(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0077650
(43) 공개일자 2023년06월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/725 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 14/705* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/7051 (2013.01)
A61K 39/0005 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0149000
(22) 출원일자 2022년11월09일
심사청구일자 2022년11월09일
(30) 우선권주장
1020210161425 2021년11월22일 대한민국(KR)

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
김헌식
서울특별시 광진구 광나루로56길 32, 201동 501호(구의동, 구의현대2단지아파트)
박효진
경기도 남양주시 진접읍 금강로 1554-20, 308동 601호(휴먼시아)
이은비
서울특별시 강동구 올림픽로62길 23-16, 큰나무집 401호(성내동)
(74) 대리인
이명진

전체 청구항 수 : 총 22 항

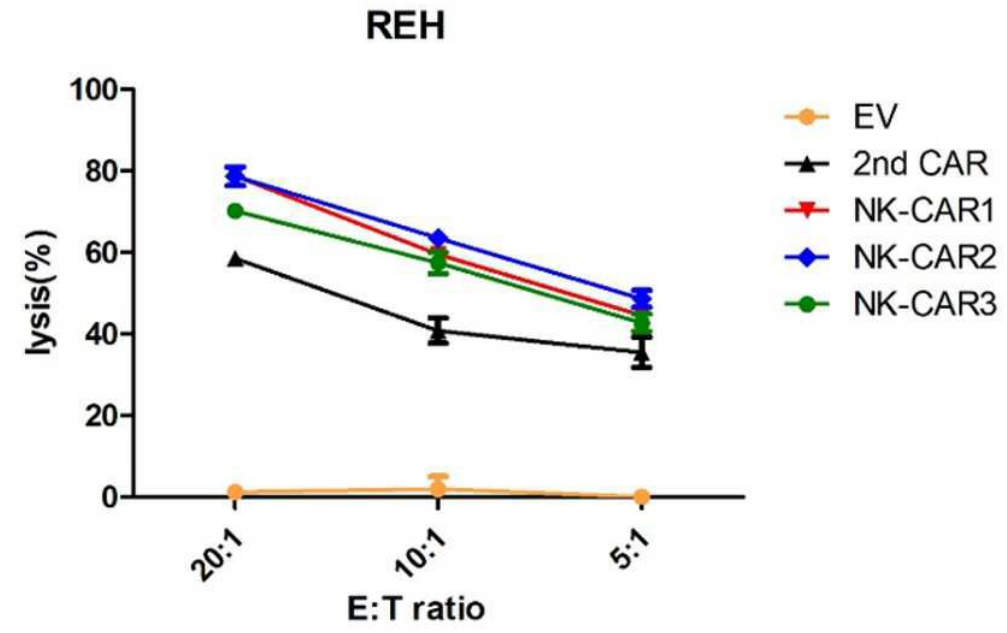
(54) 발명의 명칭 **자연살해세포-특이적 키메릭항원수용체 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체 (NK-CAR) 등에 관한 것으로서, 자연살해세포 특이적 활성화 수용체 유래 도메인들의 특정 조합을 포함하는 NK-CAR가 자연살해세포를 효과적으로 활성화하여 타겟세포에 대한 사멸능을 증진시킬 수 있음을 확인하여 완성된 것이다. 구체적으로, 본 발명자들은 특정 도메인들의 조합으로 이

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도3a



루어진 3가지의 자연살해세포 특이적 CAR를 제조하였으며, 상기 NK-CAR를 발현하는 자연살해세포는 타겟세포에 반응한 사이토카인 및 그랜자임 B의 생성이나 AKT 및 ERK 활성화가 더욱 증진되고, 탈과립화가 촉진되어 더욱 우수한 세포사멸 활성을 발휘하는 것을 확인하였다. 즉, 본 발명에 따른 NK-CAR는 자연살해세포의 활성화를 강력히 유도하여 세포사멸 활성을 증진시킬 수 있으므로, 암을 포함한 다양한 질환의 치료를 위한 면역요법으로 활용될 수 있다. 특히 자연살해세포를 이용한 CAR 기반 항암 치료는 사이토카인 방출 신드롬이나 신경독성 등을 유발하지 않고, 자가 및 동종의 자연살해세포를 이용할 수 있으므로 CAR-T 등에 비해 부작용이 적은 장점이 있다. 따라서 본 발명에 따른 NK-CAR를 발현하는 자연살해세포는 부작용은 낮추면서 질병 치료 효과는 극대화된 세포치료제로 활용될 것으로 기대된다.

(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/70517 (2013.01)
C07K 14/70521 (2013.01)
C07K 16/2803 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체로서,

(i) 항원 결합 도메인;

(ii) CD8 또는 CD28 힌지 도메인;

(iii) DAP10 세포내 신호전달 도메인;

(iv) 2B4 세포내 신호전달 도메인; 및

(v) CD3z 세포내 신호전달 도메인을 포함하고, 상기 키메릭항원수용체는 자연살해세포에서 발현되는 것을 특징으로 하는, 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 항원 결합 도메인은 종양항원 특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 것을 특징으로 하는, 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 키메릭항원수용체는 하기 특징 중 하나 이상을 만족하는 것을 특징으로 하는, 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체:

(a) 상기 CD8 힌지 도메인은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함함;

(b) 상기 CD28 힌지 도메인은 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함함;

(c) 상기 DAP10 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함함;

(d) 상기 2B4 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함함; 및

(e) 상기 CD3z 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함함.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 키메릭항원수용체는 CD28 막관통 도메인을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 CD28 막관통 도메인은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 키메릭항원수용체는 DAP10 세포외 도메인 및 DAP10 막관통 도메인으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 키메릭항원수용체는 하기 특징 중 하나 이상을 만족하는 것을 특징으로 하는, 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체:

(f) 상기 DAP10 세포외 도메인은 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함함; 및

(g) 상기 DAP10 막관통 도메인은 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함함.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 키메릭항원수용체는 신호 펩티드를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 신호 펩티드는 CD8 신호 펩티드인 것을 특징으로 하는, 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체.

청구항 10

제2항에 있어서,

상기 종양항원은 CD19, TAG72, IL13Rα2 (Interleukin 13 receptor alpha-2 subunit), CD52, CD33, CD20, TSLPR, CD22, CD30, GD3, CD171, NCAM (Neural cell adhesion molecule), FBP (Folate binding protein), Le(Y) (Lewis-Y antigen), PSCA (Prostate stem cell antigen), PSMA (Prostate-specific membrane antigen), CEA (Carcinoembryonic antigen), HER2 (Human epidermal growth factor receptor 2), Mesothelin, CD44v6 (Hyaluronate receptor variant 6), B7-H3, Glypican-3, ROR1 (receptor tyrosine kinase like orphan receptor 1), Survivin, FOLR1 (folate receptor 1), WT1 (Wilm's tumor 1), VEGFR2 (Vascular endothelial growth factor 2), EGFR, 및 KRAS로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체.

청구항 11

제2항에 있어서,

상기 항원 결합 단편은 scFv, $(scFv)_2$, Fab, Fab' 및 $F(ab')_2$로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는, 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체.

청구항 12

제2항에 있어서,

상기 종양항원 특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하기의 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체:

서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 및 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역; 및

서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 및 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체를 발현하는 자연살해세포.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 자연살해세포는 하기로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 특징을 만족하는 것을 특징으로 하는, 자연살해세포:

(a) 항원 인식시 MIP-1α, 그랜자임 B, 및 INF-γ로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 분비량이 증가함;

(b) 항원 인식시 AKT 신호 및 ERK 신호로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 활성이 증가함; 및

(c) 항원 인식시 탈과립화 수준이 증가함.

청구항 15

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체를 코딩하는 핵산 분자.

청구항 16

제15항의 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터.

청구항 17

제16항의 발현 벡터가 도입된, 단리된 세포.

청구항 18

제2항 내지 제12항 중 어느 한 항의 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체를 발현하는 자연살해세포를 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 암은 대장암, 직장암, 결장암, 갑상선암, 구강암, 인두암, 후두암, 자궁경부암, 뇌암, 폐암, 난소암, 방광암, 신장암, 간암, 췌장암, 전립선암, 피부암, 혀암, 유방암, 자궁암, 위암, 골암, 림프종, 혈액암, 편평상피세포암, 폐의 선암, 복막암, 피부암, 피부 흑색종, 안구 흑색종, 직장암, 항문부근암, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 위장암, 교아종, 난소암, 자궁내막암, 침샘암, 음문암, 및 두경부암으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 20

제2항 내지 제12항 중 어느 한 항의 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체를 발현하는 자연살해세포를 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 세포치료제.

청구항 21

(S1) 제16항의 발현 벡터를 단리된 세포에 도입시키는 단계; 및

(S2) 상기 발현 벡터가 도입된 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체의 제조방법.

청구항 22

제16항의 발현 벡터를 단리된 자연살해세포에 도입시키는 단계를 포함하는, 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체를 발현하는 자연살해세포의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체, 이를 발현하는 자연살해세포, 및 이의 용도 등에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암은 현대인의 사망원인에서 가장 큰 비중을 차지하고 있는 질환 중 하나로서 유전자의 돌연변이 등으로 인하여 정상세포가 변화하여 발생된 질병이며, 정상적인 세포의 분화, 증식, 성장 형태 등을 따르지 않는 종양 중 악성인 것을 지칭한다. 암은 특히 "제어되지 않은 세포성장"으로 특징지어지며, 이러한 비정상적인 세포 성장에 의해 종양 (tumor)이라고 불리는 세포 덩어리가 형성되어 주위의 조직으로 침투하고, 심한 경우에는 신체의 다른 기관으로 전이되기도 한다. 암은 수술, 방사선 및 약물 요법 등으로 치료를 하더라도 많은 경우에 근본적인 치유가 되지 못하고 환자에게 고통을 주며 궁극적으로는 죽음에 이르게 하는 난치성 만성질환이다. 특히, 최근에는 노년 인구의 증가, 환경 악화 등으로 인하여 세계 암 발생률은 매년 5% 이상 증가되고 있는 추세이며, WHO 보고서에 따르면 향후 25년 내 암 발생 인구는 3천 만명으로 증가되고, 이중 2천 만명의 인구는 암으로 사망할 것으로 추정되고 있다.

[0003] 암의 약물 치료, 즉, 항암제는 일반적으로 세포 독성을 가지고 있는 화합물로서 암세포를 공격해 사멸시키는 방식으로 암을 치료하는데, 암세포뿐만 아니라 정상세포에도 손상을 주기 때문에 높은 부작용을 나타낸다. 따라서 부작용을 감소시키기 위하여 표적 항암제들이 개발되었다. 그러나 이러한 표적 항암제들의 경우에는 부작용은 낮출 수 있었으나, 높은 확률로 내성이 생긴다는 한계점을 나타내었다. 따라서, 최근에는 체내의 면역체계를 이용하여 독성 및 내성으로 인한 문제점을 감소시키는 면역 항암제에 대한 관심이 급증하고 있는 추세이다. 이러한 면역 항암제의 일례로서 암세포 표면의 PD-L1에 특이적으로 결합하여 T 세포의 PD-1과의 결합을 억제하여 T 세포를 활성화시키고, 암세포를 공격하도록 만드는 면역관문억제제가 개발된 바 있다. 그러나 이러한 면역관문억제제의 경우에도 효과를 나타내는 암의 종류가 다양하지 않기 때문에, 다양한 암에서 동일하게 치료 효과를

나타내는 새로운 면역관문억제제의 개발이 절실히 필요한 실정이다.

[0004] 최근에는 암을 공격하는 면역세포를 체내에 직접 투입하여 암세포 사멸을 유도하는 항암 면역세포치료에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 항암 면역세포치료에 이용되는 대표적인 면역세포 중 하나인 자연살해세포(Natural killer cells, NK cells)는 선천적 면역반응을 담당하는 세포독성 림프구의 한 종류로, 형태학적으로는 세포질에 큰 과립을 가지며, 혈중 림프구의 5 내지 20 %를 차지한다. 자연살해세포는 표면에 다양한 면역수용체가 있어 암세포 및 정상세포를 구별할 수 있으므로, 암세포를 즉각적으로 감지하여 제거할 수 있다는 장점이 있다. 특히 자연살해세포는 암세포 및 바이러스 감염 세포 등의 발생, 증식, 전이를 억제할 뿐만 아니라 암 줄기세포를 효과적으로 제거할 수 있으므로, 암 줄기세포에 의한 암의 재발을 막을 수 있어 효과적인 항암 면역세포로 여겨진다. 뿐만 아니라, 다양한 임상연구에서 친족이나 정상인으로부터 분리한 자연살해세포를 환자에 도입하였을 때 기타 면역세포에 비해 면역거부 반응이 극히 적은 것으로 나타난 바, 세포치료제로서의 활용 가능성을 주목받고 있다.

[0005] 한편, 키메릭항원수용체 (chimeric antigen receptor, CAR)는 면역세포에 항원 특이성을 전달하도록 설계된 인공 수용체로서, 이들은 면역세포를 활성화하고 특이적 면역성을 제공하도록 선택된 항원 특이적 구성요소, 막관통 구성요소, 세포 내 구성요소 등으로 구성된다. 최근에는 이러한 키메릭항원수용체를 코딩하는 유전자를 도입한 세포를 이용한 암 면역요법이 시도되고 있다. 가장 대표적인 면역요법은 환자로부터 T 세포를 채취한 후, 키메릭항원수용체를 코딩하는 유전자를 도입하여 증폭하고, 다시 환자에게 이입하는 요법을 통하여 암을 치료하는 방법, 즉 CAR-T 세포를 이용한 요법이다. 그러나 CAR-T 세포는 뛰어난 항암 효과를 가짐에도 불구하고 사이토카인 방출 신드롬이나 신경독성 등의 부작용이 있으며, 면역거부반응을 방지하기 위해서는 자가유래 T 세포를 이용해야 하는 한계점이 있다. 나아가, 자가유래 CAR-T의 제조공정이 매우 복잡하고, 제조 비용이 상당하며, 여전히 면역부작용의 문제를 갖고 있다는 문제점들이 있다. 이를 극복하기 위해 동종유래 (allogenic)의 off-the-shelf CAR-T에 대한 연구가 진행되고 있으나, 아직까지 상기 문제점들을 해결할 수 있는 CAR-T는 개발되지 않은 실정이다.

[0006] 따라서 최근에는 CAR-T 대비 면역부작용의 위험이 덜하면서, 동종유래 세포치료제 제작이 용이한 자연살해세포 기반 치료제 "CAR-NK"가 주목받고 있다. 자연살해세포는 기타 면역세포와 비교하여 암세포 인지 범위가 보다 넓고, 별도의 유전자 조작 없이도 동종유래 세포 제작이 가능하며, 특히 면역거부 반응 등으로 인한 이식편대숙주질환의 위험이 거의 없기 때문에 자가유래세포뿐만 아니라 동종유래세포를 활용할 수 있다는 이점이 있다. 또한 NK 세포는 T 세포와 달리 off-the-shelf로 제공 가능하고 개별 환자에게 맞춤화할 필요가 없다는 점에서 보다 효율적이며, 나아가 암세포가 항원 (tumor-associated antigens, AACs)의 발현을 줄여 발생하는 CAR-T 내성 암종에도 적용이 가능할 것으로 기대된다.

[0007] 즉, NK 세포를 이용한 CAR-NK 치료제는 대량생산이 가능해 치료제 비용을 절감할 수 있으며, 면역원성이 낮아 고형암 치료제, 사이토카인 부작용 등을 낮출 수 있는 치료제 대안으로 여겨지고 있다. 그러나 현재까지 키메릭항원수용체에 대한 연구는 대부분 T 세포 구성요소에 기반한 것이며, 이를 NK 세포에 적용하기는 어려움이 있다. 따라서, NK 세포의 특성에 맞춤화된 새로운 키메릭항원수용체의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 제10-1755431호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 자연살해세포 특이적 활성화 수용체 도메인들의 특정 조합을 포함하는 키메릭항원수용체가 자연살해세포를 효과적으로 활성화하여 타겟세포 (예컨대, 암세포) 사멸 활성을 증진시킬 수 있음을 확인하여 완성된 것이다.

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 키메릭항원수용체를 발현하는 자연살해세포를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 키메릭항원수용체를 코딩하는 핵산 분자 및/또는 이를 포함하는 발현 벡터를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 발현 벡터로 형질전환된 세포를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 키메릭항원수용체를 발현하는 자연살해세포를 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 키메릭항원수용체를 발현하는 자연살해세포를 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 세포치료제를 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 (S1) 상기 발현 벡터를 단리된 세포에 형질전환하는 단계; 및

[0017] (S2) 상기 (S1) 단계에서 수득한 형질전환 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0018] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0019] 본 발명은 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체로서, (i) 항원 결합 도메인; (ii) CD8 또는 CD28 힌지 도메인; (iii) DAP10 세포내 신호전달 도메인; (iv) 2B4 세포내 신호전달 도메인; 및 (v) CD3z 세포내 신호전달 도메인을 포함하고, 상기 키메릭항원수용체는 자연살해세포에서 발현되는 것을 특징으로 하는, 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체를 제공한다.

[0020] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 항원 결합 도메인은 종양항원 특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0021] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 키메릭항원수용체는 하기 특징 중 하나 이상을 만족할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다:

[0022] (a) 상기 CD8 힌지 도메인은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함함;

[0023] (b) 상기 CD28 힌지 도메인은 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함함;

[0024] (c) 상기 DAP10 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함함;

[0025] (d) 상기 2B4 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함함; 및

[0026] (e) 상기 CD3z 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함함.

[0027] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 키메릭항원수용체는 CD28 막관통 도메인을 더 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0028] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 CD28 막관통 도메인은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0029] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 키메릭항원수용체는 DAP10 세포외 도메인 및 DAP10 막관통 도메인으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 더 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0030] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 키메릭항원수용체는 하기 특징 중 하나 이상을 만족할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다:

[0031] (f) 상기 DAP10 세포외 도메인은 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함함; 및

[0032] (g) 상기 DAP10 막관통 도메인은 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함함.

[0033] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 키메릭항원수용체는 신호 펩티드를 더 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0034] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 신호 펩티드는 CD8 신호 펩티드일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0035] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 종양항원은 CD19, TAG72, IL13Rα2 (Interleukin 13 receptor alpha-2 subunit), CD52, CD33, CD20, TSLPR, CD22, CD30, GD3, CD171, NCAM (Neural cell adhesion molecule), FBP (Folate binding protein), Le(Y) (Lewis-Y antigen), PSCA (Prostate stem cell antigen), PSMA (Prostate-specific membrane antigen), CEA (Carcinoembryonic antigen), HER2 (Human epidermal growth factor receptor 2), Mesothelin, CD44v6 (Hyaluronate receptor variant 6), B7-H3, Glypican-3, ROR1 (receptor tyrosine kinase like orphan receptor 1), Survivin, FOLR1 (folate receptor 1), WT1 (Wilm's tumor 1), VEGFR2 (Vascular endothelial growth factor 2), EGFR, 및 KRAS로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0036] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 항원 결합 단편은 scFv, $(scFv)_2$, Fab, Fab' 및 $F(ab')_2$로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0037] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 종양항원 특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하기의 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다:

[0038] (i) 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 및 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역; 및

[0039] (ii) 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 및 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역.

[0040] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 종양항원 특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0041] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체를 발현하는 자연살해세포를 제공한다. 즉, 본 발명은 상기 키메릭항원수용체를 포함하는 (발현하는) CAR-NK 세포를 제공한다.

[0042] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 자연살해세포는 하기로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 특징을 만족할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다:

[0043] (a) 항원 인식시 MIP-1α, 그랜자임 B, 및 INF-γ로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 분비량이 증가함;

[0044] (b) 항원 인식시 AKT 신호 및 ERK 신호로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 활성이 증가함; 및

[0045] (c) 항원 인식시 탈과립화 수준이 증가함.

[0046] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체를 코딩하는 핵산 분자를 제공한다.

[0047] 또한, 본 발명은 상기 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.

[0048] 또한, 본 발명은 상기 발현 벡터가 도입된, 단리된 세포를 제공한다.

[0049] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체를 발현하는 자연살해세포를 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 바람직하게는, 상기 키메릭항원수용체의 항원 결합 도메인은 종양항원 특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0050] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체를 발현하는 자연살해세포를 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 세포치료제를 제공한다.

[0051] 뿐만 아니라, 본 발명은 상기 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체를 발현하는 자연살해세포를 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0052] 뿐만 아니라, 본 발명은 암의 예방 또는 치료를 위한, 상기 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체, 상기 키메릭항원수용체를 코딩하는 핵산 분자, 상기 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터, 상기 발현 벡터가 도입된 세포, 및/또는 상기 키메릭항원수용체를 발현하는 자연살해세포의 용도를 제공한다.

[0053] 뿐만 아니라, 본 발명은 암 치료용 약제의 제조를 위한, 상기 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체, 상기 키메릭항원수용체를 코딩하는 핵산 분자, 상기 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터, 상기 발현 벡터가 도입된 세포, 및/또는 상기 키메릭항원수용체를 발현하는 자연살해세포의 용도를 제공한다. 상기 약제는 암 치료용 세포치료제일 수 있다.

[0054] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 암은 대장암, 직장암, 결장암, 갑상선암, 구강암, 인두암, 후두암, 자궁경부암, 뇌암, 폐암, 난소암, 방광암, 신장암, 간암, 췌장암, 전립선암, 피부암, 혀암, 유방암, 자궁암, 위암, 골암, 림프종, 혈액암, 편평상피세포암, 폐의 선암, 복막암, 피부암, 피부 흑색종, 안구 흑색종, 직장암, 항문부근암, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 위장암, 교아종, 난소암, 자궁내막암, 침샘암, 음문암, 및 두경부암으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0055] 본 발명은 또한, (S1) 상기 발현 벡터를 단리된 세포에 도입시키는 단계; 및 (S2) 상기 발현 벡터가 도입된 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체의 제조방법을 제공한다.

[0056] 본 발명은 또한, 상기 발현 벡터를 단리된 자연살해세포에 도입시키는 단계를 포함하는, 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체를 발현하는 자연살해세포의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0057] 본 발명은 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체 (NK-CAR) 등에 관한 것으로서, 자연살해세포 특이적 활성화 수용체 유래 도메인들의 특정 조합을 포함하는 NK-CAR가 자연살해세포를 효과적으로 활성화하여 타겟세포에 대한 사멸능을 증진시킬 수 있음을 확인하여 완성된 것이다. 구체적으로, 본 발명자들은 특정 도메인들의 조합으로 이루어진 3가지의 자연살해세포 특이적 CAR를 제조하였으며, 상기 NK-CAR를 발현하는 자연살해세포는 타겟세포에 반응한 사이토카인 및 그랜자임 B의 생성이나 AKT 및 ERK 활성화가 더욱 증진되고, 탈과립화가 촉진되어 더욱 우수한 세포사멸 활성을 발휘하는 것을 확인하였다. 즉, 본 발명에 따른 NK-CAR는 자연살해세포의 활성화를 강력히 유도하여 세포사멸 활성을 증진시킬 수 있으므로, 암을 포함한 다양한 질환의 치료를 위한 면역요법으로 활용될 수 있다. 특히 자연살해세포를 이용한 CAR 기반 항암 치료는 사이토카인 방출 신드롬이나 신경독성 등을 유발하지 않고, 자가 및 동종의 자연살해세포를 이용할 수 있으므로 CAR-T 등에 비해 부작용이 적은 장점이 있다. 따라서 본 발명에 따른 NK-CAR를 발현하는 자연살해세포는 부작용은 낮추면서 질병 치료 효과는 극대화된 세포치료제로 활용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0058] 도 1은 본 발명에 따른 키메릭항원수용체 NK-CAR1, NK-CAR2, NK-CAR3, 및 대조군 2nd generation CAR의 구조를 나타낸다.

도 2a는 본 발명에 따른 NK-CAR 레트로바이러스를 NKL 세포에 감염시킨 후 3일이 지났을 때 GFP 및 NK-CAR 발현 세포의 비율을 유세포분석으로 확인한 결과를 나타낸다.

도 2b는 레트로바이러스 감염 3일 후의 NKL 세포들 중 GFP 발현 세포를 분리하여 배양한 후, 이들 중 GFP 및 NK-CAR 발현 세포의 비율을 유세포분석으로 확인한 결과를 나타낸다.

도 2c는 본 발명에 따른 NK-CAR 레트로바이러스를 NK-92 세포에 감염시킨 후 3일이 지났을 때 GFP 및 NK-CAR 발현 세포의 비율을 유세포분석으로 확인한 결과를 나타낸다.

도 2d는 레트로바이러스 감염 3일 후의 NK-92 세포들 중 GFP 발현 세포를 분리하여 배양한 후, 이들 중 GFP 및 NK-CAR 발현 세포의 비율을 유세포분석으로 확인한 결과를 나타낸다.

도 3a는 공벡터, 대조군 2nd CAR, 또는 본 발명에 따른 NK-CAR 발현 NKL 세포의 CD19 양성 REH 세포주에 대한 세포사멸활성을 Europium assay로 측정한 결과를 나타낸다 (EV: 공벡터, 이하 동일).

도 3b 및 3c는 공벡터, 대조군 2nd CAR, 또는 본 발명에 따른 NK-CAR을 발현하는 NK92 세포의 CD19 양성 REH 세포주 (도 3b) 및 RAMOS 세포주 (도 3c)에 대한 세포사멸활성을 Europium assay로 측정한 결과를 나타낸다.

도 4a 및 4b는 공벡터, 대조군 2nd CAR, 및 본 발명에 따른 CAR-NK 발현 NKL 세포를 각각 CD19 양성 REH 세포주와 공동배양한 후 NKL 세포로부터 분비된 MPI-1α (도 4a) 및 그랜자임 B (도 4b) 수준을 ELISA로 측정한 결과를 나타낸다.

도 5a는 NKL 세포 또는 NK-CAR 발현 NKL 세포를 CD19 양성 REH 세포로 2분 또는 5분간 자극한 후 AKT 및 ERK 신호의 활성화 정도를 웨스턴 블롯으로 확인한 결과를 나타낸다.

도 5b는 NKL 세포 또는 NK-CAR 발현 NKL 세포를 재조합 인간 CD19 Fc 키메라로 2분 또는 5분간 자극한 후 AKT

및 ERK 신호의 활성화 정도를 웨스턴 블롯으로 확인한 결과를 나타낸다.

도 6은 공벡터, 대조군 2nd CAR, 또는 본 발명에 따른 NK-CAR을 발현하는 NK92 세포를 CD19 양성 세포 (REH 또는 Ramos)와 공동배양한 후, NK92 세포의 탈과립화 정도를 측정한 결과를 나타낸다.

도 7은 공벡터, 대조군 2nd CAR, 또는 본 발명에 따른 NK-CAR을 발현하는 NK92 세포를 CD19 양성 세포 (REH 또는 Ramos)와 공동배양한 후, Interferon-γ 양성 NK92 세포의 비율을 측정한 결과를 나타낸다.

도 8은 NK-CAR1의 바람직한 아미노산 서열의 일 예를 나타낸다.

도 9은 NK-CAR2의 바람직한 아미노산 서열의 일 예를 나타낸다.

도 10은 NK-CAR3의 바람직한 아미노산 서열의 일 예를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059] 본 발명은 자연살해세포 (Natural killer cells, NK 세포) 특이적 키메릭항원수용체 (chimeric antigen receptor, CAR) 등에 관한 것으로서, 자연살해세포 특이적 활성화 수용체 도메인들의 특정 조합을 포함하는 키메릭항원수용체가 자연살해세포의 활성화에 효과적이며 암세포 특이적 사멸을 유도할 수 있음을 확인하여 완성된 것이다.

[0060] 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에서는 본 발명에 따른 3가지의 NK-CAR 유전자 및 T 세포 기반 CAR (대조군) 유전자의 레트로바이러스 벡터를 제작하였으며 (실시예 1), 상기 벡터를 도입한 레트로바이러스를 이용하여 자연살해세포 (NKL 세포 및 NK92 세포)에서 키메릭항원수용체를 발현시켰다 (실시예 2).

[0061] 본 발명의 다른 실시예에서는 NK-CAR 발현 NKL 세포 및 NK92 세포의 암세포 사멸 활성을 평가한 결과, NK-CAR 발현 NKL 세포 및 NK92 세포 모두 대조군에 비해 타겟세포 (암세포)의 사멸을 더욱 효과적으로 일으키는 것을 확인하였다 (실시예 3).

[0062] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 NK-CAR 발현 NKL 세포의 사이토카인 분비능을 평가한 결과, NK-CAR 발현 NKL 세포를 타겟세포 (암세포)로 자극하였을 때 대조군에 비해 MIP-1α 및 그랜자임 B의 분비량이 더욱 증가한 것을 확인하였다 (실시예 4).

[0063] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 NK-CAR 발현 NKL 세포의 표적 항원 인식에 따른 AKT 및 ERK 신호 활성화 정도를 평가한 결과, NK-CAR 발현 NKL 세포를 타겟항원 단백질 또는 타겟항원을 발현하는 암세포로 자극하였을 때 대조군에 비해 AKT 및 ERK의 인산화 수준이 더욱 증가한 것을 확인하였다 (실시예 5).

[0064] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 NK-CAR 발현 NK92 세포는 대조군에 비해 타겟항원 인식에 따른 탈과립화 정도가 더욱 높은 것을 확인하였다 (실시예 6).

[0065] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 NK-CAR 발현 NK92 세포는 대조군에 비해 타겟항원 인식에 따른 사이토카인 생성 정도가 더욱 높은 것을 확인하였다 (실시예 7).

[0066] 즉, 본 발명에 따른 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체는 타겟에 반응하여 자연살해세포를 더욱 효과적으로 활성화하며 이의 세포사멸 활성을 증진시킬 수 있는 바, 암을 포함한 다양한 질환의 예방 및 치료를 위한 새로운 면역요법 수단으로 활용될 것으로 기대된다.

[0068] 이하, 본 발명에 대해 구체적으로 설명한다.

[0069] 본 발명은 자연살해세포에서 발현되는 것을 특징으로 하는, 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체를 제공한다.

[0070] 본 발명에 있어서, "키메릭항원수용체 (chimeric antigen receptor, CAR)"는 특정 항원을 표적화 (targeting)할 수 있는 합성 수용체 (synthetic receptors)를 의미한다. 본 발명에 따른 CAR는 항원 결합 도메인 (antigen-binding domain), 막관통 도메인 (transmembrane domain), 및 세포내 신호전달 도메인 (cytoplasmic domain)을 포함하여 수용체의 구조를 이루고 있으며, 바람직하게는 힌지 영역 (hinge region)을 더 포함한다.

[0071] 본 발명에 있어서, "항원 결합 도메인 (antigen-binding domain)"은 표적 항원을 특이적으로 인식하고 결합할 수 있는 단백질 또는 폴리펩티드 도메인을 의미한다. 본 발명에 있어서 "항원 (antigen)"은 항체 등의 체액성 면역 매개체 혹은 T 세포 수용체 (T cell receptors) 등의 세포성 면역 매개체와 특이적으로 결합할 수 있는 폴

리펩티드, 화합물, 또는 기타 물질을 의미한다.

[0072] 본 발명에 따른 항원은 구체적인 종류에 제한되지 않으며, 당업자는 목적에 따라 적절한 항원 및 상기 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인을 적절히 선택할 수 있다. 예컨대, 박테리아 또는 바이러스 등에 의한 감염성 질환을 예방 또는 치료하고자 하는 경우, 상기 박테리아 또는 바이러스 특이적 단백질에 특이적인 항원 결합 도메인을 선택할 수 있다.

[0073] 바람직하게는, 상기 항원은 종양항원 (tumor antigens)이다. 상기 종양항원은 암세포에서만 발현되는 종양특이적 항원 (tumor-specific antigens)은 물론, 정상세포에서도 발현되지만 암세포에서 특히 높은 빈도로 발현되거나 더욱 활성이 높은 종양 관련 항원 (tumor-associated antigens)을 모두 포함한다. 예컨대, 상기 종양항원은 암세포에서만 발현되거나 암세포에서 더 높은 빈도로 발현되는 표면 단백질일 수 있다. 상기 종양항원은 구체적인 종류로 제한되는 것은 아니나, 바람직하게는, CD19, TAG72, IL13Rα2(Interleukin 13 receptor alpha-2 subunit), CD52, CD33, CD20, TSLPR, CD22, CD30, GD3, CD171, NCAM (Neural cell adhesion molecule), FBP (Folate binding protein), Le(Y) (Lewis-Y antigen), PSCA (Prostate stem cell antigen), PSMA (Prostate-specific membrane antigen), CEA (Carcinoembryonic antigen), HER2 (Human epidermal growth factor receptor 2), Mesothelin, CD44v6 (Hyaluronate receptor variant 6), B7-H3, Glypican-3, ROR1 (receptor tyrosine kinase like orphan receptor 1), Survivin, FOLR1 (folate receptor 1), WT1 (Wilm's tumor 1), VEGFR2 (Vascular endothelial growth factor 2), EGFR (Epidermal growth factor receptor), 및 KRAS로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0074] 본 발명에 있어서, "힌지 영역 (hinge region)"은 항원 결합 도메인 및 막관통 도메인 사이에 위치하여 유연한 링커 (linker) 역할을 하는 부위를 의미하며, "스페이서 (spacer)"라고 명명되기도 한다. 상기 힌지 영역은 항원 결합 도메인이 항원과 결합하였을 때 항원 결합 도메인이 적절하게 위치하도록 하여 항원과 안정된 결합을 형성하도록 한다. 예컨대, 상기 힌지 영역은 CAR를 발현하는 세포의 세포막으로부터 항원 결합 도메인을 확장하기 위한 목적을 갖는다.

[0075] 본 발명에 있어서, "막관통 도메인 (transmembrane domain, TM)"은 세포막을 가로질러 세포외 및 세포내 신호전달 도메인을 연결하는 기능을 하는 임의의 폴리펩티드 또는 올리고펩티드를 의미한다. 막관통도메인은 키메릭항원수용체의 항원 결합 도메인이 세포 표면 (세포 외부)에 위치하고, 세포내 신호전달 도메인은 세포 내에 위치할 수 있도록 세포막을 관통할 수 있다. 즉, 상기 막관통 도메인은 키메릭항원수용체의 지지대 역할을 하는 동시에 항원 결합 도메인 (또는 힌지 도메인) 및 세포내 신호전달 도메인을 연결한다.

[0076] 본 발명에 있어서, "세포내 신호전달 도메인 (cytoplasmic domain 또는 cytoplasmic signaling domain, CYP)"은 세포막 안쪽의 폴리펩티드 또는 올리고펩티드를 의미한다. 세포내 신호전달 도메인은 항원 결합 도메인에 의해 전달된 신호를 받아 CAR를 발현하는 세포의 내부로 상기 신호를 전달하는 역할을 한다. 상기 신호는 세포 내부로 전달되어 생물학적 과정의 활성화 또는 억제를 유발한다. 상기 세포내 신호전달 도메인은 항원 결합 도메인이 항원과 결합하였을 때 NK 세포의 활성화를 유도할 수 있는 신호를 전달하는 것이라면 특별히 그 종류에 제한되지 않는다. 본 발명에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 하나 이상의 세포내 공동-자극 도메인 (co-stimulatory domain)을 포함할 수 있다. 상기 공동-자극 도메인은 CAR의 세포외 또는 세포내 부분에 위치하며, CAR를 발현하는 세포에 신호를 전달하는 역할을 수행한다. 즉, 상기 공동-자극 도메인은 타겟항원의 결합에 따른 NK 세포의 충분한 반응 (활성화)을 유도하는데 기여한다. 상기 공동-자극 도메인은, 예컨대 CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, 및/또는 B7-H3 유래 도메인으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0077] 본 발명에 따른 키메릭항원수용체들의 각 도메인들은 선택적으로 짧은 올리고펩티드 또는 폴리펩티드 링커에 의해 연결될 수 있다. 상기 링커는 세포외에 위치한 항원 결합 도메인에 타겟항원이 결합하였을 때, 세포 내 도메인을 통해 NK 세포 활성화를 유도할 수 있는 것이라면 특별히 그 길이나 종류에 제한되지 않으며, 당업계 공지된 링커가 제한 없이 적용될 수 있다.

[0078] 본 발명에 따른 키메릭항원수용체의 각 도메인들은 전술한 각 도메인들은 물론, 상기 도메인들 각각의 변형된 형태를 포함할 수 있다. 이때, 상기 변형은 상기 항체 및 도메인들의 기능을 변형시키지 않고, 야생형의 항체 및 도메인의 아미노산 서열에서 하나 이상의 아미노산을 치환, 결실 또는 추가하여 수행될 수 있다. 통상적으로, 상기 치환은 알라닌이거나, 전체 단백질의 전하, 극성 또는 소수성에 영향을 주지 않는 보존적 아미노산 치환 (conservative amino acid substitution)에 의해 수행될 수 있다.

[0079] 본 발명에 따른 키메릭항원수용체가 발현될 수 있는 면역세포 (T 세포, NK세포, NKT 세포, 대식세포 등)의 종류에는 제한이 없다. 바람직하게는, 본 발명의 CAR는 자연살해세포 특이적 CAR로서, 자연살해세포에서 발현되는 것을 특징으로 한다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 CAR는 자연살해세포 세포막에 위치하는 것을 특징으로 한다. 즉, 본 발명에 따른 CAR은 자연살해세포의 기능 활성화에 특화된 것으로서, 타겟항원과 결합하면 자연살해세포의 타겟세포 사멸 기능을 발동시키는 신호전달 경로 (signaling pathway)를 활성화시켜, 결과적으로 자연살해세포가 타겟세포를 특이적으로 사멸시키도록 유도한다. 본 발명에 따른 키메릭항원수용체는 투여 대상의 자가유래세포뿐만 아니라 동종유래세포에서도 발현될 수 있다.

[0080] 본 발명에 따른 키메릭항원수용체의 힌지 도메인은 CD8, CD28, IgG1, IgG4, 및/또는 KIR (killer immunoglobulin-like receptor) 유래 도메인일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니고, 당업계에서 통상적으로 사용되는 힌지 도메인을 제한 없이 적용할 수 있다.

[0081] 바람직하게는, 본 발명에 있어서 상기 힌지 도메인은 CD8 (바람직하게는, CD8α) 힌지 도메인일 수 있다. 바람직하게는, 상기 CD8 힌지 도메인은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 더욱 바람직하게는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어질 수 있으나 이에 제한되지 않으며, 상기 아미노산 서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 즉, 상기 CD8 힌지 도메인은 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0082] 또는, 본 발명에 있어서 키메릭항원수용체의 힌지 도메인은 CD28 힌지 도메인일 수 있다. 바람직하게는, 상기 CD28 힌지 도메인은 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드에 의해 코딩될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 즉, 상기 CD28 힌지 도메인은 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0083] 본 발명에 따른 키메릭항원수용체의 세포내 신호전달 도메인은 DAP10, 2B4, 및/또는 CD3z 유래 도메인일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니고, 타겟항원 자극에 의해 NK 세포를 활성화시키는 신호를 전달할 수 있는 것이라면 제한 없이 적용될 수 있다.

[0084] 본 발명에 있어서 상기 DAP10 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드에 의해 코딩될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 즉, 상기 DAP10 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0085] 또한, 본 발명에 있어서 상기 2B4 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 8의 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 8의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드에 의해 코딩될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 즉, 상기 2B4 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0086] 또한, 본 발명에 있어서 상기 CD3z (CD3ζ) 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 9의 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드에 의해 코딩될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 즉, 상기 CD3z 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0087] 바람직하게는, 본 발명에 따른 키메릭항원수용체는 CD28 막관통 도메인을 더 포함할 수 있다. 또한 상기 CD28 막관통 도메인은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드에 의해 코딩될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 즉, 상기 CD28 막관통 도메인은 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0088] 바람직하게는, 본 발명에 따른 키메릭항원수용체는 DAP10 세포외 도메인을 더 포함할 수 있다. 또한 상기 DAP10 세포외 도메인은 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드에 의해 코딩될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 즉, 상기 DAP10 세포외 도메인은 서열번호 5로 표시되는

아미노산 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0089] 바람직하게는, 본 발명에 따른 키메릭항원수용체는 DAP10 막관통 도메인을 더 포함할 수 있다. 또한 상기 DAP10 막관통 도메인은 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드에 의해 코딩될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 즉, 상기 DAP10 막관통 도메인은 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0090] 바람직하게는, 본 발명에 따른 키메릭항원수용체는 신호 펩티드를 더 포함할 수 있다. 본 발명에 있어서 "신호 펩티드 (signal peptide)"는 단백질의 N-말단에 위치하는 아미노산 배열로서, 새롭게 합성된 단백질이 소포체 (endoplasmic reticulum, ER) 등 특정 위치로 이동하도록 유도하는 역할을 한다. 본 발명에 있어서 신호 펩티드는, 예를 들면, CD8 (CD8α), GM-CSF 수용체α, Ig-κ, 및 IgG1 중쇄 등으로부터 선택된 분자에서 유래된 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는, 본 발명에 있어서, 신호 펩티드는 CD8 신호 펩티드일 수 있다. 또한 상기 CD8 신호 펩티드는 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드에 의해 코딩될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 즉, 상기 DAP10 막관통 도메인은 서열번호 10으로 표시되는 아미노산 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 신호 펩티드는 바람직하게는 재조합 단백질 (CAR)의 N 말단에 위치하는 것으로서 상기 단백질을 세포 표면으로 이동시키기 위해 사용되며, 재조합 단백질이 발현될 때 서열 일부가 잘려나가 일부 아미노산만이 남을 수도 있고, 또는 서열 전부가 잘려나가 신호 펩티드 서열 부위가 존재하지 않을 수 있다.

[0091] 바람직하게는, 상기 항원 결합 도메인은 상기 항원 특이적 항체 또는 이의 단편 (바람직하게는, 상기 항체의 항원 결합 단편)이다. 본 발명의 일 구현예에서, 상기 항원 결합 도메인은 종양항원에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인으로서, 종양항원 특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0092] 본 발명에 있어서, "항체 (antibody)"란 면역학적으로 특정 항원 (에피토프)과 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 의미하며, 다클론 항체 (polyclonal antibody), 단클론 항체 (monoclonal antibody) 및 이의 기능적인 단편 (fragment)를 모두 포함한다. 또한, 상기 용어는 키메라성 항체 (예를 들면, 인간화 뮤린 항체) 및 이종결합 항체 (예를 들면, 양특이성 항체)와 같은 유전공학에 의해 생산된 형태를 포함할 수 있다. 상기 항체는 구성 중쇄 (heavy chain) 및/또는 경쇄 (light chain)의 가변 영역 (variable region)을 포함한다 (VH, 중쇄 가변영역; VL, 경쇄 가변영역). 상기 가변 영역은 1차 구조로서 항체 분자의 항원 결합 부위를 형성하는 부분을 포함하며, 본 발명의 항체는 상기 가변 영역을 포함하는 일부 단편으로 구성될 수 있다.

[0093] 상기 용어 "에피토프"는 항체가 특이적으로 결합하는 항원 분자 내의 특정한 입체분자구조를 의미한다.

[0094] 본 발명에 있어서, 항체의 "단편 (fragments)"이란 항체의 항원 결합 기능을 보유하고 있는 (기능성) 단편을 의미하며, 바람직하게는 상기 항체의 항원 결합 단편이다. 상기 단편은 scFv, $(scFv)_2$, Fab, Fab' 및 $F(ab')_2$ 뿐만 아니라 나노바디 단편 등을 포함하는 의미로 사용된다. 상기 단편들의 정의는 당업계에 잘 알려져 있다. 바람직하게는, 상기 항원 결합 단편은 scFv이다.

[0095] 항체 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변영역 및 중쇄의 첫번째 불변영역 (CH1)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역 (hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')2 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역만을 가지고 있는 최소의 항체조각이다. 이중쇄 Fv (two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역이 연결되어 있다. 단쇄 Fv (single-chain Fv: scFv)는 일반적으로 펩티드 링커를 통하여 중쇄의 가변영역과 경쇄의 가변영역이 공유결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다.

[0096] 보다 구체적으로, "단일쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 경쇄 및 중쇄의 가변 영역을 15개 내외의 아미노산이 연결된 펩타이드 서열로 이루어진 링커 (linker)로 연결한 단백질을 의미한다. 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 쇄 (chain) 내에 존재한다. Fv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위해 목적하는 구조를 형성할 수 있도록 VH 도메인 및 VL 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 추가로 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어, "Fv" 단편은 완전한 항체 인식 및 결합 부위를 함유하는 항체 단편이다. 이러한 영역은 1개의 중쇄 가변 도메인

과 1개의 경쇄 가변 도메인이, 예를 들어 scFv로 단단하게 사실상 공유적으로 연합된 이량체로 이루어진다.

[0097] 항체는 가변영역의 서열 변화에 따라 항원 특이성이 나타나게 된다. 항원 결합 부위의 가변영역은 가변성이 적은 구조 영역 (Framework region: FR)과 가변성이 큰 상보성 결정 영역 (Complementarity determining region: CDR)으로 나눠지고, 중쇄와 경쇄 모두 CDR1, 2, 및 3으로 나뉘어지는 3개의 CDR 부위와, 4개의 FR 부위를 가진다. 상기 상보성 결정 영역은 항체의 가변영역 중에서 항원과의 결합 특이성을 부여하는 부위이다. 각각의 사슬의 CDR은 전형적으로 N-말단으로부터 시작하여 순차적으로 CDR1, CDR2, CDR3로 명명되고, 또한 특정 CDR이 위치하고 있는 사슬에 의해서 식별된다.

[0098] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명에 따른 종양항원 특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하기의 중쇄 가변영역 및/또는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다:

[0099] (i) 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR1, 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR2, 및/또는 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR3를 포함하는 중쇄 가변영역; 및

[0100] (ii) 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR1, 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR2, 및/또는 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR3를 포함하는 경쇄 가변영역.

[0101] 본 발명에 상기 CDR들은 이의 생물학적 균등물을 포함할 수 있다. 즉, 각 CDR은 상기 표기된 아미노산 서열과 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0102] 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명에 따른 종양항원 특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하거나, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드에 의해 코딩될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 즉, 상기 항체 또는 이의 단편은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 가장 바람직하게는, 상기종양항원 특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편 항-CD19 항체 또는 이의 scFv 단편일 수 있다.

[0103] 본 발명에 따른 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체는 항원 결합 도메인, CD8 도메인, CD28 도메인, DAP10 도메인, 2B4 도메인, 및/또는 CD3z 도메인의 조합을 포함할 수 있다. 더 구체적으로, 본 발명에 따른 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체는 항원 결합 도메인, CD8 또는 CD28 힌지 도메인, DAP10 세포내 신호전달 도메인, 2B4 세포내 신호전달 도메인, 및 CD3z 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 키메릭항원수용체는 CD28 막관통 도메인을 더 포함할 수 있다. DAP10 세포외 도메인 및 DAP10 막관통 도메인으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 더 포함할 수 있다.

[0104] 본 발명의 바람직한 구현예에서, 상기 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체는 항원 결합 도메인, CD8 도메인, DAP10 도메인, 2B4 도메인, 및 CD3z 도메인의 조합을 포함하거나; 항원 결합 도메인, CD28 도메인, DAP10 도메인, 2B4 도메인, 및 CD3z의 조합을 포함하거나; 항원 결합 도메인, CD8 도메인, CD28 도메인, DAP10 도메인, 2B4 도메인, 및 CD3z 도메인의 조합을 포함할 수 있다.

[0105] 본 발명의 더욱 바람직한 구현예에서, 상기 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체는 항원 결합 도메인, CD8 힌지 도메인, DAP10 세포외 도메인, DAP10 막관통 도메인, DAP10 세포내 신호전달 도메인, 2B4 세포내 신호전달 도메인, 및 CD3z 세포내 신호전달 도메인을 순차적으로 포함할 수 있다 (NK-CAR1). 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체는 항원 결합 도메인, CD28 힌지 도메인, DAP10 세포외 도메인, DAP10 막관통 도메인, DAP10 세포내 신호전달 도메인, 2B4 세포내 신호전달 도메인, 및 CD3z 세포내 신호전달 도메인을 순차적으로 포함할 수 있다 (NK-CAR2). 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체는 항원 결합 도메인, CD8 힌지 도메인, CD28 막관통 도메인, DAP10 세포내 신호전달 도메인, 2B4 세포내 신호전달 도메인, 및 CD3z 세포내 신호전달 도메인을 순차적으로 포함할 수 있다 (NK-CAR3).

[0106] 본 발명에 따른 키메릭항원수용체는 전술한 폴리펩티드 도메인은 물론, 이들의 생물학적 균등물을 포함할 수도 있다. 예를 들면, 키메릭항원수용체의 항원 인식 능력 및/또는 세포내 신호전달 능력 등을 더욱 개선하기 위해 각 도메인의 아미노산 서열에 추가적인 변화를 줄 수 있다.

[0107] 또한, 바람직하게는, 본 발명에 따른 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체는 서열번호 23 내지 25 중 어느 하나로 표시된 아미노산 서열과 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0108] 본 명세서에서 특정 서열로 표시된 폴리펩티드 (혹은 핵산 분자)는 해당 서열뿐만 아니라 이의 생물학적 균등물을 포함할 수 있다. 즉, 폴리펩티드 (핵산 분자)의 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 일 양상의 폴리펩티드 (또는 핵산 분자)는 서열번호에 기재된 서열과 실질적인 동일성 (substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 구체적으로, 특정 서열번호로 표시되는 아미노산 서열 (뉴클레오티드 서열)을 포함하는 폴리펩티드 (핵산 분자)는 해당 아미노산 서열 (뉴클레오티드 서열)에만 제한되지 않으며, 상기 아미노산 서열 (뉴클레오티드 서열)의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 본 발명의 특정 서열번호로 표시되는 아미노산 서열 (뉴클레오티드 서열)로 이루어진 폴리펩티드 분자 (핵산 분자)란, 이를 구성하는 폴리펩티드 분자 (핵산 분자)의 작용성 등가물, 예를 들어, 폴리펩티드 분자 (핵산 분자)의 일부 아미노산 서열 (뉴클레오티드 서열)이 결실 (deletion), 치환 (substitution) 또는 삽입 (insertion)에 의해 변형되었지만, 해당 폴리펩티드 (핵산 분자)와 기능적으로 동일한 작용을 할 수 있는 변이체 (variants)를 포함하는 개념이다. 구체적으로, 본 발명에 개시된 폴리펩티드 (핵산 분자)는 특정 서열번호로 표시되는 아미노산 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열 (뉴클레오티드 서열)을 포함할 수 있다. 예를 들면, 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%, 100%의 서열 상동성을 갖는 폴리펩티드 (핵산 분자)를 포함한다. 폴리펩티드 (핵산 분자)에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리펩티드 서열 (뉴클레오티드 서열)의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[0109] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체를 발현하는 세포를 제공한다. 상기 세포는 *in vitro* 또는 *in vivo* 세포일 수 있으며, 상기 세포를 필요로 하는 개체의 자가유래세포 (autologous cells) 및/또는 동종유래세포 (즉, 동종이계세포 (allogeneic cells))이거나, 이의 이종세포 (xenogenic cells)로 제조된 것 (혹은 유래한 것)일 수 있다. 바람직하게는, 상기 세포는 이를 필요로 하는 개체의 자가유래세포 및/또는 동조유래세포로 제조된 것일 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에서, 상기 세포는 이의 세포막에서 상기 키메릭항원수용체를 발현한다. 상기 세포는 T 세포, NK세포, NKT 세포, 대식세포 등과 같은 면역세포일 수 있다. 바람직하게는, 상기 세포는 자연살해세포이다. 즉, 본 발명은 본 발명에 따른 키메릭항원수용체를 발현하는, CAR-NK 세포를 제공한다. NK 세포는 면역세포들 중에서도 가장 즉각적이고 강력한 살상능력을 지닌 점에서, 본 발명의 CAR-NK 세포는 암 등의 질환 치료에 있어 강력한 면역요법이 될 수 있다.

[0110] 본 발명에 있어서, "자연살해세포 (natural killer cells, NK cells)"는 골수에서 유래하는 세포독성 림프구의 한 종류이다. 자연살해세포는 전체 림프구의 5 내지 20 %를 차지하며 선천성 면역을 담당하는데, 표면에 major histocompatibility complex 또는 항체가 없지만 바이러스 감염 세포, 암세포, 기타 변형된 세포에 대해 즉각적인 면역 반응을 제공하는 것을 특징으로 한다. 상기 자연살해세포는 개체로부터 분리된 자연살해세포는 물론 이로부터 배양되거나 변형된 자연살해세포를 포함하며, 상업적으로 이용 가능한 자연살해세포주도 이용 가능하다. 즉, 본 발명의 자연살해세포 세포는 구체적인 종류에 제한되지 않고, 자연살해세포와 동일하거나 유사한 분자적 특성 및 생물학적 활성을 가지면 충분하다. 일 구현예에서, 상기 자연살해세포는 예를 들면 HANK1, NKL, NK92, NK-YS, YT, NOI-90, 및 NK101 등으로부터 선택될 수 있으나, 이는 예시일 뿐, 이에 한정되지 않는다. 본 발명에 따른 키메릭항원수용체를 발현하는 자연살해세포는 CAR-NK 세포 (Chimeric antigen receptor natural killer cell)일 수 있다.

[0111] 본 발명에 따른 키메릭항원수용체를 발현하는 자연살해세포는, 상기 수용체를 통해 타겟을 인식하였을 때 해당 키메릭항원수용체를 발현하지 않는 자연살해세포에 비해 더욱 신속하게, 혹은 더욱 높은 수준으로 활성화될 수 있으며, 타겟세포를 더욱 신속하게, 혹은 효과적으로 사멸시킬 수 있는 것을 특징으로 한다.

[0112] 예컨대, 본 발명에 따른 키메릭항원수용체를 발현하는 자연살해세포는 타겟항원 인식시 사이토카인의 생성 및/또는 분비가 증가하는 것을 특징으로 할 수 있다. 즉, 본 발명의 NK-CAR를 발현하는 자연살해세포는 타겟 인식시 상기 NK-CAR을 발현하지 않는 자연살해세포에 비해 사이토카인의 생성 및/또는 분비의 정도가 더 높을 수 있다. 바람직하게는, 상기 사이토카인은 활성화된 자연살해세포로부터 분비되어 타겟세포의 사멸을 유도하는 것이다. 바람직하게는, 상기 사이토카인은 암세포의 성장, 증식, 이동, 및/또는 전이 등을 억제하여 항암 효과를 유도할 수 있는 사이토카인이다. 상기 사이토카인은 구체적인 종류로 제한되는 것은 아니나, 바람직하게는 MIP-1α (대식세포염증단백질-1α; Macrophage inflammatory protein-1α) 및/또는 Interferon-γ (인터페론-γ, IFN-γ) 일 수 있다. 그러나 당업자라면 상기 언급한 사이토카인 외에도 자연살해세포의 세포사멸 매커니즘과 관련된 사이토카인이라면 모두 포함될 수 있음을 인식할 것이다.

[0113] 본 발명에 따른 키메릭항원수용체를 발현하는 자연살해세포는 타겟항원 인식시 그랜자임 (Granzyme)의 생성 및/또는 분비가 증가하는 것을 특징으로 할 수 있다. 즉, 본 발명의 NK-CAR를 발현하는 자연살해세포는 타겟 인식시 상기 NK-CAR을 발현하지 않는 자연살해세포에 비해 그랜자임의 생성 및/또는 분비의 정도가 더 높을 수 있다. 상기 그랜자임은 그랜자임 A 및 B를 모두 포함한다.

[0114] 또한, 본 발명에 따른 자연살해세포는 타겟항원 인식시 자연살해세포의 활성화 및/또는 타겟세포 사멸능과 관련된 신호전달경로의 활성이 증가하는 것을 특징으로 할 수 있다. 바람직하게는, 상기 신호전달경로는 자연살해세포의 항암활성과 관련된 신호전달경로이다 (즉, 암세포의 사멸 또는 성장 억제 등을 위한 신호전달경로). 즉, 본 발명의 NK-CAR를 발현하는 자연살해세포는 타겟 인식시 상기 NK-CAR을 발현하지 않는 자연살해세포에 비해 상기 신호전달경로의 활성이 더 높을 수 있다. 상기 신호전달경로의 대표적인 예로는 AKT 신호전달 경로 및 ERK 신호전달 경로가 있다. 즉, 본 발명에 따른 키메릭항원수용체를 발현하는 자연살해세포는 상기 수용체가 표적 항원을 인식하였을 때 세포 내의 AKT 및/또는 ERK의 인산화가 증가하여 AKT 및/또는 ERK 신호전달 경로가 활성화될 수 있다.

[0115] 또한, 본 발명에 따른 키메릭항원수용체를 발현하는 자연살해세포는 타겟항원 인식시 탈과립화 (degranulation)의 정도 (수준)가 증가하는 것을 특징으로 할 수 있다. 즉, 본 발명의 NK-CAR를 발현하는 자연살해세포는 타겟 인식시 상기 NK-CAR을 발현하지 않는 자연살해세포에 비해 탈과립화가 더욱 활발히 일어날 수 있다. 이의 증거로, 본 발명에 따른 키메릭항원수용체를 발현하는 자연살해세포는 타겟 인식시 상기 키메릭항원수용체를 발현하지 않는 자연살해세포에 비해 CD107a의 수준이 더욱 증가할 수 있다.

[0116] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체를 코딩하는 핵산 분자 (즉, 폴리뉴클레오티드)를 제공한다.

[0117] 본 명세서에서 사용된 용어 "폴리뉴클레오티드"는 디옥시리보핵산 (DNA) 및 리보핵산 (RNA)을 포함한, 일반적으로 인산이에스테르 결합에 의해 서로 결합된 2 이상의 연결된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체를 포함하는 올리고머 또는 폴리머를 나타낸다. 폴리뉴클레오티드는 또한 예를 들면 뉴클레오티드 유사체, 또는 인산이에스테르 결합 이외의 "골격" 결합, 예를 들면 인산삼에스테르 결합, 포스포르아미데이트 결합, 포스포로티오에이트 결합, 티오에스테르 결합 또는 펩타이드 결합 (펩타이드 핵산)을 포함하는 DNA 및 RNA 유도체를 포함한다. 폴리뉴클레오티드는 단일-가닥 및/또는 이중-가닥 폴리뉴클레오티드, 예를 들면 디옥시리보핵산 (DNA) 및 리보핵산 (RNA)뿐만 아니라 RNA 또는 DNA 중 어느 하나의 유사체들을 포함한다.

[0118] 즉, 본 발명에 따른 핵산 분자는 본 발명에 따른 키메릭항원수용체를 구성하는 도메인들을 코딩하는 유전자를 포함한다. 상기 각 유전자들은 서로의 N 또는 C 말단에 직접 연결될 수도 있고, 링커 서열을 통해 연결될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 핵산 분자는 서열번호 11 내지 22로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 염기서열을 포함할 수 있다. 상술한 폴리펩티드와 마찬가지로, 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드는 이의 작용성 등가물을 포함한다. 따라서, 본 발명에 따른 핵산 분자는 서열번호 11 내지 22로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 염기서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다.

[0119] 구체적으로, 본 발명에 따른 핵산 분자에서 CD8 힌지 도메인을 코딩하는 부위는 서열번호 12 또는 13으로 표시된 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, CD28 힌지 도메인을 코딩하는 부위는 서열번호 14로 표시된 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, CD28 막관통 도메인을 코딩하는 부위는 서열번호 15로 표시된 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, DAP10 세포외 도메인, 막관통 도메인, 및 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 부위는 각각 순서대로 서열번호 16, 서열번호 17, 및 서열번호 18로 표시된 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 2B4 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 19로 표시된 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, CD3z 세포내 신호전달 도메인은 서열번호 20으로 표시된 염기서열을 포함할 수 있다.

[0120] 당업자는 목적에 따라 적절한 항원 결합 도메인-코딩 유전자를 선택할 수 있다. 예컨대, 상기 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체가 항암치료를 위한 것인 경우, 당업자는 당업계에 알려진 종양항원 특이적 항체 또는 이의 단편을 코딩하는 유전자를 활용할 수 있고, 혹은 새롭게 제작한 유전자 서열을 사용할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서, 상기 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체의 핵산 분자는 CD-19 특이적 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 단편을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 폴리뉴클레오티드 또는 이의 단편은 서열번호 11의 염기서열을 포함할 수 있다.

[0121] 이 밖에도, 본 발명에 따른 핵산 분자는 CD8 신호 펩타이드를 코딩하는 부위 (바람직하게는, 서열번호 21의 염

기서열을 포함함)를 포함할 수 있다.

[0122] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 즉, 본 발명은 본 발명에 따른 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0123] 본 발명에 있어서, "재조합 벡터 (recombinant vector)"란 벡터 내에 삽입된 이종의 핵산에 의해 코딩되는 펩타이드 또는 단백질을 발현할 수 있는 벡터를 지칭하는 것으로, 바람직하게는 목적 단백질 (본 발명에서는, NK 특이적 CAR)을 발현할 수 있도록 제조된 벡터를 의미한다. 상기 "벡터"는 시험관 내, 생체 왜 또는 생체 내에서 숙주 세포로 염기의 도입 및/또는 전이를 위한 임의의 매개물을 말하며, 다른 DNA 단편이 결합하여 결합된 단편의 복제를 가져올 수 있는 복제단위 (replicon)일 수 있으며, "복제 단위"란 생체 내에서 DNA 복제의 자가 유닛으로서 기능하는, 즉, 스스로의 조절에 의해 복제 가능한, 임의의 유전적 단위 (예를 들면, 플라스미드, 파지, 코스미드, 염색체, 바이러스 등)를 말한다.

[0124] 본 발명에 따른 벡터는 선형 DNA, 플라스미드 DNA 또는 재조합 바이러스성 벡터일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 상기 재조합 바이러스성 벡터는, 예를 들어, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터 및 박테리오파지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터를 포함한다. 바람직하게는, 상기 벡터는 레트로바이러스 벡터이다. 본 발명자들은 구체적인 실시예에서 pMXs-IRES-GFP 레트로바이러스 벡터를 사용하였다.

[0125] 본 발명의 재조합 벡터는 바람직하게는 RNA 중합효소가 결합하는 전사 개시 인자인 프로모터 (promoter), 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보좀 결합 부위를 코딩하는 서열과 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열, 터미네이터 등을 포함할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 폴리히스티딘 태그 (최소 5개 이상의 히스티딘 잔기로 구성된 아미노산 모티프), 신호 펩타이드 (signal peptide) 유전자, 소포체 잔류 신호 펩타이드 (endoplasmic reticulum retention signal peptide), 클로닝 사이트 (cloning site) 등을 추가로 포함할 수 있고, 태그용 유전자, 형질전환체를 선별하기 위한 항생제 내성 유전자 등의 선별용 마커 유전자 등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 재조합 벡터에서 상기 각 유전자들의 폴리뉴클레오티드 서열은 프로모터에 작동적으로 연결된다. 본 명세서에서 사용된 용어 "작동적으로 연결된 (operatively linked)"은 프로모터 서열과 같은 뉴클레오티드 발현 조절 서열과 다른 뉴클레오티드 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 뉴클레오티드 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.

[0126] 상기 재조합 벡터는 원핵세포 또는 진핵세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예를 들어, pLλ프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, tac 프로모터, T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 리보좀 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 진핵세포를 숙주로 하는 경우, 벡터가 진핵세포에서 작동하는 복제원점은 f1 복제원점, SV40 복제원점, pMB1 복제원점, 아데노 복제원점, AAV 복제원점 및 BBV 복제원점 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 tk 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.

[0127] 상기 태그용 유전자로는, 대표적으로 Avi 태그, Calmodulin 태그, polyglutamate 태그, E 태그, FLAG 태그, HA 태그, His 태그 (폴리히스티딘 태그), Myc 태그, S 태그, SBP 태그, IgG-Fc 태그, CTB 태그, Softag 1 태그, Softag 3 태그, Strep 태그, TC 태그, V5 태그, VSV 태그, Xpress 태그 등이 포함될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 벡터는 myc 태그를 포함할 수 있다. 더욱 바람직하게는, 상기 myc 태그는 서열번호 22의 염기서열을 포함하는 것일 수 있다.

[0128] 본 발명에 있어서, 상기 핵산 또는 상기 벡터는 바이러스 생산세포, 즉, 패키징 세포 (packaging cell line)에 형질주입 또는 트랜스펙션 (transfection)될 수 있다. "형질주입" 또는 "트랜스펙션"시키기 위해 원핵 또는 진핵 숙주세포 내로 외인성 핵산 (DNA 또는 RNA)을 도입하는 데에 통상 사용되는 여러 종류의 다양한 기술, 예를 들어 전기 영동법, 인산칼슘 침전법, DEAE-덱스트란 트랜스펙션 또는 리포펙션(lipofection) 등을 사용할 수 있다. 본 발명에 따른 목적 유전자 (자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체 코딩 핵산 분자)를 포함하는 바이러스는 상기 패키징 세포주 내에서 증식하여 세포 외로 방출될 수 있으며, 상기 바이러스는 목적세포 (즉, 본 발명의 NK-CAR를 최종적으로 발현시키고자 하는 세포, 예컨대 NK cells)에 트랜스덕션 (transduction)될 수 있다. 세포 내로 "트랜스덕션"된 바이러스의 핵산은 세포의 게놈에 삽입되거나 혹은 삽입되지 않은 채로 목적 단백질 (자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체)을 생산하는 데 사용된다.

[0129] 본 발명은 본 발명에 따른 발현 벡터가 도입된 (형질전환, 형질감염, 형질주입 등), 단리된 세포를 제공할 수 있다. 여기서의 세포는 최종적으로 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체를 발현하는 세포가 아닌, 상기 발현 벡터를 증식 (증폭)하기 위한 세포를 의미한다. 즉, 상기 세포는 전술한 핵산 분자 또는 발현 벡터가 직접 형질도입/형질전환/형질감염된 숙주세포를 나타낸다. 예컨대, 상기 발현 벡터가 바이러스 벡터인 경우, 상기 세포는 상기 바이러스 벡터를 포함하는 바이러스를 생성하기 위한 패키징 세포일 수 있다. 적합한 숙주의 선택은 본원의 시사내용으로부터 당업계의 통상의 기술자에게 자명한 것으로 여겨진다.

[0130] 또한, 본 발명은 (S1) 본 발명에 따른 발현 벡터를 세포에 도입시키는 단계; 및 (S2) 상기 발현벡터가 도입된 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체의 제조방법을 제공한다.

[0131] 상기 (S1) 단계는 숙주세포를 이용하여 본 발명의 발현 벡터를 증폭시키거나, 상기 벡터를 발현시키기 위해 숙주세포에 상기 발현 벡터를 도입하는 단계이다. 즉, 상기 발현 벡터를 적절한 숙주세포에 도입 (형질전환, 형질주입, 형질감염 등) 시켜, 세포 내부에서 발현 벡터가 복제되거나, 상기 발현 벡터로부터 단백질 등이 발현되도록 유도하거나, (바이러스성 벡터를 이용하는 경우) 상기 발현 벡터를 포함하는 바이러스가 생성되도록 유도할 수 있다. 상기 (S1) 단계는 사용되는 벡터 및 세포의 종류에 따라 당업자가 적절히 수행할 수 있다. 예컨대, 상기 발현 벡터가 바이러스성 벡터인 경우, 상기 발현 벡터를 숙주세포에 형질주입하여 도입시킬 수 있다.

[0132] 상기 (S2) 단계는 세포 내로 도입된 목적 유전자가 세포 내에서 충분히 증폭 혹은 발현되도록 세포를 배양하는 단계를 의미한다. 상기 배양은, 상기 발현 벡터가 숙주세포 내로 도입된 후, 상기 발현 벡터가 숙주세포 내에서 목적 단백질이 발현되게 하기에 충분한 기간 동안 (혹은, 발현 벡터가 복제되기에 충분한 기간이나 목적 유전자를 포함하는 바이러스가 생성되기에 충분한 기간 동안) 이루어질 수 있다. 더 바람직하게는, 상기 배양은, 숙주세포가 배양되는 배양 배지 내로 상기 단백질이 분비되게 하기에 충분한 기간 동안 (혹은, 목적 유전자를 포함하는 바이러스가 세포 외부로 방출되기에 충분한 기간 동안) 이루어질 수 있다.

[0133] 상기 방법은 상기 (S2) 단계 후 상기 세포로부터 생성된 (또는 증폭된) 자연살해세포 키메릭항원수용체, 이를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터, 또는 상기 발현 벡터를 포함하는 바이러스를 수득하는 단계를 더 포함할 수 있다. 숙주세포에서 생산된 키메릭항원수용체, 발현 벡터, 또는 바이러스의 특성, 숙주세포의 특성, 발현 방식, 또는 키메릭항원수용체/발현 벡터/바이러스의 표적화 여부 등을 고려하여 수득 방법을 적절히 선택 및 조절할 수 있다. 필요에 따라 세포 내 특정 소기관이나 세포질에 존재하는 키메릭항원수용체/발현 벡터/바이러스를 세포 외부로 방출하여 회수하기 위하여 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 기능적 구조에 영향을 미치지 않는 범위에서 세포를 용해시킬 수도 있다. 또한, 상기 발현 벡터를 포함하는 바이러스는 숙주세포를 배양한 배지를 수득하고, 원심분리하여 불순물을 제거하는 등의 방법으로 항체를 회수할 수 있다.

[0134] 수득한 키메릭항원수용체/발현 벡터/바이러스는 크로마토그래피, 필터 등에 의한 여과, 투석 등의 방법을 통해 불순물을 더욱 제거하고 농축하는 과정을 추가로 거칠 수 있다. 수득한 키메릭항원수용체의 분리 또는 정제는 통상의 단백질에서 사용되고 있는 분리, 정제 방법, 예를 들어 크로마토그래피에 의해 수행될 수 있다. 상기 크로마토그래피는 예를 들어, 단백질 A 컬럼, 단백질 G 컬럼, 단백질 L 컬럼을 포함하는 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피 또는 소수성 크로마토그래피를 포함할 수 있다. 상기 크로마토그래피 이외에, 추가로 여과, 초여과, 염석, 투석 등을 조합함으로써 상기 키메릭항원수용체를 분리, 정제할 수 있다. 바이러스의 분리 또는 정제는 배지를 다공성 필터로 여과하여 불순물을 제거하고, 농축시킬 수 있다.

[0135] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터를 자연살해세포에 도입시키는 단계를 포함하는, 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체를 발현하는 자연살해세포의 제조방법을 제공한다. 즉, 본 발명은 본 발명에 따른 키메릭항원수용체를 포함하는 CAR-NK 세포의 제조방법을 제공한다. 상기 발현 벡터는 전술한 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체의 제조방법을 통해 증폭된 발현 벡터일 수 있다. 상기 발현 벡터는 그 자체가 자연살해세포에 도입될 수도 있으나, 바이러스에 포함된 형태로 도입될 수도 있다. 당업자는 발현 벡터 및 자연살해세포의 종류에 따라 적절한 도입 방법을 선택할 수 있다. 예컨대, 상기 발현 벡터가 바이러스성 벡터인 경우, 상기 발현 벡터를 포함하는 바이러스를 자연살해세포에 감염시켜 상기 벡터를 세포 내로 도입시킬 수 있다 (트랜스덕션). 세포 내로 트랜스덕션된 바이러스의 핵산은 자연살해세포의 게놈 내에 삽입되거나, 삽입되지 않은 채로 발현될 수 있으며, 이로부터 본 발명의 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체가 발현될 수 있다.

[0136] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체를 발현하는 자연살해세포; 상기 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터; 및/또는 상기 발현 벡터를 포함하는 세포를 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 여기서, 상기 자연살해

세포 특이적 키메릭항원수용체의 항원 결합 도메인은 종양항원에 특이적으로 결합하는 항원 결합 도메인인 것을 특징으로 한다. 상기 자연살해세포는, 상기 조성물의 투여 대상이 되는 개체의 자가유래세포 또는 동종유래세포일 수 있다.

[0137] 본 발명에 있어서, "암 (cancer)"은 "종양 (tumor)"과 동일한 의미로 사용되며, 전형적으로 통제되지 않는 세포 성장 내지 증식을 특징으로 하는 상태를 지칭한다. 본 발명에 따른 키메릭항원수용체를 이용하여 예방 또는 치료할 수 있는 암은 고형 종양 및 비-고형 종양 (예를 들어, 혈액암 등)을 포함한다. 또한, 본 발명에 있어서 암의 유형에는 암종, 아세포종, 및 육종, 및 특정 백혈병 또는 림프성 악성 종양, 양성 및 악성 종양, 예를 들어, 육종, 암종 및 흑색종을 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0138] 본 발명의 암의 구체적인 종류에는 제한이 없으나 대장암, 직장암, 결장암, 갑상선암, 구강암, 인두암, 후두암, 자궁경부암, 뇌암, 폐암, 난소암, 방광암, 신장암, 간암, 췌장암, 전립선암, 피부암, 혀암, 유방암, 자궁암, 위암, 골암, 림프종, 혈액암, 편평상피세포암, 폐의 선암, 복막암, 피부암, 피부 흑색종, 안구 흑색종, 직장암, 항문부근암, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 위장암, 교아종, 난소암, 자궁내막암, 침샘암, 음문암, 및 두경부암 등으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 암은 본 발명의 키메릭항원수용체가 인식하는 표적 항원을 발현하는 암이다. 즉, 상기 암은 본 발명의 키메릭항원수용체의 항원 결합 도메인에 의해 인식될 수 있는 종양항원을 발현하는 암이다. 예를 들어, 본 발명에 따른 CAR가 암세포 특이적 항원 결합 도메인으로서 항-CD19 scFv를 포함하는 경우, 상기 암은 바람직하게는 정상세포에 비해 암세포에서 CD19이 과발현되거나, 활성이 더욱 높은 암일 수 있다.

[0139] 본 발명에 있어서, "혈액암"은 혈액의 구성 성분 (백혈구, 적혈구, 혈소판 등), 혈액을 만드는 골수, 면역체계를 구성하는 림프계 (림프구, 림프절, 림프관 등)에서 생긴 암을 의미한다. 대표적으로는 백혈병, 악성림프종, 다발성골수종 등이 이에 해당된다. 혈액암의 보다 구체적인 예시로는, 급성 골수병 백혈병 (Acute Myeloid Leukemia), 급성 림프모구 백혈병 (Acute Lymphoblastic Leukemia), 만성 골수성 백혈병 (Chronic Myelogenous Leukemia), 다발골수종 (Multiple Myeloma), 및 림프종 (Lymphoma) 등이 있다.

[0140] 바람직하게는, 상기 암은 림프종, B 세포 림프종, 급성 림프종, 버킷 림프종, 미만성 B형 대세포 림프종 (difuse large B cell lymphoma), 여포 림프종 (follicular lymphoma), 말트 림프종 (MALT lymphoma), 마지날존 림프종 (marginal zone lymphoma), 말초 T세포 림프종 (peripheral T cell lymphoma), 미분화 대세포 림프종 (anaplastic large cell lymphoma), 림프아세포 림프종 (lymphoblastic lymphoma), 호지킨 림프종 등에서 선택될 수 있다.

[0141] 본 발명의 조성물 내의 상기 NK-CAR을 발현하는 자연살해세포, 발현 벡터, 및/또는 발현 벡터를 포함하는 세포의 함량은 질환의 증상, 증상의 진행 정도, 환자의 상태 등에 따라서 적절히 조절 가능하며, 예컨대, 전체 조성물 중량을 기준으로 0.0001 내지 99.9중량%, 또는 0.001 내지 50중량%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 함량비는 용매를 제거한 건조량을 기준으로 한 값이다.

[0142] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 부형제는 예를 들어, 희석제, 결합제, 붕해제, 활택제, 흡착제, 보습제, 필름-코팅 물질, 및 제어방출첨가제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0143] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 서방형 과립제, 장용과립제, 액제, 점안제, 엘실릭제, 유제, 현탁액제, 주정제, 트로키제, 방향수제, 리모나아데제, 정제, 서방형정제, 장용정제, 설하정, 경질캅셀제, 연질캅셀제, 서방캅셀제, 장용캅셀제, 환제, 틴크제, 연조엑스제, 건조엑스제, 유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는 에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.

[0144] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0145] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[0146] 본 발명에 따른 정제, 산제, 과립제, 캡슐제, 환제, 트로키제의 첨가제로 옥수수전분, 감자전분, 밀전분, 유당,

백당, 포도당, 과당, 디-만니톨, 침강탄산칼슘, 합성규산알루미늄, 인산일수소칼슘, 황산칼슘, 염화나트륨, 탄산수소나트륨, 정제 라놀린, 미결정셀룰로오스, 덱스트린, 알긴산나트륨, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 카올린, 요소, 콜로이드성실리카겔, 히드록시프로필스타치, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC) 1928, HPMC 2208, HPMC 2906, HPMC 2910, 프로필렌글리콜, 카제인, 젖산칼슘, 프리모젤 등 부형제; 젤라틴, 아라비아고무, 에탄올, 한천가루, 초산프탈산셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 포도당, 정제수, 카제인나트륨, 글리세린, 스테아린산, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 덱스트린, 히드록시셀룰로오스, 히드록시프로필스타치, 히드록시메칠셀룰로오스, 정제쉘락, 전분호, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제가 사용될 수 있으며, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 옥수수전분, 한천가루, 메칠셀룰로오스, 벤토나이트, 히드록시프로필스타치, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 알긴산나트륨, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 구연산칼슘, 라우릴황산나트륨, 무수규산, 1-히드록시프로필셀룰로오스, 덱스트란, 이온교환수지, 초산폴리비닐, 포름알데히드처리 카제인 및 젤라틴, 알긴산, 아밀로오스, 구아르고무(Guar gum), 중조, 폴리비닐피롤리돈, 인산칼슘, 겔화전분, 아라비아고무, 아밀로펙틴, 펙틴, 폴리인산나트륨, 에칠셀룰로오스, 백당, 규산마그네슘알루미늄, 디-소르비톨액, 경질무수규산 등 붕해제; 스테아린산칼슘, 스테아린산마그네슘, 스테아린산, 수소화식물유(Hydrogenated vegetable oil), 탈크, 석송자, 카올린, 바셀린, 스테아린산나트륨, 카카오지, 살리실산나트륨, 살리실산마그네슘, 폴리에칠렌글리콜(PEG) 4000, PEG 6000, 유동파라핀, 수소첨가대두유(Lubri wax), 스테아린산알루미늄, 스테아린산아연, 라우릴황산나트륨, 산화마그네슘, 마크로골(Macrogol), 합성규산알루미늄, 무수규산, 고급지방산, 고급알코올, 실리콘유, 파라핀유, 폴리에칠렌글리콜 지방산에테르, 전분, 염화나트륨, 초산나트륨, 올레인산나트륨, dl-로이신, 경질무수규산 등의 활택제;가 사용될 수 있다.

[0147] 본 발명에 따른 액제의 첨가제로는 물, 묽은 염산, 묽은 황산, 구연산나트륨, 모노스테아린산슈크로스류, 폴리옥시에칠렌소르비톨지방산에스텔류(트윈에스텔), 폴리옥시에칠렌모노알킬에텔류, 라놀린에텔류, 라놀린에스텔류, 초산, 염산, 암모니아수, 탄산암모늄, 수산화칼륨, 수산화나트륨, 프롤아민, 폴리비닐피롤리돈, 에칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨 등이 사용될 수 있다.

[0148] 본 발명에 따른 시럽제에는 백당의 용액, 다른 당류 혹은 감미제 등이 사용될 수 있으며, 필요에 따라 방향제, 착색제, 보존제, 안정제, 현탁화제, 유화제, 점조제 등이 사용될 수 있다.

[0149] 본 발명에 따른 유제에는 정제수가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 유화제, 보존제, 안정제, 방향제 등이 사용될 수 있다.

[0150] 본 발명에 따른 현탁제에는 아카시아, 트라가칸타, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 미결정셀룰로오스, 알긴산나트륨, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC), HPMC 1828, HPMC 2906, HPMC 2910 등 현탁화제가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 계면활성제, 보존제, 안정제, 착색제, 방향제가 사용될 수 있다.

[0151] 본 발명에 따른 주사제에는 주사용 증류수, 0.9% 염화나트륨주사액, 링겔주사액, 덱스트로스주사액, 덱스트로스+염화나트륨주사액, 피이지(PEG), 락테이티드 링겔주사액, 에탄올, 프로필렌글리콜, 비휘발성유-참기름, 면실유, 낙화생유, 콩기름, 옥수수기름, 올레인산에칠, 미리스트산 이소프로필, 안식향산벤젠과 같은 용제; 안식향산나트륨, 살리실산나트륨, 초산나트륨, 요소, 우레탄, 모노에칠아세트아마이드, 부타졸리딘, 프로필렌글리콜, 트윈류, 니정틴산아미드, 헥사민, 디메칠아세트아마이드와 같은 용해보조제; 약산 및 그 염(초산과 초산나트륨), 약염기 및 그 염(암모니아 및 초산암모니움), 유기화합물, 단백질, 알부민, 펩톤, 검류와 같은 완충제; 염화나트륨과 같은 등장화제; 중아황산나트륨($NaHSO_3$) 이산화탄소가스, 메타중아황산나트륨($Na_2S_2O_5$), 아황산나트륨(Na_2SO_3), 질소가스(N_2), 에칠렌디아민테트라초산과 같은 안정제; 소디움비설파이드 0.1%, 소디움포름알데히드 설폭실레이트, 치오우레아, 에칠렌디아민테트라초산디나트륨, 아세톤소디움비설파이트와 같은 황산화제; 벤질알코올, 클로로부탄올, 염산프로카인, 포도당, 글루콘산칼슘과 같은 무통화제; 시엠시나트륨, 알긴산나트륨, 트윈 80, 모노스테아린산알루미늄과 같은 현탁화제를 포함할 수 있다.

[0152] 본 발명에 따른 좌제에는 카카오지, 라놀린, 위텝솔, 폴리에틸렌글리콜, 글리세로젤라틴, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 스테아린산과 올레인산의 혼합물, 수바날(Subanal), 면실유, 낙화생유, 야자유, 카카오버터+콜레스테롤, 레시틴, 라네트왁스, 모노스테아린산글리세롤, 트윈 또는 스판, 임하우젠(Imhausen), 모놀렌(모노스테아린산프로필렌글리콜), 글리세린, 아뎁스솔리두스(Adeps solidus), 부티룸 태고-G(Buytyrum Tego-G), 세베스파마 16 (Cebes Pharma 16), 헥사라이드베이스 95, 코토마(Cotomar), 히드록코테 SP, S-70-XXA, S-70-

XX75(S-70-XX95), 히드록코테(Hydrokote) 25, 히드록코테 711, 이드로포스탈 (Idropostal), 마사에스트라리움(Massa estrarium, A, AS, B, C, D, E, I, T), 마사-MF, 마수폴, 마수폴-15, 네오수포스탈-엔, 파라마운드-B, 수포시로(OSI, OSIX, A, B, C, D, H, L), 좌제기제 IV 타입 (AB, B, A, BC, BBG, E, BGF, C, D, 299), 수포스탈 (N, Es), 웨코비 (W, R, S, M ,Fs), 테제스터 트리글리세라이드 기제 (TG-95, MA, 57)와 같은 기제가 사용될 수 있다.

[0153] 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.

[0154] 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0155] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0156] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0157] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구 복용, 피하 주사, 복강 투여, 정맥 주사, 근육 주사, 척수 주위 공간(경막내) 주사, 설하 투여, 볼점막 투여, 직장 내 삽입, 질 내 삽입, 안구 투여, 귀 투여, 비강 투여, 흡입, 입 또는 코를 통한 분무, 피부 투여, 경피 투여 등에 따라 투여될 수 있다.

[0158] 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 질환의 중등도 등의 여러 관련 인자와 함께 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.

[0159] 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐 (mouse), 쥐 (rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다.

[0160] 본 발명에서 "투여"란 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.

[0161] 본 발명에서 "예방"이란 목적하는 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하며, "개선"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0162] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체를 발현하는 자연살해세포; 상기 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터; 및/또는 상기 발현 벡터를 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 키트를 제공한다. 본 발명에 따른 키트는 암의 예방 또는 치료를 위한 것이라면 구체적인 형태에 제한이 없으며, 본 발명에 따른 키메릭항원수용체의 제조, 보관, 자연살해세포 내로의 도입 및 발현, 상기 자연살해세포의 투여 등을 위한 임의의 성분 및 기기를 제한 없이 포함할 수 있다.

[0163] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체를 발현하는 자연살해세포를 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 세포치료제를 제공한다.

[0164] 본 발명에 있어서, "세포치료제 (cellular therapeutic agents)"란 인간으로부터 분리, 배양, 및 특수한 조작을 통해 제조되어, 특정 질환의 진단, 예방, 또는 치료의 목적으로 사용하기 위한 세포 내지 조직으로서, 미국 FDA에서는 세포치료제를 의약품으로 정의하고 있다. 구체적으로는, 세포치료제는 세포 또는 조직의 기능을 복원시키기 위해 살아있는 자가, 동종, 또는 이종 세포를 체외에서 증식 및 선별하거나, 기타의 방법으로 세포의 생물

학적 특성을 변화시키는 일련의 과정을 통해 제조되어, 질병의 진단, 예방, 치료 등에 사용된다.

[0166] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0168] **[실시예]**

[0169] **실시예 1. 항-CD19-CAR 발현벡터의 제조**

[0170] NK세포 특이적 신호전달 도메인을 바탕으로 본 발명에 따른 3가지의 항-CD19-DAP10-2B4-CD3ζ CAR의 인공합성 유전자를 제작하였으며 (하기 (1) 내지 (3)), 대조군으로서 항-CD19-CD28-CD3ζ CAR의 인공합성 유전자도 제작하였다 (하기 (4)).

[0171] 각 키메릭항원수용체의 종류 및 구성은 다음과 같다:

[0172] (1) myc-tag, CD19와 결합하는 항-CD19 모노클로널 항체의 scFv, CD8 힌지 도메인, DAP10 세포외 도메인, DAP10 막관통 도메인, DAP10 세포내 신호전달 도메인, 2B4 세포내 신호전달 도메인, 및 CD3ζ (CD3z로도 지칭됨) 세포내 신호전달 도메인으로 이루어지는 1분자의 키메라 단백질 ("NK-CAR1"이라 명명함);

[0173] (2) myc-tag, CD19와 결합하는 항-CD19 모노클로널 항체의 scFv, CD28 힌지 도메인, DAP10 세포외 도메인, DAP10 막관통 도메인, DAP10 세포내 신호전달 도메인, 2B4 세포내 신호전달 도메인, 및 CD3ζ 세포내 신호전달 도메인으로 이루어지는 1분자의 키메라 단백질 ("NK-CAR2"이라 명명함);

[0174] (3) myc-tag, CD19와 결합하는 항-CD19 모노클로널 항체의 scFv, CD8 힌지 도메인, CD28 막관통 도메인, DAP10 세포내 신호전달 도메인, 2B4 세포내 신호전달 도메인, 및 CD3ζ 세포내 신호전달 도메인으로 이루어지는 1분자의 키메라 단백질 ("NK-CAR3"이라 명명함); 및

[0175] (4) myc-tag, CD19와 결합하는 항-CD19 모노클로널 항체의 scFv, CD8 힌지 도메인, CD28 막관통 도메인, CD28 세포내 신호전달 도메인, 및 CD3ζ 세포내 신호전달 도메인으로 이루어지는 1분자의 키메라 단백질 (T 세포 유래 CAR; "2nd CAR" 또는 "2nd generation CAR"이라 명명함).

[0176] 상기 인공합성 유전자 각각을 포함하는 핵산단편을 EcoR1-Xho1으로 소화한 pMXs-IRES-GFP 레트로바이러스 벡터에 클로닝하여, 본 발명에 따른 NK-CAR를 발현하는 pMXs-CAR-IRES-GFP 레트로바이러스 벡터 3 종 및 대조군 T-CAR를 발현하는 레트로바이러스 벡터 1종을 제작했다. 즉, 상기 벡터는 형광단백질인 GFP와 함께 본 발명에 따른 키메릭항원수용체를 코딩한다. 본 발명에 따른 NK-CAR1, NK-CAR2, NK-CAR3, 및 대조군 2nd CAR의 구조는 도 1에 나타냈다.

[0178] **실시예 2. NK-CAR 레트로바이러스 용액의 제작**

[0179] 실시예 1에서 제조한 4 종류의 pMXs-CAR-IRES-GFP 레트로바이러스 벡터로 대장균 DH5α를 각각 형질전환하여 형질전환체를 얻었다. 상기 형질전환체 내에서 복제된 플라스미드 DNA를 HiSpeed Plasmid Midi Kit (Qiagen, #12643)를 사용해서 정제하여, 트랜스펙션 (transfection; 형질주입)용 DNA로 준비하였다. 상기 트랜스펙션용 DNA를 이하의 조작에 적용했다.

[0180] X-tremeGENE9 (Roche, #6365787001)를 제조사의 설명에 따라 사용하여, 상기 트래스팩션용 DNA를 레트로바이러스 패키징 세포주인 Plat A 세포에 형질주입했다. 형질주입 24시간 후에 배지를 교체해주었고, 배지 교체 24시간 후에 암포트로픽 레트로바이러스를 함유하는 상층액을 획득하여 0.45 μm 필터 (Nalgene, #725-2545)로 여과했다. 이 상층액을 사용해서, 10 μg/mL polybrene (Sigma, #H9268)를 제조사의 설명에 따라 사용하여 자연살해 세포 세포주인 NKL 및 NK92 세포주에 암포트로픽 바이러스를 700 G, 30분, 및 32℃ 조건으로 두 차례 spinfection 하였다.

[0181] 바이러스 감염 3일차의 세포들 중 GFP를 발현하는 세포들을 BD FACSAria™ II Cell Sorter (BD Biosciences)로 분리하여 배양하였다. 분리 3일 후의 세포를 Alexa Fluor® 647-Myc-Tag (9B11) Mouse mAb (Cell Signaling,

#2233S)로 염색했고, BD Accuri™C6 (BD Biosciences)을 이용해 분석했다. GFP 양성 세포는 본 실시예에서 제작한 레트로바이러스에 감염된 세포를 의미하고, Alexa Fluor® 647 양성 세포는 본 발명에 따른 NK-CAR를 발현하는 세포를 의미한다.

[0182] 먼저, GFP 양성세포 (바이러스에 감염된 NKL 세포) 중 Alexa Fluor® 647 양성인 세포의 비율, NK-CAR를 발현하는 NKL 세포의 비율을 측정했다. 도 2a에 나타낸 바와 같이, CAR-레트로바이러스에 감염된 NKL 세포는 약 7%이고, 이들 중 본 발명에 따른 NK-CAR를 발현하는 NKL 세포는 대략 85%인 것으로 나타났다. 2nd CAR 바이러스에 감염된 NKL 세포는 약 12%이고, 이들 중 2nd CAR를 발현하는 NKL 세포는 약 95%로 확인되었다.

[0183] 이어서, 바이러스 감염 3일 후의 NKL 세포들 중 GFP를 발현하는 NKL 세포를 BD FACSAria™ II Cell Sorter (BD Biosciences)로 분리하여 배양하였고, 이들의 GFP 및 NK-CAR 발현을 확인하기 위해 상기 서술한 바와 같이 Alexa Fluor® 647-Myc-Tag (9B11) Mouse mAb로 염색하여 BD Accuri™C6 (BD Biosciences)로 분석했다. 그 결과 99% 이상의 세포에서 GFP가 발현된 바, 바이러스에 감염된 NKL 세포들만 분리배양되었음을 알 수 있었다 (도 2b). GFP 양성 세포 대비 NK-CAR을 발현 세포의 비율을 관찰한 결과, NK-CAR1 발현 세포의 비율은 70%, NK-CAR2 발현 세포의 비율은 85%, NK-CAR3 발현 세포의 비율은 96%임을 확인하였다 (도 2b). 상기 결과는 NK-CAR의 구조적 차이가 단백질 발현에 영향을 준다는 것을 의미한다.

[0184] 또한, GFP 양성세포 (바이러스에 감염된 NK92 세포) 중 Alexa Fluor® 647 양성인 세포의 비율, NK-CAR를 발현하는 NK92 세포의 비율을 측정했다. 도 2c에 나타낸 바와 같이, NK-CAR 바이러스에 감염된 NK92 세포는 약 22 내지 26%이고, 이들 중 NK-CAR를 발현하는 NK92 세포는 대략 32 내지 85%이었다. 2nd CAR 바이러스에 감염된 NK92 세포는 약 35%이고, 이들 중 2nd CAR를 발현하는 NK92 세포는 대략 94%인 것으로 확인됐다.

[0185] 이어서, 바이러스 감염 3일 후의 NK92 세포들 중 GFP를 발현하는 NK 92 세포를 BD FACSAria™ II Cell Sorter (BD Biosciences)로 분리하여 배양하였고, 이들의 GFP 및 NK-CAR 발현을 확인하기 위해 상기 서술한 바와 같이 Alexa Fluor® 647-Myc-Tag (9B11) Mouse mAb로 염색하여 BD Accuri™C6 (BD Biosciences)로 분석했다. 그 결과 99% 이상의 세포에서 GFP가 발현된 바, 바이러스에 감염된 NK 92 세포들만 분리배양 되었음을 알 수 있었다 (도 2d). GFP 양성 세포 대비 NK-CAR을 발현 세포의 비율을 관찰한 결과, NK-CAR2 발현 세포의 비율은 63.7%, NK-CAR3 발현 세포의 비율은 96.6%임을 확인하였다 (도 2d). 상기 결과는, 앞선 결과와 마찬가지로, NK-CAR의 구조적 차이가 단백질 발현에 영향을 준다는 것을 의미한다.

[0187] **실시예 3. NK-CAR 발현 NK 세포의 항원 특이적 세포사멸 활성 평가**

[0188] 본 실시예에서는 상기 실시예를 통해 제조한 NK-CAR가 도입된 NK 세포의 세포사멸활성을 평가하였다. 먼저, NK-CAR가 도입된 NKL 세포의 세포사멸 활성을 평가하기 위해, 배양 2일째의 CD19 양성세포주 REH를 타겟 세포로 사용하였고, 24시간 휴지시킨 배양 3일째의 NK-CAR 발현 NKL 세포, 및 대조군으로서 pMXs-IRES-GFP (공벡터)가 도입된 NKL를 이펙터 세포로 사용하였다. 이펙터 세포를 휴지시키기 위해 배양 2일째의 세포를 serum free RPMI1640으로 워시 (wash)하고 10ml의 rested RPMI1640 (+5% FBS, 0.5% pen/strep, 0.5% sodium pyruvate) 배지에 현탁하여 24시간 배양하였다. 또한, NK-CAR가 도입된 NK92 세포의 세포사멸 활성을 평가하기 위해, 배양 2일째의 CD19 양성세포주 REH 및 Ramos를 타겟 세포로 사용하였고, 휴지시키지 않은 배양 2일째의 NK-CAR 발현 NK92 세포, 및 대조군으로서 pMXs-IRES-GFP (공벡터)가 도입된 NK92를 이펙터 세포로 사용하였다.

[0189] NK-CAR 발현 NKL 및 NK92 세포의 세포사멸활성은 각각 Europium assay을 통해 측정하였다. 먼저 타겟세포를 1.0×10^6 cells/400 μl이 되도록 rested IMDM (+5% FBS, 0.5% pen/strep)에 현탁한 후 40 μM BATDA (Perkin Elmer, #C136-100)를 첨가하여 5.0% CO_2 가스로 평형화한 37℃, CO_2 인큐베이터에서 30분간 보온했다. 이후 1 mM sulfinpyrazone (Sigma, #S9509)가 포함된 rested IMDM (1mM sulfinpyrazone가 포함된 rested IMDM를 assay media로 명명)으로 워시하고, 5.0×10^4 cells/1 ml이 되도록 assay media로 현탁하여 well 당 100 μl씩 첨가했다. 또, 이펙터 세포를 assay media에 현탁하고, Effector to Target (E:T) 비가 NK-CAR 발현 NKL 세포의 경우 20:1, 10:1, 또는 5:1이 되도록; NK-CAR 발현 NK92 세포의 경우 4:1, 2:1, 또는 1:1이 되도록 100 μl 첨가했

다. 이펙터 세포 대신에 spontaneous control로서 배지를, maximum lysis control로써 2% Triton X-100을 100 μl 첨가한 well을 준비했다.

[0190] 세포 및 각 대조군을 준비한 후, 96-well 플레이트를 5.0% CO_2가스로 평형화한 37℃, CO_2 인큐베이터에서 보온했다. NK-CAR 발현 NKL 세포의 경우 2시간 보온했으며, NK-CAR 발현 NK92 세포의 경우 30분 보온했다.

[0191] 이어서, 상층액 20μl을 0.3 M acetic acid를 포함한 20% europium solution (Perkin Elmer, #C135-100)에 5분 동안 반응시킨 후 Victor X4 multilabel plate reader(Perkin Elmer사)로 형광광도를 측정하여 세포살해활성(%)을 계산했다. 세포살해활성 (%)의 계산식은 다음과 같다: 세포살해활성 (%)=100×(각 웰의 측정값-Spontaneous control의 측정 값) / (Maximum lysis control의 측정 값- Spontaneous control의 측정 값).

[0192] Europium assay 결과는 도 3a 내지 3c에 나타냈다. 먼저, 도 3a는 NK-CAR 도입 NKL 세포의 세포사멸 활성을 나타낸다. EV (Empty vector)는 pMXs-IRES-GFP 벡터에 의해 만들어진 바이러스로 감염시킨 세포를, 2^{nd} CAR 및 NK-CAR는 pMXs-CAR-IRES-GFP 벡터에 의해 만들어진 바이러스로 감염시킨 NKL 세포를 의미한다. 도면에 나타낸 바와 같이, Effector to Target 비가 20:1 일 때, EV군은 CD19 양성세포주인 REH를 사멸시키지 못했으며, 2^{nd} CAR는 약 60%의 REH 세포를, NK-CAR는 약 70내지 80 %의 REH 세포를 사멸시킨 것으로 나타났다. 또한, Effector to Target 비가 10:1 또는 5:1 일 때에도, 본 발명에 따른 NK-CAR를 발현하는 NKL 세포의 REH 사멸 활성은 대조군 2^{nd} CAR 발현 세포에 비해 높은 것으로 나타났다.

[0193] 도 3b 및 3c는 각각 NK-CAR 도입 NK92 세포의 REH 세포 (도 3b) 및 RAMOS 세포 (도 3c)에 대한 사멸 활성을 나타낸다. EV (Empty vector)는 pMXs-IRES-GFP 벡터에 의해 만들어진 바이러스로 감염시킨 세포를, 2^{nd} CAR 및 NK-CAR는 pMXs-CAR-IRES-GFP 벡터에 의해 만들어진 바이러스로 감염시킨 NK92 세포를 의미한다. 도면에 나타난 바와 같이, REH 세포 및 RAMOS 세포 모두에서 2^{nd} CAR 발현 세포 대비 본 발명의 NK-CAR 발현 세포의 세포사멸 활성이 현저히 높았으며, 이와 같은 결과는 모든 Effector to Target 비에서 동일했다.

[0194] 상기 결과들은 NKL 및 NK92 세포에 NK-CAR가 도입되면서, NKL 및 NK92 세포가 CD19를 인식하고 CD19 특이적으로 타겟 세포를 사멸시키는 능력을 획득했음을 보여주는 것이다. 또한 특정 NK 활성화 수용체 조합 (NKG2D+2B4)에 기반하여 제작한 본 발명의 NK-CAR3가 NK세포 활성화에 특히 효과적임을 보여준다. 특히, NK-CAR3를 발현하는 세포는 기타 NK-CAR 발현 세포보다도 더욱 우수한 세포사멸 활성을 보였는데, 이는 본 발명에 따른 NK-CAR 중 NK-CAR3이 NK 세포의 활성화에 특히 효과적임을 보여주는 것이다.

[0196] **실시예 4. NK-CAR 발현 NK 세포의 사이토카인 분비능 확인**

[0197] 대식세포염증단백질-1α (Macrophage inflammatory protein-1α, MIP-1α; CCL3로도 불림)은 캐모카인으로 알려진 화학주성 (chemotactic) 사이토카인이며, 활성화된 자연살해세포로부터 분비된다. 그랜자임 B (Granzyme B)는 자연살해세포 및 세포독성 T세포의 그래뉼에서 가장 흔히 발견되는 세린 프로테아제 (serine protease)로서, 상기 세포들에 의한 퍼포린-매개성 표적세포 사멸 (perforin-dependent target cell death) 기작 유도에 중요한 인자이며, 퍼포린과 함께 분비된다. 즉, MIP-1α 및 그랜자임 B는 자연살해세포의 활성화 정도의 척도가 되는 바, 본 발명에 따른 NK-CAR가 NKL 세포의 세포사멸 기능을 효과적으로 유도하는지 확인하기 위해, NK-CAR 발현 세포의 MIP-1α 및 그랜자임 B 수준을 측정했다.

[0198] 배양 2일째의 CD19 양성세포주 REH를 타겟 세포로 사용하였고, 24시간 휴지시킨 배양 3일째의 NK-CAR 발현 NKL 세포, 및 대조군으로서 2^{nd} CAR 도입 NKL 세포, pMXs-IRES-GFP (공벡터; EV) 도입 NKL 세포, 및 단순 NKL 세포 (벡터가 도입되지 않은 NKL 세포)를 이펙터 세포로 사용하였다. 이펙터 세포를 휴지시키기 위해 배양 2일째의 세포를 serum free RPMI1640으로 워시하고 rested RPMI1640 (+5% FBS, 0.5% pen/strep, 0.5% sodium pyruvate) 10 ml에 현탁하여 24시간 배양하였다.

[0199] 타겟세포인 REH를 1.0×10^6 cells/100 μl/샘플, 이펙터세포를 0.5×10^6 cells/150 μl/샘플이 되도록 rested IMDM (+5% FBS, 0.5% pen/strep)에 현탁한 후 96 well plate에 분주하였다.

[0200] 이를 5.0% CO_2 가스로 평형화한 37℃ CO_2 인큐베이터에서 8시간 공동 배양하였다. 이후, 세포 배양액을 원심분리하여 상층액을 획득하였고, Human CCL3/MIP-1alpha DuoSet ELISA kit (R&D Systems, #DY270), Human Granzyme

B DuoSet ELISA kit (R&D Systems, #DY2906)를 제조사의 설명에 따라 사용하여 상기 상층액 내의 MIP-1α, 및 Granzyme B 분비량을 확인하였다.

[0201] 그 결과, 도 4a 및 4b에 나타낸 바와 같이, 활성화된 NK 세포에 의해 분비되는 MIP-1α 및 그랜자임 B는 CAR을 발현하는 세포에 의해서만 생성 및 분비된 것으로 나타났다. 뿐만 아니라, 본 발명에 따른 NK-CAR을 발현하는 NKL 세포의 사이토카인 분비량이 2^{nd} CAR를 발현하는 NKL 세포보다 현저히 높은 것으로 나타났다. 상기 결과는 본 발명에 따른, 특정 수용체 조합에 기반한 NK-CAR이 자연살해세포의 타겟세포 사멸 기능을 효과적으로 활성화하고 사이토카인 분비를 촉진한다는 것을 보여준다.

[0203] **실시예 5. NK-CAR 발현 NK 세포의 AKT 및 ERK 신호경로 활성화 확인**

[0204] 타겟항원을 인식한 자연살해세포는 AKT 및 ERK 신호를 활성화하여 항종양 효과 등을 발휘한다. 따라서, 본 발명에 따른 NK-CAR 발현 자연살해세포가 타겟항원 (CD19)을 효과적으로 인식하여 특이적인 AKT 및 ERK 신호 활성화를 일으키는지 확인하였다. 이를 위해, CD19 양성세포주인 REH 또는 재조합 인간 CD19 Fc 키메라 (Recombinant Human CD19 Fc Chimera)를 자극원으로 하여, 24시간 동안 휴지시킨 배양 3일째의 NK-CAR 도입 NKL 세포 및 대조군인 NKL 세포를 자극하였으며, 이에 따른 AKT 및 ERK 신호의 변화를 확인하였다. 세포를 휴지시키기 위해 배양 2일째의 세포를 serum free RPMI1640으로 워시하고 rested RPMI1640 (+5% FBS, 0.5% pen/strep, 0.5% sodium pyruvate) 10 ml에 현탁하여 24시간 동안 배양하였다.

[0205] REH 세포로 NKL 세포를 자극하여 세포 용해물을 획득한 과정은 다음과 같다. CD19 양성세포주인 REH 세포, 항CD19-DAP10-2B4 CAR (NK-CAR2에서 CD3ζ 세포내 신호전달 도메인이 없는 구조) 도입 NKL 세포, 및 대조군인 NKL 세포를 5.0×10^{6} cells/100 μl/샘플이 되도록 rested RPMI (+5% FBS, 0.5% pen/strep, 0.5% sodium pyruvate)으로 각각 현탁한 후, 4℃에서 10분간 보냉했다. 이어서, REH 세포와 CAR 도입 NKL 세포; 그리고 REH 세포와 대조군 NKL 세포를 각각 섞어준 후 원심분리하여 pellet 상태로 4℃에서 10분간 보냉했다. 이후 37℃ Water bath에서 2분, 5분간 자극하였고, 자극이 끝난 후에는 얼음에서 5분간 보냉하여 자극을 종결시켰다. 이후 DPBS로 세척하였고, lysis buffer를 넣고 vortex를 한 후 얼음에서 세포용해 (lysis)를 진행했다. 이후 원심분리하여 세포 용해물을 획득하였다.

[0206] 재조합 인간 CD19 Fc 키메라로 NKL 세포를 자극하여 세포 용해물을 획득한 과정은 다음과 같다. Protein G (Invitrogen, #1003D) 4.0×10^{7} beads/샘플을 wash buffer (1X PBS + 0.01% Tween-20 + 1% FBS)로 워시하였다. 여기에 재조합 인간 CD19 Fc 키메라 (R&D, #9269-CD) 4 μg/샘플을 첨가하였고, 4℃에서 1시간동안 rotation incubation 했다. 이후, wash buffer로 워시를 해주었고, 4.0×10^{7} beads/100 μl/샘플이 되도록 rested RPMI (+5% FBS, 0.5% pen/strep, 0.5% sodium pyruvate)으로 현탁하여 재조합 인간 CD19 Fc 키메라가 코팅된 Protein G beads solution을 제작했다. 항-CD19-DAP10-2B4 CAR (NK-CAR2에서 CD3ζ 세포내 신호전달 도메인이 없는 구조) 도입 NKL 세포 및 대조군인 NKL 세포를 2.0×10^{6} cells/샘플을 원심분리하여 pellet을 만들고 4℃에서 10분간 보냉했다. 이를 beads solution으로 재현탁한 후 원심분리하여 pellet을 만들고 4℃에서 10분간 보냉했다. 이후 37℃ Water bath에서 2분, 5분간 자극하였고, 자극이 끝난 후에는 얼음에서 5분간 보냉하여 자극을 종결시켰다. 이후 DPBS로 washing을 하였고, lysis buffer를 넣고 vortex를 한 후 얼음에서 세포용해를 진행했다. 이후 원심분리하여 세포 용해물을 획득하였다.

[0207] 상기 방법으로 획득한 세포용해물을 8% 아크릴 아마이드 겔을 사용하여 SDS-PAGE하였고, 반건식 전사방법 (semi-dry transfer)으로 PVDF 멤브레인 (immobilon, #IPVH00010)에 단백질을 전사하였다. 이후 5% skim milk로 블락킹을 한 후 항원항체 반응을 진행했다. 1차 항체는 4℃에서 16시간 동안 처리하였으며, 사용한 1차 항체 목록은 다음과 같다: Phospho-Akt (cell signaling, #CS9271), AKT (cell signaling, #CS9272), Phospho-p44/42 Erk1/2 (cell signaling, #CS9101), Erk1/2 (cell signaling, #CS4695). 2차 항체 (mouse anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, #SC2357))는 상온에서 1시간 처리하였다. 이후, SuperSignal™ WestPico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, #34580)를 사용하여 ImageQuant LAS 4000 (fujifilm 사)로 단백질을 검출하였다.

[0208] NK-CAR (NK-CAR2에서 CD3ζ 세포내 신호전달 도메인이 없는 구조)발현 세포주를 CD19 양성 REH 세포로 자극한 결과는 도 5a에 나타냈다. 동량의 AKT 및 ERK를 로딩하였을 때, NK-CAR 발현 세포는 REH로 5분간 자극하였을 때

전체 AKT 대비 인산화된 AKT (pS476-pAKT) 수준이 현저하게 증가하였으며, 전체 ERK 대비 인산화된 ERK 수준 역시 NK-CAR 발현 세포에서 두드러지게 증가한 것으로 나타났다. 반면, NK-CAR를 발현하지 않는 대조군 NKL 세포는 REH로 자극해도 AKT 및 ERK의 인산화 정도에 큰 차이가 없었다. NK-CAR (NK-CAR2에서 CD3ζ 세포내 신호전달 도메인이 없는 구조) 발현 세포주를 재조합 인간 CD19 Fc 키메라로 자극한 결과는 도 5b에 나타냈다. 상기 결과와 마찬가지로, NK-CAR를 발현하지 않는 NKL 세포는 CD19로 자극해도 AKT 및 ERK 신호가 활성화되지 않았으나, NK-CAR를 발현하는 NKL 세포는 CD19로 5분간 자극하였을 때 AKT 및 ERK의 인산화가 현저하게 증가하였다.

[0209] 상기 결과들은 본 발명에 따른 NK-CAR를 발현하는 자연살해세포는 타겟항원인 CD19를 효과적으로 인식하여 특이적으로 AKT 및 ERK 신호 활성화를 일으킬 수 있음을 보여준다.

[0211] **실시예 6. NK-CAR 발현 NK 세포의 세포독성 탈과립화 확인**

[0212] 탈과립 (degranualation)은 과립 (granule)이라고 하는 분비 소포로부터 항균성 세포독성 물질 등을 방출하는 세포 과정을 지칭한다. 탈과립은 과립구 (호중구, 호염기구, 및 호산구)나 비만세포, NK 세포, T 세포와 같은 면역세포에서 관찰되며, 주로 침입성 미생물을 공격하는 것을 목적으로 한다. 특히, 활성화된 NK 세포는 탈과립을 통해 표적세포의 표면에 퍼포린 및 그랜자임을 포함한 물질을 방출하여 세포사멸을 유도한다. NK 세포의 과립 내부 표면은 CD107a로 코팅되어 있다. 탈과립 후, CD107a는 세포독성 림프구 표면에 노출되므로 퍼포린으로 인한 손상으로부터 림프구의 외막을 보호한다. CD107a의 외부화에 기반한 NK 세포의 탈과립 분석은 항원에 반응한 NK 세포의 활성화의 직접적인 검출을 가능케 한다. 따라서, 본 실시예에서는 본 발명의 NK-CAR이 도입된 NK 세포의 탈과립화 정도를 측정하여 NK-CAR에 의한 NK 세포의 활성화를 검증하였다.

[0213] 구체적으로, CAR 도입 NK92 세포의 세포독성 탈과립화를 평가하기 위해, 배양 2일째의 CD19 양성 세포주 REH 및 Ramos 세포를 타겟 세포로 사용하였고, 배양 2일째의 NK-CAR 도입 NK92 세포, 및 대조군으로서 2nd CAR 도입 NK92 세포로 사용하였다. 또한, pMXs-IRES-GFP 도입 NK92 세포를 이펙터 세포로 사용하였다.

[0214] 타겟 세포는 1.0×10^{5}cells/50 μl/sample, 이펙터 세포는 1.0×10^{5}cells/100 μl/sample, anti-CD107a/LAMP1-PE (clone H4A3, BD Bioscience, #555801)는 2 μl/50 μl/sample이 되도록 IMDM (+10% FBS, 1% pen/strep)에 현탁하고 96 well plate에 각각 분주하여 최종 부피를 200 μl로 하고, 이를 5.0% CO_2가스로 평형화한 37℃, CO_2 인큐베이터에서 2시간 공동 배양하였다. 이후, 원심분리하여 세포 펠렛을 DPBS (+1% FBS)에 현탁하고 anti-CD3-PerCP (clone SK7, BD Bioscience, #347344), anti-CD56-APC (clone NCAM16.2, BD Bioscience, #341025), 및 anti-CD107a/LAMP1-PE (clone H4A3, BD Bioscience, #555801)를 각각 처리하여 4℃의 암실에서 35분 동안 표지 하였다. 이후 DPBS (+1% FBS)로 세포를 2회 워시한 후, NK92 세포 표면의 CD107a 발현을 유세포분석기를 통해 확인하여 세포독성 탈과립화를 평가하였다.

[0215] 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, NK 세포를 CD19를 발현하는 타겟세포와 공동배양 하였을 때, 공백터 (EV) 도입 세포 대비 CAR이 도입된 NK92 세포에서 CD107a 양성 세포의 비율이 증가되어 있는 것을 확인하였다. 또한, NK-CAR 도입 NK92 세포 및 2nd CAR 도입 NK92 세포를 비교한 결과, 2nd CAR 도입 세포 대비 본 발명의 NK-CAR이 도입된 NK92 세포의 탈과립화 수준이 더 높았으며, 특히 NK 활성화 수용체 조합 (NKG2D+2B4)에 기반한 NK-CAR3 도입 NK92 세포는 REH 자극군 및 Ramos 자극군에서 CD107a 양성 세포의 비율이 각각 21.6%, 44.7% 로 가장 높은 것으로 나타났다.

[0216] 상기 결과는 본 발명의 NK-CAR이 기존의 CAR에 비해 더욱 효과적으로 NK 세포의 탈과립화를 유도할 수 있으며, 따라서 더욱 우수한 세포사멸 활성을 촉진할 수 있음을 보여준다.

[0218] **실시예 7. NK-CAR 발현 NK 세포의 사이토카인 생성 정도 확인**

[0219] 본 실시예에서는 본 발명의 NK-CAR이 NK 세포를 활성화하여 사이토카인의 생성을 촉진하는지 추가로 검증하였다.

[0220] 구체적으로, NK-CAR 도입 NK92 세포의 사이토카인 생산을 평가하기 위해, 배양 2일째의 CD19 양성세포주 REH 및 Ramos 세포를 타겟 세포로 사용하였고, 배양 2일째의 NK-CAR 도입 NK92, 및 대조군으로서 2nd CAR 도입 NK92 세

포를 사용하였다. 또한, pMXs-IRES-GFP 도입 NK92 세포를 이펙터 세포로 사용하였다.

[0221] 타겟 세포를 1.0×10^5 cells/100 μl/sample, 이펙터 세포를 1.0×10^5 cells/100 μl/sample이 되도록 IMDM (+10% FBS, 1% pen/strep)에 현탁한 후 96 well plate에 각각 분주하여, 이를 5.0% CO_2가스로 평형화한 37℃, CO_2 인큐베이터에서 1시간 공동 배양하였다. 이후, brefeldin A (GolgiPlug; BD Biosciences, #51-2301KZ) 및 monensin을 함유하는 단백질 수송 억제제 (GolgiStop; BD Bioscience, #51-2092KZ)를 첨가한 후, 추가로 5시간 동안 배양하였다. 총 6시간 후, 원심분리하여 세포 펠렛을 DPBS (+1% FBS)에 현탁하고 anti-CD3-PerCP (clone SK7, BD Bioscience, #347344), anti-CD56-APC (clone NCAM16.2, BD Bioscience, #341025)로 4℃의 암실에서 35분 동안 표지 하였다. 이후 DPBS (+1% FBS)로 세포를 2회 워시한 후 BD Cytofix/Cytoperm 용액(BD Biosciences, #51-2090KZ)으로 4℃의 암실에서 20분간 세포고정/투과화 시켰다. 이후 세포를 1X BD Perm/Wash buffer(BD Biosciences, #51-2091KZ)로 두 번 워시하고, anti-Interferon-γ-PE (clone 25723.11, BD Bioscience, #340452)로 4℃의 암실에서 15시간동안 염색하였다. 염색 후, 세포를 1X BD Perm/Wash buffer로 두 번 세척하고, NK92 세포의 Interferon-γ 발현을 유세포분석기를 통해 확인하여 사이토카인 생성을 평가하였다.

[0222] 결과는 도 7에 나타냈다. 각 NK92 세포 내의 Interferon-γ 생성을 확인한 결과, CD19를 발현하는 타겟세포와 공동배양 하였을 때 공백터 (EV) 도입 세포 대비 CAR가 도입된 NK92 세포에서 Interferon-γ 양성 세포의 비율이 증가되어 있는 것을 확인하였다. 또한, NK-CAR 도입 세포 및 2^{nd} CAR 도입 세포를 비교한 결과, 2^{nd} CAR 도입 NK92 세포 대비 본 발명의 NK-CAR이 도입된 NK92 세포의 Interferon-γ 양성 세포의 비율이 더 높았으며, 특히 NK 활성화 수용체 조합 (NKG2D+2B4)에 기반한 NK-CAR3 도입 NK92 세포의 Interferon-γ 양성 세포의 비율은 REH 자극군 및 Ramos 자극군에서 각각 19.3% 및 58.6%로 가장 높은 것을 확인하였다.

[0223] 상기 결과는 본 발명의 NK-CAR이 기존의 CAR에 비해 더욱 효과적으로 NK 세포의 사이토카인 생성을 촉진할 수 있으며, 따라서 더욱 우수한 세포사멸 활성을 유도할 수 있음을 보여준다.

[0225] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명자들은 자연살해세포 특이적 활성화 수용체의 조합을 통해 시너지적인 자연살해세포 활성화 효과를 발휘할 수 있는 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체를 도출하였다. 다양한 자연살해세포를 이용한 실험에서, 상기 키메릭항원수용체를 발현하는 자연살해세포는 타겟세포를 효과적으로 인식하여 AKT 및 ERK 신호를 활성화함으로써 우수한 항종양 활성을 유도하였다. 또한, 상기 키메릭항원수용체는 자연살해세포를 활성화하여 사이토카인 등의 세포독성 물질의 생성 및 분비를 촉진하며, 탈과립화를 유도하여 세포사멸 활성을 증진시키는 것으로 나타났다. 특히, 본 발명의 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체는 T 세포 기반의 CAR에 비해 자연살해세포의 활성화 및 세포사멸 기능 유도 효과가 더욱 높은 것이 확인되었다. 따라서, 본 발명에 따른 자연살해세포 특이적 키메릭항원수용체는 신규한 항암 면역요법 수단으로서, 기존의 항암요법의 부작용 위험은 줄이면서 더욱 우수한 항암 효과를 발휘할 것으로 기대된다.

[0227] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야 한다.

[0229] 본 발명과 관련된 구체적인 서열정보는 아래 표 1에 나타냈다.

표 1

[0230]

구분	서열	서열번호
Anti-CD19 scFv	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSS	1
CD8 hinge domain	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD	2

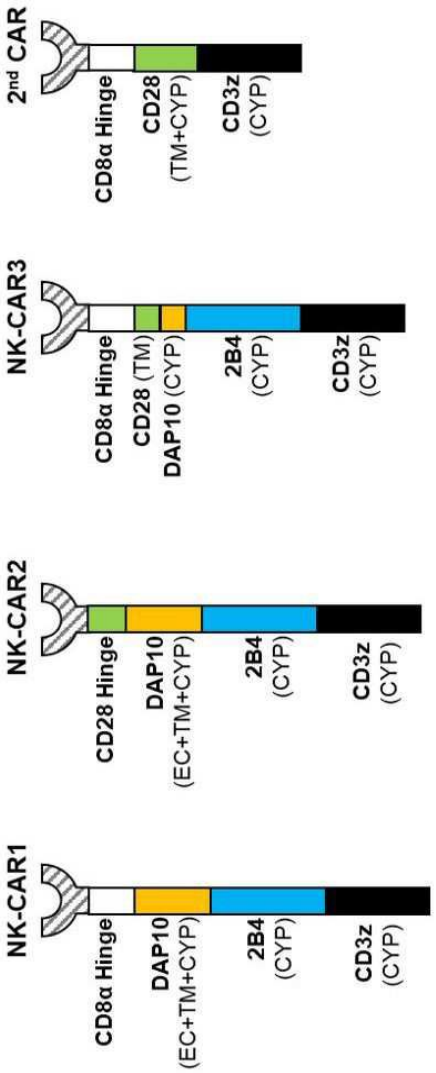
CD28 hinge domain	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLFPGPSKP	3
CD28 TM domain	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	4
DAP10 EC domain	QTTPGERSSLPAFYPGTSGSCSGCGSLSLP	5
DAP10 TM domain	LLAGLVAADAVASLLIVGAVF	6
DAP10 CYP domain	LCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRG	7
2B4 CYP domain	WRRKRKEKQSETSPKEFLTIYEDVKDLKTRRNHEQEQTFPGGGSTIYSMIQSQSSAPTS QEPAYTLYSLIQPSRKSGSRKRNHSPSFNSTIYEVIGKSQPKAQNPARLSRKELENFDV YS	8
CD3z CYP domain	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	9
CD8α signal peptide	MALPVTALLLPLALLLHAARP	10
Anti-CD19 scFv	GATATACAGATGACGCAGACAACGTCAAGTCTTTCCGCCAGCTTGGGAGACCGAGTGAC TATATCTTGTAGAGCAAGCCAGGATATTTCTAAGTATCTTAACTGGTACCAACAAAAGC CCGATGGAACGGTTAAGCTGCTTATATACCATACCAGTAGACTCCACTCCGGCGTACCA TCACGGTTTTCTGGCAGTGGCTCCGGGACCGACTATTCTTTGACGATCTCTAATCTCGA ACAAGAGGATATTGCAACATACTTTTGTCAGCAAGGCAATACCTTGCCATATACGTTTG GGGGCGGGACAAAACTTGAGATAACCGGCGGCGGTGGTTCAGGCGGTGGCGGTTCCGGT GGTGGGGGATCAGAGGTTAAGCTTCAGGAATCCGGACCAGGTTTGGTTGCCCCCAGCCA ATCTCTCAGCGTTACATGCACGGTTTCAGGCGTCAGTCTCCCCGATTACGGTGTAAGTT GGATTCGGCAACCTCCGCGAAAGGGTCTGGAATGGCTGGGGGTTATTTGGGGGAGTGAG ACAACTTATTACAACTCTGCACTTAAGAGTCGGCTTACCATCATCAAGGATAATTCAAA ATCACAAGTATTCCTGAAGATGAACTCATTGCAAACAGATGATACAGCTATATACTATT GTGCCAAGCATTACTATTATGGTGGTTCTTATGCAATGGATTACTGGGGGCAAGGCACG TCAGTGACAGTGAGTTCA	11
CD8 hinge domain_NK-CAR1	ACCACAACCCCAGCACCCCGGCCCCCTACACCTGCACCAACCATCGCCAGCCAGCCTCT GTCCCTGAGGCCAGAGGCCTGCCGCCCCGCCGCCGGCGGAGCAGTGCACACAAGGGGCC TGGACTTCGCCTGTGAT	12
CD8 hinge domain_NK-CAR3	ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCT GTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGC TGGACTTCGCCTGTGAT	13
CD28 hinge domain	ATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTAT CCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAGCCC	14
CD28 TM domain	TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGT GGCCTTTATTATTTTCTGGGTG	15
DAP10 EC domain	CAGACAACCCCCGGCGAGCGCAGCTCCCTGCCAGCCTTTTACCCTGGCACCTCCGGCTC TTGCAGCGGATGTGGCTCCCTGTCTCTGCCT	16
DAP10 TM domain	CTGCTGGCCGGCCTGGTGGCCGCCGACGCAGTGGCCTCTCTGCTGATCGTGGGAGCCGT GTTC	17
DAP10 CYP domain	CTGTGCGCCAGGCCACGGAGATCCCCAGCACAGGAGGATGGCAAGGTGTATATCAACAT GCCTGGCAGGGGA	18
2B4 CYP domain	TGGCGGAGAAAGCGGAAGGAGAAGCAGAGCGAGACATCCCCTAAGGAGTTTCTGACCAT CTACGAGGACGTGAAGGATCTGAAGACAAGGCGCAATCACGAGCAGGAGCAGACATTCC CCGGCGGAGGCTCCACCATCTATTCTATGATCCAGAGCCAGAGCTCCGCCCCCACATCC CAGGAGCCTGCCTACACCCTGTATTCCCTGATCCAGCCCAGCCGGAAGTCTGGCAGCCG GAAGAGAAACCACTCCCCATCTTTTAATAGCACCATCTACGAAGTGATCGGCAAGTCCC AGCCAAAGGCACAGAACCCAGCAAGGCTGTCTCGCAAGGAGCTGGAGAATTTCGACGTG TATAGC	19
CD3z CYP domain	AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCT CTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTG GCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTAC AATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGA GCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGG ACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC	20
CD8α signal peptide	ATGGCGCTCCCTGTCACCGCACTGCTTCTTCCGCTGGCACTGCTGCTGCACGCTGCACG GCCT	21
myc-tag	GAGCAAAAACTTATCTCTGAAGAGGACCTC	22

NK-CAR1_full insert	MALPVTALLLPLALLLHAARPEQKLISEEDLDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQD ISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYF CQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTV SGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMN SLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDQTTPGERSSLPAFYPGTSGSCSGCGSLSLPLLAGLV AADAVASLLIVGAVFLCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRGWRRKRKEKQSETSPKEFLTI YEDVKDLKTRRNHEQEQTFPGGGSTIYSMIQSQSSAPTSQEPAYTLYSLIQPSRKSGSR KRNHSPSFNSTIYEVIGKSQPKAQNPARLSRKELENFDVYSRVKFSRSADAPAYQQGQN QLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	23
NK-CAR2_full insert	MALPVTALLLPLALLLHAARPEQKLISEEDLDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQD ISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYF CQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTV SGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMN SLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHV KGKHLCPSPLFPGPSKPQTTPGERSSLPAFYPGTSGSCSGCGSLSLPLLAGLVAADAVA SLLIVGAVFLCARPRRSPAQEDGKVYINMPGRGWRRKRKEKQSETSPKEFLTIYEDVKD LKTRRNHEQEQTFPGGGSTIYSMIQSQSSAPTSQEPAYTLYSLIQPSRKSGSRKRNHSP SFNSTIYEVIGKSQPKAQNPARLSRKELENFDVYSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEL NLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRG KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	24
NK-CAR3_full insert	MALPVTALLLPLALLLHAARPEQKLISEEDLDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQD ISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYF CQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTV SGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKSQVFLKMN SLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVLCARPRRSP AQEDGKVYINMPGRGWRRKRKEKQSETSPKEFLTIYEDVKDLKTRRNHEQEQTFPGGGS TIYSMIQSQSSAPTSQEPAYTLYSLIQPSRKSGSRKRNHSPSFNSTIYEVIGKSQPKAQ NPARLSRKELENFDVYSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTY DALHMQALPPR	25
Anti-CD19 scFv H chain_CDR1	GVSLPDYGVS	26
Anti-CD19 scFv H chain_CDR2	VIWGSETTYYNSALKSR	27
Anti-CD19 scFv H chain_CDR3	HYYYGGSYAMDY	28
Anti-CD19 scFv L chain_CDR1	RASQDISKYLN	29
Anti-CD19 scFv L chain_CDR2	SRLHSGV	30
Anti-CD19 scFv L chain_CDR3	QQGNTLPYT	31

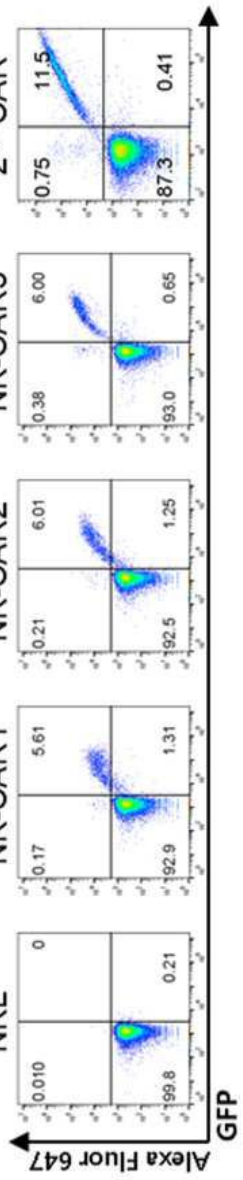
[0231]

도면

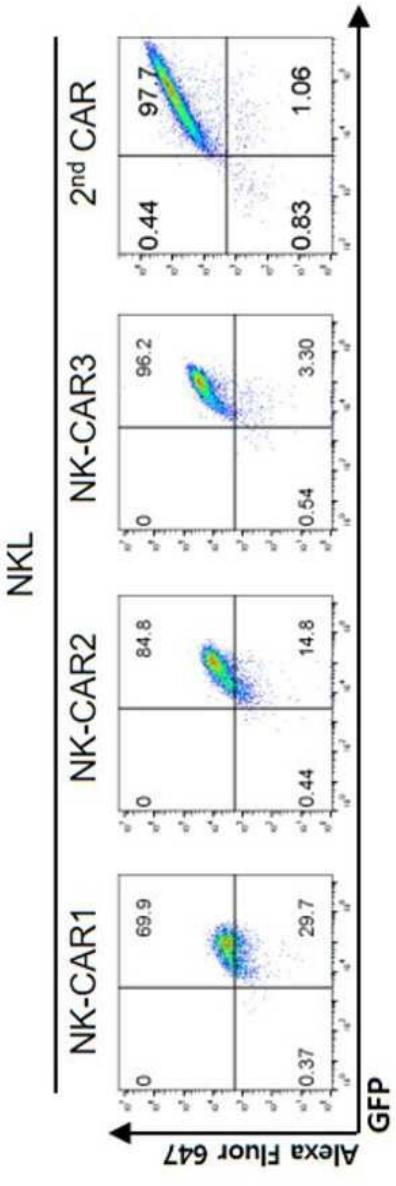
도면1


2nd CAR
CD8α Hinge
CD28 (TM+CYP)
CD3z (CYP)
NK-CAR3
CD8α Hinge
CD28 (TM)
DAP10 (CYP)
2B4 (CYP)
CD3z (CYP)
NK-CAR2
CD28 Hinge
DAP10 (EC+TM+CYP)
2B4 (CYP)
CD3z (CYP)
NK-CAR1
CD8α Hinge
DAP10 (EC+TM+CYP)
2B4 (CYP)
CD3z (CYP)

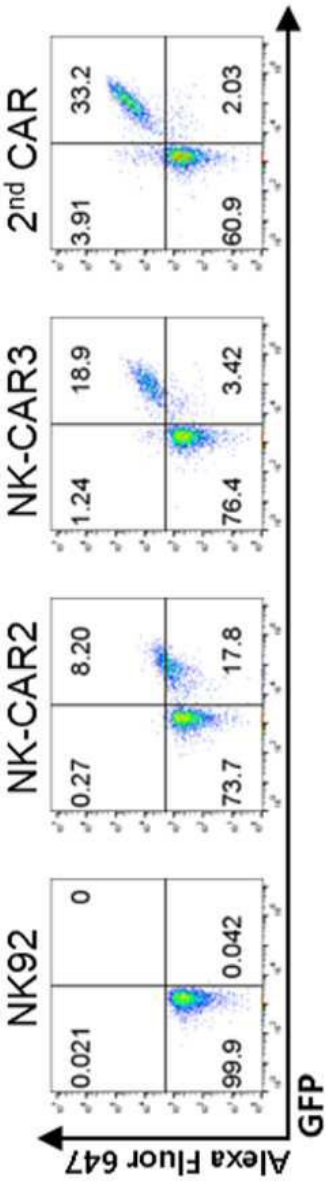
도면2a


NKL
NK-CAR1
NK-CAR2
NK-CAR3
2nd CAR
0.010
0
99.8
0.21
0.17
5.61
92.9
1.31
0.21
6.01
92.5
1.25
0.38
6.00
93.0
0.65
0.75
11.5
87.3
0.41
Alexa Fluor 647
GFP

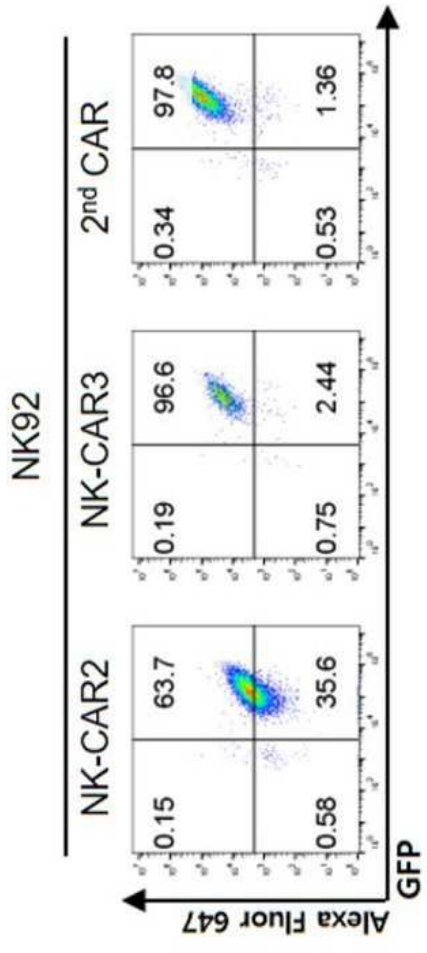
도면2b


NKL
NK-CAR1
NK-CAR2
NK-CAR3
2nd CAR
69.9
29.7
0.37
84.8
14.8
0.44
96.2
3.30
0.54
97.7
1.06
0.44
0.83
Alexa Fluor 647
GFP

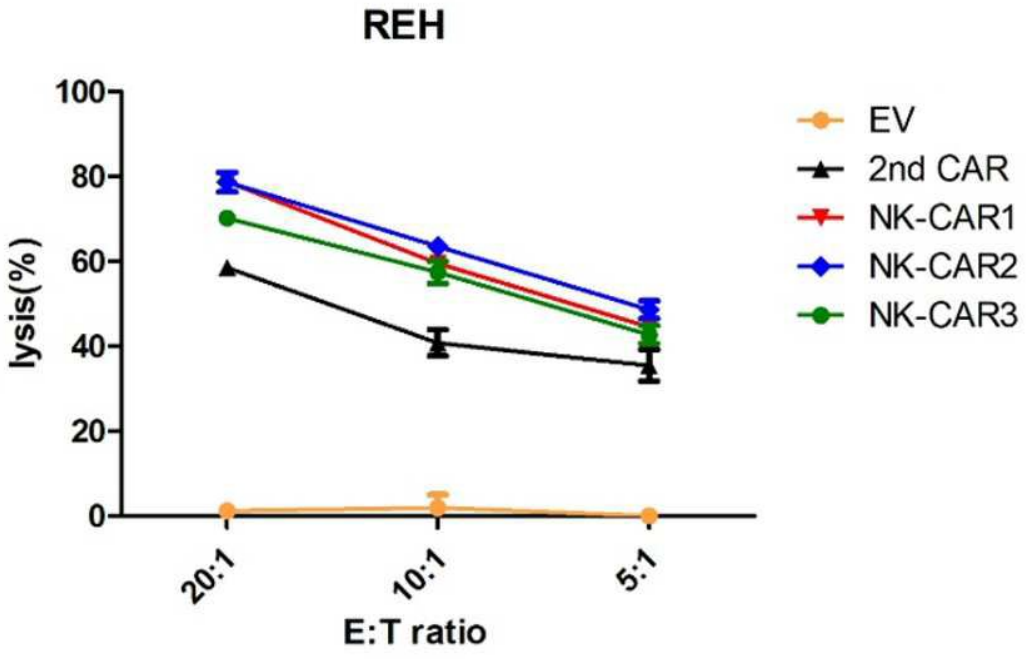
도면2c


NK92
NK-CAR2
NK-CAR3
2nd CAR
0.021
99.9
0
0.042
0.27
73.7
8.20
17.8
1.24
76.4
18.9
3.42
3.91
60.9
33.2
2.03
Alexa Fluor 647
GFP

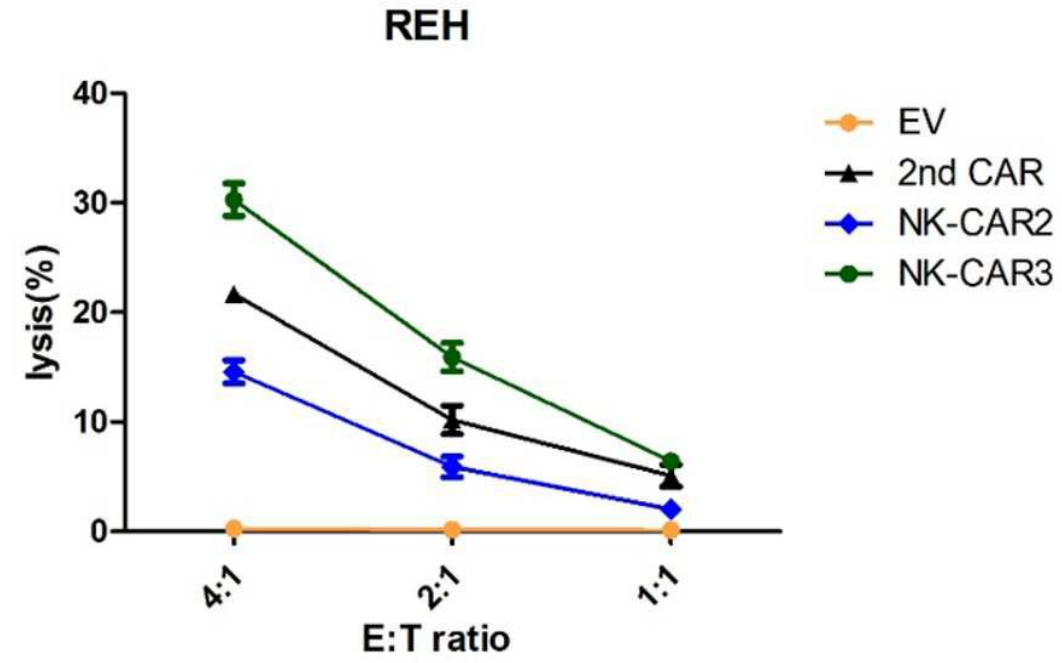
도면2d


NK92
NK-CAR3
NK-CAR2
2nd CAR
97.8
1.36
0.34
0.53
96.6
2.44
0.19
0.75
63.7
35.6
0.15
0.58
Alexa Fluor 647
GFP

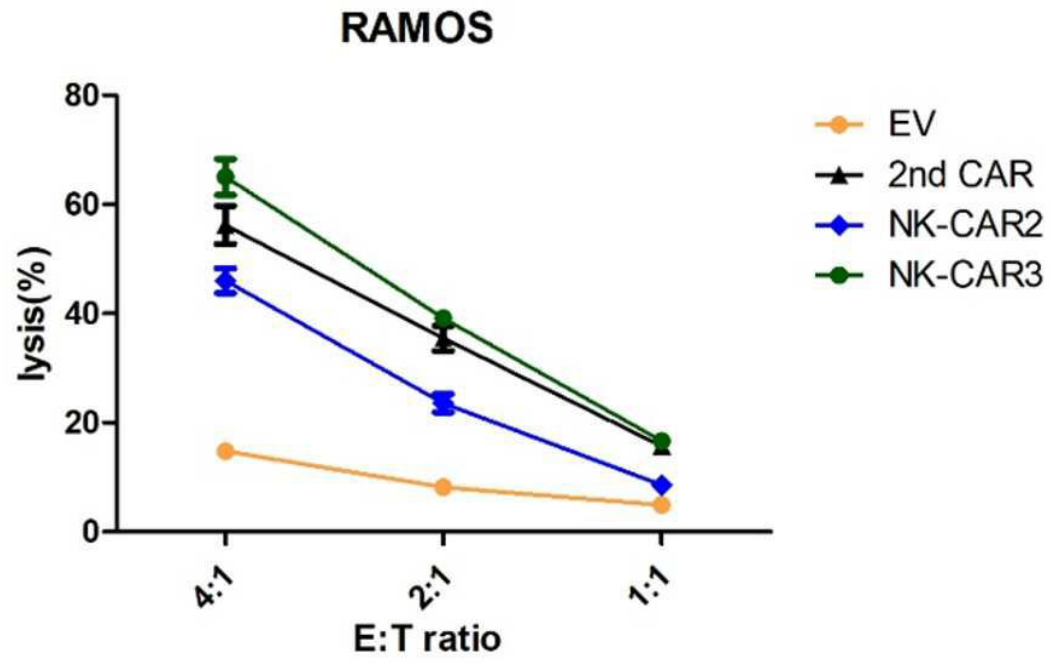
도면3a


REH
100
80
60
40
20
0
lysis(%)
20:1
10:1
5:1
E:T ratio
EV
2nd CAR
NK-CAR1
NK-CAR2
NK-CAR3

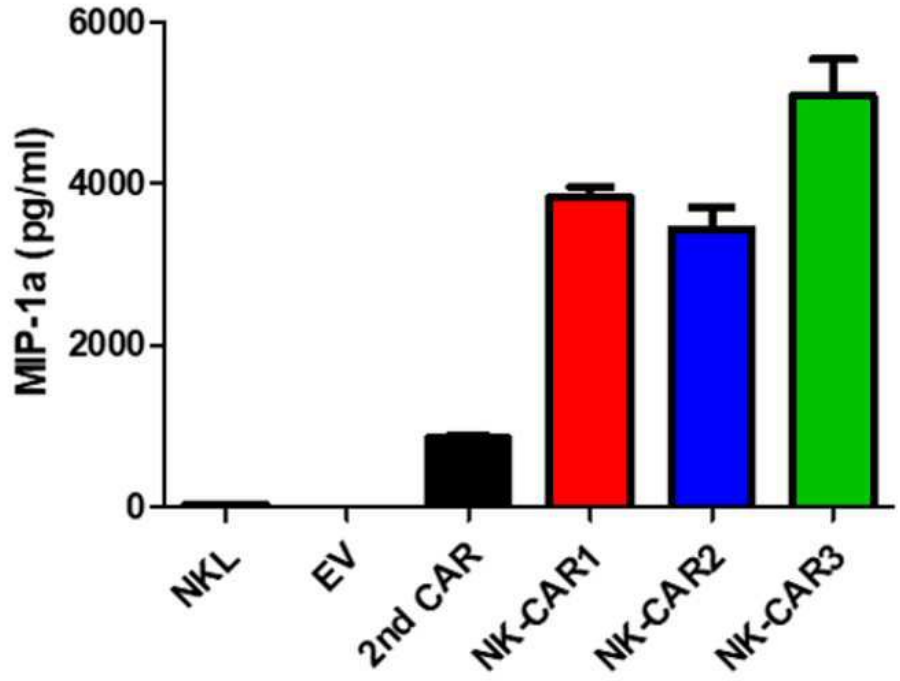
도면3b


REH
lysis(%)
40
30
20
10
0
4:1
2:1
1:1
E:T ratio
EV
2nd CAR
NK-CAR2
NK-CAR3

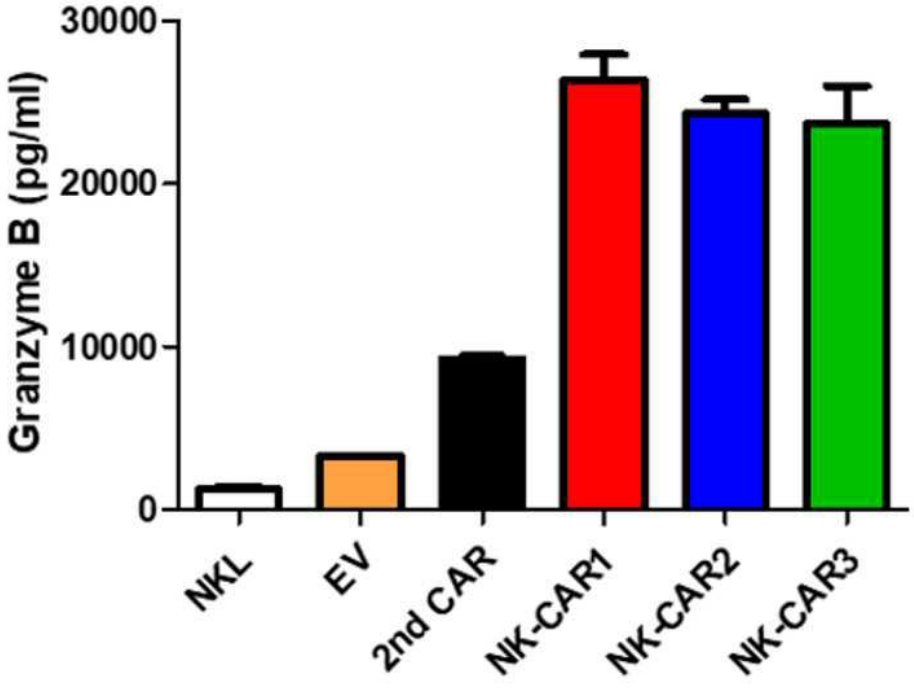
도면3c


RAMOS
lysis(%)
80
60
40
20
0
4:1
2:1
1:1
E:T ratio
EV
2nd CAR
NK-CAR2
NK-CAR3

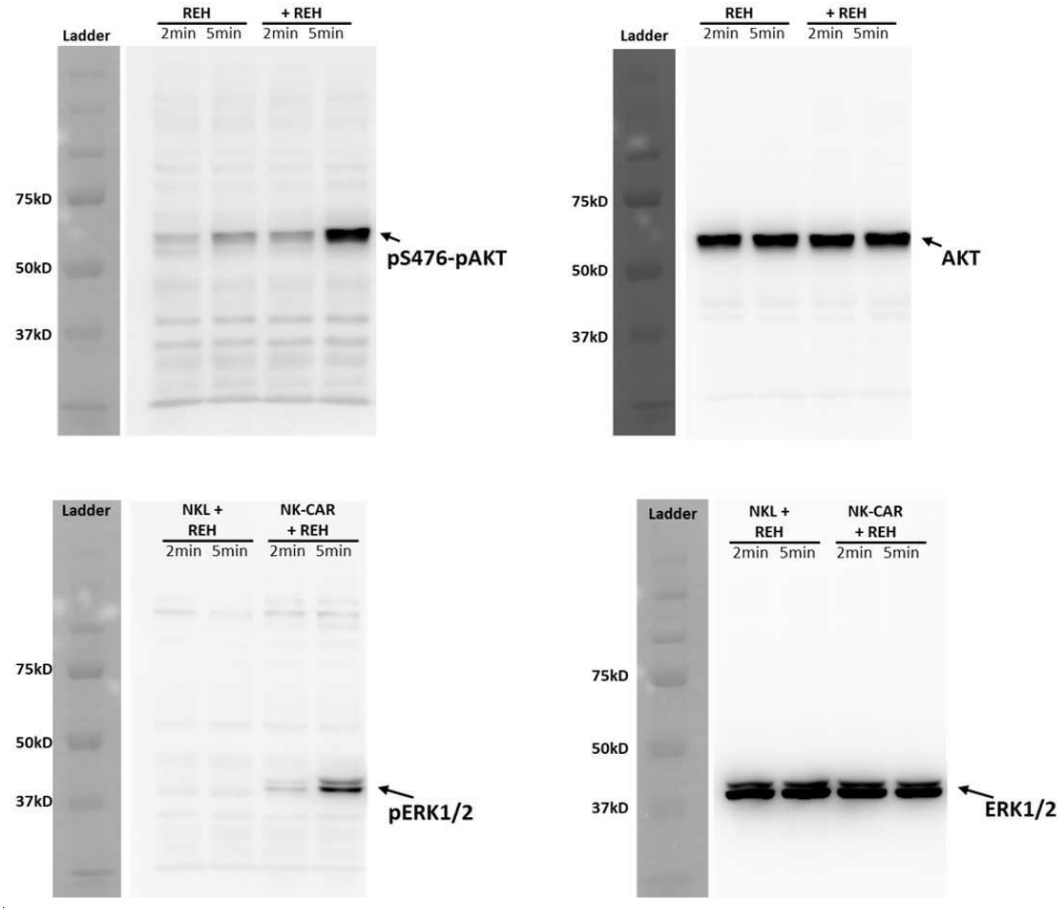
도면4a


MIP-1a (pg/ml)
6000
4000
2000
0
NKL
EV
2nd CAR
NK-CAR1
NK-CAR2
NK-CAR3

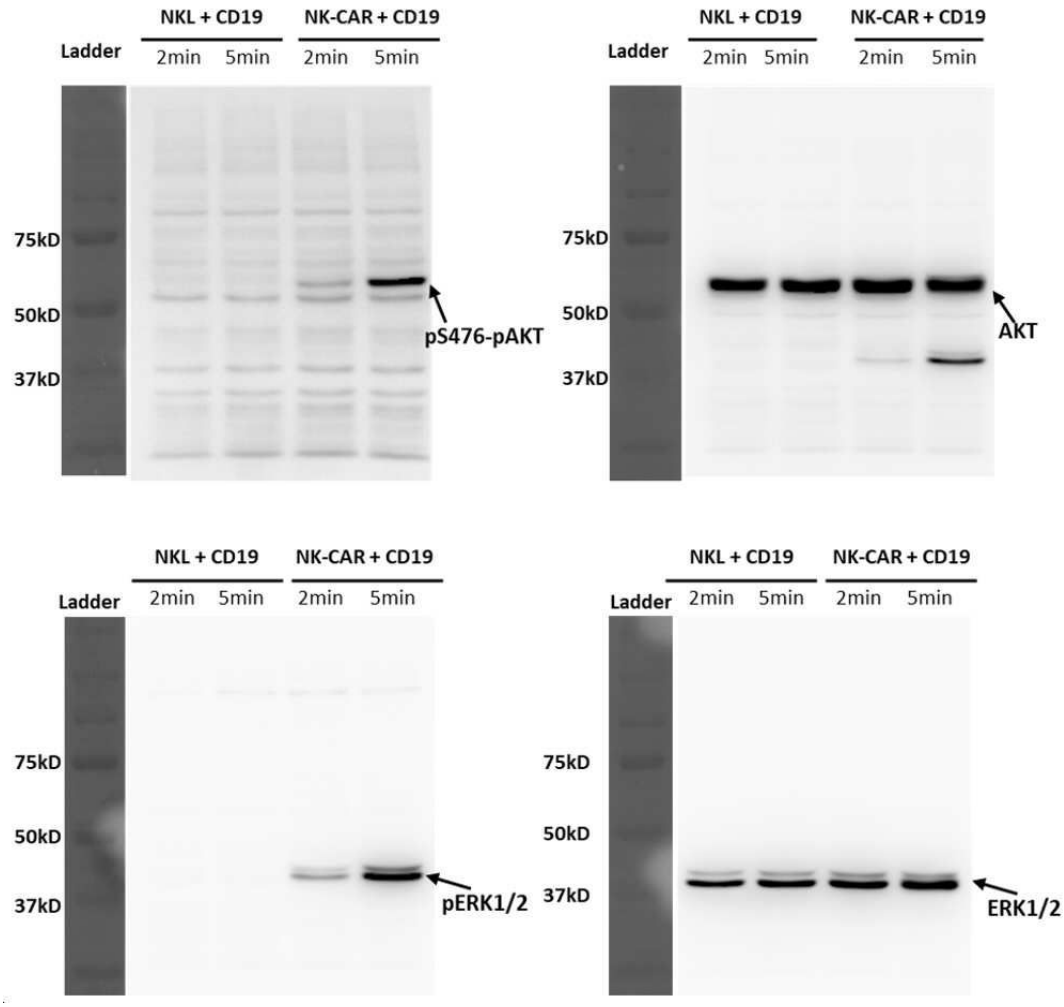
도면4b


Granzyme B (pg/ml)
30000
20000
10000
0
NKL
EV
2nd CAR
NK-CAR1
NK-CAR2
NK-CAR3

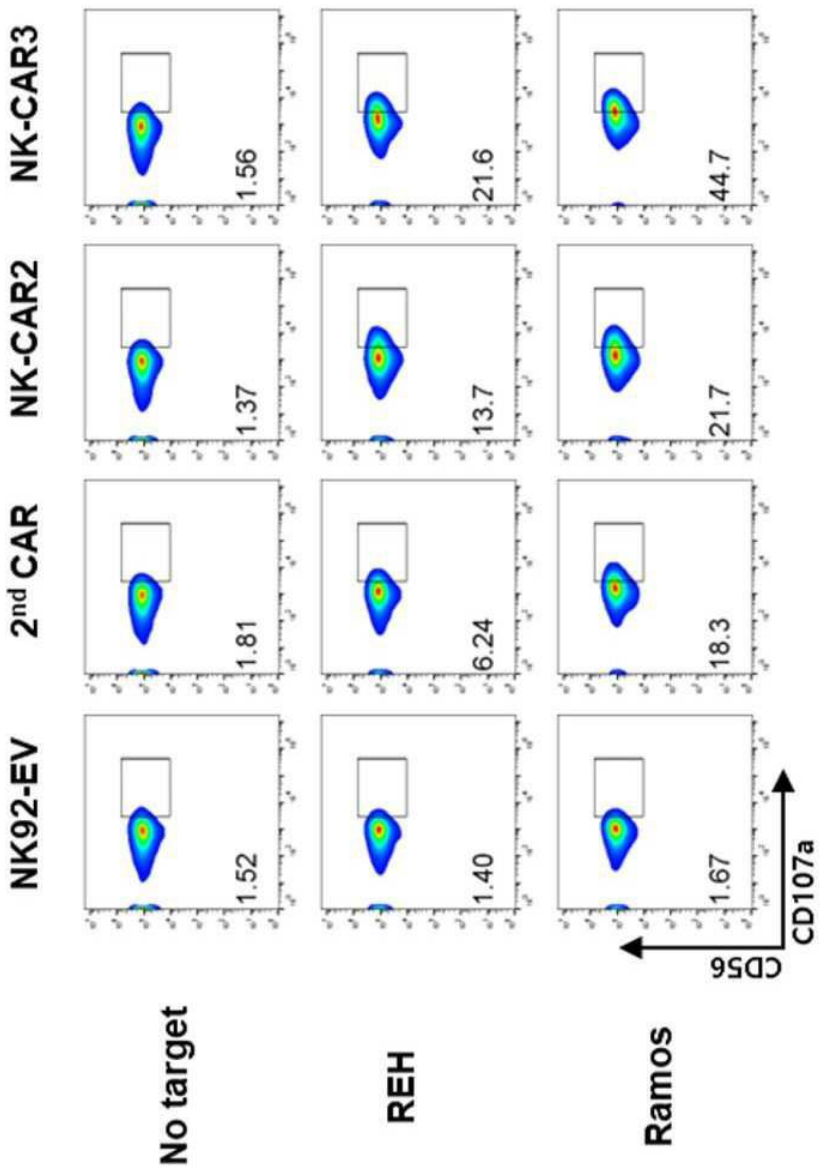
도면5a


Ladder
REH
+ REH
2min 5min 2min 5min
75kD
50kD
37kD
pS476-pAKT
AKT
NKL + REH
NK-CAR + REH
pERK1/2
ERK1/2

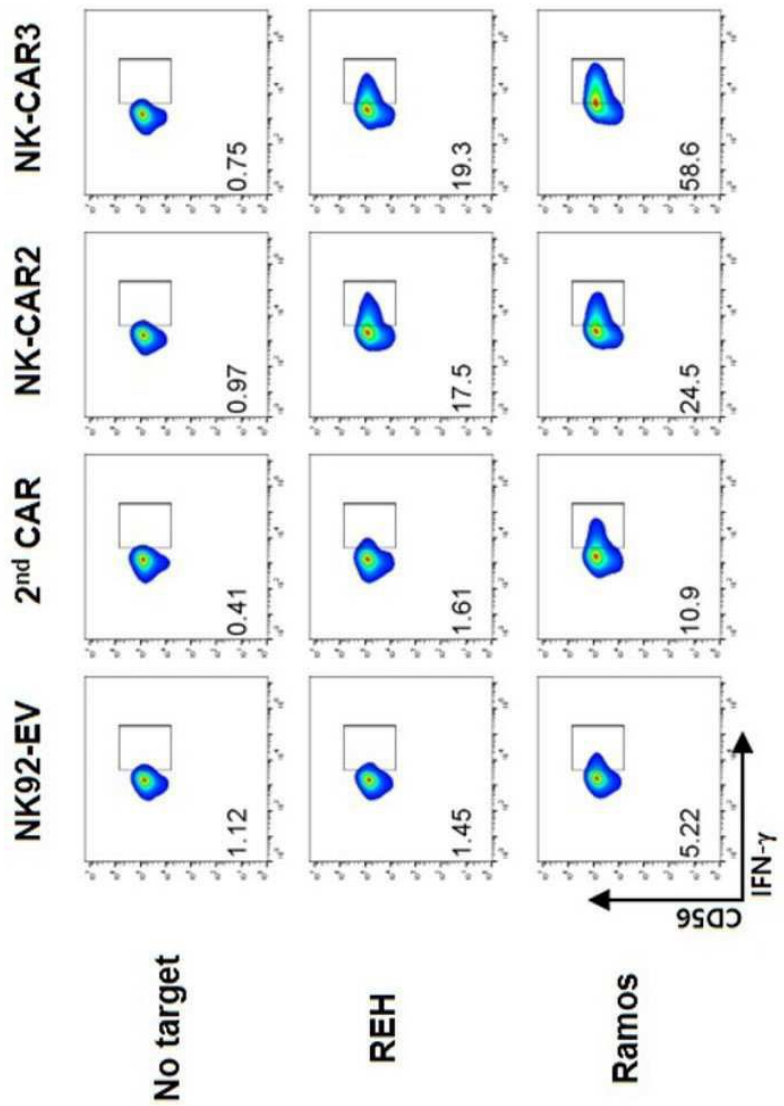
도면5b


NKL + CD19
NK-CAR + CD19
Ladder
2min
5min
2min
5min
75kD
50kD
37kD
pS476-pAKT
AKT
pERK1/2
ERK1/2

도면6


NK92-EV
2nd CAR
NK-CAR2
NK-CAR3
No target
REH
Ramos
1.52
1.81
1.37
1.56
1.40
6.24
13.7
21.6
1.67
18.3
21.7
44.7
CD56
CD107a

도면7


NK92-EV
2nd CAR
NK-CAR2
NK-CAR3
No target
REH
Ramos
1.12
0.41
0.97
0.75
1.45
1.61
17.5
19.3
5.22
10.9
24.5
58.6
CD56
IFN-γ

도면8

- NK-CAR1의 full insert 아미노산서열

(CD8a시그널 펩타이드-Myc태그-antiCD19scFv-CD8a힌지-DAP10세포외도메인-DAP10막관통도메인
-DAP10세포내도메인-2B4세포내도메인-CD3z세포내도메인)

MALPVTALLLPLALLLHAARPEQKLISEEDLDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVK
LLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGG
SEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKS
QVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA
GGAVHTRGLDFACDQTTPGERSSLPAFYPGTSGSCSGCGSLSLPLLAGLVAADAVASLLIVGAVFLCARPRRSPA
QEDGKVYINMPGRGWRRKRKEKQSETSPKEFLTIYEDVKDLKTRRNHEQEQTFPGGGSTIYSMIQSQSSAPTSQE
PAYTLYSLIQPSRKSGSRKRNHSPSFNSTIYEVIGKSQPKAQNPARLSRKELENFDVYSRVKFSRSADAPAYQQGQ
NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGL
YQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

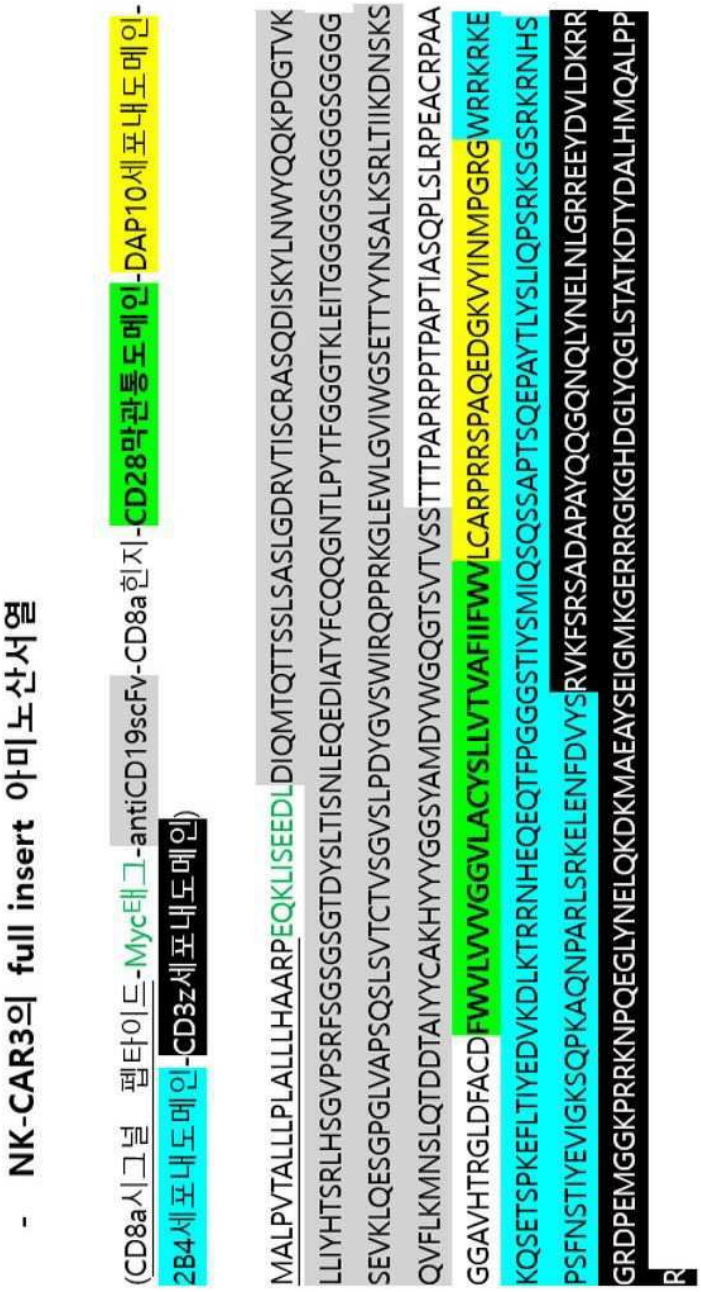
도면9

- NK-CAR2의 full insert 아미노산서열

(CD8a시그널 펩타이드-Myc태그-antiCD19scFv-CD28힌지-DAP10세포외도메인-DAP10막관통도메인
-DAP10세포내도메인-2B4세포내도메인-CD3z세포내도메인)

MALPVTALLLPLALLLHAARPEQKLISEEDLDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVK
LLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGGGSGGGGSGGGG
SEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNSALKSRLTIIKDNSKS
QVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSVTVSSIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPS
PLFPGPSKPQTTPGERSSLPAFYPGTSGSCSGCGSLSLPLLAGLVAADAVASLLIVGAVFLCARPRRSPAQEDGKV
YINMPGRGWRRKRKEKQSETSPKEFLTIYEDVKDLKTRRNHEQEQTFPGGGSTIYSMIQSQSSAPTSQEPAYTLYS
LIQPSRKSGSRKRNHSPSFNSTIYEVIGKSQPKAQNPARLSRKELENFDVYSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE
LNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTA
TKDTYDALHMQALPPR

도면10



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.