

(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0038447

(43) 공개일자 2018년04월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/705 (2006.01) A61K 35/17 (2014.01)

C12N 5/0783 (2010.01) C12N 9/12 (2006.01)

C12N 9/50 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/70578 (2013.01)

A61K 35/17 (2013.01)

(21) 출원번호

10-2018-7002679

(22) 출원일자(국제)

2016년06월29일

심사청구일자

없음

(85) 번역문제출일자

2018년01월26일

(86) 국제출원번호

PCT/US2016/040010

(87) 국제공개번호

WO 2017/004150

국제공개일자

2017년01월05일

(30) 우선권주장

62/186,108 2015년06월29일 미국(US)

(71) 출원인

더 존스 홉킨스 유니버시티

미국 메릴랜드주 21218 볼티모어 노쓰 찰스 스트리트 3400

(72) 발명자

보렐로, 이반, 엠.

미국 21231 메릴랜드 볼티모어 킹스톤 로드 912리, 수잔

미국 21224 메릴랜드 볼티모어 사우스 하이랜드 애비뉴 828

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 남앤드남

전체 청구항 수 : 총 54 항

(54) 발명의 명칭

면역 체크포인트 키메라 수용체 치료법

(57) 요약

일부 양태에서, 본 구체예는 키메라 막관통 단백질과 관련된 조성물 및 방법에 관한 것이다. 키메라 막관통 단백질은 억제 수용체의 세포외 도메인, 및 면역 반응을 활성화시킬 수 있는 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다.

(52) CPC특허분류

C07K 14/70596 (2013.01)

C12N 5/0636 (2013.01)

C12N 9/1211 (2013.01)

C12N 9/50 (2013.01)

C07K 2319/03 (2013.01)

C12N 2500/02 (2013.01)

C12N 2501/515 (2013.01)

C12N 2510/00 (2013.01)

(72) 발명자

누난, 김벌리, 에이.

미국 21209 메릴랜드 볼티모어 보니 릿지 드라이브
6607 아파트먼트 102

파돌, 드류, 엠.

미국 20833-2241 메릴랜드 브룩빌 제임스 크릭 코
트 19400

명세서

청구범위

청구항 1

억제 수용체(inhibitory receptor)의 세포외 도메인; 및

면역 반응을 활성화시킬 수 있고, 세포내 신호전달 단백질의 일부를 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는, 키메라 막관통 단백질(chimeric transmembrane protein).

청구항 2

제1항에 있어서, 단백질이 SEQ ID NO: 10의 서열을 포함하는 단백질.

청구항 3

제2항에 있어서, 단백질이 SEQ ID NO: 11의 서열을 포함하는 단백질.

청구항 4

제1항에 있어서, 단백질이 SEQ ID NO: 7 및 SEQ ID NO: 8의 서열을 포함하는 단백질.

청구항 5

제1항에 있어서, 단백질이 SEQ ID NO: 9의 서열을 포함하는 단백질.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인이 키나아제 활성을 포함하는 단백질.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인이 포스포릴화 사이트(phosphorylation site)를 포함하는 단백질.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질이 억제 수용체의 막관통 도메인 또는 세포내 신호전달 단백질의 막관통 도메인을 포함하는 단백질.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 억제 수용체가 인간 억제 수용체 또는 마우스 억제 수용체인 단백질.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 억제 수용체가 천연 효능제(native agonist)의 결합 시에 면역 활성을 감소시키는 단백질.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 억제 수용체가 천연 효능제의 결합 시에 T 세포 증식, T 세포 생존, 시토카인 분비, 또는 면역 세포용해 활성을 감소시킬 수 있는 단백질.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 억제 수용체가 림프구 억제 수용체인 단백질.

청구항 13

제12항에 있어서, 억제 수용체가 CTLA-4, PD-1, LAG-3, 또는 Tim-3인 단백질.

청구항 14

제13항에 있어서, 억제 수용체가 PD-1인 단백질.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 신호전달 단백질이 인간 단백질 또는 마우스 단백질인 단백질.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 신호전달 단백질이 면역 활성을 증가시키는 단백질.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 신호전달 단백질이 T 세포 증식, T 세포 생존, 시토카인 분비, 또는 면역 세포용해 활성을 향상시킬 수 있는 단백질.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 신호전달 단백질이 막관통 단백질이거나, 세포내 신호전달 단백질이 천연 막관통 단백질을 결합시킬 수 있는 단백질.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 신호전달 단백질이 림프구 단백질인 단백질.

청구항 20

제19항에 있어서, 세포내 신호전달 단백질이 CD3 ζ , 4-1BB, 또는 CD28인 단백질.

청구항 21

제19항에 있어서, 세포내 신호전달 단백질이 4-1BB인 단백질.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 자살 도메인(suicide domain)을 추가로 포함하는 단백질.

청구항 23

제22항에 있어서, 자살 도메인이 티미딘 키나아제 활성을 갖거나 자살 도메인이 카스파제인 단백질.

청구항 24

제23항에 있어서, 자살 도메인이 HSV 티미딘 키나아제의 티미딘 키나아제 도메인이거나 자살 도메인이 카스파제 9의 일부를 포함하는 단백질.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 키메라 막관통 단백질을 엔코딩하는 핵산.

청구항 26

제25항의 핵산을 포함하는, 재조합 세포.

청구항 27

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 키메라 막관통 단백질을 포함하는, 재조합 세포.

청구항 28

제26항 또는 제27항에 있어서, 세포가 림프구인 세포.

청구항 29

제27항에 있어서, 세포가 T 세포인 세포.

청구항 30

제27항에 있어서, 세포가 종양 침윤 림프구("TIL"; tumor infiltrating lymphocyte)인 세포.

청구항 31

제27항에 있어서, 세포가 골수 침윤 림프구("MIL"; marrow infiltrating lymphocyte)인 세포.

청구항 32

제31항에 있어서, MIL이 저산소성 MIL(hypoxic MIL)인 세포.

청구항 33

세포를, 제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 키메라 막관통 단백질을 엔코딩하는 핵산 분자로 트랜스펙션시키거나(transfecting) 감염시키는 것을 포함하는, 재조합 세포를 제조하는 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 세포가 MIL인 방법.

청구항 35

제33항 또는 제34항에 있어서, 세포를 키메라 막관통 단백질을 엔코딩하는 핵산 분자로 트랜스펙션시키거나 감염시키기 전에, 저산소 조건 하에서 MIL을 인큐베이션하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 저산소 조건이 약 0.5% 내지 약 5% 산소 기체를 포함하는 방법.

청구항 37

제35항에 있어서, 저산소 조건이 약 1% 내지 약 2% 산소 기체를 포함하는 방법.

청구항 38

제35항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 저산소 인큐베이션(hypoxic incubation) 후에 정상 산소 조건(normoxic condition) 하에서 세포를 인큐베이션하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 39

제33항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 세포를 항-CD3/항-CD28 비드와 접촉시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 40

피검체에, 제26항 내지 제32항 중 어느 한 항의 재조합 세포를 투여하는 것을 포함하는, 피검체에서 면역 반응을 증가시키는 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 재조합 세포를 제조하는 것을 추가로 포함하며, 재조합 세포의 제조가 세포를 키메라 막관통 단백질을 엔코딩하는 핵산으로 트랜스펙션시키는 것을 포함하는 방법.

청구항 42

제40항에 있어서, 피검체로부터 세포를 분리시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 43

제40항에 있어서, 피검체가 신생물(neoplasm)을 갖는 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 신생물이 백혈병, 림프종 또는 다발성 골수종인 방법.

청구항 45

제40항에 있어서, 피검체가 인간인 방법.

청구항 46

피검체에, 제26항 내지 제32항 중 어느 한 항의 재조합 세포를 투여하는 것을 포함하는, 피검체에서 신생물을 치료하는 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 재조합 세포를 제조하는 것을 추가로 포함하며, 재조합 세포의 제조가 세포를 키메라 막관통 단백질을 엔코딩하는 핵산으로 트랜스펙션시키는 것을 포함하는 방법.

청구항 48

제46항에 있어서, 피검체로부터 세포를 분리시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 49

제46항에 있어서, 피검체가 신생물을 갖는 방법.

청구항 50

제49항에 있어서, 신생물이 다발성 골수종, 백혈병 또는 림프종인 방법.

청구항 51

제46항에 있어서, 피검체가 인간인 방법.

청구항 52

제46항에 있어서, 피검체에 세포를 투여하기 전에,
세포를 항-CD3/항-CD28 비드와 접촉시키고;
세포를 저산소 조건 하에서 인큐베이션하고;
세포를 정상 산소 조건 하에서 인큐베이션하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 53

제52항에 있어서, 세포가 저산소 조건 하에서 약 0.5 내지 약 4일 동안 인큐베이션되는 방법.

청구항 54

제52항에 있어서, 세포가 정상 산소 조건 하에서 약 0.5 내지 약 4일 동안 인큐베이션되는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조문헌

[0002] 본 출원은 2015년 6월 29일에 출원된 미국가출원번호 제62/186,108호를 우선권으로 주장하며, 이러한 문헌은 전 문이 본원에 참고로 포함된다.

배경 기술

- [0003] 악성 종양을 갖는 환자들 중 대다수는 이러한 질병으로 사망할 것이다. 이러한 환자들을 치료하기 위한 한 가지 방법(approach)은 키메라 항원 수용체(CAR; chimeric antigen receptor)의 발현을 통해 종양 세포 상에서 발현되는 항원을 타겟화하기 위해 T 세포를 유전적으로 변형시키는 것이다. CAR은 인간 백혈구 항원-독립적 방식으로 세포 표면 항원을 인식하도록 설계된 항원 수용체이다. CD19-타겟화된 방법의 성공 이외에도, 다른 악성 종양을 치료하기 위해 CAR을 발현시키는 유전적으로 변형된 세포를 사용하려는 시도는 제한적인 성공을 거두었다.
- [0004] 최근에, CTLA-4(이필리무맙(ipilimumab)) 및 PD-1(니볼루맙(nivolumab), 펌브롤리주맙(pembrolizumab))을 타겟화하는 체크포인트 억제 항체(checkpoint inhibiting antibody)는 전이성 흑색종, 비-소세포 폐암 (NSCLC; non small cell lung cancer) 및 호즈킨 림프종을 포함하는 다양한 악성 종양의 치료에서 상당한 활성을 나타내었다. 이러한 데이터는, 체크포인트 차단이 어떻게 T 세포 아네르기(anergy)를 극복함으로써 효과적인 면역치료법에 대한 주요 장애를 나타내는지를 입증한다.

발명의 내용

- [0005] 일부 양태에서, 본 구체예는 억제 수용체의 세포외 도메인, 및 면역 반응을 활성화시킬 수 있는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는, 키메라 막관통 단백질에 관한 것이다. 세포외 도메인은 예를 들어, CTLA-4, PD-1, LAG-3, 또는 Tim-3으로부터의 세포외 도메인일 수 있다. 세포내 신호전달 도메인은 예를 들어, CD3 ζ, 4-1BB, 또는 CD28의 세포내 신호전달 도메인일 수 있다. 일부 양태에서, 본 구체예는 본원에 기술된 바와 같은 키메라 막관통 단백질을 엔코딩하는 핵산에 관한 것이다.
- [0006] 일부 양태에서, 본 구체예는 본원에 기술된 바와 같은 키메라 막관통 단백질을 엔코딩하는 핵산을 포함하는, 세포에 관한 것이다. 일부 양태에서, 본 구체예는 본원에 기술된 바와 같은 키메라 막관통 단백질을 포함하는, 세포에 관한 것이다.
- [0007] 일부 양태에서, 본 구체예는 세포를, 본원에 기술된 바와 같은 키메라 막관통 단백질을 엔코딩하는 핵산으로 트랜스펙션시키는(transfecting) 것을 포함하는, 재조합 세포를 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0008] 일부 양태에서, 본 구체예는 피검체에 본원에 기술된 바와 같은 재조합 세포를 투여하는 것을 포함하는, 피검체에서 면역 반응을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 일부 양태에서, 본 구체예는 피검체에 본원에 기술된 바와 같은 재조합 세포를 투여하는 것을 포함하는, 피검체에서 신생물을 치료하는 방법에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0009] 도 1은 CD8로부터의 리더 펩티드(leader peptide)("CD8a LP"), 마우스 PD-1의 세포외 도메인("PD-1 ECD"), 및 마우스 4-1BB의 막관통 및 세포내 도메인(각각 "4-1BB TM" 및 "4-1BB ICD")을 포함하는, 키메라 막관통 단백질을 엔코딩하는 뉴클레오타이드 서열(SEQ ID NO:1)을 도시한 것이다. 뉴클레오타이드 서열(SEQ ID NO:2)의 역 상보체(reverse complement)가 또한 도시되어 있다. 마우스 림프구에서 발현을 위해 코돈은 최적화되었다.
- 도 2는 CD8로부터의 리더 펩티드("CD8a LP"), 인간 PD-1의 세포외 도메인("PD-1 ECD"), 및 인간 4-1BB의 막관통 및 세포내 도메인(각각, "4-1BB TM" 및 "4-1BB ICD")을 포함하는, 키메라 막관통 단백질을 엔코딩하는 뉴클레오타이드 서열(SEQ ID NO:3)을 도시한 것이다. 뉴클레오타이드 서열(SEQ ID NO:4)의 역 상보체가 또한 도시되어 있다. 인간 림프구에서 발현을 위해 코돈은 최적화되었다.
- 도 3은 하기 실시예 2에서 기술되는 트랜스펙션 프로토콜을 이용하여, mCherry 유전자, 및 PD-1의 세포외 도메인을 포함하는 키메라 막관통 단백질을 엔코딩하는 핵산(SEQ ID NO:1)으로 트랜스펙션된 Lenti-X 293T 세포에 대한 유세포 분석 결과를 도시한 것이다. 도 3은 293T 세포에서 핵산이 발현되는 것을 도시한 것이다.
- 도 4는 하기 실시예 1에서 기술되는 형질도입 프로토콜을 이용하여, mCherry 유전자, 및 PD-1의 세포외 도메인 및 4-1BB의 세포내 도메인을 포함하는 키메라 막관통 단백질을 엔코딩하는 핵산(SEQ ID NO:1)으로 형질도입된 Lenti-X 293T 세포에 대한 유세포 분석 결과를 도시한 것이다. 세포는 1.9 mL의 바이러스를 함유한 6웰 플레이트의 1개의 웰에서 형질도입되었다. 도 4는 293T 세포에서 핵산이 발현되는 것을 도시한 것이다.
- 도 5는 하기 실시예 1에서 기술되는 형질도입 프로토콜을 이용하여, mCherry 유전자, 및 PD-1의 세포외 도메인 및 4-1BB의 세포내 도메인을 포함하는 키메라 막관통 단백질을 엔코딩하는 핵산(SEQ ID NO:1)으로 형질도입된 Lenti-X 293T 세포에 대한 유세포 분석 결과를 도시한 것이다. 세포는 0.38 mL의 바이러스를 함유한 6-웰 플레

이트의 1개의 웰에서 형질도입되었다. 도 5는 293T 세포에서 핵산이 발현되는 것을 도시한 것이다.

도 6, 패널 A 및 패널 B는 PD-1 세포외 도메인, 4-1BB 막관통 도메인, 및 4-1BB 세포내 도메인을 갖는 키메라 수용체를 포함하는 MIL이 종양 특이성(tumor specificity)에 부정적인 영향을 미치지 않는다는 것을 예시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0010] CAR 치료법은 현재까지 상당한 장래성(promise)을 나타내고 있다. 만성 림프성 백혈병(CLL; chronic lymphocytic leukemia) 및 더욱 최근에, 급성 림프모구 백혈병(ALL; acute lymphoblastic leukemia)을 타겟으로 하는 CD19 CAR은 주목할 만한 성공을 거두었다. 흥미롭게도, 다른 항원을 타겟으로 하는 CAR은 유사한 임상 반응을 제공하지 못하였다. 이러한 항원-타겟화된 방법의 하나의 한계는 이의 치료학적 적용 가능성인데, 이는 특정 표면 수용체를 발현시키는 질병 및 항원-손실 변형체로 재발되는 단일 종양 항원을 타겟화하는 한계로 국한된다.
- [0011] 종양 면역학의 주요 장애는 많은 세포 기반 방법의 내재적 항-종양 효능을 제한하는 종양-특이적 내성의 유도이다. 최근 연구에서는, 전이성 흑색종에 대한 항-CTLA-4 및 항-PD-1의 승인을 이끌어 내는 체크포인트 억제제(checkpoint inhibitor)를 타겟화함으로써 상당한 임상 효능을 나타내었다. 일부 양태에서, 본 구체에는 체크포인트 억제제를 발현시키는 세포외 도메인, 및 활성화 세포내 도메인을 포함하는, 키메라 수용체에 관한 것이다. 이는 내성 유발 메커니즘(tolerogenic mechanism)을 활성화 신호로 이용(hijack)하는 이점을 갖는다. 이러한 방법은 T 세포 에너지가 질병의 발병의 주요 양태이고 항원 특이성이 내인성 T 세포 레퍼토리(endogenous T cell repertoire)에 의해 제공되는 모든 임상 상황에서 사용될 수 있다.
- [0012] 일부 양태에서, 본 구체에는 억제 수용체의 세포외 도메인, 막관통 도메인, 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하는, 키메라 막관통 단백질에 관한 것이다. 일부 구체예에서, 세포내 신호전달 도메인은 면역 반응을 활성화시킬 수 있다. 세포내 신호전달 도메인은 세포내 신호전달 단백질의 일부를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 세포내 도메인은 세포, 예를 들어, T-세포의 활성화를 유지시키기 위해 사용될 수 있다.
- [0013] 일부 구체예에서, 세포외 도메인은 신호를 세포내 신호전달 도메인으로 전달할 수 있다. 예를 들어, 세포외 도메인은 천연 억제 수용체의 효능제의 결합 시에 신호를 세포내 신호전달 도메인으로 전달할 수 있다.
- [0014] 신호 전달(signal transduction)은 단백질의 올리고머화를 포함할 수 있다. 올리고머화는 호모-올리고머화 또는 헤테로-올리고머화를 포함할 수 있다. 올리고머화는 단백질의 다이머화, 즉, 제2 키메라 막관통 단백질과의 호모-다이머화, 또는 상이한 단백질과의 헤테로-다이머화를 포함할 수 있다.
- [0015] 신호 전달은 포스포릴화를 포함할 수 있다. 예를 들어, 세포내 신호전달 도메인은 키나아제 활성 및/또는 포스포릴화 사이트를 포함할 수 있다. 신호 전달은 자가포스포릴화, 예를 들어, 세포내 신호전달 도메인의 자가포스포릴화를 포함할 수 있다.
- [0016] 일부 구체예에서, 단백질은 막관통 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 단백질은 내장 막 단백질이다. 예를 들어, 단백질은 타입 1 막 단백질, 타입 2 막 단백질, 또는 다중-스패닝 막 단백질(multi-spanning membrane protein)일 수 있다. 일부 구체예에서, 단백질은 억제 수용체의 막관통 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 단백질은 세포내 신호전달 단백질의 막관통 도메인을 포함한다. 키메라 막관통 단백질은 예를 들어, 세포 막을 가로질러 세포외 도메인을 전위시키기 위해, 신호 펩티드를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 막관통 도메인은 IISFFLALTSTALLFLFLTLRFSVV(SEQ ID NO: 5)의 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 키메라 막관통 단백질은 CD8로부터 유래된 신호 펩티드를 포함한다. 일부 구체예에서, 신호 펩티드는 CD8 리더 펩티드를 포함한다. 일부 구체예에서, 신호 펩티드는 MALPVTALLPLALLHAARP(SEQ ID NO: 6)를 포함한다.
- [0017] 일부 구체예에서, 세포외 도메인은 억제 수용체의 세포외 도메인이다. 일부 구체예에서, 세포외 도메인은 리간드-결합 도메인, 예를 들어, 억제 수용체의 효능제-결합 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 세포외 도메인은 리간드 결합에 반응하여 막을 가로질러 신호를 전달하기 위해 충분한 구조를 포함한다. 임의의 특정 이론으로 제한하고자 하는 것은 아니지만, 다가 리간드에 의해 매개된 올리고머화에 의해 신호를 전달하는 억제 수용체에 대하여, 리간드-결합 도메인의 단순한 존재는 리간드 결합에 반응하여 막을 가로질러 신호를 전달하기에 충분한 구조일 수 있다. 임의의 특정 이론으로 제한하고자 하는 것은 아니지만, 세포막에 대한 막관통 도메인의 배향(orientation)을 변경시킴으로써 신호를 전달하는 억제 수용체에 대하여, 세포외 도메인은 리간드 결합에 반응하여 막을 가로질러 신호를 전달하기 위해 리간드-결합 도메인과 막관통 도메인 사이에 천연 구조(native structure)를 필요로 할 수 있다. 예를 들어, 세포외 도메인은 이의 리간드-결합 도메인에서 이의 막관통 도메

인까지 억제 수용체의 천연 서열(native sequence)을 포함할 수 있다.

- [0018] 천연 억제 수용체(native inhibitory receptor)는 인간 억제 수용체 또는 마우스 억제 수용체일 수 있다. 이에 따라, 세포의 도메인은 인간 또는 마우스 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 천연 억제 수용체의 기원은 예를 들어, 키메라 막관통 단백질에 대한 면역 반응을 피하기 위해, 치료될 피검체의 종과 매칭하도록 선택된다. 그럼에도 불구하고, 천연 억제 수용체는 예를 들어, 편의를 위해서, 상이한 종으로부터 선택될 수 있다. 이에 따라, 키메라 단백질은 단백질이 발현되는 세포의 종, 또는 단백질이 투여되는 피검체에 대해 이종-유래될 수 있거나 그렇지 않을 수 있다.
- [0019] 일부 구체예에서, 천연 억제 수용체는 천연 효능제의 결합 시에 면역 활성을 감소시키는 단백질들로부터 선택된다. 예를 들어, 천연 억제 수용체는 천연 효능제의 결합 시에 T 세포 증식, T 세포 생존, 시토카인 분비, 또는 면역 세포용해 활성을 감소시킬 수 있다. 천연 억제 수용체는 림프구 억제 수용체일 수 있다(즉, 억제 수용체는 림프구, 예를 들어, T 세포 상에서 발현될 수 있다). 예를 들어, 천연 억제 수용체는 T 세포 상에서 발현될 수 있으며, 천연 억제 수용체에 대한 효능제의 결합은 T 세포 증식, T 세포 생존, 시토카인 분비, 또는 면역 세포용해 활성을 지지하지 않는 세포 신호전달을 야기시킬 수 있다.
- [0020] 일부 구체예에서, 천연 억제 수용체는 CTLA-4(세포독성 T-림프구-연관 단백질 4(cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4); CD152), PD-1(계획된 세포소멸 단백질 1(Programmed cell death protein 1); CD279), LAG-3(림프구-활성화 유전자 3(lymphocyte-activation gene 3); CD223), 또는 Tim-3(T 세포 면역글로불린 뮤신-3(T cell immunoglobulin mucin-3))일 수 있다. 이에 따라, 일부 구체예에서, 세포의 도메인은 CTLA-4, PD-1, LAG-3, 또는 Tim-3으로부터의 세포의 도메인일 수 있다. 억제 수용체는 PD-1일 수 있다. 일부 구체예에서, 막관통 단백질은 PD-1의 세포의 도메인을 포함한다. 일부 구체예에서, 세포의 도메인의 서열은
- [0021] PGWFLDSPDRPWNPTFSPALLVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFVTLPLNGRDFHMSVVRARRNDSGYTL CGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPHTAHPSPSPRPAGQFQTLV(SEQ ID NO: 7)를 포함한다.
- [0022] 일부 구체예에서, 세포내 신호전달 도메인은 세포내 신호전달 단백질의 신호전달 도메인이다. 일부 구체예에서, 세포내 신호전달 도메인은 키나아제 활성 또는 포스포릴화 사이트를 포함할 수 있다. 세포내 신호전달 도메인은 일부 구체예에서, 예를 들어, 세포막을 가로지르는 신호 전달 후에, 신호전달 분자, 예를 들어, 키나아제 또는 포스포릴라아제를 활성화시킬 수 있다. 세포내 신호전달 도메인은 다운스트림 키나아제 또는 포스포릴라아제를 통해 신호를 보낼 수 있다.
- [0023] 세포내 신호전달 단백질은 인간 단백질 또는 마우스 단백질일 수 있다. 이에 따라, 세포내 신호전달 도메인은 인간 또는 마우스 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 세포내 신호전달 단백질은 예를 들어, 신호전달 도메인이 다운스트림 신호전달 분자를 활성화시키기 위해 세포의 세포질 기작(cytosolic machinery)을 사용할 수 있도록, 피검체 및 치료를 위해 사용되는 세포의 종을 매칭하도록 선택된다. 그럼에도 불구하고, 세포내 신호전달 단백질은 예를 들어, 편의를 위하여, 상이한 종들, 예를 들어, 상술된 바와 같은 종들로부터 선택될 수 있다.
- [0024] 일부 구체예에서, 세포내 신호전달 단백질은 면역 활성을 증가시킨다. 이에 따라, 키메라 막관통 단백질을 통한 신호 전달은 면역 활성을 증가시키는 신호 캐스케이드(signal cascade)를 야기시킬 수 있으며, 여기서, 세포내 신호전달 도메인은 세포내 신호전달 캐스케이드를 매개한다. 일부 구체예에서, 세포내 신호전달 단백질은 T 세포 증식, T 세포 생존, 시토카인 분비, 또는 면역 세포용해 활성을 향상시킬 수 있다. 일부 구체예에서, 세포내 신호전달 단백질은 막관통 단백질이거나, 세포내 신호전달 단백질은 천연 막관통 단백질을 결합시킬 수 있다. 세포내 신호전달 단백질은 림프구 단백질일 수 있다(즉, 세포내 신호전달 단백질은 림프구, 예를 들어, T 세포 상에서 발현될 수 있다).
- [0025] 일부 구체예에서, 세포내 신호전달 단백질은 CD3 ζ (T-세포 표면 당단백질 CD3 제타 사슬; CD247), 4-1BB(종양 괴사 인자 수용체 수퍼패밀리 일원 9; CD137), 또는 CD28(T-세포-특이적 표면 당단백질 CD28; Tp44)이다. 이에 따라, 세포내 신호전달 단백질은 CD3 ζ , 4-1BB, 또는 CD28로부터의 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 세포내 신호전달 단백질은 4-1BB일 수 있다. 이에 따라, 세포내 신호전달 단백질은 4-1BB로부터의 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 세포내 도메인은 KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCCEL(SEQ ID NO: 8)을 포함한다.
- [0026] 일부 구체예에서, 키메라 막관통 단백질은 즉, 단백질을 포함하는 재조합 세포를 사멸시키기 위해, 자살 도메인(suicide domain)을 포함한다. 자살 도메인은 티미딘 키나아제 활성 또는 카스파제 활성을 포함할 수 있다. 예

를 들어, 자살 도메인은 티미딘 키나아제 또는 카스파제일 수 있다. 일부 구체예에서, 자살 도메인은 HSV 티미딘 키나아제("HSV-TK")의 티미딘 키나아제 도메인이거나, 자살 도메인은 카스파제 9의 일부를 포함한다.

[0027] 일부 양태에서, 본 구체예는 본원에 기술된 바와 같은 키메라 막관통 단백질을 엔코딩하는 핵산 분자에 관한 것이다. 핵산 분자는 촉진제(promoter)를 포함할 수 있으며, 여기서, 촉진제는 예를 들어, 재조합 세포에서 키메라 막관통 단백질의 발현을 위해, 키메라 막관통 단백질을 엔코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일부 구체예에서, 촉진제는 구성 촉진제(constitutive promoter)이다. 일부 구체예에서, 촉진제는 세포 특이적 촉진제이다. 일부 구체예에서, 촉진제는 조직 특이적 촉진제이다.

[0028] 핵산 분자는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, 또는 SEQ ID NO:4에 기술된 서열을 포함할 수 있다. 핵산 분자는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, 또는 SEQ ID NO:4에 기술된 서열에서 적어도 약 100, 200, 300, 400, 500, 600, 또는 700개의 연속 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 핵산 분자는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, 또는 SEQ ID NO:4에 기술된 뉴클레오타이드 서열과 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 상동성(sequence homology)을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 핵산 분자는 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, 또는 SEQ ID NO:4에 기술된 뉴클레오타이드 서열에서 적어도 약 100, 200, 300, 400, 500, 600, 또는 700개의 연속 뉴클레오타이드와 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 상동성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 핵산 분자는 SEQ ID NO:3에 기술된 뉴클레오타이드 서열에서 적어도 100개의 연속 뉴클레오타이드와 적어도 95% 서열 상동성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.

[0029] 일부 구체예에서, 핵산 분자는 본원에 기술된 바와 같은 및/또는 도면에서의 아미노산 서열을 엔코딩한다. 일부 구체예에서, 핵산 분자는 SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, 또는 SEQ ID NO: 11에 기술된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 엔코딩한다. 일부 구체예에서, 핵산 분자는 본원에 기술된 및/또는 도면에서의 뉴클레오타이드 서열과 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 엔코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 상동성(homology)은 단백질의 맥락에서 동일성(identity) 또는 유사성(similarity)일 수 있다. 서열 상동성은 핵산 분자의 맥락에서 서열 동일성(sequence identity)을 지칭할 수 있다. 상동성은 기본 설정(default setting)을 이용하여 Expasy, BLASTp, Clustal, 등과 같은 일상적인 툴(routine tool)을 이용함으로써 사용될 수 있다.

[0030] 일부 구체예에서, 키메라 막관통 단백질은 하기 표에 기술된 하나 이상의 아미노산 서열을 포함한다:

서열	SEQ ID NO
IISFFLALTSTALLFLFFLTLRFSV	5
MALPVTALLPLALLHAARP	6
PGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVVTEDGNATFTCSFSNTSEFV LNWYRMSPSNQTDKLAAPFEDRSQPGQDCRFRTQLPNGRDFHM SVVRARRNDSTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVP TAHPSPSPRAGQFQTLV	7
KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEGGCEL	8
IISFFLALTSTALLFLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEGGCEL	9
PGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLVVTEDGNATFTCSFSNTSEFV LNWYRMSPSNQTDKLAAPFEDRSQPGQDCRFRTQLPNGRDFHM SVVRARRNDSTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVP TAHPSPSPRAGQFQTLVIISFFLALTSTALLFLFFLTLRFSV VKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEGGCEL	10
MALPVTALLPLALLHAARPPGWFLDSPDRPWNPTTFSPALLV VTEDGNATFTCSFSNTSEFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPFEDRS QPGQDCRFRTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSTYLCGAISLAPK AQIKESLRAELRVTERRAEVP TAHPSPSPRAGQFQTLVIISFF LALTSTALLFLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEGGCEL	11

[0031]

[0032] 일부 구체예에서, 키메라 막관통 단백질은 본원에 기술된 아미노산 서열들 중 하나와 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0033]

본원에 기술된 아미노산 서열들의 변형체는 다양한 구체예들에 포함될 수 있다. 용어 "변형체(variant)"는 단백질 또는 폴리펩티드의 아미노산 서열과 비교하여 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 등)의 아미노산 치환, 결실, 및/또는 삽입이 존재하는 단백질 또는 폴리펩티드를 지칭하며, 그러한 용어는 단백질 또는 폴리펩티드의 천연 발생 대립 유전자 변형체 및 대안적인 접합 변형체(splice variant)를 포함한다. 용어 "변형체"는 아미노산 서열에서 하나 이상의 아미노산을 유사한 또는 동종의 아미노산(들) 또는 유사하지 않은 아미노산(들)으로의 대체를 포함한다. 일부 변형체는 아미노산 서열에서 하나 이상의 아미노산 위치에서 알려진 치환을 포함한다. 다른 치환은 단백질의 전체 순 전하, 극성, 또는 소수성에 거의 또는 전혀 영향을 미치지 않는 보존적 치환을 포함한다. 보존적 치환(conservative substitution)은 키메라 막관통 단백질의 기능에 미미한 영향을 미칠 수 있다. 일부 구체예에서, 이러한 기능은 림프구, 예를 들어, 골수-침윤 림프구(MIL), 실시예 3에 기술된 바와 같은 림프구에서 발현될 때, 단백질의 특이성일 수 있다. 당업자는, 실시예 3과 동일하거나 유사한 프로토콜을 사용하여 본원에서 제공된 서열과 비교함으로써 치환이 키메라 막관통 단백질의 기능에 영향을 미치는지의 여부를 결정할 수 있다. 비-제한적인 예시적 보존적 치환은 하기 표에 기술된다. 일부 구체예에 따르면, 키메라 막관통 단백질은 본원에 기술된 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는다.

[0034] 보존적 아미노산 치환

염기성:	아르기닌 라이신 히스티딘
산성:	글루탐산 아스파르트산
하전되지 않은 극성:	글루타민 아스파라긴 세린 트레오닌 티로신
비-극성:	페닐알라닌 트립토판 시스테인 글리신 알라닌 발린 프롤린 메티오닌 류신 이소류신

[0035]

[0036] 하기 표는 보존적 아미노산 치환의 다른 방식을 기술하는 것이다.

본래 잔기	보존적 치환
Ala	Gly; Ser; Thr
Arg	Lys; Gln
Asn	Gln; His; Ser
Asp	Glu; Asn
Cys	Ser
Gln	Asn; Ser; Asp; Glu
Glu	Asp; Gln; Lys
Gly	Ala; Pro; Asn
His	Asn; Gln; Tyr
Ile	Leu; Val; Met; Val; Phe
Leu	Ile; Val; Met; Phe
Lys	Arg; Gln
Met	Leu; Tyr; Ile; Val; Phe
Pro	Ser; Thr; Ala; Gly
Phe	Met; Leu; Tyr; Trp
Ser	Thr; Gly; Asn; Asp
Thr	Ser; Asn
Trp	Tyr; Phe
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu; Met; Phe

[0037]

[0038] 이에 따라, 일부 구체예에서, 본원에 기술된 아미노산 서열의 아미노산 잔기들 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개는 보존적 치환으로 변경된다. 일부 구체예에서, 단지 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 잔기는 보존적 치환으로 치환된다.

[0039] 일부 구체예에서, 키메라 막관통 단백질은 SEQ ID NO: 10 또는 SEQ ID NO: 11의 서열 또는 이의 변형체를 포함한다. SEQ ID NO: 10은 SEQ ID NO: 5, 7, 및 8의 조합이다. SEQ ID NO: 11은 SEQ ID NO: 5, 6, 7, 및 8의 조합이다. 일부 구체예에서, SEQ ID NO: 6의 서열은 키메라 막관통 단백질을 세포외 막에 트래피킹(trafficking)하는데 도움을 줄 수 있는, 다른 신호 펩티드 또는 리더 서열로 대체된다. 일부 구체예에서, 막관통 도메인, 예를 들어, SEQ ID NO: 5는 상이한 막관통 단백질로 대체된다. 일부 구체예에서, 막관통 도메인은 PD-1의 막관통 도메인이다. 일부 구체예에서, 막관통 도메인은 4-1BB의 막관통 도메인이다.

[0040] 일부 양태에서, 본 구체예는 본원에 기술된 바와 같은 핵산을 포함하는, 재조합 세포에 관한 것이다. 일부 구체

예에서, 본 구체예는 본원에 기술된 바와 같은 키메라 막관통 단백질을 포함하는, 재조합 세포에 관한 것이다. 일부 구체예에서, 세포는 SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 11의 단백질을 포함하는 키메라 단백질을 포함한다. 일부 구체예에서, 세포는 림프구이다. 세포는 T 세포일 수 있다. 일부 구체예에서, 세포는 중앙-침윤 림프구("TIL") 또는 골수 침윤 림프구("MIL")일 수 있다.

[0041] 일부 구체예에서, 본원에 기술된 키메라 막관통 단백질을 포함하는 세포는, 피검체에 투여될 때, 키메라 막관통 단백질이 없는 세포와 비교하여, 피검체에서 보다 오랫동안 지속하고/거나 보다 길게 활성 상태로 유지된다.

[0042] 일부 양태에서, 본 구체예는 세포를 본원에 기술된 바와 같은 핵산 분자로 트랜스펙션시키는 것을 포함하는, 재조합 세포를 제조하는 방법에 관한 것이다. 일부 양태에서, 본 구체예는 세포를, 본원에 기술된 바와 같은 아미노산 서열을 엔코딩하는 핵산 분자로 트랜스펙션시키는 것을 포함하는, 재조합 세포를 제조하는 방법에 관한 것이다. 핵산 분자는 플라스미드(plasmid)일 수 있다. 세포는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 플라스미드에 의해 트랜스펙션될 수 있다. 세포는 또한, 핵산 분자를 포함하는 바이러스 또는 바이러스-유사 입자로 감염될 수 있다. 일부 구체예에서, 세포는 TIL 또는 MIL이다. 일부 구체예에서, MIL은 활성화된 MIL이다. MIL은 예를 들어, 이러한 것을 예를 들어, 저산소 조건 하에서, 항-CD3/항-CD28 비드 및 적절한 시토킨과 함께 인큐베이션함으로써 활성화될 수 있다. 저산소 조건 하에서 MIL을 성장시키는 일 예는, 예를 들어, W02016037054호에서 확인될 수 있으며, 이러한 문헌은 전문이 본원에 참고로 포함된다. 일부 구체예에서, 세포가 본원에 기술된 바와 같은 저산소 환경에서 인큐베이션된 후에, 핵산 분자는 세포에 트랜스펙션된다. 일부 구체예에서, 세포가 저산소 환경에서 약 1, 2, 3, 4 또는 5일 동안 인큐베이션된 후에, 핵산 분자는 세포에 트랜스펙션된다. 일부 구체예에서, 세포는 이후에, 정상 산소 조건 하에서, 약 1, 2, 3, 4 또는 5일 동안 인큐베이션된다.

[0043] 일부 구체예에서, 키메라 막관통 단백질을 포함하는 MIL은 W02016037054호에 기술된 방법에 따라 제조되며, 이러한 문헌은 전문이 본원에 참고로 포함된다. 일부 구체예에서, 본 방법은 피검체로부터의 골수, 림프구, 및/또는 골수 침윤 림프구("MIL")에서 세포를 제거하고; 세포를 저산소 환경에서 인큐베이션하여 활성화된 MIL을 생성시키고; 피검체에 활성화된 MIL을 투여하는 것을 포함할 수 있다. 세포는 또한, 본원에 기술된 바와 같은 항-CD3/항-CD28 항체 및 시토킨의 존재 하에 활성화될 수 있다. MIL이 저산소 환경에서 인큐베이션되기 전 또는 후에, 키메라 막관통 단백질을 엔코딩하는 핵산 분자, 예를 들어, 본원에 기술된 것들 중 하나가 세포에 트랜스펙션되거나 감염될 수 있다.

[0044] 저산소 환경은 약 21% 미만의 산소, 예를 들어, 약 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4% 미만, 또는 약 3% 미만의 산소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 저산소 환경은 약 0% 산소 내지 약 20% 산소, 예를 들어, 약 0% 산소 내지 약 19% 산소, 약 0% 산소 내지 약 18% 산소, 약 0% 산소 내지 약 17% 산소, 약 0% 산소 내지 약 16% 산소, 약 0% 산소 내지 약 15% 산소, 약 0% 산소 내지 약 14% 산소, 약 0% 산소 내지 약 13% 산소, 약 0% 산소 내지 약 12% 산소, 약 0% 산소 내지 약 11% 산소, 약 0% 산소 내지 약 10% 산소, 약 0% 산소 내지 약 9% 산소, 약 0% 산소 내지 약 8% 산소, 약 0% 산소 내지 약 7% 산소, 약 0% 산소 내지 약 6% 산소, 약 0% 산소 내지 약 5% 산소, 약 0% 산소 내지 약 4% 산소, 또는 약 0% 산소 내지 약 3% 산소를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 저산소 환경은 약 1% 내지 약 7% 산소를 포함한다. 일부 구체예에서, 저산소 환경은 약 1% 내지 약 2% 산소이다. 일부 구체예에서, 저산소 환경은 약 0.5% 내지 약 1.5% 산소이다. 일부 구체예에서, 저산소 환경은 약 0.5% 내지 약 2% 산소이다. 저산소 환경은 약 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 약 0% 산소를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 저산소 환경은 약 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 산소를 포함한다.

[0045] 저산소 환경에서 MIL의 인큐베이션은 예를 들어, 조직 배양 배지에서, 적어도 약 1시간, 예를 들어, 적어도 약 12시간, 18시간, 24시간, 30시간, 36시간, 42시간, 48시간, 60시간, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 또는 심지어 적어도 약 14일 동안, MIL을 인큐베이션하는 것을 포함할 수 있다. 인큐베이션하는 것은 MIL을, 약 1시간 내지 약 30일, 예를 들어, 약 1일 내지 약 20일, 약 1일 내지 약 14일, 또는 약 1일 내지 약 12일 동안 인큐베이션하는 것을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 저산소 환경에서 MIL을 인큐베이션하는 것은 MIL을 저산소 환경에서, 약 2일 내지 약 5일 동안 인큐베이션하는 것을 포함한다. 본 방법은 MIL을 저산소 환경에서 약 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 또는 14일 동안 인큐베이션하는 것을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 본 방법은 MIL을 저산소 환경에서 약 3일 동안 인큐베이션하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 본 방법은 MIL을 저산소 환경에서 약 2일 내지 약 4일 동안 인큐베이션하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 본 방법은 MIL을 저산소 환경에서 약 3일 내지 약 4일 동안 인

큐베이션하는 것을 포함한다.

- [0046] 일부 구체예에서, 본 방법은 예를 들어, MIL을 저산소 환경에서 인큐베이션한 후에, MIL을 정상 산소 환경에서 인큐베이션하는 것을 추가로 포함한다.
- [0047] 정상 산소 환경은 적어도 약 21% 산소를 포함할 수 있다. 정상 산소 환경은 약 5% 산소 내지 약 30% 산소, 예를 들어, 약 10% 산소 내지 약 30% 산소, 약 15% 산소 내지 약 25% 산소, 약 18% 산소 내지 약 24% 산소, 약 19% 산소 내지 약 23% 산소, 또는 약 20% 산소 내지 약 22% 산소를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 정상 산소 환경은 약 21% 산소를 포함한다.
- [0048] 정상 산소 환경에서 MIL을 인큐베이션하는 것은 MIL을, 예를 들어, 조직 배양 배지에서, 적어도 약 1시간, 예를 들어, 적어도 약 12시간, 18시간, 24시간, 30시간, 36시간, 42시간, 48시간, 60시간, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 또는 심지어 적어도 약 14일 동안 인큐베이션하는 것을 포함할 수 있다. 인큐베이션하는 것은 MIL을 약 1시간 내지 약 30일, 예를 들어, 약 1일 내지 약 20일, 약 1일 내지 약 14일, 약 1일 내지 약 12일, 또는 약 2일 내지 약 12일 동안 인큐베이션하는 것을 포함할 수 있다.
- [0049] 일부 구체예에서, 세포는, 정상 산소 환경에 배치된 후에 또는 정상 산소 환경에 배치되기 전에, 본원에 기술된 키메라 막관통 단백질을 엔코딩하는 핵산 분자로 트랜스펙션되거나 감염된다.
- [0050] 일부 구체예에서, MIL은 피검체로부터 골수 샘플을 추출하고, 본원에 기술된 바와 같이 세포를 배양/인큐베이션함으로써 얻어진다. 일부 구체예에서, 골수 샘플은 적혈구를 제거하기 위해 원심분리된다. 일부 구체예에서, 골수 샘플은 분리반출법(apheresis)으로 처리되지 않는다. 일부 구체예에서, 골수 샘플은 말초 혈액 림프구("PBL")를 포함하지 않거나, 골수 샘플에는 PBL이 실질적으로 존재하지 않는다. 이러한 방법은 TIL로서 알려지게 된 것과 동일하지 않은 세포를 선택한다. 이에 따라, MIL은 TIL이 아니다. TIL은 당업자에게 공지된 방법에 의해 선택될 수 있고, TIL이 본원에 기술된 키메라 막관통 단백질을 발현시킬 수 있도록 본원에 기술된 핵산 분자로 트랜스펙션되거나 감염될 수 있다.
- [0051] 일부 구체예에서, 세포는 또한, CD3 및 CD28에 대한 항체와 함께 배양함으로써 활성화된다. 이는 예를 들어, 세포를, 상업적으로 입수 가능하거나 당업자에 의해 제조될 수 있는 항-CD3/항-CD28 비드와 함께 인큐베이션함으로써 수행될 수 있다. 이후에, 세포는 플레이트, 플라스크, 또는 백에 플레이팅될 수 있다. 저산소 조건은 저산소 챔버 또는 세포 배양 백을 3분 동안 95% 질소 및 5% CO₂ 기체 혼합물로 플러싱(flushing)함으로써 달성될 수 있다. 이는 예를 들어, 용기에 1 내지 2% 이하의 O₂ 기체를 야기시킬 수 있다. 이후에, 세포는 본원에 기술된 바와 같이, 또는 W02016037054호의 예에서와 같이 배양될 수 있으며, 이러한 문헌은 본원에 참고로 포함된다.
- [0052] 일부 구체예에서, 본원에 기술된 바와 같은 키메라 막관통 단백질을 포함하는 저산소성 MIL이 제공된다. 일부 구체예에서, 저산소성 MIL은 약 0.5% 내지 약 5% 산소 기체의 환경에 존재한다. 일부 구체예에서, 저산소성 MIL은 약 1% 내지 약 2% 산소 기체의 환경에 존재한다. 일부 구체예에서, 저산소성 MIL은 약 1% 내지 약 3% 산소 기체의 환경에 존재한다. 일부 구체예에서, 저산소성 MIL은 약 1% 내지 약 4% 산소 기체의 환경에 존재한다. 저산소성 MIL은 저산소 환경, 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 저산소 환경에서, 소정 시간 동안, 예를 들어, 본원에 기술된 시간 동안 인큐베이션된 MIL이다. 임의의 특정 이론으로 제한하고자 하는 것은 아니지만, 저산소성 MIL은 MIL의 항-종양 능력에 영향을 미치는 단백질 및/또는 유전자 발현의 변화를 겪을 것이다. 본원에 기술된 바와 같이, 저산소성 MIL은 또한, 항-CD3/항-CD28 비드 또는 다른 유사한 활성 시약의 존재와 함께 활성화될 수 있다. 이에 따라, 저산소성 MIL은 또한, 활성화된-저산소성 MIL일 수 있다.
- [0053] 일부 양태에서, 본 구체예는 피검체에 본원에 기술된 바와 같은 재조합 세포를 투여하는 것을 포함하는, 피검체에서 면역 반응을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 일부 구체예에서, 본 구체예는 피검체에 본원에 기술된 바와 같은 재조합 세포를 투여하는 것을 포함하는, 피검체에서 신생물을 치료하는 방법에 관한 것이다. 신생물은 양성 신생물, 악성 신생물, 또는 2차 신생물일 수 있다. 신생물은 암일 수 있다. 신생물은 림프종 또는 백혈병, 예를 들어, 만성 림프성 백혈병("CLL") 또는 급성 림프모구 백혈병("ALL")일 수 있다. 신생물은 다발성 골수종, 뿐만 아니라, 임의의 고형 종양(예를 들어, 유방암, 전립선암, 폐암, 식도암, 뇌암, 신장암, 방광암, 췌장암, 골육종, 등)일 수 있다.
- [0054] 본 방법은 피검체에 복수의 본원에 기술된 바와 같은 재조합 세포를 투여하는 것을 포함할 수 있다. 본 방법은 피검체에 유효량의 본원에 기술된 바와 같은 재조합 세포를 투여하는 것을 포함할 수 있다.
- [0055] 일부 구체예에서, 세포는 피검체로부터 얻어진다. 트랜스펙션되거나 감염된 세포는 피검체로부터 얻어질 수 있

다. 세포는 본원에 기술된 바와 같이 얻어질 수 있다. 예를 들어, 투여되는 세포는 피검체에 대해 자가유래될 수 있다. 일부 구체예에서, 투여되는 세포는 피검체에 대해 동종 이계(allogeneic)이다. 세포는 피검체로부터 얻어질 수 있고, 본원에 기술된 바와 같은 키메라 막관통 단백질을 엔코딩하는 핵산으로 트랜스펙션되거나 감염될 수 있다. 세포는 딸 세포일 수 있으며, 여기서, 딸 세포의 부모는 피검체로부터 얻어졌다. 재조합 세포는 핵산으로 트랜스펙션되거나 감염된 것일 수 있거나, 재조합 세포의 부모는 핵산으로 트랜스펙션되거나 감염된 것일 수 있다. 일부 구체예에서, 트랜스펙션되거나 감염된 후 세포는 본원에 기술된 아미노 서열들 중 하나 이상을 포함하는 단백질을 발현시킨다.

[0056] 본 방법은 재조합 세포를 제조하는 것을 추가로 포함할 수 있으며, 여기서, 재조합 세포를 제조하는 것은 세포를 본원에 기술된 것과 같은, 키메라 막관통 단백질을 엔코딩하는 핵산으로 트랜스펙션시키거나 감염시키는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 키메라 막관통 단백질은 SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 11 중 임의의 하나에 기술된 아미노산 서열 또는 이의 변형체를 포함한다. 유사하게, 본 방법은 복수의 재조합 세포를 제조하는 것을 추가로 포함할 수 있으며, 여기서, 복수의 재조합 세포를 제조하는 것은 복수의 세포를, 본원에 기술된 것과 같은, 키메라 막관통 단백질을 엔코딩하는 핵산으로 트랜스펙션시키거나 감염시키는 것을 포함한다. 본 방법은 부모 세포를 확장시키는 것을 추가로 포함할 수 있으며, 예를 들어, 재조합 세포는 부모 세포의 딸 세포일 수 있다. 본 방법은 세포의 집단을 확장시키는 것을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 본 방법은 피검체에 복수의 본원에 기술된 바와 같은 재조합 세포를 투여하는 것을 포함할 수 있으며, 복수의 재조합 세포들 중 각 세포는 부모 세포의 딸 세포일 수 있다.

[0057] 본 방법은 피검체로부터 세포 또는 부모 세포를 분리시키는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0058] 본 방법은 예를 들어, 형광 활성화 세포 분류("FACS"; fluorescence activated cell sorting) 또는 자기 활성화된 세포 분류("MACS"; magnetic activated cell sorting)에 의해 세포를 분류하는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0059] 세포는 예를 들어, 약제학적으로 허용되는 조성물 중에서 임의의 적합한 경로에 의해 피검체에 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 조성물은 발열원 부재이다. 예를 들어, 세포의 투여는 당해 분야에 공지된 임의의 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 투여는 비경구, 정맥내, 동맥내, 피하, 근육내, 두개내, 안와내, 안구, 심실내, 피막내, 척수내, 수조내, 복강내, 뇌실내, 또는 척추강내일 수 있다. 비경구 투여를 위하여, 세포는 약제학적으로 허용되는 비히클 또는 담체를 갖는 조성물 중에서 정맥내, 피하, 또는 근육내 주사에 의해 투여될 수 있다. 세포는 주사에 의한, 예를 들어, 식피 주사(bolus injection) 또는 연속 주입에 의한, 비경구 투여를 위해 제형화될 수 있다. 조성물은 좌제, 용액, 또는 오일 또는 수성 비히클 중 에멀전과 같은 형태를 취할 수 있고, 제형화제(formulatory agent), 예를 들어, 현탁화제, 안정화제, 및/또는 분산제를 함유할 수 있다.

[0060] 주사에 의한 투여를 위하여, 완충제 또는 보존제와 같은 다른 용질, 뿐만 아니라 충분한 양의, 약제학적으로 허용되는 염, 또는 용액을 등장성으로 만들기 위한 글루코오스를 또한 함유할 수 있는 멸균 수성 비히클 중의 용액 중에 세포를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 일부 구체예에서, 약제 조성물은 주사 가능한 투여를 위한 멸균 용액 또는 현탁액을 제공하기 위해 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 제형화될 수 있다. 특히, 주사제는 액체 용액 또는 현탁액으로서 또는 에멀전으로서, 통상적인 형태로 제조될 수 있다. 적합한 부형제는 예를 들어, 물, 염수, 텍스트로오스, 만니톨, 락토오스, 레시틴, 알부민, 소듐 글루타메이트, 시스테인 하이드로클로라이드, 등이다. 또한, 요망되는 경우에, 주사 가능한 약제 조성물은 최소량의 비독성 보조 물질, 예를 들어, 습윤제, pH 완충제, 등을 함유할 수 있다. 적합한 약제학적 담체는 문헌["Remington's pharmaceutical Sciences" by E. W. Martin]에 기술되어 있다.

[0061] 피검체는 면역 세포를 포함하는 임의의 유기체일 수 있다. 예를 들어, 피검체는 설치류, 개과, 고양이과, 돼지, 양, 소, 말 및 영장류로부터 선택될 수 있다. 피검체는 마우스 또는 인간일 수 있다.

[0062] 피검체는 신생물을 가질 수 있다. 신생물은 양성 신생물, 악성 신생물, 또는 2차 신생물일 수 있다. 신생물은 암일 수 있다. 신생물은 림프종 또는 백혈병, 예를 들어, 만성 림프성 백혈병("CLL") 또는 급성 림프모구 백혈병("ALL")일 수 있다. 피검체는 아교모세포종, 수아세포종, 유방암, 두경부암, 신장암, 난소암, 카포시 육종, 급성 골수성 백혈병, 및 B-계통 악성 종양을 가질 수 있다. 피검체는 다발성 골수종을 가질 수 있다.

[0063] 일부 구체예에서, 피검체는 "이를 필요로 하는(in need thereof)" 피검체이다. 본원에서 사용되는 구 "이를 필요로 하는"은 피검체가 특정 방법 또는 치료를 필요로 하는 것으로 확인되거나 의심된다는 것을 의미한다. 일부 구체예에서, 확인은 임의의 진단 수단에 의한 것일 수 있다. 본원에 기술된 임의의 방법 및 치료에서, 피검체는

이를 필요로 할 수 있다.

[0064] 본원에서 사용되는 단수 용어("a," "an," 및 "the")와 같은 용어는 문맥상 달리 명확하게 요구되지 않는 한, 단수 및 복수 지시대상을 포함한다.

[0065] 이러한 문헌에서 사용되는 바와 같이, 본원에서 사용되는 용어 "포함하다(comprise, include)," "가지다(have, has)" 및 이의 활용어(conjugate)는 "~를 포함하지만, 이로 제한되지 않는(including but not limited to)"을 의미한다. 다양한 조성물, 및 방법이 다양한 성분 또는 단계를 "포함하는"("포함하지만, 이로 제한되지 않는" 것을 의미하는 것으로 해석됨)과 관련하여 기술되지만, 조성물, 방법, 및 디바이스는 또한, 다양한 구성요소 및 단계로 "본질적으로 포함하거나(consist essentially of)" "로 이루어질(consist of)" 수 있으며, 이러한 용어(terminology)는 본질적으로 닫힌-멤버 그룹(closed-member group)을 정의하는 것으로 해석되어야 한다.

[0066] 본원에서 사용되는 용어 "치료하다," "치료된," 또는 "치료하는"은 목적이 요망되지 않는 생리학적 상태, 질병 또는 질환을 늦추기(완화시키기) 위한 것인 치료학적 처리, 또는 유익한 또는 요망되는 임상 결과를 얻기 위한 치료학적 처리 모두를 의미한다. 본원에 기술된 구체예의 목적을 위하여, 유익한 또는 요망되는 임상 결과는 증상의 완화; 상태, 질병 또는 질환의 정도의 감소; 상태, 질병 또는 질환의 안정화된(즉, 악화되지 않은) 상태; 상태, 질병 또는 질환의 발병 지연 또는 상태, 질병 또는 질환 진행의 지연; 탐지 가능하거나 탐지 가능하지 않던지 간에, 상태, 질병 또는 질환 상태의 개선(amelioration) 또는 완화(remission)(일부 또는 전체인지의 여부); 환자에 의해 반드시 식별 가능하지는 않는, 적어도 하나의 측정 가능한 신체 파라미터의 개선; 또는 상태, 질병 또는 질환의 증진 또는 개선을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 이에 따라, "암의 치료" 또는 "암을 치료하는"은 암 또는 본원에 기술된 임의의 다른 상태(condition)과 관련된 임의의 1차 현상(primary phenomena) 또는 2차 증상(secondary symptom)을 경감시키거나 완화시키는 활성을 의미한다. 일부 구체예에서, 치료되는 암은 본원에 언급된 암들 중 하나이다.

[0067] 실시예

[0068] 하기 실시예는 본원에 기술된 방법 및 조성물을 예시하지만, 이로 제한되는 것은 아니다. 당업자에게 자명하고 치료법에서 일반적으로 접하게 되는 다양한 조건 및 파라미터의 다른 적합한 변형 및 개조는 본 구체예의 사상 및 범위 내에 속한다.

[0069] 실시예 1: CAR 형질도입 프로토콜

[0070] 형질도입하기 16 내지 24시간 전에, T-세포를 적절한 배지에 플레이팅하고, CD3, CD28 및 IL-2로 자극하였다. 이후에, 세포를 인큐베이터(37°C/5% CO₂)에 밤새 배치하였다. 16 내지 24시간 후에, 세포를 방해하지 않으면서 가능한 한 많은 배지를 제거하였다. 이후에, CAR 바이러스를 세포에 첨가하고, 다시 인큐베이터에 4 내지 12시간 동안 배치하였다. 4 내지 12시간 후에, 적절한 부피의, IL-2를 함유한 배지를 다시 세포에 첨가하고, 이후에, 인큐베이터에 다시 배치시켰다. 세포를 필요한 경우에 분리시키고 배지를 교체하면서, 성장시키기 위해 3 내지 12일 동안 인큐베이터에 방치시켰다. CAR 형질도입은 유세포 분석, 웨스턴 블롯팅(western blotting) 또는 형광 리포터 유전자가 사용된 경우에, 형광 현미경을 포함하지만, 이로 제한되지 않는 다양한 방법에 의해 체크될 수 있다.

[0071] 실시예 2: CAR 트랜스펙션 프로토콜

[0072] 293T 세포를 적어도 3회의 계대배양(passage) 동안 DMEM + 10% FBS에서 2일 마다 계대배양하였으며, 이 때에, 세포는 80% 컨플루언트(confluent)를 초과하지 못하였다. 트랜스펙션 하루 전에, 293T 세포를, 24시간 후(트랜스펙션 당일에) 약 80% 컨플루언트인 밀도로 시딩하였다. 트랜스펙션 당일에, 배지를 제거하고, 충분한 새로운 배지를 첨가하여 세포를 덮었다. 별도의 튜브에서, VSV-G, Gag, Pol & Rev 플라스미드, 트랜스펙션 시약 및 CAR 플라스미드를 합하고, 실온에서 10 내지 20분 동안 인큐베이션하였다. 이후에, 이러한 혼합물을 293T 세포에 첨가하고, 밤새 인큐베이션하였다. 트랜스펙션하고 12 내지 24시간 후에, 배지를 완전히 교체하거나 추가적인 새로운 배지를 첨가하였다. 트랜스펙션 후 48시간 및 72시간 둘 모두에서, 세포로부터의 바이러스-함유 배지를 수거하고, 세포를 새로운 배지로 보충하였다. 수거된 배지 중의 임의의 세포를 원심분리 또는 여과에 의해 제거하였다. 이후에, 수거된 배지를 초원심분리기에서 회전시켜 바이러스를 펠렛화하였다. 과량의 배지를 제거하고, 바이러스를 DMEM 또는 HBSS에 재-현탁하고, 멸균 튜브에 분액하고, 사용할 때까지 -80°C에서 저장하였다.

[0073] 실시예 3: MIL 기능 및 성장은 키메라 수용체 단백질의 존재에 의해 부정적인 영향을 받지 않음.

[0074] 피검체로부터 얻어진 MIL을 본원에 기술된 바와 같이 활성화시키고 확장시켰다. 간단하게, 골수 샘플을 피검체

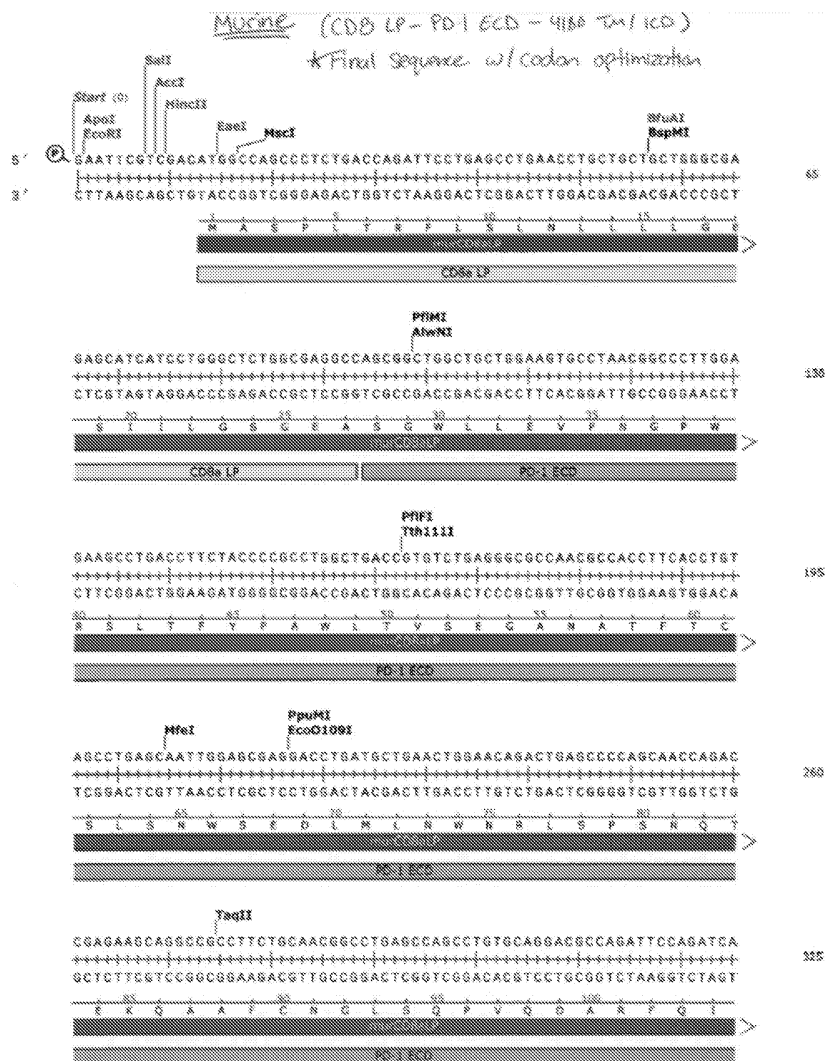
로부터 획득하고, 세포를 W02016037054호(이는 본원에 참고로 포함됨)에 기술된 바와 같이 항-CD3/항-CD28 비드 및 시토키인의 존재 하에서, 저산소 조건 하에 인큐베이션하였다. 이후에, MIL을 SEQ ID NO: 11을 포함하는 키메라 막관통 단백질을 엔코딩하는 핵산 분자를 포함하는 바이러스로 감염시켰다. 이후에, 세포를 정상 산소 조건 하에서 성장시키고, 확장시켰다. 대조군 및 감염된 MIL을 상이한 세포 타입과 접촉시켰다. MIL의 확장 및 항원을 인지하는 MIL의 능력은 키메라 막관통 단백질의 존재에 의해 부정적으로 영향을 받지 않았다. 이러한 결과는, MIL에 키메라 막관통 단백질의 첨가가 이의 기능 및 성장에 유해하지 않음을 나타내는 것이다. 이러한 결과는 도 6, 패널 A 및 패널 B에 예시되어 있으며, 이러한 도면은 두 명의 상이한 환자로부터 얻어진 것이다.

[0075] 요약하면, 본원에 제공된 구체예 및 실시예는 키메라 막관통 단백질을 발현시키는 세포가 암을 치료하고/거나 면역 반응을 조절하는데 효과적으로 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0076] 본 명세서에서 언급되고/거나 출원 데이터 시트(Application Data Sheet)에 나열된, 임의의 미국특허, 미국특허 출원공개, 미국특허출원, 해외 특허, 해외 특허출원 및 CAS 번호를 포함하는 비-특허 간행물은 이의 전문이 본원에 참고로 포함된다.

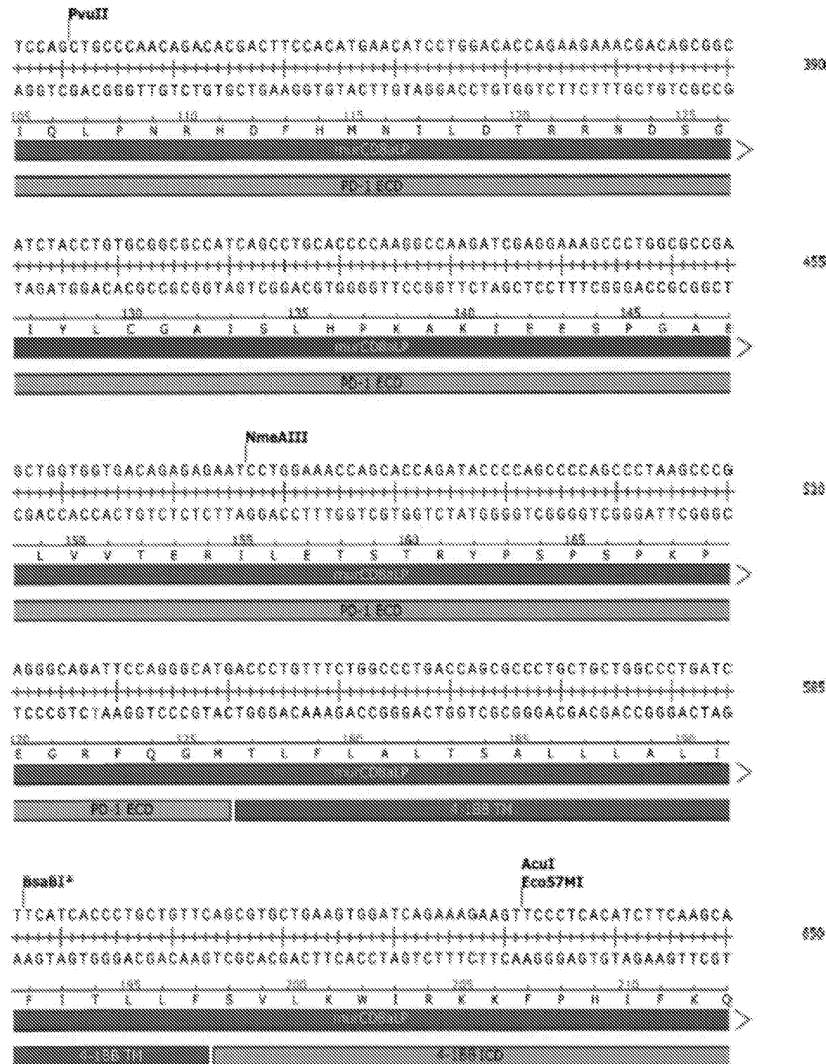
도면

도면1



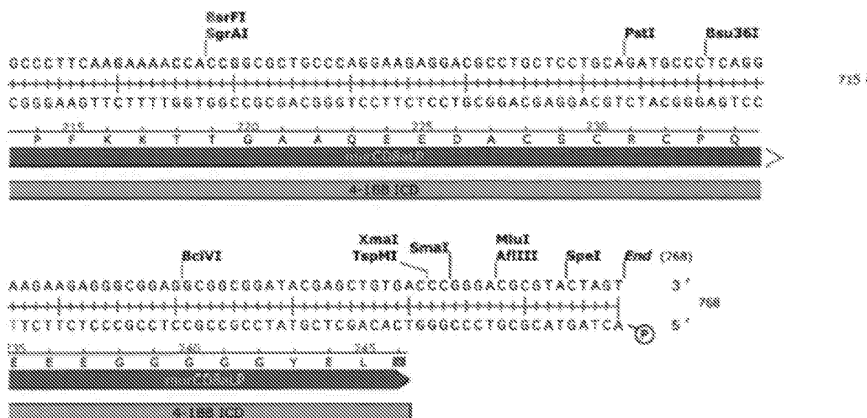
도면1a

도 1(계속)



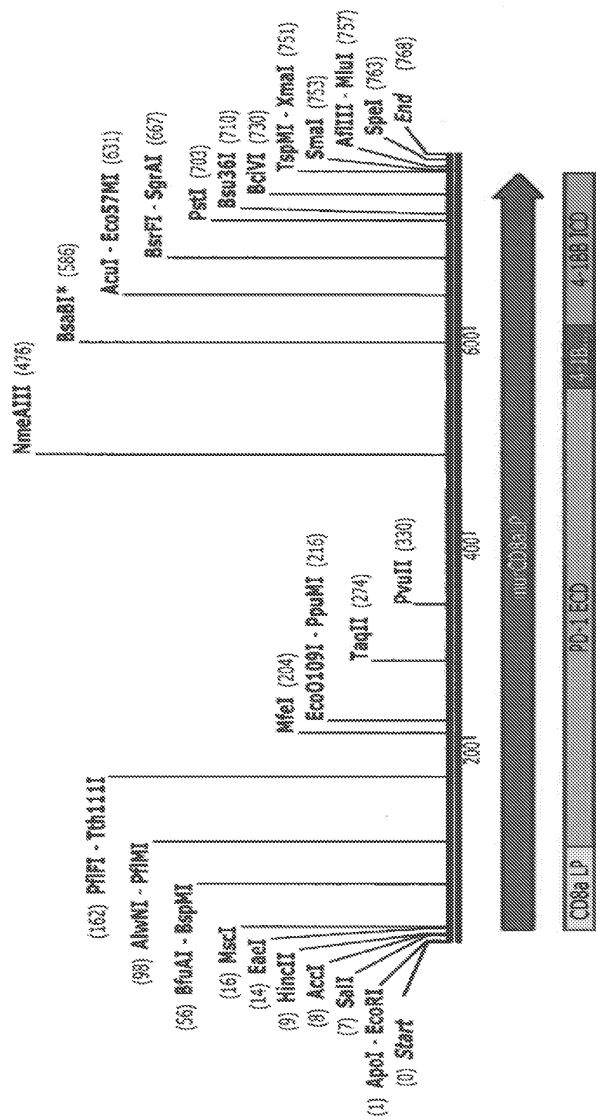
도면1b

도 1(계속)



도면1c

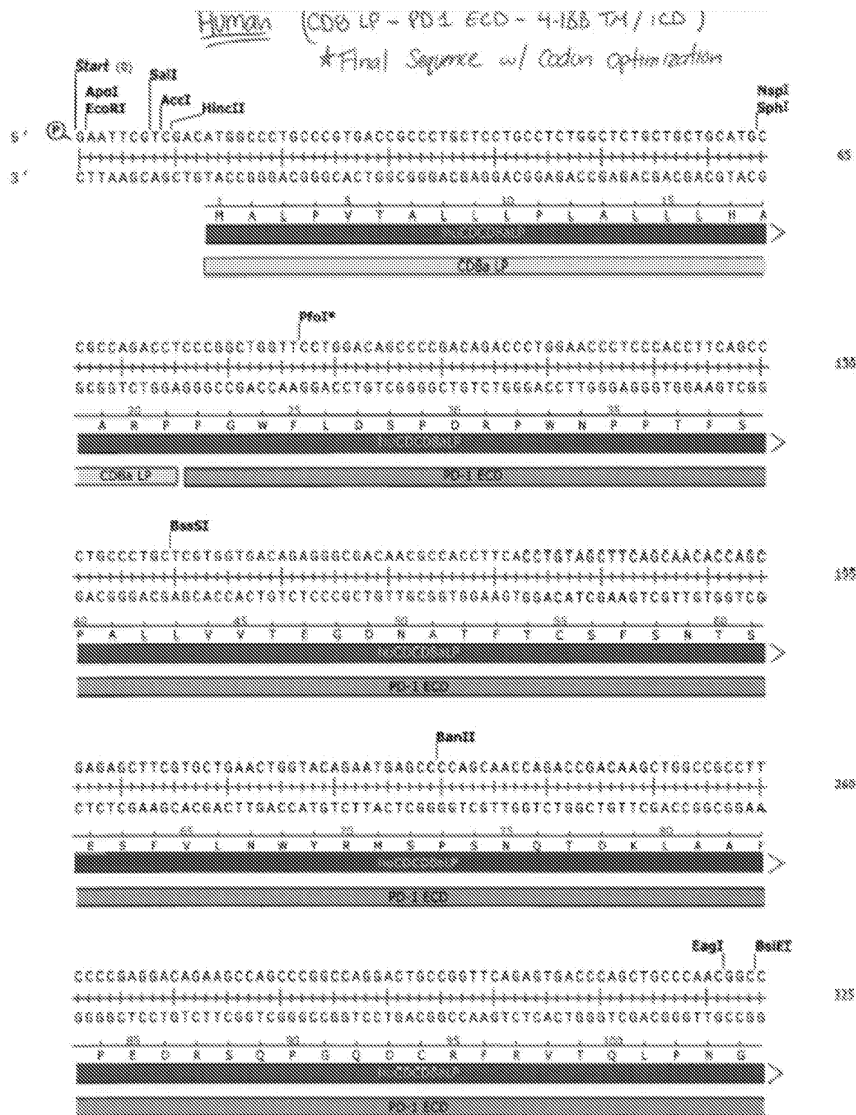
도 1(계속)



15A2GVC_murCD8aLP FINAL 032315

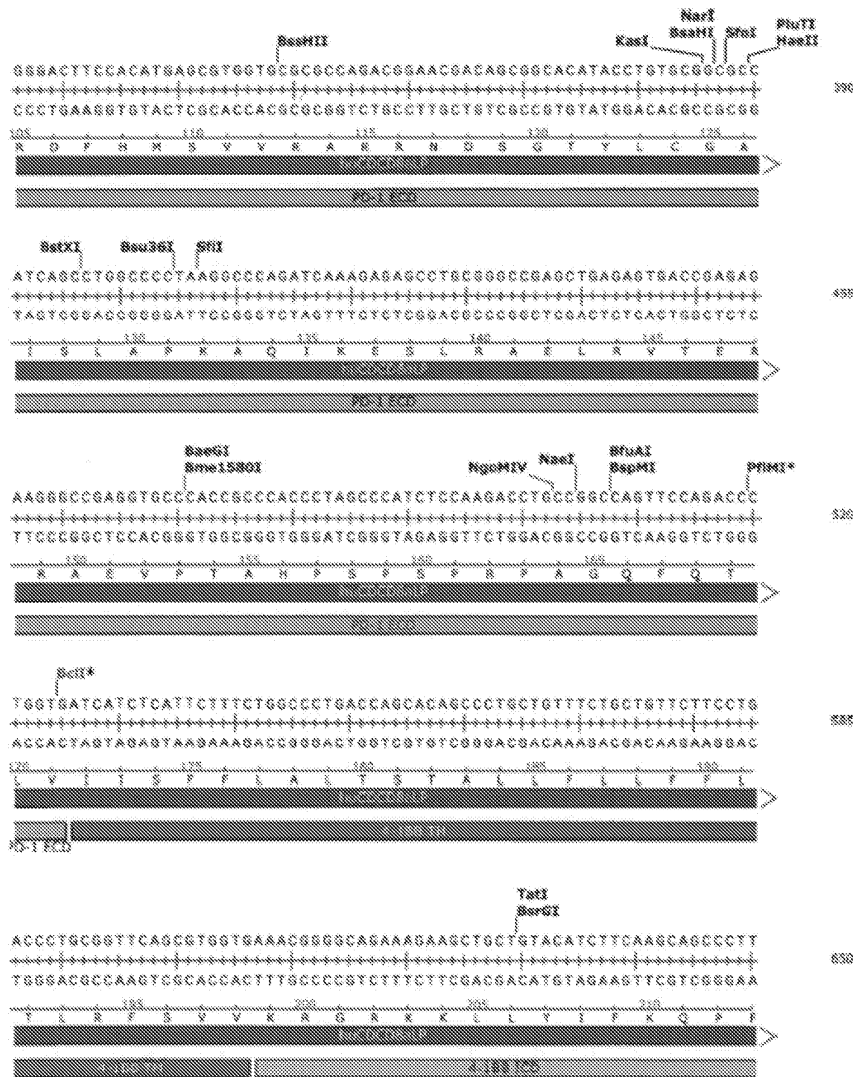
768 bp

도면2



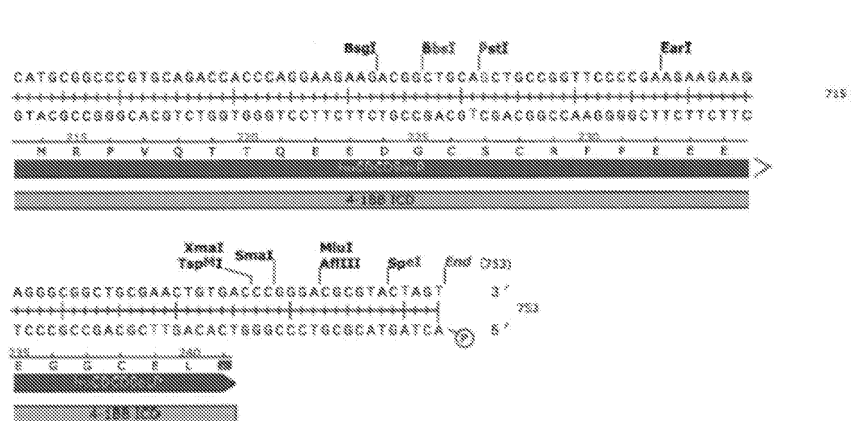
도면2a

도 2(계속)



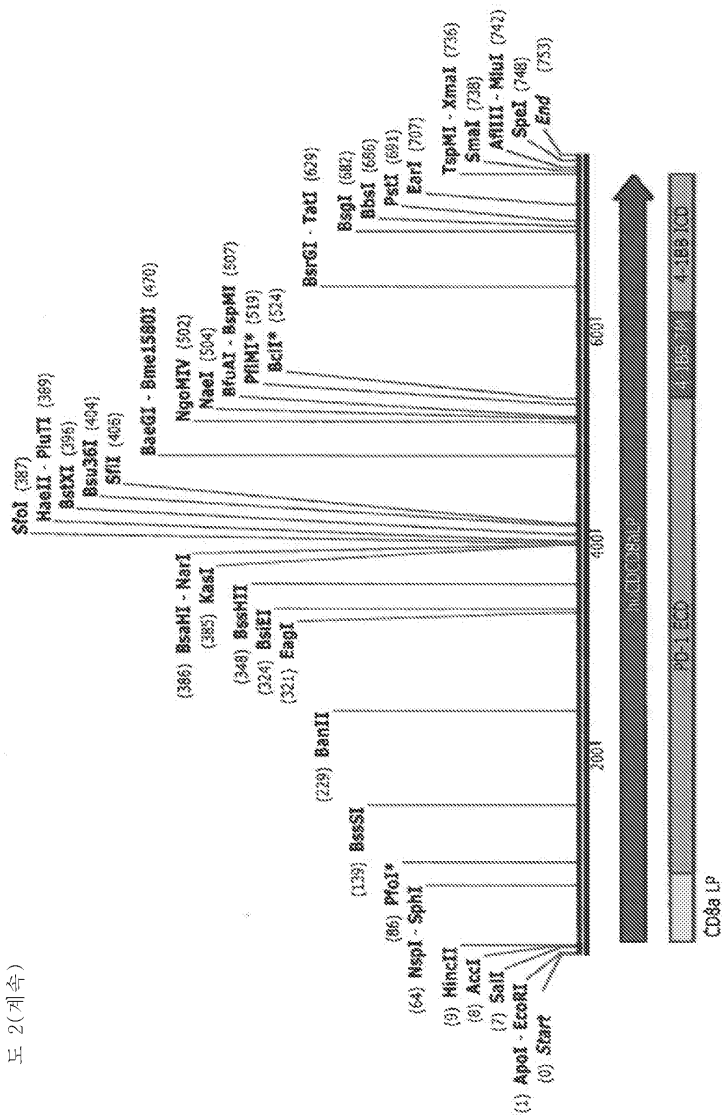
도면2b

도 2(계속)

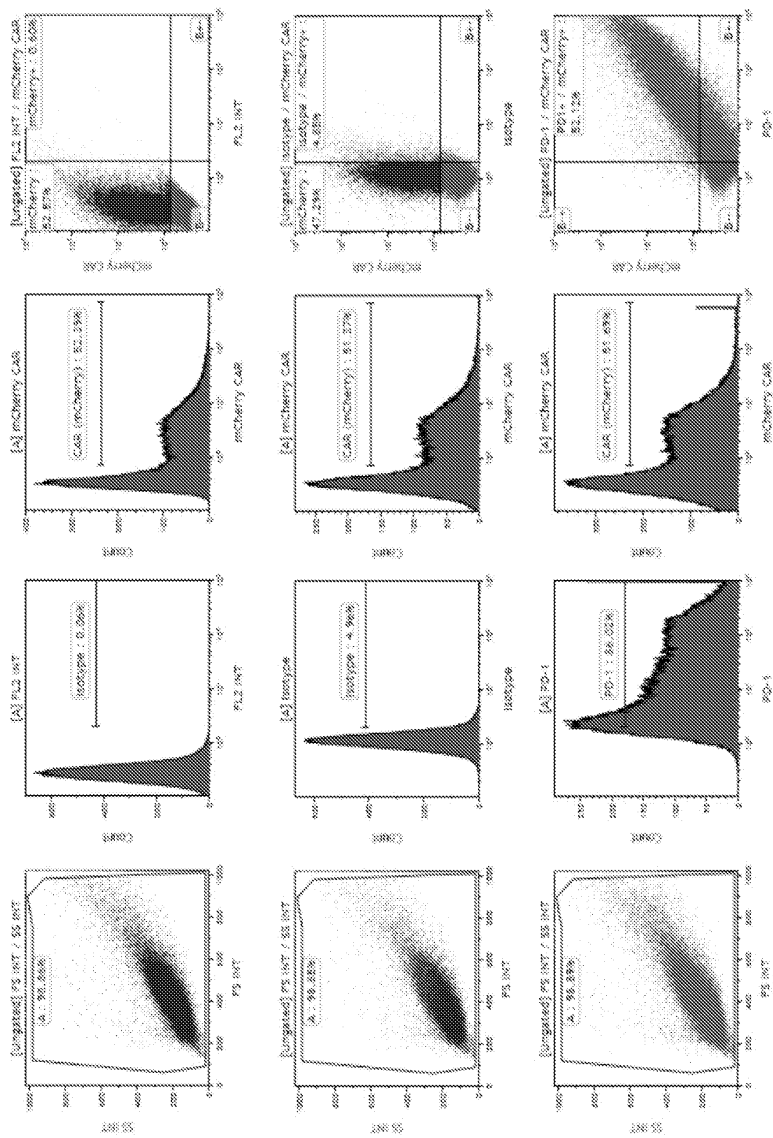


도면2c

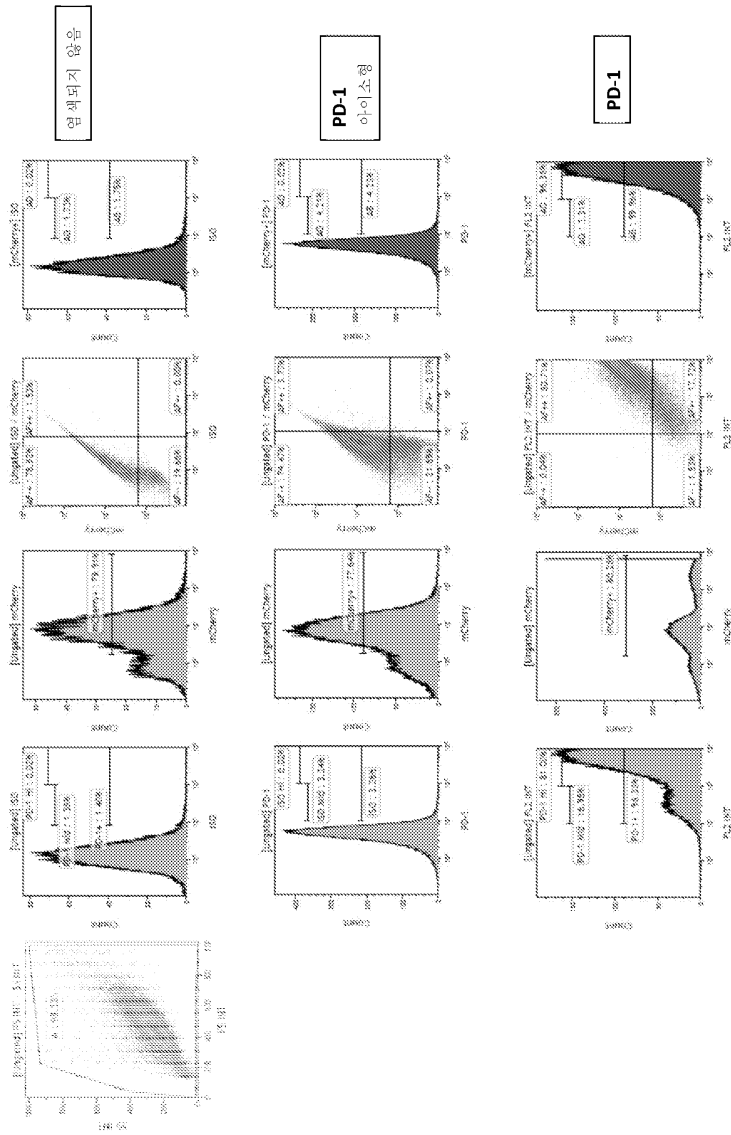
도 2(계속)



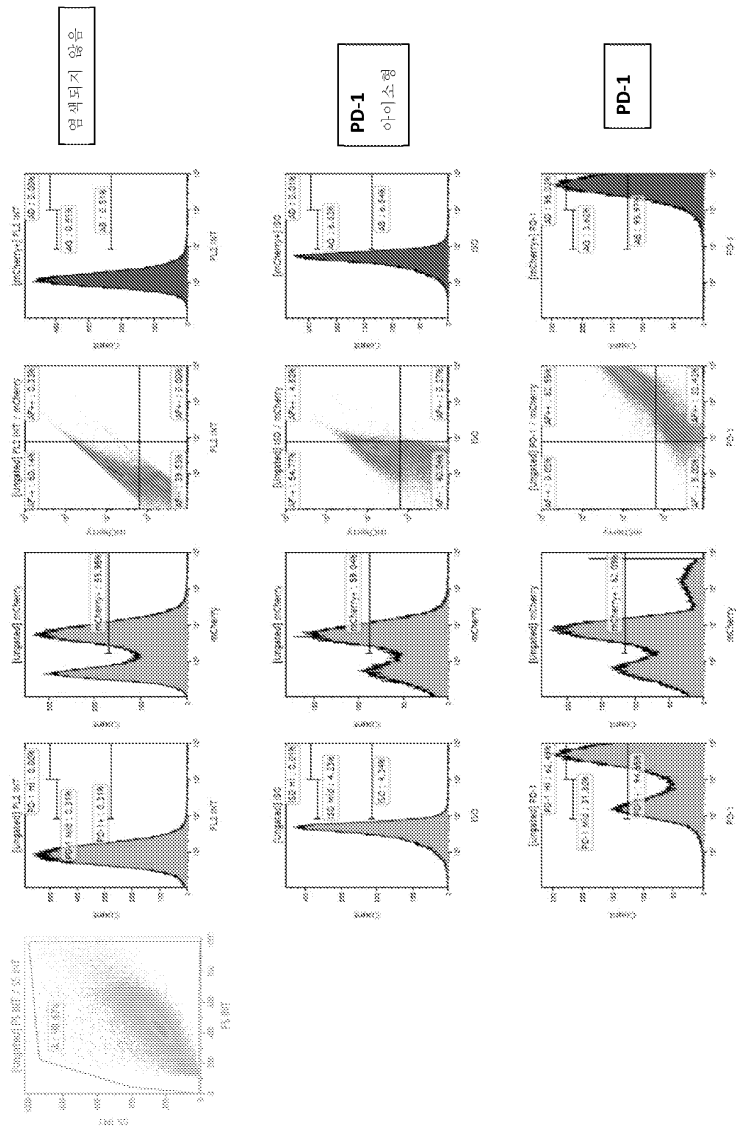
도면3



도면4

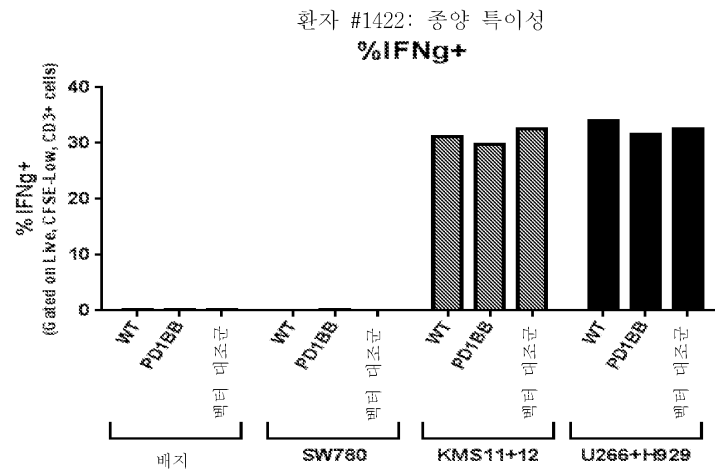


도면5



도면6

A.



B.

