

(43) 공개일자 2022년07월04일

- (71) 출원인

더 카운실 오브 더 퀸즐랜드 인스티튜트 오브 메디컬 리서치
오스트레일리아 4006 퀸즐랜드 허스턴 허스턴 로드 300

(72) 발명자

칸나, 라지브

오스트레일리아 4006 퀸즐랜드 허스톤 허스톤 로
드 300

신하, 데보탐

오스트레일리아 4006 퀸즐랜드 허스톤 허스톤 로
드 300

(74) 대리인

이치영, 장제환

(52) CPC특허분류

A61K 35/17 (2013.01)

A61K 31/4184 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-7017242

(22) 출위일자(국제) 2020년 10월 23일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2022년05월23일

(86) 국제출원번호 PCT/AU2020/051147

(87) 국제공개번호 WO 2021/077175

국제공개일자 2021년04월29일

(30) 우선권주장

2019903995 2019년 10월 23일 오스트레일리아(AU)

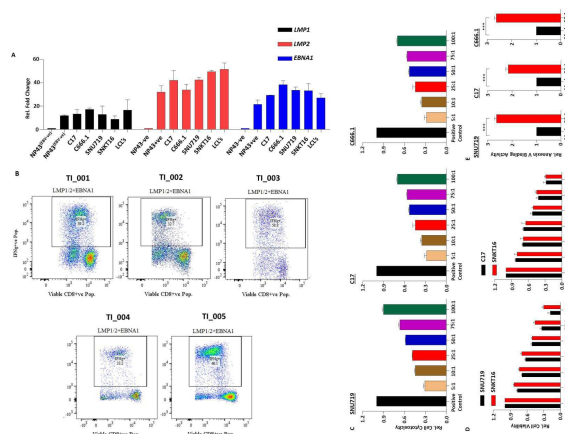
전체 청구항 수 : 총 48 항

(54) 발명의 명칭 **입양 면역요법**

(57) 요약

치료 조성물, 및 입양 면역요법 방법이 개시된다. 더 구체적으로, 엡스타인-바 바이러스(EBV) 관련 질병, 장애 또는 상태, 예를 들어 암이 있는 대상체에서 입양 면역요법 방법이 개시되어 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/519 (2013.01)

A61K 31/551 (2013.01)

A61K 39/245 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 31/22 (2018.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/2818 (2013.01)

C12N 5/0638 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는, 대상체에서 EBV-관련 질병, 장애 또는 상태를 치료 또는 예방하는 방법:

(a) EBV 항원의 제1 에피토프(epitope)에 결합하거나 이를 인식하는 동종(allogeneic) T 세포의 제1 집단을 대상체에게 투여하는 단계; 및

(b) EBV 항원 또는 추가 EBV 항원의 제2 에피토프에 결합하거나 이를 인식하는 동종 T 세포의 제2 집단을 대상체에게 투여하는 단계.

청구항 2

다음을 포함하는, 대상체에서 EBV-관련 질병, 장애 또는 상태를 치료 또는 예방하기 위한 약학적 조성물:

EBV 항원의 제1 에피토프에 결합하거나 이를 인식하는 동종 T 세포의 제1 집단;

EBV 항원 또는 추가 EBV 항원의 제2 에피토프에 결합하거나 이를 인식하는 동종 T 세포의 제2 집단; 및

선택적으로 약학적으로 허용되는 담체(carrier), 희석제(diluent) 및/또는 부형제(excipient).

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 동종 T 세포의 제1 집단 및 EBV-관련 질병, 장애 또는 상태의 세포는 둘 모두 제1 MHC 단백질을 엔코드(encodes)하는 제1 인간 백혈구 항원(human leukocyte antigen, HLA) 대립유전자(allele)를 포함하거나 이에 의해 제한되는 것을 특징으로 하는 방법 또는 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 제1 MHC 단백질은 EBV-관련 질병, 장애 또는 상태의 세포에 EBV 항원의 제1 에피토프를 제시하는 것을 특징으로 하는 방법 또는 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 동종 T 세포의 제2 집단 및 EBV-관련 질병, 장애 또는 상태의 세포 둘 모두는 제2 MHC 단백질을 엔코드하는 제2 HLA 대립유전자를 포함하거나 이에 의해 제한되는 것을 특징으로 하는 방법 또는 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 제2 MHC 단백질은 EBV 관련 질병, 장애 또는 상태의 세포에 EBV 항원 또는 추가 EBV 항원의 제2 에피토프를 제시하는 것을 특징으로 하는 방법 또는 조성물.

청구항 7

제1항 및 제3항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 동종 T 세포의 제2 집단은 동종 T 세포의 제1 집단의 투여 전에, 투여와 동시에 및/또는 투여 후에 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항 및 제3항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 시험관내(in vitro)에서 동종 T 세포의 제1 및/또는 제2 집단을 생성하는 초기 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제1항 및 제3항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에게 치료제(therapeutic agent)를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 치료제는 면역치료제(immunotherapeutic agent), MAPK 경로 억제제(MAPK pathway inhibitor), BET 억제제(BET inhibitor) 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

면역치료제, MAPK 경로 억제제, BET 억제제, 또는 이의 조합과 함께 제2항의 약학적 조성물을 포함하는 약학적 조합(combination).

청구항 12

다음 단계를 포함하는, 대상체에서 EBV-관련 질병, 장애 또는 상태를 치료 또는 예방하는 방법:

- (a) EBV 항원의 에피토프에 결합하거나 이를 인식하는 동종 T 세포 집단을 대상체에게 투여하는 단계; 및
- (b) 대상체에게 치료제를 투여하는 단계, 상기 치료제는 면역치료제, MAPK 경로 억제제, BET 억제제 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택됨.

청구항 13

다음을 포함하는, 대상체에서 EBV-관련 질병, 장애 또는 상태를 치료 또는 예방하기 위한 약학적 조성물:

EBV 항원의 에피토프에 결합하거나 이를 인식하는 동종 T 세포의 집단;

치료제, 상기 치료제는 면역치료제, MAPK 경로 억제제, BET 억제제 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택됨; 및

선택적으로 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 및/또는 부형제.

청구항 14

제12항 또는 제13항에 있어서, 상기 동종 T 세포의 집단 및 EBV-관련 질병, 장애 또는 상태의 세포는 둘 모두 MHC 단백질을 엔코딩하는 인간 백혈구 항원(HLA) 대립유전자를 포함하거나 이에 의해 제한되는 것을 특징으로 하는 방법 또는 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 MHC 단백질은 EBV 관련 질병, 장애 또는 상태의 세포에 EBV 항원의 에피토프를 제시하는 것을 특징으로 하는 방법 또는 조성물.

청구항 16

제10항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역치료제는 PD1 억제제(예를 들어, 항-PD1 항체), PD-L1 억제제(예를 들어, 항-PD-L1 항체), CTLA4 억제제(예를 들어, 항-CTLA4 항체), LAG3 억제제(예: 항-LAG3 항체), TIM3 억제제(예를 들어, 항-TIM3 항체) 또는 CD96 억제제(예를 들어, 항-CD96 항체)와 같은 면역 체크포인트(immune checkpoint) 억제제이거나 이를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법, 조합, 또는 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 면역 체크포인트 억제제는 항-PD1 항체이거나 이를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법 또는 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 항-PD1 항체는 펌브롤리주맙(Pembrolizumab), 니볼루맙(Nivolumab), 또는 세미플리맙(Cemiplimab)으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법 또는 조성물.

청구항 19

제16항에 있어서, 상기 면역 체크포인트 억제제는 항-PD-L1 항체이거나 이를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법

또는 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 항-PD1 항체는 아테졸리주맙(Atezolizumab), 아벨루맙(Avelumab) 또는 더발루맙(Durvalumab)으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법 또는 조성물.

청구항 21

제10항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 MAPK 경로 억제제는 MEK1/2 억제제이거나 이를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법, 조합, 또는 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 MEK1/2 억제제는 셀루메타닙(selumetinib) 및/또는 트레마티닙(trematinib)으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법 또는 조성물.

청구항 23

제10항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 BET 억제제는 JQ1인 것을 특징으로 하는 방법, 조합, 또는 조성물.

청구항 24

제12항 및 제14항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 동종 T 세포의 집단은 치료제의 투여 전에, 투여와 동시에 및/또는 투여 후에 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

제12항 및 제14항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 시험관내(*in vitro*)에서 동종 T 세포의 집단을 생성하는 초기 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

이전 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 EBV 항원 및/또는 추가 EBV 항원은 EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C, LMP1, LMP2 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법 또는 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 EBV 항원 및/또는 추가 EBV 항원은 EBNA1, LMP1 및/또는 LMP2이거나 이를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법 또는 조성물.

청구항 28

이전 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 EBV 관련 질병, 장애 또는 상태는 EBV 관련 암이거나 이를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법 또는 조성물.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 EBV 관련 암은 비인두 암종(nasopharyngeal carcinoma), NKT 세포 림프종(NKT cell lymphoma), 호지킨 림프종(Hodgkin's Lymphoma), 이식 후 림프증식성 질환(post-transplant lymphoproliferative disease), 버킷 림프종(Burkitt's lymphoma), 미만성 거대 B 세포 림프종(Diffuse large B-cell lymphoma), 위암(gastric cancer), 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법 또는 조성물.

청구항 30

대상체에서 EBV-관련 질병, 장애 또는 상태의 치료 또는 예방을 위한 의약 제조에서 EBV 항원의 제1 에피토프에 결합하거나 이를 인식하는 동종 T 세포의 제1 집단의 용도로서; 상기 동종 T 세포의 제1 집단은 다음과 조합하여 투여되는 것을 특징으로 하는 용도:

(a) EBV 항원 또는 추가 EBV 항원의 제2 에피토프에 결합하거나 이를 인식하는 동종 T 세포의 제2 집단; 및/또는

(b) 면역치료제, MAPK 경로 억제제, BET 억제제 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택되는 치료제.

청구항 31

대상체에서 EBV 관련 질병, 장애 또는 상태의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 EBV 항원의 제1 에피토프에 결합하거나 이를 인식하는 동종 T 세포의 제1 집단으로서; 상기 동종 T 세포의 제1 집단은 다음과 조합하여 투여되는 것을 특징으로 하는 집단:

(a) EBV 항원 또는 추가 EBV 항원의 제2 에피토프에 결합하거나 이를 인식하는 동종 T 세포의 제2 집단; 및/또는

(b) 면역치료제, MAPK 경로 억제제, BET 억제제 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택되는 치료제.

청구항 32

다음 단계를 포함하는, 대상체에서 EBV 관련 암 또는 종양을 치료 또는 예방하는 방법:

(a) EBV 항원의 에피토프에 결합하거나 이를 인식하는 동종 T 세포 집단을 대상체에게 투여하는 단계; 및

(b) 대상체에게 치료제를 투여하는 단계, 상기 치료제는 면역치료제, MAPK 경로 억제제, BET 억제제 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택됨.

청구항 33

다음에 포함하는, 대상체에서 EBV 관련 암 또는 종양을 치료 또는 예방하기 위한 약학적 조성물:

EBV 항원의 에피토프에 결합하거나 이를 인식하는 동종 T 세포의 집단;

면역치료제, MAPK 경로 억제제, BET 억제제 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택되는 치료제;

선택적으로 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 및/또는 부형제.

청구항 34

제32항 또는 제33항에 있어서, 상기 동종 T 세포의 집단 및 EBV-관련 질환, 장애 또는 상태의 세포는 둘 모두 MHC 단백질을 엔코딩하는 인간 백혈구 항원(HLA) 대립유전자를 포함하거나 이에 의해 제한되는 것을 특징으로 하는 방법 또는 조성물.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 MHC 단백질은 암 또는 종양 세포에 EBV 항원의 에피토프를 제시하는 것을 특징으로 하는 방법 또는 조성물.

청구항 36

제32항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역치료제는 PD1 억제제(예를 들어, 항-PD1 항체), PD-L1 억제제(예를 들어, 항-PD-L1 항체), CTLA4 억제제(예를 들어, 항-CTLA4 항체), LAG3 억제제(예를 들어, 항-LAG3 항체), TIM3 억제제(예를 들어, 항-TIM3 항체) 또는 CD96 억제제(예를 들어, 항-CD96 항체)와 같은 면역 체크포인트 억제제이거나 이를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법, 조합, 또는 조성물.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 면역 체크포인트 억제제는 항-PD1 항체이거나 이를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법 또는 조성물.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 항-PD1 항체는 펌브롤리주맙(Pembrolizumab), 니볼루맙(Nivolumab), 또는 세미플리맙(Cemiplimab)으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법 또는 조성물.

청구항 39

제36항에 있어서, 상기 면역 체크포인트 억제제는 항-PD-L1 항체이거나 이를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법 또는 조성물.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 항-PD1 항체는 아테졸리주맙(Atezolizumab), 아벨루맙(Avelumab) 또는 더발루맙(Durvalumab)으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법 또는 조성물.

청구항 41

제32항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 MAPK 경로 억제제는 MEK1/2 억제제이거나 이를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법, 조합, 또는 조성물.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 MEK1/2 억제제는 셀루메타닙(selumetinib) 및/또는 트레마티닙(trematinib)으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법 또는 조성물.

청구항 43

제32항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 BET 억제제는 JQ1인 것을 특징으로 하는 방법 또는 조성물.

청구항 44

제32항 및 제34항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 동종 T 세포의 집단은 치료제의 투여 전에, 투여와 동시에 및/또는 투여 후에 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 45

제32항 및 제34항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 시험관내(*in vitro*)에서 동종 T 세포의 집단을 생성하는 초기 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 46

제32항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 EBV 항원 및/또는 추가 EBV 항원은 EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C, LMP1, LMP2 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법 또는 조성물.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 EBV 항원 및/또는 추가 EBV 항원은 EBNA1, LMP1 및/또는 LMP2이거나 이를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법 또는 조성물.

청구항 48

제32항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암 또는 종양은 비인두 암종(nasopharyngeal carcinoma), NKT 세포 림프종(NKT cell lymphoma), 호지킨 림프종(Hodgkin's Lymphoma), 이식후 림프증식성 질병(post-transplant lymphoproliferative disease), 버킷 림프종(Burkitt's lymphoma), 미만성 거대 B 세포 림프종(Diffuse large B-cell lymphoma), 위암(gastric cancer), 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법 또는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

관련 출원

[0001]

[0002] 본 출원은 2019년 10월 23일에 출원된 "입양 면역요법(Adoptive Immunotherapy)"이라는 명칭의 호주 가출원 번호 제2019903995호에 대한 우선권을 주장하며, 그 전체 내용은 그 전체가 참고로 여기에 포함된다.

[0003] **기술분야**

[0004] 본 발명은 일반적으로 치료 조성물 분야, 및 입양 면역요법의 방법에 관한 것이다. 더 구체적으로, 본 발명은 암과 같은 Epstein-바 바이러스(Epstein-Barr virus, EBV)-관련 질병, 장애 또는 상태를 가진 대상체에서의 입양 면역요법의 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 입양 또는 세포 면역요법은 암, 감염 합병증 및 자가면역 질환을 치료하기 위한 강력한 도구로 부상하고 있다 [1]. 임상에서 T 세포 치료의 첫 번째 성공은 환자 유래 종양 침윤 세포(tumour-infiltrating cells, TIL)의 시험관 내 확장을 개척하고 진행된 단계의 흑색종(melanoma) 환자에게 다시 주입한 Steven Rosenberg의 그룹에 의해 입증되었다[2]. 그 이후로 T 세포 이펙터(sffector) 기능은 약물 내성 세균 및 진균 감염[3], HIV[4], CMV[5] 및 BKV[6]; 조혈 줄기 세포 이식(hematopoietic stem cell transplant, HSCT) 및 고형 장기 이식(solid organ transplant, SOT) 환자에서 혈액 악성 종양 및 EBV 관련 이식 후 림프증식성 질환(post-transplant lymphoproliferative disease, PTLD)[7]를 포함한 바이러스 감염의 치료에 대한 임상적 성공을 입증하는 것으로 알려져 있다. 그러나 고형암(solid cancers)에 대한 효과적이고 지속적인 임상 반응을 얻는 데 이러한 치료법이 미치는 영향은 여전히 중요한 과제이다.

[0006] 암에 대한 효과적인 입양 세포 전달(adoptive cell transfer, ACT) 반응과 관련된 작용 기전은 악성 세포에서 발현되는 HLA 분자가 제시하는 종양 관련 항원(tumour associated antigens, TAA)을 인식하는 T 세포의 능력을 중심으로 한다[1]. TAA는 세포 증식에 중요한 역할을 하는 분자 인자, 체세포 돌연변이에서 발생하는 신생항원 및 면역 특권 부위에 위치한 암 고환/배선 항원(cancer testes/germline antigens, CTA)으로 구성된다. 종양 침윤 림프구(tumour-infiltrating lymphocytes) 또는 말초 혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells)의 시험관 내(In vitro) 확장 T 세포가 광범위하게 사용되었다. 이 기술은 바이러스 관련 암 및 이식 환자의 질병 치료에 대해 많은 주목을 받았다. 특히, 입양 T 세포 요법은 Epstein Barr Virus, EBV) 관련 이식 후 림프종(posttransplant lymphomas, PTLD)에 대해 놀라운 임상 반응을 보였다[7]. EBV는 광범위한 인간 악성 종양과 관련이 있는 것으로 알려진 강력한 인간 유비쿼터스 B-림프자극성 발암성 헤르페스 바이러스(human ubiquitous B-lymphotropic oncogenic herpesvirus)이다.

[0007] 건강한 개체에서, EBV 감염은 바이러스에 감염된 B 세포에서 발현되는 EBNA3-6 항원을 주로 인식하는 기능적 CD8+ 세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocytes, CTL) 및 CD4+ T 림프구를 통해 면역학적으로 제어된다[8, 9]. 그러나 유비쿼터스 특성과 설득력 있는 세포 변형 능력으로 인해, EBV 감염은 버킷 림프종(Burkitt's lymphoma, BL), 호지킨 림프종(Hodgkin's lymphoma, HL), 자연 살해 또는 T(natural killer or T (NK/T), NK/T) 세포 림프종, 이식 후 림프증식성 질환(post-transplant lymphoproliferative disease, PTLD), 비인두 암종(nasopharyngeal carcinoma, NPC) 및 위 암종(gastric carcinoma, GC)과 같은 B 세포 및 상피 세포 기원의 다발성 악성 종양과 관련이 있다[10]. 현재까지, 방사선 및/또는 화학 요법은 EBV 관련 악성 종양의 치료를 위한 주요 주류로 남아 있다. 현재 EBV 특이 자가 T 세포 면역 요법을 이용한 많은 임상 시험이 진행 중이다[7]. 그러나, 환자에게 투여하기 전에 자가 CTL의 안전성을 제조하고 테스트하는 데 필요한 시간 범위는 ACT에 대한 EBV 특이적 T 세포 생성에 대한 주요 제한 중 하나였다.

발명의 내용

[0008] **발명의 요약**

[0009] 본 발명은 EBV 항원의 에피토프에 결합하거나 이를 인식하는 동종(allogeneic) EBV-특이적 T 세포를 투여함으로써 대상체에서 EBV-연관된 질병, 장애 또는 상태, 예를 들어 EBV-연관된 암을 치료 또는 예방하는 광범위한 방법에 관한 것이다.

[0010] 제1 측면에서, 본 발명은 다음 단계를 포함하는, 대상체에서 EBV-관련 질환, 장애 또는 상태를 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다:

[0011] (a) EBV 항원의 제1 에피토프에 결합하거나 이를 인식하는 동종 T 세포의 제1 집단을 대상체에게 투여하는 단계; 및

- [0012] (b) EBV 항원 또는 추가 EBV 항원의 제2 에피토프에 결합하거나 이를 인식하는 동종 T 세포의 제2 집단을 대상체에게 투여하는 단계;
- [0013] 이로써 대상체의 EBV 관련 질병, 장애 또는 상태를 치료하거나 예방할 수 있음.
- [0014] 일부 실시예에서, 본 방법은 시험관내(in vitro)에서 동종 T 세포의 제1 및/또는 제2 집단을 생성하는 초기 단계를 추가로 포함한다.
- [0015] 적합하게는, 본 방법은 대상체에게 치료제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 하나의 실시예에서, 치료제는 면역치료제(immunotherapeutic agent), MEK1/2 억제제(MEK1/2 inhibitor)와 같은 MAPK 경로 억제제(MAPK pathway inhibitor), BET 억제제(BET inhibitor) 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택된다. 이 경우, 면역치료제는 적절하게 PD1 억제제, PDL1 억제제, CTLA4 억제제, LAG3 억제제, 면역치료제는 적절하게는 TIM3 억제제 또는 CD96 억제제와 같은 면역 체크포인트 (immune checkpoint) 억제제이거나 이를 포함한다. 일부 특정 실시예에서, 면역 체크포인트 억제제는 항-PD1 항체이거나 이를 포함한다.
- [0016] 제2 측면에서, 본 발명은 다음을 포함하는, 대상체에서 EBV-관련 질병, 장애 또는 상태를 치료 또는 예방하기 위한 약학적 조성물에 관한 것이다:
- [0017] EBV 항원의 제1 에피토프에 결합하거나 이를 인식하는 동종 T 세포의 제1 집단;
- [0018] EBV 항원 또는 추가 EBV 항원의 제2 에피토프에 결합하거나 이를 인식하는 동종 T 세포의 제2 집단; 및
- [0019] 선택적으로 약학적으로 허용가능한 담체(carrier), 희석제(diluent) 및/또는 부형제(excipient).
- [0020] 전술한 측면과 관련하여, 동종 T 세포의 제1 집단 및 EBV-관련 질병, 장애 또는 병태의 세포는 적합하게 둘 모두 제1 MHC 단백질을 엔코딩하는 제1 인간 백혈구 항원(human leukocyte antigen, HLA) 대립유전자를 포함하거나 이에 의해 제한된다. 이 경우, 제1 MHC 단백질은 EBV 관련 질병, 장애 또는 상태의 세포에 EBV 항원의 제1 에피토프를 제시할 수 있다.
- [0021] 제1 및 제2 측면에 대해, 동종 T 세포의 제2 집단 및 EBV-관련 질병, 장애 또는 병태의 세포는 둘 모두 제2 MHC 단백질을 엔코딩하는 제2 HLA 대립유전자를 포함하거나 이에 의해 제한된다. 이를 위해, 제2 MHC 단백질은 EBV 관련 질병, 장애 또는 상태의 세포에 EBV 항원 또는 추가 EBV 항원의 제2 에피토프를 적합하게 제시한다.
- [0022] 전술한 측면의 일부 실시예에서, 동종 T 세포의 제2 집단은 동종 T 세포의 제1 집단의 투여 전에, 투여와 동시에 및/또는 투여 후에 투여된다.
- [0023] 제3 측면에서, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 대상체의 EBV-관련 질병, 장애 또는 상태를 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다:
- [0024] (a) EBV 항원의 에피토프에 결합하거나 이를 인식하는 동종 T 세포의 집단을 대상체에게 투여하는 단계; 및 (b) 면역치료제, MAPK 경로 억제제, BET 억제제 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택되는 치료제를 대상체에게 투여하는 단계;
- [0025] 이로써 대상체의 EBV 관련 질병, 장애 또는 상태를 치료하거나 예방할 수 있음.
- [0026] 적합하게는, 동종 T 세포의 집단은 치료제의 투여 전에, 투여와 동시에 및/또는 투여 후에 투여된다.
- [0027] 일부 실시예에서, 본 방법은 시험관내에서 동종 T 세포의 집단을 생성하는 초기 단계를 추가로 포함한다.
- [0028] 제4 측면에서, 본 발명은 다음을 포함하는, 대상체에서 EBV-관련 질병, 장애 또는 상태를 치료 또는 예방하기 위한 약학적 조성물을 제공한다:
- [0029] EBV 항원의 에피토프에 결합하거나 이를 인식하는 동종 T 세포의 집단;
- [0030] 치료제, 상기 치료제는 면역치료제, MAPK 경로 억제제, BET 억제제 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택됨; 및
- [0031] 선택적으로, 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 및/또는 부형제.
- [0032] 제3 및 제4 측면을 참조하면, 동종 T 세포의 집단 및 EBV 관련 질병, 장애 또는 상태의 세포는 적합하게 둘 다 제1 MHC 단백질을 엔코딩하는 제1 인간 백혈구 항원(HLA) 대립유전자를 포함하거나 이에 의해 제한된다. 일부 실시예에서, MHC 단백질은 EBV 관련 질병, 장애 또는 상태의 세포에 EBV 항원의 에피토프를 제공한다.

- [0033] 제3 및 제4 측면에 적합하게는, 면역치료제는 PD1 억제제, PDL1 억제제, CTLA4 억제제, LAG3 억제제, TIM3 억제제 또는 CD96 억제제와 같은 면역 체크포인트 억제제이거나 이를 포함한다. 특정 실시예에서, 면역 체크포인트 억제제는 항-PD1 항체이거나 이를 포함한다. 일부 실시예에서, MAPK 경로 억제제는 MEK1/2 억제제이거나 이를 포함한다.
- [0034] 제5 측면에서, 본 발명은 대상에서 EBV 관련 질병, 장애 또는 상태의 치료 또는 예방을 위한 의약 제조에서 EBV 항원의 제1 에피토프에 결합하거나 이를 인식하는 동종 T 세포의 제1 집단의 용도에 관한 것이고; 상기 동종 T 세포의 제1 집단은 다음과 조합하여 부여된다: (a) EBV 항원 또는 추가 EBV 항원의 제2 에피토프에 결합하거나 이를 인식하는 동종 T 세포의 제2 집단; 및/또는 (b) 치료제, 상기 치료제는 면역치료제, MAPK 경로 억제제, BET 억제제 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택됨.
- [0035] 제6 측면에서, 본 발명은 대상에서 EBV 관련 질병, 장애 또는 상태의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 EBV 항원의 제1 에피토프에 결합하거나 이를 인식하는 동종 T 세포의 제1 집단을 제공하고; 상기 동종 T 세포의 제1 집단은 다음과 조합하여 부여된다: (a) EBV 항원 또는 추가 EBV 항원의 제2 에피토프에 결합하거나 이를 인식하는 동종 T 세포의 제2 집단; 및/또는 (b) 치료제, 상기 치료제는 면역치료제, MAPK 경로 억제제, BET 억제제 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택됨.
- [0036] 전술한 측면을 참조하면, EBV 항원 및/또는 추가 EBV 항원은 EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C, LMP1, LMP2 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군에서 적합하게 선택된다. 하나의 실시예에서, EBV 항원 및/또는 추가 EBV 항원은 EBNA1, LMP1 및/또는 LMP2이거나 이를 포함한다.
- [0037] 상기 측면에 적합하게는, EBV 관련 질병, 장애 또는 상태는 EBV 관련 암이거나 이를 포함한다. 특정 실시예에서, EBV 관련 암은 비인두 암종(nasopharyngeal carcinoma), NKT 세포 림프종(NKT cell lymphoma), 호지킨 림프종(Hodgkin's Lymphoma), 이식후 림프증식성 질병(post-transplant lymphoproliferative disease), 버킷 림프종(Burkitt's lymphoma), 미만성 거대 B 세포 림프종(Diffuse large B-cell lymphoma), 위암(gastric cancer), 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택된다.
- [0038] 적합하게는, 본 발명의 전술한 측면의 대상체는 포유동물이다.
- [0039] 바람직하게는, 대상체는 인간이다.
- [0040] 본 명세서 전반에 걸쳐, 달리 명시되지 않는 한, "포함하다(comprise)", "포함하다(comprises)" 및 "포함하는(comprising)"은 배타적이 아니라 포괄적으로 사용되며, 따라서 명시된 정수 또는 정수 그룹은 하나 이상의 다른 명시되지 않은 정수 또는 정수 그룹을 포함할 수 있다.
- [0041] 부정관사 "a" 및 "an"은 단수 부정관사로 읽히지 않거나 부정관사가 참조하는 하나 이상의 단일 주제를 제외하는 것으로 해석되어서는 안 된다는 것도 이해될 것이다. 예를 들어, "a" 단백질은 하나의 단백질, 하나 이상의 단백질 또는 복수의 단백질을 포함한다.

도면의 간단한 설명

- [0042] **도 1: 시험관 내에서 여러 암을 인식하고 제거하는 동종 "기성품" EBV 특이적 T 세포의 효능.** (A) NP43(EBV-) 암 세포와 비교하여 각각의 EBV 관련 암 세포주에 걸쳐 표시된 EBV 관련 유전자의 전사체 수준에서 상대적 배수 발현의 통계적 표현. 하우스키핑(Housekeeping) 유전자, HPRT1 및 18s RNA를 로딩 대조군으로 사용하였다. (B) 이전에 설명된 바와 같이 표시된 동종 EBV 특이적 이펙터 AdE1-LMPpoly 형질감염된 T 세포에 걸쳐 생존 가능한 CD8+ 집단에서 관찰된 LMP1/2 및 EBNA1 특이적 펩티드의 존재하에서 IFN- γ 의 발현을 나타내는 FACS 플롯 [1]. (C) 다양한 이펙터 대 표적 세포 비율(5:1-100:1)에 걸쳐 T 세포 유래 세포독성의 용량 의존적 증가를 강조하는 표시된 EBV 관련 암 세포주 중 LDH 방출 분석에 의해 측정된 세포 세포독성의 통계적 표현. HLA-매칭 T 세포의 세포 독성은 양성 대조군(세포 용해 대조군)과 비교하여 암세포의 T 세포 처리 24시간 후 LDH 방출의 상대적 배수 변화로 표시된다. (D) 표적 세포 비율(5:1-100:1)에 대한 다양한 이펙터에 걸쳐 용량 의존적 방식으로 기원이 다른 여러 EBV 관련 암 세포주의 세포 성장을 억제하는 HLA-일치 T 세포의 영향을 강조하는 MTS 분석에 의해 측정된 세포 생존력의 통계적 표현. SNKT16(HLA)은 TI_001과 TI_002를 모두 처리하여 세포 생존율을 SNU719(HLA)와 C17(HLA)과 각각 비교하였다. 각 암세포의 세포 생존율은 mock(PBS) 처리된 대조군과 비교하여 T 세포 처리 24시간 후 생존 세포의 상대적 배수 변화로 표시된다. (E) HLA-일치 T 세포(이펙터 대 표적 세포 비율 50:1)의 존재 하에 표시된 EBV 관련 암 세포주 중 Annexin V 결합 분석에 의해 측정된 세포 사멸의 통계적 표현. 각 암세포 사이의 세포 사멸은 T 세포 처리 48시간 후 mock(PBS) 처리와 비교하여 T 세포 처리 샘플에서

Annexin V 결합의 상대적 배수 변화로 표시된다. 오차 막대는 3개의 독립적인 실험에서 $\pm$ SEM을 나타낸다.

도 2: 시험관내에서 EBV-연관 암 세포 이펙터 T 세포의 특성 표현형 분석. (A) (i) Ki67+ 인구의 백분율을 비교하는 통계적 표현; (ii) 활성 카스파제(Caspase) 3+ 집단의 백분율; 및 (iii) mock(PBS) 및 HLA-일치 T 세포 처리 24시간 후 생존 가능한 지시된 EBV 관련 암 세포주의 BCL2+ 집단의 백분율. SNU719 및 C17에는 각각 TI_001 및 TI_002 T 세포를 처리한 반면 SNKT16에는 두 T 세포를 모두 처리하였다. SNU719와 C17은 모두 CD45- 집단으로 게이트되었고(gated) SNKT16은 T 세포 집단과 구별하기 위해 CD45+ CD3+ CD56+ 집단으로 게이트되었다. (B) (i) CD8+ 인구의 백분율을 비교하는 통계적 표현; (ii) Ki67+ 인구의 백분율; (iii) GnzB+ (그랜자임(Granzyme) B) 집단의 백분율; (iv) GnzK+(그랜자임 K) 집단의 백분율; (iii) (A)에 기술된 바와 같이 각각의 EBV 관련 암 세포주를 치료하는 데 사용된 생존 T 세포의 Perf+(Perforin) 집단의 백분율. 오차 막대는 3개의 독립적인 실험에서 $\pm$ SEM을 나타낸다. one-way ANOVA를 사용하여 p-값을 계산했다: **p<0.01 및 ***p<0.001.

도 3: 생체내 고형암에 대한 동종 EBV-특이적 세포독성 T 세포의 치료 효능 평가. (A) C17 및 (B) C666.1 유래 종양 이종이식편(tumour xenografts)에서 관찰된 T 세포의 단일 투여 후에 관찰된 T 세포 치료 후 종양 성장 및 생존 퍼센트의 통계적 표현; 및 (C) C17 및 (D) C666.1 유래 종양 이종이식편에서 96시간 간격으로 T 세포 요법의 이중 투여량(검은색 화살표로 표시). C17은 TI_002로 처리된 반면 C666.1은 TI_004로 처리되었다. 디지털 캘리퍼스(digital calliper)를 사용하여 종양 크기(면적, mm²)를 측정하고 각 코호트(cohort)의 평균 종양 크기를 나타내었다. 각 세포주 유래 이종이식편의 종양 성장은 $n \geq 4$ 마리 마우스/그룹의 평균 종양 면적 $\pm$ SEM으로 표시된다. 표시된 기간 동안 마우스 생존을 모니터링하고 데이터의 통계적 유의성을 로그-순위 테스트(log-rank test)로 분석했다: *p<0.05, **p<0.01, 및 ***p<0.001.

도 4: "스위치 항원(switch antigen)" 요법의 평가는 생체내(in vivo) EBV-특이적 세포독성 T 세포의 개선된 효능을 제공한다. (A) (i) 종양 성장을 나타내는 SNU719 유래 이종이식편의 통계적 표현; (ii) 종양 성장의 윤리적 한계에서의 종양 중량(gms); (iii) mock(PBS) 처리된 대조군과 비교하여 처리된 T 세포(각각 96시간 간격으로 2회 투여) 그룹에서 관찰된 T 세포 치료 후 퍼센트 생존. (B) (i) 종양 성장을 나타내는 SNU719 유래 이종이식편의 통계적 표현; (ii) 종양 성장의 윤리적 한계에서의 종양 중량(gms); (iii) mock(PBS) 처리된 대조군과 비교하여 T 세포 처리된(3회 투여량) 그룹에서 관찰된 T 세포 치료 후 생존 퍼센트. 빨간색 화살표는 TI_001의 3회 연속 투여(각각 96시간 간격)를 나타내는 반면 녹색 화살표는 TI_001의 2회 투여 후 투여된 TI_004로 세 번째 투여량을 전환하는 것을 나타낸다. 각 세포주 유래 이종이식편의 종양 성장은 $n \geq 5$ 마리 마우스/그룹의 평균 종양 면적 $\pm$ SEM으로 표시된다. 종양 무게 데이터의 통계적 유의성은 Mann-Whitney t-test에 의해 분석되었다. 표시된 기간 동안 마우스 생존을 모니터링하고 데이터의 통계적 유의성을 로그 순위 테스트로 분석했다: **p<0.01, ***p<0.001, 및 ****p<0.0001.

도 5: 생체내 림프성 악성종양에 대한 동종 EBV-특이적 세포독성 T 세포의 치료 효능 평가. (A) 방사선 조사 후 CD34+ 세포를 사용하고 이식편 대 숙주 질환(GVHD)에 대한 마우스 모니터링을 사용하는 NRG 마우스에서 12주 동안 인간 면역계의 재구성 일정을 보여주는 개략도. 개략도는 또한 재구성 후 EBV 바이러스가 투여되었고(QIMR-WIL 균주) EBV 인큐베이션을 위해 2주 동안 모니터링되었음을 보여준다. HLA-일치 T 세포는 EBV 감염 후 표시된 날(빨간색 화살표로 강조 표시됨)에 투여되었고 마우스는 T 세포 치료 2주 후에 희생되었다. (B) 생존 가능한 (i) CD45+의 백분율의 존재로 표시되는 12주 동안 인간 면역계의 재구성을 강조하는 통계적 표현; (ii) CD45+ CD3+; 및 (iii) 각 그룹에 걸친 CD45+ CD19+ 집단. (C) 각 처리군에 걸쳐 CB33A CD34+ 제대혈 세포(cord blood cells)로 재구성된 $n=3$ 마우스의 비장에서 림프성 악성 종양의 크기 및 존재를 나타내는 비장(spleen)의 총 형태. G1은 TI_005의 3회 연속 투여(각각 96시간 간격)를 나타내는 반면 G2는 TI_005의 2회 투여 후 투여된 TI_002로 세 번째 투여량을 전환하는 것을 나타낸다. (D) 각 처리군에 걸쳐 비장 무게(gms 단위)를 비교하는 통계적 표현. (E) 각 처리군에 걸쳐 CB03 CD34+ 제대혈 세포로 재구성된 $n = 3$ 마우스의 비장에서 림프성 악성 종양의 크기 및 존재를 예시하는 비장의 총 형태. G1은 TI_002로 처리된 반면 G2는 (C)에 표시된 전략에 따라 TI_003으로 처리되었다. (F) 각 처리군에 걸쳐 비장 무게(gms)를 비교하는 통계적 표현. 종양 중량 데이터의 통계적 유의성은 one-way ANOVA로 분석하였다: **p<0.01, 및 ***p<0.001.

도 6: 생체내 동종 EBV-특이적 세포독성 T 세포의 치료 효능에 대한 PD1 억제제의 영향. (A) NanoString Immune 기능 패널을 사용하여 수행된 종양 침윤(TIL) CD8+ 세포에서 분리된 RNA를 관찰한 326개 유전자의 유전자 서명을 나타내는 히트맵. TILs는 종양 크기가 40mm²에 도달했을 때 TI_001 처리의 단일 용량 후 5일 후 6마리의 독립적인 마우스(LT5-10)로부터 SNU719 유래 종양 이종이식편으로부터 분리되었다. TILs에서 관찰된 유전자 발현

을 비자극(LT11) 및 EBV-웍믹스 자극(LT12)과 비교했다. (B) (i) CD3+CD8+ 집단의 백분율을 비교하는 통계적 표현; (ii) CD8+PD1+ 집단의 백분율; (iii) CD8+LAG3+ 집단의 백분율; 및 (iv) 생존 가능한 TILS의 CD8+ TIM3+ 집단의 백분율((A)에 기재됨) 및 비자극 T 세포(T 세포 요법)와 비교. 오차 막대는 3개의 독립적인 실험에서 $\pm$ SEM을 나타낸다. one-way ANOVA를 사용하여 P-값을 계산했다. (C) 종양 성장을 나타내는 SNU719 유래 이종이식편의 통계적 표현; (D) 종양 성장의 윤리적 한계에서의 종양 중량(gms); (E) mock(PBS) 처리된 대조군과 비교하여 각각의 처리군에서 관찰된 T 세포, 항-PD1 및 T 세포 및 항-PD1 요법의 조합 후 생존율. 종양 무게 데이터의 통계적 유의성은 one-way ANOVA에 의해 분석되었다. 표시된 기간 동안 마우스 생존을 모니터링하고 데이터의 통계적 유의성을 로그 순위 테스트로 분석했다: ns 유의하지 않음, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 및 **** $p < 0.0001$.

도 7: MEK1/2 억제제와 EBV-특이적 T 세포의 조합. (A) SNU719 세포와 48시간 배양 후 HLA-일치 EBV 특이적 T 세포 및 MEK1/2 억제제(AZD6244 및 트라메티닙)가 개별적으로 및 조합하여 세포 성장을 억제하는 데 미치는 영향을 강조하는 MTS 분석에 의해 측정된 세포 생존율의 통계적 표현. (B) EBV 특이적 T 세포 및 MEK1/2 억제제의 존재에서 관찰된 Annexin V 결합 분석에 의해 측정된 세포 사멸의 통계적 표현은 SNU719 세포와 함께 인큐베이션 48시간 후에 관찰된 세포 사멸 수준을 강조하는 개별 및 조합 치료로 나타남. (C) 성장 곡선은 HLA-일치 EBV 특이적 T 세포 및 MEK1/2 억제제의 존재에서 개별적으로 및 Xcelligence를 사용하여 조합하여 관찰된 세포 사멸 속도를 강조함. p-값은 one-way ANOVA를 사용하여 계산되었다: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 및 **** $p < 0.0001$.

도 8: JQ1과 EBV-특이적 T 세포의 조합. (A) SNU719 세포와의 인큐베이션 48시간 후 HLA-일치 EBV 특이적 T 세포 및 JQ1이 개별적으로 및 조합하여 세포 성장을 억제하는 데 미치는 영향을 강조하는 MTS 분석에 의해 측정된 세포 생존율의 통계적 표현. (B) EBV 특이적 T 세포 및 JQ1의 개별 및 조합 처리에서 관찰된 Annexin V 결합 분석에 의해 측정된 세포 사멸의 통계적 표현은 SNU719 세포와 인큐베이션 48시간 후에 관찰된 세포 사멸 수준을 강조 표시함. p-값은 one-way ANOVA를 사용하여 계산되었다: ns-유의하지 않음, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 및 **** $p < 0.0001$.

도 9: MEK1/2 억제제의 IC50 값 결정. 표시된 세포주를 0.1 μ M-5 μ M의 셀루마티닙(왼쪽 패널) 및 트라메티닙(오른쪽 패널)과 함께 48시간 동안 인큐베이션한 후 MTS 분석을 사용하여 수행된 세포 생존 능력의 표현. 데이터는 3개의 독립적인 실험에서 평균 $\pm$ SD로 표시된다.

도 10: MEK1/2 억제제와 HLA 일치 동종 EBV-특이적 T 세포의 조합. 세포 성장을 개별적으로 억제하는 25:1의 이펙터 대 표적 비율 및 MEK1/2 억제제 셀루마티닙(상부 패널) 및 트라메티닙(하부 패널) 1 μ M의 농도 및 (A) C17; (B) C666.1; (C) SNU719 및 (D) YCCLE1와 함께 인큐베이션 48시간 후 조합에서 HLA 일치 EBV 특이적 T 세포의 영향을 강조하는 MTS 분석에 의해 측정된 세포 생존율. 데이터는 3개의 독립적인 실험에서 평균 $\pm$ SD로 표시된다. P-값은 one-way ANOVA를 사용하여 계산되었다: ns= 유의하지 않음, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ 및 **** = $p < 0.0001$.

도 11: MEK1/2 억제제 및 HLA 매칭 동종 EBV-특이적 T 세포의 이중 조합의 영향. (A) 세포 성장 곡선은 HLA-일치 EBV 특이적 T 세포(이펙터 대 표적 비율 25:1)의 존재 하에 관찰된 SNU719(상부 패널) 및 C666.1(하부 패널)의 세포 증식 속도를 강조 표시하고, 셀루마티닙(1 μ M)을 개별적으로 또는 조합하여 Xcelligence를 사용하여 측정함. (B) Ki67 기반 세포 증식 및 (C) SNU719 발현(상단 패널) 및 C666.1(하단 패널)의 활성 카스파제-3 기반 세포 사멸에 대한 개별 및 이중 조합의 효과는 유세포 분석을 사용하여 수행됨. 데이터는 3개의 독립적인 실험에서 평균 $\pm$ SD로 표시된다. p-값은 one-way ANOVA를 사용하여 계산되었다: ns= 유의하지 않음, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 및 **** $p < 0.0001$.

도 12: MEK1/2 억제제와 HLA 불일치 동종 특이적 T 세포의 조합. 세포 성장을 개별적으로 억제하는 25:1 및 MEK1/2 억제제(A) 셀루마티닙 및 (B) 트라메티닙 1 μ M 농도 및 SNU719(상부 패널) 및 C666.1(하부 패널)과 함께 48시간 배양 후 조합에서 HLA 불일치 특정 T 세포의 영향을 강조하는 MTS 분석으로 측정된 세포 생존율. SNU719(상부 패널) 및 C666.1(하부 패널)과 함께 배양할 때. (C) HLA-일치 및 HLA-불일치 EBV 특이적 T 세포(25:1의 이펙터 대 타겟 비율에서) 단독 및 셀루마티닙 및 트라메티닙(1 μ M) 조합의 효과를 비교하는 MTS 분석에 의해 측정된 세포 생존율. 데이터는 3개의 독립적인 실험에서 평균 $\pm$ SD로 표시된다. P-값은 one-way ANOVA를 사용하여 계산되었다: ns= 유의하지 않음, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ 및 **** = $p < 0.0001$.

도 13: 암 세포 고유 경로에 대한 MEK1/2 억제제 및 HLA 일치 동종 EBV-특이적 T 세포의 이중 조합의 영향 표현형 분석. SNU719(상단 패널) 및 C666.1(하단 패널) 중 (A) pERK1/2의 발현; (B) MHC-클래스 I; (C) pSTAT3; 및 (D) 유세포 분석을 사용하여 수행된 MYC사이에서 셀루마티닙(1 μ M)과 HLA-일치 EBV 특이적 T 세포(이펙터 대 표

적 비율 25:1)의 개별 및 이중 조합의 16시간 후 암세포 표현형의 표현. 데이터는 3개의 독립적인 실험에서 평균 $\pm$ SD로 표시된다. p-값은 one-way ANOVA를 사용하여 계산되었다: ns= 유의하지 않음, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 및 **** $p < 0.0001$.

도 14: JQ1 억제제의 IC50 값 결정. 표시된 세포주를 48시간 동안 0.5 μ M-10 μ M의 JQ1과 함께 배양한 후 MTS 분석을 사용하여 수행된 세포 생존율의 표현. 데이터는 3개의 독립적인 실험에서 평균 $\pm$ SD로 표시된다.

도 15: JQ1 억제제 및 HLA 매칭 동종 EBV-특이적 T 세포의 이중 조합의 영향. 25:1 및 JQ1(2.5 μ M)의 이펙터 대 표적 비율에서 HLA-일치 EBV 특이적 T 세포가 개별적으로 및 표시된 (A) 위(SNU719, YCCLE1(상부 패널)) 및 비인두암 세포(C17, C666.1(하부 패널))와의 48시간 배양 후 조합세포 성장을 억제하는 데 미치는 영향을 강조하는 MTS 분석으로 측정된 세포 생존율. (B) 세포 성장 곡선은 HLA-일치 EBV 특이적 T 세포(이펙터 대 표적 비율 25:1) 및 JQ1(2.5 μ M)의 존재하에 개별적으로 및 Xcelligence를 사용하여 측정된 조합에서 관찰된 SNU719(상부 패널) 및 C666.1(하부 패널)의 세포 증식 속도를 강조표시를 나타냄. (C) Ki67 기반 세포 증식 및 (D) SNU719 발현(상부 패널) 및 C666.1(하부 패널)의 활성 카스파제-3 기반 세포 사멸에 대한 개별 및 이중 조합의 효과는 유세포 분석을 사용하여 수행되었다. 데이터는 3개의 독립적인 실험에서 평균 $\pm$ SD로 표시된다. p-값은 one-way ANOVA를 사용하여 계산되었다: ns = 유의하지 않음, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 및 **** $p < 0.0001$.

도 16: JQ1 억제제와 HLA 불일치 동종 특이적 T 세포의 조합. (A) 25:1의 이펙터 대 표적 비율에서 HLA 불일치 특정 T 세포의 영향을 강조하는 MTS 분석에 의해 측정된 세포 생존력 및 2.5 μ M 농도의 JQ1 억제제가 개별적으로 및 SNU719(상부 패널) 및 C666.1(하부 패널)과 함께 48시간 배양 후 조합에서 세포 성장을 억제하는 데 미치는 영향. (B) HLA 일치 및 HLA 불일치 EBV 특이적 T 세포(이펙터 대 표적 비율 25:1) 단독 및 SNU719(상부 패널) 및 C666.1(하부 패널)과 함께 배양할 때 JQ1 억제제(2.5 μ M)와 조합의 효과를 비교하는 MTS 분석에 의해 측정된 세포 생존율. 데이터는 3개의 독립적인 실험에서 평균 $\pm$ SD로 표시된다. P-값은 one-way ANOVA를 사용하여 계산되었다: ns= 유의하지 않음, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ 및 **** = $p < 0.0001$.

도 17: JQ1 억제제 및 HLA 매칭 동종 EBV-특이적 T 세포의 이중 조합이 암세포 고유 경로에 미치는 영향의 표현형 분석. (A) MYC; (B) pERK1/2; (C) pAKT; 및 (D) 유세포 분석을 사용하여 수행된 pSTAT3의 표현에 대한 SNU719(상부 패널) 및 C666.1(하부 패널) 중에서 JQ1(2.5 μ M)과 HLA-일치 EBV 특이적 T 세포(이펙터 대 표적 비율 25:1)의 개별 및 이중 조합의 16시간 후 암세포 표현형의 표현. 데이터는 3개의 독립적인 실험에서 평균 $\pm$ SD로 표시된다. p-값은 one-way ANOVA를 사용하여 계산되었다. ns= 유의하지 않음, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 및 **** $p < 0.0001$.

도 19: 생체내 셀루마티닙 및 동종 EBV-특이적 세포독성 T 세포의 이중 조합의 치료 효능 평가. (A) NRG 마우스에서 EBV 양성 SNU719 이종이식편의 성장에 대한 셀루마티닙 및 동종 T 세포(TIG-001)의 이중 조합의 영향을 평가했다. 종양이 있는 마우스에 2회 용량의 HLA-일치 T 세포(검정 화살표로 표시된 마우스당 용량당 2×10^7 T 세포) 및 셀루마티닙(12.5mg/Kg)을 개별적으로 또는 조합하여 연속 14일 동안 경구로 치료했다. 각 이종이식편의 성장은 n=9 마우스/그룹의 평균 종양 면적 $\pm$ SD로 표시된다. (B) 표시된 처리군의 마우스로부터 분리된 종양의 총 형태. (C) 표시된 처리군의 마우스로부터 (B)에 기재된 종양 중량의 표현. 데이터는 그룹당 n=3 마우스의 평균 $\pm$ SD로 표시된다. one-way ANOVA를 사용하여 P-값을 계산했다. (D) 개별적으로 처리된 동종 T 세포(TIG-001)와 셀루마티닙과 조합하여 관찰된 종양 침윤물의 생존 가능한 백분율의 표현은 유세포 분석을 사용하여 CD45, CD3 및 CD8 발현에 의해 결정된다. P-값은 스튜던트 T 테스트(Student T test)를 사용하여 계산되었다. (E) 셀루마티닙 및 동종 T 세포의 개별 및 조합 치료 후 (A)에 기재된 바와 같이 EBV 관련 종양을 보유하는 마우스의 Kaplan-Meier 전체 생존 분석. 동물의 생존(n = 6마우스/그룹)을 지정된 기간 동안 모니터링하고 통계적 유의성을 로그 순위 테스트로 분석했다: ns= 유의하지 않음, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 및 **** $p < 0.0001$.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043]

본 발명은 "기성품(off-the-shelf)" 동종 EBV 특이적 T 세포를 사용한 입양 면역요법이 EBV 관련 또는 EBV 양성 암의 범위를 치료하거나 예방할 수 있다는 놀라운 발견에 적어도 부분적으로 근거를 두고 있다. 이 치료 효과는 다른 EBV 항원 에피토프에 특이적인 EBV 특이적 T 세포 집단의 조합이 사용될 때 특히 효과적인 것으로 나타났다. 또한, 본 발명자들은 동종 EBV-특이적 T 세포와 면역 관문 억제제, MEK1/2 억제제 및/또는 BET 억제제의 조합이 EBV-관련 질병, 장애 또는 상태에 대한 이러한 입양 T 세포 요법의 효능을 상당히 개선할 수 있음을 입증하였다.

[0044]

따라서, 넓은 형태로, 본 발명은 대상체에서 EBV 관련 질병, 장애 또는 상태를 치료 또는 예방하는 방법에 관한

것으로, 상기 방법은 EBV 항원의 에피토프에 결합하거나 인식하는 동종 T 세포 집단을 대상체에 투여하여 대상체의 EBV 관련 질병, 장애 또는 상태를 치료하거나 예방하는 단계를 포함한다.

- [0045] 일 측면에서, 본 발명은 다음 단계를 포함하는, 대상체에서 EBV-관련 질환, 장애 또는 상태를 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다:
- [0046] (a) EBV 항원의 제1 에피토프에 결합하거나 이를 인식하는 동종 T 세포의 제1 집단의 치료학적으로 효과적인 양을 대상체에게 투여하는 단계; 및
- [0047] (b) EBV 항원 또는 추가 EBV 항원의 제2 에피토프에 결합하거나 이를 인식하는 동종 T 세포의 제2 집단의 치료학적으로 효과적인 양을 대상체에게 투여하는 단계;
- [0048] 이로써 대상체의 EBV 관련 질병, 장애 또는 상태를 치료하거나 예방할 수 있음.
- [0049] 관련 측면에서, 본 발명은 대상체에서 EBV-관련 질환, 장애 또는 상태를 치료 또는 예방하기 위한 약학적 조성물을 제공하고, 상기 조성물은 다음을 포함한다:
- [0050] EBV 항원의 제1 에피토프에 결합하거나 이를 인식하는 동종 T 세포의 제1 집단;
- [0051] EBV 항원 또는 추가의 EBV 항원의 제2 에피토프에 결합하거나 이를 인식하는 동종 T 세포의 제2 집단; 및
- [0052] 선택적으로 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 및/또는 부형제.
- [0053] 뒤따르는 설명은 앞서 언급한 두 가지 측면에 동일하게 적용된다.
- [0054] 엡스타인-바 바이러스(Epstein-Barr Virus) 또는 EBV는 일반적인 인간 병원체이며 인간에서 하나 이상의 질병, 장애 또는 상태를 유발하거나 이와 관련될 수 있다. 따라서, 전술한 방법의 특정 실시양태는 EBV 관련 암과 같은 인간의 EBV 감염에 의해 야기되거나 이와 관련된 하나 이상의 질병, 장애 또는 상태를 예방 및/또는 치료하는 것에 관한 것이다. EBV는 주로 상피 세포와 B 림프구를 통해 인간 숙주를 감염시키고, 여기서 인간 숙주에서 장기간 잠복기를 확립할 수 있다. EBV의 1차 감염은 전 세계적으로 감염성 단핵구증(infectious mononucleosis, IM) 사례의 90% 이상을 유발하며, EBV에 감염된 B 세포의 확장을 통해 주로 어린이와 젊은 성인을 감염시킨다. EBV는 또한 버킷 및 호지킨 림프종(Burkitt and Hodgkin's lymphomas), 위 및 비인두 암종(gastric and nasopharyngeal carcinomas), HIV에 감염된 개인의 림프종 및 이식 후 림프증식성 장애(post-transplant lymphoproliferative disorder, PTLTD)를 비롯한 여러 암과 관련이 있다. EBV는 또한 자가면역 질환, 특히 다발성 경화증과 관련이 있는 것으로 밝혀졌다.
- [0055] 본 발명의 맥락에서, "EBV-관련 질병, 장애 또는 상태"는 엡스타인 바 바이러스에 의한 감염으로 인한 또는 이와 관련된 임의의 임상 병리를 의미한다. 이를 위해, EBV 관련 질병, 장애 또는 상태는 EBV에 의해 직접 또는 간접적으로 유발되는 모든 질병 및 환자가 EBV에 감염되기 쉬운 질병을 의미할 수 있다. 전자의 범주에 속하는 질병의 예로는 전염성 단핵구증(infectious mononucleosis), 비인두암, 버킷 림프종이 있다. 후자 범주의 질병(즉, 환자를 EBV 감염 위험에 처하게 하는 질병)에는 후천성 면역 결핍 증후군이 포함되며 일반적으로 장기 이식 및 특정 암 치료를 받는 환자와 같이 면역 억제 상태 또는 면역 체계 기능 감소를 유발하는 모든 상태가 포함된다. 하나의 특정 실시예에서, EBV-관련 질환, 장애 또는 상태는 적절하게는 다발성 경화증이거나 이를 포함한다.
- [0056] 용어 "*EBV-양성 세포(EBV-positive cells)*"는 EBV 또는 하나 이상의 EBV 단백질, 예를 들어 잠복 형태를 발현하는 암 세포를 포함하는 세포를 지칭한다.
- [0057] 바람직한 실시예에서, EBV 관련 질병, 장애 또는 상태는 EBV 관련 및/또는 양성 암이거나 이를 포함한다. 본원에 기재된 바와 같이, 및 달리 명시하지 않는한, 용어 "*EBV 관련 암(EBV-associated cancer)*" 또는 "*EBV 양성 암(EBV-positive cancer)*"은 엡스타인-바 바이러스(EBV)와 관련된 암을 의미한다. 특정 실시예에서, EBV-양성 암은 약 30% 초과, 약 40% 초과, 약 50% 초과, 약 60% 초과, 약 70% 초과 또는 약 80% 초과가 EBV 바이러스를 함유하거나 발현하는 암이다.
- [0058] 본 명세서에서 일반적으로 사용되는 바와 같이, 용어 "*암(cancer)*", "*종양(tumour)*", "*악성(malignant)*" 및 "*악성(malignancy)*"은 질병 또는 상태, 또는 질병 또는 상태와 관련된 세포 또는 조직, 비정상적 또는 비정상적인 세포 증식을 특징, 종양 발생, 종양 마커의 발현, 종양 억제인자 발현 또는 활성의 소실 및/또는 비정상적이거나 비정상적인 세포 표면 마커 발현과 관련된 하나 이상의 유전적 돌연변이 또는 기타 유전적 변화를 포함하는 종종 비정상적이거나 비정상적인 분자 표현형을 동반하는 분화 및/또는 이동을 지칭한다.

- [0059] 암은 공격적이거나 잠재적으로 공격적인 암, 종양 또는 <http://www.cancer.gov/cancertopics/alphabeticallist>의 NCI 암 index에 나열된 것과 같은 기타 악성 종양이 포함될 수 있고, 육종(sarcomas), 암종(carcinomas), 림프종(lymphomas), 백혈병(leukaemias) 및 모세포종(blastomas)과 같은 모든 주요 암 형태를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 여기에는 유방암(breast cancer), 폐 선암종(lung adenocarcinoma)을 포함하는 폐암(lung cancer), 난소암(ovarian cancer), 자궁경부암(cervical cancer), 자궁암 및 전립선암(uterine cancer and prostate cancer)을 포함한 생식계(reproductive system)의 암, 뇌 및 신경계의 암, 두경부암(head and neck cancers), 결장암(colon cancer), 결장직장암 및 위암(colorectal cancer and gastric cancer)을 포함하는 위장관암(gastrointestinal cancers), 간암(liver cancer), 신장암(kidney cancer), 흑색종 및 피부암(melanoma and skin carcinomas)과 같은 피부암(skin cancers), 림프계 암 및 골수단핵구암(lymphoid cancers and myelomonocytic cancers)을 포함하는 혈구암(blood cell cancers), 췌장암 및 뇌하수체암(pancreatic cancer and pituitary cancers)과 같은 내분비계(endocrine system) 암, 뼈 및 연조직암을 포함하는 근골격암(musculoskeletal cancers)이 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 특정 실시예에서, 암은 고형암(solid cancer) 또는 백혈병(leukaemia) 또는 액체암(liquid cancer)이다. 적합하게는, 암은 하나 이상의 EBV 항원, 예를 들어, 앞서 기재된 것들과 같은 과발현을 발현한다.
- [0060] 특정 실시예에서, EBV 관련 암은 비인두 암종, NKT 세포 림프종, 호지킨 림프종, 이식후 림프증식성 질환, 버킷 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종, 위암, 이하선 암종(parotid carcinoma), 유방 암종(breast carcinoma), 평활근육종(leiomyosarcoma) 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택된다. 특정 실시예에서, EBV 관련 암은 이식 후 림프증식성 질병이 아니다.
- [0061] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "분리된(isolated)"은 자연 상태에서 제거되거나 그렇지 않으면 인간 조작을 거친 물질을 의미한다. 분리된 물질은 자연 상태에서 일반적으로 동반되는 구성 요소가 실질적으로 또는 본질적으로 없을 수 있거나, 자연 상태에서 일반적으로 동반하는 구성 요소와 함께 인공 상태가 되도록 조작될 수 있다. 분리된 물질은 재조합, 화학적 합성, 농축, 정제 또는 부분적으로 정제된 형태일 수 있다.
- [0062] 본 명세서에 사용된 "치료하는(treating)", "치료하다(treat)" 또는 "치료(treatment)"는 EBV 관련 질병, 장애 또는 상태가 발병하기 시작한 후 증상 또는 병리학적 징후를 적어도 부분적으로 개선, 제거 또는 감소시키는 치료적 개입을 의미한다. 치료가 대상에 유익하기 위해 절대적일 필요는 없다.
- [0063] 본 명세서에 사용된 "예방하는(preventing)", "예방하다(prevent)" 또는 "예방(prevention)"은 증상 또는 병리학적 징후를 적어도 부분적으로 예방 및/또는 감소시키기 위해, EBV 또는 이의 분자 구성요소에 의한 감염 또는 노출 이전 및/또는 EBV 관련 질병, 장애 또는 상태의 증상 또는 병리학적 징후의 발병 전에 개시되는 작용 과정을 의미한다. 이러한 예방은 대상체에게 유익하기 위해 절대적이거나 완전할 필요는 없음을 이해해야 한다.
- [0064] 용어 "치료적으로 효과적인 양(therapeutically effective amount)"은 특정 제제, 예컨대 EBV-특이적 동종 T 세포 또는 치료제로 치료되는 대상체에서 원하는 효과를 달성하기에 충분한 양을 의미한다. 예를 들어, 이는 EBV 관련 암, 암 전이 및 재발을 포함하는 EBV 관련 질병, 장애 또는 상태를 감소, 완화 및/또는 예방하는 데 필요한 동종 T 세포의 제1 집단, 동종 T 세포의 제2 집단 및/또는 본원에 기재된 치료제를 포함하는 조성물의 양일 수 있다. 일부 실시예에서, "치료적으로 효과적인 양"은 EBV 관련 질병, 장애 또는 상태의 증상을 감소 또는 제거하기에 충분하다. 다른 실시예에서, "치료적으로 효과적인 양"은 원하는 생물학적 효과를 달성하기에 충분한 양, 예를 들어 EBV-관련 암 성장, 재발 및/또는 전이를 감소 또는 예방하는데 효과적인 양이다.
- [0065] 이상적으로, 제제의 치료학적 유효량은 대상체에서 실질적인 세포독성 효과를 유발하지 않으면서 원하는 결과를 유도하기에 충분한 양이다. EBV 관련 질병, 장애 또는 상태를 감소, 완화 및/또는 예방하는 데 유용한 제제의 유효량은 치료되는 대상, 관련 질병, 장애 및/또는 상태(예: EBV 관련 질병, 장애 또는 상태의 유형), 및 치료 조성물의 투여 방식의 유형 및 중증도에 따라 다르다. 본 방법은 상기 언급된 것들에 더하여 암 치료와 같은 하나 이상의 추가 치료를 포함할 수 있음이 이해될 것이다. 이러한 치료에는 약물 요법, 화학 요법, 항체, 핵산 및 기타 생체 분자 요법, 방사선 요법, 수술, 영양 요법, 이완 또는 명상 요법 및 기타 자연 요법 또는 전체론 요법이 포함될 수 있지만 이에 제한되지는 않는다. 일반적으로, 약물, 생체분자(예를 들어, 항체, siRNA와 같은 억제 핵산) 또는 화학요법제는 본원에서 "항암 치료제(anti-cancer therapeutic agents)" 또는 "항암제(anti-cancer agents)"로 지칭된다.
- [0066] "투여하는(administering)" 또는 "투여(administration)"는 특정의 선택된 경로에 의해 본 명세서에 개시된 동종 T 세포 및/또는 치료제 또는 조성물을 동물 대상체로 도입하는 것을 의미한다.

- [0067] 동종 T 세포 및/또는 치료제, 또는 이를 포함하는 조성물의 투여는 정맥내(intravenous), 근육내(intramuscular), 복강내(intraperitoneal), 두개내(intracranial), 경피(transdermal), 경구(oral), 비강내(intranasal), 항문(anal) 및 안구내(intra-ocular)를 포함하는 임의의 공지된 비경구, 국소 또는 경장 경로에 의할 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다.
- [0068] 투여 형태는 타블렛(tablets), 분산액(dispersions), 현탁액(suspensions), 주사(injections), 용액(solutions), 시럽(syrups), 트로키(troches), 캡슐(capsules), 좌약(suppositories), 에어로졸(aerosols), 경피 패치(transdermal patches) 등을 포함한다. 이러한 투여 형태는 또한 이러한 목적을 위해 특별히 설계된 제어 방출 장치 또는 이러한 방식으로 추가로 작용하도록 변형된 다른 형태의 임플란트를 주사 또는 이식하는 것을 포함할 수 있다. 치료제의 제어 방출은 이를 예를 들어 아크릴 수지, 왁스, 고급 지방족 알코올, 폴리락트산 및 폴리글리콜산 및 히드록시프로필메틸 셀룰로오스와 같은 특정 셀룰로오스 유도체를 포함하는 소수성 중합체로 코팅함으로써 달성될 수 있다. 또한, 제어 방출은 다른 중합체 매트릭스, 리포솜 및/또는 미소구체를 사용하여 수행될 수 있다.
- [0069] 경구 또는 비경구 투여에 적합한 본 발명의 조성물은 캡슐, 미리 정해진 양의 본 발명의 하나 이상의 치료제를 각각 함유하는 향낭(sachets) 또는 타블렛, 분말 또는 과립과 같은 개별 단위로 또는 수성 액체, 비수성 액체, 수중유 에멀전(emulsion) 또는 유중수 액체 에멀전의 용액 또는 현탁액으로 제공될 수 있다. 이러한 조성물은 임의의 약학 방법에 의해 제조될 수 있지만, 모든 방법은 하나 이상의 필수 성분을 구성하는 담체와 상기 기재된 바와 같은 하나 이상의 제제를 결합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 조성물은 본 발명의 작용제를 액체 담체 또는 미분된 고체 담체 또는 둘 다를 균일하고 친밀하게 혼합한 다음, 필요한 경우 제품을 원하는 제시로 성형함으로써 제조된다.
- [0070] 본 명세서에 기재된 동종 T 세포, 치료제 및 조성물은 투여 제형과 양립가능한 방식으로, 약학적으로 효과적인 양으로 투여될 수 있다. 본 발명의 맥락에서 환자에게 투여되는 용량은 적절한 기간에 걸쳐 환자에게 유익한 반응을 나타내기에 충분해야 한다. 투여될 제제(들)의 양은 연령, 성별, 체중 및 전반적인 건강 상태를 포함하여 치료 대상에 따라 달라질 수 있으며, 이는 의사의 판단에 따라 달라질 것이다.
- [0071] 특정 실시예에서, 본원에 기재된 바와 같은 EBV-관련 질병, 장애 또는 상태를 치료하는 방법은 동종 T 세포 및/또는 치료제의 제1 및/또는 제2 집단의 적어도 2회 용량(예를 들어, 2,3,4,5,6 등의 용량)을 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 이러한 용량은 필요에 따라 매일, 매주, 격주로, 매월 등과 같은 주기적 방식으로 투여될 수 있다.
- [0072] 본 발명의 하나의 특정한 광범위한 적용은 앞서 기술된 것과 같은 EBV 관련 질병, 장애 또는 상태가 있는 대상체에서 세포 또는 입양 면역요법을 수행하는 방법의 제공이며, 상기 방법은 치료적으로 효과적인 양의 본원에 기재된 동종 T 세포 및 선택적으로 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0073] "세포 면역 요법(cellular immunotherapy)" 또는 "입양 면역 요법(adoptive immunotherapy)"이라는 용어는 암 또는 감염성 질환의 치료를 위해 T 세포와 같은 면역 적격 세포의 이전을 의미한다(참조, 예를 들어, June, C. H., ed., 2001, In: Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore; Vonderheide et al., 2003, Immun. Research 27:1-15). 이를 위해, 입양 면역요법은 T 세포와 같은 자가 또는 동종 세포를 사용하여 면역계와 같은 조직 또는 시스템의 생물학적 기능을 대체, 복구 또는 향상시키는 것을 일반적으로 목표로 하는 전략이라는 것이 이해될 것이다.
- [0074] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "동종(allogeneic)"은 동일한 종에 속하지만 유전적으로 상이한 개체로부터 유래된 T 세포와 같은 세포 또는 조직을 지칭하며, 따라서 일반적으로 면역학적으로 양립할 수 없다. 따라서, 용어 "동종 이계 세포(allogeneic cells)"는 항원적으로 구별되지만 동일한 종에 속하는 세포 유형을 의미한다. 일반적으로 "동종(allogeneic)"라는 용어는 기증자로부터 동일한 종의 수용자에게 이식되는 T 세포와 같은 세포를 정의하는 데 사용된다.
- [0075] 본원에 사용된 용어 "T 세포(T cell)"(즉, T 림프구)는 흉선 세포, 미성숙 T 세포, 성숙한 T 세포 등을 비롯한 포유동물(예: 인간)의 T 세포 계통 내의 모든 세포를 포함하는 것으로 의도된다. 헬퍼(helper) T 세포, 조절(regulatory) T 세포, 세포독성(cytotoxic) T 세포, 자연 살해(natural killer) T 세포 및 기억(memory) T 세포와 같은 다양한 T 세포 집단은 사이토카인(cytokine) 프로파일(profiles) 및 기능을 기반으로 정의할 수 있다. 바람직하게는, T 세포는 CD4 또는 CD8을 발현하지만 둘 모두는 발현하지 않는 성숙한 T 세포 및 T 세포

수용체이다. T 세포 수용체(TCR)는 MHC 또는 HLA 분자에 결합된 항원성 펩티드를 인식하는 역할을 하는 T 세포의 표면에서 발견되는 분자라는 것이 이해될 것이다. 적합하게는, 동종 T 세포는 CD4+ 헬퍼 T 세포 및/또는 CD8+ 세포독성 T 세포를 포함한다. 이와 관련하여, 본원에 기재된 동종 T-세포는 CD4+ 헬퍼 T 세포/CD8+ 세포독성 T 세포의 혼합된 집단에 있을 수 있다.

[0076] 본 발명에 따르면, EBV-특이적 T 세포를 포함하는 동종 T 세포의 제1 및/또는 제2 집단과 같은 동종 T 세포의 집단이 인간 환자에게 투여된다. 인간 환자에게 투여되는 동종 T 세포의 집단은 EBV 관련 질병, 장애 또는 상태의 EBV 양성 세포와 공유되는 HLA 대립유전자에 의해 적절하게 제한된다. 하나의 특정 실시예에서, 동종 T 세포의 제1 집단 및 EBV-관련 질병, 장애 또는 상태의 세포는 둘 모두 제1 MHC 단백질을 엔코딩하는 제1 인간 백혈구 항원(HLA) 대립유전자를 포함하거나, 공유하거나 이에 의해 제한된다. 또 다른 실시예에서, 동종 T 세포의 제2 집단 및 EBV-관련 질병, 장애 또는 상태의 세포는 둘 모두 제2 MHC 단백질을 엔코딩하는 제2 HLA 대립유전자를 포함하거나 이에 의해 제한된다. 일부 실시예에서, 이 HLA 대립유전자 제한은 EBV 관련 질병, 장애 또는 상태의 암 세포와 같은 세포의 HLA 할당을 확인하고, 이러한 세포의 HLA 대립유전자에 의해 제한되는 EBV-특이적 T 세포(또는 동종 T 세포의 집단을 유도하기 위한 T 세포주)를 포함하는 동종 T 세포의 집단을 선택함으로써 보장된다. HLA 할당(즉, HLA 유전자와 유형)은 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 확인(즉, 유형 지정)될 수 있다. HLA 할당을 확인하기 위한 비제한적인 예시적인 방법은 ASHI Laboratory Manual, Edition 4.2(2003)에서 찾을 수 있으며, 이는 여기에 참조로 포함된다.

[0077] 특정 실시예에서, 동종 T 세포의 제1 및/또는 제2 집단은 EBV 관련 질병, 장애 또는 상태의 EBV 양성 세포와 하나 이상(예: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 HLA 대립유전자)의 HLA 대립유전자(예: HLA-A 대립유전자, HLA-B 대립유전자, HLA-C 대립유전자 및/또는 HLA-DR 대립유전자)를 공유한다. 이와 관련하여, 동종 T 세포의 제1 및 제2 집단은 EBV-관련 질환, 장애 또는 상태의 세포와 동일한 HLA 대립유전자 중 하나 이상을 공유할 수 있는 것으로 예상된다. 실제로, 특정 실시예에서, 동종 T 세포의 제1 집단은 동종 T 세포의 제2 집단과 하나 이상의 HLA 대립유전자(예: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 HLA 대립유전자)를 공유한다. 이상적으로, 동종 T 세포의 제1 집단은 적합하게는 하나 이상의 동종 T 세포의 제2 집단의 제2 HLA 대립 유전자와 같은 HLA 대립 유전자와 공유되지 않는(즉, 다른) EBV 관련 질병, 장애 또는 상태의 세포와 공유되는 제1 HLA 대립 유전자와 같은 HLA 대립유전자를 포함한다. 비슷하게, 동종 T 세포의 제2 집단은 적합하게는 하나 이상의 동종 T 세포의 제1 집단에 포함된 제1 HLA 대립유전자와 같은 HLA 대립유전자와도 공유되지 않는(즉, 다른) EBV-연관 질병, 장애 또는 상태의 세포와 공유되는 제2 HLA 대립유전자와 같은 HLA 대립유전자를 포함한다. 이를 위해, 동종 T 세포의 제1 및 제2 집단은 바람직하게는 HLA 대립유전자와 같거나 동일한 보체(complement)를 보유하지 않거나 포함하지 않는다. 또한, 동종 T 세포의 제1 집단은 제2 에피토프를 적합하게 인식하거나 결합하지 않고/하거나 동종 T 세포의 제2 집단은 제1 에피토프를 적합하게 인식하거나 결합하지 않는다.

[0078] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "주조직적합성 복합체(major histocompatibility complex, MHC)"라는 용어는 TCR과 같은 항원 인식 분자가 인식할 수 있도록 항원 및 기타 펩티드 단편에 결합하고 이를 세포 표면에 표시하는 면역계의 일부로 기능하는 항원 제시 분자, 단백질 또는 폴리펩티드를 의미한다. MHC는 인간 MHC와 관련하여 사용될 때 용어 "인간 백혈구 항원(human leukocyte antigen, HLA)"과 상호교환적으로 사용될 수 있으며; MHC는 본원 개시된 고전적 MHC 대립유전자 또는 유전자를 포함하지만 이에 국한되지 않는 모든 HLA 하위유형을 나 타낸다: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, HLA-DM, HLA-DO, HLA-DP, HLA-DQ, 및 HLA-DR, 이에 더 하여 모든 변이체, 이소폼(isoforms), 이소타입(isotypes) 및 기타 이의 생물학적 등가물. MHC 클래스 I(MHC-I) 및 MHC 클래스 II(MHC-II) 분자는 별개의 항원 처리 경로를 사용한다. 일반적으로, 세포내 항원에서 유래된 펩티드는 MHC 클래스 I 분자에 의해 CD8+ T 세포에 제시되며, 이는 거의 모든 세포에서 발견되는 반면, 세포외 항원 유래 펩티드는 MHC-II 분자에 의해 CD4+ T 세포에 제시된다. 그러나 이 일반 원칙에 대한 몇 가지 예외가 관찰되었다.

[0079] 본원에 개시된 특정 실시예에서, 특정 EBV-특이적 항원, 펩티드 및/또는 에피토프는 EBV 관련 질병, 장애 또는 상태의 세포에 대한 적절한 MHC 클래스 I 또는 II 단백질의 맥락에서 항원-MHC 복합체에서 확인되고 제시된다. 예를 들어, 제1 MHC 단백질은 동종 T 세포의 제1 집단에 의한 인식을 위해 EBV 관련 질병, 장애 또는 상태의 세포에 EBV 항원의 제1 에피토프를 적합하게 제시하고, 제2 MHC 단백질은 동종 T 세포의 제2 집단에 의한 인식을 위해 EBV 관련 질병, 장애 또는 상태의 세포에 EBV 항원 또는 추가 EBV 항원의 제2 에피토프를 제시할 수 있다. 상기 기재에 비추어 볼때, 본 명세서에 기재된 동종 T 세포의 유전적 구성은 어떤 HLA/MHC 대립유전자가 특정 대상체 및/또는 특정 세트의 EBV 항원을 갖는 EBV 관련 질병, 장애 또는 상태에 적합한지를 결정하기 위해 평가 될 수 있다.

- [0080] 적합하게는, EBV 항원 및/또는 추가 EBV 항원은 당업계에 공지된 임의의 것일 수 있다. 예시적인 EBV 항원은 단백질 EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C, LMP1 및 LMP2를 포함한다. 특정 실시예에서, EBV 항원 및/또는 추가 EBV 항원은 EBNA1, LMP1 및/또는 LMP2이거나 이를 포함한다.
- [0081] 본 명세서에 기재된 동종 T 세포는 적합하게는 EBV 항원 및/또는 추가 EBV 항원에 대한 항원 특이성을 갖는다. 본 명세서에 사용된 "항원 특이성을 갖는다(have antigen specificity)" 및 "항원-특이적 반응을 유도한다(elicit antigen-specific response)"라는 문구는 동종 T 세포가 항원에 특이적으로 결합하고 면역학적으로 인식하여 항원에 대한 동종 T 세포의 결합이 면역 반응을 유도할 수 있음을 의미한다. 특정 이론이나 기전에 얽매이지 않고, EBV 관련 질병, 장애 또는 상태의 EBV 양성 세포에 대한 항원 특이적 반응을 유도함으로써, 본 명세서에 기술된 EBV-특이적 동종 T 세포는 다음 중 하나 이상을 제공할 수 있다: EBV 양성 암세포와 같은 EBV 양성 세포의 표적화 및 파괴, 암세포 감소 또는 제거, 면역 세포의 종양 부위 침윤 촉진, 항암 반응의 강화/확장.
- [0082] 본 명세서에서 일반적으로 사용되는 "에피토프(epitope)"는 단백질의 아미노산의 연속적 또는 불연속적 서열을 포함하는 항원성 단백질 단편이고, 상기 에피토프는 MHC 단백질과 같은 항체 또는 다른 항원 수용체와 같은 면역계의 요소에 의해 인식되거나 결합될 수 있다. 대부분의 EBV 항원이 다중 에피토프 또는 항원 결정기를 가질 수 있다는 것은 당업자에 의해 잘 이해될 것이다.
- [0083] 전술한 바에 비추어, 제1 에피토프는 EBV 단백질의 항원성 단백질 단편일 수 있고, 제2 에피토프는 적합하게는 제1 에피토프가 유래된 동일한 EBV 단백질 또는 추가의 EBV 단백질과 상이한 항원성 단백질 단편이다.
- [0084] 본 명세서에 사용된 "단백질(protein)"은 아미노산 중합체이고, 상기 아미노산은 D-아미노산, L-아미노산, 천연(natural) 및/또는 비-천연(non-natural) 아미노산을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 일반적으로 사용되는 "펩티드(peptide)"는 60개 이하의 인접 아미노산을 포함하는 단백질이다. 본 명세서에서 일반적으로 사용되는 "폴리펩티드(poly peptide)"는 60개 이상의 연속 아미노산을 포함하는 단백질이다. "단백질"이라는 용어는 당단백질 및 지단백질과 같은 단백질 함유 분자를 포함하는 것으로 이해되어야 하지만, 이에 제한되지는 않는다.
- [0085] 일부 실시예에서, 본 명세서에 기재된 동종 T 세포 및/또는 치료제(이들의 조합 포함)는 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 조성물의 형태로 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0086] 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 및/또는 부형제는 전신 투여에 안전하게 사용될 수 있는 임의의 고체, 반고체, 겔 또는 액체 충전제, 희석제 또는 캡슐화 물질을 포함할 수 있음을 이해할 것이다. 특정 투여 경로에 따라 담체, 희석제 및/또는 부형제는 설탕, 전분(starches), 셀룰로오스(cellulose) 및 그 유도체, 맥아(malt), 젤라틴(gelatine), 활석(talc), 황산칼슘(calcium sulphate), 식물성 기름(vegetable oils), 합성유(synthetic oils), 폴리올(polyols), 알긴산(alginic acid), 등장식염수(isotonic saline), 발열물질이 없는 물(pyrogen-free water), 습윤제 또는 유화제(wetting or emulsifying agents), 팽창제(bulking agents), 활택제(glidants), 코팅(coatings)(예: 장용 코팅(enteric coatings)), 연화제(emollients), 결합제(binders), 충전제(fillers), 분해제(disintegrants), 윤활제(lubricants), pH 완충제(pH buffering agents)(예: 인산염 완충제(phosphate buffers)) 및/또는 향미제(flavouring agents)를 포함하는 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 조성물은 타블렛, 분산액, 현탁액, 주사용 용액, 시럽, 트로키(troches), 캡슐, 좌약(suppositories), 에어로졸(aerosols), 경피 패치 등을 포함하는 임의의 하나 이상의 투여 형태로 인간에게 투여될 수 있다.
- [0087] 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 및 부형제를 설명하는 유용한 참고문헌은 본 명세서에 참고로 포함되는 Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Publishing Co. N.J. USA, 1991)이다.
- [0088] 특정 실시예에서, 동종 T 세포의 제2 집단은 동종 T 세포의 제1 집단의 (i) 투여전; (ii) 투여후; 또는 (iii) 투여와 동시에 투여된다. 하나의 실시예에서, 동종 T 세포의 제1 집단의 투여 및 동종 T 세포의 제2 집단의 투여(순차적으로 또는 동시에)는 EBV 관련 질병, 장애 또는 상태의 치료 또는 예방을 초래하고, 이는 동종 T 세포의 제1 집단 또는 다른 집단의 부재 하에 동종 T 세포의 제2 집단의 투여로부터의 이러한 치료 또는 예방보다 더 크다.
- [0089] 특정 실시예에서, 상기 방법은 *시험관내*에서 동종 T 세포의 제1 및/또는 제2 집단을 생성하는 초기 단계를 추가로 포함한다. 인간 환자에게 투여되는 EBV-특이적 T 세포를 포함하는 동종 T 세포의 제1 및 제2 집단은 당업계에 공지된 방법에 의해 생성 및 해동될 수 있고, 바람직하게는 투여 전에 확장되는 동결보존된 T 세포주의 기존 은행으로부터 선택될 수 있다.

- [0090] 특정 실시예에서, *시험관 내*에서 동종 T 세포의 집단을 생성하는 단계는 EBV-특이적 T 세포를 생성하도록 동종 T 세포를 하나 이상의 EBV 항원에 감작화(즉, 자극)시키는 것을 포함한다. *시험관내*에서 동종 T 세포의 집단을 생성하기 위해 사용되는 동종 T 세포는 당업계에서 공지된 임의의 방법에 의해 동종 T 세포의 공여자로부터 분리될 수 있다. 특정 실시예에서, 동종 T 세포는 동종 T 세포 공여자의 PBMC로부터 분리된 말초 혈액 림프구로부터 농축된다.
- [0091] 특정 실시예에서, 수지상 세포(dendritic cells), 사이토카인 활성화 단핵구 (cytokine-activated monocytes) 또는 말초 혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells)와 같은 항원 제시 세포를 하나 이상의 EBV 항원으로부터 유래된 하나 이상의 면역원성 펩티드로 로딩(loading)하거나 형질전환시키는 동종 T 세포를 감작시키는 단계를 포함한다. 이를 위해, 항원 제시 세포는 예를 들어 하나 이상의 EBV 항원으로부터 유래된 중첩 펩티드를 포함하는 폴리토프(polytope) 또는 풀(pool)로 로딩되거나 형질전환될 수 있다. 하나의 특정 실시예에서, *시험관 내*에서 동종 T 세포의 집단을 생성하는 단계는 말초 혈액 단핵 세포를 사용하여 동종 T 세포를 감작시키는 것을 포함한다.
- [0092] 적합하게는, 전술한 방법은 대상체에게 치료제를 투여하는 추가 단계를 포함한다. 유사하게, 상기 조성물은 치료제를 추가로 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "*치료제(therapeutic agent)*"는 대상체의 EBV 관련 질병, 장애 또는 상태와 같은 바람직하지 않은 상태 또는 질병을 이미지화, 영향, 치료, 해결, 예방 또는 개선하는 데 사용되는 화합물 또는 분자를 의미한다.
- [0093] 치료제는 당업계에 공지된 임의의 것일 수 있다. 일부 실시예에서, 치료제는 항암제 또는 항암제이거나 이를 포함한다. 일반적으로, 약물, 생체분자(예를 들어, 항체, siRNA와 같은 억제 핵산) 또는 화학요법제는 본원에서 "*항암 치료제(anti-cancer therapeutic agents)*"로 지칭된다. 예를 들면 다음이 포함될 수 있다: 파클리탁셀(paclitaxel), 독소루비신(doxorubicin), 메토틱세이트(methotrexate), 이리노테칸(irinotecan), 다카바진(dacarbazine), 테모졸로미드(temozolomide) 및 시스플라틴(cisplatin)과 같은 화학요법제(chemotherapeutic agents), 이에 제한되지 않음; 항-PD-1 항체(예를 들어, 니볼루맵(Nivolumab)) 및 항-CTLA4 항체(예를 들어, 이필리무맵(Ipilimumab))와 같은 생물치료제(biotherapeutic) 또는 면역치료제(immunotherapeutic agents), 이에 제한되지 않음; 및/또는 MAPK 경로(즉, Ras-Raf-MEK-ERK 신호 전달) 억제제 및 BET 억제제와 같은 분자 표적 제제.
- [0094] 특정 실시예에서, 치료제는 면역치료제, 미토겐 활성화 단백질 키나제(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 경로 억제제, BET 억제제 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택된다.
- [0095] 본 명세서에 사용된 용어 "*면역치료제(immunotherapeutic agent)*"는 대상체에서 면역 반응을 유도, 향상 또는 억제할 수 있는 임의의 제제를 지칭한다. 특정 실시예에서, 면역치료제는 면역 체크포인트 조절제(immune checkpoint modulator)일 수 있다. 본 명세서에 사용된 용어 "*면역 체크포인트 조절제(immune checkpoint modulator)*"는 T-세포 활성화 또는 기능을 조절하는 하나 이상의 면역 체크포인트 단백질을 완전히 또는 부분적으로 감소, 억제, 간섭 또는 조절할 수 있는 분자를 지칭한다. 특정 실시예에서, 면역 체크포인트 조절제는 면역 체크포인트 억제제이다. 면역 체크포인트 단백질의 비제한적인 예는 세포독성 T-림프구 관련 항원(cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen)(CTLA, 예: CTLA4) 및 이의 리간드 CD 80 및 CD86; 프로그램된 세포 사멸 단백질(programmed cell death protein)(PD, 예: PD-1) 및 이의 리간드 및 PDL2; 인돌아민-피롤 2,3-디옥시게나제-1(indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase-1, IDO1); T 세포막 단백질(TIM, 예를 들어, TIM3); 아데노신 A2a 수용체(adenosine A2a receptor)(A2aR); 림프구 활성화 유전자(LAG, 예를 들어, LAG3); 킬러 면역글로불린 수용체(killer immunoglobulin receptor, KIR); CD96; 등을 포함한다. 이들 단백질은 일반적으로 공동-자극 또는 억제 T-세포 반응을 담당한다는 것이 이해될 것이다. 면역 체크포인트 단백질은 자가 내성과 생리적 면역 반응의 기간 및 진폭을 광범위하게 조절하고 유지할 수 있다.
- [0096] 특정 실시예에서, 면역 체크포인트 조절제(예를 들어, 면역 체크포인트 억제제)는 소분자, 항체, 재조합 결합 단백질, 또는 면역 체크포인트 단백질에 결합하거나 그의 생물학적 활성을 억제하는 펩티드일 수 있다.
- [0097] 면역 체크포인트 조절제의 비제한적 예(예: 면역 체크포인트 억제제)는 CTLA4 억제제(예: 이필리무맵(Ipilimumab)), PD1 억제제(예: 니볼루맵(nivolumab)), PDL1 억제제(예: 아테졸리주맵(Atezolizumab), 아벨루맵(Avelumab), 더발루맵(Durvalumab)), AG3 억제제, KIR 억제제, B7-H3 리간드, B7-H4 리간드, CD96 억제제 및 TIM3 억제제를 포함한다. 특정 실시예에서, 면역 체크포인트 억제제는 항-PD1 항체, 항-PDL1 항체, 항-CTLA4 항체, 항-LAG3 항체, 항-TIM3 항체, 항-CD96 항체 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택된다.

- [0098] 하나의 특정 실시예에서, 면역 체크포인트 억제제는 PD1 억제제이거나 이를 포함할 수 있고, 더욱 특별하게 항-PD1 항체이거나 이를 포함할 수 있다. 예시적인 PD1 억제제 및 항-PD1 항체는 펌브롤리주맙(Pembrolizumab), 니볼루맙(Nivolumab), 세미플리맙(Cemiplimab), 스파르탈리주맙(Spartalizumab), 캄렐리주맙(Camrelizumab), 신틸리맙(Sintilimab), 티슬레리주맙(Tislelizumab), 토리팔리맙(Toripalimab), AMP-224 및 AMP-514를 포함한다.
- [0099] 본 명세서에 사용된 "항체(antibody)"는 이의 단편을 포함하는 면역글로불린 단백질이거나 이를 포함한다. 용어 "면역글로불린(immunoglobulin)"은 면역글로불린 동형 IgA, IgD, IgM, IgG 및 IgE 및 이의 항원 결합 단편을 포함하는 포유동물 면역글로불린 유전자 복합체의 임의의 항원 결합 단백질 생성물을 포함한다. "면역글로불린"이라는 용어에는 재조합, 키메라(chimeric) 또는 인간화(humanized) 면역글로불린이 포함되며, 그렇지 않으면 변경되거나 변이된 아미노산 잔기, 서열 및/또는 글리코실화가 포함되고, 이는 자연 발생이든 인간 개입(예: 재조합 DNA 기술)에 의해 생성된다.
- [0100] 본 발명은 또한 Fc, Fab 또는 F(ab)₂ 단편 또는 단일 사슬 Fv 항체(scFv)와 같은 항체 단편을 그 범위 내에 포함한다. 본 발명은 또한 복수의 scFv 뿐만 아니라 이량체화-활성화된 반항체(dimerisation-activated demibodies)를 포함하는 다가(multivalent) 재조합 항체 단편, 소위 디아바디(diabodies), 트리아바디(triabodies) 및/또는 테트라바디(tetrabodies)를 포함하는 것으로 고려된다(예를 들어, WO/2007/062466). 예를 들어, 이러한 항체는 Holliger et al., 1993 Proc Natl Acad Sci USA 90:6444-6448; or in Kipriyanov, 2009 Methods Mol Biol 562:177-93에 기술된 방법에 따라 제조할 수 있고, 그 전체가 참고로 여기에 포함된다.
- [0101] 일반적으로, 항체 및 항체 단편은 다클론성(polyclonal) 또는 단클론성(monoclonal)일 수 있다. 또한 항체는 적절한 숙주 세포에서 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 핵산을 발현함으로써 재조합 합성 항체 또는 항체 단편으로서 생산될 수 있음이 이해될 것이다. 파지 디스플레이 방법을 포함한 재조합 항체 발현 및 선택 기술의 비제한적인 예는 Chapter 17 of Coligan et al., CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY and Zuberbuhler et al., 2009, Protein Engineering, Design & Selection 22 169에 기술되어 있다.
- [0102] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "MAPK 억제제(MAPK inhibitor)"는 대상체에 투여시 대상체의 암세포와 같은 하나 이상의 세포에서 MAPK 경로를 억제하는 임의의 화합물 또는 화학 물질을 지칭한다. MAPK 억제제는 저분자량 억제제(low molecular weight inhibitors), 항체 또는 항체 단편, 안티센스 컨스트럭트(antisense constructs), 작은 억제제(inhibitory) RNA(즉, dsRNA에 의한 RNA 간섭(interference); RNAi) 및 리보자임(ribozymes)을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시예에서, MAPK 억제제는 작은 유기 분자입니다. MAPK 억제제는 예를 들어 RAS 억제제, RAF 억제제, MEK 억제제, ERK 억제제, JNK 억제제 및/또는 p38 억제제를 포함한다. MAPK 경로 억제제는 Ras (i.e., HRas, KRas and/or NRas), Raf (i.e., A-Raf, B-Raf and/or C-Raf), 미토겐 활성화 단백질 키나제 키나제(즉, MEK1/2) 및/또는 세포외 신호 조절 키나제(즉, ERK1/2) 기능 및/또는 신호 전달의 특정 억제제, 이의 돌연변이 변이체를 포함하는 당업계의 공지된 임의의 것일 수 있다. 예를 들어, 이러한 MAPK 경로 억제제는 다음 중에서 선택될 수 있다:
- [0103] i) MEK 억제제: AZD6244, R04987655, R05126766, TAK-733, MSC1936369B (AS703026), GSK1 120212, BAY86-9766, GDC-0973, GDC-0623, PD325901, ARRY-438162, CM 040, E6201, ARRY300;
- [0104] ii) Raf 및/또는 B-Raf 선택적 억제제: PLX4032, GSK21 18436, Sorafenib (BAY-43-9006), BMS-908662 (XL-281), RAF265, RG-7256 (R05212054, PLX3603), R05126766, ARQ-736, E-3810, DCC-2036;
- [0105] iii) ERK 억제제: Ulixertinib (BVD-523), SCH772984, DEL-22379, MK-8353 (SCH900353), AZD0364, VX-11e, CC-90003;
- [0106] iv) Ras 억제제: MCI-062, Salirasib, BAY 293, ARS-1620.
- [0107] BET 억제제는 당업계에 공지된 임의의 것일 수 있는 것으로 예상된다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "BET 억제제(BET inhibitor)"는 BET에 결합하고 BET의 생물학적 활성을 억제 및/또는 감소시키는 화합물을 지칭한다. 일부 실시예에서, BET 억제제는 BET의 생물학적 활성을 실질적으로 또는 완전히 억제한다. 일부 실시예에서, 생물학적 활성은 BET가 염색질(예: DNA와 관련된 히스톤) 및/또는 다른 아세틸화 단백질에 결합하는 것이다. 적합하게는, BET 억제제는 BRD2, BRD3, BRD4, 및 BRDT 중 하나 이상을 억제한다. BET 억제제는 미국 특허 공개번호2014/0336190에 개시된 벤즈이미다졸(benzimidazole) 유도체와 같은 브로모도메인-함유(bromodomain-containing proteins) 단백질의 조절제를 포함한다. 예시적인 BET 억제제는 I-BET 151 (GSK1210151A), I-BET 762 (GSK525762), OTX-015, TEN-010, CPI-203, CPI-0610, olinone, RVX-208, LY294002, AZD5153, MT-1 및 MS645를 포함한다.

- [0108] 또 다른 측면에서, 본 발명은 다음 단계를 포함하는, 대상체에서 EBV-관련 질병, 장애 또는 상태를 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다:
- [0109] (a) EBV 항원의 에피토프에 결합하거나 이를 인식하는 동종 T 세포의 집단을 대상체에게 투여하는 단계; 및
- [0110] (b) 대상체에게 치료제를 투여하는 단계, 상기 치료제는 면역치료제, MAPK 경로 억제제, BET 억제제 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택됨;
- [0111] 이로써 대상체의 EBV 관련 질병, 장애 또는 상태를 치료 또는 예방할 수 있다.
- [0112] 관련 측면에서, 본 발명은 대상체에서 EBV-관련 질병, 장애 또는 상태를 치료 또는 예방하기 위한 약학적 조성물에 관한 것이고, 상기 조성물은 다음을 포함한다:
- [0113] EBV 항원의 에피토프에 결합하거나 이를 인식하는 동종 T 세포의 집단;
- [0114] 치료제, 여기서 치료제는 면역치료제, MAPK 경로 억제제, BET 억제제 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택됨; 및
- [0115] 선택적으로 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 및/또는 부형제.
- [0116] "약제학적으로 허용되는 담체(*pharmaceutically acceptable carrier*)"는 생물학적으로 또는 달리 바람직하지 않은 물질로 구성된 약학적 비히클(vehicle)을 의미하며, 즉 물질은 임의의 또는 실질적인 부작용 없이 선택된 활성제와 함께 대상체에게 투여될 수 있다. 담체는 희석제, 세제, 착색제, 습윤제 또는 유화제, pH 완충제, 방부제, 형질감염제 등과 같은 부형제 및 기타 첨가제를 포함할 수 있다.
- [0117] 유사하게, 본 명세서에 제공된 바와 같은 화합물의 "약제학적으로 허용되는" 염, 에스테르(ester), 아미드(amide), 전구약물(prodrug) 또는 유도체는 이것이 생물학적으로 또는 달리 바람직하지 않은 것이 아닌 염, 에스테르, 아미드, 전구약물 또는 유도체이다.
- [0118] 뒤따르는 설명은 앞서 언급한 두 가지 측면에 동일하게 적용된다.
- [0119] 적합하게는, 동종 T 세포의 집단 및 EBV-관련 질병, 장애 또는 상태의 세포는 MHC 단백질을 엔코딩하는 인간 백혈구 항원(HLA) 대립유전자를 공유한다. 특정 실시예에서, MHC 단백질은 EBV 관련 질병, 장애 또는 상태의 세포에 EBV 항원의 에피토프를 제공한다.
- [0120] 면역치료제, MAPK 경로 억제제 및/또는 BET 억제제는 앞서 기술된 것과 같은 당업계에 공지된 임의의 것일 수 있다. 특정 실시예에서, MAPK 경로 억제제는 MEK1/2 억제제이거나 이를 포함한다. 또 다른 실시예에서, 면역치료제는 항-PD1 항체와 같은 면역 체크포인트 억제제이거나 이를 포함한다.
- [0121] 적합하게는, 동종 T 세포의 집단은 치료제의 투여 전, 투여와 동시에 및/또는 투여 후에 투여된다. 따라서, 특정 실시예에서, 대상체에게 치료제가 투여되고 이어서 동종 T 세포가 투여된다. 대안적인 실시예에서, 개인에게 동종 T 세포가 투여되고 이어서 치료제가 투여된다. 또 다른 대안적인 실시예에서, 동종 T 세포는 치료제와 동시에 투여된다.
- [0122] 하나의 실시예에서, 본 실시예의 방법은 앞서 기술된 방법과 같은 방법에 의해 *시험관내*에서 동종 T 세포의 집단을 생성하는 초기 단계를 추가로 포함한다.
- [0123] 적합하게는, EBV 항원 및/또는 추가 EBV 항원은 EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C, LMP1, LMP2 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택된다. 더욱 특별하게, EBV 항원 및/또는 추가 EBV 항원은 적합하게는 EBNA1, LMP1 및/또는 LMP2이거나 이를 포함한다.
- [0124] 적합하게는, EBV-관련 질병, 장애 또는 상태는 EBV-관련 암, 예를 들어, 앞서 기재된 암이거나 이를 포함한다. 하나의 실시예에서, EBV 관련 암은 비인두 암종, NKT 세포 림프종, 호지킨 림프종, 이식후 림프증식성 질환, 버킷 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종, 위암, 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택된다.
- [0125] 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상체에서 EBV 관련 질병, 장애 또는 상태의 치료 또는 예방을 위한 의약 제조에서 EBV 항원의 제1 에피토프에 결합하거나 이를 인식하는, 본 명세서에 기재된 것과 같은 동종 T 세포의 제1 집단의 용도에 관한 것으로서; 상기 동종 T 세포의 제1 집단은 다음과 조합하여 투여된다: (a) 예를 들어 본 명세서에 기재된 것과 같은 EBV 항원 또는 추가 EBV 항원의 제2 에피토프에 결합하거나 이를 인식하는 동종 T 세포의 제2 집단; 및/또는 (b) 본 명세서에 기재된 것과 같은 치료제, 상기 치료제는 면역치료제, MAPK 경로

억제제, BET 억제제 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택됨.

[0126] 마지막 측면에서, 본 발명은 대상체에서 EBV-관련 질병, 장애 또는 상태의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 EBV 항원의 제1 에피토프에 결합하거나 이를 인식하는 본 명세서에 기재된 것과 같은 동종 T 세포의 제1 집단을 제공하고; 상기 동종 T 세포의 제1 집단은 다음과 조합하여 투여된다: (a) 본 명세서에 기재된 것과 같은 EBV 항원 또는 추가 EBV 항원의 제2 에피토프에 결합하거나 이를 인식하는 동종 T 세포의 제2 집단; 및/또는 (b) 본 명세서에 기재된 것과 같은 치료제, 상기 치료제는 면역치료제, MAPK 경로 억제제, BET 억제제 및 이의 임의의 조합으로 구성된 군에서 선택됨.

[0127] 전술한 측면과 관련하여, "대상체(subject)"라는 용어는 인간을 포함한 포유동물, 수형 동물(예: 말, 낙타, 그레이하운드(greyhounds)), 가축(예: 소, 양, 말) 및 반려 동물(예: 고양이 및 개)을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 하나의 실시예에서, 대상체는 인간이다.

[0128] 바람직한 실시예가 상세하게 기술되고 실제적인 효과를 낼 수 있도록, 다음의 비제한적인 실시예를 참조한다.

[0129] 실시예

[0130] 실시예 1

[0131] 동종 "기성품(off-the-shelf)" T 세포 요법은 이식 수용자의 감염 합병증을 치료하기 위한 강력한 도구로 등장했다. 이 동종 항원 특이적 T 세포는 건강한 기증자의 대규모 폐닐에서 수집한 말초 혈액 림프구에서 확장되어 다양한 HLA 적용 범위를 제공하고 동결 보존되어 필요한 HLA 일치 이식 환자에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명자들은 다발성 암(multiple cancers) 치료를 위한 치료 도구로서 동종 EBV 특이적 T 세포의 전임상(preclinical) 평가를 제공한다. 또한, 본 발명자들은 동종 항원 특이적 T 세포와 PD1/PD-L1 축을 차단하는 항체의 조합이 EBV 암에 대한 입양 T 세포 요법의 효능을 유의하게 개선한다는 것을 입증했다.

[0132] 재료 및 방법

[0133] 세포 배양

[0134] 본 발명에 사용된 EBV 관련 세포주는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, Virginia, USA)에서 구입했으며 ATCC 권장 사항에 따라 배양 및 유지했다. 본 발명에 사용된 각 EBV 관련 세포주 및 해당 HLA는 표 1에 나열되어 있다. 이 세포주의 배양은 37 °C에서 20% 산소 수준과 5% CO₂에서 배양하여 유지되었다. 모든 조직 배양 플라스틱 제품은 영국 Corning® Stone Staffordshire(플라스크 및 플레이트) 및 미국 Costar® Washington DC(플라스틱 피켓)에서 구입했다. 모든 세포주는 마이코플라스마(Mycoplasma) 감염에 대해 정기적으로 테스트되었으며, QIMR Berghofer Medical Research Institute의 과학 서비스에서 STR(short tandem repeat) 프로파일링(profiling)을 사용하여 인증되었다.

[0135] RNA 추출 및 정량적 실시간 PCR

[0136] 제조사의 지침에 따라 QIAgen RNeasy® 키트(Valencia, CA, USA)를 사용하여 각 세포주에서 RNA를 추출했다. 각 세포주의 1x10⁶ 세포를 도말하고 트립신-EDTA(Sigma Aldrich®)를 사용하여 수확하고 세척(PBS, 2회)한 후 4 °C(키트에 제공)에서 적절한 부피의 RLT 완충액을 첨가하고 제조사의 지침에 따라 다음 단계를 수행하였다. RNA 추출 후 iScript™ cDNA 키트(Bio-Rad Laboratories Inc)에 제공된 DNase 효소를 사용하여 DNase 분해 단계를 수행하였다. RNA 품질 및 양은 Nanodrop ND-1000 분광광도계(Thermo-Scientific)를 사용하여 액세스했다(accessed). 역전사는 제조사 지침에 따라 iScript™ 역전사효소(Bio-Rad Laboratories Inc.)를 사용하여 수행되었다. 사용된 사이클 조건은 25 °C에서 5분 동안 프라이밍(priming), 46 °C에서 20분 동안 역전사 및 95 °C에서 1분 동안 역전사효소 불활성화였다. qRT-PCR은 Biorad CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System을 사용하여 384웰 플레이트에서 수행되었다. 프라이머(primer)는 각 간행물에서 얻은 EBV 관련 유전자 LMP1, LMP2 및 EBNA1로 구성되었다. 10 μL의 전체 부피에서 마스터믹스(mastermix)의 구성에는 5 μL의 Sybr 그린, 1mM의 각 프라이머, 1 μL의 희석된 cDNA 및 3 μL의 H2O가 포함되어 중복으로 수행된 3개의 생물학적 복제물이 있다. 사용된 사이클 조건은 95 °C에서 5분, 950C에서 10초, 60 °C에서 10초, 720C에서 5초, 최종 신장 단계 72 °C에서 5분의 40주기였다. C_t 값 계산은 함께 제공되는 Biorad CFX384 소프트웨어 버전 1.5.0.39를 사용하여 수행한 후 ΔΔC_t 방법을 사용하여 계산을 수행했으며 값은 18sRNA 및 HPRT로 정규화되었다. 각 생물학적 cDNA 샘플 분석에 대해, 역전사효소 처리 없이 cDNA 용액을 포함하는 음성 대조군은 게놈 DNA 오염을 보장하지 않는다. 이와 함께 각 프라이머 세트에는 H₂O만 포함하는 일반 음성 대조군이 포함되었다. 프라이머는 LMP1: FP-5'-

CAGTCAGGCAAGCCTATGA3', RP-5'-CTGGTTCCGGTGGAGATGA3'; LMP2: 5'-AGCTGTAAGTGTGGTTCCATGAC-3', RP-5'-GCCCCCTGGCGAAGAG-3'; EBNA1: FP-5'-TACAGGACCTGGAAATGGCC-3', RP-5'-TCTTTGAGGTCCACTGCCG-3'; HPRT1: FP-5'-CCTGGCGTCGTGATTAGTGAT-3', RP-5'-AGACGTTTCAGTCTGTCCATAA-3'; 18sRNA: 5'-CGAAAGCATTACCAAGGAC-3', RP-5'-TTATTGTGTCTGGACCTGG-3'을 포함한다.

[0137] **T 세포의 생성**

[0138] LMP/EBNA1 특이적 "기성품(off the shelf)" T 세포 은행을 생성하기 위해 광범위한 HLA 스펙트럼을 포함하는 혈청 양성 공여자의 정맥혈 100-300mL에서 말초혈 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)를 수확하였다. 절단된 gly/ala가 결실된 EBNA1 유전자[11, 12]에 융합된 16개의 HLA 제한 LMP1&2 에피토프의 폴리펩티드(polyepitope)로 구성된 AdE1-LMPpoly 벡터는 PBMC의 30%를 감염시키는 데 사용되었다(10:1의 MOI). 그런 다음 이러한 형질감염된 PBMC를 조사하고 나머지 PBMC와 2주 동안 공동 배양했다. 배양액에 신선한 성장 배지와 3-4일마다 120 IU/mL의 재조합 IL-2를 보충했다(Komtur Pharmaceuticals). 확장된 T-세포는 주입을 위해 방출되기 전에 항원 특이성과 미생물 오염에 대해 테스트되었다. HLA-일치 EBV 관련 암 세포주를 표적화하는 데 사용된 각 T 세포는 표 1에 나열되어 있다.

[0139] **세포내 사이토카인 분석**

[0140] AdE1-LMPpoly 벡터 형질감염된 T-세포 생성물에서 LMP1&2- 및 EBNA1-특이성의 빈도를 분석하기 위해, LMP1&2 또는 EBNA1의 정의된 에피토프 풀(pool) 또는 전체 EBNA1 단백질을 포함하는 중첩 펩티드 세트(모두 Mimotopes, GenScript 또는 JPT Technologies)를 사용하여 GolgiPlug(BD Biosciences)의 존재하에 4시간 동안 자극했다. 다중 매개변수 분석을 위해, 세포를 GolgiPlug 및 GolgiStop(BD Biosciences)의 존재하에 상기 나열된 펩티드 및 항-CD107a-FITC(BD Biosciences)의 존재하에 4시간 동안 자극하였다. 그런 다음 세포를 세척하고 항-CD8-PerCPy5.5(eBioscience) 및 항-CD4-PECy7(BD Biosciences)로 염색하고, Cytotfix/Cytoperm(BD Biosciences)으로 고정 및 투과화하고, 다시 세척하고 항-IFN- γ -AF700(BD Biosciences의 모든 것)으로 염색했다[11]. 추가 세척 후, 세포를 PBS에 재현탁하고 FACSDiva 소프트웨어(BD Biosciences)가 있는 BD LSR Fortessa를 사용하여 수득하였다. FlowJo 소프트웨어(TreeStar)를 사용하여 수득 후 및 Boolean 분석을 수행하였다.

[0141] **세포 생존력 분석**

[0142] CellTiter 96® Aqueous one cell viability assay 시약(Promega, WI, USA)을 사용하여 EBV 관련 암 세포주당 3개의 생물학적 복제물을 3회 반복하여 세포 생존을 분석을 수행하였다. 간략하게, 암세포(표적 세포)는 96웰 조직 배양 플레이트(BD Falcon™)에 200 μ L의 전체 배지 부피에서 웰당 5000개 세포의 밀도로 플레이트되었다. 이펙터 AdE1-LMPpoly 형질감염된 T 세포는 37° C 및 50% CO₂에서 10% FCS 및 120IU/mL의 재조합 IL-2가 포함된 RPMI-1640에서 신선하게 해동되었다. 37° C 및 50% CO₂에서 도금(plating) 및 인큐베이션 24시간 후, 이펙터 T 세포는 5:1-100:1의 이펙터 대 표적의 구배 비율(E:T)로 표적 세포에 혼합되었다. E:T 비율(ET)당 사용된 T 세포의 정확한 수(T₀)는 PBS 처리된 표적 세포(E_s) 및 단독 배지(M₀)와 함께 대조군으로 독립적으로 사용되었다. 37° C 및 50% CO₂에서 24시간 인큐베이션 후, MTS를 각 웰에 추가했고(배지에서 1:100 희석), 1시간 동안 인큐베이션한 후 플레이트를 실온에서 5분 동안 1,200 x g에서 원심분리하고 490nm의 광학 밀도에서 혼합물의 흡광도를 마이크로플레이트 판독기(microplate reader)를 통해 측정했다. 상대 세포 생존율은 다음 공식을 사용하여 계산되었다:

$$\text{Relative cell viability} = \frac{(E_T - M_0) - (T_0 - M_0)}{(E_s - M_0)}$$

[0143]

[0144] **세포 독성 분석**

[0145] 세포 독성 분석은 EBV 관련 암 세포주당 3개의 생물학적 복제물에 대해 3중으로 CytoTox 96® Nonradioactive Cytotoxic Assay Kit(Promega, WI, USA)를 사용하여 수행되었다[14]. 간략하게, 암세포(표적 세포)는 96-웰 조직 배양 플레이트에 전체 배지 부피 200 μ L에서 웰당 5000개 세포의 밀도로 플레이트되었고 세포 생존도 분석과 유사한 조건은 이전에 설명한 대로 유지되었다. 37°C에서 이펙터와 표적 세포를 혼합한 후 24시간 후, 10X 용해제를 EM 웰에 첨가하고 37°C 및 50% CO₂에서 45분 동안 인큐베이션하였다. 표적 세포를 완전히 용해시킨 후, 플레이트를 실온에서 5분 동안 1,200 x g에서 원심분리하고, 각 웰의 50 μ L 상청액을 다른 플레이트로 옮겼다. 분

석 완충액을 기질 혼합물과 혼합하고 각 웰에 분취했다. 정지 용액으로 종료한 후, 490nm의 광학 밀도에서 혼합물의 흡광도를 마이크로플레이트 판독기를 통해 측정했다. 실험 및 대조군 웰에서의 상대적 용해는 다음과 같이 계산되었다:

$$\text{Relative cytotoxicity} = \frac{(E_T - M_0) - (T_0 - M_0)}{(E_T - M_0) - (E_S - M_0)}$$

[0146]

[0147] **암세포 표현형의 다색 프로파일링(Polychromatic profiling)**

[0148] 관심있는 EBV 관련 암세포를 웰당 1×10^5 세포의 밀도로 플레이팅하고 24시간 후, 50:1의 이펙터 대 표적 (E:T)으로 T 세포와 혼합하고 37°C 및 50% CO₂에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 암세포에 대한 T 세포의 영향을 평가하기 위해 세포를 다음 항체와 함께 4° C에서 인큐베이션하였다: 인간 항-CD45-V500, 항-CD3-AF700, 항-Ki67-BV421, 항-BCL2-FITC 및 항-활성 카스파제 3-BV605. FACSDiva 소프트웨어(BD Biosciences)가 있는 BD LSR Fortessa를 사용하여 세포를 획득하고 FlowJo 소프트웨어(TreeStar)를 사용하여 수득 후 분석을 수행했다.

[0149] **AdE1-LMPpoly 형질감염된 T 세포 표현형의 다색 프로파일링**

[0150] 이펙터 AdE1-LMPpoly 형질감염된 T 세포를 새로 해동하고 50:1의 이펙터 대 표적(E:T)에서 표적 세포(1×10^5)와 혼합하고 37° C 및 50% CO₂에서 24시간 동안 인큐베이션했다. 표면 표현형의 평가를 위해, 그런 다음 세포를 다음 항체 패널(panels)과 함께 4° C에서 인큐베이션했다: (i) 인간 항-CD45-V500, 항-CD3-AF700, 항-CD4-PECy7 및 항-CD8-PerCPCy5.5; (ii) 인간 항-CD45-V450, 항-CD4-AF700, 항-CD8-PerCP Cy5.5, 항-CD14-eFluor450, 항-CD19-eFluor450; 항-PD-1-BV786; (iii) MHC- 클래스 I 항체(클론 W6/32)(집에서 만든, 마우스에서 기른 것), LIVE/DEAD 고정 가능한 근적외선 죽은 세포 염색(Thermo Fisher Scientific, MA). 세포내 분석의 경우, 세포를 TF 고정/투과성 완충액(BD Biosciences)으로 처리한 다음 Perm/Wash의 존재하에 다음 항체로 염색했다: (i) 항-퍼포린-BV421, 항-그랜자임 B-AF700 및 항-그랜자임 K-FITC. FACSDiva 소프트웨어(BD Biosciences)가 있는 BD LSR Fortessa를 사용하여 세포를 수득하고 FlowJo 소프트웨어(TreeStar)를 사용하여 수득 후 분석을 수행했다.

[0151] **동물 사육장(Animal housing)**

[0152] 모든 동물 작업은 QIMR Berghofer Medical Research Institute, Animal Ethics Committee(번호 A0707-606M)의 승인을 받았으며 과학적 목적을 위한 동물 관리 및 사용에 대한 호주 규정에 따라 엄격하게 수행되었다. 모든 실험 동물은 혼합(129SV/E X C57BL/6) 계통에서 유지되었으며 OptiMICE® 케이지(Centennial, Colorado, USA)에 있는 Queensland Institute of Medical Research Animal Facility에 25° C 12시간 명암 주기로 수용되었다. 건조된 과립 식품은 방사선 조사에 의해 살균되었다. 생쥐는 음식과 살균된 물에 자유롭게 접근할 수 있었다.

[0153] **동종 EBV 특이적 T 세포의 치료 효능에 대한 생체 내 평가**

[0154] 7-8주 된 총 12-24마리의 암컷 NOD/SCID 마우스(실험에 따라 다름)가 이 연구에 사용되었다. 마우스에 0.8 Gy 코발트(cobalt)-60을 조사하고 4시간 후 29 게이지 바늘로 EBV 관련 암세포 각각의 5×10^6 세포를 피하 주사하였다. 마우스를 매주 3회 종양 성장, 체중 및 신체 점수에 대해 모니터링하였다. 종양이 만져지면 마우스를 각 그룹으로 무작위 배정하고 각각의 용량의 PBS 또는 20×10^6 종양 HLA 일치 동종이형 EBV 특이적 T 세포로 처리했다. 이 마우스의 종양 크기는 버니어 캘리퍼스를 사용하여 매주 3회 측정되었다. 종양 면적을 계산하기 위해 다음 공식이 사용되었다: 종양 면적 = B*S 여기에서 B = 가장 큰 종양 측정 S = 가장 작은, 앞서 설명한 대로 2차원 캘리퍼스 측정을 기반으로 한다[13].

[0155] **인간화 마우스 모델에서 동종이형 EBV-특이적 T-세포의 치료 효능의 생체내 평가**

[0156] 신선한 인간 CD34+ 체대혈 세포는 부모의 서면 동의 후 건강한 만삭 신생아로부터 얻었고 제조업체의 지침에 따라 면역자기 비드(immunomagnetic beads)를 사용하여 농축되었다(CD34+ 선택 키트, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, 독일). 7-8주령의 암컷 NRG 마우스에 3-4시간 간격으로 275cGy를 두 번 조사한 다음 29게이지 바늘로 마우스당 5×10^4 CD34+ 세포(치료에 사용되는 AdE1-LMPpoly 형질감염된 T 세포와 일치하는 HLA)를 정맥 주사했다. 마우스를 체중, 체중, 이식편 대 숙주 질환(GVHD)을 포함한 부작용에 대해 매주 2회 모니터링했

다. 또한, 꼬리 정맥 채혈은 4주, 8주, 10주 및 12주에 수행되었으며, 그 동안 인간 면역 시스템의 재구성을 모니터링하기 위해 한 번에 각 마우스에서 100 μ L에서 200 μ L의 혈액을 EDTA 튜브에 수집했다. 인간 CD34+ 제대혈 세포로부터 재구성을 평가하기 위해, 표면 표현형은 인간 항-CD45-V500, 마우스 항-CD45-V450, 항-CD3-APC, 항-CD4-AF700, 항-CD8-PerCPCy5.5, 항-CD14-FITC, 항-CD19-PeCy5, 항-CD23-BV786, 및 항-CD56-BV650를 사용하여 수행되었다. 재구성 12주차에, 인간화 된 NRG 마우스에 29 게이지 바늘을 사용하여 비 마취 조건에서 100 μ L PBS에서 106 EBV 입자의 용량으로 EBV B95-8을 정맥 주사했다. EBV 감염 후 13일째에, 마우스를 각각의 용량의 PBS 또는 20×10^6 종양 HLA 일치 또는 전환된 AdE1-LMPpoly 형질감염된 T-세포로 처리하였다. 림프성 악성종양을 치료하는 데 사용되는 각 제대혈 세포 및 해당 T 세포의 HLA는 표 1에 나열되어 있다. 마우스를 T 세포 처리 후 14일 동안 모니터링한 후 도태시키고 그들의 비장을 종양 부하를 분석하였다.

[0157] **면역조직화학**

[0158] 조직학적 검사를 위해 세척 후(PBS, 3회) PBS 중 4% 포름알데히드에 조직을 수집하고 고정하고 처리 전에 70% 에탄올에 보관하였다. 그런 다음 조직을 파라핀 블록에 삽입하고 염색을 위해 5 μ m 두께의 섹션을 준비했다. Sakura Tissue-Tek® TEC™(Sakura Finetek, Tokyo, Japan)을 사용하여 Superfrost 플러스 슬라이드에 장착된 파라핀 및 4 μ m 섹션에 조직을 임베드(embedded)하였다. 면역조직화학은 QIMR Berghofer Medical Research Institute 건물 내 시설의 지원으로 수행되었다. 항원 검색은 1L MQ(pH 6.0) 완충액에서 2.94g의 구연산 삼-나트륨(tri-sodium citrate)을 사용하여 수행하고 마이크로파에 처리했다. 조직 절편을 0.2% Triton X-100/PBS에서 5분 동안 투과화한 다음 0.05% Triton X-100/PBS에서 10분 동안 투과화했다. 조직 절편을 3%(vol/vol) H₂O₂로 처리한 후 2% BSA에서 항-CD3(1:40 Dako M7254) 항체를 사용한 면역염색 후 이차 항체(VEMP7402) Dako EnVision™(Agilent, system Waukesha, WI, USA)과 헤마톡실린(haematoxylin)으로 대조염색을 수행했다. 슬라이드는 20X 또는 40X 반대를 사용하여 Aperio® Scanscope® XT(Aperio®, Vista, USA)에서 스캔되었다.

[0159] **NanoString 및 칩투 프로파일링을 사용한 유전자 서명 프로파일**

[0160] 총 6마리의 8주령 암컷 NOD/SCID 마우스에 0.8 Gy 코발트-60을 조사하고 4시간 후 29 게이지 바늘로 SNU719의 5×10^6 세포를 피하 주사하였다. 종양 크기가 40 mm²에 도달하면 마우스를 20×10^6 TI_001 T 세포로 처리했다. 5일 후, 종양을 수확하고 FACS를 사용하여 인간 항-CD45-V500, 마우스 항-CD45-V450, 항-CD3-APC, 항-CD4-PE 및 항-CD8-PerCPCy5.5를 사용하여 생존 가능한 CD8+ 집단에 대해 T 세포를 분류했다. RNA는 위에서 설명한 Qiagen RNeasy 키트를 사용하여 개별 마우스의 분류된 생존 가능한 CD8+ 집단에서 분리되었다. 유전자 발현 분석은 맞춤형 326-NanoString Immune 유전자 발현 패널을 사용하여 수행되었다. 마우스 샘플당 50ng의 총 RNA를 5 μ L의 최종 부피로 사용하고 맞춤형 유전자 발현 코드 세트의 형광 바코드로 태그가 지정된 5' 리포터 프로브(reporter probe)와 함께 3' 비오틴화된 캡처 프로브(biotinylated capture probe)와 혼합했다. 프로브와 표적 전사체를 65° C에서 12-16시간 동안 혼성화했다. 혼성화된 샘플은 권장된 제조업체 프로토콜을 사용하여 NanoString nCounter 준비 스테이션에서 실행되었으며, 여기서 초과 캡처 및 리포터 프로브가 제거되고 전사체 특이적 삼원 복합체가 스트렙타비딘 코팅 카트리지(streptavidin-coated cartridge)에 고정되었다. 샘플은 nCounter 디지털 분석기에서 최대 스캔 해상도로 스캔되었다. 데이터는 nSolver 분석 소프트웨어 및 nCounter 고급 분석 모듈을 사용하여 처리되었다. 유전자 발현 분석을 위해 데이터는 GeNorm 알고리즘에 의해 선택된 하우스키핑 유전자의 기하 평균을 사용하여 정규화되었다.

[0161] **통계 분석**

[0162] GRAPHPAD PRISM v6.0(GraphPad Software, LaJolla, CA, USA)을 사용하여 Bonferoni 사후 또는 Mann-Whitney U 테스트 테스트(도 범례에 지정)를 사용한 스튜던트 t-검정 또는 일원 또는 양방향 ANOVA를 수행하고 p-값은 도 범례에 표시된 대로 계산했다. 별표는 유의한 차이를 나타낸다(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p<0.001 및 ****p<0.0001), ns= 유의하지 않음.

[0163] **결과**

[0164] **동종 "기성품" EBV 특이적 T 세포에 의한 여러 암의 시험관 내 인식**

[0165] NPC, 위암, NKT 림프종 및 BLCL을 포함하는 다중 EBV 관련 악성종양에서 EBV 인코딩 유전자(LMP1, LMP2 및 EBNA1)의 발현을 평가하기 위해, 본 발명자들은 qRT-PCR을 사용하고 이들 유전자 각각에 대한 전사 수준을 분석했다. 본 발명자들은 모든 EBV 관련 악성 종양에서 LMP2와 EBNA1이 LMP1과 비교할 때 일관되게 더 높은 수준으로 발현되었음을 관찰했다(도 1A). 본 발명자들은 LMP1, LMP2 및/또는 EBNA1에 특이적인 동종이형 "기성품" EBV

특이적 T 세포에 대한 이러한 EBV 양성 암세포의 감수성을 평가했다(도 1B, 표 2). 도 1C-D에 제시된 데이터는 위암(SNU719), NPC(C17 및 C661) 및 NKT 림프종(SNKT16) 세포가 다양한 이펙터 대 표적 비율에서 동종 HLA 일치 EBV 특이적 T 세포에 의해 효율적으로 인식되었음을 보여준다. 또한 Annexin V 결합 분석은 모의 처리된 대조군과 비교하여 표적 세포 사멸을 나타내는 Annexin V 결합 능력의 증가를 보여주었다(도 1D-E).

[0166] 다음 실험 세트에서, 본 발명자들은 EBV 관련 암 세포의 표현형 변화에 대한 동종 EBV 특이적 T 세포의 영향을 분석했다. Ki67염색에 의해 나타난 바와 같이 HLA 일치 동종 EBV 특이적 T 세포의 존재 24시간 후 위암, SNU719 및 NPC, C17 세포 둘 다의 증식율에서 상당한 감소($p < 0.001$)를 관찰하였다(도 2A). 또한, 본 발명자들은 EBV-특이적 T 세포에 의해 유도된 증가된 세포 사멸을 시사하는 BCL2 염색의 유의한 감소($p < 0.01$) 외에도 활성 카스파제 3 염색의 유의한 증가($p < 0.001$)를 관찰하였다(도 2A). 본 발명자들은 또한 EBV 관련 암세포가 동종 EBV 특이적 T 세포에 미치는 영향을 조사하였다. 본 발명자들은 EBV 관련 암세포가 있는 상태에서 CD8+ T 세포 집단의 유의한 증가($p < 0.01$)를 관찰하였다(도 2B). 이 데이터와 일치하게, 우리는 EBV 양성 암세포에 노출되었을 때 CD8+ T 세포에서 Ki67 발현의 유의한 증가를 관찰하였다(도 2B). 또한, 이들 T 세포는 또한 GzmB, GzmK 및 Perf 염색의 유의하게 증가된 발현에 의해 지시되는 바와 같이 높은 수준의 이펙터 기능을 나타내었다(도 2B). 종합적으로, 이러한 데이터는 동종 EBV 특이적 T 세포가 시험관 내에서 HLA와 일치하는 여러 유형의 EBV 관련 암 세포를 효율적으로 인식할 수 있음을 보여준다.

[0167] 생체 내 동종 EBV 특이적 세포독성 T 세포의 치료 효능 평가

[0168] 시험관내에서 동종 EBV-특이적 T 세포에 의한 다중 EBV 관련 암의 효율적인 인식을 확립하고, 본 발명자들은 다음으로 생체 내에서 이러한 효과기 세포의 치료 효능을 평가했다. 첫 번째 실험 세트에서 면역 결핍 NOD-SCID 마우스에 방사선 조사 후 EBV 관련 NPC 종양, C17 및 C666.1(피하)을 접종했다. 이 동물들은 각 동물의 종양이 25 mm²에 도달했을 때 HLA 일치 동종 EBV 특이적 T 세포로 처리되었다. 이 동물들은 동종 HLA와 일치하는 EBV 특이적 T 세포를 한 번 또는 두 번 주입(각 주입/동물에 대해 2×10^7 T 세포)하고 종양 성장을 모니터링했다. 도 3에 제시된 데이터는 동종 HLA A2/B40-restricted 또는 HLA A11/B58-restricted LMP2-specific T 세포(2×10^7 T 세포)의 단일 주입이 종양 성장을 상당히 감소시키기에 충분했음을 보여주고, 또한 종양이 있는 마우스의 전체 생존도 개선되었음을 보여준다(도 3A 및 B). 이들 동물에 동종 EBV 특이적 T 세포를 2회 주입한 경우 종양 부담 및 전체 생존의 추가 개선이 관찰되었다(도 3C 및 D).

[0169] 다음 실험 세트에서, 본 발명자들은 치료 효능 분석을 위암으로 확장했다. 이러한 실험에서, 면역 결핍 NOD-SCID 마우스에 EBV 관련 위암인 SNU719를 접종하고 각 동물의 종양이 25mm²에 도달했을 때 HLA A24-제한 동종 LMP2-특이성 T 세포를 처리했다. NPC 종양 모델로 얻은 데이터와 일치하게, 이 동물을 HLA 일치 동종 LMP2 특이적 T 세포로 처리했을 때 종양 부담의 유의한 감소와 전체 생존의 개선이 관찰되었다(도 4A). NPC가 전달한 데이터와 동일하게, 이 동물에 대한 HLA 동형 LMP2에 대한 통지를 받았으며, 그와 같은 공감대를 이루었다(도 4A). 이 현상에 대한 가능한 설명은 면역억제성 종양 미세환경[16, 17] 또는 HLA 손실을 유발하는 면역 탈출[18]의 존재로 인한 것이며, 이는 임상 결과에 부정적인 영향을 미칠 수 있다. 따라서, 본 발명자들은 EBV 관련 종양이 HLA 발현을 변경하거나 CD8+ T 세포에 대한 EBV 에피토프의 제시를 방해할 수 있는 EBV 유전자 발현을 조절함으로써 동종 EBV 특이적 T 세포의 치료 효과를 무시한다고 가정했다. 이 가설을 탐구하기 위해, 본 발명자들은 위암이 있는 세 그룹의 마우스(SNU719)를 설정하고 동일한 HLA 일치 동종 EBV 특이적 T 세포(HLA A24 제한 LMP2 특이적 T 세포)의 3회 연속 투여량을 사용하여 한 그룹의 마우스(G1)를 치료했다. 동시에 다른 그룹(G2)도 동일한 HLA-A24 제한 동종 EBV 특이적 T 세포를 2회 연속 투여했지만 세 번째 용량을 다른 T 세포주(HLA B7 제한, EBNA1 특이적)로 전환했다(도 4B). 본 발명자들은 G1과 비교하여 G2 그룹이 T 세포의 세 번째 용량 주입 후 종양 성장의 현저한 감소와 전체 생존의 개선을 보여주었다는 것을 관찰했다(도 4B). 흥미롭게도, G1 그룹은 G2 그룹의 동물과 비교할 때 세 번째 주입 후 종양 성장에 대한 최소한의 영향과 훨씬 더 높은 종양 부담을 보여주었다(도 4B). 종합적으로, 이러한 데이터는 동종 HLA 일치 T 세포가 종양 성장을 효율적으로 차단하고 EBV 관련 상피 종양을 보유한 마우스의 전체 생존을 향상시킬 수 있음을 분명히 보여준다.

[0170] 동종 EBV-특이 T 세포 입양 면역 요법은 EBV 관련 림프성 악성 종양의 성장을 효과적으로 억제합니다

[0171] 앞서 언급한 바와 같이, EBV는 PTLD, AID 관련 림프종 및 기타 악성 림프종, 즉 호지킨 및 버킷 림프종과 같은 면역 저하 환자의 림프 증식성 질환(lymphoproliferative diseases, LPD)을 비롯한 여러 질병과 병인학적으로 관련되어 있다[19-22]. 동종 EBV 특이적 T 세포의 잠재적인 치료 효능을 추가로 입증하기 위해, 본 발명자들은 기능적으로 재구성된 인간 면역 시스템을 보유하고 있는 인간화 마우스 모델을 활용했다. 인간 면역 시스템의

재구성은 NOD-Rag1null IL2rgnull(NRG로 지칭됨) 마우스에서 제대혈 유래 CD34+ 줄기 세포의 정맥내 투여를 사용하여 확립되었으며 이 동물은 도 5A 및 B에 요약된 대로 정기적으로 모니터링되었다. 12주 후 이 마우스는 EBV(QIMR-WIL 균주)에 감염되었고 EBV-LPD의 발달 후 HLA-일치 동종 EBV 특이적 T 세포로 입양 처리되었다. 두 개의 독립적인 실험 세트를 수행했다. 첫 번째 세트에서는, NRG 마우스를 보유하는 EBV-LPD를 3개 그룹(각 그룹에 6마리 마우스)으로 분할하고 mock 처리하거나 T 세포 요법(G1 및 G2로 지칭됨)을 주입하였다. G1 그룹의 동물은 3회 용량의 HLA A2 및 A24-제한 동종이계 LMP1 및 LMP2 특이적 T 세포(2×10^7 T 세포/용량)로 처리되었지만, G2 그룹의 동물에게는 HLA A2 및 A24-제한 동종 LMP1 및 LMP2-특이적 T 세포(2×10^7 T 세포/용량)의 2회 용량과 HLA A2, B40 및 Cw3-제한 LMP1, LMP2 및 EBNA1-특이적 T 세포(2×10^7 T 세포)의 단일 용량으로 처리되었다. 그림 5C-D에 제시된 데이터는 G1 그룹의 동물이 모의 처리된 마우스와 비교할 때 종양 부담이 크게 감소했음을 보여준다. 그러나, 2개의 상이한 동종 EBV 특이적 T 세포의 조합으로 처리된 G2 그룹의 동물은 mock 처리된 동물 및 G1 동물과 비교할 때 종양 부담이 상당히 감소된 것으로 나타났다. 이러한 관찰은 동종 EBV-특이적 T 세포로 처리된 동물이 또한 유의하게 더 낮은 종양 부담을 나타내는 두 번째 세트의 독립적인 실험에서 추가로 확인되었다(도 5E-F). 이러한 데이터는 동종 HLA 일치 EBV 특이적 T 세포가 종양 성장을 효율적으로 차단하고 EBV 관련 림프성 악성 종양을 보유한 마우스의 전체 생존을 향상시킬 수 있음을 추가로 입증한다.

[0172] PD1/PD-L1 축 차단은 동종 EBV-특이적 T 세포의 치료 효능을 증가시킨다

[0173] 생체내에서 입양 전달된 동종 EBV-특이적 T 세포 및 종양 세포의 상호작용을 추가로 기술하기 위해, 본 발명자들은 SNU719 종양에서 침윤 T 세포를 분리하고 NanoString 기술을 사용하여 전사 서명을 분석했다. 또한 특정 항체를 사용하여 일부 체크포인트 분자의 발현을 검증했다. 도 6A에 제시된 데이터는 T 세포 치료 제품 및 정제된 종양 침윤 인간 T 세포에서 유전자 발현의 히트 맵을 보여준다. 이 분석은 효과기 세포 기능과 관련된 다수의 세포 유전자 및 효과기 기능과 관련된 전사 인자가 종양 침윤 인간 림프구에서 하향 조절됨을 보여주었다. 대조적으로, 다수의 체크포인트 분자의 발현은 이들 T 세포에서 상향조절되었다. 이러한 체크포인트 분자의 발현을 검증하기 위해, 우리는 종양 침윤 인간 림프구를 특정 항체로 염색하고 그 발현을 종양 보유 마우스에 투여된 T 세포 요법과 비교했다. 이 분석은 NanoString 발현을 확인하고 종양 침윤 인간 림프구가 PD-1, LAG3 및 TIM3의 높은 수준을 발현함을 보여주었다(도 6B). 이러한 관찰에 기초하여, 우리는 체크포인트 억제제와 T 세포 요법의 조합이 EBV 관련 종양에 대해 더 나은 치료 이점을 제공할 수 있다고 가정했다. 상향 조절된 PD1/PD-L1 축이 적응 면역 저항을 얻는 데 암세포에 영향을 미치는지 여부에 대한 우리의 가설을 테스트하기 위해, 본 발명자들은 생체 내에서 동종 EBV 특이적 T 세포와 함께 항 PD1 항체(니볼루맵)를 사용하여 PD1을 차단했다. 구체적으로, 니볼루맵은 T 세포 주입 24시간 후에 투여되었고, 우리는 병용 그룹이 단독 요법 및 mock 치료 그룹과 비교하여 SNU719 위암 성장을 유의하게 감소($p < 0.0001$)하는 것으로 나타났음을 관찰했다(도 6C). 또한, 본 발명자들은 단독 요법 그룹과 비교할 때 조합 그룹에서 관찰된 감소된 종양 중량으로 표시되는 유의하게 감소된 종양 크기를 관찰했다(도 6D). 중요하게는, 우리는 병용 그룹이 단독 요법 또는 mock 치료 그룹과 비교하여 치료 후 생존율이 유의하게 개선됨($p < 0.0001$)을 입증했음을 관찰했다(도 6E). 특히, 조합 그룹은 T 세포만 처리된 그룹과 비교하여 ~2배($p < 0.01$) 더 나은 생존을 보였다(도 6E). 종합적으로, 이 데이터는 PD1/PD-L1 신호 전달 경로가 암 세포를 제거하는 데 있어 동종 CD8+ T 세포의 운명을 부정적으로 지시하는데, 그 억제제가 생체 내에서 동종 EBV-특이적 CD8+ T 세포의 증대를 가능하게 하기 때문이다.

표 1

[0174] 본 발명에서 치료에 사용된 EBV 관련 암 세포 및 동종 EBV 특이적 T 세포 목록

Cancer cells or cord blood	HLA typing of cancer cells or cord blood	T cells used
SNU719	A*24:02, 24:02; B*07:02, 52:01; C*07:02, 12:02	TI_001 and TI_004
C17	A*02:01, 26:01; B*44:02, 51:01; C*05:01, 14:02	TI_002
C666.1	B*58:02; C*03:04	TI_003
SNKT16	A*02:01, 24:02; B*48:01, 52:01; C*08:03, 12:02	TI_001 and TI_002
CB33A	A*02:01, 03:01; B*40:01, 44:02; C*03:04, 05:01	TI_005 and TI_002
CB03	A*02:01, 03:01; B*44:02, 58:01; C*05:01, 07:18	TI_001 and TI_003

표 2

[0175] 본 발명에서 사용된 각각의 동종 EBV 특이적 T 세포의 HLA 및 항원 인식

Allogenic EBV-specific T cells batch code	HLA typing of T cell donor	EBV antigen specificity (HLA restriction)
TI_001	A*11:01, 24:02; B*40:01, 40:01; C*03:04, 03:04	LMP2 (A*11:01,24:02) and EBNA1(C*03:04)
TI_002	A*02:01, 02:01; B*40:01, 40:01; C*03:04, 03:04	LMP1 (A*02:01); LMP2 (A*02:01, B*40:01); EBNA1 (*03:04)
TI_003	A*11:01, 33:03; B*40:01, 58:01; C*03:02, 03:04	LMP1(58:01); LMP2 (B*40:01,58:01)
TI_004	A*03:01, 03:01; B*07:02, 07:02; C*07:01, 07:02	EBNA1(B*07:02)
TI_005	A*02:01, 23:01; B*41:02, 44:02; C*05:01, 17:01	LMP1 (A*02:01); LMP2 (A*02:01, 23:01)

[0176] 실시예 2

[0177] MEK1/2 및 EBV-특이적 T 세포를 사용한 BET 억제제의 이중 조합의 효능

[0178] 종양 성장 및 유지에 중요한 분자 또는 생화학적 경로를 억제하는 표적 요법은 종양의 면역 체계에 영향을 미치는 데 매우 중요한 것으로 판명될 수 있다. 최근 여러 연구에서 표적 치료제가 특정 면역 세포 집단, 즉 세포 독성 T 림프구 및 Treg의 기능을 약화시키는 것과 같은 면역 반응을 조절할 수 있음이 입증되었다[23]. 그들은 T 세포 프라이밍(priming)에 영향을 미치고 또한 기억 및 효과기 표현형으로의 분화를 지시하며, 면역 매개 파괴에 대한 종양 세포의 더 나은 감작을 가능하게 하는 수지상 세포에 의한 항원 종양 제시를 증가시킨다[23]. 면역 요법과 표적 요법의 상호 작용 가능성은 완전히 밝혀지지 않았지만 병용 접근법의 시너지 효과와 독성 프로파일은 시기, 순서 및 용량에 크게 좌우될 것이다[23].

[0179] 특히 MAPK(mitogen-activated protein kinase) 경로는 IL-8과 VEGF의 생산을 상향 조절하여 T 세포 기능과 동원에 대한 억제 효과를 유도하는 것으로 알려져 있다[24]. 최근 연구에 따르면 MEK1/2 억제는 순진하지만 항원 경험이 있는 이펙터 T 세포 활성화는 차단하지 않는 것으로 나타났다[25]. 또한, 독립적인 연구에 따르면 BRAF 억제제는 종양 항원 발현 및 제시의 상향 조절을 통해 면역 감작 가능성이 있음이 밝혀졌고; 예는 MAPK에서 상향 조절이 멜라닌 세포 분화 항원(melanocyte differentiation antigens, MAD)의 상향 조절을 초래하는 흑색종의 경우일 수 있다[26, 27]. 쥐 모델을 기반으로 한 최근 연구에서는 삼중 조합이 종양으로의 T 세포 침윤을 증가시키고, 생체내 세포독성을 개선하고, 동계 BRAF^{V600E} 구동 흑색종 마우스 모델에서 완전한 종양 퇴행으로 이어지기 때문에, pmel-1 ACT 및 BRAF 억제제 다브라페닙(dabrafenib)을 트라메티닙(trametinib)(MEK 억제제)과 조합하여 개선된 효능을 입증했다[28]. 또한 Kang 등은 트라메티닙이 인간 HNSCC 세포주에서 MHC 클래스 I 발현을 STT3 의존적 방식으로 향상시켜 더 나은 CD8+ T 세포 침투를 가능하게 한다는 것을 입증했다[29].

[0180] 독립적으로, 소분자 후성유전학적 변형자를 사용한 DNA의 후성유전학적 변형은 또한 면역 유전자 서명을 변경하고 항원 처리, 제시 및 면역 회피에 영향을 줄 수 있다[30, 31]. 최근 Kagoya 등은 브로모도메인 및 extra-terminal(BET) 모티프 단백질 억제제인 JQ1이 CD8+ T 세포의 줄기 세포 유사 및 중추 기억의 기능적 특성을 유지함을 보여주었다[32]. 기계적으로, BRD4(BET 단백질)는 CD8+ T 세포에서 BATF(전사 인자) 발현을 직접 조절한다. BATF는 T 세포에서 이펙터 기억 표현형으로 분화 과정을 지시하기 때문이다. 이와 같이 JQ1 처리된 CD8+ T 세포는 흑색종에 대한 쥐(murine) 적응 T 세포 모델에서 향상된 항종양 효과를 보였다[32]. 또한 JQ1은 여러 암에서 MYC의 하향 조절과 관련이 있다[33]. MYC는 PD-L1 및 CD47과 같은 면역 조절 인자를 전사적으로 조절하여 종양 미세 환경을 강력하게 조절하는 것으로 나타났다[34]. 따라서 MYC 억제는 적대적인 종양 미세 환경의 하향 조절에 의해 항종양 진행을 강력하게 유도하고 면역 매개 종양 제거를 촉진할 수 있다.

[0181] 결과

[0182] MEK1/2 억제제와 EBV 특이적 T 세포 결합

[0183] 본 발명자들은 SNU719 세포(위암 세포)를 MEK1/2 억제제(AZD6244(또는 셀루메티닙) 및 트라메티닙)를 각각 0.5

μM 및 $1.0\mu\text{M}$ 농도로 개별 치료로 처리하거나 EBV 특이적 T 세포(25:1)와 결합하여 이펙터 대 표적 비율로 처리했다. 본 발명자들은 MEK1/2 억제제와 EBV-특이적 T 세포의 조합이 개별 치료에 비해 SNU719의 세포 생존율이 유의하게 감소되었음을 관찰하였다(도 7A). 유사하게, 본 발명자들은 이중 조합 그룹이 개별 처리 그룹과 비교하여 SNU719 세포 중에서 Annexin V의 결합이 유의하게 더 높음을 관찰했다(도 7B). 또한 Xcellegence를 사용하여 MEK1/2 억제제 또는 EBV 특이적 T 세포의 개별 치료에 비해 이중 조합이 SNU719 세포에서 더 빠른 세포 사멸을 초래한다는 것을 관찰했다(도 7C). 종합적으로, 이러한 결과는 시험관 내에서 MEK1/2 억제제와 EBV 특이적 T 세포의 이중 조합의 효능을 강조한다.

[0184] **JQ1 억제제와 EBV 특이적 T 세포 결합**

[0185] 본 발명자들은 SNU719 세포를 $5.0\mu\text{M}$ 농도의 JQ1 억제제로 개별 치료로 처리하거나 이펙터 대 표적 비율로서 EBV 특이적 T 세포(25:1)와 조합하여 처리하였다. 본 발명자들은 SNU719의 세포 생존율이 JQ1 억제제와 EBV-특이적 T 세포의 조합 존재에서 개별 치료와 비교하여 유의하게 감소되었음을 관찰하였다(도 8A). 유사하게, 본 발명자들은 이중 조합 그룹이 개별 처리 그룹에 비해 SNU719 세포 사이에서 Annexin V의 상당히 더 높은 결합을 초래함을 관찰하였다(도 8B). 종합적으로, 이러한 결과는 시험관 내에서 BET 억제제와 EBV 특이적 T 세포의 이중 조합의 효능을 강조한다.

[0186] **실시예 3**

[0187] EBV 관련 고형암에서 MAPK 경로의 상향조절을 결정하기 위해, 본 발명자들은 먼저 비인두암 및 위암 세포주(약물 협력 범위 $0.1\mu\text{M}$ - $5\mu\text{M}$)에서 MEK1/2 억제제(AZD6244 또는 셀루메타닙 및 트레마티닙)의 IC50 값을 확인했다. 본 발명자들은 NPC43(EBV-) 세포주와 비교하여 두 억제제가 MTS 분석을 사용하여 $\sim 2.5\mu\text{M}$ 의 협력에서 세포 생존율(IC50)의 $\sim 50\%$ 감소를 달성했기 때문에 EBV 관련 세포주가 MAPK 경로에 대한 높은 의존성을 균일하게 입증했음을 관찰했다(도 9). 다음 실험 세트에서, 본 발명자들은 EBV 관련 고형암에 대한 동종 EBV 특이적 T 세포와 조합된 MEK1/2 억제의 영향을 결정하기를 원하였다. 따라서 본 발명자들은 각각의 EBV 관련 세포주(위 및 비인두 모두)를 개별적으로 또는 MEK1/2 억제제(셀루메타닙 및 트레마티닙 모두) 및 EBV 특이적 T 세포와 조합하여 치료하였다. 본 발명자들은 시험관 내 치료를 위해 각 HLA 일치 동종 EBV 특이적 T 세포의 25:1의 이펙터 대 표적 비율과 함께 각각의 MEK1/2 억제제($1\mu\text{M}$)의 하위 IC50 값(또는 IC25 값)을 선택하였다. 본 발명자들은 MEK1/2 억제제와 EBV-특이적 T 세포의 조합 존재 시 각각의 비인두(C17 및 C666.1) 및 위암 세포(SNU719 및 YCCLE1)의 세포 생존율이 개별 치료에 비해 유의하게 감소되었음을 관찰하였다(도 10).

[0188] 추가로, EBV-연관 암세포의 세포 증식에 대한 조합의 영향을 검증하기 위해, 본 발명자들은 Xcellegence를 사용하여 개별 및 이중 조합으로 SNU719 및 C666.1 셀에 도전하였다. 본 발명자들은 MEK1/2 억제제(셀루메타닙) 또는 HLA 일치 EBV 특이적 T 세포의 개별 치료와 비교하여 이중 조합이 SNU719 및 C666.1 세포의 더 빠른 세포 사멸을 초래한다는 것을 관찰하였다(도 11A). 본 발명자들은 또한 시험관내에서 16시간의 개별 및 이중 처리 후 SNU719 및 C666.1 세포의 유세포 분석을 사용하여 표현형 특성화를 수행하였다. 본 발명자들은 이중 처리가 개별 치료와 비교하여 세포 증식의 상당한 손실(Ki67+ 염색으로 표시됨)을 초래하고 활성 카스파제 3 염색으로 표시된 바와 같이 상당한 세포 사멸을 야기함을 관찰하였다(도 11B-C).

[0189] 다음으로, 본 발명자들은 조합의 특이성을 결정하기를 원했고 따라서 HLA 불일치 동종 T 세포와 MEK1/2 억제제(셀루메타닙 및 트레마티닙 모두)를 개별적으로 또는 조합하여 SNU719 및 C666.1 세포에 도전하였다. 본 발명자들은 HLA-불일치 동종 T 세포가 개별적으로 EBV-연관 암세포의 세포 생존력에 상당한 영향을 미치지 않는다는 것을 관찰하였다(도 12A-B). 흥미롭게도, 본 발명자들은 DMSO 처리된(대조군) 암세포와 비교하여 MEK1/2 억제제 및 HLA-불일치 동종 T 세포의 이중 조합의 존재하에서 암세포의 세포 생존력의 현저한 감소를 관찰하였다(도 12A-B). 그러나, 이중 조합의 존재하에 관찰된 감소된 세포 생존율은 MEK1/2 억제제 단독의 처리와 비교하여 세포 생존율의 유의한 감소를 나타내지 않았다(도 12A-B). 이 데이터는 MAPK 경로 단독의 억제와 HLA 불일치 T 세포의 추가로 인해 유도된 이중 조합의 존재에서 관찰된 감소된 세포 생존력이 조합의 효능을 향상시키지 않았음을 강조한다. 이 개념을 더 검증하기 위해, 본 발명자들은 각각의 HLA-일치 및 HLA-불일치 T 세포 단독 및 MEK1/2 억제제(셀루메타닙 및 트레마티닙 모두)와의 조합으로 인한 EBV 관련 암세포(SNU719 및 C666.1)의 세포 생존율 감소를 비교하였다. 본 발명자들은 단독으로 HLA-일치된 T 세포가 HLA-불일치된 T 세포와 비교하여 유의한 세포 사멸을 유도하고 이 효과가 셀루메타닙 또는 트레마티닙의 존재하에 유의하게 증폭된다는 것을 관찰하였다(도 12C).

[0190] 다음 실험 세트에서, 본 발명자들은 이중 조합 암 세포 고유 경로의 효과를 조사하고 MEK1/2 억제제와 T 세포 치료의 효과적인 조합의 근거를 설명하고자 하였다. 본 발명자들은 MEK1/2 억제제(셀루메타닙)의 존재는 치료 16

시간 후에 암세포에서 pERK1/2(도 13A)의 상당한 감소를 초래한다는 것을 관찰하였다. 결과적으로, 본 발명자들은 셀루마티닙 단독 및 각각의 HLA-일치 T 세포와 조합된 존재하에서 MHC-클래스 I 발현의 상향조절을 관찰하였다(도 13B). 이들 암세포에서 MHC-Class I 발현이 상향조절되는 기전을 검증하기 위해, 본 발명자들은 MEK1/2 억제제 pSTAT3 및 MYC 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 본 발명자들은 살루마티닙의 존재가 pSTAT3 발현의 상향 조절을 초래한다는 것을 관찰하였으며(도 13C), 이는 MHC 클래스 I 발현을 유도하는 것과 관련이 있는 것으로 나타났다[29, 35, 36]. 또한, 본 발명자들은 MEK1/2 억제제가 MYC 발현의 하향 조절을 초래한다는 것을 관찰하였다(도 13D). MYC 발현의 존재는 EBV 관련 암에서 MHC-class I 발현을 하향 조절하는 것으로 나타났으며, 따라서 간접적인 억제제 아마도 이러한 암에서 MHC-class I을 도울 것이다[37]. 따라서, MEK1/2 경로의 억제제는 STAT3 경로의 상향조절 및 MYC의 하향조절을 통해 MHC-class I 발현의 상향조절을 초래하여 HLA-일치 동종 T 세포의 존재하에 더 나은 치료 적합성을 가능하게 한다. 종합적으로, 이러한 결과는 시험관 내에서 MEK1/2 억제제와 EBV 특이적 T 세포의 이중 조합의 효능을 강조한다.

[0191] 유사하게, 본 발명자들은 먼저 비인두암 및 위암 세포주에 걸쳐 억제제의 IC50 값을 결정함으로써 JQ1 억제제를 사용하여 MYC 의존적 암 고유 경로를 표적화하였다(약물 협력 범위가 $0.5\mu\text{M}$ - $10\mu\text{M}$). 본 발명자들은 JQ1 억제제가 NPC43(EBV-) 세포주와 비교하여 EBV 관련 세포주 중 $\sim 2.5\mu\text{M}$ 의 협력에서 세포 생존율(IC50)의 $\sim 50\%$ 감소를 입증했음을 관찰하였다(도 14). EBV 관련 암 세포에 대한 동종 EBV 특이적 T 세포와 조합된 JQ1 억제제의 영향을 특성화하기 위해, 본 발명자들은 시험관 내에서 각각의 HLA 일치 동종이계 EBV 특이적 T 세포의 25:1의 이펙터 대 표적 비율과 함께 IC25 값 JQ1($2.5\mu\text{M}$)을 사용하였다. 본 발명자들은 각각의 위암 세포(SNU719 및 YCCLE1) 및 비인두(C17 및 C666.1)의 세포 생존력이 개별 치료와 비교하여 JQ1 억제제와 EBV-특이적 T 세포의 조합 존재하에 유의하게 감소되었음을 관찰하였다(도 15A). 더 나아가, Xcelligence를 사용하여 이중 조합이 개별 처리에 비해 SNU719 및 C666.1 세포의 더 빠른 세포 사멸을 초래함을 관찰하였다(도 15B). 본 발명자들은 또한 시험관 내에서 16시간의 개별 및 이중 처리 후 SNU719 및 C666.1 세포의 유세포 분석을 사용하여 표현형 특성화를 수행하였다. 본 발명자들은 이중 처리가 개별 처리와 비교하여 세포 증식의 상당한 손실(Ki67+ 염색으로 표시됨)을 초래하고 활성 카스파제 3 염색으로 표시된 바와 같이 상당한 세포 사멸을 야기함을 관찰하였다(도 15B-C).

[0192] 다음으로, 본 발명자들은 조합의 특이성을 결정하기를 원했고 따라서 JQ1 억제제와 함께 HLA 불일치 동종 T 세포를 개별적으로 또는 조합하여 SNU719 및 C666.1 세포에 도전하였다. MEK1/2 억제제에 대한 이전 데이터와 일치하게, 본 발명자들은 DMSO 처리된(대조군) 암세포와 비교하여 JQ1 억제제와 HLA-불일치 동종이계 T 세포의 조합이 있는 경우 암세포의 세포 생존율이 현저히 감소하는 것을 관찰하였다(도 16A). 그러나, 이중 조합의 존재하에 관찰된 감소된 세포 생존력은 JQ1 억제제 단독의 처리와 비교하여 세포 생존력의 유의한 감소를 나타내지 않았다(도 16A). 본 발명자들은 단독으로 HLA-일치 T 세포가 HLA-불일치 T 세포와 비교하여 유의미한 세포 사멸을 유도하고 이 효과가 JQ1의 존재하에 유의하게 증폭된다는 것을 관찰하였다(도 16B). 다음 실험 세트에서는, 본 발명자들은 JQ1 억제제와 T 세포 치료의 효과적인 조합의 근거를 조사하고 싶었다. 본 발명자들은 JQ1 억제제의 존재가 16시간의 치료 후 암세포에서 MYC 발현의 상당한 감소를 초래한다는 것을 관찰하였다(도 17A). 결과적으로, 이는 pERK1/2, pAKT 및 pSTAT3 발현의 하향조절을 야기하였다(도 17B-C). 또한, 본 발명자들은 위에서 논의한 바와 같이 MYC의 하향 조절이 이러한 암에서 MHC-class I(도 18A)을 향상시키는 결과를 낳는다는 것을 관찰하였다[37]. 특히, 본 발명자들은 또한 PD-L1 및 CD47 발현과 같은 면역 조절 분자의 하향 조절을 관찰하였다(도 18B-C). 따라서, MYC 발현의 손실은 MHC-Class I 발현을 강화하여 면역 회피 분자를 하향 조절함으로써 세포 독성 T 세포의 효능을 향상시켜 조합을 매우 효과적으로 만든다. 종합적으로, 이러한 결과는 시험관 내에서 JQ1 억제제와 EBV-특이적 T 세포의 이중 조합의 효능을 강조한다.

[0193] 다음 실험 세트에서, 본 발명자들은 생체 내에서 HLA와 일치하는 동종 EBV 특이적 T 세포의 조합에서 위에서 설명한 소분자의 효과를 조사하기를 원하였다. 본 발명자들은 암컷 NRG 마우스에서 SNU719 유래 이종이식 종양 모델을 치료하기 위해 셀루마티닙과 HLA 일치 T 세포 제품(TIG-001)의 조합을 사용하였다. 이종이식편의 크기가 $\sim 25\text{mm}^2$ 에 도달하면 TIG-001(주입당 2×10^7 세포)을 개별적으로 2회 주입하고 14일 동안 경구 투여되는 일일 투여량의 셀루마티닙(12.5mg/kg)과 함께 마우스를 치료하였다. 본 발명자들은 이중 조합이 개별 치료와 비교하여 종양 진행의 상당한 감소를 초래함을 관찰하였다(도 19A). 대조군이 150mm^2 의 윤리적 크기 한계에 도달했을 때 각 그룹에서 3마리의 마우스를 희생시켰고, 상대적으로 이중 조합 그룹의 종양 크기가 개별 치료에 비해 유의하게 작은 것으로 관찰하였다(도 19B-C). 다음으로, 본 발명자들은 유세포 분석을 사용하여 이러한 종양에서 인간 기원 림프구의 침윤을 표현형으로 지정하였다. 본 발명자들은 조합 그룹이 개별적으로 처리된 T 세포 그룹과 비교하여 훨씬 더 많은 수의 생존 가능한 CD45+CD3+CD8+ 세포를 나타냄을 관찰하였다(도 19D). 본 발명자들

은 또한 이러한 치료 후 장기 모니터링을 수행했으며(각 그룹의 마우스는 150mm^2 의 윤리적 크기 한계까지 종양 진행을 모니터링함) 이중 조합 그룹이 개별 치료 그룹과 비교하여 더 나은 생존율을 나타냄을 관찰하였다(도 19E).

- [0194] 본 명세서에서 언급된 어떤 참조의 인용은 그러한 참조가 본 출원에 대한 "선행 기술(Prior Art)"로서 이용가능하다는 것을 인정하는 것으로 해석되어서는 안된다.
- [0195] 명세서 전반에 걸쳐 목적은 본 발명을 임의의 일 실시예 또는 특징의 특정 집합으로 제한하지 않고 본 발명의 바람직한 실시예를 설명하는 것이었다. 따라서, 당업자는 본 개시내용에 비추어, 본 발명의 범위를 벗어나지 않고 예시된 특정 실시양태에서 다양한 수정 및 변경이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다. 이러한 모든 수정 및 변경은 첨부된 청구항의 범위 내에 포함되도록 의도된다.
- [0196] **참조문헌**
- [0197] [1] C.S. Azimi, Q. Tang, K.T. Roybal, J.A. Bluestone, NextGen cell-based immunotherapies in cancer and other immune disorders, *Curr Opin Immunol*, 59 (2019) 79-87.
- [0198] [2] M.E. Dudley, J.R. Wunderlich, T.E. Shelton, J. Even, S.A. Rosenberg, Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients, *J Immunother*, 26 (2003) 332-342.
- [0199] [3] S.K. Parida, T. Poiret, L. Zhenjiang, Q. Meng, J. Heyckendorf, C. Lange, A.S. Ambati, M.V. Rao, D. Valentini, G. Ferrara, E. Rangelova, E. Dodoo, A. Zumla, M. Maeurer, T-Cell Therapy: Options for Infectious Diseases, *Clin Infect Dis*, 61Suppl 3 (2015) S217-224.
- [0200] [4] M. Hale, T. Mesojednik, G.S. Romano Ibarra, J. Sahni, A. Bernard, K. Sommer, A.M. Scharenberg, D.J. Rawlings, T.A. Wagner, Engineering HIV-Resistant, Anti-HIV Chimeric Antigen Receptor T Cells, *Mol Ther*, 25 (2017) 570-579.
- [0201] [5] C. Smith, G. Okern, S. Rehan, L. Beagley, S.K. Lee, T. Aarvak, K.W. Schjetne, R. Khanna, Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement, *Clin Transl Immunology*, 4 (2015) e31.
- [0202] [6] O.M. Pello, A.J. Innes, A. Bradshaw, S.A. Finn, S. Uddin, E. Bray, E. Olavarria, J.F. Apperley, J. Pavlu, BKV-specific T cells in the treatment of severe refractory haemorrhagic cystitis after HLA-haploidentical haematopoietic cell transplantation, *Eur J Haematol*, 98 (2017) 632-634.
- [0203] [7] C. Smith, R. Khanna, Adoptive cellular immunotherapy for virus-associated cancers: a new paradigm in personalized medicine, *Immunol Cell Biol*, 95 (2017) 364-371.
- [0204] [8] R. Khanna, S.R. Burrows, M.G. Kurilla, C.A. Jacob, I.S. Misko, T.B. Sculley, E. Kieff, D.J. Moss, Localization of Epstein-Barr virus cytotoxic T cell epitopes using recombinant vaccinia: implications for vaccine development, *J Exp Med*, 176 (1992) 169-176.
- [0205] [9] R.J. Murray, M.G. Kurilla, J.M. Brooks, W.A. Thomas, M. Rowe, E. Kieff, A.B. Rickinson, Identification of target antigens for the human cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus (EBV): implications for the immune control of EBV-positive malignancies, *J Exp Med*, 176 (1992) 157-168.
- [0206] [10] M.P. Thompson, R. Kurzrock, Epstein-Barr virus and cancer, *Clin Cancer Res*, 10 (2004) 803-821.
- [0207] [11] C. Smith, J. Tsang, L. Beagley, D. Chua, V. Lee, V. Li, D.J. Moss, W. Coman, K.H. Chan, J. Nicholls, D. Kwong, R. Khanna, Effective treatment of metastatic forms of Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma with a novel adenovirus-based adoptive immunotherapy, *Cancer Res*, 72 (2012) 1116-1125.
- [0208] [12] C. Smith, L. Cooper, M. Burgess, M. Rist, N. Webb, E. Lambley, J. Tellam, P. Marlton, J.F. Seymour, M. Gandhi, R. Khanna, Functional reversion of antigen-specific CD8+ T cells from patients with Hodgkin lymphoma following in vitro stimulation with recombinant polyepitope, *J Immunol*, 177 (2006) 4897-4906.

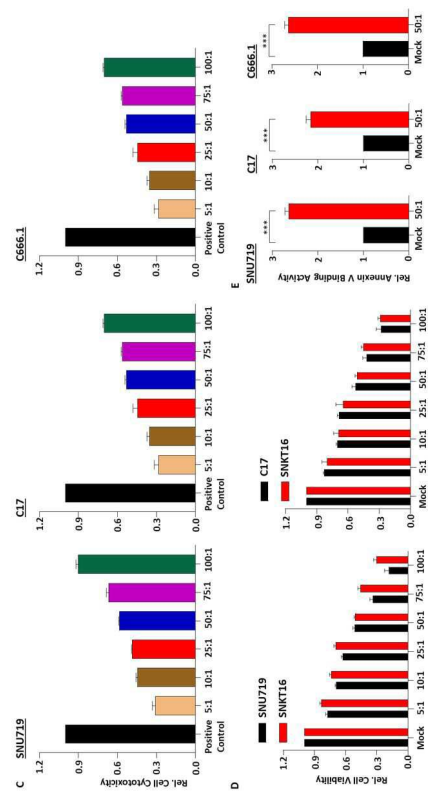
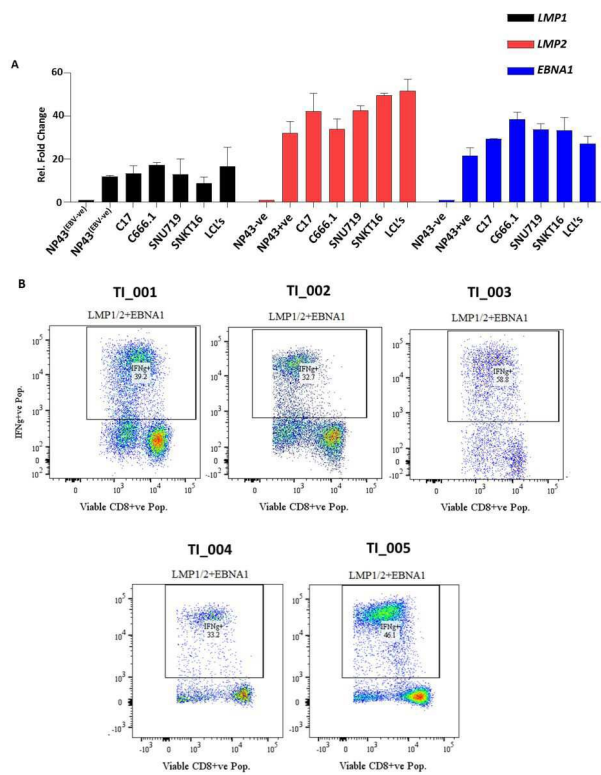
- [0209] [13] M. Kalimutho, D. Sinha, J. Jeffery, K. Nones, S. Srihari, W.C. Fernando, P.H. Duijf, C. Vennin, P. Raninga, D. Nanayakkara, D. Mittal, J.M. Saunus, S.R. Lakhani, J.A. Lopez, K.J. Spring, P. Timpson, B. Gabrielli, N. Waddell, K.K. Khanna, CEP55 is a determinant of cell fate during perturbed mitosis in breast cancer, *EMBO Mol Med*, (2018).
- [0210] [14] S.M. Smith, M.B. Wunder, D.A. Norris, Y.G. Shellman, A simple protocol for using a LDH-based cytotoxicity assay to assess the effects of death and growth inhibition at the same time, *PLoS One*, 6 (2011) e26908.
- [0211] [15] M. Kalimutho, D. Sinha, J. Jeffery, K. Nones, S. Srihari, W.C. Fernando, P.H. Duijf, C. Vennin, P. Raninga, D. Nanayakkara, D. Mittal, J.M. Saunus, S.R. Lakhani, J.A. Lopez, K.J. Spring, P. Timpson, B. Gabrielli, N. Waddell, K.K. Khanna, CEP55 is a determinant of cell fate during perturbed mitosis in breast cancer, *EMBO Mol Med*, 10 (2018).
- [0212] [16] J. Leignadier, S. Favre, S.A. Luther, I.F. Luescher, CD8 engineered cytotoxic T cells reprogram melanoma tumor environment, *Oncoimmunology*, 5 (2016) e1086861.
- [0213] [17] K.G. Anderson, I.M. Stromnes, P.D. Greenberg, Obstacles Posed by the Tumor Microenvironment to T cell Activity: A Case for Synergistic Therapies, *Cancer Cell*, 31 (2017) 311-325.
- [0214] [18] J.A. Rodriguez, HLA-mediated tumor escape mechanisms that may impair immunotherapy clinical outcomes via T-cell activation, *Oncol Lett*, 14 (2017) 4415-4427.
- [0215] [19] K.G. Lucas, Q. Sun, R.L. Burton, A. Tilden, W.P. Vaughan, M. Carabasi, D. Salzman, A. Ship, A phase I-II trial to examine the toxicity of CMV- and EBV-specific cytotoxic T lymphocytes when used for prophylaxis against EBV and CMV disease in recipients of CD34-selected/T cell-depleted stem cell transplants, *Hum Gene Ther*, 11 (2000) 1453-1463.
- [0216] [20] P. Comoli, S. Basso, M. Zecca, D. Pagliara, F. Baldanti, M.E. Bernardo, W. Barberi, A. Moretta, M. Labirio, M. Paulli, M. Furione, R. Maccario, F. Locatelli, Preemptive therapy of EBV-related lymphoproliferative disease after pediatric haploidentical stem cell transplantation, *Am J Transplant*, 7 (2007) 1648-1655.
- [0217] [21] R. Khanna, S. Bell, M. Sherritt, A. Galbraith, S.R. Burrows, L. Rafter, B. Clarke, R. Slaughter, M.C. Falk, J. Douglas, T. Williams, D.J. Moss, Activation and adoptive transfer of Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T cells in solid organ transplant patients with posttransplant lymphoproliferative disease, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A.*, 1999, pp. 10391-10396.
- [0218] [22] B. Savoldo, J.A. Goss, M.M. Hammer, L. Zhang, T. Lopez, A.P. Gee, Y.F. Lin, R.E. Quiros-Tejeira, P. Reinke, S. Schubert, S. Gottschalk, M.J. Finegold, M.K. Brenner, C.M. Rooney, H.E. Heslop, Treatment of solid organ transplant recipients with autologous Epstein Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs), *Blood*, 108 (2006) 2942-2949.
- [0219] [23] M. Vanneman, G. Dranoff, Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment, *Nat Rev Cancer*, 12 (2012) 237-251.
- [0220] [24] C. Liu, W. Peng, C. Xu, Y. Lou, M. Zhang, J.A. Wargo, J.Q. Chen, H.S. Li, S.S. Watowich, Y. Yang, D. Tompers Frederick, Z.A. Cooper, R.M. Mbofung, M. Whittington, K.T. Flaherty, S.E. Woodman, M.A. Davies, L.G. Radvanyi, W.W. Overwijk, G. Lizee, P. Hwu, BRAF inhibition increases tumor infiltration by T cells and enhances the antitumor activity of adoptive immunotherapy in mice, *Clin Cancer Res*, 19 (2013) 393-403.
- [0221] [25] P.J.R. Ebert, J. Cheung, Y. Yang, E. McNamara, R. Hong, M. Moskalenko, S.E. Gould, H. Maecker, B.A. Irving, J.M. Kim, M. Belvin, I. Mellman, MAP Kinase Inhibition Promotes T Cell and Anti-tumor Activity in Combination with PD-L1 Checkpoint Blockade, *Immunity*, 44 (2016) 609-621.
- [0222] [26] A. Boni, A.P. Cogdill, P. Dang, D. Udayakumar, C.N. Njauw, C.M. Sloss, C.R. Ferrone, K.T. Flaherty, D.P. Lawrence, D.E. Fisher, H. Tsao, J.A. Wargo, Selective BRAFV600E inhibition enhances T-

cell recognition of melanoma without affecting lymphocyte function, *Cancer Res*, 70 (2010) 5213-5219.

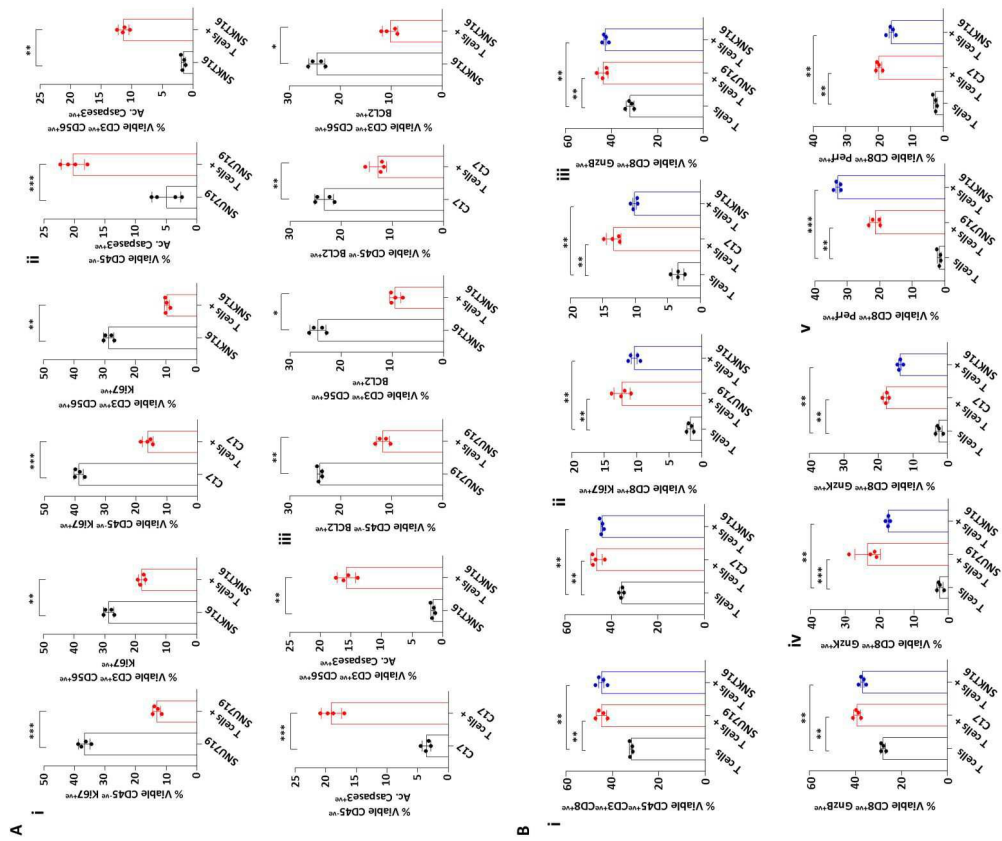
- [0223] [27] D.T. Frederick, A. Piris, A.P. Cogdill, Z.A. Cooper, C. Lezcano, C.R. Ferrone, D. Mitra, A. Boni, L.P. Newton, C. Liu, W. Peng, R.J. Sullivan, D.P. Lawrence, F.S. Hodi, W.W. Overwijk, G. Lizée, G.F. Murphy, P. Hwu, K.T. Flaherty, D.E. Fisher, J.A. Wargo, BRAF inhibition is associated with enhanced melanoma antigen expression and a more favorable tumor microenvironment in patients with metastatic melanoma, *Clin Cancer Res*, 19 (2013) 1225-1231.
- [0224] [28] S. Hu-Lieskovan, S. Mok, B. Homet Moreno, J. Tsoi, L. Robert, L. Goedert, E.M. Pinheiro, R.C. Koya, T.G. Graeber, B. Comin-Anduix, A. Ribas, Improved antitumor activity of immunotherapy with BRAF and MEK inhibitors in BRAF(V600E) melanoma, *Sci Transl Med*, 7 (2015) 279ra241.
- [0225] [29] S.H. Kang, B. Keam, Y.O. Ahn, H.R. Park, M. Kim, T.M. Kim, D.W. Kim, D.S. Heo, Inhibition of MEK with trametinib enhances the efficacy of anti-PD-L1 inhibitor by regulating anti-tumor immunity in head and neck squamous cell carcinoma, *Oncoimmunology*, 8 (2019) e1515057.
- [0226] [30] A.R. Karpf, D.A. Jones, Reactivating the expression of methylation silenced genes in human cancer, *Oncogene*, 21 (2002) 5496-5503.
- [0227] [31] H.J. Kim, S.C. Bae, Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs, *Am J Transl Res*, 3 (2011) 166-179.
- [0228] [32] Y. Kagoya, M. Nakatsugawa, Y. Yamashita, T. Ochi, T. Guo, M. Anczurowski, K. Saso, M.O. Butler, C.H. Arrowsmith, N. Hirano, BET bromodomain inhibition enhances T cell persistence and function in adoptive immunotherapy models, *J Clin Invest*, 126 (2016) 3479-3494.
- [0229] [33] J.E. Delmore, G.C. Issa, M.E. Lemieux, P.B. Rahl, J. Shi, H.M. Jacobs, E. Kastitis, T. Gilpatrick, R.M. Paranal, J. Qi, M. Chesi, A.C. Schinzel, M.R. McKeown, T.P. Heffernan, C.R. Vakoc, P.L. Bergsagel, I.M. Ghobrial, P.G. Richardson, R.A. Young, W.C. Hahn, K.C. Anderson, A.L. Kung, J.E. Bradner, C.S. Mitsiades, BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc, *Cell*, 146 (2011) 904-917.
- [0230] [34] S.C. Casey, L. Tong, Y. Li, R. Do, S. Walz, K.N. Fitzgerald, A.M. Gouw, V. Baylot, I. Gutgemann, M. Eilers, D.W. Felsher, MYC regulates the antitumor immune response through CD47 and PD-L1, *Science*, 352 (2016) 227-231.
- [0231] [35] M. Kalimutho, D. Sinha, D. Mittal, S. Srihari, D. Nanayakkara, S. Shafique, P. Raninga, P. Nag, K. Parsons, K.K. Khanna, Blockade of PDGFRbeta circumvents resistance to MEK-JAK inhibition via intratumoral CD8(+) T-cells infiltration in triple-negative breast cancer, *J Exp Clin Cancer Res*, 38 (2019) 85.
- [0232] [36] D.E. Johnson, R.A. O'Keefe, J.R. Grandis, Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer, *Nat Rev Clin Oncol*, 15 (2018) 234-248.
- [0233] [37] C.S. Tudor, C.W. Dawson, J. Eckhardt, G. Niedobitek, A.C. Buttner, B. Seliger, A. Hartmann, M. Buettnner, c-Myc and EBV-LMP1: two opposing regulators of the HLA class I antigen presentation machinery in epithelial cells, *Br J Cancer*, 106 (2012) 1980-1988.
- [0234]

도면

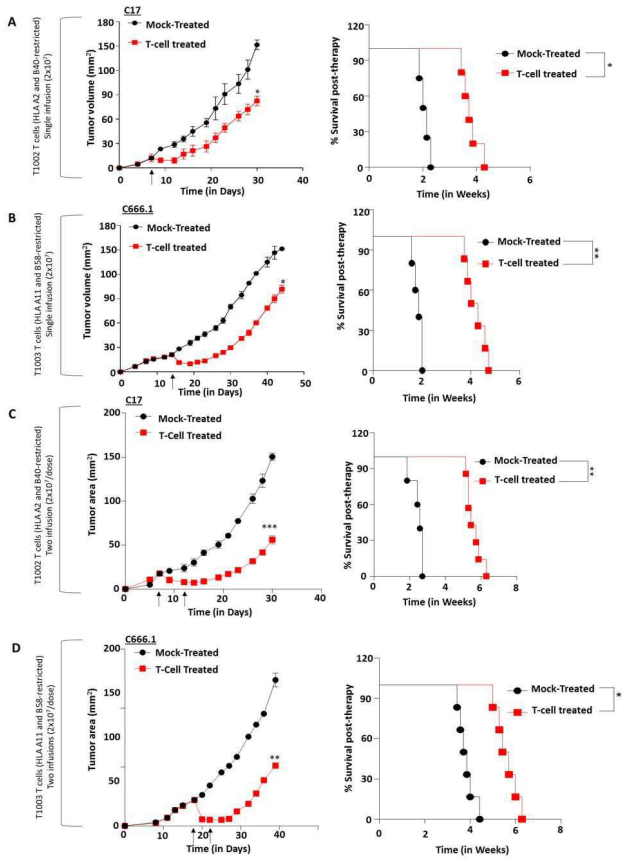
도면1



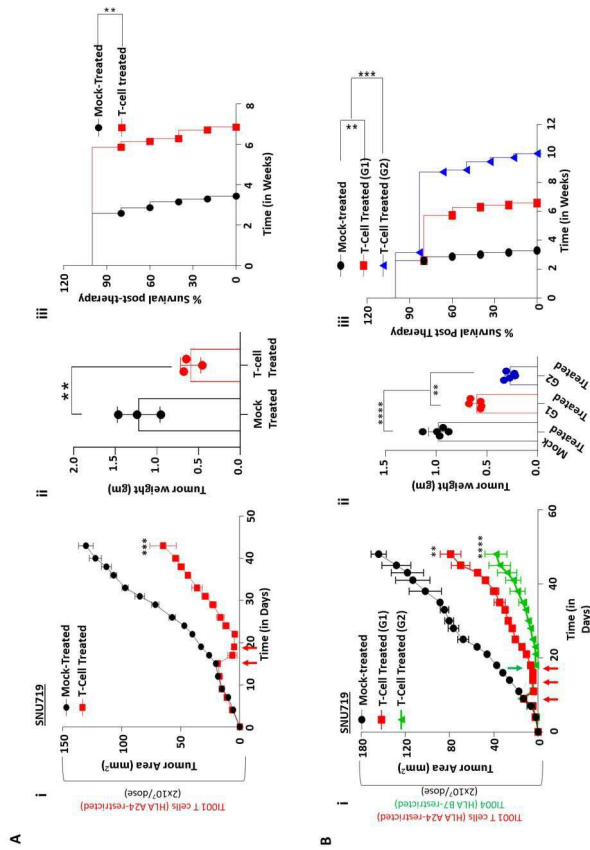
도면2



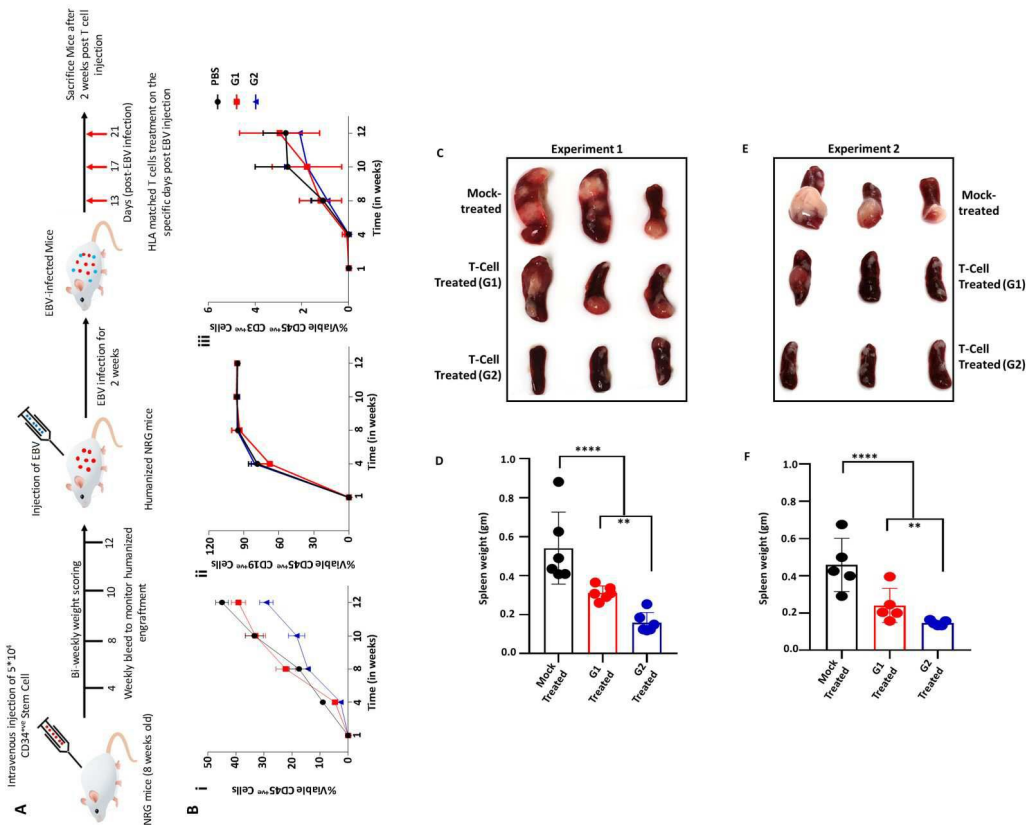
도면3



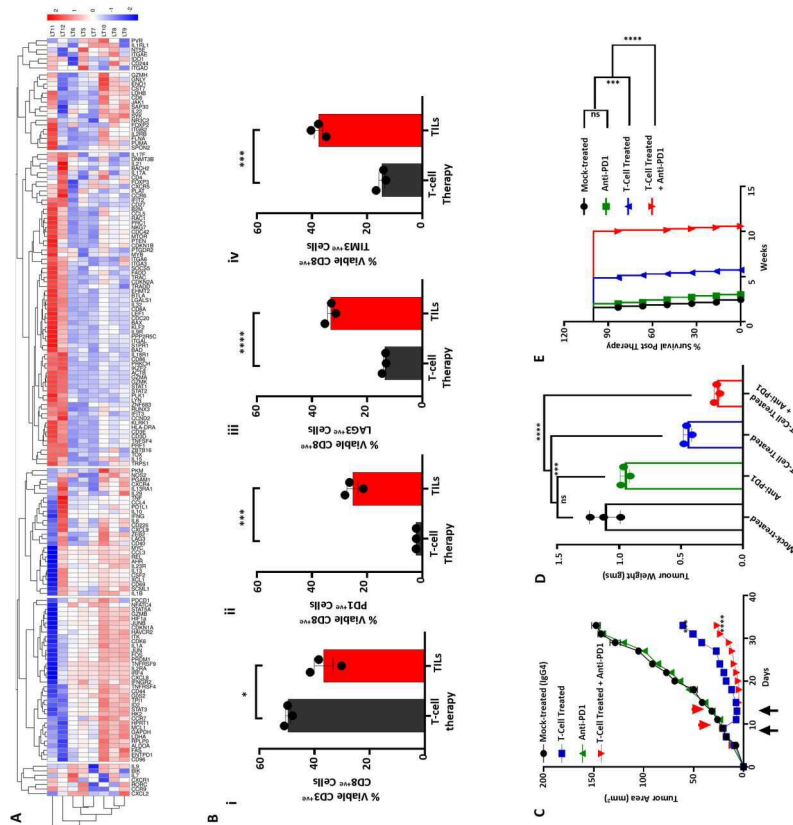
도면4



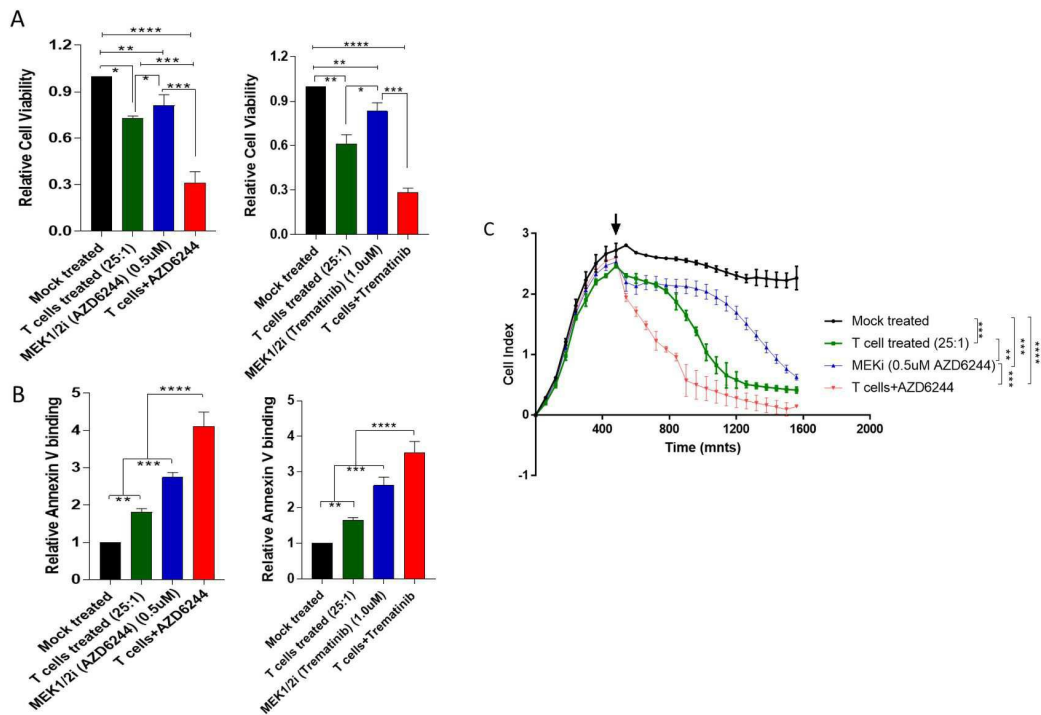
도면5



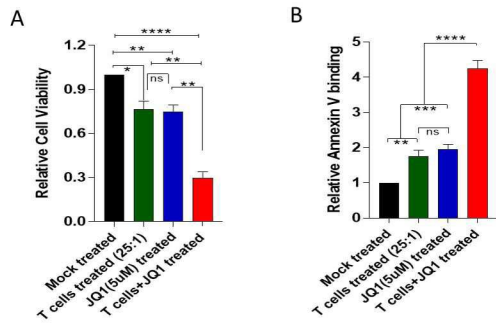
도면6



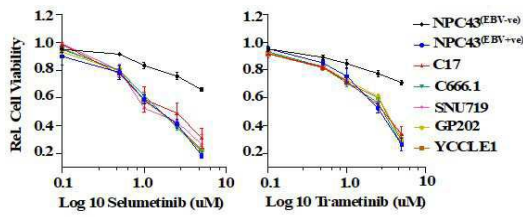
도면7



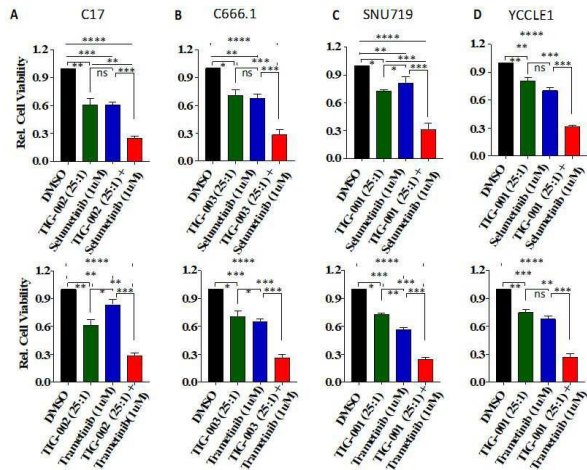
도면8



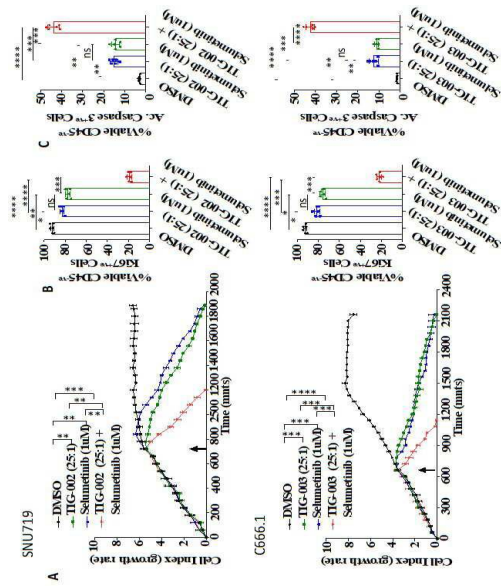
도면9



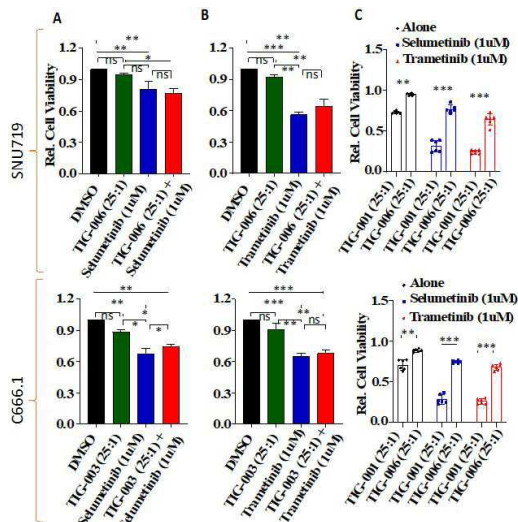
도면10



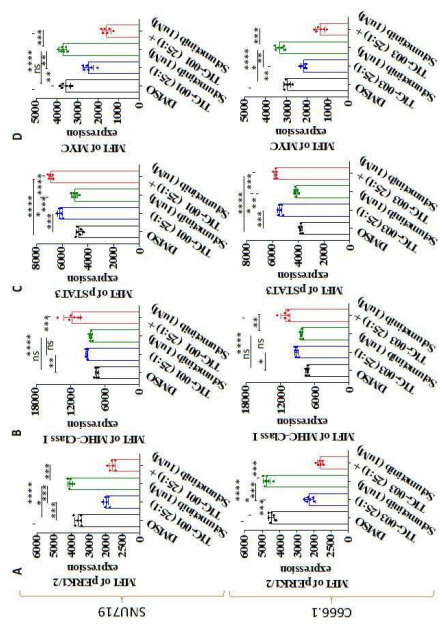
도면11



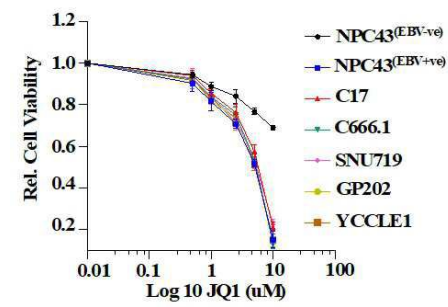
도면12



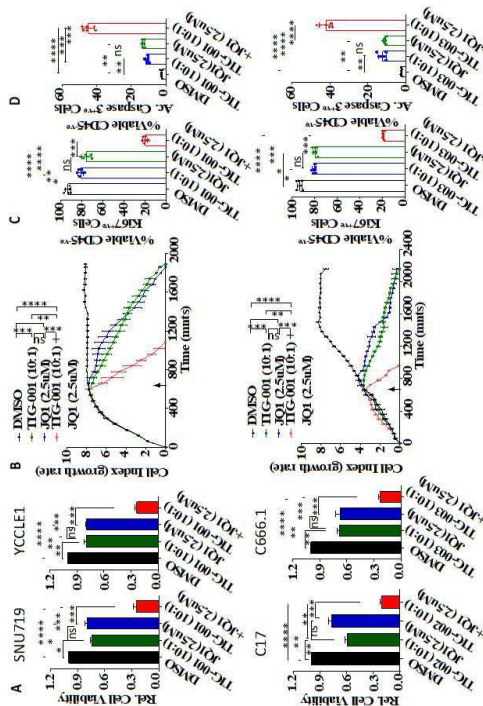
도면13



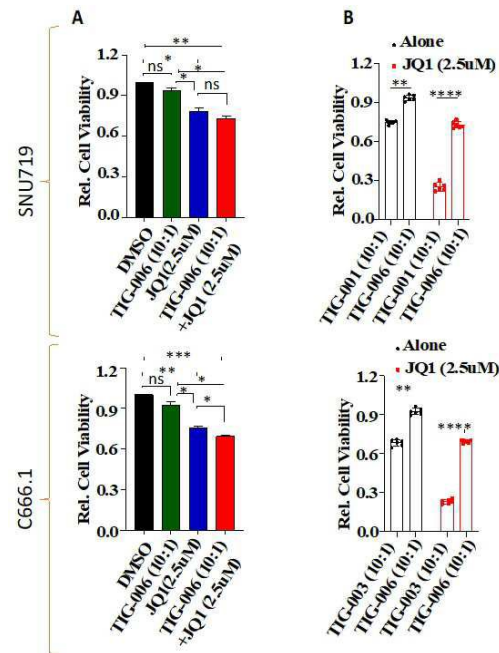
도면14



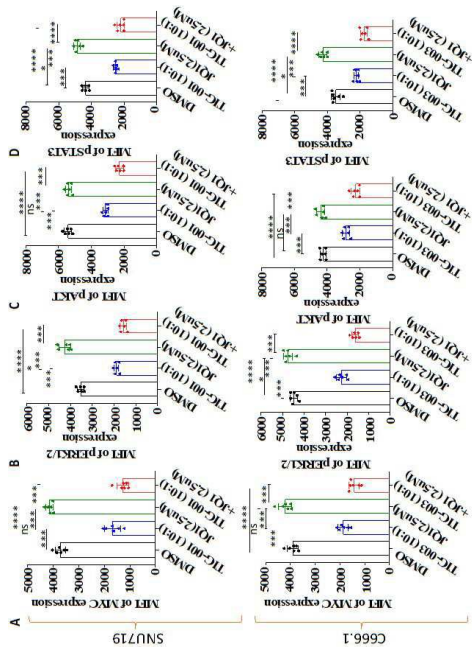
도면15



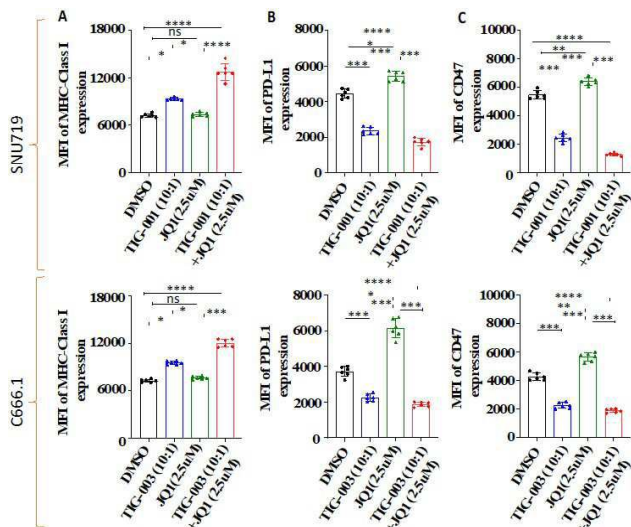
도면16



도면17



도면18



도면19

