



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0049813
(43) 공개일자 2024년04월17일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 14/54* (2024.01)
C07K 14/725 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2023.05)
A61K 39/4611 (2023.05)
- (21) 출원번호 10-2024-7007741
- (22) 출원일자(국제) 2022년08월23일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년03월07일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2022/073462
- (87) 국제공개번호 WO 2023/025788
 국제공개일자 2023년03월02일
- (30) 우선권주장
 21192853.6 2021년08월24일
 유럽특허청(EPO)(EP)
- (71) 출원인
 에플 뿔리떼끄너 빼데탈 드 로잔느 (으삐에프엘)
 스위스 체하-1015 로잔느, 으삐에프엘 이노베이션
 파크 제이, 으삐에프엘-티티오
- (72) 발명자
 구오 위강
 중국 저지양 310058 항조우 시후 디스트릭트 치우
 시 빌리지 41# 룸 302
- 탕 리
 스위스 1112 에치첸스 체민 데스 제니브리어스 6
- 자오 양
 스위스 1004 로잔 체민 데스 클로체톤스 1
- (74) 대리인
 특허법인태평양

전체 청구항 수 : 총 31 항

(54) 발명의 명칭 **항상된 암 면역치료법을 위한 IL-10 발현 세포**

(57) 요약

본 발명은 일반적으로 항암 치료법의 분야, 특히 암, 특히 고형 종양을 치료하기 위한 입양적 T 세포 전달 치료법의 용도에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 하나 이상의 재조합 구조체를 포함하는 면역 세포에 관한 것이며, 여기서 적어도 하나의 재조합 구조체는 인터루킨-10, 그의 단편 또는 변이체를 암호화한다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61K 39/4631 (2023.05)
A61K 39/464404 (2023.05)
A61K 39/464406 (2023.05)
A61K 39/464412 (2023.05)
C07K 14/5428 (2013.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 16/2803 (2013.01)
C07K 16/2863 (2013.01)
C07K 16/32 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

인터루킨-10, 그의 단편 또는 변이체를 발현하는 면역 세포로서,

상기 면역 세포는 하나 이상의 재조합 구조체를 포함하고, 적어도 하나의 재조합 구조체는 인터루킨-10, 그의 단편 또는 변이체를 암호화하는 면역 세포.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

제2 재조합 구조체는 키메라 항원 수용체(CAR), T 세포 수용체(TCR) 또는 임의의 다른 합성 종양 표적화 모티프를 암호화하는 면역 세포.

청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

상기 면역 세포는 T 세포, 키메라 항원 수용체(CAR)-T 세포, T 세포 수용체(TCR)-유전자이식 T 세포, 종양 침윤 림프구(TIL), NK 세포, NK-T 세포, CAR-NK 세포, CAR-NKT 세포, TCR-유전자이식 NK 세포, TCR-유전자이식 NK-T 세포, 수지상 세포, 대식세포, CAR-대식세포 또는 임의의 합성 종양 특이적 면역 세포인 면역 세포.

청구항 4

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서,

인터루킨-10, 그의 단편 또는 변이체를 암호화하는 구조체는 서열번호 1의 서열, 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함하거나 이를 암호화하는 면역 세포.

청구항 5

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서,

인터루킨-10, 그의 단편 또는 변이체를 암호화하는 재조합 구조체는 CAR, TCR, 또는 임의의 다른 합성 종양 표적화 모티프를 암호화하는 제2 재조합 구조체에 결합되는 면역 세포.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

인터루킨-10, 그의 단편 또는 변이체를 암호화하는 재조합 구조체는 자가-절단 펩티드(예컨대, 펩티드 2A)를 암호화하는 서열을 통해 CAR, TCR 또는 임의의 다른 합성 종양 표적화 모티프를 암호화하는 제2 재조합 구조체에 결합되는 면역 세포.

청구항 7

청구항 5 또는 청구항 6에 있어서,

CAR을 암호화하는 제2 재조합 구조체는 항체로부터 유래되는 단일-사슬 단편 변이체(scFv)의 세포외 항원 인식 도메인을 함유하는 면역 세포.

청구항 8

청구항 5 내지 청구항 7 중 어느 한 항에 있어서,

CAR을 암호화하는 제2 재조합 구조체는 막통과 영역의 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 함유하는 면역 세포.

청구항 9

청구항 5 내지 청구항 8 중 어느 한 항에 있어서,

CAR을 암호화하는 제2 재조합 구조체는 CD3 ζ 의 세포내 T 세포 활성화 도메인의 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 함유하는 면역 세포.

청구항 10

청구항 5 내지 청구항 9 중 어느 한 항에 있어서,

CAR을 암호화하는 제2 재조합 구조체는 4-1BB 또는 CD28 또는 4-1BB 및 CD28 세포내 영역의 조합을 함유하는 면역 세포.

청구항 11

청구항 5 내지 청구항 10 중 어느 한 항에 있어서,

i) 항체로부터 유래되는 단일-사슬 단편 변이체(scFv)의 세포외 항원 인식 도메인은 c-MET, CD7, CD19, CD20, CD22, CD38, CD123, CD133, CD171, CD70, BCMA, CEA, EGFR-VIII, EpCAM, EphA2, FAP, GD2, GPC3, HER2, IL-13Ra2, 메소텔린, MUC1, PSCA, PSMA, ROR1, VEGFR2, 클라우딘 18.2를 포함하는 군으로부터 선택되는 항원을 인식하거나, 또는

ii) TCR은 gp100, NY-ESO-1, MAGE-A3 및 TRP-1, 또는 이들 중 하나 이상의 조합을 포함하는 군으로부터 선택되는 항원을 인식하는 면역 세포.

청구항 12

청구항 1 내지 청구항 11 중 어느 한 항에 있어서,

상기 인터루킨-10, 그의 단편 또는 변이체는 바람직하게는 중앙 미세환경에서 면역 세포에 의해 분비되거나 막에 결합되는 면역 세포.

청구항 13

청구항 1 내지 청구항 12 중 어느 한 항에 있어서,

인터루킨-10, 그의 단편 또는 변이체를 암호화하는 구조체는 Fc, HSA, 또는 항체 융합 단백질을 암호화하는 서열 내에 또는 서열 없이 포함되는 면역 세포.

청구항 14

청구항 1 내지 청구항 13 중 어느 한 항에 있어서,

암의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위한 것이고, 상기 암은 고형 또는 액상 암인 면역 세포.

청구항 15

청구항 14에 있어서,

상기 고형 암은 폐암, 유방암, 난소암, 경부암, 자궁암, 두경부암, 교모세포종, 간세포 암종, 결장암, 직장암, 결장직장 암종, 신장암, 전립선암, 위암, 기관지암, 췌장암, 방광암, 간암, 뇌암 및 피부암, 특히 흑색종, 또는 이들 중 하나 이상의 조합을 포함하는 군으로부터 선택되는 면역 세포.

청구항 16

청구항 1 내지 청구항 15 중 어느 한 항에 있어서,

상기 면역 세포는 자가성, 동종성, 또는 이종성인 면역 세포.

청구항 17

청구항 7 또는 청구항 11에 있어서,

항체로부터 유래되는 단일-사슬 단편 변이체(scFv)의 세포의 항원 인식 도메인은 HER2, TRP-1, EGFRvIII, 및 CD19를 포함하는 군으로부터 선택되는 항원을 인식하는 면역 세포.

청구항 18

청구항 17에 있어서,

HER2를 인식하는 scFv의 아미노산 서열은 서열번호 2에 나타난 서열, 그의 단편 또는 변이체인 면역 세포.

청구항 19

청구항 17에 있어서,

TRP-1을 인식하는 scFv의 아미노산 서열은 서열번호 3에 나타난 서열, 그의 단편 또는 변이체인 면역 세포.

청구항 20

청구항 17에 있어서,

EGFRvIII을 인식하는 scFv의 아미노산 서열은 서열번호 4에 나타난 서열, 그의 단편 또는 변이체인 면역 세포.

청구항 21

청구항 17에 있어서,

CD19를 인식하는 scFv의 아미노산 서열은 서열번호 5에 나타난 서열, 그의 단편 또는 변이체인 면역 세포.

청구항 22

청구항 8 내지 청구항 21 중 어느 한 항에 있어서,

CD8 막통과 도메인 및 힌지의 폴리펩티드의 아미노산 서열은 서열번호 6에 나타난 서열, 그의 단편 또는 변이체인 면역 세포.

청구항 23

청구항 9 내지 청구항 22 중 어느 한 항에 있어서,

CD3 ζ 의 세포내 T 세포 활성화 도메인의 폴리펩티드의 아미노산 서열은 서열번호 7에 나타난 서열, 그의 단편 또는 변이체인 면역 세포.

청구항 24

치료적 유효량의 i) 청구항 1 내지 청구항 23 중 어느 한 항의 면역 세포, ii) 청구항 1 내지 청구항 23 중 어느 한 항에 기술된 것과 같은 하나 이상의 재조합 구조체를 암호화하는 핵산, 및/또는 iii) 청구항 1 내지 청구항 23 중 어느 한 항에 기술된 하나 이상의 재조합 구조체를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 플라스미드 또는 벡터, 및 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 25

청구항 24에 있어서,

적어도 하나의 부가적인 치료제 또는 치료법을 추가로 포함하는 약학적 조성물.

청구항 26

청구항 25에 있어서,

적어도 하나의 부가적인 치료제 또는 치료법은 암, 바람직하게는 고형 암을 치료하는데 유용한 항암제 또는 항암 치료법 및/또는 항염증제인 약학적 조성물.

청구항 27

청구항 26에 있어서,

상기 항암 치료법은 방사선치료법, 화학치료법, 면역 체크포인트 억제제, 면역치료법 및 호르몬 치료법, 또는 이들 중 하나 이상의 조합을 포함하는 군으로부터 선택되는 약학적 조성물.

청구항 28

청구항 27에 있어서,

상기 면역 체크포인트 억제제는 PD-1 억제제, PD-L1 억제제, 및 CTLA-4 억제제, 또는 이들 중 하나 이상의 조합을 포함하는 군으로부터 선택되는 약학적 조성물.

청구항 29

청구항 24 내지 청구항 28 중 어느 한 항의 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 암을 치료 및/또는 예방하는 방법.

청구항 30

(i) 대상체로부터 면역 세포, 바람직하게는 자연형 T 세포를 제거 및 단리하거나, 면역 세포, 바람직하게는 자연형 T 세포를 제공하는 단계, (ii) 상기 T 세포를 인터루킨-10, 그의 단편 또는 변이체를 암호화하는 적어도 하나의 재조합 구조체 및 키메라 항원 수용체(CAR), T 세포 수용체(TCR) 또는 임의의 다른 합성 종양 표적화 모티프 또는 항원을 암호화하는 제2 재조합 구조체로 유전자적으로 조작하는 단계, (iii) 조작된 T 세포의 더 큰 개체군으로 생체외에서 확장하는 단계, 및 (iv) 환자 또는 대상체 내로 재도입하는 단계를 포함하는 대상체에서 암을 치료 및/또는 예방하는 방법.

청구항 31

(i) 대상체로부터 면역 세포, 바람직하게는 자연형 T 세포를 제거 및 단리하거나, 면역 세포, 바람직하게는 자연형 T 세포를 제공하는 단계, (ii) 상기 T 세포를 인터루킨-10, 그의 단편 또는 변이체를 암호화하는 적어도 하나의 재조합 구조체 및 키메라 항원 수용체(CAR), T 세포 수용체(TCR) 또는 임의의 다른 합성 종양 표적화 모티프 또는 항원을 암호화하는 제2 재조합 구조체로 유전자적으로 조작하는 단계, (iii) 조작된 T 세포의 더 큰 개체군으로 생체외에서 확장하는 단계, 및 (iv) 환자 또는 대상체 내로 재도입하는 단계를 포함하는 대상체에서 항-종양 활성을 향상시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 항암 치료법의 분야, 특히 암, 특히 고형 종양을 치료하기 위한 입양적(adoptive) T 세포 전달 치료법의 용도에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 하나 이상의 재조합 구조체(construct)를 포함하는 면역 세포에 관한 것이며, 여기서 적어도 하나의 재조합 구조체는 인터루킨(interleukin)-10, 그의 단편 또는 변이체를 암호화한다.

배경 기술

[0002] 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포 및 T 세포 수용체(TCR) 유전자이식 T 세포(모두 '입양적 T 세포 전달' 치료법이라 부름)는 유전자적으로 조작된 T-세포 기반 입양적 전달 면역치료법이다. 예를 들면, CAR T 세포는 임상에서, 특히 혈액학적 악성물에서 유망한 결과를 보였지만, 고형 종양에서는 진전이 제한적이었다(Lim, W. A. & June, C. H. The Principles of Engineering Immune Cells to Treat Cancer. Cell 168, 724-740 (2017)).

[0003] 종양 미세환경(TME) 내의 CAR T 세포는 고형 종양에서 지속되는 항원 자극 및 다른 대사적 스트레스에 의해 일어날 수 있는 T 세포 '고갈(exhaustion)'에 의해 정의되는 이펙터(effector) 기능 및 증식 능력의 상실을 보이는 것으로 발표되었다(Schietinger, A. et al. Tumor-Specific T Cell Dysfunction Is a Dynamic Antigen-Driven Differentiation Program Initiated Early during Tumorigenesis. Immunity 45, 389-401 (2016); Vodnala, S. K. et al. T cell stemness and dysfunction in tumors are triggered by a common mechanism. Science 363, (2019)).

[0004] 고갈된 T 세포는 저해된 미토콘드리아 호흡을 나타내고, 이러한 불량한 대사적 적합성(metabolic fitness)은 T 세포 고갈을 강화시키고 항-종양 면역 반응을 손상시킬 수 있는 것으로 발표되었다. 입양적으로 전달된 CAR T

세포의 확장기 동안의 대사적 개입은 생체내 분화를 조정하고 항-종양 반응을 개선하는 것으로 나타났다 (Alizadeh, D. et al. IL15 Enhances CAR T Cell Antitumor Activity by Reducing mTORC1 Activity and Preserving Their Stem Cell Memory Phenotype. Cancer Immunol. Res. 7, 759-772 (2019)).

[0005] [0002] 그러나, 이러한 타입의 개입은 적용된 사이토카인(cytokine)이 구성적으로 공급되지 않거나 고갈로부터 T 세포를 충분히 구제하기에는 제한적인 대사적 재프로그래밍 능력에 의해 유발될 수 있는 준최적 항-종양 효과를 유도하였다.

[0006] 따라서, TME 내에서의 면역 세포의 대사적 적합성, 확장, 및 생존을 뒷받침하는 가공 공정뿐만 아니라, 향상된 항-종양 활성을 갖는 효과적인 면역 세포의 개발이 여전히 시급히 요구되고 있다.

발명의 내용

[0007] 본 발명은 인터루킨-10, 그의 단편 또는 변이체를 발현하는 면역 세포를 제공하며, 상기 면역 세포는 하나 이상의 재조합 구조체를 포함하고, 여기서 적어도 하나의 재조합 구조체는 인터루킨-10, 그의 단편 또는 변이체를 암호화한다.

[0008] 본 발명의 하나 이상의 재조합 구조체를 암호화하는 핵산 서열을 암호화하는 핵산 서열이 추가로 제공된다.

[0009] 본 발명의 핵산 서열을 포함하는 플라스미드(plasmid) 또는 벡터(vector)가 추가로 제공된다.

[0010] i) 본 발명의 면역 세포, ii) 본 발명의 핵산, 및/또는 iii) 본 발명의 플라스미드 또는 벡터, 및 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 약학적 조성물이 추가로 제공된다.

[0011] 본 발명의 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 암을 치료 및/또는 예방하는 방법이 또한 제공된다.

[0012] (i) 대상체로부터 면역 세포, 바람직하게는 자연형 T 세포를 제거 및 단리하거나, 면역 세포, 바람직하게는 자연형 T 세포를 제공하는 단계, (ii) 상기 T 세포를 인터루킨-10, 그의 단편 또는 변이체를 암호화하는 적어도 하나의 재조합 구조체 및 키메라 항원 수용체(CAR), T 세포 수용체(TCR) 또는 임의의 다른 합성 종양 표적화 모티프(motif) 또는 항원을 암호화하는 제2 재조합 구조체로 유전자적으로 조작하는 단계, (iii) 조작된 T 세포의 더 큰 개체군(population)으로 생체외에서 확장하는 단계, 및 (iv) 환자 또는 대상체 내로 재도입하는 단계를 포함하는 대상체에서 암을 치료 및/또는 예방하는 방법이 또한 제공된다.

[0013] [0003] (i) 대상체로부터 면역 세포, 바람직하게는 자연형 T 세포를 제거 및 단리하거나, 또는 면역 세포, 바람직하게는 자연형 T 세포를 제공하는 단계, (ii) 상기 T 세포를 인터루킨-10, 그의 단편 또는 변이체를 암호화하는 적어도 하나의 재조합 구조체 및 키메라 항원 수용체(CAR), T 세포 수용체(TCR) 또는 임의의 다른 합성 종양 표적화 모티프 또는 항원을 암호화하는 제2 재조합 구조체로 유전자적으로 조작하는 단계, (iii) 조작된 T 세포의 더 큰 개체군으로 생체외에서 확장하는 단계, 및 (iv) 환자 또는 대상체 내로 재도입하는 단계를 포함하는 대상체에서 항-종양 활성을 향상시키는 방법이 또한 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0014] **도 1** - IL-10을 공발현하는 HER2-특이적 CAR T 세포(IL-10 HER2 CAR T)는 항원 자극시 CAR T 세포의 OXPHOS를 향상시키고 CAR T 세포의 증식을 촉진한다. (a) HER2-지향 2세대 CAR(HER2 CAR), 및 2A 요소 이후 무린(murine) IL-10을 발현하도록 변형된 HER2-지향 2세대 CAR(HER2 CAR-IL-10)의 개략도. (b) HER2 CAR 또는 HER2 CAR-IL-10 구조체를 이용한 형질도입은 레트로바이러스 벡터에 의해 수행되었다. CAR의 발현 레벨은 유세포분석(flow cytometry)에 의해 분석되었다. 히스토그램 내의 숫자는 HER2 CAR 양성적으로 염색된 세포의 백분율을 나타낸다. 10 회의 독립적 실험으로부터 유사한 결과가 얻어졌다. (c) CAR T 세포는 마이토마이신(mitomycin) C-처리된 MC38-HER2(HER2-발현 MC38 결장암 세포)와 3일 동안 공배양되었다. 배양 상등액은 효소-결합 면역흡착 분석법(ELISA)에 의해 IL-10의 농도에 대해 조사되었다. (d, e) CAR T 세포는 세포 트래커(tracker) CFSE로 표지되었고, 표시된 기간 동안 1:1의 이펙터:표적(E:T) 비에서 마이토마이신-C-처리된 MC38-HER2 세포와 공배양되었다. (d) 상이한 날짜에 살아있는 HER2 CAR T 또는 IL-10 HER2 CAR T의 절대 수. (e) 인산염-완충 식염수(PBS), 이소형 대조군 항체, 또는 항-IL-10 mAb의 존재 하에 HER2 CAR T 또는 IL-10 HER2CAR T 세포 분열의 백분율. (f) 5:1의 E:T 비에서 24시간 동안 MC38-HER2로 자극된 CAR T 세포의 대표적인 산소 소비율(OCR) 자취. (g) (f)와 같이 처리된 세포에 대한 대표적인 세포의 산성화율(ECAR) 자취. (h) (f)로부터의 기저 OCR의 통계적 분석. (i) (g)로부터의 기저 ECAR의 통계적 분석. (j) (f) 및 (g)로부터의 OCR/ECAR의 비. 데이터는 평균±SEM

을 나타낸다. 적어도 3 회의 독립적 실험으로부터 유사한 결과가 얻어졌다.

[0004] 도 2 - IL-10 HER2 CAR T 세포는 피루베이트-독립적 방식을 통해 CAR T 세포의 항-종양 활성을 향상시킨다. (a) 표적으로서 MC38-HER2 세포를 이용한 세포독성 분석법. 표적 세포는 표시된 E:T 비에서 HER2 CAR T 또는 IL-10 HER2 CAR T 세포와 혼합되었다. (b, c, d) 형질도입되지 않은 대조군 T 세포(ctr1 T), 0 및 145 ng/ml의 존재 하의 마우스 재조합 IL-10(mIL-10), 또는 IL-10 HER2 CAR T 세포는 0.5:1의 E:T 비에서 48시간 동안 MC38-HER2 세포와 공배양한다. (b) MC38-HER2 종양 세포 살상 백분율, (c) 살아있는 CAR T 세포 카운트(count)는 유세포분석에 의해 분석되었다. (d) 공배양물 또는 휴지기에서 다기능성 CAR T 세포의 비는 세포내 사이토카인 염색에 의해 평가되었다.

도 3 - IL-10 HER2 CAR T 치료법은 확립된 마우스 MC38-HER2 결장 선암종을 근절한다. C57BL/6 마우스는 MC38-HER2 세포(3×10^5)로 피하 접종되었고, 각각 HER2 CAR T 세포(3×10^6), IL-10 HER2 CAR T 세포(3×10^6), 또는 HER2 CAR T 세포(3×10^6)를 정맥내(i.v.) 입양적 세포 전달을 받은 후, 6일에 mIL-10(1 μ g)을 정맥내 투여하였다. 각각의 처리군의 평균 종양 성장 곡선(a) 및 생존 곡선(b)이 나타나 있다. 군 내의 마우스의 총 수 중에서 장기간 생존하는 마우스의 수가 나타나 있다. (c) IL-10 HER2 CAR T 단일치료법의 처리군으로부터의 생존체는 1차 접종 90일 후에 MC38-HER2(1×10^6) 세포로 피하에 재시도되었다. 나이브(naive) WT 마우스(n=5)는 대조군으로서 동일한 수의 종양 세포로 접종되었다. 재시도에 대해 장기간 생존하는 마우스의 생존 곡선 및 수가 나타나 있다. 데이터는 평균 \pm SEM을 나타낸다.

도 4 - TRP-1 IL-10 CAR T 치료법은 마우스 B16F10 흑색종 모델에서 생존을 연장시킨다. (a) TRP-1-지향 2세대 CAR(TRP-1 CAR), 및 2A 요소 이후 뮤린 IL-10을 발현하도록 변형된 TRP-1-지향 2세대 CAR(IL-10 TRP-1 CAR)의 개략도. (b) TRP-1 CAR 또는 IL-10 TRP-1 CAR 구조체를 이용한 형질도입은 레트로바이러스 벡터에 의해 수행되었다. CAR의 발현 레벨은 유세포분석에 의해 분석되었다. 히스토그램 내의 숫자는 c-Myc 태그(tag)로 양성적으로 염색된 세포의 백분율을 나타낸다. 10 회의 독립적 실험으로부터 유사한 결과가 얻어졌다. (c, d) 0 및 145 ng/ml의 마우스 재조합 IL-10(mIL-10)의 존재 하의 TRP-1 CAR T, 또는 IL-10 TRP-1 CAR T 세포는 0.5:1의 E:T 비에서 48시간 동안 B16F10 세포와 공배양한다. (c) B16F10 종양 세포 살상 백분율, 및 (d) 살아있는 CAR T 세포 카운트는 유세포분석에 의해 분석되었다. (e, f) C57BL/6 마우스는 B16F10 흑색종 세포(3×10^5)로 피하 접종되었고, 6일에 각각 TRP-1 CAR T 세포(3×10^6), IL-10 TRP-1 CAR T 세포(3×10^6)의 정맥내 입양적 세포 전달을 받았다. 각각의 처리군의 평균 종양 성장 곡선(e) 및 생존 곡선(f)이 나타나 있다. 데이터는 평균 \pm SEM을 나타낸다.

[0005] 도 5 - IL-10 EGFRvIII CAR T 세포를 이용한 치료에 의한 사전-확립된 마우스 4T1-Luc-EGFRvIII 전이성 유방 암종 모델의 완전한 관해(regression). (a) EGFRvIII-지향 2세대 CAR(EGFRvIII CAR), 및 2A 요소 이후 뮤린 IL-10을 발현하도록 변형된 EGFRvIII-지향 2세대 CAR(IL-10 EGFRvIII CAR)의 개략도. (b) CAR의 발현 레벨은 유세포분석에 의해 분석되었다. 히스토그램 내의 숫자는 c-Myc 태그로 양성적으로 염색된 세포의 백분율을 나타낸다. 10 회의 독립적 실험으로부터 유사한 결과가 얻어졌다. (c) CAR T 세포는 마이토마이신 C-처리된 4T1-Luc-EGFRvIII과 3일 동안 공배양되었다. 배양 상등액은 ELISA에 의해 IL-10의 농도에 대해 조사되었다. (d, e) Ctrl T, 0 및 145 ng/ml의 mIL-10의 존재 하의 EGFRvIII CAR T, 또는 IL-10 EGFRvIII CAR T 세포는 0.5:1의 E:T 비에서 48시간 동안 4T1-Luc-EGFRvIII 세포와 공배양한다. (d) 4T1-Luc-EGFRvIII 종양 세포 살상 백분율, 및 (e) 살아있는 CAR T 세포 카운트는 유세포분석에 의해 분석되었다. (f-h) BALB/c 마우스는 4T1-Luc-EGFRvIII 세포(5×10^4)로 정맥내 주사되었고, EGFRvIII CAR T 세포(3×10^6), IL-10 EGFRvIII CAR T 세포(3×10^6), 또는 EGFRvIII CAR T 세포(3×10^6)의 정맥내 입양적 세포 전달을 받은 후, 각각 6일에 mIL-10(1 μ g)의 정맥내 투여를 받았다. (f) 상이한 시점에서 마우스 군의 개별 평균 광휘도(radiance)(p/s/cm²/sr). (g) 각각의 처리군의 생존 곡선 및 군 내의 마우스의 총 수 중에서 장기간 생존하는 마우스의 수가 나타나 있다. (h) 유세포분석에 의해 정량화된, 15일에 혈액에서의 CAR T 세포의 수. 데이터는 평균 \pm SEM을 나타낸다.

도 6 - IL-10 Pmel TCR T 치료법은 마우스 B16F10 흑색종 모델에서 생존을 연장시킨다. (a) IL-10 구조체를 이용한 형질도입은 레트로바이러스 벡터에 의해 수행되었다. IL-10의 발현 레벨은 ELISA에 의해 분석되었다. (b-f) C57BL/6 마우스는 B16F10 흑색종 세포(3×10^5)로 피하 접종되었고, 6일에 각각 Pmel T 세포(10×10^6) 또는 IL-10 Pmel T 세포(10×10^6)의 정맥내 입양적 세포 전달을 받았다. (b-d) PBS 대조군의 개별 종양 성장 곡선

(b), Pmel T 세포 치료법(c) 및 IL-10 Pmel T 세포 치료법(d). (e, f) 각각의 처리군의 평균 종양 성장 곡선 (e) 및 생존 곡선(f)이 나타나 있다. 데이터는 평균±SEM을 나타낸다.

[0006] 도 7 - IL-10 CD19 인간 CAR T의 시험관내 특징분석. (a) CD19-지향 2세대 CAR(CD19 CAR), 및 인간 IL-10을 발현하도록 변형된 CD19-지향 2세대 CAR(IL-10 CD19 CAR)의 개략도. (b) CAR의 발현 레벨은 유세포분석에 의해 분석되었다. 10 회의 독립적 실험으로부터 유사한 결과가 얻어졌다. (c) 분비된 IL-10의 농도는 ELISA에 의해 검출되었다. (d) Ctrl T, CD19 CAR T, 또는 IL-10 CD19 CAR T 세포는 1:32의 E:T 비에서 표적 종양 세포와 공배양하고, 종양 세포 살상 백분율은 LDH 분석법에 의해 분석되었다. (e) 평균 종양 성장 곡선. NSG 마우스는 PANC1-CD19 인간 상피모양(epithelioid) 암종 세포(2×10^6)로 접종되었고(s.c.), 8일에 CD19 hCAR T 세포(1×10^6) 또는 IL-10 CD19 hCAR T 세포(1×10^6)의 정맥내 입양적 세포 전달을 받았다(군 당 n=9). 데이터는 평균 ±SEM을 나타낸다.

도 8 - IL-10 발현은 CAR-T 세포의 미토콘드리아 적합성을 지속시킨다. C57BL/6 마우스는 MC38-HER2 종양 세포(1×10^6 , s.c.)로 접종되고, 5일에 방사선조사에 의해 준치사적으로 림프구제거되고, 6일에 정맥내 투여된 IL-10($1 \mu\text{g}$)의 존재 또는 부재 하에 IL-10 HER2 CAR-T 세포(3×10^6), 또는 HER2 CAR-T 세포(3×10^6)의 정맥내 입양적 전달을 받았다(군 당 n=5). 14일에, 마우스는 살상되었고, 표시된 조직이 처리되었다. CAR-T 세포는 유세포분석에 의한 미토콘드리아 표현형 분석을 받거나 전자 현미경 분석을 위해 분류되었다. CAR-T 세포의 미토콘드리아 질량 및 막 전위는 각각 MitoTracker Green(MG) 및 MitoTracker Deep Red(MDR)을 이용한 염색에 의해 조사되었다. a. 기능장애 미토콘드리아를 갖는 HER2 CAR-T 세포의 빈도. b. 표시된 처리군으로부터의 종양-침윤 HER2 CAR-T 세포에서 MDR/MG의 비. c. 표시된 처리군으로부터 분류된 종양내 HER2 CAR-T 세포의 대표적인 전자 현미경 이미지. d-f, (c)에 나타난 것과 같은 분류된 종양내 HER2 CAR-T 세포에서 세포 당 미토콘드리아 수의 정량화(d), 미토콘드리아 당 크리스타(crista)의 수(e), 및 미토콘드리아 면적 당 총 크리스타의 길이(f). 모든 데이터는 평균±s.e.m.을 나타내며, 언페어드(unpaired) 스튜던트 t-테스트(d, e, f), 또는 터키 다중-비교 테스트를 이용한 1-원 ANOVA(a, b)에 의해 분석된다.

도 9 - 도 5에 기술된 것과 같은 IL-10 HER2 CAR-T 또는 IL-10 TRP-1 CAR-T 세포가 처리된 후의 마우스 생존체는 원발성 종양 접종 90일 후에 각각 MC38-HER2(1×10^6) 및 B16F10(1×10^5) 세포로 피하에 재시도되었다. 나이브 WT 마우스(군 당 n=5)는 대조군으로서 동일한 후의 종양 세포로 접종되었다. a, 실험 시간선. b, c, MC38-HER2(b) 및 B16F10 종양 모델(c)에서 2차 종양 시도를 거부하는 장기간 생존체의 생존 곡선 및 수가 나타나 있다.

[0007] 도 10 - IL-10 CAR-T 세포에 의해 처리된 마우스는 줄기 세포-유사 메모리(memory)를 유도하였다. C57BL/6 마우스는 MC38-HER2 세포(1×10^6 , s.c.)로 접종되고, 5일에 방사선조사에 의해 준치사적으로 림프구제거되고, 6일에 정맥내 투여된 IL-10($1 \mu\text{g}$)의 존재 또는 부재 하에 IL-10 HER2 CAR-T 세포(3×10^6), 또는 HER2 CAR-T 세포(3×10^6)의 정맥내 입양적 전달을 받았다(군 당 n=5). 18일에, 마우스는 비장 및 말초 혈액에서 유세포분석에 의한 CAR-T 세포의 표현형 분석을 위해 살상되었다. a, b, 비장에서 총 CAR-T 세포 중의 $\text{CD62L}^+ \text{CD44}^-$ (a) 및 $\text{CD62L}^+ \text{CD44}^-$ CAR-T 세포 중의 Sca-1⁺CD122⁺(b)의 평균 빈도. c, 비장에서 CAR-T 세포 내의 Sca-1 발현의 대표적인 유세포분석 플롯 및 평균 MFI. d, 비장 및 혈액(e)에서 CAR-T 세포의 표현형을 보여주는 대표적인 유세포분석 플롯. 비장(d) 및 혈액(e)에서 총 CAR-T 세포 중의 IL-7R α ⁺KLRG-1⁻의 빈도. 모든 데이터는 평균±s.e.m.을 나타내며, 터키 다중-비교 테스트를 이용한 1-원 ANOVA에 의해 분석된다(a-e).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 명세서에 기술된 것과 유사한 또는 등가인 방법 및 물질이 본 발명의 실행 또는 테스트에 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 물질이 아래에 기술된다. 본 명세서에 언급된 모든 공개문헌, 특허 출원, 특허, 및 다른 참조문헌은 그 전체가 인용에 의해 통합된다. 본 명세서에 논의된 공개문헌 및 출원은 단지 본 출원의 출원일 이전에 이들이 개시되었음을 위해 제공된다. 본 명세서의 어느 것도 본 발명이 선행 발명으로 인해 이러한 공개문헌에 선행할 자격이 없음을 인정하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 게다가, 상기 재료, 방법, 및 실시예는 예시일 뿐이며, 한정하기 위한 의도는 아니다.

- [0016] 상충이 있는 경우, 정의를 포함하는 본 명세서가 우선할 것이다. 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 명세서의 주제가 속하는 기술분야의 기술자에 의해 보통 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에서 사용될 때, 다음의 정의가 본 발명의 이해를 용이하게 하기 위해 제공된다.
- [0017] 용어 "포함하다/포함하는"은 일반적으로 "차지하다/차지하는"의 의미로 사용되며, 다시 말해 하나 이상의 특정 또는 성분의 존재를 허용하는 것이다. 용어 "포함하다" 및 "포함하는"은 또한 보다 제한적인 표현인 "이루어진 다", "이루어지는"뿐만 아니라 "본질적으로 이루어진다/이루어지는"을 각각 포괄한다.
- [0018] [0008] 명세서 및 청구항에서 사용될 때, 단수 형태 "하나", "한" 및 "상기"는 문맥이 달리 명확하게 나타내지 않는 한 복수의 참조물을 포함한다.
- [0019] 본 명세서에서 사용될 때, "적어도 하나"는 "하나 이상", "둘 이상", "셋 이상", 등을 의미한다. 예를 들면, 적어도 하나는 하나 이상의 구조체를 의미하며, 1개의 구조체, 2개의 구조체, 3개의 구조체, 등을 나타낸다.
- [0020] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "대상체"/"이를 필요로 하는 대상체", 또는 "환자"/"이를 필요로 하는 환자"는 본 기술분야에서 잘 인식되어 있으며, 개, 고양이, 래트, 마우스, 원숭이, 소, 말, 염소, 양, 돼지, 낙타, 및 가장 바람직하게는 인간을 포함하는 포유동물을 나타내기 위해 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다. 일부 경우에 있어서, 상기 대상체는 치료를 필요로 하는 대상체 또는 질환 또는 장애를 갖는 대상체이다. 그러나, 다른 측면에서, 상기 대상체는 정상 대상체일 수 있다. 상기 용어는 특정 연령 또는 성별을 나타내지 않는다. 따라서, 남성 또는 여성과 무관하게 성인 및 신생아 대상체를 아우르기 위한 의도이다. 바람직하게는, 상기 대상체는 인간, 가장 바람직하게는 암을 앓을 위험이 있을 수 있는 인간이다.
- [0021] 본 발명에 따르면, 상기 암은 고형 또는 액상 암이다. 한 측면에서, 상기 암은 고형 암이다. 바람직하게는, 상기 고형 암은 폐암, 유방암, 난소암, 경부암, 자궁암, 두경부암, 교모세포종, 간세포 암종, 결장암, 직장암, 결장직장 암종, 신장암, 전립선암, 위암, 기관지암, 췌장암, 방광암, 간암, 뇌암 및 피부암, 특히 흑색종, 또는 이들의 하나 이상의 조합을 포함하는 비제한적 군으로부터 선택된다.
- [0022] 용어 "핵산", "폴리뉴클레오티드," 및 "올리고뉴클레오티드"는 상호교환적으로 사용되며, 선형 또는 원형 입체 형태, 및 단일- 또는 이중-가닥 형태인 임의의 종류의 데옥시리보뉴클레오티드(예컨대, DNA, cDNA, ...) 또는 리보뉴클레오티드(예컨대, RNA, mRNA, ...) 폴리머 또는 데옥시리보뉴클레오티드 및 리보뉴클레오티드의 조합(예컨대, DNA/RNA) 폴리머를 나타낸다. 상기 용어는 폴리머의 길이에 관해 제한하는 것으로 해석되어서는 안되며, 자연형 뉴클레오티드의 공지된 유사체뿐만 아니라 염기, 당 및/또는 포스페이트 모이어티(moiety)(예컨대, 포스포로티오에이트 골격)가 변형된 뉴클레오티드를 포괄할 수 있다. 일반적으로, 특정 뉴클레오티드의 유사체는 동일한 염기-쌍 특이성을 가지며, 즉 A의 유사체는 T와 염기-쌍을 이룰 것이다.
- [0023] 용어 "백터"는, 본 명세서에서 사용될 때, 본 발명의 하나 이상의 이중성 핵산 서열(들)을 함유하고, 바람직하게는 상이한 숙주 세포 사이의 전달 및/또는 증폭을 목적으로 디자인된 바이러스 백터 또는 핵산(DNA 또는 RNA) 분자, 예컨대 플라스미드 또는 다른 비히클(vehicle)을 나타낸다.
- [0024] [0009] 용어 "발현 백터", "유전자 운반 백터" 및 "유전자 치료법 백터"는 바람직하게는 프로모터(promoter)의 조절 하에 세포에서 본 발명의 하나 이상의 핵산(들)을 통합 및 발현하기에 효과적인 임의의 백터를 나타낸다. 클로닝 또는 발현 백터는 부가적인 요소, 예를 들면, 프로모터에 더하여 조절 및/또는 전사-후 조절 요소를 포함할 수 있다.
- [0025] 본 명세서에서 사용될 때, 인터루킨-10(IL-10)은 IL-10 패밀리 사이토카인의 일원을 나타낸다. IL-10은 일반적으로 비제어된 염증 반응에 의해 유발되는 조직 손상을 감소시키기 때문에 면역억제성으로 간주된다. "IL-10, 그의 단편 또는 변이체"는 바람직하게는 자연형 인간 IL-10뿐만 아니라 그 전체 내용이 인용에 의해 본 명세서에 통합되는 [Mumm et al., 2011, Cancer Cell, 20, 781- 796]; [Guo et al., 2012, Protein Expr. Purif., 83, 152-156 (2012)]; [Zheng et al., 1997, J. Immunol., 158, 4507-13]; [Qiao et al., 2019, Cancer Cell 35, 901-915]; [Guo et al., 2021, Nat Immunol 22, 746-756]에 기술되어 있는 것과 같은 그의 단편 및 변이체의 서열을 포함하는 서열을 포함한다. 한 측면에서, 상기 IL-10 서열은 서열번호 1에 나타낸 인간 IL-10 아미노산 서열이다.
- [0026] IL-10에 대해 언급할 때, 용어 "변이체"는 IL-10, 바람직하게는 본 발명의 인간 IL-10 서열의 하나 이상의 생물학적으로 활성인 유도체를 의미한다. 일반적으로, 용어 "변이체"는, 변형이 그 생물학적 활성을 파괴하지 않고 참조 분자와 "실질적으로 상동성"인 한, 자연형 분자와 비교하여 하나 이상의 부가, 치환(일반적으로 본성이 보

존됨) 및/또는 결실을 갖는 자연형 서열을 갖는 분자를 나타낸다(Gorby et al., Sci. Signal. 13, eabc0653, 2020; Saxton et al., Science 371, eabc8433, 2021). 일반적으로, 이러한 변이체의 서열은 참조 서열과 높은 정도의 서열 상동성(homology) 또는 동일성(identity), 예컨대, 2개 서열이 정렬될 때 25% 이상, 일반적으로 50% 내지 70% 이상, 보다 더 특히 80%, 또는 85% 이상, 예컨대 적어도 90%, 또는 95% 이상의 서열 상동성 또는 동일성을 가질 것이다. Spencer, Juliet V 등은 스플라이싱(splicing) 형태의 IL-10이 hIL-10과 단지 27% 서열 동일성만을 가짐에도 불구하고 생물학적 활성 또는 특성을 유지함을 발표하였다(그 전체 내용이 인용에 의해 본 명세서에 통합되는 [Spencer, Juliet V et al. "Stimulation of B lymphocytes by cmvIL-10 but not LAcvIL-10." Virology vol. 374,1 (2008): 164-9. doi:10.1016/j.virol.2007.11.031]).

- [0027] [0010] 본 명세서에서 사용될 때, 본 발명의 IL-10, 바람직하게는 인간 IL-10의 "단편"은 해당 폴리펩티드 서열 또는 핵산 서열보다 길이가 짧은 뉴클레오티드를 함유하는 서열을 나타낸다. 바람직하게는, 상기 서열 또는 단편은 해당 폴리펩티드 서열 또는 핵산 서열보다 90% 미만, 바람직하게는 60% 미만, 특히 30% 미만의 길이의 뉴클레오티드를 함유한다.
- [0028] CAR 조작된 T 세포를 이용해 종양을 치료하기 위한 신규하고 효율적인 접근법의 개발에 초점을 맞추면서, 본 발명자들은 놀라게도 대사적으로 조작된 IL-10을 발현하는 CAR T는 CAR T 세포의 운명을 고갈로부터 벗어나서 메모리-유사 상태로 향하도록 제거당하여서, 처리된 마우스의 대부분에서 확립된 고형 종양의 근절 및 오랜 치유를 유도함을 보였다. 상기 유망한 결과는 임상에서 임상적 세포 치료법의 효능을 향상시키기 위한 IL-10을 발현하는 CAR T 또는 임의의 다른 조작된 면역 세포의 큰 잠재력의 증거가 되었다.
- [0029] 한 측면에서, 본 발명은 인터루킨-10, 그의 단편 또는 변이체를 발현하는 면역 세포, 또는 면역 세포의 개체군을 제공한다. 한 측면에서, 상기 면역 세포는 단리된 면역 세포이다.
- [0030] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "면역 세포"는 재조합(조작된) 여부와 무관하게 림프구, 호중구, 및 단핵구/대식세포로 카테고리화된 임의의 타입의 면역 세포를 포함한다. 바람직한 측면에서, 상기 면역 세포는 T 세포, 키메라 항원 수용체(CAR)-T 세포, T 세포 수용체(TCR)-유전자이식 T 세포, 종양 침윤 림프구(TIL), NK 세포, NK-T 세포, CAR-NK 세포, CAR-NKT 세포, TCR-유전자이식 NK 세포, TCR-유전자이식 NK-T 세포, 수지상 세포, 대식세포, CAR-대식세포 또는 임의의 합성 종양 특이적 면역 세포를 포함하는 비제한적 군 중에서 선택된다. 상기 면역 세포의 면역 세포 개체군은 다음일 수 있다:
- [0031] - 자가성, 즉 환자 자신의 면역 세포를 이용함,
- [0032] - 동종성, 즉 공여자 혈액, 제대혈 또는 다능성 줄기 세포(예컨대, 유전자적으로 조작될 수 있는 iPSC)로부터 수득됨, 또는
- [0033] - 이종성.
- [0034] 마지막 2가지 경우에 있어서, 동종-거부(allo-rejection)를 감소시키기 위한 전략이 또한 고려되어야 하고, 기술자에게 알려져 있다.
- [0035] 바람직하게는, 상기 면역 세포는 하나 이상의 재조합 구조체를 포함하며, 여기서 적어도 하나의 재조합 구조체는 인터루킨-10, 그의 단편 또는 변이체를 암호화한다.
- [0036] [0011] 한 측면에서, 인터루킨-10, 그의 단편 또는 변이체를 암호화하는 구조체는 서열번호 1의 아미노산 서열, 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함하거나 이를 암호화한다.
- [0037] 한 측면에서, 인터루킨-10, 그의 단편 또는 변이체를 암호화하는 재조합 구조체는 CAR, TCR, 또는 임의의 다른 합성 종양 표적화 모티프를 암호화하는 제2 재조합 구조체에 결합된다.
- [0038] 바람직하게는 또한, 상기 제2 재조합 구조체는 키메라 항원 수용체(CAR), T 세포 수용체(TCR) 또는 임의의 다른 합성 종양 표적화 모티프를 암호화한다. 합성 종양-표적화 모티프의 비제한적 예는, 예컨대 그 전체가 인용에 의해 본 명세서에 통합되는 Liu R, Li X, Xiao W, Lam KS(Tumor-targeting peptides from combinatorial libraries)[published correction in Adv Drug Deliv Rev. 2018 Mar 9]의 표 2 및 표 3에 나열되어 있는 종양-표적화 펩티드를 포함한다.
- [0039] 본 기술분야의 기술자는, 예컨대 종양-표적화 펩티드와 같은 종양-표적화 모티프는, 예컨대 시험관내, 생체내 또는 생체의 선별 접근법으로부터 선택되는 스크리닝 접근법을 통한 파지-디스플레이 라이브러리로부터 검출될 수 있음을 알고 있다(예를 들면, Liu R, Li X, Xiao W, Lam KS의 도 1 참조). 암-연관 단백질, 특이적 암 세포

주, 환자 조직, 및 종양 이중이식 마우스 모델은 스크리닝 프로브로서 사용될 수 있다.

- [0040] 바람직하게는, 상기 결합은 자가-절단 펩티드(예컨대, 펩티드 2A, 예컨대 그 전체가 인용에 의해 본 명세서에 통합되는 [Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 126, 663-676] 또는 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 서열 참조)를 암호화하는 서열을 통한다. 예를 들면, 자가-절단 펩티드가 절단되면, IL-10, 그의 단편 또는 변이체는 바람직하게는 종양 미세환경에서 면역 세포에 의해 분비되거나 막에 결합된다.
- [0041] 한 측면에서, 상기 재조합 구조체는 단일-사슬 단편 변이체(scFv)의 세포의 항원 인식 도메인(domain), 막통과 영역, 세포내 T 세포 활성화 도메인 및/또는 세포내 영역의 폴리펩티드를 암호화하는 CAR을 암호화하는 핵산을 포함한다.
- [0042] 상기 단일-사슬 단편 변이체(scFv)의 세포의 항원 인식 도메인은 바람직하게는 항체 또는 리간드 또는 수용체로부터 유래된다. 일부 경우에 있어서, 상기 세포의 도메인은 힌지(hinge) 부위를 포함한다. 예컨대 CD8 힌지와 같은 다양한 힌지가 본 발명에 따라 채용될 수 있다.
- [0043] [0012] 대개, 항체로부터 유래되는 단일-사슬 단편 변이체(scFv)의 세포의 항원 인식 도메인은 c-MET, TRP-1, CD19, CD20, BCMA, CD133, CD171, CD70, CEA, EGFR, EGFR-vIII, EpCAM, EphA2, FAP, GD2, GPC3, HER2, HER3, IL-13Ra2, 메소텔린(Mesothelin), MUC1, 클라우딘(Claudin) 18.2, PSCA, PSMA, ROR1, 및 VEGFR2 또는 이들의 하나 이상의 조합을 포함하는 비제한적 군으로부터 선택되는 항원을 인식한다. 바람직한 측면에서, 본 발명의 CAR 내의 세포의 항원 인식 도메인은, 예컨대 힌지에 결합되고, HER2(서열번호 2), TRP-1(서열번호 3), EGFR-vIII(서열번호 4) 또는 CD19(서열번호 5)를 인식하는 CD8 또는 CD28 막통과 도메인 scFv이다.
- [0044] 상기 막통과 영역 및 힌지는 대개 CAR의 세포의 도메인에 융합된다. 이것은 유사하게 CAR의 세포내 도메인에 융합될 수 있다. 일부 경우에 있어서, 상기 막통과 도메인은 수용체 복합체의 다른 일원과의 상호작용을 최소화하기 위하여 이러한 도메인이 동일한 또는 상이한 표면 막 단백질의 막통과 도메인에 결합하는 것을 피하기 위해 선택되거나 아미노산 치환에 의해 변형될 수 있다. 상기 막통과 도메인은 자연형 또는 합성 공급원으로부터 유래될 수 있다. 상기 공급원이 자연형인 경우, 상기 도메인은 임의의 막-결합 또는 막통과 단백질로부터 유래될 수 있다. 본 발명에서 특정한 용도의 막통과 영역은 CD28, CD28T, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, 프로그램화 죽음-1(PD-1), 유도성 T 세포 공자극자(ICOS), 림프구 기능-연관 항원-1(LFA-1, CD11a/CD18), CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD247, CD276(B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig 알파(CD79a), DAP-10, Fc 감마 수용체, MHC 클래스 1 분자, TNF 수용체 단백질, 면역글로불린 단백질, 사이토카인 수용체, 인테그린, 신호전달 림프구 활성화 분자(SLAM 단백질), 활성화 NK 세포 수용체, BTLA, 톨(Toll) 리간드 수용체, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, LIGHT, HVEM(LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80(KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8알파, CD8베타, IL-2R 베타, IL-2R 감마, IL-7R 알파, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1(CD226), SLAMF4(CD244, 2B4), CD84, CD96(Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9(CD229), CD160(BY55), PSGL1, CD100(SEMA4D), CD69, SLAMF6(NTB-A, Ly108), SLAM(SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME(SLAMF8), SELPLG(CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, CD83에 특이적으로 결합하는 리간드, 또는 이들의 임의의 조합으로부터 유래(포함, 또는 상응)할 수 있다.
- [0045] [0013] 임의적으로, 짧은 링커(linker)는 CAR의 세포외, 막통과, 및 세포내 도메인 중 어느 것 또는 일부 사이에 결합을 형성할 수 있다.
- [0046] 바람직한 측면에서, 본 발명의 CAR 내의 막통과 도메인 및 힌지는 CD8 막통과 도메인 및 힌지이다. 한 측면에서, 상기 CD8 막통과 도메인 및 힌지는 서열번호 6의 아미노산 서열의 막통과 부위 및 힌지, 그의 단편 또는 변이체를 포함한다.
- [0047] 상기 세포내 T 세포 활성화 도메인은 그 표적에 대한 항원 결합 분자의 반응시에 T 세포를 활성화시킬 수 있다. 상기 세포내 도메인은 전형적으로 본 명세서에 기술된 것과 같은 하나 이상의 공자극성 분자를 추가로 포함함이 인식될 것이다.
- [0048] 추가 측면에서, 상기 T 세포 활성화 도메인은 CD3, 바람직하게는 CD3 제타, 보다 바람직하게는 서열번호 7의 아미노산 서열의 CD3 제타(CD3 ζ), 그의 단편 또는 변이체를 포함한다.
- [0049] "공자극성 분자"는, 본 명세서에서 사용될 때, 증식, 활성화, 분화, 등을 비제한적으로 포함하는 T 세포 반응을

매개하는 신호를 제공하는 분자를 나타낸다. 공자극성 분자는 본 명세서에 기술된 것과 같은 활성화 분자에 의해 제공되는 1차 신호 이외의 신호를 제공할 수 있다.

- [0050] 본 발명의 조작된 T 세포의 세포내(세포질) 영역은 면역 세포의 정상 이펙터 기능 중 적어도 하나의 활성화를 제공할 수 있다. T 세포의 이펙터 기능은, 예를 들면, 세포용해 활성 또는 헬퍼(helper) 활성을 나타낼 수 있다.
- [0051] 적합한 세포내 영역은 CD28, CD28T, OX-40, 4-1BB/CD137, CD2, CD7, CD27, CD30, CD40, 프로그램화 죽음-1(PD-1), 유도성 T 세포 공자극자(ICOS), 림프구 기능-연관 항원-1(LFA-1, CD1-1a/CD18), CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD247, CD276(B7-H3), LIGHT, (TNFSF14), NKG2C, Ig 알파(CD79a), DAP-10, Fc 감마 수용체, MHC 클래스 1 분자, TNF 수용체 단백질, 면역글로불린 단백질, 사이토카인 수용체, 인테그린, 신호전달 림프구 활성화 분자(SLAM 단백질), 활성화 NK 세포 수용체, BTLA, 툴 리간드 수용체, ICAM-1, B7-H3, CDS, ICAM-1, GITR, BAFRR, LIGHT, HVEM(LIGHTR), KIRDS2, SLAMF7, NKp80(KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD19, CD4, CD8알파, CD8 베타, IL-2R 베타, IL-2R 감마, IL-7R 알파, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, NKG2D, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1(CD226), SLAMF4(CD244, 2B4), CD84, CD96(Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9(CD229), CD160(BY55), PSGL1, CD100(SEMA4D), CD69, SLAMF6(NTB-A, Ly108), SLAM(SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME(SLAMF8), SELPLG(CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, CD19a, CD83과 특이적으로 결합하는 리간드, 또는 이들의 임의의 조합으로부터 유래되는(또는 이에 해당하는) 신호전달 도메인을 비제한적으로 포함(즉, 차지)함이 인식될 것이다.
- [0052] [0014] 조합의 예는 4-1BB 및 CD28 세포내 영역을 포함한다.
- [0053] 바람직한 측면에서, 상기 CAR의 세포내 도메인은 4-1BB 세포내 영역을 포함한다.
- [0054] 본 발명에 따른 예시적인 CAR 구조체는 도 1a, 도 4a, 및 도 7a에 나타낸 것과 같다.
- [0055] 상기 제2 재조합 구조체가 유전자이식 TCR을 암호화하는 경우, 상기 TCR은 바람직하게는 gp100, NY-ESO-1, MAGE-A3 및 TRP-1, 또는 이들의 하나 이상의 조합을 포함하는 비제한적 군으로부터 선택되는 항원을 인식한다.
- [0056] 한 측면에서, 인터루킨-10, 그의 단편 또는 변이체를 암호화하는 구조체는 Fc, 인간 혈청 알부민(HSA), 또는 항체 융합 단백질을 암호화하는 서열 내에 포함된다.
- [0057] 본 발명의 한 측면에서, 본 명세서에 기술된 상기 면역 세포, 또는 면역 세포의 개체군은 암의 예방 및/또는 치료에 사용하기 위한 것이다. 상기 암은 고형 또는 액상 암일 수 있다.
- [0058] 바람직하게는, 상기 암은 폐암, 유방암, 난소암, 경부암, 자궁암, 두경부암, 교모세포종, 간세포 암종, 결장암, 직장암, 결장직장 암종, 신장암, 전립선암, 위암, 기관지암, 췌장암, 방광암, 간암, 뇌암, 림프종 및 피부암, 특히 흑색종, 또는 이들의 하나 이상의 조합을 포함하는 비제한적 군으로부터 선택되는 고형 암이다. 보다 바람직하게는, 상기 고형 암은 림프종, 유방암, 위암 및 흑색종을 포함하는 군으로부터 선택된다.
- [0059] [0015] 본 발명은 본 명세서에 개시된 서열목록을 포함하는 본 명세서에 기술된 하나 이상의 재조합 구조체를 암호화하는 핵산 서열을 추가로 제공한다.
- [0060] 본 발명은 본 명세서에 개시된 서열목록을 포함하는 본 명세서에 기술된 하나 이상의 재조합 구조체를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 플라스미드 또는 벡터를 추가로 제공한다.
- [0061] 본 기술분야에 알려진 임의의 벡터는 본 발명을 위해 적합할 수 있다. 일부 측면에서, 상기 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 측면에서, 상기 벡터는 레트로바이러스 벡터(예컨대, pMSGV), DNA 벡터, 뮤린 백혈병 바이러스 벡터, SFG 벡터, RNA 벡터, 아데노바이러스 벡터, 바쿨로바이러스벡터, 엘스테인 바 바이러스 벡터, 파포바바이러스 벡터, 백시니아 바이러스 벡터, 헤르페스 심플렉스 바이러스 벡터, 아데노바이러스 연관 벡터(AAV), 렌티바이러스 벡터(예컨대, pGAR), 또는 이들의 임의의 조합이다.
- [0062] 본 발명은 또한 조성물뿐만 아니라 약학적 조성물을 고려한다.
- [0063] 본 발명의 한 측면에서, 본 발명의 약학적 조성물은 치료적 유효량의 i) 본 명세서에서 기술된 면역 세포, 또는 면역 세포의 개체군, ii) 본 명세서에 기술된 핵산, 및/또는 iii) 본 명세서에 기술된 플라스미드 또는 벡터, 및 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제를 포함한다.

- [0064] 용어 "치료적 유효량"은, 본 명세서에서 사용될 때, 타당한 의학적 판단의 범위 내에서 치료되어야 하는 징후 및/또는 증상을 현저하게 양성적으로 변형시키기에 충분히 높지만 심각한 부작용을 피하기에 충분히 낮은(합리적인 위험성/유익 비에서) 면역 세포, 핵산, 플라스미드 또는 벡터의 양을 의미한다.
- [0065] 본 명세서에 기술된 것과 같은 면역 세포, 핵산, 플라스미드 또는 벡터의 치료적 유효량은 환자 또는 대상체의 타입, 종, 연령, 체중, 성별 및 의학적 증상; 치료되어야 하는 증상 또는 질환(예컨대, 암)의 중세; 투여의 경로; 환자 또는 대상체의 신장 및 간 기능;을 포함하는 다양한 인자에 따라 선택된다. 본 기술분야의 통상의 기술을 갖는 내과의사는 질환, 예컨대 암과 같은 질환의 진행을 방지, 상쇄 또는 저지하기 위해 필요한 면역 세포, 핵산, 플라스미드, 또는 벡터의 유효량을 쉽게 결정 또는 처방할 수 있다.
- [0066] [0016] "약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제"는 일반적으로 안전하고, 비독성이고, 바람직한 약학적 조성물의 제조에 유용한 담체 또는 희석제를 의미하며, 인간 약학적 용도를 위해 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함한다.
- [0067] 본 발명의 면역 세포 또는 면역 세포의 개체군은 단독으로, 또는 약학적 조성물로서 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 본 명세서에 기술된 것과 같은 면역 세포 또는 세포의 개체군, 예컨대 T 세포와 하나 이상의 약학적으로 또는 생리학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 조합하여 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 버퍼, 예컨대 중성 버퍼화 식염수, 포스페이트 버퍼화 식염수 등; 탄수화물, 예컨대 글루코오스, 만노오스, 수크로오스 또는 텍스트란, 만니톨; 단백질; 폴리펩티드 또는 아미노산, 예컨대 글리신; 항산화제; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA 또는 글루타치온; 어주번트(예컨대, 수산화알루미늄); 및 보존제;를 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 바람직하게는 정맥내 투여용으로 제형화된다.
- [0068] 상기 약학적 조성물(용액, 현탁액 등)은 다음 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 멸균 희석제, 예컨대 주사용수, 식염수 용액, 바람직하게는 생리 식염수, 링거 용액, 등장성 염화나트륨, 고정유, 예컨대 용매 또는 현탁 매체로 작용할 수 있는 합성 모노- 또는 디글리세라이드, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 용매; 항균제, 예컨대 벤질 알코올 또는 메틸 파라벤; 항산화제, 예컨대 아스코르브산 또는 나트륨 비셀파이트; 킬레이트화제, 예컨대 에틸렌디아민테트라아세트산; 버퍼, 예컨대 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트 및 장성(tonicity)의 조절을 위한 제제, 예컨대 염화나트륨 또는 텍스트로오스. 비경구 제조물은 유리 또는 플라스틱으로 만들어진 앰플, 1회용 주사기 또는 다회 용량 바이알에 둘러싸일 수 있다. 주사가 가능한 약학적 조성물은 바람직하게는 멸균이다.
- [0069] 본 발명의 약학적 조성물은 적어도 하나의 부가적인 치료제 또는 치료법을 추가로 포함할 수 있다. 다양한 다른 부가적인 치료제가 본 명세서에 기술된 조성물과 접목되어 사용될 수 있다.
- [0070] 한 측면에서, 상기 적어도 하나의 부가적인 치료제 또는 치료법은 암, 바람직하게는 고형 암을 치료하기에 유용한 항암제 또는 항암 치료법이다. 바람직하게는, 하나 이상의 항암 치료법은 방사선치료법, 화학치료법, 면역 체크포인트 억제제, 면역치료법 및 호르몬 치료법, 또는 이들 중 하나 이상의 조합을 포함하는 군으로부터 선택될 것이다.
- [0071] 바람직하게는, 상기 면역 체크포인트 억제제는 PD-1 억제제, PD-L1 억제제, 및 CTLA-4 억제제, 또는 이들 중 하나 이상의 조합을 포함하는 군으로부터 선택된다.
- [0072] 예를 들면, 잠재적으로 유용한 부가적인 치료제는 PD-1 억제제, 예컨대 니볼루맵(Opdivo[®]), 켈브롤리주맵(Keytruda[®]), 켈브롤리주맵, 피딜리주맵, 및 아테졸리주맵을 포함한다.
- [0073] [0017] 예를 들면, 잠재적으로 유용한 부가적인 치료제는 PD-L1 억제제, 예컨대 아테졸리주맵, 아벨루맵, AMP-224, MEDI-0680, RG-7446, GX-P2, 두르발루맵, KY-1003, KD-033, MSB-0010718C, TSR-042, ALN-PDL, STI-A1014, CX-072, 및 BMS-936559를 포함한다.
- [0074] CTLA-4 억제제의 비제한적 예는 이필리무맵(Yervoy)(BMS-734016, MDX-010, MDX-101로도 알려짐) 및 트레멜리무맵(이전에는 티실리무맵, CP-675,206)을 포함한다.
- [0075] 본 발명의 화학치료법은 DNA를 손상시키거나 및/또는 세포가 복제하는 것을 방지하는 제제, 예컨대 제노톡신(genotoxin)에 관한 것일 수 있다.
- [0076] 제노톡신은 알킬화제, 황대사물질, DNA 절단제, DNA 결합제, 토포아이소머라아제 독 및 스피들 독을 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다. 알킬화제의 예는 로무스틴, 카르무스틴, 스트렙토조신, 메클로레타민, 멜팔란, 우

라실 질소 머스타드, 클로람부실, 시클로스파미드, 이포스파미드, 시스플라틴, 카르보플라틴, 마이토마이신, 티오테파, 데카르바진, 프로카르바진, 헥사메틸 멜라민, 트리에틸렌 멜라민, 부설판, 피포브로만, 미토탄 및 다른 플라틴 유도체이다.

- [0077] DNA 절단제의 예는 블레오마이신이다.
- [0078] 토포아이소머라아제 독은 토포테칸, 이리노테칸, 캄프토테신 나트륨 염, 다오루비신, 독소루비신, 이다루비신, 미톡산트론 테니포시드, 아드리아마이신 및 에토포시드를 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0079] DNA 결합제의 예는 다크티노마이신 및 미트라마이신이고, 스피놀 독은 빈블라스틴, 빈크리스틴, 나벨빈, 파클리탁셀 및 도세탁셀을 포함하는 군 중에서 선택될 수 있다.
- [0080] 본 발명의 화학치료법은 다음의 화합물 중에서 선택되는 항대사물질에 관한 것일 수 있다: 메토타렉세이트, 트리메타렉세이트, 펜토스타틴, 시타라빈, 아라-CMP, 플루다라빈 포스페이트, 히드록시우레아, 플루오로우라실, 피옥수리딘, 클로로데옥시아데노신, 잼시타빈, 티오구아닌 및 6-메르캅토프린.
- [0081] [0018] 방사선치료법은 종양을 축소시키고 암 세포를 살상하기 위한 고에너지 방사선의 사용에 관한 것이다. 방사선 치료법의 예는 외부 방사선 치료법 및 내부 방사선 치료법(근접치료법(brachytherapy)으로도 알려짐)을 비제한적으로 포함한다.
- [0082] 외부 방사선 치료법은 가장 흔하며, 전형적으로 직접 또는 간접 이온화 방사선의 빔을 종양 또는 암 부위로 향하게 하는 것을 수반한다. 방사선, 광자, 코발트 또는 입자 치료법의 빔은 종양 또는 암 부위에 집중되지만, 정상, 건강 조직의 노출을 피하는 것은 거의 불가능하다. 외부 방사선 치료법을 위한 에너지원은 직접 또는 간접 이온화 방사선(예를 들면: x-선, 감마 선 및 입자 빔 또는 이들의 조합)을 포함하는 군으로부터 선택된다.
- [0083] 내부 방사선 치료법은 종양 부위 또는 그 근처의 체내에 방사선-방출원, 예컨대 비드, 와이어, 펠렛, 캡슐, 등을 이식하는 것을 수반한다. 내부 방사선 치료법을 위한 에너지원은 다음을 포함하는 방사성 동위원소의 군으로부터 선택된다: 요오드(요오드125 또는 요오드131), 스트론튬89, 인, 팔라듐, 세슘, 인듐, 포스페이트, 또는 코발트의 동위원소, 및 이들의 조합. 이러한 이식체는 치료 후에 제거되거나, 체내에서 불활성으로 남겨둘 수 있다. 내부 방사선 치료법의 타입은 간질성, 및 체강내 근접치료법을 비제한적으로 포함한다(고용량률, 저용량률, 펄스화 용량률).
- [0084] 현재의 덜 일반적인 형태의 내부 방사선 치료법은, 예컨대 방사성 물질에 결합된 종양-특이적 항체가 환자 또는 대상체에게 투여되는 방사선-면역치료법을 이용한 방사성동위원소의 생물학적 담체를 수반한다. 상기 항체는 종양 항원에 결합하여서, 해당 조직에 방사선의 용량을 효과적으로 투여한다.
- [0085] 방사선 치료법을 투여하는 방법은 본 기술분야의 기술자에게 잘 알려져 있다.
- [0086] 다양한 다른 부가적인 치료제가 본 명세서에 기술된 조성물과 접목되어 사용될 수 있다.
- [0087] 본 발명과 조합되어 사용하기에 적합한 부가적인 치료제는 이브루티닙(Imbruvica[®]), 오파투무맵(Arzerra[®]), 리투시맵(Rituxan[®]), 베바시주맵(Avastin[®]), 트라스투주맵(Herceptin[®]), 트라스투주맵 엠탄신(KADCYLA[®]), 이마티닙(Gleevec[®]), 세톡시맵(Erbitux[®]), 파니투무맵(Vectibix[®]), 카투막소맵, 이브리투모맵, 오파투무맵, 토시투모맵, 브렌톡시맵, 알렘투주맵, 겐투주맵, 예를로티닙, 게피티닙, 반데타닙, 아파티닙, 라파티닙, 네라티닙, 악시티닙, 마시티닙, 파조파닙, 수니티닙, 소라페닙, 토세라닙, 레스타우르니닙, 악시티닙, 세디라닙, 렌바티닙, 닌테다닙, 파조파닙, 레고라페닙, 세막사닙, 소라페닙, 수니티닙, 티보자닙, 토세라닙, 반데타닙, 엔트렉티닙, 카보잔티닙, 이미티닙, 다사티닙, 닐로티닙, 포나티닙, 라도티닙, 보수티닙, 레스타우르티닙, 록솔리티닙, 파크리티닙, 코비메티닙, 셀루메티닙, 트라메티닙, 비니메티닙, 알렉티닙, 세리티닙, 크리조티닙, 아플리베르셉트, 아디포타이드, 데닐루킨 디프티톡스, mTOR 억제제, 예컨대 에베롤리무스 및 텀시롤리무스, 헤지호그 억제제, 예컨대 소니데길 및 비스모데길, CDK 억제제, 예컨대 CDK 억제제(palbociclib)를 비제한적으로 포함한다.
- [0088] [0019] 부가적인 측면에서, 상기 부가적인 치료제는 항염증제일 수 있다. 항염증제 또는 약물은 스테로이드 및 글루코코르티코이드(베타메타손, 부데소나이드, 텍사메타손, 히드로코르티손 아세테이트, 히드로코르티손, 히드로코르티손, 메틸프레드니솔론, 프레드니솔론, 프레드니손, 트리암시놀론을 포함함), 아스피린, 이부프로펜, 나프록센, 메토타렉세이트, 셀파살라진, 레플루노마이드, 항-TNF 약제, 시클로포스파미드 및 마이코페놀레이트를 포함하는 비스테로이드성 항염증성 약물(NSAIDs)을 비제한적으로 포함한다. 예시적인 NSAID는 이부프로펜, 나프록센, 나프록센 나트륨, Cox-2 억제제, 및 시알릴레이트를 포함한다. 예시적인 진통제는 아세트아미노펜, 옥시

코돈, 프로폭시펜 히드로클로라이드의 트라마돌을 포함한다. 예시적인 글루코코르티코이드는 코르티손, 텍사메타손, 히드로코르티손, 메틸프레드니솔론, 프레드니솔론, 또는 프레드니손을 포함한다. 예시적인 생물학적 반응 변형제는 세포 표면 마커(예컨대, CD4, CD5, 등)에 대해 지향하는 분자, 사이토카인 억제제, 예컨대 TNF 길항제, 예컨대 에타네르셉트(ENBREL[®]), 아달리무맙(HUMIRA[®]) 및 인플릭시맙(REMICADE[®]), 케모카인 억제제 및 부착 분자 억제제를 포함한다. 상기 생물학적 반응 변형제는 단일클론 항체뿐만 아니라 분자의 재조합 형태를 포함한다. 예시적인 DMARD는 아자티오프린, 시클로포스파미드, 시클로스포린, 메토티렉세이트, 페니실라민, 레플루노마이드, 설파살라진, 히드록시클로로퀸, 골드(경구(auranofin) 및 근육내) 및 미노시클린을 포함한다.

- [0089] 본 발명은 암을 치료 및/또는 예방하는 방법을 추가로 고려한다.
- [0090] 용어 "치료" 또는 "치료하는"은 다음을 목적으로 대상체에게 본 개시의 조성물, 약학적 조성물, 치료제, 화합물, 등을 임의로 투여하는 것을 의미한다:
- [0091] [0020] (i) 질환의 억제, 즉 임상 징후의 발생의 저지; 및/또는
- [0092] (ii) 질환의 완화, 즉 임상 징후의 관해의 유발.
- [0093] 본 명세서에서 사용될 때, 용어 "예방" 또는 "예방하는"은 질환을 예방할 목적으로 본 개시의 조성물, 약학적 조성물, 치료제, 화합물, 등을 대상체에게 임의로 투여하여 질환의 임상 징후가 발생하지 않도록 유발하는 것을 의미한다.
- [0094] 본 발명의 문맥에서, 상기 질환은 암, 바람직하게는 본 명세서에 개시된 것과 같은 고형 종양이다.
- [0095] 한 측면에서, 환자 또는 대상체에서 암을 치료 및/또는 예방하는 방법은 (i) 상기 환자 또는 대상체로부터 면역 세포, 바람직하게는 자연형 T 세포를 제거 및 단리하는 단계, (ii) 상기 T 세포를 인터루킨-10, 그의 단편 또는 변이체를 암호화하는 한 재조합 구조체 및 키메라 항원 수용체(CAR), T 세포 수용체(TCR) 또는 임의의 다른 합성 종양 표적화 모티프 또는 항원을 암호화하는 제2 재조합 구조체로 유전자적으로 조작하는 단계, (iii) 조작된 T 세포의 더 큰 개체군으로 생체의에서 확장하는 단계, 및 (iv) 상기 조작된 T 세포를 환자 또는 대상체 내로 재도입하는 단계를 포함한다. 상기 조작된 T 세포가 환자 또는 대상체 내로 재도입된 후, 본 명세서에 기술된 종양 표적화 모티프 또는 항원을 발현하는 세포에 대한 면역 반응을 매개한다. 상기 면역 반응은 T 세포에 의한 IL-10, 그의 단편 또는 변이체, 및 다른 사이토카인의 분비, 종양 표적화 모티프 또는 항원을 인식하는 T 세포의 클론 확장, 및 표적-양성 세포의 T 세포-매개성 특이적 살상을 포함한다.
- [0096] 한 측면에서, 암을 치료 및/또는 예방하는 방법은 (i) 환자 또는 대상체로부터 면역 세포, 바람직하게는 자연형 T 세포를 제거 및 단리하거나, 면역 세포, 바람직하게는 자연형 T 세포를 제공하는 단계, (ii) 상기 T 세포를 인터루킨-10, 그의 단편 또는 변이체를 암호화하는 적어도 하나의 재조합 구조체 및 키메라 항원 수용체(CAR), T 세포 수용체(TCR) 또는 임의의 다른 합성 종양 표적화 모티프 또는 항원을 암호화하는 제2 재조합 구조체로 유전자적으로 조작하는 단계, (iii) 조작된 T 세포의 더 큰 개체군으로 생체의에서 확장하는 단계, 및 (iv) 환자 또는 대상체 내로 재도입하는 단계를 포함한다.
- [0097] [0021] 한 측면에서, 대상체에서 암을 치료 및/또는 예방하는 방법은 본 발명의 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0098] 한 측면에서, 상기 기술된 치료 및/또는 예방 방법은 적어도 하나의 부가적인 치료제 또는 치료법, 바람직하게는 항암제 또는 항암 치료법, 보다 바람직하게는 치료적 유효량 또는 용량의 항암제 또는 항암 치료법을 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 하나 이상의 항암제 또는 치료법은 앞서 기술된 것과 같은 방사선치료법, 화학치료법, 면역 체크포인트 억제제, 면역치료법 및 호르몬 치료법, 또는 이들의 하나 이상의 조합을 포함하는 비제한적 군 중에서 선택될 것이다.
- [0099] 다양한 알려진 기술이 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, 벡터, 항원 결합 분자, 면역 세포, 조성물, 등을 제조하는데 사용될 수 있다.
- [0100] 본 명세서에 기술된 면역 세포의 시험관내 취급 또는 유전자 변형 이전에, 상기 세포는 대상체로부터 수득 및 단리될 수 있다. 일부 측면에서, 상기 면역 세포는 T 세포를 포함한다. T 세포는 말초 혈액 단핵구 세포(PBMC), 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위로부터의 조직, 복수, 흉수, 비장 조직, 및 종양을 포함하는 다수의 공급원으로부터 수득될 수 있다. 소정 측면에서, T 세포는 기술자에게 알려진 임의의 수의 기술, 예컨대 FICOLL™ 분리를 이용하여 대상체로부터 수집된 단위 혈액으로부터 수득될 수 있다. 세포는 바람직하게는 성분

채집술에 의해 개체의 순환 혈액으로부터 수득될 수 있다. 상기 성분채집술 생성물은 전형적으로 T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포, 다른 유핵 백혈구를 포함하는 림프구, 적혈구, 및 혈소판을 함유한다. 소정 구현예에서, 성분채집술에 의해 수집된 세포는 혈장 분획을 제거하기 위해 세척되고, 후속 처리를 위해 적절한 버퍼 또는 배지에 위치될 수 있다. 상기 세포는 PBS로 세척될 수 있다. 인식되는 것과 같이, 세척 단계가 이용될 수 있다. 세척 후, 상기 세포는 다양한 생체적합성 버퍼, 또는 버퍼가 있거나 없는 다른 식염수 용액에 재현탁될 수 있다. 소정 측면에서, 성분채집술 샘플의 원하지 않는 성분은 제거될 수 있다.

[0101] 소정 측면에서, T 세포는, 예를 들면, PERCOLL™ 구배를 통한 원심분리를 이용하여 적혈구를 용해하고 단핵구를 제거함으로써 PBMC로부터 분리된다. T 세포의 특정 하위개체군, 예컨대 CD28⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺, 및 CD45RO⁺ T 세포는 본 기술분야에 알려진 양성 또는 음성 선별 기술에 의해 추가로 분리될 수 있다. 예를 들면, 음성 선별에 의한 T 세포 개체군의 농축은 음성 선별된 세포에 특유한 표면 마커에 대한 항체의 조합을 이용해 달성될 수 있다. 본 명세서에서 이용하기 위한 한 방법은 음성 선별된 세포에 존재하는 세포 표면 마커에 대한 단일클론 항체의 카테일을 이용하는 음성 자기 면역흡착 또는 유세포분석을 통한 세포 분류 및/또는 선별이다. 예를 들면, 음성 선별에 의해 CD4⁺ 세포를 농축하기 위하여, 단일클론 항체 카테일은 전형적으로 CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR, 및 CD8에 대한 항체를 포함한다. 유세포분석 및 세포 분류는 또한 본 발명에서 사용하기 위한 관심 있는 세포 개체군을 분리하기 위해 사용될 수 있다.

[0102] [0022] PBMC는 본 명세서에서 기술된 것과 같은 방법을 이용하여 면역 세포(예컨대, CAR 또는 TCR)로 유전자 변형을 위해 직접적으로 사용될 수 있다. 소정 측면에서, PBMC를 분리한 후, T 림프구가 추가로 분리될 수 있고, 세포독성 및 헬퍼 T 림프구 모두 유전자 변형 및/또는 확장 전후에 나이브, 메모리, 및 이펙터 T 세포 하위개체군으로 분류될 수 있다.

[0103] 일부 측면에서, CD8⁺ 세포는 각각의 타입의 CD8⁺ 세포와 연관된 세포 표면 항원을 확인함으로써 나이브, 중추 메모리, 및 이펙터 세포로 추가로 분류된다.

[0104] 본 명세서에 기술된 면역 세포는 분리된 후 공지된 방법을 이용해 유전자적으로 변형될 수 있거나, 상기 면역 세포는 전구세포의 경우에 유전자적으로 변형되기 전에 시험관내에서 활성화 및 확장(예컨대, TIL 세포) 또는 분화될 수 있다. 다른 구현예에서, 상기 면역 세포, 예컨대 T 세포는 본 명세서에 기술된 키메라 항원 수용체로 유전자적으로 변형되며(예컨대, CAR을 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 바이러스 벡터로 형질도입되며), 이후 시험관내에서 활성화 및/또는 확장된다. T 세포를 활성화 및 확장하기 위한 방법은 본 기술분야에 알려져 있으며, 예를 들면, 그 전체 내용이 인용에 의해 본 명세서에 통합되는 미국 특허 제6,905,874호; 미국 특허 제6,867,041호; 미국 특허 제6,797,514호; 및 PCT W02012/079000에 기술되어 있다. 일반적으로, 이러한 방법은 PBMC 또는 분리된 T 세포를 적절한 사이토카인, 예컨대 IL-2를 갖는 배양 배지에서 일반적으로 비드 또는 다른 표면에 부착된 자극성 분자 및 공자극성 분자, 예컨대 항-CD3 및 항-CD28 항체와 접촉시키는 단계를 포함한다. 다른 측면에서, 상기 T 세포는 그 전체 내용이 인용에 의해 본 명세서에 통합되는 미국 특허 제6,040,177호; 미국 특허 제5,827,642호; 및 W02012129514에 기술된 것과 같은 방법을 이용하여 피더(feeder) 세포 및 적절한 항체 및 사이토카인을 이용해 증식하기 위하여 활성화 및 자극될 수 있다.

[0105] [0023] 본 발명의 구조체 및 조작된 면역 세포를 만들기 위한 소정의 방법은, 예컨대 그 전체 내용이 인용에 의해 본 명세서에 통합되는 PCT 출원 PCT/US2015/14520에 기술되어 있다.

[0106] PBMC는 다른 세포독성 림프구, 예컨대 NK 세포 또는 NKT 세포를 추가로 포함할 수 있음이 인식될 것이다. 본 명세서에 개시된 것과 같은 본 발명의 재조합 구조체를 전달하는 발현 벡터는 인간 공여자 T 세포, NK 세포 또는 NKT 세포의 개체군 내로 도입될 수 있다. 상기 발현 벡터를 전달하는 성공적으로 형질도입된 T 세포는 유세포분석을 이용해 분류되어 CD3 양성 T 세포를 분리한 후, 항-CD3 항체 및 IL-2 또는 본 명세서의 다른 곳에서 기술된 것과 같은 본 기술분야에 알려진 다른 방법을 이용한 세포 활성화에 더하여 상기 CAR을 발현하는 T 세포의 수를 증가시키기 위해 추가로 전파될 수 있다. 표준 절차가 인간 대상체에서 사용하기 위한 저장 및/또는 제조를 위하여 CAR을 발현하는 T 세포를 동결보존하기 위해 사용된다. 한 측면에서, T 세포의 시험관내 형질도입, 배양 및/또는 확장은 송아지 태아 혈청 및 소 태아 혈청과 같은 비-인간 동물 유래 생성물의 부재 하에 수행된다.

[0107] 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 클로닝을 위하여, 상기 벡터는 숙주 세포(자가성, 동종성 또는 이종성) 내로 도입되어 벡터 자신의 복제를 허용하고, 이로 인해 그 내부에 함유된 폴리뉴클레오티드의 사본을 증폭할 수 있다. 본 발명의 클로닝 벡터는 일반적으로 복제의 기원, 프로모터 서열, 전사 개시 서열, 인핸서(enhancer) 서열, 및

선별 마커를 비제한적으로 포함하는 서열 성분을 함유할 수 있다. 상기 요소는 본 기술분야의 통상의 기술자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들면, 복제의 기원은 숙주 세포에서 벡터의 자발적인 복제를 촉진하기 위해 선택될 수 있다.

- [0108] 용어 "자가성"은 향후 재도입되어야 하는 동일한 개체로부터 유래된 임의의 물질을 나타낸다.
- [0109] 용어 "동종성"은 한 개체로부터 유래된 후 동일한 종의 다른 개체에 도입되는, 예컨대 동종성 T 세포 이식되는 임의의 물질을 나타낸다.
- [0110] 소정 측면에서, 본 개시는 본 명세서에서 제공되는 벡터를 함유하는 단리된 숙주 세포를 제공한다. 상기 벡터를 함유하는 숙주 세포는 벡터 내에 함유된 폴리뉴클레오티드의 발현 또는 클로닝에 유용할 수 있다. 적합한 숙주 세포는 종양용해 바이러스, 원핵생물 세포, 진균 세포, 효모 세포, 또는 고등 진핵생물 세포, 예컨대 포유동물 세포를 비제한적으로 포함할 수 있다. 상기 목적을 위한 적합한 원핵생물 세포는 진정세균, 예컨대 그람(Gram)-음성 또는 그람-양성 유기체, 예를 들면, 장내세균, 예컨대 에세리키아(*Escherichia*), 예컨대, *E. 콜라이*, 엔테로박터(*Enterobacter*), 에르위니아(*Erwinia*), 클레브시엘라(*Klebsiella*), 프로테우스(*Proteus*), 살모넬라(*Salmonella*), 예컨대 살모넬라 티피무리움, 세라티아(*Serratia*), 예컨대 세라티아 마르세스칸스, 및 시겔라(*Shigella*)뿐만 아니라 바실러스(*Bacilli*), 예컨대 *B. 서브틸리스* 및 *B. 리케니포르미스*, 슈도모나스(*Pseudomonas*), 예컨대 *P. 에루기노사*, 및 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)를 비제한적으로 포함한다.
- [0111] [0024] 상기 벡터는 DEAE-덱스트란 매개성 운반, 인산칼슘 침전 방법, 양이온성 지질 매개성 운반, 리포좀 매개성 형질감염, 전기천공법, 미세발사체 충격(microprojectile bombardment), 수용체-매개성 유전자 운반, 폴리리신, 히스톤, 키토산, 및 펩티드에 의해 매개되는 운반을 비제한적으로 포함하는 본 기술분야에 알려진 임의의 적합한 방법을 이용해 숙주 세포에 도입될 수 있다.
- [0112] (i) 대상체로부터 면역 세포, 바람직하게는 자연형 T 세포를 제거 및 단리하거나, 면역 세포, 바람직하게는 자연형 T 세포를 제공하는 단계, (ii) 상기 T 세포를 인터루킨-10, 그의 단편 또는 변이체를 암호화하는 적어도 하나의 재조합 구조체 및 키메라 항원 수용체(CAR), T 세포 수용체(TCR) 또는 임의의 다른 합성 종양 표적화 모티프 또는 항원을 암호화하는 제2 재조합 구조체로 유전자적으로 조작하는 단계, (iii) 조작된 T 세포의 더 큰 개체군으로 생체외에서 확장하는 단계, 및 (iv) 환자 또는 대상체 내로 재도입하는 단계를 포함하는 대상체에서 항-종양 활성을 향상시키는 방법이 또한 고려된다.
- [0113] 본 발명에 따른 하나 이상의 방법을 수행하기 위한 키트가 또한 고려된다.
- [0114] 하나 이상의 용기 내에 본 발명의 조성물 또는 약학적 조성물을 포함하는 키트가 추가로 고려된다. 조성물은 액체 형태일 수 있거나, 냉동될 수 있다. 조성물을 위한 적합한 용기는, 예를 들면, 병, 바이알, 주사기, 및 테스트 튜브를 포함한다. 용기는 유리 또는 플라스틱을 포함하는 다양한 물질로부터 형성될 수 있다. 상기 키트는 처방을 위한 정보 또는 지시, 약물 함량, 조성, 등을 포함할 수 있는 설명서를 추가로 함유할 수 있다.
- [0115] [0025] 본 기술분야의 기술자는 본 명세서에 기술된 본 발명이 암을 치료하기 위해 IL-10을 발현하는 면역 세포(예컨대, CAR T 또는 TCR T) 전달 치료법을 이용하는 것에 제한되지 않음을 인식할 것이다. IL-10을 발현하는 CAR T 세포는 항-종양 면역력을 향상시키는 IL-10의 종양 표적화 운반을 위한 한 예시적 전략으로 간주될 수 있기 때문에, 기술자는 다른 전략, 예컨대 줄기 세포(Liu, L., et al., Mechanoresponsive stem cells to target cancer metastases through biophysical cues. *Sci. Transl. Med.* **9**, ean2966 (2017)), 혈액 혈소판(Wang, C. et al., In situ activation of platelets with checkpoint inhibitors for post-surgical cancer immunotherapy. *Nat. Biomed. Eng.* **1**, (2017)), 종양용해 바이러스(Rivadeneira, D. B. et al., Oncolytic Viruses Engineered to Enforce Leptin Expression Reprogram Tumor-Infiltrating T Cell Metabolism and Promote Tumor Clearance. *Immunity* **51**, 548-560.e4 (2019)), mRNA(암 백신, 예컨대 [Sahin, U., et al., Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature* **547**, 222-226 (2017)] 참조) 또는 나노기술(Tang, L. et al., Enhancing T cell therapy through TCR-signaling-responsive nanoparticle drug delivery. *Nat. Biotechnol.* **36**, 707-716 (2018))에 의한 IL-10의 종양 표적화 운반이 또한 본 명세서에 기술된 것과 같은 항-종양 면역력을 향상시키기 위해 포괄됨을 예상할 수 있다.
- [0116] 본 명세서에 기술된 본 발명은 구체적으로 기술된 것 이외의 변동 및 변형에 영향을 받을 수 있다. 본 발명은 그 사상 또는 본질적 특징을 벗어나지 않으면서 이러한 모든 변동 및 변형을 포함함이 이해되어야 한다. 본 발명은 또한 본 명세서에서 개별적으로 또는 집합적으로 나타내거나 표시된 모든 단계, 특징, 조성물 및 화합물,

및 상기 단계 또는 특징의 임의의 둘 이상의 임의의 모든 조합을 포함한다. 그러므로, 본 개시는 모든 측면이 예시적일 뿐 제한적인 것이 아니며, 본 발명의 범위는 부속된 청구항에 의해 나타내고, 등가의 의미 및 범위 내에 속하는 모든 변화는 그 안에 포괄되기 위한 의도인 것으로 간주되어야 한다. 다양한 참고문헌이 본 명세서 전반에 인용되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 인용에 의해 본 명세서에 통합된다. 기술한 설명은 다음의 실시예를 참조하여 보다 완전히 이해될 것이다.

[0117] [0026] 실시예

[0118] **HER2를 표적으로 하는 IL-10 CAR T 세포**

[0119] 본 발명자들은 먼저 이소성 IL-10 발현을 갖는 CAR T가 대사적 적합성을 조정하고 그 항-종양 활성을 개선하는지 여부를 조사하였다. HER2 CAR 및 2A 자가-절단 펩티드를 갖는 IL-10 유전자 단편을 레트로바이러스 벡터 pMSGV 내로 융합함으로써 IL-10 HER2 CAR 구조체를 생성하였다(도 1a). IL-10 HER2 CAR T에서 HER2 CAR의 세포 표면 발현은 종래의 HER2 CAR T 세포의 경우와 거의 동등하였다(도 1b). IL-10 HER2 CAR에 의해 생성된 IL-10 레벨을 ELISA에 의해 측정하였다(도 1c). IL-10은 항원 자극시 CD8 T 세포의 증식을 향상시키는 것으로 알려져 있기 때문에(Guo, Y. *et al.* Metabolic reprogramming of terminally exhausted CD8+ T cells by IL-10 enhances anti-tumor immunity. *Nat. Immunol.* **22**, 746-756 (2021)), 본 발명자들은 항원 자극을 받았을 때 CAR T 세포의 절대 카운트 및 세포 분열의 수를 조사하였다. IL-10 HER2 CAR T 세포의 카운트 및 세포 분열은 마이토마인신 처리된 MC38-HER2 마우스 결장암 세포와 공배양되었을 때 HER2 CAR T 세포의 경우와 비교하여 현저하게 더 높았다(도 1d, 도 1e). IL-10 HER2 CAR T 세포의 향상된 분열은 항-IL-10 항체에 의해 완전히 억제되었으며(도 1e), 이는 IL-10이 IL-10 HER2 CAR T 세포의 개선된 증식을 위해 필수적임을 시사한다. MC38-HER2 세포의 공배양 시스템에서, IL-10 HER2 CAR T 세포의 기저 산소 소비율(OCR)은 HER2 CAR T 세포와 비교하여 상승되었지만, 세포의 산성화율(ECAR)은 변하지 않고 남아있었다(도 1f 내지 도 1i). 반면에, IL-10 HER2 CAR T 세포는 mIL-10의 존재 하에 HER2 CAR T와 동등한 기저 OCR을 보였다. mIL-10의 존재 하의 HER2 CAR T 및 IL-10 HER2 CAR T의 OCR 대 EACR의 비는 모두 현저하게 증가되었으며(도 1j), 이는 IL-10 신호전달이 CAR T 세포의 산화적 인산화(OXPPOS)를 적극적으로 촉진함을 제시한다. 대사적 재프로그래밍의 결과로서, IL-10 HER2 CAR T의 종양-용해 잠재력은 크게 향상되었고(도 2a), 한편 CAR T 세포의 항원 특이적 증식 능력, 살상 효율 및 다기능성은 생체내 시나리오를 모방하는 공배양 환경(0.5:1의 E:T 비에서 48시간 동안)에서 IL-10 HER2 CAR T의 군에서 크게 향상되었다(도 2b 내지 도 2d).

[0120] 상기 데이터는 본 발명의 IL-10 CAR T가 OXPPOS를 증가시킴으로써 CAR T 세포의 대사를 재프로그래밍하여 세포 증식을 촉진할 수 있음을 뒷받침하고, 이는 본 발명의 IL-10 CAR T가 또한 대사적 개입을 통해 TME에서 종양 침윤 CAR T 세포의 증식을 촉진할 수 있음을 시사한다.

[0121] [0027] 다양한 시약에 의해 CD8⁺ T 세포에서 OXPPOS를 향상시키거나 당분해 대사를 억제하면 TME에서 CD8+ T 세포 증식, 메모리 발생, 및 항-종양 기능을 촉진하였다(Sukumar, M. *et al.* Inhibiting glycolytic metabolism enhances CD8+ T cell memory and antitumor function. *J. Clin. Invest.* **123**, 4479-4488 (2013)). IL-10 HER2 CAR T 세포에서 관찰된 대사적 조절 기능에 기반하여, 본 발명자들은 다음으로 CAR T 세포의 생체내 대사적 개입이 고형 종양에 대한 효능을 향상시키기 위해 달성될 수 있는지 여부를 조사하였다.

[0122] 사전-확립된 MC38-HER2 종양을 이용한 치료적 상황에서, 림프구제거 사전컨디셔닝된(4 Gy) IL-10 HER2 CAR T 세포(3×10^6) 단일치료법의 입양적 전달은 처리된 마우스의 80%에서 완전한 종양 관해 및 오랜 치유를 일관적으로 유도하였다(도 3a 및 도 3b). 이와 대조적으로, HER2 CAR T 단일치료법은 종양 성장 억제에 대해 최소 효과를 가졌다. mIL-10의 정맥내 투여를 통한 HER2 CAR T의 입양적 전달은 단지 일시적으로만 종양 성장을 제어하였고, 종양 관해를 유도하는 데는 실패하였다. 아울러, IL-10 HER2 CAR T 세포로 처리된 장기간의 생존체는 모두 치료법을 중단한 후 2개월에 MC38-HER2 세포의 재시도를 거부하였으며, 이는 항-종양 면역 메모리가 유도되었음을 시사한다(도 3c).

[0123] **TRP-1을 표적으로 하는 IL-10 CAR T 세포**

[0124] IL-10 CAR T 세포 치료법의 강력함을 테스트하기 위하여, 본 발명자들은 다음으로 불량한 면역원성과 높은 공격성을 갖는 마우스 B16F10 흑색종 모델이 또한 제어될 수 있는지 여부를 평가하였다. 본 발명자들은 다음으로 TRP-1을 표적으로 하는 IL-10 CAR T 세포를 생성하였고, CAR의 발현을 유세포분석에 의해 확인하였다(도 4a, 도 4b). IL-10 TRP-1 CAR T 세포의 시험관내 세포 증식 및 항-종양 활성은 종래의 TRP-1 CAR T 세포의 경우보다 뛰어났다(도 4c, 도 4d). B16F10 마우스 흑색종을 보유하는 마우스는 CAR T 세포 전달 이전에 방사선조사(4 G

y)에 의해 림프구를 제거하였다. IL-10 TRP-1 CAR T는 대부분의 종양 보유 마우스에서 현저한 종양 관해 및 최종적인 제거를 유도하였지만, TRP-1 CAR T는 오랜 치료 효과 없이 단지 일시적인 종양 성장 억제만을 보였다(도 4e). 게다가, IL-10 TRP-1 CAR T 치료법으로 처리된 마우스의 60%는 장기간의 생존을 나타내었다(도 4f).

[0125] **EGFRvIII을 표적으로 하는 IL-10 CAR T 세포**

[0126] 본 발명자들은 다음으로 공격성이 높고 전이성인 4T1-Luc-EGFRvIII(EGFRvIII 및 루시페라아제(Luc)로 안정적으로 형질감염됨) 마우스 유방 암종 모델에 대한 IL-10 CAR T의 개입을 추가로 확장하였다. 본 발명자들은 EGFRvIII을 표적으로 하는 IL-10 CAR T 세포를 제조하였다. CAR의 발현 및 IL-10 생산은 각각 유세포분석 및 ELISA에 의해 확인하였다(도 5a 내지 도 5c). IL-10 EGFRvIII CAR T 세포의 시험관내 세포 확장 및 항-종양 활성은 EGFRvIII CAR T 세포의 경우와 비교하여 현저하게 개선되었다(도 5d, 도 5e). BALB/c 마우스를 4T1-Luc-EGFRvIII 종양 세포(5×10^4)로 정맥내 주사하여 폐 전이를 발생시켰다. 마우스에 mL-10 투여를 하거나 하지 않고 EGFRvIII CAR T 세포(3×10^6)를 전달하면 일시적인 종양 억제를 야기하였다(도 5f). 특히, IL-10 EGFRvIII CAR T 세포는 종양을 완전히 근절하였고, 처리된 마우스의 100%에서 오랜 치유를 유도하였다(도 5g). 강한 항-종양 효과와 일치되게, IL-10 EGFRvIII CAR T 세포는 순환계에서 현저하게 높은 밀도의 CAR T 세포를 유도하였다(도 5h).

[0127] [0028] 상기 결과는 IL-10 HER2 CAR T가 개선된 생체내 확장, 강화된 기능성을 나타내고, 최종적으로 IL-10을 발현하는 CAR T 세포의 뛰어난 효능에 기여함을 시사하였다.

[0128] **IL-10 TCR T(Pme1) 세포**

[0129] 매우 공격적인 B16F10 마우스 흑색종 종양 모델에 대한 종양 특이적 T 세포 수용체(TCR) 유전자이식 T 세포(TCR T)에 대한 IL-10을 발현하는 T 세포 전략을 추가로 연장하기 위하여, 본 발명자들은 앞서 기술한 것과 유사하게 IL-10을 발현하는 Pme1 T 세포(IL-10 Pme1 T)를 제조하였고, IL-10 생산의 발현을 ELISA에 의해 확인하였다(도 6a). B16F10 마우스 흑색종을 보유하는 마우스는 PBS 대조군, Pme1 T 또는 IL-10 Pme1 T 세포의 입양적 전달을 받았다. IL-10 Pme1 T 세포는 대부분의 종양 보유 마우스에서 현저한 종양 관해를 유도하였지만, Pme1 T 세포는 단지 보통의 종양 성장 억제만을 보였다(도 6b 내지 도 6e). 게다가, IL-10을 발현하는 Pme1 T 세포로 처리된 마우스는 Pme1 T 세포로 처리된 경우와 비교하여 개선된 생존을 나타내었다(도 6f). 유사하게, 상기 IL-10을 발현하는 TCR T 세포 전략은 또한 고품 종양에 대한 TIL의 입양적 전달 치료법의 효능 향상을 위해 사용될 수 있었다.

[0130] **CD19를 표적으로 하는 인간 IL-10 CAR T 세포**

[0131] 마지막으로, 본 발명자들은 상기 IL-10을 발현하는 CAR T 전략을 인간 CAR T로 확장하였다. CD19 CAR 및 2A 자가-절단 켈티드를 갖는 인간 IL-10 유전자 단편을 렌티바이러스 벡터 내로 융합함으로써 IL-10 CD19 CAR 구조체를 생성하였다(도 7a). IL-10 CD19 CAR T에서 CD19 CAR의 세포 표면 발현은 종래의 CD19 CAR T 세포의 경우보다 약간 더 높았다(도 7b). IL-10 CD19 CAR에 의해 생성된 IL-10 레벨을 ELISA에 의해 측정하였다(도 7c). 따라서, 본 발명자들이 마우스 CAR T에서 관찰한 결과와 일치되게 IL-10 CD19 CAR T의 종양-용해 잠재력이 또한 향상되었다(도 7d). 아울러, 확립된 PANC1-CD19 인간 체장 종양을 보유하는 면역-결핍 NSG 마우스에서, IL-10-발현 CD19 hCAR T 세포로 처리된 모든 마우스는 재발이 없는 완전한 차도를 나타내었으며(도 7e), 이는 IL-10-발현 인간 CAR T 세포가 이종이식 모델에서 고품 종양에 대한 뛰어난 항-종양 능력을 갖고 있음을 제시한다.

[0132] [0029] IL-10-발현 CAR-T 세포는 미토콘드리아 적합성을 지속시킨다.

[0133] 미토콘드리아 적합성의 손상은 T 세포 고갈을 강화하는 것으로 나타났다. 흥미롭게도, 본 발명자들은 IL-10 발현이 HER2 CAR-T 세포 단독(27.4%) 또는 외인성 IL-10와 조합된 HER2 CAR-T 세포(21.7%)와 비교하여 IL-10 HER2 CAR-T 세포(4.8%)에서 기능장애 미토콘드리아의 실질적으로 감소된 빈도와 함께 종양-침윤 CAR-T 세포에서의 미토콘드리아 적합성을 지속시킴을 발견하였다(도 8a). IL-10 발현은 또한 IL-10 HER2 CAR-T 세포에서 MDR 대 MG의 비를 증가시켰다(도 8b). 미토콘드리아 미세구조의 EM 이미지 분석은 종래의 HER2 CAR-T 세포와 비교하여 종양-침윤 IL-10 HER2 CAR-T 세포에서 세관의 형태, 잘-구조화된 크리스타, 증가된 크리스타의 수, 및 미토콘드리아 당 크리스타의 확장된 길이를 갖는 풍부한 미토콘드리아의 부가적인 증거를 제공하였다(도 8c 내지 도 8f).

[0134] CAR-T 세포에서 IL-10 발현은 오랜 항-종양 면역력을 유도하고 줄기세포능(stemness)을 촉진한다.

[0135] IL-10-발현 CAR-T 세포가 항-종양 면역 메모리를 발생시키는지 여부를 조사하기 위하여, 본 발명자들은 입양적 CAR-T 세포 전달 후 3개월에 생존한 마우스를 재시도하였다. 인상적으로, IL-10 HER2 CAR-T 또는 IL-10 TRP-1 CAR-T 세포로 처리된 장기간 생존체의 100%는 본래의 종양 세포의 2차 시도를 거부하였다(도 9a 내지 도 9c). 강력한 면역 메모리 반응은 본 발명자들이 림프 조직 및 순환계에서 IL-10-발현 CAR-T 세포의 메모리 표현형을 조사하도록 동기부여하였다. 처리 후 12일에 CAR-T 세포(초기 전달된 CAR-T 세포는 모두 CD44hi였음)의 유세포 분석 결과는 IL-10 HER2 CAR T 세포가 비장 및 말초 혈액에서 Tscm 표현형(CD62LhiCD44lo 및 줄기 세포 항원-1(Sca-1)+CD122+에 의해 정의됨)을 갖는 개체군을 강화함을 보여주었다(도 10a 및 도 10b). 비장에서 IL-10 HER2 CAR-T 세포는 HER2 CAR-T 세포 단독과 비교하여 CD62LhiCD44lo T 세포의 빈도가 ~3.2배 더 높음을 보였고, 이 중 대부분(~71.2%)은 Sca-1+CD122+ Tscm이었다(도 10a 및 도 10b). 게다가, IL-10 HER2 CAR-T 세포는 HER2 CAR-T 세포 단독 또는 HER2 CAR-T 세포 + 외인성 IL-10과 비교하여 실질적으로 증가된 Sca-1의 발현을 나타내었다(도 10c). 상기 소견은 IL-10 HER2 CAR T 세포가 비장 및 혈액에서 HER2 CAR-T 세포보다 IL-7R α +KLRG1- 장기-생존 메모리 전구체 T 세포가 각각 ~3.7 및 2.6배 더 높은 비율로 구성되어 있다는 관찰에 의해 추가로 확인되었다(도 10d 및 도 10e). 부가적으로, 본 발명자들은 CD19 hCAR-T 세포와 비교하여 IL-10 CD19 hCAR-T 세포의 처리가 Tscm과 함께 강화되는 것으로 보임을 관찰하였다. 전체적으로, 상기 결과는 IL-10 신호전달이 마우스 및 인간 Tscm CAR-T 세포의 형성을 유도하여 장기간 항-종양 면역력에 기여할 수 있음을 시사한다.

[0136] **[0030] 서열**

[0137] 서열번호 1 - 인간 IL-10

[0138] 아미노산 서열

[0139] SPGQGTQSENSCTHFPGNLPMRLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNFNLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN

[0140] 서열번호 2 - HER2 scFv

[0141] 아미노산 서열

[0142] DYKDI VMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQDVNTAVAWYQKPKGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHYHTTPTFGQGTKVELKRATPSHNSHQVPSAGGPTANSGEVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFNIKDITYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTTVTVSS

[0143] 서열번호 3 - TRP-1 scFv

[0144] 아미노산 서열

[0145] EVQLQQSGAELVRP GALVKLSCKTSGFN IKDYFLHWVRQRPDQGLEWIGWINPDNGNTVYDPKFQGTASLTADTSSNTVYLQLSGLTSEDTAVYFCTRRDYTYEKAALDYWGQASVIVSSGGGSGGGGSDIQMSPASLSASVGETVTITCRASGNIYNYLAWYQKQKSPHLLVYDAKTLADGVPSRFSGSGSTQYSLKISSLQTEDSGNYCQHFWSLPFTFGSGTKLEIKRA

[0146] 서열번호 4 - EGFRvIII scFv

[0147] 아미노산 서열

[0148] EVQVLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGNTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGSSGWSEYWGQGTITVTVSSGGGSGGGGSDIQMTPSSLSASVGDVRTITCRASQGI RNNLAWYQKPKGKAPKRLIYAASNLSQGVPSRFTGSGSGTEFTLIVSSLQPEDFATYYCLQHHSYPLTSGGGTKVEIK

[0149] 서열번호 5 - CD19 scFv

[0150] [0031] 아미노산 서열

[0151] DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNNWYQKPKDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGT KLEITGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLVIGWSETTYNNSALKSLRTI IKDNSKSVFLKMNLSLQTDITAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS

[0152] 서열번호 6 - CD8 막통과 도메인 및 힌지

[0153] 아미노산 서열

[0154] TTTKPVLRTPSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDIYIWAPLAGICVALLLSLIITLICYHRSR

[0155] 서열번호 7 - CD3ζ

[0156] 아미노산 서열

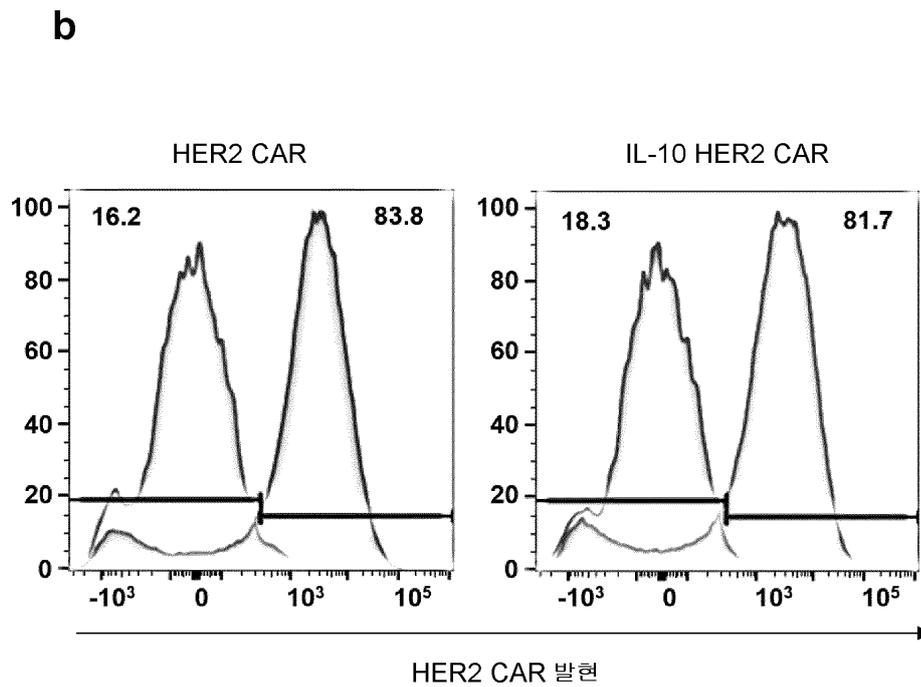
[0157] RAKFSRSAETAANLQDPNQLYNELNLGRREEYDVLEKKRARDPEMGGKQRRRNPNQEGVYNALQKDKMAEAYSEIGTKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTY
DALHMQTLAPR

도면

도면1a

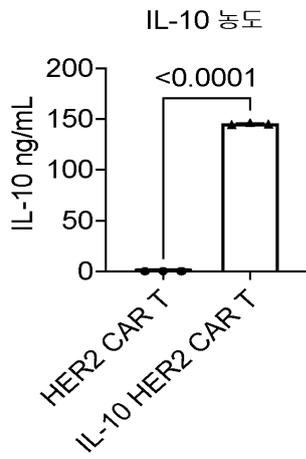


도면1b



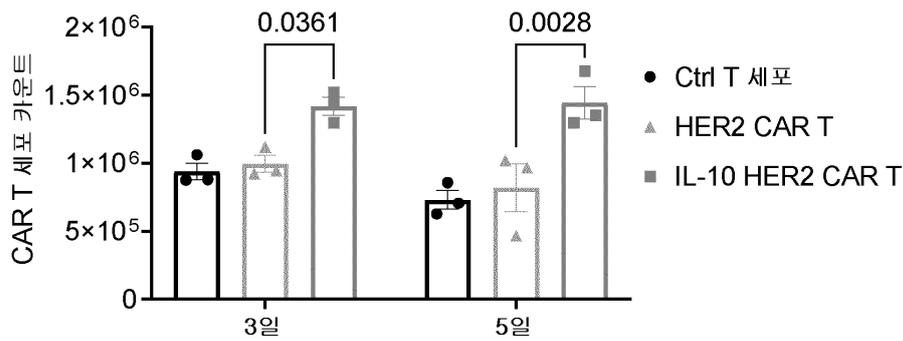
도면1c

c



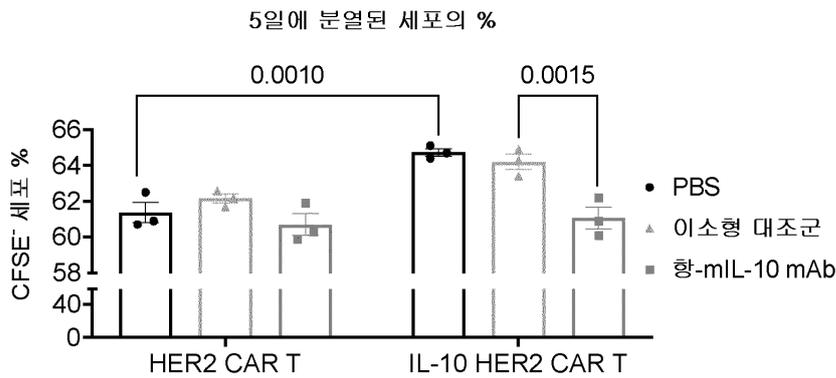
도면1d

d



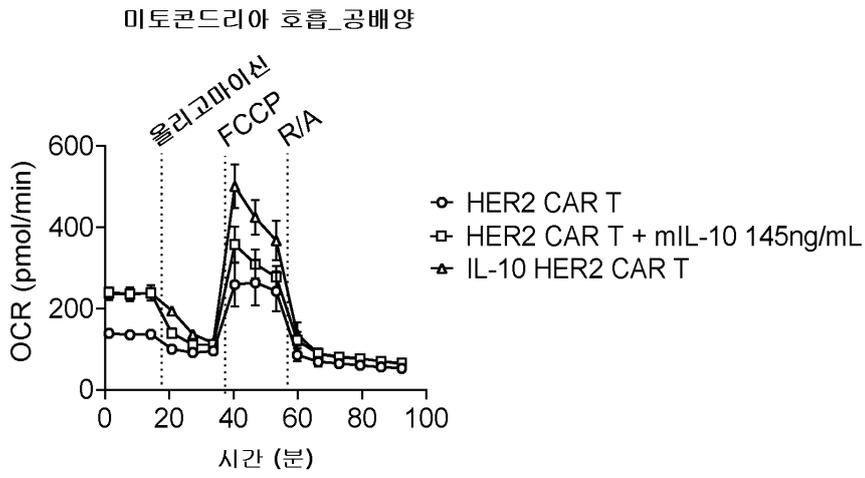
도면1e

e



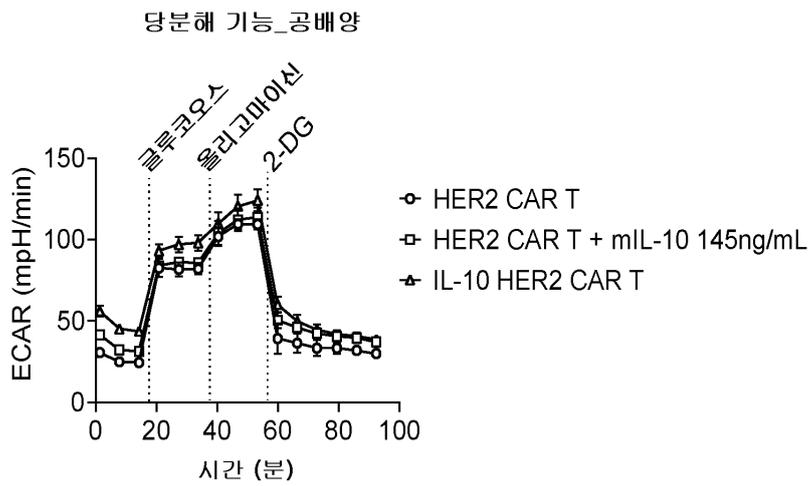
도면1f

f

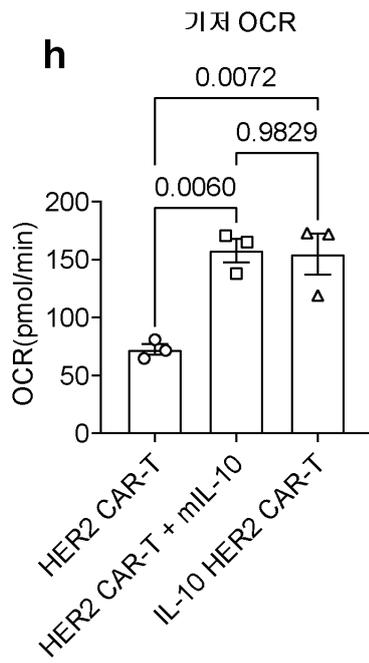


도면1g

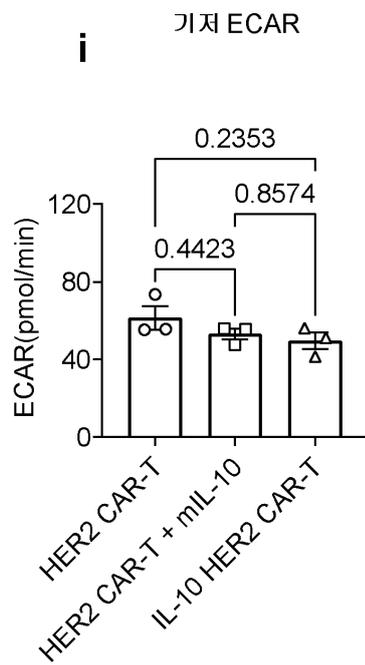
g



도면1h

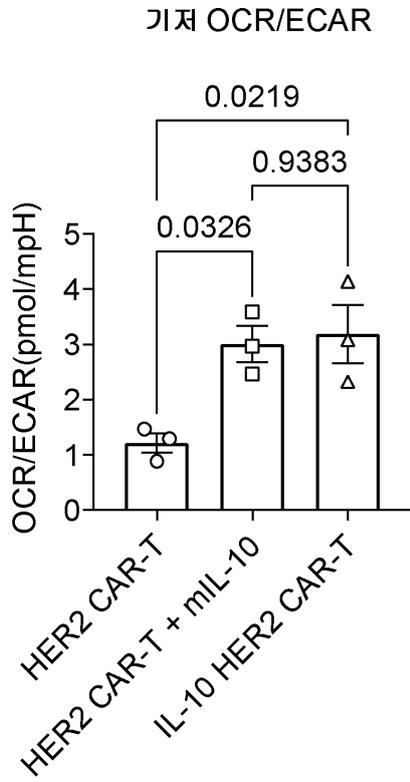


도면1i

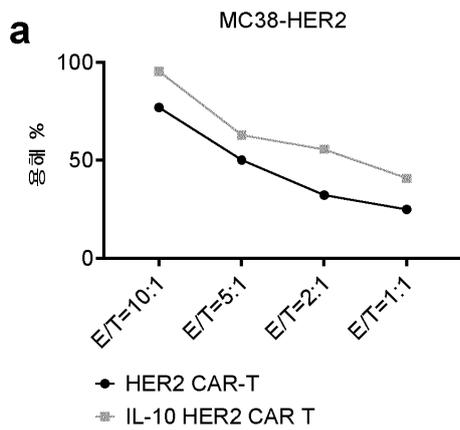


도면1j

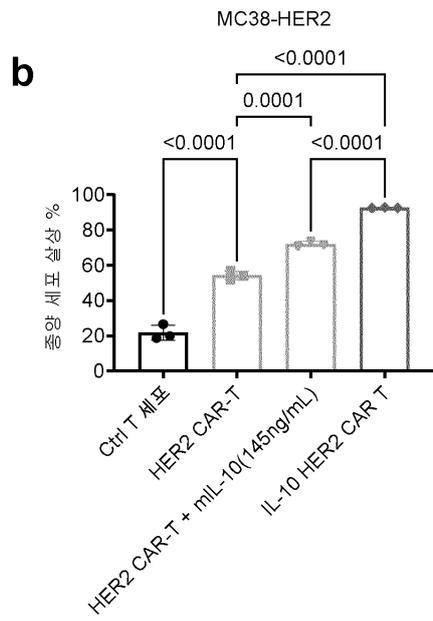
j



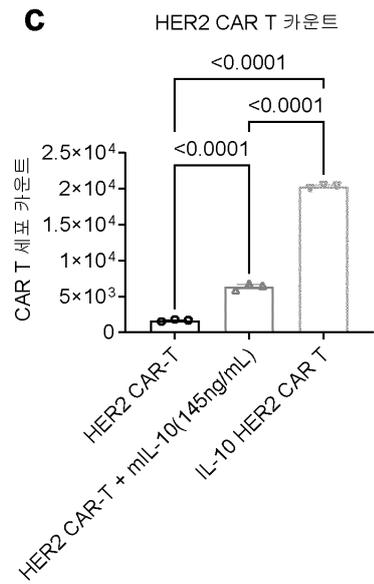
도면2a



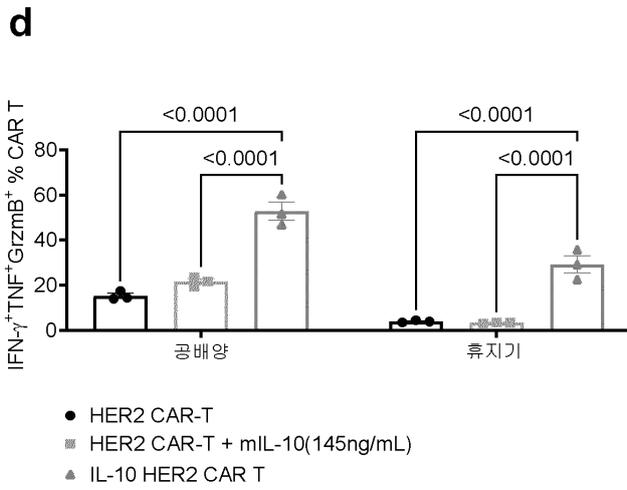
도면2b



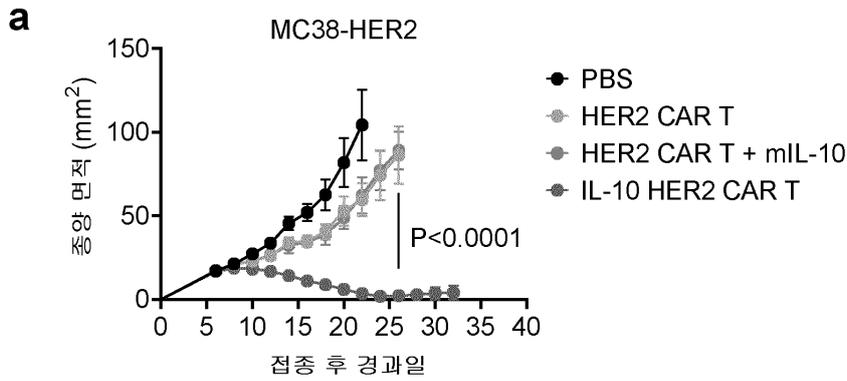
도면2c



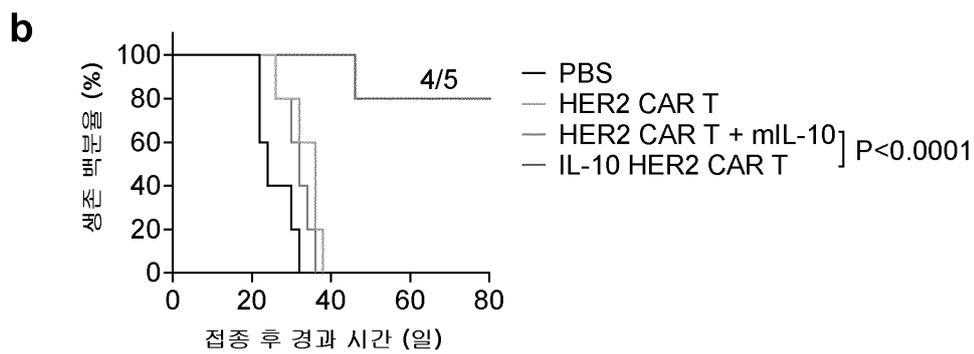
도면2d



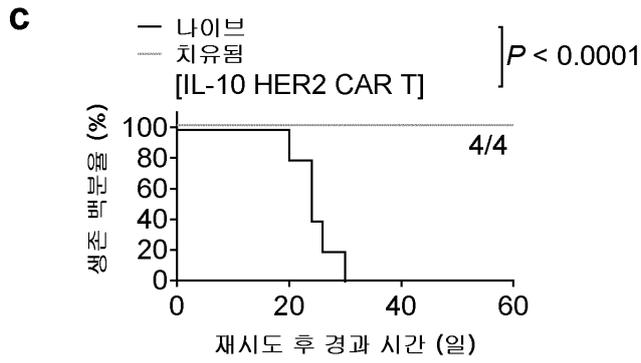
도면3a



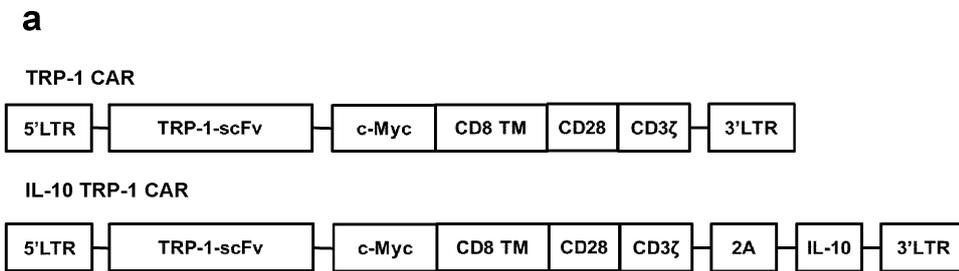
도면3b



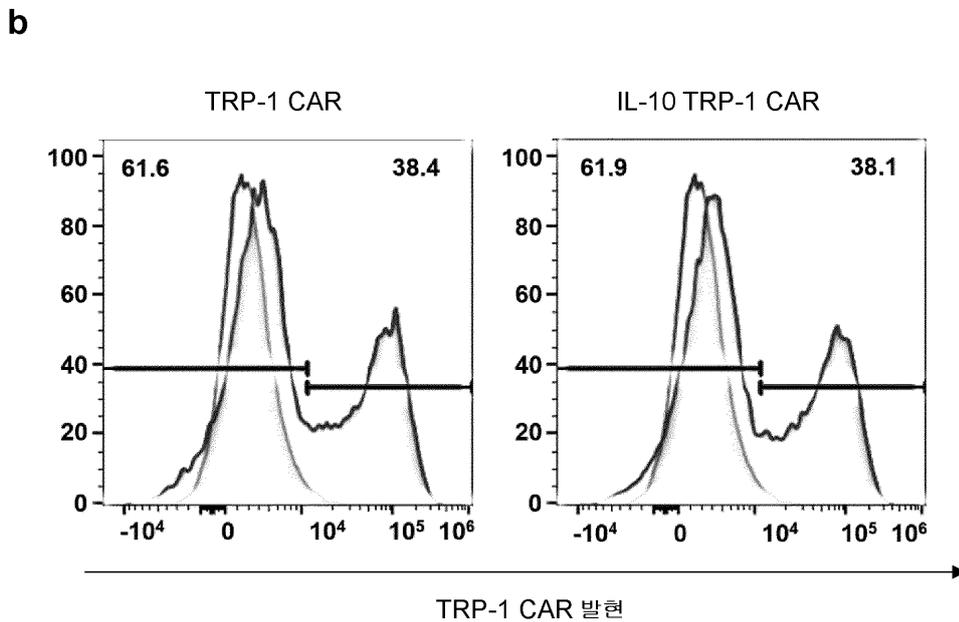
도면3c



도면4a

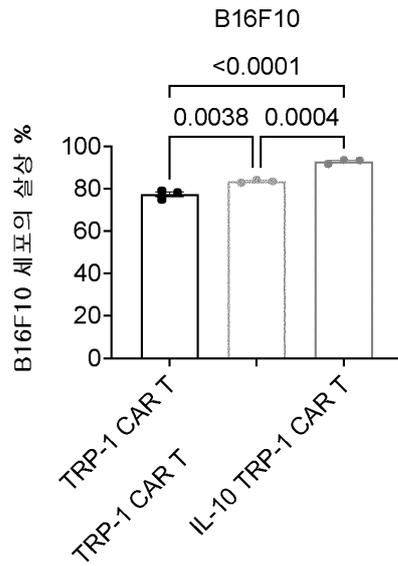


도면4b



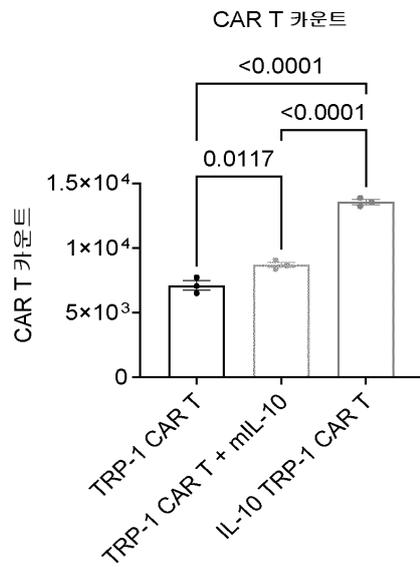
도면4c

c



도면4d

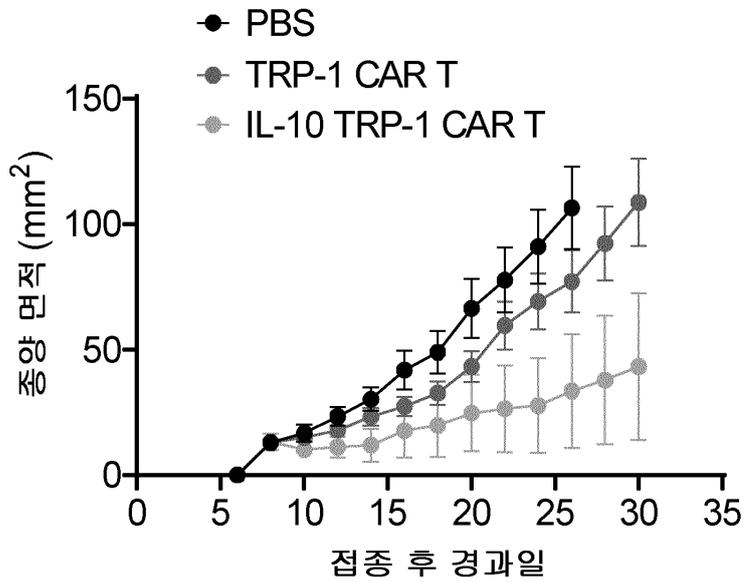
d



도면4e

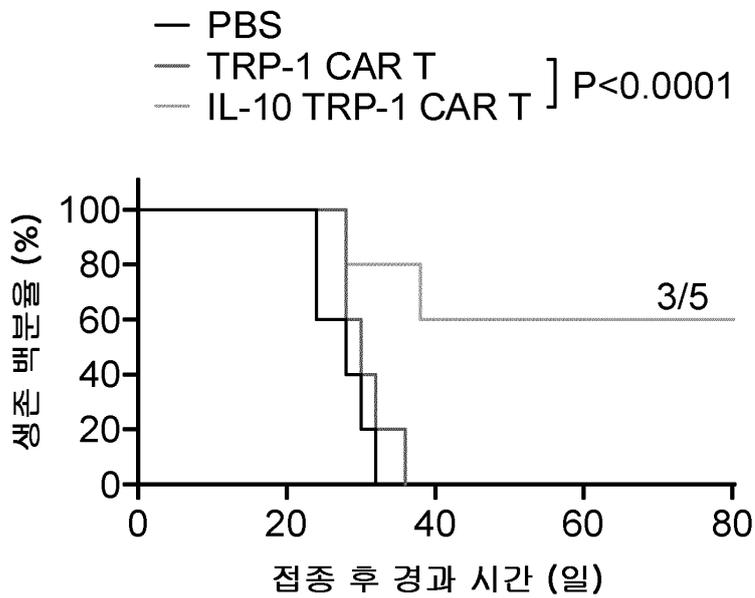
e

B16F10



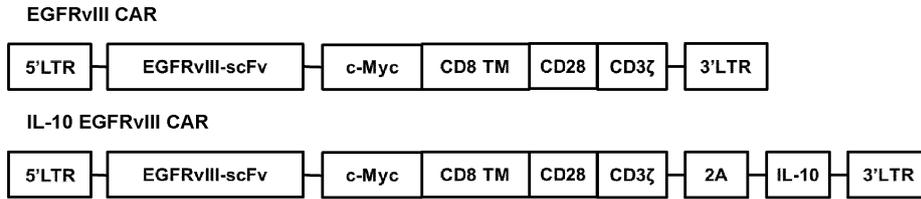
도면4f

f



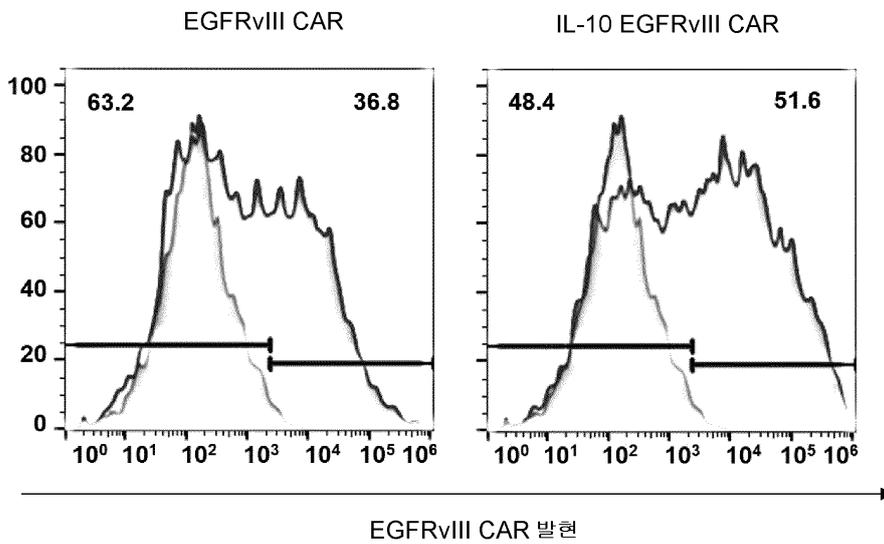
도면5a

a



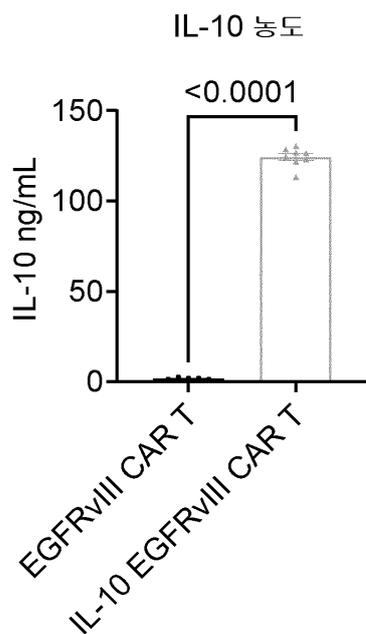
도면5b

b

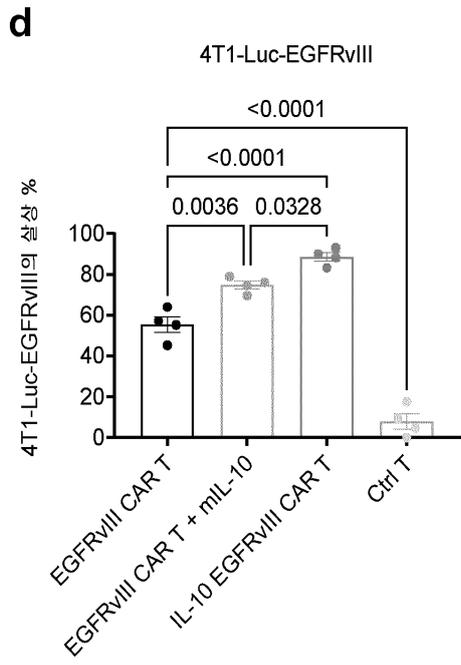


도면5c

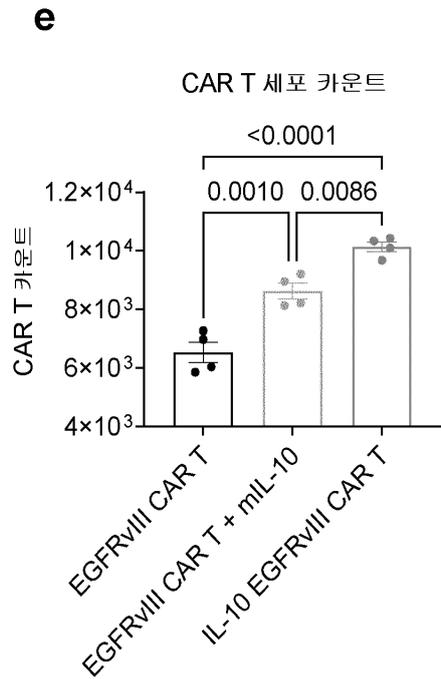
c



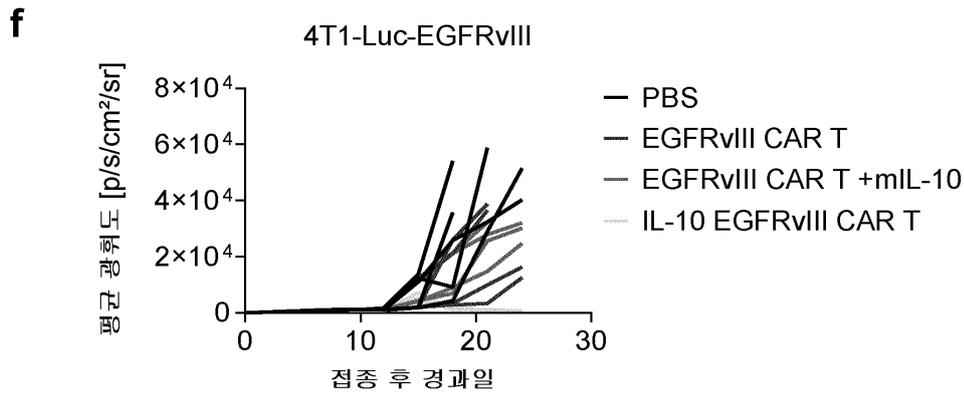
도면5d



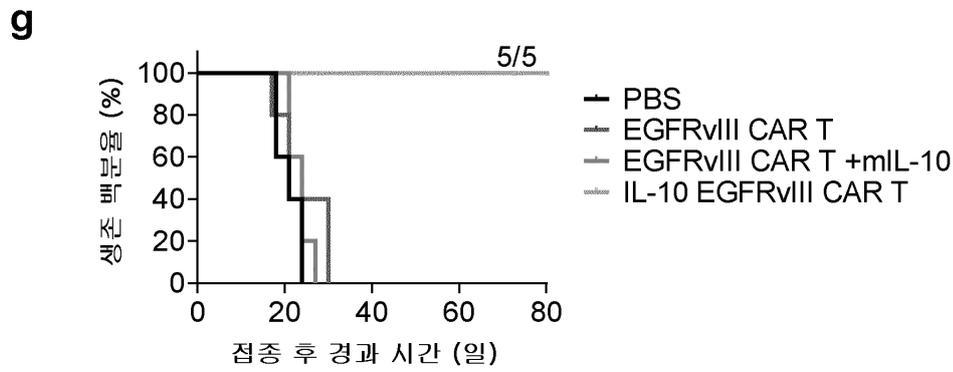
도면5e



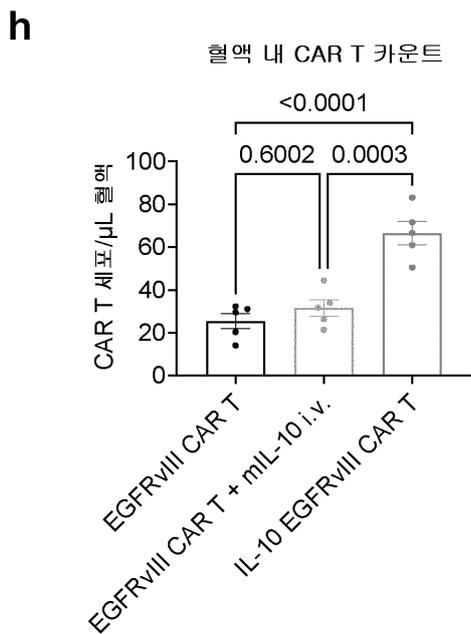
도면5f



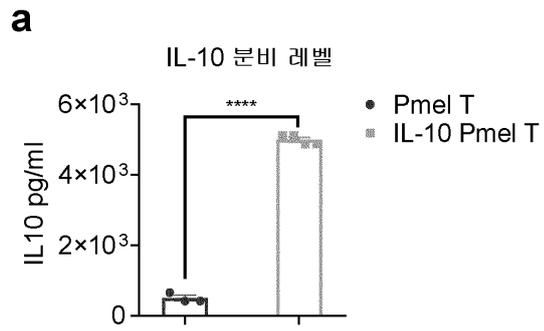
도면5g



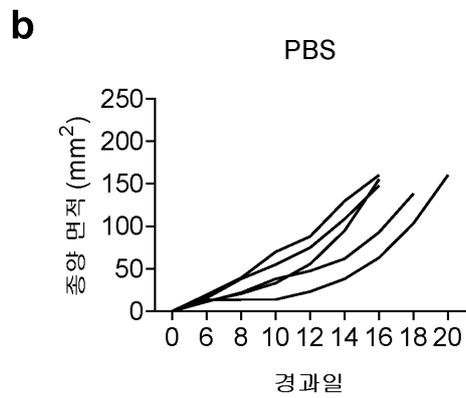
도면5h



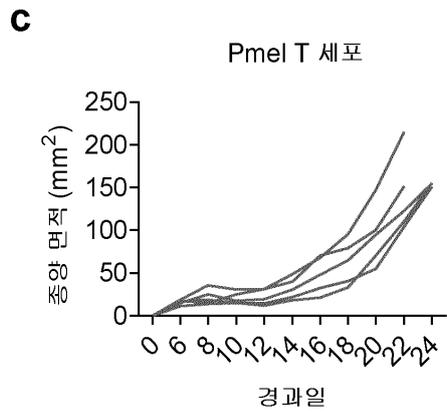
도면6a



도면6b

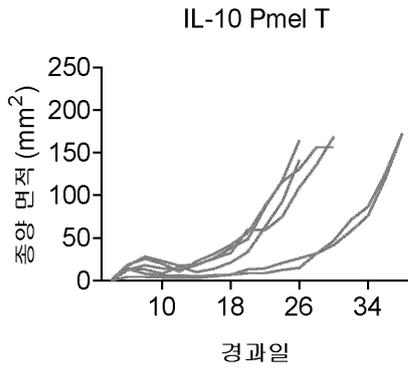


도면6c



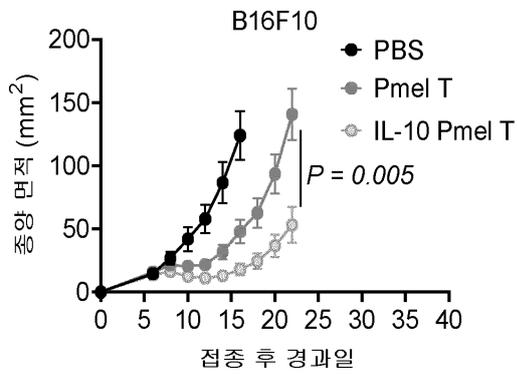
도면6d

d



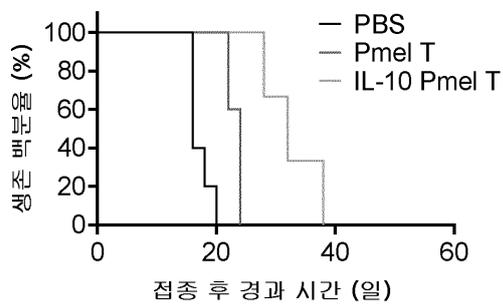
도면6e

e

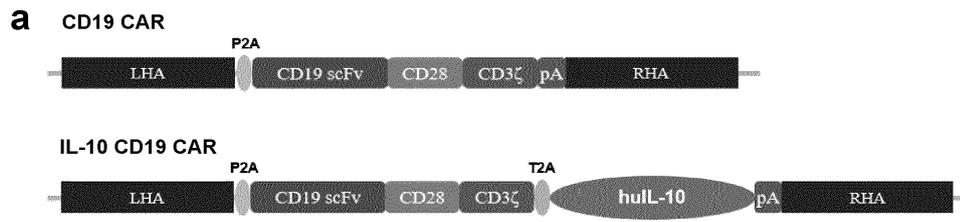


도면6f

f

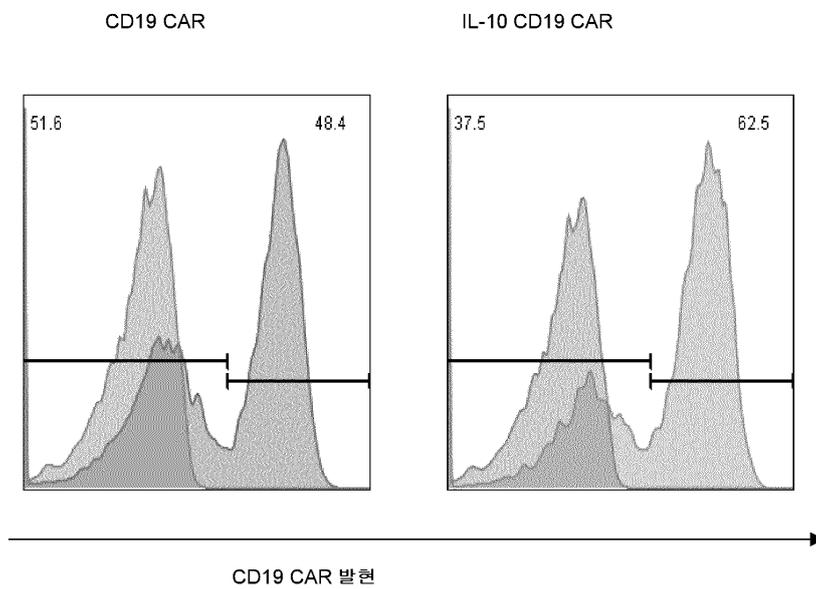


도면7a



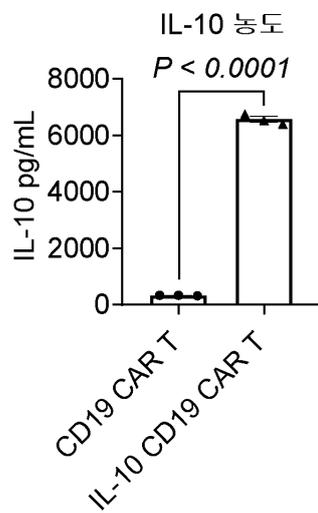
도면7b

b



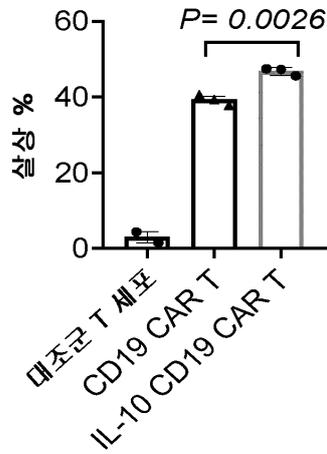
도면7c

c



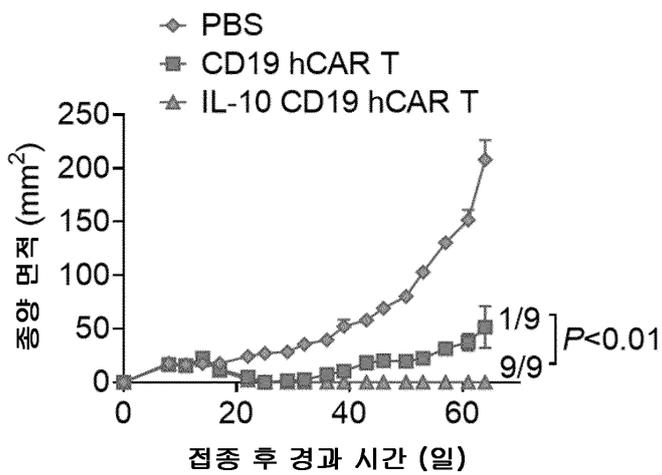
도면7d

d



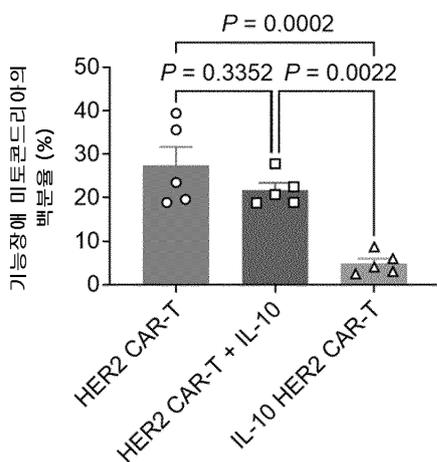
도면7e

e

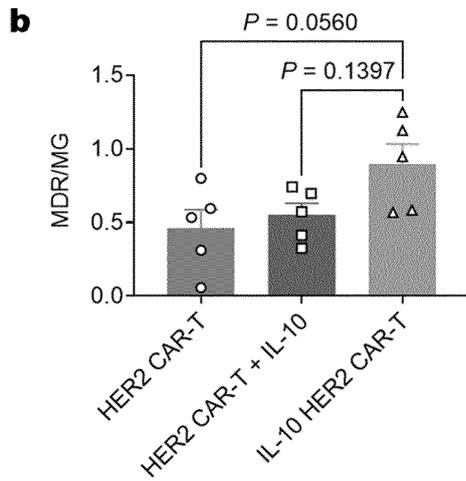


도면8a

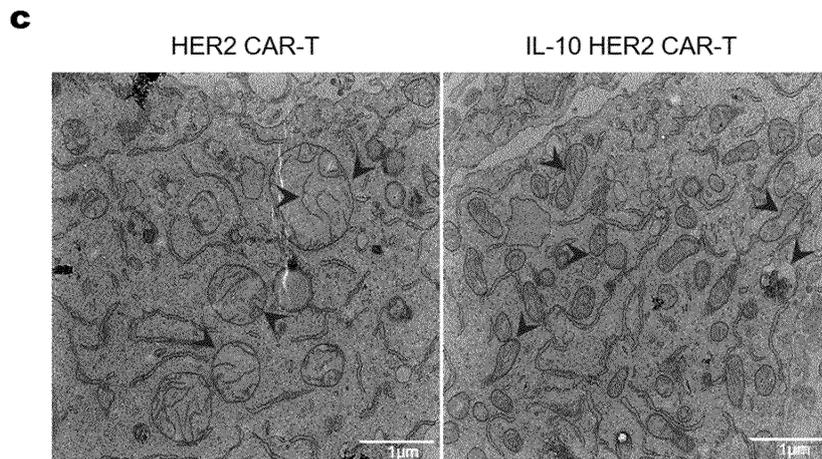
a



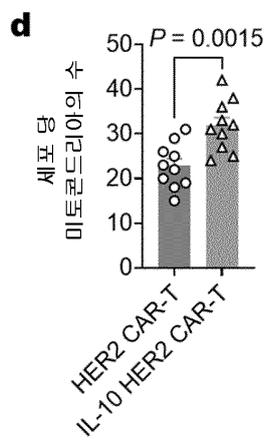
도면8b



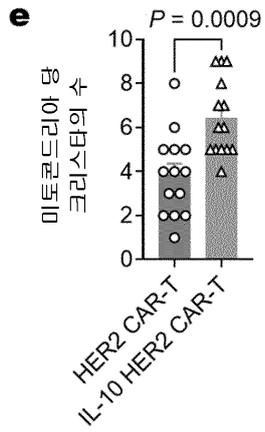
도면8c



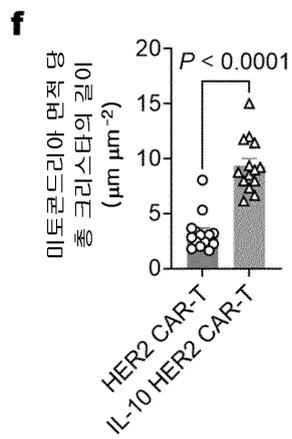
도면8d



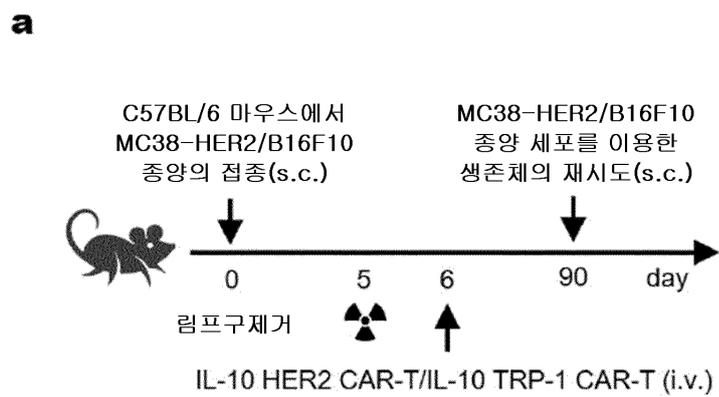
도면8e



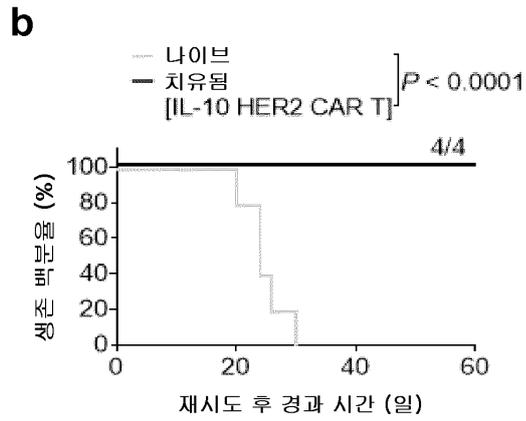
도면8f



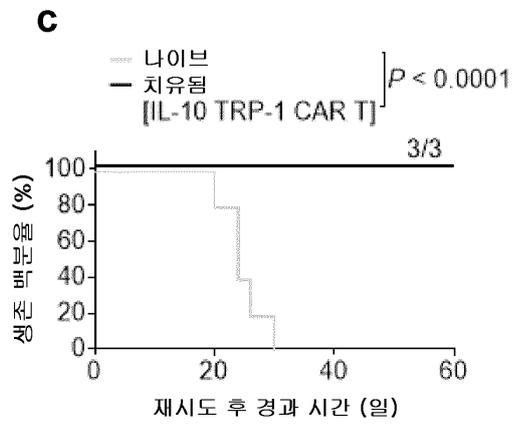
도면9a



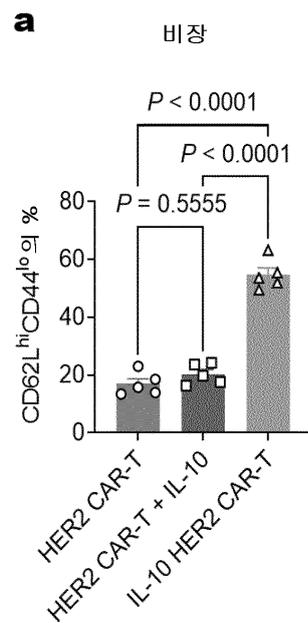
도면9b



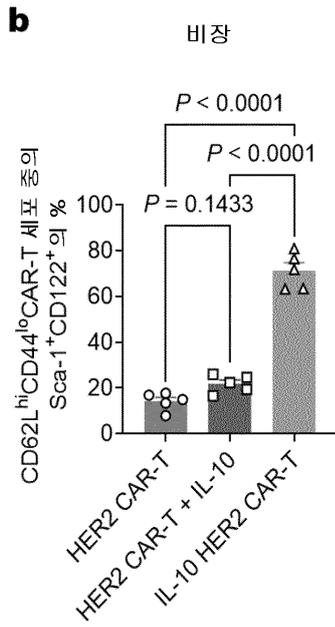
도면9c



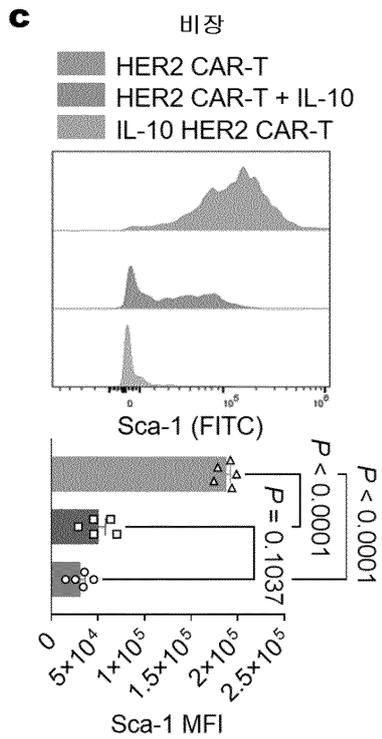
도면10a



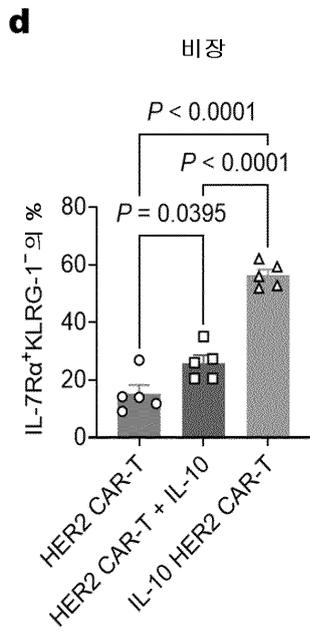
도면10b



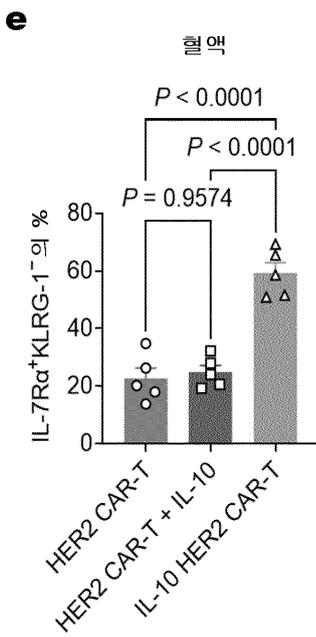
도면10c



도면10d



도면10e



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.