



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0099309
(43) 공개일자 2024년06월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/725 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/54 (2024.01)
C07K 14/705 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/7051 (2013.01)
A61K 39/4613 (2023.05)
- (21) 출원번호 10-2024-7016522
- (22) 출원일자(국제) 2022년10월19일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년05월17일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2022/078331
- (87) 국제공개번호 WO 2023/069969
국제공개일자 2023년04월27일
- (30) 우선권주장
63/257,608 2021년10월20일 미국(US)

- (71) 출원인
더 보드 오브 리젠츠 오브 더 유니버시티 오브 텍
사스 시스템
미국, 텍사스 78701, 오스틴, 210 웨스트 7 스트
리트
- (72) 발명자
레즈바니 케이티
미국 텍사스주 77030 휴스턴 홀콤브 블러바드
1515 유.티.엠.디. 앤더슨 캔서 센터
- 다허 메이
미국 텍사스주 77030 휴스턴 홀콤브 블러바드
1515 유.티.엠.디. 앤더슨 캔서 센터
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
장훈

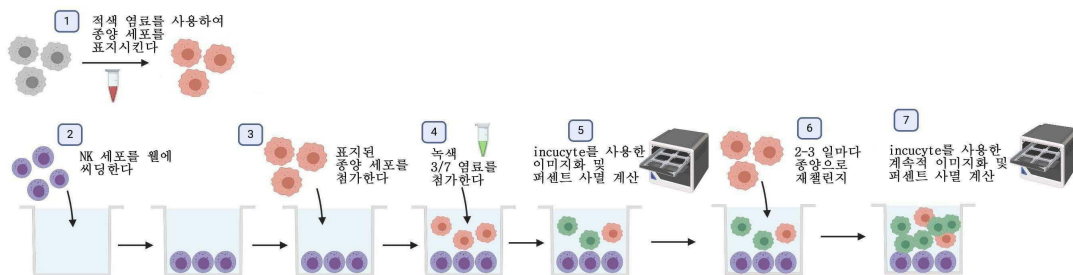
전체 청구항 수 : 총 48 항

(54) 발명의 명칭 최적의 신호 전달과 함께 CAR 작제물로 NK 세포 가공

(57) 요약

본원 개시내용의 구현에는 임의로 한지, CD28 막관통 도메인 또는 DAP10 막관통 도메인 중 하나, DAP10 공동 자극 도메인 및 CD3제타를 포함하는 특정 키메라 항원 수용체 작제물을 포함한다. 특정 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 천연 킬러(NK) 세포에 의해 발현되고, 일부 경우에, NK 세포는 하나 이상의 사이토킨 및 임의로 자살 유전자를 발현하도록 추가로 변형된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 39/4631 (2023.05)
A61K 39/464429 (2023.05)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/5443 (2013.01)
C07K 14/70521 (2013.01)
C07K 16/2896 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 5/0646 (2023.05)
A61K 2239/39 (2023.05)

(72) 발명자

바사르 라페트

미국 텍사스주 77030 휴스턴 홀콤브 블러바드 1515
유.티.엠.디. 앤더슨 캔서 센터

아카리아 수닐

미국 텍사스주 77030 휴스턴 홀콤브 블러바드 1515
유.티.엠.디. 앤더슨 캔서 센터

업레티 나디마

미국 텍사스주 77030 휴스턴 홀콤브 블러바드 1515
유.티.엠.디. 앤더슨 캔서 센터

누네즈 코테스 아나 카렌

미국 텍사스주 77030 휴스턴 홀콤브 블러바드 1515
유.티.엠.디. 앤더슨 캔서 센터

엔슬레이 에밀리

미국 텍사스주 77030 휴스턴 홀콤브 블러바드 1515
유.티.엠.디. 앤더슨 캔서 센터

명세서

청구범위

청구항 1

융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드로서, 상기 융합 단백질이 다음을 포함하는, 폴리뉴클레오타이드:

- (a) 임의로 힌지; 및
- (b1) CD28 막관통 도메인 또는
- (b2) DAP10 막관통 도메인;
- (c) DAP10 공동 자극 도메인; 및
- (d) CD3제타.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 융합 단백질이 키메라 항원 수용체(CAR)로서 추가로 정의되는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 CAR의 세포 외 도메인이 scFv를 포함하는 경우, 상기 CAR이 힌지를 포함하는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 CAR의 세포 외 도메인이 수용체의 세포외 도메인의 일부 또는 전부를 포함하는 경우, 상기 CAR이 힌지가 결여된, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 CAR의 세포 외 도메인이 수용체의 세포외 도메인의 일부 또는 전부를 포함하는 경우, 상기 CAR이 힌지를 포함하는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 6

제2항에 있어서, 상기 CAR이 하나 이상의 항원 결합 도메인을 추가로 포함하는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 7

제6항에 있어서, 항원 결합 도메인이 중앙 항원 또는 감염원을 표적화하는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD3제타가 서열번호 3을 포함하는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CD28 막관통 도메인이 서열번호 1을 포함하는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 10

제2항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CAR이 하나 이상의 추가의 공동 자극 도메인을 추가로 포함하는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 하나 이상의 추가의 공동 자극 도메인이 CD28, DAP12, 4-1BB, NKG2D, 2B4, 및 이의 조

합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 12

제2항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CAR이 신호 펩타이드를 추가로 포함하는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 신호 펩타이드가 CD8, CD27, 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자 수용체(GMSCF-R), Ig 중쇄(IgH), CD3 또는 CD4로 부터의 신호 펩타이드인, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 14

제2항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드가 관심 대상의 추가의 폴리펩타이드를 추가로 암호화하는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 추가의 관심 대상의 폴리펩타이드를 암호화하는 서열과 상기 CAR을 암호화하는 서열이 2A 요소에 의해 폴리뉴클레오타이드 상에서 분리된, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 16

제14항 또는 제15항에 있어서, 상기 관심 대상의 추가의 폴리펩타이드가 치료학적 단백질, 또는 세포 활성화, 확장 및/또는 지속성을 증진시키는 단백질인, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 17

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 관심 대상의 추가의 폴리펩타이드가 자살 유전자 생성물, 하나 이상의 사이토킨, 또는 증식, 확장 및/또는 대사 적합성을 증진시키는 하나 이상의 사람 또는 바이러스 단백질인, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 사이토킨이 IL-15, IL-2, IL-12, IL-18, IL-21, IL-23, 또는 IL-7인, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 사이토킨이 IL-15인, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 20

제18항 또는 제19항에 있어서, 상기 IL-15 서열이 서열번호 8을 포함하는, 폴리뉴클레오타이드.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 벡터가 바이러스 벡터인, 벡터.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 바이러스 벡터가 아데노바이러스 벡터, 아데노 관련 바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터인, 벡터.

청구항 24

제21항에 있어서, 상기 벡터가 비-바이러스 벡터인, 벡터.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 비-바이러스 벡터가 플라스미드인, 벡터.

청구항 26

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오타이드 또는 제21항 내지 제25항 중 어느 한 항의 벡터를 포함하는 세포.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 세포가 면역 세포인, 세포.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 면역 세포가 천연 킬러(NK) 세포, T 세포, 감마 델타 T 세포, 알파 베타 T 세포, 불변 NKT (iNKT) 세포, B 세포, 대식세포, 중간엽 기질 세포, 또는 수지상 세포인, 면역 세포.

청구항 29

제27항에 있어서, 상기 면역 세포가 NK 세포인, 면역 세포.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 NK 세포가 제대혈, 말초 혈액, 유도 만능 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 골수로부터, 또는 세포주로부터 유래되는, 면역 세포.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 NK 세포가 세포주로부터 유래되고, 상기 NK 세포주가 NK-92인, 면역 세포.

청구항 32

제30항에 있어서, 상기 NK 세포가 제대혈 단핵 세포로부터 유래되는, 면역 세포.

청구항 33

제28항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 NK 세포가 CD56+ NK 세포인, 면역 세포.

청구항 34

제28항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 NK 세포가 재조합 사이토킨을 발현하는, 면역 세포.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 사이토킨이 IL-15, IL-2, IL-12, IL-18, IL-21, IL-7, 또는 IL-23인, 면역 세포.

청구항 36

제27항 내지 제35항 중 어느 한 항의 면역 세포를 포함하는 면역 세포 집단.

청구항 37

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오타이드를 보유한 세포 또는 제21항 내지 제25항 중 어느 한 항의 벡터를 보유한 세포의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 개체의 암세포를 사멸시키는 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드를 보유하는 세포가 면역 세포인, 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 면역 세포가 NK 세포, T 세포, 감마 델타 T 세포, 알파 베타 T 세포, iNKT 세포, B

세포, 대식세포, 수지상 세포 또는 이의 혼합체인, 방법.

청구항 40

제38항 또는 제39항에 있어서, 상기 면역 세포가 NK 세포를 포함하고, 상기 NK 세포가 제대혈, 말초혈액, 유도 만능 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 골수로부터, 또는 세포주 또는 이들의 혼합체로부터 유래되는, 방법.

청구항 41

제39항 또는 제40항에 있어서, 상기 NK 세포가 제대혈 단핵 세포로부터 유래되는, 방법.

청구항 42

제38항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역 세포가 개체에 대해 동종이체인, 방법.

청구항 43

제38항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역 세포가 상기 개체에 대해 자가인, 방법.

청구항 44

제37항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드를 보유하는 세포 또는 상기 벡터를 보유하는 세포가 1회 또는 1회 초과로 상기 개체에게 투여되는, 방법.

청구항 45

제44항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드를 보유하는 세포의 개체로의 투여 사이의 지속 시간이 1-24 시간, 1-7 일, 1-4 주, 1-12 개월 또는 1년 이상인, 방법.

청구항 46

제37항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 유효량의 추가의 치료요법을 상기 개체에게 제공하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 추가의 치료요법이 수술, 방사선, 유전자 치료요법, 면역치료요법 또는 호르몬 치료요법을 포함하는, 방법.

청구항 48

제37항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드를 보유하는 세포 또는 상기 벡터를 보유하는 세포가 주입, 주사, 정맥내, 동맥내, 복막내, 기관내, 종양내, 근육내, 내시경적으로, 병변내, 두개내, 경피, 피하, 국소적으로, 관류에 의해, 종양 미세환경에서, 또는 이들의 조합에 의해 개체에게 투여되는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 출원은 2021년 10월 20일자로 출원된 미국 가특허 출원 제63/257,608호의 우선권을 주장한다.
- [0002] 본 출원은 XML 형식으로 제출된 서열 목록을 포함하며, 이는 그 전체가 본원에 참조로 인용된다. 2022년 10월 11일자로 생성된 상기 XML 복사본은 파일명이 MDAC_1299WO_Sequence_Listing_ST26.xml이며, 크기가 13,926 바이트이다.
- [0003] I. 기술분야
- [0004] 본원 개시내용의 구현에는 적어도 세포 생물학, 분자 생물학, 면역학 및 암 의학을 포함한 의학 분야를 포함한다.

배경 기술

[0005] II. 배경기술

[0006] [0004] 최근 해에 키메라 항원 수용체(CAR)가 형질도입된 자가 T 세포를 사용한 입양 세포성 치료요법은 암의 치료를 위해 매우 강력한 접근법인 것으로 입증되었고, FDA는 B 세포 백혈병 및 림프종에 대해 승인하였다.¹⁻
³그러나, 과제는 남아있고 이는 종양 세포에 대한 세포독성이 전신 독성과 연계되지 않도록 하는 것, 표적 항원 음성 악화에 대한 해결책을 모색하는 것 및 동종이계 T 세포 생성물과 함께 발생하는 문제를 처리하면서 자가 생성물을 생성하는 실행 장애물을 피하기 위해 범용의 기성 (off-the-shelf) 세포 치료요법 생성물을 개발하는 것을 포함한다.⁴천연 킬러 (NK) 세포는 이들이 종양 세포에 대해 효과적인 세포독성을 매개하고 T 세포 같이 양게 동종이계 세팅에서 이식편 대 숙주 질환(GVHD)을 유발하는 잠재력이 없기 때문에 매력적인 경쟁자이다.⁵따라서, NK 세포는 즉각적인 임상 사용을 위한 기성 세포 치료요법 생성물로서 시판될 수 있다. 또한 CAR-NK 세포는 이들의 고유 수용체를 통해 종양 세포를 인지하고 표적화하는 고유한 능력을 보유함에 따라서 원칙적으로 CAR 표적 항원의 하향 조절을 통해 질환을 탈피할 가능성이 CAR-T 세포에서 관찰되는 것보다 낮다.⁶ 제대혈 (CB)은 용이하게 가용한 "기성" 동종이계 NK 세포 공급원으로, (하나의 예로서) 이는 CD48, 4-1BBL 및 막 결합 IL-21(mbIL21)을 발현하도록 가공된 K562 세포인 GMP 순응 범용 항원 제시 세포(uAPC)를 사용하여 대량으로 고 기능 용량으로 확장될 수 있다.⁷

[0007] [0005] 본원의 개시내용은 특정 CAR 구성을 통해 목적하는 항원을 표적화할 수 있는 매우 효과적인 NK 세포를 제공하기 위한 입양 세포 치료요법 기술 분야의 오랜 요구를 충족시킨다.

발명의 내용

[0008] 간략한 요약

[0009] [0006] 본원 개시내용의 구현에는 세포가 변형된 NK 세포인 세포 치료요법을 포함하여, 이를 필요로 하는 개체에 대한 입양 세포 치료요법과 관련된 방법 및 조성물을 포함한다. 변형된 NK 세포는 특정 합성 단백질을 발현하여 특정 의학적 병태의 치료에 특히 효과적이고, 예를 들어 합성 단백질이 표적화하는 세포에 대해 NK 세포가 향상된 효능을 가질 수 있도록 한다.

[0010] [0007] 특정 구현예에서, 본원의 개시내용은 DAP10 공동 자극 도메인(예를 들어, T 세포 생물학과 비교하여 NK 세포 생물학과 보다 관련이 있음)을 DAP10 막관통 도메인 또는 CD28 막관통 도메인과 조합하고/하거나 임의로 CD28 힌지와 조합하여 포함하는 키메라 항원 수용체 작제물에 관한 것이다. 이러한 DAP10 포함 CAR 작제물은 T 세포 생물학에 보다 특이적인 CD28 공동 자극 도메인과 같은 다른 공동 자극 도메인에 비해 CAR-NK 세포의 항종양 활성을 증진시킨다. 특정 구현예에서, 상기 작제물은 입양 CAR-NK 세포 치료요법을 개선하기 위해 활용되고, 효능을 증진시킴으로써 독성 위험을 감소시킬 필요가 있는 개체에게 보다 적은 수의 CAR-NK(또는 대체 가능한 경우 CAR-T 세포)를 사용할 수 있게 한다.

[0011] [0008] 본원 개시내용의 특정 구현에는 임의의 유형의 혈액학적 악성 종양, 고형암 및/또는 감염성 질환을 갖는 환자를 치료하기 위한 CAR-NK 세포(또는 다른 대체 CAR 비히클)를 이용한 입양 세포 치료요법을 포함한다.

[0012] [0009] 본원 개시내용의 구현에는 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 융합 단백질은 다음을 포함한다: (a) 임의로 CD28 힌지; 및 (b1) CD28 막관통 도메인 또는 (b2) DAP10 막관통 도메인; 및 (c) DAP10 공동 자극 도메인. 특정 구현예에서, 융합 단백질은 키메라 항원 수용체(CAR)로서 추가로 정의된다. 일부 경우에, CAR은 하나 이상의 항원 결합 도메인을 추가로 포함하고, 항원 결합 도메인이 암 항원(고형 종양 또는 혈액학적 악성 종양) 또는 감염성 체제를 표적화하는 경우를 포함한다. 특정 경우에, CAR은 서열번호 3을 포함하는 것과 같이 CD3체타를 추가로 포함한다. 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 1에 포함된 CD28 막관통 도메인을 암호화할 수 있다. 특정 구현예에서, CAR은 CD28, DAP12, 4-1BB, NKG2D, 2B4 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 하나 이상의 추가의 공동 자극 도메인과 같은 하나 이상의 추가 공동 자극 도메인을 추가로 포함한다. CAR은 예로서, CD8, CD27, 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자 수용체(GMSCF-R), Ig 중쇄(IgH), CD3 또는 CD4로부터의 신호 펩타이드와 같은 신호 펩타이드를 추가로 포함할 수 있거나 포함하지 않을 수 있다.

[0013] [0010] 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 폴리뉴클레오타이드는 관심 대상의 하나 이상의 추가 폴리펩타이드를 추가로 암호화하는 것들을 포함한다. 관심 대상의 하나 이상의 추가 폴리펩타이드를 암호화하는 서열 및 CAR을

암호화하는 서열은 폴리뉴클레오타이드상에서 2A 요소 또는 IRES에 의해 분리될 수 있다. 특정 경우에서, 관심 대상의 추가의 폴리펩타이드는 하나 이상의 치료학적 단백질 및/또는 세포 활성화, 확장, 세포독성 및/또는 지속성을 증진시키는 단백질이다. 일부 경우에, 관심 대상의 추가 폴리펩타이드는 자살 유전자 생성물, 하나 이상의 사이토킨(예를 들어, IL-15, IL-2, IL-12, IL-18, IL-21, IL-23 및/또는 IL-7) 및/또는 증식, 확장 및/또는 대사 적합성을 증진시키는 하나 이상의 사람 또는 바이러스 단백질이다. 사이토킨이 IL-15인 경우, IL-15 서열은 서열번호 8을 포함할 수 있다.

[0014] [0011] 특정 구현예에서, 임의의 종류의 벡터는 아데노바이러스 벡터, 아데노 관련 바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터 또는 플라스미드와 같은 비-바이러스 벡터를 포함하는 본원 개시내용의 임의의 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 또한, 본원 개시내용에는 본원에 포함되는 임의의 폴리뉴클레오타이드 및/또는 본원에 포함되는 임의의 벡터를 포함하는 임의의 종류의 세포가 포함된다. 세포는 줄기 세포 또는 면역세포 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 특정 면역 세포는 하기를 포함한다: 천연 킬러(NK) 세포, T 세포, 감마 델타 T 세포, 알파 베타 T 세포, 불변 NKT(iNKT) 세포, B 세포, 대식세포, 중간엽 기질 세포, 수지상 세포 또는 이들의 혼합물. 면역 세포가 NK 세포인 경우, NK 세포는 체대혈, 말초혈액, 유도만능 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 골수로부터, 또는 NK-92 세포주로부터 유래된 NK 세포와 같은 세포주로부터 유래될 수 있다. NK 세포는 체대혈 단핵 세포로부터 유래할 수 있다. NK 세포는 CD56+ NK 세포일 수 있다. 특정 구현예에서, NK 세포는 IL-15, IL-2, IL-12, IL-18, IL-21, IL-7, 및/또는 IL-23과 같은 제조합 사이토킨을 발현한다. 또한, 본원에서는 본원 개시내용의 하나 이상의 CAR 분자를 발현하는 면역 세포 또는 줄기 세포의 집단이 포함된다. 1개 초과 유형의 CAR 분자가 세포에 의해 발현되는 경우, CAR은 의도된 세포(들)에 특이적으로 결합하는 능력을 증진시키기 위한 것과 같은 상이한 항원을 표적화할 수 있다. 집단은 임의의 종류의 세포의 혼합물을 포함할 수 있거나 포함하지 않을 수 있다.

[0015] [0012] 본원 개시내용의 구현예는 개체에서 암세포를 사멸시키는 방법을 포함하고, 상기 방법은 본원에 포함된 임의의 폴리뉴클레오타이드를 보유한 임의의 세포 및/또는 본원에 포함된 임의의 벡터를 보유한 임의의 세포의 유효량을 개체에 투여하는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드를 보유하는 세포는 NK 세포, T 세포, 감마 델타 T 세포, 알파 베타 T 세포, iNKT 세포, B 세포, 대식세포, 수지상 세포 또는 이들의 혼합물과 같은 면역 세포이다. 면역 세포는 NK 세포를 포함할 수 있고, 여기서, NK 세포는 체대혈(CB 단핵 세포 포함), 말초 혈액, 유도 만능 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 골수로부터, 세포주 또는 이들의 혼합물로부터 유래한다. 면역 세포는 개체와 관련하여 자가 또는 동종이게일 수 있다. 상기 방법의 특정 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드를 보유한 세포 및/또는 벡터를 보유한 세포는 개체에 1회 또는 1회 초과로 투여되고, 폴리뉴클레오타이드를 보유한 세포를 개체에 투여하는 사이의 기간은 1-24시간, 1-7일, 1-4주, 1-12개월 또는 1년 이상일 수 있다. 상기 방법은 수술, 방사선, 유전자 치료요법, 면역치료요법 또는 호르몬 치료요법과 같은 추가의 치료요법의 유효량을 개체에게 제공하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드를 보유하는 세포 및/또는 벡터를 보유하는 세포는 주입, 주사, 정맥내, 동맥내, 복막내, 기관내, 종양내, 근육내, 내시경적으로, 병변내, 두개내, 경피, 피하, 국소적으로, 관류에 의해, 종양 미세환경에서, 또는 이들의 조합으로 개체에게 투여될 수 있다.

[0016] [0013] 상기한 내용은, 후술하는 본 발명의 상세한 설명이 보다 잘 이해될 수 있도록, 본 발명의 특징 및 기술적 이점을 다소 광범위하게 개략적으로 기재하였다. 본원의 청구항들의 주제를 형성하는 추가적인 특징 및 이점이 이하에서 기재될 것이다. 당해 분야의 통상의 기술자는, 기재된 개념 및 구체적인 구현예가 본 발명의 디자인과 동일한 목적을 수행하기 위한 다른 구조를 변형 또는 디자인하기 위한 기초로서 용이하게 이용될 수 있다는 것을 인지해야 한다. 또한, 당해 분야의 통상의 기술자는, 이러한 균등한 구성이 첨부된 청구항들에 제시된 바와 같은 취지 및 범위를 벗어나지 않는다는 것을 이해해야 한다. 추가의 목적 및 이점과 함께 그 구성 및 조작 방법 모두에 대하여 본 발명의 특징인 것으로 간주되는 신규한 특징은 첨부된 도면과 관련하여 고려될 때 하기의 설명으로부터 더 잘 이해될 것이다. 그러나, 각 도면은 예시 및 설명의 목적으로 만 제공되며 본원 개시내용의 범위의 정의로서 의도되지 않는다는 것을 명백하게 이해해야 한다.

도면의 간단한 설명

[0017] [0014] 본원 개시내용을 보다 완전하게 이해하기 위해, 이하에서는 첨부된 도면과 관련하여 주어진 하기 설명을 참조한다.

[0015] 도 1a-1b. 질량 세포측정 패널을 사용한 표현형 분류. 1a. 형질도입되지 않은 NT(좌측)와 CD5CAR-NK CD28TMDAP10CD3z 형질도입된 NK 세포의 상이한 클러스터를 보여주는 TSNE 포노그래프 플롯. 클러스터는 페노그

래프 아래에 지적된 것처럼 색상 코드 범례와 함께 넘버링되어 있다. CARCD5 NK 세포에서 발현되는 2개의 새로운 클러스터(#8 및 #11)는 원과 직사각형으로 강조 표시되어 있다. 1b. 각 클러스터(Y축상에 표시된)에서 다양한 마커(X축상에 표시된)의 정규화된 발현을 보여주는 히트맵. 클러스터 #8과 #11에서 발현이 높은 활성화, 세포 독성 및 성숙화 마커는 직사각형으로 강조 표시되어 있다.

[0016] 도 2a-2c. DAP10 공동자극 도메인을 가진 CD5 CAR-NK 세포의 다기능성을 보여주는 이소플렉시스 단일 세포 분비체 데이터. 2a. 형질도입되지 않은(NT) NK 세포와 비교하여 상이한 CD5 CAR-NK 세포의 다기능성 퍼센트를 보여주는 막대 그래프. 2b. 형질도입되지 않은(NT) NK 세포와 비교하여 상이한 CD5 CAR-NK 세포의 다기능성 강도 지수를 보여주는 막대 그래프. 2c. 단일 세포 수준에서 다양한 사이토킨의 순열을 분비하는 능력이 가장 높은 작제물을 보여주는 다기능성 히트맵이다.

[0017] 도 3a-3c. 다수의 종양 재챌린지(rechallenge)를 통한 Incucyte 사멸 검정 실험. 3a. Incucyte 사멸 검정 재챌린지 실험의 실험 디자인 및 방법론의 하나의 구현예를 보여주는 개략도. 3b. 다양한 CD5 CAR-NK 세포 조건 중 각 종양 재챌린지(화살표로 표시) 후의 적색 수(y축; 살아있는 종양 수의 측정치)를 보여주는 그래프. 3c. 각 종양 재챌린지 후 킨플루언스 퍼센트(종양 풍부도의 측정치)를 보여주는 그래프(화살표로 표시).

[0018] 도 4a-4b. 다양한 CD5 CAR-NK 세포들 중의 산소 소비율(OCR)과 세포 외 산성화율(ECAR)을 측정하는 해마 대사 검정. 4a. 형질도입되지 않은(NT) NK 세포와 비교하여 상기 다양한 CD5 CAR-NK 세포 디자인 중에 OCR을 보여주는 그래프. 4b. 형질도입되지 않은(NT) NK 세포와 비교하여 상기 다양한 CD5 CAR-NK 세포 디자인 중에 ECAR을 보여주는 그래프.

[0019] 도 5a-5c. DAP10 공동자극 도메인과 함께 CD5 CAR-NK 세포는 맨틀 세포 림프종의 PDX 마우스 모델에서 양호한 활성을 보여준다. 5a. 피하 종양에서 종양 단독을 투여받은 마우스(좌측)와 종양 + CD5CAR-NK를 투여받은 마우스(우측)의 피하 종양에서 CD45+CD5+ 세포의 절대 수를 보여주는 막대 그래프. 5b. 비장에서 종양 단독을 투여받은 마우스(좌측)와 종양 + CD5CAR-NK를 투여받은 마우스(우측)의 피하 종양에서 CD45+CD5+ 세포의 절대 수를 보여주는 막대 그래프. 5c. 골수에서 종양만 투여받은 마우스(좌측)와 종양 + CD5CAR-NK를 투여받은 마우스(우측)의 피하 종양에서 CD45+CD5+ 세포의 절대 수를 보여주는 막대 그래프.

[0020] 도 6a-6b. DAP10 공동자극 도메인을 갖는 CD27 CAR-NK 세포는 급성 골수성 백혈병의 NSG 마우스 모델에서 종양 제어 및 생존을 개선시킨다(반딧불이 루시페라제(FFLuc)로 형질도입된 THP-1). 6a. 다양한 마우스 그룹에서 THP-1 FFLuc의 발광으로 종양 부담을 보여주는 일련의 생체 발광 영상(BLI)이다. 6b. 시간 경과에 따른 다양한 마우스 그룹의 생존율을 보여주는 생존 곡선.

[0021] 도 7a-7b. 도 7a는 다양한 작제물 동정 및 상응하는 형질도입 효율을 도시한다(도 7b). 도 7a에 나타낸 바와 같이 CB-NK 세포를 다양한 CD5 CAR 작제물로 형질도입한 후 유동 세포측정에 의해 형질도입 효율을 측정하였다. 형질도입 효율은 퍼센트 양성 세포를 기준으로 한다(도 7b). 도 7b에서, 막대 그래프의 좌측에서 우측으로의 막대는 위에서 아래로 판독했을 때 범례의 막대에 상응한다.

[0022] 도 8은 다양한 CD5 작제물의 마우스 주사 실험 계획의 한 예와 상응하는 타임라인을 제공한다. 상기 도식은 T 림프아구 세포주 CCRF-CEM을 표적으로 하는 다양한 CD5 CAR NK 세포의 생체 내 항종양 활성을 시험한 결과를 보여준다.

[0023] 도 9a-9b. 도 9a와 9b는 IgG1 힌지 세포와 함께 항-CD5 CAR NK로 치료받은 마우스가 NT NK 세포와 종양만 치료한 마우스보다 훨씬 더 오래 생존한다는 것을 보여준다. 생체발광 이미지는 각 그룹의 마우스를 보여주고(도 9a), 루시페라제 신호의 정량화는 도 9b에 나타낸다.

[0024] 도 10a-10b. 도 10a 및 10b는 CD28 힌지를 갖는 항-CD5 CAR NK로 치료한 마우스가 종양 단독, NT NK 세포 및 IgG1 힌지를 갖는 CD5 CAR NK 세포에 비해 종양 부담이 현저히 감소한다는 것을 입증한다. 각각의 그룹 내 생체발광 이미지는 도 10a에서 제공되고, 루시페라제 신호의 정량화는 도 10b에 나타낸다.

[0025] 도 11. DAP10 신호 전달을 갖는 CD5 CAR-NK 세포는 단일 세포 전사체 수준에서 높은 증식 및 대사적 이점의 증거를 보여준다. CD5CAR-DAP10-CD3z, CD5CAR-CD3z 및 NT NK 세포를 비교한 scRNAseq 데이터의 경로 집적(enrichment) 분석을 보여주는 히트맵. N=2.

[0026] 도 12. DAP10 신호 전달을 갖는 CD5 CAR-NK 세포는 단일 세포 후성유전학적 수준에서 AP1 복합체 및 BATF 계열과 관련된 TF의 집적을 나타낸다. CD5CAR-DAP10-CD3z와 CD5CAR-CD3z를 비교한 scATACseq 데이터의 TF 집적 분석을 보여주는 볼케이노 플롯. N=2.

[0027] 도 13a-13b. DAP10 신호 전달을 갖는 CD5 CAR-NK 세포는 RPPA에 의해 단백질체 수준에서 증진된 활성화를 보여준다. 13a. CD5 표적 항원으로 2분 및 15분 동안 자극하기 전(자극하지 않음)과 자극 후 NT NK 세포로 정규화된 CD5CAR-DAP10-CD3z 및 CD5CAR-CD3z의 Log2 단백질 발현 데이터를 보여주는 RPPA 분석 히트맵. 13b. 증식, 줄기성(stemness), 대사 활성, 면역 시냅스 형성 및 기억 특성과 관련된 다양한 단백질 경로 간의 상호작용을 보여주는 경로 네트워크 분석. N=2.

[0028] 도 14a-14b. DAP10 신호 전달을 갖는 CD5 CAR-NK 세포는 생체 내에서 종양 재채린지 후에도 지속되며 리콜 반응을 증가시키는 능력을 갖는다. 14a. 방사선 조사 시기, CD5+ CCRF-CEM 종양 주사 시기, CD5 CAR-NK 세포 주입 시기 및 CD5+ CCRF-CEM 종양(FFLuc-GFP가 형질도입된)을 사용한 재채린지 시기를 보여주는 생체 내 마우스 모델의 실험 계획의 세부 사항을 보여주는 개략도. 14b. 사람 CD45+ 게이트에 이어서 NK 세포 게이트(CD56+ 및 GFP-)를 보여주는 재채린지 전(좌측 패널) 및 재채린지 후 유동 세포 측정 데이터(우측 패널)를 보여주는 FACS 플롯. 이는 CD5 CAR-NK 세포가 종양 재채린지 후 확대되어 CD5+CCRF 종양에 대한 리콜 반응을 증가시킬 수 있음을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] [0029] 오랫동안 유지되어 온 특허법 협약에 따라, 청구항을 비롯하여 본 명세서에서 단어 "포함하는"과 협력하여 사용될 때의 단수 형태의 단어는 "하나 이상"을 의미한다. 본원 개시내용의 일부 구현에는 본원 개시내용의 하나 이상의 요소, 방법 단계 및/또는 방법으로 이루어지거나 필수적으로 이루어질 수 있다. 본원에 기재된 임의의 방법 또는 조성물은 본원에 기재된 임의의 다른 방법 또는 조성물에 대해 실시될 수 있고, 상이한 구현에 가 조합될 수 있는 것으로 고려된다.
- [0019] [0030] 본원 명세서 전반에 걸쳐, 문맥상 달리 요구하지 않는 경우, “포함한다(comprise)”, “포함한다(comprises)” 및 “포함하는(comprising)”이라는 용어는 언급된 단계 또는 요소, 또는 단계 또는 요소 그룹을 포함하지만 임의의 다른 단계 또는 요소 또는 단계 또는 요소의 그룹을 배제하지는 않음을 의미하는 것으로 이해될 것이다. "로 이루어진"이란 "로 이루어진"이라는 문구 뒤에 오는 모든 것을 포함하며 이에 제한되는 의미이다. 따라서 '로 이루어진'이라는 문구는 나열된 요소가 필수 또는 의무적인 사항이며 어떠한 다른 요소는 존재하지 않을 수 있음을 지적한다. "필수적으로 이루어진"이란 문구 뒤에 나열된 임의의 요소를 포함하고 나열된 요소에 대해 본원 개시내용에 명시된 활성 또는 작용을 방해하거나 이에 기여하지 않는 다른 요소로 제한된다는 의미이다. 따라서, 용어 “필수적으로 이루어진”은 열거된 요소들이 요구되거나 의무적이지만 어떠한 다른 요소들은 임의적이거나 열거된 요소들의 활성 또는 작용에 영향을 미치는지 또는 미치지 않는지의 여부에 의존하여 존재하거나 존재하지 않을 수 있음을 지적한다.
- [0020] [0031] 본원 명세서 전반에 걸쳐 “하나의 구현예”, “구현예”, “특정 구현예”, “관련 구현예”, “특정 구현예”, “추가적 구현예” 또는 “추가적 구현예” 또는 이의 조합에 대한 언급은 상기 구현예와 관련하여 기재된 특정 특성, 구조 또는 특징이 본원 개시내용의 적어도 하나의 구현예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본원 명세서의 다양한 위치에서 이전의 문장의 출현은 모두 동일한 구현예를 필수적으로 언급하지는 않는다. 추가로, 특정 특성, 구조 또는 특징은 하나 이상의 구현예에서 임의의 적합한 방식으로 조합될 수 있다.
- [0021] [0032] 본원에 사용된 바와 같은 용어 “또는” 및 “및/또는”을 사용하여 조합하여 또는 서로 배타적으로 다수의 성분들을 기재한다. 예를 들어, “x, y, 및/또는 z”는 “x” 단독, “y” 단독, “z” 단독, “x, y, 및 z,” “(x 및 y) 또는 z,” “x 또는 (y 및 z),” 또는 “x 또는 y 또는 z”를 언급할 수 있다. 이것은 구체적으로 x, y, 또는 z가 하나의 구현예로부터 배제될 수 있는 것으로 고려된다.
- [0022] [0033] 본원 전반에 걸쳐, 용어 "약"은 값이 값을 결정하는데 이용되는 장치 또는 방법에 대한 오차의 표준 편차를 포함한다는 것을 명시하기 위해 세포 및 분자 생물학 분야에서 이의 명백하고 통상적인 의미에 따라 사용된다.
- [0023] [0034] 본원에 사용된 바와 같은 용어 “가공된”은 세포, 핵산, 폴리펩타이드, 벡터 등을 포함하는, 사람의 손에 의해 생성된 실체를 언급한다. 적어도 일부 경우에, 가공된 실체는 합성이고 천연적으로 존재하지 않거나 본원의 개시내용에 사용되는 방식으로 구성되지 않는 요소를 포함한다.
- [0024] [0035] 본원에 사용된 용어 "단리된"은 다른 물질이 실질적으로 없는 분자 또는 생물학적 물질 또는 세포 물질을 지칭한다. 하나의 양상에서, "단리된"이라는 용어는 다른 DNA 또는 RNA, 또는 단백질 또는 폴리펩타이드, 또는 세포 또는 세포 기관 또는 각각 천연 공급원에 존재하는 것과 같은 조직 또는 기관으로부터 분리된 핵산, 예를 들어, DNA 또는 RNA, 또는 단백질 또는 폴리펩타이드, 또는 세포 또는 세포 기관, 또는 조직 또는 기관을 지

칭한다. 용어 “단리된”이란 또한 재조합 DNA 기술로 제조될 때 세포 물질, 바이러스 물질 및 배양 배지가 실질적으로 없거나, 화학적으로 합성될 때 화학적 전구체 또는 기타 화학물질이 실질적으로 없는 핵산 또는 펩타이드를 지칭한다. 더욱이, “단리된 핵산”은 단편으로서 자연적으로 존재하지 않고 천연 상태에서 발견되지 않는 핵산 단편을 포함하는 것으로 의미된다. 용어 “단리된”은 또한 본원에서 다른 세포 단백질로부터 단리된 폴리펩타이드를 지칭하기 위해 사용되고, 정제된 폴리펩타이드 및 재조합 폴리펩타이드 둘다를 포괄하는 것으로 의미된다. 용어 “단리된”은 또한 본원에서 다른 세포 또는 조직으로부터 단리된 세포 또는 조직을 지칭하기 위해 사용되고, 배양되고 가공된 세포 또는 조직 둘다를 포괄하는 것으로 의미된다.

[0025] [0036] 본원에 사용된 "예방한다" 및 "예방된", "예방하는" 등과 같은 유사한 용어는 질환 또는 병태, 예를 들어, 암의 발생 또는 재발 가능성을 예방, 억제 또는 감소시키기 위한 접근법을 나타낸다. 또한 질환 또는 병태의 발병 또는 재발을 지연시키거나 질환 또는 병태의 증상의 발생 또는 재발을 지연시키는 것을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같은 “예방” 및 유사 용어는 또한 질환 또는 병태의 강도, 효과, 증상 및/또는 부하를 감소시킴을 포함한다.

[0026] [0037] 본원에 사용된 바와 같은 용어 “샘플”은 일반적으로 생물학적 샘플을 지칭한다. 샘플은 개체로부터의 조직 또는 세포로부터 취득될 수 있다. 일부 예에서, 샘플은 조직 생검, 혈액(예를 들어, 전혈), 혈장, 세포외 유체, 건조된 혈반, 배양된 세포, 폐기된 조직을 포함할 수 있거나, 이들로부터 유래될 수 있다. 샘플은 수거 전에 공급원으로부터 단리될 수 있다. 비제한적인 예는 혈액, 뇌척수액, 흉막액, 양수, 림프액, 타액, 소변, 대변, 눈물, 땀 또는 점막 배설물, 및 수집 전에 1차 공급원으로부터 분리된 기타 체액을 포함한다. 일부 예에서, 샘플은 샘플 제조 동안 이의 1차 공급원(세포, 조직, 혈액과 같은 체액, 환경 샘플 등)으로부터 단리된다. 샘플은 이의 1차 공급원으로부터 정제되거나 농축될 수 있거나 그렇지 않을 수 있다. 일부 경우에, 1차 공급원은 추가 처리 전에 균질화된다. 샘플은 여과하거나 원심분리하여 베타코트, 지질 또는 미립자 물질을 제거할 수 있다. 샘플은 또한 핵산에 대해 정제되거나 농축될 수 있거나 RNase로 처리될 수 있다. 샘플은 온전하거나, 단편화되거나 부분적으로 분해된 조직 또는 세포를 함유할 수 있다.

[0027] [0038] 본원에 사용된 용어 "대상체"는 일반적으로 처리 또는 분석을 진행하고, 특정 경우에 암이 있거나 암이 있을 것으로 의심되는 생물학적 샘플을 갖는 개체를 지칭한다. 대상체는 포유류, 예를 들어, 사람, 연구 동물(예를 들어, 영장류, 래트, 마우스, 토끼), 가축(예를 들어, 소, 양, 염소, 돼지, 칠면조 및 닭), 가정용 애완동물(예를 들어, 개, 고양이 및 설치류), 말 및 유전자전이 비-사람 동물을 포함하는 방법 또는 재료의 대상인 임의의 유기체 또는 동물 대상체일 수 있다. 대상체는 환자일 수 있고, 예를 들어, 양성 또는 악성의 신생물 또는 암과 같은 질환 (의학적 병태로서 언급될 수 있는)을 갖거나 갖는 것으로 의심될 수 있다. 대상체는 치료를 받고 있는 중이거나 치료를 받은 대상체일 수 있다. 대상체는 무증상일 수 있다. 대상체는 건강한 개체일 수 있지만 암의 예방을 원하는 개체일 수 있다. 용어 “개체”는 적어도 일부 경우에 상호교환적으로 사용될 수 있다. “대상체” 또는 “개체”는 본원에 사용된 바와 같이 의학 시설에 거주하거나 거주하지 않을 수 있고 의학 시설의 외래 환자로서 치료될 수 있다. 개체는 인터넷을 통해 하나 이상의 의학적 조성물을 투여받을 수 있다. 개체는 임의의 연령의 사람 또는 비-사람 동물을 포함할 수 있고, 따라서 성인 및 청소년(즉, 어린이) 둘다 및 유아를 포함하고, 자궁내 개체를 포함한다. 상기 용어가 의학적 치료의 필요성을 암시하는 것은 아니므로 개체가 자발적으로 또는 비자발적으로 임상 또는 기초 과학 연구의 지원 여부에 관계없이 실험의 일부가 될 수 있다.

[0028] [0039] 본원에 사용되는 "치료" 또는 "치료하는"이란, 질환 또는 병리학적 상태의 증상 또는 병리학에 대한 임의의 유익한 또는 바람직한 효과를 포함하며, 심지어 치료하고자 하는 질병 또는 병태, 예를 들어, 암의 1종 이상의 측정 가능한 마커의 최소 감소도 포함할 수 있다. 치료는 임의로 질환 또는 병태의 증상의 감소 또는 개선, 또는 질환 또는 병태의 진행의 지연을 포함할 수 있다. “치료”란 반드시 질환 또는 병태 또는 이의 관련 증상의 완전한 근절 또는 치유를 필수적으로 나타내지 않는다.

[0029] [0040] 치료, 진단 또는 생리학적 목적 또는 효과와 관련하여 임의의 방법은 또한 기재된 치료, 진단, 생리학적 목적 또는 효과를 성취하거나 수행하기 위해 본원에 논의된 임의의 화합물, 조성물 또는 제제의 "용도"와 같은 "용도" 청구항 언어에 기재될 수 있다.

[0030] *****

[0031] [0041] 본원 개시내용은 키메라 항원 수용체 작제물이 적어도 일부 경우, T 세포를 포함한 다른 면역 세포에 적합한 생물학적 제제와는 반대로, NK 세포에 더 적절한 하나 이상의 성분을 가지고 있기 때문에 NK 세포에 사용하기에 더 적합한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 하나의 예에서, CD28이 T세포 생물학과 관련이 있고 NK세포

에는 존재하지 않는 공동 자극 분자인 점을 감안하여, 발명자들은 예로서 DAP10, DAP12, NKG2D 및/또는 4-1BB와 같이 NK 세포 생물학과 더 관련이 있는 대안적 공동 자극 분자를 가진 다른 CAR 벡터를 개발하였다. 본원에 포함되는 바와 같이, 다양한 공동 자극 분자를 사용한 다양한 CAR 디자인은 항원 결합 도메인으로 CD5 scFv 또는 CD27 세포 외 도메인을 특징으로 하지만 이는 단지 예시일 뿐이다. DAP10 공동 자극 도메인은 CAR-NK 세포에 보다 활성화된 표현형을 부여하며, 질량 세포 측정에 의해 동정된 특정 클러스터는 DNAM, NKG2D, CD3z 및 ZAP70과 같은 활성화 마커, TRAIL, 그랜자임(Granzyme) B 및 퍼포린(Perforin)과 같은 세포 독성 마커; 및 Eomes 및 Tbet과 같은 성숙화 마커의 발현 증가를 보여준다(도 1). 또한, DAP10 공동 자극 도메인과 DAP10 또는 CD28 막통과 도메인을 갖는 CAR-NK 세포는 다른 공동 자극 도메인을 갖는 CAR-NK 세포에 비해 보다 높은 다기능성을 보여주었다(도 2). 중요하게, DAP10 공동 자극 도메인을 갖는 CD5에 대해 지시된 CAR-NK 세포는 다수의 종양 재철허린지 후 CCRF T-ALL 세포주를 사멸시키는 능력을 갖는 반면, 다른 공동 자극 분자를 갖는 CAR-NK 세포는 기능 고갈로 인해 이후 종양 재철허린지 시 CCRF를 사멸시키는 능력을 상실한다(도 3). 대사의 관점에서, DAP10 공동 자극 도메인을 갖는 CAR-NK 세포는 보다 높은 산소 소비율(OCR)과 보다 높은 해당 작용 용량으로 입증되고, 보다 높은 세포 외 산성화율(ECAR)에 의해 입증된 바와 같이 보다 높은 산화 인산화와 함께 보다 높은 대사적 적합성을 보여주었다(도 4). 이는 특정 구현예에서 이들의 증진된 효능과 관련이 있을 수 있다. 이는 CD5 CAR-NK 세포의 효능을 시험하는 맨틀 세포 림프종의 PDX 마우스 모델(도 5)과 CD70 CAR-NK 세포의 효능을 시험하는 급성 골수성 백혈병(THP-1)의 NSG 마우스 모델(그림 6)에서 DAP10 자체물의 증진된 항종양 활성으로 해석된다. 본원에 나타난 바와 같이, NK 활성화 수용체 NKG2D의 다운스트림에 있는 중요한 어댑터 분자인 DAP10은 CAR-NK 세포에 대해 강력한 공동 자극 도메인 역할을 할 수 있고 시험관 내 및 생체 내에서의 대사 적합성과 항종양 활성을 증진시킬 수 있다.

[0032] I. 유전학적으로 가공된 수용체

[0042] 본원 개시내용은 특정 성분을 활용하여 특정 성분이 결합된 다른 유전학적으로 가공된 수용체보다 증진된 효능에 대한 유전학적으로 가공된 수용체에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 수용체는 임의로 힌지를 포함한다. 수용체가 세포 외 도메인의 적어도 일부로서 scFv를 포함하는 경우에, 수용체는 scFv와 막관통 도메인 사이의 힌지를 포함할 수 있다. 특정 예에서, 수용체의 세포 외 도메인이 scFv가 결합된, 예를 들어, 내인성 또는 다른 수용체의 세포 외 도메인의 적어도 일부를 포함하는 경우, 수용체의 세포 외 영역이 scFv를 결합하는 경우 수용체는 힌지를 포함할 수도 있고 포함하지 않을 수도 있다. 특정 경우에, 수용체는 적어도 CD28 힌지를 포함한다. 일부 경우에, 수용체는 적어도 CD28 막관통 도메인을 포함한다. 특정 경우에, 수용체는 적어도 DAP10 막관통 도메인을 포함한다. 특정 경우에, 수용체는 적어도 DAP10 공동 자극 도메인을 포함한다.

[0043] 특정 구현예에서, 증진된 수용체는 (융합 단백질의 형태를 포함하여) 다음을 포함한다:

[0044] (a) 임의로 힌지; 및

[0045] (b1) CD28 막관통 도메인 또는

[0046] (b2) DAP10 막관통 도메인;

[0047] (c) DAP10 공동 자극 도메인; 및

[0048] (d) CD3제타.

[0049] 따라서 특정 경우에, 수용체는 CD28 힌지(또는 예로서, CD8알파 힌지 또는 IgG1 힌지), CD28 막관통 도메인 및 DAP10 공동 자극 도메인을 포함한다. 다른 경우에, 수용체는 CD28 힌지, DAP10 막관통 도메인 및 DAP10 공동 자극 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서, (a)(임의로), (b1) 또는 (b2), (c) 및 (d)의 성분은 융합 단백질의 형태이고, N-말단에서 C-말단 방향으로 (a)(임의로), (b1) 또는 (b2), (c) 및 (d)의 순서로 존재한다. 특정 경우에, 융합 단백질은 (a)가 결합되어 있다.

[0050] 특정 구현예에서, 융합 단백질의 형태로 (a)(임의로), (b1) 또는 (b2), (c) 및 (d)의 성분은 CAR 구성을 포함하여 하나 이상의 항원 결합 도메인을 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 항원 결합 도메인은 N-말단에서 C-말단 방향으로 (a)(임의로), (b1) 또는 (b2), (c) 및 (d)(순서대로)의 N-말단 측에 있다. 특정 구현예에서, 유전학적으로 가공된 수용체로서의 융합 단백질은 하나 이상의 항원 결합 도메인, (a)(임의로), (b1) 또는 (b2), (c) 및 (d)로 필수적으로 이루어지거나 이루어진다. 즉, 특정 경우에, 유전학적으로 가공된 수용체는 DAP10 이외의 다른 공동 자극 도메인이 결합되어 있지만, 다른 경우에는 유전학적으로 가공된 수용체는 DAP10 이외의 하나 이상의 공동 자극 도메인을 포함한다. 유전학적으로 가공된 수용체가 DAP10 이외의 하나 이상의 다른 공동 자극 도메인을 포함하는 상기 또 다른 경우에, 다른 공동 자극 도메인(들)은 T

세포가 아닌 NK 세포에서 천연적으로 발견되는 단백질에 존재하는 공동 자극 도메인일 수도 있고 아닐 수도 있다. 특정 예는 CD28, DAP12, 4-1BB, NKG2D, 2B4, 이의 조합 등을 포함한다.

[0042] [0051] (a)(임의로), (b1) 또는 (b2), (c) 및 (d)의 성분은 융합 단백질로서 단일 폴리뉴클레오타이드 상에서 발현될 수 있고, 특정 구현예에서 융합 단백질은 하나 이상의 항원 결합 도메인을 포함한다. 폴리뉴클레오타이드는 단리될 수 있거나, 바이러스 또는 비바이러스를 포함한 임의의 종류의 벡터에 포함될 수 있다. 특정 구현예에서, 벡터는 NK 세포, T 세포, 감마 델타 T 세포, 알파 베타 T 세포, iNKT 세포, B 세포, 대식세포, 수지상 세포 또는 이들의 혼합물과 같은 면역 세포를 포함하는 임의의 유형의 세포에 존재한다. 세포의 변형에 적합한 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 상기 문헌(Sambrook and Ausubel)을 참조한다. 예를 들어, 세포는 문헌(참조: Heemskerk et al., 2008 and Johnson et al., 2009)에 기재된 형질도입 기술을 사용하여, 암 항원 또는 감염성 제제의 항원에 대해 항원 특이성을 갖는 유전학적으로 가공된 수용체를 발현하도록 형질도입될 수 있다.

[0043] [0052] 일부 구현예에서, 상기 세포는 하나 이상의 유전학적으로 가공된 수용체를 암호화하는 유전학적 가공을 통해 도입된 하나 이상의 핵산을 포함하고, 상기 핵산의 유전학적으로 가공된 생성물을 발현한다. 특정 구현예에서, 핵산은 즉, 통상적으로 가공된 세포 및/또는 상기 세포가 유래되는 유기체에서 발견되지 않는, 또 다른 유기체 또는 세포로부터 수득된 것과 같이 세포로부터 수득된 세포 또는 샘플 중에 존재하지 않는 이중성이다. 일부 구현예에서, 핵산은 천연적으로 존재하지 않는, 예를 들어, 천연에서 발견되지 않는 핵산(예를 들어, 키메라)이다. 이들은 수공의 생성물일 수 있다.

[0044] [0053] CAR을 포함하는 예시적 항원 수용체, 및 수용체를 가공하고 세포에 도입하기 위한 방법은 예를 들어, 문헌(참조: 국제 특허 출원 공개 공보 WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, 미국 특허 출원 공개 공보 US2002131960, US2013287748, US20130149337, 미국 특허 제6,451,995호, 제7,446,190호, 제8,252,592호, 제8,339,645호, 제8,398,282호, 제7,446,179호, 제6,410,319호, 제7,070,995호, 제7,265,209호, 제7,354,762호, 제7,446,191호, 제8,324,353호, 및 제8,479,118호, 및 유럽 특허 출원 EP2537416)에 기재된 것들, 및/또는 문헌(참조: Sadelain et al., 2013; Davila et al. 2013; Turtle et al., 2012; Wu et al., 2012)에 기재된 것들을 포함한다. 일부 양상에서, 유전학적으로 가공된 항원 수용체는 미국 특허 제7,446,190호에 기재된 바와 같은 CAR, 및 국제 특허 출원 공개 공보 WO/2014055668 A1에 기재된 것들을 포함한다.

[0045] [0054] 특정 구현예에서, 유전학적으로 가공된 수용체는 하나 이상의 항원 결합 도메인 및 (a), (b1) 또는 (b2) 및 (c)의 성분을 포함한다. 특정 구현예에서, 유전학적으로 가공된 수용체는 CAR이고, 일부 구현예에서 항원 결합 도메인은 항체 또는 이의 기능적 단편이다. 다른 경우에 CAR의 항원 결합 도메인은 항체 또는 이의 기능적 단편이 아니라 대신 수용체에 대한 천연 리간드이다. CAR은 2개 이상의 항원 결합 도메인을 포함함에 의해 이특이적인 단일 폴리펩타이드일 수 있고, 이중 하나는 목적하는 항원과 결합하고 다른 하나는 동일하지 않은 다른 항원과 결합한다.

[0046] [0055] 일부 구현예에서, 가공된 항원 수용체는 CAR을 포함하고 이는 활성화 또는 자극 CAR 또는 공동 자극 CAR을 포함한다(문헌참조: WO2014/055668). CAR은 일반적으로 일부 양상에서 (a), (b1) 또는 (b2) 및 (c)의 성분을 통해 하나 이상의 세포내 신호전달 성분에 연결된 세포의 항원 (또는 리간드) 결합 도메인을 포함한다. 상기 분자는 전형적으로 천연 항원 수용체를 통한 신호, 공동 자극 수용체와 조합된 상기 수용체를 통한 신호 및/또는 단독의 공동 자극 수용체를 통한 신호를 모방하거나 근접한다.

[0047] [0056] 키메라 작제물은 누출된 DNA로서 또는 적합한 벡터에서 면역 세포로 도입될 수 있는 것으로 고려된다. 세포를, 누출된 DNA를 사용하는 전기천공에 의해 안정하게 형질감염시키는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 제6,410,319호를 참조한다. 누출된 DNA는 일반적으로 발현을 위한 적당한 배향에서 플라스미드 발현 벡터 내 함유된, 키메라 수용체를 암호화하는 DNA를 언급한다.

[0048] [0057] 대안적으로, 바이러스 벡터(예를 들어, 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터)를 사용하여 키메라 CAR 작제물을 면역 세포에 도입할 수 있다. 본원의 개시내용의 방법에 따라 사용하기 위해 적합한 벡터는 면역 세포에서 비-복제성이다. 바이러스를 기반으로 하는 다수의 벡터가 공지되어 있고, 여기서, 세포에 유지되는 바이러스의 카피수는 세포의 생존율을 유지하기에 충분히 낮고, 예를 들어, HIV, SV40, EBV, HSV, 또는 BPV를 기반으로 하는 벡터가 있다.

[0049] [0058] 본원 개시내용의 특정 구현예는 (a)(임의로), (b1) 또는 (b2), (c) 및 (d)의 성분을 포함하는, 일부 경

우에, 면역원성을 감소시키기 위해 사람화된 CAR(hCAR)을 포함하는 특이적 CAR 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함하는 핵산의 용도에 관한 것이다. 특정 구현예에서, CAR은 하나 이상의 항원 간의 공유된 공간을 포함하는 에피토프를 인지할 수 있다. 특정 구현예에서, 결합 영역은 모노클로날 항체의 상보성 결정 영역, 모노클로날 항체의 가변 영역 및/또는 이의 항원 결합 단편을 포함할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 상기 특이성은 수용체에 결합하는 펩타이드 (예를 들어, 사이토킨)로부터 유래한다.

[0050] [0059] 사람 CAR 핵산은 사람 환자에 대한 세포성 면역치료요법을 증진시키기 위해 사용되는 사람 유전자들을일 수 있는 것으로 고려된다. 특정 구현예에서, 본원의 개시내용은 전장 항원-특이적 CAR cDNA 또는 암호화 영역을 포함한다. 항원 결합 영역 또는 도메인은 본원에 참조로 인용되는 미국 특허 제7,109,304호에 기재된 것들과 같은 특정 사람 모노클로날 항체로부터 유래된 단일쇄 가변 단편 (scFv)의 V_H 및 V_L 쇄의 단편을 포함할 수 있다. 상기 단편은 또한 사람 항원-특이적 항체의 임의의 수의 상이한 항원 결합 도메인일 수 있다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 단편은 사람 세포에서 발현을 위한 사람 코돈 용법을 위해 최적화된 서열에 의해 암호화된 항원-특이적 scFv이다.

[0051] [0060] 일부 구현예에서, 항원 특이적 CAR은 질환에 걸린 세포 유형(암세포 또는 감염원에 감염된 세포)에서 발현되는 항원과 같이 항원에 대한 특이성과 함께 구성된다. 따라서, CAR은 전형적으로 이의 세포외 부분에서, 하나 이상의 항원 결합 분자, 예를 들어, 하나 이상의 항원 결합 단편, 도메인, 항체 가변 도메인, 리간드, 수용체 및/또는 임의의 종류의 항체 분자를 포함한다. 당업자는 적어도 폴리펩타이드 및 일상적인 관행에 대한 지식을 바탕으로 항원에 대한 scFv를 포함한 항체를 생성할 수 있지만, 수많은 항-항원 scFv 및 모노클로날 항체가 당업계에 이미 존재할 수 있다. 일부 구현예에서, 항원 특이적 scFv는 하나 이상의 항체 클론으로부터 유래한 scFv이다.

[0052] [0061] 일부 구현예에서, 항원-특이적 CAR은 모노클로날 항체 (mAb)의 가변 중쇄 (VH) 및 가변 경쇄 (VL)로부터 유래된 단일쇄 항체 단편 (scFv)와 같은 항체 분자의 항원 결합 부분 또는 부분들을 포함한다. 특정 구현예에서, 항체 또는 이의 기능성 단편은 공지된 항체이거나 공지된 항체로부터 유래된다. 항체는 항원에 대해 드 노보 생성된 항체일 수도 있고, scFv 서열은 이러한 드 노보 항체로부터 획득되거나 유래될 수 있다.

[0053] [0062] 특정 구현예에서, CAR은 표적 항원 또는 수용체에 대한 천연 리간드 또는 천연 수용체이거나 이를 포함하는 세포 외 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 항원을 표적화하는 항체로부터의 VH 및/또는 VL이거나 이를 포함하는 세포 외 도메인을 포함한다.

[0054] [0063] 키메라 수용체를 암호화하는 개방 판독 프레임의 서열은 게놈 DNA 공급원, cDNA 공급원으로부터 획득될 수 있거나 합성되거나 (예를 들어, PCR을 통해) 이의 조합일 수 있다. 게놈 DNA의 크기 및 인트론의 수에 의존하여, 인트론이 mRNA를 안정화시키는것으로 밝혀짐에 따라 cDNA 또는 이의 조합을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 추가로, mRNA를 안정화시키기 위해 내인성 또는 외인성 비-암호화 영역을 사용하는 것이 유리할 수 있다.

[0055] [0064] 일부 양상에서 항원 특이적 결합 도메인은 CD28 또는 DAP10 막관통 도메인에 연결되고 특정 경우에는 DAP10 공동 자극 도메인과도 연결된다. 일부 경우에, CD28 또는 DAP10 막관통 도메인은 수용체 복합체의 다른 구성원과의 상호작용을 최소화하기 위해 동일하거나 상이한 표면 막 단백질의 막관통 도메인으로의 상기 도메인의 결합을 회피하도록 아미노산 치환에 의해 변형된다. 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 천연으로부터 또는 합성 공급원으로부터 유래한다. 대안적으로, 일부 구현예에서 막관통 도메인은 합성이다. 일부 양상에서, 합성 막관통 도메인은 주로 소수성 잔기들, 예를 들어, 류신 및 발린을 포함한다. 일부 양상에서, 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의 트리플렛은 합성 CD28 또는 DAP10 막관통 도메인의 각각의 말단에서 발견될 수 있다.

[0056] [0065] 일부 구현예에서, CAR 핵산은 DAP10 및 임의로 CD3zeta 이외의 것들을 암호화하는 서열을 포함한다. 1차 T 세포 활성화 신호에 추가로, 예를 들어, DAP10 이외에 CD3 및/또는 $Fc\epsilon RI\gamma$ 에 의해 개시될 수 있는 바와 같이, 표적 항원과 함께 키메라 수용체의 개입 후 면역 이펙터 세포 증식 및 이펙터 기능에 대한 추가의 자극 신호가 활용될 수 있다. 예를 들어, 세포의 활성화를 증진시키기 위한 사람 공동 자극 수용체의 일부 또는 전부를 활용하여 생체 내 지속성을 개선하고 입양 면역 치료요법의 치료학적 성공을 개선하는 것을 도와줄 수 있다. 이의 예는 DAP12, NKG2D, 2B4, CD2, CD28, CD27, 4-1BB, OX40, ICOS, (CD278), CD30, HVEM, CD40, LFA-1 (CD11a/CD18), 및/또는 ICAM-1과 같은 분자로부터의 공동 자극 도메인을 포함하지만, 특정 대안적 구현예에서, 이들 열거된 것 중 어느 하나는 CAR에서 사용이 배제될 수 있다.

[0057] II. 특이적 CAR 구현예의 예

- [0058] [0066] 특정 구현예에서, 특정 CAR 분자는 (a) 임의로, 힌지; 및 (b1) CD28 막관통 도메인 또는 (b2) DAP10 막관통 도메인; (c) DAP10 공동 자극 도메인; 및 (d) CD3제타를 포함하는 것들이 포함된다. 일부 경우에, CAR은 임의의 종류의 항원 결합 도메인을 추가로 포함하며, 이는 임의의 종류의 scFv일 수 있다. CAR의 세포 외 도메인에서 scFv가 활용되는 경우, 특정 scFv의 가변 중쇄 및 가변 경쇄는 N-말단에서 C-말단 방향으로 임의의 순서로 있을 수 있다. 예를 들어, 가변 중쇄는 가변 경쇄의 N-말단 측면 상에 있을 수 있거나 그 반대일 수 있다. CAR에서 항원에 결합하는 scFv는 코돈 최적화되어 있을 수도 있고 최적화되어 있지 않을 수도 있다. 특정 구현예에서, 벡터는 (a)(임의로), (b1) 또는 (b2), (c) 및 (d)를 포함하는 항원 특이적인 CAR을 암호화하고 하나 이상의 다른 분자를 암호화한다. 예를 들어, 벡터는 CAR을 암호화할 수도 있고, 또한 다른 관심 대상의 단백질, 예를 들어, 하나 이상의 다른 가공된 항원 수용체, 자살 유전자 및/또는 하나 이상의 특정 사이토킨을 암호화할 수도 있다.
- [0059] [0067] 동일한 분자상에서, CAR은 2개의 상이한 항원을 표적화하기 위한 것과 같이 하나 이상의 항원 특이적 세포 외 도메인을 포함할 수 있으며, 2개 항원 특이적 세포 외 도메인 사이에 링커가 있을 수 있다.
- [0060] [0068] 특이적 CAR 분자의 특정 구현예에서, CAR은 DAP10을 활용하지만 또한 본원에 포함된 것들을 포함하는, CD28, DAP12, 4-1BB, NKG2D, 또는 다른 공동 자극 도메인(본원에서는 세포질내 도메인으로 지칭될 수 있음)을 활용한다.
- [0061] [0069] CAR에 대한 특정 서열 구현예의 예는 아래에 특정 순서 없이 제공된다:
- [0062] [0070] CD28 막관통 도메인 아미노산 서열:
- [0063] FWVLVVGGVLACYSLLVTAFIIFWV (서열번호 1)
- [0064] [0071] 본원 개시내용에 의해 포함된 임의의 폴리펩타이드는 서열번호 1 또는 서열번호 1과 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% 이상 동일한 서열을 포함할 수 있다.
- [0065] [0072] 하나 이상의 세포내 도메인(적절한 경우에 본원에서 신호 활성화 도메인 또는 공동자극 도메인으로서 지칭될 수 있는)은 본원 개시내용의 특이적 CAR에서 활용되거나 활용되지 않을 수 있다. 구체적인 예는 DAP10, 특정 경우에, CD3 제타의 세포 내 도메인을 포함한다.
- [0066] [0073] 본원 개시내용의 CAR에 사용될 수 있는 특정 세포내 도메인의 예는 다음과 같다:
- [0067] [0074] DAP10 세포내 도메인 아미노산 서열의 하나의 예:
- [0068] LCARPRRSPAQEDGKVIYNMPGRG (서열번호 2)
- [0069] 본원 개시내용에 의해 포함된 임의의 폴리펩타이드는 서열번호 2 또는 서열번호 2와 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% 이상 동일한 서열을 포함할 수 있다.
- [0070] [0075] CD3제타 세포내 도메인 아미노산 서열의 하나의 예:
- [0071] [0076] RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRG (서열번호 3)
- [0072] [0077] 본원 개시내용에 의해 포함된 임의의 폴리펩타이드는 서열번호 3 또는 서열번호 3와 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% 이상 동일한 서열을 포함할 수 있다.
- [0073] [0078] 일부 경우에, CAR은 다음과 같이 DAP10(및 일부 경우에 CD3제타) 이외의 세포 내 도메인을 추가로 포함한다:
- [0074] [0079] 4-1BB 세포내 도메인 아미노산 서열:
- [0075] KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPEEEGGCEL (서열번호 4)
- [0076] 본원 개시내용에 의해 포함된 임의의 폴리펩타이드는 서열번호 4 또는 서열번호 4와 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% 이상 동일한 서열을 포함할 수 있다.
- [0077] [0080] DAP12 세포내 도메인 아미노산 서열:
- [0078] YFLGRLVPRGRGAEEATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK (서열번호 5)

- [0079] 본원 개시내용에 의해 포함된 임의의 폴리펩타이드는 서열번호 5 또는 서열번호 5와 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% 이상 동일한 서열을 포함할 수 있다.
- [0080] [0081] NKG2D 세포내 도메인 아미노산 서열:
- [0081] SANERCKSKVPCRQKQWRTSFDSKKLDLNYNHFESMEWSHRSRRGRIGWM (서열번호 6)
- [0082] [0082] CD28 세포내 도메인 아미노산 서열:
- [0083] RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (서열번호 14)
- [0084] [0083] 본원 개시내용에 의해 포함된 임의의 폴리펩타이드는 서열번호 6 또는 서열번호 6와 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% 이상 동일한 서열을 포함할 수 있다.
- [0085] [0084] CAR의 일부 구현예에서, 하나 이상의 세포 외 항원 결합 도메인과 막관통 도메인 사이에는 힌지 영역이 존재하며, 특정 경우에 이는 CAR에 scFv가 사용될 때 발생하지만 CAR에 scFv가 결합된 경우에는 발생하지 않는다. 특정 구현예에서, 힌지는 예를 들어 10-20, 10-15, 11-20, 11-15, 12-20, 12-15 또는 15-20개의 아미노산 길이와 같은 특정 길이를 갖는다. 특정 구현예에서, 힌지는 CD28 힌지이다. 특정 경우에, CAR의 효율성을 증진시키기 위해 CD28 힌지의 정체성 또는 길이를 변형시킬 수 있다. 예를 들어, 문헌(Hudecek et al. (2014) and Jonnalagadda et al. (2015))을 참조한다. 특정 구현예에서, 힌지는 CD28, CD8알파 또는 IgG1으로부터 유래한다.
- [0086] [0085] CD28 힌지 아미노산 서열의 예는 다음을 포함한다:
- [0087] IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKP (서열번호 7)
- [0088] [0086] 본원 개시내용에 의해 포함된 임의의 폴리펩타이드는 서열번호 7 또는 서열번호 7과 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% 이상 동일한 서열을 포함할 수 있다.
- [0089] [0087] 특정 구현예에서, CAR에 대한 다음 발현 작제물의 예가 활용될 수 있다. 이들 CAR은 CD5를 표적화하지만, 다른 항원이 표적화될 수 있다.
- [0090] [0088] CD5#1은 DAP12 막관통 도메인, DAP12 공동 자극 도메인, 및 CD3 제타와 함께 IgG 힌지를 포함한다.
- [0091] [0089] CD5#2는 CD28 막관통 도메인, DAP12 공동 자극 도메인, 및 CD3 제타와 함께 IgG 힌지를 포함한다.
- [0092] [0090] CD5#3은 CD28 막관통 도메인, 4-1BB 공동 자극 도메인, 및 CD3제타와 함께 IgG 힌지를 포함한다.
- [0093] [0091] CD5#4는 DAP10 막관통 도메인, DAP10 공동 자극 도메인, 및 CD3 제타와 함께 IgG 힌지를 포함한다.
- [0094] [0092] CD5#5는 CD28 막관통 도메인, DAP10 공동 자극 도메인, 및 CD3 제타와 함께 IgG 힌지를 포함한다.
- [0095] [0093] CD5#7은 CD28 막관통 도메인, NKG2D 공동 자극 도메인, 및 CD3제타와 함께 IgG 힌지를 포함한다.
- [0096] [0094] CD5#8은 CD28 막관통 도메인 및 CD3제타와 함께 IgG 힌지를 포함한다.
- [0097] [0095] CD5#9는 IgG1 힌지, CD28 막관통 도메인, CD28 공동 자극 도메인, 및 CD3제타를 포함한다.
- [0098] [0096] CD5#10은 CD28 힌지, CD28 막관통 도메인, DAP10 공동 자극 도메인, 및 CD3제타를 포함한다.
- [0099] [0097] CD5#11은 CD28 힌지, DAP10 막관통 도메인, DAP10 공동 자극 도메인, 및 CD3제타를 포함한다.
- [0100] [0098] CD5#12는 CD28 힌지, CD28 막관통 도메인, DAP12 공동 자극 도메인, 및 CD3제타를 포함한다.
- [0101] [0099] CD5#13은 CD28 힌지, CD28 막관통 도메인, CD28 공동 자극 도메인, 및 CD3제타를 포함한다.
- [0102] [0100] 임의의 적합한 항원은 본원의 방법에서 표적화될 수 있다. 항원은 특정 암 세포와 연관될 수 있지만 일부 경우에 비-암성 세포와는 연관되어 있지 않다. 예시적인 항원은 감염성 체제로부터의 항원 분자, 자동-/자가-항원, 종양-/암-연합된 항원, 및 종양 신생항원을 포함하지만 이에 제한되지 않는다(문헌참조: Linnemann et al., 2015).
- [0103] [0101] 특정 양상에서, 상기 항원은 암과 관련되고, 예시적인 종양-관련 항원은 CD19, EBNA, CD123, HER2, CA-125, TRAIL/DR4, CD20, CD70, CD38, CD123, CLL1, 암배아 항원, 알파페토단백질, CD56, AKT, Her3, 상피 종양 항원, CD319 (CS1), ROR1, 플레이트 결합 단백질, HIV-1 외피 당단백질 gp120, HIV-1 외피 당단백질 gp41, CD5, CD23, CD30, HERV-K, IL-11R알파, 카파쇄, 람다쇄, CSPG4, CD33, CD47, CLL-1, U5snRNP200, CD200,

BAFF-R, BCMA, CD70, TROP-2, CD99, p53, 돌연변이된 p53, Ras, 돌연변이된 ras, c-Myc, 세포질 세린/트레오닌 키나제 (예를 들어, A-Raf, B-Raf, 및 C-Raf, 사이클린-의존성 키나제), MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12, MART-1, 흑색종 관련 항원, BAGE, DAM-6, -10, GAGE-1, -2, -8, GAGE-3, -4, -5, -6, -7B, NA88-A, MART-1, mda-7, gp75, Gp100, PSA, PSM, 티로시나제, 티로시나제 관련 단백질, TRP-1, TRP-2, ART-4, CAMEL, CEA, Cyp-B, hTERT, hTERT, iCE, MUC1, MUC2, 포스포이노시티드 3-키나제(PI3K), TRK 수용체, PRAME, P15, RU1, RU2, SART-1, SART-3, 빌름스 종양 항원(Wilms' tumor antigen) (WT1), AFP, -카테닌 /m, 카스파제-8/m, CDK-4/m, ELF2M, Gnt-V, G250, HAGE, HSP70-2M, HST-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, 미오신/m, RAGE, SART-2, TRP-2/INT2, 707-AP, 아넥신 II, CDC27/m, TPI/m, bcr-abl, BCR-ABL, 인터페론 조절 인자 4 (IRF4), ETV6/AML, LDLR/FUT, Pml/RAR, 종양 관련 칼슘 신호 전달인자 1 (TACSTD1) TACSTD2, 수용체 티로신 키나제(예를 들어, 상피 성장 인자 수용체 (EGFR) (특히, EGFRvIII), 혈소판 유래된 성장 인자 수용체 (PDGFR), 혈관 내피 성장 인자 수용체 (VEGFR)), VEGFR2, 세포질 티로신 키나제(예를 들어, src-패밀리, syk-ZAP70 패밀리), 인테그린-연결된 키나제(ILK), 신호 전달인자 및 전사 STAT3, STATS, 및 STATE의 신호 전달인자 및 활성화인자(예를 들어, HIF-1 및 HIF-2), 핵 인자 -카파 B (NF-B), 노치 수용체(예를 들어, 노치1-4), NY ESO 1, c-Met, 라파마이신의 포유동물 표적(mTOR), WNT, 세포의 신호 조절된 키나제 (ERK), 및 이들의 조절 서브유닛, PMSA, PR-3, MDM2, 메소텔린, 신장 세포 암종-5T4, SM22-알파, 카보닉 언하이드라제 I (CAI) 및 IX (CAIX) (또한 G250로서 공지된), STEAD, TEL/AML1, GD2, 프로테아제 3, hTERT, 육종 전좌 중지점 (breakpoint), EphA2, ML-IAP, EpCAM, ERG (TMPRSS2 ETS 융합 유전자), NA17, PAX3, ALK, 안드로젠 수용체, 사이클린 B1, 폴리시알산, MYCN, RhoC, GD3, 푸코실 GM1, 메소텔리안, PSCA, sLe, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GloboH, NY-BR-1, RgsS, SART3, STn, PAX5, OY-TES1, 정자 단백질 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, 레구마인, TIE2, Page4, MAD-CT-1, FAP, MAD-CT-2, fos 관련 항원 1, CBX2, CLDN6, SPANX, TPTE, ACTL8, ANKRD30A, CDKN2A, MAD2L1, CTAG1B, SUNC1 및 LRRN1을 포함한다. 항원에 대한 서열의 예는 당업자에게 공지되어 있고, 예를 들어 GenBank® 데이터베이스에 나와 있다: CD19 (승인 번호 NG_007275.1), EBNA (승인 번호 NG_002392.2), WT1 (승인 번호 NG_009272.1), CD123 (승인 번호 NC_000023.11), NY-ESO (승인 번호 NC_000023.11), EGFRvIII (승인 번호 NG_007726.3), MUC1 (승인 번호 NG_029383.1), HER2 (승인 번호 NG_007503.1), CA-125 (승인 번호 NG_055257.1), WT1 (승인 번호 NG_009272.1), Mage-A3 (승인 번호 NG_013244.1), Mage-A4 (승인 번호 NG_013245.1), Mage-A10 (승인 번호 NC_000023.11), TRAIL/DR4 (승인 번호 NC_000003.12), 및/또는 CEA (승인 번호 NC_000019.10).

[0104] [0102] 종양 관련 항원은 예를 들어, 전립선암, 유방암, 결장직장암, 폐암, 췌장암, 신장암, 중피종, 난소암, 간암, 뇌암, 골암, 위암, 비장암, 고환암, 자궁경부암, 항문암, 담낭암, 갑상선암, 또는 흑색종암으로부터 유래할 수 있다. 예시적인 종양 관련 항원 또는 종양 세포 유래된 항원은 MAGE 1, 3, 및 MAGE 4 (또는 다른 MAGE 항원, 예를 들어, 국제 특허 공개 공보 WO 99/40188에 기재된 것들); PRAME; BAGE; RAGE, Lage (또한 NY-ESO-1로서 공지된); SAGE; 및 HAGE 또는 GAGE를 포함한다. 종양 항원의 이들 비제한적인 예는 흑색종, 폐 암종, 육종 및 방광암종과 같은 광범위한 종양 유형에서 발견된다. 예를 들어, 미국 특허 제6,544,518호를 참조한다. 전립선 암 종양-관련 항원은 예를 들어, 전립선 특이적 막 항원(PSMA), 전립선-특이적 항원 (PSA), 전립선 산 포스페이트, NKX3.1, 및 전립선의 6개 막관통 상피 항원(STEAP)을 포함한다.

[0105] [0103] 다른 종양 관련 항원은 Plu-1, HASH-1, HasH-2, Cripto 및 Criptin을 포함한다. 추가로, 종양 항원은 많은 암의 치료에 유용한, 짧은 10개 아미노산 길이의 펩타이드인 전장 고나도트로핀 호르몬 방출 호르몬 (GnRH)과 같은 자가 펩타이드 호르몬일 수 있다.

[0106] [0104] 항원은 종양 세포로부터 돌연변이된 유전자로부터 또는 정상 세포와 비교하여 종양 세포에서 상이한 수준으로 전사되는 유전자로부터 유래된 에피토프 영역 또는 에피토프 펩타이드, 예를 들어, 텔로머라제 효소, 수르비빈, 메소텔린, 돌연변이된 ras, bcr/abl 재배열, Her2/neu, 돌연변이된 또는 야생형 p53, 시토크롬 P450 1B1, 및 비정상적으로 발현된 인트론 서열, 예를 들어, N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제-V; 흑색종 및 B-세포 림프종에서 특유의 유전자형을 생성하는 면역글로불린 유전자의 클론 재정렬; 발암바이러스 공정으로부터 유래된 에피토프 영역 또는 에피토프 펩타이드를 포함하는 종양 항원, 예를 들어, 사람 파필로마 바이러스 단백질 E6 및 E7; 엡슈타인 바르 바이러스 단백질 LMP2; 종양-선택적 발현을 갖는 비돌연변이된 발암태아 단백질, 예를 들어, 암배아 항원 및 알파-페도단백질을 포함할 수 있다.

[0107] [0105] 다른 구현예에서, 항원은 병원성 미생물로부터 또는 기회주의적 병원성 미생물 (또한 본원에서 감염성 질환 미생물로서 호칭되는), 예를 들어, 바이러스, 진균류, 기생충, 원생동물 및 세균을 포함하는 감염원으로부터 획득되거나 유래된다. 특정 구현예에서, 상기 미생물로부터 유래된 항원은 전장 단백질을 포함한다.

- [0108] [0106] 이의 항원이 본원에 기재된 방법에 사용하기 위해 고려되는 예시적인 병원성 유기체는 사람 면역결핍 바이러스 (HIV), 헤르페스 심플렉스 바이러스(HSV), 호흡기 신시티알 바이러스(respiratory syncytial virus) (RSV), 사이토메갈로바이러스(CMV), 엡슈타인-바르 바이러스(Epstein-Barr virus) (EBV), 인플루엔자 A, B, 및 C, 수포성 구내염 바이러스 (VSV), 수포성 구내염 바이러스 (VSV), 폴리오마바이러스(예를 들어, BK 바이러스 및 JC 바이러스), 아데노바이러스, 메티실린-내성 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus* (MRSA))을 포함하는 스태필로코커스 종(*Staphylococcus species*), 및 스트렙토코커스 뉴모니아 (*Streptococcus pneumoniae*)를 포함하는 스트렙토코커스 종 (*Streptococcus species*)을 포함한다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 이들 및 본원에 기재된 바와 같은 항원으로서 사용하기 위한 다른 병원성 병원체로부터 유래된 단백질 및 상기 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 공보 및 GENBANK®, SWISS-PROT® 및 TREMBL®와 같은 공용 데이터베이스로부터 동정될 수 있다.
- [0109] [0107] 사람 면역결핍 바이러스 (HIV)로부터 유래된 항원은 임의의 HIV 비리온 구조적 단백질(예를 들어, gp120, gp41, p17, p24), 프로테아제, 역전사효소, 또는 tat, rev, nef, vif, vpr 및 vpu에 의해 암호화된 HIV 단백질을 포함한다.
- [0110] [0108] 헤르페스 심플렉스 바이러스 (예를 들어, HSV1 및 HSV2)로부터 유래된 항원은 HSV 후기 유전자로부터 발현된 단백질을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 유전자의 후기 그룹은 우세하게 비리온 입자를 형성하는 단백질을 암호화한다. 상기 단백질은 바이러스 캡시드를 형성하는 (UL)로부터의 5개 단백질을 포함한다: 이의 각각이 본원에 기재된 바와 같이 항원으로서 사용될 수 있는 UL6, UL18, UL35, UL38 및 주요 캡시드 단백질 UL19, UL45, 및 UL27. 본원에 항원으로서 사용하기 위해 고려되는 다른 예시적인 HSV 단백질은 ICP27 (H1, H2), 당단백질 B (gB) 및 당단백질 D (gD) 단백질을 포함한다. HSV 계통은 적어도 74개 유전자를 포함하고 이들 유전자 각각은 잠재적으로 항원으로서 사용될 수 있는 단백질을 암호화한다.
- [0111] [0109] 사이토메갈로바이러스 (CMV)로부터 유래된 항원은 CMV 구조적 단백질, 바이러스 복제의 이메디에이트 어얼리 및 어얼리 단계 동안에 발현되는 바이러스 항원, 당단백질 I 및 III, 캡시드 단백질, 코트 단백질, 보다 낮은 매트릭스 단백질 pp65 (ppUL83), p52 (ppUL44), IE1 및 IE2 (UL123 및 UL122), UL128-UL150로부터의 유전자 클러스터로부터의 단백질 생성물 (Rykman, et al., 2006), 외피 당단백질 B (gB), gH, gN, 및 pp150을 포함한다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 본원에 기재된 항원으로서 사용하기 위한 CMV 단백질은 GENBANK®, SWISS-PROT®, 및 TREMBL® (문헌참조: 예를 들어, Bennekov et al., 2004; Loewendorf et al., 2010; Marschall et al., 2009)와 같은 공용 데이터베이스에서 동정될 수 있다.
- [0112] [0110] 특정 구현예에서 사용하기 위해 고려되는 엡슈타인-반 바이러스(Epstein-Ban virus (EBV))로부터 유래된 항원은 EBV 용해 단백질 gp350 및 gp110, 엡슈타인-반 핵 항원 (EBNA)-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, EBNA-리더 단백질(EBNA-LP) 및 잠재적 막 단백질 (LMP)-1, LMP-2A 및 LMP-2B를 포함하는 잠재적 사이클 감염 동안에 생성되는 EBV 단백질을 포함한다(문헌참조: 예를 들어, Lockey et al., 2008).
- [0113] [0111] 본원에 사용하기 위해 고려되는 호흡기 신시티알 바이러스 (RSV)로부터 유래된 항원은 RSV 계통에 의해 암호화된 임의의 11개 단백질 또는 이의 항원성 단편을 포함한다: NS 1, NS2, N (뉴클레오캡시드 단백질), M (매트릭스 단백질) SH, G 및 F (바이러스 코트 단백질), M2 (제2 매트릭스 단백질), M2-1 (연장 인자), M2-2 (전사 조절), RNA 폴리머라제 및 인단백질 P.
- [0114] [0112] 사용하기 위해 고려되는 수포성 구내염 바이러스 (VSV)로부터 유래된 항원은 VSV 계통에 의해 암호화된 5개 주요 단백질, 및 이의 항원성 단편 중 임의의 하나를 포함한다: 대형 단백질 (L), 당단백질 (G), 뉴클레오 단백질 (N), 인단백질 (P), 및 매트릭스 단백질 (M) (문헌참조: 예를 들어, Rieder et al., 1999).
- [0115] [0113] 특정 구현예에서 사용하기 위해 고려되는 인플루엔자 바이러스로부터 유래된 항원은 헤마글루티닌 (HA), 뉴라미니다제 (NA), 뉴클레오단백질 (NP), 매트릭스 단백질 M1 및 M2, NS1, NS2 (NEP), PA, PB1, 1-F2, 및 PB2를 포함한다.
- [0116] [0114] 예시적 바이러스 항원은 또한 아데노바이러스 폴리펩타이드, 알파바이러스, 칼리시바이러스 폴리펩타이드(예를 들어, 칼리시바이러스 캡시드 항원), 코로나바이러스 폴리펩타이드, 디스토펙스 바이러스 폴리펩타이드, 에볼라 바이러스 폴리펩타이드, 엔테로바이러스 폴리펩타이드, 플라비바이러스 폴리펩타이드, 간염 바이러스 (AE) 폴리펩타이드 (B형 간염 코어 또는 표면 항원, C형 간염 바이러스 E1 또는 E2 당단백질, 코어, 또는 비-구조적 단백질), 헤르페스바이러스 폴리펩타이드 (헤르페스 심플렉스 바이러스 또는 바리셀라 조스터 바이러스 당단백질을 포함하는), 감염성 복막염 바이러스 폴리펩타이드, 백혈병 바이러스 폴리펩타이드,

마르부르크 바이러스 폴리펩타이드, 오르토믹소바이러스 폴리펩타이드, 파필로마 바이러스 폴리펩타이드, 파라 인플루엔자 바이러스 폴리펩타이드(예를 들어, 헤마글루티닌 및 뉴라미니다제 폴리펩타이드), 파라믹소바이러스 폴리펩타이드, 파르보바이러스 폴리펩타이드, 페스티바이러스 폴리펩타이드, 피코나 바이러스 폴리펩타이드(예를 들어, 폴리오바이러스 캡시드 폴리펩타이드), 폭스 바이러스 폴리펩타이드(예를 들어, 백시니아 바이러스 폴리펩타이드), 람비 바이러스 폴리펩타이드(예를 들어, 람비 바이러스 당단백질 G), 레오바이러스 폴리펩타이드, 레트로바이러스 폴리펩타이드, 및 로타바이러스 폴리펩타이드를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0117] [0115] 특정 구현예에서, 상기 항원은 세균성 항원일 수 있다. 특정 구현예에서, 관심 대상의 세균 항원은 분비된 폴리펩타이드일 수 있다. 다른 특정 구현예에서, 세균 항원은 세균의 외부 세포 표면 상에 노출된 폴리펩타이드 부분 또는 부분들을 갖는 항원을 포함한다.

[0118] [0116] 사용하기 위해 고려되는 메티실린-내성 스탕필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)(MRSA)를 포함하는 스탕필로코커스 종으로부터 유래된 항원은 독성 조절제, 예를 들어, Agr 시스템, Sar 및 Sae, Arl 시스템, Sar 동족체 (Rot, MgrA, SarS, SarR, SarT, SarU, SarV, SarX, SarZ 및 TcaR), Srr 시스템 및 TRAP를 포함한다. 항원으로서 작용할 수 있는 다른 스탕필로코커스 단백질은 Clp 단백질, HtrA, MsrR, 아코니타제, CcpA, SvrA, Msa, CfvA 및 CfvB를 포함한다(문헌참조: 예를 들어, *Staphylococcus: Molecular Genetics*, 2008 Caister Academic Press, Ed. Jodi Lindsay). 스탕필로코커스 아우레우스의 2개의 종 (N315 및 Mu50)에 대한 게놈은 서열분석되었고 예를 들어, PATRIC (PATRIC: The VBI PathoSystems Resource Integration Center, Snyder et al., 2007)에서 공유화되어 있다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 항원으로서 사용하기 위한 스탕필로코커스(*Staphylococcus*) 단백질은 또한 GenBank®, Swiss-Prot®, 및 TrEMBL®와 같이 다른 공용의 데이터베이스에서 동정될 수 있다.

[0119] [0117] 본원에 기재된 특정 구현예에서 사용하기 위해 고려되는 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*)로부터 유래된 항원은 뉴모라이신, PspA, 콜린-결합 단백질 A (CbpA), NanA, NanB, SpnHL, PavA, LytA, Pht, 및 필린 단백질(RrgA; RrgB; RrgC)을 포함한다. 스트렙토코커스 뉴모니아의 항원 단백질은 또한 당업계에 공지되어 있고 일부 구현예에서 항원으로서 사용될 수 있다(문헌참조: 예를 들어, Zysk et al., 2000). 스트렙토코커스 뉴모니아의 독성 균주의 완전한 게놈 서열은 서열분석되었고, 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 본원에 사용하기 위한 에스. 뉴모니아 단백질은 또한 GENBANK®, SWISS-PROT®, 및 TREMBL®와 같은 다른 공용의 데이터베이스에서 동정될 수 있다.

[0120] [0118] 본원의 개시내용에 따른 항원에 대한 특정 관심 대상의 단백질은 뉴모코씨의 표면에 노출될 것으로 예측된 독성 인자 및 단백질을 포함한다(문헌참조: 예를 들어, Frolet et al., 2010).

[0121] [0119] 항원으로 사용될 수 있는 세균 항원의 예는 액티노마이세스(*Actinomyces*) 폴리펩타이드, 바실러스 폴리펩타이드, 박테로이데스(*Bacteroides*) 폴리펩타이드, 보르데텔라(*Bordetella*) 폴리펩타이드, 바르토넬라(*Bartonella*) 폴리펩타이드, 보렐리아(*Borrelia*) 폴리펩타이드(예를 들어, 비. 부르그도페리(*B. burgdorferi*) OspA), 브루셀라(*Brucella*) 폴리펩타이드, 캄필로박터(*Campylobacter*) 폴리펩타이드, 캡노사이토파가(*Capnocytophaga*) 폴리펩타이드, 클라미디아(*Chlamydia*) 폴리펩타이드, 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 폴리펩타이드, 코시엘라(*Coxiella*) 폴리펩타이드, 더마필루스(*Dermatophilus*) 폴리펩타이드, 엔테로코커스(*Enterococcus*) 폴리펩타이드, 에를리치아(*Ehrlichia*) 폴리펩타이드, 에스케리치아(*Escherichia*) 폴리펩타이드, 프란시셀라(*Francisella*) 폴리펩타이드, 푸소박테리움(*Fusobacterium*) 폴리펩타이드, 헤모바토넬라(*Haemobartonella*) 폴리펩타이드, 헤모필루스(*Haemophilus*) 폴리펩타이드 (예를 들어, 에이치. 인플루엔자(*H. Influenzae*) b형 외막 단백질), 헬리코박터(*Helicobacter*) 폴리펩타이드, 클렙시엘라(*Klebsiella*) 폴리펩타이드, L-형 세균 폴리펩타이드, 렙토스피라(*Leptospira*) 폴리펩타이드, 리스테리아(*Listeria*) 폴리펩타이드, 마이코박테리아(*Mycobacteria*) 폴리펩타이드, 마이코플라즈마(*Mycoplasma*) 폴리펩타이드, 나이세리아(*Neisseria*) 폴리펩타이드, 네오리케치아(*Neorickettsia*) 폴리펩타이드, 노카르디아(*Nocardia*) 폴리펩타이드, 파스튜렐라(*Pasteurella*) 폴리펩타이드, 펩토코커스(*Peptococcus*) 폴리펩타이드, 펩토스트렙토코커스(*Peptostreptococcus*) 폴리펩타이드, 뉴모코커스(*Pneumococcus*) 폴리펩타이드 (즉, 에스. 뉴모니아(*S. pneumoniae*) 폴리펩타이드)(본원의 기재 참조), 프로테우스(*Proteus*) 폴리펩타이드, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 폴리펩타이드, 리케치아(*Rickettsia*) 폴리펩타이드, 로칼리마에아(*Rochalimaea*) 폴리펩타이드, 살모넬라(*Salmonella*) 폴리펩타이드, 시겔라(*Shigella*) 폴리펩타이드, 스탕필로코커스(*Staphylococcus*) 폴리펩타이드, 그룹 A 연쇄구균 폴리펩타이드 (예를 들어, 에스. 피로게네스(*S. pyrogenes*) M 단백질), 그룹 B 스트렙토코커스(에스. 아갈락티아(*S. agalactiae*) 폴리펩타이드, 트레포네마(*Treponema*) 폴리펩타이드 및 예르시니아(*Yersinia*) 폴리펩타이드(예를 들어, 와이 페스티스(*Y. pestis*) FI 및 V 항원)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다

다.

[0122]

[0120] 진균류 향원의 예는 압시디아(*Absidia*) 폴리펩타이드, 아크레모니움(*Acremonium*) 폴리펩타이드, 알테르나리아(*Alternaria*) 폴리펩타이드, 아스퍼질러스(*Aspergillus*) 폴리펩타이드, 바시디오볼루스(*Basidiobolus*) 폴리펩타이드, 바이폴라리스(*Bipolaris*) 폴리펩타이드, 블라스토마이세스(*Blastomyces*) 폴리펩타이드, 캔디다(*Candida*) 폴리펩타이드, 코씨디오이데스(*Coccidioides*) 폴리펩타이드, 코니디오볼루스(*Conidiobolus*) 폴리펩타이드, 크립토코커스(*Cryptococcus*) 폴리펩타이드, 쿠르발라리아(*Curvalaria*) 폴리펩타이드, 에피더모피톤(*Epidermophyton*) 폴리펩타이드, 엑소피알라(*Exophiala*) 폴리펩타이드, 게오텐리움(*Geotrichum*) 폴리펩타이드, 히스토플라스마(*Histoplasma*) 폴리펩타이드, 마두렐라(*Madurella*) 폴리펩타이드, 말라세지아(*Malassezia*) 폴리펩타이드, 마이크로스포룸(*Microsporum*) 폴리펩타이드, 모닐리엘라(*Moniliella*) 폴리펩타이드, 모르티에렐라(*Mortierella*) 폴리펩타이드, 뮤코르(*Mucor*) 폴리펩타이드, 파에실로마이세스(*Paecilomyces*) 폴리펩타이드, 페니실리움(*Penicillium*) 폴리펩타이드, 피알레모니움(*Phialemonium*) 폴리펩타이드, 피알로포라(*Phialophora*) 폴리펩타이드, 프로토테카(*Prototheca*) 폴리펩타이드, 슈달레스케리아(*Pseudallescheria*) 폴리펩타이드, 슈도마이크로도키움(*Pseudomicrodochium*) 폴리펩타이드, 피티움(*Pythium*) 폴리펩타이드, 리노스포리디움(*Rhinosporidium*) 폴리펩타이드, 리조푸스(*Rhizopus*) 폴리펩타이드, 스콜레코바시디움(*Scolecobasidium*) 폴리펩타이드, 스포로트릭스(*Sporothrix*) 폴리펩타이드, 스템필리움(*Stemphylium*) 폴리펩타이드, 트리코피톤(*Trichophyton*) 폴리펩타이드, 트리코스포론(*Trichosporon*) 폴리펩타이드, 및 크실로히파(*Xylomyces*) 폴리펩타이드를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0123]

[0121] 원생동물 기생충 향원의 예는 바베시아(*Babesia*) 폴리펩타이드, 발란티디움(*Balantidium*) 폴리펩타이드, 베스노이티아(*Besnoitia*) 폴리펩타이드, 크립토스포리디움(*Cryptosporidium*) 폴리펩타이드, 에이메리아(*Eimeria*) 폴리펩타이드, 엔세팔리토존(*Encephalitozoon*) 폴리펩타이드, 엔타모에바(*Entamoeba*) 폴리펩타이드, 기아르디아(*Giardia*) 폴리펩타이드, 하몬디아(*Hammondia*) 폴리펩타이드, 헤파토존(*Hepatozoon*) 폴리펩타이드, 이소스포라(*Isospora*) 폴리펩타이드, 라이슈마니아(*Leishmania*) 폴리펩타이드, 마이크로스포리디아(*Microsporidia*) 폴리펩타이드, 네오스포라(*Neospora*) 폴리펩타이드, 노세마(*Nosema*) 폴리펩타이드, 펜타트리코모나스(*Pentatrichomonas*) 폴리펩타이드, 플라스모디움(*Plasmodium*) 폴리펩타이드를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 유충 기생충 향원의 예는 아칸토케일로네마(*Acanthocheilonema*) 폴리펩타이드, 아엘루로스트론길러스(*Aelurostrongylus*) 폴리펩타이드, 안실로스토마(*Ancylostoma*) 폴리펩타이드, 안기오스트론길러스(*Angiostrongylus*) 폴리펩타이드, 아스카리스(*Ascaris*) 폴리펩타이드, 브루기아(*Brugia*) 폴리펩타이드, 부노스토무(*Bunostomum*) 폴리펩타이드, 카필라리아(*Capillaria*) 폴리펩타이드, 카베르티아(*Chabertia*) 폴리펩타이드, 쿠퍼리아(*Cooperia*) 폴리펩타이드, 크레노소마(*Crenosoma*) 폴리펩타이드, 딕티오카울루스(*Dictyocaulus*) 폴리펩타이드, 디옥토피메(*Dioctophyme*) 폴리펩타이드, 디페탈로네마(*Dipetalonema*) 폴리펩타이드, 디필로보트리움(*Dipyllobothrium*) 폴리펩타이드, 디플리디움(*Diplydium*) 폴리펩타이드, 디로필라리아(*Dirofilaria*) 폴리펩타이드, 드라쿤쿨러스(*Dracunculus*) 폴리펩타이드, 엔테로비우스(*Enterobius*) 폴리펩타이드, 필라로디에스(*Filaroides*) 폴리펩타이드, 해몬쿠스(*Haemonchus*) 폴리펩타이드, 라고킬라스카리스(*Lagochilascaris*) 폴리펩타이드, 로아(*Loa*) 폴리펩타이드, 만소넬라(*Mansonella*) 폴리펩타이드, 무엘레리우스(*Muellerius*) 폴리펩타이드, 나노피에투스(*Nanophyetus*) 폴리펩타이드, 네카토르(*Necator*) 폴리펩타이드, 네마토디루스(*Nematodirus*) 폴리펩타이드, 오에소파고스토무(*Oesophagostomum*) 폴리펩타이드, 온코세르카(*Onchocerca*) 폴리펩타이드, 오피스토르키스(*Opisthorchis*) 폴리펩타이드, 오스테르타기아(*Ostertagia*) 폴리펩타이드, 파라필라리아(*Parafilaria*) 폴리펩타이드, 파라고니무스(*Paragonimus*) 폴리펩타이드, 파라스카리스(*Parascaris*) 폴리펩타이드, 피살로프테라(*Physaloptera*) 폴리펩타이드, 프로토스트론길루스(*Protostrongylus*) 폴리펩타이드, 세타리아(*Setaria*) 폴리펩타이드, 스피로세르카(*Spirocerca*) 폴리펩타이드, 스피로메트라(*Spirometra*) 폴리펩타이드, 스테파노필라리아(*Stephanofilaria*) 폴리펩타이드, 스트론길로이데스(*Strongyloides*) 폴리펩타이드, 스트론길러스(*Strongylus*) 폴리펩타이드, 텔라지아(*Thelazia*) 폴리펩타이드, 톡사스카리스(*Toxascaris*) 폴리펩타이드, 톡소카라(*Toxocara*) 폴리펩타이드, 트리키넬라(*Trichinella*) 폴리펩타이드, 트리코스트론길러스(*Trichostrongylus*) 폴리펩타이드, 트리쿠리스(*Trichuris*) 폴리펩타이드, 운시나리아(*Uncinaria*) 폴리펩타이드, 및 우체레리아(*Wuchereria*) 폴리펩타이드(예를 들어, 피. 팔시파룸(*P. Falciparum*)) 포자소체(circumsporozoite) (PfCSP), 포자소체 표면 단백질(sporozoite surface protein) 2 (PfSSP2), 간 상태 항원 1의 카복실 말단 (PfLSA1 c-term), 및 배출된 단백질 1 (PfExp-1), 뉴모시스티스(*Pneumocystis*) 폴리펩타이드, 사코시스티스(*Sarcocystis*) 폴리펩타이드, 슈스토소마(*Schistosoma*) 폴리펩타이드, 테일레리아(*Theileria*) 폴리펩타이드, 톡소플라스마(*Toxoplasma*) 폴리펩타이드 및 트리파노소마(*Trypanosoma*) 폴리펩타이드를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

- [0124] [0122] 체외기생충 항원의 예는 벼룩; 강성 진드기 및 연성 진드기를 포함하는 진드기; 파리, 예를 들어, 미드게스(midges), 모기, 응애, 진딧물, 말파리, 뿔파리, 사슴 파리(deer flies), 체체 파리(tsetse flies), 안정한 파리(stable flies), 승저증 원인 파리 및 깔따구과(biting gnats); 개미; 거미, 이(lice); 진드기(mites); 및 진정한 벌레(true bugs), 예를 들어, 베드 벌레.bed bugs) 및 키싱 벌레(kissing bugs)로부터의 폴리펩타이드 (항원 및 알레르겐을 포함하는)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0125] III. 임의의 단백질
- [0126] [0123] 일부 구현예에서, 하나 이상의 다른 단백질은 본원 개시내용의 특정 CAR과 함께 활용된다. 하나 이상의 기타 단백질은 어떠한 이유로든 활용될 수 있고, 이는 CAR 자체의 효능을 촉진시키는 것 및/또는 CAR을 발현하는 임의의 종류의 세포의 효능을 촉진시키는 것을 포함한다. 일부 경우에, 기타 단백질(들)이 CAR 또는 세포의 활성화에 직접적으로 또는 간접적으로 영향을 미치는지의 여부에 관계없이, 기타 단백질은 치료요법으로서 CAR을 발현하는 세포를 투여받은 개체의 치료를 촉진한다. 일부 경우에 다른 단백질은 자살 유전자, 하나 이상의 사이토킨 또는 둘 다이다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 기타 단백질은 벡터로부터 제조되고 궁극적으로 2개의 별도의 폴리펩타이드로서 생성된다. 예를 들어, CAR 및 기타 단백질(들)은 예를 들어 2A 서열에 의해 또는 IRES에 의해 분리될 수 있다.
- [0127] [0124] 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토킨, 예를 들어, IL-15는 CAR과 연계하여 활용된다.
- [0128] [0125] IL-15 아미노산 서열:
- [0129] ISKPHLRISISIQYLCLLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSSAGLPKTEANWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCVKVTAMKCFLELQVLSLESGDASIHDVTENLILANNSSNGNVTESGCKECELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS (서열번호 8)
- [0130] 본원 개시내용에 의해 포함된 임의의 폴리펩타이드는 서열번호 8 또는 서열번호 8과 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% 이상 동일한 서열을 포함할 수 있다.
- [0131] [0126] 특정 구현예에서, 카스파제 9(예를 들어, 유도성 카스파제 9)와 같은 자살 유전자 생성물이 CAR와 함께 활용된다.
- [0132] [0127] 예시적 카스파제 9 아미노산 서열:
- [0133] MLEGVQVETISPGDGRFTFPRGQTCVVHYTGMLDGGKVDSSDRNKPFFKMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTI SPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLESGLGGSGVDGFGDVGALSLRGNADLAYILSMPECGHCLINNVCNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRRRFSSLHFMVEVKGDLTAKKMLALLELAQQDHGALDCCVWVILSHGCQASHLQFPGAVYGTGCPVSVVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTPEDESPPGSNPEPDATPFQEGLRFTDQLDAISSLPSTDFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLLRVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTSAS (서열번호 9)
- [0134] 본원 개시내용에 의해 포함된 임의의 폴리펩타이드는 서열번호 9 또는 서열번호 9과 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% 이상 동일한 서열을 포함할 수 있다.
- [0135] [0128] 동일한 벡터 내 CAR과 또 다른 단백질을 2개의 상이한 폴리펩타이드로 생산하려는 경우, 특정 2A 서열이 활용될 수 있다.
- [0136] [0129] E2A 아미노산 서열은 다음과 같이 활용될 수 있다:
- [0137] QCTNYALLKLAGDVESNPGP (서열번호 10)
- [0138] [0130] 기타 2A 예가 활용될 수 있고 다음과 같다:
- [0139] [0131] T2A: EGRGSLTTCGDVEENPGP (서열번호 11)
- [0140] [0132] P2A: ATNFSLLKQAGDVEENPGP (서열번호 12)
- [0141] [0133] F2A: VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP (서열번호 13)
- [0142] [0134] 본원 개시내용은 또한 임의의 유형의 면역 이펙터 세포에서의 발현을 포함하여 특정 CAR 분자를 포함한다.
- [0143] [0135] 벡터에서 CAR은 IL-15와 함께 발현될 수 있고, 이는 예를 들어 2A 서열에 의해 CAR로부터 분리될 수 있다.

[0144] A. 사이토킨

[0145] [0136] 하나 이상의 사이토킨은 (a) 임의로 힌지; 및 (b1) CD28 막관통 도메인 또는 (b2) DAP10 막관통 도메인 및 (c) DAP10 공동 자극 도메인을 포함하는 CAR과 같은 개시된 유전학적으로 가공된 수용체 중 하나 이상과 함께 활용될 수 있다. 일부 경우에, 하나 이상의 사이토킨은 가공된 수용체와 동일한 벡터 분자상에 존재하지만 다른 경우에는 이들은 별도의 벡터 분자 상에 있다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토킨은 가공된 수용체와 동일한 벡터로부터 공동 발현된다. 하나 이상의 사이토킨은 항원-특이적 수용체로부터 분리된 폴리펩타이드로서 제조될 수 있다. 하나의 예로서, 인터류킨-15 (IL-15)가 사용된다. IL-15는 조직 제한적이고 병리학적 조건하에서만 혈청내 또는 전신적으로 임의의 수준으로 관찰되기 때문에 IL-15가 사용될 수 있다. IL-15는 입양 치료요법을 위해 바람직할 수 있는 여러 속성들을 소유한다. IL-15는 천연 킬러 세포의 발육 및 세포 증식을 유도하고, 종양-잔류 세포의 기능적 억제를 완화시킴을 통해 확립된 종양의 소거를 촉진시키고 활성화-유도된 세포사를 억제하는 항상성 사이토킨이다. IL-15에 추가로, 다른 사이토킨이 고려된다. 이들은 사이토킨, 케모킨, 및 사람 적용을 위해 사용되는 세포의 활성화 및 증식에 기여하는 다른 분자를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 하나의 예로서, 하나 이상의 사이토킨은 IL-15, IL-12, IL-2, IL-18, IL-21, IL-23, IL-7, 또는 이의 조합이다. IL-15를 발현하는 NK 세포가 사용될 수 있고 계속되는 지원 사이토킨 신호전달할 수 있고, 이는 주입 후 이들의 생존을 위해 유용하다.

[0146] [0137] 특정 구현예에서, NK 세포는 하나 이상의 외인성으로 제공되는 사이토킨을 발현한다. 사이토킨은 세포 내 발현 벡터로부터 발현되기 때문에 및/또는 세포의 배양 배지에서 제공되기 때문에 NK 세포에 외인성으로 제공될 수 있다. 대안적인 경우에, 세포 내의 내인성 사이토킨은 사이토킨의 프로모터 부위(들)에서의 유전학적 재조합과 같은 내인성 사이토킨의 발현 조절의 조작시 상향조절된다. 사이토킨이 세포에 대한 발현 작제물 상에 제공되는 경우, 사이토킨은 자살 유전자와 동일한 벡터로부터 암호화될 수 있다. 사이토킨은 자살 유전자로부터의 별도의 폴리펩타이드 분자로서 및 세포의 가공된 수용체로부터 분리된 폴리펩타이드로서 발현될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원의 개시내용은 특히 NK 세포에서 IL-15와 함께 CAR 및/또는 TCR 벡터의 공동 사용에 관한 것이다.

[0147] B. 자살 유전자

[0148] [0138] 특정 구현예에서, 자살 유전자는 이의 용도를 제어하고 목적하는 이벤트 및/또는 시간에 세포 치료요법의 종료를 가능하게 하기 위해 임의의 종류의 세포 치료요법과 함께 사용된다. 자살 유전자는 필요한 경우 형질도입된 세포에 대해 사멸을 유발하는 목적을 위해 형질도입된 세포에 사용된다. 본원 개시내용에 의해 포함되는 벡터를 함유하도록 변형된 본원 개시내용의 항원 표적화 세포는 하나 이상의 자살 유전자를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 사용된 바와 같은 용어 “자살 유전자”는 프로드럭 또는 다른 제제의 투여시, 유전자 생성물을 숙주 세포를 사멸시키는 화합물로 전이시키는 유전자로서 정의된다. 다른 구현예에서, 자살 유전자는 목적하는 경우 자살 유전자 생성물을 표적화하는 제제(예를 들어, 항체)에 의해 표적화되는 유전자 생성물을 암호화한다. “자살 유전자 생성물”이란 자살 유전자에 의해 암호화된 단백질 또는 폴리펩타이드를 기재한다.

[0149] [0139] 사용될 수 있는 자살 유전자/프로드럭 조합의 예는 헤르페스 심플렉스 바이러스(Herpes Simplex Virus)-티미딘 키나제(HSV-tk) 및 간시클로비르(ganciclovir), 아시클로비르(acyclovir), 또는 FIAU; 옥시도리덕타제 및 사이클로헥시미드; 사이토신 테아미나제 및 5-플루오로시토신; 티미딘 키나제 티미딜레이트 키나제(Tdk::Tmk) 및 AZT; 및 데옥시시티딘 키나제 및 시토신 아라비노시드이다. 프로드럭 6-메틸퓨린 데옥시리보사이드를 독성의 퓨린 6-메틸퓨린으로 전환시키는 소위 자살 유전자로 불리우는 이. 콜리 퓨린 뉴클레오사이드 포스포릴라제가 사용될 수 있다. 프로드럭 치료요법과 함께 사용되는 자살 유전자의 다른 예는 이. 콜리 시토신 테아미나제 유전자 및 HSV 티미딘 키나제 유전자이다.

[0150] [0140] 예시적인 자살 유전자는 또한 CD20, CD52, EGFRv3, 또는 유도성 카스파제 9를 포함한다. 하나의 구현예에서, 절단된 버전의 EGFR 변이체 III (EGFRv3)은 선택적억제에 의해 제거될 수 있는 자살 항원으로서 사용될 수 있다. 본원의 개시내용에서 사용될 수 있는 당업계에 공지된 추가의 자살 유전자들은 퓨린 뉴클레오사이드 포스포릴라제 (PNP), 시토크롬 p450 효소 (CYP), 카복시펩티다제 (CP), 카복실에스테라제 (CE), 니트로리덕타제 (NTR), 구아닌 리보실트랜스퍼라제 (XGRTP), 글리코시다제 효소, 메티오닌- α , γ -리아제 (MET), 및 티미딘 포스포릴라제 (TP)를 포함한다. 일부 구현예에서 유도성 카스파제 9(iC9)가 사용된다. 예를 들어, iC9는 문헌(참조: Yagyu S, et al. 2015 Sep;23(9):1475-85)에 기재되어 있고, 본원에 전문이 참조로 인용된다.

[0151] [0141] 특정 구현예에서, CAR을 암호화하는 벡터, 또는 본원에 포함된 NK 세포 내의 임의의 벡터는 하나 이상의

자살 유전자를 포함한다. 자살 유전자는 CAR과 동일한 벡터 상에 존재하거나 존재하지 않을 수 있다. 자살 유전자가 CAR과 동일한 벡터에 존재하는 경우, 자살 유전자와 CAR은 예를 들어 IRES 또는 2A 요소에 의해 분리될 수 있다.

[0152] C. 기타 수용체

[0142] 일부 구현예에서, CAR을 포함하는 세포는 본원에 포함된 임의의 하나 이상의 성분을 포함하거나 포함하지 않을 수 있는 다른 CAR 분자, 하나 이상의 사이토킨 수용체, 하나 이상의 케모킨 수용체(예를 들어, CXCL8 생성 종양으로의 트래픽킹을 증진시키기 위한 CXCR1 및 CXCR2와 같은 종양 부위로의 트래픽킹 및 호밍을 증진시키기 위한 변형) 및/또는 하나 이상의 합성 TCR을 포함하는 하나 이상의 다른 수용체를 발현할 수 있다. 다른 수용체가 암 항원과 같은 항원을 표적화하는 경우, 다른 수용체는 본원 개시내용의 CAR와 동일한 항원을 표적화할 수 있거나 표적화할 수 없다.

[0154] IV. 벡터

[0143] (a) CD28 힌지; 및 (b1) CD28 막관통 도메인 또는 (b2) DAP10 막관통 도메인; 및 (c) DAP10 공동 자극 도메인을 포함하는 CAR은 바이러스 벡터 또는 비바이러스 벡터를 포함하여 임의의 적합한 벡터에 의해 수용 면역 세포에 전달될 수 있다. 바이러스 벡터의 예는 적어도 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스 또는 아데노 관련 바이러스 벡터를 포함한다. 비-바이러스 벡터의 예는 적어도 플라스미드, 트랜스포존, 지질, 나노입자 등을 포함한다.

[0144] 면역 세포가 유전학적으로 가공된 수용체를 암호화하는 벡터로 형질도입되고 자살 유전자 및/또는 사이토킨 및/또는 임의의 치료학적 유전자 생성물과 같은 또 다른 유전자 또는 유전자들의 세포 내로의 형질도입을 또한 필요로 하는 경우, 항원 표적화, 자살 유전자, 사이토킨, 및 임의의 치료학적 유전자는 동일한 벡터 상에 또는 이와 함께 포함되거나 포함되지 않을 수 있다. 일부 경우에, CAR, 자살 유전자, 사이토킨 및 임의의 치료학적 유전자는 동일한 바이러스 벡터 분자와 같은 동일한 벡터 분자로부터 발현된다. 그러한 경우에, CAR, 자살 유전자, 사이토킨 및 임의의 치료학적 유전자의 발현은 동일한 조절 요소(들)에 의해 조절되거나 조절되지 않을 수 있다. CAR, 자살 유전자, 사이토킨 및 임의의 치료학적 유전자가 동일한 벡터 상에 있는 경우, 이들은 별도의 폴리펩타이드로 발현되거나 발현되지 않을 수 있다. 이들이 별도의 폴리펩타이드로 발현되는 경우, 이들은 예를 들어 2A 요소 또는 IRES 요소에 의해 벡터 상에서 분리될 수 있다(또는 두 종류가 동일한 벡터 상에 1회 또는 1회 초과로 사용될 수 있음).

[0157] A. 일반 구현예

[0145] 당업자는 본원 개시내용의 항원 수용체의 발현을 위한 표준 재조합 기술을 통해 벡터를 작제하기 위한 장비를 잘 갖추고 있다(문헌참조: 예를 들어, Sambrook *et al.*, 2001 and Ausubel *et al.*, 1996, 이 둘다는 본원에 참조로 인용된다).

[0159] 1. 조절 요소들

[0146] 본원의 개시내용에 유용한 벡터에 포함된 발현 카세트는 특히 (5'-에서-3' 방향으로) 단백질 암호화 서열에 작동적으로 연결된 진행 전사 프로모터, 삽입 서열을 포함하는 스플라이스 신호, 및 전사 종결/폴리아데닐화 서열을 함유한다. 진행 세포에서 단백질 암호화 유전자의 전사를 제어하는 프로모터 및 인핸서는 다중 유전학적 요소들로 구성될 수 있다. 세포 기구는 각각의 요소에 의해 전달되는 조절 정보를 수집하고 통합할 수 있어 상이한 유전자들이 전사 조절의 별개의 혼한 복합 패턴으로 전개되도록 한다. 본원 개시내용과 관련하여 사용되는 프로모터는 예를 들어, 항시성, 유도성 및 조직-특이적 프로모터를 포함한다. 벡터가 암 치료요법의 생성을 위해 사용되는 경우, 프로모터는 저산소 상태하에서 효과적일 수 있다.

[0161] 2. 프로모터/인핸서

[0147] 본원에 제공된 발현 작제물은 항원 수용체 및 다른 시스트론 유전자 생성물의 발현을 구동시키기 위해 프로모터를 포함한다. 프로모터는 일반적으로 RNA 합성을 위한 개시 부위를 위치시키는 기능을 하는 서열을 포함한다. 이의 최상의 공지된 예는 TATA 박스이지만, 예를 들어, 포유동물 종결 데옥시뉴클레오티딜 트랜스퍼라제 유전자에 대한 프로모터 및 SV40 레이트 유전자에 대한 프로모터와 같이 TATA 박스가 부재인 일부 프로모터에서, 개시 부위 자체 위에 위치한 구분된 요소는 개시 위치를 고정시키는 것을 도와준다. 추가의 프로모터 요소들은 전사 개시의 빈도를 조절한다. 전형적으로, 이들은 개시 부위의 업스트림 영역에 위치하지만, 다수의 프로모터는 또한 개시 부위의 다운스트림에 기능성 요소들을 함유하는 것으로 나타났다. 암호화 서열을 프로모

터 “의 제어하에” 있도록 하기 위해, 하나는 선택된 프로모터의 “다운스트림” (즉, 이의 3')에 전사 판독 프레임의 전사 개시 부위의 5' 말단에 위치한다. “업스트림” 프로모터는 DNA의 전사를 자극하고 암호화된 RNA의 발현을 촉진시킨다.

[0163] [0148] 프로모터 요소들 사이의 공간은 흔히 가요성이어서 프로모터 기능은 요소들이 서로 상대적으로 역위되거나 이동되는 경우 보존된다. tk 프로모터에서, 예를 들어, 프로모터 요소들 간의 공간은 활성이 감소하기 시작하기 전에 50bp 이격으로 증가될 수 있다. 프로모터에 의존하여, 이것은 개별 요소들이 전사를 활성화시키기 위해 협력적으로 또는 독립적으로 기능할 수 있음을 나타낸다. 프로모터는 핵산 서열의 전사 활성화에 관여하는 시스-작용 조절 서열을 언급하는 “인핸서”와 연계하여 사용되거나 사용되지 않을 수 있다.

[0164] [0149] 프로모터는 암호화 분절 및/또는 엑손의 업스트림에 위치한 5' 비-암호화 서열을 단리시킴에 의해 수득될 수 있는 바와 같이 핵산 서열과 천연적으로 연합된 것일 수 있다. 상기 프로모터는 “내인성”으로서 언급될 수 있다. 유사하게, 인핸서는 상기 서열의 다운스트림 또는 업스트림에 위치한, 핵산 서열과 천연적으로 연관된 것일 수 있다. 대안적으로, 특정 이점은 정상적으로 이의 천연 환경에서 핵산 서열과 연합되지 않은 프로모터 프로모터를 언급하는, 재조합 또는 이중성 프로모터의 제어하에 암호화 핵산 분절을 위치시킴에 의해 획득될 수 있다. 재조합 또는 이중성 인핸서는 또한 이의 천연 환경에서 핵산 성결과 정상적으로 연합되지 않은 인핸서를 언급한다. 상기 프로모터 또는 인핸서는 다른 유전자의 프로모터 또는 인핸서, 및 임의의 다른 바이러스, 원핵 세포 또는 진핵 세포로부터 단리된 프로모터 또는 인핸서, 및 “천연적으로 존재”하지 않는, 즉, 발현을 변화시키는 상이한 전사 조절 영역, 및/또는 돌연변이의 상이한 요소들을 함유하는 프로모터 또는 인핸서를 포함할 수 있다. 예를 들어, 재조합 DNA 작제물에서 대부분 통상적으로 사용되는 프로모터는 β -락타마제 (페니실리나제), 락토스 및 트립토판 (trp-) 프로모터 시스템을 포함한다. 합성적으로 프로모터 및 인핸서의 핵산 서열을 생성하는 것에 추가로, 서열은 본원에 기재된 조성물과 연계하여 PCR™을 포함하는 재조합 클로닝 및/또는 핵산 증폭 기술을 사용하여 생성될 수 있다. 추가로, 미토콘드리아, 엽록체 등과 같은 비-핵 기관 내 서열의 전사 및/또는 발현을 지시하는 제어 서열이 또한 사용될 수 있는 것으로 고려된다.

[0165] [0150] 천연적으로, 기관(organelle), 세포 유형, 기관(organ), 또는 발현을 위해 선택된 유기체 내에서 DNA 분절의 발현을 효과적으로 지시하는 프로모터 및/또는 인핸서를 사용하는 것이 중요하다. 분자 생물학적 분야의 당업자는 일반적으로 단백질 발현을 위한 프로모터, 인핸서 및 세포 유형 조합의 사용을 알고 있다(문헌참조: 예를 들어, Sambrook *et al.* 1989, 본원에 참조로 인용됨). 사용되는 프로모터는 항상성, 조직-특이적, 유도성일 수 있고/있거나 도입된 DNA 분절의 고수준의 발현을 지시하기 위해 적당한 조건하에서 유용할 수 있고, 예를 들어, 재조합 단백질 및/또는 펩타이드의 대규모 생성에 유리하다. 프로모터는 이중성 또는 내인성일 수 있다.

[0166] [0151] 추가로 임의의 프로모터/인핸서 조합(예를 들어, epd.isb-sib.ch/의 월드 와이드 웹을 통해, 진핵 세포 프로모터 데이터 베이스 EPDB 당)은 또한 발현을 구동시키기 위해 사용될 수 있다. T3, T7 또는 SP6 세포질 발현 시스템의 사용은 또 다른 가능한 구현예이다. 진핵 세포는 적당한 세균 폴리머라제가 전달 복합체의 일부로서 또는 추가의 유전학적 발현 작제물의 일부로서 제공된 경우 특정 세균 프로모터로부터의 세포질 전사를 지시할 수 있다.

[0167] [0152] 프로모터의 비제한적인 예는 어얼리 또는 레이트 바이러스 프로모터, 예를 들어, SV40 어얼리 또는 레이트 프로모터, 사이토메갈로바이러스 (CMV) 이메디에이트 어얼리 프로모터, 라우스 육종 바이러스 (RSV) 어얼리 프로모터; 진핵 세포 프로모터, 예를 들어, 베타 액틴 프로모터, GAPDH 프로모터, 메탈로티오네인 프로모터; 및 연결된(concatenated) 반응 요소 프로모터들, 예를 들어, 사이클릭 AMP 반응 요소 프로모터들 (cre), 혈청 반응 요소 프로모터 (sre), 포르볼 (phorbol) 에스테르 프로모터 (TPA) 및 최소 TATA 박스 부근의 반응 요소 프로모터들 (tre)를 포함한다. 또한 사람 성장 호르몬 프로모터 서열(예를 들어, Genbank®에 기재된 사람 성장 호르몬 최소 프로모터, 승인 번호 X05244, 뉴클레오타이드 283-341) 또는 마우스 유방 종양 프로모터(ATCC, Cat. No. ATCC 45007로부터 가용한)를 사용할 수 있다. 특정 구현예에서, 프로모터는 CMV IE, 텍틴-1, 텍틴-2, 사람 CD11c, F4/80, SM22, RSV, SV40, Ad MLP, 베타-액틴, MHC 부류 I 또는 MHC 부류 II 프로모터이지만 치료학적 유전자의 발현을 구동시키기 위해 유용한 임의의 다른 프로모터는 본원 개시내용의 수행에 적용될 수 있다.

[0168] [0153] 특정 양상에서, 본 개시내용의 방법은 또한 인핸서 서열, 즉, 프로모터의 활성을 증가시키고 시스로 작용하고 이들의 배향과 무관하게 심지어 보다 상대적으로 긴 거리 (표적 프로모터로부터 수킬로베이스까지 이격되어 있는)에서 작용할 잠재력을 갖는 핵산 서열에 관한 것이다. 그러나, 인핸서 기능은 이들이 또한 소정의 프로모터에 근접하여 기능할 수 있으므로 필수적으로 상기 긴 거리에 제한되지 않는다.

[0169] 3. 개시 신호 및 연계된 발현

[0170] [0154] 특정 개시 신호는 또한 암호화 서열의 효율적인 해독을 위해 본원의 개시내용에 제공된 발현 작제물에 사용될 수 있다. 이들 신호는 ATG 개시 코돈 또는 인접 서열을 포함한다. 외인성 해독 제어 신호는 ATG 개시 코돈을 포함하고 제공될 필요가 있을 수 있다. 당업자는 이를 용이하게 결정할 수 있고 필요한 신호를 제공할 수 있다. 개시 코돈은 전체 삽입체의 해독을 보장하기 위해 목적하는 암호화 서열의 판독 프레임과 “인 프레임”으로 있어야 한다는 것은 널리 공지되어 있다. 외인성 해독 제어 신호 및 개시 코돈은 천연이거나 합성일 수 있다. 발현 효율은 적당한 전사 인핸서 요소들의 내포에 의해 증진될 수 있다.

[0171] [0155] 특정 구현예에서, 내부 리보솜 진입 부위 (IRES) 요소들을 사용하여 다중유전자, 또는 폴리시스트론, 메시지를 생성한다. IRES 요소들은 5' 메틸화된 캡 의존성 해독의 리보솜 스캐닝 모델을 우회할 수 있고 내부 부위에서 해독을 개시할 수 있다. 피코나바이러스 패밀리의 2개의 구성원 (소아마비 및 뇌척수심근염)으로부터의 IRES 요소들은 개시되어 있고, 또한 포유동물 메시지에서부터의 IRES가 기재되어 있다. IRES 요소들은 이중성 개방 판독 프레임에 연결될 수 있다. 다중 개방 판독 프레임은 함께 전사될 수 있고 각각은 IRES에 의해 분리되어 있고 폴리시스트론 메시지를 생성한다. IRES 요소에 의해, 각각의 개방 판독 프레임은 효율적인 해독을 위해 리보솜에 접근할 수 있다. 다중 유전자는 단일 메시지를 전사하기 위해 단일 프로모터/인핸서를 사용하여 효율적으로 발현될 수 있다.

[0172] [0156] 본원의 다른 곳에 상세히 기재된 바와 같이, 특정 2A 서열 요소들을 사용하여 본원의 개시내용에 제공된 작제물 내 유전자들의 연결되거나 공동 발현을 생성시킬 수 있다. 예를 들어, 절단 서열을 사용하여 단일 시스트론을 형성하기 위해 개방 판독 프레임들을 연결시킴에 의해 유전자들을 공동 발현시킬 수 있다. 예시적인 절단 서열은 말 비염 A 바이러스(E2A) 또는 F2A(수족구 질환 바이러스 2A) 또는 “2A-유사” 서열(예를 들어, 토세아 아시그나(*Thosaea asigna*) 바이러스 2A; T2A) 또는 돼지 테스코바이러스-1(P2A))이다. 특정 구현예에서, 단일 벡터에서 다수의 2A 서열은 동일하지 않지만, 대안적 구현예에서 동일한 벡터는 동일한 2A 서열 중 2개 이상을 사용한다. 2A 서열의 예는 이의 전문이 본원에 참조로 인용된 US 2011/0065779에 제공된다.

[0173] 4. 복제 오리진

[0174] [0157] 숙주 세포 내 벡터를 증가시키기 위해, 하나 이상의 복제 오리진 부위 (흔히 “ori”로 칭함), 예를 들어, 상기된 바와 같이 EBV의 oriP 또는 프로그래밍에서 유사하거나 상승된 기능을 갖고, 유전학적으로 가공된 oriP에 상응하는 핵산 서열을 함유할 수 있다. 대안적으로, 상기된 바와 같이 다른 염색체외 복제 바이러스의 복제 오리진 또는 자발적으로 복제하는 서열 (ARS)가 사용될 수 있다.

[0175] 5. 선택 및 스크리닝 가능한 마커

[0176] [0158] 일부 구현예에서, 본원 개시내용의 수용체 작제물을 포함하는 NK 세포는 발현 벡터 내 마커를 포함시킴에 의해 시험관내 또는 생체내에서 동정될 수 있다. 상기 마커는 발현 벡터를 함유하는 세포의 용이한 동정을 가능하게 하는 세포에 동정가능한 변화를 부여한다. 일반적으로, 선택 마커는 선택을 가능하게 하는 성질을 부여하는 마커이다. 양성 선택 마커는 마커의 존재가 이의 선택을 가능하게 하는 마커이고 음성 선택 마커는 이의 존재가 이의 선택을 차단시키는 마커이다. 양성 선택 마커의 예는 약물 내성 마커이다.

[0177] [0159] 일반적으로, 약물 선택 마커의 내포는 형질전환체의 클로닝 및 동정을 원조하고, 예를 들어, 네오마이신, 푸로마이신, 하이그로마이신, DHFR, GPT, 제오신 및 히스티디놀에 대한 내성을 부여하는 유전자는 유용한 선택 마커이다. 조건의 수행을 기반으로 하는 형질전환체의 구별을 가능하게 하는 표현형을 부여하는 마커에 추가로, 스크리닝가능한 마커, 예를 들어, 이의 기반이 비색 분석인 GFP를 포함하는 다른 유형의 마커가 또한 고려된다. 대안적으로, 헤르페스 심플렉스 티미딘 키나제 (*tk*) 또는 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제 (CAT)와 같은 음성 선택 마커로서 스크리닝가능한 효소가 사용될 수 있다. 당업자는 또한 능히 FACS 분석과 연계된 면역학적 마커를 사용하는 방법을 알고 있다. 사용되는 마커는 이것이 유전자 생성물을 암호화하는 핵산과 동시 발현될 수 있는 한 중요한 것으로 사료되지 않는다. 선택 및 스크리닝 가능한 마커의 추가의 예는 당업자에게 널리 공지되어 있다.

[0178] B. 다중시스트론 벡터

[0179] [0160] 특정 구현예에서, (a) CD28 힌지, (b1) CD28 막관통 도메인 또는 (b2) DAP10 막관통 도메인 및 (c) DAP10 공동 자극 도메인을 포함하는 유전학적으로 가공된 수용체를 암호화하는 벡터는 또한 다중시스트론 벡터로부터 발현되는 것을 포함하여 임의의 자살 유전자, 임의의 사이토킨 및/또는 임의의 치료학적 유전자를 암호

화하는 서열을 포함한다(여기서 사용되는 용어 "시스트론"은 유전자 생성물을 생성할 수 있는 핵산 서열을 지칭한다). 특정 구현예에서, 다중시스트론 벡터는 T-세포 수용체 및/또는 추가의 CAR과 같은 수용체, 자살 유전자, 및 적어도 하나의 사이토킨, 및/또는 가공된 수용체, 예를 들어, T-세포 수용체 및/또는 추가의 CAR을 암호화한다. 일부 경우에, 다중시스트론 벡터는 적어도 하나의 CAR, 적어도 하나의 비-분비성 TNF-알파 돌연변이체, 및 적어도 하나의 사이토킨을 암호화한다. 사이토킨은 사람 또는 마우스 또는 임의의 종과 같은 특정 유형의 사이토킨일 수 있다. 특정 경우에, 사이토킨은 IL15, IL12, IL2, IL18, 및/또는 IL21이다.

[0180] [0161] 특정 구현예에서, 본원 개시내용은 실질적으로 동일한 수준에서 다중 시스트론을 발현하는 능력을 갖는 폴리시스트론 벡터를 사용하는 가요성 모듈식 시스템을 제공한다(여기에서 사용된 용어 "모듈식"은 예를 들어, 표준 제조합 기술을 사용함에 의해 각각 전체 시스트론 또는 시스트론의 성분의 제거 및 대체에 의해 이의 상호교환성을 가능하게 하는 시스트론 또는 시스트론의 성분을 지칭한다). 시스템은 다수의 유전자의 조합 발현(과발현 포함)을 허용하는 세포 가공을 위해 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 벡터에 의해 발현되는 유전자 중 하나 이상은 1개, 2개 또는 그 이상의 항원 수용체를 포함한다. 다중 유전자는 CAR, TCR, 사이토킨, 케모킨, 귀소 수용체, CRISPR/Cas9-매개 유전자 돌연변이, 유인 수용체, 사이토킨 수용체, 키메라 사이토킨 수용체 등을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 벡터는 추가로 포함할 수 있다: (1) 하나 이상의 리포터, 예를 들어 세포 검정 및 동물 영상화를 위한 형광 또는 효소 리포터; (2) 하나 이상의 사이토킨 또는 다른 신호전달 분자; 및/또는 (3) 자살 유전자.

[0181] [0162] 특정 경우에, 벡터는 2A 절단 부위와 같은 임의의 종류의 절단 부위에 의해 분리된 적어도 4개의 시스트론을 포함할 수 있다. 벡터는 모로니 뮤린 백혈병 바이러스(MoMLV 또는 MMLV)-기반일 수 있거나 아닐 수 있고 이는 pUC19 골격 내 psi 패키징 서열을 갖는 3' 및 5' LTR을 포함한다. 벡터는 유전자 스와핑(swapping)을 위해 3개 이상의 2A 절단 부위 및 다중 ORF를 갖는 4개 이상의 시스트론을 포함할 수 있다. 상기 시스템은 서브클로닝을 통한 신속한 통합을 위해 제한 부위(들)에 의해 플랭킹된 다중 유전자 (7개 이상)의 조합적 과발현을 가능하게 하고, 상기 시스템은 또한 일부 구현예에서 적어도 3개의 2A-절단 부위를 포함한다. 따라서, 상기 시스템은 다중 CAR, TCR, 신호전달 분자, 사이토킨, 사이토킨 수용체, 및/또는 귀소(homing) 수용체의 발현을 가능하게 한다. 상기 시스템은 또한 다른 바이러스 및 비-바이러스 벡터에 적용될 수 있고, 이는 렌티바이러스, 아데노바이러스 AAV, 및 비-바이러스 플라스미드를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0182] [0163] 시스템의 모듈식 성질은 또한 신속한 시험과 같이 폴리시스트론 발현 벡터의 4개 시스트론 각각에 유전자를 효율적으로 서브클로닝하고 유전자 스와핑을 가능하게 한다. 폴리시스트론 발현 벡터에 전략적으로 위치한 제한 부위는 효율적인 유전자의 스와핑을 가능하게 한다.

[0183] [0164] 본원 개시내용의 구현예는 폴리시스트론 벡터를 사용하는 시스템을 포함하고, 여기서 벡터의 적어도 일부는 예를 들어 벡터의 모듈식 사용을 용이하게 하기 위해 정체(identity) 및 위치가 특이적으로 선택된 하나 이상의 제한 효소 부위를 사용함에 의해 하나 이상의 시스트론 (또는 하나 이상의 시스트론의 성분(들)의 제거 및 대체를 가능하게 함에 의한 모듈식이다. 벡터는 또한 다수의 시스트론이 단일 폴리펩타이드로 해독되고 별도의 폴리펩타이드로 가공됨으로써 벡터가 실질적으로 동물 농도로 별개의 유전자 생성물을 발현하는 이점을 부여하는 구현예를 갖는다.

[0184] [0165] 본원 개시내용의 벡터는 벡터의 하나 이상의 시스트론을 변화시키고/시키거나 하나 이상의 특정 시스트론의 하나 이상의 성분을 변화시킬 수 있도록 하는 모듈성을 위해 구성된다. 벡터는 하나 이상의 시스트론의 말단을 플랭킹하고/하거나 특정 시스트론의 하나 이상의 성분의 말단을 플랭킹하는 독특한 제한 효소 부위를 사용하여 디자인될 수 있다.

[0185] [0166] 본원 개시내용의 구현예는 각각 하나 이상의 제한 효소 부위에 의해 플랭킹된 적어도 2개, 적어도 3개, 또는 적어도 4개의 시스트론을 포함하는 폴리시스트론 벡터를 포함하고, 여기서, 적어도 하나의 시스트론은 적어도 하나의 항원 수용체를 암호화한다. 일부 경우에, 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 시스트론은 단일 폴리펩타이드로 해독되어 별도의 폴리펩타이드로 절단되는 반면, 다른 경우에는 다수의 시스트론이 단일 폴리펩타이드로 해독되어 별도의 폴리펩타이드로 절단된다. 벡터 상에 인접한 시스트론은 자가 절단 부위, 예를 들어, 2A 자가 절단 부위에 의해 분리될 수 있다. 일부 경우에, 시스트론 각각은 벡터로부터 별도의 폴리펩타이드를 발현한다. 특정 경우에, 벡터 상에 인접한 시스트론은 IRES 요소에 의해 분리되어 있다.

[0186] [0167] 특정 구현예에서, 본원의 개시내용은 예를 들어, 1개, 2개 또는 그 이상의 항원 수용체를 포함할 수 있는 다중 시스트론의 과발현을 포함하는 조합 발현을 가능하게 하는 세포 가공을 위한 시스템을 제공한다. 특정 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 폴리시스트론 벡터의 사용은 벡터가 동일한 mRNA로부터 동물 수준의 다중

유전자 생성물을 생성하도록 한다. 다중 유전자는 CAR, TCR, 사이토킨, 케모킨, 귀소 수용체, CRISPR/Cas9-매개 유전자 돌연변이, 유인 수용체, 사이토킨 수용체, 키메라 사이토킨 수용체 등을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 벡터는 추가로 예를 들어, 세포 검정 및 동물 이미징화를 위한 하나 이상의 형광성 또는 효소 리포터를 포함할 수 있다. 벡터는 또한 이들이 더 이상 필요하지 않거나 이들이 제공된 숙주에 유해하게 될 때 벡터를 보유하는 세포의 종결을 위한 자살 유전자 생성물을 포함할 수 있다.

[0187] [0168] 특정 구현예에서, 벡터는 바이러스 벡터(예를 들어, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 또는 아데노-관련 바이러스 벡터) 또는 비-바이러스 벡터이다. 벡터는 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스(MMLV) 5' LTR, 3' LTR, 및/또는 psi 패키징 요소를 포함할 수 있다. 특정 경우에, psi 패키징은 5' LTR과 항원 수용체 암호화 서열 사이에 혼입된다. 벡터는 pUC19 서열을 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 벡터의 일부 양상에서, 적어도 하나의 시스템은 사이토킨(예를 들어, IL-15, IL-7, IL-21, IL-23, IL-18, IL-12, 또는 IL-2), 케모킨, 사이토킨 수용체 및/또는 귀소 수용체를 암호화한다.

[0188] [0169] 2A 절단 부위가 벡터에서 사용되는 경우, 2A 절단 부위는 P2A, T2A, E2A 및/또는 F2A 부위를 포함할 수 있다.

[0189] [0170] 제한 효소 부위는 임의의 종류일 수 있고, 이의 인지 부위에 임의의 수의 염기, 예를 들어 4 내지 8개 염기를 포함할 수 있고; 인지 부위의 염기 수는 적어도 4, 5, 6, 7, 8개 이상일 수 있다. 절단되는 경우 상기 부위는 평활 절단 또는 접착 (sticky) 말단을 생성할 수 있다. 제한 효소는 예를 들어, I형, II형, III형, 또는 IV형일 수 있다. 제한 효소 부위는 가용한 데이터베이스, 예를 들어, 통합 관계 효소 데이터베이스(IntEnz) 또는 BRENDA (포괄적 효소 정보 시스템)으로부터 획득될 수 있다.

[0190] [0171] 예시적인 벡터는 환형일 수 있고 관례에 따라 여기서, 위치 1(환의 상단에서 12시 위치, 서열의 나머지는 시계 방향으로)은 5' LTR의 개시부에 설정된다.

[0191] [0172] 자가 절단 2A 펩타이드가 사용되는 구현예에서, 2A 펩타이드는 진핵 세포에서 해독 동안 폴리펩타이드의 "절단"을 매개하는 18 내지 22개의 아미노산(aa) 길이의 바이러스 올리고펩타이드일 수 있다. "2A"라는 명칭은 바이러스 게놈의 특정 영역을 언급하고, 상이한 바이러스 2A는 일반적으로 이들이 파생된 바이러스의 이름을 따서 명명되었다. 최초로 발견된 2A는 F2A(구제역 바이러스) 이고, 그 후 E2A(말 비염 A 바이러스), P2A(돼지 테스코바이러스 -1 2A), T2A(토세아 아시아 바이러스 2A)도 확인되었다. 2A 매개 "자가-절단"의 기전은 2A의 C-말단에서 글리실-프롤린 펩타이드 결합의 형성을 건너뛰는 리보솜인 것으로 밝혀졌다.

[0192] [0173] 특정 경우에, 벡터는 γ -레트로바이러스 전달 벡터일 수 있다. 레트로바이러스 전달 벡터는 pUC19 플라스미드(HindIII와 EcoRI 제한 효소 부위 사이의 큰 단편(2.63kb))와 같은 플라스미드를 기반으로 하는 백본을 포함할 수 있다. 백본은 5' LTR, psi 패키징 서열 및 3' LTR을 포함하는 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스(MoMLV) 기원의 바이러스 성분을 함유할 수 있다. LTR은 레트로바이러스 프로바이러스의 어느 한 측면에서 발견되는 긴 말단 반복체이고, 전달 벡터의 경우 (a) CD28 힌지, (b1) CD28 막관통 도메인 또는 (b2) DAP10 막관통 도메인, 및 (c) DAP10 공동 자극 도메인 및 임의로 관련된 성분을 포함하는 CAR과 같은 관심 대상의 유전학적 카고의 양측면에 존재한다. 뉴클레오키프시드에 의한 패키징에 대한 표적 부위인 psi 패키징 서열도 5' LTR과 CAR 암호화 서열 사이에 샌드위치된 cis로 혼입된다. 따라서, 전달 벡터의 하나의 예의 기본 구조는 pUC19 서열 - 5' LTR - psi 패키징 서열 - 관심 대상 유전자 카고 - 3' LTR - pUC19 서열과 같이 구성될 수 있다. 상기 시스템은 또한 다른 바이러스 및 비-바이러스 벡터에 적용될 수 있고, 이는 렌티바이러스, 아데노바이러스 AAV, 및 비-바이러스 플라스미드를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0193] V. 세포

[0194] [0174] 본원 개시내용은 (a) CD28 힌지, (b1) CD28 막관통 도메인 또는 (b2) DAP10 막관통 도메인 및 (c) DAP10 공동 자극 도메인을 포함하는 유전학적으로 가공된 수용체를 암호화하는 적어도 하나의 벡터를 보유하고, 또한 적어도 하나의 사이토킨 및/또는 적어도 하나의 자살 유전자를 암호화할 수 있는 임의의 종류의 면역 세포 또는 줄기 세포를 포함한다. 일부 경우에, 상이한 벡터가 CAR을 암호화하고, 자살 유전자 및/또는 사이토킨을 암호화한다. NK 세포를 포함하는 면역 세포는 제대혈(다중 공급원으로부터 폴링된 제대혈), 말초 혈액, 유도 만능 줄기 세포(iPSC), 조혈 줄기 세포(HSC), 골수 또는 이들의 혼합물로부터 유래될 수 있다. NK 세포는 예를 들어 NK-92 세포와 같은 세포주로부터 유래할 수 있지만 이에 제한되지는 않는다. NK 세포는 제대혈 단핵 세포, 예를 들어, CD56⁺ NK 세포일 수 있다.

[0195] [0175] 본원 개시내용은 통상적인 T 세포, 감마-델타 T 세포, NKT 및 불변 NK T 세포, 조절 T 세포, 대식세포,

B 세포, 수지상 세포, 중간엽 기질 세포(MSC), 또는 이들의 혼합물을 포함하는 임의의 종류의 면역 또는 기타 세포를 포괄한다.

[0196] [0176] 일부 경우에, 세포는 임의의 적합한 비율을 포함하여 유효량의 범용 항원 제공 세포(Universal Antigen Presenting Cell(UAPC))의 존재 하에 확장되었다. 세포는 예를 들어, 1:2의 비율을 포함하는, 10:1 내지 1:10; 9:1 내지 1:9; 8:1 내지 1:8; 7:1 내지 1:7; 6:1 내지 1:6; 5:1 내지 1:5; 4:1 내지 1:4; 3:1 내지 1:3; 2:1 내지 1:2; 또는 1:1의 비율로 UAPC와 함께 배양될 수 있다. 일부 경우에, NK 세포는 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100, 10-50, 100-500, 100-400, 100-300, 100-200, 200-500, 200-400, 200-300, 300-500, 300-400, 또는 400-500 U/mL의 농도에서와 같이 IL-2의 존재하에 확장시켰다.

[0197] [0177] 벡터(들)를 사용한 유전학적 변형 후, NK 세포는 즉시 주입되거나 저장될 수 있다. 특정 양상에서, 유전학적 변형 후, 상기 세포는 세포로의 유전자 전달 후 약 1, 2, 3, 4, 5일 이상 이내에 벌크 집단으로서 수일. 수주 또는 수개월 동안 생체의 증식시킬 수 있다. 추가의 양상에서, 형질감염체를 클로닝하고 단일 통합되거나 에피솜으로 유지되는 발현 카세트 또는 플라스미드의 존재 및 CAR의 발현을 입증하는 클론을 생체의 확장시킨다. 확장을 위해 선택된 클론은 항원 발현 표적 세포를 특이적으로 인지하고 용해시키는 능력을 입증한다. 재조합 면역 세포는 IL-2 또는 통상의 감마-쇄에 결합하는 다른 사이토킨 (예를 들어, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23 등)으로 자극에 의해 확장될 수 있다. 재조합 면역 세포는 인공 항원 제공 세포를 사용한 자극에 의해 확장될 수 있다. 추가의 양상에서, 유전학적으로 변형된 세포는 냉동보존시킬 수 있다.

[0198] [0178] 본원 개시내용의 구현에는 본원에 포함된 바와 같은 하나 이상의 CAR 및 하나 이상의 자살 유전자를 발현하는 세포를 포함한다. NK 세포는 특정 구현예에서 하나 이상의 CAR 및 하나 이상의 가공된 비분비성, 막 결합 TNF-알파 돌연변이체 폴리펩타이드를 암호화하는 재조합 핵산을 포함한다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 CAR 및 TNF-알파 돌연변이체 폴리펩타이드를 발현하는 것 외에, 세포는 또한 하나 이상의 치료학적 유전자 생성물을 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0199] [0179] 세포는 개체로부터 직접 수득될 수 있거나 보관소 또는 기타 저장 시설에서 수득될 수 있다. 치료요법으로서의 세포는 세포가 치료요법으로서 제공되는 개체에 대해 자가 또는 동종이계일 수 있다.

[0200] [0180] 세포는 의학적 병태에 대한 치료요법을 필요로 하는 개체로부터 기원할 수 있고, CAR, 임의의 자살 유전자, 임의의 사이토킨(들) 및 임의의 치료학적 유전자 생성물(들)을 발현하기 위한 이들의 조작 후(예를 들어, 입양 세포 치료요법을 위한 형질도입 및 확장을 위한 표준 기술 사용), 이들은 이들이 원래 공급되었던 개체에 다시 제공될 수 있다. 일부 경우에, 세포는 개체 또는 또 다른 개체에 이후 사용을 위해 저장된다.

[0201] [0181] 면역 세포는 세포 집단에 포함될 수 있고, 상기 집단은 하나 이상의 수용체 및/또는 하나 이상의 자살 유전자 및/또는 하나 이상의 사이토킨으로 형질도입된 다수를 가질 수 있다. 세포 집단은 하나 이상의 CAR 및/또는 하나 이상의 자살 유전자 및/또는 하나 이상의 사이토킨이 형질도입된 면역 세포의 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100%를 포함할 수 있다. 하나 이상의 CAR 및/또는 하나 이상의 자살 유전자 및/또는 하나 이상의 사이토킨은 별도의 폴리펩타이드일 수 있다.

[0202] [0182] 면역 세포는 특정 목적과 관련하여 모듈식이될 의도로 하나 이상의 CAR 및/또는 하나 이상의 자살 유전자 및/또는 하나 이상의 사이토킨으로 생산될 수 있다. 예를 들어, 상업적 유통을 위해 CAR 및/또는 하나 이상의 자살 유전자 및/또는 하나 이상의 사이토킨을 발현하는(또는 후속 형질도입을 위해 돌연변이체를 암호화하는 핵산과 함께 유통되는) 세포가 생성될 수 있고, 사용자는 의도된 목적(들)에 따라 하나 이상의 다른 관심 대상 유전자(치료학적 유전자 포함)를 발현하도록 이들을 변형시킬 수 있다. 예를 들어, 항원 양성 암을 포함한 항원 양성 세포 또는 감염원 감염된 세포를 치료에 관심이 있는 개체는 자살 유전자-발현 세포(또는 이중 사이토킨-발현 세포)를 수득하거나 생성할 수 있고, 항원 특이적 scFv를 포함하는 수용체를 발현하도록 이들을 변형시킬 수 있거나, 그 반대일 수 있다.

[0203] [0183] 특정 구현예에서, NK 세포가 사용되고, 하나 이상의 CAR 및/또는 하나 이상의 자살 유전자 및/또는 하나 이상의 사이토킨을 발현하는 형질도입된 NK 세포의 계통은 변형될 수 있다. 계통은 임의의 방식으로 변형될 수 있지만, 특정 구현예에서 계통은 예를 들어 CRISPR 유전자 편집에 의해 변형된다. 세포의 계통을 변형시켜 임의의 목적을 위해 세포의 효과를 증진시킬 수 있다.

[0204] VI. 치료 방법

- [0205] [0184] 다양한 구현예에서, 이들의 표면 상에 목적하는 항원을 발현하는 병에 거리거나 기타 세포는 의학적 병태를 갖는 개체에서 의학적 상태를 개선할 목적으로 또는 개체에서 의학적 병태의 위험을 감소시키거나 중증도 및/또는 발병을 지연시킬 목적으로 표적화된다. 특정 경우에, 내인성 항원을 발현하는 암 세포는 암 세포를 사멸시킬 목적으로 표적화된다. 다른 경우에 감염원으로 감염된 세포는 상기 감염된 세포를 사멸시키기 위한 목적으로 표적화된다.
- [0206] [0185] 특정 구현예에서, 본원에서 고려되는 바와 같은 CAR 작제물, 핵산 서열, 벡터, 면역 세포 등, 및/또는 이를 포함하는 약제학적 조성물은 암성 질환과 같은 질환의 예방, 치료 또는 개선을 위해 사용된다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 약제학적 조성물은 예를 들어 특정 발현을 발현하고 고형 종양일 수 있거나 아닐 수 있는 암을 비롯한 암의 예방, 개선 및/또는 치료에 특히 유용할 수 있다.
- [0207] [0186] 수용체가 사용되는 면역 세포는 NK 세포, T 세포, 감마 델타 T 세포, 알파 베타 T 세포 또는 NKT 또는 불변 NKT(iNKT), 또는 특정 구현예에서, 포유류에 대한 세포 치료요법을 위해 가공된 불변 NKT 세포일 수 있다. 세포가 NK 세포인 상기 경우에, NK 세포 치료요법은 임의의 종류의 것일 수 있고, NK 세포는 임의의 종류의 것일 수 있다. 특정 구현예에서, 세포는 하나 이상의 CAR 및/또는 하나 이상의 자살 유전자 및/또는 하나 이상의 사이토킨을 발현하도록 가공된 NK 세포이다. 특정 구현예에서, 세포는 CAR로 형질도입된 NK 세포이다.
- [0208] [0187] 특정 구현예에서, 본원 개시내용은 단독으로 또는 표준 벡터 및/또는 유전자 전달 시스템을 사용하고 적어도 일부 양상에서 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 함께 임의의 조합으로 투여될 수 있는 CAR-발현 세포, CAR 작제물, CAR 핵산 분자 및 CAR 벡터를 부분적으로 고려한다. 특정 구현예에서, 투여에 이어서 핵산 분자 또는 벡터는 대상체의 계놈에 안정적으로 통합될 수 있다.
- [0209] [0188] 특정 구현예에서, 특정 세포 또는 조직에 대해 특이적이고 NK 세포에서 지속적으로 존재하는 바이러스 벡터가 사용될 수 있다. 적합한 약제학적 담체 및 부형제는 당업계에 널리 공지되어 있다. 본원 개시내용에 따라 제조되는 조성물은 상기 동정된 질환의 예방, 치료 또는 지연을 위해 사용될 수 있다.
- [0210] [0189] 추가로, 본원의 개시내용은 종양 질환의 예방, 치료 또는 개선을 위한 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 본원에서 고려되고/되거나 본원에서 고려된 바와 같은 공정에 의해 생성되는 CAR, 핵산 서열, 벡터를 발현하는 유효량의 세포를 이를 필요로 하는 상기 대상체에 투여하는 단계를 포함한다.
- [0211] [0190] 예시적인 CAR 세포의 조성물(들)의 투여를 위해 가능한 적응증은 예를 들어, B 세포 악성종양, 다발성 골수종, 유방암, 교모세포종, 신장암, 췌장암 또는 폐암을 포함하는 종양 질환을 포함하는 암성 질환이다. 항원 표적화 CAR 세포의 조성물(들) 투여에 대한 예시적인 적응증은 항원을 발현하는 임의의 악성 종양을 포함하는 암성 질환이다. 본원 개시내용의 조성물(들)의 투여는 예를 들어, 최소 잔류 질환, 조기 암, 진행성 암 및/또는 전이성 암 및/또는 불응성 암을 포함하는 암의 모든 병기(I, II, III, 또는 IV) 및 유형을 위해 유용하다.
- [0212] [0191] 본원 개시내용은 다른 화합물, 예를 들어, 이중특이적 항체 작제물, 표적화된 독소 또는 면역 세포를 통해 작용하는 기타 화합물과의 공동 투여 프로토콜을 추가로 포함한다. 본 발명의 화합물(들)의 공동-투여를 위한 임상 용법은 동시에, 다른 성분의 투여 전 또는 후에 공동-투여를 포함할 수 있다. 특정 조합 치료요법은 화학치료요법, 방사선, 수술, 호르몬 치료요법 또는 다른 유형의 면역치료요법을 포함한다.
- [0213] [0192] 구현예는 본원에 정의된 바와 같은 CAR 작제물, 본원에 포함된 성분, 본원에 정의된 바와 같은 핵산 서열, 본원에 정의된 바와 같은 벡터 및/또는 본원에 정의된 바와 같은 숙주 세포(예를 들어, 면역 세포)를 포함하는 키트에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 키트는 (a) CD28 힌지, (b1) CD28 막관통 도메인 또는 (b2) DAP10 막관통 도메인 및/또는 (c) DAP10 공동 자극 도메인을 암호화하는 핵산 또는 이를 증폭시키기 위한 적합한 프라이머를 포함한다. 또한 본원 개시내용의 키트는 단독으로 또는 의학적 치료 또는 개입을 필요로 하는 개체에게 투여될 추가 의약품 조합하여 상기 본원에 기재된 바와 같은 약제학적 조성물을 포함하는 것으로 고려된다.
- [0214] **VII. 약제학적 조성물**
- [0215] [0193] 본원 개시내용의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체 내에 분산된 NK 세포를 포함하는 유효량의 조성물을 포함한다. 용어 "약제학적 또는 약제학적으로 허용되는"은 동물, 예를 들어, 적절하게 사람에게 투여되는 경우 역반응, 알레르기 반응 또는 다른 원치않는 반응을 생성하지 않는 분자 실체 및 조성물을 언급한다. 조성물을 포함하는 약제학적 조성물의 제조는 문헌(참조: Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Ed. Lippincott Williams and Wilkins, 2005, 본원에 참조로 인용됨)에 예시된 바와 같이, 본

원 개시내용에 비추어 당업자에게 공지되어 있다. 더욱이, 동물(예를 들어, 사람) 투여에 대해, 제조는 생물학적 표준의 FDA 사무국에 의해 요구되는 바와 같이 멸균성, 발열성, 일반적인 안정성 및 순도 표준을 충족해야만 하는 것으로 이해된다.

[0216] [0194] 본원에서 사용되는 "약제학적으로 허용되는 담체"는 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 계면활성제, 향산화제, 방부제(예를 들어, 항균제, 항진균제), 등장화제, 흡수 지연제, 염, 방부제, 약물, 약물 안정화제, 겔, 결합제, 부형제, 붕해제, 유회제, 감미제, 향미제, 염료, 유사 물질 및 이들의 조합과 같은, 당업자에게 공지된 바와 같은 것(문헌참조: 예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329, 본원에 참조로 인용됨). 지금까지 임의의 통상적인 담체가 활성 성분과 상용성이 아닌 것을 제외하고는, 약제학적 조성물 중 이의 용도가 고려된다.

[0217] [0195] 약제학적 조성물은 고체, 액체 또는 에어로졸 형태로 투여되어야 하는지의 여부, 및 주사와 같은 투여 경로에 대해 멸균되어야 하는지의 여부에 따라 상이한 유형의 담체를 포함할 수 있다. 본원에 기재된 조성물은 당업자에게 공지된 바와 같이, 정맥내, 피내, 경피, 척추강내, 동맥내, 복막내, 비강내, 질내, 직장내, 국소적으로, 근육내, 피하, 점막, 경구, 국소적으로, 국부적으로, 흡입(예를 들어, 에어로졸 흡입), 주사, 주입, 연속 주입, 직접적으로 국부 관류 욕조 표적 세포에 의해, 카테터를 통해, 세척을 통해, 크림으로, 지질 조성물(예를 들어, 리포솜)에서, 또는 다른 방법 또는 당업자에게 공지된 바와 같은 전술한 것의 임의의 조합에 의해 투여될 수 있다(문헌참조: 예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Printing Company, 1990, 본원에 참조로 인용됨).

[0218] [0196] NK 세포를 포함하는 조성물은 자유 염기, 중성 또는 염 형태의 조성물로 제형화될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 염은 경우에 따라 산 부가염, 예를 들어, 단백질질 조성물의 유리된 아미노 그룹으로 형성되거나 예를 들어 염산 또는 인산과 같은 무기산 또는 아세트산, 옥살산, 타르타르산 또는 만델산과 같은 유기산으로 형성되는 염을 포함한다. 유리된 카복실 그룹으로 형성된 염은 또한 예를 들어 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘 또는 수산화철과 같은 무기 염기; 또는 이소프로필아민, 트리메틸아민, 히스티딘 또는 프로카인과 같은 유기 염기로부터 유래될 수 있다. 제형화 시, 용액은 투여 제제와 상용성인 방식으로 및 치료학적으로 효과적인 양으로 투여될 것이다. 제형은 주사용 용액과 같은 비경구 투여용 제형 또는 폐로의 전달을 위한 에어로졸 또는 약물 방출 캡슐 등과 같은 소하 투여용 제형과 같은 다양한 투여 형태로 용이하게 투여된다.

[0219] [0197] 추가로 본원 개시내용에 따라, 투여에 적합한 본원 개시내용의 조성물은 불활성 희석제의 존재 또는 부재하에 약제학적으로 허용되는 담체로 제공된다. 담체는 동화될 수 있어야 하고, 액체, 반고체, 즉 페이스트 또는 고체 담체를 포함한다. 임의의 통상적인 매질, 제제, 희석제 또는 담체가 수용자 또는 그 안에 함유된 조성물의 치료 효과에 해로운 경우를 제외하고, 본 발명의 방법을 실시하는데 사용하기 위한 투여가능한 조성물에서의 이의 사용이 적절하다. 담체 또는 희석제의 예는 지방, 오일, 물, 식염수 용액, 지질, 리포솜, 수지, 결합제, 충전제 등 또는 이들의 조합을 포함한다. 조성물은 또한 하나 이상의 성분의 산화를 지연시키기 위해 다양한 항산화제를 포함할 수 있다. 추가로, 미생물 작용의 방지는 파라벤(예를 들어, 메틸파라벤, 프로필파라벤), 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티메로살 또는 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 항균제 및 항진균제와 같은 방부제에 의해 야기될 수 있다.

[0220] [0198] 본원 개시내용에 따르면, 조성물은 임의의 편리하고 실제적인 방식으로, 즉 용액, 현탁액, 유화, 혼합, 캡슐화, 흡수 등에 의해 담체와 조합된다. 이러한 절차는 당업자에게 일상적인 것이다.

[0221] [0199] 본원 개시내용의 특정 구현예에서, 조성물은 반고체 또는 고체 담체와 완전히 조합되거나 혼합된다. 혼합은 분쇄와 같은 임의의 편리한 방식으로 수행될 수 있다. 치료학적 활성의 손실, 즉 위에서의 변성으로부터 조성물을 보호하기 위해 안정화제가 또한 혼합 과정에서 첨가될 수 있다. 조성물에 사용하기 위한 안정화제의 예는 완충제, 글라이신 및 라이신과 같은 아미노산, 텍스트로스, 만노스, 갈락토스, 프럭토스, 락토스, 슈크로스, 말토스, 소르비톨, 만니톨 등과 같은 탄수화물을 포함한다.

[0222] [0200] 추가 구현예에서, 본원 개시내용은 NK 세포 및 임의로 수성 용매를 포함하는 조성물을 포함하는 약제학적 지질 비히클 조성물의 용도에 관한 것일 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "지질"은 특징적으로 물에 불용성이고 유기 용매로 추출할 수 있는 광범위한 물질 중 임의의 것을 포함하는 것으로 정의된다. 이러한 광범위한 부류의 화합물은 당업자에게 널리 공지되어 있고, "지질"이라는 용어가 본원에서 사용됨에 따라 임의의 특정 구조로 제한되지 않는다. 예는 장쇄 지방족 탄화수소 및 이들의 유도체를 포함하는 화합물을 포함한다. 지질은 천연적으로 존재하거나 합성(즉, 사람에 의해 디자인되거나 생성됨)일 수 있다. 그러나 지질은 일반적으로 생물학적 물질이다. 생물학적 지질은 당업계에 널리 공지되어 있고, 예를 들어 중성 지방, 인지질, 포스포글리

세리드, 스테로이드, 테르펜, 리소지질, 글리코스핑고지질, 당지질, 설파티드, 에테르 및 에스테르-연결된 지방산을 갖는 지질 및 중합가능한 지질, 및 이들의 조합을 포함한다. 물론, 당업자가 지질로 이해하는 본원에 구체적으로 기재된 것 이외의 화합물도 본 발명의 조성물 및 방법에 포함된다.

- [0223] [0201] 당업자는 조성물을 지질 비히클에 분산시키기 위해 사용될 수 있는 기술의 범위를 잘 알고 있을 것이다. 예를 들어, NK 세포 및 항체를 포함하는 조성물은 지질을 함유하는 용액에 분산되고, 지질과 용해되고, 지질과 유화되고, 지질과 혼합되고, 지질과 조합되고, 지질에 공유 결합되고, 현탁액으로서 지질에 함유되고, 마이셀 또는 리포솜과 함께 함유하거나 복합체화하거나, 그렇지 않으면 당업자에게 공지된 임의의 수단에 의해 지질 또는 지질 구조와 연합될 수 있다. 분산액은 리포솜을 형성하거나 형성하지 않을 수 있다.
- [0224] [0202] 동물 환자에게 투여되는 본원 개시내용의 조성물의 실제 투여량은 신체 및 생리학적 인자들, 예를 들어, 체중, 병태의 중증도, 치료될 질환의 유형, 이전 또는 동시 치료 개입, 환자의 특발증 및 투여 경로에 의해 결정될 수 있다. 투여량 및 투여 경로에 의존하여, 바람직한 용량 및/또는 유효량의 투여 횟수는 피험자의 반응에 따라 다양할 수 있다. 투여를 담당하는 개업의는 임의의 경우에 개별 대상체에 대한 적절한 용량(들) 및 조성물 중 활성 성분(들)의 농도를 결정할 것이다.
- [0225] [0203] 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 예를 들어, 적어도 약 0.1%의 활성 화합물을 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 활성 화합물은, 예를 들어, 유닛 중량의 약 2% 내지 약 75%, 또는 약 25% 내지 약 60% 및 이들로부터 유도가능한 임의의 범위를 차지할 수 있다. 천연적으로, 각각의 치료학적으로 유용한 조성물 중에 활성 화합물(들)의 양은 적합한 용량이 화합물의 임의의 소정의 유닛 용량으로 수득되는 방식으로 제조될 수 있다. 용해도, 생물유용성, 생물학적 반감기, 투여 경로, 제품 저장 수명 및 기타 약리학적 고려사항과 같은 인자는 이러한 약제학적 제형을 제조하는 기술분야의 당업자에 의해 고려될 것이며, 그 자체로 다양한 용량 및 치료 용법이 바람직할 수 있다.
- [0226] [0204] 다른 비제한적인 예에서, 용량은 또한 투여 당 1 마이크로그램/kg/체중, 약 5 마이크로그램/kg/체중, 약 10 마이크로그램/kg/체중, 약 50 마이크로그램/kg/체중, 약 100 마이크로그램/kg/체중, 약 200 마이크로그램/kg/체중, 약 350 마이크로그램/kg/체중, 약 500 마이크로그램/kg/체중, 약 1 밀리그램/kg/체중, 약 5 밀리그램/kg/체중, 약 10 밀리그램/kg/체중, 약 50 밀리그램/kg/체중, 약 100 밀리그램/kg/체중, 약 200 밀리그램/kg/체중, 약 350 밀리그램/kg/체중, 약 500 밀리그램/kg/체중, 내지 약 1000 mg/kg/체중 이상 및 그 안에서 유도가 가능한 임의의 범위를 포함할 수 있다. 본원에 열거된 수로부터 유도가 가능한 범위의 비제한적인 예에서, 상기에서 기재된 숫자에 기초하여, 약 5 mg/kg/체중 내지 약 100 mg/kg/체중, 약 5 마이크로그램/kg/체중 내지 약 500 mg/kg/체중 등의 범위가 투여될 수 있다.
- [0227] [0205] 본원 개시내용의 NK 세포를 포함하는 치료학적 조성물은 주입, 정맥내, 근육내, 피하, 국소적으로, 경구로, 경피로, 복막내로, 안와내로, 이식에 의해, 흡입에 의해, 척수강내로, 심실내로, 또는 비강내로 투여될 수 있다. 적당한 투여형은 치료될 질환의 유형, 질환의 중증도 및 과정, 개체의 임상적 조건, 개체의 임상적 병력 및 치료에 대한 반응 및 담당의의 판단을 기준으로 결정될 수 있다.
- [0228] [0206] 치료는 다양한 "단위 용량"을 포함할 수 있다. 유닛 용량은 치료학적 조성물의 소정량을 함유하는 것으로서 정의된다. 투여될 양 및 특정 경로 및 제형은 임상 분야의 담당자의 결정 기술내에 있다. 유닛 용량은 단일 주사로서 투여될 필요가 없지만 일정 세트의 시기 동안 연속 주입을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 유닛 용량은 단일 투여 용량을 포함한다.
- [0229] [0207] 특정 구현예에서, 적어도 주입을 포함하여 이를 필요로 하는 개체에게 전달하기 위한 용량은 10^5 내지 10^{10} 세포/kg/용량/주 및 이로부터 유래 가능한 임의의 범위이다.
- [0230] [0208] 치료 수 및 유닛 용량 둘다에 따른 투여될 양은 목적하는 치료 효과에 의존한다. 유효량은 특정 효과를 성취하기 위해 필요한 양을 언급하는 것으로 이해된다. 특정 구현예의 수행에서, 10 mg/kg 내지 200 mg/kg 범위의 용량이 이들 제제의 보호 능력에 영향을 미칠 수 있는 것으로 고려된다. 따라서, 용량이 약 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 및 200, 300, 400, 500, 1000 μ g/kg, mg/kg, μ g/일 또는 mg/일 또는 상기에서 유도될 수 있는 임의의 범위의 용량을 포함하는 것으로 고려된다. 추가로, 상기 용량은 하루 동안, 및/또는 수일, 수주 또는 수개월째 다수의 시점에 투여될 수 있다.
- [0231] [0209] 특정 구현예에서, 약제학적 조성물의 유효량은 약 1 μ M 내지 150 μ M의 혈액 수준을 제공할 수 있는 양

이다. 또 다른 구현예에서, 유효량은 약 4 μM 내지 100 μM ; 또는 약 1 μM 내지 100 μM ; 또는 약 1 μM 내지 50 μM ; 또는 약 1 μM 내지 40 μM ; 또는 약 1 μM 내지 30 μM ; 또는 약 1 μM 내지 20 μM ; 또는 약 1 μM 내지 10 μM ; 또는 약 10 μM 내지 150 μM ; 또는 약 10 μM 내지 100 μM ; 또는 약 10 μM 내지 50 μM ; 또는 약 25 μM 내지 150 μM ; 또는 약 25 μM 내지 100 μM ; 또는 약 25 μM 내지 50 μM ; 또는 약 50 μM 내지 150 μM ; 또는 약 50 μM 내지 100 μM (또는 거기에서 임의의 유래할 수 있는 범위)의 혈액 수준을 제공한다. 다른 구현예에서, 용량은 대상체에게 투여되는 치료학적 제제로부터 비롯되는 제제의 하기의 혈액 수준을 제공할 수 있다: 약, 적어도 약, 또는 최대 약 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, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100 μM 또는 거기에서 임의의 유래할 수 있는 범위. 특정 구현예에서, 대상체에게 투여되는 치료학적 제제는 체내에서 대사된 치료학적 제제로 대사되고, 이 경우에, 혈액 수준은 상기 제제의 양을 언급할 수 있다. 대안적으로, 치료학적 제제가 대상체에 의해 대사되지 않는 정도로, 본원에서 논의된 혈액 수준은 대사되지 않은 치료학적 제제를 언급할 수 있다.

[0232] A. 소화 조성물 및 제형

[0210] 본원 개시내용의 특정 구현예에서, NK 세포 및 항체를 포함하는 조성물은 소화 경로를 통해 투여되도록 제형화된다. 소화 경로는 조성물이 소화관과 직접 접촉하는 모든 가능한 투여 경로를 포함한다. 구체적으로, 본원에 기재된 약제학적 조성물은 경구, 협측, 직장 또는 설하로 투여될 수 있다. 이와 같이, 이들 조성물은 불활성 희석제 또는 동화가능한 식용 담체와 함께 제형화될 수 있거나, 경질 또는 연질 셀룰라틴 캡슐에 동봉될 수 있거나, 정제로 압축될 수 있거나, 다이어트의 음식과 함께 직접 혼입될 수 있다.

[0211] 특정 구현예에서, 활성 화합물은 부형제와 함께 혼입될 수 있고 섭취가능한 정제, 협측 정제, 트로키제, 캡슐, 엘릭시르, 현탁제, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 사용될 수 있다(문헌참조: Mathiowitz et al., 1997; Hwang et al., 1998; 미국 특허 제5,641,515호; 제5,580,579호 및 제5,792,451호, 이들 각각은 전문이 본원에 참조로 인용됨). 정제, 트로키제, 환제, 캡슐제 등은 또한 다음을 함유할 수 있다: 예를 들어 트라가칸트 검, 아카시아, 옥수수 전분, 젤라틴 또는 이들의 조합과 같은 결합제; 예를 들어 인산이칼슘, 만니톨, 락토스, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 사카린, 셀룰로스, 탄산마그네슘 또는 이들의 조합과 같은 부형제; 예를 들어, 옥수수 전분, 감자 전분, 알긴산 또는 이들의 조합과 같은 붕해제; 예를 들어 마그네슘 스테아레이트와 같은 윤활제; 예를 들어 슈크로스, 락토스, 사카린 또는 이들의 조합과 같은 감미제; 예를 들어 페퍼민트, 윈터 그린 오일, 체리 향료, 오렌지 향료와 같은 향미제 등. 투여 단위 형태가 캡슐인 경우, 상기 유형의 재료에 추가하여 액체 담체를 함유할 수 있다. 다양한 다른 물질이 코팅물로서 또는 다르게는 투여 단위의 물리적 형태를 변형시키기 위해 존재할 수 있다. 예를 들어, 정제, 환제 또는 캡슐은 셀락, 슈가 또는 둘 다로 코팅될 수 있다. 투여 형태가 캡슐인 경우, 상기 유형의 재료에 추가하여 액체 담체와 같은 담체를 함유할 수 있다. 젤라틴 캡슐, 정제 또는 환제는 장용 코팅될 수 있다. 장용 코팅은 pH가 산성인 위 또는 상부 창자에서 조성물의 변성을 방지한다. 예를 들어, 미국 특허 제5,629,001호를 참조한다. 소장에 도달하면, 본원에서 염기성 pH는 코팅을 용해시키고 조성물이 방출되고 특수화된 세포, 예를 들어 상피 장세포 및 페이어 패치 (Peyer's patch) M 세포에 의해 흡수되도록 한다. 엘릭시르 시럽은 활성 화합물 슈크로스를 감미료로서, 메틸 및 프로필파라벤을 방부제로서, 염료 및 향료, 예를 들어, 체리 또는 오렌지 향미제로서 함유할 수 있다. 물론, 임의의 투여 단위 형태를 제조하는데 사용되는 임의의 재료는 약제학적으로 순수하고 사용되는 양에서 실질적으로 무독성이어야 한다. 추가로, 활성 화합물은 지속 방출 제제 및 제형에 혼입될 수 있다.

[0212] 경구 투여를 위해 본 개시내용의 조성물은 대안적으로 구강 세정제, 치약, 협측 정제, 경구 스프레이 또는 설하 경구 투여 제형의 형태로 하나 이상의 부형제와 함께 혼입될 수 있다. 예를 들어, 봉산나트륨 용액과 같은 적절한 용매에 필요한 양의 활성 성분을 혼입하여 구강 세정제를 제조할 수 있다(문헌참조: Dobell's Solution). 대안적으로, 활성 성분은 봉산나트륨, 글리세린 및 중탄산칼륨을 함유하는 것과 같은 경구 용액에 혼입되거나, 치약에 분산되거나, 치료학적 유효량으로 물, 결합제, 연마제, 향료, 발포제 및 습윤제를 포함할 수 있는 조성물에 첨가될 수 있다. 대안적으로 조성물은 혀 아래에 놓거나 다르게는 입안에서 용해될 수 있는 정제 또는 용액 형태로 만들어질 수 있다.

[0213] 다른 소화관 투여 방식에 적합한 추가 제형은 좌제를 포함한다. 좌제는 다양한 무게와 모양의 고정 투여 형태이고, 일반적으로 직장에 삽입하기 위한 약제로 만들어진다. 삽입 후 좌제는 체강 유체에서 부드러워지거나 용융되거나 용해된다. 일반적으로 좌제의 경우 통상적인 담체는 예를 들어 폴리알킬렌 글리콜, 트리글리

세리드 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 좌제는 예를 들어 약 0.5% 내지 약 10%, 바람직하게는 약 1% 내지 약 2% 범위의 활성 성분을 함유하는 혼합물로부터 형성될 수 있다.

[0237] **B. 비경구 조성물 및 제형**

[0214] 추가 구현예에서, 조성물은 비경구 경로를 통해 투여될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "비경구"는 소화관을 우회하는 경로를 포함한다. 구체적으로, 본원에 기재된 약제학적 조성물은 미국 특허 제6,613,308호; 제5,466,468호; 제5,543,158호; 제5,641,515호; 및 제5,399,363호(이의 각각은 전문이 본원에 참조로 인용됨)에 기재된 바와 같이 예를 들어 정맥내, 피내, 근육내, 동맥내, 척수강내, 피하 또는 복강내로 투여될 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0215] 유리 염기 또는 약리학적으로 허용되는 염으로서의 활성 화합물의 용액은 하이드록시프로필셀룰로스와 같은 계면활성제와 적절하게 혼합된 물에서 제조될 수 있다. 분산액은 또한 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜 및 이들의 혼합물 및 오일에서 제조될 수 있다. 일반적인 저장 및 사용 조건하에서 이러한 제제는 미생물의 성장을 방지하는 방부제를 함유한다. 주사용에 적합한 약제학적 형태는 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 주사용 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다(미국 특허 제5,466,468호, 이의 전문이 구체적으로 본원에 인용됨). 모든 경우에 있어서, 상기 형태는 멸균되어야 하고, 용이한 주사가가능성이 존재하는 정도로 유동성이 있어야 한다. 조성물은 제조 및 저장 조건 하에서 안정하여야 하고, 미생물, 예를 들어, 세균 및 진균과 같은 미생물의 오염 작용에 대해서 보존되어야 한다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(즉, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 적합한 혼합물 및/또는 식물성 오일을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅물의 사용에 의하여, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지에 의하여, 그리고 계면활성제의 사용에 의하여 유지될 수 있다. 미생물 작용의 방지는 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들면, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산 및 티메로살 등에 의하여 달성될 수 있다. 많은 경우에, 등장화제, 예를 들어, 슈가 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주사가가능한 조성물의 흡수 지연은 해당 조성물 중에 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 사용함에 의해 야기될 수 있다.

[0216] 예를 들어, 수용액에서의 비경구 투여를 위해, 용액은 필요한 경우 적절하게 완충되어야 하고 액체 희석제는 먼저 충분한 식염수 또는 글루코스로 등장성이 되게 해야 한다. 이들 특정 수용액은 특히 정맥내, 근육내, 피하 및 복강내 투여에 적합하다. 이와 관련하여, 사용될 수 있는 멸균 수성 매질은 본원 개시내용에 비추어 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들어, 1회 용량을 등장성 NaCl 용액에 용해시키고 피하주사액을 첨가하거나 제안된 주입 부위에 주사할 수 있다(문헌참조: 예를 들어, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580). 투여량의 일부 변동은 치료받는 대상체의 상태에 따라 필연적으로 발생할 것이다. 투여를 담당하는 사람은 임의의 경우에 개별 대상체에 대한 적절한 용량을 결정할 것이다. 더욱이, 사람 투여에 대해, 제제는 생물학적 표준의 FDA 사무국에 의해 요구되는 바와 같이 멸균성, 발열성, 일반적인 안정성 및 순도 표준을 충족해야만한다.

[0217] 멸균된 주사가가능한 용액은 필요에 따라 상기 열거된 다양한 다른 성분과 함께 적당한 용매 중에 요구되는 양으로 활성 화합물을 혼입한 후 여과 멸균하여 제조된다. 일반적으로, 분산액은 다양한 멸균된 활성 성분을 기본 분산 매질, 및 상기 열거된 것들로부터 요구되는 다른 성분들을 함유하는 멸균 비히클로 혼입시킴에 의해 제조된다. 멸균 주사가가능한 용액의 제조를 위한 멸균 산제의 경우에, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 및 동결 건조 기술이고, 이는 활성 성분 또는 이의 이전의 멸균-여과된 용액으로부터 임의의 추가의 목적하는 성분의 산제를 생성시킨다. 분말화된 조성물은 안정화제와 함께 또는 안정화제 없이, 예를 들어 물 또는 식염수 용액과 같은 액체 담체와 배합된다.

[0242] **C. 기타 약제학적 조성물 및 제형**

[0218] 본원 개시내용의 다른 특정 구현예에서, NK 세포 및 항체를 포함하는 활성 화합물 조성물은 다양한 기타 경로, 예를 들어 국소(즉, 경피) 투여, 점막 투여(비강내, 질 등) 및/또는 또는 흡입을 통한 투여용으로 제형화될 수 있다.

[0219] 국소 투여용 약제학적 조성물은 연고, 페이스트, 크림 또는 분말과 같은 의약 적용을 위해 제형화된 활성 화합물을 포함할 수 있다. 연고는 국소 적용을 위한 모든 유지성, 흡착성, 에멀전 및 수용성 기반 조성물을 포함하는 반면, 크림 및 로션은 에멀전 기체만을 포함하는 조성물이다. 국소적으로 투여되는 약물은 피부를 통한 활성 성분의 흡착을 촉진하기 위한 침투 증진제를 포함할 수 있다. 적합한 침투 증진제는 글리세린,

알코올, 알킬 메틸 설펍사이드, 피롤리돈 및 루아로카프람을 포함한다. 국소 적용을 위한 조성물의 가능한 기제는 폴리에틸렌 글리콜, 라놀린, 콜드 크림 및 바셀린 뿐만 아니라 임의의 다른 적합한 흡수성, 에멀전 또는 수용성 연고 기제를 포함한다. 국소 제제는 활성 성분을 보존하고 균질한 혼합물을 제공하기 위해 필요에 따라 유화제, 겔화제 및 항미생물 방부제를 포함할 수 있다. 본 발명의 경피 투여는 또한 "패치"의 사용을 포함할 수 있다. 예를 들어, 패치는 하나 이상의 활성 물질을 미리 결정된 속도로 고정된 기간 동안 연속적인 방식으로 공급할 수 있다.

[0245] [0220] 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 점안액, 비강내 스프레이, 흡입 및/또는 다른 에어로졸 전달 비히클에 의해 전달될 수 있다. 비강 에어로졸 스프레이를 통해 조성물을 폐에 직접 전달하는 방법은 예를 들어 미국특허 제5,756,353호 및 제5,804,212호(이의 각각은 전문이 본원에 구체적으로 인용됨)에 기재되어 있다. 마찬가지로, 비강내 마이크로입자 수지(문헌참조: Takenaga et al., 1998) 및 리소포스파티딜-글리세롤 화합물(미국특허 제5,725,871호, 이의 전문이 본원에 구체적으로 참조로 인용됨)을 사용하는 약물의 전달도 약제학적 분야에서 널리 공지되어 있다. 마찬가지로, 폴리테트라플루오로에틸렌 지지체 매트릭스 형태의 경점막 약물 전달은 미국 특허 제5,780,045호(이의 전문이 본원에 구체적으로 참조로 인용됨)에 기재되어 있다.

[0246] [0221] 에어로졸이라는 용어는 액화 또는 가압 가스 추진제에 분산된 액체 입자의 미분된 고체의 콜로이드 시스템을 지칭한다. 흡입을 위한 본 발명의 전형적인 에어로졸은 액체 추진제 또는 액체 추진제와 적합한 용매의 혼합물 중 활성 성분의 현탁액으로 이루어질 것이다. 적합한 추진제는 탄화수소 및 탄화수소 에테르를 포함한다. 적합한 컨테이너는 추진제의 압력 요구 사항에 따라 다양하다. 에어로졸의 투여는 대상체의 연령, 체중 및 증상의 중증도 및 반응에 따라 다양하다.

[0247] VIII. 조합 치료요법

[0248] [0222] 특정 구현예에서, 본원 구현예의 조성물 및 방법은 적어도 하나의 추가의 치료요법과 조합된 면역 세포 집단(NK 세포 집단을 포함하는)을 포함한다. 추가의 치료요법은 방사선 치료요법, 수술 (예를 들어, 종괴절제술 및 유방절제술), 화학치료요법, 유전자 치료요법, DNA 치료요법, 바이러스 치료요법, RNA 치료요법, 면역치료요법, 골수 이식, 나노치료요법, 모노클로날 항체 치료요법, 호르몬 치료요법, 암용해 바이러스 또는 이전의 치료 조합일 수 있다. 추가의 치료요법은 보조제 또는 신규보조제 치료요법 형태일 수 있다.

[0249] [0223] 일부 구현예에서, 추가의 치료요법은 소분자 효소 억제제 또는 항-전이성 제제의 투여이다. 일부 구현예에서, 추가의 치료요법은 부작용 제한 제제 (예를 들어, 항오심 제제 등과 같은 치료의 부작용의 발병 및/또는 중증도를 감소시키는 것으로 의도된 제제)의 투여이다. 일부 구현예에서, 추가의 치료요법은 방사선 치료요법이다. 일부 구현예에서, 추가의 치료요법은 수술이다. 일부 구현예에서, 추가의 치료요법은 방사선 치료요법과 수술의 조합이다. 일부 구현예에서, 상기 추가의 치료요법은 감마 방사선 조사이다. 일부 구현예에서, 추가의 치료요법은 PBK/AKT/mTOR 경로, HSP90 억제제, 튜블린 억제제, 아포토시스 억제제, 및/또는 화학예방제를 표적화하는 치료요법이다. 추가의 치료요법은 당업계에 공지된 하나 이상의 화학치료학적 제제일 수 있다.

[0250] [0224] 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 본 발명의 세포 치료요법 이외에, 개체는 수술, 방사선, 면역 치료요법(본원 개시내용의 세포 치료요법 외), 호르몬 치료요법, 유전자 치료요법, 화학 치료요법 등을 포함하는 암에 대한 특정 추가 요법을 제공받았었거나, 제공받을 수 있거나, 제공받게 될 수 있다.

[0251] [0225] 면역 세포 치료요법은 추가의 암 치료요법과 관련하여, 치료요법 전, 치료요법 동안에, 치료요법 후 또는 다양한 조합으로 투여될 수 있다. 투여는 동시 내지 수분 내지 수일 내지 수주 범위의 간격일 수 있다. 면역 세포 치료요법이 추가의 치료학적 제제와는 별도로 환자에게 제공되는 구현예에서, 당업자는 일반적으로 각각의 전달 시간 사이에 충분한 시기가 만료되지 않도록 보장하여 2개의 화합물은 여전히 환자에 대한 유리한 조합 효과를 발휘할 수 있다. 상기 경우에, 당업자는 환자에게 항체 치료요법 및 항암 치료요법이 서로 약 12 내지 24 또는 72 h 내에, 보다 특히 서로 약 6-12 h 내에 항체 치료요법 및 항암 치료요법이 제공될 수 있는 것으로 고려된다. 일부 상황에서, 각각의 투여 사이에 수일 (2, 3, 4, 5, 6 또는 7일) 내지 수주 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8주)가 경과하는 경우, 치료를 위한 시기를 유의적으로 연장하는 것이 바람직할 수 있다.

[0252] [0226] 다양한 조합이 사용될 수 있다. 하기 예시에 대해, 면역 세포 치료요법은 "A" 이고 항암 치료요법은 "B" 이다:

[0253] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

[0254] B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

[0255] B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0256] [0227] 본 구현예의 임의의 화합물 또는 세포 치료요법의 환자로의 투여는 경우에 따라 제제의 독성을 고려하여 상기 화합물의 투여를 위한 일반 프로토콜에 따른다. 따라서, 일부 구현예에서, 조합 치료요법에 기인할 수 있는 독성을 모니터링하는 단계가 있다.

[0257] **A. 화학치료요법**

[0258] [0228] 광범위한 화학치료학적 제제는 본 발명의 구현예에 따라 사용될 수 있다. 용어 “화학치료요법”은 암을 치료하기 위한 약물의 사용을 언급한다. “화학치료학적 제제”는 암의 치료에 투여되는 화합물 또는 조성물을 함유하기 위해 사용된다. 이들 제제 또는 약물은 이들이 세포 주기에 영향을 미칠지 및 어느 단계에서 영향을 미칠지와 같은 세포 내 이들의 활성 방식에 의해 분류된다. 대안적으로, 제제는 DNA를 직접 가교결합시키거나 DNA에 삽입되거나 핵산 합성에 영향을 미침에 의해 염색체 및 유사분열 일탈을 유도하는 이의 능력을 기준으로 특징 분석될 수 있다.

[0259] [0229] 화학치료학적 제제의 예는 알킬화제, 예를 들어, 티오테파 및 사이클로스포스파미드; 알킬 설포네이트, 예를 들어, 부설판, 임프로셀판, 및 피포셀판; 아지리딘, 예를 들어, 벤조도파, 카보쿠온, 메투레도파, 및 우레도파; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리메틸올로멜라민을 포함하는 에틸렌이민 및 메틸라멜라민; 아세토게닌(특히 불라타신 및 불라타시논); 캄토테신(합성 유사체 토포테칸을 포함하는); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (이의 아도젤레신, 카젤레신 및 비젤레신 합성 유사체를 포함하는); 크립토피신(특히, 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 돌라스타틴; 두오카마이신 (합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1을 포함하는); 엘레우트레오빈; 판크라티스타틴; 사코딕티인; 스폰기스타틴; 질소 머스타드, 예를 들어, 클로람부실, 클로르나파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벡비킨, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 및 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예를 들어, 카무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 및 라님누스틴; 항생제, 예를 들어, 에네딘 항생제 (예를 들어, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감물 및 칼리케아미신 오메가I1); 디네미신 A를 포함하는 디네미신; 비스포스포네이트, 예를 들어, 클로드로네이트; 에스퍼라미신; 및 네오키노스타틴 발색단 및 관련 크로모단백질 에네딘 항생제 발색단, 아클라시노마이신, 액티노마이신, 아우트라르니신, 아자세린, 블레오마이신, 각티노마이신, 카라비신, 카미노마이신, 카지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신(모르폴리노-독소루비신, 시아노모프폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 테옥시독소루비신을 포함하는), 에피루비신, 예소루비신, 이다루비신, 마셀로마이신, 미토마이신, 예를 들어, 미토마이신 C, 마이코페놀산, 노갈라르니신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 튜버시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 및 조루비신; 항대사물, 예를 들어, 메토틱렉세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 엽산 유사체, 예를 들어, 데노프테린, 프테로프테린, 및 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예를 들어, 플루다라빈, 6-머캅토피린, 티아미프린, 및 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들어, 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 예노시타빈, 및 플록스우리딘; 안드로겐, 예를 들어, 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 및 테스톨락톤; 항-부신제(anti-adrenal), 예를 들어, 미토탄 및 트릴로스타틴; 엽산 보충제, 예를 들어, 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트렉세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르미틴; 엘리프티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 하이드록시우레아; 렌티난; 이오니다이닌; 메이탄시노이드, 예를 들어, 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단물; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 포도산트론; 포도필린산; 2-에틸하이드라지드; 프로카바진; PSK폴리사카라이드 복합체; 라죽산; 리죽신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리메틸아민; 트리코테센(특히, T-2 독신, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신; 다카바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토라톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 (“Ara-C”); 사이클로포스파미드; 탁소이드, 예를 들어, 파클리탁셀 및 도세탁셀 겐시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토피린; 플라티늄 배위 착물, 예를 들어, 시스플라틴, 옥살리플라틴, 및 카보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 노반트론; 테니포시드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; 이리노테칸 (예를 들어, CPT-11); 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드, 예를 들어, 레티노산; 카페시타빈; 카보플라틴, 프로카바진, 플리코마이신, 겐시타비엔, 나벨빈, 파네실-단백질 트랜스퍼라제 억제제, 트랜스플라티늄, 및 약제학적으로 허용되는 염, 산, 또는 상기 임의의 유도체를 포함한다.

[0260] B. 방사선 치료요법

[0261] [0230] DNA 손상을 유발하고 광범위하게 사용되어온 다른 인자들은 통상적으로 γ -선, X-선, 및/또는 방사성 동위원소의 종양 세포의 직접적인 전달로서 공지된 것을 포함한다. DNA 손상 인자의 다른 형태가 또한 고려되고, 예를 들어, 마이크로파, 양성자 빔 조사 (미국 특허 제5,760,395호 및 제4,870,287호), 및 UV-조사가 있다. 모든 이들 인자들은 DNA에 대해, DNA의 전구체에 대해, DNA의 복제 및 복구에 대해 및 염색체의 어셈블리 및 유지에 대해 광범위한 손상에 영향을 미칠 가능성이 높다. X-선에 대한 용량 범위는 장기간 (3 내지 4주) 동안 하루 50 내지 200 켈로그렐로부터 2000 내지 6000 켈로그렐의 단일 용량의 범위이다. 방사성 동위원소에 대한 용량 범위는 매우 다양하고 동위원소의 반감기, 방출된 방사선 강도 및 유형, 및 신생물 세포에 의한 흡수에 의존한다.

[0262] C. 면역치료요법

[0263] [0231] 당업자는 추가의 면역치료요법이 구현예의 방법과 조합하거나 연계하여 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 암 치료와 관련하여, 면역치료제는 일반적으로 암 세포를 표적화하고 파괴하기 위한 면역 이펙터 세포 및 분자에 의존한다. 리툭시맙 (RITUXAN®)은 그러한 예이다. 면역 이펙터는 예를 들어, 종양 세포의 표면 상에 일부 마커에 특이적인 항체일 수 있다. 단독의 항체는 치료요법의 이펙터로서 작용할 수 있거나 이것은 실제로 세포 사멸에 영향을 미치는 다른 세포를 동원할 수 있다. 항체는 또한 약물 또는 독소 (화학치료제, 방사성 핵종, 리신 A 쉐, 콜레라 독소, 백일해 독소) 등에 접합될 수 있고 표적화제로서 작용할 수 있다. 대안적으로, 이펙터는 직접적으로 또는 간접적으로 종양 세포 표적과 상호작용하는 표면 분자를 함유하는 림프구일 수 있다. 다양한 이펙터 세포는 세포독성 T 세포 및 NK 세포를 포함한다.

[0264] [0232] 항체-약물 접합체는 암 치료제의 개발을 위한 획기적 접근법인 것으로 나타났다. 암은 전세계 사망의 주요 원인 중 하나이다. 항체-약물 접합체 (ADC)는 세포-사멸 약물에 공유적으로 연결된 모노클로날 항체 (Mab)를 포함한다. 상기 접근법은 이들의 항원 표적에 대한 고특이성의 Mab와 상당히 강력한 세포독성 약물을 조합하여 농축된 수준의 항원과 함께 페이로드 (약물)를 종양 세포에 전달하는 “무장된(armed)” Mab를 유도한다. 약물의 표적화된 전달은 또한 정상 조직에서 이의 노출을 최소화하여 감소된 독성 및 개선된 치료학적 지수를 유도한다. 2개의 ADC 약물로서 2011년에 FDA에 의해 승인된 ADCETRIS® (브렌투시맙 베도틴) 및 2013년에 FDA에 의해 승인된 KADCYLA® (트라스투주맙 엠탄신 또는 T-DM1)은 상기 접근법을 검증하였다. 현재, 암 치료를 위한 임상 시험의 다양한 단계에서 30개 초과 ADC 약물 후보물이 있다(문헌참조: Leal *et al.*, 2014). 항체 조작 및 링커-페이로드 최적화가 보다 더 발전함에 따라서, 새로운 ADC의 발견 및 발전은 날로 상기 접근법 및 표적화 Mab의 생성에 적합한 새로운 표적의 동정 및 검증에 의존한다. ADC 표적을 위한 2개의 기준은 종양 세포에서 상향조절된/고수준의 발현 및 강력한 내재화이다.

[0265] [0233] 면역치료요법의 하나의 양상에서, 종양 세포는 표적화에 순응할 수 있는, 즉 대다수의 다른 세포 상에 존재하지 않는 일부 마커를 함유해야만 한다. 많은 종양 마커가 존재하고 임의의 이들 마커는 본 발명의 구현예와 관련하여 표적화를 위해 적합할 수 있다. 통상의 종양 마커는 CD20, 암배아 항원, 티로시나제 (p97), gp68, TAG-72, HMGF, 시알릴 루이스 항원(Sialyl Lewis Antigen), MucA, MucB, PLAP, 라미닌 수용체, erb B, 및 p155를 포함한다. 면역치료요법의 대안적 양상은 항암 효과를 면역 자극 효과와 조합하는 것이다. 면역 자극 분자는 또한 다음을 포함한다: 사이토킨, 예를 들어, IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, 감마-IFN, 케모킨, 예를 들어, MIP-1, MCP-1, IL-8, 및 성장 인자, 예를 들어, FLT3 리간드.

[0266] [0234] 현재 연구중에 있거나 사용중에 있는 면역치료요법의 예는 면역 보조제, 예를 들어, 마이코박테리움 보비스(Mycobacterium bovis), 플라스모듐 팔시파룸(Plasmodium falciparum), 디니트로클로로벤젠, 및 방향족 화합물(문헌참조: 미국 특허 제5,801,005호 및 제5,739,169호; Hui and Hashimoto, 1998; Christodoulides *et al.*, 1998); 사이토킨 치료요법, 예를 들어, 인터페론, 및 , IL-1, GM-CSF, 및 TNF (문헌참조: Bukowski *et al.*, 1998; Davidson *et al.*, 1998; Hellstrand *et al.*, 1998); 유전자 치료요법, 예를 들어, TNF, IL-1, IL-2, 및 p53 (문헌참조: Qin *et al.*, 1998; Austin-Ward and Villaseca, 1998; 미국 특허 제5,830,880호 및 제5,846,945호); 및 모노클로날 항체, 예를 들어, 항-CD20, 항-강글리오시드 GM2, 및 항-p185 (문헌참조: Hollander, 2012; Hanibuchi *et al.*, 1998; 미국 특허 제5,824,311호)이다. 하나 이상의 항암 치료요법은 본원에 기재된 항체 치료요법과 함께 사용될 수 있는 것으로 고려된다.

[0267] [0235] 일부 구현예에서, 면역치료요법은 면역 관문 억제제일 수 있다. 면역 관문은 신호 (동시-자극 분자)를 상향시킴시거나 신호를 하향시킨다. 면역 관문 차단에 의해 표적화될 수 있는 억제 면역 관문은 아테노신 A2A 수용체 (A2AR), B7-H3 (또한 CD276로서 공지된), B 및 T 림프구 약화인자 (BTLA), 세포독성 T-림프구-연합 단

백질 4 (CTLA-4, 또한 CD152로서 공지된), 인돌아민 2,3-디옥시게나제(IDO), 킬러-세포 면역글로불린 (KIR), 림프구 활성화 유전자-3 (LAG3), 프로그래밍된 사멸 1 (PD-1), T-세포 면역글로불린 도메인 및 뮤신 도메인 3 (TIM-3) 및 T 세포 활성화의 V-도메인 Ig 서프레서(VISTA)를 포함한다. 특히, 면역 관문 억제제는 PD-1 축 및/또는 CTLA-4를 표적화한다.

- [0268] [0236] 면역 체크포인트 억제제는 소분자, 제조합 형태의 리간드 또는 수용체와 같은 약물일 수 있거나 특히 항체, 예를 들어, 사람 항체이다(문헌참조: 예를 들어, 국제 특허 공개 공보 W02015016718; Pardoll, *Nat Rev Cancer*, 12(4): 252-64, 2012; 둘다는 본원에 참조로 인용된다). 면역 관문 단백질 또는 이의 유사체의 공지된 억제제가 사용될 수 있고 특히 키메라화된, 사람화된 또는 사람 형태의 항체가 사용될 수 있다. 당업자가 인지하는 바와 같이, 대안적 및/또는 균등한 명칭이 본원 개시내용에 언급된 특정 항체에 대해 사용될 수 있다. 상기 대안적 및/또는 균등한 명칭은 본원 개시내용과 관련하여 상호교환될 수 있다. 예를 들어, 램브롤리주맙은 대안적 및 균등한 명칭인 MK-3475 및 펄브롤리주맙으로 공지되어 있다.
- [0269] [0237] 일부 구현예에서, PD-1 결합 길항제는 PD-1의 이의 리간드 결합 파트너로의 결합을 억제하는 분자이다. 특정 양상에서, PD-1 리간드 결합 파트너는 PDL1 및/또는 PDL2이다. 또 다른 구현예에서, PDL1 결합 길항제는 PDL1의 이의 결합 파트너로의 결합을 억제하는 분자이다. 특정 양상에서, PDL1 결합 파트너는 PD-1 및/또는 B7-1이다. 또 다른 구현예에서, PDL2 결합 길항제는 PDL2의 이의 결합 파트너로의 결합을 억제하는 분자이다. 특정 양상에서, PDL2 결합 파트너는 PD-1이다. 길항제는 항체, 이의 항원 결합 단편, 면역어드레신, 융합 단백질 또는 올리고뉴클레오타이드일 수 있다. 예시적인 항체는 모두 본원에 참조로 인용된 미국 특허 US8735553, US8354509, 및 US8008449에 기재되어 있다. 본원에 제공된 방법에 사용하기 위한 다른 PD-1 축 길항제는 모두 본원에 참조로 인용된 미국 특허 출원 US20140294898, US2014022021, 및 US20110008369에 기재된 바와 같이 당업계에 공지되어 있다.
- [0270] [0238] 일부 구현예에서, PD-1 결합 길항제는 항-PD-1 항체 (예를 들어, 사람 항체, 사람화된 항체 또는 키메라 항체)이다. 일부 구현예에서, 항-PD-1 항체는 니블루맙, 펄브롤리주맙, 및 CT-011로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, PD-1 결합 길항제는 면역어드레신 (예를 들어, 불변 영역 (예를 들어, 면역글로불린 서열의 Fc 영역)에 융합된 PDL1 또는 PDL2의 세포외 또는 PD-1 결합 부분을 포함하는 면역어드레신)이다. 일부 구현예에서, PD-1 결합 길항제는 AMP-224이다. MDX-1106-04, MDX-1106, ONO-4538, BMS-936558, 및 OPDIVO[®]로서 공지된 니블루맙은 W02006/121168에 기재된 항-PD-1 항체이다. MK-3475, Merck 3475, 램브롤리주맙, KEYTRUDA[®], 및 SCH-900475로서 또한 공지된 펄브롤리주맙은 W02009/114335에 기재된 항-PD-1 항체이다. hBAT 또는 hBAT-1로서 또한 공지된 Ct-011은 W02009/101611에 기재된 항-PD-1 항체이다. B7-DCIg로서 또한 공지된 AMP-224는 W02010/027827 및 W02011/066342에 기재된 PDL2-Fc 융합 가용성 수용체이다.
- [0271] [0239] 본원에 제공된 방법에서 표적화될 수 있는 또 다른 면역 체크포인트는 CD152로서 공지된 세포독성 T-림프구-연합된 단백질 4 (CTLA-4)이다. 사람 CTLA-4의 완전한 cDNA 서열은 Genbank 승인 번호 L15006을 갖는다. CTLA-4는 T 세포의 표면 상에서 발견되고 항원-제공 세포의 표면 상에 CD80 또는 CD86에 결합하는 경우 “오프” 스위치로서 작용한다. CTLA4는 헬퍼 T 세포의 표면상에서 발견되고 억제 신호를 T 세포에 전송하는 면역글로불린 슈퍼패밀리의 구성원이다. CTLA4는 T-세포 동시 자극 단백질 CD28과 유사하고 분자 둘다는 각각 항원-제공 세포 상에서 B7-1 및 B7-2으로 불리우는 CD80 및 CD86에 결합한다. CTLA4는 억제 신호를 T 세포에 전송하는 반면 CD28은 자극 신호를 전송한다. 세포내 CTLA4는 또한 조절 T 세포에서 발견되고 이들의 기능을 위해 중요할 수 있다. T 세포 수용체 및 CD28을 통한 T 세포 활성화는 B7 분자에 대한 억제 수용체인, CTLA-4의 증가된 발현을 유도한다.
- [0272] [0240] 일부 구현예에서, 면역 체크포인트 억제제는 항-CTLA-4 항체(예를 들어, 사람 항체, 사람화된 항체, 또는 키메라 항체), 이의 항원 결합 단편, 면역어드레신, 융합 단백질 또는 올리고펩타이드이다.
- [0273] [0241] 본 발명의 방법에 사용하기 위해 적합한 항-사람-CTLA-4 항체(또는 이로부터 유래된 VH 및/또는 VL 도메인)은 당업계에 널리 공지된 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 대안적으로, 당업계에서 인지된 항-CTLA-4 항체가 사용될 수 있다. 예를 들어, 항-CTLA-4 항체는 하기에 기재되어 있다: US 8,119,129, WO 01/14424, WO 98/42752; WO 00/37504 (또한 트레멜리무맙으로서 공지된 CP675,206; 이전에 티실리무맙), 미국 특허 제 6,207,156호; Hurwitz *et al.* (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95(17): 10067-10071; Camacho *et al.* (2004) *J Clin Oncology* 22(145): Abstract No. 2505 (항체 CP-675206); 및 Mokyr *et al.* (1998) *Cancer Res* 58:5301-5304)에 기재된 항-CTLA-4 항체가 본원에 기재된 방법에 사용될 수 있다. 상기 언급된 공개 공보 각각의 교시는 참조로 인용된다. CTLA-4와 결합하는 것에 대해 임의의 당업계에 인지된 항체와 경쟁하는 항체가 또한 사용될

수 있다. 예를 들어, 사람화된 CTLA-4 항체는 국제 특허 출원 W02001014424, W02000037504, 및 미국 특허 제 8,017,114호에 기재되어 있고; 이 모두는 본원에 참조로 인용된다.

[0274] [0242] 예시적인 항-CTLA-4 항체는 이필리무맙(또한 10D1, MDX- 010, MDX- 101, 및 Yervoy®로서 공지된) 또는 이의 항원 결합 단편 및 변이체이다(문헌참조: 예를 들어, WO 01/14424). 다른 구현예에서, 상기 항체는 이필리무맙의 중쇄 및 경쇄 CDR 또는 VR을 포함한다. 따라서, 하나의 구현예에서, 항체는 이필리무맙의 VH 영역의 CDR1, CDR2, 및 CDR3 도메인 및 이필리무맙의 VL 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 항체는 상기 언급된 항체와 CTLA-4상의 동일한 항체에 결합하는 것에 경쟁하고/하거나 결합한다. 또 다른 구현예에서, 항체는 상기 언급된 항체와 적어도 약 90%의 가변 영역 아미노산 서열 동일성(예를 들어, 이필리무맙과 적어도 약 90%, 95%, 또는 99% 가변 영역 동일성)을 갖는다.

[0275] [0243] CTLA-4를 조절하기 위한 다른 분자는 모두 본원에 참조로 인용된 미국 특허 US5844905, US5885796 및 국제 특허 출원 W01995001994 및 W01998042752에 기재된 바와 같은 CTLA-4 리간드 및 수용체, 및 본원에 참조로 인용된 미국 특허 US8329867에 기재된 바와 같은 면역억제제를 포함한다.

[0276] D. 수술

[0277] [0244] 암을 갖는 사람의 대략 60%는 동일한 유형의 수술을 진행하고 이는 예방적, 진단학적 또는 단계 결정, 치유적 및 일시적인 수술을 포함한다. 치유적 수술은 암성 조직의 전부 또는 일부가 물리적으로 제거되고, 절제되고/되거나 파괴된 절제술을 포함하고 본 발명의 구현예의 치료, 화학치료요법, 방사성 치료요법, 호르몬 치료요법, 유전자 치료요법 및/또는 대안적 치료요법과 같은 다른 치료요법과 연계하여 사용될 수 있다. 종양 절제술은 종양의 적어도 일부의 물리적 제거를 언급한다. 종양 절제술에 추가로, 수술에 의한 치료는 레이저 수술, 냉동수술, 전기수술, 및 현미경적으로 제어된 수술(모흐 수술(Mohs' surgery))을 포함한다.

[0278] [0245] 암성 세포, 조직 또는 종양의 일부 또는 전부의 절제 시, 공동이 신체에 형성될 수 있다. 치료는 관류, 직접적인 주사 또는 추가의 항암 치료요법을 사용한 영역의 국소 적용에 의해 성취될 수 있다. 상기 치료는 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7일 마다, 또는 1, 2, 3, 4, 및 5주 마다, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12개월 마다 반복될 수 있다. 이들 치료는 또한 다양한 용량일 수 있다.

[0279] E. 다른 제제

[0280] [0246] 다른 제제는 치료의 치료학적 효능을 개선시키기 위해 본 구현예의 특정 양상과 조합하여 사용될 수 있는 것으로 고려된다. 이들 추가의 제제는 세포 표면 수용체 및 GAP 접속부의 상향 조절에 영향을 미치는 제제, 세포증식 억제 및 분화제, 세포 접착의 억제제, 과증식성 세포의 아포토시스 유도제에 대한 민감성을 증가시키는 제제 또는 다른 생물학적 제제를 포함한다. GAP 접속부의 수를 상승시킴에 의한 세포내 신호전달의 증가는 이웃하는 과증식성 세포 집단에 대한 항-과증식성 효과를 증가시킨다. 다른 구현예에서, 세포증식억제 또는 분화제는 치료의 항-과증식성 효능을 개선시키기 위해 본 구현예의 특정 양상과 조합하여 사용될 수 있다. 세포 접착의 억제제는 본 구현예의 효능을 개선시키는 것으로 고려된다. 세포 접착 억제제의 예는 병소 접착 키나제(FAK) 억제제 및 로바스타틴이다. 과증식성 세포의 아포토시스에 대한 민감성을 증가시키는 다른 제제, 예를 들어, 항체 c225는 치료 효능을 개선하기 위해 본 구현예의 특정 양상과 조합하여 사용될 수 있는 것으로 추가로 고려된다.

[0281] IX. 본원 개시내용의 키트

[0282] [0247] 본원에 기재된 임의의 조성물은 키트에 포함될 수 있다. 비제한적인 예에서, 세포, 세포를 생성하기 위한 시약, 벡터, 및 벡터 및/또는 이의 성분을 생성하기 위한 시약이 키트에 포함될 수 있다. 특정 구현예에서, NK 세포는 키트에 포함될 수 있고, 이들은 (a) CD28 힌지, (b1) CD28 막관통 도메인 또는 (b2) DAP10 막관통 도메인 및 (c) DAP10 공동 자극 도메인, 임의의 사이토킨 또는 임의의 자살 유전자를 포함하는 CAR을 발현할 수도 있거나 여전히 발현하지 않을 수 있다. 이러한 키트는 세포 조작을 위한 하나 이상의 시약을 가질 수도 있고 없을 수도 있다. 상기 시약은 예를 들어 소분자, 단백질, 핵산, 항체, 완충액, 프라이머, 뉴클레오타이드, 염 및/또는 이들의 조합을 포함한다. 하나 이상의 CAR, 자살 유전자 생성물 및/또는 사이토킨을 암호화하는 뉴클레오타이드는 키트에 포함될 수 있다. 사이토킨 또는 모노클로날 항체를 포함한 항체과 같은 단백질이 키트에 포함될 수 있다. 가공된 CAR 수용체의 성분들 또는 모두를 암호화하는 뉴클레오타이드는 키트에 포함될 수 있고 이는 상기 뉴클레오타이드를 생성하기 위한 시약을 포함한다.

[0283] [0248] 특정 양상에서, 키트는 본원 개시내용의 NK 세포 치료요법 및 또한 또 다른 암 치료요법을 포함한다. 일부 경우에, 키트는 세포 치료요법 구현예에 추가하여 예를 들어 화학치료요법, 호르몬 치료요법 및/또는 면역

치료요법과 같은 제2 암 치료요법을 또한 포함한다. 키트(들)는 개체에 대한 특정 암에 맞춰질 수 있고 개체에 대한 각각의 2차 암 치료요법을 포함할 수 있다.

[0284] [0249] 키트는 본원 개시 내용의 적절하게 분취된 조성물을 포함할 수 있다. 키트의 성분들은 수성 매질에 또는 동결건조된 형태로 패키징될 수 있다. 키트 용기의 수단으로는 일반적으로 바이알, 시험관, 플라스크, 병, 주사기, 또는 성분이 배치될 수 있는 다른 용기 수단, 바람직하게는 적절히 분취될 수 있는 다른 용기 수단 중 하나 이상을 포함한다. 키트 내에 1개 초과 성분 존재하는 경우, 키트는 일반적으로 추가 성분은 별도로 배치될 수 있는 제2, 제3 또는 다른 추가의 컨테이너들을 포함할 수 있다. 그러나, 성분들을 다양하게 조합하여 하나의 바이알에 포함시킬 수도 있다. 본 발명의 키트는 또한 전형적으로 상업적 판매를 위해 긴밀하게 밀폐된 상태로 조성물 및 임의의 다른 시약 컨테이너를 포함하기 위한 수단을 포함할 것이다. 이러한 컨테이너들은 목적하는 바이알들이 보유되는 사출 성형 또는 취입 성형 플라스틱 컨테이너를 포함할 수 있다.

[0285] X. 실시예

[0286] [0250] 하기의 실시예는 본 발명의 특정 구현예를 입증하기 위해 포함된다. 후속 실시예에 기재된 기술은 본 발명의 수행에서 잘 기능하는 것으로 본원 발명자에 의해 발견된 기술을 나타내고 이의 수행을 위해 특정 방식을 구성하는 것이 고려될 수 있는 것으로 당업자는 인지해야 한다. 그러나, 당업자는 본원의 개시내용의 측면에서, 기재된 특정 구현예에서 많은 변화가 만들어 질 수 있고 본 발명의 취지 및 범위로부터 벗어나는 것 없이 유사한 결과를 여전히 획득할 수 있음을 인지해야 한다.

[0287] 실시예 1

[0288] 개선된 신호전달을 갖는 CAR 작제물 성분

[0289] [0251] 도 1a-1b는 DAP10 신호 전달 도메인이 CD5 CAR-NK 세포에 활성화된 표현형을 부여한다는 것을 입증하고, 표현형 분류는 질량 세포 측정 패널을 사용하여 나타냈다. 각 데이터 포인트에 2차원 또는 3차원 맵의 위치를 부여하여 고차원 데이터를 시각화하는 통계적 방법인 t-분포 확률적 이웃 임베딩(TSNE)을 사용하여, 형질도입되지 않은 NT 세포(좌측) 및 IgG 힌지, CD28 막관통 도메인, DAP10 및 CD3제타를 포함하는 CD5 CAR((CD5CAR-NK CD28TMDAP10CD3z)를 발현하는 NK 세포(도 1a)와 비교하여 상이한 클러스터를 생성한다. CARCD5 NK 세포에서 발현되는 2개의 새로운 클러스터인 클러스터 8과 11은 원과 직사각형으로 강조 표시되어 있다. 도 1b에서 히트맵은 각 클러스터(Y축상에 표시된)에서 다양한 마커(X축상에 표시된)의 정규화된 발현을 지적한다. 클러스터 #8과 #11에서 발현이 높은 활성화, 세포 독성 및 성숙화 마커는 청색 직사각형으로 강조 표시되어 있다. 이는 DAP10 이 형질도입된 NK 세포가 형질도입되지 않은 NK 세포에는 존재하지 않는 2개의 집단 또는 클러스터를 갖고 있음을 보여준다. 이들 클러스터는 그랜자임 B, 퍼포린 등과 같은 활성화 마커를 더 많이 발현하는 NK 세포를 포함한다.

[0290] [0252] 도 2a-2c는 DAP10 공동 자극 도메인을 가진 CD5 CAR-NK 세포가 다수의 이펙터 사이토킨과 케모킨을 생산할 수 있음을 보여주고 증진된 다기능성을 보여준다. 도 2a는 다양한 CD5 CAR-NK 세포와 형질도입되지 않은(NT) NK 세포를 비교하여, DAP10 공동 자극 도메인을 가진 CD5 CAR-NK 세포의 다기능성을 보여주는 이소플렉시스 단일 세포 분비체 데이터를 입증한다. CD5 CAR#5(IgG 힌지, CD28 막관통 도메인, DAP10 및 CD3z를 포함)는 한 번에 2, 3, 4 또는 5+ 단백질을 분비하는 단일 세포의 비율이 가장 높은 최고의 다기능성을 보여준다. 도 2b는 형질도입되지 않은(NT) NK 세포와 비교하여 상이한 CD5 CAR-NK 세포 간의 다기능성 강도 지수를 보여주는 막대 그래프를 제공한다. 여기서 CD5 CAR#5는 또한 이펙터와 화학 유인성 사이토킨의 비율이 가장 높아 최고의 다기능성을 입증한다. 다기능성 히트맵은 DAP10 공동 자극 도메인을 가진 CD5 CAR-NK 세포가 단일 세포 수준에서 다양한 순열의 사이토킨을 분비하는 최고의 능력을 가짐을 도해한다(도 2c).

[0291] [0253] DAP10 TM 및 DAP10 공동 자극 도메인 둘다를 가진 CD5 CAR-NK 세포는 Incucyte 사멸 검정에서 다수의 재챌린지 후에 CD5+ T-ALL 세포주(CCRF)를 계속 사멸시킨다(도 3a-3c). Incucyte 사멸 검정 재챌린지 연구의 한 가지 개략도는 도 3a에 제공된다. 다양한 CD5 CAR-NK 세포 조건 중 각각의 종양 재챌린지(분홍 화살표로 표시) 후의 적색 수(살아있는 종양 수의 측정)의 측정은 도 3b에 제공된다. 각 종양 재챌린지(분홍 화살표로 표시된 시기) 후 종양 풍부도의 측정치인 컨플루언스 퍼센트는 도 3c에 제공된다. 이들 데이터는 DAP10 TM 및 DAP10 공동 자극 도메인(적색 사각형 선으로 표시)을 가진 CD5 CAR-NK 세포가 다른 CD5 CAR NK 세포 디자인에 비해, 및 NT NK 세포에 비해, 및 관련 없는 CD19 CAR-NK 세포에 비해 다수의 재챌린지 후에 CD5+ T-ALL 세포주(CCRF)를 계속 사멸시킴을 보여준다.

[0292] [0254] 다양한 CD5 CAR-NK 세포 중 산소 소비율(OCR)과 세포 외 산성화율(ECAR)을 측정하는 해마 대사 검정을

기준으로, DAP10 TM 및 DAP10 공동 자극 도메인을 가진 CD5 CAR-NK 세포는 다른 작제물 디자인(도 4a-4c)에 비해 보다 높은 대사적 적합성을 나타낸다. 도 4a에서, 상기 다양한 CD5 CAR-NK 세포 디자인 중에 OCR은 형질도입되지 않은(NT) NK 세포와 비교한다. 상기 다양한 CD5 CAR-NK 세포 디자인 중에 ECAR은 또한 형질도입되지 않은(NT) NK 세포와 비교한다(도 4b). 이들 데이터는 다른 디자인에 비해, 및 NT NK 세포에 비해 DAP10 TM 및 DAP10 공동 자극 도메인을 가진 CD5 CAR-NK 세포에 대해 상당히 보다 높은 OCR을 입증하고, 동일한 작제물은 이들에게 보다 높은 대사 적합성을 부여하는 가장 높은 ECAR을 갖는다.

[0293] [0255] 도 5a-5c는 DAP10 공동 자극 도메인을 가진 CD5 CAR-NK 세포가 CD5+ 맨틀 세포 림프종의 PDX 마우스 모델에서 종양 제어를 개선한다는 것을 보여준다. 종양을 단독으로 투여받은 마우스(좌측 상에)와 종양 + CD5CAR-NK를 투여받은 마우스(우측 상에)의 피하 종양 내 CD45+CD5+ 세포의 절대 수를 나타낸다(도 5a). 도 5b는 비장에서 종양 단독을 투여받은 마우스(좌측)와 종양 + CD5CAR-NK를 투여받은 마우스(우측)의 피하 종양에서 CD45+CD5+ 세포의 절대 수를 보여주는 막대 그래프를 제공한다. 골수에서 종양을 단독으로 투여받은 마우스(좌측)와 종양 + CD5CAR-NK를 투여받은 마우스(우측)의 피하 종양 내 CD45+CD5+ 세포의 절대 수를 나타낸다(도 5c).

[0294] [0256] 도 6A-6b는 DAP10 공동자극 도메인을 갖는 CD27 CAR-NK 세포가 급성 골수성 백혈병의 NSG 마우스 모델에서 종양 제어 및 생존을 개선시킴을 입증한다(반딧불이 루시페라제(FFLuc)로 형질도입된 THP-1). 도 6a에서, 일련의 생체 발광 이미징(BLI)은 다양한 마우스 그룹에서 THP-1 FFLuc의 발광으로 종양 부담을 보여준다. 시간 경과에 따른 다양한 마우스 그룹의 생존율을 보여주는 생존율 곡선은 도 6b에 제공되고, 이는 DAP10 공동 자극 도메인이 CD27 CAR-NK 세포의 생체내 효능을 개선시킴을 지적한다.

[0295] 실시예 2

[0296] CD28힌지-CD28 막관통 도메인-DAP10 공동 자극 도메인 CAR의 우수성

[0297] [0257] 본 실시예는 CD28 힌지를 포함하는 다양한 작제물, CD28 막관통 도메인을 포함하는 일부 작제물, 및 DAP10 공동 자극 도메인을 포함하는 일부 작제물을 포함하는, 특정분석을 위한 특정 CAR 작제물에 관한 것이다. 하나의 특정 구현예에서, CD28 힌지, CD28 막관통 도메인 및 DAP10 공동 자극 도메인을 포함하는 CAR 작제물에 대한 활성이 제공된다.

[0298] [0258] 도 7a는 다양한 작제물 동정 및 상응하는 형질도입 효율을 도시한다(도 7b). 도 7a에 나타난 바와 같이 CB-NK 세포를 다양한 CD5 CAR 작제물로 형질도입하고 유동 세포측정에 의해 형질도입 효율을 측정하였다. 형질도입 효율은 퍼센트 양성 세포를 기준으로 한다(도 7b).

[0299] [0259] 도 8은 다양한 CD5 작제물의 마우스 주사 실험 계획의 한 예와 상응하는 타임라인을 제공한다. 상기 도식은 T 림프아구 세포주 CCRF-CEM을 표적으로 하는 다양한 CD5 CAR NK 세포의 생체 내 항종양 활성을 시험한 결과를 보여준다.

[0300] [0260] 도 9a와 9b는 IgG1 힌지 세포와 함께 항-CD5 CAR NK로 치료받은 마우스가 NT NK 세포와 종양만 치료한 마우스보다 훨씬 더 오래 생존한다는 것을 보여준다. CD5 CAR NK 세포는 T-급성 림프구성 백혈병의 마우스 모델에서 종양 부담을 감소시켰다. 반딧불이루시페라제(FFLuc)가 형질도입된 CCRF-CEM 세포를 마우스에 1×10^5 /마우스로 주사하고 다양한 그룹을 생체발광 이미징으로 모니터링하였다. 종양 주사 2일 후, 치료 그룹의 마우스에 각각의 NK CAR 세포의 3M을 주사하였다. 각각의 그룹 내 마우스의 생체 발광 이미지(도 9a)와 루시페라제 신호의 정량화(도 9b)는 IgG1 힌지를 갖는 다양한 CD5 NK CAR를 투여받은 마우스가 종양 단독, NT NK 세포에 비해 증진된 CCRF-CEM 종양 제어를 나타냈지만 이들이 NK 세포의 지속성 결여로 시간이 지나면 종양에 굴복함을 보여준다.

[0301] [0261] 도 10a 및 10b는 CD28 힌지를 갖는 항-CD5 CAR NK로 치료한 마우스가 종양 단독, NT NK 세포 및 IgG1 힌지를 갖는 CD5 CAR NK 세포에 비해 종양 부담이 현저히 감소한다는 것을 입증한다. CD5 CAR NK 세포는 T-급성 림프구성 백혈병의 마우스 모델에서 종양 부담을 감소시켰다. 반딧불이 루시페라제(FFLuc)가 형질도입된 CCRF-CEM 세포를 마우스에 1×10^5 /마우스로 주사하고 다양한 그룹을 생체 발광 이미징으로 모니터링하였다. 종양 주사 2일 후, 치료 그룹의 마우스에 각각의 NK CAR 세포의 3M을 주사하였다. 각각의 그룹 내 마우스의 생체 발광 이미지(도 10a)와 루시페라제 신호의 정량화(도 10b)는 CD28 힌지를 갖는 다양한 CD5 NK CAR를 투여받은 마우스가 종양 단독, NT NK 세포 및 IgG1 힌지를 갖는 CD5 NK CAR에 비해 증진된 CCRF-CEM 종양 제어를 나타냄을 보여준다. 또한, DAP10 공동 자극 도메인 CD5 NK CAR은 다른 공동 자극 도메인에 비해 종양 제어를 크게 개

선시킨다.

[0302] 실시예 3

[0303] DAP10 신호 전달을 갖는 CD5 CAR-NK 세포는 전사체, 후성유전체 및 단백질체 수준에서 높은 증식 능력, 대사 활동 및 메모리 특성의 시그니처를 보여준다.

[0304] [0262] CD28 막관통(TM) 도메인과 DAP10 공동 자극 도메인 및 CD3z 신호 전달 도메인을 포함하는 CD5 CAR 작제물(CD28TMDAP10CD3z)은 다른 공동 자극 분자를 포함하는 다른 예의 CD5 CAR-NK 세포 작제물 보다 양호하게 수행하고, 시험관내 및 생체내 항종양 활성, 증진된 다기능성 및 대사 적합성, 시험관내 다수의 종양 재챌린지 후 기능 소진이 적다는 것을 보여준다. DAP10 신호 전달이 CAR-NK 세포에 이러한 유의적인 이점을 제공하는 이유를 더 자세히 특징 분석하기 위해, 본원 발명자들은 단일 세포 RNA 서열분석(scRNAseq), 단일 세포 ATAC 서열분석(scATACseq) 및 역상 단백질 어레이(RPPA)를 수행하여 DAP10-CD3z 신호 전달을 갖는 CD5 CAR-NK 세포와 공동 자극 도메인(CD3z 신호 전달만)없이 디자인된 CD5 CAR-NK 세포 및 동일한 공여자로부터 생성된 형질도입되지 않은(NT) NK 세포를 비교하였다. 단일 세포 전사체 수준에서 scRNAseq 데이터의 경로 집적 분석으로 DAP10 신호 전달이 E2F 표적과 G2M 체크포인트 경로의 집적으로 입증된 바와 같이 CAR-NK 세포에 우수한 증식 능력을 부여하고, IL-2/STAT5 신호 전달과 Myc, mTORC1 및 산화적 인산화 같은 대사 경로의 집적에 의해 입증된 바와 같이 증진된 대사 활성을 부여한다(도 11). 후성유전학적 수준에 대해, scATACseq 데이터는 DAP10-CD3z 신호 전달 도메인을 갖는 CD5 CAR-NK 세포가 각각 메모리 형성 및 피로 내성과 관련된 AP-1 복합체 및 BATF 전사인자가 집적되어 있음을 보여준다(도 12). 단백질체 수준에 대해 RPPA 데이터의 경로 집적 분석은 CD5 표적 항원 DAP10 신호 전달을 사용한 하기의 자극이 CAR-NK 세포의 증식 및 사이토카인 생산 능력(ITGA 및 INSR 단백질 경로)을 부스팅하고, 이들에게 줄기성 잠재력(COP55 경로)을 제공하고, 해당 과정과 미토콘드리아 수준 둘다에서 대사 활성을 증진시키며(GAPDH 및 PARK7 경로), 막 분극화와 표적 세포와 면역 시냅스를 형성하는 능력을 증강시키고(Cav1 경로), 이들에 메모리 잠재력(FOXO1 경로)을 부여함을 보여주는 전사체 결과를 확증하였다(도 13a 및 13b).

[0305] 실시예 4

[0306] DAP10 신호 전달을 갖는 CD5 CAR-NK 세포는 종양 재챌린지 후에도 생체 내에서 메모리 반응을 지속하고 이의 증거를 보여준다.

[0307] [0263] CAR-NK 세포는 종양 재챌린지 후 생체 내에서 메모리 반응을 증가시키는 능력에 대해 평가하였다. CCRF-CEM, CD5+ T-ALL 세포주로 잘 확립된 NSG 마우스 모델을 사용하였다. CCRF-CEM 종양 세포주에 반딧불 루시퍼라제 및 GFP(CCRF-Ffluc-GFP)를 형질도입하여 각각 생체 발광 이미징(BLI)과 유동에 의해 종양 성장을 모니터링할 수 있다. 마우스에게 -1일차에 방사선 조사(225cGy)를 실시한 후, 0일차에 마우스당 CCRF-Ffluc 종양 100,000개의 세포를 정맥내 주사하였다. 2일째에 치료 그룹에는 DAP10 신호 전달을 갖는 5×10^6 CD5 CAR-NK 세포를 정맥내 주사하였다. CCRF-CEM 종양 주사 후 93일째에 혈액을 채취하여 사람 NK 세포(hCD45+CD56+GFP-)의 퍼센트를 평가하였다. 100일째에, 치유되어 BLI 또는 유동에 의해 종양의 증거를 보이지 않는 마우스에게 50,000개의 CCRF-CEM 종양 세포를 재챌린지하였다. 1주 후(107일째), 혈액을 다시 수거하여 사람 NK 세포 퍼센트를 조사하였다. 도 14a 및 14b에 나타난 바와 같이, 종양 재챌린지 후 혈액 내 사람 NK 세포(hCD45+CD56+GFP-)의 퍼센트가 13%에서 91%로 증가하여 CAR-NK 세포가 생체 내에서 종양 재챌린지에 대한 메모리 반응을 증가시킬 수 있음을 지적한다.

[0308] 참고문헌

[0309] [0264] 하기의 참고문헌들은, 본원에 기술된 내용에 대하여 예시적인 절차이거나 이를 보충하는 기타 상세한 설명을 제공하는 정도로, 본원에 참고로서 상세하게 포함된다.

[0265] 1. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. N Engl J Med. 2018;378(5):439-448.

[0266] 2. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. N Engl J Med. 2017;377(26):2531-2544.

[0267] 3. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, et al. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. N Engl J Med. 2019;380(1):45-56.

[0268] 4. Hartmann J, Schussler-Lenz M, Bondanza A, Buchholz CJ. Clinical development of CAR T cells-challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts. EMBO Mol Med. 2017;9(9):1183-1197.

[0269] 5. Daher M, Rezvani K. Next generation natural killer cells for cancer immunotherapy: the promise of genetic engineering. Curr Opin Immunol. 2018;51:146-153.

[0270] 6. Mehta RS, Rezvani K. Chimeric Antigen Receptor Expressing Natural Killer Cells for the Immunotherapy of Cancer. Front Immunol. 2018;9:283.

[0271] 7. Liu E AS, Kerbaui L et al. GMP-compliant universal antigen presenting cells (uAPC) promote the metabolic fitness and antitumor activity of armored cord blood CAR-NK cell. Front Immunol doi: 103389/fimmu2021626098. 2021.

[0310]

[0311]

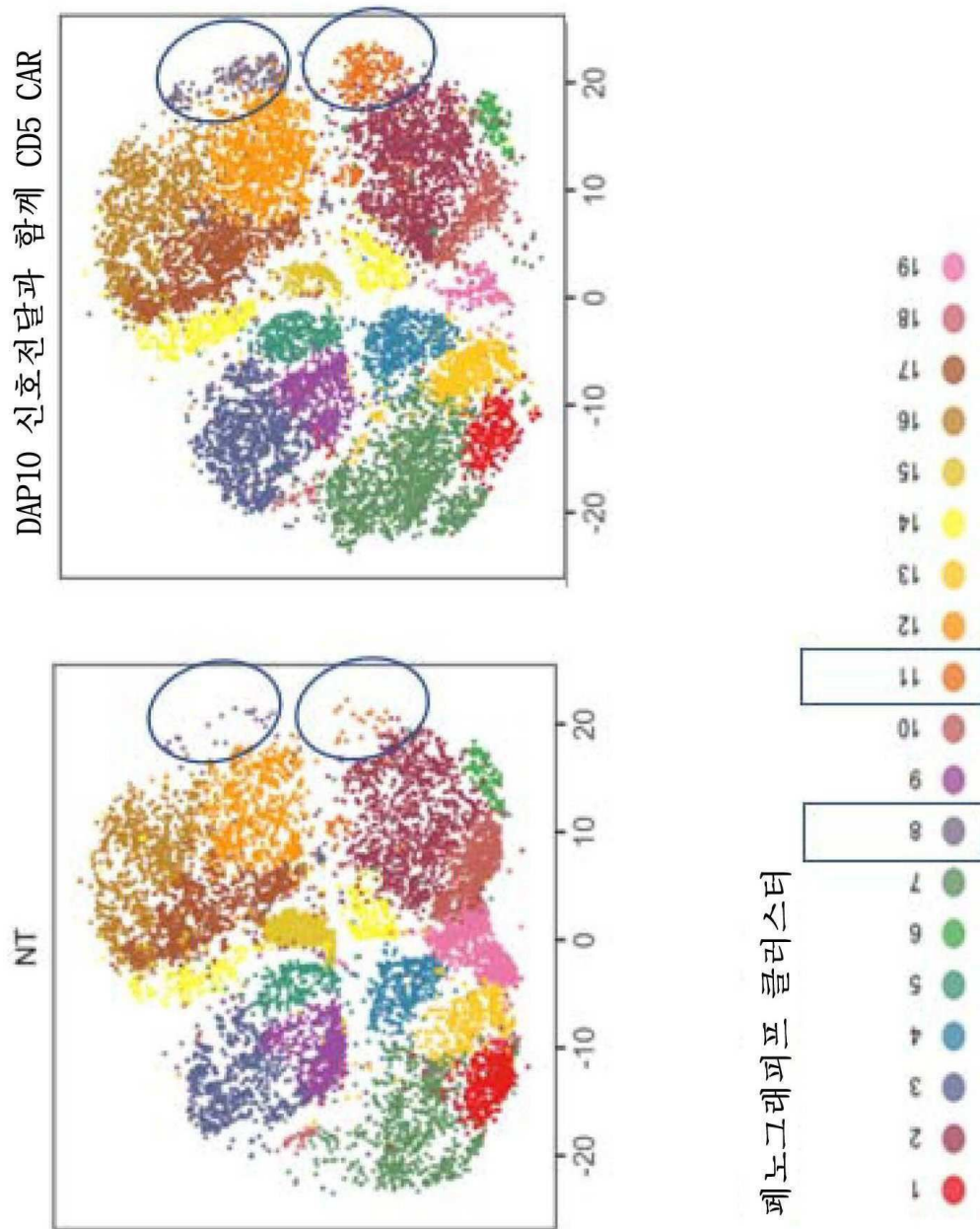
* * *

[0312]

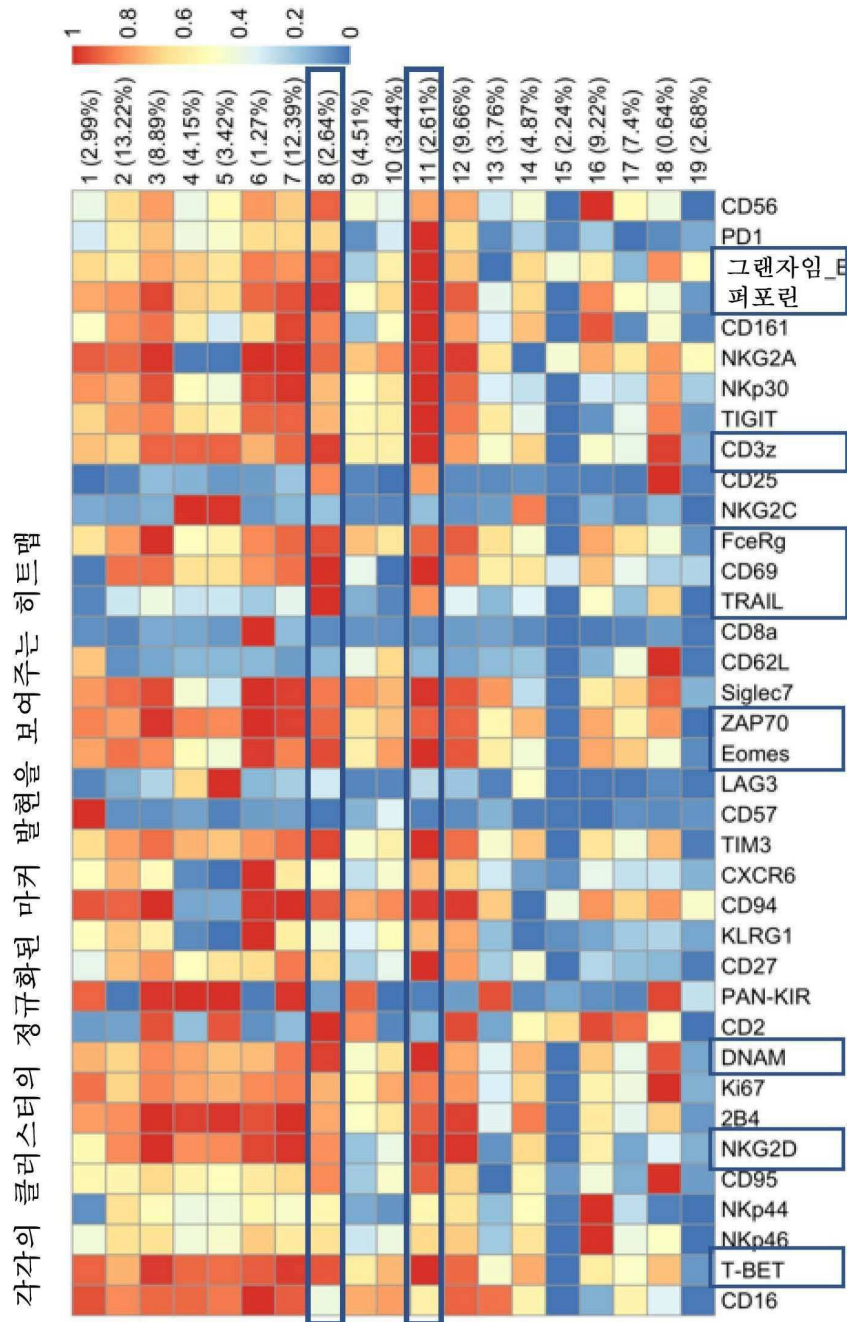
[0272] 본원에 개시되고 청구된 모든 방법들은 본 명세서의 내용을 고려하여 과도한 실험없이 만들어 수행할 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법은 바람직한 구현예의 관점에서 기술되었지만, 본 발명의 당업계의 개념, 의미 및 범위를 벗어나지 않으면서 다양한 변화들을 본원에 기술된 방법들, 상기 방법의 단계들 또는 상기 방법 단계들의 순서에 적용할 수 있다는 사실은 당업계의 숙련자들에게는 명백할 것이다. 보다 구체적으로, 화학적 및 생리학적으로 모두 관련되어 있는 특정 제제의 경우 이들을 사용하여도 동일하거나 유사한 결과가 달성된다면 본원에 기술된 제제를 대체할 수 있음도 명백할 것이다. 당업계의 숙련자들에게 명백한 이러한 모든 유사한 대체물 및 변형은 첨부된 특허청구범위에 정의된 본 발명의 의미, 범위 및 개념에 속하는 것으로 간주된다.

도면

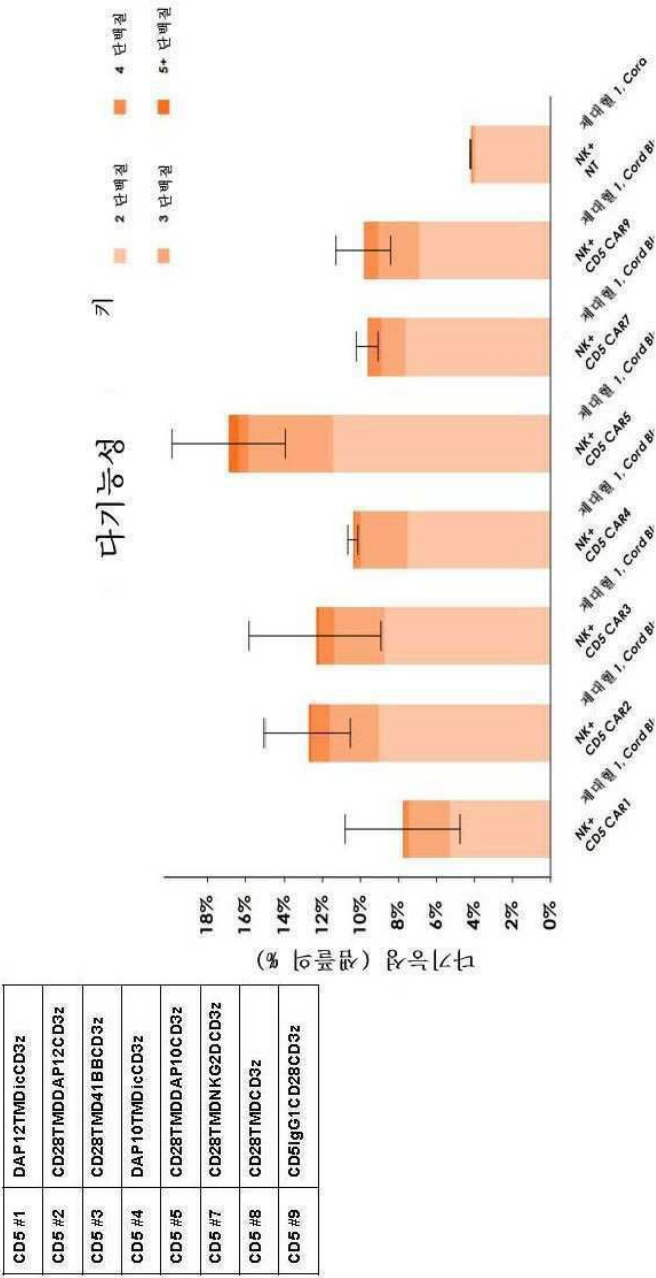
도면1a



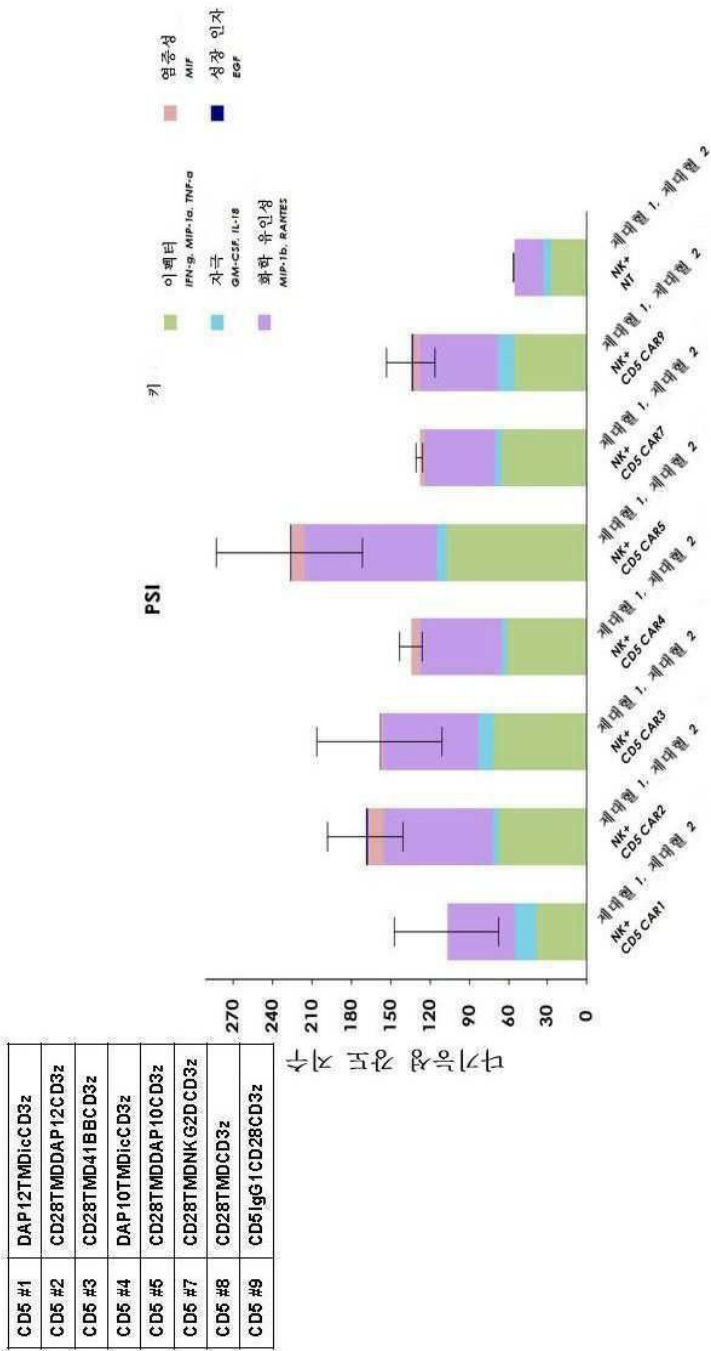
도면1b



도면2a

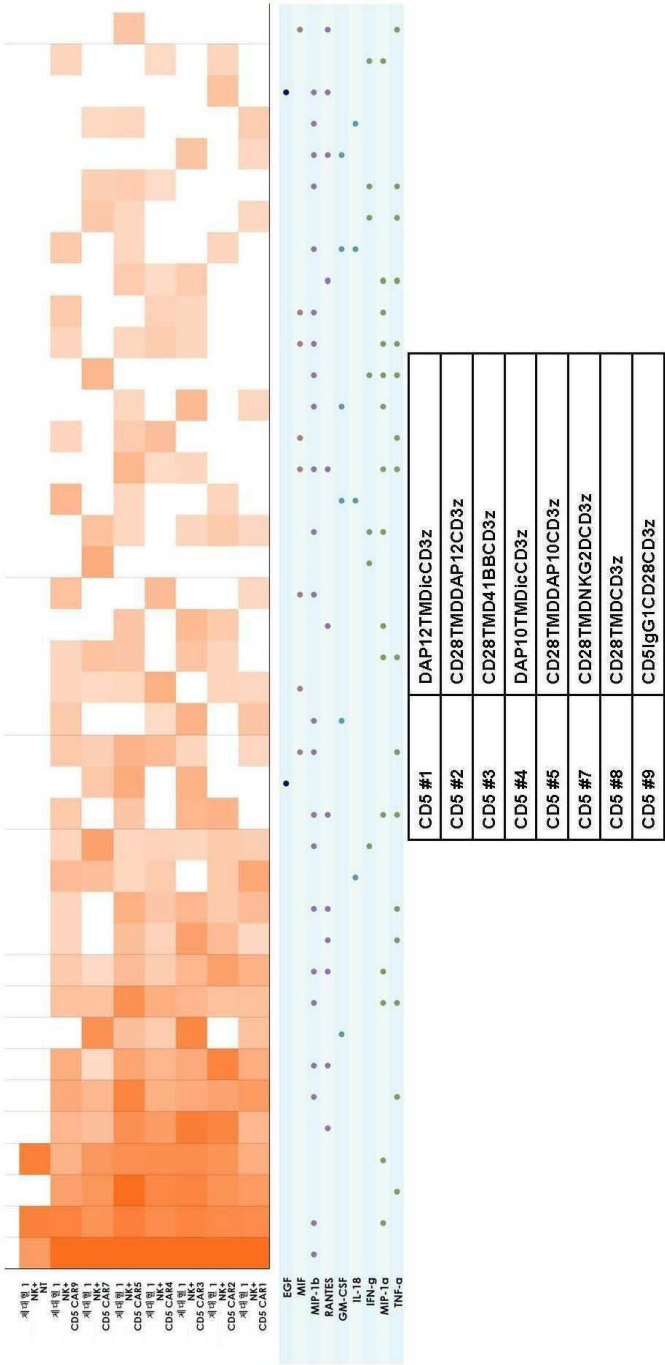


도면2b

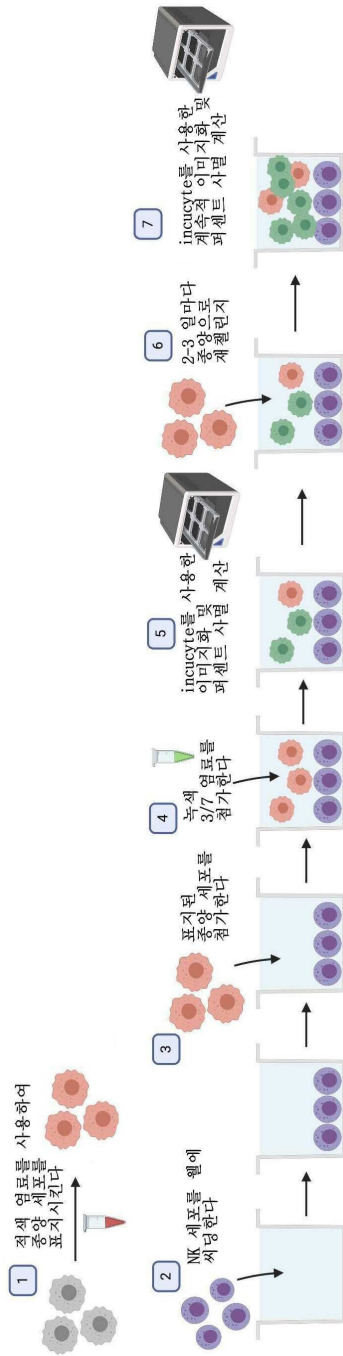


도면2c

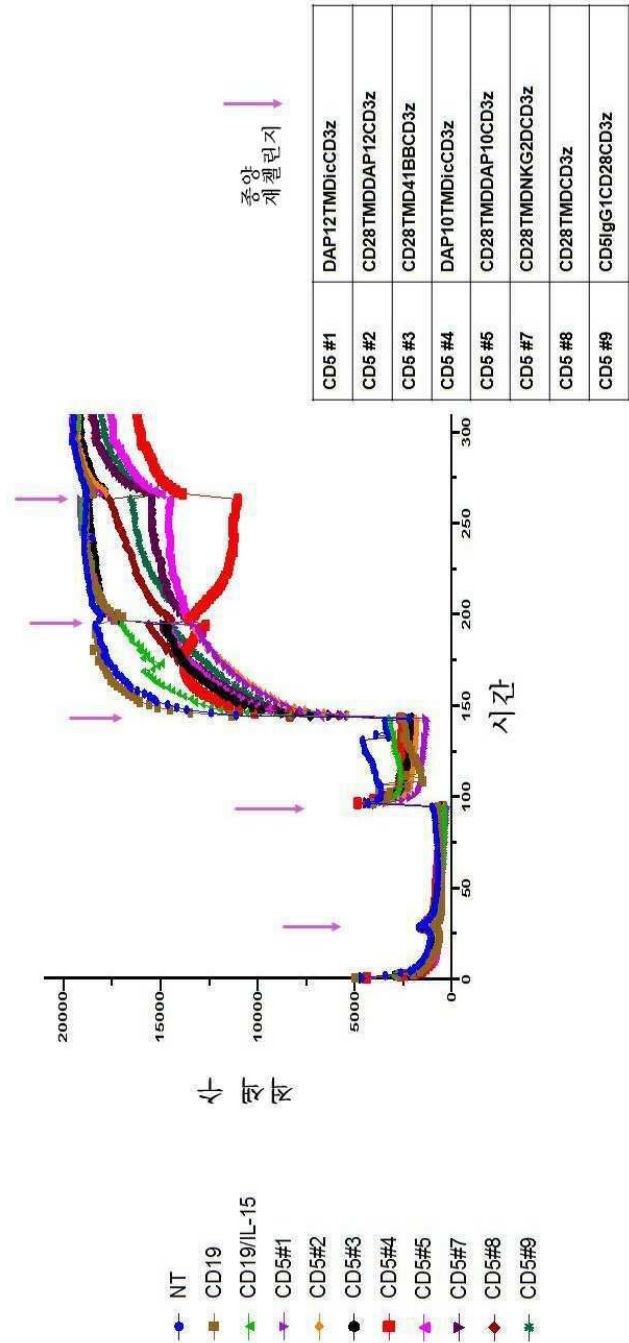
다기능성 히트 맵



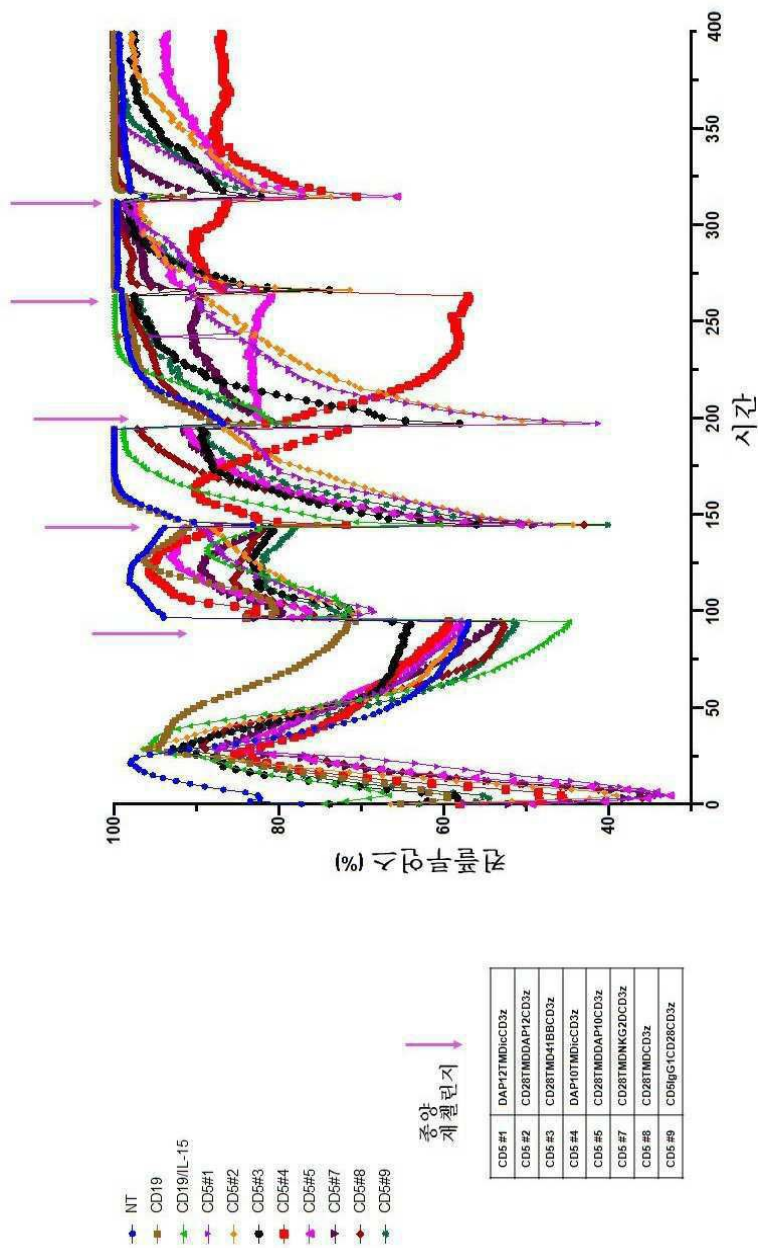
도면3a



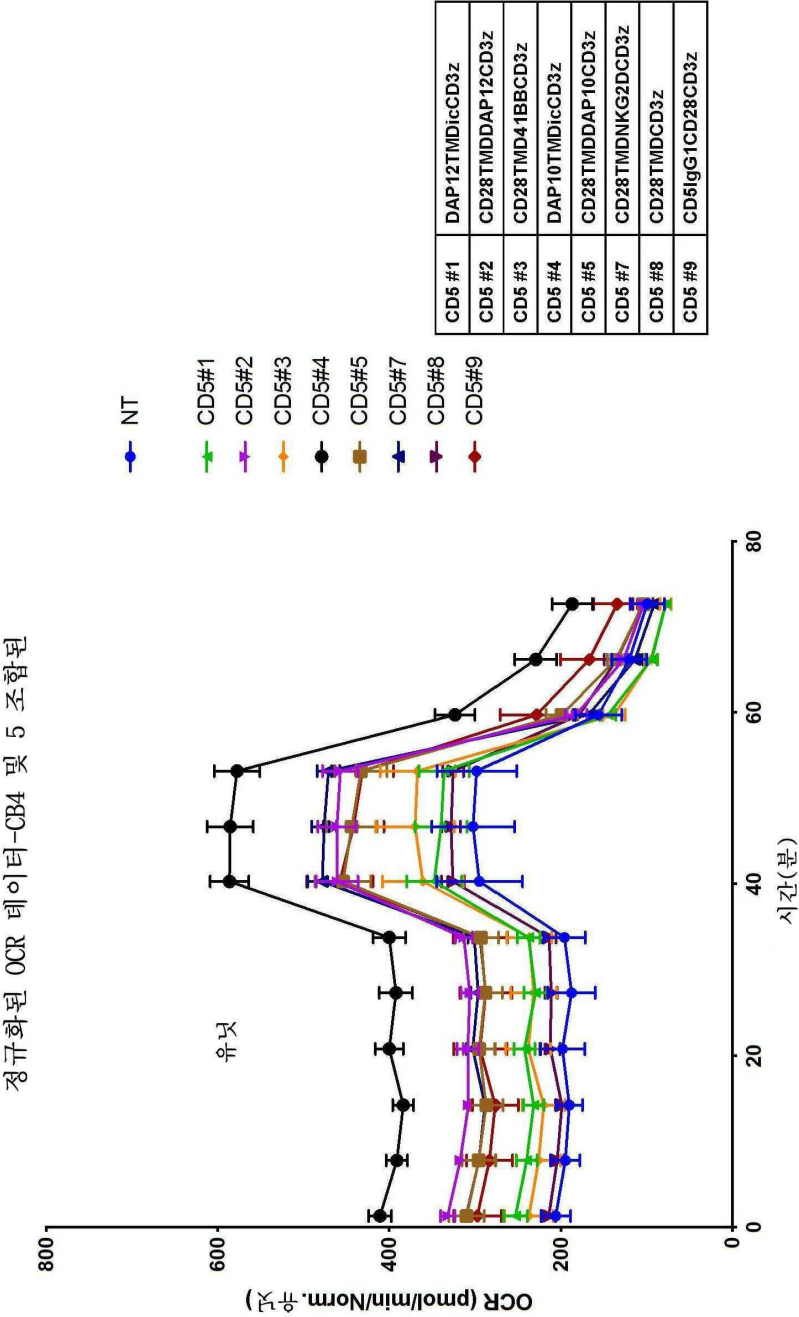
도면3b



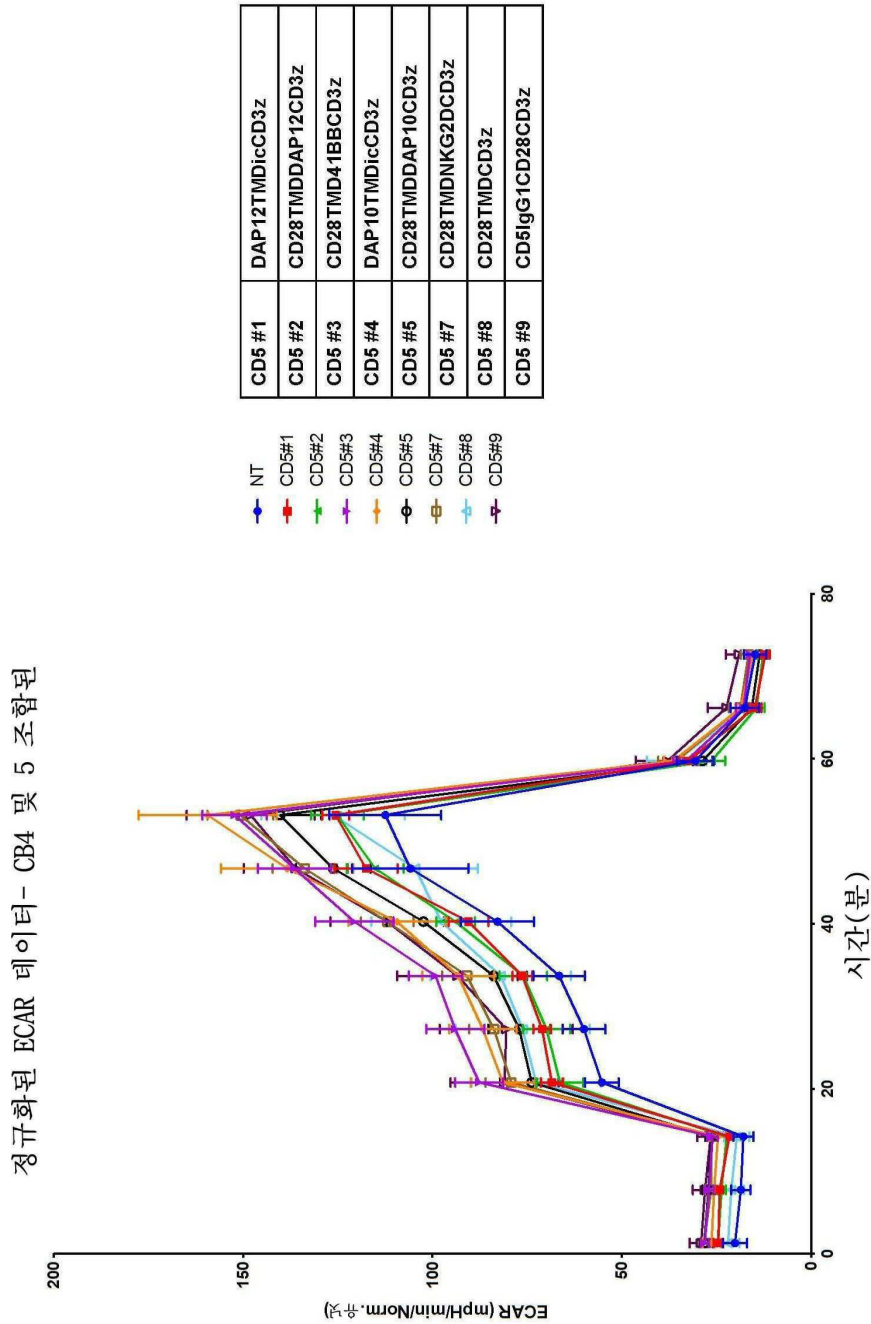
도면3c



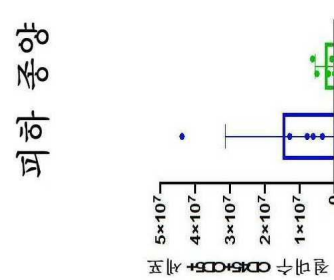
도면4a



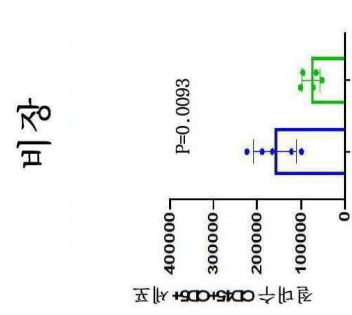
도면4b



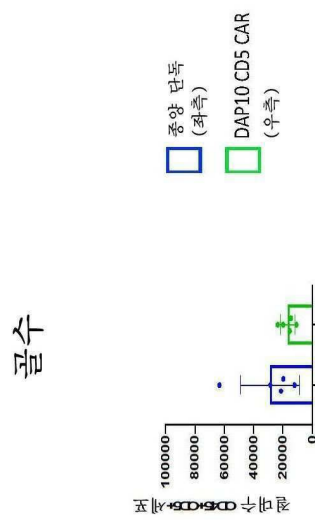
도면5a



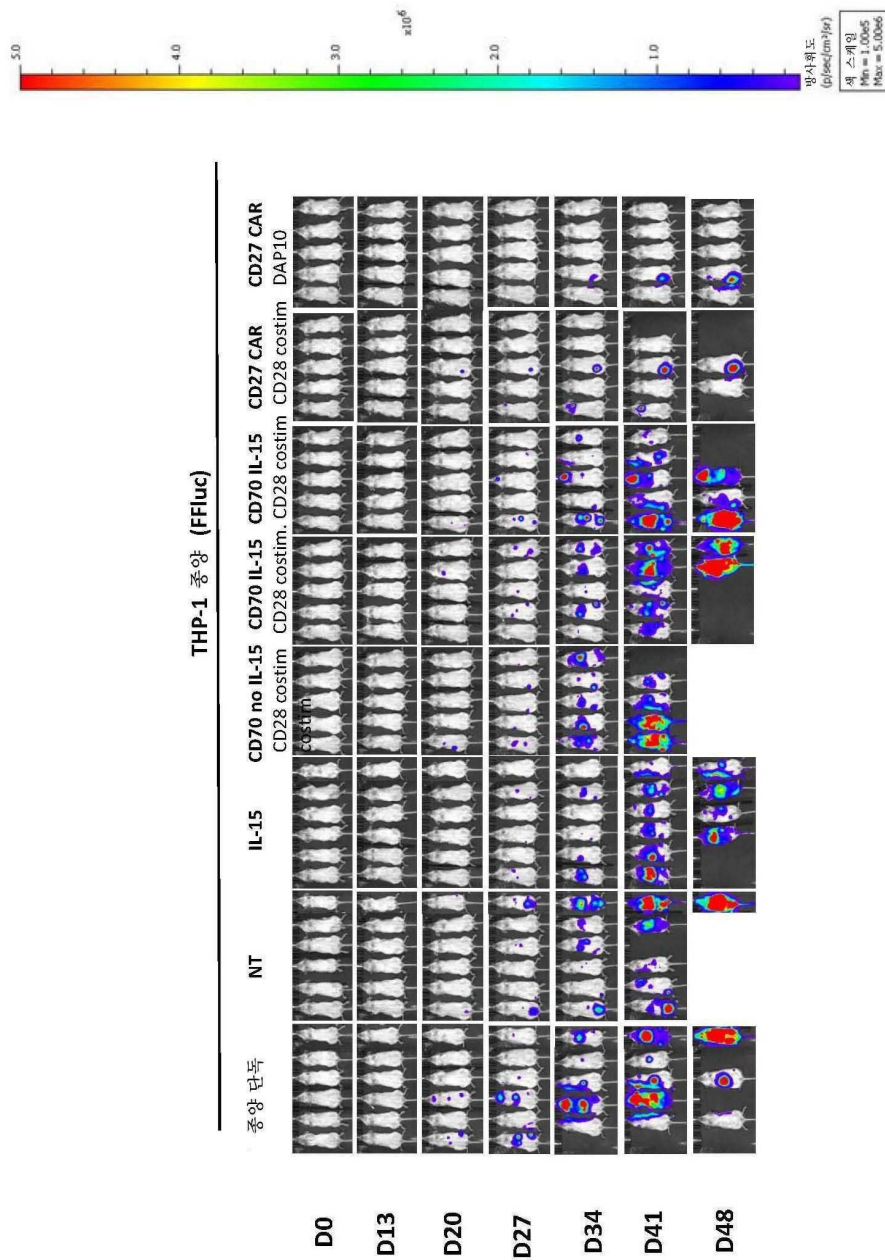
도면5b



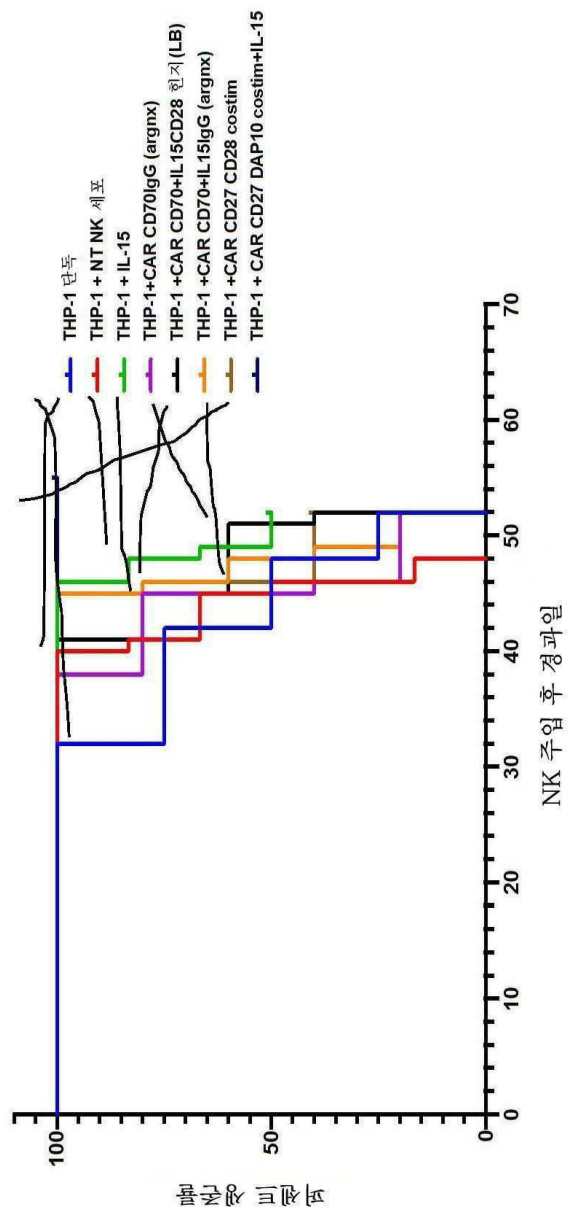
도면5c



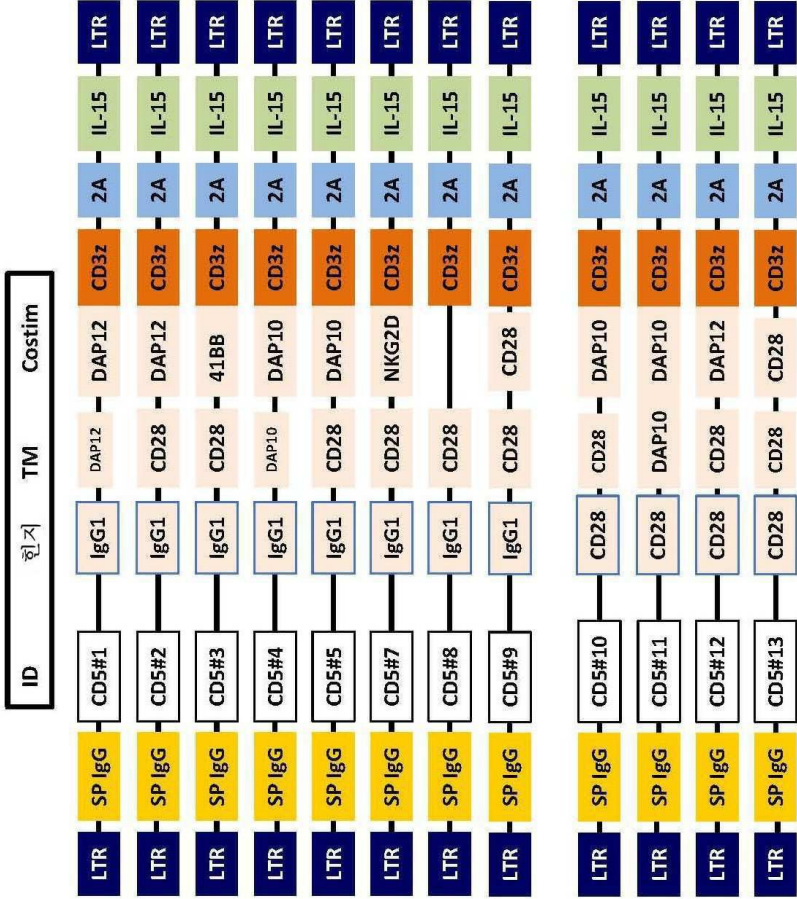
도면6a



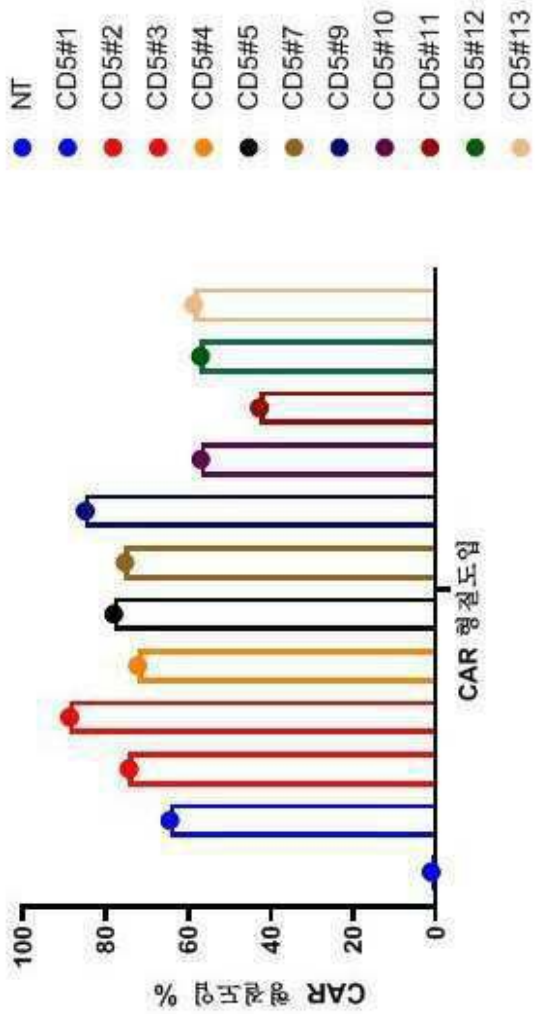
도면6b



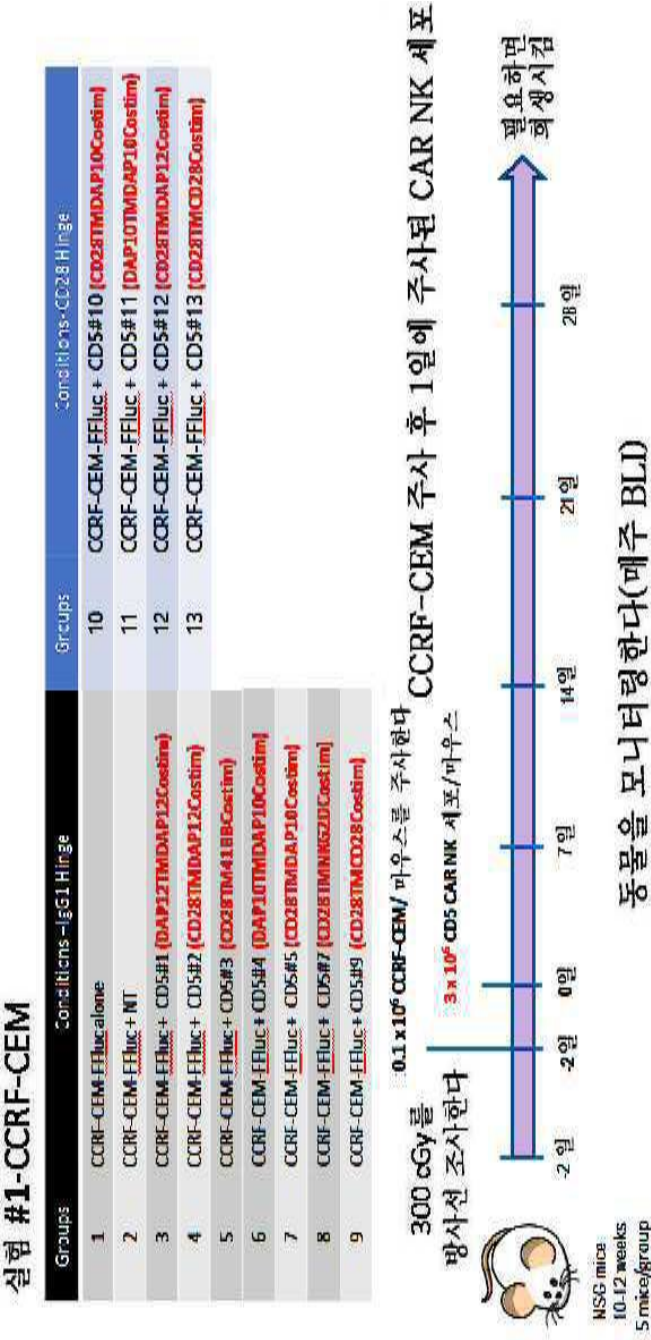
도면7a



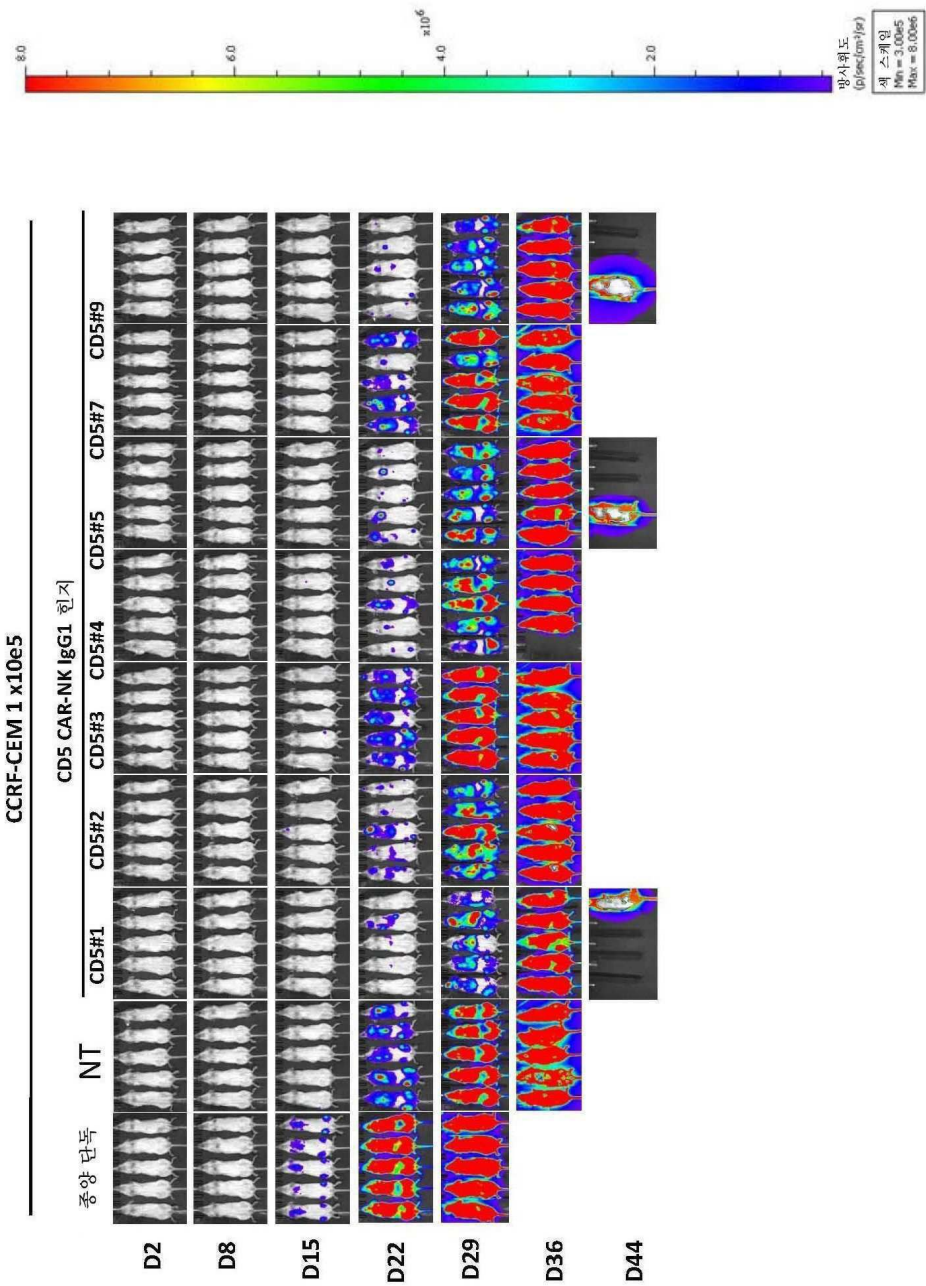
도면7b



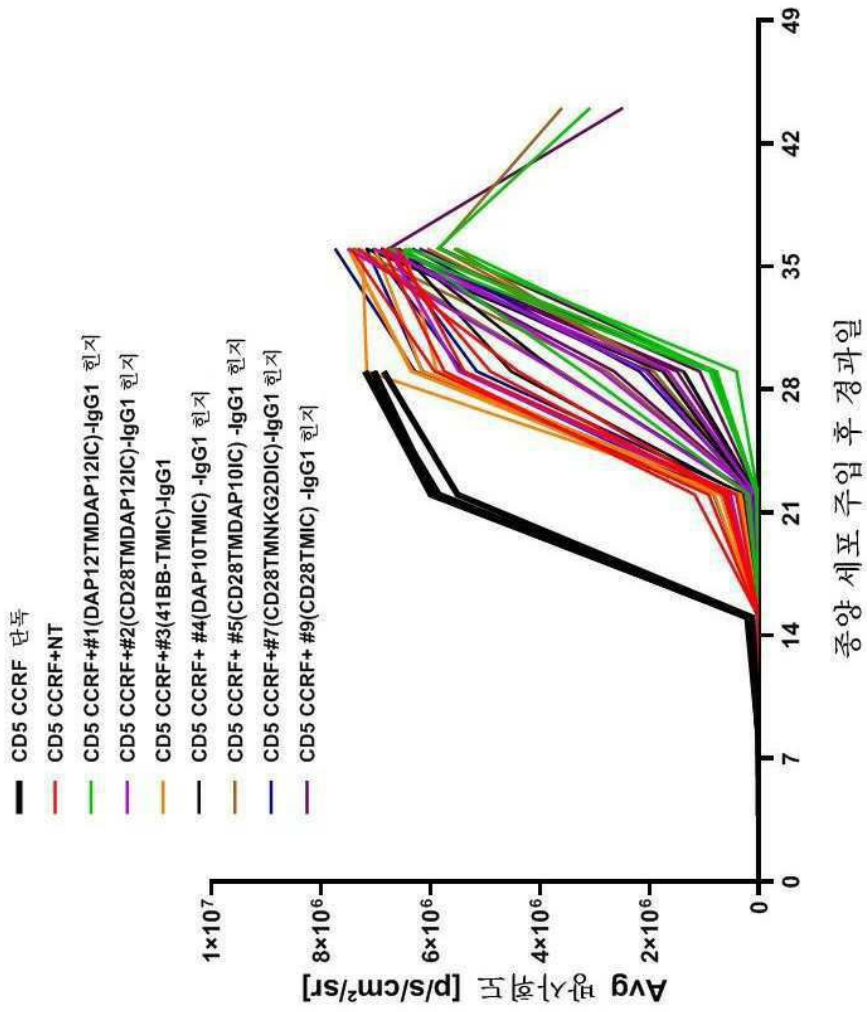
도면8



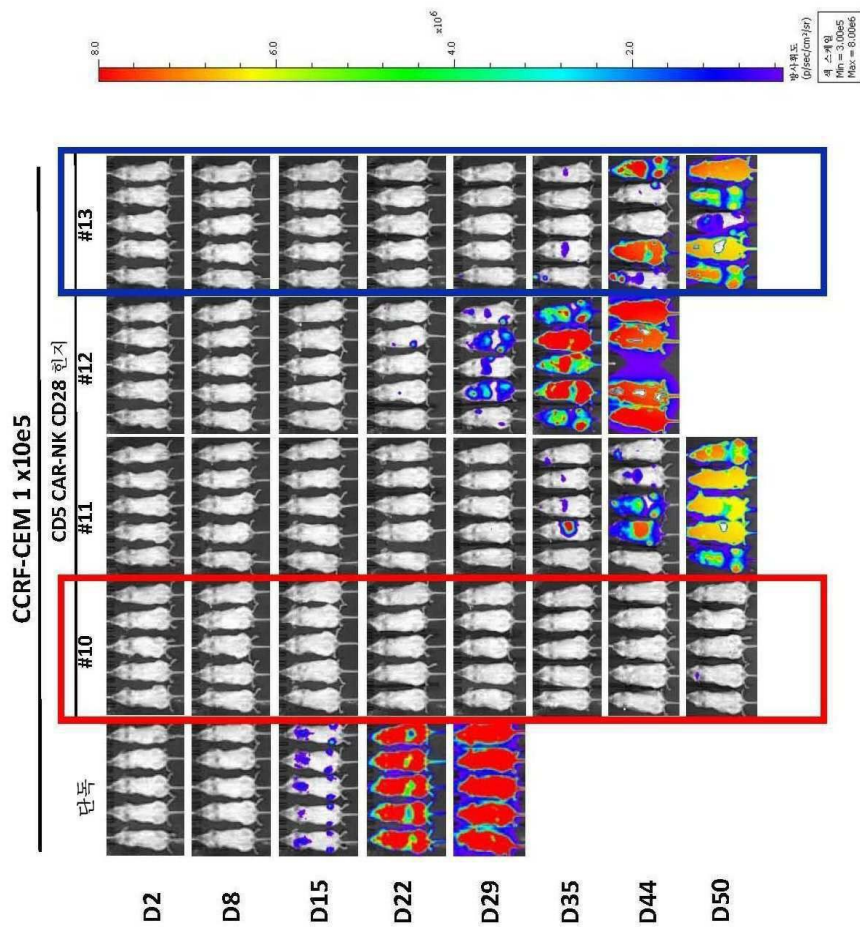
도면9a



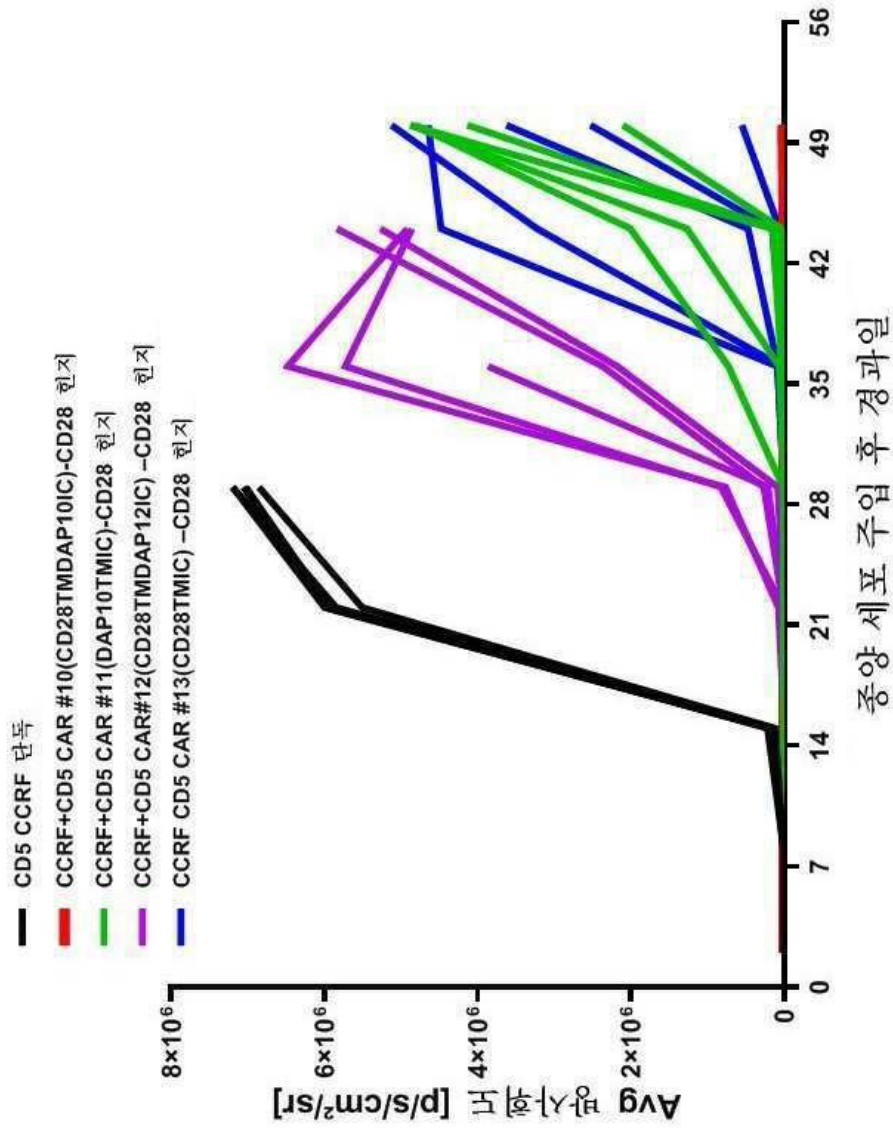
도면9b



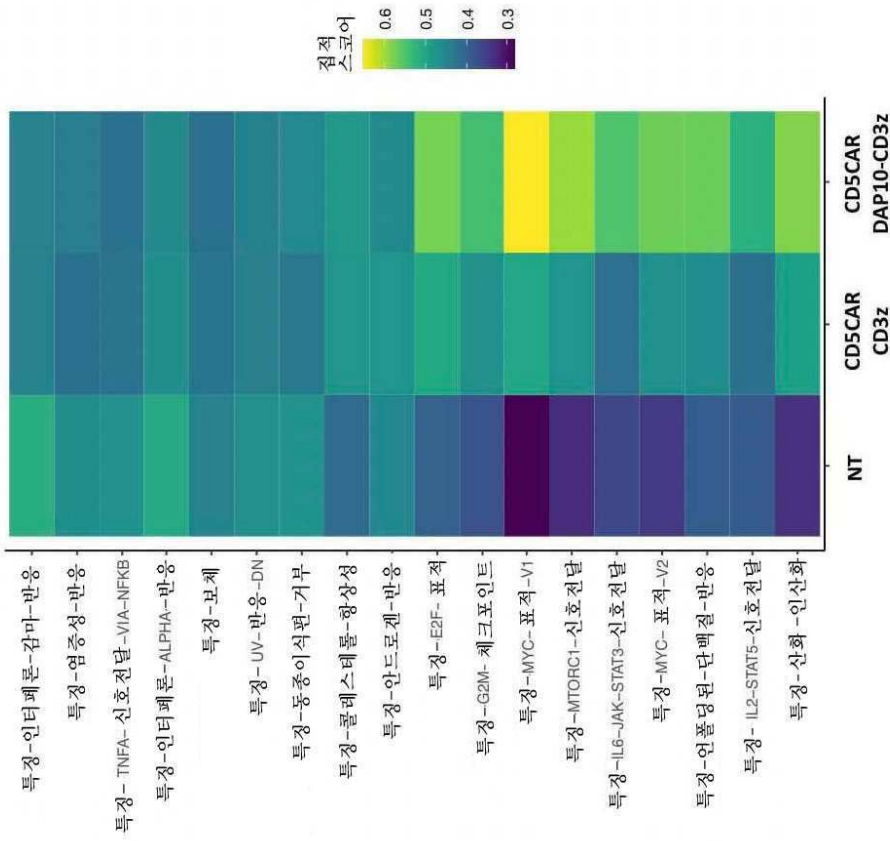
도면10a



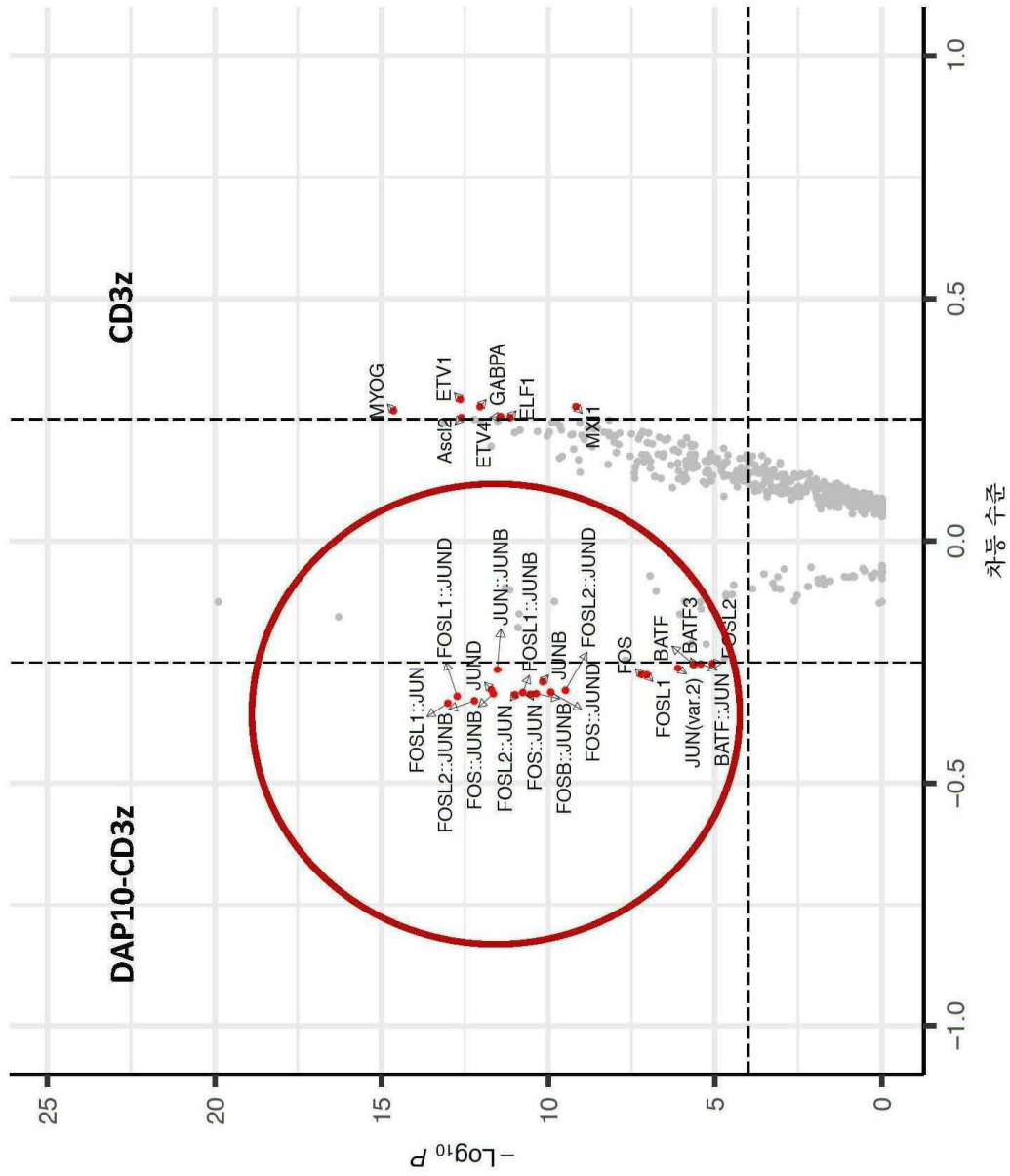
도면10b



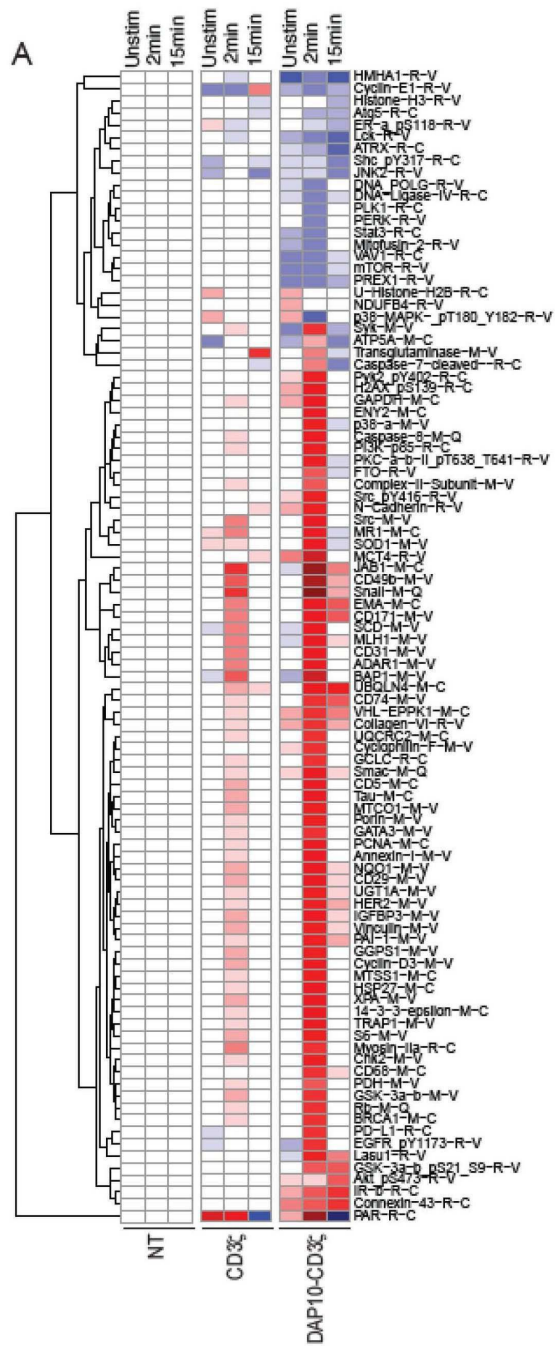
도면11



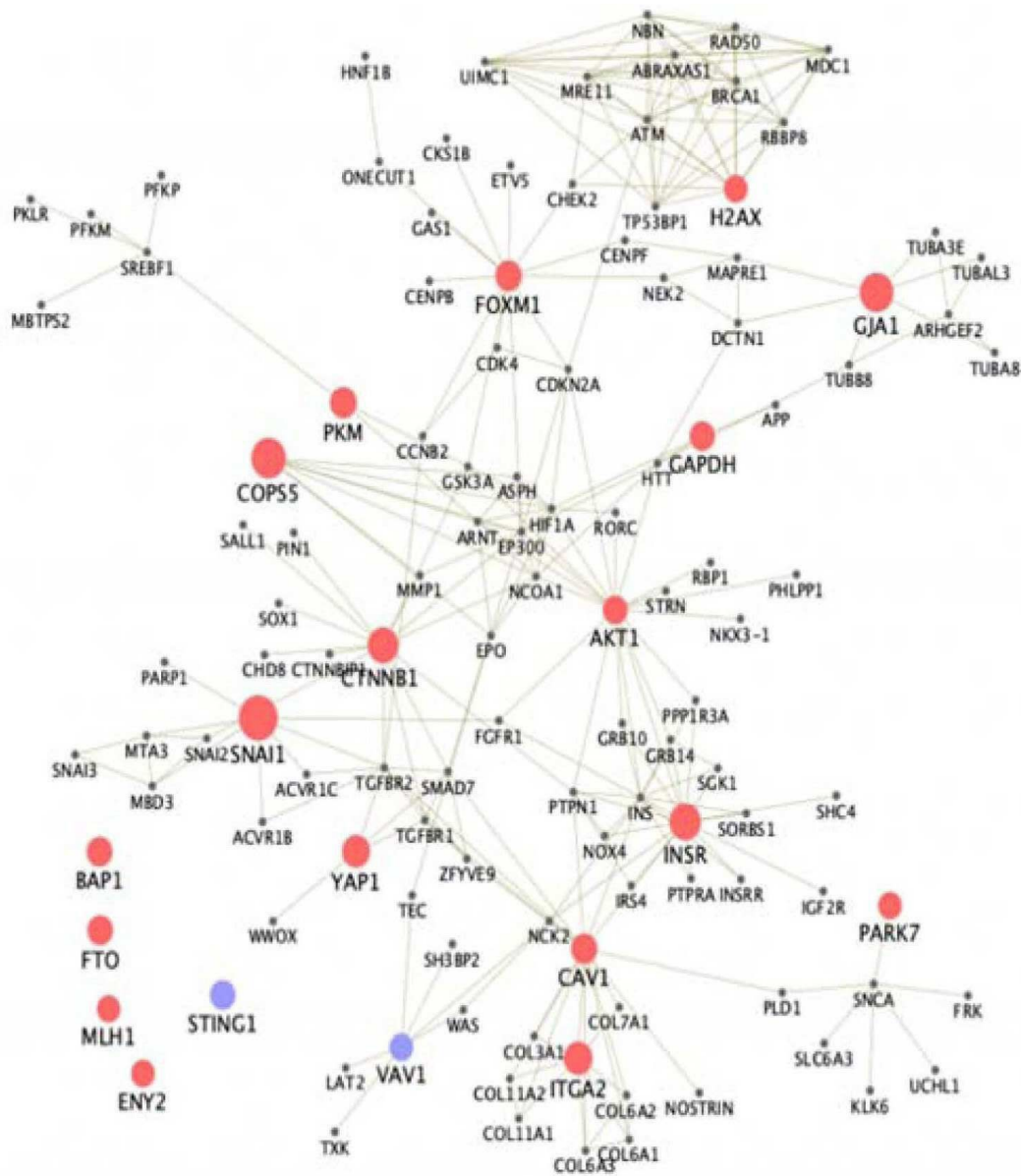
도면12



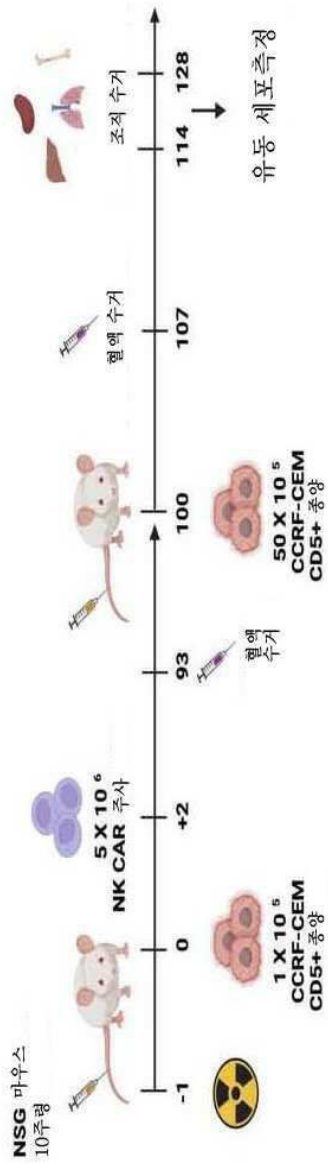
도면13a



도면13b



도면14a



도면14b

