



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0093419
(43) 공개일자 2025년06월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 40/15 (2025.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01) A61K 40/42 (2025.01)
A61P 31/12 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 40/15 (2025.01)
A61K 39/39 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2025-7019712(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2019년01월29일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2020-7024676
원출원일자(국제) 2019년01월29일
심사청구일자 2022년01월05일
- (85) 번역문제출일자 2025년06월13일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2019/015617
- (87) 국제공개번호 WO 2019/152387
국제공개일자 2019년08월08일
- (30) 우선권주장
62/623,682 2018년01월30일 미국(US)

- (71) 출원인
더 리서치 인스티튜트 앳 네이션와이드 칠드런스
하스피탈
미국 43205 오하이오주 콜럼버스 칠드런스 드라이
브 700 룸 더블유172
- (72) 발명자
리 딘 앤소니
미국, 오하이오 43110, 카날 원체스터, 2561 시털
리 로드
폴츠-스트링펠로우 제니퍼 안
미국, 미주리 63108, 세인트 루이스, 아파트먼트
134, 4444 웨스트 파인 블러바드
에드워즈-모세만 제나
미국, 오하이오 43230, 콜럼버스, 893 아리스 드
라이브
- (74) 대리인
특허법인한얼

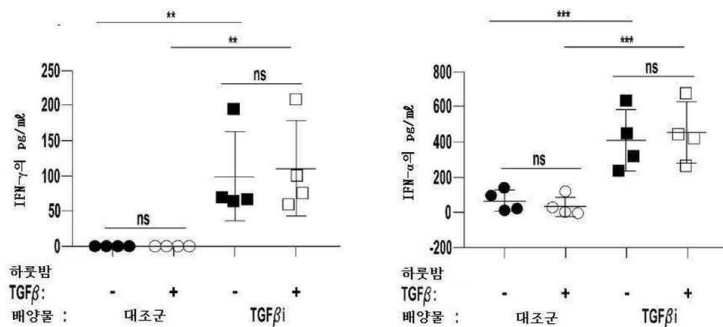
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 **형질전환 성장 인자 베타-내성 자연 살해 세포**

(57) 요약

높은 사이토카인 발현 및 TGF-β 수퍼패밀리 내성을 야기시키는 낮은 SMAD3 발현 및 변화된 유전자 발현 프로파일을 갖는 NK 세포가 기술되어 있으며, 이는 본 명세서에서 TGF-β 수퍼패밀리-각인된 자연 살해 세포(TGF β i NK 세포)로서 지칭된다. 암 또는 감염증의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암 또는 감염증을 치료하는 방법이 기술된다. 본 방법은 대상체에 치료학적 유효수의 TGF β i NK 세포를 투여하는 것을 포함한다. TGF β i NK 세포를 제조하는 방법은 TGF-β 수퍼패밀리 사이토카인의 존재하에서 자연 살해 세포의 시험관내 활성화에 의해 기술된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 40/4229 (2025.01)

A61P 31/12 (2018.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61P 35/02 (2018.01)

A61K 2039/515 (2013.01)

A61K 2239/46 (2023.05)

A61K 2239/47 (2023.05)

A61K 2239/48 (2023.05)

A61K 2239/55 (2023.05)

명세서

청구범위

청구항 1

암 또는 감염성 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암 또는 감염성 질환을 치료하는 방법으로서, 상기 대상체에게 치료학적 유효수의 형질전환 성장 인자(transforming growth factor)-베타(TGF- β) 슈퍼패밀리-각인된 자연 살해(Superfamily-Imprinted Natural Killer)(TGF β i NK) 세포를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 대상체가 감염성 질환을 갖는, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 감염성 질환이 바이러스 감염증인, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 대상체가 암을 갖는, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 암이 고형 종양인, 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 암이 백혈병, 림프종, 횡문근육종, 뇌, 및 골암으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 TGF β i NK 세포가 TGF- β 에 대해 내성이 있는, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 TGF β i NK 세포가 증가된 양의 IFN- γ , TNF- α 및 GM-CSF 중 하나 이상을 생성하는, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 TGF β i NK 세포가 SMAD3 단백질 및/또는 TGFBR3 단백질의 감소된 수준을 나타내는, 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 TGF β i NK 세포가 도 12에 도시된 것과 실질적으로 유사한 유전자 발현 프로파일을 갖는, 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 TGF β i NK 세포가 약제학적으로 허용 가능한 담체와 함께 투여되는, 방법.

청구항 12

TGF- β 슈퍼패밀리 사이토카인에 대한 증가된 내성을 나타내는 자연 살해(NK) 세포 또는 NK 세포주.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 NK 세포 또는 세포주가 TGF- β 에 대한 증가된 내성을 나타내는, NK 세포 또는 세포주.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 NK 세포가 증가된 양의 IFN- γ , TNF- α 및 GM-CSF 중 하나 이상을 생성하는, NK 세포 또는 세포주.

청구항 15

제12항에 있어서, 상기 NK 세포가 SMAD3 단백질 및/또는 TGFBR3 단백질의 감소된 수준을 나타내는, NK 세포 또는 세포주.

청구항 16

제12항에 있어서, 상기 NK 세포가 도 12에 도시된 것과 실질적으로 유사한 유전자 발현 프로파일을 갖는, NK 세포 또는 세포주.

청구항 17

제12항에 있어서, 상기 NK 세포가 TGF- β 의 존재하에서 자연 살해 세포의 시험관내 활성화에 의해 제조된, NK 세포 또는 세포주.

청구항 18

제12항에 있어서, 상기 NK 세포가 인간 NK 세포인, NK 세포 또는 세포주.

청구항 19

제12항에 있어서, 상기 NK 세포가 개 NK 세포인, NK 세포 또는 세포주.

청구항 20

TGF- β -수퍼패밀리 사이토카인의 존재하에서 자연 살해 세포를 시험관내 활성화시키는 것을 포함하는, TGF- β -수퍼패밀리 각인된 자연 살해(TGF β i NK) 세포주를 제조하는 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 TGF β i NK 세포주가 TGF- β 의 존재하에서 활성화되는, 방법.

청구항 22

제20항에 있어서, 백혈병 지지 세포(leukemia feeder cell)의 존재하에서 자연 살해 세포의 시험관내 활성화를 더 포함하는, 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 지지 세포가 K562 지지 세포인, 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 K562 지지 세포가 공동자극 단백질 및/또는 사이토카인을 발현시키도록 유전적으로 변형되는, 방법.

청구항 25

제20항에 있어서, NK-자극 엑소좀 또는 NK-자극 나노입자의 존재하에서 자연 살해 세포의 시험관내 활성화를 더 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2018년 1월 30일에 출원된 미국 가특허 출원 제62/623,682호를 우선권으로 주장하며, 이러한 문헌은 전문이 본 명세서에 참고로 포함된다.

배경 기술

[0003] 임상적 임의의 특정 종양 세포 마커를 필요로 하지 않으면서 종양 세포를 인식하고 이를 사멸시키는 능력으로 인해 입양 전달을 위해 자연 살해(NK) 세포를 사용하고자 하였다[Alizadeh *et al.*, Clin Cancer Res. 16(13): 3399-3408 (2010)]. 그러나, NK 세포 입양 전달 절차의 개발은 살아있는 세포의 제한된 공급에 의해 방해되었다. NK 세포는 혈액에서 세포의 작은 분율만을 나타내며, 통상적인 체혈로부터의 단리는 많은 세포를 수득하지 못한다. 또한, NK 세포는 각각 CD3 및 CD19 결실에 의해 T 세포 및 B 세포와 같은 오염된 PBMC로부터 정제되어야 한다[Childs *et al.*, American Society of Hematology (ASH) Education Book, vol. 2013 no. 1234-246 (2013)]. 이는 T 세포 및 B 세포의 존재가 이식편대숙주병(graft versus host disease: GVHD)의 위험을 증가시키지만 NK 세포 수율을 추가로 감소시키는 동종 이식을 위한 필수 단계이다.

[0004] NK 세포는 주로 조기 노화로 인해 다른 부류의 세포와 비교하여 시험관내에서 열악하게 확장한다. 심지어 가장 효과적인 방법을 이용하여도, NK 세포는 단지 몇 번의 계대배양 후 텔로미어 단축 및 노화에 민감하다[Denman *et al.*, PLoS ONE 7(1): e30264 (2012)]. 시험관내에서 NK 세포 생존능 및 증식을 증가시키기 위한 가장 효과적인 방법은 지지 세포(feeder cell)와의 공동-배양이다. NK 세포 확장을 위한 일반적으로 사용되는 지지 세포는 조사된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 엡스타인-바르 바이러스-형질 전환된 림프모구성 세포주(EBV-LCL), IL-15 또는 21을 구성적으로 발현하는 유전자-변형된 K562 세포, 및 다른 조사된 종양 세포주를 포함한다[Berg *et al.*, Cytotherapy, 11(3):341-55 (2009)]. 지지 세포와의 공동-배양은 집단이 1,000 내지 50,000배 증가하면서, NK 세포 생존능 및 증식을 유의미하게 증가시킨다.

[0005] 면역 요법은 생존이 지난 30년에 걸쳐 개선되지 않은 골육종(OS)과 같은 암의 결과를 개선시키기 위한 큰 가능성을 지닌다. 화학요법-내성 OS를 포함하는 OS는 자가 및 동종 활성화된 NK 세포 둘 모두에 의해 시험관내에서 용이하게 사멸된다. 그러나, OS 및 다른 고형 종양에서의 종양 미세환경은 상승된 수준의 고도의 면역억제성 사이토카인, 형질전환 성장 인자(transforming growth factor)-베타(TGF-β)를 갖는다[Lamora *et al.*, Clin Cancer Res 20: 5097-5112 (2014); Xu *et al.*, DNA Cell Biol, 33: 802-806 (2014)]. TGF-β에 차단 항체의 첨가는 OS에서 수지상 세포 백신의 효능을 개선하여(Kawano *et al.*, Clin Orthop Relat Res., 470: 2288-2294 (2012)), TGF-β가 OS에서 면역 요법을 능동적으로 억제한다는 원리의 증명을 제공하였다.

[0006] NK 세포 기능의 TGF-β의 억제는 다방면이다. TGF-β는 NK 세포의 발달을 조절하고, 후속하여 성숙에 도달 시에 이의 기능에 부정적인 영향을 미친다. TGF-β는 CD16+ NK 세포로의 NK 세포의 진행을 억제함으로써 미성숙 NK 세포 계통을 증진시킨다. TGF-β는 또한 이전에 CD16+ NK 세포가 CD16-가 되도록 유도할 수 있다[Keskin *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 104: 3378-3383 (2007)]. 또한, NK 세포에서 우성 음성 TGFβR을 발현시키는 마우스는 야생형 마우스와 비교하여 성숙한 NK 세포의 수를 증가시킨다[Viel *et al.*, Science signaling 9: ra19 (2016)].

[0007] 성숙한 NK 세포에서, TGF-β는 다수의 메커니즘을 통해 항종양 활성을 억제한다. TGF-β는 IL-2 및 IL-15 유도된 NK 세포 증식[Wilson *et al.*, PloS one 6: e22842 (2011)], 및 IL-15 유도된 mTOR 활성화[Viel *et al.*, Sci Signal., 16;9(415):ra19 (2016)]를 감소시킨다. TGF-β는 또한 IFNγ 분비를 억제하는데, 이는 적응 면역을 자극시키기 위해 중요하고, NK 세포 용해에 종양을 민감하게 할 수 있다. TGF-β는 IFNγ를 직접적으로 및 간접적으로 억제한다. SMAD3은 IFNγ 프로모터에 직접적으로 결합하고, 또한 IFNγ-증진 전사 인자, T-bet 및 E4BP4의 발현을 감소시킴으로써 간접적으로 IFNγ를 억제할 수 있다[Tang *et al.*, Nat Commun, 8: 14677 (2017)]. 그러나, IFNγ 분비의 TGF-β 매개된 억제는 IL-12, IL-15, 또는 IL-18과 함께 NK 세포의 사전-인큐베이션에 의해 부분적으로 완화될 수 있다[Yu *et al.*, Immunity, 24: 575-590 (2006)]. 또한, TGF-β는 또한 TNFα 및 GM-CSF 분비를 억제하고, 골수 내에서 NK 세포의 휴지를 증진시키기 위해 케모카인 수용체 발현을 조절한다[Castriconi *et al.*, J Immunol, 190: 5321-5328 (2013)].

[0008] 상세하게, TGF-β는 그랜자임(Granzyme) 및 퍼포린(Perforin) 분비를 감소시킴으로써 NK 세포 세포독성의 억제, 및 하기 활성 수용체의 발현을 매개한다: NKG2D, NKp30, KIRs, DNAM-1, NKp44, TRAIL, 및 CD16. 이는 동족 리간드를 발현시키는 악성 세포의 NK 세포 인식을 억제한다.

[0009] TGF-β에 대해 내성을 나타내는 NK 세포 및 T-세포를 생성하는 것에 관한 여러 방법이 존재한다. 이러한 것은

우성 음성 TGF β RII 발현 세포 및 면역-기반 치료법과 함께 TGF- β 소분자 억제제를 사용한 병용 요법을 포함한다. 중요하게, 이러한 모든 방법은 NK 세포 및 T-세포 요법의 증가된 시험관내 및 생체내 효능을 나타낸다 [Wallace *et al.*, Clin Cancer Res., 14(12):3966-74 (2008); Bollard, C., Blood, 99: 3179-3187 (2002)]. 그러나, TGF- β 의 넓은 스펙트럼 억제는 부작용에 대한 가능성을 갖는다. 왜냐하면, TGF- β 신호전달이 상황의 존적이고 중앙-중진 및 중앙-억제 효과를 가질 수 있기 때문이다. 예를 들어, 무린 모델에서 TGF- β 의 억제는 순환하는 중앙 세포의 수를 증가시켰으며 [Wrzesinski *et al.*, Clin Cancer Res., 13: 5262-5270 (2007)], TGF- β 의 넓은 스펙트럼 억제는 극심한 자가면역 질환을 야기시킨다 [Li *et al.*, Immunity 25: 455-471 (2006)]. 이에 따라, TGF- β 의 억제는 단지 주의하여 그리고 TGF- β 에 대한 중앙의 반응성을 결정한 후에 수행되어야 한다. 이에 따라, 선천적 TGF- β 내성을 생성시키는 비-전신 방법은 전신 TGF- β 억제가 가질 수 있는 부작용을 피하기 위한 유망한 대안이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 여러 타입의 암은 TGF- β 의 방출에 의해 NK 세포 사멸을 감소시킨다. 본 발명자는 TGF- β 에 대해 내성을 갖도록 NK 세포를 교육(각인(imprinting))시키는 비-유전적 방법을 개발하였다. TGF- β 각인된 NK(TGF β i NK) 세포는 IL-12/15/18로의 NK 세포의 자극 동안에 TGF- β 를 첨가함으로써 개발되었다. TGF β i NK는 정상 NK 세포보다 더 우수하게 자극 후의 이의 세포독성을 유지하였다. 추가적으로, TGF- β 와 함께 배양된 TGF β i NK 세포는 IFN- γ , TNF- α 및 GM-CSF의 분비를 증가시키며, 이는 중앙 사멸을 증가시킬 수 있고 적응성 면역 반응을 광범위하게 자극시킬 수 있다. 증가된 사이토카인 분비는 1개월 이상 동안 지속한다. TGF- β 에 대한 내성은 시험관내에서 적어도 1주 동안 지속하고, SMAD3 하향조절에 의해 매개된다.

도면의 간단한 설명

[0011] 본 발명은 하기 도면을 참조로 하여 더욱 용이하게 이해될 수 있다:

도 1은 TGF β 의 존재하에서 부모(변형되지 않은) K562로의 NK 세포 활성화가 중앙 표적에 반응하여 사이토카인 과다분비로 TGF β i NK 세포를 유도함을 나타낸 그래프를 제공한다. NK 세포는 K562에 의해 1주에 1회 자극받고, 14일 동안 IL-2(대조군) 또는 IL-2 및 10 ng/ml TGF β (TGF β i)를 함유한 배지 중에서 배양되었다. 배양 후에, IFN γ 및 TNF α 분비는 MG63 중앙 표적과 함께 공동-배양한 후에 상청액에서 평가되었다. 라인 및 막대는 평균 \pm SD를 나타낸 것이다. 통계적 차이는 다른 모든 그래프에 대해 Holm-Sidak의 다중 비교 시험과 함께 양방향 반복 측정 ANOVA에 의해 결정되었다. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

도 2는 TGF β 의 존재하에서 전염증성 사이토카인으로의 NK 세포 활성화가 중앙 표적에 반응하여 사이토카인 과다분비로 TGF β i NK 세포를 유도함을 도시한 그래프를 제공한다. NK 세포는 IL-2 및 TGF β 와 함께 또는 이의 없이 IL-12, -15, 및 -18(각각 10 ng/ml, 50 ng/ml, 및 50 ng/ml)로 하룻밤 활성화되고, 이후에 IL-2 및 TGF β 와 함께 또는 이의 없이 IL-15(1 ng/ml)에서 배양되었다. 7 내지 14일의 배양 후에, MG63에 반응한 항중앙 IFN γ 및 TNF α 생성은 세포내 유세포 분석(n=4)에 의해 측정되었다. 퍼센트 IFN γ + 및 TNF α + NK 세포는 표적 없는 것에 대해 정규화되었다. 모두에 대해 개개 데이터 포인트가 도시되었다. 통계적 차이는 다른 모든 그래프에 대해 Holm-Sidak의 다중 비교 시험과 함께 양방향 반복 측정 ANOVA에 의해 결정되었다. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

도 3은 TGF β 의 존재하에서 K562 mbIL-15(클론 4) 지지 세포로의 NK 세포 확장이 중앙 표적에 반응하여 사이토카인 과다분비로 TGF β i NK 세포를 유도함을 도시한 그래프를 제공한다. (TGF β i) TGF β 와 함께 또는 (대조군) TGF β 없이 지지 세포로의 14일 확장 후에, NK 세포는 10 ng/ml TGF β 와 함께 또는 이의 없이 50 IU/ml IL-2에서 하룻밤 휴지되었다. NK 세포는 이후에 동일한 배지에서 중앙 표적과 함께 공동-배양되었으며, 상청액은 사이토카인 분비를 측정하기 위해 수집되었다. 대조군은 검정색으로 표시되었으며, TGF β 는 적색으로 표시되었다. 다른 모든 그래프에 대해 Holm-Sidak의 다중 비교 시험과 함께 양방향 반복 측정 ANOVA에 의해 결정되었다. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

도 4는 TGF β 의 존재하에서 K562 mbIL-21 지지 세포로의 NK 세포 확장이 중앙 표적에 반응하여 사이토카인 과다분비로 TGF β i NK 세포를 유도함을 도시한 그래프를 제공한다. (TGF β i) TGF β 와 함께 또는 (대조군) TGF β 없이 지지 세포로의 14일 확장 후에, NK 세포는 10 ng/ml TGF β 와 함께 또는 이의 없이 50 IU/ml IL-2에서 하룻밤 휴지되었다. NK 세포는 이후에 동일한 배지에서 중앙 표적과 함께 공동-배양되었으며, 상청액은 사이토카인 분

비를 측정하기 위해 수집되었다. 대조군은 검정색으로 표시되었으며, TGFβ는 적색으로 표시되었다. 다른 모든 그래프에 대해 Holm-Sidak의 다중 비교 시험과 함께 양방향 반복 측정 ANOVA에 의해 결정되었다. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

도 5는 TGFβ i NK 세포를 생성시키기 위한 TGFβ의 첨가가 K562 mbIL-21(CSTX002) 지지 세포와의 확장 배양물에서 증식 가능성을 감소시키지 못함을 도시한 그래프를 제공한다. NK 세포는 0일에 동일한 수의 세포로부터 출발하여 5 도너로부터의 쌍을 이룬 배양물에서 (TGFβ i) TGFβ와 함께 또는 (대조군) TGFβ 없이 지지 세포 상에 14일 동안 확장되었다. 14일 후에 살아있는 세포의 총수가 도시되어 있고, 각 쌍을 이룬 확장을 위한 대조군 NK 세포로 정규화되었다. 스튜던트의 짝비교 t-테스트에 의해 유의미하지 않음.

도 6은 TGFβ i NK 세포가 몇 주 동안 종양 세포에 대한 사이토카인 과다분비를 유지한다는 것을 도시한 그래프를 제공한다. A) 14일 동안 부모 K562 지지 세포로 확장되거나(확장) 확장되고 추가적인 7일 동안 휴지된(휴지) TGFβ i 및 대조군 NK 세포는 MG63 표적 세포와 공동-배양되었으며, 상청액은 사이토카인 분비에 대해 평가되었다. B) 유사한 실험에서, K562mbIL-21 확장된 대조군 및 TGFβ i NK 세포로의 MG63에 대한 사이토카인 분비는 확장 7일 및 14일에 평가되었고, 21, 35 및 47일에 휴지 후에 다시 평가되었다. 최소에서 최대 위스커 사이의 중간값이 도시되어 있다. 대조군은 검정색으로 나타내며, TGFβ i는 적색으로 나타낸다. 통계적 차이는 짝비교 t-테스트에 의해 결정되었다. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

도 7은 TGFβ i NK 세포가 다수의 암에 대한 사이토카인 과다분비를 나타냄을 도시한 그래프를 제공한다. 대조군 조건 하에서 또는 TGFβ i NK 세포를 유도하기 위해 존재하는 TGFβ로 14일 확장 후에, NK 세포는 IL-2 또는 TGFβ와 함께 또는 이의 없이 하룻밤 휴지되었다. NK 세포는 이후에 3시간 동안 동일한 새로운 배지에서 종양 표적과 공동-배양되었으며, 상청액은 IFNγ 및 TNFα 사이토카인 분비를 측정하기 위해 수집되었다. DAOY(수모세포종, n=12) 및 CHLA-255(신경모세포종, n=5)에 대한 개개 데이터 포인트가 도시되어 있다. 라인 및 막대는 평균 ±SD를 나타낸 것이다.

도 8은 TGFβ i NK 세포가 TGFβ i-신호전달 단백질, SMAD3의 급격한 하향조절을 나타냄을 도시한 그래프를 제공한다. 대조군 조건 하에서 또는 TGFβ i NK 세포를 유도하기 위해 존재하는 TGFβ로 14일 확장 후에, NK 세포는 웨스턴 블롯에 의해 SMAD3 및 E4BP4의 단백질 발현에 대해 평가되었다(n=4).

도 9는 TGFβ i NK 세포가 GM-CSF, TNFα, 및 IFNγ를 과다분비함을 도시한 그래프를 제공한다. 대조군 및 TGFβ i NK 세포는 4시간 동안 2×10^6 NK 세포/ml로 $10 \mu\text{g/ml}$ 의 PHA로 자극되었으며, 사이토카인 분비가 측정되었다. 라인 및 막대는 평균 ±SD를 나타낸 것이다. 통계적 차이는 짝비교 t-테스트에 의해 결정되었다.

도 10은 부모 K562로 확장된 TGFβ i NK 세포가 대조 NK 세포와 유사한 세포독성을 가짐을 도시한 그래프를 제공한다. 대조군 및 TGFβ i NK 세포 세포독성은 IL-2 단독 또는 IL-2 및 TGFβ에서의 하룻밤 처리 후, 4-시간 칼세인-방출 세포독성 검정을 이용하여 측정되었다. 라인 및 막대는 평균 ±SD를 나타낸 것이다. 다른 모든 그래프에 대해 Holm-Sidak의 다중 비교 시험과 함께 양방향 반복 측정 ANOVA에 의해 결정되었다. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

도 11은 확장된 TGFβ i NK 세포가 골육종의 마우스 모델에서 대조군 확장된 NK 세포보다 더 양호하게 종양 성장을 제어한다는 것을 도시한 그래프를 제공한다. 대조군 NK 세포 상에서 확장하지 않지만 K562mbIL-21 지지 세포 상에서 확장된 TGFβ i NK 세포로의 마우스의 치료는 NSG 마우스의 폐에서 143b 골육종 세포주의 성장을 유의미하게 감소시킨다.

도 12는 TGFβ i NK 세포가 표준 팽창된 NK 세포와 구별되는 유전자 발현 프로파일을 갖는 것을 도시한 그래프를 제공한다. 표준 NK 세포 및 TGFβ i NK 세포는 4마리의 도너로부터의 CSTX002 상에서 쌍으로 확장되었다. mRNA가 단리되고, RNA 시퀀싱으로 처리되었다. 상위 100개의 구별되는-발현된 유전자가 동정되었다. A) 주 성분 분석이 수행되었으며, 여기서, 원래 값은 $\ln(x+1)$ -변형된다. 단위 분산 스케일링은 행에 적용되며, 주 성분을 계산하기 위해 대치(imputation)를 갖는 SVD가 이용된다. X축 및 Y축은 전체 분산의 95.4% 및 1.6%를 각각 설명하는 주 성분 1 및 주 성분 2를 나타낸다. TGFβ i NK 세포는 적색 박스에서 식별된다. 95% 초과 분산은 TGFP-각인에 의한 것이며, 2% 미만은 도너 차이의 결과이다. B) 클러스터링 분석은 동일한 log-변형된 데이터에서 수행되었다. 행은 중앙에 있으며, 단위 분산 스케일링은 행에 적용된다. 행 및 칼럼 둘 모두는 상관 거리 및 평균 연관을 이용하여 클러스터링된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명은 고도로 세포독성을 나타내고, 높은 수준의 사이토카인을 생성하고, 면역억제성 사이토카인의 TGF- β 수퍼패밀리에 대해 내성을 나타내는, TGF- β 각인된 자연 살해(TGF β i NK) 세포를 제공한다. 이러한 세포는 TGF- β 수퍼패밀리 사이토카인의 존재하에서 자연 살해 세포의 만성 시험관내 활성화에 의해 제조될 수 있다. 본 발명은 또한 암 또는 감염증의 치료를 필요로 하는 대상체에 치료학적 유효수의 TGF β i NK 세포를 투여함으로써 이를 필요로 하는 대상체에서 암 또는 감염증을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0013] 정의
- [0014] 전반에 걸쳐 사용되는 용어의 리스트를 참조하여 명확하게 이해하고 용이하게 하기 위해, 간단한 설명 섹션 및 본 출원의 나머지 부분은 본 명세서에서 편집되었다. 일부 용어는 본 분야 전반에 걸쳐 널리 공지되어 있고, 명확성을 위해 본 명세서에서 규정되며, 일부 용어는 본 출원에 고유하고, 이에 따라, 본 출원의 적절한 이해를 위해 규정되어야 한다.
- [0015] 단수 형태는 본 명세서에서 하나 또는 하나 초과; 적어도 하나를 의미한다. 본 명세서에서 복수 형태가 사용되는 경우에, 이는 일반적으로 단수형을 포함한다.
- [0016] 또한 본 명세서에서 종료점에 의한 수치 범위의 인용은 그러한 범위 내에 포함된 모든 숫자를 포함한다(예를 들어, 1 내지 5는 1, 1.5, 2, 2.75, 3, 3.80, 4, 5, 등을 포함한다).
- [0017] 본 명세서에서 사용되는 용어 "대상체"는 인간, 랫트, 마우스, 개, 염소, 양, 말, 원숭이, 유인원, 돼지, 토끼, 소, 등을 포함하지만 이로 제한되지 않는 임의의 온혈 유기체를 지칭할 수 있다. 이러한 용어가 본 출원의 조성물을 필요로 하거나 요구하는 대상체와 관련하여 사용될 때, 이러한 용어는 "이를 필요로 하는 대상체"로서 지칭될 수 있고, 본 출원의 조성물을 필요로 하는 것으로서 (예를 들어, 의료 전문가, 예를 들어, 의사에 의해) 임상적으로 진단된 대상체, 본 출원의 조성물을 필요로 할 것으로 의심되는 대상체, 질환 또는 병태에 대한 위험이 있고 본 출원의 조성물로부터 이익을 얻을 수 있는 대상체, 및 질환 또는 병태로부터 이미 고통받고 있고 본 출원의 조성물로부터 이익을 얻을 수 있는 대상체를 포함할 수 있다.
- [0018] 본 명세서에서 사용되는 용어 "약제학적으로 허용 가능한"은 건전한 의학적 판단의 범위 내에서, 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응, 또는 다른 문제 또는 합병증 없이, 합리적인 이익/위험 비율에 상응하여, 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합한 그러한 화합물, 물질, 조성물, 및/또는 투약 형태를 지칭한다.
- [0019] 용어 "치료학적으로 유효한"은 대체 요법과 통상적으로 관련된 것과 같은 부작용을 피하면서 질환 중증도를 감소시킬 목표를 달성하는 제제의 수 또는 양을 한정하기 위해 의도된다. 치료학적 유효량은 1회 이상의 용량으로 투여될 수 있다. 치료학적으로 유효한 치료는 대상체가 질환 결과 자체를 개선시키지 못하더라도 대상체의 삶의 질을 개선시키는 치료를 포함한다.
- [0020] "유효량"은 일반적으로 본 출원에 기술된 특정의 요망되는 효과를 달성하는 것을 포함하여, 예를 들어, 사이토카인 형성을 자극시키기에 효과적이며, 요망되는 국소 또는 전신 효과를 제공하는 양을 의미한다. 예를 들어, 유효량은 유익하거나 요망되는 임상 결과를 달성하기에 충분한 양이다.
- [0021] "치료하다", "치료하는", 또는 "치료"는 본 발명과 관련하여 광범위하게 사용되며, 이러한 각 용어는 특히 치료법을 방해하고/거나 이로부터 초래되는 것을 포함하는, 결핍, 기능 장애, 질환, 또는 다른 유해한 과정을 예방, 개선, 억제 또는 치료하는 것을 포함한다. 다양한 실시형태에서, 질환 또는 장애의 증상은 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 또는 적어도 50% 완화된다.
- [0022] 본 명세서에서 사용되는 용어 "투여하다"는 그러한 요망되는 효과가 생성되도록 요망되는 부위에서 조성물의 적어도 일부 국소화를 야기시키는 방법 또는 경로에 의해 대상체 내에 조성물(예를 들어, 세포 조성물)의 배치를 지칭한다. 본 명세서에 기술된 내성 자연 살해 세포 또는 조성물은 경구, 또는 정맥내, 근육내, 피하, 경피, 기도(에어로졸), 폐, 비강, 직장, 및 국소(협착 및 설하를 포함함) 투여를 포함하는 비경구 경로를 포함하지만 이로 제한되지 않는 당해 분야에 공지된 임의의 적절한 경로에 의해 투여될 수 있다.
- [0023] 본 명세서에서 사용되는 용어 "사이토카인"은 세포 신호전달 및 특히 면역조절에서 중요한 작은 단백질(약 5 내지 20 kDa)을 지칭한다. 사이토카인의 예는 케모카인, 인터페론, 인터루킨, 림포카인, 및 종양 괴사 인자를 포함한다.
- [0024] TGF β i NK 세포를 사용한 치료
- [0025] 일 양태에서, 본 발명은 암 또는 감염증의 치료를 필요로 하는 대상체에서 암 또는 감염증을 치료하는 방법을

제공한다. 본 방법은 대상체에 치료학적 유효수의 TGF-β 각인된 자연 살해(TGF-β i NK) 세포를 투여하는 것을 포함한다. 본 명세서에 기술된 바와 같이, TGF-β i NK 세포는 TGF-β 수퍼패밀리의 사이토카인에 대한 이의 내성이 면역계에 의한 억제제를 보호하기 때문에 통상적인 확장된 자연 살해 세포와 비교하여 더욱 효과적일 수 있고 생체 내에서 더 오랫동안 지속될 수 있다.

[0026] 본 명세서에서 사용되는 "자연 살해 세포"(NK 세포)는 면역계의 세포독성 림프구의 하나의 타입을 지칭한다. NK 세포는 바이러스 감염된 세포에 대한 신속한 반응을 제공하고 형질전환된 세포에 반응한다. 통상적으로, 면역 세포는 감염된 세포의 표면 상에서 주요 조직 적합성 유전자 복합체(Major Histocompatibility Complex: MHC) 분자에 의해 제시된 병원체로부터 펩타이드를 검출하여, 사이토카인 방출을 촉발시키거나 용해 또는 아포토시스를 야기시킨다. 그러나, NK 세포는 이러한 것이 병원체로부터의 펩타이드가 MHC 분자 상에 존재하는지의 여부와는 관계없이 스트레스 받은 세포(stressed cell)를 인식하는 능력을 갖기 때문에, 독특한 것이다. 이러한 것은 표적을 살해하기 위해 사전 활성화를 필요로 하지 않다는 초기 개념으로 인해 "자연 살해"로 명명되었다. NK 세포는 대형 과립 림프구(LGL)이고, 골수에서 분화하고 성숙하는 것으로 알려져 있고 이로부터 이러한 것은 이후에 순환계로 진입한다.

[0027] 본 발명은 형질전환 성장 인자-베타(TGF-β) 수퍼패밀리의 사이토카인에 대해 내성을 나타내는 NK 세포, 및 이러한 내성 NK 세포를 제조하고 사용하는 방법을 포함한다. TGF-β 수퍼패밀리는 구조적으로 관련된 세포 조절 단백질의 큰 그룹이다. TGF-β는 여러 세포 타입에서 증식, 분화 및 다른 기능을 제어하는 다기능 펩타이드이다. TGF-β-1은 전구체 단백질의 C-말단으로부터 단백질 가수분해 절단에 의해 유도된 112개의 아미노산 잔기의 펩타이드이다. 이러한 단백질은 세포 표면 세린/트레오닌-특이적 단백질 키나제 수용체의 보존된 패밀리와 상호작용하고, SMAD로 불리워지는 보존된 단백질 패밀리를 사용하여 세포내 신호를 발생시킨다. TGF-β 수퍼패밀리의 주요 서브패밀리는 TGF-β 서브패밀리(TGF-β 1 내지 4 아이소형을 포함함), 데카펜타플렉 Vg-관련(decapentaplegic Vg-related: DVR) 관련 단백질(예를 들어, 골 형태형성 단백질), 성장 분화 인자(예를 들어, GDF-1 내지 GDF-15), 및 액티빈 및 인히빈 서브패밀리를 포함한다. 일부 실시형태에서, TGF-β i NK 세포는 TGF-β에 대해 내성이 있다.

[0028] TGF-β i NK 세포는 대상체에서 암 또는 감염증을 치료하기 위해 사용될 수 있다. TGF-β i NK 세포는 통상적으로 세포의 입양 전달에 의해 투여된다. 일부 실시형태에서, 대상체는 암을 갖는 것으로 진단된다. 본 명세서에서 규정된 바와 같이, 암은 세포의 비교적 제한되지 않은 성장을 초래하는 유전적 손상을 포함하는 세포의 발달을 기초로 한 질환이다. 암 세포에 존재하는 유전적 손상은 다음 세대의 암 세포주에서 유전적 특성으로서 유지된다. 본 발명의 방법에 의해 치료되는 암은 당업자에게 알려져 있거나 본 명세서에 기술된 임의의 형태의 암일 수 있다. 고형 종양 및 대신에 통상적으로 백혈병에서 나타나는 바와 같은 비-고형 종양을 형성하는 암 둘 모두로서 나타내는 암이 치료될 수 있다. 본 발명은 암종, 육종, 및 림프종을 포함하는 다양한 상이한 타입의 암에 걸린 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.

[0029] 일부 실시형태에서, 치료되는 암에는 백혈병(예를 들어, 급성 림프모구 백혈병; 급성 골수성 백혈병; 만성 골수성 백혈병, 만성 림프성 백혈병), 골수형성이상 증후군, 림프종(예를 들어, B 세포 비-호지킨 림프종, 호지킨 림프종, T-세포 림프모구 림프종, 역형성 큰 세포 림프종), 고형 종양(예를 들어, 유방암, 전립선암, 위암, 결장암, 간세포 암종, 상인두 암종, 신경모세포종, 고악성도 신경교종), 육종(예를 들어, 유방 육종, 횡문근육종, 비-횡문근육종 연조직 육종, 골육종)이 있다. 추가 실시형태에서, 암은 백혈병, 림프종, 횡문근육종, 뇌암, 및 골암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0030] 암 치료의 효과는 TGF β i NK 세포의 투여에 반응하여 대상체에서 종양 부하의 감소 또는 종양 성장의 감소를 평가함으로써 측정될 수 있다. 종양 부하의 감소는 질량의 직접적인 감소를 나타낼 수 있거나, 이는 종양 성장 지연의 관점에서 측정될 수 있는데, 이는 치료된 종양이 동일한 용적까지 성장하는 데 필요한 시간에서 대조군 종양이 특정 용적까지 성장하는 평균 시간을 차감함으로써 계산된다.

[0031] 다른 실시형태에서, 치료되는 대상체는 감염성 질환을 갖는다. TGF β i NK 세포는 광대역 전신 효과(broad-band systemic effect)를 가지고, 다양한 상이한 미생물에 의한 감염증을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "감염성 질환"은 바이러스, 병원성 박테리아, 또는 진균으로의 감염에 의해 야기되고 호흡기, 혈액 또는 피부 접촉을 통해 감염될 수 있는 모든 질환을 포함하는 것을 의미한다. 이러한 감염성 질환의 비제한적인 예는 B형 간염, C형 간염, 인간 유두종 바이러스(HPV) 감염증, 인간 면역결핍병(HIV), 사이토메갈로 바이러스 감염증, 바이러스성 호흡 병태, 인플루엔자, 등을 포함하지만, 이로 제한되는 것은 아니다.

[0032] TGF-β 각인된 자연 살해 세포

- [0033] 본 발명의 다른 양태는 본 명세서에서 TGFβ_i NK 세포로서 지칭되는, TGF-β 수퍼패밀리 사이토카인의 존재하에서 배양된 자연 살해(NK) 세포 또는 NK 세포주를 제공한다. 이는 본 명세서에 기술된 방법에 의해 생성된 NK 세포 또는 세포주, 및 본 명세서에 제공된 NK 세포를 포함하는 조성물을 포함한다. 특별한 양태에서, 조성물은 본 명세서에 제공된 NK 세포 또는 세포주 중 하나 이상을 포함하는 약제 조성물이다. 일부 실시형태에서, TGFβ_i NK 세포는 TGF-β에 대한 내성의 증가를 나타낸다.
- [0034] TGFβ_i NK 세포는 동종 또는 자가 세포일 수 있다. 일부 양태에서, NK 세포는 포유류 NK 세포이다. "포유류" 또는 "포유동물"의 예는 영장류(예를 들어, 인간), 개, 고양이, 설치류, 돼지, 반추동물, 등을 포함한다. 특정 예는 인간, 개, 고양이, 말, 소, 양, 토끼, 기니 피그, 랫트 및 마우스를 포함한다. 특별한 실시형태에서, 포유류 NK 세포는 인간 NK 세포이다.
- [0035] TGFβ_i NK 세포는 자연 발생 NK 세포와 구별되는 다수의 특징을 나타낸다. 일부 실시형태에서, NK 세포 또는 세포주는 TGF-β에 대한 내성 증가를 나타낸다. 다른 실시형태에서, NK 세포는 생성되고, 인터페론-γ (IFN-γ), 및/또는 종양 괴사 인자-α (TNF-α), 및/또는 과립구-대식 세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF)의 양을 증가시킨다. 추가 실시형태에서, NK 세포는 SMAD 패밀리의 멤버 3(SMAD3) 단백질 및/또는 형질전환 성장 인자 베타 수용체 III(TGFBR3) 단백질 수준의 감소를 나타낸다. SMAD 단백질은 이의 명칭을 C. 엘레강스(*C. elegans*) Sma 및 드로소필라(*Drosophila*) Mad의 명칭의 축약형으로서 받아들여지고[Derynck *et al.*, Cell, 95(6), p737-740, 1998], TGF-β 반응의 전사 활성제이다.
- [0036] TGFβ_i NK 세포는 자연 발생 NK 세포와 구별되는 다수의 특징을 나타낸다. 일부 실시형태에서, NK 세포는 도 12에 도시된 것과 실질적으로 유사한 유전자 발현 프로파일을 갖는다. 실질적으로 유사한 유전자 발현 프로파일은 유전자 발현이 나타난 발현의 10% 이내인 것이다. 일부 실시형태에서, TGFβ_i NK 세포는 증가된 양의 IFN-γ, TNF-α 및 GM-CSF 단백질 중 하나 이상을 생성한다. 일부 실시형태에서, NK 세포 또는 세포주는 SCUBE1, MYO7A, KLF3, WIPF3, 및 EPHA1 발현의 증가를 나타낸다.
- [0037] TGFβ_i NK 세포는 자연 발생 NK 세포와 구별되는 다수의 특징을 나타낸다. 일부 실시형태에서, TGFβ_i NK 세포는 SMAD3 단백질 및/또는 TGFBR3 단백질 수준의 감소를 나타낸다. 일부 실시형태에서, NK 세포 또는 세포주는 CD300A, SGSM1, SMAD3, TBX21, 및 GZMK, TGFBR3, 및 GZMA 발현의 감소를 나타낸다.
- [0038] TGF-β-수퍼패밀리 각인된 자연 살해(Superfamily-Imprinted Natural Killer)(TGFβ_i NK) 세포주의 제조
- [0039] 본 발명의 다른 양태는 TGF-β-수퍼패밀리 사이토카인의 존재하에서의 자연 살해 세포의 시험관내 활성화를 포함하는, TGF-β-수퍼패밀리 각인된 자연 살해(TGFβ_i NK) 세포주를 제조하는 방법을 제공한다. 본 방법은 본 명세서에 제공된 방법에 의해 생성된 하나 이상의 TGFβ_i NK 세포를 단리시키거나 분리시키는 것을 더 포함할 수 있다. 또한, 본 방법은 하나 이상의 TGFβ_i NK세포를 배양하는 것을 더 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, TGFβ_i NK 세포주가 생성된다. 일부 실시형태에서, TGFβ_i NK 세포주는 TGF-β의 존재하에서 확장된다. 세포주는 세포 배양물에 유지될 수 있는 복수의 세포이다.
- [0040] 확장(즉, 활성화)은 NK 세포의 집단이 증가되도록 NK 세포의 세포의 증식을 지칭한다. NK 세포는 예를 들어, 말초 혈액 단핵 세포로부터 확장될 수 있다. 그러나, NK 세포는 또한 다른 타입의 세포, 예를 들어, 조혈 줄기세포 또는 전구 세포로부터 확장될 수 있다. 초기 혈액 또는 줄기세포는 다양한 상이한 공급원, 예를 들어, 태반, 제대혈, 태반 혈액, 말초 혈액, 비장 또는 간으로부터 단리될 수 있다. 확장은 세포 배양 배지에서 일어난다. 적합한 세포 배양 배지는 당업자에게 공지되어 있고, 기초 배지 이글(Basal Medium Eagle: BME), 둘베코 변형된 이글 배지(DMEM), 글라스고우 최소 필수 배지(Glasgow Minimum Essential Medium: GMEM), 둘베코 변형된 이글 배지/영양소 혼합물 F-12 Ham(DMEM/F-12), 최소 필수 배지(MEM), 이스코브 변형된 둘베코 배지(IMDM), 영양소 혼합물 F-10 Ham(Ham's F-10), 영양소 혼합물 F-12 Ham(Ham's F-12), RPMI-1640 배지, 윌리엄 배지 E, STEMSPAN[®] (Cat. No. Stem Cell Technologies, 캐나다 밴쿠버 소재), 글리코스텝 기초 성장 배지(GBGM[®]), AIM-V[®] 배지(Invitrogen), X-VIVO[™] 10(Lonza), X-VIVO.TM. 15(Lonza), OPTIMIZER(Invitrogen), STEMSPAN[®] H3000(STEMCELL Technologies), CELLGRO COMPLETE[™](Mediatech), 또는 임의의 변형된 변종 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0041] 본 명세서에서 사용되는 용어 "지지 세포(feeder cell)"는 분화하고 증식하는 능력을 가지고 있지 않지만 대사 활성을 가지고 이에 따라 표적 NK 세포의 증식을 돕는 다양한 대사 산물을 생성시키는 세포를 지칭한다. 본 발명에서 사용될 수 있는 지지 세포의 예는 유전자가 도입된 동물 세포주, 다양한 사이토카인 또는 화합물로 처리된 말초 혈액 백혈구(PBL), 자가 또는 동종 말초 혈액 백혈구(PBL), T-세포, B-세포, 단핵구, 등을 포함하지만,

이로 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 지지 세포는 K562 지지 세포이다. 추가 실시형태에서, K562 지지 세포는 클론 4 세포, 클론 9 세포, 및 CSTX002 세포로부터 선택된다.

[0042] 일부 실시형태에서, 자연 살해 세포의 시험관내 활성화는 NK-자극 엑소좀 또는 NK-자극 나노입자의 존재하에서 수행된다. 엑소좀은 직경이 30 내지 100nm인, 엔도솜으로부터 유래된 작은 세포의 소포이다. 중앙-유래된 엑소좀은 중앙 세포로부터의 다수의 분자 및 인자를 지니고, 자연 살해 세포를 자극시키기 위해 사용될 수 있다[Li *et al.*, *Exp Cell Res.*, 363(2): 141-150 (2018)]. 나노입자는 또한 자연 살해 세포를 자극시키기 위해 사용될 수 있다. 나노입자는 주변 계면층을 갖는 크기가 1 내지 2500nm인 입자이다. 이는 크기가 1 내지 100nm인 초미세 나노입자, 및 크기가 100 내지 2500nm인 미세 나노입자를 포함한다. 나노입자는 폴리머, 또는 미네랄, 예를 들어, 그래핀 옥사이드를 사용하여 제조될 수 있다. 일부 실시형태에서, 나노입자는 자연 살해 세포를 자극시키는 데 도움을 주는 항체와 같은 추가적인 기를 포함하도록 작용화된다[예를 들어, 문헌[Loftus *et al.*, *Nano Lett.*, 18(5):3282-3289 (2018)] 참조].

[0043] 투여량 및 투여

[0044] TGFβi NK 세포는 투여 부위 및 방법, 투여 스케줄, 환자 연령, 성별, 체중, 치료되거나 예방되는 장애의 특성 및 중증도, 및 의사에게 공지된 다른 인자를 고려하여, 건전한 의료 행위에 따라 투여되고 투약되어야 한다. 세포는 1회 용량 또는 분할된 용량으로 투여될 수 있다. 이에 따라, 본 명세서의 목적을 위한 억제학적 "유효량"은 당해 분야에 공지된 바와 같이 이러한 고려사항에 의해 결정된다. 양은 생존율 개선 또는 더 빠른 회복, 또는 당업자에 의해 적절한 조치로서 선택된 바와 같은 증상 또는 적응증의 개선 또는 제거를 포함하지만 이로 제한되지 않는 개선을 달성하기에 효과적이어야 한다.

[0045] 통상적으로, 상기 용량은 약 10×10^6 개의 세포/대상체 체중 kg 이하이거나 약 9×10^6 개의 세포/kg 이하이거나, 약 8×10^6 개의 세포/kg 이하이거나, 약 7×10^6 개의 세포/kg 이하이거나, 약 6×10^6 개의 세포/kg 이하이거나, 약 5×10^6 개의 세포/kg 이하이다. 대안적인 실시형태에서, 상기 용량은 약 0.25×10^6 개의 세포/kg 내지 약 5×10^6 개의 세포/kg; 또는 더욱 바람직하게는 약 1×10^6 개의 세포/kg 내지 약 5×10^6 개의 세포/kg일 수 있다. 이에 따라, 다른 대안적인 실시형태에서, 용량은 약 0.25×10^6 개의 세포/kg, 0.5×10^6 개의 세포/kg, 0.6×10^6 개의 세포/kg, 0.7×10^6 개의 세포/kg; 0.8×10^6 개의 세포/kg; 0.9×10^6 개의 세포/kg; 1.1×10^6 개의 세포/kg; 1.2×10^6 개의 세포/kg; 1.3×10^6 개의 세포/kg; 1.4×10^6 개의 세포/kg; 1.5×10^6 개의 세포/kg; 1.6×10^6 개의 세포/kg; 1.7×10^6 개의 세포/kg; 1.8×10^6 개의 세포/kg; 1.9×10^6 개의 세포/kg 또는 2×10^6 개의 세포/kg일 수 있다. 용량은 다른 실시형태에서 0.1 내지 1백만개의 세포/kg; 또는 1 내지 2백만개의 세포/kg; 또는 2 내지 3백만개의 세포/kg; 또는 3 내지 4백만개의 세포/kg; 또는 4 내지 5백만개의 세포/kg; 또는 5 내지 6백만개의 세포/kg; 또는 6 내지 7백만개의 세포/kg; 또는 7 내지 8백만개의 세포/kg; 또는 8 내지 9백만개의 세포/kg; 또는 9 내지 1천만개의 세포/kg일 수 있다.

[0046] 예시적인 투여 모드는 주사, 주입, 적하, 흡입, 또는 소화를 포함하지만, 이로 제한되는 것은 아니다. "주사"는 비제한적으로, 정맥내, 근육내, 동맥내, 척수내, 심실내, 피막내, 안와내, 심장내, 피부내, 복강내, 기관경유, 피하, 각피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 뇌척수내, 및 줄기내 주사 및 주입을 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 조성물은 정맥내 주입 또는 주사에 의해 투여된다.

[0047] TGFβi NK 세포는 인간 투여를 위한 충분히 멸균된 조건 하에서 제조된 등장성 부형제를 포함하는, 약제 조성물 형태로 공급될 수 있다. 조성물은 멸균될 수 있다. 제형은 투여 모드에 적합해야 한다. 의약 제형의 일반적인 원리를 위해, 독자는 문헌[Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy, by G. Morstyn & W. Sheridan eds, Cambridge University Press, 1996; and Hematopoietic Stem Cell Therapy, E. D. Ball, J. Lister & P. Law, Churchill Livingstone, 2000]을 지칭한다. TGFβi NK 세포의 집단을 포함하는 조성물의 세포내 부형제 및 임의의 첨부된 요소의 선택은 투여를 위해 사용되는 경로 및 디바이스에 따라 조정될 것이다.

[0048] 일부 실시형태에서, TGFβi NK 세포는 약제학적으로 허용 가능한 담체와 함께 투여된다. 적합한 약제학적으로 허용 가능한 담체는 염 용액(예를 들어, NaCl), 염수, 완충된 염수, 알코올, 글리세롤, 에탄올, 아라비아검, 식물성 오일, 벤질 알코올, 폴리에틸렌 글리콜, 젤라틴, 탄수화물, 예를 들어, 락토스, 전분의 아밀로스, 텍스트로스, 마그네슘 스테아레이트, 탭크, 규산, 점성 과라핀, 향수 오일, 지방산 에스터, 하이드록시메틸셀룰로스,

폴리비닐 피롤리돈 등뿐만 아니라 이들의 조합을 포함하지만, 이로 제한되는 것은 아니다. 약제학적 제조물은 요망되는 경우에 활성 화합물과 유해하게 반응하지 않는, 보조제, 예를 들어, 윤활제, 보존제, 안정화제, 습윤제, 유화제, 삼투압에 영향을 미치기 위한 염, 완충제, 착색제, 착향제 및/또는 방향 물질 등과 혼합될 수 있다.

[0049] 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 실시형태를 설명하기 위해 포함된다. 당업자는, 하기 실시예에 개시되는 기술이 본 발명의 실시예에 있어서 잘 기능하는 것으로 본 발명자에 의해 발견된 기술을 나타내고, 이에 따라 이의 실시를 위한 바람직한 모드를 구성하는 것으로 간주될 수 있다는 것을 인식해야 한다. 그러나, 당업자는 본 개시에 비추어, 개시되는 특정 실시형태에서 많은 변경이 이루어질 수 있고, 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않으면서 같거나 유사한 결과를 여전히 얻을 수 있다는 것을 인식해야 한다.

[0050] 실시예

[0051] 실시예 1: TGF-β 내성을 나타내도록 TGF-β에 의한 NK 세포의 각인화

[0052] 본 발명자는 가장 가능하게 주요 TGF-β 신호전달 단백질 중 하나-SMAD3의 손실을 통해, TGF-β에 대한 감수성이 감소된 TGF-β 배양으로 확장된 인간 NK 세포(TGFβ i NK)를 생성하였다. 본 발명자는 a) TGFβ i NK 세포가 종양 표적에 대해 IFN-γ, TNF-α 및 GM-CSF 분비를 상당히 증가하였고 b) TGFβ i NK 세포가 활성화 후 적어도 1개월 동안 사이토카인 과다 분비를 유지한다는 것을 입증한다.

[0053] 방법

[0054] 세포 배양: NK 세포는 글루타맥스(Glutamax), 10% FBS 및 항생제가 보충된 RPMI 1640 배지 중에서 배양되었다. 모든 세포는 Lonza MycoAlert(Lonza, LT027-58)를 이용하여 마이코플라스마(Mycoplasma) 오염에 대해 관례대로 시험되고, 모든 시점에 네가티브(negative)인 것으로 확인되었다. K562 지지 세포는 ATCC(CCL-243)로부터 구매되었고 100 Gy에서 조사되었다.

[0055] NK 세포 확장: 정제된 일차 인간 NK 세포는 0일에 조사된 K562와 1:2로 자극화되었고 7일에 1:1로 자극화되었다. 사용된 K562 세포주는 도면 범례에서, 변경되지 않음(부모), 4-1BBL 및 막-결합된 IL-15(클론 4), 또는 발현 4-1BBL 및 막-결합된 IL-21(클론 9 또는 CSTX002)로서 지시된다. 표준 확장된 NK 세포에는 50 IU/ml 재조합 인간 IL-2가 보충되었으며, 내성(TGFβ i NK) 확장된 NK 세포는 50 IU/ml IL-2 및 10 ng/ml TGF-β(Biolegend, 580706)를 수용하였다. 새로운 배지 및 사이토카인은 2 내지 3일마다 첨가되었다. NK 세포 확장은 CD37CD56⁺ 세포의 백분율을 기초로 하여 계산되었다.

[0056] 유세포 분석: 세포내 유세포 분석은 GolgiStop을 구비한 BD Cytotfix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit(BD Biosciences, 554715)를 이용하여 수행되었다. NK 표현형 및 기능을 평가하기 위해 하기 단백질에 대한 항체가 사용되었다: CD3 PeCy7/APC-H7, CD56 FITC/BV421, NKG2D Pe-CF594/BV510, TRAIL PE/APC/BV421, FasL PE, Nkp30 PE/Alexa Fluor 647/PE-Vio615, 그랜자임 A APC, 그랜자임 B BV510, 퍼포린 BV421, DNAM-1 BV711, CD107a BV510, IFN-γ APC, TNF-α BV421, CD16 PE 및 Tonbo Ghost Dye 510/780. 세포 이벤트는 LSR Fortessa에서 취득되었다. 유세포 분석 게이팅은 생존능 염료(viability dye) 만으로 염색된 세포를 사용하여 결정되었으며, 단일 칼라 대조군은 FlowJo 7.6.5/10. SMAD3 flow를 이용하여 분석되었다.

[0057] 세포독성 검정: NK 세포는 하룻밤 동안 인간 IL-2 단독 또는 10 ng/ml 가용성 TGF-β(Biolegend)와 함께 IL-2(50 IU/ml) 중에 휴지시킴으로써 세포독성 검정을 위해 준비되었다. 칼세인-AM 기반 방법으로의 세포독성 검정은 완전 배지 중의 3μg 칼세인 AM/ml/1,000,000개의 표적 세포를 사용하여 적어도 2회 수행되었다. 칼세인 검정은 NK 세포가 하룻밤 휴지되는 것과 동일한 사이토카인에서 수행되었다[Sofnachi *et al.*, Journal of visualized experiments: JoVE 48, 2540 (2011)].

[0058] 세포내 기능 유세포 분석: 종양에 반응하여 CD107a 발현 및 세포내 사이토카인 생성에 의한 탈과립화를 결정하기 위해, 300,000개의 NK 세포는 96-웰 둥근-바닥 플레이트에서 세포독성 검정에 대해 기술된 바와 같이 200μl 배지 중에서 60,000개의 종양 세포(5:1 E:T 비)와 또는 대조군으로 표적 없이 공동-배양되었다. 1μl의 모넨신이 검정 시작 시에 CD107a와 함께 각 샘플에 첨가되었다. 플레이트는 세포-세포 접촉을 증진시키기 위해 100 g×2 분으로 회전되었고, 37°C 인큐베이터에서 3시간 동안 배치되었다. 3시간 후에, 배지가 제거되고, 염색이 상세히 기술된 바와 같이 세포 표면 및 세포내 단백질에 대해 시작되었다.

[0059] 혈구계산 비드 어레이(Cytometric bead array: CSA): IFNγ 및 TNFα의 NK 세포 방출을 결정하기 위해, NK 세포는 모넨신 및 CD107a 항체를 제외하고 세포내 기능 유세포 분석에 대해 기술된 바와 같이 배양되었다. 종양

표적과 함께 3시간 공동-배양되거나 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PHA로 4시간 자극된 후에, 상청액이 수집되고, 사용할 때까지 -75°C 에서 냉동되었다. 검정 당일에, 상청액이 해동되었고, 50 μl 의 희석되지 않은 상청액이 BD CBA Soluble Soluble Master Kit(BD Biosciences, Cat#: 558265) 및 IFN γ 및 TNF α Flex Set(BD Biosciences, Cat: 558269, 560112) 또는 MACSPlex Cytokine 12 Kit(Miltenyi, Cat: 130-099-169)에 대한 제조업체 설명서에 따라 사용되었다. BD LSR II 또는 MACSQuant 상에 분석물이 획득되었다. 각 분석물에 대한 기하 평균은 Flow Jo v.10.1에서 결정되었으며, 미지 샘플은 BD LSR II 획득 샘플에 대한 공지된 표준물로부터 $R^2 \geq 0.9$ 인 표준 곡선을 이용하여 보간되었다. MACSQuant 획득 분석물의 분석은 MACSQuantify 소프트웨어(버전 2.8, 독일 베르기슈글라트바흐 소재)를 이용하여 수행되었다. 이러한 소프트웨어는 MACSPlex 표준물의 평균 APC 중간값을 이용하고, 각 샘플에서 사이토카인 농도를 계산한다.

[0060] 사이토카인으로의 NK 세포 활성화: IL-12, IL-15 및 IL-18로의 NK 세포 자극화를 위해, 일차 NK 세포는 하룻밤 동안 기술된 바와 같은 10 ng/ml IL-12(Biolegend, 573002), 50 ng/ml IL-15(Biolegend, 570302) 및 50 ng/ml IL-18(Biolegend, 592102)로 자극되었고, IL-12, IL-15 및 IL-18로 하룻밤 자극한 후 7 내지 14일 동안 1 ng/ml IL-15 중에서 휴지되었다. 사이토카인 생성에 대한 IL-2 및 TGF β 의 효과를 결정하기 위해, NK 세포는 IL-12, IL-15 및 IL-18로 하룻밤 자극시키고 그리고 7 내지 14일 동안 1 ng/ml IL-15와 함께 자극시키는 데 명시된 바와 같은 IL-2 및/또는 TGF- β 의 첨가를 제외하고 기술된 바와 같이 처리되었다. 사이토카인 생성을 측정하기 위해, NK 세포는 단지 1 ng/ml IL-15 중에서 하룻밤 및 검정 전반에 걸쳐 휴지되었고, 5:1 비로 MG63과 또는 표적 없는 대조군으로서 단지 동일한 수의 NK 세포와 공동-배양되었고, 세포내 흐름 염색은 하기에 기술되는 바와 같이 수행되었다.

[0061] RT-PCR/qPCR: 냉동되지 않고 14일 확장된 새로운 인간 NK 세포로부터의 RNA는 RNeasy 키트, QiaShredder 칼럼, 및 무-RNAase DNase 세트(모두 Qiagen, 74104, 79654, 79254)을 이용하여 단리되었으며, cDNA는 고품질 cDNA 역전사 키트(Thermo Fisher, 4368814)로 합성되었다. TGF- β 경로를 위한 PCR은 Applied Biosystems 7900HT에서 Taqman 고속 PCR 마스터믹스 및 인간 고속 96-웰 TGF- β 경로 어레이(ThermoFisher, 4418742)를 이용하여 수행되었다.

[0062] 통계 분석: 통계 분석은 GraphPad Prism 6.0 또는 7.0(미국 캘리포니아 라 호이아 소재)을 이용하여 각 도면 범례에 기술된 바와 같이 수행되었다. 0.05 미만의 p 값은 유의미한 것으로 간주되었다.

[0063] **결과 및 논의**

[0064] IFN γ 및 TNF α 는 항종양 반응에서 중요한 2개의 전염증성 사이토카인이며, 이의 생성은 TGF- β 에 의해 억제되는 것으로 보고되었다. NK 세포에 의한 전염증성 사이토카인의 생성을 결정하기 위해, NK 세포는 2주 동안 부모(변형되지 않은 K562) 플러스 또는 마이너스 TGF β 와 함께 배양되었다. 2주의 종료 시에, 대조군 및 TGF β i NK 세포는 기술된 바와 같이 종양 표적과 함께 인큐베이션되었으며, 상청액은 혈구계산 비드 어레이로 IFN- γ 및 TNF- α 분비를 측정하기 위해 수집되었다. 대조군 확장된 NK 세포와 비교하여 TGF- β 의 존재 및 부재 둘 모두 하에서 IFN- γ 및 TNF α 분비의 유의미한 증가가 관찰되었다(도 1).

[0065] 다음으로, 본 발명자는 K562 또는 다른 종양 세포에 의한 자극이 TGF β i 사이토카인 과잉 생성을 위해 필수적인지의 여부를 결정하였다. 이를 위해, 본 발명자는 종양 자극의 부재 하에서 NK 세포를 활성화시키는 것으로 잘 규명된 IL-12, EL-15, 및 IL-18을 사용하였다. TGF β 가 배양물에 첨가되었을 때, NK 세포는 종양 자극에 반응하여 증가된 IFN γ 및 TNF α 를 생성하였다(도 2).

[0066] 다른 K562 지지 세포가 증대된 사이토카인 생성과 함께 TGF β i NK 세포를 생성시킬 수 있는지의 여부를 결정하기 위해, K562 발현 mbIL-15(도 3) 또는 mbIL-21(도 4)은 2주 동안 NK 세포 플러스 또는 마이너스 TGF β 와 공동-배양되었다. 두 지지 세포 모두는 사이토카인 생성의 증가와 함께 TGF β i NK 세포를 유도하였다.

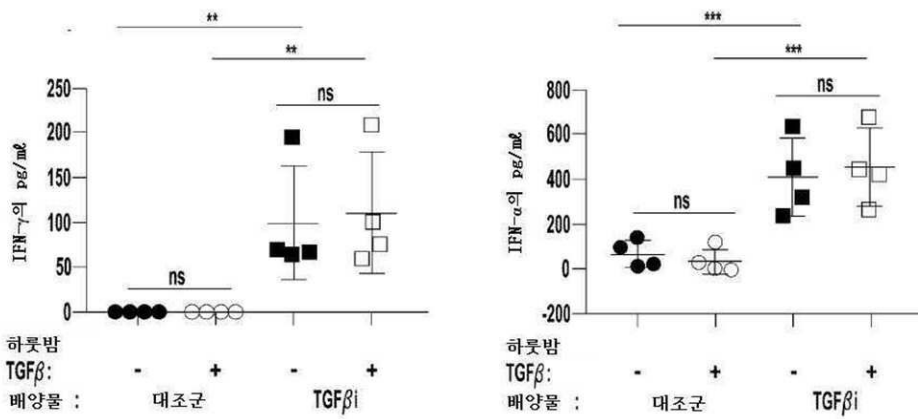
[0067] TGF β 가 NK 세포 증식을 억제하는 것으로 보고되었기 때문에, 본 발명자는 K562mbIL-21 자극에 반응하여 2주 증식을 측정하였다. 이를 위해, TGF β 는 증식에 유의미하게 영향을 미치지 않았다(도 5).

[0068] 다음으로, TGF β i NK 세포 표현형 및 기능의 지속성이 결정되었다. TGF β i NK 및 도너-매칭된 표준 NK 세포는 2주의 활성화 완료 후에 저용량 IL-2 단독(예를 들어, TGF- β 로부터 TGF β i NK가 제거됨) 중에 휴지되었다. TGF β i NK 세포는 확장의 종료 시에 및 활성화 후 7 내지 33일에 IFN- γ 및 TNF- α 의 분비에 대해 평가되었다. 활성화 후에, TGF β i NK 세포는 기준선에서 및 TGF- β 처리에서 IFN- γ 및 TNF- α 분비의 증가를 유지하였다(도 6).

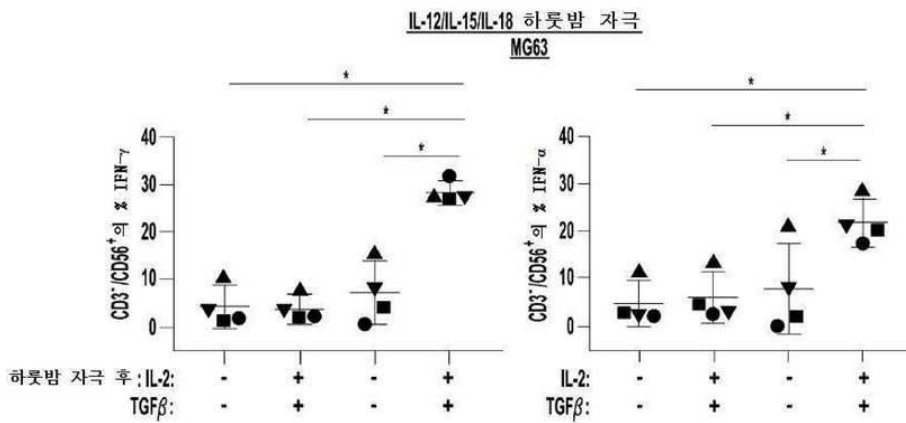
- [0069] 또한, 본 발명자는 TGFβ₁ NK 세포가 다양한 자극에 반응하여 사이토카인 과잉 생성을 유지하는 지를 결정하고자 하였다. 이를 위해, 본 발명자는, TGFβ₁ NK 세포가 수모세포종 및 신경모세포종 세포주에 반응하여 증가된 IFNγ 및 TNFα를 생성시켰고 이러한 사이토카인의 이러한 증대된 생성이 HPA 자극으로 유도될 수 있음을 확인하였으며, 이는 증가된 항종양 사이토카인을 생성시키는 선천적 능력을 제시하는 것이다(도 7 및 도 9).
- [0070] NK 세포 항종양 기능의 억제제로서 SMAD3의 기능은 명확하였다. SMAD3은 IFNγ 발현을 억제하기 위해 IFNγ 프로모터에 직접적으로 결합하며, SMAD3⁻¹ 마우스는 향상된 NK 세포 기능 및 감소된 종양 성장을 갖는다. 이에 따라, 본 발명자는 SMAD3이 웨스턴 블롯에 의해 단백질 수준에서 감소되었는지의 여부를 결정하였고, TGFβ₁ NK가 유의미하게 감소된 SMAD3 단백질을 갖는 것으로 확인되었다(도 8).
- [0071] 또한, 본 발명자는 시험관내에서 부모 K562 배양된 NK 세포, 및 생체내에서 mbIL-21 확장된 NK 세포로의 TGFβ₁ NK 세포의 세포독성을 시험하였다. 세포독성은 영향을 받지 않았다(도 10). 실제로, 생체내 TGFβ₁ NK 세포는 NSG 마우스의 폐에서 골육종의 성장을 유의미하게 감소시켰다(도 11).
- [0072] 추가적으로, RNA-seq 분석을 이용하여, 본 발명자는 TGFβ₁ NK 세포가 대조군 NK 세포와 전사적으로 구별된다는 것을 확인하였으며, 이는 기능 이외에 세포 표현형의 광범위한 변화를 시사하는 것이다(도 12).
- [0073] 요약하면, TGF-β로 확장된 인간 NK 세포(TGFβ₁ NK)는 가장 가능하게 주요 TGF-β 신호전달 단백질 중 하나-SMAD3의 손실을 통해 TGF-β에 대한 감소된 감수성을 갖는다. TGFβ₁ NK 세포는 매우 증가된 IFN-γ, TNF-α 및 GM-CSF 분비를 갖는다. 놀랍게도, 그리고 이전 논문과는 상반되게, TGF-β는 TGFβ₁ NK 세포의 전체 2주 증식을 억제하지 못하였다[Bellone *et al.*, J Immunol 155: 1066-1073 (1995)]. 증식(IL-2 및 IL-15)을 유도하기 위해 종래 논문에서 이용된 자극 조건 및 시점은 증식에서 관찰된 차이가 중요할 수 있다. NK 세포 증식에 대한 TGF-β 효과의 종래 측정은 단기간 증식을 시험하였고, 2주 증식을 시험하지 않았다[Viel *et al.*, Science signaling 9: ra19 (2016)]. 본 발명자는 종양 활성화에 의한 만성 TGF-β 자극이 잠재적으로 SMAD3^{neg}가 생존하는 것, NK 세포의 특정 서브세트의 활성화를 유도한다는 것을 제안한다. 이러한 SMAD3^{neg} NK 세포는 세포 배양 배지에서 TGF-β에 의한 SMAD3의 인산화에 대해 내성을 나타내서, 증식을 증가시킬 것이다[Oida *et al.*, Journal of immunological method 362: 195-198 (2010)].
- [0074] IFN-γ 및 TNF-α를 생성하는 TGFβ₁ NK 세포의 능력은 이러한 사이토카인이 TGF-β를 억제하고 반대로 TGF-β가 IFN-γ 및 TNF-α의 생성을 억제할 수 있기 때문에 평가되었다. 놀랍게도, TGF-β와 함께 및 이의 없이 표준 NK 세포와 비교하여 TGFβ₁ NK 세포에서의 매우 증가된 항종양 IFN-γ 및 TNF-α 분비가 확인되었다. 종래 연구는 SMAD3 결실이 기준선 IFN-γ 생성을 증가시킨다는 것을 입증하였으며, 이에 따라 SMAD3을 발현시키지 않는 TGFβ₁ NK 세포에서 유사한 메커니즘이 일어날 가능성이 있다[Tang *et al.*, Nat Commun 8: 14677 (2017)]. TGF-β는 일차 NK 세포에서 TNFα 생성을 억제한다고 보고되어 있다[Bellone *et al.*, J Immunol 155: 1066-1073 (1995)]. 예상치 못하게, TGFβ₁ NK 세포는 표준 NK 세포와 비교하여 검정 배지에서 TGF-β와 함께 또는 이의 없이 TNF-α의 유의미하게 증가된 분비를 갖는다. TNF-α 생성의 조절은 잘 이해되지 않지만, 또한 TGFβ에 의해 억제되는 것으로 알려져 있으며, 이에 따라, TGFβ₁ NK 세포에서 증가된 TNF-β 분비를 발견할 것이라는 것은 예상치 못한 것이다.
- [0075] 본 발명이 특히 이의 바람직한 실시형태를 참조하여 도시되고 기술되었지만, 첨부된 청구항에 의해 포함되는 본 발명의 범위를 벗어나지 않으면서 형태 및 세부사항의 다양한 변경이 여기에서 이루어질 수 있다는 것이 당업자에게 이해될 것이다. 상기 명세서에서 인용된 모든 특허, 출판물 및 참고문헌은 전문이 본 명세서에 참고로 포함된다.

도면

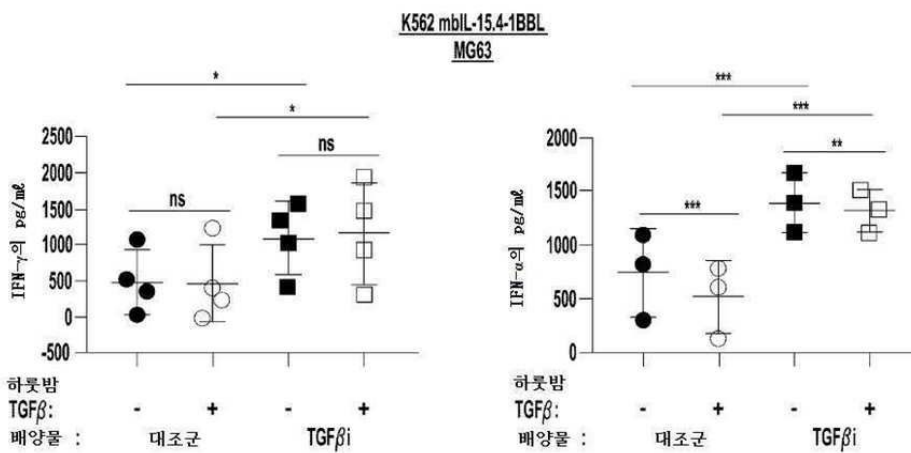
도면1



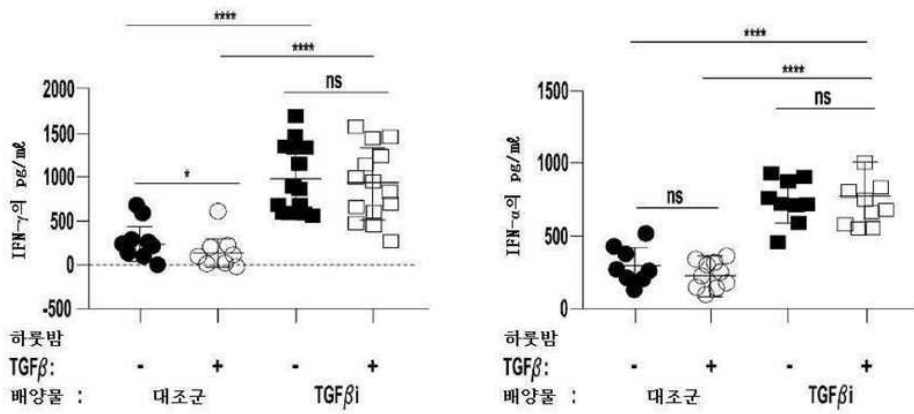
도면2



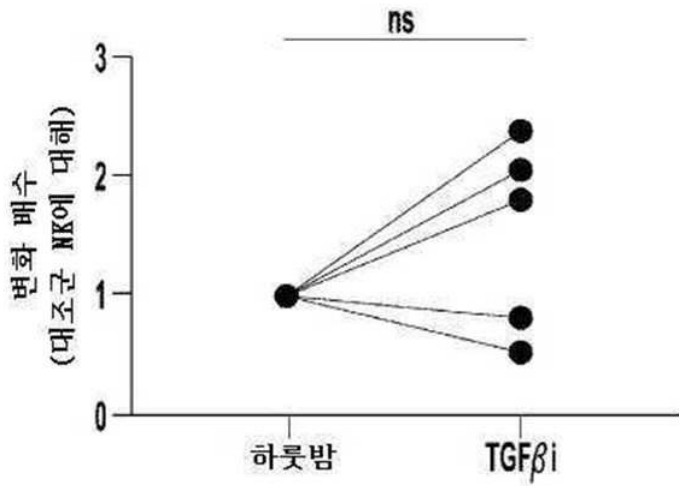
도면3



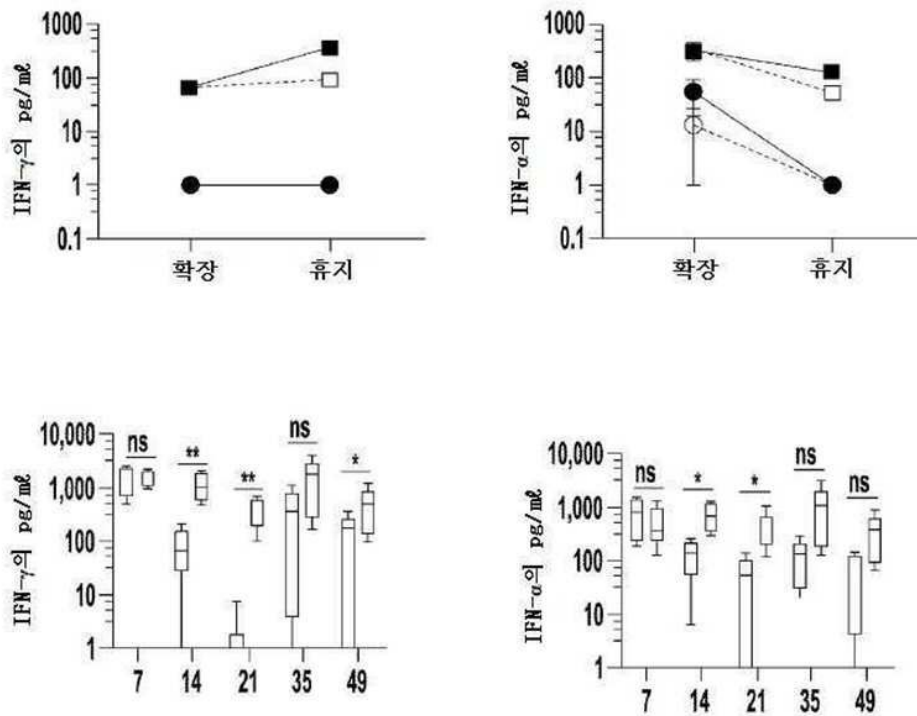
도면4



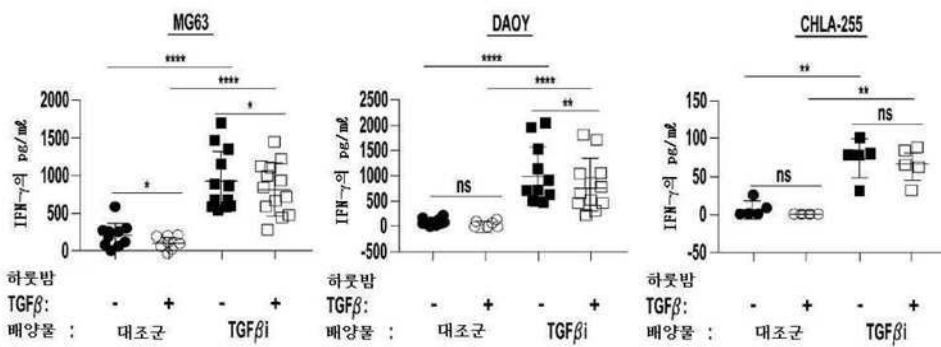
도면5



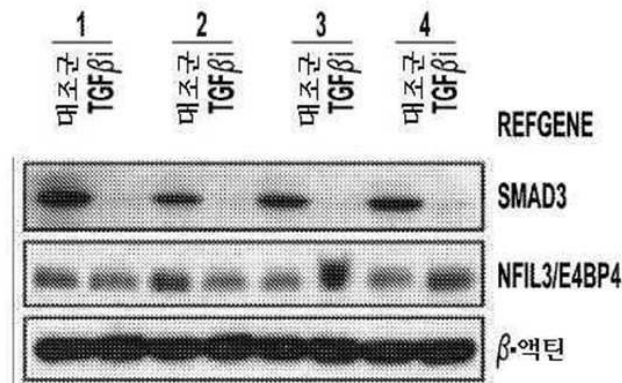
도면6



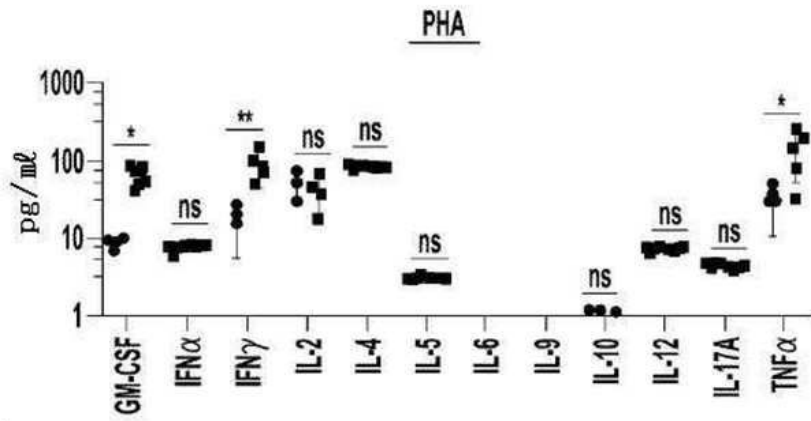
도면7



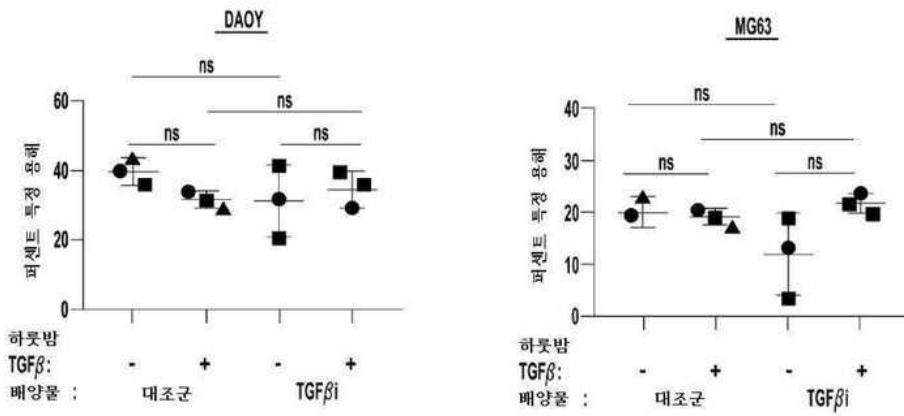
도면8



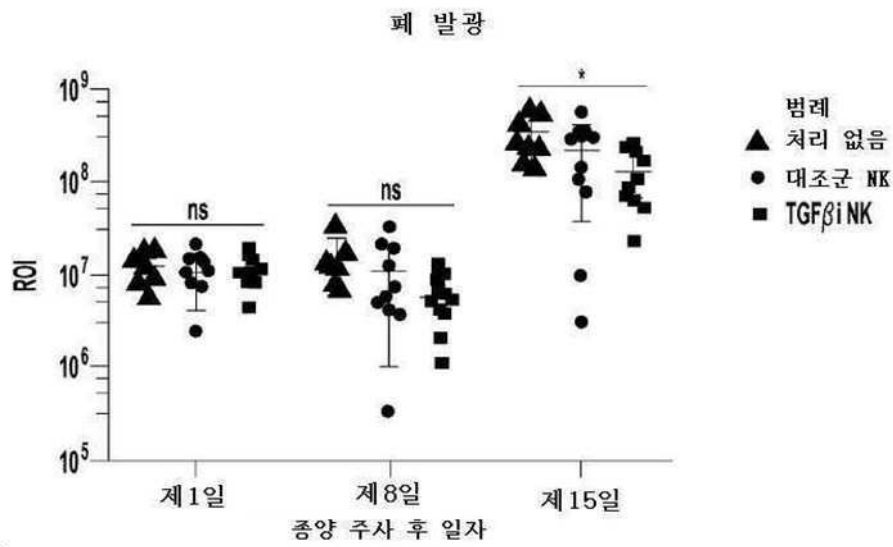
도면9



도면10



도면11



도면12

