(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0142665
(43) 공개일자 2021년11월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) *A61K 35/17* (2014.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 14/705* (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0646 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7032464
(22) 출원일자(국제) 2020년03월20일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년10월08일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2020/057879
(87) 국제공개번호 WO 2020/188105
국제공개일자 2020년09월24일
(30) 우선권주장
19164241.2 2019년03월21일
유럽특허청(EPO)(EP)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
오엔케이 테라퓨틱스 리미티드
아일랜드, 골웨이 카운티, 바르나 빌리지, 피어로드, 콜앤컴퍼니 내 (우편번호: 에이치91 브이6케이브이)
(72) 발명자
오드와이어 마이클 에이먼 피터
아일랜드 골웨이 솔트힐 폴나로마 웨스트 11
사카르 수브하쉬스
아일랜드 골웨이 헤드포드 로드 고트 나 코리브 204
(74) 대리인
김진희, 김태홍

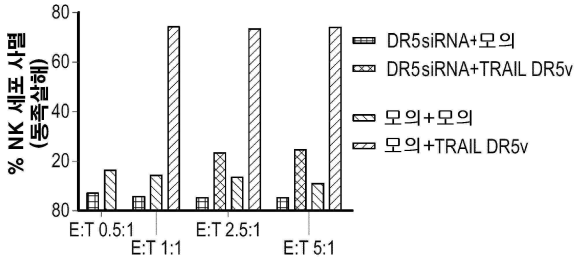
전체 청구항 수 : 총 26 항

(54) 발명의 명칭 **세포 사멸에 대한 증가된 내성을 갖는 변형된 면역 효과기 세포**

(57) 요 약

면역 효과기 세포 및 면역 효과기 세포주는 TRAIL 수용체의 넉아웃에 의해 또는 TRAIL 수용체를 면역 효과기 세포 공동자극 도메인에 연결시킴으로써, 또는 둘 모두에 의해, TRAIL 유도 세포 사멸에 대한 증가된 내성을 갖도록 변형된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/70521 (2013.01)
C12N 15/1138 (2013.01)
C12N 5/0636 (2013.01)
C12N 2310/20 (2017.05)
C12N 2510/00 (2013.01)

(30) 우선권주장
1917588.4 2019년12월02일 영국(GB)
2001593.9 2020년02월06일 영국(GB)

명 세 서

청구범위

청구항 1

TRAIL 유도 세포 사멸에 대한 증가된 내성을 갖도록 변형된 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주로서,

a) 변형은 하나 이상의 TRAIL 수용체 유전자의 발현을 넉다운(knockdown) 또는 넉아웃(knockout)시키는 것; 및/또는

b) 변형은 공동자극 도메인에 연결된 TRAIL 수용체를 발현시키는 것

을 특징으로 하는 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주.

청구항 2

제1항에 있어서, 면역 효과기 세포는 NK 세포인 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주.

청구항 3

제1항에 있어서, 면역 효과기 세포는 T 세포인 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, TRAIL 유도 세포 사멸에 대한 증가된 내성은 야생형 면역 효과기 세포에 비해 적어도 10%인 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, TRAIL 수용체는 DR4 및 DR5로부터 선택되는 것인 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 공동자극 도메인은 4-1BB, CD28, 2B4, DAP-10, DAP-12, CD278(ICOS) 및 OX40으로부터 선택되는 것인 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 돌연변이체 TRAIL 리간드를 추가로 발현하거나 발현하도록 변형되는 것인 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주.

청구항 8

제7항에 있어서, 돌연변이체 TRAIL 리간드는 TRAIL 수용체, 예컨대, DR4 및/또는 DR5에 대한 증가된 친화성을 갖는 것인 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 세포주는 NK-92 또는 KHYG-1, 또는 이의 유도체인 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에서 암을 치료하는 데 사용하기 위한 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주.

청구항 11

제10항에 있어서, 암은 혈액 암인 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주.

청구항 12

제11항에 있어서, 혈액 암은 급성 림프구성 백혈병(ALL), 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 만성 골수성 백혈병(CML), 호지킨 림프종, T-세포 림프종 및 B-세포 림프종을 포함한 비호지킨 림프종, 무증상 골수종, 무증상 다발성 골수종(SMM), 활성 골수종 또는 경쇄 골수종인 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주.

청구항 13

공동자극 도메인에 연결된 TRAIL 수용체를 발현하도록 변형된 NK-92 또는 KHYG-1 세포.

청구항 14

제13항에 있어서, TRAIL 수용체는 DR4 및 DR5로부터 선택되는 것인 NK-92 또는 KHYG-1 세포.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, 공동자극 도메인은 4-1BB, CD28, 2B4, DAP-10, DAP-12, CD278(ICOS) 및 OX40으로부터 선택되는 것인 NK-92 또는 KHYG-1 세포.

청구항 16

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주를 환자에게 투여함으로써 암을 치료하는 방법.

청구항 17

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주를 포함하는 조성물.

청구항 18

TRAIL 유도 세포 사멸에 대한 증가된 내성을 갖도록 세포를 변형시키는 단계를 포함하는 변형된 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주를 제조하는 방법으로서,

a) 변형은 하나 이상의 TRAIL 수용체 유전자의 발현을 넉다운 또는 넉아웃시키는 것; 및/또는

b) 변형은 공동자극 도메인에 연결된 TRAIL 수용체를 발현시키는 것

을 특징으로 하는, 변형된 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주의 제조 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 면역 효과기 세포는 NK 세포인 제조 방법.

청구항 20

제18항에 있어서, 면역 효과기 세포는 T 세포인 제조 방법.

청구항 21

제18항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, TRAIL 유도 세포 사멸에 대한 증가된 내성은 야생형 면역 효과기 세포에 비해 적어도 10%인 제조 방법.

청구항 22

제18항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, TRAIL 수용체는 DR4 및 DR5로부터 선택되는 것인 제조 방법.

청구항 23

제18항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 공동자극 도메인은 4-1BB, CD28, 2B4, DAP-10, DAP-12, CD278(ICOS) 및 OX40으로부터 선택되는 것인 제조 방법.

청구항 24

제18항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 면역 효과기 세포는 돌연변이체 TRAIL 리간드를 발현하도록 추가로 변형되는 것인 제조 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 돌연변이체 TRAIL 리간드는 TRAIL 수용체, 예컨대, DR4 및/또는 DR5에 대한 증가된 친화성을 갖는 것인 제조 방법.

청구항 26

제18항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 세포주는 NK-92 또는 KHYG-1, 또는 이의 유도체인 제조 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 유용한 유도체를 생산하기 위한 면역 효과기 세포 및 면역 효과기 세포주의 변형에 관한 것이다. 더욱이, 본 발명은 변형된 면역 효과기 세포 및 세포주를 생산하는 방법, 상기 세포 및 세포주를 함유하는 조성물 및 암의 치료에서의 상기 세포 및 세포를 포함하는 조성물의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 전형적으로, 면역 세포는 표적 세포의 사멸을 초래하는 면역 반응을 촉발하기 전에 주 조직적합성 복합체(MHC)를 통해 항원을 제시하는 표적 세포를 필요로 한다. 이것은 MHC 부류 I을 제시하지 않는 암 세포가 대부분의 면역 반응을 회피하게 한다.

[0003] 그러나, NK 세포는 MHC 부류 I 발현의 부재 하에 암 세포를 인식할 수 있다. 따라서, 이들은 암에 대한 신체의 방어에서 중요한 역할을 수행한다.

[0004] 반면, 특정 상황에서, 암 세포는 세포 막 상의 억제 수용체에 결합하는 리간드의 발현을 통해 면역 효과기 세포, 예컨대, NK 세포 및 T 세포의 세포독성 활성을 약화시키는 능력을 보여준다. 암에 대한 내성은 이들 및 다른 인자 사이의 균형을 포함할 수 있다.

[0005] 이 맥락에서, 세포독성은, 예컨대 세포용해 단백질을 방출함으로써, 또는 암 세포 막 상의 수용체에 결합하고 상기 암 세포의 아폽토시스를 유도함으로써(직접 또는 간접적이든 간에) 암 세포 사멸을 유도하는 면역 효과기 세포, 예컨대, NK 세포 및 T 세포의 능력을 지칭한다. 세포독성은 세포용해 단백질의 방출을 유도하는 신호에 의해 영향을 받을 뿐만 아니라 이들의 방출을 억제하는 신호에 의해 영향을 받는다. 따라서, 세포독성의 증가는 암 세포의 보다 효율적인 사멸로 이어질 것이며, 전술한 바와 같이 암 세포가 면역 효과기 세포의 세포독성 활성을 약화시킬 가능성은 적을 것이다.

[0006] NK 세포 상의 억제 수용체 기능을 제거하기 위한 유전자 변형은 MHC 부류 I 발현은 부족하지만 NK 세포독성을 약화시킬 수 있는 암 세포에 대한 NK 세포의 세포독성을 증가시키기 위한 방법으로 제안되었다(Bodduluru *et al*. 2012). NKG2A는 이러한 상황 하에서 침묵할 가치가 있는 억제 수용체로서 확립되었는데, 특정한 암 세포가 MHC 부류 I 발현의 부재 하에 NKG2A에 결합하고 NK 세포 세포독성을 억제하는 HLA-E를 발현하는 것으로 알려져 있기 때문이다(Shook *et al*. 2011; WO 제2006/023148호)(Campana D. *et al*. 2019).

[0007] NKG2A 발현을 하향조절하는 또 다른 방법이 NK-92 세포에서 나타났으며, 여기서 IL-15를 코딩하는 유전자를 이용한 형질감염이 NKG2A 발현의 감소와 관련된 것으로 나타났다(Zhang et al. 2004). 그러나, 관찰된 NK 세포의 세포독성 증가에도 불구하고, 증가는 수반되는 활성화 수용체 NKG2D의 발현 증가의 결과일 가능성이 있었다. 이것은 NK-92 세포 상의 NKG2A 수용체를 차단하는 것이 다발성 골수종 세포에 대한 세포독성의 증가와 관련되지 않았다는 관찰에 의해 뒷받침된다(Heidenreich et al. 2012). 그럼에도 불구하고, NK-92 세포주가 억제 수용체의 매우 낮은 발현을 갖는 매우 세포독성인 세포주라는 점을 주목할 만 하다. 따라서, 감소된 NKG2A 발현과 관련된 세포독성의 임의의 증가는 감지하기에 너무 사소한 것일 수 있다.

[0008] 유사한 연구가 마우스에서 수행되었다. 예를 들어, 마우스는 NK 세포 상에서 Ly49로 불리는 수용체를 발현하며, 이는 인간 억제 KIR 수용체와 유사하다. Ly49 수용체를 항체 단편으로 차단함으로써, NK 세포는 더 세포독성이

고 시험관내 및 생체내에서 쥣과 백혈병 세포를 사멸시킬 수 있는 것으로 나타났다(Koh et al. 2001).

[0009] 그러나, 변형된 NK 세포는 '정상' 세포 및 암 세포를 잘 구별할 수 없게 되기 때문에 신체 내의 '정상' 세포가 또한 변형된 NK 세포에 의한 공격에 더 취약하게 되는 것은 억제 수용체 기능을 감소시킨 결과이다. 이 부작용은 '고전적인' 억제 수용체 기능을 감소시키는 중대한 단점이다.

[0010] NK 세포가 암 세포를 사멸시키는 것으로 알려진 또 다른 방법은 이들의 표면 상에 TRAIL을 발현시키는 것이다. TRAIL 리간드는 암 세포 상의 TRAIL 수용체에 결합하여 상기 암 세포의 아폽토시스를 유도할 수 있다. 한 가지 추측에 근거한 접근법은 이러한 항암 메커니즘을 이용하기 위해 NK 세포 상의 막 결합된 TRAIL 리간드를 과발현시키는 것을 기술한다(EP1621550). 더욱이, IL-12는 NK 세포 상에서 TRAIL 발현을 상향조절하는 것으로 보고되었다(Smyth et al. 2001).

[0011] 그럼에도 불구하고, 암 세포는 TRAIL을 발현하는 NK 세포를 다루기 위한 회피적이고 보호적인 메커니즘을 발달시켰다. 유인(decoy) TRAIL 수용체가 종종 암 세포 막 상에서 발현되며, 이러한 유인 수용체(예컨대, DcR1 및 DcR2)에 대한 TRAIL의 결합은 아폽토시스를 유도할 수 없고; 이러한 메커니즘을 극복하기 위한 방법은 아직 추구되지 않았다.

[0012] 암 세포를 표적화하기 위해 TRAIL을 발현하는 NK 세포를 사용하는 또 다른 문제는 특정 NK 세포가 TRAIL 수용체 자체를 발현한다는 것이다. 따라서, NK 세포 상에서의 TRAIL 발현은 일부 경우에 동족살해(fratricide)로 이어질 수 있다.

[0013] 급성 골수성 백혈병(AML)은 골수 발달에 관여하는 전구체 세포와 관련된 조혈 악성종양이며, 성인(90%) 및 어린이(15-20%) 모두에서 급성 백혈병의 상당한 비율을 차지한다(Hurwitz, Mounce et al. 1995; Lowenberg, Downing et al. 1999). 환자의 80%가 표준 화학요법으로 차도를 달성하였음에도 불구하고(Hurwitz, Mounce et al. 1995; Ribeiro, Razzouk et al. 2005), 최소 잔존 질환(MRD)으로부터의 높은 재발률로 인해 생존은 여전히 만족스럽지 못하다. 5년 생존은 연령 의존적이며; 어린이에서 60%(Rubnitz 2012), 65세 이하의 성인에서 40%(Lowenberg, Downing et al. 1999) 및 65세 초과의 성인에서 10%이다(Ferrara and Schiffer 2013). 이러한 결과는 환자가 적합한 조혈 세포 공여자를 갖는 경우 개선될 수 있지만 많은 환자들은 그렇지 못하며, 이는 치료를 위한 대체 접근법의 필요성을 강조한다.

[0014] 자연 살해(NK) 세포는, 예컨대, 자연 살해 T(NK-T) 세포와 상이한 뚜렷한 표현형 및 효과기 기능을 갖는 세포독성 림프구이다. 예를 들어, NK-T 세포는 CD3 및 T 세포 항원 수용체(TCR) 모두를 발현하지만, NK 세포는 그렇지 못하다. NK 세포는 일반적으로 마커 CD16 및 CD56을 발현하는 것으로 밝혀져 있으며, 여기서 CD16은 Fc 수용체로서 기능하고 하기에 논의되는 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC)을 매개한다. KHYG-1은 이와 관련하여 주목할 만한 예외이다. NK 세포는 자연적으로 세포독성임에도 불구하고, 증가된 세포독성을 갖는 NK 세포주가 개발되었다. NK-92 및 KHYG-1은 광범위하게 연구되고 암 치료제에서 가능성을 보여주는 2개의 NK 세포주를 대표한다(Swift et al. 2011; Swift et al. 2012).

[0015] 암 치료에서 사용하기 위한 입양 세포 면역요법은 흔히 천연 및 변형된 T 세포를 환자에게 투여하는 것을 포함한다. T 세포는 특정 표적 암 세포에 특이적으로 결합하는 수용체 및/또는 리간드를 발현하기 위해 다양한 방식으로, 예컨대 유전적으로 변형될 수 있다. 암 세포 항원에 특이적인 고친화성 T 세포 수용체(TCR) 및 키메라성 항원 수용체(CAR)를 이용한 T 세포의 형질감염은 매우 반응성인 암 특이적 T 세포 반응을 일으킬 수 있다. 이 면역치료적 접근법의 주요 한계는 자가 생체외 확장을 위해 T 세포를 환자로부터 수득해야 하거나 또는 환자에게 세포를 전달한 직후 면역학적 박멸 또는 일부 경우 이식편대숙주 질환(GVHD)의 발병을 피하기 위해 MHC 일치 T 세포를 사용해야 한다는 것이다. 또한, 성공적으로 전달된 T 세포는 종종 순환계에서 장기간 생존하여, 치료로부터 비롯되는 지속적인 부작용을 제어하기 어렵게 만든다.

[0016] 동일단배체(haploidentical) 골수 이식 환경에서, 이식편-대-백혈병 효과는 KIR 억제 수용체-리간드 불일치가 있을 때 NK 세포에 의해 매개되는 것으로 여겨지며, 이는 AML의 치료에서 개선된 생존으로 이어질 수 있다(Ruggeri, Capanni et al. 2002; Ruggeri, Mancusi et al. 2005). 더욱이, 빠른 NK 회수는 AML에서 T 결핍 조혈 세포 이식(HCT)을 겪는 환자에서 더 나은 결과 및 더 강한 이식편-대-백혈병(GVL) 효과와 관련이 있다(Savani, Mielke et al. 2007). 다른 시험은 성인(Miller, Soignier et al. 2005) 및 어린이(Rubnitz, Inaba et al. 2010)에서 AML을 치료하기 위해 생체외에서 확장된 동일단배체 NK 세포를 사용하였다.

[0017] 몇 가지 영구적인 NK 세포주가 확립되었고, 가장 주목할만한 것은 CD16(Fc 감마 수용체 III)을 제외한, 전형적인 NK 세포 마커를 발현하는 비호지킨 림프종 환자로부터 유래된 NK-92이다. NK-92는 광범위한 전임상 시험을

거쳤고 활성화된 NK 세포 및 림포카인 활성화된 사멸(LAK) 세포와 비교하여 광범위한 종양에 대해 우수한 용해를 나타낸다(Gong, Maki et al. 1994). 1차 AML에 대한 NK-92 세포의 세포독성이 확립되었다(Yan, Steinherz et al. 1998).

[0018] 또 다른 NK 세포주인 KHYG-1은 임상 사용을 위한 잠재적인 경쟁자로서 확인되었지만(Suck et al. 2005) 감소된 세포독성을 가져 NK-92보다 덜 주목을 받았다. KHYG-1 세포는 사전 활성화되는 것으로 알려져 있다. 내인성 NK 세포와 달리, KHYG-1 세포는 항상 분극화되어 이들의 세포독성을 증가시키고 외부 자극에 이들이 더 빠르게 반응하게 만든다. NK-92 세포는 KHYG-1 세포보다 더 높은 기저선 세포독성을 갖는다.

[0019] 따라서 현재의 입양 면역요법 프로토콜은 효과기 세포의 양과 질에서 공여자 가변성에 의해 영향을 받는 것이 분명하며, 이 변수는 보다 표준화된 요법을 제공하기 위해 효과적인 세포주를 이용할 수 있었다면 제거될 수 있다.

[0020] NK 세포 세포독성에 대한 상당한 양의 연구가 마우스 모델을 사용하여 수행되었다. 한 가지 예는 퍼포린(perforin) 및 그랜자임 B(granzyme B) mRNA가 마우스 NK 세포에서 항시적으로 전사되지만, NK 세포의 자극 또는 활성화까지 최소 수준의 단백질이 검출된다는 발견이다(Fehniger et al, 2007). 이 연구와 마우스 NK 세포를 사용한 다른 연구가 흥미롭긴 하지만, 인간에서의 NK 세포 세포독성에 대한 결정적인 증거로서 신뢰할 수는 없다. 상기 예와 대조적으로, 인간 NK 세포는 자극 전에 높은 수준의 퍼포린 및 그랜자임 B 단백질을 발현한다(Leong et al, 2011). 결과는 마우스 또는 인간 NK 세포가 배양에서 새로 단리될 때, 마우스 NK 세포는 약한 세포용해 활성을 갖는 반면, 인간 NK 세포는 강한 세포용해 능력을 나타낸다는 것이다.

[0021] 마우스 및 인간 NK 세포는 또한 이들의 발현 마커, 신호전달 캐스케이드 및 조직 분포에서 크게 다양하다. 예를 들어, CD56은 인간 NK 세포를 위한 마커로서 사용되는 반면, 마우스 NK 세포는 이 마커를 전혀 발현하지 않는다. 더욱이, NK 세포 세포독성을 조절하기 위한 잘 확립된 메커니즘은 리간드 결합 NK 활성화 및 억제 수용체를 통한 것이다. 가장 두드러진 인간 NK 활성화 수용체 중 2개는 NKp30 및 NKp44인 것으로 알려져 있으며, 이들 중 어느 것도 마우스 NK 세포 상에서 발현되지 않는다. NK 억제 수용체와 관련하여, 인간 NK 세포는 MHC 부류 I을 인식하고 세포독성 활성을 약화시키는 KIR을 발현하는 반면, 마우스 NK 세포는 KIR을 전혀 발현하지 않고, 대신에 Ly49s를 발현한다(Trowsdale et al, 2001). 결론적으로, 마우스 NK 세포는 이들의 천연 생리학적 환경에서 인간 NK 세포와 동일한 기능을 달성함에도 불구하고, 이 역할을 충족하는 메커니즘은 종마다 크게 다르다.

[0022] 따라서, 예컨대, 더 많은 세포독성 프로파일을 갖는 대안적이고 바람직하게는 개선된 면역 효과기 세포 및 세포주가 필요하다.

[0023] 본 발명의 목적은 TRAIL 유도 세포 사멸에 덜 취약하고/거나 더 세포독성인 표현형을 갖는 면역 효과기 세포 및 면역 효과기 세포주를 제공하는 것이다. 추가 목적은 변형된 면역 효과기 세포 및 세포주를 생산하는 방법, 상기 세포 또는 세포주를 함유하는 조성물 및 암의 치료에서의 상기 조성물의 용도를 제공하는 것이다. 보다 특정한 구현예는 확인된 암, 예컨대, 혈액 암, 예컨대 백혈병뿐만 아니라 고형 종양을 위한 치료를 제공하는 것을 목표로 한다. 특정 구현예는 변형된 세포의 세포독성을 추가로 향상시키기 위해 면역 효과기 세포 및 세포주의 2개 이상의 변형을 조합하는 것을 목표로 한다.

발명의 내용

[0024] TRAIL 유도 세포 사멸에 대해 내성이고, 선택적으로, 바람직하긴 하지만, 더 세포독성인 표현형을 갖는 변형된 면역 효과기 세포 및 세포주가 본원에 제공된다. 또한, 세포 및 세포주를 제조하는 방법이 제공된다. 또한 변형된 면역 효과기 세포 및 세포주의 조성물, 및 암을 치료하기 위한 상기 세포 및 조성물의 용도가 제공된다.

[0025] 면역 효과기 세포/세포주는 NK 세포 및 T 세포로부터 선택되는 것이 바람직하다.

[0026] 본 발명은 예를 들어 TRAIL 수용체, 억제 수용체 및/또는 체크포인트 억제 수용체를 코딩하는 유전자를 넉아웃(knock out) 및/또는 넉다운(knock down)시키고, 변형된 TRAIL 수용체, TRAIL 리간드 및 변이체를 코딩하는 유전자를 발현시키고/거나, 키메라성 항원 수용체(CAR) 및/또는 Fc 수용체를 코딩하는 유전자를 발현시키기 위해 유전공학을 사용하여 면역 효과기 세포를 변형시키는 방법을 제공한다.

[0027] 더욱이, 본 발명의 조성물은 2개 이상의 변형이 제공되는 면역 효과기 세포 및 면역 효과기 세포주를 포함하며, 여기서 다중 변형은 세포 및 세포주의 세포독성 활성을 추가로 향상시킨다.

[0028] 본 발명은 TRAIL 유도 세포 사멸에 대한 증가된 내성을 갖도록 변형된 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주를 제공한다. 세포 자체는 TRAIL 유도 세포 사멸에 대해 내성이다. 바람직하게는, 세포는 하나 이상의 TRAIL 수용체의 감소된 기능을 갖도록 (예컨대, 유전적으로) 변형되었다.

[0029] 본 발명에 따르면, 변형된 면역 효과기 세포주, 예컨대, NK-92 세포 및 이의 유도체를 사용하여, 암, 예컨대, 혈액 암 및 고형 종양을 치료하는 방법을 추가로 제공되며, 여기서 변형된 면역 효과기 세포주는 체크포인트 억제 수용체의 발현이 결여되고, TRAIL 리간드 변이체를 발현하고/거나 CAR 및/또는 Fc 수용체를 발현하도록 선택적으로 추가로 조작된다.

[0030] 특히 본 발명에 따라 치료가능한 질환은 암, 혈액 암, 백혈병 및 특히 급성 골수성 백혈병을 포함한다. 특히 인간에서의 종양 및 암이 치료될 수 있다. 본원에서 종양에 대한 언급은 신생물에 대한 언급을 포함한다.

[0031] **발명의 상세한 내용**

[0032] 따라서, 본 발명은 TRAIL 유도 세포 사멸을 저항하도록 변형된 면역 효과기 세포 또는 세포주를 제공한다. 세포는 결과적으로 TRAIL 유도 세포 사멸 또는 동족살해에 덜 취약할 수 있다.

[0033] 면역 효과기 세포는 바람직하게는 림프구이다.

[0034] 바람직한 구현예에서, 림프구는 NK 세포이다. NK 세포는 바람직하게는 1차 NK 세포, KHYG-1 세포 또는 NK-92 세포이다.

[0035] 다른 바람직한 구현예에서, 림프구는 T 세포이다. T 세포는 바람직하게는 1차 T 세포 또는 Jurkat 세포이다.

[0036] 하기에 더 상세히 설명된 바와 같이, 면역 효과기 세포는 TRAIL 유도 세포 사멸에 대한 이들의 내성을 증가시키고, 선택적으로, 암 세포에 대한 이들의 세포독성 활성을 증가시키기 위해 유전적으로 변형되었다.

[0037] 함께, 본 발명의 면역 효과기 세포 및 세포주는 (문맥이 달리 요구하지 않는 한) 면역 효과기 세포로 지칭될 것이다. 마찬가지로, (문맥이 달리 요구하지 않는 한) T 세포는 T 세포주를 포함할 것이고, NK 세포는 NK 세포주를 포함할 것이다.

[0038] 바람직한 일련의 구현예에서, 면역 효과기 세포는 하나 이상의 TRAIL 수용체의 감소된 기능을 갖도록 변형되었다. 이것은 선택적으로 유전자 넉아웃 또는 넉다운을 사용하거나(예컨대, siRNA를 사용하거나) 또는 세포 소포체 내에서 TRAIL 수용체의 발현을 제한하여 달성된다. 유리하게도, 변형된 세포는 TRAIL 신호전달에 의해 달성되는 세포 사멸에 내성이거나 더 내성이다.

[0039] 바람직하게는, DR4 및/또는 DR5 기능은 본 발명의 세포 상에서 감소된다. DR4 및/또는 DR5 유전자는 넉아웃되는 것이 특히 바람직하다. 다수의 카피의 유전자가 존재하는 경우, 모두 넉아웃되는 것이 바람직하다.

[0040] TRAIL 유도 세포 사멸에 대한 세포의 감수성을 감소시키는 다른 수단이 사용될 수 있다. 선택적으로, TRAIL 유도 세포 사멸은 면역 효과기 세포에서 c-FLIP를 과발현시키고/거나 카스파제 8 발현을 넉다운시킴으로써 감소된다. 따라서, 본 발명의 NK 세포 및 T 세포에서, c-FLIP는 과발현될 수 있다. 따라서, 또한, 본 발명의 NK 세포 및 T 세포에서, 카스파제 8 발현은 감소되거나 넉다운되거나 넉아웃된다.

[0041] 면역 효과기 세포는 세포의 TRAIL 유도 사멸을 감소시키고 더 세포독성인 표현형을 갖는 세포를 제공하는 방식으로 변형될 수 있다. 바람직하게는 동일한 변형이 이러한 이점 모두를 달성할 수 있다.

[0042] TRAIL 유도 세포 사멸에 대한 본 발명에 따른 면역 효과기 세포의 내성은 야생형 면역 효과기 세포에 비해 바람직하게는 적어도 5%, 더욱 바람직하게는 적어도 10%, 더욱 바람직하게는 적어도 25%, 가장 바람직하게는 적어도 50% 증가된다. 세포 사멸에 대한 내성은 숙련자에게 공지된 많은 방법으로, 예컨대, 세포 생존력 분석을 수행함으로써 측정될 수 있다. 바람직하게는, 세포 사멸에 대한 증가된 내성은 유세포분석적 프로피듐 아이오다이드 세포 생존력 분석을 사용하여 측정된다. 일 예에서, TRAIL 유도 세포 사멸에 대해 적어도 10% 증가된 내성을 나타내도록 본 발명에 따라 변형된 면역 효과기 세포 집단은 분석을 통해 확인될 것이고, 여기서 가용성 TRAIL은 (1) 변형된 세포 및 (2) 야생형 세포와 함께 인큐베이션된 다음, 각각의 세포 집단을 프로피듐 아이오다이드로 염색한 후, 변형된 세포 집단은 야생형 집단보다 적어도 10% 높은 세포 생존력을 갖는 것으로 확인된다.

[0043] 면역 효과기 세포는 공동자극 도메인에 연결된 TRAIL 수용체를 발현하도록 변형되는 것이 바람직하다. 세포는 하나 이상의 공동자극 도메인에 연결된 TRAIL 수용체를 발현할 수 있다. 바람직하게는, TRAIL 수용체는 DR4 및 DR5로부터 선택된다. 바람직하게는, 공동자극 도메인은 4-1BB, CD28, 2B4, DAP-10, DAP-12, CD278(ICOS) 및

OX40 중 하나 이상으로부터 선택된다. 더욱 바람직하게는, 공동자극 도메인은 CD3zeta에 연결된 4-1BB이다.

[0044] 공동자극 도메인은 항원 수용체(예컨대, DR4 또는 DR5)가 보낸 것 외에 시그널을 제공하고 림프구(예컨대, NK 세포)의 완전한 활성화를 유도하는 것을 도울 수 있는 단백질 도메인이다. 면역 효과기 세포의 완전한 활성화는 사이토카인 생산, 지속적인 증식, 항아폽토시스 세포내 신호전달 및/또는 항원 수용체를 통한 추가 자극에 대한 향상된 민감도를 초래한다. 전반적으로, 이것은 더 세포독성인 표현형을 갖는 면역 효과기 세포를 제공한다. 따라서, 공동자극 도메인에 연결된 수용체에 대한 리간드의 결합은 리간드 결합의 이러한 세포 자극 결과를 활성화시킨다.

[0045] 면역 효과기 세포의 변형으로부터 비롯되는 증가되거나 향상된 세포독성은 이러한 변형을 갖지 않는 야생형 세포의 세포독성과 비교하여 정의된다. 야생형 세포는 변형을 포함하지만 변형 자체를 갖지 않는 세포와 동일한 유형의 세포로서 정의된다. 예를 들어, 본 발명은 공동자극 도메인 CD28에 연결된 DR5를 발현하도록 변형된 NK-92 세포를 제공하고, 이들 NK 세포는 야생형 NK-92 세포(즉, CD28에 연결된 DR5를 발현하도록 변형되지 않은 NK-92 세포)에 비해 암 세포에 대해 증가된 세포독성을 나타내도록 변형된다.

[0046] KHYG-1 세포는 전형적으로 휴식시에 낮은 수준의 DR4 및 DR5를 발현한다. 그럼에도 불구하고, DR4 및/또는 DR5의 발현은 세포가 활성화되거나 외인성 인자의 영향 하에/노출될 때 상향조절될 수 있다. 이와 같이, KHYG-1 세포도 본 발명에 따라 적합하게 변형된다.

[0047] 표적(예컨대, 암) 세포에 대한 본 발명에 따른 면역 효과기 세포의 세포독성은 야생형 면역 효과기 세포에 비해 바람직하게는 적어도 10%, 더욱 바람직하게는 적어도 20%, 더욱 바람직하게는 적어도 50%, 가장 바람직하게는 적어도 100% 증가된다. 세포독성은 면역 효과기 세포와의 공동 인큐베이션 동안 표적 세포 사멸을 결정하는 공지된 방법을 사용하여 쉽게 측정된다. 바람직하게는, 증가된 세포독성은 유세포분석적 프로피듐 아이오다이드 세포 생존력 분석을 사용하여 측정된다. 일 예에서, 암 세포에 대해 적어도 10% 증가된 세포독성을 나타내도록 본 발명에 따라 변형된 면역 효과기 세포 집단은 분석을 통해 확인될 것이고, 여기서 표적 암 세포는 (1) 본 발명의 변형된 세포 또는 (2) 야생형(즉, 변형되지 않은) 면역 효과기 세포와 함께 인큐베이션된 다음, 각각의 암 세포 집단을 염색한 후, 야생형 면역 효과기 세포와 함께 인큐베이션된 암 세포는 변형된 면역 효과기 세포 집단과 함께 인큐베이션된 암 세포보다 적어도 10% 높은 세포 생존력을 갖는 것으로 확인된다.

[0048] 유리하게도, 하나 이상의 공동자극 도메인에 연결된 TRAIL 수용체는 본 발명의 면역 효과기 세포의 표면 상의 기존 TRAIL 수용체와 경쟁하고, 따라서 이들 사멸 유도 TRAIL 수용체에 대한 TRAIL의 결합을 제한한다. 추가로, 공동자극 도메인에 연결된 TRAIL 수용체를 발현하는 면역 효과기 세포는 면역 효과기 세포의 세포독성 활성을 증가시키는 TRAIL의 결합시에 활성화 신호를 생성한다. 이것은 변형된 면역 효과기 세포를 사용하여 암을 치료할 때 특히 유리한 특징일 수 있다.

[0049] 본 발명의 모든 일련의 구현예에서, 감소되거나 부재된 체크포인트 억제 수용체 기능을 갖는 면역 효과기 세포가 제공될 수 있다. 본 발명의 이러한 면역 효과기 세포는 바람직하게는 넉아웃된 하나 이상의 체크포인트 억제 수용체 유전자를 갖는다. 바람직하게는, 이들 수용체는 특이적 체크포인트 억제 수용체이다. 바람직하게는, 이들 체크포인트 억제 수용체는 CD96(TACTILE), CD152(CTLA4), CD223(LAG-3), CD279(PD-1), CD328(SIGLEC7), SIGLEC9, TIGIT 및 TIM-3 중 하나 이상 또는 모두이다.

[0050] 다른 구현예에서, 하나 이상의 억제 수용체 신호전달 경로가 넉아웃되거나 감소된 기능을 나타내는 면역 효과기 세포가 제공되며, 결과는 다시 감소되거나 부재된 억제 수용체 기능이다. 예를 들어, SHP-1, SHP-2 및/또는 SHIP에 의해 매개되는 신호전달 경로는 세포의 유전적 변형에 의해 넉아웃된다.

[0051] 생성된 면역 효과기 세포는 개선된 세포독성을 나타내므로, 암 요법, 특히 혈액 암 요법에서, 및 특히 백혈병 및/또는 다발성 골수종의 치료에서 더 많이 사용된다.

[0052] 유전적 변형은 세포가 성숙한 면역 효과기 세포로 분화되기 전에 발생할 수 있다. 예를 들어, 다분화능 줄기 세포(예컨대, iPSC)는 하나 이상의 체크포인트 억제 수용체를 발현하는 능력을 상실하도록 유전적으로 변형될 수 있다. 그리고 나서, 변형된 iPSC는 증가된 세포독성을 갖는 유전적으로 변형된 면역 효과기 세포를 생산하도록 분화된다.

[0053] 면역 효과기 세포 활성화 후 전자의 발현으로 인해 다른 억제 수용체에 비해 체크포인트 억제 수용체의 기능을 감소시키는 것이 바람직하다. 대부분의 KIR 패밀리와 같은 정상적인 또는 '고전적인' 억제 수용체 NKG2A 및 LIR-2는 MHC 부류 I에 결합하므로 주로 자가 표적화 문제를 감소시키는데 관여한다. 따라서, 바람직하게는, 체크포인트 억제 수용체는 넉아웃된다. 본 발명에 따른 이들 수용체의 감소되거나 부재된 기능은 암 세포가 면역

효과기 기능(수용체가 완전히 기능적인 경우 발생할 수 있음)을 억제하는 것을 방지한다. 따라서, 본 발명의 이들 구현예의 주요 이점은 암 세포에 의한 이들의 세포독성 활성의 억제에 덜 민감한 면역 효과기 세포에 있으며, 그 결과 이들은 암 치료에 유용하다.

[0054] 본원에 사용된 바와 같이, 억제 수용체에 대한 언급은 일반적으로 면역 효과기 세포, 예컨대, NK 세포의 원형질막 상에 발현된 수용체를 지칭하며, 그의 상보적인 리간드에 결합시 상기 면역 효과기 세포의 세포독성을 감소시키는 것을 담당하는 세포내 신호를 초래한다. 이러한 억제 수용체는 면역 효과기 세포의 '휴지' 및 '활성화' 상태 모두 동안 발현되며, 종종 신체의 세포 및 조직에 대한 세포독성 반응을 억제하는 '자가 용인' 메커니즘을 갖는 면역 시스템을 제공하는 것과 관련이 있다. 예는 NK 세포 상에서 발현되어 신체의 건강한 세포 상에서 발현되는 MHC 부류 I을 인식하는 억제 수용체 패밀리 'KIR'이다.

[0055] 또한 본원에 사용된 바와 같이, 체크포인트 억제 수용체는 일반적으로 상기 지칭된 억제 수용체의 서브세트로서 일반적으로 간주된다. 그러나, 다른 억제 수용체와 달리, 체크포인트 억제 수용체는 면역 효과기 세포, 예컨대, NK 세포의 장기간 활성화 및 세포독성 동안 더 높은 수준으로 발현된다. 이 현상은, 예를 들어, 염증 부위에서 만성 세포독성을 약화시키는데 유용하다. 예는 체크포인트 억제 수용체 PD-1, CTLA-4 및 CD96을 포함하고, 이들 모두는 NK 세포 상에서 발현된다.

[0056] 본 발명의 면역 효과기 세포는 또한 CD96(TACTILE), CD152(CTLA4), CD223(LAG-3), CD279(PD-1), CD328(SIGLEC7), SIGLEC9, TIGIT 및 TIM-3으로부터 선택된 체크포인트 억제 수용체를 코딩하는 유전자가 결여될 수 있다.

[0057] 유전자가 결여된 면역 효과기 세포는 전체 또는 부분적인 결실, 돌연변이 또는 그렇지 않으면 실질적으로 기능적 유전자 산물이 발현되지 않는 것을 지칭할 수 있다. 본 발명자들은 이전에 KHYG-1 세포에서 체크포인트 억제 수용체의 발현을 넉다운시키기 위해 siRNA를 사용하는 세포독성 효과를 보여주었다. CD96 넉다운(KD) KHYG-1 세포는 다양한 효과기:표적(E:T) 비율에서 백혈병 세포에 대해 향상된 세포독성을 입증하였다. 구현예에서, 면역 효과기 세포는 억제 수용체 중 2개 이상을 코딩하는 유전자가 결여되어 있다.

[0058] 보다 특정 구현예는 CD96(TACTILE), CD152(CTLA4) 및 CD279(PD-1)로부터 선택된 체크포인트 억제 수용체를 코딩하는 유전자가 결여된 면역 효과기 세포를 포함한다.

[0059] 추가의 바람직한 구현예에서, 면역 효과기 세포는 1차 T 세포, NK 세포 또는 NK-92 NK 세포의 유도체이다. NK 세포는 또한 KHYG-1 세포의 유도체일 수 있다.

[0060] 본 발명의 면역 효과기 세포는 추가로 돌연변이체(변이체) TRAIL 리간드를 발현하는 것이 바람직하다. 따라서, 면역 효과기 세포의 세포독성 향상 변형은TRAIL 리간드 및/또는 돌연변이된 TRAIL 리간드 변이체 모두의 증가된 발현을 포함한다.

[0061] 생성된 면역 효과기 세포는 TRAIL 수용체에 대한 증가된 결합, 그 결과, 암, 특히 혈액 암, 특히 백혈병에 대한 증가된 세포독성을 나타낸다. 그러나, 본 발명의 면역 효과기 세포는 상기 및 하기에 기재된 변형으로 인해 TRAIL 유도 세포 사멸에 덜 민감하다.

[0062] 돌연변이체/변이체는 바람직하게는 유인 수용체에 대한 야생형 TRAIL의 결합과 비교하여, '유인' 수용체에 대해 더 낮은 친화성(또는 사실상 친화성이 없음)을 갖는다. 이러한 유인 수용체는 TRAIL 리간드에 결합하지만 세포 사멸을 개시하는 능력이 없고, 일부 경우에, 사멸 신호전달 경로를 길항하는 작용을 하는 TRAIL 수용체의 부류를 대표한다. 돌연변이체/변이체 TRAIL 리간드는 WO 제2009/077857호에 따라 제조될 수 있다.

[0063] 돌연변이체/변이체는 개별적으로 TRAIL 수용체, 예컨대, DR4 및 DR5에 대해 증가된 친화성을 가질 수 있다. 야생형 TRAIL은 전형적으로 DR4에 대해 >2 nM, DR5에 대해 >5 nM 및 유인 수용체 DcR1에 대해 >20 nM(WO 제2009/077857호; 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정됨), 또는 DR4에 대해 약 50 내지 100 nM, DR5에 대해 1 내지 10 nM 및 DcR1에 대해 175 내지 225 nM의 K_D를 갖는 것으로 알려져 있다(Truneh, A. et al. 2000; 등온 적정 열량계 및 ELISA에 의해 측정됨). 따라서, DR4에 대한 증가된 친화성은 각각 <2 nM 또는 <50 nM의 K_D로서 적합하게 정의되는 반면, DR5에 대한 증가된 친화성은 정의된 분석에 따라 각각 <5 nM 또는 <1 nM의 K_D로서 적합하게 정의된다. 유인 수용체 DcR1에 대한 감소된 친화성은 각각 >50 nM 또는 >225 nM의 K_D로서 적합하게 정의된다. 어떤 경우든, TRAIL 변이체/돌연변이체에 의해 나타나는 친화성의 증가 또는 감소는 야생형 TRAIL에 의해 나타나는 기저선 친화성에 대한 것이다. 친화성은 야생형 TRAIL에 의해 나타난 것과 비교하여 바람직하게는 적어도

10%, 적어도 25%, 적어도 50%, 더욱 바람직하게는 적어도 100% 증가된다.

[0064] TRAIL 변이체는 바람직하게는 야생형 TRAIL에 대한 그의 치환성과 비교하여 DR4 및 DR5 중 하나 또는 둘 모두에 대해 증가된 친화성을 갖는다. 바람직하게는, 친화성은 야생형 TRAIL에 대한 것보다 DR4 및/또는 DR5에 대해 적어도 1.5배, 2배, 5배, 10배, 100배, 또는 심지어 1,000배 이상이다.

[0065] TRAIL 변이체는 특정 경우에 DR4, DcR1 및 DcR2에 대한 그의 친화성과 비교하여 DR5에 대해 증가된 친화성을 가질 수 있다. 바람직하게는, 친화성은 DR4, DcR1 및 DcR2 중 하나 이상에 대한 것보다 DR5에 대해 적어도 1.5배, 2배, 5배, 10배, 100배, 또는 심지어 1,000배 이상이다. 더욱 바람직하게는, 친화성은 DR4, DcR1 및 DcR2 중 적어도 2개, 및 바람직하게는 모두에 대한 것보다 DR5에 대해 적어도 1.5배, 2배, 5배, 10배, 100배, 또는 심지어 1,000배 이상이다.

[0066] 추가의 특정 구현예는 TRAIL 유인 수용체에 대해 감소된 친화성을 갖거나 친화성을 갖지 않는 돌연변이체 TRAIL 리간드를 발현하는 면역 효과기 세포를 포함한다. 바람직하게는, 이러한 면역 효과기 세포는 NK-92의 유도체이다. 추가의 특정 구현예는 TRAIL 유인 수용체에 대해 감소된 친화성을 갖거나 친화성을 갖지 않으며 DR4 및/또는 DR5에 대해 증가된 친화성을 갖는 돌연변이체 TRAIL 리간드를 발현하는 면역 효과기 세포를 포함한다.

[0067] 본 발명의 이러한 구현예의 핵심적인 이점은 야생형 세포와 비교하여 다중 변형을 갖고 암 세포를 사멸시키는 데 더 큰 효능을 갖는 면역 효과기 세포에 있다.

[0068] 특정 구현예에서, TRAIL 변이체는 131, 149, 159, 160, 189, 191, 193, 195, 199, 200, 201, 203, 204, 212, 213, 214, 215, 218, 240, 251, 261, 264, 266, 267, 269, 및 270으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다.

[0069] 특정 구현예에서, TRAIL 변이체는 G131R, G131K, R149I, R149M, R149N, R149K, S159R, G160E, Y189A, Y189Q, R191K, Q193H, Q193K, Q193S, Q193R, E195R, N199V, N199R, N199H, T200H, K201R, K201H, D203A, K204E, K204D, K204Y, K212R, Y213W, T214R, S215D, S215E, S215H, S215K, S215D, D218H, D218A, Y240A, K251D, K251E, K251Q, T261L, H264R, I266L, D267Q, D269A, D269H, 및 H270D로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 치환을 포함한다.

[0070] 특정 구현예에서, TRAIL 변이체는 G131R, G131K, R149I, R149M, R149N, R149K, S159R, G160E, Y189A, Y189Q, R191K, Q193H, Q193K, Q193S, Q193R, E195R, N199V, N199R, N199H, T200H, K201R, K201H, D203A, K204E, K204D, K204Y, K212R, Y213W, T214R, S215D, S215E, S215H, S215K, S215D, D218H, D218A, Y240A, K251D, K251E, K251Q, T261L, H264R, I266L, D267Q, D269A, D269H, 및 H270D로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 2개의 치환을 포함한다.

[0071] 특정 구현예에서, TRAIL 변이체는 G131R, G131K, R149I, R149M, R149N, R149K, S159R, G160E, Y189A, Y189Q, R191K, Q193H, Q193K, Q193S, Q193R, E195R, N199V, N199R, N199H, T200H, K201R, K201H, D203A, K204E, K204D, K204Y, K212R, Y213W, T214R, S215D, S215E, S215H, S215K, S215D, D218H, D218A, Y240A, K251D, K251E, K251Q, T261L, H264R, I266L, D267Q, D269A, D269H, 및 H270D로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 3개의 치환을 포함한다.

[0072] 특정 구현예에서, TRAIL 변이체의 아미노산 치환은 G131R, G131K, R149I, R149M, R149N, R149K, S159R, G160E, Y189A, Y189Q, R191K, Q193H, Q193K, Q193S, Q193R, E195R, N199V, N199R, N199H, T200H, K201R, K201H, D203A, K204E, K204D, K204Y, K212R, Y213W, T214R, S215D, S215E, S215H, S215K, S215D, D218H, D218A, Y240A, K251D, K251E, K251Q, T261L, H264R, I266L, D267Q, D269A, D269H, H270D, T214R / E195R, T214R / D269H, Y189A / Q193S / N199V / K201R / Y213W / S215D, Y213W / S215D, N199R / K201H, N199H / K201R, G131R / N199R / K201H, G131R / N199R / K201H / R149I / S159R / S215D, G131R / R149I / S159R / S215D, G131R / N199R / K201H / R149I / S159R / S215D, G131R / D218H, Y189Q / R191K / Q193R / H264R / I266L / D267Q, T261L / G160E, T261L / H270D, T261L / G160E / H270D, 및 T261L / G160E / H270D / T200H("/"의 사용은 다중 아미노산 치환을 나타냄)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0073] 특정 구현예에서, TRAIL 변이체의 아미노산 치환은 DR5에 대해 증가된 친화성을 갖는 변이체에 기초하여 선택되며; 이러한 종류의 치환은 D269H, E195R, T214R, D269H / E195R, T214R / E195R, T214R / D269H, N199V, Y189A / Q193S / N199V / K201R / Y213W / S215D, Y213W / S215D, D269A 및 Y240A로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0074] 특정 구현예에서, TRAIL 변이체의 아미노산 치환은 DR4에 대해 증가된 친화성을 갖는 변이체에 기초하여 선택되며; 이러한 종류의 치환은 G131R, G131K, R149I, R149M, R149N, R149K, S159R, Q193H, W193K, N199R, N199R / K201H, N199H / K201R, G131R / N199R / K201H, G131R / N199R / K201H, G131R / N199R / K201H / R149I / S159R / S215D, G131R / R149I / S159R / S215D, G131R / D218H, K201R, K201H, K204E, K204D, K204L, K204Y, K212R, S215E, S215H, S215K, S215D, D218H, K251D, K251E, K251Q 및 Y189Q / R191K / Q193R / H264R / I266L / D267Q로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0075] 특정 구현예에서, TRAIL 변이체의 아미노산 치환은 TRAIL 유인 수용체에 대해 감소된 친화성을 갖는 변이체에 기초하여 선택되며; 이러한 종류의 치환은 T261L, H270D, T200H, T261L / G160E, T261L / H270D, T261L / G160E / H270D, T261L / G160E / H270D / T200H, D203A 및 D218A로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0076] 본 발명자들은 돌연변이체 TRAIL을 발현하도록 NK 세포를 이전에 유전적으로 변형시켰다. 변형된 KHYG-1 및 NK-92 세포는 돌연변이체 TRAIL을 발현하였다. 변형된 KHYG-1 세포는 시험관내에서 암 세포주에 대해 개선된 세포독성을 나타내었다. 이러한 세포주는 TRAIL 수용체(예컨대, DR4 및 DR5)를 발현한다. 변형된 면역 효과기 세포의 다른 바람직한 구현예는 TRAIL 수용체를 전혀 또는 실질적으로 발현하지 않거나, 또는 변형된 면역 효과기 세포의 생존력이 돌연변이체 TRAIL의 발현에 의해 부정적으로 영향을 받지 않을 정도로 충분히 낮은 수준에서만 그렇게 한다. 추가로, 공동자극 도메인에 연결된 TRAIL 수용체를 갖는 면역 효과기 세포는 본원에 기재된 바와 같이 사용될 수 있다.

[0077] 선택적인 구현예에서, TRAIL 또는 TRAIL 변이체를 발현하는 변형된 면역 효과기 세포를 사용한 암의 치료는 암 세포 상에서의 TRAIL 사멸 수용체의 발현을 상향조절할 수 있는 제제를 환자에게 투여함으로써 향상된다. 이 제제는 변형된 면역 효과기 세포의 투여 전, 투여와 조합하여 또는 투여 후에 투여될 수 있다. 그러나, 제제는 변형된 면역 효과기 세포를 투여하기 전에 투여되는 것이 바람직하다. 바람직한 구현예에서, 제제는 암 세포 상에서의 DR5의 발현을 상향조절한다. 제제는 선택적으로 화학요법 약물, 예컨대, 보르테조밉일 수 있고, 암 상에서의 DR5 발현을 상향조절할 수 있는 저용량으로 투여된다. 본 발명은 DR5 발현을 상향조절할 수 있는 임의의 특정 제제에 제한되지 않지만, DR5 유도제의 예는 보르테조밉, 제피티닙, 피페르롱구민, 독소루비신, 알파-토코페릴 석시네이트 및 HDAC 억제제를 포함한다.

[0078] 돌연변이체/변이체 TRAIL 리간드는 또한 하나 이상의 면역 효과기 세포 공동자극 도메인, 예컨대, 41BB/CD137, CD3zeta/CD247, DAP12 또는 DAP10에 연결될 수 있다. 따라서, 변이체가 표적 세포 상의 그의 수용체에 결합하는 것은 표적 세포 내에서 아폽토시스 신호를 촉진할뿐만 아니라 면역 효과기 세포에서 추가 세포독성 신호를 자극한다.

[0079] 본 발명의 추가의 바람직한 구현예에 따르면, 이들 각각의 면역 효과기 세포 변형과 관련하여 상기에 더 상세하게 기재된 바와 같이 감소된 체크포인트 억제 수용체 기능을 추가로 갖고 또한 돌연변이체 TRAIL 리간드를 발현하는 변형된 면역 효과기 세포가 제공된다.

[0080] 본 발명은 또한 하나 이상의 CAR을 발현하도록 변형된 면역 효과기 세포 및 면역 효과기 세포주, 바람직하게는 NK-92 세포 및 이의 유도체를 제공한다.

[0081] 암 요법 용도에 적합하게, CAR은 암 세포 상의 하나 이상의 리간드, 예컨대, 골수종 세포 상의 CS1(SLAMF7)에 특이적으로 결합한다. 특정 암, 예컨대, 다발성 골수종을 치료하는 데 사용하기 위해, CAR은 CD38에 결합할 수 있다. 예를 들어, CAR은 예컨대, 공지된 단클론 항체 다라투무맙으로부터 유래되거나, 이와 유사하거나 동일한 가변 영역의 결합 특성을 포함할 수 있다. 이러한 면역 효과기 세포는 혈관신생을 억제하는 제제, 예컨대, 레날리도미드와 조합하여 암 요법에 사용될 수 있다. 암, 특히 백혈병 및 특히 AML의 요법에서 사용하기 위해, CAR은 CLL-1에 결합할 수 있다.

[0082] CAR-NK 세포 및 CAR-T 세포는 이중특이적일 수 있으며, 이들의 친화성은 2개의 별개의 리간드/항원에 대한 것이다. 이중특이적 CAR은 암 세포 상의 잠재적 결합 부위의 수를 증가시키기 위해 또는 대안적으로 CAR에 특이적인 리간드를 발현하는 다른 면역 효과기 세포에 암 세포를 국소화하기 위해 사용될 수 있다. 암 요법에서 사용하기 위해, 이중특이적 CAR은 표적 종양 세포 및 효과기 세포, 예컨대, T 세포, NK 세포 또는 대식세포에 결합할 수 있다. 따라서, 예를 들어, 다발성 골수종의 경우, 이중특이적 CAR은 T 세포 항원(예컨대, CD3 등) 및 종양 세포 마커(예컨대, CD38 등)에 결합할 수 있다. 이중특이적 CAR은 대안적으로 2개의 별개의 종양 세포 마커에 결합하여, 표적 종양 세포에 대한 면역 효과기 세포의 전체 결합 친화성을 증가시킬 수 있다. 이것은 표적 항원 중 하나를 하향조절함으로써 암 세포가 내성을 발달시킬 위험을 감소시킬 수 있다. 다발성 골수종에서 이 경우의 예

는 CD38 및 CS-1/SLAMF7 모두에 결합하는 CAR일 것이다. CAR에 의해 적합하게 표적화된 또 다른 종양 세포 마커는 CD47에 의해 예시된 종양 상의 "나를 먹지 마세요(don't eat me)" 유형 마커이다.

[0083] 본 발명의 선택적인 특징은 전술한 면역 효과기 세포 및 면역 효과기 세포주에 추가 변형을 제공하는 것을 포함하고, 여기서 예를 들어, Fc 수용체(하위유형 및 유도체를 포함하는 CD16, CD32 또는 CD64일 수 있음)는 세포의 표면 상에서 발현된다. 사용시, 이러한 세포는 항체 코팅된 암 세포의 증가된 인식을 나타낼 수 있고, 세포독성 반응의 활성화를 개선할 수 있다.

[0084] 본 발명의 추가의 선택적인 특징은 변형된 면역 효과기 세포 및 면역 효과기 세포주가 신체의 특정 표적 영역으로 더 잘 귀소하도록 적응시키는 것을 포함한다. 본 발명의 면역 효과기 세포는 특정 암 세포 위치에 표적화될 수 있다. 혈액 암의 치료를 위한 바람직한 구현예에서, 본 발명의 면역 효과기 세포는 골수로 귀소하도록 적응된다. 특정 면역 효과기 세포는 골수로 귀소하도록 푸코실화 및/또는 시알릴화에 의해 변형된다. 이것은 적절한 푸코실트랜스퍼라아제 및/또는 시알릴트랜스퍼라아제를 각각 발현하도록 면역 효과기 세포를 유전적으로 변형함으로써 달성될 수 있다. 면역 효과기 세포의 종양 부위로의 증가된 귀소는 또한 암 혈관을 통한 면역 효과기 세포 침윤을 정상화하기 위해 종양 혈관구조의 파괴에 의해, 예컨대 규칙적인 화학요법에 의해, 또는 혈관신생을 표적화하는 약물을 사용함으로써 가능해질 수 있다(Melero et al, 2014).

[0085] 본 발명의 또 다른 선택적인 특징은 배양에서 빠른 성장 및 증식을 위한 증가된 고유한 능력을 갖는 변형된 면역 효과기 세포 및 면역 효과기 세포주를 제공하는 것이다. 이것은, 예를 들어 하나 이상의 성장 유도 사이토카인을 발현하거나 과발현하도록 세포를 형질감염시킴으로써 달성될 수 있다. 이러한 목적에 적합한 사이토카인의 예는 IL-2 및 IL-15를 포함한다. 더욱이, 이러한 선택적인 변경은 성장 배지에 지속적으로 사이토카인을 보충하는 것에 대한 비용 효과적인 대안을 제공한다.

[0086] 1차 NK 세포는 IL-15를 사용하여 확장되는 것이 바람직한데, IL-2의 존재 하에 1차 NK 세포를 확장시키는 것이 DR5 발현을 상향조절할 수 있고 따라서 세포를 동족살해에 더 취약하게 만들 수 있다는 것이 관찰되었기 때문이다.

[0087] 본 발명은 TRAIL 유도 세포 사멸에 더 내성이게 하고/거나 그의 세포독성을 증가시키기 위해 본원에 기재된 바와 같은 세포 또는 세포주를 유전적으로 변형시키는 단계를 포함하는, 변형된 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주를 제조하는 방법을 추가로 제공한다. 이 유전적 변형은 예컨대, CRISPR에 의한 유전자의 안정적인 넉아웃, 또는 예컨대, siRNA에 의한 유전자의 일시적인 넉아웃일 수 있다.

[0088] 바람직한 구현예에서, TRAIL 유도 세포 사멸에 대한 증가된 내성 및 증가된 세포독성을 갖는 새로운 면역 효과기 세포주(전술한 바와 같음), 예컨대, NK-92 세포의 유도체를 제공하기 위해, 안정적인 유전적 변형 기술, 예컨대, CRISPR이 사용된다.

[0089] 구현예에서, 방법은 억제 수용체 기능을 감소시키기 위해 변형된 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주를 제조하는 데 추가로 유용하다. 바람직하게는, 이러한 억제 수용체는 체크포인트 억제 수용체이다.

[0090] 보다 특정 구현예는 감소된 억제 수용체 기능을 갖는 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주를 제조하기 위한 방법을 포함하고, 여기서 체크포인트 억제 수용체는 CD96(TACTILE), CD152(CTLA4), CD223(LAG-3), CD279(PD-1), CD328(SIGLEC7), SIGLEC9, TIGIT 및 TIM-3으로부터 선택된다.

[0091] 바람직한 구현예에서, 방법은 둘 이상의 억제 수용체의 기능을 감소시키기 위해 면역 효과기 세포를 변형시키는 단계를 포함한다.

[0092] 본 발명은 또한 TRAIL 리간드 또는 돌연변이체 TRAIL(변이체) 리간드를 발현하도록 세포 또는 세포주를 유전적으로 변형시키는 단계를 포함하는 변형된 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주를 제조하는 방법을 추가로 제공한다.

[0093] 구현예에서, 방법은 TRAIL 수용체에 대해 증가된 친화성을 갖는 돌연변이체 TRAIL 리간드를 발현하기 위해 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주를 변형시키는 단계를 포함한다. 바람직하게는, TRAIL 수용체는 DR4 및/또는 DR5이다. 바람직한 구현예는 유인 TRAIL 수용체에 대해 감소된 친화성을 갖는 돌연변이체 TRAIL 리간드를 발현하도록 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주를 변형시키는 방법을 제공한다.

[0094] 추가의 바람직한 구현예에서, 방법은 체크포인트 억제 수용체의 기능을 제거하고 또한 유인 TRAIL 수용체에 대해 결합 친화성이 감소되거나 전혀 없는 돌연변이체 TRAIL 리간드를 발현하도록 면역 효과기 세포 또는 면역 효

과기 세포주를 변형시키는 단계를 포함한다.

[0095] 추가의 전형적인 구현예는 하나 이상의 체크포인트 억제 수용체의 기능이 제거되고/거나 유인 TRAIL 수용체에 대해 결합 친화성이 감소되거나 전혀 없는 돌연변이체 TRAIL 리간드가 발현되는 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주를 제조하기 위한 방법을 제공하며, 세포는 CAR 또는 이중특이적 CAR을 발현하도록 추가로 변형된다. CAR의 특성은 선택적으로 전술한 바와 같다.

[0096] 구현예에서, 방법은 하나 이상의 체크포인트 억제 수용체의 기능이 제거되고/거나 유인 TRAIL 수용체에 대해 결합 친화성이 감소되거나 전혀 없는 돌연변이체 TRAIL 리간드가 발현되는 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주를 제조하는 단계를 포함하고, 세포는 CAR 또는 이중특이적 CAR을 발현하도록 선택적으로 변형되고, 세포는 하나 이상의 Fc 수용체를 발현하도록 추가로 변형된다. 적합한 Fc 수용체는 CD16(FcRIII), CD32(FcRII) 및 CD64(FcRI)로부터 선택된다.

[0097] 상기 모든 것의 바람직한 구현예는 NK-92의 유도체인 NK 세포 및 NK 세포주를 제조하는 방법을 포함한다.

[0098] 본 발명의 목적에 따라, 증가된 세포독성을 갖는 변형된 면역 효과기 세포, 면역 효과기 세포주 또는 이의 조성물은 환자에서의 암, 특히 인간에서의 특히 혈액 암을 치료하는 데 사용하기 위한 것이다.

[0099] 바람직한 구현예에서, 변형된 면역 효과기 세포, 면역 효과기 세포주 또는 조성물은 급성 림프구성 백혈병(ALL), 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 만성 골수성 백혈병(CML), 호지킨 림프종, T-세포 림프종 및 B-세포 림프종을 포함한 비호지킨 림프종, 무증상 골수종, 무증상 다발성 골수종(SMM), 활성 골수종 또는 경쇄 골수종을 포함하는 혈액 암을 치료하는 데 사용하기 위한 것이다.

[0100] 더욱더 바람직한 구현예에서, NK 세포주는 혈액 암을 치료하는 데 사용하기 위해, NK-92 세포에서 체크포인트 억제 수용체 기능을 감소시킴으로써 또는 NK-92 세포에서 돌연변이체 TRAIL 리간드를 발현시킴으로써, 또는 둘 모두에 의해 선택적으로 추가로 변형된 본 발명에 기재된 바와 같은 NK-92의 유도체로서 수득된다.

[0101] 본원, 상기 및 하기에 기재된 변형된 면역 효과기 세포, 면역 효과기 세포주 및 이의 조성물은 암, 특히 인간에서의 암의 치료에, 예컨대, 혈액 세포의 암 또는 고형 암의 치료에 적합하다. 면역 효과기 세포 및 유도체는 바람직하게는 인간 면역 효과기 세포이다. 인간 요법을 위해, 인간 면역 효과기 세포가 바람직하게는 사용된다.

[0102] 활성제 및 이의 조합을 이를 필요로 하는 환자에게 전달하기 위한 다양한 투여 경로가 숙련자에게 공지될 것이다. 본 발명의 구현예는 혈액 암 치료를 위한 것이다. 변형된 면역 효과기 세포 및/또는 면역 효과기 세포주의 투여는 전신 또는 국소적일 수 있고, 예를 들어 복강내 경로를 통할 수 있다.

[0103] 다른 구현예에서, 활성제는 보다 직접적으로 투여된다. 따라서 투여는 특히 고형 종양에 적합하게, 직접 종양내일 수 있다.

[0104] 면역 효과기 세포는 일반적으로 본 발명의 방법, 용도 및 조성물에 적합한 것으로 여겨진다. 본원의 특정 예에서 사용된 세포처럼, NK 세포/T 세포는 암 세포주로부터 수득된 NK 세포/T 세포일 수 있다. 유리하게도, 예를 들어 사멸하게 만들고/거나 분열할 수 없게 만듦으로써, 바람직하게는 그의 종양원성을 감소시키기 위해 처리된 NK/T 세포는 혈액 암 세포주로부터 수득될 수 있고 혈액 암을 치료하기 위해 본 발명의 방법에 사용될 수 있다.

[0105] 암 유래의 세포를 치료 용도에 더 적합하게 만들기 위해, 그것은 일반적으로 환자에서 종양을 형성하는 경향을 감소시키거나 제거하기 위한 일부 방식으로 처리되거나 전처리된다. 특정 변형된 NK 세포주, 예컨대, NK-92 세포는 분열할 수 없게 될 수 있고 이들은 방사선 조사되고 이들의 사멸 능력을 유지하지만 3-4일 내에 사멸하기 때문에 안전하다. 따라서, 특정 세포 및 세포주는 예컨대, 방사선 조사의 결과로서 증식할 수 없다. 본원의 방법에 사용하기 위한 잠재적인 면역 효과기 세포의 처리는 이들이 분열하고 생체내에서 종양을 형성하는 것을 방지하기 위한 방사선 조사 및 세포가 분열하고 생체내에서 종양을 형성하는 것을 방지하기 위해 활성화될 수 있는 자살 유전자를 코딩하는 서열을 삽입하기 위한 유전적 변형을 포함한다. 자살 유전자는 이후에 유전자를 발현하는 세포에서 세포 사멸을 유발하는 외인성, 예컨대, 순환성 제제에 의해 작동될 수 있다. 추가의 대안은 요법의 특정 면역 효과기 세포를 표적화하는 단클론 항체의 사용이다. 예를 들어, CD52는 KHYG-1 세포 상에서 발현되고, 이 마커에 대한 단클론 항체의 결합은 항체 의존적 세포 매개 세포독성(ADCC) 및 KHYG-1 세포 사멸을 초래할 수 있다.

[0106] Suck et al, 2006에 의해 공개된 문헌에서 논의된 바와 같이, 암 유래의 NK 세포 및 세포주는 Gammacell® 3000 Elan과 같은 방사선 조사기를 사용하여 쉽게 방사선 조사된다. 세슘-137의 공급원은 방사선량을 제어하는 데 사용되며, 예를 들어, 1 Gy 및 50 Gy 사이의 용량-반응 곡선은 증가된 세포독성의 이점을 유지하면서 세포의

증식 능력을 제거하기 위한 최적의 선량을 결정하는 데 사용될 수 있다. 이것은 방사선의 각 선량이 투여된 후 세포를 세포독성에 대해 분석함으로써 달성된다.

[0107] 잘 확립된 자가 또는 MHC 일치 T 세포 접근법보다 입양 세포 면역요법을 위해 방사선 조사된 NK 세포주를 사용하는 상당한 이점이 있다. 첫째, 고도의 증식 성질을 갖는 면역 효과기 세포주의 사용은 변형된 NK 세포주의 확장이 보다 쉽게 그리고 상업적 수준에서 달성될 수 있음을 의미한다. 이후, 변형된 면역 효과기 세포주의 방사선 조사는 환자에게 세포를 투여하기 전에 수행될 수 있다. 유용한 세포독성을 유지하는 이러한 방사선 조사된 세포는 제한된 수명을 가지며, 변형된 T 세포와 달리 지속적인 부작용을 유발하는 오랜 시간 동안 순환하지 않을 것이다.

[0108] 또한, 동종이계 변형된 면역 효과기 세포 및 면역 효과기 세포주의 사용은 환자 내의 MHC 부류 I 발현 세포가 자가 면역 효과기 세포 세포독성 반응에 대해 할 수 있는 것과 동일한 방식으로 면역 효과기 세포 세포독성 반응을 억제할 수 없음을 의미한다. 암 세포 사멸을 위한 동종이계 면역 효과기 세포 및 세포주의 사용은 이전에 언급된 GVL 효과로부터 이익을 얻으며, 자가 T 세포와 달리, 동종이계 면역 효과기 세포 및 세포주는 GVHD의 발병을 자극하지 않으므로, 입양 세포 면역요법을 통한 암의 치료를 위한 훨씬 바람직한 옵션이다.

[0109] 구현예

[0110] 본 발명에 따르면, 하기 구현예가 제공된다:

[0111] 1. TRAIL 유도 세포 사멸에 대한 증가된 내성을 갖도록 변형된 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주.

[0112] 2. 구현예 1에 있어서, 면역 효과기 세포는 NK 세포인 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주.

[0113] 3. 구현예 1에 있어서, 면역 효과기 세포는 T 세포인 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주.

[0114] 4. 구현예 1 내지 구현예 3 중 어느 한 구현예에 있어서, TRAIL 유도 세포 사멸에 대한 증가된 내성은 야생형 면역 효과기 세포에 비해 적어도 10%인 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주.

[0115] 5. 구현예 1 내지 구현예 4 중 어느 한 구현예에 있어서, 하나 이상의 TRAIL 수용체 유전자의 발현을 넉다운 또는 넉아웃하도록 변형된 것인 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주.

[0116] 6. 구현예 1 내지 구현예 5 중 어느 한 구현예에 있어서, 공동자극 도메인에 연결된 TRAIL 수용체를 발현하거나 발현하도록 변형된 것인 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주.

[0117] 7. 구현예 5 또는 구현예 6에 있어서, TRAIL 수용체는 DR4 및 DR5로부터 선택되는 것인 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주.

[0118] 8. 구현예 6 또는 구현예 7에 있어서, 공동자극 도메인은 4-1BB, CD28, 2B4, DAP-10, DAP-12, CD278(ICOS) 및 OX40으로부터 선택되는 것인 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주.

[0119] 9. 구현예 1 내지 구현예 8 중 어느 한 구현예에 있어서, 돌연변이체 TRAIL 리간드를 추가로 발현하거나 발현하도록 변형된 것인 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주.

[0120] 10. 구현예 9에 있어서, 돌연변이체 TRAIL 리간드는 TRAIL 수용체, 예컨대, DR4 및/또는 DR5에 대한 증가된 친화성을 갖는 것인 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주.

[0121] 11. 구현예 1 내지 구현예 10 중 어느 한 구현예에 있어서, 세포주는 NK-92 또는 KHYG-1, 또는 이의 유도체인 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주.

[0122] 12. 구현예 1 내지 구현예 11 중 어느 한 구현예에 있어서, 환자에서 암을 치료하는 데 사용하기 위한 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주.

[0123] 13. 구현예 12에 있어서, 암은 혈액 암인 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주.

[0124] 14. 구현예 13에 있어서, 혈액 암은 급성 림프구성 백혈병(ALL), 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 만성 골수성 백혈병(CML), 호지킨 림프종, T-세포 림프종 및 B-세포 림프종을 포함한 비호지킨 림프종, 무증상 골수종, 무증상 다발성 골수종(SMM), 활성 골수종 또는 경쇄 골수종인 면역 효과기 세포 또는 면역 효과기 세포주.

[0125] 15. 공동자극 도메인에 연결된 TRAIL 수용체를 발현하도록 변형된 NK-92 또는 KHYG-1 세포.

[0126] 16. 구현예 15에 있어서, TRAIL 수용체는 DR4 및 DR5로부터 선택되는 것인 NK-92 또는 KHYG-1 세포.

[0127] 17. 구현예 15 또는 구현예 16에 있어서, 공동자극 도메인은 4-1BB, CD28, 2B4, DAP-10, DAP-12, CD278(ICOS) 및 OX40으로부터 선택되는 것인 NK-92 또는 KHYG-1 세포.

도면의 간단한 설명

[0128] 본 발명은 이제 첨부 도면을 참조하여 특정 구현예에서 예시된다:

도 1은 DR5 발현을 넉다운함으로써 NK 세포 동족살해의 완화를 보여주고;

도 2는 T 세포 상에서의 DR5 발현을 보여주며;

도 3은 DR5-41BB 키메라를 사용한 T 세포의 형질감염을 보여주고;

도 4는 DR5-41BB 키메라의 발현을 통한 TRAIL 유도 T 세포 사멸의 완화를 보여주며;

도 5는 NK 세포 상에서의 DR5 발현을 보여주고;

도 6은 DR5-41BB 키메라를 사용한 NK 세포의 형질감염을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0129] DNA, RNA 및 아미노산 서열은 하기에 언급되어 있으며:

[0130] 서열번호: 1은 DR5에 대한 예시적인 gRNA이고;

[0131] 서열번호: 2는 DR4에 대한 예시적인 gRNA이며;

[0132] 서열번호: 3은 DR4에 대한 두 번째 예시적인 gRNA이고;

[0133] 서열번호: 4는 DR5-41BB 키메라 DNA 서열이다.

[0134] **실시예**

[0135] 본 발명은 TRAIL 유도 세포 사멸에 대한 감소된 민감도 및/또는 더 세포독성인 활성 및 따라서 인간에서 암 세포 사멸을 유발하는 개선된 능력을 나타내도록 변형된 면역 효과기 세포의 생산과 관련하여 보다 구체적으로 상세하게 기재되어 있다.

[0136] 체크포인트 억제 수용체 기능의 넉아웃/넉다운 및 돌연변이체 TRAIL의 넉인의 관련 예의 경우 WO 제2017/017184호를 참고한다.

[0137] **실시예 1 - NK 세포 TRAIL 수용체 DR4 및 DR5의 넉아웃**

[0138] 사멸 수용체 5(DR5) 및/또는 사멸 수용체 4(DR4) 기능이 제거된 NK 세포를 다음과 같이 제조한다.

[0139] TRAIL-R2(DR5) 및 TRAIL-R1(DR4)을 표적화하는 gRNA 작제물을 설계하고(예컨대,

[0140] 서열번호:1: CCCAUCUUGAACAUACCAG(DR5),

[0141] 서열번호:2: AACCGGUGCACAGAGGGUGU(DR4) 및

[0142] 서열번호:3: AUUUACAAGCUGUACAUGGG(DR4))

[0143] NK 세포에서의 DR5 및 DR4 유전자(들)를 코딩하는 내인성 유전자를 표적화하도록 제조한다. 그리고 나서, CRISPR/Cas9 게놈 편집을 사용하여 DR5 및/또는 DR4 표적 유전자를 넉아웃시킨다.

[0144] DR5 유전자에 대해 총 3개의 gRNA 후보를 선택하고, RPMI8226 세포에서의 이들의 절단 효능을 결정한다. DR4 유전자에 대해 총 3개의 gRNA 후보를 선택하고, HL60 세포에서의 이들의 절단 효능을 결정한다. RPMI8226 세포 및 HL60을 Maxcyte® GT를 사용하여 gRNA:Cas9 리보핵단백질(RNP) 복합체로 전기천공한 후, DR5를 넉아웃하고/거나 유세포분석법에 의해 분석한다. gRNA의 절단 활성을 또한 시험관내 불일치 검출 분석을 사용하여 결정한다. T7E1 엔도뉴클레아제는 완전하게 일치하지 않는 DNA를 인식하고 절단하여, 모 DR5 유전자/DR4 유전자를 CRISPR/Cas9 형질감염 및 비상동 말단 연결(NHEJ) 후 돌연변이된 유전자와 비교할 수 있게 한다.

[0145] 가장 높은 KO 효율을 갖는 gRNA를 1차 NK 세포, NK 세포주 또는 CD34+ 전구세포에서 DR5/DR4를 넉아웃시키기 위한 추가 실험을 위해 선택한다(NK 세포로의 후속 분화 및 확장을 위해). DR4/DR5의 넉아웃을 유세포분석 기반

분석에 의해 결정한다.

[0146] **실시예 2 - NK 세포에서의 TRAIL 수용체 DR4 및 DR5의 넉다운**

[0147] NK-92 세포, KHYG-1 세포 및 1차 NK 세포에서의 DR4 및/또는 DR5의 siRNA 넉다운을 전기천공에 의해 수행한다. Nucleofection 키트 T가 Lonza사의 Amaxa Nucleofector II와 함께 사용될 수 있는데, 그것은 NK 세포와 함께 사용하기에 적절하고 분열 세포 및 비분열 세포 모두를 성공적으로 형질감염시킬 수 있고 최대 90%의 형질감염 효율을 달성하기 때문이다.

[0148] Nucleofector 용액을 실온으로 가온한다(샘플당 100 ul). 혈청 및 보충물을 함유하는 배양 배지의 분취량을 또한 50 ml 튜브에서 37℃로 예열한다. 6웰 플레이트를 혈청 및 보충물을 함유하는 4 ml의 배양 배지를 첨가하여 준비한다. 플레이트를 가습된 37℃/5% CO_2 인큐베이터에서 사전 인큐베이션한다.

[0149] 100 μl Nucleofection 용액 중의 $2x10^6$ 세포를 20 μM siRNA 용액과 부드럽게 혼합하여 2 μM의 최종 농도를 달성한다. 혼합하는 동안 기포를 피한다. 혼합물을 Amaxa 인증 큐벳 내로 옮기고, Nucleofector 큐벳 홀더에 넣는다.

[0150] 프로그램을 실행하여 완료시키고, 큐벳 내의 샘플을 즉시 제거한다. 그리고 나서, 500 μl의 미리 평형화된 배양 배지를 각 큐벳에 첨가한다. 그리고 나서, 웰당 5 ml의 최종 부피를 확립하기 위해, 각 큐벳 내의 샘플을 준비된 6웰 플레이트의 상응하는 웰로 부드럽게 옮긴다.

[0151] 그리고 나서, 형질감염 분석이 수행될 때까지 세포를 가습된 37℃/5% CO_2 인큐베이터에서 인큐베이션한다. DR4 및/또는 DR5 발현 수준을 측정하기 위해, 유세포분석을 전기천공 72시간 후에 수행한다. 이 전기천공 프로토콜은 KHYG-1 세포, NK-92 세포 및 1차 NK 세포에서 DR4 및 DR5 넉다운을 확실히 초래하는 것으로 밝혀졌다.

[0152] **실시예 3 - DR4-CD28/DR5-CD28 융합 단백질**

[0153] 면역조절성 융합 단백질(IFP)은 DR4 또는 DR5의 세포외 도메인, 또는 이의 일부, 및 CD28의 세포내 신호전달 도메인, 또는 이의 일부를 포함할 수 있다. 소수성 구성요소는 DR4/DR5 또는 CD28 중 어느 것의 막관통 도메인, 또는 이의 일부로 구성될 수 있다. 일부 DR4-CD28 또는 DR5-CD28 융합 단백질에서, 소수성 구성요소는 CD28의 막관통 도메인을 포함하고, 세포외 구성요소는 CD28의 세포외 부분, 구체적으로 소수성 구성요소에 인접한 세포외 시스테인 잔기를 추가로 포함한다. 세포외 구성요소는 DR4 또는 DR5의 세포외 도메인의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다.

[0154] 세포외 구성요소는 DR4/DR5의 전체 세포외 도메인을 포함할 수 있다. 따라서, DR4-CD28 또는 DR5-CD28 작제물은 TRAIL에 대한 DR4 또는 DR5의 결합으로부터의 전형적인 억제 신호일 것을 CD28 세포내 신호전달 도메인에 의해 생성된 양성 신호로 전환하는 능력을 갖는다.

[0155] DR4-CD28 융합 단백질 또는 DR5-CD28 융합 단백질을 코딩하는 예시적인 핵산 분자는 하기 요소를 포함한다(5'에서 3'으로): 세포외 구성요소(DR4/DR5)-다량체화 도메인(CD28 시스테인)-소수성 구성요소(CD28 막관통)-세포내 구성요소(CD28 세포내).

[0156] 작제물을 코딩하는 핵산은 PCR에 의해 내부에서 생성된 다음 pENTR™/DTOPO® 벡터(Invitrogen) 내로 방향성 있게 TOPO 클로닝된 다음, Gateway® 기술(Invitrogen)을 사용하여 레트로바이러스 벡터 pMP71-attR 내로 전달될 수 있다. 일부 경우에, IFP를 코딩하는 핵산 분자는 pMP71-attR 레트로바이러스 벡터 내로 클로닝하기 전에 코돈 최적화된다.

[0157] **실시예 4 - NK 세포에서의 변형된 TRAIL 수용체 넉인**

[0158] NK-92 세포, KHYG-1 세포 및 1차 확장된 NK 세포를 공동자극 도메인 CD28(상기와 같음) 또는 4-1BB에 연결된 DR5 또는 DR4를 코딩하는 유전자로 형질감염시킨다.

[0159] 천연 사멸 도메인이 아닌 4-1BB 또는 CD28 공동자극 도메인에 융합된 DR5 또는 DR4 세포외 결합 도메인을 함유하는 면역조절성 융합 단백질(IFP)을 코딩하는 유전자의 패널을 생성한다. 구체적으로, 선택된 유전자는 4-1BB 또는 CD28 및 CD3zeta 엔도도메인 및 CD8a의 막관통 및 줄기 영역을 함유하는 DR5 백본을 포함하는 IFP를 코딩할 수 있다. 유전자 작제물을 일시적 발현을 위해 mRNA로서 그리고 안정적인 장기 발현을 확립하기 위해 SB 벡터를 사용하여 전달한다.

[0160] NK 세포를 IFP로 형질감염시킨 후(상기와 같이 사용된 Nucleofection 키트 T), 성공적으로 형질감염된 세포를

이들의 IFP 기능성에 기초하여 선택한다. 그리고 나서, 선택된 세포를 이전에 설명한 바와 같이 인큐베이션하고 계대한다.

[0161] NK 세포에서 발현된 생성된 IFP는 TRAIL의 결합에 대해 야생형 DR5와 경쟁하지만, 야생형 DR5와 달리 결합시에 활성화 신호를 생산하여 더 세포독성인 NK 세포 표현형을 유도한다.

[0162] **실시예 5 - TRAIL 유도 사멸에 대한 변형된 NK 세포의 증가된 내성**

[0163] 야생형 NK 세포를 실시예 1, 2, 3 및 4의 유전적으로 변형된 NK 세포와 비교한다.

[0164] 실험 설계 I:

[0165] TRAIL 유도 세포 사멸에 대한 각각의 세포 유형의 민감도를 RPMI-8226, MM1S, HL60, Panc-1 및 BxPC3과의 공동 배양시 유세포분석법에 의해 평가한다. 간략히, (1) 야생형 NK 세포, (2) 높은 친화성 막 결합된 TRAIL 리간드 $DR4^{4C9}$ 또는 $DR5^{E195R;D269H}$를 발현하는 NK 세포, (3) $DR4^{KO}$ 또는 $DR5^{KO}$를 갖는 NK 세포, (4) 높은 친화성 막 결합된 TRAIL 리간드 $DR4^{4C9}$ 또는 $DR5^{E195R;D269H}$를 발현하는 $DR4^{KO}$ 또는 $DR5^{KO}$를 갖는 NK 세포를 각각의 암 표적 세포 유형에 대해 시험한다.

[0166] 실험 설계 II:

[0167] TRAIL 유도 세포 사멸에 대한 각각의 세포 유형의 민감도를 RPMI-8226, MM1S, HL60, Panc-1 및 BxPC3과의 공동 배양시 유세포분석법에 의해 평가한다. 간략히, (1) 야생형 NK 세포, (2) 높은 친화성 막 결합된 TRAIL 리간드 $DR4^{4C9}$ 또는 $DR5^{E195R;D269H}$를 발현하는 NK 세포, (3) $DR4^{KI-IFP}$ 또는 $DR5^{KI-IFP}$를 갖는 NK 세포 및 (4) 높은 친화성 막 결합된 TRAIL 리간드 $DR4^{4C9}$ 또는 $DR5^{E195R;D269H}$를 발현하는 $DR4^{KI-IFP}$ 또는 $DR5^{KI-IFP}$를 갖는 NK 세포를 갖는 NK 세포를 각각의 암 표적 세포 유형에 대해 시험한다.

[0168] 실험 설계 III:

[0169] TRAIL 유도 세포 사멸에 대한 각각의 세포 유형의 민감도를 RPMI-8226, MM1S, HL60, Panc-1 및 BxPC3과의 공동 배양시 유세포분석법에 의해 평가한다. 간략히, (1) 야생형 NK 세포, (2) 높은 친화성 막 결합된 TRAIL 리간드 $DR4^{4C9}$ 또는 $DR5^{E195R;D269H}$를 발현하는 NK 세포, (3) $DR4^{KO}$ 또는 $DR5^{KO}$를 갖는 NK 세포, (4) $DR4^{KI-IFP}$ 또는 $DR5^{KI-IFP}$를 갖는 NK 세포, (5) 높은 친화성 막 결합된 TRAIL 리간드 $DR4^{4C9}$ 또는 $DR5^{E195R;D269H}$를 발현하는 $DR4^{KO}$ 및 $DR4^{KI-IFP}$ 또는 $DR5^{KO}$ 및 $DR5^{KI-IFP}$를 갖는 NK 세포를 갖는 NK 세포를 각각의 암 표적 세포 유형에 대해 시험한다.

[0170] **실시예 6 - T 세포 TRAIL 수용체 DR4 및 DR5의 넉아웃**

[0171] 사멸 수용체 5(DR5) 및/또는 사멸 수용체 4(DR4) 기능이 제거된 T 세포를 다음과 같이 제조한다.

[0172] TRAIL-R2(DR5) 및 TRAIL-R1(DR4)을 표적화하는 gRNA 작제물을 설계하고(예컨대,

[0173] 서열번호:1: CCCAUCUUGAACAUACCAG(DR5),

[0174] 서열번호:2: AACCGGUGCACAGAGGGUGU(DR4) 및

[0175] 서열번호:3: AUUUACAAGCUGUACAUGGG(DR4))

[0176] T 세포에서의 DR5 및 DR4 유전자(들)를 코딩하는 내인성 유전자를 표적화하도록 제조한다. 그리고 나서, CRISPR/Cas9 게놈 편집을 사용하여 DR5 및/또는 DR4 표적 유전자를 넉아웃시킨다.

[0177] DR5 유전자에 대해 총 3개의 gRNA 후보를 선택하고, RPMI8226 세포에서의 이들의 절단 효능을 결정한다. DR4 유전자에 대해 총 3개의 gRNA 후보를 선택하고, HL60 세포에서의 이들의 절단 효능을 결정한다. RPMI8226 세포 및 HL60을 Maxcyte® GT를 사용하여 gRNA:Cas9 리보핵단백질(RNP) 복합체로 전기천공한 후, DR5를 넉아웃하고/거나 유세포분석법에 의해 분석한다. gRNA의 절단 활성을 또한 시험관내 불일치 검출 분석을 사용하여 결정한다. T7E1 엔도뉴클레아제는 완전하게 일치하지 않는 DNA를 인식하고 절단하여, 모 DR5 유전자/DR4 유전자를 CRISPR/Cas9 형질감염 및 비상동 말단 연결(NHEJ) 후 돌연변이된 유전자와 비교할 수 있게 한다.

[0178] 가장 높은 KO 효율을 갖는 gRNA를 T 세포, T 세포주 또는 전구세포에서 DR5/DR4를 넉아웃시키기 위한 추가 실험을 위해 선택하였다(T 세포로의 후속 분화 및 확장을 위해). DR4/DR5의 넉아웃을 유세포분석 기반 분석에 의해

결정한다.

[0179] **실시예 7 - NK 세포 동족살해 내성**

[0180] 도 1에 예시된 바와 같이, 하기 세포에서 NK 세포 동족살해를 평가하였다: (1) 모의(mock) 또는 야생형 NK 세포로 지칭되는 1차 NK 세포, (2) 높은 친화성 막 결합된 TRAIL 리간드 $DR5^{E195R;D269H}$를 발현하는 1차 NK 세포, (3) siRNA를 통한 $DR5^{KD}$를 갖는 1차 NK 세포 및 (4) siRNA를 통한 $DR5^{KD}$를 갖고 또한 높은 친화성 막 결합된 TRAIL 리간드 $DR5^{E195R;D269H}$를 발현하는 1차 NK 세포.

[0181] DR5 넉다운을 받은 1차 NK 세포를 확장 9일에 DR5로 전기천공한 반면, DR5 TRAIL 변이체를 받은 1차 NK 세포를 확장 12일에 변이체 mRNA로 전기천공하였다.

[0182] IL-2 함유 성장 배지에서 1차 NK 세포의 연장된 확장 후에, DR5 발현이 상향조절되어 DR5 TRAIL 변이체가 발현될 때 동족살해를 증가시키는 것으로 관찰되었다.

[0183] 데이터는 siRNA를 사용하여 DR5 발현을 넉다운하는 것이 이들 NK 세포가 야생형 TRAIL 또는 고친화성 DR5 TRAIL 변이체를 발현하는지 여부에 관계없이 1차 확장된 NK 세포를 동족살해로부터 보호한다는 것을 분명히 나타낸다.

[0184] **실시예 8 - T 세포 상에서의 DR5 발현**

[0185] TRAIL 사멸 수용체 5(DR5) 발현을 Jurkat T 세포 상에서 측정하였다.

[0186] Jurkat T 세포를 RPMI-1640, 10% FBS 및 1% 페니실린-스트렙토마이신의 존재 하에 배양하였다. 세포를 로그 성장 단계 동안 채취하고, 표준 작동 프로토콜에 따라 TRAIL-DR5/CD262 세포 표면 발현의 발현에 대해 면역 표현형을 분석하였다

[0187] 간략히, 세포를 PBS, 나트륨 아지드 및 2% FBS를 함유하는 완충액으로 세척하였다. 이후, 세포를 적절한 부피에 재현탁시키고 항-DR5 항체(클론: DJR2-4, 공급원: Biolegend, Cat: 307406)로 염색하였다. 그리고 나서, 세포를 얼음 위에서 20분 동안 2 μl의 항체와 함께 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 세포를 PBS, 나트륨 아지드 및 2% FBS를 함유하는 완충액으로 2회 세척하여 결합되지 않은 항체를 제거하였다. 세포를 PBS, 나트륨 아지드 및 2% FBS를 함유하는 200 μl 완충액에 최종적으로 재현탁시키고, 488 nm 청색 레이저를 사용하고 585/42 밴드 패스 필터를 사용하여 방출된 신호를 검출하는 BD FACS Canto II 상에서 유세포분석법에 의해 측정하였다. 결과를 FlowJo 소프트웨어(버전 X)에 의해 분석하였다.

[0188] 도 2는 FMO 대조군 샘플(1.29%) 및 항-DR5 염색된 샘플(86.8%) 모두에서 Jurkat T 세포 상에서 DR5의 발현을 보여준다.

[0189] Jurkat T 세포가 이들의 표면 상에서 TRAIL 사멸 수용체 5(DR5)를 고도로 발현한다는 것은 분명하다.

[0190] **실시예 9 - T 세포 상에서의 DR5-41BB 키메라의 발현**

[0191] 아폽토시스 DR5 신호 캐스케이드를 활성인 자극 T 세포 반응으로 전환시키기 위해, DR5-41BB 융합 단백질(서열번호: 4)을 Jurkat T 세포에서 발현시켰다.

[0192] Jurkat T 세포를 RPMI-1640, 10% FBS 및 1% 페니실린-스트렙토마이신의 존재 하에 배양하였다. 세포를 로그 성장 단계 동안 채취하고, 표준 전기천공 프로토콜 하에 mRNA 전기천공을 사용하여 형질감염시켰다. DR5-41BB mRNA를 시트레이트 완충액 중에 1 μg/μl의 농도로 사용하였다. 세포를 완충액에서 1회 세척한 다음, $2x10^6$ 세포/100 μl의 밀도로 농축시켰다. 세포를 모의 전기천공시키거나, 또는 10 μg/100 μl의 최종 농도로 DR5-41BB 키메라로 전기천공시켰다. 세포를 6 웰 플레이트에서 전기천공 후 즉시 회수하고 37℃에서 20분 동안 회복되도록 하였다. 인큐베이션 후, 세포에 RPMI-1640 및 10% FBS를 함유하는 배지를 보충하였다. 세포를 회복시키고, 추가로 24시간 동안 37℃에서 인큐베이션한 후, DR5-41BB 키메라의 발현을 유세포분석법에 의해 분석하였다.

[0193] 간략히, 세포를 PBS, 나트륨 아지드 및 2% FBS를 함유하는 완충액으로 세척하였다. 이후, 세포를 적절한 부피에서 재현탁하고, 항-DR5 항체(클론: DJR2-4, 공급원: Biolegend, Cat: 307406)로 염색하였다. 그리고 나서, 세포를 얼음 위에서 20분 동안 2 μl의 항체와 함께 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 세포를 PBS, 나트륨 아지드 및 2% FBS를 함유하는 완충액으로 2회 세척하여 결합되지 않은 항체를 제거하였다. 세포를 PBS, 나트륨 아지드 및 2% FBS를 함유하는 500 μl 완충액에 최종적으로 재현탁시키고, 488 nm 청색 레이저를 사용하고 585/42 밴드 패스 필터를 사용하여 방출된 신호를 검출하는 BD FACS Canto II 상에서 유세포분석법에 의해 측정하였다.

결과를 FlowJo 버전 X에 의해 분석하였다.

[0194] 도 3은 Jurkat T 세포 상에서의 DR5-41BB 키메라의 발현을 보여준다. 모의 전기천공된 Jurkat T 세포에서의 DR5 발현은 698의 평균 MFI 값을 보여주었다. 형질감염된 Jurkat T 세포 상에서의 DR5 발현 및 DR5-41BB 발현은 2073의 평균 MFI 값을 보여주었다. 모의 전기천공된 T 세포를 백그라운드 MFI=0에 정규화시, DR5-41BB 특이적 발현이 1375의 평균 MFI 값과 동일함을 알 수 있다.

[0195] 따라서, DR5-41BB 키메라는 T 세포에서 성공적으로 발현될 수 있는 것으로 나타났다.

[0196] **실시예 10 - DR5-41BB 키메라의 보호 효과**

[0197] 야생형 Jurkat T 세포 및 실시예 9로부터의 DR5-41BB 키메라를 발현하는 Jurkat T 세포를 TRAIL 리간드에 노출되었을 때 이들의 취약성에 대해 평가하였다.

[0198] Jurkat T 세포를 RPMI-1640, 10% FBS 및 1% 페니실린-스트렙토마이신의 존재 하에 배양하였다. 세포를 로그 성장 단계 동안 채취하고, 표준 전기천공 프로토콜 하에 mRNA 전기천공을 사용하여 형질감염시켰다. DR5-41BB mRNA를 시트레이트 완충액에서 1 μg/μl의 농도로 사용하였다. 세포를 완충액에서 1회 세척한 후, $2x10^6$ 세포/100 μl의 밀도로 농축시켰다. 세포를 모의 전기천공시키거나 또는 10 μg/100 μl의 최종 농도에서 DR5-41BB 키메라로 전기천공시켰다. 세포를 6 웰 플레이트에서 전기천공 후 즉시 회복시키고, 37℃에서 20분 동안 회복시켰다. 인큐베이션 후, 세포에 RPMI-1640 및 10% FBS를 함유하는 배지를 보충하였다.

[0199] 세포를 회복시키고, 추가로 4시간 동안 37℃에서 인큐베이션한 후, 이들을 96 웰 플레이트에서 기능 분석에 사용하여 (a) 모의 전기천공된 또는 (b) DR5-41BB mRNA 전기천공된 Jurkat T 세포 상에서의 TRAIL 리간드의 독성을 평가하였다.

[0200] 도 4에서 볼 수 있는 바와 같이, T 세포를 100 ng/ml의 최종 농도에서 가용성 TRAIL 리간드의 부재 또는 존재 하에 개별적으로 배양하였다. 각각의 플롯은 n=3을 나타낸다. 분석을 16시간 동안 수행하였고, T 세포에서의 세포 사멸을 BD FACS Canto II 기반 분석 플랫폼에서 유세포분석법을 사용하여 프로피듐 아이오다이드에 의해 평가하였다. TRAIL 리간드의 존재는 T 세포 상에서 독성 효과(~37.5% 세포 사멸)를 분명히 나타내었지만, 이 TRAIL 유도 세포 사멸은 DR5-41BB 키메라 수용체를 발현함으로써 우회(~15% 세포 사멸)할 수 있었다.

[0201] 따라서, DR5-41BB 키메라의 발현은 T 세포에게 TRAIL 유도 세포 사멸에 대한 내성을 제공하는 것으로 나타났다.

[0202] **실시예 11 - NK 세포 상에서의 DR5-41BB 키메라의 발현**

[0203] 아폽토시스 DR5 신호 캐스케이드를 활성인 자극 NK 세포 반응으로 전환시키기 위해, DR5-41BB 융합 단백질(서열번호: 4)을 1차 확장된 NK 세포에서 발현시켰다.

[0204] 1차 확장된 NK 세포를 10% 인간 AB 혈청의 존재 하에 12일 동안 제조사 지침에 따라 Miltenyi Biotec으로부터의 NK 세포 확장 배지의 존재 하에 배양하였다. 세포를 로그 성장 단계 동안 채취하고 표준 전기천공 프로토콜 하에 mRNA 전기천공을 사용하여 형질감염시켰다. DR5-41BB mRNA를 시트레이트 완충액에서 1 μg/μl의 농도에서 사용하였다. 세포를 완충액에서 1회 세척한 후, $2x10^6$ 세포/100 μl의 밀도로 농축시켰다. 세포를 모의 전기천공시키거나 또는 7.5 μg/100 μl의 최종 농도에서 DR5-41BB 키메라로 전기천공시켰다.

[0205] 세포를 6 웰 플레이트에서 전기천공 후 즉시 회복시키고 37℃에서 20분 동안 회복시켰다. 인큐베이션 후, 세포에 10% 인간 AB 혈청을 함유하는 NK 세포 MACS 배지(Miltenyi Bioctec)를 보충하였다. 세포를 회복시키고 추가로 24시간 동안 37℃에서 인큐베이션한 후 DR5-41BB 키메라의 발현을 유세포분석법에 의해 분석하였다.

[0206] 간략히, 세포를 PBS, 나트륨 아지드 및 2% FBS를 함유하는 완충액으로 세척하였다. 이후, 세포를 적절한 부피에서 재현탁시키고 항-DR5 항체(클론: DJR2-4, 공급원: Biolegend, Cat: 307406)로 염색하였다. 그리고 나서, 세포를 얼음 위에서 20분 동안 2 μl의 항체와 함께 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 세포를 PBS, 나트륨 아지드 및 2% FBS를 함유하는 완충액으로 2회 세척하여 결합되지 않은 항체를 제거하였다. 세포를 PBS, 나트륨 아지드 및 2% FBS를 함유하는 500 μl 완충액에 최종적으로 재현탁시키고, 488 nm 청색 레이저를 사용하고 585/42 밴드 패스 필터를 사용하여 방출된 신호를 검출하는 BD FACS Canto II 상에서 유세포분석법에 의해 측정하였다. 결과를 FlowJo 버전 X에 의해 분석하였다.

[0207] 도 5는 모의 전기천공된 NK 세포에서의 DR5 수용체 발현(평균 MFI 값: 208)을 보여주는 반면, 도 6은 DR5-41BB 키메라성 mRNA 전기천공된 NK 세포에서의 DR5 수용체 발현(평균 MFI 값: 608)을 보여준다. 모의 전기천공된 NK

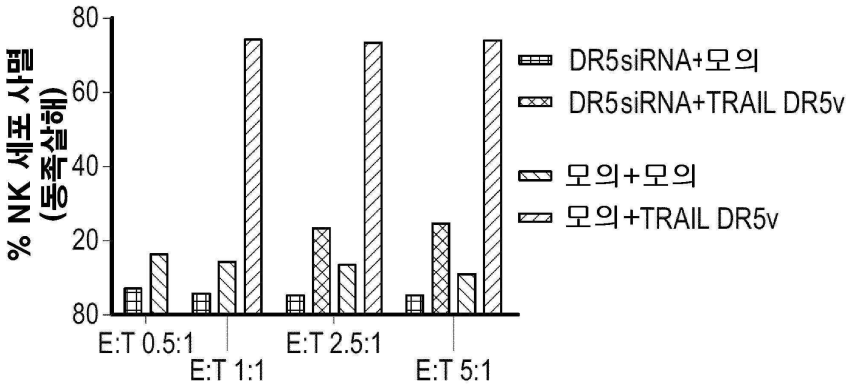
세포를 백그라운드 MFI=0에 정규화시, DR5-41BB 특이적 발현(608-208)이 400 MFI 단위와 동일하다는 것을 알 수 있다.

[0208] 따라서 DR5-41BB 융합 단백질은 NK 세포 뿐만 아니라 T 세포에서 성공적으로 발현될 수 있는 것으로 나타났다.

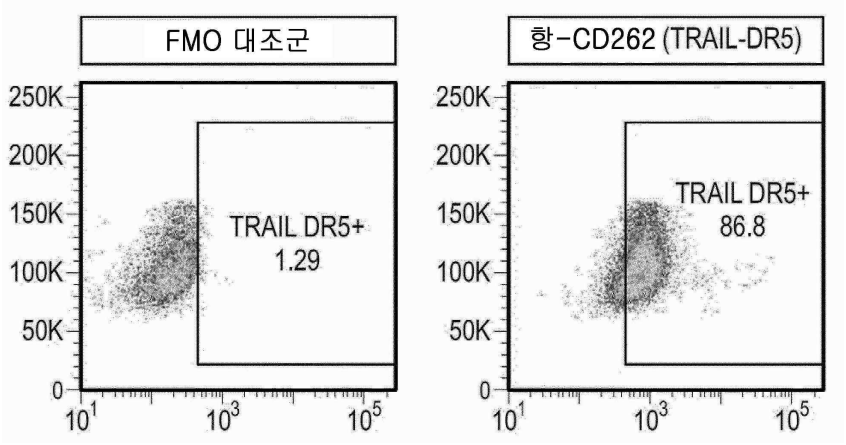
[0209] 따라서 본 발명은 암 요법에서 사용하기 위해, TRAIL 유도 세포 사멸에 내성인 면역 효과기 세포 및 세포주, 및 이의 생산을 제공한다. 이 접근법은 높은 친화성 막 결합된 TRAIL 리간드를 발현하는 유전적으로 변형된 면역 효과기 세포에 인접하여 동족살해를 방지하는 면역 효과기 세포 상의 TRAIL 수용체의 넉다운/넉아웃의 조합을 포함한다. 더욱이, 공동자극 도메인에 연결된 TRAIL 수용체의 넉인은 면역 효과기 세포가 인접한 면역 효과기 세포로부터의 동족살해 유도 신호를 매우 강력한 면역 효과기 세포 세포독성에 필요한 활성화 신호 전달로 전환하게 한다.

도면

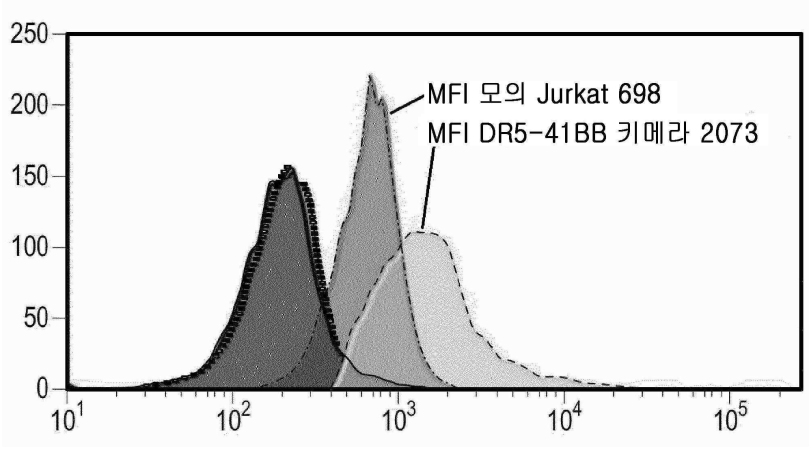
도면1



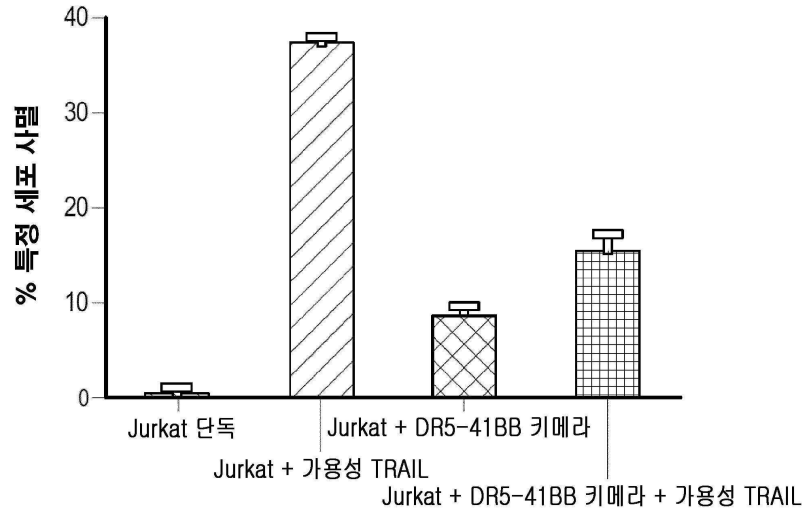
도면2



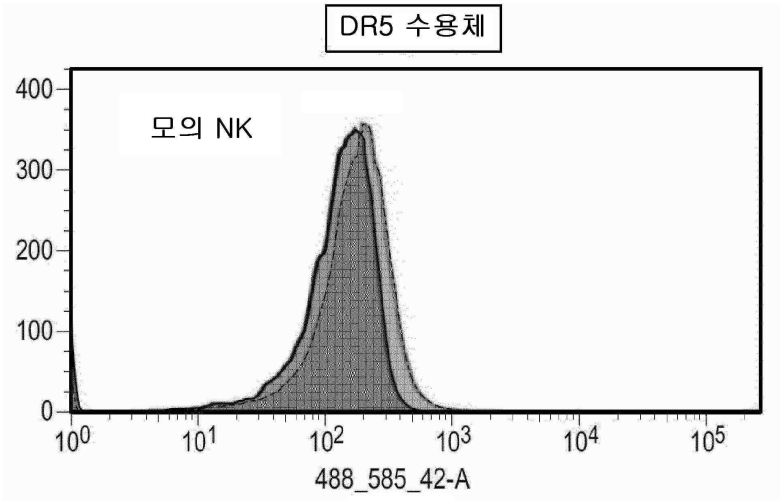
도면3


250
200
150
100
50
0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
MFI 모의 Jurkat 698
MFI DR5-41BB 키메라 2073

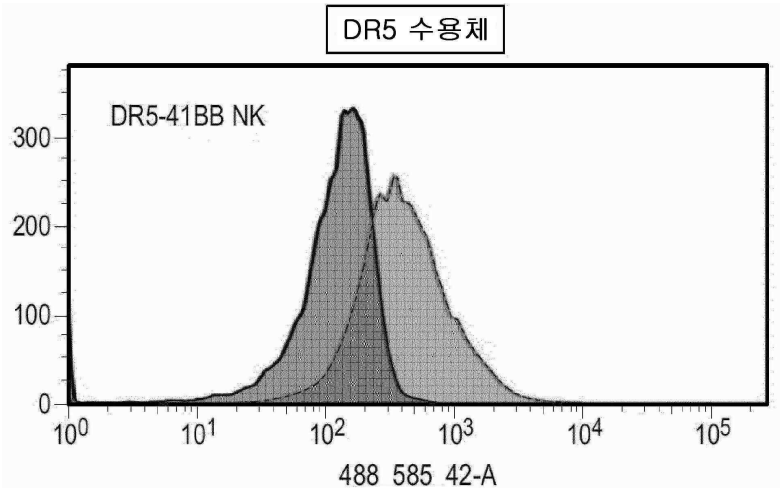
도면4


% 특정 세포 사멸
40
30
20
10
0
Jurkat 단독
Jurkat + 가용성 TRAIL
Jurkat + DR5-41BB 키메라
Jurkat + DR5-41BB 키메라 + 가용성 TRAIL

도면5


DR5 수용체
모의 NK
400
300
200
100
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
488_585_42-A

도면6



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> ONK Therapeutics Limited

<120> MODIFIED IMMUNE EFFECTOR CELLS WITH INCREASED RESISTANCE TO CELL DEATH

<130> P40540WO

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

cccaucuuga acauaccag 19

<210> 2

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

aaccggugca cagagggugu 20

<210> 3

<211> 20

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

auuuacaagc uguacauggg 20

<210> 4

<211> 840

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

atggaacaac ggggacagaa cgccccggcc gcttcggggg cccggaaaag gcacggccca 60

ggacccaggg aggcgcgggg agccaggcct gggctccggg tccccaagac ccttgtgctc 120

gttgtcgccg cggtcctgct gttggtctca gctgagtctg ctctgatcac ccaacaagac 180

ctagctcccc agcagagagt ggccccacaa caaaagaggt ccagcccctc agagggattg 240

tgtccacctg gacaccatat ctcagaagac ggtagagatt gcatctcctg caaatatgga 300

caggactata gcactcactg gaatgacctc cttttctgct tgcgctgcac caggtgtgat 360

tcaggtgaag tggagctaag tccctgcacc acgaccagaa acacagtgtg tcagtgcgaa 420

gaaggcacct tccgggaaga agattctcct gagatgtgcc ggaagtgccg cacagggtgt 480

cccagaggga tggtcaaggt cggtgattgt acaccctgga gtgacatcga atgtgtccac 540

aaagaatcag gcatcatcat aggagtcaca gttgcagccg tagtcttgat tgtggctgtg 600

tttgtttgca agtctttact gtggaagaaa atcatctcct tctttcttgc gctgacgtcg 660

actgcgttgc tcttcctgct gttcttcctc acgctccgtt tctctgttgt taaacggggc 720

agaaagaaac tcctgtatat attcaaacaa ccatttatga gaccagtaca aactactcaa 780

gaggaagatg gctgtagctg ccgatttcca gaagaagaag aaggaggatg tgaactgtga 840