(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0005566
(43) 공개일자 2025년01월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01) *A61P 37/02* (2006.01)
C07K 14/54 (2024.01) *C07K 14/725* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2025.01)
A61K 40/11 (2025.01)
(21) 출원번호 10-2024-7025594
(22) 출원일자(국제) 2022년12월27일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년07월29일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/082431
(87) 국제공개번호 WO 2023/129929
국제공개일자 2023년07월06일
(30) 우선권주장
63/295,491 2021년12월30일 미국(US)

(71) 출원인
티알1엑스, 인크.
미국, 캘리포니아 92037, 라 호이아, 히든 밸리 로드 2566
(72) 발명자
드 브리에스, 잔 엣버트
미국, 캘리포니아 92037, 라 호이아, 히든 밸리 로드 2566
론카롤로, 마리아 그라지아
미국, 캘리포니아 92037, 라 호이아, 히든 밸리 로드 2566
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김영철, 김민정, 김 순 영

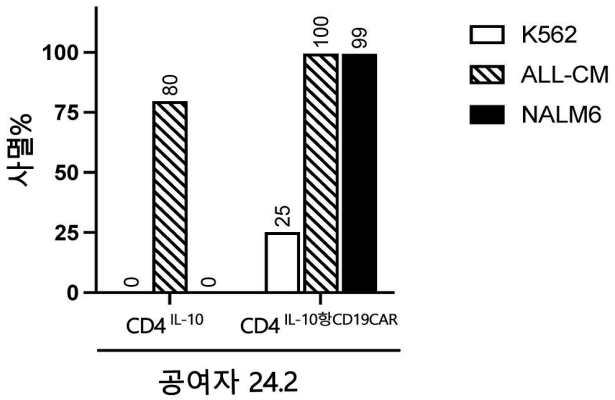
전체 청구항 수 : 총 254 항

(54) 발명의 명칭 **IL-10 및 키메라 항원 수용체를 발현하는 CD4+ T 세포 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 개시내용은 IL-10과 키메라 항원 수용체를 발현하도록 $CD4^+$ T세포를 유전자 변형시키는 방식으로 생성된 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(자가유래 또는 동종이계 단일 공여자 및 동종이계 다중 공여자) 집단을 제공한다. $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포를 생성하는 방법과, 면역 관용화, GvHD, 세포 및 기관 이식, 암, 및 기타 자가면역 및 염증성 장애의 치료를 위해 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포를 사용하는 방법이 추가로 제공된다.

대 표 도



공여자 24.2

(52) CPC특허분류
A61K 40/31 (2025.01)
A61K 40/4211 (2025.01)
A61K 40/4215 (2025.01)
A61K 40/4221 (2025.01)
C07K 14/5428 (2013.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 16/2803 (2013.01)
C07K 16/2878 (2013.01)
C07K 16/2887 (2013.01)
(72) 발명자
팰리어드, 자비에르
미국, 캘리포니아 92037, 라 호이아, 히든 밸리 로드 2566
드 브리에스, 데이비드
미국, 캘리포니아 92037, 라 호이아, 히든 밸리 로드 2566

명 세 서

청구범위

청구항 1

유전자 변형된 $CD4^+$ T세포($CD4^{IL-10/CAR}$)로서,

(a) 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor; CAR)를 인코딩하는 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절; 및

(b) 인터류킨-10(IL-10)을 인코딩하는 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절;을 포함하는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 2

제1항에 있어서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절이 CAR의 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 제1 조절 요소를 포함하는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 3

제2항에 있어서, 조절 요소가 CAR의 구성적 발현을 유도하는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, CAR이 항원 결합 도메인, 힌지 영역, 막관통 도메인 및 세포내 신호 전달 도메인을 포함하는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 5

제4항에 있어서, 항원 결합 도메인이 단일 사슬 항체 단편인, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 6

제5항에 있어서, 단일 사슬 항체 단편이 단일 사슬 Fv(scFv)를 포함하는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 7

제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 도메인이 자가면역 질환, 염증성 장애 또는 암과 관련된 항원을 표적으로 하는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 8

제7항에 있어서, 항원이 CD19, CD20, CD22, CD27, CD38, B7-H3, CD23, Lym1, Lym2, CLEC5A, CDH179b, FLT3, GCC, Muc, BCMA, CSF2RA, GFRα4, CD32, CD33, CEA, IL11Rα, IL13Rα, NYBR1, SLea, CD200R, TGFβR2, CD276, TROP2, LAMP1, PTK7, DLL3, CDH1, CDH6, CDH17, CDH19, TSHR, 티로시나아제, HLA-A*02, HLA-A*24 또는 시트룰린화된 펩타이드, 인슐린, MOG, GAD65, IA2, 글리아딘(gliadin), 및 데스모글레인(desmoglein)으로 이루어지는 군에서 선택되는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 9

제4항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 도메인이 항-CD19 항원 결합 도메인을 포함하는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 10

제9항에 있어서, 항-CD19 항원 결합 도메인이 서열번호 11의 서열을 갖는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 11

제4항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 도메인이 항-BCMA 항원 결합 도메인인, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 12

제10항에 있어서, 항-BCMA 항원 결합 도메인이 서열번호 50 내지 53의 서열을 포함하는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 힌지 영역이 인간 CD8α 힌지 영역, 인간 CD28 힌지 영역, IgG1 힌지 영역 또는 IgG4 힌지 영역에서 선택되는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 14

제13항에 있어서, 힌지 영역이 인간 CD8α에서 유도된 것인, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 TNFRSF19 막관통 도메인, CD3제타 막관통 도메인, CD8α 막관통 도메인, CD4 막관통 도메인, CD28 막관통 도메인 또는 B7 패밀리 유도성 공동자극(ICOS) 막관통 도메인에서 선택되는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 16

제15항에 있어서, 막관통 도메인이 인간 CD8α에서 유도된 것인, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, CAR이 하나 이상의 공동자극 도메인을 추가로 포함하는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 18

제17항에 있어서, CAR이 2개의 공동자극 도메인을 포함하는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 공동자극 도메인이 4-1BB, CD28, OX40, ICOS, CD27, MYD88-CD40 및 KIR2DS2로 이루어지는 군에서 선택되는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 20

제19항에 있어서, 하나 이상의 공동자극 도메인 중 하나가 CD28에서 유도된 것인, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 21

제18항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 공동자극 도메인이 4-1BB에서 유도된 것인, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인이 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프

(ITAM)를 포함하는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM)가 CD3제타에서 유도된 것인, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, CAR이,

항-CD19 항원 결합 도메인, 항-BCMA 항원 결합 도메인 또는 항-CD20 항원 결합 도메인;

인간 CD8α 힌지 영역;

인간 CD8α 막관통 영역;

CD28 공동자극 도메인; 및

CD3제타 사슬 세포내 신호전달 도메인;을 포함하는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, CAR이 서열번호 9, 16, 22, 34, 41 내지 49, 또는 54의 서열을 포함하는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 26

제25항에 있어서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절이 서열번호 10, 17, 23, 35 또는 55의 서열을 포함하는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절이 T세포 핵 게놈에 삽입되는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절이 T세포 핵 게놈에 삽입되지 않는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 29

제27항 또는 제28항에 있어서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절이 벡터 내에 있는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절이 IL-10의 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 제2 조절 요소를 포함하는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, IL-10이 인간 IL-10인, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 32

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, IL-10이 바이러스 IL-10인, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 33

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, IL-10이 서열번호 1의 서열을 갖는 단백질인, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 34

제33항에 있어서, 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절이 서열번호 2의 서열을 갖는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 35

제30항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 조절 요소가 IL-10의 구성적 또는 유도성 발현을 유도하는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절이 T세포 핵 게놈에 삽입되는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 37

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절이 T세포 핵 게놈에 삽입되지 않는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 38

제36항 또는 제37항에 있어서, 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절이 벡터 내에 있는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 39

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절과 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절이 동일한 벡터 내에 있는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 40

제29항, 제38항 또는 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터가 바이러스 벡터인, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 41

제40항에 있어서, 벡터가 렌티바이러스 벡터인, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 42

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^+$ T세포는 배양 배지 1 mL 중 10^6개의 $CD4^+$ T세포당 적어도 100 pg의 IL-10을 구성적으로 발현하는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 43

제42항에 있어서, $CD4^+$ T세포는 10^6개의 $CD4^+$ T세포/mL당 적어도 100 pg, 200 pg, 500 pg, 1 ng, 5 ng, 10 ng 또는 50 ng의 IL-10을 구성적으로 발현하는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 44

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^+$ T세포는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체를 이용한 활성화 후 10^6개의 $CD4^+$ T세포/mL당 적어도 1 ng의 IL-10을 발현하는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 45

제44항에 있어서, $CD4^+$ T세포는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체를 이용한 활성화 후 10^6개의 $CD4^+$ T세포/mL당 적어도 2 ng, 5 ng, 10 ng, 100 ng, 200 ng 또는 500 ng의 IL-10을 발현하는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 46

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^+$ T세포는 변형되지 않은 $CD4^+$ T세포보다 적어도 5배 더 높은 수준으로 IL-10을 발현하는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 47

제46항에 있어서, $CD4^+$ T세포는 변형되지 않은 $CD4^+$ T세포보다 적어도 10배 더 높은 수준으로 IL-10을 발현하는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 48

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절, 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절, 또는 둘 모두가 선별 마커를 인코딩하는 서열을 추가로 포함하는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 49

제48항에 있어서, 선별 마커가 ΔNGFR인, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 50

제49항에 있어서, ΔNGFR이 서열번호 3의 서열을 갖는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 51

제50항에 있어서, 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절이 서열번호 4의 서열을 포함하는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 52

제48항에 있어서, 선별 마커가 EGFR 폴리펩타이드의 절단된 형태인, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 53

제9항, 제10항, 또는 제13항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^+$ T세포는 $CD19^+$ 표적세포에 대해 시험관내 세포독성을 나타낼 수 있는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 54

제9항, 제10항, 또는 제13항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^+$ T세포는 $CD19^+$ 표적세포에 대해 생체내 세포독성을 나타낼 수 있는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 55

제53항 또는 제54항에 있어서, $CD19^+$ 표적세포가 자가항체 생산 B세포인, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 56

제53항 또는 제54항에 있어서, $CD19^+$ 표적세포가 $CD19^+$ 암세포인, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 57

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^+$ T세포는 골수계 표적세포에 대해 시험관내 세포독성을 나타낼 수 있는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 58

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^+$ T세포는 골수계 표적세포에 대해 생체내 세포독성을 나타낼 수 있는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 59

제53항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^+$ T세포는 $CD19^+$ 표적세포와 골수계 표적세포에 대해 세포독성을 나타낼 수 있는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 60

제57항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 골수계 표적세포가 클래스 I MHC, CD13, CD54 및 CD112 중 하나 이상을 발현하는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 61

제53항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, $CD19^+$ 표적세포에 대한 세포독성이 1회 이상의 시험관내 재자극 후에도 유지되는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 62

제53항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 골수계 표적세포에 대한 세포독성이 1회 이상의 시험관내 재자극 후에도 유지되는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 63

제1항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^+$ T세포는 동종이계 $CD4^+$ T세포 증식을 억제할 수 있는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 64

제1항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^+$ T세포는 동종이계 $CD8^+$ T세포 증식을 억제할 수 있는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 65

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^+$ T세포는 동종이계 $CD4^+$ T세포 증식, 동종이계 $CD8^+$ T세포 증식 및 동종이계 PBMC를 억제할 수 있는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 66

제63항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 억제 특성이 1회 이상의 시험관내 재자극 후에도 유지되는, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포.

청구항 67

제1항 내지 제66항 중 어느 한 항의 유전자 변형된 $CD4^+$ 세포를 포함하는 $CD4^+$ T세포 집단.

청구항 68

제67항에 있어서, 유전자 변형 전 $CD4^+$ T세포는 1명, 2명, 3명, 4명, 5명, 6명, 7명, 8명, 9명 또는 10명의 T세포 공여자로부터 얻어 풀링한 것인, $CD4^+$ T세포 집단.

청구항 69

제68항에 있어서, 집단 내 $CD4^+$ T세포가 집합적으로 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개 또는 그 이상의 상이한 HLA 일배체형을 갖는, $CD4^+$ T세포 집단.

청구항 70

제67항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포가 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서 서로 적어도 1/10, 2/10, 3/10, 4/10, 5/10, 6/10, 7/10, 8/10 또는 9/10 일치하는, $CD4^+$ T세포 집단.

청구항 71

제67항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포가 HLA-A, HLA-B, HLA-C 및 HLA-DRB1 유전자좌에서 서로 적어도 1/8, 2/8, 3/8, 4/8, 5/8, 6/8, 7/8 또는 8/8 일치하는, $CD4^+$ T세포 집단.

청구항 72

제67항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포가 HLA-A 유전자좌에서 서로 2/2 일치하는, $CD4^+$ T세포 집단.

청구항 73

제67항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포가 HLA-B 유전자좌에서 서로 2/2 일치하는, $CD4^+$ T세포 집단.

청구항 74

제67항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포가 HLA-C 유전자좌에서 서로 2/2 일치하는, $CD4^+$ T세포 집단.

청구항 75

제67항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포가 HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서 서로 적어도 3/4 또는 4/4 일치하는, $CD4^+$ T세포 집단.

청구항 76

제67항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포가 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서 서로 5/10, 6/10, 7/10, 8/10 또는 9/10 미만으로 일치하는, $CD4^+$ T세포 집단.

청구항 77

제76항에 있어서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포가 HLA-A, HLA-B, HLA-C 및 HLA DRB1 유전자좌에서 서로 4/8, 5/8, 6/8, 7/8 또는 8/8 미만으로 일치하는, $CD4^+$ T세포 집단.

청구항 78

제76항 또는 제77항에 있어서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포가 HLA-A 유전자좌에서 서로 2/2 미만으로 일치하는, $CD4^+$ T세포 집단.

청구항 79

제76항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포가 HLA-B 유전자좌에서 서로 2/2 미만으로 일치하는, $CD4^+$ T세포 집단.

청구항 80

제76항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포가 HLA-C 유전자좌에서 서로 2/2 미만으로 일치하는, $CD4^+$ T세포 집단.

청구항 81

제76항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포가 HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서 서로 2/4, 3/4 또는 4/4 미만으로 일치하는, $CD4^+$ T세포 집단.

청구항 82

제67항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포가 A*02 대립유전자를 갖거나 모두 A*02 음성인, $CD4^+$ T세포 집단.

청구항 83

제67항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포가 A*24 대립유전자를 갖거나 모두 A*24 음성인, $CD4^+$ T세포 집단.

청구항 84

제67항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, $NGFR^+$ 세포 집단 내 $CD4^+$ T세포의 적어도 30%가 CAR을 발현하는, $CD4^+$ T세포 집단.

청구항 85

제84항에 있어서, $NGFR^+$ 세포 집단 내 $CD4^+$ T세포의 적어도 60%가 CAR을 발현하는, $CD4^+$ T세포 집단.

청구항 86

제85항에 있어서, $NGFR^+$ 세포 집단 내 $CD4^+$ T세포의 적어도 90%가 CAR을 발현하는, $CD4^+$ T세포 집단.

청구항 87

제67항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^+$ T세포가 동결된 현탁액 중에 있는, $CD4^+$ T세포 집단.

청구항 88

제67항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^+$ T세포가 액체 현탁액 중에 있는, $CD4^+$ T세포 집단.

청구항 89

제88항에 있어서, 액체 현탁액이 이전에 동결되었던 것인, $CD4^+$ T세포 집단.

청구항 90

제1항 내지 제66항 중 어느 한 항의 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포, 또는 제67항 내지 제89항 중 어느 한 항의 $CD4^+$ T세포 집단을 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 91

유전자 변형된 $CD4^+$ T세포($CD4^{IL-10/CAR}$) 세포를 제조하는 방법으로서,

(a) 1명 이상의 T세포 공여자로부터 1차 $CD4^+$ T세포를 얻는 단계; 및

(b) 하기 (i)과 (ii)를 도입하여 $CD4^+$ T세포를 변형시키는 단계;를 포함하는, 방법:

(i) 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절; 및

(ii) IL-10을 인코딩하는 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절.

청구항 92

제91항에 있어서, 단계 (a)에서, 1차 $CD4^+$ T세포를 2명, 3명, 4명, 5명, 6명, 7명, 8명, 9명 또는 10명의 상이한 T세포 공여자로부터 얻는, 방법.

청구항 93

제92항에 있어서, 단계 (b)로부터의 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포를 풀링하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 94

제91항에 있어서, 단계 (a)에서, 1차 $CD4^+$ T세포가 환자의 자가유래 세포인, 방법.

청구항 95

제91항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (a) 후 및 단계 (b) 전, 또는 단계 (b) 후에,

항-CD3 항체와 항-CD28 항체, 또는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체가 코팅된 비드, 또는 CD3과 CD28을 통해 인간 T세포를 활성화시키고 확장시키는 중합체성 나노매트릭스 시약의 존재 하에서, 또는 다른 T세포 특이적 면역 세포 배양 배지, 활성화제 및 보충제의 존재 하에서 $CD4^+$ T세포를 인큐베이션하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 96

제95항에 있어서, 추가로 IL-2의 존재 하에서 $CD4^+$ T세포를 인큐베이션하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 97

제91항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절, 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절, 또는 둘 모두가 하나 이상의 바이러스 벡터를 사용하여 1차 $CD4^+$ T세포에 도입되는, 방법.

청구항 98

제97항에 있어서, 바이러스 벡터가 렌티바이러스 벡터인, 방법.

청구항 99

제91항 내지 제98항 중 어느 한 항에 있어서, CAR이 자가면역 질환, 염증성 장애 또는 암과 관련된 표적 항원에

특이적인, 방법.

청구항 100

제99항에 있어서, 표적 항원이 자가면역 질환, 염증성 장애 또는 암과 관련이 있는 것인, 방법.

청구항 101

제91항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, CAR이 항-CD19 CAR, 항-CD20 CAR, 항-CD22 CAR, 항-BCMA CAR, 항-B7-H3 CAR, 항-CD27 CAR 또는 항-CD38 CAR인, 방법.

청구항 102

제91항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, CAR이 서열번호 9, 16, 22, 34, 41 내지 49, 또는 54의 서열을 갖는, 방법.

청구항 103

제91항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절이 서열번호 10, 17, 23, 35 또는 55의 서열을 갖는, 방법.

청구항 104

제91항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서, IL-10이 서열번호 1의 서열을 갖는, 방법.

청구항 105

제91항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절이 서열번호 2의 서열을 갖는, 방법.

청구항 106

제91항 내지 제105항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절, 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절, 또는 둘 모두가 선별 마커를 인코딩하는 분절을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 107

제106항에 있어서, 인코딩된 선별 마커가 ΔNGFR인, 방법.

청구항 108

제107항에 있어서, 인코딩된 선별 마커가 서열번호 3의 서열을 갖는, 방법.

청구항 109

제106항에 있어서, 선별 마커가 EGFR 폴리펩타이드의 절단된 형태인, 방법.

청구항 110

제91항 내지 제109항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (b) 후에,

(c) 선별 마커를 발현하는 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포를 단리하여, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포가 농축된 집단을 생성하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 111

제110항에 있어서, 상기 농축된 집단 내 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포의 적어도 30% 또는 적어도 60%가 IL-10과 CAR을 발현하는, 방법.

청구항 112

제111항에 있어서, 상기 농축된 집단 내 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포의 적어도 90%가 IL-10과 CAR을 발현하는, 방

법.

청구항 113

제110항 내지 제112항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 농축된 집단 내 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포의 적어도 75%가 선별 마커를 발현하는, 방법.

청구항 114

제113항에 있어서, 상기 농축된 집단 내 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포의 적어도 90%가 선별 마커를 발현하는, 방법.

청구항 115

제110항 내지 제114항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (c) 후에, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포가 농축된 집단을 인큐베이션하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 116

제115항에 있어서, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포가 농축된 집단을 인큐베이션하는 단계가, CD3과 CD28을 통해 인간 T세포를 활성화시키고 확장시키는 중합체성 나노매트릭스 시약 또는 IL-2의 존재 하에서 (i) 항-CD3 항체와 항-CD28 항체, 또는 (ii) 항-CD3 항체와 항-CD28 항체가 코팅된 비드의 존재 하에서; 또는 (iii) 다른 T세포 특이적 면역 세포 배양 배지, 활성화제 및 보충제의 존재 하에서; 수행되는, 방법.

청구항 117

제91항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포를 동결시키는 후속 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 118

제92항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 2명의 T세포 공여자가 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서 서로 적어도 1/10, 2/10, 3/10, 4/10, 5/10, 6/10, 7/10, 8/10 또는 9/10 일치하는, 방법.

청구항 119

제92항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 2명의 T세포 공여자가 HLA-A, HLA-B, HLA-C 및 HLA-DRB1 유전자좌에서 서로 적어도 1/8, 2/8, 3/8, 4/8, 5/8, 6/8, 7/8 또는 8/8 일치하는, 방법.

청구항 120

제92항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 2명의 T세포 공여자가 HLA-A 유전자좌에서 서로 2/2 일치하는, 방법.

청구항 121

제92항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 2명의 T세포 공여자가 HLA-B 유전자좌에서 서로 2/2 일치하는, 방법.

청구항 122

제92항 내지 제121항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 2명의 T세포 공여자가 HLA-C 유전자좌에서 서로 2/2 일치하는, 방법.

청구항 123

제92항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 2명의 T세포 공여자가 HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에

서 서로 적어도 3/4 또는 4/4 일치하는, 방법.

청구항 124

제92항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 2명의 T세포 공여자가 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서 서로 5/10, 6/10, 7/10, 8/10 또는 9/10 미만으로 일치하는, 방법.

청구항 125

제124항에 있어서, 적어도 2명의 T세포 공여자가 HLA-A, HLA-B, HLA-C 및 HLA DRB1 유전자좌에서 서로 4/8, 5/8, 6/8, 7/8 또는 8/8 미만으로 일치하는, 방법.

청구항 126

제124항 또는 제125항에 있어서, 적어도 2명의 T세포 공여자가 HLA-A 유전자좌에서 서로 2/2 미만으로 일치하는, 방법.

청구항 127

제124항 내지 제126항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 2명의 T세포 공여자가 HLA-B 유전자좌에서 서로 2/2 미만으로 일치하는, 방법.

청구항 128

제124항 내지 제127항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 2명의 T세포 공여자가 HLA-C 유전자좌에서 서로 2/2 미만으로 일치하는, 방법.

청구항 129

제124항 내지 제128항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 2명의 T세포 공여자가 HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서 서로 2/4, 3/4 또는 4/4 미만으로 일치하는, 방법.

청구항 130

제92항 내지 제129항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 2명의 T세포 공여자가 각각 A*02 대립유전자를 갖거나 A*02 음성인, 방법.

청구항 131

제92항 내지 제129항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 2명의 T세포 공여자가 각각 A*24 대립유전자를 갖거나 A*24 음성인, 방법.

청구항 132

제92항 내지 제131항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (a)에서, 1차 $CD4^+$ T세포를 하나 이상의 동결된 스톡에서 얻는, 방법.

청구항 133

제92항 내지 제132항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (a)에서, 1차 $CD4^+$ T세포를 적어도 2명의 상이한 T세포 공여자의 동결되지 않은 말초혈액 단핵 세포로부터 얻는, 방법.

청구항 134

제133항에 있어서, 말초혈액 단핵 세포로부터 $CD4^+$ T세포를 단리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 135

혈액암을 치료하는 방법으로서,

혈액암 환자에게 항암 효과를 유도하기에 충분한 치료적 유효량의 제1항 내지 제66항 중 어느 한 항의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, 제67항 내지 제89항 중 어느 한 항의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 제90항의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 136

제135항에 있어서, $CD4^{IL-10/CAR}$의 투여 전 또는 후에 상기 환자에게 동종 HSCT 이식편을 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 137

악성종양을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법으로서,

상기 환자에게 동종 HSCT 이식편을 투여하는 단계, 및

치료적 유효량의 제1항 내지 제66항 중 어느 한 항의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, 제67항 내지 제89항 중 어느 한 항의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 제90항의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 138

제137항에 있어서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포의 양이 나아가 동종 HSCT의 이식편대백혈병(GvL) 또는 이식편대종양(GvT) 효능을 억제하지 않으면서 이식편대숙주병(GvHD)을 억제하거나 예방하기에 충분한 양인, 방법.

청구항 139

제135항 내지 제138항 중 어느 한 항에 있어서, 악성종양 또는 혈액암이 골수성 백혈병인, 방법.

청구항 140

제135항 내지 제139항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포가 CD13을 발현하는 암세포를 표적으로 삼아 사멸시키는, 방법.

청구항 141

제135항 내지 제140항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포가 HLA-클래스 I을 발현하는 암세포를 표적으로 삼아 사멸시키는, 방법.

청구항 142

제135항 내지 제141항 중 어느 한 항에 있어서, 골수성 백혈병이 급성 골수성 백혈병(AML)인, 방법.

청구항 143

제135항 내지 제138항 중 어느 한 항에 있어서, 악성종양 또는 혈액암이 $CD19^{+}$, $CD20^{+}$, $CD22^{+}$, $BCMA^{+}$, $CD27^{+}$, $CD38^{+}$ 또는 $B7\text{-}H3^{+}$ 혈액암인, 방법.

청구항 144

제143항에 있어서, $CD19^{+}$, $CD20^{+}$, $CD22^{+}$, $BCMA^{+}$, $CD27^{+}$, $CD38^{+}$ 또는 $B7\text{-}H3^{+}$ 혈액암이 만성 림프구성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병(ALL) 및 비호지킨 림프종에서 선택되는, 방법.

청구항 145

제136항 내지 제144항 중 어느 한 항에 있어서, 동종 HSCT 이식편을 환자와 관련이 있거나 관련이 없는 공여자로부터 얻는, 방법.

청구항 146

제135항 내지 제144항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포가 환자의 자가유래가 아닌 세포인, 방법.

청구항 147

제135항 내지 제144항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포가 환자의 자가유래 세포인, 방법.

청구항 148

제135항 내지 제144항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포가 환자의 동종이계 세포인, 방법.

청구항 149

제135항 내지 제144항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포가 환자에게의 투여 전 숙주 동종항원에 대해 면역결핍화된(anergized) 것이 아닌, 방법.

청구항 150

제135항 내지 제144항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포가 Tr1 유사 세포인, 방법.

청구항 151

제135항 내지 제144항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포가 다클론성인, 방법.

청구항 152

제135항 내지 제144항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포가 다클론성이며 환자의 자가유래가 아닌 세포인, 방법.

청구항 153

제135항 내지 제144항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포가 다클론성이며 환자의 자가유래 세포인, 방법.

청구항 154

제135항 내지 제144항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포가 유전자 변형되기 전 적어도 2명의 공여자로부터 단리된 것인, 방법.

청구항 155

제154항에 있어서, 적어도 2명의 공여자 중 누구도 동종 HSCT 공여자와 동일한 공여자가 아닌, 방법.

청구항 156

제135항 내지 제155항 중 어느 한 항에 있어서, 동종 HSCT 이식편을 환자와 일치하거나 일치하지 않는 공여자로부터 얻는, 방법.

청구항 157

제135항 내지 제156항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포가 CD19, CD20 또는 BCMA를 발현하는 세포를 표적으로 삼아 사멸시키는, 방법.

청구항 158

제135항 내지 제157항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포가 CD54를 발현하는 세포를 표적으로 삼아 사멸시키는, 방법.

청구항 159

제135항 내지 제158항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포가 HLA-클래스 I과 CD54를 발현하는 암세포를 표적으로 삼아 사멸시키는, 방법.

청구항 160

제135항 내지 제159항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포가 CD112와 CD155를 발현하는 암세포를 표적으로 삼아 사멸시키는, 방법.

청구항 161

제135항 내지 제160항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포가 CD58을 발현하는 암세포를 표적으로 삼아 사멸시키는, 방법.

청구항 162

제135항 내지 제161항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포가 환자의 암세포를 표적으로 삼아 사멸시키는, 방법.

청구항 163

제135항 내지 제162항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포가 환자의 고형 종양 세포를 표적으로 삼아 사멸시키는, 방법.

청구항 164

제136항 내지 제163항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포가 동종이계 $CD4^+$ T세포 증식을 억제하는, 방법.

청구항 165

제135항 내지 제164항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포가 동종이계 $CD8^+$ T세포 증식을 억제하는, 방법.

청구항 166

제136항 내지 제163항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포가 동종이계 $CD4^+$ T세포 증식, 동종이계 $CD8^+$ T세포 증식, 및 PBMC를 억제하는, 방법.

청구항 167

동종이계 조혈 줄기세포 이식(동종 HSCT)을 통해 혈액암을 치료하는 방법으로서,

환자에게 동종 HSCT 이식편을 투여하는 단계; 및

상기 환자에게 일정량의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포를 투여하는 단계로서, 여기서 선택적으로 상기 양은 동종 HSCT 이식편의 이식편대백혈병(GvL) 또는 이식편대종양(GvT) 효능을 억제하지 않으면서 이식편대숙주병(GvHD)을 억제하거나 예방하기에 충분한 양인 단계;를 포함하고,

여기서 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 구성적 또는 유도성 프로모터의 제어 하에 있는 인간 IL-10의 코딩 서열의 벡터 매개 유전자 전달과, 구성적 또는 유도성 프로모터의 제어 하에 있는 CAR의 코딩 서열의 벡터 매개 유전자 전달을 통해 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포를 포함하고;

여기서 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 환자의 암세포를 표적으로 삼아 사멸시키고;

여기서 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 환자에게의 투여 전 숙주 동종항원에 대해 면역결핍화된 것이 아니고; 및

여기서 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 환자의 자가유래가 아닌 세포이며, Tr1 유사 세포인, 방법.

청구항 168

동종이계 조혈 줄기세포 이식(동종 HSCT)을 통해 혈액암을 치료하는 방법으로서,

환자에게 동종 HSCT 이식편을 투여하는 단계; 및

상기 환자에게 일정량의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포를 투여하는 단계로서, 여기서 선택적으로 상기 양은 동종 HSCT 이식편의 이식편대백혈병(GvL) 또는 이식편대종양(GvT) 효능을 억제하지 않으면서 이식편대숙주병(GvHD)을 억제하거나 예방하기에 충분한 양인 단계;를 포함하고,

여기서 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 구성적 또는 유도성 프로모터의 제어 하에 있는 인간 IL-10의 코딩 서열의 벡터 매개 유전자 전달과, 구성적 또는 유도성 프로모터의 제어 하에 있는 CAR의 코딩 서열의 벡터 매개 유전자 전달을 통해 유전자 변형된 $CD4^{+}$ T세포를 포함하고;

여기서 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 환자의 암세포를 표적으로 삼아 사멸시키고;

여기서 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 환자에게의 투여 전 숙주 동종항원에 대해 면역결핍화된 것이 아니고; 및

여기서 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 환자의 자가유래 세포이며, Tr1 유사 세포인, 방법.

청구항 169

환자에서 $CD19^{+}$, $CD20^{+}$, $CD22^{+}$, $BCMA^{+}$, $CD27^{+}$, $CD38^{+}$ 또는 $B7\text{-}H3^{+}$ 혈액암의 재발을 예방하는 방법으로서,

$CD19^{+}$, $CD20^{+}$, $CD22^{+}$, $BCMA^{+}$, $CD27^{+}$, $CD38^{+}$ 또는 $B7\text{-}H3^{+}$ 혈액암이 재발할 위험이 있는 것으로 식별된 환자에게, 항암 효과를 유도하기에 충분한 치료적 유효량의 제1항 내지 제66항 중 어느 한 항의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, 제67항 내지 제89항 중 어느 한 항의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 제90항의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 170

환자에서 $B7\text{-}H3^{+}$ 암의 재발을 예방하는 방법으로서,

$B7\text{-}H3^{+}$ 암을 앓고 있는 것으로 식별된 환자에게, 항암 효과를 유도하기에 충분한 치료적 유효량의 제1항 내지 제66항 중 어느 한 항의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, 제67항 내지 제89항 중 어느 한 항의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 제90항의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 171

제170항에 있어서, $B7\text{-}H3^{+}$ 암이 고형 종양인, 방법.

청구항 172

제171항에 있어서, 고형 종양이 유방암, 뇌암, 폐암, 간암, 위암, 비장암, 결장암, 직장암, 췌장암, 전립선암, 자궁암, 피부암, 두부암, 경부암, 육종, 신경모세포종 및 난소암으로 이루어지는 군에서 선택되는, 방법.

청구항 173

최소 잔류 질환이 있는 암 환자를 치료하는 방법으로서,

최소 잔류 질환이 있거나 최소 잔류 질환이 있을 수 있는 위험이 있는 것으로 식별된 환자에게, 항암 효과를 유도하기에 충분한 치료적 유효량의 제1항 내지 제66항 중 어느 한 항의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, 제67항 내지 제89항 중 어느 한 항의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 제90항의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 174

환자를 치료하는 방법으로서,

면역 관용화가 필요한 환자에게, 치료적 유효량의 제1항 내지 제66항 중 어느 한 항의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, 제67항 내지 제89항 중 어느 한 항의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 제90항의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 175

제174항에 있어서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단의 동결된 현탁액을 해동시키는 사전 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 176

제174항 또는 제175항에 있어서, 환자가 염증성 또는 자가면역 질환을 앓고 있는, 방법.

청구항 177

제176항에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환이 1형 당뇨병, 자가면역 포도막염, 자가면역 간염, 류마티스 관절염, 건선, 건선성 관절염, 백반증, 원형탈모증, 다발성 경화증, 전신 루푸스, 염증성 장질환, 애디슨병, 그레이브스병, 쇼그렌 증후군, 하시모토 갑상선염, 중증 근무력증, 자가면역 혈관염, 악성 빈혈, 궤양성 대장염, 수포성 질환, 피부경화증 및 셀리악병으로 이루어지는 군에서 선택되는, 방법.

청구항 178

제177항에 있어서, 염증성 또는 자가면역 질환이 크론병, 궤양성 대장염, 셀리악병, 1형 당뇨병, 루푸스, 건선, 건선성 관절염, 강직성 척추염 또는 류마티스 관절염인, 방법.

청구항 179

제174항에 있어서, 환자가 NLPR3 인플라마솜(inflammasome)의 과활성과 관련된 질환 또는 장애를 앓고 있는, 방법.

청구항 180

제174항에 있어서, 환자가 2형 당뇨병, 신경변성 질환, 심혈관 질환 또는 염증성 장질환을 앓고 있는, 방법.

청구항 181

제174항에 있어서, 환자가 활성화된 단핵구, 대식세포 또는 수지상세포에 의한 IL-1β의 생산 증가와 관련된 질환 또는 장애를 앓고 있는, 방법.

청구항 182

제174항에 있어서, 환자가 활성화된 단핵구, 대식세포 또는 수지상세포에 의한 IL-18의 생산 증가와 관련된 질환 또는 장애를 앓고 있는, 방법.

청구항 183

제174항에 있어서, 환자가 활성화된 단핵구, 대식세포 또는 수지상세포에 의한 성숙 카스파아제 1의 생산 증가와 관련된 질환 또는 장애를 앓고 있는, 방법.

청구항 184

제174항에 있어서, 환자가 알레르기 또는 아토피 질환을 앓고 있는, 방법.

청구항 185

제184항에 있어서, 알레르기 또는 아토피 질환이 천식, 아토피 피부염 및 비염으로 이루어지는 군에서 선택되는, 방법.

청구항 186

제174항에 있어서, 환자가 식품 알레르기가 있는, 방법.

청구항 187

제174항에 있어서, 환자가 고형 종양이 있는, 방법.

청구항 188

제187항에 있어서, 고형 종양이 유방암, 뇌암, 폐암, 간암, 위암, 비장암, 결장암, 직장암, 췌장암, 전립선암, 자궁암, 피부암, 두부암, 경부암, 육종, 신경모세포종 및 난소암으로 이루어지는 군에서 선택되는, 방법.

청구항 189

제174항에 있어서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단 또는 약제학적 조성물의 투여 전 또는 후에, 상기 환자에게 기관을 이식하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 190

제189항에 있어서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단 또는 약제학적 조성물이 기관 이식의 숙주 거부반응을 예방하거나 이의 중증도를 감소시키는, 방법.

청구항 191

제174항에 있어서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단 또는 약제학적 조성물의 투여 전 또는 후에, 상기 환자에게 iPS 세포 유래 세포 또는 조직을 이식하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 192

제191항에 있어서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단 또는 약제학적 조성물이 세포 이식의 숙주 거부반응을 예방하거나 이의 중증도를 감소시키는, 방법.

청구항 193

제174항에 있어서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단 또는 약제학적 조성물의 투여 전 또는 후에, 상기 환자에게 재조합 AAV를 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 194

제193항에 있어서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단 또는 약제학적 조성물이 재조합 AAV에 대한 면역 반응을 감소시키는, 방법.

청구항 195

제174항에 있어서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단 또는 약제학적 조성물의 투여 전 또는 후에, 상기 환자에게 AAV 이외의 재조합 바이러스 벡터를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 196

제195항에 있어서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단 또는 약제학적 조성물이 AAV 이외의 재조합 바이러스 벡터에 대한 면역 반응을 감소시키는, 방법.

청구항 197

제196항에 있어서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단 또는 약제학적 조성물의 투여 전 또는 후에, 상기 환자에게 면역원성 치료 단백질을 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 198

제197항에 있어서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단 또는 약제학적 조성물이 면역원성 치료 단백질에 대한 면역 반응을 감소시키는, 방법.

청구항 199

제197항 또는 제198항에 있어서, 면역원성 치료 단백질이 치료용 항체, 인자 VIII 대체, 사이토카인 및 사이토카인 뮤테인에서 선택되는, 방법.

청구항 200

제174항에 있어서, 환자가 바이러스 또는 박테리아 감염에 대해 과도한 면역 반응을 나타내는, 방법.

청구항 201

제200항에 있어서, 환자가 코로나바이러스 감염을 앓고 있는, 방법.

청구항 202

제174항에 있어서, 환자에서 얻은 생물학적 샘플에서 선별 마커를 검출하여, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포의 존재 또는 부재를 검출하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 203

제202항에 있어서, 생물학적 샘플이 환자의 생검 또는 혈액인, 방법.

청구항 204

환자에서 자가면역 질환, 알레르기 질환 또는 염증성 질환을 치료하거나 저해하는 방법으로서,

자가면역 질환, 알레르기 질환 또는 염증성 질환을 앓고 있는 것으로 식별된 환자에게, 자가면역 질환, 알레르기 질환 또는 염증성 질환을 치료하거나 저해하기에 충분한 치료적 유효량의 제1항 내지 제66항 중 어느 한 항의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, 제67항 내지 제89항 중 어느 한 항의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 제90항의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 205

조혈 줄기세포, 골수 세포, 제대혈 세포, 조직 줄기세포 또는 고형 기관을 이식받은 환자에서 이식 거부반응을 감소시키는 방법으로서,

이식된 조혈 줄기세포, 골수 세포 또는 고형 기관의 거부반응이 있는 것으로 식별된 환자에게, 이식 거부반응을 감소시키기에 충분한 치료적 유효량의 제1항 내지 제66항 중 어느 한 항의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, 제67항 내지 제89항 중 어느 한 항의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 제90항의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 206

환자에서 이식편대숙주병(GvHD)을 치료하는 방법으로서,

이식편대숙주병(GvHD)을 앓고 있거나 이식편대숙주병(GvHD)을 앓게 될 위험이 있는 것으로 식별된 환자에게, GvHD를 억제하거나 예방하기에 충분한 치료적 유효량의 제1항 내지 제66항 중 어느 한 항의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, 제67항 내지 제89항 중 어느 한 항의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 제90항의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 207

제206항에 있어서, 이식편대숙주병(GvHD)이 급성 GvHD를 포함하는, 방법.

청구항 208

제206항에 있어서, 이식편대숙주병(GvHD)이 만성 GvHD를 포함하는, 방법.

청구항 209

환자에서 조직 또는 기관 손상을 치료하는 방법으로서,

조직 또는 기관 손상을 갖고 있거나 조직 또는 기관 손상을 갖게 될 위험이 있는 것으로 식별된 환자에게, 조직 또는 기관 손상의 복구를 유도하기 충분한 치료적 유효량의 제1항 내지 제66항 중 어느 한 항의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, 제67항 내지 제89항 중 어느 한 항의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 제90항의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 210

폴리뉴클레오타이드 작제물로서,

(a) 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 제1 폴리뉴클레오타이드 분절; 및

(b) 인터류킨-10(IL-10)을 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오타이드 분절;을 포함하는, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 211

제210항에 있어서, 제1 폴리뉴클레오타이드 분절이 CAR의 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 제1 조절 요소를 포함하는, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 212

제211항에 있어서, 제1 조절 요소가 CAR의 구성적 발현을 유도하는, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 213

제210항 내지 제212항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 폴리뉴클레오타이드 분절이 IL-10의 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 제2 조절 요소를 포함하는, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 214

제213항에 있어서, 제2 조절 요소가 IL-10의 구성적 발현을 유도하는, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 215

제210항 내지 제214항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 폴리뉴클레오타이드 분절과 제2 폴리뉴클레오타이드 분절 사이에 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 또는 자가 절단 펩타이드를 추가로 포함하는, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 216

제215항에 있어서, 자가 절단 펩타이드가 F2A, P2A, T2A 및 E2A로 이루어지는 군에서 선택되는, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 217

제210항 내지 제216항 중 어느 한 항에 있어서, CAR이 항원 결합 도메인, 힌지 영역, 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하는, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 218

제217항에 있어서, 항원 결합 도메인이 단일 사슬 항체 단편을 포함하는, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 219

제218항에 있어서, 단일 사슬 항체 단편이 단일 사슬 Fv(scFv)를 포함하는, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 220

제210항 내지 제219항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 도메인이 자가면역 질환, 염증성 장애 또는 암과 관련된 항원을 표적으로 하는, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 221

제220항에 있어서, 항원이 CD19, CD20, CD22, BCMA, CD27, CD38, CEA, B7-H3, CD23, Lym1, Lym2, CLEC5A, CDH179b, FLT3, GCC, Muc, CSF2RA, GFRα4, CD32, CD33, IL11Rα, IL13Rα, NYBR1, SLea, CD200R, TGFβR2, CD276, TROP2, LAMP1, PTK7, DLL3, CDH1, CDH6, CDH17, CDH19, TSHR, 티로시나아제, HLA-A*02, HLA-A*24 시트룰린화된 펩타이드, 인슐린, MOG, GAD65, IA2, 글리아딘, 및 데스모글레인으로 이루어지는 군에서 선택되는, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 222

제210항 내지 제221항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 도메인이 항-CD19 항원 결합 도메인인, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 223

제222항에 있어서, 항-CD19 항원 결합 도메인이 서열번호 11의 서열을 갖는, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 224

제210항 내지 제221항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 도메인이 항-BCMA 항원 결합 도메인인, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 225

제224항에 있어서, 항-BCMA 항원 결합 도메인이 서열번호 50 내지 53 중 어느 한 서열을 갖는, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 226

제210항 내지 제225항 중 어느 한 항에 있어서, 힌지 영역이 인간 CD8α 힌지 영역, 인간 CD28 힌지 영역, IgG1 힌지 영역 또는 IgG4 힌지 영역에서 선택되는, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 227

제226항에 있어서, 힌지 영역이 인간 CD8α에서 유도된 것인, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 228

제210항 내지 제227항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 TNFRSF19 막관통 도메인, CD3제타 막관통 도메인, CD8α 막관통 도메인, CD4 막관통 도메인, CD28 막관통 도메인 또는 B7 패밀리 유도성 공동자극(ICOS) 막관통 도메인에서 선택되는, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 229

제228항에 있어서, 막관통 도메인이 CD8α에서 유도된 것인, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 230

제210항 내지 제229항 중 어느 한 항에 있어서, CAR이 하나 이상의 공동자극 도메인을 추가로 포함하는, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 231

제230항에 있어서, CAR이 2개의 공동자극 도메인을 포함하는, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 232

제210항 내지 제231항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 공동자극 도메인이 4-1BB, CD28, OX40, ICOS, CD27, MYD88-CD40 및 KIR2DS2로 이루어지는 군에서 선택되는, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 233

제232항에 있어서, 하나 이상의 공동자극 도메인 중 하나가 CD28에서 유도된 것인, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 234

제231항 내지 제233항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 공동자극 도메인이 4-1BB에서 유도된 것인, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 235

제210항 내지 제234항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인이 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM)를 포함하는, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 236

제210항 내지 제235항 중 어느 한 항에 있어서, 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM)가 CD3제타에서 유도된 것인, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 237

제210항 내지 제236항 중 어느 한 항에 있어서, CAR이,

항-CD19 항원 결합 도메인, 항-BCMA 항원 결합 도메인 또는 항-CD20 항원-결합;

인간 CD8 힌지 영역;

CD8 막관통 영역;

CD28 공동자극 도메인; 및

CD3제타 사슬 세포내 신호전달 도메인;을 포함하는, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 238

제210항 내지 제237항 중 어느 한 항에 있어서, CAR이 서열번호 9, 16, 22, 34, 41 내지 49, 또는 54의 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 239

제238항에 있어서, 제1 폴리뉴클레오타이드 분절이 서열번호 10, 17, 23, 35 또는 55의 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 240

제210항 내지 제239항 중 어느 한 항에 있어서, IL-10이 인간 IL-10인, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 241

제210항 내지 제239항 중 어느 한 항에 있어서, IL-10이 바이러스 IL-10인, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 242

제210항 내지 제239항 중 어느 한 항에 있어서, IL-10이 서열번호 1의 서열을 갖는 단백질인, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 243

제242항에 있어서, 제2 폴리뉴클레오타이드 분절이 서열번호 2의 서열을 갖는, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 244

제210항 내지 제243항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 폴리뉴클레오타이드 분절 또는 제2 폴리뉴클레오타이드 분절이 선별 마커를 인코딩하는 서열을 추가로 포함하는, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 245

제244항에 있어서, 선별 마커가 ΔNGFR인, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 246

제245항에 있어서, ΔNGFR이 서열번호 3의 서열을 갖는, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 247

제245항에 있어서, 서열번호 4의 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 248

제244항 내지 제247항 중 어느 한 항에 있어서, 선별 마커가 EGFR 폴리펩타이드의 절단된 형태인, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 249

제210항 내지 제248항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터인 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 250

제249항에 있어서, 벡터가 바이러스 벡터인, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 251

제250항에 있어서, 벡터가 렌티바이러스 벡터인, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 252

폴리뉴클레오타이드 작제물로서,

(a) 서열번호 10, 17, 23, 35 또는 55의 서열을 갖는 제1 폴리뉴클레오타이드 분절; 및

(b) 서열번호 2의 서열을 갖는 제2 폴리뉴클레오타이드 분절;을 포함하는, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 253

폴리뉴클레오타이드 작제물로서,

(a) 서열번호 10, 17, 23, 35 또는 55의 서열을 갖는 제1 폴리뉴클레오타이드 분절;

(b) 서열번호 2의 서열을 갖는 제2 폴리뉴클레오타이드 분절; 및

(c) 제1 폴리뉴클레오타이드 분절과 제2 폴리뉴클레오타이드 분절 사이에 서열번호 33의 서열을 갖는 제3 폴리뉴클레오타이드 분절;을 포함하는, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

청구항 254

폴리뉴클레오타이드 작제물로서,

(a) 서열번호 10, 17, 23, 35 또는 55의 서열을 갖는 제1 폴리뉴클레오타이드 분절;

(b) 서열번호 2의 서열을 갖는 제2 폴리뉴클레오타이드 분절;

(c) 제1 폴리뉴클레오타이드 분절과 제2 폴리뉴클레오타이드 분절 사이에 서열번호 27의 서열을 갖는 제3 폴리뉴클레오타이드 분절; 및

(d) 서열번호 4의 서열을 갖는 제4 폴리뉴클레오타이드 분절;을 포함하는, 폴리뉴클레오타이드 작제물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원의 교차 참조

[0002] 본 출원은 2021년 12월 30일자 출원된 미국 임시 출원 제63/295,491호의 우선권을 주장하며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 인용된다.

[0003] 서열목록

[0004] 본 출원은 XML 형식으로 제출된 서열목록을 포함하며, 이러한 서열목록은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다. 2022년 12월 24일자 생성된 상기 XML 사본의 명칭은 37104-50735-Sequence-Listing.xml이고, 크기는 95.2 킬로바이트(KB)이다.

배 경 기 술

[0005] 조절 T세포는 자가 항원과 비(non)-병원성 항원에 대한 면역학적 내성을 유지하고 면역 항상성을 유지하는 작지만 중요한 T세포 서브세트에 속한다. 조절 T세포에는 두 가지 주요 집단, 즉, $CD4^+$ $FOXP3^+$ $CD25^+$ T세포($FOXP3^+$ 세포)와 1형 조절 T세포(Tr1 세포)가 있다. $FOXP3^+$ 세포와 Tr1 세포는 모두 기관(organ) 및 췌도 이식, 이식편대숙주병(GvHD), 및 다양한 자가면역 및 염증성 질환의 다양한 전임상 모델에서 병원성 T세포 반응을 하향조절한다.

[0006] Tr1 세포는 임상 연구에서 효과적인 것으로 확인되었다. 진행 중인 중등도 내지 중증 크론병 환자에게 클로닝되고 항원 특이적인 자가유래 Tr1 세포를 투여한 경우, 객관적이고 일시적인 관해가 나타났다(문헌[Desreumaux et al., *Gastroenterology*. 2012;143(5):1207-1217.e2.]). 또한, 동종이계 조혈 줄기세포 이식(allogeneic hematopoietic stem cell transplantation; allo-HSCT; 동종 HSCT) 후 백혈병 환자에게 동종 특이적 Tr1 세포가 농축된 공여자 유래 $CD4^+$ T세포 집단을 입양 전달(adoptive transfer)한 경우, 중증 GvHD 없이, 면역계가 신속하게 재구성되며 미생물 및 바이러스 감염에 대한 보호 효과가 나타났다. 반응이 있는 환자에서는, 치유로 이어지는 장기(long term) 관해와 내성(7년 이상)이 달성되었다(문헌[Bacchetta et al., *Front Immunol.* 2014;5:16]).

[0007] 이러한 고무적인 결과에도 불구하고, 충족되지 않은 의학적 요구가 높은 환자를 위한 대규모 요법을 위해 공여자 유래 또는 자가유래 Tr1 세포를 생산하는 것은 항상 실현 가능한 것이 아니며, 매우 번거롭고, 순수한 Tr1 세포를 대량으로 생성하는 것이 가능하지 않다.

[0008] 최근에, 라카파로(Locafaro)와 동료들은, 단일 공여자 유래의 정제된 $CD4^+$ T세포에 인간 IL-10 유전자를 함유하는 양방향성 렌티바이러스 벡터를 형질도입하는 방식으로 이러한 문제 중 일부를 회피하였다. 생성된 단일 공여자 $CD4^{IL-10}$ 집단은 자연 발생 Tr1 세포의 주요 기능을 공유하고 있었다. Tr1 세포와 마찬가지로, 단일 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포는 IL-10을 높은 수준으로 생산하고, 동종이계 $CD4^+$ T세포와 동종이계 $CD8^+$ T세포 둘 모두의 증식을 하향조절한다. 또한, 이는 정상 골수계 세포(항원제시세포, APC 포함)와 골수성 백혈병 세포 둘 모두에 대해 직접적으로 세포독성을 나타낸다. 인간화 이종이식편대숙주병(GvHD) 모델에서, 이러한 단일 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포는 이식편대백혈병(GvL) 활성을 유지하면서 GvHD를 감소시키는 데 효과적인 것으로 나타났다. 문헌[Locafaro et al. Mol Ther. 2017;25(10):2254-2269] 및 국제공개 WO 2016/146,542호를 참조한다.

[0009] $CD4^{IL-10}$ 세포의 세포독성 능력을 비(non)-골수계 세포로 재지향시키면서, 동시에 이러한 세포의 면역 억제 활성과 면역 항상성 유지 활성을 보존하는 수단이 필요하다.

발명의 내용

[0010] 본 개시내용은 외인성 IL-10과 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor; CAR) 둘 모두를 발현하도록 조작된 새로운 유형의 면역 세포인 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포를 제공한다. 본 발명자들은, IL-10에 더한 CAR의 발현이 이러한 Tr1 유사 세포의 세포독성 특성을 골수계 표적 이외의 치료적으로 유용한 표적으로 재지향시키면서, 놀랍게

도 세포의 면역 조절 특성은 온전하게 유지한다는 것을 발견하였다. CAR이 이러한 Tr1 유사 세포의 세포독성 특성을 골수계 세포 이외의 치료적으로 유용한 표적으로 지향시키면서 세포의 면역 조절 특성은 온전하게 유지하는 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포를 사용한 치료 방법, 치료를 위한 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포의 용도, 및 다양한 장애를 치료하기 위한 약제의 제조에서의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포의 용도가 또한 기재되어 있다.

[0011] 본 개시내용은 (a) 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절, 및 (b) 인터류킨-10(IL-10)을 인코딩하는 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절을 포함하는 유전자 변형된 $CD4^{+}$ T세포($CD4^{IL-10/CAR}$)를 제공한다.

[0012] 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 CAR의 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 조절 요소를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조절 요소는 CAR의 구성적 발현을 유도한다.

[0013] 일부 실시형태에서, CAR은 항원 결합 도메인, 힌지 영역, 막관통 도메인, 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.

[0014] 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 단일 사슬 항체 단편을 포함한다. 일부 실시형태에서, 단일 사슬 항체 단편은 단일 사슬 Fv(single chain Fv; scFv)를 포함한다.

[0015] 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 자가면역 질환, 염증성 장애 또는 암과 관련된 항원을 표적으로 한다.

[0016] 일부 실시형태에서, 항원은 관련 MHC 분자의 맥락에서 CD19, CD20, CD22, BCMA, CD27, CD38, B7-H3, CD23, Lym1, Lym2, CLEC5A, CDH179b, FLT3, GCC, Muc, CSF2RA, GFRα4, CD32, CD33, CEA, IL11Rα, IL13Rα, NYBR1, SLea, CD200R, TGFβR2, CD276, TROP2, LAMP1, PTK7, DLL3, CDH1, CDH6, CDH17, CDH19, TSHR, 티로시나아제, HLA-A*02, HLA-A*24 또는 시트룰린화된 펩타이드, 인슐린, MOG, GAD65, IA2, 글리아딘(gliadin), 및 데스모글레인(desmoglein)으로 이루어지는 군에서 선택된다.

[0017] 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 항-CD19 항원 결합 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD19 항원 결합 도메인은 서열번호 11의 서열을 포함한다.

[0018] 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 항-CD20 항원 결합 도메인이다. 일부 실시형태에서, 항-CD20 항원 결합 도메인은 서열번호 18의 서열을 포함한다.

[0019] 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 항-BCMA 항원 결합 도메인이다. 일부 실시형태에서, 항-BCMA 항원 결합 도메인은 서열번호 50 내지 53의 서열을 포함한다.

[0020] 일부 실시형태에서, 힌지 영역은 인간 CD8 힌지 영역, 인간 CD28 힌지 영역, IgG1 힌지 영역 또는 IgG4 힌지 영역에서 선택된다. 일부 실시형태에서, 힌지 영역은 인간 CD8에서 유도된다.

[0021] 일부 실시형태에서, 막관통 도메인은 TNFRSF19 막관통 도메인, CD3제타 막관통 도메인, CD8α 막관통 도메인, CD4 막관통 도메인, CD28 막관통 도메인, 또는 B7 패밀리 유도성 공동자극(inducible costimulatory; ICOS) 막관통 도메인에서 선택된다. 일부 실시형태에서, 막관통 도메인은 CD8α 막관통 도메인에서 유도된다.

[0022] 일부 실시형태에서, CAR은 하나 이상의 공동자극 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, CAR은 2개의 공동자극 도메인을 포함한다.

[0023] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 공동자극 도메인은 4-1BB, CD28, OX40, ICOS, CD27, MYD88-CD40 및 KIR2DS2로 이루어지는 군에서 선택된다.

[0024] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 공동자극 도메인 중 하나는 CD28에서 유도된다.

[0025] 일부 실시형태에서, 제2 공동자극 도메인은 4-1BB에서 유도된다.

[0026] 일부 실시형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM)는 CD3제타에서 유도된다.

[0027] 일부 실시형태에서, CAR은 항-CD19 항원 결합 도메인, 항-BCMA 항원 결합 도메인 또는 항-CD20 항원 결합 도메인; 인간 CD8 힌지 영역; TNFRSF19 막관통 영역; 4-1BB 공동자극 도메인; 및 CD3제타 사슬 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CAR은 항-CD19 항원 결합 도메인, 항-BCMA 항원 결합 도메인 또는 항-CD20 항원 결합 도메인; 인간 CD8 힌지 영역; CD8α 막관통 영역; 4-1BB 공동자극 도메인; 및 CD3제타 사슬 세

포내 신호전달 도메인을 포함한다.

[0028] 일부 실시형태에서, CAR은 서열번호 9, 16, 22, 34, 41 내지 49, 또는 54의 서열을 포함한다.

[0029] 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 서열번호 10, 17, 23, 35 또는 55의 서열을 포함한다.

[0030] 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 T세포 핵 게놈에 삽입된다.

[0031] 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 T세포 핵 게놈에 삽입되지 않는다.

[0032] 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 벡터 내에 있다.

[0033] 일부 실시형태에서, 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 IL-10의 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 조절 요소를 포함한다. 일부 실시형태에서, IL-10은 인간 IL-10이다. 일부 실시형태에서, IL-10은 바이러스 IL-10이다.

[0034] 일부 실시형태에서, IL-10은 서열번호 1의 서열을 갖는 단백질이다. 일부 실시형태에서, 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 서열번호 2의 서열을 포함한다.

[0035] 일부 실시형태에서, 조절 요소는 IL-10의 구성적 발현을 유도한다.

[0036] 일부 실시형태에서, 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 T세포 핵 게놈에 삽입된다.

[0037] 일부 실시형태에서, 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 T세포 핵 게놈에 삽입되지 않는다.

[0038] 일부 실시형태에서, 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 벡터 내에 있다.

[0039] 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절과 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 동일한 벡터 내에 있다. 일부 실시형태에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 실시형태에서, 벡터는 렌티바이러스 벡터이다.

[0040] 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 배양 배지 1 mL 중 10^6개의 $CD4^+$ T세포당 적어도 100 pg의 IL-10을 구성적으로 발현한다.

[0041] 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 10^6개의 $CD4^+$ T세포/mL당 적어도 100 pg, 200 pg, 500 pg, 1 ng, 5 ng, 10 ng 또는 50 ng의 IL-10을 구성적으로 발현한다.

[0042] 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체를 이용한 활성화 후 10^6개의 $CD4^+$ T세포/mL당 적어도 1 ng의 IL-10을 발현한다.

[0043] 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체를 이용한 활성화 후 10^6개의 $CD4^+$ T세포/mL당 적어도 2 ng, 5 ng, 10 ng, 100 ng, 200 ng 또는 500 ng의 IL-10을 발현한다.

[0044] 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 변형되지 않은 $CD4^+$ T세포보다 적어도 5배 더 높은 수준으로 IL-10을 발현한다. 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 변형되지 않은 $CD4^+$ T세포보다 적어도 10배 더 높은 수준으로 IL-10을 발현한다.

[0045] 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 10^6개의 $CD4^+$ T세포/mL당 적어도 100 pg의 IL-5를 발현한다. 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 10^6개의 $CD4^+$ T세포/mL당 적어도 100 pg, 200 pg, 500 pg, 1 ng, 5 ng, 10 ng 또는 50 ng의 IL-5를 발현한다.

[0046] 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체를 이용한 활성화 후 10^6개의 $CD4^+$ T세포/mL당 적어도 1 ng의 IL-5를 발현한다.

[0047] 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체를 이용한 활성화 후 10^6개의 $CD4^+$ T세포/mL당 적어도 2 ng, 5 ng, 10 ng, 100 ng, 200 ng 또는 500 ng의 IL-5를 발현한다.

[0048] 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 10^6개의 $CD4^+$ T세포/mL당 적어도 100 pg의 IFN-γ를 발현한다.

[0049] 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 10^6개의 $CD4^+$ T세포/mL당 적어도 100 pg, 200 pg, 500 pg, 1 ng, 5 ng, 10 ng

또는 50 ng의 IFN-γ를 발현한다.

[0050] 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체를 이용한 활성화 후 10^6개의 $CD4^+$ T세포/mL당 적어도 1 ng의 IFN-γ를 발현한다.

[0051] 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체를 이용한 활성화 후 10^6개의 $CD4^+$ T세포/mL당 적어도 2 ng, 5 ng, 10 ng, 100 ng, 200 ng 또는 500 ng의 IFN-γ를 발현한다.

[0052] 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 10^6개의 $CD4^+$ T세포/mL당 적어도 25 pg의 IL-4를 발현한다.

[0053] 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 10^6개의 $CD4^+$ T세포/mL당 적어도 25 pg, 50 pg, 75 pg, 100 pg, 200 pg, 500 pg, 1 ng, 5 ng, 10 ng 또는 50 ng의 IL-4를 발현한다.

[0054] 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체를 이용한 활성화 후 10^6개의 $CD4^+$ T세포/mL당 적어도 100 pg의 IL-4를 발현한다.

[0055] 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체를 이용한 활성화 후 10^6개의 $CD4^+$ T세포/mL당 적어도 100 pg, 200 pg, 300 pg, 400 pg, 500 pg, 600 pg, 700 pg, 800 pg, 900 pg, 1000 pg, 2 ng, 5 ng, 10 ng, 100 ng, 200 ng 또는 500 ng의 IL-4를 발현한다.

[0056] 일부 실시형태에서, IL-10, IL-4, IFN-γ 및 IL-5 중 하나 이상의 발현은 1회 이상의 재자극 후에도 안정하다.

[0057] 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절 또는 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 선별 마커를 인코딩하는 서열을 추가로 포함한다.

[0058] 일부 실시형태에서, 선별 마커는 ΔNGFR이다. 일부 실시형태에서, ΔNGFR은 서열번호 3의 서열을 갖는다. 일부 실시형태에서, 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 서열번호 4의 서열을 포함한다.

[0059] 일부 실시형태에서, 선별 마커는 EGFR 폴리펩타이드의 절단된 형태이다.

[0060] 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 $CD19^+$ 표적세포에 대해 시험관내 세포독성을 나타낼 수 있다.

[0061] 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 $CD19^+$ 표적세포에 대해 생체내 세포독성을 나타낼 수 있다.

[0062] 일부 실시형태에서, $CD19^+$ 표적세포는 자가항체 생산 B세포이다.

[0063] 일부 실시형태에서, $CD19^+$ 표적세포는 $CD19^+$ 암세포이다.

[0064] 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 골수계 표적세포에 대해 시험관내 세포독성을 나타낼 수 있다.

[0065] 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 골수계 표적세포에 대해 생체내 세포독성을 나타낼 수 있다.

[0066] 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 $CD19^+$ 표적세포와 골수계 표적세포에 대해 세포독성을 나타낼 수 있다.

[0067] 일부 실시형태에서, 골수계 표적세포는 클래스 I MHC, CD13, CD54 및 CD112 중 하나 이상을 발현한다.

[0068] 일부 실시형태에서, $CD19^+$ 표적세포에 대한 세포독성은 1회 이상의 시험관내 재자극 후에도 유지된다. 일부 실시형태에서, $CD19^+$ 표적세포에 대한 세포독성은 1회 이상의 시험관내 확장 후에도 유지된다.

[0069] 일부 실시형태에서, 골수계 표적세포에 대한 세포독성은 1회 이상의 시험관내 재자극 후에도 유지된다. 일부 실시형태에서, 골수계 표적세포에 대한 세포독성은 1회 이상의 시험관내 확장 후에도 유지된다.

[0070] 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 동종이계 $CD4^+$ T세포 증식을 억제할 수 있다.

[0071] 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 동종이계 $CD8^+$ T세포 증식을 억제할 수 있다.

[0072] 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 동종이계 $CD4^+$ T세포 증식, 동종이계 $CD8^+$ T세포 증식, 및 PBMC 증식을 억제할

수 있다.

[0073] 일부 실시형태에서, 억제 특성은 1회 이상의 재자극 후에도 유지된다.

[0074] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 임의의 유전자 변형된 $CD4^+$ 세포를 포함하는 $CD4^+$ T세포 집단을 특징으로 한다.

[0075] 일부 실시형태에서, 유전자 변형 전 $CD4^+$ T세포는 2명, 3명, 4명, 5명, 6명, 7명, 8명, 9명 또는 10명의 상이한 T세포 공여자로부터 얻고어지고 풀링되었다.

[0076] 일부 실시형태에서, 집단 내 $CD4^+$ T세포는 집합적으로 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개 또는 그 이상의 상이한 HLA 일배체형을 갖는다.

[0077] 일부 실시형태에서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포는 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서 서로 적어도 1/10, 2/10, 3/10, 4/10, 5/10, 6/10, 7/10, 8/10 또는 9/10 일치한다.

[0078] 일부 실시형태에서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포는 HLA-A, HLA-B, HLA-C 및 HLA-DRB1 유전자좌에서 서로 적어도 1/8, 2/8, 3/8, 4/8, 5/8, 6/8, 7/8 또는 8/8 일치한다.

[0079] 일부 실시형태에서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포는 HLA-A 유전자좌에서 서로 2/2 일치한다.

[0080] 일부 실시형태에서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포는 HLA-B 유전자좌에서 서로 2/2 일치한다.

[0081] 일부 실시형태에서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포는 HLA-C 유전자좌에서 서로 2/2 일치한다.

[0082] 일부 실시형태에서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포는 HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서 서로 적어도 3/4 또는 4/4 일치한다.

[0083] 일부 실시형태에서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포는 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서 서로 5/10, 6/10, 7/10, 8/10 또는 9/10 미만으로 일치한다.

[0084] 일부 실시형태에서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포는 HLA-A, HLA-B, HLA-C 및 HLA DRB1 유전자좌에서 서로 4/8, 5/8, 6/8, 7/8 또는 8/8 미만으로 일치한다.

[0085] 일부 실시형태에서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포는 HLA-A 유전자좌에서 서로 2/2 미만으로 일치한다.

[0086] 일부 실시형태에서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포는 HLA-B 유전자좌에서 서로 2/2 미만으로 일치한다.

[0087] 일부 실시형태에서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포는 HLA-C 유전자좌에서 서로 2/2 미만으로 일치한다.

[0088] 일부 실시형태에서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포는 HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서 서로 2/4, 3/4 또는 4/4 미만으로 일치한다.

[0089] 일부 실시형태에서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포는 A*02 대립유전자를 갖거나 A*02 음성이다.

[0090] 일부 실시형태에서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포는 A*24 대립유전자를 갖거나 A*24 음성이다.

[0091] 일부 실시형태에서, $NGFR^+$ 세포 집단 내 $CD4^+$ T세포의 적어도 30%는 CAR을 발현한다.

[0092] 일부 실시형태에서, $NGFR^+$ 세포 집단 내 $CD4^+$ T세포의 적어도 60%는 CAR을 발현한다.

[0093] 일부 실시형태에서, $NGFR^+$ 세포 집단 내 $CD4^+$ T세포의 적어도 90%는 CAR을 발현한다.

[0094] 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 동결된 현탁액 중에 있다.

[0095] 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 액체 현탁액 중에 있다.

[0096] 일부 실시형태에서, 액체 현탁액은 이전에 동결되었던 것이다.

[0097] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 임의의 $CD4^+$ T세포 또는 본원에 제공된 임의의 $CD4^+$ T세포 집단을 포함하는 본원에 제공된 임의의 약제학적 조성물을 특징으로 한다.

[0098] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포를 제조하는 방법으로서, (a) 1명 이상의 T세포 공여자로부터 1차 $CD4^+$ T세포를 얻는 단계; 및 (b) (i) 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절과, (ii) IL-10을 인코딩하는 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절,을 도입하여 $CD4^+$ T세포를 변형시키는 단계;를 포함하는 방법을 특징으로 한다.

[0099] 일부 실시형태에서, 단계 (a)에서, 1차 $CD4^+$ T세포는 2명, 3명, 4명, 5명, 6명, 7명, 8명, 9명 또는 10명의 상이한 T세포 공여자로부터 얻는다.

[0100] 일부 실시형태에서, 방법은 단계 (b)로부터의 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포를 풀링하는 단계를 추가로 포함한다.

[0101] 일부 실시형태에서, 단계 (a)에서, 1차 $CD4^+$ T세포는 환자의 자가유래 세포이다.

[0102] 일부 실시형태에서, 방법은 단계 (a) 후 및 단계 (b) 전, 또는 단계 (b) 후에, 항-CD3 항체와 항-CD28 항체, 또는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체가 코팅된 비드의 존재 하에서 $CD4^+$ T세포를 인큐베이션하는 단계를 추가로 포함한다.

[0103] 일부 실시형태에서, 방법은 추가로 IL-2의 존재 하에서 $CD4^+$ T세포를 인큐베이션하는 단계를 추가로 포함한다.

[0104] 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절, 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절, 또는 둘 모두는 하나 이상의 바이러스 벡터를 사용하여 1차 $CD4^+$ T세포에 도입된다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터이다.

[0105] 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 CAR의 코딩 서열을 포함한다.

[0106] 일부 실시형태에서, CAR은 자가면역 질환, 염증성 장애 또는 암과 관련된 표적 항원에 특이적이다.

[0107] 일부 실시형태에서, 표적 항원은 자가면역 질환, 염증성 장애 또는 암과 관련이 있다.

[0108] 일부 실시형태에서, CAR은 항-CD19 CAR, 항-CD20 CAR, 항-CD22 CAR, 항-BCMA CAR, 항-B7-H3 CAR, 항-CD27 CAR 또는 항-CD38 CAR이다.

[0109] 일부 실시형태에서, CAR은 서열번호 9, 16, 22, 34, 41 내지 49, 또는 54의 서열을 포함한다.

[0110] 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 서열번호 10, 17, 23, 35 또는 55의 서열을 포함한다.

[0111] 일부 실시형태에서, IL-10은 서열번호 1의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 서열번호 2의 서열을 포함한다.

[0112] 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절 또는 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 선별 마커를 인코딩하는 분절을 추가로 포함한다.

[0113] 일부 실시형태에서, 인코딩된 선별 마커는 ΔNGFR이다. 일부 실시형태에서, 인코딩된 선별 마커는 서열번호 3의 서열을 갖는다.

[0114] 일부 실시형태에서, 선별 마커는 EGFR 폴리펩타이드의 절단된 형태이다.

[0115] 일부 실시형태에서, 방법은 단계 (b) 후에, 선별 마커를 발현하는 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포를 단리하여, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포가 농축된 집단을 생성하는 단계를 추가로 포함한다.

[0116] 일부 실시형태에서, 농축된 집단 내 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포의 적어도 30% 또는 적어도 60%는 IL-10과 CAR을 발현한다.

[0117] 일부 실시형태에서, 농축된 집단 내 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포의 적어도 90%는 IL-10과 CAR을 발현한다.

[0118] 일부 실시형태에서, 농축된 집단 내 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포의 적어도 40%는 선별 마커를 발현한다.

[0119] 일부 실시형태에서, 농축된 집단 내 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포의 적어도 75%는 선별 마커를 발현한다.

[0120] 일부 실시형태에서, 농축된 집단 내 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포의 적어도 90%는 선별 마커를 발현한다.

[0121] 일부 실시형태에서, 방법은 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포가 농축된 집단을 인큐베이션하는 단계를 추가로 포함한다.

[0122] 일부 실시형태에서, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포가 농축된 집단을 인큐베이션하는 단계는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체, 또는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체가 코팅된 비드의 존재 하에서, IL-2의 존재 하에서 수행된다.

[0123] 일부 실시형태에서, 상기 방법은 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포를 동결시키는 후속 단계를 추가로 포함한다.

[0124] 일부 실시형태에서, 적어도 2명의 T세포 공여자는 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서 서로 적어도 1/10, 2/10, 3/10, 4/10, 5/10, 6/10, 7/10, 8/10 또는 9/10 일치한다.

[0125] 일부 실시형태에서, 적어도 2명의 T세포 공여자는 HLA-A, HLA-B, HLA-C 및 HLA-DRB1 유전자좌에서 서로 적어도 1/8, 2/8, 3/8, 4/8, 5/8, 6/8, 7/8 또는 8/8 일치한다.

[0126] 일부 실시형태에서, 적어도 2명의 T세포 공여자는 HLA-A 유전자좌에서 서로 2/2 일치한다. 일부 실시형태에서, 적어도 2명의 T세포 공여자는 HLA-B 유전자좌에서 서로 2/2 일치한다. 일부 실시형태에서, 적어도 2명의 T세포 공여자는 HLA-C 유전자좌에서 서로 2/2 일치한다.

[0127] 일부 실시형태에서, 적어도 2명의 T세포 공여자는 HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서 서로 적어도 3/4 또는 4/4 일치한다.

[0128] 일부 실시형태에서, 적어도 2명의 T세포 공여자는 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서 서로 5/10, 6/10, 7/10, 8/10 또는 9/10 미만으로 일치한다.

[0129] 일부 실시형태에서, 적어도 2명의 T세포 공여자는 HLA-A, HLA-B, HLA-C 및 HLA DRB1 유전자좌에서 서로 4/8, 5/8, 6/8, 7/8 또는 8/8 미만으로 일치한다.

[0130] 일부 실시형태에서, 적어도 2명의 T세포 공여자는 HLA-A 유전자좌에서 서로 2/2 미만으로 일치한다. 일부 실시형태에서, 적어도 2명의 T세포 공여자는 HLA-B 유전자좌에서 서로 2/2 미만으로 일치한다. 일부 실시형태에서, 적어도 2명의 T세포 공여자는 HLA-C 유전자좌에서 서로 2/2 미만으로 일치한다.

[0131] 일부 실시형태에서, 적어도 2명의 T세포 공여자는 HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서 서로 2/4, 3/4 또는 4/4 미만으로 일치한다.

[0132] 일부 실시형태에서, 적어도 2명의 T세포 공여자는 각각 A*02 대립유전자를 갖거나 A*02 음성이다. 일부 실시형태에서, 적어도 2명의 T세포 공여자는 각각 A*02 대립유전자를 갖거나 A*02 음성이다.

[0133] 일부 실시형태에서, 단계 (a)에서, 1차 $CD4^+$ T세포는 하나 이상의 동결된 스톡에서 얻는다.

[0134] 일부 실시형태에서, 단계 (a)에서, 1차 $CD4^+$ T세포는 적어도 2명의 상이한 T세포 공여자의 동결되지 않은 말초 혈액 단핵 세포에서 얻는다.

[0135] 일부 실시형태에서, 방법은 말초혈액 단핵 세포로부터 $CD4^+$ T세포를 단리하는 단계를 추가로 포함한다.

[0136] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 혈액암을 치료하는 방법으로서, 혈액암 환자에게 항암 효과를 유도하기에 충분한 치료적 유효량의 본원에 제공된 임의의 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포, 본원에 제공된 임의의 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포 집단, 또는 본원에 제공된 임의의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 특징으로 한다.

[0137] 일부 실시형태에서, 방법은 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포의 투여 전 또는 후에 환자에게 동종 HSCT 이식편을 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0138] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 악성종양을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법으로서, 환자에게 동종 HSCT 이식편을 투여하는 단계, 및 치료적 유효량의 본원에 제공된 임의의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, 본원에 제공된 임의의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 본원에 제공된 임의의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 특징으로 한다.

[0139] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포의 양은 나아가 동종 HSCT의 이식편대백혈병(GvL) 또는 이식편대종양(GvT) 효능을 억제하지 않으면서 이식편대숙주병(GvHD)을 억제하거나 예방하기에 충분하다.

[0140] 일부 실시형태에서, 악성종양 또는 혈액암은 골수성 백혈병이다.

[0141] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 CD13을 발현하는 암세포를 표적으로 삼아 사멸시킨다.

[0142] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 HLA-클래스 I을 발현하는 암세포를 표적으로 삼아 사멸시킨다.

[0143] 일부 실시형태에서, 골수성 백혈병은 급성 골수성 백혈병(AML)이다.

[0144] 일부 실시형태에서, 악성종양 또는 혈액암은 $CD19^{+}$, $CD20^{+}$, $CD22^{+}$, $CD27^{+}$, $CD38^{+}$, $BCMA^{+}$ 또는 $B7\text{-}H3^{+}$ 혈액암이다.

[0145] 일부 실시형태에서, $CD19^{+}$, $CD20^{+}$, $CD22^{+}$, $CD27^{+}$, $CD38^{+}$, $BCMA^{+}$ 또는 $B7\text{-}H3^{+}$ 혈액암은 만성 림프구성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병(ALL) 및 비호지킨 림프종에서 선택된다.

[0146] 일부 실시형태에서, 동종 HSCT 이식편은 환자와 관련이 있거나 관련이 없는 공여자로부터 얻는다.

[0147] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 환자의 자가유래가 아닌 세포이다.

[0148] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 환자의 자가유래 세포이다.

[0149] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 환자와 동종이계인 세포이다.

[0150] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 환자에게의 투여 전 숙주 동종항원에 대해 면역결핍화된(anergized) 것이 아니다.

[0151] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 Tr1 유사 세포이다.

[0152] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 다클론성이다.

[0153] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 다클론성이며 환자의 자가유래가 아닌 세포이다.

[0154] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 다클론성이며 환자의 자가유래 세포이다.

[0155] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 유전자 변형되기 전 적어도 2명의 공여자로부터 단리된 것이다.

[0156] 일부 실시형태에서, 적어도 2명의 공여자 중 누구도 동종 HSCT 공여자와 동일한 공여자가 아니다.

[0157] 일부 실시형태에서, 동종 HSCT 이식편은 환자와 일치하거나 일치하지 않는 공여자로부터 얻는다.

[0158] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 CD19, CD20 또는 BCMA를 발현하는 세포를 표적으로 삼아 사멸시킨다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 CD54를 발현하는 세포를 표적으로 삼아 사멸시킨다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 HLA-클래스 I과 CD54를 발현하는 암세포를 표적으로 삼아 사멸시킨다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 CD112와 CD155를 발현하는 암세포를 표적으로 삼아 사멸시킨다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 CD58을 발현하는 암세포를 표적으로 삼아 사멸시킨다.

[0159] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 환자의 암세포를 표적으로 삼아 사멸시킨다.

[0160] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 환자의 고형 종양 세포를 표적으로 삼아 사멸시킨다.

[0161] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 동종이계 조혈 줄기세포 이식(동종 HSCT)을 통해 혈액암을 치료하는 방법으로서,

[0162] 환자에게 동종 HSCT 이식편을 투여하는 단계, 및

[0163] 환자에게, 동종 HSCT 이식편의 이식편대백혈병(GvL) 또는 이식편대종양(GvT) 효능을 억제하지 않으면서 이식편대숙주병(GvHD)을 억제하거나 예방하기에 충분한 양의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포를 투여하는 단계,를 포함하며,

[0164] 여기서 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 구성적 프로모터 또는 유도성 프로모터의 제어 하에 있는 인간 IL-10의 코딩 서열과 구성적 프로모터 또는 유도성 프로모터의 제어 하에 있는 CAR의 코딩 서열을 포함하는 하나 이상의 벡터의 벡터 매개 유전자 전달을 통해 유전자 변형된 $CD4^{+}$ T세포를 포함하고;

[0165] 여기서 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 환자의 암세포를 표적으로 삼아 사멸시키며;

[0166] 여기서 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 환자에게의 투여 전 숙주 동종항원에 대해 면역결핍화된 것이 아니고; 및

[0167] 여기서 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 환자의 자가유래가 아닌 세포이며, Tr1 유사 세포인 방법을 특징으로 한다.

[0168] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 동종이계 조혈 줄기세포 이식(동종 HSCT)을 통해 혈액암을 치료하는 방법으로서,

[0169] 환자에게 동종 HSCT 이식편을 투여하는 단계, 및

[0170] 환자에게 일정량의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포를 투여하는 단계로서, 여기서 선택적으로 상기 양은 동종 HSCT 이식편의 이식편대백혈병(GvL) 또는 이식편대종양(GvT) 효능을 억제하지 않으면서 이식편대숙주병(GvHD)을 억제하거나 예방하기에 충분한 양인 단계,를 포함하며,

[0171] 여기서 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 구성적 프로모터 또는 유도성 프로모터의 제어 하에 있는 인간 IL-10의 코딩 서열과 구성적 프로모터 또는 유도성 프로모터의 제어 하에 있는 CAR의 코딩 서열을 포함하는 하나 이상의 벡터의 벡터 매개 유전자 전달을 통해 유전자 변형된 $CD4^{+}$ T세포를 포함하고;

[0172] 여기서 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 환자의 암세포를 표적으로 삼아 사멸시키며;

[0173] 여기서 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 환자에게의 투여 전 숙주 동종항원에 대해 면역결핍화된 것이 아니고; 및

[0174] 여기서 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 환자의 자가유래 세포이며, Tr1 유사 세포인 방법을 특징으로 한다.

[0175] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 환자에서 $CD19^{+}$, $CD20^{+}$, $CD22^{+}$, $CD27^{+}$, $CD38^{+}$, $BCMA^{+}$ 또는 $B7\text{-}H3^{+}$ 혈액암의 재발을 예방하는 방법으로서,

[0176] $CD19^{+}$, $CD20^{+}$, $CD22^{+}$, $BCMA^{+}$ 또는 $B7\text{-}H3^{+}$ 혈액암을 앓고 있거나 $CD19^{+}$, $CD20^{+}$, $CD22^{+}$, $BCMA^{+}$ 또는 $B7\text{-}H3^{+}$ 혈액암이 재발할 위험이 있는 것으로 식별된 환자에게, 항암 효과를 유도하기에 충분한 치료적 유효량의 본원에 제공된 임의의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, 본원에 제공된 임의의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 본원에 제공된 임의의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 특징으로 한다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 HSCT의 투여 후에 투여된다.

[0177] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 환자에서 $B7\text{-}H3^{+}$ 암의 재발을 예방하는 방법으로서, $B7\text{-}H3^{+}$ 암을 앓고 있는 것으로 식별된 환자에게, 항암 효과를 유도하기에 충분한 치료적 유효량의 본원에 제공된 임의의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, 본원에 제공된 임의의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단 또는 본원에 제공된 임의의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 특징으로 한다.

[0178] 일부 실시형태에서, $B7\text{-}H3^{+}$ 암은 고형 종양이다.

[0179] 일부 실시형태에서, 고형 종양은 유방암, 뇌암, 폐암, 간암, 위암, 비장암, 결장암, 직장암, 췌장암, 전립선암,

자궁암, 피부암, 두부암, 경부암, 육종, 신경모세포종 및 난소암으로 이루어지는 군에서 선택된다.

[0180] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 최소 잔류 질환이 있는 환자를 치료하는 방법으로서, 최소 잔류 질환이 있거나 최소 잔류 질환이 있을 수 있는 위험이 있는 것으로 식별된 환자에게, 항암 효과를 유도하기에 충분한 치료적 유효량의 본원에 제공된 임의의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, 본원에 제공된 임의의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단 또는 본원에 제공된 임의의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 특징으로 한다.

[0181] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 환자를 치료하는 방법으로서, 면역 관용화가 필요한 환자에게 치료적 유효량의 본원에 제공된 임의의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, 본원에 제공된 임의의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 본원에 제공된 임의의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 특징으로 한다.

[0182] 일부 실시형태에서, 방법은 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단의 동결된 현탁액을 해동시키는 사전 단계를 추가로 포함한다.

[0183] 일부 실시형태에서, 환자는 염증성 또는 자가면역 질환을 앓고 있다.

[0184] 일부 실시형태에서, 염증성 또는 자가면역 질환은 자가면역 포도막염, 건선, 백반증, 원형탈모증, 건선성 관절염, 염증성 장질환, 하시모토 갑상선염, 자가면역 혈관염, 궤양성 대장염, 수포성 질환, 피부경화증, 셀리악병, 그레이브스병, 전신경화증, 중증 근무력증, 항-NMDA 뇌염, 유사천포창 질환(심상성 및 낙엽상), 후천성 수포성 표피박리증, 혈전성 혈소판감소성 자반증, 특발성 혈소판감소성 자반증, 자가항체 유발 혈관 염증, 자가항체 유발 심장염, 류마티스 관절염, 자가항체 유발 류마티스 관절염, 시신경척수염 스펙트럼 장애, 전신 홍반성 루푸스(SLE), 다발성 경화증(MS), 쇼그렌 증후군, 자가면역 근육병증, 1형 당뇨병, 애디슨병, 악성 빈혈, 자가면역 간염, 원발성 담즙성 담관염(PBC), 자가면역 췌장염, 굿파스처병, 원발성 막성 신장병증, 난소 기능부전, 자가면역 고환염, 안구건조증, 재생불량성 빈혈, 자가면역 호중구감소증 및 특발성 간질성 폐렴으로 이루어지는 군에서 선택된다.

[0185] 일부 실시형태에서, 염증성 또는 자가면역 질환은 크론병, 궤양성 대장염, 셀리악병, 1형 당뇨병, 루푸스, 건선, 건선성 관절염, 강직성 척추염 또는 류마티스 관절염이다.

[0186] 일부 실시형태에서, 환자는 NLPR3 인플라마솜(inflammasome)의 과활성과 관련된 질환 또는 장애를 앓고 있다.

[0187] 일부 실시형태에서, 환자는 2형 당뇨병, 신경변성 질환, 심혈관 질환 또는 염증성 장질환을 앓고 있다.

[0188] 일부 실시형태에서, 환자는 활성화된 단핵구, 대식세포 또는 수지상세포에 의한 IL-1β의 생산 증가와 관련된 질환 또는 장애를 앓고 있다.

[0189] 일부 실시형태에서, 환자는 활성화된 단핵구, 대식세포 또는 수지상세포에 의한 IL-18의 생산 증가와 관련된 질환 또는 장애를 앓고 있다.

[0190] 일부 실시형태에서, 환자는 활성화된 단핵구, 대식세포 또는 수지상세포에 의한 성숙 카스파아제 1의 생산 증가와 관련된 질환 또는 장애를 앓고 있다.

[0191] 일부 실시형태에서, 환자는 알레르기 또는 아토피 질환을 앓고 있다.

[0192] 일부 실시형태에서, 알레르기 또는 아토피 질환은 천식, 아토피 피부염 및 비염으로 이루어지는 군에서 선택된다.

[0193] 일부 실시형태에서, 환자는 식품 알레르기가 있다.

[0194] 일부 실시형태에서, 환자는 고형 종양이 있다.

[0195] 일부 실시형태에서, 고형 종양은 유방암, 뇌암, 폐암, 간암, 위암, 비장암, 결장암, 직장암, 췌장암, 전립선암, 자궁암, 피부암, 두부암, 경부암, 육종, 신경모세포종 및 난소암으로 이루어지는 군에서 선택된다.

[0196] 일부 실시형태에서, 방법은 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단 또는 약제학적 조성물의 투여 전 또는 후에, 환자에게 기관을 이식하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단 또는 약제학적 조성물은 기관 이식의 숙주 거부반응을 예방하거나 이의 중증도를 감소시킨다.

[0197] 일부 실시형태에서, 방법은 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단 또는 약제학적 조성물의 투여 전 또는 후에,

환자에게 iPS 세포 유래 세포 또는 조직을 이식하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단 또는 약제학적 조성물은 세포 이식의 숙주 거부반응을 예방하거나 이의 중증도를 감소시킨다.

[0198] 일부 실시형태에서, 방법은 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단 또는 약제학적 조성물의 투여 전 또는 후에, 상기 환자에게 재조합 AAV를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단 또는 약제학적 조성물은 재조합 AAV에 대한 면역 반응을 감소시킨다.

[0199] 일부 실시형태에서, 방법은 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단 또는 약제학적 조성물의 투여 전 또는 후에, 환자에게 AAV 이외의 재조합 바이러스 벡터를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단 또는 약제학적 조성물은 AAV 이외의 재조합 바이러스 벡터에 대한 면역 반응을 감소시킨다.

[0200] 일부 실시형태에서, 방법은 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단 또는 약제학적 조성물의 투여 전 또는 후에, 환자에게 면역원성 치료 단백질을 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단 또는 약제학적 조성물은 면역원성 치료 단백질에 대한 면역 반응을 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 면역원성 치료 단백질은 치료용 항체, 인자 VIII 대체, 사이토카인, 및 사이토카인 뮤테인에서 선택된다.

[0201] 일부 실시형태에서, 환자는 바이러스 또는 박테리아 감염에 대해 과도한 면역 반응을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 환자는 코로나바이러스 감염을 앓고 있다. 일부 실시형태에서, 환자는 기관 및/또는 조직 손상을 갖고 있다.

[0202] 일부 실시형태에서, 방법은 환자에서 얻은 생물학적 샘플에서 선별 마커를 검출하여, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포의 존재 또는 부재를 검출하는 단계를 추가로 포함한다.

[0203] 일부 실시형태에서, 생물학적 샘플은 환자의 생검 또는 혈액이다.

[0204] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 환자에서 자가면역 질환, 알레르기 질환 또는 염증성 질환을 치료하거나 저해하는 방법으로서, 자가면역 질환, 알레르기 질환 또는 염증성 질환을 앓고 있는 것으로 식별된 환자에게, 자가면역 질환, 알레르기 질환 또는 염증성 질환을 치료하거나 저해하기에 충분한 치료적 유효량의 본원에 제공된 임의의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, 본원에 제공된 임의의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 본원에 제공된 임의의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 특징으로 한다.

[0205] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 조혈 줄기세포, 골수 세포, 제대혈 세포, 조직 줄기세포 또는 고형 기관을 이식받은 환자에서 이식 거부반응을 감소시키는 방법으로서, 이식된 조혈 줄기세포, 골수 세포, 조직 줄기세포 또는 고형 기관의 거부반응이 있는 것으로 식별된 환자에게, 이식 거부반응을 감소시키기에 충분한 치료적 유효량의 본원에 제공된 임의의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, 본원에 제공된 임의의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 본원에 제공된 임의의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 특징으로 한다.

[0206] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 환자에서 이식편대숙주병(GvHD)을 치료하는 방법으로서, 이식편대숙주병(GvHD)을 앓고 있거나 이식편대숙주병(GvHD)을 앓게 될 위험이 있는 것으로 식별된 환자에게, GvHD를 억제하거나 예방하기에 충분한 치료적 유효량의 본원에 제공된 임의의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, 본원에 제공된 임의의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 본원에 제공된 임의의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 특징으로 한다.

[0207] 일부 실시형태에서, 이식편대숙주병(GvHD)은 급성 GvHD를 포함한다.

[0208] 일부 실시형태에서, 이식편대숙주병(GvHD)은 만성 GvHD를 포함한다.

[0209] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 환자에서 조직 또는 기관 손상을 치료하는 방법으로서, 조직 또는 기관 손상을 갖고 있거나 조직 또는 기관 손상을 갖게 될 위험이 있는 것으로 식별된 환자에게, 조직 또는 기관 손상의 복구를 유도하기에 충분한 치료적 유효량의 본원에 제공된 임의의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, 본원에 제공된 임의의 $CD4^{IL-}$

$^{10/CAR}$ 세포 집단, 또는 본원에 제공된 임의의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 특징으로 한다.

[0210] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 (a) 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 제1 폴리뉴클레오타이드 분절; 및 (b) 인터류킨-10(IL-10)을 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오타이드 분절;을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 작제물을 특징으로 한다.

[0211] 일부 실시형태에서, 제1 폴리뉴클레오타이드 분절은 CAR의 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 조절 요소를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조절 요소는 CAR의 구성적 발현을 유도한다.

[0212] 일부 실시형태에서, 제2 폴리뉴클레오타이드 분절은 IL-10의 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 조절 요소를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조절 요소는 IL-10의 구성적 발현을 유도한다.

[0213] 일부 실시형태에서, 방법은 제1 폴리뉴클레오타이드 분절과 제2 폴리뉴클레오타이드 분절 사이에 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 또는 자가 절단 펩타이드를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 자가 절단 펩타이드는 F2A, P2A, T2A 및 E2A로 이루어지는 군에서 선택된다.

[0214] 일부 실시형태에서, CAR은 항원 결합 도메인, 힌지 영역, 막관통 도메인, 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.

[0215] 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 단일 사슬 항체 단편을 포함한다. 일부 실시형태에서, 단일 사슬 항체 단편은 단일 사슬 Fv(scFv)를 포함한다.

[0216] 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 자가면역 질환, 염증성 장애 또는 암과 관련된 항원을 표적으로 한다.

[0217] 일부 실시형태에서, 항원은 CD19, CD20, CD22, BCMA, B7-H3, CD27, CD38, CEA, BCMA, CD23, Lym1, Lym2, CLEC5A, CDH179b, FLT3, GCC, Muc, CSF2RA, GFRα4, CD32, CD33, IL11Rα, IL13Rα, NYBR1, SLea, CD200R, TGFβR2, CD276, TROP2, LAMP1, PTK7, DLL3, CDH1, CDH6, CDH17, CDH19, TSHR, 티로시나아제, HLA-A2, 시트룰린화된 펩타이드, 인슐린, GAD65, IA2, 글리아딘, 및 데스모글레인으로 이루어지는 군에서 선택된다.

[0218] 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 항-CD19 항원 결합 도메인이다. 일부 실시형태에서, 항-CD19 항원 결합 도메인은 서열번호 11의 서열을 포함한다.

[0219] 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 항-CD20 항원 결합 도메인이다. 일부 실시형태에서, 항-CD20 항원 결합 도메인은 서열번호 18의 서열을 포함한다.

[0220] 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 항-BCMA 항원 결합 도메인이다. 일부 실시형태에서, 항-BCMA 항원 결합 도메인은 서열번호 50 내지 53의 서열을 포함한다.

[0221] 일부 실시형태에서, 힌지 영역은 인간 CD8 힌지 영역, 인간 CD28 힌지 영역, IgG1 힌지 영역 또는 IgG4 힌지 영역에서 선택된다. 일부 실시형태에서, 힌지 영역은 인간 CD8에서 유도된다.

[0222] 일부 실시형태에서, 막관통 도메인은 TNFRSF19 막관통 도메인, CD3제타 막관통 도메인, CD8α 막관통 도메인, CD4 막관통 도메인, CD28 막관통 도메인, 또는 B7 패밀리 유도성 공동자극(ICOS) 막관통 도메인에서 선택된다. 일부 실시형태에서, 막관통 도메인은 CD8α에서 유도된다.

[0223] 일부 실시형태에서, CAR은 하나 이상의 공동자극 도메인을 추가로 포함한다.

[0224] 일부 실시형태에서, CAR은 2개의 공동자극 도메인을 포함한다.

[0225] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 공동자극 도메인은 4-1BB, CD28, OX40, ICOS, CD27, MYD88-CD40 및 KIR2DS2로 이루어지는 군에서 선택된다.

[0226] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 공동자극 도메인 중 하나는 CD28에서 유도된다.

[0227] 일부 실시형태에서, 제2 공동자극 도메인은 4-1BB에서 유도된다.

[0228] 일부 실시형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM)는 CD3제타에서 유도된다.

[0229] 일부 실시형태에서, CAR은 항-CD19 항원 결합 도메인, 항-BCMA 항원 결합 도메인 또는 항-CD20 항원 결합 도메인; 인간 CD8 힌지 영역; CD8 막관통 영역; CD28 공동자극 도메인; 및 CD3제타 사슬 세포내 신호전달 도메인을

포함한다.

[0230] 일부 실시형태에서, CAR은 서열번호 9, 16, 22 또는 34의 서열을 포함한다.

[0231] 일부 실시형태에서, 제1 폴리뉴클레오타이드 분절은 서열번호 10, 17, 23, 35 또는 55의 서열을 포함한다.

[0232] 일부 실시형태에서, IL-10은 인간 IL-10이다. 일부 실시형태에서, IL-10은 바이러스 IL-10이다.

[0233] 일부 실시형태에서, IL-10은 서열번호 1의 서열을 갖는 단백질이다. 일부 실시형태에서, 제2 폴리뉴클레오타이드 분절은 서열번호 2의 서열을 포함한다.

[0234] 일부 실시형태에서, 제1 폴리뉴클레오타이드 분절 또는 제2 폴리뉴클레오타이드 분절은 선별 마커를 인코딩하는 서열을 추가로 포함한다.

[0235] 일부 실시형태에서, 선별 마커는 ΔNGFR이다. 일부 실시형태에서, ΔNGFR은 서열번호 3의 서열을 갖는다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 작제물은 서열번호 4의 서열을 포함한다.

[0236] 일부 실시형태에서, 선별 마커는 EGFR 폴리펩타이드의 절단된 형태이다.

[0237] 일부 실시형태에서, 작제물은 벡터이다. 일부 실시형태에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 실시형태에서, 벡터는 렌티바이러스 벡터이다.

[0238] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 서열번호 10, 17, 23, 35 또는 55의 서열을 갖는 제1 폴리뉴클레오타이드 분절; 및 서열번호 2의 서열을 갖는 제2 폴리뉴클레오타이드 분절;을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 작제물을 특징으로 한다.

[0239] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 서열번호 10, 17, 23, 35 또는 55의 서열을 갖는 제1 폴리뉴클레오타이드 분절; 서열번호 2의 서열을 갖는 제2 폴리뉴클레오타이드 분절; 및 제1 폴리뉴클레오타이드 분절과 제2 폴리뉴클레오타이드 분절 사이에 서열번호 33의 서열을 갖는 제3 폴리뉴클레오타이드 분절;을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 작제물을 특징으로 한다.

[0240] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 서열번호 10, 17, 23, 35 또는 55의 서열을 갖는 제1 폴리뉴클레오타이드 분절; 서열번호 2의 서열을 갖는 제2 폴리뉴클레오타이드 분절; 제1 폴리뉴클레오타이드 분절과 제2 폴리뉴클레오타이드 분절 사이에 서열번호 27의 서열을 갖는 제3 폴리뉴클레오타이드 분절; 및 서열번호 4의 서열을 갖는 제4 폴리뉴클레오타이드 분절;을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 작제물을 특징으로 한다.

[0241] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 단일 공여자 또는 다중 공여자 유래의 $CD4^{IL-10}$ 세포로서, 여기서 IL-10은 바이러스 IL-10인 $CD4^{IL-10}$ 세포를 특징으로 한다. 바이러스 IL-10은 서열번호 6 또는 18의 서열을 갖는다. 일부 실시형태에서, 바이러스 IL-10은 서열번호 7의 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, IL-10은 인간 IL-10 유래의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 아미노산이 바이러스 IL-10 유래의 상응하는 아미노산 서열로 대체된 인간 IL-10이다. 일부 실시형태에서, $CD4^{+}$ T세포는 구성적 프로모터의 제어 하에 있는 외인성 바이러스 IL-10으로 형질도입된다. 일부 실시형태에서, 발현 제어 요소는 활성화된 $CD4^{+}$ T세포에서 바이러스 IL-10의 발현을 유도한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 IL-10을 인코딩하는 외인성 폴리뉴클레오타이드는 T세포 핵 게놈에 삽입된다. 일부 실시형태에서, 바이러스 IL-10을 인코딩하는 외인성 폴리뉴클레오타이드는 T세포 핵 게놈에 삽입되지 않는다. 일부 실시형태에서, 바이러스 IL-10을 인코딩하는 외인성 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 7의 서열을 갖는다.

[0242] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 단일 공여자 또는 다중 공여자 유래의 $CD4^{IL-10}$ 세포로서, 여기서 IL-10은 무스 무스쿨루스(*Mus musculus*), "마우스(MOUSE)"(서열번호 58); 라투스 노르베기쿠스(*Rattus norvegicus*), "래트(RAT)"(서열번호 59); 마카카 물라타(*Macaca mulatta*), "MACMU"(서열번호 60); 고릴라 고릴라(Gorilla gorilla), "고릴라(GORILLA)"(서열번호 61); 마카카 파시쿨라리스(*Macaca fascicularis*), "시노(CYNO)"(서열번호 62); 파피오 아누비스(*Papio Anubis*), "OLIVE BABOON"(서열번호 63); 판 파니스쿠스(*Pan paniscus*), "보노보(BONOBO)"(서열번호 64); 판 트로글로디테스(*Pan troglodytes*), "침프(CHIMP)"(서열번호 65); 및 EBVB9(서열번호 66)의 IL-10인 $CD4^{IL-10}$ 세포를 특징으로 한다. 일부 실시형태에서, IL-10은 무스 무스쿨루스, "MOUSE"(서열번호 58); 라투스 노르베기쿠스, "RAT"(서열번호 59); 마카카 물라타, "MACMU"(서열번호 60); 고릴라 고릴라, "GORILLA"(서열번호 61); 마카카 파시쿨라리스, "CYNO"(서열번호 62); 파피오 아누비스, "OLIVE BABOON"(서열

번호 63); 판 파니스쿠스, "BONOBO"(서열번호 64); 판 트로글로디테스, "CHIMP"(서열번호 65); 및 EBVB9(서열번호 66)의 IL-10과 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 단백질이다.

[0243] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 단일 공여자 또는 다중 공여자 유래의 $CD4^{IL-10}$ 세포로서, 여기서 IL-10은 인간 IL-10의 변이체인 $CD4^{IL-10}$ 세포를 특징으로 한다. 인간 IL-10의 변이체는 서열번호 67 또는 서열번호 68의 서열을 갖는다. 일부 실시형태에서, IL-10은 인간 IL-10 유래의 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 아미노산이 또 다른 종 IL-10(예를 들어, 무스 무스쿨루스, "MOUSE"(서열번호 58); 라투스 노르베기쿠스, "RAT"(서열번호 59); 마카카 물라타, "MACMU"(서열번호 60); 고릴라 고릴라, "GORILLA"(서열번호 61); 마카카 파시쿨라리스, "CYNO"(서열번호 62); 파피오 아누비스, "OLIVE BABOON"(서열번호 63); 판 파니스쿠스, "BONOBO"(서열번호 64); 판 트로글로디테스, "CHIMP"(서열번호 65); 및 EBVB9(서열번호 66)의 IL-10) 유래의 상응하는 아미노산 서열로 대체된 인간 IL-10이다. 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 구성적 프로모터의 제어 하에 있는 외인성 IL-10 변이체로 형질도입된다. 일부 실시형태에서, 발현 제어 요소는 활성화된 $CD4^+$ T세포에서 IL-10 변이체의 발현을 유도한다. 일부 실시형태에서, IL-10 변이체를 인코딩하는 외인성 폴리뉴클레오타이드는 T세포 핵 게놈에 삽입된다. 일부 실시형태에서, IL-10 변이체를 인코딩하는 외인성 폴리뉴클레오타이드는 T세포 핵 게놈에 삽입되지 않는다.

[0244] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 바이러스 IL-10 $CD4^{IL-10}$ 세포를 제조하는 방법으로서,

[0245] (i) 단일 T세포 공여자로부터 1차 $CD4^+$ T세포를 얻는 단계; 및

[0246] (ii) 바이러스 IL-10을 인코딩하는 외인성 폴리뉴클레오타이드를 도입하여 공여자 $CD4^+$ T세포를 변형시키는 방식으로,

[0247] 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포를 얻는 단계;를 포함하는 방법을 제공한다.

[0248] 일부 실시형태에서, 방법은 단계 (i) 후 또는 단계 (ii) 후에, 항-CD3 항체와 항-CD28 항체, 또는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체가 코팅된 비드의 존재 하에서 1차 $CD4^+$ T세포를 인큐베이션하는 단계를 추가로 포함한다.

[0249] 일부 실시형태에서, 방법은 추가로 IL-2의 존재 하에서 1차 $CD4^+$ T세포를 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 외인성 폴리뉴클레오타이드는 벡터를 사용하여 바이러스 IL-10을 인코딩한다.

[0250] 일부 실시형태에서, 바이러스 IL-10을 인코딩하는 외인성 폴리뉴클레오타이드는 선별 마커를 인코딩하는 분절을 포함한다. 일부 실시형태에서, 인코딩된 선별 마커는 ΔNGFR이다. 일부 실시형태에서, 인코딩된 선별 마커는 서열번호 3의 서열을 갖는다. 일부 실시형태에서, 인코딩된 선별 마커는 절단된 EGFR 폴리펩타이드이다. 일부 실시형태에서, 인코딩된 선별 마커는 절단된 인간 EGFR 폴리펩타이드이다.

[0251] 일부 실시형태에서, 방법은 단계 (ii) 후에, 선별 마커를 발현하는 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포를 단리하여, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포가 농축된 집단을 생성하는 단계를 추가로 포함한다.

[0252] 일부 실시형태에서, 방법은 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포가 농축된 집단을 인큐베이션하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포가 농축된 집단을 인큐베이션하는 단계는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체, 또는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체가 코팅된 비드의 존재 하에서, IL-2의 존재 하에서 수행된다.

[0253] 일부 실시형태에서, 단계 (i)에서, 1차 $CD4^+$ T세포는 동결된 스톡에서 얻는다. 일부 실시형태에서, 단계 (i)에서, 1차 $CD4^+$ T세포는 단일 T세포 공여자의 동결되지 않은 말초혈액 단핵 세포에서 얻는다.

[0254] 일부 실시형태에서, 방법은 말초혈액 단핵 세포로부터 $CD4^+$ T세포를 단리하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 말초혈액 단핵 세포는 버피 코트 또는 성분채집술(apheresis)로부터 얻는다.

도면의 간단한 설명

[0255] **도 1**은, 본원에 제공된 다양한 키메라 항원 수용체(CAR)에 대한 구조의 비제한적인 예시이다.

도 2a는, $CD4^{IL-10항-CD19CAR}$ 세포를 생산하기 위해 항-CD19 CAR을 $CD4^+$ T세포로 전달하기 위한 렌티바이러스 벡터에 사용되는, 완전 인간 항-CD19 단클론 항체 FMC63 유래의 scFv, CD8α 힌지, CD8α 막관통 도메인, CD28 공동자극 도메인, 및 CD3ζ 활성화 도메인을 포함하는 항-CD19 CAR 코딩 서열의 부분 구조를 예시한다.

도 2b는, $CD4^{IL-10항-CD19CAR}$ 세포를 생산하기 위해 항-CD19 CAR을 $CD4^+$ T세포로 전달하는 데 사용되는 렌티바이러스 벡터(pLV 항-CD19 CAR)를 예시한다.

도 3a와 도 3b는, $CD4^{IL-10}$ 세포 또는 $CD4^{IL-10항-CD19CAR}$ 세포를 생산하기 위해 인간 IL-10 및 ΔNGFR 코딩 서열을 $CD4^+$ T세포로 전달하는 데 사용되는 렌티바이러스 벡터(LVV; $LVV^{IL-10-NGFR}$)를 생성하는 데 사용되는 양방향성 플라스미드(pLV-IL-10)를 예시한다. **도 3a**는, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포를 생산하기 위해 인간 IL-10 및 ΔNGFR 코딩 서열을 다수의 공여자 유래의 $CD4^+$ T세포로 전달하기 위한 양방향성 렌티바이러스 벡터의 부분 구조를 예시한다. **도 3b**는, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포를 생산하기 위해 인간 IL-10 및 ΔNGFR 코딩 서열을 다수의 공여자 유래의 $CD4^+$ T세포로 전달하기 위한 양방향성 렌티바이러스 벡터(hPGK.IL10.WPRE.mhCMV.ΔNGFR.SV40PA)의 완전한 원형 구조를 예시한다.

도 4는, 예시 목적으로 자연 B세포 분화 동안의 항원 발현을 보여준다.

도 5a 내지 도 5c는, $CD4^{IL-10항-CD19CAR}$ 세포를 생성하는 방법의 비제한적인 예에 대한 도식을 보여준다. 각각의 방법에서, 인간 $CD4^+$ T세포를 5% 인간 AB 혈청과 rhIL-2(50 U/mL)가 보충된 완전 배양 배지(X-vivo)에서 항-CD3/항-CD28 비드(Miltenyi)(세포:비드 비 3:1)를 이용하여 활성화시켰다. **도 5a**는, 활성화 48시간 후 활성화된 $CD4^+$ T세포에 항-CD19 CAR을 인코딩하는 렌티바이러스 벡터($LVV^{CD19-CAR}$)를 형질도입하고, 24시간 후(즉, 활성화 72시간 후)에 인간 IL-10과 인간 NGF 수용체의 절단된 형태를 인코딩하는 양방향성 렌티바이러스 벡터($LVV^{IL-10-NGFR}$)를 형질도입하는 방법을 보여준다. 두 가지 LVV 모두 감염 다중도(MOI) 20으로 사용하였다. **도 5b**는, 활성화 48시간 후 활성화된 $CD4^+$ T세포에 $LVV^{IL-10-NGFR}$을 형질도입하고, 24시간 후(즉, 활성화 72시간 후)에 $LVV^{CD19-CAR}$을 형질도입하는 방법을 보여준다. **도 5c**는, 활성화 48시간 후 활성화된 $CD4^+$ T세포에 $LVV^{IL-10-NGFR}$과 $LVV^{CD19-CAR}$을 동시에 형질도입하는 방법을 보여준다. 대조군(CAR을 발현하지 않음)은 활성화 48시간 후 활성화된 $CD4^+$ T세포에 $LVV^{IL-10-NGFR}$만을 형질도입하는 방식으로 생성하였다. **도 5a 내지 도 5c** 각각의 경우, 폴리브렌(8 μg/mL)의 존재 하에서 형질도입을 수행하였다. 또한, **도 5a 내지 도 5c** 각각의 경우, 형질도입 10일 내지 28일 후, 형질도입된 세포(즉, ΔNGFR+ 세포)를 항-CD271 마이크로비드(Miltenyi)와 항-CD19 CAR 마이크로비드(Miltenyi)를 사용하여 정제하였다. 정제된 세포를 이전에 설명된 바와 같이(문헌[Andolfi et al. Mol. Ther. 20(9):1778-1790 (2012)] 및 문헌[Locafaro et al. Mol. Ther. 25(10): 2254-2269 (2017)]) 14일마다 재자극하였다. 2회차(TF2) 및 3회차(TF3) 재자극 후, 생성된 세포($CD4^{IL-10항-CD19CAR}$ 세포 또는 대조군 $CD4^{IL-10}$ 세포)를 시험관내 및 생체내에서 특징분석하였다. 배양 배지를 전체 배양 기간 동안 필요한 경우 2일 내지 3일마다 새로운 배지로 교환하였다.

도 6a는, 대조군(좌측 패널)과 **도 5a**에 기재된 방법에 따라 생산된 $CD4^{IL-10항-CD19CAR}$(우측 패널)에 대한 유세포분석 플롯(x축은 항-CD19 CAR의 발현이고 y축은 IL-10의 대용물인 NGFR의 발현임)을 보여준다. **도 6b**는, 대조군(좌측 패널)과 **도 5b**에 기재된 방법에 따라 생산된 $CD4^{IL-10항-CD19CAR}$(우측 패널)에 대한 유세포분석 플롯(x축은 항-CD19 CAR의 발현이고 y축은 NGFR의 발현임)을 보여준다. **도 6c**는, 대조군(좌측 패널)과 **도 5c**에 기재된 방법에 따라 생산된 $CD4^{IL-10항-CD19CAR}$(우측 패널)에 대한 유세포분석 플롯(x축은 항-CD19 CAR의 발현이고 y축은 NGFR의 발현임)을 보여준다.

도 7은, $CD4^{IL-10}$ T세포(대조군)와 $CD4^{IL-10항-CD19CAR}$ T세포에 대한 유세포분석 플롯(x축은 항-CD19 CAR의 발현이고 y축은 NGFR의 발현임)을 보여준다. 상단 패널은 **도 5c**에 제시된 방법에 따라 공여자 26.1로부터 생성된 $CD4^{IL-10항-CD19CAR}$ T세포와 $CD4^{IL-10}$ T세포(대조군)를 나타낸다. 하단 패널은 **도 5c**에 제시된 방법에 따라 공여자 26.2로부터

생성된 $CD4^{IL-10항-CD19CAR}$ T세포와 $CD4^{IL-10}$ T세포(대조군)를 나타낸다.

도 8a 내지 도 8d는, 3명의 상이한 공여자(26.1, 26.2 및 26.3)로부터 단리된 $CD4^{+}$ T세포로부터 생성된 $CD4^{IL-10}$ T세포(대조군)와 $CD4^{IL-10/CAR}$ T세포에 대한 사이토카인 생산 프로파일을 보여준다. 사이토카인 생산 프로파일에는 IL-10(**도 8a**), IFN-γ(**도 8b**), IL-4(**도 8c**) 및 IL-5(**도 8d**)가 포함된다.

도 9는, 공여자 24.2로부터 단리된 $CD4^{+}$ T세포로부터 생성된 $CD4^{IL-10}$ T세포(대조군)와 $CD4^{IL-10/CAR}$ T세포에 대한 사이토카인 생산 프로파일을 보여준다.

도 10은, 공여자 24.2로부터 단리된 $CD4^{+}$ T세포로부터 생성된 $CD4^{IL-10항-CD19CAR}$ 세포가 시험관내에서 CD19를 발현하는 NALM6 세포를 사멸시킴을 보여준다. ALL-CM는 골수계 세포주이며, NK 사멸에 민감한 세포주인 K562는 대조군으로 포함시켰다.

도 11a는, 3명의 상이한 공여자(26.1, 26.2 및 26.3)로부터 단리된 $CD4^{+}$ T세포로부터 생성된 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포가 시험관내에서 $CD19^{+}$ NALM6 세포를 사멸시킴을 보여준다.

도 11b는, NALM6 세포와 $CD4^{IL-10}$ T세포(대조군) 또는 NALM6 세포와 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포의 공동 배양 3일차 상청액 중 IL-10의 수준을 보여준다. BLQ: 정량 수준(31 pg/mL) 미만.

도 12는, 2회차 재자극(TF2) 후에 단리된 $CD4^{IL-10}$ T세포(대조군)와 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포(**도 5c** 참조)의 공동 배양 후 동종이계 $CD4^{+}$ T세포의 증식 검정에서 얻은 유세포분석 플롯(eFluor® 670 대비 카운트)을 보여준다. 상단 패널은 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포와의 공동 배양 후 $CD4^{+}$ T세포의 증식을 보여준다. 하단 패널은 $CD4^{IL-10}$ T세포(대조군)와의 공동 배양 후 $CD4^{+}$ T세포의 증식을 보여준다. 유세포분석 플롯은 "미분열(undivided)" 세포와 "분열(divided)" 세포를 보여주며, 여기서 분열하는 세포에는 각 분열 후 희석으로 인해 점점 더 적은 양의 eFluor® 670이 포함되어 있다. $CD4^{IL-10}$ T세포(대조군)와 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포에 의해 매개되는 억제는 다음과 같이 계산하였다: 100-([$CD4^{IL-10}$ T세포(대조군) 또는 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포 존재 하에서 반응 세포의 증식/반응 세포의 증식] x 100).

도 13은, 2회차 재자극(TF2) 후에 단리된 $CD4^{IL-10}$ T세포(대조군)와 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포(**도 5c** 참조)의 공동 배양 후 동종이계 $CD8^{+}$ T세포의 증식 검정에서 얻은 유세포분석 플롯(eFluor® 670 대비 카운트)을 보여준다. 상단 패널은 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포와의 공동 배양 후 $CD8^{+}$ T세포의 증식을 보여준다. 하단 패널은 $CD4^{IL-10}$ T세포(대조군)와의 공동 배양 후 $CD8^{+}$ T세포의 증식을 보여준다. 유세포분석 플롯은 "미분열" 세포와 "분열" 세포를 보여주며, 여기서 분열하는 세포에는 각 분열 후 희석으로 인해 점점 더 적은 양의 eFluor® 670이 포함되어 있다. $CD4^{IL-10}$ T세포(대조군)와 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포에 의해 매개되는 억제는 다음과 같이 계산하였다: 100-([$CD4^{IL-10}$ T세포(대조군) 또는 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포 존재 하에서 반응 세포의 증식/반응 세포의 증식] x 100).

도 14는, 3회차 재자극(TF3) 후에 단리된 $CD4^{IL-10}$ T세포(대조군)와 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포(**도 5c** 참조)의 공동 배양 후 동종이계 PBMC의 증식 검정에서 얻은 유세포분석 플롯(eFluor® 670 대비 카운트)을 보여준다. 유세포분석 플롯은 "증식성" 세포를 보여주며, 여기서 분열하는 세포에는 각 분열 후 희석으로 인해 점점 더 적은 양의 eFluor® 670이 포함되어 있다. $CD4^{IL-10}$ T세포(대조군)와 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포에 의해 매개되는 억제는 다음과 같이 계산하였다: 100-([$CD4^{IL-10}$ T세포(대조군) 또는 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포 존재 하에서 반응 세포의 증식/반응 세포의 증식] x 100).

도 15는, 마우스에서 생체내 $CD19^{+}$ 종양세포의 성장을 평가하기 위한 실험 개요의 개략도를 보여준다. 0일차에, NSG 마우스에 (i) NALM6-루시퍼라아제(마우스당 1 x 10^5개), (ii) NALM6-루시퍼라아제(마우스당 1 x 10^5개) + PBMC(마우스당 2.5 x 10^6개), (iii) NALM6-루시퍼라아제(마우스당 1 x 10^5개) + $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포(마우스당

2.5 x 10^6개), 또는 (iv) NALM6-루시퍼라아제(마우스당 1 x 10^5개) + PBMC(마우스당 2.5 x 10^6개) + $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포(마우스당 2.5 x 10^6개)를 주사하였다.

도 16a는, **도 15**에 기재된 조건 (i) 내지 (iv)에 따라 주사한 후 3일차, 6일차, 9일차 및 12일차에 NSG 마우스의 NALM6-루시퍼라아제 세포로부터의 생물발광을 보여준다.

도 16b는, **도 16a**의 이미지로부터 생물발광을 정량화하는 선 그래프를 보여준다. **도 15**에 기재된 조건 (i) 내지 (iv) 각각에 대한 시간 경과에 따른(NALM6-루시퍼라아제 주사 후 일수) 총 플럭스[p/s]. P값은 조건 (ii) 내지 (iv)를 조건 (i)(NALM6-루시퍼라아제 단독)과 비교하는 Mann-Whitney 검정을 사용하여 12일차에 측정하였다.

도 17은, **도 15**에 기재된 조건 (i), (ii) 및 (iii)에 따라 주사된 마우스에 대한 시간 경과에 따른 체중 감소의 선 그래프를 보여준다. 체중 감소는 이종이식편대숙주병(GvHD)의 지표로 사용된다.

도 18a 내지 도 18c는, xeno-GvHD의 인간화 마우스 모델에서 단일 공여자 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포와 다중 공여자 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포를 보여준다. **도 18a**는, 방사선 조사된 NSG 마우스에 3일차에 (i) 동종이계 PBMC(2.5E6개 세포/마우스), (ii) 단일 공여자 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포(2.5E6개 세포/마우스), (iii) 다중 공여자 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포(2.5E6개 세포/마우스), (iv) PBMC + 단일 공여자 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포, 또는 (v) PBMC + 다중 공여자 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포(2.5E6개 세포/마우스)를 정맥내(i.v.) 주사한 후 동종이계 PBMC에 의해 유도된 xeno-GvHD의 인간화 마우스 모델에서 시험한 단일 공여자 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포를 보여준다. **도 18b**는, 방사선 조사된 NSG 마우스에 3일차에 동종이계 PBMC(2.5E6개 세포/마우스) 및/또는 단일 공여자 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포를 정맥내(i.v.) 주사한 후 동종이계 PBMC에 의해 유도된 xeno-GvHD의 인간화 마우스 모델에서 시험한 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포를 보여준다. **도 18c**는, 방사선 조사된 NSG 마우스에 3일차에 동종이계 PBMC(2.5E6개 세포/마우스) 및/또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포(2.5E6개 세포/마우스)를 정맥내(i.v.) 주사한 후 동종이계 PBMC에 의해 유도된 xeno-GvHD의 인간화 마우스 모델에서 시험한 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포를 보여준다. PBMC: 말초 단핵 세포; GvHD: 이식편대숙주병.

도 19는, $CD4^{IL-10}$ 세포를 생성하는 예시적인 프로토콜을 예시한다.

도 20a는, LV-IL-10/ΔNGFR(인간 IL-10과 인간 NGF 수용체의 절단된 형태를 인코딩하는 양방향성 렌티바이러스 벡터)로 형질도입된 인간 $CD4^+$ T세포에서 $CD4^+ΔNGFR^+$ 세포의 %(평균±SD, n=10)와 벡터 카피 수(VCN, 평균±SD, n=10)를 보여준다. **도 20b**는, LV-IL-10/ΔNGFR로 형질도입되고 항-CD271 마이크로비드를 사용하여 정제된 2명의 대표적인 공여자(공여자 B와 공여자 C) 유래의 인간 $CD4^+$ T세포에서 CD4와 ΔNGFR의 발현에 대한 FACS 분석을 보여준다.

도 21은, 2회차 (TF2) 및 2회차 (TF3) 재자극 후 단일 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포의 사이토카인 생산 프로파일을 보여준다. TF2 $CD4^{IL-10}$ 세포와 TF3 $CD4^{IL-10}$ 세포를 자극하지 않은 상태로 남겨두거나(화살표는 자발적/자극되지 않은 샘플을 나타냄), 고정된 CD3 mAb(10 mg/mL)와 가용성 CD28 mAb(1 mg/mL)로 48시간 동안 자극하였다. 배양 상청액을 수집하고, IL-10, IL-4, IL-5, IFN-γ 및 IL-22의 수준을 ELISA로 측정하였다. 모든 샘플은 삼중으로 시험하였다. 평균±SD, 시험된 8명(n=8)의 공여자가 제시되어 있다.

도 22a는, FACS에 따라 분석된 2회차 자극(TF2) 후 그랜자임 B(GzB)를 발현하는 $CD4^{IL-10}$ 세포의 %를 보여준다. 7명(n=7)의 공여자와 단일 공여자에 대한 박스 및 위스커(box and whisker) 플롯이 제시되어 있다. **도 22b**는, $CD4^{IL-10}$ 세포(10^5개/웰)를 K562 세포 및 ALL-CM 세포(10^5개/웰)와 1:1 비로 3일 동안 공동 배양한 경우 사멸 세포의 %를 보여준다. 박스와 위스커는 4명(n=4)의 공여자의 데이터를 나타내며, 도트(dot)는 단일 공여자의 데이터를 나타낸다.

도 23a와 도 23b는, 단일 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포가 동종이계 $CD4^+$ T세포의 증식을 억제할 수 있음을 보여준다. 동종이계 PBMC 세포를 eFluor® 670(10^5개 세포/웰)으로 표지하고, $CD4^{IL-10}$ 세포(10^5개 세포/웰)의 부재 또는 존재하에서 동종이계 성숙 수지상세포(DC)(5 x 10^4개 세포/웰)와 가용성 항-CD3 mAb를 이용하여 반응자:억제자 비

1:1로 자극하였다. 4일 동안의 배양 후, $CD4^{+}\Delta NGFR^{-}$ T세포에 대해 게이팅한 후에 유세포분석을 이용하여 eFluor® 670 희석에 따라 증식하는 반응 세포의 %를 결정하였다. **도 23a**는 공여자-C, 공여자-E 및 공여자-F의 결과를 보여주고, **도 23b**는 공여자-H, 공여자-I 및 공여자-L의 결과를 보여준다. 증식률과 억제율이 제시되어 있다. $CD4^{IL-10}$ 세포에 의해 매개되는 억제는 다음과 같이 계산하였다: 100-([$CD4^{IL-10}$ 세포 존재 하에서 반응 세포의 증식/반응 세포 단독의 증식] x 100).

도 24a와 도 24b는, 단일 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포가 동종이계 $CD8^{+}$ T세포의 증식을 억제할 수 있음을 보여준다. 동종이계 PBMC 세포를 eFluor® 670(10^5개 세포/웰)으로 표지하고, $CD4^{IL-10}$ 세포(10^5개 세포/웰)의 부재 또는 존재 하에서 동종이계 성숙 수지상세포(DC)(5 x 10^4개 세포/웰)와 가용성 항-CD3 mAb를 이용하여 반응자:억제자 비 1:1로 자극하였다. 4일 동안의 배양 후, $CD4^{+}\Delta NGFR^{-}$ T세포에 대해 게이팅한 후에 유세포분석을 이용하여 eFluor® 670 희석에 따라 증식하는 반응 세포의 %를 결정하였다. **도 24a**는 공여자-C, 공여자-E 및 공여자-F의 결과를 보여주고, **도 24b**는 공여자-H, 공여자-I 및 공여자-L의 결과를 보여준다. 증식률과 억제율이 제시되어 있다. $CD4^{IL-10}$ 세포에 의해 매개되는 억제는 다음과 같이 계산하였다: 100-([$CD4^{IL-10}$ 세포 존재 하에서 반응 세포의 증식/반응 세포 단독의 증식] x 100).

도 25는, 8명의 개별 공여자 유래의 $CD4^{IL-10}$ 세포에 의해 생산된 평균 수준(+/- SD)과 비교한, 3회차(TF3) 재자극 후 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포의 사이토카인 생산 프로파일을 보여준다. 3명의 공여자 유래의 TF3 $CD4^{IL-10}$ 세포를 1:1:1 비로 풀링하고, 고정된 CD3 mAb(10 mg/mL)와 가용성 CD28 mAb(1 mg/mL)로 48시간 동안 자극하였다. 배양 상청액을 수집하고, IL-10, IL-4, IL-5, IFN-감마 및 IL-22의 수준을 ELISA로 측정하였다. 도트는 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포의 결과이고; 회색 막대는 8명(n=8)의 단일 공여자의 평균±SD를 나타낸다.

도 26a는, 풀을 생성하는 데 사용된 3명(n=3)의 단일 공여자의 $CD4^{IL-10}$ 세포에 의한 그랜자임 B 발현의 평균 수준%(+/- SD)와 비교한, 그랜자임 B(GzB)를 발현하는 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포의 %를 보여준다. 세포를 3회차 자극(TF3) 후 FACS로 분석하였다. **도 26b**는, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포(10^5개/웰)를 K562 세포 및 ALL-CM 세포(10^5개/웰)와 1:1 비로 3일 동안 공동 배양한 경우 사멸 세포의 %를 보여준다. 잔류 백혈병 세포($CD45^{+}CD33^{+}$)를 각각의 표적세포에 대해 FACS로 계수하였다. 도트는 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포의 결과이고, 회색 막대는 풀을 생성하는 데 사용된 3명(n=3)의 단일 공여자의 평균±SD를 나타낸다.

도 27a와 도 27b는, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포가 동종이계 $CD4^{+}$ T세포와 $CD8^{+}$ T세포의 증식을 억제할 수 있음을 보여준다. 동종이계 PBMC 세포를 eFluor® 670(10^5개 세포/웰)으로 표지하고, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포(10^5개 세포/웰)의 부재 또는 존재 하에서 동종이계 성숙 수지상세포(DC)(5 x 10^4개 세포/웰)와 가용성 항-CD3 mAb를 이용하여 반응자:억제자 비 1:1로 자극하였다. 4일 동안의 배양 후, $CD4^{+}\Delta NGFR^{-}$ T세포와 $CD8^{+}\Delta NGFR^{-}$ T세포에 대해 게이팅한 후에 유세포분석을 이용하여 eFluor® 670 희석에 따라 증식하는 반응 세포의 %를 결정하였다. **도 27a**는, 공여자-C, 공여자-E 및 공여자-F로부터 풀링된 $CD4^{+}$ 세포를 함유하는 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포의 결과를 보여준다. **도 27b**는, 공여자-H, 공여자-I 및 공여자-L로부터 풀링된 $CD4^{+}$ 세포를 함유하는 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포의 결과를 보여준다. $CD4^{IL-10}$ 세포에 의해 매개되는 억제는 다음과 같이 계산하였다: 100-([$CD4^{IL-10}$ 세포 존재 하에서 반응 세포의 증식/반응 세포 단독의 증식] x 100).

도 28은, 방사선 조사 후 0일차에 주사된 인간 PBMC 및/또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포에 의한 GvHD의 유도를 시험하는 프로토콜을 예시한다.

도 29는, PBMC(5 x 10^6개 세포/마우스), 다중 공여자(3명의 공여자) $CD4^{IL-10}$ 세포(5 x 10^6개 세포/마우스), 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포(3명의 공여자)(5 x 10^6개 세포/마우스)와 조합된 PBMC(5 x 10^6개 세포/마우스)의 주사 후 각 일차에서 GvHD를 나타내는 NSG 마우스의 %를 보여준다.

도 30은, PBMC(5 x 10^6개 세포/마우스), 다중 공여자(3명의 공여자) $CD4^{IL-10}$ 세포(5 x 10^6개 세포/마우스), 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포(3명의 공여자)(5 x 10^6개 세포/마우스)와 조합된 PBMC(5 x 10^6개 세포/마우스)가 주사된 NSG 마우스에서 비장(좌측 패널)과 골수(우측 패널)로의 $CD4^{IL-10}$ 세포의 이동을 보여준다. 8명(n=8)의 공여자와 단일 공여자에 대한 박스 및 위스커 플롯이 제시되어 있다.

도 31은, 방사선 조사 후 0일차에 주사된 $CD4^+$ T세포와 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포 또는 단일 공여자(BC-H) $CD4^{IL-10}$ 세포에 의한 GvHD의 유도를 시험하는 프로토콜을 예시한다.

도 32는, 주사 후 각 일차에서 GvHD를 나타내는 NSG 마우스의 %를 보여준다.

도 33a 내지 도 33c는, 순환하는 백혈병 세포의 감소와 장기 무백혈병 생존율(leukemia free survival)에 기반하여 시험된 이식편대백혈병(GvL) 효과를 보여준다. 백혈병은 이전에 설명된 바와 같이(문헌[Locafaro G. et al Molecular Therapy 2017]) 측정하였다. 0일차에, NSG 마우스에 준치사량으로 방사선을 조사하고, 골수성 백혈병 세포(ALL-CM)(5 x 10^6개)를 정맥내 주사하였다. **도 33a**는 실험의 예시이다. **도 33b**는, 3일차에 PBMC(5 x 10^6개) 또는 단일 공여자(공여자 BC-I와 공여자 BC-H) $CD4^{IL-10}$ 세포(2.5 x 10^6개)가 주사된 동물에서의 무백혈병 생존율을 보여준다. **도 33c**는, 3일차에 PBMC(5 x 10^6개) 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포(공여자 BC-I와 공여자 BC-H)(2.5 x 10^6개)가 주사된 동물에서의 무백혈병 생존율을 보여준다.

도 34a 내지 도 34c는, 0일차에 NSG 마우스에 준치사량으로 방사선을 조사하고, ALL-CM 세포(5 x 10^6개)를 정맥내 주사한 후 측정된 장기 무백혈병 생존율을 보여준다. **도 34a**는 실험의 예시를 보여준다. **도 34b**는, 3일차에 단핵 세포(PBMC)(5 x 10^6개) 단독, 또는 단핵 세포(PBMC)(5 x 10^6개) + 단일 공여자(공여자 BC-H와 공여자 BC-I) $CD4^{IL-10}$ 세포(2.5 x 10^6개)가 주사된 동물의 데이터를 보여준다. **도 34c**는, 3일차에 단핵 세포(PBMC)(5 x 10^6개) 단독, 또는 단핵 세포(PBMC)(5 x 10^6개) + 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포(BC-I/BC-H)(2.5 x 10^6개)가 주사된 동물의 데이터를 보여준다.

도 35a 내지 도 35g는, $CD4^{IL-10}$ 세포에 의한 NLPR3 인플라마솜 활성화의 저해를 보여준다. **도 35a**는, 단일 공여자(#1) 유래 $CD4^{IL-10}$ 세포 상청액이 LPS 활성화된 단핵구에 의한 IL-1β의 생산에 미치는 영향을 보여준다. **도 35b**는, 또 다른 단일 공여자(#2) 유래 $CD4^{IL-10}$ 세포 상청액이 LPS 활성화된 단핵구에 의한 IL-1β의 생산에 미치는 영향을 보여준다. **도 35c**는, 단일 공여자(#1) 유래의 $CD4^{IL-10}$ 세포 상청액이 NLPR3 인플라마솜 활성화제 니게리신(NIG)에 의해 증강된 LPS 유도 IL-1β 생산의 저해에 미치는 영향을 보여준다. **도 35d**는, 단일 공여자(#2) 유래의 $CD4^{IL-10}$ 세포 상청액이 NLPR3 인플라마솜 활성화제 니게리신(NIG)에 의해 증강된 LPS 유도 IL-1β 생산의 저해에 미치는 영향을 보여준다. **도 35e**는, 단일 공여자 유래 세포와 2명의 상이한 공여자로부터 풀링된 세포의 $CD4^{IL-10}$ 세포 상청액이 항-IL-10 수용체(항-IL-10R) mAb의 존재 또는 부재 하에서 단핵구에 의한 LPS 유도 IL-1β 생산에 미치는 영향을 보여주는 막대 그래프이다. **도 35f**는, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포 상청액이 항-IL-10 수용체(항-IL-10R) mAb의 존재 또는 부재 하에서 단핵구에 의한 IL-1β의 생산에 미치는 영향을 보여준다. **도 35g**는, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포 상청액이 항-IL-10R mAb의 존재 또는 부재 하에서 니게리신과 조합된 LPS에 의해 유도된 IL-18의 생산에 미치는 영향을 보여준다.

도 36은, 이식편대골수성백혈병과 xeno-GvHD 효과를 시험하기 위한 실험 프로토콜을 예시한다. 0일차에, NSG 마우스에 ALL-CM 세포(2.5 x 10^6개)를 정맥내 주사하였다. 3일차에, 마우스를 5개의 군으로 나누고, 각각의 군을 **도 36**에 제시된 농도로 다음과 같이 처리하였다: (i) 대조군으로서 처리 없음; (ii) 동종이계 단핵 세포(PBMC); (iii) 동종이계 PBMC와 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포(BC-E, BC-V, BC-T, 1:1:1로 풀링됨); (iv) 동종이계 PBMC와 단일 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포(BC-E); 또는 (v) 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포.

도 37은, 단일 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포(BC-T, BC-V 및 BC-E)와 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포(풀: BC-E, BC-V 및 BC-T,

1:1:1로 풀링됨)의 사이토카인 분비 프로파일을 도시한 막대 그래프이다.

도 38은, 단일 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포(BC-V와 BC-E)와 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포(BC-V/BC-E/BC-T의 풀)가 동종이계 $CD4^{+}$ T세포와 $CD8^{+}$ T세포의 시험관내 증식에 미치는 억제 효과를 보여준다. 동종이계 PBMC 세포를 eFluor® 670(5 x 10^4개 세포/웰)으로 표지하고, $CD4^{IL-10}$ 세포(5 x 10^4개 세포/웰)의 부재 또는 존재 하에서 동종이계 성숙 수지상세포(DC)(1 x 10^4개 세포/웰)와 가용성 항-CD3 mAb를 이용하여 반응자:억제자 비 1:1로 자극하였다. 3일 동안의 배양 후, $CD4^{+}$ ΔNGFR^{-} T세포(상단) 또는 $CD8^{+}$ ΔNGFR^{-} T세포(하단)에 대해 게이팅한 후에 유세포분석을 이용하여 eFluor® 670 희석에 따라 증식하는 반응 세포의 %를 결정하였다. **도 38**은, 단일 공여자 BC-V 및 BC-E 유래의 세포와, 공여자 BC-V, BC-E 및 BC-T로부터 풀링된 세포의 결과를 보여준다. 증식률과 억제율이 제시되어 있다. $CD4^{IL-10}$ 세포에 의해 매개되는 억제는 다음과 같이 계산하였다: 100-([$CD4^{IL-10}$ 세포 존재 하에서 반응 세포의 증식/반응 세포 단독의 증식] x 100).

도 39는, 단일 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포(BC-E 및 BC-V) 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포(BC-E+BC-V+BC-T)와 ALL-CM 골수계 종양세포 또는 K562 세포의 공동 배양에서 살아있는 세포의 %를 보여준다. 결과에 따르면, 단일 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포와 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포는 ALL-CM 골수계 종양세포에 대해서는 선택적 세포독성 효과를 나타냈지만, 클래스 I MHC 발현이 결여된 K562 세포에 대해서는 그렇지 않은 것으로 나타났다.

도 40은, 0일차에 ALL-CM 세포(2.5 x 10^6개)가 정맥내 주사된 NSG 마우스에서 측정된 무백혈병 생존율을 보여준다. 3일차에, 마우스를 5개의 군으로 나누고, 각각의 군을 다음과 같이 처리하였다: (i) 대조군으로서 처리 없음; (ii) 동종이계 단핵 세포(PBMC); (iii) 동종이계 PBMC와 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포(BC-V/BC-T/BC-E); (iv) 동종이계 PBMC와 단일 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포(BC-E); 또는 (v) 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포. 그래프는 각각의 군에서 동물의 무백혈병 생존율을 보여준다.

도 41은, ALL-CM 세포(2.5 x 10^6개)를 주사하고, 3일차에 (i) 대조군으로서 처리 없음; (ii) 동종이계 단핵 세포(PBMC); (iii) 동종이계 PBMC와 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포(BC-E, BC-V, BC-T); (iv) 동종이계 PBMC와 단일 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포(BC-E); 또는 (v) 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포를 후속으로 투여한 후 각 일차에서 GvHD를 나타내지 않은 NSG 마우스의 %를 보여준다.

도 42는, 2.5E+06개의 PBMC(공여자 C, E, F 및 H와 동종이계)를 투여받은 NSG 마우스가 모두 22일차에 급성의 치명적인 xeno-GvHD를 나타냈음을 보여준다. PBMC와 조합된 단일 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포(로트 C) 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포(로트 CEFH)를 투여하면, 각각, 마우스의 75%(4마리 마우스 중 3마리) 및 80%(5마리 마우스 중 4마리)에서 치명적인 xeno-GvHD의 발생이 예방되었다. 대조적으로, 2.5E+06개의 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포를 전달한 경우에는 GvHD의 어떠한 징후도 유도되지 않았다. 이러한 결과를 종합하면, 4명의 상이한 공여자 유래의 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포가 단일 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포보다 강력하게 또는 약간 더 강력하게 병원성 인간 T세포 반응을 억제하는 것으로 보인다. PBMC: 말초 단핵 세포; GvHD: 이식편대숙주병.

도 43a는, 인간(서열번호 1), 무스 무스쿨루스, "MOUSE"(서열번호 58); 라투스 노르베기쿠스, "RAT"(서열번호 59); 마카카 물라타, "MACMU"(서열번호 60); 고릴라 고릴라, "GORILLA"(서열번호 61); 마카카 파시쿨라리스, "CYNO"(서열번호 62); 파피오 아누비스, "OLIVE BABOON"(서열번호 63); 판 파니스쿠스, "BONOBO"(서열번호 64); 판 트로글로디테스, "CHIMP"(서열번호 65); 및 EBVB9(서열번호 66)를 포함하는 다양한 종의 IL-10 단백질 서열의 정렬을 보여준다.

도 43b는, 인간 IL-10의 하나 이상의 아미노산을 상응하는 위치에 있는 바이러스 IL-10(EBVB9)의 아미노산으로 대체하여 생성한 IL-10 변이체의 서열을 제공한다. 또한, 예시적인 변이체인 가능한 huIL-10 HYBRID #1(서열번호 67)과 가능한 huIL-10 HYBRID #2(서열번호 68)의 서열이 제공되어 있다. "*"는 치환된 하나 이상의 아미노산 위치를 나타낸다. "#"는 IL-10 HYBRID #2(서열번호 20)에 대한 바람직한 I105에서 A105로의 아미노산 치환을 나타낸다.

도 43c는, 인간 IL-10(서열번호 1)과 IL-10 EBVB9(서열번호 66)의 정렬을 보여준다. "*"는 IL-10 HYBRID #1에

서 치환된 하나 이상의 아미노산 위치를 나타낸다. "#"는 IL-10 HYBRID #2에 대한 바람직한 I105에서 A105로의 아미노산 치환을 나타낸다.

도면은 단지 예시의 목적으로 본 발명의 다양한 실시형태를 도시한 것이다. 당업자는, 본원에 기재된 본 발명의 원리에서 벗어나지 않는 한 본원에 예시된 구조 및 방법의 대안적인 실시형태가 이용될 수 있다는 것을 하기 논의로부터 쉽게 인식할 수 있을 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0256] ### 6.1. 정의

[0257] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자가 통상적으로 이해하는 의미를 갖는다. 본원에 사용된 하기 용어는 하기에 설명된 의미를 갖는다.

[0258] "**이식편대백혈병 효과(Graft-versus-leukemia effect)**" 또는 "**GvL**"은 동종이계 조혈 줄기세포 이식(HSCT) 또는 골수 이식(BMT) 후 나타나는 효과를 나타낸다. 동종이계 이식편 내 T림프구는 악성 잔류 숙주 백혈병 세포를 제거한다.

[0259] "**이식편대종양 효과(Graft versus tumor effect)**" 또는 "**GvT**"는 동종이계 조혈 줄기세포 이식(HSCT) 또는 골수 이식(BMT) 후 나타나는 효과를 나타낸다. 동종이계 이식편 내 T림프구는 악성 잔류 숙주 암세포, 예를 들어 골수종, 림프구성 및 골수성 백혈병, 림프종, 다발성 골수종, 및 가능하게는 유방암의 세포를 제거한다. GvT라는 용어는 GvL의 일반적인 용어이다.

[0260] "**치료**", "**치료하는**" 등의 용어는, 의학 분야에서 이해되는 가장 넓은 의미로 본원에서 사용된다. 특히, 상기 용어는 일반적으로 목적하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 달성하는 것을 의미한다. 본원에 사용된 "치료"는 포유동물, 특히 인간의 질환 또는 병태의 임의의 치료를 포함하며, 이에는, (a) 질환 또는 병태에 걸리기 쉬울 수 있지만 아직 질환 또는 병태를 앓고 있는 것으로 진단되지 않은 대상에서 일어날 수 있는 질환 또는 병태를 예방하는 것; (b) 질환 또는 병태를 저해하는 것(예를 들어, 이의 발달을 중단시키는 것); 또는 (c) 질환 또는 병태를 완화시키는 것(예를 들어, 질환 또는 병태의 퇴행을 유발하고, 하나 이상의 증상의 개선을 제공하는 것)이 포함된다. 임의의 병태에 대한 개선은 당업계에 알려진 표준 방법 및 기술에 따라 용이하게 평가될 수 있다. 질환에 대한 방법에 따라 치료되는 대상 집단에는, 바람직하지 않은 병태 또는 질환을 앓고 있는 대상뿐 아니라, 병태 또는 질환이 발생할 위험이 있는 대상도 포함된다.

[0261] 본원에 사용된 "**HLA 일치(HLA-matched)**"는, 한 쌍의 개체가 HLA 클래스 I(HLA-A, HLA-B 및 HLA-C) 유전자좌와 클래스 II(HLA-DRB1 및 HLA-DQB1) 유전자좌에 개체를 서로 면역학적으로 적합하게 만드는 일치하는 HLA 대립유전자를 가지고 있음을 나타낸다. HLA 적합성은, 예를 들어 문헌[Tiervy, Haematologica 2016 Volume 101(6):680-687](이는 본원에 참조로 인용됨)에 기재된 바와 같은, 당업계에서 이용 가능한 임의의 방법을 사용하여 결정될 수 있다.

[0262] 소정의 유전자좌에 있어서, 한 개체의 2개의 대립유전자가 각각 다른 한 개체의 2개의 대립유전자와 일치하는 경우, 한 쌍의 개체는 2/2 일치한다. 한 개체의 2개의 대립유전자 중 하나만 다른 한 개체의 2개의 대립유전자 중 하나와 일치하는 경우, 한 쌍의 개체는 ½ 일치한다. HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서, 한 개체의 10개의 대립유전자(HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌 각각에 대해 2개)가 모두 다른 한 개체의 10개의 대립유전자 모두와 일치하는 경우, 한 쌍의 개체는 10/10 일치한다.

[0263] 바람직한 실시형태에서, 대립유전자 수준 유형 분류가 HLA 적합성의 결정에 사용된다. 대립유전자 수준 유형 분류는 첫 번째, 두 번째, 세 번째 및 네 번째 필드의 모든 숫자를 사용하여 정의된 HLA 유전자에 대한 고유한 뉴클레오타이드 서열, 예를 들어 A*02:01:01:01에 해당한다. 기능적으로, 각각, 코딩 서열에서의 침묵 치환과 비코딩 서열에서의 치환에 따라 달라지는 대립유전자를 특징으로 하는 세 번째 필드와 네 번째 필드는, 치환이 HLA 대립유전자의 발현을 막는 경우를 제외하고는 관련이 없다(예를 들어, 비기능(null) 대립유전자 B*15:01:01:02N). 비기능 대립유전자가 없으면, 동종반응성 T세포에 의해 인식될 가능성이 매우 높고 유해한 임상 영향을 미칠 수 있는 불일치로 이어질 수 있다. 비코딩 서열에서의 치환은 발현 수준에 영향을 미칠 수 있다(예를 들어, A24low 대립유전자 A*24:02:01:02L). 이러한 가변성은 항-HLA 동종인식에도 영향을 미칠 수 있다.

[0264] 본원에 사용된 "**HLA 불일치(HLA-mismatched)**"라는 용어는, 한 쌍의 개체가 HLA 클래스 I(HLA-A, HLA-B 및 HLA-C) 유전자좌와 클래스 II(HLA-DRB1 및 HLA-DQB1) 유전자좌에 개체를 서로 면역학적으로 적합하지 않게 만드는 불일치 HLA 대립유전자를 가지고 있음을 나타낸다.

[0265] 본원에 사용된 "**부분 HLA 불일치(partially HLA-mismatched)**"라는 용어는, 한 쌍의 개체가 HLA 클래스 I(HLA-A, HLA-B 및 HLA-C) 유전자좌와 클래스 II(HLA-DRB1 및 HLA-DQB1) 유전자좌에 개체를 허용 가능한 정도로 서로 면역학적으로 적합하지 않게 만드는 불일치 HLA 대립유전자를 가지고 있음을 나타낸다. 일부 연구에서 허용적 불일치가 확인되었다. 일부 HLA 클래스 I 비적합성은 더 허용적인 것으로 간주된다.

[0266] "**HLA 일배체형(HLA haplotype)**"은, 하나는 모계로부터 유전되고 하나는 부계로부터 유전되는 염색체별 일련의 HLA 유전자좌 대립유전자를 나타낸다. 클래스 I(HLA-A, HLA-B 및 HLA-C) 유전자좌와 클래스 II(HLA-DRB1 및 HLA-DQB1) 유전자좌에 대한 유전자형을 사용하여 HLA 일배체형을 결정할 수 있다.

[0267] "**치료적 유효량**"이라는 용어는, 치료를 통해 질환의 증상을 개선시키는 데 효과적인 양이다.

[0268] "**예방적 유효량**"이라는 용어는, 질환, 병태 또는 이들의 증상을 완전히 또는 부분적으로 예방한다는 측면에서 효과적인 양이다.

[0269] "**개선시키는**"이라는 용어는, 질환 상태, 예를 들어 신경변성 질환 상태의 치료에서 임의의 치료적으로 유익한 결과(예방, 중증도 또는 진행의 약화, 관해, 또는 치유 포함)를 나타낸다.

[0270] "**$CD4^{IL-10/CAR}$**"이라는 용어는, 키메라 항원 수용체를 발현하도록 유전자 변형된 임의의 $CD4^{IL-10}$ 세포를 나타낸다. $CD4^{IL-10/CAR}$이 특정 키메라 항원 수용체를 나타내는 경우, 명명법에는 CAR의 특이성에 대한 지정이 포함될 수 있다(예를 들어, "$CD4^{IL-10/항-[항원]\ CAR}$" 세포). 예를 들어, $CD4^{IL-10/CAR}$과 $CD4^{IL-10/CD19\ CAR}$은 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0271] 본원에 사용된 "**자가유래(HLA haplotype)**"라는 용어는, 세포가 다시 도입되는 동일한 개체(예를 들어, 환자)에서 유도된 세포를 나타낸다.

[0272] 본원에 사용된 "**동종이계(allogeneic)**"라는 용어는, 유전적으로 동일하지 않은 동일한 종의 둘 이상의 상이한 개체에서 취해진 세포를 나타낸다.

[0273] ### 6.2. 기타 해석상 협의

[0274] 본원에 언급된 범위는 언급된 종점을 포함하여 범위 내 모든 값을 약칭하는 것으로 이해된다. 예를 들어, 1 내지 50의 범위는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 및 50으로 이루어지는 군으로부터의 임의의 숫자, 숫자의 조합 또는 하위 범위를 포함하는 것으로 이해된다.

[0275] ### 6.3. $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포

[0276] 제1 양태에서, CAR을 인코딩하는 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드로부터 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하고, IL-10을 인코딩하는 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드로부터 IL-10을 발현하도록 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포 또는 $CD4^+$ T세포 집단이 설명된다($CD4^{IL-10/CAR}$ 세포).

[0277] #### 6.3.1. $CD4^+$ T세포와 T세포 공여자

[0278] $CD4^{IL-10/CAR}$(자가유래 또는 동종이계 단일 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$, 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$) 집단을 생성하는 데 사용되는 $CD4^+$ T세포는 당업계에서 이용 가능한 방법을 사용하여 공여자, 바람직하게는 인간 공여자의 말초혈액, 제대혈 또는 다른 혈액 샘플로부터 단리될 수 있다. 전형적인 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 말초혈액으로부터 단리된다. 특정 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 백혈구성분채집술과 버피 코트를 사용하여 단리된다. 특정 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 제3자에서 얻은 말초혈액으로부터 단리된다.

[0279] 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 사전 동결된 혈액 스톡, 사전 동결된 말초혈액 단핵 세포(PBMC) 스톡 또는 사전 동결된 $CD4^+$ T세포 스톡으로부터 단리된다. 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 이전에 동결된 적이 없는 말초혈액 또는 PBMC로부터 단리된다. 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 개별 공여자로부터 얻은 혈액 또는 PBMC로부터 별도로 단리된 후, 풀링된다. 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 먼저 복수의 공여자로부터 풀링된 혈액 또는

PBMC로부터 단리된다.

[0280] 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 단일 T세포 공여자로부터 얻는다. 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 2명, 3명, 4명, 5명, 6명, 7명, 8명, 9명 또는 10명의 상이한 T세포 공여자로부터 얻는다.

[0281] 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포로 치료를 받게 될 환자로부터 얻는다.

[0282] 일부 실시형태에서, 1명 이상의 T세포 공여자는 유전자형에 관계없이 선택된다. 일부 실시형태에서, 1명 이상의 T세포 공여자는 유전자형에 기반하여 선택된다.

[0283] 특정 실시형태에서, 1명 이상의 T세포 공여자는 HLA 일배체형에 기반하여 선택된다.

[0284] 일부 실시형태에서, 적어도 2명의 상이한 T세포 공여자 중 일부 또는 전부는 일치하는 HLA 일배체형을 갖는다. 일부 실시형태에서, 적어도 2명의 상이한 T세포 공여자 중 일부 또는 전부는 일치하지 않는 HLA 일배체형을 갖는다.

[0285] 일부 실시형태에서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포는 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서 서로 적어도 1/10, 2/10, 3/10, 4/10, 5/10, 6/10, 7/10, 8/10 또는 9/10 일치한다. 일부 실시형태에서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포는 HLA-A, HLA-B, HLA-C 및 HLA-DRB1 유전자좌에서 서로 적어도 1/8, 2/8, 3/8, 4/8, 5/8, 6/8, 7/8 또는 8/8 일치한다. 일부 실시형태에서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포는 HLA-A 유전자좌에서 서로 2/2 일치한다. 일부 실시형태에서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포는 HLA-B 유전자좌에서 서로 2/2 일치한다. 일부 실시형태에서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포는 HLA-C 유전자좌에서 서로 2/2 일치한다. 일부 실시형태에서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포는 HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서 서로 적어도 3/4 또는 4/4 일치한다. 일부 실시형태에서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포는 A*02 대립유전자 또는 A*24 대립유전자를 갖는다.

[0286] 일부 실시형태에서, 1명 이상의 T세포 공여자 중 누구도 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포로 치료를 받게 될 숙주가 아니다. 일부 실시형태에서, 1명 이상의 T세포 공여자 중 누구도 본원에 기재된 치료 방법에서 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포와 함께 사용되는 줄기세포(예를 들어, HSC), 조직 또는 기관의 공여자가 아니다. 일부 실시형태에서, T세포 공여자 중 한 명 이상은 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포로 치료를 받게 될 숙주이다.

[0287] 일부 실시형태에서, T세포 공여자 중 한 명 이상은 치료를 받게 될 환자(숙주)와 HLA가 불일치하거나 부분적으로 HLA가 불일치한다. 일부 실시형태에서, T세포 공여자 중 한 명 이상은 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서 환자와 5/10, 6/10, 7/10, 8/10, 9/10 또는 10/10 미만으로 일치한다. 일부 실시형태에서, T세포 공여자 중 한 명 이상은 HLA-A, HLA-B, HLA-C 및 HLA-DRB1 유전자좌에서 환자와 4/8, 5/8, 6/8, 7/8 또는 8/8 미만으로 일치한다. 일부 실시형태에서, T세포 공여자 중 한 명 이상은 HLA-A, HLA-B 또는 HLA-C 유전자좌에서 환자와 2/2 미만으로 일치한다. 일부 실시형태에서, T세포 공여자 중 한 명 이상은 HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서 환자와 2/4, 3/4 또는 4/4 미만으로 일치한다.

[0288] 일부 실시형태에서, T세포 공여자 중 한 명 이상은 HSC 공여자와 HLA가 불일치하거나 부분적으로 HLA가 불일치한다. 일부 실시형태에서, T세포 공여자 중 한 명 이상은 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서 HSC 공여자와 5/10, 6/10, 7/10, 8/10, 9/10 또는 10/10 미만으로 일치한다. 일부 실시형태에서, T세포 공여자 중 한 명 이상은 HLA-A, HLA-B, HLA-C 및 HLA-DRB1 유전자좌에서 HSC 공여자와 4/8, 5/8, 6/8, 7/8 또는 8/8 미만으로 일치한다. 일부 실시형태에서, T세포 공여자 중 한 명 이상은 HLA-A, HLA-B 또는 HLA-C 유전자좌에서 HSC 공여자와 2/2 미만으로 일치한다. 일부 실시형태에서, T세포 공여자 중 한 명 이상은 HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서 HSC 공여자와 3/4 또는 4/4 미만으로 일치한다.

[0289] 바람직한 실시형태에서, $CD4^+$ T세포 중 어느 것도 불멸화된 것이 아니다.

[0290] **6.3.2. CAR을 인코딩하는 외인성 폴리뉴클레오타이드**

[0291] 본 개시내용의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절로부터 CAR을 인코딩하는 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절을 발현하도록 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포이다. CAR

은 항원 결합 도메인, 힌지, 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인의 네 가지 주요 구성요소를 갖는 모듈식 설계를 갖는다. 이러한 요소들은 각각 별개의 기능을 가지며, 문헌[Rafiq et al., *Nat. Rev. Clin. Onco.*, 17: 147-167 (2020)](이는 그 전문이 본원에 참조로 인용됨)에 기재된 바와 같은 구성 단백질 도메인의 다수의 변형을 통해 CAR의 최적의 분자 설계를 달성할 수 있다.

[0292] 일부 실시형태에서, CAR 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 1세대 CAR, 2세대 CAR 또는 3세대 CAR을 인코딩한다. 일부 실시형태에서, 1세대 CAR에는 항원 결합 도메인, 힌지 영역, 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인이 포함된다. 일부 실시형태에서, 2세대 CAR에는 항원 결합 도메인, 힌지 영역, 막관통 도메인, 공동자극 도메인 및 세포내 신호전달 도메인이 포함된다. 2세대 CAR의 비제한적인 예에는, 미국 특허출원공개 제2004/0043401호, 제2013/0287748호, 제2014/0227237호, 제2014/0099309호 및 제2014/0050708호; 국제공개 WO 2012/079000호; 및 WO 2015/157252호에 기재된 것들이 포함되며, 상기 문헌들은 그 전문이 본원에 참조로 인용된다.

[0293] 일부 실시형태에서, 2세대 CAR은 pCAR이다. 일부 실시형태에서, pCAR는 다음을 포함하는 2세대 CAR을 포함한다: (i) (a) 신호전달 영역; (b) 공동자극 신호전달 영역; (c) 막관통 도메인; 및 (d) 표적 항원 상의 제1 에피토프와 특이적으로 상호작용하는 제1 결합 요소; 및 (ii) (e) (b)의 것과 상이한 공동자극 신호전달 영역; (f) 막관통 도메인; 및 (g) 제2 표적 항원 상의 제2 에피토프와 특이적으로 상호작용하는 제2 결합 요소;를 포함하는 키메라 공동자극 수용체(CCR). pCAR의 비제한적인 예는 미국 특허 제10,703,794호에 기재된 바와 같으며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 인용된다.

[0294] 일부 실시형태에서, 3세대 CAR은 항원 결합 도메인, 힌지 영역, 막관통 도메인, 제1 공동자극 도메인과 제2 공동자극 도메인, 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 3세대 CAR의 비제한적인 예에는, 미국 특허출원공개 제2014/0322275A1호; 제2019/0345217호; 제2019/0112380A1호; 및 제2020/0031904A1호에 기재된 것들이 포함되며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 인용된다.

[0295] 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 단일 사슬 항체 단편(예를 들어, scFv), 나노바디(예를 들어, 낙타화 V_HH 도메인), 사이토카인, 리간드 또는 펩타이드(애드넥틴과 DARPin)를 포함한다.

[0296] **6.3.2.1. 항원 결합 도메인**

[0297] 일부 실시형태에서, CAR의 항원 결합 도메인은 단일 사슬 항체 단편을 포함한다. 일부 실시형태에서, 단일 사슬 항체 단편은 단일 사슬 Fv(scFv)를 포함한다.

[0298] 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 자가면역 질환, 염증성 장애 또는 암과 관련된 항원을 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 자가항원을 표적으로 한다.

[0299] 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 자가면역 질환 또는 염증성 장애와 관련된 항원을 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, 자가면역 질환 또는 염증성 장애와 관련된 항원은 관련 MHC 분자의 맥락에서, 비제한적으로, 항-HLA-A*02, 항-HLA-A*24 또는 시트룰린화된 펩타이드, 인슐린, MOG, GAD65, IA2, 글리아딘 및 데스모글레인으로 이루어지는 군에서 선택된다. 일부 실시형태에서, 자가면역 질환 또는 염증성 장애와 관련된 항원은 CD19, CD20, CD22, CD27, BCMA 및 CD38로 이루어지는 군에서 선택된다.

[0300] 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 암 관련 항원을 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, 암 관련 항원은 CD19, CD20, CD22, BCMA, B7-H3, CEA, BCMA, CD23, Lym1, Lym2, CLEC5A, CDH179b, FLT3, GCC, Muc, CSF2RA, GFRα4, CD32, CD33, IL11Rα, IL13Rα, NYBR1, SLea, CD200R, TGFβR2, CD276, TROP2, LAMP1, PTK7, DLL3, CDH1, CDH6, CDH17, CDH19, TSHR 및 티로시나아제로 이루어지는 군에서 선택된다.

[0301] 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 B세포 항원을 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, B세포 항원은, 예를 들어 도 4에 제시된 바와 같이, 부분적으로 B세포 분화 동안의 발현에 기반하여 선택된다. B세포 항원을 표적으로 하는 항원 결합 도메인의 비제한적인 예는 국제공개 WO 2020/010235호에 기재되어 있으며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 인용된다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 CD19를 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 CD20을 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 CD22를 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 BCMA를 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 B7-H3을 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 CD27을 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 CD38을 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 B세포 성숙 항원(BCMA)을 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 암배아 항원(CEA)을 표적으로 한다.

[0302] 일부 실시형태에서, 단일 사슬 항체 단편은 CD19(예를 들어, 분화 클러스터 19 단백질(CD19)(예를 들어, OMIM 수탁번호 107265))에 결합하는 단일 사슬 Fv(scFv)를 포함한다.

[0303] 일부 실시형태에서, CD19를 표적으로 하는 scFv는 항-인간 CD19-특이적 mAb 클론 FMC63에서 유도된다(문헌 [Nicholson et al., *Mol. Immunol.*, 34(16-17): 1157-65 (1997)], 이는 그 전문이 본원에 참조로 인용됨). 일부 실시형태에서, CD19를 표적으로 하는 scFv는 미국 특허출원공개 제2018/0355052호 또는 제2020/0392200호, 또는 국제공개 WO 2020/010235호에 기재되어 있으며, 이는 각각 그 전문이 본원에 참조로 인용된다.

[0304] 일부 실시형태에서, 항-CD19 항원 결합 도메인은 서열번호 11의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD19 항원 결합 도메인은 서열번호 11과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD19 항원 결합 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분절은 서열번호 12를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD19 항원 결합 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분절은 서열번호 12와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0305] 일부 실시형태에서, 항-CD19 항원 결합 도메인은 서열번호 13과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD19 항원 결합 도메인은 서열번호 14와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD19 항원 결합 도메인은 서열번호 13과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인과, 서열번호 14와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0306] 일부 실시형태에서, 단일 사슬 항체 단편은 CD20(예를 들어, 분화 클러스터 20 단백질(CD20)(예를 들어, OMIM 수탁번호 112210))에 결합하는 단일 사슬 Fv(scFv)를 포함한다. CD20을 표적으로 하는 scFv의 비제한적인 예에는, 국제공개 WO 2020/010235호와 미국 특허출원공개 제2020/0392200호에 기재된 것들이 포함되며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 인용된다.

[0307] 일부 실시형태에서, 항-CD20 항원 결합 도메인은 서열번호 18의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD20 항원 결합 도메인은 서열번호 18과 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD20 항원 결합 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분절은 서열번호 19를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD20 항원 결합 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분절은 서열번호 19와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0308] 일부 실시형태에서, 항-CD20 항원 결합 도메인은 서열번호 20과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD20 항원 결합 도메인은 서열번호 21과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD20 항원 결합 도메인은 서열번호 20과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인과, 서열번호 21과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0309] 일부 실시형태에서, 단일 사슬 항체 단편은 CD22(예를 들어, 분화 클러스터 22 단백질(CD22)(예를 들어, OMIM 수탁번호 107266))에 결합하는 단일 사슬 Fv(scFv)를 포함한다. CD22를 표적으로 하는 scFv의 비제한적인 예에는, 국제공개 WO 2020/010235호와 미국 특허출원공개 제2020/0392200호에 기재된 것들이 포함되며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 인용된다.

[0310] 일부 실시형태에서, 항-CD22 항원 결합 도메인은 서열번호 24의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD22 항원 결합 도메인은 서열번호 24와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD22 항원 결합 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분절은 서열번호 25를 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD22 항원 결합 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분절은 서열번호 25와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0311] 일부 실시형태에서, 항-CD22 항원 결합 도메인은 서열번호 26과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD22 항원 결합 도메인은 서열번호 27과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD22 항원 결합 도메인은 서열번호 26과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인과, 서열번호 27과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0312] 일부 실시형태에서, 단일 사슬 항체 단편은 종양괴사인자 수용체 슈퍼패밀리 멤버 17(TNFRSF17)로도 알려진 B세포 성숙 항원(BCMA)에 결합하는 단일 사슬 Fv(scFv)를 포함한다.

[0313] BCMA를 표적으로 하는 scFv의 비제한적인 예에는, 미국 특허 US9765342B2호 또는 국제공개 WO 2010/104949호에 기재된 것들이 포함되며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 인용된다. 예를 들어, 국제공개 WO 2010/104949호에 기재된 바와 같이, 항-BCMA scFv는 A7D12.2, C11 D5.3, C12A3.2 또는 C13F12.1 항체의 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다.

[0314] 일부 실시형태에서, 항-BCMA 항원 결합 도메인은 서열번호 50 또는 52와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-BCMA 항원 결합 도메인은 서열번호 51 또는 53과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-BCMA 항원 결합 도메인은 서열번호 50 또는 52와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인과, 서열번호 51 또는 53과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0315] 일부 실시형태에서, 단일 사슬 항체 단편은 CD276(예를 들어, 분화 클러스터 276 단백질(CD276)(예를 들어, OMIM 수탁번호 605715))으로도 알려진 B7-H3에 결합하는 단일 사슬 Fv(scFv)를 포함한다.

[0316] B7-H3을 표적으로 하는 scFv의 비제한적인 예에는, 미국 특허출원공개 제2016/0053017호와 제2018/0346544호에 기재된 것들이 포함되며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 인용된다. 예를 들어, 미국 특허출원공개 제2018/0346544호에 기재된 바와 같이, 항-CD276 scFv는 MGA271(CD276.MG), CD276.N1, CD276.N2, CD276.N3, CD276.N4 또는 CD276.N5 항체의 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다.

[0317] 일부 실시형태에서, 항-B7-H3 항원 결합 도메인은 서열번호 36의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-B7-H3 항원 결합 도메인은 서열번호 36과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-B7-H3 항원 결합 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분절은 서열번호 37을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-B7-H3 항원 결합 도메인을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분절은 서열번호 37과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0318] 일부 실시형태에서, 항-B7-H3 항원 결합 도메인은 서열번호 38과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-B7-H3 항원 결합 도메인은 서열번호 39와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-B7-H3 항원 결합 도메인은 서열번호 38과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인과, 서열번호 39와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0319] 일부 실시형태에서, 단일 사슬 항체 단편은 CD27(예를 들어, OMIM 수탁번호 186711)에 결합하는 단일 사슬 Fv(scFv)를 포함한다.

[0320] 일부 실시형태에서, 단일 사슬 항체 단편은 CD38(예를 들어, OMIM 수탁번호 107270)에 결합하는 단일 사슬 Fv(scFv)를 포함한다.

[0321] 일부 실시형태에서, 단일 사슬 항체 단편은 CEA(예를 들어, 암배아 항원 단백질(CEA)(예를 들어, OMIM 수탁번호 114890))에 결합하는 단일 사슬 Fv(scFv)를 포함한다.

[0322] 일부 실시형태에서, 단일 사슬 항체 단편은 BCMA(예를 들어, B세포 성숙 항원(BCMA)(예를 들어, OMIM 수탁번호 109545))에 결합하는 단일 사슬 Fv(scFv)를 포함한다

[0323] #### 6.3.2.2. 힌지 영역

[0324] 힌지 영역은 막관통 도메인을 통해 세포외 항원 결합 도메인을 세포내 신호전달 도메인(예를 들어, 하나 이상의 공동자극 도메인과 세포내 신호전달 도메인)에 연결한다. 힌지는 입체 장애를 극복하기에 충분한 유연성과, 표적 항원에 대한 항원 결합 도메인의 접근과 결합을 용이하게 하는 적절한 길이를 제공한다. 일부 실시형태에서, 힌지의 길이와 조성의 차이는 CAR을 통한 항원 결합과 신호전달에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 힌지 영역 내 스페이서 서열 또는 힌지 영역에 부가된 스페이서 서열은 표적 항원에 대한 항원 결합 도메인의 접근과 결합을 용이하게 한다. 일부 실시형태에서, 힌지 영역은 사이토카인 생산에 영향을 미친다.

[0325] 일부 실시형태에서, 힌지 영역은 인간 CD8 힌지 영역, 인간 CD28 힌지 영역, IgG1 힌지 영역 또는 IgG4 힌지 영역에서 선택된다. 일부 실시형태에서, 힌지 영역은 인간 CD8에서 유도된다. 일부 실시형태에서, 인간 CD8에서 유도된 힌지 영역은 서열번호 28의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 인간 CD8에서 유도된 힌지 영역은 서열번호 28과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0326] 6.3.2.3. 막관통 도메인

[0327] 막관통 영역은 $CD4^{IL-10/CAR}$ T세포에 CAR을 고정시킨다. 일부 실시형태에서, 막관통 도메인은 CAR의 안정성과 기능에 영향을 미친다.

[0328] 일부 실시형태에서, 막관통 도메인은 TNFRSF19 막관통 도메인, CD3제타 막관통 도메인, CD8α 막관통 도메인, CD4 막관통 도메인, CD28 막관통 도메인, 또는 B7 패밀리 유도성 공동자극(ICOS) 막관통 도메인으로 이루어지는 군에서 선택된다. 일부 실시형태에서, 막관통 도메인은 TNFRSF19에서 유도된다. 일부 실시형태에서, TNFRSF19에서 유도된 막관통 도메인은 서열번호 29의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, TNFRSF19에서 유도된 막관통 도메인은 서열번호 29와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0329] 6.3.2.4. 세포내 신호전달 도메인과 공동자극 도메인

[0330] 세포내 신호전달 도메인은 $CD4^{IL-10/CAR}$ T세포를 활성화시킨다. 일부 실시형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 T세포 기능, 대사 및 지속성에 관여한다.

[0331] 일부 실시형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 2개 이상의 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM)는 CD3제타에서 유도된다. 일부 실시형태에서, CD3제타에서 유도된 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 30의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD3제타에서 유도된 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 30과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0332] 일부 실시형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 하나 이상의 공동자극 도메인을 추가로 포함한다. 이러한 경우, 하나 이상의 공동자극 도메인은 하나 이상의 공동자극 도메인 없이 CAR을 포함하는 $CD4^{+}$ T세포와 비교하여, T세포 활성화, 기능, 대사 및 지속성을 증강시킨다. 활성화 도메인에 더하여 공동자극 도메인을 함유하는 CAR을 갖는 $CD4^{+}$(예를 들어, $CD4^{IL-10/CAR}$) T세포는 IL-2를 생산하며, 반복된 항원 노출 시 증식할 수 있다.

[0333] 일부 실시형태에서, 상이한 공급원에서 유도된 공동자극 도메인(예를 들어, 4-1BB와 CD28)은 $CD4^{+}$(예를 들어, $CD4^{IL-10/CAR}$) T세포에서 상이한 기능 및 대사 프로파일을 유도한다. 예를 들어, CD28에서 유도된 공동자극 도메인을 포함하는 CAR을 갖는 $CD4^{+}$(예를 들어, $CD4^{IL-10/CAR}$) T세포는 이펙터 기억 T세포로의 증강된 분화를 경험한다. 또 다른 예에서, 4-1BB에서 유도된 공동자극 도메인을 포함하는 CAR을 갖는 $CD4^{+}$(예를 들어, $CD4^{IL-10/CAR}$) T세포는 중추 기억 T세포로의 증강된 분화를 경험한다.

[0334] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 공동자극 도메인은 4-1BB, CD28, OX40, ICOS, CD27, MYD88-CD40, 및 KIR2DS2이다.

[0335] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 공동자극 도메인은 4-1BB에서 유도된다. 일부 실시형태에서, 4-1BB에서 유도된 공동자극 도메인은 서열번호 31의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 4-1BB에서 유도된 공동자극 도메인은 서열번호 31과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0336] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 공동자극 도메인은 CD28에서 유도된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 공동자극 도메인은 CD28 공동자극 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD28에서 유도된 공동자극 도메인은 서열번호 32의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, CD28에서 유도된 공동자극 도메인은 서열번호 32와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0337] 일부 실시형태에서, CAR은 2개의 공동자극 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, CAR은 4-1BB에서 유도된 공동자극 도메인을 포함하는 제1 공동자극 도메인과, CD28 공동자극 도메인에서 유도된 공동자극 도메인을 포함하는 제2 공동자극 도메인을 포함한다.

[0338] 6.3.2.5. 키메라 항원 수용체(CAR)

[0339] 일부 실시형태에서, CAR 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 자가면역 질환, 염증성 장애 또는 암과 관련된 항원을 표적으로 하는 항원 결합 도메인을 포함하는 CAR을 인코딩한다.

[0340] 일부 실시형태에서, CAR 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 자가면역 질환 또는 염증성 장애와 관련된 항원을 표적으로 하는 항원 결합 도메인을 포함하는 CAR을 인코딩한다. 일부 실시형태에서, 자가면역 질환 또는 염증성 장애와 관련된 항원은 관련 MHC 분자의 맥락에서, 비제한적으로, 항-HLA-A*02, 항-HLA-A*24 또는 시트룰린화된 펩타이드, 인슐린, MOG, GAD65, IA2, 글리아딘 및 데스모글레인으로 이루어지는 군에서 선택된다.

[0341] 일부 실시형태에서, CAR 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 암 관련 항원을 표적으로 하는 항원 결합 도메인을 포함하는 CAR을 인코딩한다. 일부 실시형태에서, 암 관련 항원은 CD19, CD20, CD22, B7-H3, CEA, BCMA, CD23, Lym1, Lym2, CLEC5A, CDH179b, FLT3, GCC, Muc, CSF2RA, GFRα4, CD32, CD33, IL11Rα, IL13Rα, NYBR1, SLea, CD200R, TGFβR2, CD276, TROP2, LAMP1, PTK7, DLL3, CDH1, CDH6, CDH17, CDH19, TSHR 및 티로시나아제로 이루어지는 군에서 선택된다.

[0342] 일부 실시형태에서, CAR 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 B세포 항원을 표적으로 하는 항원 결합 도메인을 포함하는 CAR을 인코딩한다. 일부 실시형태에서, B세포 항원은, 예를 들어 도 4에 제시된 바와 같이, 부분적으로 B세포 분화 동안의 발현에 기반하여 선택된다. B세포 항원을 표적으로 하는 항원 결합 도메인의 비제한적인 예는 국제공개 WO 2020/010235호에 기재되어 있으며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 인용된다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 CD19를 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 CD20을 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 CD22를 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 B7-H3을 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 CD27을 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 CD38을 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 B세포 성숙 항원(BCMA)을 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, 항원 결합 도메인은 암배아 항원(CEA)을 표적으로 한다.

[0343] 일부 실시형태에서, CAR 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 항-CD19 항원 결합 도메인을 포함하는 CAR을 인코딩한다. 일부 실시형태에서, CAR 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 항-CD19 항원 결합 도메인을 포함하는 2세대 CAR을 인코딩한다. 일부 실시형태에서, CAR 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 항-CD19 항원 결합 도메인을 포함하는 3세대 CAR을 인코딩한다.

[0344] 일부 실시형태에서, CAR 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 항-CD19 항원 결합 도메인, 힌지 영역, 막관통 도메인, 공동자극 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 항-CD19 CAR을 인코딩한다. 일부 실시형태에서, CAR 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 항-CD19 항원 결합 도메인; 인간 CD8 힌지 영역; TNFRSF19 막관통 영역; 4-1BB 공동자극 도메인; 및 CD3제타 사슬 세포내 신호전달 도메인을 인코딩한다. 일부 실시형태에서, 항-CD19 CAR은 서열번호 9의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD19 CAR은 서열번호 9와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 서열번호 10의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 서열번호 10과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0345] 항-CD19 항원 결합 도메인을 포함하는 CAR의 비제한적인 예에는, 미국 특허출원공개 제2020/0392200호, 국제공개 WO 2020/010235호 또는 WO 2012/079000호에 기재된 것들이 포함되며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 인용된다.

[0346] 일부 실시형태에서, CAR 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 항-CD20 항원 결합 도메인을 포함하는 CAR을 인코딩한다. 일부 실시형태에서, CAR 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 항-CD20 항원 결합 도메인을 포함하는 2세대 CAR을 인코딩한다. 일부 실시형태에서, CAR 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 항-CD20 항원 결합 도메인을 포함하는 3세대 CAR을 인코딩한다.

[0347] 일부 실시형태에서, CAR 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 항-CD20 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 공동자극 도메인 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 항-CD20 CAR을 인코딩한다. 일부 실시형태에서, CAR 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 항-CD20 항원 결합 도메인; 인간 CD8 막관통 영역; 4-1BB 공동자극 도메인; 및 CD3제타 사슬 세포내 신호전달 도메인을 인코딩한다. 일부 실시형태에서, 항-CD20 CAR은 서열번호 16의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD20 CAR은 서열번호 16과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 서열번호 17의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 서열번호 17과 적어도 80%, 85%, 90%,

95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0348] 항-CD20 항원 결합 도메인을 포함하는 CAR의 비제한적인 예에는, 미국 특허출원공개 제2020/0392200호 또는 국제공개 WO 2020/010235호에 기재된 것들이 포함되며, 이는 모두 그 전문이 본원에 참조로 인용된다.

[0349] 일부 실시형태에서, CAR 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 항-CD22 항원 결합 도메인을 포함하는 CAR을 인코딩한다. 일부 실시형태에서, CAR 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 항-CD22 항원 결합 도메인을 포함하는 2세대 CAR을 인코딩한다. 일부 실시형태에서, CAR 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 항-CD22 항원 결합 도메인을 포함하는 3세대 CAR을 인코딩한다.

[0350] 일부 실시형태에서, 항-CD22 CAR은 서열번호 22의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-CD22 CAR은 서열번호 22와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 서열번호 23의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 서열번호 23과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0351] 항-CD22 CAR을 포함하는 CAR의 비제한적인 예에는, 국제공개 WO 2020/010235호와 미국 특허출원공개 제2020/0392200호에 기재된 것들이 포함되며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 인용된다.

[0352] 항-B7-H3 CAR을 포함하는 CAR의 비제한적인 예에는, 미국 특허출원공개 제2016/0053017호, 제2017/0369585호 및 제2018/0346544호에 기재된 것들이 포함되며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 인용된다.

[0353] 일부 실시형태에서, CAR 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 항-B7-H3 항원 결합 도메인을 포함하는 CAR을 인코딩한다. 일부 실시형태에서, CAR 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 항-B7-H3 항원 결합 도메인을 포함하는 2세대 CAR을 인코딩한다. 일부 실시형태에서, CAR 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 항-B7-H3 항원 결합 도메인을 포함하는 3세대 CAR을 인코딩한다.

[0354] 일부 실시형태에서, 항-B7-H3 CAR은 서열번호 34의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-B7-H3 CAR은 서열번호 34와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 서열번호 35의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 서열번호 35와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0355] 일부 실시형태에서, CAR 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 항-CD27 항원 결합 도메인을 포함하는 CAR을 인코딩한다. 일부 실시형태에서, CAR 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 항-CD27 항원 결합 도메인을 포함하는 2세대 CAR을 인코딩한다. 일부 실시형태에서, CAR 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 항-CD27 항원 결합 도메인을 포함하는 3세대 CAR을 인코딩한다.

[0356] 일부 실시형태에서, CAR 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 항-CD38 항원 결합 도메인을 포함하는 CAR을 인코딩한다. 일부 실시형태에서, CAR 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 항-CD38 항원 결합 도메인을 포함하는 2세대 CAR을 인코딩한다. 일부 실시형태에서, CAR 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 항-CD38 항원 결합 도메인을 포함하는 3세대 CAR을 인코딩한다.

[0357] 일부 실시형태에서, CAR 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 항-CEA 항원 결합 도메인을 포함하는 CAR을 인코딩한다. 일부 실시형태에서, CAR 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 항-CEA 항원 결합 도메인을 포함하는 2세대 CAR을 인코딩한다. 일부 실시형태에서, CAR 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 항-CEA 항원 결합 도메인을 포함하는 3세대 CAR을 인코딩한다.

[0358] 일부 실시형태에서, CAR 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 항-BCMA 항원 결합 도메인을 포함하는 CAR을 인코딩한다. 일부 실시형태에서, CAR 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 항-BCMA 항원 결합 도메인을 포함하는 2세대 CAR을 인코딩한다. 일부 실시형태에서, CAR 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 항-BCMA 항원 결합 도메인을 포함하는 3세대 CAR을 인코딩한다. 일부 실시형태에서, 항-BCMA CAR은 서열번호 41 내지 49 및 54의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 항-BCMA CAR은 서열번호 41 내지 49 및 54와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0359] 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드는 CAR의 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 조절 요소(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 조절 요소)를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 조절

요소는 프로모터이다.

[0360] 일부 실시형태에서, 조절 요소는 $CD4^+$ T세포에서 CAR의 발현을 지시할 수 있는 프로모터를 포함한다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 $CD4^+$ T세포에서 CAR의 구성적 발현을 유도한다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 활성화된 $CD4^+$ T세포에서 CAR의 발현을 유도한다.

[0361] 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 성공적으로 형질도입된 $CD4^+$ T세포의 선별을 가능하게 하는 선별 마커(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 선별 마커)를 인코딩하는 분절을 추가로 포함한다.

[0362] 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 벡터를 사용하여 $CD4^+$ T세포로 전달된다. 일부 실시형태에서, 벡터는 플라스미드 벡터이다. 일부 실시형태에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 실시형태에서, 벡터는 레트로바이러스 벡터(예를 들어, 감마레트로바이러스 벡터)이다. 일부 실시형태에서, 벡터는 렌티바이러스 벡터이다.

[0363] 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 렌티바이러스 벡터를 사용하여 $CD4^+$ T세포로 전달되며, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 렌티바이러스 벡터 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 문헌 [Matrai *et al.*, *Molecular Therapy* 18(3):477-490 (2010)](이는 본원에 참조로 인용됨)에 개시된 렌티바이러스 벡터("Matrai")가 사용된다. 일부 실시형태에서, 키메라 항원 수용체(CAR)를 인코딩하는 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절;과 인터류킨-10(IL-10)을 인코딩하는 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절이 단일 렌티바이러스 벡터에 존재한다. 이러한 경우, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절과 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 제1 프로모터에 작동 가능하게 연결되어 있다. 예를 들어, 렌티바이러스 벡터는 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 또는 자가 절단 펩타이드(예를 들어, 2A 자가 절단 펩타이드)를 통해 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절에 작동 가능하게 연결된 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드인 인간 PGK 프로모터를 포함한다.

[0364] 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 T세포 핵 게놈에 삽입된다. 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 핵 게놈에 삽입되지 않는다. 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 T세포 세포질에 존재한다.

[0365] **6.3.3. IL-10을 인코딩하는 외인성 폴리뉴클레오타이드**

[0366] 본 개시내용의 단일 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포 또는 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포는 IL-10을 인코딩하는 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절을 포함하도록 추가로 유전자 변형되었다. 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 하나 이상의 조절 요소(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 하나 이상의 조절 요소)에 작동 가능하게 연결된 IL-10 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절을 포함한다.

[0367] IL-10 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 인간, 보노보(bonobo) 또는 레서스(rhesus)의 IL-10을 인코딩할 수 있다. 일부 실시형태에서, IL-10 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 서열번호 1의 서열을 갖는 인간 IL-10을 인코딩한다. 일부 실시형태에서, IL-10 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 서열번호 1과 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 인간 IL-10의 변이체를 인코딩한다. 일부 실시형태에서, IL-10 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다. 일부 실시형태에서, IL-10 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 서열번호 2와 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는다.

[0368] 일부 실시형태에서, 외인성 폴리뉴클레오타이드는 바이러스 IL-10을 인코딩한다. 다양한 실시형태에서, 외인성 폴리펩타이드는 HCMV, GMCMV, RhCMV, BaCMV, MOCMV, SMCMV, EBV, 보노보-HV, BaLCV, OvHV-2, EHV-2, CyHV-3, AngHV-1, ORFV, BPSV, PCPV, LSDV, SPV, GPV 또는 CNPV 유래의 IL-10을 인코딩한다. 일부 실시형태에서, 외인성 폴리펩타이드는 EBV 또는 ORFV 유래의 바이러스 IL-10을 인코딩한다.

[0369] 일부 실시형태에서, 바이러스 IL-10은 서열번호 6의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 IL-10은 서열번호 6 또는 18과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 IL-10을 코딩하는 외인성 폴리펩타이드는 서열번호 7의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 IL-10을 코딩하는 외인성 폴리펩타이드는 서열번호 7과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0370] 일부 실시형태에서, IL-10은 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 아미노산 변형을 갖는

인간 IL-10을 포함하는 단백질이다. 일부 실시형태에서, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 아미노산 변형은 상응하는 아미노산 위치에 있는 바이러스 IL-10의 아미노산으로 대체된 것이다.

[0371] 일부 실시형태에서, IL-10 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 인간 IL-10(예를 들어, 서열번호 1)과 비교하여 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 그 이상의 아미노산 치환을 갖는 인간 IL-10의 변이체를 인코딩한다. 일부 실시형태에서, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 아미노산 치환은 상응하는 아미노산 위치(들)에 있는 바이러스 IL-10의 아미노산(들)으로의 치환(들)이다. 일부 실시형태에서, IL-10 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 인간 IL-10(예를 들어, 서열번호 1)과 비교하여 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 그 이상의 아미노산 삽입, 결실 또는 변형을 갖는 인간 IL-10의 변이체를 인코딩한다. 일부 실시형태에서, 인간 IL-10의 변이체는 서열번호 56 또는 57의 서열을 갖는다.

[0372] 일부 실시형태에서, IL-10 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 무스 무스쿨루스, "MOUSE"(서열번호 58); 라투스 노르베기쿠스, "RAT"(서열번호 59); 마카카 물라타, "MACMU"(서열번호 60); 고릴라 고릴라, "GORILLA"(서열번호 61); 마카카 파시쿨라리스, "CYNO"(서열번호 62); 파피오 아누비스, "OLIVE BABOON"(서열번호 63); 판 파니스쿠스, "BONOBO"(서열번호 64); 판 트로글로디테스, "CHIMP"(서열번호 65); 및 EBVB9(서열번호 66)의 IL-10을 인코딩한다. 일부 실시형태에서, IL-10 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 무스 무스쿨루스, "MOUSE"(서열번호 58); 라투스 노르베기쿠스, "RAT"(서열번호 59); 마카카 물라타, "MACMU"(서열번호 60); 고릴라 고릴라, "GORILLA"(서열번호 61); 마카카 파시쿨라리스, "CYNO"(서열번호 62); 파피오 아누비스, "OLIVE BABOON"(서열번호 63); 판 파니스쿠스, "BONOBO"(서열번호 64); 판 트로글로디테스, "CHIMP"(서열번호 65); 및 EBVB9(서열번호 66)의 IL-10과 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 단백질을 인코딩한다.

[0373] 일부 실시형태에서, IL-10 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 인간 IL-10(예를 들어, 서열번호 1)과 비교하여 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 그 이상의 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실을 갖는 인간 IL-10의 변이체를 인코딩한다. 일부 실시형태에서, 변형은 상응하는 위치에 무스 무스쿨루스, "MOUSE"(서열번호 58); 라투스 노르베기쿠스, "RAT"(서열번호 59); 마카카 물라타, "MACMU"(서열번호 60); 고릴라 고릴라, "GORILLA"(서열번호 61); 마카카 파시쿨라리스, "CYNO"(서열번호 62); 파피오 아누비스, "OLIVE BABOON"(서열번호 63); 판 파니스쿠스, "BONOBO"(서열번호 64); 판 트로글로디테스, "CHIMP"(서열번호 65); 및 EBVB9(서열번호 66)의 아미노산으로의 치환, 삽입 및/또는 결실이다. 일부 실시형태에서, 인간 IL-10의 변이체는 서열번호 67 또는 서열번호 68의 서열을 갖는다.

[0374] 일부 실시형태에서, IL-10 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 인간 IL-10과 비교하여 면역자극 활성이 감소된 인간 IL-10의 변이체를 인코딩한다. 일부 실시형태에서, 인간 IL-10의 변이체는 I105A 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, 인간 IL-10의 변이체는 문헌[A Single Amino Acid Determines the Immunostimulatory Activity of Interleukin 10, J Exp Med, 191, 2, 2000, p.213-223]에 기재된 방법을 사용하여 제조된다.

[0375] 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 IL-10의 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 조절 요소를 추가로 포함하며, 여기서 하나 이상의 조절 요소는 형질도입된 $CD4^+$ T세포에서 인코딩된 IL-10의 발현을 지시한다.

[0376] 일부 실시형태에서, 조절 요소(들)는 $CD4^+$ T세포에서 IL-10의 발현을 지시할 수 있는 프로모터를 포함한다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 $CD4^+$ T세포에서 IL-10의 구성적 발현을 유도한다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 활성화된 $CD4^+$ T세포에서 IL-10의 발현을 유도한다.

[0377] 일부 실시형태에서, 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 성공적으로 형질도입된 $CD4^+$ T세포의 선별을 가능하게 하는 선별 마커(예를 들어, 본원에 기재되어 있거나 당업계에 알려져 있는 임의의 선별 마커)를 인코딩하는 분절을 추가로 포함한다.

[0378] 전형적인 실시형태에서, 외인성 폴리뉴클레오타이드는 벡터를 사용하여 $CD4^+$ T세포로 전달된다. 일부 실시형태에서, 벡터는 플라스미드 벡터이다. 일부 실시형태에서, 벡터는 바이러스 벡터이다.

[0379] 일부 실시형태에서, CAR을 인코딩하는 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절과 IL-10을 인코딩하는 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 동일한 벡터 내에 있다. 일부 실시형태에서, CAR을 인코딩하는 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절과 IL-10을 인코딩하는 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 동일한 바이러스 벡터 내에 있다. 일부 실시형태에서, CAR을 인코딩하는 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절과 IL-10을 인코딩하는 제2 외

인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 동일한 렌티바이러스 벡터 내에 있다.

[0380] 특정 실시형태에서, 외인성 폴리뉴클레오타이드는 렌티바이러스 벡터를 사용하여 $CD4^+$ T세포로 전달되며, 외인성 폴리뉴클레오타이드는 렌티바이러스 벡터 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 문헌[Matrai *et al.*, *Molecular Therapy* 18(3):477-490 (2010)](이는 본원에 참조로 인용됨)에 개시된 렌티바이러스 벡터("Matrai")가 사용된다.

[0381] 일부 실시형태에서, 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 T세포 핵 게놈에 삽입된다. 일부 실시형태에서, 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 핵 게놈에 삽입되지 않는다. 일부 실시형태에서, 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 T세포 세포질에 존재한다.

[0382] 특정 실시형태에서, 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 서열번호 5의 서열을 갖는다. 일부 실시형태에서, 외인성 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 5와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는다.

[0383] **6.3.4. 조절 요소**

[0384] 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절 및/또는 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은, 각각, CAR 또는 IL-10의 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 조절 요소를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 조절 요소는 프로모터 서열, 인핸서 서열, 비코딩 서열, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0385] 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 CAR의 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 조절 요소를 추가로 포함하며, 여기서 조절 요소는 형질도입된 $CD4^+$ T세포에서 인코딩된 CAR의 발현을 지시한다. 일부 실시형태에서, 유도성 프로모터는 치료용으로 적절한 경우 CAR의 발현을 유도하는 데 사용된다.

[0386] 일부 실시형태에서, 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 IL-10의 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 조절 요소를 추가로 포함하며, 여기서 조절 요소는 형질도입된 $CD4^+$ T세포에서 인코딩된 IL-10의 발현을 지시한다. 일부 실시형태에서, 유도성 프로모터는 치료용으로 적절한 경우 IL-10의 발현을 유도하는 데 사용된다. 일부 실시형태에서, IL-10 프로모터가 사용된다.

[0387] 일부 실시형태에서, 프로모터는 조직 특이적 프로모터이다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 계통 특이적 프로모터이다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 CAR 또는 IL-10의 유비쿼터스 발현을 유도하는 데 사용될 수 있는 프로모터이다.

[0388] 일부 실시형태에서, 프로모터는 천연 인간 프로모터이다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 인간 신장인자(EF)-1α 프로모터이다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 인간 포스포글리세레이트 키나아제(PGK) 프로모터이다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 인간 유비퀴틴 C(UBI-C) 프로모터이다.

[0389] 일부 실시형태에서, 프로모터는 합성 프로모터이다. 특정 실시형태에서, 프로모터는 최소 CMV 코어 프로모터이다. 특정 실시형태에서, 프로모터는 유도성 또는 구성적 양방향성 프로모터이다. 특정 실시형태에서, 문헌[Amendola et al., *Nature Biotechnology*, 23(1):108-116 (2005)]에 개시된 합성 양방향성 프로모터가 사용된다. 이러한 프로모터는 유비쿼터스 또는 조직 특이적 방식으로 2개의 mRNA의 상호조정된 전사를 매개할 수 있다. 특정 실시형태에서, 양방향성 프로모터는 CAR과 선별 마커 또는 IL-10과 선별 마커의 발현을 유도한다.

[0390] 일부 실시형태에서, 프로모터는 천연 인간 프로모터이다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 인간 신장인자(EF)-1α 프로모터이다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 인간 포스포글리세레이트 키나아제(PGK) 프로모터이다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 인간 유비퀴틴 C(UBI-C) 프로모터이다.

[0391] 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절 및/또는 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 코딩 서열의 3'에 하나 이상의 비코딩 서열을 추가로 포함한다. 코딩 서열의 3'에 있는 비코딩 서열의 비제한적인 예에는, 3' 미번역 영역(UTR), poly(A) 신호 및 우드척 간염 바이러스 전사 후 조절 요소(WPRE)가 포함된다.

[0392] 일부 실시형태에서, 외인성 폴리뉴클레오타이드는 하나 초과의 코딩 서열을 포함한다. 예를 들어, 외인성 폴리뉴클레오타이드는 단일 연속 폴리뉴클레오타이드 서열(예를 들어, 단일 폴리뉴클레오타이드 작제물)에 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절과 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절을 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 코딩 서열은 CAR을 인코딩하는 서열과 선별 마커를 인코딩하는 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 코딩 서열은 IL-10을 인코딩하는 서열과 선별 마커를 인코딩하는 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 코딩 서열은 CAR을 인코딩하는 서열, IL-10을 인코딩하는 서열 및 선별 마커를 인코딩하는 하나 이

상의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 외인성 폴리뉴클레오타이드에는 선별 마커가 없다.

[0393] 일부 실시형태에서, 다수의 코딩 서열은 하나 이상의 내부 리보솜 진입 부위(IRES)에 의해 분리된다.

[0394] 일부 실시형태에서, 다수의 코딩 서열은 하나 이상의 자가 절단 펩타이드에 의해 분리된다. 일부 실시형태에서, 자가 절단 펩타이드는 2A 자가 절단 펩타이드일 수 있다. 자가 절단 펩타이드의 비제한적인 예에는, 수족구병 바이러스(F2A), 돼지 테스코바이러스-1(P2A), 토세아 아시그나(Thosea asigna) 바이러스(T2A) 또는 말 A형 비염 바이러스(E2A) 유래의 펩타이드를 포함하는 2A 펩타이드(18개 내지 22개 아미노산)가 포함된다. 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드, 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드, 또는 둘 모두는 푸린(furin) P2A 펩타이드를 인코딩하는 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드, 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드, 또는 둘 모두는 T2A 펩타이드를 인코딩하는 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드, 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드, 또는 둘 모두는 E2A 펩타이드를 인코딩하는 서열을 포함한다.

[0395] 일부 실시형태에서, 코딩 서열은 중쇄의 코딩 서열과 경쇄의 코딩 서열 사이에 자가 절단 펩타이드를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 자가 절단 펩타이드는 F2A, P2A, T2A 및 E2A로 이루어지는 군에서 선택된다.

[0396] **6.3.5. 선별 마커**

[0397] 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절, 제2 외인성 뉴클레오타이드 분절, 또는 둘 모두는, 성공적으로 형질도입된 $CD4^+$ T세포의 선별을 가능하게 하는 선별 마커를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분절을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절, 제2 외인성 뉴클레오타이드 분절, 또는 둘 모두에는 선별 마커가 없다.

[0398] 일부 실시형태에서, 외인성 폴리뉴클레오타이드는 단일 연속 폴리뉴클레오타이드 서열(예를 들어, 단일 폴리뉴클레오타이드 작제물)에 존재하는 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절과 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절을 포함한다. 이러한 경우, 외인성 폴리뉴클레오타이드는 성공적으로 형질도입된 $CD4^+$ T세포의 선별을 가능하게 하는 하나 이상의 선별 마커를 포함한다.

[0399] 일부 실시형태에서, 선별 마커는 ΔNGFR이다. 특정 실시형태에서, 선별 마커는 서열번호 3의 서열을 갖는 폴리펩타이드이다. 특정 실시형태에서, 선별 마커는 서열번호 3과 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드이다. 특정 실시형태에서, ΔNGFR 선별 마커를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 4의 서열을 갖는다. 일부 실시형태에서, ΔNGFR 선별 마커를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 4와 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는다.

[0400] 일부 실시형태에서, 선별 마커의 발현은 외인성 폴리뉴클레오타이드로부터의 IL-10의 발현과 상관관계가 있다. 일부 실시형태에서, 선별 마커의 발현은 외인성 폴리뉴클레오타이드로부터의 IL-10의 발현과 선형의 상관관계가 있다. 따라서, 일부 실시형태에서, 선별 마커의 발현은 외인성 폴리뉴클레오타이드로부터의 IL-10의 발현을 추론하기 위해 측정된다.

[0401] 일부 실시형태에서, 선별 마커는 EGFR 폴리펩타이드의 절단된 형태이다. 일부 실시형태에서, 선별 마커는 인간 EGFR 폴리펩타이드, 선택적으로 문헌[Wang et al. "A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells", *Blood*, v. 118, n. 5 (2011)](이는 그 전문이 본원에 참조로 인용됨)에 개시된 huEGFR의 절단된 형태이다.

[0402] 일부 실시형태에서, 외인성 폴리뉴클레오타이드는 항생제 내성 유전자를 인코딩하는 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 외인성 폴리뉴클레오타이드는 암피실린 내성 유전자를 인코딩하는 서열을 포함한다.

[0403] **6.3.6. $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포 또는 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포의 유전자 발현**

[0404] $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포는 IL-10을 발현한다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포는 IL-10을 구성적으로 발현한다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포는 활성화될 때 IL-10을 발현한다.

[0405] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포(예를 들어, 자가유래 단일 공여자 또는 동종이계 단일 공여자) 또는 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포는 배양액 1 mL 중 10^6개의 $CD4^+$ T세포당 적어도 100 pg의 IL-10을 구성적으로 발현한다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포 또는 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포는 배양액 1 mL 중 10^6개의 $CD4^+$ T세포당

적어도 200 pg, 500 pg, 1 ng, 5 ng, 10 ng 또는 50 ng의 IL-10을 구성적으로 발현한다.

[0406] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(예를 들어, 자가유래 단일 공여자 또는 동종이계 단일 공여자) 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체의 조합, 또는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체가 코팅된 비드를 이용한 활성화 후 배양액 1 mL 중 10^6개의 $CD4^+$ T세포당 적어도 1 ng 또는 2 ng의 IL-10을 발현한다. 일부 실시형태에서, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ T세포는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체, 또는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체가 코팅된 비드를 이용한 활성화 후 배양액 1 mL 중 10^6개의 $CD4^+$ T세포당 적어도 5 ng, 10 ng, 100 ng, 200 ng 또는 500 ng의 IL-10을 발현한다.

[0407] 다양한 실시형태에서, IL-10의 생산량은 ELISA, 실시간 중합효소 연쇄 반응(PCR), 분광분석적 절차, 비색법, 아미노산 분석, 방사성표지화, Edman 분해, HPLC, 웨스턴 블롯팅 등과 같은 단백질 검출 및 측정을 위한 다양한 방법을 사용하여 활성화 12시간, 24시간 또는 48시간 후에 측정된다. 바람직한 실시형태에서, IL-10의 생산량은 항-CD3 항체와 항-CD28 항체를 이용한 활성화 48시간 후에 ELISA로 측정된다.

[0408] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(예를 들어, 자가유래 단일 공여자 또는 동종이계 단일 공여자) 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 변형되지 않은 $CD4^+$ T세포보다 적어도 5배 더 높은 수준으로 IL-10을 발현한다. 일부 실시형태에서, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ T세포는 변형되지 않은 $CD4^+$ T세포보다 적어도 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 11배, 12배, 13배, 14배, 15배, 20배, 30배, 40배 또는 50배 더 높은 수준으로 IL-10을 발현한다.

[0409] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(예를 들어, 자가유래 단일 공여자 또는 동종이계 단일 공여자) 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 10^6개의 $CD4^+$ T세포/mL당 적어도 100 pg의 IL-5를 발현한다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(예를 들어, 자가유래 단일 공여자 또는 동종이계 단일 공여자) 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 10^6개의 $CD4^+$ T세포/mL당 적어도 100 pg, 200 pg, 500 pg, 1 ng, 5 ng, 10 ng 또는 50 ng의 IL-5를 발현한다.

[0410] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(예를 들어, 자가유래 단일 공여자 또는 동종이계 단일 공여자) 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체를 이용한 활성화 후 10^6개의 $CD4^+$ T세포/mL당 적어도 1 ng의 IL-5를 발현한다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(예를 들어, 자가유래 단일 공여자 또는 동종이계 단일 공여자) 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체를 이용한 활성화 후 10^6개의 $CD4^+$ T세포/mL당 적어도 2 ng, 5 ng, 10 ng, 100 ng, 200 ng 또는 500 ng의 IL-5를 발현한다.

[0411] 다양한 실시형태에서, IL-5의 생산량은 ELISA, 실시간 중합효소 연쇄 반응(PCR), 분광분석적 절차, 비색법, 아미노산 분석, 방사성표지화, Edman 분해, HPLC, 웨스턴 블롯팅 등과 같은 단백질 검출 및 측정을 위한 다양한 방법을 사용하여 활성화 12시간, 24시간 또는 48시간 후에 측정된다. 바람직한 실시형태에서, IL-5의 생산량은 항-CD3 항체와 항-CD28 항체를 이용한 활성화 48시간 후에 ELISA로 측정된다.

[0412] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(예를 들어, 자가유래 단일 공여자 또는 동종이계 단일 공여자) 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 10^6개의 $CD4^+$ T세포/mL당 적어도 100 pg의 IFN-γ를 발현한다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(예를 들어, 자가유래 단일 공여자 또는 동종이계 단일 공여자) 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 10^6개의 $CD4^+$ T세포/mL당 적어도 100 pg, 200 pg, 500 pg, 1 ng, 5 ng, 10 ng 또는 50 ng의 IFN-γ를 발현한다.

[0413] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(예를 들어, 자가유래 단일 공여자 또는 동종이계 단일 공여자) 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체를 이용한 활성화 후 10^6개의 $CD4^+$ T세포/mL당 적어도 1 ng의 IFN-γ를 발현한다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(예를 들어, 자가유래 단일 공여자 또는 동종이계 단일 공여자) 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체를 이용한 활성화 후 10^6개의 $CD4^+$ T세포/mL당 적어도 2 ng, 5 ng, 10 ng, 100 ng, 200 ng 또는 500 ng의 IFN-γ를 발현한다.

[0414] 다양한 실시형태에서, IFN-γ의 생산량은 ELISA, 실시간 중합효소 연쇄 반응(PCR), 분광분석적 절차, 비색법, 아미노산 분석, 방사성표지화, Edman 분해, HPLC, 웨스턴 블롯팅 등과 같은 단백질 검출 및 측정을 위한 다양한 방법을 사용하여 활성화 12시간, 24시간 또는 48시간 후에 측정된다. 바람직한 실시형태에서, IFN-γ의 생산량은 항-CD3 항체와 항-CD28 항체를 이용한 활성화 48시간 후에 ELISA로 측정된다.

[0415] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(예를 들어, 자가유래 단일 공여자 또는 동종이계 단일 공여자) 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 10^6개의 $CD4^+$ T세포/mL당 적어도 25 pg의 IL-4를 발현한다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(예를 들어, 자가유래 단일 공여자 또는 동종이계 단일 공여자) 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 10^6개의 $CD4^+$ T세포/mL당 적어도 25 pg, 50 pg, 75 pg, 100 pg, 200 pg, 500 pg, 1 ng, 5 ng, 10 ng 또는 50 ng의 IL-4를 발현한다.

[0416] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(예를 들어, 자가유래 단일 공여자 또는 동종이계 단일 공여자) 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체를 이용한 활성화 후 10^6개의 $CD4^+$ T세포/mL당 적어도 100 pg의 IL-4를 발현한다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(예를 들어, 자가유래 단일 공여자 또는 동종이계 단일 공여자) 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체를 이용한 활성화 후 10^6개의 $CD4^+$ T세포/mL당 적어도 100 pg, 200 pg, 300 pg, 400 pg, 500 pg, 600 pg, 700 pg, 800 pg, 900 pg, 1000 pg, 2 ng, 5 ng, 10 ng, 100 ng, 200 ng 또는 500 ng의 IL-4를 발현한다.

[0417] 다양한 실시형태에서, IL-4의 생산량은 ELISA, 실시간 중합효소 연쇄 반응(PCR), 분광분석적 절차, 비색법, 아미노산 분석, 방사성표지화, Edman 분해, HPLC, 웨스턴 블롯팅 등과 같은 단백질 검출 및 측정을 위한 다양한 방법을 사용하여 활성화 12시간, 24시간 또는 48시간 후에 측정된다. 바람직한 실시형태에서, IL-4의 생산량은 항-CD3 항체와 항-CD28 항체를 이용한 활성화 48시간 후에 ELISA로 측정된다.

[0418] 일부 실시형태에서, IL-10, IL-4, IFN-γ, IL-22 및 IL-5 중 하나 이상의 발현은 1회 이상의 재자극 후에도 안정하다.

[0419] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(예를 들어, 자가유래 단일 공여자 또는 동종이계 단일 공여자) 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 선별 마커를 추가로 발현한다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 전형적으로 Tr1 세포에서 발현되는 단백질을 발현한다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 Tr1 세포의 마커 단백질 특징을 발현한다.

[0420] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(예를 들어, 자가유래 단일 공여자 또는 동종이계 단일 공여자) 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 CD49b를 발현한다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 LAG-3을 발현한다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 TGF-β를 발현한다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 IFN-γ를 발현한다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 GzB를 발현한다. 일부 실시형태에서, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포는 골수계 항원제시세포로 활성화될 때 GzB를 방출한다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 퍼포린을 발현한다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 골수계 항원제시세포로 활성화될 때 퍼포린을 발현한다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 CD18을 발현한다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 CD2를 발현한다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 CD226을 발현한다. 일부 실시형태에서, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포는 IL-22를 발현한다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 IL-10을 발현한다.

[0421] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(예를 들어, 자가유래 단일 공여자 또는 동종이계 단일 공여자) 또는 다중

공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 Tr1 세포의 적어도 하나의 기능을 나타낸다. 다양한 실시형태에서, 상기 기능은 IL-10의 분비, TGF-β의 분비, 및 그랜자임 B(GzB)와 퍼포린의 방출을 통한 골수계 항원제시세포의 특이적 사멸이다.

[0422] **6.3.7. $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포의 추가 특성**

[0423] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 항-CD19 CAR을 포함한다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 $CD19^{+}$ 표적세포에 대해 시험관내 세포독성을 나타낼 수 있다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 $CD19^{+}$ 표적세포에 대해 생체내 세포독성을 나타낼 수 있다. 일부 실시형태에서, $CD19^{+}$ 표적세포는 자가항체 생산 B세포이다. 일부 실시형태에서, $CD19^{+}$ 표적세포는 $CD19^{+}$ 암세포이다. 일부 실시형태에서, $CD19^{+}$ 표적세포에 대한 세포독성은 1회 이상의 재자극 후에도 유지된다(예를 들어, 도 5a 내지 도 5c에 기재된 생산 방법 참조).

[0424] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 골수계 표적세포에 대해 시험관내 세포독성을 나타낼 수 있다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 골수계 표적세포에 대해 생체내 세포독성을 나타낼 수 있다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 $CD19^{+}$ 표적세포와 골수계 표적세포에 대해 세포독성을 나타낼 수 있다. 일부 실시형태에서, 골수계 표적세포는 클래스 I MHC, CD13, CD54 및 CD112 중 하나 이상을 발현한다. 일부 실시형태에서, 골수계 표적세포에 대한 세포독성은 1회 이상의 재자극 후에도 유지된다(예를 들어, 도 5a 내지 도 5c에 기재된 생산 방법 참조).

[0425] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 동종이계 $CD4^{+}$ T세포 증식을 억제할 수 있다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 동종이계 $CD4^{+}$ T세포 증식을 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80% 또는 적어도 90% 억제할 수 있다.

[0426] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 동종이계 $CD8^{+}$ T세포 증식을 억제할 수 있다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 동종이계 $CD8^{+}$ T세포 증식을 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80% 또는 적어도 90% 억제할 수 있다.

[0427] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 동종이계 $CD4^{+}$ T세포 증식과 동종이계 $CD8^{+}$ T세포 증식을 억제할 수 있다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 동종이계 $CD4^{+}$ T세포 증식을 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80% 또는 적어도 90% 억제하고, 동종이계 $CD8^{+}$ T세포 증식을 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80% 또는 적어도 90% 억제할 수 있다.

[0428] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포에 의해 매개되는 억제는 다음과 같이 계산된다: 100-([$CD4^{IL-10}$ T세포(대조군)와 $CD4^{IL-10/CAR}$ T세포 존재 하에서 반응 세포의 증식/반응 세포의 증식] x 100).

[0429] 일부 실시형태에서, 억제 특성은 1회 이상의 재자극 후에도 안정하다.

[0430] **6.3.8. 공정별 생성물**

[0431] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ T세포(자가유래 또는 동종이계 단일 공여자, 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포)는 CAR을 인코딩하는 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절과 IL-10을 인코딩하는 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절을 이용하여 $CD4^{+}$ T세포를 변형시키는 방식으로 얻는다. 일부 실시형태에서, CAR을 인코딩하는 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절과 IL-10을 인코딩하는 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절을 이용하여 $CD4^{+}$ T세포를 변형시키는 방법은 하기 공정을 포함한다: (i) IL-10을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분절을 이용한 제1 형질도입, 이어서 CAR을 인코딩하는 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절을 이용한 제2 형질도입; (ii) CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분절을 이용한 제1 형질도입, 이어서 IL-10을 인코딩하는 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절을 이용한 제2 형질도입; (iii) IL-10을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분절과 CAR을 인코딩하는 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절의 동시 형질도입(즉, 공동 형질도입); 또는 (iv) IL-10을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분절과 CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분절 둘 모두를 포함하는 단일 폴리뉴클레오타이드 작제물

의 형질도입. 일부 실시형태에서, IL-10을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 마커 단백질(예를 들어, ΔNGFR)의 코딩 서열을 추가로 포함한다.

[0432] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포)는, (i) CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분절을 포함하는 제1 폴리뉴클레오타이드 작제물과 IL-10을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분절을 포함하는 제2 폴리뉴클레오타이드 작제물, 또는 (ii) CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분절과 IL-10을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분절을 포함하는 단일 폴리뉴클레오타이드 작제물을 이용하여, $CD4^{+}$ T세포를 변형시키는 방식으로 얻는다.

[0433] 일부 실시형태에서, CAR을 인코딩하는 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절, IL-10을 인코딩하는 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절, 또는 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절과 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 작제물은 바이러스 벡터 또는 플라스미드 벡터를 통해 $CD4^{+}$ T세포에 도입된다. 일부 실시형태에서, $CD4^{+}$ T세포는 IL-10을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분절을 함유하는 제1 바이러스 벡터(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 바이러스 벡터)로 형질도입된 후, CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분절을 함유하는 제2 바이러스 벡터(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 바이러스 벡터)로 두 번째 형질도입된다. 또 다른 실시형태에서, $CD4^{+}$ T세포는 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절을 함유하는 제1 바이러스 벡터(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 바이러스 벡터)와 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절을 함유하는 제2 바이러스 벡터로 공동 형질도입된다. 또 다른 실시형태에서, $CD4^{+}$ T세포는 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절과 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절 둘 모두를 함유하는 바이러스 벡터(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 바이러스 벡터)로 형질도입된다.

[0434] 일부 실시형태에서, 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ T세포는 (i) 적어도 2명의 상이한 T세포 공여자로부터 얻은 1차 $CD4^{+}$ T세포를 풀링하는 단계와; (ii) 풀링된 $CD4^{+}$ T세포를 본원에 기재된 방법에 따라 변형시키는 단계;를 통해 생성된다. 일부 실시형태에서, 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ T세포는 (i) 적어도 2명의 상이한 T세포 공여자로부터 1차 $CD4^{+}$ T세포를 얻는 단계; (ii) 각 공여자의 $CD4^{+}$ T세포를 본원에 기재된 방법에 따라 별도로 변형시키는 단계; 및, 그 다음 (iii) 유전자 변형된 $CD4^{+}$ T세포를 풀링하는 단계;를 통해 생성된다.

[0435] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ T세포는 $CD4^{+}$ T세포를 활성화시킬 수 있는 단백질의 존재 하에서 배양된 것이다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ T세포는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체, 또는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체가 코팅된 비드의 존재 하에서 배양된 것이다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ T세포는 항-CD3 항체, 항-CD28 항체 및 IL-2, 또는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체가 코팅된 비드 및 IL-2의 존재 하에서 배양된 것이다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ T세포는 CD3과 CD28을 통해 인간 T세포를 활성화시키고 확장시키는 중합체성 나노매트릭스 시약의 존재 하에서 배양된 것이다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ T세포는 다른 T세포 특이적 면역 세포 배양 배지, 활성화제 및 보충제의 존재 하에서 배양된 것이다.

[0436] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ T세포(단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ T세포)는 동결된 스톡(예를 들어, 동결된 현탁액) 중에 있다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ T세포(단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ T세포)는 액체 현탁액 중에 있다.

[0437] **6.4. $CD4^{IL-10/CAR}$ T세포 집단**

[0438] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 상기 본원에 기재된 바와 같은 $CD4^{IL-10/CAR}$ T세포 집단을 특징으로 한다. 일부 실시형태에서, 상기 집단은 $CD4^{+}$ T세포(예를 들어, 1차 $CD4^{+}$ T세포)를 추가로 포함한다.

[0439] 일부 실시형태에서, $CD4^{+}$ T세포 집단은 자가유래 또는 동종이계 단일 T세포 공여자로부터 얻은 $CD4^{+}$ T세포(단일 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 1차 $CD4^{+}$ T세포는 단일 T세포 공여자에서 유래한 것이

다. 일부 실시형태에서, 1차 $CD4^+$ T세포는 동일한 개체(즉, 동일한 환자)에서 유래한 것이다. 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포 집단은 적어도 2명의 상이한 T세포 공여자로부터 얻은 $CD4^+$ T세포(다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 1차 $CD4^+$ T세포는 동종 HSCT의 공여자에서 유래한 것이다.

[0440] 일부 실시형태에서, 2명, 3명, 4명, 5명, 6명, 7명, 8명, 9명 또는 10명의 상이한 T세포 공여자로부터 $CD4^+$ T세포를 얻고 풀링하였다. 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ T세포와, 이를 제조하고 사용하는 방법은 국제출원 PCT/US2021/039464호에 기재되어 있으며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 인용된다. 본원에 기재된 방법 및/또는 조성물이 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포를 생성하는 데 채택될 수 있다.

[0441] 일부 실시형태에서, 1차 $CD4^+$ T세포는 공여자의 유전 정보를 분석한 후 공여자들 중에서 선택된 공여자에서 유래한 것이다. 일부 실시형태에서, 공여자(즉, 1차 $CD4^+$ T세포의 공여자)의 유전 정보는 분석되지 않는다. 일부 실시형태에서, 1차 $CD4^+$ T세포는 HLA 일배체형에 기반하여 선택된 공여자에서 유래한 것이다. 일부 실시형태에서, 집단 내 $CD4^+$ T세포는 집합적으로 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개 또는 그 이상의 상이한 HLA 일배체형을 갖는다. 일부 실시형태에서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포는 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서 서로 적어도 1/10, 2/10, 3/10, 4/10, 5/10, 6/10, 7/10, 8/10 또는 9/10 일치한다. 일부 실시형태에서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포는 HLA-A, HLA-B, HLA-C 및 HLA-DRB1 유전자좌에서 서로 적어도 1/8, 2/8, 3/8, 4/8, 5/8, 6/8, 7/8 또는 8/8 일치한다.

[0442] 일부 실시형태에서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포는 HLA-A 유전자좌에서 서로 2/2 일치한다. 일부 실시형태에서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포는 HLA-B 유전자좌에서 서로 2/2 일치한다. 일부 실시형태에서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포는 HLA-C 유전자좌에서 서로 2/2 일치한다. 일부 실시형태에서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포는 HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서 서로 적어도 3/4 또는 4/4 일치한다. 일부 실시형태에서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포는 A*02 대립유전자 또는 A*24 대립유전자를 갖는다. 일부 실시형태에서, 모든 $CD4^+$ T세포는 A*02 또는 A*24 음성이다.

[0443] 일부 실시형태에서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포는 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서 서로 5/10, 6/10, 7/10, 8/10 또는 9/10 미만으로 일치한다. 일부 실시형태에서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포는 HLA-A, HLA-B, HLA-C 및 HLA-DRB1 유전자좌에서 서로 4/8, 5/8, 6/8, 7/8 또는 8/8 미만으로 일치한다. 일부 실시형태에서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포는 HLA-A 유전자좌에서 서로 2/2 미만으로 일치한다. 일부 실시형태에서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포는 HLA-B 유전자좌에서 서로 2/2 미만으로 일치한다. 일부 실시형태에서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포는 HLA-C 유전자좌에서 서로 2/2 미만으로 일치한다. 일부 실시형태에서, 집단 내 모든 $CD4^+$ T세포는 HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서 서로 3/4 또는 4/4 미만으로 일치한다.

[0444] 일부 실시형태에서, 집단 내 $CD4^+$ T세포의 적어도 30%(예를 들어, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 98%)는 ΔNGFR의 발현에 의해 추론되는 바와 같이 CAR과 IL-10을 발현한다.

[0445] 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 동결된 현탁액 중에 있다. 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 액체 현탁액 중에 있다. 일부 실시형태에서, 액체 현탁액은 이전에 동결되었던 것이다.

[0446] **6.5. 약제학적 조성물**

[0447] 또 다른 양태에서, 약제학적 조성물이 제공된다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 본원에 제공된 임의의 단일 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ T세포, 본원에 제공된 임의의 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ T세포, 또는 본원에 제공된 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ T세포 집단, 및 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제를 포함한다.

[0448] 약제학적 조성물은 인간 또는 수의학적 의약에 적합한 임의의 투여 경로에 의한 투여용으로 제형화될 수 있다. 전형적인 실시형태에서, 조성물은 정맥내(IV) 투여용으로 제형화된다. 일부 실시형태에서, 조성물은 정맥내(IV)

주입용으로 제형화된다. IV 투여용으로 제형화된 실시형태에서, 약제학적 조성물은 발열원이 없고 적합한 pH, 등장성 및 안정성을 갖는 비경구적으로 허용 가능한 수용액의 형태일 것이다.

[0449] 일부 실시형태에서, 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제는 식염수, 젖산 링거액 또는 생리학적으로 적합한 용액이다. 다양한 실시형태에서, 약제학적 조성물 용액은 인간 혈청 알부민을 2% 내지 20%, 바람직하게는 5% 포함한다.

[0450] 일부 실시형태에서, 전신 투여, 특히 정맥내 투여에 의한 약제학적 조성물의 투여에 적합한 약제학적 조성물의 단위 투여 형태가 제공된다.

[0451] 일부 실시형태에서, 단위 투여 형태는 10^4개 내지 10^{11}개의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, 10^4개 내지 10^{10}개의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, 10^4개 내지 10^9개의 $CD4^{IL-10/CAR}$ T세포 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, 10^5개 내지 10^{10}개의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, 10^5개 내지 10^9개의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, 10^5개 내지 10^8개의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, 또는 10^5개 내지 10^7개의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포를 함유한다.

[0452] 전형적인 실시형태에서, 단위 투여 형태의 약제학적 조성물은 액체 형태이다.

[0453] 6.6. 단일 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포를 제조하는 방법

[0454] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포를 제조하는 방법을 제공한다.

[0455] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 방법은 CAR을 인코딩하는 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절과 IL-10을 인코딩하는 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절을 도입하여 $CD4^+$ T세포 또는 풀링된 $CD4^+$ T세포를 변형시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, CAR을 인코딩하는 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절과 IL-10을 인코딩하는 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절을 이용하여 $CD4^+$ T세포 또는 풀링된 $CD4^+$ T세포를 변형시키는 방법은 하기 공정을 포함한다: (i) IL-10을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분절을 이용한 제1 형질도입, 이어서 CAR을 인코딩하는 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절을 이용한 제2 형질도입; (ii) CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분절을 이용한 제1 형질도입, 이어서 IL-10을 인코딩하는 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절을 이용한 제2 형질도입; (iii) IL-10을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분절과 CAR을 인코딩하는 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절의 동시 형질도입(즉, 공동 형질도입); 또는 (iv) IL-10을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분절과 CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분절 둘 모두를 포함하는 단일 폴리뉴클레오타이드 작제물의 형질도입.

[0456] 일부 실시형태에서, IL-10을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분절과 CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분절을 포함하는 단일 폴리뉴클레오타이드 작제물은, IL-10이 하나의 프로모터(예를 들어, PGK 또는 EF1a) 하에 있고 CAR이 제2 프로모터(예를 들어, CMV) 하에 있는 양방향성 벡터이다. 이러한 경우, 작제물이 선별 마커를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 경우, 폴리뉴클레오타이드 서열은 IL-10 또는 CAR의 다운스트림일 수 있다.

[0457] 일부 실시형태에서, IL-10을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분절과 CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분절을 포함하는 단일 폴리뉴클레오타이드 작제물은 5'에서 3' 방향으로 IL-10을 인코딩하는 서열과 CAR을 인코딩하는 서열을 포함한다. 이러한 실시형태에서, IL-10을 인코딩하는 서열과 CAR을 인코딩하는 서열은 단일 프로모터(예를 들어, 구성적 또는 유도성)에 작동 가능하게 연결되어 있다. 이러한 실시형태에서, 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 인코딩하는 서열 또는 2A-펩타이드를 인코딩하는 서열은 IL-10을 인코딩하는 서열과 CAR을 인코딩하는 서열 사이에 위치한다.

[0458] 일부 실시형태에서, IL-10을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분절과 CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 분절을 포함하는 단일 폴리뉴클레오타이드 작제물은 5'에서 3' 방향으로 CAR을 인코딩하는 서열과 IL-10을 인코딩하는 서열을 포함한다. 이러한 실시형태에서, CAR을 인코딩하는 서열과 IL-10을 인코딩하는 서열은 단일 프로모터(예를 들어, 구성적 또는 유도성)에 작동 가능하게 연결되어 있다. 이러한 실시형태에서, 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 인코딩하는 서열 또는 2A-펩타이드를 인코딩하는 서열은 CAR을 인코딩하는 서열과 IL-10을 인코딩하는 서열 사이에 위치한다.

[0459] 일부 실시형태에서, 방법은 (a) 1명 이상의 T세포 공여자로부터 얻은 1차 $CD4^+$ T세포를 풀링하는 단계; 및 (b) 본원에 제공된 방법에 따라 CAR을 인코딩하는 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절과 IL-10을 인코딩하는 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절을 도입하여 풀링된 $CD4^+$ T세포를 변형시키는 단계;를 포함한다. 다른 실시형태에서, 방법은 (a) 1명 이상의 T세포 공여자로부터 1차 $CD4^+$ T세포를 얻는 단계; (b) (예를 들어, 본원에 제공된 방법에 따라) CAR을 인코딩하는 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절과 IL-10을 인코딩하는 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절을 도입하여 각 공여자의 $CD4^+$ T세포를 별도로 변형시키고; 그 후, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포 풀링하여 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포를 얻는 단계;를 포함한다. 당업계에 알려진 다양한 방법을 사용하여 CAR을 인코딩하는 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절, IL-10을 인코딩하는 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절 또는 둘 모두를 1차 $CD4^+$ T세포에 도입할 수 있다.

[0460] 일부 실시형태에서, 방법은 항-CD3 항체와 항-CD28 항체, 또는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체가 코팅된 비드의 존재 하에서 1차 $CD4^+$ T세포 또는 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포를 인큐베이션하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 항-CD3 항체, 항-CD28 항체 및 IL-2, 또는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체가 코팅된 비드 및 IL-2의 존재 하에서 1차 $CD4^+$ T세포 또는 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포를 인큐베이션하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 피더세포 혼합물의 존재 하에서 1차 $CD4^+$ T세포 또는 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포를 인큐베이션하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 항-CD3 항체와 항-CD28 항체의 나노제제 존재 하에서 1차 $CD4^+$ T세포 또는 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포를 인큐베이션하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션은 CD3과 CD28을 통해 인간 T세포를 활성화시키고 확장시키는 중합체성 나노매트릭스 시약의 존재 하에서 수행된다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ T세포는 다른 T세포 특이적 면역 세포 배양 배지, 활성화제 및 보충제의 존재 하에서 배양된 것이다.

[0461] 일부 실시형태에서, 인큐베이션 단계는 본원에 제공된 방법에 따라 CAR을 인코딩하는 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절과 IL-10을 인코딩하는 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절을 도입하기 전에 수행된다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션 단계는 (a) 1명 이상의 상이한 T세포 공여자로부터 얻은 1차 $CD4^+$ T세포를 풀링하는 단계 후이지만; (b) 본원에 제공된 방법에 따라 CAR을 인코딩하는 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절과 IL-10을 인코딩하는 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절을 도입하여 풀링된 $CD4^+$ T세포를 변형시키는 단계 전;에 수행된다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션 단계는 (a) 1명 이상의 상이한 T세포 공여자로부터 1차 $CD4^+$ T세포를 얻는 단계 후이지만; (b) 본원에 제공된 방법에 따라 CAR을 인코딩하는 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절과 IL-10을 인코딩하는 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절을 도입하여 각 공여자의 $CD4^+$ T세포를 별도로 변형시키는 단계 전;에 수행된다.

[0462] 일부 실시형태에서, 인큐베이션 단계는 단계 (b) 후에 수행된다. 즉, 일부 실시형태에서, 인큐베이션 단계는 (b) 본원에 제공된 방법에 따라 CAR을 인코딩하는 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절과 IL-10을 인코딩하는 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절을 도입하여 풀링된 $CD4^+$ T세포를 변형시키는 단계 후에 수행된다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션 단계는 (b) 본원에 제공된 방법에 따라 CAR을 인코딩하는 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절과 IL-10을 인코딩하는 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절을 도입하여 각 공여자의 $CD4^+$ T세포를 별도로 변형시키는 단계 후이지만, 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포를 풀링하여 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포를 얻는 단계 전에 수행된다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션 단계는 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포를 풀링하여 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포를 얻는 단계 후에 수행된다.

[0463] 일부 실시형태에서, 인큐베이션 단계는 1회 초과로 수행된다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션 단계는 $CD4^+$ T세포의 유전자 변형 전후에 모두 수행된다.

[0464] 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절, 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절, 또는 둘 모두는 바이러스 벡터를 사용하여 1차 $CD4^+$ T세포에 도입된다. 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절과 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절은 동일한 바이러스 벡터에 위치한다. 일부 실시형태에서, 바이러스

벡터는 렌티바이러스 벡터이다.

[0465] 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 9, 16, 22, 34, 41 내지 49, 및 54의 서열을 갖는 CAR을 인코딩하는 분절과, 서열번호 1의 서열을 갖는 IL-10을 인코딩하는 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 9, 16, 22, 34, 41 내지 49, 및 54와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 CAR을 인코딩하는 분절을 포함하고, 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 1과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 IL-10을 인코딩하는 분절을 포함한다.

[0466] 일부 실시형태에서, CAR 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 서열번호 10, 17, 23, 35 또는 55의 서열을 갖고, IL-10 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 서열번호 2의 서열을 갖는다. 일부 실시형태에서, CAR 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 서열번호 10, 17, 22, 35 또는 55와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖고, IL-10 인코딩 폴리뉴클레오타이드 분절은 서열번호 2와 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는다. 일부 실시형태에서, 제1 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절, 제2 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절, 또는 둘 모두는, 성공적으로 형질도입된 $CD4^+$ T세포의 선별을 가능하게 하는 마커를 인코딩하는 분절을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 인코딩된 선별 마커는 ΔNGFR이다. 특정 실시형태에서, 인코딩된 선별 마커는 서열번호 4의 서열을 갖는다. 일부 실시형태에서, 인코딩된 선별 마커는 인간 EGFR 폴리펩타이드의 절단된 형태이다.

[0467] 일부 실시형태에서, 방법은 하나 이상의 선별 마커를 발현하는 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포를 단리하여, 유전자 변형된 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포가 농축된 집단을 생성하는 단계를 추가로 포함한다.

[0468] 일부 실시형태에서, 농축된 집단 내 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포의 적어도 40%(예를 들어, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 98%)는 선별 마커를 발현하며, 여기서 선별 마커는 IL-10 발현에 대한 대용물이다. 일부 실시형태에서, 농축된 집단 내 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포의 적어도 75%(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 98%)는 선별 마커를 발현하며, 여기서 선별 마커는 IL-10 발현에 대한 대용물이다. 일부 실시형태에서, 농축된 집단 내 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포의 적어도 75%는 선별 마커를 발현한다. 일부 실시형태에서, 농축된 집단 내 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포의 적어도 95%는 선별 마커를 발현한다. 일부 실시형태에서, 농축된 집단 내 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포의 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%는 선별 마커를 발현한다.

[0469] 일부 실시형태에서, 농축된 집단 내 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포의 적어도 75%(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 98%)는 IL-10을 발현한다. 일부 실시형태에서, 농축된 집단 내 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포의 적어도 75%는 IL-10을 발현한다. 일부 실시형태에서, 농축된 집단 내 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포의 적어도 95%는 IL-10을 발현한다. 일부 실시형태에서, 농축된 집단 내 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포의 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%는 IL-10을 발현한다.

[0470] 일부 실시형태에서, 농축된 집단 내 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포의 적어도 30%(예를 들어, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 98%)는 CAR을 발현한다. 일부 실시형태에서, 농축된 집단 내 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포의 적어도 50%는 CAR을 발현한다. 일부 실시형태에서, 농축된 집단 내 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포의 적어도 75%는 CAR을 발현한다. 일부 실시형태에서, 농축된 집단 내 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포의 적어도 95%는 CAR을 발현한다. 일부 실시형태에서, 농축된 집단 내 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포의 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%는 CAR을 발현한다.

[0471] 일부 실시형태에서, 농축된 집단 내 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포의 적어도 30%(예를 들어, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 98%)는 IL-10과 CAR을 발현한다. 일부 실시형태에서, 농축된 집단 내 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포의 적어도 50%는 IL-10과 CAR을 발현한다. 일부 실시형태에서, 농축된 집단 내 유전자 변형된

$CD4^+$ T세포의 적어도 75%는 IL-10과 CAR을 발현한다. 일부 실시형태에서, 농축된 집단 내 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포의 적어도 95%는 IL-10과 CAR을 발현한다. 일부 실시형태에서, 농축된 집단 내 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포의 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%는 IL-10과 CAR을 발현한다.

[0472] 일부 실시형태에서, 방법은 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포가 농축된 집단을 인큐베이션하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션은 항-CD3 항체와 항-CD28 항체, 또는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체가 코팅된 비드의 존재 하에서 수행된다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션은 추가로 IL-2의 존재 하에서 수행된다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션은 피더세포의 존재 하에서 수행된다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션은 항-CD3 항체와 항-CD28 항체의 나노제제 존재 하에서 수행된다. 일부 실시형태에서, 인큐베이션은 CD3과 CD28을 통해 인간 T세포를 활성화시키고 확장시키는 중합체성 나노매트릭스 시약의 존재 하에서 수행된다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ T세포는 다른 T세포 특이적 면역 세포 배양 배지, 활성화제 및 보충제의 존재 하에서 배양된 것이다.

[0473] 일부 실시형태에서, 방법은 유전자 변형된 $CD4^+$ T세포를 동결시키는 단계를 추가로 포함한다.

[0474] 일부 실시형태에서, 1차 $CD4^+$ T세포는 HLA 일배체형에 기반하여 선택된 공여자에서 유래한 것이다. 일부 실시형태에서, 방법은 유전 정보를 분석하여 T세포 공여자를 선별하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 잠재적인 T세포 공여자의 유전 정보 또는 HLA 일배체형을 분석하는 단계를 포함한다.

[0475] 일부 실시형태에서, 1차 $CD4^+$ T세포는 1차 $CD4^+$ T세포 또는 이의 변형을 이용하여 치료하고자 하는 숙주와 적어도 부분적으로 HLA가 일치하는 공여자에서 유래한 것이다. 일부 실시형태에서, 1차 $CD4^+$ T세포는 줄기세포(HSC), 조직 또는 기관 공여자와 적어도 부분적으로 HLA가 일치하는 공여자에서 유래한 것이다. 일부 실시형태에서, $CD4^+$ T세포는 줄기세포(HSC), 조직 또는 기관 공여자와 HLA가 일치하는 공여자에서 유래한 것이다. 일부 실시형태에서, 1차 $CD4^+$ T세포는 숙주와 생물학적으로 관련이 없는 제3 공여자로부터 얻는다. 일부 실시형태에서, 1차 $CD4^+$ T세포는 줄기세포, 조직 또는 기관 공여자와 생물학적으로 관련이 없는 제3 공여자로부터 얻는다.

[0476] 일부 실시형태에서, 단계 (a)에서, 1차 $CD4^+$ T세포는 2명, 3명, 4명, 5명, 6명, 7명, 8명, 9명 또는 10명의 상이한 T세포 공여자로부터 얻는다. 일부 실시형태에서, 적어도 2명의 T세포 공여자는 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서 서로 적어도 1/10, 2/10, 3/10, 4/10, 5/10, 6/10, 7/10, 8/10 또는 9/10 일치한다. 일부 실시형태에서, 적어도 2명의 T세포 공여자는 HLA-A, HLA-B, HLA-C 및 HLA-DRB1 유전자좌에서 서로 적어도 1/8, 2/8, 3/8, 4/8, 5/8, 6/8, 7/8 또는 8/8 일치한다. 일부 실시형태에서, 적어도 2명의 T세포 공여자는 HLA-A 유전자좌에서 서로 2/2 일치한다. 일부 실시형태에서, 적어도 2명의 T세포 공여자는 HLA-B 유전자좌에서 서로 2/2 일치한다. 일부 실시형태에서, 적어도 2명의 T세포 공여자는 HLA-C 유전자좌에서 서로 2/2 일치한다. 일부 실시형태에서, 적어도 2명의 T세포 공여자는 HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서 서로 적어도 3/4 또는 4/4 일치한다. 일부 실시형태에서, 적어도 2명의 T세포 공여자는 각각 A*02 대립유전자 또는 A*24 대립유전자를 갖는다. 일부 실시형태에서, T세포 공여자는 HLA-A*02 음성이다. 일부 실시형태에서, 적어도 2명의 T세포 공여자는 각각 HLA-A*02 또는 HLA-A*24 음성이다.

[0477] 일부 실시형태에서, 적어도 2명의 T세포 공여자는 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서 서로 5/10, 6/10, 7/10, 8/10 또는 9/10 미만으로 일치한다. 일부 실시형태에서, 적어도 2명의 T세포 공여자는 HLA-A, HLA-B, HLA-C 및 HLA-DRB1 유전자좌에서 서로 4/8, 5/8, 6/8, 7/8 또는 8/8 미만으로 일치한다. 일부 실시형태에서, 적어도 2명의 T세포 공여자는 HLA-A 유전자좌에서 서로 2/2 미만으로 일치한다. 일부 실시형태에서, 적어도 2명의 T세포 공여자는 HLA-B 유전자좌에서 서로 2/2 미만으로 일치한다. 일부 실시형태에서, 적어도 2명의 T세포 공여자는 HLA-C 유전자좌에서 서로 2/2 미만으로 일치한다. 일부 실시형태에서, 적어도 2명의 T세포 공여자는 HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서 서로 3/4 또는 4/4 미만으로 일치한다.

[0478] 일부 실시형태에서, 단계 (a)에서, 1차 $CD4^+$ T세포는 하나 이상의 동결된 스톡에서 얻는다. 일부 실시형태에서, 단계 (a)에서, 1차 $CD4^+$ T세포는 적어도 2명의 상이한 T세포 공여자의 동결되지 않은 말초혈액 단핵 세포에서 얻는다. 일부 실시형태에서, 방법은 말초혈액 단핵 세포로부터 $CD4^+$ T세포를 단리하는 단계를 추가로 포함한다.

일부 실시형태에서, 단계 (a)에서, 1차 $CD4^+$ T세포는 액체 현탁액에서 얻는다. 일부 실시형태에서, 액체 현탁액은 이전에 동결된 스톡에서 얻는다.

[0479] 일부 실시형태에서, 방법은 숙주의 말초혈액 단핵 세포(PBMC) 존재 하에서 $CD4^+$ T세포를 면역결핍화시키는 단계를 포함하지 않는다. 일부 실시형태에서, 방법은 재조합 IL-10 단백질의 존재 하에서 $CD4^+$ T세포를 면역결핍화시키는 단계를 포함하지 않으며, 여기서 재조합 IL-10 단백질은 $CD4^+$ T세포로부터 발현된 것이 아니다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 숙주의 DC10 세포 존재 하에서 $CD4^+$ T세포를 면역결핍화시키는 단계를 포함하지 않는다.

[0480] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 방법은 1회 이상의 풀링, 정제, 재자극 및 확장 단계 후에, CAR을 인코딩하는 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절과 IL-10을 인코딩하는 외인성 폴리뉴클레오타이드 분절을 도입하여 $CD4^+$ T세포 또는 풀링된 $CD4^+$ T세포를 변형시키는 단계를 포함한다.

[0481] **6.7. $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포를 사용하는 방법**

[0482] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 환자를 치료하는 방법으로서, 치료를 필요로 하는 환자에게 본원에 제공된 임의의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(예를 들어, 자가유래 단일 공여자 또는 동종이계 단일 공여자), 본원에 제공된 임의의 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ T세포, 본원에 제공된 임의의 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 본원에 제공된 임의의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다

[0483] 일부 실시형태에서, 상기 방법은 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포의 동결된 현탁액을 해동시키는 사전 단계를 추가로 포함한다.

[0484] 일부 실시형태에서, 자가유래 단일 공여자 또는 동종이계 단일 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, 또는 약제학적 조성물은 환자에서 병원성 T세포 반응을 예방하거나 이의 중증도를 감소시킨다.

[0485] 일부 실시형태에서, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포 또는 약제학적 조성물은 염증성 또는 자가면역 반응을 예방하거나 이의 중증도를 감소시킨다.

[0486] 일부 실시형태에서, 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 약제학적 조성물은 환자에서 병원성 T세포 반응을 예방하거나 이의 중증도를 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 약제학적 조성물은 염증을 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 약제학적 조성물은 조직 복구를 증강시킨다. 일부 실시형태에서, 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 약제학적 조성물은 자가 항원과 비병원성 항원에 대한 면역학적 내성을 증강시키고 면역 항상성을 유지한다. 일부 실시형태에서, 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 약제학적 조성물은 기관 이식, GvHD, 및 다양한 자가면역 및 염증성 질환과 관련된 병원성 T세포 반응을 하향조절한다. 일부 실시형태에서, 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 약제학적 조성물은 자가면역 질환을 치료한다. 일부 실시형태에서, 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 약제학적 조성물은 NLPR3 인플라마솜의 과활성을 감소시키거나 NLPR3 인플라마솜 과활성과 관련된 증상을 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 약제학적 조성물은 종양세포의 사멸을 유도하거나 종양 성장을 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 약제학적 조성물은 무질환 생존율(예를 들어, 최소 잔류 질환의 부재)을 증가시킨다. 일부 실시형태에서, 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 약제학적 조성물은 상처 치유 또는 조직 복구를 유도한다.

[0487] 일부 실시형태에서, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포 또는 약제학적 조성물은 환자에서 병원성 T세포 반응을 예방하거나 이의 중증도를 감소시키는 데 효과적인 양으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포 또는 약제학적 조성물은 염증을 감소시키는 데 효과적인 양으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포 또는 약제학적 조성물은 조직 복구를 증강시키는 데 효과적인 양으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 다중

공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포 또는 약제학적 조성물은 자가 항원과 비병원성 항원에 대한 면역학적 내성을 증강시키고 면역 항상성을 유지하는 데 효과적인 양으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포 또는 약제학적 조성물은 기관 이식, GvHD 및 다양한 자가면역 또는 염증성 질환과 관련된 병원성 T세포 반응을 하향조절하는 데 효과적인 양으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포 또는 약제학적 조성물은 자가면역 질환을 치료하는 데 효과적인 양으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포 또는 약제학적 조성물은 NLPR3 인플라마솜의 과활성을 감소시키거나 NLPR3 인플라마솜 과활성과 관련된 증상을 감소시키는 데 효과적인 양으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포 또는 약제학적 조성물은 종양세포의 사멸을 유도하거나 종양 성장을 감소시키는 데 효과적인 양으로 투여된다. 일부 실시형태에서, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포 또는 약제학적 조성물은 무질환 생존율(예를 들어, 최소 잔류 질환의 부재)을 증가시는 데 효과적인 양으로 투여된다.

[0488] 일부 실시형태에서, 단일 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(예를 들어, 자가유래 또는 동종이계) 또는 약제학적 조성물은 환자에서 병원성 T세포 반응을 예방하거나 이의 중증도를 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 단일 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 약제학적 조성물은 염증을 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 단일 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포 또는 약제학적 조성물은 조직 복구를 증강시킨다. 일부 실시형태에서, 단일 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 약제학적 조성물은 자가 항원과 비병원성 항원에 대한 면역학적 내성을 증강시키고 면역 항상성을 유지한다. 일부 실시형태에서, 단일 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 약제학적 조성물은 기관 이식, GvHD, 및 다양한 자가면역 및 염증성 질환과 관련된 병원성 T세포 반응을 하향조절한다. 일부 실시형태에서, 단일 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포 또는 약제학적 조성물은 자가면역 질환을 치료한다. 일부 실시형태에서, 단일 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 약제학적 조성물은 NLPR3 인플라마솜의 과활성을 감소시키거나 NLPR3 인플라마솜 과활성과 관련된 증상을 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 단일 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 약제학적 조성물은 종양세포의 사멸을 유도하거나 종양 성장을 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 단일 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 약제학적 조성물은 무질환 생존율(예를 들어, 최소 잔류 질환의 부재)을 증가시킨다. 일부 실시형태에서, 단일 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 약제학적 조성물은 상처 치유 또는 조직 복구를 유도한다.

[0489] 일부 실시형태에서, 치료 방법은 투여 후 환자에서 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포를 모니터링하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 환자에서 얻은 생물학적 샘플에서 선별 마커를 검출하여, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포의 존재 또는 부재를 검출하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 환자에서 선별 마커를 검출하고, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포를 환자에게 투여한 후 선별 마커의 검출을 사용하여 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포를 추적하고/하거나 모니터링하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 선별 마커는 환자의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 존재 하에서의 변화를 추적하기 위해 다수의 시점에서 검출된다. 일부 실시형태에서, 생물학적 샘플은 환자의 생검 또는 혈액 샘플이다.

[0490] $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포)는 치료적 유효량으로 투여된다. 상기 양은 체중과 다른 임상 인자에 기반하여 결정될 수 있다. 일부 실시형태에서, 1 kg당 10^3개 내지 10^{11}개의 세포가 투여된다. 일부 실시형태에서, 1 kg당 10^3개 내지 10^{10}개의 세포가 투여된다. 일부 실시형태에서, 1 kg당 10^3개 내지 10^9개의 세포가 투여된다. 일부 실시형태에서, 1 kg당 10^3개 내지 10^8개의 세포가 투여된다. 일부 실시형태에서, 1 kg당 10^3개 내지 10^7개의 세포가 투여된다. 일부 실시형태에서, 1 kg당 10^3개 내지 10^6개의 세포가 투여된다. 일부 실시형태에서, 1 kg당 10^3개 내지 10^5개의 세포가 투여된다. 일부 실시형태에서, 1 kg당 10^3개 내지 10^4개의 세포가 투여된다.

[0491] 다양한 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포)는 치료적으로 유효한 일정에 따라 투여된다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(자가유래 단

일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포)는 1회 투여된다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포)는 매일, 3일마다, 7일마다, 14일마다, 21일마다 또는 매월 투여된다.

[0492] $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포)는 전신, 피하 또는 복강내와 같은 상이한 투여 경로에 따라 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포는 인간 혈청 알부민을 2% 내지 20%, 바람직하게는 5% 함유할 수 있는 식염수 또는 생리학적 용액 내에서 투여된다.

[0493] **6.7.1. GvHD를 감소시키거나 예방하는 방법**

[0494] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물은 조혈 줄기세포(HSC) 이식(HSCT) 이전에, HSCT와 동시에 또는 HSCT 이후에 환자를 치료하는 데 사용된다.

[0495] 다양한 실시형태에서, HSCT는 일치 관련 HSCT 또는 일치 비관련 HSCT이다. 다양한 실시형태에서, HSCT는 동일단배체 HSCT, 불일치하는 관련 HSCT 또는 불일치하는 비관련 HSCT이다.

[0496] 일부 실시형태에서, 환자는 동종 HSCT를 이용한 치료를 필요로 하는 혈액학적 악성종양을 앓고 있다. 일부 실시형태에서, 혈액학적 악성종양은 비정상 골수계 세포에 의해 매개된다. 일부 실시형태에서, 악성종양 또는 혈액암은 골수성 백혈병이다. 일부 실시형태에서, 악성종양 또는 혈액암은 $CD19^+$, $CD20^+$, $CD22^+$, $BCMA^+$ 또는 $B7\text{-}H3^+$ 혈액암이다. 일부 실시형태에서, $CD19^+$, $CD20^+$, $CD22^+$ 또는 $B7\text{-}H3^+$ 혈액암은 만성 림프구성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병(ALL) 및 비호지킨 림프종에서 선택된다.

[0497] 일부 실시형태에서, T세포 공여자는 $CD4^{IL-10/CAR}$(자가유래 단일 공여자 또는 동종이계 단일 공여자) 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포와 HSC를 이용하여 치료하고자 하는 환자의 유전 정보, 및/또는 HSC 공여자의 유전 정보에 기반하여 선택된다. 일부 실시형태에서, T세포 공여자는 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포와 HSC를 이용하여 치료하고자 하는 환자의 HLA 일배체형, 및/또는 HSC 공여자의 HLA 일배체형에 기반하여 선택된다. 일부 실시형태에서, 방법은 $CD4^{IL-10}$ 세포를 투여하기 전, T세포 공여자의 유전 정보 또는 HLA 일배체형을 분석하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 숙주의 유전 정보 또는 HLA 일배체형을 분석하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 HSC 공여자의 유전 정보 또는 HLA 일배체형을 분석하는 단계를 추가로 포함한다.

[0498] 일부 실시형태에서, T세포 공여자, 숙주 및 HSC 공여자는 생물학적으로 관련이 없다. 일부 실시형태에서, T세포 공여자, 숙주 및 HSC 공여자는 상이한 HLA 일배체형을 갖는다. 일부 실시형태에서, T세포 공여자, 숙주 및 HSC 공여자는 HLA 일배체형이 적어도 부분적 불일치한다. 일부 실시형태에서, T세포 공여자는 역치 값 초과의 HLA 일치를 갖는 HLA 일배체형을 갖는 경우에 선택된다.

[0499] 일부 실시형태에서, HSC 공여자는 환자와 부분적으로 HLA가 불일치한다. 일부 실시형태에서, HSC 공여자는 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서 환자와 5/10, 6/10, 7/10, 8/10, 9/10 또는 10/10 미만으로 일치한다. 일부 실시형태에서, HSC 공여자는 HLA-A, HLA-B, HLA-C 및 HLA-DRB1 유전자좌에서 환자와 4/8, 5/8, 6/8, 7/8 또는 8/8 미만으로 일치한다. 일부 실시형태에서, HSC 공여자는 HLA-A, HLA-B 또는 HLA-C 유전자좌에서 환자와 2/2 미만으로 일치한다. 일부 실시형태에서, HSC 공여자는 HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서 환자와 3/4 또는 4/4 미만으로 일치한다.

[0500] 일부 실시형태에서, T세포 공여자 중 한 명 이상은 환자와 HLA가 불일치하거나 부분적으로 HLA가 불일치한다. 일부 실시형태에서, T세포 공여자 중 한 명 이상은 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서 환자와 5/10, 6/10, 7/10, 8/10, 9/10 또는 10/10 미만으로 일치한다. 일부 실시형태에서, T세포 공여자 중 한 명 이상은 HLA-A, HLA-B, HLA-C 및 HLA-DRB1 유전자좌에서 환자와 4/8, 5/8, 6/8, 7/8 또는 8/8 미만으로 일치한다. 일부 실시형태에서, T세포 공여자 중 한 명 이상은 HLA-A, HLA-B 또는 HLA-C 유전자좌에서 환자와 2/2 미만으로 일치한다. 일부 실시형태에서, T세포 공여자 중 한 명 이상은 HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서 환자와 2/4, 3/4 또는 4/4 미만으로 일치한다.

[0501] 일부 실시형태에서, T세포 공여자 중 한 명 이상은 HSC 공여자와 HLA가 불일치하거나 부분적으로 HLA가 불일치

한다. 일부 실시형태에서, T세포 공여자 중 한 명 이상은 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서 HSC 공여자와 5/10, 6/10, 7/10, 8/10, 9/10 또는 10/10 미만으로 일치한다. 일부 실시형태에서, T세포 공여자 중 한 명 이상은 HLA-A, HLA-B, HLA-C 및 HLA-DRB1 유전자좌에서 HSC 공여자와 4/8, 5/8, 6/8, 7/8 또는 8/8 미만으로 일치한다. 일부 실시형태에서, T세포 공여자 중 한 명 이상은 HLA-A, HLA-B 또는 HLA-C 유전자좌에서 HSC 공여자와 2/2 미만으로 일치한다. 일부 실시형태에서, T세포 공여자 중 한 명 이상은 HLA-DRB1 및 HLA-DQB1 유전자좌에서 HSC 공여자와 3/4 또는 4/4 미만으로 일치한다.

[0502] 일부 실시형태에서, 환자에게 투여될 때, 본원에 제공된 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포(단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물은 이식된 조혈 줄기세포에 의한 GvHD를 예방하거나 이의 중증도를 감소시킨다.

[0503] 일부 실시형태에서, 환자에게 투여될 때, 본원에 제공된 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포(단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물은 이식된 조혈 세포에 의한 병리학적 T세포 반응을 예방하거나 이의 중증도를 감소시킨다. 특정 실시형태에서, $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포 또는 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포는 GvHD를 예방하거나 감소시킨다.

[0504] 일부 실시형태에서, 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10}$ 세포 또는 약제학적 조성물은 병원성 T세포에 의해 유도되는 조직 손상 또는 염증을 예방하거나 이의 중증도를 감소시킨다.

[0505] **6.7.2. 암을 치료하는 방법**

[0506] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물은 암의 치료에 사용된다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물은 악성종양을 치료하는 데 사용된다.

[0507] 바람직한 실시형태에서, $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포)는 항종양 효과, 특정 실시형태에서, 항백혈병 효과를 직접 매개한다.

[0508] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물은 조혈 줄기세포 이식(HSCT), 말초혈액 줄기세포(PBSC), 제대혈(CB) 또는 골수(BM) 이식 전 또는 후에 투여된다.

[0509] 일부 실시형태에서, 신생물 세포(neoplastic cell)는 CD19를 발현한다. 일부 실시형태에서, 신생물 세포는 CD20을 발현한다. 일부 실시형태에서, 신생물 세포는 CD22를 발현한다. 일부 실시형태에서, 신생물 세포는 BCMA를 발현한다. 일부 실시형태에서, 신생물 세포는 B7-H3을 발현한다. 일부 실시형태에서, 신생물 세포는 CD13을 발현한다. 일부 실시형태에서, 신생물 세포는 HLA-클래스 I을 발현한다. 일부 실시형태에서, 신생물 세포는 CD54를 발현한다. 일부 실시형태에서, 신생물 세포는 CD13, HLA-클래스 I 및 CD54를 발현한다. 일부 실시형태에서, 신생물 세포는 CD112를 발현한다. 일부 실시형태에서, 신생물 세포는 CD58을 발현한다. 일부 실시형태에서, 신생물 세포는 CD155를 발현한다. 일부 실시형태에서, 종양은 CD112, CD58 또는 CD155를 발현한다. 다양한 실시형태에서, 종양은 고형 종양 또는 혈액학적 종양이다. 일부 실시형태에서, 종양은 고형 종양이다. 일부 실시형태에서, 고형 종양은 B7-H3을 발현한다. 일부 실시형태에서, 고형 종양은 유방암, 뇌암, 폐암, 간암, 위암, 비장암, 결장암, 직장암, 췌장암, 전립선암, 자궁암, 피부암, 두부암, 경부암, 육종, 신경모세포종 및 난소암으로 이루어지는 군에서 선택된다.

[0510] 일부 실시형태에서, 환자는 부신암, 항문암, 담관암, 방광암, 뼈암, 성인의 뇌/CNS 종양, 소아의 뇌/CNS 종양, 유방암, 남성 유방암, 원발성 불명암, 캐슬만병, 자궁경부암, 결장/직장암, 자궁내막암, 식도암, 유잉 종양군, 눈암, 담낭암, 위장관 카르시노이드 종양, 위장관 간질 종양(GIST), 임신 융모성 질환, 호지킨병, 카포시 육종, 신장암, 후두 및 하인두 암, 급성 림프구성 백혈병(ALL), 급성 골수성 백혈병(AML, 골수성 육종 및 피부 백혈병

포함), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 골수단핵구성 백혈병(CMML), 소아 백혈병, 간암, 폐암, 비소세포폐암, 소세포폐암, 폐 카르시노이드 종양, 림프종, 피부 림프종, 악성 중피종, 다발성 골수종, 골수이형성 증후군, 비강 및 부비동암, 비인두암, 신경모세포종, 비호지킨 림프종, 소아 비호지킨 림프종, 구강 및 구인두암, 골육종, 난소암, 췌장암, 음경암, 뇌하수체 종양, 전립선암, 망막모세포종, 횡문근육종, 타액선암, 성인 연부조직 육종(암), 피부암, 기저세포 및 편평세포 피부암, 흑색종 피부암, 메르켈세포 피부암, 소장암, 위암, 고환암, 흉선암, 갑상선암, 자궁 육종, 질암, 외음부암, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 및 윌름스 종양으로 이루어지는 군에서 선택되는 암을 앓고 있다.

[0511] 일부 실시형태에서, 암은 골수계 종양이다. 특정 실시형태에서, 암은 AML 또는 CML이다. 일부 실시형태에서, 암은 골수계 종양이다. 일부 실시형태에서, 암은 ALL이다.

[0512] 일부 실시형태에서, 방법은 혈액, 골수 및 림프절에 영향을 미치는 혈액암을 치료하는 데 사용된다. 다양한 실시형태에서, 혈액암은 림프종(예를 들어, 호지킨 림프종), 림프구성 백혈병, 골수종이다. 다양한 실시형태에서, 혈액암은 급성 또는 만성 골수성(골수계) 백혈병(AML, CML), 또는 골수이형성 증후군이다.

[0513] 일부 실시형태에서, 악성종양 또는 혈액암은 $CD19^{+}$, $CD20^{+}$, $CD22^{+}$, $BCMA^{+}$ 또는 $B7\text{-}H3^{+}$ 혈액암이다. 일부 실시형태에서, $CD19^{+}$, $CD20^{+}$, $CD22^{+}$, $BCMA^{+}$ 또는 $B7\text{-}H3^{+}$ 혈액암은 만성 림프구성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병(ALL) 및 비호지킨 림프종이다.

[0514] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포)는 혈액암을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법으로서, 환자에게 치료적 유효량의 본원에 제공된 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법에 사용된다.

[0515] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포는 $CD19^{+}$ 혈액암을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법으로서, 환자에게 치료적 유효량의 본원에 제공된 $CD4^{IL\text{-}10/항\text{-}CD19\ CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/항\text{-}CD19\ CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/항\text{-}CD19\ CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법에 사용된다.

[0516] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포는 $CD20^{+}$ 혈액암을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법으로서, 환자에게 치료적 유효량의 본원에 제공된 $CD4^{IL\text{-}10/항\text{-}CD20\ CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/항\text{-}CD20\ CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/항\text{-}CD20\ CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법에 사용된다.

[0517] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포는 $CD22^{+}$ 혈액암을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법으로서, 환자에게 치료적 유효량의 본원에 제공된 $CD4^{IL\text{-}10/항\text{-}CD22\ CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/항\text{-}CD22\ CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/항\text{-}CD22\ CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법에 사용된다.

[0518] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포는 $B7\text{-}H3^{+}$ 암(예를 들어, 고형암)을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법으로서, 환자에게 치료적 유효량의 본원에 제공된 $CD4^{IL\text{-}10/항\text{-}B7\text{-}H3\ CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/항\text{-}B7\text{-}H3\ CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/항\text{-}B7\text{-}H3\ CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법에 사용된다.

[0519] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포는 $BCMA^{+}$ 암(예를 들어, 고형암)을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법으로서, 환자에게 치료적 유효량의 본원에 제공된 $CD4^{IL\text{-}10/항\text{-}BCMA\ CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/항\text{-}BCMA\ CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/항\text{-}BCMA\ CAR}$ 세포 집단, 또

는 임의의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법에 사용된다.

[0520] 일부 실시형태에서, 암은 치료적 개입에 대해 불응성이거나 저항성이 있다.

[0521] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 방법은 환자에서 $CD19^+$, $CD20^+$, $CD22^+$, $BCMA^+$ 또는 $B7\text{-}H3^+$ 혈액암 및 고형암의 재발을 예방하는 데 사용되며, 이러한 방법은 $CD19^+$, $CD20^+$, $CD22^+$, $BCMA^+$ 또는 $B7\text{-}H3^+$ 혈액암 또는 고형암을 앓고 있거나, $CD19^+$, $CD20^+$, $CD22^+$, $BCMA^+$ 또는 $B7\text{-}H3^+$ 혈액암 또는 고형암이 재발할 위험이 있는 것으로 식별된 환자에게, 항암 효과를 유도하기에 충분한 치료적 유효량의 본원에 제공된 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0522] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포)는 치료적 개입과 병용된다. 병용은 동시에 또는 상이한 시점에 수행될 수 있다. 바람직하게는, 치료적 개입은 화학요법, 방사선요법, 동종 HSCT, 면역 억제, 수혈, 골수 이식, 성장인자, 생물학적 제제로 이루어지는 군에서 선택된다.

[0523] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포)는 악성종양을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법으로서, 환자에게 동종 HSCT 이식편을 투여하는 단계, 및 환자에게 치료적 유효량의 본원에 제공된 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법에 사용된다.

[0524] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포)는 (직접적인 항종양 효과에 더하여) GvHD를 예방하고 장기적인 내성을 유도하기 위해 동종이계 HSCT(동종 HSCT)를 받는 암 환자를 치료하는 데 사용된다. $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포의 양은 (줄기세포 제제에 존재하는 공여자 T세포에 의해 매개되는) 동종 HSCT의 이식편대백혈병(GvL) 또는 이식편대종양(GvT) 효능을 억제하지 않으면서 이식편대숙주병(GvHD)을 억제하거나 예방하기에 충분한 양이다.

[0525] 최소 잔류 질환이 있는 환자를 치료하는 방법으로서, 최소 잔류 질환이 있거나 최소 잔류 질환이 있을 수 있는 위험이 있는 것으로 식별된 환자에게, 항암 효과를 유도하기에 충분한 치료적 유효량의 본원에 제공된 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법이 또한 본원에 제공된다.

[0526] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물은 종양 침윤성 종양 성장 촉진성 골수 계통 세포(예를 들어, 단핵구, 대식세포, 호중구)의 세포 사멸을 유도한다.

[0527] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물은 B세포(예를 들어, $CD19^+$ B세포, $CD20^+$ B세포, $CD22^+$ B세포, $BCMA^+$, $B7\text{-}H3^+$ B세포 또는 $B7\text{-}H3^+$ 고형 종양 세포)의 세포 사멸을 유도한다.

[0528] **6.7.3. 염증성 또는 자가면역 질환을 치료하는 방법**

[0529] 일부 실시형태에서, 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL\text{-}10/CAR}$ 세포는 염증성 또는 자가면역 질환을 치료하기 위

해 투여된다. 일부 실시형태에서, 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 NLPR3 인플라마솜의 과활성과 관련된 질환 또는 장애를 치료하기 위해 투여된다.

[0530] NOD 유사 수용체 패밀리(NLR) 단백질 NLRP3은 병원성, 환경적 또는 내인성 공급원으로부터의 위험 신호를 감지하는 세포내 신호전달 분자이다. 활성화 후, NLPR3은 카스파아제-1과 상호작용하여, 인플라마솜으로 명명되는 복합체를 형성한다. 이는 카스파아제-1을 활성화시켜, 전염증성 사이토카인 IL-1β와 IL-18을 활성 형태로 절단하고 파이롭토시스(pyroptosis)로 알려진 일종의 염증성 세포 사멸을 매개한다.

[0531] 일부 실시형태에서, 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 머클-웰스 증후군(MWS), 가족성 한랭 자가염증 증후군(FCAS) 및 신생아 발병 다기관 염증성 질환(NOMID)에서 선택되는 염증성 질환을 치료하기 위해 투여된다. 일부 실시형태에서, 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 대사 증후군, 2형 당뇨병, 죽상경화증, 알츠하이머병, 파킨슨병, ALS, 비알코올성 지방간염, 골관절염, 규폐증, 석면증, 통풍 및 폐 섬유증에서 선택되는 만성 질환을 치료하기 위해 투여된다. 일부 실시형태에서, 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 크론병, 궤양성 대장염, 다발성 경화증 및 전신 홍반성 루푸스, 또는 당뇨병성 망막병증, 급성 녹내장 및 연령 관련 황반변성과 같은 염증성 안질환을 치료하기 위해 투여된다.

[0532] 일부 실시형태에서, 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 NLRP3과 관련된 질환을 치료하기 위해 투여된다. 이러한 질환은 CAPS, NASH, 알츠하이머병, 파킨슨병, 심혈관 질환, 골관절염, 통풍, 가성통풍, 신석회증, 2형 당뇨병, 쇼그렌 증후군, 낫적혈구병(SCD), AMD, 감염, 뇌 말라리아, 석면증, 접촉 과민반응, 일광화상, 규폐증, 낭포성 섬유증, 염증성 장질환, ALS, 골수이형성 증후군 및 포도막염으로 이루어지는 군에서 선택된다.

[0533] 일부 실시형태에서, 질환은 파킨슨병, 알츠하이머병, 연령 관련 인지 장애, 전두측두형 치매, 외상 후 뇌 손상, 뇌내 출혈, 패혈증 관련 뇌병증, 뇌허혈, 지주막하 출혈, 간질, 아크릴아미드 중독, 오피오이드로 인한 신경염증, 만성 편두통, 수술기주위 신경인지 장애, 뇌졸중 후 인지 장애, 심장마비 후 인지 장애, 사회적 고립으로 인한 인지 장애, 불안 및 외상 후 스트레스 장애에서 선택되는 뇌 장애이다.

[0534] 일부 실시형태에서, 질환은 천식, IR 폐 손상, ARDS/COPD, 미세먼지로 인한 폐 손상, 방사선 폐렴, 폐 고혈압, 사르코이드증, 낭포성 섬유증 및 알레르기성 비염에서 선택되는 폐 장애이다.

[0535] 일부 실시형태에서, 질환은 죽상경화증, 심부전, 고혈압, 심근경색증, 심방세동, 대사 기능장애로 인한 심장 손상, 심부전 및 내피 기능장애에서 선택되는 심장 장애이다.

[0536] 일부 실시형태에서, 질환은 대장염과 같은 위장관 질환이다. 일부 실시형태에서, 질환은 급성 간부전, 면역 일주기 조절, NASH, 당뇨병의 인지 기능장애, IR 간 손상, 특이약물로 인한 간 손상 및 간 섬유증에서 선택되는 간 장애이다. 일부 실시형태에서, 질환은 당뇨병성 뇌병증, 당뇨병 관련 죽상경화증, 인슐린 저항성, 췌도 이식 거부반응, 만성 결정 신경병증, 신장 섬유증, I/R 신장 손상, 비만 관련 신장 질환 및 신장 고혈압에서 선택되는 췌장 또는 신장 장애이다. 일부 실시형태에서, 질환은 건선과 망막 신생혈관형성에서 선택되는 피부 또는 눈 장애이다. 일부 실시형태에서, 질환은 조산과 같은 생식계 장애이다. 일부 실시형태에서, 질환은 원발성 월경통, 선천적 면역, 선천적 내지 후천적 면역, 전신 홍반성 루푸스-루푸스 신염, 및 다발성 경화증에서 선택되는 면역 장애이다. 일부 실시형태에서, 질환은 머클-웰스 증후군, 류마티스 관절염, 낫적혈구병 및 VCP 관련 질환에서 선택되는 유전성 장애이다. 일부 실시형태에서, 질환은 다발성 경화증 관련 신경병증성 통증, 만성 전립선염/만성 골반 통증, 암으로 인한 뼈 통증 및 과민증에서 선택되는 통증 장애이다. 일부 실시형태에서, 질환은 두경부암의 인간 편평세포 암종과 같은 암이다. 일부 실시형태에서, 질환은 박테리아, 바이러스 또는 기생충 감염과 같은 감염성 장애이다.

[0537] 일부 실시형태에서, 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 NLRP3 관련 질환에 대해 현재 이용 가능한 치료제, 예컨대 IL-1을 표적으로 하는 생물학적 제제와 병용된다. 생물학적 제제에는 재조합 IL-1 수용체 안타고니스트인 아나킨라(anakinra), 중화 IL-1β 항체인 카나키누맙(canakinumab) 및 가용성 미끼(decoy) IL-1 수용체인 릴로나셉트(rilonacept)가 포함된다.

[0538] 일부 실시형태에서, 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 2형 당뇨병, 대사 증후군, 심혈관 질환, SLE, MS, CD, 궤양성 대장염(UC), 골관절염, 비알코올성 지방간염(Nash), 파킨슨병, ALS, 폐 섬유증, 규폐증, 석면증, 당뇨병성 망막병증 및 연령 관련 황반변성에서 선택되는 질환을 치료하기 위해 투여된다.

[0539] 일부 실시형태에서, 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 염증을 치료하기 위해 투여된다. 염증은, 비제한적으로, 관상동맥 질환(CAD), 2형 당뇨병, 신경변성 질환 또는 염증성 장질환과 관련이 있을 수 있다.

[0540] 일부 실시형태에서, 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 활성화된 단핵구, 대식세포 또는 수지상세포에 의한 IL-1β의 생산 증가와 관련된 질환 또는 장애를 치료하기 위해 투여된다. 일부 실시형태에서, 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 활성화된 단핵구, 대식세포 또는 수지상세포에 의한 IL-18의 생산 증가와 관련된 질환 또는 장애를 치료하기 위해 투여된다. 일부 실시형태에서, 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 활성화된 단핵구, 대식세포 또는 수지상세포에 의한 성숙 카스파아제 1의 생산 증가와 관련된 질환 또는 장애를 치료하기 위해 투여된다.

[0541] 일부 실시형태에서, 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 활성화된 단핵구, 대식세포 또는 수지상세포에 의한 IL-1β의 생산을 감소시키기 위해 투여된다. 일부 실시형태에서, 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 활성화된 단핵구, 대식세포 또는 수지상세포에 의한 IL-18의 생산을 감소시키기 위해 투여된다. 일부 실시형태에서, 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 활성화된 단핵구, 대식세포 또는 수지상세포에 의한 성숙 카스파아제 1의 생산을 감소시키기 위해 투여된다.

[0542] **6.7.4. 기타 장애를 치료하는 방법**

[0543] 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포)는 면역 관용화가 필요한 환자에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 방법은 면역 관용화가 필요한 환자에게, 치료적 유효량의 본원에 제공된 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0544] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물은 자가면역 질환을 치료하기 위해 환자에게 투여된다.

[0545] 일부 실시형태에서, 자가면역 질환은 자가면역 포도막염, 건선, 백반증, 원형탈모증, 건선성 관절염, 염증성 장질환, 하시모토 갑상선염, 자가면역 혈관염, 궤양성 대장염, 수포성 질환, 피부경화증, 셀리악병, 그레이브스병, 전신경화증, 중증 근무력증, 항-NMDA 뇌염, 유사천포창 질환(심상성 및 낙엽상), 후천성 수포성 표피박리증, 혈전성 혈소판감소성 자반증, 특발성 혈소판감소성 자반증, 자가항체 유발 혈관 염증, 자가항체 유발 심장염, 류마티스 관절염, 자가항체 유발 류마티스 관절염, 시신경척수염 스펙트럼 장애, 전신 홍반성 루푸스(SLE), 다발성 경화증(MS), 쇼그렌 증후군, 자가면역 근육병증, 1형 당뇨병, 애디슨병, 악성 빈혈, 자가면역 간염, 원발성 담즙성 담관염(PBC), 자가면역 췌장염, 굿파스처병, 원발성 막성 신장병증, 난소 기능부전, 자가면역 고환염, 안구건조증 및 특발성 간질성 폐렴으로 이루어지는 군에서 선택된다. 일부 실시형태에서, 자가면역 질환은 크론병, 궤양성 대장염, 셀리악병, 1형 당뇨병, 루푸스, 건선, 건선성 관절염 또는 류마티스 관절염이다. 일부 실시형태에서, 환자는 알레르기 또는 아토피 질환을 앓고 있다. 알레르기 또는 아토피 질환은 천식, 아토피 피부염 및 비염으로 이루어지는 군에서 선택될 수 있다. 일부 실시형태에서, 환자는 식품 알레르기가 있다.

[0546] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물은 HSCT 이외의 세포 및 기관 이식에 대한 병원성 T세포 반응을 예방하거나 이의 중증도를 감소시키기 위해 투여된다. 일부 실시형태에서, 방법은 본원에 제공된 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물의 투여 전 또는 후에, 상기 환자에게 기관을 이식하는 단계를 포함한다. 특정 실시형태에서, 기관은 신장, 심장, 폐, 간 또는 췌도 세포이다. 바람직한 실시형태에서, 본원에 제공된 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포

(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물은 기관 이식의 숙주 거부반응을 예방하거나 이의 중증도를 감소시킨다.

[0547] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물은 유전자 요법, 예를 들어 재조합 아데노바이러스, 아데노연관바이러스(AAV), 단순 헤르페스 바이러스(HSV), 레트로바이러스, 렌티바이러스, 비삽입성 렌티바이러스, 알파바이러스, 플라비바이러스, 랍도바이러스, 홍역 바이러스, 뉴캐슬병 바이러스, 폭스바이러스 또는 피코르나바이러스의 투여와 관련된 면역 반응을 예방하거나 감소시키기 위해 투여된다. 이러한 실시형태에서, 방법은 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 약제학적 조성물의 투여 전 또는 후에, 상기 환자에게 재조합 아데노바이러스, 아데노연관바이러스(AAV), 단순 헤르페스 바이러스(HSV), 레트로바이러스, 렌티바이러스, 비삽입성 렌티바이러스, 알파바이러스, 플라비바이러스, 랍도바이러스, 홍역 바이러스, 뉴캐슬병 바이러스, 폭스바이러스 또는 피코르나바이러스를 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0548] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물은 AAV 이외의 재조합 바이러스 벡터에 대한 면역 반응을 예방하거나 감소시키기 위해 투여된다. 이러한 실시형태에서, 방법은 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단 또는 약제학적 조성물의 투여 전 또는 후에, 상기 환자에게 AAV 이외의 재조합 바이러스 벡터를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. AAV 이외의 바이러스 벡터의 비제한적인 예에는, 단순 헤르페스 바이러스(HSV), 레트로바이러스, 렌티바이러스, 알파바이러스, 플라비바이러스, 랍도바이러스, 홍역 바이러스, 뉴캐슬병 바이러스, 폭스바이러스 또는 피코르나바이러스가 포함된다.

[0549] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물은 iPS 유래 조직 또는 세포의 이식과 관련된 면역 반응을 예방하거나 감소시키기 위해 투여된다. iPS 유래 조직 및 세포에는, 비제한적으로, 심근세포, 간세포, 상피세포, 연골, 뼈 및 근육 세포, 뉴런이 포함된다.

[0550] 일부 실시형태에서, 방법은 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단 또는 약제학적 조성물의 투여 전 또는 후에, 환자에게 면역원성 치료 단백질을 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단 또는 약제학적 조성물은 면역원성 치료 단백질에 대한 면역 반응을 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 면역원성 치료 단백질은 치료용 항체, 인자 VIII 대체, 사이토카인, 및 사이토카인 뮤테인에서 선택된다.

[0551] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물은 염증을 치료하기 위해 투여된다. 염증은, 비제한적으로, 관상동맥 질환(CAD), 2형 당뇨병, 신경변성 질환, 비알코올성 지방간염(NASH) 또는 염증성 장질환과 관련이 있을 수 있다.

[0552] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물은 NLPR3 인플라마솜의 과활성과 관련된 질환 또는 장애를 치료하기 위해 투여된다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물은 활성화된 단핵구, 대식세포 또는 수지상세포에 의한 IL-1β의 생산 증가와 관련된 질환 또는 장애를 치료하기 위해 투여된다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물은 활성화된 단핵구, 대식세포 또는 수지상세포에 의한 IL-18의 생산 증가와 관련된 질환 또는 장애를 치료하

기 위해 투여된다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물은 활성화된 단핵구, 대식세포 또는 수지상세포에 의한 카스파아제 1의 생산 증가와 관련된 질환 또는 장애를 치료하기 위해 투여된다.

[0553] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물은 활성화된 단핵구, 대식세포 또는 수지상세포에 의한 IL-1β의 생산을 감소시키기 위해 투여된다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물은 활성화된 단핵구, 대식세포 또는 수지상세포에 의한 IL-18의 생산을 감소시키기 위해 투여된다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물은 활성화된 단핵구, 대식세포 또는 수지상세포에 의한 성숙 카스파아제 1의 생산을 감소시키기 위해 투여된다.

[0554] 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물은 바이러스 감염에 대한 환자의 과활성 면역 반응을 감소시키기 위해 투여된다. 일부 실시형태에서, 바이러스는 SARS-coV-2이다. 일부 실시형태에서, 본원에 제공된 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물은 독성 쇼크, 사이토카인 폭풍, 치료용 항체, 인자 VIII 대체, 사이토카인 및 사이토카인 뮤테인과 같은 박테리아 감염에 대한 과활성 면역 반응을 감소시키기 위해 투여된다.

[0555] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 환자에서 자가면역 질환, 알레르기 질환 또는 염증성 질환을 치료하거나 저해하는 방법으로서, 자가면역 질환, 알레르기 질환 또는 염증성 질환을 앓고 있는 것으로 식별된 환자에게, 자가면역 질환, 알레르기 질환 또는 염증성 질환을 치료하거나 저해하기에 충분한 치료적 유효량의 본원에 제공된 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0556] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 조혈 줄기세포, 골수 세포 또는 고형 기관이 이식된 환자에서 이식 거부반응을 감소시키는 방법으로서, 이식된 조혈 줄기세포, 골수 세포 또는 고형 기관의 거부반응이 있는 것으로 식별된 환자에게, 이식 거부반응을 감소시키기에 충분한 치료적 유효량의 본원에 제공된 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0557] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 환자에서 이식편대숙주병(GvHD)을 치료하는 방법으로서, 이식편대숙주병(GvHD)을 앓고 있거나 이식편대숙주병(GvHD)을 앓게 될 위험이 있는 것으로 식별된 환자에게, GvHD를 억제하거나 예방하기에 충분한 치료적 유효량의 본원에 제공된 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포(자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 또는 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포), 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단, 또는 임의의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, GvHD는 급성 GvHD이다. 일부 실시형태에서, GvHD는 만성 GvHD이다.

[0558] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 환자에서 조직 또는 기관 손상을 치료하는(예를 들어, 상처 치유) 방법으로서, 조직 또는 기관 손상을 갖고 있거나 조직 또는 기관 손상을 갖게 될 위험이 있는 것으로 식별된 환자에게, 조직 또는 기관 손상의 복구를 유도하기에 충분한 치료적 유효량의 본원에 제공된 임의의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포, 본원에 제공된 임의의 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 집단 또는 본원에 제공된 임의의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를

포함하는 방법을 특징으로 한다.

[0559] **6.8. 폴리뉴클레오타이드와 벡터**

[0560] 본 개시내용은 또한, (a) 키메라 항원 수용체(CAR)(예를 들어, 본원에 제공된 임의의 CAR)를 인코딩하는 제1 폴리뉴클레오타이드 분절; (b) 인터류킨-10(IL-10)을 인코딩하는 제2 폴리뉴클레오타이드 분절; 및 (c) NGFR의 절단된 형태를 인코딩하는 제3 폴리뉴클레오타이드 분절을 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 작제물을 특징으로 한다. 일부 실시형태에서, 제1 폴리뉴클레오타이드 분절과 제2 및 제3 폴리뉴클레오타이드는 동일한 작제물 내에 있다. 일부 실시형태에서, 제1 폴리뉴클레오타이드는 제1 폴리뉴클레오타이드 작제물 내에 있고, 제2 폴리뉴클레오타이드 분절과 제3 폴리뉴클레오타이드 분절은 제2 폴리뉴클레오타이드 작제물 내에 있다. 일부 실시형태에서, 제3 폴리뉴클레오타이드 분절은 선택적이다.

[0561] 일부 실시형태에서, 제1 폴리뉴클레오타이드 분절은 CAR의 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 조절 요소(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 조절 요소(예를 들어, 임의의 프로모터))를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조절 요소는 CAR의 발현을 유도한다.

[0562] 일부 실시형태에서, 제2 폴리뉴클레오타이드 분절은 IL-10의 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 조절 요소(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 조절 요소(예를 들어, 임의의 프로모터))를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조절 요소는 IL-10의 구성적 발현을 유도한다.

[0563] 일부 실시형태에서, 제3 폴리뉴클레오타이드 분절은 선별 마커(예를 들어, ΔNGFR)의 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 조절 요소(예를 들어, 본원에 기재된 임의의 예시적인 조절 요소(예를 들어, 임의의 프로모터))를 포함한다. 일부 실시형태에서, 조절 요소는 ΔNGFR의 구성적 발현을 유도한다.

[0564] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 작제물은 제1 폴리뉴클레오타이드 분절과 제2 폴리뉴클레오타이드 분절 사이에 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 또는 자가 절단 펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 작제물은 제2 폴리뉴클레오타이드 분절과 제1 폴리뉴클레오타이드 분절 사이에 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 또는 자가 절단 펩타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 자가 절단 펩타이드는 F2A, P2A, T2A 및 E2A로 이루어지는 군에서 선택된다.

[0565] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 작제물은, 5'에서 3' 방향으로, 제1 폴리뉴클레오타이드 분절에 작동 가능하게 연결된 프로모터, 자가 절단 펩타이드 또는 IRES, 및 제2 폴리뉴클레오타이드 분절을 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 작제물은, 5'에서 3' 방향으로, 제1 폴리뉴클레오타이드 분절에 작동 가능하게 연결된 프로모터, 자가 절단 펩타이드 또는 IRES, 제2 폴리뉴클레오타이드 분절, 및 제3 폴리뉴클레오타이드 분절에 작동 가능하게 연결된 제2 프로모터를 포함한다.

[0566] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 작제물은, 5'에서 3' 방향으로, 제2 폴리뉴클레오타이드 분절에 작동 가능하게 연결된 프로모터, 자가 절단 펩타이드 또는 IRES, 및 제1 폴리뉴클레오타이드 분절을 포함한다.

[0567] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 작제물은 제1 폴리뉴클레오타이드 분절에 작동 가능하게 연결된 제1 프로모터와, 제2 폴리뉴클레오타이드 분절에 작동 가능하게 연결된 제2 프로모터를 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 작제물은 제1 폴리뉴클레오타이드 분절에 작동 가능하게 연결된 제1 프로모터, 제2 폴리뉴클레오타이드 분절에 작동 가능하게 연결된 제2 프로모터, 및 제3 폴리뉴클레오타이드 분절에 작동 가능하게 연결된 제3 프로모터를 포함한다.

[0568] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 작제물은 자가면역 질환, 염증성 장애 또는 암과 관련된 항원을 표적으로 하는 항원 결합 도메인을 인코딩한다. 일부 실시형태에서, 항원은 관련 MHC 분자의 맥락에서 CD19, CD20, CD22, CD27, BCMA, CD38, HLA*A2, HLA*A24 또는 시트룰린화된 펩타이드, 인슐린, MOG, GAD65, IA2, 글리아딘, 및 데스모글레인으로 이루어지는 군에서 선택된다.

[0569] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 작제물은 암 관련 항원을 표적으로 하는 항원 결합 도메인을 인코딩하는 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 암 관련 항원은 CD19, CD20, CD22, CD23, CD27, CD38, CEA, BCMA, Lym1, Lym2, CLEC5A, CDH179b, FLT3, GCC, Muc, CSF2RA, GFRα4, CD32, CD33, IL11Rα, IL13Rα, NYBR1, SLea, CD200R, TGFβR2, CEA, CD276, TROP2, LAMP1, PTK7, DLL3, CDH1, CDH6, CDH17, CDH19, TSHR, B7-H3 및 티로시나아제로 이루어지는 군에서 선택된다.

[0570] 일부 실시형태에서, 제1 폴리뉴클레오타이드 분절은 서열번호 10, 17, 23, 35 또는 55의 서열을 포함한다.

[0571] 일부 실시형태에서, 제2 폴리뉴클레오타이드 분절은 서열번호 2의 서열을 포함한다.

[0572] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 작제물은 하나 이상의 선별 마커(예를 들어, 본원에 제공된 임의의 선별 마커)를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 폴리뉴클레오타이드 분절, 제2 폴리뉴클레오타이드 분절, 또는 둘 모두는 선별 마커를 인코딩하는 서열을 추가로 포함한다.

[0573] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 작제물은 선별 마커로서 ΔNGFR을 포함한다.

[0574] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 작제물은 서열번호 4의 서열을 포함하는 ΔNGFR을 포함한다.

[0575] 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 작제물은 선별 마커로서 EGFR의 절단된 형태를 포함한다.

[0576] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 작제물은 하나 이상의 벡터이다. 일부 실시형태에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 바이러스 벡터의 비제한적인 예에는, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 감마레트로바이러스, 아데노연관바이러스, 아데노바이러스, 헬퍼 의존성 아데노바이러스, 센다이바이러스 또는 바큘로바이러스가 포함된다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 작제물은 렌티바이러스 벡터이다.

[0577] 일부 실시형태에서, 제1 폴리뉴클레오타이드는 제1 렌티바이러스 벡터 내에 있고, 제2 폴리뉴클레오타이드 분절은 제2 렌티바이러스 벡터 내에 있다.

[0578] 일부 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터는 T세포 핵 게놈에 삽입될 수 있다. 일부 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터는 T세포 핵 게놈에 삽입될 수 없다. 일부 실시형태에서, 삽입성 결핍 렌티바이러스 벡터가 사용된다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, Matrai 등의 문헌에 개시된 삽입성 결핍 렌티바이러스 벡터 또는 다른 렌티바이러스 벡터가 사용된다. 일부 실시형태에서, 인테그라아제 결함 렌티바이러스가 사용된다. 예를 들어, 문헌[Matrai *et al.*, *Hepatology* 53:1696-1707 (2011)](이는 본원에 참조로 인용됨)에 기재된 바와 같은, 인테그라아제에 불활성화 돌연변이(D64V)를 함유하는 인테그라아제 결함 렌티바이러스가 사용될 수 있다.

[0579] ## 6.9. 실시예

[0580] 하기 실시예는 제한이 아닌 예시를 위해 제공된다.

[0581] ### 6.9.1. 실험 관찰 요약

[0582] 전체적으로, 하기 기재되는 실험의 데이터는, 인간 $CD4^+$ T세포가 2개의 상이한 렌티바이러스 벡터로 형질도입될 수 있음을 입증하였다: 1) 인간 B세포 표면 항원 결합 도메인, CD8α 힌지, CD8α 막관통 도메인, CD28 공동자극 도메인 및 CD3제타 활성화 도메인을 포함하는 합성 CAR을 인코딩하는 LVV와, 2) 인간 IL-10 유전자와 NGFR 유전자의 절단된 형태를 인코딩하는 양방향성 벡터. 생성된 형질도입된 $CD4^+$ T세포는 CD19 CAR(CD19 발현으로 측정됨)과 IL-10/NGFR(NGFR 발현으로 측정됨)을 모두 발현하였다. 2개의 상이한 렌티바이러스 벡터로의 순차적 또는 동시 형질도입 후 이중 형질도입된 $CD4^+$ T세포(도 2a와 도 2b에 기재된 항-CD19 CAR을 발현할 때, 일반적으로 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 또는 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포로 지정됨)가 생성되었을 때, 형질도입 효율에는 차이가 없었다.

[0583] CD3과 CD28을 통한 활성화 후, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 $CD4^{IL-10}$ 세포 및 Tr1 세포에 대해 기재된 사이토카인 생산 프로파일과 유사한 사이토카인 생산 프로파일을 나타냈다. 예를 들어, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 IL-10을 높은 수준으로 생산하였으며, IL-4, IFN-γ 및 IL-5는 생산하지 않거나 낮은 수준으로 생산하였다. 주목할 점은, 이러한 사이토카인 생산 프로파일이 장기간 배양 후에도 안정하였다는 점이다.

[0584] 흥미롭게도, $CD19^+$ 표적세포와 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포를 공동 배양하면, $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포가 특이적으로 활성화되고 IL-10의 생산이 유도되었다.

[0585] $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포는, $CD4^{IL-10}$ 세포에서도 확인할 수 있었던 바와 같이, 시험관내에서 PBMC 증식, 동종이계 $CD4^+$ T세포 증식 및 동종이계 $CD8^+$ T세포 증식을 억제하였다.

[0586] $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포는 시험관내에서 $CD19^+$ 표적세포를 특이적으로 사멸시켰지만, $CD4^{IL-10}$ 세포와 마찬가지로, 골수계 표적세포를 사멸시키는 능력을 유지하였으며, 이러한 능력은 클래스 I MHC, CD13, CD54 및 CD112 중 하나 이상의 발현에 따라 달라졌다. 또한, $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ T세포는 생체내에서 $CD19^+$ 표적세포 성장을 강력하게 저해하

였다. 중요한 점은, 단일 공여자 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포와 다중 공여자 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포는, 단일 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포와 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포에 대해 기재된 바와 유사하게, xeno-GvHD를 유도하지 않았지만, PBMC는 중증 xeno-GvHD를 유도하였다. 마지막으로, $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포는 항종양 효과에서 PBMC와의 상조 작용을 나타냈는데, 이는 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포가 $CD4^{IL-10}$ 세포에 대해 기재된 바와 같이 보호성 GvL 반응을 방해하지 않음을 나타낸다(문헌[Locafaro et al. Mol Ther. 2017;25(10):2254-2269]). 또한, 단일 공여자 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포와 다중 공여자 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포는 동종이계 PBMC에 의해 유도된 GvHD의 인간화 마우스 모델에서 마우스를 xeno-GvHD로부터 보호하였다(**도 18a 내지 도 18c** 참조).

[0587] 이러한 데이터에 따르면, 표적세포에서 발현되는 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$과 CD19 사이의 특정 상호작용이 이러한 세포의 활성화를 유도하여 $CD19^{+}$ 표적세포를 특이적으로 사멸시키고 IL-10의 생산을 유도하는 것으로 나타났다.

[0588] 데이터를 종합하면, $CD4^{IL-10/CAR}$ T세포는 자가항체 생산 B세포를 제거할 뿐 아니라, IL-10의 생산을 통해 병원성 자가면역 $CD4^{+}$ T세포 반응과 $CD8^{+}$ T세포 반응을 동시에 억제할 수 있기 때문에, 모든 B세포 및 T세포 매개 자가면역 질환을 치료하는 데 고유한 임상적 유용성이 있는 것으로 보인다. 또한, 데이터에 따르면, $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포는 자체적으로 GvHD를 유도하지 않으며 PBMC의 보호성 항종양 효과(GvL 효과)를 방해하지 않기 때문에, 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포는, 특히 동종이계 HSCT를 겪은 환자에서 $CD19^{+}$ 종양세포를 치료/제거하거나 종양의 재발을 예방하는데 있어 고유한 임상적 유용성이 있는 것으로 나타났다.

[0589] 중요한 점은, 심지어 고농도에서도, $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포(자가유래 또는 동종이계)는 자체적으로 GvHD를 유도하지 않았다는 점이다. 이러한 결과는, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포가 i) 표적 항원을 발현하는 백혈병과 다른 악성종양, ii) HSCT의 GvL 또는 GvT 치료 효과는 유지하면서 GvHD를 감소시키기 위해 동종이계 HSCT 또는 BM 이식을 받는 환자의 백혈병과 다른 악성종양, iii) 자가면역 B세포의 제거, 및 병원성 T세포 반응과 NLPR3 인플라마솜의 하향조절을 통한 자가면역 질환, iv) 병원성 T세포 반응과 NLPR3 인플라마솜의 하향조절을 통한 염증성 질환, v) 세포 및 기관 이식 거부반응, vi) 비제한적으로 B7-H3을 포함하는, 종양 관련 항원을 발현하는 고형 종양, 및 vii) 조직 복구와 상처 치유를 통한 면역 매개 질환의 치료에 사용될 수 있음을 입증한다.

[0590] ### 6.9.2. 실시예 1: $CD4^{IL-10/항-CD19\ CAR}$ 세포의 생성

[0591] #### 6.9.2.1. IL-10/ΔNGFR 및 항-CD19 CAR을 위한 벡터 생산

[0592] $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포의 생산을 위해 2세대 CD19 CAR을 사용하였다. CD19 CAR은 완전 인간 항-CD19 단클론 항체(서열번호 12) 유래의 scFv, CD8α 힌지, CD8α 막관통 도메인, CD28 공동자극 도메인 및 CD3ζ(CD3제타) 활성화 도메인을 포함하고 있다(도 2a). 도 2a에 제시된 바와 같은 CD19 CAR을 렌티바이러스 벡터(LVV)에 삽입하였다(도 2b 참조). CD19, CD20, CD22, BCMA 또는 B7H3을 표적으로 하는 예시적인 CAR의 예시에 대해서는 도 1을 참조한다. 항-CD19 scFv(FMC63)의 코딩 서열을 인간 CD8α 힌지 영역, CD8α 막관통 영역, CD28 공동자극 도메인 및 CD3ζ 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 렌티바이러스 백본에 결찰시키는 방식으로 렌티바이러스 벡터를 생성하였다. 항-CD19 CAR 검출제(Miltenyi)를 이용하여 항-CD19 CAR의 표면 발현을 모니터링하였다.

[0593] $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포의 생산을 위해 IL-10을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 $CD4^{+}$ T세포에 도입하기 위해, 인간 IL-10(서열번호 2)과 NGFR(CD271로도 알려져 있음)의 절단된 형태(ΔNGFR)(서열번호 4) 둘 모두의 코딩 서열을 함유하는 렌티바이러스 벡터(LVV)(도 4)를 사용하였다. IL-10과 ΔNGFR의 코딩 서열을 함유하는 LVV는 국제공개 WO2016/146542호에 추가로 설명되어 있으며, 이는 그 전문이 참조로 인용된다.

[0594] pH15C(ATCC 68192)의 549 bp 단편으로부터의 인간 IL-10의 코딩 서열을 플라스미드 pLV-IL-10에 결찰시키는 방식으로 렌티바이러스 벡터를 생성하였다. 양방향성 프로모터(인간 PGK 프로모터와 반대 방향에 있는 CMV 프로모터의 최소 코어 요소)의 존재가 2개의 전이유전자의 공동 발현을 가능하게 하였다. 플라스미드는 항생제(예를 들어, 암피실린(ampicillin) 또는 카나마이신(kanamycin)) 내성 유전자의 코딩 서열을 추가로 함유하고 있었다. IL-10 작제물의 예시적인 예시에 대해서는 도 3a와 도 3b를 참조한다.

[0595] 293T세포로의 Ca_3PO_4 일시적 4-플라스미드 공동 트랜스펙션을 통해 렌티바이러스 벡터를 생산하고, 초원심분리로

농축시켰다: 벡터 수집을 위해 배양물에 1 μM 소듐 부티레이트를 첨가했다. 한계 희석법을 통해 293T세포에서 역가를 추정하고, HIV-1 Gag p24 항원 면역 포획(NEN Life Science Products; Waltham, MA)을 통해 벡터 입자를 측정하였다. 역가와 입자의 비로 벡터 감염성을 계산하였다. 농축된 벡터의 경우, 역가는 1 mL당 1 x 10^8개 내지 6 x 10^9개의 형질도입 단위(transducing unit)였고, 감염성은 1 ng당 5 x 10^4개 내지 5 x 10^5개의 형질도입 단위였다.

[0596] 6.9.2.2. $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포의 생산

[0597] 도 5a 내지 도 5c에 제시된 바와 같이, 세 가지 상이한 방법을 사용하여 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포를 생산하였다. 각각의 상이한 방법에서, 건강한 인간 공여자로부터 $CD4^+$ T세포를 정제하였다. 정제된 인간 $CD4^+$ T세포를 5% 인간 AB 혈청과 rhIL-2(50 U/mL)가 보충된 완전 배양 배지(X-vivo)에서 항-CD3/항-CD28 비드(Miltenyi)(세포:비드 비 3:1)를 이용하여 활성화시켰다.

[0598] 도 5a는, 활성화 48시간 후 활성화된 $CD4^+$ T세포에 항-CD19 CAR을 인코딩하는 렌티바이러스 벡터($LVV^{CD19-CAR}$)를 형질도입하고, 24시간 후(즉, 활성화 72시간 후)에 인간 IL-10과 인간 NGF 수용체의 절단된 형태를 인코딩하는 양방향성 렌티바이러스 벡터($LVV^{IL-10-NGFR}$)를 형질도입하는 방법을 보여준다. 두 가지 LVV 모두 감염 다중도(MOI) 20으로 사용하였다.

[0599] 도 5b는, 활성화 48시간 후 활성화된 $CD4^+$ T세포에 $LVV^{IL-10-NGFR}$을 형질도입하고, 24시간 후(즉, 활성화 72시간 후)에 $LVV^{CD19-CAR}$을 형질도입하는 방법을 보여준다.

[0600] 도 5c는, 활성화 48시간 후 활성화된 $CD4^+$ T세포에 $LVV^{IL-10-NGFR}$과 $LVV^{CD19-CAR}$을 동시에 형질도입하는 방법을 보여준다. 대조군 $CD4^{IL-10}$ 세포는 활성화 48시간 후 활성화된 $CD4^+$ T세포에 $LVV^{IL-10-NGFR}$만을 형질도입하는 방식으로 생성하였다. 도 5a 내지 도 5c 각각의 경우, 폴리브렌(8 μg/mL)의 존재 하에서 형질도입을 수행하였다. 또한, 도 5a 내지 도 5c 각각의 경우, 형질도입 10일 내지 28일 후, 형질도입된 세포(즉, ΔNGFR+ 세포)를 항-CD271 마이크로비드(Miltenyi)와 항-CD19 CAR 마이크로비드(Miltenyi)를 사용하여 정제하였다. 정제된 세포를 이전에 설명된 바와 같이(문헌[Andolfi et al. Mol. Ther. 20(9):1778-1790 (2012)] 및 문헌[Locafaro et al. Mol. Ther. 25(10): 2254-2269 (2017)]) 14일마다 재자극하였다. 2회차(TF2) 및 3회차(TF3) 재자극 후, 생성된 세포($CD4^{IL-10항CD19CAR}$)를 시험관내 및 생체내에서 특징분석하였다. 배양 배지를 전체 배양 기간 동안 필요한 경우 2일 내지 3일마다 새로운 배지로 교환하였다.

[0601] $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포를 TF3(즉, 3회차 재자극 후)에서 항-CD271 mAb(Biolegend)와 항-CD19 CAR 검출 시약(Miltenyi)으로 염색하여 분석하고, 유세포분석으로 분석하였다. $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포의 정체성과 순도가 세 가지 상이한 형질도입 방법에 대한 NGFR과 항-CD19 CAR의 공동 발현을 결정한다는 것을 나타내는 염색은, 각각, 88.6%(도 5a에 기재된 방법으로부터 도 6a), 64.1%(도 5b에 기재된 방법으로부터 도 6b) 및 52.6%(도 5c에 기재된 방법으로부터 도 6c)였다. 예상한 바와 같이, 도 5c에 기재된 방법을 사용하여 동일한 공여자(공여자 26.1과 26.2)로부터 각각 생성되고 대조군으로서 사용된 $CD4^{IL-10}$ 세포는 CD19 CAR을 발현하지 않았다(도 7).

[0602] 도 7에 제시된 바와 같이, $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포는 IL-10(NGFR의 발현으로 측정됨)과 항-CD19 CAR을 모두 발현하였다. 본 실험에서, 비드 활성화 48시간 후 2명의 상이한 공여자(26.1과 26.2) 유래의 $CD4^+$ T세포에 $LVV^{IL-10-NGFR}$과 $LVV^{항-CD19\ CAR}$을 동시에 형질도입하였다(방법 5C). $CD4^{IL-10}$ T세포(대조군)를 생성하기 위해, 비드 활성화 48시간 후 공여자 26.1과 26.2 유래의 $CD4^+$ T세포에 $LVV^{IL-10-NGFR}$을 단독으로 형질도입하였다. 이들의 분석을 위해, 2회차의 재자극(즉, TF2) 후 피더세포를 이용하여 $CD4^{IL-10}$ 세포(대조군)와 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포를 분석하였다. $CD4^{IL-10}$ 세포(대조군)와 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ T세포를 모두 항-CD271 mAb(Biolegends)와 CD19-CAR 검출 시약(Miltenyi)으로 염색하고, 유세포분석으로 분석하였다. 도 7에 제시된 바와 같이, $LVV^{IL-10-NGFR}$과 $LVV^{CD19-CAR}$로 형질도입된 세포의 대부분은 CD271과 CD19-CAR을 발현하였으며(도 7, 우측 패널), $LVV^{IL-10-NGFR}$로만 형질도입된 세포의 대부분은 CD271을

발현하였지만, CD19-CAR은 발현하지 못했다(도 7, 좌측 패널).

[0603] 이러한 결과는, 2개의 상이한 LVV를 이용하여 형질도입의 시기와 순서에 관계없이 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포를 성공적으로 생성할 수 있음을 나타낸다. 또한, 이는, IL-10과 CAR 둘 모두를 인코딩하는 단일 LVV를 사용하여 $CD4^{IL-10/CAR}$을 생성할 수 있음을 시사한다.

[0604] **6.9.2.3. $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포는 자연 유래 Tr1 세포와 $CD4^{IL-10}$ 세포에 필적한 사이토카인 생산 프로파일을 갖는다**

[0605] 도 5c에 기재된 방법에 따라, (i) 항-CD19-CAR을 함유하는 LVV와 (ii) IL-10과 ΔNGFR을 함유하는 LVV로의 동시 형질도입을 통해 3명의 상이한 건강한 공여자(26.1, 26.2 및 26.3) 유래의 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포를 생성하였다. 특히, $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포를 생성하기 위해, 비드 활성화 48시간 후 3명의 상이한 공여자(26.1, 26.2 및 26.3) 유래의 $CD4^+$ T세포에 $LVV^{IL-10-NGFR}$과 $LVV^{CD19-CAR}$을 동시에 형질도입하였다. $CD4^{IL-10}$ T세포(대조군)를 생성하기 위해, 비드 활성화 48시간 후 3명의 상이한 공여자(26.1, 26.2 및 26.3) 유래의 $CD4^+$ T세포에 $LVV^{IL-10-NGFR}$을 형질도입하였다.

[0606] 이들의 분석을 위해, $CD4^{IL-10}$ 세포(대조군)와 $CD4^{IL-10/CAR}$ T세포에 대해 각각 2 x 10^5개의 세포(200 μL 중)를 이전에 설명된 바와 같이(문헌[Andolfi et al. Mol. Ther. 20(9): 1778-1790 (2012)] 및 문헌[Locafaro et al. Mol. Ther. 25(10): 2254-2269 (2017)]) 재자극하였다. 2회차(TF2)의 재자극 후 14일차에, 세포를 고정된 항-CD3 mAb와 가용성 항-CD28 mAb로 48시간 동안 자극하였다. 배양 상청액을 수집하고, IL-10, IL-4, IL-5 및 IFN-γ의 수준을 ELISA로 측정하였다.

[0607] 도 8a 내지 도 8d에 제시된 바와 같이, 사이토카인 생산 수준에 있어 약간의 개별적인 차이가 관찰되었지만, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는, $CD4^{IL-10}$ 세포 및 Tr1 세포와 마찬가지로(제시되지 않음), IL-10을 높은 수준으로, IL-4를 낮은 수준으로, IFN-γ와 IL-5를 가변적인 수준으로 생산하였다.

[0608] TF3에서 수집된 공여자 24.2 유래의 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포에서도 유사한 결과가 관찰되었다(도 9). 본 실험을 위한 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포를 생성하기 위해, 비드 활성화 48시간 후 공여자 24.2 유래의 $CD4^+$ T세포에 $LVV^{IL-10-NGFR}$과 $LVV^{CD19-CAR}$을 동시에 형질도입하였다(도 5c 참조). $CD4^{IL-10}$ T세포(대조군)를 생성하기 위해, 비드 활성화 48시간 후 공여자 24.2 유래의 $CD4^+$ T세포에 $LVV^{IL-10-NGFR}$을 단독으로 형질도입하였다. 이들의 분석을 위해, $CD4^{IL-10}$ T세포(대조군)와 $CD4^{IL-10/CAR}$ T세포에 대해 각각 2 x 10^5개의 세포(200 μL 중)를 이전에 설명된 바와 같이(문헌[Andolfi et al. Mol. Ther. 20(9): 1778-1790 (2012)] 및 문헌[Locafaro et al. Mol. Ther. 25(10): 2254-2269 (2017)]) 재자극하였다. 간략하게, 3회차(TF3)의 재자극 후 14일차에, 세포를 고정된 항-CD3 mAb와 가용성 항-CD28 mAb로 48시간 동안 자극하였다. 배양 상청액을 수집하고, IL-10, IL-4, IL-5 및 IFN-γ의 수준을 ELISA로 측정하였다.

[0609] 도 9에 제시된 바와 같이, 장기간 배양 후에도 이러한 세포는 여전히 IL-10을 높은 수준으로, IL-4를 낮은 수준으로, IFN-γ와 IL-5를 가변적인 수준으로 생산하였다.

[0610] 도 8a 내지 도 8d 및 도 9의 데이터를 종합하면, 정제된 $CD4^{IL-10}$ 세포에 $LVV^{IL-10-NGFR}$과 $LVV^{CD19-CAR}$을 동시에 형질도입하는 것이 가능하며, 이에 따라 $CD4^{IL-10}$ T세포 및 Tr1 세포와 동일한 고유하고 특징적인 사이토카인 생산 프로파일을 갖는 $CD4^{IL-10-CAR}$ T세포가 생성되는 것으로 보인다. 또한, $CD4^{IL-10-CAR}$ T세포를 TF2 또는 TF3에서 채취했을 때 사이토카인 생산 프로파일에 있어 차이가 관찰되지 않았는데, 이는 이러한 사이토카인 생산 프로파일이 장기간에 걸쳐 안정함을 나타낸다.

[0611] **6.9.3. 실시예 2: $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포의 세포독성과 $CD19^+$ 표적세포와의 결합 후 활성화**

[0612] $CD4^{IL-10}$ 세포는 정의된 조건 하에서 ALL-CM과 같은 골수계 종양세포를 사멸시킬 수 있는 것으로 알려져 있었다(문헌[Andolfi et al. Mol Ther. 2012;20(9):1778-1790]). CD19를 발현하는 세포주(예를 들어, NALM6)와 공동

배양할 때 항-CD19 CAR의 공동 발현이 $CD19^+$ 세포를 사멸시킬 수 있는 세포($CD4^{IL-10항CD19CAR}$)를 생산하는지를 평가하기 위해 본 실험을 설계하였다.

[0613] 특히, 모두 공여자 24.2로부터 단리된 $CD4^+$ T세포로부터 생성된 $CD4^{IL-10}$ 세포(대조군)와 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포를 3회차 재자극(TF3) 후에 수집하고(도 5c 참조), K562 세포, NALM6($CD19^+$) 세포 또는 ALL-CM 표적세포(10^5개 세포/웰)와 1:1 비로 3일 동안 공동 배양하였다. 3일 동안의 공동 배양 후, 유세포분석을 사용하여 각 공동 배양물에서 잔류 표적세포의 존재를 결정하였다.

[0614] 데이터에 따르면, $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포가, CD19-CAR과 $CD19^+$ 표적세포의 결합을 통해, $CD19^+$ NALM6 세포를 사멸시키는 것으로 나타났다. 대조적으로, 대조군으로 사용된 $CD4^{IL-10}$ 세포는 효과가 없어, $CD19^+$ NALM6 세포를 사멸시키지 못했다(도 10). 나아가, $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포는, $CD4^{IL-10}$ 세포와 마찬가지로, 골수계 종양세포주 ALL CM을 사멸시켰다. $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포와 $CD4^{IL-10}$ 세포는 모두, 비특이적 세포독성과 NK세포에 의한 사멸에 고도로 민감한 K562 세포에 대해서는 세포독성 효과를 나타내지 않거나 매우 낮은 세포독성 효과를 나타냈다(도 10).

[0615] 이러한 결과는, $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포에서 발현되는 CD19-CAR과 NALM6 림프종 세포에서 발현되는 CD19의 결합이 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포의 세포독성 기구를 촉발시켜, $CD19^+$ 표적세포의 선택적이고 효율적인 사멸을 유도함을 나타낸다. 또한, $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포는, $CD4^{IL-10}$ 세포와 마찬가지로, 이전에 설명된 바와 같이(문헌[Andolfi et al. Mol Ther. 2012;20(9):1778-1790]) CD13, 클래스 I MHC 항원, CD54 및 CD112 중 하나 이상을 발현하는 골수계 표적세포를 사멸시키는 능력을 유지한다.

[0616] 선택적 세포독성 활성을 유도하는 것에 더하여, $CD4^{IL-10항CD19CAR}$과 $CD19^+$ NALM6 표적세포의 결합은 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포에 의한 선택적 활성화와 IL-10의 생산을 유도하였다.

[0617] 이러한 실험을 위해, 3명의 상이한 공여자(26.1, 26.2 및 26.3)로부터 단리된 $CD4^+$ T세포로부터 $CD4^{IL-10}$ 세포(대조군)와 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포를 생성하였다. IL-10의 생산을 평가하기 전, 3명의 상이한 공여자 각각으로부터 생성된 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포에 대해 $CD19^+$ 세포의 선택적 사멸을 확인하였다.

[0618] 특히, 3명의 상이한 공여자(26.1, 26.2 및 26.3)로부터 단리된 $CD4^+$ T세포로부터 생성된 $CD4^{IL-10}$ 세포(대조군)와 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포를 2회차 재자극(TF2) 후에 수집하고(도 5c 참조), K562 세포, NALM6($CD19^+$) 세포 또는 ALL-CM 표적세포(10^5개 세포/웰)와 1:1 비로 3일 동안 공동 배양하였다. 3일 동안의 공동 배양 후, 유세포분석을 사용하여 각 공동 배양물에서 잔류 백혈병 표적세포의 존재를 결정하였다. NK세포에 의한 비특이적 세포독성과 사멸에 고도로 민감한 K562 세포주를 대조군으로 사용하였다. 데이터는 도 11a에 제시되어 있다.

[0619] 도 11a에 제시된 바와 같이, 3명의 상이한 공여자(26.1, 26.2 및 26.3)로부터 생성된 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포는 $CD19^+$ NALM6 세포를 효율적으로 사멸시켰다. $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포는 골수계 종양 세포주 ALL-CM을 사멸시키는 능력을 유지하였으며, CD19를 발현하지는 않지만, NK세포에 의한 비특이적 세포독성과 사멸에 민감한 것으로 알려져 있는 K562 세포에 대해서는 세포독성을 나타내지 않거나 약하게만 나타냈다(도 11a). $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포는 또한 골수성 백혈병 세포주인 ALL-CM을 사멸시켰다. NALM6 세포와 단 3일 동안의 공동 배양 후 세포독성 검정의 상청액에서 상당량의 IL-10이 측정되었다(도 11b). 대조적으로, NALM6 세포와 동일한 공여자 유래의 $CD4^{IL-10}$ 세포를 공동 배양한 경우에는 IL-10(정량 한계: 31 pg/mL)을 검출할 수 없었다(도 11b).

[0620] 데이터를 종합하면, $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포는 관련 표적세포에서 발현되는 CD19와 CD19-CAR의 결합에 의해 선택적으로 활성화되는 것으로 보인다. 이러한 활성화는, (i) 세포의 세포독성/세포용해 활성으로 이어져 $CD19^+$ 표적세포의 사멸을 초래하고, (ii) $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포 면역 조절 및 억제 기능에 필요한 IL-10의 생산을 유도하였다. 나아가, $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포는 $CD4^{IL-10}$ 세포에서 이전에 관찰되었던 바와 동일한 골수계 종양 표적세포에 대한 세포독성 능력을 유지한다. 마지막으로, $CD4^{IL-10}$ 세포가 $CD19^+$ NALM6 세포를 사멸시키지 못하는 것(도 11b)은,

$CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포의 세포독성 활성이 항-CD19 CAR과 $CD19^{+}$ 표적세포의 결합에 기인한다는 것을 보여준다.

[0621] **6.9.4. 실시예 3: $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포는 동종이계 $CD4^{+}$ T세포와 $CD8^{+}$ T세포 둘 모두의 증식 반응을 억제한다**

[0622] 각각 TF2 또는 TF3에서 채취한 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포와 $CD4^{IL-10}$ 세포는 IL-10을 높은 수준으로 생산하기 때문에, 두 가지 세포를 모두 건강한 공여자에서 취한 동종이계 $CD4^{+}$ T세포와 $CD8^{+}$ T세포의 증식을 억제하는 능력에 대해 시험하였다.

[0623] 동종이계 $CD4^{+}$ T세포의 증식을 평가하기 위해, 동종이계 PBMC 세포를 eFluor® 670(웰당 1 x 10^{5}개의 세포)으로 표지하고, 2회차 재자극 후에 단리된(도 5c 참조) $CD4^{IL-10}$ 세포(대조군) 또는 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포(웰당 1 x 10^{5}개의 세포)의 존재 또는 부재 하에서 성숙 동종이계 수지상세포(DC)(웰당 5 x 10^{4}개의 세포)와 가용성 항-CD3 mAb를 이용하여 반응자:억제자 비 1:1로 자극하였다. 4일 동안의 배양 후, 유세포분석을 이용하여 eFluor® 670 희석에 따라 $CD4^{+}$ 증식 반응 T세포의 %를 결정하였다. 유세포분석을 위해, 세포를 $CD4^{+}\Delta NGFR^{-}$ T세포에 대해 게이팅하였다.

[0624] 동종이계 $CD8^{+}$ T세포의 증식을 평가하기 위해, 동종이계 PBMC 세포를 eFluor® 670(웰당 1 x 10^{5}개의 세포)으로 표지하고, 2회차 재자극 후에 단리된(도 5c 참조) $CD4^{IL-10}$ 세포(대조군) 또는 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포(웰당 1 x 10^{5}개의 세포)의 존재 또는 부재 하에서 성숙 동종이계 수지상세포(DC)(웰당 5 x 10^{4}개의 세포)와 가용성 항-CD3 mAb를 이용하여 반응자:억제자 비 1:1로 자극하였다. 4일 동안의 배양 후, 유세포분석을 이용하여 eFluor® 670 희석에 따라 $CD8^{+}$ 증식 반응 T세포의 %를 결정하였다. 유세포분석을 위해, 세포를 $CD8^{+}\Delta NGFR^{-}$ T세포에 대해 게이팅하였다.

[0625] 동종이계 PBMC의 증식을 평가하기 위해, 동종이계 PBMC 세포를 eFluor® 670(웰당 1 x 10^{5}개의 세포)으로 표지하고, 2회차 재자극 후에 단리된(도 5c 참조) $CD4^{IL-10}$ 세포(대조군) 또는 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포(웰당 1 x 10^{5}개의 세포)의 존재 또는 부재 하에서 성숙 동종이계 수지상세포(DC)(웰당 5 x 10^{4}개의 세포)와 가용성 항-CD3 mAb를 이용하여 반응자:억제자 비 1:1로 자극하였다. 4일 동안의 배양 후, 유세포분석을 이용하여 eFluor® 670 희석에 따라 $CD8^{+}$ 증식 반응 T세포의 %를 결정하였다. 유세포분석을 위해, 세포를 $CD3^{+}\Delta NGFR^{-}$ T세포에 대해 게이팅하였다.

[0626] 도 12에 제시된 바와 같이, TF2에서 채취한 3명의 상이한 건강한 공여자 26.1, 26.2 및 26.3 유래의 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포는 동종이계 $CD4^{+}$ T세포의 증식을, 각각, 78%, 48% 및 74% 억제하였다. 이들은 또한, 동종이계 $CD8^{+}$ T세포의 증식을, 각각, 77%, 41% 및 42% 억제하였다(도 13). 동일한 3명 공여자(즉, 26.1, 26.2 및 26.3)로부터 생성된 $CD4^{IL-10}$ 세포에서 비슷한 결과를 얻었으며, 이는 동종이계 $CD4^{+}$ T세포의 증식을, 각각, 83%, 81% 및 61%, 동종이계 $CD8^{+}$ T세포의 증식을, 각각, 77%, 41% 및 68% 저해하였다(도 12와 도 13). 마지막으로, $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포와 $CD4^{IL-10}$ 세포는 또한 TF3에서 채취되었을 때 동종이계 T세포의 증식을 억제하는 데 효과적이었다. 특히, $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포는, $CD4^{IL-10}$ 세포와 마찬가지로, PBMC의 증식을, 각각, 69% 및 60% 억제하였다(도 14).

[0627] 이러한 결과를 종합하면, $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포는 동종이계 $CD4^{+}$ T세포와 동종이계 $CD8^{+}$ T세포 둘 모두에 대해 면역억제 효과가 있고, 면역억제 효과는 $CD4^{IL-10}$ 세포에 필적하며; CAR의 공동 발현은 $CD4^{IL-10}$ 세포의 면역억제 효과를 없애거나 변경시키지 못하는 것으로 보인다. 또한, 결과에 따르면, 면역억제 기능은 장기간 배양 후에도(즉, TF3 후 단리된 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ T세포에서) 안정한 것으로 나타났다.

[0628] **6.9.5. 실시예 4: $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포를 사용한 GvHD와 암의 치료 또는 예방**

[0629] **생체내 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포의 효과**

[0630] 인간화 xeno-GvHD 질환과 종양 이식 NSG 마우스 모델에서 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포 집단이 $CD19^{+}$ 종양 성장, GvL 효과 및 GvHD의 유도에 미치는 영향에 대해 시험하였다.

[0631] 체중에 따라, NSG 마우스에 준치사량으로 방사선을 조사하였다(175 Gr 내지 200 Gr). 0일차에, NSG 마우스에 (i) NALM6-루시퍼라아제(마우스당 1 x 10^5개), (ii) NALM6-루시퍼라아제(마우스당 1 x 10^5개) + PBMC(마우스당 2.5 x 10^6개), (iii) NALM6-루시퍼라아제(마우스당 1 x 10^5개) + $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포(마우스당 2.5 x 10^6개), 또는 (iv) NALM6-루시퍼라아제(마우스당 1 x 10^5개) + PBMC(마우스당 2.5 x 10^6개) + $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포(마우스당 2.5 x 10^6개)를 주사하였다(도 15 참조).

[0632] 표준 생물발광 측정을 통해 백혈병 세포 성장에 미치는 영향을 결정하였다(도 16a와 도 16b). 또한, PBMC 및/또는 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포의 투여 후 0일차, 9일차, 12일차 및 15일차에 체중을 측정하여 마우스에서 GvHD의 발달을 모니터링하였다(도 17 참조).

[0633] 도 16a와 도 16b에 제시된 바와 같이, PBMC는 NALM6 세포의 성장을 저해하여(도 16a와 도 16b), 인간 환자에서 동종 HSCT의 이식편대백혈병 효과를 모델링하였지만, 이는 인간 동종 HSCT 요법에서 관찰되었던 GvHD와 유사하게 마우스에서 xeno-GvHD를 유도하였다(도 17). 대조적으로, $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포는 NALM6 세포의 성장을 저해하였고(도 16a와 도 16b), 체중 감소로 측정된 바와 같이 xeno-GvHD의 어떠한 징후도 유발하지 않았다(도 17). PBMC + $CD4^{IL-10/CAR}$ T세포를 이용한 치료는 가장 큰 항백혈병 효과(도 16a와 도 16b)와 가장 큰 항종양 효과(도 17)를 나타냈다.

[0634] 이러한 데이터는, $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ T세포가 강한 세포독성을 나타내며, 생체내에서 $CD19^{+}$ 표적세포를 선택적으로 사멸시킴을 나타낸다. 또한, 이는 PBMC의 보호성 GvL 효과를 방해하지 않으며, 실제로 상조적으로 작용한다. PBMC와 대조적으로, $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ T세포 단독 처리 또는 PBMC와의 조합 처리는, xeno-GvHD를 유도하지 않았다.

[0635] **6.9.6. 실시예 5: 생체내에서 억제 활성을 나타내며 중증 xeno-GvHD를 효과적으로 예방하는 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포**

[0636] 도 18a에 설명된 추가 연구를 사용하여 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포가 GvHD를 유도하는지와 이러한 세포가 PBMC에 의해 유도된 GvHD를 보호하는지를 평가하였다. 특히, 인간화 NSG 마우스에 준치사량으로 방사선을 조사하고, 동종이계 PBMC를 이용하여 GvHD를 유도하였다. 마우스를 도 18a에 따라 처리하였다. 3일차에, 마우스에 (i) PBMC(2.5E6개 세포/마우스), (ii) 단일 공여자(BC26.3) $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포(2.5E6개 세포/마우스), (iii) 다중 공여자(BC-26.1, BC26.2 및 BC26.3) $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포(2.5E6개 세포/마우스), (iv) PBMC(2.5E6개 세포/마우스)와 단일 공여자(BC26.3) $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포(2.5E6개 세포/마우스), 또는 (v) PBMC(2.5E6개 세포/마우스)와 다중 공여자(BC-26.1, BC26.2 및 BC26.3) $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포(2.5e6개 세포/마우스)를 정맥내 투여하였다(도 18a 참조). 체중 감소, 털 모양, 피부 외관, 구부린 자세(hunch) 및 활동성의 복합 점수를 사용하여 GvHD를 결정하였다(Bondanza 등의 문헌(2006)). 복합 점수가 ≥6이고/이거나 체중 감소가 ≥ 20%인 마우스를 인도적인 이유로 안락사시켰다. PBMC의 공여자는 단일 공여자 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포와 다중 공여자 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포를 생성하는 데 사용된 공여자와 관련이 없었다.

[0637] 도 18b와 도 18c에 제시된 바와 같이, 2.5E6개의 PBMC 세포 주사는 16일차까지 전격적이며 급속하게 치명적인 xeno-GvHD를 유도하였으며, 2.5E6개의 단일 공여자 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포(도 18b) 또는 2.5E6개의 다중 공여자 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포(도 18c)를 투여받은 마우스는 xeno-GvHD의 어떠한 징후도 나타내지 않았다. 나아가, 마우스가 2.5E6개의 PBMC와 2.5E6개의 단일 공여자 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포(도 18b), 또는 2.5E6개의 PBMC와 2.5E6개의 다중 공여자 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포(도 18c)를 투여받은 경우, PBMC와 단일 공여자 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$의 공동 투여는 마우스를 PBMC 유도 xeno-GvHD로부터 보호하였다.

[0638] 이러한 결과는, 단일 공여자 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포와 다중 공여자 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포가 생체내에서 xeno-GvHD를 유도하지 않음을 나타낸다. 또한, 단일 공여자 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포와 다중 공여자 $CD4^{IL-10항CD19CAR}$ 세포는 PBMC에 의해 유도된 중증 xeno-GvHD를 효과적으로 예방하는데, 이는 이러한 세포가 생체내에서 억제 활성을 나타냄을 입증한다.

[0639] **기타 실험**

[0640] $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포가 장기 생존에 미치는 영향을 결정하기 위해 치료군의 마우스를 추가 기간 동안 모니터링하였다.

[0641] 투여 후 말초혈액과 조직에서 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포의 양과 국소화도 모니터링하였다. 구체적으로, 말초혈액과, 염증 부위, 즉, 림프절, 비장, 소화관 및 골수에서 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포의 존재를 모니터링하였다. 장기 생존을 결정하기 위해 치료군(들)의 마우스를 추가 3주 동안 모니터링하였다.

[0642] 결과에 따르면, xeno-GvHD의 감소와 예방이 지속되는 것으로 나타났다.

[0643] **6.9.7. 실시예 6: $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포를 사용한 만성 염증성 질환과 자가면역 질환의 치료**

[0644] NLPR3 인플라마솜의 활성화는 다수의 만성 염증성 질환 및 자가면역 질환과 관련이 있다. NLPR3 인플라마솜은 단핵구/대식세포에 의한 전염증성 사이토카인 IL-1β와 IL-18의 카스파아제 1 매개 생산을 유도하는 "위험 신호"에 의해 활성화될 수 있다. 일련의 시험관내 실험을 수행하여 $CD4^{IL-10/항-CD19\ CAR}$ 세포가 NLPR3 인플라마솜과 인간 단핵구에 의한 IL-1β/IL-18의 생산에 미치는 영향을 조사하였다.

[0645] 먼저, Ficoll/Paque(Sigma-Aldrich)에서 표준 밀도 원심분리를 통해 말초혈액으로부터 인간 PBMC를 단리하였다. 단핵구 단리 키트 II(Miltenyi)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 음성 선별을 통해 인간 PBMC로부터 단핵구를 단리하였다. 양성 선별 또는 부착은 세포의 바람직하지 않은 활성화를 유도할 수 있기 때문에, 음성 선별이 바람직하다. 3% 무독소 인간 AB 혈청을 함유하는 배양 배지 중 96웰 마이크로티터 플레이트에, 웰당 200 μl의 상청액 중 $CD4^{IL-10/항-CD19\ CAR}$ 세포의 다양한 희석액 존재 하에서 단리된 단핵구를 5 x 10^4개의 세포/200 μl로 플레이팅하였다.

[0646] 표 1은, 상이한 단핵구 세트에 적용된 처리 조건을 요약한 것으로, 각각의 세트에는 6개의 세포 웰이 포함되어 있었다. NLPR3 인플라마솜 활성화제인 니게리신과 조합된 LPS를 이용하여 단핵구를 활성화시켰다. 카스파아제 1 저해제 Z-YVADfmk와 특정 NLPR3 저해제 MC950을 대조군으로서 표시된 바와 같이 첨가하였다.

[0647] [표 1]

표 1

군 #	단핵구	CD4 세포/상청액	YVADfmk*	LPS** + 니게리신	기타
배지 대조군 인큐베이션 시간: 1 시간; 이어서 4 시간 동안의 LPS 에 의한 활성화					
1	단핵구	없음	없음	없음	
2	단핵구	없음	없음	LPS + Nig	
3	단핵구	없음	Z-YVADfmk	LPS + Nig	
4	단핵구	없음	MCC950	LPS + Nig	
단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포 배양물 또는 $CD4^{GFP}$ 세포 배양물에서 얻은 상청액*** 존재 하에서의 단핵구의 배양					
5	단핵구	단일 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포의 50% 상청액	없음	LPS + Nig	
6	단핵구	단일 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포의 25% 상청액	없음	LPS + Nig	
7	단핵구	단일 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포의 12.5% 상청액	없음	LPS + Nig	
8	단핵구	단일 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포의 50% 상청액	없음	LPS + Nig	항-IL-10 수용체 항체
9	단핵구	다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포의 50% 상청액	없음	LPS + Nig	
10	단핵구	다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포의 25% 상청액	없음	LPS + Nig	
11	단핵구	다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포의 12.5% 상청액	없음	LPS + Nig	
12	단핵구	다중 공여자 $CD4^{IL-10/CAR}$ 세포의 50% 상청액	없음	LPS + Nig	항-IL-10 수용체 항체
13	단핵구	$CD4^{GFP}$ 세포의 50% 상청액	없음	LPS + Nig	

* Z-YVADfmk 는 카스파아제 1 에 특이적인 저해제임. DMSO 에 용해시킨 20 μM Z-YVADfmk(Biovision, Enzo Life Sciences 또는 Axxora Life Sciences)를 사용하였음.
** LPS(Sigma-Aldrich) 100 ng/mL + LPS 인큐베이션의 마지막 30 분 동안 니게리신(Nig, Invivogen) 10 μM 을 첨가하였음, MCC950(Invivogen) 10 μM.
*** $CD4^{IL-10}$ 세포 또는 $CD4^{GFP}$ 세포를 1 x 10^6/mL 로 3 일 동안 인큐베이션하고 상청액을 수집하는 방식으로 $CD4^{IL-10}$ 배양물과 CD4 GFP 또는 NGFR 배양물의 상청액을 얻었음. IL-10 의 생산 수준은 IL-10 특이적 ELISA 를 통해 측정하였음. 항-IL-10R 항체(Biolegend) 30 μg/mL.

[0648]

[0649] 표 1에 개략된 처리 후, 각 군에 대해 6개의 웰로부터 상청액을 수집하고, 성숙 IL-1β 또는 IL-18에 특이적인 ELISA(Biolegend)를 통해 IL-1β/IL-18의 생산을 측정하였다. 선택된 군에서 수집한 세포를 웨스턴 블롯으로 분석하여 활성화된 카스파아제 1의 수준을 결정하였다.

[0650] 실험 데이터에 따르면, 자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 및 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/항-CD19\ CAR}$ 세포가 활성화된 단핵구에 의한 IL-1β와 IL-18의 생산을 하향조절하는 것으로 나타났다. 나아가, 자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 및 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/항-CD19\ CAR}$ 세포는 활성화된 단핵구에서 성숙 카스파아제 1의 생산을 하향조절하는 것으로 나타났다. 또한, 자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 및 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/항-CD19\ CAR}$ 세포와, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포에 의해 생산된 IL-10은 인플라마솜을 하향조절하는 것으로 나타났다.

[0651] 단핵구 대신 인간 대식세포 또는 수지상세포를 이용하여 유사한 실험을 수행하였다. 실험 결과에 따르면, $CD4^{IL-10/항-CD19\ CAR}$ 세포가 활성화된 대식세포 및 수지상세포에 의한 IL-1β, IL-18 및 성숙 카스파아제 1의 생산을 하향조절하는 것으로 나타났다.

[0652] 이러한 데이터는, 자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 및 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/항-CD19\ CAR}$ 세포가 NLPR3 인플라마솜의 과활성화가 관여하는 질환 또는 장애의 치료에 사용될 수 있음을 나타낸다. 특히, 자가유래 단일 공여자, 동종이계 단일 공여자 및 동종이계 다중 공여자 $CD4^{IL-10/항-CD19\ CAR}$ 세포는 만성 염증성 질환과 자가면역 질환을 치료하는 데 사용될 수 있다. NLPR3 인플라마솜은 외인성 또는 내인성 "위험 신호", 예컨대 병원체 관련 분자 패턴(PAMP), 실리카, 석면, 및 손상된 미토콘드리아, 괴사 및 스트레스를 받은 세포로부터의 산물과 같은 위험 관련 분자 패턴(DAMP), 및 요도산 결정에 의해 활성화될 수 있다.

[0653] **6.9.8. 실시예 7: 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포의 생성**

[0654] **벡터 생산**

[0655] 국제공개 WO2016/146542호(이는 그 전문이 본원에 참조로 인용됨)에 기재된 바와 같이 인간 IL-10과 NGFR의 절단된 형태(ΔNGFR) 둘 모두의 코딩 서열을 함유하는 렌티바이러스 벡터(도 3a와 도 3b)를 이용한 형질도입을 통해 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포를 생산하였다. 벡터의 서열은 서열번호 5로 제공되어 있다. 간략하게, pH15C(ATCC 68192)의 549 bp 단편으로부터의 인간 IL-10의 코딩 서열을 플라스미드 #1074.1071.hPGK.GFP.WPRE.mhCMV.dNGFR.SV40PA에 결찰시키는 방식으로 렌티바이러스 벡터를 생성하였다. 양방향성 프로모터(인간 PGK 프로모터와 반대 방향에 있는 CMV 프로모터의 최소 코어 요소)의 존재가 2개의 전이유전자의 공동 발현을 가능하게 하였다. 플라스미드는 항생제(예를 들어, 암피실린 또는 카나마이신) 내성 유전자의 코딩 서열을 추가로 함유하고 있었다.

[0656] 293T세포로의 Ca_3PO_4 일시적 4-플라스미드 공동 트랜스펙션을 통해 렌티바이러스 벡터를 생산하고, 초원심분리로 농축시켰다: 벡터 수집을 위해 배양물에 1 μM 소듐 부티레이트를 첨가했다. 한계 희석법을 통해 293T세포에서 역가를 추정하고, HIV-1 Gag p24 항원 면역 포획(NEN Life Science Products; Waltham, MA)을 통해 벡터 입자를 측정하였다. 역가와 입자의 비로 벡터 감염성을 계산하였다. 농축된 벡터의 경우, 역가는 1 mL당 5 x 10^8개 내지 6 x 10^9개의 형질도입 단위였고, 감염성은 1 ng당 5 x 10^4개 내지 5 x 10^5개의 형질도입 단위였다.

[0657] **$CD4^{IL-10}$ 세포의 생산**

[0658] 도 19는 $CD4^{IL-10}$ 세포의 생산 공정에 대한 도식적 표현이다. 건강한 공여자 유래의 $CD4^+$ T세포를 정제하였다. 인간 $CD4^+$ T세포를 가용성 항-CD3 mAb, 가용성 항-CD28 mAb 및 rhIL-2(50 U/mL)를 이용하여 48시간 동안 활성화시킨 후, 인간 IL-10과 인간 NGF 수용체의 절단된 형태를 인코딩하는 양방향성 렌티바이러스 벡터(LV-IL-10/ΔNGFR)를 이용하여 감염 다중도(MOI) 20으로 형질도입하였다.

[0659] 11일 후, FACS를 이용하여 형질도입된 세포를 ΔNGFR의 발현에 대해 분석하고, 미세방울 디지털 PCR(ddPCR)로 벡터 카피 수(VCN)를 정량화하였다.

[0660] 10명 상이한 공여자 유래의 $CD4^+$ T세포에 대한 평균 형질도입 효율은 45 ± 17%였고, VCN은 2.7 ± 0.6%였다. 도 20a는, LV-IL-10/ΔNGFR(인간 IL-10과 인간 NGF 수용체의 절단된 형태를 인코딩하는 양방향성 렌티바이러스 벡터)로 형질도입된 인간 $CD4^+$ T세포에서 $CD4^+ΔNGFR^+$ 세포의 %(평균±SD, n=10, 좌측 막대)와 벡터 카피 수(VCN, 평균±SD, n=10, 우측 막대)를 보여준다. $CD4^{IL-10}$ 세포에서 미세방울 디지털 PCR(ddPCR)로 $CD4^+ΔNGFR^+$ 세포의 빈도와 벡터 카피 수를 정량화하였다.

[0661] 항-CD271 mAb 코팅된 마이크로비드를 사용하여 $ΔNGFR^+$ T세포를 정제한 결과, 순도 >95%의 $CD4^{IL-10}$ 세포 집단이 얻어졌다. 정제 후, 세포를 CD4와 ΔNGFR에 대한 마커로 염색하고, FACS로 분석하였다. 데이터에 따르면, 정제 단계를 거친 순도가 98%를 초과하는 것으로 나타났다. 도 20b는, 시험된 10명의 공여자 중 2명의 대표적인 공여자(공여자 B와 공여자 C)의 FACS 데이터를 보여준다. 정제된 $CD4^{IL-10}$ 세포를 14일 간격으로 3회 재자극하고, 2회차(TF2) 및/또는 3회차 재자극(TF3) 후 시험관내 및 생체내 기능을 시험하였다.

[0662] 휴지 상태의 $CD4^{IL-10}$ 세포는 IL-10을 구성적으로 생산하였다. 활성화 시, IL-10의 생산 수준이 크게 증강되었다.

[0663] **$CD4^{IL-10}$ 세포는 자연 유래 Tr1 세포에 필적한 사이토카인 생산 프로파일을 갖는다.**

[0664] 2회차(TF2) 및 3회차(TF3) 재자극 후 단일 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포의 사이토카인 생산 프로파일을 분석하고, 결과를 도 21에 제공하였다. 구체적으로, $CD4^{IL-10}$ 세포(200 μl 중 2 x 10^5개의 세포)를 이전에 설명된 바와 같이(문헌[Andolfi et al. Mol Ther. 2012;20(9):1778-1790] 및 문헌[Locafaro et al. Mol Ther. 2017;25(10):2254-2269]) 재자극하였다. 14일차에, 2회차(TF2) 및 3회차(TF3)의 재자극 후, $CD4^{IL-10}$ 세포를 자극하지 않은 상태로 남겨두거나(주황색 막대), 고정된 항-CD3 mAb와 가용성 항-CD28 mAb로 48시간 동안 자극하였다(회색 막대). 배양 상청액을 수집하고, IL-10, IL-4, IL-5, IFN-γ 및 IL-22의 수준을 ELISA로 측정하였다. 모든 샘플은 삼중으로 시험하였다. 평균±SD, 시험된 8명(n=8)의 공여자가 제시되어 있다. 도 21에 제시된 결과에 따르면, 고정

된 항-CD3 mAb와 가용성 항-CD28 mAb로 자극한 $CD4^{IL-10}$ 세포가 Tr1 세포 사이토카인 생산 프로파일을 나타내는 것으로 나타났다.

[0665] 상이한 공여자들 간에 상당한 차이가 관찰되었지만, 2회차(TF2) 또는 3회차(TF3) 재자극 후 전체적인 사이토카인 생산 프로파일은 비슷하였으며, Tr1 세포의 프로파일을 반영하였다(문헌[Roncarolo et al., Immunity, 2018]). Tr1 세포와 마찬가지로, $CD4^{IL-10}$ 세포는 IL-10, IL-5, IFN-γ 및 IL-22를 높은 수준으로 생산하였지만, IL-4는 낮은 수준으로, IL-2는 검출 가능하지 않은 수준으로 생산하였다.

[0666] **$CD4^{IL-10}$ 세포는 그랜자임 B를 높은 수준으로 발현하고 골수성 백혈병 세포를 선택적으로 사멸시킨다**

[0667] 2회차(TF2)의 재자극 후 $CD4^{IL-10}$ 세포를 그랜자임 B(GzB)의 발현에 대해 추가로 분석하였다. 도 22a의 데이터에 따르면, 대부분의 $CD4^{IL-10}$ 세포가 GzB를 발현하는 것으로 나타났다. 7명의 상이한 공여자에서 유도된 모든 $CD4^{IL-10}$ 세포의 95% 초과가 그랜자임 B를 높은 수준으로 발현하였다.

[0668] 2회차(TF2)의 재자극 후 얻은 $CD4^{IL-10}$ 세포를 골수성 백혈병 세포(ALL-CM)와 적혈구성 백혈병 세포주(K562)에 대한 세포독성 효과에 대해 추가로 분석하였다. $CD4^{IL-10}$ 세포(10^5개/웰)를 K562 세포 및 ALL-CM 세포(10^5개/웰)와 1:1 비로 3일 동안 공동 배양하였다. 잔류 백혈병 세포주($CD45^{low}CD33^+$)를 각각의 표적세포에 대해 FACS로 계수하였다.

[0669] $CD4^{IL-10}$ 세포는 도 22b에 제시된 바와 같이 골수성 백혈병 세포(ALL-CM)를 선택적으로 사멸시켰다. 사멸된 ALL-CM 세포의 %는 62% 내지 100%로 가변적이었으며, 적혈구성 백혈병 세포주 K562(비특이적 세포독성 활성에 대해 고도로 민감함)의 사멸%는 0% 내지 27%로 가변적이었다(4명의 상이한 공여자가 시험됨). 이러한 데이터를 종합하면, $CD4^{IL-10}$ 세포는 그랜자임 B를 발현하여 골수성 백혈병 세포를 효율적으로 사멸시키는 것으로 보인다. 예상한 바와 같이, 개별 공여자 유래 $CD4^{IL-10}$ 세포의 사멸 능력에 있어서 약간의 차이가 관찰되었다.

[0670] **$CD4^{IL-10}$ 세포는 동종이계 $CD4^+$ T세포와 $CD8^+$ T세포 둘 모두의 증식 반응을 억제한다**

[0671] $CD4^{IL-10}$ 세포가 또한 동종이계 $CD4^+$ T세포 또는 $CD8^+$ T세포에 미치는 영향에 대해 분석하였다. 구체적으로, 동종이계 PBMC 세포를 eFluor® 670(10^5개 세포/웰)으로 표지하고, $CD4^{IL-10}$ 세포(10^5개 세포/웰)의 부재 또는 존재하에서 동종이계 성숙 수지상세포(DC)(5 x 10^4개 세포/웰)와 가용성 항-CD3 mAb를 이용하여 반응자:억제자 비 1:1로 자극하였다. 4일 동안의 배양 후, $CD4^+\Delta NGFR^-$ T세포 또는 $CD8^+\Delta NGFR^-$ T세포에 대해 게이팅한 후에 유세포분석을 이용하여 eFluor® 670 희석에 따라 증식하는 반응 세포의 %를 결정하였다. 도 23a와 도 23b는, 6명의 상이한 풀링되지 않은 공여자(도 23a의 공여자-C, 공여자-E 및 공여자-F와, 도 23b의 공여자-H, 공여자-I 및 공여자-L) 유래의 $CD4^{IL-10}$ 세포가 $CD4^+$ T세포에 미치는 영향을, 증식률 및 억제율과 함께 보여준다. 도 24a와 도 24b는, 6명의 상이한 풀링되지 않은 공여자(도 24a의 공여자-C, 공여자-E 및 공여자-F와, 도 24b의 공여자-H, 공여자-I 및 공여자-L) 유래의 $CD4^{IL-10}$ 세포가 $CD8^+$ T세포에 미치는 영향을 보여준다.

[0672] 결과에 따르면, 풀링되지 않고 별도로 시험된 6명의 상이한 공여자 유래의 $CD4^{IL-10}$ 세포가 동종이계 $CD4^+$ T세포와 $CD8^+$ T세포 둘 모두의 증식 반응을 하향조절하는 것으로 나타났다. $CD4^+$ T세포에 대한 억제 효과는 51% 내지 96%로 가변적이었으며, $CD8^+$ T세포에 대한 억제 효과는 62% 내지 73%로 가변적이었다.

[0673] **다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포의 생산과 특징분석**

[0674] 다수의 공여자 유래의 $CD4^+$ 세포를 사용하여 상기 및 도 19에 기재된 바와 같이 $CD4^{IL-10}$ 세포를 생성하였다. 각 공여자 유래의 $CD4^{IL-10}$ 세포를 2회차(TF2) 및 3회차(TF3) 재자극으로 자극하였다. 3회차 자극 후, 3명의 공여자 유래의 $CD4^{IL-10}$ 세포를 1:1:1 비로 풀링하고, 고정된 항-CD3 mAb와 가용성 항-CD28 mAb로 48시간 동안 자극하였다.

[0675] **다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포는 개별 공여자의 $CD4^{IL-10}$ 세포와 Tr1 세포에 필적한 사이토카인 생산 프로파일을 갖는다.**

[0676] 배양 상청액을 수집하고, IL-10, IL-4, IL-5, IFN-γ 및 IL-22의 수준을 ELISA로 측정하였다. 도 25에 제시된 결과에 따르면, 3명의 상이한 동종이계 공여자로부터 풀링된(1:1:1로 풀링됨) 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포(적색 도트)의 사이토카인 생산이 개별 공여자(n=8)에서 유도된 $CD4^{IL-10}$ 세포 유래 $CD4^{IL-10}$ 세포(회색 막대)의 사이토카인 생산과 비슷한 것으로 나타났다. 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포는 IL-10, IL-5, IFN-γ 및 IL-22를 높은 수준으로 생산하였으며, IL-4는 낮은 수준으로, IL-2는 검출 가능하지 않은 수준으로 생산하였다(제시되지 않음). 이러한 데이터는, $CD4^{IL-10}$ 세포를 풀링하는 것이 가능하며, 이러한 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포가 단일 공여자 유래 $CD4^{IL-10}$ 세포와 Tr1 세포의 사이토카인 생산 특징을 유지함을 나타낸다. 중요한 점은, 풀링된 동종이계 세포 집단이 생존 가능한 세포를 >95% 함유하고 있으며, 이는 이러한 세포들이 서로를 사멸시키지 않음을 나타낸다는 점이다.

[0677] **다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포는 그랜자임 B를 높은 수준으로 발현하고 골수성 백혈병 세포주를 사멸시킨다.**

[0678] 3회차(TF3)의 재자극 후 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포를 그랜자임 B(GzB)의 발현에 대해 추가로 분석하였다. 도 26a의 데이터에 따르면, 대부분의 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포가 GzB를 발현하는 것으로 나타났다. 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포의 95% 초과가 그랜자임 B를 발현하였으며, 이는 단일 공여자 유래 $CD4^{IL-10}$ 세포의 GzB 발현에 필적하는 수준이었다.

[0679] 3회차(TF3)의 재자극 후 얻은 $CD4^{IL-10}$ 세포를 골수성 백혈병 세포(ALL-CM 세포주) 또는 K562 세포에 대한 세포독성 효과에 대해 추가로 분석하였다. 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포(10^5개/웰)를 K562 세포 및 ALL-CM 세포(10^5개/웰)와 1:1 비로 3일 동안 공동 배양하였다. 잔류 백혈병 세포주($CD45^{low}CD33^+$)를 각각의 표적세포에 대해 FACS로 계수하였다. 도 26b에 제시된 결과에 따르면, 비특이적 세포독성과 NK세포 세포독성에 대해 고도로 민감한 K562 세포에 대해 일정 수준의 세포독성이 나타나는 것으로 나타났다. 그럼에도 불구하고, 골수성 백혈병 세포(ALL-CM)에 대한 선택성 수준은 단일 공여자 유래 $CD4^{IL-10}$ 세포에 필적하는 수준으로 얻어졌다.

[0680] **다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포는 동종이계 $CD4^+$ T세포와 $CD8^+$ T세포 둘 모두의 증식 반응을 억제한다**

[0681] 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포가 동종이계 $CD4^+$ T세포 또는 $CD8^+$ T세포에 미치는 영향에 대해서도 분석하였다. 구체적으로, 동종이계 PBMC 세포를 eFluor® 670(10^5개 세포/웰)으로 표지하고, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포(10^5개 세포/웰)의 부재 또는 존재 하에서 동종이계 성숙 수지상세포(DC)(5 x 10^4개 세포/웰)와 가용성 항-CD3 mAb를 이용하여 반응자:억제자 비 1:1로 자극하였다. 4일 동안의 배양 후, $CD4^+\Delta NGFR^-$ T세포와 $CD8^+\Delta NGFR^-$ T세포에 대해 게이팅한 후에 유세포분석을 이용하여 eFluor® 670 희석에 따라 증식하는 반응 세포의 %를 결정하였다. 도 27a는, 공여자-C, 공여자-E 및 공여자-F 유래의 $CD4^{IL-10}$ 세포를 함유하는 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포의 결과를 보여준다. 도 27b는, 동결시키고, 보관하고, 시험 전에 해동한 공여자-H, 공여자-I 및 공여자-L 유래의 $CD4^{IL-10}$ 세포를 함유하는 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포의 결과를 보여준다.

[0682] 도 27a는, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포(3명의 상이한 공여자 유래)가 $CD4^+$ T세포 및 $CD8^+$ T세포 반응을, 각각, 96% 및 74% 억제함을 보여준다. 세포를 동결시키고, 보관하고, 시험 전에 해동한 후에 시험한 두 번째 상이한 배치의 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포로부터 비슷한 결과를 얻었다(도 27b). $CD4^+$ T세포 및 $CD8^+$ T세포 증식의 억제는 각각 68% 및 75%였다. 이러한 데이터는, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포가 기능 손실 없이 동결되고 보관될 수 있음을 나타낸다.

[0683] 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포로부터 얻은 데이터를 종합하면, 이러한 세포 제제는 어떠한 문제없이 풀링될 수 있는

것으로 보인다. 이는 생존 가능한 세포를 >95% 함유하고, 단일 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포의 모든 관련 기능(사이토카인 생산, 세포독성 능력, 및 동종이계 T세포 반응의 억제)을 유지한다. 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포의 더 큰 풀을 사용하면, 상이한 개별 공여자에서 유래한 $CD4^{IL-10}$ 세포 로트 사이에서 관찰되는 자연적인 차이를 감소시킬 수 있으며, 인간 요법을 위한 기성품 $CD4^{IL-10}$ 세포를 대량으로 제공할 수 있다.

[0684] 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포 제품은 잘 정의되고 로트간 변동이 적은 효능 및 출하 기준의 결정을 가능하게 하는 더 균질한 제품이라는 점에서 상당한 이점이 있다. 또한, 연속적인 대규모 세포 생산 공정의 개발을 가능하게 할 수 있다.

[0685] **다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포를 생산하는 다른 방법**

[0686] 렌티바이러스 형질도입 전, 최소 3명 내지 5명의 상이한 공여자 유래의 버피 코트를 풀링하였다. 항-CD4 항체를 사용하는 양성 선별을 통해 버피 코트로부터 $CD4^+$ 세포를 단리하였다. 풀링된 $CD4^+$ 세포의 순도는 FACS로 확인하였다. 대안적으로, 최소 3명 내지 5명의 정상적인 건강한 공여자로부터 동결된 인간 $CD4^+$ 세포를 얻었다. 동결된 인간 $CD4^+$ 세포는 사용 전에 해동시켰다. 버피 코트 또는 동결된 스톡 유래의 $CD4^+$ 세포를 IL-2의 존재 하에서 항-CD3 항체와 항-CD28 항체의 조합 또는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체가 코팅된 비드를 이용하여 24시간 내지 48시간 동안 활성화시켰다. 일부 경우에, 버피 코트 또는 동결된 스톡 유래의 $CD4^+$ 세포를 가용성 항-CD3 mAb, 가용성 항-CD28 mAb 및 rhIL-2(50 U/mL)를 이용하여 48시간 동안 활성화시키고, $CD4^{IL-10}$ 세포의 생산에 대해 상기 기재된 바와 같이 인간 IL-10을 인코딩하는 양방향성 렌티바이러스 벡터로 형질도입하였다.

[0687] 일부 경우에, T세포 공여자(또는 공여자로부터 단리된 $CD4^+$ 세포)의 HLA 일배체형을 먼저 결정하고, 목적하는 HLA 일배체형을 갖는 $CD4^+$ 세포를 선택적으로 풀링하여 사용하였다.

[0688] 상기 기재된 활성화된 $CD4^+$ 세포에 상기 기재된 인간 IL-10과 ΔNGFR의 코딩 서열을 함유하는 렌티바이러스 벡터를 형질도입하는 방식으로 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포를 생성하였다.

[0689] 7일차 내지 11일차, 즉, 형질도입 5일 내지 9일 후에, 세포를 채취하고, 성공적으로 형질도입된 T세포를 항-NGFR 항체를 이용하여 정제하였다. 이러한 공정은 일반적으로 순도 95%의 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포 집단을 생성한다.

[0690] 정제된 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포를 계수하고, 선택적으로 IL-2의 존재 하 추가 8일 내지 10일 동안 피더세포의 존재 하에서 항-CD3 항체와 항-CD28 항체, 또는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체가 코팅된 비드의 혼합물로 재자극하였다. 일부 경우에, 정제된 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포를 피더세포의 존재 하에서 재자극하였다.

[0691] 14일 내지 18일의 총 배양 기간 후, $CD4^{IL-10}$ 세포를 채취하고, 계수하고, 항-CD3 항체와 항-CD28 항체 또는 항-CD3 항체와 항-CD28 항체가 코팅된 비드를 이용한 활성화 후 또는 자발적으로 IL-10을 생산하는 능력에 대해 시험하였다. 또한, GrzB와 퍼포린의 수준을 측정하였다. 인간 T세포(PBMC)와, 정제된 $CD4^+$ T세포 및 $CD8^+$ T세포의 증식을 억제하는 능력을 또한 시험하였다.

[0692] 또한, IFN-γ, IL-10, IL-4 및 IL-5와 같은 다른 사이토카인의 생산에 대해 이전에 설명된 바와 같이 항-CD3 항체와 항-CD28 항체의 조합을 사용하여 200 μL 부피 중 200,000개 $CD4^{IL-10}$ 세포를 활성화시킨 후 구성적으로 IL-22의 생산을 측정하였다. 풀링된 $CD4^{IL-10}$ 세포를 동결시킨 후 보관하였다.

[0693] **6.9.9. 실시예 8: 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포를 사용한 GvHD의 치료 또는 예방**

[0694] **생체내 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포의 효과**

[0695] 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포 집단을 NSG 마우스 모델인 인간화 xeno-GvHD 질환 모델에서, 도 28에 예시된 바와 같이 인간 PBMC에 의해 유도된 xeno-GvHD에 미치는 영향에 대해 시험하였다. NSG 마우스에 준치사량으로 방사선을

조사하고, 인간 PBMC(5 x 10^6개 세포/마우스), 다중 공여자(3명의 공여자) $CD4^{IL-10}$ 세포(5 x 10^6개 세포/마우스), 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포(BC-C/BC-E/BC-F)(5 x 10^6개 세포/마우스)와 조합된 인간 PBMC(5 x 10^6개 세포/마우스)를 정맥내 주사하였다. 이전에 설명된 바와 같이(문헌[Bondanza et al. Blood, 2006]) 체중 감소(>20% 체중 감소), 피부 병변, 털 상태, 활동성 및 구부린 자세에 기반하여 xeno-GvHD를 평가하였다.

[0696] 도 29는, 주사 후 각 일차에서 xeno-GvHD를 나타내는 NSG 마우스의 %를 보여준다. 5 x 10^6개의 인간 PBMC를 방사선 조사된 NSG 마우스에 투여한 결과, 예상치 못하게 비정상적으로 전격성인 GvHD가 발생하였다. 10일차에 모든 마우스가 죽었으며, 이는 매우 치명적인 xeno-GvHD임을 반영한다. 5 x 10^6개의 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포를 공동 투여하면 이러한 전격성 GvHD가 지연되었지만, 희생에 대한 인도적으로 사전 지정된 기준인 20% 체중 감소에 도달했기 때문에 14일차에 마우스를 희생시켰다(도 29). 그럼에도 불구하고, 이러한 결과는, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포가 매우 중증인 xeno-GvHD를 지연시킬 수 있음을 나타낸다. 중요한 점은, PBMC(5 x 10^6개 세포)와 동일한 용량으로 단독으로 투여된 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포가 xeno-GvHD의 어떠한 징후도 유도하지 않았다는 점이다.

[0697] 인간 PBMC(5 x 10^6개 세포/마우스), 다중 공여자(3명의 공여자; BC-C/BC-E/BC-F) $CD4^{IL-10}$ 세포(5 x 10^6개 세포/마우스), 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포(3명의 공여자; BC-C/BC-E/BC-F)(5 x 10^6개 세포/마우스)와 조합된 인간 PBMC(5 x 10^6개 세포/마우스)가 주사된 NSG 마우스의 비장(도 30, 좌측 패널)과 골수(도 30, 우측 패널)에서 주사 후 14일차에, 인간 $CD4^{IL-10}$ 세포의 존재를 또한 시험하였다. 도 30에 제시된 결과에 따르면, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포가 비장과 골수로 이동하는 것으로 나타났다. 세포 주입 후 14일차에 이러한 세포가 낮은 비율로 존재하는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포가 인간 PBMC에 의해 유도된 전격성 xeno-GvHD를 지연시켰으며, 자체적으로 xeno-GvHD를 유발하지 않음을 나타낸다.

[0698] **다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포는 정제된 $CD4^+$ 세포에 의한 중증 xeno-GvHD를 저해함**

[0699] 도 31에 예시된 바와 같이 2.5 x 10^6개의 정제된 인간 $CD4^+$ T세포의 투여를 통해 GvHD 질환을 유도한 후 인간화 xeno-GvHD 모델에서 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포를 시험하였다. 0일차에 NSG 마우스에 준치사량으로 방사선을 조사하고, 3일차에 인간 $CD4^+$ T세포(2.5 x 10^6개 세포/마우스)를 단독으로, 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포(3명의 상이한 공여자; BC-H/BC-I/BC-L)(2.5 x 10^6개 세포/마우스) 또는 풀로부터의 단일 공여자(BC-H) 유래의 $CD4^{IL-10}$ 세포(2.5 x 10^6개 세포/마우스)와 조합으로 정맥내 주사하였다. 이전에 설명된 바와 같이(문헌[Bondanza et al. Blood, 2006]) 체중 감소(>20% 체중 감소), 피부 병변, 털 상태, 활동성 및 구부린 자세에 기반하여 xeno-GvHD를 평가하였다.

[0700] 도 32는, 주사 후 각 일차에서 GvHD를 나타내는 NSG 마우스의 %를 보여준다. 결과에 따르면, 다중 공여자(BC-H/BC-I/BC-L) $CD4^{IL-10}$ 세포가 인간 동종이계 $CD4^+$ T세포에 의해 매개되는 xeno-GvHD를 저해할 수 있는 것으로 나타났다. 본 실험에서, $CD4^+$ T세포를 투여받은 대조군의 모든 마우스가 20일차에 죽었기 때문에, xeno-GvHD는 매우 중증이었다. 대조적으로, 2.5 x 10^6개의 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포를 공동 투여한 경우에는 GvHD가 75% 저해되었다. 단일 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포도 보호 효과가 있었지만, 효과는 덜 강력하였다.

[0701] **기타 실험**

[0702] 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포의 치료 효과를 다음과 같은 4개의 상이한 마우스 군에서 시험하였다: (i) $CD4^{IL-10}$ 세포와 관련이 없는 공여자 유래의 인간 PBMC를 투여받은 마우스(xeno-GvHD 양성 대조군); (ii) 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포를 투여받은 마우스(음성 대조군); (iii) PBMC와 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포를 1:1 비로 투여받은 마우스; 및 (iv) PBMC와 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포를 2:1 비 또는 상이한 비로 투여받은 마우스. PBMC와 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포의 조합을 투여받은 동물 중에서, 일부 동물은 PBMC와 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포를 동시에 투여받았

고, 일부 동물은 PBMC를 투여받고 며칠(예를 들어, 5일) 후에 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포를 투여받았으며, 일부 동물은 PBMC를 투여받기 며칠(예를 들어, 5일) 전에 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포를 투여받았다.

[0703] PBMC 및/또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포의 투여 후 1주차, 2주차, 3주차, 4주차, 필요한 경우 5주차에 체중을 측정하여 마우스에서 GvHD의 발달을 모니터링하였다. 체중 감소에 더하여, 마우스를 피부 병변, 털 상태 및 활동성에 대해 검사하였다. 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포가 장기 생존에 미치는 영향을 결정하기 위해 치료군의 마우스를 추가 기간 동안 모니터링하였다.

[0704] 투여 후 말초혈액과 조직에서 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포의 양과 국소화도 모니터링하였다. 구체적으로, 말초혈액과, 염증 부위, 즉, 림프절, 비장, 소화관 및 골수에서 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포의 존재를 모니터링하였다. 장기 생존을 결정하기 위해 치료군(들)의 마우스를 추가 3주 동안 모니터링하였다.

[0705] 결과에 따르면, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포가 xeno-GvHD를 감소시키고 예방하는 데 효과적인 것으로 나타났다.

[0706] **6.9.10. 실시예 9: GvHD의 저해와 암의 치료**

[0707] 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포 집단을 인간 PBMC와 AML 종양세포가 이식된 NSG 마우스 모델에서 인간 PBMC에 의해 유도된 xeno-GvHD에 미치는 영향과 항종양 효과에 대해 시험하였다. AML 세포(ALL-CM)를 국제공개WO 2016/146542호에 이전에 설명된 바와 같이 i.v. 투여하였다. 3일 후에, PBMC 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포, 또는 이들의 조합을 투여하였다.

[0708] 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포는 실시예 1에 기재된 바와 같이 얻었다. 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포의 치료 효과를, 각각 0일차에 방사선 조사와 5 x 10^6개의ALL-CM 세포(AML 마우스)를 투여받은 다음과 같은 4개의 상이한 마우스 군에서 시험하였다: (i) 추가 치료를 받지 않은 AML 마우스; (ii) 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포와 관련이 없는 공여자로부터 얻은 5 x 10^6개의 인간 PBMC를 투여받은 AML 마우스(PBMC는 중증 xeno-GvHD를 유발함); (iii) 2.5 x 10^6개의 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포를 투여받은 AML 마우스; 및 (iv) PBMC와 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포의 조합을 1:1 또는 2:1 비, 또는 상이한 비로 투여받은 AML 마우스. 하나의 추가 군의 마우스는 ALL-CML 세포를 투여받지 않았지만, 방사선 조사 후 3일차에 5 x 10^6개의 인간 PBMC를 투여받았다.

[0709] 체중 감소, 피부 병변, 털 상태, 활동성, 사망률 및 장기 생존율에 기반하여 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포가 인간 PBMC에 의해 유도된 xeno-GvHD에 미치는 영향을 시험하였다. 순환 종양세포의 감소와 장기 무종양 생존율에 기반하여 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포의 항종양 또는 이식편대백혈병(GvL) 효과를 시험하였다.

[0710] 장기 생존율과 완전 종양 관해를 모니터링하기 위해 일부 마우스를 최대 7주 동안 모니터링하였다.

[0711] 결과에 따르면, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포가 xeno-GvHD의 저해와 암의 치료 둘 모두에 효과적인 것으로 나타났다.

[0712] **6.9.11. 실시예 10: 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포를 사용한 암의 치료**

[0713] 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포 집단을 NSG 마우스의 T세포 요법에 대한 ALL-CM 백혈병 모델에서 시험하였다.

[0714] 0일차에, NSG 마우스에 준치사량으로 방사선을 조사하고, 골수성 백혈병 세포(ALL-CM)(5 x 10^6개)를 정맥내 주사하였다(도 33a 참조). 첫 번째 동물 군에서는, 3일차에 PBMC(5 x 10^6개) 또는 단일 공여자(공여자 BC-I와 공여자 BC-H) $CD4^{IL-10}$ 세포(2.5 x 10^6개)를 주사하였다. 두 번째 동물 군에서는, 3일차에 PBMC(5 x 10^6개) 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포(2.5 x 10^6개)를 주사하였다. 순환하는 백혈병 세포의 감소와 장기 무백혈병 생존율에 기반하여 동물에서 이식편대백혈병(GvL) 효과를 시험하였다. 백혈병은 이전에 설명된 바와 같이(문헌[Locafaro G. et al Molecular Therapy 2017]) 측정하였다.

[0715] 도 33b와 도 33c에 제시된 바와 같이, ALL-CM 골수성 백혈병 세포가 주사된 마우스는 모두 17일차에 광범위한

백혈병 진행을 나타냈다. 5 x 10^6개의 PBMC를 투여하면, 백혈병 진행이 강력하게 저해되었다. 흥미롭게도, 적은 수(2.5 x 10^6개)의 단일 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포(도 33b) 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포(도 33c)를 이용한 경우 비슷한 수준의 백혈병 진행의 저해가 나타났다. 이러한 데이터는, 단일 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포와 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포가 강력하고 직접적인 항골수성 백혈병 효과가 있음을 나타낸다.

[0716] ALL-CM 골수성 백혈병 세포가 주사된 마우스에서 PBMC와 조합으로 단일 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포와 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포의 이식편대백혈병(GvL) 효과를 추가로 시험하였다(도 34a 참조). 5 x 10^6개의 PBMC를 투여한 경우 백혈병 진행이 강력하게 저해되었으며, 5 x 10^6개의PBMC를 단일 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포(2.5 x 10^6개)와 조합으로 투여한 경우에는 상조 작용 효과가 나타났다(도 34b). 흥미롭게도, 5 x 10^6개의PBMC를 2.5 x 10^6개의 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포와 조합으로 투여한 경우 비슷한 상조적 GvL 효과가 나타났다(도 34c). 이러한 데이터는, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포가 PBMC와 상조적으로 작용하여 강력한 GvL 효과를 매개함을 나타낸다.

[0717] **6.9.12. 실시예 11: 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포를 사용한 만성 염증성 질환과 자가면역 질환의 치료**

[0718] NLPR3 인플라마솜의 활성화는 다수의 만성 염증성 질환 및 자가면역 질환과 관련이 있다. NLPR3 인플라마솜은 단핵구/대식세포에 의한 전염증성 사이토카인 IL-1β와 IL-18의 카스파아제 1 매개 생산을 유도하는 "위험 신호"에 의해 활성화될 수 있다. 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포가 NLPR3 인플라마솜과 인간 단핵구에 의한 IL-1β/IL-18의 생산에 미치는 영향을 조사하기 위해 일련의 시험관내 실험을 수행하였다.

[0719] 먼저, Ficoll/Paque(Sigma-Aldrich)에서 표준 밀도 원심분리를 통해 말초혈액으로부터 인간 PBMC를 단리하였다. 단핵구 단리 키트 II(Miltenyi)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 음성 선별을 통해 인간 PBMC로부터 단핵구를 단리하였다. 양성 선별 또는 부착은 세포의 바람직하지 않은 활성화를 유도할 수 있기 때문에, 음성 선별이 바람직하다. 3% 무독소 인간 AB 혈청을 함유하는 배양 배지 중 96웰 마이크로티터 플레이트에, 웰당 2 x 10^5개 또는 1 x 10^5개의 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포/200 μl의 존재 하에서 단리된 단핵구를 5 x 10^4개 세포/200 μl로 플레이팅하였다.

[0720] 표 2는, 17개의 단핵구 세트에 적용된 처리 조건을 요약한 것으로, 각각의 세트에는 6개의 세포 웰이 포함되어 있었다. LPS는 단독으로 ATP에 의해 제공되는 2차 신호 없이 인간 단핵구를 활성화시킬 수 있는 것으로 알려져 있다.

[0721] [표 2]

표 2					
군 #	단핵구	CD4 세포/상청액	YVADfmk*	LPS**	기타
배지 대조군 인큐베이션 시간: 1.5 시간; 이어서 4 시간 동안의 LPS 에 의한 활성화					
1	단핵구	없음	없음	없음	
2	단핵구	없음	없음	LPS	
3	단핵구	없음	YVADfmk	LPS	
단핵구와 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포의 공동 배양					
4	단핵구	$CD4^{IL-10}$ 세포	없음	없음	
5	단핵구	$CD4^{IL-10}$ 세포	없음	LPS	
6	단핵구	$CD4^{IL-10}$ 세포	YVADfmk	LPS	
단핵구와 대조군 $CD4\ GFP^+$ 세포의 공동 배양					
7	단핵구	CD4 GFP 세포	없음	없음	
8	단핵구	CD4 GFP 세포	없음	LPS	
9	단핵구	CD4 GFP 세포	YVADfmk	LPS	
다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포 배양물 또는 $CD4\ GFP^+$ 세포 배양물에서 얻은 상청액*** 존재 하에서의 단핵구의 배양					
10	단핵구	$CD4^{IL-10}$ 세포의 50% 상청액	없음	LPS	
11	단핵구	$CD4^{IL-10}$ 세포의 25% 상청액	없음	LPS	
12	단핵구	$CD4^{IL-10}$ 세포의 12.5% 상청액	없음	LPS	
13	단핵구	$CD4^{IL-10}$ 세포의 50% 상청액	없음	LPS	항-IL-10 항체
14	단핵구	CD4 GFP 세포의 50% 상청액	없음	LPS	
15	단핵구	CD4 GFP 세포의 25% 상청액	없음	LPS	
16	단핵구	CD4 GFP 세포의 12.5% 상청액	없음	LPS	
17	단핵구	CD4 GFP 세포의 50% 상청액	없음	LPS	항-IL-10 항체

* YVADfmk 는 카스파아제 1 에 특이적인 저해제임. DMSO 에 용해시킨 20 mM Z-YVADfmk(Biovision, Enzo Life Sciences 또는 Axxora Life Sciences)를 사용하였음.
** LPS(Signa-Aldrich) 100 ng/mL
*** $CD4^{IL-10}$ 세포 또는 $CD4^{GFP}$ 세포를 1 x 10^6/mL 로 3 일 동안 인큐베이션하고 상청액을 수집하는 방식으로 $CD4^{IL-10}$ 배양물과 CD4 GFP 또는 NGFR 배양물의 상청액을 얻었음. IL-10 의 생산 수준은 IL-10 특이적 ELISA 를 통해 측정하였음.

[0722]

[0723] 표 2에 개략된 처리 후, 각 군에 대해 6개의 웰로부터 상청액을 수집하고, 성숙 IL-1β 또는 IL-18에 특이적인 ELISA(Biolegend)를 통해 IL-1β/IL-18의 생산을 측정하였다. 군 #3, 10, 13, 14 및 17의 6개의 웰에서 수집한 세포를 웨스턴 블롯으로 분석하여 활성화된 카스파아제 1의 수준을 결정하였다.

[0724] 실험 데이터에 따르면, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포가 활성화된 단핵구에 의한 IL-1β와 IL-18의 생산을 하향조절하는 것으로 나타났다. 나아가, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포는 활성화된 단핵구에서 성숙 카스파아제 1의 생산을 하향조절하는 것으로 나타났다. 또한, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포와 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포에 의해 생산된 IL-10은 인플라마솜을 하향조절하는 것으로 나타났다.

[0725] 단핵구 대신 인간 대식세포 또는 수지상세포를 이용하여 유사한 실험을 수행하였다. 실험 결과에 따르면, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포가 활성화된 대식세포 및 수지상세포에 의한 IL-1β, IL-18 및 성숙 카스파아제 1의 생산을 추가로 하향조절하는 것으로 나타났다.

[0726] 이는, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포가 NLPR3 인플라마솜의 과활성화가 관여하는 질환 또는 장애의 치료에 사용될 수 있음을 시사한다. 특히, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포는 만성 염증성 질환과 자가면역 질환을 치료하는 데 사용될 수 있다. NLPR3 인플라마솜은 외인성 또는 내인성 "위험 신호", 예컨대 병원체 관련 분자 패턴(PAMP), 실리카, 석면, 및 손상된 미토콘드리아, 괴사 및 스트레스를 받은 세포로부터의 산물과 같은 위험 관련 분자 패턴(DAMP), 및 요도산 결정에 의해 활성화될 수 있다.

[0727] **6.9.13. 실시예 12: NLPR3 인플라마솜의 활성화와 인간 단핵구에 의한 IL-1β 및 IL-18의 생산을 저해하는 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포 상청액**

[0728] 범용 단핵구 단리 키트(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)를 사용하여 PBMC로부터 $CD14^+$ 단핵구를 단리하고, 96 편평 마이크로티터 웰에 웰당 2 x 10^5개/200 μL로 플레이팅하고, LPS의 존재 하에서 배양하였다.

표 1에 요약된 바와 같이 Z-YVADfmk(20 μM), MMC950(10 μM), IL-10(10 ng/mL), 또는 다양한 농도의 단일 공여자 또는 풀링된 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포 상청액의 존재 하에서 세포를 추가로 배양하였다.

[0729] 이전에 설명된 바와 같이(문헌[Andolfi et al. 2012, Mol. Therapy Vol. 20, 1778-1790], 문헌[Locafaro et al. Mol Ther 2017, 25, 2254]), 항-CD3 항체와 항-CD28 항체의 조합을 이용하여 72시간 동안 활성화시킨 단일 공여자 또는 풀링된 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포에서 상청액을 얻었다. 일부 경우(도 35c와 도 35d)에, 단핵구를 LPS 활성화 마지막 30분 동안 첨가한 NLPR3 인플라마솜 활성화제 니게리신("NIG")과 조합된 LPS와 함께 인큐베이션하였다.

[0730] NLPR3 인플라마솜이 LPS에 의해 활성화되어, 성숙 카스파아제 1과, IL-1β와 IL-18의 생물학적 활성 형태가 생산되었다. LPS 활성화의 부재 하에서 플레이팅된 단핵구는 인큐베이션 기간 동안 IL-10을 검출 가능한 수준으로 생산하지 못했다(제시되지 않음).

[0731] 단일 공여자 유래 $CD4^{IL-10}$ 세포의 상청액(1 mL당 1769 pg의 IL-10 함유)을 첨가하면, 공여자 #1 및 #2 유래의 LPS 활성화된 단핵구에 의한 IL-1β의 생산이, 각각, 50%, 25% 및 12.5%의 농도에서 용량 의존적 방식으로 저해되었다(도 35a와 도 35b). GFP로 형질도입된 $CD4^{+}$ 세포의 상청액을 대조군으로 사용하였다. 50% 및 25%의 농도에서 IL-1β 생산의 완전한 저해가 관찰되었지만, GFP로 형질도입된 대조군 $CD4^{+}$ 세포의 상청액은 50% 농도에서 효과가 없었다.

[0732] 다양한 농도의 $CD4^{IL-10}$ T세포 상청액(50%, 25% 또는 12.5%), Z-YVADfmk 또는 MCC950을 LPS와 니게리신("NIG")으로 활성화된 단핵구에서 추가로 시험하였다. 단일 공여자(BC-E) $CD4^{IL-10}$ 세포 또는 풀링된 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포의 상청액은, 각각, 1 mL당 IL-10을 5295 pg 또는 3532 pg 함유하고 있었다. 단일 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포의 상청액은 또한 NLPR3 인플라마솜 활성화제 니게리신에 의해 증강된 LPS 유도 IL-1β 생산을 저해하는 데 매우 효과적이었다(도 35c와 도 35d).

[0733] 데이터에 따르면, 50% 농도의 $CD4^{IL-10}$ 세포 상청액이 비가역적 카스파아제 1 저해제 Z-YVADfmk(문헌[Guo et al. 2015, Nature Med 21, 677]), 선택적 NLPR3 인플라마솜 저해제 MCC950(문헌[Coll et al. 2019, Nature Chem. Biol 15,556]) 및 재조합 IL-10만큼 효과적인 것으로 나타났으며, 이는 IL-10 함유 상청액이 NLPR3 인플라마솜 활성화와 성숙 카스파아제 1의 생산을 저해하여 전염증성 사이토카인 IL-1β의 생산을 강력하게 저해했음을 나타낸다(도 35a 내지 도 35d).

[0734] 단일 공여자(BC-E) $CD4^{IL-10}$ 세포와 2명의 상이한 공여자(BC-C/BC-E)로부터 풀링된 $CD4^{IL-10}$ 세포의 상청액을 이용한 일련의 두 번째 실험에서 비슷한 결과를 얻었다. Andolfi 등의 문헌(2012)에 기재된 바와 같이 $CD4^{IL-10}$ 세포를 항-CD3 항체와 항-CD28 항체의 조합을 이용하여 활성화시켰다. 3일 후, $CD4^{IL-10}$ 세포의 상청액을 수집하였다. 이러한 상청액은, 각각, 1 mL당 IL-10을 5295 pg 또는 3532 pg 함유하고 있었으며, 공여자 #3의 단핵구에 의한 LPS 유도 IL-1β 생산을 용량 의존적 방식으로 저해하였다(도 35e). 50% 농도의 상청액은 Z-YVADfmk와 MCC950만큼 효과가 있었다. 풀링된 $CD4^{IL-10}$ 세포 상청액의 저해 효과는 항-IL-10 수용체 항체에 의해 완전히 중화되었다. 유사하게, 3명의 상이한 공여자로부터 풀링된 상청액(1 mL당 2589 pg의 IL-10 함유)은 공여자 #4의 단핵구에 의한 IL-1β의 생산을 용량 의존적으로 저해하였다(도 35f). 상청액의 저해 효과는 항-IL-10 수용체 항체에 의해 완전히 중화되었으며, 이는 NLPR3 활성화가 IL-10에 의해 매개됨을 나타낸다. 결과에 따르면, 전염증성 사이토카인 IL-1β의 생산이 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ T세포에 의해 생산된 IL-10에 의해 강력하게 저해되는 것으로 나타났다. 예상한 바와 같이, 항-IL-10 수용체 항체는 Z-VADfmk와 MCC950에 의해 매개되는 IL-1β 생산의 저해에는 효과가 없었다(도 35e).

[0735] LPS와 니게리신에 의해 활성화된 공여자 #4의 단핵구에서 $CD4^{IL-10}$ T세포를 추가로 시험하였다. 각각, 1 mL당 2583 pg 또는 2589 pg의 IL-10, ZYVADfmk 또는 MCC950을 함유하는 다양한 농도의 단일 공여자(BC-V) 또는 다중 공여자(3명의 공여자; BC-T/BC-U/BC-V) $CD4^{IL-10}$ 세포 상청액을 시험하였다. 도 35g에 제시된 데이터에 따르면, 3명의 상이한 공여자(BC T-U-V)의 풀링된 상청액이 니게리신과 조합된 LPS에 의해 유도된 IL-18의 생산을 하향 조절하는 것으로 나타났다.

[0736] 이러한 데이터를 종합하면, 단일 $CD4^{IL-10}$ 세포와 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포에 의해 생산된 IL-10이 NLPR3 인플라마솜을 강력하게 하향조절하여 전염증성 사이토카인 IL-1β와 IL-18을 강력하게 저해하는 것으로 보인다.

[0737] **6.9.14. 실시예 13: 생체내에서 xeno-GvHD와 골수계 종양 성장을 저해하는 단일 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포와 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포**

[0738] 단일 공여자(BC-T, BC-V 및 BC-E) $CD4^{IL-10}$ 세포 또는 다중 공여자(BC-V/BC-T/BC-E) $CD4^{IL-10}$ 세포의 기능적 특성과 품질을 문헌[Andolfi et al. Mol Ther 2012, 20, 177] 및 문헌[Locafaro et al. Mol Ther 2017, 25, 2254]에 기재된 바와 같이 시험하였다. 단일 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포와 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포는 모두 IL-10을 높은 수준으로, IFN-감마를 가변적인 수준으로, IL-4를 낮은 수준으로, IL-2를 검출 가능하지 않은 수준으로(제시되어 있지 않음) 생산하였으며, 이는 Tr1 세포의 특징적인 사이토카인 생산 프로파일을 반영한다(도 37).

[0739] 나아가, 시험관내 동종이계 PBMC에서 $CD4^+$ T세포 및 $CD8^+$ T세포 증식에 대한 단일 공여자(BC-T, BC-V 및 BC-E) $CD4^{IL-10}$ 세포 또는 다중 공여자(BC-V/BC-T/BC-E) $CD4^{IL-10}$ 세포의 억제 능력을 측정하였다. PBMC를 eFluor® 670(Invitrogen)로 표지하였다. 표지된 PBMC(1 x 10^5개)를 고정된 항-CD3 항체(10 mg/mL)와 가용성 항-CD28 항체(1 mg/mL)를 이용하여 활성화시켰다. 단일 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포와 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포를 96웰 둥근 바닥 플레이트에 최종 부피 0.2 mL로 1:1 비로 첨가하였다. 4일 동안의 공동 배양 후, eFluor® 670 표지된 반응 세포의 증식에 대한 억제 효과를 문헌[Locafaro et al. Mol Ther 2017, 25, 2254]에 기재된 바와 같이 유세포분석을 사용하여 eFluor® 670 희석에 따라 결정하였다. 도 38에는 유세포분석 결과가 제시되어 있다. 단일 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포와 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포는 동종이계 $CD4^+$ T세포 및 $CD8^+$ T세포 둘 모두의 시험관내 증식을 80%가 넘는 수준으로 강력하게 저해하였다(도 38).

[0740] $CD4^{IL-10}$ 세포를 골수성 백혈병 세포(ALL-CM)와 적혈구성 백혈병 세포주(K562)에 대한 세포독성 효과에 대해 추가로 분석하였다. 단일 공여자(BC-E 및 BC-V) $CD4^{IL-10}$ 세포 또는 다중 공여자(BC-V/BC-T/BC-E) $CD4^{IL-10}$ 세포를 ALL-CM 세포 또는 K562 세포와 1:1 비로 공동 배양하였다. 3일 후, 세포를 채취하고, 생존한 CD45low, $CD3^-$ 표적세포를 계수하고, 문헌[Locafaro et al. Mol Ther 2017, 25, 2254]에 기재된 바와 같이 FACS로 분석하였다. 단일 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포와 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포는 또한 ALL-CM 골수계 종양세포에서 강력하고 직접적인 세포독성 효과를 매개하였지만, 세포독성 활성에 필요한 클래스 I MHC 발현이 결여된 민감한 K562 세포를 사멸시키는 데에는 실패하였다(도 39). 단일 공여자(BC-E 및 BC-V) $CD4^{IL-10}$ 세포 또는 다중 공여자(BC-V/BC-T/BC-E) $CD4^{IL-10}$ 세포는 이러한 두 가지 표적 세포주(ALL-CM과 K562)에 대해 비슷한 세포독성 활성을 나타냈다.

[0741] ALL-CM 세포(2.5 x 10^6개)가 정맥내 주사된 NSG 마우스의 인간화 xeno-GvHD 질환 모델을 사용하여, 생체내에서 단일 공여자(BC-E) $CD4^{IL-10}$ 세포와 다중 공여자(BC-V/BC-T/BC-E) $CD4^{IL-10}$ 세포의 세포독성 효과를 또한 시험하였다. 동종이계 공여자의 인간 PBMC에 의해 유도된 GvHD에 대한 효과뿐 아니라, 치료 환경의 ALL CM 세포주에서 급성 골수성 백혈병의 성장에 대한 효과를 도 36에 예시된 바와 같이 시험하였다.

[0742] 8주령 내지 10주령의 암컷 NOD scid 감마(NSG) 마우스를 Charles-River Italia(Calco, Italy)로부터 입수하였다. 실험 프로토콜은 Ospedale San Raffaele의 동물 연구 내부 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC))에서 승인되었다. 0일차에, 마우스를 선형 가속기에서 전신 방사선 조사하였다. 0일차에, ALL-CM 세포(2.5 x 10^6개)를 주사하였다. 0일차에, 상이한 마우스 군에 세포를 주사하지 않거나, 동종이계 PBMC(2.5 x 10^6개), 동종이계 PBMC(2.5 x 10^6개)와 조합된 단일 공여자(BC-E, 2.5 x 10^6개) $CD4^{IL-10}$ 세포 또는 3명의 상이한 공여자(BC-V/BC-T/BC-E, 2.5 x 10^6개)로부터 1:1:1 비로 풀링된 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포를 주사하거나, 또는 3일차에 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포(2.5 x 10^6개)를 주사하였다. 모든 세포는 Iscove 변형 Dulbecco 배지 중 250 μL 부피로 i.v. 투여하였다. 마우스를 주 3회 내지 4회 모니터링하였다.

[0743] NSG 마우스를 5마리 마우스의 5개의 코호트로 나누고, 0일차에 각각의 군을 다음과 같이 처리하였다: (i) 대조군으로서 처리 없음; (ii) 동종이계 단핵 세포(PBMC); (iii) 동종이계 PBMC와 다중 공여자(BC-V/BC-T/BC-E)

$CD4^{IL-10}$ 세포; (iv) 동종이계 PBMC와 단일 공여자(BC-E) $CD4^{IL-10}$ 세포; 또는 (v) 3일차에 투여한 다중 공여자(BC-V/BC-T/BC-E) $CD4^{IL-10}$ 세포. 골수성 백혈병 진행을 이전에 설명된 바와 같이(문헌[Locafaro et al. Mol Ther 2017, 25, 2254]) 측정하였다.

[0744] NSG 마우스에 ALL-CM 세포를 투여하면 이러한 세포가 신속하게 확장되어, 20일차에 모든 마우스가 죽거나 희생되어야 했다. PBMC를 주사하면 예상한 바와 같이 백혈병 진행이 예방되었다. 동종이계 PBMC와 조합으로 제공된 단일 공여자 $CD4^{IL10}$ 세포와 다중 공여자 $CD4^{IL10}$ 세포는 모두 PBMC의 항골수성 백혈병 효과를 방해하지 않았다.

[0745] ALL-CM 세포의 투여 후 3일차(이미 이러한 세포의 거대한 확장이 진행 중일 때)에 다중 공여자(BC-V/BC-T/BC-E) $CD4^{IL-10}$ 세포를 주사한 경우 종양 성장이 저해되었다. 이러한 결과는, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포가 생체내에서 직접적인 치료적 항골수성 백혈병 효과가 있음을 나타낸다(도 40).

[0746] 하지만, 유익한 항골수성 백혈병 효과에도 불구하고, PBMC는 매우 중증 형태의 xeno-GvHD를 유도하여 24일차에 모든 마우스가 죽었다(도 41). 본 연구에서는, 단일 공여자(BC-E) $CD4^{IL-10}$ 세포와 다중 공여자(BC-V/BC-T/BC-E) $CD4^{IL-10}$ 세포를 NSG 마우스에 투여한 후 PBMC에 의해 유도된 xeno-GvHD를 저해하는 능력에 대해 시험하였다. 0일차에, NSG 마우스에 ALL-CM 세포(2.5×10^6개)를 주사하였다. 마우스를 5개의 군으로 나누고, 각각의 군을 다음과 같이 처리하였다: (i) 대조군으로서 처리 없음; (ii) 동종이계 단핵 세포(PBMC); (iii) 동종이계 PBMC와 다중 공여자(BC-V/BC-T/BC-E) $CD4^{IL-10}$ 세포(BC-E, BC-V, BC-T); (iv) 동종이계 PBMC와 단일 공여자(BC-E) $CD4^{IL-10}$ 세포, 또는 (v) 3일차에 주사한 다중 공여자(BC-V/BC-T/BC-E) $CD4^{IL-10}$ 세포. 동물에서, 생존과 체중 감소로 xeno-GvHD를 측정하였다. 또한, 문헌[Bondanza et al, Blood, 2006, 107, 1828]에 기재된 바와 같이 구부린 자세, 털 상태 및 피부 온전성을 모니터링하였다. 체중 감소가 20% 초과에 도달하면, 마우스를 인도적인 이유로 희생시켰다. 도 41은, 1일차에 ALL-CM 세포(2.5×10^6개)를 주사하고, 단일 공여자 또는 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포의 존재 유무 하에 PBMC로 후속 처리한 후 각 일차에 GvHD를 나타내지 않는 NSG 마우스의 %를 보여준다.

[0747] 결과에 따르면, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포는 xeno-GvHD를 유도하지 않고, 동종이계 PBMC에 의해 유도된 xeno-GvHD를 하향조절하는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 종합하면, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포는 중증 xeno-GvHD를 하향조절하고, 치료 환경에서 직접적인 항골수성 백혈병 효과를 나타내며, PBMC의 보호성 항골수성 백혈병 효과를 방해하지 않는 것으로 보인다.

[0748] **6.9.15. 실시예 14: 4명의 상이한 공여자에서 유도된 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포의 입양 전달**

[0749] 4명의 상이한 공여자에서 유도된 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포의 입양 전달을 PBMC 유도 xeno-GvHD를 저해하는 전달 능력에 대해 시험하였다.

[0750] 이러한 실험에서, 단일 공여자(공여자 C; 로트 C) $CD4^{IL-10}$ 세포와 4명의 상이한 공여자(공여자 C, E, F 및 H; 로트 CEFH)에서 유도된 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포를 동종이계 PBMC에 의해 유도된 GvHD의 인간화 마우스 모델에서 시험하였다. 이러한 모델에서, 0일차에 NSG 마우스에게 준치사량으로 방사선을 조사하고, 3일차에 (저속 볼루스 i.v.로) 다음을 주사하였다: (i) 2.5E+06개의 동종이계 PBMC, (ii) 2.5E+06개의 단일 공여자 CD^{4IL-10} 세포(로트 C)와 조합된 2.5E+06개의 동종이계 PBMC, (iii) 2.5E+06개의 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포(로트 CEFH)와 조합된 2.5E+06개의 동종이계 PBMC, 또는 (iv) 2.5E+06개의 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포(로트 CEFH) 단독. 체중 감소, 털 모양, 피부 외관, 구부린 자세 및 활동성의 복합 점수를 사용하여 GvHD를 결정하였다(문헌[Bondanza A, et al. *Blood* 2006;107:1828-36] 참조). 도 42에 제시된 바와 같이, 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포를 투여받은 마우스만 연구의 종결 시 GvHD가 100% 없었다.

[0751] 이러한 데이터를 요약하면, 4명의 상이한 공여자에서 유도된 다중 공여자 CD^{4IL-10} 세포의 입양 전달이 PBMC 유도 xeno-GvHD를 저해하여, xeno-GvHD를 유도하지 않은 것으로 보인다.

[0752] **6.9.16. 실시예 15: IL-10 변이체의 생성**

[0753] 다른 종의 IL-10 서열을 고려하여 아미노산 변형(들)(예를 들어, 치환, 삽입, 결실)을 도입하는 방식으로 인간 IL-10 변이체를 생성하였다. 변형 부위는 도 43a에 제시된 바와 같이 서열 정렬로 결정하였다. 정렬을 통해 종 간에 상이한 아미노산을 갖는 아미노산 위치를 식별하고, 아미노산의 치환, 삽입 또는 결실을 도입하는 방식으로 변형시켰다.

[0754] 인간 IL-10의 변이체의 두 가지 예가 도 43b에 제시되어 있다. 인간 IL-10의3개의 아미노산(D, I 및 A)을 상응하는 위치에 있는 바이러스 IL-10(EBVB9)의 3개의 상이한 아미노산(E, A 및 D)으로 치환하여 가능한 huIL-10 HYBRID #1(서열번호 21)을 생성하였다. 인간 IL-10의 하나의 아미노산(I105)을 상응하는 위치에 있는 바이러스 IL-10(EBVB9)의 또 다른 아미노산(A105)으로 치환하여 가능한 huIL-10 HYBRID #2(서열번호 22)를 생성하였다. 도 43c는, 인간 IL-10(서열번호 1)과 IL-10 EBVB9(서열번호 18)의 정렬을 보여주며, 여기서 "*"는 IL-10 HYBRID #1에서 치환된 하나 이상의 아미노산 위치를 나타내고, "#"는 IL-10 HYBRID #2에 바람직한 I105에서 A105로의 아미노산 치환을 나타낸다.

[0755] 인간 IL-10 변이체를 상기 섹션에 기재된 바와 같이 발현 벡터에 클로닝하고, 변이형 단백질의 발현과 기능에 대해 시험하였다. 선택된 인간 IL-10 변이체를 사용하여 $CD4^{IL-10}$ 세포를 생성하였다. $CD4^{IL-10}$ 세포의 효율을 본원에 제공된 바와 같이 시험하였다.

[0756] **6.9.17. 실시예 1 내지 11에 대한 추가 실험 방법 및 재료**

[0757] **세포 제제 및 세포주.** 말초혈액 단핵 세포(PBMC)는 Ficoll-Hypaque 구배에 따라 원심분리를 통해 준비하였다. $CD4^+$ T세포는 CD4 T세포 단리 키트(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)를 이용하여 순도 >95%로 정제하였다. 성숙 수지상세포(DC)는 $CD14^+$ 마이크로비드(Miltenyi Biotech, Germany)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 양성 선별된 말초혈액 $CD14^+$ 단핵구로부터 생성하고, 10% 소 태아 혈청(FBS; Lonza, Italy), 100 U/mL 페니실린/스트렙토마이신(Lonza, Italy), 2 mM L-글루타민(Lonza, Italy)이 보충된 RPMI 1640(Lonza, Italy) 중에서, 10 ng/mL 재조합 인간(rh) IL-4(R&D Systems, Minneapolis MN, USA)와 100 ng/mL rhGM-CSF(Genzyme, Seattle, WA, USA)의 존재 하에 37℃에서 5일 동안 배양하고, 1 mg/mL의 지질다당류(LPS, Sigma, CA, USA)를 이용하여 추가 2일 동안 성숙시켰다.

[0758] **플라스미드 작제.** pH15C(ATCC 번호 68192)에서 인간 IL-10의 코딩 서열을 절단하고, 549 bp 단편을 pBluKSM(Invitrogen)의 다중 클로닝 부위에 클로닝하여 pBluKSM-hIL-10을 얻었다. pBluKSM-hIL-10에서 hIL-10을 절제하고 1074.1071.hPGK.GFP.WPRE.mhCMV.dNGFR.SV40PA(본원에서 LV-ΔNGFR로 명명됨)에 결찰시켜 LV-IL-10/ΔNGFR를 얻는 방식으로 555 bp 단편을 얻었다. 양방향성 프로모터(인간 PGK 프로모터와 반대 방향에 있는 CMV 프로모터의 최소 코어 요소)의 존재가 2개의 전이유전자의 공동 발현을 가능하게 하였다(문헌[Locafaro et al. Mol Ther. 2017;25(10):2254-2269]). LV-IL-10/ΔNGFR의 서열을 파이로시퀀싱(Primm)으로 검증하였다.

[0759] **벡터 생산 및 적정.** 293T세포로의 Ca_3PO_4 일시적 4-플라스미드 공동 트랜스펙션을 통해 VSV-G 가성형 3세대 양방향성 렌티바이러스 벡터를 생산하고, 문헌[Locafaro et al. Mol Ther. 2017;25(10):2254-2269]에 기재된 바와 같이 초원심분리를 통해 농축시켰다. 한계 희석법을 통해 역가를 추정하고, HIV-1 Gag p24 항원 면역 포획(NEN Life Science Products; Waltham, MA)을 통해 벡터 입자를 측정하고, 역가와 입자 사이의 비로 벡터 감염성을 측정하였다. 역가는 1 mL당 5 x 10^8개 내지 6 x 10^9개의 형질도입 단위였고, 감염성은 p24 1 ng당 5 x 10^4개 내지 10^5개의 형질도입 단위였다.

[0760] **$CD4^{IL-10}$ 세포주의 생성.** 다클론성 CD4 형질도입된 세포는 이전에 설명된 바와 같이(문헌[Andolfi et al. Mol Ther. 2012;20(9):1778-1790]) 얻었다. 간략하게, CD4 정제된 T세포를 가용성 항-CD3 단클론 항체(mAb, 30 ng/mL, OKT3, Janssen-Cilag, Raritan, NJ, USA), 항-CD28 mAb(1 μg/mL, BD) 및 rhIL-2(50 U/mL, PROLEUKIN, Novartis, Italy)를 이용하여 48시간 동안 활성화시켰다. T세포에 LV-IL-10/ΔNGFR($CD4^{IL-10}$)을 감염 다중도(MOI) 20으로 형질도입하였다. 11일차에, $CD4^+$ΔNGFR$^+$ 세포를 $CD271^+$ 마이크로비드(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)를 사용하여 비드 분류하고, 5% 인간 혈청(BioWhittaker-Lonza, Washington), 100 U/mL 페니실린-스트렙토마이신(BioWhittaker) 및 50 U/mL rhIL-2(PROLEUKIN, Novartis, Italy)가 포함된 X-VIVO15 배지 중에서 확장시켰다. 7일차와 10일차에, 50 U/mL의 rhIL-2가 보충된 새로운 배지로 배지를 교환하였다. 14일차에, 세포를 수집하고, 세척하고, 이전에 설명된 바와 같이(문헌[Andolfi et al. Mol Ther. 2012;20(9):1778-

1790]) 동종이계 피더 혼합물로 재자극하였다. 14일 후 세포를 수집하고, 동결시켰다. 해동된 $CD4^{IL-10}$ 세포를 재자극하고, 2회차 및 3회차 재자극 및 확장 후, 시험관내에서 기능적으로 특징분석하고 생체내 실험에 사용하였다.

[0761] **벡터 카피 수 분석.** 삽입되지 않은 벡터 형태를 제거하기 위해 형질도입 후 11일 동안 세포를 배양하였다. QIAamp DNA 혈액 미니 키트(QIAGEN, 51106)를 이용하여 제조업체의 지침에 따라 게놈 DNA를 단리하였다. QX200 미세방울 디지털 PCR 시스템(Bio-Rad)을 이용하여 제조업체의 지침에 따라 벡터 삽입을 정량화하였다.

[0762] **사이토카인 결정.** 사이토카인 생산을 측정하기 위해, 2회차 및 3회차 재자극 후 단일 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포와 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포를 자극하지 않은 상태로 남겨두거나, 최종 부피 200 μL의 배지(96웰 둥근 바닥 플레이트, 2 x 10^5개/웰) 중에서 고정된 항-CD3 mAb(10 μg/mL)와 가용성 항-CD28 mAb(1 μg/mL)로 자극하였다. 48시간 동안의 배양 후에 상청액을 수집하고, IL-10, IL-4, IL-5, IFN-γ 및 IL-22의 수준을 ELISA(BD Biosciences)를 이용하여 제조업체의 지침에 따라 결정하였다.

[0763] **유세포 분석.** CD4로 표면을 염색한 후 그랜자임 B(클론 MHGB04, Invitrogen, USA)의 발현을 위해, $CD4^{IL-10}$ 세포를 고정시키고, 투과성으로 만들고, BD Cytofix/Cytoperm™ 키트(Cat. No. 554714, Biolegend, USA)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 염색하였다. 염색된 세포를 1% FBS가 보충된 PBS로 2회 세척하고, FlowJo 10 소프트웨어를 이용하여 분석한 BD LSRFortessa로 분석하였다.

[0764] **사멸 검정.** 2회차 및 3회차 재자극 후, 단일 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포와 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포의 세포독성을 공동배양 실험으로 분석하였다. 간략하게, 비골수성 백혈병 세포주와 골수성 백혈병 세포주, 각각, K562와 ALL-CM를 표적세포로 사용하고, $CD4^{IL-10}$ 세포와 1:1 비(10^5개의 표적세포와 10^5개의 $CD4^{IL-10}$ 세포)로 3일 동안 플레이팅하였다. 공동 배양 종결 시, 세포를 채취하고, K562 세포와 ALL-CM 세포를 FACS로 분석하고 계수하였다.

[0765] **억제 검정.** 단일 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포와 다중 공여자 $CD4^{IL-10}$ 세포의 억제 능력을 측정하기 위해, 동종이계 PBMC를 Cell Proliferation Dye eFluor® 670(Invitrogen, CA, USA)으로 제조업체의 지침에 따라 표지한 후, 동종이계 성숙 DC(5 x 10^4개의 세포/웰)와 가용성 항-CD3 mAb(50 ng/mL)로 자극하였다. PBMC와 억제 세포를 1:1 비(10^5개의 PBMC와 10^5개의 $CD4^{IL-10}$ 세포)로 첨가하였다. 3일 동안의 배양 후, $CD4^+$ΔNGFR$^-$ T세포 또는 $CD8^+$ΔNGFR$^-$ T세포의 eFluor® 670 희석을 FACS로 분석하여 반응 세포의 증식을 확인하였다.

[0766] **이식편대숙주병 모델:** 모든 실험에서 6/8주령 암컷 NSG 마우스를 사용하였다. 0일차에, 마우스를 선형 가속기에서 마우스의 체중에 따라 175 cGy 내지 200 cGy의 1회 선량으로 전신 방사선 조사하고, PBMC 세포(5 x 10^6개), $CD4^{IL-10}$ 세포(단일 공여자 또는 다중 공여자(3명의 공여자 풀))(5 x 10^6개 또는 2.5 x 10^6개), 또는 $CD4^{IL-10}$ 세포(5 x 10^6개 또는 2.5 x 10^6개)와 조합된 PBMC(5 x 10^6개)를 정맥내 주사하였다. 생존, 체중 감소, 활동성, 털, 피부 및 구부린 자세를 이전에 설명된 바와 같이(문헌[Bondanza et al. Blood. 2006;107(5):1828-1836]) 적어도 주 3회 모니터링하였다. 체중 감소가 20%인 경우 인도적인 이유로 마우스를 안락사시켰다.

[0767] 대안적으로, 0일차에 상기와 같이 마우스에 전신 방사선 조사하였다. 3일차에, 마우스에 $CD4^+$ T세포(5 x 10^6개 또는 2.5 x 10^6개), 단일 공여자 및 다중 공여자(3명의 공여자 풀) $CD4^{IL-10}$ 세포(5 x 10^6개 또는 2.5 x 10^6개), 또는 단일 공여자 및 다중 공여자(3명의 공여자 풀) $CD4^{IL-10}$ 세포(5 x 10^6개 또는 2.5 x 10^6개)와 조합된 $CD4^+$ T세포(5 x 10^6개 또는 2.5 x 10^6개)를 주사하였다. GvHD 유도를 상기와 같이 모니터링하였다.

[0768] **7. 참조로서의 인용**

[0769] 본 출원에 인용된 모든 간행물, 특허, 특허출원 및 다른 문서는, 각각의 개별 간행물, 특허, 특허출원 또는 다른 문서가 모든 목적을 위해 개별적으로 본원에 참조로 인용되는 것으로 나타난 바와 같은 동일한 정도로 모든 목적을 위해 그 전문이 참조로 인용된다.

[0770] **8. 등가물**

[0771] 다양한 특정 실시형태가 예시되고 기재되었지만, 상기 명세서는 제한적인 것이 아니다. 본 발명(들)의 사상 및

범위에서 벗어나지 않는 한, 다양한 변경이 이루어질 수 있다는 것을 이해할 것이다. 본 명세서를 검토하면 당업자에게 다수의 변형이 명확해질 것이다.

[0772] 9. 서열

[0773] 서열번호 1 (인간 IL-10 아미노산 서열 - 단백질 서열: Ref P22301)

[0774] MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQD
PDIKAHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN

[0775] 서열번호 2 (예시적인 인간 IL-10 폴리뉴클레오타이드 서열)

[0776] atgcacagctcagcactgctctgttgcctggtcctcctgactggggtgagggccagcccaggccagggcacccagtctgagaacagctgcacccacttccca
ggcaacctgcctaacatgcttcgagatctccgagatgccttcagcagagtgaagacttttctttcaaatgaaggatcagctggacaacttgttgttaaaggag
tccttgctggaggactttaagggttacctgggttgccaagccttgtctgagatgatccagttttacctggaggaggtgatgccccaagctgagaaccaagac
ccagacatcaaggcgcatgtgaactccctgggggagaacctgaagaccctcaggctgaggctacggcgctgtcatcgatttcttccctgtgaaaacaagagc
aaggccgtggagcaggtgaagaatgcctttaataagctccaagagaaaggcatctacaaagccatgagtgagtttgacatcttcatcaactacatagaagcc
tacatgacaatgaagatacgaaactga

[0777] 서열번호 3 (ΔNGFR 아미노산 서열)

[0778] MGAGATGRAMDGPRLLLLLLLGVSLGGAKEACPTGLYTHSGECCKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTECVGLQSMSAPCVEA
DDAVCRCAYGYYQDETTGRCEACRVCEAGSGLVFSCQDKQNTVCEECPDGTYSDEANHVDPCLPCTVCEDTERQLRECTRWADAECEEIPGRWITRSTPPEG
SDSTAPSTQEPEAPPEQDLIASTVAGVVTTVMGSSQPVVTRGTTDNLIPVYCSILAAVVVGLVAYIAFKRWNRGIL

[0779] 서열번호 4 (예시적인 ΔNGFR 폴리뉴클레오타이드 서열)

[0780] atgggggcaggtgccaccggccgcgccatggacgggccgcgcctgctgctgttgctgcttctgggggtgtcccttggaggtgccaaggaggcatgccccaca
ggcctgtacacacacagcggtgagtgctgcaaagcctgcaacctgggcgagggtgtggcccagccttgtggagccaaccagaccgtgtgtgagccctgcctg
gacagcgtgacgttctccgacgtggtgagcgcgaccgagccgtgcaagccgtgcaccgagtgcgtggggctccagagcatgtcggcgccgtgcgtggaggcc
gacgacgccgtgtgccgctgcgcctacggctactaccaggatgagacgactgggcgctgcgaggcgtgccgcgtgtgcgaggcgggctcgggcctcgtgttc
tcctgccaggacaagcagaacaccgtgtgcgaggagtgccccgacggcacgtattccgacgaggccaaccacgtggacccgtgcctgccctgcaccgtgtgc
gaggacaccgagcgccagctccgcgagtgcacacgctgggccgacgccgagtgcgaggagatccctggccgttggattacacggtccacacccccagagggc
tcggacagcacagccccagcacccaggagcctgaggcacctccagaacaagacctcatagccagcacggtggcaggtgtggtgaccacagtgatgggcagc
tcccagcccgtggtgacccgaggcaccaccgacaacctcatccctgtctattgctccatcctggctgctgtggttgtgggccttgtggcctacatagccttc
aagaggtggaacaggggatcctctag

[0781] 서열번호 5 (pLV-IL10의 뉴클레오타이드 서열):

[0782] tggccattgcatacgttgtatccatatcataatatgtacatttatattggctcatgtccaacattaccgccatgttgacattgattattgactagttattaa
tagtaatcaattacggggtcattagttcatagcccatatatggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccc
cgcccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttg
gcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgaccttatgggac
tttcctacttggcagtacatctacgtattagtcatcgctattaccatggtgatgcggttttggcagtacatcaatgggcgtggatagcggtttgactcacgg
ggatttccaagtctccaccccattgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaacaactccgccccattgacg
caaatgggcggtaggcgtgtacggtgggaggtctatataagcagagctcgtttagtgaaccggggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctct
ctggctaactagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgcttcaagtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagat
ccctcagacccttttagtcagtgtggaaaatctctagcagtggcgcccgaacagggacttgaaagcgaaagggaaaccagaggagctctctcgacgcaggac
tcggcttgctgaagcgcgcacggcaagaggcgaggggcggcgactggtgagtacgccaaaaattttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgcga
gagcgtcagtattaagcgggggagaattagatcgcgatgggaaaaaattcggttaaggccaggggaaagaaaaaatataaattaaaacatatagtatgggc
aagcagggagctagaacgattcgcagttaatcctggcctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaatactgggacagctacaaccatcccttcagacagg
atcagaagaacttagatcattatataatacagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaaggatagagataaaagacaccaaggaagctttagacaagatagag
gaagagcaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggccgctgatcttcagacctggaggaggagatatgagggacaattggagaagtgaattatata
aatataaagtagtaaaaattgaaccattaggagtagcacccaccaaggcaaagagaagagtggtgcagagagaaaaaagagcagtgggaataggagctttgt
tccttgggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgcagcgtcaatgacgctgacggtacaggccagacaattattgtctggtatagtgcagcagcaga
acaatttgctgagggctattgaggcgcaacagcatctgttgcaactcacagtctggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaaagatacc
taaaggatcaacagctcctggggatttggggttgctctggaaaactcatttgcaccactgctgtgccttggaatgctagttggagtaataaatctctggaac

agatttggaatcacacgacctggatggagtgggacagagaaattaacaattacacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaa
agaatgaacaagaattattggaattagataaatgggcaagtttgtggaattggtttaacataacaaattggctgtggtatataaaattattcataatgatag
taggaggcttggtaggtttaagaatagtttttgctgtactttctatagtgaatagagttaggcagggatattcaccattatcgtttcagacccacctcccaa
ccccgaggggacccgacaggcccgaaggaatagaagaagaaggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggtatcggt
taacttttaaaagaaaaggggggattgggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacatacaaactaaagaattacaaaaacaaa
ttacaaaaattcaaaatttttatcgatcacgagactagcctcgagagatctgatcataatcagccataccacatttgtagaggttttacttgctttaaaaaac
ctcccacacctccccctgaacctgaaacataaaatgaatgcaattgttgttgttaacttgtttattgcagcttataatggttacaaataaggcaatagcatc
acaaatttcacaaataaggcatttttttcactgcattctagttttggtttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggatctcaaatccctcggaa
gctgcgcctgtcttaggttggagtgatacatttttatcacttttacccgtctttggattaggcagtagctctgacggccctcctgtcttaggttagtgaaaa
atgtcactctcttacccgtcattggctgtccagcttagctcgcaggggaggtggtctggatccaccatgtctagaggatccccctgttccacctcttgaagg
ctatgtaggccacaaggcccacaaccacagcagccaggatggagcaatagacagggatgaggttgtcggtggtgcctcgggtcaccacgggctgggagctgc
ccatcactgtggtcaccacacctgccaccgtgctggctatgaggtcttgttctggaggtgcctcaggctcctgggtgctgggggctgtgctgtccgagccct
ctgggggtgtggaccgtgtaatccaacggccagggatctcctcgcactcggcgtcggcccagcgtgtgcactcgcggagctggcgctcggtgtcctcgcaca
cggtgcagggcaggcacgggtccacgtggttggcctcgtcggaatacgtgccgtcggggcactcctcgcacacggtgttctgcttgtcctggcaggagaaca
cgaggcccgagcccgcctcgcacacgcggcacgcctcgcagcgcccagtcgtctcatcctggtagtagccgtaggcgcagcggcacacggcgtcgtcggcct
ccacgcacggcgccgacatgctctggagccccacgcactcggtgcacggcttgcacggctcggtcgcgctcaccacgtcggagaacgtcacgctgtccaggc
agggctcacacacggtctggttggctccacaaggctgggccacaccctcgcccaggttgcaggctttgcagcactcaccgctgtgtgtgtacaggcctgtgg
ggcatgcctccttggcacctccaagggacacccccagaagcagcaacagcagcaggcgcggcccgtccatggcgcggccggtggcacctgcccccatcgccc
gcctcccgcggcagcgctcgacttccagctcggtccgctttgcggactgatggggctgcgctgcgctgcgctccagcgcccccccctgcccgccggagctggc
cgcggcccgaattcctgcaggaattcgatggaggctggatcggtcccggtgtcttctatggaggtcaaaacagcgtggatggcgtctccaggcgatctgacg
gttcactaaacgagctctgcttatataggcctcccaccgtacacgcctaccctcgagaagcttgatatcgaattcccacggggttggggttgcgccttttcc
aaggcagccctgggtttgcgcagggacgcggctgctctgggcgtggttccgggaaacgcagcggcgccgaccctgggtctcgcacattcttcacgtccgttc
gcagcgtcacccggatcttcgccgctaccttgtgggccccccggcgacgcttcctgctccgcccctaagtcgggaaggttccttgcggttcgcggcgtgcc
ggacgtgacaaacggaagccgcacgtctcactagtaccctcgcagacggacagcgccagggagcaatggcagcgcgccgaccgcgatgggctgtggccaata
gcggctgctcagcggggcgcgccgagagcagcggccgggaaggggcggtgcgggaggcggggtgtggggcggtagtgtgggccctgttcctgcccgcgcggt
gttccgcattctgcaagcctccggagcgcacgtcggcagtcggctccctcgttgaccgaatcaccgacctctctccccaggggatccccggtctgcaggaa
ttcatgcacagctcagcactgctctgttgcctggtcctcctgactggggtgagggccagcccaggccagggcacccagtctgagaacagctgcacccacttc
ccaggcaacctgcctaacatgcttcgagatctccgagatgccttcagcagagtgaagacttttctttcaaatgaaggatcagctggacaacttgttgttaaag
gagtccttgctggaggactttaagggttacctgggttgccaagccttgtctgagatgatccagttttacctggaggaggtgatgccccaagctgagaaccaa
gacccagacatcaaggcgcatgtgaactccctgggggagaacctgaagaccctcaggctgaggctacggcgctgtcatcgatttcttccctgtgaaaacaag
agcaaggccgtggagcaggtgaagaatgcctttaataagctccaagagaaaggcatctacaaagccatgagtgagtttgacatcttcatcaactacatagaa
gcctacatgacaatgaagatacgaaactgagtcgagaatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggtattcttaactatgttgctccttttt
acgctatgtggatacgctgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcattttctcctccttgtataaatcctggttgctgtctctt
tatgaggagttgtggcccgttgtcaggcaacgtggcgtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaacccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctc
ctttccgggactttcgctttcccctccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgccttgcccgctgctggacaggggctcggctgttgggcactgac
aattccgtggtgttgtcggggaaatcatcgtcctttccttggctgctcgcctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcccttcg
gccctcaatccagcggaccttccttcccgcggcctgctgccggctctgcggcctcttccgcgtcttcgccttcgccctcagacgagtcggatctccctttgg
gccgcctccccgcctggaattcgagctcggtacctttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccacttttttaaaagaaaaggggggactgg
aagggctaattcactcccaacgaagacaagatctgctttttgcttgtactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactag
ggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgcttcaagtagtgtgtgcccgtctgttgtgtgactctggtaactagagatccctcagaccct
tttagtcagtgtggaaaatctctagcagtagtagttcatgtcatcttattattcagtatttataacttgcaaagaaatgaatatcagagagtgagaggaact
tgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaatagcatcacaaatttcacaaataaagcatttttttcactgcattctagttgtggtttgtccaaac
tcatcaatgtatcttatcatgtctggctctagctatcccgcccctaactccgcccatcccgcccctaactccgcccagttccgcccattctccgccccatgg
ctgactaatttttttttatttatgcagaggccgaggccgcctcggcctctgagctattccagaagtagtgaggaggctttttttggaggcctaggcttttgcgt
cgagacgtacccaattcgccctatagtgagtcgtattacgcgcgctcactggccgtcgttttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcgttacccaacctt
aatcgccttgcagcacatccccctttcgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgcaccgatcgcccttcccaagcggccgcacgctcagtggaacgaaaa
ctcacgttaagggattttggtcatgaacaataaaactgtctgcttacataaacagtaatacaaggggtgttatgagccatattcaacgggaaacgtcttgct
ctaggccgcgattaaattccaacatggatgctgatttatatgggtataaatgggctcgcgataatgtcgggcaatcaggtgcgacaatctatcgattgtatg
ggaagcccgatgcgccagagttgtttctgaaacatggcaaaggtagcgttgccaatgatgttacagatgagatggtcagactaaactggctgacggaatttta
tgcctcttccgaccatcaagcattttatccgtactcctgatgatgcatggttactcaccactgcgatccccgggaaaacagcattccaggtattagaagaat
atcctgattcaggtgaaaacattgttgatgcgctggcagtgttcctgcgccggttgcattcgattcctgtttgtaattgtccttttaacagcgatcgcgtat

ttcgtctcgctcaggcgcaatcacgaatgaataacggtttggttgatgcgagtgattttgatgacgagcgtaatggctggcctgttgaacaagtctggaaag
aaatgcataaacttttgccattctcaccggattcagtcgtcactcatggtgatttctcacttgataaccttatttttgacgaggggaaattaataggttgta
ttgatgttggacgagtcggaatcgcagaccgataccaggatcttgccatcctatggaactgcctcggtgagttttctccttcattacagaaacggctttttc
aaaaatatggtattgataatcctgatatgaataaattgcagtttcatttgatgctcgatgagtttttctaagaattaattcatgagcggatacatatttgaa
tgtatttagaaaaataaacaaatagggqttccgcgactatgtctttgataatctcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcaga
ccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaaaaccaccgctaccagcggtggtttgttt
gccggatcaagagctaccaactctttttccgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccacca
cttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtcttaccgggttggactc
aagacgatagttaccggataaggcgcagcggtcgggctgaacgggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacct
acagcgtgagctatgagaaagcgccacgcttcccgaagggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgagggagct
tccagggggaaacgcctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgatgctcgtcaggggggcggagcctatg
gaaaaacgccagcaacgcggccttttacggttcctggccttttgctggcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcctttgagtgagctgat
accgctcgccgcagccgaacgaccgagcgcagcgagtcagtgagcgaggaagcggaagagcgcccaatacgcaaaccgcctctccccgcgcgttgtatgctt
ccggctcgtatgttgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaaacagctatgaccatgattacgccaagccgaattaaccctcactaaagggga
acagctagc

[0783] **서열번호 6 (바이러스 인터류킨-10 동족체, 일명 인터류킨-10 BCRF1, 일명 IL10H_EBVB9)** 단백질 서열: Ref: P03180

[0784] MERRLVVTLQCLVLLYLAPECGGTDQCDNFPQMLRDLRDAFSRVKTFFQTKDEVDNLLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQDPEAKDHV
NSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQIKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTIKAR

[0785] **서열번호 7 (바이러스 인터류킨-10 동족체 cDNA 서열)**

[0786] 뉴클레오타이드 서열 (cDNA): Ref: NC_007605.1

[0787] 5'_atggagcgaaggttagtggtcactctgcagtgcctggtgctgctttacctggcacctgagtgtggaggtacagaccaatgtgacaattttccccaaatg
ttgagggacctaagagatgccttcagtcgtgttaaaacctttttccagacaaaggacgaggtagataacctttgctcaaggagtctctgctagaggacttt
aagggctaccttggatgccaggccctgtcagaaatgatccaattctacctggaggaagtcatgccacaggctgaaaaccaggaccctgaagccaaagaccat
gtcaattctttgggtgaaaatctaaagaccctacggctccgcctgcgcaggtgccacaggttcctgccgtgtgagaacaagagtaaagctgtggaacagata
aaaaatgcctttaacaagctgcaggaaaaaggaatttacaaagccatgagtgaatttgacatttttattaactacatagaagcatacatgacaattaaagcc
aggtga_3'

[0788] **서열번호 9 (항-CD19 CAR 아미노산 서열)**

[0789] MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQ
EDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYN
SALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSAAAPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF
DTALAAVICSALATVLLALLILCVIYCKRQPRRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE
YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0790] **서열번호 10 (항-CD19 CAR 폴리뉴클레오타이드 서열)**

[0791] ATGCTGCTGCTGGTCACCAGCCTGCTGCTGTGCGAGCTCCCTCACCCCGCCTTTCTGCTTATCCCGGACATTCAGATGACACAGACCACCTCGAGCTTGTCC
GCGTCGCTGGGCGATCGCGTGACCATCTCCTGCCGGGCCTCCCAAGACATTTCAAAGTATCTCAACTGGTACCAGCAGAAGCCGGACGGAACCGTGAAACTG
CTGATCTACCATACCAGCCGCCTGCACTCCGGCGTGCCGTCCCGCTTCTCCGGATCGGGTTCCGGAACTGACTACTCACTGACTATCTCCAACTTGGAACAA
GAGGACATCGCCACTTACTTCTGTCAACAAGGAAATACCCTTCCCTACACCTTCGGGGGGGGTACCAAGCTGGAGATCACTGGGGGCGGAGGCTCCGGTGGA
GGCGGATCCGGCGGTGGAGGGAGCGAAGTCAAGCTGCAGGAATCAGGACCAGGACTCGTGGCGCCATCCCAGTCCCTGTCGGTGACCTGTACTGTCTCCGGA
GTCAGCCTCCCCGATTACGGAGTGTCATGGATTAGGCAACCCCCAAGAAAAGGGCTGGAATGGCTCGGAGTGATCTGGGGCTCCGAAACCACCTACTACAAC
TCGGCGCTGAAGTCCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACTCCAAGAGCCAAGTGTTCTTGAAGATGAACAGCTTGCAGACCGACGATACCGCAATCTACTAC
TGTGCCAAGCACTATTACTACGGGGGGTCTTACGCCATGGACTACTGGGGACAGGGCACCTCCGTGACTGTCTCGTCCGCGGCCGCGCCCGCCCCTCGGCCC
CCGACTCCTGCCCCGACGATCGCTTCCCAACCTCTCTCGCTGCGCCCGGAAGCATGCCGGCCCGCCGCCGGTGGCGCTGTCCACACTCGCGGACTGGACTTT
GATACCGCACTGGCGGCCGTGATCTGTAGCGCCCTGGCCACCGTGCTGCTGGCGCTGCTCATCCTTTGCGTGATCTACTGCAAGCGGCAGCCTAGGCGAAAG
AAGCTCCTCTACATTTTCAAGCAACCCTTCATGCGCCCCGTGCAAACCACCCAGGAGGAGGATGGATGCTCATGCCGGTTCCCTGAGGAAGAAGAGGGCGGT
TGCGAGCTCAGAGTGAAATTCAGCCGGTCGGCTGACGCCCCGGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAATGAGCTCAACCTGGGGCGCCGCGAAGAG
TACGACGTGCTGGACAAGAGGAGAGGCAGAGATCCGGAAATGGGCGGAAAGCCAAGGCGGAAGAACCCGCAGGAAGGTCTTTACAACGAACTGCAGAAGGAC

AAGATGGCCGAGGCCTACTCCGAGATTGGGATGAAGGGAGAAAGACGGAGGGGAAAGGGACATGACGGACTTTACCAGGGCCTGAGCACTGCCACGAAGGAC
ACCTATGATGCCCTGCACATGCAGGCGCTGCCGCCTCGG

[0792] 서열번호 11 (FMC63에 대한 항-CD19 scFv 아미노산 서열)

[0793] MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQ
EDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYN
SALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS

[0794] 서열번호 12 (항-CD19 scFv 폴리뉴클레오타이드 서열)

[0795] atgcttctcctggtcacctccctgctcctctgcgaactgcctcaccctgccttccttctgattcctgacattcagatgactcagaccacctcttccttgtcc
gcgtcactgggagacagagtgaccatctcgtgtcgcgcaagccaggatatctccaagtacctgaactggtaccaacagaagcccgacgggactgtgaagctg
ctgatctaccacacctcacgcctgcacagcggagtgccaagcagattctccggctccggctcgggaaccgattactcgcttaccattagcaacctcgagcag
gaggacatcgctacctacttctgccagcaaggaaataccctgccctacaccttcggcggaggaaccaaattggaaatcaccggcggaggaggctccgggggga
ggaggttccgggggcgggggttccgaagtgaagctccaggagtccggccccggcctggtggcgccgtcgcaatcactctctgtgacctgtaccgtgtcggga
gtgtccctgcctgattacggcgtgagctggattcggcagccgccgcggaagggcctggaatggctgggtgtcatctggggatccgagactacctactacaac
tcggccctgaagtcccgcctgactatcatcaaagacaactcgaagtcccaggtctttctgaagatgaactccctgcaaactgacgacaccgccatctattac
tgtgctaagcactactactacggtggaagctatgctatggactactgggggcaaggcacttcggtgactgtgtcaagcgcggccgcaactaccacccctgcc
cctcggccgccgactccggccccaaccatcgcaagccaaccccctctccttgcgccccgaagcttgccgcccggccgcgggtggagccgtgcataccgggggg
ctggactttgcctgcgatatctacatttgggccccgctggccggcacttgcggcgtgctcctgctgtcgctggtcatcacccttactgcaagaggggccgg
aagaagctgctttacatcttcaagcagccgttcatgcggcccgtgcagacgactcaggaagaggacggatgctcgtgcagattccctgaggaggaagagggg
ggatgcgaactgcgcgtcaagttctcacggtccgccgacgccccgcatatcaacagggccagaatcagctctacaacgagctgaacctgggaaggagagag
gagtacgacgtgctggacaagcgacgcggacgcgacccggagatgggggggaaaccacggcggaaaaaccctcaggaaggactgtacaacgaactccagaaa
gacaagatggcggaagcctactcagaaatcgggatgaagggagagcggaggaggggaaagggtcacgacgggctgtaccagggactgagcaccgccactaag
gatacctacgatgccttgcatatgcaagcactcccaccccgg

[0796] 서열번호 13 (FMC63에 대한 항-CD19 scFv VH)

[0797] MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQ
EDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIT

[0798] 서열번호 14 (FMC63에 대한 항-CD19 scFv VL)

[0799] EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYG
GSYAMDYWGQGTSVTVSS

[0800] 서열번호 16 (항-CD20 CAR 아미노산 서열)

[0801] MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAY
MQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKP
WIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIKAAATTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR
GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR
EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0802] 서열번호 17 (항-CD20 CAR 폴리뉴클레오타이드 서열)

[0803] ATGCTCCTTCTCGTGACCTCCCTGCTTCTCTGCGAACTGCCCCATCCTGCCTTCCTGCTGATTCCCGAGGTGCAGTTGCAACAGTCAGGAGCTGAACTGGTC
AAGCCAGGAGCCAGCGTGAAGATGAGCTGCAAGGCCTCCGGTTACACCTTCACCTCCTACAACATGCACTGGGTGAAACAGACCCCGGGACAAGGGCTCGAA
TGGATTGGCGCCATCTACCCCGGGAATGGCGATACTTCGTACAACCAGAAGTTCAAGGGAAAGGCCACCCTGACCGCCGACAAGAGCTCCTCCACCGCGTAT
ATGCAGTTGAGCTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCCGACTACTACTGCGCACGGTCCAACTACTATGGAAGCTCGTACTGGTTCTTCGATGTCTGGGGGGCC
GGCACCACTGTGACCGTCAGCTCCGGGGGCGGAGGATCCGGTGGAGGCGGAAGCGGGGGTGGAGGATCCGACATTGTGCTGACTCAGTCCCCGGCAATCCTG
TCGGCCTCACCGGGCGAAAAGGTCACGATGACTTGTAGAGCGTCGTCCAGCGTGAACTACATGGATTGGTACCAAAAGAAGCCTGGATCGTCACCCAAGCCT
TGGATCTACGCTACATCTAACCTGGCCTCCGGCGTGCCAGCGCGGTTCAGCGGGTCCGGCTCGGGCACCTCATACTCGCTGACCATCTCCCGCGTGGAGGCT
GAGGACGCCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCCTTCAACCCGCCGACTTTTGGAGGCGGTACTAAGCTGGAGATCAAAGCGGCCGCAACTACCACCCCT
GCCCCTCGGCCGCCGACTCCGGCCCCAACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTGCGCCCCGAAGCTTGCCGCCCGGCCGCGGGTGGAGCCGTGCATACCCGG
GGGCTGGACTTTGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCCGCTGGCCGGCACTTGCGGCGTGCTCCTGCTGTCGCTGGTCATCACCCTTTACTGCAAGAGGGGC
CGGAAGAAGCTGCTTTACATCTTCAAGCAGCCGTTCATGCGGCCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGCAGATTCCCTGAGGAGGAAGAG

GGGGGATGCGAACTGCGCGTCAAGTTCTCACGGTCCGCCGACGCCCCCGCATATCAACAGGGCCAGAATCAGCTCTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGGAGA
GAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGACGCGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGGAAACCACGGCGGAAAAACCCTCAGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAG
AAAGACAAGATGGCGGAAGCCTACTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGGAAAGGGTCACGACGGGCTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACT
AAGGATACCTACGATGCCTTGCATATGCAAGCACTCCCACCCCGG

[0804] **서열번호 18 (항-CD20 scFv 아미노산 서열)**

[0805] EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMEIWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNY
YGSSYWFFDVWGAGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGS
GTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPTFGGGTKLEIK

[0806] **서열번호 19 (항-CD20 scFv 폴리뉴클레오타이드 서열)**

[0807] GAGGTGCAGTTGCAACAGTCAGGAGCTGAACTGGTCAAGCCAGGAGCCAGCGTGAAGATGAGCTGCAAGGCCTCCGGTTACACCTTCACCTCCTACAACATG
CACTGGGTGAAACAGACCCCGGGACAAGGGCTCGAATGGATTGGCGCCATCTACCCCGGGAATGGCGATACTTCGTACAACCAGAAGTTCAAGGGAAAGGCC
ACCCTGACCGCCGACAAGAGCTCCTCCACCGCGTATATGCAGTTGAGCTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCCGACTACTACTGCGCACGGTCCAACTACTAT
GGAAGCTCGTACTGGTTCTTCGATGTCTGGGGGGCCGGCACCACTGTGACCGTCAGCTCCGGGGGCGGAGGATCCGGTGGAGGCGGAAGCGGGGGTGGAGGA
TCCGACATTGTGCTGACTCAGTCCCCGGCAATCCTGTCGGCCTCACCGGGCGAAAAGGTCACGATGACTTGTAGAGCGTCGTCCAGCGTGAACTACATGGAT
TGGTACCAAAAGAAGCCTGGATCGTCACCCAAGCCTTGGATCTACGCTACATCTAACCTGGCCTCCGGCGTGCCAGCGCGGTTCAGCGGGTCCGGCTCGGGC
ACCTCATACTCGCTGACCATCTCCCGCGTGGAGGCTGAGGACGCCGCGACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCCTTCAACCCGCCGACTTTTGGAGGCGGTACT
AAGCTGGAGATCAAA

[0808] **서열번호 20 (항-CD20 scFv VH)**

[0809] EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMEIWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNY
YGSSYWFFDVWGAGTTVTVSS

[0810] **서열번호 21 (항-CD20 scFv VL)**

[0811] DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPTFGGGTK
LEIK

[0812] **서열번호 22 (항-CD22 CAR 아미노산 서열)**

[0813] MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPQVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKN
QFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTIWSYLNWYQQRPGKA
PNLLIYAASSLQSGVPSRFSGRGSGTDFTLTISSLQAEDFATYYCQQSYSIPQTFGQGTKLEIKAAATTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV
HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL
GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0814] **서열번호 23 (항-CD22 CAR 폴리뉴클레오타이드 서열)**

[0815] ATGCTTCTTTTGGTGACTTCCCTTTTGCTGTGCGAGTTGCCACACCCCGCCTTCCTGCTTATTCCCCAGGTACAGCTCCAGCAGAGTGGCCCAGGGCTCGTG
AAGCCAAGCCAGACGCTGTCCCTGACTTGTGCAATTTCAGGGGATTCAGTTTCATCAAATAGCGCGGCGTGGAATTGGATTCGACAATCTCCTTCCCGAGGG
TTGGAATGGCTTGGACGAACATATTACAGATCCAAATGGTATAACGACTATGCGGTATCAGTAAAGTCAAGAATAACCATTAACCCCGACACAAGCAAGAAC
CAATTCTCTTTGCAGCTTAACTCTGTCACGCCAGAAGACACGGCAGTCTATTATTGCGCTCGCGAGGTAACGGGTGACCTGGAAGACGCTTTTGACATTTGG
GGGCAGGGTACGATGGTGACAGTCAGTTCAGGGGGCGGTGGGAGTGGGGGAGGGGGTAGCGGGGGGGGAGGGTCAGACATTCAGATGACCCAGTCCCCTTCA
TCCTTGTCTGCCTCCGTCGGTGACAGGGTGACAATAACATGCAGAGCAAGCCAAACAATCTGGAGCTATCTCAACTGGTACCAGCAGCGACCAGGAAAAGCG
CCAAACCTGCTGATTTACGCTGCTTCCTCCCTCCAATCAGGCGTGCCTAGTAGATTTAGCGGTAGGGGCTCCGGCACCGATTTTACGCTCACTATAAGCTCT
CTTCAAGCAGAAGATTTTGCGACTTATTACTGCCAGCAGTCCTATAGTATACCTCAGACTTTCGGACAGGGTACCAAGTTGGAGATTAAGGCGGCCGCAACT
ACCACCCCTGCCCCTCGGCCGCCGACTCCGGCCCCAACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTGCGCCCCGAAGCTTGCCGCCCGGCCGCGGGTGGAGCCGTG
CATACCCGGGGGCTGGACTTTGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCCGCTGGCCGGCACTTGCGGCGTGCTCCTGCTGTCGCTGGTCATCACCCTTTACTGC
AAGAGGGGCCGGAAGAAGCTGCTTTACATCTTCAAGCAGCCGTTCATGCGGCCCGTGCAGACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGCAGATTCCCTGAG
GAGGAAGAGGGGGGATGCGAACTGCGCGTCAAGTTCTCACGGTCCGCCGACGCCCCCGCATATCAACAGGGCCAGAATCAGCTCTACAACGAGCTGAACCTG
GGAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGACGCGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGGAAACCACGGCGGAAAAACCCTCAGGAAGGACTGTACAAC
GAACTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTACTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGGAAAGGGTCACGACGGGCTGTACCAGGGACTGAGC
ACCGCCACTAAGGATACCTACGATGCCTTGCATATGCAAGCACTCCCACCCCGG

[0816] 서열번호 24 (항-CD22 scFv 아미노산 서열)

[0817] QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARE
VTGDLEDAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTIWSYLNWYQQRPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGR
GSGTDFTLTISSLQAEDFATYYCQQSYSIPQTFGQGTKLEIKAAA

[0818] 서열번호 25 (항-CD22 scFv 폴리뉴클레오타이드 서열)

[0819] CAGGTACAGCTCCAGCAGAGTGGCCCAGGGCTCGTGAAGCCAAGCCAGACGCTGTCCCTGACTTGTGCAATTTCAGGGGATTCAGTTTCATCAAATAGCGCG
GCGTGGAATTGGATTCGACAATCTCCTTCCCGAGGGTTGGAATGGCTTGGACGAACATATTACAGATCCAAATGGTATAACGACTATGCGGTATCAGTAAAG
TCAAGAATAACCATTAACCCCGACACAAGCAAGAACCAATTCTCTTTGCAGCTTAACTCTGTCACGCCAGAAGACACGGCAGTCTATTATTGCGCTCGCGAG
GTAACGGGTGACCTGGAAGACGCTTTTGACATTTGGGGGCAGGGTACGATGGTGACAGTCAGTTCAGGGGGCGGTGGGAGTGGGGGAGGGGGTAGCGGGGGG
GGAGGGTCAGACATTCAGATGACCCAGTCCCCTTCATCCTTGTCTGCCTCCGTCGGTGACAGGGTGACAATAACATGCAGAGCAAGCCAAACAATCTGGAGC
TATCTCAACTGGTACCAGCAGCGACCAGGAAAAGCGCCAAACCTGCTGATTTACGCTGCTTCCTCCCTCCAATCAGGCGTGCCTAGTAGATTTAGCGGTAGG
GGCTCCGGCACCGATTTTACGCTCACTATAAGCTCTCTTCAAGCAGAAGATTTTGCGACTTATTACTGCCAGCAGTCCTATAGTATACCTCAGACTTTCGGA
CAGGGTACCAAGTTGGAGATTAAGGCGGCCGCA

[0820] 서열번호 26 (항-CD22 scFv VH)

[0821] QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARE
VTGDLEDAFDIWGQGTMVTVSS

[0822] 서열번호 27 (항-CD22 scFv VL)

[0823] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTIWSYLNWYQQRPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGRGSGTDFTLTISSLQAEDFATYYCQQSYSIPQTFGQGT
KLEIKAAA

[0824] 서열번호 28 (인간 CD8 힌지 영역)

[0825] AAATTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC

[0826] 서열번호 29 (TNFRSF19 막관통 도메인)

[0827] DTALAAVICSALATVLLALLILCVIYCKRQ

[0828] 서열번호 30 (CD3제타)

[0829] RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYD
ALHMQALPPR

[0830] 서열번호 31 (4-1BB 공동자극 도메인)

[0831] KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

[0832] 서열번호 32 (CD28 공동자극 도메인)

[0833] RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS

[0834] 서열번호 33 (2A 서열)

[0835] RAKRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPRAKR

[0836] 서열번호 34 (항-B7-H3 CAR 아미노산 서열)

[0837] MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPQVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPILGIANYAQKFQGRVTITADESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARGGAGGSGSYYPLIWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCGASQSVSSSYLAWYQQKPGQAP
RLLIYDASSRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSWPPTWTFGQGTKLEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLF
PGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR
REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0838] 서열번호 35 (항-B7-H3 CAR 폴리뉴클레오타이드 서열)

[0839] atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgcgaactgccgcatccggcgtttctgctgattccgcaggtgcagctgcagcagagcggcgcggaagtgaaa
aaaccgggcagcagcgtgaaagtgagctgcaaagcgagcggcggcacctttagcagctatgcgattagctgggtgcgccaggcgccgggccagggcctggaa

tggatgggcggcattattccgattctgggcattgcgaactatgcgcagaaatttcagggccgcgtgaccattaccgcggatgaaagcaccagcaccgcgtat
atggaactgagcagcctgcgcagcgaagataccgcggtgtattattgcgcgcgcggcggcgcgggcggcagcggcagctattatccgctgatttggggccag
ggcaccaccgtgaccgtgagcagcggcggcggcggcagcggcggcggcggcagcggcggcggcggcagcgaaattgtgctgacccagagcccggcgaccctg
agcctgagcccgggcgaacgcgcgaccctgagctgcggcgcgagccagagcgtgagcagcagctatctggcgtggtatcagcagaaaccgggccaggcgccg
cgcctgctgatttatgatgcgagcagccgcgcgaccggcattccggcgcgctttagcggcagcggcagcggcaccgattttaccctgaccattagcagcctg
gaaccggaagattttgcggtgtattattgccagcagcgcagcagctggccgccgacctggacctttggccagggcaccaaactggaaattaaacgcgcggcg
gcgattgaagtgatgtatccgccgccgtatctggataacgaaaaaagcaacggcaccattattcatgtgaaaggcaaacatctgtgcccgagcccgctgttt
ccgggcccgagcaaaccgttttgggtgctggtggtggtggggcggcgtgctggcgtgctatagcctgctggtgaccgtggcgtttattatttttttgggtgcgc
agcaaacgcagccgcctgctgcatagcgattatatgaacatgaccccgcgccgcccgggcccgacccgcaaacattatcagccgtatgcgccgccgcgcgat
tttgcggcgtatcgcagccgcgtgaaatttagccgcagcgcggatgcgccggcgtatcagcagggccagaaccagctgtataacgaactgaacctgggccgc
cgcgaagaatatgatgtgctggataaacgccgcggccgcgatccggaaatgggcggcaaaccgcgccgcaaaaacccgcaggaaggcctgtataacgaactg
cagaaagataaaatggcggaagcgtatagcgaaattggcatgaaaggcgaacgccgccgcggcaaaggccatgatggcctgtatcagggcctgagcaccgcg
accaaagatacctatgatgcgctgcatatgcaggcgctgccgccgcgc

[0840] **서열번호 36 (항-B7-H3 scFv 아미노산 서열)**

[0841] QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPILGIANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGAG
GSGSYYPLIWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCGASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPARFSGSG
SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSWPPTWTFGQGTKLEIKRAAA

[0842] **서열번호 37 (항-B7-H3 scFv 폴리뉴클레오타이드 서열)**

[0843] caggtgcagctgcagcagagcggcgcggaagtgaaaaaaccgggcagcagcgtgaaagtgagctgcaaagcgagcggcggcacctttagcagctatgcgatt
agctgggtgcgccaggcgccgggccagggcctggaatggatgggcggcattattccgattctgggcattgcgaactatgcgcagaaatttcagggccgcgtg
accattaccgcggatgaaagcaccagcaccgcgtatatggaactgagcagcctgcgcagcgaagataccgcggtgtattattgcgcgcgcggcggcgcgggc
ggcagcggcagctattatccgctgatttggggccagggcaccaccgtgaccgtgagcagcggcggcggcggcagcggcggcggcggcagcggcggcggcggc
agcgaaattgtgctgacccagagcccggcgaccctgagcctgagcccgggcgaacgcgcgaccctgagctgcggcgcgagccagagcgtgagcagcagctat
ctggcgtggtatcagcagaaaccgggccaggcgccgcgcctgctgatttatgatgcgagcagccgcgcgaccggcattccggcgcgctttagcggcagcggc
agcggcaccgattttaccctgaccattagcagcctggaaccggaagattttgcggtgtattattgccagcagcgcagcagctggccgccgacctggacctttt
ggccagggcaccaaactggaaattaaacgcgcggcggcg

[0844] **서열번호 38 (항-B7-H3 scFv VH)**

[0845] QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPILGIANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGAG
GSGSYYPLIWGQGTTVTVSS

[0846] **서열번호 39 (항-B7-H3 scFv VL)**

[0847] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCGASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSWPPTWTFG
QGTKLEIKRAAA

[0848] **서열번호 40 (CD8α 막관통 영역)**

[0849] IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC

[0850] **서열번호 41 (항-BCMA CAR 아미노산 서열)**

[0851] MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIYWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDP
VEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFRHYSMNWVKQAPGKGLKWMGRINTE
SGVPIYADDFKGRFAFSVETSASTAYLVINNLKDEDTASYFCSNDYLYSLDFWGQGTALTVSSFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP
AAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQ
NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0852] **서열번호 42 (항-BCMA CAR 아미노산 서열)**

[0853] MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDP
VEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRAPGKGLKWMGWINTE
TREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYLQINNLKYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQGTSVTVSSFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP
AAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQ

NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0854] 서열번호 43 (항-BCMA CAR 아미노산 서열)

[0855] MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIYWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDP
VEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTHYSMNWVKQAPGKGLKWMGRINTE
TGEPLYADDFKGRFAFSLETSASTAYLVINNLKNEDTATFFCSNDYLYSCDYWGQGTTLTVSSFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP
AAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQ
NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0856] 서열번호 44 (항-BCMA CAR 아미노산 서열)

[0857] MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTID
PVEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRAPGKGLKWMGWINT
ETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYLQINNLKYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQGTSVTVSSAAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPE
ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAY
QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0858] 서열번호 45 (항-BCMA CAR 아미노산 서열)

[0859] MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDP
VEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRAPGKGLKWMGWINTE
TREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYLQINNLKYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQGTSVTVSSAAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA
CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQ
QGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0860] 서열번호 46 (항-BCMA CAR 아미노산 서열)

[0861] MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDP
VEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRAPGKGLKWMGWINTE
TREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYLQINNLKYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQGTSVTVSSAAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA
CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSA
DAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP
PR

[0862] 서열번호 47 (항-BCMA CAR 아미노산 서열)

[0863] MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDP
VEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRAPGKGLKWMGWINTE
TREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYLQINNLKYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQGTSVTVSSAAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA
CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQN
QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0864] 서열번호 48 (항-BCMA CAR 아미노산 서열)

[0865] MALPVTALLLPLALLLHAARPDIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDP
VEEDDVAVYYCLQSRTIPRTFGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRAPGKGLKWMGWINTE
TREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYLQINNLKYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQGTSVTVSSAAAFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA
CRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRRDQRLPP
DAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE
IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0866] 서열번호 49 (항-BCMA CAR 아미노산 서열)

[0867] DIVLTQSPPSLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIPRTF
GGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSINWVKRAPGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETS
ASTAYLQINNLKYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQGTSVTVSSAAATTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCG
VLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGK
PRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0868] 서열번호 50 (항-BCMA 중쇄 아미노산 서열)

[0869] QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHDG
AVAGLFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTC
NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0870] 서열번호 51 (항-BCMA 경쇄 아미노산 서열)

[0871] SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQPPGQAPVVVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAVYYCQVWDSSSDHVVFGGG
TKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKGDSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTV
EKTVAPTECS

[0872] 서열번호 52 (항-BCMA CAR 중쇄 아미노산 서열)

[0873] QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSNYWMHWVRQAPGQGLEWMGATYRGHSDTYYNQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGAIY
DGYDVLDNWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0874] 서열번호 53 (항-BCMA 경쇄 아미노산 서열)

[0875] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSNLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYRKLPWTFGQGT
KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC

[0876] 서열번호 54 (항-BCMA CAR 아미노산 서열)

[0877] MALPVTALLLPLALLLHAARPQVKLEESGGGLVQAGRSLRLSCAASEHTFSSHVMGWFRQAPGKERESVAVIGWRDISTSYADSVKGRFTISRDNAKKTLYL
QMNSLKPEDTAVYYCAARRIDAADFDSWGQGTQVTVSSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFTMGWFRQAPGKEREFVAAISLSPTLAYYAE
SVKGRFTISRDNAKNTVVLQMNSLKPEDTALYYCAADRKSVMSIRPDYWGQGTQVTVSSTSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD
FACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY
DVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0878] 서열번호 55 (항-BCMA CAR 코딩 서열을 포함하는 핵산 서열)

[0879] TGTAGTCTTATGCAATACTCTTGTAGTCTTGCAACATGGTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGAGAAAAAGCACCGTGCATGCCGATTGGTGG
AAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGGCAACAGACGGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATTGCCGCATTGCAGAGATATTGTATTTA
AGTGCCTAGCTCGATACATAAACGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAA
GCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCA
GTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGGCG
GCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGCGATG
GGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAAATATAAATTAAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCT
GTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAAC
CCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAGACCACCGCACAGCAAGC
GGCCGGCCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTA
GCACCCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATG
GGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCAT
CTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGC
TCTGGAAAACTCATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACACGACCTGGATGGAGTGGGAC
AGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGG
GCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAACATAACAAATTGGCTGTGGTATATAAAATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAGAATAGTTTTTGCT
GTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATTATCGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAA
GAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTCGATTAGTGAACGGATCTCGACGGTATCGCCTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGC
AGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAG

CAGAGATCCAGTTTATCGATGAGTAATTCATACAAAAGGACTCGCCCCTGCCTTGGGGAATCCCAGGGACCGTCGTTAAACTCCCACTAACGTAGAACCCAG
AGATCGCTGCGTTCCCGCCCCCTCACCCGCCCGCTCTCGTCATCACTGAGGTGGAGAAGAGCATGCGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCAC
ATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTG
GCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAG
TGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACGCCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATC
CCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCTTGGGCGCTGGGGCC
GCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCT
GGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTT
CGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCG
CCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGC
GGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGT
CCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGA
CTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAA
GTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGAGGATCGCTAGCGCTACCGGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCGAATTCGCCGCCACCATGGCTCTGCCCGTC
ACCGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCACGCTGCTCGCCCTCAGGTCAAACTGGAAGAATCTGGCGGAGGCCTGGTGCAGGCAGGACGGAGCCTG
CGCCTGAGCTGCGCAGCATCCGAGCACACCTTCAGCTCCCACGTGATGGGCTGGTTTCGGCAGGCCCCAGGCAAGGAGAGAGAGAGCGTGGCCGTGATCGGC
TGGAGGGACATCTCCACATCTTACGCCGATTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAAGACACTGTATCTGCAGATGAACAGCCTG
AAGCCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGCGCAGCAAGGAGAATCGACGCAGCAGACTTTGATTCCTGGGGCCAGGGCACCCAGGTGACAGTGTCTAGCGGA
GGAGGAGGATCTGAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGCGGCCTGGTGCAGGCCGGAGGCTCTCTGAGGCTGAGCTGTGCAGCATCCGGAAGAACCTTCACA
ATGGGCTGGTTTAGGCAGGCACCAGGAAAGGAGAGGGAGTTCGTGGCAGCAATCAGCCTGTCCCCTACCCTGGCCTACTATGCCGAGAGCGTGAAGGGCAGG
TTTACCATCTCCCGCGATAACGCCAAGAATACAGTGGTGCTGCAGATGAACTCCCTGAAACCTGAGGACACAGCCCTGTACTATTGTGCCGCCGATCGGAAG
AGCGTGATGAGCATTAGACCAGACTATTGGGGGCAGGGAACACAGGTGACCGTGAGCAGCACTAGTACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCG
CCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATC
TACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTC
AAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAG
TTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAG
AGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTAC
AGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCAC
ATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAATCTAGATCCGCGTCTGGAACAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTG
CTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGC
TGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCT
GTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGG
GCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACG
TCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCT
CCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTGGAATTAATTCTGCAGTCGAGACCTAGAAAAACATGGAGCAATCACAAGTAGCAATACAGCAGCTACCAATGCTGATTG
TGCCTGGCTAGAAGCACAAGAGGAGGAGGAGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCA
CTTTTTAAAAGAAAAGAGGGGACTGGAAGGGCTAATTATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGCACTC
CCAACGAAGACAAGATGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTC
TGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGT

[0880] 서열번호 56 (바이러스 IL-10에 기반한 예시적인 인간 IL-10 변이체 치환)

[0881] MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQTKDEVDNLLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQD
PEAKDHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQIKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN

[0882] 서열번호 57 (바이러스 IL-10에 기반한 아미노산 치환을 갖는 예시적인 인간 IL-10 변이체)

[0883] MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQD
PDAKAHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN

[0884] 서열번호 58 (무스 무스쿨루스; "MOUSE")

[0885] MPGSALLCCLLLLTGMRISRGQYSREDNNCTHFPVGQSHMLLELRTAFSQVKTFFQTKDQLDNILLTDSLMQDFKGYLGCQALSEMIQFYLVEVMPQAEKHG
PEIKEHLNSLGEKLKTLRMRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKSDFNKLQDQGVYKAMNEFDIFINCIEAYMMIKMKS

[0886] 서열번호 59 (라투스 노르베기쿠스; "RAT")

[0887] MPGSALLCCLLLLAGVKTSKGHSIRGDNNCTHFPVSQTHMLRELRAAFSQVKTFFQKKDQLDNILLTDSLLQDFKGYLGCQALSEMIKFYLVEVMPQAENHG
PEIKEHLNSLGEKLKTLWIQLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNDFNKLQDKGVYKAMNEFDIFINCIEAYVTLKMKN

[0888] 서열번호 60 (마카카 물라타; "MACMU")

[0889] MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTRFPGNLPHMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNILLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENHD
PDIKEHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFSKLQEKGVYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIQN

[0890] 서열번호 61 (고릴라 고릴라; "GORILLA")

[0891] MHSSALLCCLVLLTGVRASPGHGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQD
PDIKAHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGVYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN

[0892] 서열번호 62 (마카카 파시쿨라리스; "CYNO")

[0893] MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTRFPGNLPHMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNILLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENHD
PDIKEHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFSKLQEKGVYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIQN

[0894] 서열번호 63 (파피오 아누비스; "OLIVE BABOON")

[0895] MHSSALLCCLVVLTGVRASPGQGTQSENSCTRFPGNLPHMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNILLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENHD
PDIKEHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFSKLQEKGVYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIQN

[0896] 서열번호 64 (판 파니스쿠스; "BONOBO")

[0897] MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQD
PDIKVHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN

[0898] 서열번호 65 (판 트로글로디테스; "CHIMP")

[0899] MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCQALXEMIQFYLEEVMPQAENQD
PDIKVHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIVKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN

[0900] 서열번호 66 (EBVB9)

[0901] MERRLVVTLQCLVLLYLAPECGGTDQCDNFPQMLRDLRDAFSRVKTFFQTKDEVDNLLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQDPEAKDHV
NSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQIKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTIKAR

[0902] 서열번호 67 huIL-10 HYBRID #1

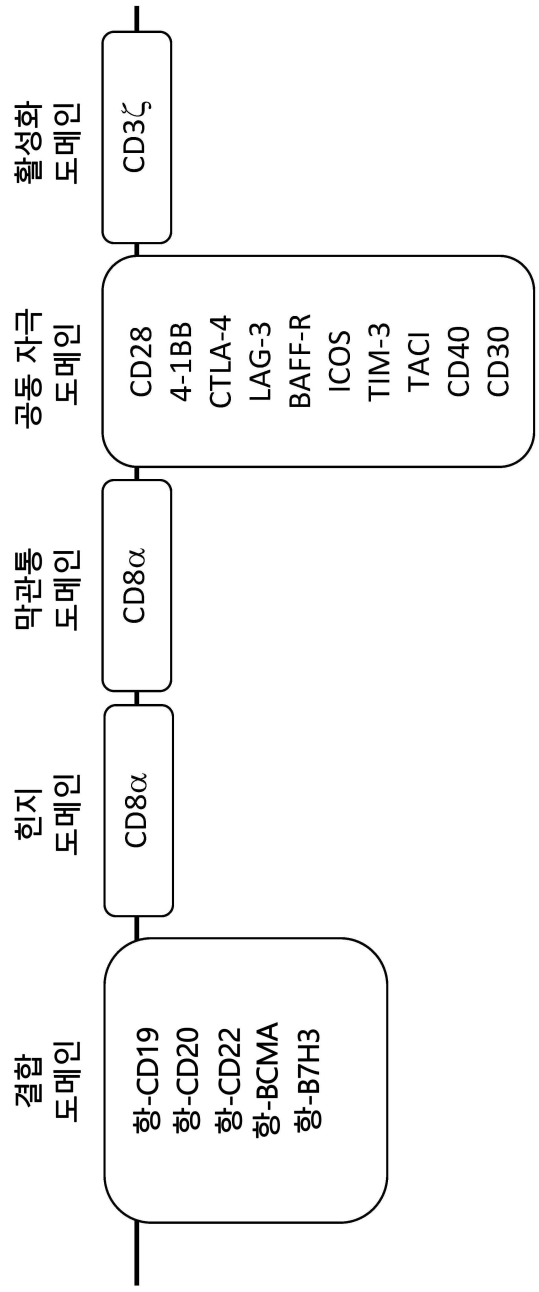
[0903] MHSSALLCCLVLLTGRASPGQGTQSENSCTHFPGNIPNMLRDIRDAFSRVKTEFQTKDEVDNLLLKESLLEDEKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQDP
EAKDHVNSLGENLKTLRLRIRRCHRFLPCENKSKAVEQIKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN

[0904] 서열번호 68 huIL-10 HYBRID #2

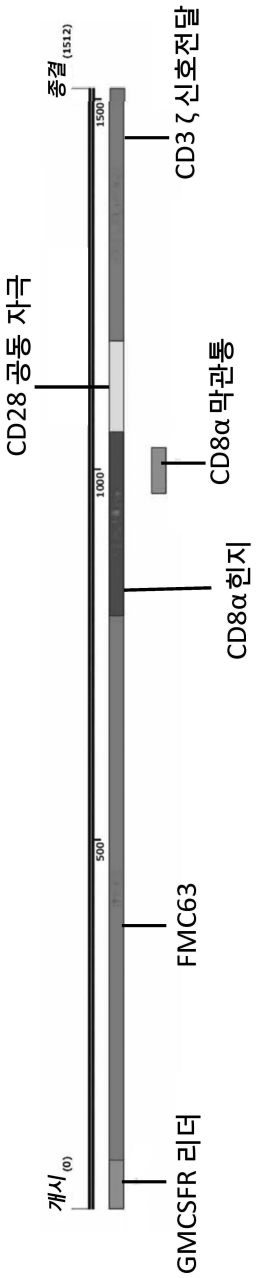
[0905] MHSSALLCCLVLLTGRASPGQGTQSENSCTHFPGNIPNMLRDIRDAFSRVKTEFQMKDQLDNLLLKESLLEDEKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQDP
DAKAHVNSLGENLKTLRLRIRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN

도면

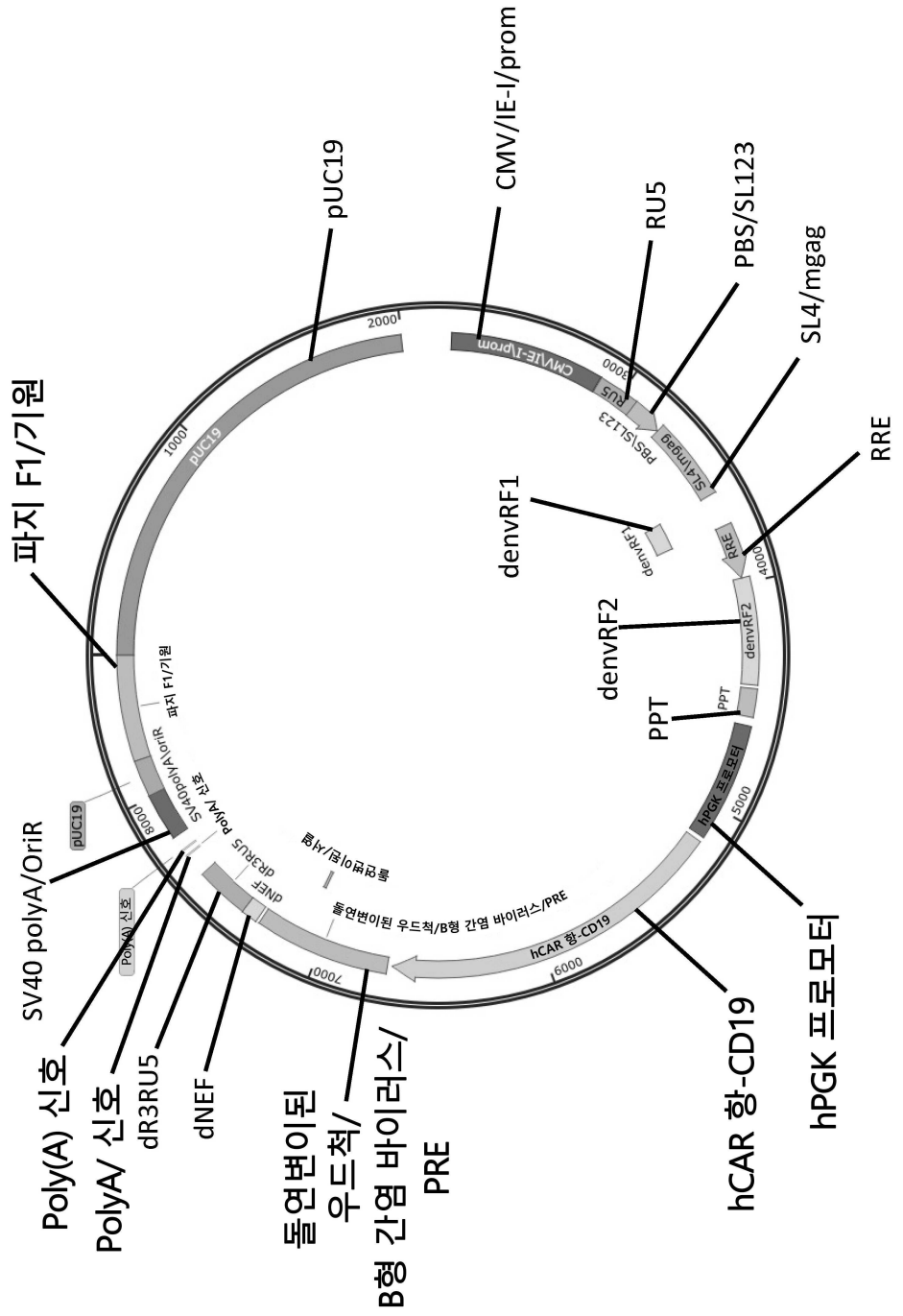
도면1


결합 도메인
항-CD19
항-CD20
항-CD22
항-BCMA
항-B7H3
힌지 도메인
CD8α
막관통 도메인
CD8α
공동 자극 도메인
CD28
4-1BB
CTLA-4
LAG-3
BAFF-R
ICOS
TIM-3
TACI
CD40
CD30
활성화 도메인
CD3ζ

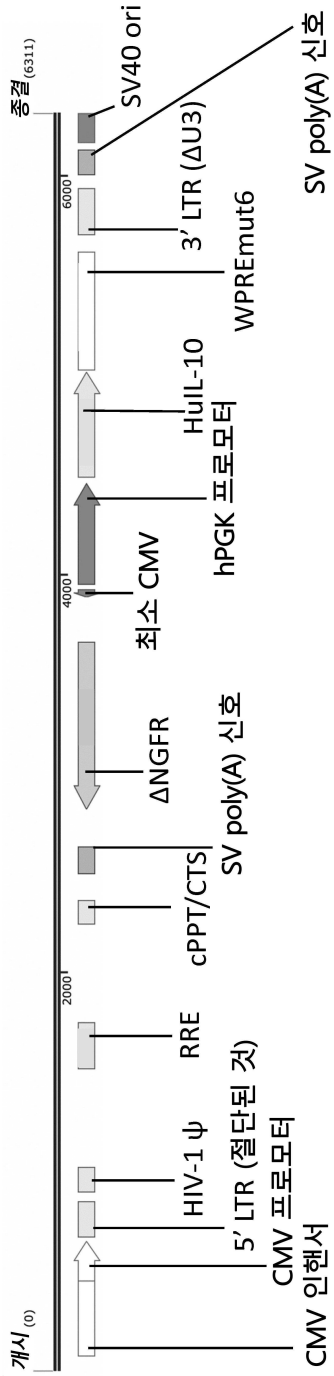
도면2a


종결 (1512)
1500
1000
500
개시 (0)
CD3ζ 신호전달
CD28 공동 자극
CD8α 막관통
CD8α 힌지
FMC63
GMCSFR 리더

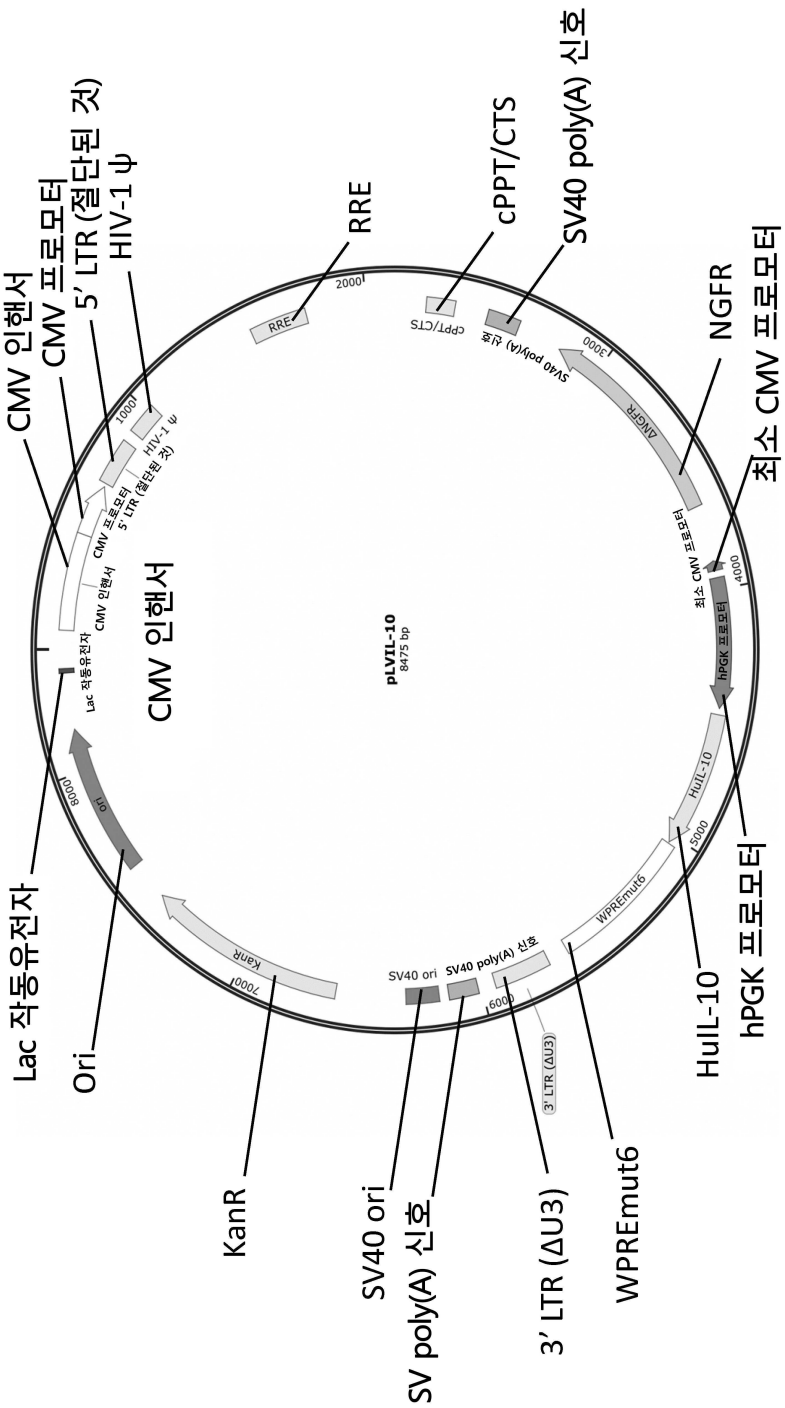
도면2b


pUC19
CMV/IE-I/prom
RU5
PBS/SL123
SL4/mgag
RRE
denvRF1
denvRF2
PPT
hPGK 프로모터
hCAR 항-CD19
돌연변이된 우드척/B형 간염 바이러스/PRE
dNEF
dR3RU5
Poly(A) 신호
PolyA/ 신호
SV40 polyA/OriR
파지 F1/기원

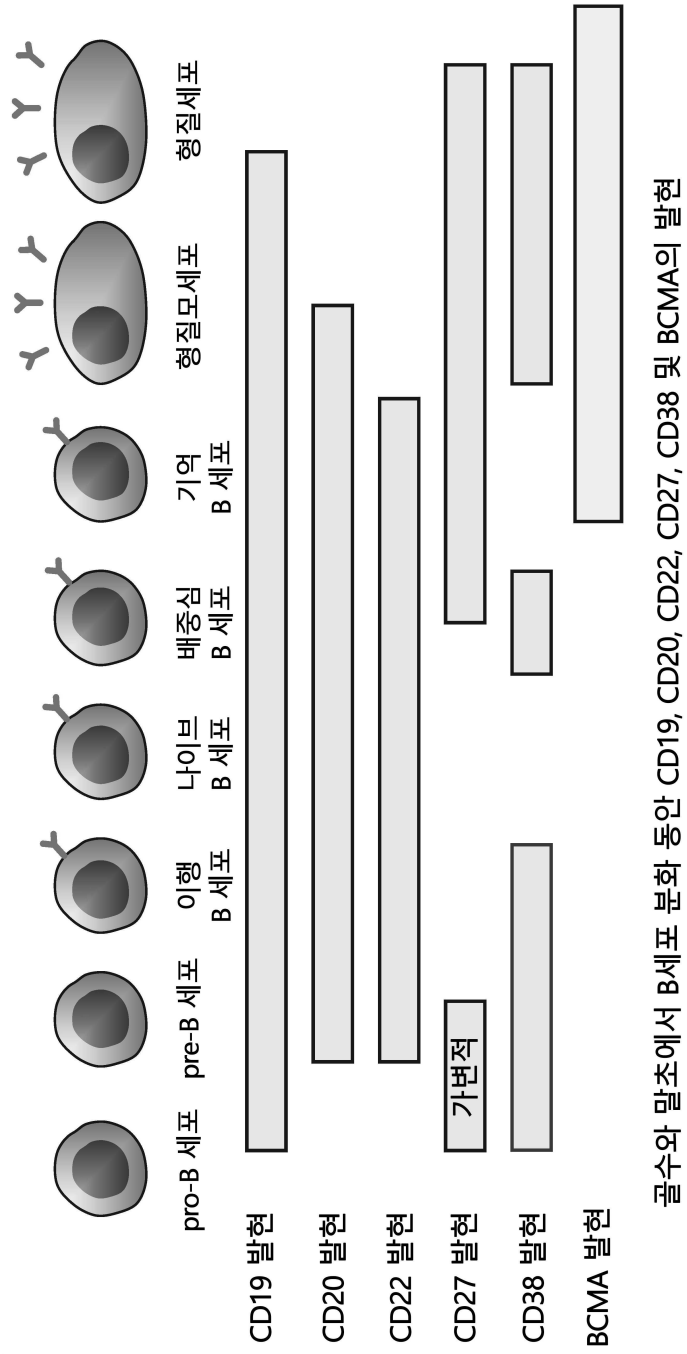
도면3a


개시 (0)
종결 (6311)
2000
4000
6000
CMV 인핸서
CMV 프로모터
5' LTR (절단된 것)
HIV-1 ψ
RRE
cPPT/CTS
SV poly(A) 신호
ΔNGFR
최소 CMV
hPGK 프로모터
HuIL-10
WPREmut6
3' LTR (ΔU3)
SV40 ori
SV poly(A) 신호

도면3b

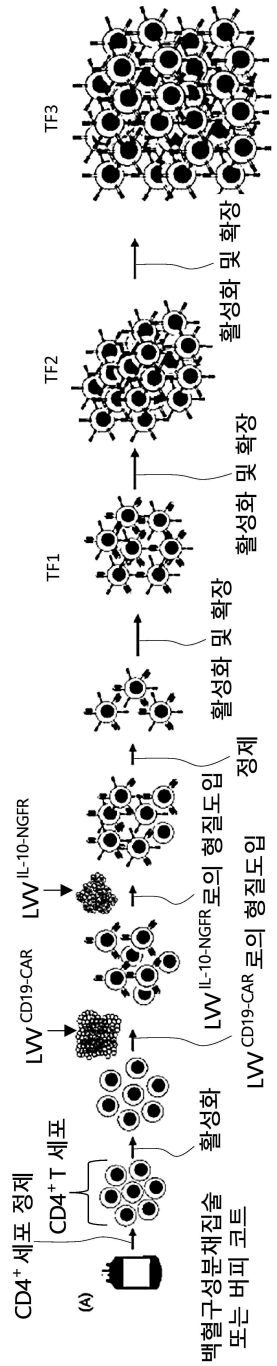

CMV 인핸서
CMV 프로모터
5' LTR (절단된 것)
HIV-1 ψ
RRE
cPPT/CTS
SV40 poly(A) 신호
NGFR
최소 CMV 프로모터
hPGK 프로모터
HuIL-10
WPREmut6
3' LTR (ΔU3)
SV40 ori
SV poly(A) 신호
KanR
Ori
Lac 작동유전자
pLVIL-10
8475 bp

도면4

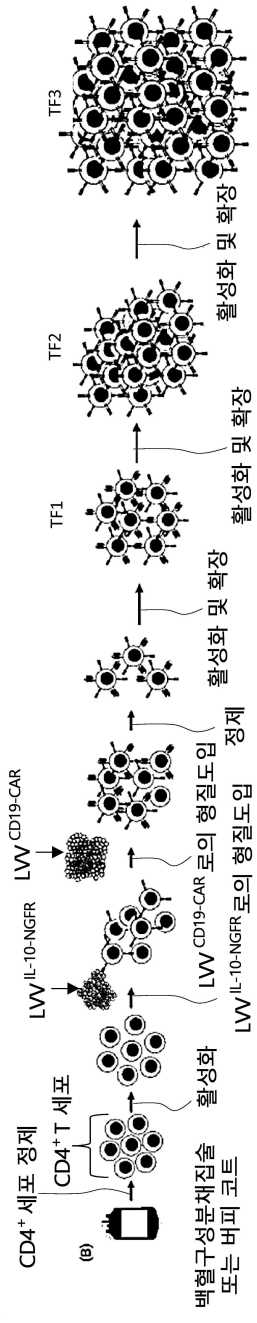


골수와 말초에서 B세포 분화 동안 CD19, CD20, CD22, CD27, CD38 및 BCMA의 발현

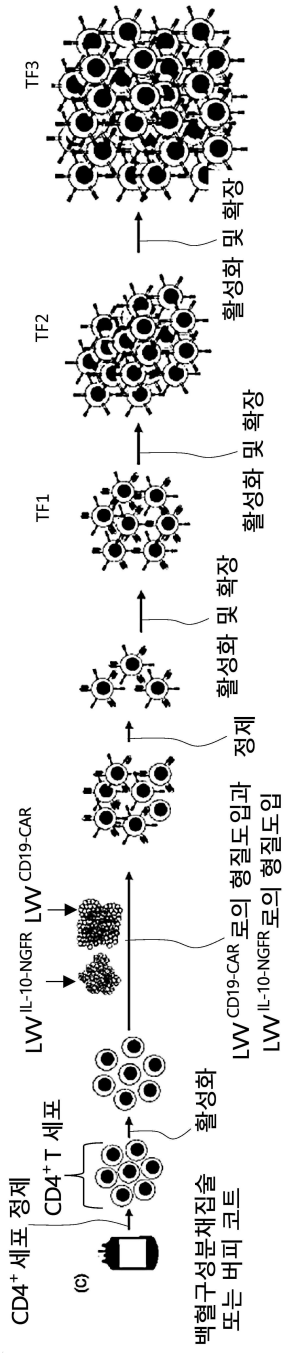
도면5a


CD4+ 세포 정제
CD4+T 세포
(A)
백혈구성분채집술
또는 버피 코트
활성화
LV CD19-CAR
LV IL-10-NGFR
LV CD19-CAR 로의 형질도입
LV IL-10-NGFR로의 형질도입
정제
활성화 및 확장
TF1
활성화 및 확장
TF2
활성화 및 확장
TF3

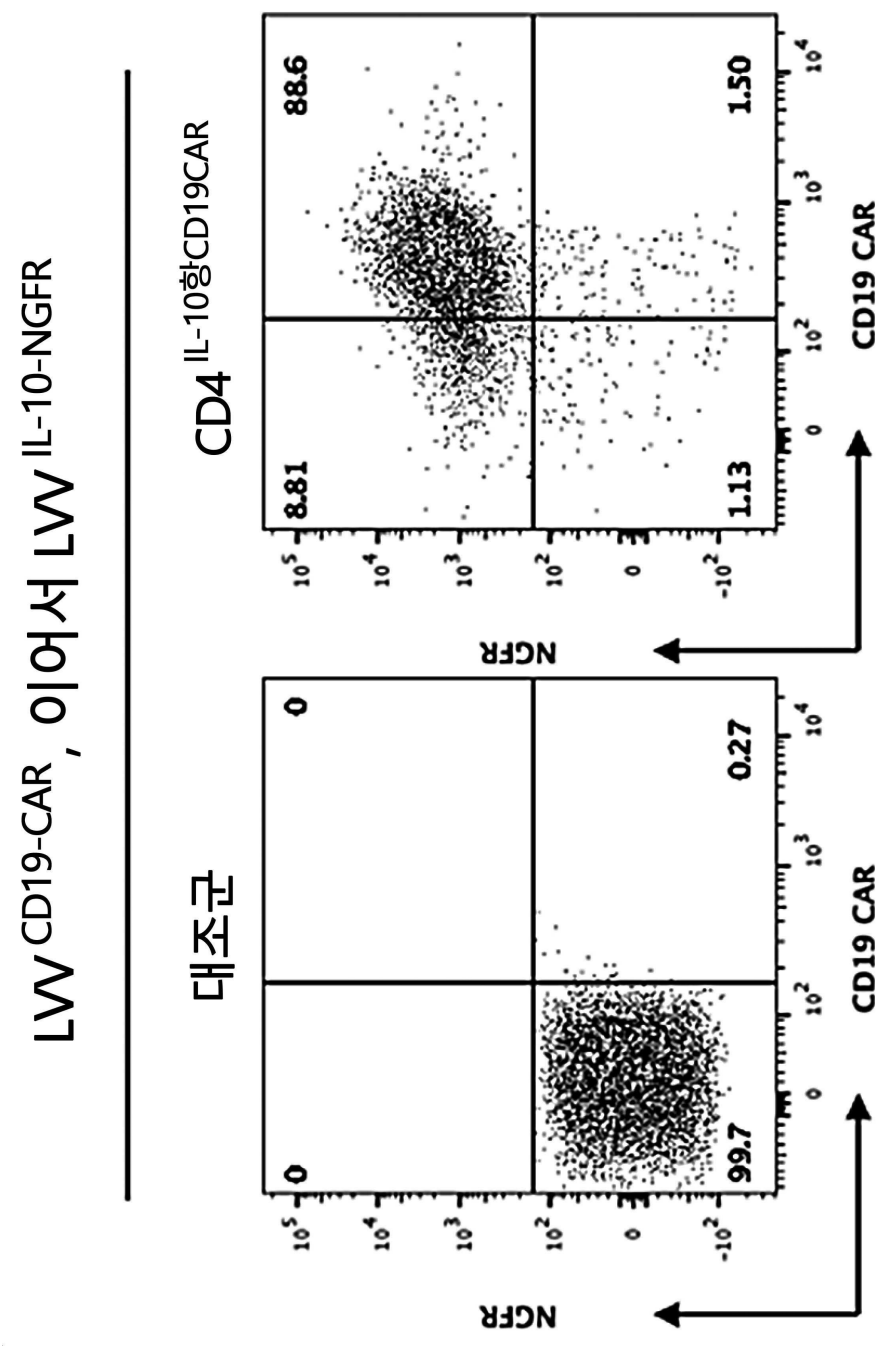
도면5b


백혈구성분채집술
또는 버피 코트
(B)
CD4+ 세포 정제
CD4+ T 세포
활성화
LV IL-10-NGFR
LV CD19-CAR
LV IL-10-NGFR 로의 형질도입
LV CD19-CAR 로의 형질도입
정제
활성화 및 확장
TF1
활성화 및 확장
TF2
활성화 및 확장
TF3

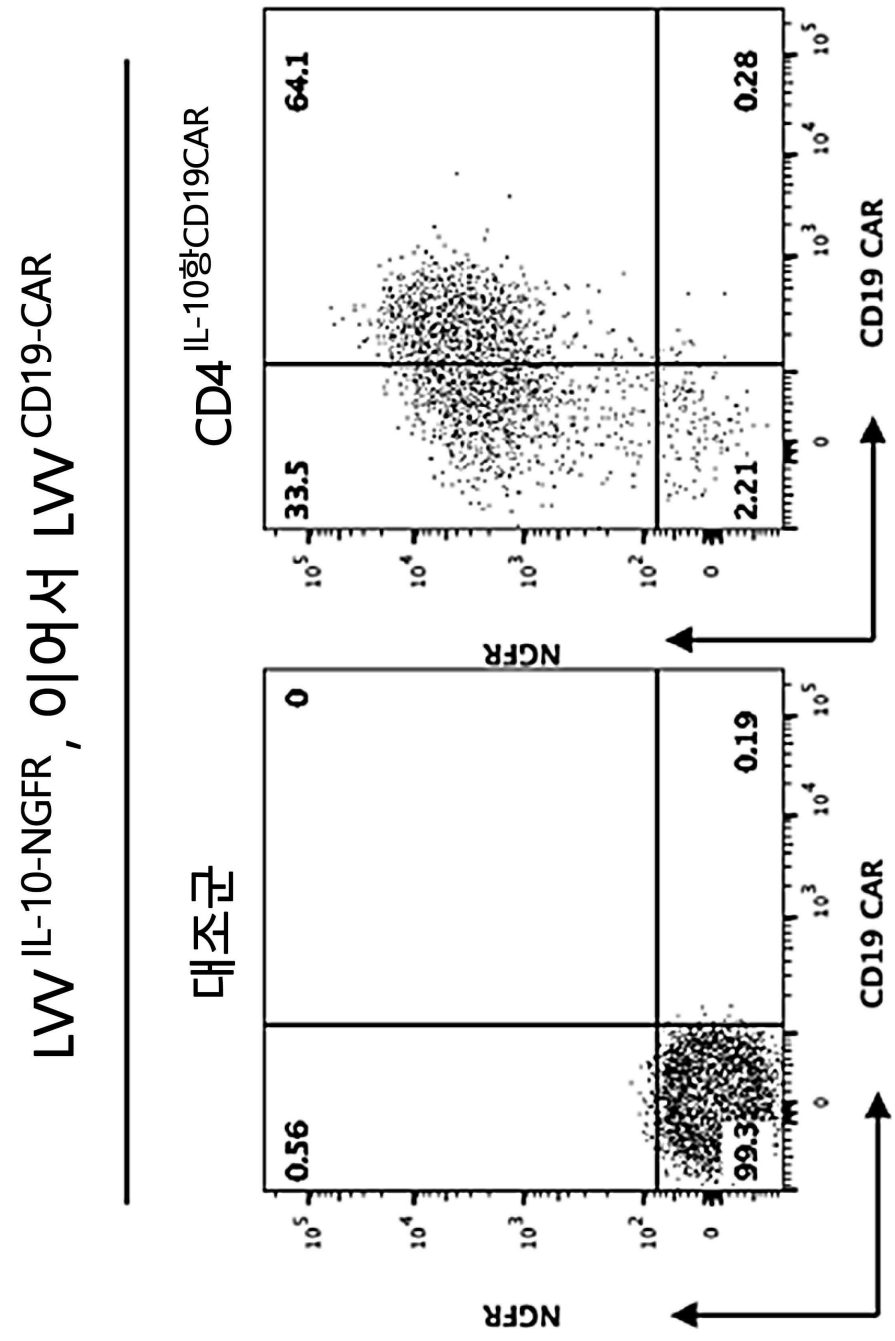
도면5c


CD4+ 세포 정제
CD4+ T 세포
(c)
백혈구성분채집술
또는 버피 코트
활성화
LVV IL-10-NGFR
LVV CD19-CAR
LVV CD19-CAR 로의 형질도입과
LVV IL-10-NGFR 로의 형질도입
정제
활성화 및 확장
TF1
활성화 및 확장
TF2
활성화 및 확장
TF3

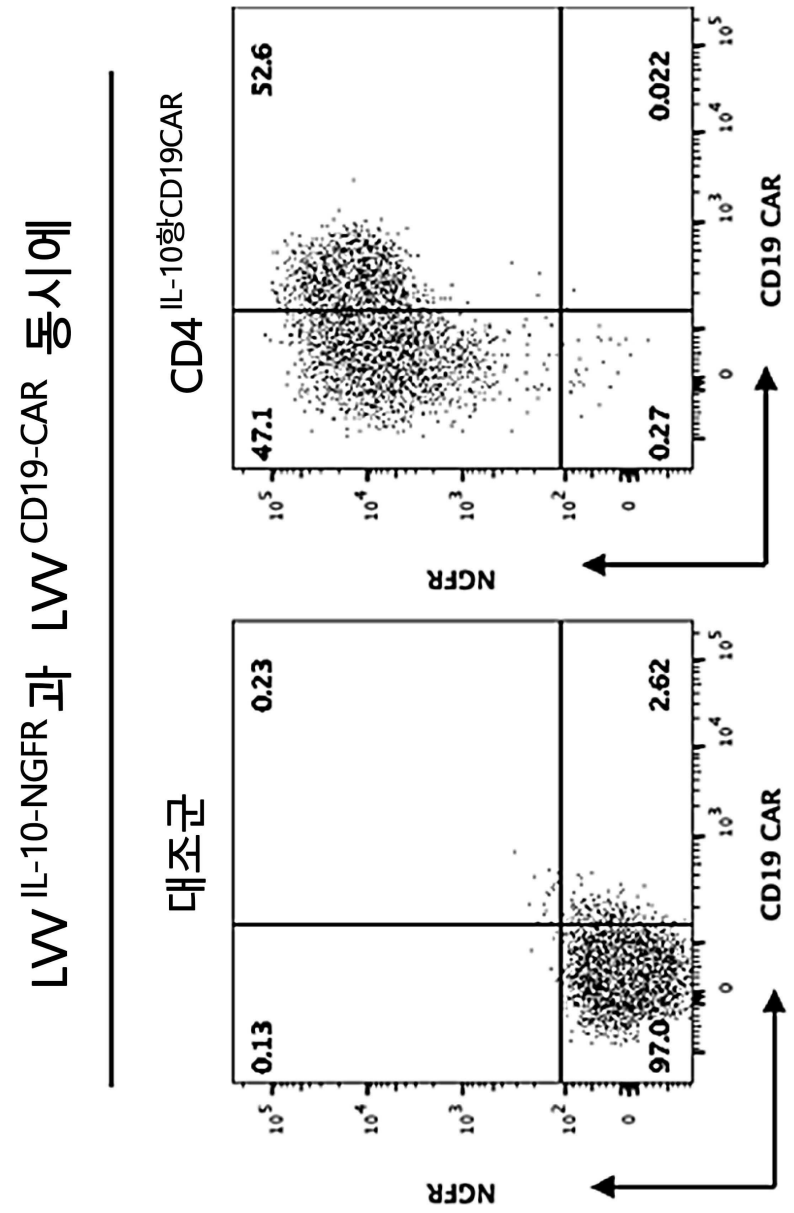
도면6a


LVV CD19-CAR, 이어서 LVV IL-10-NGFR
대조군
CD4 IL-10항CD19CAR
0
0
0.27
99.7
8.81
88.6
1.13
1.50
NGFR
CD19 CAR

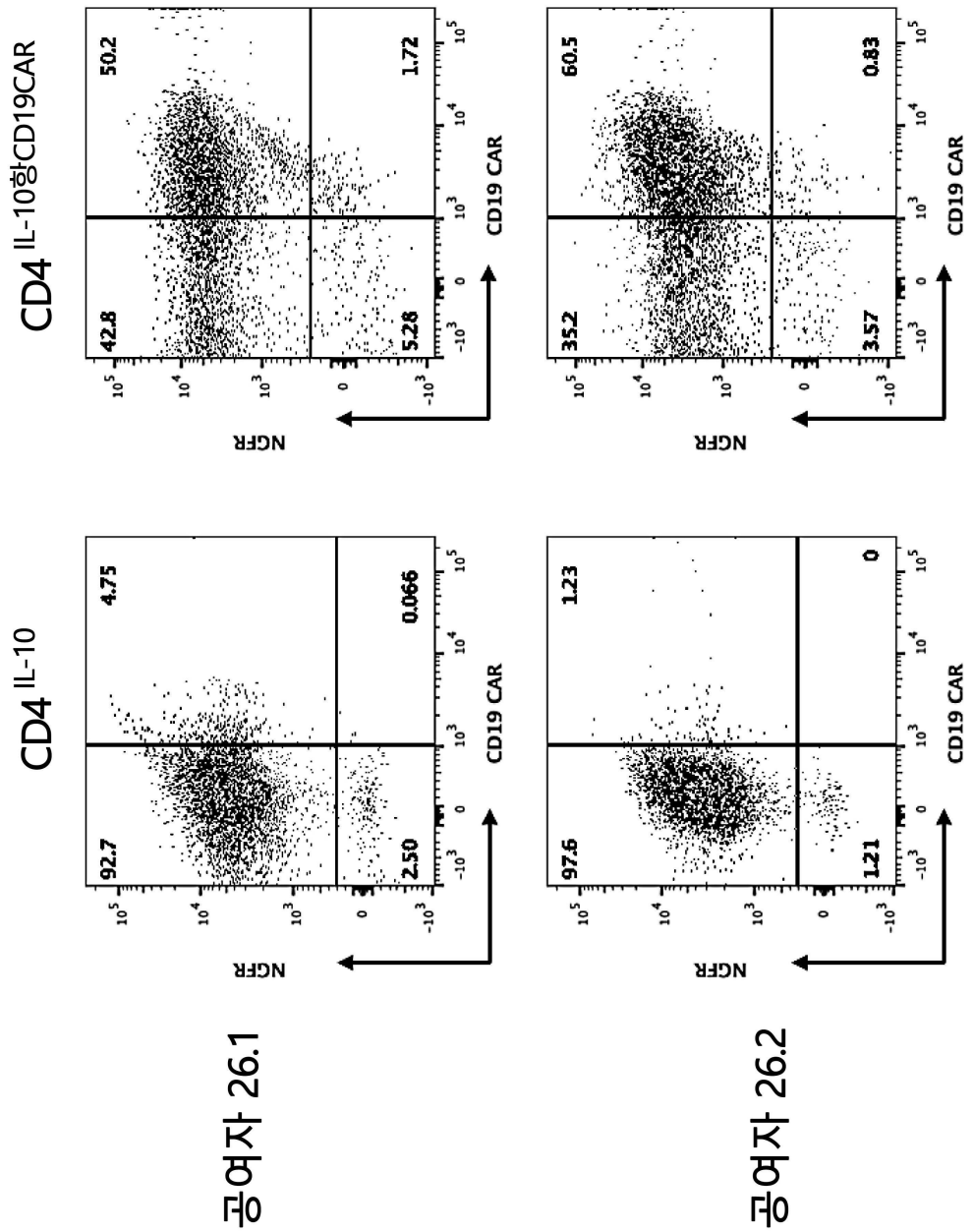
도면6b


LVV IL-10-NGFR, 이어서 LVV CD19-CAR
대조군
CD4 IL-10항CD19CAR
64.1
0.28
33.5
2.21
0
0.19
0.56
99.3
NGFR
CD19 CAR

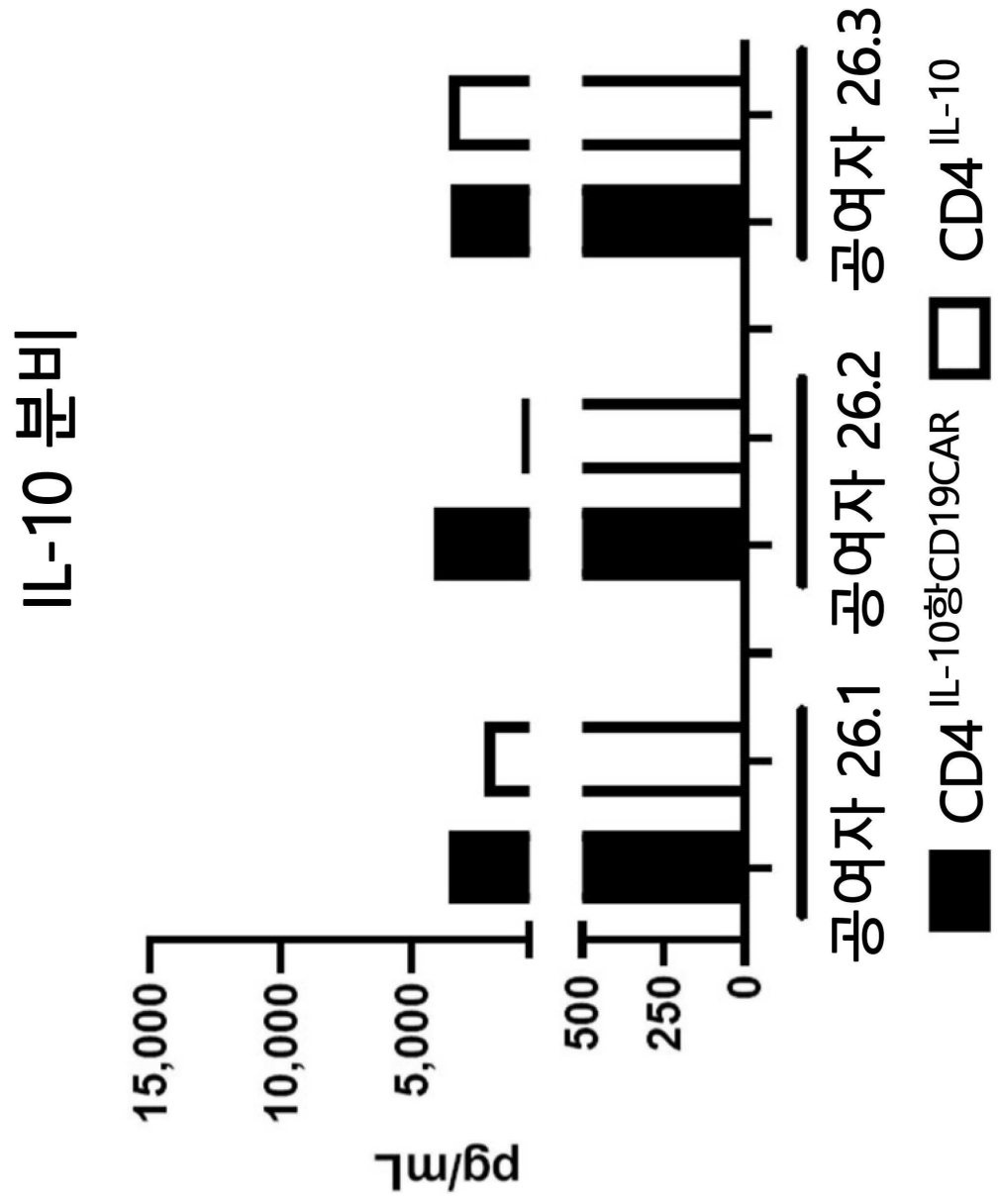
도면6c


LVV IL-10-NGFR과 LVV CD19-CAR 동시에
대조군
CD4 IL-10항CD19CAR
0.13
0.23
97.0
2.62
47.1
52.6
0.27
0.022
NGFR
CD19 CAR

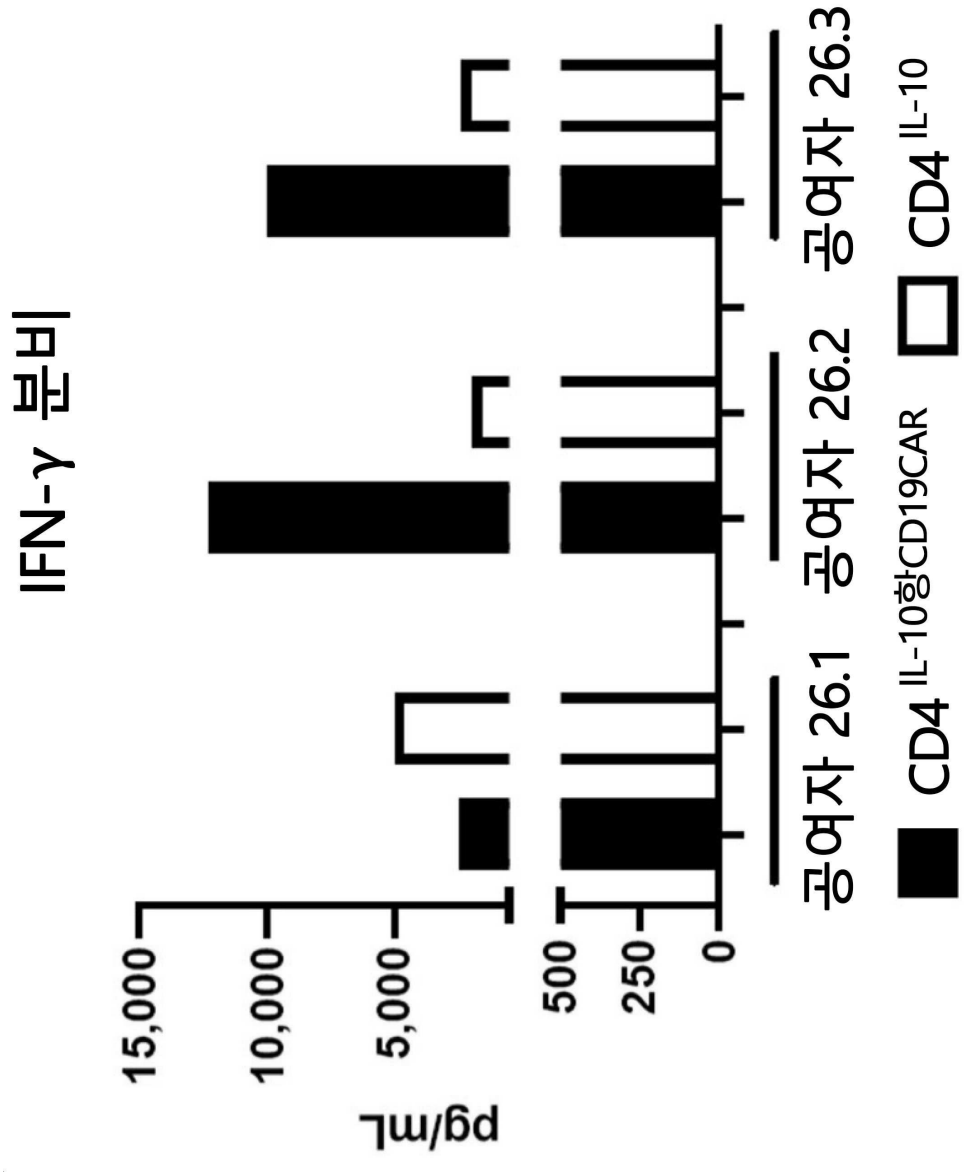
도면7


CD4 IL-10항CD19CAR
CD4 IL-10
NGFR
CD19 CAR
50.2
1.72
42.8
5.28
60.5
0.83
35.2
3.57
4.75
0.066
92.7
2.50
1.23
0
97.6
1.21
공여자 26.1
공여자 26.2

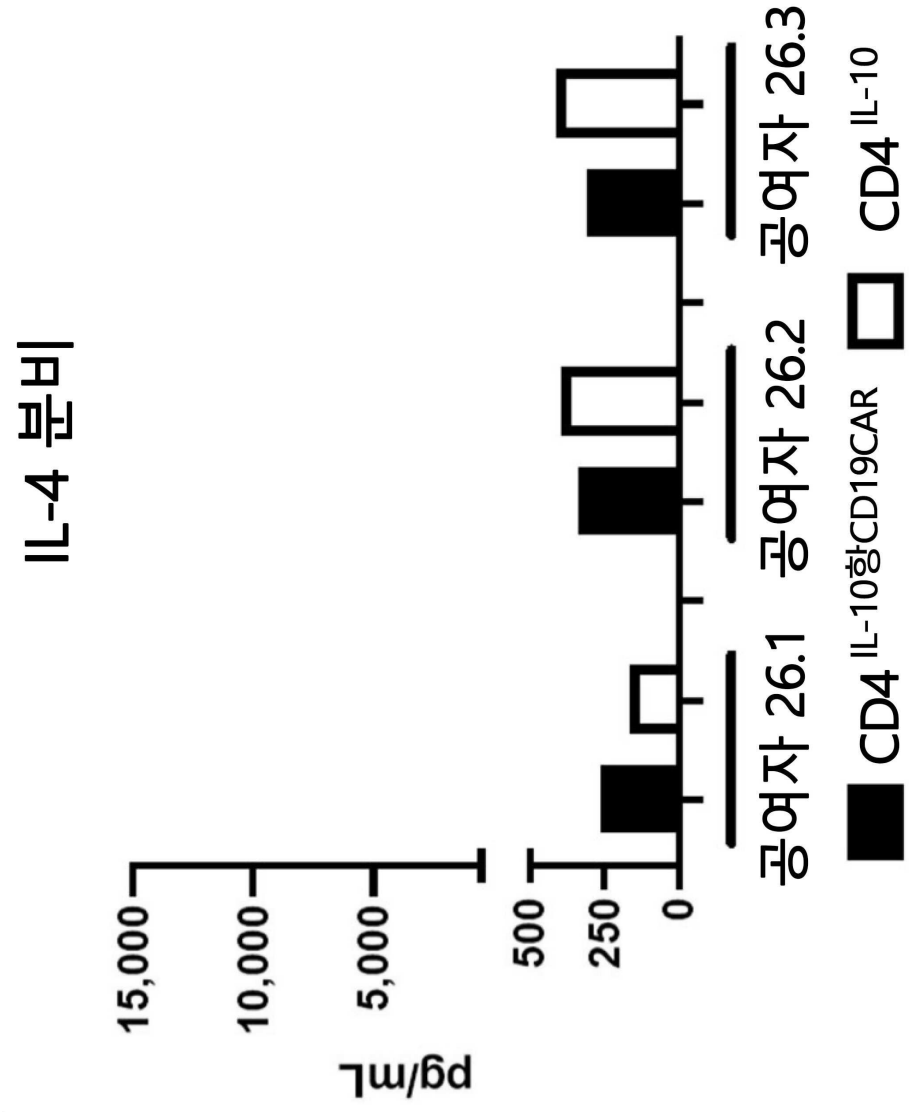
도면8a


IL-10 분비
pg/mL
15,000
10,000
5,000
500
250
0
공여자 26.1
공여자 26.2
공여자 26.3
CD4 IL-10항CD19CAR
CD4 IL-10

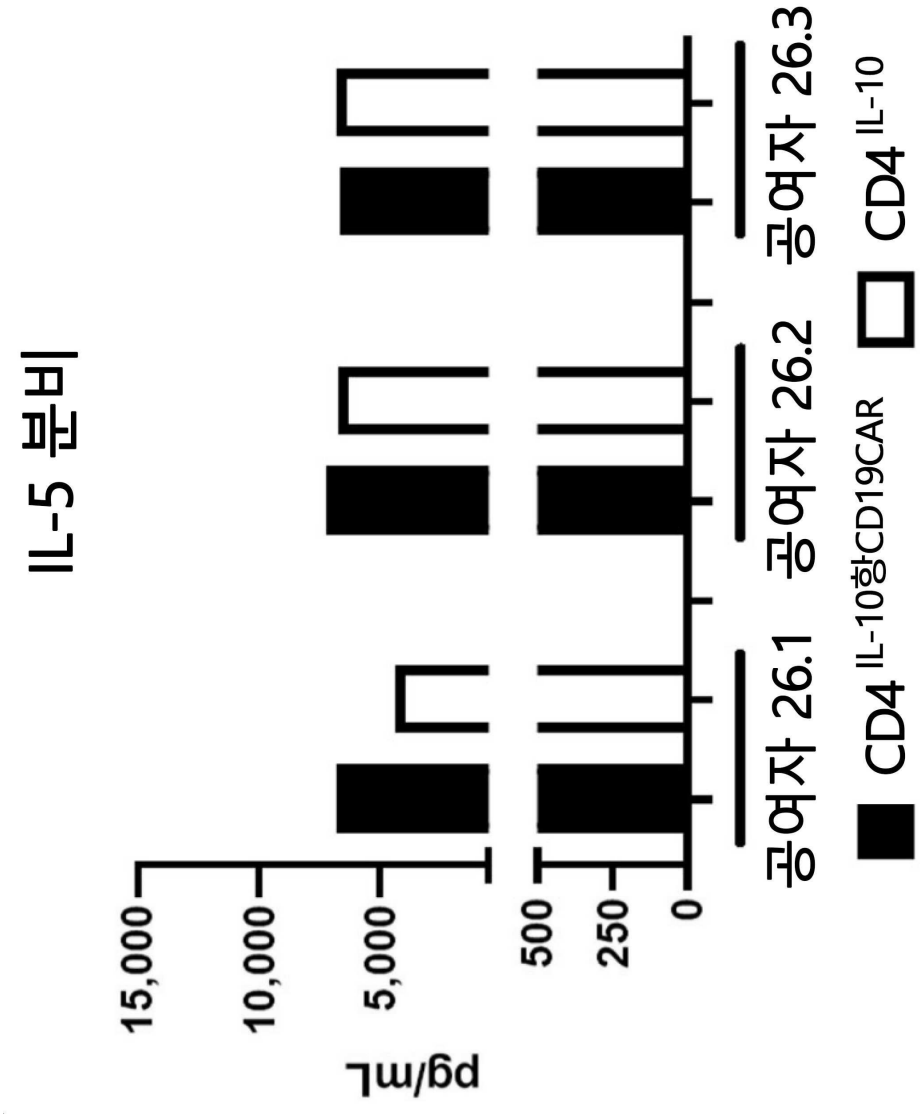
도면8b


IFN-γ 분비
pg/mL
15,000
10,000
5,000
500
250
0
공여자 26.1
공여자 26.2
공여자 26.3
CD4 IL-10항CD19CAR
CD4 IL-10

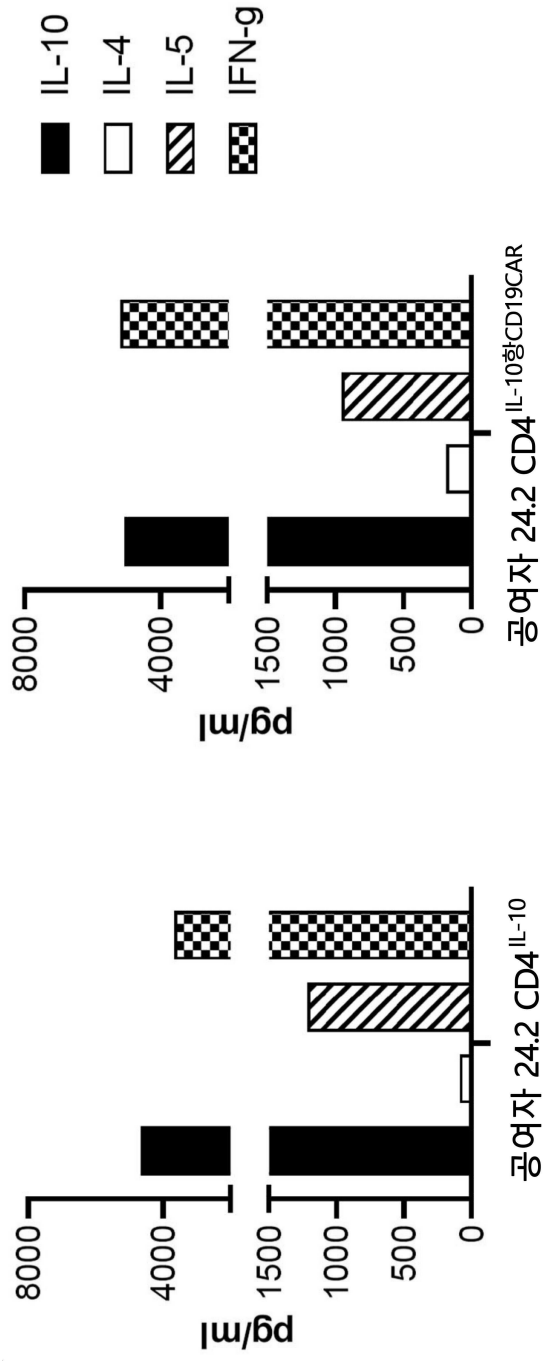
도면8c


IL-4 분비
pg/mL
15,000
10,000
5,000
500
250
0
공여자 26.1
공여자 26.2
공여자 26.3
CD4 IL-10항CD19CAR
CD4 IL-10

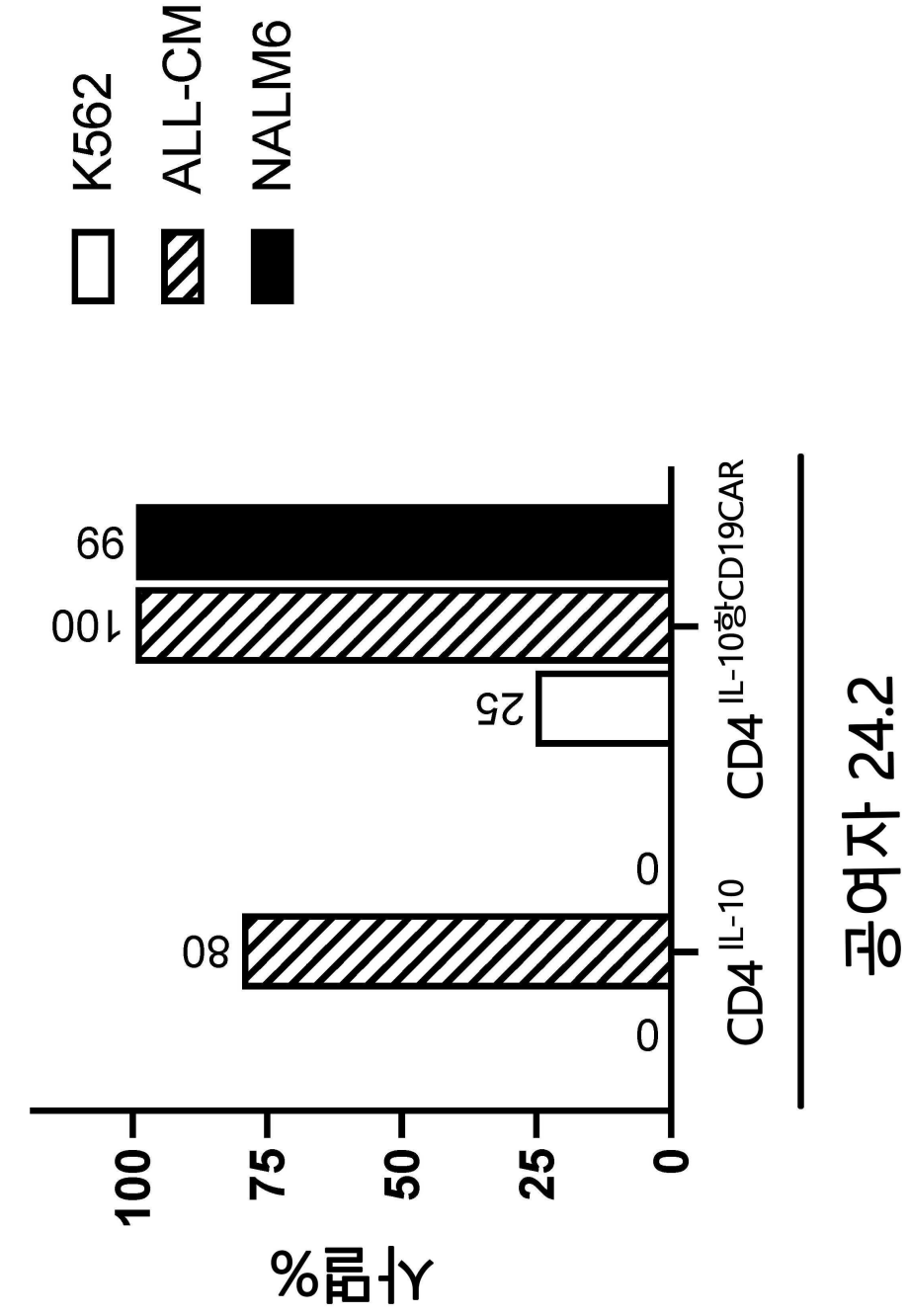
도면8d


IL-5 분비
pg/mL
15,000
10,000
5,000
500
250
0
공여자 26.1
공여자 26.2
공여자 26.3
CD4 IL-10항CD19CAR
CD4 IL-10

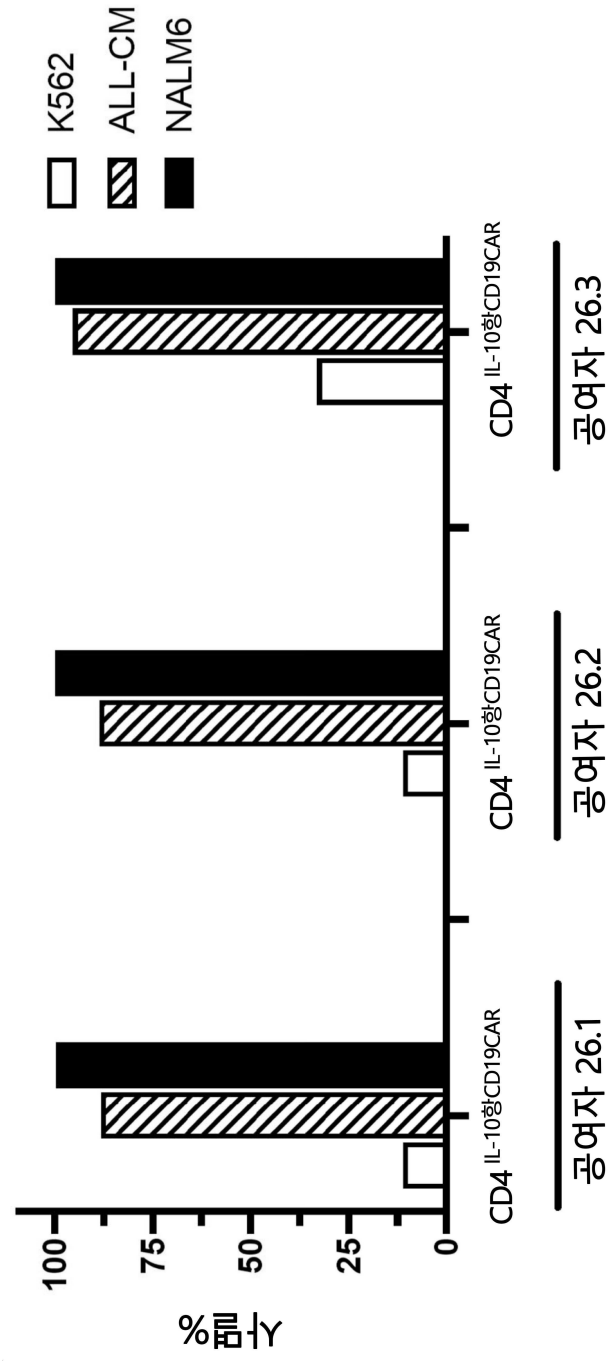
도면9


IL-10
IL-4
IL-5
IFN-g
pg/ml
8000
4000
1500
1000
500
0
공여자 24.2 CD4IL-10항CD19CAR
공여자 24.2 CD4IL-10

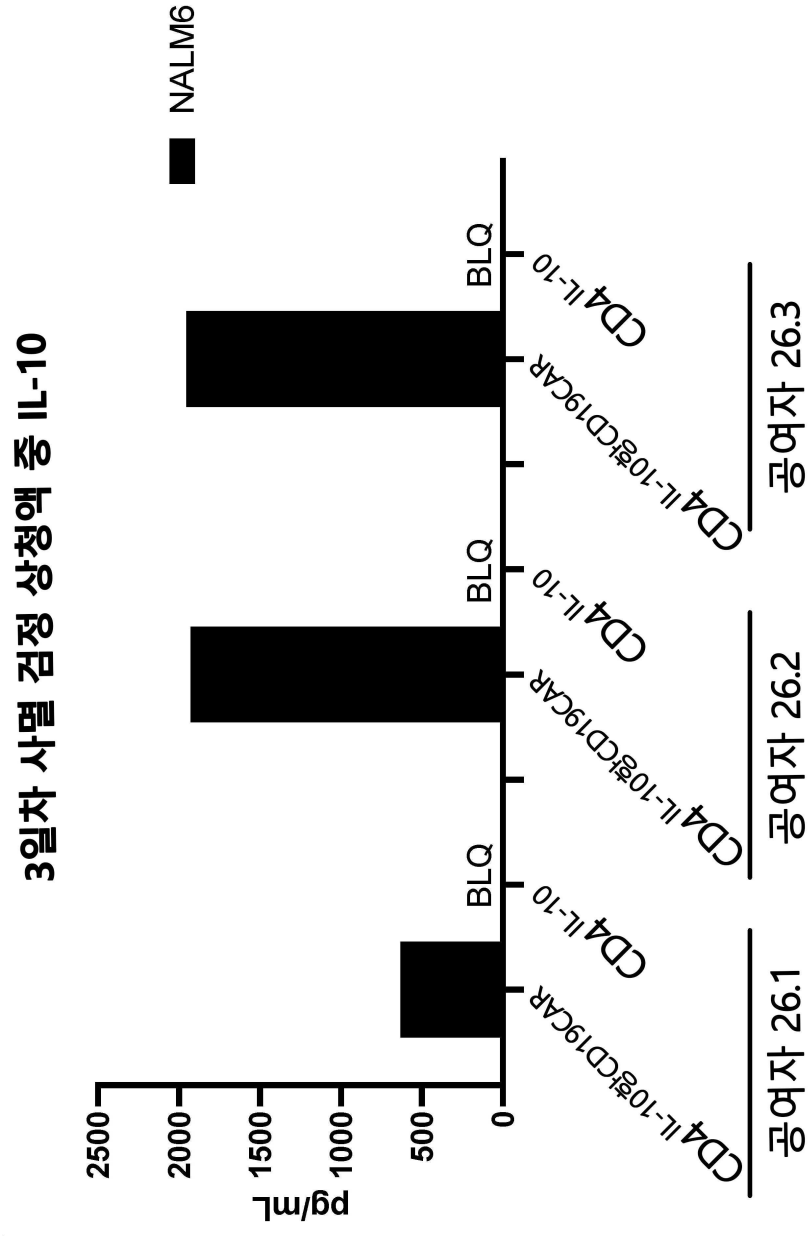
도면10


K562
ALL-CM
NALM6
%세포사
100
75
50
25
0
공여자 24.2
CD4 IL-10
CD4 IL-10항CD19CAR
0
80
0
25
100
99

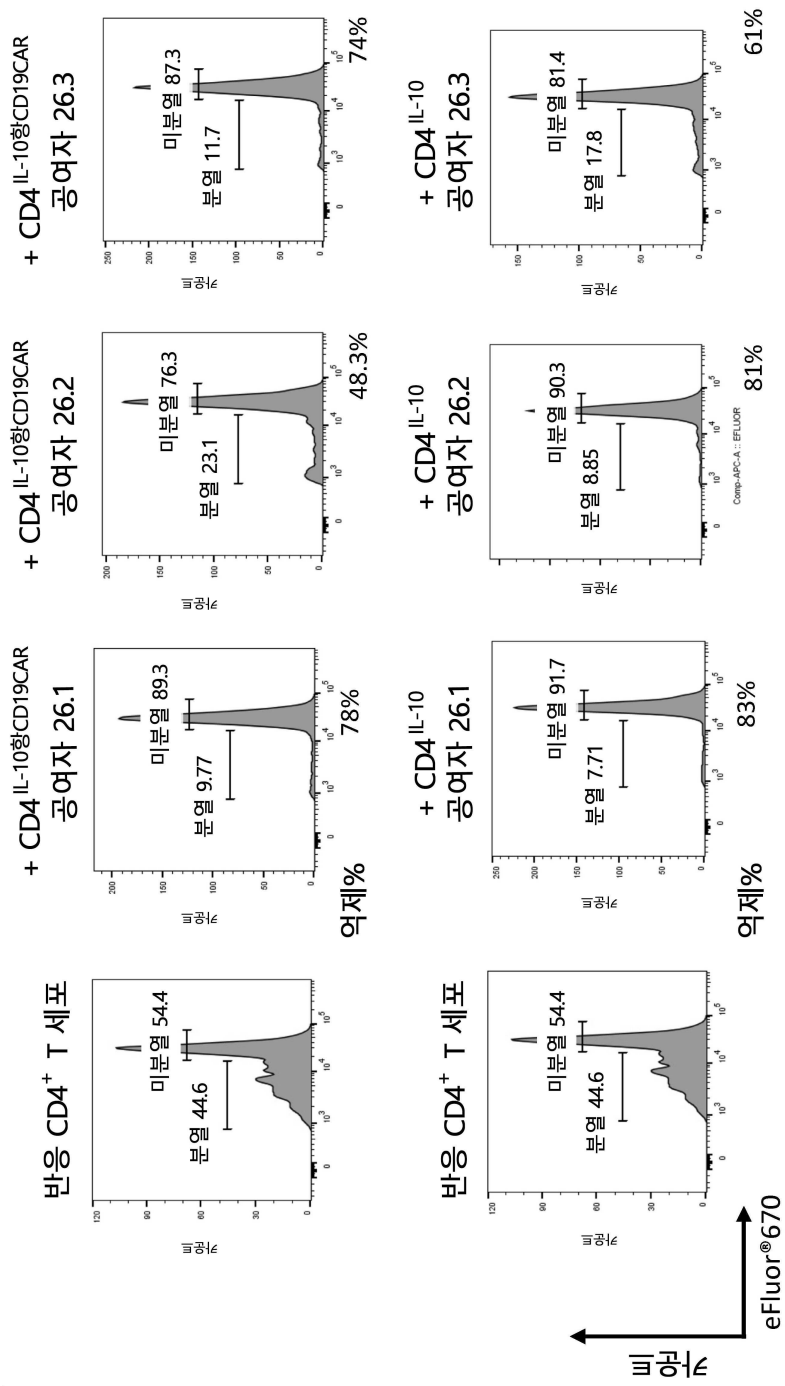
도면11a


K562
ALL-CM
NALM6
%용해
100
75
50
25
0
CD4 IL-10항CD19CAR
CD4 IL-10항CD19CAR
CD4 IL-10항CD19CAR
공여자 26.1
공여자 26.2
공여자 26.3

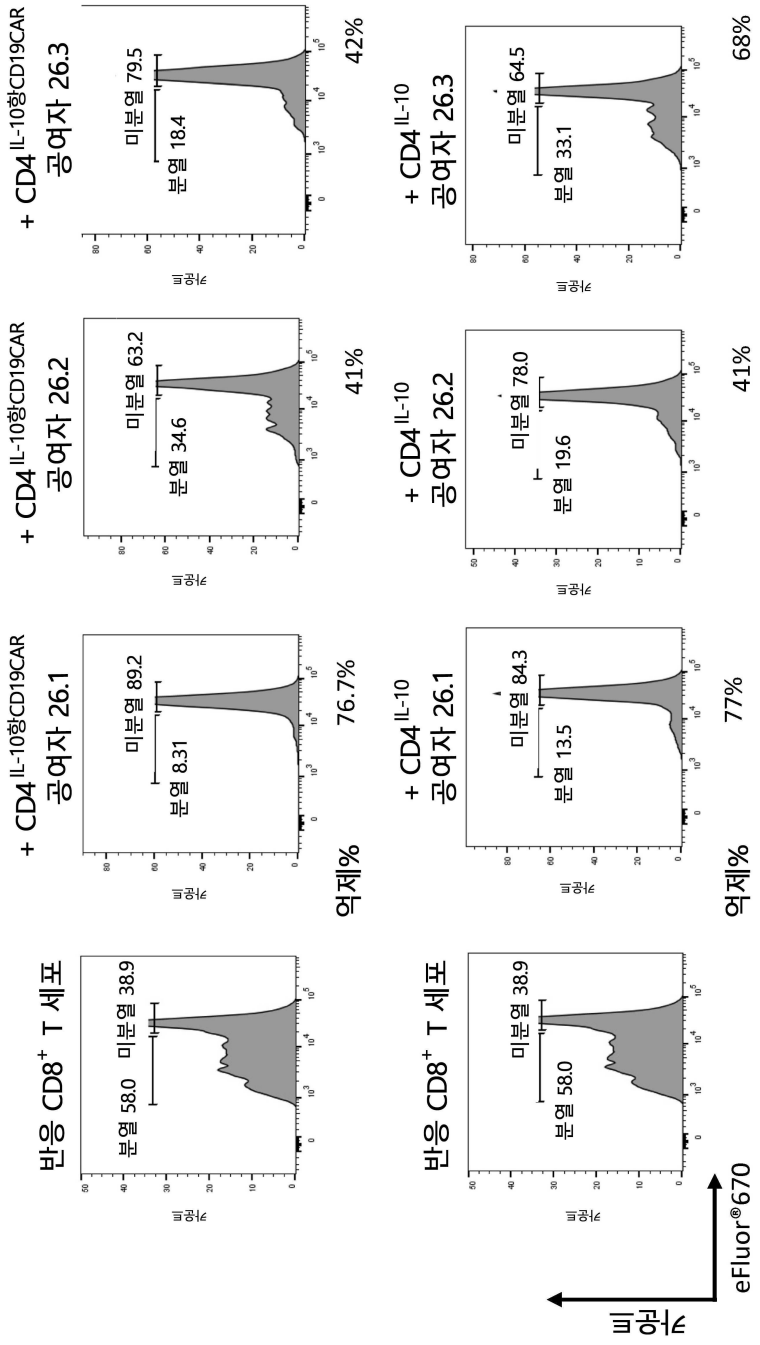
도면11b


3일차 사멸 검정 상청액 중 IL-10
NALM6
pg/mL
2500
2000
1500
1000
500
0
BLQ
BLQ
BLQ
CD4 IL-10
CD4 IL-10양CD19CAR
CD4 IL-10
CD4 IL-10양CD19CAR
CD4 IL-10
CD4 IL-10양CD19CAR
공여자 26.1
공여자 26.2
공여자 26.3

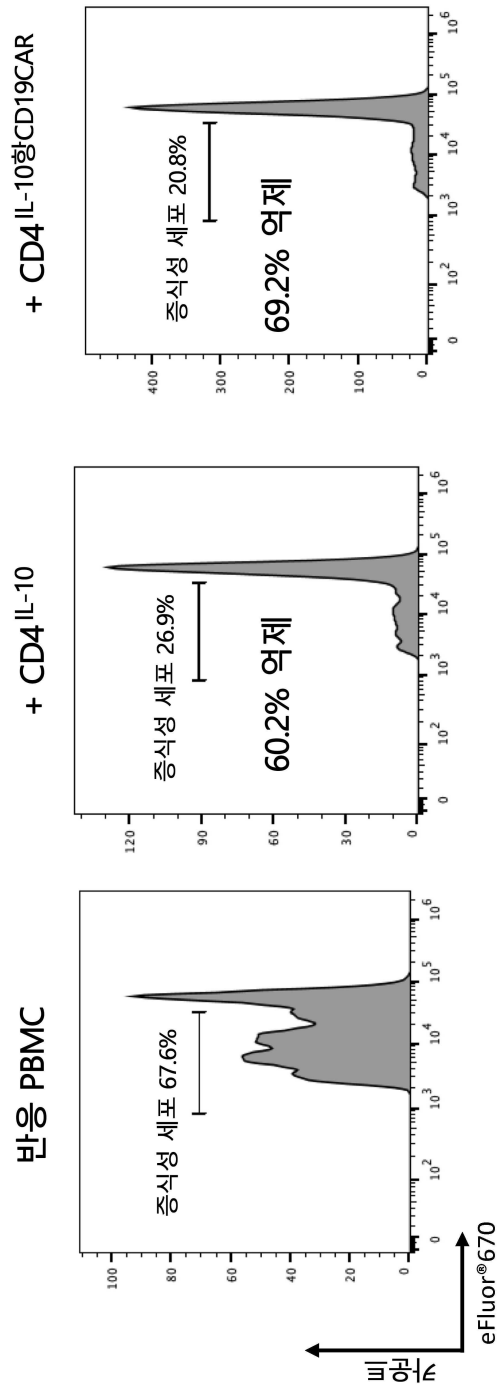
도면12


반응 CD4+ T 세포
+ CD4 IL-10항CD19CAR 공여자 26.1
+ CD4 IL-10항CD19CAR 공여자 26.2
+ CD4 IL-10항CD19CAR 공여자 26.3
+ CD4 IL-10 공여자 26.1
+ CD4 IL-10 공여자 26.2
+ CD4 IL-10 공여자 26.3
미분열 54.4
분열 44.6
미분열 89.3
분열 9.77
78%
미분열 76.3
분열 23.1
48.3%
미분열 87.3
분열 11.7
74%
미분열 91.7
분열 7.71
83%
미분열 90.3
분열 8.85
81%
미분열 81.4
분열 17.8
61%
억제%
카운트
eFluor®670

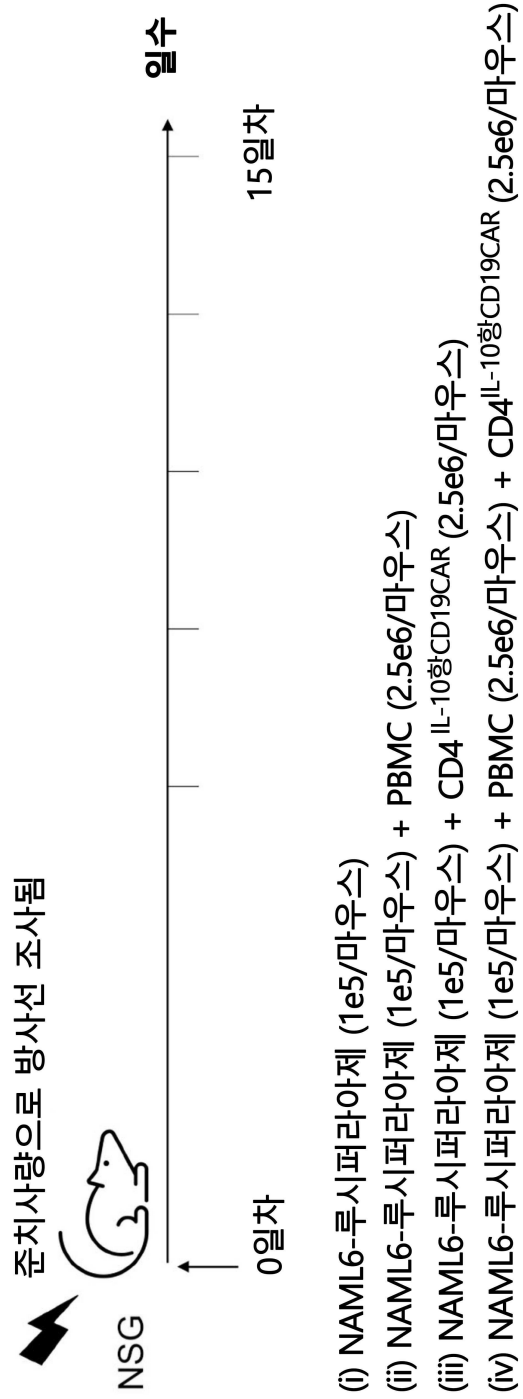
도면13


반응 CD8+ T 세포
분열 58.0
미분열 38.9
억제%
+ CD4 IL-10항CD19CAR 공여자 26.1
미분열 89.2
분열 8.31
76.7%
+ CD4 IL-10항CD19CAR 공여자 26.2
미분열 63.2
분열 34.6
41%
+ CD4 IL-10항CD19CAR 공여자 26.3
미분열 79.5
분열 18.4
42%
반응 CD8+ T 세포
분열 58.0
미분열 38.9
억제%
+ CD4 IL-10 공여자 26.1
미분열 84.3
분열 13.5
77%
+ CD4 IL-10 공여자 26.2
미분열 78.0
분열 19.6
41%
+ CD4 IL-10 공여자 26.3
미분열 64.5
분열 33.1
68%
카운트
eFluor®670

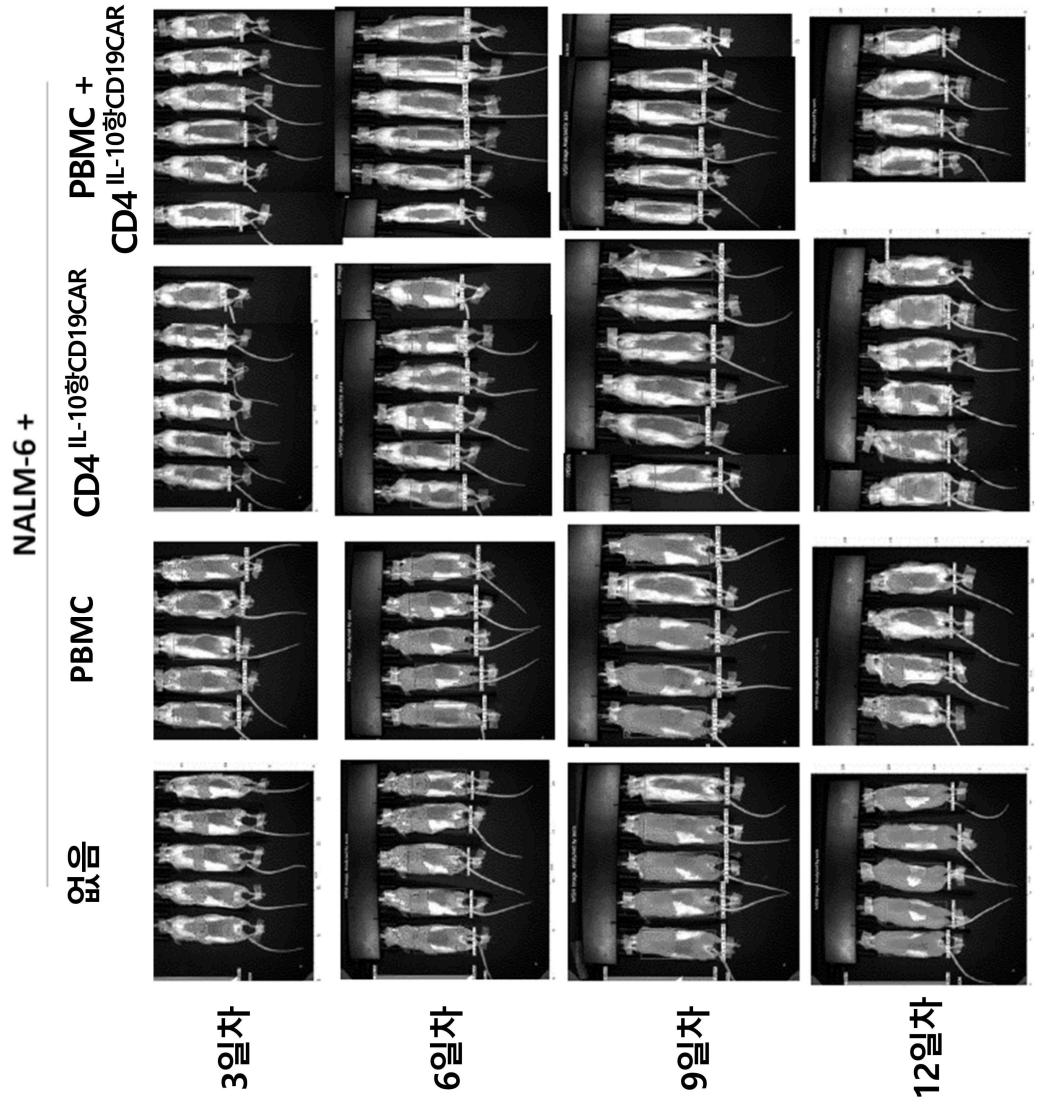
도면14


반응 PBMC
+ CD4 IL-10
+ CD4 IL-10항CD19CAR
증식성 세포 67.6%
증식성 세포 26.9%
60.2% 억제
증식성 세포 20.8%
69.2% 억제
카운트
eFluor®670

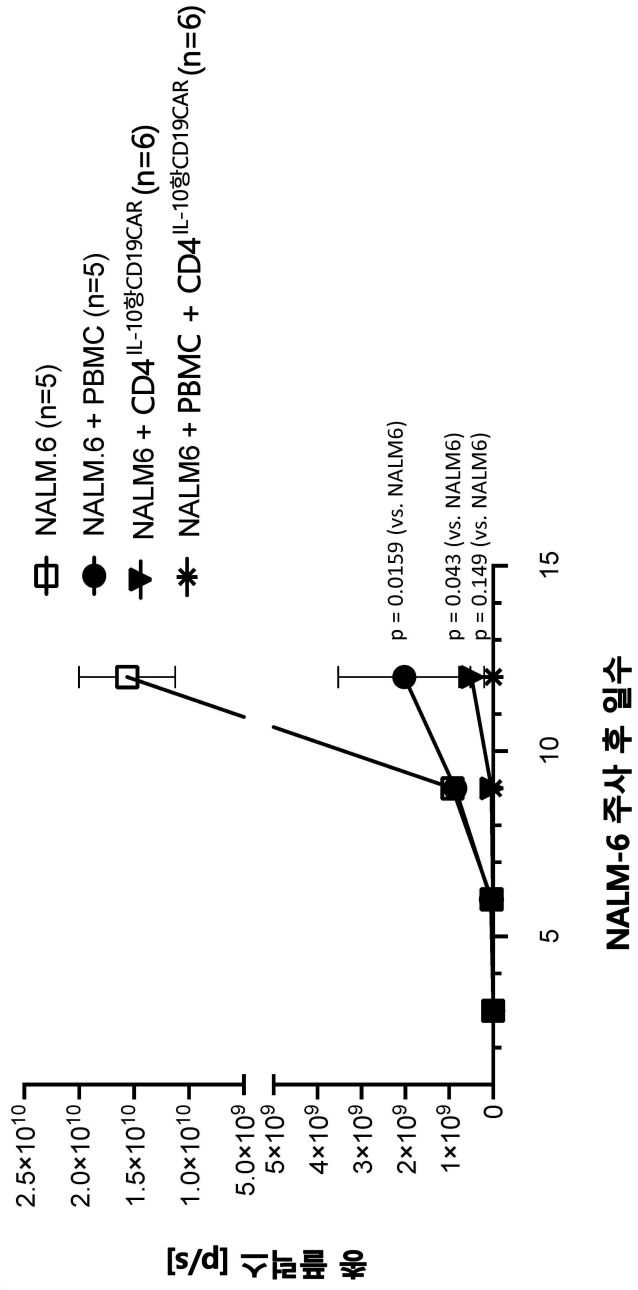
도면15


준치사량으로 방사선 조사됨
NSG
일수
0일차
15일차
(i) NAML6-루시퍼라아제 (1e5/마우스)
(ii) NAML6-루시퍼라아제 (1e5/마우스) + PBMC (2.5e6/마우스)
(iii) NAML6-루시퍼라아제 (1e5/마우스) + CD4 IL-10항CD19CAR (2.5e6/마우스)
(iv) NAML6-루시퍼라아제 (1e5/마우스) + PBMC (2.5e6/마우스) + CD4 IL-10항CD19CAR (2.5e6/마우스)

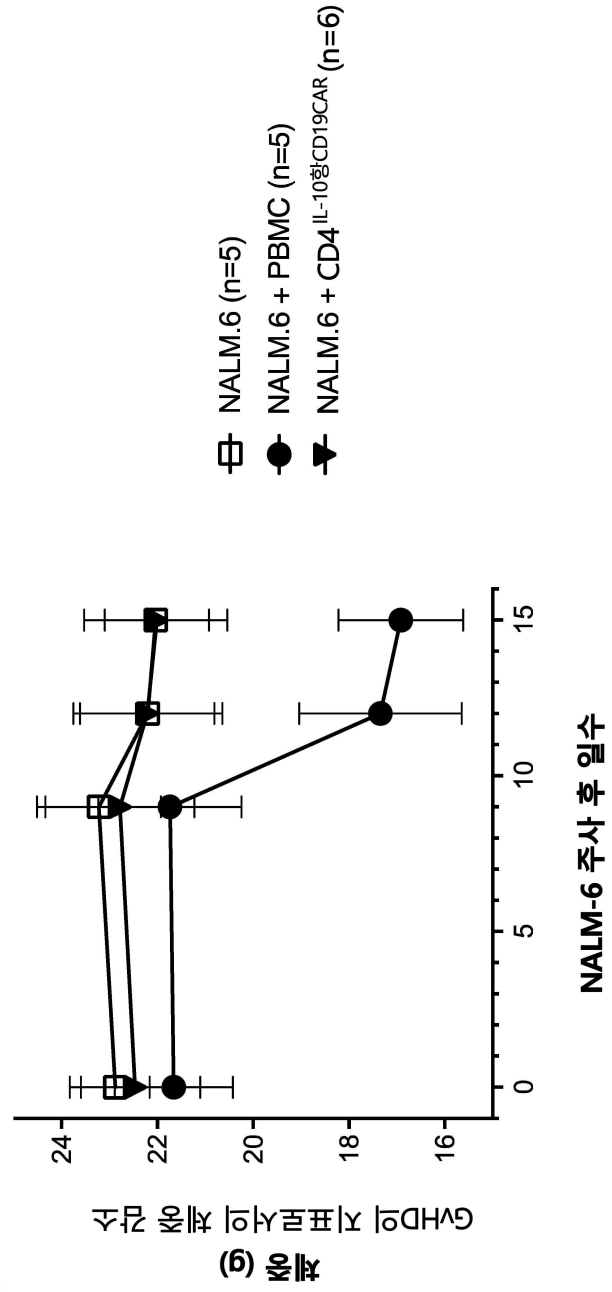
도면16a


NALM-6 +
없음
PBMC
CD4 IL-10항CD19CAR
PBMC + CD4 IL-10항CD19CAR
3일차
6일차
9일차
12일차

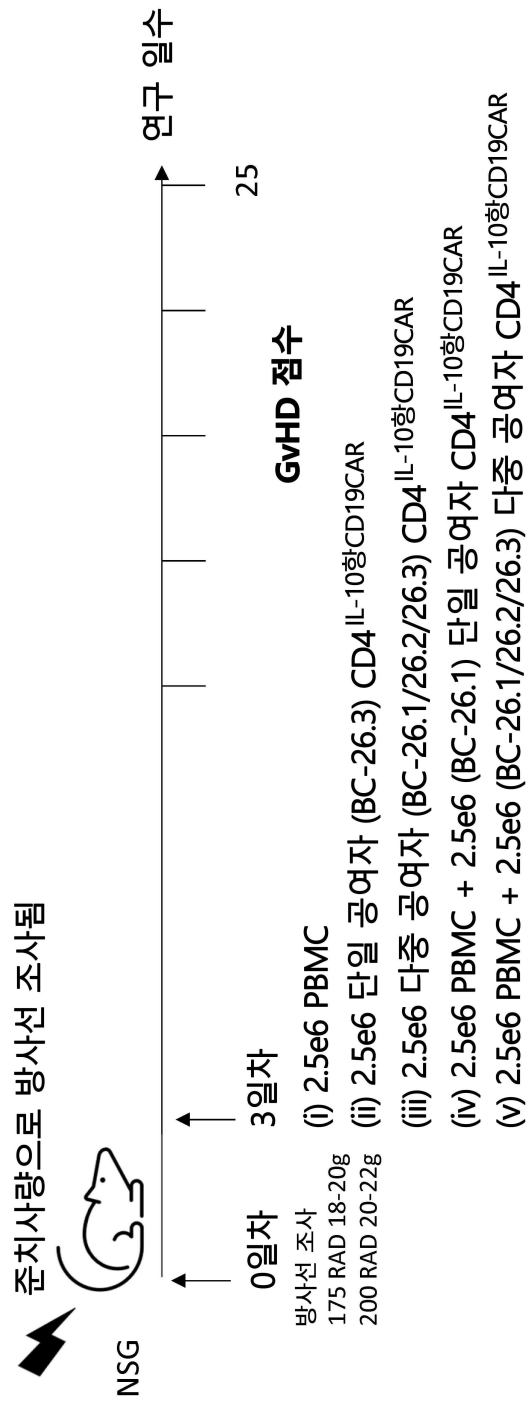
도면16b


NALM.6 (n=5)
NALM.6 + PBMC (n=5)
NALM6 + CD4 IL-10항CD19CAR (n=6)
NALM6 + PBMC + CD4 IL-10항CD19CAR (n=6)
p = 0.0159 (vs. NALM6)
p = 0.043 (vs. NALM6)
p = 0.149 (vs. NALM6)
생 플럭스 [p/s]
NALM-6 주사 후 일수

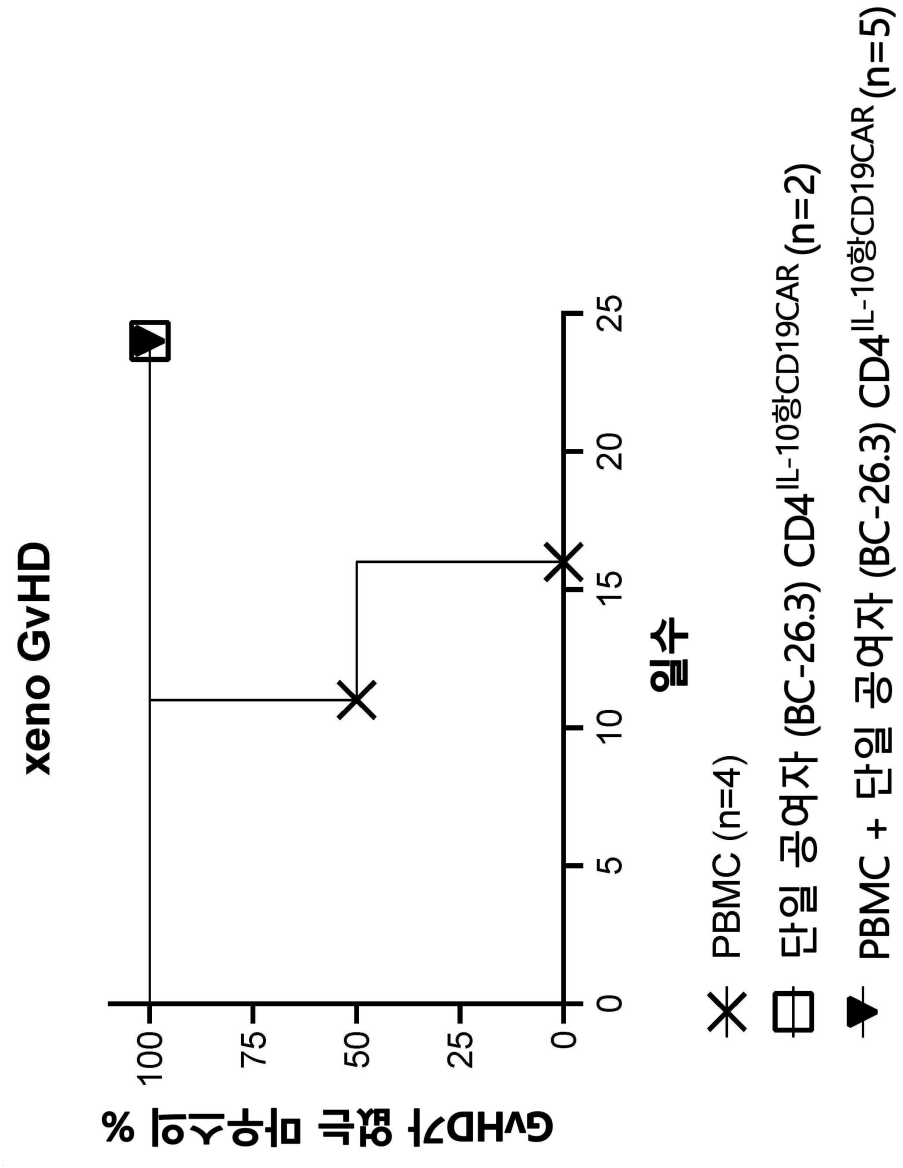
도면17


NALM.6 (n=5)
NALM.6 + PBMC (n=5)
NALM.6 + CD4IL-10항CD19CAR (n=6)
체중 (g)
GvHD의 지표로서의 체중 감소
24
22
20
18
16
0
5
10
15
NALM-6 주사 후 일수

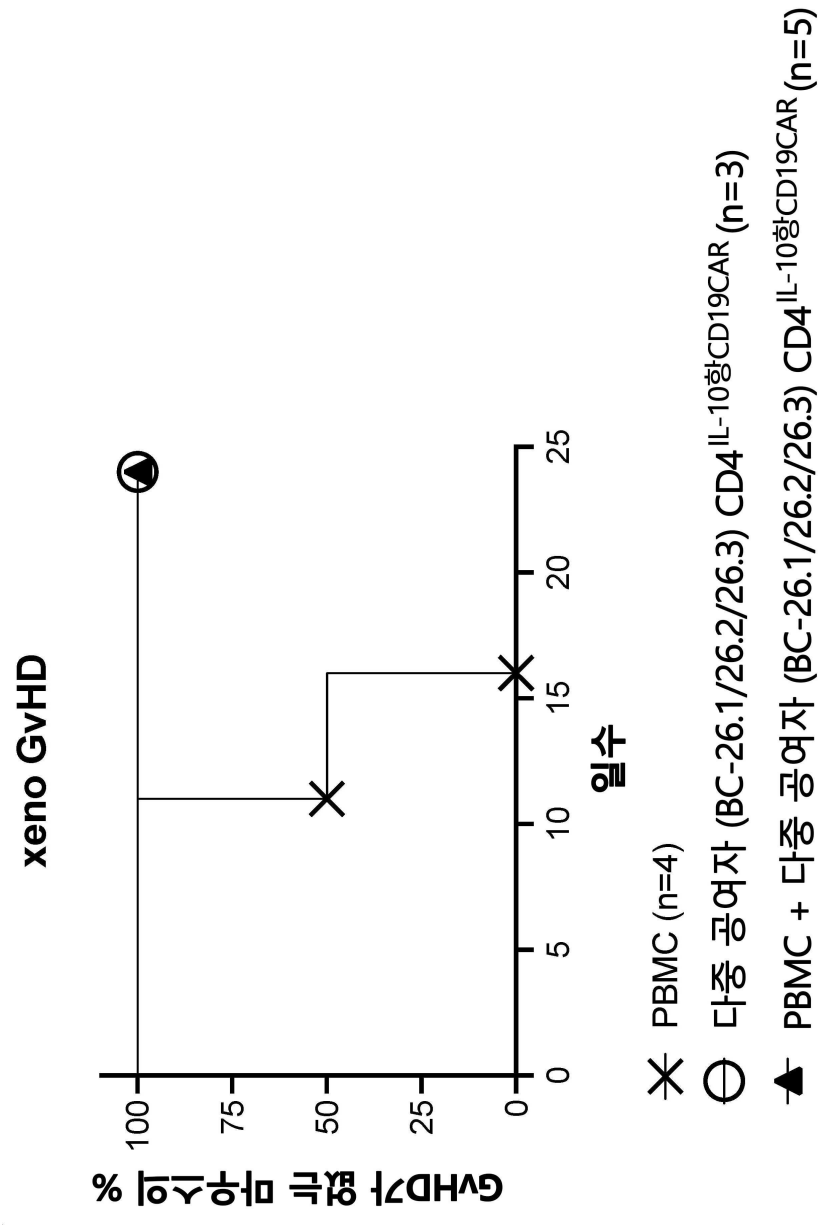
도면18a


준치사량으로 방사선 조사됨
NSG
0일차
방사선 조사
175 RAD 18-20g
200 RAD 20-22g
3일차
(i) 2.5e6 PBMC
(ii) 2.5e6 단일 공여자 (BC-26.3) CD4IL-10항CD19CAR
(iii) 2.5e6 다중 공여자 (BC-26.1/26.2/26.3) CD4IL-10항CD19CAR
(iv) 2.5e6 PBMC + 2.5e6 (BC-26.1) 단일 공여자 CD4IL-10항CD19CAR
(v) 2.5e6 PBMC + 2.5e6 (BC-26.1/26.2/26.3) 다중 공여자 CD4IL-10항CD19CAR
GvHD 점수
25
연구 일수

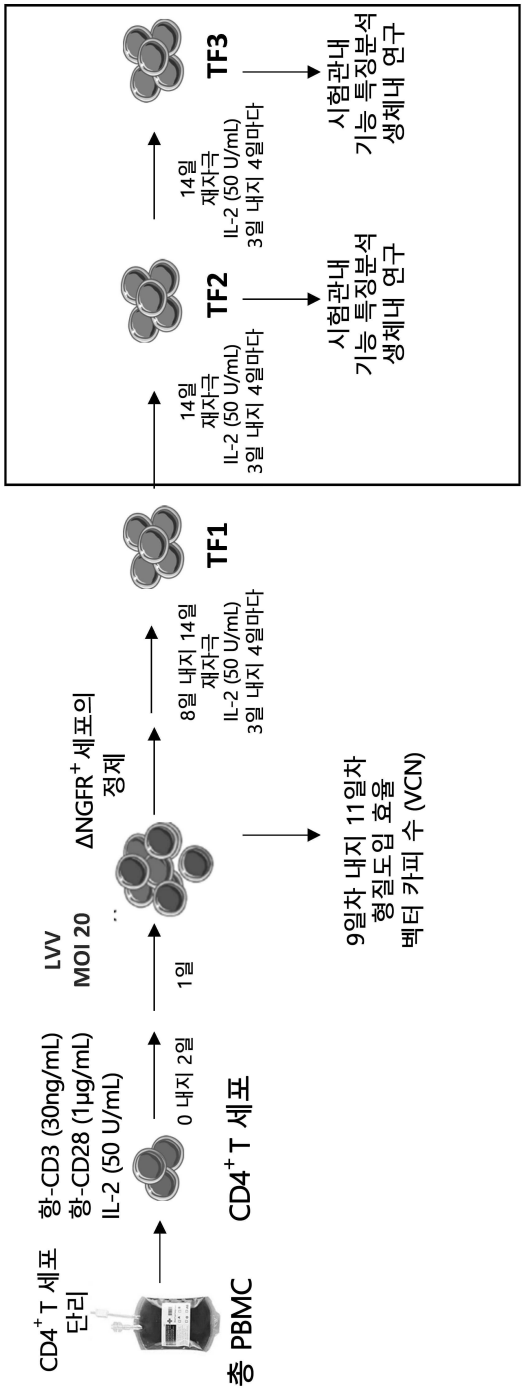
도면18b


xeno GvHD
GvHD가 없는 마우스의 %
100
75
50
25
0
0
5
10
15
20
25
일수
PBMC (n=4)
단일 공여자 (BC-26.3) CD4IL-10항CD19CAR (n=2)
PBMC + 단일 공여자 (BC-26.3) CD4IL-10항CD19CAR (n=5)

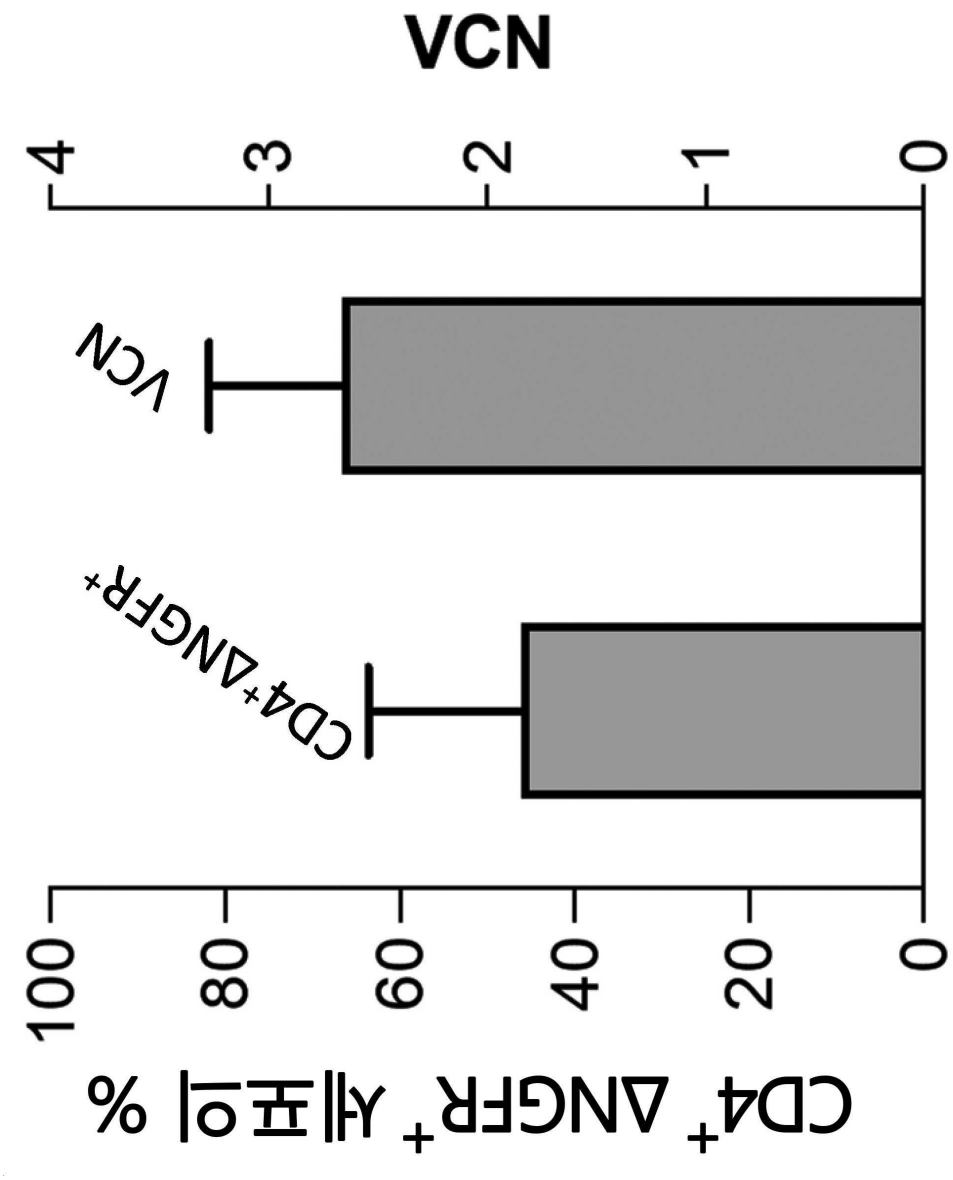
도면18c


xeno GvHD
GvHD가 없는 마우스의 %
100
75
50
25
0
0
5
10
15
20
25
일수
PBMC (n=4)
다중 공여자 (BC-26.1/26.2/26.3) CD4IL-10항CD19CAR (n=3)
PBMC + 다중 공여자 (BC-26.1/26.2/26.3) CD4IL-10항CD19CAR (n=5)

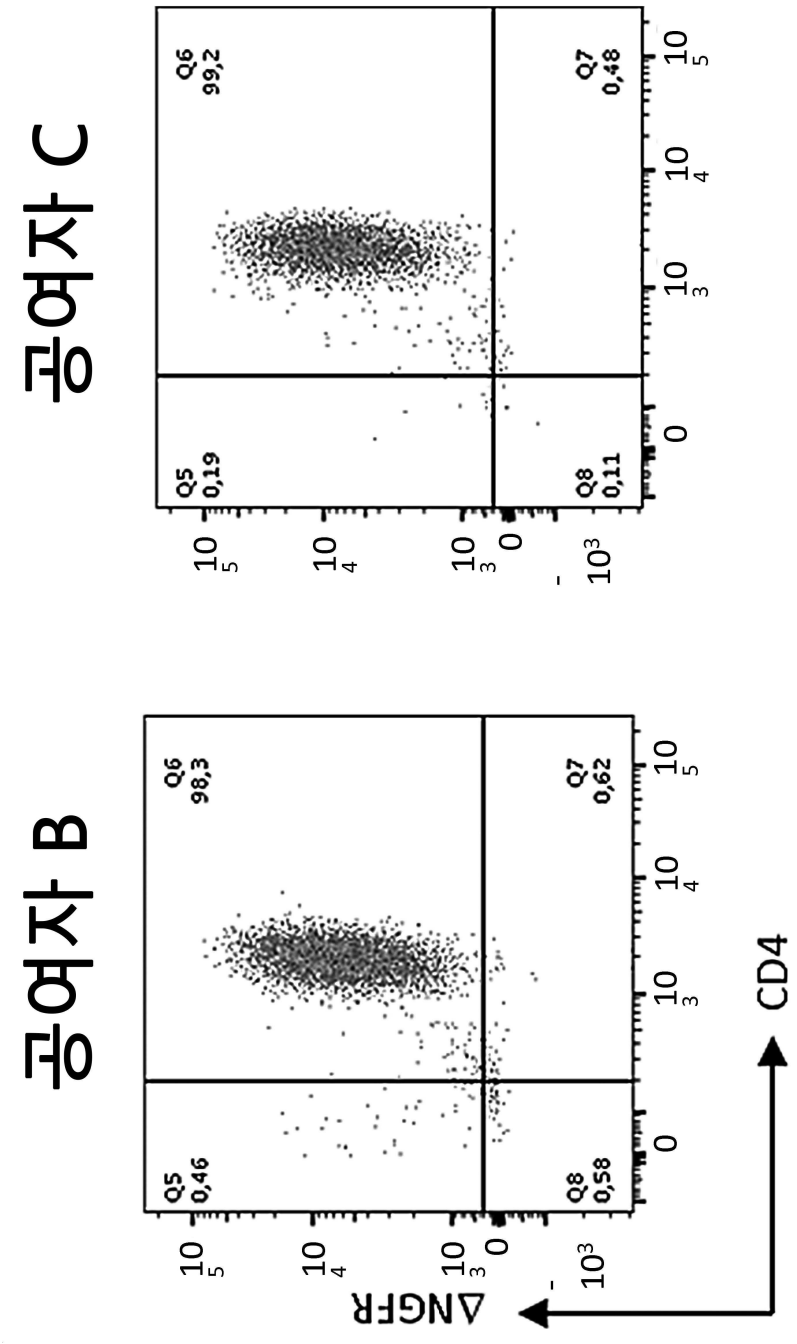
도면19


CD4+ T 세포
단리
총 PBMC
항-CD3 (30ng/mL)
항-CD28 (1μg/mL)
IL-2 (50 U/mL)
CD4+ T 세포
0 내지 2일
LVV
MOI 20
1일
ΔNGFR+ 세포의
정제
8일 내지 14일
재자극
IL-2 (50 U/mL)
3일 내지 4일마다
TF1
9일차 내지 11일차
형질도입 효율
벡터 카피 수 (VCN)
14일
재자극
IL-2 (50 U/mL)
3일 내지 4일마다
TF2
시험관내
기능 특징분석
생체내 연구
14일
재자극
IL-2 (50 U/mL)
3일 내지 4일마다
TF3
시험관내
기능 특징분석
생체내 연구

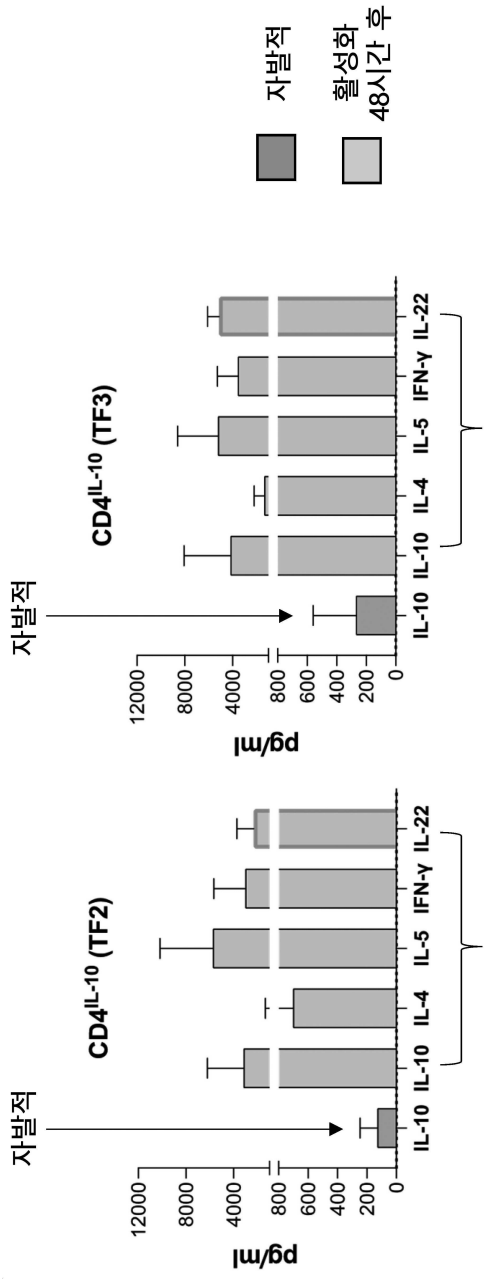
도면20a



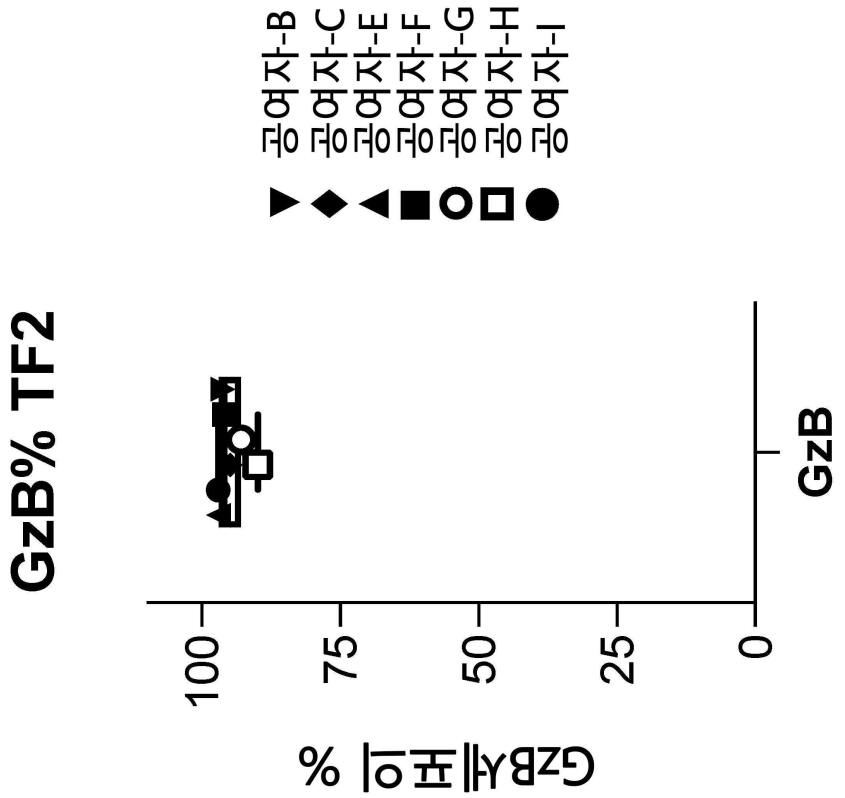
도면20b


공여자 C
Q6
99,2
Q7
0,48
Q5
0,19
Q8
0,11
공여자 B
Q6
98,3
Q7
0,62
Q5
0,46
Q8
0,58
ΔNGFR
CD4
0
10^3
10^4
10^5

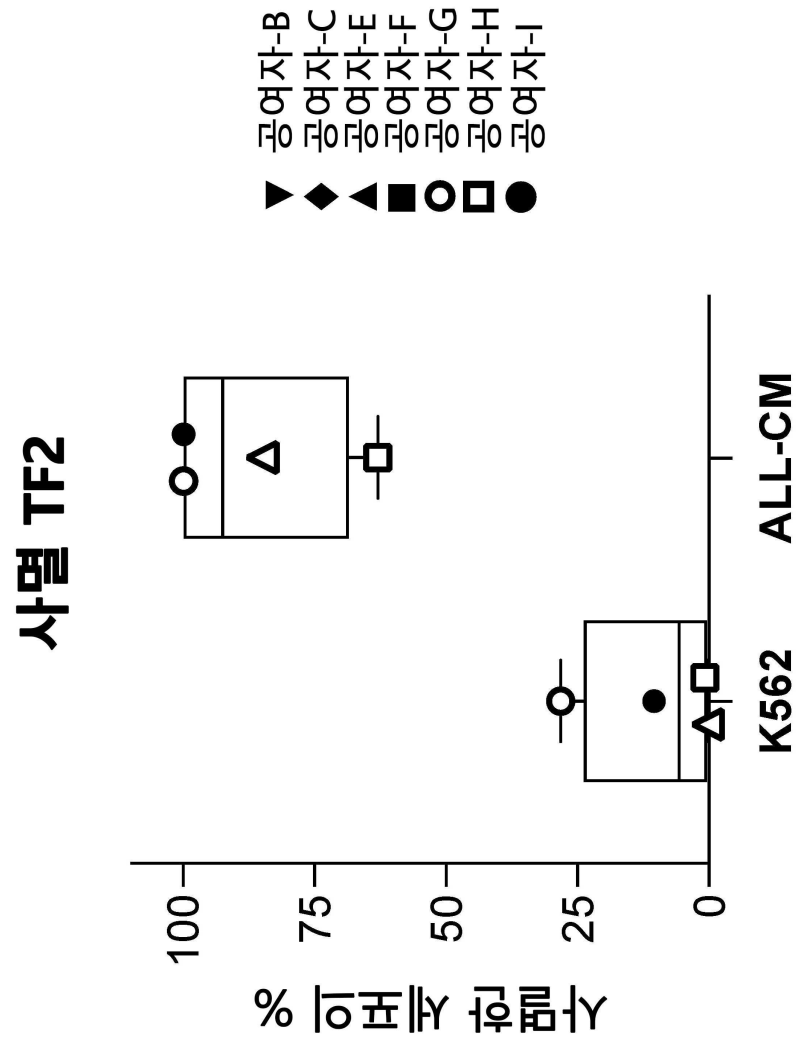
도면21


자발적
활성화
48시간 후
CD4IL-10 (TF3)
CD4IL-10 (TF2)
pg/ml
12000
8000
4000
800
600
400
200
0
IL-10
IL-10
IL-4
IL-5
IFN-γ
IL-22

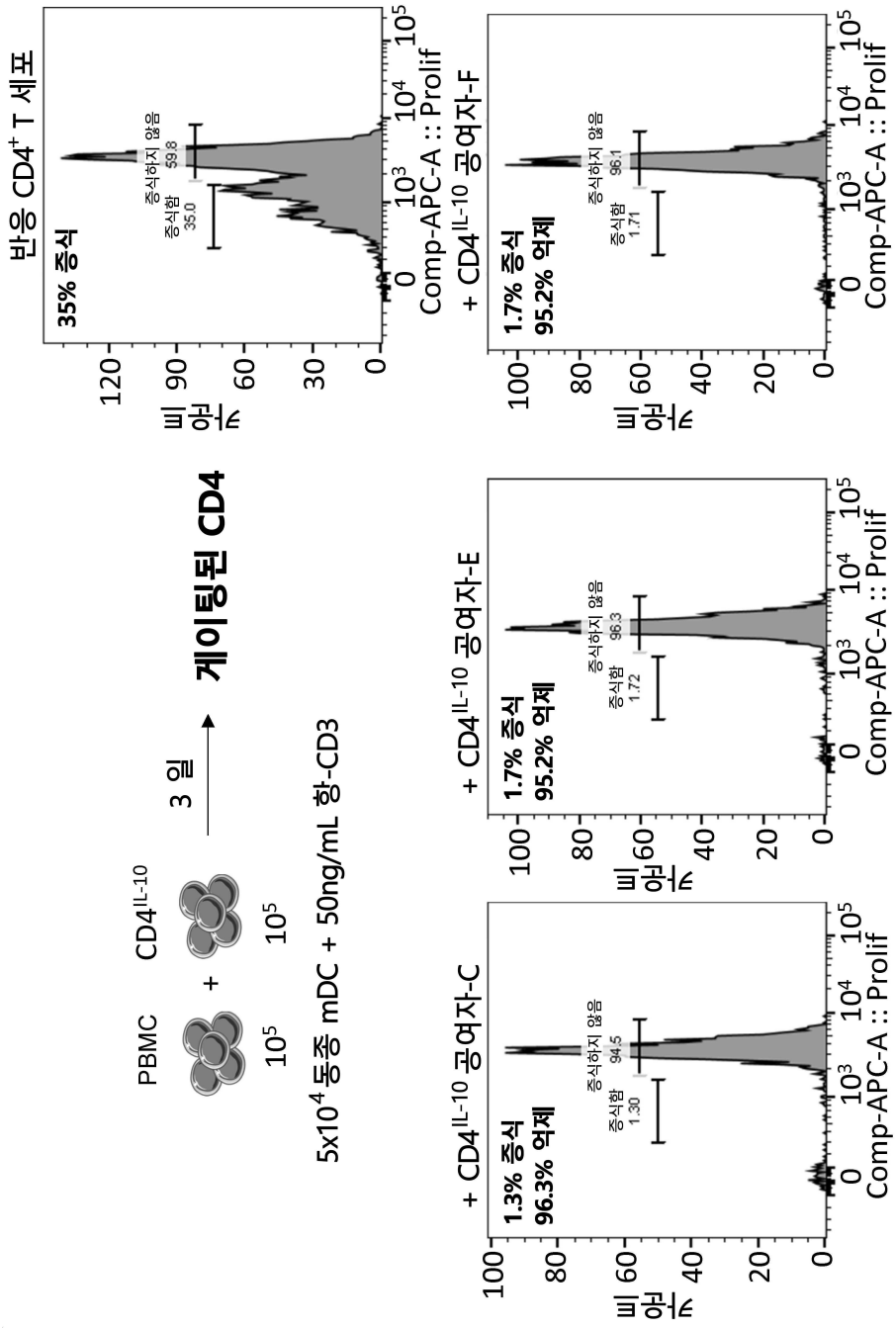
도면22a



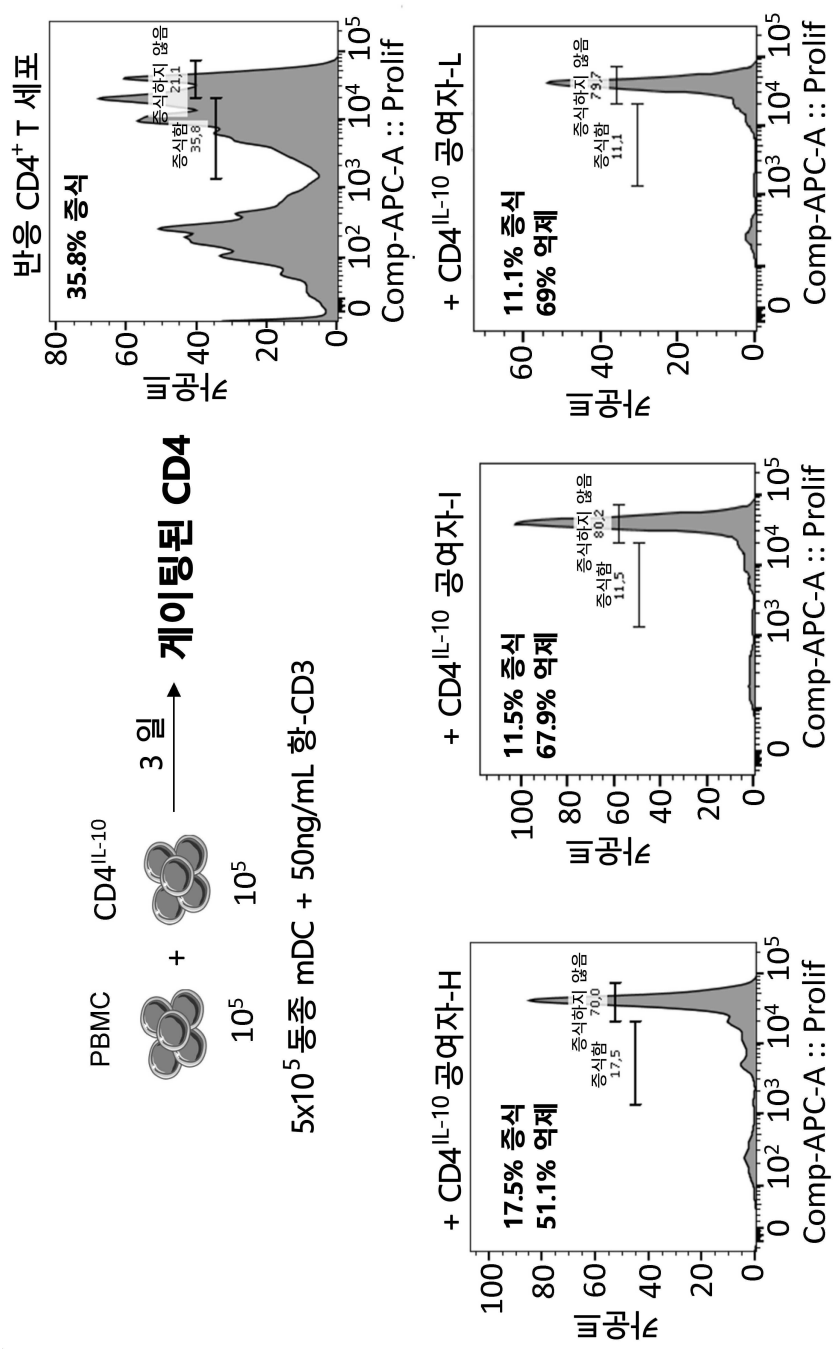
도면22b


사멸 TF2
여자-B
여자-C
여자-E
여자-F
여자-G
여자-H
여자-I
남
남
남
남
남
남
남
사멸한 세포의 %
100
75
50
25
0
K562
ALL-CM

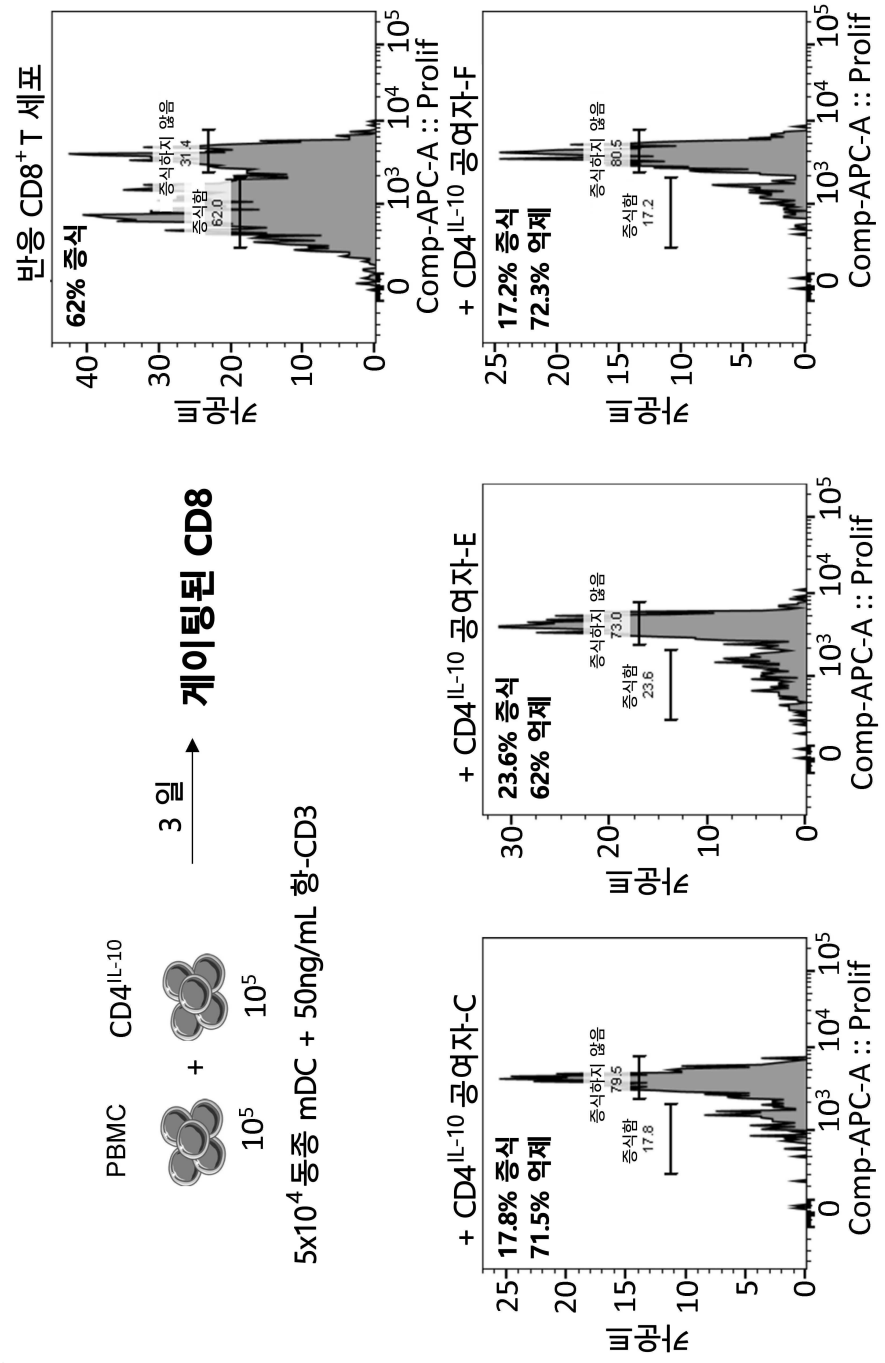
도면23a


반응 CD4+ T 세포
35% 증식
증식하지 않음
증식함
59.8
35.0
카운트
Comp-APC-A :: Prolif
+ CD4IL-10 공여자-F
1.7% 증식
95.2% 억제
증식하지 않음
증식함
96.1
1.71
+ CD4IL-10 공여자-E
1.7% 증식
95.2% 억제
증식하지 않음
증식함
96.3
1.72
+ CD4IL-10 공여자-C
1.3% 증식
96.3% 억제
증식하지 않음
증식함
94.5
1.30
게이팅된 CD4
3 일
PBMC
CD4IL-10
105
105
5x104 동종 mDC + 50ng/mL 항-CD3

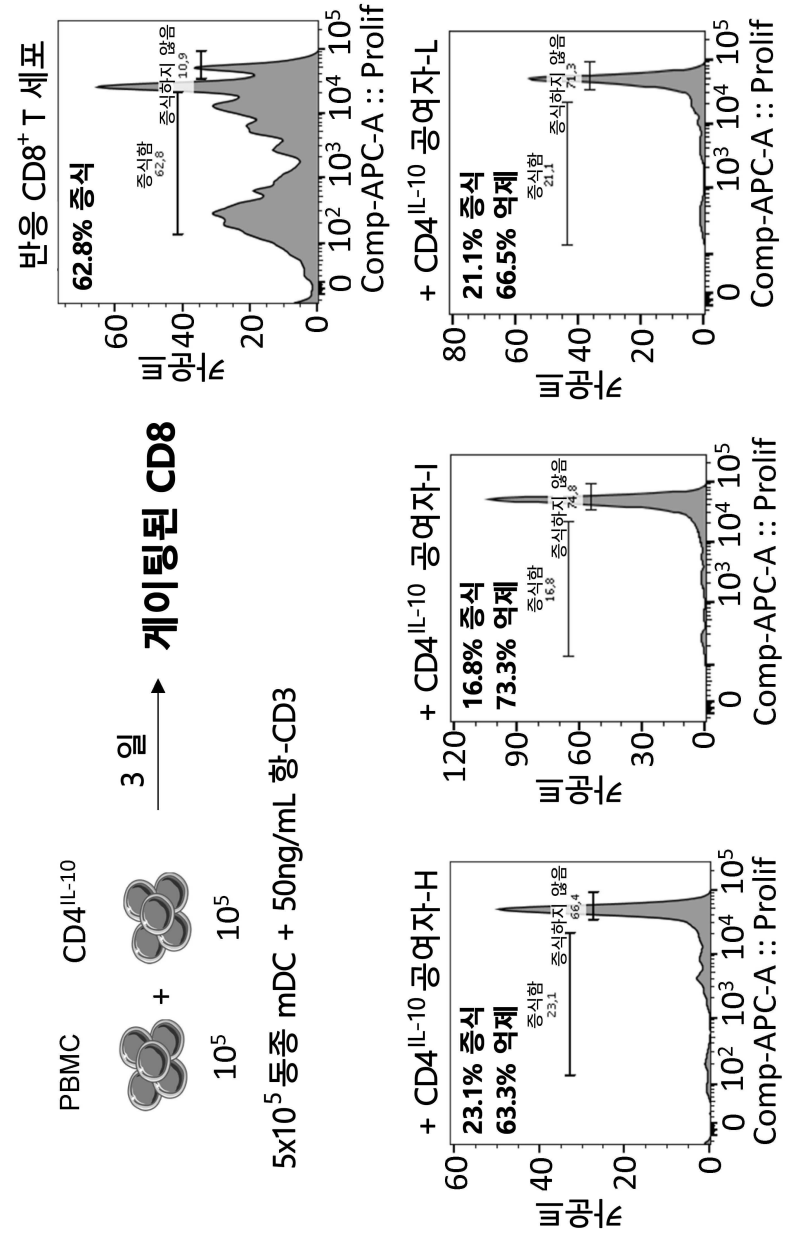
도면23b


반응 CD4+ T 세포
35.8% 증식
증식하지 않음
21.1
증식함
35.8
+ CD4IL-10 공여자-L
11.1% 증식
69% 억제
증식하지 않음
79.7
증식함
11.1
+ CD4IL-10 공여자-I
11.5% 증식
67.9% 억제
증식하지 않음
80.2
증식함
11.5
+ CD4IL-10 공여자-H
17.5% 증식
51.1% 억제
증식하지 않음
70.0
증식함
17.5
카운트
Comp-APC-A :: Prolif
PBMC
CD4IL-10
+
10^5
10^5
3 일
게이팅된 CD4
5x10^5 동종 mDC + 50ng/mL 항-CD3

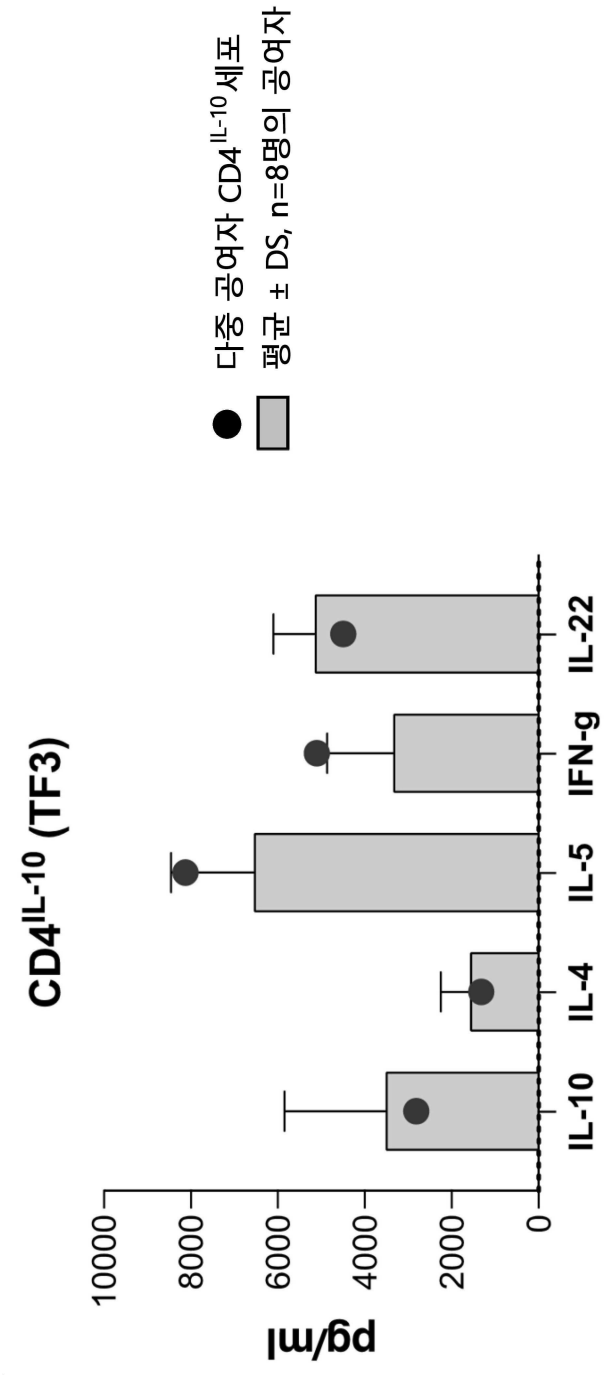
도면24a


PBMC
CD4IL-10
10^5
+
10^5
3 일
게이팅된 CD8
5x10^4 동종 mDC + 50ng/mL 항-CD3
반응 CD8+ T 세포
62% 증식
증식하지 않음
31.4
증식함
62.0
+ CD4IL-10 공여자-F
17.2% 증식
72.3% 억제
증식하지 않음
80.5
증식함
17.2
+ CD4IL-10 공여자-E
23.6% 증식
62% 억제
증식하지 않음
73.0
증식함
23.6
+ CD4IL-10 공여자-C
17.8% 증식
71.5% 억제
증식하지 않음
79.5
증식함
17.8
카운트
Comp-APC-A :: Prolif

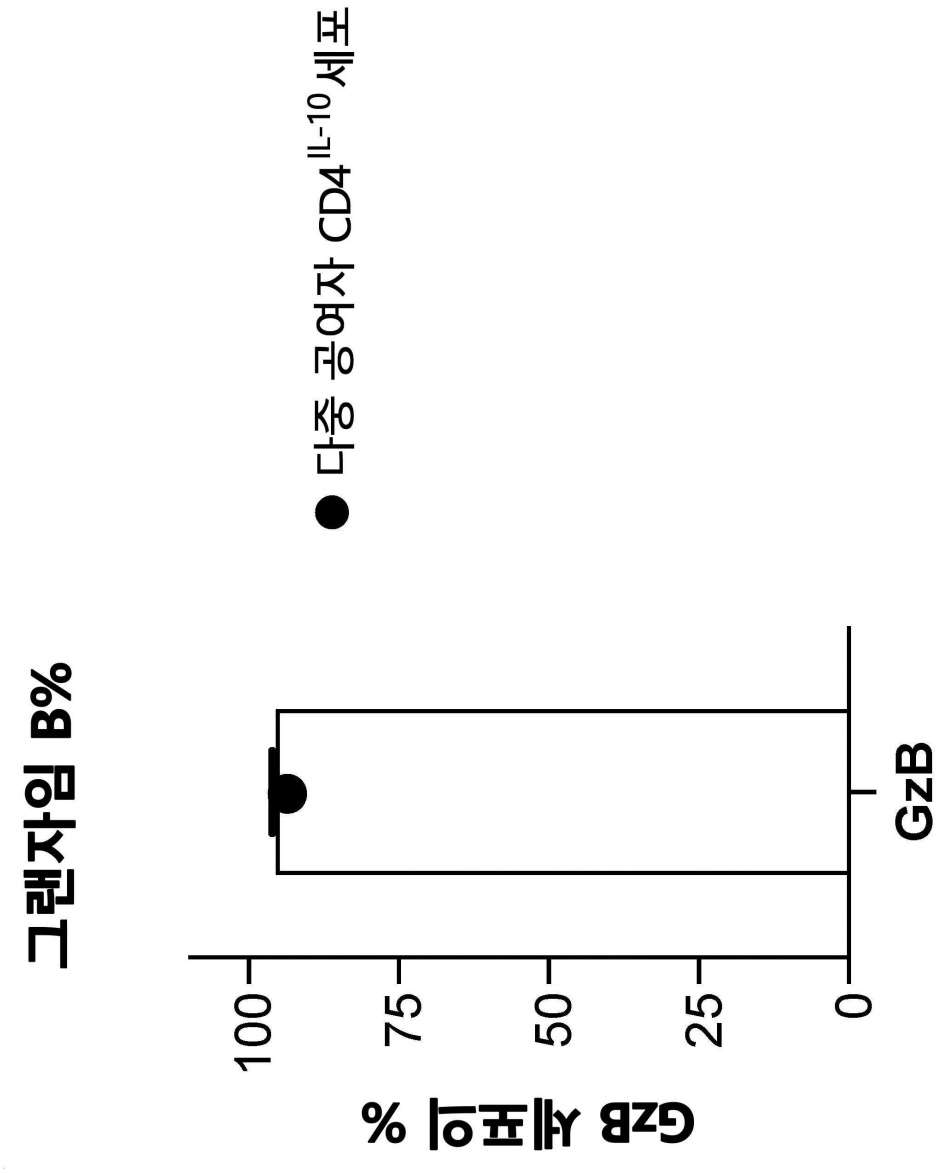
도면24b


PBMC
CD4IL-10
+
10^5
10^5
5x10^5 동종 mDC + 50ng/mL 항-CD3
3 일
게이팅된 CD8
반응 CD8+ T 세포
62.8% 증식
증식함
62,8
증식하지 않음
10,9
+ CD4IL-10 공여자-L
21.1% 증식
66.5% 억제
증식함
21,1
증식하지 않음
71,3
+ CD4IL-10 공여자-I
16.8% 증식
73.3% 억제
증식함
16,8
증식하지 않음
74,8
+ CD4IL-10 공여자-H
23.1% 증식
63.3% 억제
증식함
23,1
증식하지 않음
66,4
카운트
Comp-APC-A :: Prolif

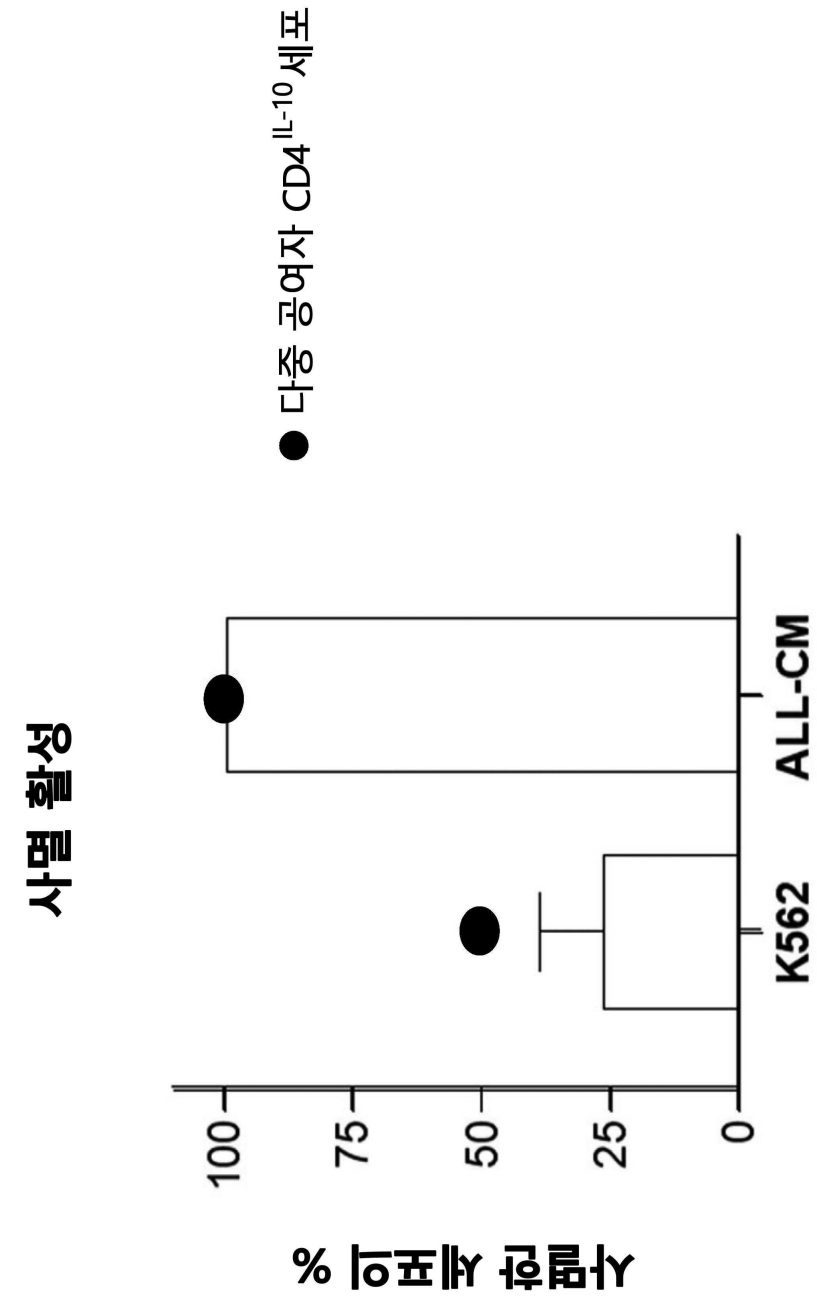
도면25


다중 공여자 CD4IL-10 세포
평균 ± DS, n=8명의 공여자
CD4IL-10 (TF3)
pg/ml
10000
8000
6000
4000
2000
0
IL-10
IL-4
IL-5
IFN-g
IL-22

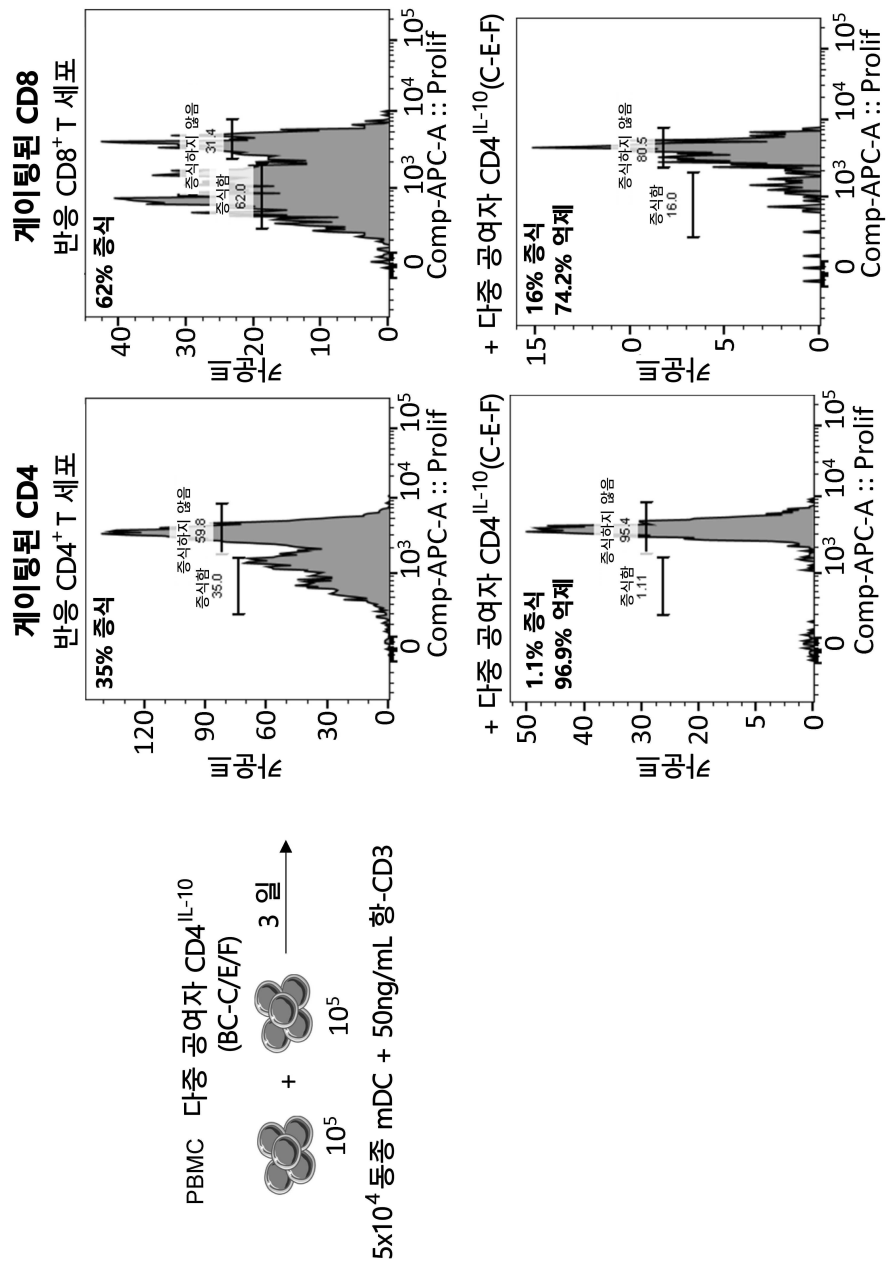
도면26a



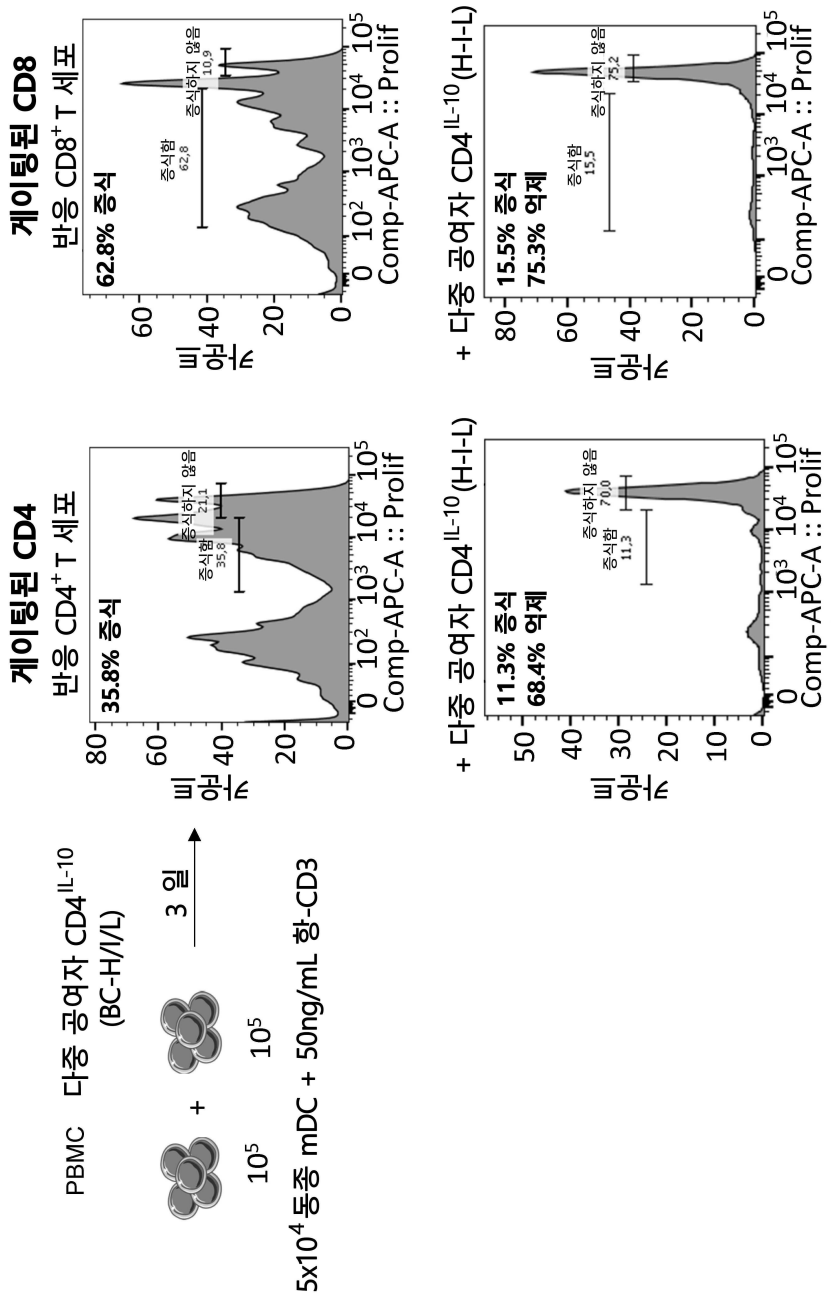
도면26b



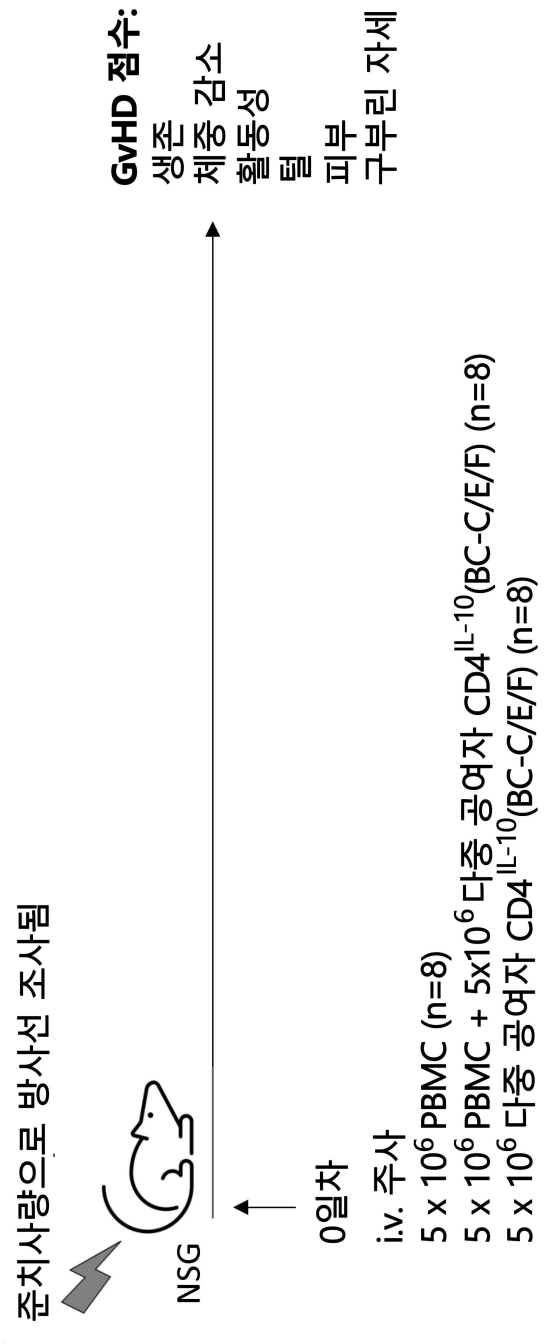
도면27a


게이팅된 CD8
반응 CD8+ T 세포
62% 증식
증식하지 않음
31.4
증식함
62.0
게이팅된 CD4
반응 CD4+ T 세포
35% 증식
증식하지 않음
59.8
증식함
35.0
+ 다중 공여자 CD4IL-10(C-E-F)
16% 증식
74.2% 억제
증식하지 않음
80.5
증식함
16.0
+ 다중 공여자 CD4IL-10(C-E-F)
1.1% 증식
96.9% 억제
증식하지 않음
95.4
증식함
1.11
카운트
Comp-APC-A :: Prolif
PBMC
다중 공여자 CD4IL-10
(BC-C/E/F)
3 일
105
105
5x104 동종 mDC + 50ng/mL 항-CD3

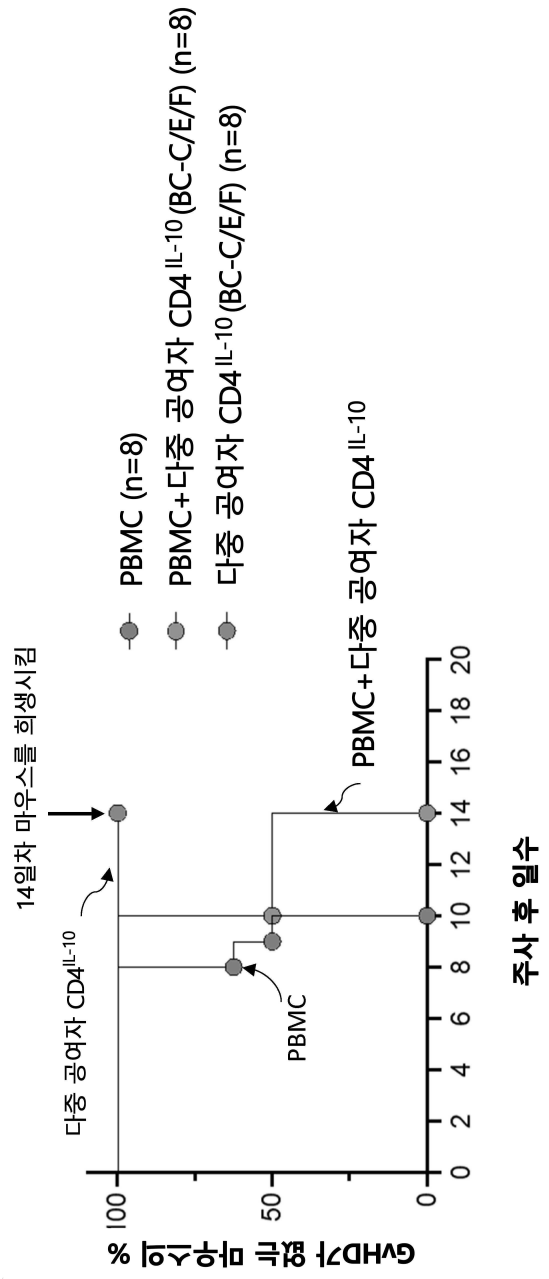
도면27b


게이팅된 CD8
반응 CD8+ T 세포
62.8% 증식
증식함
62,8
증식하지 않음
10,9
게이팅된 CD4
반응 CD4+ T 세포
35.8% 증식
증식함
35,8
증식하지 않음
21,1
+ 다중 공여자 CD4IL-10(H-I-L)
15.5% 증식
75.3% 억제
증식함
15,5
증식하지 않음
75,2
11.3% 증식
68.4% 억제
증식함
11,3
증식하지 않음
70,0
카운트
Comp-APC-A :: Prolif
PBMC
다중 공여자 CD4IL-10
(BC-H/I/L)
+
3 일
10^5
10^5
5x10^4 동종 mDC + 50ng/mL 항-CD3

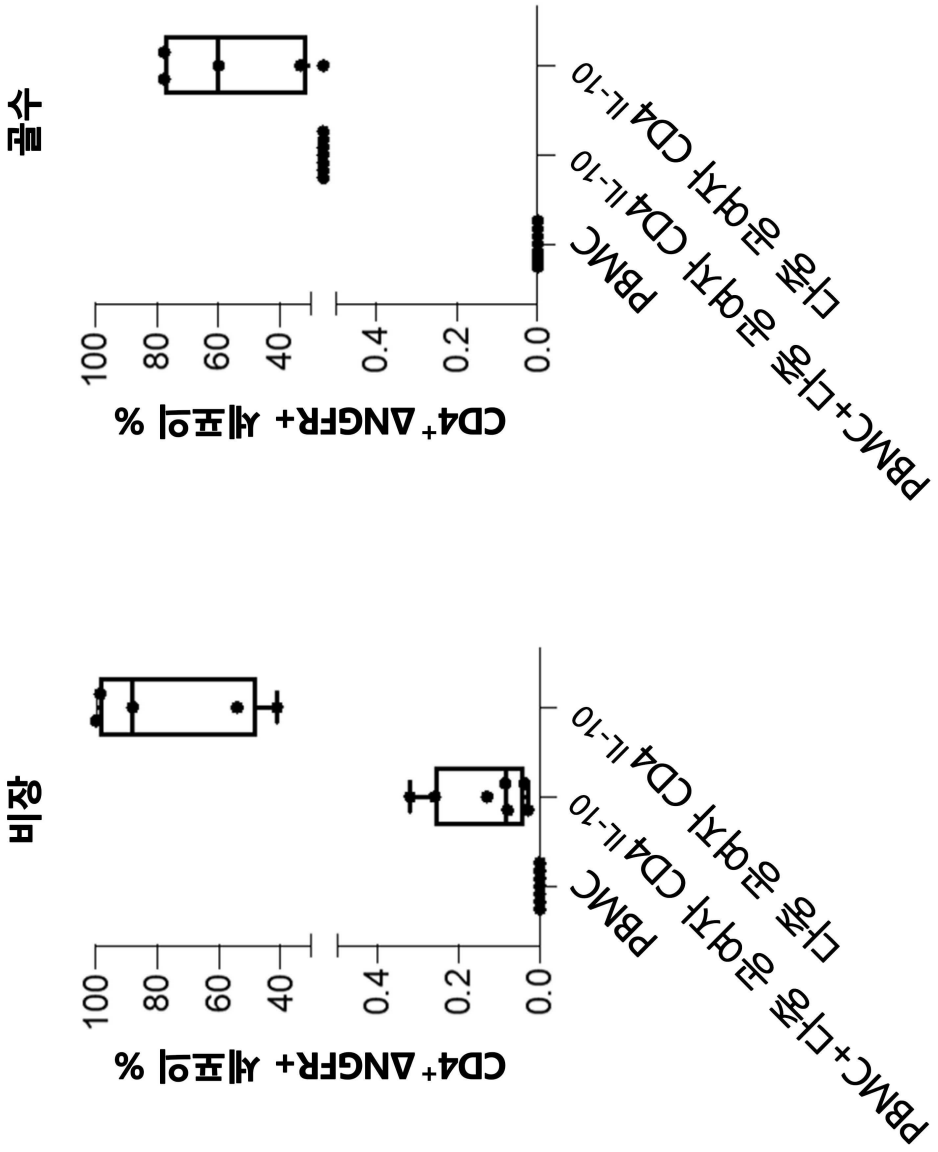
도면28


준치사량으로 방사선 조사됨
NSG
0일차
i.v. 주사
5 x 10^6 PBMC (n=8)
5 x 10^6 PBMC + 5x10^6 다중 공여자 CD4^IL-10(BC-C/E/F) (n=8)
5 x 10^6 다중 공여자 CD4^IL-10(BC-C/E/F) (n=8)
GvHD 점수:
생존
체중 감소
활동성
털
피부
구부린 자세

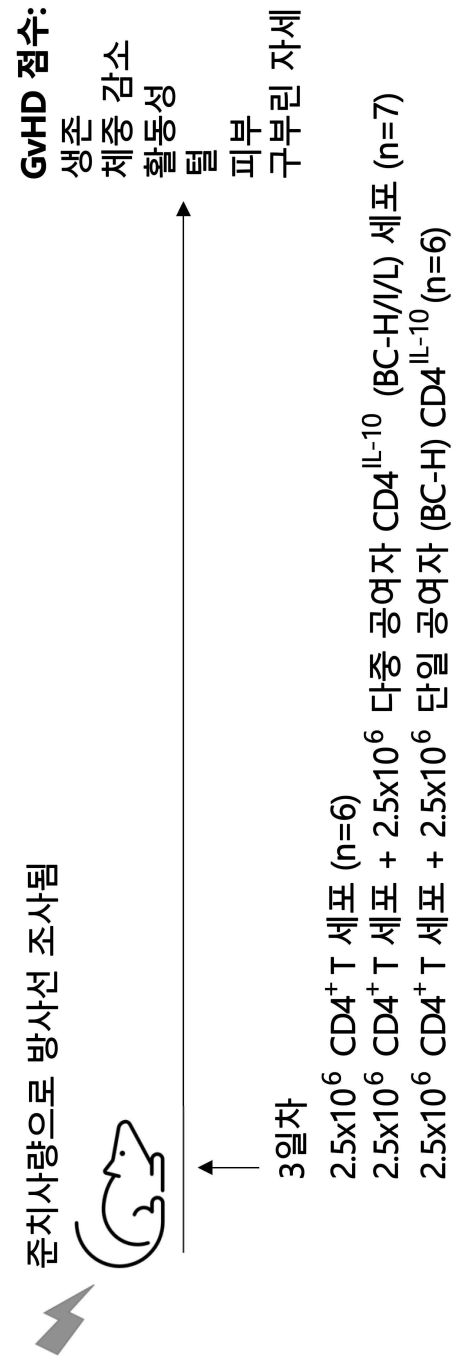
도면29


PBMC (n=8)
PBMC+다중 공여자 CD4 IL-10 (BC-C/E/F) (n=8)
다중 공여자 CD4 IL-10 (BC-C/E/F) (n=8)
14일차 마우스를 희생시킴
다중 공여자 CD4IL-10
PBMC
PBMC+다중 공여자 CD4 IL-10
GvHD가 없는 마우스의 %
100
50
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20
주사 후 일수

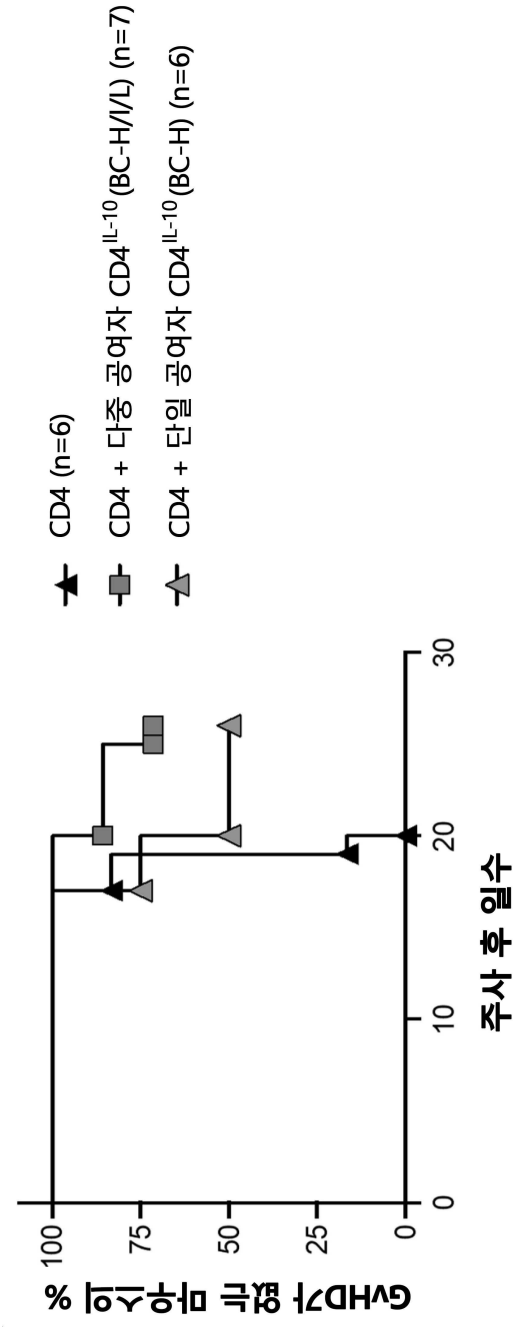
도면30


골수
비장
CD4+ ΔNGFR+ 세포의 %
100
80
60
40
0.4
0.2
0.0
PBMC
PBMC+다샤 활성화 CD4 IL-10
다샤
활성화 CD4 IL-10

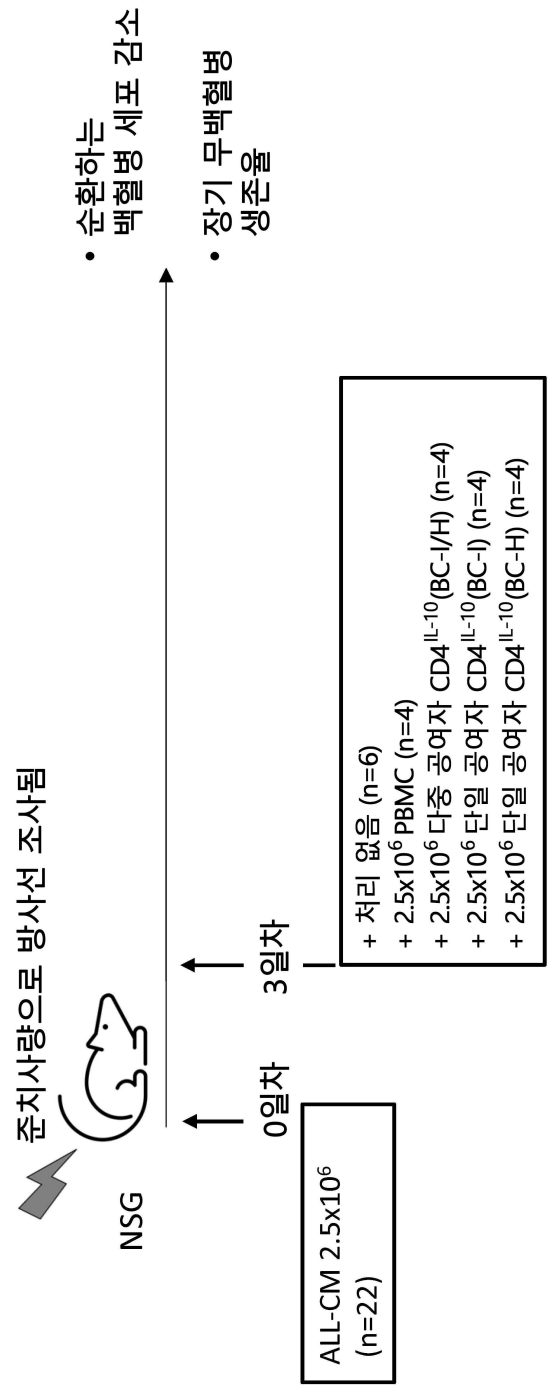
도면31


GvHD 점수:
생존
체중 감소
활동성
털
피부
구부린 자세
준치사량으로 방사선 조사됨
3일차
2.5x10^6 CD4+ T 세포 (n=6)
2.5x10^6 CD4+ T 세포 + 2.5x10^6 다중 공여자 CD4^IL-10 (BC-H/I/L) 세포 (n=7)
2.5x10^6 CD4+ T 세포 + 2.5x10^6 단일 공여자 (BC-H) CD4^IL-10 (n=6)

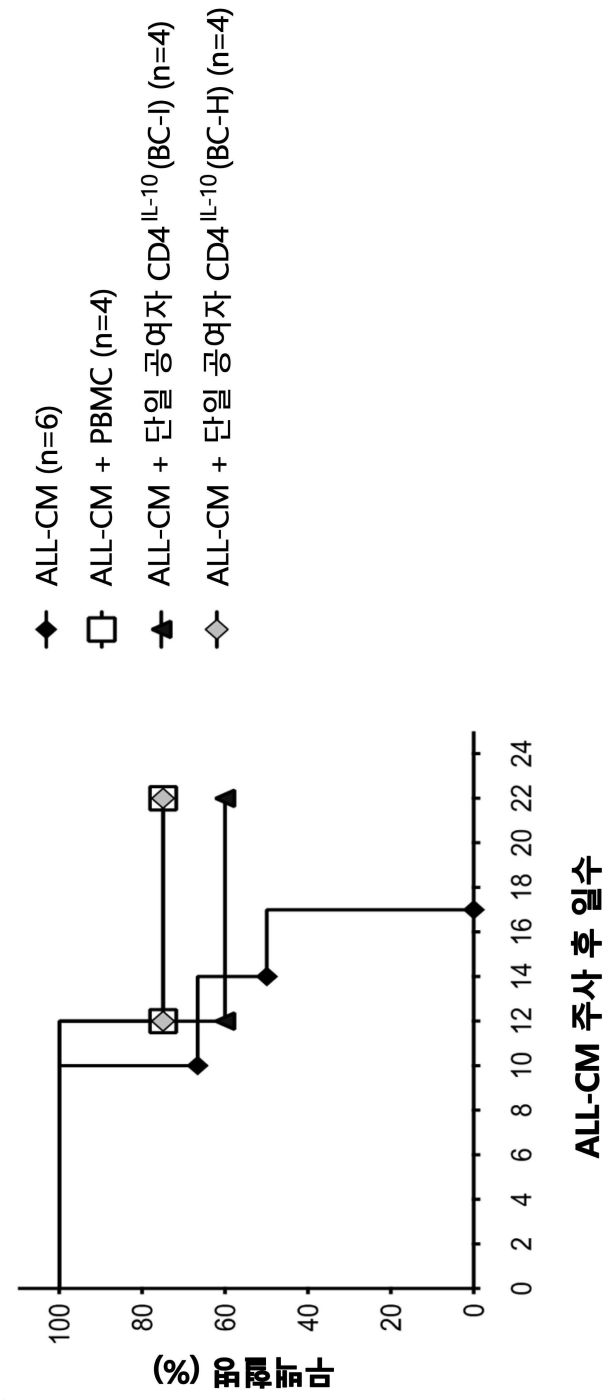
도면32


CD4 (n=6)
CD4 + 다중 공여자 CD4IL-10(BC-H/I/L) (n=7)
CD4 + 단일 공여자 CD4IL-10(BC-H) (n=6)
GvHD가 없는 마우스의 %
100
75
50
25
0
0
10
20
30
주사 후 일수

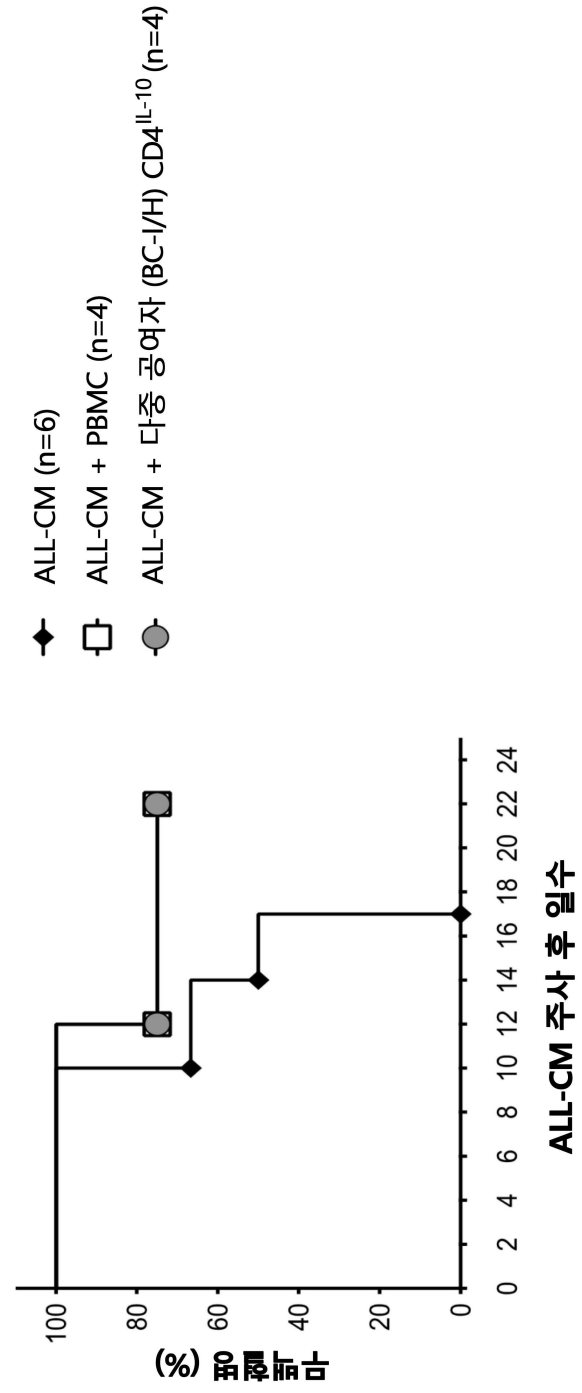
도면33a


준치사량으로 방사선 조사됨
NSG
0일차
3일차
ALL-CM 2.5x10^6 (n=22)
+ 처리 없음 (n=6)
+ 2.5x10^6 PBMC (n=4)
+ 2.5x10^6 다중 공여자 CD4^IL-10(BC-I/H) (n=4)
+ 2.5x10^6 단일 공여자 CD4^IL-10(BC-I) (n=4)
+ 2.5x10^6 단일 공여자 CD4^IL-10(BC-H) (n=4)
• 순환하는 백혈병 세포 감소
• 장기 무백혈병 생존율

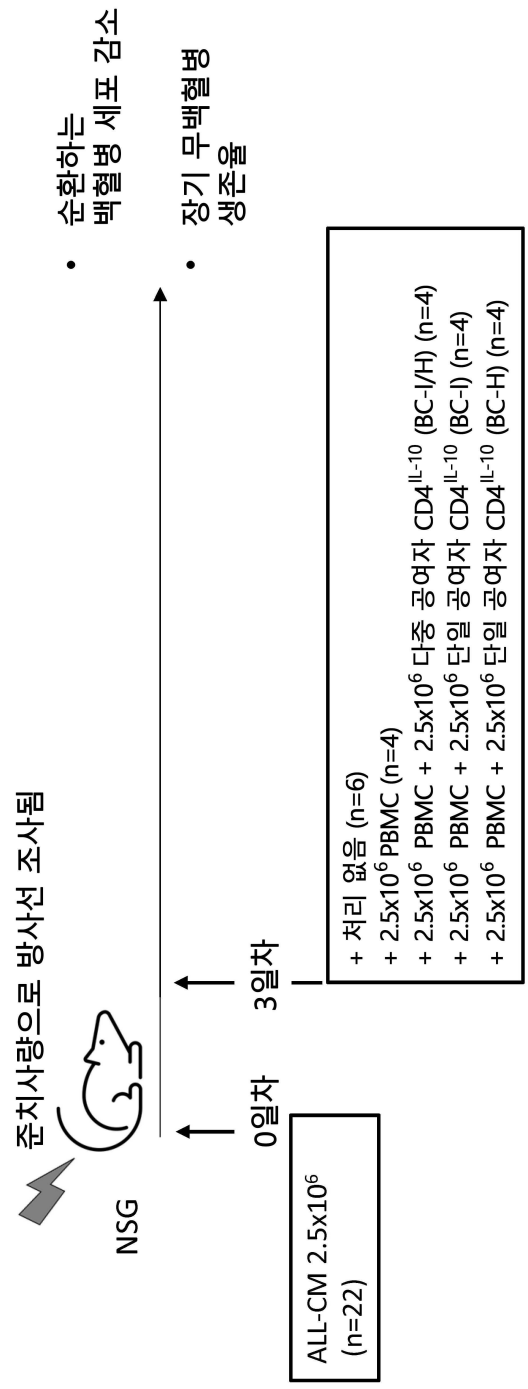
도면33b


ALL-CM (n=6)
ALL-CM + PBMC (n=4)
ALL-CM + 단일 공여자 CD4 IL-10 (BC-I) (n=4)
ALL-CM + 단일 공여자 CD4 IL-10 (BC-H) (n=4)
생존율 (%)
100
80
60
40
20
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
ALL-CM 주사 후 일수

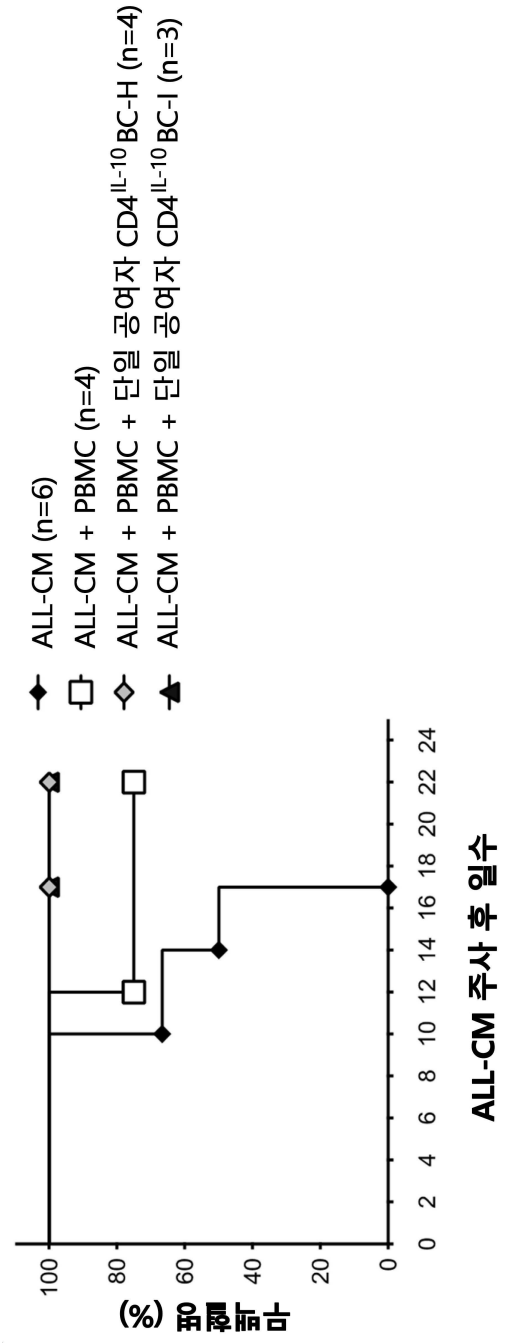
도면33c


ALL-CM (n=6)
ALL-CM + PBMC (n=4)
ALL-CM + 다중 공여자 (BC-I/H) CD4IL-10 (n=4)
무백혈병 (%)
100
80
60
40
20
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
ALL-CM 주사 후 일수

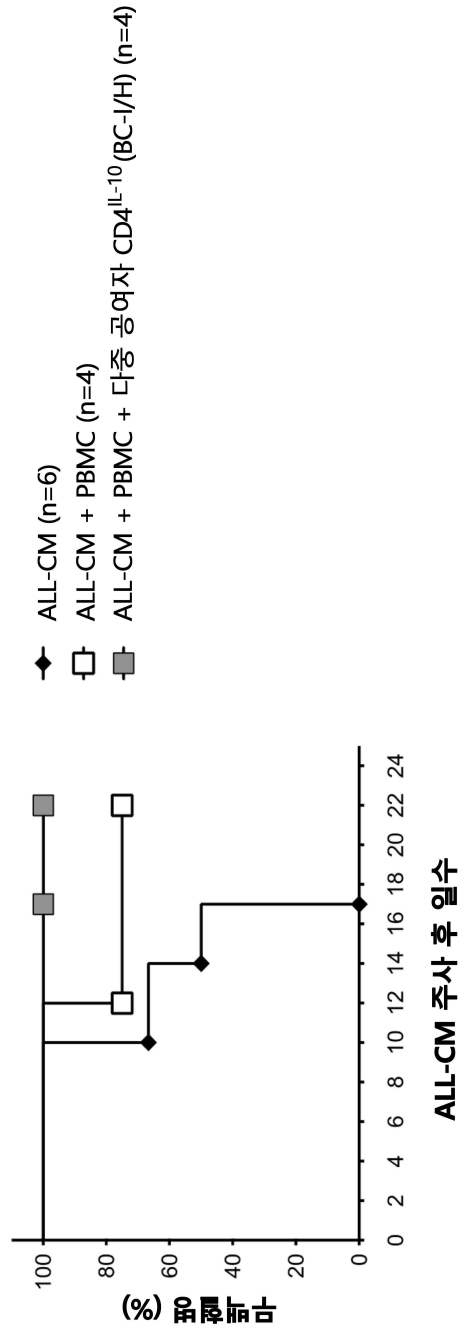
도면34a


준치사량으로 방사선 조사됨
NSG
0일차
3일차
ALL-CM 2.5x10^6 (n=22)
+ 처리 없음 (n=6)
+ 2.5x10^6 PBMC (n=4)
+ 2.5x10^6 PBMC + 2.5x10^6 다중 공여자 CD4^IL-10 (BC-I/H) (n=4)
+ 2.5x10^6 PBMC + 2.5x10^6 단일 공여자 CD4^IL-10 (BC-I) (n=4)
+ 2.5x10^6 PBMC + 2.5x10^6 단일 공여자 CD4^IL-10 (BC-H) (n=4)
• 순환하는 백혈병 세포 감소
• 장기 무백혈병 생존율

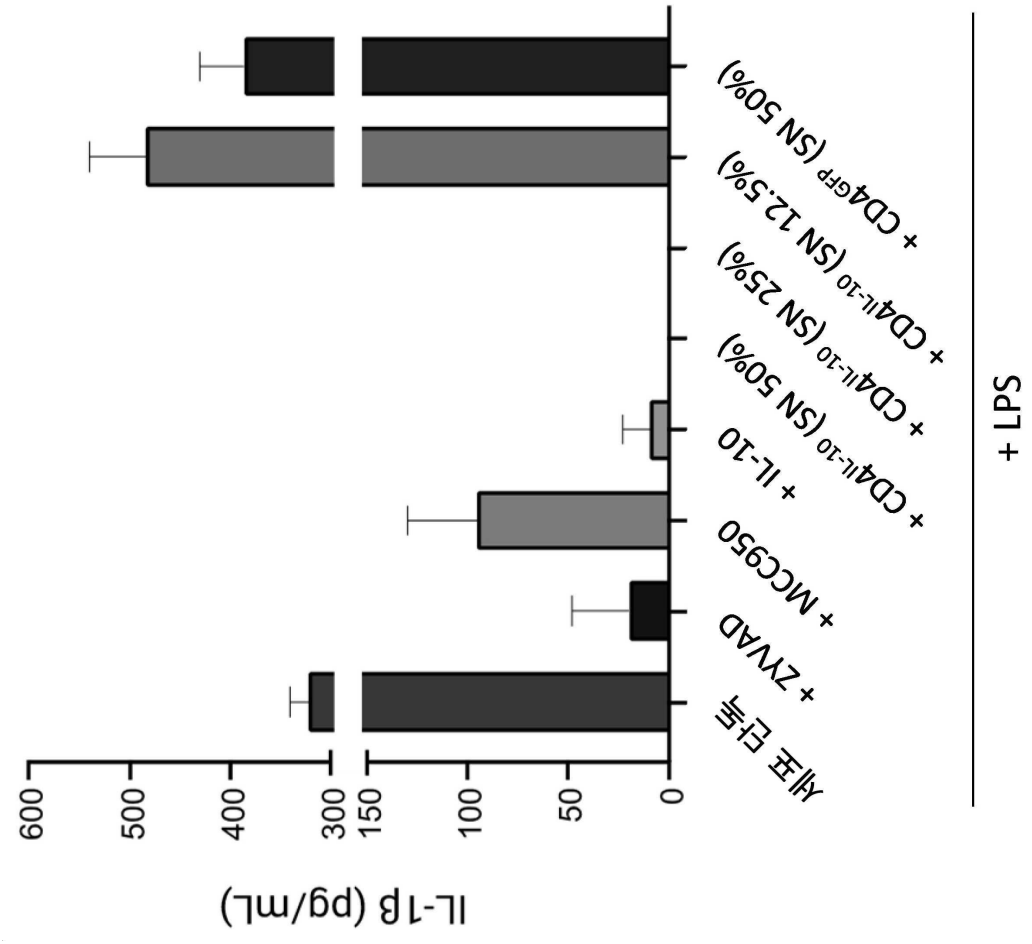
도면34b


ALL-CM (n=6)
ALL-CM + PBMC (n=4)
ALL-CM + PBMC + 단일 공여자 CD4IL-10 BC-H (n=4)
ALL-CM + PBMC + 단일 공여자 CD4IL-10 BC-I (n=3)
생존율 (%)
100
80
60
40
20
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
ALL-CM 주사 후 일수

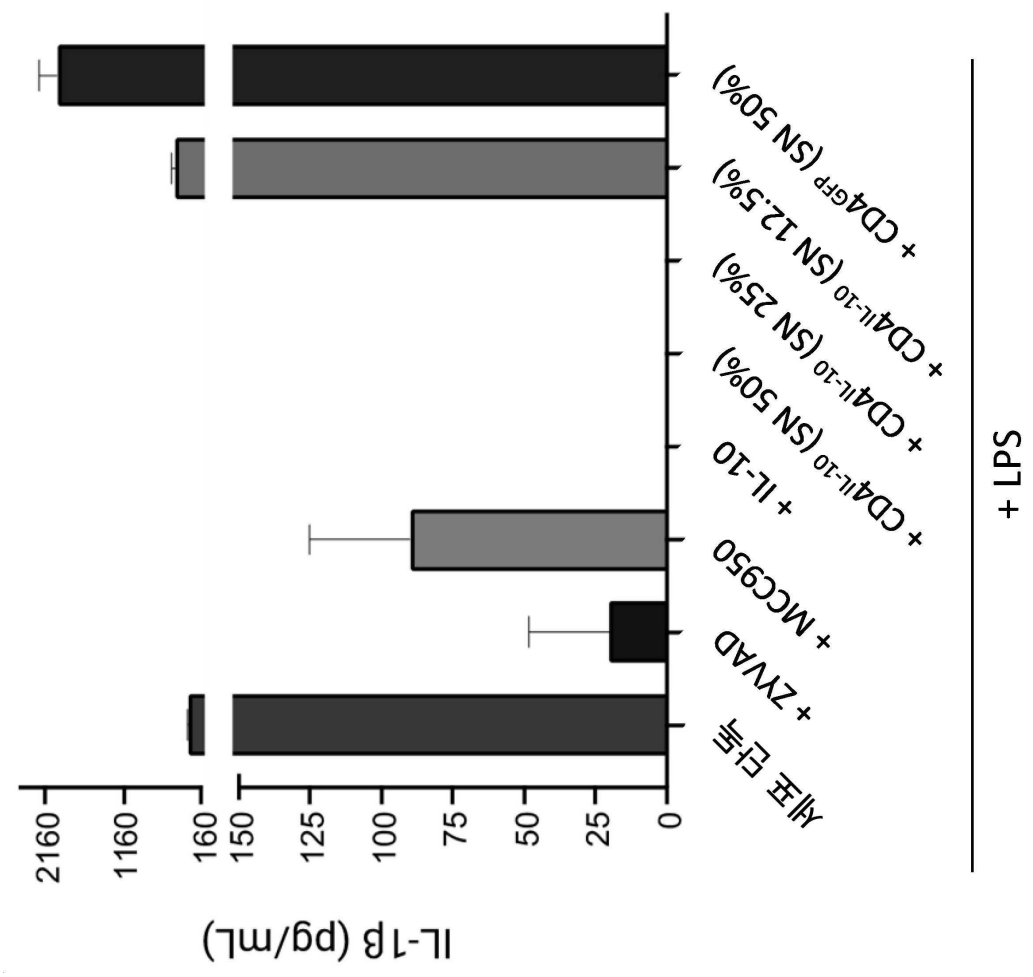
도면34c


ALL-CM (n=6)
ALL-CM + PBMC (n=4)
ALL-CM + PBMC + 다중 공여자 CD4IL-10(BC-I/H) (n=4)
무백혈병 (%)
100
80
60
40
20
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
ALL-CM 주사 후 일수

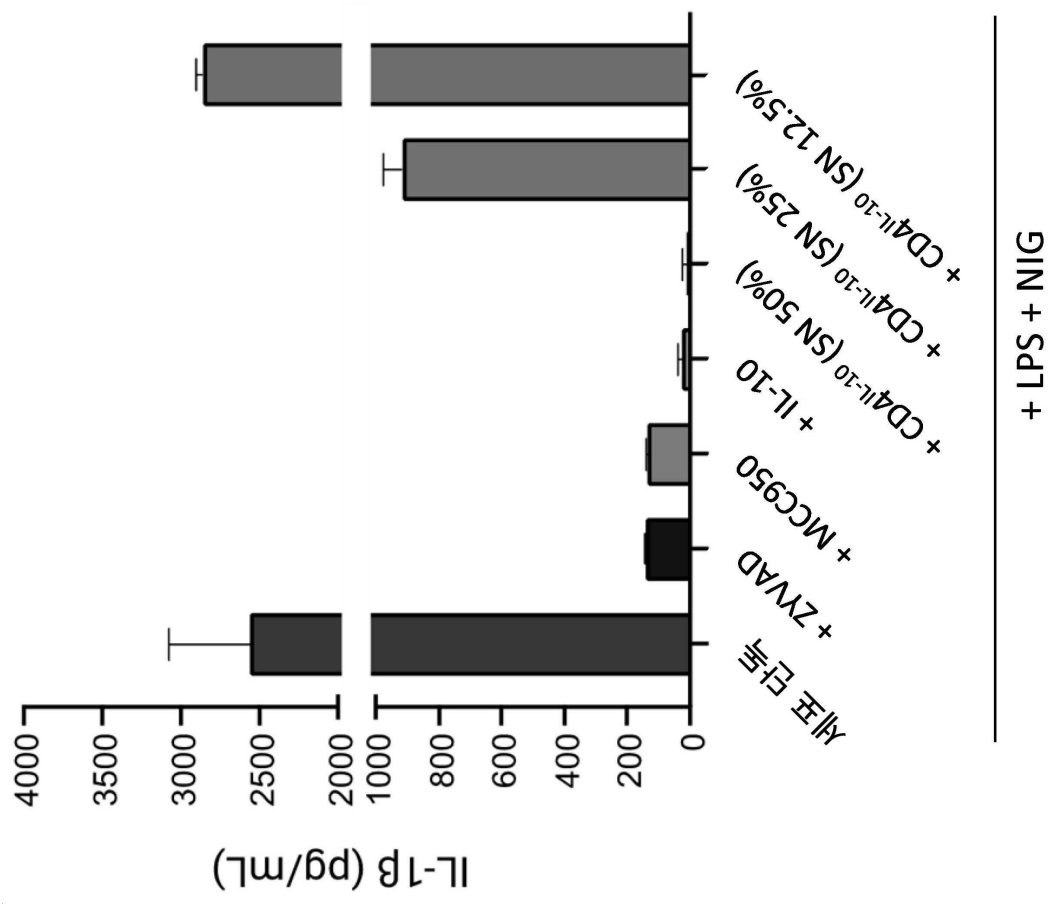
도면35a


IL-1β (pg/mL)
600
500
400
300
150
100
50
0
세포 단독
+ ZYVAD
+ MCC950
+ IL-10
+ CD4IL-10 (SN 50%)
+ CD4IL-10 (SN 25%)
+ CD4IL-10 (SN 12.5%)
+ CD4GFP (SN 50%)
+ LPS

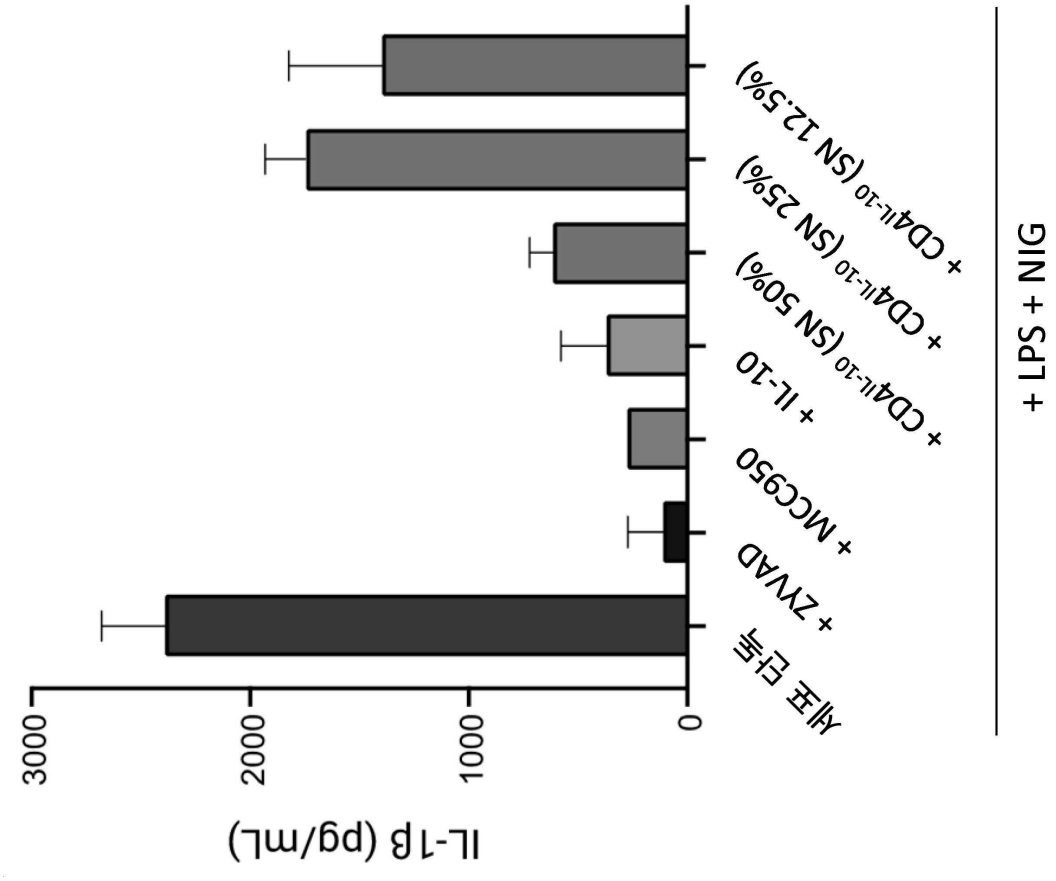
도면35b


IL-1β (pg/mL)
2160
1160
160
150
125
100
75
50
25
0
세포 단독
+ ZVAD
+ MCC950
+ IL-10
+ CD4IL-10 (SN 50%)
+ CD4IL-10 (SN 25%)
+ CD4IL-10 (SN 12.5%)
+ CD4GFP (SN 50%)
+ LPS

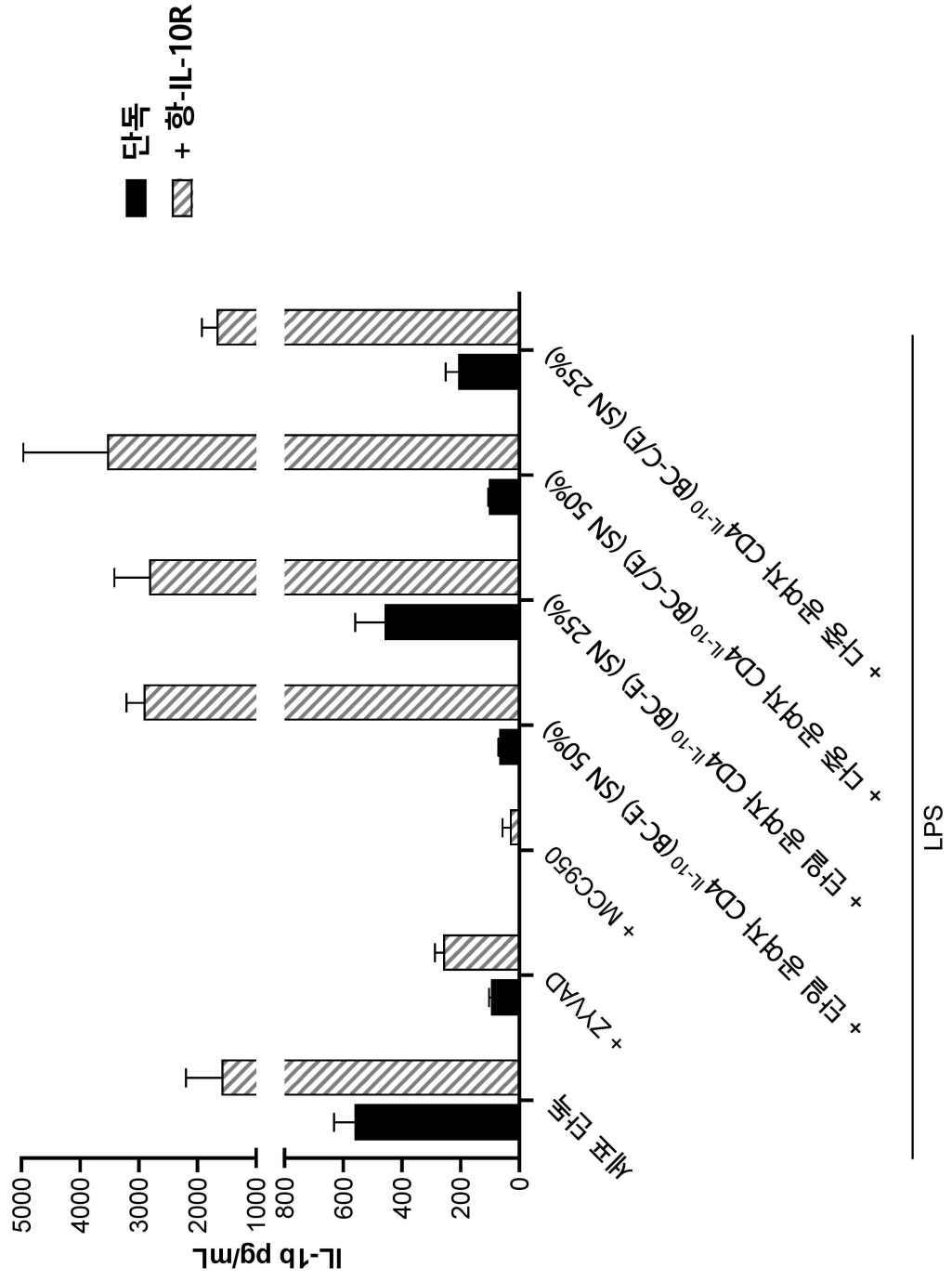
도면35c


IL-1β (pg/mL)
4000
3500
3000
2500
2000
1000
800
600
400
200
0
세포 단독
+ ZYVAD
+ MCC950
+ IL-10
+ CD4IL-10 (SN 50%)
+ CD4IL-10 (SN 25%)
+ CD4IL-10 (SN 12.5%)
+ LPS + NIG

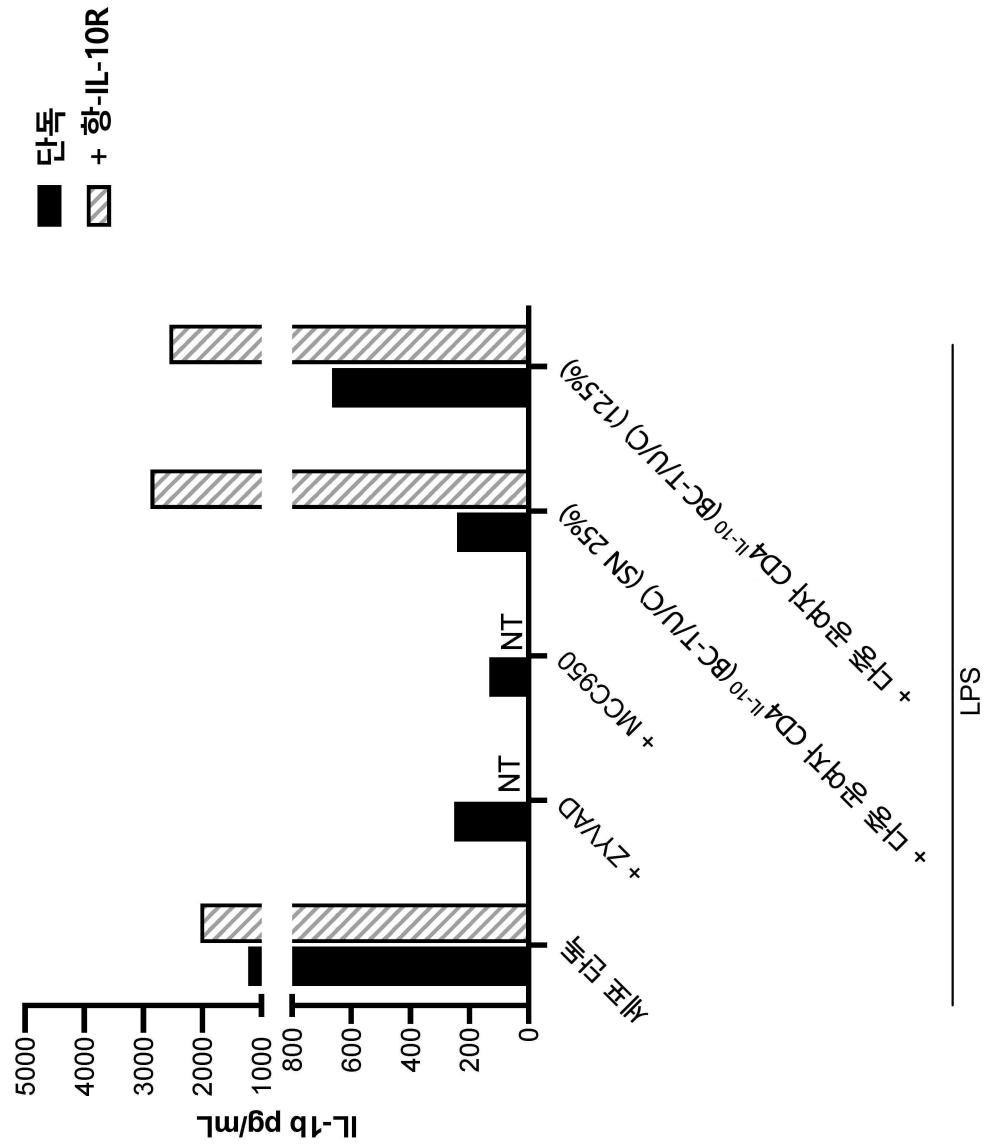
도면35d


IL-1β (pg/mL)
3000
2000
1000
0
세포 단독
+ ZYVAD
+ MCC950
+ IL-10
+ CD4IL-10 (SN 50%)
+ CD4IL-10 (SN 25%)
+ CD4IL-10 (SN 12.5%)
+ LPS + NIG

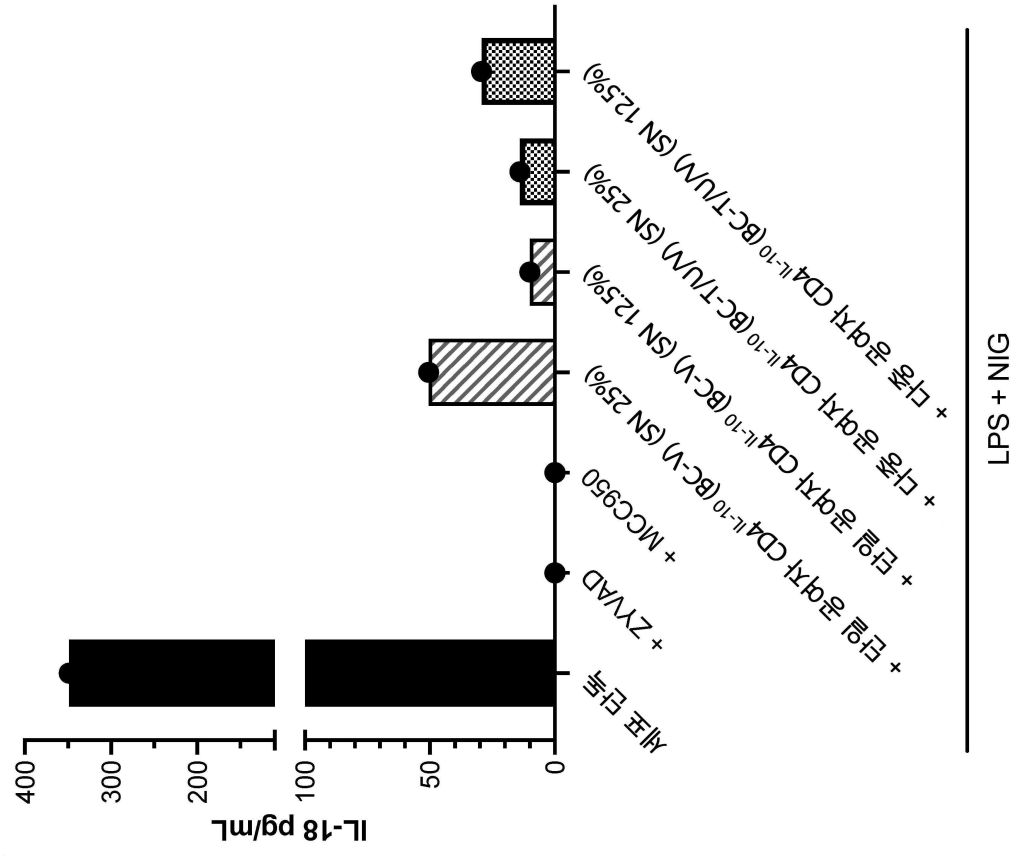
도면35e


단독
+ 항-IL-10R
IL-1b pg/mL
5000
4000
3000
2000
1000
800
600
400
200
0
처치 안함
+ ZYVAD
+ MCC950
+ 단일 융합자 CD4IL-10 (BC-E) (SN 50%)
+ 단일 융합자 CD4IL-10 (BC-E) (SN 25%)
+ 다중 융합자 CD4IL-10 (BC-C/E) (SN 50%)
+ 다중 융합자 CD4IL-10 (BC-C/E) (SN 25%)
LPS

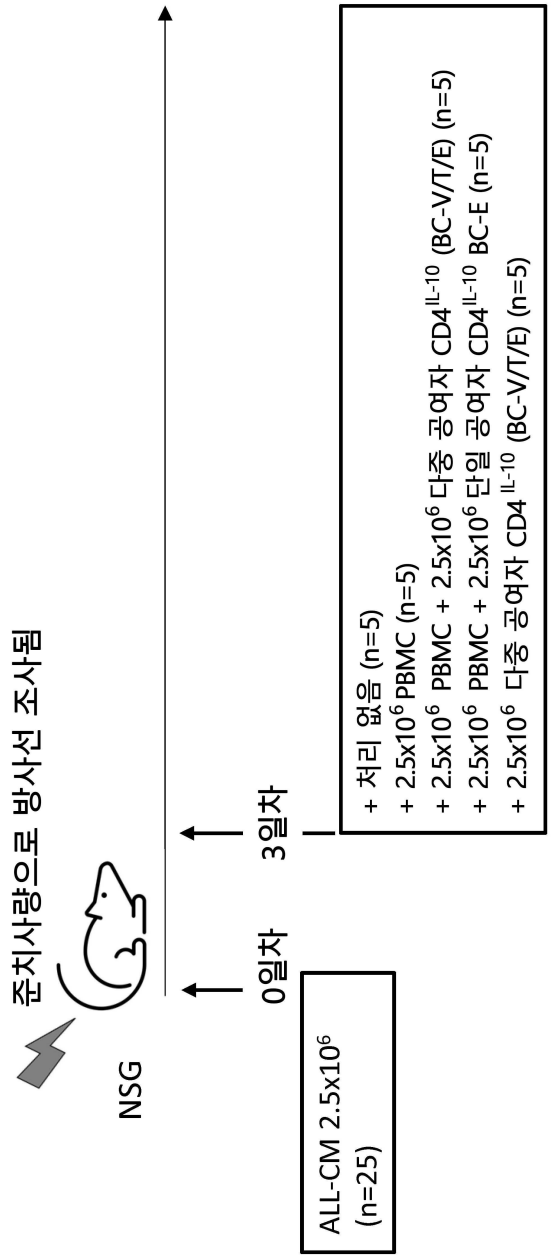
도면35f


단독
+ 항-IL-10R
IL-1b pg/mL
5000
4000
3000
2000
1000
800
600
400
200
0
NT
NT
LPS
처분 단독
+ ZYVAD
+ MCC950
+ 다중 융합 CD4IL-10 (BC-T/U/C) (SN 25%)
+ 다중 융합 CD4IL-10 (BC-T/U/C) (12.5%)

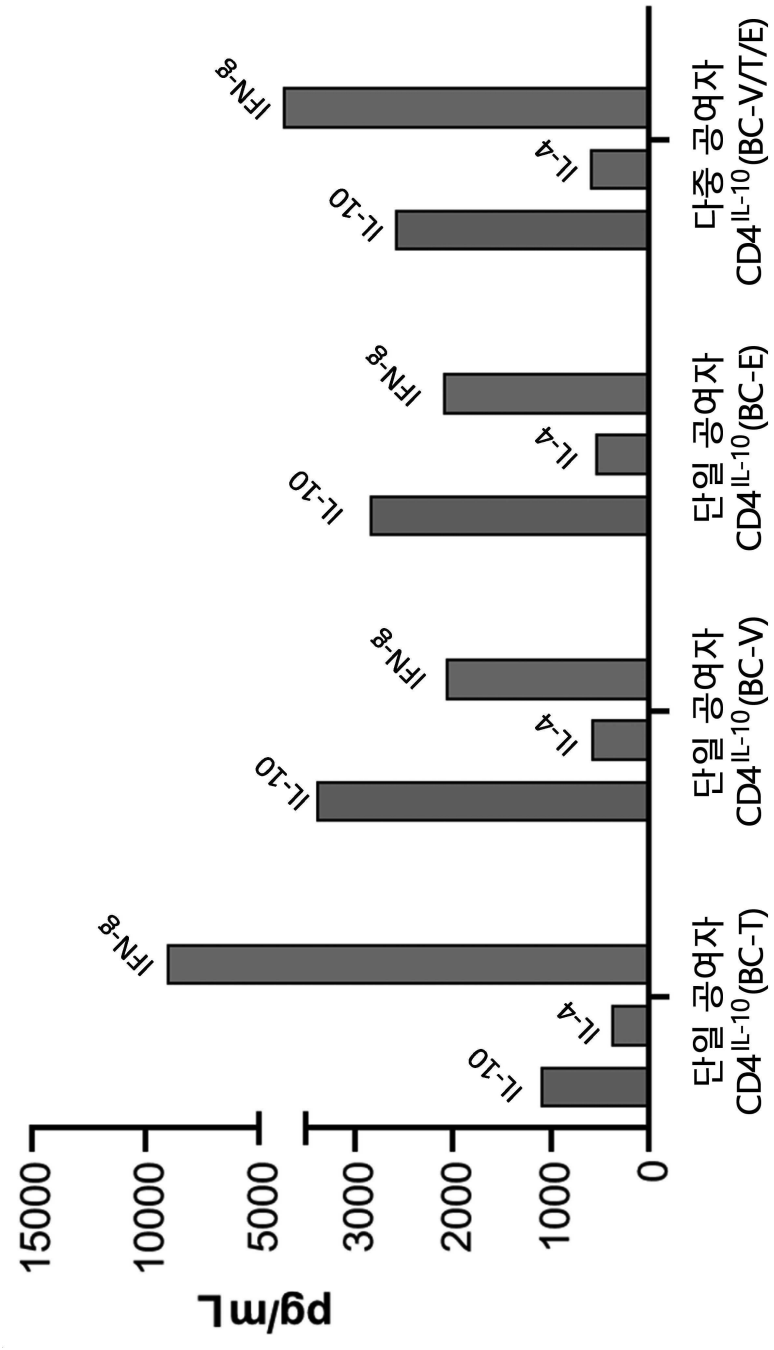
도면35g


IL-18 pg/mL
400
300
200
100
50
0
LPS + NIG
처리 없음
+ ZVAD
+ MCC950
+ 단일 공여자 CD4IL-10 (BC-V) (SN 25%)
+ 단일 공여자 CD4IL-10 (BC-V) (SN 12.5%)
+ 다중 공여자 CD4IL-10 (BC-T/U/V) (SN 25%)
+ 다중 공여자 CD4IL-10 (BC-T/U/V) (SN 12.5%)

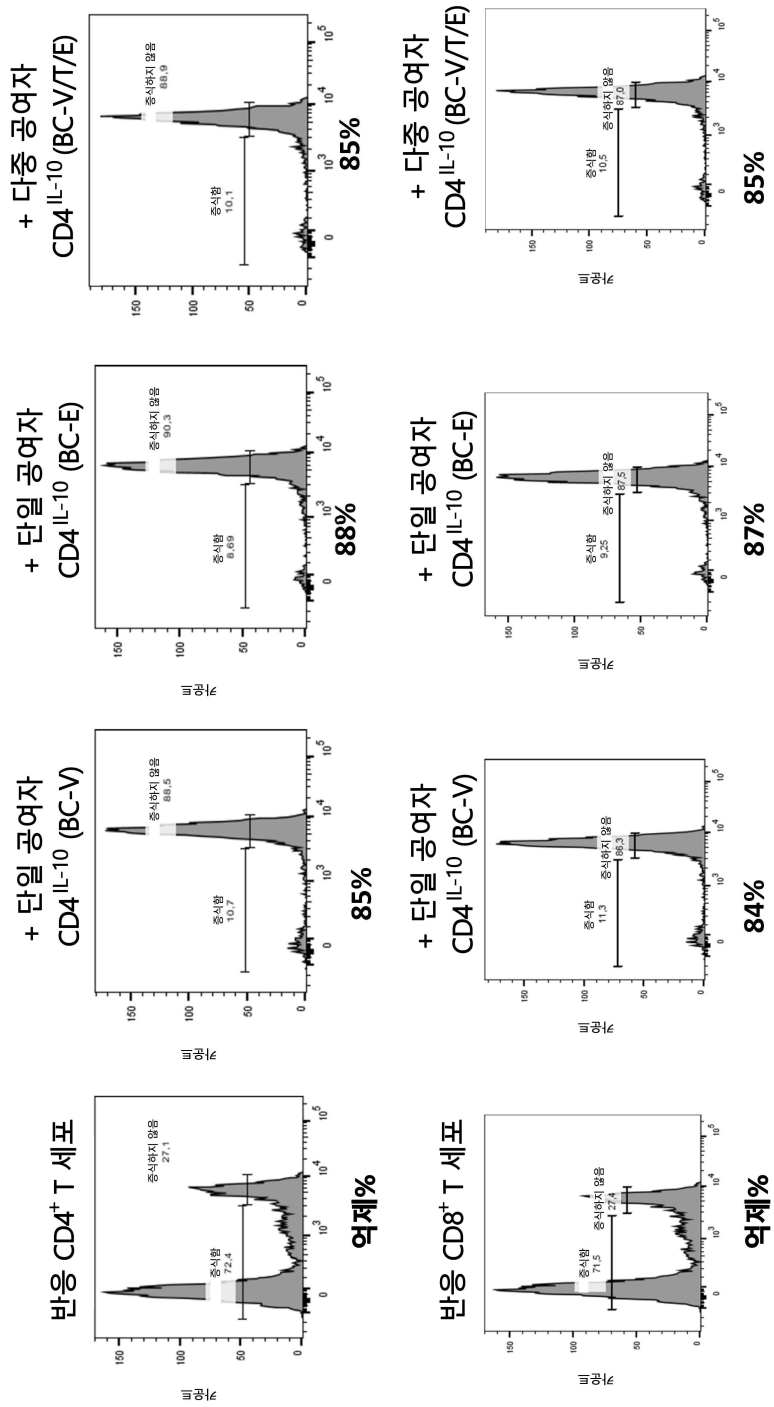
도면36


준치사량으로 방사선 조사됨
NSG
0일차
3일차
ALL-CM 2.5x10^6 (n=25)
+ 처리 없음 (n=5)
+ 2.5x10^6 PBMC (n=5)
+ 2.5x10^6 PBMC + 2.5x10^6 다중 공여자 CD4^IL-10 (BC-V/T/E) (n=5)
+ 2.5x10^6 PBMC + 2.5x10^6 단일 공여자 CD4^IL-10 BC-E (n=5)
+ 2.5x10^6 다중 공여자 CD4^IL-10 (BC-V/T/E) (n=5)

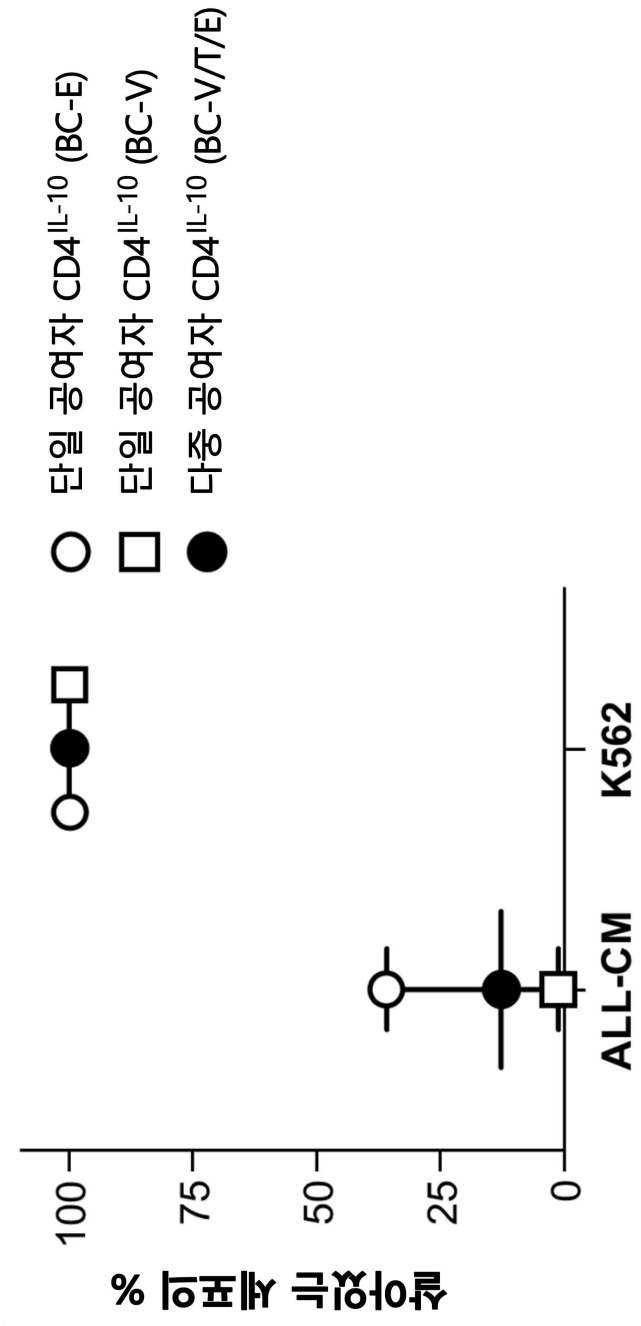
도면37


pg/mL
15000
10000
5000
3000
2000
1000
0
IL-10
IL-4
IFN-g
단일 공여자
CD4IL-10(BC-T)
IL-10
IL-4
IFN-g
단일 공여자
CD4IL-10(BC-V)
IL-10
IL-4
IFN-g
단일 공여자
CD4IL-10(BC-E)
IL-10
IL-4
IFN-g
다중 공여자
CD4IL-10(BC-V/T/E)

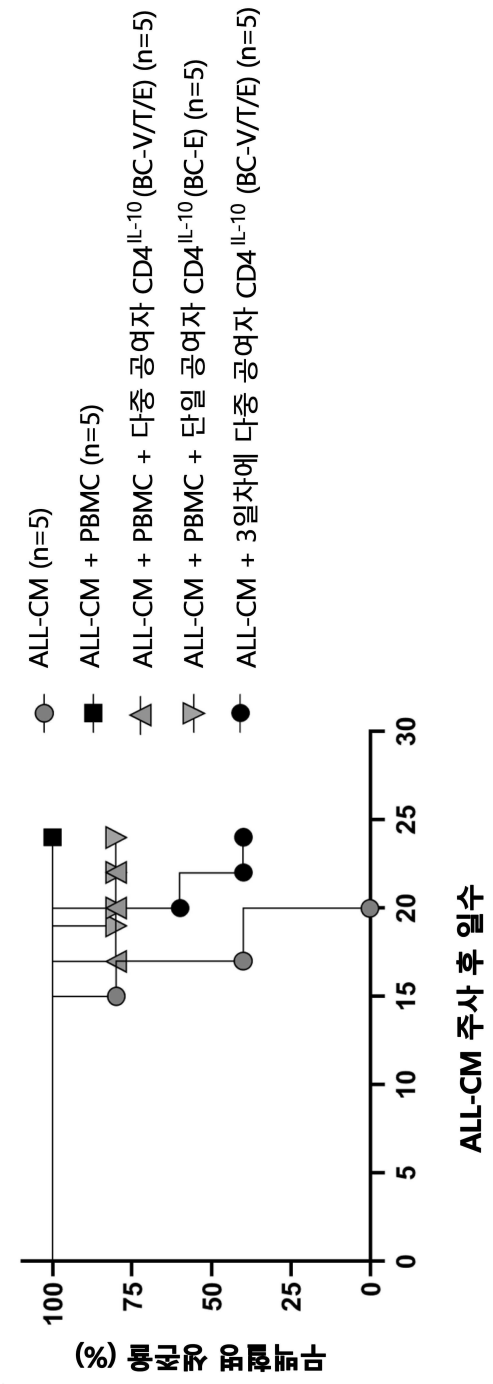
도면38


반응 CD4+ T 세포
반응 CD8+ T 세포
+ 단일 공여자 CD4 IL-10 (BC-V)
+ 단일 공여자 CD4 IL-10 (BC-E)
+ 다중 공여자 CD4 IL-10 (BC-V/T/E)
증식함
증식하지 않음
억제%
85%
84%
87%
88%
85%
85%
카운트

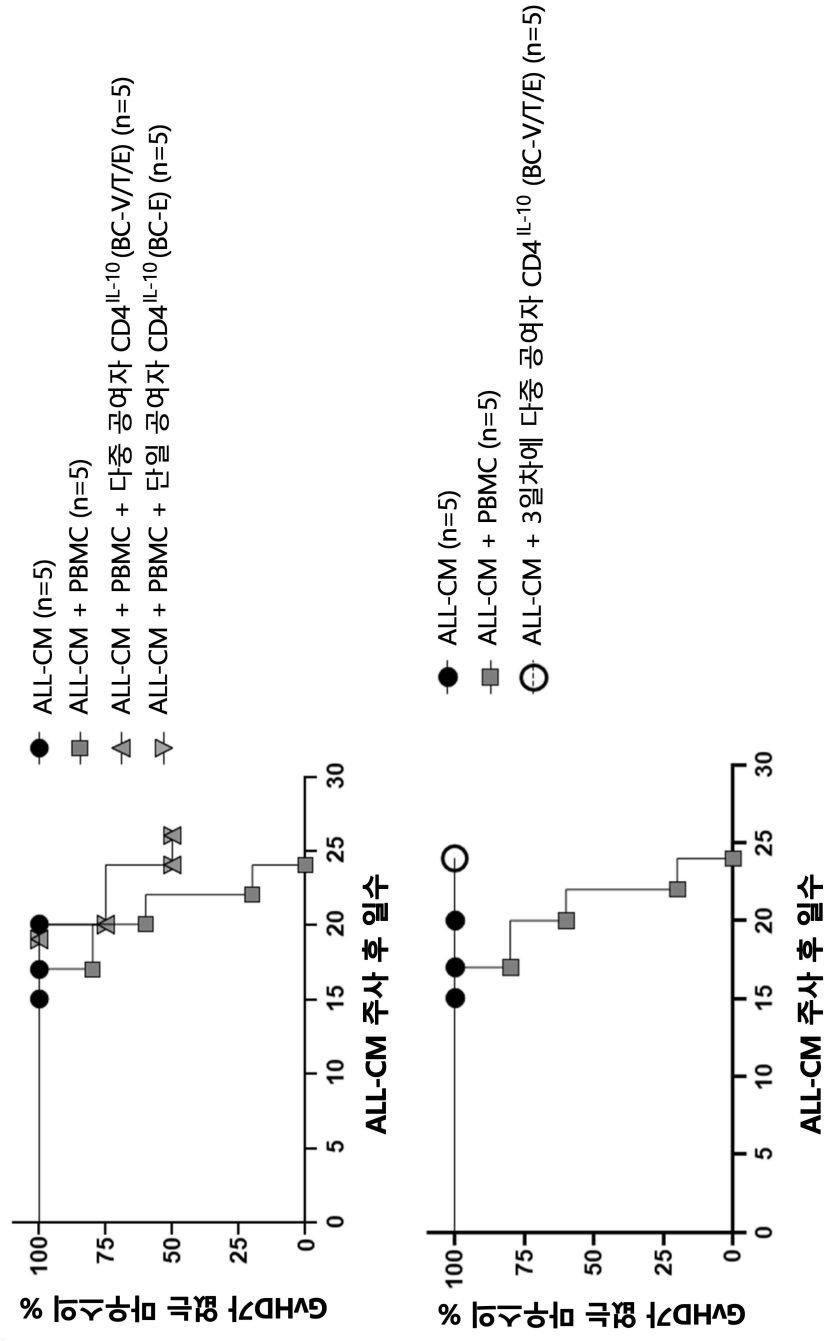
도면39


단일 공여자 CD4IL-10 (BC-E)
단일 공여자 CD4IL-10 (BC-V)
다중 공여자 CD4IL-10 (BC-V/T/E)
살아있는 세포의 %
100
75
50
25
0
ALL-CM
K562

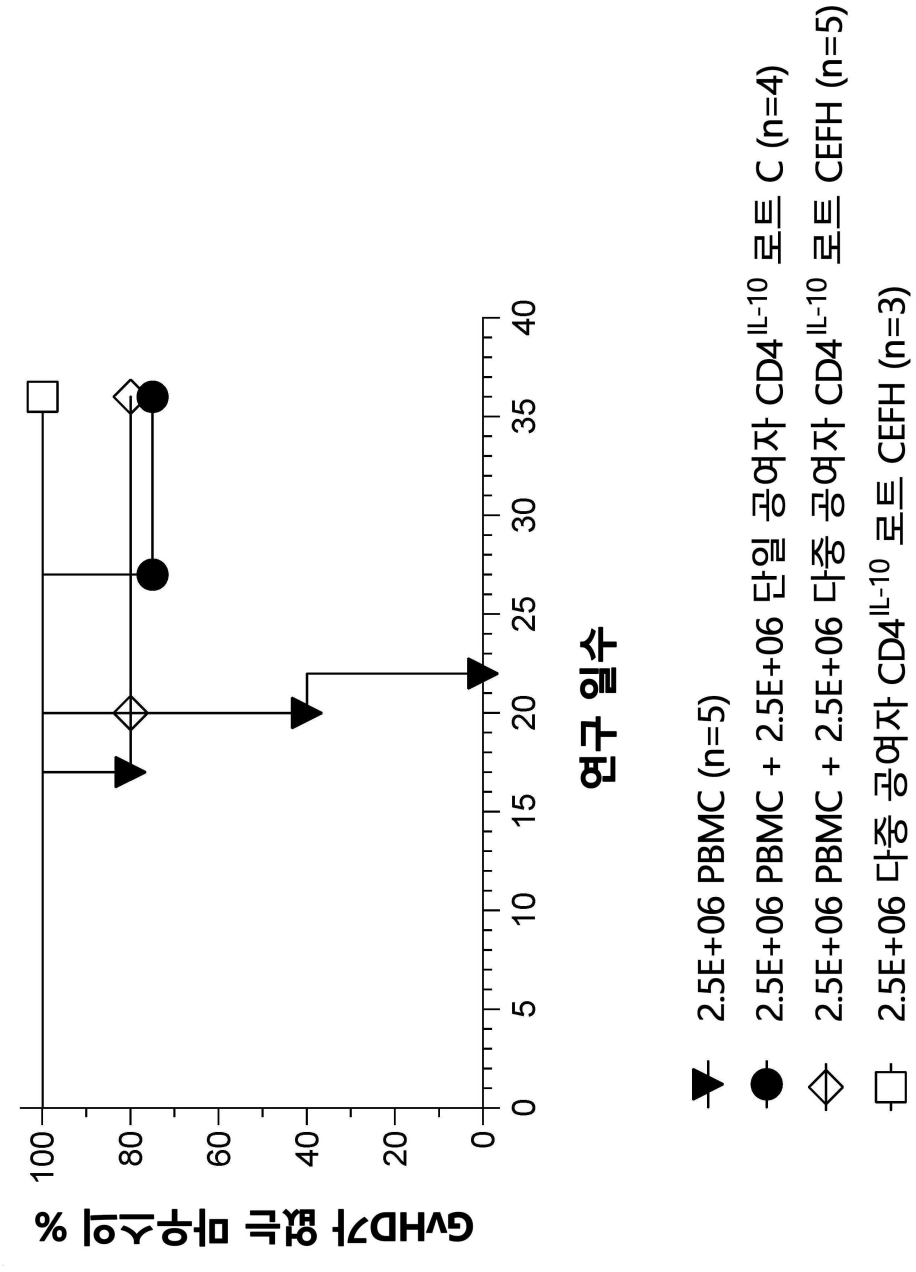
도면40


ALL-CM (n=5)
ALL-CM + PBMC (n=5)
ALL-CM + PBMC + 다중 공여자 CD4IL-10 (BC-V/T/E) (n=5)
ALL-CM + PBMC + 단일 공여자 CD4IL-10 (BC-E) (n=5)
ALL-CM + 3일차에 다중 공여자 CD4IL-10 (BC-V/T/E) (n=5)
무백혈병 생존율 (%)
100
75
50
25
0
0
5
10
15
20
25
30
ALL-CM 주사 후 일수

도면41


GvHD가 없는 마우스의 %
ALL-CM 주사 후 일수
ALL-CM (n=5)
ALL-CM + PBMC (n=5)
ALL-CM + PBMC + 다중 공여자 CD4IL-10 (BC-V/T/E) (n=5)
ALL-CM + PBMC + 단일 공여자 CD4IL-10 (BC-E) (n=5)
GvHD가 없는 마우스의 %
ALL-CM 주사 후 일수
ALL-CM (n=5)
ALL-CM + PBMC (n=5)
ALL-CM + 3일차에 다중 공여자 CD4IL-10 (BC-V/T/E) (n=5)

도면42


GvHD가 없는 마우스의 %
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
연구 일수
2.5E+06 PBMC (n=5)
2.5E+06 PBMC + 2.5E+06 단일 공여자 CD4IL-10 로트 C (n=4)
2.5E+06 PBMC + 2.5E+06 다중 공여자 CD4IL-10 로트 CEFH (n=5)
2.5E+06 다중 공여자 CD4IL-10 로트 CEFH (n=3)

도면43a

```
(서열번호:1)   IL-10_HUMAN      1   --MHSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKE
(서열번호:58)  IL-10_MOUSE      1   --MPGSALLCCLLLLTGMRISRGQYSREDNNCTHFPVGQSHMLLELRTAFSQVKTFFQTKDQLDNILLTD
(서열번호:59)  IL-10_RAT        1   --MPGSALLCCLLLLAGVKTKGHSIRGDNNCTHFPVSQTHMLRELRAAFSQVKTFFQKKDQLDNILLTD
(서열번호:60)  IL-10_MACMU      1   --MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTRFPGNLPHMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNILLKE
(서열번호:61)  IL-10_GORILLA    1   --MHSSALLCCLVLLTGVRASPGHGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKE
(서열번호:62)  IL-10_CYNO       1   --MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTRFPGNLPHMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNILLKE
(서열번호:63)  IL-10_OLIVE BABOON 1 --MHSALLCCLVVLTGVRASPGQGTQSENSCTRFPGNLPHMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKE
(서열번호:64)  IL-10-BONOBO     1   --MHSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKE
(서열번호:65)  IL-10-CHIMP      1   --MHSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKE
(서열번호:66)  IL-10H_EBVB9     1   MERRLVVTLQCLVLL---YLAPECG--GTDQCDNFP----QMLRDLRDAFSRVKTFFQTKDEVDNLLLKE

               IL-10_HUMAN      69  SLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKA
               IL-10_MOUSE      69  SLMQDFKGYLGCQALSEMIQFYLVEVMPQAEKHGPEIKEHLNSLGEKLKTLRMRLRRCHRFLPCENKSKA
               IL-10_RAT        69  SLLQDFKGYLGCQALSEMIKFYLVEVMPQAENHGPEIKEHLNSLGEKLKTLWIQLRRCHRFLPCENKSKA
               IL-10_MACMU      69  SLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENHDPDIKEHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKA
               IL-10_GORILLA    69  SLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKA
               IL-10_CYNO       69  SLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENHDPDIKEHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKA
               IL-10_OLIVE BABOON 69 SLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENHDPDIKEHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKA
               IL-10-BONOBO     69  SLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQDPDIKVHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKA
               IL-10-CHIMP      69  SLLEDFKGYLGCQAIXEMIQFYLEEVMPQAENQDPDIKVHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKA
               IL-10H_EBVB9     62  SLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQDPEAKDHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKA

               IL-10_HUMAN      139 VEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN
               IL-10_MOUSE      139 VEQVKSDFNKLQDQGVYKAMNEFDIFINCIEAYMMIKMKS
               IL-10_RAT        139 VEQVKNDFNKLQDKGVYKAMNEFDIFINCIEAYVTLKMKN
               IL-10_MACMU      139 VEQVKNAFSKLQEKGVYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIQN
               IL-10_GORILLA    139 VEQVKNAFNKLQEKGVYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN
               IL-10_CYNO       139 VEQVKNAFSKLQEKGVYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIQN
               IL-10_OLIVE BABOON 139 VEQVKNAFSKLQEKGVYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIQN
               IL-10-BONOBO     139 VEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN
               IL-10-CHIMP      139 VEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN
               IL-10H_EBVB9     132 VEQIKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTIKAR-
```

가능한 hulL-10 HYBRID#1 (서열번호: 67)

하기의 임의의 조합 아미노산 변화 (*)

```
                                                          *   **
MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQTKDEVDNLLLKESLLEDFKGY
LGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQDPEAKDHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQIKNAFNKLQEKGI
YKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN   **  *                                      *
```

가능한 hulL-10 HYBRID#2 (서열번호 68)

바람직한 단일 aa 변화 I105에서 A105로 아미노산 변화 (#)

```
MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGY
LGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQDPDAKAHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGI
YKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN    #
```


공개특허 10-2025-0005566

도면43c

```
                                                                  * **
(서열번호: 1) IL10_HUMAN   1   --MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKE
(서열번호: 66)IL10H_EBVB9  1   MERRLVVTLQCLVLLYLAPECGGT----DQCDNFP----QMLRDLRDAFSRVKTFFQTKDEVDNLLLKE
                                          *# *
              IL10_HUMAN  69   SLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKA
              IL10H_EBVB9 62   SLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQDPEAKDHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKA
                                  *
              IL10_HUMAN  139  VEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN
              IL10H_EBVB9 132  VEQLKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTIKAR-
```

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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