



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0153027
(43) 공개일자 2022년11월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/55 (2017.01) A61K 31/436 (2006.01)
A61K 31/4545 (2006.01) A61K 38/13 (2006.01)
A61K 47/54 (2017.01) A61K 47/60 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/725 (2006.01)
C07K 16/44 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 47/55 (2017.08)
A61K 31/436 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-7033204

(22) 출원일자(국제) 2021년03월05일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2022년09월23일

(86) 국제출원번호 PCT/US2021/021201

(87) 국제공개번호 WO 2021/178887

국제공개일자 2021년09월10일

(30) 우선권주장

62/986,349 2020년03월06일 미국(US)

(71) 출원인

퍼듀 리서치 파운데이션

미국, 인디애나 47906, 웨스트 라파예트 파운드리
드라이브 101

(72) 발명자

로우, 필립 에스.

미국, 인디애나 47906, 웨스트라파엣 팜 리지 로
드 5850

나폴레, 존 빅터

미국, 인디애나 47906, 웨스트라파엣 예거 로드
2550, 아파트먼트 02-10

루오, 첸

미국, 인디애나 47906, 웨스트라파엣 노블 코트
739

(74) 대리인

정영수

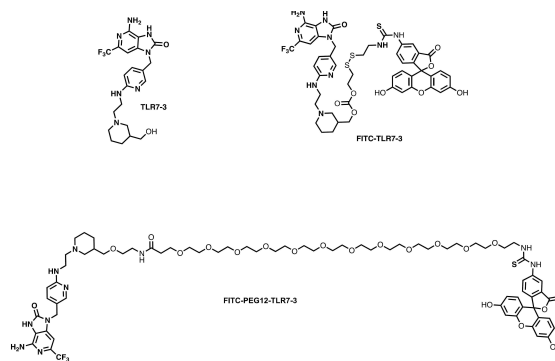
전체 청구항 수 : 총 87 항

(54) 발명의 명칭 CAR-T 세포 활성을 변형시키기 위한 방법, 화합물 및 조성물

(57) 요약

키메라 항원 수용체를 발현하는 T 세포(CAR-T 세포)의 표적외 독성을 감소시키고/시키거나 CAR-T 세포 활성화의 향상된 제어를 제공하기 위한 화합물, 조성물 및 방법, 및 암이 있는 대상체를 치료하고/하거나 암이 있는 대상체에서 CAR-T 세포 활성을 변형시키는 방법.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 31/4545 (2013.01)
A61K 38/13 (2013.01)
A61K 47/542 (2017.08)
A61K 47/551 (2017.08)
A61K 47/555 (2017.08)
A61K 47/558 (2017.08)
A61K 47/60 (2017.08)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

암이 있는 대상체에서 T 세포 활성을 변형시키고/시키거나 암을 치료하는 방법으로서, 하기를 포함하는 방법:

대상체에게 다음을 포함하는 조성물을 투여하는 단계:

키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 핵산 서열에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함하는 벡터, 또는 CAR을 발현하는 T 세포(CAR-T 세포)

(여기서 CAR은 제1 표적화 모이어티, 제2 표적화 모이어티, 또는 제1 및 제2 표적화 모이어티 모두에 대한 것임);

하나 이상의 어댑터 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 대상체에게 투여하는 단계로서, 각각의 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 제1 표적화 모이어티에 연결된 소분자 리간드를 포함하는 단계; 및

제2 표적화 모이어티에 연결된 활성 변형 화합물을 대상체에게 투여하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 소분자 리간드는 제1 링커에 의해 제1 표적화 모이어티에 연결되는, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 하나 이상의 어댑터 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 적어도 하기:

어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염의 제1 세트로서, 이들 각각은 제1 표적화 모이어티에 연결된 소분자 리간드를 포함하는 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염의 제1 세트; 및

어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염의 제2 세트로서, 이들 각각은 제2 표적화 모이어티에 연결된 소분자 리간드를 포함하는 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염의 제2 세트를 포함하고;

제1 소분자 리간드는 제1 유형의 암 세포 상에서 과발현된 수용체에 특이적이고 제2 소분자 리간드는 제2 유형의 암 세포에서 과발현된 수용체에 특이적인, 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 활성 변형 화합물은 제2 링커에 의해 제2 표적화 모이어티에 연결되는, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 활성 변형 화합물은 하기를 포함하는, 방법:

고갈된 CAR-T 세포를 재생시키도록 제형화된 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염; 또는

CAR-T 세포의 활성을 감소시키도록 제형화된 면역억제 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 6

제1항, 제2항 또는 제5항에 있어서, 활성 변형 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 타크롤리무스, 시롤리무스 및 사이클로스포린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 면역억제 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는, 방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 제1 표적화 모이어티 및 제2 표적화 모이어티는 동일한 구조를 갖는, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 소분자 리간드는 제1 링커에 의해 제1 표적화 모이어티에 연결되고, 활성 변형 화합물은 제2 링커에 의해 제2 표적화 모이어티에 연결되고, 제1 링커 및 제2 링커는 동일한 것인, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 소분자 리간드는 제1 링커에 의해 제1 표적화 모이어티에 연결되고, 활성 변형 화합물은 제2 링커에 의해 제2 표적화 모이어티에 연결되고, 제1 링커 및 제2 링커는 상이한 것인, 방법.

청구항 10

제1항, 제2항 또는 제5항 중 어느 한 항에 있어서, CAR은 고친화도로 제1 표적화 모이어티 또는 제2 표적화 모이어티에 결합하는 항체의 단쇄 단편 가변(scFv) 영역을 포함하는 인식 영역을 갖는, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 및 활성 변형 화합물 중 하나 이상 각각은 서브-나노몰 범위의 친화도로 CAR의 scFv 영역에 결합하는, 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 활성 변형 화합물은 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하고, 고갈된 CAR-T 세포의 억제 신호전달을 차단하고, 고갈된 CAR-T 세포를 항원 독립적 경로를 통해 재활성화하도록, 또는 둘 다하도록 제형화되는, 방법.

청구항 13

제10항에 있어서, CAR-T 세포의 인식 영역을 활성 변형 화합물에 연결된 제2 표적화 모이어티에 결합하는 것은 활성 변형 화합물을 CAR-T 세포로 내재화하는, 방법.

청구항 14

제1항, 제2항 또는 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 어댑터 화합물 각각의 소분자 리간드는 정상 조직 또는 비표적화된 암 세포와 비교하여 표적화된 암 세포 상에서 과발현되는 수용체에 특이적인, 방법.

청구항 15

제1항, 제2항 또는 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 소분자 리간드는 플레이트, 2-[3-(1,3-디카복시프로필)우레아이드]펜탄디옥산 (DUPA) 리간드, 뉴로키닌 1 수용체 (NK-1R) 리간드, 탄산탈수효소 IX (CAIX) 리간드, 감마글루타미드 트랜스펩타제의 리간드, 자연 살해 그룹 2D 수용체 (NKG2D) 리간드, 및 콜레스티로키닌 B 수용체 (CCKBR 또는 CCK2) 리간드로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 16

제1항, 제2항 또는 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 표적화 모이어티 및 제2 표적화 모이어티는 각각 2,4-디니트로페놀 (DNP), 2,4,6-트리니트로페놀 (TNP), 바이오틴, 디곡시제닌, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC), NHS-플루오레세인, 펜타플루오로페닐 에스테르, 테트라플루오로페닐 에스테르, 크노틴, 셀 타이린, 및 DARPin로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는, 방법.

청구항 17

제8항 또는 제9항에 있어서, 제1 링커 및 제2 링커는 각각 독립적으로 방출성 링커 또는 비-방출성 링커인, 방법.

청구항 18

제8항 또는 제9항에 있어서, 제1 링커, 제2 링커, 또는 둘 모두는 독립적으로 C₁-C₂₀ 알킬, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리프로판, 올리고-(4-피페리딘 카복실산, 올리고 피페리딘, 펩티드, 사카로-펩티드, 친수성 아미노산,

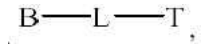
당, 비천연 펩티도글리칸, 폴리비닐피롤리돈, 플루로닉 F-127, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

청구항 19

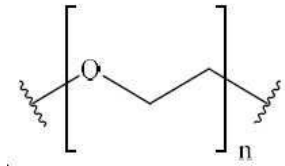
제8항 또는 제9항에 있어서, 제1 링커 또는 제2 링커는 PEG를 포함하는, 방법.

청구항 20

제1항, 제2항, 제5항 또는 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 각각 하기 화학식을 갖는 것인, 방법:



B는 소분자 리간드를 나타내고, L은 제1 링커를 나타내고, T는 제1 표적화 모이어티를 나타내고, 그리고 L은 하기 화학식을 갖는 구조를 포함한다:



n은 0 내지 200의 정수이고;

청구항 21

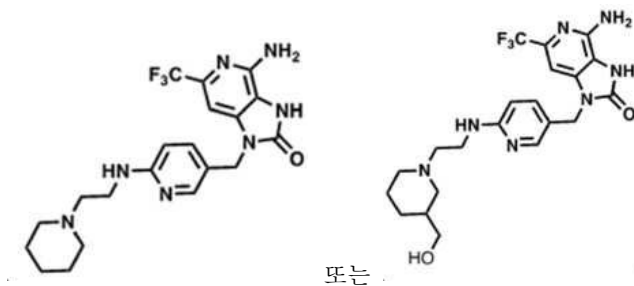
제12항에 있어서, 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 톨(Toll) 유사 수용체 (TLR) 효능제, 인터페론 유전자 자극제 효능제, 포스파타제 억제제, Nod 유사 수용체 자극제, 흑색종 2 유사 수용체 효능제에는 부재, 키나제 억제제, 레틴산 유도성 유전자-I 유사 수용체, 및 진행된 당화 최종 생성물에 대한 수용체로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 TLR7 또는 TLR7/8 효능제인, 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 재생 화합물은 하기 화학식 중 하나를 갖는 것인, 방법:

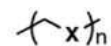


청구항 24

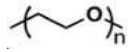
제2항에 있어서, 하나 이상의 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염 내의 제1 링커는 소분자 리간드와 제1 표적화 모이어티 사이에 위치하고 하기 화학식으로부터 선택된 구조를 갖는 화학적 모이어티를 포함하는, 방법:



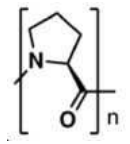
알킬,



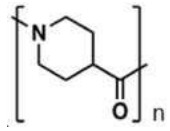
X = O, S, NH,



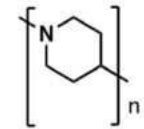
폴리 에틸렌 글리콜(PEG),



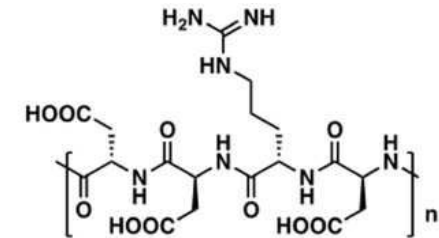
폴리프롤린,



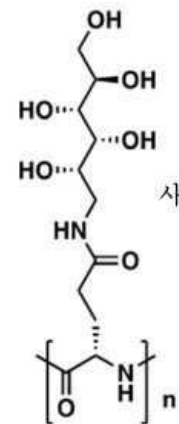
올리고-(4-피페리딘 카복실산),



올리고 피페리딘,

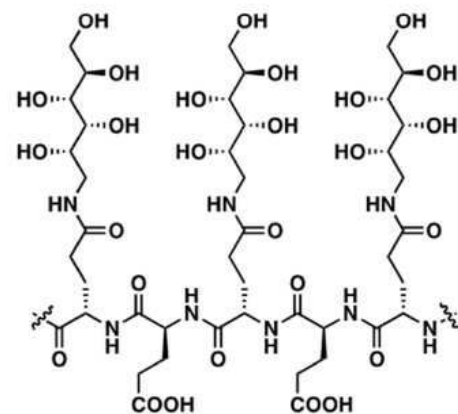


펩티드,



사카로-펩티드

, 및

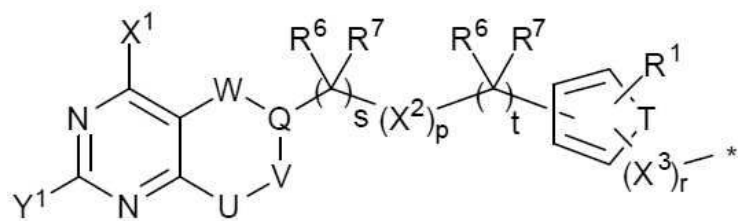


사카로-펩티드,

여기서 n은 0 내지 200의 정수이다.

청구항 25

제1항 또는 제24항에 있어서, 하나 이상의 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염의 소분자 리간드는 하기 화학식을 갖는 구조를 포함하는, 방법:



식 중,

X^1 및 Y^1 은 각각 할로, R^2 , OR^2 , SR^3 , 및 NR^4R^5 로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

U, V 및 W는 $-(R^{6a})C=$, $-N=$, $-(R^{6a})C(R^{7a})-$, 및 $-N(R^{4a})-$ 로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택된 2가 모이어티를 나타내고;

Q는 C 및 CH로 이루어진 군으로부터 선택되고;

T는 S, O, N 및 $-C=C-$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

X^2 및 X^3 은 각각 산소, 황, $-C(Z)-$, $-C(Z)O-$, $-OC(Z)-$, $-N(R^{4b})-$, $-C(Z)N(R^{4b})-$, $-N(R^{4b})C(Z)-$, $-OC(Z)N(R^{4b})-$, $-N(R^{4b})C(Z)O-$, $-N(R^{4b})C(Z)N(R^{5b})-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-N(R^{4a})S(O)_2-$, $-C(R^{6b})(R^{7b})-$, $-N(C\equiv CH)-$, $-N(CH_2C\equiv CH)-$, C_1-C_{12} 알킬렌, 및 C_1-C_{12} 알키엔옥시로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고, 여기서, Z는 산소 또는 황이고;

R^1 은 수소, 할로, C_1-C_{12} 알킬 및 C_1-C_{12} 알콕시로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^2 , R^3 , R^4 , R^{4a} , R^{4b} , R^5 , R^{5b} , R^{6b} , 및 R^{7b} 는 각각 수소, 할로, C_1-C_{12} 알킬, C_1-C_{12} 알콕시, C_1-C_{12} 알카노일, C_1-C_{12} 알케닐, C_1-C_{12} 알킬닐, $(C_1-C_{12}$ 알콕시)카보닐, 및 $(C_1-C_{12}$ 알킬아미노)카보닐로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

R^6 및 R^7 각각은 수소, 할로, C_1-C_{12} 알킬, 및 C_1-C_{12} 알콕시로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나; 또는, R^6 및 R^7 은 함께 합쳐져서 카보닐 기를 형성하고;

R^{6a} 및 R^{7a} 각각은 수소, 할로, C_1-C_{12} 알킬, 및 C_1-C_{12} 알콕시로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나; 또는, R^{6a} 및 R^{7a} 는 함께 합쳐져서 카보닐 기를 형성하고;

p, r, s 및 t는 각각 독립적으로 0 또는 1이고; 그리고

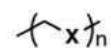
*는 하나 이상의 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염이 화학적 모이어티를 포함하는 경우 공유 결합을 나타낸다.

청구항 26

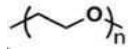
제4항에 있어서, 제2 링커는 제2 표적화 모이어티와 활성 변형 화합물 사이에 위치하고 하기 화학식으로부터 선택된 구조를 갖는 화학적 모이어티를 포함하는, 방법:



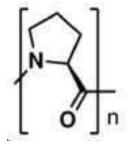
알킬,



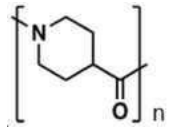
X = O, S, NH,



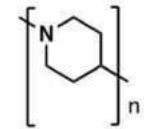
폴리 에틸렌 글리콜(PEG),



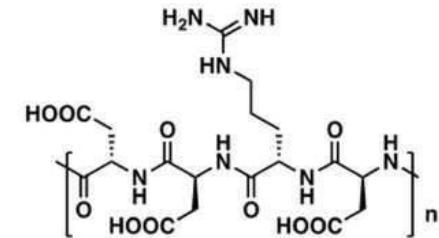
폴리프롤린,



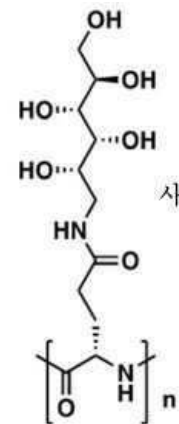
올리고-(4-피페리딘 카복실산),



올리고 피페리딘,

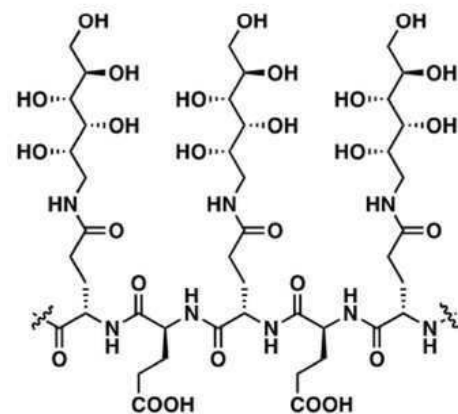


펩티드,



사카로-펩티드

, 및

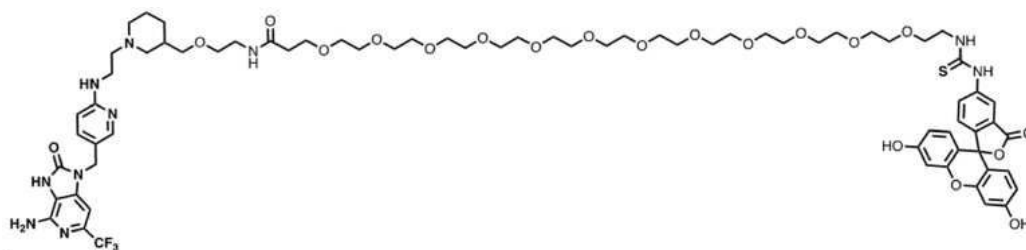


사카로-펩티드,

여기서 n은 0 내지 200의 정수이다.

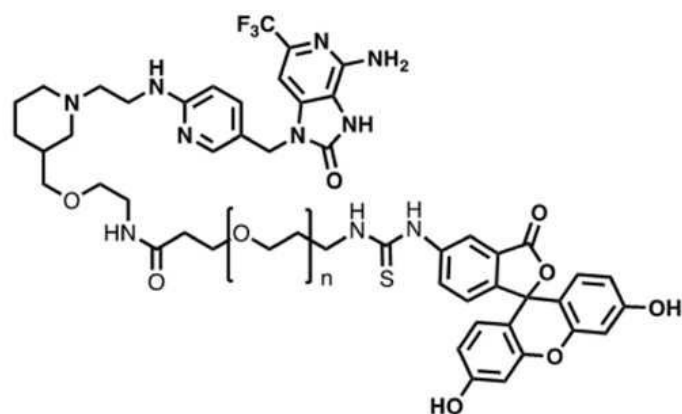
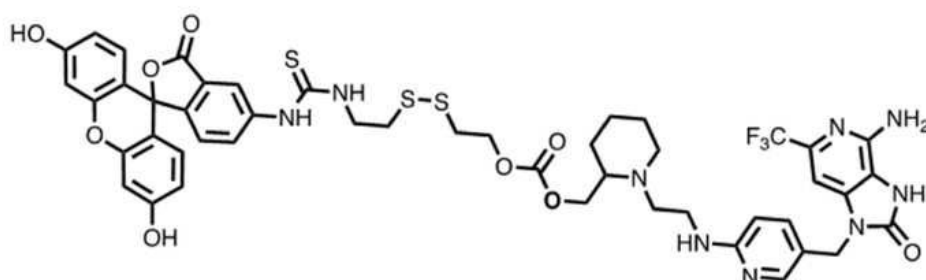
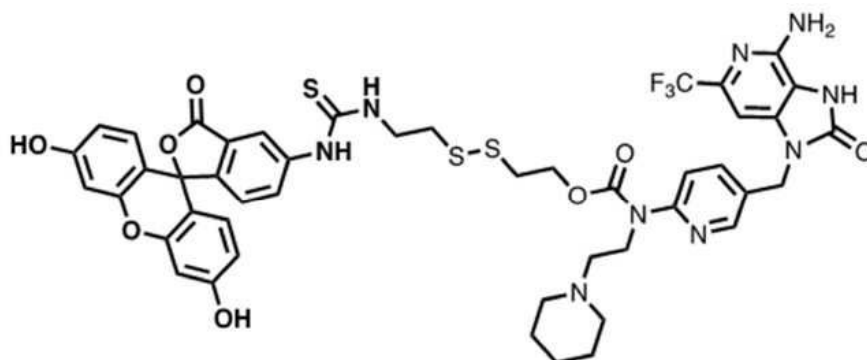
청구항 27

제5항, 제12항, 제21항 또는 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 하기 화학식을 갖는 것인, 방법:

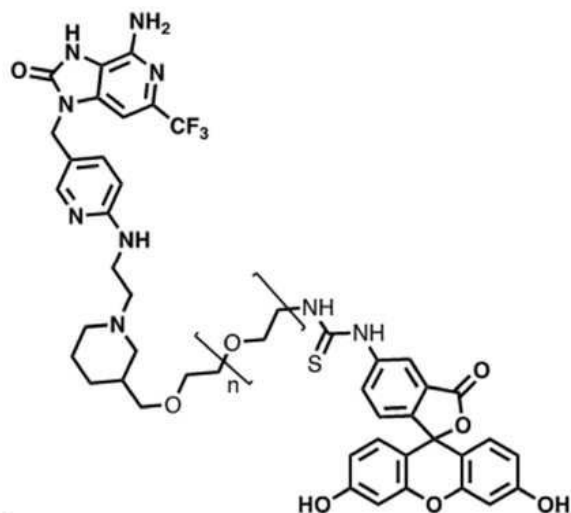


청구항 28

제5항, 제12항, 제21항 또는 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 하기 화학식 중 하나의 구조를 갖는, 방법:



여기서 n = 0 내지 200, 또는



여기서 $n = 0$ 내지 50.

청구항 29

제1항, 제2항, 제5항 또는 제21항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 하나 이상의 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 활성 변형 화합물은 대상체의 체중 kg당 약 10 nmol/kg 내지 약 10,000 nmol의 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 30

제1항, 제2항, 제5항 또는 제21항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 하나 이상의 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 활성 변형 화합물은 대상체의 체중 kg당 약 10 nmol/kg 내지 약 2,000 nmol의 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 31

제1항, 제2항, 제5항 또는 제21항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 하나 이상의 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 활성 변형 화합물은 대상체의 체중 kg당 약 10 nmol/kg 내지 약 1,000 nmol의 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 32

제1항, 제2항, 제5항 또는 제21항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 하나 이상의 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 활성 변형 화합물은 대상체의 체중 kg당 약 10 nmol/kg 내지 약 600 nmol의 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 33

제1항, 제2항, 제5항 또는 제21항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 하나 이상의 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 활성 변형 화합물은 대상체의 체중 kg당 약 200 nmol/kg 내지 약 600 nmol의 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 34

제1항, 제2항, 제5항 또는 제21항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 하나 이상의 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 활성 변형 화합물은 대상체의 체중 kg당 약 250 nmol/kg 내지 약 600 nmol의 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 35

제1항에 있어서, 상기 암은 암은 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부의 암, 경부의 암, 피부 흑색종, 안구내 흑색종 자궁암, 난소암, 자궁내막 암, 직장암, 위장암, 결장암, 유방암, 삼중 음성 유방암, 나팔관의 암종, 자궁 경부의 암종, 질의 암종, 외음부의 암종, 호지킨 질환, 식도의 암, 소장암, 내분비계의 암, 갑상선의 암, 부

갑상선의 암, 부신의 암, 연조직의 육종, 요도의 암, 전립선암, 백혈병, 늑막 중피종, 방광의 암, 버킷 림프종, 요관의 암, 신장의 암, 신우의 암종, 중추신경계 (CNS)의 신생물, 원발성 CNS 림프종, 척추 종양, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종, 또는 위식도 접합부의 선암종인, 방법.

청구항 36

제1항, 제2항, 제5항 또는 제21항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, CAR은 항-FITC 항체의 scFv 영역인 인식 영역을 포함하는, 방법.

청구항 37

제1항에 있어서, CAR은 CD28, CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), 및 CD278 (ICOS)로 이루어진 군으로부터 선택된 공동 자극 도메인을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 38

제1항에 있어서, CAR은 T 세포 CD3 ψ 사슬 또는 Fc 수용체 γ 인 활성화 신호전달 도메인을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 39

제1항, 제2항, 제5항 또는 제21항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 하기를 추가로 포함하는, 방법:

하나 이상의 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 투여하기 전에, 또는 CAR-T 세포 조성물을 투여하기 전에 대상체를 영상화하는 단계.

청구항 40

제1항, 제2항, 제5항 또는 제21항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염 중 적어도 하나는 항체가 아니고 항체의 단편을 포함하지 않는, 방법.

청구항 41

제1항, 제2항, 제5항 또는 제21항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 표적화 모이어티 및 제2 표적화 모이어티 중 하나 또는 둘 모두가 펩티드 에피토프를 포함하지 않는, 방법.

청구항 42

제1항에 있어서, 벡터는 렌티바이러스 벡터를 포함하는, 방법.

청구항 43

CAR-T 세포 요법을 받은 대상체를 치료하는 방법으로서,

하나 이상의 어댑터 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 대상체에게 투여하는 단계로서, 각각의 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 제1 표적화 모이어티에 연결된 소분자 리간드를 포함하는 단계를 포함하고,

여기서, 투여 단계 전에, 대상체는 제1 표적화 모이어티를 인식하고 그에 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 T 세포의 적어도 용량을 받은, 방법

청구항 44

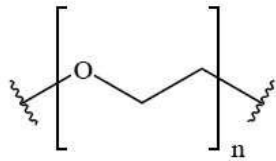
제43항에 있어서, 제2 표적화 모이어티에 연결된 활성 변형 화합물을 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서 CAR은 제2 표적화 모이어티를 인식하고 그에 결합하는, 방법.

청구항 45

제43항 또는 제44항에 있어서, 각각의 어댑터 화합물의 소분자 리간드는 제1 링커를 통해 제1 표적화 모이어티에 연결되는, 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 제1 링커는 하기 화학식을 갖는 구조를 포함하는, 방법:



여기서 n은 0 내지 200의 정수이다.

청구항 47

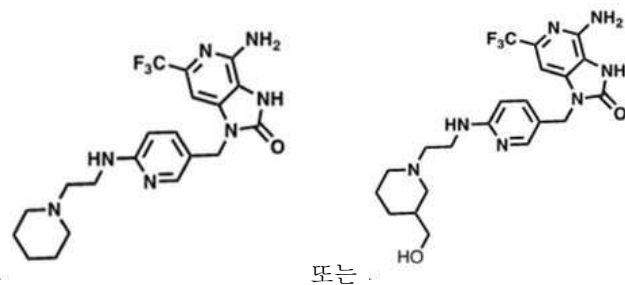
제44항에 있어서, 활성 변형 화합물은 제2 링커에 의해 제2 표적화 모이어티에 연결되는, 방법.

청구항 48

제44항 또는 제47항에 있어서, 활성 변형 화합물은 제2 표적화 모이어티에 연결된 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하고, 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 톨(Toll) 유사 수용체 (TLR) 효능제, 인터페론 유전자 자극제 효능제, 포스파타제 억제제, Nod 유사 수용체 자극제, 흑색종 2 유사 수용체 효능제에는 부재, 키나제 억제제, 레티산 유도성 유전자-I 유사 수용체, 및 진행된 당화 최종 생성물에 대한 수용체를 포함하는 군으로부터 선택되는, 방법.

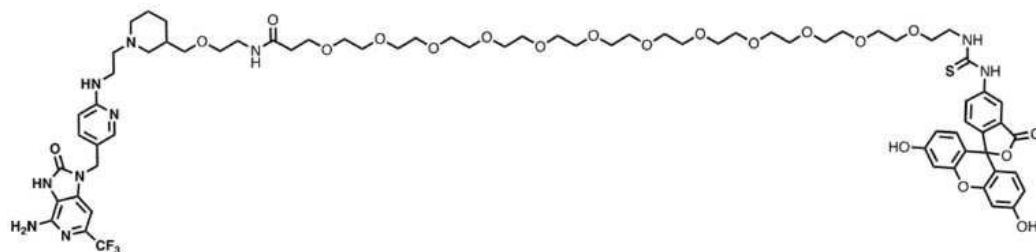
청구항 49

제48항에 있어서, 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 하기 화학식 중 하나의 구조를 갖는 TLR7 효능제인, 방법:



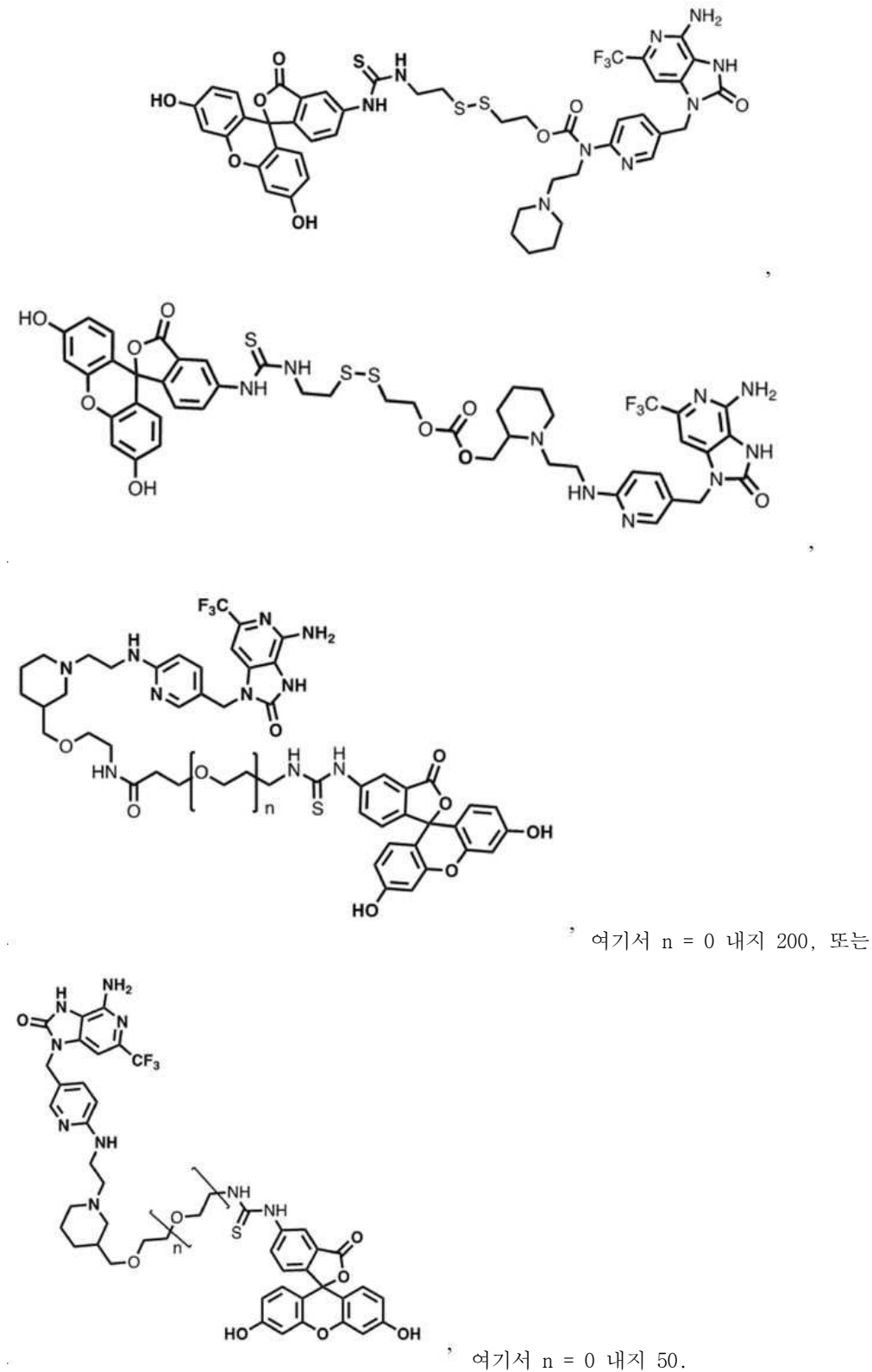
청구항 50

제48항 또는 제49항에 있어서, 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 하기 화학식을 갖는 것인, 방법:



청구항 51

제48항에 있어서, 재생 화합물은 하기 화학식 중 하나의 구조를 갖는, 방법:



청구항 52

암이 있는 대상체에서 T 세포 활성을 변형시키기 위한 조합으로서, 하기를 포함하는, 조합물:

하나 이상의 어댑터 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염으로서, 이들 각각이 제1 표적화 모이어티에 연결된 소분자 리간드를 포함하는 하나 이상의 어댑터 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염; 및

제2 표적화 모이어티에 연결된 활성 변형 화합물로서, 하기를 포함하는, 활성 변형 화합물:

재생 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는
면역억제 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 53

제52항에 있어서, 하나 이상의 어댑터 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 적어도 하기를 포함하는, 조합물:

어댑터 화합물의 제1 세트로서, 각각이 제1 표적화 모이어티에 연결된 제1 소분자 리간드를 포함하고, 제1 소분자 리간드는 비표적화 유형의 세포와 비교하여 제1 유형의 암 세포 상에서 과발현되는 수용체에 특이적인, 어댑터 화합물의 제1 세트.

어댑터 화합물의 제2 세트로서, 각각이 제1 표적화 모이어티에 연결된 제2 소분자 리간드를 포함하고, 제2 소분자 리간드는 비표적화 유형의 세포와 비교하여 제2 유형의 암 세포 상에서 과발현되는 수용체에 특이적인, 어댑터 화합물의 제2 세트.

청구항 54

제52항 또는 제53항에 있어서, 제1 표적화 모이어티 및 제2 표적화 모이어티는 동일한 구조를 갖는, 조합물.

청구항 55

제52항 또는 제53항에 있어서, 제1 표적화 모이어티 및 제2 표적화 모이어티는 상이한 구조를 갖는, 조합물.

청구항 56

제52항에 있어서, 하나 이상의 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염 중 하나 이상은 소분자 리간드와 제1 표적화 모이어티 사이에 위치하는 제1 링커를 추가로 포함하는, 조합물.

청구항 57

제52항에 있어서, 제2 링커는 제2 표적화 모이어티와 활성 변형 화합물 사이에 위치하는, 조합물.

청구항 58

제56항에 있어서, 제2 링커는 제2 표적화 모이어티와 활성 변형 화합물 사이에 위치하고, 제1 링커 및 제2 링커는 동일한 구조 또는 상이한 구조를 갖는, 조합물.

청구항 59

제52항에 있어서, 하기를 포함하는 조성물을 추가로 포함하는, 조성물:

키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 핵산 서열에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함하는 벡터; 또는

CAR을 발현하는 T 세포(CAR-T 세포);

(여기서 CAR은 제1 표적화 모이어티, 제2 표적화 모이어티, 또는 제1 및 제2 표적화 모이어티 모두에 대한 것임);

청구항 60

제59항에 있어서, CAR은 고친화도로 제1 표적화 모이어티 및 제2 표적화 모이어티에 결합하는 항체의 단쇄 단편 가변(scFv) 영역을 포함하는 인식 영역을 갖는, 조합물.

청구항 61

제60항에 있어서, 제1 및 제2 표적화 모이어티는 서브-나노몰 범위의 친화도로 scFv 영역에 결합하는 것인, 조합물.

청구항 62

제52항, 제53항 또는 제55항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 소분자 리간드는 플레이트, 2-[3-(1,3-디카복시프로필)우레이도]펜탄디오익산 (DUPA) 리간드, 뉴로키닌 1 수용체 (NK-1R) 리간드, 탄산탈수효소 IX (CAIX) 리간드, 감마 글루타밀 트랜스펩티다제의 리간드, 자연 살해 그룹 2D 수용체 (NKG2D) 리간드, 및 콜레시스토키닌 B 수용체 (CCKBR 또는 CCK2) 리간드로 이루어진 군으로부터 선택되는, 조합물.

청구항 63

제52항, 제53항 또는 제55항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 표적화 모이어티, 제2 표적화 모이어티, 또는 제1 및 제2 표적화 모이어티 둘 모두는 2,4-디니트로페놀 (DNP), 2,4,6-트리니트로페놀 (TNP), 바이오틴, 디곡시제닌, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC), NHS-플루오레세인, 펜타플루오로페닐 에스테르, 테트라플루오로페닐 에스테르, 크노틴, 센타이린, 및 DARPin로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는, 조합물.

청구항 64

제58항에 있어서, 제1 링커 및 제2 링커 중 적어도 하나는 방출성 링커인, 조합물.

청구항 65

제58항에 있어서, 제1 링커 및 제2 링커 중 적어도 하나는 비-방출성 링커인, 조합물.

청구항 66

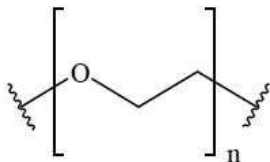
제58항에 있어서, 제1 링커, 제2 링커, 또는 제1 및 제2 링커 둘 모두는 각각 독립적으로 C_1 - C_{20} 알킬, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리프로린, 올리고-(4-피페리딘 카복실산, 올리고 피페리딘, 펩티드, 사카로-펩티드, 친수성 아미노산, 당, 비천연 펩티도글리칸, 폴리비닐피롤리돈, 플루로닉 F-127, 또는 이들의 조합을 포함하는, 조합물.

청구항 67

제66항에 있어서, 적어도 제1 링커 또는 제2 링커는 PEG를 포함하는, 조합물.

청구항 68

제58항에 있어서, 제1 링커 및 제2 링커 중 하나 이상은 하기 화학식을 갖는 구조를 포함하는, 조합물:



여기서 n 은 0 내지 200의 정수이다.

청구항 69

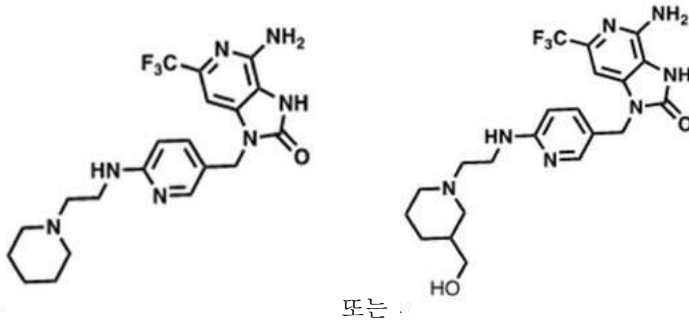
제52항에 있어서, 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 톨(Toll) 유사 수용체 (TLR) 효능제, 인터페론 유전자 자극제 효능제, 및 포스파타제 억제제, Nod 유사 수용체 자극제, 흑색종 2 유사 수용체 효능제에는 부재, 키나제 억제제, 레틴산 유도성 유전자-I 유사 수용체, 및 진행된 당화 최종 생성물에 대한 수용체를 포함하는 군으로부터 선택되는, 조합물.

청구항 70

제69항에 있어서, 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 TLR7 효능제인, 조합물.

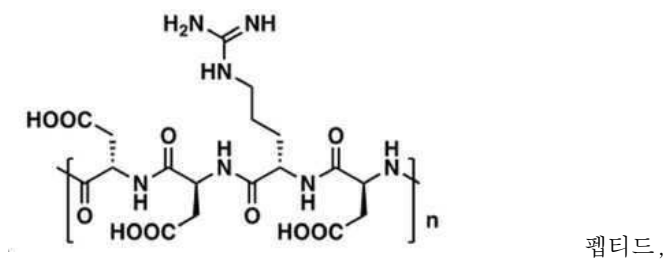
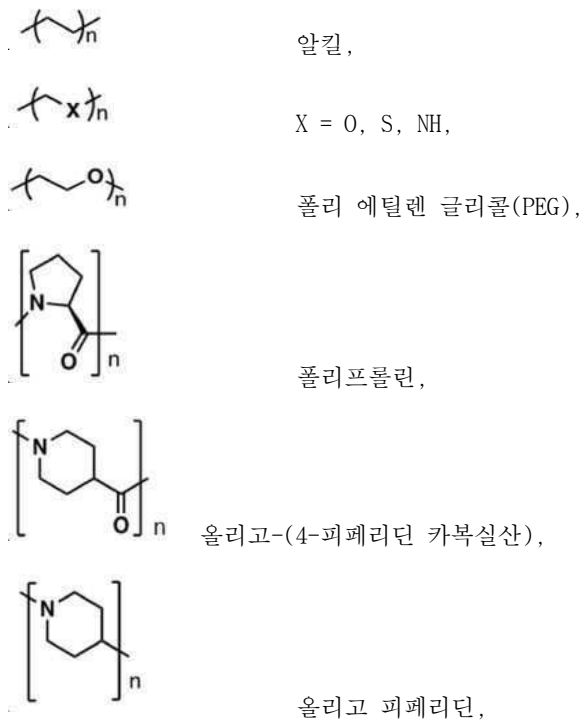
청구항 71

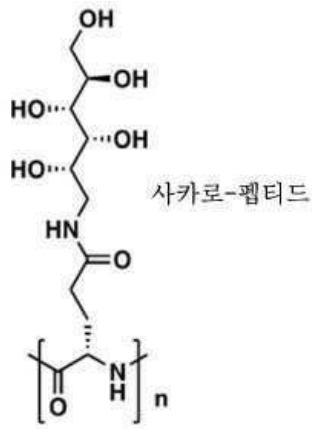
제70항에 있어서, TLR7 효능제는 하기 화학식을 갖는, 조합물:



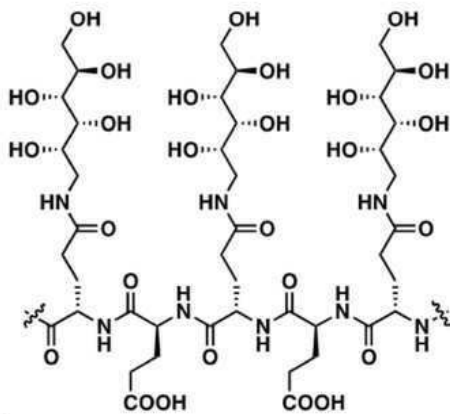
청구항 72

제56항 또는 제58항에 있어서, 하나 이상의 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염 내의 제1 링커는 소분자 리간드와 제1 표적화 모이어티 사이에 위치하고 하기 화학식으로부터 선택된 하나 이상의 구조를 포함하는, 조합물:





, 및



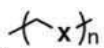
여기서 n 은 0 내지 200의 정수이다.

청구항 73

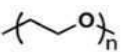
제57항 또는 제58항에 있어서, 제2 링커는 제2 표적화 모이어티와 활성 변형 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염 사이에 위치하고, 하기 화학식으로부터 선택된 하나 이상의 구조를 포함하는, 조합물:



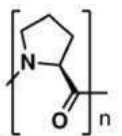
알킬,



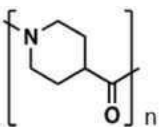
$X = O, S, NH,$



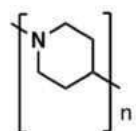
폴리 에틸렌 글리콜(PEG),



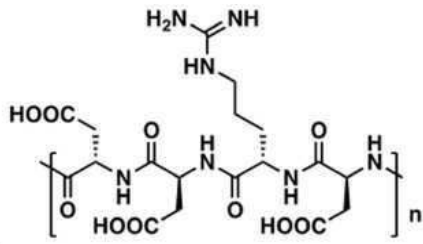
폴리프롤린,



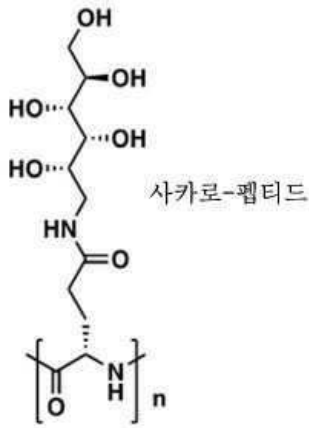
올리고-(4-피페리딘 카복실산),



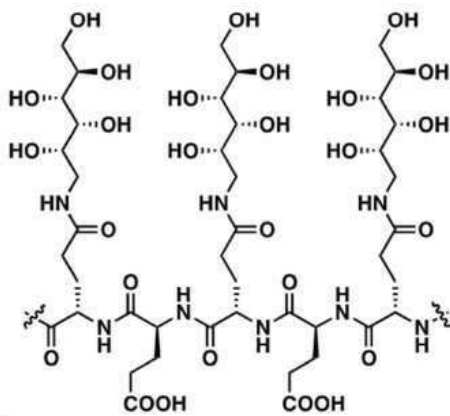
올리고 피페리딘,



펩티드,



, 및



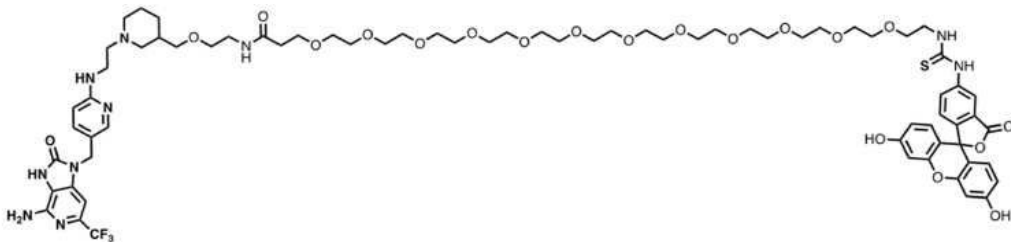
사카로-펩티드,

여기서 n은 0 내지 200의 정수이다.

여기서 n은 0 내지 200의 정수이다.

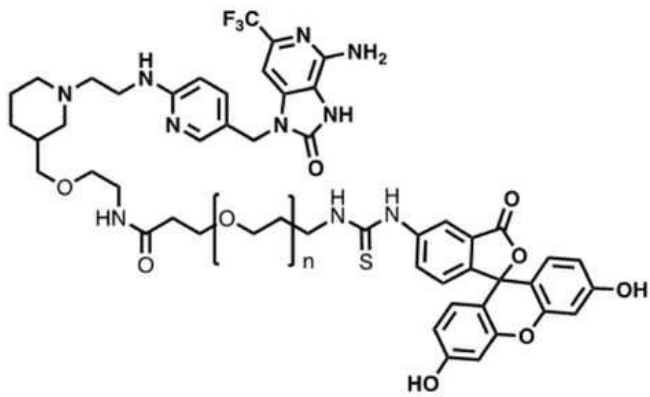
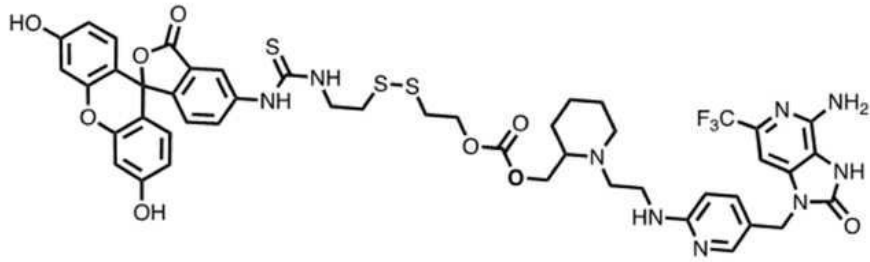
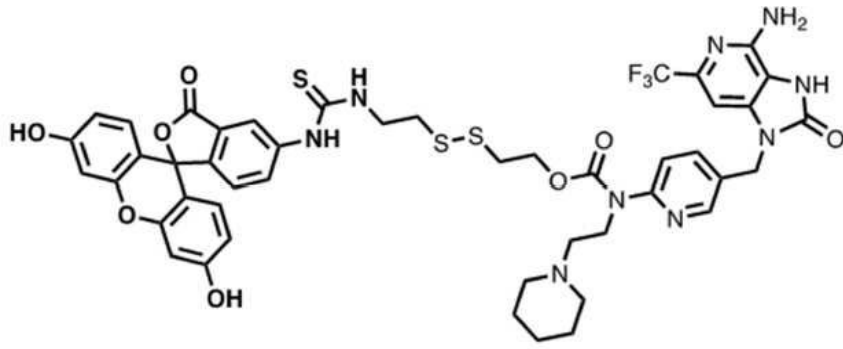
청구항 74

제52항 또는 제69항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 하기 화학식을 갖는, 조합물:

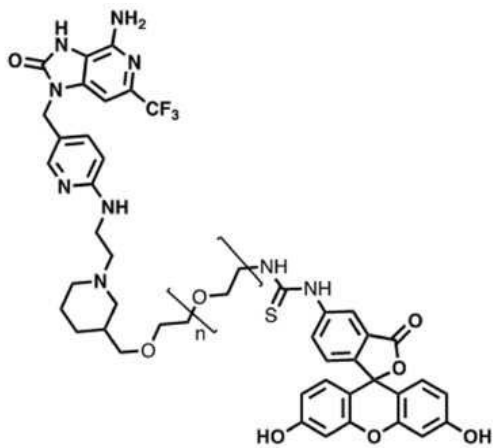


청구항 75

제52항 또는 제69항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 하기 화학식 중 하나의 구조를 갖는, 조합물:



여기서 $n = 0$ 내지 200, 그리고



여기서 $n = 0$ 내지 50.

청구항 76

제60항 또는 제61항에 있어서, 항체의 scFv 영역은 항-FITC 항체의 scFv 영역인, 조합물.

청구항 77

제59항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, CAR은 CD28, CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), 및 CD278 (ICOS)로

이루어진 군으로부터 선택된 공동 자극 도메인을 추가로 포함하는, 조합물.

청구항 78

제59항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, CAR은 활성화 신호전달 도메인을 추가로 포함하는, 조합물.

청구항 79

제78항에 있어서, 활성화 신호전달 도메인은 T 세포 CD3 ψ 사슬 또는 Fc 수용체 γ 인, 조합물.

청구항 80

제52항에 있어서, 각각의 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 항체가 아니고 항체의 단편을 포함하지 않는, 조합물.

청구항 81

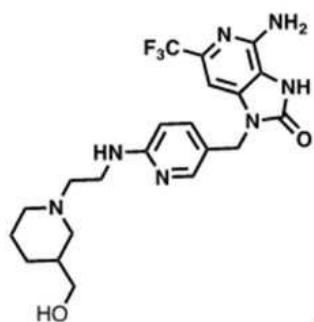
제52항에 있어서, 제1 표적화 모이어티는 펩티드 에피토프를 포함하지 않는, 조합물.

청구항 82

키메라 항원 수용체를 발현하는 T 세포를 재생하기 위한 화합물로서, 표적화 모이어티에 연결된 재생 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하되, 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 톨(Toll) 유사 수용체 (TLR) 효능제, 인터페론 유전자 자극제 효능제, 포스파타제 억제제, Nod 유사 수용체 자극제, 흑색 종 2 유사 수용체 효능제에는 부재, 키나제 억제제, 레티산 유도성 유전자-I 유사 수용체, 및 진행된 당화 최종 생성물에 대한 수용체를 포함하는 군으로부터 선택되는, 화합물.

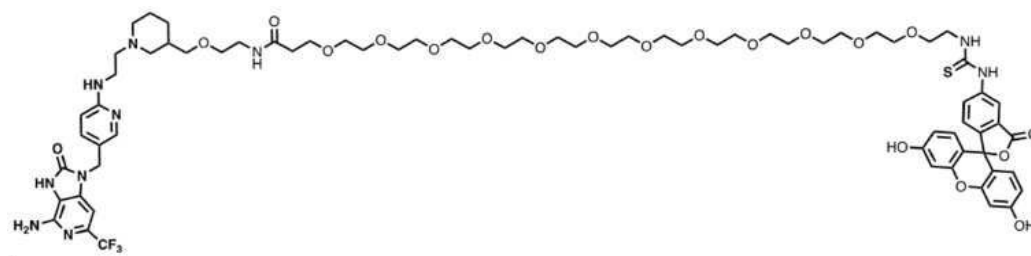
청구항 83

제82항에 있어서, 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 하기 화학식의 구조를 갖는, 화합물:



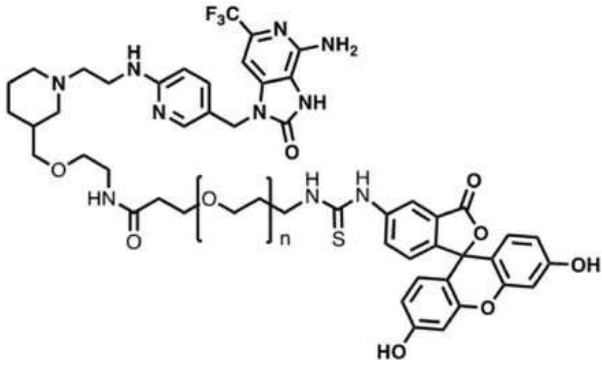
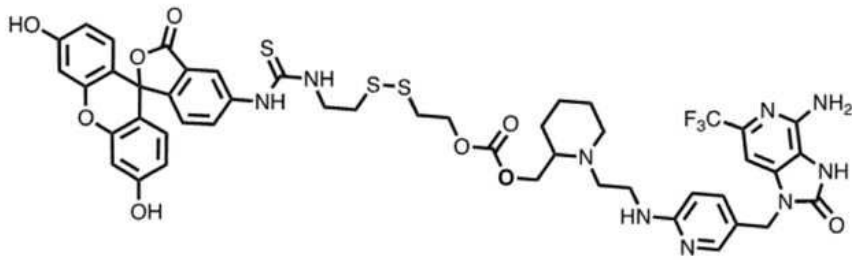
청구항 84

제82항 또는 제83항에 있어서, 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 하기 화학식의 구조를 갖는, 화합물:

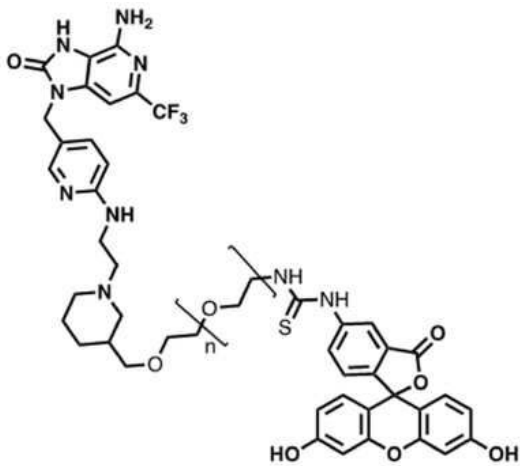


청구항 85

제82항 또는 제83항에 있어서, 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 하기 화학식 중 하나의 구조를 갖는, 화합물:



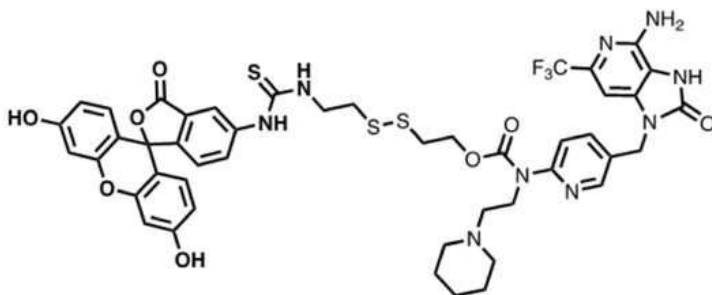
* 여기서 $n = 0$ 내지 200, 그리고



* 여기서 $n = 0$ 내지 50.

청구항 86

제82항에 있어서, 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 하기 화학식을 갖는, 화합물:



청구항 87

제82항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, 표적화 모이어티는 2,4-디니트로페놀 (DNP), 2,4,6-트리니트로페놀 (TNP), 바이오틴, 디곡시제닌, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC), NHS-플루오레세인, 펜타플루오로페닐 에스테르 (PFP), 테트라플루오로페닐 에스테르 (TFP), 크노틴, 센타이린, 및 설계된 안키린

반복 단백질 (DARPin)로 이루어진 군으로부터 선택되는, 화합물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

우선권

[0002]

이 특허 출원은 2020년 3월 6일에 출원된 미국 임시 특허 출원 제62/986,349호와 관련이 있고, 그의 우선권 이점을 주장하며, 그 내용은 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0003]

분야

[0004]

본 개시내용은 암이 있는 대상체를 치료하고 키메라 항원 수용체를 발현하는 T 세포(CAR-T 세포)의 표적외 독성을 감소시키고/시키거나 CAR-T 세포 활성화의 향상된 제어를 제공하기 위한 화합물, 조성물, 및 방법에 관한 것이다. 특히, 표적화 모이어티는 CAR-T 세포 요법과 조합하여 활성 화합물과 함께 이용되어 CAR-T 세포를 지시하고 원하는 대로 그의 활성을 변형시킨다.

배경 기술

[0005]

림프구(예를 들어, T 세포)를 환자에게 입양 전달하는 것을 기반으로 하는 면역요법은 암 및 다른 질환의 치료에 소중한 요법이다. 림프구의 입양 전달을 기반으로 하는 면역 요법의 개발에서 중요한 진전이 이루어졌다. 많은 상이한 유형의 면역치료제 중에서, 개발되고 있는 면역치료제 중 가장 유망한 것 중 하나는 키메라 항원 수용체를 발현하는 T 세포(CAR-T 세포)이다.

[0006]

T 세포는 키메라 항원 수용체 또는 CAR이라고 하는 인공 T 세포 수용체를 표면에 생성하도록 유전적으로 조작되었다. CAR은 T 세포가 표적화 종양 세포에서 발견되는 미리 선택된 특정 단백질 또는 항원을 인식할 수 있도록 하는 단백질이다. CAR-T 세포는 실험실에서 배양 및 확장된 다음, 자가 대상체에 재주입될 수 있다. 조작된 T 세포 수용체의 안내를 통해, CAR-T 세포는 표면에 특정 항원을 표시하는 암 세포를 인식하고 파괴한다.

[0007]

기존 CAR은 인식 및 종양에 의해 발현되는 항원에 대한 결합을 위한 인식 영역(예를 들어, 항체로부터 유래된 단쇄 단편 가변(scFv) 영역)을 포함한다. 인식 영역은 T 세포 수용체의 외형질 도메인에 융합되어 T 세포와 암 세포와의 맞물림을 향상시킬 수 있다. 암 세포의 신속한 사멸을 촉진하기 위해, CAR은 예를 들어, CD3 ψ , Fc 수용체 감마 신호전달 도메인, 또는 하나 이상의 공동자극 도메인 예컨대 CD28, 4-1BB, ICOS, OX40 등으로부터 유래될 수 있는 활성화 신호전달 도메인을 함유하도록 추가로 변형될 수 있다.

[0008]

CAR-T 세포가 시험관 내에서 긍정적인 결과를 보여주긴 했지만, 이러한 유전자 조작 T 세포를 사용하여 인간 암을 치료하는 것은 CAR-T 세포의 활성 제어와 연관된 문제를 야기하였다. 특히 고형 종양 암에서 그러한 과제 중 하나는 정상 조직이 아닌 종양 또는 다른 악성 표적 전체에 걸쳐 균질하게 발현되는 표적 항원을 확인하는 것이다. 현재까지 상피암에 대해 균질한 발현을 보이는 표적은 거의 확인되지 않았다. 따라서 CAR-T 세포는 정상 조직 상에서도 발현되는 종양 연관 항원을 표적으로 삼아 잠재적으로 정상 조직을 손상시킬 수 있다. 이는 암 환자에게 해를 입히거나 심지어 사망에 이르게 할 수 있는 독성으로 이어질 수 있다. 이러한 독성은 예를 들어 신경학적 독성, "온 표적/오프 종양(on target/off tumor)" 인식 및 과민증을 포함할 수 있다.

[0009]

또한, "사이토카인 폭풍(cytokine storm)" 또는 사이토카인 방출 증후군(CRS)이라고도 하는 사이토카인 연관 독성은 CAR-T 세포 요법의 일반적이고 잠재적으로 치명적인 합병증이다. CRS는 CAR-T 세포 전달과 같은 현대적인 면역 요법을 사용하여 임상적 이점을 매개하는 데 일반적으로 필요한 높은 수준의 CAR-T 세포 확장 및 면역 활성화의 결과로 발생할 수 있는 비항원 특이적 독성이다. 기존의 CAR-T 세포와 표적 사이의 상호작용은 CAR-T 세포의 활성화 및 확장과 정상 및 종양 세포의 용해를 유발한다. 이것은 인터페론 감마(IFN- γ) 및 종양 괴사 인자 알파(TNF α)와 같은 여러 사이토카인의 방출과 관련이 있다. 이러한 신호의 조합물은 또한 향상된 종양파괴 능력을 갖고 높은 수준의 염증유발 사이토카인 (예를 들어, 인터류킨 6 (IL-6), 인터류킨 1 (IL-1), 및 인터류킨 10 (IL-10)) 및 다른 매개체 예컨대 유도성 산화질소 합성효소 (iNOS)를 분비하는 단핵구 및 대식세포의 활성화를 촉발하고, 이들 모두는 CRS 및 다른 관련 독성의 진행을 촉진할 수 있다. 대부분의 환자에서, CRS 증상은 일반적으로 열과 근육통과 함께 경미하고 독감과 유사하다. 그러나 일부 환자는 다기관 시스템 부전을 유발할 수 있는 심각한 염증 증후군을 경험한다.

[0010]

특히 이러한 의료 개입과 관련된 독성을 없애기 위해 CAR-T 세포 요법을 위한 개선된 방법 및 조성물을 제공할

필요가 남아 있다. CAR-T 세포는 암과 같은 질환의 치료 도구로서 큰 가능성을 보여주지만, 표적의 독성을 감소시키고 CAR-T 세포 활성화를 보다 정밀하게 제어할 수 있는 추가 CAR-T 세포 요법이 필요하다.

발명의 내용

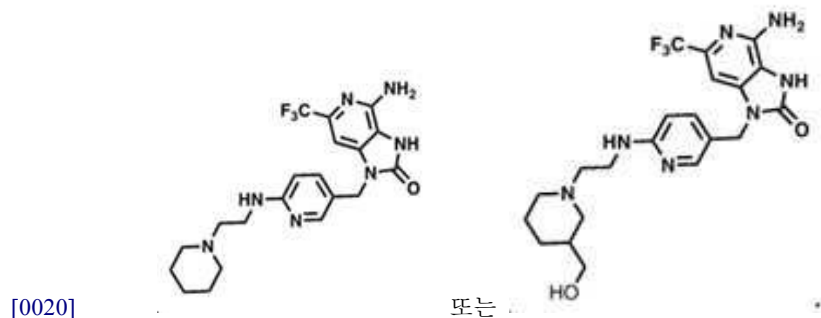
해결하려는 과제

- [0011] 표적의 독성을 감소시키고 CAR-T 세포 요법(예를 들어, 암 치료)을 발전시키는 키메라 항원 수용체를 발현하는 T 세포(CAR-T 세포)의 활성화를 보다 정확하게 제어하기 위한 화합물, 조성물 및 방법이 제공된다. 이러한 요법에서, (제1 링커에 의해 또는 직접) 제1 표적화 모이어티에 연결된 소분자 리간드는 암 치료를 위해 CAR-T 세포를 암으로 보내는, 사용 중인 하나 이상의 암 세포와 CAR-T 세포 사이의 어댑터 화합물(adaptor compound)(즉, 브릿지)로서 사용된다. 어댑터 화합물의 일부인 소분자 리간드는 예를 들어, 플레이트, 2-[3-(1,3-디카복시프로필)우레이도]펜탄디옥산 (DUPA) 리간드, 뉴로키닌 1 수용체 (NK-1R) 리간드, 탄산탈수효소 IX (CAIX) 리간드, 감마 글루타미드 트랜스펩티다제의 리간드, 자연 살해 그룹 2D 수용체 (NKG2D) 리간드, 또는 콜레시스토키닌 B 수용체 (CCKBR 또는 CCK2) 리간드일 수 있고, 이들 각각은 소분자 리간드 이는 특정 유형의 암 세포에서 과발현되는 수용체에 특이적으로 결합한다(즉, 이들 리간드에 대한 수용체는 정상 조직 및 비표적 암 세포와 비교하여 표적 암 세포 상에서 과발현됨).
- [0012] 어댑터 화합물에서, 소분자 리간드는 CAR-T 세포에 의해 발현되는 키메라 항원 수용체(CAR)에 결합하는 제1 표적화 모이어티에 연결될 수 있다. 제1 "표적화 모이어티"는 예를 들어 2,4-디니트로페놀 (DNP), 2,4,6-트리니트로페놀 (TNP), 바이오틴, 디곡시제닌, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC), NHS-플루오레세인, 펜타플루오로페닐 에스테르 (PFP), 테트라플루오로페닐 에스테르 (TFP), 크노틴, 센타이린, 및 설계된 안키린 반복 단백질 (DARPin)로부터 선택될 수 있다.
- [0013] 제1 표적화 모이어티는 CAR-T 세포에 의해 발현되는 유전자 조작된 CAR의 인식 영역에 결합한다. 따라서, CAR의 인식 영역(예를 들어, 항체의 단쇄 단편 가변 영역(scFv), Fab, Fv, Fc, (Fab')₂ 단편 등)은 제1 표적화 모이어티에 대한 것이다. 따라서, 제1 표적화 모이어티에 연결된 소분자 리간드를 포함하는 어댑터 화합물은 암과 CAR-T 세포 사이의 브릿지 역할을 하여 암 치료를 위해 CAR-T 세포를 암으로 향하게 한다. 따라서, CAR-T 세포 요법이 감소된 표적의 독성, 및 CAR-T 세포 활성화의 더 정밀한 제어를 제공할 수 있는 것은, 어댑터 화합물 내의 소분자 리간드가 감소된 표적의 독성을 초래하는 비표적화된 조직이 아닌 표적화된 암 세포에 특이적으로 결합하기 때문이고, 어댑터 화합물은 CAR-T 세포 활성화를 정밀하게 제어하기 위해 어댑터 화합물의 농도의 신속한 변화를 허용하는 짧은 순환 반감기를 갖는다.
- [0014] 특정 구현예에서, 하나 이상의 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염 중 적어도 하나는 항체가 아니며 항체의 단편을 포함하지 않는다.
- [0015] 상기 기재된 요법은 또한 상이한 종양 특이적 어댑터 화합물(예를 들어, 상이한 소분자 리간드이지만 동일한 표적화 모이어티)의 각태일이 투여될 수 있다는 이점을 갖는다. 결과적으로, 돌연변이되어 원발성 종양 항원을 상실한 이중 고품종 종양이 여전히 박멸될 수 있는 것은, 여러 종양 특이적 어댑터 화합물이 사용되고 상이한 종양 특이적 어댑터 화합물은 종양이 돌연변이되어 원발성 종양 항원을 상실할 때 암과 CAR-T 세포 사이의 브릿지(들)로서 작용할 수 있다.
- [0016] 어댑터 화합물의 사용은 또한 단일 유형의 인식 영역을 가진 단일 유형의 CAR-T 세포를 사용하여 여러 유형의 종양을 박멸할 수 있기 때문에 '보편성'을 제공한다. CAR-T 세포는 어댑터 화합물 내의 제1 표적화 모이어티에 대한 단일 유형의 인식 영역을 갖지만, 상이한 어댑터 화합물은 다중 종양 유형에 대한 상이한 소분자 리간드(즉, 종양 표적화 리간드)를 갖는다. 따라서 어댑터 화합물 내의 상이한 소분자 리간드가 상이한 종양 유형에 결합하기 때문에, 어댑터 화합물이 상이한 항원을 발현하는 종양을 사멸시키기 위한 CAR-T 세포 '범용' CAR-T 세포를 만들지만, 인식 영역의 한 유형을 갖는 CAR-T 세포의 한 유형만이 사용된다.
- [0017] CAR-T 세포 요법이 직면한 추가 문제는 CAR-T 세포가 기능장애를 일으키거나 "고갈"되거나, 종양 미세환경에서 종양 항원 또는 면역억제 인자(예를 들어, 골수성 유래된 억제 세포 세포(MDSC), 종양-연관된 대식세포(TAM), 조절 T 세포(Treg), 및 억제 사이토카인)에 만성적으로 노출되면 증식 감소가 초래될 수 있다는 것이다. 대조적으로, CAR-T 세포는 과활성되어 환자에게 치명적일 수 있는 사이토카인 방출 증후군(CRS)과 같은 CAR-T 세포 요법의 원치 않는 부작용을 초래할 수 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해, 적어도 하나의 구현예에서, CAR의 일부인 인식 영역(예를 들어, scFV 단편)의 세포내이입을 이용하여 활성 변형 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는

염을 CAR-T 세포에 전달한다.

[0018] 활성 변형 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 직접적으로 또는 제2 링커에 의해 제2 표적화 모이어티에 연결된다. 특정 구현예에서, 제2 표적화 모이어티는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: DNP, TNP, 바이오틴, 디곡시제닌, 플루오레세인, FITC, NHS-플루오레세인, 펜타플루오로페닐 에스테르, 테트라플루오로페닐 에스테르, 크노틴, 센타이린, 및 DARPin. 일부 구현예에서, 제1 표적화 모이어티 및 제2 표적화 모이어티 중 하나 또는 둘 모두는 펩티드 에피토프를 포함하지 않는다.

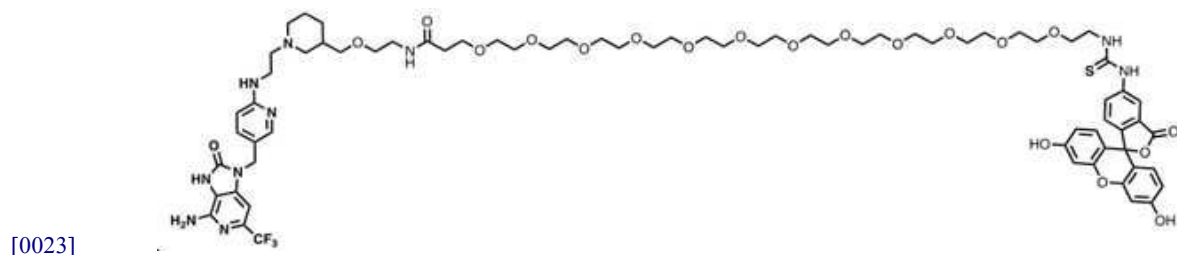
[0019] 활성 변형 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함할 수 있다. 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 (예를 들어, 억제 신호전달 또는 고갈된 CAR-T 세포를 차단하고, 항원 독립적 경로를 통해 고갈된 CAR-T 세포를 재활성화하고, 전술한 두 가지를 수행하거나 다른 방법을 통해) 고갈된 CAR-T 세포를 재생시키도록 제형화된 화합물, 약물 또는 활성제일 수 있다. 다양한 구현예에서, 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 톨(Toll) 유사 수용체 (TLR) 효능제 (예를 들어, TLR1, TLR2, TLR7, TLR8, TLR7/8, TLR9, TLR3, TLR4, 등), 인터페론 유전자 자극제 (STING) 효능제, Nod 유사 수용체 자극제 (NLRs), 흑색종 2 (AIM2) 유사 수용체 (ALRs) 효능제 부재, 키나제 억제제 표적화 키나제 예컨대 GSK-3beta, PI3K, 등, 및 포스파타제 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가 구현예에서, 예를 들어 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염이 TLR7/8 효능제인 경우, 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 하기 화학식 중 하나를 갖는다:



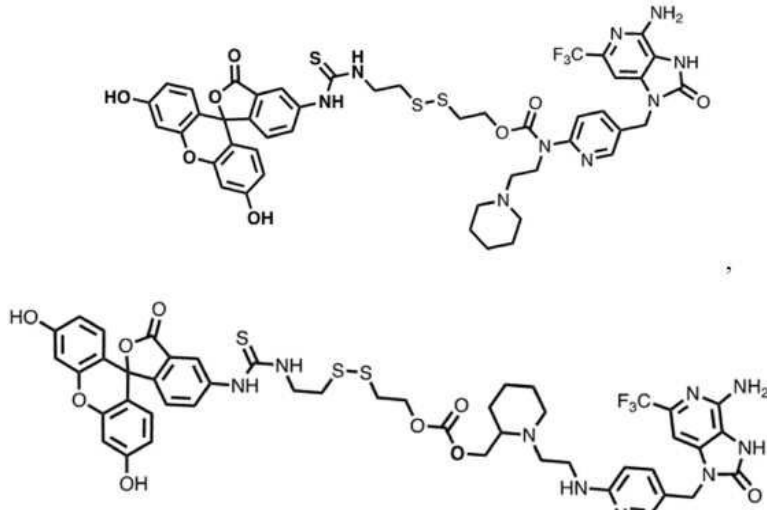
[0021] 투여될 때, 재생 약물은 CAR-T 세포 내로 전달된다(예를 들어, 제2 표적화 모이어티 및 CAR 인식 영역을 통해). CAR-T 세포 내에서 재생 약물을 농축함으로써, 고갈되거나 기능 장애 CAR-T 세포는 기능적 및 종양 사멸 CAR-T 세포로 재생되어 고형 종양의 재개된 박멸을 유도할 수 있다. CAR-T 세포를 표적으로 하는 재생 화합물의 투여는 종양 미세환경에 의해 유도된 CAR-T 세포의 고갈 또는 기능장애를 역전시킬 수 있다.

과제의 해결 수단

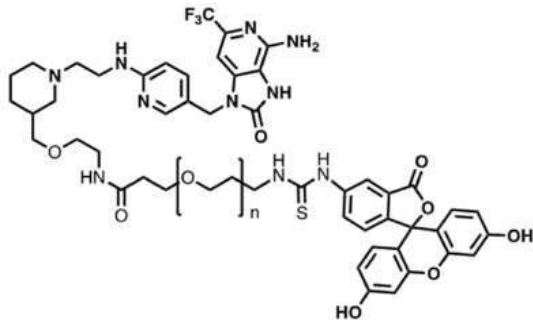
[0022] 일부 구현예에서, 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 하기 화학식을 갖는다:



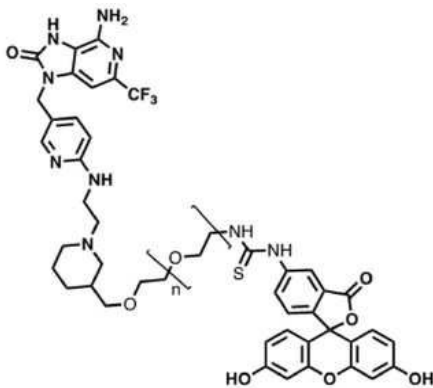
[0024] 일부 구현예에서, 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 하기 화학식 중 하나의 구조를 갖는다:



[0025] ,



[0026] , 여기서 $n = 0$ 내지 200, 또는



[0027] , 여기서 $n = 0$ 내지 50.

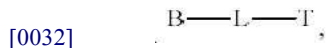
[0028] CAR-T 세포 활성의 정확한 제어를 가능하게 하고 CAR-T 세포의 활성을 감소시키기 위해, 활성 변형 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 면역억제 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함할 수 있다. 면역억제 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 CAR-T 세포의 활성을 감소시키도록 제형화된 화합물, 약물 또는 활성제일 수 있다. 다양한 구현예에서, 면역억제 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 타크롤리무스, 시롤리무스 및 사이클로스포린으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 투여될 때, 면역억제 약물은 CAR-T 세포 내로 전달된다(예를 들어, 제2 표적화 모이어티 및 CAR 인식 영역을 통해). CAR-T 세포 내에 면역억제제를 농축함으로써, CAR-T 세포 활성을 감소시켜 CRS와 같은 과도한 CAR-T 세포 활성화의 유해한 부작용을 억제할 수 있다.

[0029] 암이 있는 대상체에서 T 세포 활성을 변형시키는 방법(예를 들어, 암을 치료하는 것) 및/또는 암을 치료하는 방법이 또한 제공된다. 방법은 CAR을 인코딩하는 핵산 서열, 또는 CAR을 발현하는 CAR-T 세포에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함하는 벡터(예를 들어, 렌티바이러스 벡터)를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계로서, CAR은 제1 표적화 모이어티, 제2 표적화 모이어티, 또는 제1 및 제2 표적화 모이어티 둘 모두로 향하는 단

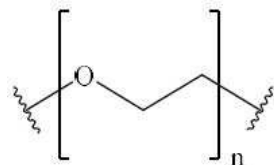
계; 하나 이상의 어댑터 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 환자에게 투여하는 단계로서, 각각의 어댑터 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 제1 표적화 모이어티에 연결된 소분자 리간드를 포함하는 단계; 및 제2 표적화 모이어티에 연결된 활성 변형 화합물 (예를 들어, 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염 또는 면역억제 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염)을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 방법은 하나 이상의 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 투여하기 전에, 또는 CAR-T 세포 조성물을 투여하기 전에 대상체를 영상화하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0030] 각각의 어댑터 화합물의 소분자 리간드는 제1 링커에 의해 그의 제1 표적화 모이어티에 연결될 수 있다. 독립적으로, 활성 변형 화합물은 제2 링커에 의해 제2 표적화 모이어티에 연결될 수 있다. 제1 및 제2 링커가 모두 이용되는 구현예에서, 제1 및 제2 링커는 동일한 구조 또는 상이한 구조를 가질 수 있다. 제1 및 제2 링커는 각각 독립적으로 방출성 링커 또는 비-방출성 링커일 수 있다. 특정 구현예에서, 제1 링커, 제2 링커, 또는 둘 모두는 독립적으로 C₁-C₂₀ 알킬, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리프로린, 올리고-(4-피페리딘 카복실산, 올리고 피페리딘, 펩티드, 사카로-펩티드, 친수성 아미노산, 당, 비천연 펩티도글리칸, 폴리비닐피롤리돈, 플루로닉 F-127, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 제1 링커 또는 제2 링커는 PEG를 포함한다.

[0031] 특정 구현예에서, 하나 이상의 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 각각 하기 화학식을 갖는다:

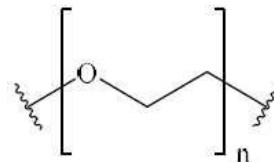


[0033] B는 소분자 리간드를 나타내고, L은 제1 링커를 나타내고, T는 제1 표적화 모이어티를 나타내고, 그리고 L은 하기 화학식을 갖는 구조를 포함한다:



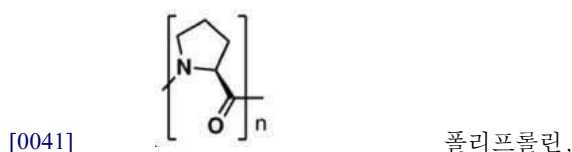
[0034] , n은 0 내지 200의 정수이고;

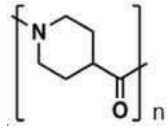
[0035] 유사하게, 특정 구현예에서, 제2 링커는 하기 화학식을 갖는 구조를 가질 수 있다:



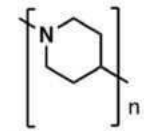
[0036] , n은 0 내지 200의 정수이다.

[0037] 이용되는 경우, 하나 이상의 어댑터 화합물 (또는 그의 약제학적으로 허용되는 염) 내의 제1 링커는 소분자 리간드와 제1 표적화 모이어티 사이에 위치할 수 있다. 유사하게, 이용되는 경우, 활성 변형 화합물 내의 제2 링커는 제2 표적화 모이어티와 활성 변형 화합물 사이에 위치할 수 있다. 특정 구현예에서, 제1 링커 및/또는 제2 링커는 각각 하기 화학식으로부터 독립적으로 선택된 구조를 갖는 화학적 모이어티를 포함할 수 있다:

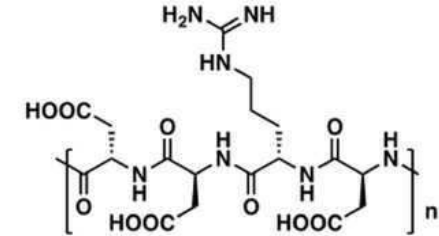




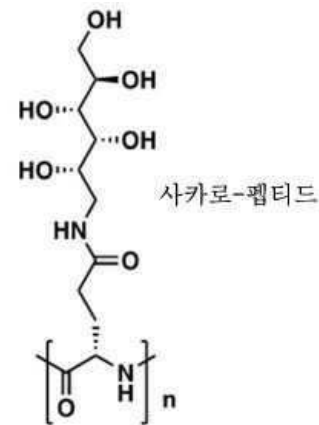
[0042] 올리고-(4-피페리딘 카복실산),



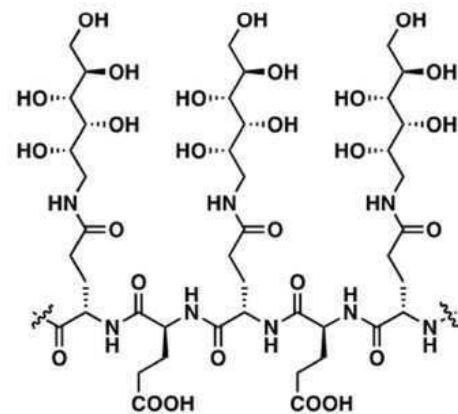
[0043] 올리고 피페리딘,



[0044] 펩티드,



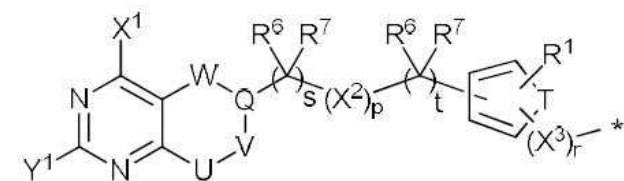
[0045] , 및



[0046] 사카로-펩티드,

[0047] 여기서 n은 0 내지 200의 정수이다.

[0048] 특정 구현예에서, 하나 이상의 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염의 소분자 리간드는 하기 화학식을 갖는 구조를 포함한다:



[0049]

- [0050] 식 중,
- [0051] X^1 및 Y^1 은 각각 할로, R^2 , OR^2 , SR^3 , 및 NR^4R^5 로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0052] U, V 및 W는 $-(R^{6a})C=$, $-N=$, $-(R^{6a})C(R^{7a})-$, 및 $-N(R^{4a})-$ 로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택된 2가 모이어티를 나타내고;
- [0053] Q는 C 및 CH로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0054] T는 S, O, N 및 $-C=C-$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0055] X^2 및 X^3 은 각각 산소, 황, $-C(Z)-$, $-C(Z)O-$, $-OC(Z)-$, $-N(R^{4b})-$, $-C(Z)N(R^{4b})-$, $-N(R^{4b})C(Z)-$, $-OC(Z)N(R^{4b})-$, $-N(R^{4b})C(Z)O-$, $-N(R^{4b})C(Z)N(R^{5b})-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-N(R^{4a})S(O)_2-$, $-C(R^{6b})(R^{7b})-$, $-N(C\equiv CH)-$, $-N(CH_2C\equiv CH)-$, C_1-C_{12} 알킬렌, 및 C_1-C_{12} 알키엔옥시로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고, 여기서, Z는 산소 또는 황이고;
- [0056] R^1 은 수소, 할로, C_1-C_{12} 알킬 및 C_1-C_{12} 알콕시로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0057] R^2 , R^3 , R^4 , R^{4a} , R^{4b} , R^5 , R^{5b} , R^{6b} , 및 R^{7b} 는 각각 수소, 할로, C_1-C_{12} 알킬, C_1-C_{12} 알콕시, C_1-C_{12} 알카노일, C_1-C_{12} 알케닐, C_1-C_{12} 알킬닐, $(C_1-C_{12}$ 알콕시)카보닐, 및 $(C_1-C_{12}$ 알킬아미노)카보닐 로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0058] R^6 및 R^7 각각은 수소, 할로, C_1-C_{12} 알킬, 및 C_1-C_{12} 알콕시로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나; 또는, R^6 및 R^7 은 함께 합쳐져서 카보닐 기를 형성하고;
- [0059] R^{6a} 및 R^{7a} 각각은 수소, 할로, C_1-C_{12} 알킬, 및 C_1-C_{12} 알콕시로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나; 또는, R^{6a} 및 R^{7a} 는 함께 합쳐져서 카보닐 기를 형성하고;
- [0060] p, r, s 및 t는 각각 독립적으로 0 또는 1이고; 그리고
- [0061] *는 하나 이상의 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염이 화학적 모이어티를 포함하는 경우 공유 결합을 나타낸다.
- [0062] 적어도 하나의 구현예에서, 하나 이상의 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 적어도 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염의 제1 세트로서, 이들 각각은 제1 표적화 모이어티에 연결된 소분자 리간드를 포함하는 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염의 제1 세트; 및 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염의 제2 세트로서, 이들 각각이 제1 표적화 모이어티에 연결된 제2 소분자 리간드를 포함하는 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염의 제2 세트를 포함하고; 여기서 제1 소분자 리간드는 제1 유형의 암 세포 상에서 과발현된 수용체에 특이적이고 제2 소분자 리간드는 제2 유형의 암 세포에서 과발현된 수용체에 특이적이다.
- [0063] 특정 구현예에서, CAR은 (예를 들어, 서브-나노몰 범위에서) 고친화도로 제1 표적화 모이어티 및/또는 제2 표적화 모이어티에 결합하는 항체의 scFv 영역을 포함하는 인식 영역을 가질 수 있다. 예를 들어 그리고 제한 없이 scFv 영역은 항-FITC 항체의 scFv 영역일 수 있다. 이러한 방식으로, 투여될 때, CAR-T 세포의 인식 영역을 제2 표적화 모이어티에 결합하는 것은 제2 표적화 모이어티에 연결된 활성 변형 화합물을 CAR-T 세포 내로 내재화한다.
- [0064] CAR은 공동 자극 도메인 및/또는 활성화 신호전달 도메인을 추가로 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 공동 자극 도메인은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다: CD28, CD137(4-1BB), CD134(OX40) 및 CD278(ICOS). 특정 구현예에서, 활성화 신호전달 도메인은 T 세포 CD3 ψ 사슬 또는 Fc 수용체 γ 이다.
- [0065] (예를 들어, CAR-T 세포 활성을 변형시킴으로써) CAR-T 세포 요법을 받은 대상체를 치료하는 방법이 또한 개시된 조성물, 세포, 벡터 및 화합물을 사용하여 제공된다. 일부 구현예에서, 대상체에서 암을 치료하고/하거나 암

세포를 사멸시키는 방법은 하나 이상의 어댑터 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염으로서, 이들 각각이 제1 표적화 모이어티에 연결된 소분자 리간드를 포함하는 하나 이상의 어댑터 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 여기서, 투여 단계 전에, 대상체는 제1 표적화 모이어티를 인식하고 그에 결합하는 CAR을 발현하는 T 세포의 적어도 용량을 받았다. 일부 구현예에서, 방법은 제2 표적화 모이어티에 연결된 활성 변형 화합물을 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서 CAR은 제2 표적화 모이어티를 인식하고 그에 결합한다.

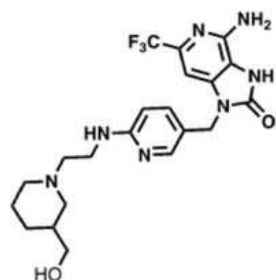
[0066] 또한, T 세포 활성(예를 들어, 암 치료를 초래할 수 있음)을 변형시키기 위한 조합물이 제공된다. 조합물을 하나 이상의 어댑터 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하되, 각각의 어댑터 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 제1 표적화 모이어티에 연결된 소분자 리간드; 및 활성 변형 화합물을 포함하고, 활성 변형 화합물은 재생 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 면역억제 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함한다 하나 이상의 어댑터 화합물 (또는 그의 약제학적으로 허용되는 염) 및 활성 변형 화합물은 본원에 기재된 임의의 화합물일 수 있고, 제한 없이 각각 제1 링커 및 제2 링커를 포함한다.

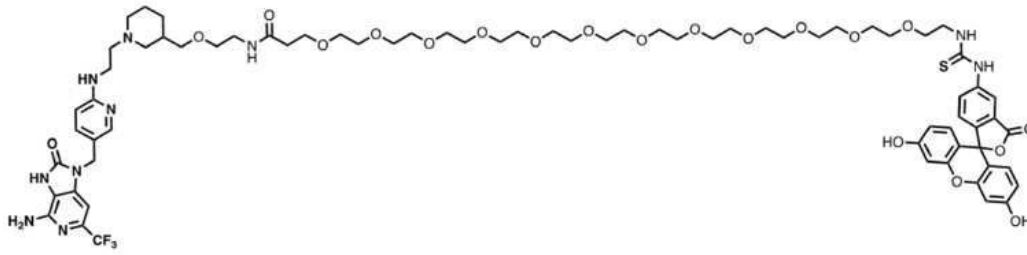
[0067] 암이 있는 대상체에서 T 세포 활성을 변형시키고/시키거나 암을 치료하기 위한 다른 조합물은 하나 이상의 어댑터 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염으로서, 각각이 제1 표적화 모이어티에 연결된 소분자 리간드를 포함하는 하나 이상의 어댑터 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염; 활성 변형 화합물로서, 재생 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 면역억제 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 활성 변형 화합물; 및 CAR-T 세포를 포함하는 조성물로서, CAR-T 세포는 제1 표적화 모이어티, 제2 표적화 모이어티 또는 제1 및 제2 표적화 모이어티 둘 모두에 대한 것인 CAR을 포함하는 조성물을 포함한다. 예를 들어, CAR은 (예를 들어, 서브나노몰 범위에서) 고친화도로 제1 표적화 모이어티 및/또는 제2 표적화 모이어티에 결합하는 인식 영역을 가질 수 있다. 하나 이상의 어댑터 화합물 (또는 그의 약제학적으로 허용되는 염), 활성 변형 화합물, 및 CAR-T 세포 조성물은 본원에 기재된 임의의 화합물 및 조성물일 수 있다.

[0068] 벡터 조성물을 포함하는, T 세포 활성 변형/암 치료를 위한 조합물이 또한 제공된다. 일부 구현예에서, 조합물은 하나 이상의 어댑터 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염으로서, 각각이 제1 표적화 모이어티에 연결된 소분자 리간드를 포함하는 하나 이상의 어댑터 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염; 활성 변형 화합물로서, 재생 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 면역억제 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 활성 변형 화합물; 및 CAR을 인코딩하는 핵산 서열에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함하는 벡터 조성물을 포함한다. 하나 이상의 어댑터 화합물 (또는 그의 약제학적으로 허용되는 염), 활성 변형 화합물, 벡터 조성물, 및 CAR은 본원에 기재된 임의의 화합물, 조성물 또는 CAR (적절한 경우)일 수 있고, 제한 없이, 각각 제1 링커 및 제2 링커를 포함한다. 벡터 조성물은 렌티바이러스 벡터를 포함할 수 있다. 예를 들어 그리고 제한 없이 벡터 조성물은 핵산 벡터를 포함하는 렌티바이러스 입자를 포함할 수 있다. 적어도 하나의 구현예에서, 벡터 조성물은 치료적 유효량의 개시된 바이러스 입자를 포함한다.

[0069] CAR-T 세포를 재생하기 위한 화합물도 제공된다. CAR-T 세포를 재생시키기 위한 화합물은 TLR 효능제, STING 효능제, NLR, ALR 효능제, 키나제 억제제 표적화 키나제, RLR, RAGE, 포스포타제 억제제, 및 표적화된 CAR-T 세포의 엔도솜 또는 세포질에 위치한 임의의 다른 패턴 인식 수용체를 포함하는 그룹으로부터 선택된 재생 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함한다.

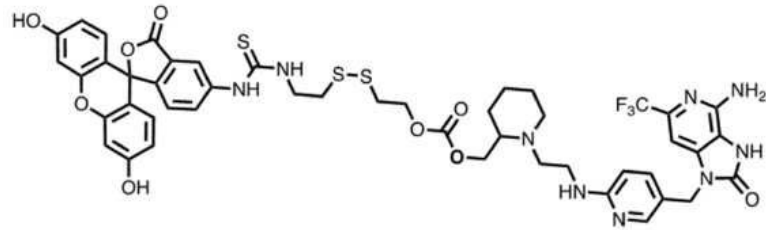
[0070] 특정 구현예에서, CAR-T 세포를 재생시키기 위한 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 하기 화학식의 구조를 갖는다:



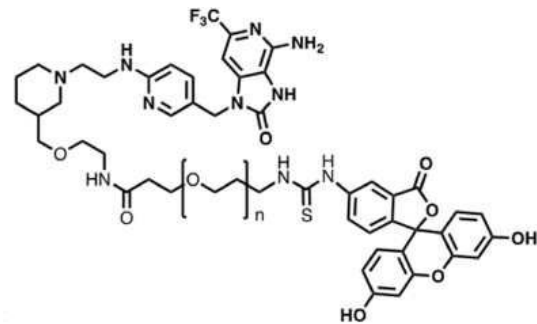


[0073]

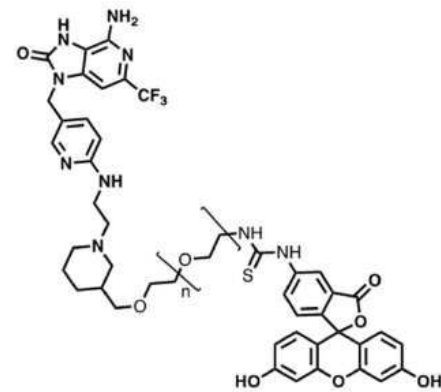
[0074] 특정 구현예에서, CAR-T 세포를 재생시키기 위한 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 하기 화학식 중 하나의 구조를 갖는다:



[0075]

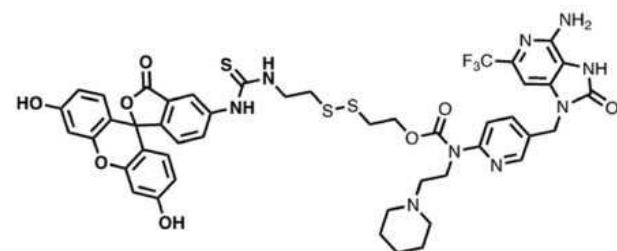


[0076] 여기서 $n = 0$ 내지 200, 또는



[0077] 여기서 $n = 0$ 내지 50.

[0078] 특정 구현예에서, CAR-T 세포를 재생시키기 위한 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 하기 화학식을 갖는다:



[0079]

도면의 간단한 설명

[0080]

구현에 및 다른 특징, 이점 및 양태, 그리고 그것들을 달성하는 문제는 다양한 구현예에 대한 하기의 상세한 설명에 비추어 명백해질 것이다. 이러한 상세한 설명은 첨부 도면과 함께 취해질 때 더 잘 이해될 것이다.

도 1은 CAR-T 세포 형질도입에 사용할 수 있는 작제물의 일반 다이어그램을 보여준다.

도 2a는 시험관 내 고갈 모델의 예시를 보여준다.

도 2b는 감소된 사멸 효과에 의해 나타난 바와 같이 시험관 내에서 신선한 MDA-MB-231 세포로 두 번 자극한 후 항-FITC CAR-T 세포가 고갈되었음을 보여주며, 도 2c는 T 세포 고갈 마커 (PD-1+Tim3+LAG3+)의 상응하는 증가된 발현을 보여준다.

도 3은 TLR7 효능제-FITC 콘주게이트의 구조를 보여준다.

도 3b는 증가된 사멸 효과로 나타낸, 고갈 모델에서 시험관 내에서 고갈된 항-FITC CAR-T 세포에 대한 TLR7 효능제-FITC 콘주게이트의 재생 효과를 보여주고; FITC-AF647은 항-FITC CAR-T 세포에 대해 $K_d = 8.03 \text{ nM}$ 을 가지며;

도 4a는 감소된 종양 크기로 나타낸 KB 이중이식 모델에서 FITC-TLR7 효능제 콘주게이트의 재생 효과를 보여준다.

도 4b 및 도 4c는 고갈 마커(PD-1⁺Tim3⁺)의 감소된 발현으로 나타낸 KB 이중이식 모델에서 FITC-TLR7 효능제 콘주게이트의 재생 효과를 보여준다.

도 4d는 CAR T 세포 집단의 변화를 보여준다.

도 4e는 마우스 체중의 변화를 보여준다.

가능하고 편리한 경우, 동일하거나 유사한 부분 또는 단계를 지칭하기 위해 도면 및 설명에서 유사한 참조 번호가 사용된다. 도면은 단순화된 형태이고 정확한 규모가 아니다. 본 개시내용은 다양한 변형 및 대안적 형태가 가능하지만, 그의 예시적인 구현예는 도면에 도시되고 상세히 기재된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0081]

서열 목록의 간단한 설명

[0082]

서열번호: 1은 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하기 위한 예시적인 핵산 서열이고;

[0083]

서열번호: 2는 서열번호: 1 또는 3에 의해 인코딩되는 예시적인 CAR 아미노산 서열이고; 그리고

[0084]

서열번호: 3은 CAR을 인코딩하기 위한 예시적인 핵산 서열이다.

[0085]

상기-기재된 서열은 하기 서열 목록 섹션에 제시되고, 또한 본원에 출원되고 본원에 참조로 포함된 파일에 인코딩된 컴퓨터에서 제공된다. 컴퓨터가 읽을 수 있는 형식으로 기록된 정보는 37 C.F.R. § 1.821(f)에 따라 본원에 제공된 서면 서열 목록과 동일하다.

[0086]

상세한 설명

[0087]

본 개시내용은 키메라 항원 수용체를 발현하는 T 세포(CAR-T 세포)를 기존 CAR-T 세포 요법과 비교하여 대상체에 투여한 후 표적의 독성에 대한 경향을 감소시키는 화합물 및 조성물의 제조 및 용도에 관한 것이다. 용어 "표적의 독성"은 대상체를 치료하는 의사에 바람직하지 않은 기관 또는 조직 손상 또는 대상체의 체중 감소, 또는 치료 의사에 대한 잠재적 유해 지표인 대상체에 대한 임의의 다른 효과, 예를 들어, B 세포 무형성증, 발열, 혈압 강하, 또는 폐 부종을 의미한다. 용어 "치료하다", "치료하는", "치료된", 또는 "치료" (질환 또는 병태와 관련하여)는 유익한 또는 바람직한 결과를 얻기 위한 접근법이고, 바람직하게는 임상 결과를 포함하고, 하기 중 하나 이상을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다: 질환과 연관된 병태의 개선, 질환 치유, 질환 중증도 감소, 질환의 진행 지연, 질환과 연관된 하나 이상의 증상의 완화, 질환을 앓고 있는 사람의 삶의 질 증가, 생존 연장 및/또는 예방적(prophylactic) 또는 예방적(preventative) 치료. 암과 관련하여, 특히 용어 "치료하다", "치료하는", "치료된" 또는 "치료"는 추가로 종양의 크기를 줄이는 것, 종양을 완전히 또는 부분적으로 제거하는 것 (예를 들어, 완전한 또는 부분적인 반응), 안정적인 질환 유발, 암 진행 예방(예를 들어, 무진행 생존), 또는

의사가 암의 요법적, 예방적(prophylactic) 또는 예방적(preventative) 치료로 간주하는 암에 대한 임의의 다른 효과를 의미할 수 있다.

[0088] 다양한 구현예에서, 조성물은 유전자 조작된 CAR-T 세포 및 하나 이상의 어댑터 화합물을 포함한다. 어댑터 화합물은 하나 이상의 표적화된 암 세포에 대해 특이성을 가질 수 있고, 투여시 어댑터 화합물이 표적 암 세포와 CAR-T 세포 사이에 브릿지를 형성하도록 표적화 모이어티를 통해 CAR-T 세포의 키메라 항원 수용체(CAR)와 결합하도록 적응된다. 적어도 하나의 구현예에서, CAR-T 세포의 CAR은 어댑터 화합물의 표적화 모이어티에 대해 특이적으로 결합하여 표적의 독성 및 다른 상호작용을 감소시키도록 한다. 이러한 방식으로, CAR-T 세포는 어댑터 화합물에 결합할 수 있고, 그렇게 결합될 때 어댑터 화합물은 암 치료를 위해 CAR-T 세포를 표적화된 암 세포로 지시할 수 있다.

[0089] 다양한 구현예는 CAR-T 세포를 대상체에 투여한 후 생체 내에서 CAR-T 세포 활성화의 제어를 향상시키도록 제한된다. 예를 들어, 이러한 조성물의 구현예는 유전자 조작된 CAR-T 세포 및 적어도 하나의 활성 변형 화합물(예를 들어, 재생 화합물, 면역억제 화합물, 또는 이들 중 어느 하나의 약제학적으로 허용되는 염)을 포함할 수 있다. CAR-T 세포 및 활성 변형 화합물이 대상체에 투여될 때 CAR-T 세포가(예를 들어, 특이적으로) 활성 변형 화합물과 커플링된 표적화 모이어티에 연결되도록 CAR-T 세포는 활성 변형 화합물의 표적화 모이어티에 지시된 CAR을 포함할 수 있다. 적어도 하나의 구현예에서, CAR의 인식 영역은 활성 변형 화합물을 CAR-T 세포 내로 전달하기 위해 추가로 이용될 수 있다. 이러한 구현예는 어댑터 화합물 대신에 또는 이와 함께 사용될 수 있다.

[0090] 본원에 사용된 "CAR-T 세포"는 T 세포 표면 상에서 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 분자 생물학적 방법을 통해 변형된 T 세포 또는 그의 집단을 지칭한다. CAR은 원하는 표적에 대해 미리 정의된 결합 특이성을 갖는 폴리펩티드이며 T 세포 활성화 도메인의 세포내 부분에 작동적으로 연결된다(예를 들어, 융합으로서, 하나 이상의 디설파이드 결합에 의해 연결된 별도의 사슬 등). MHC 클래스 I 및 클래스 II 제한을 우회함으로써 CD8+ 및 CD4+ 서브세트 모두의 CAR 조작된 T 세포가 재지정된 표적 세포 인식을 위해 동원될 수 있다.

[0091] 하기에 추가로 상세히 기재된 바와 같이, CAR은 본원에 추가로 정의된 바와 같은 인식 영역을 포함한다. 특정 구현예에서, CAR은 추가로, 예를 들어 T 세포 CD3-제타(CD3 ψ) 사슬, Fc 수용체 감마 신호전달 도메인 또는 Fc 수용체 γ , 또는 하나 이상의 공동자극 도메인 예컨대 CD28, CD137 (4-1BB), CD278 (ICOS), 또는 CD134 (OX40)로부터 유래될 수 있는 활성화 신호전달 도메인을 포함할 수 있다.

[0092] 특정 CAR은 CD3 ψ 막횡단 및 엔도도메인에 대한(예를 들어, 단클론성 항체로부터 유래된 단쇄 가변 단편(scFv)로서) 결합 기능의 융합이다. 이러한 분자는 표적의 인식 수용체 결합 기능에 의한 인식에 대한 응답으로 제타 신호를 전달한다. 그러나 많은 대안이 있다. 비제한적인 예로서, 천연 T 세포 수용체(TCR) 알파 및 베타 단쇄로부터의 항원 인식 도메인이 결합 기능으로서 사용될 수 있다. 대안적으로, 수용체 엑토도메인(예를 들어, CD4 엑토도메인)이 사용될 수 있다. 결합 기능에 필요한 모든 것은 특정 방식으로 고친화도로 주어진 표적을 결합할 수 있다는 것이다.

[0093] 또한, 리간드/수용체, 인식 영역/표적화 모이어티, 핵산/상보적 핵산, 항체/항원, 또는 다른 결합 쌍을 언급할 때, "특이적으로 결합", "고친화도로 결합" 또는 "특이적으로" 또는 "선택적으로" 결합한다는 단백질 및 다른 생물 체제의 이중 집단에서 단백질의 존재를 결정하는 결합 반응을 나타낸다. 따라서, 지정된 조건 하에서, 명시된 리간드 또는 인식 영역은 각각 특정 수용체(예를 들어, 암 세포에 존재하는 것) 또는 표적화 모이어티에 결합하고 샘플에 존재하는 다른 단백질(예를 들어, 정상적이고 건강한 세포와 관련된 것들)에 상당한 양으로 결합하지 않는다. 특이적 결합 또는 고친화도 결합은 또한 예를 들어, 고려되는 방법의 결합 화합물, 리간드, 항체, 또는 항체의 항원 결합 부위로부터 유래된 결합 조성물이 임의의 다른 결합 화합물과의 친화력보다 종종 적어도 25% 초과, 더 자주 적어도 50% 초과, 가장 자주 적어도 100% (2-배) 초과, 정상적으로 적어도 10배 초과, 더 정상적으로 적어도 20-배 초과, 및 가장 정상적으로 적어도 100-배 초과인 친화력으로 표적에 결합하는 것을 의미한다.

[0094] 전형적인 구현예에서, 표적에 특이적으로 결합하는 분자는 예를 들어, Scatchard 분석에 의해 결정된 바와 같이 적어도 약 10^6 리터/mol ($K_D = 10^{-6}$ M), 및 바람직하게는 적어도 약 10 리터/mol인 친화력을 가질 것이다. 일부 결합 화합물은 하나 초과 표적에 특이적으로 결합할 수 있음을 당업자는 인지하고 있으며, 예를 들어 항체는 그의 항원에, 항체의 올리고당에 의해 락틴에, 및/또는 항체의 Fc 영역에 의해 Fc 수용체에 특이적으로 결합한다.

[0095] 화합물, 조성물 및 방법은 이제 상세히 설명될 것이다. 본원에 제공된 원리에 대한 이해를 촉진하기 위한 목적

으로, 도면에 예시된 구현예를 참조할 것이며, 특정 언어는 이를 기재하기 위해 사용될 것이다. 그럼에도 불구하고 이러한 구현예의 설명에 의해 범위의 제한이 의도되지 않음이 이해될 것이다. 반대로, 본 개시내용은 첨부된 청구범위에 의해 정의된 범위의 취지 및 범위 내에 포함될 수 있는 대안, 수정 및 등가물을 포함하도록 의도된다. 이전에 언급된 바와 같이, 이 기술은 하나 이상의 바람직한 구현예에서 예시되고 설명될 수 있지만, 본 발명의 조성물, 화합물 및 방법은 많은 상이한 구성, 형태, 재료 및 부속품을 포함할 수 있다.

[0096] 상기 언급된 바와 같이, 특정 화합물은 암 세포와 CAR-T 세포 사이에 브릿지를 형성하도록 적응된 하나 이상의 어댑터 화합물 (또는 그의 약제학적으로 허용되는 염)을 포함하며, 여기서 CAR-T 세포는 어댑터 화합물의 표적화 모이어티에 대한 CAR을 포함한다 따라서, CAR-T 세포는 어댑터 화합물의 표적화 모이어티에 결합할 수 있고, 그렇게 결합될 때 어댑터 화합물은 암 치료를 위해 CAR-T 세포를 암으로 지시할 수 있다.

[0097] 어댑터 화합물

[0098] 적어도 하나의 구현예에서, 어댑터 화합물 (또는 그의 약제학적으로 허용되는 염)은 제1 링커 또는 다른를 통해 제1 표적화 모이어티에 연결된 소분자 리간드이다. 소분자 리간드는 암 세포 유형에 특이적으로 결합하는 임의의 소분자 리간드일 수 있다(즉, 이러한 리간드에 대한 수용체는 정상 조직 또는 다른 비표적화된 유형의 암과 비교하여 표적화된 암 세포에서 과발현됨). 본원에 사용된 "리간드"는 화합물의 중심 원자 또는 이온(예를 들어, 약물)에 부착된 분자, 이온 또는 원자이다. "리간드"는 또한 효능제 또는 길항제가 아니고 효능제 또는 길항제 특성을 갖지 않는 결합체를 포괄한다. 또한, 용어 "과발현된", "과발현" 및 이들의 형성물(수용체 발현 등과 관련하여 사용되는 경우)은 관련 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 부여된 의미를 가지며, 이는 (제한 없이) 정상 조직 또는 다른 비표적화 유형의 세포와 비교하여 표적 세포(예를 들어, 종양 세포) 상의 특정 수용체의 증가된 존재를 포함한다.

[0099] 적어도 하나의 구현예에서, 어댑터 화합물의 소분자 리간드는 폴레이트, 탄산탈수효소 IX (CAIX) 리간드, 2-[3-(1,3-디카복시프로필)우레이도]펜타디오익산 (DUPA) 리간드, 뉴로키닌 1 수용체 (NK-1R) 리간드, 감마 글루타미드 트랜스펩티다제의 리간드, 자연 살해 그룹 2D 수용체 (NKG2D) 리간드, 또는 콜레스티스토키닌 B 수용체 (CCKBR 또는 CCK2) 리간드이다. 앞서 언급한 각각은 특정 암 세포 유형에서 과발현되는 수용체에 특이적으로 결합하는 소분자 리간드이다(즉, 이러한 각 리간드에 대한 수용체는 정상 조직에서 이러한 수용체의 발현과 비교하여 암에서, 또는 잠재적으로, 표적화된 암 유형을 경험하지 않는 병든 조직에서 과발현된다). 실제로 CAIX 리간드에 대한 수용체는 예를 들어 신장, 난소, 외음부 및 유방암에서 발견되고; NK-1R 리간드에 대한 수용체는 예를 들어 결장암 및 췌장암에서 발견되고; DUPA 리간드는 PSMA 양성 인간 전립선암 세포 및 다른 암 세포 유형에 의해 결합된 리간드이고; NKG2D 리간드에 대한 수용체는 예를 들어 폐암, 결장암, 신장암, 전립선암 및 T 및 B 세포 림프종에서 발견되며; CCKBR 리간드에 대한 수용체는 특히 갑상선, 폐, 췌장, 난소, 뇌, 위, 위장관 기질 및 결장의 암에서 발견되고; 그 중에서도, 트랜스펩티다제는 예를 들어 난소암, 결장암, 간암, 정상세포 신경교종, 흑색종 및 백혈병에서 과발현된다.

[0100] 다른 구현예에서, 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 항체가 아니고 항체의 단편을 포함하지 않는다. 또 다른 구현예에서, 제1 표적화 모이어티는 펩티드 에피토프를 포함하지 않는다.

[0101] 한 구현예에서, 소분자 리간드는 약 10,000 달톤 미만, 약 9,000 달톤 미만, 약 8,000 달톤 미만, 약 7,000 달톤 미만, 약 6,000 달톤 미만, 약 5,000 달톤 미만, 약 4,500 달톤 미만, 약 4,000 달톤 미만, 약 3,500 달톤 미만, 약 3,000 달톤 미만, 약 2,500 달톤 미만, 약 2,000 달톤 미만, 약 1,500 달톤 미만, 약 1,000 달톤 미만, 또는 약 500 달톤 미만의 질량을 가질 수 있다. 또 다른 구현예에서, 소분자 리간드는 약 1 내지 약 10,000 달톤, 약 1 내지 약 9,000 달톤, 약 1 내지 약 8,000 달톤, 약 1 내지 약 7,000 달톤, 약 1 내지 약 6,000 달톤, 약 1 내지 약 5,000 달톤, 약 1 내지 약 4,500 달톤, 약 1 내지 약 4,000 달톤, 약 1 내지 약 3,500 달톤, 약 1 내지 약 3,000 달톤, 약 1 내지 약 2,500 달톤, 약 1 내지 약 2,000 달톤, 약 1 내지 약 1,500 달톤, 약 1 내지 약 1,000 달톤, 또는 약 1 내지 약 500 달톤의 질량을 가질 수 있다. 다른 구현예에서, 이들 덩어리는 표적화 모이어티에도 적용될 수 있다.

[0102] 한 구현예에서, DUPA 유도체는 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적 염에서 제1 표적화 모이어티에 연결된 소분자 리간드의 리간드일 수 있다. 이러한 DUPA 유도체는 국제 공개 번호 WO 2015/057852에 기재되어 있으며, 이는 그에 관한 교시를 위해 그 전체가 참고로 본원에 포함된다.

[0103] 적어도 하나의 구현예에서, 소분자 리간드는 폴레이트이다. "폴레이트"는 예를 들어, 염산의 유사체 및 유도체 예컨대, 제한 없이, 폴린산 (예를 들어, 류코보린), 프테로일폴리글루탐산, 프테로일-D-글루탐산, 및 염산 수용

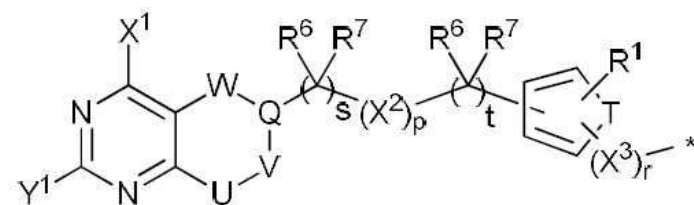
체 결합 프테르딘 예컨대 테트라하이드로프테린, 디하이드로폴레이트, 테트라하이드로폴레이트, 및 그것의 데아자 및 디데아자 유사체를 비롯하여 염산, 염산 유사체, 또는 또 다른 염산 수용체 결합 분자일 수 있다.

[0104] 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질과 관련하여 "유사체" 또는 "유도체"는 원래의 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질과 유사하거나 동일한 기능을 보유하지만, 원래 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질의 유사하거나 동일한 아미노산 서열 또는 구조를 반드시 포함하지는 않는 또 다른 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질을 지칭한다. 유사체는 바람직하게는 하기 중 적어도 하나를 만족한다: (a) 원래 아미노산 서열과 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 단백질성 체제; (b) 엄격한 조건 하에 원래 아미노산 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 혼성화되는 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 단백질성 체제; 또는 (c) 원래 아미노산 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열과 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 99% 동일한 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 단백질성 체제.

[0105] 용어 "데아자" 및 "디데아자" 유사체는 자연 발생 염산 구조에서 1개 또는 2개의 질소 원자에 대해 치환된 탄소 원자를 갖는 당염기에 인식된 유사체들, 또는 그의 유사체 또는 유도체를 지칭한다. 예를 들어, 데아자 유사체는 폴레이트, 폴린산, 프테로폴리글루탐산, 및 폴레이트 수용체 결합 프테리딘 예컨대 테트라하이드로프테린, 디하이드로폴레이트, 및 테트라하이드로폴레이트의 1-데아자, 3-데아자, 5-데아자, 8-데아자, 및 10-데아자 유사체를 포함할 수 있다. 디데아자 유사체는 예를 들어 1,5-디데아자, 5,10-디데아자, 8,10-디데아자, 및 5,8-디데아자 유사체를 포함한다. 전술한 염산 유사체는 폴레이트 수용체에 결합하는 능력을 반영하여 통상적으로 "폴레이트"으로 지칭된다. 다른 폴레이트 수용체 결합 유사체는 아미노프테린, 아메토프테린 (메토크세이트), N10-메틸폴레이트, 2-탈아미노-하이드록시폴레이트, 데아자 유사체 예컨대 1-데아자메토프테린 또는 3-데아자메토프테린, 및 3',5'-디클로로-4-아미노-4-데옥시-N¹⁰-메틸프테로일글루탐산 (디클로로메토크세이트)을 포함한다.

[0106] 전술한 유사체 및/또는 유도체는 또한 폴레이트-수용체에 결합하는 능력을 반영하여 "폴레이트", "폴레이트" 또는 "폴레이트들"로 지칭된다. 이러한 분자는 외인성 분자와 접합될 때 폴레이트 매개 세포내이입과 같은 막횡단 수송을 향상시키는 데 효과적이다. 전술한 것은 본원에 기재된 폴레이트 수용체 결합 리간드에서 사용될 수 있다.

[0107] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 어댑터 화합물의 소분자 리간드는 하기 화학식을 가질 수 있다:



[0108]

[0109] 식 중,

[0110] X¹ 및 Y¹은 각각 할로, R², OR², SR³, 및 NR⁴R⁵로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

[0111] U, V 및 W는 -(R^{6a})C=, -N=, -(R^{6a})C(R^{7a})-, 및 -N(R^{4a})-로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택된 2가 모이어티를 나타내고;

[0112] Q는 C 및 CH로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0113] T는 S, O, N 및 -C=C-로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0114] X² 및 X³은 각각 산소, 황, -C(Z)-, -C(Z)O-, -OC(Z)-, -N(R^{4b})-, -C(Z)N(R^{4b})-, -N(R^{4b})C(Z)-, -OC(Z)N(R^{4b})-, -N(R^{4b})C(Z)O-, -N(R^{4b})C(Z)N(R^{5b})-, -S(O)-, -S(O)₂-, -N(R^{4a})S(O)₂-, -C(R^{6b})(R^{7b})-, -N(C≡CH)-, -N(CH₂C≡CH)-, C₁-C₁₂ 알킬렌, 및 C₁-C₁₂ 알키엔옥시로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고, 여기서, Z는 산소 또는 황이고;

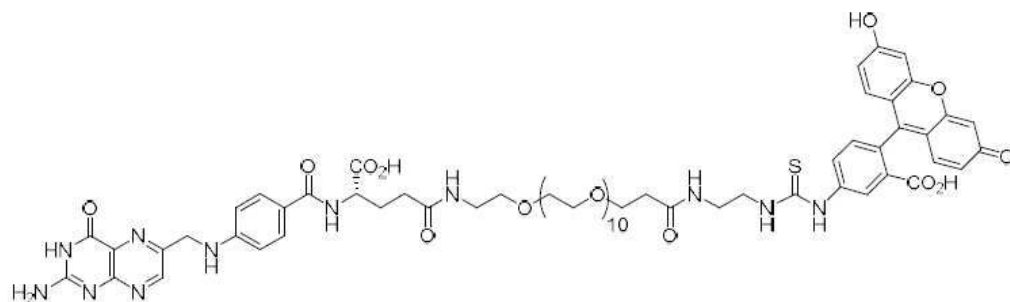
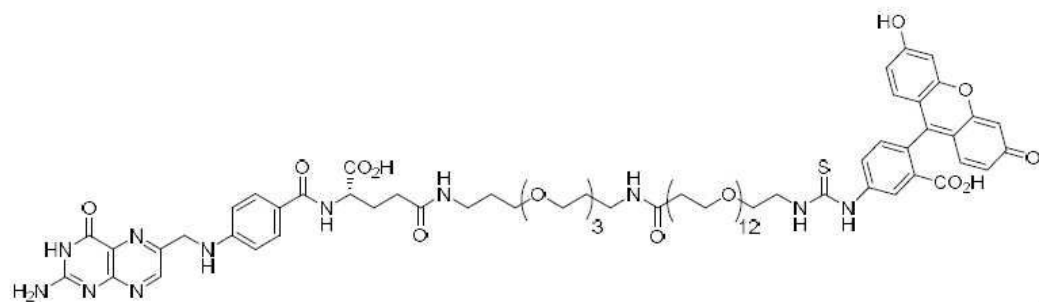
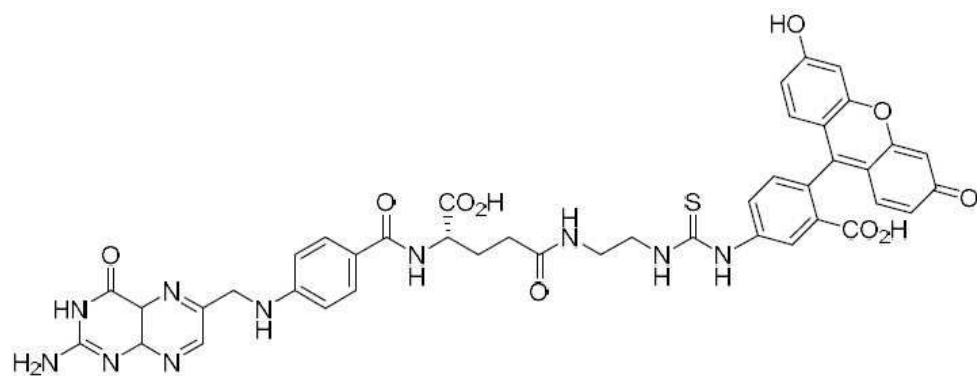
- [0115] R^1 은 수소, 할로, C_1 - C_{12} 알킬 및 C_1 - C_{12} 알콕시로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0116] R^2 , R^3 , R^4 , R^{4a} , R^{4b} , R^5 , R^{5b} , R^{6b} , 및 R^{7b} 는 각각 수소, 할로, C_1 - C_{12} 알킬, C_1 - C_{12} 알콕시, C_1 - C_{12} 알카노일, C_1 - C_{12} 알케닐, C_1 - C_{12} 알키닐, (C_1 - C_{12} 알콕시)카보닐, 및 (C_1 - C_{12} 알킬아미노)카보닐 로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;
- [0117] R^6 및 R^7 각각은 수소, 할로, C_1 - C_{12} 알킬, 및 C_1 - C_{12} 알콕시로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나; 또는, R^6 및 R^7 은 함께 합쳐져서 카보닐 기를 형성하고;
- [0118] R^{6a} 및 R^{7a} 각각은 수소, 할로, C_1 - C_{12} 알킬, 및 C_1 - C_{12} 알콕시로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나; 또는, R^{6a} 및 R^{7a} 는 함께 합쳐져서 카보닐 기를 형성하고;
- [0119] p, r, s 및 t는 각각 독립적으로 0 또는 1이고; 그리고
- [0120] *는 임의의 추가 화학적 모이어티가 플레이트의 일부이거나 플레이트와 커플링된 경우 콘주게이트의 나머지 부분에 대한 선택적 공유 결합을 나타낸다.
- [0121] 한 양태에서, 암은 소분자 리간드에 대한 수용체를 (정상 조직 또는 세포 또는 다른 유형의 암과 비교하여) 과 발현할 수 있다. 하나의 예시적인 구현예에서, 어댑터 화합물은 소분자 리간드에 연결된 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)를 포함한다. 또 다른 양태에서, 예를 들어, 세포독성 T 세포, 또는 다른 유형의 T 세포는 항-FITC scFv를 포함하는 CAR을 발현하도록 형질전환될 수 있다. 이러한 양태에서, CAR은 어댑터 화합물 내의 소분자 리간드의 암에 대한 결합의 결과로서 암을 장식하는 FITC를 표적화할 수 있다. 따라서 정상 비표적 세포에 대한 독성을 피할 수 있다. 이 구현예에서, 항-FITC CAR 발현 T 세포가 FITC에 결합할 때, CAR-T 세포가 활성화되고 암이 치료된다.
- [0122] 어댑터 화합물은 (직접적으로 또는 예를 들어, 제1 링커를 통해) 제1 표적화 모이어티에 연결된다. 어댑터 화합물 내의 제1 표적화 모이어티는 CAR-T 세포의 집단에 의해 발현되는 유전자 조작된 CAR의 인식 영역에 결합하도록 구성된다. 예를 들어 그리고 제한 없이 제1 표적화 모이어티는 2,4-디니트로페놀 (DNP), 2,4,6-트리니트로페놀 (TNP), 바이오틴, 디곡시제닌, 플루오레세인, FITC, NHS-플루오레세인, 펜타플루오로페닐 에스테르, 테트라플루오로페닐 에스테르, 크노틴, 센타이린, DARPIn, 아피바디, 아필린, 안티칼린, 랑체, 아비머, 비시사이클릭 펩티드, FN3 스캐폴드, cys-knot, 파미노머, 쿠니츠(Kunitz) 도메인, 또는 오바디(Obody)을 포함할 수 있다. 이 용가능한 표적화 모이어티의 다양한 구현예가 하기에 기재되어 있고 이들 구현예 중 임의의 것이 어댑터 화합물 내의 제1 표적화 모이어티와 함께 이용될 수 있다.
- [0123] 적어도 하나의 구현예에서, 소분자 리간드는 제1 링커를 통해 제1 표적화 모이어티에 연결되고 하기 구조를 포함한다:
- [0124] $B-L-T$,
- [0125] 여기서 B는 소분자 리간드를 나타내고, L은 제1 링커를 나타내고, T는 제1 표적화 모이어티를 나타낸다. 이용가능한 링커의 다양한 구현예가 하기에 기재되어 있고 이들 구현예 중 임의의 것이 어댑터 화합물의 제1 링커와 함께 이용될 수 있다.
- [0126] 대상체에게 투여될 때, (예를 들어, 제1 링커에 의해) 제1 표적화 모이어티에 연결된 소분자 리간드는 표적 암 세포와 CAR-T 세포 사이의 브릿지 역할을 하고 치료를 위해 CAR-T 세포를 암으로 향하게 한다. 다양한 구현예에서, 암과 CAR-T 세포 사이의 브릿지(즉, 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염)는 본원에 기술되거나 실시예에 나타난 어댑터 화합물 중 임의의 것일 수 있다.
- [0127] 적어도 하나의 구현예에서, 어댑터 화합물 (또는 그의 약제학적으로 허용되는 염)은 작은 유기 분자이므로 투여 후 혈류로부터의 청소능이 신속하게 달성될 수 있다(즉, 약 20분 이하 내에).
- [0128] 하나 이상의 어댑터 화합물이 투여될 CAR-T 세포 집단은 제1 표적화 모이어티로 지향된 인식 영역을 갖는 CAR (예를 들어, scFv of 항체, Fab 단편, 가변 영역 (Fv), Fc 영역, (Fab')₂ 단편, 등)를 포함한다. 특정 구현예

에서, 예를 들어 어댑터 화합물 내의 제1 표적화 모이어티가 FITC 항체인 경우, CAR의 인식 영역은 항-FITC 항체의 scFv 영역이다.

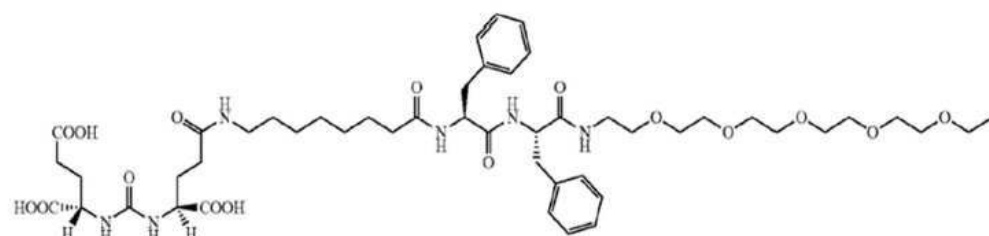
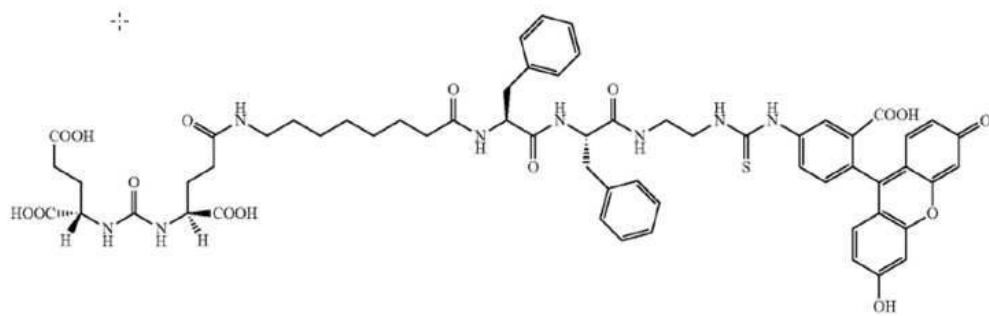
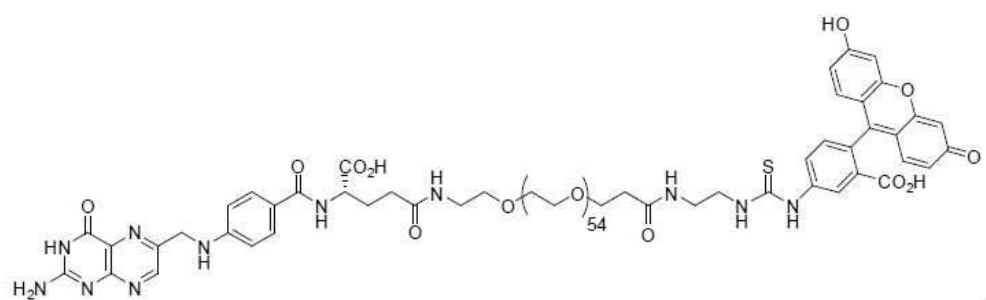
[0129] 적어도 하나의 구현예에서, CAR의 인식 영역은 예를 들어 서브나노몰 범위에서와 같이 고친화도로 제1 표적화 모이어티에 결합한다. 따라서, 투여될 때, CAR-T 세포는 어댑터 화합물 (또는 그의 약제학적으로 허용되는 염)의 표적화 모이어티에 결합할 것이고 CAR-T 세포 반응은 '브릿지'의 소분자 리간드 부분에 대한 수용체를 발현하는 암 세포에만 표적화되어, 정상 조직에 대한 표적의 독성을 감소시킬 수 있다. 실제로, 소분자 리간드는 그에 연결된 임의의 CAR-T 세포를 특이적으로 표적 세포에 지시할 수 있다.

[0130] 하나 이상의 어댑터 화합물 (또는 그의 약제학적으로 허용되는 염)의 사용은 단일 유형의 인식 영역을 갖는 단일 유형의 CAR-T 세포가 다중 종양 유형을 근절하기 위해 다중 어댑터 화합물과 함께 사용될 수 있기 때문에 '보편성'을 제공한다. 예시적으로, CAR-T 세포에 의해 인식되는 각 어댑터 화합물의 표적화 모이어티는 일정하게 유지되어, 한 유형의 CAR-T 세포 작제물이 사용될 수 있는 반면, 암에 결합하는 소분자 리간드는 다양한 암의 표적화를 허용하기 위해 어댑터 화합물 사이에서 변경될 수 있다. 예를 들어 그리고 비제한적으로, 어댑터 화합물의 제1 세트 및 제2 세트는 대상체에게 투여될 수 있으며, 여기서 제1 세트는 제1 표적화 모이어티에 연결된 제1 소분자 리간드를 포함하고 제2 세트는 제1 표적화 모이어티에 연결된 제2 소분자 리간드를 포함한다. 이러한 구현예에서, 제1 소분자 리간드는 (건강한 조직 또는 상이한 유형의 암 세포, 집합적으로 "비표적화 세포" 상에서 이러한 수용체의 기준선 발현과 비교하여) 제1 유형의 암 세포 상에서 과발현된 수용체에 특이적이고, 제2 소분자 리간드는 (비표적화 세포 상에서 이러한 수용체의 기준선 발현과 비교하여) 제2 유형의 암 세포 상에서 과발현된 수용체에 특이적이다. 두 세트의 어댑터 화합물 (또는 그의 약제학적으로 허용되는 염)이 동일한 표적화 모이어티(즉, 제1 표적화 모이어티)에 연결되어, CAR은 그와 결합하도록 지시되지만, 상이한 소분자 리간드는 표적화되고, 상이한 암 세포 유형을 치료하는 데 사용할 수 있는 것으로 인정될 것이다. 따라서 어댑터 화합물 내의 상이한 소분자 리간드가 상이한 종양 유형에 결합하기 때문에, 어댑터 화합물이 상이한 항원을 발현하는 종양을 사멸시키기 위한 CAR-T 세포 '범용' CAR-T 세포를 만들지만, 인식 영역의 한 유형을 갖는 CAR-T 세포의 한 유형만이 사용될 필요가 있다.

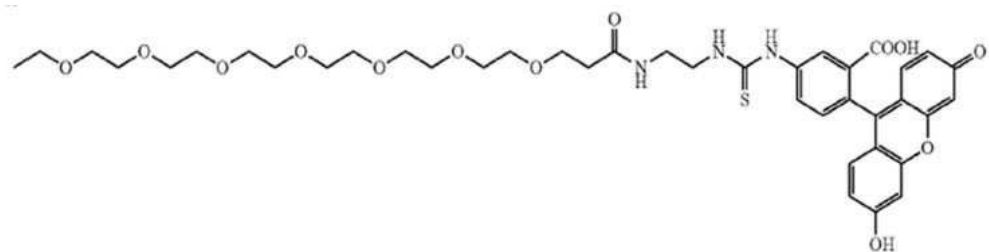
[0131] 특정 구현예에서, 제1 링커(즉, '브리지' 또는 어댑터 화합물)에 의해 제1 표적화 모이어티에 연결된 소분자 리간드는 하기 구조 중 임의의 것을 가질 수 있다:



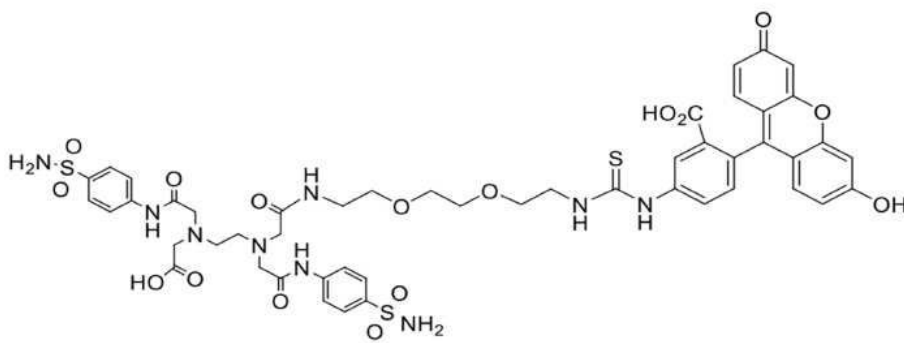
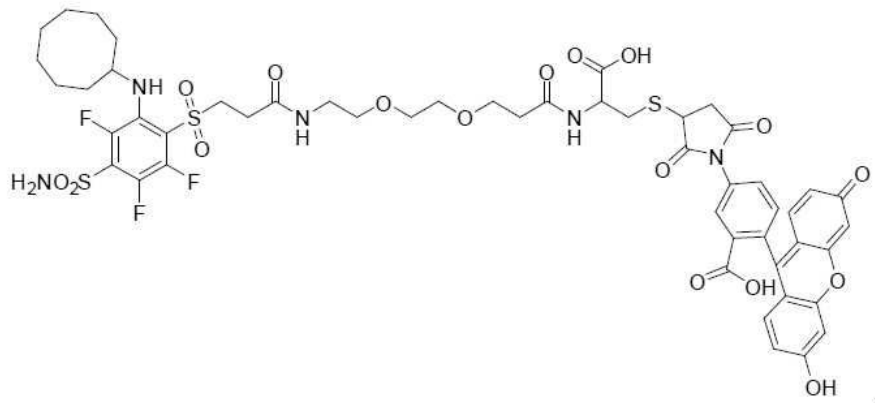
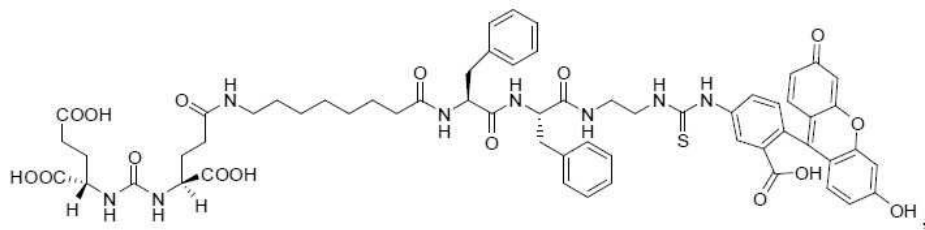
[0132]



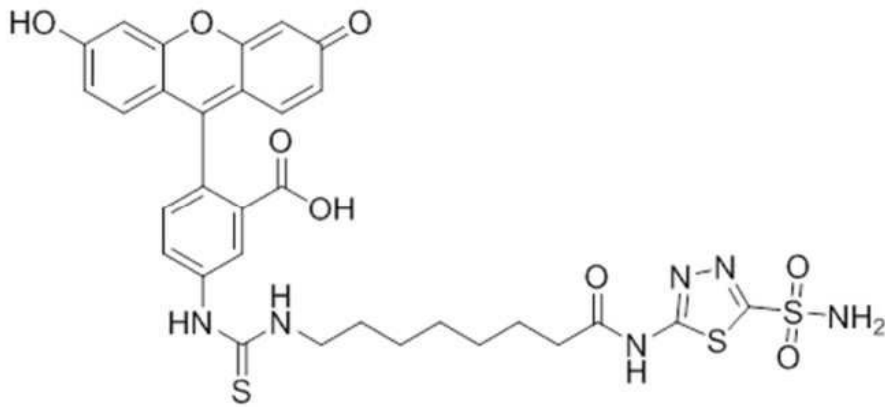
[0133]



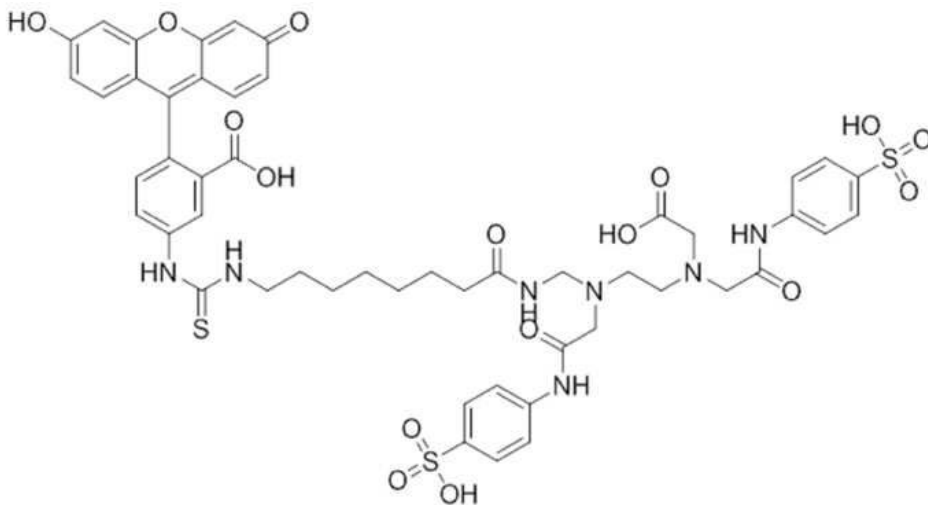
[0134]



[0135]



[0136] 또는



[0137]

[0138] 활성 변형 화합물

[0139] 기존 CAR-T 세포 요법이 직면한 일반적인 문제는 CAR-T 세포가 기능장애를 일으키거나 "고갈"되어, 종양 미세환경에서 종양 항원 또는 면역억제 인자 (예를 들어, 골수성 유래된 억제 세포(MDSC), 종양-연관된 대식세포(TAM), 조절 T 세포(Treg), 및 억제 사이토카인)에 만성적으로 노출되면 증식 감소가 초래될 수 있다는 것이다. T 세포 고갈은 불량한 효과기 기능, 억제 수용체의 지속적인 발현 및 기능적 효과기 또는 기억 T 세포와 구별되는 전사 상태로 정의된다. 고갈은 종양의 최적 제어를 방해하고 감소된 T 세포 고갈은 개선된 임상 반응을 초래할 수 있다.

[0140] 대조적으로, CAR-T 세포는 또한 과활성되어 사이토카인 방출 증후군(CRS) 및 환자에게 치명적일 수 있는 다른 독성과 같은 기존 CAR-T 세포 요법의 원치 않는 부작용을 초래할 수 있다. 이러한 상태는 높은 수준의 CAR-T 세포 확장 및 면역 활성화로 인해 발생할 수 있으며, 이는 궁극적으로 정상 및 종양 세포 모두의 용해 및 인터페론 감마(IFN- γ) 및 종양 괴사 인자 알파(TNF α)와 같은 여러 사이토카인의 방출을 유발한다. 이러한 신호의 조합물은 또한 향상된 종양 파괴 능력을 갖고 높은 수준의 염증유발 사이토카인 (예를 들어, 인터류킨 6 (IL-6), 인터류킨 1 (IL-1), 및 인터류킨 10 (IL-10)) 및 다른 매개체 예컨대 유도성 산화질소 합성효소 (iNOS)를 분비하는 단핵구 및 대식세포의 활성화를 촉발하고, 이들 모두는 CRS 및 다른 관련 독성의 진행을 촉진할 수 있다.

[0141] CAR-T 세포 요법의 원치 않는 부작용을 다루기 위해, 특정 화합물 및 그의 조성물은 함께 투여될 때 CAR-T 세포의 활성을 표적화 및 변형하기 위한 활성 변형 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함한다. 예를 들어, 활성 변형 화합물은 CAR-T 세포를 재생하기 위한 재생 화합물, CAR-T 세포의 활성을 감소시키기 위한 면역억제 화합물, 또는 상기 중 어느 하나의 약제학적으로 허용되는 염을 포함한다.

[0142] 추가로, CAR-T 세포의 CAR(예를 들어, scFv 단편)의 인식 영역은 세포내이입을 이용하고 CAR-T 세포 내로 활성 변형 화합물의 내재화를 촉진하도록 변형될 수 있다. 한 구현예에서, 면역억제 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은, 면역억제 화합물이 CAR-T 세포에 농축되고, 그 결과 CAR-T 세포 활성화가 감소되어, 과도한 CAR-T 세포 활성화 예컨대 CRS의 유해한 부작용을 제어할 수 있는 이러한 방식으로 CAR-T 세포 내로 내재화될

수 있다. 이러한 방식으로, 면역억제 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 CAR-T 세포를 표적화하기 위해 CAR-T 세포 조성물과 함께 사용될 수 있고 CAR-T 세포 활성화를 감소시킬 수 있다.

[0143] 유사하게, 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 CAR의 인식 영역을 통해 CAR-T 세포 내로 내재화될 수 있다. CAR-T 세포 내에서 재생 화합물 (또는 해당하는 경우 활성 성분)을 농축함으로써, 고갈되거나 기능장애가 있는 CAR-T 세포가 기능적 및 종양 사멸 CAR-T 세포로 재생되어 종양의 재개된 박멸을 유도할 수 있다. 따라서, 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 CAR-T 세포 조성물과 함께 사용되어 CAR-T 세포를 표적화할 수 있고 종양 미세환경에 의해 유도된 CAR-T 세포의 고갈 또는 기능장애를 역전시킬 수 있다.

[0144] 활성 변형 화합물 (또는 그의 약제학적으로 허용되는 염)은 제2 표적화 모이어티에 연결될 수 있고 CAR-T 세포의 CAR의 인식 영역의 적어도 일부는 제2 표적화 모이어티로 향한다. 이용가능한 표적화 모이어티의 다양한 구현예가 하기에 기재되어 있고 이들 구현예 중 임의의 것이 활성 변형 화합물 내의 제2 표적화 모이어티와 함께 사용될 수 있다. 따라서, CAR-T 세포는 활성 변형 화합물 내의 제2 표적화 모이어티에 고친화도로 결합할 수 있다.

[0145] 적어도 하나의 구현예에서, 활성 변형 화합물은 제2 링커를 통해 제2 표적화 모이어티에 연결된다. 어댑터 화합물 내의 제1 링커 및 활성 변형 화합물 내의 제2 링커는 동일한 구조 또는 상이한 구조를 가질 수 있다. 한 구현예에서, 활성 변형 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염 내의 제2 링커는 방출성 링커 또는 비-방출성 링커일 수 있고, 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염 내의 제1 링커는 비-방출성 링커일 수 있다. 이용가능한 링커의 다양한 구현예가 하기에 기재되어 있고 이들 구현예 중 임의의 것이 활성 변형 화합물의 제2 링커와 함께 사용될 수 있다.

[0146] 재생 화합물

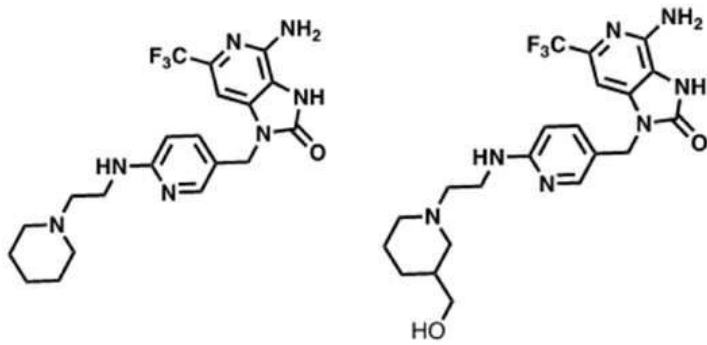
[0147] "CAR-T 세포의 재생"은 CAR-T 세포의 활성화, CAR-T 세포의 증식 증가, 고갈되거나 기능장애 CAR-T 세포의 억제 신호전달 차단, 항원 독립적 경로를 통한 CAR-T 세포 재활성화, 또는 다르게는 CAR-T 세포의 기능의 증가를 의미한다. 활성 변형 화합물은 재생 화합물 (또는 그의 약제학적으로 허용되는 염)을 포함하는 경우, 본 화합물의 구현예는 종양 미세환경에 의해 유도된 T 세포 고갈 또는 기능장애, 감소된 증식, 및 유사 상태를 예방 또는 역전시키는데 특히 유용할 수 있다.

[0148] 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 T 세포를 재생시킬 수 있는 임의의 약물 또는 다른 화합물 예컨대, 예를 To11) 유사 수용체 (TLR) 효능제 (예를 들어, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR7/8, TLR9 등의 효능제), 인터페론 유전자 자극제 (STING) 효능제, Nod 유사 수용체 (NLR) 자극제, 흑색종 2 (AIM2) 유사 수용체 (ALR) 효능제 부재, 키나제 억제제 표적화 키나제 예컨대 GSK-3beta, PI3K, 등, 및/또는 포스포타제 억제제를 포함할 수 있다.

[0149] 특정 구현예에서, 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 레틴산 유도성 유전자-I (RIG-I) 유사 수용체 (RLR), 진행된 당화 최종 생성물에 대한 수용체 (RAGE), 또는 세포의 엔도솜 또는 세포질에 위치하는 임의의 다른 패턴 인식 수용체를 포함한다.

[0150] 본원에 사용된 바와 같이, "패턴 인식 수용체"는 백혈구의 막에서 발현되고 수용체를 활성화하고 궁극적으로 선천적 면역 반응을 유도하는 특정 리간드에 결합할 수 있는 임의의 면역 수용체를 의미한다. 또한, TLR은 선천적 면역계에서 핵심적인 역할을 하는 단백질 부류이며 패턴 인식 수용체의 한 예이다. TLR은 일반적으로 미생물에서 유래한 구조적으로 보존된 분자를 인식하는 단일 막 스패닝 수용체이며 일반적으로 수지상 세포, 대식세포, 자연 살해(NK) 세포, 적응 면역성 세포(즉, T 및 B 림프구) 및 비면역 세포(상피 및 내피 세포 및 섬유아세포)를 비롯한 백혈구의 막에서 발현된다.

[0151] 적어도 하나의 구현예에서, 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 하기 화학식 중 하나의 구조를 갖는다:

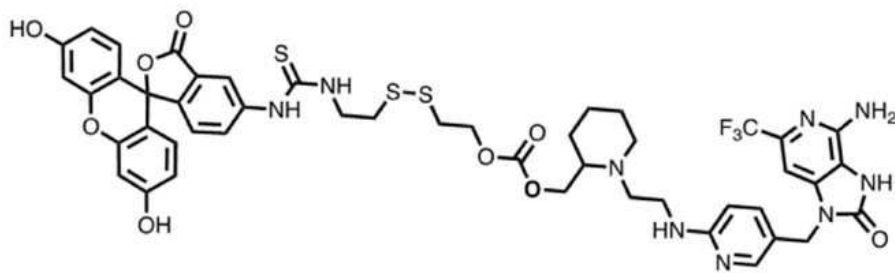
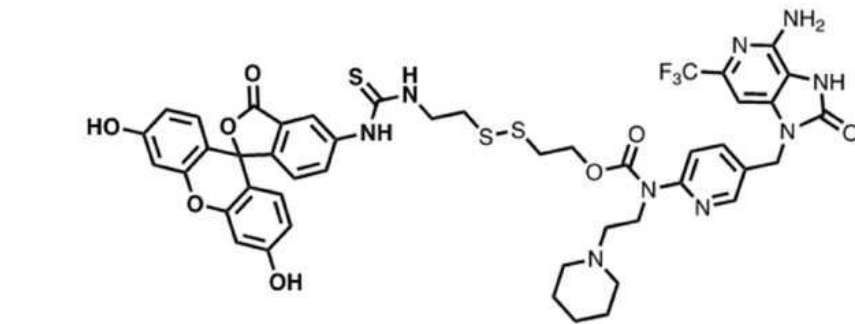


[0152]

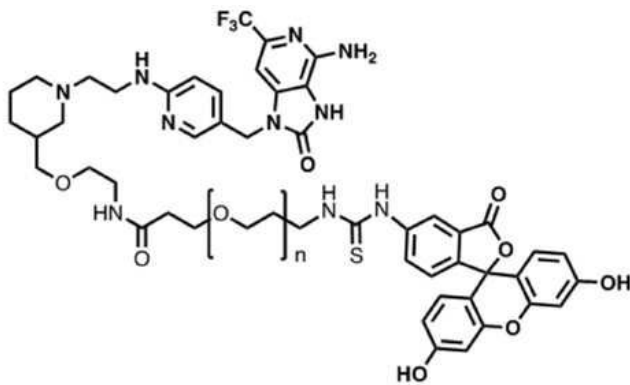
및

[0153]

일부 구현예에서, 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 하기 화학식 중 하나의 구조를 갖는다:

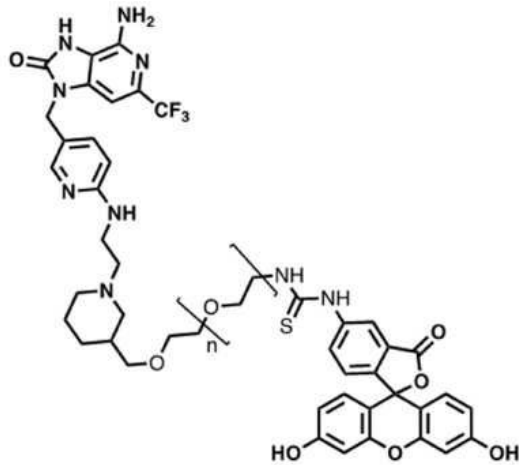


[0154]



[0155]

여기서 $n = 0$ 내지 200, 그리고



[0156] 여기서 $n = 0$ 내지 50.

[0157] 면역억제 화합물

[0158] 또 다른 구현예에서, 활성 변형 화합물은 CAR-T 세포를 표적화하고 그 활성을 감소시킬 수 있는 면역억제 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 포함한다. CAR-T 세포의 "활성 감소"는 CAR-T 세포의 임의의 활성을 억제하거나, CAR-T 세포를 사멸시키거나, CAR-T 세포의 수를 감소시키거나, CAR-T 세포의 증식을 방지 또는 감소시키는 것을 의미한다. 이러한 조성물은 CRS 또는 다른 독성을 치료하거나 예방하는데 유용할 수 있다.

[0159] 면역억제 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 T 세포의 활성을 감소시킬 수 있는 임의의 약물 또는 다른 화합물, 예를 들어 타크롤리무스, 시롤리무스, 사이클로스포린 및/또는 다른 면역억제 화합물을 포함할 수 있다.

[0160] 약제학적으로 허용되는 염

[0161] 제1 표적화 모이어티에 연결된 소분자 리간드(즉, 어댑터 화합물) 또는 제2 표적화 모이어티에 연결된 활성 변형 화합물(즉, 재생 화합물 또는 면역억제 화합물)의 "약제학적으로 허용되는 염"이 고려된다. 용어 "약제학적으로 허용되는 염"은 반대 이온이 의약품에 사용될 수 있는 염을 지칭한다. 다양한 구현예에서, 이러한 염은 1) 모 화합물의 유리 염기와, 무기 산 예컨대 염산, 브롬화수소산, 질산, 인산, 황산, 및 과염소산 등과의 반응, 또는 유기 산 예컨대 아세트산, 옥살산, (D) 또는 (L) 말산, 말레산, 메탄 설폰산, 에탄설폰산, p-톨루엔설폰산, 살리실산, 타르타르산, 시트르산, 석신산 또는 말론산 등과의 반응으로 수득될 수 있는 산 부가 염; 또는 2) 모 화합물에 존재하는 산성 양성자가 금속 이온, 예를 들어, 알칼리 금속 이온, 알칼리 토류 이온, 또는 알루미늄 이온으로 대체되거나; 또는 유기 염기 예컨대 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 트리메타민, N-메틸글루카민, 등과 배위될 때 형성된 염을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 약제학적으로 허용되는 염은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 임의의 이러한 약제학적으로 허용되는 염은 본원에 기재된 구현예와 관련하여 고려된다.

[0162] 다양한 구현예에서, 적합한 산 부가 염은 무독성 염을 형성하는 산으로부터 형성된다. 예시적인 예는 아세테이트, 아스파르테이트, 벤조에이트, 베실레이트, 바이카보네이트/카보네이트, 바이설페이트/설페이트, 보레이트, 캄실레이트, 시트레이트, 에디실레이트, 에실레이트, 포르메이트, 푸마레이트, 글루탐에이트, 글루코네이트, 글루쿠로네이트, 헥사플루오로포스페이트, 히벤제이트, 하이드로염화물/클로라이드, 하이드로브롬화물/브로마이드, 하이드로아이오다이드/아이오다이드, 이세티오네이트, 락테이트, 말레이트, 말레에이트, 말로네이트, 메실레이트, 메틸설페이트, 나프틸레이트, 2-나프실레이트, 니코티네이트, 니트레이트, 오로테이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 포스페이트/수소 포스페이트/디하이드로전 포스페이트, 사카레이트, 스테아레이트, 석시네이트, 타르트레이트, 토실레이트 및 트리플루오로아세테이트 염을 포함한다.

[0163] 다양한 구현예에서, 적합한 염기 염은 무독성 염을 형성하는 염기로부터 형성된다. 예시적인 예는 아르기닌, 벤자틴, 칼슘, 콜린, 디에틸아민, 디올라민, 글리신, 라이신, 마그네슘, 메글루민, 올아민, 칼륨, 나트륨, 트로메타민 및 아연 염을 포함한다. 산과 염기의 헤미염(hemisalt)도 형성될 수 있다(예를 들어, 헤미설페이트 및 헤미칼슘 염).

[0164] 표적화 모이어티

[0165] 제1 또는 제2 표적화 모이어티의 동일성은 각각이 바람직하게는 특이도로 CAR에 의해 인식되고 결합되어야

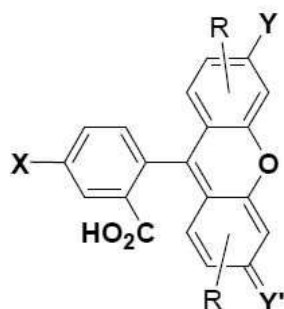
하고, 상대적으로 낮은 분자량을 갖고, 예를 들어 비제한적으로 서브-나노몰 범위에서 고친화도로 CAR에 결합해야 한다는 점에서만 제한된다.

[0166] 다양한 구현예에서, 어댑터 화합물 내의 제1 표적화 모이어티 및 활성 변형 화합물 내의 제2 표적화 모이어티는 동일한 구조를 갖는다. 다른 구현예에서, 제1 표적화 모이어티 및 제2 표적화 모이어티는 상이한 구조를 갖는다.

[0167] CAR-T 세포에 의해 발현되는 CAR에 결합하는 활성 변형 화합물 내의 제2 표적화 모이어티 및 하나 이상의 어댑터 화합물 (또는 그의 약제학적으로 허용되는 염)의 제1 표적화 모이어티의 예는 예를 들어, DNP, TNP, 바이오 틴, 디곡시제닌, 플루오레세인, FITC, NHS-플루오레세인, 펜타플루오로페닐 에스테르, 테트라플루오로페닐 에스테르, 크노틴, 셉타이린, DARPin, 아피바디, 아필린, 안티칼린, 삼량체, 아비머, 비시사이클릭 펩티드, FN3 스캐폴드, cys-knot, 파미노머, 쿠니츠 도메인, 또는 Obody를 포함할 수 있다. 다양한 양태에서, 예시적인 제1 또는 제2 표적화 모이어티는 소분자량 유기 분자를 포함하는 합텐이다.

[0168] 이의 제1 및 제2 표적화 모이어티는 동일하거나 상이한 구조를 가질 수 있다. 활성 변형 화합물은 재생 화합물을 포함하는 적어도 하나의 구현예에서, 하나 이상의 어댑터 화합물 (또는 그의 약제학적으로 허용되는 염(들)) 내의 제1 표적화 모이어티 및 활성 변형 화합물 내의 제2 표적화 모이어티는 동일한 구조를 갖는다. 활성 변형 화합물은 면역억제 화합물을 포함하는 또 다른 구현예에서, 하나 이상의 어댑터 화합물 (또는 그의 약제학적으로 허용되는 염(들)) 내의 제1 표적화 모이어티 및 활성 변형 화합물 내의 제2 표적화 모이어티는 동일한 구조를 갖는다.

[0169] 적어도 하나의 예시적인 구현예에서, 제1 및/또는 제2 표적화 모이어티는 하기 예시적인 구조를 가질 수 있다:



[0170]

[0171] 여기서:

[0172] X는 산소, 질소 또는 황이고, 여기서 X는 링커 L에 부착되고;

[0173] Y는 OR^a , NR_2^a , 또는 NR_3^{a+} 이고; 그리고 Y'는 O, NR^a , 또는 NR_2^{a+} 이고;

[0174] 각각의 R은 각 경우에 H, 플루오로, 설푼산, 설푼네이트 및 이들의 염 등으로부터 독립적으로 선택되고; 그리고

[0175] R^a 는 수소 또는 알킬이다.

[0176] 링커

[0177] 상기 언급된 바와 같이, 어댑터 화합물 및 활성 변형 화합물 둘 모두는 각각 제1 링커 및 제2 링커를 가질 수 있다. 제1 및 제2 링커는 동일하거나 상이한 구조를 가질 수 있다.

[0178] 용어 "링커"는 어댑터 화합물 또는 활성 변형 화합물 (각각 "활성 화합물") 및/또는 표적화 모이어티 (예를 들어, 제1 또는 제2 표적화 모이어티)의 소분자 리간드와 화학 결합을 형성하도록 생체-기능적으로 적합화되고 분자의 2개 이상의 부분을 연결하여 화합물을 형성하는 원자의 사슬을 포함한다. 예시적으로, 원자의 사슬은 탄소 (C), 질소 (N), 산소 (O), 황 (S), 실리콘 (Si), 및 인 (P), 또는 C, N, O, S, 및 P, C, N, O, 및 S로부터 선택될 수 있다. 원자의 사슬은 소분자 리간드 및 표적화 모이어티와 같은 상이한 기능적 능력을 공유적으로 연결할 수 있다. 링커(예를 들어, 제1 또는 제2 링커)는 인접 골격에 약 2 내지 약 2,000개의 원자 범위와 같은 광범위한 연결을 포함할 수 있고 방출성 또는 비-방출성 링커를 포함할 수 있다.

[0179] 링커의 맥락에서 용어 "방출성"은 예를 들어 환원제 불안정한, pH 불안정한, 산 불안정한, 염기 불안정한, 산화적으로 불안정한, 대사적으로 불안정한, 생화학적으로 불안정한, 효소 불안정한 또는 p-아미노벤질 기반 다가

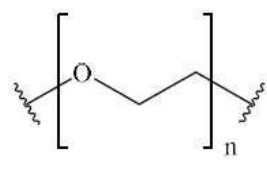
방출성 결합에 의해 생리학적 상태 하에 파손될 수 있는 (예를 들어, 화학적으로 또는 효소적으로 가수분해될 수 있는) 적어도 하나의 결합을 포함하는 링커를 의미한다. 결합 파괴를 초래하는 생리적 조건은 반드시 생물학적 또는 대사 과정을 포함할 필요는 없으며, 대신에 예를 들어, 생리학적 pH에서 또는 세포 소기관, 예컨대 사이토졸 pH보다 더 낮은 pH를 갖는 엔도솜으로의 구획화의 결과로서 표준 화학 반응, 예컨대 가수분해 반응을 포함할 수 있다. 절단가능한 결합은 방출성 링커 내의 2개의 인접한 원자를 연결하고/하거나 본원에 기재된 바와 같은 다른 링커 부분 또는 표적화 모이어티 및/또는 활성 성분을, 예를 들어 방출성 링커의 한쪽 또는 양쪽 말단에서 연결할 수 있다. 일부 경우에, 방출성 링커는 두 개 이상의 조각으로 나뉜다. 일부 경우에, 방출성 링커는 표적화 모이어티로부터 분리된다.

[0180] 대조적으로, 링커의 맥락에서 용어 "비-방출성"은 생리학 조건 하에 쉽게 또는 빠르게 끊어지지 않는 적어도 하나의 결합을 포함하는 링커를 의미한다. 일부 구현예에서, 비-방출성 링커는 생리적 조건 하에 안정한 골격을 포함한다(예를 들어, 골격은 가수분해(예를 들어, 수성 가수분해 또는 효소 가수분해)에 민감하지 않음). 일부 구현예에서, 비-방출성 링커를 포함하는 본원에 제공된 활성 변형 화합물 또는 어댑터 화합물은 표적화 모이어티로부터 방출되지 않는다. 일부 구현예에서, 비-방출성 링커는 골격에 디설파이드 결합(예를 들어, S-S) 또는 에스테르가 결여되어 있다. 일부 구현예에서, 화합물은 표적화 모이어티 및 화합물 순환의 전체 기간 동안 실질적으로 안정한 골격에 의해 연결된 활성 성분을 포함한다. 비-방출성 링커는 아마이드, 에스테르, 에테르, 아민, 및/또는 티오에테르(예를 들어, 티오-말레이미드)를 포함할 수 있다. 특정 예가 본원에 제공되지만, 생리적 조건 하에 쉽게 또는 빠르게 끊어지지 않는 적어도 하나의 결합이 형성된다면 임의의 분자(들)가 비-방출성 링커에 사용될 수 있음이 이해될 것이다.

[0181] 방출성 및 비-방출성 링커 모두는 (예를 들어, 각 화합물의) 생체분포, 생체이용률 및 PK/PD를 최적화하고/하거나 일반적으로 당업계에 공지되어 있거나 폐길화(PEGylation) 등을 통해 이후에 개발된 방법론에 따라 표적화 세포로의 (예를 들어, 각 화합물의) 흡수를 증가시키도록 조작될 수 있다.

[0182] 각 어댑터 화합물 (또는 그의 약제학적으로 허용되는 염) 내의 제1 링커 또는 활성 변형 화합물 (또는 그의 약제학적으로 허용되는 염) 내의 제2 링커는 C_1-C_{20} 알킬, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리프로린, 올리고-(4-피페리딘) 카복실산, 올리고 피페리딘, 펩티드, 사카로-펩티드, 친수성 아미노산, 당, 비천연 펩티도글리칸, 폴리비닐피롤리돈, 플루로닉 F-127, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 링커는 펩티드 에피토프를 포함하지 않는다. 추가로, 링커는 소분자 리간드와 제1 표적화 모이어티 사이에 화학적 모이어티를 추가로 포함할 수 있다.

[0183] 본원의 특정 구현예에서, 어댑터 화합물 (또는 그의 약제학적으로 허용되는 염)의 제1 링커(L) 및/또는 활성 변형 화합물 (또는 그의 약제학적으로 허용되는 염)의 제2 링커는 하기 화학식을 갖는 구조를 포함한다:



[0184] ,

[0185] 여기서 n 은 0 내지 200의 정수이다. 또 다른 구현예에서, n 은 0 내지 150, 0 내지 110, 0 내지 100, 0 내지 90, 0 내지 80, 0 내지 70, 0 내지 60, 0 내지 50, 0 내지 40, 0 내지 30, 0 내지 20, 0 내지 15, 0 내지 14, 0 내지 13, 0 내지 12, 0 내지 11, 0 내지 10, 0 내지 9, 0 내지 8, 0 내지 7, 0 내지 6, 0 내지 5, 0 내지 4, 0 내지 3, 0 내지 2, 0 내지 1, 15 내지 16, 15 내지 17, 15 내지 18, 15 내지 19, 15 내지 20, 15 내지 21, 15 내지 22, 15 내지 23, 15 내지 24, 15 내지 25, 15 내지 26, 15 내지 27, 15 내지 28, 15 내지 29, 15 내지 30, 15 내지 31, 15 내지 32, 15 내지 33, 15 내지 34, 15 내지 35, 15 내지 36, 15 내지 37, 15 내지 38, 15 내지 39, 15 내지 40, 15 내지 50, 15 내지 60, 15 내지 70, 15 내지 80, 15 내지 90, 15 내지 100, 15 내지 110, 15 내지 120, 15 내지 130, 15 내지 140, 15 내지 150의 정수일 수 있거나, 또는 n 은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 108, 110, 120, 130, 140, 또는 150일 수 있다.

[0186] 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염 내의 제1 링커, 및/또는 활성 변형 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염 내의 제2 링커는 직접 연결(예를 들어, FITC의 이소티오시아네이트 기와 어댑터 화합물에 대한 소분자 리간드의 유리 아민 기 사이의 반응)일 수 있거나 연결은 중개 링커를 통해 이루어질 수 있다. 한

구현예에서, 존재하는 경우, 중개 링커는 2가 링커와 같은 당업계에 공지된 임의의 생체적합성 링커일 수 있다. 하나의 예시적인 구현예에서, 2가 링커는 약 1 내지 약 30개의 탄소 원자를 포함할 수 있다. 또 다른 예시적인 구현예에서, 2가 링커는 약 2 내지 약 20개의 탄소 원자를 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 저분자량 2가 링커(즉, 약 30 달톤 내지 약 300 달톤의 대략적인 분자량을 갖는 것)가 사용된다. 또 다른 구현예에서, 적합한 링커 길이는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 또는 40, 또는 그 초과 개의 원자를 갖는 링커를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0187] 또 다른 구현예에서, 제1 또는 제2 링커는 하나 이상의 링커를 포함할 수 있는 2가 링커일 수 있다. 예시적인 링커는 다음 표에 나타나 있으며, 여기서 *는 어댑터 화합물의 소분자 리간드, 어댑터 화합물의 제1 표적화 모이어티, 활성 변형 화합물의 제2 표적화 모이어티, 재생 화합물, 면역억제 화합물, 또는 다른 2가의 제1 또는 제2 링커 부분에 대한 부착점을 나타낸다.

[0188] 표 1. 링커 식

[0189]

[0190]

[0191]

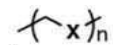
또 다른 구현예에서, 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염 내의 제1 링커, 또는 활성 변형 화합물(재생 화합물 또는 면역억제 화합물), 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염 내의 제2 링커는 각각 하기 화학식에서 선택된 구조를 갖는 링커 모이어티를 포함할 수 있다:

[0192]



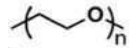
알킬,

[0193]



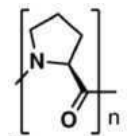
X = O, S, NH,

[0194]



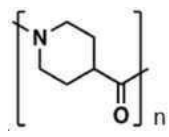
폴리 에틸렌 글리콜(PEG),

[0195]



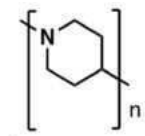
폴리프롤린,

[0196]



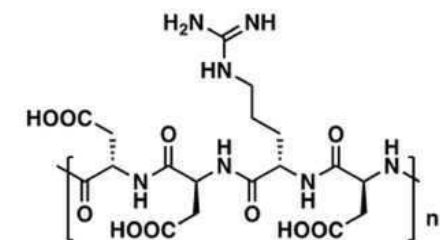
올리고-(4-피페리딘 카복실산),

[0197]

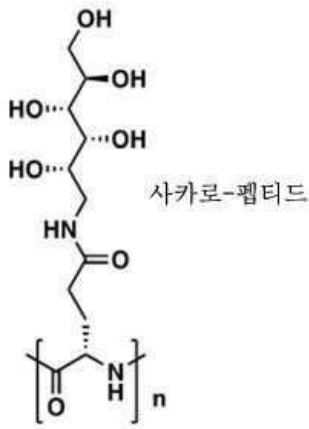


올리고 피페리딘,

[0198]

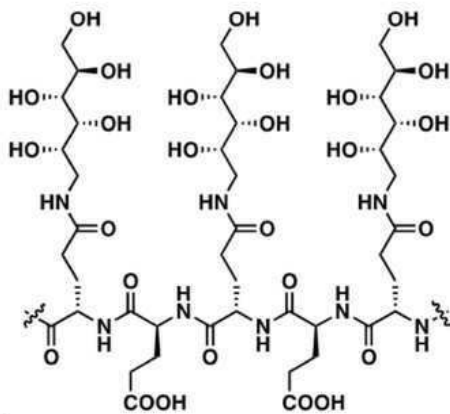


펩티드,



[0199]

, 및



[0200]

사카로-펩티드,

[0201]

여기서 n 은 0 내지 200의 정수이다.

[0202]

화합물(예를 들어, 어댑터 화합물, 활성 변형 화합물, 및 이의 약제학적 염)은 당업자에 의해 실시되는 통상적인 유기 합성 방법에 의해 제조될 수 있다. 화합물에 대한 설명은 당업자에게 알려진 화학적 결합의 원리에 의해 제한된다. 따라서, 기가 다수의 치환기 중 하나 이상에 의해 치환될 수 있는 경우, 이러한 치환은 화학적 결합의 원리를 따르고 본질적으로 불안정하지 않고/않거나 및/또는 수성, 중성 및 여러 공지된 생리적 조건과 같은 주변 조건 하에 불안정할 가능성이 있는 것으로 당업자에게 알려진 화합물을 제공하도록 선택된다. 예를 들어, 헤테로사이클로알킬 또는 헤테로아릴은 당업자에게 공지된 화학적 결합 원리에 따라 고리 헤테로원자를 통해 분자의 나머지에 부착되어 본질적으로 불안정한 화합물을 피한다.

[0203]

특정 구현예에서, 어댑터 화합물(들), 활성 변형 화합물, 및/또는 전술한 것 중 어느 하나의 약제학적으로 허용되는 염은 하나 이상의 키랄 중심을 함유할 수 있거나 다중 입체이성질체로서 존재할 수 있다. 따라서, 다양한 구현예는 순수한 입체이성질체 뿐만 아니라 입체이성질체들의 혼합물, 예컨대 거울상이성질체, 부분입체이성질체, 및 거울상이성질체 또는 부분입체이성질체적으로 풍부한 혼합물을 포함한다.

[0204]

추가로, 적어도 하나의 구현예에서, 어댑터 화합물(들), 활성 변형 화합물 및/또는 전술한 것 중 어느 하나의 약제학적으로 허용되는 염은 기하 이성질체로서 존재할 수 있다. 따라서, 다양한 구현예는 화합물의 순수한 기하 이성질체 또는 기하 이성질체의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0205]

어댑터 화합물(들), 활성 변형 화합물, 및/또는 전술한 것 중 어느 하나의 약제학적으로 허용되는 염은 또한 수화된 형태를 포함하는 용매화된 형태 뿐만 아니라 불용매화된 형태로 존재할 수 있다. 일반적으로, 용매화된 형태는 불용매화된 형태와 동등하며 본 개시내용의 범위 내에 포함된다.

[0206]

CAR-T 세포 조성물

[0207]

조성물 및 방법은 조작된 CAR-T 세포 조성물을 포함할 수 있다. 적어도 하나의 구현예에서, T 림프구(예를 들어, 세포독성 T 림프구)는 브릿지(즉, 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염)의 제1 표적화 모이어티(예를 들어, FITC, DNP, 또는 TNP) 또는 활성 변형 화합물의 제2 표적화 모이어티를 인식하고 그에 결합하는 CAR를 발현하도록 조작된다.

- [0208] 적어도 하나의 구현예에서, CAR은 1) 제1 또는 제2 표적화 모이어티를 인식하고 그에 특이적으로 결합하는 인식 영역(예를 들어, 항체의 scFv 영역, Fab 단편 등), 2) T 림프구의 증식 및 생존을 향상시키는 공동 자극 도메인, 및 3) T 림프구 활성화 신호를 생성하는 활성화 신호전달 도메인을 포함하는 3개의 도메인을 포함한다.
- [0209] CAR의 인식 영역이 scFv 영역을 포함하는 경우, scFv 영역은 (i) 제1 또는 제2 표적화 모이어티에 결합하는 당 업계에 공지된 항체, (ii) 선택된 제1 및 제2 표적화 모이어티, 예컨대 합텐을 사용하여 새로 제조된 항체, 및 (iii) 이러한 항체의 scFv 영역, 예를 들어, 이들이 유래된 scFv 영역의 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 적어도 약 99.5% 서열 동일성을 갖는 scFv 영역으로부터 유래된 서열 변이체로부터 제조될 수 있다.
- [0210] 폴리펩티드 서열에 대한 참조와 관련하여 "서열 동일성 퍼센트 (%)"은 서열을 정렬하고, 필요하다면 갭을 도입하여 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하고, 임의의 보존적 치환을 서열 동일성의 일부로서 고려하지 않은 후, 참조 서열 내의 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 또는 핵산 잔기 각각의 백분율로서 정의된다. 퍼센트 서열 동일성을 결정하기 위한 정렬은 예를 들어 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 당업계의 기술 내에 있는 다양한 방식으로 달성될 수 있다. 예를 들어, 서열 간의 퍼센트 동일성 또는 유사성의 결정은 예를 들어 GAP 프로그램(Genetics Computer Group, 소프트웨어; 현재 <http://www.accelrys.com>에서 Accelrys를 통해 사용 가능)을 사용하여 수행할 수 있으며 정렬은 예를 들어, ClustalW 알고리즘(VNTI 소프트웨어, InforMax Inc.)을 사용하여 수행될 수 있다. 또한, 관심 있는 핵산 또는 아미노산 서열을 이용하여 서열 데이터베이스를 검색할 수 있다. 데이터베이스 검색을 위한 알고리즘은 일반적으로 BLAST 소프트웨어를 기반으로 하지만(Altschul 등, 1990), 당업자는 비교되는 서열의 전장에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는 데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여 서열을 정렬하기 위한 적절한 매개변수를 결정할 수 있다. 일부 구현예에서, 동일성 퍼센트는 핵산 또는 아미노산 서열의 전장을 따라 결정될 수 있다.
- [0211] 특정 구현예에서, CAR의 공동 자극 도메인은 CAR이 제1 또는 제2 표적화 모이어티에 결합할 때 세포독성 T 림프구의 증식 및 생존을 향상시키는 역할을 할 수 있다. 적합한 공동 자극 도메인은 CD28, CD137 (4-1BB), 종양 괴사 인자 (TNF) 수용체 계열의 구성원, CD134 (OX40), 수용체의 TNFR-상과의 구성원, CD27, CD30, CD150, DNAX 활성화 단백질 of 10KDa (DAP10), NKG2D, 및 CD278 (ICOS), 활성화된 T 세포 상에서 발현되는 CD28-상과 공동 자극 분자, 또는 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 당업자는 이러한 공동 자극 도메인의 서열 변이체가 본 발명에 부정적인 영향을 미치지 않고 사용될 수 있고, 여기서 변이체는 모델링되는 도메인과 동일하거나 유사한 활성을 갖는다는 것을 이해할 것이다. 다양한 구현예에서, 이러한 변이체는 이들이 유래된 도메인의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 적어도 약 99.5% 서열 동일성을 가질 수 있다.
- [0212] 예시적인 구현예에서, 활성화 신호전달 도메인은 CAR이 제1 또는 제2 표적화 모이어티에 결합할 때 T 림프구(예를 들어, 세포독성 T 림프구)를 활성화시키는 역할을 한다. 적합한 활성화 신호전달 도메인은 제한 없이 T 세포 CD3 ψ 사슬, CD3 델타 수용체 단백질, mb1 수용체 단백질, B29 수용체 단백질, 및 Fc 수용체 γ 를 포함한다. 당업자는 변이체가 모델링되는 도메인과 동일하거나 유사한 활성을 갖는 경우 이들 활성화 신호전달 도메인의 서열 변이체가 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 다양한 구현예에서, 변이체는 이들이 유래된 도메인의 아미노산 서열에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 적어도 약 99.5% 서열 동일성을 갖는다.
- [0213] CAR을 인코딩하는 작제물은 유전 공학 기술을 사용하여 제조할 수 있다. 이러한 기술은 문헌[Sambrook 등, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2001), 및 Green and Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 4th Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2012)]에 자세히 기재되어 있고, 문헌 둘 다 본원에 그 전체가 참조로 포함된다(총칭하여 "프로토콜").
- [0214] 비제한적인 예로서, 플라스미드 또는 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 슬리핑 뷰티 및 피기백(비-바이러스 매개 CAR 유전자 전달 시스템을 포함하는 트랜스포존/트랜스포사제 시스템))는 프레임 내에 인식 영역, 하나 이상의 공동 자극 도메인, 및 활성화 신호전달 도메인을 포함하고 5'에서 3' 방향으로 연결된 융합 단백질을 인코딩하여 제조될 수 있다.

- [0215] 다른 배열도 허용되며 인식 영역, 활성화 신호전달 도메인, 및 하나 이상의 공동 자극 도메인을 포함한다.
- [0216] "벡터"라는 용어는 관심 핵산을 운반, 보유 또는 발현하는 기능을 하는 임의의 핵산을 의미한다. 핵산 벡터는 발현, 패키징, 슈도타이핑 또는 형질도입과 같은 특수 기능을 가질 수 있다. 벡터는 클로닝 또는 서플 벡터로 사용하도록 적응된 경우 조작 기능도 가질 수 있다. 벡터의 구조는 특정 용도에 적합하고 만들 수 있는 임의의 원하는 형태를 포함할 수 있다. 그러한 것은 예를 들어, 플라스미드 및 파아지미드와 같은 원형 형태 뿐만 아니라 선형 또는 분지형 형태를 포함할 수 있다. 핵산 벡터는 예를 들어 DNA 또는 RNA로 구성될 수 있을 뿐만 아니라 뉴클레오타이드 유도체, 유사체 또는 모방체를 부분적으로 또는 완전히 함유할 수 있다. 이러한 벡터는 재조합 또는 화학적으로 합성된 천연 공급원으로부터 얻을 수 있다.
- [0217] 융합 단백질에 인식 영역을 배치하는 것은 일반적으로 세포의 외부에 영역이 표시되도록 하는 것이다. 원하는 경우, CAR은 또한 융합 단백질이 세포 표면으로 적절히 내보내지도록 하는 신호 펩티드(예를 들어, CD8 α 신호 펩티드), 융합 단백질이 내재성 막 단백질로 유지되도록 하는 막횡단 도메인 (예를 들어, CD8 α 막횡단 도메인, CD28 막횡단 도메인, 또는 CD3 ψ 막횡단 도메인), 및 인식 영역에 유연성을 부여하고 표적화 모이머에 강한 결합을 허용하는 힌지 도메인(예를 들어, CD8 α 힌지)과 같은 추가의 요소를 포함할 수 있다.
- [0218] 융합 단백질 서열이 렌티바이러스 발현 벡터에 통합되고 "SP"가 신호 펩티드이고 CAR은 항-FITC CAR이고, CD8 α 힌지 및 CD8 α 막횡단 도메인이 존재하고, 공동 자극 도메인은 4-1BB이고 활성화 신호 도메인은 CD3 ψ 인 예시적인 CAR의 다이어그램이 도 1에 제시되어 있다. CAR 삽입물의 예시적인 핵산 서열은 서열번호: 1 및 3으로 제공되고, 인코딩된 아미노산 서열은 서열번호: 2로 제공된다. 또 다른 구현예에서, 서열번호: 2는 인간화 또는 인간 아미노산 서열을 포함하거나 그로 이루어질 수 있다.
- [0219] 적어도 하나의 구현예에서, CAR은 항-FITC 항체의 scFv 영역을 포함하는 인식 영역을 가지며, 공동 자극 도메인 및 공동 자극 도메인은 CD137(4-1BB)이고, 활성화 신호전달 도메인 및 활성화 신호전달 도메인은 T 세포 CD3 ψ 사슬이다. 항-FITC scFv 및 항-플루오레세인 scFv가 동등한 용어라는 것은 당업자에게 잘 알려져 있다.
- [0220] T 림프구(예를 들어, 세포독성 T 림프구)는 T 림프구의 집단을 CAR 작제물을 인코딩하는 발현 벡터로 형질감염 시킴으로써 CAR 작제물을 발현하도록 유전자 조작될 수 있다. 선택된 CAR 작제물을 발현하는 형질도입된 T 림프구 집단을 제조하기 위한 적합한 방법은 당업자에게 잘 알려져 있고 적어도 프로토콜에 기재되어 있다.
- [0221] 적어도 하나의 구현예에서, 서열번호: 1 또는 3의 핵산을 포함하는 CAR-T 세포가 사용된다. 또 다른 구현예에서, 서열번호: 2의 폴리펩티드를 포함하는 CAR-T 세포가 사용된다. 또 다른 양태에서, 서열번호: 1 또는 3을 포함하는 렌티바이러스 벡터가 사용된다. 또 다른 구현예에서, 서열번호: 2는 인간화 또는 인간 아미노산 서열을 포함하거나 그로 이루어질 수 있다.
- [0222] 이들 각각의 구현예에서, 서열번호: 1 내지 3에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 적어도 약 99.5% 서열 동일성을 갖는 변이체 핵산 서열 또는 아미노산 서열이 사용할 수 있다. 다른 구현예에서, 변이체 서열이 서열번호: 2의 폴리펩티드를 인코딩하는 한, 핵산 서열은 서열번호: 1 또는 2에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 적어도 약 99.5% 서열 동일성을 갖는 변이체 핵산 서열일 수 있다. 또 다른 구현예에서, 핵산 서열 또는 아미노산 서열은 200개 핵산의 스트레치를 따라, 또는 서열 번호: 2의 경우, 200개 아미노산의 스트레치를 따라서 서열번호: 1 또는 3에 대해 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 적어도 약 99.5% 서열 동일성을 갖는 변이체 핵산 또는 아미노산 서열일 수 있다.
- [0223] 한 구현예에서, 본원에 기재된 방법에 사용된 T 림프구(예를 들어, CAR-T 세포를 제조하는 데 사용되는 세포독성 T 림프구)는 자가 세포일 수 있지만, 예컨대 치료되는 환자가 고-용량 화학요법 또는 방사선 치료를 받아 환자의 면역계를 파괴할 때 이종 세포가 또한 사용될 수 있다. 한 구현예에서, 동종이형 세포가 사용될 수 있다.
- [0224] T 림프구는 당업계에 잘 알려진 수단에 의해 대상체로부터 얻어질 수 있다. 예를 들어, T 세포(예를 들어, 세포독성 T 세포)는 대상체로부터 말초 혈액을 수집하고 혈액을 피콜(Ficoll) 밀도 구배 원심분리에 적용한 다음, 음성 T 세포 분리 키트(예를 들어, EasySepTM T Cell Isolation Kit)를 사용하여 말초 혈액에서 T 세포의 집단을 분리함으로써 획득될 수 있다.
- [0225] 특정 구현예에서, T 림프구(예를 들어, 세포독성 T 세포)의 집단은 순수할 필요는 없고 다른 세포, 예컨대 다른 유형의 T 세포(예를 들어, 세포독성 T 세포의 경우), 단핵구, 대식세포, 자연 살해 세포, 및 B 세포를 함유할

수 있다. 추가로, 적어도 하나의 구현예에서, 수집되는 집단은 선택된 세포 유형의 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 선택한 세포 유형의 적어도 약 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%를 포함할 수 있다.

[0226] 일반적으로 T 림프구를 얻은 후 세포의 활성화를 촉진하는 조건에서 세포를 배양한다. 적어도 하나의 구현예에서, 배양 조건은 세포가 배양 배지의 구성요소에 대한 반응성에 대한 우려 없이 대상체에게 투여될 수 있도록 하는 것이다. 예를 들어, 배양 조건은 소 혈청 알부민과 같은 소 혈청 생성물을 포함하지 않을 수 있다. 한 양태에서, 활성화는 세포독성 T 세포의 경우 항-CD3 항체와 같은 공지된 활성화제를 배양 배지에 도입함으로써 달성될 수 있다. 다른 적합한 활성화제는 일반적으로 알려져 있으며, 예를 들어 항-CD28 항체를 포함한다. 림프구 집단은 예를 들어 약 1 내지 약 4일 동안 활성화를 촉진하는 조건 하에 배양될 수 있다. 적절한 활성화 수준은 세포 크기, 증식률 또는 유동 세포측정에 의해 결정된 활성화 마커에 의해 결정될 수 있다.

[0227] 적어도 하나의 구현예에서, T 림프구의 집단이 활성화를 촉진하는 조건 하에 배양된 후, 세포는 CAR을 인코딩하는 발현 벡터로 형질감염된다. 다양한 구현예에서 사용하기에 적합한 벡터 및 형질감염 방법이 상기에 기재되어 있다. 형질감염 후, 세포는 환자에게 즉시 투여될 수 있거나 세포가 형질감염으로부터 회복되는 시간, 예를 들어 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 또는 그 초과 일, 또는 약 5 내지 약 12 일, 약 6 내지 약 13 일, 약 7 내지 약 14 일, 또는 약 8 내지 약 15 일 동안 배양될 수 있다. 한 양태에서, 적합한 배양 조건은 활성화를 촉진하기 위해 사용된 제제의 존재 또는 부재하에 세포가 활성화를 위해 배양된 조건과 유사할 수 있다.

[0228] 따라서, 상기 기재된 바와 같이, 본원에 기재된 치료 방법은 1) 자가 또는 이종 T 림프구(예를 들어, CAR-T 세포를 제조하는 데 사용되는 세포독성 T 림프구)의 집단을 수득하는 단계, 2) 세포의 활성화를 촉진하는 조건 하에 T 림프구를 배양하는 단계, 3) CAR-T 세포를 형성하기 위해 CAR을 인코딩하는 발현 벡터로 림프구를 형질감염시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0229] 세포가 형질감염되고 활성화된 경우, CAR-T 세포를 포함하는 조성물이 제조되어 대상체에게 투여될 수 있다. 적어도 하나의 구현예에서, 소 혈청과 같은 임의의 동물 생성물이 결여된 배양 배지를 사용하여 CAR-T 세포를 배양할 수 있다. 다른 구현예에서, 박테리아, 진균 및 마이코플라스마에 의한 오염을 피하기 위해 당업자에 의해 전형적으로 사용되는 조직 배양 조건이 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 환자에게 투여되기 전에 세포(예를 들어, CAR-T 세포)를 펠렛화하고, 세척하고, 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제에 재현탁시킨다.

[0230] CAR-발현 T 림프구(예를 들어, 세포독성 T 림프구)를 포함하는 예시적인 조성물은 멸균 290 mOsm 식염수에서, 불용성 동결배지(혈장-용해물 A, 텍스트로스, 염화나트륨 주사, 인간 혈청 알부민 및 DMSO를 함유함)에서, 2% 인간 혈청 알부민이 있는 0.9% NaCl에서, 또는 임의의 다른 멸균 290 mOsm 불용성 물질에서 세포를 포함하는 조성물을 포함한다. 대안적으로, 또 다른 구현예에서, 배양 배지의 동일성에 따라, CAR-T 세포는 조성물로서 배양 배지에 투여되거나, 투여 전에 배양 배지에 농축 및 재현탁될 수 있다. 다양한 구현예에서, CAR-T 세포 조성물은 임의의 적합한 수단, 예컨대 비경구 투여, 예를 들어, 진피내, 피하, 근육내, 복강내, 정맥내 또는 척수강내를 통해 대상체에게 투여될 수 있다.

[0231] 한 양태에서, CAR-T 세포의 총 수 및 환자에게 투여되는 조성물 중 세포의 농도는 사용되는 T 림프구(예를 들어, 세포독성 T 림프구)의 유형, CAR의 결합 특이성, 제1 또는 제2 또는 제3 표적화 모이어티 및 소분자 리간드의 동일성, 재생 화합물, 또는 면역억제성 화합물, 암의 동일성, 환자에서 암의 위치, 조성물을 환자에게 투여하기 위해 사용되는 수단, 치료받는 환자의 건강, 연령 및 체중을 포함한다. 다양한 구현예에서, 형질도입된 CAR-T 세포를 포함하는 적합한 조성물은 부피가 약 0.1 ml 내지 약 200 ml 및 약 0.1 ml 내지 약 125 ml인 것을 포함한다.

[0232] 벡터 조성물

[0233] 조성물 및 방법의 특정 구현예는 벡터 조성물을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물은 본원에 기재된 CAR 작제물을 인코딩하는 핵산 서열(예를 들어, 그리고 제한 없이, 서열번호: 1 또는 3)에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함하는 벡터를 포함한다. 일부 구현예에서, 벡터 조성물은 본원에 기재된 CAR을 인코딩하는 핵산 서열을 보유하는 렌티바이러스 입자를 포함한다. 일부 구현예에서, 벡터 조성물은 치료 유효량의 이러한 렌티바이러스 입자를 포함한다.

[0234] 렌티바이러스는 사용될 수 있는 벡터 시스템의 비제한적인 예이다. 렌티바이러스는 일반적인 레트로바이러스 유전자 Gag, Pol 및 Env 외에 조절 또는 구조적 기능을 가진 다른 유전자를 함유하는 복합 레트로바이러스이다.

복합성이 높을수록 바이러스는 잠복 감염 과정에서와 같이 수명 주기를 조절할 수 있다. 렌티바이러스의 몇 가지 예는 인간 면역결핍 바이러스 (HIV-1 및 HIV-2) 및 유인원 면역결핍 바이러스 (SIV)를 포함한다. 렌티바이러스 벡터는 HIV 병독성 유전자를 다중 약독화하여 생성되었고, 예를 들어 유전자 Env, Vif, Vpr, Vpu 및 Nef가 결실되어 벡터는 생물학적으로 안전하다.

[0235] 렌티바이러스 벡터는 유전자 요법에 많은 이점을 제공한다. 비-통합되도록 조작되지 않는 한, 렌티바이러스 벡터는 표적 세포의 염색체에 안정적으로 통합되어 전달된 이식유전자의 장기간 발현을 허용한다. 또한, 바이러스 유전자를 전달하지 않으므로 세포독성 T 세포에 의해 파괴될 수 있는 형질도입된 세포를 생성하는 문제를 피할 수 있다. 또한, 대부분의 계획된 임상 적용에 충분한 비교적 큰 클로닝 능력을 가지고 있다. 레트로바이러스 중 에서, 렌티바이러스는 자신의 게놈을 비분열 세포의 염색질에 통합하는 독특한 능력을 가지고 있다. 이는 조혈 계, 뇌, 간, 폐 및 근육과 같은 조직에 대한 유전자 요법의 맥락에서 특히 중요하다. 예를 들어, HIV-1로부터 유래된 벡터는 세포 예컨대 뉴런, 간세포, 및 근세포로의 이식유전자의 효율적인 생체 내 및 생체외 전달, 통합 및 안정한 발현을 허용한다(Blomer 등, 1997; Kafri 등, 1997; Naldini 등, 1996; Naldini 등, 1998).

[0236] 렌티바이러스 벡터는 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Naldini 등 (1996) *Science* 272: 263-267; Zufferey 등 (1998) *J. Virol.* 72: 9873-9880; Dull 등 (1998) *J. Virol.* 72: 8463-8471; 미국 특허 제 6,013,516호; 미국 특허 제5,994,136호]를 참조한다. 일반적으로, 이러한 벡터는 벡터를 함유하는 세포의 선택, 렌티바이러스 입자 내로 외래 핵산의 혼입 및 표적 세포 내로의 핵산 전달을 위한 필수 서열을 보유하도록 구성된다.

[0237] 일반적으로 사용되는 렌티바이러스 벡터 시스템은 소위 3세대 시스템이다. 3세대 렌티바이러스 벡터 시스템은 4 개의 플라스미드를 포함할 수 있다. "전달 플라스미드"는 렌티바이러스 벡터 시스템에 의해 표적 세포로 전달되는 폴리뉴클레오티드 서열을 인코딩한다. 전달 플라스미드는 일반적으로 전달 플라스미드 서열의 숙주 게놈으로 의 통합을 용이하게 하는 긴 말단 반복부(LTR) 서열에 의해 측정된 하나 이상의 관심 이식유전자 서열을 갖는다. 안전상의 이유로 전달 플라스미드는 일반적으로 생성된 벡터 복제를 무능하게 만들도록 설계된다. 예를 들어, 전달 플라스미드는 숙주 세포에서 감염 입자의 생성에 필요한 유전자 요소가 결여된다. 또한, 전달 플라스미드는 3' LTR를 결실하여 바이러스를 "자가 불활성화"(SIN)하도록 설계할 수 있다. 문헌[Dull 등 (1998) *J. Virol.* 72:8463-8471; Miyoshi 등 (1998) *J. Virol.* 72:8150-8157]를 참조한다.

[0238] 3세대 시스템은 일반적으로 2개의 "패키징 플라스미드" 및 "외피 플라스미드"를 포함한다. "외피 플라스미드"는 일반적으로 프로모터에 작동적으로 연결된 Env 유전자를 인코딩한다. 3세대 시스템의 적어도 하나의 구현예에서, Env 유전자는 VSV-G이고 프로모터는 CMV 프로모터이다. 3세대 시스템은 2개의 패키징 플라스미드를 사용하는데, 하나는 Gag 및 Pol을 인코딩하고 다른 하나는 Rev를 추가 안전성 특징으로서 인코딩하고, 이는 소위 2세대 시스템의 단일 패키징 플라스미드보다 개선된 것이다. 더 안전하지만, 3세대 시스템은 사용하기가 더 복잡할 수 있으며 추가 플라스미드 추가로 인해 바이러스 역가가 낮아질 수 있다. 예시적인 패키징 플라스미드는 pMD2.G, pRSV-rev, pMDLG-pRRE 및 pRRL-GOI를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0239] 일부 경우에, 렌티바이러스 벡터 시스템은 "패키징 세포주"의 사용에 의존한다. 일반적으로 패키징 세포주는, 전달 플라스미드, 패키징 플라스미드(들), 및 외피 플라스미드가 세포 내로 도입될 때 세포가 감염성 렌티바이러스 입자를 생성할 수 있는 세포주이다. 형질감염 또는 전기천공을 포함하여 플라스미드를 세포에 도입하는 다양한 방법을 사용할 수 있다. 일부 경우에, 패키징 세포주가 렌티바이러스 벡터 시스템의 렌티바이러스 입자로 의 고효율 패키징에 적합하다.

[0240] 본원에 사용된 용어 "렌티바이러스 벡터"는 게놈 패키징에 필요한 렌티바이러스 시스템 핵산 서열을 인코딩하는 핵산을 의미한다. 렌티바이러스 벡터는 또한 예를 들어 역전사, 프로바이러스 통합 또는 게놈 전사에 필요한 시스템 서열을 포함하는 유전자 전달에 유익한 다른 시스템 핵산 서열을 인코딩할 수 있다. 렌티바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터의 형질도입 기능을 수행한다. 이와 같이, 벡터 게놈의 정확한 구성은 표적 세포에 도입하고자 하는 유전 물질에 따라 달라질 것이다. 따라서 벡터 게놈은 예를 들어 패키징, 역전사, 통합 또는 전사에 필요한 것 이외의 추가 폴리펩티드 또는 기능을 인코딩할 수 있다. 이러한 기능은 일반적으로 관심 핵산의 발현에 필요한 시스템 요소에 대한 코딩을 포함한다. 렌티바이러스 시스템 서열 또는 요소는, 렌티바이러스 벡터 게놈이 패키징 세포주에 의해 렌티바이러스 입자 내로 패키징되고 표적 세포 내로 도입될 수 있는 한 렌티바이러스 게놈 또는 다른 바이러스 또는 벡터 게놈으로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 렌티바이러스 벡터에 대한 표적 세포는 면역 세포이다. 일부 구현예에서, 표적 면역 세포는 T 세포 또는 NK 세포이다. 일부 구현예에서, 표적 면역 세포는 종양 미세환경에 존재한다.

- [0241] 생성된 렌티바이러스 입자는 일반적으로 RNA 게놈(예를 들어, 전달 플라스미드에서 유래), Env 단백질이 내장된 지질-이중층 외피, 및 인테그라제, 프로테아제 및 기질 단백질을 포함하는 다른 보조 단백질을 포함한다. 본원에 사용된 용어 "렌티바이러스 입자"는 외피를 포함하고 렌티바이러스의 하나 이상의 특성을 가지며 표적 숙주 세포(예를 들어, T 세포 또는 NK 세포)를 침범할 수 있는 바이러스 입자를 의미한다. 이러한 특성은 예를 들어, 비-분열 숙주 세포를 감염시킴, 비-분열 숙주 세포를 형질도입함, 숙주 면역 세포를 감염시키거나 형질도입함, gag 구조적 폴리펩티드 p7, p24, 및 p17 중 하나 이상을 포함하는 렌티바이러스 비리온을 함유함, env 인코딩된 당단백질 p41, p120, 및 p160 중 하나 이상을 포함하는 렌티바이러스 외피를 함유함, 복제, 프로바이러스 통합 또는 전사에서 기능하는 하나 이상의 렌티바이러스 시스 작용 서열을 포함하는 게놈을 함유함, 렌티바이러스 프로테아제, 역전사효소 또는 인테그라제를 인코딩하는 게놈을 함유함, 또는 조절 활성을 인코딩하는 게놈 예컨대 Tat 또는 Rev를 함유함을 포함할 수 있다. 렌티바이러스 벡터 및 렌티바이러스 입자에 대한 상세한 설명은 국제 공개 번호 WO 2019/200056에 제공되며, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.
- [0242] 렌티바이러스 벡터를 사용하여 T 세포 활성화 수용체를 인코딩할 수 있다. "T 세포 활성화 수용체"는 T 세포 활성화 수용체가 형질도입된 세포에 유사분열 신호를 제공하도록 형질도입된 세포의 세포 표면 상에서 발현되도록 구성된 하나 이상의 막형단 단백질을 의미한다. T 세포 활성화 수용체는 대부분의 경우 표적 세포가 T 세포이기 때문에 사용된다. 본 방법은 다른 세포 유형에서 활성을 유지하는 활성화 수용체를 사용하여 다른 세포 유형과 함께 사용하도록 적응될 수 있다. 본원에 유용한 T 세포 활성화 수용체는 사이토카인 수용체 신호전달 도메인, 공동자극 수용체 신호전달 도메인, T 세포 수용체 서브유닛 신호전달 도메인, 성장 인자 수용체 신호전달 도메인 등인 신호전달 도메인을 포함할 수 있다(예를 들어, 이전과 같이 CAR 조성물과 관련하여 기재됨).
- [0243] 일부 경우에 형질도입된 세포를 특정 세포 또는 조직으로 표적화하는 수단을 제공하는 것이 유리할 수 있다. 따라서, 렌티바이러스 벡터는 (다른 유전자 대신에 또는 추가로) 본원에 기재된 CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 제1 및/또는 제2 표적화 모이어티에 지시된 것 및 예를 들어, 소분자 리간드 또는 그와 연결된 화합물을 유도가능하게 이량체화함)를 포함할 수 있다.
- [0244] 공지된 바와 같이, 렌티바이러스 벡터는 T 세포에 특이적인 프로모터 및/또는 인핸서를 추가로 포함할 수 있다. 일부 경우에, 프로모터를 사용하여 T 세포 활성화 수용체의 발현을 조절할 수 있다. 추가로, 렌티바이러스 벡터는 (예를 들어, 슈도타이핑 목적을 위해) 융합 당단백질을 포함할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Joglekar 등 (2017) *Human Gene Therapy Methods* 28:291-301]를 참조한다. 특정 구현예에서, 융합 당단백질 또는 그의 기능적 변이체를 슈도타이핑하면 T 세포를 포함하나 이에 제한되지 않는 특정 세포 유형의 표적화 형질도입을 용이하게 한다.
- [0245] 특정 구현예에서, 그의 벡터는 우드처크 간염 바이러스 전사후 조절 요소 (wPRE) 또는 wPRE와 실질적으로 동일한 핵산 서열을 포함할 수 있다. [미국 특허 제6,136,597호; Lee 등 (2005) *Exp Physiol.* 90:33-37]를 참조한다. 감소된 크기를 갖는 wPRE 요소의 변이체는 당업계에 공지되어 있다. wPRE-0는 중간 크기의 wPRE 변이체를 지칭한다. 일부 구현예에서, wPRE 서열은 이러한 바이러스 벡터에 의해 전달되는 유전자의 발현을 증가시킨다.
- [0246] 일부 경우에, 렌티바이러스 벡터는 2A 펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 용어 "2A 펩타이드"는 단일 열린 해독틀로부터 2개 이상의 단백질을 생성하도록 구성된 자가 절단 펩타이드를 지칭한다. 2A 펩티드는 진행 세포에서 번역 동안 폴리펩티드의 "절단"을 매개하는 18-22개의 잔기 길이의 바이러스 올리고펩티드이다. "2A 펩타이드"는 다양한 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 지칭할 수 있다. 2A 펩티드의 설계 및 사용에 대한 자세한 방법론은 문헌[Szymczak-Workman 등 (2012) *Cold Spring Harb. Protoc.* 2012: 199-204]에 의해 제공된다.
- [0247] 일부 구현예에서, 벡터 조성물은 대상체에게 직접 투여된다. 일부 구현예에서, 벡터 조성물은 T 세포와 함께 투여된다. 일부 구현예에서, 벡터 조성물 및 T 세포는 별도로 투여된다. 일부 구현예에서, T 세포는 투여된 벡터 조성물에 의해 생체 내에서 활성화되고 형질도입된다.
- [0248] 암을 치료하기 위한 조합물, 조성물 및 방법
- [0249] 암을 치료하기 위한 조합물 및 조성물이 또한 제공된다. 본원에 사용된 용어 "조합물"은 일반적으로 본원에 기재된 화합물 중 하나 이상 (예를 들어, 어댑터 화합물, 활성 변형 화합물 (예를 들어, 재생 화합물 또는 면역억제 화합물), 또는 전술한 것의 약제학적으로 허용되는 염)을 포함하는 하나 초과 성분들을 포함하는 임의의 생성물을 지칭한다. 본원에 기재된 조성물은 단리된 화합물 또는 염, 용액, 수화물, 용매화물 및 다른 형태의 화합물로부터 제조될 수 있음을 이해해야 한다. 하이드록시, 아미노 등과 같은 특정 작용기는 화합물의 다양한 물

리적 상태에서 물 및/또는 다양한 용매와 착물을 형성할 수 있음이 이해된다. 또한, 특정 상황에서, 화합물 (및 화합물을 포함하는 조성물)은 화합물의 다양한 비정질, 비정질, 부분 결정질, 결정질 및/또는 다른 형태학적 형태로부터 제조될 수 있고, 조성물은 화합물의 다양한 수화물 및/또는 용매화물로부터 제조될 수 있다. 따라서, 본원에 기재된 화합물을 인용하는 약제학적 조성물은 화합물의 다양한 형태학적 형태 및/또는 용매화물 또는 수화물 형태 각각, 또는 이들의 임의의 조합 또는 개별 형태를 포함한다.

[0250] 암이 있는 대상체에서 T 세포 활성을 변형시키고/시키거나 암을 치료하기 위한 조합물은 하나 이상의 어댑터 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 및 활성 변형 화합물 (예를 들어, 재생 화합물, 면역억제 화합물, 또는 전술한 것의 약제학적으로 허용되는 염)도 제공된다. 이러한 화합물은 임의의 유사한 화합물일 수 있고, 적어도 하나의 구현예에서, 각각의 어댑터 화합물은 제1 링커에 의해 제1 표적화 모이어티에 연결된 소분자 리간드를 포함하고, 활성 변형 화합물은 제2 링커를 통해 제2 표적화 모이어티에 연결된 재생 화합물 또는 면역억제 화합물을 포함한다. 추가로, 적어도 하나의 구현예에서, 조합물은 CAR을 발현하는 CAR-T 세포 또는 CAR을 인코딩하는 핵산 서열 (예를 들어, 서열번호: 1 또는 3) 에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함하는 벡터를 포함하는 조성물을 추가로 포함하고, CAR은 제1 표적화 모이어티, 제2 표적화 모이어티, 또는 제1 및 제2 표적화 모이어티 둘 모두에 대해 지시된다.

[0251] 또 다른 구현예에서, (예를 들어, 대상체에서 T 세포 활성을 변형시킴으로써) 암을 치료하기 위한 조합물이 제공된다. 조합물은 본 개시내용의 화합물 및 조성물 중 하나 이상을 포함한다.

[0252] 화합물 및 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체, 보조제, 희석제, 부형제, 및/또는 비히클, 및 이들의 조합을 함유하는 단위 복용 형태 및/또는 조성물로 투여될 수 있다. 용어 "투여하는" 및 그의 형성물은 일반적으로 본원에 기재된 화합물 및 조성물(예를 들어, CAR-T 세포 조성물, 어댑터 화합물(들) 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염(들), 및/또는 활성 변형 화합물)을 대상체의 세포, 조직, 기관 또는 생물학적 유체에 도입하는 임의의 및 모든 수단을 지칭한다.

[0253] 염으로서 화합물 및 조성물의 투여가 적절할 수 있다. 허용되는 염의 예는 알칼리 금속 (예를 들어, 나트륨, 칼륨 또는 리튬) 또는 알칼리 토류 금속 (예를 들어, 칼슘) 염을 제한없이 포함하고; 그러나 일반적으로 치료되는 대상에게 투여될 때 무독성이고 효과적인 염이 허용된다.

[0254] 본원에 사용된 바와 같이, "대상체"는 포유동물, 바람직하게는 인간이지만, 비-인간 동물 (실험실, 농업, 가정용, 또는 야생 동물을 제한없이 포함함)일 수도 있다. 따라서, 본원에 기재된 방법, 화합물 및 조성물은 인간 및 수의과 질환 및 적용 모두에 적용가능하다. 다양한 양태에서, 대상체는 실험실용 동물, 예컨대 설치류 (예를 들어, 마우스, 랫트, 햄스터 등), 토끼, 원숭이, 침팬지, 가축 예컨대 개, 고양이, 또는 토끼, 농업 동물 예컨대 소, 말, 돼지, 양, 또는 염소 또는 포획된 야생 동물 예컨대 곰, 팬더, 사자, 호랑이, 표범, 코끼리, 얼룩말, 기린, 고릴라, 돌고래 또는 고래일 수 있다. 특정 구현예에서, 대상체는 "환자", 즉, 병리의 징후에 대해 평가되고 있는 정의된 질환이 없는 사람 또는 동물을 포함하는 질환 또는 병태에 대한 의료 보호를 받고 있는 살아있는 인간 또는 동물이다. 특정 구현예에서, 본원의 방법을 사용하여 처리될 수 있는 대상체는 암이 있거나 가질 위험이 있는 것으로 확인되거나 선택된 대상체를 포함한다. 이러한 식별 및/또는 선택은 임상 또는 진단 평가에 의해 이루어질 수 있다.

[0255] 화합물 및 조성물은 약제학적 조성물로서 제형화되고/되거나 선택된 투여 경로에 적합한 다양한 형태로 인간 환자와 같은 대상에게 투여될 수 있다. 실제로, 어댑터 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 활성 변형 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 CAR-T 세포 조성물, 또는 벡터 조성물 (예를 들어, 그의 렌티바이러스 입자 포함)은 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법을 사용하여 대상체에게 투여될 수 있다. 한 양태에서, 본원에 기재된 어댑터 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 재생 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 면역억제 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 단위 복용 형태 및/또는 약제학적으로 허용되는 통상적인 무독성 담체, 보조제 및 비히클을 함유하는 제형으로 투여될 수 있다.

[0256] 추가로, 본원에 기재된 바와 같은 어댑터 화합물(들), 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염(들), 또는 재생 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 면역억제 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 CAR-T 세포 조성물, 또는 벡터 조성물은 혈류 내로, 근육 내로, 또는 내부 기관 내로 직접 투여될 수 있다. 다양한 구현예에서, 이러한 비경구 투여에 적합한 경로는 정맥내, 동맥내, 복강내, 척추강내, 경막외, 뇌실내, 요도내, 흉골내, 두개내, 종양내, 근육내 및 피하 전달을 포함한다. 한 구현예에서, 비경구 투여를 위한 수단은 바늘(마이크로니들 포함) 주사기, 무바늘 주사기 및 주입 기술을 포함한다. 본 발명의 화합물 및 조성물은 또한 원하는 투여 방식을 위해 제형화될 수 있음이 이해될 것이다.

- [0257] 예를 들어, 비경구 제형은 일반적으로 수용액이고 염, 담체 또는 부형제 예컨대 염, 탄수화물 및 완충제 (바람직하게는 pH 3 내지 9)를 함유할 수 있지만, 적합한 경우, 또한 멸균 비-수용액으로서 또는 적합한 비히클 예컨대 멸균, 무발열원 물 또는 멸균 염수와 함께 사용될 건조 형태로서 제형화될 수 있다. 다른 구현예에서, 본원에 기재된 임의의 액체 제형은 비경구 투여에 적합할 수 있다. 비경구 제형을 위한 멸균 동결건조 분말을 생성하기 위한 동결건조에 의한 멸균 조건 하에서의 제조는 당업자에게 잘 알려진 표준 약제학적 기술을 사용하여 용이하게 달성될 수 있다. 한 구현예에서, 비경구 제형의 제조에 사용된 어댑터 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 재생 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 면역억제 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 활성 변형 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염의 용해도는 용해도-증진제의 혼입과 같은 적절한 제형 기술의 사용에 의해 증가될 수 있다.
- [0258] 주사 또는 주입에 적합한 어댑터 화합물(들) 및/또는 활성 변형 화합물의 약제학적 복용 형태는 리포솜에 선택적으로 캡슐화된 멸균 주사가능 또는 불용성 용액 또는 분산물의 즉석 제조를 위해 적응된 활성 성분을 포함하는 멸균 수용액 또는 분산물 또는 멸균 분말을 포함할 수 있다. 모든 경우에 궁극적인 복용 형태는 제조 및 보관 조건에서 멸균되고 유동적이며 안정적이어야 한다. 액체 담체 또는 비히클은 예를 들어 비제한적으로 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 PEG(들), 등), 식물성 오일, 무독성 글리세릴 에스테르, 및/또는 이들의 적합한 혼합물을 포함하는 용매 또는 액체 분산매일 수 있다. 적어도 하나의 구현예에서, 적절한 유동성은 리포솜의 형성에 의해, 분산물의 경우에 필요한 입자 크기의 유지에 의해 또는 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물의 작용은 다양한 항균제 및 항진균제, 예컨대 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티메로살 등의 첨가에 의해 예방될 수 있다. 특정 경우에, 하나 이상의 등장제, 예컨대 당, 완충액, 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 주사용 조성물의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키기 위해 제형화된 제제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 혼입에 의해 야기될 수 있다.
- [0259] 멸균 주사 용액은 활성 성분을 필요한 양의 적절한 용매에 혼입하고 필요에 따라 위에 제시된 다른 성분 중 하나 이상과 혼합한 후 필터 멸균하여 제조할 수 있다. 멸균 주사 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 및 냉동 건조 기술이며, 이는 활성 성분의 분말과 이전에 멸균 여과된 용액에 존재하는 임의의 추가의 원하는 성분을 생성한다.
- [0260] 화합물의 유용한 투여량은 동물 모델에서 시험관 내 활성 및 생체 내 활성을 비교함으로써 결정할 수 있다. 마우스 및 다른 동물의 유효 복용량을 인간 대상으로 외삽하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 실제로, 화합물의 복용량은 대상체의 상태, 치료되는 암 유형, 병리가 얼마나 진행되었는지, 화합물의 투여 경로 및 조직 분포, 및 다른 요법적 치료(방사선 요법 또는 병용 요법에서의 추가 약물)의 공동 사용의 가능성에 따라 크게 다를 수 있다. 치료에 사용하기 위해 필요한 조성물 및/또는 화합물(들)의 양(예를 들어, 치료적 또는 예방적 유효량 또는 용량)은 특정 적용뿐만 아니라 선택된 염(해당되는 경우) 및 대상체의 특성(예를 들어, 대상체의 연령, 상태, 성별, 체표면적 및/또는 질량, 약물 내성)로 달라질 것이고, 궁극적으로 주치의, 임상의 또는 다른 사람의 재량을 따를 것이다. "치료적 유효량" 또는 "예방적 유효량"은 인코딩된 이중 항원에 특이적인 원하는 면역 반응을 유도하거나 (즉, 치료될 병태의 증상의 감소, 예방 또는 치료를 야기하기 위해) 대상체에서 이익을 나타내기에 충분한 시약 또는 약제학적 조성물의 양으로 정의된다.
- [0261] 다양한 구현예에서, 대상체에 투여되는 형질도입된 CAR-T 세포는 약 1×10^5 내지 약 1×10^{15} 또는 1×10^6 내지 약 1×10^{15} 개의 형질도입된 CAR-T 세포를 포함할 수 있다. 다양한 구현예에서, 약 1×10^5 내지 약 1×10^{10} , 약 1×10^6 내지 약 1×10^{10} , 약 1×10^6 내지 약 1×10^9 , 약 1×10^6 내지 약 1×10^8 , 약 1×10^6 내지 약 2×10^7 , 약 1×10^6 내지 약 3×10^7 , 약 1×10^6 내지 약 1.5×10^7 , 약 1×10^6 내지 약 1×10^7 , 약 1×10^6 내지 약 9×10^6 , 약 1×10^6 내지 약 8×10^6 , 약 1×10^6 내지 약 7×10^6 , 약 1×10^6 내지 약 6×10^6 , 약 1×10^6 내지 약 5×10^6 , 약 1×10^6 내지 약 4×10^6 , 약 1×10^6 내지 약 3×10^6 , 약 1×10^6 내지 약 2×10^6 , 약 2×10^6 내지 약 6×10^6 , 약 2×10^6 내지 약 5×10^6 , 약 3×10^6 내지 약 6×10^6 , 약 4×10^6 내지 약 6×10^6 , 약 4×10^6 내지 약 1×10^7 , 약 1×10^6 내지 약 1×10^7 , 약 1×10^6 내지 약 1.5×10^7 , 약 1×10^6 내지 약 2×10^7 , 약 0.2×10^6 내지 약 1×10^7 , 약 0.2×10^6 내지 약 1.5×10^7 , 약 0.2×10^6 내지 약 2×10^7 , 또는 약 5×10^6 개의 CAR-T 세포가 대상체에게 투여될 수 있다. 한 양태에서, 본원에 기재된 임의의 구현예에서, CAR-T 세포의 단일 용량 또는 다중 용량이 대상체에게 투여될 수 있다. 이 단락에 기재된 임의의 구현

예에서, CAR-T 세포 용량은 대상체 체중 kg당 CAR-T 세포의 수일 수 있다. 본원에 기재된 임의의 구현예에서, CAR-T 세포는 어댑터 화합물(들) 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염 전 또는 후에 투여될 수 있다.

[0262] 다른 구현예에서, CAR-T 세포 조성물 중 대상체에게 투여되는 CAR-T 세포의 용량은 약 1백만, 약 2백만, 약 3백만, 약 4백만, 약 5백만, 약 6백만, 약 7백만, 약 8백만, 약 9백만, 약 100만, 약 1100만, 약 1200만, 약 1250만, 약 1300만, 약 1400만, 및 약 1500만 개의 CAR-T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 이들 구현예에서, CAR-T 세포 용량은 대상체 체중 kg당 CAR-T 세포의 수일 수 있다.

[0263] 대상체에게 투여될 하나 이상의 어댑터 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 재생 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 면역억제 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 활성 변형 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염의 양은 치료되는 암, 하나 이상의 어댑터 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 재생 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염의 투여 경로, 및 조직 분포에 따라 상당히 달라질 수 있다.. 대상체에게 투여되는 양은 체표면적, 질량 및 의사 평가에 기초할 수 있다.

[0264] 다양한 구현예에서, 투여되는 양은 예를 들어, 약 0.05 mg 내지 약 30 mg, 0.05 mg 내지 약 25.0 mg, 약 0.05 mg 내지 약 20.0 mg, 약 0.05 mg 내지 약 15.0 mg, 약 0.05 mg 내지 약 10.0 mg, 약 0.05 mg 내지 약 9.0 mg, 약 0.05 mg 내지 약 8.0 mg, 약 0.05 mg 내지 약 7.0 mg, 약 0.05 mg 내지 약 6.0 mg, 약 0.05 mg 내지 약 5.0 mg, 약 0.05 mg 내지 약 4.0 mg, 약 0.05 mg 내지 약 3.0 mg, 약 0.05 mg 내지 약 2.0 mg, 약 0.05 mg 내지 약 1.0 mg, 약 0.05 mg 내지 약 0.5 mg, 약 0.05 mg 내지 약 0.4 mg, 약 0.05 mg 내지 약 0.3 mg, 약 0.05 mg 내지 약 0.2 mg, 약 0.05 mg 내지 약 0.1 mg, 약 0.01 mg 내지 약 2 mg, 약 0.3 mg 내지 약 10 mg, 약 0.1 mg 내지 약 20 mg, 또는 약 0.8 내지 약 3 mg의 범위일 수 있다. 당업자는 용량이 위에 언급된 인자에 기초하여 위에 제공된 다양한 범위 내에서 변할 수 있고 의사의 재량에 따라 달라질 수 있음을 쉽게 이해할 것이다.

[0265] 다른 구현예에서, 하나 이상의 어댑터 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 재생 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 면역억제 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 활성 변형 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염의 용량은, 예를 들어 약 50 nmol/kg 내지 약 3,000 nmol/대상체 체중 kg, 약 50 nmol/kg 내지 약 2,800 nmol/kg 약 50 nmol/kg 내지 약 2,600 nmol/kg 약 50 nmol/kg 내지 약 2,400 nmol/kg 약 50 nmol/kg 내지 약 2,200 nmol/kg 약 50 nmol/kg 내지 약 2,100 nmol/kg 약 50 nmol/kg 내지 약 2,000 nmol/kg, 약 50 nmol/kg 내지 약 1,000 nmol/kg, 약 50 nmol/kg 내지 약 900 nmol/kg, 약 50 nmol/kg 내지 약 800 nmol/kg, 약 50 nmol/kg 내지 약 700 nmol/kg, 약 50 nmol/kg 내지 약 600 nmol/kg, 약 50 nmol/kg 내지 약 500 nmol/kg, 약 50 nmol/kg 내지 약 400 nmol/kg, 약 50 nmol/kg 내지 약 300 nmol/kg, 약 50 nmol/kg 내지 약 200 nmol/kg, 약 50 nmol/kg 내지 약 100 nmol/kg, 약 100 nmol/kg 내지 약 300 nmol/kg, 약 100 nmol/kg 내지 약 500 nmol/kg, 약 100 nmol/kg 내지 약 1,000 nmol/kg, 약 100 nmol/kg 내지 약 2,000 nmol/대상체 체중 kg의 범위일 수 있다. 다른 구현예에서, 용량은 약 1 nmol/kg, 약 5 nmol/kg, 약 10 nmol/kg, 약 20 nmol/kg, 약 25 nmol/kg, 약 30 nmol/kg, 약 40 nmol/kg, 약 50 nmol/kg, 약 60 nmol/kg, 약 70 nmol/kg, 약 80 nmol/kg, 약 90 nmol/kg, 약 100 nmol/kg, 약 150 nmol/kg, 약 200 nmol/kg, 약 250 nmol/kg, 약 300 nmol/kg, 약 350 nmol/kg, 약 400 nmol/kg, 약 450 nmol/kg, 약 500 nmol/kg, 약 600 nmol/kg, 약 700 nmol/kg, 약 800 nmol/kg, 약 900 nmol/kg, 약 1000 nmol/kg, 약 2,000 nmol/kg, 약 2,500 nmol/kg 또는 약 3,000 nmol/대상체의 체중 kg일 수 있다. 또 다른 구현예에서, 용량은 약 0.1 nmol/kg, 약 0.2 nmol/kg, 약 0.3 nmol/kg, 약 0.4 nmol/kg, 또는 약 0.5 nmol/kg, 약 0.1 nmol/kg 내지 약 1000 nmol/kg, 약 0.1 nmol/kg 내지 약 900 nmol/kg, 약 0.1 nmol/kg 내지 약 850 nmol/kg, 약 0.1 nmol/kg 내지 약 800 nmol/kg, 약 0.1 nmol/kg 내지 약 700 nmol/kg, 약 0.1 nmol/kg 내지 약 600 nmol/kg, 약 0.1 nmol/kg 내지 약 500 nmol/kg, 약 0.1 nmol/kg 내지 약 400 nmol/kg, 약 0.1 nmol/kg 내지 약 300 nmol/kg, 약 0.1 nmol/kg 내지 약 200 nmol/kg, 약 0.1 nmol/kg 내지 약 100 nmol/kg, 약 0.1 nmol/kg 내지 약 50 nmol/kg, 약 0.1 nmol/kg 내지 약 10 nmol/kg, 또는 약 0.1 nmol/kg 내지 약 1 nmol/대상체의 체중 kg일 수 있다. 다른 구현예에서, 용량은 약 0.3 nmol/kg 내지 약 1000 nmol/kg, 약 0.3 nmol/kg 내지 약 900 nmol/kg, 약 0.3 nmol/kg 내지 약 850 nmol/kg, 약 0.3 nmol/kg 내지 약 800 nmol/kg, 약 0.3 nmol/kg 내지 약 700 nmol/kg, 약 0.3 nmol/kg 내지 약 600 nmol/kg, 약 0.3 nmol/kg 내지 약 500 nmol/kg, 약 0.3 nmol/kg 내지 약 400 nmol/kg, 약 0.3 nmol/kg 내지 약 300 nmol/kg, 약 0.3 nmol/kg 내지 약 200 nmol/kg, 약 0.3 nmol/kg 내지 약 100 nmol/kg, 약 0.3 nmol/kg 내지 약 50 nmol/kg, 약 0.3 nmol/kg 내지 약 10 nmol/kg, 또는 약 0.3 nmol/kg 내지 약 1 nmol/대상체의 체중 kg일 수 있다.

[0266] 다양한 다른 구현예에서, 하나 이상의 어댑터 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 재생 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 면역억제 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 활성

변형 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염의 용량은 예를 들어, 약 10 nmol/kg 내지 약 10,000 nmol/kg, from 약 10 nmol/kg 내지 약 5,000 nmol/kg, from 약 10 nmol/kg 내지 약 3,000 nmol/kg, 약 10 nmol/kg 내지 약 2,500 nmol/kg, 약 10 nmol/kg 내지 약 2,000 nmol/kg, 약 10 nmol/kg 내지 약 1,000 nmol/kg, 약 10 nmol/kg 내지 약 900 nmol/kg, 약 10 nmol/kg 내지 약 800 nmol/kg, 약 10 nmol/kg 내지 약 700 nmol/kg, 약 10 nmol/kg 내지 약 600 nmol/kg, 약 10 nmol/kg 내지 약 500 nmol/kg, 약 10 nmol/kg 내지 약 400 nmol/kg, 약 10 nmol/kg 내지 약 300 nmol/kg, 약 10 nmol/kg 내지 약 200 nmol/kg, 약 10 nmol/kg 내지 약 150 nmol/kg, 약 10 nmol/kg 내지 약 100 nmol/kg, 약 10 nmol/kg 내지 약 90 nmol/kg, 약 10 nmol/kg 내지 약 80 nmol/kg, 약 10 nmol/kg 내지 약 70 nmol/kg, 약 10 nmol/kg 내지 약 60 nmol/kg, 약 10 nmol/kg 내지 약 50 nmol/kg, 약 10 nmol/kg 내지 약 40 nmol/kg, 약 10 nmol/kg 내지 약 30 nmol/kg, 약 10 nmol/kg 내지 약 20 nmol/kg, 약 200 nmol/kg 내지 약 900 nmol/kg, 약 200 nmol/kg 내지 약 800 nmol/kg, 약 200 nmol/kg 내지 약 700 nmol/kg, 약 200 nmol/kg 내지 약 600 nmol/kg, 약 200 nmol/kg 내지 약 500 nmol/kg, 약 250 nmol/kg 내지 약 600 nmol/kg, 약 300 nmol/kg 내지 약 600 nmol/kg, 약 300 nmol/kg 내지 약 500 nmol/kg, 또는 약 400 nmol/kg 내지 약 600 nmol/kg 의 범위일 수 있다.

[0267] 다양한 다른 구현예에서, 하나 이상의 어댑터 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 재생 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 면역억제 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 활성 변형 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염의 용량은 예를 들어, 약 1 nmol/kg 내지 약 10,000 nmol/kg, from 약 1 nmol/kg 내지 약 5000 nmol/kg, from 약 1 nmol/kg 내지 약 3000 nmol/kg, 약 1 nmol/kg 내지 약 2500 nmol/kg, 약 1 nmol/kg 내지 약 2000 nmol/kg, 약 1 nmol/kg 내지 약 1000 nmol/kg, 약 1 nmol/kg 내지 약 900 nmol/kg, 약 1 nmol/kg 내지 약 800 nmol/kg, 약 1 nmol/kg 내지 약 700 nmol/kg, 약 1 nmol/kg 내지 약 600 nmol/kg, 약 1 nmol/kg 내지 약 500 nmol/kg, 약 1 nmol/kg 내지 약 400 nmol/kg, 약 1 nmol/kg 내지 약 300 nmol/kg, 약 1 nmol/kg 내지 약 200 nmol/kg, 약 1 nmol/kg 내지 약 150 nmol/kg, 약 1 nmol/kg 내지 약 100 nmol/kg, 약 1 nmol/kg 내지 약 90 nmol/kg, 약 1 nmol/kg 내지 약 80 nmol/kg, 약 1 nmol/kg 내지 약 70 nmol/kg, 약 1 nmol/kg 내지 약 60 nmol/kg, 약 1 nmol/kg 내지 약 50 nmol/kg, 약 1 nmol/kg 내지 약 40 nmol/kg, 약 1 nmol/kg 내지 약 30 nmol/kg, 또는 약 1 nmol/kg 내지 약 20 nmol/kg의 범위일 수 있다.

[0268] 또 다른 구현예에서, 어댑터 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 재생 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 면역억제 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 활성 변형 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염의 약 20 μ g/kg 체중 내지 약 3 mg/kg 체중이 대상체에게 투여될 수 있다. 또 다른 양태에서, 양은 약 0.2 mg/kg 체중 내지 약 0.4 mg/kg 체중일 수 있거나 약 50 μ g/kg 체중일 수 있다.

[0269] 달리 명시되지 않는 한, 본원에 기재된 모든 투여 구현예에서 "kg"은 대상체 체중의 킬로그램이다.

[0270] 하나 이상의 어댑터 화합물(들), 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 재생 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 면역억제 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 활성 변형 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염의 단일 용량 또는 다중 용량이 대상체에게 투여될 수 있다.

[0271] CAR-T 세포와 제1 표적화 모이어티에 연결된 소분자(즉, 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염)의 투여 사이의 타이밍은 사용되는 CAR-T 세포의 유형, CAR의 결합 특성, 제1 표적 모이어티 및 소분자 리간드의 동일성, 암의 동일성, 암 대상체에서의 위치, CAR-S 세포 및 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 대상체에게 투여하기 위해 사용되는 수단, 및 대상체의 건강, 연령 및 체중을 포함하는 인자에 따라 광범위하게 달라질 수 있다.

[0272] 적어도 하나의 구현예에서, 제1 표적화 모이어티에 연결된 소분자 리간드 (즉, 어댑터 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염)는 CAR-T 세포(또는 이의 조성물) 전 또는 후에, 예컨대 약 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 또는 51 시간 내에, 또는 약 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 초과 일 내에 투여될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 하나 이상의 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 CAR-T 세포 조성물과 동시에, 그러나 상이한 제형으로, 또는 동일한 제형으로 대상체에게 투여될 수 있다.

[0273] 당업계에 공지된 임의의 적용 가능한 투약 스케줄은 어댑터 화합물(들), 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 활성 변형 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염 (예를 들어, 재생 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 면역억제 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염)의 투여를 위해, 또는 CAR-T 세포 조성물을 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 1일 1회 투약(qd라고도 알려짐), 1일 2회 투약(bid라고도 알려짐), 1일 3회 투약(tid라고도 알려짐), 주당 2회 투약(BIW라고도 알려짐), 주당 3회 투약(TIW라고도 알려짐), 주 1회 투

약 등이 사용될 수 있다. 한 양태에서, 선택된 투여 스케줄은 CAR-T 세포 조성물의 세포독성을 조절하고 임의의 잠재적 유해 효과 (예를 들어, CRS)를 제어하기 위해 투여되는 화합물/조성물의 농도 (예컨대, 투여되는 CAR-T의 수 포함)를 고려할 수 있다.

[0274] 상기 구현예 중 임의의 것의 시스템을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 CAR-T 세포의 활성을 변형함으로써 암 치료를 촉진하고/하거나 암 세포를 사멸시키는 방법이 또한 제공된다.

[0275] 일부 구현예에서, 본원에 제시된 임의의 화합물 및 조성물을 사용하여 암을 치료하는 방법이 제공된다. 본원에 기재된 방법에서, 암은 어댑터 화합물(들), 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 또는 CAR-T 세포 조성물을 대상체에게 투여하기 전에 추가로 영상화될 수 있다. 예를 들어, 영상화는 양전자 방출 단층촬영 (PET) 영상화, 자기 공명 영상 (MRI), 또는 단일-광자-방출 컴퓨터 단층촬영 (SPECT)/컴퓨터 단층촬영 (CT) 영상화에 의해 일어날 수 있다. 영상화 방법은 당업계에 공지된 임의의 적합한 영상화 방법일 수 있다. 한 구현예에서, 영상화 방법은 본원에 기재된 소분자 리간드(예를 들어, 어댑터 화합물 또는 그의 염)의 사용을 수반할 수 있지만, 본원에 기재된 영상화 유형에 적합한 조영제에 연결된다.

[0276] 적어도 하나의 구현예에서, CAR-T 세포의 활성을 변형시키는 (예를 들어, 암을 치료하는) 방법은 제1 표적화 모이어티, 제2 표적화 모이어티, 또는 제1 및 제2 표적화 모이어티 둘 모두에 대해 지시된 CAR을 포함하는 CAR-T 세포를 대상체에게 투여하는 단계; 하나 이상의 어댑터 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 대상체에게 투여하는 단계로서, 각각의 어댑터 화합물은 제1 표적화 모이어티에 연결된 소분자 리간드를 포함하는 단계; 및 제2 표적화 모이어티에 연결된 활성 변형 화합물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0277] 특정 구현예에서, CAR-T 세포의 활성을 변형시키고/시키거나 암을 치료하는 방법은 제1 표적화 모이어티, 제2 표적화 모이어티 또는 제1 및 제2 표적화 모이어티 둘 모두에 대해 지시된 CAR을 인코딩하는 핵산 서열에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함하는 벡터를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계로서, 투여 단계 전, 동안 또는 후에 대상체는 하나 이상의 어댑터 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염의 용량을 받았거나 받고, 각각의 어댑터 화합물은 제1 표적화 모이어티에 연결된 소분자 리간드를 포함하는 단계를 포함한다. 추가로, 일부 구현예에서, 벡터 조성물의 투여 단계 전, 동안 또는 후에, 대상체는 제2 표적화 모이어티에 연결된 활성 변형 화합물의 용량을 받았거나 받는다.

[0278] 이러한 벡터 조성물은 본원에 기재된 적어도 CAR을 인코딩하는 핵산 벡터를 포함하는 벡터(예를 들어, 벡터를 포함하는 렌티바이러스 입자)를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 벡터 조성물은 임의의 상기 구현예에 따른 치료적 유효량의 렌티바이러스 입자를 포함한다.

[0279] 벡터 조성물은 경구, 비강, 정맥내, 동맥내, 근육내 또는 복강내 경로를 포함하는 임의의 경로에 의해 투여될 수 있다. 일부 경우에, 벡터 조성물은 정맥내 주사 또는 종양내 주사에 의해 투여된다.

[0280] 하나 이상의 어댑터 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염 각각은 제1 링커를 통해 제1 표적화 모이어티에 연결될 수 있고, 활성 변형 화합물은 제2 링커를 통해 제2 표적화 모이어티에 연결될 수 있다. 제1 및 제2 링커는 본원에 기재된 임의의 링커를 포함할 수 있고 동일하거나 상이한 구조를 가질 수 있다. 유사하게, 제1 및 제2 표적화 모이어티는 본원에 기재된 임의의 표적화 모이어티를 포함할 수 있고 동일하거나 상이한 구조를 가질 수 있다. 또 다른 구현예에서, 제1 및 제2 표적화 모이어티는 동일한 구조를 갖는 반면, 제1 및 제2 링커는 동일하거나 상이한 구조를 갖는다. 추가로, 활성 변형 화합물은 예를 들어 재생 화합물 또는 면역억제 화합물을 포함하는 본원에 기재된 임의의 활성 변형 화합물을 포함할 수 있다.

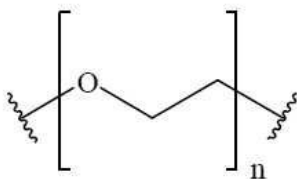
[0281] "암"은 명세서에 비추어 읽을 때 명백하고 통상적인 의미를 가지며 신체의 다른 부분을 침범하거나 퍼질 가능성이 있는 비정상적인 세포 성장을 수반하는 질환 그룹을 포함할 수 있지만 이에 국한되지 않는다. 다수의 유형의 암은 암종, 육종, 골육종, 림프종, 흑색종, 중피종, 비인두 암종, 백혈병, 선암종, 및 골수종을 제한없이 포함하여 본원에 기재된 조성물, 화합물, 및 방법을 사용하여 치료될 수 있다. 방법에 따라 및/또는 본 발명의 화합물 및 조성물을 사용하여 치료될 수 있는 암의 다른, 아마도 더 구체적인 예는 폐암 (비-소세포 폐암을 제한없이 포함함), 골암 (골육종을 제한없이 포함함), 췌장암, 피부암 (피부 흑색종을 제한없이 포함함), 두부의 암, 경부의 암, 안구내 흑색종, 자궁암, 난소암, 자궁내막 암, 직장암, 위장암, 결장암, 유방암, 삼중 음성 유방암, 나팔관의 암종, 자궁경부의 암종, 질의 암종, 외음부의 암종, 호지킨 질환, 식도의 암, 소장의 암, 내분비계의 암, 갑상선의 암, 부갑상선의 암, 부신의 암, 연조직의 육종, 요도의 암, 전립선암, 백혈병 (만성 백혈병, 급성 백혈병, 급성 골수구성 백혈병, 림프구성 림프종, 골수성 백혈병, 골수단핵구성 백혈병, 및 모발 세포 백혈병을 제한없이 포함함), 늑막 중피종, 방광의 암, 버킷 림프종, 요관의 암, 신장의 암 (신장 세포 암종을 제한없이

포함함), 신우의 암종, 중추신경계 (CNS)의 신생물, 원발성 CNS 림프종, 척추 종양, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종, 및 위식도 접합부의 선암종을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0282] 이들 구현예의 일부 양태에서, 암은 폴레이트 수용체를 발현하는 암, 예를 들어 이에 제한되지 않는 폴레이트 수용체 α -발현 암이다. 다른 구현예에서, 암은 폴레이트 수용체 β -발현 암이다. 이들 구현예의 일부 양태에서, 암은 자궁내막암, 비-소세포 폐암, 난소암, 또는 삼중-음성 유방암이다.

[0283] 치료 중인 암은 종양일 수 있다. 또 다른 구현예에서, 암은 악성일 수 있다. 또 다른 구현예에서, 암은 예를 들어 암이 폴레이트 수용체- β 를 발현하는 급성 골수구성 백혈병과 같은 급성 골수구성 백혈병이다.

[0284] CAR-T 세포의 활성을 변형시키고/시키거나 암을 치료하는 방법의 특정 구현예는 CAR-T 세포를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계로서, CAR-T 세포는 제1 표적화 모이어티, 제2 표적화 모이어티, 또는 제1 및 제2 표적화 모이어티 둘 모두에 대해 지시된 CAR을 포함하는 단계; 및 하나 이상의 어댑터 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 대상체에게 투여하는 단계로서, 각각의 어댑터 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 제1 링커를 통해 제1 표적화 모이어티에 연결된 소분자 리간드를 포함하고, 제1 링커는 하기 화학식을 갖는 구조를 포함하는 단계를 포함한다:

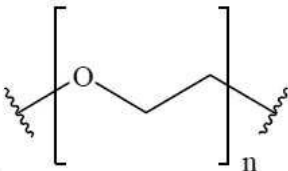


[0285]

[0286] 여기서 n은 0 내지 200의 정수이다.

[0287] 적어도 하나의 구현예에서, 방법은 (예를 들어, 제2 링커를 통해 또는 직접) 제2 표적화 모이어티에 연결된 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 대상체에게 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 구현예에서, 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 예를 들어 TLR 효능제 (예를 들어, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR7/8, TLR9, 등의 효능제), STING 효능제, NLR, ALR 효능제, 키나제 억제제 표적화 키나제, RLR, RAGE, 포스파타제 억제제, 및 표적화된 세포의 엔도솜 또는 세포질에 위치한 임의의 다른 패턴 인식 수용체를 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다.

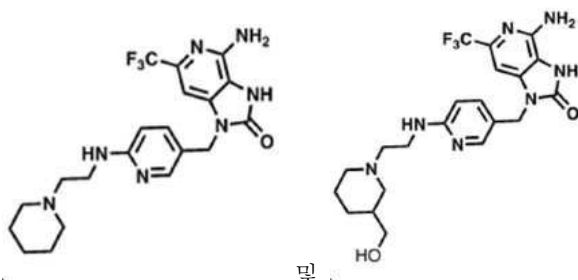
[0288] 추가로, 제2 링커는 하기 화학식을 갖는 구조를 포함할 수 있다:



[0289]

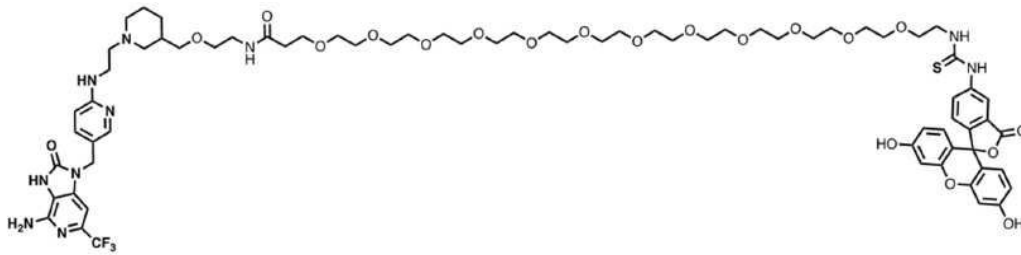
[0290] 여기서 n은 0 내지 200의 정수이다.

[0291] 암을 치료하는 방법의 적어도 하나의 예시적 구현예에서, 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 하기 화학식 중 하나의 구조를 갖는 TLR 효능제 (예를 들어, TLR 7, TLR7/8, 또는 TLR8)이다:



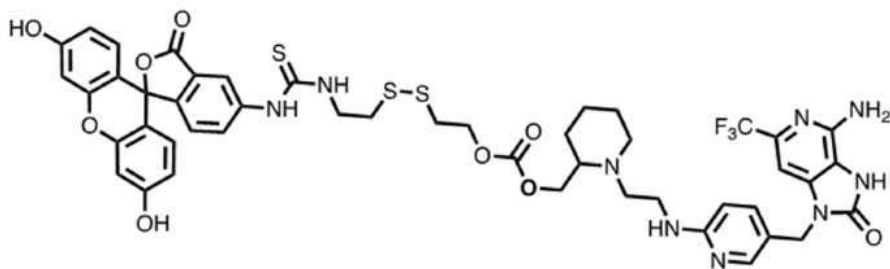
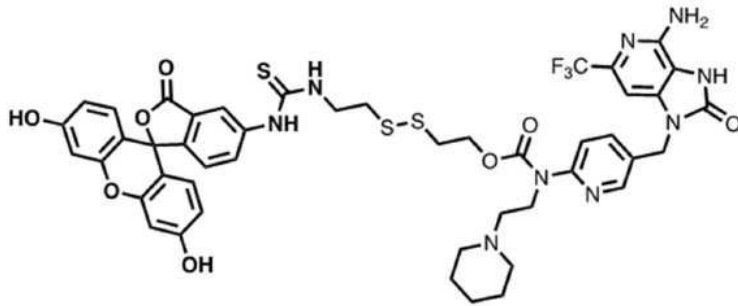
[0292]

[0293] 특정 다른 구현예에서, 재생 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염은 하기 화학식을 갖는다:

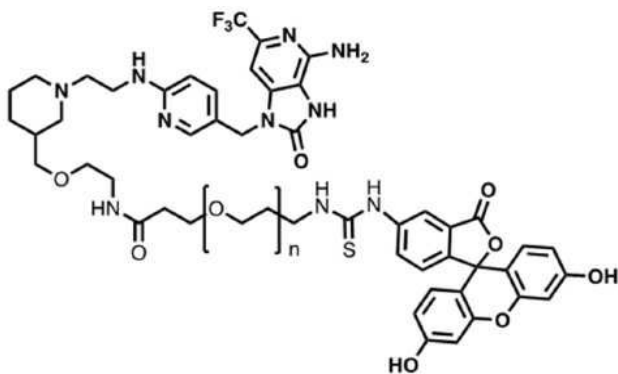


[0294]

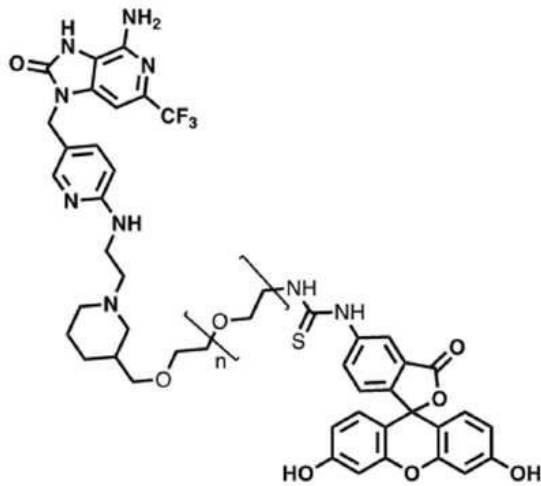
[0295] 이러한 방법의 다른 구현예에서, 재생 화합물은 하기 화학식 중 하나의 구조를 갖는다:



[0296]



[0297] 여기서 $n = 0$ 내지 200 , 그리고



여기서 $n = 0$ 내지 50.

- [0298] CAR-T 세포 요법을 받은 대상체를 치료하는 방법이 또한 제공된다. 특정 구현예에서, 이러한 방법은 하나 이상의 어댑터 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염으로서, 이들 각각이 제1 표적화 모이어티에 연결된 소분자 리간드를 포함하는 하나 이상의 어댑터 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 여기서, 투여 단계 전에, 대상체는 제1 표적화 모이어티를 인식하고 그에 결합하는 CAR을 발현하는 CAR-T 세포의 용량을 받았다. 일부 구현예에서, 방법은 제2 표적화 모이어티에 연결된 활성 변형 화합물을 대상체에게 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다. CAR-T 세포는 본원에 기재된 CAR(예를 들어, 제1 표적화 모이어티, 제2 표적화 모이어티, 또는 제1 및 제2 표적화 모이어티 둘 모두를 인식하고 그에 결합하는 CAR)의 구현예 중 하나 이상을 발현할 수 있다. 이러한 방법의 하나 이상의 어댑터 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 및 활성 변형 화합물은 본원에 기재된 임의의 구현예를 포함할 수 있다.
- [0299] 본원에 기재된 임의의 구현예에서, 암에 대한 CAR-T 세포 독성이 발생하더라도 대상체에서 표적의 독성을 조절하는 사이토카인 방출이 발생하지 않을 수 있다. 본원에 기재된 임의의 구현예에서, 암에 대한 CAR-T 세포 독성이 발생하더라도 표적외 조직 독성이 대상체에서 발생하지 않을 수 있다. 본원에 기재된 임의의 구현예에서, 암은 종양을 포함할 수 있고, 표적의 독성이 발생하지 않더라도 대상체에서 종양 크기가 감소될 수 있다.
- [0300] 본원에 기재된 임의의 구현예에서, CRS는 감소되거나 예방될 수 있고 방법은 대상체에서 종양 부피의 감소를 초래할 수 있다. 본원에 기재된 임의의 구현예에서, CRS로 인한 체중 감소는 감소되거나 예방될 수 있다. 본원에 기재된 임의의 구현예에서, 암은 종양을 포함할 수 있고 종양에 대한 완전한 반응이 얻어질 수 있다.
- [0301] 화합물, 조성물, 조합물 및 방법에서, 어댑터 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 활성 변형 화합물, CAR-T 세포 조성물, 및 벡터 조성물의 모든 구현예는 적용가능하지만, 표적화 모이어티 구현예 및 링커 구현예를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0302] 명세서에 언급된 모든 특허, 특허 출원 공개, 저널 기사, 교과서 및 다른 간행물은 본 개시내용이 속하는 당업자의 기술 수준을 나타낸다. 이러한 모든 간행물은 각각의 개별 공보가 참조로 포함되는 것으로 구체적이고 개별적으로 표시된 것처럼 동일한 정도로 참조로 본원에 포함된다.
- [0303] 다음 설명에서, 본 개시내용의 완전한 이해를 제공하기 위해 다수의 특정 세부사항이 제시된다. 특정한 예는 이들 특정한 세부사항 중 일부 또는 전부 없이 실시될 수 있고, 본 개시내용은 특정한 생물학적 시스템, 특정한 암, 또는 특정한 기관 또는 조직으로 제한되지 않으며, 이는 물론 달라질 수 있지만 본원에 제공된 데이터의 관점에서 적용가능한 채로 남아 있는 것으로 이해되어야 한다.
- [0304] 추가적으로, 본 개시물의 다양한 기술들 및 메커니즘은 때때로 2개의 성분 사이의 연결 또는 링크를 설명한다. 단어, 예컨대 부착, 링크, 커플링, 연결 및 이들의 변형 형태와 유사한 용어는, 그 차이가 언급되거나 문맥으로부터 달리 명확하지 않는 한, 상호교환적으로 사용된다. 이러한 단어와 표현은 반드시 직접적인 연결을 의미하는 것은 아니지만 매개 성분을 통한 연결을 포함한다. 다양한 다른 성분이 주목되는 두 성분 사이에 존재할 수 있기 때문에, 두 성분 사이의 연결은 반드시 직접적이고 방해받지 않는 연결을 의미하는 것은 아님을 주목해야 한다. 결과적으로, 연결이 달리 명시되지 않는 한 직접적이고 방해받지 않는 연결을 의미하지는 않는다.
- [0305] 또한, 본 개시내용은 단지 설명의 목적을 위해 이러한 방식으로 제시되며, 본원에 기재된 원리 및 구현예는 본 명세서에 구체적으로 기재된 것과 다른 구성을 갖는 화합물 및/또는 조성물 성분에 적용될 수 있음이 이해될 것

이다. 실제로, 본 개시내용의 조성물 및 화합물의 성분은 그의 원하는 적용을 진척하기 위해 조정될 수 있음이 명시적으로 고려된다.

[0306] 달리 정의되지 않는 한, 여기에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 화학적 및 생물학적 기술의 숙련자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 물질이 본원의 주제의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 재료가 본 명세서에 기재되어 있다. 또한, 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 바와 같이, 단수형 "a", "an" 및 "the"는 내용이 달리 명백하게 지시하지 않는 한 복수의 지시 대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, 화합물/조성물이 "하나의" 알킬 또는 아릴로 치환되는 경우, 화합물/조성물은 적어도 하나의 알킬 및/또는 적어도 하나의 아릴로 선택적으로 치환된다.

[0307] 범위가 분자량과 같은 물리적 특성, 또는 화학식과 같은 화학적 특성에 대해 본원에서 사용되는 경우, 범위 및 그 안의 특정 구현예의 모든 조합 및 하위 조합이 포함되는 것으로 의도된다.

[0308] 또한 "약"이라는 용어는 숫자 또는 수치 또는 범위(예를 들어, 정수, 분수 및 백분율 포함)를 언급할 때, 언급된 숫자 또는 수치 범위가 실험적 가변성(또는 통계적 실험 오차 내에서) 내의 근사치이고, 따라서 수치 또는 범위는 명시된 수치 또는 수치 범위의 1% 내지 15%에서 달라질 수 있고(예를 들어, 인용된 값의 +/- 5 % 내지 15%), 단, 당업자는 인용된 값과 동등한 것으로 간주될 것이다(예를 들어, 동일한 기능 또는 결과를 가짐). 용어 "포함하는" (및 "포함한다(comprise)" 또는 "포함한다(comprises)" 또는 "갖는" 또는 "포함하는(including)"과 같은 관련 용어)은 다른 특정 구현예에서, 예를 들어 본원에 기재된 임의의 화합물, 물질의 조성물, 조성물, 방법 또는 공정 등의 구현예가 기재된 특색으로 "구성될" 수 있거나 또는 "본질적으로 이루어질" 수 있음을 배제하는 것으로 의도되지 않는다. "실질적으로"라는 용어는 값 또는 범위, 예를 들어 명시된 값 또는 범위의 명시된 한계의 90% 이내, 95% 이내, 또는 99% 이내의 가변성 정도를 허용할 수 있다.

[0309] 요법의 방법이 하나 초과와 치료, 화합물 또는 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 경우에, 투여의 순서, 시기, 수, 농도 및 부피는 단지 의학적인 요건 및 치료 제한에 의해서만 제한되는 것으로 이해될 것이다 (즉, 2종의 치료는 대상체에게, 예를 들어 동시에, 연속적으로, 순차적으로, 대안적으로, 또는 임의의 다른 요법에 따라 투여될 수 있음).

[0310] 또한, 대표적인 구현예를 기재함에 있어서, 본 개시내용은 방법 및/또는 공정을 특정 순서의 단계로서 제시할 수 있다. 방법 또는 공정이 본원에 기재된 특정 순서의 단계에 의존하지 않는 한, 방법 또는 공정은 설명된 특정 순서의 단계로 제한되어서는 안 된다. 당업자가 이해할 수 있는 바와 같이, 단계의 다른 순서가 가능할 수 있다. 따라서, 본원에 개시된 단계의 특정 순서는 청구범위에 대한 제한으로 해석되어서는 안 된다. 또한, 방법 및/또는 공정에 대한 청구항은 기재된 순서대로 단계의 수행으로 제한되어서는 안 되며, 당업자는 서열이 다양할 수 있고 여전히 본 개시내용의 사상 및 범위 내에 있다는 것을 용이하게 인식할 수 있다.

[0311] 따라서, 이 설명 및 첨부된 청구범위는 본 개시내용에 기초하여 당업자에게 명백한 모든 수정 및 변경을 포함하도록 의도된다.

[0312] 실시예

[0313] 하기 실시예는 본 개시내용의 특정 구현예를 예시하고 청구된 발명의 범위를 어떤 식으로든 제한하려는 것이 아니다.

[0314] 실시예 1

[0315] FITC-폴레이트의 합성

[0316]

[0317]

[0318]

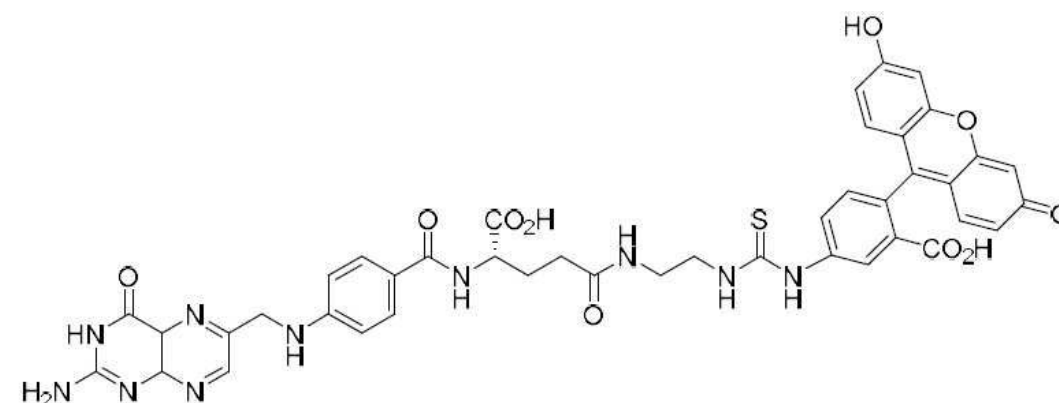
[0319]

[0320]

[0321]

[0322]

[0323]

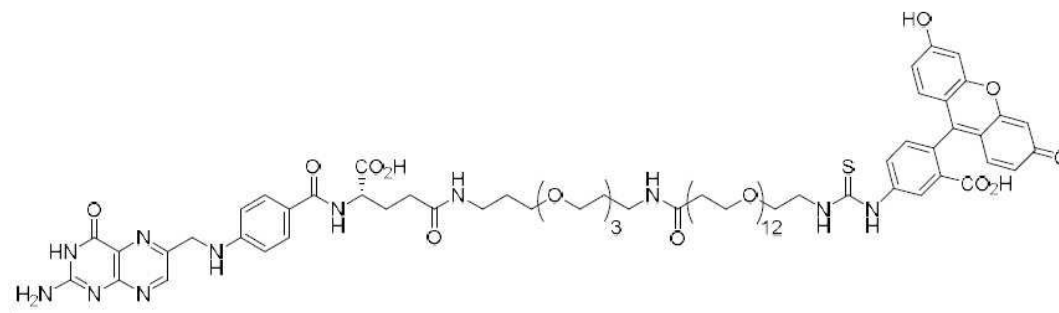


폴레이트- γ -에틸렌디아민은 테트라메틸구아니딘 및 디이소프로필아민의 존재 하에 무수 디메틸설폭시드(DMF)에서 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC) 이성질체 I(Sigma-Aldrich)에 커플링되었다. 미정제 생성물을 Xterra RP18 분취용 HPLC 컬럼(Waters)에 로딩하고 99% 5 mM 인산나트륨(이동상 A, pH 7.4) 및 1% 아세트니트릴(이동상 B)로 시작하여 20 mL/분의 유속으로 10분 내에 90% A 및 10% B에 도달하는 구배 조건으로 용출하였다.

이러한 조건 하에 FITC-폴레이트 주요 피크는 일반적으로 27 내지 50분에 용출된다. FITC-폴레이트 분획의 품질은 UV 검출기가 있는 분석적 역상 HPLC에 의해 모니터링되었다. 98.0% 초과 순도(LCMS)를 갖는 분획을 동결건조하여 최종 FITC-폴레이트 생성물을 얻었다. 당업계에서 공지된 바와 같이, 이러한 구조를 갖는 화합물은 EC17로도 지칭된다.

실시예 2

FITC-PEG12-폴레이트의 합성



범용 폴리에틸렌 글리콜(PEG) Nova TagTM 수지(0.2 g)를 펩타이드 합성 용기에 로딩하고 이소프로필 알코올(*i*-PrOH)(3 x 10 mL) 및 디메틸포름아미드(DMF, 3 x 10 mL)로 세척하였다. 9-플루오레닐메톡시카보닐(Fmoc) 탈보호를 DMF(3 x 10 mL) 중 20% 피페리딘을 사용하여 수행하였다. 반응 진행을 평가하기 위해 카이저(Kaiser) 테스트를 수행하였다. 그 다음 DMF, N,N-디이소프로필에틸아민(*i*-Pr₂NEt)(4 당량), 및 벤조트리아졸-1-일-옥시트리피롤리디노포스포늄 헥사플루오로포스페이트(PyBOP)(2 당량) 중 Fmoc-L-글루탐산 5-tert-부틸 에스테르(Fmoc-Glu-(O-*t*-Bu)-OH)(23.5 mg)의 용액을 용기에 도입하였다. Fmoc 탈보호를 DMF(3 x 10 mL) 중 20% 피페리딘을 사용하여 수행하였다. 그 다음 N¹⁰-TFA-Pte-OH(22.5mg), DMF, *i*-Pr₂NEt(4 당량) 및 PyBOP(2 당량)의 용액을 용기에 도입하였다. 아르곤을 2시간 동안 버블링하고, 수지를 DMF(3 x 3 mL) 및 *i*-PrOH(3 x 3 mL)로 세척하였다. 디클로로메탄(DCM) 중 수지를 팽윤시킨 후, DCM/트리플루오로에탄(TFE)(1:1)(2 x 3 mL) 중 1M 하이드록시벤조트리아졸(HOBT) 용액을 첨가하였다. 아르곤을 1시간 동안 버블링하고, 용매를 제거하고, 수지를 DMF(3 x 3 mL) 및 *i*-PrOH(3 x 3 mL)로 세척하였다. DMF 중의 수지를 팽윤시킨 후, DMF, *i*-Pr₂NEt(4 당량), 및 PyBOP(2 당량) 중의 Fmoc-NH-(PEG)₁₂-COOH(46.3 mg)의 용액을 첨가하였다. 아르곤을 2시간 동안 버블링하고, 수지를 DMF(3 x 3 mL) 및 *i*-PrOH(3 x 3 mL)로 세척하였다.

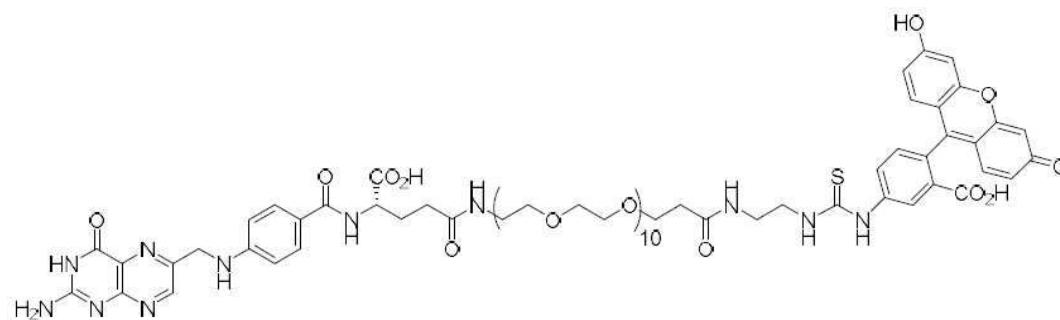
Fmoc 탈보호를 DMF(3 x 10 mL) 중 20% 피페리딘을 사용하여 수행하였다. 반응 진행을 평가하기 위해 카이저

(Kaiser) 테스트를 수행하였다.

[0324] DMF 및 *i*-Pr₂NEt(4 당량) 중 FITC(Life Technologies 21.4 mg)의 용액을 용기에 도입한 다음, 아르곤을 2시간 동안 버블링하고, 수지를 DMF(3 x 3 mL) 및 *i*-Pr₂NEt -PrOH(3 x 3 mL)로 세척하였다. 그 다음 용기에 DMF 중 2% NH₂NH₂(2 x 2mL)를 첨가하였다. TFA:H₂O: 트리이소프로필실란 (TIS) (95:2.5:2.5) (절단 용액)을 사용하여 최종 화합물을 수지로부터 절단하고 진공 하에 농축시켰다. 농축 생성물을 Et₂O에 침전시키고 진공 하에 건조시켰다. 미정제 생성물을 분취용 RP-HPLC(이동상: A = 10 mM 암모늄 아세테이트 pH = 7, B = ACN; 방법: 13 mL/분에서 30분 내 0% B에서 30% B)를 사용하여 정제하였다. 순수한 분획을 모으고 냉동 건조하여 FITC-PEG12-폴레이트를 제공하였다.

[0325] 실시예 3

[0326] FITC-PEG20-폴레이트의 합성



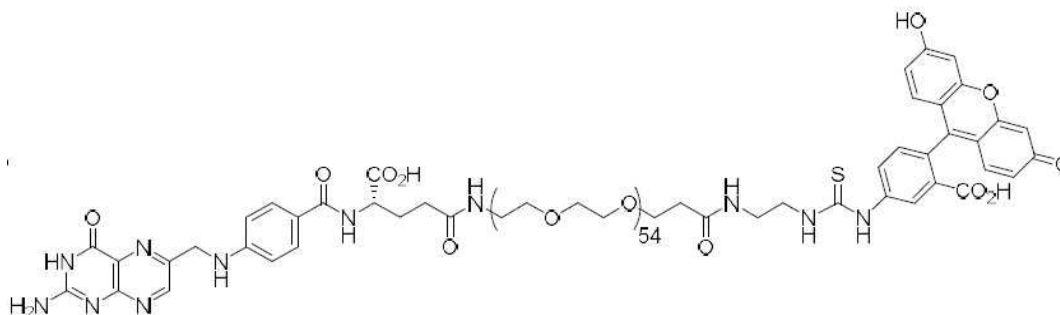
[0327]

[0328] 에틸렌디아민, 중합체 결합(200 내지 400 메쉬)-수지(50 mg)를 펩티드 합성 용기에 로딩하고 DCM(3 mL), 그 다음 DMF(3 mL)로 팽윤시켰다. 그 다음 용기에 DMF 중 Fmoc-PEG₂₀-COOH 용액 (131 mg, 1.0 당량), *i*-Pr₂NEt (6.0 당량), 및 PyBOP (4.0 당량)을 도입하였다. 아르곤을 6시간 동안 버블링하고, 커플링 용액을 배수하고, 수지를 DMF(3 x 10 mL) 및 *i*-PrOH(3 x 10 mL)로 세척하였다. 반응 진행을 평가하기 위해 카이저(Kaiser) 테스트를 수행하였다. 각 아미노산 커플링 전에 DMF(3 x 10 mL) 중 20% 피페리딘을 사용하여 Fmoc 탈보호를 수행되었다. Fmoc-Glu-OtBu(72 mg, 2.0 당량) 및 Tfa.프테로익산(41 mg, 1.2 당량) 커플링 단계와의 반응을 완료하기 위해 위의 순서를 반복하였다. 수지를 DMF 중 2% 히드라진 3 x 10 mL(5분)로 세척하여 프테로익산 상의 트리플루오로-아세틸 보호기를 절단하고 *i*-PrOH(3 x 10 mL) 그 다음 DMF(3 x 10 mL)로 세척하였다. 수지를 아르곤 하에 30 분 동안 건조시켰다. 절단 용액을 사용하여 폴레이트-펩티드를 수지로부터 절단하였다. 10 mL의 절단 혼합물을 도입하고 아르곤을 1.5시간 동안 버블링하였다. 절단 혼합물을 깨끗한 플라스크로 배수시켰다. 수지를 더 많은 절단 혼합물로 3회 세척하였다. 조합 혼합물을 감압 하에 더 작은 부피(~ 5 mL)로 농축하고 에틸 에테르에서 침전시켰다.

[0329] 침전물을 원심분리에 의해 수집하고, 에틸 에테르로 세척하고(3회) 고진공 하에 건조시켰다. 건조된 폴레이트-PEG₂₀-EDA(1.0 당량)를 실온에서 DMSO 및 DIPEA 중 FITC(50 mg, 1.5 당량)로 처리하였다. 반응의 진행을 LCMS에 의해 모니터링하였다. 8시간 후 출발 물질을 소비하여 생성물을 얻었다. 미정제 반응 혼합물을 분취용 HPLC(이동상 A = 10 mM 암모늄 아세테이트, pH = 7; 유기상 B = 아세트ونی트릴; 방법: 13 mL/분에서 35분 내에 0% B 내지 30% B)로 정제하고 60% 수율로 FITC-PEG20-폴레이트를 제공하였다.

[0330] 실시예 4

[0331] FITC-PEG108-폴레이트의 합성



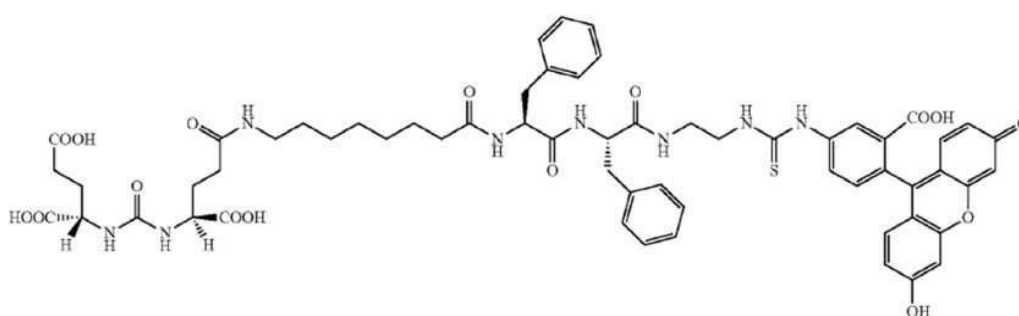
[0332]

[0333] 에틸렌디아민, 중합체 결합(200 내지 400 메쉬)-수지(50mg)를 펩티드 합성 용기에 로딩하고 DCM(3 mL), 그 다음 DMF(3 mL)로 팽윤시켰다. 그 다음 용기에 DMF 중 Fmoc-PEG₃₆-COOH 용액 (161 mg, 1.0 당량), *i*-Pr₂NEt (6.0 당량), 및 PyBOP (4.0 당량)을 도입하였다. 아르곤을 6시간 동안 버블링하고, 커플링 용액을 배수하고, 수지를 DMF(3 x 10 mL) 및 *i*-PrOH(3 x 10 mL)로 세척하였다. 반응 진행을 평가하기 위해 카이저(Kaiser) 테스트를 수행하였다. 각 아미노산 커플링 전에 DMF(3 x 10 mL) 중 20% 피페리딘을 사용하여 Fmoc 탈보호를 수행되었다. 2X Fmoc-PEG₃₆-COOH (161 mg, 1.0 당량), Fmoc-Glu-OtBu(72 mg, 2.0 당량) 및 Tfa.프테로익산(41 mg, 1.2 당량) 커플링 단계와의 반응을 완료하기 위해 위의 순서를 반복하였다. 마지막에 수지를 DMF 중 2% 히드라진 3 x 10 mL(5분)로 세척하여 프테로익산 상의 트리플루오로-아세틸 보호기를 절단하고 *i*-PrOH(3 x 10 mL) 그 다음 DMF(3 x 10 mL)로 세척하였다. 수지를 아르곤 하에 30분 동안 건조시켰다. 절단 용액을 사용하여 폴레이트-펩티드를 수지로부터 절단하였다. 10 mL의 절단 혼합물을 도입하고 아르곤을 1.5시간 동안 버블링하였다. 절단 혼합물을 깨끗한 플라스크로 배수시켰다. 수지를 더 많은 절단 용액으로 3회 세척하였다. 조합 혼합물을 감압 하에 더 작은 부피(~ 5 mL)로 농축하고 에틸 에테르에서 침전시켰다.

[0334] 침전물을 원심분리에 의해 수집하고, 에틸 에테르로 세척하고(3회) 고진공 하에 건조시켰다. 건조된 폴레이트-PEG₁₀₈-EDA(1.0 당량)를 실온에서 DMSO 및 DIPEA 중 FITC(50 mg, 1.5 당량)로 처리하였다. 반응 진행을 LCMS로 모니터링하였다. 10시간 후 출발 물질을 소비하여 생성물을 얻었다. 미정제 반응 혼합물을 분취용 HPLC(이동상 A = 10 mM 암모늄 아세테이트, pH = 7; 유기상 B = 아세트ونی트릴; 방법: 13 mL/분에서 35분 내에 0% B 내지 30% B)로 정제하고 64% 수율로 FITC-PEG108-폴레이트를 제공하였다.

[0335] 실시예 5

[0336] FITC-DUPA의 합성



[0337]

[0338] 다음과 같이 고상 방법론에 의해 DUPA-FITC를 합성하였다. 범용 Nova TagTM 수지(50 mg, 0.53mM)를 DCM(3 mL)에 이어 DMF 3 mL로 팽윤시켰다. DMF 중 20% 피페리딘 용액(3 x 3 mL)을 수지에 첨가하고 아르곤을 5분 동안 버블링하였다. 수지를 DMF(3 x 3 mL) 및 이소프로필 알코올(*i*-PrOH, 3 x 3 mL)로 세척하였다. DMF 중의 수지를 팽윤시킨 후, DMF 중의 DUPA-(OtBu)-OH(1.5 당량), HATU(2.5 당량) 및 *i*-Pr₂NEt(4.0 당량)의 용액을 첨가하였다. 아르곤을 2시간 동안 버블링하고, 수지를 DMF(3 x 3mL) 및 *i*-PrOH(3 x 3mL)로 세척하였다.

[0339] DMF 중의 수지를 팽윤시킨 후, DCM/TFE(1:1)(2 x 3 mL) 중 1M HOBt의 용액을 첨가하였다. 아르곤을 1시간 동안 버블링하고, 용매를 제거하고, 수지를 DMF(3 x 3 mL) 및 *i*-PrOH(3 x 3 mL)로 세척하였다. DMF 중의 수지를 팽윤시킨 후, DMF 중의 Fmoc-Phe-OH(2.5 당량), HATU(2.5 당량) 및 DIPEA(4.0 당량)의 용액을 첨가하였다. 아르

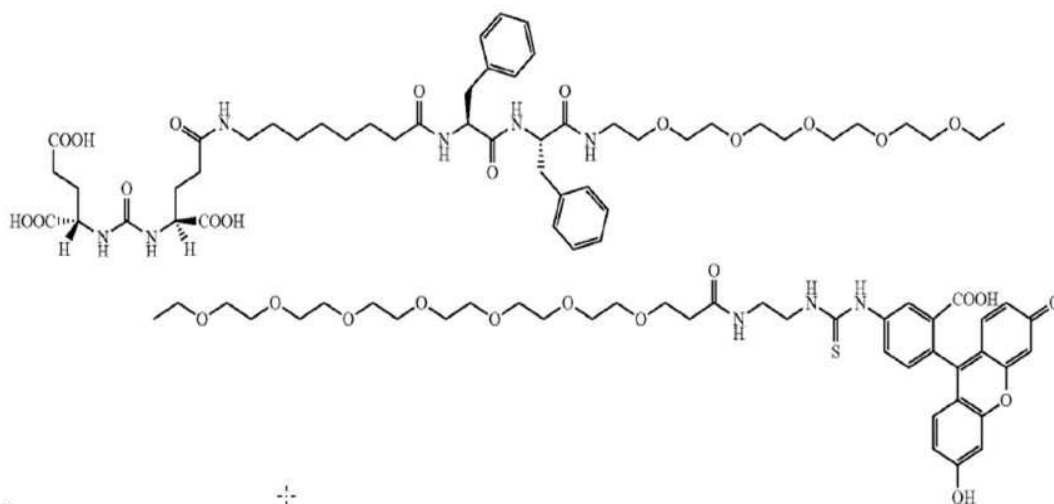
곤을 2시간 동안 버블링하고, 수지를 DMF(3 x 3 mL) 및 *i*-PrOH(3 x 3 mL)로 세척하였다.

[0340] 8-아미노옥탄산 및 플루오레세인 이소티오시아네이트 또는 로다민 B 이소티오시아네이트의 첨가를 위한 2개 초과
 [0341] 과의 커플링 단계에 대해 상기 순서를 반복하였다.

절단 용액을 사용하여 최종 화합물을 수지로부터 절단하고 진공 하에 농축시켰다. 농축 생성물을 디에틸 에테르
 에서 침전시키고 진공 하에 건조시켰다. 미정제 생성물을 분취용 RP-HPLC($\lambda = 488 \text{ nm}$; 용매 구배: 25분 내 1%
 B 내지 80% B, 80% B 세척, 30분 실행; A = 10 mM NH_4OAc , pH = 7; B = 아세토니트릴(ACN))을 사용하여 정제하
 였다. ACN을 진공 하에 제거하고 정제된 분획을 냉동 건조하여 갈색-오렌지색 고체로 FITC-DUPA를 얻었다. RP-
 HPLC: $t_R = 8.0$ 분 (A = 10 mM NH_4OAc , pH = 7.0; B = ACN, 용매 구배: 10분 내에 1% B 내지 50% B, 80% B 세척
 15분 실행). ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6/\text{D}_2\text{O}$): δ 0.981.27 (ms, 9H); 1.45 (b, 3H); 1.68-1.85 (ms, 11H); 2.03 (m,
 8H); 2.6-3.44 (ms, 12H); 3.82 (b, 2H); 4.35 (m, 1H); 6.53 (d, $J = 8.1 \text{ Hz}$, 2H), 6.61 (dd, $J = 5.3, 3.5$
 Hz, 2H); 6.64 (s, 2H); 7.05 (d, $J = 8.2 \text{ Hz}$, 2H), 7.19 (m, 5H); 7.76 (d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 1H); 8.38 (s, 1H).
 HRMS (ESI) (m/z): $\text{C}_{51}\text{H}_{59}\text{N}_7\text{O}_{15}\text{S}$ 에 대한 ($M + H$) $^+$ 계산치, 1040.3712, 실측치, 1040.3702. UV/vis: $\lambda_{\text{max}} = 491$
 nm.

[0342] 실시예 6

[0343] FITC-PEG12-DUPA의 합성



[0344]

[0345] 1,2-디아미노에탄 트리틸-수지(0.025 g)를 펩타이드 합성 용기에 로딩하고 *i*-PrOH(3 x 10 mL), 이어서 DMF(3 x
 10 mL)로 세척하였다. 그 다음 용기에 DMF 중 Fmoc-NH-(PEG) $_{12}$ -COOH (42.8 mg)의 용액, *i*-Pr $_2$ NEt (2.5 당량),
 및 PyBOP (2.5 당량)을 도입하였다. 생성된 용액을 Ar로 1시간 동안 버블링하고, 커플링 용액을 배수하고, 수지
 를 DMF(3 x 10 mL) 및 *i*-PrOH(3 x 10 mL)로 세척하였다. 반응 진행을 평가하기 위해 카이저(Kaiser) 테스트를
 수행하였다. Fmoc 탈보호를 DMF(3 x 10 mL) 중 20% 피페리딘을 사용하여 수행하였다. 이 절차를 반복하여 모든
 커플링 단계를 완료하였다(2 x 1.5 당량의 Fmoc-Phe-OH 및 1.5 당량의 8-아미노옥탄산 및 1.2 당량의 DUPA가 각
 각의 커플링 단계에 사용됨).

[0346] DUPA 커플링 후, 수지를 DMF(3 x 10 mL) 및 *i*-PrOH(3 x 10 mL)로 세척하고 감압 하에 건조시켰다. 절단 용액을
 사용하여 펩티드 합성 용기의 수지로부터 펩티드를 절단하였다. 15 mL의 절단 용액을 펩티드 합성 용기에 첨가
 하고, 반응물을 Ar 하에 15분 동안 버블링시켰다. 각각 5분 동안 2개의 추가 10 mL 양의 절단 용액으로 수지를
 처리하였다. 절단 혼합물을 약 5 mL로 농축하고 에틸 에테르로 침전시켰다. 침전물을 원심분리에 의해
 수집하고, 에틸 에테르(3X)로 세척하고, 고진공 하에 건조시켜 미정제 물질을 회수하였다.

[0347] 디메틸설폭사이드(DMSO, 1 mL) 중 미정제 DUPA-(PEG) $_{12}$ -EDA(10 mg) 및 FITC(5.6 mg)의 교반 용액에 *i*-Pr $_2$ NEt(5
 당량)를 실온에서 첨가하고 아르곤 하에 6시간 동안 교반하였다. 반응을 LCMS로 모니터링하고 분취용 HPLC(이동
 상: A = 10 mM 암모늄 아세테이트 pH = 7, B = ACN; 방법: 13 mL/분에서 30분 내 0% B에서 50% B)로 정제하였
 다. 정제된 분획을 모으고 냉동 건조하여 FITC-PEG12-DUPA를 제공하였다.

[0348] 실시예 7

[0349] FITC-PEG11-NK1의 합성

[0350]



[0351]

건조 CH_2Cl_2 중 NK-1 (0.02 g, 0.0433 mmol, 1.0 당량), *O*-(2-아미노에틸)-*O*-(2-아미노)에틸]테카에틸렌 글리콜 (BocNH-PEG₁₁-NH₂) (Sigma, 0.0336 g, 0.0521 mmol, 1.2 당량), 벤조트리아졸-1-일-옥시트리피롤리디노포스포늄 헥사플루오로포스페이트 (PyBOP) (0.027 g, 0.0521 mmol, 1.2 당량)의 교반 용액에 *N,N*-디이소프로필에틸아민 (DIPEA) (0.076 mL, 0.4338 mmol, 10 당량)을 아르곤 하에 실온에서 첨가하였다. 반응 진행을 LCMS로 모니터링 하고 분취용 RP-HPLC(Waters, XBridgeTM Prep C18, 5 μm ; 19 X 100 mm 컬럼, 이동상 A = 20 mM 암모늄 아세테이트 완충액, pH 7, B = 아세토니트릴, 10분 내에 구배 10 내지 100% B, 13 mL/분, λ = 220 nm, 254 nm)로 정제하였다. 순수한 분획을 수집하고, 모든 유기 용매를 증발시키고, 샘플을 48시간 동안 동결건조하여 NK1-PEG₁₁-NHBoc를 제공하였다. 수율: 40.13 mg(97%). 건조 DCM 중 NK1-PEG₁₁-NHBoc(0.0165 g, 0.015 mmol)에 트리플루오로아세트산(TFA, 20 당량)을 첨가하고 반응 혼합물을 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 과잉의 TFA를 제거하고, 나머지 용액을 물로 희석하고 CH_2Cl_2 (3 x 5 mL)를 사용하여 추출하였다. 조합한 유기 층을 염수로 세척하고, (Na_2SO_4) 상에서 건조시키고 농축시켰다. 수득된 잔류물을 진공 하에 건조시키고 추가 정제 없이 다음 단계에 사용하였다. 건조 디메틸설폭사이드 (DMSO, 0.3 mL), NK1-PEG₁₁-NH₂ (0.008 g, 0.0081 mmol, 1.0 당량), 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC) (Sigma, 0.0037 g, 0.0097 mmol, 1.2 당량)의 교반 용액을 디이소프로필에틸아민 (0.0028 mL, 0.0162 mmol, 2.0 당량)에 실온에서 아르곤 하에 첨가하였다. 반응 진행을 LCMS로 모니터링 하고 생성물을 분취용 RP-HPLC(Waters, XBridgeTM Prep C18, 5 μm ; 19 X 100 mm 컬럼, 이동상 A = 20 mM 암모늄 아세테이트 완충액, pH 7, B = 아세토니트릴, 10분 내에 구배 10 내지 100% B, 13 mL/분, λ = 280 nm)로 정제하였다. 순수한 분획을 수집하고 모든 유기 용매를 증발시키고 샘플을 48시간 동안 동결건조하여 FITC-PEG₁₁-NK1을 8.54 mg(77%)의 수율로 제공하였다.

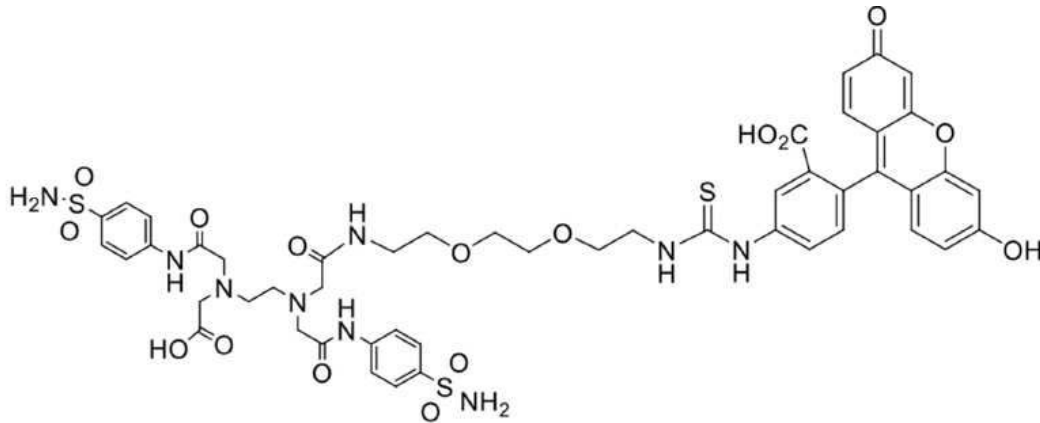
[0352]

* 주석: NK-1 화합물은 문헌의 절차를 사용하여 제조된 염기 리간드로부터 시작하는 2-단계 절차에 의해 합성되었다. (참조: DESIGN AND DEVELOPMENT OF NEUROKININ-1 RECEPTOR-BINDING AGENT DELIVERY CONJUGATES, Application Number: PCT/US2015/44229, 이는 참조로 본원에 포함됨).

[0353]

실시예 8

[0354] FITC-PEG2-CA9의 합성



[0355]

[0356] CA9 리간드(53.6mg)를 테플론 자기 교반 막대를 사용하여 50 mL 둥근 바닥 플라스크에서 DMF(2 내지 3 mL)에 용해시켰다. 진공을 사용하여 주변 공기를 제거하고 질소 가스로 교체하였고, 이 작업은 3주기로 수행되었다. 둥근 바닥 플라스크는 일정한 질소 가스 하에 유지되었다. 플라스크에 28.9 N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카보디이미드 하이드로염화물 (EDC), 그 다음 21.6 mg의 1-하이드록시벤조트리아졸 수화물 (HOBt) 및 18.9 μ L의 Boc-PEG₂-NH₂ (Sigma Aldrich)를 첨가하였다. 5.4 μ L의 트리에틸아민(TEA)을 첨가하고 반응물을 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 HPLC를 사용하여 정제하고 UHPLC-MS로 확인하였다(831의 표적 m/z). 고진공 회전식 증발을 사용하여 아세토니트릴을 제거하고 생성물을 동결건조시켰다. 화합물을 1:1 TFA:DCM과 30분 동안 혼합하였다. TFA/DCM을 고진공 회전 증발을 사용하여, 이어서 고진공 상에서 30분 동안 제거하였다. 이어서, 화합물을 DMF에 용해시키고 5 몰 당량의 *i*-Pr₂NEt, 16 mg의 플루오레세인 이소티오시아네이트(Life Technologies)와 조합하고 1 시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 HPLC로 정제하고 UHPLC-MS로 표적 화합물을 확인하였다(1120의 표적 m/z). 샘플을 동결 건조하고 -20°C에서 보관하였다.

[0357] 실시예 9

[0358] T 세포 준비

[0359] 피콜(Ficoll) 밀도 구배 원심분리(GE Healthcare Lifesciences)를 사용하여 건강한 공여자의 전혈로부터 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 분리되었다. 그 다음 EasySepTM 인간 T 세포 분리 키트(STEM CELL 기술)를 사용하여 PBMC로부터 T 세포를 분리하였다. 40 내지 100 IU/mL 인간 IL-2 (Miltenyi Biotech), 2% 인간 AB 유형 혈청, 및 1% 페니실린/스트렙토마이신 설페이트가 있는 TexMACS 배지 (Miltenyi Biotech Inc)에서 T 세포를 배양하였다. Dynabeads Human T-활성제 CD3/CD28(ThermoFisher Scientific)을 1:1 비율로 T 세포에 첨가하여 T 세포를 활성화하였다. 활성화 12 내지 24시간 후, 22 내지 32°C에서 90분 동안 1,200 g에서 스피넉션하여 8 μ g/mL 폴리브레인(Santa Cruz Biotech)의 존재 하에 FITC-CAR 렌티바이러스 입자로 T 세포를 형질도입하였다.

[0360] CAR 변형이 있는 것(CAR-Ts) 및 CAR 변형이 없는 것(비형질전환된 Ts)을 함유하는 T 세포 혼합물을 활성화 비드의 제거 전에 6일 동안 활성화 비드의 존재 하에 배양하였다. 형광 활성화 세포 분류는 GFP 발현을 기반으로 CAR-T 세포(GFP 양성) 및 형질전환되지 않은 T 세포(GFP 음성)를 분류하는 데 사용되었다. 분류된 T 세포를 마우스에 주사하기 전에 7 내지 15일 동안 배양하였다. T 세포 혼합물을 사용하는 경우, CAR-T 세포 및 형질전환되지 않은 T 세포를 원하는 비율로 혼합한 후 마우스 주입을 수행하였다. 도 2-4E에 표시된 데이터는 이러한 절차로 준비된 T 세포를 사용하여 얻은 것이다.

[0361] 실시예 10

[0362] CAR 유전자를 인코딩하는 렌티바이러스 벡터의 생성

[0363] 중복 PCR 방법을 사용하여 플루오레세인에 대한 scFv를 포함하는 CAR 작제물을 생성하였다. 플루오레세인에 대한 scFV, 항-플루오레세인(4-4-20) 항체로부터 유래된 4M5.3(Kd = 270 fM, 762bp)을 합성하였다. 인간 CD8 α 신호 펩티드(SP, 63bp), 힌지 및 막횡단 영역(249bp), 4-1BB의 세포질 도메인(CD137, 141bp) 및 CD3 ψ 사슬(336bp)을 인코딩하는 서열은 도 1에 도시된 바와 같이, 중복 PCR에 의해 항-플루오레세인 scFV와 융합되었다. 생성된 CAR 작제물(1551bp)을 EcoRI/NotI 절단 렌티바이러스 발현 벡터 pCDH-EF1-MCS-(PGK-GFP)에 삽입하였다.

(도 1, System Biosciences). 렌티바이러스 벡터에서 CAR 작제물의 서열은 DNA 시퀀싱에 의해 확인되었다. 본원에서 달리 명시되지 않는 한, 실시예에 대한 데이터를 생성하는 데 사용된 CAR 작제물은 서열번호: 1의 핵산 서열 및 서열번호: 2의 아미노산 서열을 갖는다.

[0364] 예시적인 CAR 핵산 코딩 서열은 서열번호: 1을 포함할 수 있고, 여기서 제1 ATG는 개시 코돈이다.

[0365] 예시적인 CAR 아미노산 서열은 서열번호: 2를 포함할 수 있다.

[0366] 예시적인 삽입체는 서열 번호: 3을 포함할 수 있고, 여기서 제1 GCCACC 서열은 제한 효소 절단 부위에 이어 ATG 개시 코돈을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 서열번호: 1 또는 3에 의해 인코딩되는 아미노산 서열은 서열번호: 2를 포함할 수 있다.

[0367] 실시예 11

[0368] 인간 T 세포 형질도입을 위한 CAR 유전자를 함유하는 렌티바이러스의 생산

[0369] 항-플루오레세인(즉, 항-FITC) 단쇄 단편 가변(scFv) CAR을 함유하는 렌티바이러스 바이러스를 제조하기 위해, HEK-293TN 패키징 세포주를 공동 형질감염된 with encoding 항-플루오레세인 scFv CAR을 인코딩하는 렌티바이러스 벡터 및 렌티바이러스 패키징 플라스미드 혼합물 (Cellecta) 또는 ViraPower 렌티바이러스 패키징 혼합물 (ThermoFisher)의 2세대로 형질감염시켰다. 형질감염 24시간 및 48시간 후, CAR 유전자를 갖는 렌티바이러스를 함유하는 상청액을 수확하고 인간 T 세포로의 향후 형질도입을 위해 표준 폴리에틸렌 글리콜 바이러스 농축 방법(Clontech)에 의해 바이러스 입자를 농축시켰다.

[0370] 실시예 12

[0371] 인간 PBMC로부터 인간 T 세포의 단리

[0372] Ficol1 밀도 구배 원심분리(GE Healthcare Lifesciences)에 의해 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 T 세포를 단리하였다. 나머지 Ficol1 용액을 세척한 후, EasySep™ 인간 T 세포 단리 키트(STEM CELL 기술)를 사용하여 T 세포를 단리하였다. 인간 IL-2(100 IU/mL, Miltenyi Biotech Inc)의 존재 하에 1% 페니실린 및 스트렙토마이신 설페이트가 있는 TexMACSTM 배지(Miltenyi Biotech Inc)에서 정제된 T 세포를 배양하였다. T 세포를 다중-웰 플레이트에서 1×10^6 세포/mL의 밀도로 배양하였다. T 세포를 분할하고 2 내지 3일마다 다시 공급하였다.

[0373] 실시예 13

[0374] 인간 T 세포의 형질도입

[0375] 인간 IL-2(100 IU/mL)의 존재 하에 12 내지 24시간 동안 항-CD3/CD28 항체(Life Technologies)와 커플링된 Dynabeads로 단리된 T 세포를 활성화한 다음, 항-플루오레세인 CAR 유전자를 인코딩하는 렌티바이러스로 형질도입되었다. 세포를 72시간 후에 수확하였고, 형질도입된 T 세포 상의 CAR의 발현을 유동 세포측정을 사용하여 GFP 형광 세포를 측정함으로써 확인하였다.

[0376] 실시예 14

[0377] CAR-T 세포 고갈 모델(시험관 내 및 생체 내)

[0378] 시험관 내에서 이 전략의 초기 개량을 위해, 고갈 마커($PD-1^+Tim3^+LAG3^+$)의 출현 및 CAR-T 세포 세포독성의 손실을 모니터링하면서 FITC-폴레이트 어댑터 화합물의 존재 하에 새로운 MDA-MB-231 세포(10^4 /웰)로의 연속 이동(12시간마다)에 의해 고갈된 CAR-T 세포(10^4 /웰)를 생성하였다. CAR-T 세포 고갈을 역전시키는 비표적화 및 FITC 표적화 TLR7 효능제의 능력이 문서화되었다.

[0379] 동일한 FITC-TLR7 효능제가 생체 내에서 고갈/기능장애를 역전시킬 수 있는지 여부를 평가하기 위해, CAR-T 세포 기능장애/고갈의 상기 특징이 두드러질 때까지 동일한 항-FITC CAR-T 세포로 KB 종양이 있는 NSG 마우스를 처리하였다. 동일한 FITC-TLR7 효능제의 꼬리 정맥 주사 시, T 세포 고갈/기능장애 마커가 역전되고 종양 사멸이 회복되는 것이 관찰되었다.

[0380] 시험관 내 모델의 경우, 보다 구체적으로 항-FITC CAR-T 세포(10^4 /웰)를 96웰 플레이트에서 MDA-MB-231(10^4 /

웰)과 1:1 비율로 공동 배양한 반면, 신선한 MDA-MB-231 세포(10^4 /웰)를 웰에 12시간마다 2회 첨가하여 FITC-CAR-T 세포를 고갈시켰다. 재생 화합물로 처리하기 위해, MDA-MB-231 세포로 2회 자극한 후, 대신 mcherry+(MDA-MB-231; 10^4 /웰) 세포를 첨가하고, 재생 화합물을 상이한 농도로 첨가하였다. 세포를 고갈된 항-FITC CAR-T 세포와 16시간 동안 공동 배양하였다. 그 다음 살아있는 mcherry+(MDA-MB-231) 세포의 수를 4시간마다 Incucyte S3로 계수하였다. 사멸 효능은 16시간의 세포수/8시간의 세포수를 나누고 100%를 곱하여 계산하였다.

[0381] 생체 내 모델의 경우, 보다 구체적으로, 잭슨 랩(Jackson Lab)의 8 내지 10주령 NSG 마우스(균주 번호 005557)를 사용하였다. 마우스의 엽산 수치를 인간에서 발견되는 생리학적 수치로 낮추기 위해 엽산 결핍 식단(TD.95247, Envigo) 상에서 모든 NSG 마우스를 유지하였다. 그 다음 NSG 마우스의 옆구리에 1.5×10^6 KB 세포를 이식하였다. 종양이 약 30 내지 50 mm³에 도달하면, 모든 마우스를 비-CAR-T 세포 처리군과 CAR-T 세포 처리군의 2개의 군으로 나누었다. CAR-T 세포 처리군은 i.v. 주사에 의해 1×10^7 항-FITC-CAR-T 세포를 받았다. 4시간 및 24시간 후, CAR-T 세포 처리군 마우스에 500 nmol/kg의 FITC-엽산 어댑터 화합물을 제공하였다. CAR-T 세포 주사 5일 후, 모든 CAR-T 세포 처리군 마우스를 식염수 비히클 대조군 및 TLR7 처리군의 2개의 하위군으로 나누었다. TLR7 처리군의 마우스는 주당 2회 10 nmol/마우스의 FITC-TLR7를 받았다. 대조군은 동일한 부피의 100 μ l의 염수 비히클을 주당 2회 받았다. 모든 CAR-T 세포 처리군 마우스에 500 nmol/kg의 FITC-엽산을 주당 1회 계속 받았다. 종양 부피는 캘리퍼스로 비맹점으로 측정되었고 공식 $(a \times b^2)/2$ (a는 종양의 가장 큰 직경이고 b는 가장 작은 직경임)을 사용하여 계산되었다.

[0382] 실시예 15

[0383] 종양에 침윤하는 CAR-T 세포의 유동 세포측정

[0384] 종양 분해(tumor digestion) 후, MACS 키트(Cat#130-095-929)를 사용하였다. 단일 세포 현탁액을 얼음 위에서 10분 동안 Fc 차단제(항-마우스 CD16/CD32)와 함께 사전 인큐베이션한 다음, 어두운 곳에서 4°C에서 접합된 항체와 함께 인큐베이션하였다. 세포를 획득 전에 FACS 완충액으로 2회 세척하였다. FACS 획득은 Fortessa(BD) 유동 세포측정기를 사용하여 수행되었다. 데이터는 Flowjo를 사용하여 분석되었다.

[0385] 실시예 16

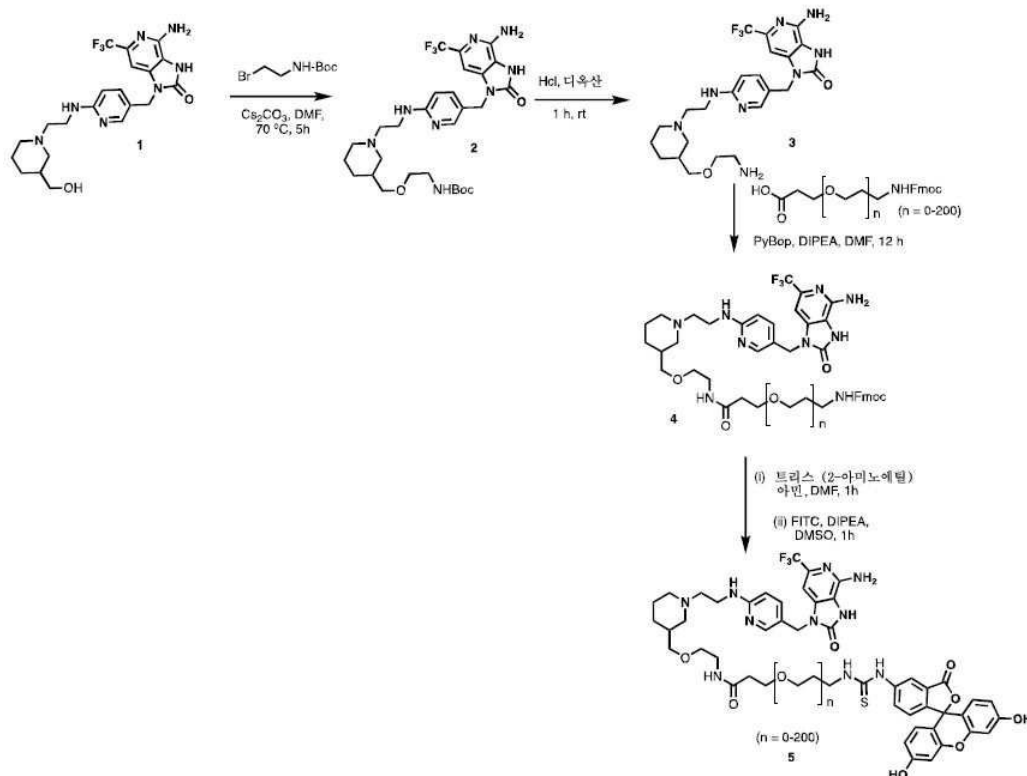
[0386] 시험관 내 항-FITC CAR-T 세포의 고갈

[0387] 본 실시예에서는 상기와 같이 고갈된 CAR-T 세포 모델을 사용하였다. 간략하게, 도 2b는 MDA-MB-231 세포가 항-FITC CAR-T 세포 및 FITC-엽산 어댑터 화합물과 공동 배양되었고 신선한 MDA-MB-231 세포는 12시간마다 3회 연속으로 공동 배양물에 첨가된 검정 결과를 보여준다. 도 2b의 결과는 이러한 CAR-T 세포가 시험관 내에서 MDA-MB-231 세포에 의한 2회 자극 후 고갈되었음을 나타내며, 이는 감소된 사멸 효능 및 증가된 고갈 마커 발현(PD-1+Tim3+Lag3+)으로 표시된다.

[0388] 실시예 17

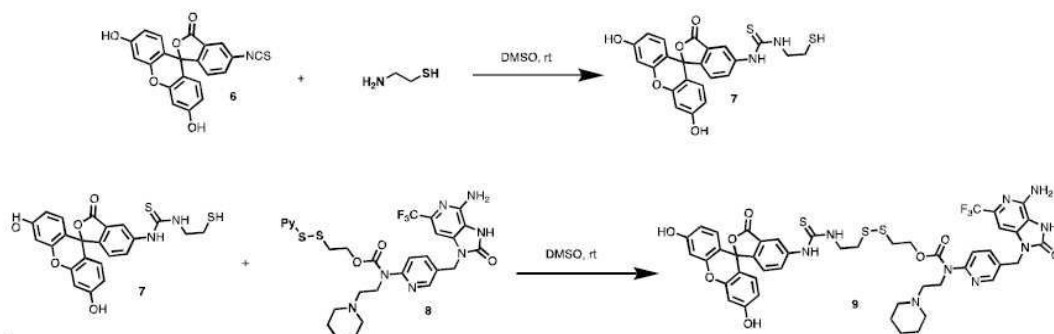
[0389] 방출성 또는 비-방출성 링커가 있는 FITC-TLR7 효능제 재생 화합물의 합성

[0390] 이 실시예에서, 방출성 또는 비-방출성 링커를 갖는 FITC-TLR7 효능제 재생 화합물의 합성이 제시된다.



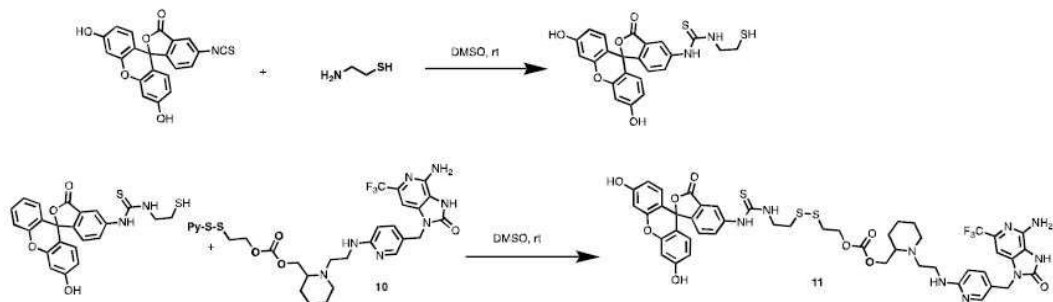
[0391]

[0392] DMF 중 화합물 **1**(1 당량)의 교반 용액에 Cs₂CO₃(2 당량) 및 Boc-브로모에틸 아민(1.5 당량)을 첨가하고 70°C에서 5시간 동안 가열하였다. 일단 출발 물질이 소모되면, 반응 혼합물을 물로 희석하고 HPLC를 사용하여 정제하여 화합물 **2**를 얻었다. -Boc 기를 탈보호하기 위해, **2**를 디옥산 중 HCl에 용해시키고 약 1시간 동안 교반하였다. 그 다음 이를 증발 건조시키고 추가 정제 없이 다음 단계로 옮겼다. 화합물 **3**(1 당량)을 DMF에 용해시키고 적절한 Fmoc-N-아미도-PEG_n-산(1.1 당량), PyBop(1.5 당량), DIPEA(2 당량)로 처리하고 약 12시간 동안 교반하였다. 출발 물질이 소모되면 이를 HPLC로 정제하여 **4**를 얻었다. 화합물 **4**(1 당량)를 DMF 중 트리스(아미노에틸)아민(10 당량)으로 탈보호하고 HPLC (이동상 A = 10 mM 암모늄 아세테이트, pH = 7; 유기상 B = 아세토니트릴)로 다시 정제하였다. 정제된 화합물(1 당량)을 FITC(1.1 당량)로 처리하여 적당한 수율로 FITC-PEG_n-TLR7 비-방출성 콘주게이트를 얻었다.



[0393]

[0394] DMSO 중 FITC(1 당량)의 교반 용액에 DIPEA(1 당량)의 존재 하에 머캅토 에틸아민(1 당량)을 첨가하였다. 이것을 약 10분 동안 교반하여 화합물 **7**을 얻었다. 다른 플라스크에서, 화합물 **8**(1 당량)을 DMSO에 용해시키고 적절한 양의 중간체 **7**(1 당량)과 혼합하였다. 이것을 약 2시간 동안 교반하고 LCMS로 분석하였다. 생성물을 HPLC (이동상 A = 10mM 암모늄 아세테이트, pH = 7; 유기상 B = 아세토니트릴)로 정제하여 화합물 **9**를 중간 내지 양호한 수율로 얻었다.



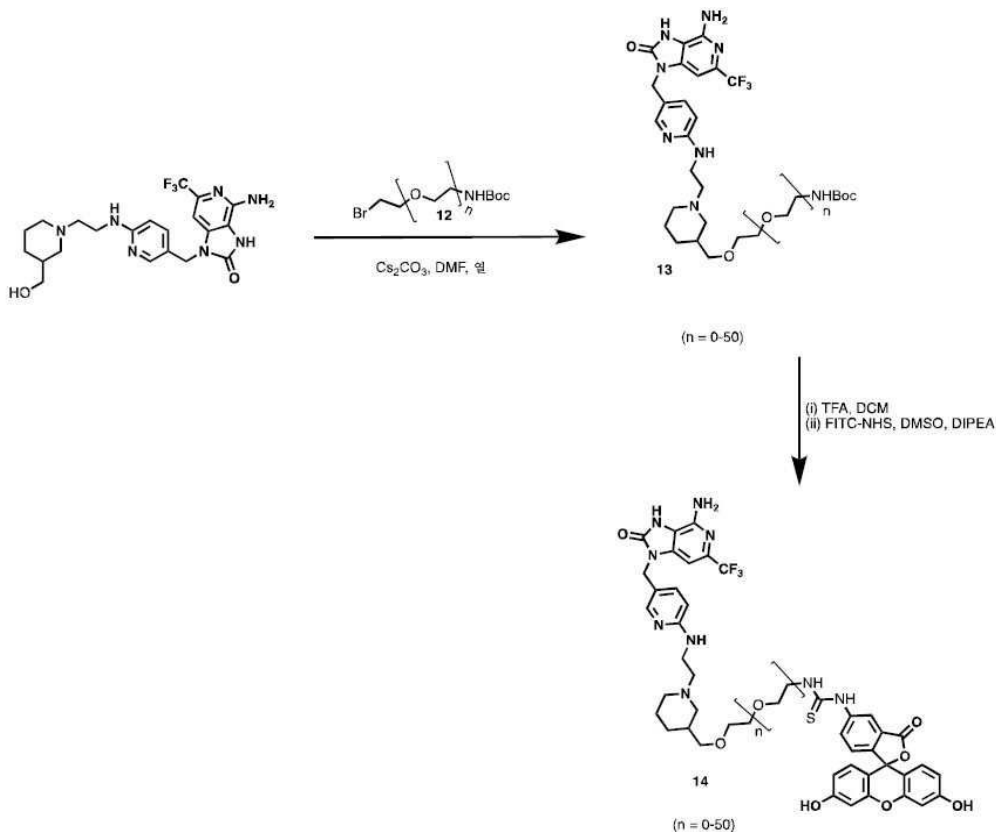
[0395]

[0396]

DMSO 중 화합물 10(1 당량)의 교반 용액에 중간체 7(1 당량)을 첨가하였다. 이것을 약 2시간 동안 교반하고 LCMS로 분석하였다. 생성물을 HPLC (이동상 A = 10mM 암모늄 아세테이트, pH = 7; 유기상 B = 아세토니트릴)로 정제하여 화합물 11(FITC-TLR7-3)을 중간 내지 양호한 수율로 얻었다.

[0397]

FITC-PEGn-TLR7 비-방출성 콘주게이트에 대한 합성 반응식



[0398]

[0399]

DMF 중 화합물 1(1 당량)의 교반 용액에 Cs_2CO_3 (2 당량) 및 Boc-브로모 아민 12(1.5 당량)을 첨가하고 70℃에서 5시간 동안 가열하였다. 일단 출발 물질이 소모되면, 반응 혼합물을 물로 희석하고 HPLC를 사용하여 정제하여 화합물 13을 얻었다. -Boc 기를 탈보호하기 위해, 2를 디옥산 중 HCl에 용해시키고 약 1시간 동안 교반하였다. 그 다음 이를 증발 건조시키고 추가 정제 없이 다음 단계로 옮겼다. 탈보호된 화합물 13(1 당량)을 FITC(1.1 당량)로 처리하여 적당한 수율로 FITC-PEGn-TLR7 (14) 비-방출성 콘주게이트를 얻었다.

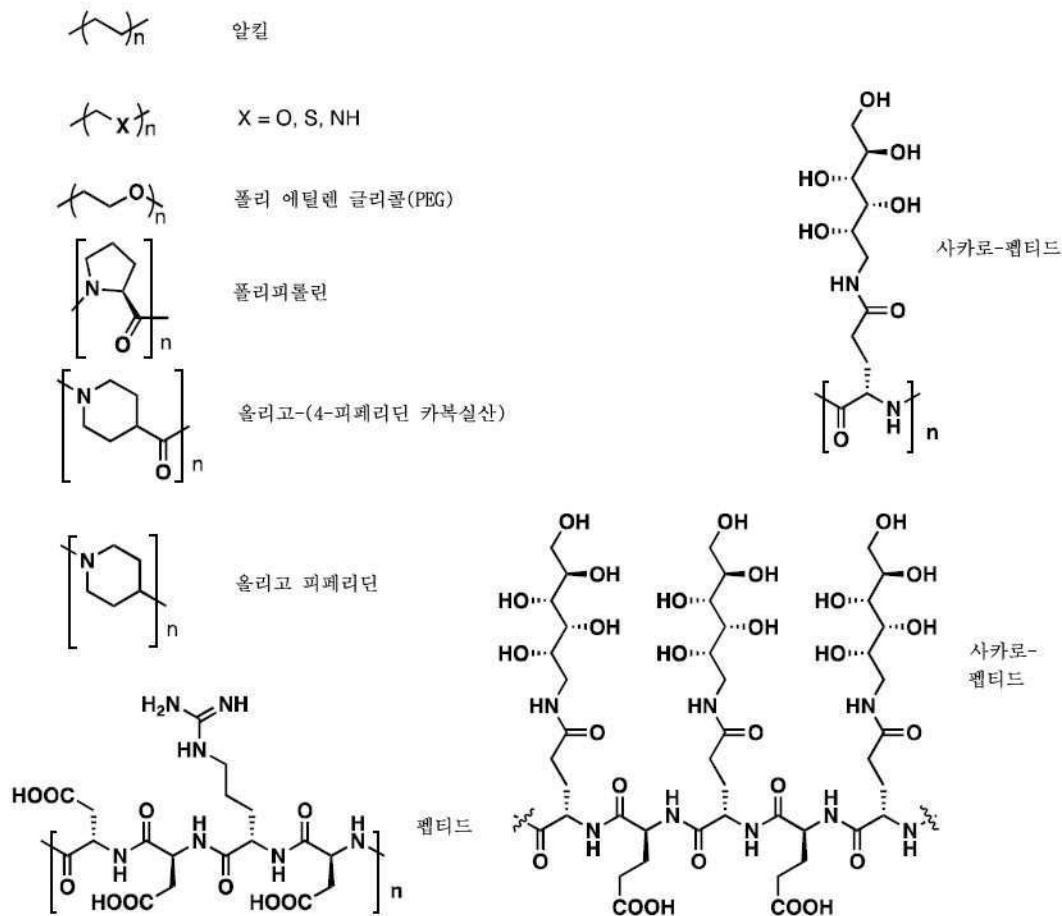
[0400]

실시예 18

[0401]

FITC-TLR7 효능제 재생 화합물 링커의 설계

[0402] 이 실시예에서는 링커는 있는 FITC-TLR7 효능제 재생 화합물의 디자인을 보여준다.



[0403]

[0404] 실시예 19

[0405] 시험관 내 항 FITC CAR-세포의 재생

[0406] 이 실시예에서, TLR7 효능제(재생 화합물)에 접합된 FITC에 의한 항-FITC CAR-T 세포의 재생은 CAR-T 세포 고갈 모델에 표시된다. TLR7 효능제의 구조는 도 3a에 기재되어 있다. 간략하게, 도 3b의 데이터는 증가된 사멸에 의해 표시된, 고갈 모델에서 시험관 내 고갈된 항-FITC CAR-T 세포에 대한 TLR7 효능제 및 TLR7-효능제-FITC 콘주게이트(재생 화합물)의 재생 효과를 나타낸다.

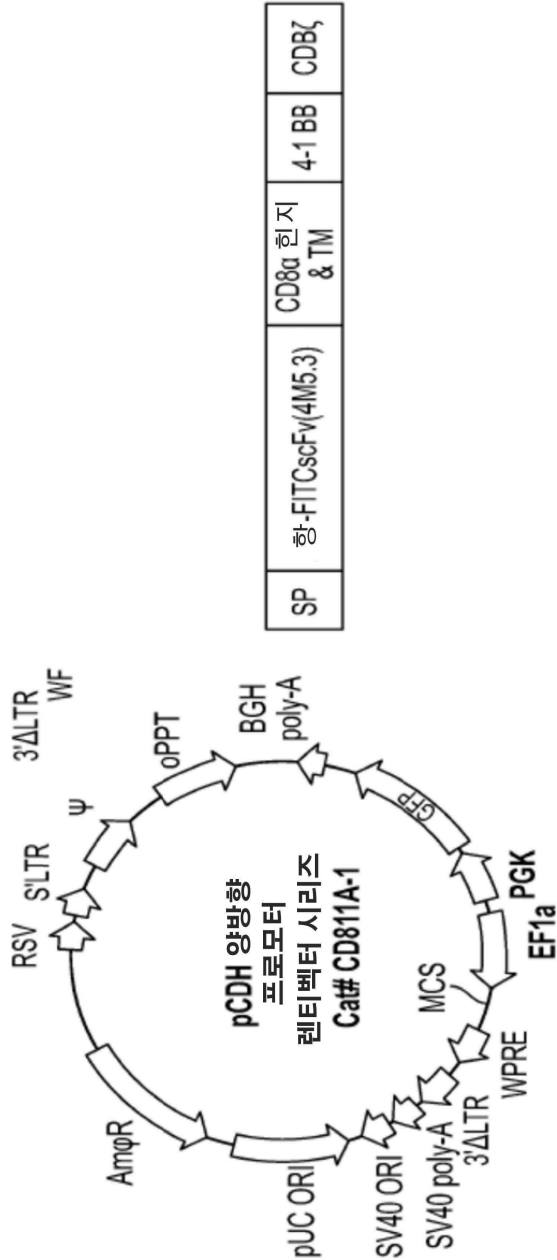
[0407] 실시예 20

[0408] 생체 내 항 FITC CAR-세포의 재생

[0409] 이 실시예에서, 상기 기술된 바와 같은 KB 이중이식 모델에서 FITC(재생 화합물)에 접합된 TLR7 효능제에 의한 항-FITC CAR-T 세포의 재생이 제시된다. 간략하게, 도 4는 감소된 종양 크기(도 4a) 및 감소된 고갈 마커 발현(PD-1+Tim3+)(도 4b 및 도 4c)으로 표시된 바와 같이 KB 이중이식 모델에서 FITC-TLR7 효능제 콘주게이트의 재생 효과를 보여준다. 도 4d 및 도 4e는 처리 동안 CAR T 세포의 백분율 변화 및 마우스 체중의 변화를 나타낸다.

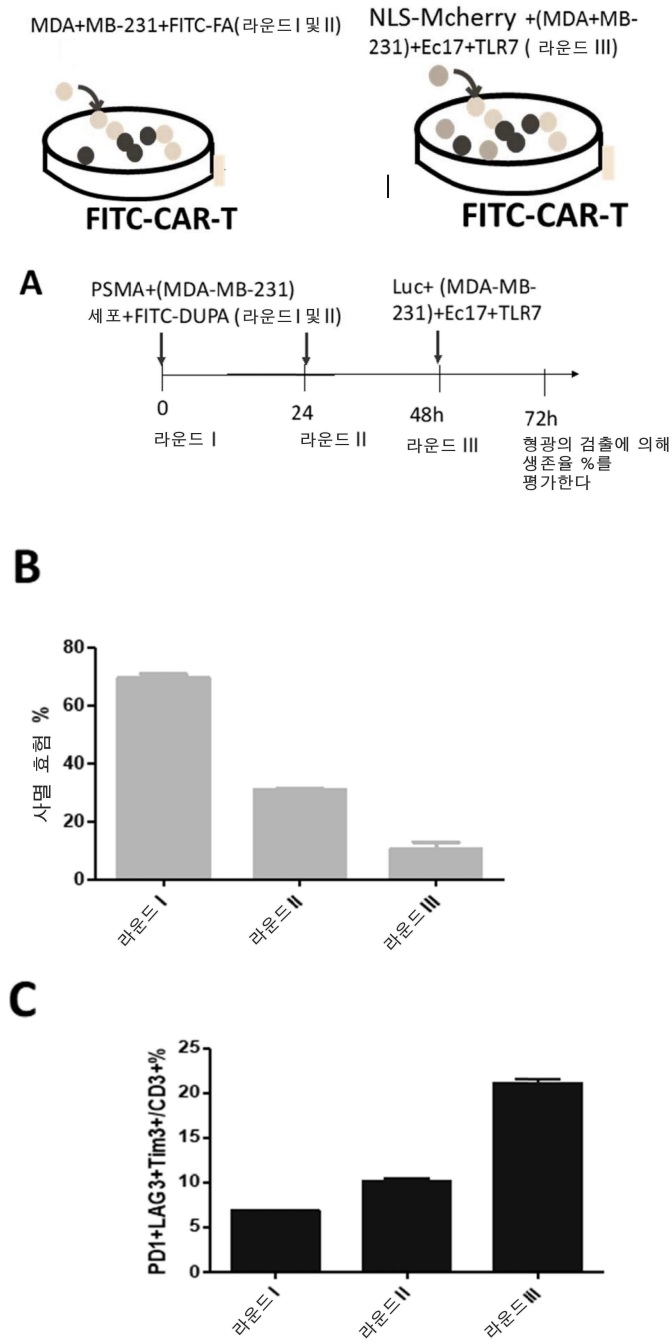
도면

도면1

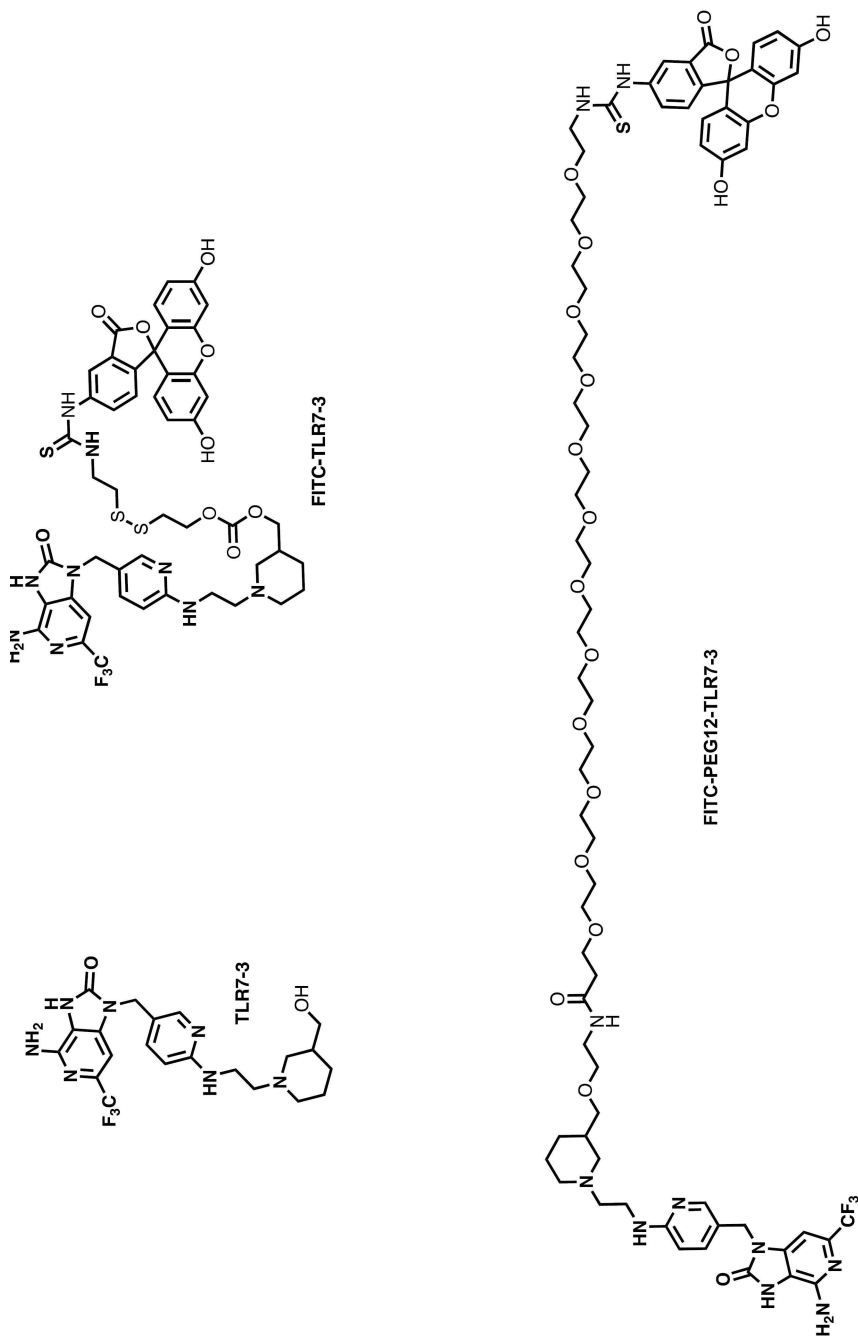


SP	항-FITCscFv(4M5.3)	CD8α 힌지 & TM	4-1 BB	CDBζ
----	-------------------	--------------	--------	------

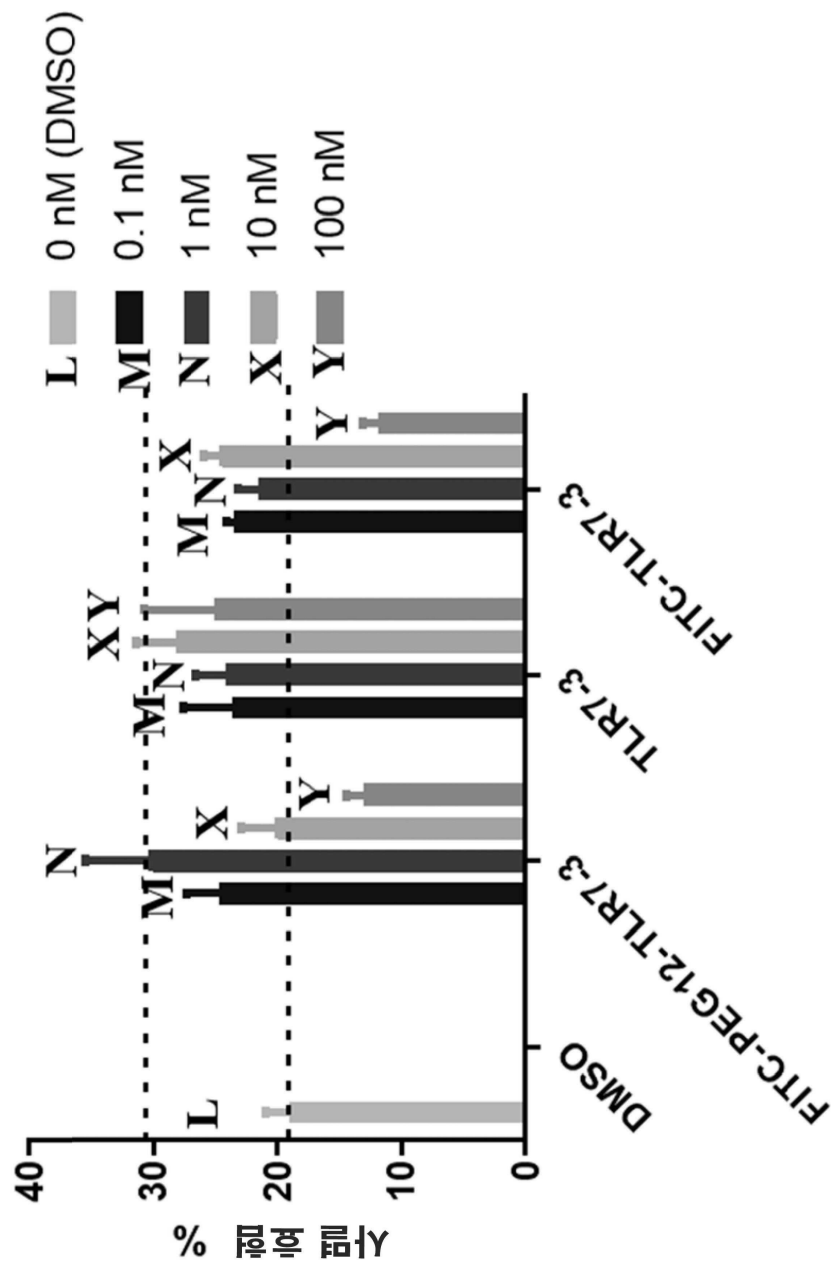
도면2



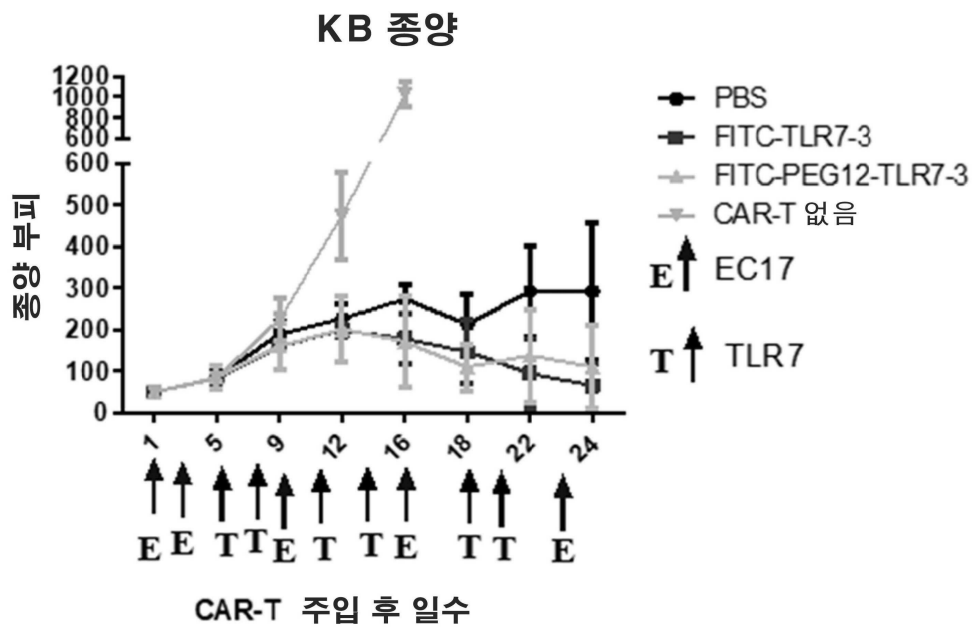
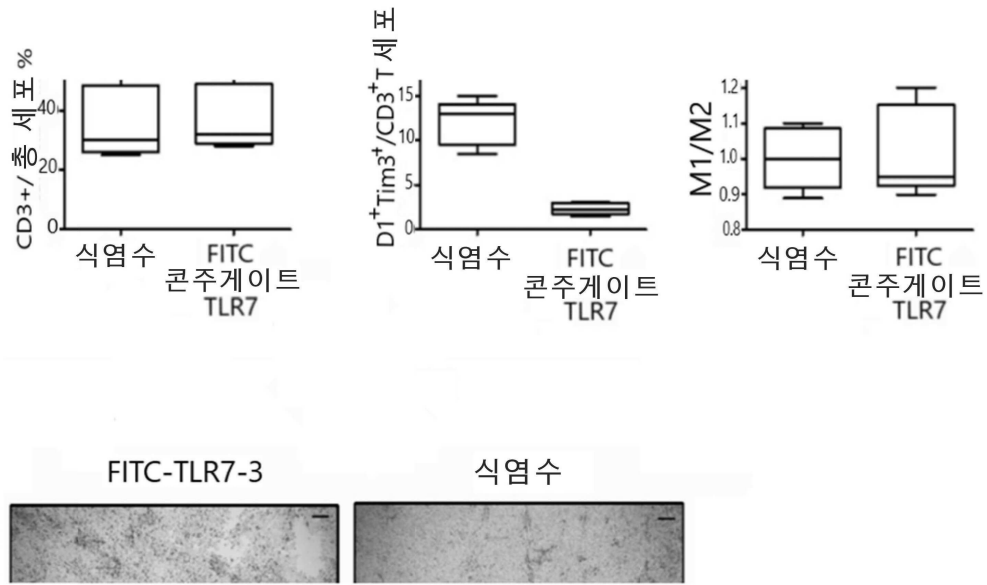
도면3a



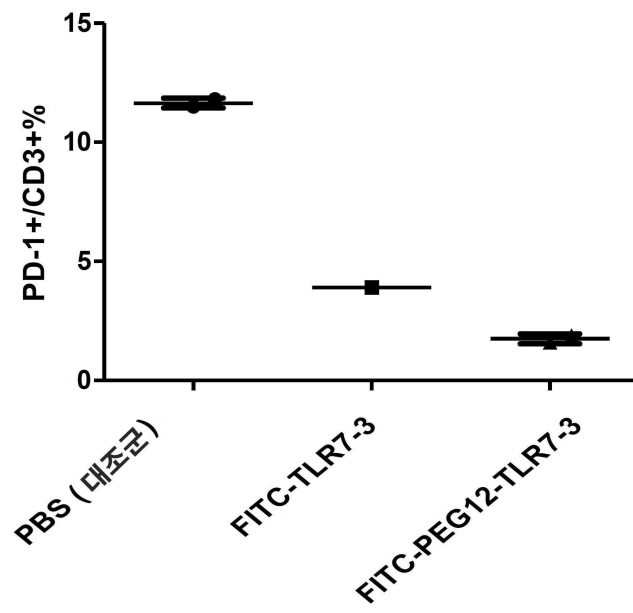
도면3b



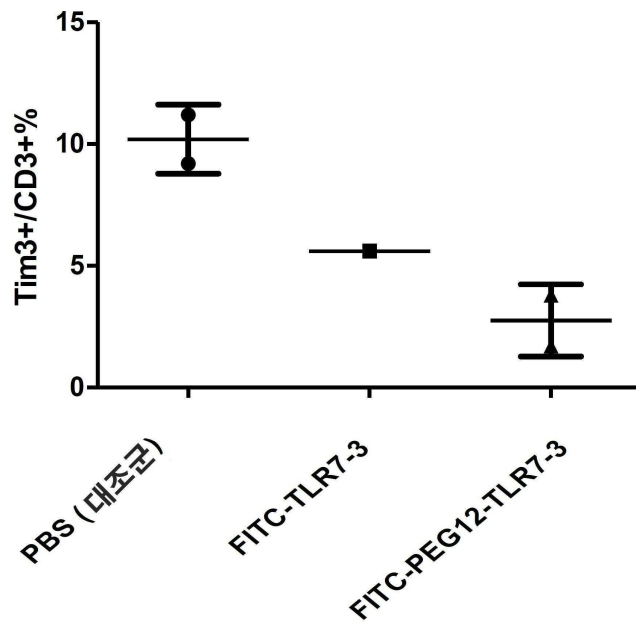
도면4a



도면4b

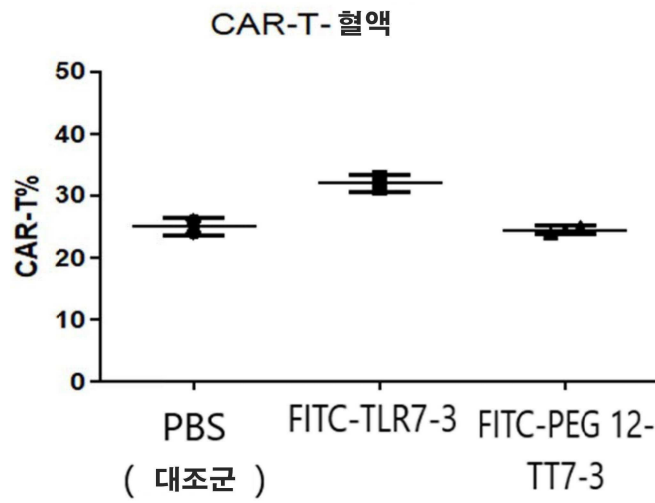


도면4c

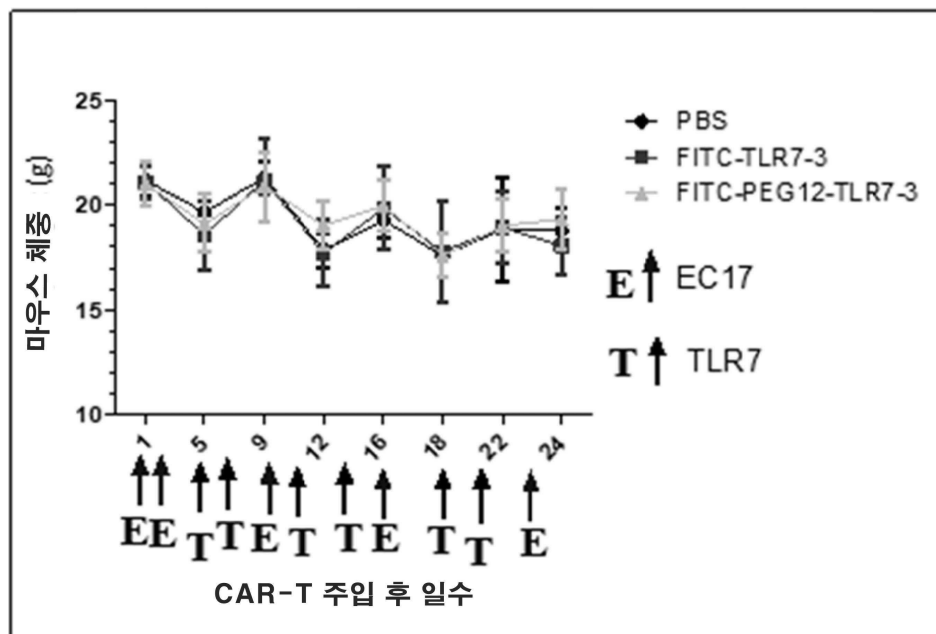


도면4d

혈액 중 CAR-T%



도면4e



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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