



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년11월22일
(11) 등록번호 10-2733541
(24) 등록일자 2024년11월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0789 (2010.01) A01K 67/027 (2024.01)
A61K 31/405 (2006.01) A61K 38/21 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0647 (2013.01)
A01K 67/027 (2024.01)
(21) 출원번호 10-2019-7034111
(22) 출원일자(국제) 2018년04월20일
심사청구일자 2021년04월20일
(85) 번역문제출일자 2019년11월19일
(65) 공개번호 10-2020-0020677
(43) 공개일자 2020년02월26일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/060238
(87) 국제공개번호 WO 2018/193119
국제공개일자 2018년10월25일
(30) 우선권주장
1706410.6 2017년04월21일 영국(GB)
1801511.5 2018년01월30일 영국(GB)
(56) 선행기술조사문헌
JP2012525141 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
오스페달레 산 라파엘 에스.알.엘.
이탈리아, 밀라노 I-20132, 60, 비아 올게티나
폰다지오네 텔레톤 이티에스
이탈리아 로마 16비-00185 비아 바레세
(72) 발명자
날디니, 루이지
이탈리아 20132 밀라노 비아 올게티나 58 샌 라파
엘레 텔레톤 인스티튜트 포 게네 테라피 (티겟)
에스코바르, 줄리아
이탈리아 20132 밀라노 비아 올게티나 58 샌 라파
엘레 텔레톤 인스티튜트 포 게네 테라피 (티겟)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인(유)남아이피그룹, 특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 37 항

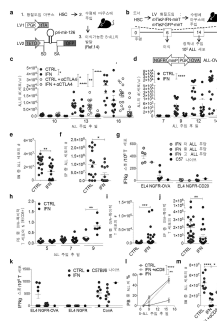
심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 유전자 치료법

(57) 요약

백터를 포함하는 조혈모세포(HSC), 조혈전구세포(HPC), 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구로서, 상기 백터는 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 인터페론-알파(IFN α)를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하며, HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 면역 체크포인트 억제제 및/또는 종양 관련 항원(TAA)-특이적 T-세포와 조합되어 사용된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 31/405 (2013.01)

A61K 38/21 (2013.01)

A61K 39/3955 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61K 48/005 (2013.01)

A61K 48/0083 (2013.01)

C07K 16/2818 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

C12N 2740/16043 (2013.01)

(72) 발명자

젠트너, 베른하르트 루돌프

이탈리아 20132 밀라노 비아 올게티나 58 센 라파
엘레 텔레톤 인스티튜트 포 게네 테라피 (티겟)

무치, 아델

이탈리아 20132 밀라노 비아 올게티나 58 센 라파
엘레 텔레톤 인스티튜트 포 게네 테라피 (티겟)

명세서

청구범위

청구항 1

환자의 암 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 조혈모세포(HSC), 조혈전구세포(HPC), 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구를 포함하고, 상기 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 백터를 포함하고, 상기 백터는 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하고, 상기 약학적 조성물은 종양 관련 항원(TAA)-특이적 T-세포, 면역 체크포인트 억제제 및/또는 1-메틸-트립토판(1-MT)과 조합되어 사용되는, 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 사이토킨은 인터페론(IFN), IL-12 또는 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF)인, 약학적 조성물

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 사이토킨은 IFN α 또는 IFN γ 인, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 약학적 조성물은 면역 체크포인트 억제제 및 TAA-특이적 T 세포와 조합되어 사용되는, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, TAA-특이적 T-세포가 키메라 항원 수용체(CAR) 및/또는 트랜스제닉 T-세포 수용체(TCR)를 발현하는, 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, TAA가 암배아 항원(CEA), 에스트로젠 수용체, 프로게스테론 수용체, 에프린B2, ROR1, 메소텔린, c-Met, GD-2 및 MAGE A3 TCR, 4-1BB, 썸암종 항원, 알파-태아단백질, BAFF, B-림프종 세포, C242 항원, 탄산무수화효소 9(CA-IX), CCR4, CD152, CD200, CD22, CD19, CD22, CD123, CD221, CD23(IgE 수용체), CD28, CD4, CD40, CD44, CD44 v6, CD51, CD52, CD56, CD74, CD80, CS-1, CNT0888, CTLA-4, DR5, EpCAM, CD3, 피브로넥틴 엑스트라 도메인-B, 플레이트 수용체 1, 당단백질 75, GPNMB, HGF, 인간 산란 인자 수용체 키나제, IGF-1 수용체, IGF-I, IgG1, L1-CAM, IL-13, IL-6, 인슐린-유사 성장 인자 I 수용체, 인테그린 $\alpha 5 \beta 1$, 인테그린 $\alpha v \beta 3$, MORAb-009, MS4A1, 뮤신 CanAg, N-글리코실뉴라민산, NPC-1C, PDGF-R α , PDL192, 포스포타이딜세린, 전립선 암종 세포, RANKL, RON, SCH 900105, SDC1, SLAMF7, 테나스신 C, TGF 베타 2, TGF- β , TRAIL-R1, TRAIL-R2, 종양 항원 CTAA16.88, 혈관 내피 성장 인자(VEGF), VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR2, 비멘틴, 5T4, CD5, CD19, CD20, CD21, CD25, CD37, CD30, CD33, CD45, CAMPATH-1(CDw52), HLA-DR, 항-이디오타입, TAG-72, EpCAM, MUC1, 플레이트-결합 단백질, A33, G250, 전립선-특이적 막 항원(PSMA), 전립선 특이적 항원(PSA), 페리틴, 강글리오시드, Le^y, CA-125, CA19-9, 표피 성장 인자 수용체(EGFR), p185HER2, IL-2 수용체, de2-7 EGFR, 섬유모세포 활성화 단백질(FAP), 테나스신, 메탈로프로테이나제, 엔도시알린, 탄산무수화효소, 갈락틴 9, 알돌라제 A, eIF $\gamma 4$, 티로시나제, 갈락틴 4, HERKV-K10, p53, NY-LU-12, 레스틴, NY-CO-38, MAGE-1, MAGE-4a, SSX2, NY-ESO-1, SCP-1, 707-AP, AFP, ART-4, BAGE, b-카테닌/m, Bcr-abl, CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27m, CDK4/m, CT, Cyp-B, DAM-6(MAGE-B2) 및 DAM-10(MAGE-B1), ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gp100, HAGE, HER-2/neu, HLA-A*0201-R170I, HPV-E7, HSP70-2M, HST-2, hTERT(hTRT), iCE, KIAA0205, LAGE, LDLR/FUT, MAGE, MART-1/멜란-A, MC1R, 마이오신/m, MUC1, MUM-1, MUM-2, MUM-3, NA88-A, NY-ESO-1, P15, p190 마이너 bcr-abl, Pml/RAR α , PRAME, RAGE, RU1, RU2, SAGE, SART-1, SART-3, TEL/AML1, TPI/m, TRP-1, 단백질 1, gp75, TRP-2, TRP-2/INT2 및 WT1로 구성된 군으로부터 선택되는, 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, TAA-특이적 T-세포가 환자로부터 분리된 세포로부터 유래되는, 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, TAA-특이적 T-세포가 적어도 하나의 내인성 유전자를 파괴하도록 조작된, 약학적 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 적어도 하나의 내인성 유전자는 TCR α 사슬, TCR β 사슬 및 구조적 적합 복합체(MHC)를 인코딩하는 내인성 유전자로부터 선택되는, 약학적 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 면역 체크포인트 억제제가

(i) 항체이고/이거나;

(ii) A2AR(아데노신 A2A 수용체), B7-H3(CD276), B7-H4(VTCN1), BTLA(B 및 T 림프구 감쇠 인자; CD272), HVEM(헤르페스 바이러스 침투 매개인자), CTLA-4(세포독성 T-림프구-관련 단백질 4; CD152), IDO(인돌아민 2,3-디옥시게나제), TDO(트립토판 2,3-디옥시게나제), KIR(킬러-세포 면역글로불린-유사 수용체), LAG3(림프구 활성화 유전자-3), PD-1(프로그램된 치사 1 수용체), PD-L1(PD-1 리간드 1), PD-L2(PD-1 리간드 2), TIM-3(T-세포 면역글로불린 도메인 및 뮤신 도메인 3), VISTA(T 세포 활성화의 V-도메인 Ig 억제인자), B7-1(CD80), 및 B7-2(CD86)로 구성된 군으로부터 선택되는 억제성 체크포인트 분자를 억제하는, 약학적 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 벡터가 적어도 하나의 mir-130a 표적 서열 및 적어도 하나의 mir-126 표적 서열을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 벡터가 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 조직 특이적 프로모터를 추가로 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 조직 특이적 프로모터는 TEK(Tie2) 프로모터인, 약학적 조성물.

청구항 14

제1항에 있어서, 암이 혈액 악성 종양 또는 고형 종양인, 약학적 조성물.

청구항 15

제1항에 있어서, 암이 간암 또는 아교모세포종인, 약학적 조성물.

청구항 16

환자의 암 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 종양 관련 항원(TAA)-특이적 T-세포를 포함하고, 상기 환자에는 조혈모세포(HSC), 조혈전구세포(HPC), 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 사전 투여되었으며, 상기 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 벡터를 포함하고, 상기 벡터는 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 17

환자의 암 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 면역 체크포인트 억제제를 포함하고, 상기 환자에는 조혈모세포(HSC), 조혈전구세포(HPC), 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 사전 투여되었으며, 상기 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 벡터를 포함하고, 상기

백터는 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 18

환자의 암 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 1-메틸-트립토판(1-MT)을 포함하고, 상기 환자에는 조혈모세포(HSC), 조혈전구세포(HPC), 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 사전 투여되었으며, 상기 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 백터를 포함하고, 상기 백터는 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 19

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 사이토킨은 인터페론(IFN), IL-12 또는 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF)인, 약학적 조성물.

청구항 20

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 사이토킨은 IFN α 또는 IFN γ 인, 약학적 조성물.

청구항 21

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 백터는 적어도 하나의 mir-130a 표적 서열 및 적어도 하나의 mir-126 표적 서열을 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 22

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 백터가 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 조직 특이적 프로모터를 추가로 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 조직 특이적 프로모터는 TEK(Tie2) 프로모터인, 약학적 조성물.

청구항 24

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 혈액 악성 종양 또는 고형 종양인, 약학적 조성물.

청구항 25

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 간암 또는 아교모세포종인, 약학적 조성물.

청구항 26

환자의 암 치료 또는 예방을 위한 면역 체크포인트 억제제와 종양 관련 항원(TAA)-특이적 T-세포의 조합물로서, 상기 환자에는 백터를 포함하는 조혈모세포(HSC) 또는 조혈전구세포(HPC)가 사전 투여되었으며, 상기 백터는 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는, 조합물.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 사이토킨은 인터페론(IFN), IL-12 또는 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF)인, 조합물.

청구항 28

제26항에 있어서, 상기 사이토킨은 IFN α 또는 IFN γ 인, 조합물.

청구항 29

제26항에 있어서, 상기 백터는 적어도 하나의 mir-130a 표적 서열 및 적어도 하나의 mir-126 표적 서열을 포함

하는, 조합물.

청구항 30

제26항에 있어서, 상기 벡터가 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 조직 특이적 프로모터를 추가로 포함하는, 조합물.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 조직 특이적 프로모터는 TEK(Tie2) 프로모터인, 조합물.

청구항 32

제26항에 있어서, 암이 혈액 악성 종양 또는 고형 종양인, 조합물.

청구항 33

제26항에 있어서, 암이 간암 또는 아교모세포종인, 조합물.

청구항 34

(a) 조혈모세포(HSC), 조혈전구세포(HPC), 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구로서, 상기 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 벡터를 포함하고, 상기 벡터는 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는, HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구; 및

(b) 종양 관련 항원(TAA)-특이적 T-세포, 면역 체크포인트 억제제 및/또는 1-메틸-트립토판(1-MT)을 포함하는, 생성물.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 사이토킨은 인터페론(IFN), IL-12 또는 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF)인, 생성물.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 사이토킨은 IFN α 또는 IFN γ 인, 생성물.

청구항 37

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 사이토킨은 인터페론(IFN)이고, 상기 TAA-특이적 T-세포는 CAR를 발현하고, 상기 TAA는 B7-H3인, 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 임의적으로, 암을 치료하거나 예방하기 위한 면역 체크포인트 억제제, 종양 관련 항원(TAA)-특이적 T-세포 및/또는 1-메틸-트립토판(1-MT)과 조합된 사이토킨 유전자 치료법, 특히, 인터페론(예를 들어, 인터페론-알파 또는 -감마) 유전자 치료법의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 면역요법은 오래 지속되는 차도를 유도하는 이의 잠재력으로 인해 항암 치료법으로서 새로운 관심을 얻고 있다. 면역 반응을 피하기 위해 암 세포에 의해 공동-선택된 메카니즘에 대한 이해 증가는 면역 체크포인트를 표적으로 하는 신규한 치료법의 개발로 이어졌으며, 이에 의해 면역 시스템의 위력이 발휘되었다¹. 이러한 약물의 임상 실험은 전이성 흑색종과 같은 종래에 항상 치명적이라고 여겨졌던 종양에서 전례없는 비율의 지속가능한 반응에 이르렀다^{2,3}. 그러나, 이러한 진보에도 불구하고, 고전적 음성 체크포인트 CTLA4 또는 PD1/PDL14의 차단에 대한 내성을 부여하는, 면역억제 종양 미세환경의 존재 또는 종양-특이적 T 세포의 생성 실패로 인해 상당

부분의 환자는 이러한 치료법에 반응하지 않는다.

[0003] 따라서, 현재의 노력은 면역치료법의 이점이 더 많은 종양 환자에게까지 확대될 수 있는, 새로운 면역 체크포인트 표적 및 조합 치료법을 발견하는 것을 목표로 하고 있다. 이와 관련하여, 항암제로서 인터페론(IFN)과 같은 사이토킨의 용도에 대한 관심이 새롭게 대두되고 있다⁵. 종양 세포 및 혈관에 대한 세포증식억제 및 항-혈관신생 효과 이외에, IFN, 특히, 타입 I 인터페론은 수지상 세포(DC)의 성숙 및 교차-감작, T 세포의 증식 및 세포독성, 자연 킬러(NK) 세포의 처사 능력, 및 B 세포의 면역글로불린 클래스 스위치를 증가시킨다^{6,7}. 본 발명자들은 이식된, 유전자 조작된 조혈모세포(HSC)의 종양 침윤 단핵구/대식세포 자손에서 인터페론-알파(IFN α) 트랜스진을 선택적으로 발현시키는 세포 및 유전자 치료 전략이 항-종양 반응을 증대시킬 수 있다는 개념 검증을 이전에 보고하였다. 이러한 종양-표적화된 IFN α 전달 전략은 마우스에서 전신 독성을 보이지 않았으며, 유방 및 결장직장 암 세포의 폐 및 간 전이뿐만 아니라 자연적 유방 종양의 성장을 각각 억제하였다⁸⁻¹⁰.

[0004] 또 다른 면역요법 접근법은 종양-관련 항원(TAA)에 대해 지시된 트랜스제닉 T 세포 수용체(TCR) 또는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 유전자 조작된 T 세포의 입양 전달이다^{11,12}. 이러한 접근법은 TAA에 대한 내인성 T 세포 반응을 유도하지 못하는 낮은 돌연변이 부담을 갖는 악성 종양에 특히 적합하다. CD19 항원을 인식하는 CAR T 세포는 재발성 및 난치성 B 세포 악성 종양에서 주목할만한 효능을 입증하였다. 그러나, 이러한 연구는 또한, 골수(BM) 질환 또는 백혈병에 관한 결절 질환에서 치료학적 효과가 덜 명백하였으며, 이는 면역억제성 미세환경이 특히, 고형 종양 덩어리에서 성공적인 면역요법에 대한 주요 장애를 나타낸다는 것을 시사한다. 더욱이, B 세포 급성 림프모구 백혈병(B-ALL)과 같은 빠르게 성장하는 종양에서, 항원 손실은 CD19 CAR T 세포로 처리된 환자의 20% 이하에서 발생하며, 이는 단일 항원에 대해 유도된 면역요법의 예시를 보여준다^{11,13}. 그러나, 동종이형 이식 설정 이외에 백혈병이 TAA-특이적 T 세포 반응을 유도하는지의 여부 및 이러한 반응이 치료학적 목적으로 강화될 수 있는지의 여부에 대해 이용가능한 데이터는 거의 존재하지 않는다.

[0005] 개선된 암 치료법에 대한 요구가 여전히 남아있다. 본 발명은 유전자 치료법에 의해 전달된 사이토킨, 예컨대, IFN α 가 다른 면역치료학적 전략과 조합되어 사용되는 경우 향상된 효능이 달성될 수 있음을 확립함으로써 이러한 요구를 달성한다.

발명의 내용

[0006] 발명의 개요

[0007] 본 발명자들은 유전자 치료법에 의해 전달된 사이토킨 예컨대, 인터페론이 항-종양 반응의 유도, 강화 및 유지를 증대시킬 수 있으며, 다른 면역요법 전략, 특히, 면역 체크포인트 억제제로의 치료 및 종양 관련 항원(TAA)-특이적 T-세포로의 치료로 상승작용할 수 있음을 놀랍게도 발견하였다.

[0008] 본 발명의 일 양태에 따르면, 벡터를 포함하는 조혈모세포(HSC), 조혈전구세포(HPC), 골수/단핵구-수입전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 제공되며, 여기에서, 벡터는 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하며, HSC, HPC, 골수/단핵구-수입전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 면역 체크포인트 억제제와 조합되어 사용된다.

[0009] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 벡터를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수입전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 제공되며, 여기에서, 벡터는 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하며, HSC, HPC, 골수/단핵구-수입전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 종양 관련 항원(TAA)-특이적 T-세포와 조합되어 사용된다.

[0010] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 벡터를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수입전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 제공되며, 여기에서, 벡터는 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하며, HSC, HPC, 골수/단핵구-수입전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 면역 체크포인트 억제제 및 TAA-특이적 T-세포와 조합되어 사용된다.

[0011] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 벡터를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수입전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 제공되며, 여기에서, 벡터는 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하며, HSC, HPC, 골수/단핵구-수입전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 종양 관련 항원(TAA)-특이적 T-세포와 조합되어 사용된다.

티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하며, HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 1-메틸-트립토판(1-MT)과 조합되어 사용된다.

- [0012] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 벡터로서, 면역 체크포인트 억제제와 조합되어 사용되는 벡터가 제공된다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 벡터로서, TAA-특이적 T-세포와 조합되어 사용되는 벡터가 제공된다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 벡터로서, 면역 체크포인트 억제제 및 TAA-특이적 T-세포와 조합되어 사용되는 벡터가 제공된다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 벡터로서, 1-메틸-트립토판(1-MT)과 조합되어 사용되는 벡터가 제공된다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 CAR 및/또는 트랜스제닉 TCR을 발현하는 TAA-특이적 T-세포가 제공되며, 여기에서, 환자에는 벡터를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 사전 투여되었으며, 벡터는 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함한다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 TAA-특이적 T-세포가 제공되며, 여기에서, 환자에는 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 벡터가 사전 투여되었다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 면역 체크포인트 억제제가 제공되며, 여기에서, 환자에는 벡터를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 사전 투여되었으며, 벡터는 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함한다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 면역 체크포인트 억제제가 제공되며, 여기에서, 환자에는 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 벡터가 사전 투여되었다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 1-메틸-트립토판(1-MT)이 제공되며, 여기에서, 환자에는 벡터를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 사전 투여되었으며, 벡터는 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함한다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 1-메틸-트립토판(1-MT)이 제공되며, 여기에서, 환자에는 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 벡터가 사전 투여되었다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 면역 체크포인트 억제제와 TAA-특이적 T-세포의 조합물이 제공되며, 여기에서, 환자에는 벡터를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 사전 투여되었으며, 벡터는 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함한다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 TAA-특이적 T-세포와 면역 체크포인트 억제제의 조합물이 제공되며, 여기에서, 환자에는 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 벡터가 사전 투여되었다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 벡터를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구를 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 여기에서, 벡터는 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-

126 표적 서열을 포함하며, HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 면역 체크포인트 억제제 및/또는 TAA-특이적 T-세포와 조합되어 사용되는, 방법이 제공된다.

- [0025] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 벡터를 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 벡터는 면역 체크포인트 억제제 및/또는 TAA-특이적 T-세포와 조합되어 사용되는 방법이 제공된다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 벡터를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 사전 투여된 환자에서 암을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 여기에서 벡터는 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하며, 상기 방법은 TAA-특이적 T-세포를 환자에게 투여하고/거나 면역 체크포인트 억제제를 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 방법이 제공된다.
- [0027] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 벡터가 사전 투여된 환자에서 암을 치료하고/거나 예방하기 위한 방법으로서, 환자에게 TAA-특이적 T-세포를 투여하는 단계 및/또는 환자에게 면역 체크포인트 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, 방법이 제공된다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 벡터를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구를 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 여기에서, 벡터는 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하며, HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 1-메틸-트립토판(1-MT)과 조합되어 사용되는 방법이 제공된다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 벡터를 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 벡터는 1-메틸-트립토판(1-MT)과 조합되어 사용되는, 방법이 제공된다.
- [0030] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 벡터를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 사전 투여된 환자에서 암을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 여기에서 벡터는 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하며, 상기 방법은 1-메틸-트립토판(1-MT)을 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 방법이 제공된다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 벡터가 사전 투여된 환자에서 암을 치료하고/거나 예방하기 위한 방법으로서, 환자에게 1-메틸-트립토판(1-MT)을 투여하는 단계를 포함하는, 방법이 제공된다.
- [0032] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 조혈모세포(HSC), 조혈전구세포(HPC), 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 제공되며, 여기에서, 폴리뉴클레오타이드는 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하며, HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 면역 체크포인트 억제제와 조합되어 사용된다.
- [0033] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 제공되며, 여기에서, 폴리뉴클레오타이드는 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하며, HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 종양 관련 항원(TAA)-특이적 T-세포와 조합되어 사용된다.
- [0034] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 제공되며, 여기에서, 폴리뉴클레오타이드는 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하며, HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 면역 체크포인트 억제제 및 TAA-특이적 T-세포와 조합되어 사용된다.

- [0035] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 폴리뉴클레오티드를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 제공되며, 여기에서, 폴리뉴클레오티드는 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하며, HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 1-메틸-트립토판(1-MT)과 조합되어 사용된다.
- [0036] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드로서, 면역 체크포인트 억제제와 조합되어 사용되는 폴리뉴클레오티드가 제공된다.
- [0037] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드로서, TAA-특이적 T-세포와 조합되어 사용되는 폴리뉴클레오티드가 제공된다.
- [0038] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드로서, 면역 체크포인트 억제제 및 TAA-특이적 T-세포와 조합되어 사용되는 폴리뉴클레오티드가 제공된다.
- [0039] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드로서, 1-메틸-트립토판(1-MT)과 조합되어 사용되는 폴리뉴클레오티드가 제공된다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 CAR 및/또는 트랜스제닉 TCR을 발현하는 TAA-특이적 T-세포가 제공되며, 여기에서, 환자에는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 사전 투여되었으며, 폴리뉴클레오티드는 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함한다.
- [0041] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 TAA-특이적 T-세포가 제공되며, 여기에서, 환자에는 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 사전 투여되었다.
- [0042] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 면역 체크포인트 억제제가 제공되며, 여기에서, 환자에는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 사전 투여되었으며, 이때 폴리뉴클레오티드는 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함한다.
- [0043] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 면역 체크포인트 억제제가 제공되며, 여기에서, 환자에는 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 사전 투여되었다.
- [0044] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 1-메틸-트립토판(1-MT)이 제공되며, 여기에서, 환자에는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 사전 투여되었으며, 폴리뉴클레오티드는 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함한다.
- [0045] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 1-메틸-트립토판(1-MT)이 제공되며, 여기에서, 환자에는 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 사전 투여되었다.
- [0046] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 면역 체크포인트 억제제와 TAA-특이적 T-세포의 조합물이 제공되며, 여기에서, 환자에는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 사전 투여되었으며, 폴리뉴클레오티드는 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함한다.
- [0047] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 TAA-특이적 T-세포와 면역 체크포인트 억제제의 조합물이 제공되며, 여기에서, 환자에는 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 사전 투여되었

다.

- [0048] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 폴리뉴클레오티드를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구를 이룰 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하여, 암을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 여기에서, 폴리뉴클레오티드는 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하며, HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 면역 체크포인트 억제제 및/또는 TAA-특이적 T-세포와 조합되어 사용되는, 방법이 제공된다.
- [0049] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 이룰 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하여, 암을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 폴리뉴클레오티드는 면역 체크포인트 억제제 및/또는 TAA-특이적 T-세포와 조합되어 사용되는, 방법이 제공된다.
- [0050] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, TAA-특이적 T-세포를 환자에게 투여하고/거나 면역 체크포인트 억제제를 환자에게 투여하는 것을 포함하여, 폴리뉴클레오티드를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 사전 투여된 환자에서 암을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 여기에서, 폴리뉴클레오티드는 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는, 방법이 제공된다.
- [0051] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 사전 투여된 환자에서 암을 치료하고/거나 예방하기 위한 방법으로서, 환자에게 TAA-특이적 T-세포를 투여하는 단계 및/또는 환자에게 면역 체크포인트 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, 방법이 제공된다.
- [0052] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 폴리뉴클레오티드를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구를 이룰 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하여, 암을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 여기에서, 폴리뉴클레오티드는 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하며, HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 1-메틸-트립토판(1-MT)와 조합되어 사용되는, 방법이 제공된다.
- [0053] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 이룰 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하여, 암을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 여기에서 폴리뉴클레오티드는 1-메틸-트립토판(1-MT)과 조합되어 사용되는, 방법이 제공된다.
- [0054] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 1-메틸-트립토판(1-MT)을 환자에게 투여하는 것을 포함하여, 폴리뉴클레오티드를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 사전 투여된 환자에서 암을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 여기에서 폴리뉴클레오티드는 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는, 방법이 제공된다.
- [0055] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자에게 1-메틸-트립토판(1-MT)을 투여하는 단계를 포함하여, 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 사전 투여된 환자에서 암을 치료하고/거나 예방하기 위한 방법이 제공된다.
- [0056] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 백터를 포함하는 조혈모세포(HSC), 조혈전구세포(HPC), 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 제공되며, 여기에서, 백터는 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 타입 1 인터페론(IFN)을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하며, HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 면역 체크포인트 억제제와 조합되어 사용된다.
- [0057] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 백터를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 제공되며, 여기에서, 백터는 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하며, HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 종양 관련 항원(TAA)-특이적 T-세포와 조합되어 사용된다.
- [0058] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 백터를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵

구가 제공되며, 여기에서, 벡터는 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하며, HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 면역 체크포인트 억제제 및 TAA-특이적 T-세포와 조합되어 사용된다.

[0059] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 벡터를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 제공되며, 여기에서, 벡터는 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하며, HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 1-메틸-트립토판(1-MT)과 조합되어 사용된다.

[0060] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 벡터로서, 면역 체크포인트 억제제와 조합되어 사용되는 벡터가 제공된다.

[0061] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 벡터로서, TAA-특이적 T-세포와 조합되어 사용되는 벡터가 제공된다.

[0062] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 벡터로서, 면역 체크포인트 억제제 및 TAA-특이적 T-세포와 조합되어 사용되는 벡터가 제공된다.

[0063] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 벡터로서, 1-메틸-트립토판(1-MT)과 조합되어 사용되는 벡터가 제공된다.

[0064] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 CAR 및/또는 트랜스제닉 TCR을 발현하는 TAA-특이적 T-세포가 제공되며, 여기에서, 환자에는 벡터를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 사전 투여되었으며, 벡터는 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함한다.

[0065] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 TAA-특이적 T-세포가 제공되며, 여기에서, 환자에는 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 벡터가 사전 투여되었다.

[0066] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 면역 체크포인트 억제제가 제공되며, 여기에서, 환자에는 벡터를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 사전 투여되었으며, 벡터는 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함한다.

[0067] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 면역 체크포인트 억제제가 제공되며, 여기에서, 환자에는 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 벡터가 사전 투여되었다.

[0068] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 1-메틸-트립토판(1-MT)이 제공되며, 여기에서, 환자에는 벡터를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 사전 투여되었으며, 벡터는 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함한다.

[0069] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 1-메틸-트립토판(1-MT)이 제공되며, 여기에서, 환자에는 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 벡터가 사전 투여되었다.

[0070] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 면역 체크포인트 억제제와 TAA-특이적 T-세포의 조합물이 제공되며, 여기에서, 환자에는 벡터를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 사전 투여되었으며, 벡터는 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함한다.

- [0071] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 TAA-특이적 T-세포와 면역 체크포인트 억제제의 조합물이 제공되며, 여기에서, 환자에는 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 벡터가 사전 투여되었다.
- [0072] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 벡터를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구를 이룰 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하여, 암을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 여기에서, 벡터는 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하며, HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 면역 체크포인트 억제제 및/또는 TAA-특이적 T-세포와 조합되어 사용되는, 방법이 제공된다.
- [0073] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 벡터를 이룰 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하여, 암을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 여기에서 벡터는 면역 체크포인트 억제제 및/또는 TAA-특이적 T-세포와 조합되어 사용되는, 방법이 제공된다.
- [0074] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, TAA-특이적 T-세포를 환자에게 투여하고/거나 면역 체크포인트 억제제를 환자에게 투여하는 것을 포함하여, 벡터를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 사전 투여된 환자에서 암을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 여기에서 벡터는 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는, 방법이 제공된다.
- [0075] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자에게 TAA-특이적 T-세포를 투여하는 단계 및/또는 환자에게 면역 체크포인트 억제제를 투여하는 단계를 포함하여, 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 벡터가 사전 투여된 환자에서 암을 치료하고/거나 예방하는 방법이 제공된다.
- [0076] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 벡터를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구를 이룰 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 여기에서, 벡터는 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하며, HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 1-메틸-트립토판(1-MT)과 조합되어 사용되는, 방법이 제공된다.
- [0077] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 벡터를 이룰 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하여, 암을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 벡터는 1-메틸-트립토판(1-MT)과 조합되어 사용되는, 방법이 제공된다.
- [0078] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자에게 TAA-특이적 T-세포를 투여하는 단계 및/또는 환자에게 면역 체크포인트 억제제를 투여하는 단계를 포함하여, 벡터를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 사전 투여된 환자에서 암을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 여기에서 벡터는 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는, 방법이 제공된다.
- [0079] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자에게 1-메틸-트립토판(1-MT)을 투여하는 단계를 포함하여, 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 벡터가 사전 투여된 환자에서 암을 치료하고/거나 예방하는 방법이 제공된다.
- [0080] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 조혈모세포(HSC), 조혈전구세포(HPC), 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 제공되며, 여기에서, 폴리뉴클레오타이드는 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 타입 1 인터페론(IFN)을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하며, HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 면역 체크포인트 억제제와 조합되어 사용된다.
- [0081] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 제공되며, 여기에서, 폴리뉴클레오타이드는 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표

적 서열을 포함하며, HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 종양 관련 항원(TAA)-특이적 T-세포와 조합되어 사용된다.

- [0082] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 폴리뉴클레오티드를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 제공되며, 여기에서, 폴리뉴클레오티드는 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하며, HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 면역 체크포인트 억제제 및 TAA-특이적 T-세포와 조합되어 사용된다.
- [0083] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 폴리뉴클레오티드를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 제공되며, 여기에서, 폴리뉴클레오티드는 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하며, HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 1-메틸-트립토판(1-MT)과 조합되어 사용된다.
- [0084] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드로서, 면역 체크포인트 억제제와 조합되어 사용되는 폴리뉴클레오티드가 제공된다.
- [0085] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드로서, TAA-특이적 T-세포와 조합되어 사용되는 폴리뉴클레오티드가 제공된다.
- [0086] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드로서, 면역 체크포인트 억제제 및 TAA-특이적 T-세포와 조합되어 사용되는 폴리뉴클레오티드가 제공된다.
- [0087] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드로서, 1-메틸-트립토판(1-MT)과 조합되어 사용되는 폴리뉴클레오티드가 제공된다.
- [0088] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 CAR 및/또는 트랜스제닉 TCR을 발현하는 TAA-특이적 T-세포가 제공되며, 여기에서, 환자에는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 사전 투여되었으며, 상기 폴리뉴클레오티드는 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함한다.
- [0089] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 TAA-특이적 T-세포가 제공되며, 여기에서, 환자에는 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 사전 투여되었다.
- [0090] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 면역 체크포인트 억제제가 제공되며, 여기에서, 환자에는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 사전 투여되었으며, 상기 폴리뉴클레오티드는 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함한다.
- [0091] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 면역 체크포인트 억제제가 제공되며, 여기에서, 환자에는 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 사전 투여되었다.
- [0092] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 1-메틸-트립토판(1-MT)이 제공되며, 여기에서, 환자에는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 사전 투여되었으며, 상기 폴리뉴클레오티드는 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함한다.
- [0093] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 1-메틸-트립토판(1-MT)이 제공되며, 여기에서, 환자에는 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-

130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 사전 투여되었다.

- [0094] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 면역 체크포인트 억제제와 TAA-특이적 T-세포의 조합물이 제공되며, 여기에서, 환자에는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수입전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 사전 투여되었으며, 상기 폴리뉴클레오티드는 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함한다.
- [0095] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 TAA-특이적 T-세포와 면역 체크포인트 억제제의 조합물이 제공되며, 여기에서, 환자에는 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 사전 투여되었다.
- [0096] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 폴리뉴클레오티드를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수입전구세포, 대식세포 또는 단핵구를 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하여, 암을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 여기에서, 폴리뉴클레오티드는 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하며, HSC, HPC, 골수/단핵구-수입전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 면역 체크포인트 억제제 및/또는 TAA-특이적 T-세포와 조합되어 사용되는, 방법이 제공된다.
- [0097] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하여, 암을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 폴리뉴클레오티드는 면역 체크포인트 억제제 및/또는 TAA-특이적 T-세포와 조합되어 사용되는, 방법이 제공된다.
- [0098] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 폴리뉴클레오티드를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수입전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 사전 투여된 환자에서 암을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 폴리뉴클레오티드는 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하며, 방법은 TAA-특이적 T-세포를 환자에게 투여하고/거나 면역 체크포인트 억제제를 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 방법이 제공된다.
- [0099] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 사전 투여된 환자에서 암을 치료하고/거나 예방하기 위한 방법으로서, 환자에게 TAA-특이적 T-세포를 투여하는 단계 및/또는 환자에게 면역 체크포인트 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, 방법이 제공된다.
- [0100] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 폴리뉴클레오티드를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수입전구세포, 대식세포 또는 단핵구를 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 여기에서, 폴리뉴클레오티드는 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하며, HSC, HPC, 골수/단핵구-수입전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 1-메틸-트립토판(1-MT)과 조합되어 사용되는, 방법이 제공된다.
- [0101] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하여, 암을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 여기에서, 폴리뉴클레오티드는 1-메틸-트립토판(1-MT)과 조합되어 사용되는, 방법이 제공된다.
- [0102] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 1-메틸-트립토판(1-MT)을 환자에게 투여하는 것을 포함하여, 폴리뉴클레오티드를 포함하는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수입전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 사전 투여된 환자에서 암을 치료하거나 예방하는 방법으로서, 여기에서, 폴리뉴클레오티드는 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는, 방법이 제공된다.
- [0103] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 사전 투여된 환자에서 암을 치료하고/거나 예방하는 방법으로서, 환자에게 1-메틸-트립토판(1-MT)을 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0104] 일 구체예에서, TAA-특이적 T-세포는 키메라 항원 수용체(CAR) 및/또는 트랜스제닉 T-세포 수용체(TCR)를 발현한다. 일 구체예에서, TAA-특이적 T-세포는 CAR을 발현한다. 일 구체예에서, TAA-특이적 T-세포는 트랜스제닉

TCR을 발현한다.

- [0105] 따라서, 본 발명은 TAA-특이적 CAR 또는 TCR을 발현하도록 조작된 T-세포를 이용할 수 있다.
- [0106] 일 구체예에서, 사이토킨은 인터페론(IFN), IL-12 또는 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF)이다.
- [0107] 일 구체예에서, 사이토킨은 인터페론(IFN)이다. 바람직하게는, 사이토킨은 타입 I 인터페론 또는 타입 II 인터페론이다.
- [0108] 바람직한 구체예에서, 사이토킨은 IFN α 이다.
- [0109] 또 다른 바람직한 구체예에서, 사이토킨은 인터페론-감마(IFN γ)이다.
- [0110] 일 구체예에서, 타입 I 인터페론은 인터페론-알파(IFN α) 또는 인터페론-베타(IFN β)이다.
- [0111] 일 구체예에서, 타입 I 인터페론은 IFN α 이다.
- [0112] 일 구체예에서, 타입 I 인터페론은 IFN β 이다.
- [0113] 일 구체예에서, 타입 II 인터페론은 인터페론-감마(IFN γ)이다.
- [0114] 일 구체예에서, 본 발명의 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포, 단핵구 또는 백터가 환자에서 암의 재발을 예방하는데 사용하기 위해 제공된다.
- [0115] 일 구체예에서, 본 발명의 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포, 단핵구 또는 백터가 환자에서 암의 진행을 예방하는데 사용하기 위해 제공된다.
- [0116] 일 구체예에서, TAA는 암배아 항원(CEA), 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, 에프린B2, ROR1, 메소텔린, c-Met, GD-2, 및 MAGE A3 TCR, 4-1BB, 썸암종 항원, 알파-태아단백질, BAFF, B-림프종 세포, C242 항원, 탄산무수화효소 9(CA-IX), CCR4, CD152, CD200, CD22, CD19, CD22, CD123, CD221, CD23(IgE 수용체), CD28, CD4, CD40, CD44, CD44 v6, CD51, CD52, CD56, CD74, CD80, CS-1, CNT0888, CTLA-4, DR5, EpCAM, CD3, 피브로넥틴 엑스트라 도메인-B, 플레이트 수용체 1, 당단백질 75, GPNMB, HGF, 인간 산란 인자 수용체 키나제, IGF-1 수용체, IGF-I, IgG1, L1-CAM, IL-13, IL-6, 인슐린-유사 성장 인자 I 수용체, 인테그린 $\alpha 5 \beta 1$, 인테그린 $\alpha v \beta 3$, MORAb-009, MS4A1, 뮤신 CanAg, N-글리코틸뉴라민산, NPC-1C, PDGF-R α , PDL192, 포스포티딜세린, 전립선 암종 세포, RANKL, RON, SCH 900105, SDC1, SLAMF7, 테나스신 C, TGF 베타 2, TGF- β , TRAIL-R1, TRAIL-R2, 종양 항원 CTAA16.88, 혈관 내피 성장 인자(VEGF), VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR2, 비멘틴, 5T4, CD5, CD19, CD20, CD21, CD25, CD37, CD30, CD33, CD45, CAMPATH-1(CDw52), HLA-DR, 항-이디오타입, TAG-72, Ep-CAM, MUC1, 플레이트-결합 단백질, A33, G250, 전립선-특이적 막 항원(PSMA), 전립선 특이적 항원(PSA), 페리틴, 강글리오시드(예를 들어, GD2, GD3, GM2), Le^y, CA-125, CA19-9, 표피 성장 인자 수용체(EGFR), p185HER2, IL-2 수용체, de2-7 EGFR, 섬유모세포 활성화 단백질(FAP), 테나스신, 메탈로프로테이나제, 엔도시알린, 탄산무수화효소, 갈락틴 9, 알둘라제 A, eIF $\gamma 4$, 티로시나제, 갈락틴 4, HERKV-K10, p53, NY-LU-12, 레스틴, NY-CO-38, MAGE-1, MAGE-4a, SSX2, NY-ESO-1, SCP-1, 707-AP, AFP, ART-4, BAGE, b-카테닌/m, Bcr-abl, CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27m, CDK4/m, CT, Cyp-B, DAM-6 (MAGE-B2) 및 DAM-10 (MAGE-B1), ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gp100, HAGE, HER-2/neu, HLA-A*0201-R170I, HPV-E7, HSP70-2M, HST-2, hTERT(hTERT), iCE, KIAA0205, LAGE, LDLR/FUT, MAGE, MART-1/멜란-A, MC1R, 마이오신/m, MUC1, MUM-1, MUM-2, MUM-3, NA88-A, NY-ESO-1, P15, p190 마이너 bcr-abl, Pml/RARa, PRAME, RAGE, RU1, RU2, SAGE, SART-1, SART-3, TEL/AML1, TPI/m, TRP-1, 단백질 1, gp75, TRP-2, TRP-2/INT2 또는 WT1 중 임의의 하나 이상으로부터 선택된다.
- [0117] 일 구체예에서, TAA는 CD19이다.
- [0118] 바람직한 구체예에서, TAA-특이적 T-세포는 CD19-특이적 CAR을 발현한다.
- [0119] 일 구체예에서, TAA-특이적 T-세포는 환자로부터 분리된 세포로부터 유래된다.
- [0120] 일 구체예에서, TAA-특이적 T-세포는 적어도 하나의 내인성 유전자를 파괴하도록 조작되었으며, 바람직하게는, 여기에서 적어도 하나의 내인성 유전자는 TCR α 사슬, TCR β 사슬 및 구조적 적합 복합체(MHC)를 인코딩하는 내인성 유전자로부터 선택된다.
- [0121] 일 구체예에서, 면역 체크포인트 억제제는 항체이며, 바람직하게는, 여기에서, 면역 체크포인트 억제제 항체는 항-CTLA4 항체, 항-PD1 항체, 항-PDL1 항체, 항-PDL2 항체 및 항-LAG-3 항체로 구성된 군으로부터 선택된다.

- [0122] 일 구체예에서, 벡터는 적어도 하나의 mir-130a 표적 서열 및 적어도 하나의 mir-126 표적 서열을 포함하며, 바람직하게는, 벡터는 2개의 mir-130a 표적 서열 및 2개의 mir-126 표적 서열을 포함한다.
- [0123] 일 구체예에서, 본 발명에 사용되는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 적어도 하나의 mir-130a 표적 서열 및 적어도 하나의 mir-126 표적 서열을 포함하며, 바람직하게는, 본 발명에 사용되는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 2개의 mir-130a 표적 서열 및 2개의 mir-126 표적 서열을 포함한다.
- [0124] 벡터 또는 폴리뉴클레오티드는 사이토킨, 예를 들어, 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 조직 특이적 프로모터를 추가로 포함할 수 있다. 바람직한 조직 특이적 프로모터는 TEK(Tie2) 프로모터이다.
- [0125] 일 구체예에서, 암은 혈액 악성 종양 또는 고형 종양이며, 바람직하게는, 혈액 악성 종양은 급성 골수성 백혈병(AML), 림프모구성 백혈성, 급성 림프모구성 백혈병(ALL), 골수이형성 증후군(MDS), 골수증식종양(MPN), 원발성 골수섬유증, 본태성 고혈소판증, 진성 적혈구증가증, 비정형 만성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병(CML), 림프종, 다발성 골수종, 비호지킨 림프종 및 호지킨 림프종으로 구성된 군으로부터 선택되며; 또는 바람직하게는, 고형 종양은 폐암, 유방암, 식도암, 위암, 결장암, 췌장암, 췌관암, 난소암, 두경부암, 활막육종, 혈관육종, 골육종, 갑상선암, 자궁내막암, 신경모세포종, 횡문근육종, 간암, 흑색종, 전립선암, 신장암, 연조직육종, 요로상피세포 암, 담관암, 아교모세포종, 자궁경부암 및 결장직장암으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0126] 일 구체예에서, 암은 원발성 종양으로부터의 전이이다.
- [0127] 일 구체예에서, 본 발명에 사용되는 세포는 벡터 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 HSC이며, 여기에서, 벡터 또는 폴리뉴클레오티드는 사이토킨, 예를 들어, 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함한다.
- [0128] 일 구체예에서, 본 발명에 사용되는 세포는 벡터 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 HPC이며, 여기에서, 벡터 또는 폴리뉴클레오티드는 사이토킨, 예를 들어, 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함한다.
- [0129] 일 구체예에서, 본 발명에 사용되는 세포는 벡터 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 골수/단핵구-수임전구세포이며, 여기에서, 벡터 또는 폴리뉴클레오티드는 사이토킨, 예를 들어, 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함한다.
- [0130] 일 구체예에서, 본 발명에 사용되는 세포는 벡터 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 대식세포이며, 여기에서, 벡터 또는 폴리뉴클레오티드는 사이토킨, 예를 들어, 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함한다.
- [0131] 일 구체예에서, 본 발명에 사용되는 세포는 벡터 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 단핵구이며, 여기에서, 벡터 또는 폴리뉴클레오티드는 사이토킨, 예를 들어, 타입 1 인터페론을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함한다.
- [0132] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 제1 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 벡터 및 제2 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 벡터를 포함하는 조혈모세포(HSC), 조혈전구세포(HPC), 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 제공되며, 여기에서, 제1 및 제2 사이토킨은 상이하다.
- [0133] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 조혈모세포(HSC), 조혈전구세포(HPC), 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구의 집단이 제공되며, 집단에는 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 제1 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 벡터 및 제2 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 벡터가 형질도입되며, 여기에서, 제1 및 제2 사이토킨은 상이하다.
- [0134] 일 구체예에서, 제1 사이토킨은 제1 벡터에 인코딩되며, 제2 사이토킨은 제2 벡터에 인코딩된다. 일 구체예에서, 제1 및 제2 사이토킨은 동일한 벡터에서 인코딩된다.
- [0135] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 제1 사이토킨을 인코딩하는 뉴

클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 및 제2 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드의 조합물이 제공되며, 여기에서, 제1 및 제2 사이토킨은 상이하다.

- [0136] 일 구체예에서, 제1 사이토킨은 제1 폴리뉴클레오티드에 인코딩되며, 제2 사이토킨은 제2 폴리뉴클레오티드에 인코딩된다. 일 구체예에서, 제1 및 제2 사이토킨은 동일한 폴리뉴클레오티드에서 인코딩된다. 폴리뉴클레오티드는 예를 들어, 벡터의 형태로 존재할 수 있다.
- [0137] 일 구체예에서, 제1 및 제2 사이토킨은 인터페론(IFN) 또는 종양 괴사 인자 알파(TNF α)로부터 각각 독립적으로 선택된다.
- [0138] 일 구체예에서, 제1 및 제2 사이토킨은 각각 독립적으로 타입 I IFN(바람직하게는, IFN α 또는 IFN β), 타입 II IFN(바람직하게는, IFN γ) 및 TNF α 로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0139] 일 구체예에서, 제1 및 제2 사이토킨은 각각 독립적으로 IFN α , IFN β , IFN γ 및 TNF α 로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0140] 일 구체예에서, 제1 사이토킨은 IFN α 이며, 제2 사이토킨은 IFN γ 이다.
- [0141] 일 구체예에서, 제1 사이토킨은 IFN α 이며, 제2 사이토킨은 TNF α 이다.
- [0142] 바람직한 구체예에서, 제1 사이토킨은 IFN γ 이며, 제2 사이토킨은 TNF α 이다.
- [0143] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 벡터를 포함하는 조혈모세포(HSC), 조혈전구세포(HPC), 골수/단핵구-수입전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 제공되며, 여기에서, 벡터는 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하며, 사이토킨은 인터페론(IFN) 또는 종양 괴사 인자 알파(TNF α)이다.
- [0144] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 벡터가 제공되며, 여기에서, 사이토킨은 인터페론(IFN) 또는 종양 괴사 인자 알파(TNF α)이다.
- [0145] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 환자의 암 치료 또는 예방에 사용하기 위한 사이토킨을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 mir-130a 및/또는 mir-126 표적 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 제공되며, 여기에서, 사이토킨은 인터페론(IFN) 또는 종양 괴사 인자 알파(TNF α)이다.
- [0146] 일 구체예에서, IFN은 타입 II IFN(바람직하게는, IFN γ) 또는 타입 I IFN(바람직하게는, IFN α 또는 IFN β)이다.
- [0147] 일 구체예에서, 사이토킨은 IFN γ 이다. 일 구체예에서, 사이토킨은 IFN α 이다. 일 구체예에서, 사이토킨은 IFN β 이다.

도면의 간단한 설명

- [0148] 도 1. OVA-특이적 CD8⁺ T 세포의 유도에 의한 IFN 마우스에서 OVA-ALL 성장의 억제.

a, HSC를 조작하고, 자발적 B-ALL을 생성하는데 사용되는 렌티바이러스 벡터(LV)의 개략적 대표도. **b**, 실험 설계. **c**, CTRL (n=10, 아이소형 대조군 항체로 처리됨), IFN(n=10, 아이소형 대조군 항체로 처리됨), CTRL + aCTLA4(n=14) 및 IFN + aCTLA4(n=13) 마우스의 시간 경과에 따른 말초혈(PB)에서 어미 ALL의 절대수(평균 \pm SEM). 각각의 점은 단일 마우스를 나타낸다. *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001, 인자 실험에서 종단 데이터에 대한 비모수적 순위-기반 방법. **d**, **e**, **f** IFN(n=15) 및 CTRL(n=15) 마우스의 BM 및 비장(**e**, **f**; 종양 주입 후 14 일)에서 시간 경과에 따른 PB에서 OVA-ALL(상단에 도식된 NGFR/OVA 양방향성 LV로 조작됨)(**d**)의 절대수(평균 \pm SEM)(9개 실험 중 하나가 도식됨). 각각의 점은 단일 마우스를 나타낸다. ****p<0.0001, 인자 실험에서 종단 데이터에 대한 비모수적 순위-기반 방법 (**d**); *p<0.05, ** p<0.01, 맨-휘트니(Mann-Whitney) (**e**, **f**). **g**, NGFR-OVA 또는 NGFR-CD20 BdLV로 형질도입된 EL4 표적 세포주에 대한 IFN γ -ELISPOT에 의해 시험한 종양 주입 후 13 일, IFN 마우스 또는 종양-비함유 CTRL(나이브 C57BI/6, n=1) 마우스로부터의 비장 CD8⁺ T 세포. 각각의 점은 단일 마우스를 나타낸다(평균 \pm SEM). 저 종양 부담 (n=5): 5.2 \pm 4.9 (평균 \pm SEM) % OVA-ALL; 중 종양 부담 (n=1): 33% OVA-ALL; 고 종양 부담 (n=6): 51 \pm 4.9 %OVA-ALL. **h**, IFN(n=14-6) 및 CTRL(n=15-8) 마우스의

PB에서 OVA-특이적 T 세포의 백분율(평균 \pm SEM). $^{**}p<0.01$, OVA-ALL 주입 후 9일째에 수행된 맨 휘트니. 각각의 점은 단일 마우스를 나타낸다. 트랜스제닉 OT-I 마우스로부터의 T 세포는 양성 대조군으로서 사용된다(미도시됨). **i, j**, 3개의 독립된 실험으로부터 IFN(n=23) 및 CTRL(n=26) 마우스에서 종양 주입 후 9일째에 BM(**i**) 및 비장(**j**)에서 OVA-특이적 T 세포의 절대수(평균 \pm SEM). $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$, 맨-휘트니. 각각의 점은 단일 마우스를 나타낸다. **k, (g)**에서와 같이 시험한 종양 비함유 마우스로부터 또는 종양 주입 후 9일째에 IFN(n=7) 및 CTRL(n=8) 마우스로부터의 비장 CD8⁺ T 세포. OT-I 마우스(미도시됨)로부터의 T 세포 및 콘카나발린 A(ConA) 자극은 양성 대조군으로서 사용된다. 각각의 점은 단일 마우스를 나타낸다. **l, m**, IFN(n=9), CD8-고갈된 IFN(n=7) 및 CTRL(n=9) 마우스의 PB에서 OVA-ALL의 백분율(**l**) 및 절대수(**m**)(평균 \pm SEM). $^{**}p<0.01$, $^{****}p<0.0001$, 인자 실험에서 종단 데이터에 대한 비모수적 순위-기반 방법(**l**); $^{*}p<0.05$, $^{****}p<0.0001$, 던 테스트(Dunn's test)에 의해 조절된 p-값을 갖는 크루스칼-왈리스(Kruskal-Wallis)(**m**).

도 2. 입양 전달된 OT-I T 세포는 확장되며, IFN 마우스에서 OVA-ALL을 함유한다.

a, b, 실험 설계(**a**) 및 IFN(n=7) 또는 CTRL(n=7) 마우스에서 시간 경과에 따른 OVA-ALL 성장(**b**, PB 중 백분율; 평균 \pm SEM). **c**, OT-I 입양 전달 후 3일째에 IFN(n=7), CTRL(n=7) 및 종양-비함유(C57BI/6 종양 비함유, n=3) 마우스의 BM 및 비장에서 OTI T 세포의 절대수(평균 \pm SEM). $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, 맨-휘트니. 각각의 점은 단일 마우스를 나타낸다. **d**, 입양 전달 후 3일째에 (**c**)의 마우스의 BM 및 비장에서 OT-I T 세포 내에서 나이브(CD44-CD62L⁺), 중심 메모리(CD44+CD62L⁺) 및 이펙터 메모리(CD44+CD62L⁻) 세포의 백분율(평균 \pm SEM). $^{**}p<0.01$, 비모수 조합 시험. **e, f**, 실험 설계(**e**) 및 OVA-ALL-주입된 CTRL(n=12), IFN + OT-I(n=9) 및 CTRL + OT-I(n=10) 마우스의 생존 곡선(**f**). $^{*}p<0.05$, $^{****}p<0.0001$ 멘텔-헨젤(Mantel-Haenszel) 시험, 본페로니(Bonferroni) 시험에 의해 조절된 p-값. **g, (f)**로부터의 CTRL + OT-I 및 IFN + OT-I 마우스 및 종양-비함유 C57BI/6 마우스(n=3)의 시간 경과에 따른 PB에서 입양 전달된 OT-I T 세포의 절대수(평균 \pm SEM). 장기 생존 마우스는 녹색으로 도시된다. 각 선은 단일 마우스를 나타낸다. **h, (f, g)**로부터의 마우스의 PB에서 OT-I T 세포에서 Lag3 발현의 백분율(평균 \pm SEM). 각 선은 단일 마우스를 나타낸다.

도 3. ISG/Th1은 유전자 시그니처를 프라이밍시키고, IFN 마우스에서 고전적 단핵구 및 M1-왜곡을 증가시켰다.

a, OVA-ALL 접종 전 및 후에 IFN 및 CTRL 마우스의 BM 및 비장에서 암 면역 유전자 패널의 발현에서 변화를 보여주는 볼케이노 플롯. 수평 파선은 유의 임계값을 나타낸다(FDR<0.05). 수직 파선은 CTRL 마우스와 관련하여 2배 증가/감소된 발현을 갖는 유전자를 나타낸다. ISG는 주황색으로 나타내며, Th1 및 T 세포 활성화 유전자는 연청색으로 나타내며, IFN 및 Th1 반응에 공통적인 유전자는 녹색으로 나타내며, 대식세포 및 DC 활성화 유전자는 적색으로 나타내며, NK 세포 활성화 유전자는 보라색으로 나타내며, 항원 처리 유전자는 청색으로 나타내며, 백혈병 관련 유전자는 회색으로 나타낸다. 삽입도는 오른쪽에 확대되어 도시된다. CTRL BM + ALL(n=2)를 제외하고 각 샘플에 있어서 n=3 마우스. **b**, 종양-비함유 C57BI/6 마우스로부터 및 종양 주입 후 9일째에 OVA-ALL-주입된 IFN(n=6) 및 CTRL(n=5) 마우스로부터의 비장 CD4⁺ T 세포에서 나타낸 Th1 유전자(OVA-ALL-주입된 CTRL 마우스 대비 평균 배수-변화 \pm SEM)의 RT-qPCR에 의한 발현 분석. 각각의 점은 단일 마우스를 나타낸다. $^{*}p<0.05$, 맨-휘트니. **c**, OVA-ALL 주입 전 및 후(12일)의 IFN(n=11) 및 CTRL(n=13) 마우스의 PB에서 나타낸 골수 집단의 백분율(평균 \pm SEM). $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$, $^{****}p<0.0001$, 크루스칼-왈리스, 던 테스트에 의한 조절된 p 값. 통계 분석은 각 개별 골수 세포 집단 내에서 수행한다.

도 4. IFN 세포 및 유전자 치료법은 지속성 항-암 반응을 유도하며, 면역 체크포인트 치료법과 조합되는 경우, 생존을 추가로 향상시킨다.

a, b, c, d 표시된 ALL 세포와 일차(**a**; n=11,13; $^{*}p<0.05$, 멘텔-헨젤 테스트) 및 후속 종양 접종 후 OVA-ALL-주입된 IFN 및 CTRL 마우스의 생존 곡선(**b**: n=3 (**a**)로부터의 장기 생존 IFN 마우스 vs. 4마리 나이브 마우스; **c**: (**a,b**)로부터의 동일한 3마리의 생존 마우스 vs. 4마리 나이브 마우스; **d**: (**a, b, c**)로부터의 3마리 생존 마우스 중 2마리 vs. 4마리 나이브 마우스. **e**, 실험 설계. **f, g**, OVA-ALL 주입된 (**f**) IFN (n=14), CTRL (n=14), IFN + aCTLA4 (n=14) 및 CTRL + aCTLA4 (n=15) 마우스의 생존 곡선, $^{*}p<0.05$, $^{***}p<0.001$, 멘텔-헨젤 테스트, 본페로니 방법에 의해 조절된 p-값; 및 (**g**) IFN + aCTLA4 (n=10) 및 CTRL + aCTLA4 (n=12) 마우스, $^{*}p<0.05$, 멘텔-헨젤 테스트. **h**, NGFR-OVA 또는 NGFR-CD20 BdLV 또는 PGK-OFP 또는 PGK-tTA LV로 형질도입된 EL4 표적 세포주에 대한 IFNg-ELISPOT에 의해 시험한 종양-비함유 (OT-I, n=1 및 이식된 CTRL 마우스, n=2) 마우스로부터 및 종양 주입 후 51일째의 (**f**) (IFN n=3, CTRL n=1, IFN + aCTLA4 n=4, CTRL + aCTLA4 n=3)로부터의 생존 마우스로부터의 PBMC. 파선은 EL4 NGFR 표적 세포에 대해 관찰된 더 높은 중간 배경 수준을 나타낸다. 각각의 점은 모두 4개의 TAA에 대해 시험된 단일 마우스를 나타낸다. **i**, 이차 종양 재-접종 후 4일째(화살표

끝, T2) 및 OVA-ALL 주입 전 (화살표 시작, T0) (f)로부터의 생존 마우스(각 화살표는 마우스를 나타냄)의 TCR-베타 CDR 레퍼토리의 클론성 및 유사성. j, 종양 주입 후 19일째에 (h)에서와 같이 IFN γ -ELISPOT에 의해 시험한 (g) (IFN + α CTLA-4 생존자, 전체 청색 기호, n=3; CTRL + α CTLA-4 생존자, 전체 적색 기호, n=1; IFN + α CTLA-4 비반응자, 빈 청색 기호, n=7; CTRL + α CTLA-4, 빈 적색 기호, n= 12개 비-반응자 대조군 중 8개)로부터의 마우스의 PBMC. 각각의 점은 모두 4개의 TAA에 대해 시험된 단일 마우스를 나타낸다. k, (j)에서 도시된 IFN γ -ELISPOT 검정에 의해 평가되는 면역 반응성을 기반으로 하여 계층화된 (g)로부터의 마우스의 생존 곡선. 2개 이상의 항원에 대해 반응하는 마우스는 적색으로 나타내며; 1개의 항원에 대해 반응하거나 어떠한 항원에도 반응하지 않는 마우스는 검정색으로 나타낸다. 발현으로서 1에 대해 카운트된 OVA 및 NGFR 카운트에 대한 반응성은 BdLV 내에 존재하는 양방향성 프로모터에 의해 공동-조절됨을 주목하라.

도 5. 조작된 OVA-ALL은 어미 ALL과 비교하여 증가된 면역원성을 보여주었다.

a, OVA-ALL을 생성시키는데 사용된 양방향성 LV(BdLV)의 개략적 대표도와 정제된 OVA-ALL에 대한 NGFR 발현을 보여주는 대표적인 플롯. a, 종양 주입된 마우스의 PB에서 ALL에 대한 B-ALL(CD19+OFP+) 및 NGFR 발현을 식별하는데 사용된 게이팅 전략. c, 상단: 면역-적격 C57BI/6(n=5) 마우스의 PB에서 어미 ALL 및 면역-적격 C57BI/6(n=5) 및 면역-결핍 NSG(n=6) 마우스의 PB에서 OVA-ALL의 백분율(평균 \pm SEM). 하단: 면역-적격 C57BI/6(n=5) 및 면역결핍 NSG(n=6) 마우스의 PB에 존재하는 ALL에서 NGFR 마커의 발현. NGFR 및 OVA 항원의 발현은 BdLV 내에 존재하는 양방향성 프로모터에 의해 공동-조절됨을 주목하라. d, e, 희생 시에 면역 적격 C57BI/6(n=6) (d) 및 면역-결핍 NSG(n=6) 마우스(e)의 BM에 존재하는 백혈병 세포에서 NGFR 마커의 발현 및 OVA-ALL의 백분율(평균 \pm SEM).

도 6. IFN 마우스에서 OVA-ALL 성장의 억제 및 OVA-특이적 T 세포의 유도.

a, OVA-특이적 CD8+ T 세포를 식별하는데 사용된 게이팅 전략. b, c, d, 종양 주입 후 9일째에 IFN (n=14-6) 및 CTRL (n=15-8) 마우스의 PB(b)에서 및 BM 및 비장(c, d)에서 OVA-ALL의 백분율(b) 및 절대수(c, d)(평균 \pm SEM). ***P<0.001, 맨-휘트니. 각각의 점은 단일 마우스를 나타낸다. e, 종양 접종 후 9일째에 IFN(n=9), CD8-고갈된 IFN(n=7) 및 CTRL(n=9) 마우스의 PB에서 OVA-ALL의 백분율. 각각의 점은 단일 마우스를 나타낸다. *p<0.05, ***p<0.001, 크루스칼-왈리스, 던 테스트에 의한 조절된 p 값.

도 7. OVA-ALL 아폽토시스, 세포 주기 및 증식 비율을 평가하는데 사용된 게이팅 전략.

a, b, 종양 주입 후 9일째에 IFN (n=11) 및 CTRL (n=15) 마우스의 BM 및 비장에 존재하는 초기 아폽토시스(아넥신+7-AAD-), 후기 아폽토시스(아넥신+7-ADD+), 치사/괴사(아넥신-7AAD+) 및 생존(아넥신-7-AAD-) OVA-ALL 세포의 게이팅 전략(a) 및 분석(b)(백분율, 평균 \pm SEM). *P<0.05, 맨-휘트니. c, d, 게이팅 전략(c) 및 종양 주입 후 9일째에 IFN(n=11) 및 CTRL(n=15)의 BM 및 비장에서 세포 주기의 G0((Ki67-Hoechst^{low}), G1(Ki67+Hoechst^{low}) 및 S-G2-M (Ki67+Hoechst^{high}) 페이스에서 OVAALL 분포의 분석(d: 백분율, 평균 \pm SEM). e, f, 게이팅 전략(e) 및 종양 주입 후 9일째에 IFN (n=11) 및 CTRL (n=15) 마우스의 BM 및 비장에 존재하는 증식성 EdU+ ALL 세포의 분석(f: 백분율, 평균 \pm SEM). **p<0.01, 맨-휘트니.

도 8. OVA-ALL-주입된 CTRL, IFN 마우스 및 종양-비함유 C57BI/6 마우스에서 OT-I T 세포의 입양 전달.

a. OT-I 입양 전달 후 지시된 시간에서 CTRL(n=7) 및 IFN(n=7) 마우스의 PB에서 OVA-ALL의 절대수(평균 \pm SEM). 각각의 점은 단일 마우스를 나타낸다. b, OT-I T 세포의 입양 전달 후 3일째에 IFN(n=7), CTRL(n=7) 및 종양-비함유(C57BI/6 종양 비함유, n=3) 마우스의 BM 및 비장에서 OT-I T 세포의 Lag3 발현. 각각의 점은 단일 마우스를 나타낸다. c, 입양 전달된 OT-I T 세포(CD45.2+)를 식별하는데 사용된 게이팅 전략 및 (a, b)로부터의 마우스의 BM 및 비장에 존재하는 OT-I T 세포에서 Lag3 발현. OFP-CD8+ T 세포에 대해 게이팅함으로써 OVA-ALL 세포가 먼저 배제된다. CD45.1 및 CD45.2 마커는 방사성-내성 수령체-유래된 CD8+ T 세포(CD45.1+), 도너-유래된 CD8+ T 세포(CD45.1.2+) 및 입양 전달된 OT-I T 세포(CD45.2+)를 구별하는데 사용된다. 종양 비함유 마우스에서, 입양 전달된 OT-I T 세포는 CD8+ T 세포로서 규정되며, CD45.2+ CD8+ T 세포에 대한 게이팅에 의해 CD8+ 수령체-유래된 T 세포(CD45.1+)로부터 구별된다. d, 나이브(CD62L+CD44-), 중심 메모리(CD62L+CD44+) 및 이펙터 메모리(CD62L-CD44+) 입양 전달된 OT-I T 세포를 식별하는데 사용된 게이팅 전략. OT-I T 세포는 (c, OVA-ALL은 CD19-CD8+ T 세포에 대한 게이팅에 의해 먼저 배제됨)에 기술된 바와 같이 식별된다. e, f, OT-I T 세포의 입양 전달 후 3일째에 (a, b)에 도시된 마우스로부터의 BM 및 비장에서 OVA-ALL의 절대수(e)(평균 \pm SEM) 및 ALL 상의 NGFR 마커 발현(f). 각각의 점은 단일 마우스를 나타낸다. **p<0.01, ***p< 0.001, 맨-휘트니(e).

보충 도 6. 정제된 비장 CD4+ T 세포에서 원형(prototypical) Th2 및 Treg 유전자의 유전자 발현 분석.

a, 종양-비함유 나이브 C57BI/6 마우스로부터 및 종양 주입 후 9일째에 OVA-ALL-주입된 IFN(n=6) 및 CTRL(n=5) 마우스로부터 정제된 비장 CD4+ T 세포에서 나타낸 Th2 및 Treg 유전자(OVA-ALL-주입된 CTRL 마우스 대비 평균 배수-변화 \pm SEM)의 RT-qPCR에 의한 발현 분석. 각각의 점은 단일 마우스를 나타낸다.

도 9. 입양 전달된 OT-I T 세포는 확장되며, IFN 마우스에서 OVA-ALL을 함유한다.

a, b, c, d, IFN + OT-I (n=9, **a, c**) 및 CTRL + OT-I (n=10, **b, d**) 마우스의 PB (**a, b**) 및 BM (**c, d**)에서 ALL 세포의 백분율(평균 \pm SEM) 및 ALL 세포 상의 NGFR 마커의 발현. 장기 생존 마우스는 녹색으로 도시된다. NGFR 발현은 백혈병이 근절된 생존 마우스에 대해서는 나타나지 않음을 주목하라. 각 개별 마우스는 단일 점(**b, d**) 또는 선(**a, b**)로서 나타낸다. **e, f**, (**a, b, c, d**, CTRL + OT-I, n=8; IFN + OT-I, n=3)로부터 안락사시킨 종양-함유 마우스의 BM, 비장 및 림프절에서 나이브(CD62L+CD44-), 중심 메모리(CD62L+CD44+) 및 이펙터 메모리(CD62LCD44+) OT-I T 세포의 백분율(평균 \pm SEM). **f**, (**e**)에 도시된 마우스의 BM, 비장 및 림프절에 존재하는 OT-I T 세포에서 PD1 발현의 백분율(평균 \pm SEM). 각각의 점은 단일 마우스를 나타낸다.

도 11. 종양 함유 및 종양-비주입된 IFN 및 CTRL 마우스의 PB 및 비장에서 골수 세포의 유동 세포측정 분석.

a, b, c, 게이팅 전략(**a**) 및 종양 주입 후 10일째에, 종양-비함유 및 OVA-ALL 주입된 IFN 및 CTRL 마우스 (CTRL: n=3, IFN n=2, CTRL + ALL: n=9, IFN + ALL: n=7)의 비장에서 골수 세포 집단의 분석(**b**, 절대수, 평균 \pm SEM). 대식세포(MF)는 CD19-CD11c-Ly6G-F4/80+ 세포로서 확인되며, IAb (MHC-II) 마커를 사용하여 MHC-II+ MF 및 MHC-II- Mf로 추가로 구별된다. 본 발명자들은 CD19-F4/80-CD11c+MHCII+ 수지상 세포로부터 CD19-F4/80-CD11c+MHCII-골수 세포를 구별하였다. 본 발명자들은 과립구를 CD19-F4/80-CD11c-CD11b+Ly6C+Ly6G+로서, 고전적 단핵구를 CD19-F4/80-CD11c-CD11b+Ly6C-lowLy6G-로서 및 비고전적 단핵구를 CD19-F4/80-CD11c-CD11b+Ly6C-Ly6G-로서 규정하였다. **p<0.01, 크루스칼-왈리스, 던 테스트에 의한 조절된 p 값. 통계는 각 개별 골수 집단 내에서 수행한다. **d**, (**c**)로부터의 종양 비함유 또는 종양-함유 IFN 및 CTRL 마우스에 존재하는 MHC-II 대식세포의 백분율. **p<0.01, 크루스칼-왈리스, 던 테스트에 의한 조절된 p 값.

도 12. 종양-함유 및 종양-비주입된 IFN 및 CTRL 마우스의 BM 및 비장에서 T 조절 세포 및 BM에서 골수 세포의 유동 세포측정 분석.

a, b, 게이팅 전략 및 종양 주입 후 10일째에, 종양-비함유 및 OVA-ALL 주입된 IFN 및 CTRL 마우스 (CTRL: n=3, IFN n=2, CTRL + ALL: n=9, IFN + ALL: n=7)의 BM에서 골수 세포 집단의 분석(절대수, 평균 \pm SEM). 각각의 점은 단일 마우스를 나타낸다. 대식세포(MF)는 CD19-CD11c-Ly6G-F4/80+ 세포로서, 수지상 세포(DC)는 CD19-F4/80-CD11c+MHCII+로서, 과립구는 CD19-F4/80-CD11c-CD11b+Ly6C+Ly6G+로서, 고전적 단핵구는 CD19-F4/80-CD11c-CD11b+Ly6C-lowLy6G-로서 및 비고전적 단핵구는 CD19-F4/80-CD11c-CD11b+Ly6CLy6G-로서 규정된다. *p<0.05, **p<0.01, 크루스칼-왈리스, 던 테스트에 의한 조절된 p 값. 통계는 각 개별 골수 집단 내에서 수행한다. **c, d**, 게이팅 전략(**c**) 및 (**b**)로부터 종양-비함유 및 OVA-ALL-주입된 IFN 및 CTRL의 BM 및 비장에서 T 조절 세포의 분석(**d**, 절대수, 평균 \pm SEM). 각각의 점은 단일 마우스를 나타낸다. T 조절 세포는 CD3+CD4+CD25+FoxP3+로서 규정된다. **p<0.01, 크루스칼-왈리스, 던 테스트에 의한 조절된 p 값. 통계는 각 개별 조직 내에서 수행한다.

도 13. 종양 함유 및 종양-비주입된 IFN 및 CTRL 마우스의 비장에서 NK 및 NKT 세포의 유동 세포측정 분석.

a, b, 게이팅 전략(**a**) 및 종양 주입 후 10일째에 종양-비함유 또는 OVA-ALL 주입된 IFN 및 CTRL 마우스 (CTRL: n=3, IFN n=2, CTRL + ALL: n=9, IFN + ALL: n=7)의 비장 및 BM에 존재하는 NK 및 NKT 세포의 분석(**b**, 절대수, 평균 \pm SEM). 각각의 점은 단일 마우스를 나타낸다. NK 세포는 CD19-CD3-NK1.1+로서, NKT 세포는 CD19-CD3+NK1.1+로서 규정된다. CD11b 및 CD27 마커를 사용하여, 본 발명자들은 가장 미숙한 생성인자(CD11b-CD27+), 성숙하고 가장 세포독성인 사이토킨 생성인자(CD11b+CD27+) 및 성숙하며 덜 세포독성인 사이토킨 생성인자(CD11b+CD27-) NK 세포를 추가로 구별하였다. **p<0.01, ***p<0.001, 크루스칼-왈리스, 던 테스트에 의한 조절된 p 값. 통계는 각 개별 집단 내에서 수행한다. **c**, (**b**)로부터의 종양-비함유 또는 종양 함유 IFN 및 CTRL 마우스의 비장(상단) 및 BM(하단)에서 지시된 NK 세포 하위-집단의 백분율(평균 \pm SEM). 각각의 점은 단일 마우스를 나타낸다. **d, e**, (**b**)로부터의 마우스의 비장(**d**) 및 BM(**e**)에 존재하는 CD11b+CD27+ (**d**) 및 CD11b+CD27- (**d, e**) NK 세포에서 NKG2D 및 Nkp46 발현의 백분율(평균 \pm SEM). 각각의 점은 단일 마우스를 나타낸다. *p<0.05, **p<0.01, 크루스칼-왈리스, 던 테스트에 의한 조절된 p 값. 통계는 각 개별 집단 내에서 수행한다.

도 14. OVA-특이적 T 세포에 의해 발휘된 면역 압력은 마우스에서 OVA-음성 ALL 세포의 면역-선택으로 이어진다.

a, 각각의 개별 IFN(n=11) 및 CTRL(n=13) 마우스의 PB에서 OVA-ALL의 백분율(평균 \pm SEM). 각 선은 단일 마우스를 나타낸다. **b**, 빠른 또는 지연된 질환 과정을 보여주는 IFN (n=8) 및 CTRL (n=13) 마우스의 PB에서 OVA-특이적 T 세포(각 선은 단일 마우스를 나타냄)의 절대수(평균 \pm SEM) 및 BM-침윤 ALL(또는 BM 분석이 이용가능하지 않은 마우스에 있어서 PB 순환 ALL)에서의 NGFR 발현(빠른 질환 과정: CTRL: 13-29일(범위), 20.4 ± 1.3 (평균 \pm SEM), n=11; IFN:16-27일, 20.8 ± 1.8 , n=5; 지연된 질환 과정: CTRL: 34-44일, 39 ± 5 , n=2; IFN: 34-100일, 56 ± 22 , n=3). **c**, 장기 생존 IFN(n=3) 마우스의 PB에서 OVA-특이적 T 세포의 절대수(평균 \pm SEM). 각 선은 단일 마우스를 나타낸다. **d**, OVA-ALL로의 2차 종양 접종 후 14일째에 도 4b로부터의 생존 IFN 마우스(n=3) vs 4 나이브 마우스에서 OVA-특이적 T 세포의 백분율(평균 \pm SEM). 각각의 점은 단일 마우스를 나타낸다. **e**, 마우스에서 주입 전 1 대 1 비율로 혼합된 OVA-ALL 및 어미 ALL 세포를 보여주는 대표적인 플롯.

도 15. 개별 마우스에서 백혈병 성장 동태.

a, b, 각 개별 (a) IFN (n=14), CTRL (n=14), IFN + aCTLA4 (n=14) 및 CTRL + aCTLA4 (n=15) 마우스 및 (b) IFN + aCTLA4 (n=10) 및 CTRL + aCTLA4 (n=12) 마우스의 PB에서 OVA-ALL의 백분율(평균 \pm SEM). 각 선은 단일 마우스를 나타낸다.

도 16. OVA-음성 ALL 세포의 면역-선택은 CTLA4-처리된 IFN 및 CTRL 마우스 둘 모두에서 향상된다.

a, 빠른 질환 과정, 지연된 질환 과정 또는 장기 생존을 보여주는 IFN (n=14), CTRL (n=14), IFN+aCTLA4 (n=14) 및 CTRL+aCTLA4 (n=15) 마우스의 PB에서 OVA-특이적 T 세포(각 선은 단일 마우스를 나타냄)의 절대수(평균 \pm SEM) 및 BM-침윤 ALL(또는 BM이 이용가능하지 않은 마우스에 있어서 PB 순환 ALL)에서 NGFR 발현. 빠른 질환 과정: CTRL: 14-21일(범위), 15.66 ± 0.8 (평균 \pm SEM), n=12; IFN: 17-25일, 21 ± 1.3 , n=8; CTRL + CTLA4: 14-21일, 19 ± 1.2 , n=6; IFN + CTLA4: 25일, 25 ± 0 , n=2; 지연된 질환 과정: CTRL: 36일, n=1; IFN: 30-36일, 34 ± 2 , n=3; CTRL + CTLA4, 30-64일, 42 ± 7.4 , n=5; IFN + CTLA4: 25-64일, 44 ± 4.9 , n=7). **b**, (a)로부터의 마우스의 PB에서 CD8⁺ T 세포 내의 OVA-특이적 T 세포의 백분율. *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001, 인자 실험에서 종단 데이터에 대한 비모수적 순위-기반 방법. **c**, OVA-ALL 주입 전 (화살표 시작, T0) 및 OVA-ALL 투여 후 30일째(화살표 끝, T1) 도 4f로부터의 종양-비함유 장기 생존 마우스(각 화살표는 마우스를 나타냄)의 TCR-베타 CDR 레퍼토리의 클론성 및 유사성.

도 17. IFN 유전자 치료법은 후천성 면역을 활성화시킴으로써 ALL 성장을 억제한다.

CTRL(n=10, 아이소형 대조군 항체로 처리됨), IFN(n=10, 아이소형 대조군 항체로 처리됨), CTRL + aCTLA4(n=14) 및 IFN + aCTLA4(n=13) 마우스의 시간 경과에 따른 말초혈(PB)에서 어미 ALL의 절대수(평균 \pm SEM). 각각의 점은 단일 마우스를 나타낸다. *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001, 인자 실험에서 종단 데이터에 대한 비모수적 순위-기반 방법.

도 18. IFN 유전자 치료법은 TME에서 면역-자극 프로그램을 도입한다.

CTRL + ALL (n=7) 및 IFN + ALL (n=8)로부터의 마우스의 BM에서 MHC-I 분자 상에 면역-우성 OVA(SINFEKL) 펩티드를 제시하는 DC의 백분율. *P<0.05, 맨-휘트니.

도 19. IFN 유전자 치료법에 의한 백혈병 TME의 전사적 재프로그래밍.

a, b, 종양-함유(ALL) 마우스 vs. 대조군(CTRL) 마우스(a) 또는 IFN 유전자 치료법(b)으로 처리되거나 (IFN+ALL) 처리되지 않은(ALL) ALL 마우스로부터의 비장 대식세포에서 상향-조절(녹색) 또는 하향-조절(주황색)된 상이하게 발현된 유전자(abs. log₂FC>1.5, FDR<0.05)를 보여주는 볼케이노 플롯(왼쪽 패널). 막대 그래프(오른쪽 패널)는 나타낸 비교로부터 상향-조절(녹색) 또는 하향-조절(주황색) 유전자에서 풍부화된 GO 용어를 보여준다. **c, d**, ALL 마우스(c) 또는 IFN+ALL 마우스(d)에서 유도된 ISG로부터의 대식세포에서 탈조절된 유전자의 선택된 RNA-Seq 스냅샷. **e, f**, IFN 유전자 치료법으로 처리되거나 처리되지 않은 CTRL 또는 ALL 마우스의 비장으로부터 분류된 10,821 CD11b⁺ 세포로부터의 scRNA-Seq 데이터가 통합된 tSNE 플롯. 전사적으로 규정된 클러스터 및 관련 세포 유형(e)은 범례로 숫자 및 색상으로 나타낸다. 실험 조건을 기반으로 하여 착색된, 클러스터 1로부터의 세포(비-고전적 단핵구)에서 단일-세포 RNA-Seq 데이터(f). **g**, 지시된 비교시 클러스터 1(비-고전적 단핵구)로부터의 scRNA-Seq 데이터에서 상향-조절(녹색) 또는 하향-조절(주황색)된 상위 100개 유전자(log₂FC로

순위매김)에서 풍부화된 GO 용어. **h**, 지시된 조건에 있어서 선택된 유전자의 비-고전적 단핵구에서 평균 발현 (log 변환된 TPM 값, 세포 수에 대해 표준화됨). **i**, 하위-클러스터링 후 클러스터 1(비-고전적 단핵구)로부터의 scRNA-Seq 데이터의 최소 스패닝 트리(MST) 분석. 각 파이는 하위-클러스터를 나타내며, 이의 크기(세포 수) 및 조성(실험 조건)을 보여준다. 별표로 표시된 파이는 분산된 조성을 갖는 마이너 하위-클러스터를 나타낸다.

도 20. IFN 유전자 치료법은 임상 전달된 CAR19-형질도입된 T 세포의 활성을 증대시키며, 생존을 향상시킨다.

a, b, 실험 설계(**a**) 및 CTRL + CTRLT (n=5), IFN + CTRLT (n=5), CTRL + CART19 (n=7), IFN + CART19 (n=7)에서 시간 경과에 따른 ALL 성장(**b**, PB에서 절대수; 평균 \pm SEM). ****p<0.0001, 인자 실험에서 종단 데이터에 대한 비모수적 순위-기반 방법. **c**, (**b**)로부터의 마우스의 PB에서 CD8+NGFR+ CART19 세포에서 Lag3 발현의 백분율(평균 \pm SEM). 장기 생존 마우스는 녹색으로 도시된다. 각 선은 단일 마우스를 나타낸다. **d, e**, 실험 설계(**d**) 및 CTRL + CTRLT (n=7), IFN + CTRLT (n=6), CTRL + CART19 (n=7), IFN + CART19 (n=6), CTRL + iCART19 (n=7), IFN + iCART19 (n=6), IFN + CTRLT 후기(n=6, 후기 중개 시험), IFN + iCART19 후기 (n=6, 후기 중개 시험)에서 시간 경과에 따른 ALL 성장(**e**, PB에서 절대수; 평균 \pm SEM). ****p<0.0001, 인자 실험에서 종단 데이터에 대한 비모수적 순위-기반 방법. 통계 분석은 선택된 군에서 수행된다(보충 온라인 표 9 및 10 참조). **f**, (**b**)로부터의 마우스의 PB에서 CD8+NGFR+ CART19 세포 상의 Lag3 발현의 시간 경과에 따른 백분율(평균 \pm SEM). CTRL + CART19 및 CTRL + iCART19 마우스는 함께 플롯팅된다. 장기 생존 마우스는 녹색으로 도시된다. 각 선은 단일 마우스를 나타낸다. **g**, (**b** 및 **e**)로부터의 CART19 또는 iCART19 세포로 처리된 마우스의 생존 곡선. 도 20 으로부터의 CART19 및 iCART19로 처리된 CTRL 마우스. **b, e**는 (CTRL + i/CART19, n=21), IFN + CART19 (n=13), IFN + iCART19 (n=6), IFN + iCART19 후기(n=6)와 함께 플롯팅된다. ****p \leq 0.0001 멘텔-헨젤 시험, 본페로니에 의해 조절된 p-값.

도 21. 조작된 OVA-ALL은 어미 ALL과 비교하여 증가된 면역원성을 보여주었다.

ALL-주입된 CTRL(n=10, 아이소형 대조군 항체로 처리됨), IFN(n=10, 아이소형 대조군 항체로 처리됨), CTRL + α CTLA4(n=14) 및 IFN + α CTLA4(n=13) 마우스의 생존 곡선. **p<0.01, 멘텔-헨젤 테스트.

도 22. 비장 대식세포에서 대규모 RNA-Seq 분석.

a, ALL 대조군과 비교하여 IFN 유전자 치료법으로 처리된 ALL 마우스(IFN+ALL)로부터 대식세포에서 상향-조절(n=213) 또는 하향-조절(n=258)된 유전자의 지시된 조건에서의 발현 수준을 보여주는 박스 플롯. 번호는 지시된 비교에서 윌콕슨 부호 순위 테스트의 결과를 나타낸다. **b**, 지시된 조건으로부터 대식세포에서 RNA-Seq 데이터 세트 간의 상호관계의 히트맵. 번호는 계산된 결정 계수를 나타낸다(R^2). 샘플은 감속되지 않은 계층적 클러스터링을 기반으로 하여 정렬된다.

도 23. 비장 CD11b⁺ 세포로부터의 scRNA-Seq 데이터에서 세포 유형 식별.

a, 나타낸 유전자 시그니처(GS)의 단일-세포 발현 수준을 보여주는 tSNE 플롯. 비-고전적 단핵구: Cd300e, 1700011I03Rik, Tspan9, Dmpk, Fxyd2; 고전적 단핵구: Ly6c2, Tarm, Tfec, Psrcl, Mmp8; 호중구: Il1lf9, Pglyrp4, Nlrp12, Mrgpra2b, Mmp8, Ltf, Amer2, Stfa211, Gm5483; 수지상 세포: Adam23, Procr, Mab2113, Sucnr1, Fndc5, Rnf186, Flt3, Cd207, Adam11, Apo17c, Htr7; 대식세포: Vcam1, Mertk, Actn1, Fcna, Crip2, Spic, Kcna2, Gfra2, Stab2, Jup; NK 세포: Khdc1c, Khdc1b, Phactr3, Col8a2, Klra4, Adamts14, Gzma, Cma1, Gzmb, Clip4; T 세포: Cd3g, Cd3e, Bcl11b, Actn2, Camk4; B 세포: Pax5, Cd79a, Cd19, Chst3, Scn4a, Cacnali, Ly6d, Klhl14, Mzb1. 색도는 각 시그니처 내에서 유전자에 걸쳐 평균 발현(log 변환된 TPM)을 반영한다. **b**, 각 클러스터에 대한 상위 20개 분별 유전자의 발현(최도적 log 변환된 TPM 값)을 보여주는 히트맵. 각 클러스터에 대해 선택된 대표적인 유전자는 오른쪽에 도시된다. 각 클러스터에 대한 200개 이하의 단일 세포가 도시된다.

도 24. 비장 CD11b⁺ 세포에 대한 scRNA-Seq 데이터에서 백혈병 및 IFN-유도된 변화.

실험 조건을 기반으로 하여 착색된 클러스터 2-11로부터 scRNA-Seq 데이터를 보여주는 tSNE 플롯.

도 25. 비-고전적 단핵구로부터의 scRNA-Seq 데이터의 하위-클러스터링 분석 및 CD4 T 세포에 대한 유전자 발현 분석.

a, 3개이 대표적인 ALL-주입된 CTRL(CTRL + ALL), IFN 비반응자(IFN + ALL NR) 및 IFN 반응자(IFN + ALL R) 마우스로부터의 비장에서 OVA-ALL 세포(상단) 및 OVA-특이적 CD8 T 세포(하단)를 보여주는 유동 세포측정 플롯.

이러한 마우스로부터의 CD11b⁺ 세포는 scRNA-seq에 의해 분석하였다. **b**, 클러스터링(상단 플롯) 또는 실험 조건(하단 플롯)을 기반으로 하여 착색된 비-고전적 단핵구 집단 내의 세포의 하위-클러스터를 보여주는 tSNE 플롯. 순환된 서브-클러스터는 분산된 조성물과의 마이너 하위-클러스터를 나타내며, 도 19i에서 별표로 표시된 것에 상응한다.

도 26. IFN 유전자 치료법은 CART19 세포의 활성화를 증대시킨다.

a, 마우스 T 세포를 형질도입시키는데 사용된 양방향성 LV(BdLV)의 개략적 대표도 및 도 20b로부터의 마우스에서 융합 전에 형질도입되지 않은(UT) 및 형질도입된(CART19) CD4 및 CD8 T 세포에서 NGFR 발현의 백분율. **b**, 도 20b로부터의 마우스에서 융합 전에 나이트(CD62L+CD44⁺), 중심 메모리(CD62L+CD44⁺) 및 이펙터 메모리(CD62L-CD44⁺) UT 또는 CART19 T 세포의 백분율. **c**, PB에서 B 세포 무형성을 나타내는 도 20b로부터의 IFN + CART19 생존 마우스의 대표적인 유동 세포형광측정 플롯. **d**, CTRL + CART19(n=7) 및 IFN + CART19(n=7) 마우스로부터 CD8+NGFR⁺ CART19 세포 상에서 PD1 발현의 시간 경과에 따른 백분율(평균 ± SEM). 장기 생존 마우스는 녹색으로 도시된다. 각 선은 단일 마우스를 나타낸다. **e**, **f**, (**d**)로부터의 마우스의 CD4⁺ (**e**) 및 CD8⁺ (**f**) CART19 세포에 대한 시간 경과에 따른 NGFR 발현 수준(평균 형광 강도, MFI). 장기 생존 마우스는 녹색으로 도시된다. 각 선은 단일 마우스를 나타낸다.

도 27. IFN 유전자 치료법은 iCART19 세포의 활성화를 증대시킨다.

a, 도 20e로부터의 마우스에서 융합 전에 형질도입되지 않은(UT) 및 형질도입된(CART19) CD4 및 CD8 T 세포에서 NGFR 발현의 백분율. **b**, 도 20e로부터의 마우스에서 융합 전에 나이트(CD62L+CD44⁺), 중심 메모리(CD62L+CD44⁺) 및 이펙터 메모리(CD62L-CD44⁺) UT 또는 CART19 T 세포의 백분율. **c**, CTRL + CART19(n=7), IFN + CART19(n=6), CTRL + iCART19(n=7), IFN + iCART19(n=6) 및 IFN + iCART19 후기(n=6, 후기 중재 실험) 마우스로부터 CD4(상단) 및 CD8(하단) NGFR⁺ CART19 세포의 절대수(평균 ± SEM). 장기 생존 마우스는 녹색으로 도시된다. 각 선은 단일 마우스를 나타낸다. **d**, (**c**)로부터의 마우스의 CD4⁺(상단) 및 CD8⁺(하단) CART19 세포에 대한 시간 경과에 따른 NGFR 발현 수준(평균 형광 강도, MFI). 장기 생존 마우스는 녹색으로 도시된다. 각 선은 단일 마우스를 나타낸다.

도 28

각제물 NGFR 대조군(상단), Tig126/130a(중간) 및 Tta126/130a(하단)의 구조

도 29

백혈병 성장에 대한 IFN γ 전달 및 백혈병에 의해 유도된 미세환경의 평가.

도 30

Tie2 벡터 백본을 이용하여 백혈병 미세환경으로의 여러 면역자극 사이토킨의 동시적 전달의 평가.

도 31

체크포인트 억제제인 항-CTLA-4 및 항-LAG-3, 및 인돌아민-2,3-디옥시게나제(IDO) 억제제인 1-메틸-트립토판(1-MT)을 포함하는 다른 면역치료 전략과 IFN γ 의 유전자 치료법-기반 전달 간의 상승작용의 평가.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

세포

줄기 세포는 많은 세포 유형으로 분화될 수 있다. 모든 세포 유형으로 분화될 수 있는 세포는 분화전능성으로서 공지되어 있다. 포유동물에서, 단지 접합체(zygote) 및 초기 배아 세포만이 분화전능성이다. 전부는 아니나 대부분의 다세포 유기체에서 줄기 세포가 발견된다. 이들은 체세포 분열을 통해 이들 자신을 재생시키고 광범위한 특수화된 세포 유형으로 분화시키는 능력을 특징으로 한다. 2개의 광범위한 유형의 포유동물 줄기 세포는 배반포의 내세포 집단(inner cell mass)으로부터 분리된 배아 줄기 세포, 및 성체 조직에서 발견되는 성체 줄기 세포이다. 배아 발달시, 줄기 세포는 모든 특수화된 배아 조직으로 분화될 수 있다. 성체 유기체에서, 줄기 세포 및 전구세포는 몸체에 대한 수복 시스템으로서 작용하여 특수화된 세포를 보충하며, 또한, 혈액, 피부 또는 장 조직과 같은 재생 기관의 정상적 교체(turnover)를 유지한다.

조혈 줄기 세포(HSC)는 예를 들어, 말초혈, 골수 및 제대혈에서 발견될 수 있는 다능 줄기 세포이다. HSC는 임의의 혈액 세포 계열로 자가-재생하고 분화될 수 있다. 이들은 모든 조혈 조직(예컨대, 골수, 비장 및 흉선)에

서 전체 면역계, 및 적혈구 및 골수 계열을 재콜로니화할 수 있다. 이들은 모든 계열의 조혈 세포의 일생 생성을 제공한다.

[0152] 조혈전구세포(HPC)는 특정 유형의 세포로의 분화력을 갖는다. 그러나, 줄기 세포와 대조적으로, 이들은 이미 훨씬 더욱 특이적이며; 이들은 이들의 "표적" 세포로 분화하도록 강요된다. HSC와 HPC 간의 차이는 HSC가 무기한으로 복제될 수 있는 반면, HPC는 단지 제한된 횟수로만 분열될 수 있다는 점이다.

[0153] 일 구체예에서, 본 발명은 HSC 및 HPC를 포함하는 세포의 혼합된 집단(예를 들어, HSPC 집단)을 사용할 수 있다.

[0154] 분화된 세포는 줄기 세포 또는 전구세포와 비교하여 더욱 특수화된 세포이다. 분화는 유기체가 단일 접합체로부터 조직과 세포 유형의 복합 시스템으로 변화될 때 다세포 유기체의 발달 동안 발생한다. 분화는 또한 성체에서 공통된 과정이다: 성체 줄기 세포는 조직 수복 및 정상 세포 교체 동안 분열되며 완전하게 분화된 도터 세포를 생성한다. 분화는 세포의 크기, 형상, 막 전위, 대사 활성 및 신호에 대한 반응성을 극적으로 변화시킨다. 이러한 변화는 주로 유전자 발현에서 고도로 제어된 변형으로 인한 것이다. 다시 말해서, 분화된 세포는 특정 유전자의 활성화 및 탈활성화를 포함하는 발달 과정으로 인해 특이적 구조를 가지며 특정 기능을 수행하는 세포이다. 여기에서, 분화된 세포는 조혈 계통 예컨대, 단핵구, 대식세포, 호중구, 호염구, 호산구, 적혈구, 거핵구/혈소판, 수지상 세포, T-세포, B-세포 및 NK-세포의 분화된 세포를 포함한다. 예를 들어, 조혈 계통의 분화된 세포는 미분화된 세포(HSC 및 HPC)에서 발현되지 않거나 더 적은 정도로 발현되는 세포 표면 분자의 검출에 의해 HSC 및 HPC와 구별될 수 있다. 적합한 인간 계통 마커의 예로는 CD33, CD13, CD14, CD15(골수), CD19, CD20, CD22, CD79a (B), CD36, CD71, CD235a(적혈구), CD2, CD3, CD4, CD8(T), CD56(NK)을 포함한다.

[0155] 세포 소스

[0156] 일 구체예에서, 본 발명에 사용되는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 조직 샘플로부터 취득된다. 예를 들어, HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 성체 및 태아 말초혈, 체대혈, 골수, 간 또는 비장으로부터 취득될 수 있다. 바람직하게는, 이들 세포는 말초혈 또는 골수로부터 취득된다. 이들은 성장 인자 처리에 의해 생체내에서 세포의 유동화 후 취득될 수 있다.

[0157] HSC 또는 HPC의 유동화는 예를 들어, G-CSF, 플렉사사포르(plerixaphor) 또는 이들의 조합물을 사용하여 수행될 수 있다. 기타 제제, 예컨대, NSAID, CXCR2 리간드(Grobeta) 및 디펩티딜 펩티다제 억제제는 또한 유동화제로서 유용할 수 있다.

[0158] 줄기 세포 성장 인자 GM-CSF 및 G-CSF의 유용성을 이용하여, 대부분의 조혈모세포 이식 절차는 골수로부터 수집된 것보다는, 이제 말초혈로부터 수집된 줄기 세포를 사용하여 수행된다. 말초혈 줄기 세포 수집은 더 큰 이식편을 제공하며, 도너는 전신 마취 처리되어 이식편을 수집할 필요가 없으며, 생착 시간이 더 짧으며, 더 낮은 장기 재발률을 제공할 수 있다.

[0159] 골수는 표준 흡입 방법(정상-상태 또는 유동화 후)에 의해 또는 차세대 수확 도구를 사용함으로써 수집될 수 있다.

[0160] 또한, HSC는 또한, 유도된 만능성 줄기 세포로부터 유래될 수 있다.

[0161] HSC 특징

[0162] HSC는 전형적으로 유동 세포측정 절차에 의해 낮은 전방 산란 및 측면 산란 프로파일이다. 일부는 미토콘드리아 활성의 측정을 허용하는 로다민 라벨링에 의해 입증된 바와 같이 대사적으로 정지되어 있다. HSC는 특정 세포 표면 마커 예컨대, CD34, CD45, CD133, CD90 및 CD49f를 포함할 수 있다. 이들은 또한, CD38 및 CD45RA 세포 표면 마커의 발현이 결핍된 세포로서 규정될 수 있다. 그러나, 이들 마커 중 일부의 발현은 HSC의 발달 단계 및 조직-특이적 환경에 의존적이다. "측면 집단 세포"로 불리는 일부 HSC는 유동 세포측정에 의해 검출되는 바와 같이 Hoechst 33342 염료를 배제한다. 따라서, HSC는 이들의 식별 및 분리를 허용하는 묘사적 특징을 갖는다.

[0163] 음성 마커

[0164] CD38은 인간 HSC에 대한 가장 잘 확립되고 유용한 단일 음성 마커이다.

[0165] 인간 HSC는 또한, 계통 마커 예컨대, CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD24, CD36, CD56, CD66b, CD271 및 CD45RA에 대해 음성일 수 있다. 그러나, 이들 마커는 HSC 풍부화를 위해 조합되어 사용되어야 할 수 있다.

- [0166] 음성 마커에 있어서, 이는 인간 HSC가 이들 마커의 발현이 결핍되는 것으로 이해해야 한다.
- [0167] 양성 마커
- [0168] CD34 및 CD133은 HSC에 대한 가장 유용한 양성 마커이다.
- [0169] 일부 HSC는 또한, CD90, CD49f 및 CD93과 같은 계열 마커에 대해 양성이다. 그러나, 이들 마커는 HSC 풍부화를 위해 조합되어 사용되어야 할 수 있다.
- [0170] 양성 마커에 있어서, 이는 인간 HSC가 이들 마커를 발현하는 것으로 이해해야 한다.
- [0171] 따라서, 세포의 치료학적 집단은 $CD34^{+}CD38^{-}$ 일 수 있다. 추가의 분리가 예를 들어, $CD34^{+}CD38^{-}CD45RA^{-}CD90^{+}CD49f^{+}$ 세포를 수득하기 위해 수행될 수 있다.
- [0172] miRNA 발현
- [0173] 세포에서 miRNA mir-126 및 mir-130a의 발현은 세포가 HSC 또는 HPC임을 나타낸다. 더욱 특히, mir-126 발현은 세포가 세포가 원시적 HPC임을 나타낸다. Mir-130a 발현은 세포가 더욱 원시적인 HPC임을 나타낸다.
- [0174] **사이토킨**
- [0175] 사이토킨은 세포 시그널링에서 중요한 역할을 담당하는 대략 5-20kDa 크기의 작은 단백질 카테고리이다. 사이토킨은 인터페론, 케모킨, 인터루킨, 림포킨 및 종양 괴사 인자를 포함할 수 있으며, 대식세포, B 림프구, T 림프구, 비만 세포, 내피 세포 및 섬유모세포를 포함하는 광범위한 세포에 의해 생성된다.
- [0176] 사이토킨은 수용체를 통하여 작용하며, 면역계에서 특히 중요한 역할을 담당하며, 혈액성 및 세포-기반 면역 반응 사이의 균형을 조절한다.
- [0177] 사이토킨은 인터페론(IFN), IL-12 및 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF)를 포함한다.
- [0178] 인터페론(IFN)은 병원체(예를 들어, 바이러스, 박테리아 및 기생충) 및 종양 세포의 존재에 대해 반응하는 숙주 세포에 의해 이루어 지는 시그널링 단백질의 군이다.
- [0179] IFN은 전형적으로 3개의 부류로 나누어진다: 타입 I, 타입 II 및 타입 III.
- [0180] 타입 I 인터페론(IFN)
- [0181] 타입 I 인터페론(IFN)은 면역 세포(백혈구, 예를 들어, NK 세포, B-세포, T-세포, 대식세포 등)에 의해 생성된 부류의 사이토킨이다. 타입 I IFN은 다면발현성 사이토킨으로서 불리는데, 이들이 다중 세포 유형에 대해 특이적 IFN 효과를 가질 수 있기 때문이다.
- [0182] 일 구체예에서, 타입 I IFN은 인터페론-알파(IFN α)이다. IFN α 는 또한, IFN-알파, IFN α , INF α -1/13으로서 공지되어 있다.
- [0183] 예시적인 IFN α 아미노산 서열은 다음과 같다:
- MALTFALLVALLVLVLSCKSSCSVGCGLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFP
QEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLENDLEACVIQ
GVGVTTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRS
KE
- [0184] (SEQ ID NO: 6)
- [0185] 일 구체예에서, 타입 I IFN을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO:6의 아미노산 서열을 포함하는 IFN α 단백질을 인코딩한다. 일 구체예에서, 타입 I IFN을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO:6과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 IFN α 단백질을 인코딩하며, SEQ ID NO:6의 아미노산 서열을 갖는 IFN α 단백질의 기능이 실질적으로 유지된다.

[0186] IFN α 를 인코딩하는 예시적인 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:

```
ATGGCCTTGACCTTTGCTTTACTGGTGGCCCTCCTGGTGCTCAGCTGCAAGTCAAGCTGCTC
TGTTGGGCTGTGATCTGCCTCAAACCCACAGCCTGGGTAGCAGGAGGACCTTGATGCTCCTGG
CACAGATGAGGAGAATCTCTCTTTTTCTCTGCTTGAAGGACAGACATGACTTTGGATTTCCC
CAGGAGGAGTTTGGCAACCAGTTCCAAAAGGCTGAAACCATCCCTGTCTCCATGAGATGAT
CCAGCAGATCTTCAATCTCTTCAGCACAAAGGACTCATCTGCTGCTTGGGATGAGACCCCTCC
TAGACAAATTCTACACTGAACTCTACCAGCAGCTGAATGACCTGGAAGCCTGTGTGATACAG
```

[0187]

```
GGGGTGGGGGTGACAGAGACTCCCCGTGATGAAGGAGGACTCCATTCTGGCTGTGAGGAAATA
CTTCCAAAGAATCACTCTCTATCTGAAAGAGAAGAAATACAGCCCTTGTGCCTGGGAGGTTG
TCAGAGCAGAAATCATGAGATCTTTTTCTTTGTCAACAACTTGCAAGAAAGTTTAAGAAGT
AAGGAATGA
```

[0188] (SEQ ID NO: 7)

[0189] 일 구체예에서, IFN α 를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO: 7의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일 구체예에서, IFN α 를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO:7과 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%의 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 상기 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO:6의 단백질과 실질적으로 동일한 기능을 갖는 단백질을 인코딩한다.

[0190] 일 구체예에서, 타입 1 IFN은 인터페론-베타(IFN β ; IFN β)이다.

[0191] 예시적인 IFN β 아미노산 서열은 다음과 같다:

```
MTNKCLLQIALLLCFSTTALSMSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFD
IP EEIKQLQQFKEDAAALTIYMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLK
TVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINR
LTGYLRN
```

[0192] (SEQ ID NO: 8)

[0193] 일 구체예에서, 타입 I IFN을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO:8의 아미노산 서열을 포함하는 IFN β 단백질을 인코딩한다. 일 구체예에서, 타입 I IFN을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO:8과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 IFN β 단백질을 인코딩하며, SEQ ID NO:8의 아미노산 서열을 갖는 IFN β 단백질의 기능이 실질적으로 유지된다.

[0194] IFN β 를 인코딩하는 예시적인 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:

```
gaattctcagggtcgtttgcttttcttttgcttttctcccaagtccttgttttacaatttgctt
tagtcattcactgaaactttaaaaaacattagaaaacctcacagtttgtaaactctttttc
cctatttatatatatcataagataggagcttaaaataaagagtttttagaaaactactaaaatg
taaatagacataggaaaactgaaagggagaaagtgaagtgaggaaattcctctgaatagaga
gaggaccatctcatataaataggccataccacggagaaaggacattctaactgcaacct
```

[0195]

ttcgaagcctttgctctggcacaacaggtagtaggcgacactgttcgtgttggtcaacatg
 accaacaagtgtctcctccaaattgctctcctgttggtgcttctccactacagctctttcc
 atgagctacaacttgcttggttccctacaaagaagcagcaattttcagtgtcagaagctc
 ctgtggcaattgaatgggaggcttgaatactgcctcaaggacaggatgaactttgacatc
 cctgaggagattaagcagctgcagcagttccagaaggaggacgccgcattgaccatctat
 gagatgctccagaacatctttgctattttcagacaagattcatctagcactggctggaat
 gagactattgttgagaacctcctggctaattgtctatcatcagataaaccatctgaagaca
 gtccctggaagaaaaactggagaaagaagatttcaccaggggaaaactcatgagcagctcg
 cacctgaaaagatattatgggaggattctgcattacctgaaggccaaggagtacagtcac
 tgtgcctggaccatagtcagagtggaaatcctaaggaaacttttacttcattaacagactt
 acaggttacctccgaaactgaagatctcctagcctgtgcctctgggactggacaattgct
 tcaagcattcttcaaccagcagatgctgtttaagtgactgatggctaattgactgcatat
 gaaaggacactagaagattttgaaatttttattaaattatgagttatttttattttattta
 aattttatttttgaaaataaattatttttgggtgcaaaagtcaacatggcagttttaattt
 cgatttgatttatataaccatccatattataaaattgccaaagtacctattagttgttctt
 tttaaaatatacctgcaaagtagtatactttctggcccctgcctttaaggaattttaa
 tcaagaaagccatgatggaatatataaggtaagagacaataaggggacctgaaccttatg
 ggggaataaatatggcatgaactgctgtgggattaaaagagaaaaggaaagctggaggggt
 ctggaactaaacctgggggtcccatctcctactgtgtgttccagattctctcatcata
 aagttagaattgagctggccatcaggaatagccagaggaatatgtcagcttttgtgttct
 ccctaaccttccccagttatttgggggatcactttgctcctcgaaagatttttaataat
 tatgtgccccccaccatccctgcaagcttaagggtgagaagtcccatttacttccatgac
 actattaagcagcaatctctttattctgctcatcatgggacagccaagatgtgtgggtat
 cttaggggagctgtgggtccctgtctgctggcatggcacaggcatcagaggaagaagaac
 ctttttataccctagccatctgggttagttttctccctagtttttcaaaaaactaagcctg
 cttccagtccccactgccttggttcatacagaattc

(SEQ ID NO: 9)

[0196]

[0197]

일 구체예에서, IFN β 를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 SEQ ID NO: 9의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일 구체예에서, IFN β 를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 SEQ ID NO:9와 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%의 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 상기 뉴클레오타이드 서열은 SEQ ID NO:8의 IFN β 단백질과 실질적으로 동일한 기능을 갖는 단백질을 인코딩한다.

[0198]

일 구체예에서, 타입 I IFN을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 코돈 최적화된다.

[0199]

타입 II 인터페론 - 인터페론- γ (IFN γ)

[0200]

면역 인터페론으로서 또한 공지된 인터페론- γ (IFN γ)은 인터루킨-12에 의해 활성화되고, 면역 반응을 조절하고 활성화시키는데 중요한 역할을 한다.

[0201]

예시적인 IFN γ 아미노산 서열은 다음과 같다:

MKYTSYILAFQLCIVLGLSLGCYCDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEE
 SDRKIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVT
 DLNVQRKAIHELIIQVMAELSPAAKTGKRKRSQMLFRGRASQ

[0202]

(SEQ ID NO: 12)

[0203]

SEQ ID NO: 12의 아미노산 1-23은 신호 펩티드로서 작용하고 분해되어 SEQ ID NO: 12의 아미노산 24-161로 대 표되는 성숙한 단백질을 형성할 수 있다. IFN γ 의 예시적인 성숙 아미노산 서열은 다음과 같다:

QDPYVKEAENLKKYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKNFKD
DQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPA
KTGKRKRSQMLFRGRRASQ

(SEQ ID NO: 13)

[0204]

[0205]

일 구체예에서, IFN γ 을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 SEQ ID NO:12 또는 13의 아미노산 서열을 포함하는 IFN γ 단백질을 인코딩한다. 일 구체예에서, IFN γ 을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 SEQ ID NO:12 또는 13과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 IFN γ 단백질을 인코딩하며, SEQ ID NO:12 또는 13의 아미노산 서열을 갖는 IFN γ 단백질의 기능이 실질적으로 유지된다.

[0206]

추가예 예시적인 IFN γ 아미노산 서열은 다음과 같다:

MNATHCILALQLFLMAVSGCYCHGTVIESLESNNYFNSSGIDVEEKSLFLDIWRNWQKDGD
MKILQSQIISFYLRLEVLKDNQAISSNISVIESHLITTFNSNSKAKKDAFMSIAKFEVNNP
QVQRQAFNELIRVHQLLPESLSLRKRKRSRC

[0207]

(SEQ ID NO: 17)

[0208]

일 구체예에서, IFN γ 을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 SEQ ID NO:17의 아미노산 서열을 포함하는 IFN γ 단백질을 인코딩한다. 일 구체예에서, IFN γ 을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 SEQ ID NO:17과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 IFN γ 단백질을 인코딩하며, SEQ ID NO:17의 아미노산 서열을 갖는 IFN γ 단백질의 기능이 실질적으로 유지된다.

[0209]

IFN γ 를 인코딩하는 예시적인 뉴클레오타이드 서열은 다음과 같다:

ATGAAATATACAAGTTATATCTTGGCTTTTCAGCTCTGCATCGTTTTGGGTTCTCTTGGCTG
TTACTGCCAGGACCCATATGTAAGAAGCAGAAAACCTTAAGAAATATTTTAATGCAGGTC
ATTCAGATGTAGCGGATAATGGAACCTTTTTCTTAGGCATTTTGAAGAATTGGAAAGAGGAG
AGTGACAGAAAAATAATGCAGAGCCAAATTGTCTCCTTTTACTTCAAACCTTTTAAAAACTT
TAAAGATGACCAGAGCATCCAAAAGAGTGTGGAGACCATCAAGGAAGACATGAATGTCAAGT
TTTTCAATAGCAACAAAAAGAAACGAGATGACTTCGAAAAGCTGACTAATTATTCGGTAACT
GACTTGAATGTCCAACGCAAAGCAATACATGAACATCAAGTGATGGCTGAACGTGTCGCC
AGCAGCTAAACAGGGAAGCGAAAAAGGAGTCAGATGCTGTTTCGAGGTCGAAGAGCATCCC
AGTAA

[0210]

(SEQ ID NO: 14)

[0211]

IFN γ 의 성숙 형태를 인코딩하는 예시적인 뉴클레오타이드 서열은 다음과 같다:

CAGGACCCATATGTAAGAAGCAGAAAACCTTAAGAAATATTTTAATGCAGGTCATTCAGA
TGTAGCGGATAATGGAACCTTTTTCTTAGGCATTTTGAAGAATTGGAAAGAGGAGAGTGACA
GAAAAATAATGCAGAGCCAAATTGTCTCCTTTTACTTCAAACCTTTTAAAAACTTTAAAGAT
GACCAGAGCATCCAAAAGAGTGTGGAGACCATCAAGGAAGACATGAATGTCAAGTTTTTCAA
TAGCAACAAAAAGAAACGAGATGACTTCGAAAAGCTGACTAATTATTCGGTAACTGACTTGA
ATGTCCAACGCAAAGCAATACATGAACATCAAGTGATGGCTGAACGTGTCGCCAGCAGCT
AAAAACAGGGAAGCGAAAAAGGAGTCAGATGCTGTTTCGAGGT

[0212]

(SEQ ID NO: 15)

[0213] IFN γ 를 인코딩하는 추가적인 예시적인 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:

```
ATGAACGCTACACACTGCATCTTGGCTTTGCAGCTCTTCCTCATGGCTGTTTCTGGCTGTTA
CTGCCACGGCACAGTCATTGAAAGCCTAGAAAGTCTGAATAACTATTTTAACTCAAGTGGCA
TAGATGTGGAAGAAAAAGAGTCTCTTCTTGGATATCTGGAGGAAGTGGCAAAAGGATGGTGAC
ATGAAAAATCCTGCAGAGCCAGATTATCTCTTTCTACCTCAGACTCTTTGAAGTCTTGAAAGA
CAATCAGGCCATCAGCAACAACATAAGCGTCATTGAATCACACCTGATTACTACCTTCTTCA
GCAACAGCAAGGCGAAAAAGGATGCATTATCATGAGTATTGCCAAGTTTGAGGTCAACAACCCA
CAGGTCCAGCGCCAAGCATTCAATGAGCTCATCCGAGTGGTCCACCAGCTGTTGCCGGAATC
CAGCCTCAGGAAGCGGAAAAAGGAGTCGCTGCTGA
```

(SEQ ID NO: 16)

[0214]

[0215] 일 구체예에서, IFN γ 를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO: 14, 15 또는 16의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일 구체예에서, IFN γ 를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO: 14, 15 또는 16과 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%의 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 상기 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO: 12 또는 13의 단백질과 실질적으로 동일한 기능을 갖는 단백질을 인코딩한다.

[0216] IFN γ 를 인코딩하는 추가적인 예시적인 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:

```
ATGAACGCTACACACTGCATCTTGGCTTTGCAGCTCTTCCTCATGGCTGTTTCTGGCTGTTA
CTGCCACGGCACAGTCATTGAAAGCCTAGAAAGTCTGAATAACTATTTTAACTCAAGTGGCA
TAGATGTGGAAGAAAAAGAGTCTCTTCTTGGATATCTGGAGGAAGTGGCAAAAGGATGGTGAC
ATGAAAAATCCTGCAGAGCCAGATTATCTCTTTCTACCTCAGACTCTTTGAAGTCTTGAAAGA
CAATCAGGCCATCAGCAACAACATAAGCGTCATTGAATCACACCTGATTACTACCTTCTTCA
GCAACAGCAAGGCGAAAAAGGATGCATTATCATGAGTATTGCCAAGTTTGAGGTCAACAACCCA
CAGGTCCAGCGCCAAGCATTCAATGAGCTCATCCGAGTGGTCCACCAGCTGTTGCCGGAATC
CAGCCTCAGGAAGCGGAAAAAGGAGTCGCTGCTGA
```

(SEQ ID NO: 18)

[0217]

[0218] 일 구체예에서, IFN γ 를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO: 18의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일 구체예에서, IFN γ 를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO: 18과 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%의 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 상기 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO: 17의 단백질과 실질적으로 동일한 기능을 갖는 단백질을 인코딩한다.

[0219] 일 구체예에서, IFN γ 을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 코돈 최적화된다.

[0220] 종양 괴사 인자 α (TNF α)

[0221] 종양 괴사 인자 α (TNF α)는 전신 염증에 관여하는 사이토킨이다. 이의 주된 역할은 면역 세포의 조절에 있다.

[0222] TNF α 는 활성화된 대식세포에 의해 대부분 생성되지만, 다른 세포 유형, 예컨대, CD4+ 림프구, NK 세포, 호중구, 비만 세포, 호산구 및 뉴론에 의해 또한 생성된다.

[0223] 예시적인 TNF α 아미노산 서열은 다음과 같다:

```
MSTESMIRDVELAEELPQKMGGFQNSRRCLCLSLFSFLLVAGATTFLCLLNFGVIGVQRDE
KFPNGLPLISSMAQTLTLRSSSQNSSDKPVAHVVANHQVEEQLEWLSQRANALLANGMDLKD
NQLVVPADGLYLVSQVLFKQGCPDYVLLTHTVSRFAISYQEKVNLLSAVKSPCPKDTPEG
AELKPWYEPYILGGVFQLEKGDQLSAEVNLPKYLDFAESGQVYFGVIAL
```

(SEQ ID NO: 19)

[0224]

[0225] 일 구체예에서, TNF α 을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO: 19의 아미노산 서열을 포함하는 TNF α 단백

질을 인코딩한다. 일 구체예에서, TNF α 을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO:19와 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 TNF α 단백질을 인코딩하며, SEQ ID NO:19의 아미노산 서열을 갖는 TNF α 단백질의 기능은 실질적으로 유지된다.

[0226] TNF α 를 인코딩하는 예시적인 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:

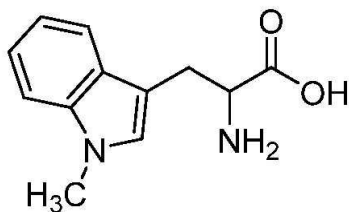
```
ATGAGCACAGAAAGCATGATCCGCGACGTGGAAGTGGCAGAAGAGGCACTCCCCAAAAGAT
GGGGGGCTTCCAGAACTCCAGGCGGTGCCTATGTCTCAGCCTCTTCTCATTCTGCTTGTGG
CAGGGGCCACACGCTCTTCTGTCTACTGAACTTCGGGGTGATCGGTCCCCAAAGGGATGAG
AAGTTCCCAAATGGCCTCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCCAGACCCTCACACTCAGATCATC
TTCTCAAAATTCGAGTGACAAGCCTGTAGCCACGTCGTAGCAAACCACCAAGTGGAGGAGC
AGCTGGAGTGGCTGAGCCAGCGCGCCAACGCCCTCCTGGCCAACGGCATGGATCTCAAAGAC
AACCAACTAGTGGTGCCAGCCGATGGGTTGTACCTTGCTACTCCCAGGTTCTCTTCAAGGG
ACAAGGCTGCCCCGACTACGTGCTCCTCACCCACACCGTCAGCCGATTGTGCTATCTCATACC
AGGAGAAAAGTCAACCTCCTCTCTGCCGTCAAGAGCCCCCTGCCCAAGGACACCCCTGAGGGG
GCTGAGCTCAAACCTGGTATGAGCCCATATACCTGGGAGGAGTCTTCCAGCTGGAGAAGGG
GGACCAACTCAGCGCTGAGGTCAATCTGCCCAAGTACTTAGACTTTGCGGAGTCCGGGCAGG
TCTACTTTGGAGTCATTGCTCTG
```

[0227] (SEQ ID NO: 20)

[0228] 일 구체예에서, TNF α 를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO: 20의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일 구체예에서, TNF α 를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO:20과 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%의 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 상기 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO:19의 단백질과 실질적으로 동일한 기능을 갖는 단백질을 인코딩한다.

[0229] 1-메틸-트립토판(1-MT)

[0230] 1-메틸트립토판(1-MT)은 트립토판 이화작용 효소 인돌아민 2,3-디옥시게나제(IDO)의 억제제이며, 다음과 같은 구조를 갖는다:



[0231]

[0232] 본 발명의 1-MT는 염 또는 에스테르, 특히, 약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르로서 존재할 수 있다.

[0233] 일 구체예에서, 1-ML은 D-1-MT이다. 일 구체예에서, 1-ML은 L-1-MT이다. 일 구체예에서, 1-ML은 라세미체 혼합물이다.

[0234] 본 발명의 제제의 약학적으로 허용되는 염은 이의 적합한 산 부가 또는 염기 염을 포함한다. 적합한 약학적 염의 고찰은 문헌[Berge et al. (1977) J Pharm Sci 66: 1-19]에서 찾아볼 수 있다.

[0235] 본 발명은 또한, 적절한 경우, 제제의 모든 거울상이성질체 및 호변이성질체를 포함한다. 당업자는 광학 특성 (예를 들어, 하나 이상의 키랄 탄소 원자) 또는 호변이성질체 특징을 갖는 화합물을 인식할 것이다. 상응하는 거울상이성질체 및/또는 호변이성질체는 당업계에 공지된 방법에 의해 분리/제조될 수 있다.

[0236] **마이크로 RNA 표적 서열**

[0237] 마이크로RNA 유전자는 Y 크로모솜을 제외하고 모든 인간 크로모솜에 걸쳐 흩어져 있다. 이들은 게놈의 비-코딩 영역 또는 단백질-코딩 유전자의 인트론 내에 위치할 수 있다. miRNA의 대략 50%는 폴리시스트론 일차 전사물질로서 전사되는 클러스터에 나타난다. 단백질-코딩 유전자와 유사하게, miRNA는 폴리머라제-II 프로모터로부터 일

반적으로 전사되며, 소위 일차 miRNA 전사물(pri-miRNA)를 생성시킨다. 그 후, 이러한 pri-miRNA는 RNase 타입 III 패밀리에, Drosha 또는 Dicer에 속하는 두 효소에 의해 수행되는 일련의 엔도뉴클레오티드 절단 단계를 통해 처리된다. pri-miRNA로부터, mirna 전구체(pre-mirna)로 불리는 약 60개 뉴클레오티드 길이의 줄기 루프는 Drosha 및 DiGeorge 증후군 임계 영역 유전자(DGCR8)로 구성된 특정 핵 복합체에 의해 절제되며, 이는 일차 줄기 루프의 기저 부근에 두 가닥 모두를 자르고, 5' 포스페이트 및 2bp 길이 3' 오버행을 남긴다. 그 후, pre-mirna는 RNA-GTP 및 Exportin에 의해 핵으로부터 세포질로 활성적으로 이송된다. 그 후, Dicer는 Drosha 절단에 의해 규정되지 않은 줄기 루프의 말단에서 이중 가닥 절단을 수행하여, 19-24 bp 듀플렉스를 생성시키며, 이는 성숙 miRNA 및 듀플렉스의 반대 가닥으로 구성되며, miRNA*로 불린다. 열역학 비대칭 규칙에 따라, 듀플렉스의 단지 하나의 가닥이 RNA-유도된 침묵 복합체(RISC)로 선택적으로 로딩되며, 성숙 마이크로RNA로서 축적된다. 이러한 가닥은 일반적으로, siRNA 듀플렉스의 각 말단의 5' 말단으로 도입되는 단일-뉴클레오티드 미스매치에 의해 입증된 바와 같이 5' 말단이 이의 상보물에 덜 단단히 페어링되는 가닥이다. 그러나, 유사한 정도의 듀플렉스 가닥 둘 모두의 축적을 지지하는 일부 miRNA가 존재한다.

- [0238] 마이크로RNA는 실험적 유전자 녹다운에 널리 사용되는 작은 간섭 RNA(siRNA)와 매우 많이 유사한 RNAi를 촉발시킨다. miRNA와 siRNA 간의 주요 차이는 이들의 생물발생이다. 일단 RISC에 로딩되면, 작은 RNA 분자의 가이드 가닥은 단백질-코딩 유전자의 3' 비번역된 영역(3'UTR)에서 우선적으로 발견되는 mRNA 표적 서열과 상호작용한다. 소위 씨드 서열로 불리는 miRNA의 5' 말단으로부터 카운트하여 2-8개 뉴클레오티드는 RNAi를 촉발시키는데 필수적임이 입증되었다. 전체 가이드 가닥 서열이 mRNA 표적에 완벽하게 상보적인 경우, 일반적으로 siRNA 및 식물 miRNA의 경우에서와 같이, mRNA는 작은 RNA 듀플렉스의 소위 "슬라이서"로도 불리는 Argonaute(Ago) 단백질의 관여에 의해 RNA-유도된 침묵 복합체(RISC)로 엔도뉴클레오티드 절단된다. DGRC(DiGeorge 증후군 결정 영역 유전자 8) 및 TRBP(TAR(HIV) RNA 결합 단백질 2)는 각각 Drosha 및 Dicer RNase III 효소에 의해 성숙 miRNA 생물발생을 촉진하는 이중-가닥 RNA-결합 단백질이다. miRNA 듀플렉스의 가이드 가닥은 이펙터 복합체 RISC에 혼입되는데, 이는 불완전한 염기-페어링을 통해 특이적 표적을 인식하고, 전사후 유전자 침묵을 유도한다. 이러한 조절 모드에는 몇 가지 메커니즘이 제안되었다: miRNA는 번역 개시의 억제를 유도하거나, 탈아데닐화에 의한 분해를 위한 표적 mRNA를 표시하거나 표적을 세포질 P-바디 내로 격리될 수 있다.
- [0239] 다른 한편으로, 단지 씨드가 표적 mRNA에 완벽하게 상보적이거나, 나머지 염기는 불완전한 페어링을 보이는 경우, RNAi는 다중 메커니즘을 통해 작용하여 번역 억제로 이어진다. 진핵생물 mRNA 분해는 주로 mRNA의 3' 말단에서 폴리A 테일의 쇼트닝, 및 5' 말단에서 탈-캡핑 이어서 5'-3' 엑소뉴클레아제 분해 및 별개의 세포질 영역, mRNA 붕괴 경로 성분 풍부화된 소위 P-바디에서 mRNA의 축적을 통해 발생한다.
- [0240] 본 발명에 따르면, 사이토킨, 예컨대, 타입 1 IFN의 발현은 상응하는 miRNA 표적 서열을 사용하여 내인성 miRNA에 의해 조절된다. 이러한 방법을 사용하여, 세포에서 내생적으로 발현되는 miRNA는 벡터 또는 폴리뉴클레오티드에 위치하는 이의 상응하는 miRNA 표적 서열에 결합함으로써 그 세포에서 트랜스진 발현을 방지하거나 감소시킨다. 이는 조직 특이적 프로모터에 의존적인 것에 비해 많은 이점을 가지며, 특히, 조직 특이적 프로모터는 비-표적 세포의 분획에서 불완전 발현(leaky expression)과 종종 관련이 있다는 점이다.
- [0241] 본 발명에 유용한 miRNA 표적 서열은 HSC에서 발현되나, 분화된 세포, 예를 들어, 골수 세포(중양-침윤 대식세포 포함)에서 광범위하게 발현되지 않는 miRNA 표적 서열이다. 이는 IFN α 발현이 HSC에 독성인 것으로 알려져 있기 때문에 특히 중요하다.
- [0242] 본 발명에 사용하기 위한 miRNA 표적 서열의 바람직한 예는 mir-130a 및 mir-126이다.
- [0243] mir-126 miRNA의 mir-126 표적 서열로의 결합은 적혈구 계통의 세포 및 HSC에서 가장 효과적으로 발현을 차단한다. 따라서, mir-126 표적 서열은 골수 및 림프 계열에서 활발한 트랜스진 발현에 의존적인 유전자 치료법 적용에 특히 적합하다.
- [0244] mir-126 miRNA는 하기 뉴클레오티드 서열을 가질 수 있다: UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG (SEQ ID NO: 1).
- [0245] 일 구체예에서, mir-126 표적 서열은 GCATTATTACTACGGTACGA (SEQ ID NO:2)의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0246] 일 구체예에서, 본 발명에 사용되는 벡터 또는 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO:2의 뉴클레오티드 서열의 적어도 하나, 적어도 2개, 또는 적어도 3개의 복사체를 포함한다. 바람직한 구체예에서, mir-126 표적 서열은 SEQ ID NO: 2의 뉴클레오티드 서열의 2개 복사체를 포함한다.
- [0247] 일 구체예에서, 본 발명에 사용되는 HSC, HPC, 골수/단핵구-수입전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 SEQ ID NO:2

의 뉴클레오티드 서열의 적어도 하나, 적어도 2개, 또는 적어도 3개의 복사체를 포함한다. 바람직한 구체예에서, mir-126 표적 서열은 SEQ ID NO: 2의 뉴클레오티드 서열의 2개 복사체를 포함한다.

[0248] 복사체 mir-126 표적 서열은 스페이서 서열에 의해 분리될 수 있다. 스페이서 서열은 적어도 하나, 적어도 2개, 적어도 3개 또는 적어도 4개 또는 적어도 5개의 뉴클레오티드 염기를 포함할 수 있다.

[0249] mir-130a miRNA의 mir-130a 표적 서열로의 결합은 적혈구 계통의 세포 및 HSC에서 가장 효과적으로 발현을 차단한다(miR-126과 유사). 따라서, miR-130a 표적 서열은 골수 및 림프 계통에서 활발한 트랜스진 발현에 의존적인 유전자 치료법 적용에 특히 적합하다.

[0250] mir-130a miRNA는 하기 뉴클레오티드 서열을 가질 수 있다: CAGUGCAAUGUAAAAGGGCAU (SEQ ID NO: 3).

[0251] 일 구체예에서, mir-130a 표적 서열은 ATGCCCTTTTAACATTGCACTG (SEQ ID NO: 4)의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0252] 일 구체예에서, mir-130a 표적 서열은 SEQ ID NO:4의 뉴클레오티드 서열의 적어도 하나, 적어도 2개, 또는 적어도 3개의 복사체를 포함한다. 바람직한 구체예에서, mir-130a 표적 서열은 SEQ ID NO: 4의 뉴클레오티드 서열의 2개 복사체를 포함한다.

[0253] 복사체 mir-130a 표적 서열은 스페이서 서열에 의해 분리될 수 있다. 스페이서 서열은 적어도 하나, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개 또는 적어도 5개의 뉴클레오티드 염기를 포함할 수 있다.

[0254] 일 구체예에서, 벡터는 mir-126 표적 서열의 2개 복사체 및 mir-130a 표적 서열의 2개 복사체를 포함한다.

[0255] 일 구체예에서, mir-126 표적 서열의 2개 복사체 및 mir-130a 표적 서열의 2개 복사체는 하기의 뉴클레오티드 서열에 포함된다:

GCATTATTACTCACGGTACGACGATGCATTATTACTCACGGTACGACACGCGTATGCCC
TTTTAACATTGCACTGATGCATATGCCCTTTTAACATTGCACTG (SEQ ID NO: 5).

[0256] 조합 표적 서열, 예를 들어, mir-126 표적 서열의 2개 복사체 및 mir-130a 표적 서열의 2개 복사체를 포함하는 표적 서열은 본 발명에 사용하기에 특히 바람직한데, 이러한 조합의 사용은 HSC에서 벡터의 억제 및 골수 자손에서의 발현을 최대화시키기 때문이다.

[0258] 또한, 조합 표적을 사용하는 경우, HSC에서 트랜스진 하향조절은 2개의 독립적인 miRNA에 의해 보장되며, 내인성 miRNA 조절로의 간섭 위험이 감소되며, 따라서, 표적 서열의 안전성 및 효율성을 증가시킨다.

[0259] 벡터

[0260] 벡터는 한 환경으로부터 다른 환경으로의 실체의 전달을 허용하거나 촉진하는 도구이다. 본 발명에 따르면, 예를 들어, 재조합 핵산 기법에 사용되는 일부 벡터는 핵산의 세그먼트(예를 들어, 이중성 DNA 세그먼트, 예컨대, 이중성 Cdna 세그먼트)와 같은 실체가 표적 세포 내로 전달될 수 있게 한다. 벡터는 세포 내에서 이중성 핵산(DNA 또는 RNA)을 유지하거나, 핵산의 세그먼트를 포함하는 벡터의 복제를 조장하거나, 핵산의 세그먼트에 의해 인코딩된 단백질의 발현을 조장하는 목적을 수행할 수 있다. 벡터는 비-바이러스성 또는 바이러스성일 수 있다. 재조합 핵산 기법에 사용되는 벡터의 예는 플라스미드, 크로모솜, 인공 크로모솜 및 바이러스를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 벡터는 또한, 예를 들어, 네이키드 핵산(예를 들어, DNA)일 수 있다. 이의 가장 단순한 형태에서, 벡터 자체가 관심 뉴클레오티드일 수 있다.

[0261] 본 발명에 사용되는 벡터는 예를 들어, 플라스미드 또는 바이러스 벡터일 수 있으며, 폴리뉴클레오티드의 발현을 위한 프로모터 및 선택적으로, 프로모터의 조절인자를 포함할 수 있다. 바람직한 구체예에서, 벡터는 바이러스 벡터이다.

[0262] 본 발명에 사용되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터는 당업계에서 공지된 다양한 기법, 예컨대, 형질전환, 형질감염 및 형질도입을 이용하여 세포 내로 도입될 수 있다. 여러 기법, 예를 들어, 재조합 바이러스 벡터, 예컨대, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 바콜로바이러스 및 헤르페스 심플렉스 바이러스 벡터, 슬립핑 뷰티 벡터로의 형질도입; 핵산의 직접 주입 및 유전자총 형질전환은 당업계에 공지되어 있다.

[0263] 비-바이러스 전달 시스템은 DNA 형질감염 방법을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 따라서, 형질감염은 비-바이

러스 벡터를 사용하여 유전자를 표적 세포에 전달하는 공정을 포함한다. 전형적인 형질감염 방법은 전기천공, DNA 유전자총법, 지질-매개된 형질감염, 컴팩트 DNA-매개된 형질감염, 리포솜, 면역리포솜, 리포펙션, 양이온제-매개된 형질감염, 양이온성 계면 양친매성제(CFA)(Nature Biotechnology 1996 14; 556) 및 이들의 조합을 포함한다.

[0264] 용어 "형질감염"은 바이러스 및 비-바이러스 전달 둘 모두에 의한 세포에의 폴리뉴클레오티드의 전달을 포괄하는 것으로 이해되어야 한다.

[0265] 또한, 본 발명은 유전자 표적화 프로토콜, 예를 들어, DNA-변형체의 전달을 이용할 수 있다.

[0266] 바이러스 전달 시스템은 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터, 헤르페스 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 및 바쿨로바이러스 벡터를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0267] 레트로바이러스는 용해 바이러스의 세포 주기와 상이한 세포 주기를 갖는 RNA 바이러스이다. 이와 관련하여, 레트로바이러스는 DNA 매개체를 통해 복제하는 감염성 실체이다. 레트로바이러스가 세포를 감염시킬 경우, 이의 게놈은 역전사효소에 의해 DNA 형태로 변환된다. DNA 복사체는 감염성 바이러스 입자의 어셈블리에 필요한 바이러스 인코딩된 단백질 및 새로운 RNA 게놈의 생성을 위한 주형으로서 작용한다.

[0268] 많은 레트로바이러스, 예를 들어, 뮤린 백혈병 바이러스(MLV), 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 말 전염성 빈혈 바이러스(EIAV), 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV), 라우스 육종 바이러스(RSV), 퓨지나미 육종 바이러스(FuSV), 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스(Mo-MLV), FBR 뮤린 골육종 바이러스(FBR MSV), 몰로니 뮤린 육종 바이러스(Mo-MSV), 아벨손 뮤린 백혈병 바이러스(A-MLV), 조류 골수세포종 바이러스-29(MC29), 및 조류 적아세포종 바이러스(AEV) 및 렌티바이러스를 포함하는 모든 기타 레트로바이러스과가 있다.

[0269] 레트로바이러스의 상세한 목록은 코핀(Coffin) 등의 문헌에서 찾아볼 수 있다("Retroviruses" 1997 Cold Spring Harbour Laboratory Press Eds: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus pp 758-763).

[0270] 렌티바이러스는 또한, 레트로바이러스 계열에 속하나, 이들은 분열 및 비-분열 세포 둘 모두를 감염시킬 수 있다(Lewis et al (1992) EMBO J. 3053-3058).

[0271] 일 구체예에서, 벡터는 렌티바이러스 벡터이다.

[0272] 프로모터

[0273] 일 구체예에서, 벡터는 조직 특이적 프로모터를 포함한다. 바람직하게는, 조직 특이적 프로모터는 종양 침윤 골수 세포의 서브세트, 예컨대, Tie2 발현 단핵구(TEM) 또는 M2-분극화된 대식세포에 대한 특이적 발현을 구동시킨다.

[0274] 바람직한 구체예에서, 조직 특이적 프로모터는 TEK(Tie2) 프로모터이다.

[0275] 예시적인 TEK 프로모터 뉴클레오티드 서열은 다음과 같다:

```
gatcacgagactagcctcgagtcacacctgcaaactggaaacattaattggttcttaagatc
atcatcgacgtgataaaacctgggacagaaattagtcagactagctgcatctgccttttcc
tctggtgggtaggaaaaggaggagtataatgatttcctcaggcatgaaggatgatgatgagc
aaagtgtatactctctaataatgtcataattcatattgtggagtaattatctggataagt
gtagggtctctgacctcattctagatattgtacattccatggctattttcattttggtccat
gaactctctttgctctcatgagcaccatttttatcccaatctaataatcctgtatgtttgtgttt
ttacacagattagtttttaaatgttatataatattgcttctgaaacaccattgctcaatga
ctaccaaatactttctcattaccaaataccttctatgccaaacttcttcaagaaatttgatcac
cttttagatgaattgttaatgaaaattaaagctatagccgggcaacatgggtatctttgggcta
```

[0276]

atggccaaccaacaggccatctgtgtgaaagaaaacaggctaacaatTTTTGGactctgggtct
cttggggctacattgagcattgacctcacgggtgctcactgaaattaattgcttttcagggtt
gtatTTTctcatcacggaaaccttcttctcccaattcaaaccatgtgggttaaaatgagaaa
acaaaagccaaaacggcttccacacccaaaagctccttctgtcagagatcccagtagcccc
gggagagctgttagaagtctgagaaggattggatcatcatcgcataccatacataggtggagg
gcttggtattctcagtttcccgctatgagaggatacccctattgtttctgaaaatgctgac
cgggacccacacttccaacaaaaattcctctgcccctacagcagcagcaaaagcagcagcag
aagcaacagcaacagataagtgttttgatgaattgcgagatggatagggttgagtgtcccc
agccctgctgataccaaatgcctttaagatacagcctttcccatcctaatactacaaaggaaa
caggaaaaaggaacttaaaactcctgtgctcagacagaaatgagactgttacagcctgctt
ctgtgctgttccttcttgcctctaacttgtaacaagacgtagtaggacgatgctaattggaa
agtcaaaaccgctgggtttttgaaaggatcctagactcgagcggccgcca

(SEQ ID NO: 10)

일 구체예에서, TEK 프로모터는 SEQ ID NO: 10의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일 구체예에서, TEK 프로모터는 SEQ ID NO:10과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%의 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

TEK(Tie2) 프로모터는 mir-126 표적 서열 및/또는 mir-130a 표적 서열과 조합될 수 있다. 이는 종양-침윤 골수 세포의 서브세트, 예를 들어, 종양 침윤 대식세포에서 특이적 트랜스진 발현을 가능하게 한다.

일 구체예에서, 벡터는 TEK(Tie2) 인핸서 서열을 추가로 포함할 수 있다.

예시적인 TEK(Tie2) 인핸서 서열은 하기와 같다:

cttcagacctggaggaggagatatgagggaccaattgtggccagacgattccttaactcgtg
ttacacctgcagaatgagtttttagatctagctgtgacctcttccccagccccacccccatt
gtcccccttggtgtgccttcaggaatctgatcattcttctctcctgctccttcccaaaggctgc
aggagcaggtgtgaagacgtggatgtgccagatgcagagtcctgacacttttcaacacatct
gcatattagaggaagtacataccattgcttggtggtttcatgtctaattgtggtatgagtg
gacaaagagagggagaaaaatTTGGactagccaaagaagccagtcaggcgtggggtttgaagg
gcatcgtgggcggctgtcattttgctctctgcttgctcacagcccccttgcccagggttgacca
gtgaggtgtatgtgctggtcacacccatctcagcagatctgtcagctttcccgcttttggtta
aagggtgatcatgcttcctggggggagcactggaagacaatgctcggccactttcctcca
gatacaataggcggagtcaggaaggcagtagttgacattgctggggctggggaggcactcact
gctctgcggccgtcagatggtgaaccagcttaaaccttgccacacagggcctgggttgtaa
ggcgtctggctgcagagccaaaggggactccaccctggggacaggagtgttttagacatctg
ggaatctgggatgggcttcaaattctgatccctgtgtcagaaacaaccacaaaacaataaga
gtaccagtaataacaaaaatgactaccctaggttgatgcctttatgtgccaagtgtcaatt
g

(SEQ ID NO: 11)

일 구체예에서, TEK 인핸서 서열은 SEQ ID NO: 11의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일 구체예에서, TEK 인핸서는 SEQ ID NO:11과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%의 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

코돈 최적화

본 발명에 사용된 폴리뉴클레오티드는 코돈-최적화될 수 있다. 코돈 최적화는 WO 1999/41397 및 WO 2001/79518에 종래 기술되어 있다. 상이한 세포는 이들의 특정 코돈 사용에 있어서 상이하다. 이러한 코돈 편향은 세포 유형에서 특정 tRNA의 상대적 존재비에서의 편향에 상응한다. 서열의 코돈을 변경시켜 이들이 상응하는 tRNA의 상대적 존재비와 매칭되도록 맞추으로써, 발현을 증가시키는 것이 가능하다. 같은 이유로, 상응하는 tRNA가 특정 세포 유형에서 희귀한 것으로 알려진 코돈을 의도적으로 선택함으로써 발현을 감소시키는 것이 가능하다. 따라서, 추가적인 정도의 번역 조절이 이용가능하다.

HIV 및 기타 렌티바이러스를 포함하는 많은 바이러스는 많은 수의 희귀 코돈을 사용하며, 일반적으로 사용되는

포유동물 코돈에 상응하도록 코돈을 교체함으로써, 포유동물 생산자 세포에서 패키징 구성요소의 증가된 발현이 달성될 수 있다. 포유동물 세포는 물론 다양한 다른 유기체에 대한 코돈 사용 표는 당업계에 공지되어 있다.

- [0287] 코돈 최적화는 또한, mRNA 불안정성 모티프 및 크립틱(cryptic) 스플라이스 부위의 제거를 포함할 수 있다.
- [0288] 종양 관련 항원(TAA)
- [0289] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 종양 관련 항원(TAA; 또한, 종양 항원으로서 공지됨)은 암 세포, 예를 들어, 종양 세포에 의해 발현된 항원 분자를 나타낸다. TAA는 TAA 분자의 일부(예를 들어, 에피토프)에 특이적으로 결합할 수 있는 면역 수용체(예를 들어, TCR, 트랜스제닉 TCR 또는 CAR)를 발현하는 면역 세포에 의해 인식될 수 있다.
- [0290] 본원에 사용된 바와 같은 용어 TAA-특이적 T-세포는 TAA에 특이적인 TCR 또는 CAR을 발현하는 T-세포를 나타낸다.
- [0291] TAA-특이적 TCR 또는 TAA-특이적 CAR을 발현하는 T-세포는 TAA를 발현하는 종양 세포를 특이적으로 표적화하며 치사시킬 수 있다. TAA-특이적 TCR은 트랜스제닉 TCR일 수 있다.
- [0292] 일 구체예에서, TAA-특이적 T-세포는 유전자 조작되지 않을 수 있다. T 세포는 자연적으로 유도된 종양-특이적 T 세포일 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 사용되는 T 세포는 종양 또는 림프절로부터 확장될 수 있다.
- [0293] 특정 TAA는 비-종양 세포(예를 들어, 건강한 세포)와 비교하여 특정 유형의 종양 세포에서 높은 상대적 존재비로 발현될 수 있다.
- [0294] 예시적인 TAA는 암배아 항원(CEA), 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, 에프린B2, ROR1, 메소텔린, c-Met, GD-2, 및 MAGE A3 TCR, 4-1BB, 샘암종 항원, 알파-태아단백질, BAFF, B-림프종 세포, C242 항원, 탄산무수화효소 9(CA-IX), CCR4, CD152, CD200, CD22, CD19, CD22, CD123, CD221, CD23 (IgE 수용체), CD28, CD4, CD40, CD44, CD44 v6, CD51, CD52, CD56, CD74, CD80, CS-1, CNT0888, CTLA-4, DR5, EpCAM, CD3, 피브로블라스트 엑스트라 도메인-B, 플레이트 수용체 1, 당단백질 75, GPNMB, HGF, 인간 산란 인자 수용체 키나제, IGF-1 수용체, IGF-I, IgG1, L1-CAM, IL-13, IL-6, 인슐린-유사 성장 인자 I 수용체, 인테그린 $\alpha 5 \beta 1$, 인테그린 $\alpha v \beta 3$, MORAb-009, MS4A1, 뮤신 CanAg, N-글리코실뉴라민산, NPC-1C, PDGF-R α , PDL192, 포스포타일세린, 전립선 암종 세포, RANKL, RON, SCH 900105, SDC1, SLAMF7, 테나스신 C, TGF 베타 2, TGF- β , TRAIL-R1, TRAIL-R2, 종양 항원 CTAA16.88, 혈관 내피 성장 인자(VEGF), VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR2, 비헨틴, 5T4, CD5, CD19, CD20, CD21, CD25, CD37, CD30, CD33, CD45, CAMPATH-1(CDw52), HLA-DR, 항-이디오타입, TAG-72, Ep-CAM, MUC1, 플레이트-결합 단백질, A33, G250, 전립선-특이적 막 항원(PSMA), 전립선 특이적 항원(PSA), 페리틴, 강글리오시드(예를 들어, GD2, GD3, GM2), Le^y, CA-125, CA19-9, 표피 성장 인자 수용체(EGFR), p185HER2, IL-2 수용체, de2-7 EGFR, 섬유모세포 활성화 단백질(FAP), 테나스신, 메탈로프로테이나제, 엔도시알린, 탄산무수화효소, 갈락틴 9, 알돌라제 A, eIF $\gamma 4$, 티로시나제, 갈락틴 4, HERKV-K10, p53, NY-LU-12, 레스틴, NY-CO-38, MAGE-1, MAGE-4a, SSX2, NY-ESO-1, SCP-1, 707-AP, AFP, ART-4, BAGE, b-카테닌/m, Bcr-abl, CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27m, CDK4/m, CT, Cyp-B, DAM-6(MAGE-B2) 및 DAM-10(MAGE-B1), ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gp100, HAGE, HER-2/neu, HLA-A*0201-R170I, HPV-E7, HSP70-2M, HST-2, hTERT(hTERT), iCE, KIAA0205, LAGE, LDLR/FUT, MAGE, MART-1/멜란-A, MC1R, 마이오신/m, MUC1, MUM-1, MUM-2, MUM-3, NA88-A, NY-ESO-1, P15, p190 마이너 bcr-abl, Pml/RARa, PRAME, RAGE, RU1, RU2, SAGE, SART-1, SART-3, TEL/AML1, TPI/m, TRP-1, 단백질 1, gp75, TRP-2, TRP-2/INT2 또는 WT1를 포함한다.
- [0295] 추가적인 TAA는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 식별될 수 있다 - 예를 들어, 그 내용이 본원에 참조로 통합된 고찰 문헌 [Zilberberg et al. 2015 (Biology of Blood and Marrow Transplantation, Volume 21, Issue 6, June 2015, Pages 1000-1007)] 참조.
- [0296] T-세포
- [0297] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "T-세포"는 CD8+ T-세포, CD4+ T-세포, 나이브 T-세포, 메모리 줄기 T-세포, 중심 메모리 T-세포, 이중 음성 T-세포, 이펙터 메모리 T-세포, 이펙터 T-세포, Th0 세포, Tc0 세포, Th1 세포, Tc1 세포, Th2 세포, Tc2 세포, Th17 세포, Th22 세포, 감마/델타 T-세포를 나타낼 수 있다.
- [0298] 본 발명에 사용되는 T-세포는 입양 T-세포 전달에 사용될 수 있다. 본 발명은 또한, 종양-침윤 림프구(TIL) 및/또는 골수 침윤 림프구(MIL)의 입양 전달을 포함한다.

- [0299] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "입양 T-세포 전달"은 환자에게 T-세포 집단의 투여를 나타낸다. T-세포는 대상체로부터 분리될 수 있으며, 그 후, 유전자 변형되고, 환자에 투여되기 전에 TAA-특이적 TCR 또는 CAR을 발현하기 위해 시험관내(생체외)에서 배양될 수 있다.
- [0300] 입양 세포 전달은 동종성 또는 자가성일 수 있다.
- [0301] "자가성 세포 전달"에 있어서, 이는 세포의 출발 집단이 형질도입되는 T-세포 집단이 투여되는 대상체와 동일한 대상체로부터 수득되는 것으로 이해되어야 한다. 자가성 전달은 면역학적 부적합과 관련된 문제를 회피하고, 유전자 매칭된 도너의 이용가능성과 무관하게 대상체에 이용가능할 수 있기 때문에 유리하다.
- [0302] "동종성 세포 전달"에 있어서, 이는 세포의 출발 집단이 형질도입되는 세포 집단이 투여되는 대상체와 상이한 대상체로부터 수득되는 것으로 이해되어야 한다. 바람직하게는, 도너는 세포가 투여되는 대상체와 유전적으로 매칭되어 면역학적 부적합 위험성을 최소화시킬 것이다. 대안적으로, 도너는 환자와 미스매칭되고 연관되지 않을 수 있다.
- [0303] 형질도입된 세포 집단의 적합한 용량은 치료학적으로 및/또는 예방학적으로 효과적인 그러한 용량이다. 투여되는 용량은 치료할 대상체 및 상태에 의존적일 수 있으며, 당업자에게 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0304] T-세포는 환자로부터 분리된 T-세포로부터 유래될 수 있다. T-세포는 대상체로부터 분리된 혼합된 세포 집단, 예컨대, 말초혈 림프구(PBL)의 집단의 일부일 수 있다. PBL 집단 내의 T-세포는 당업계에 공지된 방법에 의해, 예컨대, 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체 또는 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체와 컨주게이션된 세포 크기 비드를 사용하여 활성화될 수 있다.
- [0305] T-세포는 $CD4^{+}$ 헬퍼 T 세포 또는 $CD8^{+}$ 세포독성 T 세포일 수 있다. T-세포는 $CD4^{+}$ 헬퍼 T 세포/ $CD8^{+}$ 세포독성 T-세포의 혼합된 집단에 존재할 수 있다. 예를 들어, 임의적으로 항-CD28 항체와 조합된 항-CD3 항체를 사용한 폴리클로날 활성화는 $CD4^{+}$ 및 $CD8^{+}$ T-세포의 증식을 촉발시킬 것이다.
- [0306] T-세포는 유전자 변형된 세포가 입양 전달되는 대상체로부터 분리될 수 있다. 이와 관련하여, 세포는 대상체로부터 T-세포를 분리하고, 임의적으로 T-세포를 활성화시키고, TCR 유전자를 생체외에서 세포에 전달함으로써 제조될 수 있다. 그 후, 대상체의 후속 면역요법이 TCR-형질도입된 세포의 입양 전달에 의해 수행될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이 이러한 과정은 자가성 T-세포 전달을 나타낸다 - 즉, TCR-형질도입된 세포는 원래 T-세포가 유래된 동일한 대상체에 투여된다.
- [0307] 대안적으로, T-세포는 상이한 대상체로부터 분리될 수 있으며, 따라서 이는 동종성이다. T-세포는 도너 대상체로부터 분리될 수 있다. 예를 들어, 대상체가 동종성 조혈모세포 이식(Allo-HSCT) 또는 고형 기관 이식 또는 세포 이식 또는 줄기 세포 요법으로 처리되는 경우, 세포는 기관, 조직 또는 세포가 유래되는 도너로부터 유래될 수 있다. 도너 및 치료를 받는 대상체는 형제자매일 수 있다.
- [0308] 대안적으로, T-세포는 줄기 세포, 예컨대, 조혈모세포(HSC)로부터 유래될 수 있다. HSC로의 유전자 전이는 세포 표면에서 TCR 발현으로 이어지지 않는데, 줄기 세포가 CD3 분자를 발현하지 않기 때문이다. 그러나, 줄기 세포가 흥선으로 이동되는 림프 전구체로 분화되는 경우, CD3 발현의 개시가 흥선세포에서 도입된 TCR의 표면 발현으로 이어진다.
- [0309] 이러한 접근법의 이점은 성숙 T-세포가 일단 생성되면, 단지 도입된 TCR만을 발현시키며, 내인성 TCR 사슬은 거의 또는 전혀 발현하지 않는데, 왜냐하면 도입된 TCR 사슬의 발현이 기능성 TCR 알파 및 베타 유전자를 형성하기 위한 내인성 TCR 유전자 세그먼트의 재배열을 억제하기 때문이다. 추가의 이점은 유전자-변형된 줄기 세포가 요망되는 항원 특이성을 갖는 성숙 T-세포의 연속 공급원이라는 점이다. 따라서, 본원에 규정된 바와 같은 HSC, HPC 또는 백터는 분화시 TAA-특이적 TCR을 발현하는 T-세포를 생성하는 유전자-변형된 줄기 세포, 바람직하게는, 유전자-변형된 조혈모세포와 조합되어 사용될 수 있다.
- [0310] 당업계에 공지된 다른 접근법이 본 발명의 세포 또는 본 발명의 방법에 의해 제조된 세포에서 내인성 유전자의 발현을 감소시키거나, 제한하거나, 방지하거나, 침묵시키거나 폐지시키는데 사용될 수 있다.
- [0311] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "붕괴"는 유전자 발현의 감소, 제한, 방지, 침묵 또는 폐지를 나타낸다. 당업자는 내인성 유전자를 붕괴시키기 위해 당업계에 공지된 임의의 방법, 예를 들어, 게놈 편집, 유전자 침묵, 유전자 녹-다운 또는 유전자 녹-아웃을 위한 임의의 적합한 방법을 이용할 수 있다.

- [0312] 예를 들어, 내인성 유전자는 인공 뉴클레아제로 붕괴될 수 있다. 인공 뉴클레아제는 예를 들어, (예를 들어, 관심 유전자를 인코딩하는) 특이적 폴리뉴클레오티드 서열을 선택적으로 표적으로 하도록 조작된 인공 제한 효소이며, 상기 폴리뉴클레오티드 서열에서 이중 가닥 파괴를 유도한다. 전형적으로, 이중 가닥 파괴(DSB)는 오류 발생이 쉬운 비-상동성 말단 봉합(NHEJ)에 의해 수복될 것이며, 이에 의해 내인성 유전자를 발현할 수 없는 비-작용성 폴리뉴클레오티드 서열의 형성을 발생시킬 것이다.
- [0313] 일부 구체예에서, 인공 뉴클레아제는 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성인자-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN) 및 CRISPR/Cas(예를 들어, CRISPR/Cas9)로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0314] T-세포 수용체(TCR)
- [0315] 항원 프로세싱 동안, 항원은 세포 안에서 분해되며, 그 후, 주요 조직적합 복합체(MHC) 분자에 의해 세포 표면으로 운반된다. T-세포는 항원 제시 세포의 표면에서 이러한 펩티드:MHC 복합체를 인식할 수 있다. 2가지의 상이한 클래스의 MHC 분자: MHC I 및 MHC II가 존재하며, 각 클래스는 상이한 세포 구획으로부터의 펩티드를 세포 표면에 전달한다.
- [0316] T 세포 수용체(TCR)는 MHC 분자에 결합된 항원 인식을 담당하는 T-세포의 표면 상에서 발견된 분자이다. TCR 헤테로다이어머는 약 95%의 T-세포에서 알파(α) 및 베타(β) 사슬로 구성되는 반면, 약 5%의 T-세포는 감마(γ) 및 델타(δ) 사슬로 구성된 TCR을 갖는다.
- [0317] TCR과 항원 및 MHC의 맞물림은 T 림프구의 활성화를 발생시키며, T 림프구 상의 TCR은 관련된 효소, 공동-수용체 및 특정화된 악세사리 분자에 의해 매개된 일련의 생화학 사건을 통해 발현된다.
- [0318] TCR의 각 사슬은 면역글로불린 슈퍼패밀리의 구성원이며, N-말단 면역글로불린(Ig)-가변(V) 도메인, 하나의 Ig-불변(C) 도메인, 트랜스멤브레인/세포막-스패닝 영역, 및 C-말단부에서의 짧은 세포질 테일을 지닌다.
- [0319] 두 TCR α 사슬 및 β 사슬 둘 모두의 가변 도메인은 3개의 초가변성 또는 상보성 결정 영역(CDR)을 지닌다. CDR3은 프로세싱된 항원 인식을 담당하는 주요 CDR이며, 그러나, 알파 사슬의 CDR1 또한 항원 펩티드의 N-말단부와 상호작용하는 것으로 입증되었으며, 반면 베타 사슬의 CDR1은 펩티드의 C-말단부와 상호작용한다. CDR2는 MHC 분자를 인식하는 것으로 여겨진다.
- [0320] TCR 도메인의 불변 도메인은 시스테인 잔기가 이황화 결합을 형성하여 두 사슬 간의 링크를 만드는 짧은 연결 서열로 구성된다.
- [0321] 본 발명에 사용된 TCR은 TCR이 불변 도메인에서 2개 이상의 이황화 결합을 포함할 수 있도록 α 및 β 사슬 각각에서 하나 이상의 추가적인 시스테인 잔기를 지닐 수 있다.
- [0322] 상기 구조는 TCR이 포유동물에서 3개의 별개의 사슬 (γ , δ , 및 ϵ) 및 ζ -사슬을 지니는 CD3과 같은 다른 분자와 연합되게 한다. 이들 악세사리 분자는 음으로 하전된 트랜스멤브레인 영역을 가지며, TCR로부터 세포 내로의 신호를 전파시키는데 필수적이다. CD3- 및 ζ -사슬은 TCR과 함께 T 세포 수용체 복합물로서 공지된 것을 형성한다.
- [0323] T 세포 복합물로부터의 신호는 특이적 공동-수용체에 의한 MHC 분자의 동시 결합에 의해 향상된다. 헬퍼 T-세포에 있어서, 이러한 공동-수용체는 CD4(클래스 II MHC에 특이적)이며; 반면 세포독성 T-세포에 있어서, 이러한 공동-수용체는 CD8(클래스 I MHC에 특이적)이다. 공동-수용체는 항원 제시 세포와 T 세포 사이의 연장된 맞물림을 허용하며, 활성화된 T 림프구의 시그널링에 관련된 세포 내부에 필수 분자(예를 들어, LCK)를 모집한다.
- [0324] 따라서, 본원에 사용된 바와 같은 용어 "T-세포 수용체"(TCR)는 MHC 분자에 의해 제시되는 경우, 펩티드를 인식할 수 있는 분자를 나타낸다. 분자는 2개 사슬 α 및 β (또는 임의적으로, γ 및 δ)의 헤테로다이어머일 수 있거나, 이는 단일 사슬 TCR 작제물일 수 있다.
- [0325] 본 발명에 사용되는 TCR은 하나 초과와 종으로부터 유래된 서열을 포함하는 하이브리드 TCR일 수 있다. 예를 들어, 무린 TCR이 인간 TCR보다 인간 T-세포에서 더욱 효과적으로 발현됨이 놀랍게도 발견되었다. 따라서, TCR은 인간 가변 영역 및 무린 불변 영역을 포함할 수 있다.
- [0326] 이러한 접근법의 단점은 무린 불변 서열이 면역 반응을 촉발시켜, 전달된 T-세포의 거부로 이어질 수 있다는 점이다. 그러나, 입양 T-세포 치료법을 위한 환자를 준비시키는데 이용되는 컨디셔닝 요법은 무린 서열을 발현하는 T-세포의 생착을 허용하기에 충분한 면역억제를 발생시킬 수 있다.

- [0327] 주요 조직접합 복합체(MHC)에 결합된 항원 펩티드와의 접촉 대부분을 확립시키는 TCR의 부분은, 각 T 세포 클론에 있어서 고유한 상보성 결정 영역 3(CDR3)이다. CDR3 영역은 흉선에서 발생하며, 가변성(V), 다양성(β 및 δ 사슬에 있어서, D) 및 접합(J) 유전자에 속하는 비-연속 유전자를 포함하는 체세포 재배열 사건시 생성된다. 게다가, 각 TCR 사슬 유전자의 재배열 유전자좌에서 삽입/결실된 무작위 뉴클레오티드는 고도의 가변성 CDR3 서열의 다양성을 크게 증가시킨다. 이와 같이, 생물학적 샘플에서 특이적 CDR3 서열의 빈도는 특이적 T 세포 집단의 존재비를 나타낸다. 건강한 인간에서 TCR 레퍼토리의 큰 다양성은 항원 제시 세포의 표면 상에 MHC 분자에 의해 제시된 다양한 이종 항원에 대한 광범위한 보호를 제공한다. 이와 관련하여, 이론적으로 10^{15} 개 이하의 다양한 TCR이 흉선에서 생성될 수 있음이 주지된다.
- [0328] T-세포 수용체 다양성은 CDR3에 중점을 두고 있으며, 이러한 영역은 주로 항원 인식을 담당한다.
- [0329] CDR은 예를 들어, 주어진 서열로부터 1, 2 또는 3개의 치환, 첨가 또는 결실을 포함할 수 있으며, 단 TCR은 MHC 분자에 의해 제시되는 경우 TAA 유래된 펩티드에 결합하는 능력을 보유한다.
- [0330] TAA에 특이적인 TCR은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용하여 당업자에 의해 용이하게 생성될 수 있다.
- [0331] 예를 들어, TAA-특이적 TCR은 아마도 린네만(Linnemann) 등에 의한 TCR 유전자 포획 방법에 의해 식별된다(Nature Medicine 19, 1534-1541 (2013)). 간략하게는, 이러한 방법은 TCR 유전자를 인코딩하는 게놈 DNA 단편의 포획 및 시퀀싱에 의해 TCR 서열을 식별하기 위해 높은 처리량 DNA-기반 전략을 이용하며, TAA-특이적 TCR을 식별하는데 사용될 수 있다.
- [0332] 개선된 TCR 발현 및 감소된 TCR 미스페어링
- [0333] CD3 분자의 공급 증가는 예를 들어, 본 발명의 TCR을 발현시키도록 변형된 세포에서 TCR 발현을 증가시킬 수 있다. 따라서, T 세포는 CD3-감마, CD3-델타, CD3-엡실론 및/또는 CD3-제타를 인코딩하는 하나 이상의 유전자를 포함하도록 (예를 들어, 벡터를 사용하여) 변형될 수 있다. 일 구체예에서, T 세포는 CD3-제타를 인코딩하는 유전자를 포함한다. T 세포는 CD8을 인코딩하는 유전자를 포함할 수 있다. 이러한 유전자를 인코딩하는 벡터는 유전자 조작된 세포의 안전성 프로파일을 증가시키기 위해 선택가능한 마커 또는 자살 유전자를 인코딩할 수 있다. 유전자는 자가-절단 서열, 예컨대, 2A 자가-절단 서열에 의해 연결될 수 있다.
- [0334] 대안적으로, CD3 유전자를 인코딩하는 하나 이상의 개별 벡터가 TCR을 인코딩하는 하나 이상의 벡터와 동시에, 순차적으로 또는 별도로 T 세포로의 공동-전달을 위해 제공될 수 있다.
- [0335] 트랜스제닉 TCR은 T-세포의 항원 특이성을 변경하기 위해 본 발명에 사용되는 T-세포에서 발현될 수 있다. TCR-형질도입된 T-세포는 적어도 2개의 TCR 알파 및 2개의 TCR 베타 사슬을 발현한다. 내인성 TCR 알파/베타 사슬이 자기-관용성인 수용체를 형성하는 경우, 도입된 TCR 알파/베타 사슬은 주어진 표적 항원에 대한 규정된 특이성을 갖는 수용체를 형성한다.
- [0336] 그러나, TCR 유전자 치료법은 이식된(즉, 트랜스제닉) TCR의 충분한 발현을 필요로 하는데, 전달된 TCR이 내인성 TCR의 존재에 의해 희석되어, 종양 특이적 TCR의 최적의 발현을 발생시킬 수 있기 때문이다. 또한, 내인성 사슬 및 도입된 사슬 간의 미스페어링이 발생하여 신규한 수용체를 형성할 수 있으며, 이는 자가-항원에 대해 예상치 못한 특이성을 나타내고, 환자에 이식되는 경우 자가면역 손상을 초래할 수 있다.
- [0337] 따라서, 여러 전략이 내인성 TCR 사슬과 도입된 TCR 사슬간의 미스페어링의 위험을 감소시키기 위해 탐구되었다. TCR 알파/베타 계면의 돌연변이는 원치않는 미스페어링을 감소시키기 위해 현재 사용되는 하나의 전략이다. 예를 들어, 알파 및 베타 사슬의 불변 도메인에서 시스테인의 도입은 이황화 결합의 형성을 허용하며, 도입된 사슬의 페어링을 향상시키는 반면, 야생형 사슬과의 미스페어링을 감소시킨다.
- [0338] 따라서, 본 발명에 사용된 TCR은 α 사슬 및 β 사슬이 T-세포에서 발현되는 경우, 상기 사슬들과 내인성 TCR α 및 β 사슬 간의 미스페어링의 빈도가 감소되도록 α 사슬/ β 사슬 계면에서 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 일 구체예에서, 하나 이상의 돌연변이는 α 사슬 및 β 사슬 각각의 불변 영역 도메인 내에 시스테인 잔기를 도입시키며, 여기에서 시스테인 잔기는 α 사슬 및 β 사슬 간의 이황화 결합을 형성할 수 있다.
- [0339] 미스페어링을 감소시키기 위한 또 다른 전략은, 종양 특이적 TCR α 및 또는 β 사슬을 인코딩하는 유전자에 첨가되며 내인성 TCR 유전자의 발현을 제한하도록 설계된, siRNA를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 도입에 의존적이다(Okamoto S. Cancer research 69, 9003-9011, 2009).
- [0340] 따라서, 본 발명에 사용되는 TCR을 인코딩하는 벡터 또는 폴리뉴클레오티드는 내인성 TCR 유전자의 발현을 제한

하거나 폐지시키기 위한 목적으로 하나 이상의 siRNA 또는 다른 제제를 포함할 수 있다.

- [0341] 또한, 인공 뉴클레아제, 예컨대, 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화인자-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN), 또는 내인성 TCR 유전자의 불변 영역을 표적으로 하고, 내인성 TCR 알파 및/또는 베타 사슬 유전자의 영구적 파괴를 수득하도록 설계된 CRISPR/Cas 시스템(TRAC 및, 또는 TRBC)을 조합시켜, 종양 특이적 TCR의 완전한 발현을 허용하며, 따라서, TCR 미스페어링 위험을 감소시키거나 폐지하는 것이 가능하다. TCR 유전자 편집으로도 공지된 이러한 과정은 시험관내 및 생체내에서 TCR 유전자 전이보다 월등한 것으로 입증되었다(Provasi E., Genovese P., Nature Medicine May; 18(5):807-15; 2012).
- [0342] 또한, 게놈 편집 기법은, 본 발명에 사용되는 TCR를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 임의적으로, 하나 이상의 프로모터 서열 및/또는 기타 발현 조절 서열을 포함하는 발현 카세트를 인공 뉴클레아제에 의해 붕괴된 내인성 유전자 내로의 표적화된 통합을 허용한다(Lombardo A., Nature biotechnology 25, 1298-1306; 2007).
- [0343] 트랜스제닉 TCR의 발현을 증가시키고, "뮤린화"를 구성하는 TCR 미스페어링을 감소시키기 위해 또 다른 전략이 개발되었으며, 이는 이들의 뮤린 대응물에 의해 인간 TCR α 및 TCR β 불변 영역(예를 들어, TRAC, TRBC1 및 TRBC2 영역)을 대체한다. TCR 불변 영역의 뮤린화는 예를 들어, 문헌 [Sommermeier and Uckert J Immunol; 2010 (184:6223-6231)]에 기술되었다. 따라서, 본 발명에 사용된 TCR은 뮤린화될 수 있다.
- [0344] 키메라 항원 수용체(CAR)
- [0345] CAR은 세포의 리간드 결합 도메인, 가장 일반적으로는, 세포내 시그널링 성분에 연결된 모노클로날 항체(scFv)의 단일쇄 가변 단편, 가장 일반적으로, CD3 ζ을 단독으로 또는 하나 이상의 공동자극분자 도메인과 조합하여 포함한다. 스페이서는 종종 세포의 항원-결합 도메인 및 트랜스멤브레인 모이어트 사이에 첨가되어 표적과의 상호작용을 최적화시킨다.
- [0346] 본 발명에 사용하기 위한 CAR은 하기를 포함한다:
- [0347] (i) 항원-특이적 표적화 도메인;
- [0348] (ii) 트랜스멤브레인 도메인;
- [0349] (iii) 임의적으로, 적어도 하나의 공동자극 도메인; 및
- [0350] (iv) 세포내 시그널링 도메인.
- [0351] 바람직하게는, 항원-특이적 표적화 도메인은 항체 또는 이의 단편, 더욱 바람직하게는, 단일쇄 가변 단편을 포함한다.
- [0352] 바람직하게는, 항원-특이적 표적화 도메인은 TAA를 표적으로 한다.
- [0353] 일 구체예에서, 항원-특이적 표적화 도메인은 CD19를 표적으로 한다.
- [0354] 트랜스멤브레인 도메인의 예는 T 세포 수용체 복합물, CD28 및 CD8a의 제타 사슬의 트랜스멤브레인 도메인을 포함한다.
- [0355] 공동자극 도메인의 예는 CD28, CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), Dap10, CD27, CD2, CD5, ICAM-1, LFA-1, Lck, TNFR-I, TNFR-II, Fas, CD30 및 CD40으로부터의 공동자극 도메인을 포함한다.
- [0356] 일 구체예에서, 공동자극 도메인은 CD28로부터의 공동자극 도메인이다.
- [0357] 세포내 시그널링 도메인의 예는 인간 CD3 제타 사슬, FcγRIII, FcεRI, Fc 수용체의 세포질 테일 및 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM) 함유 세포질 수용체를 포함한다.
- [0358] 키메라 항원 수용체
- [0359] 본원에 사용된 바와 같은 "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR" 또는 "CAR들"은 세포(예를 들어, T 세포 예컨대, 나이브 T 세포, 중심 메모리 T 세포, 이펙터 메모리 T 세포 또는 이들의 조합물)에 대한 항원 특이성을 부여할 수 있는 조작된 수용체를 지칭한다. CAR은 또한, 인공 T-세포 수용체, 키메라 T-세포 수용체 또는 키메라 면역수용체로서 공지되어 있다. 바람직하게는, 본 발명의 CAR은 항원-특이적 표적화 영역, 세포외 도메인, 트랜스멤브레인 도메인, 임의적으로, 하나 이상의 공동-자극 도메인 및 세포내 시그널링 도메인을 포함한다.
- [0360] 항원-특이적 표적화 도메인

- [0361] 항원-특이적 표적화 도메인은 관심있는 표적 항원에 결합하는 능력을 갖는 CAR을 제공한다. 항원-특이적 표적화 도메인은 바람직하게는, 관심 임상 항원을 표적으로 하며, 이러한 항원에 대한 이펙터 면역 반응을 촉발시켜 종양 치사를 발생시키는 것이 바람직할 것이다.
- [0362] 항원-특이적 표적화 도메인은 생물학적 분자(예를 들어, 세포 표면 수용체 또는 중양 단백질, 또는 이들의 구성요소)를 특이적으로 인식하고 이에 결합하는 능력을 지닌 임의의 단백질 또는 펩티드일 수 있다. 항원-특이적 표적화 도메인은 관심있는 생물학적 분자에 대한 임의의 자연 발생, 합성, 반-합성 또는 재조합으로 생성된 결합 파트너를 포함한다.
- [0363] 예시적인 항원-특이적 표적화 도메인은 항체 또는 항체 단편 또는 유도체, 수용체의 세포외 도메인, 세포 표면 분자/수용체에 대한 리간드, 또는 이의 수용체 결합 도메인, 및 중양 결합 단백질을 포함한다.
- [0364] 바람직한 구체예에서, 항원-특이적 표적화 도메인은 항체이거나, 이로부터 유래된다. 항체-유래된 표적화 도메인은 항체의 단편, 또는 항체의 하나 이상의 단편의 유전자 조작된 생성물일 수 있으며, 이 단편은 항원과의 결합에 관련된다. 예로는 가변 영역(Fv), 상보성 결정 영역(CDR), Fab, 단일 사슬 항체(scFv), 중쇄 가변 영역(VH), 경쇄 가변 영역(VL) 및 카멜리드 항체(VH)를 포함한다.
- [0365] 바람직한 구체예에서, 결합 도메인은 단일 사슬 항체(scFv)이다. scFv는 무린, 인간 또는 인간화된 scFv일 수 있다.
- [0366] 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 관련하여 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"은 항체의 중쇄 또는 경쇄의 가변 영역에서 고도로 가변성인 루프를 나타낸다. CDR은 항원 형태와 상호작용할 수 있으며, 항원에 대한 결합을 주로 결정할 수 있다(일부 프레임워크 영역이 결합에 관여한다고 알려져 있지만). 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 각각 3개 CDR을 함유한다.
- [0367] "중쇄 가변 영역" 또는 "VH"는 프레임워크 영역으로서 공지된 측면 스트레치 사이에 위치한 3개의 CDR을 함유하는 항체의 중쇄의 단편을 나타내며, 이는 CDR보다 더욱 고도로 보존되며, 스캐폴드를 형성하여 CDR을 지지한다.
- [0368] "경쇄 가변 영역" 또는 "VL"은 프레임워크 영역 사이에 위치한 3개의 CDR을 함유하는 항체의 경쇄의 단편을 나타낸다.
- [0369] "Fv"는 완전한 항원 결합 부위를 보유하기 위한 항체의 가장 작은 단편을 나타낸다. Fv 단편은 단일 중쇄의 가변 영역에 결합된 단일 경쇄의 가변 영역으로 구성된다.
- [0370] "단일-사슬 Fv 항체" 또는 "scFv"는 서로 직접적으로 연결되거나 펩티드 링커 서열을 통해 연결되는 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역으로 구성된 조작된 항체를 나타낸다.
- [0371] 중양 세포 표면 분자에 특이적으로 결합하는 항체는 당업계에 널리 공지된 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 이러한 방법은 파아지 디스플레이, 인간 또는 인간화된 항체를 생성하는 방법, 또는 인간 항체를 생성하도록 조작된 유전자이식 동물 또는 식물을 이용하는 방법을 포함한다. 부분적 또는 완전한 합성 항체의 파아지 디스플레이 라이브러리가 이용가능하며, 표적 분자에 결합할 수 있는 항체 또는 이의 단편에 대해 스크리닝될 수 있다. 인간 항체의 파아지 디스플레이 라이브러리가 또한 이용가능하다. 일단 확인되면, 항체를 코딩하는 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오타이드 서열이 분리되고/거나 결정될 수 있다.
- [0372] 암 항원을 표적으로 하는 표적화 도메인과 관련하여, 표적화 도메인의 선택은 처리될 암의 유형에 의존적일 것이며, 중양 항원을 표적으로 할 수 있다. 대상체로부터의 중양 샘플은 특정 바이오마커 또는 세포 표면 마커의 존재에 대해 특성 결정될 수 있다. 예를 들어, 대상체로부터의 유방암 세포는 Her2Neu, 에스트로겐 수용체 및/또는 프로게스테론 수용체 각각에 대해 양성 또는 음성일 수 있다. 개별 대상체의 중양 세포에서 발견된 중양 항원 또는 세포 표면 분자가 선택된다. 바람직하게는, 항원-특이적 표적화 도메인은 중양 세포에서 발견되며, 정상 조직에서 실질적으로 발견되지 않거나, 비-치명적 정상 조직에 대한 이의 발현이 제한되는 세포 표면 분자를 표적으로 한다.
- [0373] 본 발명에 사용되는 CAR에 의해 표적화될 수 있는 TAA는 비제한적으로, 암배아 항원(CEA), 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, 에프린B2, ROR1, 메스텔린, c-Met, GD-2, 및 MAGE A3 TCR, 4-1BB, 썸암종 항원, 알파-태아단백질, BAFF, B-림프종 세포, C242 항원, 탄산무수화효소 9(CA-IX), CCR4, CD152, CD200, CD22, CD19, CD22, CD123, CD221, CD23(IgE 수용체), CD28, CD4, CD40, CD44, CD44 v6, CD51, CD52, CD56, CD74, CD80, CS-1, CNT0888, CTLA-4, DR5, EpCAM, CD3, 피브로넥틴 엑스트라 도메인-B, 플레이트 수용체 1, 당단백질 75, GPNMB, HGF, 인간 산란 인자 수용체 키나제, IGF-1 수용체, IGF-I, IgG1, L1-CAM, IL-13, IL-6, 인슐린-유사

성장 인자 I 수용체, 인테그린 $\alpha 5\beta 1$, 인테그린 $\alpha v\beta 3$, MORAb-009, MS4A1, 뮤신 CanAg, N-글리코실뉴라민산, NPC-1C, PDGF-R α , PDL192, 포스포티딜세린, 전립선 암종 세포, RANKL, RON, SCH 900105, SDC1, SLAMF7, 테나스신 C, TGF 베타 2, TGF- β , TRAIL-R1, TRAIL-R2, 종양 항원 CTAA16.88, 혈관 내피 성장 인자(VEGF), VEGF-A, VEGFR-1, VEGFR2, 비멘틴, 5T4, CD5, CD19, CD20, CD21, CD25, CD37, CD30, CD33, CD45, CAMPATH-1(CDw52), HLA-DR, 항-이디오타입, TAG-72, Ep-CAM, MUC1, 폴레이트-결합 단백질, A33, G250, 전립선-특이적 막 항원 (PSMA), 전립선 특이적 항원 (PSA), 페리틴, 강글리오시드(예를 들어, GD2, GD3, GM2), Ley, CA-125, CA19-9, 표피 성장 인자 수용체(EGFR), p185HER2, IL-2 수용체, de2-7 EGFR, 섬유모세포 활성화 단백질(FAP), 테나스신, 메탈로프로테이나제, 엔도시알린, 탄산무수화효소, 갈렉틴 9, 알돌라제 A, eIF $\gamma 4$, 티로시나제, 갈렉틴 4, HERKV-K10, p53, NY-LU-12, 레스틴, NY-CO-38, MAGE-1, MAGE-4a, SSX2, NY-ESO-1, SCP-1, 707-AP, AFP, ART-4, BAGE, b-카테닌/m, Bcr-abl, CAMEL, CAP-1, CASP-8, CDC27m, CDK4/m, CT, Cyp-B, DAM-6(MAGE-B2) 및 DAM-10(MAGE-B1), ELF2M, ETV6-AML1, G250, GAGE, GnT-V, Gp100, HAGE, HER-2/neu, HLA-A*0201-R170I, HPV-E7, HSP70-2M, HST-2, hTERT(hTERT), iCE, KIAA0205, LAGE, LDLR/FUT, MAGE, MART-1/멜란-A, MC1R, 마이오신 /m, MUC1, MUM-1, MUM-2, MUM-3, NA88-A, NY-ESO-1, P15, p190 마이너 bcr-abl, Pml/RAR α , PRAME, RAGE, RU1, RU2, SAGE, SART-1, SART-3, TEL/AML1, TPI/m, TRP-1, 단백질 1, gp75, TRP-2, TRP-2/INT2 또는 WT1 중 임의의 하나 이상을 포함한다.

[0374] 공동-자극 도메인

[0375] 본 발명에 사용되는 CAR은 또한 하나 이상의 공동-자극 도메인을 포함할 수 있다. 도메인은 세포 증식, 세포 생존 및 메모리 세포의 발달을 향상시킬 수 있다.

[0376] 각 공동-자극 도메인은 예를 들어, TNFR 슈퍼패밀리의 구성원, CD28, CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), Dap10, CD27, CD2, CD5, ICAM-1, LFA-1, Lck, TNFR-1, TNFR-II, Fas, CD30, CD40 또는 이들의 조합물 중 임의의 하나 이상의 공동-자극 도메인을 포함한다. 다른 단백질로부터의 공동-자극 도메인은 또한, 본 발명에 사용되는 CAR 과 사용될 수 있다. 추가적인 공동-자극 도메인은 당업자에게 자명할 것이다.

[0377] 세포내 시그널링 도메인

[0378] 본 발명에 사용되는 CAR은 또한, 세포내 시그널링 도메인을 포함할 수 있다. 이러한 도메인은 세포질 도메인일 수 있으며, 이펙터 기능 신호를 변환하여 세포에 지시하여 이의 특수화된 기능을 수행할 수 있다. 세포내 시그널링 도메인의 예는 비제한적으로, T-세포 수용체의 ζ 사슬 또는 이의 임의의 동족체(예를 들어, η 사슬, Fc ϵ R1 γ 및 β 사슬, MB1(Ig α) 사슬, B29(Ig β) 사슬, 등), CD3 폴리펩티드(Δ , δ 및 ϵ), syk 패밀리의 티로신 키나제(Syk, ZAP 70, 등), src 패밀리의 티로신 키나제(Lck, Fyn, Lyn, 등) 및 T-세포 형질도입에 관여하는 다른 분자, 예컨대, CD2, CD5 및 CD28을 포함한다. 세포내 시그널링 도메인은 인간 CD3 제타 사슬, Fc γ RIII, Fc ϵ RI, Fc 수용체의 세포질 테일, 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM) 함유 세포질 수용체 또는 이들의 조합물일 수 있다.

[0379] 트랜스멤브레인 도메인

[0380] 본 발명에 사용되는 CAR은 또한, 트랜스멤브레인 도메인을 포함할 수 있다. 트랜스멤브레인 도메인은 임의의 타입 I, 타입 II 또는 타입 III 트랜스멤브레인 단백질을 포함하는 트랜스멤브레인 도메인을 지닌 임의의 단백질로부터의 트랜스멤브레인 서열을 포함할 수 있다. 본 발명에 사용되는 CAR의 트랜스멤브레인 도메인은 또한, 인공 소수성 서열을 포함할 수 있다. 본 발명에 사용되는 CAR의 트랜스멤브레인 도메인은 다이머화되지 않도록 선택될 수 있다. 추가적인 트랜스멤브레인 도메인은 당업자에게 자명할 것이다. CAR 작제물에 사용되는 트랜스멤브레인(TM) 영역의 예로는 1) CD28 TM 영역(Pule et al, *Mol Ther*, 2005, Nov;12(5):933-41; Brentjens et al, *CCR*, 2007, Sep 15;13(18 Pt 1):5426-35; Casucci et al, *Blood*, 2013, Nov 14;122(20):3461-72.); 2) OX40 TM 영역(Pule et al, *Mol Ther*, 2005, Nov;12(5):933-41); 3) 41BB TM 영역(Brentjens et al, *CCR*, 2007, Sep 15;13(18 Pt 1):5426-35); 4) CD3 제타 TM 영역(Pule et al, *Mol Ther*, 2005, Nov;12(5):933-41; Savoldo B, *Blood*, 2009, Jun 18;113(25):6392-402.); 5) CD8a TM 영역(Maher et al, *Nat Biotechnol*, 2002, Jan;20(1):70-5.; Imai C, *Leukemia*, 2004, Apr;18(4):676-84; Brentjens et al, *CCR*, 2007, Sep 15;13(18 Pt 1):5426-35; Milone et al, *Mol Ther*, 2009, Aug;17(8):1453-64)이 있다.

[0381] 면역 체크포인트 억제제

[0382] 본원에 사용된 바와 같은 용어 면역 체크포인트 억제제는 억제성 체크포인트 분자의 발현을 억제, 차단, 방지, 감소 또는 하향조절하거나, 그렇지 않으면 억제성 체크포인트 분자에 대한 길항제인 분자, 화합물, 항체 또는

약물을 나타낸다. 세포 표면 상에서 발현되는 경우, 억제성 체크포인트 분자는 상기 세포에 대한 T-세포 매개된 면역 반응을 억제하거나 약화시킨다. 예를 들어, 억제성 체크포인트 분자의 발현은 세포가 T-세포 반응에 의해 치사되는 것을 예방할 수 있다. 암 세포가 억제성 체크포인트 분자를 발현하는 경우 이러한 메카니즘은 특히 해로운데, 이는 암 세포가 숙주 T-세포 반응을 피할 수 있게 하기 때문이다. 따라서, 종양 세포 상의 억제성 체크포인트 분자가 면역 체크포인트 억제제에 의해 억제되는 경우, 종양 세포에 대한 향상된 숙주 T-세포 반응이 발생할 것이다.

- [0383] 일 구체예에서, 면역 체크포인트 억제제는 A2AR(아데노신 A2A 수용체), B7-H3(CD276), B7-H4(VTCN1), BTLA(B 및 T 림프구 감쇠 인자; CD272), HVEM(헤르페스 바이러스 침투 매개인자), CTLA-4(세포독성 T-림프구-관련 단백질 4; CD152), IDO(인돌아민 2,3-디옥시게나제), TDO(트립토판 2,3-디옥시게나제), KIR(킬러-세포 면역글로불린-유사 수용체), LAG3(림프구 활성화 유전자-3), PD-1(프로그래밍된 치사 1 수용체), PD-L1(PD-1 리간드 1), PD-L2(PD-1 리간드 2), TIM-3(T-세포 면역글로불린 도메인 및 뮤신 도메인 3), VISTA(T 세포 활성화의 V-도메인 Ig 억제인자), B7-1(CD80), B7-2(CD86)로 구성된 군으로부터 선택되는 억제성 체크포인트 분자를 억제한다. 체크 포인트 억제제의 조합물이 또한 사용될 수 있다.
- [0384] 일 구체예에서, 면역 체크포인트 억제제는 PD-1 억제제이며; 바람직하게는, PD-1 억제제는 항-PD-1 항체이다.
- [0385] 또 다른 구체예에서, 면역 체크포인트 억제제는 PD-L1 억제제이며; 바람직하게는, PD-L1 억제제는 항-PD-L1 항체이다.
- [0386] 또 다른 구체예에서, 면역 체크포인트 억제제는 PD-L2 억제제이며, 바람직하게는, PD-L2 억제제는 항-PD-L2 항체이다.
- [0387] 또 다른 구체예에서, 면역 체크포인트 억제제는 CTLA4 억제제이며; 바람직하게는, CTLA4 억제제는 항-CTLA4 항체이다.
- [0388] 또 다른 구체예에서, 면역 체크포인트 억제제는 LAG-3 억제제이며; 바람직하게는, LAG-3 억제제는 항-LAG-3 항체이다.
- [0389] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "항체"는 면역글로불린 유전자 또는 면역글로불린 유전자들에 의해 실질적으로 인코딩된 폴리펩티드 또는 이의 단편으로서 이해되며, 이는 항원(예를 들어, 세포 표면 마커)에 특이적으로 결합하며 인식한다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "항체"는 전체 또는 온전한 항체 분자(예를 들어, IgM, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4 포함), IgA, IgD, 또는 IgE) 또는 이의 임의의 항원-결합 단편을 나타낸다.
- [0390] 항체는 폴리클로날 항체 또는 모노클로날 항체일 수 있다. 모노클로날 항체는 동일한 면역 세포(예를 들어, 항체 생성 B-세포주 및 암성 B-세포주의 융합물로부터 생성될 수 있는 하이브리도마)에 의해 생성된다. 특정 항원에 대해 지시된 모노클로날 항체는 상기 항원 상의 단일의 특이적 에피토프를 인식할 것이다. 대조적으로, 폴리클로날 항체는 다중의 동일하지 않은 세포주로부터 생성되며, 따라서, 특정 항원상의 여러 상이한 에피토프를 인식한다.
- [0391] 항체의 항원-결합 단편은 예를 들어, 단일 사슬 항체, 단일 사슬 Fv 단편(scFv), Fd 단편, Fab 단편, Fab' 단편, 또는 F(ab')₂ 단편을 포함한다. scFv 단편은 scFv가 유래되는 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 둘 모두를 포함하는 단일 폴리펩티드 사슬이다. 또한, 인트라바디, 미니바디, 트리아바디 및 디아바디(예를 들어, 문헌 [Todorovska et al. (2001) J Immunol Methods 248(1):47-66; Hudson and Kortt (1999) J Immunol Methods 231(1):177-189; Poljak 25 (1994) Structure 2(12): 1121-1123; Rondon and Marasco (1997) Annual Review of Microbiology 21:257-283] 참조)가 또한 항체의 정의 내에 포함되며, 본원에 기술된 방법에 사용하기에 적합하다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "항체"는 또한, 전체 항체의 변형에 의해 생성된 항체 단편 또는 재조합 방법을 이용하여 새로 합성된 것들을 포함한다.
- [0392] 특정 항원에 대해 지시된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 생성하기에 적합한 방법은 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Greenfield (2014) Antibodies: A Laboratory Manual, Second Edition 201-221] 참조).
- [0393] 변이체, 유도체, 유사체, 동족체 및 단편
- [0394] 본원에 언급된 특정 단백질 및 폴리뉴클레오티드 이외에, 본 발명은 또한, 변이체, 유도체, 유사체, 동족체 및 이의 단편의 사용을 포함한다.
- [0395] 본 발명에 있어서, 임의의 주어진 서열의 변이체는 해당 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드가 이의 내인성 기능

중 적어도 하나를 실질적으로 보유하게 하는 방식으로 잔기(아미노산 잔기 또는 핵산 잔기이든지)의 특이적 서열이 변형된 서열이다. 변이 서열은 자연 발생 단백질에 존재하는 적어도 하나의 잔기의 첨가, 결실, 치환, 변형, 대체 및/또는 변이에 의해 수득될 수 있다.

[0396] 본 발명의 단백질 또는 폴리펩티드와 관련하여 본원에 사용된 바와 같은 용어 "유도체"는 생성된 단백질 또는 폴리펩티드가 이의 내인성 기능 중 적어도 하나를 실질적으로 보유한다는 전제하에 서열로부터 또는 서열에 대한 하나 (또는 그 초과)의 아미노산 잔기의 임의의 치환, 변이, 변형, 대체, 결실 및/또는 첨가를 포함한다.

[0397] 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드와 관련하여 본원에 사용된 바와 같은 용어 "유사체"는 임의의 모방체, 즉 모방하는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드의 내인성 기능 중 적어도 하나를 갖는 화학적 화합물을 포함한다.

[0398] 본 발명에 사용되는 단백질은 또한, 침묵 변화를 생성시켜 기능적으로 동등한 단백질을 발생시키는 아미노산 잔기의 결실, 삽입 또는 치환을 가질 수 있다. 고의의 아미노산 치환은 내인성 기능이 보유되는 한 잔기의 극성, 전하, 용해성, 소수성, 친수성 및/또는 양극성에서의 유사성을 기반으로 하여 이루어질 수 있다. 예를 들어, 음으로 하전된 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함하며; 양으로 하전된 아미노산은 리신 및 아르기닌을 포함하며; 유사한 친수성 값을 갖는 비하전된 극성 헤드 기를 갖는 아미노산은 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌 및 티로신을 포함한다.

[0399] 치환은 아미노산의 유사한 아미노산으로의 대체(보존적 치환)를 포함할 수 있다. 유사한 아미노산은 예를 들어, 하기 제시된 바와 같이 함께 그룹화된 관련 특성을 갖는 측쇄 모이어티를 갖는 아미노산이다:

[0400] (i) 염기성 측쇄: 리신(K), 아르기닌(R), 히스티딘(H);

[0401] (ii) 산성 측쇄: 아스파르트산(D) 및 글루탐산(E);

[0402] (iii) 비하전된 극성 측쇄: 아스파라긴(N), 글루타민(Q), 세린(S), 트레오닌(T) 및 티로신(Y); 또는

[0403] (iv) 비-극성 측쇄: 글리신(G), 알라닌(A), 발린(V), 류신(L), 이소류신(I), 프롤린(P), 페닐알라닌(F), 메티오닌(M), 트립토판(W) 및 시스테인(C).

[0404] 변이체 서열은 아미노산 치환, 첨가, 결실 및/또는 삽입을 포함할 수 있다.

[0405] 보존적 치환, 첨가 또는 결실은 예를 들어, 하기 표에 따라 이루어질 수 있다. 두 번째 열의 동일한 블록 및 바람직하게는, 세 번째 열의 동일한 선상의 아미노산은 서로 치환될 수 있다:

지방족	비-극성	GAP
		ILV
	극성-비하전됨	CSTM
		NQ
	극성-하전됨	DE
		KR
방향족		HFWY

[0406]

[0407] 본 발명은 또한, 상동 치환(치환 및 대체 둘 모두는 존재하는 아미노산 잔기의 대안적 잔기로의 상호교환을 의미하는 것으로 본원에 사용됨), 예를 들어, 유사-유사 치환(like-for-like substitution) 예컨대, 염기성 대 염기성, 산성 대 산성, 극성 대 극성 등의 치환을 포함한다. 비-상동 치환은 또한, 한 부류의 잔기로부터 또 다른 부류로 발생할 수 있거나, 대안적으로, 비천연 아미노산, 예컨대, 오르니틴의 내포를 포함한다.

[0408] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "변이체"는 야생형 아미노산 서열 또는 야생형 뉴클레오티드 서열과의 특정 상동성을 갖는 실체를 의미할 수 있다. 용어 "상동성"은 "동일성"과 동등할 수 있다.

[0409] 변이체 서열은 대상 서열과 적어도 50%, 55%, 65%, 75%, 85% 또는 90% 동일할 수 있거나, 바람직하게는, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 동일할 수 있는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 전형적으로, 변이체는 대

상 아미노산 서열과 동일한 활성 부위 등을 포함할 것이다. 상동성이 또한 유사성(즉, 유사한 화학적 특성/기능을 갖는 아미노산 잔기) 면에서 고려될 수 있지만, 본 발명과 관련하여, 서열 동일성의 면에서 상동성을 표현하는 것이 바람직하다.

- [0410] 변이체 서열은 대상 서열과 적어도 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 75%, 85% 또는 90% 동일할 수 있거나, 바람직하게는, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 동일할 수 있는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 상동성이 또한 유사성 면에서 고려될 수 있지만, 본 발명과 관련하여, 서열 동일성의 면에서의 상동성을 표현하는 것이 바람직하다.
- [0411] 바람직하게는, 본원에 상세히 기재된 SEQ ID NO 중 임의의 하나에 대한 동일성 퍼센트를 갖는 서열에 대한 언급은 언급된 SEQ ID NO의 전체 길이에 걸쳐 언급된 동일성 퍼센트를 갖는 서열을 나타낸다.
- [0412] 동일성 비교는 육안으로 또는 더욱 일반적으로, 용이하게 입수가능한 서열 비교 프로그램의 도움으로 수행될 수 있다. 이러한 시점에서 입수가능한 컴퓨터 프로그램은 2개 이상의 서열 간의 상동성 또는 동일성 백분율을 계산할 수 있다.
- [0413] 상동성 백분율은 연속 서열 대비 계산될 수 있으며, 즉, 한 서열은 다른 서열과 정렬되며, 한 번에 한 잔기씩 한 서열의 각 아미노산은 다른 서열의 상응하는 아미노산과 직접 비교된다. 이는 "갭핑되지 않은" 정렬로 불린다. 전형적으로, 이러한 갭핑되지 않은 정렬은 상대적으로 짧은 수의 잔기에 대비해서만 수행된다.
- [0414] 이는 매우 단순하며 일관된 방법이지만, 예를 들어, 동일한 쌍의 서열에 있어서, 뉴클레오타이드 서열에서 하나의 삽입 또는 결실은 다음 코돈이 정렬 밖으로 벗어나게 하며, 따라서, 전반적인 정렬이 수행될 때 상동성 퍼센트에서 큰 감소를 잠재적으로 초래할 수 있음은 고려되지 않았다. 결과적으로, 대부분의 서열 비교 방법은 전체 상동성 스코어를 과도하게 훼손시키지 않으면서 가능한 삽입 및 결실을 고려한 최적의 정렬을 생성하도록 설계된다. 이는 서열 정렬에서 "갭"을 삽입하여 국소 상동성을 최대화시키고자 함으로써 달성된다.
- [0415] 그러나, 이러한 더욱 복잡한 방법은 정렬에서 발생하는 각 갭에 대한 "갭 페널티"를 할당하여, 동일한 수의 동일한 아미노산에 있어서, 두 개의 비교된 서열 간의 더 높은 관련성을 반영하는, 가능한 적은 갭을 갖는 서열 정렬이 많은 갭을 갖는 서열보다 더 높은 스코어를 획득할 것이다. 갭의 존재에 대해 상대적으로 높은 코스트를 부과하고, 갭에서 각 후속 잔기에 대한 더 낮은 페널티를 부과하는 "아핀 갭 코스트(affine gap cost)"가 전형적으로 이용된다. 이는 가장 일반적으로 사용되는 갭 스코어링 시스템이다. 물론 높은 갭 페널티는 더 적은 갭을 갖는 최적화된 정렬을 생성시킬 것이다. 대부분의 정렬 프로그램은 갭 페널티의 변형을 허용할 것이다. 그러나, 서열 비교를 위해 이러한 소프트웨어를 사용할 경우 디폴트 값을 사용하는 것이 바람직하다. 예를 들어, GCG Wisconsin Bestfit 패키지를 사용할 경우, 아미노산 서열에 대한 디폴트 갭 페널티는 갭에 있어서 -12이며, 각 연장부에 있어서 -4이다.
- [0416] 따라서, 최대 백분율 상동성의 계산은 먼저 갭 페널티를 고려한 최적 정렬의 생성을 필요로 한다. 이러한 정렬을 수행하는데 적합한 컴퓨터 프로그램은 GCG Wisconsin Bestfit 패키지이다(University of Wisconsin, U.S.A.; Devereux *et al.* (1984) *Nucleic Acids Res.* 12: 387). 서열 비교를 수행할 수 있는 다른 소프트웨어의 예는 비제한적으로, BLAST 패키지(문헌 [Ausubel *et al.* (1999) *ibid* - Ch. 18] 참조), FASTA(Atschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 403-410) 및 비교 도구를 위한 GENWORKS 슈트를 포함한다. BLAST 및 FASTA 둘 모두는 오프라인 및 온라인 검색에서 입수가능하다(문헌 [Ausubel *et al.* (1999) *ibid*, pages 7-58 to 7-60] 참조). 그러나, 일부 적용에 있어서, GCG Bestfit 프로그램을 사용하는 것이 바람직하다. BLAST 2 서열로 불리는데도 다른 도구는 또한, 단백질 및 뉴클레오타이드 서열 비교에 이용가능하다(문헌 [*FEMS Microbiol. Lett.* (1999) 174: 247-50; *FEMS Microbiol. Lett.* (1999) 177: 187-8] 참조).
- [0417] 최종 상동성 백분율이 동일성 면에서 측정될 수 있지만, 정렬 과정 자체는 전형적으로, 양자택일 쌍(all-or-nothing pair) 비교를 기반으로 하지 않는다. 대신에, 화학적 유사성 또는 진화적 거리에 기초하여 각 쌍별 비교에 스코어를 할당하는 척도 유사성 스코어 매트릭스가 일반적으로 사용된다. 일반적으로 사용되는 이러한 매트릭스의 예는 BLOSUM62 매트릭스이다 - 프로그램의 BLAST 슈트에 대한 디폴트 매트릭스. GCG Wisconsin 프로그램은 일반적으로, 공개 디폴트 값 또는 제공되는 경우 사용자 기호 비교 표를 이용한다(추가 상세한 내용에 있어서는 사용자 매뉴얼 참조). 일부 적용에 있어서, GCG 패키지에 있어서 공개 디폴트 값, 또는 다른 소프트웨어의 경우, 디폴트 매트릭스, 예컨대, BLOSUM62를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0418] 일단 소프트웨어가 최적의 정렬을 생성하였다면, 상동성 백분율, 바람직하게는, 서열 동일성 백분율을 계산하는 것이 가능하다. 소프트웨어는 전형적으로, 이를 서열 비교의 일부로서 수행하며, 수치 결과를 생성한다.

- [0419] "단편"은 또한 변형이며, 이 용어는 전형적으로, 기능적으로 또는 예를 들어, 검정에서 관심이 있는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드의 선택된 영역을 나타낸다. 따라서, "단편"은 전장 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드의 일부인 아미노산 또는 핵산을 나타낸다.
- [0420] 이러한 변종은 표준 재조합 DNA 기법 예컨대, 부위-특이적 돌연변이 유발을 이용하여 제조될 수 있다. 삽입을 수행하고자 하는 경우, 삽입 부위의 어느 한 측면의 자연 발생 서열에 상응하는 5' 및 3' 측면인접 영역과 함께 삽입부를 인코딩하는 합성 DNA가 제조될 수 있다. 측면인접 영역은 자연 발생 서열의 부위에 상응하는 간편한 제한 부위를 함유하여, 서열이 적절한 효소(들)로 절단되고 합성 DNA가 절단부에 리게이팅될 수 있다. 그 후, DNA는 본 발명에 따라 발현되어 인코딩된 단백질을 만든다. 이러한 방법은 단지 DNA 서열의 조작을 위한 당업계에 공지된 많은 표준 기법의 예시이며, 다른 공지된 기법이 또한 사용될 수 있다.
- [0421] 조합
- [0422] 본 발명의 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포, 단핵구 또는 백터는 면역 체크포인트 억제제와 조합되어 사용될 수 있다.
- [0423] 대안적으로, 본 발명의 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포, 단핵구 또는 백터는 TAA-특이적 세포와 조합되어 사용될 수 있다.
- [0424] 대안적으로, 본 발명의 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포, 단핵구 또는 백터는 CAR을 발현하는 TAA-특이적 T 세포와 조합되어 사용될 수 있다.
- [0425] 대안적으로, 본 발명의 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포, 단핵구 또는 백터는 트랜스제닉 TCR을 발현하는 TAA-특이적 세포와 조합되어 사용될 수 있다.
- [0426] 대안적으로, 본 발명의 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포, 단핵구 또는 백터는 면역 체크포인트 억제제 및 트랜스제닉 TCR을 발현하는 TAA-특이적 T 세포와 조합되어 사용될 수 있다.
- [0427] 대안적으로, 본 발명의 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포, 단핵구 또는 백터는 면역 체크포인트 억제제 및 CAR을 발현하는 TAA-특이적 T 세포와 조합되어 사용될 수 있다.
- [0428] 대안적으로, 본 발명의 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포, 단핵구 또는 백터는 1-메틸-트립토판 (1-MT)과 조합되어 사용될 수 있다.
- [0429] 본원에 사용된 바와 같은 문구 "~와 조합되어 사용되는"은 본 발명의 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포, 단핵구 또는 백터와 면역 체크포인트 억제제 및/또는 TAA-특이적 T 세포의 순차적, 별도 또는 동시 투여를 포함한다.
- [0430] 본 발명의 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포, 단핵구 또는 백터는 TAA-특이적 T-세포 및/또는 면역 체크포인트 억제제 이전 적어도 5분, 적어도 10분, 적어도 15분, 적어도 30분, 적어도 45분, 적어도 60분에 투여될 수 있다.
- [0431] 본 발명의 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포, 단핵구 또는 백터는 TAA-특이적 T-세포 및/또는 면역 체크포인트 억제제 이전 적어도 1시간, 적어도 2시간, 적어도 3시간, 적어도 4시간, 적어도 5시간, 적어도 6시간, 적어도 12시간, 적어도 24시간, 적어도 48시간, 적어도 72시간에 투여될 수 있다.
- [0432] 본 발명의 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포, 단핵구 또는 백터는 TAA-특이적 T-세포 및/또는 면역 체크포인트 억제제 이전 적어도 1일, 적어도 2일, 적어도 3일, 적어도 4일, 적어도 5일, 적어도 6일, 적어도 7일, 또는 적어도 14일에 투여될 수 있다.
- [0433] 본 발명의 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포, 단핵구 또는 백터는 TAA-특이적 T-세포 및/또는 면역 체크포인트 억제제 이전 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 4주, 적어도 5주, 적어도 6주, 적어도 7주, 적어도 8주, 적어도 9주, 적어도 10주, 적어도 11주, 또는 적어도 12주에 투여될 수 있다.
- [0434] 본 발명의 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포, 단핵구 또는 백터는 TAA-특이적 T-세포 및/또는 면역 체크포인트 억제제 이전 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 4개월, 적어도 5개월, 적어도 6개월, 적어도 7개월, 적어도 8개월, 적어도 9개월, 적어도 10개월, 적어도 11개월, 또는 적어도 12개월에 투여될 수 있다.
- [0435] 본 발명의 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포, 단핵구 또는 백터는 TAA-특이적 T-세포 및/또는 면

역 체크포인트 억제제 이전 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 4개월, 적어도 5개월, 적어도 6개월, 적어도 7개월, 적어도 8개월, 적어도 9개월, 적어도 10개월, 적어도 11개월, 또는 적어도 12개월에 투여될 수 있다.

- [0436] 본 발명의 본원에 사용된 바와 같은 문구 "~와 조합되어 사용되는"은 본 발명의 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포, 단핵구 또는 백터와 1-메틸-트립토판(1-MT)의 순차적, 별도 또는 동시 투여를 포함한다.
- [0437] 본 발명의 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포, 단핵구 또는 백터는 1-메틸-트립토판(1-MT) 이전 적어도 5분, 적어도 10분, 적어도 15분, 적어도 30분, 적어도 45분, 적어도 60분에 투여될 수 있다.
- [0438] 본 발명의 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포, 단핵구 또는 백터는 1-메틸-트립토판(1-MT) 이전 적어도 1시간, 적어도 2시간, 적어도 3시간, 적어도 4시간, 적어도 5시간, 적어도 6시간, 적어도 12시간, 적어도 24시간, 적어도 48시간, 적어도 72시간에 투여될 수 있다.
- [0439] 본 발명의 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포, 단핵구 또는 백터는 1-메틸-트립토판(1-MT) 이전 적어도 1일, 적어도 2일, 적어도 3일, 적어도 4일, 적어도 5일, 적어도 6일, 적어도 7일, 또는 적어도 14일에 투여될 수 있다.
- [0440] 본 발명의 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포, 단핵구 또는 백터는 1-메틸-트립토판(1-MT) 이전 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 4주, 적어도 5주, 적어도 6주, 적어도 7주, 적어도 8주, 적어도 9주, 적어도 10주, 적어도 11주, 또는 적어도 12주에 투여될 수 있다.
- [0441] 본 발명의 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포, 단핵구 또는 백터는 1-메틸-트립토판(1-MT) 이전 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 4개월, 적어도 5개월, 적어도 6개월, 적어도 7개월, 적어도 8개월, 적어도 9개월, 적어도 10개월, 적어도 11개월, 또는 적어도 12개월에 투여될 수 있다.
- [0442] 본 발명의 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포, 단핵구 또는 백터는 1-메틸-트립토판(1-MT) 이전 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 4개월, 적어도 5개월, 적어도 6개월, 적어도 7개월, 적어도 8개월, 적어도 9개월, 적어도 10개월, 적어도 11개월, 또는 적어도 12개월에 투여될 수 있다.
- [0443] 약학적 조성물
- [0444] 본 발명에 따라 사용하기 위한 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포, 단핵구 면역 체크포인트 억제제, TAA-특이적 T-세포, 백터, 1-메틸-트립토판(1-MT) 및 이들의 조합물은 약학적으로 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제로 제형화될 수 있다.
- [0445] 환자
- [0446] 환자는 인간 환자일 수 있다. 환자는 인간외 동물일 수 있다.
- [0447] 환자는 암 환자일 수 있다. 대안적으로, 환자는 암 발병 위험이 있는 환자일 수 있다.
- [0448] 환자는 암 발병 위험이 있는 것으로 이전에 결정되었을 수 있다. 증가된 위험은 유전자 스크리닝에 의해 및/또는 환자 가족 병력의 고찰을 통해 결정될 수 있었다. 환자는 증가된 암 발병 위험을 나타내는 하나 이상의 유전자 마커를 발현하는 것으로 결정될 수 있다.
- [0449] 적합하게는, 당업자는 증가된 암 발병 위험과 관련된 유전자 위험 인자(예를 들어, 유전자 마커)를 알고 있을 것이다. 당업자는 대상체가 증가된 암 발병 위험을 갖는지의 여부를 결정하기 위해 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법 또는 기술을 이용할 수 있다.
- [0450] 대상체는 이전에 암 치료를 받았을 수 있다. 대상체는 암으로부터 차도가 있는 상태일 수 있다. 대상체는 화학요법에 내성이 있을 수 있다.
- [0451] 본 발명의 일부 양태에서, 환자에는 TAA-특이적 T-세포 및/또는 면역 체크포인트 억제제의 투여 전에 본 발명의 조혈모세포(HSC), 조혈전구세포(HPC), 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 사전 투여되었다.
- [0452] 일 구체예에서, 본 발명의 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 TAA-특이적 T-세포 및/또는 면역 체크포인트 억제제의 투여 전 적어도 6시간, 적어도 12시간, 적어도 24시간, 적어도 48시간, 적어도 72시간에 환자에게 투여된다.
- [0453] 일 구체예에서, 본 발명의 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 TAA-특이적 T-세포 및

/또는 면역 체크포인트 억제제 투여 전 적어도 1일, 적어도 2일, 적어도 3일, 적어도 4일, 적어도 5일, 적어도 6일, 적어도 7일, 또는 적어도 14일에 환자에게 투여된다.

[0454] 일 구체예에서, 본 발명의 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 TAA-특이적 T-세포 및 /또는 면역 체크포인트 억제제 투여 전 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 4주, 적어도 5주, 적어도 6주, 적어도 7주, 적어도 8주, 적어도 9주, 적어도 10주, 적어도 11주, 또는 적어도 12주에 환자에게 투여된다.

[0455] 일 구체예에서, 본 발명의 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 TAA-특이적 T-세포 및 /또는 면역 체크포인트 억제제 투여 전 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 4개월, 적어도 5개월, 적어도 6개월, 적어도 7개월, 적어도 8개월, 적어도 9개월, 적어도 10개월, 적어도 11개월, 또는 적어도 12개월에 환자에게 투여된다.

[0456] 본 발명의 일부 양태에서, 환자에게는 1-메틸-트립토판(1-MT)의 투여 전에 본 발명의 조혈모세포(HSC), 조혈전구세포(HPC), 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구가 사전 투여되었다.

[0457] 일 구체예에서, 본 발명의 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 1-메틸-트립토판(1-MT)의 투여 전 적어도 6시간, 적어도 12시간, 적어도 24시간, 적어도 48시간, 적어도 72시간에 환자에게 투여된다.

[0458] 일 구체예에서, 본 발명의 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 1-메틸-트립토판(1-MT) 투여 전 적어도 1일, 적어도 2일, 적어도 3일, 적어도 4일, 적어도 5일, 적어도 6일, 적어도 7일, 또는 적어도 14일에 환자에게 투여된다.

[0459] 일 구체예에서, 본 발명의 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 1-메틸-트립토판(1-MT) 투여 전 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 4주, 적어도 5주, 적어도 6주, 적어도 7주, 적어도 8주, 적어도 9주, 적어도 10주, 적어도 11주, 또는 적어도 12주에 환자에게 투여된다.

[0460] 일 구체예에서, 본 발명의 HSC, HPC, 골수/단핵구-수임전구세포, 대식세포 또는 단핵구는 1-메틸-트립토판(1-MT) 투여 전 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 4개월, 적어도 5개월, 적어도 6개월, 적어도 7개월, 적어도 8개월, 적어도 9개월, 적어도 10개월, 적어도 11개월, 또는 적어도 12개월에 환자에게 투여된다.

[0461] 인간 및 수의과 치료 둘 모두는 본 발명의 범위 내에 있다.

[0462] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "포함하는(comprising)", "포함하다(comprise)" 및 "포함하여(comprised of)"는 "포함하여(including)" 또는 "포함하다(include)"; 또는 "함유하는" 또는 "함유하다"와의 동의어이며, 포괄적이거나 개방단이며, 추가의 언급되지 않은 구성원, 요소 또는 단계를 배제하지 않는다. 용어 "포함하는", "포함하다" 및 "포함하여"는 또한 용어 "구성되는"을 포함한다.

[0463] 본 발명의 실시는 다르게 나타내지 않는 한, 당업자의 능력 내에 있는 세포 생물학, 분자 생물학, 조직학, 면역학, 종양학의 통상적인 기법을 사용할 것이다. 이러한 기술은 문헌에 설명되어 있다.

[0464] 예를 들어, 문헌 [Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F.M. et al. (1995 and periodic supplements) Current Protocols in Molecular Biology, Ch. 9, 13 and 16, John Wiley & Sons; Roe, B., Crabtree, J. and Kahn, A. (1996) DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques, John Wiley & Sons; Polak, J.M. and McGee, J.O' D. (1990) In Situ Hybridization: Principles and Practice, Oxford University Press; Gait, M.J. (1984) Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; and Lilley, D.M. and Dahlberg, J.E. (1992) Methods in Enzymology: DNA Structures Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA, Academic Press] 참조. 이들 전반적인 내용 각각은 본원에 참조로 통합된다.

[0465] 본 발명의 다양한 바람직한 특징 및 구체예가 이제 비제한적인 예에 의해 기술될 것이다.

[0466] **실시예**

[0467] **실시예 1 - 종양-표적화된 IFN α 는 ALL 모델에서 T 세포-매개된 항-종양 반응을 증대시킨다.**

[0468] 본 발명자들은 *mTie2*-IFN-mirT LV (IFN 마우스), 또는 *mTie2*-GFP-mirT LV 중 어느 하나로 형질도입되거나 Mock-형질도입(둘 모두 대조군 마우스로서 사용됨)된 HSC를 C57Bl/6 마우스에 이식하여, 분화된 TIE2+ 단핵구 자손에 대한 IFN/GFP 발현을 표적화 하였으며, 이는 종양에서 매우 풍부화된다^{15,16}. 이전에 제시된 바와 같이,

mTie2-IFN-mirT LV 형질도입된 세포로의 재구성은 명시적인 부작용 없이 기능적 다중-계통 이식편을 발생시킨다⁸⁻¹⁰. 그 후, 본 발명자들은 재구성된 마우스에 본 발명자들의 이전에 기술된 B-ALL 모델(도 1a)을 접종하고, 대조군 마우스 대비 IFN 마우스에서 백혈병 성장의 억제를 발견하였다(도 1b, c). 항-CTLA4 차단 항체(aCTLA4)의 투여는 대조군 마우스에서 어떠한 효과도 없었으나, IFN 마우스에서 ALL 억제를 추가로 유의하게 향상시켰으며, 이는 IFN 마우스에서 관찰된 반응에 대한 면역 기여를 암시한다. IFN 유전자 치료법과 aCTLA4의 조합은 마우스의 생존을 유의하게 개선시켰다(도 21). 항-종양 면역성의 도입을 조사하기 위해, 본 발명자들은 ALL 세포를 오브알부민(OVA) 모델 항원과 양방향성 프로모터로부터의 절두된 형태의 신경 성장 인자 수용체(NGFR) 세포 표면 마커의 대등한 발현을 허용하는 렌티바이러스 벡터(LV)로 조작하였다(OVA-ALL, 도 5a, b).

[0469] 면역적격 C57BI/6 마우스 내로 주입될 경우, OVA-ALL은 어미 ALL과 비교하여 마우스의 분획에서 더 느린 성장 동태 및 지연된 발병을 보여주었다. 검시시, 모든 마우스는 ALL 세포에 의한 대량의 BM 침윤을 보여주었으며, 마우스에서 NGFR 음성 모세포의 증식과 질환 지연을 보였다(도 5c,d). OVA ALL 세포를 면역결핍 NOD-SCID-IL2Rg^{-/-} (NSG) 마우스에 주입한 경우, 본 발명자들은 어미 세포와 유사한 종양 성장을 관찰하였으며, NGFR 발현 손실은 관찰되지 않았다(도 5c, e). 종합적으로, 이들 결과는 아마도 주입 생성물에 존재하는 희귀한 비-형질도입 또는 침묵(OVA/NGFR 음성)의 ALL 클론의 면역 편집 및 선택을 초래하는 OVA-ALL 변종의 증가된 면역결핍을 나타낸다. 그러나, 어떠한 접종으로도 생존한 마우스는 없었다. 따라서, 본 발명자들은 OVA-ALL에 대한 항-종양 면역 반응을 증대시키는 종양-표적화된 IFN 세포 및 유전자 기반 전달 능력을 시험하였다. ALL은 대조군 마우스에서 급속히 확장된 반면(도 1d-f), IFN 마우스의 혈액 내 모세포의 출현 및 축적이 지연되었으며, BM 및 비장에서의 침윤을 감소시켰다. 참고로, IFN 마우스의 일부는 분석된 모든 장기에서 백혈병의 부재를 보여주었다.

[0470] IFN 마우스로부터의 시험관내 자극된 정제된 비장 CD8⁺ T 세포는 g-IFN-ELISPOT에 대한 특이적 반응의 유도를 보여주었으며, 마우스에서 반응 세포(responder cell) 수의 증가는 가장 낮은 종양 부담을 보여준다(도 1g). OVA-특이적 CD8⁺ T 세포는 IFN 마우스 및 대조군 마우스 둘 모두에서 OVA257-264-H-2Kb-펩타이드 염색에 의해 검출되었으며, 전자의 균의 혈액 및 BM에서 더 높은 백분율 및 수를 갖는다(도 1h-j 및 도 6a). 게다가, 대조군 마우스의 CD8⁺ T 세포는 IFN 마우스의 T 세포에서와 같이 OVA로의 생체의 재-자극시 IFN-g를 방출시키지 않았으며(도 1k), 이는 IFN 마우스 대비 대조군에서 종양 억제의 결핍과 일치하는 기능장애를 암시한다(도 6b-d). 놀랍게도, IFN 마우스에서 CD8⁺ T 세포의 고갈은 항-종양 반응을 증식시켰다(도 1l,m). 종합적으로, 이들 결과는 IFN 마우스에서 종양 신생-항원에 대한 효과적인 반응을 시작할 수 있는 CTL의 도입을 나타낸다.

[0471] 본 발명자들은 또한, 대조군 대비 CD8-고갈된 IFN 마우스에서 초기의 더 낮은 종양 부담을 주목하였으며, 이는 CD8-매개된 대조군 이외의 추가적인 메커니즘이 적어도 초기에 일시적으로 종양 억제에 기여할 수 있음을 암시한다(도 6e). IFN 마우스 및 대조군 마우스 간의 BM 및 비장 ALL 세포의 아포토틱 세포 분획 및 세포 주기 분포의 차이가 존재하지 않은 반면(도 7a-d), EdU 혼입에 의해 측정된 바와 같은 증식율은 IFN 마우스의 BM에서 더 낮았으나, 비장에서는 그렇지 않았다(도 7e,f). 가능하게는, IFN에 의해 직접적으로 촉발되는 증식의 지연은 종양 세포 성장을 억제하는데 효과적인 이펙터 대 표적 비율에서 종양 특이적 CTL의 형성에 유리할 수 있다.

[0472] **실시예 2 - 입양 전달된 트랜스제닉 OT-I T 세포만이 IFN 마우스에서 확장되며 백혈병을 함유한다.**

[0473] T 세포 모집 및 활성화에 대한 타입-I IFN의 효과를 조사하기 위해, 본 발명자들은 IFN 마우스 및 대조군 마우스에서 나이브 트랜스제닉 OVA-특이적 T 세포(OT-I)를 입양 전달시켰다(도 2a). 본 발명자들은 2개 군 사이의 주입 시간을 조절하여 유사한 백혈병 부담하에 OT-I 세포를 주입하고(도 2b 및 도 8a), 그 후 3일째에 마우스를 분석하였다. 본 발명자들은 OT-I 세포가 종양-비함유 대조군과 유사한 낮은 수로 회수된 대조군 마우스보다 백혈병 주입된 IFN 마우스의 비장 및 BM에서 실질적으로 더 높은 수의 OT-I 세포를 관찰하였다(도 2c). 세포형광 측정 분석은, 백혈병-함유 IFN 마우스 및 대조군 마우스에서 대부분의 OT-I 세포가 활성화 수용체 LAG3를 상향 조절하였으며, 중심 메모리 또는 이펙터 메모리 표현형을 획득하였으며, 전자의 군에서 증가된 활성화를 가짐을 보여주었다.

[0474] 이러한 발견은 OT-I 세포가 수확물의 나이브 표현형을 유지한 종양-비함유 대조군 마우스와 극명하게 대조되는 것이었다(도 2d 및 도 8b-d). 백혈병 부담은 입양 T 세포 전달 후 초기에 이미 대조군 마우스 대비 IFN 마우스에서 현저하게 감소되었다(도 8e). 대조군 마우스의 거의 모든 백혈병 세포는 NGFR 마커를 발현한 반면, IFN 마우스에서 NGFR 음성 세포의 분획이 증가하였으며, 이는 OVA-ALL에 대한 선택적 압력을 암시한다(도 8f).

[0475] 그 후, 본 발명자들은 생존 조장에 있어서 IFN 세포 치료법과 OT-I T 세포의 입양 전달의 시너지를 연구하였다(도 2e). OT-I T 세포의 주입은 대조군에서 없는 것에 비해 20% 마우스 생존을 발생시킨 반면, 조합된 치료는

생존율을 67%까지 현저하게 향상시켰다(도 2f). IFN + OT-I 마우스의 종단 분석은 OT-I 확장을 나타냈으며, 이는 주입시 6일째에 피크로 나타났으며, 일시적 LAG3 상향 조절 및 OVA-ALL 제거를 수반하였다(도 2g,h 및 도 9a). 물론, 질환으로 쓰러진 이러한 IFN + OT-I 마우스(도 2g,h 및 도 9a에서 검정색으로 도시됨)는 혈액 및 BM에서 NGFR 음성 ALL 세포의 증식을 보여주었으며, 이와 같이, 이는 OVA-발현 백혈병 세포가 주입 OT-I 세포에 의해 근절되었음을 확인시켜준다(도 9a, c). 반대로, 대부분의 대조군 마우스에서 OT-I 세포는 확장되지 못하였으며, T 세포 고갈의 징후인 항시적으로 높은 수준의 LAG3 발현을 보여주었다(도 2g, h). 따라서, 주입 OT-I 세포는 이러한 마우스에서 OVA-발현 B-ALL 세포를 근절하는데 실패하였는데, 이는 순환 NGFR-발현 백혈병 세포의 초기의 그러나, 일시적인 감소 후 혈액 및 BM에서 이들의 증식에 의해 입증된 바와 같다(도 9b,d).

[0476] 부검시, IFN+ OT-I 마우스의 BM, 비장 및 림프절에서 OT-I T 세포의 우수한 분획이 메모리 풀로서 유지되고, PD1 억제 마커를 하향 조절한 반면, CTRL + OT-I 마우스에서 대부분의 OT-I T 세포는 고갈된 이펙터의 특징을 가졌는데, 이들이 모두 PD1 마커를 발현하기 때문이다(도 9e, f). 예측되는 바와 같이, 종양 주입되지 않은 대조군 마우스에 주입된 OT-I T 세포는 확장되지 않았으며, Lag3 발현을 상향 조절하지 않았다(도 2g,h). 종합적으로, 이들 데이터는, OT-I 세포가 IFN 마우스에서 양호한 활성화 및 확장을 겪어 종양 제거로 이어지는 반면, 이들 세포는 대조군 마우스에서는 저-기능성이며, 확장에 실패하고, 고갈 표현형의 증거를 나타내었음을 보여준다.

[0477] **실시예 3 - IFN 마우스에서 M1 및 Th1 반응에 대한 프라이밍된 면역 유전자 시그니처; 및 IFN 유전자 치료법은 종양 미세환경(TME)에서 백혈병-유도된 변화를 상쇄시키고, 면역자극 프로그램을 부과한다.**

[0478] 본 발명자들의 IFN 유전자 전달 전략이 백혈병 미세환경을 변경시켜 효과적 면역 반응의 유도에 유리한지의 여부를 연구하기 위해, 본 발명자들은 백혈병 접종 전 및 후에 대조군 및 IFN 마우스의 비장 및 BM에서 암 면역 프로파일링에 사용되는 750개 유전자 패널에 대한 유전자 발현의 다중화된 측정을 수행하였다. IFN vs. 대조군 마우스의 두 조직 모두에서 거의 모두 현저하게 상향 조절된 유전자는 IFN 자극된 유전자(ISG)였으며, 비장에서 T-세포 활성화, 항원 처리, 대식세포/DC 활성화, NK 활성화 및 온전한 면역성 유전자는 본 발명자들의 처리가 이들 조직에서 IFN/Th1 반응 시그니처를 부과함을 확인시켜준다. 이러한 변화는 종양 접종 후에 분명히 유지되었으며, 백혈병-관련 유전자의 하향 조절에 의해 달성되었다(도 3a). 그 후, 본 발명자들은 비장 CD4+ T 세포를 정제하여 선택된 유전자에서 정보를 얻고, Th1 전사 인자 TBET를 인코딩하는 Tbx21의 현저한 상향 조절을 보여주었으며, 대조군 종양 함유 마우스 대비 IFN 마우스에서 원형 Th2 및 Treg 유전자에서의 변화를 보여주지 않았다. 본 발명자들은 또한, IFN 마우스에서 I117 유전자의 상향 조절을 관찰하였으나, 이러한 변화는 다른 원형 I122 및 Rorc Th17 유전자의 상향 조절을 수반하지 않았다(도 3b 및 도 10a).

[0479] 그 후, 본 발명자들은 혈액, 비장 및 BM에서 골수 세포의 표현형을 특성 결정하였다. 본 발명자들은 대조군 마우스 대비 IFN 마우스의 혈액에서 증가된 백분율의 고전적 (Ly6C+Ly6G-) 단핵구 및 감소된 백분율의 비-고전적 (Ly6C-Ly6G-) 단핵구를 발견하였으며, 이러한 차이는 백혈병 접종시 추가로 향상되었다(도 3c 및 도 11a). 본 발명자들은 또한 IFN 마우스에서 증가된 순환 과립구(Ly6Cint Ly6G+)를 발견하였다. 대조군 마우스의 비장에서 백혈병 성장은 미숙한 골수 세포(CD11cint MHCII-F4/80-)의 확장 및 MHC-II 음성 M2 대식세포의 증가된 백분율을 수반한 반면, IFN 마우스에서는 이들 변화 중 어느 것도 관찰되지 않았다(도 11b-d). 또한, 백혈병-관련 변화는 IFN 마우스의 BM 골수 세포에서 부재하였으며, 이는 대신 MHC-I 상에 면역-우성 OVA₂₅₇₋₂₆₄ 펩티드를 제시하는 DC 및 DC의 분획물의 증가를 나타냈다(도 12a,b 및 도 18). 유사하게는, 백혈병 마우스의 비장 및 BM에서 관찰된 NK 및 NKT 세포의 변화 - 활성화 NKG2D 수용체의 감소된 발현 포함 -는 IFN 마우스에 부재하였다(도 13a-e).

[0480] RNA-시퀀싱(RNA-Seq) 분석은 대식세포에서 백혈병 유도된 전사 변화를 드러냈으며, 이는 실질적으로 IFN 유전자 치료법에 대응하였다(도 22a,b). 대조군 마우스 대비 ALL 마우스로부터의 비장 대식세포는 면역억제 사이토킨 IL-10, 억제 면역 체크포인트 PD-1을 인코딩하는 유전자는 물론 면역 자극 유전자 온톨로지(GO) 용어에 대한 세포 분열 및 반응과 연결된 유전자를 상향 조절하였다. 지방산 대사, 백혈구 활성화 및 항원 제시와 관련된 GO 용어에 있어서 하향 조절된 유전자가 풍부화되었다(도 19a,c). ALL 마우스에서 IFN 유전자 치료법은 방어 반응, 백혈구 이동 및 인터페론 GO 용어에 대한 반응에서 풍부한 IFN-자극된 유전자(ISC)의 상향 조절을 특징으로 하는 면역자극 프로그램을 유도하였으며, I110의 백혈병 유도된 상향-조절 및 MHC II 유전자의 하향-조절을 방해하였다(도 19b-d). ALL 마우스에서 IFN 유전자 치료법은 대조군에서 촉발된 것보다 높은 수준으로 ISC를 유도하였으며(도 19d 및 도 22a), 대조군 및 IFN 종양-비함유 마우스로부터의 대식세포의 전사체는 높은 연관성을 보인다 반면, 이들은 ALL 및 IFN+ALL 군으로부터 명백히 구별되었다(도 22b). 이러한 데이터는 본 발명자들의 단핵

구-매개된 유전자 치료법이 TME에 대한 IFN을 우선적으로 표적으로 한다는 이전의 보고를 확인시켜 주고 확장시킨다(De Palma, M. et al. (2008) Cancer Cell 14: 299-311; Escobar, G. et al. (2014) Sci. Transl. Med. 6: 217ra3; Catarinella, M. et al. (2016) EMBO Mol. Med. 8: 155-170).

[0481] 더욱 비편향된 방식으로 TME에 대한 IFN 유전자 치료법 및 백혈병의 영향을 분석하기 위해, 본 발명자들은 IFN 유전자 치료법으로 처리되거나 처리되지 않은 대조군 및 종양-함유 마우스의 비장으로부터 분리된 CD11b+ 세포에 대한 단일-세포 (sc)RNA-Seq를 수행하였다. 액적 기반 접근법(Zheng, G.X. et al. (2017) Nat. Commun. 8: 14049)을 이용하여, 본 발명자들은 10,821개 세포로부터 scRNA-Seq 데이터를 생성시키고, 평균 1,338 유전자/세포를 검출하였다. 공개된 데이터세트(Lavin, Y. et al. (2014) Cell 159: 1312-1326; Varol, D. et al. (2017) Immunity 46: 1030-1044; ImmGen)를 이용한 그래프-기반 클러스터링 및 유전자 시그니처 분석은 단핵구(cl. 1-3), 호중구(cl. 4-6), 수지상 세포(cl. 7), 대식세포(cl. 8), 자연 킬러 및 T 세포(cl. 9), 비만 세포(cl. 10) 및 B 세포(cl. 11)에 상응하는 11개 클러스터를 식별하였다. 비-고전적(cl. 1) 및 고전적(cl. 2) 단핵구, 클러스터 공동-발현 단핵구 및 호중구 유전자(cl. 3)(Yáñez, A. et al. (2017) Immunity 47: 890-902) 및 호중구 성숙 중간체를 포함하는 단핵구와 호중구 집단 내에 이질성이 관찰되었다(도 19e 및 도 23a,b). 백혈병은 비-고전적 단핵구의 전사적 랜스케이프에 대해 큰 영향을 미쳤으며(도 19f), 이는 종양-비함유 마우스의 비장에서 확장되었다(도 11c 참조). 대식세포 및 DC를 포함하는 다른 골수 세포 집단은 백혈병을 상대적으로 덜 유도한 변화를 보였다(도 24). 종양-관련된 비-고전적 단핵구는 염증의 음성 조절 및 보체 활성화와 같은 GO 용어에서 풍부화된 유전자를 상향 조절한 반면, 이들은 항원 처리 및 제시에 연관된 유전자를 하향-조절하였다(도 19g). IFN 유전자 치료법은, 방어 및 온전한 면역 반응과 관련된 GO 용어에서 풍부화된 유전자는 물론 MHC II 유전자의 상향 조절에 의해 입증된 바와 같이, ALL 마우스로부터의 비-고전적 단핵구에 ISG-구동된 면역자극 프로그램을 부과하였다(도 19g, h). IFN 유전자 치료법에 의한 TME의 전사 재프로그래밍은, 그래프 기반 클러스터링 및 상이한 유전자 발현에 의해 드러난 바와 같이(도 19f,h), IFN 유전자 치료법(도 25a)에 반응하지 않은 마우스로부터의 비-고전적 단핵구에서 덜 효과적이었다. 비-고전적 단핵구로부터의 scRNA-Seq 데이터의 하위클러스터링은 4개의 주요 하위클러스터를 식별하였다(1A 내지 1D; 도 25b). 하위클러스터 1A는 대조군 및 IFN 마우스 둘 모두로부터의 무질환 마우스로부터의 세포를 포함한 반면, 나머지 3개의 하위클러스터는 IFN+ALL 반응자(1B), IFN+ALL 비반응자(1C) 및 ALL(1D)로부터의 세포와 크게 중복되었다. 최소-스패닝 트리(MST) 분석은 1A 내지 1D의 궤적을 드러냈으며, 비반응자 대 반응자 IFN 마우스로부터의 세포에서 부분적 vs. 효과적인 재프로그래밍을 확인시켜준다(도 19i).

[0482] 덧붙여, 본 발명자들은 또한 종양-주입된 IFN 마우스의 BM에서 FOXP3+CD25+CD4+ T 세포의 증가된 수를 발견하였다(도 12c,d). 종합적으로, 이러한 변화는 IFN 마우스에서 M1 및 Th1 반응의 활성화에 대한 프라이밍과 일치하며, 이는 백혈병 집중시 보호성 면역 반응의 유도에 유리할 수 있다.

[0483] **실시예 4 - IFN 처리는 다중 종양 항원을 표적으로 하는 이중 항-종양 반응을 유도한다.**

[0484] 그 후, 본 발명자들은 종양-표적화된 IFN α 처리가 또한 마우스에서 장기 이중 반응을 촉진할 수 있는지의 여부를 조사하였다. 놀랍게도, IFN 마우스의 평균 24%(5개의 상이한 실험의 평균, n=11, 14, 8, 16, 12)는 장기간 생존하였으며, 질병이 효과적으로 치유된 반면, 대조군 마우스의 단지 2%(n=13, 14, 8, 16, 13)만이 이에 대하여 생존하였다(도 4a 및 도 14a에 제시된 한 대표적인 실험). 참고로, 생존 시간을 기반으로 하여 마우스를 계층화시킴으로써, 본 발명자들은 종양 주입 후 초기에 안락사된 마우스가 낮은 백분율의 순환 OVA-특이적 T 세포를 보였으며, NGFR 음성 ALL은 출현하지 않았음을 발견하였다(도 14b). 반대로, 후기 시점에서 안락사된 마우스는 가변 비율의 순환 OVA-특이적 T 세포의 유도를 보여주었으며, NGFR-음성 ALL 클론이 출현하였다(도 14b). 이러한 결과는 질병에 굴복한 마우스가 면역 반응을 일으키지 못하고 매우 초기에 죽거나, 항-OVA 반응을 일으키지만, 면역-선택된 OVA 음성 ALL 클론의 고갈 또는 출현으로 인해 마우스를 보호하는데 있어서 이들 세포가 실패하였기 때문에 궁극적으로 사망함을 암시한다. 장기 생존체는 안정한 순환 OVA-특이적 T 세포를 보였으며, OV-ALL로 재-접종되는 경우, 무질환을 유지하였다(도 4b 및 도 14c). 종양 제거는 순환 OVA-특이적 T 세포의 확장과 관련되었으며, 이는 메모리 T 세포 반응의 발달이 후속 종양 집중으로부터 마우스를 보호하는데 있어서 주요 역할을 담당함을 시사한다(도 14d). 놀랍게도, 장기 생존 IFN 마우스는 이들 세포 또는 어미 세포 단독의 1 대 1 비율로 재-접종된 경우 OVA-발현 및 어미 OVA-음성 ALL 세포 둘 모두를 효과적으로 제거하였으며, 이는 추가적인 종양-관련 항원(TAA)에 대한 반응의 확산이 발생하였으며, 장기 이중 보호를 달성하는데 필요할 수 있음을 시사한다(도 4c,d 및 도 14e).

[0485] **실시예 5 - IFN 처리와 CTLA-4 차단의 조합은 백혈병에 대한 생존을 향상시킨다.**

- [0486] 그 후, 본 발명자들은 본 발명자들의 실험 OVA-ALL 모델에서 종양-표적화된 IFN α 처리로의 CTLA-4 차단 치료법의 조합을 조사하였다(도 4e). 모든 처리군 - IFN 유전자 치료법 또는 aCTLA4 단독으로의 처리 또는 이들의 조합-은 대조군 대비 마우스 생존율을 현저하게 증가시킨 반면, 조합 치료법은 제2 실험(IFN+aCTLA4 30% vs aCTLA4 8%; 도 4g 및 도 15b)에서 확인된 바와 같이 더욱 효과적이었다(IFN 21%; aCTLA4 20%; CTRL+아이소형 대조군 항체 7%; IFN+aCTLA4 36%; 도 4f 및 도 15a). IFN 또는 aCTLA-4 처리는 PB에서 OVA207 특이적 T 세포의 백분율을 증가시켰으며, 이는 조합 군에서 추가로 증가되었다(도 16b). 따라서, 지연된 질병 과정(도 16a)에 일관되게 수반되지는 않았지만 NGFR-음성 ALL의 면역 선택은 IFN+aCTLA4 및 aCTLA4 군에서 더욱 명백하였으며, 이는 단일 신생-항원에 대한 면역 반응은 종양 보호를 제공할 수 없음을 암시한다. 우성 OVA 항원 이외에, 본 발명자들의 ALL 모델은 또한 형질전환된 표현형 유도를 돕는 잠재적인 신생-항원으로서 OFF(이는 miR-126과 공동-발현됨) 및 원핵세포 트랜스-활성인자 tTA(이는 miR-126 발현을 상향 조절함)를 발현한다(도 1a 참조). 본 발명자들은 tTA, OFF, NGFR 또는 OVA를 발현하는 LV가 형질도입된 표적 세포를 갖는 장기 생존 마우스(도 4f에 도시된 실험)의 말초혈 단핵 세포(PBMC)를 자극하였으며, ELISPOT에 의해 γ -IFN 생성을 측정하였다. 대부분의 이러한 마우스는 OVA에 더하여 하나 이상의 신생-항원에 대한 반응성을 보였으며, 가장 강한 반응은 tTA에 대해서 관찰되었으며, 가장 약한 반응은 NGFR에 대한 것이다(도 4h).
- [0487] 이러한 발견은 추가의 신생-항원에 대한 면역 반응의 확산이 대부분의 장기 생존 마우스에서 발생하였음을 나타낸다. 그 후, 본 발명자들은 이들 마우스를 1:1 비율의 OVA-양성 및 음성 ALL로 재접종하고, 이들 대부분이 재접종에서 생존하였음을 발견하였다. 놀랍게도, 개별 마우스의 분석은, 생존 실패한 마우스가 종양 항원에 대한 광범위한 반응을 발생시키지 못하였고/거나 하나 초과된 신생-항원이 결핍된 ALL 클론의 선택에 굴복하였음을 나타내었다(보충 표 1). 마우스의 생존에 기초하는 후천성 면역 반응의 추가 지표로서, 본 발명자들은 백혈병 접종 전 및 후에 PBMC의 TCR- β 상보성 결정 영역(CDR) 레퍼토리를 비교하였다. 다양한 마우스 중 생산적 클론성(각 마우스 내에서 0=폴리클론 내지 1=모노클론 범위의 다양성의 척도) 및 레퍼토리의 유사성 둘 모두는 백혈병 재접종시 증가되었으며, 이는 생존 마우스 중 일반적인 세트의 TAA에 대한 종양-반응성 T 세포 클론의 확장을 나타낸다(도 4i 및 도 16c).
- [0488] 다중 신생-항원에 대한 반응의 발생이 장기 생존의 예측인자인지의 여부를 추가로 평가하기 위해, 본 발명자들은 새로운 실험을 수행하였으며, IFNg-ELISPOT 검정에 의해 모든 공지된 TAA에 대한 T 세포 반응성을 조사하기 위해 OVA-ALL 접종 후 초기에 PBMC를 수집하였다. 다중 TAA를 포함하는 항-종양 레퍼토리를 보여주는 마우스는 단일 TAA에 반응하거나 TAA 부재의 마우스보다 훨씬 더 높은 장기 생존 가능성을 가졌으며, TAA 부재 마우스는 질환으로 인해 모두 치사되었다(도 4j,k).
- [0489] 종합적으로, 이들 데이터는 IFN 유전자 치료법 및 CTLA4 차단 둘 모두가 T-세포 프라이밍을 증가시키며, 종양 신생-항원에 대한 반응 레퍼토리를 확대시키며, 이들 반응이 부가성이며, 종양으로부터 장기 보호할 수 있음을 보여준다.
- [0490] **실시예 6 - IFN 유전자 치료법은 입양 전달된 CAR19-형질도입된 T 세포의 활성화 및 확장을 증대시키며, 생존을 향상시킨다.**
- [0491] 임상 관련 모델에서 IFN 유전자 치료법과 입양 T-세포 전달 사이의 시너지를 추가로 연구하기 위해, 본 발명자들은 마우스 CD19(CART19 세포)를 표적으로 하며, CD28 내성자극 도메인을 혼입시킨 종래 기술된 2세대(2G) CAR을 발현하는 T 세포를 발생시켰으며(Kochenderfer, J.N. et al. (2010) Blood 116: 3875-3886), 마우스를 어미(OVA-음성) ALL로 주입 처리하였다. CAR 유전자 전이에 있어서, 본 발명자들은 양방향 프로모터로부터 CAR 및 NGFR 마커를 대등하게 발현하는 LV를 이용하였다(Casucci, M. et al. (2013) Blood 122: 3461-3472) (도 26a,b). CART19 세포 생착을 허용하기 위해(Davila, M.L. et al. (2013) PLoS One 8: 1-14), 마우스를 주입 전 사이클로포스파미드로 컨디셔닝하였다(도 20a). CART19 세포 단독은 본 발명자들의 실험 조건하에 대조군 마우스에서 신속하게 성장하는 ALL에 대해 거의 영향을 미치지 않는 반면, 이들은 백혈병 부담을 현저하게 억제하였으며, IFN 마우스에서 정상 B 세포를 고갈시켰다(도 20b 및 도 26c). OT-I T 세포를 사용한 결과를 연상시키는, CART19 세포는 IFN에서 초기의 일시적인 LAG3 및 PD1 상향 조절을 드러냈으나, 대조군 마우스에서는 그렇지 않았으며, 이는 장기 IFN 생존체에서 가장 높은 피크에 도달하였다(도 20c 및 도 26d, IFN 장기 생존체는 녹색으로 도시됨). 놀랍게도, NGFR 발현이 또한 IFN 마우스의 CART19 세포에서 상향조절되었으며, 아마도, IFN 마우스에서 CART 세포의 더 높은 대사 활성화에 반응하여 포스포글리세레이트 키나제 프로모터(PGK)의 증가된 활성을 반영한다(도 26e,f). 본 발명자들의 LV에서 NGFR 및 CAR19 발현은 PGK 프로모터에 의해 공동-조절되기 때문에, 후자의 더 높은 발현은 또한 IFN 마우스에서 더욱 효율적인 CD19+ ALL 치사에 유리할 수 있다. 본 발명자들은 또한, 개선된 CD19 CAR 버전(iCAR19)을 시험하였으며, 이는 제1 및 제3 CD3제타 ITAM 도메인에서 불활성화

돌연변이를 함유하며, 표준 CAR19와 비교하여 치사 효율을 개선시키고 T 세포 생존력을 증가시키는 것으로 보고되었다(Kochenderfer, J.N. et al. (2010) Blood 116: 3875-3886). 본 발명자들은 대조군 또는 IFN 마우스를 낮은 또는 높은 백혈병 부담하에 CAR19를 발현하는 T-세포 또는 대조군 T-세포로 처리하였다(도 20d 및 도 27a, b). CART19 및 iCART19 세포가 검출가능하나, 대조군 마우스에서 종양 부담에 대한 현저한 효과를 갖지 않는 반면, 이들은 초기 및 후기 중재 실험에서 IFN 마우스에서 ALL을 현저하게 억제하였다(도 20e). 또한, 본 발명자들은 IFN 마우스로부터의 CART19 세포 둘 모두에서 LAG3 상향 조절을 초기에 확인하였다(도 20f). 종단 분석은 ALL 성장 억제 또는 제거에 수반되는 IFN 마우스에서의 iCART19 확장의 피크를 드러냈으며, IFN 마우스에서 NGFR/CAR19 발현의 초기 상향 조절을 드러냈다(도 27c,d). 종합적으로, CART19 세포로 처리된 IFN의 상당 부분은 최신 후속 처리에서도 여전히 살아 있었다(도 20g).

[0492] **재료 및 방법**

[0493] **실험 설계**

[0494] 실험 모델 및 검정의 이전 경험에 따라 샘플 크기를 선택하였다. 분석에서 제외된 샘플 또는 동물은 없었다. 마우스를 각 실험군에 무작위 할당하였다. 본 발명자들은 블라인드 되지 않았다.

[0495] 플라스미드 작제물 및 LV 생성

[0496] mTie2-IFN-mirT, mTie2-GFP-mirT, PGK-OFP, PGK-tTA LV는 종래 기술되어 있다^{9,10,14}. NGFR-OVA 전달 BdLV는 NGFR-GFP BdLV38에서 GFP cDNA (AgeI - SalI) 대신에 PCR에 의해 PGK-OVA LV37로부터 증폭된 OVA cDNA (AgeI - SalI)를 클로닝함으로써 생성하였다. 사용된 프라이머는 다음과 같다: 프라이머 Fw: 5' - CGACCGGTCCACAAAGACAGCACCATTGACA; 프라이머 Rv: 5' - ATGTCTGACTTAAGGGGAAACACATCTGCCAAAGA. NGFR-CD20 전달 BdLV는 NGFR-GFP BdLV에서 GFP cDNA (AgeI 블런트 - SalI) 대신에 합성된 플라스미드((KpnI 블런트 - SalI)로부터 코돈 최적화된 인간 CD20 cDNA를 클로닝함으로써 생성하였다. NGFR-CAR19 및 NGFR-iCAR19 전달 BdLV는 하기 프라이머를 사용하여 NGFR-GFP BdLV에서 GFP cDNA (AgeI - SalI) 대신에 PCR에 의해 종래 기술된(Kochenderfer, J.N. et al. (2010) Blood 116: 3875-3886) CAR19 및 비활성 CAR19 서열을 클로닝함으로써 생성하였다: 프라이머 Rv(비활성 CAR19): 5'-AAACAGCTCCTCGAGTTATCTAGGGGCCA; 프라이머 Rv (CAR19): 5'-AAACAGCTCCCTCGAGTCATCTAGGGGCCAGT; 프라이머 Fw (CAR19 및 비활성 CAR19): 5' - AACACCGGTGTACCGAATTCATGGGCGTG. 농축된 VSV-G-슈도타입 LV를 생성하고, 종래 기술된 바와 같이 역가 측정하였다(Follenzi, A. et al. (2000) Nat. Genet. 25: 217-222).

[0497] **마우스**

[0498] C57Bl/6 Ly45.2 및 Ly45.1 마우스를 Charles River Laboratory로부터 구입하였다. C57Bl/6 Ly45.1/Ly45.2는 San Raffaele Scientific Institute 동물 연구 시설에서 C57Bl/6 Ly45.2 및 C57Bl/6 Ly45.1 마우스를 교배시켜 수득하였으며, HPC 이식을 위한 도너로서 사용하였다. 트랜스제닉 OT-I C57Bl/6 Ly45.2 마우스를 San Raffaele Scientific Institute 동물 연구 시설에서 콜로니로서 유지하였다. 모든 동물 절차는 San Raffaele Scientific Institute (IACUC 600)의 Animal Care and Use Committee에 의해 승인된 프로토콜에 따라 수행하였으며, 이탈리아법에 따라 보건국 및 지방 당국에 전달되었다.

[0499] **조혈모 전구세포(HSPC) 이식**

[0500] C57Bl/6 마우스에서 HSPC 이식

[0501] 6주령 C57Bl/6 Ly45.2/Ly45.1 마우스를 CO2로 안락사시키고, 대퇴골과 경골을 플러싱시킴으로써 BM을 수확하였다. HS/PC에 풍부화된 계통-음성 세포는 면역-자성 칼럼-기반 세포 정제 시스템(계통 세포 고갈 키트 마우스, Miltenyi, #130-090-858)을 사용하여 총 BM으로부터 분리하였다. 그 후, 10⁶ 계통 음성 세포/ml를 사이토킨 콕테일(모두 Peprotech로부터 20ng/ml IL-3, 100ng/ml SCF, 100ng/ml FLT-3L, 50ng/ml TPO)을 함유하는 무혈청 StemSpan 배지(StemCell Technologies)에서 3-4hr 동안 사전-자극하고, 그 후, 동일한 사이토킨-함유 배지에서 12hr 동안 10⁸ 형질도입 유닛/ml의 용량으로 지시된 렌티바이러스 벡터로 형질도입하였다. 형질도입 후, 세포를 세척하고, 10⁶ 세포를 치명적으로 조사된 6주령의 C57Bl/6 Ly45.1 암컷의 꼬리 정맥에 주입하였다. 방사선량은 두 선량으로 935 cGy 스플릿(split)이었다. 형질도입된 세포를 또한, 10% FBS, SCF(100ng/ml), FLT3L(100ng/ml), 페니실린(100 IU/ml), 스트렙토마이신(100ug/ml) 및 2% 글루타민이 보충된 IMDM에서 15일 동안 시험관내 배양하였으며, 그 후, 안정한 조혈 재구성(6주)시 이식된 마우스로부터 분리된 PBMC 세포와 함께

시험하여 종래 기술된 바와 같은 qPCR에 의해 VCN을 정량화하였다(De Palma et al., Blood 2005).

[0502] **종양 연구**

[0503] 마우스 OVA-ALL

[0504] OVA-ALL 하위-클론을 어미 ALL 클론 #1114에 NGFR-OVA BdLV를 형질도입시킴으로써 생성시켰다. 간략하게는, ALL을 10% FBS, 페니실린(100 IU/ml), 스트렙토마이신(100ug/ml), 2% 글루타민, IL3(20ng/ml), SCF(100ng/ml), FLT3L(100ng/ml), TPO(50ng/ml)가 보충된 Stem Span 중에 2×10^6 세포/ml의 농도로 배양물에서 유지시키고, NGFR-OVA BdLV를 2×10^7 TU/ml로 형질도입시켰다. LV 노출 6시간 후, 형질도입된 ALL을 세척하고, 거의 치사되게 조사된 (450 cGy) 수형체 C57Bl/6 Ly45.2 마우스에 정맥내 주입하였다. ALL이 총 PB 세포의 90%에 도달한 경우 14일 후 백혈병 마우스를 희생시키고, BM을 대퇴골과 경골을 플러싱시킴으로써 수확하였다.

[0505] NGFR+ 형질도입된 세포를 면역-자성 세포 라벨링(CD271 MicroBead Kit, Miltenyi, #130-099-023)에 의해 분리하였다. 선택된 ALL의 순도는 세포를 항 NGFR 항체로 라벨링시킴으로써 유동 세포측정 분석에 의해 결정하였으며, 98%로 추정되었다(NGFR+ ALL; 도 5a 참조). 그 후, OVA-ALL 배치를 다중 분취량으로 냉동시키고, 액체 질소에서 저장하고, 모든 실험에 사용하였다. 종양 접종을 위해, 마우스에 200 μ l의 포스페이트 완충 염수(PBS) 중에 재현탁된 3×10^4 어미 ALL 또는 10^5 OVA-ALL의 용량을 정맥내 주입하였다. 재접종 실험에 있어서, 본 발명자들은 1:1 비율의 OVA-ALL 및 어미(OVA-음성) ALL을 혼합하였다(105 종 ALL). 주입 생성물의 조성은 항 NGFR 항체로 혼합 세포를 라벨링시킴으로써 생체내 주입 전에 유동 세포측정 분석에 의해 확인하였다. 종양 성장 동태는 주기적 PB 샘플링에 대한 세포형광측정 분석에 의해 결정하였다. 생존 연구에 있어서, 마우스를 매일 검사하고, 고통의 징후를 보이는 경우, 질병 상태를 평가하고, 후속하여 안락사시키고, 추가 분석을 위해 BM 및 비장을 멸균 상태에서 수집하였다. CTLA-4 차단 실험에 있어서, 마우스 항-마우스 CTLA4 차단 모노클로날 항체(mAb 클론 9D9 BioXCell, #BE0164) 또는 마우스 아이소형 대조군 항체(mAb 클론 MCP-11 BioXCell, #BE0086)를 총 5회 항체 주입에 있어서 3-4일마다 200 μ g/마우스의 초기 용량 이어서, 100 μ g/마우스의 용량으로 어미 ALL 또는 OVA-ALL 주입후 3일째부터 복강내 투여하였다.

[0506] **생체내 CD8 T 세포 고갈**

[0507] 생체내 T 세포 고갈에 있어서, 항 CD8 고갈 모노클로날 항체(mAb 53-6.72 BioXCell, #BE0004-1)를 OVA-ALL 주입 전 1일에 그 후, 전체 실험 기간 동안 3일마다 200ug/마우스의 용량으로 마우스에 복강내 투여하였다.

[0508] **입양 OT-I T 세포 전달**

[0509] 입양 T 세포 실험에 있어서, OT-I T 세포를 면역-자성 선택에 의해 8주령 트랜스제닉 암컷 OT-I C57Bl/6 Ly45.2 마우스의 비장으로부터 정제하였다(CD8+ T 세포 분리 키트, Miltenyi, #130-104-075). 선택된 OT-I T 세포의 순도는 항 CD8, CD4 및 CD3 항체의 패널을 사용하여 세포형광측정 분석에 의해 평가하였다. 1×10^6 나이브 OT-I T 세포를 OVA-ALL 주입 후 지시된 시간에 이식 IFN 또는 CTRL 마우스에 정맥내 주입하였다.

[0510] **CART19 세포의 생성**

[0511] T 세포를 먼저 면역-자성 선택(Pan T 세포 분리 키트, Miltenyi, # 130-095-130)에 의해 8주령 암컷 C57Bl/6 CD45.2+ 마우스의 비장으로부터 정제하고, 후속하여 제조업자의 지시에 따라 항-CD3/CD28 Dyna 비드(ThermoFisher # 11452D)로 활성화시켰다. T 세포를 10%FBS, 페니실린(100U/ml), 스트렙토마이신(100ug/ml), 1% 글루타민, IL2(30u/ml), IL7(5ng/ml), IL15(5ng/ml), Na 피루베이트(1mM), Hepes(20mM), NEAA (1uM) 및 베타-메르캅토에탄올(0.05mM)이 보충된 RPMI에서 배양하였다. 활성화 후 1일째에, T 세포를 10^8 TU/ml의 NGFR-CAR19 또는 NGFR-iCAR19 BdLV로 1×10^6 세포/ml의 농도에서 형질도입시켰다. LV 노출 후 12시간째에, T 세포를 세척하고, 7×10^6 (도 20b로부터의 실험) 및 10^7 (도 20e로부터의 실험) NGFR+ T 세포의 용량으로 마우스에 주입 전 8일 동안 배양물에서 확장시켰다.

[0512] **생체내 Edu 증식 검정**

[0513] 생체내 증식 검정을 BrdU에 대한 대체로 사용되는 티미딘 유사체인 5-에티닐-2'-데옥시우리딘(EdU, Invitrogen)을 사용하여 수행하였다. Edu를 10 mg/ml의 농도로 멸균 1x PBS에 용해시켰다. 분석 전 24h에 마우스에 100 μ g의 Edu를 i.p. 주입하였다. BM 및 비장을 수확하고, 제조업자의 지시에 따라 처리하고(Click-iT® Edu Flow Cytometry Assay Kit, Invitrogen, #C10636), 백혈병 세포로의 Edu 혼입 비율을 유동 세포측정 분석에 의해 측

정하였다.

[0514] **세포 배양 및 형질도입**

[0515] 마우스 EL4 C57Bl/6-유래된 림프종 세포주를 10% FBS, 페니실린(100 IU/ml), 스트렙토마이신(100 μ g/ml) 및 2% 글루타민이 보충된 IMDM에서 유지하였다. 형질도입을 10^8 TU/ml 용량의 지시된 벡터 스톱으로 106 세포/ml의 농도에서 수행하였다. 세포를 12시간 동안 인큐베이션한 후, 세척하여 벡터를 제거하였다. 형질도입된 세포에서 OFP를 유동 세포측정 분석에 의해 배양 7일 후 평가하였다. NGFR 및 CD20 발현을 형질도입 후 7일에 항-NGFR 또는 항-CD20 항체로 세포를 염색시킴으로써 평가하였다(유동 세포측정 단락 참조). 형질도입된 세포의 VCN을 종래 기술된 바와 같이 배양 15일 후 실시간 qPCR에 의해 결정하였다(De Palma et al., Blood 2005).

[0516] **유동 세포측정**

[0517] 모든 세포측정 분석은 FACSCanto II 및 LSRFortessa 기구(BD Bioscience)를 사용하여 수행하고, FlowJo 소프트웨어로 분석하였다(v. 9.3, Tree Star Inc.).

[0518] 배양된 세포

[0519] EL4 세포를 세척하고, 2% FBS를 함유하는 PBS에 재현탁시켰다. 면역염색을 위해, 세포를 4°C에서 15분 동안 항-마우스 Fc 수용체 차단 항체와 인큐베이션하고, 그 후, 항 NGFR 또는 항 CD20 항체와 4°C에서 20분 동안 염색하였다(항체에 있어서, 보충 표 1 참조). 분석으로부터 죽은 세포를 배제시키기 위해, 세포를 세척하고, 10 ng/ml 7-아미노악티노마이신 D(7-AAD)를 함유하는 PBS에 재현탁시켰다.

[0520] 말초혈

[0521] 각 마우스에 있어서, 250 μ l의 말초혈을 45 mg/mL EDTA를 함유하는 10 μ L의 PBS에 첨가하였다. 면역염색을 위해, 공지된 부피의 전체혈(100 μ l)을 먼저 항-마우스 Fc γ III/II 수용체(Cd16/Cd32) 차단 항체와 10분 동안 실온에서 인큐베이션하고, 그 후, 실온에서 15분 동안 모노클로날 항체(항체에 있어서, 보충 표 1 참조)의 존재하에 인큐베이션하였다. 적혈구를 동일 부피의 FBS(100 μ l)의 존재하에 TQ-Prep 워크스테이션(Beckman-Coulter)을 이용한 용해에 의해 제거하여 백혈구를 보호하였다. 정량적 유동 세포측정을 위해, 본 발명자들은 먼저 상기 기술된 바와 같이 공지된 부피의 혈액(100 μ l)을 염색하고 용해시키고, 그 후, 본 발명자들은 공지된 농도를 갖는 고정된 부피(50 μ l)의 유동-카운트 형광구(Flow-count Fluorosphere)(Beckman Coulter, #7547053)를 첨가하였다. 세포의 절대수를 결정하기 위해, 본 발명자들은 하기 식을 이용하였다: 절대 카운트(세포/ μ l) = [카운트된 총 세포 수/(카운트된 총 형광구 수 x 2)] x 유동-카운트 형광구의 농도. OVA-특이적 펜타머 염색에 있어서, 전혈을 먼저 H₂O로 용해시켰다. 그 후, 1×10^6 PBMC를 2mM EDTA 및 0.5% 소 혈청 알부민(BSA)을 함유하는 50ul의 PBS에 재현탁시키고, 10분 동안 실온에서 항-마우스 Fc γ III/II 수용체(Cd16/Cd32) 차단 항체와 인큐베이션하고, 그 후, OVA-특이적 펜타머 시약(0.5 μ g/ 1×10^6 세포) 및 모노클로날 항체(항체에 있어서 보충 표 1 참조)와 추가 10분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 분석으로부터 죽은 세포를 배제시키기 위해, 세포를 세척하고, 2% FBS 및 10 ng/ml의 7-아미노악티노마이신 D(7-AAD)를 함유하는 PBS에 재현탁시켰다. PB에서 Treg 세포 염색을 위해, 본 발명자들은 먼저 상기 기술된 바와 같이 50 μ l의 전혈(항체에 있어서, 보충 표 1 참조)에 대한 표면 염색을 수행하였다. 그 후, 염색된 전혈을 세척하고, 100ul의 고정/투과 용액(eBioscience, #00-5523-00)에 재현탁시키고, 20분 동안 실온에서 인큐베이션하고, 세척하고, 항-마우스 FoxP3 또는 아이소형 대조군 항체를 함유하는 50 μ l의 투과 용액에 재현탁시키고, 20분 동안 실온에서 인큐베이션하였다.

[0522] 골수

[0523] PBS 2% FBS 용액에 대퇴골을 플러싱시키고, 40 μ m 나일론 필터를 통해 세포 현탁액을 통과시킴으로써 BM 세포를 수득하였다. 세포(1×10^6 - 3×10^6 세포)를 세척하고, 2mM EDTA 및 0.5% 소 BSA를 함유하는 100 μ l의 PBS에 재현탁시키고, 항-마우스 Fc γ III/II 수용체(Cd16/Cd32) 차단 항체와 4°C에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 염색을 모노클로날 항체(항체에 있어서 보충 표 1 참조)로 20분 동안 4°C에서 수행하였다. OVA-특이적 펜타머 염색에 있어서, 1×10^6 BM 세포를 PB에 대해 상기 기술된 바와 같이 염색하였다. 모든 세포내 염색 및 일부 표면 염색을 위해, LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Staining (ThermoFisher, #L34959)를 제조업자의 지시에 따라 생존 세포 및 죽은 세포를 구별하는데 사용하였다. BM에서 Treg 염색을 위해, 본 발명자들은 먼저 PB에 대해 상기 기술된 바와 같이 1×10^6 BM 세포에 대한 표면 염색을 수행하였다.

[0524] 비장

- [0525] 비장을 먼저 분쇄하고, 생성된 세포 현탁액을 40 μ m 나일론 필터를 통하여 통과시켰다. 적혈구를 H2O에 의해 용해시키고, 수득된 세포 현탁액을 40 μ m 나일론 필터를 통해 추가로 통과시키고, 2mM EDTA 및 0.5% BSA를 함유하는 냉 PBS로 세척하였다. 세포를 BM에 대해 상기 기술된 바와 같이 처리하고 면역염색하였다.
- [0526] 세포 주기 염색
- [0527] OVA-ALL 주입된 마우스로부터의 BM 세포 및 비장 세포를 상기 기술된 바와 같이 수확하였다. 그 후, 세포를 표면 마커에 대해 염색하고, 세척하고 BD Cytotfix 완충액(BD #554655)을 사용하여 고정하고, 세척하고 BD Perm 2 (BD #347692)으로 투과시키고, 세척하고 PerCP-Cy5.5- 또는 APC-컨쥬게이션된 Ki67 항체로 염색하고, 1 μ g/mL의 Hoechst를 지닌 BD Cytotfix 완충액에 최종적으로 재현탁시켰다. 그 후, 세포를 UV 레이저를 갖춘 BD LSRFortessa 기계에서 분석하였다.
- [0528] 세포 아포토시스 염색
- [0529] OVA-ALL 주입된 마우스로부터의 BM 세포 및 비장 세포를 상기 기술된 바와 같이 수확하였다. 그 후, 세포를 상기 기술된 바와 같이 표면 마커로 염색하였다. 그 후, 염색된 세포를 세포 염색 완충액(BioLegend, #420201)으로 2회 세척하고, Annexin V Binding Buffer (Biolegend #422201)에 재현탁시키고, 15분 동안 실온에서 5 μ l의 퍼시픽 블루 컨쥬게이션된 Annexin V 및 10 μ l의 7-AAD (Biolegend, #420403/420404)와 인큐베이션하였다. 그 후, 400 μ l의 Annexin V Binding Buffer를 각 샘플에 첨가하고, OVA-ALL에서 아포토틱/치사 세포의 비율을 유동 세포측정 분석에 의해 염색으로부터 30분 이내에 측정하였다.
- [0530] **ELISPOT 검정**
- [0531] g-IFN ELISPOT을 5 μ g/ml의 항 마우스 IFN-g 일차 항체(BD, #554430)로 코팅된 96-웰 편평 바닥 플레이트(Millipore)에서 수행하였다. 비장 CD8+ 이펙터 T 세포를 먼저 면역-자성 세포 라벨링(CD8 MicroBead Kit, Miltenyi, #130-049-401)에 의해 정제하고, 순도를 항 CD8, CD4 및 CD3 항체의 패널을 이용하여 세포형광측정 분석에 의해 평가하였다. 후속하여, 이펙터 T 세포를 조사된 (6000 cGy) 10⁵ EL4 표적 세포의 존재하에 105 또는 2x10⁵ 세포/벽의 최종 농도로 플레이팅하였다. 일부 실험에서, 본 발명자들은 또한, 대조군으로서 2.5 μ g/ml의 콘카나발린 A로 이펙터 T 세포를 자극하였다. 37°C/5%CO2에서 46시간 인큐베이션 후, 세포를 세척하고, 2시간 동안 바이오티닐화된 항-마우스 IFN-g 항체(클론 XMG 1.2, BD #554410, 1 μ g/ml)와 인큐베이션하였다. 그 후, 플레이트를 PBS-Tween으로 4회 세척하고, 이어서, PBS로 3회 세척하고, 그 후, 아비딘-POD(Roche #11089153001)를 1시간 동안 첨가하였다(PBS 중 1:5000 희석됨). 그 후, 플레이트를 PBS-Tween으로 4회 이어서 PBS로 3회 세척하고, 그 후, 50 μ l의 3-아미노-9-에틸카르바졸 기질(AEC, SIGMA #A6926/50tab)을 각 웰에 15-20분 동안 첨가하였다. 수돗물을 첨가하여 반응을 중지시키고, 스폿을 ELI-Expert.Elispot-Reader로 정량화하고, Eli.Analyze Version 5.1(A.EL.VIS)에 의해 분석하였다. 이펙터 세포로서 총 PBMC를 사용하는 경우, 총 혈액을 먼저 H2O로 용해시켜 적혈구를 제거하고, 회수된 PBMC를 카운트하고, 10⁵ 세포/웰의 최종 농도로 플레이팅하였다.
- [0532] **RNA 추출, qPCR 및 유전자 발현 분석**
- [0533] BM 세포, 비장 세포 및 정제된 비장 CD4+ T 세포로부터의 RNA 추출은 RNeasy Plus 미니 Kit(Qiagen)를 사용하여 수행하였다. 세포를 베타-메르캅토에탄올이 보충된 Buffer RLT 플러스에 용해시켰다. 그 후, 용해물을 20-게이지 니들을 통해 통과시켰다. 그 후, RNA를 제조업자의 지시에 따라 추출하였다. 추출된 mRNA를 SuperScript Vilo kit (11754250; Invitrogen)를 사용하여 레트로-전사하였다. 단일 유전자에 대한 모든 Q-PCR 분석은 Applied Biosystems(하기 참조)으로부터 TaqMan 프로브를 사용하여 수행하였다. QPCR은 Viia 7 기구를 사용하여 40 사이클 동안 진행시킨 반면, 그 후, Viia 7 소프트웨어를 사용하여 원자료(Ct)를 추출하였다. 유전자 발현을 결정하기 위해, 각 유전자의 임계 사이클(Ct)과 참조 유전자의 임계 사이클 간의 차이(Δ Ct)를 계산하였다. Δ Ct가 낮을수록, 유전자 발현 수준은 더 높다. 그 후, 상대적 정량화 값을 수득하기 위해, 본 발명자들은 식 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 에 의해 관심 유전자의 배수-변화 발현을 참조 샘플에서의 이의 발현 대비 계산하였다. p 값은 두 군 간의 각 유전자에 대한 평균 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 값의 맨-휘트니를 기반으로 하여 계산하였다.
- [0534] 하기 Taqman 프로브는 정제된 비장 마우스 CD4+ T 세포에 대해 사용하였다: *I110* Mm00439616_m1), *I117* (Mm00439618_m1), *Ifn-g* (Mm01168134_m1), *I12* Mm00434256_m1), *Tbx21* (TBET) (Mm00450960_m1), *Rorc* (Mm01261022_m1), *Foxp3* Mm00475156_m1), *Gata3* (Mm00484683_m1), *I122* (Mm00444241_m1), *I14*

Mm00445259_m1).

[0535] TCR 시퀀싱

[0536] 인풋 DNA를 종양 주입 전(T0), 종양 비함유 장기 생존 마우스에서 OVA-ALL 주입 후 30일(T1) 및 1:1 비율로 혼합된 OVA-ALL과 어미 ALL로 재-접종 후 4일째에 IFN 및 CTRL 마우스의 PBMC로부터 획득하였다. TCRβ 사슬 시퀀싱은 모두 54개의 공지된 발현된 Vβ 및 모두 13개의 Jβ 영역에 대해 특이적인 프라이머를 지닌 ImmunoSEQ 플랫폼을 사용하여 Adaptive Biotechnologies에서 수행하였다. 아미노산 수준에서 각 고유의 CDR 주형을 백만 당 카운트(cpm)로 정량화하였다. 클론성을 1 - 종 균등도(Pielou's evenness)로서 계산하였다³⁹:

$$C = 1 - \frac{H'}{H}$$

[0538] 상기 식에서, H'는 0보다 높은 주형 카운트(즉, 마우스에서 모든 관찰가능한 주형 세트)에 대해 계산된 샘플의 엔트로피이며, H는 하기 식으로 규정된, 마우스에 대한 최대 이론적 엔트로피이다:

$$H = \ln(S)$$

[0540] 상기 식에서, S는 마우스에서 구별되는 주형의 수이다. 유사성은 1 - 샘플 s와 t 시간에서 주형 카운트의 평균 사이의 Bray-Curtis 간격으로서 평가되었다:

$$S_t = 1 - \frac{\sum_i |s_{i,t} - \overline{s_{i,t}}|}{\sum_i |s_{i,t} + \overline{s_{i,t}}|}$$

[0542] 이러한 측정치는 Sørensen-Dice 유사성 지수와 동등하며, 시간 t에서 모든 i 관찰된 주형을 포함하여 이를 계산하였다.

[0543] 대규모 RNA-시퀀싱

[0544] RNA를 ReliaPrep RNA MiniPrep System (Promega)를 사용하여 10,000-50,000개의 분류된 세포로부터 추출하고, RNA-Seq 라이브러리를 약간 변형된 SMART-Seq2 프로토콜로 제조하였다(Picelli, S. et al. (2014) Nat. Protoc. 9: 171-181). 간략하게는, RNA(1-5ng)를 커스텀 올리고dT 및 주형-스위칭 LNA 올리고(서열)를 이용하여 역전사하고, 이어서 PCR 증폭 및 세정을 수행하였다(Ampure XP beads, Beckman Coulter). 생성된 cDNA(0.5-1ng)을 55℃에서 30분 동안 태깅하고, 최종 RNA-Seq 라이브러리를 Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina)로부터의 시약을 사용하여 생성시켰다. 시퀀싱은 NextSeq 500/550 High Output v2 키트(75 사이클)을 사용하여 NextSeq 500 기계(Illumina, San Diego, CA)에서 수행하였다.

[0545] 단일-세포 RNA-시퀀싱

[0546] 점액-기반 디지털 3' 말단 scRNA-Seq를 제조업자의 지시에 따라 Chromium Single Cell 3' Reagent Kit v2를 사용하여 Chromium Single-Cell Controller (10X Genomics, Pleasanton, CA)에서 수행하였다. 간략하게는, 현탁된 단일 세포를 에멀전 중의 겔 비드(GEM)에서 분할하고, 용해시키고, 이어서 RNA 바코딩, 역전사 및 PCR 증폭(12-14 사이클)을 수행하였다. 시퀀싱-준비 scRNA-Seq를 제조업자의 지시에 따라 제조하고, 체크하고 2100 Bioanalyzer (Agilent Genomics, Santa Clara, CA) 및 Qubit 3.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 기구를 사용하여 정량화하였다. 시퀀싱은 NextSeq 500/550 High Output v2 키트(75 사이클)을 사용하여 NextSeq 500 기계(Illumina, San Diego, CA)에서 수행하였다.

[0547] 전산 방법

[0548] 원시 관독을 처리하고, 디폴트 변수와 함께 CellRanger 버전 1.3 (<https://support.10xgenomics.com/single-cell-gene-expression/software/pipelines/latest/what-is-cell-ranger>)를 사용하여 ENSEMBL mm10 전사체에 정렬시켰다. 유효한 바코드 및 UMI(Unique Molecular Identifiers)를 갖는 확실하게 맵핑된 관독치, 비-PCR 복제물만을 유지시켰다. 본 발명자들은 저품질 세포를 여과시켰다. 세포에 대해 검출된 최소 300개 고유 유전자가 필요하며, 추가로 0.1을 초과하는 미토콘드리아 대 내인성 유전자 발현의 비율을 갖는 세포는 폐기하였다. 생성된 10,821개 세포를 추가 분석을 위해 보유하였다. 유전자 발현 값은 백만 당 log 변환된 전사체로 정량화하였

다[log(TPM + 1)]. 다운스트림 분석은 R 소프트웨어 패키지 Seurat 버전 2.1(<https://github.com/satijalab/seurat/>)을 사용하여 수행하였다. 세포 클러스터링 및 tSNE 분석은 1,031개의 가장 가변성인 유전자에서 수행하였으며, 평균 발현이 0.01을 초과하며, 평균 비율 대비 log 변환 분산이 0.5를 초과하도록 선택되었다.

[0549] 나노스트링 데이터 분석

[0550] RNA 발현은 제조업자의 지시에 따라 마우스 패널용 nCounter PanCancer Immune Profiler(Nanostring Technologies)를 사용하여 nCounter SPRINT 기기에서 평가하였다. NanoString®으로 수득된 전사체 카운트는 하기와 같이 처리하였다. RCC 파일에서 로 카운트(raw count)는 R/Bioconductor 라이브러리 NanoStringNorm(v 1.1.21)을 사용하여 표준화시키고⁴⁰; 기술적 검정 변동은 내부 대조군의 기하학적 평균을 사용하여 표준화시키고, 배경을 추정하여 음성 대조군의 평균을 계산하고, RNA 카운트는 하우스키핑 유전자 발현의 기하학적 평균을 사용하여 표준화시키고, 추가 분산 안정화를 적용하였다. 표준화된 데이터의 차등 발현은 R/Bioconductor limma 라이브러리에서 구현된 선형 모델을 통해 평가하였다⁴¹. 전사체는 조절된 p-값 < 0.05의 임계값으로 다르게 표현된 것으로 간주되었다(Benjamini-Hochberg 보정).

[0551] 통계적 분석

[0552] 값은 나타낸 바와 같이 평균 ± 평균의 표준 오차(SEM)로서 표현하였다. 통계적 분석은 달리 언급되지 않는 한 맨-휘트니 테스트 또는 크러스칼-왈리스 테스트에 이은 던 포스트-테스트 보정에 의해 수행하였다. p<0.05의 차이는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다. 분석은 R 3.2.2⁴², NPC Test R10⁴³ 및 Prism(GraphPad Prism version 7.0)으로 수행하였다. 도 2에서 세포 집단의 분석은 비모수 조합 테스트에 의해 수행하였으며⁴³, 이는 모수 Hotelling t-제곱 2-샘플 테스트에 대한 순열-기반 대체 테스트이다. 이러한 방법론은 다변량 표준성에 대한 가정을 충족시키지 못하는 소수의 관찰 군에서 평균의 다변량 비교 수행을 허용한다. 도 1a, I, 도 16b, 도 17 및 도 20b는 모수 절차가 적절하지 않은 작은 샘플 크기, 극단치의 존재, 비-가우시안 및 매우 치우친 데이터 분포를 설명할 수 있는 비모수 프레임워크 내에서 모델링되었다. 요인 설계에서 종단 분석에 적합한 강력하고 유연한 순위-기반 방법을 적용하였다^{44,45}. 이러한 맥락에서, 가설 시험은 평균 사이의 차이보다는 수집된 변수의 분포의 차이를 탐지하는데 초점을 맞추고 있다^{46,47}. 이러한 분석은 R46에서 개발된 nparLD 패키지를 사용함으로써 수행되었다. 생존 곡선은 카플랜-마이어(KM)에 의해 추정되었다. 여기서 고려되는 사건 변수는 시간 대 사망이며, 어떠한 정보 검열도 발생하지 않았다. 비모수 log-순위(멘텔-헨젤) 테스트 통계를 사용하여 k-샘플과 관련된 k 생존 곡선을 비교하였다⁴⁸. 2개 초과군의 존재시, 본페로니 방법에 의해 p-값을 조절함으로써 다중 비교 문제를 해결하였다.

[0553] 실시예 7

[0554] 본 발명자들은 타입-II 인터페론인 인터페론-감마(IFN γ)의 종양-특이적 발현을 위한 신규한 렌티바이러스 벡터 작제물을 개발하였다. 종양-특이성은 종양-침윤 골수 세포의 세브세트에서 선택적으로 트랜스진 발현을 유도하는 Tie2(Tek) 유전자좌로부터 인핸서/프로모터 서열을 통해 전사 조절에 의해 제공되는 반면, 종래 기술된 바와 같이 miR-126-3p 및 miR-130a에 의해 인식되는 마이크로RNA 표적 서열의 도움으로 조절모 및 전구세포에서 발현을 방지한다(Escobar, G. et al. (2014) Sci Transl Med 6: 217ra3). 이러한 작제물은 "Tig126/130a"로 불렸다.

[0555] Tie2의 조절하에 인터페론-알파 및 miR-126 표적 서열(즉, Tie2.Ifna.126T)의 발현을 위한 유사한 작제물을 "Tia126"으로 칭하였다.

[0556] Tig126/130a 및 Tia126 벡터 이외에, 본 발명자들은 종양 괴사 인자 알파(Tnfa) 유전자의 cDNA를 수반하는 렌티바이러스 벡터를 개발하였으며, 이는 "Tta126/130a"로 칭하였다. 작제물(예를 들어, Tig126/130a 및 Tta126/130a)의 구조는 도 28에 도시되어 있다.

[0557] 치료법은 생체의 조절모 및 전구세포(HSPC)를 Tig126/130a로 형질도입시키고, 이어서 조작된 세포를 컨디셔닝된 수령체에 이식함으로써 전달된다. 생착 후, HSPC 자손은 확장되고 분화될 것이며, 이들 중 일부는 종양 미세환경에 모집될 것이다. 프로모터 활성은 혈관주위 영역으로 국소화되고, 신생축진 및 면역억제 기능을 갖는 종양-침윤 단핵구/대식세포, 특히, Tie2-발현 단핵구/대식세포(TEM)의 서브세트에서 특이적으로 상향조절되어(De

Palma, M. et al. (2005) Cancer Cell 8: 211-226; De Palma, M. et al. (2008) Cancer Cell 14: 299-311), 이러한 전략적 위치에서 카고(예를 들어, IFN γ)를 전달한다.

[0558] 본 발명자들은 인간 필라델피아-유사 B-ALL을 밀접하게 모방한 B-급성 림프모구 백혈병(B-ALL)의 이식가능한 모델을 사용하였으며(Nucera, S. et al. (2016) Cancer Cell 29: 905-921), 이는 예를 들어, 골수-유래된 억제제 세포의 출현, MHC 클래스 II 유전자의 하향조절 및 IL10 및 PD1의 상향조절을 특징으로 하는 중앙축진 면역억제 미세환경을 용이하게 유도한다.

[0559] 본 발명자들은 먼저 백혈병에 의해 유도된 중앙축진 미세환경 및 백혈병 성장에 대한 Tlg126/130a-기반 IFN γ 전달의 결과를 평가하였다(도 29).

[0560] 6- 내지 8-주령 C57/BL6 마우스를 생물학적으로 비활성인 절두된 신경 성장 인자 수용체(NGFR) 유전자를 발현하는 Tlg126/130a, Tta126/130a 또는 대조군 렌티바이러스 벡터로 형질도입된 계통-음성 HSPC로 재구성시켰다. Tlg126/130a 및 Tta126/130a 투여량은 생체외에서 각각 1.39 및 2.01 및 생체내에서 각각 0.44 및 0.83의 벡터 복사체 수로서 정량화하였다. 이식 후 8주째에 말초혈의 재구성시, 동물에 B-ALL을 제공하고, 그 후, 빈번하게 혈액을 수집하였다. 대조군 동물과 비교하여, IFN γ 를 발현하도록 조작된 마우스는 현저하게 더 느린 질환 진행을 보였다(도 29a). 또한, 희생시 본 발명자들은 비장 대식세포에서 MHC 클래스 II 발현의 상향조절(도 29b)은 물론 골수에서 골수-유래된 억제인자 세포의 감소(도 29c)를 관찰하였으며, 이는 더욱 항-종양의 "M1-유사" 분극 상태로의 중앙 미세환경의 전환 쪽으로 향한다. Tlg126/130a 유전자 치료법에 의한 백혈병 억제 정도는 유사한 벡터 백본(Tia126), 동일한 전달 플랫폼 및 동일한 백혈병 모델을 사용하여 배치된 타입-I 인터페론 카고(즉, 인터페론-알파)로 본 발명자가 이전에 관찰한 것과 유사하였다. 반대로, Tta126/130a 벡터는 단일요법으로서 배치되는 경우, 백혈병 성장에 대한 측정가능한 효과를 가지지 않았다.

[0561] 그 후, 본 발명자들은 다양한 트랜스진 카고를 갖춘 Tie2 벡터 백본을 사용하여 백혈병 미세환경의 여러 면역 자극 사이토킨의 동시적 전달을 조합하였다. 본 발명자들은 생물학적으로 비활성인 Tie2.NGFR 벡터로 형질도입된 대조군 또는 Tia126 단일요법과 비교하여 Tia126, Tlg126/130a 및 Tta126/130a 벡터의 이중 조합물을 계통-음성 HSPC에 공동-형질도입하고, 이러한 세포를 치사량으로 조사된 수령체 마우스에 이식하였다. 마우스를 예측되는 바와 같이, 조합된 사이토킨 발현으로 인한 추가적 독성 없이 재구성시켰다. 특정 정량적 PCR 검정에 의해 측정된 단일 벡터의 벡터 복사체 수는 재구성된 마우스에서 0.1 내지 0.3의 다소 낮은 범위였다. 마우스에 상기 기술된 바와 같이 B-ALL를 접종하였다. Tia126 단독은 Tlg126/130a 또는 Tta126/130a와의 조합과 유사하게, 대조군 대비 백혈병 성장 감소를 보였다(도 30a).

[0562] 놀랍게도, Tlg126/130a 및 Tta126/130a의 조합물은 백혈병 진행에서 극적인 감소를 발생시켰으며, 이는 비장 대식세포 상에서 MHC 클래스 II 발현의 현저한 증가(도 30b), MDSC의 감소(도 30c) 및 비장에서 세포독성 CD8+ T 세포의 증가(도 30d)와 관련된다. 이러한 데이터는 Tie2 인핸서/프로모터의 조절하에 백혈병 침윤 골수 세포를 통해 중앙 미세환경에서 국소적으로 발현되는 IFN γ 와 TNF α 간의 시너지를 암시한다.

[0563] 추가로, 본 발명자들은 IFN γ 의 본 발명자들의 유전자 치료법-기반 전달과 체크포인트 억제제 항-CTLA-4 및 항-LAG-3 및 IDO 효소의 억제제인 1-메틸-트립토판(1-MT)을 포함하는 다른 면역치료 전략과의 잠재적 시너지를 평가하였다. 본 발명자들은 계통-음성 HSPC를 Tlg126/130a 또는 대조군인 생물학적으로 비활성인 Tie2.NGFR 벡터로 형질도입시키고, 이 세포를 치사량으로 조사된 수령체 마우스에 이식하였다. 마우스를 예상되는 바와 같이, 조합된 사이토킨 발현으로 인한 추가적 독성 없이 재구성시켰다. 특이적 정량적 PCR 검정에 의해 측정된 단일 벡터의 벡터 복사체 수는 재구성된 마우스에서 Tlg126/130a에 있어서 0.72이며, 대조군에 있어서 0.84였다. 마우스에 상기 기술된 바와 같은 B-ALL을 접종하였다.

[0564] 본 발명자들은, 항-CTLA-4(α CTLA4) 및 항-LAG-3(α LAG3)가 단독요법으로 B-ALL 진행 감소에 이미 일부 효능을 보여준 반면, 1-MT 처리는 유리한 효과를 가지지 않음을 관찰하였다(도 31a). 게다가, 1-MT 및 체크포인트 억제제 둘 모두와 IFN γ 의 유전자 치료법-기반 전달의 조합은 치료 효능을 증가시키며, 비장 및 골수 대식세포 상의 MHC 클래스 II 발현의 현저한 증가(도 31a 및 31b) 및 비장에서 세포독성 CD8+ T 세포의 증가(도 31d)와 관련된 질환 진행의 감소(도 31a)로 이어진다.

[0565]

참고 문헌

1. Khalil, D. N., Smith, E. L., Brentjens, R. J. & Wolchok, J. D. The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **13**, 273–290 (2016).
2. Topalian, S. L., Drake, C. G. & Pardoll, D. M. Immune Checkpoint Blockade : A Common Denominator Approach to Cancer Therapy. *Cancer Cell* **27**, 450–461 (2015).
3. Schadendorf, D. *et al.* Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *J. Clin. Oncol.* **33**, 1889–94 (2015).
4. Pitt, J. M. *et al.* Resistance Mechanisms to Immune-Checkpoint Blockade in Cancer: Tumor-Intrinsic and -Extrinsic Factors. *Immunity* **44**, 1255–1269 (2016).
5. Parker, B. S., Rautela, J. & Hertzog, P. J. Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 131–44 (2016).
6. Hervas-Stubbs, S. *et al.* Direct effects of type I interferons on cells of the immune system. *Clin. Cancer Res.* **17**, 2619–27 (2011).
7. Fuertes, M. B., Woo, S. R., Burnett, B., Fu, Y. X. & Gajewski, T. F. Type I interferon response and innate immune sensing of cancer. *Trends Immunol.* **34**, 67–73 (2013).
8. De Palma, M. *et al.* Tumor-Targeted Interferon-Alpha Delivery by Tie2-Expressing Monocytes Inhibits Tumor Growth and Metastasis. *Cancer Cell* **14**, 299–311 (2008).
9. Escobar, G. *et al.* Genetic engineering of hematopoiesis for targeted IFN- α delivery inhibits breast cancer progression. *Sci. Transl. Med.* **6**, 217ra3 (2014).
10. Catarinella, M. *et al.* IFN α gene/cell therapy curbs colorectal cancer colonization of the liver by acting on the hepatic microenvironment. *EMBO Mol. Med.* **8**, 155–70 (2016).
11. Fesnak, A. D., June, C. H. & Levine, B. L. Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 566–81 (2016).
12. Rosenberg, S. A. & Restifo, N. P. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science (80-.).* **348**, 62–68 (2015).
13. Sotillo, E. *et al.* Convergence of acquired mutations and alternative splicing of CD19 enables resistance to CART-19 immunotherapy. *Cancer Discov.* **5**, 1282–1295 (2015).
14. Nucera, S. *et al.* miRNA-126 Orchestrates an Oncogenic Program in B Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell* **29**, 905–921 (2016).

[0566]

15. De Palma, M., Veneri, M. A., Roca, C. & Naldini, L. Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* **9**, 789–95 (2003).
16. De Palma, M. *et al.* Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* **8**, 211–26 (2005).
17. Mellman, I., Coukos, G. & Dranoff, G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* **480**, 480–9 (2011).
18. Kumar, V., Patel, S., Tcyganov, E. & Gabrilovich, D. I. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends Immunol.* **37**, 208–220 (2016).
19. Ruffell, B. & Coussens, L. M. Macrophages and therapeutic resistance in cancer. *Cancer Cell* **27**, 462–472 (2015).
20. Joyce Johanna A. and Fearon Douglas T. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science (80-.)*. **348**, (2015).
21. Verdegaa, E. M. E. *et al.* Neoantigen landscape dynamics during human melanoma-T cell interactions. *Nature* **536**, 91–5 (2016).
22. Matsushita, H. *et al.* Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. *Nature* **482**, 400–4 (2012).
23. Linnemann, C. *et al.* High-throughput epitope discovery reveals frequent recognition of neo-antigens by CD4+ T cells in human melanoma. *Nat Med* **21**, 81–85 (2015).
24. Lu, Y. C. *et al.* Efficient identification of mutated cancer antigens recognized by T cells associated with durable tumor regressions. *Clin. Cancer Res.* **20**, 3401–3410 (2014).
25. McGranahan, N. *et al.* Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science (80-.)*. **351**, 1463–1469 (2016).
26. Schumacher, T. N. & Schreiber, R. D. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science (80-.)*. **348**, 69–74 (2015).
27. Sharma, P. & Allison, J. P. Immune Checkpoint Targeting in Cancer Therapy : Toward Combination Strategies with Curative Potential. *Cell* **161**, 205–214 (2015).
28. Schildberg, F. A., Klein, S. R., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family. *Immunity* **44**, 955–972 (2016).
29. Yang, X. *et al.* Targeting the Tumor Microenvironment with Interferon- β Bridges Innate and Adaptive Immune Responses. *Cancer Cell* **25**, 37–48 (2014).

[0567]

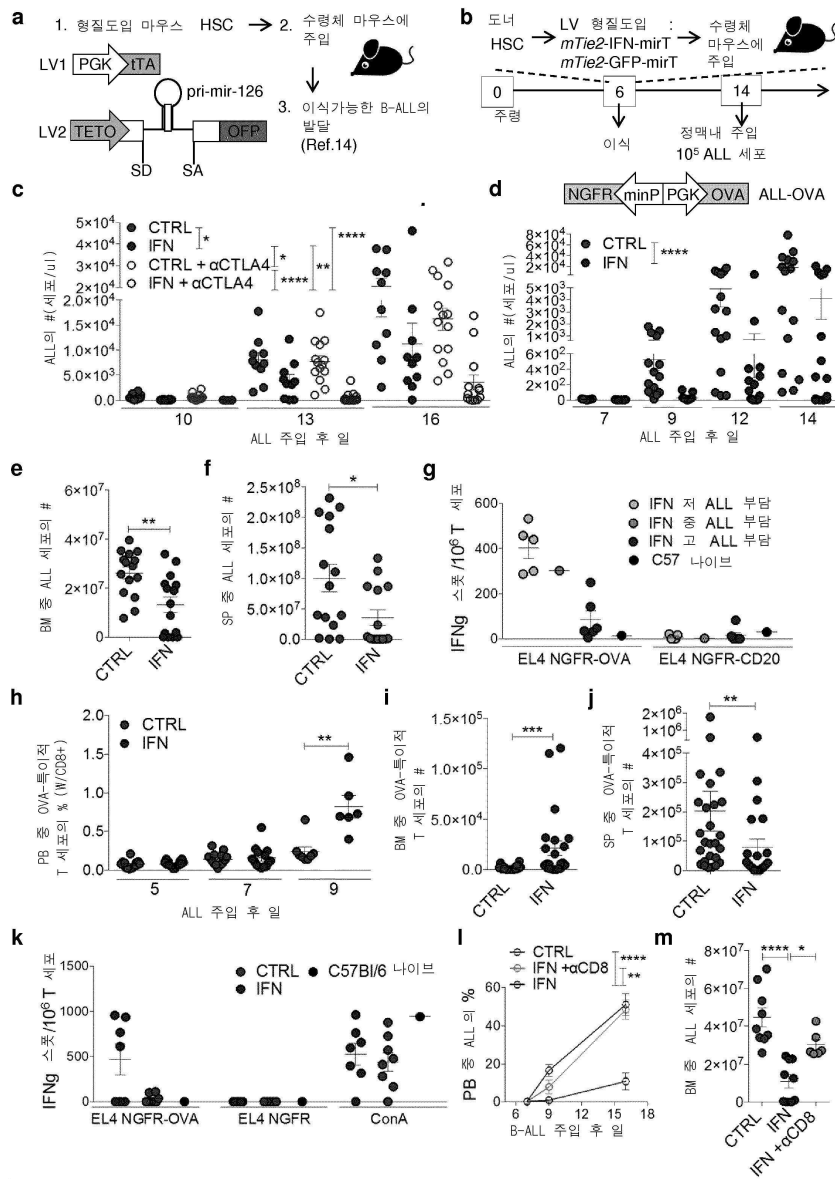
30. Huang, T.-H., Chintalacharuvu, K. R. & Morrison, S. L. Targeting IFN- α to B Cell Lymphoma by a Tumor-Specific Antibody Elicits Potent Antitumor Activities. *J. Immunol.* **179**, 6881–6888 (2007).
31. Wilson, E. B. *et al.* Blockade of chronic type I interferon signaling to control persistent LCMV infection. *Science* **340**, 202–7 (2013).
32. Sandler, N. G. *et al.* Type I interferon responses in rhesus macaques prevent SIV infection and slow disease progression. *Nature* **511**, 601–605 (2014).
33. Joseph Benci, A. L. *et al.* Tumor Interferon Signaling Regulates a Multigenic Resistance Program to Immune Checkpoint Blockade. *Cell* **167**, 1540–1554 (2016).
34. Gentles, A. J. *et al.* The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat. Med.* **21**, 938–945 (2015).
35. Mlecnik, B. *et al.* Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability. *Immunity* **44**, 698–711 (2016).
36. Bachireddy, P., Burkhardt, U. E., Rajasagi, M. & Wu, C. J. Haematological malignancies: at the forefront of immunotherapeutic innovation. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 201–215 (2015).
37. Mátrai, J. *et al.* Hepatocyte-targeted expression by integrase-defective lentiviral vectors induces antigen-specific tolerance in mice with low genotoxic risk. *Hepatology* **53**, 1696–1707 (2011).
38. Amendola, M., Venneri, M. A., Biffi, A., Vigna, E. & Naldini, L. Coordinate dual-gene transgenesis by lentiviral vectors carrying synthetic bidirectional promoters. *Nat. Biotechnol.* **23**, 108–116 (2005).
39. Tumei, P., Harview, C., Yearley, J. & Al, E. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* **515**, 568–571 (2014).
40. Waggott, D. *et al.* NanoStringNorm: An extensible R package for the pre-processing of nanostring mRNA and miRNA data. *Bioinformatics* **28**, 1546–1548 (2012).
41. Ritchie, M. E. *et al.* limma powers differential expression analyses for RNA742 sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* **43**, e47 (2015).
42. R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. *R Foundation for Statistical Computing Vienna Austria* **0**, {ISBN} 3-900051-07-0 (2016).
43. Pesarin, F. & Salmaso, L. *Permutation Tests for Complex Data. Permutation Tests for Complex Data: Theory, Applications and Software* (2010). doi:10.1002/9780470689516
44. Brunner, E. & Puri, M. L. Nonparametric methods in factorial designs. *Stat. Pap.* **42**, 1–52 (2001).
45. Brunner, E., Domhof, S. & Langer, F. Nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments. *Wiley Ser. Probab. Stat.* xvii, 261 (2002).
46. Noguchi, K., Gel, Y. R., Brunner, E. & Konietzschke, F. nparLD: An R software package for the nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments. *J. Stat. Softw.* **50**, 1–23 (2012).
47. Feys, J. New Nonparametric Rank Tests for Interactions in Factorial Designs with Repeated Measures New Nonparametric Rank Tests for. **15**, (2016).
48. Therneau, T. M. A Package for Survival Analysis in S. *Survival* (2015).

[0568]

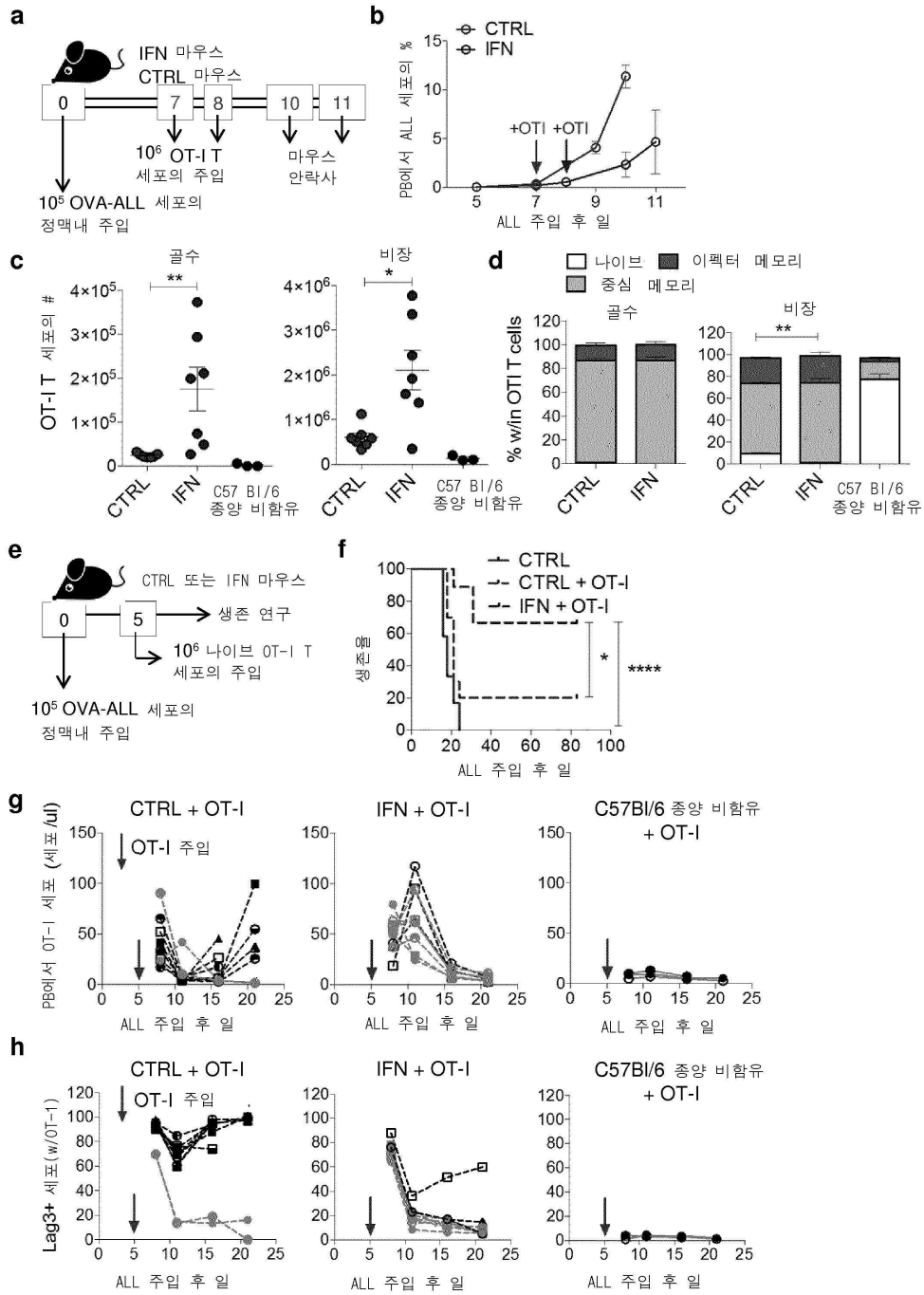
[0569]

도면

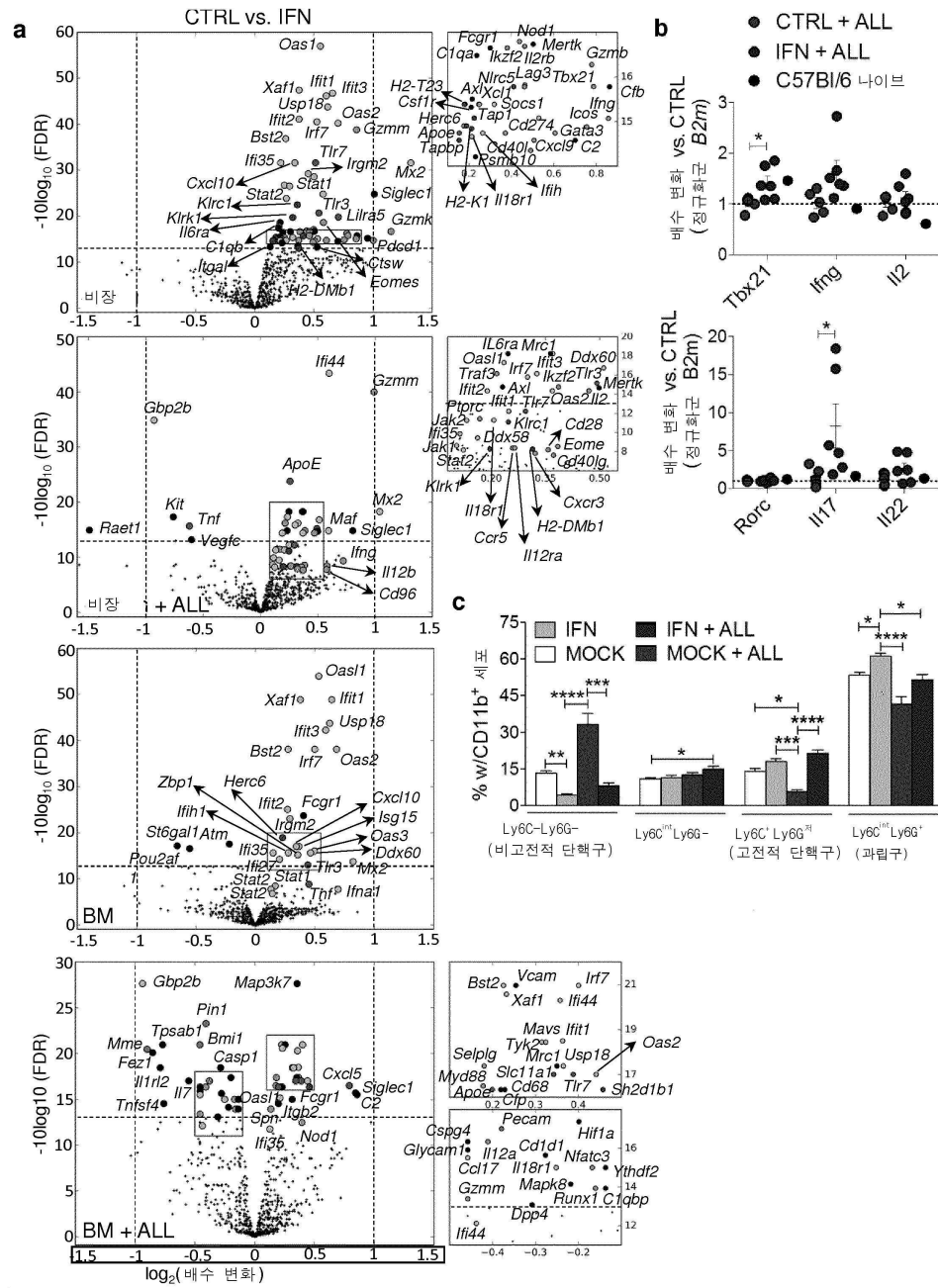
도면1



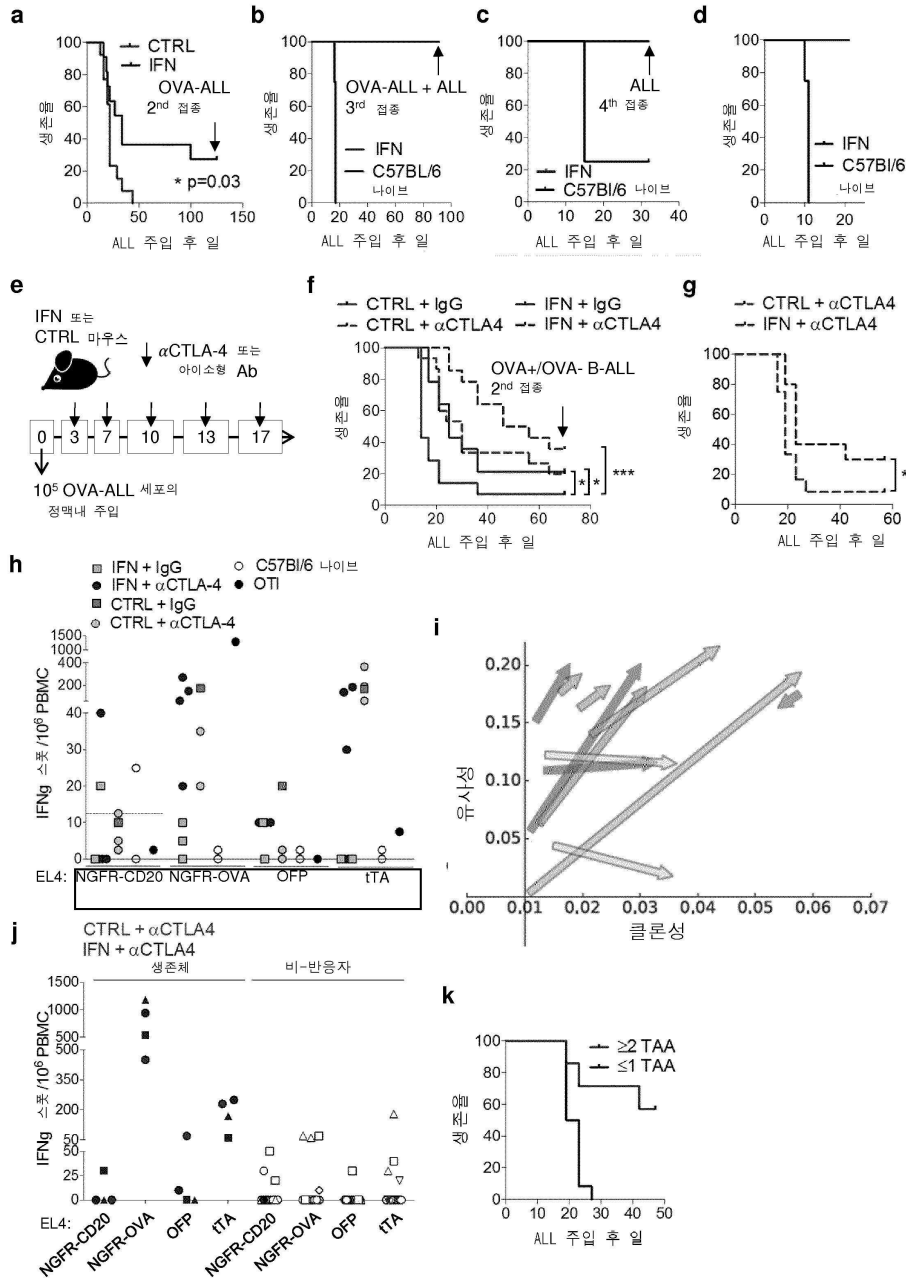
도면2



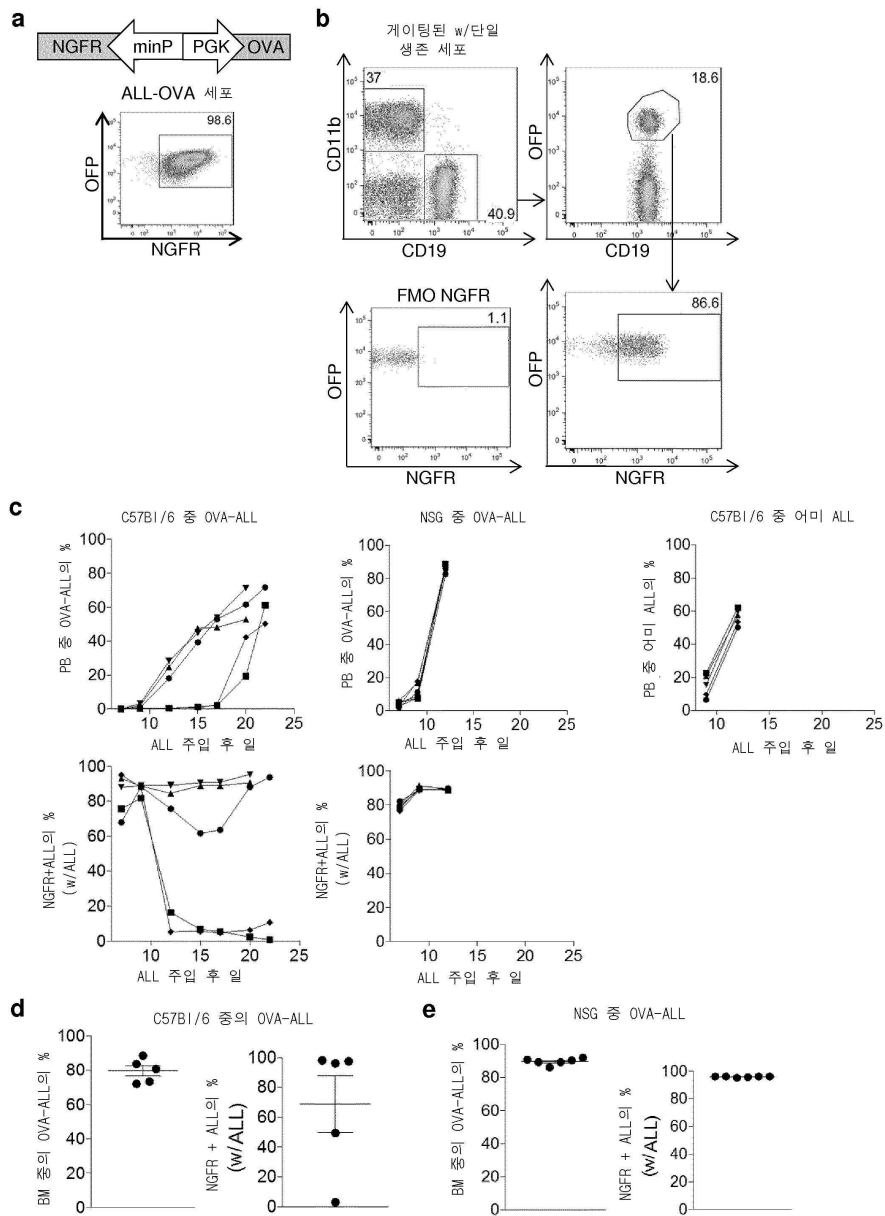
도면3



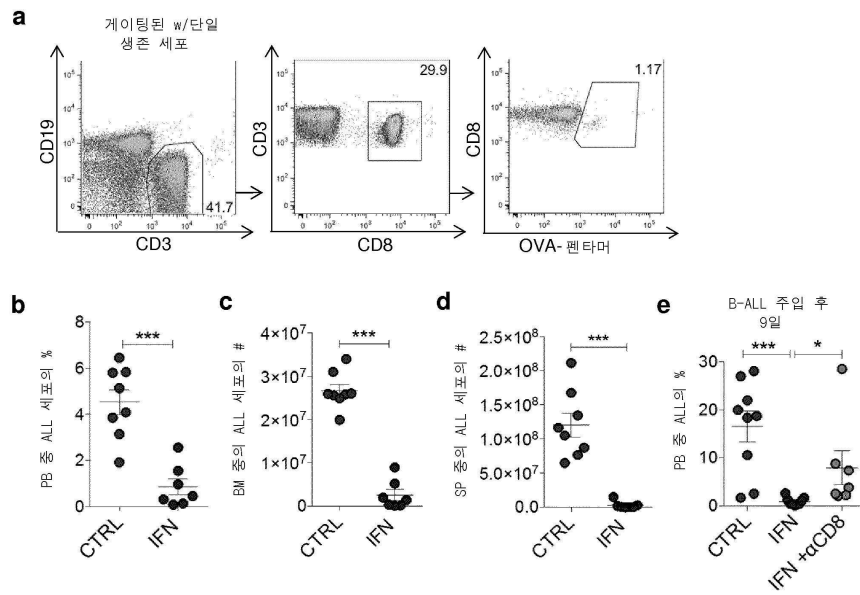
도면4



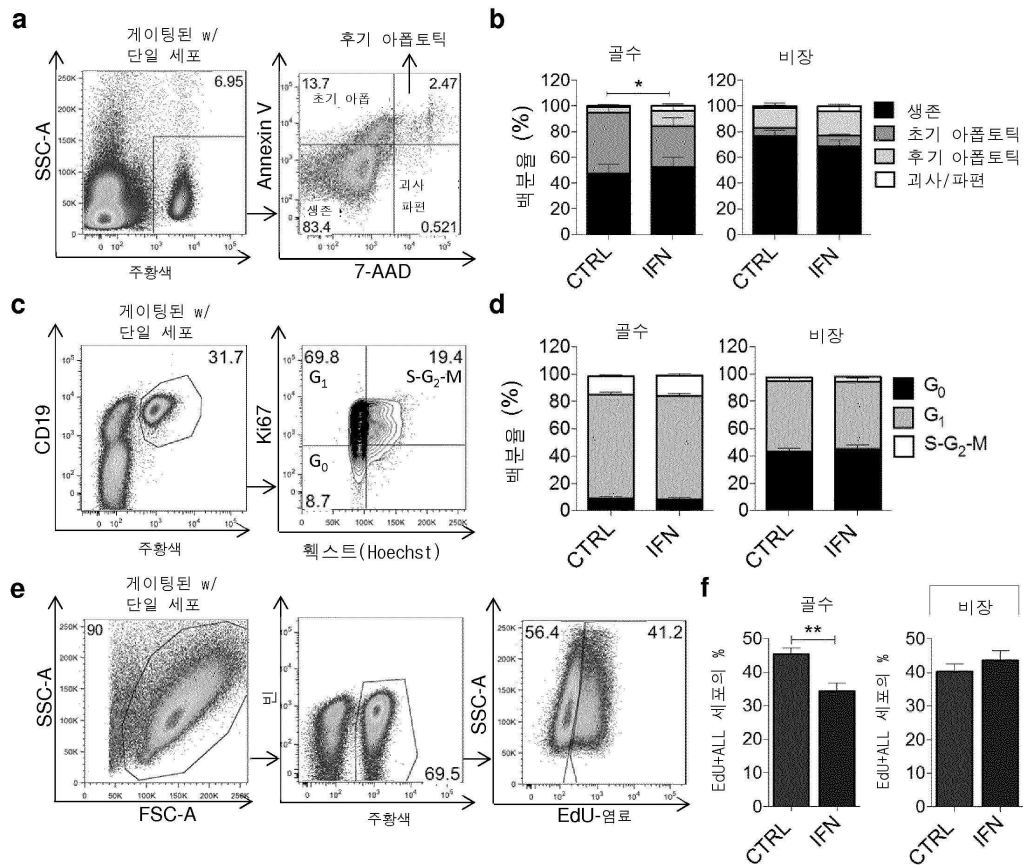
도면5



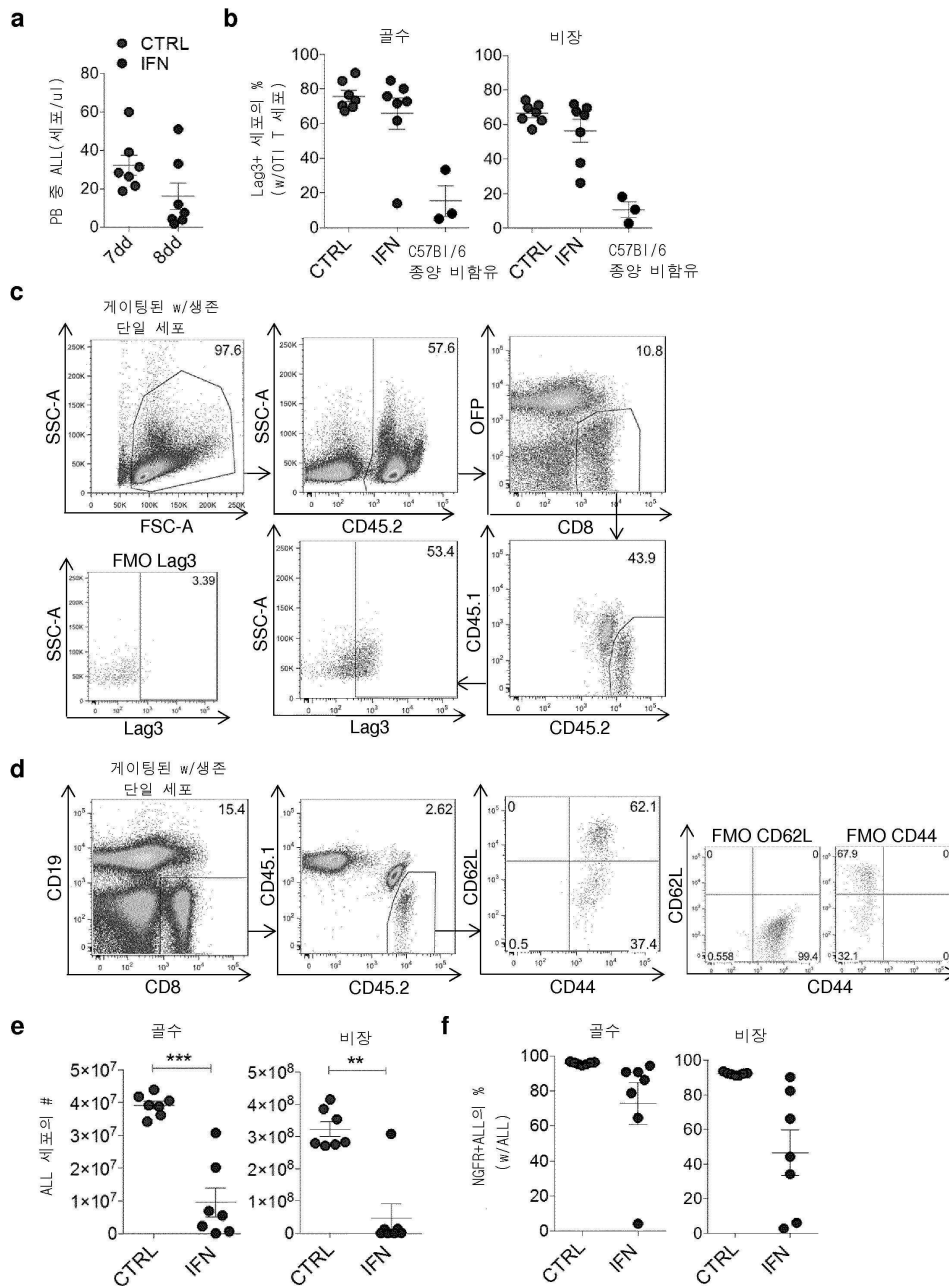
도면6



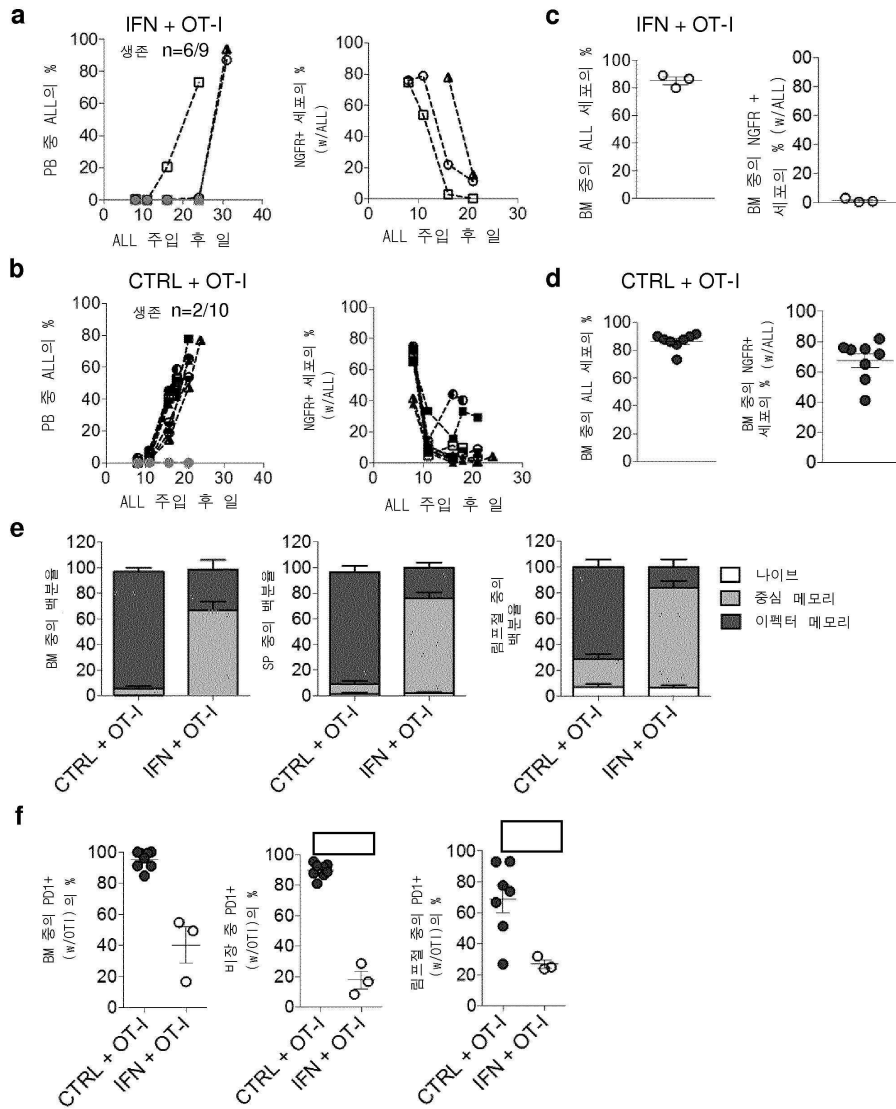
도면7



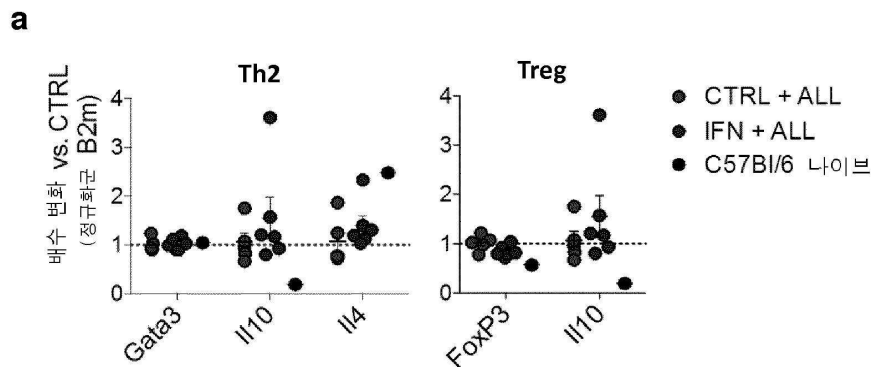
도면8



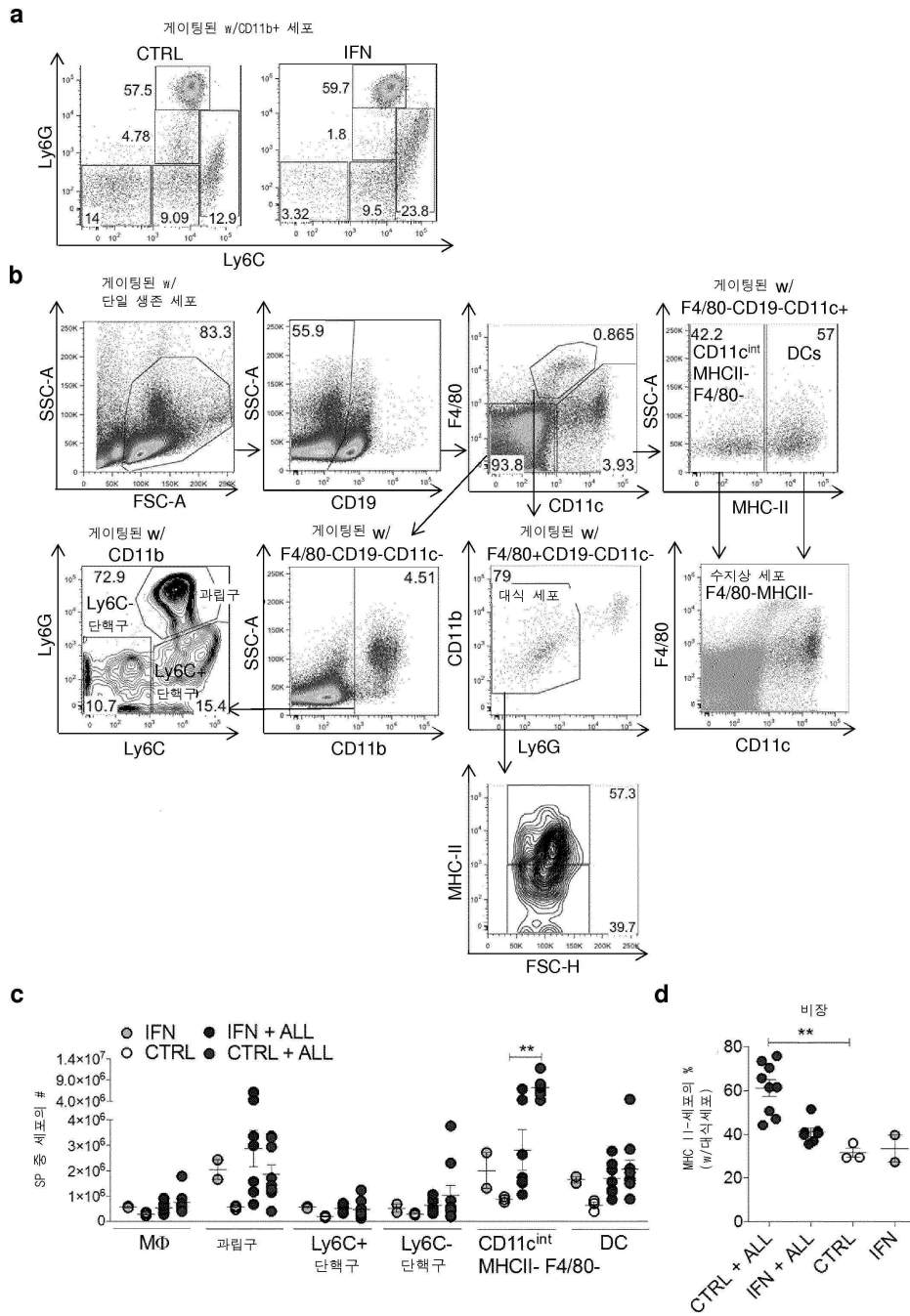
도면9



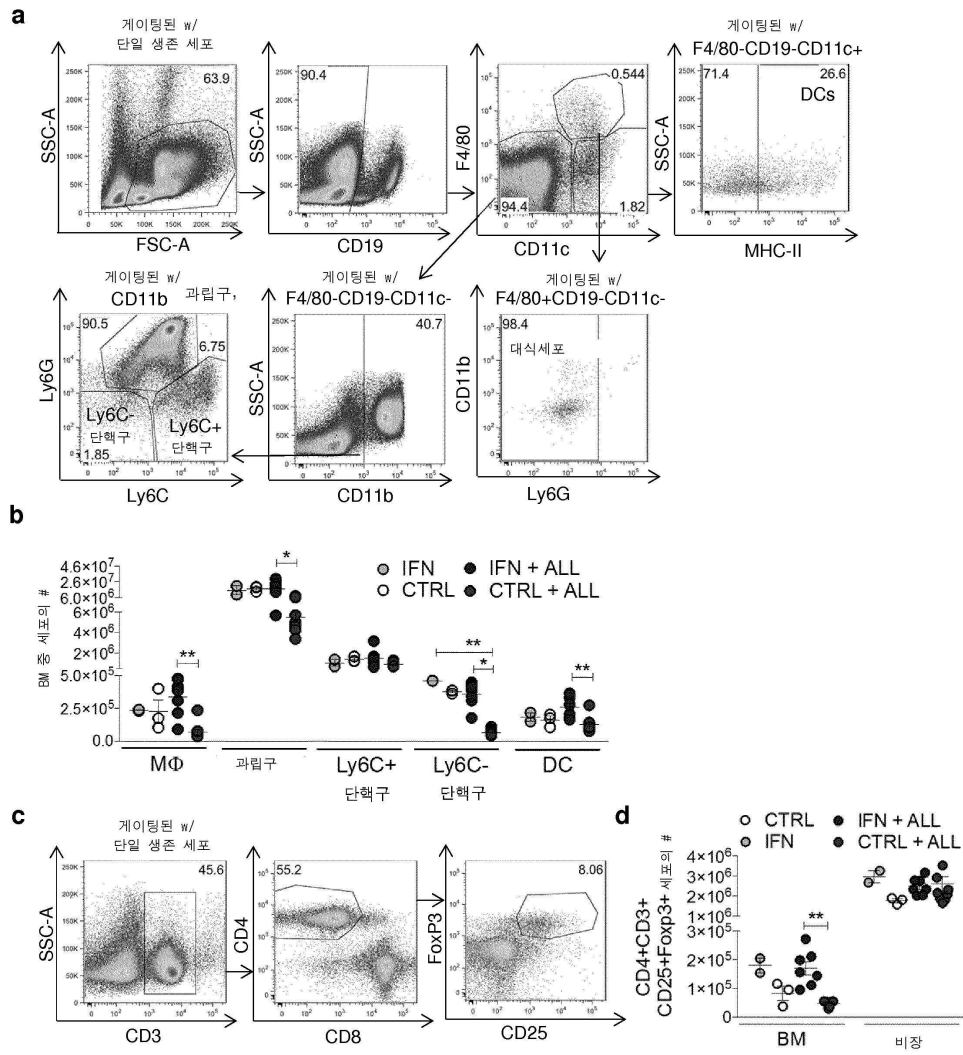
도면10



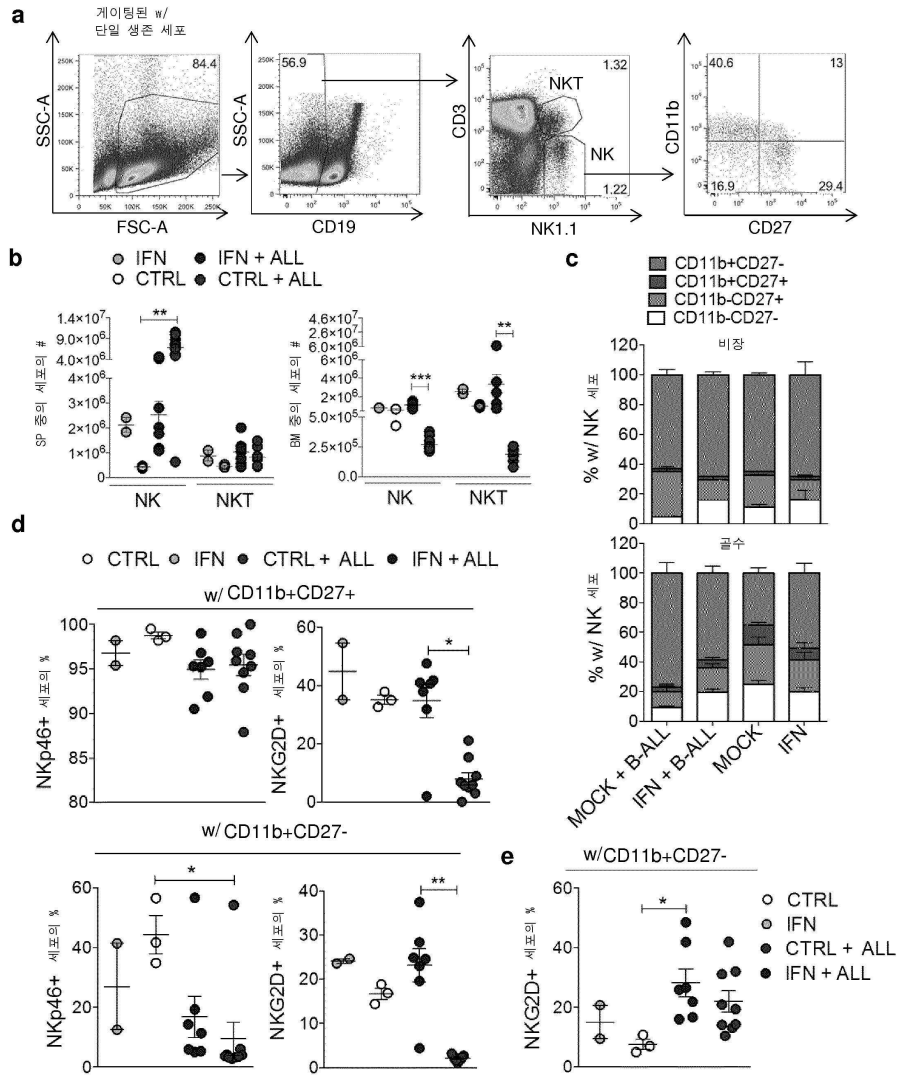
도면11



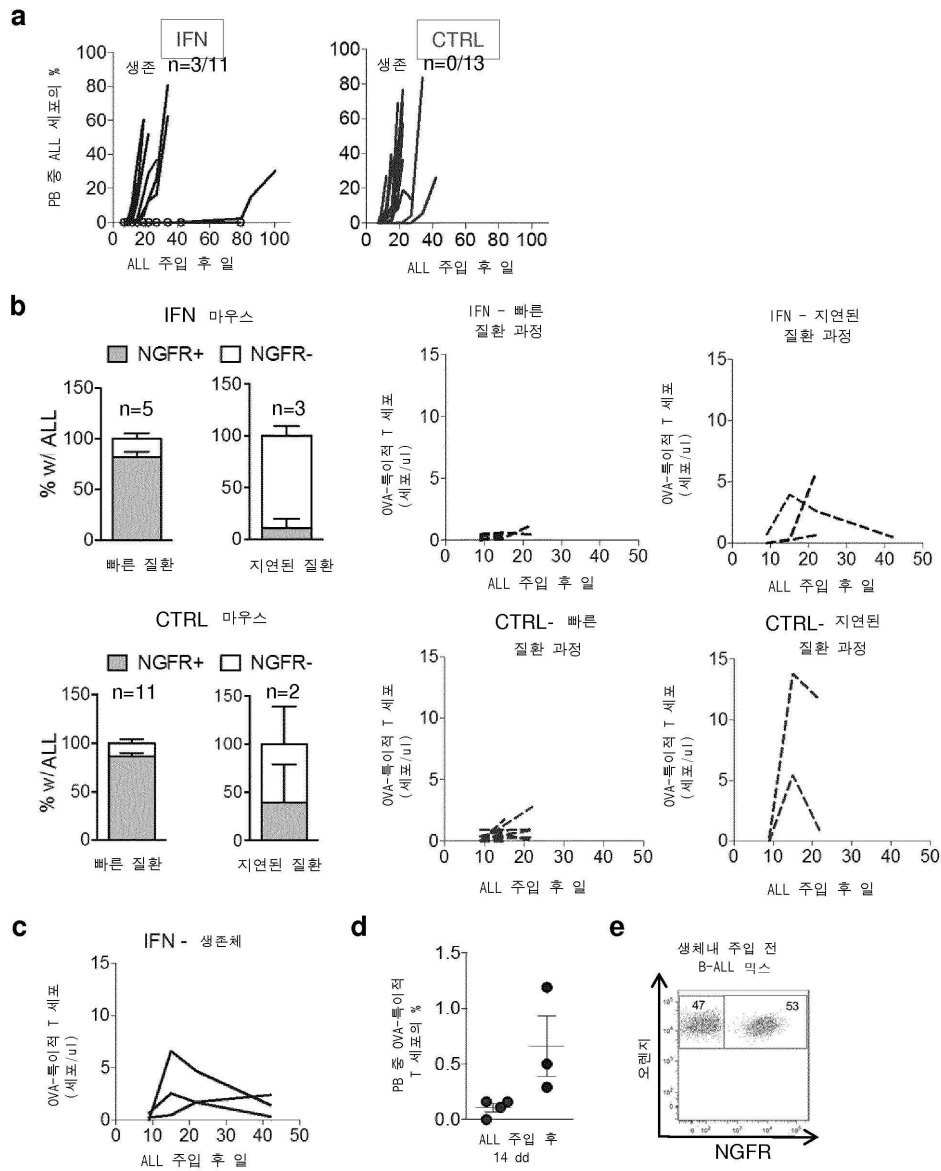
도면12



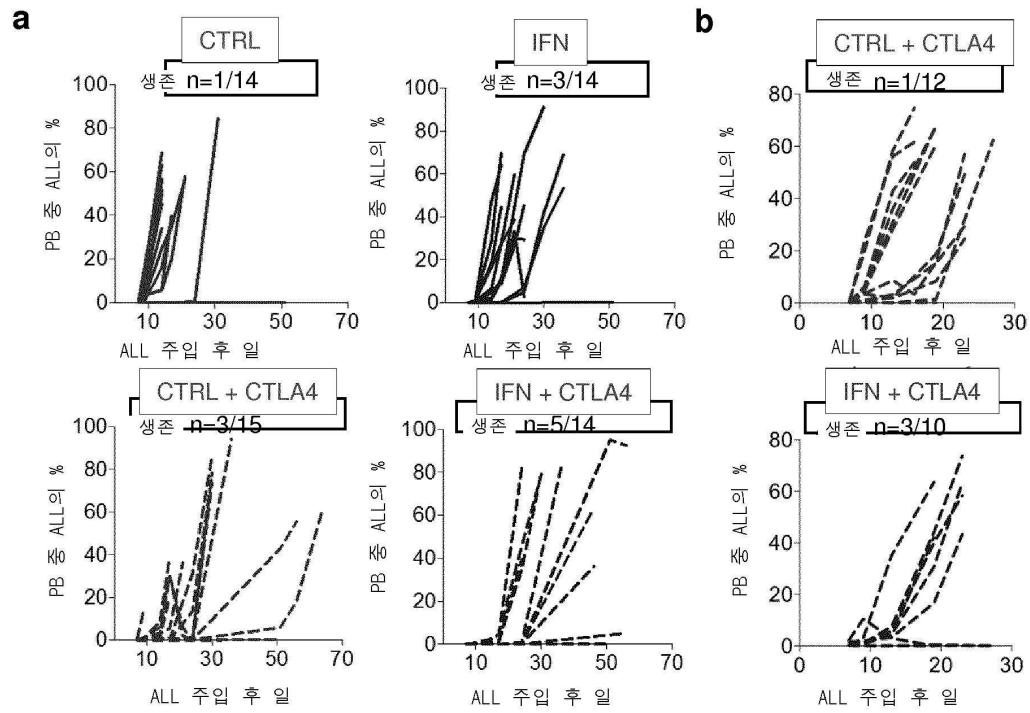
도면13



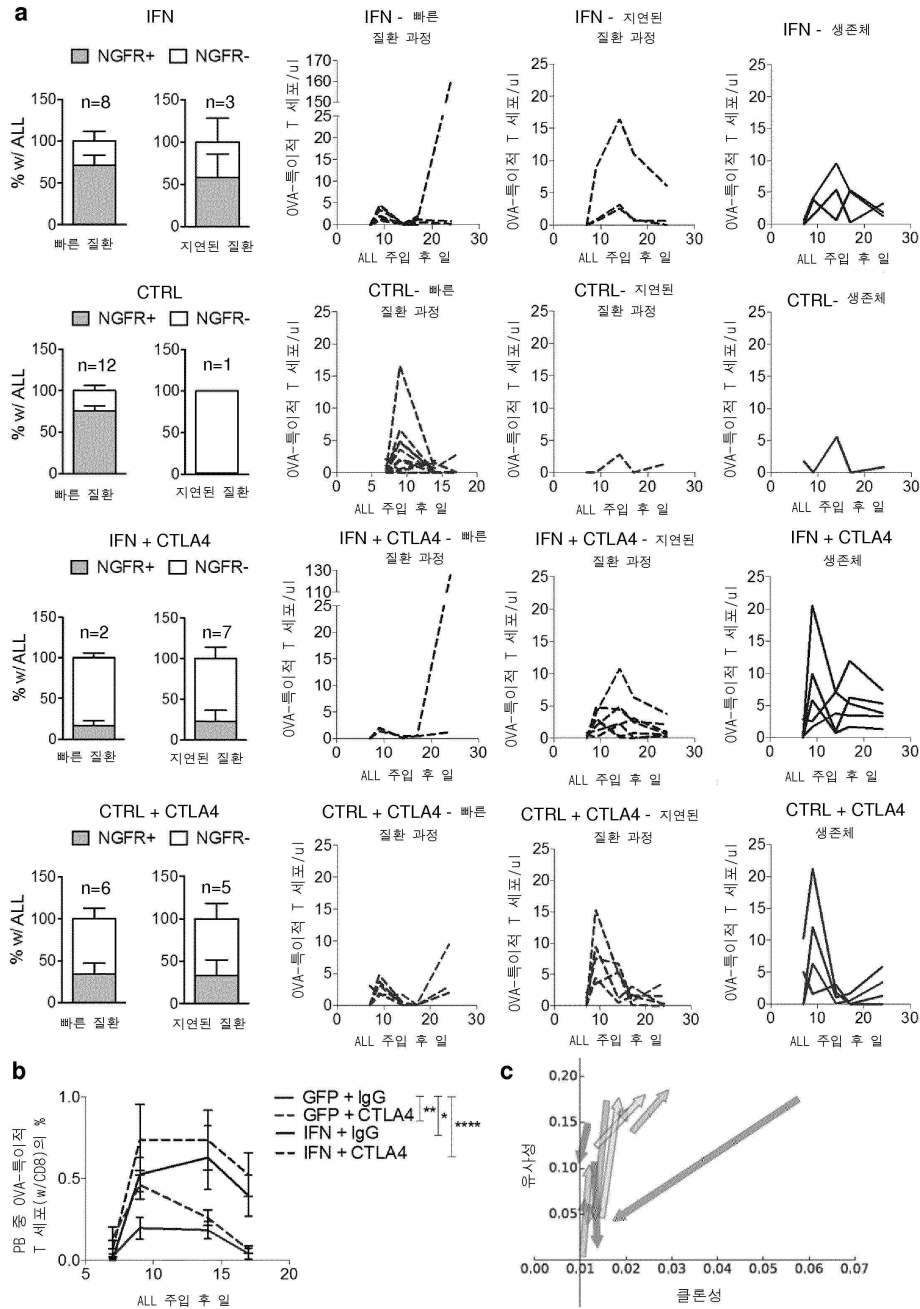
도면14



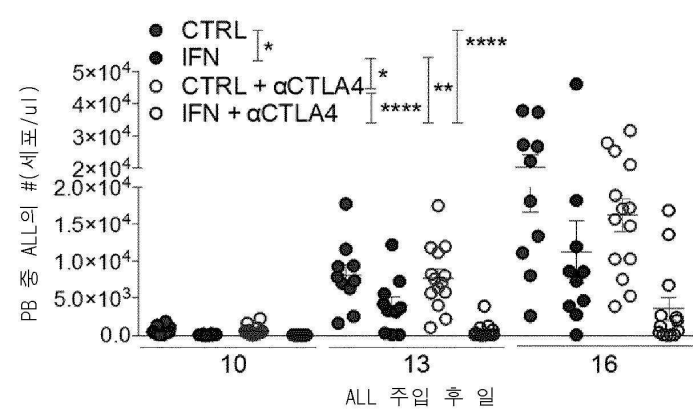
도면15



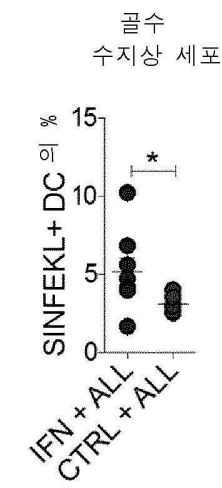
도면16



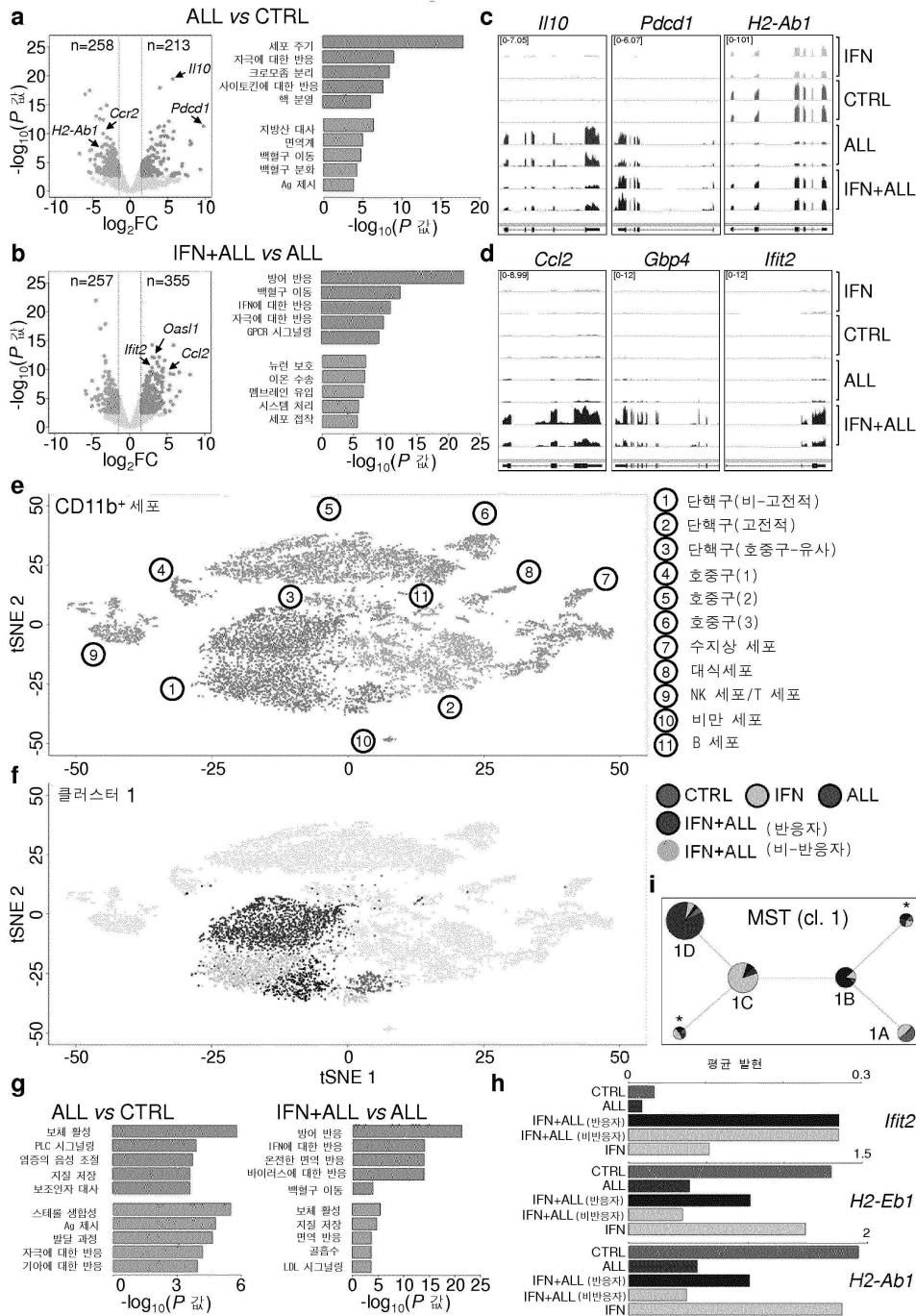
도면17



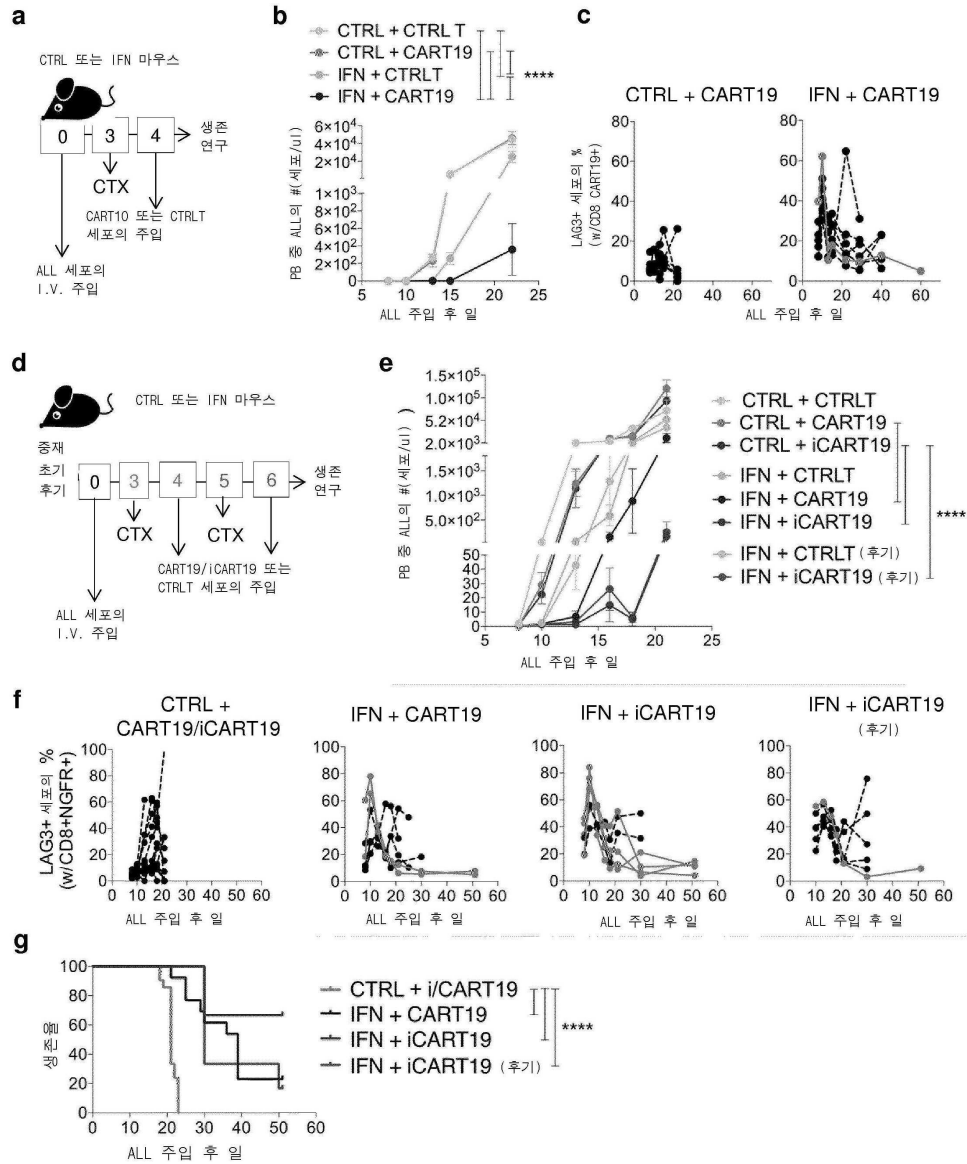
도면18



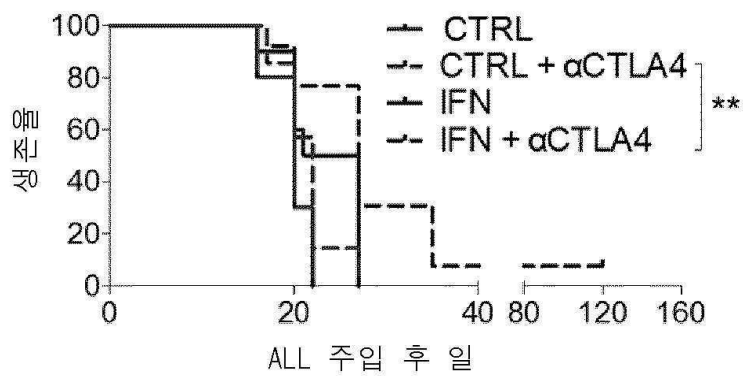
도면19



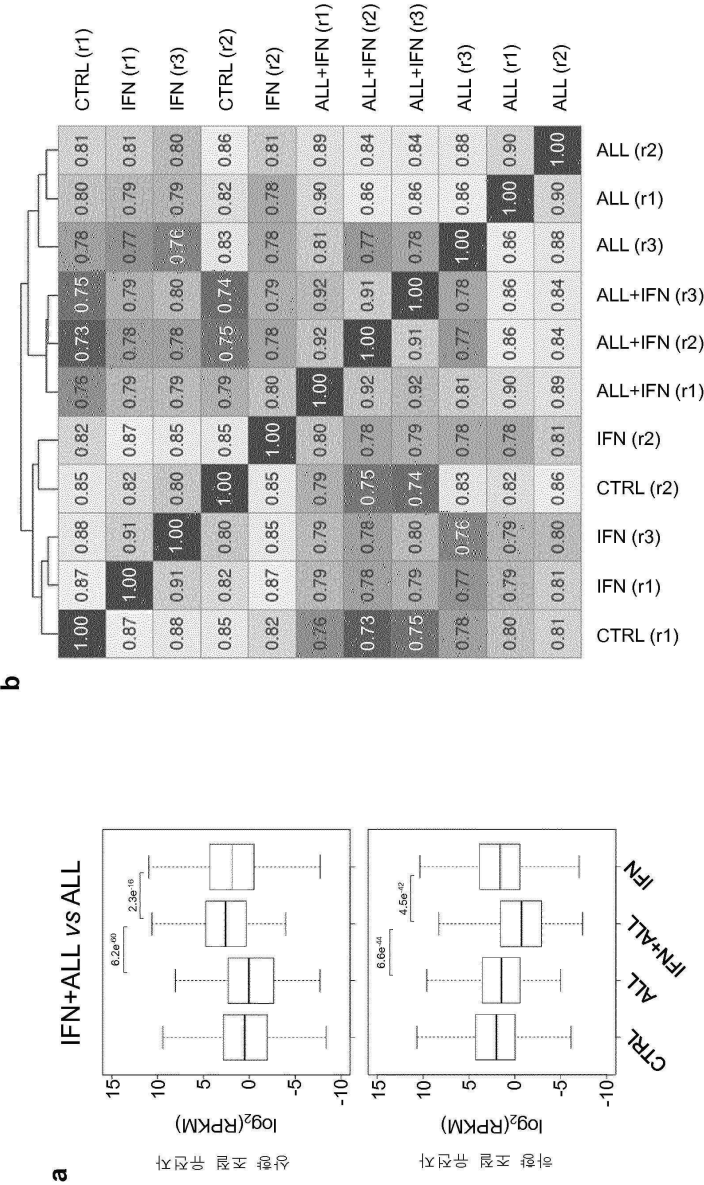
도면20



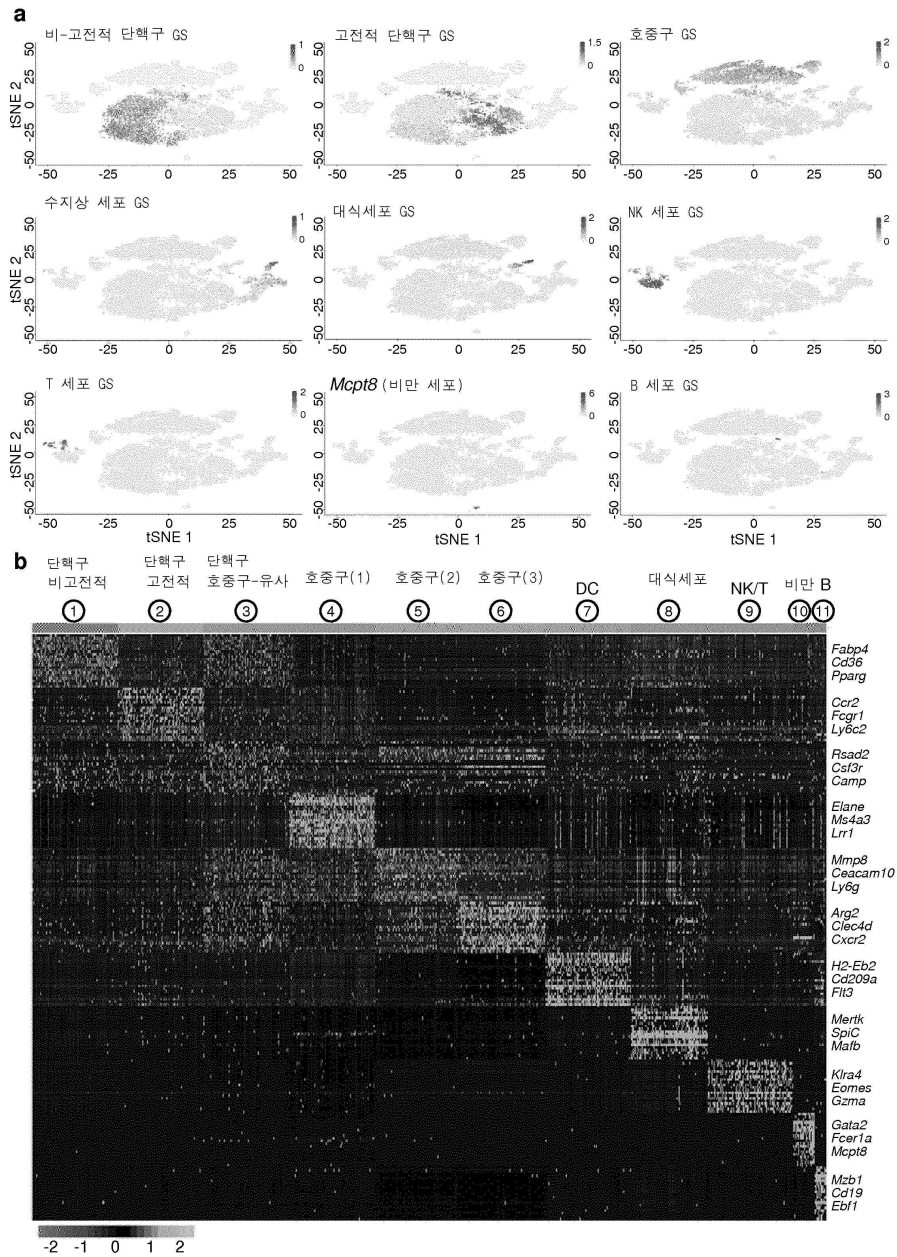
도면21



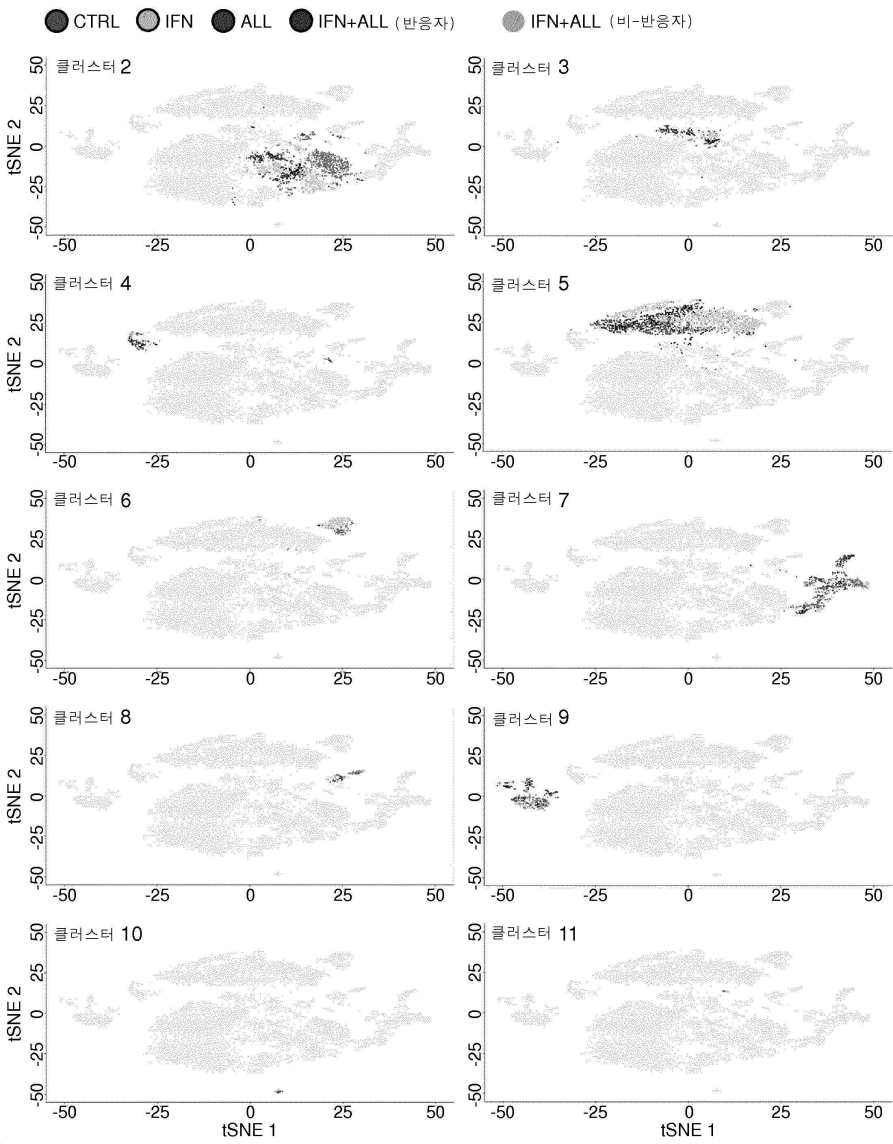
도면22



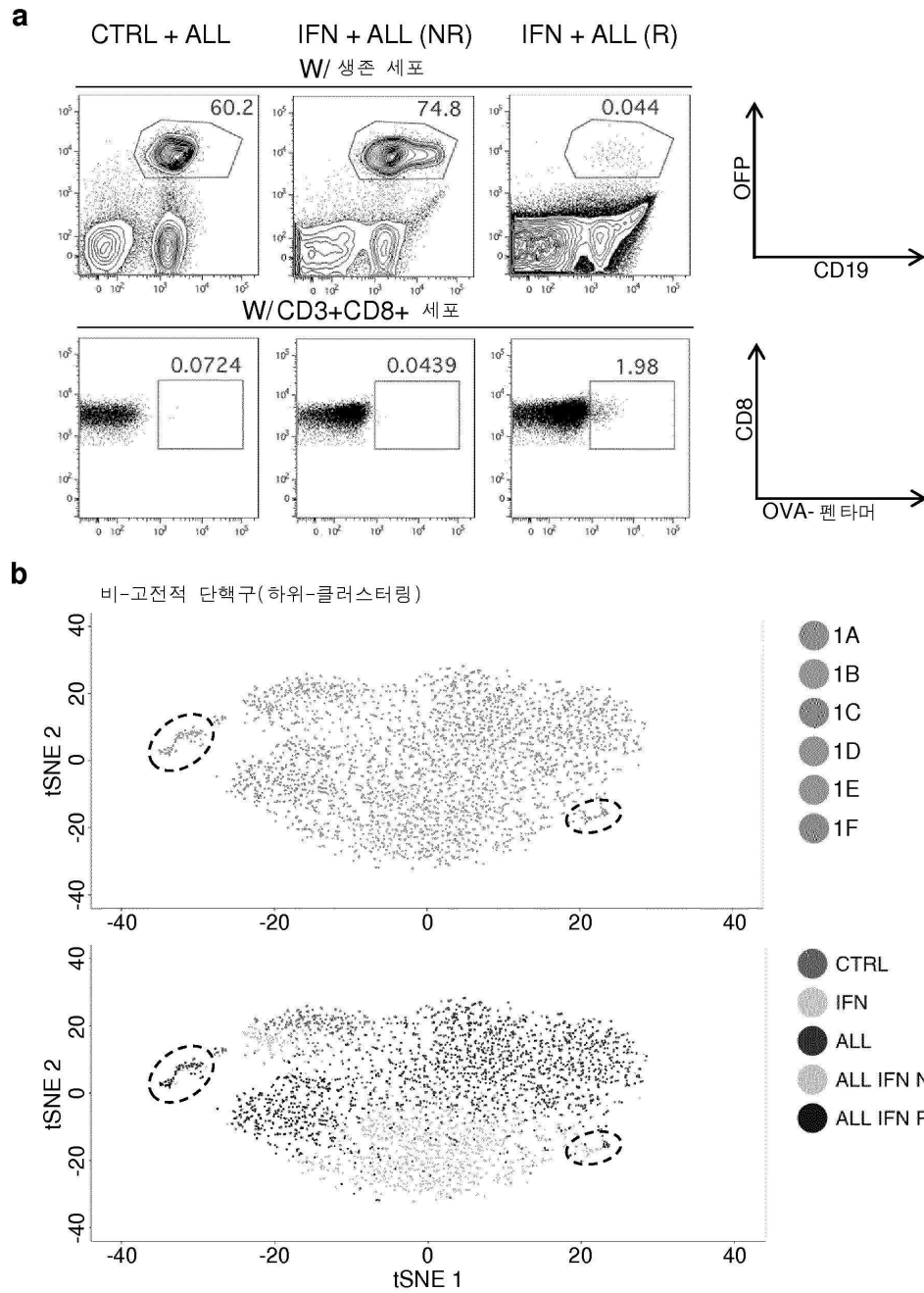
도면23



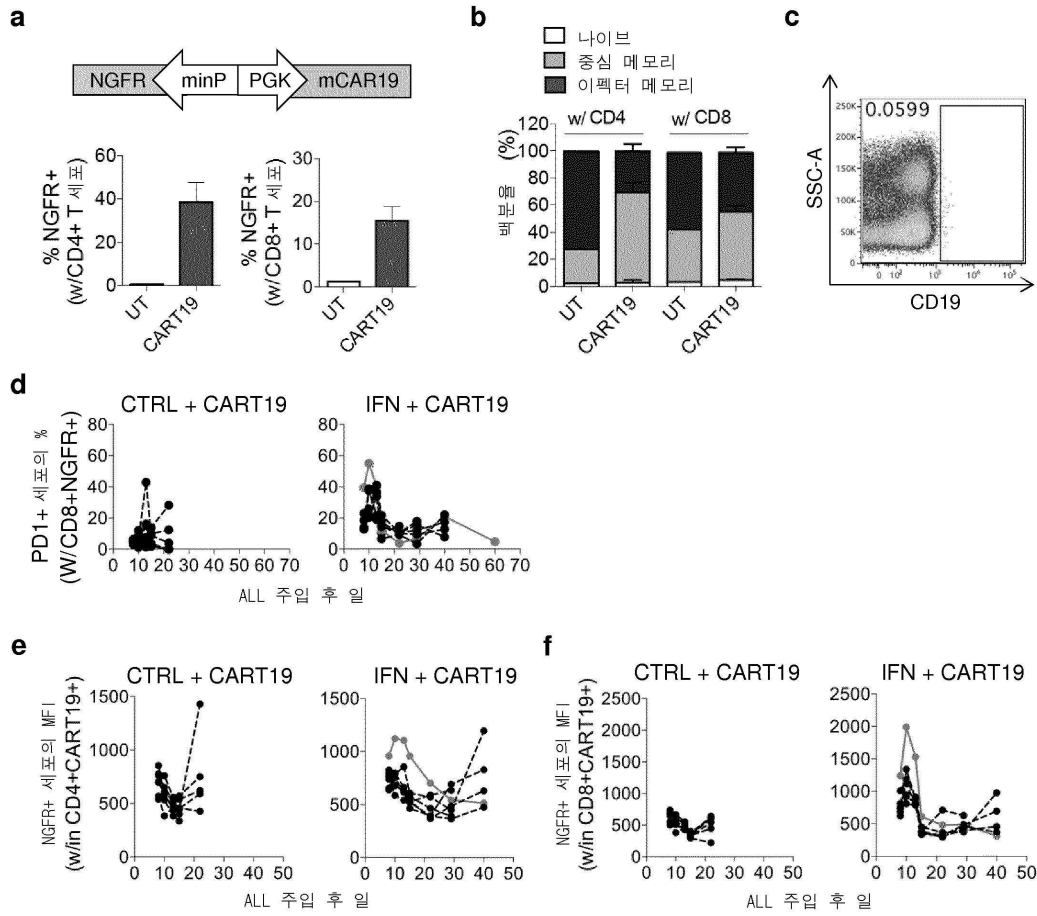
도면24



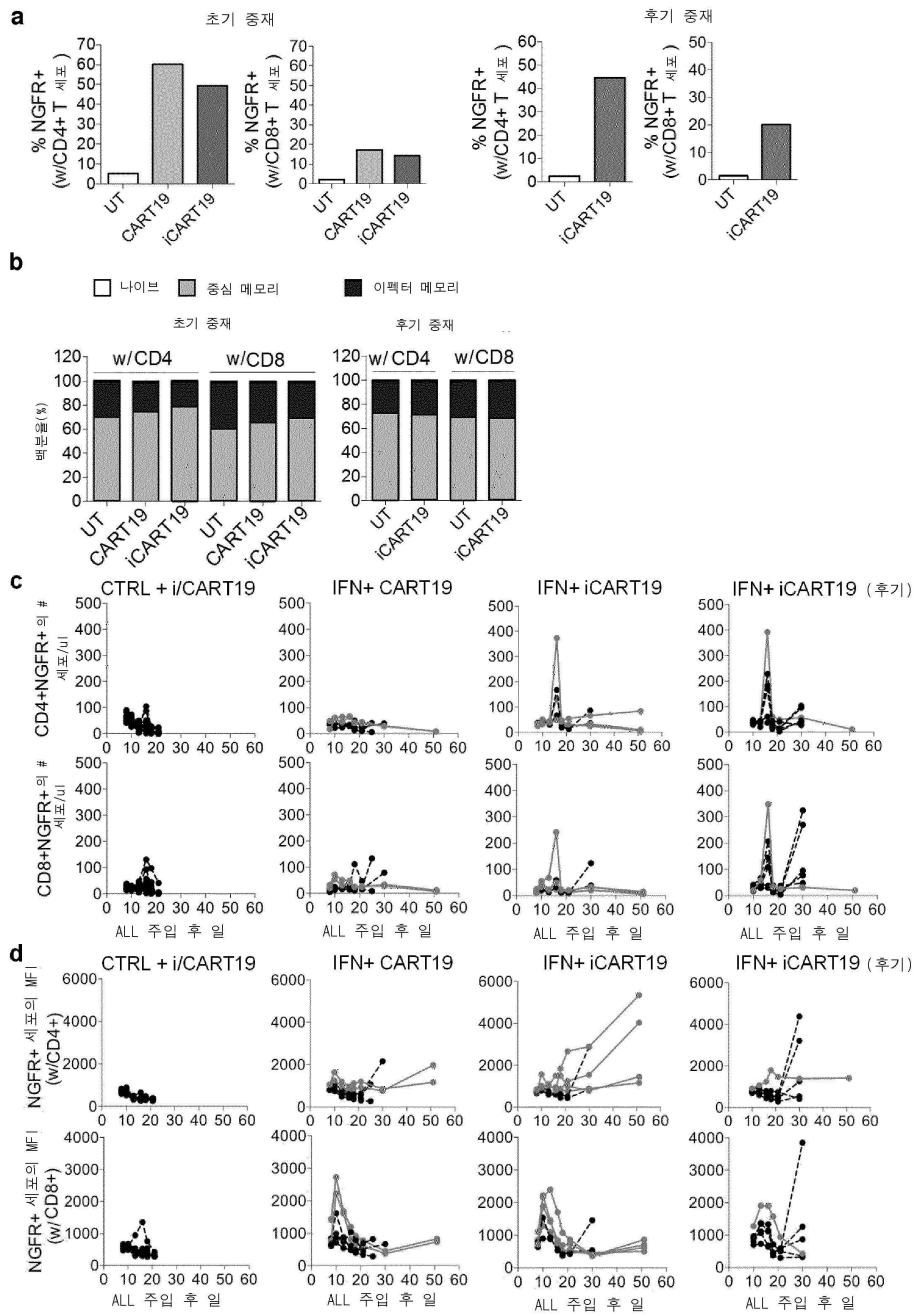
도면25



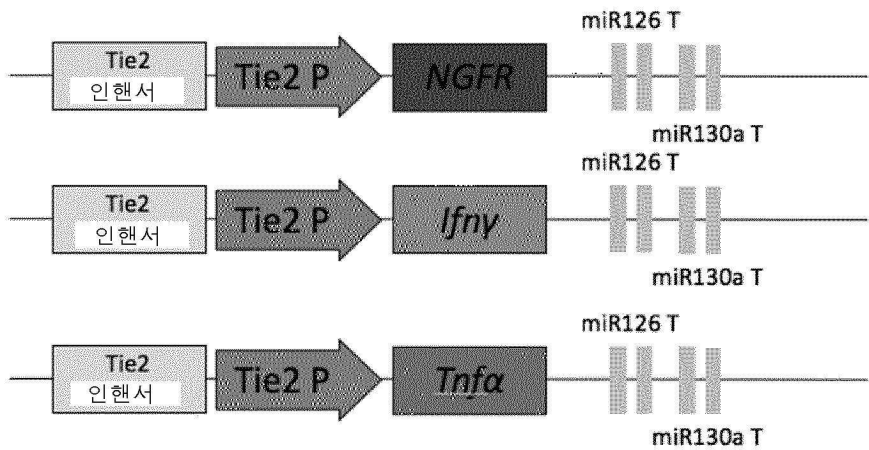
도면26



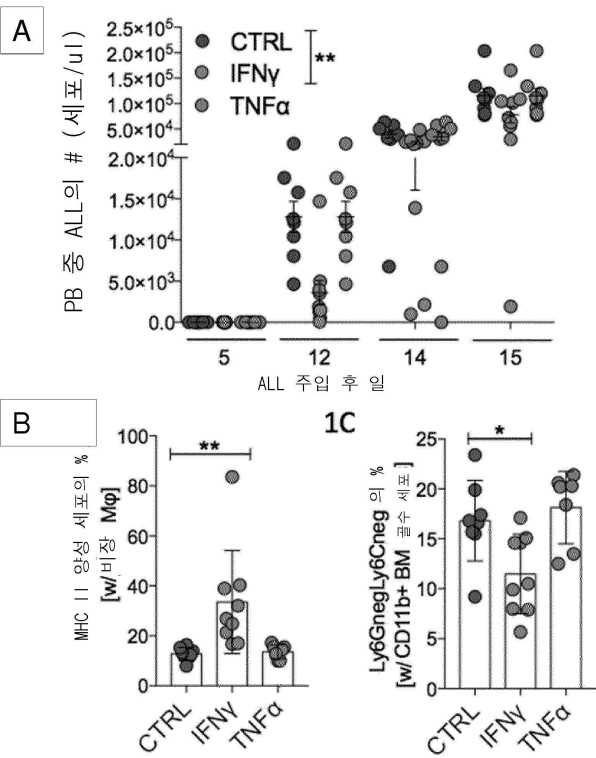
도면27



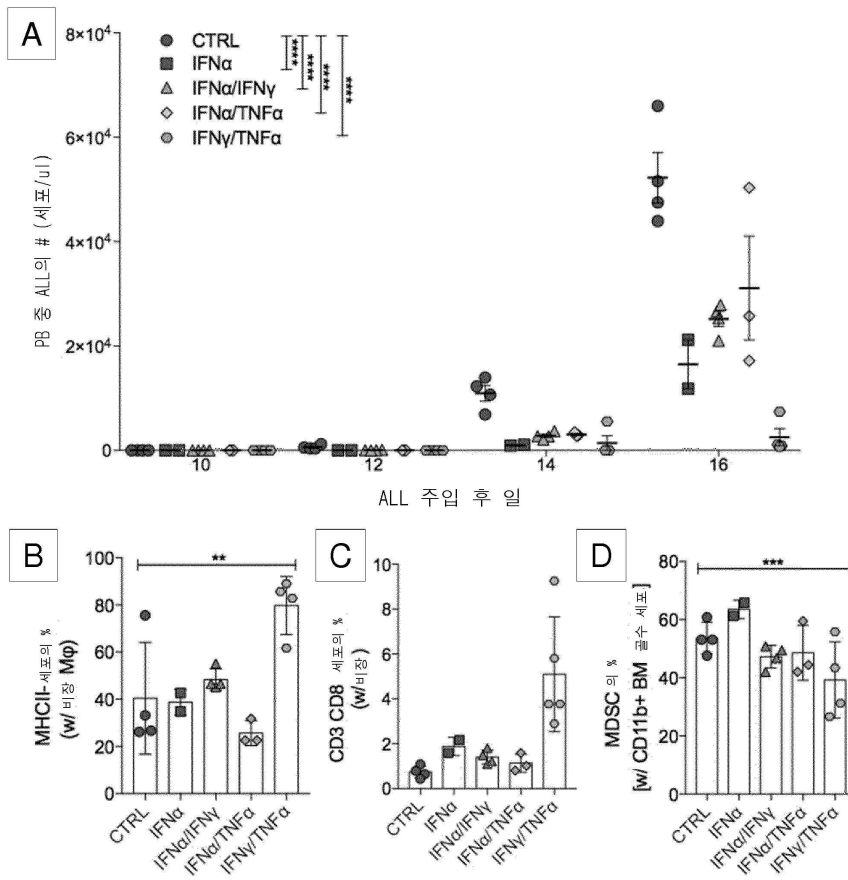
도면28



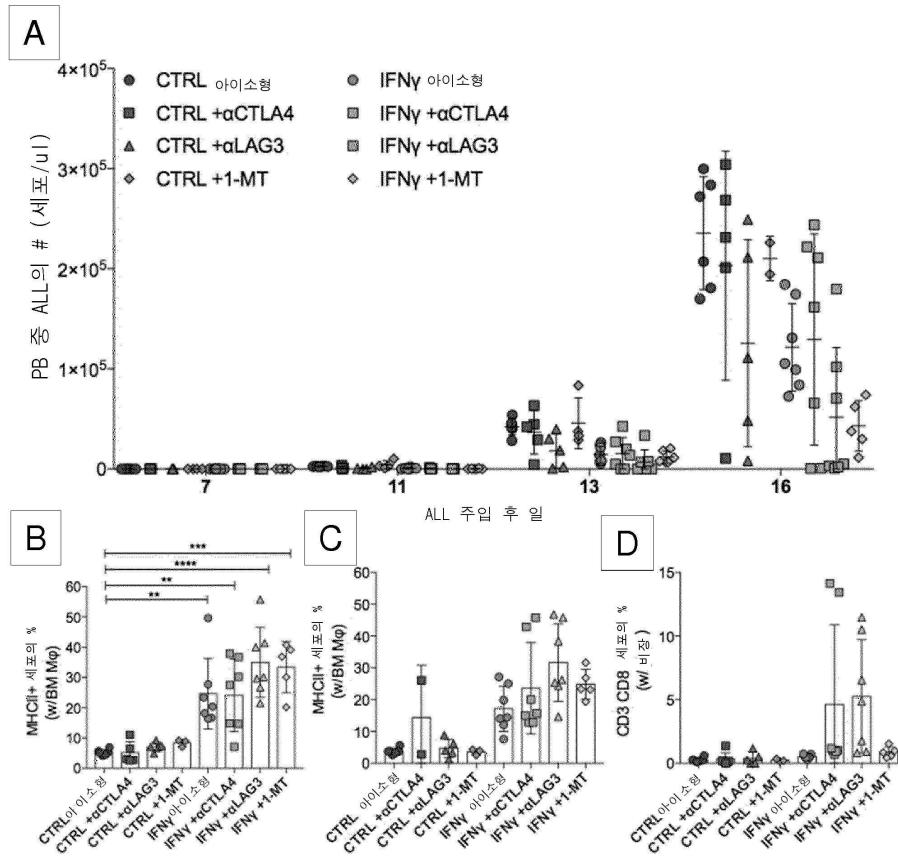
도면29



도면30



도면31



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Ospedale San Raffaele S.r.l

Fondazione Telethon

<120> Gene therapy

<130> P111897PCT

<140> PCT/EP2018/060238

<141> 2018-04-20

<150> GB 1706410.6

<151> 2017-04-21

<150> GB 1801511.5

<151> 2018-01-30

<160> 25

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mir-126 miRNA
 <400> 1
 ucguaccgug aguaauaaug cg 22
 <210> 2
 <211> 21
 <
 212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mir-126 target sequence
 <400> 2
 gcattattac tcacgtacg a 21
 <210> 3
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mir-130a miRNA
 <400> 3
 cagugcaaug uuaaaagggc au 22
 <210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mir-130a target sequence
 <400> 4
 atgccctttt aacattgcac tg 22
 <210> 5
 <211> 102
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sequence comprising two copies of mir-126 target sequence and two
 copies of mir-130a target sequence
 <400> 5

gcattattac tcacggtacg acgatgcatt attactcacg gtacgaacgc gtagccctt 60
ttaaattgc actgatgcat atgccctttt aacattgcac tg 102

<210> 6

<211> 188

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> example interferon-alpha (IFN-alpha) sequence

<400> 6

Met Ala Leu Thr Phe Ala Leu Leu Val Ala Leu Leu Val Leu Ser Cys

1 5 10 15
Lys Ser Ser Cys Ser Val Gly Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu

20 25 30
Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser

35 40 45
Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu

50 55 60
Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His

65 70 75 80
Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser

85 90 95
Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr

100 105 110
Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val

115 120 125
Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys

130 135 140
Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro

145 150 155 160
Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu

165 170 175
Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu

180 185

<210> 7

<211> 567

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> example nucleotide sequence encoding an IFN- α

<400> 7

```
atggccttga cctttgcttt actggtggcc ctctggtgc tcagctgcaa gtcaagctgc      60
tctgtgggct gtgatctgcc tcaaaccac agcctgggta gcaggaggac ctgatgctc      120
ctggcacaga tgaggagaat ctctcttttc tctgcttga aggacagaca tgactttgga      180
tttccccagg aggagtttgg caaccagttc caaaaggctg aaaccatccc tgcctccat      240
gagatgatcc agcagatctt caatctcttc agcacaagg actcatctgc tgcttgggat      300
gagaccctcc tagacaaatt ctacactgaa ctctaccagc agctgaatga cctggaagcc      360
tgtgtgatac agggggtggg ggtgacagag actccctga tgaaggagga ctccattctg      420
```

```
gctgtgagga aatacttcca aagaatcact ctctatctga aagagaagaa atacagccct      480
tgtgcctggg aggttgtcag agcagaaatc atgagatctt tttctttgtc aacaaacttg      540
caagaaagtt taagaagtaa ggaatga                                     567
```

<210> 8

<211> 187

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> example IFN- β sequence

<400> 8

Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser

1 5 10 15

Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg

20 25 30

Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg

35 40 45

Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu

50 55 60

Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile

65 70 75 80

Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser

85 90 95
Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val
100 105 110
Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu
115 120 125
Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys
130 135 140
Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser

145 150 155 160
His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr
165 170 175
Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
180 185

<210> 9

<211> 1835

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> example nucleotide sequence encoding an IFN-beta

<400> 9

gaattctcag gtcgtttgct ttcctttgct tttcccaag tcttgttta caatttgctt	60
tagtcattca ctgaaacttt aaaaaacatt agaaaacctc acagtttgta aatctttttc	120
cctattatat atatcataag ataggagctt aaataaagag ttttagaaac tactaaaatg	180
taaatgacat aggaaaaactg aaaggagagaa gtgaaagtgg gaaattcctc tgaatagaga	240
gaggaccatc tcatataaat aggccatacc cacggagaaa ggacattcta actgcaacct	300
ttcgaagcct ttgctctggc acaacaggta gtaggcgaca ctgttcgtgt tgtcaacatg	360
accaacaagt gtctctcca aattgctctc ctgtttgtgt tctccactac agctcttttc	420
atgagctaca acttgcttgg attcctacaa agaagcagca attttcagtg tcagaagctc	480
ctgtggcaat tgaatgggag gcttgaatac tgcctcaagg acaggatgaa ctttgacatc	540
cctgaggaga ttaagcagct gcagcagttc cagaaggagg acgccgcatt gaccatctat	600
gagatgctcc agaacatctt tgctattttc agacaagatt catctagcac tggctggaat	660

gagactattg ttgagaacct cctggctaata gtctatcatc agataaacca tctgaagaca 720
gtcctggaag aaaaactgga gaaagaagat ttcaccaggg gaaaactcat gagcagctcg 780
cacctgaaaa gatattatgg gaggattctg cattacctga aggccaagga gtacagtcac 840
tgtgcctgga ccatagtcag agtggaaatc ctaaggaact tttacttcat taacagactt 900
acaggttacc tccgaaactg aagatctcct agcctgtgcc tctgggactg gacaattgct 960

tcaagcattc ttcaaccagc agatgctgtt taagtgactg atggctaata tactgcatat 1020
gaaaggacac tagaagattt tgaaattttt attaaattat gagttatttt tatttattta 1080
aattttattt tggaaaataa attatttttg gtgcaaaagt caacatggca gttttaattt 1140
cgatttgatt tatataacca tccatattat aaaattgcc agtacctatt agttgttctt 1200
tttaaaatat acctgcaaag tagtatactt tctggccctt gccitttaagg aatttaaaat 1260
tcaagaaagc catgatggaa tatataaggt aagagacaat aaggggacct gaaccttatg 1320
ggggaataaa tatggcatga actgctgtgg gattaaaaga gaaaaggaaa gctggagggt 1380

ctggaactaa acctgggggtt cccattcttc ctactgtgtg ttccagattc tctcatcata 1440
aagttagaat tgagctggcc atcaggaata gccagaggaa tatgtcagct tttgtgttct 1500
ccctaacctt cccagttat ttgggggac actttgtctc tcgaaagatt tttaaataat 1560
tatgtcccc ccaccatccc tgcaagctta aggggtgagaa gtccattta cttccatgac 1620
actattaagc agcaatctt ttattctgct catcatggga cagccaagat gtgtgggtat 1680
cttaggggag ctgtgggtcc ctgtctgtcg gcatggcaca ggcatcagag gaagaagaac 1740
ctttttatac cctagccatc tggttagttt tctccctagt ttttcaaaaa actaagcctg 1800

cttcagttc ccactgcctt gttcatacag aattc 1835

<210> 10
<211> 1291
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> example TEK promoter sequence
<400> 10

gatcacgaga ctagcctcga gtcacacctg caaactggaa acattaattg gttcttaaga 60
tcatcatcga cgtgataaaa cctgggacag aaattagtca agactagctg catctgcctt 120
ttcctctggt gggtaggaaa aggaggagta taatgatttc ctcaggcatg aaggtcgaatg 180
atgagcaaag tgtatactct ctaatctaata gtcataattc atattgtgga gtaattatct 240
ggataaggtg agggctctcg acctcattct agatattgta cattccatgg ctattttcat 300

tttgggccat gaactctctt tgctctcatg agcaccatit ttatcccaat ctaatcctgt 360
atgtttgtgt ttttacacag attagttttt aaatgttata tataatttgc ttctgaaaca 420
ccattgctca atgactacca aatctttctc attacaaaaa tccttctatg ccaacttctt 480
caagaaatit gatcacctit agatgaattg ttaatgaaaa ttaaagctat agccggcaac 540
atgggtatct ttgggctaag ggccaaccaa caggccatct gtgtgaaaga aaacaggcta 600
acaattttgg actctggctt cttggggcta cattgagcat tgacctcacc ggtgctcact 660
gaaattaatt gcttttcagg ttgtattttc tcatcacgga aaccttcttc tcccaattca 720

aacctgtgg gttaaaatga gaaaacaaaa gccaaaacgg cttccacac ccaaaagctc 780
cttctgtcag agatcccagt agccccggga gagctgttag aagtctgaga aggattggct 840
atcatcgcat accatacata ggtggagggc ttgttattct cagtttcccg cctatgagag 900
gataccccta ttgtttctga aaatgctgac cgggacccac acttccaaca aaaattcctc 960
tgccctaca gcagcagcaa aagcagcagc agaagcaaca gcaacagata agtgttttga 1020
tgaattgca gatggatagg gcttgagtgc cccagccct gctgatacca aatgccttta 1080
agatacagcc tttcccatcc taatctacaa aggaaacagg aaaaaggaac ttaaaactcc 1140

ctgtgctcag acagaaatga gactgttaca gcctgcttct gtgctgttcc ttcttgctc 1200
taacttgtaa acaagacgta gtaggacgat gctaattgaa agtcacaaac cgctgggttt 1260
ttgaaaggat cctagactcg agcgccgcc a 1291

<210> 11

<211> 869

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> example TEK (Tie2) enhancer sequence

<400> 11

cttcagacct ggaggaggag atatgaggga ccaattgtgg ccagacgatt ccttaactcg 60
tgttacacct gcagaatgag ttttagatct agctgtgacc ttttcccca gccccaccc 120

cattgtcccc ttgtgtgcct tcaggaatct gatcattctt ctctcctgct ctttccaaa 180
ggctgcagga gcaggtgtga agacgtggat gtgccagatg cagagtcttg aacttttca 240
acacatctgc atattagagg aagtacatac ccattgcttg gtggtttcat gtctaattgt 300
glatgagtgt gacaaagaga gggagaaaat ttggactagc caaagaagcc agtcaggcgt 360
ggggtttgaa gggcatcgtg ggcggctgtc atttgccttc tgcttgtcac agcccttgc 420
ccagggcttg accagtgagg tgtatgtgct ggtcacaccc atctcagcag atctgtcagc 480

tttcccgctt ttgttaaagg gtgatatcat gcttcctggg gggagcactg gaagacaatg 540

ctcggccact ttcctccaga tacaataggc ggagtcagga aggcagtatt gacattgctg 600

gggctgggga ggcactcact gctctgcggc cgtcagatgg tgaaccagct taaccttggc 660

acacagggcc tgggttgtgc aaggcgtctg gctgcagagc caaaggggac tccaccttgg 720

ggacaggagt gctttagaca tctgggaatc tgggatgggc ttcaaattct gatccctgtg 780

tcagaaacaa ccacaaaaca ataagagtac cagtaataac aaaaatgact accctaggtt 840

gaatgccttt atgtgccaag tgtcaattg 869

<210> 12

<211> 166

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> example IFNgamma sequence

<400> 12

Met Lys Tyr Thr Ser Tyr Ile Leu Ala Phe Gln Leu Cys Ile Val Leu

1 5 10 15

Gly Ser Leu Gly Cys Tyr Cys Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu

20 25 30

Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn

35 40 45

Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp

50 55 60

Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe

65 70 75 80

Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile

85 90 95

Lys Glu Asp Met Asn Val Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg

100 105 110

Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val

115 120 125

Gln Arg Lys Ala Ile His Glu Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser

130 135 140

Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg
145 150 155 160
Gly Arg Arg Ala Ser Gln
165

<210> 13

<211> 143

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> example mature amino acid sequence of IFNgamma

<400> 13

Gln	Asp	Pro	Tyr	Val	Lys	Glu	Ala	Glu	Asn	Leu	Lys	Lys	Tyr	Phe	Asn
1				5					10					15	
Ala	Gly	His	Ser	Asp	Val	Ala	Asp	Asn	Gly	Thr	Leu	Phe	Leu	Gly	Ile
			20					25					30		
Leu	Lys	Asn	Trp	Lys	Glu	Glu	Ser	Asp	Arg	Lys	Ile	Met	Gln	Ser	Gln
		35					40					45			
Ile	Val	Ser	Phe	Tyr	Phe	Lys	Leu	Phe	Lys	Asn	Phe	Lys	Asp	Asp	Gln
	50					55					60				

Ser	Ile	Gln	Lys	Ser	Val	Glu	Thr	Ile	Lys	Glu	Asp	Met	Asn	Val	Lys
65					70					75					80
Phe	Phe	Asn	Ser	Asn	Lys	Lys	Lys	Arg	Asp	Asp	Phe	Glu	Lys	Leu	Thr
				85					90					95	
Asn	Tyr	Ser	Val	Thr	Asp	Leu	Asn	Val	Gln	Arg	Lys	Ala	Ile	His	Glu
			100					105					110		
Leu	Ile	Gln	Val	Met	Ala	Glu	Leu	Ser	Pro	Ala	Ala	Lys	Thr	Gly	Lys
		115					120					125			

Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly Arg Arg Ala Ser Gln
130 135 140

<210> 14

<211> 501

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> example nucleotide sequence encoding an IFNgamma

<400> 14

atgaaatata caagttatat cttggctttt cagctctgca tcgttttggg ttctcttggc	60
tgttactgcc aggaccata tgtaaaagaa gcagaaaacc ttaagaaata ttttaatgca	120
ggtcattcag atgtagcgga taatggaact cttttcttag gcattttgaa gaattggaaa	180
gaggagagtg acagaaaaat aatgcagagc caaattgtct ctttttactt caaacttttt	240
aaaaacttta aagatgacca gagcatcaa aagagtgtgg agaccatcaa ggaagacatg	300
aatgtcaagt ttttcaatag caacaaaaag aaacgagatg acttcgaaaa gctgactaat	360
tattcggtaa ctgacttgaa tgtccaacgc aaagcaatac atgaactcat ccaagtgatg	420
gctgaactgt cgccagcagc taaaacaggg aagcgaaaaa ggagtcagat gctgtttcga	480
ggtcgaagag catcccagta a	501

<210> 15

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> example nucleotide sequence encoding a mature form of IFNgamma

<400> 15

caggacccat atgtaaaaga agcagaaaac ctttaagaaat attttaatgc aggtcattca	60
gatgtagcgg ataattggaac tcttttctta ggcattttga agaattggaa agaggagagt	120
gacagaaaaa taatgcagag ccaaattgtc tccttttact tcaaactttt taaaaacttt	180
aaagatgacc agagcatcca aaagagtgtg gagaccatca aggaagacat gaatgtcaag	240
tttttcaata gcaacaaaaa gaaacgagat gacttcgaaa agctgactaa ttattcggtg	300
actgacttga atgtccaacg caaagcaata catgaactca tccaagtgat ggctgaactg	360
tcgccagcag ctaaacacgg gaagcgaaaa aggagtcaga tgctgtttcg aggt	414

<210> 16

<211> 468

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> example nucleotide sequence encoding an IFNgamma

<400> 16

atgaacgcta cacactgcat cttggctttg cagctcttcc tcatggctgt ttctggctgt	60
tactgccacg gcacagtcac tgaaagccta gaaagtctga ataactatct taactcaagt	120

ggcatagatg tggaagaaaa gagtctcttc ttggatatct ggaggaactg gcaaaaggat 180
 ggtgacatga aaatcctgca gagccagatt atctctttct acctcagact ctttgaagtc 240
 ttgaaagaca atcaggccat cagcaacaac ataagcgtca ttgaatcaca cctgattact 300

acctttctca gcaacagcaa ggcgaaaaag gatgcattca tgagtattgc caagtttgag 360
 gtcaacaacc cacaggtcca gcgccaagca ttcaatgagc tcattccgagt ggtccaccag 420
 ctgttgccgg aatccagcct caggaagcgg aaaaggagtc gctgctga 468

<210> 17

<211> 155

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> example mature IFNgamma amino acid sequence

<400> 17

Met Asn Ala Thr His Cys Ile Leu Ala Leu Gln Leu Phe Leu Met Ala

1 5 10 15

Val Ser Gly Cys Tyr Cys His Gly Thr Val Ile Glu Ser Leu Glu Ser

20 25 30

Leu Asn Asn Tyr Phe Asn Ser Ser Gly Ile Asp Val Glu Glu Lys Ser

35 40 45

Leu Phe Leu Asp Ile Trp Arg Asn Trp Gln Lys Asp Gly Asp Met Lys

50 55 60

Ile Leu Gln Ser Gln Ile Ile Ser Phe Tyr Leu Arg Leu Phe Glu Val

65 70 75 80

Leu Lys Asp Asn Gln Ala Ile Ser Asn Asn Ile Ser Val Ile Glu Ser

85 90 95

His Leu Ile Thr Thr Phe Phe Ser Asn Ser Lys Ala Lys Lys Asp Ala

100 105 110

Phe Met Ser Ile Ala Lys Phe Glu Val Asn Asn Pro Gln Val Gln Arg

115 120 125

Gln Ala Phe Asn Glu Leu Ile Arg Val Val His Gln Leu Leu Pro Glu

130 135 140

Ser Ser Leu Arg Lys Arg Lys Arg Ser Arg Cys

145

150

155

<210> 18

<211> 468

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> example nucleotide sequence encoding an IFNgamma

<400> 18

atgaacgcta cacactgcat cttggctttg cagctcttcc tcatggctgt ttctggctgt	60
tactgccacg gcacagtcac tgaaagccta gaaagtctga ataactatct taactcaagt	120
ggcatagatg tggaagaaaa gagtctcttc ttggatatct ggaggaactg gcaaaaggat	180
ggtgacatga aaatcctgca gagccagatt atctctttct acctcagact ctttgaagtc	240
ttgaaagaca atcaggccat cagcaacaac ataagcgtca ttgaatcaca cctgattact	300

accttcttca gcaacagcaa ggcgaaaaag gatgcattca tgagtattgc caagtttgag	360
gtcaacaacc cacaggtcca gcgccaagca ttcaatgagc tcatccgagt ggtccaccag	420
ctgttgccgg aatccagcct caggaagcgg aaaaggagtc gctgctga	468

<210> 19

<211> 235

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> example tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) sequence

<400> 19

Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala

1	5	10	15
---	---	----	----

Leu Pro Gln Lys Met Gly Gly Phe Gln Asn Ser Arg Arg Cys Leu Cys

20	25	30
----	----	----

Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Leu Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe

35	40	45
----	----	----

Cys Leu Leu Asn Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Asp Glu Lys Phe

50	55	60
----	----	----

Pro Asn Gly Leu Pro Leu Ile Ser Ser Met Ala Gln Thr Leu Thr Leu

65	70	75	80
----	----	----	----

Arg Ser Ser Ser Gln Asn Ser Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val
85 90 95
Ala Asn His Gln Val Glu Glu Gln Leu Glu Trp Leu Ser Gln Arg Ala
100 105 110
Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Met Asp Leu Lys Asp Asn Gln Leu Val
115 120 125
Val Pro Ala Asp Gly Leu Tyr Leu Val Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys
130 135 140

Gly Gln Gly Cys Pro Asp Tyr Val Leu Leu Thr His Thr Val Ser Arg
145 150 155 160
Phe Ala Ile Ser Tyr Gln Glu Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Val Lys
165 170 175
Ser Pro Cys Pro Lys Asp Thr Pro Glu Gly Ala Glu Leu Lys Pro Trp
180 185 190
Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp
195 200 205

Gln Leu Ser Ala Glu Val Asn Leu Pro Lys Tyr Leu Asp Phe Ala Glu
210 215 220
Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Val Ile Ala Leu
225 230 235

<210> 20

<211> 705

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> example nucleotide sequence encoding a TNFalpha

<400> 20

atgagcacag aaagcatgat ccgcgacgtg gaactggcag aagaggcact cccccaaaag 60

atggggggct tccagaactc caggcgggtgc ctatgtctca gcctcttctc attctctgctt 120

gtggcagggg ccaccacgct cttctgtctc ctgaacttcg gggatgatcgg tccccaaagg 180

gatgagaagt tcccaaattg cctccctctc atcagttcta tggcccagac cctcacactc 240

agatcatctt ctcaaaattc gagtgacaag cctgtagccc acgtcgtagc aaaccaccaa 300

gtggaggagc agctggagtg gctgagccag cgcgccaacg ccctcctggc caacggcatg 360

gatctcaaag acaaccaact agtgggtgcca gccgatgggt tgtaccttgt ctactcccag 420
gttctcttca agggacaagg ctgccccgac tacgtgctcc tcaccacac cgtcagccga 480
tttgctatct cataccagga gaaagtcaac ctctctctg ccgtcaagag cccctgcccc 540

aaggacaccc ctgagggggc tgagctcaaa ccctggatg agcccatata cctgggagga 600
gtcttcacg tggagaagg ggaccaactc agcgtgagg tcaatctgcc caagtactta 660
gactttgagg agtcgggca ggtctacttt ggagtcattg ctctg 705

<210> 21
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer (Fw)
<400> 21
cgaccggtcc acaaagacag caccatgaca 30
<210> 22
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer (Rv)
<400> 22

attgtcgact taaggggaaa cacatctgcc aaaga 35
<210> 23
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer Rv (inactive CAR19)
<400> 23
aaacagctcc tcgagttatc taggggcca 29
<210> 24
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer Rv (CAR19)
<400> 24

aaacagctcc ctcgagtcac ctaggggccca gt 32

<210> 25

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer Fw (CAR19 and inactive CAR19)

<400> 25

aacaccggtg taccgaattc atgggcgtg 29