



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0141695
(43) 공개일자 2019년12월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/28 (2015.01) A61K 38/19 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) C12N 5/0775 (2010.01)
C12N 5/0783 (2010.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/28 (2013.01)
A61K 38/195 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-7033512

(22) 출원일자(국제) 2018년04월13일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2019년11월13일

(86) 국제출원번호 PCT/US2018/027492

(87) 국제공개번호 WO 2018/191619

국제공개일자 2018년10월18일

(30) 우선권주장

62/485,295 2017년04월13일 미국(US)

62/583,343 2017년11월08일 미국(US)

(71) 출원인

센티 바이오사이언시스, 인코포레이티드

미국, 캘리포니아 94080, 사우스 샌 프란시스코,
코퍼레이트 드라이브 2

(72) 발명자

루, 티모시, 쿠안-타

미국, 마이애미 02139, 캄브리지, 엔이47-221, 테
크놀로지 스퀘어 500

고들리, 러셀, 모리슨

미국, 캘리포니아 94122, 샌 프란시스코, 아파트
2, 유다 스트리트 2421

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김영철, 김 순 영

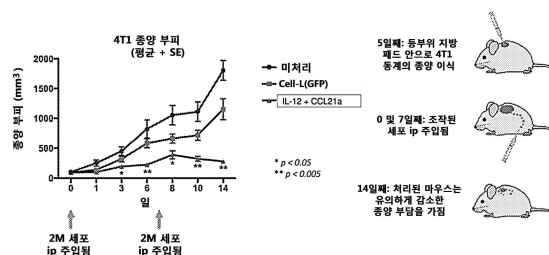
전체 청구항 수 : 총 39 항

(54) 발명의 명칭 병용 암 면역요법

(57) 요약

암에서 다중 면역억제성 기전을 동적으로 조절하고 표적화하기 위한 방법 및 조성물이 본 명세서에 제공된다. 일부 양태는 그 각각이 종양의 상이한 면역억제성 기전을 조절하는 다중 이펙터 분자를 생성하도록 조작된 세포뿐만 아니라 상기 세포를 사용하여 암, 예컨대 난소, 유방, 또는 결장 암을 치료하는 방법을 제공한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 38/208 (2013.01)

A61K 38/215 (2013.01)

A61K 38/217 (2013.01)

A61K 39/395 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/2818 (2013.01)

C12N 15/63 (2013.01)

C12N 5/0636 (2013.01)

C12N 5/0663 (2013.01)

(72) 발명자

린, 잭, 추-치아오

미국, 캘리포니아 94065, 레드우드 시티, 해스팅스
솔 엘엔. 2802

개리슨, 브라이언, 스코트

미국, 캘리포니아 95120, 산 호세, 카사마 그릭
시티 1105

이, 필립, 잔민

미국, 캘리포니아 94501, 알라메다, 베이 스트리트
1106

곤잘레스-준카, 알바

미국, 캘리포니아 94122, 샌 프란시스코, 아파트
105, 7번가 1467

왕, 돈-홍

미국, 캘리포니아 94080, 사우스 샌 프란시스코,
코퍼레이트 드라이브 2, 센티 바이오사이언시스,
인코포레이티드

명세서

청구범위

청구항 1

대상체에서 종양 부피를 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은 종양이 있는 대상체에게 종양-매개된 면역억제성 기전을 조절하는 다중 이펙터 분자를 생성하도록 조작된 간엽 줄기 세포를 포함하는 조성물을 종양의 부피를 감소시키는 유효량으로 전달하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 다중 이펙터 분자는 사이토카인, 수용체/리간드, 항체, 뉴클레오타이드, 펩타이드 및 효소로부터 선택되는, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 종양은 방광 종양, 뇌종양, 유방 종양, 자궁경부 종양, 결장직장 종양, 식도 종양, 신경아교종, 신장 종양, 간 종양, 폐 종양, 흑색종, 난소 종양, 췌장 종양, 전립선 종양, 피부 종양, 갑상선 종양 및 자궁 종양으로부터 선택되는, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 (a) 제1 이펙터 분자를 생성하도록 조작된 제1 간엽 줄기 세포 및 (b) 제2 이펙터 분자를 생성하도록 조작된 제2 간엽 줄기 세포를 포함하는, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 제1 이펙터 분자 및 제2 이펙터 분자를 생성하도록 조작된 간엽 줄기 세포를 포함하는, 방법.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, 상기 제1 이펙터 분자는 IL-12이고 상기 제2 이펙터 분자는 CCL21인, 방법.

청구항 7

제4항 또는 제5항에 있어서, 상기 제1 이펙터 분자는 IFN- β 이고 제2 이펙터 분자는 IFN- γ 인, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 간엽 줄기 세포는 IL-12, CCL21, IFN- β , IFN- γ , 또는 전술한 것 중 임의의 2종 이상의 조합을 생성하도록 조작되는, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 체크포인트 억제제를 더 포함하는, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 체크포인트 억제제는 항-PD-1 항체, 항-PD-1L 항체 또는 항-CTLA-4 항체인, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 체크포인트 억제제는 항-CTLA-4 항체인, 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 항-CD40 항체를 더 포함하는, 방법.

청구항 13

제3항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양은 유방 종양인, 방법.

청구항 14

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양은 결장직장 종양인, 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양의 부피는 대조군에 비하여 적어도 25%까지 감소되고, 선택적으로 상기 대조군은 비변형된 간엽 줄기 세포인, 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 종양의 부피는 대조군에 비하여 적어도 50%까지 감소되고, 선택적으로 상기 대조군은 비변형된 간엽 줄기 세포인, 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 종양의 부피는 대조군에 비하여 적어도 75%까지 감소되고, 선택적으로 상기 대조군은 비변형된 간엽 줄기 세포인, 방법.

청구항 18

제4항 또는 제5항에 있어서, 상기 종양은 유방 종양이고, 제1 이펙터 분자는 IL-12이고, 제2 이펙터 분자는 CCL21이고, 그리고 선택적으로 상기 조성물은 항-CTLA-4 항체를 더 포함하는, 방법.

청구항 19

제4항 또는 제5항에 있어서, 상기 종양은 결장직장 종양이고, 제1 이펙터 분자는 IL-12이고, 제2 이펙터 분자는 CCL21이고, 그리고 선택적으로 상기 조성물은 추가로 항-CD40 항체를 포함하는, 방법.

청구항 20

종양-매개된 면역억제성 기전을 조절하는 다중 이펙터 분자를 생성하도록 조작된 간엽 줄기 세포로, 선택적으로 상기 이펙터 분자 중 하나는 IL-12이고 이펙터 분자 중 또 다른 것은 CCL21인, 조작된 간엽 줄기 세포.

청구항 21

대상체에서 종양의 부피를 감소시키기 위한 유효량으로 제형화된, 종양-매개된 면역억제성 기전을 조절하는 다중 이펙터 분자를 생성하도록 조작된 간엽 줄기 세포를 포함하는 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 다중 이펙터 분자는 사이토카인, 수용체/리간드, 항체, 뉴클레오타이드, 펩타이드 및 효소로부터 선택되는, 조성물.

청구항 23

제21항 또는 제22항에 있어서, 상기 종양은 방광 종양, 뇌종양, 유방 종양, 자궁경부 종양, 결장직장 종양, 식도 종양, 신장아교종, 신장 종양, 간 종양, 폐 종양, 흑색종, 난소 종양, 췌장 종양, 전립선 종양, 피부 종양, 갑상선 종양, 및 자궁 종양으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 24

제21항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 (a) 제1 이펙터 분자를 생성하도록 조작된 제1 간엽 줄기 세포 및 (b) 제2 이펙터 분자를 생성하도록 조작된 제2 간엽 줄기 세포를 포함하는, 조성물.

청구항 25

제21항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 제1 이펙터 분자 및 제2 이펙터 분자를 생성하도록 조작된 간엽 줄기 세포를 포함하는, 조성물.

청구항 26

제24항 또는 제25항에 있어서, 상기 제1 이펙터 분자는 IL-12이고 제2 이펙터 분자는 CCL21인, 조성물.

청구항 27

제24항 또는 제25항에 있어서, 상기 제1 이펙터 분자는 IFN- β 이고 제2 이펙터 분자는 IFN- γ 인, 조성물.

청구항 28

제21항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 간엽 줄기 세포는 IL-12, CCL21, IFN- β , IFN- γ 또는 전술한 것 중 임의의 2종 이상의 조합을 생성하도록 조작되는, 조성물.

청구항 29

제21항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 체크포인트 억제제를 더 포함하는, 조성물.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 체크포인트 억제제는 항-PD-1 항체, 항-PD-1L 항체 또는 항-CTLA-4 항체인, 조성물.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 체크포인트 억제제는 항-CTLA-4 항체인, 조성물.

청구항 32

제21항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 추가로 항-CD40 항체를 포함하는, 조성물.

청구항 33

제23항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양은 유방 종양인, 조성물.

청구항 34

제21항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양은 결장직장 종양인, 조성물.

청구항 35

제21항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 종양의 부피는 대조군에 비하여 적어도 25%까지 감소되고, 선택적으로 상기 대조군은 비변형된 간엽 줄기 세포인, 조성물.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 종양의 부피는 대조군에 비하여 적어도 50%까지 감소되고, 선택적으로 상기 대조군은 비변형된 간엽 줄기 세포인, 조성물.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 종양의 부피는 대조군에 비하여 적어도 75%까지 감소되고, 선택적으로 상기 대조군은 비변형된 간엽 줄기 세포인, 조성물.

청구항 38

제24항 또는 제25항에 있어서, 상기 종양은 유방 종양이고, 제1 이펙터 분자는 IL-12이고, 제2 이펙터 분자는 CCL21이고, 그리고 선택적으로 상기 조성물의 간엽 줄기 세포는 항-CTLA-4 항체를 생성하도록 조작된, 조성물.

청구항 39

제24항 또는 제25항에 있어서, 상기 종양은 결장직장 종양이고, 제1 이펙터 분자는 IL-12이고, 제2 이펙터 분자

는 CCL21이고, 그리고 선택적으로 상기 조성물의 간엽 줄기 세포는 항-CD40 항체를 생성하도록 조작된, 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에서 2017년 4월 13일자로 출원된 미국 가출원 번호 62/485,295 및 2017년 11월 8일자로 출원된 미국 가출원 번호 62/583,343의 이점을 주장하고, 이들 각각은 본 명세서에 전체적으로 참고로 포함된다.

배경 기술

[0003] 미국에서는 매년 22,000건 초과와 새로운 난소 암 사례와 14,000건 초과와 사망이 발생하여 (Siegel RL, et al. (2016) CA Cancer J Clin 66(1):7-30), 6억 달러 이상의 추정된 연간 건강관리 부담금을 안고 있다 (Dizon D MJ (2010) Gynecol Oncol 116 (3)). 종래의 접근법, 예컨대 화학 요법 (예를 들어, 카보플라틴/시스플라틴 및/또는 파클리탁셀)은 종종 난소 암을 치료할 수 없다. 환자의 대략 70%가 1차 화학 요법에서 차도를 달성하지 못하고, 차도가 있는 환자의 40-50%는 3년 이내에 재발한다.

[0004] 다른 암, 예컨대 유방암 및 결장암의 치료는 각각 85% 및 65%의 5-년 생존율과 연관된다. 요법은 종종 침습성 수술 및 화학요법의 조합을 포함한다.

발명의 내용

[0005] 일부 구현예에서, 암, 예컨대 난소암, 유방암, 결장암, 폐암, 및 췌장암의 표적화된 치료를 위한 병용 세포 기반 면역요법이 본 명세서에 제공된다. 이 병용 면역요법은 종양 내 및/또는 종양 근처에서 다인 조절을 가능하게 하는 조작된 세포 회로 ("종양 미세환경 (TME)")에 의존한다. 병용 면역요법에서의 고무된 진전에도 불구하고, 암에 대한 이의 효능은 하기 과제에 부분적으로 기인하여 제한되었다. 상당한 부작용을 유발하지 않으면서 최대의 효과를 달성하기 위해 여러 요법을 동시에 전달하는 것은 어렵다. 임상 시험에서 다중의 전신적으로-투여 및/또는 국소적으로-주입된 요법의 적절한 투여 및 시기를 결정하는 것도 또한 어렵다. 그러나, 본 명세서에 제공된 병용 면역요법은 종양 특이적이고 효과적이지만 전신 독성을 제한한다. 이 병용 면역요법은, 일부 사례에서, 단일 전달 비히클로부터 다중 면역조절 이펙터(effector) 분자를 종양 미세환경에 전달하는 데 사용될 수 있다. 유익하게는, 본 발명의 세포 회로는 일부 구현예에서, 간엽 줄기 세포 (MSC)에서 조작되어, 선택적으로 종양 (전이를 포함함)으로 향할 수 있고, 전-염증/면역자극성 분비물 및 특정 조건 하에서 항-염증성 분비물을 생성할 수 있고, 그리고 저면역원성이다. 이들 특성은 무엇보다도, 예를 들어, 중요한 안전성 문제, 부작용 또는 거부없이 동종 세포 요법에 대해 그 사용을 가능하게 한다.

[0006] 종양은 종양 세포와 주변 기질, 예를 들어 세포외 기질, 암-연관된 기질 세포 (MSC 및 섬유모세포), 종양 맥관 구조, 및 면역계 사이의 복잡한 상호작용이라는 것이 점점 더 인식되고 있다. TME는 환자의 선천적 및 적응성 면역계 둘 모두를 표적으로 하는 다중 기전을 통해 항종양 면역 반응을 억제한다. 예를 들어, 종양은 CCL22와 같은 특정한 케모카인을 정교화함에 의해 통상적인 T 세포의 항종양 활성을 억제하는 조절 T 세포를 모집 및 유도할 수 있다. 종양은 또한 T 세포 및 NK 세포의 활성을 억제하는 분자, 예컨대 PD-L1과 같은 면역 체크포인트(checkpoint)를 발현할 수 있다. 따라서, 단일 경로를 표적화하는 것은 고형 종양에 대한 강력한 효능을 달성하기에 충분하지 않을 수 있다.

[0007] 따라서, 일부 양태에서, 본 개시내용은 다중 이펙터 분자를 생성하도록 조작된 간엽 줄기 세포 (MSC)를 제공하고, 그 중 적어도 2종은 상이한 종양-매개된 면역억제성 기전 (예를 들어, 다중 경로를 표적화함)을 조절한다. 일부 구현예에서, 이펙터 분자는 (a) T 세포 신호전달, 활성 및/또는 동원을 자극하고, (b) 항원 전달 및/또는 처리를 자극하고, (c) 천연 살해 세포-매개된 세포독성 신호전달, 활성 및/또는 동원을 자극하고, (d) 수지상 세포 분화 및/또는 성숙을 자극하고, (e) 면역 세포 동원을 자극하고, (f) 전-염증 대식세포 신호전달, 활성 및/또는 동원을 자극하거나 또는 항-염증성 대식세포 신호전달, 활성 및/또는 동원을 억제하고, (g) 기질 열화를 자극하고, (h) 면역자극성 대사물 생산을 자극하고, (i) 유형 I 인터페론 신호전달을 자극하고, (j) 음성 공동자극 신호전달을 억제하고, (k) 항종양 면역 세포 (예를 들어, T 세포/NK 세포)의 세포자멸사 유도 신호전달을 억제하거나 암 세포의 세포자멸사를 유도하고, (l) T 조절 (Treg) 세포 신호전달, 활성 및/또는 동원을 억제하고, (m) 종양 체크포인트 분자를 억제하고, (n) 인터페론 유전자 자극인자(STING)의 신호전달을 자극하고, (o) 골수

성-유래된 억제제 세포 신호전달, 활성화 및/또는 동원을 억제하고, (p) 면역억제성 인자/대사물을 저하시키고, (q) 혈관 내피 성장 인자 신호전달을 억제하고, 및/또는 (r) 직접적으로 종양 세포를 사멸시킨다. 예를 들어, 조작된 MSC에 의해 생산된 하나의 이펙터 분자는 TME에서 항종양 면역-매개된 기전 또는 면역자극성 기전을 자극할 수 있고, 반면에 동일한 MSC (또는 상이한 MSC)에 의해 생산된 또 다른 이펙터 분자는 TME 내 면역억제성 기전 (예를 들어, CD28/B7 계열 경로 (예를 들어 PD-1, CTLA-4, CD28) 또는 IL-10)을 억제할 수 있다. 또 다른 예로서, 조작된 MSC에 의해 생산된 하나의 이펙터 분자는 종양 미세환경에서 염증성 경로 (예를 들어, TNF 수용체 상과(super family) 경로 (예를 들어, OX40, CD137, CD40, GITR), 일반적 감마-사슬 계열 경로 (예를 들어 IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL15, IL-21) 또는 톨-유사 수용체 경로 (예를 들어 TLR4, TLR9))를 자극할 수 있고, 반면에 동일한 MSC (또는 상이한 MSC)에 의해 생산된 또 다른 이펙터 분자는 종양 미세환경에서 염증의 음성 조절인자 (예를 들어, Stat3, 브루톤 티로신 키나제, c-kit, 및/또는 SOCS-1)를 억제할 수 있다.

[0008] 본 개시내용에 의해 포괄된 이펙터 분자의 비-제한적인 예는 사이토카인, 항체, 케모카인, 뉴클레오타이드, 펩타이드, 효소, 및 종양용해 바이러스를 포함한다. 예를 들어, MSC는 적어도 1, 2, 3 또는 그 초과와 하기 이펙터 분자: IL-12, IL-16, IFN- β , IFN- γ , IL-2, IL-15, IL-7, IL-36 γ , IL-18, IL-1 β , IL-21, OX40-리간드, CD40L, 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-CTLA-4 항체, 항-TGF β 항체, 항-TNFR2, MIP1 α (CCL3), MIP1 β (CCL5), CCL21, CpG 올리고데옥시뉴클레오타이드, 및 항종양 펩타이드 (예를 들어, 항종양 활성을 갖는 항-미생물 펩타이드, 예를 들어, Gaspar, D. et al. *Front Microbiol.* 2013; 4: 294; Chu, H. et al. *PLoS One.* 2015; 10(5): e0126390, 및 웹사이트: aps.unmc.edu/AP/main.php 참고)를 발현하도록 (그리고 전형적으로 분비하도록) 조작될 수 있다.

[0009] 간엽 줄기 세포가 이펙터 분자를 생성하도록 배양하는 것을 포함하는 방법이 또한 본 명세서에 제공된다.

[0010] 간엽 줄기 세포에 의해 생산된 적어도 하나의 이펙터 분자를 *생체내*에서 생산하도록 간엽 줄기 세포를 대상체에게 전달하는 것을 포함하는 방법이 추가로 본 명세서에 제공된다. 일부 구현예에서, 이펙터 분자는 종양 미세환경에서 생산되거나 또는 종양 미세환경으로 전달된다.

[0011] 더 나아가, 간엽 줄기 세포를 암이 진단된 대상체에게 전달하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 일부 구현예에서, 상기 암은 난소암이지만, 다른 암/종양도 치료될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 제공된 방법은 방광 종양, 뇌종양, 유방 종양, 자궁경부 종양, 결장직장 종양, 식도 종양, 신경아교종, 신장 종양, 간 종양, 폐 종양, 흑색종, 난소 종양, 췌장 종양, 전립선 종양, 피부 종양, 갑상선 종양, 및/또는 자궁 종양을 치료하기 위해 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] **도 1**은 인공 5' UTR (copGFP의 막대 업스트림) 및 3' UTR (copGFP의 막대 다운스트림)로 핵감염된 플라스미드를 사용하여 인간 MSC에서 GFP의 발현을 도시한다. 생존한 MSC의 >80%은 이 프로토콜에서 높은 수준의 GFP를 발현한다 (어두운 회색 히스토그램).

도 2는 "이펙터 1" (BFP) 및 "이펙터 2" (GFP)의 이중 발현을 도시하는 2A 발현 벡터 디자인 및 유세포측정 히스토그램을 도시한다. 좌측 플롯: 제2 피크 히스토그램 (중간 회색)은 BFP-2A-GFP 작제물을 함유하는 세포를 나타내고, 제3 피크 히스토그램 (어두운 회색)은 GFP 발현 작제물 만을 함유하는 세포를 나타내고, 제1 피크 히스토그램 (밝은 회색)은 형질감염되지 않은 세포를 나타낸다. 우측 플롯: 제3 피크 히스토그램 (중간 회색)은 BFP-2A-GFP 작제물을 함유하는 세포를 나타내고, 제2 피크 히스토그램 (밝은 회색)은 GFP 발현 작제물 만을 함유하는 세포를 나타내고, 제1 피크 히스토그램 (중간 회색)은 형질감염되지 않은 세포를 나타낸다. 우측 플롯에서 이동된 곡선은 GFP⁺ 세포를 생성하는 2A 디자인이 또한 공-발현 BFP이라는 것을 나타낸다.

도 3은 복강내로 주입된 젓과 BM-유래된 MSC (BM-MSC)가 *생체내* 4T1 유방암 세포의 종양 부위로 향한다는 것을 나타내는 데이터를 도시한다. 형광으로 표지된 BM-MSC (치료적 세포)는 4T1 유방 종양 세포를 담지하는 마우스 안으로 주입되었다. 유방 종양 세포는 루시퍼라제 리포터를 발현한다. 좌측 상의 처음 최상부 2개 패널은 지시된 바와 같이 주사 후 1일 및 7일째에 종양을 담지하는 마우스에서 치료적 세포 (BM-MSC)의 이미징형성을 나타낸다. 좌측 상의 세번째 최상부 패널은 주사 후 7일째에 종양을 담지하는 마우스에서 종양 세포의 이미징형성을 나타낸다. 좌측 상의 하단 2개 패널은 지시된 바와 같이 주사 후 1일 및 7일째에 종양을 담지하지 않는 정상 마우스에서의 치료적 세포의 이미징형성을 보여준다. 치료적 세포의 귀소에 대한 종양의 효과를 나타내는 개략도가 가장 우측에 제공된다.

도 4는 IL-12 및 CCL21a를 발현하는 조작된 MSC가 유방암의 동소이식 마우스 모델에서 상당한 종양 성장 지연을 유도했음을 나타내는 데이터를 도시한다. 좌측 상의 차트는 마우스에서 4T1 유방 종양 성장에 대한 조작된 MSC의 효과를 나타낸다 ($n = 8$). 차트에서 각각의 라인은 0일 및 7일째에 대조군 MSC 성장 배치 또는 조작된 MSC 중 어느 하나의 복강내 주사를 받는 마우스에서의 종양 부피를 나타낸다. 마우스는 IL-12를 발현하는 조작된 MSC 및 CCL21a를 발현하는 조작된 MSC의 복강내 주사를 받았다. 종양 부피는 격일마다 캘리퍼스 측정에 의해 결정되었다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM을 나타낸다. 대조군 배치 그룹과 비교하여 $*p < 0.05$, $**p < 0.005$. 우측 상의 도식은 처리된 마우스에서 처리의 타임라인 및 종양 부담에 대한 조작된 MSC 발현된 조합 유전자 IL-12 및 CCL21a의 효과를 나타낸다.

도 5A는 IFN- β , IFN- γ , IL-12, CCL21a 또는 이들의 조합을 발현하는 조작된 MSC가 유방암 (4T1 삼중 음성 유방 암종)의 동소이식 마우스 모델에서 종양 성장을 억제한다는 것을 나타내는 데이터를 포함한다. 각각의 이펙터는 상이한 MSC에 의해 발현되었고, 조합 치료를 위해 MSC는 (1:1 비로) 조합되었다. 각각의 차트는 마우스에서 4T1 유방 종양의 성장에 대한 지시된 면역요법 단독으로 또는 조합하여 발현하는 조작된 MSC의 효과를 나타낸다 ($n = 6-8$). **도 5a**의 각각의 라인은 개별 마우스를 나타낸다. **도 5b**의 좌측 그래프는 14일째에 각각의 치료에서 개별 마우스의 종양 중량을 도시한다. **도 5b**의 우측 그래프는 시간이 지남에 따라 각각의 치료를 받는 마우스에 대한 평균 $\pm$ SEM으로 나타낸 종양 부피를 도시한다.

도 6a는 OX40L, TRAIL, IL15, cGAS 또는 이들의 조합을 발현하는 조작된 MSC가 유방암 (4T1 삼중 음성 유방 암종)의 동소이식 마우스 모델에서 종양 성장을 유의하게 억제하지 않음을 나타내는 데이터를 포함한다. 각각의 이펙터는 상이한 MSC에 의해 발현되었고, 조합 치료를 위해 MSC는 (1:1 비로) 조합되었다. 각각의 차트는 마우스에서 4T1 유방 종양의 성장에 대한 지시된 면역요법 단독으로 또는 조합하여 발현하는 조작된 MSC의 효과를 나타낸다 ($n = 6-8$). **도 6a**의 각각의 라인은 개별 마우스를 나타낸다. **도 6b**의 좌측 그래프는 각각의 치료에서 개별 마우스의 종양 중량을 도시한다. **도 6b**의 우측 그래프는 시간이 지남에 따라 각각의 치료를 받는 마우스에 대한 평균 $\pm$ SEM으로 나타낸 체중을 도시한다.

도 7a는 IL-12 및 CCL21a를 발현하는 조작된 MSC가 유방암 (4T1 삼중 음성 유방 암종)의 동소이식 마우스 모델에서 종양 성장을 억제하지만; 그러나 항-CD40 항체의 첨가는 종양 성장을 감소시키지 않는다는 것을 나타내는 데이터를 포함한다. 각각의 이펙터는 상이한 MSC에 의해 발현되었고, 조합 치료를 위해 MSC는 (1:1 비로) 조합되었다. 각각의 차트는 마우스에서 4T1 유방 종양의 성장에 대한 지시된 면역요법 단독으로 또는 조합하여 발현하는 조작된 MSC의 효과를 나타낸다 ($n = 6-8$). **도 7a**의 각각의 라인은 개별 마우스를 나타낸다. **도 7b**는 각각의 치료에서 개별 마우스의 종양 중량을 도시한다.

도 8a는 OX40L, TRAIL, IL15, HACvPD-1, 또는 이들의 조합을 발현하는 조작된 MSC가 유방암 (4T1 삼중 음성 유방 암종)의 동소이식 마우스 모델에서 종양 성장을 유의하게 억제하지 않음을 나타내는 데이터를 포함한다. 각각의 이펙터는 상이한 MSC에 의해 발현되었고, 조합 치료를 위해 MSC는 (1:1 비로) 조합되었다. 각각의 차트는 마우스에서 4T1 유방 종양의 성장에 대한 지시된 면역요법 단독으로 또는 조합하여 발현하는 조작된 MSC의 효과를 나타낸다 ($n = 6-8$). **도 8a**의 각각의 라인은 개별 마우스를 나타낸다. **도 8b**의 좌측 그래프는 각각의 치료에서 개별 마우스의 종양 중량을 도시한다. **도 8b**의 우측 그래프는 시간이 지남에 따라 각각의 치료를 받는 마우스에 대한 평균 $\pm$ SEM으로 나타낸 체중을 도시한다.

도 9a는 IL-12 및 CCL21a를 발현하는 조작된 MSC가 유방암 (4T1 삼중 음성 유방 암종)의 동소이식 마우스 모델에서 종양 성장을 억제하지만; 그러나 CCL21a, IL-36 감마 및 IL-7을 발현하는 MSC의 조합은 종양 성장을 감소시키지 않는다는 것을 나타내는 데이터를 포함한다. 그러나, 시험된 이펙터 조합의 일부는 독성을 야기할 수 있다. 각각의 이펙터는 상이한 MSC에 의해 발현되었고, 조합 치료를 위해 MSC는 (1:1 비로) 조합되었다. 각각의 차트는 마우스에서 4T1 유방 종양의 성장에 대한 지시된 면역요법 단독으로 또는 조합하여 발현하는 조작된 MSC의 효과를 나타낸다 ($n = 6-8$). **도 9a**의 각각의 라인은 개별 마우스를 나타낸다. **도 9b**는 각각의 치료에서 개별 마우스의 종양 중량을 도시한다.

도 10a-10b는 독성 및 스크리닝에 대한 GFP 용량 단계적 확대 연구로부터의 데이터를 포함한다. **도 10a**는 GFP를 발현하는 조작된 MSC가 독성을 유도하지 않는다는 것을 나타낸다. 각각의 이펙터는 상이한 MSC에 의해 발현되었고, 조합 치료를 위해 MSC는 (1:1 비로) 조합되었다. 각각의 차트는 마우스에서 4T1 유방 종양의 성장에 대한 지시된 면역요법 단독으로 또는 조합하여 발현하는 조작된 MSC의 효과를 나타낸다 ($n = 6-8$). **도 10a**의 각각의 라인은 개별 마우스를 나타낸다. **도 10b**는 각각의 치료에서 개별 마우스의 종양 중량을 도시한다.

도 11a는 조작된 인간 MSC가 마우스 4T1 종양으로 향하지 않는다는 것을 나타낸다. **도 11b**는 각각의 치료에서

개별 마우스의 종양 중량을 도시한다. 효능은 격일로 캘리퍼스 측정으로부터 종양 부피에 의해 결정되었다.

도 12는 IL-12 및 CCL21a가 종양 팽창을 감소시킬 수 있다는 것을 나타내는 데이터를 포함한다.

도 13a는 IL-12 및 CCL21을 발현하는 조작된 MSC는 유방암 (4T1 삼중 음성 유방 암종)의 동소이식 마우스 모델에서 종양 성장을 억제하기에 충분하고 체크포인트 억제제 (항-PD-1 항체 또는 항-CTLA-4 항체)의 첨가는 효능을 증가시키지 않았다는 것을 나타내는 데이터를 포함한다. 각각의 이펙터는 상이한 MSC에 의해 발현되었고, 조합 치료를 위해 MSC는 (1:1 비로) 조합되었다. 각각의 차트는 마우스에서 4T1 유방 종양의 성장에 대한 지시된 면역요법 단독으로 또는 조합하여 발현하는 조작된 MSC의 효과를 나타낸다 ($n = 6-8$). **도 13a**의 각각의 라인은 개별 마우스를 나타낸다. **도 13b**는 각각의 치료에서 개별 마우스의 종양 중량을 도시한다.

도 14는 IL-12 및 CCL21a를 발현하는 조작된 MSC가 결장직장암의 마우스 모델에서 상당한 종양 성장 지연을 유도했음을 나타내는 데이터를 도시한다. 좌측 상의 그래프는 마우스에서 CT26 결장직장 종양 성장에 대한 조작된 MSC의 효과를 나타낸다 ($n = 8$). 차트에서 각각의 라인은 0일 및 7일째에 대조군 MSC 성장 배지 또는 조작된 MSC 중 어느 하나의 복강내 주사를 받는 마우스에서의 종양 부피를 나타낸다. 마우스는 IL-12를 발현하는 조작된 MSC 및 CCL21a를 발현하는 조작된 MSC의 복강내 주사를 받았다. 종양 부피는 격일마다 캘리퍼스 측정에 의해 결정되었다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM을 나타낸다. 대조군 배지 그룹과 비교하여 $*p < 0.05$, $**p < 0.005$. 우측 상의 도식은 처리된 마우스에서 처리의 타임라인 및 종양 부담에 대한 조작된 MSC 발현된 조합 유전자 IL-12 및 CCL21a의 효과를 나타낸다.

도 15는 조작된 MSC 세포를 투약하는 최적의 시간을 결정하기 위한 CT26 마우스 모델에서 종양 성장 동력학을 나타내는 그래프이다.

도 16a-16b는 결장암의 동계의 마우스 모델에서 평균 종양 성장에 대해 항-CD40 또는 항-CTLA4 항체와 조합된 IL-12 및 CCL21a를 발현하는 조작된 MSC의 효과를 나타내는 그래프를 포함한다. CT26 결장 종양을 담지하는 마우스는 7개의 처리 중 하나로 처리되었다 (처리 그룹당 $n=5-6$). MSC-IL-12+MSC-CCL21a는 조합 치료에 대해 IL-12를 발현하는 조작된 세포 및 CCL21a를 발현하는 조작된 세포로 (1:1 비로) 치료를 나타낸다. **도 16b**의 좌측 그래프는 각각의 치료에서 개별 마우스의 종양 중량을 도시한다. **도 16b**의 우측 그래프는 시간이 지남에 따라 각각의 치료를 받는 마우스에 대한 평균 $\pm$ SEM으로 나타낸 종양 부피를 도시한다.

도 17a-17b는 용량-의존적 장기간 생존 연구로부터의 데이터를 포함한다. **도 17a**는 개별 그룹의 종양 부피를 도시한다. **도 17b**는 체중 (상단부), 종양 부피 (하단부), 및 생존율 (우측)을 도시한다.

도 18a는 IL-12, CCL21a, 및 IL15 또는 HACvPD-1 중 어느 하나를 발현하는 조작된 MSC는 마우스 모델 결장직장암에서 종양 성장을 유의하게 억제한다는 것을 나타내는 데이터를 포함한다. 각각의 이펙터는 상이한 MSC에 의해 발현되었고, 조합 치료를 위해 MSC는 (1:1 비로) 조합되었다. 각각의 차트는 마우스에서 CT26 결장직장 종양의 성장에 대한 지시된 면역요법 단독으로 또는 조합하여 발현하는 조작된 MSC의 효과를 나타낸다 ($n = 6-8$). **도 18a**의 각각의 라인은 개별 마우스를 나타낸다. **도 18b**는 각각의 치료에서 개별 마우스의 종양 중량을 도시한다. **도 18c**는 종양 미세환경 내에 침윤하는 면역 모집단의 대표적인 그래프이다. **до 18d**는 총 CD3 모집단에서 조절 T 세포 (Treg)의 백분율을 도시한다. 조작된 MSC-IL2 및 CCL21a로 처리된 종양 미세환경에서 Treg의 수에서 상당한 감소가 있었다. **도 18e**는 종양 중량으로 면역 침윤의 백분율에 상호관련된다. 높은 림프구 (CD3+)를 갖는 샘플은 낮은 종양 중량과 상호관련되는 것이 발견된 반면, 높은 골수성 (CD11b+) 침윤을 갖는 샘플은 더 높은 종양 부담과 상관되었다.

도 19는 복강내로 주입된 첫과 BM-유래된 MSC (BM-MSC)가 생체내 CT26 결장암 종양의 부위로 향하는 것을 나타내는 데이터를 포함한다. 간단한 실험 프로토콜이 상부 좌측 코너에 제공되어 있다. 하부 좌측 이미지 (루시페라제 신호 (종양 특이적))는 MSC 주사 전에 생체내 루시페라제 리포터를 발현하는 CT26 종양 세포의 가시화를 도시한다. 형광 표지된 MSC는 CT26 종양 (종양+)을 담지하는 마우스 안으로 복강내로 주입되었고 MSC의 위치는 DiR 신호 분석으로 시각화되었다. CT26 종양 (종양+)을 담지하는 마우스에서 MSC의 편재화가 MSC 주사 후 1일 및 3일에 대해 도시되어 있다 (MSC-특이적, 종양+). 대조군 (MSC 단독, 종양 단독 및 음성 대조군)에 대해 수행된 DiR 신호 분석의 결과는 지시된 바와 같이 도시되어 있다.

도 20a는 조작된 인간 MSC가 마우스 CT26 종양으로 향하지 않는다는 것을 도시한다. **도 20b**는 각각의 치료에서 개별 마우스의 종양 중량을 나타낸다. 효능은 격일로 캘리퍼스 측정으로부터 종양 부피에 의해 결정되었다.

도 21a-21b는 복강내 공간에서 CT26-LUC (루시페라제) 종양 성장의 동력학을 도시한다. CT26 세포주는 0일째 주입되었고 세마리 (3) 마우스가 7일, 10일, 14일, 및 18일째에 수확되어 종양 성장의 동력학을 결정하였다. **도**

21a의 제1 행은 종양 부담을 모니터링하기 위한 IVIS 이미저로 마우스 체중 및 ROI를 측정한다. 제2 행은 각각의 그룹에서 개별 마우스의 종양의 종양 중량 및 ROI를 모니터링한다. 제3 행은 전신 ROI 또는 종양 ROI 중 어느 하나와 종양 중량을 상호관련시킨다. **도 21b**는 종양 미세환경을 더 잘 특징화하기 위해 18일째 그룹에서 세 마리 (3) 마우스의 면역 프로파일을 도시한다.

도 22a는 IL-12 및 CCL21a를 발현하는 조작된 MSC가 결장직장암의 피하 마우스 모델에서 종양 성장을 억제하지만; 그러나 CCL21a 및 IL-36 감마 또는 IL-7을 발현하는 MSC의 조합은 종양 성장을 감소시키지 않는다는 것을 나타내는 데이터를 포함한다. 각각의 이펙터는 상이한 MSC에 의해 발현되었고, 조합 치료를 위해 MSC는 (1:1 비로) 조합되었다. 각각의 차트는 마우스에서 CT26 결장 종양의 성장에 대한 지시된 면역요법 단독으로 또는 조합하여 발현하는 조작된 MSC의 효과를 나타낸다 ($n = 6-8$). **도 22a**의 각각의 라인은 개별 마우스를 나타낸다. **도 22b**는 각각의 치료 그룹에서 개별 마우스의 종양 중량을 도시한다.

도 23a-23b는 **도 22a-22b**에 의해 제시된 실험으로부터 종양 면역 침윤물 통계를 포함한다. 3마리 마우스가 PBS, 미접촉 MSC, 및 MSC-IL12+MSC-CCL21a (콤보) 그룹으로부터 선택되어 면역 프로파일 종양 미세환경에 대한 유세포측정이 수행되었다. **도 23a**는 미접촉 MSC가 투약된 그룹과 비교하여 콤보 그룹에서 침윤성 CD3 및 CD8 세포독성 T 모집단의 유의미한 증가를 나타낸다. **도 23b**는 미접촉 MSC로 처리된 그룹과 비교하여 콤보 그룹에서 과립구성 골수-유래 억제 세포 (gMDSC) 및 대식세포 모집단에서의 유의미한 감소를 나타낸다.

도 24a-24b는 **도 22a-22b**에 의해 제시된 실험에 관한, 면역 백분율 및 종양 중량과 관련된 데이터를 포함한다. **도 24a** 및 **도 24b**는 더 많은 CD3+ 및 CD8+ T 세포를 갖는 샘플 (좌측 최상부 및 중심 그래프)이 종양 중량의 감소와 강하게 상관됨을 도시한다. 이들 도면은 또한 대식세포, 수지상 세포 및 MDSC를 포함하여 더 적은 CD11b 골수 세포를 갖는 샘플이 더 낮은 종양 부담을 나타냄을 나타낸다 (**도 24a**의 하부 중심 및 우측 그래프 및 **도 24b**의 상부 행).

도 25a-25b는 복강내 및 피하 결장직장암 마우스 모델에서 MSC-IL-12+CCL21a 요법으로부터 데이터를 포함한다. 렌티바이러스 형질도입된 주의 3개 상이한 로트가 MSC-IL12 및 CCL21a에 대해 시험되었다 (TL008-3/4, TL019-01/02, 및 TL022-01/02; 각각의 TL 번호는 하나의 로트를 나타낸다). **도 25a**는 MSC-IL12 + MSC-CCL21a의 모든 3개의 로트가 피하 및 복강내 모델 둘 모두에서 종양 부담을 감소시킬 수 있음을 나타낸다 (처음 5개의 그래프는 SC 모델로부터의 것이고, 마지막 3개는 IP 모델로부터의 것이다). 모든 마우스로부터의 종양은 11일째에 수집되었다. **도 25b**는 각각의 그룹으로부터의 평균 종양 중량을 나타낸다.

도 26a는 조작된 병용 치료 MSC-IL-12+MSC-CCL21a, 또는 MSC-CCL21a+MSC-IFN- β 가 결장직장암의 피하 마우스 모델에서 종양 성장을 억제하지만; 그러나 CCL21a 및 s41BBL을 발현하는 MSC의 조합은 종양 성장을 감소시키지 않는다는 것을 나타내는 데이터를 포함한다. 각각의 이펙터는 상이한 MSC에 의해 발현되었고, 조합 치료를 위해 MSC는 (1:1 비로) 조합되었다. 각각의 차트는 마우스에서 CT26 결장 종양의 성장에 대한 지시된 면역요법 단독으로 또는 조합하여 발현하는 조작된 MSC의 효과를 나타낸다 ($n = 6-8$). **도 26a**의 각각의 라인은 개별 마우스를 나타낸다. **도 26b**는 각각의 치료에서 개별 마우스의 종양 중량을 도시한다. MSC-IL12 + MSC-CCL21a는 미접촉 MSC가 주입된 마우스에 비교하여 최상의 효능을 나타낸다. 치료 효능은 또한 MSC-IFN β + MSC-CCL21a로 처리된 그룹에서 관측되었다.

도 27a-27b는 **도 26a-26b**에 의해 제시된 실험으로부터의 추가의 데이터를 제공한다. **도 27a-27b**는 지시된 조작된 MSC로 처리된 각각의 그룹의 면역 프로파일을 나타내는 그래프이다. MSC-IL12 + MSC-CCL21a로 처리한 후 대식세포 모집단에서의 일관된 감소가 관찰되었다 (**도 27a**). 미접촉 MSC에 대해 MSC-IL12 + MSC-CCL21a로 처리된 그룹과 비교할 때 CD3+ 모집단에서 침윤 증가 및 CD11b+ 모집단에서 침윤 감소의 일반적인 추세가 또한 관찰되었다 (**도 27a** 및 **도 27b**).

도 28a-28b는 또한 **도 26a-26b**에 의해 제시된 실험으로부터의 추가의 데이터를 제공한다. **도 28a-28b**는 면역 침윤과 종양 중량의 상관관계를 나타낸다. 낮은 대식세포 및 수지상 세포를 갖는 샘플은 보다 낮은 종양 부담을 가진다 (**도 28b**, 최상부 중심 및 최상부 우측).

도 29는 상기 결장직장암 모델(**도 22a** 및 **도 26a**)로부터의 생체내 데이터를 조합한 그래프를 도시한다. **도 22a** 및 **도 26a**로부터 조합된 CT26 데이터는 3개 그룹: 종양 단독 (PBS), 미접촉 MSC로 처리된 것, 및 MSC-IL12 + MSC-CCL21a로 처리된 것을 캡처한다.

도 30a-30c는 또한 **도 22a** 및 **도 26a**로부터의 조합된 데이터를 도시한다. 그래프는 유세포측정 실험 데이터로부터의 평균 면역 침윤의 수를 나타낸다. 통계적 유의도는 **도 30a**로부터 CD8+T에서 관찰되어, 종양 미세환경을 제

분극시키고 더 많은 세포독성 T 세포 침윤을 허용하는 MSC-IL12 + MSC-CCL21a의 능력을 입증한다. 더욱이, MSC-IL12 + MSC-CCL21a에 의해 처리된 그룹에서 CD11b+ 골수성 모집단 침윤에서의 감소가 있었다 (도 30b). 수집된 데이터는 수지상 세포 및 대식세포 모집단이 통계적 유의하였다는 것을 나타냈다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 간엽 줄기 세포 (MSC) (또한 일명 간엽 기질 세포)는 중배엽에서 유래한 비-조혈 성체 줄기 세포의 서브셋이다. 이들은 중배엽 계열, 예컨대 연골세포, 골세포 및 지방세포, 뿐만 아니라 외배엽 세포 및 내배엽 세포로의 자기-재생 능력 및 다중계통 분화를 갖는다. 윤리적 우려와 기형종 형성이 없는 MSC는 면역 질환과 비-면역 질환 둘 모두의 치료를 위한 세포 요법에 사용되는 주요 줄기 세포 유형이다. 이들은 골수, 지방 조직, 탯줄, 태아 간, 근육 및 폐로부터 쉽게 단리될 수 있으며 시험관내에서 성공적으로 확장될 수 있다. 또한, MSC가 외인성 및 전신적으로 인간 및 동물에게 전달될 때, 이들은 종양 미세환경 및 전이성 영역을 포함하여 염증이 있는 손상된 조직 부위로 향하는 (직접적으로 이동하는) 경향이 있다. 염증-지향된 MSC 귀소는 케모카인, 접착 분자 및 매트릭스 금속단백분해효소 (MMP)를 포함하여 몇 가지 중요한 세포 이동조절-관련된 분자를 포함한다.
- [0014] 상이한 종양-매개된 면역억제성 기전을 조절하는 이펙터 분자를 생성하기 위해 MSC와 같은 면역 세포를 조작하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 이들 MSC는 본 명세서에서 "조작된 MSC"로 지칭된다. 조작된 핵산을 전형적으로 함유하는, 이들 MSC는 자연적으로 발생하지 않는다. 일부 구현예에서, MSC는 이펙터 분자, 예를 들어, 면역 반응을 자극하는 것을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 핵산을 포함하도록 조작된다.
- [0015] "이펙터 분자"는 다른 분자에 결합하고 그것이 결합하는 그 분자의 생물학적 활성을 조절하는 분자 (예를 들어, 핵산 예컨대 DNA 또는 RNA, 또는 단백질 (폴리펩타이드) 또는 펩타이드)를 지칭한다. 예를 들어, 이펙터 분자는 효소적 활성, 유전자 발현 또는 세포 신호전달을 증가 또는 감소시키기 위한 리간드로서 작용할 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 이펙터 분자는 상이한 면역조절 기전을 조절 (활성화 또는 억제)한다. 분자에 직접적으로 결합하고 조절함으로써, 이펙터 분자는 또한 제2의 다운스트림 분자를 간접적으로 조절할 수 있다. 일부 구현예에서, 이펙터 분자는 분비된 분자인 반면, 다른 구현예에서, 이펙터 분자는 세포 표면에 결합되거나 세포 내 남아있다. 예를 들어, 이펙터 분자는 예를 들어 면역조절 활성, 귀소 특성 또는 세포의 지속성을 향상시키기 위해 내부 세포 상태를 변형시키는 세포내 전사 인자, microRNA, 및 shRNA를 포함한다. 이펙터 분자의 비-제한적 예는 사이토카인, 케모카인, 대사물 수준을 조절하는 효소, 사이토카인을 조절하는 항체 또는 유인 분자, 귀소 분자, 및/또는 인테그린을 포함한다.
- [0016] 용어 "조절하다"는 생물학적 활성의 유지, 생물학적 활성의 (부분적인 또는 완전한) 억제 및 생물학적 활성의 (부분적인 또는 완전한) 자극/활성화를 포함한다. 본 용어는 또한 생물학적 활성을 감소 또는 증가 (예를 들어, 향상)시키는 것을 포함한다. 2개의 상이한 이펙터 분자는 이펙터 분자가 (예를 들어, 항원 전달 및/또는 처리를 자극하는) 다른 이펙터 분자에 의해 조절된 종양-매개된 면역억제성 기전과 상이한 종양-매개된 면역억제성 기전을 조절할 때 (예를 들어, T 세포 신호전달을 자극할 때) "상이한 종양-매개된 면역억제성 기전을 조절하는" 것으로 고려된다.
- [0017] 이펙터 분자에 의한 조절은 직접적이거나 간접적일 수 있다. 직접적인 조절은 이펙터 분자가 다른 분자에 결합하여 그 분자의 활성을 조절할 때 발생한다. 간접적인 조절은 이펙터 분자가 다른 분자에 결합하고 그 분자의 활성을 조절하고, 그 조절의 결과로 (이펙터 분자가 결합되지 않은) 여전히 또 다른 분자의 활성이 조절될 때 발생한다.
- [0018] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 이펙터 분자에 의한 종양-매개된 면역억제성 기전의 조절은 적어도 10% (예를 들어, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 또는 200%)까지 면역자극성 및/또는 항종양 면역 반응에서 (예를 들어, 전신으로 또는 종양 미세환경에서) 증가를 초래한다. 예를 들어, 종양-매개된 면역억제성 기전의 조절은 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 100%까지 면역자극성 및/또는 항종양 면역 반응에서 증가를 초래할 수 있다. 일부 구현예에서, 종양-매개된 면역억제성 기전의 조절은 10-20%, 10-30%, 10-40%, 10-50%, 10-60%, 10-70%, 10-80%, 10-90%, 10-100%, 10-200%, 20-30%, 20-40%, 20-50%, 20-60%, 20-70%, 20-80%, 20-90%, 20-100%, 20-200%, 50-60%, 50-70%, 50-80%, 50-90%, 50-100%, 또는 50-200% 면역자극성 및/또는 항종양 면역 반응에서의 증가를 초래한다. 면역자극성 및/또는 항종양 면역 반응에서, 예를 들어, 전신으로 또는 종양 미세환경에서의 "증가"는 달리 이펙

터 분자(들)의 부재에서 발생하는 면역자극성 및/또는 항종양 면역 반응에 비례하는 것으로 이해되어야 한다.

- [0019] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 이펙터 분자에 의한 종양-매개된 면역억제성 기전의 조절은 적어도 2 배 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 10, 25, 20, 25, 50, 또는 100 배)까지 면역자극성 및/또는 항종양 면역 반응에서 (예를 들어, 전신으로 또는 종양 미세환경에서) 증가를 초래한다. 예를 들어, 종양-매개된 면역억제성 기전의 조절은 적어도 3 배, 적어도 5 배, 적어도 10 배, 적어도 20 배, 적어도 50 배, 또는 적어도 100 배까지 면역자극성 및/또는 항종양 면역 반응에서 증가를 초래할 수 있다. 일부 구현예에서, 종양-매개된 면역억제성 기전의 조절은 2-10, 2-20, 2-30, 2-40, 2-50, 2-60, 2-70, 2-80, 2-90, 또는 2-100 배까지 면역자극성 및/또는 항종양 면역 반응에서 증가를 초래한다.
- [0020] 면역자극성 및/또는 항종양 면역 기전의 비-제한적인 예는 T 세포 신호전달, 활성화 및/또는 동원, 항원 전달 및/또는 처리, 천연 살해 세포-매개된 세포독성 신호전달, 활성화 및/또는 동원, 수지상 세포 분화 및/또는 성숙, 면역 세포 동원, 전-염증 대식세포 신호전달, 활성화 및/또는 동원, 기질 열화, 면역자극성 대사물 생산, 인터페론 유전자 자극인자(STING)의 신호전달 (IFN 분비 및 Th1 분극화를 증가하고, 항종양 면역 반응을 증진시킴), 및/또는 유형 I 인터페론 신호전달을 포함한다. 이펙터 분자는 전술한 면역자극성 기전 중 적어도 하나 (하나 이상)를 자극할 수 있고, 따라서 면역자극성 반응에서 증가를 초래한다. 전술한 면역자극성 및/또는 항종양 면역 기전에서의 변화는, 예를 들어, T 세포 증식 또는 세포독성에 대한 *시험관내* 검정, *시험관내* 항원 전달 검정, (예를 들어, 특정 마커의) 발현 검정, 및/또는 (예를 들어, 사이토카인의) 세포 분비 검정을 사용하여 평가될 수 있다.
- [0021] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 이펙터 분자에 의한 종양-매개된 면역억제성 기전의 조절은 적어도 10% (예를 들어, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 또는 200%)까지 면역억제성 반응에서 (예를 들어, 전신으로 또는 종양 미세환경에서) 감소를 초래한다. 예를 들어, 종양-매개된 면역억제성 기전의 조절은 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 100%까지 면역억제성 반응에서 감소를 초래할 수 있다. 일부 구현예에서, 종양-매개된 면역억제성 기전의 조절은 면역억제성 반응에서 10-20%, 10-30%, 10-40%, 10-50%, 10-60%, 10-70%, 10-80%, 10-90%, 10-100%, 10-200%, 20-30%, 20-40%, 20-50%, 20-60%, 20-70%, 20-80%, 20-90%, 20-100%, 20-200%, 50-60%, 50-70%, 50-80%, 50-90%, 50-100%, 또는 50-200% 감소를 초래한다. 면역억제성 반응에서, 예를 들어, 전신으로 또는 종양 미세환경에서의 "감소"는 달리 이펙터 분자(들)의 부재에서 발생하는 면역억제성 반응에 비례하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0022] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 이펙터 분자에 의한 종양-매개된 면역억제성 기전의 조절은 적어도 2배 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 10, 25, 20, 25, 50, 또는 100 배)까지 면역억제성 반응에서 (예를 들어, 전신으로 또는 종양 미세환경에서) 감소를 초래한다. 예를 들어, 종양-매개된 면역억제성 기전의 조절은 적어도 3 배, 적어도 5 배, 적어도 10 배, 적어도 20 배, 적어도 50 배, 또는 적어도 100 배까지 면역억제성 반응에서 감소를 초래할 수 있다. 일부 구현예에서, 종양-매개된 면역억제성 기전의 조절은 2-10, 2-20, 2-30, 2-40, 2-50, 2-60, 2-70, 2-80, 2-90, 또는 2-100 배까지 면역억제성 반응에서 감소를 초래한다.
- [0023] 면역억제성 기전의 비-제한적인 예는 음성 공통자극 신호전달, 세포독성 세포 (예를 들어, T 세포 및/또는 NK 세포)의 세포자멸 유도 신호전달, T 조절 (Treg) 세포 신호전달, 종양 체크포인트 분자 생산/유지, 골수성-유래된 억제성 세포 신호전달, 활성화 및/또는 동원, 면역억제성 인자/대사물 생산, 및/또는 혈관 내피 성장 인자 신호전달을 포함한다. 이펙터 분자는 전술한 면역억제성 기전 중 적어도 하나 (하나 이상)를 억제할 수 있고, 따라서 면역억제성 반응에서의 감소를 초래한다. 전술한 면역억제성 기전에서의 변화는, 예를 들어, T 세포 증식에서의 증가 및/또는 IFN γ 생산 (음성 공통자극 신호전달, T_{reg} 세포 신호전달 및/또는 MDSC)에서의 증가; 아넥신 V/PI 유동 염색 (세포자멸 유도 신호전달); 발현, 예를 들어, PDL1 발현에 대한 유동 염색 (종양 체크포인트 분자 생산/유지); ELISA, LUMINEX®, qPCR을 통한 RNA, 효소적 검정, 예를 들어, IDO 트립토판 이화 (면역억제성 인자/대사물 생산); 및 PI3K의 인산화, Akt, p38 (VEGF 신호전달)에 의해 평가될 수 있다.
- [0024] 일부 구현예에서, MSC는 막-결박된 항-CD3 및/또는 항-CD28 효능제 세포의 도메인을 발현하도록 조작된다.
- [0025] 일부 구현예에서, MSC는 적어도 2개의 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 초과) 이펙터 분자를 생성하도록 조작되고, 그 각각은 상이한 종양-매개된 면역억제성 기전을 조절한다. 다른 구현예에서, MSC는 MSC에 의해 천연적으로 생산되지 않는 적어도 하나의 이펙터 분자를 생성하도록 조작된다. 이러한 이펙터 분자, 예를 들어, MSC에 의해 천연적으로 생산된 이펙터 분자의 기능을 보충할 수 있다.
- [0026] 일부 구현예에서, 이펙터 분자는 부가적으로 기능하고: 2개의 이펙터 분자의 효과는, 예를 들어, 별도로 기능하

는 2개 이펙터 분자의 효과의 합과 동등할 수 있다. 다른 구현예에서, 이펙터 분자는 상승작용으로 기능하고: 2개의 이펙터 분자의 효과는, 예를 들어, 2개 이펙터 분자의 조합된 기능보다 클 수 있다. 본 개시내용은 또한 이펙터 분자(들)와 이들이 생산되는 면역 세포 (예를 들어, MSC) 사이에 가산성 및 동반상승효과를 포괄한다.

[0027]

종양-매개된 면역억제성 기전을 조절하는 이펙터 분자는, 예를 들어, 분비된 인자 (예를 들어, 면역계에 관여된 세포의 기전을 조절하는 사이토카인, 케모카인, 항체, 및/또는 유인 수용체), 세포 상태를 조정하는 세포내 인자 (예를 들어, 전-염증 특성을 고양하도록 세포의 상태를 조절하는 microRNA 및/또는 전사 인자), 엑소좀 안으로 포장된 인자 (예를 들어, microRNA, 세포질 인자, 및/또는 세포외 인자), 표면 표시된 인자 (예를 들어, 체크포인트 억제제, TRAIL), 및 및/또는 대사 유전자 (예를 들어, 대사물 또는 아미노산을 생산하거나/조절하거나 또는 열화시키는 효소)일 수 있다.

[0028]

일부 구현예에서, 이펙터 분자는 하기 비제한적인 분자의 부류로부터 선택될 수 있다: 사이토카인, 항체, 케모카인, 뉴클레오타이드, 펩타이드, 및 효소. 전술한 이펙터 분자의 부류의 비-제한적인 예가 아래에 열거되어 있다

표 1

예시적인 이펙터 분자

[0029]

이펙터 명칭	카테고리	기능
항-CD40	작용제 항체	T-세포 자극
항 PD-1/PD-L1	작용제 항체	체크포인트 제거
항-CTLA-4	작용제 항체	체크포인트 제거
항-VEGF	길항제 항체	면역억제성/혈관신생 인자 중화
항-TNF α	길항제 항체	사이토카인/친-종양 인자 중화
항-IL-10	길항제 항체	면역억제성 사이토카인 중화
항-SDF1/CXCL12	길항제 항체	친-종양 케모카인 중화
(T β RII)2 트랩	캡처 트랩	면역억제성 사이토카인 중화
CCL21	케모카인	백혈구/NK 유인
CCL1	케모카인	백혈구/NK 유인
CCL17	케모카인	백혈구/NK 유인
CCL19	케모카인	백혈구/NK 유인
CCL21	케모카인	백혈구/NK 유인
CCL20	케모카인	백혈구/NK 유인
CCL21a	케모카인	백혈구/NK 유인
MIP1b (CCL5)	케모카인	백혈구/NK 유인
CXCL10	케모카인	백혈구/NK 유인
CXCL11	케모카인	백혈구/NK 유인
CCL2	케모카인	단핵구 유인
MIP-1알파 (CCL3)	케모카인	백혈구/NK 유인
XCL1	케모카인	백혈구/NK 유인
IFN베타	사이토카인	T 세포 반응, 종양 세포 사멸
IFN감마	사이토카인	T 세포 반응, 종양 세포 사멸
IL-12	사이토카인	T 세포, NK 세포
IL-1베타	사이토카인	T 세포, NK 세포
IL-15	사이토카인	T-세포 및 NK 자극
IL-2	사이토카인	T-세포 및 NK 자극
IL-21	사이토카인	T-세포 자극
IL-24	사이토카인	T-세포 자극
IL36-감마	사이토카인	T-세포 자극
IL-7	사이토카인	T-세포 자극
IL-22	사이토카인	T-세포 자극
IL-18	사이토카인	T-세포 자극
그란자임/페르포린	효소	직접적인 종양 세포 사멸
OX86 (항-OX40)	리간드	T-세포 자극
항-TGF베타	중화하는 항체	면역억제성 사이토카인 중화
TRAIL	수용체/리간드	직접적인 종양 세포 사멸
FASL (CD49L)	수용체/리간드	직접적인 종양 세포 사멸

OX40-L	수용체/리간드	T-세포 자극
cGAS	분비된 분자	항원-제시 세포 자극
41BBL	분비된 분자	공-활성화 of T-세포
CD40L	분비된 분자	T-세포 자극
GM-CSF	분비된 분자	단핵구에 대한 성장 인자
STING	분비된 분자	항원-제시 세포 자극
HAC-V '마이크로바디'_PD1	길항제 항체	체크포인트 억제
vCD	전구약물	활성화에 의해 세포독성 분자로 전환
CpG/뉴클레오타이드	뉴클레오타이드	STING 효능제

[0030] 일부 구현예에서, MSC는 이펙터 분자를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 조작된 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 핵산은 적어도 2 이펙터 분자를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함한다. 예를 들어, 조작된 핵산은 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 8, 적어도 9, 또는 적어도 10 이펙터 분자를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된 핵산은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 그 초과 이펙터 분자를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함한다.

[0031] 일부 구현예에서, MSC는, 각각이 적어도 하나의 (예를 들어, 1, 2 또는 3) 이펙터 분자를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 적어도 2개의 조작된 핵산을 포함하도록 조작된다. 예를 들어, MSC는, 각각이 적어도 하나의 (예를 들어, 1, 2 또는 3) 이펙터 분자를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 8, 적어도 9, 또는 적어도 10의 조작된 핵산을 포함하도록 조작될 수 있다. 일부 구현예에서, MSC는, 각각이 적어도 하나의 (예를 들어, 1, 2 또는 3) 이펙터 분자를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 그 초과 조작된 핵산을 포함하도록 조작된다.

[0032] "조작된 핵산"은 자연적으로 발생하지 않는 핵산이다. 그러나, 조작된 핵산은 전체적으로 자연적으로 발생하지는 않지만, 자연에서 발생하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있음을 이해해야 한다. 일부 구현예에서, 조작된 핵산은 상이한 유기체 (예를 들어, 상이한 종)로부터의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 조작된 핵산은 쥐와 뉴클레오타이드 서열, 박테리아 뉴클레오타이드 서열, 인간 뉴클레오타이드 서열 및/또는 바이러스 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 용어 "조작된 핵산"은 재조합 핵산 및 합성 핵산을 포함한다. "재조합 핵산"은 핵산 분자를 연결함으로써 구성되고, 일부 구현예에서, 생존 세포에서 복제될 수 있는 분자를 지칭한다. "합성 핵산"은 증폭되거나 또는 화학적으로, 또는 다른 수단에 의해 합성된 분자를 지칭한다. 합성 핵산은 화학적으로 변형되거나 달리 변형되지만 자연적으로 발생하는 핵산 분자와 염기쌍을 이룰 수 있는 것들을 포함한다. 재조합 핵산 및 합성 핵산은 또한 전술한 것 중 하나의 복제로부터 생성된 이들 분자를 포함한다. 본 개시내용의 조작된 핵산은 단일 분자 (예를 들어, 동일한 플라스미드 또는 다른 벡터에 포함됨)에 의하거나 또는 다수의 상이한 분자 (예를 들어, 다수의 상이한 독립적으로 복제하는 분자)에 의해 인코딩될 수 있다.

[0033] 본 개시내용의 조작된 핵산은 표준 분자 생물학 방법을 사용하여 제조될 수 있다 (예를 들어, Green and Sambrook, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2012, Cold Spring Harbor Press 참고). 일부 구현예에서, 조작된 핵산 작제물은 GIBSON ASSEMBLY® 클로닝 (예를 들어, 각각이 본원에 참고로 편입되는, Gibson, D.G. *et al.* Nature Methods, 343-345, 2009; 및 Gibson, D.G. *et al.* Nature Methods, 901-903, 2010 참고)을 사용하여 생산된다. GIBSON ASSEMBLY®는 전형적으로 단일-튜브 반응에서 3가지 효소적 활성인 5' 엑소뉴클레아제, DNA 중합효소의 'Y' 연장 활성 및 DNA 리가제 활성을 사용한다. 5' 엑소뉴클레아제 활성은 5' 말단 서열을 제거하고 어닐링을 위한 상보적 서열을 노출시킨다. 그런 다음 중합효소 활성은 어닐링된 영역 상의 겹에 채운다. 그런 다음 DNA 리가제는 틱을 밀봉하고 DNA 단편을 함께 공유결합한다. 인접한 단편의 중첩 서열은 골든 게이트 어셈블리에 사용된 것보다 훨씬 길고 따라서 바른 어셈블리의 백분율이 더 높게 초래된다. 일부 구현예에서, 조작된 핵산 작제물은 IN-FUSION® 클로닝 (Clontech)을 사용하여 생산된다.

[0034] "프로모터"는 나머지 핵산 서열의 개시 및 전사 속도가 제어되는 핵산 서열의 제어 영역을 지칭한다. 프로모터는 또한 조절 단백질 및 분자가 결합할 수 있는 하위-영역, 예컨대 RNA 중합효소 및 다른 전사 인자를 함유할 수 있다. 프로모터는 구성적, 유도성, 억제성, 조직-특이적 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 프로모터는 그

것이 조절하는 핵산 서열의 발현을 구동하거나 또는 전사를 구동한다. 본 명세서에서, 프로모터는 그것이 핵산 서열과 관련하여 올바른 기능적 위치 및 배향에 있을 때 "작동가능하게 연결된" 것으로 간주되며, 이것은 그 서열의 전사 개시 및/또는 발현을 제어 ("구동")하도록 조절한다.

[0035] 프로모터는 주어진 유전자 또는 서열의 코딩 분절의 업스트림에 위치한 5' 비-코딩 서열을 단리함에 의해 수득될 수 있는 바와 같이, 유전자 또는 서열과 자연적으로 관련된 것일 수 있다. 이러한 프로모터는 "내인성"으로 지칭될 수 있다. 일부 구현예에서, 코딩 핵산 서열은, 그것의 천연 환경에서 인코딩된 서열과 정상적으로 연관되지 않은 프로모터를 지칭하는, 재조합 또는 이중성 프로모터의 제어하에 배치될 수 있다. 이러한 프로모터는 다른 유전자의 프로모터; 임의의 다른 세포로부터 단리된 프로모터; 및 "자연 발생"하지 않는 합성 프로모터 또는 향상제, 예컨대, 예를 들어, 상이한 전사 조절 영역의 상이한 요소 및/또는 당해 기술에 공지된 유전공학의 방법을 통해 발현을 변경시키는 돌연변이를 함유하는 것들을 포함할 수 있다. 프로모터 및 향상제의 핵산 서열을 합성적으로 생성하는 것에 더하여, 서열은 중합효소 연쇄 반응 (PCR)을 포함하는 재조합 클로닝 및/또는 핵산 증폭 기술을 사용하여 생성될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,683,202 및 미국 특허 번호 5,928,906 참고).

[0036] 조작된 핵산의 프로모터는 "유도성 프로모터"일 수 있으며, 이는 신호의 존재에서, 신호에 의해 영향을 받거나 또는 신호에 의해 접촉될 때 전사 활성을 조절 (예를 들어, 개시 또는 활성화)하는 것을 특징으로 하는 프로모터를 지칭한다. 신호는 유도성 프로모터로부터 전사 활성을 조절하는 데 활성이 되는 방식으로 유도성 프로모터와 접촉하는 내인성 또는 정상적으로 외인성 상태 (예를 들어, 광), 화합물 (예를 들어, 화학적 또는 비-화학적 화합물) 또는 단백질 (예를 들어, 사이토카인)일 수 있다. 전사의 활성화는 프로모터에 직접적으로 작용하여 전사를 유도하거나 프로모터가 전사를 유도하는 것을 방해하는 억제인자를 불활성화함에 의해 프로모터에 간접적으로 작용하는 것을 포함할 수 있다. 반대로, 전사의 비활성화는 프로모터에 직접적으로 작용하여 전사를 방지하거나 프로모터에 그 다음 작용하는 억제인자를 활성화시킴에 의해 프로모터 상에 간접적으로 작용하는 것을 포함할 수 있다.

[0037] 프로모터는 국소 종양 상태 (예를 들어, 염증 또는 저산소증) 또는 그 상태 또는 신호의 존재하에 프로모터로부터의 전사가 활성화, 비활성화, 증가 또는 감소되는 경우 신호에 "반응성"이거나 또는 "조절"된다. 일부 구현예에서, 프로모터는 반응 인자를 포함한다. "반응 요소"는 프로모터로부터 유전자 발현을 조절 (조정)하는 특정한 분자 (예를 들어, 전사 인자)에 결합하는 프로모터 영역 내의 짧은 DNA 서열이다. 본 개시내용에 따라 사용될 수 있는 반응 인자는, 비제한적으로, 플로레틴-조정가능한 조절 요소 (PEACE), 아연-핑거 DNA-결합 도메인 (DBD), 인터페론-감마-활성화된 서열 (GAS) (본 명세서에 참고로 편입된, Decker, T. et al. *J Interferon Cytokine Res.* 1997 Mar;17(3):121-34), 인터페론-자극된 반응 인자 (ISRE) (본 명세서에 참고로 편입된, Han, K. J. et al. *J Biol Chem.* 2004 Apr 9;279(15):15652-61), NF-kappaB 반응 인자 (본 명세서에 참고로 편입된, Wang, V. et al. *Cell Reports.* 2012; 2(4): 824-839), 및 STAT3 반응 인자 (본 명세서에 참고로 편입된, Zhang, D. et al. *J of Biol Chem.* 1996; 271: 9503-9509)를 포함한다. 다른 반응 인자가 본 명세서에 포괄된다.

[0038] 반응성 프로모터 (예를 들어, TGF-베타 반응성 프로모터)의 비-제한적인 예는 표 2에 열거되어 있고, 이것은 프로모터 및 전사 인자의 디자인을 나타낼 뿐만 아니라 전사 인자 (TF) 및 이식유전자 전사 (T)에 대한 유발제 분자의 효과가 도시되어 있다 (B, 결합; D, 해리; n.d., 확인되지 않음) (A, 활성화; DA, 비활성화; DR, 탈억제) (Horner, M. & Weber, W. *FEBS Letters* 586 (2012) 20784-2096m, 및 본 명세서에서 인용된 참조문헌 참고).

표 2

반응성 프로모터의 예

[0039]

시스템	프로모터 및 오퍼레이터	전사 인자 (TF)	유발제 분자	유발제에 대한 반응	
				TF	T
전사 활성제-반응성 프로모터					
AIR	PAIR (OalcA-PhCMVmin)	AlcR	아세트알데하이드	n. d.	A
ART	PART (OARG-PhCMVmin)	ArgR-VP16	l-아르기닌	B	A
BIT	PBIT3 (OBirA3-PhCMVmin)	BIT (BirA-VP16)	바이오틴	B	A

큐메이트 - 활성제	PCR5 (OCu06-PhCMVmin)	cTA (CymR-VP16)	큐메이트	D	DA
큐메이트 - 역활성제	PCR5 (OCu06-PhCMVmin)	rcTA (rCymR-VP16)	큐메이트	B	A
E-OFF	PETR (OETR-PhCMVmin)	ET (E-VP16)	에리트로마이신	D	DA
NICE-OFF	PNIC (ONIC-PhCMVmin)	NT (Hd노르-VP16)	6-하이드록시-니코틴	D	DA
PEACE	PTtgR1 (OTtgR-PhCMVmin)	TtgA1 (TtgR-VP16)	플로레틴	D	DA
PIP-OFF	PPIR (OPIR-Phsp70min)	피트 (PIP-VP16)	프리스티나마이신 I	D	DA
QuoRex	PSCA (OscbR-PhCMVmin)PSPA (OpapRI-PhCMVmin)	SCA (ScbR-VP16)	SCB1	D	DA
산화환원	PROP (OROP-PhCMVmin)	산화환원 (REX-VP16)	NADH	D	DA
TET-OFF	PhCMV*-1 (Otet07-PhCMVmin)	tTA (TetR-VP16)	테트라사이클린	D	DA
TET-ON	PhCMV*-1 (Otet07-PhCMVmin)	rtTA (rTetR-VP16)	독시사이클린	B	A
TIGR	PCTA (Orhe0-PhCMVmin)	CTA (RheA-VP16)	열	D	DA
TraR	O7x(tra box)-PhCMVmin	p65-TraR	3-옥소-C8-HSL	B	A
VAC-OFF	P1Van02 (OVan02-PhCMVmin)	VanA1 (VanR-VP16)	바닐릭산	D	DA
전사 억제인자-반응성 프로모터					
큐메이트 - 억제인자	PCu0 (PCM5-OCu0)	CymR	큐메이트	D	DR
E-ON	PETRON8 (PSV40-OETR8)	E-KRAB	에리트로마이신	D	DR
NICE-ON	PNIC (PSV40-ONIC8)	NS (Hd노르-KRAB)	6-하이드록시-니코틴	D	DR
PIP-ON	PPIRON (PSV40-OPIR3)	PIT3 (PIP-KRAB)	프리스티나마이신 I	D	DR
Q-ON	PSCAON8 (PSV40-OscbR8)	SCS (ScbR-KRAB)	SCB1	D	DR
TET-ON<comma> 억제인자계	Otet0-PHPRT	tTS-H4 (TetR-HDAC4)	독시사이클린	D	DR
T-REX	PTet0 (PhCMV-Otet02)	TetR	테트라사이클린	D	DR
UREX	PUREX8 (PSV40-Ohuc08)	mUTS (KRAB-HucR)	요소	D	DR
VAC-ON	PVanON8 (PhCMV-OVan08)	VanA4 (VanR-KRAB)	바닐릭산	D	DR
하이브리드 프로모터					
QuoRexPIP-ON(NOT IF gate)	OscbR8-OPIR3-PhCMVmin	SCAPIT3	SCB1프리스티나마이신 I	DD	DADR
QuoRexE-ON(NOT IF gate)	OscbR-OETR8-PhCMVmin	SCAE-KRAB	SCB1에리트로마이신	DD	DADR
TET-OFFE-ON(NOT IF gate)	Otet07-OETR8-PhCMVmin	tTAE-KRAB	테트라사이클린에리트로마이신	DD	DADR
TET-OFFPIP-ONE-ON	Otet07-OPIR3-OETR8-PhCMVmin	tTAPIT3E-KRAB	테트라사이클린프리스티나마이신 I에리트로마이신	DDD	DADRDR

[0040]

프로모터의 다른 비-제한적인 예는 사이토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터, 연신 인자 1-알파 (EF1a) 프로모터, 연신 인자 (EFS) 프로모터, MND 프로모터 (골수증식성 육종 바이러스 향상제를 갖는 변형된 MoMuLV LTR의 U3 영역을 함유하는 합성 프로모터), 포스포글리세레이트 키나제 (PGK) 프로모터, 비장 초점-형성 바이러스 (SFV) 프로모터, 유인원 바이러스 40 (SV40) 프로모터, 및 유비퀴틴 C (UbC) 프로모터를 포함한다 (참고 표 3).

표 3

[0041]

예시적인 프로모터

명칭	DNA 서열
CMV	GTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAAATTACGGTAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCATATGACGTTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCATGGGTGGAGTATTACGGTAAATGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTGGTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAATGGGCGGTAGGCGTGACGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTC (SEQ ID NO: 1)
EF1a	GGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCGGAGAAGTTGGGGGAGGGGTGCGCAATTGACCGGTGCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGCCGTGTACTGGCTCCGCGCTTTTCCCGAGGGTGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCGCGGTGAACGTTCTTTTCGCAACGGGTTTGGCGCCAGAACACAGGTAGTGCCGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCCTGCTTGAATTAATCTCCACCTGGCTGCAGTACGTATTCTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCCTGCGCTTAAGGAGCCCTTCGCTCGTGTGCTTGAGTTGAGGCTGGCCCTGGGCGCTGGGGCGCCGCGTGCGAATCTGGTGCGACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAAATTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCGCGGGCGCGACGGGGCCCGTGGCTCCCGAGCGCACATGTTCCGGGAGGCGGGGCTGCGAGCGCGACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGCGCTGCTTGGTGCTGTCTCGCGCGCGCTGTATCGCCCCGCGCGGGCGCAAGGCTGGCCCGGTGGCACCA GTTGGGTGAGCGGAAGATGGCCGCTTCCCGTCTGCTGCAGGGAGTCAAAATGGAGGACGCGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAAGTCAACACAAAGGAAAGGGCTTTCCGTCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGAGTACGTGCTTCTAGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCGACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATCTCCTTGGAA TTTGCCCTTTTGAGTTTGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTACAGGTGTCGTGA
EFS	GGATCTGCGATCGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCGGAGAAGTTGGGGGAGGGGTCGCAATTGAACCGGTGCTTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCTTTTCCCGAGGGTGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCGCGGTGAACGTTCTTTTCGCAACGGGTTTGGCGCA GAACACAGCTGAAGCTTCGAGGGGCTCGCATCTCTCTTACGCGCCCGCGCCCTACCTGAGGCCGCCATCCACGCCGGTTGAGTTCGCTTCTGCCGCTCCCGCTGTGGTGCTCCTGAAGTGCCTCCGCGCTCTAGGTTAAAGCTCA GGTGAGAGCCGGGCTTTGTCCGGCGCTCCCTTGGAGCCTACCTAGACTCAGCCGGCTCTCCACGCTTTGCTGACCC TGCTTGCTCAACTCTACGTCTTTGTTCTGTTCTGCGCGCTTACAGATCCAAGCTGTGACCGCGCGCTAC (SEQ ID NO: 2)
MND	TTTATTTAGTCTCCAGAAAAAGGGGGAATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGGATCAAGGTTAGGAACAGAGAGACAGAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCTGCCCCGCTCAGGGCCAAGAACAGTTGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCTGCCCCGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCAGATGCGGTCCCGCCCTCAGCAGTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCAAGGACCTGAAATGACCTGTGCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTGCTTCTCGCTTCTGTTGCGCGCTTCTGCTCCCGAGCTCAATAA AAGAGCCCA (SEQ ID NO: 3)
PGK	GGGGTTGGGTTGCGCCTTTTCCAGGCAGCCCTGGGTTTGCAGAGGACGCGGCTGCTTGGGCGTGTTCCGGGAAACGCAGCGCGCGGACCCCTGGGTCTCGCACATTCTTACGTCCGTTTCGAGCGTACCCGGATCTTCGCGCTACCTTGTGGGCCCCCGCGACGCTTCTGCTCCGCCCTAAGTCGGGAAGGTTCTTGGGTTTCGCGGCTGCGGACGTTGACAAACGGAAGCCGACGCTCTACTAGTACCCTCGCAGACGACAGCGCCAGGGAGCAATGGCAGCGCGCGACCGGATGGGCTGTGGCCAATAGCGGCTGCTCAGCGGGGCGCGCGAGAGCAGCGCGGGAAGGGGCGGTGCGGGAGGCGGGGTGTTGGGGCGGTAGTGTGGGCCCTGTTCTGCCCCGCGGTGTTCCGCAATTCTGCAAGCCTCCGAGCGCACGTCGGCAGTCGGCTCCCTCGTTGACCGAATCACCGACCTCTCTCCCGAG (SEQ ID NO: 4)
SFFV	GTAACGCCATTTTGCAAGGCATGAAAAATACCAACCAAGAATAGAGAAGTTGATCAAGGCGGGTACATGAAAA TAGCTAACGTTGGGCCAAACAGGATATCTGCGGTGAGCAGTTTCGGCCCCGGCCCGGGGCCAAGAACAGATGGTCAACGCAGTTTCGGCCCCGGCCGAGGCCAAGAAGATGGTCCCGAGATATGGCCCAACCTCAGCAGTTTCTTAAGACCCATCAGATGTTTCCAGGCTCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGCGCCTTATTTGAATTAACCAATCAGCCTGCTTCTGCTTCTGTTTCGCGCGCTTCTGCTTCCCGAGCTCTATAAAGAGCTCACAACCCCTACTCGGCGCGCAGTCTCCGACAGACTGAGTCGCGGG (SEQ ID NO: 5)
SV40	CTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCCATTTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTATTTATGTCAGAGGCGAGGCGCCTCTGCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTTGGAGGCTAGGCTTTTGCAAAAAGCT (SEQ ID NO: 6)

Ubc	GCGCCGGGTTTTGGCGCCTCCCGCGGGCGCCCCCTCTCACGGCGAGCGCTGCCACGTCAGACGAAGGGCGCAGGAG CGTTCCTGATCCTTCCGCCCGGACGCTCAGGACAGCGGCCGCTGCTCATAAGACTCGGCCTTAGAACCCAGTATCA GCAGAAGGACATTTTAGGACGGGACTTGGGTGACTCTAGGGCACTGGTTTTCTTCCAGAGAGCGGAACAGCGCAGGA AAAGTAGTCCCTTCTCGGCGATTCTGCGGAGGGATCTCCGTGGGGCGGTGAACGCCGATGATTATATAAGGACGCGCC GGGTGTGGCACAGCTAGTTCCGTCGACCGGGATTGGGTGCGGTTCTTGTGTGGATCGCTGTGATCGTCACTT GGTGAGTTGCGGGCTGCTGGGCTGGCCGGGGCTTTCGTGGCCGCGGGCGCTCGGTGGGACGGAAGCGTGTGGAGAG ACCGCCAAGGGCTGTAGTCTGGGTCCGCGAGCAAGGTTGCCCTGAACTGGGGGTGGGGGAGCGCACAAAATGGCGG CTGTTCCCGAGTCTTGAATGGAAGACGCTTGTAAAGCGGGCTGTGAGGTCGTTGAAACAAGGTGGGGGGCATGGTGGG CGGCAAGAACCAAGGTCTTGAAGCCTTCGCTAATGCGGGAAGCTCTTATTCGGGTGAGATGGGCTGGGGCACCATC TGGGGACCCTGACGTGAAGTTGTCACTGACTGGAGAACTCGGGTTGTGCTGCTGGTTGCGGGGGCGGCAGTTATGCG GTGCCGTTGGGCAGTGCACCCGTACCTTTGGGAGCGCGCGCTCGTCTGTCGTGACGTCACCCGTTCTGTTGGCTTA TAATGCAGGGTGGGGCCACCTGCCGGTAGGTGTGCGGTAGGCTTTTCTCCGTCGAGGACGAGGGTTCGGGCCTAGG GTAGGCTCTCCTGAATCGACAGGCGCGGACCTCTGGTGAGGGGAGGGATAAGTGAGGCGTCAGTTTCTTTGGTCGGT TTTATGTACCTATCTTTAAGTAGCTGAAGCTCCGGTTTTTGAACATATGCGCTCGGGGTGGCGAGTGTGTTTTGTGA AGTTTTTTAGGCACCTTTTGAATGTAATCATTTGGGTCAATATGTAATTTTCAGTGTAGACTAGTAAAGCTTCTGCG AGGTCGACTCTAGAAAATTGCCGCTAAATTCTGGCCGTTTTTGGCTTTTTTGTAGAC (SEQ ID NO: 7)
-----	--

[0042] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 프로모터는 종양 미세환경 내에서 신호에 의해 조절된다. 종양 미세환경은 종양 미세환경의 존재 하에서 프로모터의 활성이 종양 미세환경의 부재 하의 프로모터의 활성에 비하여 적어도 10%까지 증가되거나 또는 줄어드는 경우 프로모터를 조절하는 것으로 간주된다. 일부 구현예에서, 프로모터의 활성은 종양 미세환경의 부재 하의 프로모터의 활성에 비하여 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 100%까지 증가되거나 또는 줄어든다. 예를 들어, 프로모터의 활성은 종양 미세환경의 부재 하의 프로모터의 활성에 비하여 10-20%, 10-30%, 10-40%, 10-50%, 10-60%, 10-70%, 10-80%, 10-90%, 10-100%, 10-200%, 20-30%, 20-40%, 20-50%, 20-60%, 20-70%, 20-80%, 20-90%, 20-100%, 20-200%, 50-60%, 50-70%, 50-80%, 50-90%, 50-100%, 또는 50-200%까지 증가되거나 또는 줄어든다.

[0043] 일부 구현예에서, 프로모터의 활성은 종양 미세환경의 부재 하의 프로모터의 활성에 비하여 적어도 2배 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 10, 25, 20, 25, 50, 또는 100 배)까지 증가되거나 또는 줄어든다. 예를 들어, 프로모터의 활성은 종양 미세환경의 부재 하의 프로모터의 활성에 비하여 적어도 3 배, 적어도 5 배, 적어도 10 배, 적어도 20 배, 적어도 50 배, 또는 적어도 100 배까지 증가되거나 또는 줄어든다. 일부 구현예에서, 프로모터의 활성은 종양 미세환경의 부재 하의 프로모터의 활성에 비하여 2-10, 2-20, 2-30, 2-40, 2-50, 2-60, 2-70, 2-80, 2-90, 또는 2-100 배까지 증가되거나 또는 줄어든다.

[0044] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 프로모터는 저산소 상태 하에서 활성화된다. "저산소 상태"는 신체 또는 신체 영역이 조직 수준에서 적절한 산소 공급이 부족한 상태이다. 저산소 상태는 염증을 유발할 수 있다 (예를 들어, 저산소 상태에서 염증성 사이토카인의 수준은 증가한다). 일부 구현예에서, 저산소 상태 하에서 활성화되는 프로모터는 염증성 사이토카인의 활성의 발현을 감소시키는 이펙터 분자를 인코딩하는 뉴클레오타이드에 작동가능하게 연결되고, 따라서 저산소 상태에 의해 야기되는 염증을 감소시킨다. 일부 구현예에서, 저산소 상태 하에서 활성화되는 프로모터는 저산소증 반응성 요소 (HRE)를 포함한다. "저산소증 반응성 요소 (HRE)"는 저산소증-유도성 인자 (HIF)에 반응하는 반응 인자이다. 일부 구현예에서, HRE는 공통 모티프 NCGTG (여기서 N은 A 또는 G 임)를 포함한다.

[0045] 일부 구현예에서, 조작된 MSC는 다중 이펙터 분자를 생산한다. 예를 들어, MSC는 2-20 상이한 이펙터 분자를 생산하도록 조작될 수 있다. 일부 구현예에서, MSC는 2-20, 2-19, 2-18, 2-17, 2-16, 2-15, 2-14, 2-13, 2-12, 2-11, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3, 3-20, 3-19, 3-18, 3-17, 3-16, 3-15, 3-14, 3-13, 3-12, 3-11, 3-10, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-20, 4-19, 4-18, 4-17, 4-16, 4-15, 4-14, 4-13, 4-12, 4-11, 4-10, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 5-20, 5-19, 5-18, 5-17, 5-16, 5-15, 5-14, 5-13, 5-12, 5-11, 5-10, 5-9, 5-8, 5-7, 5-6, 6-20, 6-19, 6-18, 6-17, 6-16, 6-15, 6-14, 6-13, 6-12, 6-11, 6-10, 6-9, 6-8, 6-7, 7-20, 7-19, 7-18, 7-17, 7-16, 7-15, 7-14, 7-13, 7-12, 7-11, 7-10, 7-9, 7-8, 8-20, 8-19, 8-18, 8-17, 8-16, 8-15, 8-14, 8-13, 8-12, 8-11, 8-10, 8-9, 9-20, 9-19, 9-18, 9-17, 9-16, 9-15, 9-14, 9-13, 9-12, 9-11, 9-10, 10-20, 10-19, 10-18, 10-17, 10-16, 10-15, 10-14, 10-13, 10-12, 10-11, 11-20, 11-19, 11-18, 11-17, 11-16, 11-15, 11-14, 11-13, 11-12, 12-20, 12-19, 12-18, 12-17, 12-16, 12-15, 12-14, 12-13, 13-20, 13-19, 13-18, 13-17, 13-16, 13-15, 13-14, 14-20, 14-19, 14-18, 14-17, 14-16, 14-15, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 15-16, 16-20, 16-19, 16-18, 16-17, 17-20, 17-19, 17-18, 18-20, 18-19, 또는 19-20 이펙터 분자를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, MSC는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17,

18, 19, 또는 20 이펙터 분자를 생산하도록 조작된다.

- [0046] 본 개시내용의 조작된 MSC는 전형적으로 다중 이펙터 분자를 생산하며, 그 중 적어도 2종은 상이한 종양-매개된 면역억제성 기전을 조절한다. 일부 구현예에서, 이펙터 분자 중 적어도 하나는 종양 미세환경에서 염증성 경로를 자극하고, 그리고 이펙터 분자 중 적어도 하나는 종양 미세환경에서 염증의 음성 조절인자를 억제한다.
- [0047] "종양 미세환경"은 주위 혈관, 면역 세포, 섬유모세포, 골수-유래 염증 세포, 림프구, 신호전달 분자 및 세포의 기질 (ECM)을 포함하여 종양이 존재하는 세포 환경이다 (예를 들어, Pattabiraman, D.R. & Weinberg, R.A. *Nature Reviews Drug Discovery* 13, 497-512 (2014); Balkwill, F.R. et al. *J Cell Sci* 125, 5591-5596, 2012; and Li, H. et al. *J Cell Biochem* 101(4), 805-15, 2007 참고).
- [0048] 일부 구현예에서, MSC는 적어도 하나의 귀소 분자를 생산하도록 조작된다. "귀소"는 표적 부위 (예를 들어, 세포, 조직 (예를 들어, 종양), 또는 장기)로 세포의 활성 향해 (이동)를 지칭한다. "귀소 분자"는 MSC가 표적 부위로 향하게 하는 분자를 지칭한다. 일부 구현예에서, 귀소 분자는 MSC가 표적 부위를 인식하고 및/또는 그의 상호작용을 개시하는 기능을 한다. 귀소 분자의 비-제한적인 예는 CXCR1 CCR9, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CCR2, CCR4, FPR2, VEGFR, IL6R, CXCR1, CSCR7, 및 PDGFR을 포함한다.
- [0049] 일부 구현예에서, 귀소 분자는 케모카인 수용체 (케모카인에 결합하는 세포 표면 분자)이다. 케모카인은 세포에서 지향된 화학주성을 포함할 수 있는 세포에 의해 분비된 작은 사이토카인 또는 신호전달 단백질이다. 케모카인은 4개의 주요 아과: CXC, CC, CX3C 및 XC로 분류될 수 있으며, 이들 모두는 표적 세포의 표면 상에 위치한 케모카인 수용체에 선택적으로 결합함에 의해 생물학적 효과를 발휘한다. 일부 구현예에서, MSC는 MSC가 케모카인 구배에 따라 기질 세포-유래 인자 1 (SDF1, C-X-C 모티프 케모카인 12, 및 CXCL12로도 알려져 있음)-발현 세포, 조직, 또는 종양으로 향하게 하는 케모카인 수용체인 CXCR4를 생성하도록 조작된다. 본 개시내용의 조작된 MSC에 의해 생산될 수 있는 케모카인 수용체의 비-제한적 예는 하기를 포함한다: CXC 케모카인 수용체 (예를 들어, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, 및 CXCR7), CC 케모카인 수용체 (CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10, 및 CCR11), CX3C 케모카인 수용체 (예를 들어, CX3CR1, which binds to CX3CL1), 및 XC 케모카인 수용체 (예를 들어, XCR1). 일부 구현예에서, 케모카인 수용체는 G 단백질-연결된 막관통 수용체, 또는 종양 괴사 인자 (TNF) 수용체 상과 (비제한적으로 TNFRSF1A, TNFRSF1B를 포함함)의 구성원이다. 일부 구현예에서, MSC는 CXCL8, CXCL9, 및/또는 CXCL10 (T-세포 동원을 촉진), CCL3 및/또는 CXCL5, CCL21 (Th1 동원 및 분극화)을 생산하도록 조작된다.
- [0050] 일부 구현예에서, MSC는 N-포름일화-함유 올리고펩타이드 (비제한적으로 FPR2 및 FPR1을 포함함)를 검출하는 G-단백질 커플링된 수용체 (GPCR)를 생산하도록 조작된다.
- [0051] 일부 구현예에서, MSC는 인터류킨 (비제한적으로 IL6R을 포함함)을 검출하는 수용체를 생산하도록 조작된다.
- [0052] 일부 구현예에서, MSC는 다른 세포, 조직, 또는 종양으로부터 분비된 성장 인자 (비제한적으로 FGFR, PDGFR, EGFR, 및 VEGF 계열의 수용체를 포함함, 비제한적으로 VEGF-C 및 VEGF-D를 포함함)를 검출하는 수용체를 생산하도록 조작된다.
- [0053] 일부 구현예에서, 귀소 분자는 인테그린이다. 인테그린은 세포-세포의 기질 (ECM) 접착을 촉진하는 막관통 수용체이다. 인테그린은 2개 서브유닛: α (알파) 및 β (베타)를 갖는 절대 이종이량체이다. 인테그린의 α 서브유닛은, 비제한적으로: ITGA1, ITGA2, ITGA3, ITGA4, ITGA5, ITGA6, ITGA7, ITGA8, ITGA9, ITGA10, ITGA11, ITGAD, ITGAE, ITGAL, ITGAM, ITGAV, ITGA2B, ITGAX일 수 있다. 인테그린의 β 서브유닛은, 비제한적으로: ITGB1, ITGB2, ITGB3, ITGB4, ITGB5, ITGB6, ITGB7, 및 ITGB8일 수 있다. 본 개시내용의 MSC는 인테그린 α 및 β 서브유닛의 임의의 조합을 생산하도록 조작될 수 있다.
- [0054] 일부 구현예에서, 귀소 분자는 매트릭스 메탈로프로테이나제 (MMP)이다. MMP는 내피 세포벽 하부에 있는 기저막의 성분을 절단하는 효소이다. MMP의 비-제한적인 예는 MMP-2, MMP-9, 및 MMP를 포함한다. 일부 구현예에서, MSC는 MMP를 억제하는 분자의 억제제 (예를 들어, 단백질)를 생산하도록 조작된다. 예를 들어, MSC는 TIMP 메탈로프로테이나제 억제제 1 (TIMP-1) 또는 막 1형 MMP (MT1-MMP)의 억제제 (예를 들어, RNAi 분자)를 발현하도록 조작될 수 있다.
- [0055] 일부 구현예에서, 귀소 분자는 예를 들어 표적 조직의 내피 상의 셀렉틴 (예를 들어, 조혈 세포 E-/L-셀렉틴 리간드 (HCELL), Dykstra et al., *Stem Cells*. 2016 Oct;34(10):2501-2511)에 결합하는 리간드이다.
- [0056] 용어 "귀소 분자"는 또한 MSC의 귀소를 개선하고/향상하는 분자의 생산을 조절하는 전사 인자를 포괄한다.

- [0057] 일부 구현예에서, MSC 귀소는 대상체에서 종양/암 세포를 국부적으로 조사함으로써 증가된다. 방사선학적 조직 손상은 MSC 귀소뿐만 아니라 그 손상된 조직에 대한 내인성 T 세포 귀소를 돕는다.
- [0058] *조작된 세포의 예*
- [0059] 본 명세서에서 제공된 바와 같은 세포 (예를 들어, MSC)는 다중 이펙터 분자를 생산하도록 조작되며, 그 중 적어도 2종은 상이한 종양-매개된 면역억제성 기전을 조절한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 그 초과)의 이펙터 분자는 종양 미세환경에서 적어도 하나의 면역자극성 기전을 자극하거나, 또는 종양 미세환경에서 적어도 하나의 면역억제성 기전을 억제한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 그 초과)의 이펙터 분자는 종양 미세환경에서 적어도 하나의 면역억제성 기전을 억제하고, 적어도 하나의 이펙터 분자 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 그 초과)는 종양 미세환경에서 적어도 하나의 면역억제성 기전을 억제한다. 또 다른 구현예에서, 적어도 2개 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 또는 그 초과)의 이펙터 분자는 종양 미세환경에서 적어도 하나의 면역자극성 기전을 자극한다. 또 다른 구현예에서, 적어도 2개 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 그 초과)의 이펙터 분자는 종양 미세환경에서 적어도 하나의 면역억제성 기전을 억제한다.
- [0060] 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 T 세포 신호전달, 활성 및/또는 동원을 자극하는 적어도 하나의 이펙터 분자를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 항원 전달 및/또는 처리를 자극하는 적어도 하나의 이펙터 분자를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 천연 살해 세포-매개된 세포독성 신호전달, 활성 및/또는 동원을 자극하는 적어도 하나의 이펙터 분자를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 수지상 세포 분화 및/또는 성숙을 자극하는 적어도 하나의 이펙터 분자를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 면역 세포 동원을 자극하는 적어도 하나의 이펙터 분자를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 M1 대식세포 신호전달, 활성 및/또는 동원을 자극하는 적어도 하나의 이펙터 분자를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 Th1 분극화를 자극하는 적어도 하나의 이펙터 분자를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 기질 열화를 자극하는 적어도 하나의 이펙터 분자를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 면역자극성 대사물 생산을 자극하는 적어도 하나의 이펙터 분자를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 유형 I 인터페론 신호전달을 자극하는 적어도 하나의 이펙터 분자를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 음성 공동자극 신호전달을 억제하는 적어도 하나의 이펙터 분자를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 항종양 면역 세포의 세포자멸유도 신호전달 (예를 들어, TRAIL을 포함)을 억제하는 적어도 하나의 이펙터 분자를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 T 조절 (T_{reg}) 세포 신호전달, 활성 및/또는 동원을 억제하는 적어도 하나의 이펙터 분자를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 종양 체크포인트 분자를 억제하는 적어도 하나의 이펙터 분자를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 인터페론 유전자의 자극인자(STING) 신호전달을 활성화하는 적어도 하나의 이펙터 분자를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 골수성-유래된 억제제 세포 신호전달, 활성 및/또는 동원을 억제하는 적어도 하나의 이펙터 분자를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 면역억제성 인자/대사물을 분해하는 적어도 하나의 이펙터 분자를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 혈관 내피 성장 인자 신호전달을 억제하는 적어도 하나의 이펙터 분자를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 종양 세포를 직접적으로 사멸시키는 적어도 하나의 이펙터 분자 (예를 들어, 그란자임, 페르포린, 종양용해 바이러스, 세포질분해적 펩타이드 및 효소, 예를 들어, ADCC를 유발하는 항종양 항체)를 생산하도록 조작된다.
- [0061] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 이펙터 분자: T 세포 신호전달, 활성 및/또는 동원을 자극하고, 항원 전달 및/또는 처리를 자극하고, 천연 살해 세포-매개된 세포독성 신호전달, 활성 및/또는 동원을 자극하고, 수지상 세포 분화 및/또는 성숙을 자극하고, 면역 세포 동원을 자극하고, 대식세포 신호전달을 자극하고, 기질 열화를 자극하고, 면역자극성 대사물 생산을 자극하고, 또는 유형 I 인터페론 신호전달을 자극하고; 그리고 적어도 하나의 이펙터 분자는 음성 공동자극 신호전달을 억제하고, 항종양 면역 세포의 세포자멸유도 신호전달을 억제하고, T 조절 (T_{reg}) 세포 신호전달, 활성 및/또는 동원을 억제하고, 종양 체크포인트 분자를 억제하고, 인터페론 유전자 자극인자(STING) 신호전달을 활성화하고, 골수성-유래된 억제제 세포 신호전달, 활성 및/또는 동원을 억제하고, 면역억제성 인자/대사물을 분해하고, 혈관 내피 성장 인자 신호전달을 억제하고, 또는 직접적으로 종양 세포를 사멸한다.

- [0062] 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IL-12, IFN- β , IFN- γ , IL-2, IL-15, IL-7, IL-36 γ , IL-18, IL-1 β , OX40-리간드, 및 CD40L로부터 선택된 적어도 하나의 이펙터 분자; 및/또는 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-CTLA-4 항체, 및 항-IL-35 항체로부터 선택된 적어도 하나의 이펙터 분자; 및/또는 MIP1 α (CCL3), MIP1 β (CCL5), 및 CCL21로부터 선택된 적어도 하나의 이펙터 분자; 및/또는 CpG 올리고데옥시뉴클레오타이드로부터 선택된 적어도 하나의 이펙터 분자; 및/또는 미생물 펩타이드로부터 선택된 적어도 하나의 이펙터 분자를 생산하도록 조작된다.
- [0063] 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- β 및 사이토카인, 항체, 케모카인, 뉴클레오타이드, 펩타이드, 효소, 및 인터페론 유전자의 자극인자 (STING)로부터 선택된 적어도 하나의 이펙터 분자를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- β 및 적어도 하나의 사이토카인 또는 수용체/리간드 (예를 들어, IL-12, IFN- γ , IL-2, IL-15, IL-7, IL-36 γ , IL-18, IL-1 β , OX40-리간드, 및/또는 CD40L)를 생산하도록 조작된다.
- [0064] 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- β 및 적어도 하나의 사이토카인 또는 수용체/리간드 (예를 들어, IL-12, IFN- γ , IL-2, IL-15, IL-7, IL-36 γ , IL-18, IL-1 β , OX40-리간드, 및/또는 CD40L)를 생산하도록 조작된다.
- [0065] 일부 구현예에서 사이토카인은 Treg 세포에 결합하는 것을 방지하고 우선적으로 CD8 및 NK 세포에 결합하는 항체 단편에 융합된 IL-2와 같이 세포 특이적 표적화된 결합을 유도하도록 사이토카인에 자기-결합하는 항체, 항체-단편, 또는 수용체와 함께 조작된 융합 단백질로 생산된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- β 및 적어도 하나의 항체 (예를 들어, 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 항-CTLA-4 항체, 항-VEGF, 항-TGF- β , 항-IL-10, 항-TNF- α , 및/또는 항-IL-35 항체)를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- β 및 적어도 하나의 케모카인 (MIP1 α (CCL3), MIP1 β (CCL5), 및/또는 CCL21)을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- β 및 적어도 하나의 뉴클레오타이드 (예를 들어, CpG 올리고데옥시뉴클레오타이드)를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- β 및 적어도 하나의 펩타이드 (예를 들어, 항종양 펩타이드)를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- β 및 적어도 하나의 효소를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- β 및 적어도 하나의 STING 활성제를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- β 및 직접적인 항종양 활성 (예를 들어, 종양용해 바이러스)를 갖는 적어도 하나의 이펙터를 생산하도록 조작된다.
- [0066] 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- α 및 MIP1- α 를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- α 및 MIP1- β 를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- α 및 CXCL9를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- α 및 CXCL10을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- α 및 CXCL11을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- α 및 CCL21을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 IL-12, IFN- γ , IL-2, IL-7, IL-15, IL36- γ , IL-18, CD40L 및/또는 41BB-L을 추가로 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 항-CD40 항체, 항-CTLA4 항체, 항-PD-L1 항체, 및/또는 OX40L을 추가로 생산하도록 조작된다.
- [0067] 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- β 및 MIP1- α 를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- β 및 MIP1- β 를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- β 및 CXCL9를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- β 및 CXCL10을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- β 및 CXCL11을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- β 및 CCL21을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 IL-12, IFN- γ , IL-2, IL-7, IL-15, IL36- γ , IL-18, CD40L 및/또는 41BB-L을 추가로 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 항-CD40 항체, 항-CTLA4 항체, 항-PD-L1 항체, 및/또는 OX40L을 추가로 생산하도록 조작된다.
- [0068] 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IL-12 및 MIP1- α 를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IL-12 및 MIP1- β 를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IL-12 및 CXCL9를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IL-12 및 CXCL10을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IL-12 및 CXCL11을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IL-12 및 CCL21을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 IFN- β ,

IFN- γ , IL-2, IL-7, IL-15, IL36- γ , IL-18, CD40L 및/또는 41BB-L을 추가로 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 항-CD40 항체, 항-CTLA4 항체, 항-PD-L1 항체, 및/또는 OX40L을 추가로 생산하도록 조작된다.

[0069] 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 TNF-관련된 세포자멸사-유도 리간드 (TRAIL) 및 MIP1- α 를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 TRAIL 및 MIP1- β 를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 TRAIL 및 CXCL9를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 TRAIL 및 CXCL10을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 TRAIL 및 CXCL11을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 TRAIL 및 CCL21을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 IL-12, IFN- γ , IL-2, IL-7, IL-15, IL36- γ , IL-18, CD40L 및/또는 41BB-L을 추가로 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 항-CD40 항체, 항-CTLA4 항체, 항-PD-L1 항체, 및/또는 OX40L을 추가로 생산하도록 조작된다.

[0070] 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 인터페론 유전자 자극인자 (STING) 및 MIP1- α 를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 STING 및 MIP1- β 를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 STING 및 CXCL9를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 STING 및 CXCL10을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 STING 및 CXCL11을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 STING 및 CCL21을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 IL-12, IFN- γ , IL-2, IL-7, IL-15, IL36- γ , IL-18, CD40L 및/또는 41BB-L을 추가로 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 항-CD40 항체, 항-CTLA4 항체, 항-PD-L1 항체, 및/또는 OX40L을 추가로 생산하도록 조작된다.

[0071] 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 CD40L 및 MIP1- α 를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 CD40L 및 MIP1- β 를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 CD40L 및 CXCL9를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 CD40L 및 CXCL10을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 CD40L 및 CXCL11을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 CD40L 및 CCL21을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 IL-12, IFN- γ , IL-2, IL-7, IL-15, IL36- γ , IL-18, 및/또는 41BB-L을 추가로 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 항-CD40 항체, 항-CTLA4 항체, 항-PD-L1 항체, 및/또는 OX40L을 추가로 생산하도록 조작된다.

[0072] 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 시토신 데아미나제 및 MIP1- α 를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 시토신 데아미나제 및 MIP1- β 를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 시토신 데아미나제 및 CXCL9를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 시토신 데아미나제 및 CXCL10을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 시토신 데아미나제 및 CXCL11을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 시토신 데아미나제 및 CCL21을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 IL-12, IFN- γ , IL-2, IL-7, IL-15, IL36- γ , IL-18, CD40L, 및/또는 41BB-L을 추가로 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 항-CD40 항체, 항-CTLA4 항체, 항-PD-L1 항체, 및/또는 OX40L을 추가로 생산하도록 조작된다.

[0073] 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- α 및 IL-12를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- α 및 IFN- γ 를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- α 및 IL-2를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- α 및 IL-7을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- α 및 IL-15를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- α 및 IL-36 γ 를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- α 및 IL-18을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- α 및 CD40L을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- α 및 41BB-L을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 MIP1- α , MIP1- β , CXCL9, CXCL10, CXCL11, 및/또는 CCL21을 추가로 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 항-CD40 항체, 항-CTLA4 항체, 항-PD-L1 항체, 및/또는 OX40L을 추가로 생산하도록 조작된다.

[0074] 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- β 및 IL-12를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- β 및 IFN- γ 를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- β 및 IL-2를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- β 및 IL-7을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- β 및 IL-15를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예

서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- β 및 IL-36 γ 를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- β 및 IL-18을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- β 및 CD40L을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IFN- β 및 41BB-L을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 MIP1- α , MIP1- β , CXCL9, CXCL10, CXCL11, 및/또는 CCL21을 추가로 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 항-CD40 항체, 항-CTLA4 항체, 항-PD-L1 항체, 및/또는 OX40L을 추가로 생산하도록 조작된다.

[0075] 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 TNF-관련된 세포자멸사-유도 리간드 (TRAIL) 및 IL-12를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 TRAIL 및 IFN- γ 를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 TRAIL 및 IL-2를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 TRAIL 및 IL-7을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 TRAIL 및 IL-15를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 TRAIL 및 IL-36 γ 를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 TRAIL 및 IL-18을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 TRAIL 및 CD40L을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 TRAIL 및 41BB-L을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 MIP1- α , MIP1- β , CXCL9, CXCL10, CXCL11, 및/또는 CCL21을 추가로 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 항-CD40 항체, 항-CTLA4 항체, 항-PD-L1 항체, 및/또는 OX40L을 추가로 생산하도록 조작된다.

[0076] 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 인터페론 유전자 자극인자 (STING) 및 IL-12를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 STING 및 IFN- γ 를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 STING 및 IL-2를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 STING 및 IL-7을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 STING 및 IL-15를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 STING 및 IL-36 γ 를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 STING 및 IL-18을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 STING 및 CD40L을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 STING 및 41BB-L을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 MIP1- α , MIP1- β , CXCL9, CXCL10, CXCL11, 및/또는 CCL21을 추가로 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 항-CD40 항체, 항-CTLA4 항체, 항-PD-L1 항체, 및/또는 OX40L을 추가로 생산하도록 조작된다.

[0077] 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 CD40L 및 IL-12를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 CD40L 및 IFN- γ 를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 CD40L 및 IL-2를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 CD40L 및 IL-7을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 CD40L 및 IL-15를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 CD40L 및 IL-36 γ 를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 CD40L 및 IL-18을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 CD40L 및 41BB-L을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 MIP1- α , MIP1- β , CXCL9, CXCL10, CXCL11, 및/또는 CCL21을 추가로 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 항-CD40 항체, 항-CTLA4 항체, 항-PD-L1 항체, 및/또는 OX40L을 추가로 생산하도록 조작된다.

[0078] 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 시토신 데아미나제 및 IL-12를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 시토신 데아미나제 및 IFN- γ 를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 시토신 데아미나제 및 IL-2를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 시토신 데아미나제 및 IL-7을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 시토신 데아미나제 및 IL-15를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 시토신 데아미나제 및 IL-36 γ 를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 시토신 데아미나제 및 IL-18을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 시토신 데아미나제 및 CD40L을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 시토신 데아미나제 및 41BB-L을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 MIP1- α , MIP1- β , CXCL9, CXCL10, CXCL11, 및/또는 CCL21을 추가로 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 항-CD40 항체, 항-CTLA4 항체, 항-PD-L1 항체, 및/또는 OX40L을 추가로 생산하도록 조작된다.

[0079] 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 MIP1- α 및 IL-12를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 MIP1- α 및 MIP1- γ 를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 MIP1- α 및 IL-2를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 MIP1- α 및 IL-7을 생산하

체를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 IFN- α , IFN- β , TRAIL, STING, CD40L, 및/또는 시토신 데아미나제를 추가로 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 MIP1- α , MIP1- β , CXCL9, CXCL10, CXCL11, 및/또는 CCL21을 추가로 생산하도록 조작된다.

[0100] 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IL-7 및 항-PD-L1 항체를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IL-7 및 OX40L을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IL-7 및 항-CTLA4 항체를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IL-7 및 항-CD47 항체를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 IFN- α , IFN- β , TRAIL, STING, CD40L, 및/또는 시토신 데아미나제를 추가로 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 MIP1- α , MIP1- β , CXCL9, CXCL10, CXCL11, 및/또는 CCL21을 추가로 생산하도록 조작된다.

[0101] 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IL-15 및 항-PD-L1 항체를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IL-15 및 OX40L을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IL-15 및 항-CTLA4 항체를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IL-15 및 항-CD47 항체를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 IFN- α , IFN- β , TRAIL, STING, CD40L, 및/또는 시토신 데아미나제를 추가로 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 MIP1- α , MIP1- β , CXCL9, CXCL10, CXCL11, 및/또는 CCL21을 추가로 생산하도록 조작된다.

[0102] 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IL-36- γ 및 항-PD-L1 항체를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IL-36- γ 및 OX40L을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IL-36- γ 및 항-CTLA4 항체를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IL-36- γ 및 항-CD47 항체를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 IFN- α , IFN- β , TRAIL, STING, CD40L, 및/또는 시토신 데아미나제를 추가로 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 MIP1- α , MIP1- β , CXCL9, CXCL10, CXCL11, 및/또는 CCL21을 추가로 생산하도록 조작된다.

[0103] 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IL-18 및 항-PD-L1 항체를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IL-18 및 OX40L을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IL-18 및 항-CTLA4 항체를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 IL-18 및 항-CD47 항체를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 IFN- α , IFN- β , TRAIL, STING, CD40L, 및/또는 시토신 데아미나제를 추가로 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 MIP1- α , MIP1- β , CXCL9, CXCL10, CXCL11, 및/또는 CCL21을 추가로 생산하도록 조작된다.

[0104] 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 CD40L 및 항-PD-L1 항체를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 CD40L 및 OX40L을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 CD40L 및 항-CTLA4 항체를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 CD40L 및 항-CD47 항체를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 IFN- α , IFN- β , TRAIL, STING, CD40L, 및/또는 시토신 데아미나제를 추가로 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 MIP1- α , MIP1- β , CXCL9, CXCL10, CXCL11, 및/또는 CCL21을 추가로 생산하도록 조작된다.

[0105] 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 41BB-L 및 항-PD-L1 항체를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 41BB-L 및 OX40L을 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 41BB-L 및 항-CTLA4 항체를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, MSC)는 41BB-L 및 항-CD47 항체를 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 IFN- α , IFN- β , TRAIL, STING, CD40L, 및/또는 시토신 데아미나제를 추가로 생산하도록 조작된다. 일부 구현예에서, 세포는 MIP1- α , MIP1- β , CXCL9, CXCL10, CXCL11, 및/또는 CCL21을 추가로 생산하도록 조작된다.

[0106] 세포 유형

[0107] 본 개시내용은 주로 다중 이펙터 분자를 생산하도록 조작된 간엽 줄기 세포 (MSC) (예를 들어, 인간 MSC)를 지칭한다. 그러나, 본 개시내용은 MSC에 제한되지 보다는 다른 세포 유형 (예를 들어, 면역계의 세포 유형)을 포괄하는 것으로 의도된다는 것이 이해되어야 한다. 예를 들어, 본 명세서에서 제공된 바와 같은, (이펙터 분자를 생산하도록 조작된) 조작된 세포는 천연 살해 (NK) 세포, NKT 세포, 타고난 림프양 세포, 비만 세포, 호산구, 호염기구, 대식세포, 중성구, 및 수지상 세포, T 세포 (예를 들어, CD8⁺ T 세포, CD4⁺ T 세포, 감마-델타 T 세포, 및 T 조절 세포 (CD4⁺, FOXP3⁺, CD25⁺)) 및 B 세포로부터 선택될 수 있다. 따라서, 임의의 구현예에서, 본 개시내용의 MSC는 전술한 세포 유형 중 하나 이상에 대해 치환될 수 있다.

- [0108] 일부 구현예에서, 조작된 간엽 줄기 세포는 골수로부터의 것이다 (이로부터 수득되거나 또는 이로부터 유래된다). 일부 구현예에서, 조작된 간엽 줄기 세포는 지방 조직으로부터의 것이다 (이로부터 수득되거나 또는 이로부터 유래된다). 일부 구현예에서, 조작된 간엽 줄기 세포는 탭줄로부터의 것이다 (이로부터 수득되거나 또는 이로부터 유래된다). 일부 구현예에서, 조작된 간엽 줄기 세포는 만능 줄기 세포 (예를 들어, 배아 줄기 세포 또는 유도 만능 줄기 세포)로부터의 것이다.
- [0109] 따라서, 본 개시내용은, 적어도 2종이 상이한 종양-매개된 면역억제성 기전을 조절하는 다중 이펙터 분자를 생산하도록 조작된 T 세포 (예를 들어, CD8⁺ T 세포, CD4⁺ T 세포, 감마-델타 T 세포, 또는 T 조절 세포 (CD4⁺, FOXP3⁺, CD25⁺))를 제공한다. 일부 구현예에서, B 세포는 다중 이펙터 분자를 생산하도록 조작되고, 그 중 적어도 2종은 상이한 종양-매개된 면역억제성 기전을 조절한다. 일부 구현예에서, NK 세포는 다중 이펙터 분자를 생산하도록 조작되고, 그 중 적어도 2종은 상이한 종양-매개된 면역억제성 기전을 조절한다. 일부 구현예에서, NKT 세포는 다중 이펙터 분자를 생산하도록 조작되고, 그 중 적어도 2종은 상이한 종양-매개된 면역억제성 기전을 조절한다. 일부 구현예에서, 타고난 림프양 세포는 다중 이펙터 분자를 생산하도록 조작되고, 그 중 적어도 2종은 상이한 종양-매개된 면역억제성 기전을 조절한다. 일부 구현예에서, 비만 세포는 다중 이펙터 분자를 생산하도록 조작되고, 그 중 적어도 2종은 상이한 종양-매개된 면역억제성 기전을 조절한다. 일부 구현예에서, 호산구는 다중 이펙터 분자를 생산하도록 조작되고, 그 중 적어도 2종은 상이한 종양-매개된 면역억제성 기전을 조절한다. 일부 구현예에서, 호염기구는 다중 이펙터 분자를 생산하도록 조작되고, 그 중 적어도 2종은 상이한 종양-매개된 면역억제성 기전을 조절한다. 일부 구현예에서, 대식세포는 다중 이펙터 분자를 생산하도록 조작되고, 그 중 적어도 2종은 상이한 종양-매개된 면역억제성 기전을 조절한다. 일부 구현예에서, 중성구는 다중 이펙터 분자를 생산하도록 조작되고, 그 중 적어도 2종은 상이한 종양-매개된 면역억제성 기전을 조절한다. 일부 구현예에서, 수지상 세포는 다중 이펙터 분자를 생산하도록 조작되고, 그 중 적어도 2종은 상이한 종양-매개된 면역억제성 기전을 조절한다.
- [0110] 일부 구현예에서, 이펙터 분자 중 적어도 하나는 종양 미세환경에서 면역자극성 기전을 자극하고 및/또는 종양 미세환경에서 면역억제성 기전을 억제한다.
- [0111] 일부 구현예에서, 이펙터 분자 중 적어도 하나는 (a) T 세포 신호전달, 활성화 및/또는 동원을 자극하고, (b) 항원 전달 및/또는 처리를 자극하고, (c) 천연 살해 세포-매개된 세포독성 신호전달, 활성화 및/또는 동원을 자극하고, (d) 수지상 세포 분화 및/또는 성숙을 자극하고, (e) 면역 세포 동원을 자극하고, (f) 전-염증 대식세포 신호전달, 활성화 및/또는 동원을 자극하거나 또는 항-염증성 대식세포 신호전달, 활성화 및/또는 동원을 억제하고, (g) 기질 열화를 자극하고, (h) 면역자극성 대사물 생산을 자극하고, (i) 유형 I 인터페론 신호전달을 자극하고, (j) 음성 공동자극 신호전달을 억제하고, (k) 항종양 면역 세포의 세포자멸사 신호전달을 억제하고, (l) T 조절 (T_{reg}) 세포 신호전달, 활성화 및/또는 동원을 억제하고, (m) 종양 체크포인트 분자를 억제하고, (n) 인터페론 유전자 자극인자 (STING) 신호전달을 자극하고, (o) 골수성-유래된 억제제 세포 신호전달, 활성화 및/또는 동원을 억제하고, (p) 면역억제성 인자/대사물을 저하시키고, (q) 혈관 내피 성장 인자 신호전달을 억제하고, 및/또는 (r) 직접적으로 종양 세포를 사멸시킨다.
- [0112] 면역계는 타고난 면역계 및 적응성 시스템을 포함하고, 그 각각은 특이적 기능을 갖는 상이한 유형의 세포를 포함한다. 타고난 면역계는 다른 유기체에 의한 감염으로부터 숙주를 방어하는 세포 및 기전을 포함한다. 감염에 대해 즉각적인 방어를 제공하는 타고난 면역계는 비-특이적 방식으로 병원체를 인식하고 이에 반응하며 숙주에 대한 오래 지속되는 면역력을 제공하지는 않는다. (예를 들어, 포유동물과 같은 척추 동물에서) 타고난 면역계의 주요 기능은 하기를 포함한다: 사이토카인 및 케모카인이라 불리는 특화된 화학적 매개체를 포함한 화학적 인자의 생성을 통해 면역 세포를 감염의 부위로 모집하는 단계; 보체 캐스케이드를 활성화시켜 박테리아를 확인하고, 세포를 활성화시키고, 항체 복합체 또는 죽은 세포의 청소능을 증진하는 단계; 특화된 백혈구에 의해 장기, 조직, 혈액 및 림프에 존재하는 이물질을 식별하고 제거하는 단계; 항원 전달로 알려진 과정을 통해 적응성 면역계를 활성화시키는 단계; 감염원에 대한 물리적 및 화학적 장벽으로 작용하는 단계.
- [0113] 타고난 면역계의 성분은 물리적 장벽 (피부, 위장관, 기도), 방어 메커니즘 (분비, 점액, 담즙), 및 일반적인 면역 반응 (염증)을 포함한다. 백혈구들 (또한 소위 백혈구) 및 식균 세포는 타고난 면역계 및 반응에서 기능하는 주요 세포 유형으로, 감염을 일으킬 수 있는 병원체를 식별하고 제거한다.
- [0114] 백혈구는 특정 장기 또는 조직과 밀접하게 관련되어 있지 않으며 독립적인 단일-세포 유기체의 것과 유사하게 기능한다. 백혈구는 자유롭게 이동하여 세포 잔해, 이물질 및 침입하는 미생물과 상호작용하고 이를 포착할 수

있다. 신체의 다른 많은 세포와는 달리, 대부분의 타고난 면역 백혈구는 스스로 분열하거나 번식할 수 없지만 골수에 존재하는 다분화능 조혈 줄기 세포의 생성물이다. 백혈구의 유형은 비제한적으로: 비만 세포, 호염기구, 호산구, 천연 사멸 세포 (NK 세포), 타고난 림프양 세포 (ILC), 및 감마-델타 T 세포를 포함한다.

[0115] 비만 세포는 결합 조직 및 점막에 존재하는 타고난 면역 세포의 유형이다. 비만 세포는 상처 치유 및 병원체에 대한 방어와 관련이 있지만, 또한 종종 알러지 및 과민증과 관련이 있다. 활성화되는 경우, 비만 세포는 다양한 호르몬 매개체 및 케모카인, 또는 화학주성 사이토카인과 함께 히스타민 및 헤파린이 풍부한 특징적인 과립을 빠르게 환경으로 방출한다. 히스타민은 혈관을 확장시켜 염증의 특징적인 징후를 일으키고 중성구 및 대식세포를 동원한다.

[0116] 호염기구 및 호산구는 중성구에 관련된 세포이다. 병원체 만남에 의해 활성화되면 히스타민-방출 호염기구는 기생충에 대한 방어에 중요하며 천식과 같은 알러지성 반응에 중요한 역할을 한다. 호산구는 활성화되면 기생충을 죽이는 데 매우 효과적인 다양한 독성 단백질과 자유 라디칼을 분비하지만, 알러지성 반응 중에 조직을 손상시킬 수도 있다. 따라서, 호산구에 의한 독소의 활성화 및 방출은 임의의 부적절한 조직 파괴를 방지하도록 엄격하게 조절된다.

[0117] 천연 살해 세포 (NK 세포)는 침입하는 미생물을 직접 공격하지 않는 타고난 면역계의 성분이다. 오히려, NK 세포는, MHC I (주조직 적합성 복합체)로 불리는 비정상적으로 저수준의 세포-표면 마커-숙주세포의 바이러스성 감염을 일으킬 수 있는 상황-를 가지는, 절충된 숙주세포, 예컨대 종양 세포 또는 바이러스-감염된 세포를 파괴한다. NK 세포는 낮은 표면 MHC I 분자를 갖는 세포를 사멸시키기 위해 활성화를 필요로하지 않는 초기 개념으로 인해 명명되었다.

[0118] 감마-델타 T 세포는 타고난 면역력과 적응성 면역력 사이의 경계에 이들을 위치시키는 특성을 나타낸다. 일부 사례에서, 감마-델타 T 세포는 TCR 유전자를 재 배열하여 접합 다양성을 생성하고 메모리 표현형을 전개한다는 점에서 적응성 면역력의 성분으로 간주될 수 있다. 다양한 서브셋이 또한 제한된 TCR 또는 NK 수용체가 패턴 인식 수용체로서 사용될 수 있는 타고난 면역계의 일부로 간주될 수 있다. 예를 들어, 다수의 Vgamma9/Vdelta2 T 세포는 미생물에 의해 생성된 공통 분자에 빠르게 반응하고, 매우 제한된 상피내 Vdelta1 T 세포는 스트레스 받은 상피 세포에 반응할 것이다.

[0119] 식균세포는 병원체 또는 입자를 삼켜 버리거나, 또는 '포식세포인' 타고난 면역 세포이다. 입자 또는 병원체를 삼키기 위해, 식균세포는 그것의 원형질 막의 일부를 연장하여, 막이 입자를 둘러쌀 때까지 (입자는 이제 세포 내부에 있음) 막이 입자 주위를 감싸도록 한다. 일단 세포 내부에 침입한 병원체는 엔도솜 안에 함유되어, 리소솜과 병합한다. 리소솜은 입자 또는 유기체를 사멸시키고 소화시키는 효소 및 산을 함유한다. 일반적으로, 식균 세포는 병원체를 찾으며 신체를 순찰하지만 사이토카인으로 불리는 다른 세포에 의해 생성된 고도로 특화된 분자 신호의 그룹에도 또한 반응할 수 있다. 식균세포의 유형은, 비제한적으로: 대식세포, 중성구, 및 수지상 세포를 포함한다.

[0120] 대식세포는 모세혈관의 벽을 가로질러 이동하고 침입하는 병원체를 쫓아 세포 사이의 영역으로 유입함에 의해 혈관계의 외부로 이동할 수 있는 큰 식균 세포이다. 조직에서, 기관-특이적 대식세포는 단핵구로 불리는 혈액에 존재하는 식균세포와 구별된다. 대식세포는 가장 효율적인 식균세포이며, 상당한 수의 박테리아 또는 다른 세포 또는 미생물을 식균할 수 있다. 대식세포의 표면상의 수용체에 대한 박테리아 분자의 결합은 "호흡 버스트"의 생성을 통해 박테리아를 삼키고 파괴하도록 하여, 반응성 산소 종의 방출을 유발한다. 병원체는 또한 대식세포를 자극하여 케모카인을 생성하고, 이는 다른 세포를 감염 부위로 모집한다. 염증을 촉진하는 대식세포를 M1 대식세포라고 하고, 반면에 염증을 줄이고 조직 치유를 촉진하는 대식세포를 M2 대식세포라고 지칭한다.

[0121] 2개의 다른 세포 유형 (호산구 및 호염기구)과 함께 중성구는 그것의 세포질에 과립이 존재하기 때문에 과립구로 알려져 있거나, 그것의 독특한 핵 모양의 핵으로 인해 다형핵 세포 (PMN)로 알려져 있다. 중성구 과립은 박테리아와 진균류를 죽이거나 그의 성장을 억제하는 다양한 독성 물질을 함유한다. 대식세포와 유사하게, 중성구는 호흡 버스트를 활성화시킴에 의해 병원체를 공격한다. 중성구 호흡 버스트의 주요 산물은 과산화수소, 유리 산소 라디칼 및 차아염소산염을 포함한 강한 산화제이다. 중성구는 풍부하며 일반적으로 감염의 부위에 도달하는 최초의 세포이다.

[0122] 수지상 세포 (DC)는 외부 환경, 주로 피부 (이들이 종종 랑게르한스 세포로 지칭되는 곳) 및 코, 폐, 위 및 내장의 내부 점막 내벽과 접촉하는 조직에 존재하는 식균세포이다. 그들은 뉴런 수상조직과의 유사성 때문에 명명되었지만, 수지상 세포는 신경계에 연결되어 있지 않다. 수지상 세포는 항원 전달의 과정에서 매우 중요하며 타

고난 면역계와 적응성 면역계 사이의 연결로서 역할을 한다.

- [0123] 타고난 림프양 세포 (ILC)는 보호성 면역력과 항상성 및 염증의 조절에서 중요한 역할을 한다. ILC는 이들이 생산하는 사이토카인 및 그것의 발달 및 기능을 조절하는 전사 인자에 기초하여 분류된다. 그룹 1 ILC는 1형 사이토카인을 생산하고 천연 살해 세포를 포함한다. 그룹 2 ILC는 2형 사이토카인을 생산하고, 그룹 3 ILC는 사이토카인 IL-17A 및 IL-22를 생산한다. 천연 살해 세포는 절충된 숙주세포, 예컨대 종양 세포 또는 바이러스-감염된 세포를 파괴한다. 그들은 항체의 부재에서 스트레스 받은 세포를 인식할 수 있어, 이들이 절충된 숙주세포에 빠르게 반응할 수 있게 한다.
- [0124] 골수 세포는 타고난 면역계에서 기능하는 세포이다. 골수 세포는 비제한적으로, 단핵구, 대식세포, 중성구, 호염기구, 호산구, 적혈구, 수지상 세포, 및 거핵구 또는 혈소판을 포함한다. 림프양 세포는 T 세포, B 세포, 및 천연 살해 세포를 포함한다.
- [0125] 적응성 면역계는 적응성 면역 반응을 생성한다. 적응성 면역 반응은 그것의 일반적인 형태에서, 항원 단편(세포 표면 상에 제시를 위해 MHC I 및/또는 MHC II에 결합하는 항원으로부터 유래된 특이적 아미노산 서열)과 연관된 주조직 적합성 (MHC)-부류 I 또는 부류 II 분자를 발현하는 항원 제시 세포 (APC)와의 상호작용을 통해 헬퍼 (TH, CD4⁺) 및 세포독성 (CD8⁺) T 세포 서브셋의 민감화로 개시한다. 감각화된 또는 프라이밍된 CD4⁺ T 세포는 다양한 T 세포 서브셋뿐만 아니라 B 세포의 활성화에 참여하는 림포카인을 생산한다. 감각화된 CD8⁺ T 세포는 림포카인에 반응하여 수가 증가하고, 일치하는 MHC-인코딩된 부류 I 분자와 관련된 특정한 항원 단편을 발현하는 임의의 세포를 파괴할 수 있다. 따라서, 암성 종양의 과정에서, CTL은 암 관련된 또는 암 특이적 항원을 발현하는 세포를 박멸하여, 그것에 의해 종양 확산 및 질병 발생의 진행을 제한한다.
- [0126] "B 림프구"또는 "B 세포"는 백혈구의 한 유형이다. B 세포는 항체를 분비함으로써 적응성 면역계의 체액성 면역 성분에서 기능한다. B 세포는 두 가지 주요한 기능을 갖는다: 이들은 T 세포에 항원을 제시하고, 더 중요한 것은, 이들은 감염성 미생물을 중화시키는 항체를 생성한다. 항체는 병원체의 표면을 코팅하고 세 가지 주요 역할: 중화, 옵소닌화 및 보체 활성화를 제공한다.
- [0127] 중화는 병원체가 항체로 덮여 있기 때문에 숙주 세포에 결합하여 감염시킬 수 없을 때 발생한다. 옵소닌화에서, 항체-결합된 병원체는 중성구 및 대식세포와 같은 면역 세포를 경고하고, 병원체를 삼켜서 소화하는 적기로 역할을 한다. 보체는 박테리아를 직접적으로 파괴하거나 용해시키는 과정이다.
- [0128] 항체는 두 가지 방식으로 발현된다. B 세포의 표면 상에 위치한 B-세포 수용체 (BCR)는 실제로 항체이다. B 세포는 또한 병원체를 확산시키고 결합시키기 위해 항체를 분비한다. 이 이중 발현은 초기 문제, 예를 들어 박테리아가 독특한 BCR에 의해 인식되고 B 세포를 활성화시키기 때문에 중요하다. 활성화된 B 세포는 항체를, 본질적으로 BCR이지만 가용성인 형태로 분비함에 의해 반응한다. 이것은 반응이 전체의 과정을 개시한 박테리아에 대해 특이적이라는 것을 보장한다.
- [0129] 모든 항체는 고유하지만, 이들은 일반적인 카테고리: IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE에 속한다. (Ig는 항체에 대한 또 다른 단어인 면역글로불린의 약자이다.) 이들은 역할이 겹치지만, IgM은 일반적으로 보체 활성화에 중요하고; IgD는 호염기구 활성화에 관여하고; IgG는 중화, 옵소닌화 및 보체 활성화에 중요하고; IgA는 위장관에서의 중화에 필수적이고; IgE는 기생충 및 알러지성 반응에서 비만 세포를 활성화시키는데 필요하다.
- [0130] 메모리 B 세포 활성화는 그것의 모체 B 세포에 공유된, 그것의 표적 항원의 검출 및 결합으로 개시한다. 특정 바이러스-특이적 메모리 B 세포와 같은 일부 메모리 B 세포는 T 세포의 도움없이 활성화될 수 있지만, 다른 것은 T 세포 도움이 필요하다. 항원에 결합함으로써, 메모리 B 세포는 수용체-매개된 세포내이입을 통해 항원을 흡수하여, 분해하고 세포막 상의 MHC-II 분자와 복합체로 펩타이드 조각으로서 T 세포에 제시한다. 동일한 항원으로 활성화된 T 세포로부터 유래된 메모리 T 헬퍼 (TH) 세포, 전형적으로 메모리 여포성 T 헬퍼 (TFH) 세포는 그것의 TCR을 통해 이들 MHC-II-펩타이드 복합체를 인식하고 결합한다. TCR-MHC-II-펩타이드 결합 및 메모리 TFH 세포로부터의 다른 신호의 증계에 이어, 메모리 B 세포가 활성화되고 모낭의 반응을 통해 혈장모세포 및 혈장 세포로 분화되거나 이들이 혈장 세포 및 더 많은 메모리 B 세포를 발생하는 종자 중심 반응으로 들어간다.
- [0131] 조절 B 세포 (Breg)는 면역-조절 및 면역 반응의 억제에 참여하는 작은 B 세포의 집단을 나타낸다. 이들 세포는 상이한 기전에 의해 면역계를 조정한다. 주요 기전은 항-염증성 사이토카인 인터류킨 10 (IL-10)의 생산이다. Breg의 조절 효과는 염증, 자가면역 질환, 이식 반응의 다양한 모델 및 항종양 면역력에서 설명되었다.
- [0132] T 세포는 다양한 역할을 하며 서브셋에 의해 분류된다. T 세포는 어떤 단백질이 세포의 표면에 존재하는지를

기준으로, 두 가지 넓은 카테고리: CD8⁺ T 세포 또는 CD4⁺ T 세포로 분할된다. T 세포는 감염된 세포를 사멸시키는 것 및 다른 면역 세포를 활성화 또는 동원하는 것을 포함하여 다수의 기능을 수행한다.

[0133] CD8⁺ T 세포는 세포독성 T 세포 또는 세포독성 림프구 (CTL)로도 불린다. 이들은 바이러스-감염된 세포와 암 세포를 인식하고 제거하는 데 결정적이다. CTL은 세포자멸사 (프로그래밍된 세포사)를 유발하는 세포독소를 함유하는 특화된 구획 또는 과립을 갖는다. 그것의 효력 때문에, 과립의 방출은 면역계에 의해 엄격하게 조절된다.

[0134] 4가지 주요한 CD4⁺ T-세포 서브셋은 Th1, Th2, Th9, Th17, Tfh (T 역포성 헬퍼) 및 Treg로, "Th"는 "T 헬퍼 세포"를 지칭한다. Th1 세포는 세포내 미생물, 특히 박테리아에 대한 면역 반응을 조정하는 데 중요하다. 이들은 박테리아-섭취 대식세포와 같은 다른 면역 세포를 경고하고 활성화시키는 분자를 생성하고 분비한다. Th2 세포는 B 세포, 과립구 및 비만 세포를 경고함에 의해, 연충 (기생충 벌레)과 같은 세포외 병원체에 대한 면역 반응을 조정하는 데 중요하다. Th17 세포는 면역 및 비-면역 세포를 활성화시키는 신호전달 분자인, 인터류킨 17 (IL-17)을 생산하는 그것의 능력으로 명명되었다. Th17 세포는 중성구를 동원하는 데 중요하다.

[0135] 조절 T 세포 (Treg)는 다른 T 세포의 활성을 모니터링하고 억제한다. 이들은 불리한 면역 활성화를 방지하고, 신체 자체의 세포와 항원에 대한 면역 반응의 내성 또는 예방을 유지한다. 1형 조절 T (Tr1) 세포는 내성을 촉진 및 유지하는 데 중추적 역할을 하는 조절 T 세포의 유도성 서브셋이다. Tr1 세포가 면역 반응을 제어하는 주요 기전은 높은 수준의 IL-10의 분비 및 그란자임 B의 방출을 통한 골수 세포의 사멸이다. 또한, Th3 (TGF-베타 분비), iTreg (Treg 세포로 전환된 비-흉선 Tconv) 및 iTR35 (Treg 세포로 전환된 Tconv IL-35)가 있다.

[0136] 메모리 T 세포는 초기 T 세포 반응 후 장기간 지속하는 항원-특이적 T 세포의 서브셋이다. 이들은 그것의 동족 항원에 대한 재-노출에 의해 다수의 이펙터 T 세포로 빠르게 확장하고, 따라서 면역계에 과거 항원에 대한 "메모리"를 제공한다. 본 명세서에 기재된 암 백신은 면역계에 종양 특이적 항원에 대한 "메모리"를 제공하고, 그것에 의해 새롭게 출현한 암 세포 또는 전이된 암 세포에 대한 강력한 면역 반응을 유도한다.

[0137] 림프구 또는 림프양 세포는 척추동물의 적응성 면역계에서 백혈구이다. 림프구는 (세포-매개된, 세포독성 타고난 면역력에서 기능하는) 천연 살해 세포 (NK 세포), (세포-매개된, 세포독성 적응성 면역력에 대한) T 세포, 및 (체액성, 항체-유도된 적응성 면역력에 대한) B 세포를 포함한다.

[0138] 방법

[0139] 본 개시내용의 조작된 MSC (또는 다른 조작된 면역 세포)를 배양하는 것을 포함하는 방법이 또한 본 명세서에 제공된다. MSC를 배양하는 방법이 공지되어 있다. 일부 구현예에서, MSC는 성장 배지 (예를 들어, MSCGM 인간 간엽 줄기 세포 성장 BULLETKIT™ 배지 (혈청 함유), THERAPEAK™ MSCGM-CD™ 간엽 줄기 세포 화학적 한정 배지 (무혈청), 또는 RoosterBio xeno-free MSC 배지)에서의 배양물이다.

[0140] MSC에 의해 생산된 적어도 하나의 이펙터 분자를 생체내에서 생성하도록 본 명세서에서 제공된 바와 같은 조작된 MSC를 대상체 (예를 들어, 인간 대상체)에게 전달 또는 투여하는 것을 포함하는 방법이 본 명세서에 추가로 제공된다. 일부 구현예에서, 본 MSC는 정맥내, 복강내, 기관내, 피하, 종양내, 경구, 항문, 비강내 (예를 들어, 전달 입자에 포장됨), 또는 동맥 (예를 들어, 내부 경동맥) 경로를 통하여 투여된다. 따라서, 본 MSC는 전신으로 또는 국소적으로 (예를 들어, TME에) 투여될 수 있다.

[0141] 일부 방법은 종양 (또는 암)이 있는 대상체 (또는 환자 모집단)을 선택하고, 상기 대상체를 종양-매개된 면역억제성 기전을 조절하는 조작된 MSC로 치료하는 것을 포함한다.

[0142] 본 개시내용의 조작된 MSC는 일부 경우에 난소암과 같은 암을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 다른 암이 본 명세서에 기술되어 있다. 예를 들어, 조작된 MSC는 방광 종양, 뇌 종양, 유방 종양, 자궁 경부 종양, 결장직장 종양, 식도 종양, 신경아교종, 신장 종양, 간 종양, 폐 종양, 흑색종, 난소 종양, 췌장 종양, 전립선 종양, 피부 종양, 갑상선 종양, 및/또는 자궁 종양을 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0143] 본 명세서에 제공된 방법은 또한 조작된 세포, 예컨대 조작된 MSC의 제제를 전달하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 제제는 예를 들어 MSC 이외의 세포의 5% 미만 (예를 들어, 4%, 3%, 2% 또는 1% 미만)을 함유하는 실질적으로 순수한 제제이다. 제제는 1×10^5 세포/kg 내지 1×10^7 세포/kg, 예컨대 MSC를 포함할 수 있다.

[0144] 추가의 구현예

[0145] 1. 그 중 적어도 2종이 상이한 종양-매개된 면역억제성 기전을 조절하는, 다중 이펙터 분자를 생성하도록 조작된 간엽 줄기 세포; 또는 대상체에서 종양의 부피를 줄이는데 유효한 양으로 선택적으로 제형화된, 종양-매개된

면역억제성 기전을 조절하는 다중 이펙터 분자를 생성하도록 조작된 간엽 줄기 세포를 포함하는 조성물.

- [0146] 2. 단락 1의 간엽 줄기 세포 또는 조성물에 있어서, 상기 이펙터 분자 중 적어도 하나는 종양 미세환경에서 면역자극성 기전을 자극하고 및/또는 종양 미세환경에서 면역억제성 기전을 억제한다.
- [0147] 3. 단락 1의 간엽 줄기 세포 또는 조성물에 있어서, 상기 이펙터 분자 중 적어도 하나는 (a) T 세포 신호전달, 활성화 및/또는 동원을 자극하고, (b) 항원 전달 및/또는 처리를 자극하고, (c) 천연 살해 세포-매개된 세포독성 신호전달, 활성화 및/또는 동원을 자극하고, (d) 수지상 세포 분화 및/또는 성숙을 자극하고, (e) 면역 세포 동원을 자극하고, (f) 전-염증 대식세포 신호전달, 활성화 및/또는 동원을 자극하거나 또는 항-염증성 대식세포 신호전달, 활성화 및/또는 동원을 억제하고, (g) 기질 열화를 자극하고, (h) 면역자극성 대사물 생산을 자극하고, (i) 유형 I 인터페론 신호전달을 자극하고, (j) 음성 공동자극 신호전달을 억제하고, (k) 항종양 면역 세포의 세포자멸유도 신호전달을 억제하고, (l) T 조절 (T_{reg}) 세포 신호전달, 활성화 및/또는 동원을 억제하고, (m) 종양 체크포인트 분자를 억제하고, (n) 인터페론 유전자 자극인자 (STING) 신호전달을 자극하고, (o) 골수성-유래된 억제제 세포 신호전달, 활성화 및/또는 동원을 억제하고, (p) 면역억제성 인자/대사물을 저하시키고, (q) 혈관 내피 성장 인자 신호전달을 억제하고, 및/또는 (r) 직접적으로 종양 세포를 사멸시킨다.
- [0148] 4. 이펙터 분자를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 조작된 핵산을 포함하는, 단락 1-3 중 어느 하나의 간엽 줄기 세포 또는 조성물.
- [0149] 5. (a) 적어도 2개의 이펙터 분자를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 조작된 핵산; 또는 (b) 그 각각이, 적어도 하나의 이펙터 분자를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는, 적어도 2개의 조작된 핵산을 포함하는, 단락 1-4 중 어느 하나의 간엽 줄기 세포 또는 조성물.
- [0150] 6. 단락 1-5 중 어느 하나의 간엽 줄기 세포 또는 조성물에 있어서, 상기 종양은 방광 종양, 뇌종양, 유방 종양, 자궁경부 종양, 결장직장 종양, 식도 종양, 신경아교종, 신장 종양, 간 종양, 폐 종양, 흑색종, 난소 종양, 췌장 종양, 전립선 종양, 피부 종양, 갑상선 종양, 및 자궁 종양으로부터 선택된다.
- [0151] 7. 단락 1-6 중 어느 하나의 간엽 줄기 세포 또는 조성물에 있어서, 상기 간엽 줄기 세포 또는 조성물에 의해 생산된 이펙터 분자 중 적어도 하나는 사이토카인, 수용체/리간드, 항체, 뉴클레오타이드, 펩타이드, 및 효소로부터 선택된다.
- [0152] 8. 단락 7의 간엽 줄기 세포 또는 조성물에 있어서, 상기 사이토카인은 케모카인, 인터페론, 인터류킨, 림포카인, 및 종양 괴사 인자로부터 선택된다.
- [0153] 9. 단락 8의 간엽 줄기 세포 또는 조성물에 있어서, 상기 케모카인은 MIP1a (CCL3), MIP1b (CCL5), CCL21, CXCL9, CXCL10 및 CXCL11로부터 선택된다.
- [0154] 10. 단락 8 또는 9의 간엽 줄기 세포 또는 조성물에 있어서, 상기 인터페론은 IFN- β 및 IFN- γ 로부터 선택된다.
- [0155] 11. 단락 8-10 중 어느 하나의 간엽 줄기 세포 또는 조성물에 있어서, 상기 인터류킨은 IL-12, IFN- β , IFN- λ , IL-2, IL-15, IL-7, IL-36 λ , IL-18, 및 IL-1 β 로부터 선택된다.
- [0156] 12. 단락 7-11 중 어느 하나의 간엽 줄기 세포 또는 조성물에 있어서, 상기 수용체/리간드는 OX40-리간드 및 CD40L로부터 선택된다.
- [0157] 13. 단락 7-12 중 어느 하나의 간엽 줄기 세포 또는 조성물에 있어서, 상기 항체는 체크포인트 억제제 및 항-IL-35 항체로부터 선택된다.
- [0158] 14. 단락 13의 간엽 줄기 세포 또는 조성물에 있어서, 상기 체크포인트 억제제는 항-PD-1 항체, 항-PD-L1 항체, 및 항-CTLA-4 항체로부터 선택된다.
- [0159] 15. 단락 7-14 중 어느 하나의 간엽 줄기 세포 또는 조성물에 있어서, 상기 뉴클레오타이드는 CpG 올리고뉴클레오타이드로부터 선택된다.
- [0160] 16. 단락 7-15 중 어느 하나의 간엽 줄기 세포 또는 조성물에 있어서, 상기 펩타이드는 항종양 펩타이드이다.
- [0161] 17. 단락 7-16 중 어느 하나의 간엽 줄기 세포 또는 조성물에 있어서, 상기 효소는 기질을 분해하는 효소, 면역억제성 대사물을 분해하는 효소 및 면역자극성 대사물 생산을 자극하는 효소로부터 선택된다.

- [0162] 18. 단락 1-17 중 어느 하나의 간엽 줄기 세포 또는 조성물에 있어서, 상기 이펙터 분자 중 적어도 하나는 IFN- β 이고, 이펙터 분자 중 적어도 하나는 사이토카인, 항체, 케모카인, 뉴클레오타이드, 효소, 및 종양용해 바이러스로부터 선택된다.
- [0163] 19. 단락 1-18 중 어느 하나의 간엽 줄기 세포 또는 조성물에 있어서, 상기 이펙터 분자 중 적어도 하나는 종양 미세환경에서 염증성 경로를 자극하고, 및/또는 이펙터 분자 중 적어도 하나는 종양 미세환경에서 염증의 음성 조절인자를 억제한다.
- [0164] 20. 단락 19의 간엽 줄기 세포 또는 조성물에 있어서, 상기 염증성 경로는 TNF 수용체 상과 경로, 일반 감마-사슬 계열 경로, 또는 톨-유사 수용체 경로이다.
- [0165] 21. 단락 19 또는 20의 간엽 줄기 세포 또는 조성물에 있어서, 상기 염증의 음성 조절인자는 Stat3, 브루톤 티로신 키나제, c-kit, 또는 SOCS-1이다.
- [0166] 22. 단락 1-21 중 어느 하나의 간엽 줄기 세포 또는 조성물에 있어서, 상기 간엽 줄기 세포 또는 조성물은 귀소 분자를 생산하도록 조작된다.
- [0167] 23. 단락 22의 간엽 줄기 세포 또는 조성물에 있어서, 상기 귀소 분자: CCR9, CXCR3, CXCR4, CCR2, CCR4, FPR2, VEGFR, IL6R, CXCR1, CSCR7, 및 PDGFR로부터 선택된다.
- [0168] 24. 단락 4-23 중 어느 하나의 간엽 줄기 세포 또는 조성물에 있어서, 상기 프로모터는 유도성 프로모터이다.
- [0169] 25. 단락 4-23 중 어느 하나의 간엽 줄기 세포 또는 조성물에 있어서, 상기 프로모터는 CMV 프로모터, EF1a 프로모터, EFS 프로모터, MND 프로모터, PGK 프로모터, SFFV 프로모터, SV40 프로모터, 또는 UbC 프로모터이다.
- [0170] 26. 단락 2-22 중 어느 하나의 간엽 줄기 세포 또는 조성물에 있어서, 상기 프로모터는 선택적으로 전사 인자 결합 도메인을 포함하는 합성 프로모터이다.
- [0171] 27. 단락 2-26 중 어느 하나의 간엽 줄기 세포 또는 조성물에 있어서, 상기 프로모터는 국소 종양 상태에 의해 조절된다.
- [0172] 28. 단락 27의 간엽 줄기 세포 또는 조성물에 있어서, 상기 국소 종양 상태는 저산소증이다.
- [0173] 29. 단락 27의 간엽 줄기 세포 또는 조성물에 있어서, 상기 국소 종양 상태는 염증이다.
- [0174] 30. 단락 25의 간엽 줄기 세포 또는 조성물에 있어서, 상기 유도성 프로모터는 플로레틴-조정가능한 조절 요소 (PEACE) 또는 아연-핑거 DNA-결합 도메인 (DBD)을 포함한다.
- [0175] 31. 단락 1-30 중 어느 하나의 간엽 줄기 세포 또는 조성물에 있어서, 상기 간엽 줄기 세포 또는 조성물은 골수, 지방 조직, 탯줄, 또는 만능 줄기 세포로부터의 것이다.
- [0176] 32. 단락 1-31 중 어느 하나의 간엽 줄기 세포 또는 조성물에 있어서, 상기 간엽 줄기 세포 또는 조성물은 IL-12 및 CCL21을 생산하도록 조작된다.
- [0177] 33. 단락 32의 간엽 줄기 세포 또는 조성물에 있어서, 상기 간엽 줄기 세포 또는 조성물은 IFN- β 및/또는 IFN- γ 를 생산하도록 조작된다.
- [0178] 34. 단락 32 또는 33의 간엽 줄기 세포 또는 조성물에 있어서, 상기 간엽 줄기 세포 또는 조성물은 항-CD40 항체 및/또는 항-CTLA4 항체를 생산하도록 조작된다.
- [0179] 35. 이펙터 분자를 생산하도록 단락 1-34 중 어느 하나의 간엽 줄기 세포를 배양하는 것을 포함하는 방법.
- [0180] 36. 간엽 줄기 세포에 의해 생산된 적어도 하나의 이펙터 분자를 생체내에서 생산하도록 단락 1-34 중 어느 하나의 간엽 줄기 세포 또는 조성물을 대상체에게 전달하는 것을 포함하는 방법.
- [0181] 37. 단락 36의 방법에 있어서, 상기 적어도 하나의 이펙터 분자는 대상체의 종양 미세환경에서 생산된다.
- [0182] 38. 단락 1-34 중 어느 하나의 간엽 줄기 세포 또는 조성물을 암이 진단된 대상체에게 전달하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법.
- [0183] 39. 단락 38의 방법에 있어서, 상기 암은 난소암이다.
- [0184] 40. 단락 38의 방법에 있어서, 상기 암은 유방암이다.

- [0185] 41. 단락 38의 방법에 있어서, 상기 암은 결장암이다.
- [0186] 42. 대상체에게 항-CD40 항체 및/또는 항-CTLA4 항체를 투여하는 것을 더 포함하는 단락 36-41 중 어느 하나의 방법.
- [0187] 43. IL-12 및 CCL21을 생산하도록 조작된 간엽 줄기 세포의 제제의 치료적 유효량을 유방 종양이 있는 대상체에게 전달하는 것을 포함하는, 대상체에서 유방암을 치료하는 방법.
- [0188] 44. 단락 43의 방법에 있어서, 상기 제제는 항-CD40 항체 및/또는 항-CTLA4 항체를 더 포함한다.
- [0189] 45. 대상체에게 항-CD40 항체 및/또는 항-CTLA4 항체를 투여하는 것을 더 포함하는 단락 43의 방법.
- [0190] 46. 단락 43-45 중 어느 하나의 방법에 있어서, 상기 제제는 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함한다.
- [0191] 47. 단락 43-46 중 어느 하나의 방법에 있어서, 상기 치료적으로 유효량은 적어도 20%까지 유방 종양의 부피를 감소시킨다.
- [0192] 48. 단락 47의 방법에 있어서, 상기 유방 종양의 부피는 대상체에게 제제의 전달 14일 이내에 적어도 20%까지 감소된다.
- [0193] 49. 단락 48의 방법에 있어서, 상기 유방 종양의 부피는 대상체에게 제제의 전달 7일 이내에 적어도 20%까지 감소된다.
- [0194] 50. 단락 43-46 중 어느 하나의 방법에 있어서, 상기 치료적 유효량은 적어도 50%까지 유방 종양의 부피를 감소시킨다.
- [0195] 51. 단락 47의 방법에 있어서, 상기 유방 종양의 부피는 대상체에게 제제의 전달 14일 이내에 적어도 50%까지 감소된다.
- [0196] 52. 단락 48의 방법에 있어서, 상기 유방 종양의 부피는 대상체에게 제제의 전달 7일 이내에 적어도 50%까지 감소된다.
- [0197] 53. IL-12 및 CCL21을 생산하도록 조작된 간엽 줄기 세포의 제제의 치료적 유효량을 결장 종양이 있는 대상체에게 전달하는 것을 포함하는, 대상체에서 결장암을 치료하는 방법.
- [0198] 54. 단락 53의 방법에 있어서, 상기 제제는 항-CD40 항체 및/또는 항-CTLA4 항체를 더 포함한다.
- [0199] 55. 대상체에게 항-CD40 항체 및/또는 항-CTLA4 항체를 투여하는 것을 더 포함하는 단락 53의 방법.
- [0200] 56. 단락 53-55 중 어느 하나의 방법에 있어서, 상기 제제는 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함한다.
- [0201] 57. 단락 53-56 중 어느 하나의 방법에 있어서, 상기 치료적 유효량은 적어도 20%까지 결장 종양의 부피를 감소시킨다.
- [0202] 58. 단락 57의 방법에 있어서, 상기 결장 종양의 부피는 대상체에게 제제의 전달 14일 이내에 적어도 20%까지 감소된다.
- [0203] 59. 단락 58의 방법에 있어서, 상기 결장 종양의 부피는 대상체에게 제제의 전달 7일 이내에 적어도 20%까지 감소된다.
- [0204] 60. 단락 53-56 중 어느 하나의 방법에 있어서, 상기 치료적 유효량은 적어도 50%까지 결장 종양의 부피를 감소시킨다.
- [0205] 61. 단락 57의 방법에 있어서, 상기 결장 종양의 부피는 대상체에게 제제의 전달 14일 이내에 적어도 50%까지 감소된다.
- [0206] 62. 단락 58의 방법에 있어서, 상기 결장 종양의 부피는 대상체에게 제제의 전달 7일 이내에 적어도 50%까지 감소된다.
- [0207] 실시예
- [0208] 실시예 1

- [0209] 본 실시예는 인간 면역요법 (hIT) 적재물 (hMSC-hIT)을 발현하기 위한 간엽 줄기 세포 (MSC) 및 마우스 면역요법 (mIT) 적재물 (mMSC-mIT)을 발현하기 위한 마우스 MSC (mMSC)를 조작하는 것을 기술한다. 인간 및 쥐 면역-조절 유전자를 인코딩하는 DNA (항-PD1 항체, 항-CTLA4 항체, CCL21, IL2, IL12, IL15, 및 구성적으로 활성화 STING (인터페론 유전자 자극인자; Woo SR, et al. (2015) *Trends Immunol* 36(4):250-256) 돌연변이체)를 합성하고, 발현 벡터 안으로 클로닝하고, 각각의 마우스 및 인간 MSC에 도입하고, 그리고 그 발현을 특성규명한다. 면역-조절 유전자를 인코딩하는 DNA는 그런 다음 IFN- β 와 조합하여 MSC에서 발현된다.
- [0210] **방법:** 상이한 작용 기전을 갖는 면역요법 적재물을 인코딩하는 유전자가 합성된다: 1) 체크포인트 억제제, 2) 케모카인, 3) 사이토카인, 및 4) STING (인터페론 유전자 자극인자) 경로 조절제 (Woo SR, et al. (2015) *Trends Immunol* 36(4):250-256). 체크포인트 억제제에 대해, 항-PD1 및 항-CTLA4 항체가 발현된다. 케모카인에 대해, 수지상 세포의 이동조절을 매개하는 것으로 알려진 CCL21, CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포 (Dubinett SM, et al. (2010) *Cancer J* 16(4):325-335)가 발현된다. 사이토카인에 대해, IL2, IL12, 및 IL15가 발현된다. STING 경로 조절제에 대해, 구성적으로 활성화인 세포내 STING 돌연변이체 (Tang ED & Wang CY (2015) *PLoS One* 10(3):e0120090)가 발현된다. 면역요법의 마우스 및 인간 버전 둘 모두 (각각 mIT 및 hIT)가 사용된다. 시험된 추가의 이펙터 분자는 하기를 포함한다: IL1베타, IFN-감마, IL17, 뿐만 아니라 IL7 (Cieri N, et al. (2013) *Blood* 121(4):573-584).
- [0211] 이들 유전자는 CMV 프로모터의 다운스트림 인코딩되어 고수준의 발현을 달성한다. 도 1에서 나타난 바와 같이, GFP는 CMV 프로모터로 전기천공된 플라스미드 (핵감염화 기술)를 사용하여 MSC에서 높은 수준으로 발현될 수 있다. 플라스미드는 MSC로 핵감염된다. 인간 골수-유래된 MSC (hMSC)는 상업적 공급원으로부터 구매된다. 마우스 MSC (mMSC)는 대퇴골 골수로부터 유래된다 (Kidd S, et al. (2009) *Stem Cells* 27(10):2614-2623).
- [0212] 분비된 치료적 적재물의 발현은 적재물을 인식하는 상업적으로 이용가능한 항체와 함께 ELISA 또는 비드-계 멀티플렉스 검정을 사용하여 확인된다. 대안적으로, 적재물은 Myc 태그와 융합되고, 항-Myc 항체는 라벨링에 사용된다. 구성적 STING 돌연변이체에 대해, IFN-베타 프로모터로부터 루시퍼라제를 발현하는 리포터 플라스미드를 사용하여 활성화를 확인한다 (Fitzgerald KA, et al. (2003) *Nat Immunol* 4 (5):491-496). 적재물의 기능적 시험이 또한 수행되고 실시예 2에서 보다 상세하게 설명된다.
- [0213] 다음으로, 이들 면역요법 적재물은 IFN-베타와 조합하여 발현된다. 목표 중 하나는 난소암 세포에 대해 IFN-베타와 함께 부가적 또는 상승적 활성을 갖는 이펙터를 확인하는 것이다. MSC로부터 병용 면역요법 적재물을 발현하기 위해 2가지 전략이 사용된다. (1) MSC는 2개의 플라스미드, 그 하나는 상기 목록의 적재물을 발현하고 다른 하나는 IFN-베타를 인코딩하는 플라스미드로 핵감염하고, 따라서 이들 유전자를 발현하는 세포의 혼합된 모집단을 초래한다. (2) 상기 목록의 적재물 및 IFN-베타 둘 모두를 공-발현하는 플라스미드는 단일 벡터 내에 구축된다. 이 접근법에는 3가지 구조가 사용된다: (i) 2A '리보솜 스킵핑' 태그에 의해 분리된, 적재물 및 IFN-베타를 발현하는 단일 프로모터 (도 2); (ii) 내부 리보솜 유입 부위 (IRES)에 의해 분리된 적재물 및 IFN-베타를 발현하는 단일 프로모터; 및 (iii) 2개의 프로모터가 적재물 및 IFN-베타의 발현을 독립적으로 유도하기 위해 사용된다. 별도 프로모터가 적재물 및 IFN-베타 (예를 들어, SFFV, CMV, 및/또는 MND 프로모터)를 발현하는 데 사용된다. 이들 프로모터 및 종결 서열의 상이한 조합은 적재물 양자를 발현하는 배치형태를 식별하기 위해 평가된다.
- [0214] 이들 전략을 시험하고 면역요법 적재물 및 IFN-베타의 발현 수준을 평가한다. MSC의 생존도 또한 평가한다. CMV, SFFV 및 MND 프로모터는 MSC에서 이미 입증되었다.
- [0215] 플라스미드 형질감염 및 전기천공에 대한 대안으로서, 렌티바이러스 벡터가 적재물 발현 작제물을 MSC 안으로 형질도입하기 위해 사용될 수 있다. 렌티바이러스 벡터를 사용하여 MSC에서 GFP를 발현시킬 수 있다 (데이터는 도시되지 않음). 렌티바이러스로 조작된 MSC는 번역적으로 실행가능해야 하며 다가오는 임상 시험을 위해 프라이밍되어야 한다 (Deng P, et al. (2016) *Neural Regen Res* 11(5):702-705; Beegle JR, et al. (2016) *Mol Ther Methods Clin Dev* 3:16053). 일부 구현예에서, 발현 작제물은 트랜스포손을 사용하여 MSC 안으로 도입되거나, PhiC31을 사용하여 게놈 슈도 부위에 통합되거나, 또는 뉴클레아제, 예컨대 아연 핑거 (ZF), 클러스터링된 규칙적으로 공간 사이의 짧은 회문성 반복 (CRISPR), 또는 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN)를 사용하여 도입될 수 있다.
- [0216] 병용 면역요법 발현을 위해 추구될 수 있는 추가의 전략은 적재물당 하나의 플라스미드를 구축하고, 각각의 플라스미드를 MSC 모집단 안으로 독립적으로 핵감염시키고, 생성된 세포 모집단을 혼합하는 것이다. 대안적으로,

적재물은 렌티바이러스 및 MSC에 유전적으로 통합된 다수의 렌티바이러스 상으로 인코딩될 수 있다.

[0217] 실시예 2

[0218] 본 실시예에는 개별 및 병용 면역요법 적재물을 갖는 MSC의 *시험관내* 특성규명을 기술한다. 암 세포에 대한 면역요법-발현 MSC의 직접적인 항암 효과가 먼저 측정된다. 다음에, 일차 면역 세포 (T 세포에 초점조정) 및 암 세포 공동 배양에 대한 면역요법-발현 MSC의 효과를 측정한다. 면역요법-발현 MSC의 면역-자극 특성은 마우스와 인간 세포 시스템 둘 모두에서 염증성 바이오마커 패널을 기준으로 순위 정렬된다. 자체적으로 또는 T 세포와 함께 암 세포 사멸을 유의하게 향상시키는 면역요법-발현 MSC가 확인되고, *생체내* 시험으로 나아가기 위한 최상의 후보가 선택된다.

[0219] **방법:** 실시예 1의 면역요법-발현 MSC는 암 요법과 관련된 *시험관내* 모델을 사용하여 그것의 기능적 효과에 대해 평가된다. 인간 난소암 세포 (예를 들어, OVCAR8 및 SKOV3) 및 순환 PBMC로부터 분리된 인간 면역 세포를 사용하여 hIT를 발현하는 hMSC를 시험한다. 마우스 난소암 세포 (예를 들어, ID8) 및 마우스 면역 세포를 사용하여 mIT를 발현하는 mMSC를 시험한다.

[0220] **체크포인트 억제제.** 세포-결합 검정을 사용하여 발현된 항체의 활성을 확인한다. 항체인 CTLA4 및 PD1의 표적은 둘 모두 T 세포를 음성적으로 조절하지만, T-세포 활성화의 상이한 단계에서 상향조절된다 (Boutros C, et al. (2016) *Nat Rev Clin Oncol* 13(8):473-486; Valsecchi ME (2015) *New Engl J Med* 373(13):1270-1270). CTLA4는 프라이밍 단계에서 간단히 상향조절되고, 반면에 PD1은 T 세포 활성화의 이펙터 단계에서 일관되게 발현된다 (Pardoll DM (2012) *Nat Rev Cancer* 12(4):252-264; Legat A, et al. (2013) *Front Immunol* 4:455). 항-CTLA4 항체는 T-세포 표면상의 CTLA4에 결합하여, 초기 단계에서 CTLA4가 T-세포 활성화를 정지시키는 것을 차단하고, 인간 항-PD1 항체는 PD1에 결합하여, 종양 세포가 T-세포 활성을 억제하는 것을 방지한다.

[0221] T 세포는 EASYSEP™ 자기 비드 (STEMCELL Technologies)를 사용한 음성 선택에 의해 PBMC로부터 분리된다. 분리된 T 세포는 인간 T-활성제 CD3/28 Dynabeads (Thermo Fisher)에 의해 활성화되고 CTLA-4 및 PD-1의 발현은 5일에 걸쳐 모니터링되어 각각의 표면 마커에 대한 최적의 발현 타이밍을 선택한다. 적절한 날에, CTLA-4 또는 PD-1에 대한 항체를 발현하는 MSC로부터 조절된 배지 또는 비-발현 MSC로부터의 대조 조절된 배지가 활성화된 T 세포에 적용되어 이들 항체의 직접적인 세포-표면-수용체 결합을 확인한다. 유세포측정과 함께 형광색소-라벨링된 이차 검출 항체는 결합을 확인해야 한다.

[0222] **케모카인.** CCL21 케모카인 기능성은 CCL21 화학주성에 반응하는 케모카인 수용체 CCR7을 발현하는 분리된 고유 T 세포 및 세포 이동 검정을 사용하여 확인된다. 구체적으로, CCL21-발현 또는 대조군 MSC를 트랜스-웰의 하나의 구획에 첨가한 후, 다른 구획으로부터 분리된 고유 T 세포에 의해 세포 이동을 평가하고, 이어서 이동된 T 세포의 수를 열거한다 (Justus CR, et al. (2014) *J Vis Exp* (88)).

[0223] **사이토카인.** IL2, IL12, 및 IL15의 활성이 측정된다. IL2, IL12 및 IL15에 특이적인 ELISA 검정을 사용하여 MSC 상청액에서 이들 사이토카인의 수준을 검출한다. 기능적 생물활성 검정은 CTLL-2 세포주를 사용하여 IL2 또는 IL15-매개된 증식을 평가하거나, NKG 세포주를 사용하여 MSC 상청액에 의한 IL12-매개된 IFN-감마 생산을 평가한다. LUMINEX® 기술을 사용한 다중화된 사이토카인 프로파일링 검정을 사용하여 또한 사이토카인 발현 및 면역 세포에 대한 영향을 평가할 수도 있다.

[0224] **STING 경로.** STING 경로 활성화는 구성적 STING 돌연변이체 적재물로 측정된다. LUMINEX® 비드를 사용하여, STING 돌연변이체의 발현과 함께 유형 I 인터페론 (예를 들어, IFN-알파2 및 IFN-베타)의 분비가 MSC에서 프로파일링된다.

[0225] **난소암 세포에 대한 면역요법-발현 MSC의 직접적인 영향.** 난소암 세포 성장 및 생존력에 대한 MSC의 임의의 직접적인 영향을 *시험관내*에서 시험하였다. 예를 들어, mMSC 또는 hMSC 후보는 마우스 난소암 세포주 (ID8) 또는 인간 난소암 세포주 (OVCAR8 및 SKOV3)와 공동 배양되고, 암 세포 세포독성은 잘-특성규명된 락테이트 탈수소효소 (LDH) 검정에 의해 측정된다. 공동 배양 24시간 후, 상청액을 수집하고, 후속으로 플레이트 판독기상에서 비흡광도에 의해 정량화되는 효소적 반응을 통해 세포 사멸과 상관된 LDH 수준에 대해 측정한다. 추가로, 암 세포 수는 트립판 블루 배제에 의해 생세포 대 죽은 세포를 계수하고 아넥신-V 및 요오드화 프로피듐 염색을 사용한 유세포측정에 의해 생세포 대 세포사멸적/죽은 세포를 계수함에 의해 평가된다.

[0226] **T 세포 및 난소암 세포 공동-배양 시스템 상에서 면역요법-발현 MSC의 영향.** 시험은 면역요법-발현 MSC가 *시험관내*에서 난소암 세포에 대해 개선된 항암 활성을 갖도록 T 세포와 같은 면역 세포를 자극할 수 있는지 여부를 결정한다. 구체적으로, mMSC-mIT 후보는 마우스 비장세포 및 ID8 암 세포주와 공동 배양되거나, 또는 hMSC-hIT

후보는 인간 PBMC 및 OVCAR8 또는 SKOV3 세포주와 공동 배양된다. 공동 배양 검정은 MSC의 유무에 관계없이 난소암 세포와 함께 PBMC/비장세포를 사용하고, 항-CD3/28 비드 자극을 수반한다. 암 세포사를 평가하기 위해, 16 시간 사멸 검정은 LDH 세포독성 측정과 같은 기술을 사용하고, 염료 표지된-난소암 세포를 비-표지된 이펙터 PBMC/비장세포와 고정된 비율로 조합하고 유세포측정에 의한 사멸 (Jedema I, et al. (2004) *Blood* 103(7):2677-2682), 및 요오드화 프로피듐과 함께 아넥신-V를 사용한 유세포측정에 의한 세포자멸사 관독을 분석하여 수행된다. T 세포 활성화/증식은 구체적으로 3-5일에 CFSE 세포 분열 및 1-3일에 IFN-감마의 사이토카인 생산에 의한 검정이다.

[0227] CTLA-4 및 PD1을 발현하는 T 세포를 생성하는 대안적인 전략은 파이토헤마글루티닌 (PHA)으로 활성화시켜 세포 표면 수용체 PD1 및 CTLA4를 발현시키는 것이다. 3일째에, 활성화된 T 세포의 ~99%는 PD1을 발현해야 하고 반면에 이들 중 ~15%는 CTLA4를 발현해야 한다 (Pardoll DM (2012) *Nat Rev Cancer* 12(4):252-264; Legat A, et al. (2013) *Front Immunol* 4:455). 10일째에, CTLA4 발현은 하향조절되지만 PD1 발현은 유지될 때 활성화된 T 세포는 이펙터 상에 있어야 한다. 이들 항체의 직접적인 세포-표면-수용체 결합이 평가된다. 유도-후 3일 및 10일째에, 각각의 체크포인트 억제제 항체 발현 작제물을 갖는 MSC가 T 세포 배양물에 적용된다. 표지된 검출 항체를 유세포측정과 함께 사용하여 결합을 확인한다. 상업적 항체는 대조군으로 사용된다.

[0228] 실시예 3

[0229] 본 실시예는 동계의 난소암 모델에서 면역요법 적재물을 발현하는 MSC의 *생체내* 특성규명을 기술한다. 면역요법-발현 MSC의 항종양 효능은 난소암의 동계 마우스 모델 (마우스 면역계를 갖는 mMSC-mIT)을 사용하여 특성규명된다. 조작된 MSC의 종양 귀소 및 동계 난소 마우스 모델에서 개별 및 병용 면역요법의 발현이 측정된다. 조작된 MSC 처리를 한 난소 종양 부담 및 마우스 생존이 또한 측정된다. 본 실시예는 TME에 대한 조작된 MSC의 선택적 귀소 및 다른 신체 부위에 대비한 난소 종양에서 면역요법 인자의 국소화된 생산을 입증해야 한다. 본 실시예는 또한 면역요법-발현 조작된 MSC 처리를 한 종양 부담에서의 현저한 감소 및 마우스 생존의 연장을 입증해야 한다.

[0230] **방법:** 마우스 난소 상피성 표면 세포 (MOSE)의 자발적인 전환으로부터 유래된 마우스 ID8 세포주를 사용하여 동계의 난소 종양 모델을 만든다 (Roby KF, et al. (2000) *Carcinogenesis* 21(4):585-591). ID8 세포주는 레닐라루시페라제 (rLuc)를 발현하는 렌티바이러스로 감염되어 개통벌레 루시페라제 (ffLuc)를 발현하는 MSC에 직교하는 *생체내* 생물발광 이미지형성을 가능하게 한다. 성공적인 rLuc 발현이 마우스에서 동계의 난소암 모델을 확립하기 전에 *시험관내* ID8에서 확인된다. 동계의 모델 경우, 5×10^5 ID8 세포를 6 내지 8 주령의 C57BL/6 마우스의 복강내로 주입한다 (36, 54). MSC는 ffLuc-발현 플라스미드와 함께 실시예 1로부터의 플라스미드를 발현하는 적재물로 핵감염된다.

[0231] mMSC-mIT 후보는 5주 동안 일주일에 한 번 동물당 10^6 MSC의 용량으로 (종양 세포 주사 후) 25일째에 개시하는 동계의 마우스 모델에 도입된다 (Dembinski JL, et al. (2013) *Cytotherapy* 15(1):20-32). 난소 종양 부하 및 mMSC-mIT 후보는 각각 rLuc 및 ffLuc 생물발광 이미지형성뿐만 아니라 말단 시점에 따른 조직학적 분석을 통해 경시적으로 시각화된다. 체중 감량, 주름진 모피, 불완전한 신체 자세, 복부 팽만, 및 황달과 같은 고통의 징후가 전개될 때 마우스를 안락사시킨다. 마우스의 생존 곡선을 측정한다. 종양 세포의 원위 전이는 생물발광 이미지형성 (BLI) 및 안락사시의 검시에 의해 정량화된다. 면역계 프로파일링 및 활성은 치료에 대한 반응의 바이오마커로서 상이한 시점에서 측정된다.

[0232] MSC의 예상된 항종양 효과의 가변성을 평가하기 위해, 모델을 확립하는 데 사용된 ID8 세포의 용량이 변화되고 (예를 들어, 세포 수를 5×10^6 으로 증가시킴), 사용된 MSC의 용량이 변화되고, 그리고 종양 확립 후 MSC가 전달될 때 시간이 조절된다.

[0233] mMSC가 마우스 모델에서 난소 종양으로 향하는 것이 밝혀졌지만, 일부 적재물이 이 귀소 활성을 방해할 가능성이 있다. 이들 사례에서, 이들 적재물의 발현은 유도성이 되도록 조작될 수 있다. 이것은 예를 들어 플로레틴-유도성 시스템 (Gitzinger M, et al. (2009) *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(26):10638-10643)으로 달성될 수 있다. 대안적으로, 이량체화 시스템은 소분자를 사용하여 합성 아연-핑거 DNA-결합 도메인을 교차활성인자 도메인과 연결하는 데 사용될 수 있다 (Clackson T, et al. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(18):10437-10442). 대안적으로 또는 추가적으로, 낮은 O_2 와 같은 신호에 기초하여 종양 미세환경에서 유발되는 유도성 적재물 발현 작제물이 구축될 수 있다.

[0234] 렌티 바이러스 ffluc 작제물은 또한 MSC를 감염시키기 위해 사용될 수 있다.

[0235] **실시예 4**

[0236] 본 실시예는 인간 면역 세포를 갖는 마우스에서 인간 난소암의 이종이식 모델에서 면역요법 적제물을 발현하는 MSC의 효능의 *생체내* 특성규명을 기술한다. CD34⁺ 세포 이식편 (인간화된 면역계를 갖는 hMSC-hIT)을 통해 인간 면역 세포로 이식된 면역결핍 마우스에서 인간 난소암 모델에서 조작된 MSC의 활성이 시험된다. 조작된 MSC의 귀소 및 인간 면역 세포를 갖는 마우스에서 인간 이종이식 난소 종양에서의 개별 및 병용 면역요법의 발현이 측정된다. 조작된 MSC 처리에 의한 난소 종양 부담 및 마우스 생존이 또한 시험된다. 본 실시예는 조작된 MSC의 상승된 귀소 및 마우스의 다른 신체 부위에 대비해 인간 이종이식 난소 종양으로의 면역요법 인자의 국소화된 생산을 입증해야 한다. 본 실시예는 또한 면역계 조성물에서의 변화와 관련이 있는 면역요법-발현 조작된 MSC에 의한 종양 부담의 상당한 감소 및 마우스 생존의 연장의 또한 입증해야 한다.

[0237] **방법.** 조작된 MSC의 인간 임상시험으로의 번역을 가능하게하기 위해, hMSC-hIT 작제물이 인간 암의 인간화된 마우스 모델에서 시험된다. 마우스에서 면역요법-발현 hMSC의 효과는 CD34⁺ 조혈 줄기 세포 (HSC)로 이식된 면역결핍 마우스 (NSG)에서 인간 난소암 세포주의 이종 이식을 사용함에 의해 모델링된다.

[0238] 인간 난소암 세포의 경우, OVCAR8 및 SKOV3 세포주가 사용된다. 실시예 3에 기재된 바와 같은 유사한 분석법을 사용하여 경시적으로 종양 부하 및 마우스 생존을 조사하였다.

[0239] 두 가지 대안적인 접근법이 또한 사용될 수 있다. (1) 인간 T 세포를 마우스에 주입할 수 있다. (2) 인간 PBMC를 마우스에 주입할 수 있다.

[0240] 발현 벡터: pL+MCS

```
ACGCGTGTAGTCTTATGCAATACTCTTGTAGTCTTGCAACATGGTAACGATGAGTTAGCAACATGC
CTTACAAGGAGAGAAAAAGCACCGTGATGCCGATTGGTGGAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCT
TATTAGGAAGGCAACAGACGGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATTGCCGATTCAGAG
GATATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCGATACAATAAACGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGC
CTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCT
TCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTTAGTCA
GTGTGGAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACCTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGCT
CTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGTCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGA
GTACGCCAAAAATTTTGAAGTACGCGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGACGTCAGTATT
AAGCGGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAAAT
ATAAATTAAAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTTCGAGTTAATCCTGGCCTG
```

[0241]

TTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATC
AGAAGAACCTTAGATCATTTATATAATACAGTAGCAACCCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGAT
AAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAAGATAGAGGAAGAGCAACAAAAGTAAGACCAACCGCA
CAGCAAGCGGCCACTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGATATAGGCAAAATTTGGAGAAAGTGAAT
TATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCCAAAGAGAAGA
GTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGC
AGGAAGCACTATGGGCGCAGCCTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTTATTGTCTGGTA
TAGTGACGACGACGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTGTCAACTCACA
GTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAGATACCTAAAGGATCAACA
GCTCTGGGGATTGGGGTTGCTCTGGAATAACTCATTTGCAACCATGCTGTGCCTTTGGAATGCTAG
TTGGAGTATAAAATCTTGGAACAGATTGGAATCACACGACCTGGATGGATGGGACAGAGAAAT
TAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTTAATTGAAGAATCGAAAAACGCAAGAAAAGAAATG
AACAAAGAAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAAACATAACAAATTGG
CTGTGGTATATAAAATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAGAATAGTTTTTGTCT
GTACTTTCTATAGTGAATAGAGATTAGGCAGGGATATTCACCAATTACGTTTCAGACCCACCTCCCA
ACCCGAGGGGACCCGACAGGCGCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGTGGAGAGAGAGACAGAGAC
AGATCCAATTCGATTAGTGAACGGATCTCGACGGTATCGGTTAACTTTTAAAAAGAAAAGGGGGAT
TGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAA
TTACAAAAACAAATTACAAAAATCAAAATTTTATCTCGACATGGTGGCGACCGGTAGCGCTAGCG
GATCGATAAGCTTGATATCGCTGACGCCAATCTTGACTGGGATCCGCGTCAAGTGGAGCAA
GGCAGGTGGACAGTCTCGCAGGCAATGCGTGACTGACTGAGGCGCGGACTCTAGTTTAAACTGCGT
GACTGACTCTAGAAGATCCGGCAGTGGCGCCGCGTCGACAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGT
GAAAAGATTGACTGGTATTTTAACTATGTTGCTCCTTTACGCTATGIGGATACGCTGCTTTAATGC
CTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCAATTTCTCTCTTGATAAACTCGTTGGTGTG
TCTTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTGAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCATGTTGTTGCTGAC
GCAACCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCCTGTGAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCC
TCCCTATTGCCACGGCGAACTCATCGCCGCTGCCTTGCCCGTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGT
TGGGCACTGACAAATCCGTGGTGTGTGCGGGAAATCATCGCTCTTCTTGGCTGCTCGCTGTGT
TGCCACCTGGAATCTGCGCGGGAGCTCCTTCTGCTACGTCCTTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTT
CCTTCCCGCGGCTGCTGCCGGCTCTGCGGCTCTTCCGCGTCTTTCGCTTTCGCCCTCAGACGAGTC
GGATCTCCTTTTGGGCGCGCTCCCCGCTTGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTA
GATCTTAGGCCACTTTTAAAGAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATCTACTCCCAACGAAAAATA
AGATCTGCTTTTGTGTGACTGGGTTCTCTGTTAGAACAGATCTAGCCTGGGAGCTCTATGCG
TAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCCTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCC
CGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACATAGAGATCCCTCAGACCCCTTTAGTCAAGTGTGGAAAACTCTA
GCAGTAGTAGTTTACTGTCTATTATTAGTATTATAACTTGCAAGAATGAATATCAGAGA
GTGAGAGGAACCTGTTTATTGACAGTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAATTTCA
CAATAAAGCATTTTTTTTACTGCTTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCA
TGCTGGCTCTAGCTATCCCGCCCTTAACCTCGGCCAGTTCGCCCCATTCTCGCCCCATGGCTGAC
TAATTTTTTTTATTATGCGAGGCCGAGGCCGCTCGGCTCTGAGCTATTCGAGAAGTAGTGAG
GAGGCTTTTGGAGGCTAGACTTTTGACAGAGCGGCCCAATCTGTAATCATGTTGATAGCTGT
TTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTA
AAGCCTGGGGTGCTAATGAGTAGTGAATCAATTAATTTGCGTTGCGCTCAGTCCCGCTTCC
AGTCGGGAACCTGTCTGTCGACCTGCATTAATGAATCGGCCAACCGCGGGGAGAGGCGGTTTG
CGTATTGGGCGCTCTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGTTCGGTTCGGCTGCGGCGAG
CGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAG
AACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTT
CCATAGGCTCCGCCCTTGACGAGCATCACAATAATCGACGCTCAAGTCAAGGTTGGCGCAAAACC
CGACAGGACTATAAAGTACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGTCCCTCGTGGCTCTCTCTGTCCGA
CCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCTTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTC
ACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTGCTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCC
CGTTACGCCGACCGCTGCGGCTTATCCGGTAACATCTGCTTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGA
CTTATGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGATGTAGGCGGTGCTA
CAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTC
TGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCT
GGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGAAGCAGAGATTACCGCGCAAAAAAAGGATCTCAAGAGA
TCTTTGATCTTTTTCACGGGCTGACGCTCAGTGGACGCAAACTCAGTTTAAAGGATTTTGGT
CATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAAGTGAAGTTTAAATCAAT

CTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTC
AGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGG
GAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCAGCTCCAGAT
TTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGC
CTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGGCGGAAGCTAGAGTAAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGGC
CAACGTTGTGTGCAATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTGAGC
TCCGGTCCCAACGATCAAGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCC
TTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCA
CTGCATAATTCTCTTACTGTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCA
AGTCAATTCGAGAAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCGGCGTCAATACGGGATAATA
CCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGCTCATATTGGAACCGTTCTTCGGGGCGAAAACTCT
CAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAG
CATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAG
GGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATAATTATTGAAGCATT
TATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGG
GTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGCTCTAAGAAACCATTAATTATCATGACATTA
ACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAA
CTCTGACATATGACGCTCCGAGAGCGGTACAGCTGTCTGTAAAGCGGATGCCGGGAGCAGACA
AGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCTGGCTTAACATGCGGCATCAG
AGCAGATTGTACTGAGAGTGACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAA
TACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGC
CTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAACGC
CAGGGTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTG (SEQ ID NO: 8)

[0243]

[0244]

실시예 5. 4T1 삼중 음성 유방 암종

[0245]

하기 실험에서, MSC는 하기 이펙터 분자 중 하나를 발현하도록 조작되고, 그런 다음 단독으로 또는 조합하여 동소이식 유방암 마우스 모델: IFN β , IFN γ , IL12, IL15, IL36 γ , IL7, TRAIL, cGAS, CCL21a, OX40L, CD40L, 또는 HACV-PD1에 투여된다. 일부 예에서, 체크포인트 억제제 (항-CD40, 항-PD1, 또는 항-CTLA-4 항체)가 조작된 MSC로의 투여와 조합하여 주입되었다.

[0246]

MSC 귀소

[0247]

하기 실험은 쥐와 MSC가 유방암의 동소이식 마우스 모델에서 종양으로 향하는 것을 입증한다. 루시페라제-발현 4T1 유방 종양 세포 (5×10^5)를 동소이식으로 암컷 BALB/cJ 마우스 마우스의 등부위 지방 패드 안으로 이식하였다. 5일 후, 마우스에 1백만개의 (XenoLight DiR (Caliper Life Sciences)로) 형광-표지된 쥐와 BM-유래된 MSC (BM-MSC, 치료적 세포)를 복강내 주입하였다. MSC 주입 후 1일 및 7일째에, 형광 분석을 사용하여 Ami HT 살아있는 동물 이미저 (Spectral Instruments)를 사용하여 MSC 편재화를 결정하였다. 7일째에, 종양 편재화 및 크기는 Ami HT 이미 저를 사용하여 4T1 세포의 루시페라제 생물발광 리포터를 통해 결정되었다. 도 3에 도시된 바와 같이, 주입된 MSC는 종양의 부위로 공동-국소화하여, 이들 세포가 실제로 4T1 유방 종양의 부위로 생체내에서 구체적으로 향한다는 것을 나타낸다. 주입된 MSC는 1일 이내에 종양으로 향하여 7일 이상 지속된다. 그에 반해서, 주입된 MSC는 정상적인 마우스에서 종양이 없는 배면으로 향하지 않는다. 이들 결과는 MSC가 항암 분자, 단백질 또는 화합물에 대한 전달 비히클로서 사용될 수 있음을 시사한다.

[0248]

조작된 인간 MSC가 마우스 종양을 향할 수 있는지를 결정하기 위해, GFP, IL2 또는 CCL21a 중 어느 하나를 발현하는 조작된 인간 MSC의 상이한 라인을 4T1 종양을 갖는 BALB/c 마우스에 주입하였다. 효능은 격일마다 캘리퍼스 측정으로부터 종양 부피에 의해 결정되었다. 도 11a-11b는 인간 MSC가 마우스 4T1 종양으로 향하지 않는다는 것을 나타낸다.

[0249]

생체내 효능

[0250]

하기 실험은 유방암의 동소이식 모델에서 면역요법 이펙터 (적제물)를 발현하는 MSC의 생체내 효능을 입증한다. 4T1-Neo-Fluc 마우스 유방 종양 세포 (Imanis Life Sciences, 5×10^5 세포)를 암컷 BALB/cJ 마우스 (The Jackson Laboratory)의 등쪽 지방 패드 안으로 동소이식으로 이식하였다. 마우스는 그런 다음 종양 이식 5일 후에 처리 그룹으로 무작위화하였다. 마우스는 2주 동안 일주일에 한 번 상이한 면역요법 이펙터 (적제물)를 발현하는 대조 MSC 성장 배지 또는 조작된 MSC (2×10^6 세포) 중 어느 하나의 복강내 주사를 받았다. 각각의 면역요법은 상이한 MSC에 의해 발현되었고, 조합 치료를 위해 MSC가 조합되었다 (1:1 비). 격일마다 캘리퍼스 측정에 의해 종양 성장을 모니터링하고, 마우스 무게를 매주 2회 기록하였다. 최초 MSC 처리 14일 후에 마우스를 안락사시키고, 추가 분석을 위해 조직을 수집하였다

[0251]

도 4는 종양 성장이 배지로 처리된 대조군에 비교하여 조작된 MSC 발현된 조합 유전자 IL-12 및 CCL21a로 처리

된 마우스에서 지연되었음을 나타낸다.

[0252] **도 5a-5c**는 단일 면역요법 이펙터 (예를 들어, IFN- β , IFN- γ , IL-12 또는 CCL21a)를 발현하는 조작된 MSC가 배지-처리된 마우스에 비교하여 동계의 4T1 마우스 종양의 성장을 억제하였음을 나타낸다. 놀랍게도, 면역요법 이펙터가 조합될 때, 특히 IL-12 및 CCL21a의 조합, 및 IFN- β , IFN- γ , IL-12 및 CCL21a의 조합일 때 종양 성장에 대한 상승작용 효과가 관찰되었다 (**도 5a-5c**).

[0253] **도 6a-6b**는 OX40L, TRAIL, IL15, cGAS 또는 이들의 조합을 발현하는 조작된 MSC가 종양 성장을 억제하지 않음을 나타낸다.

[0254] **도 7a-7b**는 IL-12 및 CCL21a를 발현하는 조작된 MSC가 종양 성장을 억제하지만; 그러나 항-CD40 항체의 첨가는 종양 성장을 감소시키지 않는다는 것을 나타낸다.

[0255] **도 8a-8b**는 OX40L, TRAIL, IL15, HACvPD-1 또는 이들의 조합을 발현하는 조작된 MSC가 종양 성장을 유의하게 억제하지 않음을 나타낸다.

[0256] **도 9a-9b**는 IL-12 및 CCL21a를 발현하는 조작된 MSC가 종양 성장을 억제하지만; 그러나 CCL21a, IL-36 감마 및 IL-7을 발현하는 MSC의 조합은 종양 성장을 감소시키지 않는다는 것을 나타낸다. 그러나, 시험된 이펙터 조합 중 일부는 독성을 유발할 수 있다.

[0257] **용량 단계적 확대 및 독성**

[0258] 독성은 GFP 그룹에서의 상기 실험의 일부에서 관찰되었으므로, 독성의 숨은 원인을 결정하기 위해 용량 단계적 확대 연구가 수행되었다. 이 실험은 조작된 MSC 세포 발현 GFP가 독성을 유발하지는 않지만 (**도 10a-10b**), 오히려 MSC 현탁액 배지가 독성의 주요 원인일 수 있음을 확인하였다.

[0259] **큰 종양에 대한 효과**

[0260] 이 실험은 IL12 및 CCL21a를 발현하는 조작된 마우스 MSC가 더 큰 종양 (> 800mm³)으로부터 종양 부담을 감소시킬 수 있는지를 시험하였다. 더 큰 종양은 작은 종양보다 치료하기가 더 어렵고, 이 실험은 이 이펙터 조합이 종양 팽창을 감소시킬 수 있음을 입증한다 (**도 12a-12b**).

[0261] **체크포인트 억제제**

[0262] **도 13a**는 IL-12 및 CCL21을 발현하는 조작된 MSC가 종양 성장을 억제하기에 충분하고, 주사에 의한 체크포인트 억제제 (항-PD-1 항체 또는 항-CTLA-4 항체)의 첨가가 효능을 증가시키지 않았다는 것을 나타낸다.

[0263] **실시예 6. CT26 결장직장 암종**

[0264] 하기 실험에서, MSC는 하기 이펙터 분자 중 하나를 발현하도록 조작되었고, 그런 다음 단독으로 또는 조합하여 결장직장 암종 마우스 모델에 투여되었다: IFN β , IL12, IL15, IL36 γ , IL7, CCL21a, HACv-PD1, 또는 41BB. 일부 예에서, 체크포인트 억제제 (항-CD40 또는 항-CTLA-4 항체)를 조작된 MSC와의 투여로 조합하여 주입하였다.

[0265] **도 14**는 IL-12 및 CCL21a를 발현하는 조작된 MSC가 상당한 종양 성장 지연을 유도함을 나타낸다.

[0266] **도 15**는 조작된 MSC 세포를 투여하기 위한 최적의 시간을 결정하기 위해 CT26 마우스 모델에서의 종양 성장 동역학을 나타낸다.

[0267] **생체내 효능**

[0268] 하기 실험은 결장 (결장직장) 암의 피하 마우스 모델에서 면역요법 이펙터 (적재물)를 발현하는 MSC의 **생체내** 효능을 입증한다. CT26-Neo-Fluc 마우스 결장암 세포 (Imanis Life Sciences, 5×10^5)를 암컷 BALB/cJ 마우스 (The Jackson Laboratory)의 옆구리 안으로 피하로 주사하였다. 종양 이식 7일 후, 마우스를 하기 처리 그룹으로 무작위화하였다: 대조군 MSC 성장 배지, 조작된 MSC (MSC-12+CCL21a), 항-CD40 항체, 항-CTLA4 항체 (Bio X 세포), 항-CD40 항체와 조합한 MSC-12+CCL21a 또는 항-CTLA4 항체와 조합한 MSC-12+CCL21a. 조작된 MSC (2×10^6 세포)를 2주 동안 1주 1회 (0일 및 7일째) 복강내로 (ip) 주입하였다. 항-CD40 항체는 0일 및 3일째에 ip (100 μ g)로 주입되었다. 항-CTLA4 항체는 0일, 3일 및 7일째에 ip (100 μ g)로 주입되었다. 종양 성장은 격일마다 캘리퍼스 측정으로 모니터링하고 마우스 중량은 매주 2회 기록하였다. 최초 MSC 처리 후 11일에 마우스를 안락사시키고, 종양을 수집하고 칭량하였다. 각각의 처리 그룹에서 개별 마우스의 종양 중량을 측정하고 그 결과를 **도 16b**의 최하부 좌측 (좌측 그래프)에 나타내었다. 각각의 처리 그룹의 평균 종양 부피는 경시적으로 모니터링

되었다 (도 16b, 우측 그래프). 처리 그룹 2 (IL-12+CCL21a+항-CTLA4 항체), 4 (IL-12+CCL21a) 및 7 (IL-12+CCL21a+항-CD40 항체)은 GFP-처리된 마우스에 비해 CT26 결장 종양의 평균 성장을 억제했다 (도 16b, 우측 그래프). 각각의 처리 그룹에서 개별 마우스의 종양 부피가 경시적으로 측정될 때 유사한 결과가 관찰되었다 (도 16a). 따라서, 면역요법을 발현하는 MSC로의 조합 치료는 생체내 결장암 세포의 성장을 억제하였다.

[0269] 도 18a는 IL-12, CCL21a 및 IL15 또는 HACvPD-1 중 어느 하나를 발현하는 조작된 MSC가 마우스 모델 결장직장암에서 종양 성장을 유의하게 억제함을 나타낸다. 도 18b는 각각의 치료에서 개별 마우스에 대한 종양 중량을 나타낸다. 도 18c는 종양 미세환경 내의 침윤하는 면역 모집단의 대표적인 그래프이다. 도 18d는 총 CD3 모집단에서 조절 T 세포 (Treg)의 백분율을 나타낸다. 조작된 MSC-IL2 및 CCL21a로 처리된 종양 미세환경에서 Treg의 수에서 상당한 감소가 있었다. 도 18e는 면역 침윤의 백분율을 종양 중량과 상관시킨다. 림프구 (CD3+)가 증가한 샘플은 낮은 종양 중량과 상관관계가 있는 것으로 나타났으며, 반면에 높은 골수성 (CD11b+) 침윤이있는 샘플은 더 높은 종양 부담과 상관관계가 있었다.

[0270] 장기 생존

[0271] 마우스는 주입된 항-CD40 항체와 조합하여 조작된 MSC-IL12 및 CCL21a 요법의 상이한 농도로 2회 투여되었다. 두 번째 투여 후, 종양 부담이 1500mm³보다 클 때까지 종양 부피는 매주 2회 모니터링되었고, 그리고 마우스를 희생시켰다. 도 17a는 개별 그룹의 종양 부피를 나타낸다. 도 17b 좌측 그래프는 경시적으로 개별 그룹으로부터 마우스 체중 및 종양 부피를 추적한다. 도 17b 우측 그래프는 다른 그룹의 생존 플롯을 도시한다.

[0272] MSC 귀소

[0273] 다음의 실험은 첫과 MSC가 결장암의 마우스 모델에서 종양으로 향한다는 것을 입증한다. 간단한 실험 프로토콜이 도 19의 좌측 상단 부분에 제공된다. 루시페라제-발현 CT26 결장암 종양 세포 (5x10⁵)를 암컷 BALB/cJ 마우스의 오른쪽 허벅지 안으로 피하로 이식하였다. 4일 후, 종양 편재화 및 크기는 Ami HT 살아있는 동물 이미지 (Spectral Instruments)를 사용하여 CT26 세포의 루시페라제 리포터를 통해 결정되었다 (도 19, 좌측 하단 패널, 루시페라제 신호 (종양-특이적)). 종양 이식 후 5일에, XenoLight DiR (Caliper Life Sciences)로 형광표지된 2백만 첫과 BM-MSC를 복강내 주사를 통해 종양-보유 마우스 (종양+)에 이식하였다. MSC 주사 후 1일 및 3일째에, XenoLight DiR 형광 라벨링된 MSC의 편재화가 Ami HT 이미지를 사용하여 결정되었다 (도 19, 우측 패널, DiR 신호 (MSC-특이적)). 주입된 MSC는 CT26 결장 종양의 부위에 공동 국소화되었다 (도 19, 좌측 하단 패널에서 MSC 주사 전에 마우스에서 종양-특이적 루시페라제 신호의 편재화 및 우측 상에 주사 후 1일 및 3일째에 종양 + 마우스에서 MSC-특이적 DiR 신호를 비교함). 따라서, MSC는 생체내에서 CT26 결장 종양의 부위로 구체적으로 향하며, 이들 결과는 MSC가 항암 분자, 단백질 또는 화합물의 전달 비히클로서 사용될 수 있음을 보여준다.

[0274] 도 20a는 조작된 인간 MSC가 마우스 CT26 종양으로 향하지 않는다는 것을 나타낸다. 도 20b는 각각의 처리에서 개별 마우스에 대한 종양 중량을 나타낸다. 효능은 격일마다 캘리퍼스 측정으로부터 종양 부피에 의해 결정되었다.

[0275] 종양 성장 동력학

[0276] 도 21a-21b는 복강내 공간에서 CT26-LUC (루시페라제) 종양 성장의 동력학을 나타낸다. CT26 세포주를 0일째에 주입하고 세 마리 (3) 마우스를 7일, 10일, 14일 및 18일째에 수확하여 종양 성장의 동력학을 결정하였다. 도 21a의 제1 행은 종양 부담을 모니터링하기 위해 IVIS 이미지로 마우스 체중 및 ROI를 측정한다. 제2 행은 각각의 그룹에서 개별 마우스의 종양의 ROI와 종양 중량을 모니터링한다. 제3 행은 전신 ROI 또는 종양 ROI 중 어느 하나와 종양 중량을 연관시킨다. 도 21b는 종양 미세환경을 더 잘 이해하기 위해 18일째 그룹에서 세 마리 (3) 마우스의 면역 프로파일을 보여준다.

[0277] 종양 침윤물 통계/면역 백분율/종양 중량

[0278] 피하 마우스 모델

[0279] 도 22a는 IL-12 및 CCL21a를 발현하는 조작된 MSC가 결장직장암의 피하 마우스 모델에서 종양 성장을 억제하지만; 그러나 CCL21a 및 IL-36 감마 또는 IL-7을 발현하는 MSC의 조합은 종양 성장을 감소시키지 않는다는 것을 나타내는 데이터를 포함한다. 도 23a-23b는 종양 면역 침윤물 통계를 포함한다. 면역 프로파일 종양 미세환경에 대한 유세포측정을 수행하기 위해 PBS, 미접촉 MSC, 및 MSC-IL12+MSC-CCL21a (콤보) 그룹으로부터 세 마리 마우스를 선택하였다. 도 23a는 미접촉 MSC로 투여된 그룹과 비교하여 콤보 그룹에서 침윤성 CD3 및 CD8 세포독성 T

모집단에서의 현저한 증가를 보여준다. **도 23b**는 미접촉 MSC로 처리된 그룹과 비교하여 콤보 그룹에서 과립구성 골수성-유래된 억제 세포 (gMDSC) 및 대식세포 모집단에서의 유의미한 감소를 보여준다.

[0280] **도 24a-24b**는 면역 백분율 및 종양 중량에 관한 데이터를 포함하며, 더 많은 CD3+ 및 CD8+ T 세포를 갖는 샘플 (우측 상부 및 종양 그래프)은 종양 중량의 감소와 강한 상관관계가 있다는 것을 나타낸다. 이들 도면은 또한 대식세포, 수지상 세포 및 MDSC를 포함하여 더 적은 CD11b 골수 세포를 갖는 샘플이 더 낮은 종양 부담을 나타낸다는 것을 도시한다 (**도 24a**의 하부 종양 및 우측 그래프 및 **도 24b**의 상부 행).

[0281] **동소이식 마우스 모델**

[0282] **도 26a**는 IL-12 및 CCL21a, 또는 CCL21a 및 IFN- β 를 발현하는 조작된 MSC가 결장직장암의 동소이식 마우스 모델에서 종양 성장을 억제하지만; 그러나 CCL21a 및 s41BBL을 발현하는 MSC의 조합은 종양 성장을 감소시키지 않는다는 것을 나타낸다. 각각의 이펙터는 상이한 MSC에 의해 발현되었고, 조합 치료를 위해 MSC는 (1:1 비로) 조합되었다. 각각의 차트는 마우스에서 4T1 유방 종양의 성장에 대한 지시된 면역요법 단독으로 또는 조합하여 발현하는 조작된 MSC의 효과를 나타낸다 (n = 6-8). **도 26a**의 각각의 라인은 개별 마우스를 나타낸다. **도 26b**는 각각의 치료에서 개별 마우스의 종양 중량을 도시한다. MSC-IL12 + MSC-CCL21a는 미접촉 MSC가 주입된 마우스에 비교하여 최상의 효능을 나타낸다. 치료 효능은 또한 MSC-IFN β + MSC-CCL21a로 처리된 그룹에서 관측되었다.

[0283] **도 27a-27b**는 지시된 조작된 MSC로 처리된 각각의 그룹의 면역 프로파일을 나타내는 그래프이다. MSC-IL12 + MSC-CCL21a로 처리한 후 대식세포 모집단에서의 일관된 감소가 관찰되었다 (**도 27a**). 미접촉 MSC에 대해 MSC-IL12 + MSC-CCL21a로 처리된 그룹과 비교할 때 CD3+ 모집단에서 증가된 침윤 및 CD11b+ 모집단에서 줄어든 침윤의 일반적인 추세가 또한 관찰되었다 (**도 27a** 및 **도 27b**).

[0284] **도 28a-28b**는 면역 침윤과 종양 중량의 상관관계를 나타낸다. 낮은 대식세포 및 수지상 세포를 갖는 샘플은 보다 낮은 종양 부담을 가진다 (**도 28b**, 최상부 중심 및 최상부 우측). **도 28c**는 각각의 그룹으로부터 평균 종양 중량을 나타낸다. 통계적 유의도는 미접촉 MSC와 비교하여 MSC-IL12 + MSC-CCL21a, 또는 MSC-IFN β + MSC-CCL21a 둘 모두에서 관측되었다.

[0285] **도 29**는 상기 결장직장암 모델로부터의 생체내 데이터를 조합한 그래프를 도시한다 (**도 22a** 및 **도 26a**). **도 22a** 및 **도 26a**로부터 조합된 CT26 데이터는 3개 그룹: 종양 단독 (PBS), 미접촉 MSC로 처리된 것, 및 MSC-IL12 + MSC-CCL21a로 처리된 것을 캡처한다.

[0286] **도 30a-30c**는 또한 **도 22a** 및 **도 26a**로부터의 조합된 데이터를 도시한다. 그래프는 유세포측정 실험 데이터로부터의 평균 면역 침윤의 수를 나타낸다. 통계적 유의도는 **도 30a**로부터 CD8+T에서 관찰되어, 종양 미세환경을 재분극시키고 더 많은 세포독성 T 세포 침윤을 허용하는 MSC-IL12 + MSC-CCL21a의 능력을 입증한다. 더욱이, MSC-IL12 + MSC-CCL21a에 의해 처리된 그룹에서 CD11b+ 골수성 모집단 침윤에서의 감소가 있었다 (**도 30b**). 수지상 세포 및 대식세포 모집단을 사용하여 수집된 데이터는 통계적 유의도였다.

[0287] **결장직장암의 복강내 및 피하 마우스 모델에서 IL12 및 CCL21a 요법**

[0288] **도 25a-25b**는 복강내 및 피하 결장직장암 마우스 모델에서 MSC-IL-12+CCL21a 요법으로부터 데이터를 포함한다. 렌티바이러스 형질도입된 주의 3개 상이한 로트가 MSC-IL12 및 CCL21a에 대해 시험되었다 (TL008-3/4, TL019-01/02, 및 TL022-01/02; 각각의 TL 번호는 하나의 로트를 나타낸다). **도 25a**는 MSC-IL12 + MSC-CCL21a의 모든 3개의 로트가 피하 및 복강내 모델 둘 모두에서 종양 부담을 감소시킬 수 있음을 나타낸다 (처음 5개의 그래프는 SC 모델로부터의 것이고, 마지막 3개는 IP 모델로부터의 것이다). 모든 마우스로부터의 종양은 11일째에 수집되었다. **도 25b**는 각각의 그룹으로부터의 평균 종양 중량을 나타낸다.

[0289] 참고문헌:

References:

1. Kidd S, et al. (2009) Stem Cells 27(10):2614-2623.
2. Dembinski JL, et al. (2013) Cytotherapy 15(1):20-32.
3. Siegel RL, et al. (2016) CA Cancer J Clin 66(1):7-30.
4. Dizon D MJ (2010) Gynecol Oncol 116(3).
5. Woo SR, et al. (2015) Trends Immunol 36(4):250-256.
6. Hamanishi J, et al. (2016) Int Immunol 28(7):339-348.
7. Li S, et al. (2012) Oncolytic Virother 1:1-21.
8. Koneru M, et al. (2015) J Transl Med 13:102.
9. Cruz CR, et al. (2010) Cytotherapy 12(6):743-749.
10. Li YQ, et al. (2013) PLoS One 8(10):e76379.
11. Wiedemann GM, et al. (2016) Oncoimmunology 5(9):e1175794.
12. Squillaro T, et al. (2016) Cell Transplant 25(5):829-848.
13. Studeny M, et al. (2004) J Natl Cancer Inst 96(21):1593-1603.
14. Ling X, et al. (2010) Cancer Microenviron 3(1):83-95.
15. Schukur L, et al. (2015) Sci Transl Med 7(318):318ra201.
16. Howlader N NA, Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ and Cronin KA. (2015).

[0290]

17. Lengyel E (2010) *Am J Pathol* 177(3):1053-1064.
18. McGuire WP, et al. (1996) *The New England journal of medicine* 334(1):1-6.
19. McGuire WP, et al. (1989) *Annals of internal medicine* 111(4):273-279.
20. Adams SF & Benencia F (2015) *Future Oncology* 11(9):1293-1296.
21. Maude SL, et al. (2014) *N Engl J Med* 371(16):1507-1517.
22. Bargou R, et al. (2008) *Science* 321(5891):974-977.
23. Kershaw MH, et al. (2014) *Clin Trans Immunol* 3:e16.
24. Gilham DE, et al. (2012) *Trends Mol Med* 18(7):377-384.
25. Klinger M, et al. (2012) *Blood* 119(26):6226-6233.
26. Fu J, et al. (2015) *Sci Transl Med* 7(283):283ra252.
27. Moynihan KD, et al. (2016) *Nat Med* 22(12):1402-1410.
28. Mohammadi M, et al. (2016) *Cancer Gene Ther* 23(9):285-286.
29. Wang D, et al. (2013) *Cell Transplant* 22(12):2267-2277.
30. Nowakowski A, et al. (2016) *Stem Cells Int* 2016:4956063.
31. Sun Z, et al. (2014) *J Hematol Oncol* 7:14.
32. Ando M, et al. (2015) *Stem Cell Reports* 5(4):597-608.
33. Zhao Q, et al. (2015) *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(2):530-535.
34. Xie C, et al. (2013) *Br J Cancer* 109(5):1198-1205.
35. Parker BS, et al. (2016) *Nat Rev Cancer* 16(3):131-144.
36. Roby KF, et al. (2000) *Carcinogenesis* 21(4):585-591.
37. Sharma AD, et al. (2015) *J Vis Exp* (95):e52242.
38. Waterman RS, et al. (2012) *PLoS One* 7(9):e45590.
39. Dubinett SM, et al. (2010) *Cancer J* 16(4):325-335.
40. Tang ED & Wang CY (2015) *PLoS One* 10(3):e0120090.
41. Cieri N, et al. (2013) *Blood* 121(4):573-584.
42. Fitzgerald KA, et al. (2003) *Nat Immunol* 4(5):491-496.
43. Wong AS, et al. (2016) *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(9):2544-2549.
44. Wong AS, et al. (2015) *Nat Biotechnol* 33(9):952-961.
45. Nissim L, et al. (2014) *Mol Cell* 54(4):698-710.
46. Deng P, et al. (2016) *Neural Regen Res* 11(5):702-705.
47. Beegle JR, et al. (2016) *Mol Ther Methods Clin Dev* 3:16053.
48. Boutros C, et al. (2016) *Nat Rev Clin Oncol* 13(8):473-486.
49. Valsecchi ME (2015) *New Engl J Med* 373(13):1270-1270.
50. Pardoll DM (2012) *Nat Rev Cancer* 12(4):252-264.
51. Legat A, et al. (2013) *Front Immunol* 4:455.
52. Justus CR, et al. (2014) *J Vis Exp* (88).
53. Jedema I, et al. (2004) *Blood* 103(7):2677-2682.
54. Peng D, et al. (2015) *Nature* 527(7577):249-253.
55. Gitzinger M, et al. (2009) *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(26):10638-10643.

[0291]

56. Clackson T, et al. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(18):10437-10442.
57. Siuti P, et al. (2013) *Nature Biotechnology* 31(5):448-452.
58. Farzadfard F & Lu TK (2014) *Science* 346(6211):1256272.
59. Perli SD, et al. (2016) *Science* 353(6304).
60. Roquet N, et al. (2016) *Science* 353(6297):aad8559.
61. Wong ASL, et al. (2016) *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
62. Gardner TS, et al. (2000) *Nature* 403(6767):339-342.
63. Deans TL, et al. (2007) *Cell* 130(2):363-372.
64. Warren L, et al. (2010) *Cell Stem Cell* 7(5):618-630.
65. Yang BX, et al. (2015) *Cell* 163(1):230-245.
66. Kumar RM, et al. (2014) *Nature* 516(7529):56-61.
67. Zhang J, et al. (2016) *Cell Stem Cell* 19(1):66-80.
68. Cahan P, et al. (2014) *Cell* 158(4):903-915.
69. Doulatov S, et al. (2013) *Cell Stem Cell* 13(4):459-470.
70. Kim K, et al. (2011) *Nat Biotechnol* 29(12):1117-1119.
71. Chavez A, et al. (2016) *Nat Methods* 13(7):563-567.
72. Slomovic S & Collins JJ (2015) *Nat Methods* 12(11):1085-1090.

[0292]

[0293]

본 명세서에 개시된 모든 참고문헌, 특허 및 특허 출원은 이들 각각이 인용되는 요지와 관련하여 참조로 포함되며, 일부 경우에 문서의 전체를 포함할 수 있다.

[0294]

본원에서 명세서 및 청구 범위에서 사용된 바와 같은 부정 관사 "a" 및 "an"은, 달리 명백하게 지시되지 않는 한, "적어도 하나"를 의미하는 것으로 이해되어야 한다.

[0295]

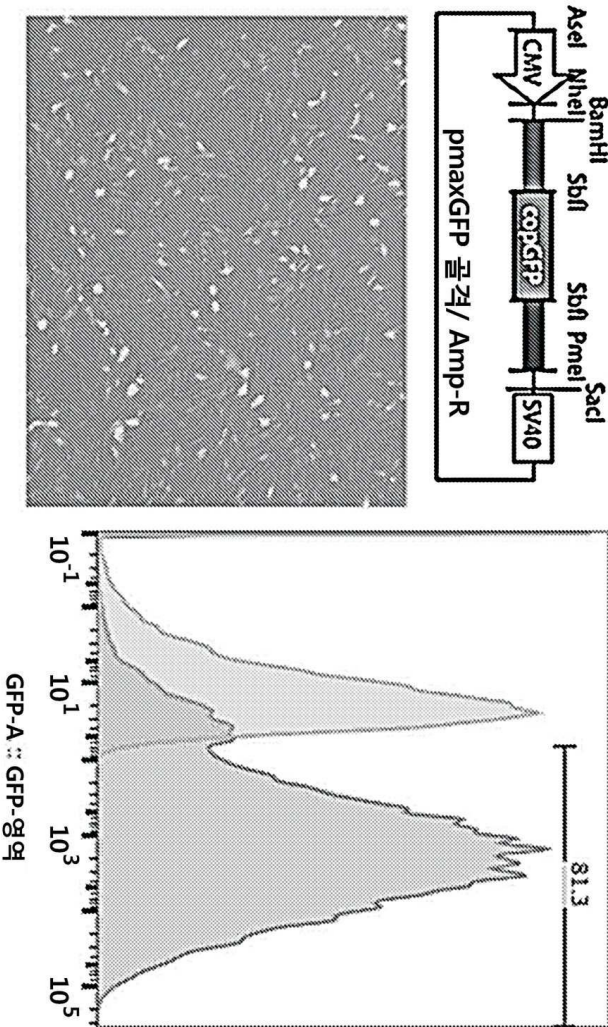
또한, 달리 명백하게 지시되지 않는 한, 하나 이상의 단계 또는 작용을 포함하는 본 명세서에 청구된 임의의 방법에서, 본 방법의 단계 또는 작용의 순서는 본 방법의 단계 또는 작용이 인용된 순서에 반드시 제한되는 것은 아니라는 것이 이해되어야 한다.

[0296]

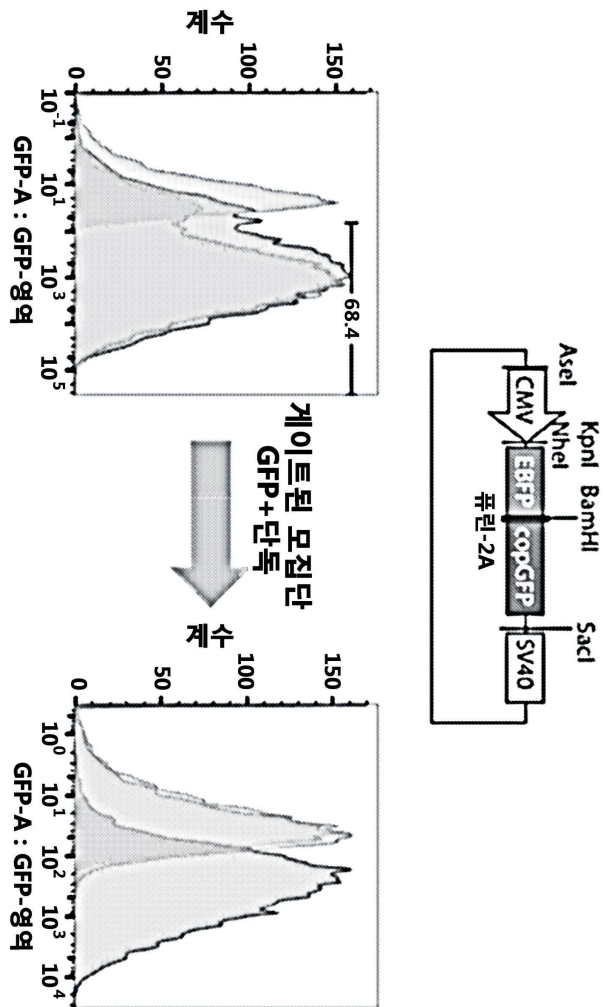
상기 명세서에서 뿐만 아니라 청구범위에서, "포함하는", "함유하는", "수반하는", "갖는", "함유하는", "포괄하는", "보유하는", "이루어지는" 등과 같은 모든 이행 어구는 개방형, 즉 비제한적으로 포함하는 것을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 단지 이행 어구 "구성되는" 및 "본질적으로 구성되는" 만이 각각 미국 특허청의 특허 심사 절차의 매뉴얼, 부문 2111.03에 기술된 바와 같이 폐쇄형이거나 반-폐쇄형인 이행 어구이어야 한다.

도면

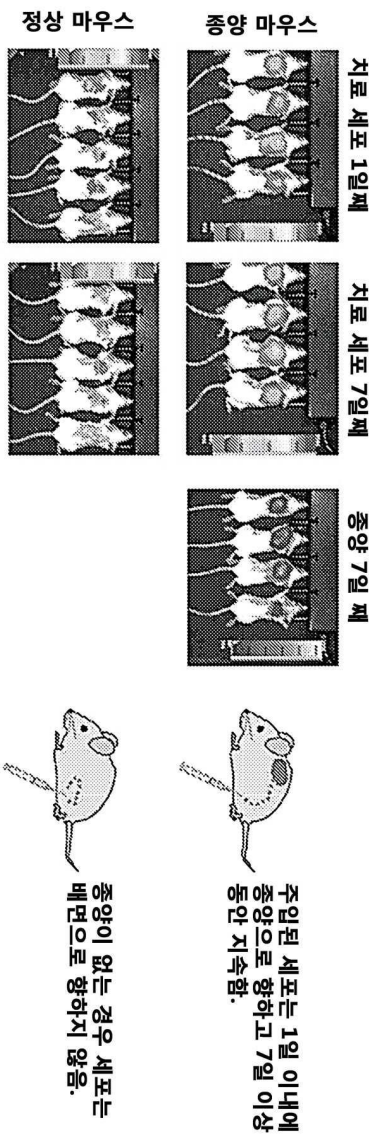
도면1



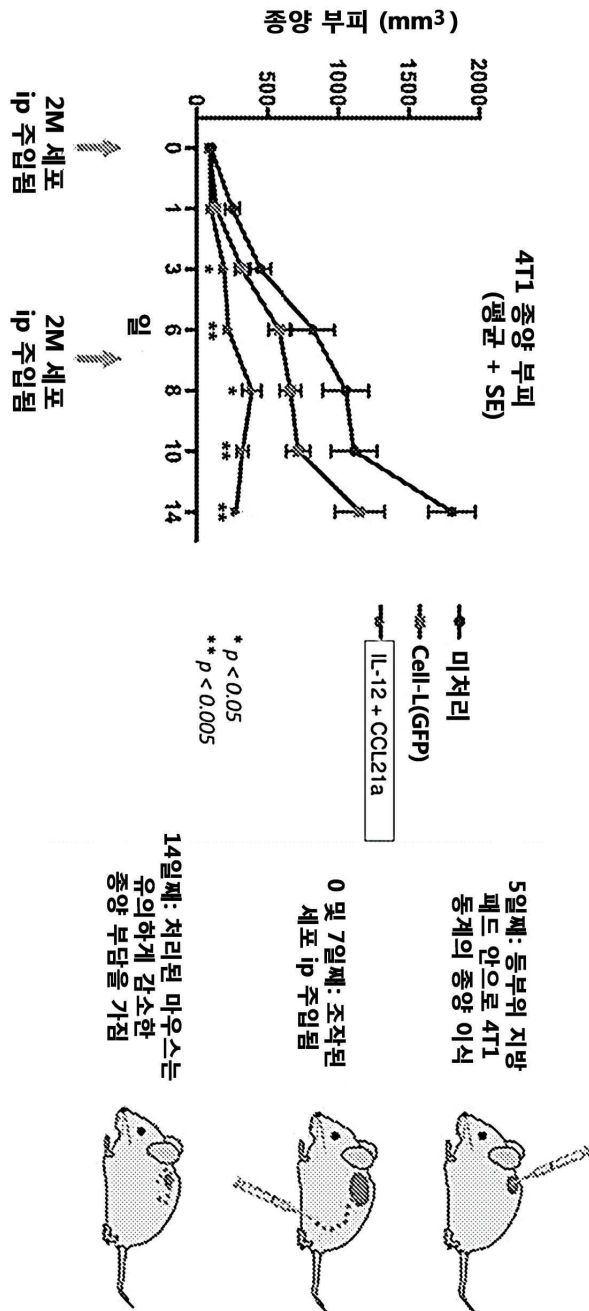
도면2



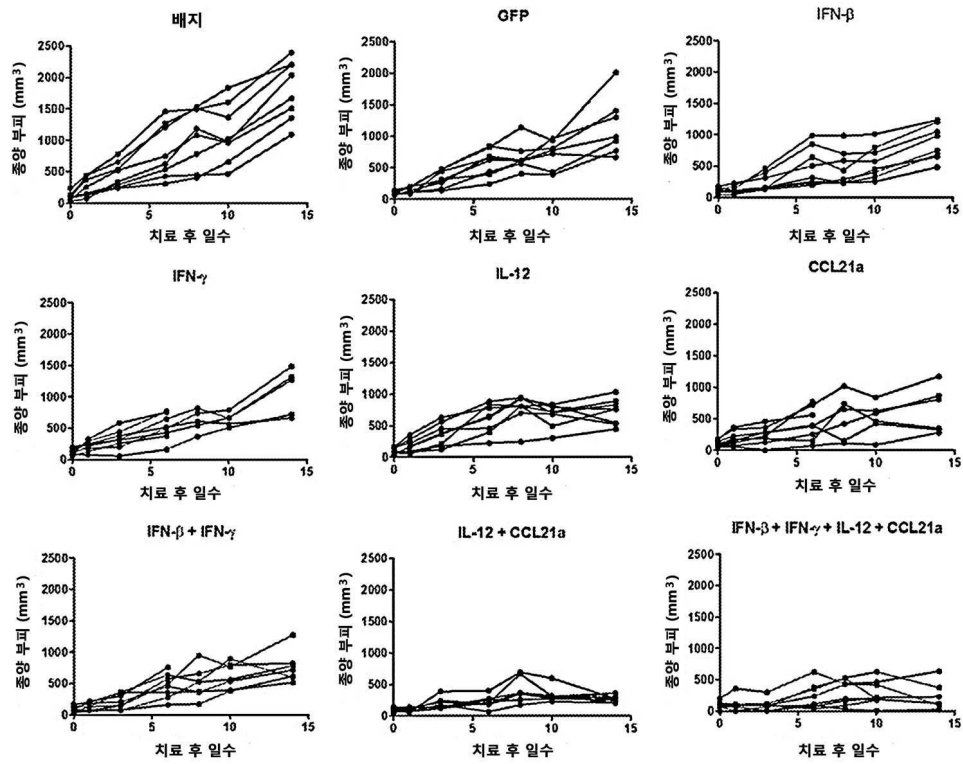
도면3



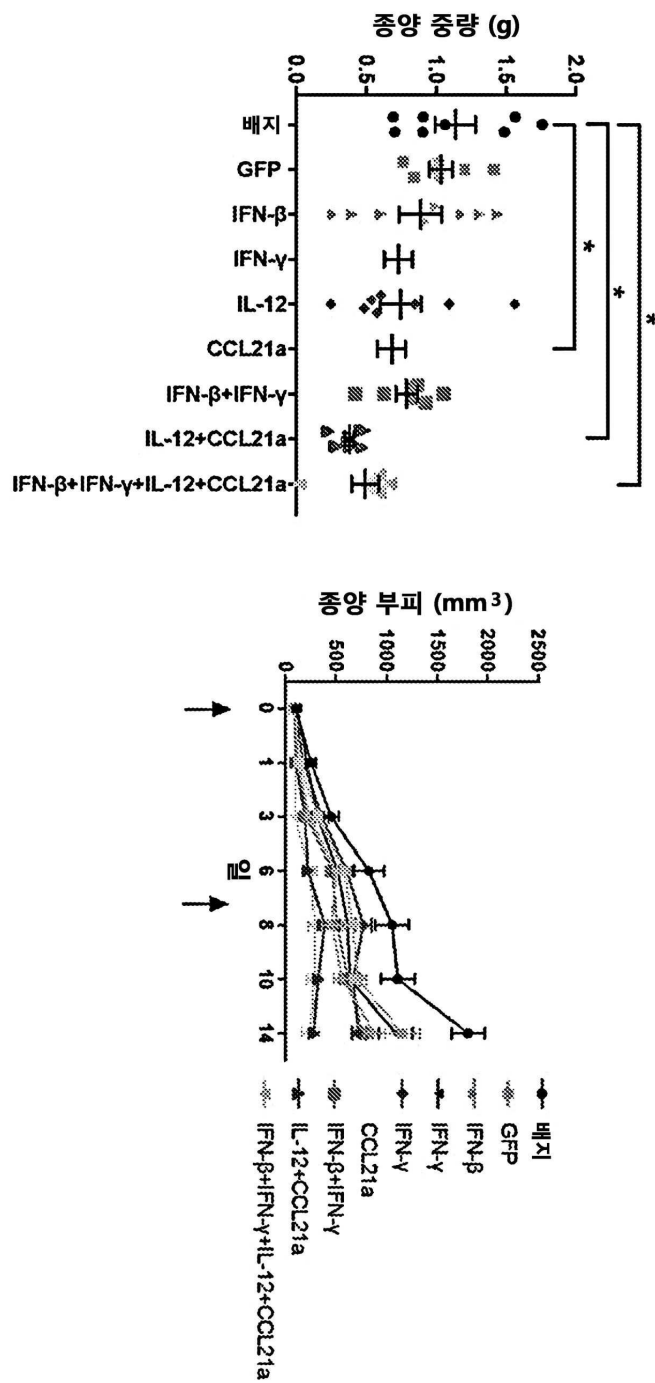
도면4



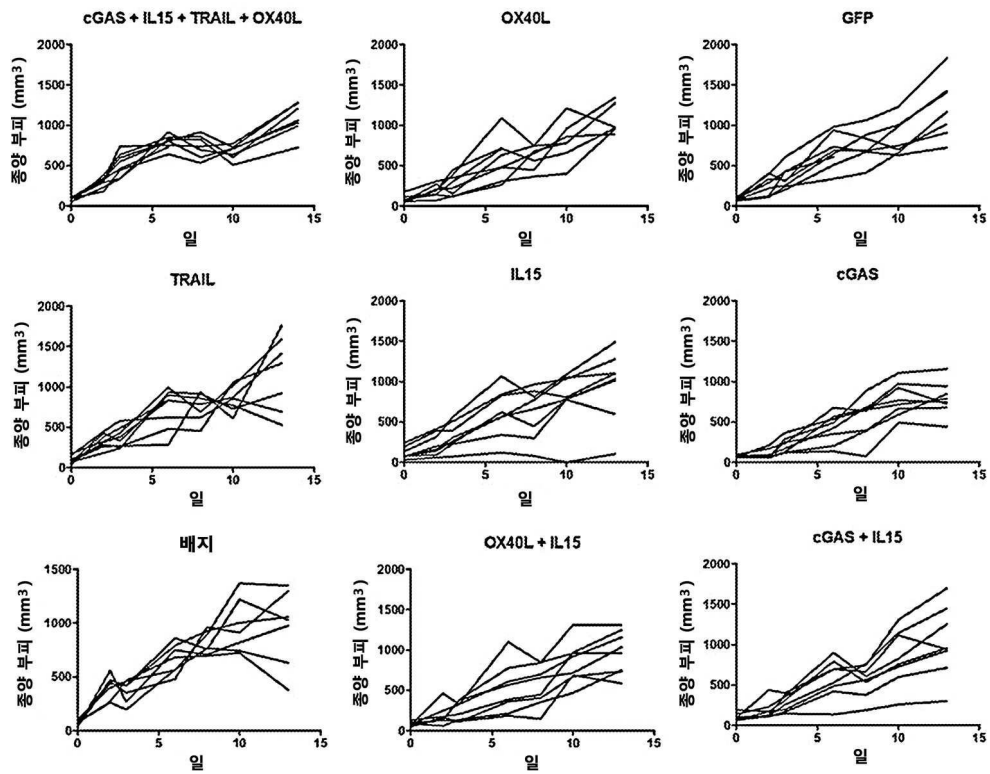
도면5a



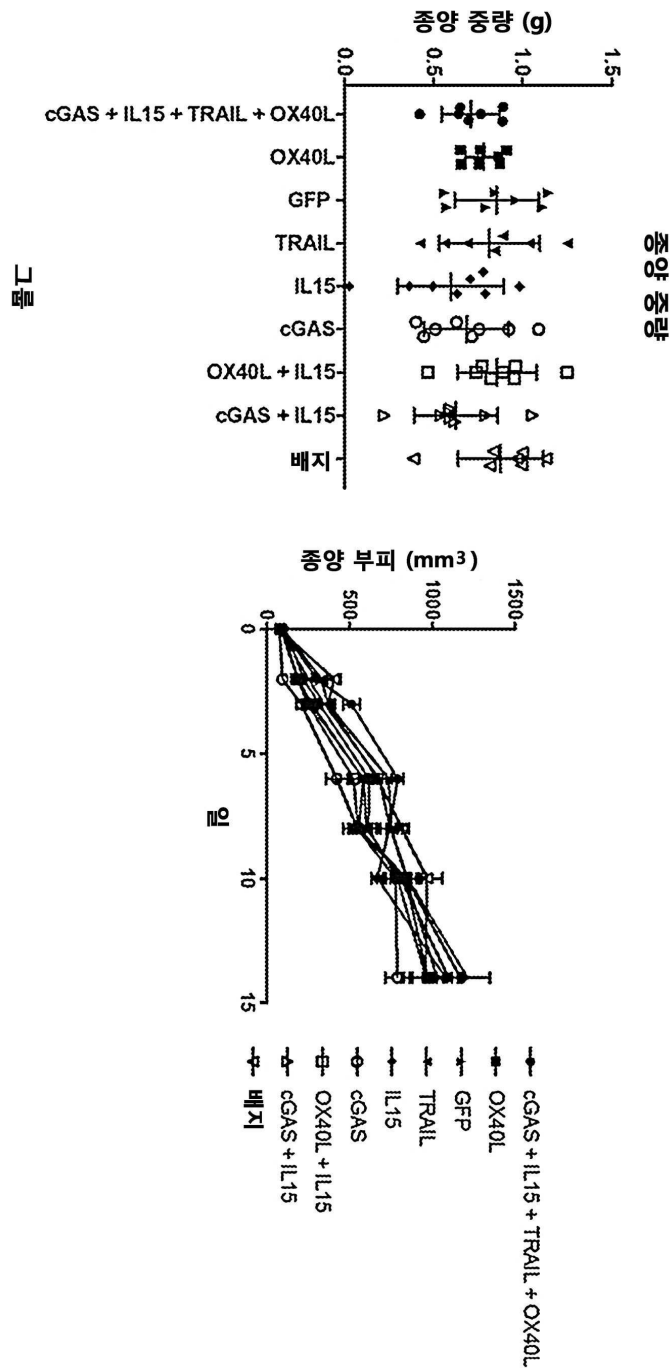
도면5b



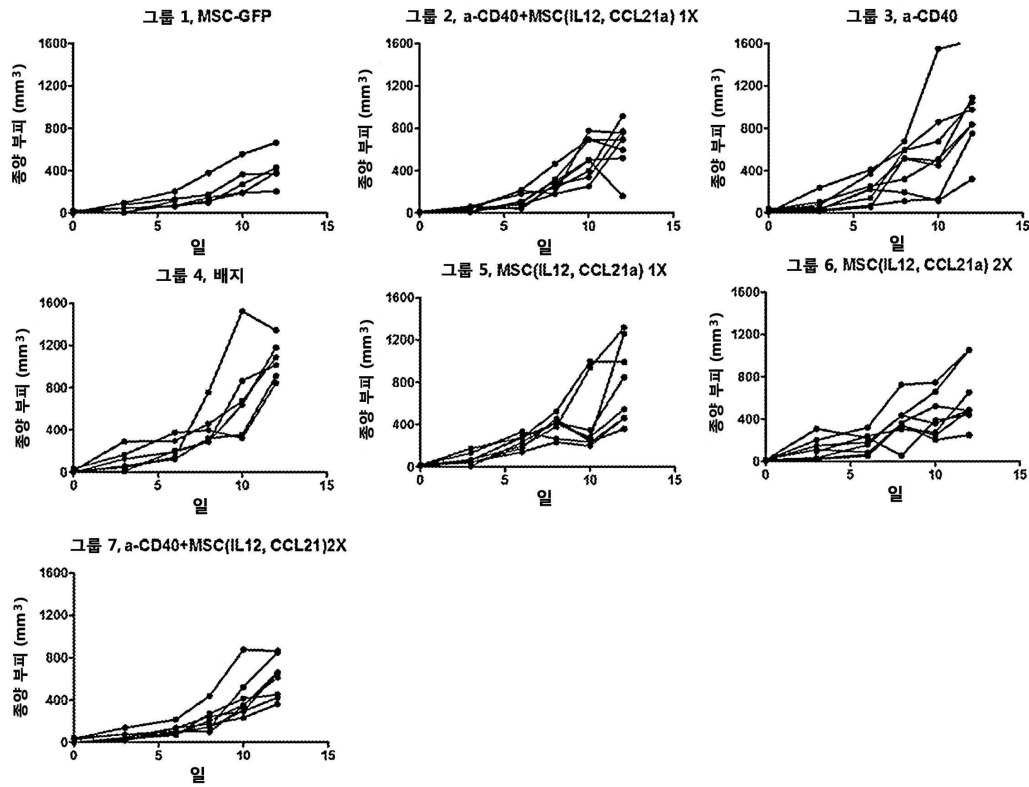
도면6a



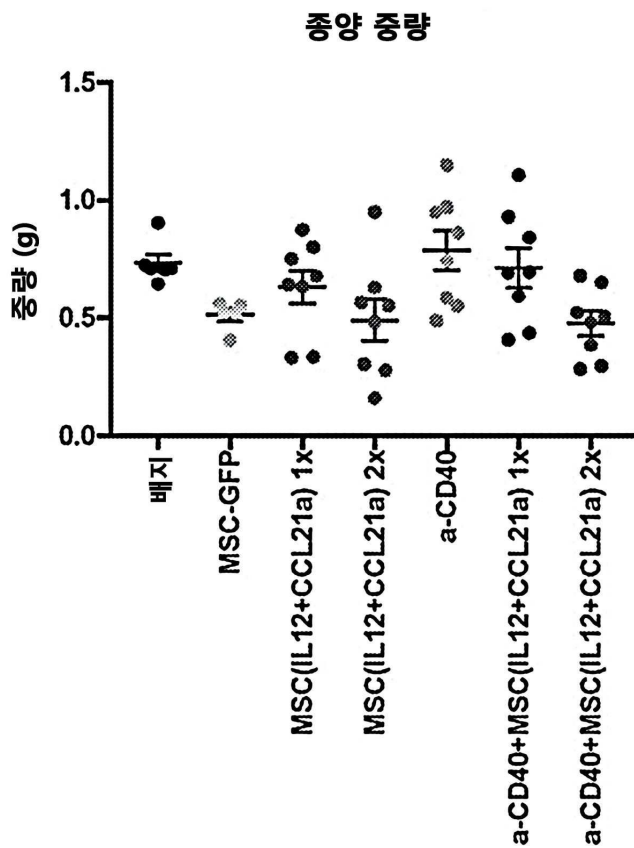
도면6b



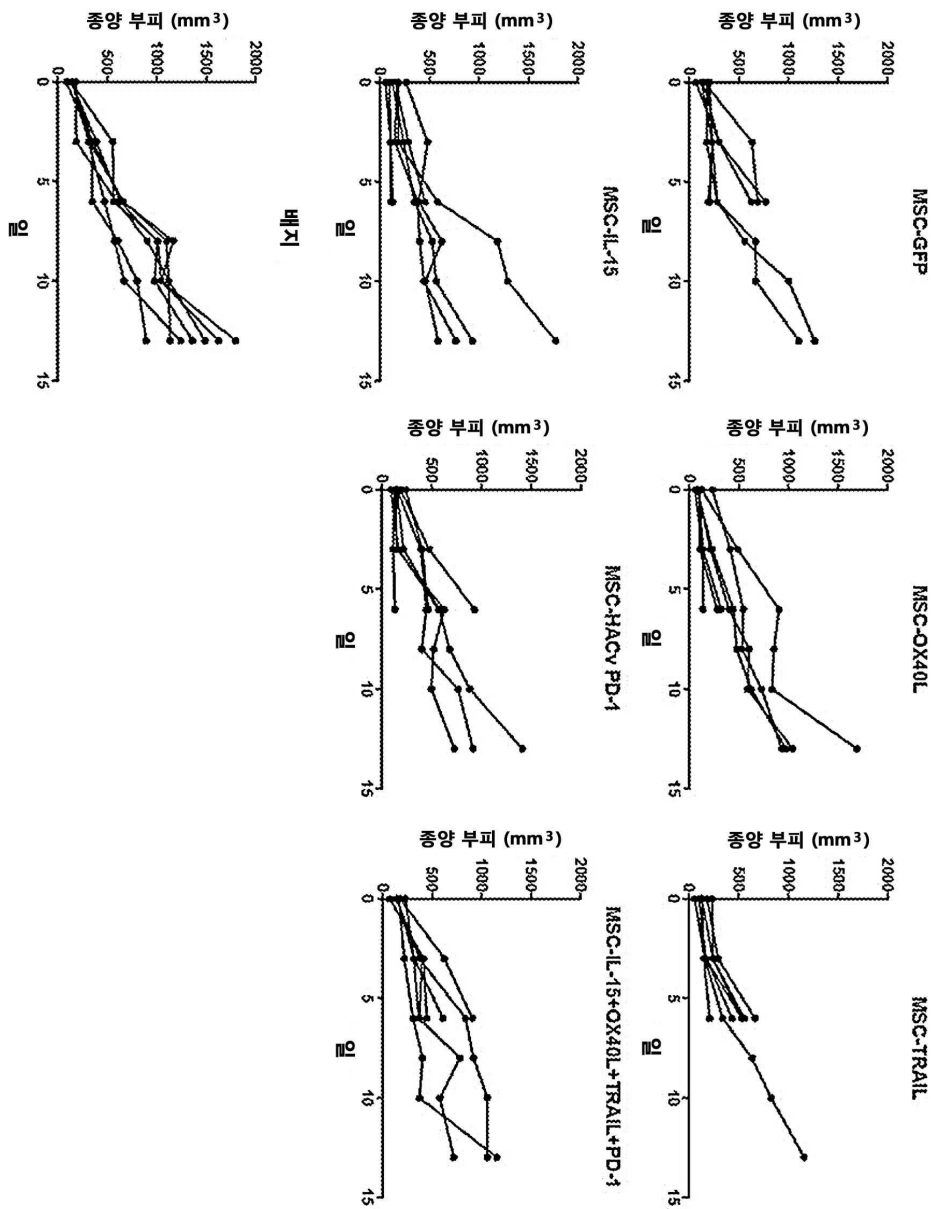
도면7a



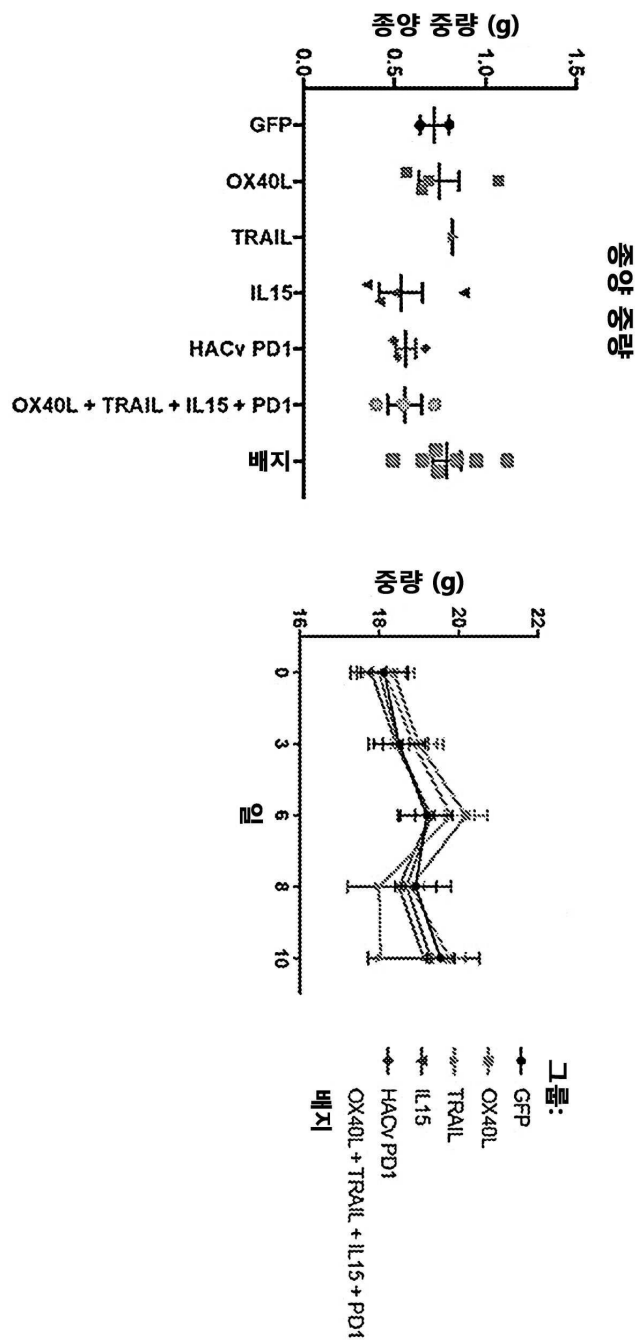
도면7b



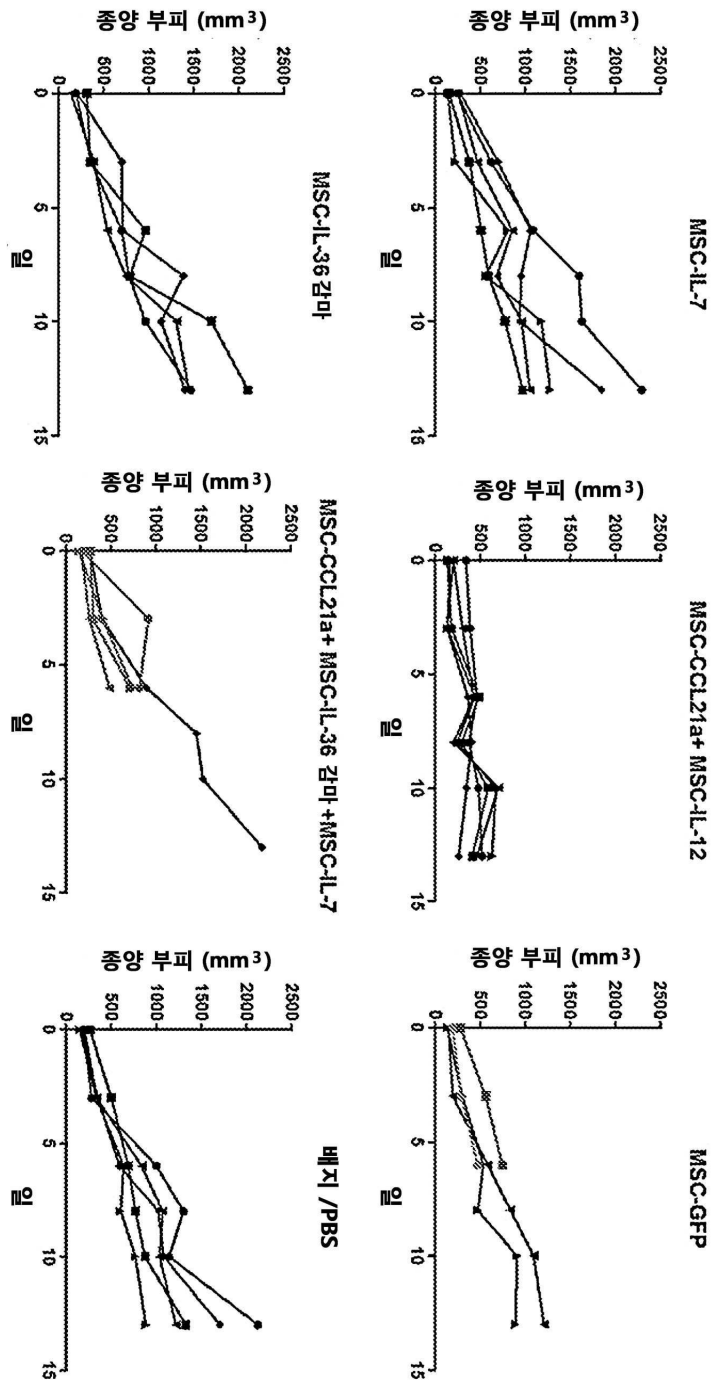
도면8a



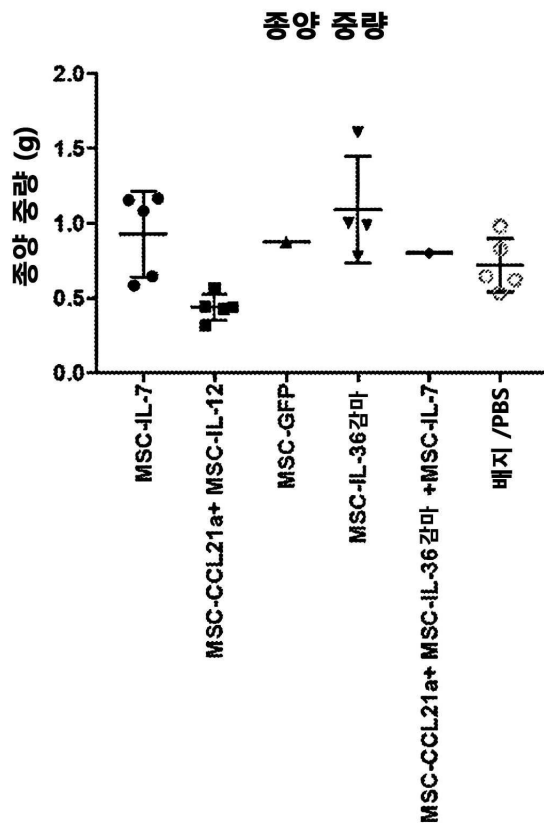
도면8b



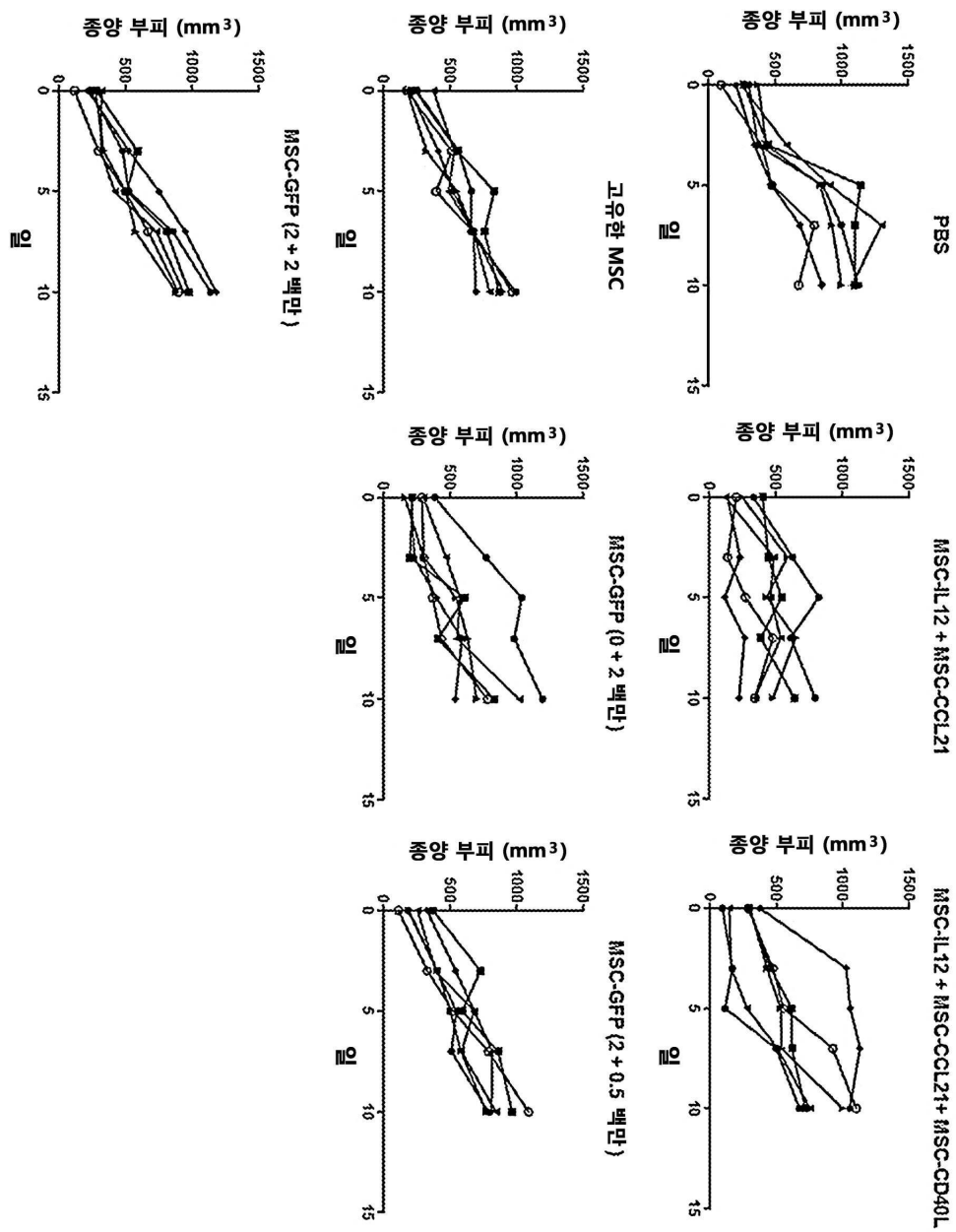
도면9a



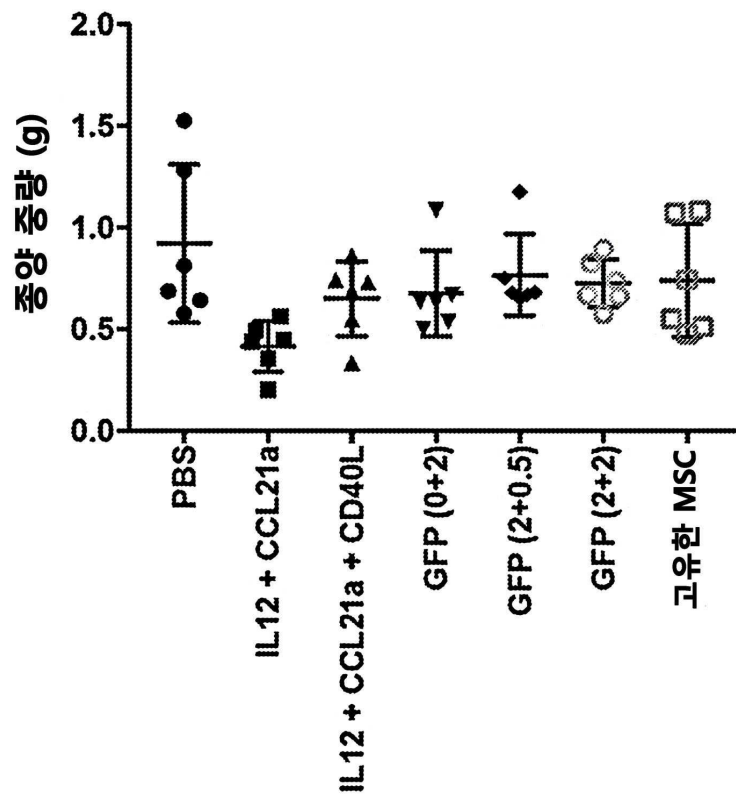
도면9b



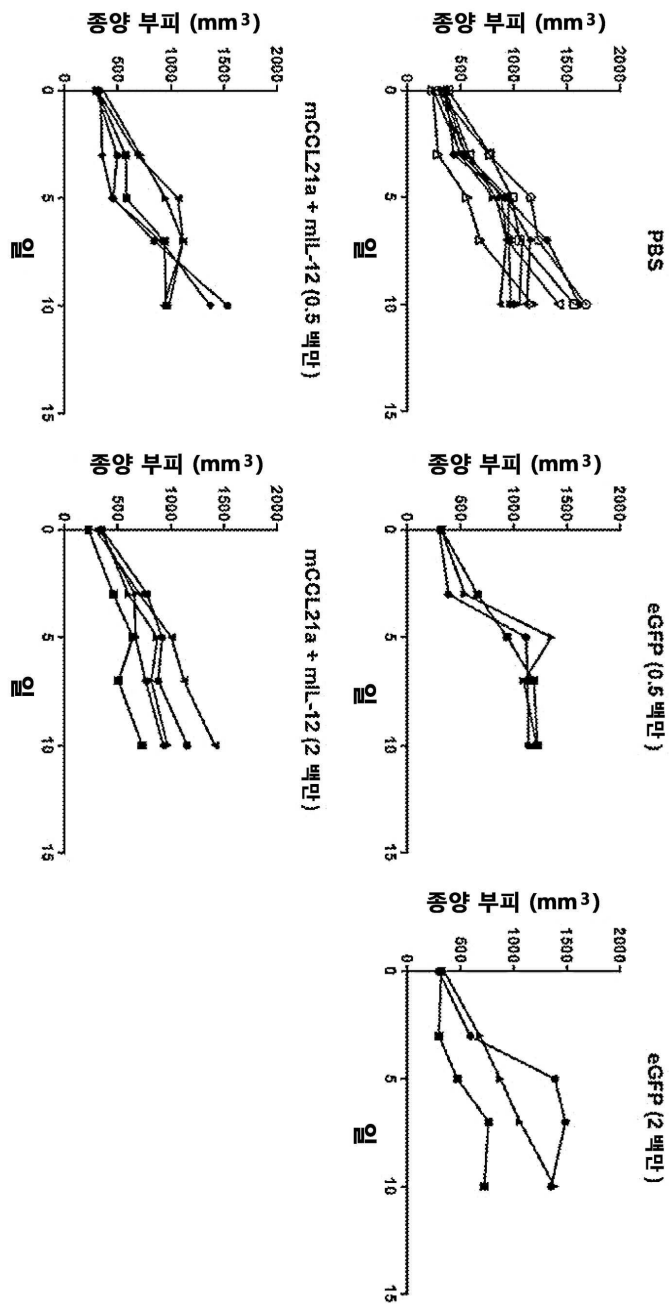
도면10a



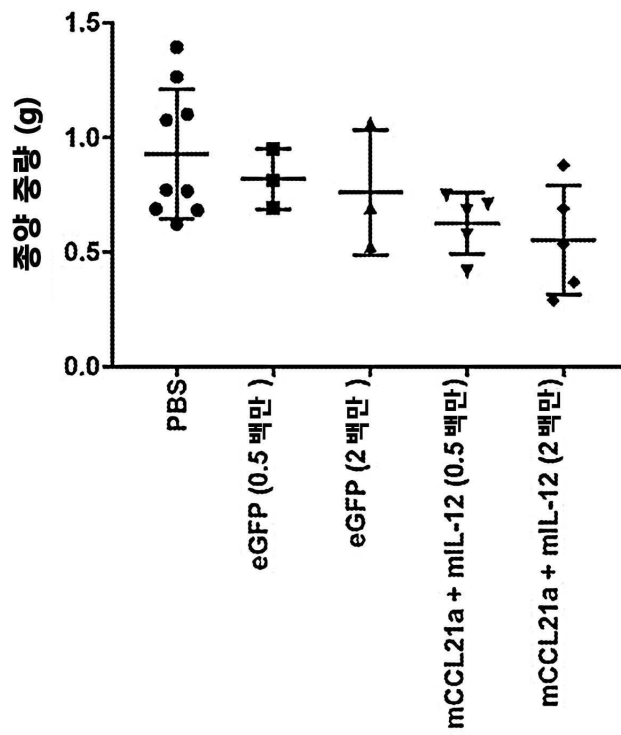
도면10b



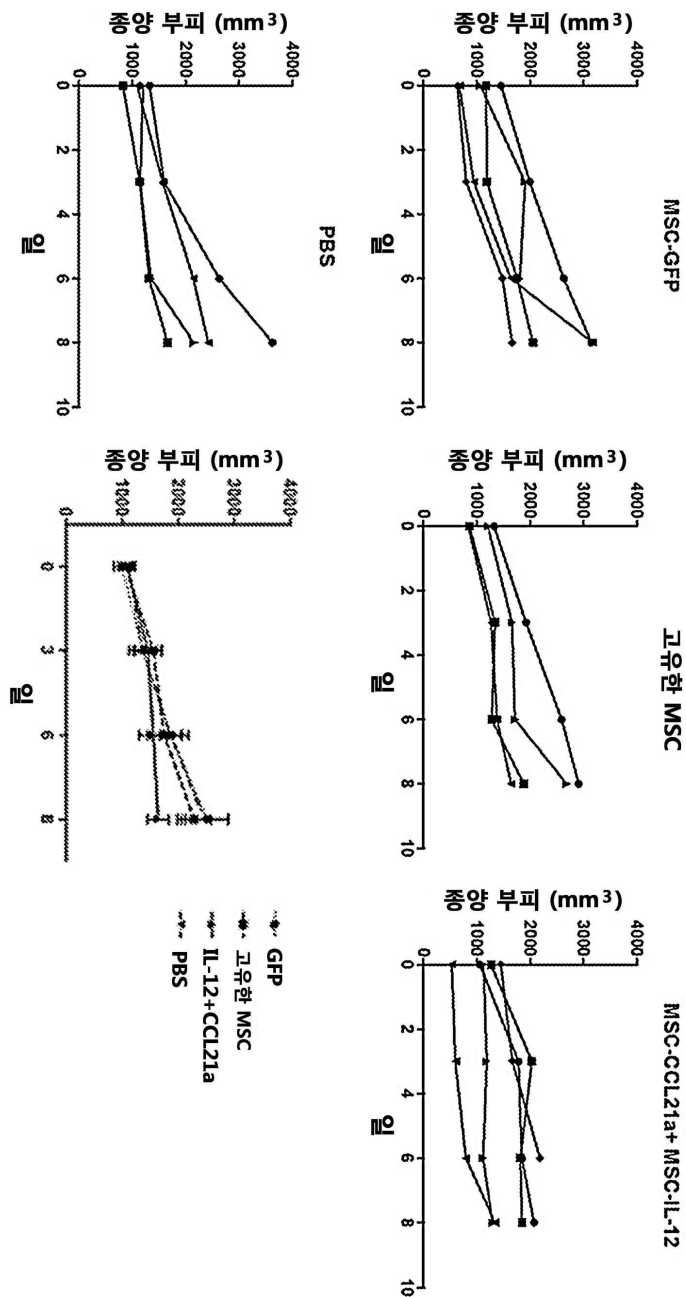
도면11a



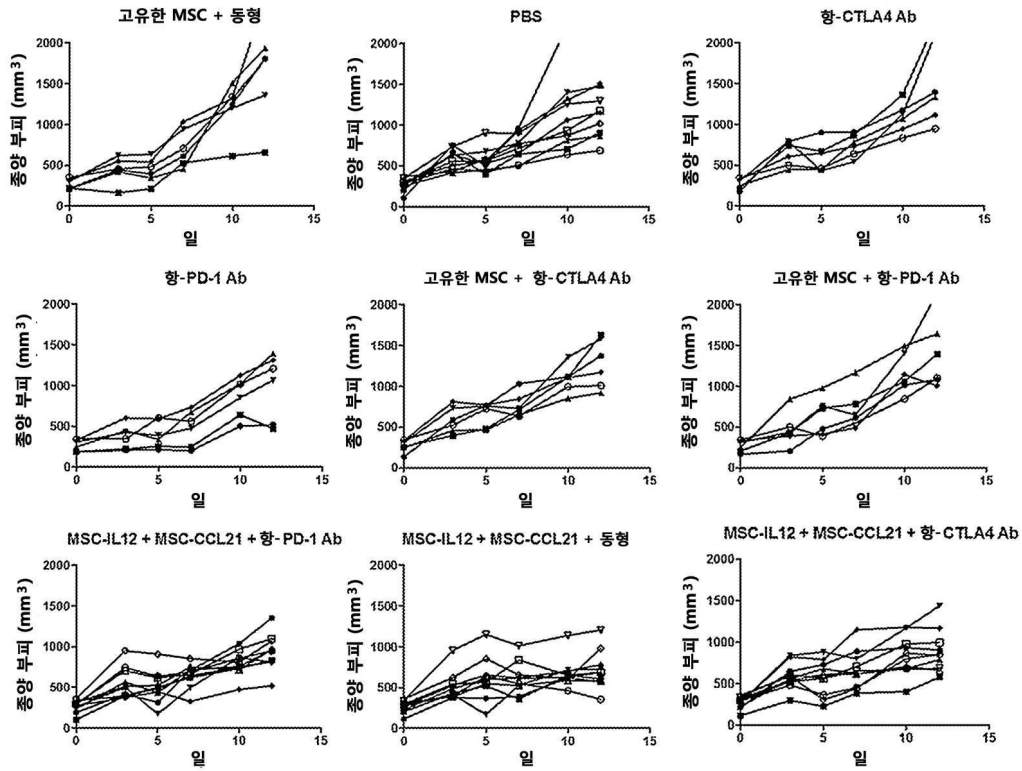
도면11b



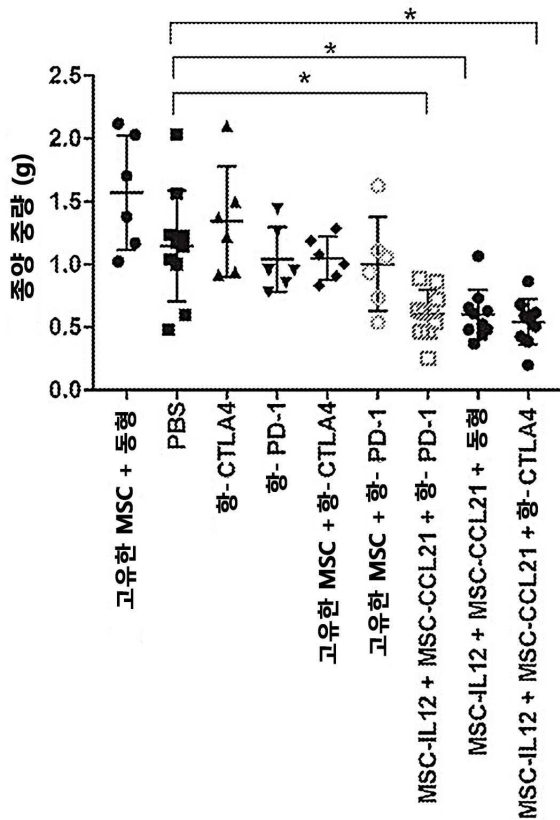
도면12



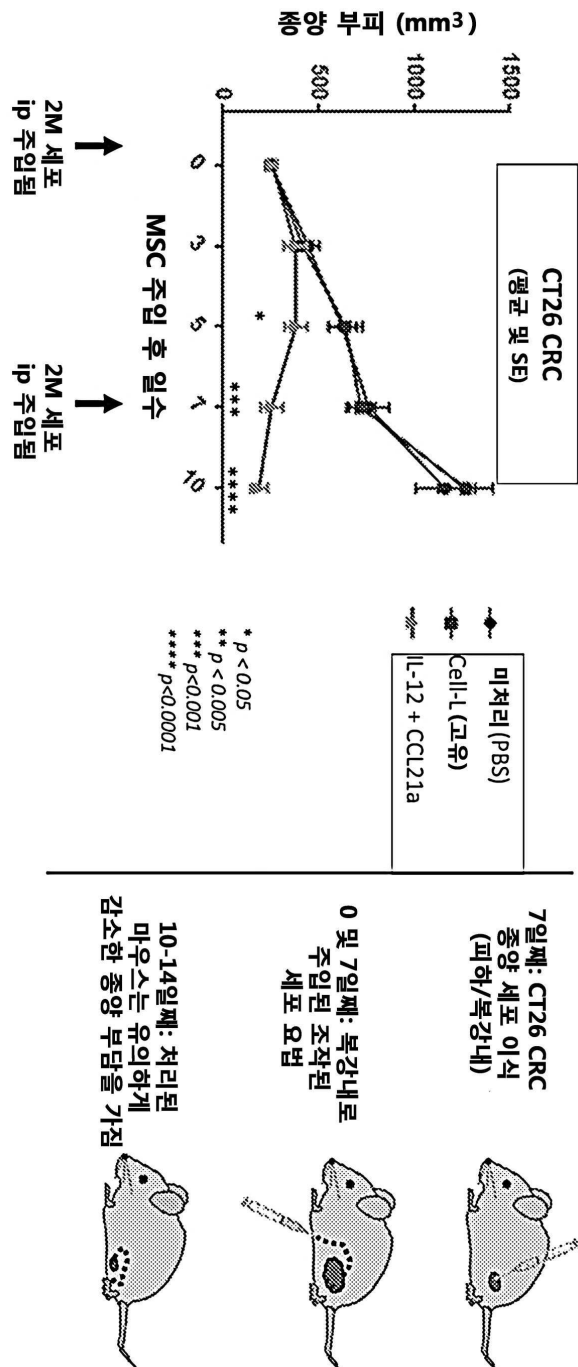
도면13a



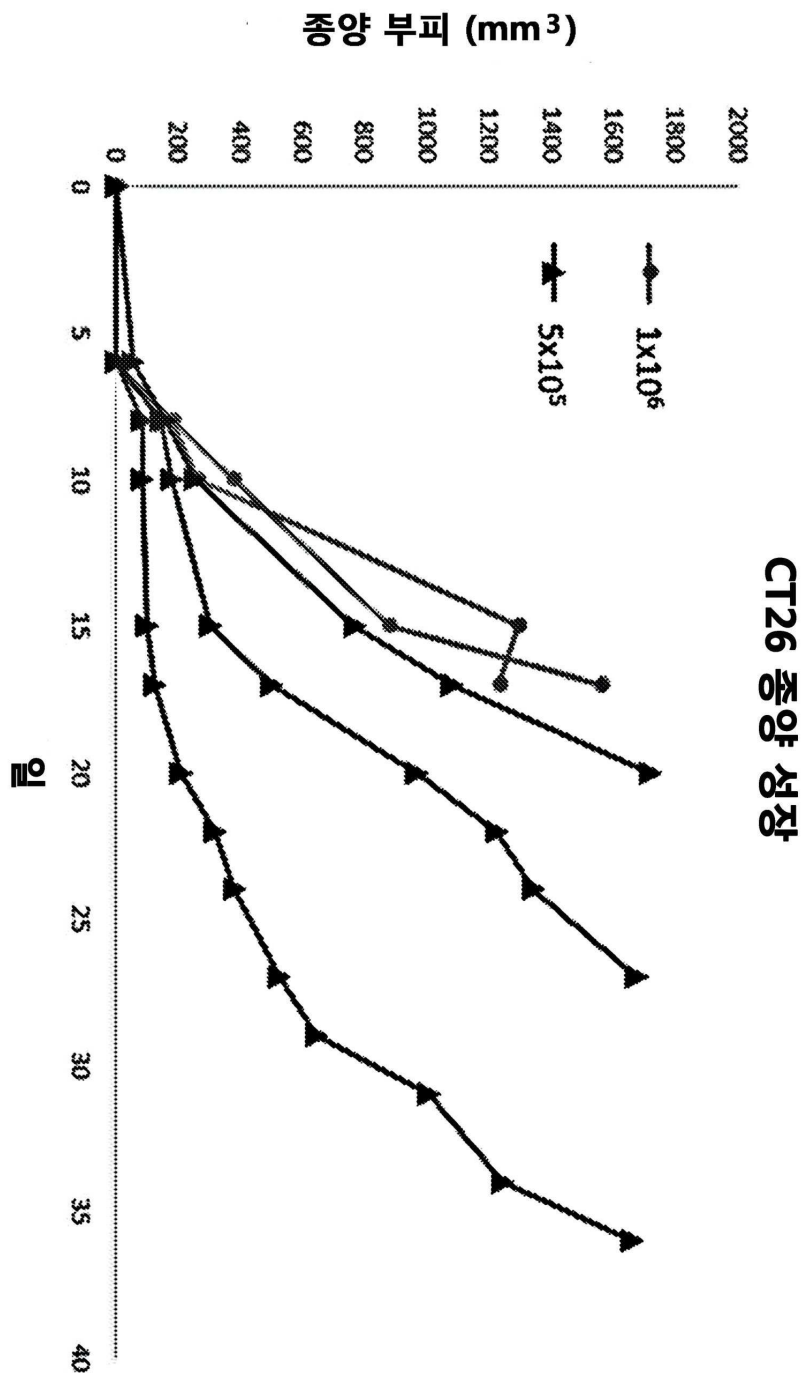
도면13b



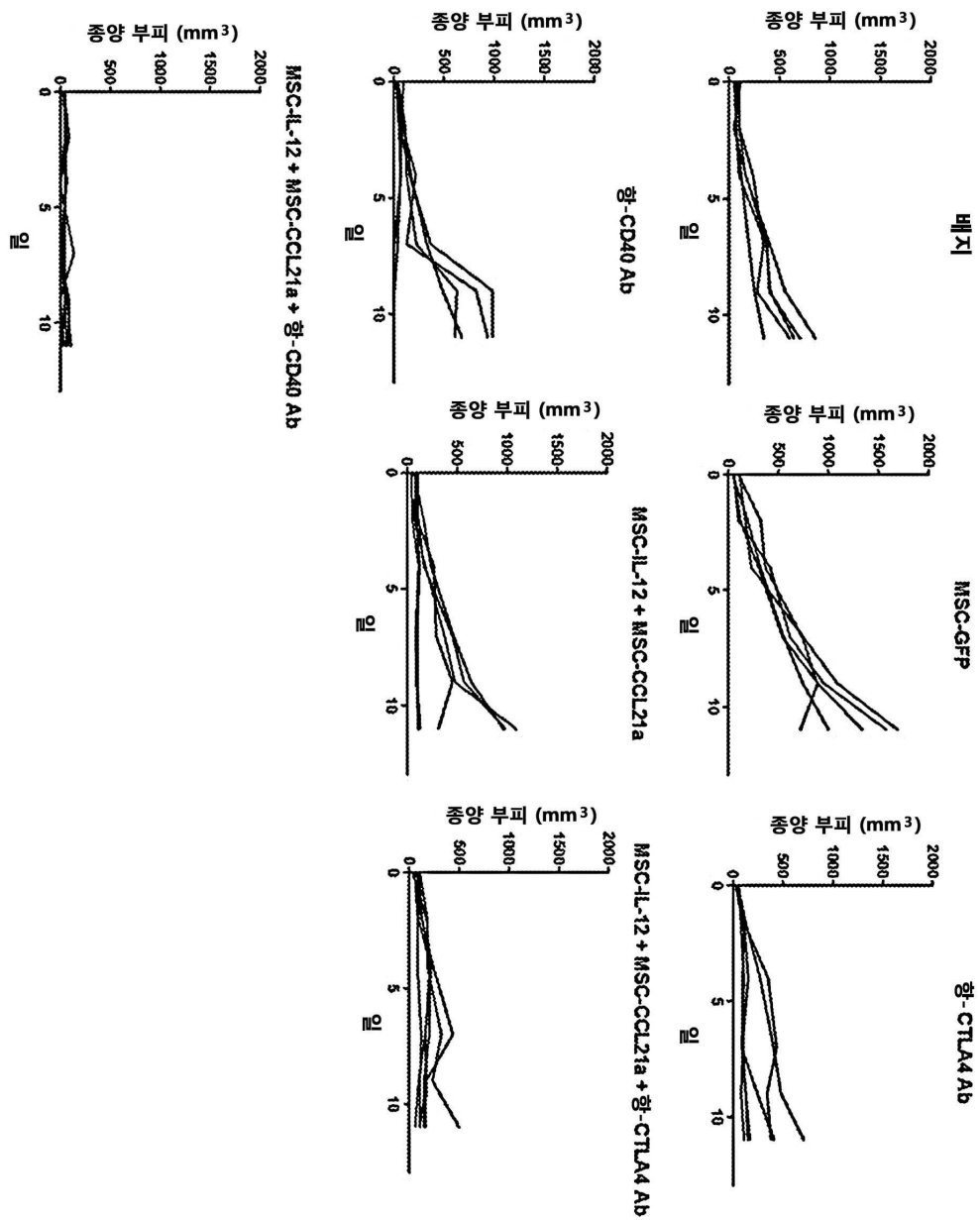
도면14



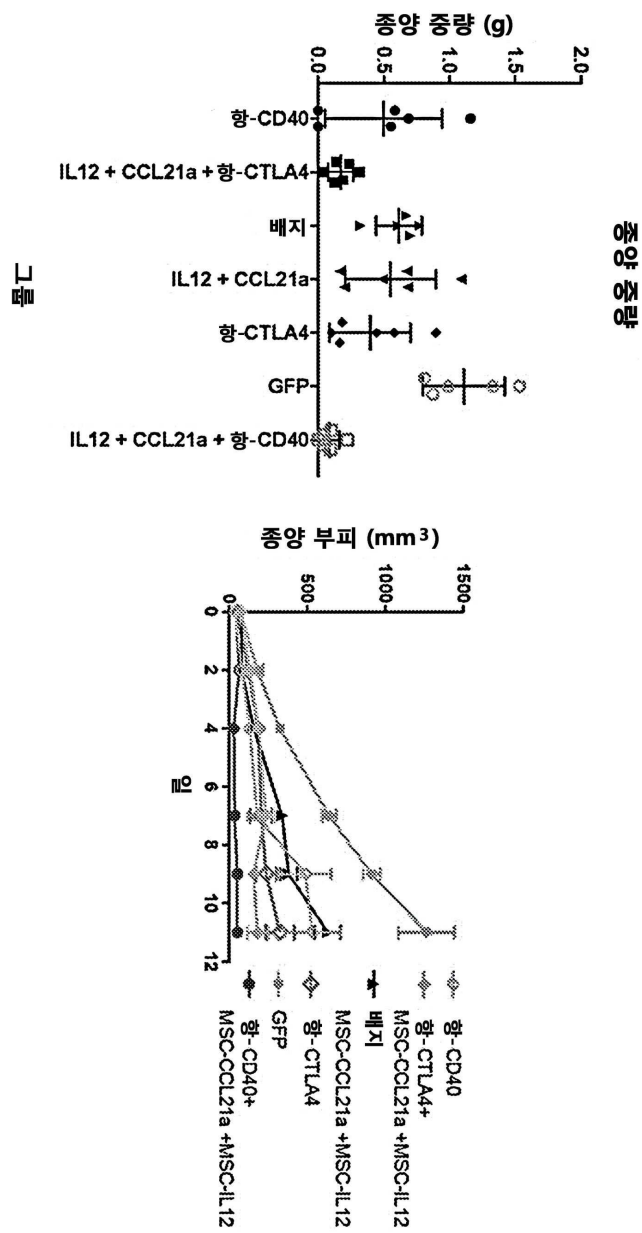
도면15



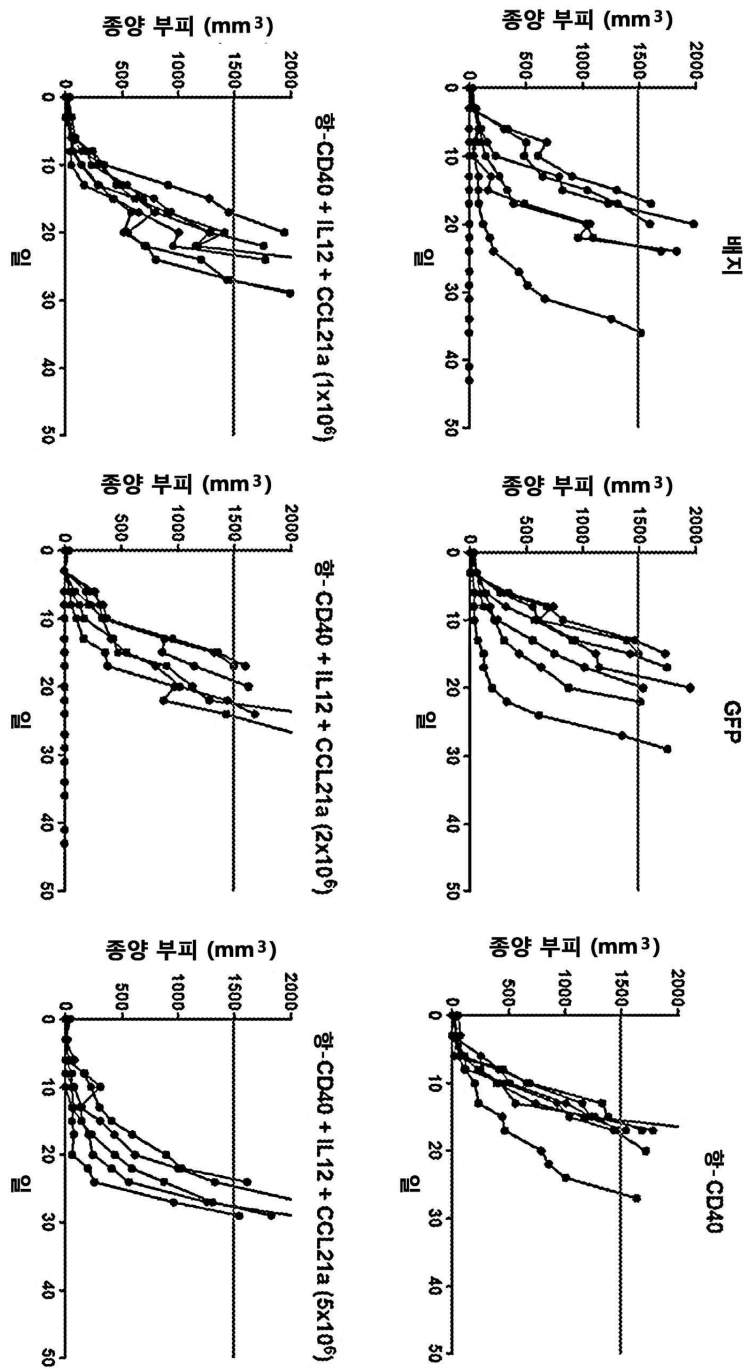
도면16a



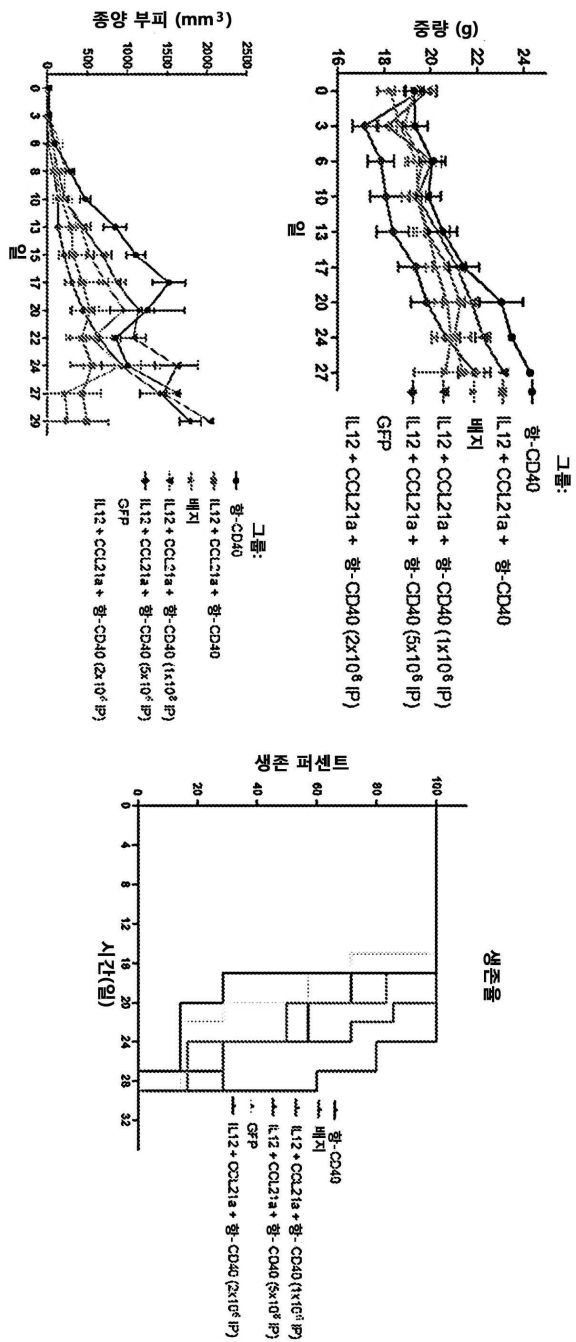
도면16b



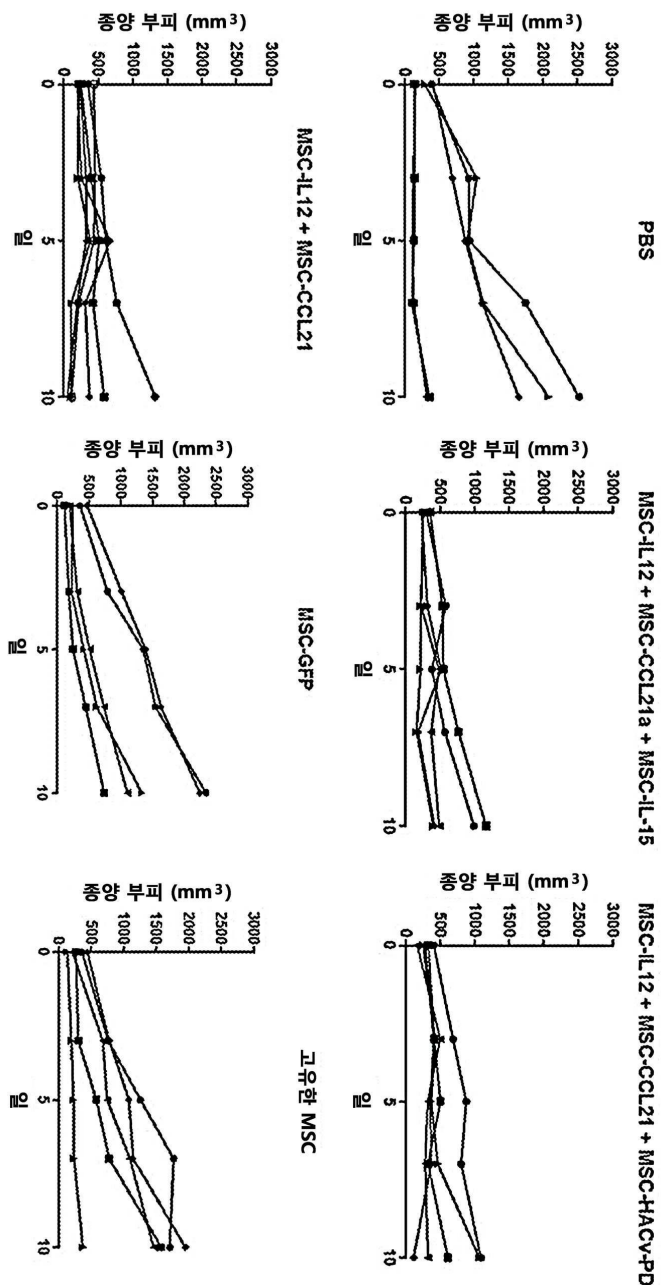
도면17a



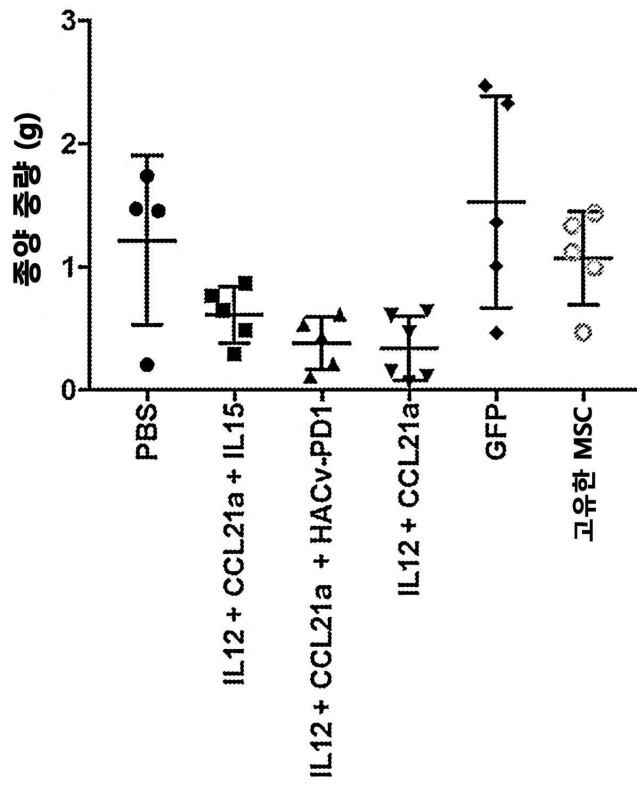
도면17b



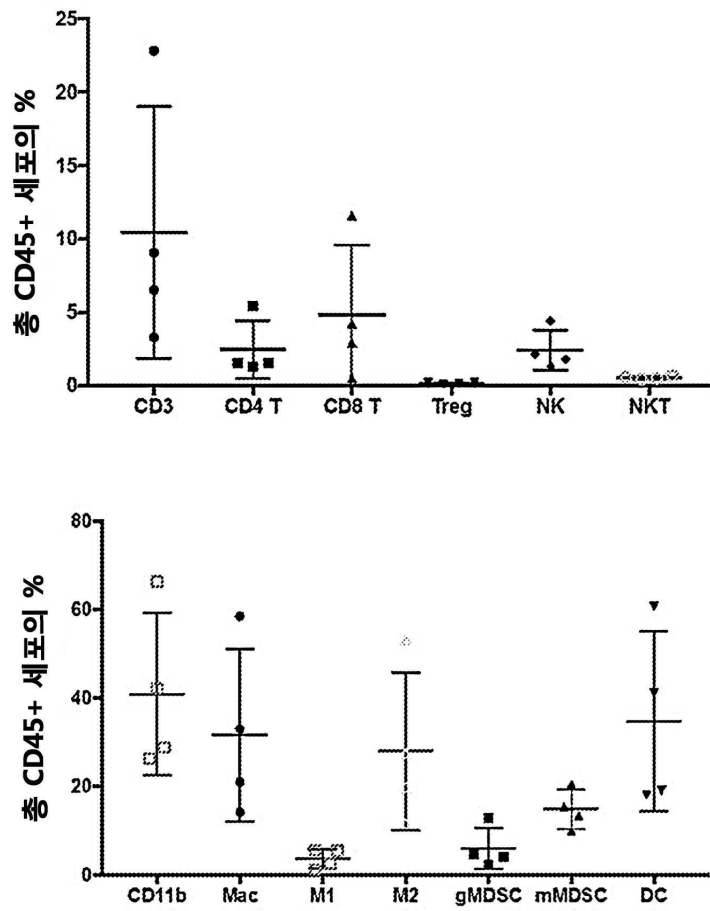
도면18a



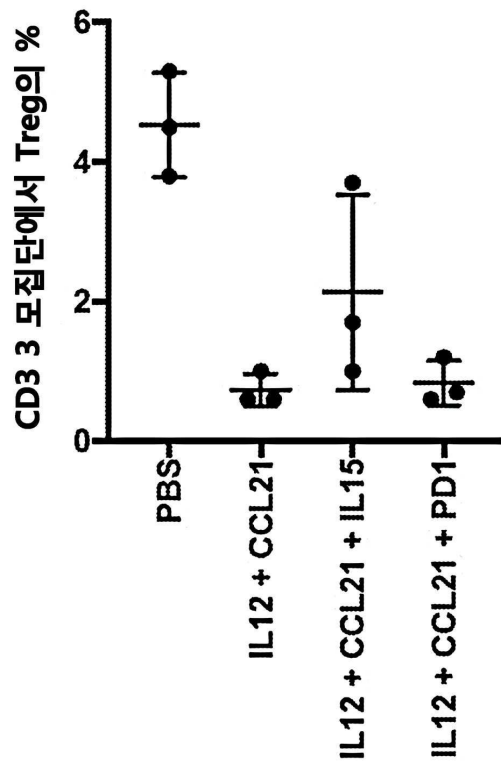
도면18b



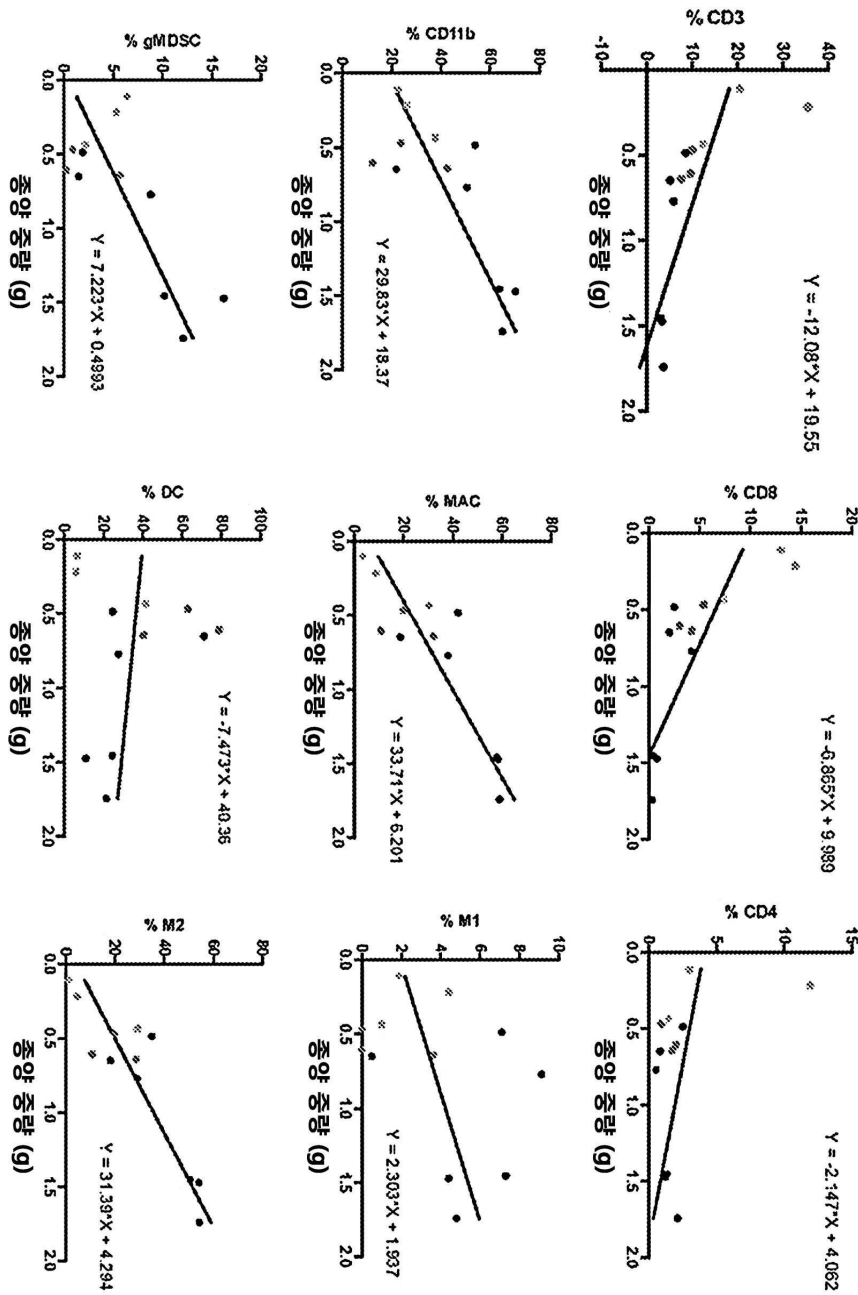
도면18c



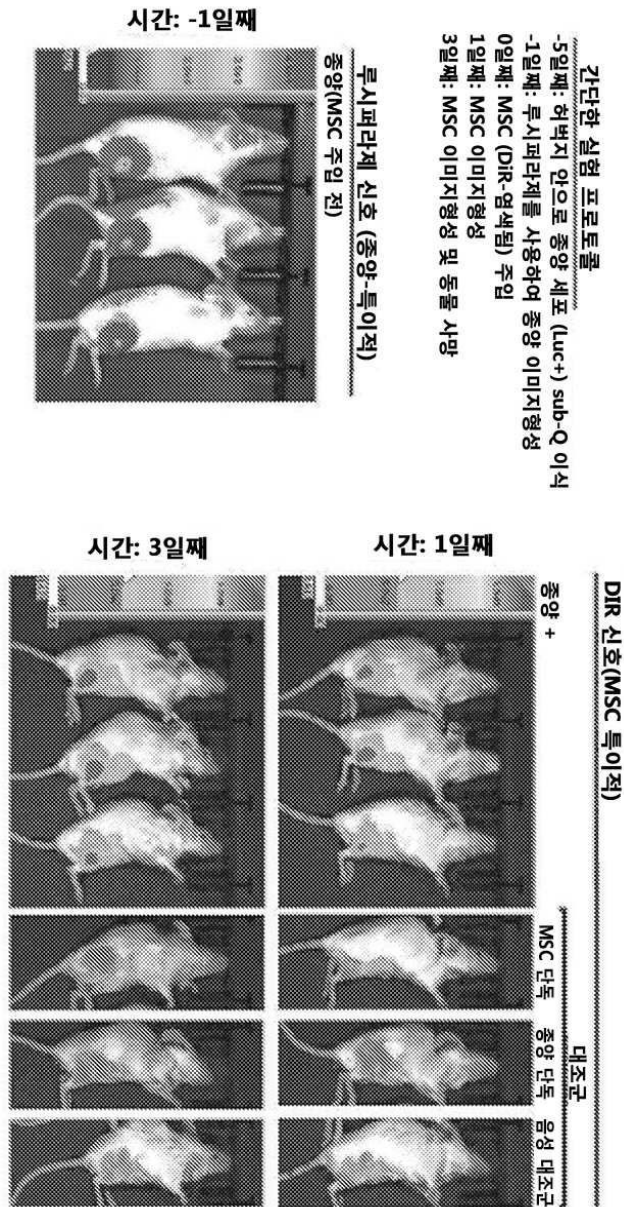
도면18d



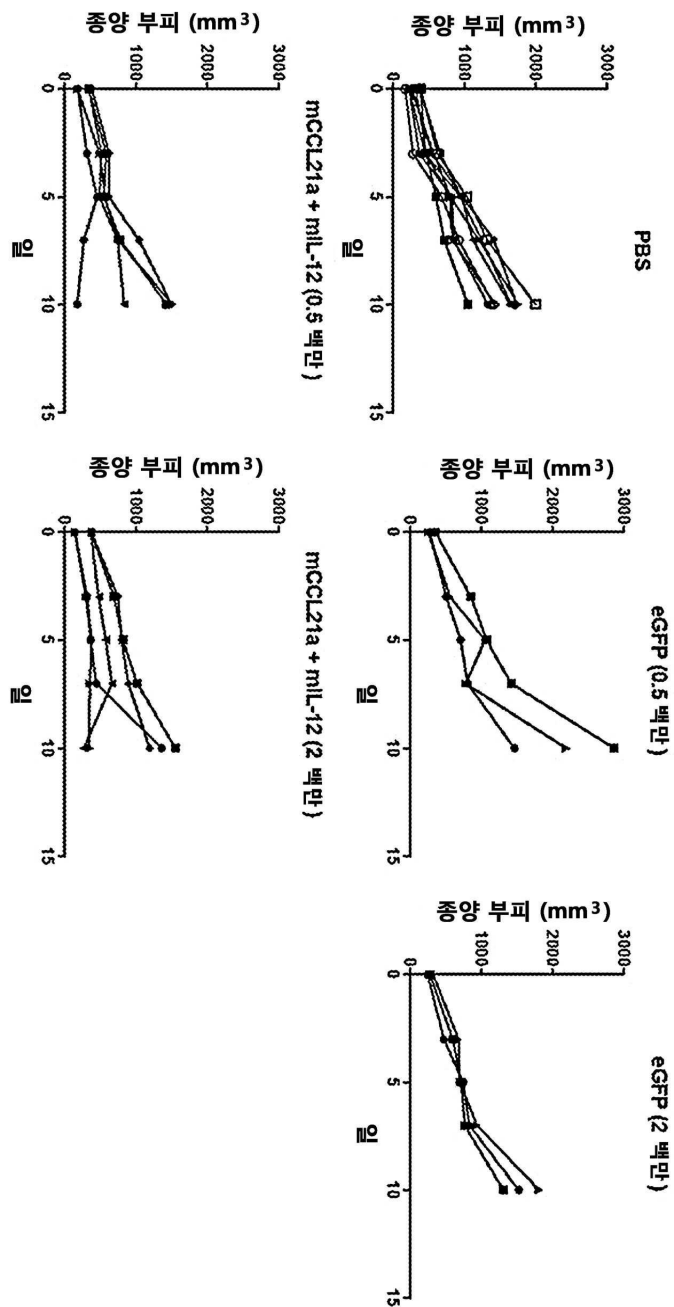
도면18e



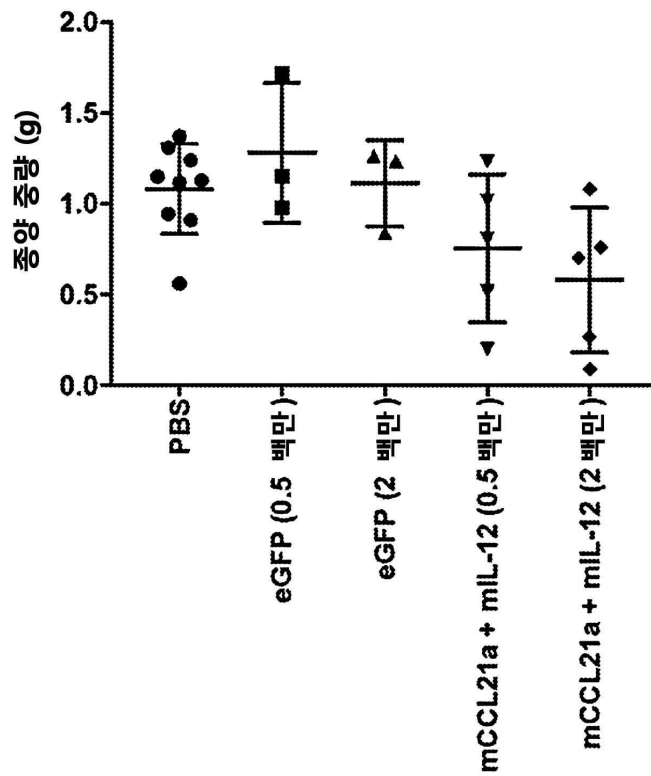
도면19



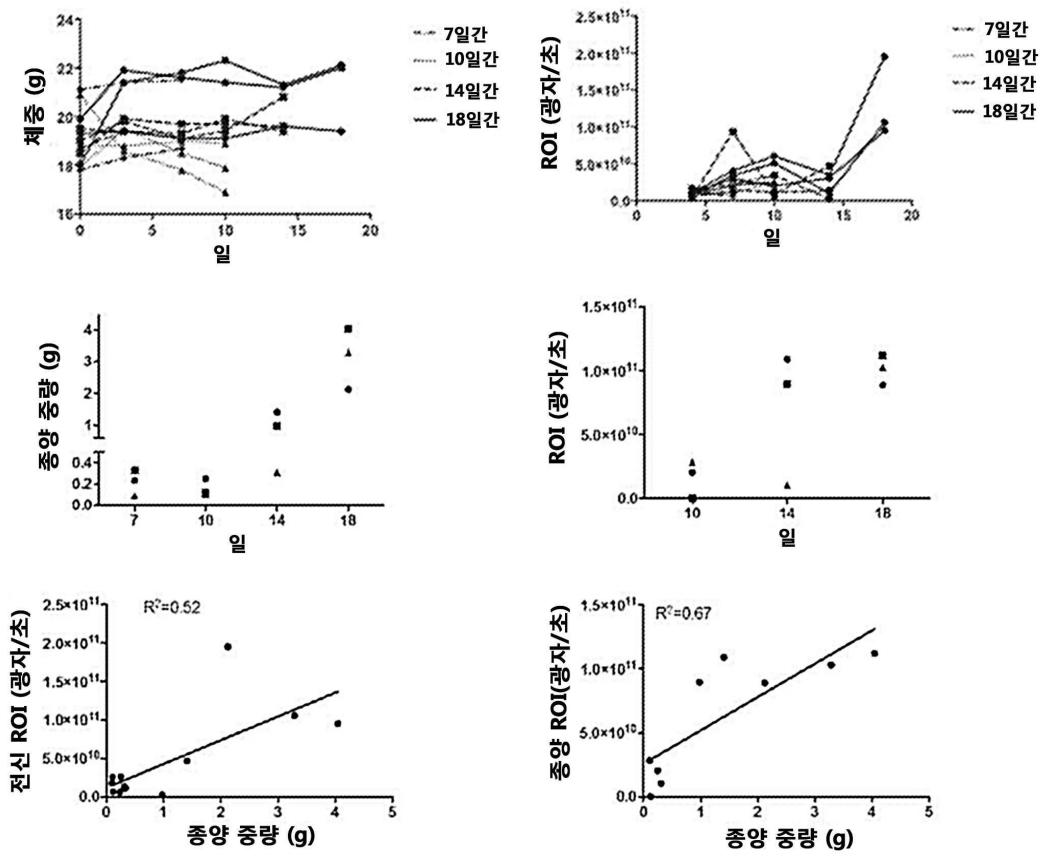
도면20a



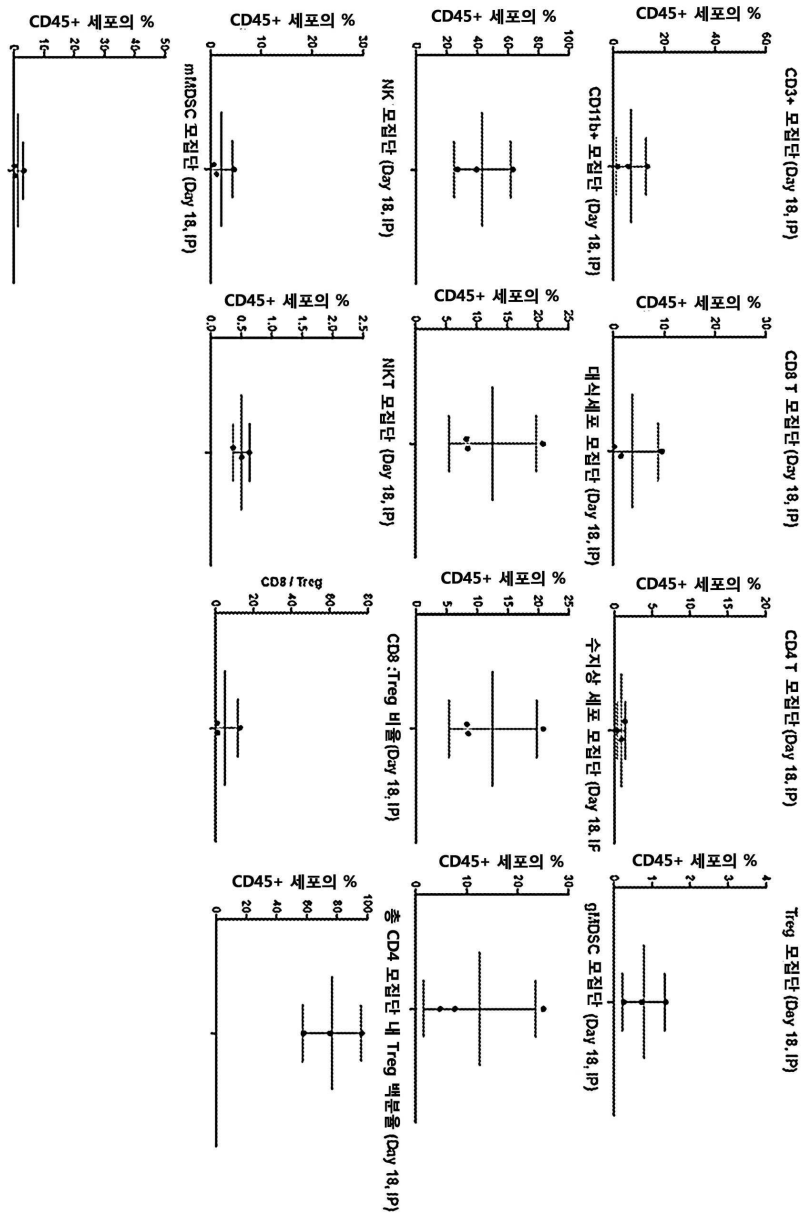
도면20b



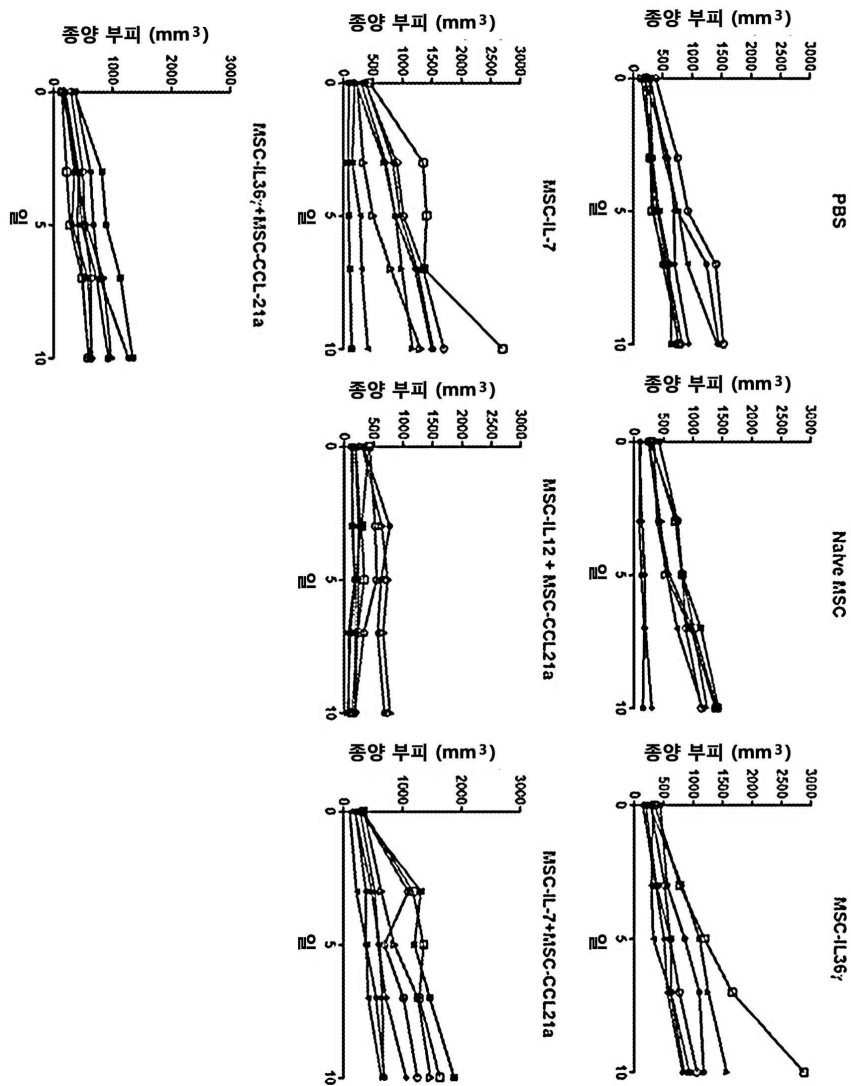
도면21a



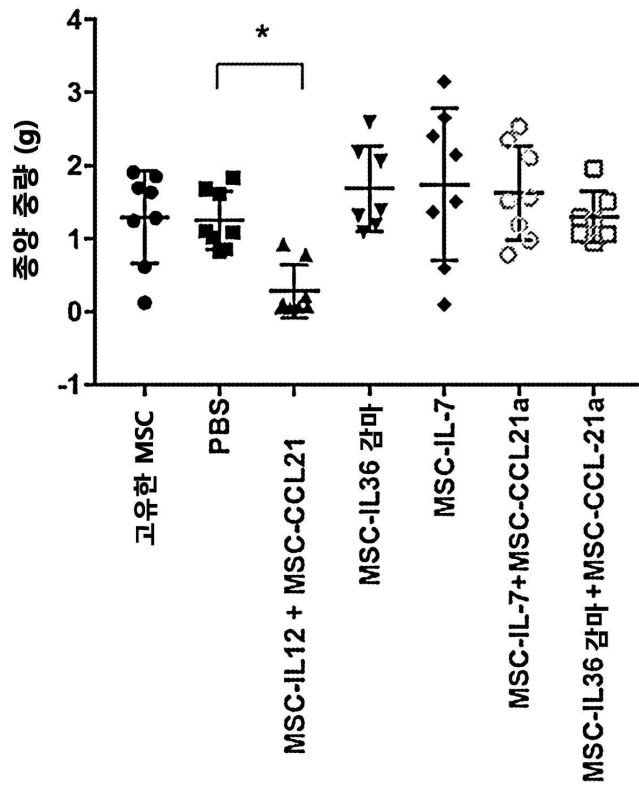
도면21b



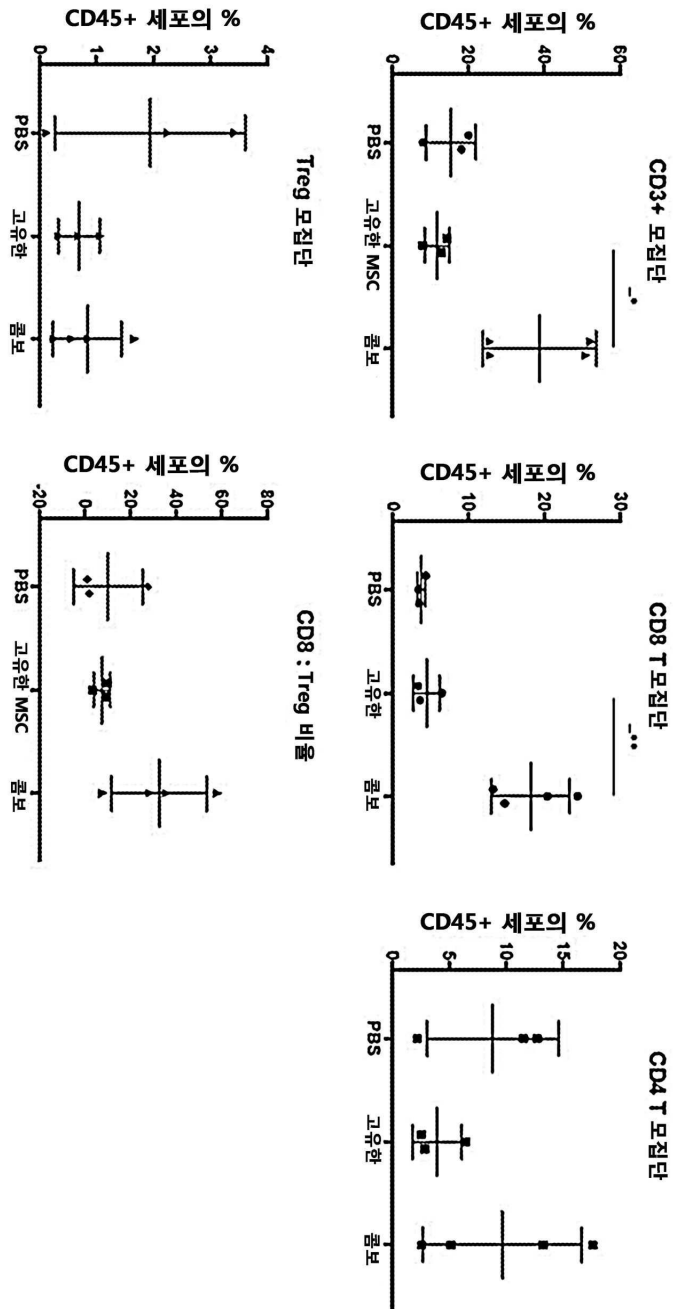
도면22a



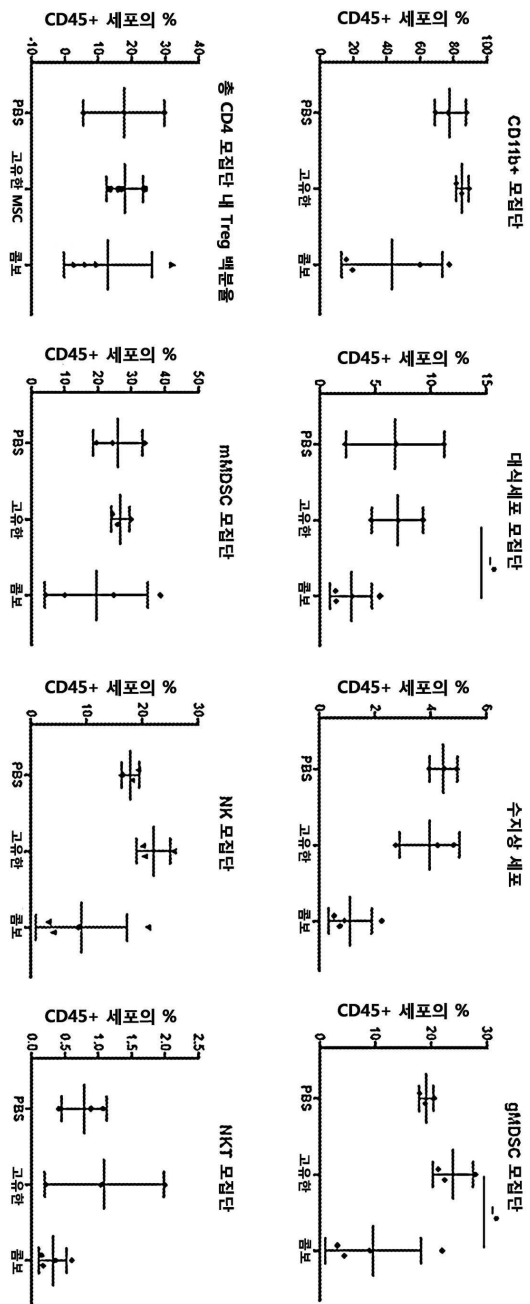
도면22b



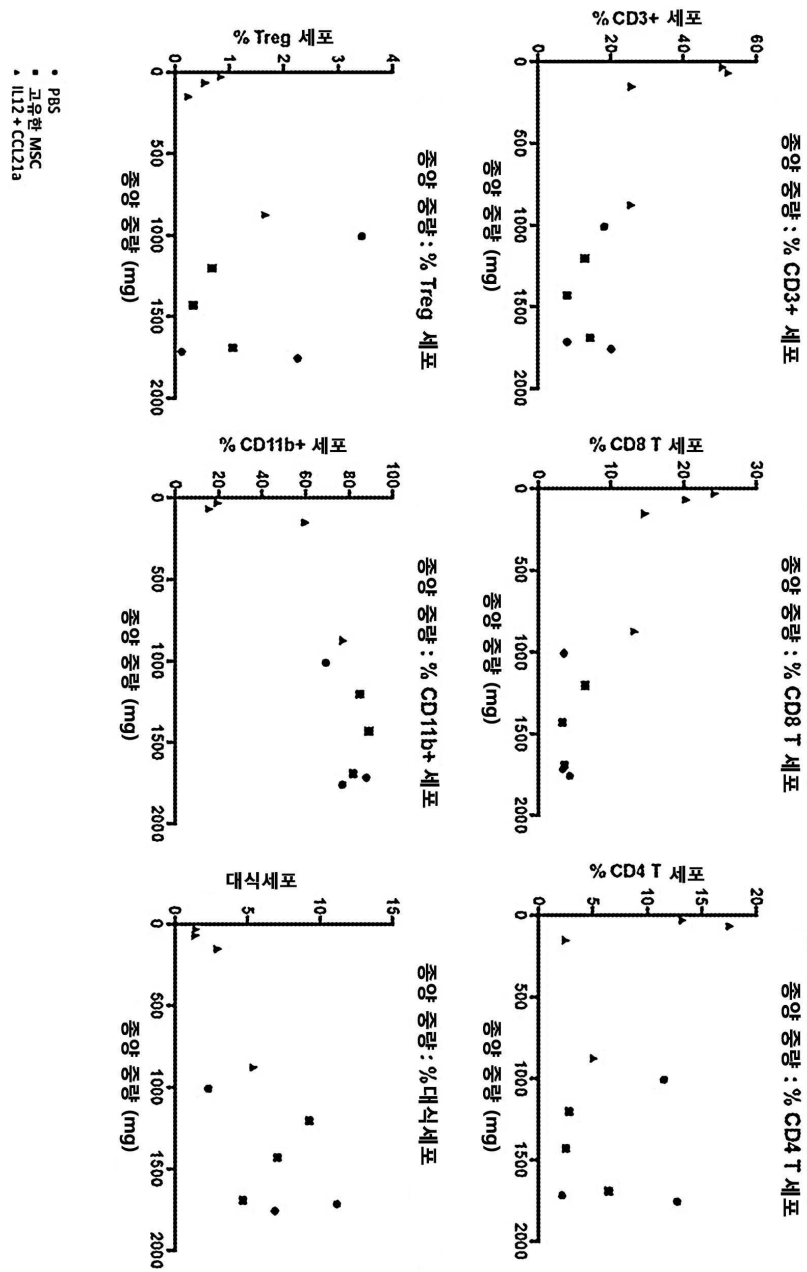
도면23a



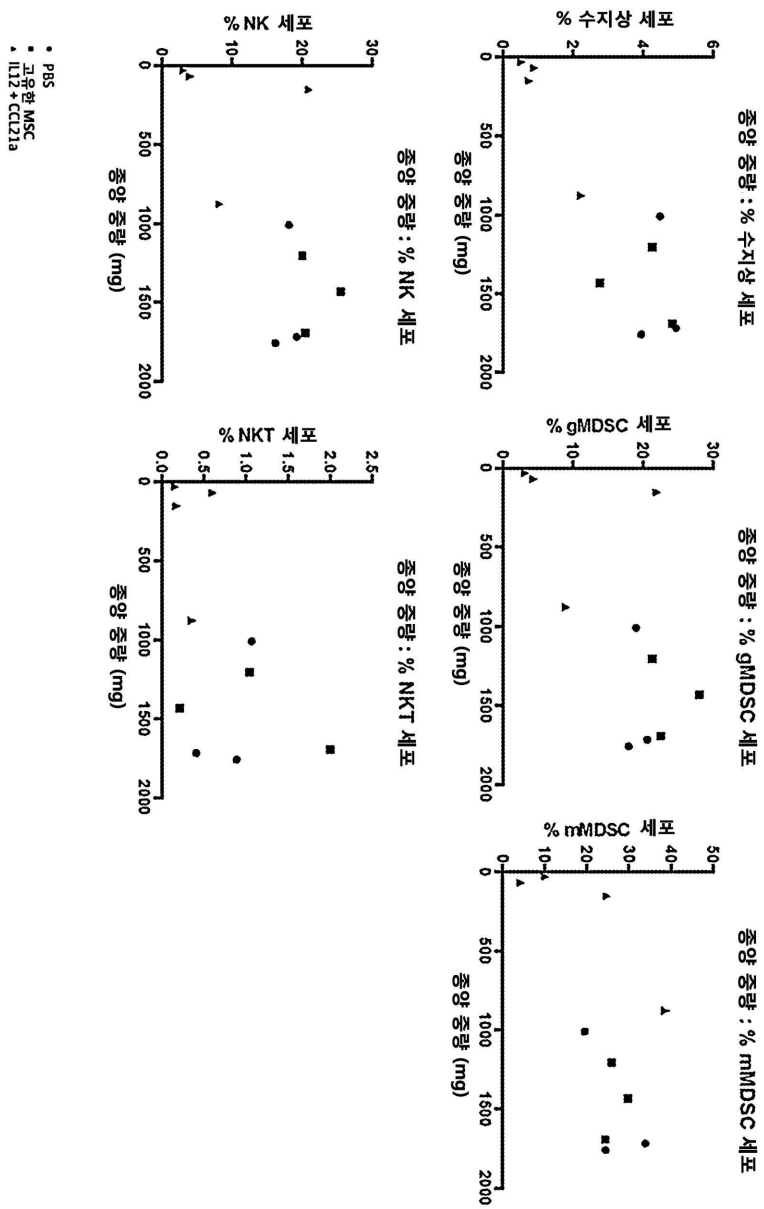
도면23b



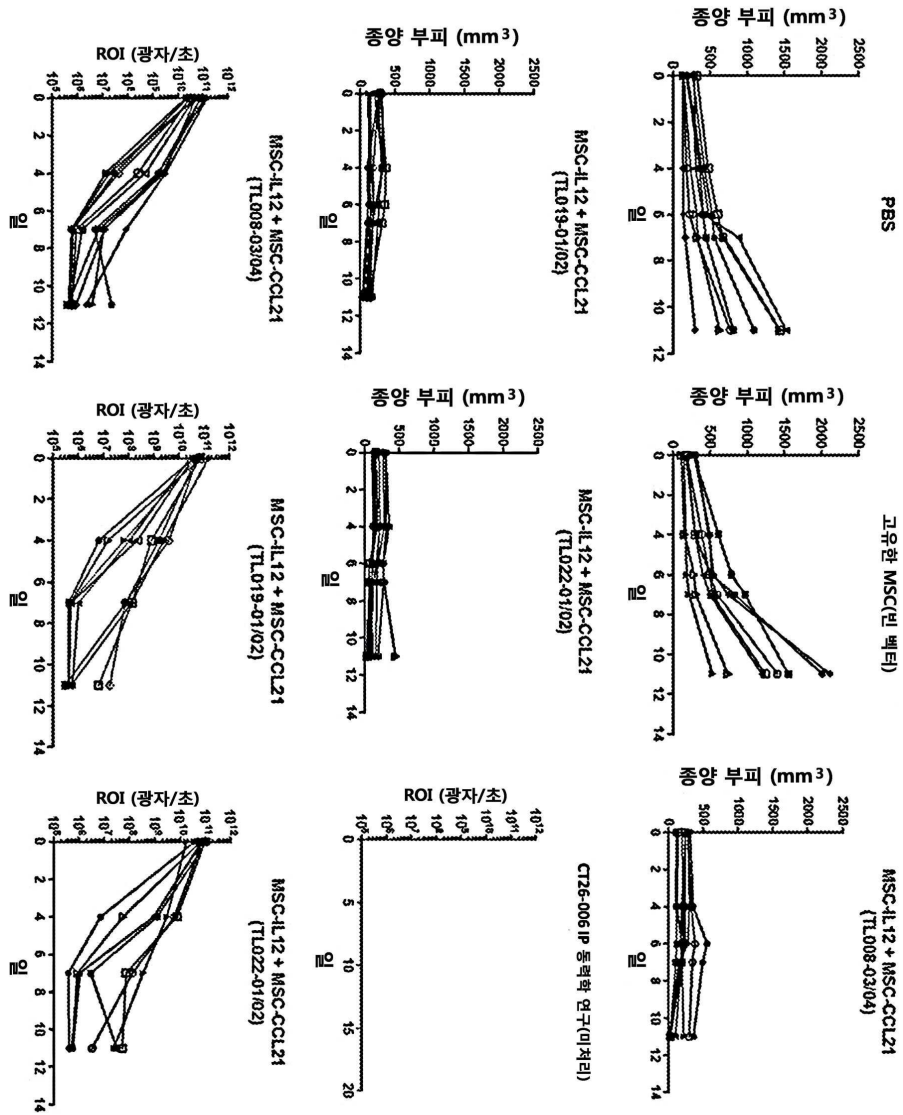
도면24a



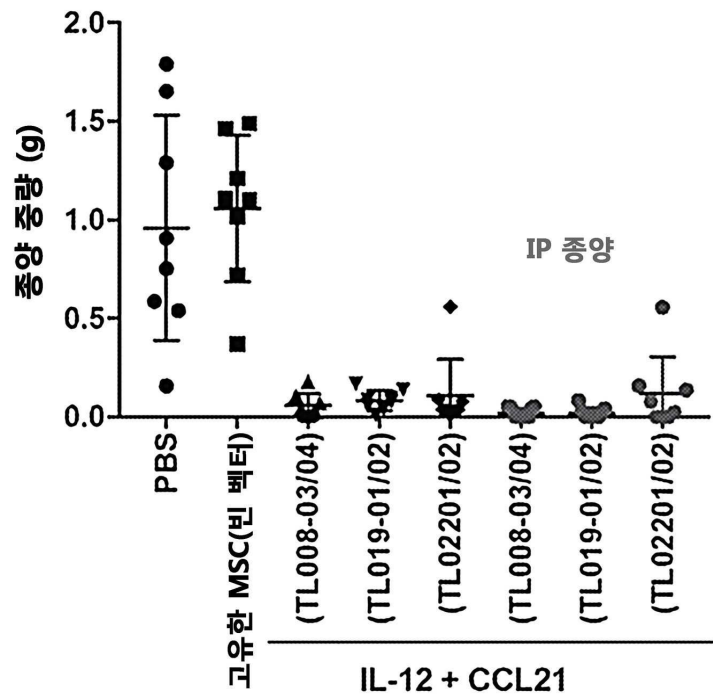
도면24b



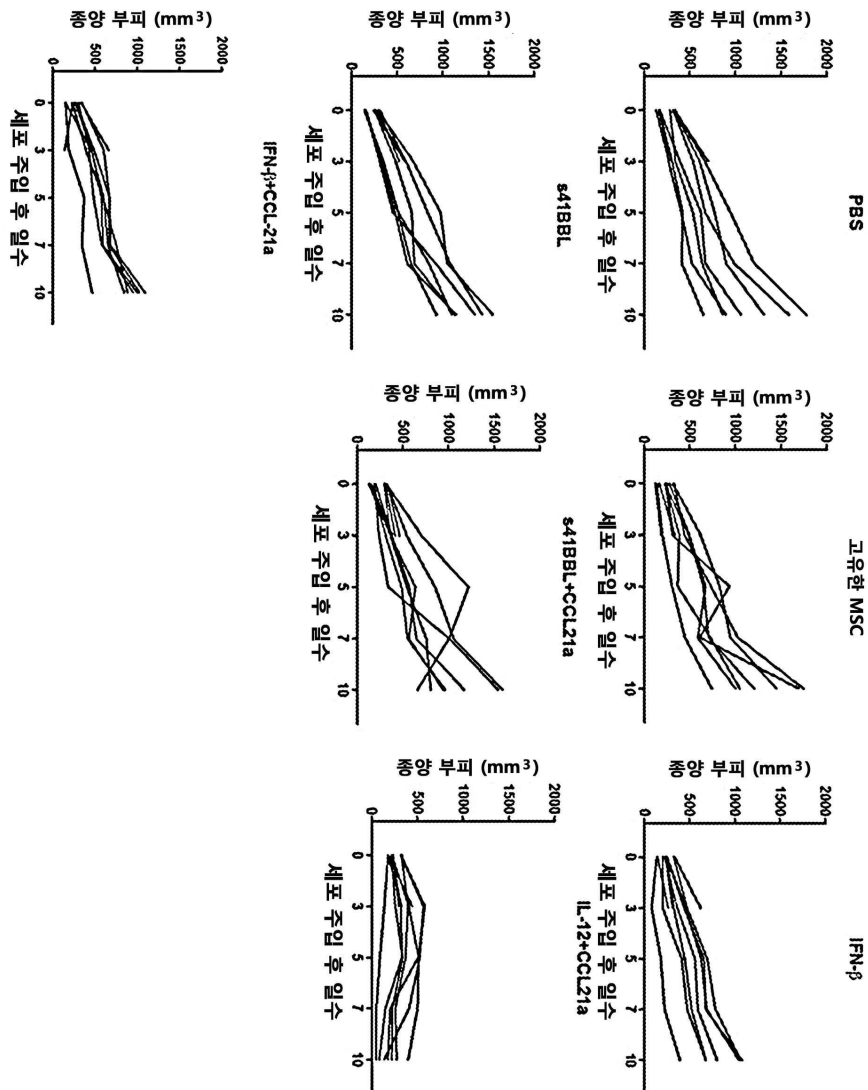
도면25a



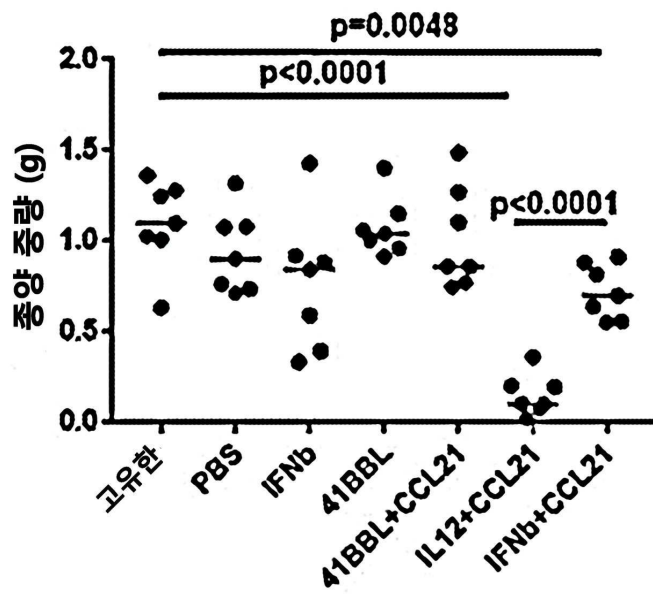
도면25b



도면26a

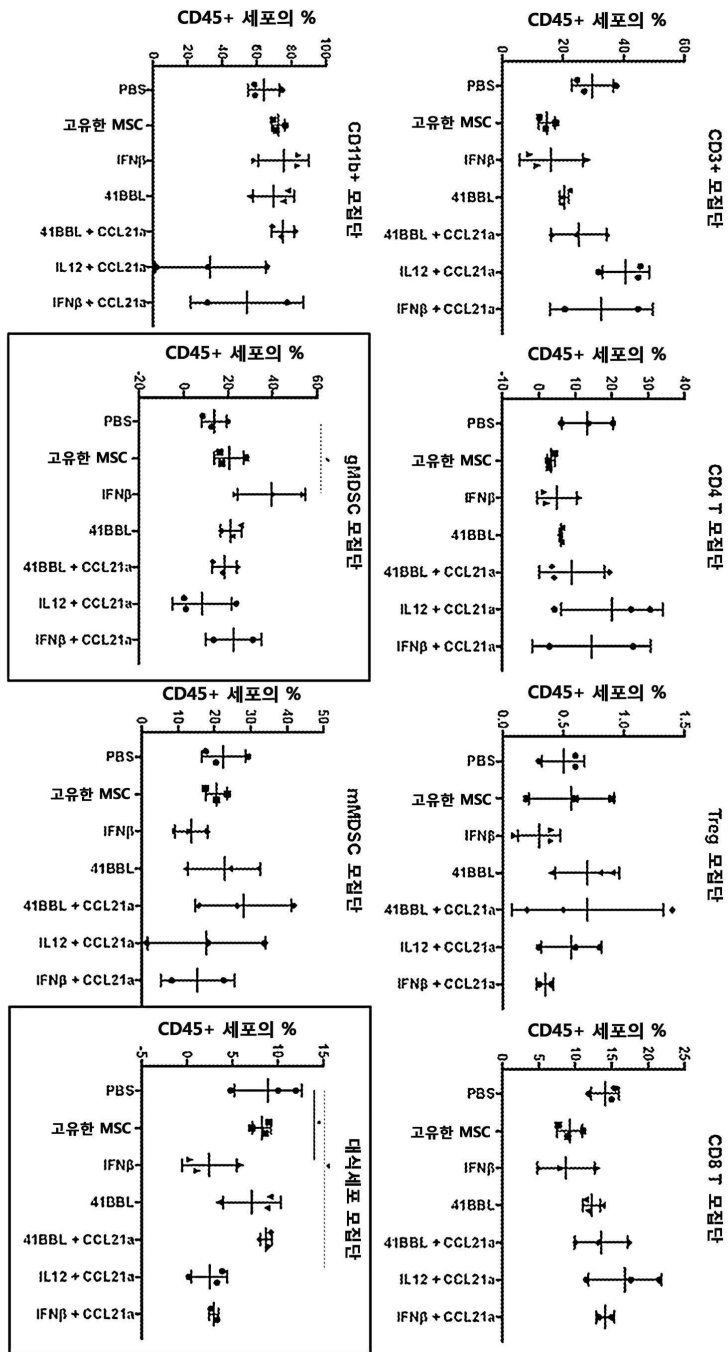


도면26b

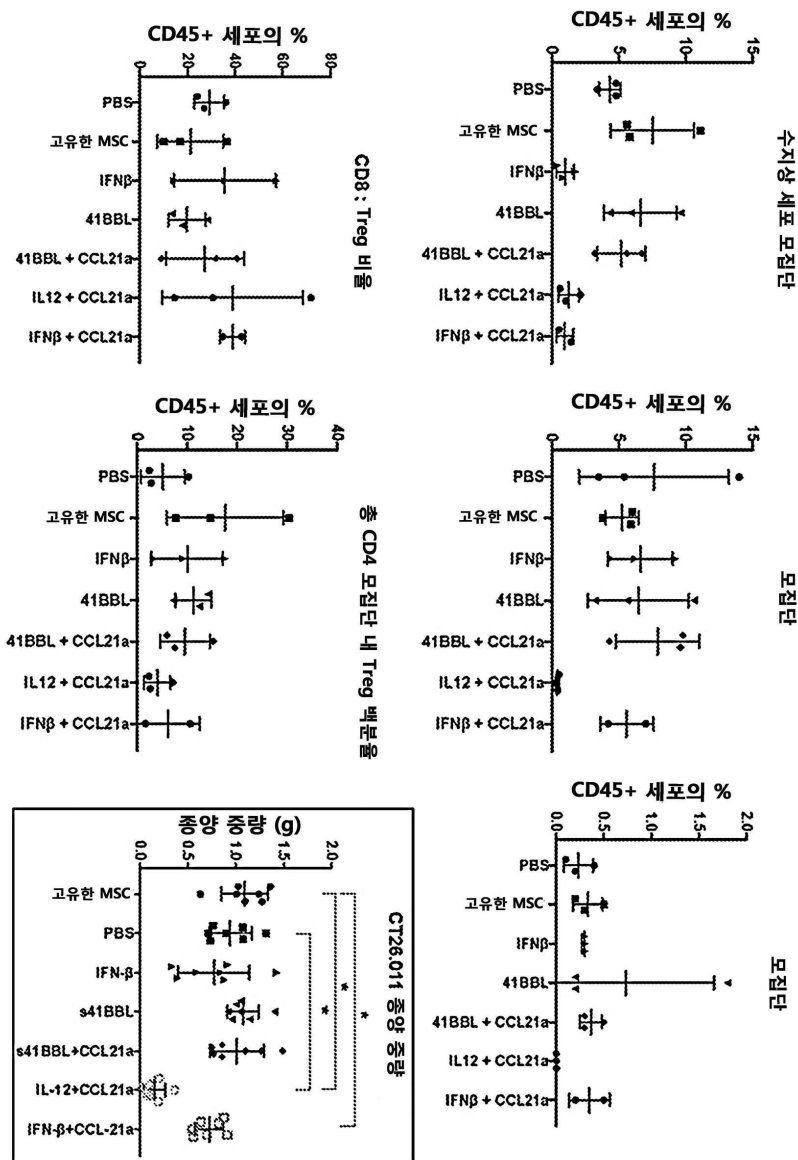


도면27a

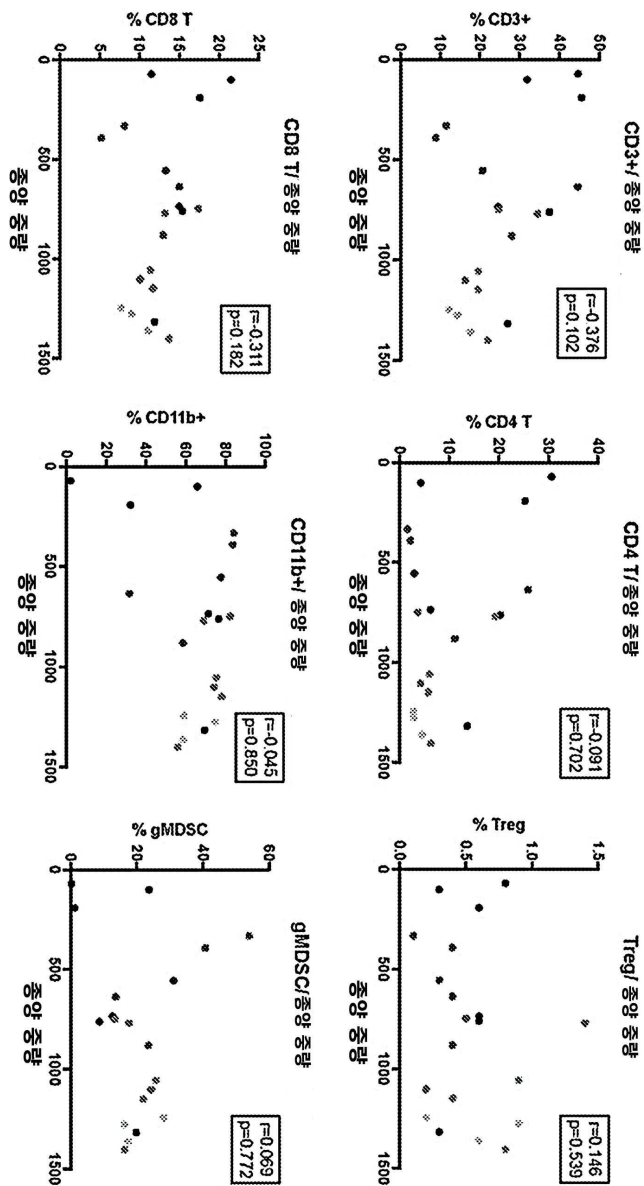
□ 유의량 차이



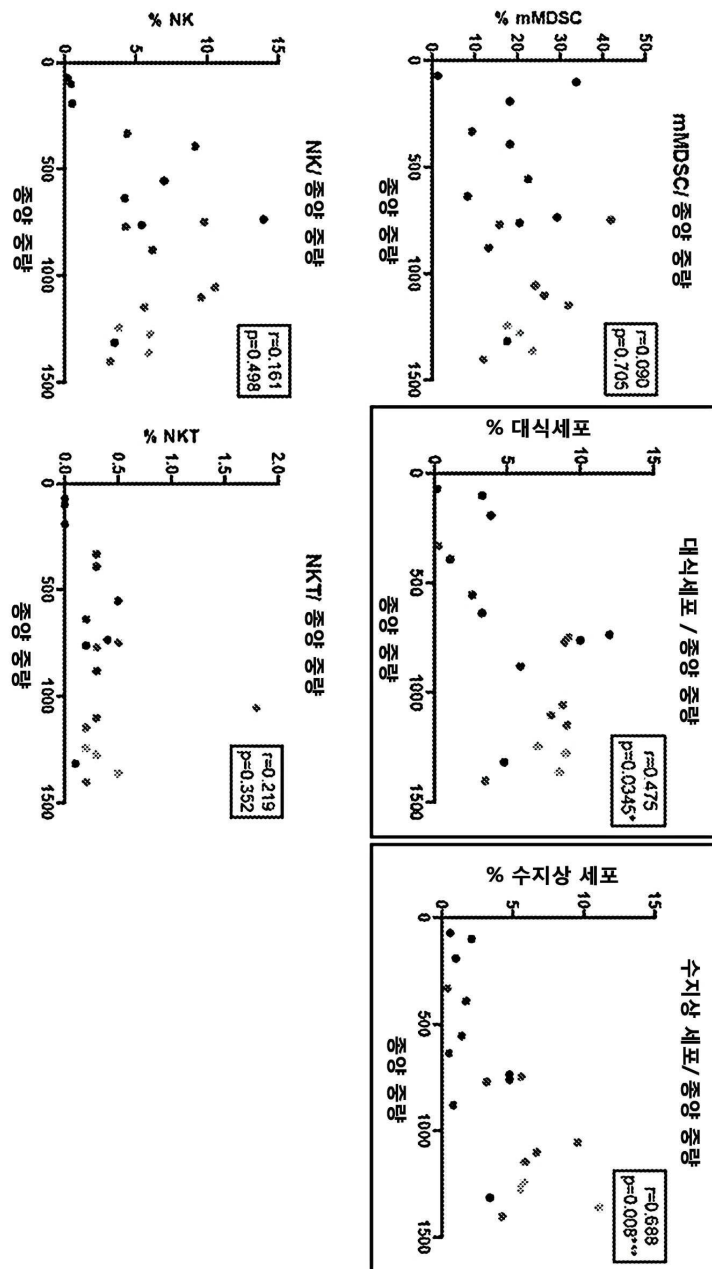
도면27b



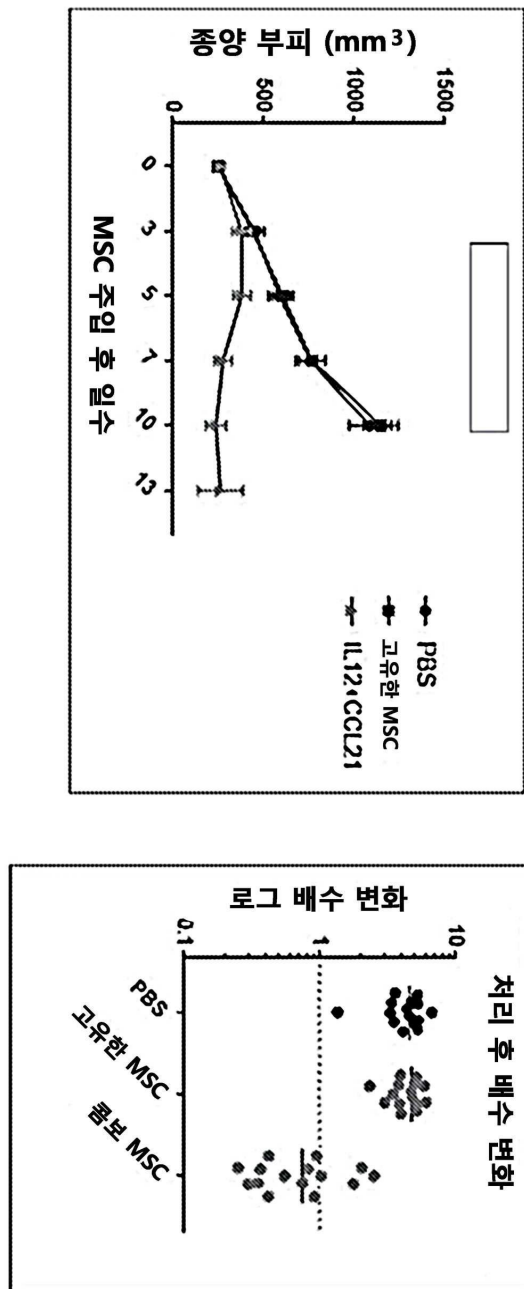
도면28a



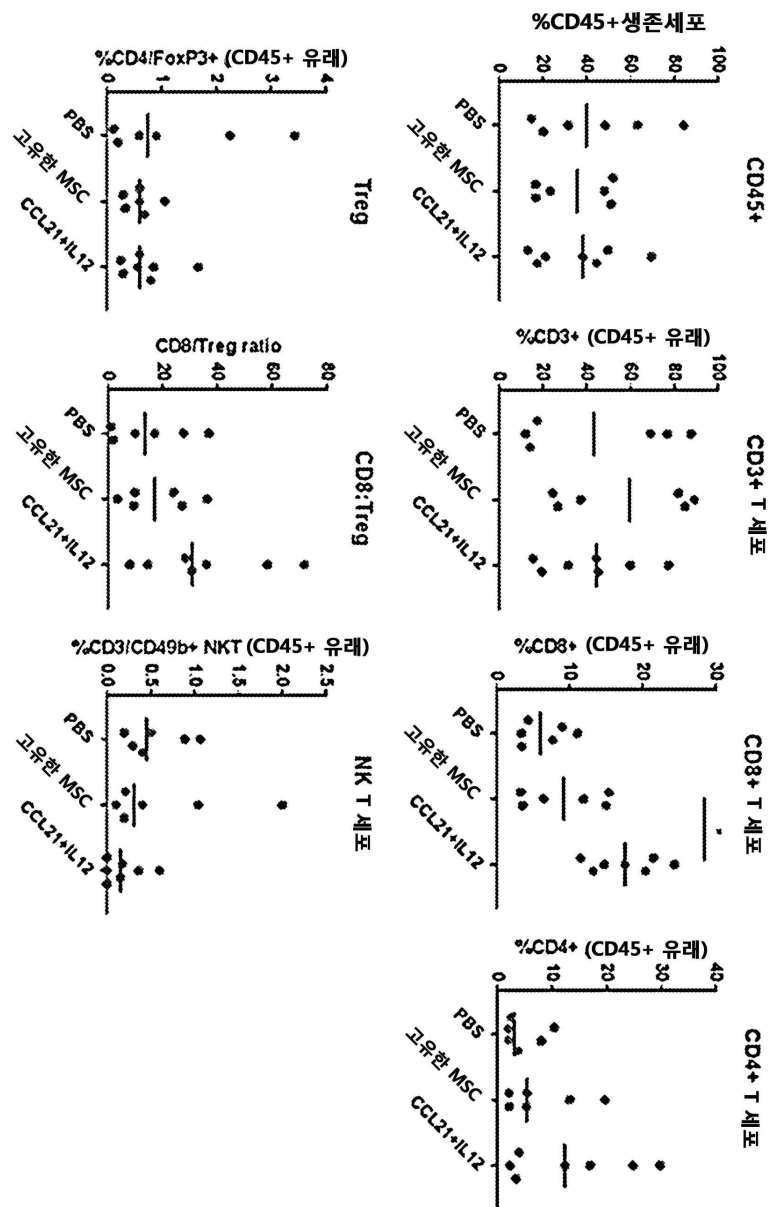
도면28b



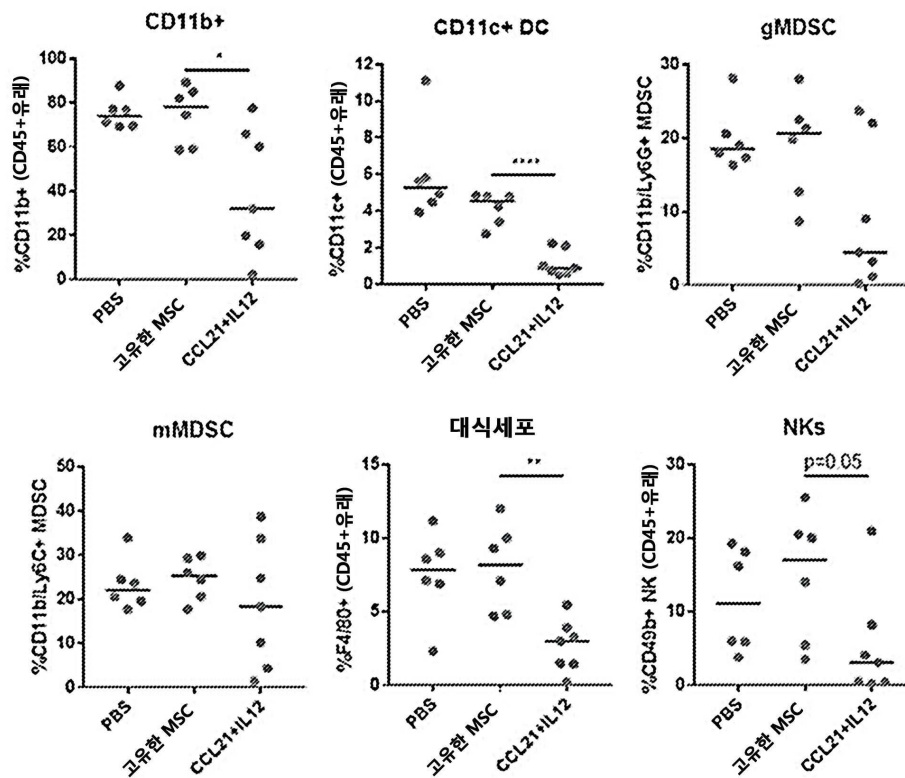
도면29



도면30a



도면30b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Senti Biosciences, Inc.
- <120> COMBINATORIAL CANCER IMMUNOTHERAPY
- <130> S1969.70002W000
- <140> PCT/US2018/027492
- <141> 2018-04-13
- <150> US 62/485,295
- <151> 2017-04-13
- <150> US 62/583,343
- <151> 2017-11-08
- <160> 9
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 588
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 1

gttgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata 60

gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgctt ggctgaccgc 120

ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag 180

ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac ttggcagtac 240

atcaagtgtg tcatatgccg agtacgcccc ctattgacgt caatgacggg aaatggcccc 300

cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg 360

tattagtcat cgctattacc atggatgatgc ggttttggca gtacatcaat gggcgtggat 420

agcggtttga ctacggggga tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtgtgt 480

tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa caactccgcc ccattgacgc 540

aaatgggcgg taggcgtgta cggtgggagg tctatataag cagagctc 588

<210> 2

<211> 544

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 2

ggatctgcga tcgtcccggt gcccgtcagt gggcagagcg cacatcgccc acagtccccg 60

agaagttggg gggaggggtc ggcaattgaa ccggtgccta gagaaggtgg cgcggggtaa 120

actgggaaag tgatgtcgtg tactggctcc gcctttttcc cgagggtggg ggagaaccgt 180

atataagtgc agtagtcgcc gtgaacgttc tttttcgcaa cgggtttgcc gccagaacac 240

agctgaagct tcgaggggct cgcattcttc cttcacgcgc ccgccgcctt acctgaggcc 300

gccatccacg ccggttgagt cgcgttctgc cgcctcccgc ctgttggtgcc tctgaactg 360

cgcccgccgt ctaggtaagt ttaaagctca ggtcgagacc gggcctttgt ccggcgctcc 420

cttggagcct acctagactc agccggctct ccacgctttg cctgaccctg cttgtctaac 480

tctacgtctt tgtttcgttt tctgttctgc gccgttacag atccaagctg tgaccggcgc 540

ctac 544

<210> 3

<211> 399

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 3

tttatttagt ctccagaaaa aggggggaat gaaagacccc acctgtaggt ttggcaagct	60
aggatcaagg ttaggaacag agagacagca gaatatgggc caaacaggat atctgtggt	120
agcagttcct gccccggctc agggccaaga acagttggaa cagcagaata tgggccaac	180
aggatatctg tggtaagcag ttcctgcccc ggctcagggc caagaacaga tggccccag	240
atgcggctcc gccctcagca gtttctagag aaccatcaga tgtttccagg gtgccccag	300
gacctgaaat gaccctgtgc cttatttgaa ctaaccaatc agttcgcttc tcgcttctgt	360
tcgcgcgctt ctgctccccg agctcaataa aagagccca	399

<210> 4

<211> 511

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 4

ggggttgggg ttgcgccttt tccaaggcag cctgggttt gcgcaggac gcggtgctc	60
tgggcgtggt tccgggaaac gcagcggcgc cgaccctggg tctcgacat tcttcacgtc	120
cgttcgcagc gtcacccgga tcttcgccgc tacccttggt ggccccccgg cgacgttcc	180
tgctcgcgcc ctaagtcggg aaggttcctt gcggttcgcg gcgtgccgga cgtgacaaac	240
ggaagccgca cgtctcacta gtaccctcgc agacggacag cgccaggag caatggcagc	300
gcgccgaccg cgatgggctg tggccaatag cggtctctca gcggggcgcg ccgagagcag	360
cgcccgaggaa ggggcggctc gggaggcggg gtgtggggcg gtagtgtggg cctgttcct	420
gccccgcggg tgttcgcgat tctgcaagcc tccggagcgc acgtcggcag tcggtccct	480
cgttgaccga atcaccgacc tctctcccca g	511

<210> 5

<211> 408

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 5

gtaacccat ttgcaaggc atggaaaaat accaaaccaa gaatagagaa gttcagatca	60
---	----

agggcgggta catgaaaata gctaacgttg ggccaaacag gatatctgcg gtgagcagtt	120
tcggccccgg cccggggcca agaacagatg gtcaccgcag ttctggcccc ggcccagaggc	180
caagaacaga tggccccag atatggccca accctcagca gtttcttaag acccatcaga	240
tgtttccagg ctcccccaag gacctgaaat gacctgcgc cttatttgaa ttaaccaatc	300
agcctgttc tcgtttctgt tcgcgcgtt ctgcttcccg agctctataa aagagctcac	360
aaccctcac tcggcgcgcc agtctccga cagactgagt cgcccggg	408
<210> 6	
<211> 344	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic polynucleotide	
<400> 6	
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtga aagtcaccag gtcaccagc aggcagaagt	60
atgcaaagca tgcatctcaa ttagtcagca accagggtgtg gaaagtcacc aggtcccca	120
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgcccta	180
actccgcca tcccgcctt aactccgcc agtccgcc attctccgc ccatggctga	240
ctaattttt ttatttatgc agaggccgag gccgcctctg cctctgagct attccagaag	300
tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa agct	344
<210> 7	
<211> 1229	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic polynucleotide	
<400> 7	
gcgccgggtt ttggcgctc ccgcgggcgc cccctctc acggcgagcg ctgccacgtc	60
agacgaaggg cgcaggagcg ttccgatcc ttccgcccgg acgctcagga cagcgccccg	120
ctgctcataa gactcggcct tagaaccaca gtatcagcag aaggacattt taggacggga	180
cttgggtgac tciagggcac tggttttctt tccagagagc ggaacaggcg aggaaaagta	240
gtcccttctc ggcgattctg cggagggatc tccgtggggc ggtgaacgcc gatgattata	300
taaggacgcg ccgggtgtgg cacagctagt tccgtcgcag ccgggatttg ggtcgcggtt	360
cttgtttgtg gatcgctgtg atcgtcactt ggtgagttgc gggctgctgg gctggccggg	420
gctttcgtgg ccgccgggcc gctcgggtgg acggaagcgt gtggagagac cgccaagggc	480

ttagtcttgg gtccgcgagc aaggttgccc tgaactgggg gttgggggga gcgcacaaaa 540

 tggcggtctgt tcccagagct tgaatggaag acgcttgtaa ggccggctgt gaggtcgttg 600
 aaacaagggtg gggggcatgg tgggcggcaa gaaccaagg tcttgaggcc ttcgctaattg 660
 cgggaaagct cttattcggg tgagatgggc tggggcacca tctggggacc ctgacgtgaa 720
 gtttgcact gactggagaa ctccgggtttg tcgtctggtt gcgggggcgg cagttatgcg 780
 gtgccgttgg gcagtgcacc cgtacctttg ggagcgcgcg cctcgtcgtg tcgtgacgtc 840
 acccgttctg ttggcttata atgcagggtg ggccacactg ccggtagggtg tgcggtaggc 900
 ttttctccgt cgcaggacgc aggggttcggg cctagggtag gctctcctga atcgacaggc 960

 gccggacctc tggtaggggg agggataagt gaggcgtcag tttctttggt cggttttatg 1020
 tacctatctt ctttaagtagc tgaagctccg gttttgaact atgcgctcgg ggttggcgag 1080
 tgtgttttgt gaagtttttt aggcaccttt tgaatatgaa tcatttgggt caatatgtaa 1140
 ttttcagtgt tagactagta aagcttctgc aggtcgactc tagaaaattg tccgctaaat 1200
 tctggccgtt tttggctttt ttgtagac 1229

 <210> 8
 <211> 6029
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 8

 acgcgtgtag tcttatgcaa tactcttgta gtcttgcaac atggtaacga tgagtttagca 60

 acatgcctta caaggagaga aaaagcaccg tgcattccga ttggtggaag taagggtgta 120
 cgatcgtgcc ttattaggaa ggcaacagac gggctctgaca tggattggac gaaccactga 180
 attgccgat tgcagagata ttgtatttaa gtccctagct cgatacaata aacgggtctc 240
 tctggttaga ccagatctga gcctgggagc tctctggcta actagggaac cactgctta 300
 agcctcaata aagcttgcc ttagtgcttc aagtagtgtg tgcccgctctg ttgtgtgact 360
 ctggttaacta gagatccctc agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg 420
 cccgaacagg gacctgaaag cgaaaggga accagagctc tctcgacgca ggactcggct 480

 tgctgaagcg cgcacggcaa gaggcgaggg gcggcgactg gtgagtacgc caaaaatttt 540
 gactagcggg ggctagaagg agagagatgg gtgcgagagc gtcagtatta agcgggggag 600
 aattagatcg cgatgggaaa aaattcgggt aaggccaggg ggaaagaaaa aatataaatt 660
 aaaacatata gtatgggcaa gcaggagct agaacgattc gcagttaatc ctggcctgtt 720

agaaacatca gaaggctgta gacaaatact gggacagcta caaccatccc ttcagacagg 780
 atcagaagaa cttagatcat tataataac agtagcaacc ctctattgtg tgcataaag 840
 gatagagata aaagacacca aggaagcttt agacaagata gaggaagagc aaaacaaaag 900

 taagaccacc gcacagcaag cggccactga tcttcagacc tggaggagga gatatgaggg 960
 acaattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca ttaggagtag 1020
 caccaccaa ggcaaagaga agagtgggtc agagagaaaa aagagcagtg ggaataggag 1080
 ctttgttctt tgggttcttg ggagcagcag gaagcactat gggcgagcc tcaatgacgc 1140
 tgacgttaca ggccagacaa ttattgtctg gtatagtga gcagcagaac aatttgctga 1200
 gggctattga ggcgcaacag catctgttgc aactcacagt ctggggcatc aagcagctcc 1260
 aggcaagaat cctggctgtg gaaagatacc taaaggatca acagctcctg gggatttggg 1320

 gtgtctctgg aaaactcatt tgcaccactg ctgtgccttg gaatgctagt tggagtaata 1380
 aatctctgga acagattgga atcacacgac ctggatggag tgggacagag aaattaacaa 1440
 ttacacaagc ttaatacact ccttaattga agaatcgcaa aaccagcaag aaaagaatga 1500
 acaagaatta ttggaattag ataaatgggc aagtttgtgg aattggttta acataacaaa 1560
 ttggctgtgg tatataaaat tattcataat gatagtagga ggcttggtag gtttaagaat 1620
 agtttttgcg gtactttcta tagtgaatag agttaggcag ggatattcac cattatcgtt 1680
 tcagaccac ctccaaccc cgagggggacc cgacaggccc gaaggaatag aagaagaagg 1740

 tggagagaga gacagagaca gatccattcg attagtgaac ggatctcgac ggtatcggtt 1800
 aacttttaaa agaaaagggg ggattggggg gtacagtga ggggaaagaa tagtagacat 1860
 aatagcaaca gacatacaaa ctaaagaatt acaaaaacaa attacaaaa tcaaaatttt 1920
 atctcgacat ggtggcgacc ggtagcgcta gcggatcgat aagcttgata tcgcctgcag 1980
 ccgaattcct tgacttggga tccgcgtcaa gtggagcaag gcaggtggac agtcctgcag 2040
 gcatgcgtga ctgactgagg ccgcgactct agtttaact gcgtgactga ctctagaaga 2100
 tccggcagtg cgcccgctc gacaatcaac ctctggatta caaaatttgt gaaagattga 2160

 ctggtattct taactatgtt gctcctttta cgctatgttg atacgtgct ttaatgcctt 2220
 tgtatcatgc tattgttcc cgtatggctt tcattttctc ctcttgtat aaatcctggt 2280
 tgctgtctct ttaagaggag ttgtggcccg ttgtcaggca acgtggcgtg gtgtgactg 2340
 tgtttgctga cgcaaccccc actggttggg gcattgccac cacctgtcag ctctttccg 2400
 ggactttcgc tttccccctc cctattgcca cggcggaact catcgccgc tgccttgccc 2460
 gctgctggac aggggctcgg ctgttgggca ctgacaattc cgtggtgttg tcggggaaat 2520

catcgtcctt tccttggctg ctgcctgtg ttgccacctg gattctgcgc gggacgtcct	2580
tctgctacgt cccttcggcc ctcaatccag cggaccttcc ttcccgcggc ctgctgccgg	2640
ctctgcggcc tcttcgcgt cttgccttc gccctcagac gagtcggatc tccctttggg	2700
ccgcctcccc gcctggtacc tttaagacca atgacttaca aggcagctgt agatcttagc	2760
cactttttaa aagaaaagg gggactggaa gggctaattc actcccaacg aaaataagat	2820
ctgctttttg cttgtactgg gtctctctgg ttagaccaga tctgagcctg ggagctctct	2880
ggctaactag ggaaccact gcttaagcct caataaagct tgccttgagt gcttcaagta	2940
gtgtgtgccc gtctgttggt tgactctggt aactagagat cctcagacc cttttagtca	3000
gtgtggaaaa tccttagcag tagtagttca tgcacttta ttattcagta ttataactt	3060
gcaaagaaat gaatatcaga gagtgagagg aacttgttta ttgcagctta taatggttac	3120
aaataaagca atagcatcac aaatttcaca aataaagcat ttttttact gcattctagt	3180
tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct tatcatgtct ggctctagct atcccccccc	3240
taactccgcc cagttccgcc cattctccgc cccatggctg actaatTTTT tttatttatg	3300
cagaggccga ggccgcctcg gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg	3360
gaggcctaga cttttgcaga gacggcccaa attcgtaac atggctatag ctgtttcctg	3420
tgtgaaattg ttatccgtc acaattccac acaacatacg agccggaagc ataaagtga	3480
aagcctgggg tgcctaatga gtgagctaac tcacattaat tgcgttgcgc tctactgccc	3540
ctttccagtc gggaacctg tcgtgccagc tgcattaatg aatcgccaa cgcgcgggga	3600
gaggcggttt gcgtattggg cgctcttcg cttcctcgct cactgactcg ctgcgtcgg	3660
tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag	3720
aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc	3780
gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac gagcatcaca	3840
aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt	3900
ttccccctgg aagctccctc gtgcgtctc ctgttccgac cctgccgctt accggatacc	3960
tgtccgctt tctccctcg ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc ttaggtatc	4020
tcagttcgtt gtaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaacc cccgttcagc	4080
ccgaccgtg cgcttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact	4140
tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggat gtaggcggtg	4200
ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaaggaca gtatttggtg	4260

tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca 4320
aacaaccac cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa 4380
aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct ttctacggg gtctgacgct cagtggaaacg 4440
aaaactcacg ttaagggaatt ttggcatga gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc 4500
ttttaatta aaaaagaagt tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa acttggtctg 4560
acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta ttctgttcat 4620
ccatagttag ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat acgggagggc ttaccatctg 4680

gccccagtgc tgcaatgata ccgcgagacc cacgtcacc ggctccagat ttatcagcaa 4740
taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtgggcc tgcaacttta tccgcctcca 4800
tccagtctat taattgttgc cgggaagcta gagtaagtag ttcgccagtt aatagtttgc 4860
gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg tgggtgtcacg ctctgtcttt ggtatggctt 4920
cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg atccccatg ttgtgcaaaa 4980
aagcggtag ctcttcggc cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat 5040
cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct 5100

tttctgtgac tggtagaglac tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga 5160
gttgcctttg cccggcgta atacgggata ataccgcgc acatagcaga actttaaaag 5220
tgctcatcat tgaaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta ccgtgttga 5280
gatccagttc gatgtaacce actcgtgcac ccaactgatc ttcagcatct ttactttca 5340
ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggg 5400
cgacacggaa atgttgaata ctcatactct tcctttttca atattattga agcatttatc 5460
agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag 5520

gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgt ctaagaaacc attattatca 5580
tgacattaac ctataaaaat aggcgtatca cgaggccctt tcgtctcgcg cgtttcgggtg 5640
atgacggtga aaacctctga cacatgcagc tcccggagac ggtcacagct tgtctgtaag 5700
cggatgccgg gagcagacaa gcccgtcagg gcgcgtcagc ggggtgttggc ggggtgtcggg 5760
gctggcttaa ctatgcggca tcagagcaga ttgtactgag agtgcacat atgcggtgtg 5820
aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcacag gcgccattcg ccattcaggc 5880
tgcgcaactg ttgggaaggc cgatcgggtc gggcctcttc gctattacgc cagctggcga 5940

aagggggatg tgctgcaagg cgattaagtt gggtaacgcc agggttttcc cagtcacgac 6000
gttgtaaaac gacggccagt gccaaagctg 6029

<210> 9

<211> 1179

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 9

ggctccggtg cccgtcagtg ggcagagcgc acatcgccca cagtccccga gaagttgggg	60
ggaggggtcg gcaattgaac cgggtgcctag agaaggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt	120
gatgccgtgt actggctccg cctttttccc gaggtgggg gagaaccgta tataagtgca	180
gtagtgcgcg tgaacgttct ttttcgcaac gggtttgccg ccagaacaca ggtaagtgcc	240
gtgtgtgggt cccgcgggcc tggcctcttt acgggttatg gcccttgcgt gccttgaatt	300
acttccacct ggctgcagta cgtgattctt gatcccgagc ttcgggttgg aagtgggtgg	360
gagagttcga ggccttgcgc ttaaggagcc ccttcgcctc gtgcttgagt tgaggcctgg	420
cctgggcgct ggggccgccc cgtgcgaatc tggcggcacc ttcgcgcctg tctcgtgct	480
ttcgataagt ctctagccat ttaaaatttt ttagtacctg ctgcgacgt ttttttctgg	540
caagatagtc ttgtaaatgc gggccaagat ctgcacactg gtatttcggt ttttggggcc	600
gcgggcggcg acggggcccc tgcgtcccag cgcacatgtt cggcgaggcg gggcctgcga	660
gcgcgaccac cgagaatcgg acgggggtag tctcaagctg gccggcctgc tctggtgcct	720
gtcctcgcgc cgccgtgtat cgccccgcc cgggcggaac ggctggccc gtcggcacca	780
gttgcgtgag cggaaagatg gccgttccc ggtcctgctg caggagctc aaaatggagg	840
acgcggcgct cgggagagcg ggcgggtgag tcaccacac aaaggaaaag ggcctttccg	900
tcctcagccg tcgttcatg tgactccacg gactaccggg cgccgtccag gcacctgat	960
tagttctcga gcttttggag tacgtcgtct ttaggttggg gggaggggtt ttatgcgatg	1020
gagtttcccc acactgagtg ggtggagact gaagttaggc cagcttgca cttgatgtaa	1080
ttctccttgg aatttgcct tttttagttt ggatcttgg tcatctcaa gcctcagaca	1140
gtggttcaaa gttttttct tccatttcag gtgtcgtga	1179