다)에 의해 성취할 수 있다.

[0156] 인간화된 항체의 제조에 사용되는 인간 가변 도메인(경쇄 및 중쇄 모두)의 선택은 항원성을 감소시키기 위한 것이다. 소위 "최적합 (best-fit)" 방법에 따라, 설치류 항체의 가변 도메인의 서열을 공지된 인간 가변-도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 선별한다. 이어서 상기 설치류의 서열에 가장 가까운 인간 서열을 상기 인간화된 항체의 인간 프레임워크(FR)로서 수용한다(Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987))(내용 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다). 또 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 하위그룹의 모든 인간 항체의 공통 서열로부터 유래된 특정한 프레임워크를 사용한다. 같은 프레임워크를 다수의 상이한 인간화된 항체에 사용할 수도 있다(Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993))(내용 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다).

[0157] 항체를 표적 항원의 높은 친화성 및 다른 유리한 생물학적 성질의 유지와 함께 인간화시킬 수 있다. 본 발명의 일 양태에 따라, 인간화된 항체를, 모 서열 및 인간화된 서열의 3-차원 모델을 사용하여 상기 모 서열 및 다양한 개념상의 인간화된 생성물의 분석 과정에 의해 제조한다. 3-차원 면역글로불린 모델을 통상적으로 입수할 수 있으며 이는 당해 분야의 숙련가들에게 친숙하다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 있음직한 3차원 입체형태 구조를 예시하고 나타내는 컴퓨터 프로그램을 이용할 수 있다. 이들 디스플레이의 검사는 상기 후보 면역글로불린 서열의 기능화에서 잔기들의 있음직한 역할의 분석, 즉 후보 항원에 결합하는 상기 후보 면역글로불린의 능력에 영향을 미치는 잔기들의 분석을 허용한다. 이렇게 하여, FR 잔기를 선택하고 목적하는 항체 특성, 예를 들어 표적 항원에 대한 증가된 친화성이 성취되도록 수용 및 유입 서열로부터 조합할 수 있다. 일반적으로, CDR 잔기는 항원 결합에 대한 영향에 직접적이고 가장 실질적으로 관여한다.

[0158] T 세포의 증대

[0159] 일 실시형태에서, 본 발명은 CD3에 대해 지시된 단일쇄 가변 단편 (scFv) 및 CD28 및 4-1BB의 세포내 도메인의 단편을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 키메라 막 단백질을 코딩하는 전기천공된 mRNA를 포함하는 T 세포를 포함한다. 본 발명은 또한, 분자에 대한 항체 또는 이의 단편을 포함하는 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인, 및 CD28 및 4-1BB의 세포내 도메인의 단편을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 키메라 막 단백질을

코딩하는 전기천공된 mRNA를 포함하는 전기천공된 또는 증대된 T 세포군을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 상기 mRNA는 세포군의 세포 중 적어도 하나의 세포에 도입되고 상기 세포의 표면상에 발현된다.

[0160] 일 실시형태에서, 상기 전기천공시키고 증대시키고자 하는 T 세포의 공급원은 말초 혈액 단핵구이다.

[0161] 일반적으로, 상기 T 세포를 상기에 부착된 표면과 CD3/TCR 복합체 관련 신호를 자극하는 작용제 및 상기 T 세포의 표면상의 공자극 분자를 자극하는 리간드를 접촉시킴으로써 증대시킨다. 본 발명은 상기 전기천공된 세포군을 배양시킴을 포함하는 전기천공된 T 세포군을 증대시키는 신규의 방법을 포함하며, 여기에서 상기 세포군내 함유된 전기천공된 T 세포는 적어도 10배 증대된다. 일 실시형태에서, 상기 세포군 중 적어도 하나의 세포는 CD3을 발현한다. 임의의 특정한 이론에 얽매이고자 하는 것은 아니지만, CD3을 발현하는 세포를 상기 전기천공된 세포의 표면상에서 발현되는 키메라 막 단백질과 접촉시키고 결합시킬 수 있다. 상기 키메라 막 단백질을 발현하는 적어도 하나의 세포는 CD3을 발현하는 또 다른 세포와 상호작용할 수 있다. 이러한 상호작용은 상기 전기천공된 T 세포의 증대를 자극할 수 있다.

[0162] 본 명세서에 개시된 데이터에 의해 입증되는 바와 같이, 본 명세서에 개시된 방법들에 의한 상기 전기천공된 T 세포의 증대는 약 10 배, 20 배, 30 배, 40 배, 50 배, 60 배, 70 배, 80 배, 90 배, 100 배, 200 배, 300 배, 400 배, 500 배, 600 배, 700 배, 800 배, 900 배, 1000 배, 2000 배, 3000 배, 4000 배, 5000 배, 6000 배, 7000 배, 8000 배, 9000 배, 10,000 배, 100,000 배, 1,000,000 배, 10,000,000 배, 또는 그 이상 및 이들 사이의 모든 전체 또는 부분 정수배까지 크게 증가될 수 있다. 일 실시형태에서, 상기 T 세포는 약 20배 내지 약 50배의 범위로 증대된다.

[0163] 배양에 이어서, 상기 T 세포를 일정 기간 동안 또는 상기 세포가, 상기 세포를 또 다른 배양 기구로 옮기기 전에 최적의 계대 배양을 위해 융합 또는 높은 세포 밀도에 도달할 때까지 배양 기구 중의 배양 배지에서 인큐베이션시킬 수 있다. 상기 배양 기구는 시험관내에서 세포의 배양에 통상적으로 사용되는 임의의 배양 기구일 수 있다. 배양 기간은 시험관내에서 세포의 배양에 적합한 임의의 시간일 수 있다. 상기 T 세포 매질을 상기 T 세포의 배양 기간 중 언제라도 교체할 수 있다. 바람직하게, 상기 T 세포 배지를 대략 2 내지 3일마다 교체한다. 이어서 상기 T 세포를 상기 배양 기구로부터 수거하며, 그 결과 상기 T 세포를 즉시 사용하거나 또는 나중의 사용을 위해 보관하기 위해 냉동보존할 수 있다. 일 실시형태에서, 본 발명은 상기 배양된 T 세포를 냉동보존함을 추가로 포함한다.

[0164] 상기 세포는 미국 가출원 5,199,942호 (본원에 참고로 인용됨)에 기재된 방법을 사용하여 추가로 증대될 수 있다. 예컨대, 미국 가출원 5,199,942호에 기재된 증대는 본원에 기재된 다른 증대 방법 이외에 추가될 수 있다. 간략하게는, T 세포의 생체외 배양 및 증대는 미국 가출원 5,199,942호에 기재된 것과 같은 세포 성장 인자, 또는 문헌[Dudley et al., J. Immunol., 26(4):332-342, 2003, for a Rapid Expansion Protocol (REP)]에 기재된 것과 같은 다른 인자, 예컨대, flt3-L, IL-1, IL-2, IL-3 및 c-kit 리간드를 추가로 포함한다.

[0165] 일 양태에서, 상기 T 세포의 증대 방법은 상기 T 세포를 단리하고 후속 전기천공에 이어서 배양시킴을 또한 포함할 수 있다.

[0166] 본 명세서에 기재된 바와 같은 배양 단계(본 명세서에 기재된 바와 같은 작용제와의 접촉)는 매우 짧을 수 있다, 예를 들어 24시간 미만, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 또는 23시간일 수 있다. 본 명세서에 추가로 기재된 바와 같은 배양 단계(본 명세서에 기재된 바와 같은 작용제와의 접촉)는 보다 길 수 있다, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14일 이상일 수 있다.

[0167] 다양한 용어들이 배양물 중의 세포를 설명하는데 사용된다. 세포 배양물은 일반적으로 살아있는 유기체로부터 채취하고 조절된 조건하에서 생육시킨 세포를 지칭한다. 1차 세포 배양물은 유기체로부터 직접 채취하고 1차 계대배양 전인 세포, 조직 또는 기관의 배양물이다. 세포는 상기가 세포 생육 및/또는 분열을 촉진하여 보다 큰 상기 세포군을 생성시키는 조건하에서 생육 배지에 놓일 때 배양물 중에서 증대된다. 세포를 배양물 중에서 증대시킬 때, 세포 증식 속도는 전형적으로는 상기 세포의 수가 2배로 되는데 필요한 시간의 양(달리 배가시간으로서 공지됨)에 의해 측정된다.

[0168] 각 계대배양의 라운드를 계대라 칭한다. 세포를 계대배양시킬 때, 이를 계대되었다라고 한다. 특정한 세포군 또는 세포주는 때때로 상기가 계대된 횟수로 지칭되거나 또는 상기를 특징으로 한다. 예를 들어, 10회 계대된 배양된 세포군을 P10 배양물이라 칭할 수 있다. 1차 배양물, 즉 조직으로부터 세포의 단리에 따른 1차 배양물은 P0으로 표시한다. 상기 1차 계대배양 다음에, 상기 세포를 2차 배양물(P1 또는 계대 1)로서 기재한다. 상

기 2차 계대배양 후에, 상기 세포는 3차 배양물(P2 또는 계대 2) 등으로 된다. 당해 분야의 숙련가들은 계대 기간 동안 다수의 집단 배가가 있을 수 있음을 알 것이다; 따라서 배양물의 집단 배가 수는 계대수보다 크다. 계대 사이의 기간 동안 세포의 증대(즉 집단 배가의 수)는 다수의 인자들, 예를 들어 비제한적으로 시딩 밀도, 기질, 배지, 및 계대 사이의 시간에 따라 변한다.

[0169] 일 실시형태에서, 상기 세포를 수시간(약 3시간) 내지 약 14일 또는 그 사이의 임의의 정수값의 시간 동안 배양할 수 있다. T 세포 배양에 적합한 조건은 증식 및 생육성에 필요한 인자들, 예를 들어 혈청 (예: 소태아 또는 인간 혈청), 인터류킨-2(IL-2), 인슐린, IFN-γ, IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF-β, 및 TNF-α, 또는 숙련가에게 공지된 세포 생육을 위한 임의의 다른 첨가제를 함유할 수 있는 적합한 배지 (예: 최소 필수 배지 또는 RPMI 배지 1640 또는 X-비보(vivo) 15, 론자(Lonza))를 포함한다. 상기 세포 생육을 위한 다른 첨가제는 비제한적으로 계면활성제, 플라스마네이트, 및 환원제, 예를 들어 N-아세틸-시스테인 및 2-머캅토에탄올을 포함한다. 배지는 아미노산, 나트륨 피루베이트, 및 비타민이 첨가되고, 무혈청이거나 또는 적합한 양의 혈청(또는 혈장) 또는 한정된 호르몬 세트, 및/또는 T 세포의 생육 및 증대에 충분한 양의 시토카인(들)이 보충된 RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α-MEM, F-12, X-비보 15, 및 X-비보 20, 옵티마이저(Optimizer)를 포함할 수 있다. 항생제, 예를 들어 페니실린 및 스트렙토마이신을, 대상체에게 주입해야 하는 세포의 배양물이 아닌, 실험 배양물에만 포함시킨다. 상기 표적 세포를 생육을 지지하는데 필요하는 조건, 예를 들어 적합한 온도 (예: 37 ℃) 및 분위기 (예: 공기+5% CO_2)하에서 유지시킨다.

[0170] 상기 T 세포를 배양하는데 필요한 배지는 상기 T 세포를 공자극할 수 있는 작용제를 포함할 수 있다. 예를 들어, CD3을 자극할 수 이는 작용제는 CD3에 대한 항체이고, CD28을 자극할 수 있는 작용제는 CD28에 대한 항체이다. 이는, 본 명세서에 개시된 데이터에 의해 입증되는 바와 같이, 본 명세서에 개시된 방법에 의해 단리된 세포가 대략적으로 10 배, 20 배, 30 배, 40 배, 50 배, 60 배, 70 배, 80 배, 90 배, 100 배, 200 배, 300 배, 400 배, 500 배, 600 배, 700 배, 800 배, 900 배, 1000 배, 2000 배, 3000 배, 4000 배, 5000 배, 6000 배, 7000 배, 8000 배, 9000 배, 10,000 배, 100,000 배, 1,000,000 배, 10,000,000 배 이상 증대될 수 있기 때문이다. 일 실시형태에서, 상기 T 세포는 상기 전기천공된 세포군을 배양시킴으로써 약 20 배 내지 약 50 배 이상의 범위로 증대된다.

[0171] 또 다른 실시형태에서, 상기 T 세포의 증대 방법은 추가의 용도를 위해 상기 증대된 T 세포를 단리함을 또한 포함할 수 있다. 더욱 또 다른 실시형태에서, 상기 증대 방법은 상기 증대된 T 세포의 후속적인 전기천공에 이은 배양을 또한 포함한다. 상기 후속적인 전기천공은 작용제를 코딩하는 mRNA를 상기 T 세포의 증대된 세포군내에 전기천공시킴을 포함할 수 있으며, 여기에서 상기 작용제는 T 세포를 추가로 자극한다. 상기 작용제는 상기 T 세포를, 예를 들어 추가적인 증대, 효과기 기능 또는 또 다른 T 세포 기능을 자극함으로써 자극할 수 있다. 일 실시형태에서, 상기 작용제 mRNA를 상기 키메라 막 단백질 mRNA와 동시-전기천공시킨다. 또 다른 실시형태에서, 상기 작용제 mRNA를 상기 전기천공된 세포군의 배양 후에 전기천공시킨다.

[0172] 또 다른 실시형태에서, 상기 방법은 증대된 T 세포군을 CD3, CD27, CD28, CD83, CD86, CD127, 4-1BBL 및 PD1로 이루어진 그룹 중에서 선택된 적어도 하나의 공-자극 분자와 함께 자극하는 단계를 추가로 포함한다.

[0173] 치료법

[0174] 본 명세서에 기재된 T 세포를 치료용 조성물에 포함시킬 수 있다. 상기 조성물은 약제학적 조성물을 포함할 수 있으며 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 치료 유효량의 상기 T 세포를 포함하는 약제학적 조성물을 투여할 수 있다.

[0175] 일 양태에서, 본 발명은 대상체의 표적 세포 또는 조직에 대해 T 세포-매개된 면역 반응을 자극하는 방법으로서, CD3에 대해 지시된 단일쇄 가변 단편 (scFv) 및 CD28 및 4-1BB의 세포내 도메인의 단편을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 키메라 막 단백질을 코딩하는 mRNA와 함께 치료학적 유효량의 T 세포를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 세포군의 세포 중 적어도 하나의 세포는 키메라 막 단백질을 발현하는, 방법을 포함한다. 상기 T 세포는, 유도된 용해가 항체-의존적 세포-매개된 세포독성 (ADCC)인 경우와 같이 표적 세포 또는 조직의 용해를 유도하기 위하여 투여될 수 있다.

[0176] 일 실시형태에서, 본 발명은 입양 세포 전달 요법을 위한 방법을 포함한다. 상기 방법은 대상체에게 불리하게 작용하는 병증을 예방 또는 치료를 위해 대상체에게 T 세포를 포함하는 증대된 세포군을 투여하는 단계를 포함한다. 이러한 실시형태에서, 상기 증대된 세포군은, CD3에 대해 지시된 단일쇄 가변 단편 (scFv) 및 CD28 및 4-1BB의 세포내 도메인의 단편을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 키메라 막 단백질을 코딩하는 mRNA와 함께

T 세포를 포함하는 세포군을 전기천공하는 단계로서, 여기서 상기 세포군의 세포 중 적어도 하나의 세포는 상기 키메라 막 단백질을 발현하는, 단계; 및 상기 세포군을 배양하는 단계로서, 여기서 이에 함유된 T 세포가 적어도 10배 증대되는, 단계를 포함하는 방법에 따라 증대된다.

[0177] 또 다른 실시형태에서, 증진된 면역성과 관련된 질환 또는 병증의 치료를 필요로 하는 대상체에게 T 세포를 포함하는 증대된 세포군을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 증진된 면역성과 관련된 질환 또는 병증을 치료하는 방법이 제공된다. 상기 증대된 세포군은, CD3에 대해 지시된 단일쇄 가변 단편 (scFv) 및 CD28 및 4-1BB의 세포내 도메인의 단편을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 키메라 막 단백질을 코딩하는 mRNA와 함께 T 세포를 포함하는 세포군을 전기천공하는 단계로서, 여기서 상기 세포군의 세포 중 적어도 하나의 세포가 상기 키메라 막 단백질을 발현하는, 단계; 및 상기 세포군을 배양하는 단계로서, 여기서 이에 함유된 T 세포가 적어도 10배 증대되는, 단계를 포함하는 방법에 따라 증대된다.

[0178] 본 명세서에 기재된 바와 같이 생성된 증대된 T 세포는 균질하며, T 세포 기능을 갖는다. 더욱이, 상기 증대된 T 세포를 포유동물, 바람직하게는 인간에게 투여하여 면역 반응, 예를 들어 자가면역 질병, 예를 들어 당뇨병, 건선, 류마티스성 관절염, 다발성 경화증, GVHD, 증대성 동종이식편 내성 유도, 이식편 거부 등을 억제할 수 있다. 또한, 본 발명의 세포를, 감소되거나 또는 달리 억제된 면역 반응, 특히 세포-매개된 면역 반응이 질병의 치료 또는 경감에 바람직할 수 있는 임의의 병증의 치료에 사용할 수 있다.

[0179] 또한, 본원에 기재된 바와 같이 생성된 증대된 T 세포를 사용하여 자가면역 질환을 치료할 수 있다. 자가면역 질병의 예는 비제한적으로 후천성 면역결핍 증후군 (AIDS, 이는 자가면역 성분을 갖는 바이러스성 질병이다), 원형 탈모, 강직성 척추염, 항인지질 증후군, 자가면역 애디슨병, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 자가면역 내이 질환 (AIED), 자가면역 림프구증식 증후군 (ALPS), 자가면역 혈소판감소 자색반 (ATP), 베체트병, 심근병증, 복강스프루-포진성 피부염; 만성피로 면역 기능장애 증후군 (CFIDS), 만성 염증성 탈수초성 다발성 신경병증 (CIPD), 흉터 유천포창, 저온 응집병, 크레스트 증후군, 크론병, 데고스병, 소아 피부근염, 원판상 루푸스, 본태성 혼합 한랭글로불린혈증, 섬유근통-섬유근염, 그레이브스 병, 길랑-바레 증후군, 하시모토 갑상선염, 특발성 폐섬유화증, 특발성 혈소판감소 자반증 (ITP), IgA 신장병증, 인슐린-의존성 당뇨병, 소아 만성 관절염 (스틸병), 소아 류마티스 관절염, 메니에르병, 혼합 결합 조직병, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 악성 빈혈, 결절다발 동맥염, 다발성 연골염, 다분비선 증후군, 류마티스 다발성 근육통, 다발근염 및 피부근염, 원발성 무감마글로불린혈증, 원발성 담즙성 간경변, 건선, 건선 관절염, 레이노 증후군, 라이터 증후군, 류마티스 열, 류마티스 관절염, 사르코이드증, 피부경화증 (진행성 전신 경화증 (PSS), 또한 전신 경화증 (SS)으로서 공지됨), 쇼그렌 증후군, 근강직 증후군, 전신 홍반 루푸스, 타카야수 동맥염, 측두 동맥염/거대 세포 동맥염, 궤양성 대장염, 포도막염, 백반증, 및 베게너 육아종증을 포함한다.

[0180] 본 명세서에 기재된 바와 같이 생성된 증대된 T 세포를 또한 염증 질환의 치료를 위해 사용할 수 있다. 염증 질환의 예는 비제한적으로 만성 및 급성 염증 질환을 포함한다. 염증 질환의 예는 알쯔하이머병, 천식, 아토피성 알러지, 알러지, 죽상동맥경화증, 기관지 천식, 습진, 사구체신염, 이식편 대 숙주병, 용혈성 빈혈, 골관절염, 패혈증, 뇌졸중, 조직 및 기관 이식, 혈관염, 당뇨성 망막병증 및 인공호흡기 유발된 폐 손상을 포함한다.

[0181] 또 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 T 세포를 면역 반응의 치료가 필요한 대상체에서 상기 면역 반응의 치료를 위한 약제의 제조에 사용할 수 있다.

[0182] 본 발명의 세포를 동물, 바람직하게는 포유동물, 훨씬 더 바람직하게는 인간에게 투여하여 암을 치료할 수 있다. 또한, 본 발명의 세포를 암과 관련된 임의의 병증, 특히 종양 세포(들)에 대한 세포-매개된 면역 반응 (이때 상기 질병을 치료하거나 경감시키는 것이 바람직할 수 있다)의 치료에 사용할 수 있다. 암의 예로는 비제한적으로 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 피부암, 췌장암, 직장결장암, 신장암, 간암, 뇌암, 림프종, 백혈병, 폐암, 갑상선암종 등을 포함한다.

[0183] 본 발명의 세포를 적합한 전-임상 및 임상 실험 및 시험에서 측정하고자 하는 투여량 및 경로 및 시간에 투여할 수 있다. 세포 조성물을 이들 범위내의 투여량으로 수회 투여할 수 있다. 본 발명의 세포의 투여를 당해 분야의 숙련가들에 의해 결정되는 바와 같은 목적하는 질병 또는 병증의 치료에 유용한 다른 방법들과 병행할 수 있다.

[0184] 투여하고자 하는 본 발명의 세포는 치료 중인 대상체에 대해서 자가유래, 동종이계 또는 이종발생성일 수 있다.

[0185] 본 발명의 세포의 투여를 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 임의의 통상적인 방식으로 수행할 수 있다. 본 발명의 세포를 에어로졸 흡입, 주사, 섭취, 수혈, 주입 및 이식에 의해 대상체에게 투여할 수 있다. 본 명세서에

기재된 조성물을 환자에게 경동맥, 피하, 피내, 종양내, 결절내, 척수내, 근육내, 정맥(i.v.) 주사에 의해 또는 복강내로 투여할 수 있다. 다른 경우에, 본 발명의 세포를 상기 대상체의 염증 부위, 상기 대상체의 국소 질병 부위, 림프절, 기관, 종양 등에 직접 주사한다.

[0186] 본 명세서에 기재된 세포를 또한 임의의 수의 매트릭스를 사용하여 투여할 수 있다. 본 발명은 전형적으로 T 세포의 조절을 통해, 면역계를 지지하거나, 유지하거나 조절하기 위해 인공 림프 기관으로서 작용하는 새로운 환경내에서 상기와 같은 매트릭스를 사용한다. 상응하게, 본 발명은 조직 공학에 유용성이 입증된 상기 매트릭스 조성물 및 제형을 사용할 수 있다. 상응하게, 본 발명의 조성물, 장치 및 방법에 사용될 수 있는 매트릭스의 유형은 실질적으로 제한이 없으며 생물학적 및 합성 매트릭스를 모두 포함할 수 있다. 하나의 특정한 예에서, 미국특허 제 5,980,889 호; 미국특허 제 5,913,998 호; 미국특허 제 5,902,745 호; 미국특허 제 5,843,069 호; 미국특허 제 5,787,900 호; 또는 미국특허 제 5,626,561 호(이들 특허는 내용 전체가 본 명세서에 참고로 인용된다)에 제시된 조성물 및 장치가 사용된다. 매트릭스는 포유동물 숙주에 투여시 생체적합성임과 통상적으로 관련되는 특징들을 포함한다. 매트릭스는 천연 및/또는 합성 물질로부터 형성될 수 있다. 상기 매트릭스는 동물의 체내에서 영구적인 구조물 또는 제거 가능한 구조물을 남기는 것이 바람직한 경우에 비-생분해성, 예를 들어 임플란트; 또는 생분해성일 수 있다. 상기 매트릭스는 스펀지, 임플란트, 튜브, 텔파 패드, 섬유, 중공 섬유, 동결건조된 성분, 젤, 분말, 다공성 조성물 또는 나노입자의 형태를 취할 수 있다. 또한, 매트릭스를 시딩된 세포 또는 생성된 시토카인 또는 다른 활성 작용제의 지속적인 방출을 허용하도록 설계할 수도 있다. 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 매트릭스는 가요성이고 탄성이며, 무기염, 수성 유체 및 산소를 포함한 용해된 기체상 작용제와 같은 물질에 투과성인 반고체 스캐폴드로서 기재될 수 있다.

[0187] 매트릭스를 본 명세서에서는 생체적합성 물질의 일례로서 사용한다. 그러나, 본 발명은 매트릭스로 제한되지 않으며, 따라서 매트릭스 또는 매트릭스들이란 용어가 존재하는 어디에서나 이들 용어를, 세포 유지 또는 세포 순회를 허용하고, 생체적합성이며, 자체가 반-투과성이거나 또는 특정한 반-투과성 물질과 함께 사용되는 물질을 통해서 직접 거대분자의 순회를 허용할 수 있는 다른 물질 및 장치를 포함하는 것으로 판독해야 한다.

[0188] 약제학적 조성물

[0189] 본 발명의 약제학적 조성물은 본 명세서에 기재된 바와 같은 증대된 T 세포군을 하나 이상의 약학적으로 또는 생리학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제와 함께 포함할 수 있다. 상기와 같은 조성물은 완충제, 예를 들어 중성 완충 염수, 포스페이트 완충 염수 등; 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스, 슈크로스 또는 덱스트란, 만니톨; 단백질; 폴리펩티드 또는 아미노산, 예를 들어 글리신; 산화방지제; 킬레이트제, 예를 들어 EDTA 또는 글루타치온; 항원보강제 (예: 수산화 알루미늄); 및 보존제를 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물을 바람직하게는 정맥내 투여용으로 제형화한다.

[0190] 본 발명의 약제학적 조성물을 치료하고자 하는(또는 예방하고자 하는) 질병에 적합한 방식으로 투여할 수 있다. 상기 투여량 및 투여 빈도는 환자의 조건, 및 환자의 질병의 유형 및 중증도와 같은 인자에 의해 결정될 것이지만, 적합한 투여량은 임상 시험에 의해 결정될 수도 있다.

[0191] 본 명세서에 기재된 증대된 T 세포를 포함하는 약제학적 조성물을 10^4 내지 10^9 세포/kg 체중, 바람직하게는 10^5 내지 10^6 세포/kg 체중(이들 범위내의 모든 정수 값 포함)의 투여량으로 투여할 수 있다. T 세포 조성물을 또한 상기 투여량에서 수회 투여할 수 있다. 상기 세포를 면역요법에 통상적으로 공지된 주입 기법을 사용하여 투여할 수 있다 (예를 들어, 문헌[Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988]을 참조하시오). 특정 환자에 최적인 투여량 및 치료 섭생을, 상기 환자를 질병의 징후에 대해 모니터하고 치료를 상응하게 조절함으로써 의학 분야의 숙련가에 의해 쉽게 결정할 수 있다.

[0192] 몇몇 실시형태에서, 활성화된 T 세포를 대상체에게 투여하고 이어서 후속으로 혈액을 다시채혈하고(또는 성분채집술을 수행하고), 본 발명에 따라 상기로부터 T 세포를 활성화시키고, 상기 환자에게 상기 활성화되고 증대된 T 세포를 재주입하는 것이 바람직할 수 있다. 상기 과정을 수주마다 수회 수행할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, T 세포를 10 ㎖ 내지 400 ㎖의 채혈된 혈액으로부터 활성화시킬 수 있다. 몇몇 실시형태에서, T 세포를 20 ㎖, 30 ㎖, 40 ㎖, 50 ㎖, 60 ㎖, 70 ㎖, 80 ㎖, 90 ㎖ 또는 100 ㎖의 채혈된 혈액으로부터 활성화시킨다. 이론에 얽매이고자 하는 것은 아니지만, 상기 수회의 채혈/수회의 재주입 프로토콜을 사용하여 T 세포의 일정한 세포군을 선택할 수 있다.

[0193] 본 발명의 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법 또는 T 세포를 치료 수준으로 증대시키는 당해 분야에 공지된 다른 방법들을 사용하여 활성화되고 증대된 세포를 환자에게 임의의 수의 관련 치료 양상, 예를 들어 비

제한적으로 항바이러스 요법, 시도포비어 및 인터류킨-2, 시타라빈(또한 ARA-C로서 공지됨)과 같은 작용제에 의한 치료 또는 MS 환자용 나탈리주맵 치료 또는 건선 환자용 에팔리주맵 치료 또는 PML 환자용 다른 치료와 함께 (예를 들어 상기 치료 전, 상기 치료와 동시에, 또는 상기 치료에 이어서) 투여한다. 추가의 실시형태에서, 본 발명의 T 세포를 화학요법, 방사선, 면역억제제, 예를 들어 사이클로스포린, 아자티오프린, 메토트렉세이트, 마이코페놀레이트 및 FK506, 항체, 또는 다른 면역제거제, 예를 들어 CAM PATH, 항-CD3 항체 또는 다른 항체 요법, 사이톡신, 플루다리빈, 사이클로스포린, FK506, 라파마이신, 마이코페놀산, 스테로이드, FR901228, 시토카인, 및 조사와 함께 사용할 수 있다. 이들 약물은 칼슘 의존성 포스파타제 칼시뉴린(사이클로스포린 및 FK506)을 억제하거나 또는 성장 인자 유도된 신호전달에 중요한 p70S6 키나제(라파마이신)를 억제한다. (Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993). 추가의 실시형태에서, 본 발명의 세포 조성물을 환자에게 골수 이식, 화학요법제, 예를 들어 플루다라빈, 외부-광선 조사 요법(XRT), 사이클로포스파미드, 또는 항체, 예를 들어 OKT3 또는 CAMPATH를 사용하는 T 세포 제거 요법과 함께 (예를 들어 상기 전에, 상기와 동시에 또는 상기에 이어서) 투여한다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 세포 조성물을 B-세포 제거 요법, 예를 들어 CD20과 반응하는 작용제, 예를 들어 리툭산에 이어서 투여한다. 예를 들어, 일 실시형태에서, 대상체는 고용량 화학요법에 의한 표준 치료에 이어서, 말초 혈액 줄기세포 이식을 겪을 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 상기 이식에 이어서, 대상체는 본 발명의 증대된 면역 세포의 주입을 받는다. 추가의 실시형태에서, 증대된 세포를 수술 전 또는 수술에 이어서 투여한다.

[0194] 환자에게 투여하고자 하는 상기 치료의 투여량은 치료되는 병증의 정확한 성질 및 치료 수용자에 따라 변할 것이다. 인간 투여를 위한 투여량의 크기조정을 당해 분야-승인된 실행에 따라 수행할 수 있다. 예를 들어 CAMPATH에 대한 용량은 일반적으로 성인 환자의 경우 1 내지 약 100 ㎎의 범위로, 대개는 1 내지 30일의 기간 동안 매일 투여될 것이다. 바람직한 1일 용량은 하루에 1 내지 10 ㎎이나, 일부의 경우 하루에 40 ㎎ 이하의 보다 큰 용량이 사용될 수도 있다(미국특허 제 6,120,766 호에 기재됨).

[0195] 본 발명에 유용할 수 있는 방법 및 조성물은 실시예들에 제시된 특정한 제형들로 제한되지 않음은 물론이다. 하기의 실시예들을, 본 발명의 세포, 증대 및 배양 방법 및 치료 방법의 제조 및 사용에 대한 완전한 개시 및 기재와 함께 당해 분야의 통상적인 숙련가들에게 제공하기 위해 제시하며, 이는 발명자들이 그들의 발명으로서 간주하는 범위를 제한하고자 하지 않는다.

[0196] 본 발명의 실시는, 달리 나타내지 않는 한, 분자 생물학(재조합 기법 포함), 미생물학, 세포 생물학, 생화학 및 면역학의 통상적인 기법들을 사용하며, 이들은 충분히 숙련가의 이해 범위내에 있다. 상기와 같은 기법들은 예를 들어 하기 문헌에 충분히 설명되어 있다: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", fourth edition (Sambrook, 2012); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Culture of Animal Cells" (Freshney, 2010); "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1997); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller and Calos, 1987); "Short Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 2002); "Polymerase Chain Reaction: Principles, Applications and Troubleshooting", (Babar, 2011); "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 2002). 이들 기법을 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드의 생성에 적용할 수 있으며, 그 자체가 본 발명의 수행 및 실시에 고려될 수 있다. 특정한 실시형태들에 특히 유용한 기법들은 하기 섹션에서 논의될 것이다.

[0197]

[0198] 실험 실시예

[0199] 본 발명은 하기의 실험 실시예를 참조로 추가로 상세히 설명된다. 이러한 실시예는 단지 설명의 목적으로만 제공되며, 달리 명시되지 않는 한 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 따라서, 본 발명은 하기의 실시예에 제한되는 것으로 해석되어서는 안되며, 오히려 본원에 제공된 교시의 결과로 명백해지는 임의의 및 모든 변형을 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[0200] 추가의 설명 없이, 당업자는 전술한 설명 및 하기의 실시예를 사용하여 본 발명의 화합물을 제조 및 이용하고, 청구된 방법을 실시할 수 있는 것으로 생각된다. 따라서, 하기의 실시예는 본 발명의 바람직한 실시예를 구체적으로 밝히며, 본 발명의 나머지 부분을 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0201] 본원에 개시된 실험 수행에 사용된 재료 및 방법이 하기에 기술된다.

[0202] **시험관내 전사 (IVT) mRNA 벡터의 작제.** 모든 유전자를 합성하고/하거나 증폭시키고, 공개적으로 이용가능한

서열 정보를 이용하여 PCR로 이를 조립하였다. PCR 생성물을 GFP를 pGEM-GFP.64A로 대체한 pGEM.64A 기반 벡터 내로 서브클로닝하여 공개적으로 이용가능한 서열 정보를 갖는 pGEM.64A 기반 IVT 벡터를 생성하였다.

[0203] **RNA 시험관내 전사 (IVT).** 시험관내 전사 키트, 예컨대, mMESSAGE mMACHINE® T7 Ultra (Ambion, Inc)를 사용하여 IVT RNA를 생성하였다. IVT RNA 생성물을 RNA 정제 프로토콜, 예컨대, RNeasy 미니 키트 (Qiagen, Inc., Valencia, CA)를 사용하여 정제하였다. 정제된 RNA를 약 1-2 mg/ml의 RNase가 없는 물 중에 용출시켰다.

[0204] **T 세포의 RNA 전기천공.** PBMC 또는 증대된 T 세포를 전기천공하고, 이를 OPTI-MEM (Invitrogen)으로 3회 세척하고 1-3 x 10^8/ml의 최종 농도로 OPTI-MEM 중에 재현탁하였다. 이어서, 0.1 ml의 세포를 10 ㎍의 IVT RNA (또는 지시된 바와 같이)와 함께 혼합하고, 전기천공기, 예컨대, BTX EM830 (Harvard Apparatus BTX, Holliston, MA, USA)를 사용하여 2-mm 큐벳 중에서 전기천공하였다.

[0205] **T 세포 자극 및 증대.** PBMC를 항-CD3 scFv-28BB를 코딩하는 RNA와 함께 전기천공하고, 300 μ/ml IL-2로 보충된 R10 배지 중에 배양하였다. 전기천공 3일 후를 기점으로 격일마다 IL-2를 포함하는 새로운 배지를 배양물에 첨가하였다. 자극 9일 후 T 세포의 표현형 및 기능을 시험하였다. CD3/CD28 비드 자극된 T 세포, 또는 OKT3 항체를 PBMC에 첨가함으로써 증대된 T 세포를 대조군으로 사용하였다.

[0206] **전기천공된 T 세포 상의 CAR 검출.** 세포를 세척하고 FACS 완충액 (PBS + 0.1% 나트륨 아자이드 및 0.4% BSA) 중에 현탁하였다. 비오틴-표지된 다클론 염소 항-마우스 F(ab)2 항체 (뮤린 scFv 용) 또는 항-인간 항-F(ab)2 (인간 scFv 용) (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA)를 상기 세포에 첨가하고, 4 ℃에서 25분 동안 인큐베이션하고, 이어서, 이를 2회 세척하였다. 이어서, 세포를 피코에리쓰린-표지된-스트렙타비딘 (BD Pharmingen, San Diego, CA)으로 염색하였다.

[0207] **ELISA 및 루미넥스 (luminex) 검정.** 표적 세포인 CD19를 발현하는 상이한 종양 세포주를 세척하고, R10 배지 중에 10^6 세포/mL로 현탁하였다. 1×10^5개의 각각의 표적 세포 유형을 96 웰 둥근 바닥 플레이트 (Corning)의 복제용 웰 (duplicate well)에 첨가하였다. 효과기 T 세포 배양물인 CD19 CAR RNA 전기천공된 T 세포군을 세척하고, R10 중에 10^6 세포/mL로 현탁하였다. 1×10^5개의 효과기 T 세포를 상기 96 웰 플레이트의 지시된 웰 중 표적 세포와 함께 배합하였다. 추가로, T 세포를 단독으로 함유하는 세포를 제조하였다. 상기 플레이트를 37 ℃에서 18 내지 20 시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 상청액을 수거하고 표준 방법을 사용하여 ELISA 검정 (Pierce, Rockford, IL)을 수행하였다.

[0208] **CD107a 염색.** 세포를 96 웰 플레이트 중 160 ㎕의 완전 RPMI 배지 중에 1:1의 E:T (10^5 효과기:10^5 표적)로 플레이팅하였다. 20 ㎕의 피코에리쓰린-표지된 항-CD107a 항체 (BD Pharmingen, San Diego, CA)를 첨가하고, 상기 세포를 골지 스탑 (Golgi stop) 첨가 전 1시간 동안 37 ℃에서 인큐베이션하고, 또 다른 2.5 시간 동안 인큐베이션하였다. 2.5 시간 후 10 ㎕의 FITC-항-CD8 및 APC-항-CD3를 첨가하고, 상기 세포를 37 ℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 상기 샘플을 FACS 완충액으로 1회 세척하였다. BD FacsCalibur (BD Biosciences)를 이용하여 유세포 분석을 수행하였고, FlowJo (Treestar Inc, Ashland, OR)를 이용하여 이를 분석하였다.

[0209] **루시페라제 기재 CTL 검정.** Nalm6-CBG (또는 PDL1 또는 HVEM로 형질도입된 Nalm6-CBG)를 생성하고, 하기와 같이 변형된 버젼의 루시페라제 기재 세포독성 T 림프구 (CTL) 검정에 이를 사용하였다. Nalm6-CBG 세포를 세척하고 R10 배지 중에 1 x 10^5 세포 /ml로 재현탁하고, 100 ㎕의 CBG-표지된 세포를 상이한 비율의 T 세포 (예: 30:1, 15:1 등)와 함께 37 ℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 100 ㎕의 상기 혼합물을 96 웰 백색 루미노미터플레이트 (luminometerplate)로 옮기고, 100 ㎕의 기질을 첨가하고, 발광을 즉시 측정하였다.

[0210] 서열번호 1

[0211] caggctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgccgccccgggcccacccgcaagcattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgctccaaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactgtaa

[0212] 서열번호 2

[0213] gaggagcaggctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgccgccccgggcccacccgcaagcattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgctccaaacggggcagaaagaaactcctgtatatattcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctg

ccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactgtaa

[0214] 서열번호 3

[0215] atg gcg cgc ggc ctc cag ctt ctg ctc ctg agc tgc gcc tac agc ctg gct ccc gcg acg ccg gag gtg aag gtg gct tgc tcc gaa gat gtg gac ttg ccc tgc acc gcc ccc tgg gat ccg cag gtt ccc tac acg gtc tcc tgg gtc aag tta ttg gag ggt ggt gaa gag agg atg gag aca ccc cag gaa gac cac ctc agg gga cag cac tat cat cag aag ggg caa aat ggt tct ttc gac gcc ccc agc cgc cat gaa agg ccc tat tcc ctg aag atc cga aac act acc agc tgc aac tcg ggg aca tac agg tgc act ctg cag gac ccg gat ggg cag aga aac cta agt ggc aag gtg atc ttg aga gtg aca gga tgc cct gca cag cgt aaa gaa gag act ttt aag aaa tac aga gcg gag att gtc ctg ctg ctg gct ctg gtt att ttc tac tta aca ctc atc att ttc act tgt aag ttt gca cgg cta cag agt atc ttc cca gat ttt tct aaa gct ggc atg gaa cga gct ttt ctc cca gtt acc tcc cca aat aag cat tta ggg cta gtg act cct cac aag aca gaa ctg gta tga

[0216] 서열번호 4

[0217] atggatccccagtgcactatgggactgagtaacattctctttgtgatggccttcctgctctctggtgctgctcctctgaagattcaagcttatttcaatgag actgcagacctgccatgccaatttgcaaactctcaaaaccaaagcctgagtgagctagtagtattttggcaggaccaggaaaacttggttctgaatgaggta tacttaggcaaagagaaatttgacagtgttcattccaagtatatgggccgcacaagttttgattcggacagttggaccctgagacttcacaatcttcagatc aaggacaagggcttgtatcaatgtatcatccatcacaaaaagcccacaggaatgattcgcatccaccagatgaattctgaactgtcagtgcttgctaacttc agtcaacctgaaatagtaccaatttctaatataacagaaaatgtgtacataaatttgacctgctcatctatacacggttacccagaacctaagaagatgagt gttttgctaagaaccaagaattcaactatcgagtatgatggtgttatgcagaaatctcaagataatgtcacagaactgtacgacgtttccatcagcttgtct gtttcattccctgatgttacgagcaatatgaccatcttctgtattctggaaactgacaagacgcggcttttatcttcacctttctctatagagcttgaggac cctcagcctcccccagaccacattccttggattacagctgtacttccaacagttattatatgtgtgatggttttctgtctaattctatggaaatggaagaag aagaagcggcctcgcaactcttataaatgtggaaccaacacaatggagagggaagagagtgaacagaccaagaaaagagaaaaaatccatatacctgaaaga tctgatgaagcccagcgtgtttttaaaagttcgaagacatcttcatgcgacaaaagtgatacatgtttttaa

[0218] 서열번호 5

[0219] atggaatacgcctctgacgcttcactggaccccgaagccccgtggcctcccgcgccccgcgctcgcgcctgccgcgtactgccttgggccctggtcgcgggg ctgctgctgctgctgctgctcgctgccgcctgcgccgtcttcctcgcctgcccctgggccgtgtccggggctcgcgcctcgcccggctccgcggccagcccg agactccgcgagggtcccgagctttcgcccgacgatcccgccggcctcttggacctgcggcagggcatgtttgcgcagctggtggcccaaaatgttctgctg atcgatgggcccctgagctggtacagtgacccaggcctggcaggcgtgtccctgacgggggcctgagctacaaagaggacacgaaggagctggtggtggcc aaggctggagtctactatgtcttctttcaactagagctgcggcgcgtggtggccggcgagggctcaggctccgtttcacttgcgctgcacctgcagccactg cgctctgctgctggggccgccgccctggctttgaccgtggacctgccacccgcctcctccgaggctcggaactcggccttcggtttccagggccgcttgctg cacctgagtgccggccagcgcctgggcgtccatcttcacactgaggccagggcacgccatgcctggcagcttacccagggcgccacagtcttgggactcttc cgggtgacccccgaaatcccagccggactcccttcaccgaggtcggaataa

[0220] 서열번호 6

[0221] atgcagatcccacaggcgccctggccagtcgtctgggcggtgctacaactgggctggcggccaggatggttcttagactccccagacaggccctggaacccc cccaccttctccccagccctgctcgtggtgaccgaaggggacaacgccaccttcacctgcagcttctccaacacatcggagagcttcgtgctaaactggtac cgcatgagccccagcaaccagacggacaagctggccgccttccccgaggaccgcagccagcccggccaggactgccgcttccgtgtcacacaactgcccaac gggcgtgacttccacatgagcgtggtcagggcccggcgcaatgacagcggcacctacctctgtggggccatctccctggcccccaaggcgcagatcaaagag agcctgcgggcagagctcagggtgacagagagaagggcagaagtgcccacagcccaccccagcccctcacccaggccagccggccagttccaaaccctggtg ttttgggtgctggtggtggttggtggagtcctggcttgctatagcttgctagtaacagtggcctttattatttctgggtgaggagtaagaggagcaggctc ctgcacagtgactacatgaacatgactccccgccgccccgggcccacccgcaagcattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgctcc taa

[0222] 서열번호 7

[0223] attcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactgagagt gaagttcagcaggagcgcagacgcccccgcgtaccagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttgga caagagacgtggccgggaccctgagatgggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggc ctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgccct tcacatgcaggccctgcccctcgctaa

[0224] 본원에 기재된 상기 실험의 결과를 하기에 기재한다.

[0225] **항-CD3 OKT3 항체로 자극된 T 세포와 같이 효과적인 CD3 scFv-28BB RNA 전기천공된 T 세포 증대.** CD3에 대해 지시된 항체 (OKT3 또는 H5L1)로부터의 단일쇄 가변 단편 (scFv) 도메인을 합성하고/하거나 PCR로 증폭시키고, CD8 막관통 도메인, CD28 및 4-1BB 세포내 신호전달 도메인에 연결하고, pGEM.64A RNA 기반 벡터 내로 서브클로닝하였다 (도 1). 상기 변형된 pGEM.64 작제물 (OKT3-28BB RNA 또는 H5L1 RNA)로부터 RNA를 합성하고, 이를 말초 혈액 단핵구 (PBMC) 내로 전기천공하였다. 2개의 정상 PBMC 공여체로부터 수득된 PBMC 군 중에서 T 세포 증대를 평가하였다. OKT3-28BB RNA 전기천공 후 증대된 상기 PBMC를 항-CD3 OKT3 항체와 인큐베이션한 PBMC와 비교하였다. 결과는, OKT3-28BB RNA 전기천공 후 증대된 T 세포가 OKT3 항체 자극 후의 T 세포 증대만큼 효과적이었다는 것을 입증하였다 (도 2).

[0226] **CD3 scFv-28BB RNA 전기천공된 PBMC로부터 증대된 T 세포는 OKT3 항체 자극된 T 세포와 유사한 표현형을 나타내며, 보다 우수한 효과기 기능을 가진다.** OKT3와 함께 PBMC 자극, 항-CD3/항-CD28 코팅된 비드 (Beads)와 함께 정제된 T 세포 자극, 또는 OKT-28BB RNA 또는 H5L1-28BB RNA와 함께 PBMC 전기천공을 비롯한, 상이한 방법으로 증대된 T 세포의 표현형을 평가하였다. 결과는, OKT-28BB 또는 H5L1-28BB를 코딩하는 RNA와 함께 PBMC의 전기천공으로 수득된 T 세포의 표현형이, OKT3 항체와 함께 자극된 PMBC로부터의 T 세포 표현형 [다수의 효과기 기억 T 세포 (CD45RO+/CD62L-) 포함]과 유사한 반면, 항-CD3/항-CD28 비드 자극된 T 세포는 균일하게 중심 기억 표현형 (CD45RO+/Cd62L+)을 나타낸다는 것을 입증하였다 (도 3).

[0227] T 세포를 CD19 CAR를 코딩하는 RNA와 함께 전기천공한 후의 기능성에 대해 추가로 평가하였다. 전기천공된 CD19 CAR RNA의 발현은 각각의 T 세포군과 유사하였다 (도 4). OKT3 항체 자극된 PBMC, OKT-28BB RNA 전기천공된 PBMC, H5L1-28BB RNA 전기천공된 PBMC, 및 항-CD3/항-CD28 비드 자극된 PBMC로부터 수득된 CD19 CAR RNA 전기천공된 T 세포군을, CD19 양성 종양 세포주인 Nalm6과 함께 상기 T 세포를 공동-인큐베이션한 후 CD107a 상향 조절에 대해 평가하였다 (도 5A 및 5B). 결과는, OKT-28BB RNA 전기천공된 T 세포에서, OKT3 항체 또는 항-CD3/항-CD28 비드로 자극된 T 세포에서 보다 높은 수준의 CD107a 발현을 입증하였다. OKT-28BB RNA 전기천공된 PBMC로부터 수득된 T 세포는, 항-종양 활성으로 평가시. OKT3 항체 및 CD3/CD28 비드 자극된 T 세포보다 보다 확고한 기능성을 갖는다.

[0228] **공자극 분자, 스위치 수용체 및 시토카인을 코딩하는 RNA와 함께 동시-전기천공을 통해 증대된 T 세포에 대한 추가의 최적화.** RNA 전기천공으로 추가로 분자를 첨가하는 것이 RNA 전기천공된 PBMC의 증대에 의해 수득된 T 세포를 추가로 증대시킬 수 있는지 시험하기 위하여, 도 10에 나열된 바와 같이 OKT-28BB RNA를 상이한 조합의 공자극 분자, 스위치 수용체 또는 시토카인을 코딩하는 RNA와 함께 혼합하였다. RNA 전기천공된 PBMC로부터 수득된 T 세포의 표현형 및 기능성을 OKT3 항체 자극된 PBMC로부터 수득된 T 세포와 비교하였다. 표현형 분석을 도 6에 도시한다. OKT-28BB RNA 전기천공으로부터 수득된 T 세포 (OKT-28bb-1)는 OKT3 항체 자극으로부터 수득된 T 세포와 비교하여 중심 기억 T 세포 표현형을 나타냈다. 약 25.08%의 OKT3 항체 자극으로부터 수득된 T 세포 대비 약 54.54%의 OKT-28BB RNA 전기천공으로부터 수득된 T 세포가 CCR7/CD62L 이중 양성 세포였다.

[0229] 더욱이, 세포예정사 1 (PD1), CD83, CD86, 4-1BBL, PD1-CD28 또는 IL-21를 코딩하는 다른 RNA와 OKT-28BB RNA와의 전기천공은 T 세포 증대를 증가시켰다. OKT-28bb-2 및 OKT-28bb-6에서, T 세포 증대는 약 64.85% (OKT-28bb-5) 내지 약 69.21% (OKT-28bb-3)로 추가로 증가되었다. OKT-28BB RNA와 단독으로 전기천공된 PBMC로부터 수득된 T 세포에서 PD1은 현저히 상향조절되었고, 이에 반해, OKT-28BB RNA 전기천공된 PBMC로부터 수득된 T 세포 중에서 약 32.37%의 PD1/CD27 이중 양성 세포가 검출되고, OKT3 항체 자극된 PBMC로부터 수득된 T 세포 중에서 6.24% PD1/CD27 이중 양성 세포가 검출되었다. 또한, T 세포 증대 단계 동안의 다른 RNA의 동시-전기천공은 일부 증대된 T 세포군인 OKT-28bb-6 (9.30%) 및 OKT-28bb-2 (14.08%)에서 PD1 발현을 감소시켰다.

[0230] 인터페론-감마 (도 7) 및 IL-2 (도 8)의 시토카인 생산을 CD19 CAR RNA로 전기천공된 증대된 T 세포 (CD19 CAR T 세포)중에서 평가하고, CD19를 발현하는 상이한 종양 세포주와 함께 인큐베이션하였다. 다른 RNA와 동시-전기천공한 결과, 상이한 CD19 종양 세포주와 인큐베이션한 후 CD19 CAR RNA T 세포로부터 분비된 IFN-감마가 다양한 수준으로 유도되었다. OKT-28BB RNA와 함께 전기천공된 PBMC로부터 수득된 CD19 CAR RNA T 세포가, OKT3 항체 자극된 PBMC로부터 수득된 CD19 CAR RNA T 세포보다 더 높은 수준의 IL-2를 분비하였다.

[0231] CD19 CAR RNA T 세포의 용해 능력을 또한 측정하였다. CD19 CAR RNA T 세포를, CD19 양성 세포주인 Nalm6 및 PLL1 또는 HVEM로 형질도입된 Nalm6과 함께 인큐베이션하였다. 용해 활성은 일부 CD19 CAR RNA T 세포, 구체적으로는 OKT-288bb-2 및 OKT-28bb-4에서 감소되었다 (도 9). 이와 반대로, CD19 CAR RNA 전기천공된 OKT-28bb-1 및 OKT-28bb-3 T 세포에서의 용해 활성은 PBMC의 OKT3 항체 자극으로부터 수득된 CD19 CAR RNA T 세포만큼

우수했다. OKT-28BB RNA 전기천공으로 증대된 CD19 CAR RNA T 세포는 보다 많은 중심 기억 T 세포를 생성하면서, 이들은, 주로 효과기 기억 세포인 OKT3 항체 자극된 T 세포만큼 효과적으로 종양 세포를 사멸할 수 있었다 (도 10).

[0232] 개념의 증거로, 0일에 NSG 마우스를 1E6 Nalm6-ESO-CBG로 (정맥내) 주사하였다. 7일에, $1x10^6$ NY-ESO-T TCR (1G4 TCR) RNA 전기천공된 OKT3-28BB RNA T 세포 (RNA-T) 또는 CD3/CD28 비드 T 세포 (Beads)를 (정맥내) 주사하였다. 종양 부하를 생체발광 영상화로 모니터링하였다. 도 11은, Beads 자극된 T 세포보다 TCR로 전달된 RNA-T 세포에서 보다 양호한 종양 대조군을 관찰하였음을 도시한다.

[0233] 렌티바이러스의 RNA-T 세포로의 형질도입 효율을 시험하기 위해, 1일 또는 2일에 RNA T 세포를 수거하고, 0.5ml, 1ml 또는 2ml/웰로 구성된 24 웰 플레이트에 1.5 x 10^6/ml의 세포 농도로 분액하였다. 0.1ml의 농축된 4D5.BBZ 렌티바이러스 벡터 ($5x10^6$/ml의 역가)를 각 웰에 첨가하였다. 1일 또는 2일에 대조군으로 4D5.BBZ 렌티바이러스 벡터를 지시된 바와 같이 감염 다중도 (MOI)로 CD3/CD28 비드 자극된 T 세포에 첨가하였다. 자극 9일 후, 증대된 T 세포를 형질도입된 CAR 발현의 검출을 위하여 유세포 분석 염색하였다 (도 12).

[0234] 도 13에 도시된 결과는, 렌티바이러스로 형질도입되거나 비-형질도입된 RNA T 세포 둘 모두가 CD3/CD28 비드 자극된 T 세포에서 만큼 효과적으로 증대되었다는 것을 의미한다.

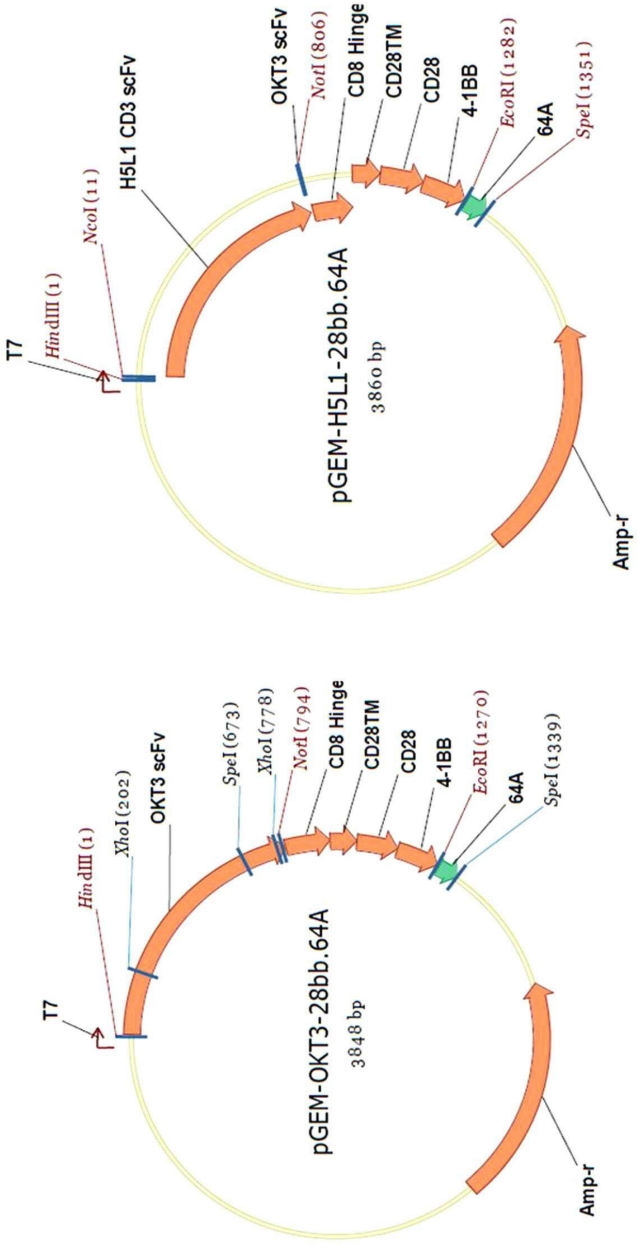
[0235] 이어서, 렌티바이러스로 형질도입된 RNA T 세포, 또는 Beads 자극된 T 세포를 Her2 양성 세포주인 SK-OV3, MCF7 및 MDA231로, 또는 Her2 음성 종양 세포주인 MDA468로 4시간 동안 자극하고, 유세포 분석으로 CD107a 발현을 검출하였다. 도 14 참고.

[0236] 렌티바이러스로 형질도입된 RNA-T 세포에서의 시토카인 생산을 Beads 자극된 T 세포와 비교하였다. 렌티바이러스로 형질도입된 RNA T 세포, 또는 Beads 자극된 T 세포를, Her2 양성 세포주인 SK-OV3, MCF7 및 MDA231, 또는 Her 음성 종양 세포주인 MDA468로 4시간 동안 자극하였다. 밤새 인큐베이션한 후 ELISA로 시토카인 수준을 분석한 경우 (도 15), 렌티바이러스로 형질도입된 RNA T 세포는 Beads 자극된 T 세포 보다 더 많은 IL-2 및 IFN-γ를 생성하였다.

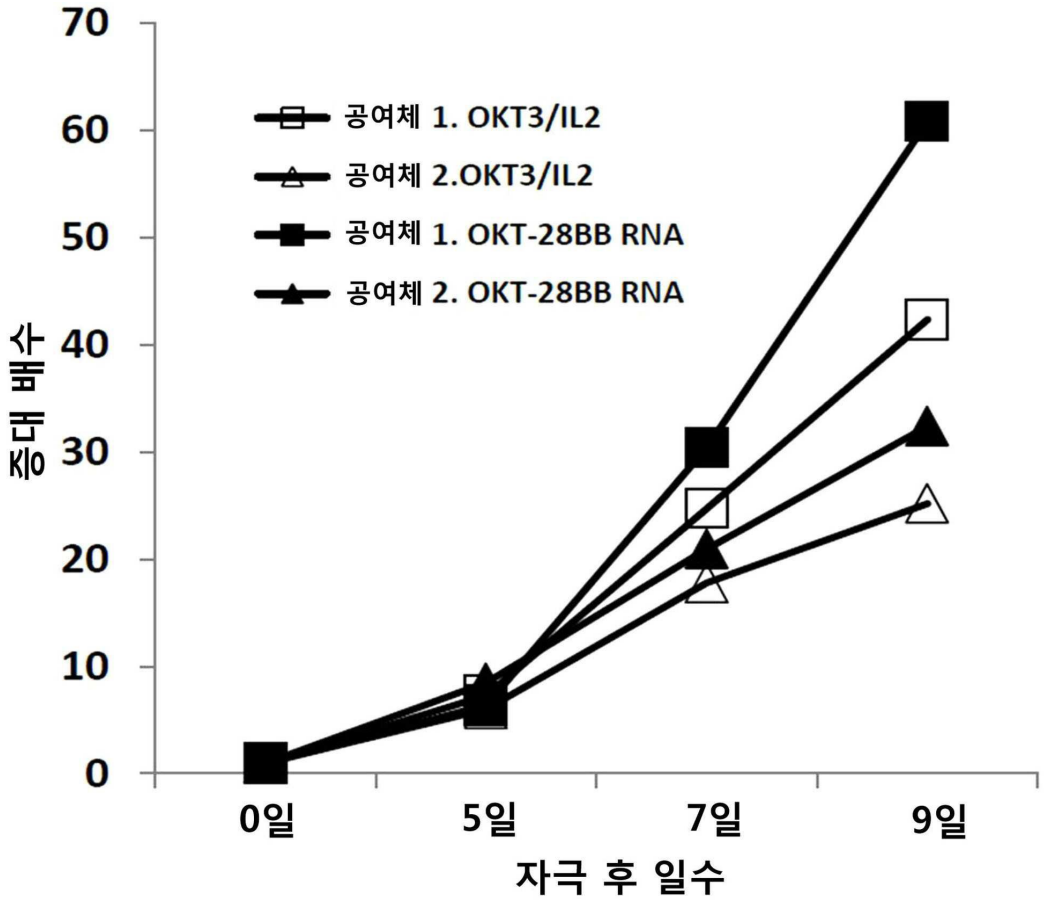
[0237] 본원에 인용된 각각의 모든 특허, 특허 출원 및 공개의 개지 내용은 그 전체가 본원에 참고로 인용된다. 본 발명이 특정 실시예를 참고하여 개시되었으나, 본 발명의 진정한 사상 및 범위를 벗어나지 않고 본 발명의 다른 실시예 및 변형이 당업자에 의해 고안될 수 있다는 것이 자명하다. 첨부된 청구 범위는 이러한 모든 실시예 및 등가의 변형을 포함하는 것으로 해석된다.

도면

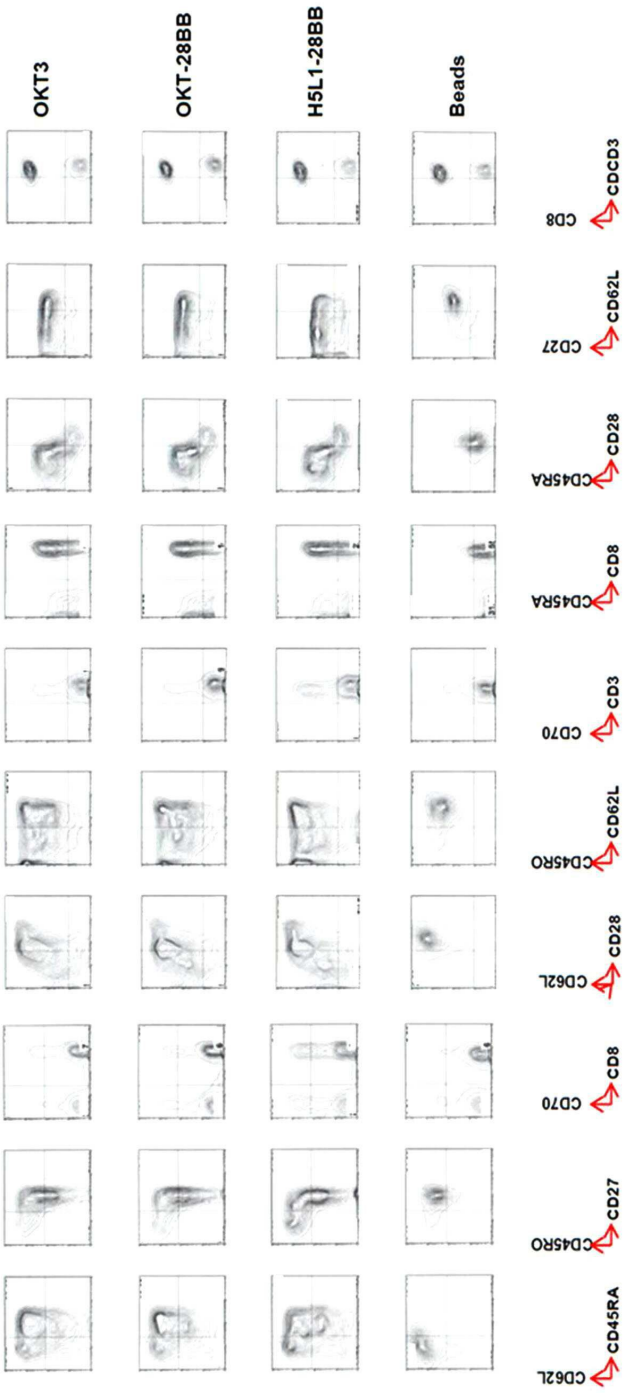
도면1


pGEM-H5L1-28bb.64A
3860 bp
T7
HindIII (1)
NcoI (11)
H5L1 CD3 scFv
OKT3 scFv
NotI (806)
CD8 Hinge
CD28TM
CD28
4-1BB
EcoRI (1282)
64A
SpeI (1351)
Amp-r
pGEM-OKT3-28bb.64A
3848 bp
T7
HindIII (1)
XhoI (202)
OKT3 scFv
SpeI (673)
XhoI (778)
NotI (794)
CD8 Hinge
CD28TM
CD28
4-1BB
EcoRI (1270)
64A
SpeI (1339)
Amp-r

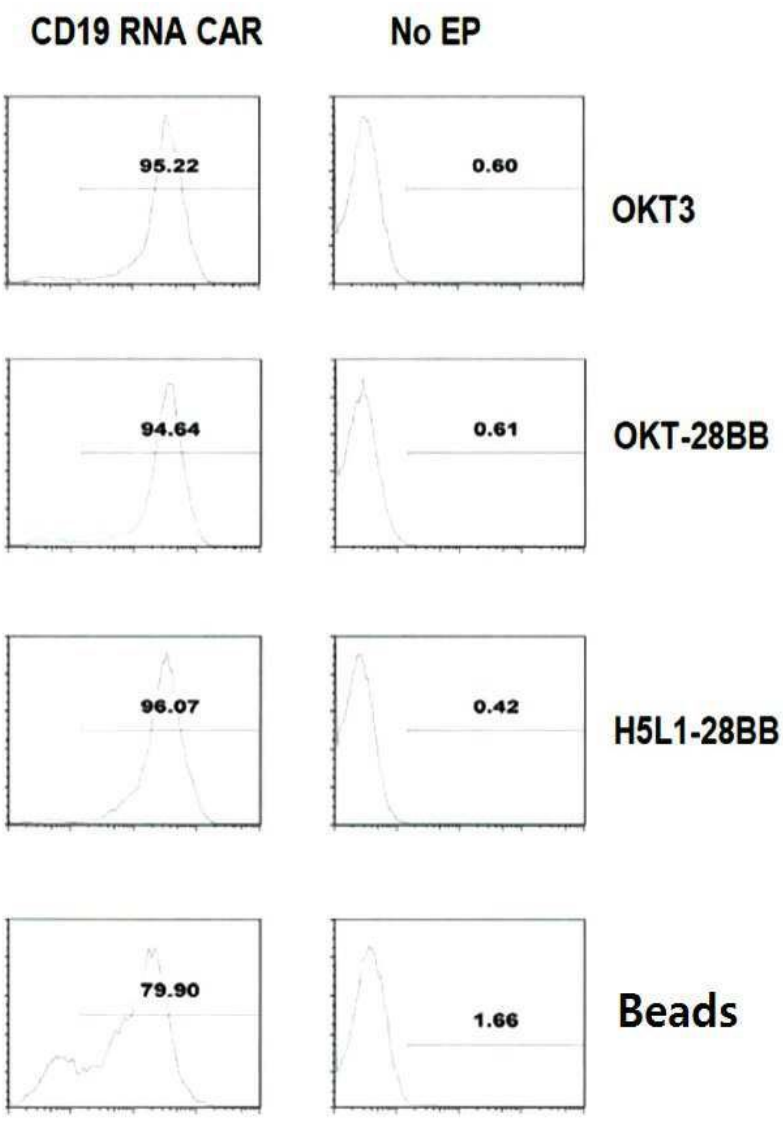
도면2


70
60
50
40
30
20
10
0
증식 배수
공여체 1. OKT3/IL2
공여체 2.OKT3/IL2
공여체 1. OKT-28BB RNA
공여체 2. OKT-28BB RNA
0일
5일
7일
9일
자극 후 일수

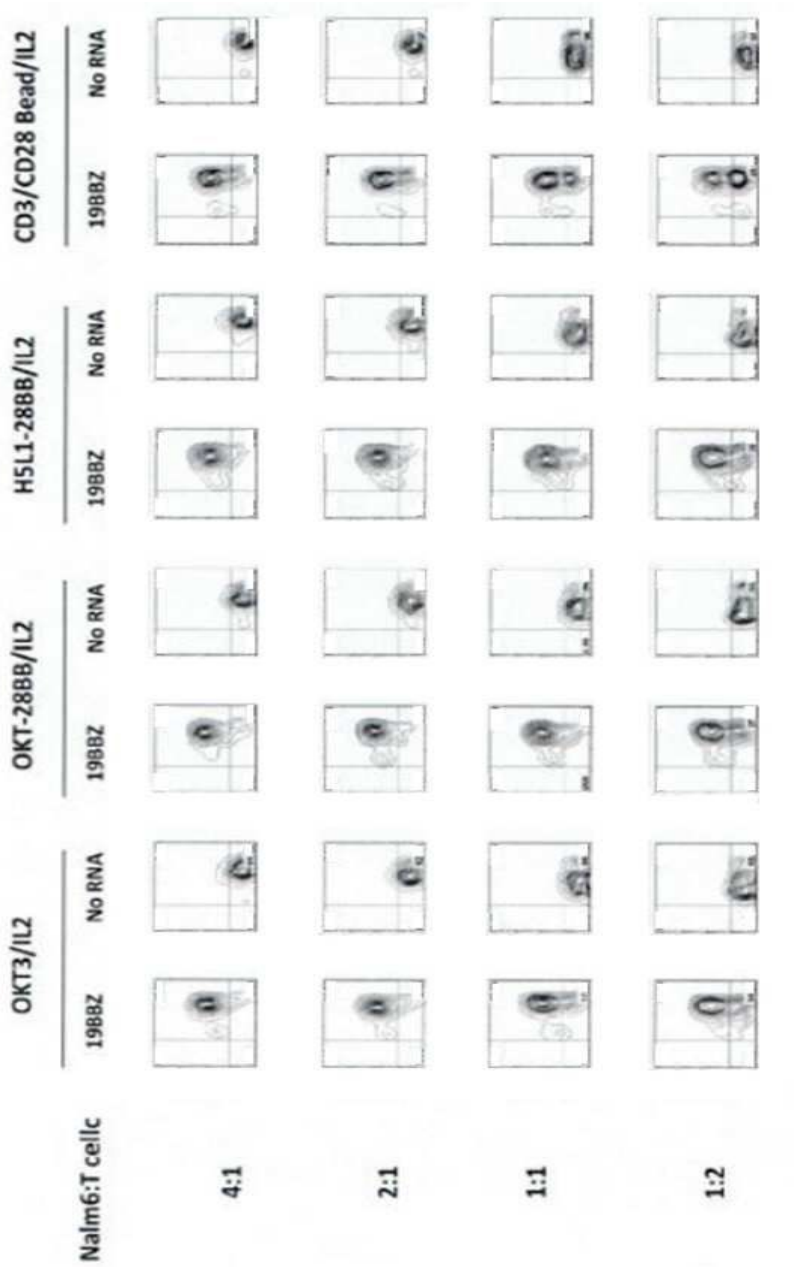
도면3


OKT3
OKT-28BB
H5L1-28BB
Beads
CD8 CD3
CD27 CD62L
CD45RA CD28
CD45RA CD8
CD70 CD3
CD45RO CD62L
CD62L CD28
CD70 CD8
CD45RO CD27
CD62L CD45RA

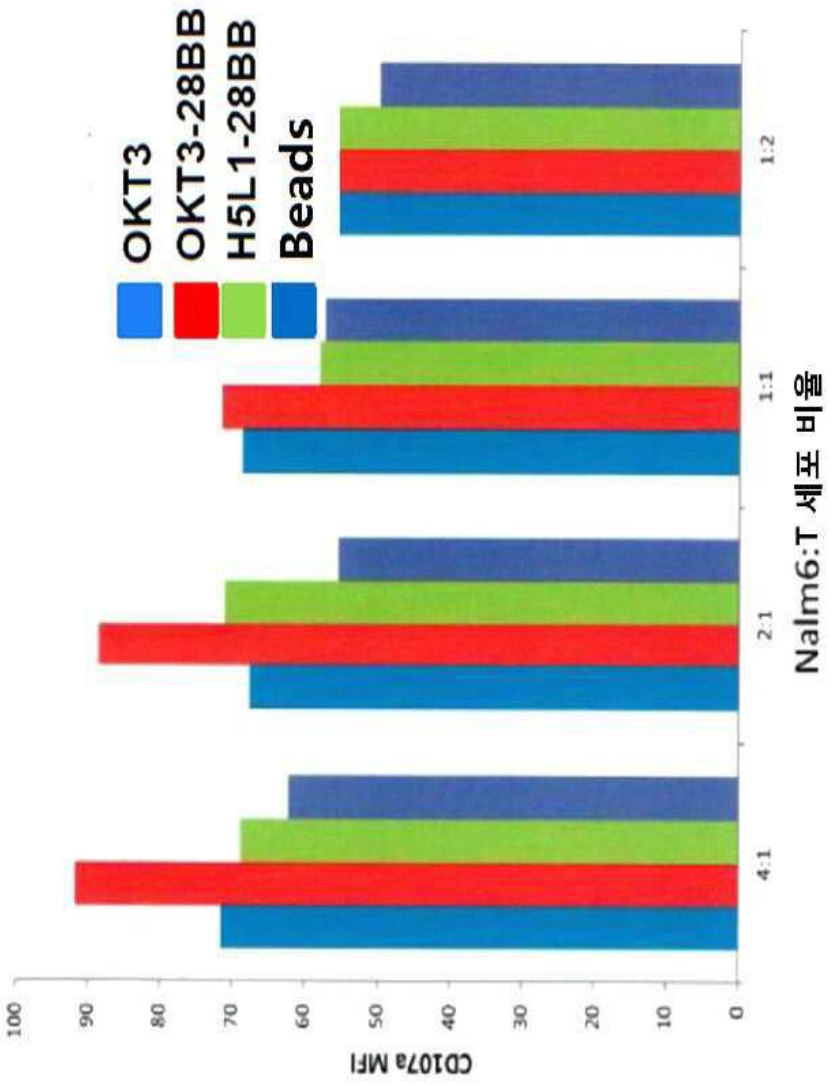
도면4


CD19 RNA CAR
No EP
95.22
0.60
OKT3
94.64
0.61
OKT-28BB
96.07
0.42
H5L1-28BB
79.90
1.66
Beads

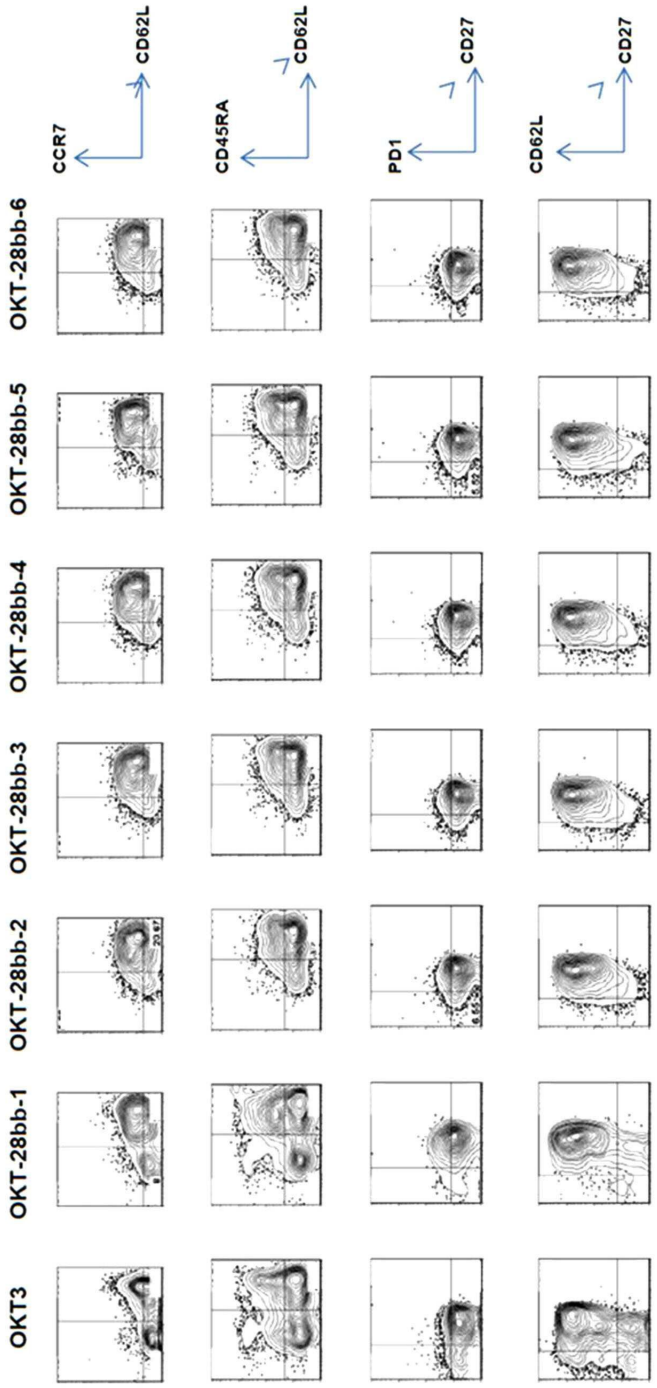
도면5a


Nalm6:T cellc
OKT3/IL2
19BBZ
No RNA
OKT-28BB/IL2
19BBZ
No RNA
H5L1-28BB/IL2
19BBZ
No RNA
CD3/CD28 Bead/IL2
19BBZ
No RNA
4:1
2:1
1:1
1:2

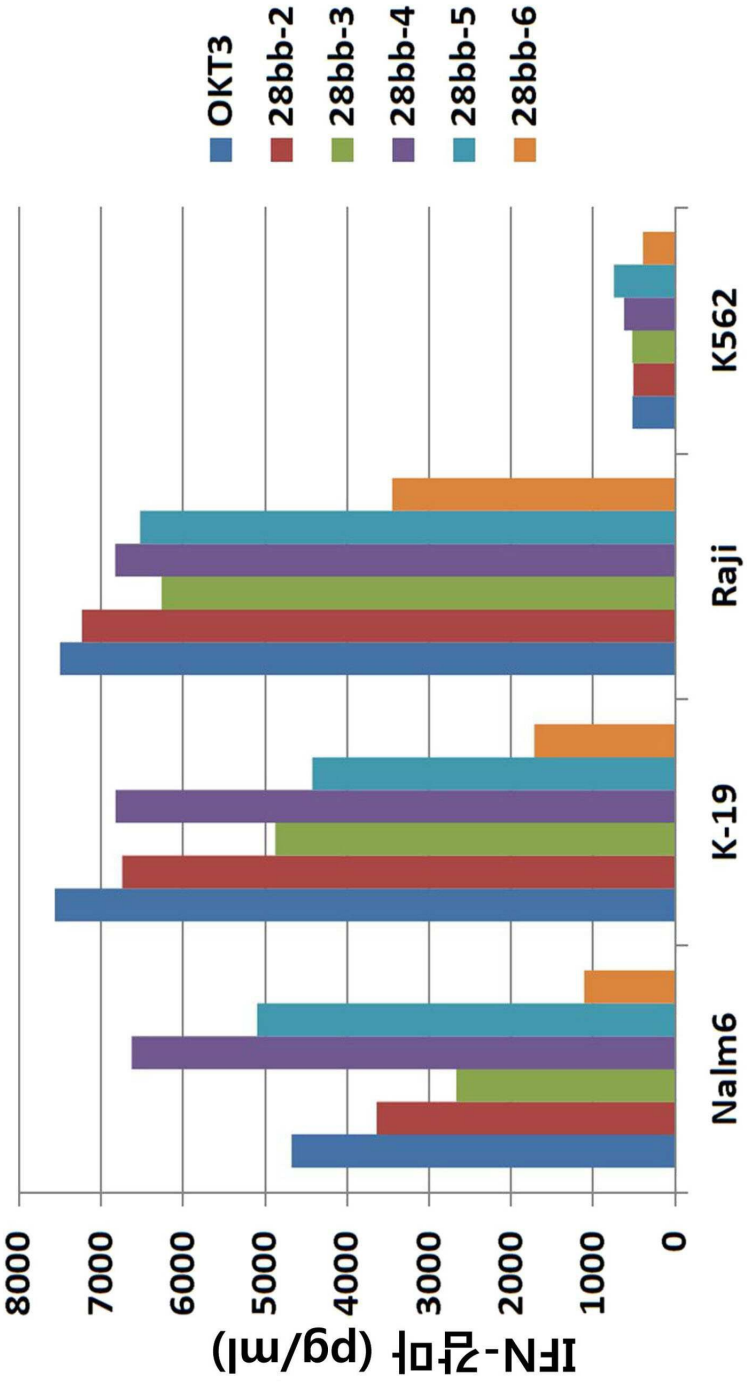
도면5b


OKT3
OKT3-28BB
H5L1-28BB
Beads
CD107a MFI
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
4:1
2:1
1:1
1:2
Nalm6:T 세포 비율

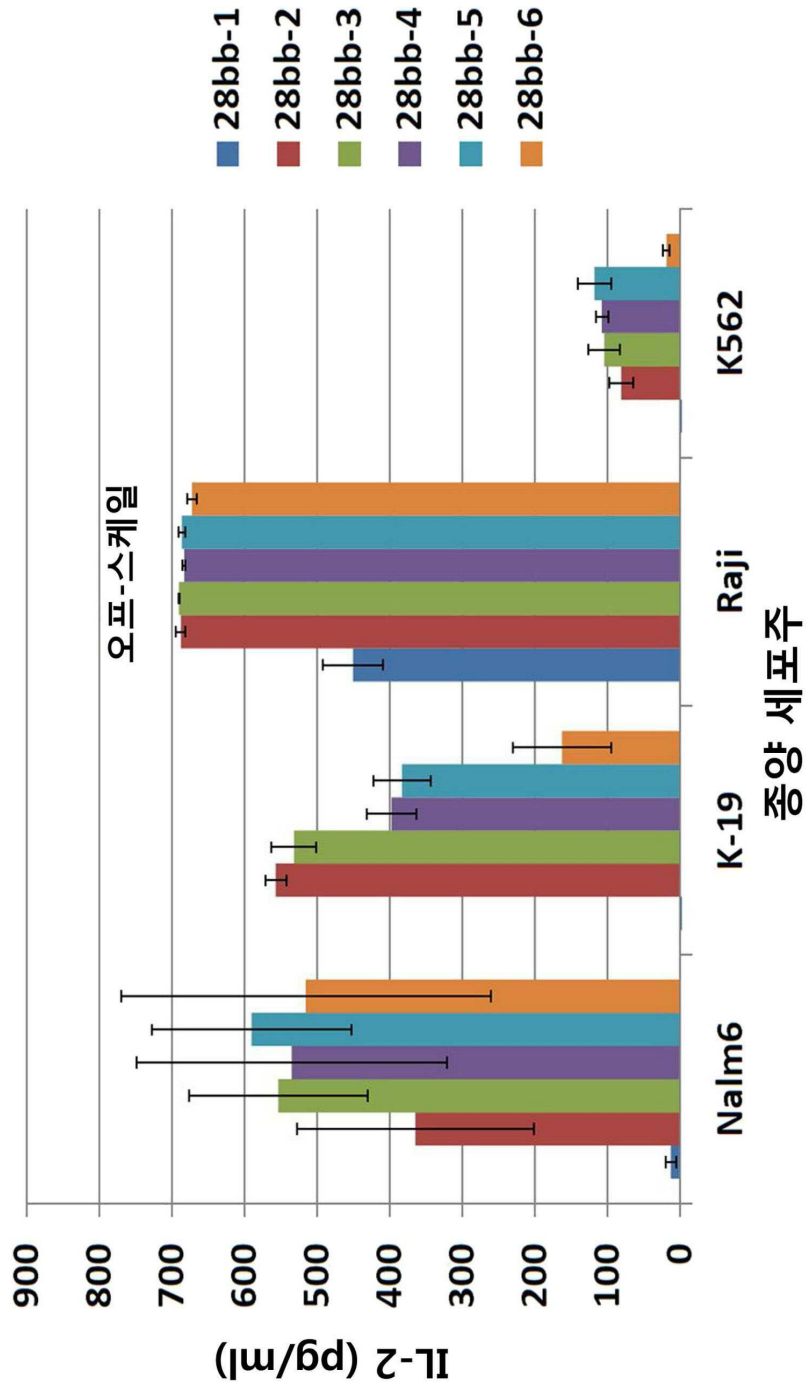
도면6


CCR7
CD62L
CD45RA
CD62L
PD1
CD27
CD62L
CD27
OKT-28bb-6
OKT-28bb-5
OKT-28bb-4
OKT-28bb-3
OKT-28bb-2
OKT-28bb-1
OKT3

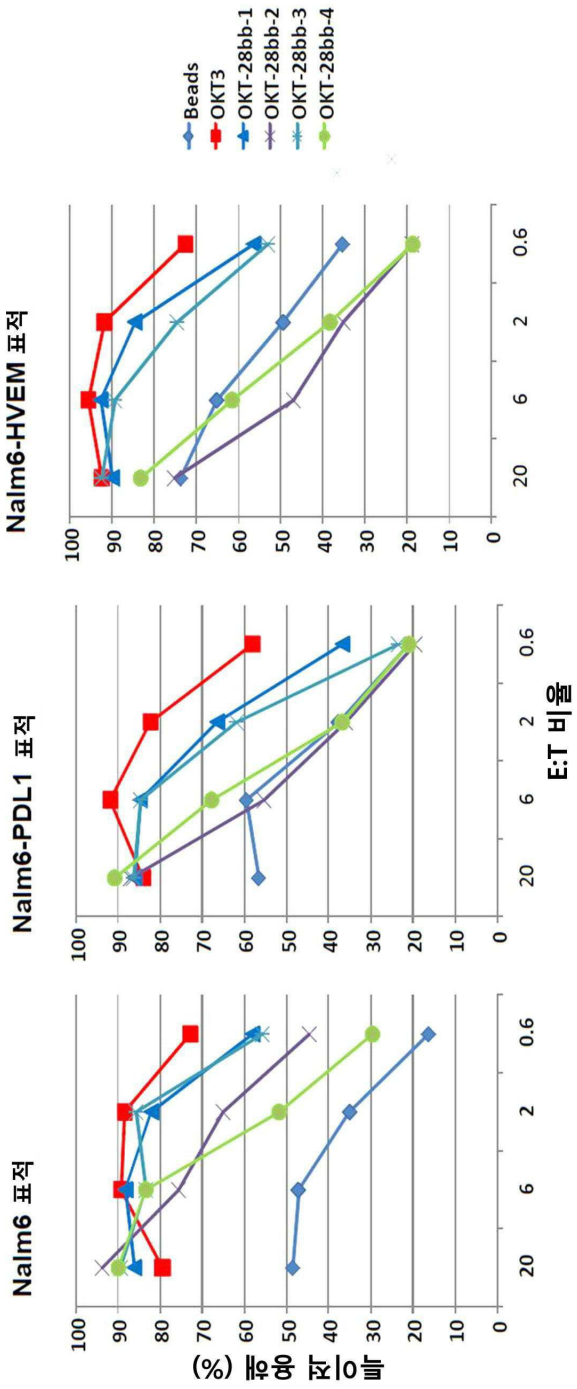
도면7


OKT3
28bb-2
28bb-3
28bb-4
28bb-5
28bb-6
IFN-감마 (pg/ml)
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Nalm6
K-19
Raji
K562

도면8


28bb-1
28bb-2
28bb-3
28bb-4
28bb-5
28bb-6
IL-2 (pg/ml)
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
오프-스케일
Nalm6
K-19
Raji
K562
종양 세포주

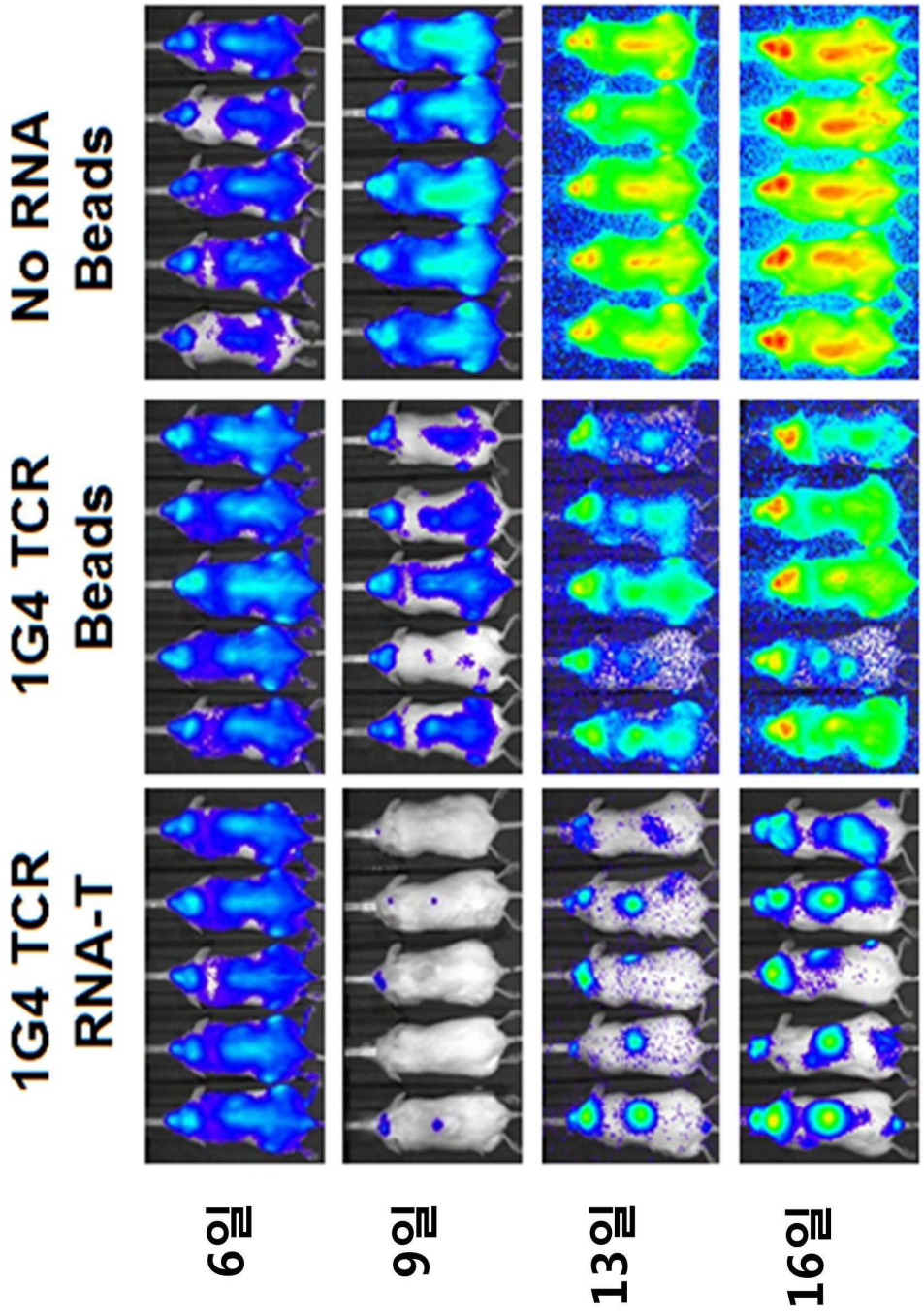
도면9


Beads
OKT3
OKT-28bb-1
OKT-28bb-2
OKT-28bb-3
OKT-28bb-4
Nalm6 표적
Nalm6-PDL1 표적
Nalm6-HVEM 표적
특이적 용해 (%)
E:T 비율
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
20
6
2
0.6

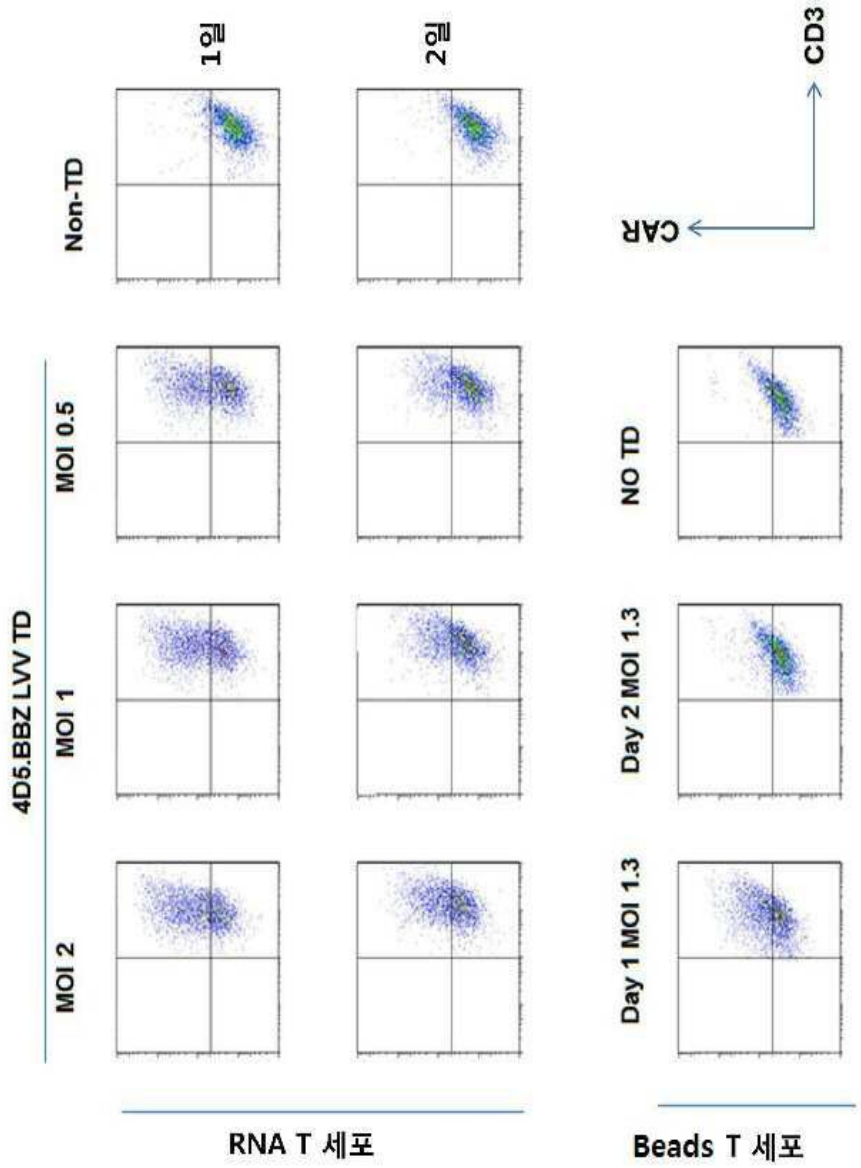
도면10

	OKT-28bb	CD86	CD83	4-1BBL	PD1-CD28	IL-21
OKT-28bb-1	V					
OKT-28bb-2	V	V		V		
OKT-28bb-3	V	V		V	V	V
OKT-28bb-4	V	V		V	V	
OKT-28bb-5	V	V	V		V	
OKT-28bb-6	V	V	V		V	V

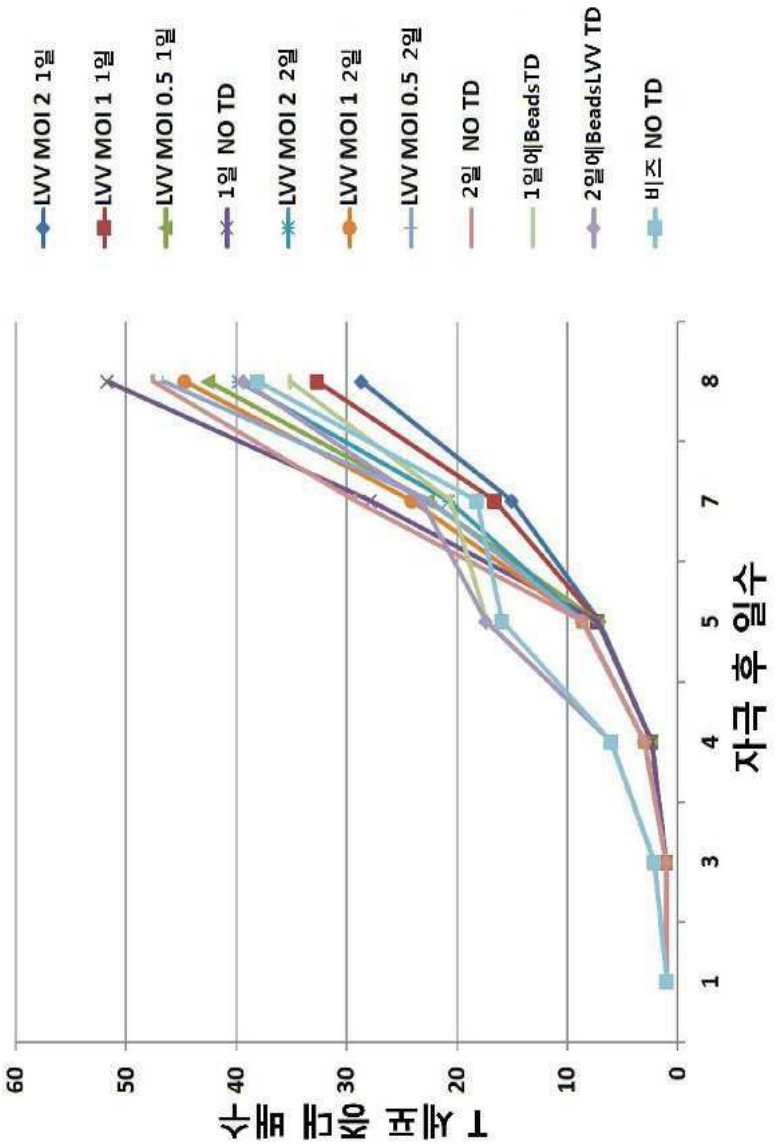
도면11



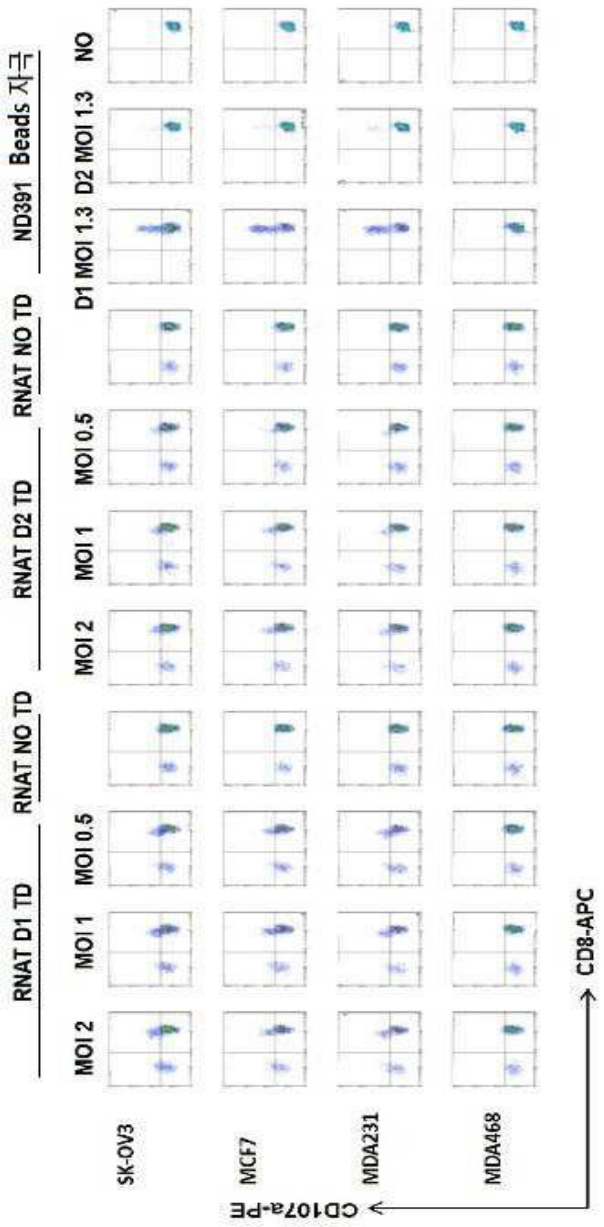
도면12


1일
2일
CD3
CAR
Non-TD
4D5.BBZ LVV TD
MOI 0.5
MOI 1
MOI 2
NO TD
Day 2 MOI 1.3
Day 1 MOI 1.3
RNA T 세포
Beads T 세포

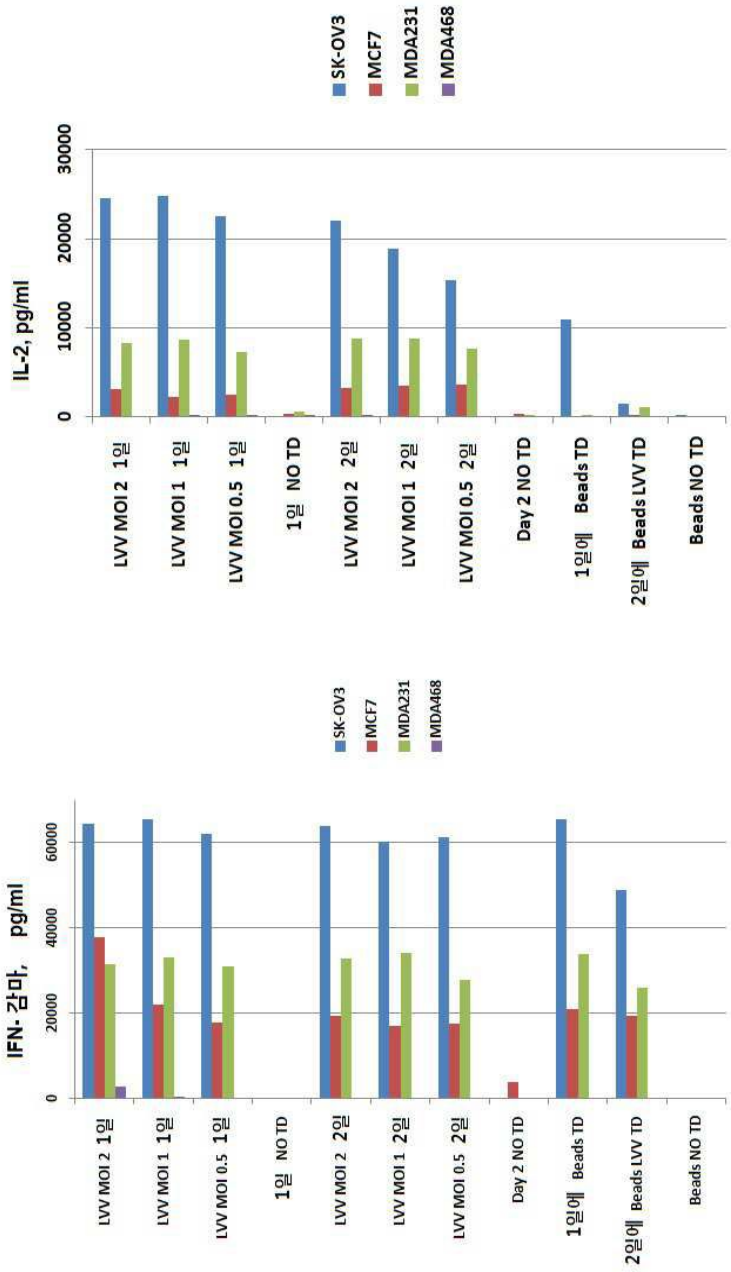
도면13


LVV MOI 2 1일
LVV MOI 1 1일
LVV MOI 0.5 1일
1일 NO TD
LVV MOI 2 2일
LVV MOI 1 2일
LVV MOI 0.5 2일
2일 NO TD
1일에BeadsTD
2일에BeadsLVV TD
비즈 NO TD
T 세포 양의 배수
0
10
20
30
40
50
60
1
3
4
5
7
8
자극 후 일수

도면14


RNAT D1 TD
RNAT NO TD
RNAT D2 TD
RNAT NO TD
ND391 Beads 자극
MOI 2
MOI 1
MOI 0.5
MOI 2
MOI 1
MOI 0.5
D1 MOI 1.3
D2 MOI 1.3
NO
SK-OV3
MCF7
MDA231
MDA468
CD107a-PE
CD8-APC

도면15



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> The trustees of the university of pennsylvania

<120> COMPOSITIONS AND METHODS OF STIMULATING AND EXPANDING T CELLS

<130> IPA170462-CN

<150> 62/073,268

<151> 2014-10-31

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1263

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 1

atggcactgc ccgtgaccgc cctcctcctg cccctcgcgc tactcctgca cgccgccaga 60

ccccaggtgc agctgcagca gagtggcgct gagctggccc gccccggcgc ctccgtgaag 120

atgtcctgca aggctagtgg gtataccttc accaggtata ctatgcactg ggtgaagcag 180

cgtccggggc aggggctcga gtggatcggc tacatcaatc cctcccgcgg ctacaccaat 240

tacaaccaga agttcaagga taaggccacg ctgaccacag acaagagtag ctccacggcc 300

tacatgcagt tatcaagtct gacctctgag gactccgctg tgtactattg tgcgaggtac 360

tacgacgacc actactgtct ggactactgg ggccaaggca caaccctgac tgtaagttcc 420

tccggcggcg gggggtccgg cggcggcggc tccggcgggg ggggtagtat cgtgctgaca 480

cagagtcccg caatcatgtc cgcaagcccc ggagagaagg tgaccatgac gtgtagtgct 540

tccagctccg tgtcctatat gaactggtac cagcagaaat ccgggacttc ccccaagaga 600

tggatctacg acaccagtaa gctggccagt ggcgtgcctg cacacttccg cggcagtggc 660

tccggcacta gttacagtct caccatctcc gggatggaag ctgaggacgc cgctacctac 720

tactgccagc agtggagctc gaacccattc accttcggtt cggggaccaa gctcgagatc 780

aacagggcgg ccgccaccac gacgccagcg ccgcgaccac caacaccggc gcccaccatc 840

gcgtcgcagc ccctgtccct gcgcccagag gcgtgccggc cagcggcggg gggcgcagtg 900

cacacgaggg ggctggactt cgcctgtgat ttttgggtgc tggtggtggt tggtggagtc 960

ctggcttgct atagcttgct agtaacagtg gcctttatta ttttctgggt gaggagtaag 1020

aggagcaggc tcctgcacag tgactacatg aacatgactc cccgccgccc cgggcccacc 1080

cgcaagcatt accagcccta tgccccacca cgcgacttcg cagcctatcg ctccaaacgg 1140

ggcagaaaga aactcctgta tatattcaaa caaccattta tgagaccagt acaaactact 1200

caagaggaag atggctgtag ctgccgattt ccagaagaag aagaaggagg atgtgaactg 1260

taa 1263

<210> 2

<211> 1269

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 2

atggcactgc ccgtgaccgc cctcctcctg cccctcgcgc tactcctgca cgccgccaga 60

cccgacgtgc agctcgtgca gtccggggcc gaggtcaaga agccaggcgc ctccgtgaaa 120
gtgtcgtgca aggcttccgg gtacacgttc acgaggtaca cgatgcactg ggtgcggcag 180
gcccccggcc agggcctgga gtggatcggc tacatcaatc cctctcgcgg ctacacaaat 240
tacgccgact ccgtgaaagg ccggttcacc attactaccg acaagtccac cagcactgcc 300
tatatggagc tgtccagtct ccgcagcgag gatacggcca cgtactactg tgcccgatac 360
tacgacgacc actactgcct ggactactgg gggcagggaa ccaccgtgac agtgtcttcc 420
ggggaaggga ccagcactgg ctcgggcggc tccgggggtt ccgggggtgc cgacgatatc 480

cagatgaccc aaagtcccag ctcgctgagc gccagtgtcg gcgatcgcgt gaccatcacc 540
tgccgcgcgt ctcagtctgt gtcctacatg aactggtacc agcaaaagcc cggtaaggcc 600
cccaagcgct ggatctacga caccagcaaa gtcgcctcgg gcgtccccgc ccggttcagc 660
gggtccgggt ccgggacaga ttactcgctc acgatcaact cgctggaggc ggaagacgcc 720
gcaacttatt attgccagca gtggagttcc aaccctctga ccttcggggg tggcacgaag 780
gtggaaatca aggcggccgc caccacgacg ccagcgccgc gaccaccaac accggcgccc 840
accatcgcgt cgcagcccct gtccctgcgc ccagaggcgt gccggccagc ggcgggggggc 900

gcagtgcaca cgagggggct ggacttcgcc tgtgattttt gggtgctggt ggtggttggt 960
ggagtcctgg cttgctatag cttgctagta acagtggcct ttattatttt ctgggtgagg 1020
agtaagagga gcaggctcct gcacagtgac tacatgaaca tgactccccg ccgccccggg 1080
cccacccgca agcattacca gccctatgcc ccaccacgcg acttcgcagc ctatcgctcc 1140
aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa 1200
actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt 1260
gaactgtaa 1269

<210> 3
<211> 624
<212> DNA
<213> Homo Sapiens
<400> 3
atggcgcgcg gcctccagct tctgctcctg agctgcgcct acagcctggc tcccgcgacg 60
ccggaggtga aggtggcttg ctccgaagat gtggacttgc cctgcaccgc cccctgggat 120
ccgcaggttc cctacacggt ctcctgggtc aagttattgg agggtggtga agagaggatg 180
gagacacccc aggaagacca cctcagggga cagcactatc atcagaaggg gcaaaatggt 240

tctttcgacg cccccagccg ccatgaaagg ccctattccc tgaagatccg aaacactacc 300

agctgcaact cggggacata caggtgcact ctgcaggacc cggatgggca gagaaaccta 360

agtggcaagg tgatcttgag agtgacagga tgccctgcac agcgtaaaga agagactttt 420

aagaaataca gagcggagat tgtcctgctg ctggctctgg ttattttcta cttaacactc 480

atcattttca cttgtaagtt tgcacggcta cagagtatct tcccagattt ttctaaagct 540

ggcatggaac gagcttttct cccagttacc tccccaaata agcatttagg gctagtgact 600

cctcacaaga cagaactggt atga 624

<210> 4

<211> 990

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 4

atggatcccc agtgcactat gggactgagt aacattctct ttgtgatggc cttcctgctc 60

tctggtgctg ctcctctgaa gattcaagct tatttcaatg agactgcaga cctgccatgc 120

caatttgcaa actctcaaaa ccaaagcctg agtgagctag tagtattttg gcaggaccag 180

gaaaacttgg ttctgaatga ggtatactta ggcaaagaga aatttgacag tgttcattcc 240

aagtatatgg gccgcacaag ttttgattcg gacagttgga ccctgagact tcacaatctt 300

cagatcaagg acaagggctt gtatcaatgt atcatccatc acaaaaagcc cacaggaatg 360

attcgcatcc accagatgaa ttctgaactg tcagtgcttg ctaacttcag tcaacctgaa 420

atagtaccaa tttctaatat aacagaaaat gtgtacataa atttgacctg ctcatctata 480

cacggttacc cagaacctaa gaagatgagt gttttgctaa gaaccaagaa ttcaactatc 540

gagtatgatg gtgttatgca gaaatctcaa gataatgtca cagaactgta cgacgtttcc 600

atcagcttgt ctgtttcatt ccctgatgtt acgagcaata tgaccatctt ctgtattctg 660

gaaactgaca agacgcggct tttatcttca cctttctcta tagagcttga ggaccctcag 720

cctccccccag accacattcc ttggattaca gctgtacttc caacagttat tatatgtgtg 780

atggttttct gtctaattct atggaaatgg aagaagaaga agcggcctcg caactcttat 840

aaatgtggaa ccaacacaat ggagagggaa gagagtgaac agaccaagaa aagagaaaaa 900

atccatatac ctgaaagatc tgatgaagcc cagcgtgttt ttaaaagttc gaagacatct 960

tcatgcgaca aaagtgatac atgtttttaa 990

<210> 5

<211> 765

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 5

atggaatacg cctctgacgc ttcactggac cccgaagccc cgtggcctcc cgcgccccgc 60

gctcgcgcct gccgcgtact gccttgggcc ctggtcgcgg ggctgctgct gctgctgctg 120

ctcgctgccg cctgcgccgt cttcctcgcc tgcccctggg ccgtgtccgg ggctcgcgcc 180

tcgcccggct ccgcggccag cccgagactc cgcgagggtc ccgagctttc gcccgacgat 240

cccgccggcc tcttggacct gcggcagggc atgtttgcgc agctggtggc ccaaaatgtt 300

ctgctgatcg atgggcccct gagctggtac agtgacccag gcctggcagg cgtgtccctg 360

acgggggcc tgagctacaa agaggacacg aaggagctgg tggtggccaa ggctggagtc 420

tactatgtct tctttcaact agagctgcgg cgcgtggtgg ccggcgaggg ctcaggctcc 480

gtttcacttg cgctgcacct gcagccactg cgctctgctg ctggggccgc cgccctggct 540

ttgaccgtgg acctgccacc cgcctcctcc gaggctcgga actcggcctt cggtttccag 600

ggccgcttgc tgcacctgag tgccggccag cgcctgggcg tccatcttca cactgaggcc 660

agggcacgcc atgcctggca gcttacccag ggcgccacag tcttgggact cttccgggtg 720

acccccgaaa tcccagccgg actcccttca ccgaggtcgg aataa 765

<210> 6

<211> 717

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 6

atgcagatcc cacaggcgcc ctggccagtc gtctgggcgg tgctacaact gggctggcgg 60

ccaggatggt tcttagactc cccagacagg ccctggaacc cccccacctt ctccccagcc 120

ctgctcgtgg tgaccgaagg ggacaacgcc accttcacct gcagcttctc caacacatcg 180

gagagcttcg tgctaaactg gtaccgcatg agccccagca accagacgga caagctggcc 240

gccttccccg aggaccgcag ccagcccggc caggactgcc gcttccgtgt cacacaactg 300

cccaacgggc gtgacttcca catgagcgtg gtcagggccc ggcgcaatga cagcggcacc 360

tacctctgtg gggccatctc cctggccccc aaggcgcaga tcaaagagag cctgcgggca 420

gagctcaggg tgacagagag aagggcagaa gtgcccacag cccaccccag cccctcaccc 480

aggccagccg gccagttcca aaccctggtg ttttgggtgc tggtggtggt tggtggagtc 540

ctggcttgct atagcttgct agtaacagtg gcctttatta ttttctgggt gaggagtaag 600

aggagcaggc tcctgcacag tgactacatg aacatgactc cccgccgccc cgggcccacc 660

cgcaagcatt accagcccta tgccccacca cgcgacttcg cagcctatcg ctcctaa 717

<210> 7

<211> 1461

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 7

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60

ccggacatcc agatgacaca gactacatcc tccctgtctg cctctctggg agacagagtc 120

accatcagtt gcagggcaag tcaggacatt agtaaatatt taaattggta tcagcagaaa 180

ccagatggaa ctgttaaact cctgatctac catacatcaa gattacactc aggagtccca 240

tcaaggttca gtggcagtgg gtctggaaca gattattctc tcaccattag caacctggag 300

caagaagata ttgccactta cttttgccaa cagggtaata cgcttccgta cacgttcgga 360

gggggggacta agttggaaat aacaggtggc ggtggctcgg gcggtggtgg gtcgggtggc 420

ggcggatctg aggtgaaact gcaggagtca ggacctggcc tggtggcgcc ctcacagagc 480

ctgtccgtca catgcactgt ctcaggggtc tcattacccg actatggtgt aagctggatt 540

cgccagcctc cacgaaaggg tctggagtgg ctgggagtaa tatggggtag tgaaaccaca 600

tactataatt cagctctcaa atccagactg accatcatca aggacaactc caagagccaa 660

gttttcttaa aaatgaacag tctgcaaact gatgacacag ccatttacta ctgtgccaaa 720

cattattact acggtggtag ctatgctatg gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc 780

gtctcctcaa ccacgacgcc agcgccgcga ccaccaacac cggcgcccac catcgcgtcg 840

cagcccctgt ccctgcgccc agaggcgtgc cggccagcgg cgggggcgc agtgcacacg 900

agggggctgg acttcgcctg tgatatctac atctgggcgc ccttggccgg gacttgtggg 960

gtccttctcc tgtcactggt tatcaccctt tactgcaaac ggggcagaaa gaaactcctg 1020

tatatattca aacaaccatt tatgagacca gtacaaacta ctcaagagga agatggctgt 1080

agctgccgat ttccagaaga agaagaagga ggatgtgaac tgagagtgaa gttcagcagg 1140

agcgcagacg cccccgcgta ccagcagggc cagaaccagc tctataacga gctcaatcta 1200

ggacgaagag aggagtacga tgttttggac aagagacgtg gccgggaccc tgagatgggg 1260

ggaaagccga gaaggaagaa ccctcaggaa ggcctgtaca atgaactgca gaaagataag 1320

atggcggagg cctacagtga gattgggatg aaaggcgagc gccggagggg caaggggcac 1380

gatggccttt accagggtct cagtacagcc accaaggaca cctacgacgc ccttcacatg 1440

caggccctgc cccctcgcta a 1461