



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년10월24일

(11) 등록번호 10-2721222

(24) 등록일자 2024년10월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
**A61K 35/17** (2015.01) **A61P 31/12** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01) **C12N 5/0783** (2010.01)
- (52) CPC특허분류  
**A61K 35/17** (2023.05)  
**A61P 31/12** (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7030695(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2019년07월01일  
 심사청구일자 2023년09월08일
- (85) 번역문제출일자 2023년09월08일
- (65) 공개번호 10-2023-0133942
- (43) 공개일자 2023년09월19일
- (62) 원출원 특허 10-2021-7003409  
 원출원일자(국제) 2019년07월01일  
 심사청구일자 2021년02월03일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2019/040145
- (87) 국제공개번호 WO 2020/014029  
 국제공개일자 2020년01월16일
- (30) 우선권주장  
 62/696,131 2018년07월10일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
 US20170029777 A1

- (73) 특허권자  
 이뮤너티바이오, 인크.  
 미국 90232 캘리포니아주 컬버 시티 제퍼슨 블러  
 마드 9920
- (72) 발명자  
 두갈, 로히트  
 미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 존 홉킨스 코  
 트 3530 난트케이웨스트, 인크. 내  
 신하, 란지트  
 미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 존 홉킨스 코  
 트 3530 난트케이웨스트, 인크. 내
- (74) 대리인  
 양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 21 항

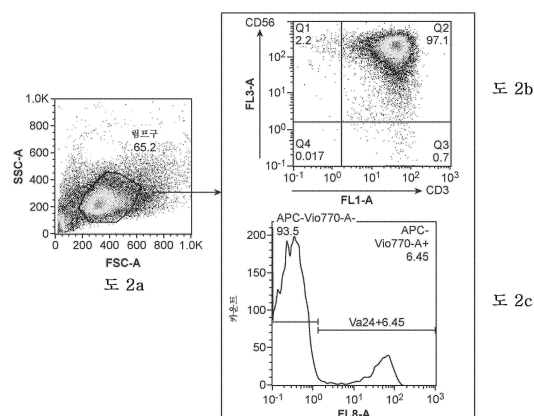
심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 제대혈로부터 CIK NKT 세포의 생성

## (57) 요약

CIK NKT 세포를 배양하기 위한 방법 및 맞춤형 배지 조성물이 본원에서 제공된다.

## 대표도



(52) CPC특허분류

**A61P 35/00** (2018.01)

**C12N 5/0646** (2023.05)

C12N 2501/2302 (2013.01)

C12N 2501/2307 (2013.01)

C12N 2501/2315 (2013.01)

C12N 2501/26 (2013.01)

C12N 2501/998 (2013.01)

C12N 2501/999 (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

치료 유효량의 CIK NKT 세포 집단을 포함하고, 여기서 집단 내의 세포의 50% 초과가 CD56 및 CD3을 발현하고, 집단 내의 세포의 10% 미만이 Va24를 발현하는 것인, Gal-Cer의 부재 하에 암 또는 바이러스 감염의 치료를 필요로 하는 환자에서 암 또는 바이러스 감염을 치료하기 위한 제약 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, CIK NKT 세포 집단의 90% 초과가 CD56 및 CD3을 발현하고, CIK NKT 세포 집단의 10% 미만이 Va24를 발현하는 것인 제약 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 치료 유효량의 CIK NKT 세포가 환자의 체표면적  $m^2$  당 약  $1 \times 10^8$  내지 약  $1 \times 10^{11}$ 개인 제약 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 암이 백혈병, 림프종, 진성 다혈구혈증, 다발성 골수종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 중쇄 질환, 육종, 및 암종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 정맥내, 복강내 및 피하로 이루어진 군으로부터 선택된 경로에 의해 환자에게 투여되는 제약 조성물.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, CIK NKT 세포가 CAR 및/또는 시토카인을 발현하는 것인 제약 조성물.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, 항체를 추가로 포함하는 제약 조성물.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, CIK NKT 세포 집단이

혈액 샘플로부터 단핵 세포를 분리하는 단계; 및

분리된 단핵 세포를 (i) IL-7, (ii) ALT-803 또는 IL-15, (iii) FLT3 리간드, 및 (iv) Gal-Cer와 접촉시키는 단계

에 의해 생성되는 것인 제약 조성물.

#### 청구항 9

혈액 샘플로부터 단핵 세포를 분리하는 단계; 및

분리된 단핵 세포를 (i) IL-7, (ii) ALT-803 또는 IL-15, (iii) FLT3 리간드, 및 (iv) Gal-Cer와 접촉시키는 단계를 포함하는,

혈액 샘플로부터 CIK NKT 세포 집단의 50% 초과가 CD56 및 CD3을 발현하고, CIK NKT 세포 집단의 10 % 미만이 Va24를 발현하는 CIK NKT 세포 집단을 생성하는 방법.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, IL-7이 5 내지 20 ng/mL 범위의 농도로 존재하는 것인 방법.

#### 청구항 11

제9항에 있어서, ALT-803이 100 내지 300 ng/mL 범위의 농도로 존재하는 것인 방법.

#### 청구항 12

제9항에 있어서, FLT3 리간드가 5 내지 20 ng/mL 범위의 농도로 존재하는 것인 방법.

#### 청구항 13

제9항에 있어서, Gal-Cer이 2 내지 10  $\mu$ g/mL 범위의 농도로 존재하는 것인 방법.

#### 청구항 14

제9항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 풍부화된 CIK NKT 세포를 혈액 샘플의 나머지에서 분리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 15

제14항에 있어서, CIK NKT 세포를 확장시키기 위해 분리된, 풍부화된 CIK NKT 세포를 항-CD3 항체, 항-CD28 항체, 및 IL-2와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 16

제9항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, CIK NKT 세포 집단의 90% 초과가 CD56 및 CD3을 발현하고, CIK NKT 세포 집단의 10% 미만인 Va24를 발현하는 것인 방법.

#### 청구항 17

제9항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, Gal-Cer이 Gal-Cer이 로드된 CD1d 사량체의 형태로 존재하는 것인 방법.

#### 청구항 18

제15항에 있어서, 항-CD3 항체가 5 ng/mL 내지 60 ng/mL의 양으로 존재하는 것인 방법.

#### 청구항 19

제15항에 있어서, 항-CD28 항체가 0.1  $\mu$ g/mL 내지 2  $\mu$ g/mL의 양으로 존재하는 것인 방법.

#### 청구항 20

제15항에 있어서, IL-2가 50 ng/mL 내지 500 ng/mL의 농도로 존재하는 것인 방법.

#### 청구항 21

제9항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 집단의 생성에 인터페론-감마를 포함하지 않는 방법.

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2018년 7월 10일에 출원된 미국 가출원 번호 62/696,131의 우선권 이익을 주장하며, 상기 가출원은 본원에 참조로 포함된다.

### 배경 기술

[0003] 자연 킬러 T 세포(NKT 세포)는 자연 킬러(NK)세포 표면 마커를 발현하는 T 림프구의 하위세트를 나타낸다. 불변 NKT 세포(iNKT)로 명명된 NKT 세포의 하위세트는 고도로 제한된 T 세포 수용체(TCR)를 발현한다. iNKT 세포

는 선천 및 적응 면역 반응을 연결하는데 중요한 역할을 하고, 감염성 질환, 알레르기, 천식, 자가면역, 및 종양 감시와 같은 다양한 질환에 연루되어 있지만(Juno et al. PLoS Pathog. 2012; 8(8)), 그의 활성화는 일반적으로 CD1d-제한 지질 리간드 알파-갈락토실세라미드(Gal-Cer)를 필요로 한다. Gal-Cer(예를 들어, Gal-Cer/CD1d 사랑체 형태)을 도입하는 데 필요한 절차는 이들 NKT 세포를 사용하여 환자를 치료하는 비용을 상당히 증가시킬 수 있고, 일부 경우에는 이들의 치료적 유용성의 범위를 제한할 수 있다. 따라서, 광범위한 조직 유형을 갖는 환자를 치료하는데 사용될 수 있는 안전하고 비용-효과적인 NKT 세포 치료는 여전히 요구된다.

### 발명의 내용

- [0004] Gal-Cer의 부재 하에 활성화될 수 있는 CIK NKT 세포가 본 개시내용에 제공된다. 일부 실시양태에서, CIK NKT 세포 집단 내 세포의 50 % 초과가 CD56 및 CD3을 발현하고, 집단 내 세포의 10 % 미만이 Va24를 발현한다. 집단으로부터의 복수의 CIK NKT 세포를 포함하는 조성물 및 키트가 또한 제공된다. CIK NKT 세포를 생산하고, 세포를 사용하여 암을 치료하는 방법이 또한 제공된다.
- [0005] 본 개시내용은 CIK NKT 세포 집단을 제공하며, 여기서 집단 내 세포의 50 % 초과가 CD56 및 CD3을 발현하고, 집단 내 세포의 10 % 미만이 Va24를 발현한다.
- [0006] 임의로, CIK NKT 세포 집단은 알파-갈락토실세라미드(Gal-Cer)의 부재 하에 표적 세포를 사멸시킬 수 있다. 임의로, 표적 세포는 암 세포이다. 암 세포주는 골수 백혈병 세포, 수모세포종 세포, 및 단핵구성 세포로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 임의로, 암 세포는 K562 세포, Daudi 세포, DAOY 세포, 및 THP-1 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0007] 임의로, CIK NKT 세포는 1.0 내지 10.0의 EC50으로 복수의 표적 세포를 사멸시킨다. 임의로, CIK NKT 세포는 Gal-Cer의 존재 하에 표적 세포를 사멸시키는 CIK NKT 세포의 IC50의 90 % 이상 및 110 % 이하인 EC50으로 표적 세포를 사멸시킬 수 있다.
- [0008] 본 개시내용은 상기 기재된 CIK NKT 세포 집단 중 임의의 집단으로부터의 복수의 CIK NKT 세포, 및 생리학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 조성물을 또한 제공한다.
- [0009] 상기 기재된 CIK NKT 세포 집단 중 임의의 집단으로부터의 복수의 CIK NKT 세포 및 용기 및/또는 키트가 암을 치료하기 위한 것임을 나타내는 라벨을 포함하는 암을 치료하기 위한 키트가 또한 제공된다.
- [0010] 제대혈 샘플로부터 CIK NKT 세포를 풍부화시키는 방법으로서, 제대혈 샘플로부터 단핵 세포를 분리하는 것; 및 분리된 단핵 세포를 IL-7, ALT-803 또는 IL-15, FLT3 리간드, 및 Gal-Cer로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 작용제와 접촉시킴으로써, CIK NKT 세포를 풍부화시키는 것을 포함하는 방법이 또한 제공된다. IL-7은, 존재하는 경우, 5 내지 20 ng/mL 범위의 농도로 존재할 수 있다. ALT-803은, 존재하는 경우, 100 내지 300 ng/mL 범위의 농도로 존재할 수 있다. FLT3 리간드는, 존재하는 경우, 5 내지 20 ng/mL 범위의 농도로 존재할 수 있다. Gal-Cer은, 존재하는 경우, 2 내지 10  $\mu$ g/mL 범위의 농도로 존재할 수 있다.
- [0011] 임의로, 방법은 제대혈 샘플의 나머지에서 풍부화된 CIK NKT 세포를 분리하는 것을 추가로 포함한다. 임의로, 방법은, CIK NKT 세포를 확장시키기 위해 분리된 CIK NKT 세포를 항-CD3, 항-CD28, 및 IL2와 접촉시키는 것을 추가로 포함한다. 임의로, 방법은 분리된 CIK NKT 세포를 Gal-Cer과 접촉시키는 것을 추가로 포함한다. 임의로, Gal-Cer은 Gal-Cer이 로드된 CD1d 사랑체의 형태로 사용된다. 임의로, 항-CD3 항체는 5 ng/mL 내지 60 ng/mL의 양으로 존재할 수 있다. 임의로, 항-CD28 항체는 0.1  $\mu$ g/mL 내지 2  $\mu$ g/mL의 양으로 존재한다. 임의로, IL-2는 50 ng/mL 내지 500 ng/mL의 농도로 존재한다. 임의로, CIK NKT 세포의 풍부화 및/또는 확장은 인터페론-감마를 포함하지 않는다.
- [0012] 상기 기재된 CIK NKT 세포를 풍부화, 분리 및 확장시키는 방법에 의해 생산된 CIK NKT 세포 집단이 또한 제공된다.
- [0013] 필요로 하는 환자에서 암 또는 바이러스 감염을 치료하는 방법으로서, 환자에게 치료 유효량의 상기 기재된 바와 같은 CIK NKT 세포 집단 중 임의의 집단으로부터의 CIK NKT 세포를 투여하여 암을 치료하는 것을 포함하는 방법이 또한 제공된다. 임의로, 환자의 체표면적  $m^2$  당  $1 \times 10^8$  내지 약  $1 \times 10^{11}$  CIK NKT 세포가 환자에게 투여된다. 임의로, 암은 백혈병, 림프종, 진성 다혈구형증, 다발성 골수종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 중쇄 질환, 육종 및 암종으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 임의로 세포는 정맥내, 복강내 및 피하로 이루어진 군으로부터 선택된 경로에 의해 환자에게 투여된다. 임의로, 방법은 항체를 투여하는 것을 추가로 포함한다.

[0014] 제1항의 CIK NKT 세포 집단으로서, CIK NKT 세포가 CAR 및/또는 시토카인을 발현하고, CIK NKT 세포 집단 내 세포의 50 % 초과가 CD56 및 CD3을 발현하고, 집단 내 세포의 10 % 미만이 Va24를 발현하는 CIK NKT 세포 집단이 또한 제공된다.

[0015] 상기 일반적 설명 및 하기 상세한 설명은 예시적이고 설명적이며, 개시내용의 추가적인 설명을 제공하도록 의도된다. 다른 목적, 이점 및 신규한 특징은 통상의 기술자에게 용이하게 명백할 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0016] 목적, 특징 및 이점은 첨부된 도면과 함께 고려될 때 다음의 개시내용과 관련하여 보다 용이하게 이해될 수 있을 것이다.

도 1은 CIK NKT 세포가 표적 세포를 사멸시키는데 사용되는 경로의 개략도이다.

도 2a는 CD3, CD56, 및 Va24로 염색된 CIK NKT 세포의 유동 세포측정법 분석 결과를 보여준다. 도 2a는 전방 산란 및 크기 산란 도표이고; 도 2b는 CD3 및 CD56 도표를 보여주는 것이고; 도 2c는 Va24 도표를 보여준다.

도 3a는 제대혈 CIK NKT 세포의 존재(원으로 표시됨) 또는 부재(정사각형으로 표시됨) 하에서의 제대혈 CIK NKT 세포에 의한 DAOY 세포의 사멸을 보여준다. 도 3b는 제대혈 CIK NKT 세포(정사각형으로 표시됨) 또는 말초혈 iNKT 세포(원형으로 표시됨)에 의한 루시퍼라제-발현 THP1 세포의 사멸을 보여준다.

도 4는 제대혈 CIK NKT 세포에 의한 K562 세포, DAOY 세포, 및 Daudi 세포의 사멸을 보여준다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 개요

[0018] 본 출원은 비-CD1d 제한 방식으로, 즉, Gal-Cer/CD1d 사량체의 형성과 독립적으로 표적 세포를 사멸시킬 수 있는 시토카인 유도 킬러 NKT 세포(CIK NKT 세포)를 제공한다. CIK NKT 세포는 광범위한 표적 세포를 표적화하는데 사용될 수 있고, 이식편-대-숙주 질환(GVHD)을 유발하지 않을 것이다. GVHD는 림프구가 침투하여 내장, 피부 및 간과 같은 기관에서 광범위한 염증을 일으키는 림프구의 침습적 능력으로 인해 발생한다. CIK NKT는 GVHD 기관으로의 표적화에 중요한 케모카인 수용체를 발현하지 않지만, 종양으로의 귀소를 용이하게 하는 수용체를 발현하고, 따라서 이들은 GVHD를 유발하지 않을 것으로 밝혀졌다. CD3+, CD56+ 단일 양성 세포 및 CD3+/CD56+ 이중 양성 세포로 이루어진 이중 집단을 통상적으로 생산하고, 일반적으로 30 % 이하로 이중 양성 세포를 생산하는 기존의 CIK NKT 세포를 생산하는 기술과 비교하여, 본 방법은 CD3+/CD56+ 이중 양성 세포로 우세하게 이루어진 세포 집단을 생산한다. 한 측면에서, 집단 내 CIK NKT 세포의 적어도 50 %가 CD56 및 CD3 둘 다를 발현하고, 집단 내 세포의 10 % 미만이 Va24를 발현한다. CIK NKT 세포를 생산하는 방법은 세포를 인터페론-감마에 노출시키는 것을 요구하지 않고, 이는 비용을 절감한다. 따라서, 본 출원은 GVHD와 같은 임상적으로 유해한 증상을 일으키지 않으면서, 다양한 질환, 예를 들어, 암을 치료하기 위해 광범위하게 사용될 수 있는 안전하고 비용-효과적인 NKT 세포 치료를 제공한다.

[0019] 본 개시내용은 집단으로부터의 복수의 CIK NKT 세포를 포함하는 조성물 및 키트를 또한 제공한다. CIK NKT 세포를 생산하고, CIK NKT 세포를 사용하여 암을 치료하는 방법이 또한 제공된다.

[0020] 용어

[0021] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다.

[0022] 본 명세서 및 다음의 청구범위에서, 다음의 의미를 갖는 것으로 정의될 다수의 용어가 언급될 것이다:

[0023] 본원에 사용된 용어는 단지 특정한 실시양태를 기재하기 위한 것이며, 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 본원에 사용된 바와 같은 단수 형태는, 문맥이 달리 명백하게 나타내지 않는 한, 복수 형태도 포함하는 것으로 의도된다. 따라서, 예를 들어, "자연 킬러 세포"에 대한 언급은 복수의 자연 킬러 세포를 포함한다.

[0024] 범위를 포함한 모든 수치 표기, 예를 들어, pH, 온도, 시간, 농도, 양, 및 분자량은, 적절한 경우에, 0.1 또는 1.0의 증분만큼 (+) 또는 (-) 달라지는 근사치이다. 항상 분명하게 언급되지는 않지만, 모든 수치 표기는 용어 "약"이 선행할 수 있다는 것을 이해하여야 한다.

[0025] 본원에 사용된 바와 같이, "+"는 특정 세포 마커의 존재를 나타내는 데 사용된 경우, 세포 마커가 이소형 대조



군에 비해 형광 활성화 세포 분류에 검출가능하게 존재하거나; 또는 정량적 또는 반-정량적 RT-PCR에서 배경위에서 검출가능하다는 것을 의미한다.

[0026] 본원에 사용된 바와 같이, "-"는 특정 세포 마커의 존재를 나타내는 데 사용된 경우, 세포 마커가 이소형 대조군에 비해 형광 활성화 세포 분류에 검출가능하지 않게 존재하거나; 또는 정량적 또는 반-정량적 RT-PCR에서 배경위에서 검출가능하지 않다는 것을 의미한다.

[0027] 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이해될 바와 같이, 임의의 및 모든 목적을 위해, 특히 서면 기재사항을 제공하는 관점에서, 본원에 개시된 모든 범위는 임의의 및 모든 가능한 하위범위 및 그의 하위범위의 조합을 또한 포괄한다. 임의의 열거된 범위는 동일한 범위가 적어도 2등분, 3등분, 4등분, 5등분, 10등분 등으로 분해되는 것을 충분히 기재하고 가능하게 하는 것으로 용이하게 인식될 수 있다. 비-제한적 예로서, 본원에 논의된 각각의 범위는 하위 3분의 1, 중간 3분의 1 및 상위 3분의 1 등으로 용이하게 분해될 수 있다. 또한, 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이해될 바와 같이, 모든 언어 예컨대 "최대", "적어도", "초과", "미만" 등은 언급된 수를 포함하고, 상기 논의된 바와 같은 하위범위로 후속적으로 분해될 수 있는 범위를 지칭한다. 최종적으로, 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이해될 바와 같이, 범위는 각각의 개별 구성원을 포함한다. 따라서, 예를 들어, 1-3개 세포를 갖는 군은 1, 2, 또는 3개 세포를 갖는 군을 지칭한다. 유사하게, 1-5개 세포를 갖는 군은 1, 2, 3, 4, 또는 5개 세포를 갖는 군 등을 지칭한다.

[0028] 항상 명확하게 언급되지는 않지만, 본원에 기재된 시약은 단지 예시적인 것이고, 그의 등가물이 관련 기술분야에 공지되어 있다는 것 또한 이해되어야 한다.

[0029] "임의의" 또는 "임의로"는 후속적으로 기재된 사건 또는 상황이 발생하거나 발생하지 않을 수 있으며, 그 기재가 사건 또는 상황이 발생하는 경우 및 발생하지 않는 경우를 포함한다는 것을 의미한다.

[0030] 용어 "포함하는"은 조성물 및 방법이 열거된 요소를 포함하지만, 다른 요소를 제외하지는 않음을 의미하는 것으로 의도된다. "로 본질적으로 이루어지는"은, 조성물 및 방법을 정의하기 위해 사용되는 경우, 조합에 대해 임의의 본질적인 유의성이 있는 다른 요소를 제외하는 것을 의미할 것이다. 예를 들어, 본원에 정의된 바와 같은 요소로 본질적으로 이루어진 조성물은 청구범위의 기본적인 신규한 특징(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는 다른 요소를 제외하지 않을 것이다. "로 이루어진"은, 미량보다 많은 다른 성분 및 실질적인 방법 단계를 제외하는 것을 의미할 것이다. 이들 전환 용어 각각에 의해 정의된 실시양태는 본 개시내용의 범주 내이다.

[0031] 본원에 사용된 용어 "세포독성" 및 "세포용해"는, NK 세포와 같은 이펙터 세포의 활성을 기재하는데 사용되는 경우, 동의어인 것으로 의도된다. 일반적으로, 세포독성 활성은 임의의 다양한 생물학적, 생화학적 또는 생물물리학적 메커니즘에 의한 표적 세포의 사멸과 관련된다. 세포용해는 보다 구체적으로 이펙터가 표적 세포의 형질 막을 용해시키고, 그에 따라 그의 물리적 완전성을 파괴하는 활성을 지칭한다. 이는 표적 세포의 사멸을 일으킨다. 이론에 얽매이는 것을 원하지는 않으나, NK 세포의 세포독성 효과는 세포용해로 인한 것으로 여겨진다.

[0032] 세포/세포 집단에 대한 용어 "사멸"은 그 세포/세포 집단의 사멸에 이르게 할 임의의 유형의 조작을 포함하는 것으로 지시된다.

[0033] 용어 "시토카인" 또는 "시토카인들"은 면역계의 세포에 영향을 미치는 생물학적 분자의 일반적 클래스를 지칭한다. 예시적인 시토카인은 FLT3 리간드, 인터페론 및 인터류킨(IL), 특히 IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 및 IL-21을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0034] 용어 "환자", "대상체", "개체" 등은 본원에서 상호교환 가능하게 사용되고, 본원에 기재된 방법에 적용가능한 임의의 동물, 또는 그의 시험관내 또는 계내 세포를 지칭한다. 비-제한적인 특정 실시양태에서, 환자, 대상체 또는 개체는 인간이다.

[0035] 용어 "치료하는" 또는 "치료"는 대상체, 예컨대 인간에서 본원에 기재된 질환 또는 장애의 치료를 포함하고, (i) 질환 또는 장애를 억제하는 것, 즉 그의 진행을 저지시키는 것; (ii) 질환 또는 장애를 완화시키는 것, 즉 장애의 퇴행을 일으키는 것; (iii) 장애의 진행을 저속화시키는 것; 및/또는 (iv) 질환 또는 장애의 1종 이상의 증상의 진행을 억제, 완화 또는 저속화시키는 것을 포함한다. 대상체에 모노클로날 항체 또는 자연 킬러 세포를 "투여하는" 또는 "투여"라는 용어는 의도된 기능을 수행하기 위해 항체 또는 세포를 임의의 경로로 도입 또는 전달하는 것을 포함한다. 투여는 세포 또는 모노클로날 항체의 전달에 적합한 임의의 경로에 의해 수행될 수 있다. 따라서, 전달 경로는 정맥내, 근육내, 복강내, 또는 피하 전달을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, CIK NKT 세포는 예를 들어, 종양 내로의 주사에 의해 종양에 직접 투여된다. 일부 실시양태에서, 본원에

기재된 변형된 CIK NKT 세포는 비경구로, 예를 들어 주사, 주입 또는 이식(피하, 정맥내, 근육내, 방광내, 또는 복강내)에 의해 투여된다.

- [0036] 용어 "발현"은 유전자 산물의 생산을 지칭한다.
- [0037] 본원에 사용된 용어 "세포독성"은 NK 세포와 같은 이펙터 세포의 활성을 기재하는데 사용되는 경우, 임의의 다양한 생물학적, 생화학적 또는 생물물리학적 메커니즘에 의한 표적 세포의 사멸과 관련된다.
- [0038] 용어 "감소시키다", "저하된", "저하" 및 "감소시키다"는 모두 본원에서, 참조 수준과 비교하여 적어도 10 % 만큼의 감소, 예를 들어 참조 수준과 비교하여 적어도 약 20 %, 또는 적어도 약 30 %, 또는 적어도 약 40 %, 또는 적어도 약 50 %, 또는 적어도 약 60 %, 또는 적어도 약 70 %, 또는 적어도 약 80 %, 또는 적어도 약 90 % 만큼 또는 최대 100 % 및 그를 포함하는 감소(즉, 참조 샘플과 비교하여 부재하는 수준), 또는 참조 수준과 비교하여 10-100 % 사이의 임의의 감소를 지칭하는 것으로 사용된다.
- [0039] 용어 "암"은 백혈병, 암종 및 육종을 포함하여, 포유동물에서 발견되는 모든 유형의 암, 신생물 또는 악성 종양을 지칭한다. 예시적인 암은 뇌암, 유방암, 자궁경부암, 결장암, 두경부암, 간암, 신장암, 폐암, 비소세포 폐암, 흑색종, 중피종, 난소암, 육종, 위암, 자궁암 및 수모세포종을 포함한다. 추가적인 예는 호지킨병, 비-호지킨 림프종, 다발성 골수종, 신경모세포종, 난소암, 횡문근육종, 원발성 혈소판증가증, 원발성 마크로글로불린혈증, 원발성 뇌 종양, 암, 악성 췌장 인슐린종, 악성 카르시노이드, 방광암, 전암성 피부 병변, 고환암, 림프종, 갑상선암, 신경모세포종, 식도암, 비뇨생식관암, 악성 고갈습혈증, 자궁내막암, 부신 피질암, 내분비 및 외분비 췌장의 신생물, 및 전립선암을 포함한다.
- [0040] 용어 "치료 유효량" 또는 "유효량"은 비치료된 환자에 비해 질환의 증상을 호전시키는데 요구되는 양을 지칭한다. 질환의 치유적 치료를 위해 본 개시내용을 실시하는데 사용되는 활성 화합물(들)의 유효량은 투여 방식, 대상체의 연령, 체중 및 전반적인 건강에 따라 달라진다. 궁극적으로, 주치의 또는 수의사가 적절한 양 및 투여 요법을 결정할 것이다. 이러한 양을 "유효량"이라 한다.
- [0041] 표제 또는 부제는 독자의 편의를 위해 본 명세서에 사용될 수 있으며, 이는 본 개시내용의 범주에 영향을 미치지도록 의도된 것은 아니다. 추가적으로, 본 명세서에 사용된 일부 용어는 다음에 보다 구체적으로 정의되어 있다.
- [0042] 시토카인 유도 킬러 자연 킬러 T 세포(CIK NKT 세포)
- [0043] 자연 킬러 T 세포는 T 세포 및 자연 킬러 세포 둘 다의 특성을 공유하는 T 세포의 이종 집단이다. 예를 들어, NKT 세포는 알파 베타 T-세포 수용체를 발현하지만, NKp44, NKp46, 및 NKp30와 같이 일반적으로 NK 세포와 연관된 다양한 분자 마커 또한 발현한다. NKT 세포는 모든 말초 혈액 T 세포의 약 0.1 % 만을 구성한다. NKT 세포는 자가면역 및 이식편 거부 의 억제, 병원체에 대한 내성의 촉진, 및 종양 면역의 촉진에 연루되어 왔다.
- [0044] NKT 세포는 T 세포 수용체(TCR)의 용도의 차이에 따라 일반적으로 제1형 및 제2형으로 분류된다. 불변 NKT 세포로도 통상적으로 지칭되는 제1형 NKT 세포는, 불변 TCR 알파 사슬, Va24를 포함하는 고도로 제한된 T 세포 수용체를 발현하는 NKT 세포이다.
- [0045] 불변 NKT 세포는 일반적으로 CD1d에 의해 제시된 지질 리간드 알파-갈락토실세라미드(Gal-Cer)를 인식함으로써 활성화된다. CD1d는 다양한 항원 제시 세포의 표면에 발현된 당단백질의 CD1 패밀리의 구성원이고, 지질 항원의 제시에 관여한다. CD8+ 및 CD4+ T 세포 각각에 단백질 항원을 제시하는 제1종 및 제2종 주조직적합성 복합체(MHC) 분자와 대조적으로, CD1 분자는 T 세포에게 표시하기 위해 외래 및 자기 지질 항원 둘 다를 포획하고 처리할 수 있다. Gal-Cer은 일반적으로 병원성 세포, 예를 들어, 박테리아로부터 유래된다.
- [0046] 제1형 NKT 세포와 비교하여, 제2형 NKT 세포는 보다 다양한 TCR 레퍼토리 및 보다 높은 서열 다양성을 갖는다. 제2형 NKT 세포는 Gal-Cer에 반응하지 않는다. 즉 이들의 활성화는 Gal-Cer의 존재와는 독립적이다.
- [0047] 본원에 개시된 CIK NKT 세포는 제2형 NKT 세포의 범주에 속한다. CIK NKT 세포는 시토카인 유도를 통해 생산될 수 있다. 일부 경우에, 이들은 예를 들어 제대혈로부터 시토카인 유도를 통해 생산된다. 일부 경우에, 이들은 제대혈 샘플로부터 iNKT 세포를 풍부화 또는 분리하는 과정 동안 생산된다. 그러나, CIK NKT 세포는 여러 방면에서 일반적인 iNKT 세포와 상이하다. 표현형적으로, TCR 수용체의 알파 사슬에 대한 마커인 Va24를 발현하고, Va24를 발현하는 iNKT 세포의 비율이 70 % 이상인 iNKT 세포와 달리, CIK NKT 세포는 감소된 Va24의 발현을 갖는다. 예를 들어, Va24를 발현하는 CIK NKT 세포의 비율은 총 CIK NKT 세포 집단의 10 % 미만일 수 있다. 세포독성의 관점에서, 당지질인 알파 갈락토실 세라미드(Gal-Cer)를 인식함으로써 활성화되는 iNKT 세포와 달리,



CIK NKT 세포는 활성화되기 위해 Gal-Cer이 필요없고, (Gal-Cer)의 부재 하에 세포를 사멸시킬 수 있다(도 3 및 도 4 참조).

[0048] 따라서, 표현형의 관점에서, 본원에 제공된 CIK NKT 세포는 일반적으로 CD56 및 CD3의 높은 발현 수준 및 Va24의 낮은 발현을 갖는다. 일부 경우에, 제대혈 세포로부터 생산된 CIK NKT 집단의 적어도 90 %는 CD56 및 CD3을 발현하고, 집단 내 세포의 10 % 미만은 Va24를 발현한다.

[0049] CIK NKT 세포의 분리 및 배양 방법

[0050] 제대혈 수집

[0051] 인간 제대혈은 조혈 줄기 세포의 구성이 높고, CIK NKT 세포를 생성하기 위한 공급원으로서 사용될 수 있다. 제대혈을 수집하기 위해, 보통, 인간 태반은 출산 후 그의 배출 직후 회수된다. 태반은 멸균, 단일 수송 장치(태반의 온도를 20-28℃로 유지함)에서, 예를 들어 US 특허 번호 7,147,626에 실질적으로 기재된 바와 같은 제대혈 수집 키트에서 수송될 수 있다. 바람직하게는, 태반은 분만 후 4 내지 24시간에 실험실로 전달된다.

[0052] 태반은 통상적인 제대혈 회수 과정에 적용될 수 있다. 일반적으로, 바늘 또는 캐놀라를 사용하여, 중력의 도움으로 태반을 방혈시킨다(예를 들어, US 특허 번호 5,372,581 (Anderson); US 특허 번호 5,415,665 (Hessel et al.) 참조). 바늘 또는 캐놀라는 보통 제대 정맥에 놓이고, 태반으로부터 제대혈이 빠지는 것을 돕도록 태반을 부드럽게 마사지할 수 있다. 이러한 제대혈 회수는 상업적으로 수행될 수 있다(예를 들어 라이프뱅크 인크., 시더 놀즈, 뉴저지., 비아코드, 코드 블러드 레지스트리 및 크라이요셀)(LifeBank Inc., Cedar Knolls, N.J., ViaCord, Cord Blood Registry and CryoCell). 바람직하게는, 제대혈 회수 동안 조직 파괴를 최소화하기 위해, 추가적인 조작 없이 태반의 제대혈은 중력에 의해 빠진다.

[0053] 제대혈 세포를 수집하는 방법은, 예를 들어 US 2015-0225697에 기재된 바와 같이 널리 공지되어 있다. 제대혈 단핵 세포(Comics)는 관련 기술분야에 널리 공지된 방법, 예를 들어 피콜-파크(Ficoll-Paque)를 사용하는 밀도 구배 방법을 사용하여 수집된 제대혈로부터 분리될 수 있다. Comics의 분리에 적합한 시약은 예를 들어 스템 셀 테크놀로지 인크.(Stem cell Technology Inc.)로부터 상업적으로 입수가 가능하다.

[0054] **CIK NKT 세포의 풍부화**

[0055] CIK NKT 세포를 풍부화시키기 위해, 다양한 시토카인의 존재 하에 일정 기간 동안 Comics를 배양할 수 있다. 풍부화는 이중 세포 집단(예를 들어, Comics)에서 표적 세포 수의 비율을 증가시키는 것을 지칭한다. 풍부화 기간은 2일-3주, 예를 들어, 1-2주, 5-10일, 또는 약 2주일 수 있다. 다양한 성장 배지, 예를 들어 로스웰 파크 메모리얼 인스티튜트 배지(RPMI), 또는 둘베코 변형 이글 배지(DMEM)가 사용될 수 있다. 임의로, 배지는 인간 AB 혈청 및/또는 Gal-Cer을 추가로 포함한다. 임의로, 인간 AB 혈청은 5-15 %v/v, 예를 들어, 약 10 %v/v로 존재한다. 임의로, Gal-Cer은 2-10 µg/mL, 예를 들어 약 5 µg/mL의 농도로 존재한다. 배지에 첨가될 수 있는 적합한 시토카인은 줄기 세포 인자, FLT3 리간드, IL-7, 및 ALT-803 또는 IL-15로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 시토카인을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, FLT3 리간드는 5-20 ng/mL 범위, 예를 들어, 10 ng/mL의 농도로 존재하고; IL-7은 5-20 ng/mL, 예를 들어, 10 ng/mL 범위의 농도로 존재하고/하거나; ALT-803은 100-300 ng/mL, 예를 들어, 약 175 ng/mL 범위의 농도로 존재한다.

[0056] FLT3 리간드는 조혈성 4개의 나선형 다발 시토카인이고, 이는 줄기 세포 인자(SCF) 및 콜로니 자극 인자 1(CSF-1)과 구조적으로 상동적이다. FLT3 리간드는 다른 성장 인자와 상승적으로 다양한 혈액 세포 전구세포의 증식 및 분화를 자극한다. 이는 수지상 세포의 성장을 자극하는 주요 성장 인자이다.

[0057] ALT-803은 인간 IL-15 돌연변이체 IL-15N72D(위치 72에서의 잔기 치환) 및 IL-15Rα 스시-Fc 융합 단백질로 이루어진 복합체이다(Zhu et al. J. Immunol. 2009; 183: 3598-607 참조, 관련 개시내용은 본원에 참조로 포함됨).

[0058] CIK NKT 세포는 관련 기술분야에 널리 공지된 방법, 예를 들어 CIK NKT 세포가 자석 비드에 결합하도록 TCR의 Va24-J18 사슬에 대한 항체와 커플링된 자석 비드를 풍부화된 배양물과 함께 인큐베이션하고, 후속적으로 자기장의 존재 하에 비드에 결합된 CIK NKT 세포를 분리하는 방법으로 상기 기재된 풍부화된 배양물로부터 분리될 수 있다. 사용될 수 있는 적합한 항체의 한 예는 6B11 항체이고, 이는 바이오레전드(Biolegend)(캘리포니아주 샌디에고)와 같은 판매회사로부터 상업적으로 입수가 가능하다. CIK NKT 세포를 분리하기에 적합한 시약은 독일 밀테니 바이오테크(Miltenyi Biotec)으로부터의 것이다. CIK NKT 세포는 일반적으로 PBS-함유 혈청(예를 들어, 인간 AB 혈청)에서 분리된다. 임의로, 분리 용액은 EDTA를 또한 함유한다.

- [0059] 따라서, 제대혈로부터 CIK NKT 세포를 풍부화시키는 방법으로서 하기: 제대혈 샘플로부터, 하기: 제대혈 샘플로부터 단핵 세포를 분리하는 것; 및 CIK NKT 세포를 풍부화시키기 위해 분리된 단핵구를 IL-7, ALT-803, FLT3 리간드 및 Gal-Cer로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 작용제와 접촉시키는 것을 포함하는 방법이 본원에 제공된다.
- [0060] **CIK NKT 세포의 확장**
- [0061] 상기와 같이 분리된 CIK NKT 세포는 적합한 성장 배지에서 확장될 수 있다. 확장은 표적 세포의 수가 증가하도록 분리된 표적 세포 집단을 성장시키는 것을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 성장 배지는 독일 밀테니 바이오텍(Miltenyi Biotec)으로부터 입수가능한 NK Macs 배지이다. 일부 실시양태에서, 성장 배지는 NKT 세포 성장에 적합한 양의 IL-2, 항-CD3, 및/또는 항 CD28 항체로 보충된다. 일부 실시양태에서, 항-CD3 항체는 5 ng/mL 내지 60 ng/mL, 예를 들어 20 ng/mL의 농도로 존재한다. 일부 실시양태에서, 항-CD28 항체는 0.1 µg/mL 내지 2 µg/mL, 예를 들어 0.5 µg/mL의 농도로 존재한다. 일부 실시양태에서, IL-2는 50 ng/mL 내지 500 ng/mL, 예를 들어, 200 ng/mL의 농도로 존재한다. 일부 실시양태에서, 성장 배지는 인간 AB 혈청(예를 들어, 약 10 %v/v)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 성장 배지는 Gal-Cer이 로드된 CD1d 사량체를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, Gal-Cer이 로드된 CD1d 사량체는, 예를 들어 프로이문(ProImmune)(영국 옥스포드)으로부터 상업적으로 입수가능한 사전-조립된 사량체이다. Gal-Cer이 로드된 CD1d 사량체를 조립하는 방법은 널리 공지되어 있다. 일반적으로, Gal-Cer 지질은 사량체가 되기 위해 스트렙타비딘 표면 상에서 올리고머화되는 CD1d 단백질과 공동-인큐베이션된다. CD1d 복합체에 Gal-Cer이 결합할 때, 이를 컬럼 정제하고, 확장을 위한 시약으로서 사용하였다. Gal-Cer이 로드된 CD1d 사량체를 제조하는 예시적인 방법 중 일부는 [www.proimmune.com/ecommerce/pdf\\_files/PS\\_DE000-RPE\\_V1.1%20%28CD1d%20Tetramer%20Empty%20%28R-PE%20Labeled%29%29.pdf](http://www.proimmune.com/ecommerce/pdf_files/PS_DE000-RPE_V1.1%20%28CD1d%20Tetramer%20Empty%20%28R-PE%20Labeled%29%29.pdf) 및 [proimmune.com/ecommerce/pdf\\_files/ST14.pdf](http://proimmune.com/ecommerce/pdf_files/ST14.pdf)에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, Gal-Cer이 로드된 CD1d 사량체는 성장 배지 중 Gal-Cer의 농도가 약 20-200 ng/mL, 예를 들어, 50-150 ng/mL, 또는 80-120 ng/mL, 또는 약 100 ng/mL의 Gal-Cer이 되도록 하는 양으로 사용된다. 일부 실시양태에서, CIK NKT 세포는 다양한 적용을 위한 적합한 양의 세포에 도달하도록 수일 또는 수주에 걸쳐 성장되고 확장된다.
- [0062] 이에 따라, 본 개시내용은 제대혈로부터 CIK NKT 세포를 성장시키는 방법으로서 하기: 제대혈 샘플로부터, 하기: 제대혈 샘플로부터 단핵 세포를 분리하는 것; 및 CIK NKT 세포를 풍부화시키기 위해 분리된 단핵구를 IL-7, ALT-803, FLT3 리간드 및 Gal-Cer로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 작용제와 접촉시키는 것을 포함하는 방법을 제공한다.
- [0063] **CIK NKT 세포의 표현형 결정**
- [0064] 특정 실시양태에서, CIK NKT 세포 집단은 1종 이상의 기능적으로 관련된 마커, 예를 들어, CD56 및 CD3(NKT 세포에 대한 마커) 및 TCR 수용체 Va24(이의 높은 발현은 NKT 세포가 불변 NKT 세포임을 나타냄)를 검출함으로써 평가될 수 있다.
- [0065] 일부 실시양태에서, 일반적인 불변 NKT 세포에 비해 더 낮은 비율의 Va24+ 세포를 포함하는 CIK NKT 세포 집단이 본원에 제공된다. CIK NKT 세포 집단은 약 4 %, 약 5 %, 약 6 %, 약 7 %, 약 8 %, 약 9 %, 또는 약 10 %의 Va24+ 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, CIK NKT 세포 집단은 0-20 %, 5-10 %, 1-7 %, 또는 4-8 % Va24+ 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, CIK NKT 세포 집단은 20 % 이하, 15 % 이하, 10 % 이하의 Va24+ 세포를 포함한다.
- [0066] 일부 실시양태에서, 일반적인 불변 NKT 세포 집단에서의 비율과 실질적으로 유사한 비율의 CD56+ 세포를 포함하는 CIK NKT 세포 집단이 본원에서 제공된다. CIK NKT 세포 집단은 적어도 약 50 %, 적어도 약 60 %, 적어도 약 70 %, 적어도 약 80 %, 적어도 약 90 %, 적어도 약 95 %, 적어도 약 96 %, 적어도 약 97 %, 적어도 약 98 %, 또는 약 99 %의 CD56+ 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, CIK NKT 세포 집단은 50-100 %, 70-100 %, 85-100 %, 90-100 %, 95-100 %, 또는 98-100 % CD56+ 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, CIK NKT 세포 집단은 50 % 이상, 70 % 이상, 85 % 이상, 90 % 이상, 93 % 이상, 또는 95 % 이상의 CD56+ 세포를 포함한다.
- [0067] 일부 실시양태에서, 일반적인 불변 NKT 세포 집단에서의 비율과 실질적으로 유사한 비율의 CD3+ 세포를 포함하는 CIK NKT 세포 집단이 본원에서 제공된다. CIK NKT 세포 집단은 적어도 약 50 %, 적어도 약 60 %, 적어도 약 70 %, 적어도 약 80 %, 적어도 약 90 %, 적어도 약 95 %, 적어도 약 96 %, 적어도 약 97 %, 적어도 약 98 %, 또는 약 99 %의 CD3+ 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, CIK NKT 세포 집단은 50-100 %, 70-100 %, 85-100

%, 90-100 %, 95-100 %, 또는 98-100 %의 CD3+ 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, CIK NKT 세포 집단은 50 % 이상, 70 % 이상, 85 % 이상, 90 % 이상, 93 % 이상, 또는 95 % 이상의 CD3+ 세포를 포함한다.

[0068] 일부 실시양태에서, 일반적인 불변 NKT 세포 집단에서의 비율과 실질적으로 유사한 비율의 CD56+ CD3+ 세포를 포함하는 CIK NKT 세포 집단이 본원에 제공된다. CIK NKT 세포 집단은 적어도 약 50 %, 적어도 약 60 %, 적어도 약 70 %, 적어도 약 80 %, 적어도 약 90 %, 적어도 약 95 %, 적어도 약 96 %, 적어도 약 97 %, 적어도 약 98 %, 또는 약 99 %의 CD56+ CD3+ 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, CIK NKT 세포 집단은 50-100 %, 70-100 %, 85-100 %, 90-100 %, 95-100 %, 또는 98-100 %의 CD56+ CD3+ 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, CIK NKT 세포 집단은 50 % 이상, 70 % 이상, 85 % 이상, 90 % 이상, 93 % 이상, 또는 95 % 이상의 CD56+ CD3+ 세포를 포함한다.

[0069] CIK NKT 세포의 세포독성

[0070] 임의로, 분리된 또는 풍부화된 자연 킬러 세포의 세포독성 활성은, 예를 들어 종양 세포(예를 들어, 배양된 K562, DAOY, THP-1, LN-18, U937, WERI-RB-1, U-118MG, HT-29, HCC2218, KG-1, 또는 U266 종양 세포) 등을 표적 세포로 사용하는 세포독성 검정에서 평가될 수 있다. 본원에 개시된 CIK NKT 세포는 MHC 유형과 무관하게 및  $\alpha$ Gal-Cer의 존재와 무관하게 표적 세포를 사멸시킬 수 있다.

[0071] 세포독성을 평가하기 위한 검정, 예를 들어 MTT 검정은 널리 공지되어 있다. 이는 테트라졸륨 화합물 MTT를 기반으로 한 시스템이다. 간략하게, 표적 세포가 CIK NKT 세포와 접촉되는 처리 기간 후에, 10  $\mu$ L의 새로 희석된 MTT 용액( $2.5 \text{ mg mL}^{-1}$ )을 각각의 웰에 첨가하고, 플레이트를 37 °C 에서 가습 5 % CO<sub>2</sub> 분위기 하에 4시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 기간이 종료되면, 배지를 제거하고, 포르마잔 생성물을 100  $\mu$ L의 디메틸 술폰 시드에 용해시켰다. 세포 생존율은 선라이스 테칸(SUNRICE Tecan) 흡광도 판독기(솔러, Schoeller)를 사용하여 570 nm에서의 흡광도의 측정에 의해 평가하였다. 50 % 세포 성장 억제를 생산하는 화합물 농도(IC<sub>50</sub>)를 세포 생존(%) 대 약물 농도( $\mu$ M)를 플롯팅하여 구축된 곡선으로부터 계산하였다. 판독값을 대조군의 비율(세포 생존률)로 전환시켰다. 세포 사멸 검정의 비제한적 방법은 술포로다민 B(SRB) 검정, 뉴트랄 레드(NR) 검정, 예컨대 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 [www.rsc.org/suppdata/mt/c4/c4mt00112e/c4mt00112e1.pdf](http://www.rsc.org/suppdata/mt/c4/c4mt00112e/c4mt00112e1.pdf)에 기재된 것을 포함한다.

[0072] CIK NKT 세포가 표적 세포를 사멸시키는 효능을 EC<sub>50</sub>으로 평가할 수 있다. 본 개시내용에 사용된 EC<sub>50</sub>은 표적 세포의 50 %가 사멸되는 검정에서 사용된 이펙터 대 표적 비를 지칭한다. 일부 실시양태에서, CIK NKT 세포는 1-10, 예를 들어 1-8, 2-6, 2-5.5, 또는 3-7의 EC<sub>50</sub>으로 복수의 표적 세포를 사멸시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 세포는 THP-1이고 EC<sub>50</sub>은 4.64이다. 일부 실시양태에서, 표적 세포는 DAOY이고 IC<sub>50</sub>은 3.69이다. 일부 실시양태에서, 표적 세포는 K562이고 IC<sub>50</sub>은 2.6이다.

[0073] 변형된 CIK NKT 세포

[0074] **키메라 항원 수용체**

[0075] 상기와 같이 생산된 CIK NKT 세포는 세포 표면 상에 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 추가로 조작될 수 있다. 임의로, CAR은 종양-특이적 항원에 특이적이다. 종양-특이적 항원은, 비-제한적 예로서, US 2013/0189268; WO 1999024566 A1; US 7098008; 및 WO 2000020460 A1에 기재되어 있으며, 이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 종양-특이적 항원은, 비제한적으로, NKG2D, CS1, GD2, CD138, EpCAM, EBNA3C, GPA7, CD244, CA-125, ETA, MAGE, CAGE, BAGE, HAGE, LAGE, PAGE, NY-SEO-1, GAGE, CEA, CD52, CD30, MUC5AC, c-Met, EGFR, FAB, WT-1, PSMA, NY-ESO1, AFP, CEA, CTAG1B, CD19 및 CD33을 포함한다. 추가적인 비-제한적 종양-연관 항원, 및 그와 연관된 악성종양은 표 1에서 발견될 수 있다.

[0076] 표 1. 종양-특이적 항원 및 연관된 악성종양

표적 항원	연관된 악성종양
α-플래이트 수용체	난소암
CAIX	신세포 암종
CD19	B-세포 악성종양
	만성 림프구성 백혈병 (CLL)
	B-세포 CLL (B-CLL)
	급성 림프구성 백혈병 (ALL); 조혈 줄기 세포 이식 (HSCT) 후 ALL
	림프종; 불응성 여포성 림프종; B- 세포 비-호지킨 림프종 (B-NHL)
	백혈병
	HSCT 후 B-세포 악성종양
	제대혈 이식 (UCBT) 후 B-계통 림프성 악성종양
CD19/CD20	림프구성 백혈병
CD20	림프종
	B-세포 악성종양
	B-세포 림프종
	외투 세포 림프종
	무통성 B-NHL
	백혈병
CD22	B-세포 악성종양
CD30	림프종; 호지킨 림프종
CD33	AML
CD44v7/8	자궁경부 암종
CD138	다발성 골수종
CD244	신경모세포종
CEA	유방암
	결장직장암
CS1	다발성 골수종
EBNA3C	EBV 양성 T-세포
EGP-2	다발성 악성종양
EGP-40	결장직장암

[0077]

표적 항원	연관된 악성종양
EpCAM	유방 암종
Erb-B2	결장직장암
	유방암 및 다른 암
	전립선암
Erb-B 2,3,4	유방암 및 다른 암
FBP	난소암
테아 아세틸콜린 수용체	횡문근육종
GD2	신경모세포종
GD3	흑색종
GPA7	흑색종
Her2	유방 암종
	난소암
	상피 기원의 종양
Her2/new	수모세포종
	폐 악성종양
	진행성 골육종
	교모세포종
IL-13R-a2	신경교종
	교모세포종
	수모세포종
KDR	종양 신생혈관계
k-경쇄	B-세포 악성종양
	B-NHL, CLL
LeY	암종
	상피 유래 종양
L1 세포 부착 분자	신경모세포종
MAGE-A1	흑색종
메소텔린	다양한 종양
MUC1	유방암; 난소암
NKG2D 리간드	다양한 종양
종양테아성 항원 (h5T4)	다양한 종양
PSCA	전립선 암종
PSMA	전립선/종양 혈관계
mAb IgE 에 의해 표적화된 TAA	다양한 종양
TAG-72	선암종
VEGF-R2	종양 신생혈관계

[0078]

[0079]

[0080]

일부 실시양태에서, CAR은 CD19, CD33 또는 CSPG-4를 표적화한다.

실시예에서, 변이체 폴리펩티드는 관련 기술분야에 공지된 방법, 예컨대 올리고뉴클레오티드-매개(부위-지정) 돌연변이유발, 알라닌 스캐닝 및 PCR 돌연변이유발을 사용하여 제조된다. 부위 지정 돌연변이 유발(Carter, 1986; Zoller and Smith, 1987), 카세트 돌연변이 유발, 제한 선택 돌연변이 유발(Wells et al., 1985) 또는 다른 공지된 기술이 CD16 변이체를 생산하기 위해 클로닝된 DNA에 수행될 수 있다(Ausubel, 2002; Sambrook and Russell, 2001).

[0081]

임의로, CAR은 특정 암 유형과 연관된 항원을 표적화한다. 임의로, 암은 급성 백혈병(예를 들어, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수구성 백혈병(골수모구성, 전골수구성, 골수단핵구성, 단핵구성, 및 적백혈병 포함)) 및 만성 백혈병(예를 들어, 만성 골수구성(과립구성) 백혈병 및 만성 림프구성 백혈병)을 포함하는 백혈병, 진성 다혈구혈증, 림프종(예를 들어, 호지킨병 및 비-호지킨병), 다발성 골수종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 증쇄 질환, 육종 및 암종, 예컨대 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골원성 육종, 척삭종, 혈관육종, 내피육



종, 림프관육종, 림프관내피육종, 활막종, 증피종, 유잉 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결장 암종, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평 세포 암종, 기저 세포 암종, 선암종, 한선 암종, 피지선 암종, 유두상 암종, 유두상 선암종, 낭선암종, 수질성 암종, 기관지원성 암종, 신세포 암종, 간세포암, 담관 암종, 융모막암종, 정상피종, 배아성 암종, 윌름스 종양, 자궁경부암, 고환 종양, 폐 암종, 소세포 폐 암종, 방광 암종, 상피 암종, 신경교종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 상의세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 핼지교종, 수막종, 흑색종, 신경모세포종 및 망막모세포종을 포함하나 이에 제한되지는 않는 고형 종양으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0082] 일부 실시양태에서, CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 CAR의 기능을 변경하지 않으면서 CAR을 코딩하는 아미노산 서열을 변경하도록 돌연변이된다. 예를 들어, "비-필수" 아미노산 잔기에서 아미노산 치환을 유도하는 폴리뉴클레오티드 치환이 상기 개시된 CAR에서 이루어질 수 있다. CAR은, 예를 들어, 특허 공개 번호 WO 2014039523; US 20140242701; US 20140274909; US 20130280285; 및 WO 2014099671에 기재된 바와 같이 조작될 수 있고, 이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 임의로, CAR은 CD19 CAR, CD33 CAR 또는 CSPG-4 CAR이다.

# [0083] 추가 변형 - 시토카인

[0084] 일부 실시양태에서, CAR-발현 CIK NKT 세포는 적어도 1종의 시토카인을 발현하도록 추가로 변형된다. 구체적인 실시양태에서, 적어도 1종의 시토카인은 IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 또는 그의 변이체이다. 바람직한 실시양태에서, 시토카인은 IL-12이다. IL-12의 대표적인 폴리펩티드는 수탁 번호 IF45\_A([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/IF45\\_A](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/IF45_A))에 제시된 아미노산 서열 및 수탁 번호 IF45\_B([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/IF45\\_B](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/IF45_B))에 제시된 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다.

# [0085] 치료상 적용

[0086] 본 개시내용은 질환의 임의의 단계에 있는 대상체에서 임의의 유형의 암을 치료하는 방법 또한 제공한다. 적합한 암의 비제한적 예는 암종, 흑색종 또는 육종을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 조혈 기원의 암, 예컨대 백혈병 또는 림프종을 치료하는데 사용된다. 일부 실시양태에서, 암은 고형 종양이다.

[0087] 일부 실시양태에서, 대상체에서 임의의 유형의 암을 치료하는 방법은 환자에게 치료 유효량의 CIK NKT 세포를 투여하여 암을 치료하는 것을 포함한다. CIK NKT 세포는 CIK NKT 세포 집단으로부터의 것이고, 여기서 집단 내 세포의 90 % 초과가 CD56 및 CD3을 발현하고, 집단 내 세포의 10 % 미만이 Va24를 발현한다.

[0088] 개시내용은 임의의 유형의 바이러스 감염을 치료하는 방법 또한 제공하며, 이는 환자에게 치료 유효량의 CIK NKT 세포를 투여하여 암을 치료하는 것을 포함한다. CIK NKT 세포는 CIK NKT 세포 집단으로부터의 것이고, 여기서 집단 내 세포의 90 % 초과가 CD56 및 CD3을 발현하고, 집단 내 세포의 10 % 미만이 Va24를 발현한다.

[0089] 치료를 필요로 하는 대상체를 본원에 기재된 바와 같은 CIK NKT 세포로 치료하는 방법이 또한 제공된다. 일부 실시양태에서, 대상체 또는 환자는 암 또는 바이러스 감염과 같은 감염성 질환을 앓고 있다.

[0090] CIK NKT 세포는 개체에게 절대적인 수의 세포로 투여될 수 있고, 예를 들어, 상기 개체는 약 1000개의 세포/주사 내지 최대 약 100억개의 세포/주사, 예컨대 주사당 약, 적어도 약, 또는 최대 약,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^3$  (등) 개의 CIK NKT 세포, 또는 종점을 포함하여 임의의 2개의 수 사이의 임의의 범위로 투여될 수 있다. 따라서, 본 개시내용은 복수의 CIK NKT 세포를 포함하는 조성물로서, 세포의 수가  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ , 또는  $5 \times 10^3$  (등) 인 조성물을 또한 제공한다.

[0091] 다른 실시양태에서, 상기 개체는 약 1000개 세포/주사/㎡ 내지 최대 약 100억개 세포/주사/㎡, 예컨대 주사당 약, 적어도 약, 또는 최대 약,  $1 \times 10^8/\text{m}^2$ ,  $1 \times 10^7/\text{m}^2$ ,  $5 \times 10^7/\text{m}^2$ ,  $1 \times 10^6/\text{m}^2$ ,  $5 \times 10^6/\text{m}^2$ ,  $1 \times 10^5/\text{m}^2$ ,  $5 \times 10^5/\text{m}^2$ ,  $1 \times 10^4/\text{m}^2$ ,  $5 \times 10^4/\text{m}^2$ ,  $1 \times 10^3/\text{m}^2$ ,  $5 \times 10^3/\text{m}^2$  (등) CIK NKT 세포, 또는 종점을 포함하여 임의의 2개의 수 사이의 임의의 범위로 투여될 수 있다.

[0092] 다른 실시양태에서, CIK NKT 세포는 이러한 개체에게 세포의 상대적인 수만큼 투여될 수 있으며, 예를 들어, 상기 개체는 개체의 킬로그램당 약 1000개의 세포 내지 최대 약 100억개의 세포, 예컨대 개체의 킬로그램당 약,



적어도 약, 또는 최대 약,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ , 또는  $5 \times 10^3$  (등) 개의 CIK NKT 세포, 또는 종점을 포함하여 임의의 2개의 수 사이의 임의의 범위로 투여될 수 있다.

[0093] 다른 실시양태에서, 총 용량은 체표면적  $m^2$ 에 의해 계산될 수 있으며, 이는  $m^2$  당 약  $1 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$ , 또는 종점을 포함하여 임의의 2개의 수 사이의 임의의 범위를 포함한다. 평균 사람은 약 1.6 내지 약 1.8 $m^2$ 이다. 바람직한 실시양태에서, 약 10억 내지 약 30억개의 CIK NKT 세포가 환자에게 투여된다. 다른 실시양태에서, 용량당 주사되는 CIK NKT 세포의 양은 체표면적  $m^2$ 에 의해 계산될 수 있으며, 이는  $m^2$  당  $1 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$ 개를 포함한다. 사람의 평균 체표면적은 1.6-1.8 $m^2$ 이다.

[0094] 다른 실시양태에서, CIK NKT 세포는 이러한 개체에게 세포의 상대적인 수만큼 투여될 수 있고, 예를 들어, 상기 개체는 개체의 킬로그램당 약 1000개의 세포 내지 최대 약 100억개의 세포, 예컨대 개체의 킬로그램당 약, 적어도 약, 또는 최대 약,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ , 또는  $5 \times 10^3$  (등) 개의 CIK NKT 세포, 또는 종점을 포함하여 임의의 2개의 수 사이의 임의의 범위로 투여될 수 있다.

[0095] CIK NKT 세포는 암을 갖는 환자에게 1회 투여될 수 있거나, 또는 다수회, 예를 들어, 치료 동안 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 또는 23시간마다 1회, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7일마다 1회, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 초과 주마다 1회, 또는 종점을 포함하여 임의의 2개의 수 사이의 임의의 범위로 투여될 수 있다.

[0096] 일부 실시양태에서, CIK NKT 세포는 CIK NKT 세포 및 배지, 예컨대 인간 혈청 또는 그의 증가물을 포함하는 조성물로 투여된다. 일부 실시양태에서, 배지는 인간 혈청 알부민을 포함한다. 일부 실시양태에서, 배지는 인간 혈장을 포함한다. 일부 실시양태에서, 배지는 약 1 % 내지 약 15 % 인간 혈청 또는 인간 혈청 증가물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 배지는 약 1 % 내지 약 10 % 인간 혈청 또는 인간 혈청 증가물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 배지는 약 1 % 내지 약 5 % 인간 혈청 또는 인간 혈청 증가물을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 배지는 약 2.5 % 인간 혈청 또는 인간 혈청 증가물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 혈청은 인간 AB 혈청이다. 일부 실시양태에서, 인간 치료제에 사용하는 데 허용되는 혈청 대체물이 인간 혈청 대신에 사용된다. 이러한 혈청 대체물은 관련 기술분야에 공지되어 있거나 또는 미래에 개발될 수 있다. 15 % 초과 인간 혈청의 농도가 사용될 수 있으나, 약 5 % 초과 농도는 엄청난 비용일 것으로 생각된다. 일부 실시양태에서, CIK NKT 세포는 CIK NKT 세포 및 세포 생존율을 지지하는 등장성 액체 용액을 포함하는 조성물로 투여된다. 일부 실시양태에서, CIK NKT 세포는 동결보존된 샘플로부터 재구성된 조성물로 투여된다.

[0097] CIK NKT 세포를 포함하는 제약상 허용되는 조성물은 다양한 담체 및 부형제를 포함할 수 있다. 다양한 수성 담체, 예를 들어, 완충 식염수 등이 사용될 수 있다. 이들 용액은 멸균이고, 보통 바람직하지 않은 물질을 함유하지 않는다. 적합한 담체 및 부형제 및 그의 제제는 문헌(Remington: the Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, David B. Troy, ed., Lippicott Williams & Wilkins (2005))에 기재되어 있다. 제약상 허용되는 담체는 생물학적으로 또는 달리 바람직하지 않은 것이 아닌 물질을 의미한다. 즉, 물질은 대상체에게 바람직하지 않은 생물학적 효과를 일으키거나 또는 이를 함유하는 제약 조성물의 다른 성분과 유해한 방식으로 상호작용하지 않으면서 투여된다. 대상체에게 투여되는 경우, 담체는 활성 성분의 분해를 최소화하고 대상체에서 유해 부작용을 최소화하도록 임의로 선택된다. 본원에 사용된 용어 제약상 허용되는는 생리학상 허용되는 및 약리학상 허용되는과 동의어로 사용된다. 제약 조성물은 보통 저장 시 완충 및 보존을 위한 작용제를 포함할 것이고, 투여 경로에 따라 적절한 전달을 위한 완충제 및 담체를 포함할 수 있다.

[0098] 생체내 또는 시험관내에서 사용하기 위한 이들 조성물은 세포에 사용되는 멸균 기술에 의해 멸균될 수 있다. 조성물은 생리학적 조건에 가까워지기 위해 필요에 따라 허용가능한 보조 물질, 예컨대 pH 조정제 및 완충제, 독성 조정제 등, 예를 들어 아세트산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 락트산나트륨 등을 함유할 수 있다. 이들 제제 및/또는 다른 작용제 중의 세포의 농도는 달라질 수 있고, 주로 유체 부피, 점도, 체중 등에 기초하여 선택된 특정한 투여 방식 및 대상체의 필요에 따라 선택될 것이다.

[0099] 한 실시양태에서, CIK NKT 세포는 치료되는 암에 대한 1종 이상의 다른 치료 또는 작용제와 함께 환자에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 치료되는 암에 대한 1종 이상의 다른 치료는, 예를 들어, 항체, 방사선, 화학요법, 줄기 세포 이식, 또는 호르몬 요법을 포함한다.

[0100] 일부 실시양태에서, CIK NKT 세포 및 다른 암 작용제/치료는 동시에 또는 대략 동시에(예를 들어, 서로 약 1, 5, 10, 15, 20, 또는 30분 이내에) 투여된다. 일부 실시양태에서, CIK NKT 세포 및 다른 암 작용제/치료는 순차적으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 다른 암 치료/작용제는 CIK NKT 세포의 투여 1, 2 또는 3일 후에 투여된다.

[0101] 한 실시양태에서, 다른 암 작용제는 항체이다. 한 실시양태에서, CIK NKT 세포는 이환 세포를 표적화하는 항체와 함께 투여된다. 한 실시양태에서, CIK NKT 세포 및 항체는 환자에게 함께, 예를 들어 동일한 제제 중에서; 개별적으로, 예를 들어 개별 제제 중에서, 동시에 투여되거나; 또는 개별적으로, 예를 들어 상이한 투여 스케줄로 또는 하루 중 상이한 시간에 투여될 수 있다. 개별적으로 투여되는 경우에, 항체는 임의의 적합한 경로, 예컨대 정맥내 또는 종양내 주사를 통해 투여될 수 있다.

[0102] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 CIK NKT 세포는 치료 항체 및/또는 다른 항암제와 조합되어 사용된다. 치료 항체는 암-연관 또는 종양-연관 마커를 발현하는 세포를 표적화하는데 사용될 수 있다. 암 치료 모노클로날 항체의 예가 표 2에 제시된다.

[0103] 표 2. 예시적인 치료 모노클로날 항체

FDA-승인된 치료 모노클로날 항체의 예				
항체	상표명	회사	표적	적응증 (표적화된 질환)
알렘투주맙	캄파트®	젠자임	CD52	만성 림프구성 백혈병
브렌독시맙 베도틴	에드세트리스®		CD30	역형성 대세포 림프종 (ALCL) 및 호지킨 림프종
세톡시맙	에르비톡스®	브리스톨-마이어스 스쿼/일라이 릴리/머크 카게아아	표피 성장 인자 수용체	결장직장암, 두경부암
갬투주맙	밀로타르그®	와이어쓰	CD33	급성 골수성 백혈병 (칼리케아미신 수반)
이브리투모맙 티옥세탄	제발린®	스펙트럼 파마슈티칼스, 인크.	CD20	비-호지킨림프종 (이트림- 90 또는 인툼-111 수반)
이필리무맙 (MDX-101)	에르보이®		CTLA-4 차단	흑색종
오파투무맙	아르제라®		CD20	만성 림프구성 백혈병
팔리비주맙	시나기스®	메드이퀼	RSV F 단백질의 에피토프	호흡기 세포융합 바이러스
파니투무맙	백터빅스®	암젠	표피 성장 인자 수용체	결장직장암
리톡시맙	리톡산®, 매테라®	바이오젠 아이텍/ 제넨테크	CD20	비-호지킨 림프종
토시투모맙	백사르®	글락소스미스클라인	CD20	비-호지킨 림프종

[0104]

FDA-승인된 치료 모노클로날 항체의 예				
항체	상표명	회사	표적	적응증 (표적화된 질환)
트라스투주맙	헤르셉틴®	제넨테크	ErbB2.	유방암
블리나투노맙			이중특이적 CD19- 지정 CD3 T-세포 결속체	필라델피아 염색체-음성 재발성 또는 불응성 B 세포 전구체 급성 림프모구성 백혈병 (ALL)
아벨루마맙			항-PD-L1	비-소세포 폐암, 전이성 메르켈 세포 암종; 위암, 유방암, 난소암, 방광암, 흑색종, 중피종, 전이성 또는 국부 진행성 고형 종양 포함
다라투맙			CD38	다발성 골수종
엘로투주맙			SLAMF7-지정 (또한 CD319 로도 공지됨) 면역자극 항체	다발성 골수종

[0105]

[0106]

이러한 CIK NKT 세포의 투여는 모노클로날 항체의 투여와 동시에, 또는 순차적인 방식으로 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, CIK NKT 세포는 대상체가 모노클로날 항체로 치료된 후에 대상체에게 투여된다. 대안적으로, CIK NKT 세포는 모노클로날 항체와 동시에, 예를 들어 24시간 내에 투여될 수 있다.

[0107]

일부 실시양태에서, CIK NKT 세포는 정맥내로 투여된다. 일부 실시양태에서, CIK NKT 세포는 골수 내로 직접 주입된다.

[0108]

그러므로, 필요로 하는 환자에서 암 또는 바이러스 감염을 치료하는 방법으로서, 환자에게 치료 유효량의 CIK NKT 세포 집단으로부터의 CIK NKT 세포를 본원에 개시된 방법을 사용하여 투여하여 암을 치료하는 것을 포함하는 방법이 본 개시내용에 제공된다.

[0109]

키트

[0110]

본원에 기재된 바와 같은 양의 CIK NKT 세포를 포함하는 조성물을 사용하여 암 또는 감염성 질환을 치료하기 위한 키트가 또한 개시된다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 키트는 또한 적어도 1종의 모노클로날 항체를 포함할 수 있다.

[0111]

특정 실시양태에서, 키트는 CIK NKT 세포의 투여 전에, 그와 동시에 또는 투여 후에 투여될 추가적인 화합물, 예컨대 치료 활성 화합물 또는 약물을 함유할 수 있다. 이러한 화합물의 예는 항체, 비타민, 미네랄, 플루드로코르티손, 이부프로펜, 리도카인, 퀴니딘, 화학요법제 등을 포함한다.

[0112]

다양한 실시양태에서, 키트의 사용에 대한 지침서는 암 또는 감염성 질환의 치료에서 키트 구성요소를 사용하기 위한 지시사항을 포함할 것이다. 지침서는 CIK NKT 세포를 어떻게(예를 들어, 해동 및/또는 배양) 하는지에 관한 정보를 추가로 함유할 수 있다. 지침서는 투여량 및 투여 빈도에 관한 지침을 추가로 포함할 수 있다.

[0113]

특정 실시양태에서, 키트는 본원에 기술된 1종 이상의 조성물, 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 CIK NKT 세포를 포함하는 조성물로 충전된 1종 이상의 용기를 추가로 포함한다. 키트가 암, 예컨대 본원에 기재된 바와 같은 암을 치료하기 위한 것임을 나타내는 라벨이 이러한 용기와 임의로 결합될 수 있다. 임의로, 라벨은 제약 또는 생물학적 제품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기관에 의해 규정된 형태의 통지를 또한

포함하며, 이 통지는 제조, 사용 또는 판매 기관에 의한 인간 투여를 위한 승인을 반영한다.

- [0114] 본 개시내용 및 실시예는 제대혈 샘플로부터 유래된 CIK NKT 세포를 생산 및 사용하는 것을 예시하며, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본원에 기재된 것과 유사한 접근법을 사용하여 다른 조혈 전구 세포 샘플로부터도 CIK NKT 세포가 생성될 수 있음을 이해할 것이다.
- [0115] 개시된 방법 및 조성물에 사용될 수 있거나, 그와 함께 사용될 수 있거나, 그의 제조에 사용될 수 있거나, 또는 그의 생성물인 물질, 조성물 및 성분이 개시된다. 이들 및 다른 물질이 본원에 개시되고, 이들 물질의 조합, 하위세트, 상호 작용, 군 등이 개시되는 경우, 이들 화합물의 각각의 다양한 개별 및 포괄적 조합 및 순열에 대한 구체적인 언급이 명시적으로 개시되지 않을 수 있으나, 각각이 본원에 구체적으로 고려되고 기재되는 것으로 이해된다. 예를 들어, 방법이 개시 및 논의되고 방법을 포함하여 다수의 분자에 대해 이루어질 수 있는 다수의 변형이 논의되는 경우, 방법의 각각 및 모든 조합 및 순열, 및 가능한 변형은 달리 구체적으로 반대로 지시되지 않는 한 구체적으로 고려된다. 마찬가지로, 이들의 임의의 하위세트 또는 조합이 또한 구체적으로 고려되고 개시된다. 이러한 개념은 개시된 조성물을 사용하는 방법에서의 단계를 포함하나 이에 제한되지는 않는, 본 개시내용의 모든 측면에 적용된다. 따라서, 수행될 수 있는 다양한 추가적인 단계가 존재하는 경우, 이들 추가적인 단계 각각은 개시된 방법의 임의의 구체적 방법 단계 또는 방법 단계의 조합으로 수행될 수 있고, 각각의 이러한 조합 또는 조합의 하위세트가 구체적으로 고려되고 개시된 것으로 간주되어야 하는 것으로 이해된다.
- [0116] 실시예
- [0117] 본 개시내용은 하기 비-제한적 실시양태를 포함한다.
- [0118] 실시양태 1. 집단 내 세포의 50 % 초과가 CD56 및 CD3을 발현하고, 집단 내 세포의 10 % 미만이 Va24를 발현하는 것인 CIK NKT 세포 집단.
- [0119] 실시양태 2. 실시양태 1에 있어서, CIK NKT 세포가 알파-갈락토실세라미드(Gal-Cer)의 부재 하에 표적 세포를 사멸시킬 수 있는 것인 CIK NKT 세포 집단.
- [0120] 실시양태 3. 실시양태 1에 있어서, 표적 세포가 암 세포인 CIK NKT 세포 집단.
- [0121] 실시양태 4. 실시양태 1에 있어서, 암 세포주가 골수 백혈병 세포, 수모세포종 세포, 및 단핵구성 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 CIK NKT 세포 집단.
- [0122] 실시양태 5. 실시양태 3에 있어서, 암 세포가 K562 세포, Daudi 세포, DAOY 세포, 및 THP-1 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 CIK NKT 세포 집단.
- [0123] 실시양태 6. 실시양태 2 내지 5에 있어서, CIK NKT 세포가 1.0 내지 10.0의 EC50으로 복수의 표적 세포를 사멸시키는 것인 CIK NKT 세포 집단.
- [0124] 실시양태 7. 실시양태 6에 있어서, Gal-Cer의 존재 하에 표적 세포를 사멸시키는 CIK NKT 세포의 EC50의 90 % 이상 및 110 % 이하의 EC50으로 표적 세포를 사멸시킬 수 있는 것인 CIK NKT 세포 집단.
- [0125] 실시양태 8. 실시양태 1 내지 7 중 임의의 CIK NKT 세포 집단으로부터의 복수의 CIK NKT 세포, 및 생리학상 허용되는 부형제를 포함하는 조성물.
- [0126] 실시양태 9. 실시양태 1 내지 7 중 임의의 CIK NKT 세포 집단으로부터의 복수의 CIK NKT 세포를 포함하고, 용기 및/또는 키트가 암을 치료하기 위한 것임을 나타내는 라벨을 추가로 포함하는, 암을 치료하기 위한 키트.
- [0127] 실시양태 10. 제대혈 샘플로부터 단핵 세포를 분리하는 것; 및 분리된 단핵 세포를 IL-7, ALT-803 또는 IL-15, FLT3 리간드, 및 Gal-Cer로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 작용제와 접촉시킴으로써, CIK NKT 세포를 풍부화시키는 것을 포함하는, 제대혈 샘플로부터 CIK NKT 세포를 풍부화시키는 방법.
- [0128] 실시양태 11. 실시양태 10에 있어서, IL-7이, 존재하는 경우, 5 내지 20 ng/mL 범위의 농도로 존재하는 방법.
- [0129] 실시양태 12. 실시양태 10 또는 11에 있어서, ALT-803이, 존재하는 경우, 100 내지 300 ng/mL 범위의 농도로 존재하는 방법.
- [0130] 실시양태 13. 실시양태 10 내지 12에 있어서, FLT3 리간드가, 존재하는 경우, 5 내지 20 ng/mL 범위의 농도로 존재하는 방법.
- [0131] 실시양태 14. 실시양태 10 내지 13에 있어서, Gal-Cer이 2 내지 10  $\mu$ g/mL 범위의 농도로 존재하는 방법.

- [0132] 실시양태 15. 실시양태 10에 있어서, 풍부화된 CIK NKT 세포를 체대혈 샘플의 나머지에서부터 분리하는 것을 추가로 포함하는 방법.
- [0133] 실시양태 16. 실시양태 15에 있어서, CIK NKT 세포를 확장시키기 위해 분리된 CIK NKT 세포를 항-CD3, 항-CD28, 및 IL-2와 접촉시키는 것을 추가로 포함하는 방법.
- [0134] 실시양태 17. 실시양태 16에 있어서, 분리된 CIK NKT 세포를 Gal-Cer과 접촉시키는 것을 추가로 포함하는 방법.
- [0135] 실시양태 18. 실시양태 17에 있어서, Gal-Cer이 Gal-Cer이 로드된 CD1d 사량체의 형태로 존재하는 것인 방법.
- [0136] 실시양태 19. 실시양태 16에 있어서, 항-CD3 항체가 5 ng/mL 내지 60 ng/mL의 양으로 존재하는 것인 방법.
- [0137] 실시양태 20. 실시양태 16 내지 19에 있어서, 항-CD28 항체가 0.1  $\mu$ g/mL 내지 2  $\mu$ g/mL의 양으로 존재하는 것인 방법.
- [0138] 실시양태 21. 실시양태 16 내지 20에 있어서, IL-2가 50 ng/mL 내지 500 ng/mL의 농도로 존재하는 것인 방법.
- [0139] 실시양태 22. 실시양태 16 내지 21에 있어서, CIK NKT 세포의 생산이 인터페론-감마를 포함하지 않는 것인 방법.
- [0140] 실시양태 23. 환자에게 치료 유효량의 실시양태 1 내지 7 중 임의의 CIK NKT 세포 집단으로부터의 CIK NKT 세포를 투여하여 암을 치료하는 것을 포함하는, 필요로 하는 환자에서 암 또는 바이러스 감염을 치료하는 방법.
- [0141] 실시양태 24. 실시양태 23에 있어서, 환자의 체표면적  $m^2$  당 약  $1 \times 10^8$  내지 약  $1 \times 10^{11}$ 개의 세포가 환자에게 투여되는 것인 방법.
- [0142] 실시양태 25. 실시양태 23에 있어서, 암이 백혈병, 림프종, 진성 다혈구혈증, 다발성 골수종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 중쇄 질환, 육종 및 암종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.
- [0143] 실시양태 26. 실시양태 25에 있어서, 세포가 정맥내, 복강내 및 피하로 이루어진 군으로부터 선택된 경로에 의해 환자에게 투여되는 것인 방법.
- [0144] 실시양태 27. 실시양태 23 내지 26에 있어서, 항체를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.
- [0145] 실시양태 28. 실시양태 10 내지 27 중 임의의 방법에 의해 생산된 CIK NKT 세포 집단.
- [0146] 실시양태 29. 실시양태 1에 있어서, CIK NKT 세포가 CAR 및/또는 시토카인을 발현하는 것인 CIK NKT 세포 집단.
- [0147] 실시예
- [0148] 하기 실시예는 단지 예시적 목적을 위한 것이며, 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 관련 기술분야의 통상의 기술자가 이용가능한 다양한 대체 기술 및 절차가 존재하며, 이는 유사하게 관련 기술분야의 통상의 기술자가 하기 실시예를 성공적으로 수행할 수 있게 한다.
- [0149] 실시예 1: CIK-NKT 세포의 표현형
- [0150] 스템 셀 테크놀로지 인크.(Stem cell Technology Inc.)로부터의 피콜-파크(Ficoll-Paque) 및 셉메이트™(Sepmate™)를 사용하는 밀도 구배 방법에 의해 체대혈 샘플로부터 체대혈 단핵 세포(Comics)를 분리하였다. NKT의 풍부화를 위해, Comics를 10 % 인간 AB 혈청을 갖는 RPMI 배지에서 2주 동안 Gal-Cer(5  $\mu$ g/mL), FLT3-L(10 ng/mL), IL-7(10 ng/mL), 및 ALT-803(175 ng/mL)과 함께 인큐베이션하였다. NKT 세포를 독일 밀테니 바이오텍(Miltenyi Biotec)으로부터의 시약을 사용하여 친화도 크로마토그래피에 의해 분리하였다. 후속적으로, 밤새 Gal-Cer이 로드된 CD1d 사량체에 의한 활성화를 위해, 분리된 세포를 10 % 인간 AB 혈청을 갖는 NK Macs 배지에서 항-CD3 항체(20 ng/mL), 항-CD28 항체(0.5  $\mu$ g/mL), 및 IL2(200 ng/mL)의 존재 하에 확장시켰다. Gal-Cer이 로드된 CD1d 사량체는 프로이문(ProImmune)(영국 옥스포드)으로부터의 것이었고, 이는 Gal-Cer 이 100 ng/mL의 양으로 존재하는 양으로 사용되었다. 확장 일주일 후에, 이들 세포는 CD3, CD56, 또는 Va24를 인식하는 항체로 염색되었다. 결과는 대부분의 세포(97.1 %)가 CD56 및 CD3 둘 다에 대해 양성이고(도 2b), 작은 비율의 세포(6.45 %)가 Va24에 대해 양성임을 보여준다(도 2c). 이는 체대혈 CIK NKT 세포가 낮은 Va24 발현을 갖지만, CD3 및 CD56의 발현이 온전하게 유지됨을 나타낸다.
- [0151] 실시예 2: CIK NKT 세포의 세포독성은 Gal-Cer에 독립적임.
- [0152] 실시예 2에 기재된 바와 같이 제조된 NKT-CIK 세포의 암 세포주 DAOY에 대한 세포독성을 평가하였다. DAOY 세



포를 1  $\mu\text{g/mL}$ 의 Gal-Cer과 함께 밤새 인큐베이션하였다. 이어서, Gal-Cer 처리된 DAOY 세포를 형광 염료(칼시엔 AM)와 함께 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 세척한 후, 나타낸 바와 같은 다양한 이펙터 대 표적 비(최고 비는 32:1이었음)로 CB-NKT CIK와 함께 4시간 동안 인큐베이션하였다. DAOY 세포의 사멸을 세포용해로 측정하였고, 이는 세포로부터 방출된 칼시엔AM 염료의 양에 의해 표시된다. 도 3a는 CB-NKT CIK에 의해 일어나는 DAOY 세포로부터 방출된 칼시엔AM 염료의 양을 보여준다. 데이터를 표적 세포의 용해 %로서 제시하였다. 결과는, Gal-Cer이 로드된 표적 세포군과 Gal-Cer이 로드되지 않은 표적 세포군 사이에 사멸의 관점에서 유의한 차이가 존재하였다는 것을 보여주며, 이는 Gal-Cer 처리가 사멸 특이성을 부여하지 않았다는 것을 나타낸다.

[0153] 도 3b는 루시페라제-발현 THP1 세포에 대한 PBiNKT 세포(말초 혈액으로부터 분리된 iNKT 세포)와 상기 기재된 바와 같이 제대혈로부터 유래된 NKT-CIK 세포(CB-CIK NKT 세포)의 세포독성을 비교한다. 공급원이 제대혈이 아닌 말초 혈액인 것을 제외하고는 CB-CIK NKT 세포와 동일한 방식(실시예 1 참조)으로 PBiNKT 세포를 분리하였다. THP1 세포를 CB-CIK NKT 세포 또는 PBiNKT 세포와 나타낸 바와 같은 다양한 이펙터 대 표적 비로 공동-배양하였고, 가장 높은 비는 32:1이었다. Gal-Cer는 본 실험에서 사용하지 않았다. 결과는 CB-CIK NKT 세포가 PBiNKT 세포보다 THP-1을 사멸시키는데 더욱 강력하다는 것을 보여준다.

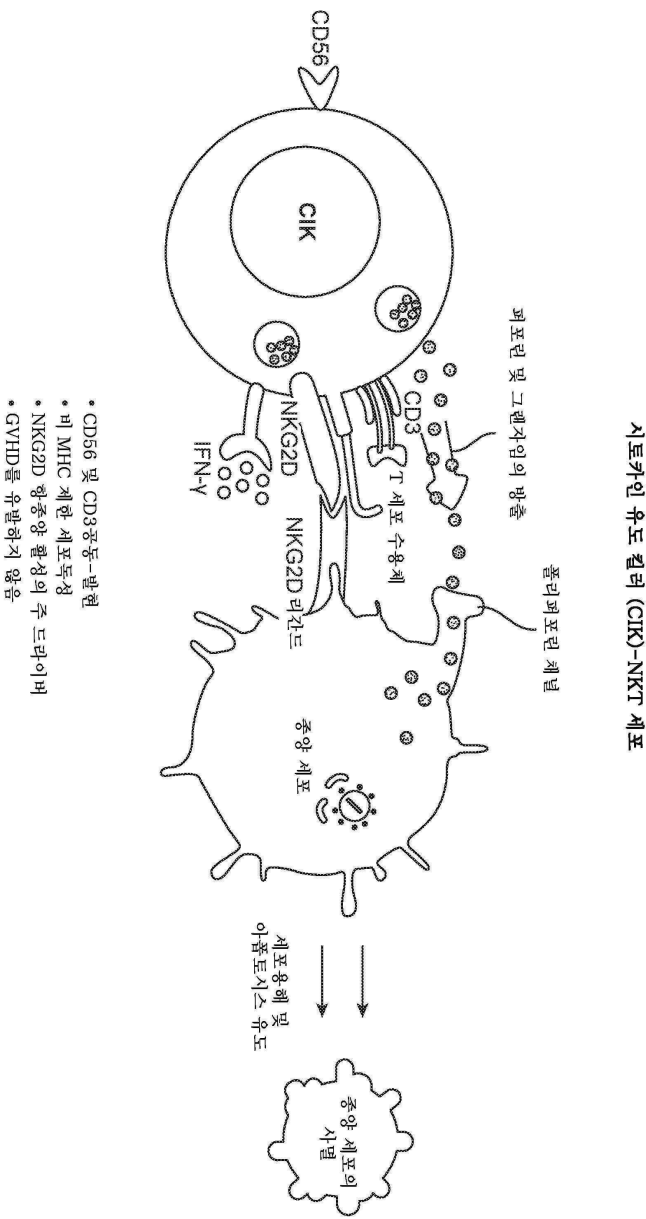
[0154] 실시예 3: K562 및 Daudi 세포에 대한 CIK NKT 세포의 세포독성

[0155] 상기와 같이 수득된 CB-NKT CIK 세포의 루시페라제-발현 암 세포주, DAOY, Daudi, 및 K562를 사멸시키는 능력에 대해 검정하였다(도 4에서 각각 삼각형, 정사각형, 및 원형으로 표시됨). 말초 혈액 분리된 iNKT를 대조군으로서 사용하였다(도 4에서 역삼각형). 세포 사멸 검정을 암 세포 및 이펙터 세포(CB CIK NKT 또는 PBiNKT)의 공동-배양 4-시간 후에 수행하였다. 암 세포의 사멸은 세포용해의 %로 측정하였고, 이는 이들 암 세포주에서의 루시페라제의 상실에 의해 표시된다. 다양한 이펙터 대 표적 비가 나타낸 바와 같이 사용되었고, 가장 높은 값은 32:1이었다. 결과는 CB-CIK NKT 세포가 비 CD1d/MHC 제한된 방식으로 표적 세포를 사멸시킴을 나타낸다.

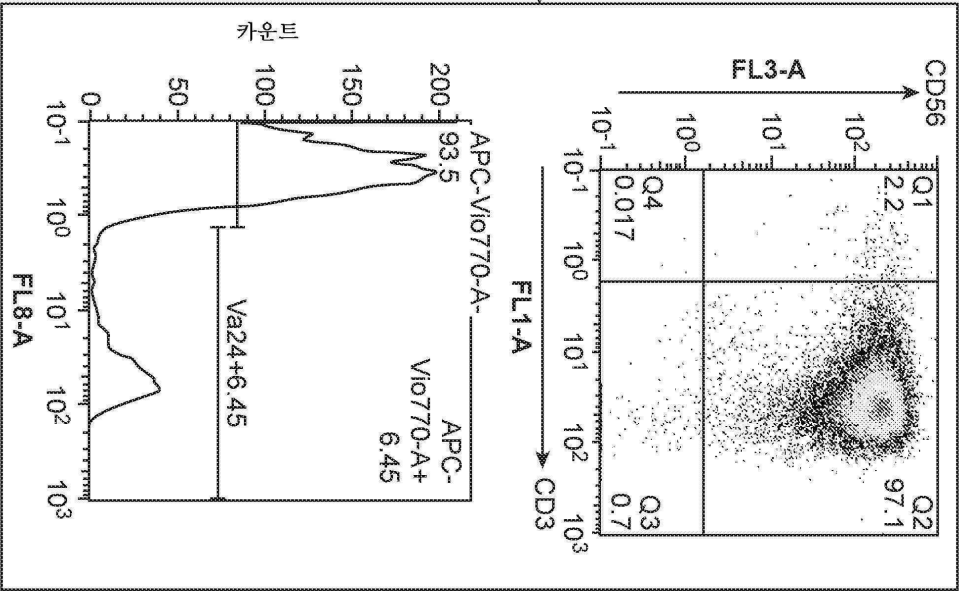
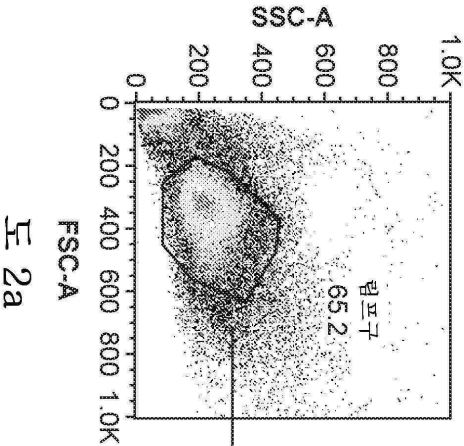


도면

도면1



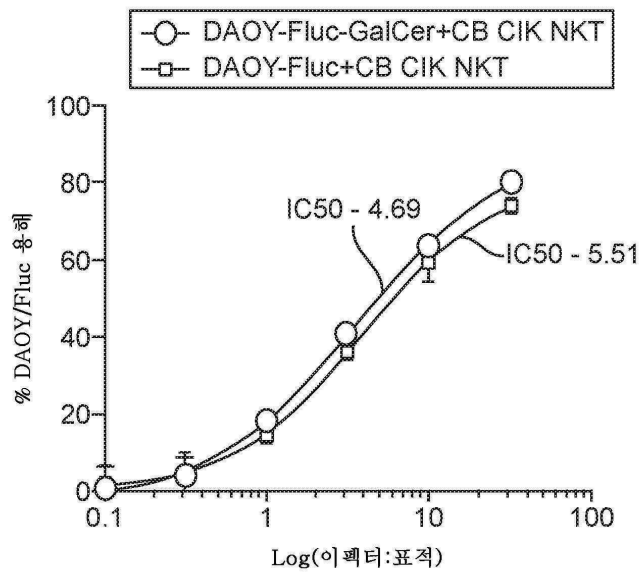
도면2



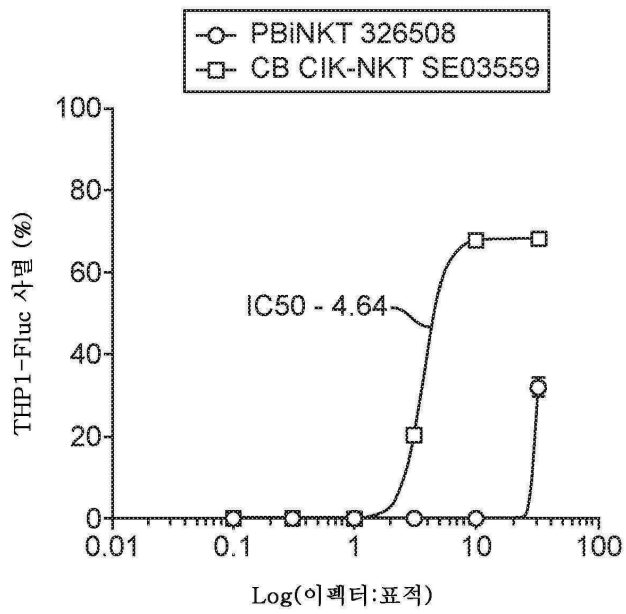
도 2b

도 2c

도면3a



도면3b



도면4

