(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0045930
(43) 공개일자 2022년04월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 14/725* (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/005 (2013.01)
A61K 38/1774 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7038628
(22) 출원일자(국제) 2020년04월30일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년11월25일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/030837
(87) 국제공개번호 WO 2020/223550
국제공개일자 2020년11월05일
(30) 우선권주장
62/841,183 2019년04월30일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
마이얼로이드 테라퓨틱스, 인크.
미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 테크놀로지 스퀘어 300 스위트 203
(72) 발명자
게츠 다니엘
미국 02199 매사추세츠주 보스턴 보일스톤 스트리트 800 스위트 2222
왕 육시아오
미국 02199 매사추세츠주 보스턴 보일스톤 스트리트 800 스위트 2222
(74) 대리인
김진희, 김태홍

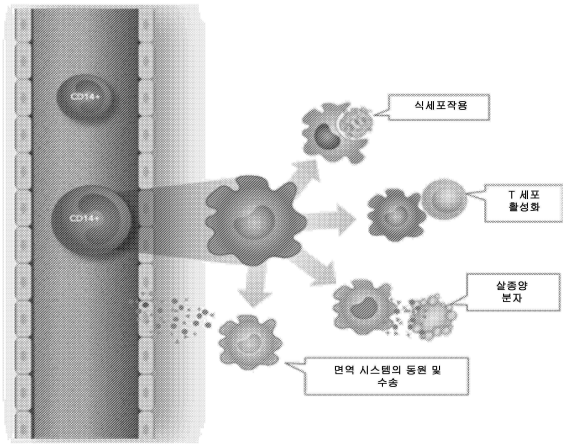
전체 청구항 수 : 총 265 항

(54) 발명의 명칭 **조작된 키메라 융합 단백질 조성물 및 이의 사용 방법**

(57) 요 약

본 개시는 암 또는 감염의 면역요법을 위해 증강된 식세포 활성을 가진 키메라 항원 수용체를 발현하는 조작된 식세포성 세포를 제조하고 사용하는 조성물 및 방법을 제공한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 39/00 (2013.01)
A61K 39/3955 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 16/00 (2013.01)
C07K 16/2896 (2013.01)
C07K 16/32 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)

(30) 우선권주장
62/841,190 2019년04월30일 미국(US)
16/827,302 2020년03월23일 미국(US)
16/827,381 2020년03월23일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) (i) 막횡단 도메인, 및

(ii) 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인

을 포함하는 식세포 또는 테더링(tethering) 수용체(PR) 서브유닛; 및

(b) 표적 세포의 항원에 특이적인 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인

을 포함하는 키메라 융합 단백질(CFP)을 코딩하는 재조합 핵산을 포함하는 조성물로서,

막횡단 도메인과 세포외 도메인은 작동 가능하게 연결되고; 항원은 CD19 또는 CD22 항원이 아니고, CFP와 표적 세포의 항원의 결합 시, CFP를 발현하는 세포의 사멸 또는 식세포작용 활성은 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 20% 증가되고, 사멸 또는 식세포작용 활성은 유세포분석에 의해 측정되는 것인 조성물.

청구항 2

(a) (i) 막횡단 도메인, 및

(ii) 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인

을 포함하는 식세포 또는 테더링 수용체(PR) 서브유닛; 및

(b) 표적 세포의 항원에 특이적인 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인

을 포함하는 키메라 융합 단백질(CFP)을 코딩하는 재조합 핵산을 포함하는 조성물로서,

막횡단 도메인과 세포외 도메인은 작동 가능하게 연결되고; CFP와 표적 세포의 항원의 결합 시, CFP를 발현하는 세포의 사멸 또는 식세포작용 활성은 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 10배 증가되고, 사멸 또는 식세포작용 활성은 CFP를 발현하는 세포 100개당 삼킴(engulfment)으로서 계산되는 것인 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 식세포 또는 테더링 수용체로부터 유래하거나, 세포내 신호전달 도메인은 식세포작용 활성화 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 Megf10, MerTk, FcR 또는 Bai1로부터 선택된 식세포 수용체 이외의 수용체로부터 유래한 것인 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 표 2에 나열된 수용체들로 구성된 군으로부터 선택된 수용체로부터 유래한 것인 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 염증유발 신호전달 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은, PI3K 동원 도메인이 아닌 염증유발 신호전달 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 8

(a) (i) 막횡단 도메인, 및

(ii) 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인

을 포함하는 식세포 또는 테더링 수용체(PR) 서브유닛; 및

(b) 표적 세포의 항원에 특이적인 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인

을 포함하는 키메라 융합 단백질(CFP)을 코딩하는 재조합 핵산을 포함하는 조성물로서,

막횡단 도메인과 세포외 도메인은 작동 가능하게 연결되고; 세포내 신호전달 도메인은 Megf10, MerTk, FcRα 및 Bai1로부터 선택된 식세포 수용체 이외의 식세포 수용체로부터 유래한 것인 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, CFP와 표적 세포의 항원의 결합 시, CFP를 발현하는 세포의 사멸 활성은 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 20% 이상 증가되고, CFP를 발현하는 세포의 사멸 또는 식세포작용 활성은 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 20% 증가되고, 사멸 또는 식세포작용 활성은 유세포분석에 의해 측정되는 것인 조성물.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 렉틴, 덱틴 1, CD206, 스캐빈저 수용체 A1(SRA1), MARCO, CD36, CD163, MSR1, SCARA3, COLEC12, SCARA5, SCARB1, SCARB2, CD68, OLR1, SCARF1, SCARF2, CXCL16, STAB1, STAB2, SRCRB4D, SSC5D, CD205, CD207, CD209, RAGE, CD14, CD64, F4/80, CCR2, CX3CR1, CSF1R, Tie2, HuCRIg(L), CD64, CD32a, CD16a, CD89, Fc-알파 수용체 I, CR1, CD35, CD3ζ, CR3, CR4, Tim-1, Tim-4, TNFR1, MDA5, CD40 및 CD169로 구성된 군으로부터 선택된 단백질로부터 유래한 것인 조성물.

청구항 11

제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 염증유발 신호전달 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 12

(a) (i) 막횡단 도메인, 및

(ii) 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인

을 포함하는 식세포 또는 테더링 수용체(PR) 서브유닛; 및

(b) 표적 세포의 항원에 특이적인 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인

을 포함하는 키메라 융합 단백질(CFP)을 코딩하는 재조합 핵산을 포함하는 조성물로서,

막횡단 도메인과 세포외 도메인은 작동 가능하게 연결되고; 세포내 신호전달 도메인은 렉틴, 덱틴 1, CD206, 스캐빈저 수용체 A1(SRA1), MARCO, CD36, CD163, MSR1, SCARA3, COLEC12, SCARA5, SCARB1, SCARB2, CD68, OLR1, SCARF1, SCARF2, CXCL16, STAB1, STAB2, SRCRB4D, SSC5D, CD205, CD207, CD209, RAGE, CD14, CD64, F4/80, CCR2, CX3CR1, CSF1R, Tie2, HuCRIg(L), CD64, CD32a, CD16a, CD89, Fc-알파 수용체 I, CR1, CD35, CD3ζ, CR3, CR4, Tim-1, Tim-4, TNFR1, MDA5, CD40 및 CD169로 구성된 군으로부터 선택된 식세포 수용체로부터 유래한 것인 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, CFP와 표적 세포의 항원의 결합 시, CFP를 발현하는 세포의 사멸 또는 식세포작용 활성은 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 55% 증가되는 것인 조성물.

청구항 14

제12항 또는 제13항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 Megf10, MerTk, FcRα 또는 Bai1로부터 선택된 식세포

수용체 이외의 식세포 수용체로부터 유래한 것인 조성물.

청구항 15

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 염증유발 신호전달 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은, PI3K 동원 도메인이 아닌 염증유발 신호전달 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 17

(a) (i) 막횡단 도메인, 및

(ii) 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인

을 포함하는 식세포 또는 테더링 수용체(PR) 서브유닛; 및

(b) 표적 세포의 항원에 특이적인 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인

을 포함하는 키메라 융합 단백질(CFP)을 코딩하는 재조합 핵산을 포함하는 조성물로서,

막횡단 도메인과 세포외 도메인은 작동 가능하게 연결되고; 세포내 신호전달 도메인은, PI3K 동원 도메인이 아닌 염증유발 신호전달 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 18

(a) (i) 막횡단 도메인, 및

(ii) 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인

을 포함하는 식세포 또는 테더링 수용체(PR) 서브유닛; 및

(b) 표적 세포의 항원에 특이적인 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인

을 포함하는 키메라 융합 단백질(CFP)을 코딩하는 재조합 핵산을 포함하는 조성물로서,

막횡단 도메인과 세포외 도메인은 작동 가능하게 연결되고; 세포내 신호전달 도메인은 TFNR1 수용체로부터 유래한 신호전달 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 19

(a) (i) 막횡단 도메인, 및

(ii) 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인

을 포함하는 식세포 또는 테더링 수용체(PR) 서브유닛; 및

(b) 표적 세포의 항원에 특이적인 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인

을 포함하는 키메라 융합 단백질(CFP)을 코딩하는 재조합 핵산을 포함하는 조성물로서,

막횡단 도메인과 세포외 도메인은 작동 가능하게 연결되고; 세포내 신호전달 도메인은 CD40 수용체로부터 유래한 신호전달 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 20

(a) (i) 막횡단 도메인, 및

(ii) 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인

을 포함하는 식세포 또는 테더링 수용체(PR) 서브유닛; 및

(b) 표적 세포의 항원에 특이적인 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인

을 포함하는 키메라 융합 단백질(CFP)을 코딩하는 재조합 핵산을 포함하는 조성물로서,

막횡단 도메인과 세포외 도메인은 작동 가능하게 연결되고; 세포내 신호전달 도메인은 MDA5로부터 유래한 신호전달 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 21

제17항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, CFP와 표적 세포의 항원의 결합 시, CFP를 발현하는 세포의 사멸 또는 식세포작용 활성은 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 20% 이상 증가되고, 사멸 또는 식세포작용 활성은 유세포분석에 의해 측정되는 것인 조성물.

청구항 22

제17항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 식세포 수용체로부터 유래한 것인 조성물.

청구항 23

제17항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은, Megf10, MerTk, FcR 또는 Bai1로부터 선택된 식세포 수용체 이외의 식세포 수용체로부터 유래한 것인 조성물.

청구항 24

제17항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 렉틴, 덱틴 1, CD206, 스캐빈저 수용체 A1(SRA1), MARCO, CD36, CD163, MSR1, SCARA3, COLEC12, SCARA5, SCARB1, SCARB2, CD68, OLR1, SCARF1, SCARF2, CXCL16, STAB1, STAB2, SRCRB4D, SSC5D, CD205, CD207, CD209, RAGE, CD14, CD64, F4/80, CCR2, CX3CR1, CSF1R, Tie2, HuCRIg(L), CD64, CD32a, CD16a, CD89, Fc-알파 수용체 I, CR1, CD35, CD3ζ, CR3, CR4, Tim-1, Tim-4, TNFR1, MDA5, CD40 및 CD169로 구성된 군으로부터 선택된 식세포 수용체로부터 유래한 것인 조성물.

청구항 25

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 PI3K 동원 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 FcRγ 세포내 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 N에서 C의 순서로 FcRγ 세포내 도메인 및 CD40 수용체 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 28

제26항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 C에서 N의 순서로 FcRγ 세포내 도메인 및 CD40 수용체 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 29

제26항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 N에서 C의 순서로 FcRγ 세포내 도메인 및 TNFR1 수용체 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 30

제26항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 C에서 N의 순서로 FcRγ 세포내 도메인 및 TNFR1 수용체 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 31

제26항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 N에서 C의 순서로 FcRγ 세포내 도메인 및 MDA5 신호전달 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 32

제26항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 C에서 N의 순서로 FcRγ 세포내 도메인 및 MDA5 신호전달 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 33

제26항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 N에서 C의 순서로 FcRγ 세포내 도메인 및 PI3K 동원 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 34

제26항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 C에서 N의 순서로 FcRγ 세포내 도메인 및 PI3K 동원 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, CFP는 CFP가 세포에서 발현될 때 세포의 세포막 내로 기능적으로 혼입되는 것인 조성물.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 항원을 발현하는 표적 세포의 식세포작용의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 37

제36항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 항원을 발현하는 표적 세포의 식세포작용의 적어도 1.1배 증가를 나타내고, 이때 식세포작용은 유세포분석에 의해 측정되는 것인 조성물.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 항원을 발현하는 표적 세포의 식세포작용의 적어도 1.2배, 1.3배, 1.4배, 1.5배, 1.6배, 1.7배, 1.8배, 1.9배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 20배, 30배, 40배 또는 50배 증가를 나타내고, 이때 식세포작용은 유세포분석에 의해 측정되는 것인 조성물.

청구항 39

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 항원을 발현하는 표적 세포는 암 세포인 조성물.

청구항 40

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 항원을 발현하는 표적 세포는 직경이 적어도 0.8 마이크론인 조성물.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 스캐빈저 수용체로부터 유래한 것인 조성물.

청구항 42

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 사이토카인 생성의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 43

제42항에 있어서, 사이토카인은 IL-1, IL3, IL-6, IL-12, IL-13, IL-23, TNF, CCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11, IL-18, IL-23, IL-27, CSF, MCSF, GMCSF, IL17, IP-10, RANTES, 인터페론 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 44

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 이펙터 활성의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 45

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 교차 제시의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 46

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 MHC 클래스 II 단백질의 발현의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 47

제1항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 CD80의 발현의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 48

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 CD86의 발현의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 49

제1항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 MHC 클래스 I 단백질의 발현의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 50

제1항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 TRAIL/TNF 패밀리 사멸 수용체의 발현의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 51

제1항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 B7-H2의 발현의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 52

제1항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 LIGHT의 발현의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 53

제1항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 HVEM의 발현의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 54

제1항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 CD40의 발현의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 55

제1항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 TL1A의 발현의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 56

제1항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 41BBL의 발현의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 57

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 OX40L의 발현의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 58

제1항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 GITRL 사멸 수용체의 발현의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 59

제1항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 CD30L의 발현의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 60

제1항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 TIM4의 발현의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 61

제1항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 TIM1 리간드의 발현의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 62

제1항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 SLAM의 발현의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 63

제1항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 CD48의 발현의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 64

제1항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 CD58의 발현의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 65

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 CD155의 발현의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 66

제1항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 CD112의 발현의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 67

제1항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 PDL1의 발현의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 68

제1항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 B7-DC의 발현의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 69

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 호흡 폭발의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 70

제1항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 ROS 생성의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 71

제1항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 iNOS 생성의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 72

제1항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 iNOS 생성의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 73

제1항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 세포외 소포 생성의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 74

제1항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 항원을 발현하는 표적 세포와의 트로고사이토시스(trogocytosis)의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 75

제1항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 식세포작용의 CD47 매개 억제에 대한 내성의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 76

제1항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 식세포작용의 LILRB1 매개 억제에 대한 내성의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 77

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 도메인은 Rac 억제 도메인, Cdc42 억제 도메인 또는 GTPase 억제 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 78

제64항에 있어서, Rac 억제 도메인, Cdc42 억제 도메인 또는 GTPase 억제 도메인은 CFP를 발현하는 세포의 식세포 컵(phagocytic cup)에서 Rac, Cdc42 또는 GTPase를 억제하는 것인 조성물.

청구항 79

제1항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 도메인은 F-액틴 해체 활성화 도메인, ARHGAP12 활성화 도

메인, ARHGAP25 활성화 도메인 또는 SH3BP1 활성화 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 80

제1항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, CFP를 발현하는 세포는 포스파티딜이노시톨 3,4,5-트리스포스페이트 생성의 증가를 나타내는 것인 조성물.

청구항 81

제1항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 세포외 도메인은 Ig 결합 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 82

제1항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서, 세포외 도메인은 IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, FcRγI, FcRγIIA, FcRγIIB, FcRγIIC, FcRγIIIA, FcRγIIIB, FcRn, TRIM21, FcRL5 결합 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 83

제1항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 세포외 도메인은 FcR 세포외 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 84

제1항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 세포외 도메인은 FcR-알파, FcRβ, FcRε 또는 FcRγ 세포외 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 85

제1항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 세포외 도메인은 FcRα(FCAR) 세포외 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 86

제1항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 세포외 도메인은 FcRβ 세포외 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 87

제1항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, 세포외 도메인은 FcRε(FCER1A) 세포외 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 88

제1항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 세포외 도메인은 FcRγ(FDGR1A, FCGR2A, FCGR2B, FCGR2C, FCGR3A, FCGR3B) 세포외 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 89

제1항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 세포외 도메인은 인테그린 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 90

제1항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 세포외 도메인은 하나 이상의 인테그린 α1, α2, αIIb, α3, α4, α5, α6, α7, α8, α9, α10, α11, αD, αE, αL, αM, αV, αX, β1, β2, β3, β4, β5, β6, β7 또는 β8 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 91

제1항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 도메인은 CD47 억제 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 92

제1항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, PR 서브유닛은, 막횡단 도메인 및 세포외 항원 결합 도메인에 작동가능하게 연결된 세포외 도메인을 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 93

제92항에 있어서, 세포외 도메인은 수용체, 힌지, 스페이서 또는 링커의 세포외 도메인을 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 94

제93항에 있어서, 세포외 도메인은 PR의 세포외 부분을 포함하는 것인 조성물.

청구항 95

제94항에 있어서, PR의 세포외 부분은 PR 세포내 신호전달 도메인와 동일한 PR로부터 유래한 것인 조성물.

청구항 96

제92항 내지 제95항 중 어느 한 항에 있어서, 세포외 도메인은 스캐빈저 수용체 또는 면역글로불린 도메인의 세포외 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 97

제96항에 있어서, 면역글로불린 도메인은 면역글로불린 또는 면역글로불린 힌지 영역의 세포외 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 98

제92항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서, 세포외 도메인은 식세포 삼킴 마커를 포함하는 것인 조성물.

청구항 99

제92항 내지 제98항 중 어느 한 항에 있어서, 세포외 도메인은 다량체 조립이 가능한 구조를 포함하는 것인 조성물.

청구항 100

제92항 내지 제98항 중 어느 한 항에 있어서, 세포외 도메인은 다량체화를 위한 스카폴드를 포함하는 것인 조성물.

청구항 101

제1항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, 세포외 도메인은 길이가 적어도 10개, 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 150개, 200개, 300개, 300개, 400개 또는 500개 아미노산인 조성물.

청구항 102

제1항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, 세포외 도메인은 길이가 최대 500개, 400개, 300개, 200개 또는 100개 아미노산인 조성물.

청구항 103

제1항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 세포외 항원 결합 도메인은 표적 세포의 항원에 특이적으로 결합하는 것인 조성물.

청구항 104

제1항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서, 세포외 항원 결합 도메인은 항체 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 105

제1항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 세포외 항원 결합 도메인은 수용체 도메인, 항체 도메인을 포함하고, 이때 항체 도메인은 기능적 항체 단편, 단일 쇄 가변 단편(scFv), Fab, 단일 도메인 항체(sdAb), 나노바디, V_H 도메인, V_L 도메인, VNAR 도메인, V_{HH} 도메인, 이중특이적 항체, 디아바디, 또는 이들의 기능적 단편 또는 조

합을 포함하는 것인 조성물.

청구항 106

제1항 내지 제105항 중 어느 한 항에 있어서, 세포외 항원 결합 도메인은 리간드, 수용체의 세포외 도메인 또는 어댑터를 포함하는 것인 조성물.

청구항 107

제1항 내지 제106항 중 어느 한 항에 있어서, 세포외 항원 결합 도메인은 단일 항원에 특이적인 단일 세포외 항원 결합 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 108

제1항 내지 제107항 중 어느 한 항에 있어서, 세포외 항원 결합 도메인은 적어도 2개의 세포외 항원 결합 도메인을 포함하고, 이때 적어도 2개의 세포외 항원 결합 도메인 각각은 상이한 항원에 특이적인 것인 조성물.

청구항 109

제1항 내지 제108항 중 어느 한 항에 있어서, 항원은 암 항원 또는 병원성 항원 또는 자가면역 항원인 조성물.

청구항 110

제1항 내지 제109항 중 어느 한 항에 있어서, 항원은 바이러스 항원을 포함하는 것인 조성물.

청구항 111

제1항 내지 제110항 중 어느 한 항에 있어서, 항원은 T-림프구 항원인 조성물.

청구항 112

제1항 내지 제111항 중 어느 한 항에 있어서, 항원은 세포외 항원인 조성물.

청구항 113

제1항 내지 제112항 중 어느 한 항에 있어서, 항원은 세포내 항원인 조성물.

청구항 114

제1항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서, 항원은 타이미딘 키나제(TK1), 하이포잔틴-구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제(HPRT), 수용체 티로신 키나제 유사 오판(Orphan) 수용체 1(ROR1), 뮤신-1, 뮤신-16(MUC16), MUC1, 표피 성장 인자 수용체 vIII(EGFRvIII), 메소텔린, 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER2), 메소텔린, EBNA-1, LEMD1, 포스파티딜 세린, 암배아 항원(CEA), B 세포 성숙 항원(BCMA), 글리피칸 3(GPC3), 여포 자극 호르몬 수용체, 섬유모세포 활성화 단백질(FAP), 에리쓰로포이에틴 생성 간세포암종 A2(EphA2), EphB2, 천연 킬러 군 2D(NKG2D) 리간드, 디시알로강글리오사이드(Disialoganglioside) 2(GD2), CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD19, CD20, CD22, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44v6, CD45, CD56CD79b, CD97, CD117, CD123, CD133, CD138, CD171, CD179a, CD213A2, CD248, CD276, PSCA, CS-1, CLECL1, GD3, PSMA, FLT3, TAG72, EPCAM, IL-1, 인테그린 수용체, PRSS21, VEGFR2, PDGFR-β, SSEA-4, EGFR, NCAM, 프로스타제(prostase), PAP, ELF2M, GM3, TEM7R, CLDN6, TSHR, GPRC5D, ALK, IGLL1, 피부 림프구 관련 항원(CLA) 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 115

제1항 내지 제114항 중 어느 한 항에 있어서, 항원은 CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CCR4, CXCR4, CD8, CD30, CD45, CD56 및 피부 림프구 관련 항원(CLA)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 116

제114항에 있어서, 항원은 CD5 항원인 조성물.

청구항 117

제114항에 있어서, 항원은 HER2 항원인 조성물.

청구항 118

제1항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, 항원은 난소암 항원 또는 T 림프종 항원인 조성물.

청구항 119

제1항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, 항원은 인테그린 수용체인 조성물.

청구항 120

제1항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, 항원은 α1, α2, αIIb, α3, α4, α5, α6, α7, α8, α9, α10, α11, αD, αE, αL, αM, αV, αX, β1, β2, β3, β4, β5, β6, β7 및 β8로 구성된 군으로부터 선택된 인테그린 수용체인 조성물.

청구항 121

제1항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 항원은 2개 이상의 항원을 포함하는 것인 조성물.

청구항 122

제1항 내지 제121항 중 어느 한 항에 있어서, 막횡단 도메인과 세포외 항원 결합 도메인은 링커를 통해 작동 가능하게 연결되는 것인 조성물.

청구항 123

제1항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 막횡단 도메인과 세포외 항원 결합 도메인은 CD8α, IgG1 또는 IgG4의 힌지 영역과 같은 링커를 통해 작동 가능하게 연결되는 것인 조성물.

청구항 124

제1항 내지 제123항 중 어느 한 항에 있어서, 세포외 도메인은 다량체화 스카폴드를 포함하는 것인 조성물.

청구항 125

제1항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 막횡단 도메인은 FcR 막횡단 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 126

제1항 내지 제125항 중 어느 한 항에 있어서, 막횡단 도메인은 20개, 10개 또는 5개 이하의 변형을 가진 FcR-ε 막횡단 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 127

제1항 내지 제126항 중 어느 한 항에 있어서, 막횡단 도메인은 신탁신(syntaxin) 3 또는 신탁신 4 또는 신탁신 5와 같은 신탁신으로부터의 막횡단 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 128

제1항 내지 제127항 중 어느 한 항에 있어서, 막횡단 도메인은 CD8 막횡단 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 129

제1항 내지 제127항 중 어느 한 항에 있어서, 막횡단 도메인은 CD28 막횡단 도메인 또는 CD2 막횡단 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 130

제1항 내지 제127항 중 어느 한 항에 있어서, 막횡단 도메인은 CD68 막횡단 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 131

제1항 내지 제130항 중 어느 한 항에 있어서, 막횡단 도메인은 CFP가 세포에서 발현될 때 내생성 수용체의 막횡단 도메인과 올리고머화하는 것인 조성물.

청구항 132

제1항 내지 제131항 중 어느 한 항에 있어서, 막횡단 도메인은 CFP가 세포에서 발현될 때 외생성 수용체의 막횡단 도메인과 올리고머화하는 것인 조성물.

청구항 133

제1항 내지 제132항 중 어느 한 항에 있어서, 막횡단 도메인은 CFP가 세포에서 발현될 때 내생성 수용체의 막횡단 도메인과 이량체화하는 것인 조성물.

청구항 134

제1항 내지 제133항 중 어느 한 항에 있어서, 막횡단 도메인은 CFP가 세포에서 발현될 때 외생성 수용체의 막횡단 도메인과 이량체화하는 것인 조성물.

청구항 135

제1항 내지 제134항 중 어느 한 항에 있어서, 막횡단 도메인은 세포내 신호전달 도메인이 유래한 단백질과 상이한 단백질로부터 유래한 것인 조성물.

청구항 136

제1항 내지 제135항 중 어느 한 항에 있어서, 막횡단 도메인은 세포외 도메인이 유래한 단백질과 상이한 단백질로부터 유래한 것인 조성물.

청구항 137

제1항 내지 제136항 중 어느 한 항에 있어서, 막횡단 도메인은 식세포 수용체의 막횡단 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 138

제1항 내지 제137항 중 어느 한 항에 있어서, 막횡단 도메인 및 세포외 도메인은 동일한 단백질로부터 유래한 것인 조성물.

청구항 139

제1항 내지 제138항 중 어느 한 항에 있어서, 막횡단 도메인은 세포내 신호전달 도메인과 동일한 단백질로부터 유래한 것인 조성물.

청구항 140

제1항 내지 제139항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 핵산은 DAP12 동원 도메인을 코딩하는 것인 조성물.

청구항 141

제1항 내지 제140항 중 어느 한 항에 있어서, 막횡단 도메인은 DAP12와 올리고머화하는 막횡단 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 142

제1항 내지 제141항 중 어느 한 항에 있어서, 막횡단 도메인은 길이가 적어도 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 31개 또는 32개 아미노산인 조성물.

청구항 143

제1항 내지 제142항 중 어느 한 항에 있어서, 막횡단 도메인은 길이가 최대 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 31개 또는 32개 아미노산인 조성물.

청구항 144

제1항 내지 제143항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 도메인은 포스파타제 억제 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 145

제1항 내지 제144항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 도메인은 ARP2/3 억제 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 146

제1항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 도메인은 적어도 하나의 ITAM 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 147

제1항 내지 제146항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 도메인은 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 ITAM 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 148

제1항 내지 제147항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 도메인은 적어도 하나의 ITAM 도메인을 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 149

제1항 내지 제148항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 도메인은 CD3 제타 TCR 서브유닛, CD3 엡실론 TCR 서브유닛, CD3 감마 TCR 서브유닛, CD3 델타 TCR 서브유닛, TCR 제타 쇄, Fc 엡실론 수용체 1 쇄, Fc 엡실론 수용체 2 쇄, Fc 감마 수용체 1 쇄, Fc 감마 수용체 2a 쇄, Fc 감마 수용체 2b1 쇄, Fc 감마 수용체 2b2 쇄, Fc 감마 수용체 3a 쇄, Fc 감마 수용체 3b 쇄, Fc 베타 수용체 1 쇄, TYROBP(DAP12), CD5, CD16a, CD16b, CD22, CD23, CD32, CD64, CD79a, CD79b, CD89, CD278, CD66d, 이들의 기능적 단편, 및 이들에 대한 적어도 1개 내지 20개 이하의 변형을 가진 이들의 아미노산 서열의 군으로부터 선택된 적어도 하나의 ITAM 도메인을 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 150

제149항에 있어서, 적어도 하나의 ITAM 도메인은 Src 패밀리 키나제 인산화 부위를 포함하는 것인 조성물.

청구항 151

제149항에 있어서, 적어도 하나의 ITAM 도메인은 Syk 동원 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 152

제1항 내지 제151항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 도메인은 F-액틴 해중합 활성화 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 153

제1항 내지 제152항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 도메인은 효소 활성을 결여하는 것인 조성물.

청구항 154

제1항 내지 제153항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 도메인은 CD3 제타 세포내 도메인으로부터 유래한 도메인을 포함하지 않는 것인 조성물.

청구항 155

제1항 내지 제154항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 도메인은 CD47 억제 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 156

제1항 내지 제155항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은, PSGL-1의 세포내 영역과 같은 인테그린을 활성화시키는 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 157

제1항 내지 제156항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은, EPAC 및 C3G로부터의 것과 같은, Rap1 GTPase를 활성화시키는 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 158

제1항 내지 제157항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 팍실린(paxillin)으로부터의 것인 조성물.

청구항 159

제1항 내지 제158항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 국소(focal) 부착 키나제를 활성화시키는 것인 조성물.

청구항 160

제1항 내지 제159항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 단일 식세포 수용체로부터 유래한 것인 조성물.

청구항 161

제1항 내지 제160항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 단일 스캐빈저 수용체로부터 유래한 것인 조성물.

청구항 162

제1항 내지 제161항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 도메인은 식세포작용 증강 도메인을 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 163

제1항 내지 제162항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 도메인은 염증유발 신호전달 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 164

제163항에 있어서, 염증유발 신호전달 도메인은 키나제 활성화 도메인 또는 키나제 결합 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 165

제163항 또는 제164항에 있어서, 염증유발 신호전달 도메인은 IL-1 신호전달 캐스케이드 활성화 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 166

제163항 내지 제165항 중 어느 한 항에 있어서, 염증유발 신호전달 도메인은 TLR3, TLR4, TLR7, TLR9, TRIF, RIG-1, MYD88, MAL, IRAK1, MDA-5, IFN 수용체, NLRP 패밀리 구성원, NLRP1-14, NOD1, NOD2, 피린(Pyrin), AIM2, NLRC4, FCGR3A, FCERIG, CD40, Tank 결합 키나제(TNK), 캐스파제 도메인 또는 프로캐스파제 결합 도메인, 또는 이들의 임의의 조합으로부터 유래한 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 것인 조성물.

청구항 167

제1항 내지 제166항 중 어느 한 항에 있어서, CFP는 전체 길이 세포내 신호전달 도메인을 포함하지 않는 것인 조성물.

청구항 168

제1항 내지 제167항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 도메인은 길이가 적어도 5개, 10개, 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 150개, 200개, 300개, 300개, 400개 또는 500개 아미노산인 조성물.

청구항 169

제1항 내지 제168항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 도메인은 길이가 최대 10개, 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 150개, 200개, 300개, 300개, 400개 또는 500개 아미노산인 조성물.

청구항 170

제1항 내지 제169항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 핵산은 FcRα 쇄 세포외 도메인, FcRα 쇄 막횡단 도메인 및/또는 FcRα 쇄 세포내 도메인을 코딩하는 것인 조성물.

청구항 171

제1항 내지 제170항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 핵산은 FcRβ 쇄 세포외 도메인, FcRβ 쇄 막횡단 도메인 및/또는 FcRβ 쇄 세포내 도메인을 코딩하는 것인 조성물.

청구항 172

제170항 또는 제171항에 있어서, FcRα 쇄 또는 FcRβ 쇄는 세포에서 발현될 때 FcRɣ와 복합체를 형성하는 것인 조성물.

청구항 173

제172항에 있어서, FcRα 쇄 또는 FcRβ 쇄는 세포에서 발현될 때 내생성 FcRɣ와 복합체를 형성하는 것인 조성물.

청구항 174

제170항 내지 제173항 중 어느 한 항에 있어서, FcRα 쇄 또는 FcRβ 쇄는 FcRɣ를 발현하지 않는 세포의 세포막 내로 혼입되지 않는 것인 조성물.

청구항 175

제170항 내지 제174항 중 어느 한 항에 있어서, CFP는 FcRα 쇄 세포내 신호전달 도메인을 포함하지 않는 것인 조성물.

청구항 176

제170항 내지 제175항 중 어느 한 항에 있어서, CFP는 FcRβ 쇄 세포내 신호전달 도메인을 포함하지 않는 것인 조성물.

청구항 177

제1항 내지 제176항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 핵산은 TREM 세포외 도메인, TREM 막횡단 도메인 및/또는 TREM 세포내 도메인을 코딩하는 것인 조성물.

청구항 178

제177항에 있어서, TREM은 TREM1, TREM2 또는 TREM3인 조성물.

청구항 179

N-말단에서 C-말단으로

(a) 표적 세포의 항원에 특이적인 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인; 및

(b) (i) CD8 막횡단 도메인, 및

(ii) Fcγ 세포내 신호전달 도메인 및 CD40 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인

을 포함하는 식세포 또는 테더링 수용체(PR) 서브유닛

을 포함하는 PR 융합 단백질(CFP)을 코딩하는 재조합 핵산을 포함하는 조성물로서, 막횡단 도메인과 세포외 도메인은 링커에 의해 작동 가능하게 연결된 것인 조성물.

청구항 180

N-말단에서 C-말단으로

(a) 표적 세포의 항원에 특이적인 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인; 및

(b) (i) CD8 막횡단 도메인, 및

(ii) Fcγ 세포내 신호전달 도메인 및 TNFR1 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인

을 포함하는 식세포 또는 테더링 수용체(PR) 서브유닛

을 포함하는 PR 융합 단백질(CFP)을 코딩하는 재조합 핵산을 포함하는 조성물로서, 막횡단 도메인과 세포외 도메인은 링커를 통해 작동 가능하게 연결된 것인 조성물.

청구항 181

N-말단에서 C-말단으로

(a) 표적 세포의 항원에 특이적인 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인; 및

(b) (i) CD8 막횡단 도메인, 및

(ii) Fcγ 세포내 신호전달 도메인 및 MDA5 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인

을 포함하는 식세포 또는 테더링 수용체(PR) 서브유닛

을 포함하는 PR 융합 단백질(CFP)을 코딩하는 재조합 핵산을 포함하는 조성물로서, 막횡단 도메인과 세포외 도메인은 링커에 의해 작동 가능하게 연결된 것인 조성물.

청구항 182

제179항 내지 제181항 중 어느 한 항에 있어서, 항원은 CD5 항원인 조성물.

청구항 183

제179항 내지 제181항 중 어느 한 항에 있어서, 항원은 HER2 항원인 조성물.

청구항 184

제179항 내지 제183항 중 어느 한 항에 있어서, CFP는 신호 펩타이드를 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 185

제184항에 있어서, 신호 펩타이드는 GMCSF 신호 펩타이드인 조성물.

청구항 186

제184항에 있어서, CFP는 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 187

제184항에 있어서, CFP는 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 188

제184항에 있어서, CFP는 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 189

제1항 내지 제188항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 핵산은 염증유발 뉴클레오타이드, 또는 염증유발 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 190

제1항 내지 제189항 중 어느 한 항에 있어서, 염증유발 폴리펩타이드를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 191

제189항 또는 제190항에 있어서, 염증유발 폴리펩타이드는 케모카인 또는 사이토카인인 조성물.

청구항 192

제191항에 있어서, 케모카인은 IL-1, IL3, IL5, IL-6, i18, IL-12, IL-13, IL-23, TNF, CCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11, IL-18, IL-23, IL-27, CSF, MCSF, GMCSF, IL17, IP-10, RANTES, 인터페론으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 193

제191항에 있어서, 사이토카인은 IL-1, IL3, IL5, IL-6, IL-12, IL-13, IL-23, TNF, CCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11, IL-18, IL-23, IL-27, CSF, MCSF, GMCSF, IL17, IP-10, RANTES, 인터페론으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 194

제189항에 있어서, 뉴클레오타이드는 ATP, ADP, UTP, UDP 및/또는 UDP-글루코스로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 195

제1항 내지 제194항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 핵산은 염증의 항상성 조절인자를 코딩하는 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 196

제195항에 있어서, 염증의 항상성 조절인자는 mRNA의 비번역 영역(UTR) 내의 서열인 조성물.

청구항 197

제196항에 있어서, UTR 내의 서열은 RNA 결합 단백질에 결합하는 서열인 조성물.

청구항 198

제196항 또는 제197항에 있어서, 번역은 RNA 결합 단백질이 비번역 영역(UTR) 내의 서열에 결합할 때 억제되거나 방해되는 것인 조성물.

청구항 199

제197항 또는 제198항에 있어서, UTR 내의 서열은 컨센서스 서열인 WWWU(AUUUA)UUUW(서열번호 35)를 포함하고, 이때 W는 A 또는 U인 조성물.

청구항 200

제1항 내지 제199항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 핵산은 바이시스트론성(bicistronic) 벡터에서 발현되는 것인 조성물.

청구항 201

제1항 내지 제200항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 세포는 포유동물 세포인 조성물.

청구항 202

제1항 내지 제201항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 세포는 인간 세포인 조성물.

청구항 203

제1항 내지 제202항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 세포는 병원체에 의해 감염된 세포를 포함하는 것인 조성물.

청구항 204

제1항 내지 제203항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 세포는 암 세포인 조성물.

청구항 205

제1항 내지 제204항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 세포는 림프구인 암 세포인 조성물.

청구항 206

제1항 내지 제205항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 세포는 난소암 세포인 암 세포인 조성물.

청구항 207

제1항 내지 제206항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 세포는 난소 췌장 세포인 암 세포인 조성물.

청구항 208

제1항 내지 제207항 중 어느 한 항에 있어서, 표적 세포는 교모세포종 세포인 암 세포인 조성물.

청구항 209

제1항 내지 제208항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 핵산은 DNA인 조성물.

청구항 210

제1항 내지 제209항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 핵산은 RNA인 조성물.

청구항 211

제1항 내지 제210항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 핵산은 mRNA인 조성물.

청구항 212

제1항 내지 제211항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 핵산은 circRNA인 조성물.

청구항 213

제1항 내지 제212항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 핵산은 tRNA인 조성물.

청구항 214

제1항 내지 제213항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 핵산은 microRNA인 조성물.

청구항 215

제1항 내지 제214항 중 어느 한 항의 조성물의 재조합 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 216

제215항에 있어서, 바이러스 벡터인 벡터.

청구항 217

제216항에 있어서, 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터인 벡터.

청구항 218

제215항 내지 제217항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 폴리펩타이드를 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 추가로 포함하는 벡터.

청구항 219

제215항 내지 제218항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리시스트론성(polycistronic) 벡터인 벡터.

청구항 220

제218항 또는 제219항에 있어서, 적어도 하나의 핵산 서열 각각은 별개의 프로모터에 작동 가능하게 연결된 것인 벡터.

청구항 221

제215항 내지 제220항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 내부 리보좀 진입 부위(IRES)를 추가로 포함하는 벡터.

청구항 222

제215항 내지 제221항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 폴리펩타이드를 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열을 플랭킹하는 5' UTR 및/또는 3' UTR을 추가로 포함하는 벡터.

청구항 223

제215항 내지 제222항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 조절 영역을 추가로 포함하는 벡터.

청구항 224

제1항 내지 제214항 중 어느 한 항의 조성물의 재조합 핵산에 의해 코딩된 폴리펩타이드.

청구항 225

제1항 내지 제214항 중 어느 한 항의 조성물, 제216항 내지 제223항 중 어느 한 항의 벡터 또는 제224항의 폴리펩타이드를 포함하는 세포.

청구항 226

제225항에 있어서, 미성숙 골수 세포인 세포.

청구항 227

제225항에 있어서, 비분극화된 또는 비분화된 골수 세포인 세포.

청구항 228

제225항에 있어서, CD14+/CD16^{low} 세포인 세포.

청구항 229

제225항에 있어서, CD14+/CD16- 세포 또는 CD14-/CD16+ 세포인 세포.

청구항 230

제225항에 있어서, 식세포성 세포인 세포.

청구항 231

제225항에 있어서, 줄기 세포 유래 세포, 골수 세포, 대식세포, 수지상 세포, 림프구, 비만 세포, 단핵구, 호중구, 미세아교세포, 호산구, 호염기구, 골수 조상세포, 모자이크 표현형 세포 또는 성상세포인 세포.

청구항 232

제225항에 있어서, M1 대식세포인 세포

청구항 233

제225항에 있어서, M2 대식세포인 세포.

청구항 234

제225항 내지 제233항 중 어느 한 항에 있어서, 자가 세포인 세포.

청구항 235

제225항 내지 제233항 중 어느 한 항에 있어서, 동종이계 세포인 세포.

청구항 236

변형된 세포의 집단으로서, 변형된 세포의 복수의 집단이 제1항 내지 제214항 중 어느 한 항의 조성물, 제216항 내지 제223항 중 어느 한 항의 벡터 또는 제224항의 폴리펩타이드를 포함하는 것인 변형된 세포의 집단.

청구항 237

제236항에 있어서, 상기 복수는 변형된 세포의 집단의 적어도 80%를 포함하는 것인 변형된 세포의 집단.

청구항 238

제237항에 있어서, 세포의 집단은 농후화되지 않은 것인 변형된 세포의 집단.

청구항 239

제237항 또는 제238항에 있어서, 세포의 집단은 CD14+/CD16- 세포, CD14-/CD16+ 세포 또는 $CD14+/CD16^{low}$ 세포인 변형된 세포의 집단.

청구항 240

제237항 또는 제239항에 있어서, 세포의 집단은 식세포성 세포인 변형된 세포의 집단.

청구항 241

(a) 제1항 내지 제214항 중 어느 한 항의 조성물, 제216항 내지 제223항 중 어느 한 항의 벡터 또는 제224항의 폴리펩타이드, 제225항 내지 제235항 중 어느 한 항의 세포, 또는 제236항 내지 제240항 중 어느 한 항의 세포의 집단; 및

(b) 약학적으로 허용 가능한 부형제

를 포함하는 약학 조성물.

청구항 242

제241항에 있어서, 추가 치료제를 더 포함하는 약학 조성물.

청구항 243

제241항 또는 제242항에 있어서, 추가 치료제는 CD47 아고니스트, Rac를 억제하는 작용제, Cdc42를 억제하는 작용제, GTPase를 억제하는 작용제, F-액틴 해체를 촉진하는 작용제, CFP로의 PI3K 동원을 촉진하는 작용제, PI3K 활성을 촉진하는 작용제, 포스파티딜이노시톨 3,4,5-트리스포스페이트의 생성을 촉진하는 작용제, ARHGAP12 활성을 촉진하는 작용제, ARHGAP25 활성을 촉진하는 작용제, SH3BP1 활성을 촉진하는 작용제, 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

청구항 244

제241항 내지 제243항 중 어느 한 항에 있어서, 약학적으로 허용 가능한 부형제는 무혈청 배지, 지질 또는 나노입자를 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 245

질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 질환을 치료하는 방법으로서, 제241항 내지 제244항 중 어느 한 항의 약학 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 246

제245항에 있어서, 질환은 암인 방법.

청구항 247

제246항에 있어서, 암은 고형 암인 방법.

청구항 248

제247항에 있어서, 고형 암은 난소암, 신장암, 유방암, 전립선암, 간암, 뇌암, 림프종, 백혈병, 피부암, 췌장암, 대장암, 폐암으로 구성된 군으로부터 선택되고, 적합한 암은 난소암을 포함하는 것인 방법.

청구항 249

제246항에 있어서, 암은 액형 암인 방법.

청구항 250

제249항에 있어서, 액형 암은 백혈병 또는 림프종인 방법.

청구항 251

제249항에 있어서, 액형 암은 T 세포 림프종인 방법.

청구항 252

제245항에 있어서, 질환은 T 세포 악성종양인 방법.

청구항 253

제245항 내지 제252항 중 어느 한 항에 있어서, 추가 치료제를 대상체에게 투여하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 254

제253항에 있어서, 추가 치료제는 CD47 아고니스트, Rac를 억제하는 작용제, Cdc42를 억제하는 작용제, GTPase를 억제하는 작용제, F-액틴 해체를 촉진하는 작용제, CFP로의 PI3K 동원을 촉진하는 작용제, PI3K 활성을 촉진하는 작용제, 포스파티딜이노시톨 3,4,5-트리스포스페이트의 생성을 촉진하는 작용제, ARHGAP12 활성을 촉진하는 작용제, ARHGAP25 활성을 촉진하는 작용제, SH3BP1 활성을 촉진하는 작용제, 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 255

제245항 내지 제254항 중 어느 한 항에 있어서, 투여는 주입 또는 주사를 포함하는 것인 방법.

청구항 256

제245항 내지 제255항 중 어느 한 항에 있어서, 투여는 고형 암에 직접 투여하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 257

제245항 내지 제256항 중 어느 한 항에 있어서, 투여는 circRNA, mRNA, 바이러스 벡터, 입자, 나노입자,

리포좀, 엑소좀 또는 세포를 투여하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 258

제245항 내지 제257항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에서 CD4+ T 세포 반응 또는 CD8+ T 세포 반응을 이끌어내는 것인 방법.

청구항 259

세포를 제조하는 방법으로서, 세포를 제1항 내지 제214항 중 어느 한 항의 조성물, 제216항 내지 제223항 중 어느 한 항의 벡터 또는 제224항의 폴리펩타이드와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 260

재259항에 있어서, 접촉은 형질도입을 포함하는 것인 방법.

청구항 261

제260항에 있어서, 형질도입은 화학적 형질감염, 전기천공, 뉴클레오펙션 또는 바이러스 감염을 포함하는 것인 방법.

청구항 262

약학 조성물을 제조하는 방법으로서, 지질을 제1항 내지 제214항 중 어느 한 항의 조성물, 제216항 내지 제223항 중 어느 한 항의 벡터 또는 제224항의 폴리펩타이드와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 263

제262항에 있어서, 접촉은 지질 나노입자를 형성하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 264

약학 조성물을 제조하는 방법으로서, 항체를 제1항 내지 제214항 중 어느 한 항의 조성물 또는 제216항 내지 제223항 중 어느 한 항의 벡터와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 265

제264항에 있어서, 접촉은 지질 나노입자를 형성하는 단계를 포함하는 것인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

배 경 기 술

[0001] **교차참조**

[0002] 본원은 2019년 4월 30일에 출원된 미국 가출원 제62/841,190호, 2019년 4월 30일에 출원된 미국 가출원 제62/841,183호, 2020년 3월 23일에 출원된 미국 비가출원 제16/827,381호, 및 2020년 3월 23일에 출원된 미국 비가출원 제16/827,302호의 이익을 주장하고, 이들 각각은 전체적으로 본원에 참고로 포함된다.

[0003] **서열목록**

[0004] 본 출원은 ASCII 포맷으로 전자적으로 제출된 서열목록을 함유하며 이의 전문이 인용에 의해 본원에 포함된다. 2020년 5월 8일에 생성된 상기 ASCII 카피는 56371-701_601_SL.txt로 명명되고 크기는 56,537 바이트이다.

[0005] **배경**

[0006] 세포 면역요법은 치료하기 어려운 질환, 예컨대, 암, 및 지속적인 감염, 및 다른 형태의 치료에 불응하는 특정 질환과 싸우기 위한 유망한 신기술이다. CAR-T 세포의 발견 및 면역요법에서의 이의 잠재적 사용으로 중대한 돌

파구가 마련되었다. CAR-T 세포는 T 세포를 특정 병든 세포, 예컨대, 암 세포로 표적화하는 것을 돕고 사용된 세포내 도메인 및 공발현된 면역억제 사이토카인에 따라 표적 암 세포를 사멸시키기 위한 세포독성 반응, 또는 면역억제 및/또는 내성을 유도할 수 있는 키메라 항원 수용체를 발현하는 T 림프구이다. 그러나, 그 과정에서 몇 가지 한계가 CAR-T 세포에 대한 진전을 늦추고 임상시험에서 그의 가능성을 약화시킨다.

[0007] CAR-T 세포의 한계를 이해하는 것은 기술을 활용하고 더 우수한 면역요법 모델을 향한 혁신을 지속하는 열쇠이다. 구체적으로, T 세포 악성종양에서, CAR-T 세포는 중대한 문제점에 직면하는 것으로 보인다. CAR-T 세포 및 악성 T 세포는 대다수의 T 세포 림프종들(TCL)에서 표면 항원을 공유하므로, CAR-T 세포는 암 세포와 동일한 방식으로 세포독성에 노출된다. 일부 경우, CAR-T 생성물은 악성 T 세포에 의해 오염될 수 있다. 추가로, T 세포 무형성증은 CAR-T 세포의 연장된 지속으로 인해 잠재적 문제점이다. 다른 한계는 CAR-T 세포가 고형 종양 내로 침투하는 능력 부족, 및 그의 항종양 잠재력을 하향조절하는 작용을 하는 강력한 종양 미세환경을 포함한다. CAR-T 세포 기능도 내생성 T 세포 불활성화 및 고갈을 유발하는 면역억제 종양 미세환경(TME)에 의해 부정적인 영향을 받는다.

[0008] 대식세포를 비롯한 골수 세포는 골수 계통으로부터 유래하고 선천성 면역 시스템에 속하는 세포이다. 이 세포들은 혈액 내로 빠져나가 조직 내로 이동할 수 있는 골수 줄기 세포로부터 유래한다. 이들의 주요 기능들 중 일부는 식세포작용, T 세포 반응의 활성화, 및 세포 잔해물(debris) 및 세포외 매트릭스의 제거를 포함한다. 이들은 또한 항상성 유지, 및 염증의 시작과 해결에 있어서 중요한 역할을 한다. 더욱이, 골수 세포들은 이들이 주변 미세환경으로부터 받는 자극의 유형에 따라 전구염증부터 소염까지 상이한 반응을 나타낼 수 있는, 대식세포를 비롯한 다수의 다운스트림 세포들로 분화할 수 있다. 나아가, 조직 대식세포는 CDT 이펙터 세포, NK 세포 및 T 조절 세포를 비롯한 다른 면역 세포 유형에 대한 넓은 조절 및 활성화 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 대식세포는 악성 종양에서 주요 면역 침윤물인 것으로 밝혀졌고 이펙터 면역 침윤 및 기능에 대한 광범위한 면역억제 영향을 발휘하는 것으로 확인되었다.

[0009] 골수 세포는 단핵구, 수지상 세포, 조직 대식세포 및 과립구를 포함하는 면역 시스템의 주요 세포 구획이다. 골수 세포의 세포 개체발생, 활성화, 분화 및 조직 특이적 기능의 모델은 놀라운 결과를 제공하면서 지난 몇 년 동안 재검토되었다. 그러나, 항상성 및 질환 동안 그들의 엄청난 분화유연성 및 불균질성은 전혀 이해되지 않았다. 골수 세포가 식세포작용 및 T 세포를 활성화시키는 그의 능력을 포함하는 많은 기능들을 갖지만, 치료적 용도를 위한 이 기능들의 활용은 여전히 이해하기 어렵다. 따라서, 개선된 치료제의 개발을 위해 T 세포 악성종양을 포함하나 이것으로 제한되지 않는 다른 세포 유형을 사용하는 더 새로운 방법을 찾고 있다.

[0010] 조작된 골수 세포도 생체내에서 수명이 짧을 수 있고, 표현형적으로 다양할 수 있고, 민감할 수 있고, 분화유연성을 가질 수 있고, 종종 시험관내에서 조작하기 어려운 것으로 발견된다. 예를 들면, 단핵구에서의 외생성 유전자 발현은 비조혈 세포에서의 외생성 유전자 발현에 비해 어렵다. 골수 세포(예를 들면, 단핵구/대식세포)의 형질감염과 관련된 상당한 기술적 어려움이 있다. 전문적인 식세포로서 골수 세포, 예컨대, 단핵구/대식세포는 핵산 온전성을 파괴할 수 있고 이 세포 내로의 유전자 전달을 비효율적인 과정으로 만들 수 있는 많은 강력한 분해 효소들을 포함한다. 이것은 면역 또는 염증 자극에 노출된 후 그의 생리학의 현저한 변화를 겪는 활성화된 대식세포의 경우 특히 그러하다. 대식세포가 일반적으로 분열하지 않는 말기 세포이기 때문에 이 세포의 바이러스 형질도입은 방해를 받으므로; 복제 게놈 내로의 통합에 의존하는 벡터들 중 일부는 제한된 성공을 거두었다. 나아가, 대식세포는 "위험 신호"에 잘 반응하므로, 유전자 전달에 사용된 원래의 바이러스 벡터들 중 몇몇은 이 세포들에서 강력한 항바이러스 반응을 유도함으로써, 이 벡터들을 유전자 전달에 부적합하게 만든다.

발명의 내용

[0011] 골수 세포의 다양한 기능성은 이 세포를, 많은 치료 효과를 갖도록 조작될 수 있는 이상적인 세포 요법 후보자로 만든다. 본 개시는 면역 시스템의 골수 세포(예를 들면, CD14+ 세포), 특히 식세포성 세포를 사용한 면역요법에 관한 것이다. 골수 세포를 사용하여 다수의 치료적 적응증들을 예상할 수 있다. 예를 들면, 골수 세포 면역요법은 암, 자가면역, 섬유성 질환 및 감염에 있어서 매우 중요할 수 있다. 본 개시는 면역 시스템의 식세포성 세포, 특히 대식세포를 포함하는 골수 세포를 사용하는 면역요법에 관한 것이다. 본원에 개시된 본 발명의 목적은 치료적 용도를 위해 골수 세포의 이 기능들 중 하나 이상의 기능을 활용하는 것이다. 예를 들면, 본원에 개시된 본 발명의 목적은 치료적 용도를 위해 조작된 골수 세포를 비롯한 골수 세포의 식세포 활성을 활용하는 것이다. 예를 들면, 본원에 개시된 본 발명의 목적은 T 세포 활성화를 촉진하기 위해 조작된 골수 세포를 비롯한 골수 세포의 능력을 활용하는 것이다. 예를 들면, 본원에 개시된 본 발명의 목적은 살종양 분자의 분비를 촉진하기 위해 조작된 골수 세포를 비롯한 골수 세포의 능력을 활용하는 것이다. 예를 들면, 본원에 개시된 본 발

명의 목적은 면역 세포 및 분자의 동원 및 수송을 촉진하기 위해 조작된 골수 세포를 비롯한 골수 세포의 능력을 활용하는 것이다. 본 개시는 추가로 세포의 분화 능력, 성숙 잠재력 및/또는 그의 분화유연성을 손상시키지 않으면서 골수 세포의 기능적 양태를 증가시킬 목적으로, 골수 세포를 성공적으로 형질감염시킬 수 있거나 형질도입할 수 있거나, 골수 세포의 유전적 변형을 다른 방식으로 유도할 수 있는 혁신적인 방법 및 조성물을 제공한다.

[0012] 본 개시는 병든 세포, 예컨대, 암 세포 및 감염된 세포를 직접적 및/또는 간접적으로 공격하고 사멸시킬 수 있는(ATAK) 조작된 골수 세포(예를 들면, CD14+ 세포), 예컨대, 대식세포 또는 다른 식세포성 세포의 제조 및 사용을 포함한다. 조작된 골수 세포, 예컨대, 대식세포 및 다른 식세포성 세포는 예를 들면, 재조합 핵산 기술, 합성 핵산, 유전자 편집 기법(예를 들면, CRISPR), 형질도입(예를 들면, 바이러스 구축물의 사용), 전기천공 또는 뉴클레오펙션을 이용하여 질환 관련 항원(예를 들면, 암 항원)에 특이적인 세포외 결합 도메인을 가진 키메라 융합 단백질(CFP)을 코딩하는 핵산 서열(예를 들면, mRNA, 플라스미드, 바이러스 구축물)을 세포 내로 혼입함으로써 제조될 수 있다. 골수 세포는 넓고 다양한 범위의 활성을 갖도록 조작될 수 있다는 것을 확인하였다. 예를 들면, 골수 세포는 항원 결합 도메인을 함유하는 키메라 융합 단백질(CFP)을 발현하여 넓고 다양한 범위의 활성을 갖도록 조작될 수 있다는 것을 발견하였다. 예를 들면, 골수 세포는 이 세포가 CFP와 표적 세포 상의 항원의 결합 시 표적 세포의 증가된 식세포작용을 나타내도록 증강된 식세포 활성을 갖게끔 조작될 수 있는 것을 발견하였다. 골수 세포는 이 세포가 CFP와 표적 세포 상의 항원의 결합 시 T 세포, 예컨대, 종양 미세환경 내의 T 세포의 활성화를 촉진하도록 T 세포 활성화를 촉진하게끔 조작될 수 있다는 것도 확인하였다. 조작된 골수 세포는 이 세포가 CFP와 표적 세포 상의 항원의 결합 시 근처 세포로부터의 살종양 분자의 분비를 촉진하도록 살종양 분자의 분비를 촉진하게끔 조작될 수 있다. 조작된 골수 세포는 이 세포가 CFP와 표적 세포 상의 항원의 결합 시 면역 세포 및 분자를 표적 세포 또는 종양 미세환경으로 동원하고 수송하는 것을 촉진하도록 면역 세포 및 분자의 동원 및 수송을 촉진하게끔 조작될 수 있다.

[0013] 본 개시는 조작된 골수 세포가 고형 종양으로 용이하게 동원된다는 점; 조작 가능한 생존 기간을 가짐으로써, 무형성증 및 면역결핍을 초래하는 연장된 지속의 위험을 낮춘다는 점; 골수 세포가 T 세포에 의해 오염될 수 없다는 점; 예를 들면, 골수 세포가 악성 T 세포와 동일한 항원을 발현하지 않기 때문에 골수 세포가 동족살해를 피할 수 있다는 점; 및 골수 세포가 활용될 수 있는 수많은 항종양 기능들을 가진다는 점을 포함하는, 조작된 골수 세포가 CAR-T 세포의 한계들 중 적어도 일부를 극복한다는 중요한 발견에 기반한다. 일부 양태에서, 조작된 골수 유래 세포는 병든 세포를 표적화하고 파괴하는 더 안전한 면역요법 수단일 수 있다.

[0014] 더욱이, 대식세포와 같은 골수 세포는 종양 환경(TME)에서 편재적으로 발견되고 특히 일부 종양 유형에서 가장 풍부한 세포이다. 대식세포와 같은 골수 세포는 면역 시스템에서의 그들의 역할의 일부로서 병든 세포를 제거하는 데 천연적으로 개입한다. 본 발명은 또한 구체적으로 병든 세포뿐만 아니라 전달 페이로드, 예컨대, 항원 및 사이토카인도 표적화하고, 사멸시키고 직접적 및/또는 간접적으로 제거하기 위해 골수 세포 기능을 활용하는 것에 관한 것이다.

[0015] 조작된 골수 세포도 생체내에서 수명이 짧을 수 있고, 표현형적으로 다양할 수 있고, 민감할 수 있고, 분화유연성을 가질 수 있고, 종종 시험관내에서 조작하기 어려운 것으로 발견된다. 예를 들면, 단핵구에서의 외생성 유전자 발현은 비조혈 세포에서의 외생성 유전자 발현에 비해 어렵다. 골수 세포(예를 들면, 단핵구/대식세포)의 형질감염과 관련된 상당한 기술적 어려움이 있다. 전문적인 식세포로서, 골수 세포, 예컨대, 단핵구/대식세포는 핵산 온전성을 파괴할 수 있고 이 세포 내로의 유전자 전달을 비효율적인 과정으로 만들 수 있는 많은 강력한 분해 효소들을 포함한다. 이것은 면역 또는 염증 자극에 노출된 후 그의 생리학의 현저한 변화를 겪는 활성화된 대식세포의 경우 특히 그러하다. 대식세포가 일반적으로 분열하지 않는 말기 세포이기 때문에 이 세포의 바이러스 형질도입은 방해를 받으므로; 복제 게놈 내로의 통합에 의존하는 벡터들 중 일부는 제한된 성공을 거두었다. 나아가, 대식세포는 "위험 신호"에 잘 반응하므로, 유전자 전달에 사용된 원래의 바이러스 벡터들 중 몇몇은 이 세포들에서 강력한 항바이러스 반응을 유도함으로써, 이 벡터들을 유전자 전달에 부적합하게 만든다. 본 개시는 추가로 세포의 분화 능력, 성숙 잠재력 및/또는 그의 분화유연성을 손상시키지 않으면서 골수 세포의 기능적 양태를 증가시킬 목적으로, 골수 세포를 성공적으로 형질감염시킬 수 있거나 형질도입할 수 있거나, 골수 세포의 유전적 변형을 다른 방식으로 유도할 수 있는 혁신적인 방법 및 조성물을 제공한다.

[0016] **참고에 의한 포함**

[0017] 본 명세서에서 언급된 모든 간행물들, 특허들 및 특허출원들은 각각의 개별 간행물, 특허 또는 특허출원이 참고로 포함되는 것으로 구체적 및 개별적으로 표시된 것처럼 동일한 정도로 본원에 참고로 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0018] 본 발명의 신규 특징은 첨부된 청구범위에 구체적으로 기재되어 있다. 본 발명의 특징 및 장점은 본 발명의 원리가 이용되는 예시적인 실시양태가 기재되어 있는 하기 상세한 설명, 및 첨부된 도면을 참조함으로써 더 잘 이해될 것이다.

도 1a는 골수 세포의 잠재적으로 조작될 수 있는 기능들 중 일부를 보여주는 도표를 도시한다.

도 1b는 상이한 유형의 암에서 다양한 세포 유형들의 존재를 표시하는 도표를 도시한다. 대식세포는 도시된 암 유형들에서 가장 풍부한 세포이다.

도 2a는 세포외 결합 도메인, 막횡단 도메인, 제1 세포내 신호전달 도메인 및 제2 세포내 신호전달 도메인을 함유하는 예시적인 키메라 수용체 융합 단백질(CFP)을 보여주는 개략도를 도시한다. 신호전달 도메인은 다른 수용체로부터 유래할 수 있고 임의의 수의 세포 기능을 이끌어내도록 디자인될 수 있다.

도 2b는 세포외 결합 도메인, 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인(좌측)을 함유하는 예시적인 CFP, 및 세포외 결합 도메인, 막횡단 도메인, 제1 세포내 신호전달 도메인, 제2 세포내 신호전달 도메인, 제3 세포내 신호전달 도메인 및 하나 이상의 추가 세포내 신호전달 도메인을 함유하는 CFP를 보여주는 개략도를 도시한다. 신호전달 도메인은 다른 수용체로부터 유래할 수 있고 임의의 수의 세포 기능을 이끌어내도록 디자인될 수 있다.

도 2c는 항-CD5 세포외 결합 도메인, 막횡단 도메인, 및 PI3K 동원 도메인에 융합된 FcRɣ로부터 유래한 세포내 도메인을 함유하는 세포내 신호전달 도메인을 함유하는 예시적인 CFP 이량체를 보여주는 개략도를 도시한다.

도 2d는 세포외 항원 결합 도메인, 막횡단 도메인, 및 식세포작용 도메인, PI3K 동원 도메인 및 염증유발(전구염증) 도메인을 함유하는 세포내 신호전달 도메인을 함유하는 예시적인 CFP 이량체를 보여주는 개략도를 도시한다.

도 3은 각각의 서브유닛이 단일 표적에 결합하는 scFv에 융합된 세포외 도메인을 함유하는 예시적인 CFP 동종이량체(좌측), 및 이종이량체의 제1 서브유닛이 제1 표적에 결합하는 scFv에 융합된 세포외 도메인을 함유하고 이종이량체 서브유닛의 제2 서브유닛이 제2 표적에 결합하는 scFv에 융합된 세포외 도메인을 함유하는 예시적인 CFP 이종이량체(우측)를 도시하는 개략도이다.

도 4a는 스캐빈저(scavenger) 수용체의 세포외 도메인(ECD), 막횡단 도메인(TM) 및 세포내 도메인에 융합된 항원 특이적 scFv에 융합된 신호 펩타이드를 함유하는 CFP를 코딩하는 예시적인 재조합 핵산을 도시하는 개략도이다.

도 4b는 골수 세포의 세포막 내로 혼입된 도 4a의 CFP를 도시하는 개략도이다. 도시된 CFP는 암 세포의 암 항원에 결합된 scFv를 함유한다. 세포외 도메인, 막횡단 도메인 및 세포내 도메인은 하나 이상의 스캐빈저 수용체로부터 유래할 수 있다.

도 4c는 빈 벡터(대조군) 또는 CFP를 코딩하는 벡터가 형질도입되고 염료 로딩 종양 세포와 공배양된 인간 일차 골수 세포에서의 상대적인 식세포작용의 예측된 결과를 도시하는 예시적인 그래프이다. 유세포분석을 이용하여 식세포작용을 정량한다.

도 4d는 빈 벡터(대조군) 또는 CFP를 코딩하는 벡터가 형질도입되고 표시된 이펙터 세포:표적 세포 비(E:T 비)에서 루시퍼라제를 발현하는 종양 세포(표적 세포)와 공배양된 인간 일차 골수 세포(이펙터 세포)의 존재 하에서 인큐베이션될 때 종양 세포의 퍼센트 특이적 용해의 예측된 결과를 도시하는 예시적인 그래프이다.

도 4e는 빈 벡터(대조군) 또는 CFP를 코딩하는 벡터가 형질도입된 세포로 치료한 후 마우스 이종이식편 종양 모델에서의 퍼센트 생존의 예측된 결과를 도시하는 예시적인 그래프이다.

도 5a는 CD8 힌지 도메인, CD8 막횡단 도메인, 및 식세포작용 활성화 도메인 및 염증유발 도메인을 함유하는 세포내 도메인에 융합된 항원 특이적 scFv에 융합된 신호 펩타이드를 함유하는 CFP(M1-CAR)를 코딩하는 예시적인 재조합 핵산을 도시하는 개략도이다.

도 5b는 골수 세포의 세포막 내에 혼입된 도 5a의 CFP(M1-CAR)를 도시하는 개략도이다. 도시된 CFP는 암 세포의 암 항원에 결합된 scFv를 함유한다.

도 5c는 빈 벡터(대조군) 또는 CFP(M1-CAR)를 코딩하는 벡터가 형질도입되고 염료 로딩 종양 세포와 공배양된 인간 일차 골수 세포에서의 상대적인 식세포작용의 예측된 결과를 도시하는 예시적인 그래프이다. 유세포분석을

이용하여 식세포작용을 정량한다.

도 5d는 빈 벡터(대조군) 또는 CFP(M1-CAR)를 코딩하는 벡터가 형질도입된 골수 세포에서의 도시된 사이토카인 생성의 배수 증가의 예측된 결과를 도시하는 예시적인 그래프이다.

도 5e는 벡터 대조군 또는 CFP(M1-CAR)를 코딩하는 벡터가 형질도입된 인간 일차 골수 세포에서의 도시된 M1 마커 생성의 배수 증가의 예측된 결과를 도시하는 예시적인 그래프이다.

도 5f는 빈 벡터(대조군) 또는 CFP(M1-CAR)를 코딩하는 벡터가 형질도입되고 표시된 이펙터 세포:표적 세포 비(E:T 비)에서 루시퍼라제를 발현하는 종양 세포(표적 세포)와 공배양된 인간 일차 골수 세포(이펙터 세포)의 존재 하에서 인큐베이션될 때 종양 세포의 퍼센트 특이적 용해의 예측된 결과를 도시하는 예시적인 그래프이다. 루시퍼라제 어세이를 이용하여 특이적 용해를 정량한다.

도 5g는 빈 벡터(대조군) 또는 CFP(M1-CAR)를 코딩하는 벡터가 형질도입된 인간 일차 골수 세포를 사용한 치료 후 마우스 이종이식편 종양 모델에서의 퍼센트 생존의 예측된 결과를 도시하는 예시적인 그래프이다.

도 6a는 CD8 힌지 도메인, CD8 막횡단 도메인, 세포내 식세포작용 활성화 도메인 및 세포내 통합 활성화 도메인에 융합된 항원 특이적 scFv에 융합된 신호 펩타이드를 함유하는 CFP(인테그린-CAR)를 코딩하는 예시적인 재조합 핵산을 도시하는 개략도이다.

도 6b는 골수 세포의 세포막 내에 혼입된 도 6a의 CFP(인테그린-CAR)를 도시하는 개략도이다. 도시된 CFP는 암 세포의 암 항원에 결합된 scFv를 함유한다.

도 6c는 빈 벡터(대조군) 또는 CFP(인테그린-CAR)를 코딩하는 벡터가 형질도입되고 염료 로딩 종양 세포와 공배양된 인간 일차 골수 세포에서의 상대적인 식세포작용의 예측된 결과를 도시하는 예시적인 그래프이다. 유세포분석을 이용하여 식세포작용을 정량한다.

도 6d는 빈 벡터(대조군) 또는 CFP(인테그린-CAR)를 코딩하는 벡터가 형질도입되고 표시된 이펙터 세포:표적 세포 비(E:T 비)에서 루시퍼라제를 발현하는 종양 세포(표적 세포)와 공배양된 인간 일차 골수 세포(이펙터 세포)의 존재 하에서 인큐베이션될 때 종양 세포의 퍼센트 특이적 용해의 예측된 결과를 도시하는 예시적인 그래프이다.

도 6e는 빈 벡터(대조군) 또는 CFP(인테그린-CAR)를 코딩하는 벡터가 형질도입된 인간 일차 골수 세포의 상대적인 침윤의 예측된 결과를 도시하는 예시적인 그래프이다.

도 6f는 빈 벡터(대조군) 또는 CFP(인테그린-CAR)를 코딩하는 벡터가 형질도입된 인간 일차 골수 세포를 사용한 치료 후 마우스 이종이식편 종양 모델에서의 퍼센트 생존의 예측된 결과를 도시하는 예시적인 그래프이다.

도 7은 골수 세포의 세포막 내로 혼입된 CFP(교차 제시-CAR)를 도시하는 개략도이다. 도시된 교차 제시-CAR은 CD8 힌지 도메인, CD8 막횡단 도메인, 세포내 식세포작용 활성화 도메인 및 세포내 교차 제시 활성화 도메인에 융합된 암 세포의 암 항원에 결합된 scFv를 함유한다. 교차 제시-CAR은 항원을 교차 제시 경로로 안내할 수 있다.

도 8은 골수 세포에서 모의 발현, 또는 항-CD5 scFv를 가진 세포외 도메인 (ECD)을 가진 다양한 구축물들의 발현 후 예시적인 유세포분석 데이터(측면 산란(SSC) 대 CD5+)를 도시한다. 도시된 구축물은 FcRγ 세포내 도메인에 융합된 CD40 세포내 도메인에 융합된 CD8 막횡단 도메인에 융합된 CD8 힌지 도메인에 융합된 항-CD5 scFv를 함유하는 ECD(CD5-CD8h-CD8tm-CD40-FcR); CD40 세포내 도메인에 융합된 FcRγ 세포내 도메인에 융합된 CD8 막횡단 도메인에 융합된 CD8 힌지 도메인에 융합된 항-CD5 scFv를 함유하는 ECD(CD5-CD8h-CD8tm-FcR-CD40); PI3K 동원 도메인에 융합된 FcRγ 세포내 도메인에 융합된 CD8 막횡단 도메인에 융합된 CD8 힌지 도메인에 융합된 항-CD5 scFv를 함유하는 ECD(CD5-CD8h-CD8tm-FcR-PI3K); FcRγ 세포내 도메인에 융합된 CD8 막횡단 도메인에 융합된 CD8 힌지 도메인에 융합된 항-CD5 scFv를 함유하는 ECD(CD5-CD8h-CD8tm-FcR); CD8 막횡단 도메인에 융합된 CD8 힌지 도메인에 융합된 항-CD5 scFv를 함유하는 ECD(CD5-CD8h-CD8tm-no ICD); PI3K 동원 도메인에 융합된 FcRγ 세포내 도메인에 융합된 CD8 막횡단 도메인에 융합된 CD8 힌지 도메인에 융합된 항-CD5 scFv를 함유하는 ECD(CD5-CD28h-CD28tm-FcR-PI3K); PI3K 동원 도메인에 융합된 FcRγ 세포내 도메인에 융합된 CD68 막횡단 도메인에 융합된 CD8 힌지 도메인에 융합된 항-CD5 scFv를 함유하는 ECD(CD5-CD8h-CD68tm-FcR-PI3K); PI3K 동원 도메인에 융합된 FcRγ 세포내 도메인에 융합된 CD8 막횡단 도메인에 융합된 항-CD5 scFv를 함유하는 ECD(CD5-CD8tm-FcR-PI3K); PI3K 동원 도메인에 융합된 FcRγ 세포내 도메인에 융합된 CD28 막횡단 도메인에 융합된 항-CD5 scFv를 함유하는 ECD(CD5-CD28tm-FcR-PI3K); 및 PI3K 동원 도메인에 융합된 FcRγ 세포내 도메인

에 융합된 CD68 막횡단 도메인에 융합된 항-CD5 scFv를 함유하는 ECD(CD5-CD68tm-FcR-PI3K)를 포함한다.

도 9는 골수 세포에서 모의 발현, 또는 항-CD5 scFv를 가진 세포외 도메인 (ECD)을 가진 다양한 구축물들의 발현 후 예시적인 유세포분석 데이터(측면 산란(SSC) 대 항-CD5 CFP+)를 도시한다. 도시된 구축물은 PI3K 동원 도메인에 융합된 FcRγ 세포내 도메인에 융합된 CD8 막횡단 도메인에 융합된 CD8 힌지 도메인에 융합된 항-CD5 scFv를 함유하는 ECD(CD5-CD8h-CD8tm-FcR-PI3K); FcRγ 세포내 도메인에 융합된 CD8 막횡단 도메인에 융합된 CD8 힌지 도메인에 융합된 항-CD5 scFv를 함유하는 ECD(CD5-CD8h-CD8tm-FcR); CD8 막횡단 도메인에 융합된 CD8 힌지 도메인에 융합된 항-CD5 scFv를 함유하는 ECD(CD5-CD8h-CD8tm-no ICD); CD40 세포내 도메인에 융합된 FcRγ 세포내 도메인에 융합된 CD8 막횡단 도메인에 융합된 CD8 힌지 도메인에 융합된 항-CD5 scFv를 함유하는 ECD(CD5-CD8h-CD8tm-FcR-CD40); 및 TNFR2 세포내 도메인에 융합된 FcRγ 세포내 도메인에 융합된 CD8 막횡단 도메인에 융합된 CD8 힌지 도메인에 융합된 항-CD5 scFv를 함유하는 ECD(CD5-CD8h-CD8tm-FcR-TNFR2)를 포함한다.

도 10a는 THP-1 세포에서 발현된 FarRed 형광단-표지부착된 CFP에 의해 표적화된 항원으로 코팅된 FITC-표지부착된 비드를 사용한 식세포작용 어세이의 예시적인 실험 순서도를 보여주는 개략도를 도시한다.

도 10b는 도 10a의 실험 디자인을 이용할 때 모의 발현 또는 항-CD5 CFP의 발현 후 예시적인 유세포분석 데이터(측면 산란(SSC) 대 CSFE-FarRed)를 도시한다.

도 10c는 도 10a의 실험 디자인을 이용할 때 빈 벡터(모의군) 또는 도시된 CFP를 코딩하는 벡터가 형질도입되고 BSA 또는 CD5로 코팅된 FITC-표지부착된 비드와 공배양된 인간 일차 골수 세포에서의 상대적인 식세포작용을 보여주는 예시적인 그래프를 도시한다.

도 10d는 도 10a의 실험 디자인을 이용할 때 모의 발현 또는 표시된 항-CD5 CFP의 발현 후 표시된 단백질의 농도(pg/㎖)의 예시적인 막대 그래프를 도시한다. 각각의 CFP는 표시된 세포내 도메인에 융합된 CD8 막횡단 도메인에 융합된 CD8 힌지 도메인에 융합된 항-CD5 scFv를 함유하는 ECD를 함유하였다.

도 10e는 24시간 동안 IL-10, IL-4 및 TGFβ의 존재 하에서 인큐베이션된 후 H9 T 세포 림프종 세포와 함께 인큐베이션된, 항-CD5 CFP를 발현하는 일차 인간 단핵구 세포에서 M1 관련 마커(CD16 및 MHC 클래스 I)의 발현을 측정하는 예시적인 그래프를 도시한다. 항-CD5 CFP를 발현하는 일차 인간 단핵구 세포는 M2 환경에서 강력한 활성을 나타내었다.

도 10f는 24시간 동안 IL-10, IL-4 및 TGFβ의 존재 하에서 항-CD5 키메라 항원 수용체를 발현하는 일차 인간 단핵구 세포를 인큐베이션한 다음, 하룻밤 동안 H9 T 세포 림프종 세포를 인큐베이션한 후, TNF-α의 농도(pg/㎖)의 예시적인 막대 그래프를 도시한다. 항-CD5 CFP를 발현하는 일차 인간 단핵구 세포는 종양 미세환경(TME) 유사 조건에서 염증 매개자를 생성하도록 작용할 수 있었다.

도 10g는 24시간 동안 IL-10, IL-4 및 TGFβ의 존재 하에서 항-CD5 CFP를 발현하는 일차 인간 단핵구 세포를 인큐베이션한 다음, 하룻밤 동안 H9 T 세포 림프종 세포를 인큐베이션한 후, 표시된 화학유인제(CCL3, CCL4, CXCL10 및 CXCL12)의 농도(pg/㎖)의 예시적인 막대 그래프를 도시한다. 항-CD5 CFP를 발현하는 일차 인간 단핵구 세포는 종양 미세환경(TME) 유사 조건에서 T 세포 화학유인제 및 NK 세포 화학유인제를 비롯한 광범위한 케모카인들을 분비하도록 작용할 수 있었다.

도 10h는 24시간 동안 IL-10, IL-4 및 TGFβ의 존재 하에서 항-CD5 CFP를 발현하는 일차 인간 단핵구 세포를 인큐베이션한 다음, 하룻밤 동안 H9 T 세포 림프종 세포를 인큐베이션한 후, 표시된 화학유인제(CCL8, CXCL1, 에오탁신(eotaxin) 및 CCL5)의 농도(pg/㎖)의 예시적인 막대 그래프를 도시한다. 항-CD5 CFP를 발현하는 일차 인간 단핵구 세포는 다형핵 호중구(PMN) 및 호산구를 활성화시키는 케모카인 및 백혈구 화학유인제를 포함하는 광범위한 케모카인들을 분비하도록 작용할 수 있었다.

도 11a는 THP-1 세포에서 발현된 FarRed 형광단-표지부착된 CFP에 의해 표적화된 CFSF-표지부착된 표적 세포를 사용한 식세포작용 어세이의 예시적인 실험 순서도를 보여주는 개략도를 도시한다.

도 11b는 도 11a의 실험 디자인을 이용하여 THP-1 세포에서 모의 발현 또는 항-CD5 CFP의 발현 후 예시적인 유세포분석 데이터(측면 산란(SSC) 대 정방향 산란(FSC); CSFE 대 FarRed; 및 세포 총수 대 CSFE)를 도시한다. 골수 세포주를 항-CD5 CFP로 전기천공하고 세포내 FarRed 염료로 표지부착시켰다. 이 세포를, 1:3 골수 세포:종양 세포 비에서 CFSE에 의해 미리 표지부착된 H9 T 세포 암 세포와 함께 인큐베이션하였다. 4시간 후, 식세포작용을 유세포분석으로 측정하였다.

도 11c는 도 11a의 실험 디자인을 이용하여 빈 벡터(모의군) 또는 도시된 CFP를 코딩하는 벡터로 전기천공하고 세포내 FarRed 염료로 표지부착시킨 골수 세포주에서의 상대적인 식세포작용을 보여주는 예시적인 그래프를 도시한다. 이 세포를 1:3 골수 세포:종양 세포 비에서 CFSE에 의해 미리 표지부착된 H9 T 세포 암 세포와 함께 인큐베이션하였다. 4시간 후, 식세포작용을 유세포분석으로 측정하였다.

도 12a는 일차 인간 단핵구 세포에서 발현된 FarRed 형광단-표지부착된 CFP에 의해 표적화된 pHRodo-표지부착된 표적 세포를 사용한 식세포작용 어세이의 예시적인 실험 순서도를 보여주는 개략도를 도시한다.

도 12b는 도 12a의 실험 디자인을 이용하여 일차 인간 단핵구 세포에서 모의 발현 또는 항-CD5 CFP의 발현 후 예시적인 유세포분석 데이터(pHRodo 대 FarRed)를 도시한다. 일차 인간 단핵구 세포를 항-CD5 CFP로 전기천공하고 세포내 FarRed 염료로 표지부착시켰다. 이 세포를 HRodo에 의해 미리 표지부착된 H9 T 세포 암 세포와 함께 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 식세포작용을 유세포분석으로 측정하였다.

도 12c는 도 12a의 실험 디자인을 이용하여 일차 인간 단핵구 세포에서 모의 발현 또는 도시된 항-CD5 CFP의 발현 후 상대적인 식세포작용을 보여주는 도 12b의 결과를 정량하는 예시적인 그래프를 도시한다.

도 12d는 비드 기반 식세포작용 어세이를 수행한 후 단핵구 세포에서 모의 발현 또는 표시된 항-CD5 CFP의 발현 후 표시된 단백질의 농도(pg/㎖)의 예시적인 막대 그래프를 도시한다.

도 13은 표시된 농도에서 세포 없이 인큐베이션하거나 CCL2와 함께 항-CD5 CFP를 발현하는 THP-1 세포를 인큐베이션한 후 시간에 따른 상대적인 형광 유닛(RFU)의 예시적인 그래프를 도시한다. 대조군에 비해 배수 증가는 어세이 완충제만으로 처리된 세포에 비해 CCL2 유도 화학주성의 비를 도시한다. 그래프 상의 각각의 막대는 2개의 재현실험 웰의 평균 ± SD를 나타낸다.

도 14는 표시된 농도에서 세포 없이 인큐베이션하거나 CCL2와 함께 항-CD5 CFP를 발현하는 일차 인간 단핵구 세포를 인큐베이션한 후 시간에 따른 상대적인 형광 유닛(RFU)의 예시적인 그래프를 도시한다. 대조군에 비해 배수 증가는 어세이 완충제만으로 처리된 세포에 비해 CCL2 유도 화학주성의 비를 도시한다. 그래프 상의 각각의 막대는 2개의 재현실험 웰의 평균 ± SD를 나타낸다.

도 15a는 말초 T 세포 림프종 동물 모델 실험의 예시적인 실험 순서도를 보여주는 개략도를 도시한다. 항-CD5 CFP를 발현하는 표시된 양의 인간 일차 단핵구를 사용한 치료를 종양 시딩 후 11일째 날에 시작하였다. IVIS 영상화를 이용하여 종양 질량을 측정하였다.

도 15b는 도 15a에 나타낸 실험에 따라 인간 일차 단핵구 세포에서 항-CD5 CFP를 발현시킨 후 예시적인 유세포분석 데이터(측면 산란(SSC) 대 항-CD5 CFP+)를 도시한다.

도 15c는 도 15a에 나타낸 실험에 따라 비히클 또는 항-CD5 CFP를 발현하는 인간 일차 단핵구로 치료한 마우스 이종이식편 모델의 예시적인 결과를 도시한다. 0일째 날, 루시퍼라제를 발현하는 CD5+ 종양 세포를 NSG 마우스에게 주사하였다. 그 다음, 마우스를 치료하지 않았거나, 항-CD5 CFP로 전기천공한 인간 일차 단핵구를 표시된 용법으로 마우스에게 주사하였다.

도 15d는 도 15c의 결과로부터 시간에 따른 상대적인 종양 크기의 그래프를 도시한다. 루시퍼라제 형광의 IVIS 영상화를 이용하여 종양 질량을 측정하였다.

도 16a는 말초 T 세포 림프종 동물 모델 실험의 예시적인 실험 순서도를 보여주는 개략도를 도시한다. 항-CD5 CFP를 발현하는 표시된 양의 인간 일차 단핵구를 사용한 치료를 종양 시딩 후 11일째 날에 시작하였다.

도 16b는 도 16a에 나타낸 실험에 따라 인간 일차 단핵구 세포에서 항-CD5 CFP를 발현시킨 후 예시적인 유세포분석 데이터(측면 산란(SSC) 대 항-CD5 CFP+)를 도시한다. 데이터는 95% 형질감염 효율의 달성을 보여준다.

도 16c는 도 16a에 나타낸 실험에 따라 시간에 따른 상대적인 종양 크기의 그래프를 도시한다. 루시퍼라제 형광의 IVIS 영상화를 이용하여 종양 질량을 측정하였다.

도 16d는 도 16a에 나타낸 실험에 따라 시간에 따른 상대적인 종양 크기의 그래프를 도시한다. 캘리퍼 측정을 이용하여 종양 질량을 측정하였다. 데이터는 치료가 면역 손상된 마우스 모델에서 지연된 종양 진행 및 종양 질량의 통계적으로 유의미한 감소와 관련되어 있었음을 입증한다. 본페로니-던(Bonferroni-Dunn) 방법을 이용하여 통계적 유의성을 측정하였고, 이때 알파는 0.5이다. 일관된 SD를 가정하지 않으면서 각각의 행을 개별적으로 분석하였다. t 검정의 수: 8 또는 4.

도 17a는 세포외 결합 도메인, 막횡단 도메인, FcRγ로부터 유래한 제1 세포내 신호전달 도메인, 및 MDA5로부터 유래한 제2 세포내 신호전달 도메인을 함유하는 예시적인 CFP를 보여주는 개략도를 도시한다.

도 17b는 형질감염되지 않은 일차 단핵구(상단), 및 세포외 CD5 결합 도메인, 막횡단 도메인, FcRγ로부터 유래한 제1 세포내 신호전달 도메인 및 MDA5로부터 유래한 제2 세포내 신호전달 도메인을 함유하는 CFP를 코딩하는 시험관내 전사된 mRNA로 형질감염된 일차 단핵구에서의 발현을 보여주는 예시적인 유세포분석 데이터(측면 산란(SSC) 대 항-CD5 CFP+)를 도시한다.

도 17c는 형질감염되지 않은 일차 단핵구, 및 세포외 CD5 결합 도메인, 막횡단 도메인, FcRγ로부터 유래한 제1 세포내 신호전달 도메인 및 MDA5로부터 유래한 제2 세포내 신호전달 도메인을 함유하는 CFP를 코딩하는 시험관내 전사된 mRNA로 형질감염된 일차 단핵구에서 분비된 표시된 사이토카인의 농도(pg/㎖)의 예시적인 막대 그래프를 도시한다.

도 18a는 세포외 결합 도메인, 막횡단 도메인, FcRγ로부터 유래한 제1 세포내 신호전달 도메인, 및 TNFR1 또는 TNFR2로부터 유래한 제2 세포내 신호전달 도메인을 함유하는 예시적인 키메라 수용체 융합 단백질(CFP)을 보여주는 개략도를 도시한다.

도 18b는 형질감염되지 않은 일차 단핵구(좌측); 세포외 CD5 결합 도메인, 막횡단 도메인, FcRγ로부터 유래한 제1 세포내 신호전달 도메인 및 TNFR1로부터 유래한 제2 세포내 신호전달 도메인을 함유하는 CFP를 코딩하는 시험관내 전사된 mRNA로 형질감염된 일차 단핵구(중간); 및 세포외 CD5 결합 도메인, 막횡단 도메인, FcRγ로부터 유래한 제1 세포내 신호전달 도메인, 및 TNFR2로부터 유래한 제2 세포내 신호전달 도메인을 함유하는 CFP를 코딩하는 시험관내 전사된 mRNA로 형질감염된 일차 단핵구(우측)에서의 발현을 보여주는 예시적인 유세포분석 데이터(측면 산란(SSC) 대 항-CD5 CFP+)를 도시한다.

도 18c는 형질감염되지 않은 일차 단핵구; 세포외 CD5 결합 도메인, 막횡단 도메인, FcRγ로부터 유래한 제1 세포내 신호전달 도메인 및 TNFR1로부터 유래한 제2 세포내 신호전달 도메인을 함유하는 CFP를 코딩하는 시험관내 전사된 mRNA로 형질감염된 일차 단핵구; 및 세포외 CD5 결합 도메인, 막횡단 도메인, FcRγ로부터 유래한 제1 세포내 신호전달 도메인 및 TNFR2로부터 유래한 제2 세포내 신호전달 도메인을 함유하는 CFP를 코딩하는 시험관내 전사된 mRNA로 형질감염된 일차 단핵구에서 분비된 표시된 사이토카인/케모카인의 농도(pg/㎖)의 예시적인 막대 그래프를 도시한다.

도 19a는 세포외 결합 도메인, 막횡단 도메인, FcRγ로부터 유래한 제1 세포내 신호전달 도메인 및 CD40, PI3K 동원 도메인 또는 TNFR2로부터 유래한 제2 세포내 신호전달 도메인을 함유하는 CFP를 보여주는 개략도를 도시한다.

도 19b는 M2 자극 어세이의 예시적인 실험 순서도를 보여주는 개략도를 도시한다. 상이한 CFP 구축물을 발현하는 일차 단핵구를 24시간 동안 M2 조건(IL4, IL10, TGFβ)에서 배양한 후, 코팅되지 않은 배양 플레이트 또는 재조합 CD5 항원으로 코팅된 배양 플레이트에 첨가하였다. 세포를 24시간 동안 플레이트 상에서 인큐베이션하였고, 배지 내로 분비된 다양한 사이토카인들의 양을 측정하였다.

도 19c는 형질감염되지 않은 일차 단핵구; 세포외 CD5 결합 도메인, 막횡단 도메인, FcRγ로부터 유래한 제1 세포내 신호전달 도메인 및 TNFR1로부터 유래한 제2 세포내 신호전달 도메인을 함유하는 CFP를 코딩하는 시험관내 전사된 mRNA로 형질감염된 일차 단핵구; 및 세포외 결합 도메인, 막횡단 도메인, FcRγ로부터 유래한 제1 세포내 신호전달 도메인 및 TNFR2로부터 유래한 제2 세포내 신호전달 도메인을 함유하는 CFP를 코딩하는 시험관내 전사된 mRNA로 형질감염된 일차 단핵구에서 분비된 표시된 사이토카인/케모카인(TNFα, IL8, IL1β, IP-10, Gro-알파/KC, CCL3, CCL4, CCL5 및 CXCL12)의 농도(pg/㎖)의 예시적인 막대 그래프를 도시한다. CD5 라이게이션은 여러 염증유발 사이토카인들 및 케모카인들의 상향조절을 유도하였다.

도 20a는 THP-1 세포에서 세포외 HER2 결합 도메인(scFv), 세포외 Flag 태그, CD8로부터 유래한 세포외 힌지 도메인, CD8 막횡단 도메인, 및 (a) FcRγ로부터 유래한 제1 세포내 신호전달 도메인 및 PI3K 동원 도메인을 함유하는 제2 세포내 신호전달 도메인, (b) MEGF10으로부터 유래한 제1 세포내 신호전달 도메인 및 PI3K 동원 도메인을 함유하는 제2 세포내 신호전달 도메인, 또는 (c) CD3ζ로부터 유래한 세포내 신호전달 도메인을 함유하는 CFP를 코딩하는 예시적인 렌티바이러스 구축물의 개략도를 도시한다. 형질도입되지 않은 일차 단핵구, 또는 도시된 CFP 구축물이 형질도입된 일차 단핵구에서의 발현을 보여주는 예시적인 유세포분석 데이터(측면 산란(SSC) 대 Flag-PE)도 도시되어 있다.

도 20b는 식세포작용 어세이의 예시적인 실험 순서도를 보여주는 개략도를 도시한다.

도 20c는 도 20b에 도시된 식세포작용 어세이를 이용할 때 도 20a에 도시된 렌티바이러스 구축물이 형질도입된 THP-1 세포의 식세포작용 퍼센트의 예시적인 막대 그래프를 도시한다. 포볼-12-미리스테이트-13-아세테이트(PMA)에 의해 활성화되거나 PMA 없이 활성화된, 형질도입된 THP-1 세포를 FarRed 표지부착된 SKOV3 종양 세포와 함께 하룻밤 동안 인큐베이션하였다. 식세포작용을 보여주는 세포의 예시적인 형광 현미경 영상도 도시되어 있다.

도 20d는 도 20b에 도시된 식세포작용 어세이를 수행한 후 식세포작용을 보여주는 예시적인 유세포분석 데이터(FarRed 대 PE)를 도시한다. PMA에 의해 활성화되거나 PMA 없이 활성화된, 형질도입된 THP-1 세포를 FarRed 표지부착된 SKOV3 종양 세포와 함께 하룻밤 동안 인큐베이션하였다.

도 20e는 도 20b에 도시된 식세포작용 어세이를 수행한 후 예시적인 유세포분석 데이터(SSC 대 FSC 및 FarRed 대 PE)를 도시한다. PMA에 의해 활성화되거나 PMA 없이 활성화된, 형질도입된 THP-1 세포를 FarRed 표지부착된 SKOV3 종양 세포와 함께 하룻밤 동안 인큐베이션하였다. 하기 식에 의해 계산된 표적 세포의 퍼센트 세포 사멸을 보여주는 예시적인 막대 그래프도 도시되어 있다: $\frac{(\#SKOV3\ 단독\ -\ 이펙터와\ 함께\ \#SKOV3)}{\#SKOV3\ 단독} \times 100\%$.

도 21a는 건강한 기증자 Leukopak으로부터 단리었고 세포외 HER2 결합 도메인(scFv), 세포외 Flag 태그, CD8로부터 유래한 세포외 힌지 도메인, CD8 막횡단 도메인, 및 FcRγ로부터 유래한 제1 세포내 신호전달 도메인 및 PI3K 동원 도메인을 함유하는 제2 세포내 신호전달 도메인을 함유하는 CFP를 코딩하는 렌티바이러스 벡터가 형질도입된 CD14+ 세포를 사용한 식세포작용 어세이의 예시적인 실험 순서도를 보여주는 개략도를 도시한다.

도 21b는 도 21a에 도시된 식세포작용 어세이를 이용할 때 건강한 기증자 Leukopak으로부터 단리되었고 세포외 HER2 결합 도메인(scFv), 세포외 Flag 태그, CD8로부터 유래한 세포외 힌지 도메인, CD8 막횡단 도메인, 및 FcRγ로부터 유래한 제1 세포내 신호전달 도메인 및 PI3K 동원 도메인을 함유하는 제2 세포내 신호전달 도메인을 함유하는 CFP를 코딩하는 렌티바이러스 벡터가 형질도입된 CD14+ 세포의 식세포작용의 퍼센트의 예시적인 막대 그래프를 도시한다. 형질도입된 세포를 표적 세포(Jurkat(HER2-) 또는 SKOV3(HER2+))와 함께 하룻밤 동안 인큐베이션하였다. SKOV3 세포의 식세포작용을 보여주나, Jurkat 세포의 식세포작용을 보여주지 않는 예시적인 형광 현미경 세포 영상도 도시되어 있다.

도 21c는 도 21a에 도시된 식세포작용 어세이를 수행한 후 식세포작용을 보여주는 예시적인 유세포분석 데이터(CSFE 대 PE)를 도시한다. 건강한 기증자 Leukopak으로부터 단리된 형질도입된 CD14+ 세포를 CFSE 표지부착된 HER2+ SKOV3 난소 종양 세포 및 CFSE 표지부착된 HER2- Jurkat 세포와 함께 하룻밤 동안 인큐베이션하였다. 도 21a에 도시된 실험에서 표적 세포의 퍼센트 세포 사멸을 보여주는 예시적인 막대 그래프도 도시되어 있다.

도 22a는 CFP 발현 세포가 종양 부위를 침투하는 능력을 조사하고 침투 후 CFP 발현 세포의 활성화를 평가하기 위한 MSTO 중피종 동물 모델 실험의 예시적인 실험 순서도를 보여주는 개략도를 도시한다.

도 22b는 건강한 기증자 Leukopak으로부터 단리되었고 세포외 HER2 결합 도메인(scFv), 세포외 Flag 태그, CD8로부터 유래한 세포외 힌지 도메인, CD8 막횡단 도메인, 및 FcRγ로부터 유래한 제1 세포내 신호전달 도메인 및 PI3K 동원 도메인을 함유하는 제2 세포내 신호전달 도메인을 함유하는 CFP를 코딩하는 렌티바이러스 벡터가 형질도입된 CFSE 표지부착된 CD14+ 세포를 MSTO 종양 보유 NSG 마우스에게 투여한 지 24시간 후 제거된 종양 샘플의 생체영상화를 보여주는 형광 현미경 영상을 도시한다. 형질도입된 세포는 종양 내로 이동하고 종양 세포 주위에서 축적되는 것으로 관찰되었다.

도 22c는 건강한 기증자 Leukopak으로부터 단리되었고 세포외 HER2 결합 도메인(scFv), 세포외 Flag 태그, CD8로부터 유래한 세포외 힌지 도메인, CD8 막횡단 도메인, 및 FcRγ로부터 유래한 제1 세포내 신호전달 도메인 및 PI3K 동원 도메인을 함유하는 제2 세포내 신호전달 도메인을 함유하는 CFP를 코딩하는 렌티바이러스 벡터가 형질도입된 CFSE 표지부착된 CD14+ 세포를 MSTO 종양 보유 NSG 마우스에게 투여한 지 24시간 후 제거된 비장 샘플의 생체영상화를 보여주는 형광 현미경 영상을 도시한다. 형질도입된 세포는 비장 내로 이동하는 것으로 관찰되었다. 세포를 주입한 지 24시간 후 비장으로부터 단리된 CFSE 표지부착된 세포를 유세포분석으로도 조사하였다. 비장의 CFSE 표지부착된 세포는 HLA, CD14 및 CD303의 발현을 유지하였다. 흥미롭게도, CCR2 발현은 CD370(CLEC9A)의 동시적인 증가와 함께 감소하는 것으로 관찰되었는데, 이는 세포가 비장 내로 이동하고 T 세포 반응을 자극할 수 있는 전문적인 APC로 발달할 수 있음을 잠재적으로 암시한다. 흥미롭게도, CD206(만노스) 발

현은 CD45와 마찬가지로 감소하는 것으로 관찰되었다. 만노스 수용체 발현의 감소는 M1 표현형으로의 분화와 관련될 수 있다.

도 23은 MSTO 중피종 동물 모델 실험의 예시적인 실험 순서도를 보여주는 개략도를 도시한다. 항-HER2 CFP를 발현하는 표시된 양의 인간 일차 단핵구를 사용한 치료를 종양 시딩 후 21일째 날에 시작하였다. IVIS 영상화를 이용하여 종양 질량을 측정하였다.

도 24는 도 23에 나타낸 실험에 따라 시간에 따른 종양 크기의 그래프를 도시한다. 항-HER2 CFP를 발현하는 인간 일차 단핵구의 주입은 대조군 치료 동물에 비해 종양 진행의 지연과 관련되어 있었다.

도 25는 표적 세포 CD47 수용체 SIRP-알파(SIRPα) 매개 신호전달에 의한 식세포 수용체의 억제를 표시하는 도표를 도시한다.

도 26a는 재조합 우성 음성 CFP 구축물의 디자인의 그래프 표시(상부 패널), 및 대식세포에서 발현된 재조합 CFP 단백질에 의한 내생성 SIRPα의 억제를 보여주는 그래프 표시를 도시한다. CFP는 표적 세포에서 CD47에 결합할 수 있는 세포외 SIRPα 도메인, SIRPα TM 도메인을 갖지만, 세포내 신호전달 도메인을 결여한다.

도 26b는 대조군 및 우성 음성 CFP 형질도입된 세포에 의한 상대적인 식세포작용의 예시적인 예측된 결과를 보여준다.

도 26c는 대조군 및 우성 음성 CFP 형질도입된 세포에 의한 표적 세포 용해의 예시적인 예측된 결과를 보여준다(E:T, 이펙터:표적).

도 26d는 우성 음성 CFP 형질도입된 대식세포를 사용한 치료 후 종양 모델에서의 마우스 생존의 예시적인 예측된 결과를 보여준다.

도 27a는 표적 세포에서 CD47에 결합할 수 있는 SIRPα 세포외 도메인, SIRPα TM 도메인을 포함하지만, 세포내 SIRPα 신호전달 도메인을 결여하는 재조합 CFP인 SIRPα-PI3K(상부 패널)의 디자인의 그래프 표시를 도시한다. 상기 CFP는 PI3-키나제(PI3K) 결합 도메인을 가진 세포내 신호전달 도메인과 세포내 말단에서 융합된다. BD: 결합 도메인. 하부 패널은 대식세포에서 발현된 재조합 CFP 단백질에 의한 내생성 SIRPα의 억제를 보여주는 그래프 표시를 보여준다.

도 27b는 대조군 및 SIRPα-PI3K CFP 형질도입된 세포에 의한 상대적인 식세포작용의 예측된 결과의 일례를 보여준다.

도 27c는 대조군 및 SIRPα-PI3K CFP 형질도입된 세포에 의한 상대적인 Akt 인산화의 예측된 결과의 일례를 보여준다.

도 27d는 대조군(빈 벡터가 형질도입된) 대식세포에 비해 CFP(인테그린-CAR)를 발현하는 세포에 의한 종양 세포의 증가된 용해의 예측된 결과를 보여준다.

도 27e는 SIRPα-PI3K CFP가 형질도입된 대식세포를 사용한 치료 후 종양의 마우스 이종이식편 모델, 또는 비치료 대조군에서 예측된 생존 곡선을 보여준다.

도 28a의 상부 패널은 CD47에 결합할 수 있는 SIRPα 세포외 도메인, SIRPα TM 도메인을 포함하지만 세포내 SIRPα 신호전달 도메인을 결여하는 재조합 CFP(SIRPα-M1)(상부 패널)의 디자인의 그래프 표시를 도시한다. 상기 CFP는 염증유발 도메인을 가진 세포내 신호전달 도메인을 함유한다. 하부 패널은 골수 세포(예를 들면, 대식세포)에서 발현될 때 재조합 CFP 단백질에 의한 내생성 SIRPα의 억제를 보여주는 그래프 표시를 보여준다. 염증유발 도메인은 M1 분극화를 유도할 수 있다.

도 28b는 SIRPα-M1을 골수 세포(예를 들면, 대식세포)에 형질도입할 때 벡터 대조군에 비해 M1 상태 마커 발현의 증가를 보여주는 유세포분석 어세이의 예측된 결과의 일례를 보여준다.

도 28c는 SIRPα-M1을 골수 세포(예를 들면, 대식세포)에 형질도입할 때 벡터 대조군에 비해 염증유발 마커의 증가를 보여주는 유세포분석 어세이의 예측된 결과의 일례를 보여준다.

도 28d는 대조군(빈 벡터가 형질도입된) 골수 세포(예를 들면, 대식세포)에 비해 SIRPα-M1을 발현하는 세포에 의한 종양 세포의 증가된 용해의 예측된 결과를 보여준다.

도 28e는 SIRPα-M1이 형질도입된 골수 세포(예를 들면, 대식세포)를 사용한 치료 후 종양의 마우스 이종이식편

모델 또는 비치료 대조군에서 예측된 생존 곡선을 보여준다.

도 29a의 상부 패널은 SIRPαβ 쇄와 융합된, 암 항원에 특이적인 세포외 scFv를 포함하는 수용체 기반 CFP인 SIRPαβ의 예시적인 개략도를 도시한다. CD47 수용체 SIRPα의 세포외 부분은 암 항원에 특이적인 scFv에 융합된다. SIRPα의 ECD를 SIRPβ의 막횡단 도메인과 융합시킨다. CFP의 세포내 도메인은 SIRPβ로부터 유래한 세포내 도메인을 포함한다. scFv와 표적 리간드의 결합에 의한 CFP의 활성화는 DAP12의 활성화를 통해 표적 세포의 식세포작용을 유발하는 SIRPβ 세포내 도메인을 활성화시킨다. 하부 패널은 골수 세포(예를 들면, 대식세포)에서 발현된 재조합 SIRPαβ 단백질의 그래프 표시를 보여준다.

도 29b는 벡터 대조군에 비해 식세포 수용체 융합 단백질 SIRPαβ의 그래프 표시를 도시한다.

도 29c는 대조군(빈 벡터가 형질도입된) 대식세포에 비해 SIRPαβ가 형질도입된 대식세포에 의한 표적 세포의 증가된 용해의 예측된 결과를 보여준다.

도 29d는 SIRPαβ가 형질도입된 대식세포를 사용한 치료 후 종양의 마우스 이종이식편 모델 또는 비치료 대조군에서의 생존 곡선을 도시하는 예측된 결과를 보여준다.

도 30a는 조절 요소 서열, CFP를 코딩하는 서열, T2A를 코딩하는 서열 및 시알리다제(sialidase)를 코딩하는 서열을 포함하는 핵산 구축물의 예시적인 개략도를 도시한다. T2A 서열은 번역 시 시알리다제가 CFP로부터 절단될 수 있게 한다.

도 30b는 분비된 시알리다제의 존재 하에서 표적 세포의 증강된 식세포 삼킴(engulfment)의 그래프 표시를 도시한다.

도 30c는 시알리다제의 존재 하에서 CFP를 발현하는 조작된 골수 세포에 의한 표적 세포의 증강된 용해를 보여주는 예측된 결과를 도시한다.

도 30d는 활성화된 단핵구(예를 들면, 대식세포)에서의 발현을 위해 조절 요소를 가진 시알리다제 코딩 핵산 구축물의 예시적인 개략도를 도시한다.

도 30e는 식세포성 세포에서의 NF-카파 B(NF-κB) 활성화의 결과로서 표적 세포의 증강된 식세포 삼킴의 그래프 표시를 도시한다. NF-카파 B의 활성화는 시알리다제를 코딩하는 핵산 구축물의 발현을 활성화시킨다.

도 30f는 3' UTR에서 조절 요소를 가진 시알리다제 코딩 핵산 구축물의 예시적인 개략도를 도시한다. ARE 도메인은 구축물의 표적화된 발현을 위해 사용될 수 있을 뿐만 아니라 mRNA 반감기의 기간도 증가시킬 수 있거나 감소시킬 수 있는, RNA 결합 단백질을 위한 결합 서열 모티프를 가진다.

도 30g는 도 6f에 나타낸 시알리다제 구축물을 발현한 결과로서 표적 세포의 증강된 식세포 삼킴의 그래프 표시이다.

도 31a는 FcRα 쇄에 융합된, 암 항원에 특이적인 세포외 scFv를 포함하는 FcRα 기반 CFP의 예시적인 개략도를 도시한다(상부 패널). FcRα 쇄는 세포내 도메인을 결여한다. 막횡단 도메인은 대식세포에서의 발현을 위해 내생성 Fcγ 수용체 막횡단 도메인과 삼량체화한다. scFv와 표적 항원의 결합에 의한 CFP의 활성화는 FcRα-Fcγ 수용체를 활성화시키고, 이것은 표적 세포의 식세포작용을 유발한다. 하부 패널은 골수 세포(예를 들면, 대식세포)에서 발현된 재조합 FcRα-CFP의 그래프 표시를 보여준다.

도 31b는 벡터 대조군에 비해 CFP(FcRα-CAR)를 발현하는 세포의 상대적인 식세포작용 활성의 그래프 표시를 도시한다.

도 31c는 대조군(빈 벡터가 형질도입된) 골수 세포(예를 들면, 대식세포)에 비해 CFP(FcRα-CAR)가 형질도입된 골수 세포(예를 들면, 대식세포)에 의한 표적 세포의 증가된 용해의 예측된 결과를 보여준다.

도 31d는 CFP(FcRα-CAR)가 형질도입된 골수 세포(예를 들면, 대식세포)를 사용한 치료 후 종양의 마우스 이종이식편 모델 또는 비치료 대조군에서의 생존 곡선을 도시하는 예측된 결과를 보여준다.

도 32a는 TREM 1/2/3의 ECD에 융합된, 암 항원에 특이적인 세포외 scFv를 포함하는 CFP(TREM-CAR)의 예시적인 개략도를 도시한다(상부 패널). CFP는 TREM 1/2/3의 TM 및 ICD를 포함한다. TREM의 막횡단 도메인은 내생성 DAP12 막횡단 도메인과 삼량체화하고, 이것은 식세포작용을 촉진하고 염증을 조절한다. scFv와 표적 항원의 결합에 의한 CFP의 활성화는 TREM 매개 내생성 DAP12 신호전달을 활성화시키고, 이것은 표적 세포의 식세포작용을 유발한다. 하부 패널은 골수 세포(예를 들면, 대식세포)에서 발현된 재조합 CFP(TREM-CAR)의 그래프 표시를 보

여준다.

도 32b는 벡터 대조군에 비해 CFP(TREM-CAR)를 발현하는 세포의 상대적인 식세포작용 활성의 그래프 표시를 도시한다.

도 32c는 대조군(빈 벡터가 형질도입된) 골수 세포(예를 들면, 대식세포)에 비해 CFP(TREM-CAR)가 형질도입된 골수 세포(예를 들면, 대식세포)에 의한 표적 세포의 증가된 용해의 예측된 결과를 보여준다.

도 32d는 CFP(TREM-CAR)가 형질도입된 골수 세포(예를 들면, 대식세포)를 사용한 치료 후 종양의 마우스 이종이식편 모델 또는 비치료 대조군에서의 생존 곡선을 도시하는 예측된 결과를 보여준다.

도 33a는 캐스파제(caspase) 동원 CFP(캐스파제-CAR)의 예시적인 개략도를 보여준다. 구축물은 N-말단에서 C-말단으로 신호 펩타이드, 항원 특이적 scFv, (예를 들면, CD8로부터의) 힌지 영역, (예를 들면, CD8로부터의) TM 영역, ITAM 함유 식세포작용 신호전달 도메인(예를 들면, FcRɣ), 바이시스트론성(bicistronic) 발현을 위한 T2A 서열, SH2 도메인, 캐스파제 절단 서열 및 프로캐스파제로 구성된다(상부 패널). 이 구축물은 대식세포 내로 형질도입될 때 CFP 및 SH2-프로캐스파제를 공발현할 것이다. 프로캐스파제는 휴면 상태에서 자가억제된다. 종양 표면 항원과 CAR 수용체의 결합은 ITAM 티로신 모티프의 인산화를 야기하여, SH2 융합된 프로캐스파제의 동원을 이끌어낸다. 프로캐스파제의 클러스터링은 자가절단 및 활성화를 야기한다. SH2와 프로캐스파제 사이의 링커도 인식 부위에서 절단될 것이다. 활성화된 캐스파제 1/4/5는 강한 염증을 유도한다(하부 패널).

도 33b는 인간 일차 골수 세포(예를 들면, 대식세포)를 표적 종양 세포와 공배양할 때, 빈 벡터에 비해 캐스파제 동원 CFP(캐스파제-CAR)를 발현하는 세포에서의 증가된 염증 유전자 발현을 도시하는 예측된 결과를 보여준다. ELISA에 의한 사이토카인 프로파일링은 벡터 대조군에 비해 염증유발 사이토카인 및 케모카인의 증가된 분비를 보여준다.

도 33c는 인간 일차 골수 세포(예를 들면, 대식세포)를 표적 종양 세포와 공배양할 때 빈 벡터에 비해 캐스파제 동원 CFP(캐스파제-CAR)를 발현하는 세포에서의 증가된 염증유발 세포 표면 마커 발현을 도시하는 예측된 유세포분석 결과를 보여준다.

도 33d는 대조군(빈 벡터가 형질도입된) 골수 세포(예를 들면, 대식세포)에 비해 캐스파제 동원 CFP(캐스파제-CAR)가 형질도입된 골수 세포(예를 들면, 대식세포)에 의한 표적 종양 세포의 증가된 용해의 예측된 결과를 보여준다.

도 33e는 캐스파제 동원 CFP(캐스파제-CAR)가 형질도입된 대식세포를 사용한 치료 후 종양의 마우스 이종이식편 모델 또는 비치료 대조군에서의 생존 곡선을 도시하는 예측된 결과를 보여준다.

도 34a는 CFP 구축물의 예시적인 모듈식 디자인의 그래프 표시를 도시한다.

도 34b는 CFP 구축물의 예시적인 모듈식 디자인의 그래프 표시를 도시한다.

도 34c는 CFP 구축물의 예시적인 모듈식 디자인의 그래프 표시를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 모든 용어들은 당분야에서 숙련된 자에 의해 이해될 바와 같이 이해되기 위한 것이다. 달리 정의되어 있지 않은 한, 본원에서 사용된 모든 기술 용어들 및 과학 용어들은 본 개시가 속하는 분야에서 통상의 기술을 가진 자에 의해 통상적으로 이해되는 의미와 동일한 의미를 가진다.

[0020] 본원에서 사용된 단락 제목은 조직화하기 위한 것일 뿐이고 기재된 보호대상을 제한하는 것으로서 해석되어서는 안 된다.

[0021] 본 개시의 다양한 특징들이 단일 실시양태의 문맥으로 기재될 수 있지만, 이 특징들은 별개로 또는 임의의 적합한 조합으로 제공될 수도 있다. 대조적으로, 본 개시가 명료함을 위해 별개의 실시양태의 문맥으로 본원에 기재될 수 있지만, 본 개시는 단일 실시양태로 구현될 수도 있다.

[0022] 본 명세서에서 "일부 실시양태", "한 실시양태", "하나의 실시양태" 또는 "다른 실시양태"의 언급은 실시양태와 관련하여 기재된 특징, 구조 또는 특성이 본 개시의 적어도 일부 실시양태에 포함되나, 반드시 모든 실시양태에 포함될 필요는 없음을 의미한다.

[0023] 본 명세서 및 청구범위에서 사용된 바와 같이, 용어 "포함하는"(및 임의의 형태의 포함하는, 예컨대,

"포함한다" 및 "포함하고"), "가진"(및 임의의 형태의 가진, 예컨대, "가진다" 및 "갖고"), "포괄하는"(및 임의의 형태의 포괄하는, 예컨대, "포괄한다" 및 "포괄하고") 또는 "함유하는"(및 임의의 형태의 함유하는, 예컨대, "함유한다" 및 "함유하고")은 포괄적이거나 제한이 없고 언급되지 않은 추가 요소 또는 방법 단계를 배제하지 않는다. 본 명세서에서 논의된 임의의 실시양태가 본 개시의 임의의 방법 또는 조성물과 관련하여 구현될 수 있거나, 그 반대도 마찬가지라는 것은 예상된다. 나아가, 본 개시의 조성물은 본 개시의 방법을 달성하는 데 사용될 수 있다.

[0024] 측정될 수 있는 값, 예컨대, 파라미터, 양, 일시적인 지속시간 등을 언급할 때 본원에서 사용된 용어 "약" 또는 "대략"은 특정된 값으로부터 +/-30% 이하, +/-20% 이하, +/-10% 이하, +/-5% 이하 또는 +/-1% 이하의 편차를 포괄하기 위한 것이고, 단 이러한 편차는 본 개시의 수행에 적절해야 한다. 수식어 "약" 또는 "대략"이 지칭하는 값 그 자체도 구체적으로 개시된 것임을 이해해야 한다.

[0025] 본원은 표적 세포에 특이적으로 결합하도록 디자인된 조작된 골수 세포(호중구, 단핵구, 골수 수지상 세포(mDC), 비만 세포 및 대식세포를 포함하나, 이들로 제한되지 않음)를 제공한다. 조작된 골수 세포는 직접적으로(예를 들면, 식세포작용을 통해) 및/또는 간접적으로(예를 들면, T 세포를 활성화시킴으로써) 표적 세포를 공격하고 사멸시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 세포는 암 세포이다.

[0026] 암은 본 개시에서 상세히 기재된 한 예시적인 실시양태이지만, 본원에 기재된 방법 및 기술은 체내의 감염된 세포 또는 다른 방식으로 병든 세포를 표적화하는 데 유용할 것으로 예상된다. 유사하게, 조작된 세포를 사용하는 치료제 및 백신 조성물이 본원에 기재되어 있다.

[0027] 본원은 암과 같은 질환 또는 병태를 치료하는 조성물 및 방법을 제공한다. 본원에서 제공된 조성물 및 방법은 병든 세포, 예컨대, 암 세포를 표적화하기 위해 호중구, 단핵구, 골수 수지상 세포(mDC), 비만 세포 및 대식세포를 포함하나 이들로 제한되지 않는 인간 골수 세포를 사용한다. 본원에서 제공된 조성물 및 방법은 T 세포 활성화 및 동원, 이펙터 면역 세포 활성화(예를 들면, CD8 T 세포 및 NK 세포 활성화), 항원 교차 제시, 증강된 염증 반응, 조절 T 세포의 감소 및 식세포작용을 포함하는 다양한 기작들로 병든 세포, 예컨대, 암세포 및/또는 병든 조직을 제거하는 데 사용될 수 있다. 예를 들면, 골수 세포는 암 세포에 대한 면역학적 반응을 유지하는 데 사용될 수 있다.

[0028] 본원은 키메라 융합 단백질(CFP), 예컨대, 식세포 수용체(PR) 융합 단백질(PFP), 스캐빈저 수용체(SR) 융합 단백질(SFP), 인테그린 수용체(IR) 융합 단백질(IFP) 또는 캐스파제 동원 수용체(캐스파제-CAR) 융합 단백질을 코딩하는 재조합 핵산을 포함하는 조성물을 제공한다. 상기 재조합 핵산에 의해 코딩된 CFP는 표적 세포의 항원에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인(ECD)을 포함할 수 있다. 세포외 도메인은 수용체, 예컨대, CD2, CD8, CD28, CD68, 식세포 수용체, 스캐빈저 수용체 또는 인테그린 수용체로부터 유래한 힌지 도메인 또는 세포외 도메인에 융합될 수 있다. 상기 재조합 핵산에 의해 코딩된 CFP는 막횡단 도메인, 예컨대, CD2, CD8, CD28, CD68, 식세포 수용체, 스캐빈저 수용체 또는 인테그린 수용체로부터 유래한 막횡단 도메인도 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 재조합 핵산에 의해 코딩된 CFP는 세포내 신호전달 도메인, 예컨대, 식세포 수용체, 스캐빈저 수용체 또는 인테그린 수용체로부터 유래한 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 예를 들면, 세포내 도메인은 식세포 수용체, 스캐빈저 수용체 또는 인테그린 수용체로부터 유래한 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 예를 들면, 세포내 도메인은 식세포 활성, 염증 반응, 산화질소 생성, 인테그린 활성화, (예를 들면, 케모카인 수용체 발현을 통한) 증강된 이펙터 세포 이동, 항원 제시, 및/또는 증강된 교차 제시를 촉진하는 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, CFP는 식세포 수용체 융합 단백질(PFP)이다. 일부 실시양태에서, CFP는 식세포 스캐빈저 수용체 융합 단백질(PFP)이다. 일부 실시양태에서, CFP는 인테그린 수용체 융합 단백질(IFP)이다. 일부 실시양태에서, CFP는 염증 수용체 융합 단백질이다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산에 의해 코딩된 CFP는 동원 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 예를 들면, 세포내 도메인은 하나 이상의 PI3K 동원 도메인, 캐스파제 동원 도메인 또는 캐스파제 활성화 및 동원 도메인(CARD)을 포함할 수 있다.

[0029] 본원은 (i) 막횡단 도메인, 및 (ii) 식세포 수용체 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 식세포 또는 테더링(tethering) 수용체(PR) 서브유닛(예를 들면, 식세포 수용체 융합 단백질(PFP)); 및 항원, 예를 들면, 표적 세포의 항원 또는 표적 세포 상에 제시된 항원에 특이적인 세포외 항원 결합 도메인을 포함하는 CFP를 코딩하는 재조합 핵산을 포함하는 조성물을 제공하는 것으로서; 이때 막횡단 도메인과 세포외 항원 결합 도메인은 융합된 수용체의 세포외 항원 결합 도메인에 의한 표적에의 항원 결합이 식세포 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 활성화시키도록 작동 가능하게 연결된다.

[0030] 본원은 막횡단 도메인, 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 식세포 또는 테더링 수용체(PR) 서브유닛을 포함하는 PR 서브유닛(예를 들면, 식세포 수용체 융합 단백질(PFP)); 및 표적 세포의 항원에 특이적인 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 CFP를 코딩하는 재조합 핵산 서열을 포함하는 조성물을 제공하는 것으로서, 이때 막횡단 도메인과 세포외 도메인은 작동 가능하게 연결되고; CFP와 표적 세포의 항원의 결합 시, CFP를 발현하는 골수 세포, 예컨대, 호중구, 단핵구, 골수 수지상 세포(mDC), 비만 세포 또는 대식세포의 사멸 또는 식세포작용 활성은 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 550%, 600%, 650%, 700%, 750%, 800%, 850%, 900%, 950% 또는 1000% 이상 증가된다.

[0031] 본원은 막횡단 도메인, 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 식세포 또는 테더링 수용체(PR) 서브유닛을 포함하는 PR 서브유닛(예를 들면, 식세포 수용체 융합 단백질(PFP)); 및 표적 세포의 항원에 특이적인 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 CFP를 코딩하는 재조합 핵산 서열을 포함하는 조성물을 제공하는 것으로서; 이때 막횡단 도메인과 세포외 도메인은 작동 가능하게 연결되고; CFP와 표적 세포의 항원의 결합 시, CFP를 발현하는 골수 세포, 예컨대, 호중구, 단핵구, 골수 수지상 세포(mDC), 비만 세포 또는 대식세포의 사멸 또는 식세포작용 활성은 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 1.1배, 1.5배, 2배, 2.5배, 3배, 3.5배, 4배, 4.5배, 5배, 5.5배, 6배, 6.5배, 7배, 7.5배, 8배, 8.5배, 9배, 9.5배, 10배, 11배, 12배, 13배, 14배, 15배, 16배, 17배, 18배, 19배, 20배, 25배, 30배, 40배, 50배, 75배 또는 100배 증가된다.

[0032] 한 양태에서, 본원은 (a) (i) 항-CD5 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인, 및 (ii) 세포외 도메인에 작동 가능하게 연결된 막횡단 도메인을 포함하는 키메라 융합 단백질(CFP)을 코딩하는 서열을 포함하는 재조합 폴리핵산을 포함하는 골수 세포, 예컨대, 호중구, 단핵구, 골수 수지상 세포(mDC), 비만 세포 또는 대식세포; 및 (b) 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공하는 것으로서; 이때 골수 세포는 CFP를 발현하고 CFP를 발현하지 않는 골수 세포에 비해 CD5를 발현하는 표적 세포의 식세포작용의 적어도 1.1배 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CD5 결합 도메인은 항체의 항원 결합 단편, Fab 단편, scFv 도메인 또는 sdAb 도메인을 포함하는 CD5 결합 단백질이다. 일부 실시양태에서, CD5 결합 도메인은 (i) 서열번호 1의 가변 중쇄(V_H) 서열, 또는 서열번호 1에 대한 적어도 90% 서열 동일성을 가진 가변 중쇄(V_H) 서열; 및 (ii) 서열번호 2의 가변 경쇄(V_L) 서열, 또는 서열번호 2에 대한 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 가진 가변 경쇄(V_L) 서열을 포함하는 scFv를 포함한다. 일부 실시양태에서, CD5 결합 도메인은 서열번호 33을 포함하거나 서열번호 33에 대한 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 가진 scFv를 포함한다. 일부 실시양태에서, HER2 결합 도메인은 (i) 서열번호 8의 가변 중쇄(V_H) 서열, 또는 서열번호 8에 대한 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 가진 가변 중쇄(V_H) 서열; 및 (ii) 서열번호 9의 가변 경쇄(V_L) 서열, 또는 서열번호 9에 대한 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 가진 가변 경쇄(V_L) 서열을 포함하는 scFv를 포함한다. 일부 실시양태에서, CD5 결합 도메인은 서열번호 32를 포함하거나 서열번호 32에 대한 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 가진 scFv를 포함한다. 일부 실시양태에서, CFP는 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 세포내 도메인을 포함하는 야생형 단백질은 세포외 도메인을 포함하지 않는다.

[0033] 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 CD8로부터 유래한 힌지 도메인도 포함하고, 이때 힌지 도메인은 막횡단 도메인 및 항-CD5 결합 도메인에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시양태에서, 세포외 힌지 도메인은 서열번호 7의 서열, 또는 서열번호 7에 대한 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 가진 서열을 포함한다.

[0034] 일부 실시양태에서, CFP는 서열번호 30의 막횡단 도메인, 또는 서열번호 30에 대한 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 가진 막횡단 도메인에 융합된 세포외 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, CFP는 서열번호 31의 막횡단 도메인, 또는 서열번호 31에 대한 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 가진 막횡단 도메인에 융합된 세포외 도메인을 포함한다.

[0035] 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 CD8 막횡단 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 서열번호 6 또는 29의 서열, 또는 서열번호 6 또는 29에 대한 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 가진 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 서열번호 18의 서열, 또는 서열번호 18에 대한 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 가진 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 서열번호 34의 서열, 또는 서열번호 34에 대한 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 가진 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 서열번호 19의 서열, 또는 서열번호 19에 대한 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 가진 서열을 포함한다.

[0036] 일부 실시양태에서, CFP는 식세포작용 신호전달 도메인을 포함하는 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 식세포작용 신호전달 도메인은 Megf10, MerTk, FcRα 및 Bai1 이외의 수용체로부터 유래한 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 식세포작용 신호전달 도메인은 Megf10, MerTk, FcR 및 Bai1 이외의 수용체로부터 유래한 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 식세포작용 신호전달 도메인은 CD3ζ 이외의 수용체로부터 유래한 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 식세포작용 신호전달 도메인은 FcRγ, FcRα 또는 FcRε으로부터 유래한 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 식세포작용 신호전달 도메인은 CD3ζ로부터 유래한 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, CFP는 서열번호 3, 20, 27 및 28 중 어느 하나의 세포내 신호전달 도메인, 또는 서열번호 3, 20, 27 및 28 중 어느 하나에 대한 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 가진 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인은 염증유발 신호전달 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 염증유발 신호전달 도메인은 PI3-키나제(PI3K) 동원 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 염증유발 신호전달 도메인은 서열번호 4의 서열, 또는 서열번호 4에 대한 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 가진 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 염증유발 신호전달 도메인은 CD40의 세포내 신호전달 도메인으로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 염증유발 신호전달 도메인은 서열번호 5의 서열, 또는 서열번호 5에 대한 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 가진 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, CFP는 서열번호 21의 세포내 신호전달 도메인, 또는 서열번호 21에 대한 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 가진 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, CFP는 서열번호 23의 세포내 신호전달 도메인, 또는 서열번호 23에 대한 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 가진 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.

[0037] 일부 실시양태에서, CFP는 서열번호 14의 서열, 또는 서열번호 14에 대한 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 가진 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, CFP는 서열번호 15의 서열, 또는 서열번호 15에 대한 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 가진 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, CFP는 서열번호 16의 서열, 또는 서열번호 16에 대한 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 가진 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, CFP는 서열번호 24의 서열, 또는 서열번호 24에 대한 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 가진 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, CFP는 서열번호 25의 서열, 또는 서열번호 25에 대한 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 가진 서열을 포함한다.

[0038] 일부 실시양태에서, CFP는 (a) (i) CD5에 특이적으로 결합하는 scFv, 및 (ii) CD8로부터 유래한 힌지 도메인, CD28로부터 유래한 힌지 도메인 또는 CD68로부터의 세포외 도메인의 적어도 일부를 포함하는 세포외 도메인; (b) CD8 막횡단 도메인, CD28 막횡단 도메인, CD2 막횡단 도메인 또는 CD68 막횡단 도메인; 및 (c) (i) FcRα, FcRγ 또는 FcRε으로부터 유래한 제1 세포내 신호전달 도메인, 및 (ii) (A) PI3K 동원 도메인을 포함하거나, (B) CD40으로부터 유래한 제2 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 적어도 2개의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, CFP는 상기 (c)에 대한 대안으로서, (i) 식세포 수용체 세포내 도메인으로부터 유래한 제1 세포내 신호전달 도메인, 및 (ii) (A) PI3K 동원 도메인을 포함하거나, (B) CD40으로부터 유래한 스캐빈저 수용체 식세포 수용체 세포내 도메인으로부터 유래한 제2 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 적어도 2개의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함한다. 세포내 신호전달

도메인이 유래할 수 있는 예시적인 스캐빈저 수용체는 표 2에서 확인될 수 있다. 일부 실시양태에서, CFP는 선천성 면역 수용체의 세포내 신호전달 도메인으로부터 유래한 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.

[0039] 일부 실시양태에서, 재조합 폴리핵산은 mRNA이다. 일부 실시양태에서, 재조합 폴리핵산은 circRNA이다. 일부 실시양태에서, 재조합 폴리핵산은 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 재조합 폴리핵산은 바이러스 벡터를 통해 전달된다.

[0040] 일부 실시양태에서, 골수 세포는 CD14+ 세포, CD14+/CD16- 세포, CD14+/CD16+ 세포, CD14-/CD16+ 세포, CD14-/CD16- 세포, 수지상 세포, M0 대식세포, M2 대식세포, M1 대식세포 또는 모자이크 골수 세포/대식세포/수지상 세포이다.

[0041] 한 양태에서, 본원은 암의 치료를 필요로 하는 인간 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, (a) (i) 항-CD5 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인, 및 (ii) 세포외 도메인에 작동 가능하게 연결된 막횡단 도메인을 포함하는 키메라 융합 단백질(CFP)을 코딩하는 서열을 포함하는 재조합 폴리핵산 서열을 포함하는 골수 세포; 및 (b) 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 상기 인간 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공하는 것으로서; 이때 상기 골수 세포는 CFP를 발현한다.

[0042] 일부 실시양태에서, CFP와 대상체의 표적 암 세포에 의해 발현된 CD5의 결합 시 골수 세포의 사멸 또는 식세포작용 활성은 CFP를 발현하지 않는 골수 세포에 비해 20% 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, 종양의 성장은 인간 대상체에서 억제된다.

[0043] 일부 실시양태에서, 암은 CD5+ 암이다. 일부 실시양태에서, 암은 백혈병, T 세포 림프종 또는 B 세포 림프종이다.

[0044] 일부 실시양태에서, 항-CD5 결합 도메인은 항체의 항원 결합 단편, scFv 도메인, Fab 단편 또는 sdAb 도메인을 포함하는 CD5 결합 단백질이다. 일부 실시양태에서, 항-CD5 결합 도메인은 CD5에 결합하는 단백질 또는 이의 단편, 예컨대, CD5의 리간드(예를 들면, CD5의 천연 리간드)이다.

[0045] 일부 실시양태에서, CFP는 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 추가로 포함하고, 이때 상기 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인은 식세포작용 신호전달 도메인을 포함하고, 세포내 도메인을 포함하는 야생형 단백질은 세포외 도메인을 포함하지 않는다.

[0046] 일부 실시양태에서, 식세포작용 신호전달 도메인은 Megf10, MerTk, FcRα 및 Bai1 이외의 수용체로부터 유래한 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 식세포작용 신호전달 도메인은 FcRγ, FcRα 또는 FcRε으로부터 유래한 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.

[0047] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인은 염증유발 신호전달 도메인도 포함한다. 일부 실시양태에서, 염증유발 신호전달 도메인은 PI3-키나제(PI3K) 동원 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 CD8 막횡단 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 CD8로부터 유래한 힌지 도메인, CD28로부터 유래한 힌지 도메인, 또는 CD68로부터의 세포외 도메인의 적어도 일부를 포함한다.

[0048] 일부 실시양태에서, CFP는 (a) (i) CD5에 특이적으로 결합하는 scFv, 및 (ii) CD8로부터 유래한 힌지 도메인, CD28로부터 유래한 힌지 도메인, 또는 CD68로부터의 세포외 도메인의 적어도 일부를 포함하는 세포외 도메인; (b) CD8 막횡단 도메인, CD28 막횡단 도메인, CD2 막횡단 도메인 또는 CD68 막횡단 도메인; 및 (c) (i) FcRγ 또는 FcRε으로부터 유래한 제1 세포내 신호전달 도메인, 및 (ii) (A) PI3K 동원 도메인을 포함하거나, (B) CD40으로부터 유래한 제2 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 적어도 2개의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 mRNA 또는 circRNA이다. 일부 실시양태에서, 골수 세포는 CD14+ 세포, CD14+/CD16- 세포, CD14+/CD16+ 세포, CD14-/CD16+ 세포, CD14-/CD16- 세포, 수지상 세포, M0 대식세포, M2 대식세포, M1 대식세포 또는 모자이크 골수 세포/대식세포/수지상 세포이다.

[0049] 일부 실시양태에서, 방법은 CD47 아고니스트, Rac를 억제하는 작용제, Cdc42를 억제하는 작용제, GTPase를 억제하는 작용제, F-액틴 해체를 촉진하는 작용제, PFP로의 PI3K 동원을 촉진하는 작용제, PI3K 활성을 촉진하는 작용제, 포스파티딜이노시톨 3,4,5-트리스포스페이트의 생성을 촉진하는 작용제, ARHGAP12 활성을 촉진하는 작용제, ARHGAP25 활성을 촉진하는 작용제, SH3BP1 활성을 촉진하는 작용제, 일차 및/또는 이차 림프계 장기에서 림프구의 격리를 촉진하는 작용제, 이차 림프계 장기에서 미감작 T 세포 및 중추 기억 T 세포의 농도를 증가시키는 작용제, 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 추가 치료제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0050] 일부 실시양태에서, 골수 세포는 (a) CFP와 이량체화하는 내생성 펩타이드 또는 단백질; (b) CFP와 이량체화하는 비내생성 펩타이드 또는 단백질; 및/또는 (c) CFP와 상호작용하는 펩타이드 또는 단백질을 코딩하는 서열을 포함하는 제2 재조합 폴리핵산 서열을 추가로 포함하고; 이때 이량체화 또는 상호작용은 CFP를 발현하지 않는 골수 세포에 비해 CFP를 발현하는 골수 세포에 의한 식세포작용을 증강시킨다.

[0051] 일부 실시양태에서, 골수 세포는 (i) 이펙터 활성, 교차 제시, 호흡 폭발, ROS 생성, iNOS 생성, 염증 매개자, 세포외 소포 생성, 포스파티딜이노시톨 3,4,5-트리스포스페이트 생성, 항원을 발현하는 표적 세포와의 트로고사이토시스(trogocytosis), 식세포작용의 CD47 매개 억제에 대한 내성, 식세포작용의 LILRB1 매개 억제에 대한 내성, 또는 이들의 임의의 조합의 증가; 및/또는 (ii) IL-1, IL3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-23, TNFα, 사이토카인의 TNF 패밀리, CCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11, IL-18, IL-23, IL-27, CSF, MCSF, GMCSF, IL-17, IP-10, RANTES, 인터페론, MHC 클래스 I 단백질, MHC 클래스 II 단백질, CD40, CD48, CD58, CD80, CD86, CD112, CD155, TRAIL/TNF 패밀리 사멸 수용체, TGFβ, B7-DC, B7-H2, LIGHT, HVEM, TL1A, 41BBL, OX40L, GITRL, CD30L, TIM1, TIM4, SLAM, PDL1, MMP(예를 들면, MMP2, MMP7 및 MMP9), 또는 이들의 임의의 조합의 발현의 증가를 나타낸다.

[0052] 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 식세포 또는 테더링 수용체로부터 유래하거나, 세포내 신호전달 도메인은 식세포작용 활성화 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 Megf10, MerTk, FcR-알파 또는 Bai1로부터 선택된 식세포 수용체 이외의 수용체로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 TNFR1, MDA5, CD40, 렉틴, 덱틴 1, CD206, 스캐빈저 수용체 A1(SRA1), MARCO, CD36, CD163, MSR1, SCARA3, COLEC12, SCARA5, SCARB1, SCARB2, CD68, OLR1, SCARF1, SCARF2, CXCL16, STAB1, STAB2, SRCRB4D, SSC5D, CD205, CD207, CD209, RAGE, CD14, CD64, F4/80, CCR2, CX3CR1, CSF1R, Tie2, HuCRIg(L), CD64, CD32a, CD16a, CD89, Fcα 수용체 I, CR1, CD35, CD3ζ, 보체 수용체, CR3, CR4, Tim-1, Tim-4 및 CD169로 구성된 군으로부터 선택된 수용체(예를 들면, 식세포 수용체)와 같은 단백질로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 염증유발 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 PI3K 동원 도메인이 아닌 염증유발 신호전달 도메인을 포함한다.

[0053] 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 ITAM 도메인 함유 수용체로부터 유래한다.

[0054] 본원은 막횡단 도메인, 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 식세포 또는 테더링 수용체(PR) 서브유닛; 및 표적 세포의 항원에 특이적인 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 PR 융합 단백질(PFP)과 같은 CFP를 코딩하는 재조합 핵산을 포함하는 조성물을 제공하는 것으로서; 이때 막횡단 도메인과 세포외 도메인은 작동 가능하게 연결되고; 세포내 신호전달 도메인은 Megf10, MerTk, FcRα 또는 Bai1로부터 선택된 식세포 수용체 이외의 식세포 수용체로부터 유래한다.

[0055] 일부 실시양태에서, CFP와 표적 세포의 항원의 결합 시, CFP를 발현하는 세포의 사멸 활성은 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 550%, 600%, 650%, 700%, 750%, 800%, 850%, 900%, 950% 또는 1000% 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, CFP는 CFP가 세포에서 발현될 때 세포의 세포막 내로 기능적으로 혼입된다. 일부 실시양태에서, CFP와 표적 세포의 항원의 결합 시, CFP를 발현하는 세포의 사멸 활성은 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 1.1배, 1.5배, 2배, 2.5배, 3배, 3.5배, 4배, 4.5배, 5배, 5.5배, 6배, 6.5배, 7배, 7.5배, 8배, 8.5배, 9배, 9.5배, 10배, 11배, 12배, 13배, 14배, 15배, 16배, 17배, 18배, 19배, 20배, 25배, 30배, 40배, 50배, 75배 또는 100배 증가된다.

[0056] 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 TNFR1, MDA5, CD40, 렉틴, 덱틴 1, CD206, 스캐빈저 수용체 A1(SRA1), MARCO, CD36, CD163, MSR1, SCARA3, COLEC12, SCARA5, SCARB1, SCARB2, CD68, OLR1, SCARF1, SCARF2, CXCL16, STAB1, STAB2, SRCRB4D, SSC5D, CD205, CD207, CD209, RAGE, CD14, CD64, F4/80, CCR2, CX3CR1, CSF1R, Tie2, HuCRIg(L), CD64, CD32a, CD16a, CD89, Fcα 수용체 I, CR1, CD35, CD3ζ, CR3, CR4, Tim-1, Tim-4 및 CD169로 구성된 군으로부터 선택된 수용체, 예컨대, 식세포 수용체로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 염증유발 신호전달 도메인을 포함한다.

[0057] 본원은 막횡단 도메인, 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 식세포 또는 테더링 수용체(PR) 서브유닛; 및 표적 세포의 항원에 특이적인 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 PR 융합 단백질(PFP)과 같은 CFP를 코딩하는 재조합 핵산을 포함하는 조성물을 제공하는 것으로서; 이때 막횡단 도메인과 세포외 도메인은 작동 가능하게 연결되고; 세포내 신호전달 도메인은 TNFR1, MDA5, CD40, 렉틴, 덱틴

1, CD206, 스캐빈저 수용체 A1(SRA1), MARCO, CD36, CD163, MSR1, SCARA3, COLEC12, SCARA5, SCARB1, SCARB2, CD68, OLR1, SCARF1, SCARF2, CXCL16, STAB1, STAB2, SRCRB4D, SSC5D, CD205, CD207, CD209, RAGE, CD14, CD64, F4/80, CCR2, CX3CR1, CSF1R, Tie2, HuCRIg(L), CD64, CD32a, CD16a, CD89, Fcα 수용체 I, CR1, CD35, CD3ζ, CR3, CR4, Tim-1, Tim-4 및 CD169로 구성된 군으로부터 선택된 수용체, 예컨대, 식세포 수용체로부터 유래한다.

[0058] 일부 실시양태에서, CFP와 표적 세포의 항원의 결합 시, CFP를 발현하는 세포의 사멸 활성은 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 550%, 600%, 650%, 700%, 750%, 800%, 850%, 900%, 950% 또는 1000% 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 Megf10, MerTk, FcRα 또는 Bai1로부터 선택된 식세포 수용체 이외의 식세포 수용체로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 염증유발 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 PI3K 동원 도메인, 예컨대, CD19로부터 유래한 PI3K 동원 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 PI3K 동원 도메인이 아닌 염증유발 신호전달 도메인을 포함한다.

[0059] 본원은 막횡단 도메인, 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 식세포 또는 테더링 수용체(PR) 서브유닛; 및 표적 세포의 항원에 특이적인 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 PR 융합 단백질(PFP)과 같은 CFP를 코딩하는 재조합 핵산을 포함하는 조성물을 제공하는 것으로서; 이때 막횡단 도메인과 세포외 도메인은 작동 가능하게 연결되고; 세포내 신호전달 도메인은 PI3K 동원 도메인이 아닌 염증유발 신호전달 도메인을 포함한다.

[0060] 본원은 표적 세포, 예컨대, 병든 세포를 표적화할 수 있는 조작된 골수 세포를 생성하기 위해 골수 세포와 같은 세포에서 발현될 수 있는 조작된 CFP, 예컨대, 식세포 수용체 융합 단백질의 조성물을 제공한다.

[0061] 표적 세포는 예를 들면, 암 세포이다. 일부 실시양태에서, 조작된 골수 세포는 암 세포를 삼킨 후 그의 세포 표면 상에 암 항원을 제시하여 T 세포를 활성화시킬 수 있다. "항원"은 면역 반응을 자극할 수 있는 분자이다. 헬퍼 T 림프구(T 헬퍼(TH) 세포)이든 아니면 세포독성 T 림프구(CTL)이든 T 세포에 의해 인식되는 항원은 온전한 단백질로서 인식되지 않고, 오히려 세포 표면 상의 MHC 단백질(예컨대, 클래스 I 또는 클래스 II MHC 단백질)과 회합된 작은 펩타이드로서 인식된다. 천연 생성 면역 반응의 과정 동안, 항원 제시 세포(APC) 상의 클래스 II MHC 분자와 회합된 상태로 인식되는 항원은 세포 외부로부터 획득되고, 내재화되고, 클래스 II MHC 분자와 회합되는 작은 펩타이드로 프로세싱된다.

[0062] 일부 실시양태에서, CFP와 표적 세포의 항원의 결합 시, CFP를 발현하는 세포의 사멸 활성은 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 550%, 600%, 650%, 700%, 750%, 800%, 850%, 900%, 950% 또는 1000% 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, CFP는 CFP가 세포에서 발현될 때 세포의 세포막 내로 기능적으로 혼입된다. 일부 실시양태에서, CFP와 표적 세포의 항원의 결합 시, CFP를 발현하는 세포의 사멸 활성은 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 1.1배, 1.5배, 2배, 2.5배, 3배, 3.5배, 4배, 4.5배, 5배, 5.5배, 6배, 6.5배, 7배, 7.5배, 8배, 8.5배, 9배, 9.5배, 10배, 11배, 12배, 13배, 14배, 15배, 16배, 17배, 18배, 19배, 20배, 25배, 30배, 40배, 50배, 75배 또는 100배 증가된다.

[0063] 일부 실시양태에서, 항원을 발현하는 표적 세포는 암 세포이다. 일부 실시양태에서, 항원을 발현하는 표적 세포는 직경이 적어도 0.8 마이크론이다.

[0064] 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 항원을 발현하는 표적 세포의 식세포작용의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 항원을 발현하는 표적 세포의 식세포작용의 적어도 1.1배 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 항원을 발현하는 표적 세포의 식세포작용의 적어도 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 20배, 30배 또는 50배 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 사이토카인 생성의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 사이토카인은 IL-1, IL3, IL-6, IL-12, IL-13, IL-23, TNF, CCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11, IL-18, IL-23, IL-27, CSF, MCSF, GMCSF, IL17, IP-10, RANTES, 인터페론 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 이펙터 활성의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태

에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 교차 제시의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 MHC 클래스 II 단백질의 발현의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 CD80의 발현의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 CD86의 발현의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 MHC 클래스 I 단백질의 발현의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 TRAIL/TNF 패밀리 사멸 수용체의 발현의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 B7-H2의 발현의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 LIGHT의 발현의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 HVEM의 발현의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 CD40의 발현의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 TL1A의 발현의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 41BBL의 발현의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 OX40L의 발현의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 GITRL 사멸 수용체의 발현의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 CD30L의 발현의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 TIM4의 발현의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 TIM1 리간드의 발현의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 SLAM의 발현의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 CD48의 발현의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 CD58의 발현의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 CD155의 발현의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 CD112의 발현의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 PDL1의 발현의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 B7-DC의 발현의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 호흡 폭발의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 ROS 생성의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 iNOS 생성의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 iNOS 생성의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 세포외 소포 생성의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 항원을 발현하는 표적 세포와의 트로고사이토시스의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 식세포작용의 CD47 매개 억제에 대한 내성의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 CFP를 발현하지 않는 세포에 비해 식세포작용의 LILRB1 매개 억제에 대한 내성의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, CFP를 발현하는 세포는 포스파티딜이노시톨 3,4,5-트리스포스페이트 생성의 증가를 나타낸다.

[0065] 일부 실시양태에서, CFP의 세포외 도메인은 Ig 결합 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, FcRㅣI, FcRㅣIIA, FcRㅣIIB, FcRㅣIIC, FcRㅣIIIA, FcRㅣIIIB, FcRn, TRIM21, FcRL5 결합 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, CFP의 세포외 도메인은 FcR 세포외 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, CFP의 세포외 도메인은 FcRα, FcRβ, FcRε 또는 FcRㅣ 세포외 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 FcRα(FCAR) 세포외 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 FcRβ 세포외 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 FCER1A 세포외 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 FDGR1A, FCGR2A, FCGR2B, FCGR2C, FCGR3A 또는 FCGR3B 세포외 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 인테그린 도메인 또는 인테그린 수용체 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 하나 이상의 인테그린 α1, α2, αIIb, α3, α4, α5, α6, α7, α8, α9, α10, α11, αD, αE, αL, αM, αV, αX, β1, β2, β3, β4, β5, β6, β7 또는 β8 도메인을 포함한다.

[0066] 일부 실시양태에서, CFP는 막횡단 도메인에 작동 가능하게 연결된 세포외 도메인 및 세포외 항원 결합 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 수용체, 힌지, 스페이서 및/또는 링커의 세포외 도메인도 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 식세포 수용체의 세포외 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, CFP의 세포외 부분은 세포내 신호전달 도메인이 유래한 수용체와 동일한 수용체로부터 유래한다. 일부 실시

양태에서, 세포외 도메인은 스캐빈저 수용체의 세포외 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 면역글로불린 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역글로불린 도메인은 면역글로불린 또는 면역글로불린 힌지 영역의 세포외 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 식세포 삼킴 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 다량체 조립이 가능한 구조를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 다량체화를 위한 스카폴드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 길이가 적어도 10개, 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 150개, 200개, 300개, 300개, 400개 또는 500개 아미노산이다. 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 길이가 최대 500개, 400개, 300개, 200개 또는 100개 아미노산이다. 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 표적 세포의 항원에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 항체 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 수용체 도메인, 항체 도메인을 포함하고, 이때 항체 도메인은 기능적 항체 단편, 단일 쇄 가변 단편(scFv), Fab, 단일 도메인 항체(sdAb), 나노바디, V_H 도메인, V_L 도메인, VNAR 도메인, V_{HH} 도메인, 이중특이적 항체, 디아바디, 또는 이들의 기능적 단편 또는 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 리간드, 수용체의 세포외 도메인 또는 어댑터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 단일 항원에 특이적인 단일 세포외 항원 결합 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 적어도 2개의 세포외 항원 결합 도메인을 포함하고, 이때 적어도 2개의 세포외 항원 결합 도메인 각각은 상이한 항원에 특이적이다.

[0067] 일부 실시양태에서, 항원은 암 관련 항원, 계통 관련 항원, 병원성 항원 또는 자가면역 항원이다. 일부 실시양태에서, 항원은 바이러스 항원을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항원은 T 림프구 항원이다. 일부 실시양태에서, 항원은 세포외 항원이다. 일부 실시양태에서, 항원은 세포내 항원이다. 일부 실시양태에서, 항원은 타이미딘 키나제(TK1), 하이포잔틴-구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제(HPRT), 수용체 티로신 키나제 유사 오판(Orphan) 수용체 1(ROR1), 뮤신-1, 뮤신-16(MUC16), MUC1, 표피 성장 인자 수용체 vIII(EGFRvIII), 메소텔린, 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER2), EBNA-1, LEMD1, 포스파티딜 세린, 암배아 항원(CEA), B 세포 성숙 항원(BCMA), 글리피칸 3(GPC3), 여포 자극 호르몬 수용체, 섬유모세포 활성화 단백질(FAP), 에리쓰로포이에틴 생성 간세포암종 A2(EphA2), EphB2, 천연 킬러 군 2D(NKG2D) 리간드, 디시알로강글리오사이드(Disialoganglioside) 2(GD2), CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD19, CD20, CD22, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44v6, CD45, CD56CD79b, CD97, CD117, CD123, CD133, CD138, CD171, CD179a, CD213A2, CD248, CD276, PSCA, CS-1, CLECL1, GD3, PSMA, FLT3, TAG72, EPCAM, IL-1, 인테그린 수용체, PRSS21, VEGFR2, PDGFRβ, SSEA-4, EGFR, NCAM, 프로스타제(prostase), PAP, ELF2M, GM3, TEM7R, CLDN6, TSHR, GPRC5D, ALK, Dsg1, Dsg3, IGLL1 및 이들의 조합으로부터의 항원으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 항원은 CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CCR4, CD8, CD30, CD45 및 CD56으로 구성된 군으로부터 선택된 단백질의 항원이다. 일부 실시양태에서, 항원은 난소암 항원 또는 T 림프종 항원이다. 일부 실시양태에서, 항원은 인테그린 수용체의 항원이다. 일부 실시양태에서, 항원은 α1, α2, αIIb, α3, α4, α5, α6, α7, α8, α9, α10, α11, αD, αE, αL, αM, αV, αX, β1, β2, β3, β4, β5, β6, β7 및 β8로 구성된 군으로부터 선택된 인테그린 수용체 또는 인테그린의 항원이다. 일부 실시양태에서, 항원은 인테그린 수용체 리간드의 항원이다. 일부 실시양태에서, 항원은 피브로넥틴, 비트로넥틴, 콜라겐 또는 라미닌의 항원이다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 2종 이상의 상이한 항원들에 결합할 수 있다.

[0068] 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 자가항원 또는 이의 단편, 예컨대, Dsg1 또는 Dsg3을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 수용체 도메인 또는 항체 도메인을 포함하고, 이때 항체 도메인은 자가항원, 예컨대, Dsg1 또는 Dsg3에 결합한다.

[0069] 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인과 세포외 항원 결합 도메인은 링커를 통해 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인과 세포외 항원 결합 도메인은 링커, 예컨대, CD8α, IgG1 또는 IgG4의 힌지 영역을 통해 작동 가능하게 연결된다.

[0070] 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 다량체화 스카폴드를 포함한다.

[0071] 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 CD8 막횡단 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 CD28 막횡단 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 CD68 막횡단 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 CD2 막횡단 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 FcR 막횡단 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 FcRγ 막횡단 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 FcRα 막횡단 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 FcRβ 막횡단 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 FcRε 막횡단 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 막횡단

도메인은 신탁신(syntaxin), 예컨대, 신탁신 3 또는 신탁신 4 또는 신탁신 5로부터의 막횡단 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 CFP가 세포에서 발현될 때 내생성 수용체의 막횡단 도메인과 올리고머화한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 CFP가 세포에서 발현될 때 외생성 수용체의 막횡단 도메인과 올리고머화한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 CFP가 세포에서 발현될 때 내생성 수용체의 막횡단 도메인과 이량체화한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 CFP가 세포에서 발현될 때 외생성 수용체의 막횡단 도메인과 이량체화한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 세포내 신호전달 도메인이 유래한 단백질과 상이한 단백질로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 세포외 도메인이 유래한 단백질과 상이한 단백질로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 식세포 수용체의 막횡단 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인과 세포외 도메인은 동일한 단백질로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 세포내 신호전달 도메인과 동일한 단백질로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 DAP12 동원 도메인을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 DAP12와 올리고머화하는 막횡단 도메인을 포함한다.

[0072] 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 길이가 적어도 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 31개 또는 32개 아미노산이다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 길이가 최대 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 31개 또는 32개 아미노산이다.

[0073] 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 식세포 수용체로부터 유래한 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 Megf10, MerTk, FcRα 또는 Bai1로부터 선택된 식세포 수용체 이외의 식세포 수용체로부터 유래한 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 TNFR1, MDA5, CD40, 렉틴, 덱틴 1, CD206, 스캐빈저 수용체 A1(SRA1), MARCO, CD36, CD163, MSR1, SCARA3, COLEC12, SCARA5, SCARB1, SCARB2, CD68, OLR1, SCARF1, SCARF2, CXCL16, STAB1, STAB2, SRCRB4D, SSC5D, CD205, CD207, CD209, RAGE, CD14, CD64, F4/80, CCR2, CX3CR1, CSF1R, Tie2, HuCRIg(L), CD64, CD32a, CD16a, CD89, Fc-알파 수용체 I, CR1, CD35, CD3ζ, CR3, CR4, Tim-1, Tim-4 및 CD169로 구성된 군으로부터 선택된 식세포 수용체로부터 유래한 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 PI3K 동원 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 스캐빈저 수용체로부터 유래한 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 CD47 억제 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 Rac 억제 도메인, Cdc42 억제 도메인 또는 GTPase 억제 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, Rac 억제 도메인, Cdc42 억제 도메인 또는 GTPase 억제 도메인은 PFP를 발현하는 세포의 식세포 컵(phagocytic cup)에서 Rac, Cdc42 또는 GTPase를 억제한다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 F-액틴 해체 활성화 도메인, ARHGAP12 활성화 도메인, ARHGAP25 활성화 도메인 또는 SH3BP1 활성화 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 포스파타제 억제 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 ARP2/3 억제 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 적어도 하나의 ITAM 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개 이상의 ITAM 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 CD3 제타, CD3 엡실론, CD3 감마, CD3 델타, Fc 엡실론 수용체 1 쇄, Fc 엡실론 수용체 2 쇄, Fc 감마 수용체 1 쇄, Fc 감마 수용체 2a 쇄, Fc 감마 수용체 2b1 쇄, Fc 감마 수용체 2b2 쇄, Fc 감마 수용체 3a 쇄, Fc 감마 수용체 3b 쇄, Fc 베타 수용체 1 쇄, TYROBP(DAP12), CD5, CD16a, CD16b, CD22, CD23, CD32, CD64, CD79a, CD79b, CD89, CD278, CD66d, 이들의 기능적 단편, 및 이들에 대한 적어도 1개 내지 20개 이하의 변형을 가진 이들의 아미노산 서열의 ITAM 도메인으로부터 선택된 적어도 하나의 ITAM 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 ITAM 도메인은 Src 패밀리 키나제 인산화 부위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 ITAM 도메인은 Syk 동원 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 F-액틴 해중합 활성화 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 효소 활성을 결여한다.

[0074] 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 CD3 제타 세포내 도메인로부터 유래한 도메인을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 MerTK 세포내 도메인로부터 유래한 도메인을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 TLR4 세포내 도메인으로부터 유래한 도메인을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 CD47 억제 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 인테그린을 활성화시키는 도메인, 예컨대, PSGL-1의 세포내 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 Rap1 GTPase를 활성화시키는 도메인, 예컨대, EPAC 및 C3G로부터 유래한 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 팍실린(paxillin)으로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 국소(focal) 부착 키나제를 활성화시킨다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 단일 식세포 수용체로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 단일 스캐빈저 수용체로부터 유래한다.

일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 식세포작용 증강 도메인을 포함한다.

[0075] 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 염증유발 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 염증유발 신호전달 도메인은 키나제 활성화 도메인 또는 키나제 결합 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 염증유발 신호전달 도메인은 IL-1 신호전달 캐스케이드(cascade) 활성화 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 염증유발 신호전달 도메인은 TLR3, TLR4, TLR7, TLR9, TRIF, RIG-1, MYD88, MAL, IRAK1, MDA-5, IFN 수용체, STING, NLRP 패밀리 구성원, NLRP1-14, NOD1, NOD2, 피린(Pyrin), AIM2, NLRC4, FCGR3A, FCERIG, CD40, Tank1 결합 키나제(TBK), 캐스파제 도메인, 프로캐스파제 결합 도메인 또는 이들의 임의의 조합으로부터 유래한 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.

[0076] 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 콘넥신(connexin)(Cx) 단백질로부터 유래한 신호전달 도메인, 예컨대, 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 예를 들면, 세포내 도메인은 Cx43, Cx46, Cx37, Cx40, Cx33, Cx50, Cx59, Cx62, Cx32, Cx26, Cx31, Cx30.3, Cx31.1, Cx30, Cx25, Cx45, Cx47, Cx31.3, Cx36, Cx31.9, Cx39, Cx40.1 또는 Cx23으로부터 유래한 신호전달 도메인, 예컨대, 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 예를 들면, 세포내 도메인은 Cx43으로부터 유래한 신호전달 도메인, 예컨대, 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다.

[0077] 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 SIGLEC 단백질로부터 유래한 신호전달 도메인, 예컨대, 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 예를 들면, 세포내 도메인은 Siglec-1(시알로어드헤신(Sialoadhesin)), Siglec-2(CD22), Siglec-3(CD33), Siglec-4(MAG), Siglec-5, Siglec-6, Siglec-7, Siglec-8, Siglec-9, Siglec-10, Siglec-11, Siglec-12, Siglec-13, Siglec-14, Siglec-15, Siglec-16 또는 Siglec-17로부터 유래한 신호전달 도메인, 예컨대, 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다.

[0078] 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 C형 렉틴 단백질로부터 유래한 신호전달 도메인, 예컨대, 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 예를 들면, 세포내 도메인은 만노스 수용체 단백질로부터 유래한 신호전달 도메인, 예컨대, 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 예를 들면, 세포내 도메인은 아시알로당단백질 수용체 단백질로부터 유래한 신호전달 도메인, 예컨대, 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 예를 들면, 세포내 도메인은 대식세포 갈락토스 유형 렉틴(MGL), DC-SIGN(CLEC4L), 란게린(Langerin)(CLEC4K), 골수 DAP12 관련 렉틴(MDL)-1(CLEC5A), DC 관련 C형 렉틴 1(덱틴 1) 서브패밀리 단백질, 덱틴 1/CLEC7A, DNGR1/CLEC9A, 골수 C형 렉틴 유사 수용체(MICL)(CLEC12A), CLEC2(CLEC1B), CLEC12B, DC 면역수용체(DCIR) 서브패밀리 단백질, DCIR/CLEC4A, 덱틴 2/CLEC6A, 혈액 DC 항원 2(BDCA2)(CLEC4C), 민클(Mincle)(대식세포 유도성 C형 렉틴)(CLEC4E), NOD 유사 수용체 단백질, NOD 유사 수용체 MHC 클래스 II 트랜스활성화제(CIITA), IPAF, BIRC1, RIG-I 유사 수용체(RLR) 단백질, RIG-I, MDA5, LGP2, NAIP5/버클(Birc1e), NLRP 단백질, NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP4, NLRP5, NLRP6, NLRP7, NLRP89, NLRP9, NLRP10, NLRP11, NLRP12, NLRP13, NLRP14, NLR 단백질, NOD1 또는 NOD2, 또는 이들의 임의의 조합으로부터 유래한 신호전달 도메인, 예컨대, 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다.

[0079] 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 세포 부착 분자로부터 유래한 신호전달 도메인, 예컨대, 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 예를 들면, 세포내 도메인은 IgCAM, 캐드헤린(cadherin), 인테그린, C형의 렉틴 유사 도메인 단백질(CTLD) 및/또는 프로테오글리칸 분자로부터 유래한 신호전달 도메인, 예컨대, 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 예를 들면, 세포내 도메인은 E-캐드헤린, P-캐드헤린, N-캐드헤린, R-캐드헤린, B-캐드헤린, T-캐드헤린 또는 M-캐드헤린으로부터 유래한 신호전달 도메인, 예컨대, 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 예를 들면, 세포내 도메인은 셀렉틴(selectin), 예컨대, E-셀렉틴, L-셀렉틴 또는 P-셀렉틴으로부터 유래한 신호전달 도메인, 예컨대, 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다.

[0080] 일부 실시양태에서, CFP는 전체 길이 세포내 신호전달 도메인을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 길이가 적어도 5개, 10개, 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 150개, 200개, 300개, 300개, 400개 또는 500개 아미노산이다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 길이가 최대 10개, 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 150개, 200개, 300개, 300개, 400개 또는 500개 아미노산이다.

[0081] 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 FcRα 쇄 세포외 도메인, FcRα 쇄 막횡단 도메인 및/또는 FcRα 쇄 세포내 도메인을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 FcRβ 쇄 세포외 도메인, FcRβ 쇄 막횡단 도메인 및/또는 FcRβ 쇄 세포내 도메인을 코딩한다. 일부 실시양태에서, FcRα 쇄 또는 FcRβ 쇄는 세포에서 발현될 때 FcRγ와 복합체를 형성한다. 일부 실시양태에서, FcRα 쇄 또는 FcRβ 쇄는 세포에서 발현될 때 내생성 FcRγ와 복합체를 형성한다. 일부 실시양태에서, FcRα 쇄 또는 FcRβ 쇄는 FcRγ를 발현하지 않는 세포의 세포막 내로 혼입되지 않는다. 일부 실시양태에서, CFP는 FcRα 쇄 세포내 신호전달 도메인을 포함하지 않는다. 일부 실시양태

에서, CFP는 FcRβ 쇄 세포내 신호전달 도메인을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 TREM 세포외 도메인, TREM 막횡단 도메인 및/또는 TREM 세포내 도메인을 코딩한다. 일부 실시양태에서, TREM은 TREM1, TREM2 또는 TREM3이다.

[0082] 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 염증유발 폴리펩타이드를 코딩하는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 재조합 핵산에서 염증유발 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드, 예를 들면, ATP, ADP, UTP, UDP 및/또는 UDP-글루코스를 추가로 포함한다.

[0083] 일부 실시양태에서, 조성물은 염증유발 폴리펩타이드를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 염증유발 폴리펩타이드는 케모카인, 사이토카인이다. 일부 실시양태에서, 케모카인은 IL-1, IL3, IL5, IL-6, i18, IL-12, IL-13, IL-23, TNF, CCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11, IL-18, IL-23, IL-27, CSF, MCSF, GMCSF, IL17, IP-10, RANTES 및 인터페론으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 사이토카인은 IL-1, IL3, IL5, IL-6, IL-12, IL-13, IL-23, TNF, CCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11, IL-18, IL-23, IL-27, CSF, MCSF, GMCSF, IL17, IP-10, RANTES 및 인터페론으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0084] 일부 실시양태에서, 골수 세포는 전달을 위해 특이적으로 표적화된다. 골수 세포는 전문화된 생체분해성 중합체, 예컨대, PLGA(폴리(젖산-코-글리콜산)) 및/또는 폴리비닐 알코올(PVA)을 사용함으로써 표적화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 화합물은 골수 세포 기능에 영향을 미치기 위해 이러한 중합체 구조물 내로 선택적으로 혼입될 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적화 구조물은 예를 들면, 하나 이상의 PLGA 및 하나 이상의 PVA 층의 다층 구조물이다. 일부 실시양태에서, 표적화 구조물은 적층된 활성을 위해 순서대로 조립된다. 일부 실시양태에서, 표적화된 중합체 구조물은 예컨대, 특정 분극화를 부여하는 미세환경에서 골수 세포를 유지하기 위해 골수 세포 표면에 부착될 수 있고 하나 이상의 성분, 예컨대, 성장 인자 및 사이토카인을 전달할 수 있는 불안정한 구조물과 같은 특정 모양의 구성요소로 조직화된다. 일부 실시양태에서, 중합체 구조물은 이 구조물이 골수 세포에 의한 식세포작용을 통해 삼켜지지 않으나 표면 상에 부착된 상태로 남아있을 수 있게 한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 성장 인자는 M1 분극화 인자, 예컨대, 사이토카인일 수 있다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 성장 인자는 M2 분극화 인자, 예컨대, 사이토카인일 수 있다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 성장 인자는 대식세포 활성화 사이토카인, 예컨대, IFNɣ일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합체 구조물은 고형 종양과 같은 생체내 환경에서 하나 이상의 성장 인자를 지속적으로 방출할 수 있다.

[0085] 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 염증의 항상성 조절인자를 코딩하는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 염증의 항상성 조절인자는 mRNA의 비번역 영역(UTR) 내의 서열이다. 일부 실시양태에서, UTR 내의 서열은 RNA 결합 단백질에 결합하는 서열이다. 일부 실시양태에서, 번역은 RNA 결합 단백질이 비번역 영역(UTR) 내의 서열에 결합할 때 억제되거나 방해된다. 일부 실시양태에서, UTR 내의 서열은 컨센서스 서열인 WWWU(AUUUA)UUUW(서열번호 35)를 포함하고, 이때 W는 A 또는 U이다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 바이시스트론성 벡터에서 발현된다.

[0086] 일부 실시양태에서, 표적 세포는 포유동물 세포이다. 일부 실시양태에서, 표적 세포는 인간 세포이다. 일부 실시양태에서, 표적 세포는 병원체에 의해 감염된 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 세포는 암 세포이다. 일부 실시양태에서, 표적 세포는 림프구인 암 세포이다. 일부 실시양태에서, 표적 세포는 난소암 세포인 암 세포이다. 일부 실시양태에서, 표적 세포는 유방 세포인 암 세포이다. 일부 실시양태에서, 표적 세포는 췌장 세포인 암 세포이다. 일부 실시양태에서, 표적 세포는 교모세포종 세포인 암 세포이다.

[0087] 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 DNA이다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 RNA이다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 mRNA이다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 비변형된 mRNA이다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 변형된 mRNA이다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 circRNA이다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 tRNA이다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 microRNA이다.

[0088] 본원은 본원에 기재된 CFP를 코딩하는 재조합 핵산 서열을 포함하는 벡터도 제공한다. 일부 실시양태에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 벡터는 하나 이상의 폴리펩타이드를 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 벡터는 폴리시스트론성(polycistronic) 벡터이다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 핵산 서열 각각은 별개의 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시양태에서, 벡터는 하나 이상의 내부 리보좀 진입 부위(IRES)도 포함한다. 일부 실시양태에서, 벡터는 하나 이상의 폴리펩타이드를 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열을 플랭킹하는 5' UTR 및/또는 3' UTR을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 벡터는 하나 이상의 조절 영역도 포함한다.

[0089] 본원은 본원에 기재된 조성물의 재조합 핵산에 의해 코딩된 폴리펩타이드도 제공한다.

[0090] 본원은 본원에 기재된 조성물, 본원에 기재된 벡터 또는 본원에 기재된 폴리펩타이드를 포함하는 세포도 제공한다. 일부 실시양태에서, 세포는 식세포성 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 줄기 세포 유래 세포, 골수 세포, 대식세포, 수지상 세포, 림프구, 비만 세포, 단핵구, 호중구, 미세아교세포 또는 성상세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 자가 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 동종이계 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 M1 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 M2 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 M1 대식세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 M2 대식세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 M1 골수 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 M2 골수 세포이다.

[0091] 본원은 본원에 기재된 조성물, 예컨대, 본원에 기재된 재조합 핵산, 본원에 기재된 벡터, 본원에 기재된 폴리펩타이드 또는 본원에 기재된 세포; 및 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약학 조성물도 제공한다.

[0092] 일부 실시양태에서, 약학 조성물은 추가 치료제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 추가 치료제는 CD47 아고니스트, Rac를 억제하는 작용제, Cdc42를 억제하는 작용제, GTPase를 억제하는 작용제, F-액틴 해체를 촉진하는 작용제, PFP로의 PI3K 동원을 촉진하는 작용제, PI3K 활성을 촉진하는 작용제, 포스파티딜이노시톨 3,4,5-트리스포스페이트의 생성을 촉진하는 작용제, ARHGAP12 활성을 촉진하는 작용제, ARHGAP25 활성을 촉진하는 작용제, SH3BP1 활성을 촉진하는 작용제 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 약학적으로 허용 가능한 부형제는 무혈청 배지, 지질 또는 나노입자를 포함한다.

[0093] 본원은 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 질환을 치료하는 방법으로서, 본원에 기재된 약학 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법도 제공한다. 일부 실시양태에서, 질환은 암이다. 일부 실시양태에서, 암은 고형 암이다. 일부 실시양태에서, 고형 암은 난소암, 신장암, 유방암, 전립선암, 간암, 뇌암, 림프종, 백혈병, 피부암, 췌장암, 대장암, 폐암으로 구성된 군으로부터 선택되고, 적합한 암은 난소암을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 액형 암이다. 일부 실시양태에서, 액형 암은 백혈병 또는 림프종이다. 일부 실시양태에서, 액형 암은 T 세포 림프종이다. 일부 실시양태에서, 질환은 T 세포 악성종양이다.

[0094] 일부 실시양태에서, 방법은 추가 치료제를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 추가 치료제는 CD47 아고니스트, Rac를 억제하는 작용제, Cdc42를 억제하는 작용제, GTPase를 억제하는 작용제, F-액틴 해체를 촉진하는 작용제, PFP로의 PI3K 동원을 촉진하는 작용제, PI3K 활성을 촉진하는 작용제, 포스파티딜이노시톨 3,4,5-트리스포스페이트의 생성을 촉진하는 작용제, ARHGAP12 활성을 촉진하는 작용제, ARHGAP25 활성을 촉진하는 작용제, SH3BP1 활성을 촉진하는 작용제 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0095] 일부 실시양태에서, 투여는 주입 또는 주사를 포함한다. 일부 실시양태에서, 투여는 고형 암에 직접적으로 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 투여는 circRNA 기반 전달 절차, 비입자 캡슐화된 mRNA 기반 전달 절차, mRNA 기반 전달 절차, 바이러스 기반 전달 절차, 입자 기반 전달 절차, 리포좀 기반 전달 절차 또는 엑소좀 기반 전달 절차를 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체에서 CD4+ T 세포 반응 또는 CD8+ T 세포 반응이 유발된다.

[0096] 본원은 세포를 제조하는 방법으로서, 세포를 본원에 기재된 조성물, 본원에 기재된 벡터 또는 본원에 기재된 폴리펩타이드와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법도 제공한다. 일부 실시양태에서, 접촉은 형질도입을 포함한다. 일부 실시양태에서, 접촉은 화학적 형질감염, 전기천공, 뉴클레오펙션, 또는 바이러스 감염 또는 형질도입을 포함한다.

[0097] 본원은 약학 조성물을 제조하는 방법으로서, 지질을 본원에 기재된 조성물 또는 본원에 기재된 벡터와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법도 제공한다. 일부 실시양태에서, 접촉은 지질 나노입자를 형성하는 단계를 포함한다.

[0098] 본원은 약학 조성물을 제조하는 방법으로서, 항체를 본원에 기재된 조성물 또는 본원에 기재된 벡터와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법도 제공한다. 일부 실시양태에서, 접촉은 지질 나노입자를 형성하는 단계를 포함한다.

[0099] **정의**

[0100] "작용제"는 임의의 세포, 소분자 화합물, 항체 또는 이의 단편, 핵산 분자, 또는 폴리펩타이드를 지칭할 수 있다.

[0101] "변경" 또는 "변화"는 증가 또는 감소를 지칭할 수 있다. 예를 들면, 변경은 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 또는 심지어 70%, 75%, 80%, 90% 또는 100%만큼 많은 증가 또는 감소일 수 있다. 예를 들

면, 변경은 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 10배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 또는 심지어 70배, 75배, 80배, 90배 또는 100배만큼 많은 증가 또는 감소일 수 있다.

[0102] 본원에서 사용된 "항원 제시 세포" 또는 "APC"는 전문적인 항원 제시 세포(예를 들면, B 림프구, 대식세포, 단핵구, 수지상 세포, 랑게르한스 세포)뿐만 아니라, 다른 항원 제시 세포(예를 들면, 각질세포, 내피 세포, 성상세포, 섬유모세포, 희소돌기아교세포, 흉선 상피 세포, 갑상선 상피 세포, 아교 세포(뇌), 췌장 베타 세포, 및 혈관 내피 세포)도 포함한다. APC는 주조직적합성 복합체(MHC) 분자를 발현할 수 있고 그의 표면 상에 MHC와 복합체를 형성한 항원을 표시할 수 있고, 이 항원은 T 세포에 의해 인식될 수 있고 T 세포 활성화 및 면역 반응을 유발할 수 있다. 전문적인 항원 제시 세포, 특히 수지상 세포는 미감작 T 세포를 자극하는 데 있어서 핵심 역할을 한다. 비전문적인 항원 제시 세포, 예컨대, 섬유모세포도 이 과정에 기여할 수 있다. APC는 외생성 항원을 프로세싱하고 클래스 I MHC 분자 상의 프로세싱된 항원을 제시함으로써 펩타이드 항원을 교차 제시할 수도 있다. 클래스 I MHC 분자와 함께 인식되는 단백질을 생성하는 항원은 일반적으로 세포 내부에서 생성된 단백질이고, 이 항원은 프로세싱되고 클래스 I MHC 분자와 회합한다.

[0103] "생물학적 샘플"은 유기체로부터 유래한 임의의 조직, 세포, 유체 또는 다른 물질을 지칭할 수 있다.

[0104] 용어 "에피토프"는 항체 또는 이의 결합 단편, T 세포 수용체 및/또는 항체 유사 분자에 결합할 수 있는 임의의 단백질 결정인자, 예컨대, 서열 또는 구조 또는 아미노산 잔기를 지칭할 수 있다. 에피토프성 결정인자는 전형적으로 분자의 화학적 활성 표면 기, 예컨대, 아미노산 또는 당 측쇄로 구성되고, 일반적으로 특정 3차원 구조적 특성뿐만 아니라 특정 전하 특성도 가진다. "T 세포 에피토프"는 T 세포 수용체에 의해 인식되는 펩타이드 또는 펩타이드-MHC 복합체를 지칭할 수 있다.

[0105] 조작된 세포, 예컨대, 조작된 골수 세포는 일시적으로 발현될지라도 세포 내에 적어도 하나의 외생성 핵산 서열을 가진 세포를 지칭할 수 있다. 외생성 핵산의 발현은 다른 곳에 기재된 다양한 방법들에 의해 수행될 수 있고, 당분야에서 공지된 방법들을 포괄한다. 본 개시는 조작된 세포, 예를 들면, 조작된 골수 세포, 예컨대, 조작된 식세포성 세포의 제조 및 사용에 관한 것이다. 본 개시는 특히, 예를 들면, 키메라 융합 단백질(CFP)을 코딩하는 외생성 핵산을 포함하는 조작된 세포에 관한 것이다.

[0106] 용어 "면역 반응"은 T 세포 매개 면역 반응, NK 세포 매개 면역 반응 및/또는 B 세포 매개 면역 반응을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 이 반응들은 T 세포 보조자극 및 NK 세포 보조자극의 조절에 의해 영향을 받을 수 있다. 예시적인 면역 반응은 T 세포 반응, 예를 들면, 사이토카인 생성 및 세포성 세포독성을 포함한다. 추가로, 면역 반응은 NK 세포 활성화, B 세포 활성화 및/또는 T 세포 활성화, 예를 들면, 항체 생성(체액성 반응) 및 사이토카인 반응성 세포, 예를 들면, 대식세포의 활성화에 의해 간접적으로 영향을 받는 면역 반응을 포함한다. 면역 반응은 후천성 면역 반응을 포함한다. 후천성 면역 시스템은 외래 분자 구조물, 예컨대, 침입 유기체의 항원에 반응할 수 있다. 선천성 면역 시스템과 달리, 후천성 면역 반응은 병원체에 매우 특이적이다. 후천성 면역은 오래 지속되는 보호도 제공할 수 있다. 후천성 면역 반응은 체액성 면역 반응 및 세포 매개 면역 반응을 포함한다. 체액성 면역 반응에서, B 세포에 의해 체액 내로 분비된 항체는 병원 유래 항원에 결합하여, 다양한 기작들, 예를 들면, 보체 매개 용해를 통해 병원체의 제거를 이끌어낸다. 세포 매개 면역 반응에서, 다른 세포를 파괴할 수 있는 T 세포가 활성화된다. 예를 들면, 질환과 관련된 단백질이 세포에 존재하는 경우, 이 단백질은 세포 내에서 단백질용해에 의해 펩타이드로 단편화될 수 있다. 그 후, 특정 세포 단백질은 그 자신을 이 방식으로 형성된 항원 또는 펩타이드에 부착시킬 수 있고, 이들을 세포의 표면으로 수송할 수 있고, 이 표면에서 이들은 분자 방어 기작, 예컨대, T 세포에게 제시될 수 있다. 세포독성 T 세포는 이 항원을 인식할 수 있고 이 항원을 가진 세포를 사멸시킬 수 있다.

[0107] "리간드"는 수용체와 같은 또 다른 분자와 결합할 수 있거나 복합체를 형성할 수 있는 분자를 지칭할 수 있다. 리간드는 단백질, 당단백질, 탄수화물, 지단백질, 호르몬, 지방산, 인지질, 또는 수용체에 결합하는 임의의 성분을 포함할 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 수용체는 특정 리간드를 가진다. 일부 실시양태에서, 수용체는 리간드에의 복잡한 결합을 가질 수 있고, 이 경우 수용체는 구조적 구성, 전하 분포 또는 임의의 다른 물리화학적 특성에서 적어도 유사성을 공유하는 여러 리간드들에 결합할 수 있다. 리간드는 생체분자일 수 있다. 리간드는 비생물적 물질일 수 있다. 예를 들면, 리간드는 스캐빈저 수용체 MARCO에 대한 리간드인 음으로 하전된 입자일 수 있다. 예를 들면, 리간드는 스캐빈저 수용체 SRA1에 대한 리간드인 TiO_2일 수 있다.

[0108] 용어 "주조직적합성 복합체(MHC)", "MHC 분자" 또는 "MHC 단백질"은 항원성 펩타이드에 결합할 수 있고 항원성 펩타이드를 T 림프구에 제시할 수 있는 단백질을 지칭한다. 이러한 항원성 펩타이드는 T 세포 에피토프를 대표

할 수 있다. 인간 MHC는 HLA 복합체로서도 지칭된다. 따라서, 용어 "인간 백혈구 항원(HLA)", "HLA 분자" 또는 "HLA 단백질"은 용어 "주조직적합성 복합체(MHC)", "MHC 분자" 및 "MHC 단백질"과 교환 가능하게 사용된다. HLA 단백질은 HLA 클래스 I 또는 HLA 클래스 II로서 분류될 수 있다. 상기 2종의 HLA 클래스의 단백질들의 구조는 매우 유사하나; 이들은 매우 상이한 기능을 가진다. 클래스 I HLA 단백질은 대다수의 종양 세포들을 포함하는 신체의 거의 모든 세포들의 표면 상에 존재한다. 클래스 I HLA 단백질은 통상적으로 내생성 단백질 또는 세포 내부에 존재하는 병원체로부터 유래한 항원으로 로딩된 후, 미감작 또는 세포독성 T 림프구(CTL)에 제시된다. HLA 클래스 II 단백질은 수지상 세포, B 세포 및 대식세포를 포함하나 이들로 제한되지 않는 항원 제시 세포(APC) 상에 존재한다. 이들은 주로 외부 항원 공급원, 예를 들면, 세포의 외부로부터 프로세싱된 펩타이드를 헬퍼 T 세포에게 제시한다.

[0109] HLA 클래스 II 시스템에서, B 세포는 엔도좀(endosome) 내로의 더 일반적인 엔도사이토시스(endocytosis)를 나타내지만, 대식세포 및 미성숙 수지상 세포와 같은 식세포는 식세포작용을 통해 물질을 파고좀(phagosome) 내로 흡수할 수 있고, 상기 파고좀은 라이소좀과 융합되고, 라이소좀의 산성 효소는 흡수된 단백질을 많은 상이한 펩타이드들로 절단한다. 자가포식은 HLA 클래스 II 펩타이드의 또 다른 공급원이다. 가장 많이 연구된 서브클래스 II HLA 유전자는 HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRA 및 HLA-DRB1이다.

[0110] HLA 클래스 II 분자에 의한 CD4+ 헬퍼 T 세포에의 펩타이드의 제시는 외래 항원에 대한 면역 반응을 유발할 수 있다. CD4+ T 세포는 일단 활성화되면 B 세포 분화 및 항체 생성뿐만 아니라, CD8+ T 세포(CTL) 반응도 촉진할 수 있다. CD4+ T 세포는 다른 면역 세포의 분화를 활성화시키고 유도하는 사이토카인 및 케모카인도 분비할 수 있다. HLA 클래스 II 분자는 전형적으로 클래스 I 펩타이드 결합 홈(groove)보다 더 개방된 펩타이드 결합 홈을 형성하기 위해 상호작용하는 α 쇄와 β 쇄의 이종이량체이다.

[0111] HLA 대립유전자는 전형적으로 공우성 방식으로 발현된다. 예를 들면, 각각의 사람은 3개의 클래스 I 유전자들(HLA-A, HLA-B 및 HLA-C) 각각의 2개의 대립유전자를 보유하므로, 6개의 상이한 유형의 클래스 II HLA를 발현할 수 있다. 클래스 II HLA 좌위에서, 각각의 사람은 한 쌍의 HLA-DP 유전자(α 쇄 및 β 쇄를 코딩하는 DPA1 및 DPB1), HLA-DQ(α 쇄 및 β 쇄에 대한 DQA1 및 DQB1), 하나의 유전자 HLA-DRα(DRA1) 및 하나 이상의 유전자 HLA-DRβ(DRB1 및 DRB3, DRB4 또는 DRB5)를 유전한다. 예를 들면, HLA-DRB1은 거의 400개 초과의 공지된 대립유전자를 가진다. 이것은 하나의 이형접합 개체가 6개 또는 8개의 기능적 클래스 II HLA 대립유전자들을 유전할 수 있음을 의미한다: 각각의 부모로부터 3개 이상. 따라서, HLA 유전자는 고도의 다형성을 갖고; 많은 상이한 대립유전자들이 한 집단 내부의 상이한 개체들에 존재한다. HLA 단백질을 코딩하는 유전자는 많은 가능한 변이를 가짐으로써, 각각의 사람의 면역 시스템이 광범위한 외부 침입자들에 반응할 수 있게 한다. 일부 HLA 유전자들은 수백 개의 확인된 버전들(대립유전자들)을 갖고, 이들 각각은 특정 번호를 제공받는다. 일부 실시양태에서, 클래스 I HLA 대립유전자는 HLA-A*02:01, HLA-B*14:02, HLA-A*23:01, HLA-E*01:01(비고전적)이다. 일부 실시양태에서, 클래스 II HLA 대립유전자는 HLA-DRB*01:01, HLA-DRB*01:02, HLA-DRB*11:01, HLA-DRB*15:01 및 HLA-DRB*07:01이다.

[0112] "골수 세포"는 넓게는 조혈 세포 시스템의 골수 계통의 세포를 지칭할 수 있고, 예를 들면, 림프구 계통을 배제할 수 있다. 예를 들면, 골수 세포는 과립구 계통 및 단핵구 계통의 세포를 포함한다. 골수 세포는 골수 내의 조혈 줄기 세포로부터 유래한 공통된 조상세포로부터 분화된다. 골수 세포 계통에의 위탁은 상이한 전사 인자의 활성화에 의해 좌우될 수 있고, 따라서 골수 세포는 세포외 자극 및 세포내 자극을 기반으로 말단 세포 유형으로 더 분화하는 능력으로서 기재될 수 있는 분화유연성 수준을 가진 세포로서 특징져질 수 있다. 골수 세포는 그의 표면 상의 다양한 케모카인 수용체들을 통해 국소 조직 내로 신속히 동원될 수 있다. 골수 세포는 다양한 사이토카인들 및 케모카인들에 반응한다.

[0113] 예를 들면, 골수 세포는 하나 이상의 사이토카인 및 케모카인, 예컨대, G-CSF, GM-CSF, Flt3L, CCL2, VEGF 및 S100A8/9의 영향 하에서 골수에서 조혈 줄기 세포로부터 유래한 세포일 수 있다. 일부 실시양태에서, 골수 세포는 전구체 세포이다. 일부 실시양태에서, 골수 세포는 공통된 골수 조상세포 또는 과립구 조상세포, 골수모세포 또는 단핵구-수지상 세포 조상세포, 또는 이들의 조합의 특성을 가진 세포일 수 있다. 골수는 과립구 또는 단핵구, 또는 이들의 전구체 세포를 포함할 수 있다. 골수는 미성숙 과립구, 미성숙 단핵구, 미성숙 대식세포, 미성숙 호중구 및 미성숙 수지상 세포를 포함할 수 있다. 골수는 단핵구 또는 전구단핵구 세포 또는 단핵구 전구체를 포함할 수 있다. 일부 경우, 본원에서 사용된 골수 세포는 M0 표현형, M1 표현형 또는 M2 표현형을 가진 단핵구를 지칭할 수 있다. 골수는 수지상 세포(DC), 성숙 DC, 단핵구 유래 DC, 형질세포양 DC, 전구수지상 세포, 또는 DC의 전구체를 포함할 수 있다. 골수는 성숙 호중구, 호중구 전구체 또는 다형핵구(PMN)일 수 있는 호중구를 포함할 수 있다. 골수는 대식세포, 단핵구 유래 대식세포, 조직 대식세포, M0, M1 또는 M2 표현형의 대식세

포를 포함할 수 있다. 골수는 종양 침윤 단핵구(TIM)를 포함할 수 있다. 골수는 종양 관련 단핵구(TAM)를 포함할 수 있다. 골수는 골수 유래 억제제 세포(MDSC)를 포함할 수 있다. 골수는 조직 체류 대식세포를 포함할 수 있다. 골수는 종양 관련 DC(TADC)를 포함할 수 있다. 따라서, 골수 세포는 하나 이상의 세포 표면 마커, 예를 들면, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD38, CCR5, CD66, Lox-1, CD11c, CD64, CD68, CD163, CCR2, CCR5, HLA-DR, CD1c, CD83, CD141, CD209, MHC-II, CD123, CD303, CD304, SIGLEC 패밀리 단백질 및 CLEC 패밀리 단백질을 발현할 수 있다. 일부 경우, 골수 세포는 하나 이상의 세포 표면 마커, 예를 들면, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD66, Lox-1, CD11c, CD64, CD68, CD163, CCR2, CCR5, HLA-DR, CD1c, CD83, CD141, CD209, MHC-II, CD123, CD303, CD304 또는 이들의 조합의 높은 또는 낮은 발현을 특징으로 할 수 있다.

[0114] "식세포작용"은 "삼킴"과 교환 가능하게 사용되고, 세포가 입자, 예컨대, 암 세포 또는 감염된 세포를 삼키는 과정을 지칭할 수 있다. 이 과정은 입자를 함유하는 내부 구획(파고좀)을 생성할 수 있다. 이 과정은 신체로부터 입자, 예컨대, 암 세포 또는 감염된 세포를 소화하고/하거나 제거하는 데 이용될 수 있다. 식세포 수용체는 식세포작용의 과정에 관여할 수 있다. 식세포작용의 과정은 면역 반응 및 항원 제시와 밀접히 커플링될 수 있다. 외생성 항원의 프로세싱은 일부 유형의 엔도사이토시스 사건에 의한 전문적인 항원 제시 세포 내로의 흡수 후에 일어난다. 식세포작용은 항원 제시도 용이하게 할 수 있다. 예를 들면, 암 항원을 포함하는, 식세포작용을 통해 삼켜진 세포 또는 병원체로부터의 항원은 프로세싱되고 APC의 세포 표면 상에 제시될 수 있다.

[0115] "폴리펩타이드"는 펩타이드 결합을 통해 함께 연결된 아미노산을 함유하는 분자, 예컨대, 당단백질, 지단백질, 세포 단백질 또는 막 단백질을 지칭할 수 있다. 폴리펩타이드는 단백질의 하나 이상의 서브유닛을 포함할 수 있다. 폴리펩타이드는 재조합 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리펩타이드는 단일 아미노산 쇄 내에 스페이서, 링커 또는 펩타이드 절단 서열에 의해 분리될 수 있는 하나 초과의 펩타이드 서열을 포함할 수 있다. 폴리펩타이드는 융합된 폴리펩타이드일 수 있다. 폴리펩타이드는 하나 이상의 도메인, 모듈 또는 모이어티를 포함할 수 있다.

[0116] "수용체"는 신호를 전달도입하는 폴리펩타이드, 예컨대, 세포외 신호를 세포에 전달도입하는 폴리펩타이드로 구성된 화학적 구조물을 지칭할 수 있다. 수용체는 세포, 세포 형성 또는 유기체에서 정보를 전달하는 역할을 할 수 있다. 수용체는 적어도 하나의 수용체 유닛을 포함하고 2개 이상의 수용체 유닛을 함유할 수 있고, 이때 각각의 수용체 유닛은 단백질 분자, 예를 들면, 당단백질 분자를 포함한다. 수용체는 리간드에 결합하고 리간드와 복합체를 형성할 수 있는 구조물을 함유할 수 있다. 신호전달 정보는 세포 표면 상의 리간드와 결합한 후 수용체의 입체구조적 변화에 의해 전달될 수 있다.

[0117] 용어 "항체"는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4, IgA(IgA1 및 IgA2를 포함함), IgD, IgE, IgM 및 IgY를 포함하나 이들로 제한되지 않는, 일반적으로 면역글로불린으로서 공지되어 있는 한 부류의 단백질들을 지칭한다. 용어 "항체"는 전체 길이 항체, 단일 쇄 항체, 단일 도메인 항체(sdAb) 및 이들의 항원 결합 단편을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 항원 결합 항체 단편은 Fab, Fab' 및 F(ab')2, Fd(V_H 및 C_H1로 구성됨), 단일 쇄 가변 단편(scFv), 단일 쇄 항체, 디설파이드에 의해 연결된 가변 단편(dsFv), 및 V_L 및/또는 V_H 도메인을 포함하는 단편을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 항체는 임의의 동물로부터 유래할 수 있다. 단일 쇄 항체를 비롯한 항원 결합 항체 단편은 단독으로, 또는 힌지 영역, CH1 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인 중 하나 이상과 함께 가변 영역(들)을 포함할 수 있다. 가변 영역(들)과 힌지 영역, CH1, CH2 및 CH3 도메인의 임의의 조합도 포함된다. 항체는 예를 들면, HLA와 회합된 폴리펩타이드 또는 HLA-펩타이드 복합체에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체, 다중클론 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체, 및 인간 단일클론 및 다중클론 항체일 수 있다.

[0118] 용어 "재조합 핵산"은 재조합 수단에 의해 제조되거나, 발현되거나, 생성되거나 단리된 핵산을 지칭한다. 재조합 핵산은 천연 생성 뉴클레오타이드 서열이 아닌 뉴클레오타이드 서열을 함유할 수 있다. 재조합 핵산은 실험실에서 합성될 수 있다. 재조합 핵산은 재조합 DNA 기술, 예를 들면, DNA의 효소 변형, 예컨대, 효소 제한 분해, 라이게이션 및 DNA 클로닝을 이용함으로써 제조될 수 있다. 재조합 핵산은 DNA, RNA, 이들의 유사체, 또는 이들의 조합일 수 있다. 재조합 DNA는 예컨대, 메신저 RNA(mRNA)를 생성하기 위해 생체외에서 또는 시험관내에서 전사될 수 있다. 재조합 mRNA를 단리하고 정제하고 사용하여 세포를 형질감염시킬 수 있다. 재조합 핵산은 단백질 또는 폴리펩타이드를 코딩할 수 있다.

[0119] 핵산을 세포 내로 도입하거나 혼입하는 과정은 형질전환, 형질감염 또는 형질도입을 통한 과정일 수 있다. 형질전환은 세균 세포에 의한 외래 핵산의 흡수 과정이다. 이 과정은 플라스미드 DNA의 증식, 단백질 생성 및 다른 적용에 적합하다. 형질전환은 재조합 플라스미드 DNA를, 환경으로부터 세포외 DNA를 흡수하는 적격 세균 세포 내로 도입한다. 일부 세균 종들은 특정 환경 조건 하에서 천연적으로 적격하지만, 적격성은 실험실 환경에서 인

위적으로 유도된다. 형질감염은 DNA, RNA 또는 항체와 같은 소분자를 진핵 세포 내로 도입하는 것이다. 형질감염은 박테리오파지를 세균 세포 내로 도입하는 것을 지칭할 수도 있다. '형질도입'은 주로 재조합 바이러스 벡터 입자를 표적 세포 내로 도입하는 것을 기술하는 데 사용되는 반면, '감염'은 야생형 바이러스에 의한 인간 또는 동물의 천연 감염을 지칭한다.

[0120] 용어 "벡터"는 숙주 세포에서 자율적으로 복제할 수 있고 핵산 분자를 클로닝할 수 있게 하는 핵산 분자를 지칭할 수 있다. 당분야에서 숙련된 자에게 공지되어 있는 바와 같이, 벡터는 플라스미드, 코스미드, 파지미드, 바이러스 벡터, 파지 벡터, 효모 벡터, 포유동물 벡터 등을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 예를 들면, 외생성 유전자 형질전환을 위한 벡터는 플라스미드일 수 있다. 특정 실시양태에서, 벡터는 복제 기점, 및 숙주 세포에서의 핵산 서열의 복제 및/또는 유지에 필요한 다른 요소를 함유하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 벡터 또는 플라스미드는 발현 벡터이다. 발현 벡터는 이 벡터에 작동 가능하게 연결되어 있는 유전자 및/또는 핵산 서열의 발현을 유도할 수 있다. 일부 실시양태에서, 발현 벡터 또는 플라스미드는 원형 이중 가닥 DNA 분자의 형태로 존재한다. 벡터 또는 플라스미드는 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있거나 통합되지 않을 수 있다. 일부 실시양태에서, 플라스미드의 핵산 서열은 도입 후 숙주 세포의 게놈 또는 염색체 내로 통합되지 않는다. 예를 들면, 플라스미드는 숙주 세포에서 핵산 서열, 예를 들면, 플라스미드가 보유하는 유전자 또는 오픈 리딩 프레임의 일시적인 발현 또는 안정한 발현을 위한 요소를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 벡터는 일시적인 발현 벡터이다. 일부 실시양태에서, 벡터는 숙주 세포에서 자율적으로 복제하는, 안정적으로 발현된 벡터이다. 일부 실시양태에서, 플라스미드의 핵산 서열은 숙주 세포 내로 도입될 때 숙주 세포의 게놈 또는 염색체 내로 통합된다. 본원에 개시된 방법에서 사용될 수 있는 발현 벡터는 플라스미드, 에피좀, 세균 인공 염색체, 효모 인공 염색체, 박테리오파지 또는 바이러스 벡터를 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 벡터는 DNA 또는 RNA 벡터일 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 벡터는 (예를 들면, 역전사를 통해) 숙주 세포 내로 도입될 때 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있는 RNA 벡터, 예를 들면, 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터이다. 동등한 기능을 제공하는, 당분야에서 숙련된 자에 의해 공지되어 있는 다른 형태의 발현 벡터, 예를 들면, 자가 복제 염색체외 벡터 또는 숙주 게놈 내로 통합될 수 있는 벡터도 사용될 수 있다. 예시적인 벡터는 벡터 자신에 연결되어 있는 핵산을 자율적으로 복제할 수 있고/있거나 발현할 수 있는 벡터이다.

[0121] 융합 단백질과 관련하여 사용된 용어 "스페이서" 또는 "링커"는 융합 단백질의 2개의 다른 펩타이드 서열들을 연결하는 펩타이드 서열을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 링커 또는 스페이서는 단백질 또는 RNA 서열들 사이의 약간의 최소 거리 또는 다른 공간적 관계를 연결하거나 보존하는 것 이외의 특정 생물학적 활성을 갖지 않는다. 일부 실시양태에서, 스페이서의 성분 아미노산은 분자의 일부 성질, 예컨대, 분자의 접힘, 유연성, 순전하 또는 소수성에 영향을 미치도록 선택될 수 있다. 본 개시의 실시양태에서 사용되기에 적합한 링커는 당분야에서 숙련된 자에게 잘 공지되어 있고, 직쇄 또는 분지쇄 탄소 링커, 헤테로환형 탄소 링커 또는 펩타이드 링커를 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 링커는 각각의 항원성 펩타이드가 적절히 접히도록 보장하기에 충분한 거리에 의해 2개 이상의 폴리펩타이드들, 예를 들면, 2개의 항원성 펩타이드들을 분리하는 데 사용된다. 예시적인 펩타이드 링커 서열은 유연한 확장된 입체구조를 채택하고 정돈된 이차 구조를 발생시키는 경향을 나타내지 않는다. 유연성 링커 단백질 영역의 아미노산은 Gly, Asn 및 Ser, 또는 Gly, Asn 및 Ser을 함유하는 아미노산 서열의 임의의 순열을 포함할 수 있다. 다른 거의 중성 아미노산, 예컨대, Thr 및 Ala도 링커 서열에 사용될 수 있다.

[0122] 용어 "치료한다", "치료된", "치료하는", "치료" 등은 장애 및/또는 이와 관련된 증상(예를 들면, 신생물 또는 종양 또는 감염원 또는 자가면역 질환)을 감소시키거나, 예방하거나 호전시키는 것을 지칭하기 위한 것이다. "치료"는 질환(예를 들면, 암 또는 감염원에 의한 감염 또는 자가면역 질환)의 발병 또는 의심된 발병 후 요법을 대상체에게 투여하는 것을 지칭할 수 있다. "치료"는 질환과 관련된 임의의 증상 또는 다른 좋지 않은 효과 및/또는 요법과 관련된 부작용의 발생 또는 재발의 빈도, 또는 중증도를 경감시키는 것을 지칭할 수 있는 "호전"의 개념을 포함한다. 용어 "치료"는 환자의 질환 또는 장애의 중증도를 감소시키는 것, 예를 들면, 질환을 가진 환자의 수명을 연장시키거나 생존 가능성을 높이는 것, 또는 그의 재발을 지연시키는 것, 예를 들면, 질환을 앓고 있는 환자의 관해 기간을 늘리는 것을 지칭하는 "관리"의 개념도 포괄한다. 배제되지는 않지만, 장애 또는 병태의 치료는 장애, 병태 또는 이와 관련된 증상이 완전히 제거될 것을 요구하지 않는다는 것이 인식된다. 본원에서 사용된 용어 "예방한다", "예방하는", "예방" 및 이들의 문법적으로 동등한 용어는 작용제 또는 화합물의 투여가 시작될 때 질환 또는 병태와 관련된 증상을 발생시키지 않은 대상체에서 이러한 증상의 발병을 피하거나 지연시키는 것을 의미할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 대상체 또는 환자의 치료는 치료 조성물, 예컨대, 약물, 대사물질, 예방 성분, 또는 약물, 대사물질 또는 예방 성분을 코딩하거나 다른 방식으로 형성하

는 핵산, 펩타이드 또는 단백질을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료는 세포 또는 세포 집단을, 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료는 본원에 기재된 하나 이상의 조작된 세포, 예를 들면, 하나 이상의 조작된 골수 세포, 예컨대, 식세포성 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 치료는 병리학적 질환, 병태 또는 증후군, 또는 잠복 질환, 병태 또는 증후군일 수 있는 질환, 병태 또는 증후군의 치료를 포함한다. 일부 경우, 본원에서 사용된 바와 같이, 치료는 치료 백신을 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 조작된 식세포성 세포는 환자 또는 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 인간 대상체에게 투여된 세포는 면역원성을 감소시킨다. 예를 들면, 조작된 식세포성 세포는 이식편 대 숙주 질환(GVHD) 또는 동족 살해 효과를 유발하지 않을 수 있거나 감소시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 인간 대상체에게 투여된 조작된 세포는 대상체에게 면역적합하다(즉, 대상체에서 천연적으로 발현된 일치하는 HLA 서브타입을 가짐). 대상체 특이적 HLA 대립유전자 또는 대상체의 HLA 유전형은 당분야에서 공지되어 있는 임의의 방법에 의해 확인될 수 있다. 예시적인 실시양태에서, 상기 방법은 서열분석 데이터 세트로부터 추출된 리드(read)와, 다형성 유전자의 대립유전자 변이체를 포함하는 유전자 기준 세트의 정렬을 생성하는 단계, 상기 정렬에서 각각의 대립유전자 변이체에 대한 제1 사후 확률 또는 사후 확률 유도 점수를 결정하는 단계, 제1 대립유전자 변이체로서 최대 제1 사후 확률 또는 사후 확률 유도 점수를 가진 대립유전자 변이체를 확인하는 단계, 제1 대립유전자 변이체 및 하나 이상의 다른 대립유전자 변이체와 정렬된 하나 이상의 중첩 리드를 확인하는 단계, 가중 계수를 이용하여 하나 이상의 다른 대립유전자 변이체에 대한 제2 사후 확률 또는 사후 확률 유도 점수를 결정하는 단계, 최대 제2 사후 확률 또는 사후 확률 유도 점수를 가진 대립유전자 변이체를 선택함으로써 제2 대립유전자 변이체를 확인하는 단계, 및 제1 대립유전자 변이체 및 제2 대립유전자 변이체의 결과물(output)을 제공하는 단계를 포함할 수 있는 다형성 유전자 유형의 확인을 포함하고, 이때 제1 대립유전자 변이체 및 제2 대립유전자 변이체는 다형성 유전자에 대한 유전자 유형을 규정한다.

[0123] "단편"은 단백질 또는 핵산의 일부를 지칭할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단편은 기준 단백질 또는 핵산의 생물학적 활성의 적어도 50%, 75%, 80%, 90%, 95% 또는 심지어 99%를 보유한다.

[0124] 용어 "단리된", "정제된", "생물학적으로 순수한" 및 이들의 문법적으로 동등한 용어는 물질이 그의 천연 상태에서 발견될 때 그 물질이 정상적으로 동반하는 성분을 다양한 정도로 함유하지 않는 물질을 지칭한다. "단리한다"는 원래의 공급원 또는 주변으로부터의 분리 정도를 의미한다. "정제한다"는 단리보다 더 높은 분리 정도를 의미한다. "정제된" 또는 "생물학적으로 순수한" 단백질은 임의의 불순물이 단백질의 생물학적 성질에 실질적으로 영향을 미치지 않거나 다른 불리한 결과를 야기하지 않도록 다른 물질을 충분히 갖지 않는다. 즉, 본 개시의 핵산 또는 펩타이드는 재조합 DNA 기법에 의해 생성될 때 세포 물질, 바이러스 물질 또는 배양 배지, 또는 화학적으로 합성될 때 화학적 전구체 또는 다른 화학물질을 실질적으로 갖지 않는 경우 정제된 상태이다. 순도 및 균질도는 전형적으로 분석 화학 기법, 예를 들면, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 또는 고성능 액체 크로마토그래피를 이용함으로써 측정된다. 용어 "정제된"은 핵산 또는 단백질이 전기영동 겔에서 본질적으로 1개의 밴드를 생성함을 의미할 수 있다. 변형, 예를 들면, 인산화 또는 글리코실화될 수 있는 단백질의 경우, 상이한 변형은 따로 정제될 수 있는 상이한 단리된 단백질들을 생성할 수 있다.

[0125] 용어 "신생물" 또는 "암"은 부적절하게 높은 수준의 세포 분열, 부적절하게 낮은 수준의 아폽토시스 또는 이들 둘 다에 의해 야기되거나, 이러한 세포 분열, 이러한 아폽토시스 또는 이들 둘 다를 초래하는 임의의 질환을 지칭한다. 교모세포종은 신생물 또는 암의 비제한적인 일례이다. 용어 "암" 또는 "종양" 또는 "과다증식성 장애"는 암 야기 세포의 전형적인 특성, 예컨대, 제어되지 않는 증식, 불멸성, 전이력, 빠른 성장 및 증식률, 및 특정 특징적인 형태학적 특징을 가진 세포의 존재를 지칭한다. 암 세포는 종종 종양의 형태로 존재하나, 이러한 세포는 동물 내에 단독으로 존재할 수 있거나, 비종양유발성 암 세포, 예컨대, 백혈병 세포일 수 있다.

[0126] 용어 "백신"은 질환(예를 들면, 신생물/종양/감염원/자가면역 질환)의 예방 및/또는 치료를 위한 면역을 생성하는 조성물을 의미하는 것으로서 이해되어야 한다. 따라서, 본원에서 사용된 백신은 재조합 핵산, 또는 재조합 핵산을 포함하고 발현하는 세포를 포함하는 의약이고, 백신접종으로 특정 방어 및 보호 물질을 생성하기 위해 인간 또는 동물에 사용되기 위한 것이다. "백신 조성물"은 약학적으로 허용 가능한 부형제, 담체 또는 희석제를 포함할 수 있다. 본 개시의 양태는 식세포성 세포 기반 백신을 제조하는 데 있어서 기술의 이용에 관한 것이다.

[0127] 용어 "약학적으로 허용 가능한"은 인간을 비롯한 동물에 사용되도록 연방정부 또는 주정부의 규제 관청에 의해 승인되었거나 승인될 수 있거나, 미국 약전 또는 다른 일반적으로 인정되는 약전에 나열되어 있음을 의미한다. "약학적으로 허용 가능한 부형제, 담체 또는 희석제"는 작용제와 함께 대상체에게 투여될 수 있고 그의 약리학적 활성을 파괴하지 않고 치료량의 작용제를 전달하기에 충분한 용량으로 투여될 때 독성을 나타내지 않는 부형

제, 담체 또는 희석제를 지칭한다.

[0128] 본 개시의 방법에 유용한 핵산 분자는 활성을 갖거나 폴리펩타이드를 코딩하는 임의의 핵산 분자를 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 내생성 서열과 실질적으로 동일한 폴리뉴클레오타이드는 전형적으로 이중 가닥 핵산 분자의 적어도 한 가닥과 하이브리드화할 수 있다. "하이브리드화한다"는 핵산 분자가 다양한 엄격도 조건 하에서 상보적인 폴리뉴클레오타이드 서열들 또는 이들의 부분 사이에 페어링하여 이중 가닥 분자를 형성할 때를 의미한다(예를 들면, 문헌[Wahl, G. M. and S. L. Berger (1987) Methods Enzymol. 152:399; Kimmel, A. R. (1987) Methods Enzymol. 152:507)] 참조). 예를 들면, 엄격한 염 농도는 통상적으로 약 750 mM 미만의 NaCl 및 75 mM의 구연산삼나트륨, 약 500 mM 미만의 NaCl 및 50 mM의 구연산삼나트륨, 또는 약 250 mM 미만의 NaCl 및 25 mM의 구연산삼나트륨일 수 있다. 낮은 엄격도 하이브리드화는 유기 용매, 예를 들면, 포름아미드의 부재 하에서 수득될 수 있는 반면, 높은 엄격도 하이브리드화는 적어도 약 35% 포름아미드 또는 적어도 약 50% 포름아미드의 존재 하에서 수득될 수 있다. 엄격한 온도 조건은 통상적으로 적어도 약 30℃, 적어도 약 37℃ 또는 적어도 약 42℃의 온도를 포함할 수 있다. 추가 파라미터, 예컨대, 하이브리드화 시간, 세제, 예를 들면, 도데실황산나트륨(SDS)의 농도 및 담체 DNA의 포함 또는 배제의 변경은 당분야에서 숙련된 자에게 잘 공지되어 있다. 다양한 수준의 엄격도는 필요할 때 이 다양한 조건들을 조합함으로써 달성될 수 있다. 예시적인 실시양태에서, 하이브리드화는 750 mM NaCl, 75 mM 구연산삼나트륨 및 1% SDS에서 30℃에서 일어날 수 있다. 또 다른 예시적인 실시양태에서, 하이브리드화는 500 mM NaCl, 50 mM 구연산삼나트륨, 1% SDS, 35% 포름아미드 및 100 ㎍/㎖ 변성된 연어 정자 DNA(ssDNA)에서 37℃에서 일어날 수 있다. 또 다른 예시적인 실시양태에서, 하이브리드화는 250 mM NaCl, 25 mM 구연산삼나트륨, 1% SDS, 50% 포름아미드 및 200 ㎍/㎖ ssDNA에서 42℃에서 일어날 수 있다. 이 조건들의 유용한 변경은 당분야에서 숙련된 자에게 용이하게 명확할 것이다. 대다수의 적용에 있어서, 하이브리드화 후 세척 단계도 엄격도가 달라질 수 있다. 세척 엄격도 조건은 염 농도 및 온도에 의해 정의될 수 있다. 전술된 바와 같이, 세척 엄격도는 염 농도의 감소 또는 온도의 증가에 의해 증가될 수 있다. 예를 들면, 세척 단계를 위한 엄격한 염 농도는 약 30 mM 미만의 NaCl 및 3 mM 구연산삼나트륨, 또는 약 15 mM 미만의 NaCl 및 1.5 mM 구연산삼나트륨일 수 있다. 세척 단계를 위한 엄격한 온도 조건은 적어도 약 25℃, 적어도 약 42℃ 또는 적어도 약 68℃의 온도를 포함할 수 있다. 예시적인 실시양태에서, 세척 단계는 30 mM NaCl, 3 mM 구연산삼나트륨 및 0.1% SDS에서 25℃에서 일어날 수 있다. 다른 예시적인 실시양태에서, 세척 단계는 15 mM NaCl, 1.5 mM 구연산삼나트륨 및 0.1% SDS에서 42℃에서 일어날 수 있다. 또 다른 예시적인 실시양태에서, 세척 단계는 15 mM NaCl, 1.5 mM 구연산삼나트륨 및 0.1% SDS에서 68℃에서 일어날 수 있다. 이 조건들의 추가 변경은 당분야에서 숙련된 자에게 용이하게 자명할 것이다. 하이브리드화 기법은 당분야에서 숙련된 자에게 잘 공지되어 있고, 예를 들면, 문헌[Benton and Davis (Science 196:180, 1977)]; 문헌[Grunstein and Hogness (Proc. Natl. Acad. Sci., USA 72:3961, 1975)]; 문헌[Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, New York, 2001)]; 문헌[Berger and Kimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, New York)]; 및 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York]에 기재되어 있다.

[0129] "실질적으로 동일한"은 기준 아미노산 서열(예를 들면, 본원에 기재된 아미노산 서열들 중 어느 하나) 또는 핵산 서열(예를 들면, 본원에 기재된 핵산 서열들 중 어느 하나)에 대한 적어도 50% 동일성을 나타내는 폴리펩타이드 또는 핵산 분자를 의미한다. 이러한 서열은 비교를 위해 사용된 서열과 아미노산 수준 또는 핵산에서 적어도 60%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 심지어 99% 이상 동일할 수 있다. 서열 동일성은 전형적으로 서열 분석 소프트웨어(예를 들면, 제네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group)(미국 위스콘신주 53705 매디슨 1710 유니버시티 애비뉴 위스콘신 대학 생명공학 센터)의 서열 분석 소프트웨어 팩키지, BLAST, BESTFIT, GAP 또는 PILEUP/PRETTYBOX 프로그램)를 이용함으로써 측정된다. 이러한 소프트웨어는 다양한 치환, 결실 및/또는 다른 변형에 상동성 정도를 배정함으로써 동일한 또는 유사한 서열을 일치시킨다. 보존적 치환은 전형적으로 하기 군 내의 치환을 포함한다: 글리신, 알라닌; 발린, 이소류신, 류신; 아스파르트산, 글루탐산, 아스파라긴, 글루타민; 세린, 쓰레오닌; 라이신, 아르기닌; 및 페닐알라닌, 티로신. 동일성 정도를 측정하는 예시적인 접근법에서, BLAST 프로그램은 밀접히 관련된 서열을 표시하는, e-3과 e-m° 사이의 확률 점수와 함께 사용될 수 있다. "기준"은 비교의 표준이다. 각각의 서열에서 특정 위치 또는 잔기의 넘버링은 사용된 특정 단백질 및 넘버링 체계에 의해 좌우됨을 이해할 것이다. 넘버링은 예를 들면, 성숙 단백질의 전구체 및 성숙 단백질 그 자체에서 상이할 것이고, 종 사이의 서열 차이는 넘버링에 영향을 미칠 수 있다. 당분야에서 숙련된 자는 당분야에서 잘 공지되어 있는 방법, 예를 들면, 기준 서열에의 서열 정렬 및 상동성 잔기의 확인으로 임의의 상동성 단백질 및 각각의 코딩 핵산에서 각각의 잔기를 확인할 수 있을 것이다.

[0130] 용어 "대상체" 또는 "환자"는 치료, 관찰 또는 실험의 객체인 유기체, 예컨대, 동물(예를 들면, 인간)을 지칭한다. 단지 예로써, 대상체는 인간 또는 비인간 포유동물, 예컨대, 비인간 영장류, 뮤린, 소, 말, 개, 양 또는 고양이를 포함하나 이들로 제한되지 않는 포유동물을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다.

[0131] 용어 "치료 효과"는 장애(예를 들면, 신생물, 종양 또는 감염원에 의한 감염 또는 자가면역 질환) 또는 이의 관련 병리의 증상들 중 하나 이상의 증상을 어느 정도 경감시키는 것을 의미한다. 본원에서 사용된 "치료 유효량"은 세포 또는 대상체에게 단회 또는 다회 용량으로 투여될 때 이러한 치료의 부재 하에서 예상된 것을 능가하는 수준으로 이러한 장애를 가진 환자의 생존 가능성을 높이거나, 장애의 하나 이상의 징후 또는 증상을 감소시키거나, 예방하거나 지연시키는 데 효과적인 작용제의 양을 지칭한다. "치료 유효량"은 치료 효과를 달성하는 데 요구된 양을 한정하기 위한 것이다. 당분야에서 통상의 기술을 가진 의사 또는 수의사는 요구된 약학 조성물의 "치료 유효량"(예를 들면, ED50)을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다.

[0132] **병든 세포를 공격하도록 "표적화된" 조작된 골수 세포**

[0133] 본 개시는 외래 물질, 입자, 병든 세포, 세포 잔해물, 염증 신호, 화학유인제의 검출; 내생성 DAMP 및 PAMP 신호전달 경로의 활성화; 골수형성, 혈관외유출 유발; 화학주성; 식세포; 피노사이토시스(pinocytosis); 동원; 삼킴; 청소(scavenging); 병원체의 세포내 산화적 파열 및 용해 또는 사멸의 활성화; 병들거나 손상된 세포의 검출, 삼킴 및 사멸; 생체내 원치 않는 세포, 조직 또는 무세포 잔해물의 제거; 항원 제시 및 선천성 면역의 활성화에 있어서의 역할; 면역 반응 캐스케이드의 활성화 및 조절; T 세포 레퍼토리의 활성화; 자가포식; 염증 및 비염증 아폽토시스; 피롭토시스(pyroptosis), 스트레스에 대한 반응에 대한 면역 편집 및 조직 항상성의 회복과 관련된 성질을 비롯한 선천성 기능적 역할을 면역 방어에 활용함으로써 표적화된 킬러 골수 세포를 제조하는 조성물 및 방법을 포함한다. 한 양태에서, 본원은 치료적 적용에 사용하기 위해 골수 세포의 하나 이상의 기능을 증강시키는 방법 및 조성물을 제공하는 것으로서, 상기 하나 이상의 기능은 외래 물질, 입자, 병든 세포, 세포 잔해물, 염증 신호, 화학유인제의 검출; 내생성 DAMP 및 PAMP 신호전달 경로의 활성화; 골수형성, 혈관외유출 유발; 화학주성; 식세포작용; 피노사이토시스; 동원; 트로고사이토시스; 삼킴; 청소; 병원체의 세포내 산화적 파열 및 세포내 용해 또는 사멸의 활성화; 병들거나 손상된 세포의 검출, 삼킴 및 사멸; 생체내 원치 않는 세포, 조직 또는 무세포 잔해물의 제거; 항원 제시 및 선천성 면역의 활성화에 있어서의 역할; 면역 반응 캐스케이드의 활성화 및 조절; T 세포 레퍼토리의 활성화; 자가포식; 염증 및 비염증 아폽토시스; 피롭토시스, 스트레스에 대한 반응에 대한 면역 편집 및 조직 항상성의 회복 중 하나 이상일 수 있다. 한 실시양태에서, 상기 조성물 및 방법은 특정 골수 세포의 유전적 변형으로 이 골수 세포의 표적화 및 사멸 기능을 증강시키는 것에 관한 것이기도 하다. 본원에 기재된 조성물 및 방법은 적어도 하나의 유전적 변형을 포함하는 조작된 골수 세포의 생성에 관한 것이고, 조작된 골수 세포가 병원체 또는 병든 세포 또는 암 세포를 인식할 수 있고/있거나, 표적화할 수 있고/있거나, 식세포작용을 통해 삼킬 수 있고/있거나, 사멸시킬 수 있고/있거나 제거할 수 있고 추가로 병원체 또는 병든 세포의 식세포작용, 사멸 및/또는 제거 후 특정 면역 반응 캐스케이드를 활성화시킬 수 있도록 병원체, 병든 세포, 예컨대, 종양 또는 암 세포를 인식하고 이들에 대한 이펙터 기능을 유도하는 것에 관한 것일 수 있다.

[0134] 골수 세포는 종양에서 가장 풍부한 세포인 것으로 보인다(도 1b). 골수 세포는 신체의 건강한 정상 세포에 비해 종양 세포를 인식할 수도 있고 신체의 종양 세포에 대한 면역 반응을 일으킬 수도 있다. 선천성 면역 반응의 감시자로서, 골수 세포는 비-자가 또는 비정상적인 세포 유형을 감지할 수 있고 식세포작용으로서 지칭되는 과정을 통해 이 유형을 제거할 수 있다. 이것은 종양 세포의 골수 세포 매개 식세포작용 및 용해를 유도하는 데 있어서 치료적 이점에 관한 것일 수 있다. 그러나, 이 천연 생성 종양 침윤 골수 세포(TIM)는 종양 미세환경(TME)의 영향을 받을 수 있다. TIM은 불균질한 세포 집단을 구성한다. 많은 TIM들은 골수 유래 조혈 줄기 세포로부터 유래한 순환 단핵구 및 과립구로부터 유래한다. 그러나, 종양 유래 인자에 의한 지속적인 자극의 존재 하에서 단핵구 및 과립구 조상세포는 그들의 본질적인 말기 분화 경로로부터 성숙 대식세포, DC 또는 과립구로 전환하고, 종양 촉진 골수 세포 유형이 될 수 있다. 대안적으로 활성화된 병리학적 미성숙 골수 세포로의 분화가 유리하다. 이 미성숙 골수 세포는 종양 관련 DC(TADC), 종양 관련 호중구(TAN), 골수 유래 억제제 세포(MDSC) 및 종양 관련 대식세포(TAM)를 포함한다. 이 긴급 골수형성에 대한 대안으로, TAM은 배아 또는 단핵구로부터 유래할 수 있는 조직 체류 대식세포로부터 유래할 수도 있다. 이 조직 체류 대식세포는 발암과정 동안 표현형 및 기능의 변화를 겪고, 증식은 조직 체류 대식세포로부터 유래한 TAM을 유지하는 데 도움이 될 수 있다. 종양 미세환경은 종양 침윤 골수 세포가 골수 유래 억제제 세포가 되고 T 세포를 억제하는 능력을 획득하도록 유도할 수 있다. 결과적으로, 종양을 침윤할 수 있고 식세포 흡수 및 사멸을 위해 종양 세포를 표적화할 수 있는 치료적으로 효과적인 TIM을 생성하는 혁신적인 방법이 필요하다.

[0135] 한 양태에서, 본원은 특정 표적 세포, 예를 들면, 종양 세포 또는 병원성 세포를 표적화할 수 있는 조작된 골수 세포를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 조작된 골수 세포는 종양 세포를 침윤하고 표적화하고 사멸시키는 데 있어서 강력하다. 본원에 기재된 조작된 골수/식세포성 세포는 식세포성 세포를 표적 세포, 예를 들면, 종양 세포 또는 암 세포로 표적화하는 데 도움을 주는 하나 이상의 단백질을 코딩하는 재조합 핵산을 포함하도록 디자인된다. 한 실시양태에서, 조작된 골수 세포는 종양을 용이하게 침윤할 수 있다. 한 실시양태에서, 조작된 골수 세포는 순환하는 동안 대상체의 병들지 않은 비종양 세포에 대한 교차반응성을 갖지 않거나 무시할만한 수준으로 가지면서 표적 세포에 대한 높은 특이성을 가진다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 조작된 골수/식세포성 세포는 세포가 TME 영향을 극복/우회하고 강력한 항종양 반응을 일으키는 데 도움을 줄 재조합 핵산을 포함하도록 디자인된다. 한 실시양태에서, 본원에 기재된 조작된 골수/식세포성 세포는 표적 세포의 식세포작용을 증가시키는 재조합 핵산을 포함하도록 디자인된다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 조작된 골수/식세포성 세포는 트로고사이토시스를 증가시키거나, 감소시키거나 제거하고/하거나, 표적 세포의 식세포 용해를 증강시키는 재조합 핵산을 포함하도록 디자인된다.

[0136] 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 조성물은 키메라 수용체 융합 단백질(CFP), 예를 들면, 식세포 수용체(PR) 융합 단백질(PFP)을 코딩하는 재조합 핵산을 포함하는 골수 세포를 포함한다. 재조합 핵산은 (i) 막횡단 도메인, 및 (ii) PR 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 PR 서브유닛; 및 표적 세포의 항원에 특이적인 세포외 항원 결합 도메인을 코딩하는 서열을 포함할 수 있고; 이때 막횡단 도메인과 세포외 항원 결합 도메인은 작동 가능하게 연결되고; PR 세포내 신호전달 도메인은 신호 형질도입 도메인을 가진 수용체로부터 유래한다. 재조합 핵산은 식세포성 세포를 표적 세포로 향하게 하고 그의 식세포 활성을 증강시키는 데 도움을 주는 하나 이상의 원형질막 수용체를 구성하는 하나 이상의 폴리펩타이드도 코딩한다.

[0137] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 골수 세포는 병든 세포, 종양 세포 또는 병원체일 수 있는 표적 세포에 대한 제1 식세포 신호, 및 제1 신호에 의해 시작된 표적에 대한 식세포 및 사멸 반응을 증가시키는, 염증 신호인 제2 신호에 반응할 수 있는 키메라 수용체를 포함하는 하나 이상의 재조합 단백질을 포함한다.

[0138] *식세포*

[0139] 본원은 식세포성 세포를 '개선하거나', '변형시키거나', '조작하는' 단계, 및 이 세포를 환자 또는 대상체 내의 특정 세포 유형 또는 부류의 세포일 수 있는 특정 표적을 향해 표적화하는 단계를 포함하는, 면역요법을 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 질환을 가진 환자이다. 용어 대상체 및 환자는 종종 이 단락에서 교환 가능하게 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 식세포성 세포는 질환을 가진 대상체로부터 유래하고, 이때 질환은 예를 들면, 암이다. 대상체로부터의 자가 세포는 시험관내에서 변형된 후 세포 내로 투여될 수 있고, 이때 변형된 식세포성 세포는 대상체에서 암 세포를 특이적으로 공격하고 사멸시키도록 재디자인되어 있다.

[0140] 일부 실시양태에서, 대상체는 암이 아닌 질환을 가진다.

[0141] 일부 실시양태에서, 대상체는 감염인 질환을 가진다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 면역요법을 위한 방법 및 조성물은 식세포성 세포를 '개선하거나', '변형시키거나', '조작하고' 이 세포를 감염, 예를 들면, 대상체 내의 감염된 세포를 향해 표적화하기 위한 것이다.

[0142] 일부 실시양태에서, 대상체는 바이러스, 세균, 진균 또는 원생동물 감염인 질환을 가진다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 면역요법을 위한 방법 및 조성물은 식세포성 세포를 '개선하거나', '변형시키거나', '조작하고' 이 세포를 감염된 대상체 내부의 바이러스 감염된 세포, 세균 감염된 세포, 진균 감염된 세포 또는 원생동물 감염된 세포를 향해 표적화하기 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 면역요법을 위한 방법 및 조성물은 식세포성 세포를 '개선하거나', '변형시키거나', '조작하고' 이 세포를 대상체 내의 바이러스, 세균, 진균 또는 임의의 병원체를 향해 표적화하여, 대상체 내의 바이러스, 세균, 진균 또는 병원체가 식세포작용을 통해 삼켜지고/지거나 사멸되게 하기 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 면역요법을 위한 방법 및 조성물은 식세포성 세포를 '개선하거나', '변형시키거나', '조작하고' 이 세포를 대상체 내의 바이러스 항원, 세균 항원, 진균 항원 또는 병원체의 항원을 향해 표적화하여, 대상체 내의 바이러스, 세균, 진균 또는 병원체에 대한 적어도 하나의 개선된 면역 반응이 대상체 내에 있게 하기 위한 것이다.

[0143] 일부 실시양태에서, 골수 세포, 예컨대, 식세포성 세포는 동종이계 세포이다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 면역요법을 위한 방법 및 조성물은 동종이계 공급원으로부터 유래한 골수 세포, 예컨대, 식세포성 세포를 수득하는 단계를 포함한다. 그 후, 동종이계 공급원으로부터의 변형된 또는 조작된 세포가 대상체의 병든 세포

를 공격하거나, 직접적으로 또는 간접적으로 식세포작용을 통해 병든 세포를 삼키고/키거나 병든 세포를 사멸시키거나, 질환에 대한 대상체의 적어도 하나의 면역 반응을 개선할 수 있도록 식세포성 세포와 같은 골수 세포를 변형시키거나 조작하고 병든 대상체 내로 도입할 수 있다. 일부 실시양태에서, 동종이계 공급원은 인간이다. 일부 실시양태에서, 동종이계 공급원은 건강한 인간이다.

[0144] 식세포는 면역 시스템의 천연 감시자이고 신체의 첫 번째 방어선을 형성한다. 식세포는 병원체, 병원체 감염된 세포, 외래 물질 또는 암성 세포를 삼키고 이것을 신체로부터 제거한다. 대다수의 잠재적 병원체들은 예를 들면, 인지될 수 있는 감염을 야기할 수 있기 전에 이 시스템에 의해 신속히 중화된다. 이것은 클래쓰린(clathrin) 코팅된 피트(pit) 시스템을 통한 수용체 매개 흡수, 피노사이토시스, 특히 막 파동운동(ruffling) 및 식세포작용의 결과로서 마이크로피노사이토시스를 수반할 수 있다. 그러므로, 식세포는 다양한 비-자가(및 자가) 요소들에 의해 활성화될 수 있고 그의 "표적"의 인식에 있어서 분화유연성 수준을 나타낼 수 있다.

[0145] 단핵구, 대식세포 및 수지상 세포로 구성된 단핵 식세포 시스템(MPS)은 조직 항상성, 및 항원 제시에 있어서 그의 역할을 통한 면역 반응의 균형 결정에 필수적이다. MPS는 골수 조상세포로부터 유래하고 혈액 단핵구, 조직 대식세포 및 수지상 세포를 생성하는 세포 계통이다. 따라서, MPS로부터 대식세포를 생성하는 과정은 전신 순환계로 들어갈 준비가 된 단핵구로의 분화 과정을 겪는 BM 내의 전구단핵구로 시작한다. 순환계에서의 짧은 시간(<48시간) 후, 이 새로 형성된 단핵구는 말초 조직 내로 신속히 침윤하고, 이 조직에서 이들 중 대다수가 대식세포 또는 수지상 세포(DC)로 분화한다. 항미생물 식세포작용은 질환 야기 미생물을 제거하고 분해하고, 사이토카인 및 케모카인 분비를 통해 염증유발 신호전달을 유도하고, 면역 세포를 동원하여 효과적인 염증 반응을 일으킨다. 이 유형의 식세포작용은 종종 "염증성 식세포작용"(또는 "면역원성 식세포작용")으로서 지칭된다. 그러나, 특정 지속적인 감염과 같은 일부 경우, 소염 반응은 미생물 흡수 후 일어날 수 있다. 항미생물 식세포작용은 통상적으로 미성숙 수지상 세포(DC) 및 대식세포와 같은 골수 계통의 전문적인 식세포, 및 조직 체류 면역 세포에 의해 수행된다. 손상된 아폽토시스성 세포들 또는 세포의 식세포작용은 전형적으로 비염증성("비면역원성"으로서도 지칭됨) 과정이다. 주변 조직에 대한 손상을 야기하지 않거나 염증유발 면역 반응을 유도하지 않으면서, 형질전환된 또는 악성 세포(자가 세포) 및 세포는 식세포작용을 통해 삼켜지고 아폽토시스성 세포는 신속히 제거된다. 이 유형의 아폽토시스성 세포 제거는 비염증 과정이고, 특정 수용체를 통해 식세포에 의해 결합되는 "나를 먹어" 신호를 아폽토시스성 세포의 표면에 노출하는 단계를 동반하면서, 식세포를 아폽토시스성 세포의 위치로 동원하기 위해 아폽토시스성 세포로부터 "나를 찾아" 신호를 방출하는 단계; 및 아폽토시스성 세포를 삼키기 위해 세포골격을 재배열하는 단계; 이어서, 삼켜진 아폽토시스성 세포를 분해하고 특정 식세포 반응(예를 들면, 소염 사이토카인의 분비)을 이끌어내는 단계를 포함한다.

[0146] 원형질막 외피 내로의 미립자, 예를 들면, 0.5 ㎛ 초과의 입자의 흡수인 식세포작용은 유체상 마크로피노사이토시스성 경로 및 수용체 경로에 의한 가용성 리간드의 엔도사이토시스와 밀접히 관련되어 있고 부분적으로 중첩된다. 에페로사이토시스(efferocytosis)로서도 공지되어 있는 아폽토시스성 세포의 흡수, 및 감염 및 염증으로부터 비롯된 괴사성 세포의 흡수(네크롭토시스(necroptosis) 및 피롭토시스(pyroptosis))와 관련된 변이체. 외생성 입자의 흡수(이종포식)는 손상된 세포내 소기관의 격리 및 라이소좀 처리의 내생성 과정인 자가포식과 공통된 특징을 가진다. 입자 크기, 수용체-리간드 상호작용의 다중도 및 세포골격의 관여에 따라 다양한 흡수 기작들이 있다. 파고좀 액포는 일단 내재화되면 일차 라이소좀, 또는 소포체(ER) 및 골지 복합체의 생성물과 선택적으로 융합하여, 이차 파고라이소좀을 형성한다(Russell, D.G. (2011). Immunol. Rev. 240, 252-268). 이 경로는 엔도사이토시스 및 분비 소포 대식세포, DC, 파골세포 및 호산구와의 융합 및 분열을 겪는다는 점에서 역동적이다. 항미생물 식세포작용은 질환 야기 미생물을 제거하고 분해하고, 사이토카인 및 케모카인 분비를 통해 염증유발 신호전달을 유도하고, 면역 세포를 동원하여 효과적인 염증 반응을 일으킨다. 이 유형의 식세포작용은 종종 "염증성 식세포작용"(또는 면역원성 식세포작용")으로서 지칭된다. 그러나, 특정 지속적인 감염과 같은 일부 경우, 소염 반응은 미생물 흡수 후 일어날 수 있다. 항미생물 식세포작용은 통상적으로 미성숙 수지상 세포(DC) 및 대식세포와 같은 골수 계통의 전문적인 식세포, 및 조직 체류 면역 세포에 의해 수행된다. 대조적으로, 손상된 자가 유래 아폽토시스성 세포 또는 세포 잔해물의 식세포작용(예를 들면, 에페로사이토시스)은 전형적으로 비염증성("비면역원성"으로서도 지칭됨) 과정이다. 수십억 개의 손상된 세포들, 죽어가는 세포들 및 원치 않는 세포들은 매일 아폽토시스를 겪는다. 원치 않는 세포는 예를 들면, 발생 동안 생성된 과도한 세포, 노화 세포, 감염된 세포(세포내 세균 또는 바이러스), 형질전환된 또는 악성 세포, 및 세포독성제에 의해 비가역적으로 손상된 세포를 포함한다.

[0147] 골수는 선택된 조직 체류 대식세포를 대체하고 염증 및 감염 동안 조직 골수 집단을 증폭시킬 순환 호중구 및 단핵구의 공급원이다. 식세포작용 후, 새로 동원된 단핵구 및 조직 대식세포는 원형질막 내의 기존 인지질 및

아라키도네이트로부터 그들의 생성물을 생성하고 호흡 폭발의 활성화 또는 유도성 산화질소 합성의 유도에 의해 생성된 라디칼을 방출함으로써 그들의 생성물을 분비하고; 전술된 바와 같이 생성된 저분자량 생성물(아라키도네이트 대사물질, 수퍼록사이드 음이온 및 산화질소)의 합성에 의해 달성되는 것과 별개로, 대식세포에서 식세포작용에 의해 유도된 분비는 점진적인 산성화를 초래하는, RNA의 새로운 합성 및 pH의 변화에 의해 주로 달성된다.

[0148] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 식세포는 단핵구 또는 단핵구 계통의 세포이다.

[0149] 일부 실시양태에서, 골수 세포는 MARCO+ SignR1+이고 외부 변연부에서 발견되고 캡슐화된 세균을 신속히 제거하는 식세포성 대식세포이다. 유사한 CD169+ F4/80^{-} 대식세포는 림프절의 피막하동의 내층을 형성하고 바이러스 감염에 관여하다. 간 내의 쿱퍼 세포를 비롯한 내피 대식세포는 혈액 및 림프절로부터 미생물 및 항원성 리간드를 제거하여, 점막 면역에 필적할만하나 점막 면역과 구별되는 동모양(sinusoidal) 면역 기능을 제공한다는 것을 주목하였다. 조직 대식세포들이 여전히 전형적인 대식세포 마커를 발현할지라도, 모든 조직 대식세포들이 구성적으로 식세포성 세포인 것은 아니다. 설치류 비장의 변연부에서, F4/80을 결여하는 금속친화성 대식세포는 시알산 결합 면역글로불린(Ig) 유사 렉틴 1(SIGLEC1[시알로어드헤신])인 CD169을 강하게 발현하나, 약한 식세포성을 가진다. 비전문적인 식세포는 상피 세포 및 섬유모세포를 포함한다. 섬유모세포는 부착 분자 ICAM 및 비트로렉틴 수용체를 통해 CD11b 내지 CD18 이외의 인테그린을 사용함으로써 아폽토시스성 잔해물을 제거하는 "작업부류 식세포"이다. 성상세포도 효율적으로 분해하지는 않지만 아폽토시스성 사체를 삼키는 것으로 보고되어 있다. 식세포작용과 관련된 원형질막 수용체는 옵소닌, 주로 IgG 항체의 보존된 도메인에 대한 FcR(활성화 또는 억제), 및 보체 수용체, 예컨대, 보체 활성화의 고전적인(IgM 또는 IgG) 또는 대안적인 렉틴 경로에 의해 침착된 iC3b에 대한 CR3일 수 있다. CR3은 아마도 대식세포 유래 보체를 침착시킴으로써 옵소닌의 부재 하에서 인식을 매개할 수도 있다. 항미생물 식세포작용은 통상적으로 미성숙 수지상 세포(DC) 및 대식세포와 같은 골수 계통의 전문적인 식세포 및 조직 체류 면역 세포에 의해 수행된다.

[0150] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 본 세포 조작 프로그램의 목적을 위해, 면역요법에 사용하기 위한 조작에 사용되는 세포는 강력한 식세포성 세포이다.

[0151] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 본 세포 조작 프로그램의 목적을 위해, 면역요법에 사용하기 위한 조작에 사용되는 세포는 전혈, 말초 혈액 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위로부터의 조직, 복수, 흉막 삼출물, 비장 조직으로부터 수득된다.

[0152] 일부 실시양태에서, 면역요법에 사용하기 위한 조작에 사용되는 세포는 말초 혈액으로부터 수득된다.

[0153] 간 MPS 중에서, 암 면역요법을 위한 세포의 생성이라는 목적과 관련하여 자극 및 억제 둘 다의 다양한 구조적 및 기능적 구별이 특징규명되었다.

표 1

간 단핵구, 대식세포 및 DC 의 예시적인 표현형 특성

	분자적으로 정의됨	다른 특성
간 단핵구	CD14++CD16- CD14++CD16+ DC 유사 표현형-높은 DR, CD80+ 대식세포 유사 표현형-CD163+, CD68+ CD16+CD14dim CD14 "DC" - 단핵구로부터 유래한 것으로 추정됨	CD16+ 단핵구(이것이 CD14++CD16+인지 아니면 CD16+CD14dim인지에 대해 정의되지 않았음)는 혈액 단핵구에 비해 더 우수한 식세포작용을 갖고 CD4+ T 세포를 효율적으로 활성화시킬 수 있다.
간 대식세포	범(Pan) CD68	간 대식세포는 조절 및 스캐빈저 역할을 하면서 본질적으로 우세한 면역관용을 갖는 듯하다.
간 수지상 세포	BDCA1 (CD1c+) DC BDCA2 (CD303+) DC BDCA3 (CD141hi) DC	본질적으로 면역관용; 비장에 비해 더 낮은 보조자극 마커 발현; LPS 자극 시 IL-10 생성; 재자극 시 IL-10을 생성하고 과소반응하는 T 세포 자극; 미감작 T 세포 자극 시 더 많은 수의 FoxP3+ Treg 세포 생성; 혈액에 비해 약한 MLR 반응

[0154]

[0155] 일부 실시양태에서, 본원에서 면역요법에 사용되도록 조작된 골수 세포는 대식세포, 수지상 세포, 비만 세포, 단핵구, 호중구, 미세아교세포 및 성상세포로 구성된 군으로부터 선택된 골수 세포를 포함한다.

[0156] 일부 실시양태에서, 면역요법에 사용되도록 조작된 골수 세포는 식세포성 세포이다. 일부 실시양태에서, 식세포성 세포는 단핵구이다.

[0157] 일부 실시양태에서, 본원에서 면역요법에 사용되도록 조작된 골수 세포는 단핵구, 단핵구 유래 대식세포 및/또는 수지상 세포이다.

[0158] 일부 실시양태에서, 본원에서 면역요법에 사용되도록 조작된 골수 세포는 단핵구 또는 대식세포이다.

[0159] 일부 실시양태에서, 골수 세포는 말초 혈액으로부터 수득된다.

[0160] 일부 실시양태에서, 골수 세포는 선택 마커 $CD14^{+}CD16^{low}$에 의해 선택된다. 일부 실시양태에서, 골수 세포는 정화(elutriation)를 통해 선택된다.

[0161] 일부 실시양태에서, 골수 세포는 대상체의 백혈구성분채집술 컬럼으로부터 단리된다. 일부 실시양태에서, 대상체는 조작된 세포를 포함하는 약학 조성물을 투여받은 동일한 대상체이다.

[0162] 일부 실시양태에서, 대상체는 조작된 세포를 포함하는 약학 조성물을 투여받은 동일한 대상체가 아니다.

[0163] 일부 실시양태에서, 백혈구성분채집술은 더 많은 골수 세포를 수집하기 위해 주당 1회 동일한 대상체에 대해 수행된다. 일부 실시양태에서, 백혈구성분채집술은 더 많은 골수 세포를 수집하기 위해 8일 내지 10일에 걸쳐 1회 초과의 빈도로 동일한 대상체에 대해 수행된다. 일부 실시양태에서, 백혈구성분채집술은 더 많은 골수 세포를 수집하기 위해 한 달에 걸쳐 2회 초과의 빈도로 동일한 대상체에 대해 수행된다.

[0164] 일부 실시양태에서, 골수 세포는 백혈구성분채집술 샘플 또는 말초 혈액 샘플로부터 단리된다. 일부 실시양태에서, 골수 세포는 조상세포이다. 일부 실시양태에서, 골수 세포는 단핵구 전구체 세포이다. 일부 실시양태에서,

본원에 기재된 골수 세포는 말기 세포로 분화되지 않고 말기 세포 표현형, 예컨대, 조직 대식세포를 나타내지 않는다. 일부 실시양태에서, 골수 세포는 CD14+ 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 골수 세포는 CD16을 발현하지 않는다. 일부 실시양태에서, 골수 세포는 소량의 CD16을 발현한다. 일부 실시양태에서, 골수 세포는 생물학적 샘플, 예컨대, 말초 혈액 또는 성분채집술 샘플로부터의 조작을 목적으로 CD14+ 세포의 선택에 의해 미리 선택된다. 일부 실시양태에서, 선택은 선택될 골수 세포와 접촉하거나 맞물리지 않으면서 수행된다. 일부 실시양태에서, 골수 세포는 조작 전에 분류, 예를 들면, 유세포분석 기반 세포 분류기(FACS)에 의해 생물학적 샘플로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, CD16을 발현하는 골수 세포를 항체로 포획하고, 남은 골수 세포를 수집하여 조작을 위해 사용하였다. 일부 실시양태에서, 골수 세포를 수득하기 위해, CD16 이외의 하나 이상의 다른 세포 표면 분자, 예를 들면, CD3, CD8, CD11c, CD40 또는 CD206을 음성 선택 과정에서 포획하기 위해 표적화한다.

[0165] 한 양태에서, 본원은 융합 단백질을 코딩하는 적어도 하나의 외생성 재조합 핵산을 포함하는 골수 세포를 제공한다. 융합 단백질은 적어도 막횡단 도메인, 및 표적 세포에 결합할 수 있는 영역을 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 키메라 단백질일 수 있다. 예를 들면, 키메라 단백질은 표적, 예를 들면, 표적 세포 상의 표적 항원, 항원성 펩타이드 또는 리간드에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 세포는 암 세포이다. 일부 실시양태에서, 표적은 암 항원이다. 일부 실시양태에서, 키메라 단백질은 골수 세포에서 발현되고, TME 유도 억제 신호를 극복하고 활성화된 염증유발 골수 세포로서 작용하도록 골수 세포를 활성화시킨다. 한 실시양태에서, 골수 세포에서 발현된 키메라 단백질은 표적(제1 신호) 이외에 제2 신호에 반응할 수 있고, 이때 제2 신호는 염증유발 신호 및 활성화 신호이다. 일부 실시양태에서, 골수 세포에서 발현된 키메라 단백질은 표적 또는 제1 신호 이외에 다수의 신호들에 반응할 수 있다. 키메라 단백질은 표적 또는 제1 신호 이외에 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 이상의 신호에 반응할 수 있다.

[0166] 또 다른 실시양태에서, 골수 세포에서 발현된 키메라 단백질은 표적에 결합하도록 특이적이다. 일부 실시양태에서, 표적은 암 항원이다. 키메라 단백질의 발현은 표적 특이성을 골수 세포에 부여한다.

[0167] 한 실시양태에서, 골수 세포에서 발현된 키메라 단백질은 다중체화할 수 있고, 예를 들면, 하나 초과의 신호 또는 신호 유형의 활성화 및 프로세싱을 위해 다수의 도메인들을 가진다. 일부 실시양태에서, 다수의 도메인들의 활성화는 동시적으로 골수 세포에 대한 증가된 이펙터 반응을 유발한다. 골수 세포에 대한 이펙터 반응은 예를 들면, 증강된 식세포작용, 염증유발 활성화 및 표적 세포의 사멸을 포괄한다. 일부 실시양태에서, 골수 세포에서 발현된, 다중체화할 수 있는 키메라 단백질은 하나 초과의 리간드, 예컨대, 표적 항원 및 헬퍼 분자에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 키메라 단백질은 암 세포 상의 다수의 표적 항원들에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 키메라 단백질은 다수의 세포들 상의 다수의 표적 항원들에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 키메라 단백질은 암 세포 상의 대식세포-단핵구 억제 표적에 결합할 수 있고, 세포내 말단에 융합된 염증유발 도메인을 사용한 접촉 시 자극 신호를 생성할 수 있다("신호 스위치"로서 지칭되는 과정). 예를 들면, 키메라 단백질의 세포외 도메인은 CD47 결합 도메인을 포함할 수 있는 반면, 키메라 융합 단백질은 천연 CD47 수용체의 막횡단 및/또는 세포내 도메인을 결여하나, 세포내 영역에서 PI3K 동원 도메인을 포함함으로써, 종양 세포와의 접촉으로부터의 대식세포-단핵구 억제 신호를 염증유발 식세포작용 증강 신호로 전환시킨다.

[0168] 일부 실시양태에서, 키메라 단백질은 발현된 키메라 단백질의 다수의 유닛들에 결합할, 예를 들면, 다량체화할 수 있다. 다량체화는 이량체, 삼량체, 사량체, 오량체, 육량체, 칠량체, 팔량체, 구량체 또는 십량체 형성을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다량체화는 막횡단 영역, 세포외 영역 또는 세포내 영역 또는 이들의 조합의 회합을 통해 일어날 수 있다. 예를 들면, 식세포 수용체 MARCO의 콜라겐성 도메인의 영역을 포함하는 키메라 단백질은 그의 효과적인 기능을 위해 삼량체를 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 키메라 단백질은 다른 분자, 예를 들면, 또 다른 수용체와 회합할 수 있다. 예를 들면, 키메라 단백질은 Fcɣ TM 도메인과 이량체화하는 Fc-알파 막횡단 도메인을 포함하고, 이때 Fcɣ는 내생성 수용체일 수 있다.

[0169] 일부 실시양태에서, 다중체화할 수 있는 키메라 단백질은 하나 초과의 신호에 의해 활성화된 후 다수의 세포내 신호전달 분자들을 활성화시킬 수 있는 다수의 세포내 도메인을 포함한다. 예를 들면, 키메라 단백질은 식세포작용 수용체 도메인 및 염증유발 도메인을 포함할 수 있다. 예를 들면, 키메라 단백질은 FcR 신호전달 도메인, 및 프로캐스파제를 동원하는 추가 인산화 도메인을 포함한다.

[0170] *PFP 융합 단백질의 식세포 수용체(PR) 서브유닛*

[0171] 본원은 식세포 수용체(PR) 융합 단백질(PFP)인 CFP를 코딩하는 재조합 핵산을 제공한다. PFP는 막횡단(TM) 도메인, 및 PR 세포내 신호전달 도메인을 포함하는세포내 도메인(ICD)을 포함하는 PR 서브유닛을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, PFP를 코딩하는 재조합 핵산이 세포에서 발현될 때, PFP는 세포의 세포막 내로 기능적으로

혼입된다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 식세포성 세포, 예를 들면, 대식세포와 같은 골수 세포의 막 내로 특이적으로 혼입되는 막횡단 도메인을 코딩한다.

[0172] 일부 실시양태에서, 적합한 PR은 막에 걸쳐 있는 단백질들의 라이브러리를 스크리닝한 후 선택된다. PR 서브유닛은 세포외 도메인에서 암 세포 결합 항체와 융합된다. 일부 실시양태에서, PR은 세포내 말단에서 하나 이상의 추가 도메인과 융합될 수 있다.

[0173] *CFP 융합 단백질의 세포내 도메인*

[0174] 일부 실시양태에서, CFP 서브유닛은 식세포 수용체의 TM 도메인을 포함한다.

[0175] 일부 실시양태에서, CFP 서브유닛은 식세포 수용체의 ICD 도메인을 포함한다.

[0176] 일부 실시양태에서, 식세포 수용체는 스캐빈저 수용체이다. 많은 스캐빈저 수용체들이 물질의 검출 및 섭취에 협력하지만, 식세포작용의 과정에 개입하는 모든 수용체들이 단독으로 삼킴을 유발하는 것은 아니다. 특정 식세포작용 및 스캐빈저 수용체의 개입은 다운스트림 면역 반응에 현저한 영향을 미칠 수 있다. 예를 들면, 500 nm 음전하 나노입자를 사용한 A형 스캐빈저 수용체 MARCO의 유발은 소염 면역관용 면역 반응과 관련되어 있다. 반면, 양전하를 가진 입자는 NLRP3 및/또는 섬유화 반응과 같은 염증유발 경로를 활성화시키는 식세포작용 수용체의 서브세트에 의해 삼켜진다. 더욱이, 특정 스캐빈저 수용체 경로, 예컨대, 내피 세포에 의해 발현된 스캐빈저 수용체(SREC-I)는 항원 교차 제시에 있어서 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 대식세포 활성 및 임상 효능을 증강시키기 위해 활용될 수 있는 잠재적 수용체의 확인 및 이해는 CFP 개발 플랫폼에 있어서 중요한 단계이다.

[0177] 천연적으로 전문적인 식세포에 의해 가변적으로 발현된 비옵소닌 수용체는 렉틴 유사 인식 분자, 예컨대, CD169, CD33, 및 시알릴화된 잔기에 대한 관련 수용체를 포함한다. 추가로, 식세포는 덱틴-1(잘 정의된 신호전달 능력을 가진 진균 β-글루칸에 대한 수용체), 관련 C형 렉틴(예를 들면, MICL, 덱틴-2, 민클 및 DNGR-1), 및 스캐빈저 수용체의 군도 발현한다. SR-A, MARCO 및 CD36은 도메인 구조가 상이하고, 아폽토시스 리간드와 미생물 리간드의 인식이 중첩될지라도 구별된다. CD36 관련 패밀리 구성원은 아포단백질 리간드가 수용체 나선형 다발에 결합하는 반면, 그의 외면(exofacial) 도메인은 채널을 형성하고, 이 채널을 통해 콜레스테롤과 같은 지질이 막 이중층으로 전위됨을 보여주었다.

표 2

인간의 스캐빈저 수용체

유전자 명칭, 별칭	NCBI 등록 #
MSR1, SR-AI, CD204, SCARA1, SR-A1	NM_138715
대안적으로 스플라이싱된 형태의 SR-AI SR-AII SR-A1.1	NM_002445
MARCO, SCARA2, SR-A6	NM_006770
SCARA3, MSRL1, SR-A3	NM_016240
COLEC12, SCARA4, SRCLI, SRCLII, CL-P1, SR-A4	NM_130386
SCARA5, TESR, NET33 SR-A5	NM_173833
CD36 SCARB3, FAT, GPIV, PAS4 SR-B2	NM_001001548
SCARB1 SR-BI, CD36L1 SR-B1	NM_005505
CD68 gp110, SCARD1, LAMP4 SR-D1	NM_001251
OLR1 LOX-1, SCARE1, CLEC8A SR-E1	NM_002543
대안적으로 스플라이싱된 형태의 SRE-1 LOXIN SR-E1.1	NM_001172632
CLEC7A, 덱틴-1, SCARE2, CD369, SR-E2	NM_197947
CD206/MRC1, 만노스 수용체 1 SR-E3	NM_002438
ASGPR ASGR1, CLEC4H1, HL-1 SR-E4	NM_001197216
SCARF1, SREC-I, SR-F1	NM_003693
MEGF10, EMARDD, SR-F2	NM_032446
CXCL16, SR-PSOX SR-G1	NM_001100812
STAB1, FEEL-1, SR-H1	NM_015136
STAB2, FEEL-2, SR-H2	NM_017564
CD163 M130, CD163A, SR-I1	NM_004244
CD163L1 CD163B, M160 SR-I2	NM_001297650
SCART1 CD163c-a SR-I3	NR_002934.3
RAGE(막 형태) AGER SR-J1	NM_001136
RAGE(가용성 형태) AGER SR-J1.1	AB061668
CD44 Pgp-1 SR-K1	NM_000610
LRP1 A2MR, APOER, CD91 SR-L1	NM_002332
LRP2 메갈린, gp330 SR-L2	NM_004525

[0178]

SRCRB4D	NM_080744
SSC5D	NM_001144950
CD14	NM_000591
Ly75/CD205	NM_002349
CD207/란게린	NM_015717
CD209/DC-SIGN CLEC4L	NM_021155

[0179]

표 3

SR 패밀리 구성원의 선택된 리간드

SR 분자	리간드
SR-AI/II	혈청 중의 정의되지 않은 단백질, 활성화된 B 세포, β 아밀로이드 단백질, 아폽토시스성 세포 AGE 변형된 단백질 Ox-LDL, Ac-LDL, LPS, LTA, G^+ 및 G^- 세균
MARCO	비장 B 세포 폐 클라라(clara) 세포 내의 UGRP-1, Ox-LDL, Ac-LDL, G^+ 및 G^- 세균
SRCL-I/II	T 및 Tn 항원, Ox-LDL, G^+ 및 G^- 세균, 효모
LOX-1	피브로넥틴, AGE 변형된 단백질, 아폽토시스성 세포, Ox-LDL, G^+ 및 G^- 세균
SR-PSOX	케모카인 수용체, 포스파티딜 세린 CXCR6, G^+ 및 G^- 세균, 아폽토시스성 세포, Ox-LDL
FEEL-I/II	AGE 변형된 단백질, Ac-LDL, G^+ 및 G^- 세균
dSR-CI	Ac-LDL, G^+ 및 G^- 세균, 글루칸, 라미나린
CD-36	트롬보스폰딘, 콜라겐, AGE, 아폽토시스성 세포, Ox-LDL, 플라스모듐 감염된 RBC 상의 PfEMP 단백질, 세균 상의 디아실화된 지질
SR-BI	AGE 변형된 단백질, 아폽토시스성 세포 Ox-LDL
CLA-I/인간 SR-BI	아폽토시스성 세포, Ox-LDL, LPS, C 형 간염 바이러스 E2 당단백질
gp-340	계면활성제 단백질-A, 계면활성제 단백질-D, G^+ 및 G^- 세균 인플루엔자 A 바이러스, gp-120

(ND, 정의되지 않았음)

[0180]

[0181] 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 식세포작용을 위한 키메라 항원성 수용체(CAR-P)를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 식세포 수용체(PR) 융합 단백질을 코딩한다.

[0182] 일부 실시양태에서, 재조합 핵산에 의해 코딩된 CFP의 ICD는 TNFR1, CD40, MDA5, 렉틴, 덱틴 1, 만노스 수용체(CD206), 스캐빈저 수용체 A1(SRA1), MARCO, CD36, CD163, MSR1, SCARA3, COLEC12, SCARA5, SCARB1, SCARB2, CD68, OLR1, SCARF1, SCARF2, CXCL16, STAB1, STAB2, SRCRB4D, SSC5D, CD205, CD207, CD209, RAGE, CD14, CD64, F4/80, CCR2, CX3CR1, CSF1R, Tie2, HuCRIg(L) 및 CD169 수용체로 구성된 군으로부터 선택된 단백질로부터의 도메인을 포함한다.

[0183] 일부 실시양태에서, ICD는 렉틴, 덱틴 1, 만노스 수용체(CD206), 스캐빈저 수용체 A1(SRA1), MARCO(콜라겐성 구조를 가진 대식세포 수용체, 일명: SRA6, SCARA2), CD36(트롬보스폰딘 수용체, 일명: 스캐빈저 수용체 클래스 B, 구성원 3), CD163(스캐빈저 수용체, 시스테인 풍부 1형), MSR1, SCARA3, COLEC12(일명: C형 렉틴을 가진 스캐빈저 수용체, SCARA4, 또는 콜렉틴(Collectin) 12), SCARA5, SCARB1, SCARB2, CD68(SCARD, 마이크로시알린), OLR1(산화된 저밀도 지단백질 수용체 1, LOX1, 또는 C형 렉틴 도메인 패밀리 8 구성원 A), SCARF1, SCARF2, SRCRB4D, SSC5D, 및 CD169(일명, 시알로어드헤신 수용체, SIGLEC1) 중 어느 하나 이상으로부터 유래한 신호전달 도메인을 포함한다.

[0184] 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 예를 들면, 인간 MARCO의 세포내 도메인을 코딩한다. PR 서브유닛은 아미노산 서열 MRNKKILKEDELLSETQQAAFHQIAMEPFEINVPKPKRRNGVNF(서열번호 36)를 가진 인간 MARCO의 44개 아미노산 ICD를 가진 세포내 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, PR 서브유닛은 MARCO의 세포내 도메인과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한 변이체를 포함한다. 일부 실시양태에서, PR은 인간 MARCO의 막횡단 영역을 포함한다.

[0185] 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 인간 SRA1의 세포내 도메인을 코딩한다. CFP는 아미노산 서열

MEQWDHFHNQQEDTDSCSESVKFDARSMTALLPPNPKNSPSLQEKLKSFK(서열번호 37)를 가진 인간 SRA1의 50개 아미노산 ICD를 가진 세포내 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, PR 서브유닛은 인간 SRA1의 세포내 도메인과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한 변이체를 포함한다. SRA의 세포내 영역은 인산화 부위를 가진다.

[0186] 일부 실시양태에서, CFP는 인간 SRA1의 막횡단 영역을 포함한다.

[0187] 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 CD36의 세포내 도메인을 코딩하는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 CD36의 TM 도메인을 코딩하는 서열을 포함한다. 천연 생성 전체 길이 CD36은 2개의 TM 도메인 및 2개의 짧은 세포내 도메인을 갖고, CD36의 세포외 도메인은 산화된 LDL에 결합한다. 세포내 도메인들 둘 다가 아실화된 지방산인 시스테인의 쌍을 함유한다. 이것은 공지된 신호전달 도메인(예를 들면, 키나제, 포스파타제, g-단백질 결합 또는 스카폴딩 도메인)을 결여한다. N-말단 세포질 도메인은 매우 짧고(5개 내지 7개의 아미노산 잔기) 원형질막의 내부 소엽과 밀접히 관련되어 있다. 카르복시 말단 도메인은 신호전달 분자와 상호작용하는 것으로 공지되어 있는, CD4 및 CD8의 세포내 도메인 내의 영역과 상동한 CXCX5K 모티프를 함유하는 13개의 아미노산을 함유한다. CD36의 세포내 도메인은 lyn 키나제, MAP 키나제 및 국소 부착 키나제(FAK)를 활성화시키는 신호전달 복합체를 조립할 수 있고, src 상동성 2 함유 포스포티로신 포스파타제(SHP-2)를 불활성화시킬 수 있다. 구아닌 뉴클레오타이드 교환 인자(GEF)의 구성원은 잠재적 핵심 신호전달 중간체로서 확인되었다.

[0188] 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 예를 들면, 인간 SCARA3의 세포내 도메인을 코딩한다. CFP는 아미노산 서열 MKVRSAGGDGDALCVTEEDLAGDDEDMPTFPCTQKGRPGPRCSRCQKNLSLHTSVR(서열번호 38)을 가진 인간 SCARA3의 56개 아미노산 ICD를 가진 세포내 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, CFP는 인간 SCARA3의 세포내 도메인과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일한 변이체를 포함한다. 일부 실시양태에서, CFP는 SCARA3의 TM 도메인을 포함한다.

[0189] 일부 실시양태에서, PR의 TM 도메인은 길이가 약 20개 내지 30개 아미노산이다. 일부 실시양태에서, TM 도메인은 다수의 막횡단 영역들을 포함한다. 일부 실시양태에서, TM 도메인은 길이가 약 20개 내지 30개, 30개 내지 40개, 40개 내지 50개, 50개 내지 60개, 60개 내지 70개, 70개 내지 80개, 80개 내지 90개, 90개 내지 100개, 100개 내지 150개, 또는 더 많은 수의 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, SR의 TM 도메인은 길이가 약 20개 내지 30개 아미노산이다.

[0190] 스캐빈저 수용체는 동종이량체 또는 이종이량체로서 존재할 수 있다. 예를 들면, MARCO는 동종삼량체로서 존재한다. 일부 실시양태에서, 스캐빈저 수용체는 단량체이다. 일부 실시양태에서, 스캐빈저 수용체는 동종이량체이다. 일부 실시양태에서, 스캐빈저 수용체는 이종이량체이다. 일부 실시양태에서, 스캐빈저 수용체는 동종삼량체이다. 실시양태에서, 스캐빈저 수용체는 이종삼량체이다. 일부 실시양태에서, 스캐빈저 수용체는 동종사량체이다. 일부 실시양태에서, 스캐빈저 수용체는 이종사량체이다. 일부 실시양태에서, 스캐빈저 수용체는 동일하거나 상이한 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개 이상의 서브유닛을 포함하는 다량체이다.

[0191] 일부 실시양태에서, PSP의 TM 도메인 또는 ICD 도메인은 FcR, Megf10, Bai1 또는 MerTK로부터 유래하지 않는다. 일부 실시양태에서, PR의 ICD는 CD3 제타 세포내 도메인을 포함하지 않는다.

[0192] 일부 실시양태에서, 세포내 도메인 및 막횡단 도메인은 FcRβ로부터 유래한다.

[0193] 한 양태에서, 재조합 핵산은 (a) 표적 세포의 항원에 특이적인 세포외 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인, (b) 막횡단 도메인, 및 (c) 식세포 수용체로부터 유래한 제1 부분 및 비-식세포 수용체로부터 유래한 제2 부분을 포함하는 재조합 PSR 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 식세포 스캐빈저 수용체(PSR) 융합 단백질(PFP)인, 증강된 식세포작용을 위한 키메라 항원성 수용체(CAR-P)를 코딩한다.

[0194] 일부 실시양태에서, 제2 부분은 PI3K 동원 도메인이 아니다.

[0195] 비-식세포 수용체로부터 유래한 제2 부분은 재조합 핵산을 발현하는 조작된 골수 세포, 예컨대, 식세포성 세포의 식세포작용 및/또는 염증 잠재력을 증강시키는 세포내 신호전달 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-식세포 수용체로부터 유래한 제2 부분은 하나 초과의 세포내 도메인(ICD)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 비-식세포 수용체로부터 유래한 제2 부분은 제2 ICD를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비-식세포 수용체로부터 유래한 제2 부분은 제2 ICD 및 제3 ICD를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비-식세포 수용체로부터 유래한 제2 부분은 제2 ICD, 제3 ICD 및 제4 ICD를 포함하고, 이때 제2 부분은 재조합 핵산에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 세포내 부분은 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 또는 7개 이상의 ICD를 포함한다. 비-식세포 수용체로부터 유래한 제2, 제3 또는 제4 ICD를 포함하는 각각의 제2 부분은 다음과 같이 기재된다.

[0196] *세포내 신호전달 및 염증 활성화를 증강시키기 위한 키메라 항원 수용체*

[0197] 한 양태에서, 재조합 핵산은 식세포 ICD 이외에, 예컨대, 대식세포와 같은 골수 세포가 감염과 싸우는 데 개입할 때 강력한 염증유발 면역 활성화 능력을 부여하는 제2 세포내 도메인을 코딩한다. 제2 세포내 도메인(제2 ICD)은 제1 식세포 ICD의 세포질 말단에 융합된다. 제2 세포내 도메인은 인플라마좀(inflammasome) 및 염증유발 신호를 유발하는 데 필요한 제2 신호를 제공한다. 노드(Nod) 유사 수용체(NLR)는 선천성 면역 반응에서 활성화되고 올리고머화되어, 염증유발 캐스파제를 동원하고 그의 절단 및 활성화를 유도하는 플랫폼으로서 사용되는 다중단백질 복합체를 형성하는 수용체의 서브세트이다. 이것은 ROS의 직접적인 활성화를 유발하고, 종종 피롭토시스로서 공지되어 있는 격렬한 세포 사멸을 초래한다. 4종의 인플라마좀 복합체 NLRP1m, NLRP3, IPAF 및 AIM2가 있다.

[0198] 종양 미세환경(TME)은 면역억제 환경을 구성한다. IL-10, 글루코코르티코이드 호르몬, 아폽토시스성 세포 및 면역 복합체의 영향은 선천성 면역 세포 기능을 방해할 수 있다. 식세포성 세포를 비롯한 면역 세포는 면역관용 표현형으로 자리 잡는다. 대식세포와 같은 골수 세포에서, 통상적으로 M2 표현형으로서 공지되어 있는 이 표현형은 세포가 강력하고 병원체를 사멸시킬 수 있는 M1 표현형과 구별된다. 예를 들면, LPS 또는 IFNγ에 노출된 대식세포와 같은 골수 세포는 M1 표현형을 향해 분극화할 수 있는 반면, IL-4 또는 IL-13에 노출된 대식세포와 같은 골수 세포는 M2 표현형을 향해 분극화할 수 있다. LPS 또는 IFNγ는 대식세포와 같은 골수 세포의 표면 상의 Toll 유사 수용체 4(TLR4)와 상호작용하여, Trif 및 MyD88 경로를 유도하고 전사 인자 IRF3, AP-1 및 NFKB의 활성화를 유도함으로써, 염증유발 M1 골수 세포 반응을 위해 TNF 유전자, 인터페론 유전자, CXCL10, NOS2, IL-12 등을 활성화시킬 수 있다. 유사하게, IL-4 및 IL-13은 IL-4R에 결합하여, 소염 반응(M2 반응)과 관련된 유전자인 CCL17, ARG1, IRF4, IL-10, SOCS3 등의 발현을 조절하는 Jak/Stat6 경로를 활성화시킨다. CD14, CD80, D206의 발현, 및 CD163의 낮은 발현은 M1 표현형을 향한 골수 세포, 예컨대, 대식세포 분극화의 지표이다.

[0199] 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 염증 반응을 위한 세포질 도메인을 포함하는 하나 이상의 추가 세포내 도메인을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 조작된 골수 세포, 예컨대, 대식세포에서 염증 반응을 위한 세포질 도메인을 포함하는 식세포 수용체(PR) 융합 단백질(PFP)을 코딩하는 재조합 핵산의 발현은 M1 표현형과 유사한 강력한 염증유발 반응을 부여한다.

[0200] 일부 실시양태에서, 염증 반응을 위한 세포질 도메인은 TLR3, TLR4, TLR9, MYD88, TRIF, RIG-1, MDA5, CD40, IFN 수용체, NLRP-1, NLRP-2, NLRP-3, NLRP-4, NLRP-5, NLRP-6, NLRP-7, NLRP-8, NLRP-9, NLRP-10, NLRP-11, NLRP-12, NLRP-13, NLRP-14, NOD1, NOD2, 피린, AIM2, NLRC4 및/또는 CD40의 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.

[0201] 일부 실시양태에서, 식세포 스캐빈저 수용체(PR) 융합 단백질(PFP)은 IL-1 신호전달 캐스케이드의 활성화를 위한 염증유발 세포질 도메인을 포함한다.

[0202] 일부 실시양태에서, 키메라 수용체(예를 들면, 식세포 수용체(PR) 융합 단백질(PFP))의 세포질 부분은 toll 유사 수용체로부터의 세포질 도메인, 예컨대, toll 유사 수용체 3(TLR3), toll 유사 수용체 4(TLR4), toll 유사 수용체 7(TLR7), toll 유사 수용체 8(TLR8), toll 유사 수용체 9(TLR9)의 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.

[0203] 일부 실시양태에서, 키메라 수용체의 세포질 부분은 인터류킨-1 수용체 관련 키나제 1(IRAK1)로부터의 적합한 영역을 포함한다.

[0204] 일부 실시양태에서, 키메라 수용체의 세포질 부분은 분화 일차 반응 단백질(MYD88)로부터의 적합한 영역을 포함한다.

[0205] 일부 실시양태에서, 키메라 수용체의 세포질 부분은 미엘린 및 림프구 단백질(MAL)로부터의 적합한 영역을 포함한다.

[0206] 일부 실시양태에서, 키메라 수용체의 세포질 부분은 레티노산 유도성 유전자(RIG-1)로부터의 적합한 영역을 포함한다.

[0207] 일부 실시양태에서, CFP의 세포질 부분은 MYD88, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9, MAL 또는 IRAK1 중 어느 하나의 세포질 도메인을 포함한다.

[0208] 일부 실시양태에서, 재조합 CFP 세포내 신호전달 도메인은 식세포 수용체로부터 유래한 제1 부분 및 비-식세포 수용체로부터 유래한 제2 부분을 포함하고, 이때 비-식세포 수용체로부터 유래한 제2 부분은 인산화 부위를 포

함한다. 일부 실시양태에서, 인산화 부위는 자가인산화 부위에 적합한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인산화 부위는 Src 패밀리 키나제에 의한 인산화에 적합한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인산화 부위는 인산화 시 키나제의 SH2 도메인에 결합할 수 있는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 수용체 티로신 키나제 도메인은 제1 세포질 부분 이외에 PFP의 세포질 말단에서 융합된다.

[0209] 일부 실시양태에서, 인산화는 티로신 인산화이다.

[0210] 일부 실시양태에서, 제2 세포내 도메인은 면역 수용체 티로신 활성화 모티프(ITAM)이다. ITAM 모티프는 포유동물 α 및 β 면역글로불린 단백질, TCRɣ 수용체, FCRɣ 수용체 서브유닛, CD3 쇄 수용체 및 NFAT 활성화 분자에 존재한다.

[0211] 일부 실시양태에서, PFP 세포내 도메인은 1개의 ITAM 모티프를 포함한다. 일부 실시양태에서, PFP 세포내 도메인은 1개 초과의 ITAM 모티프를 포함한다. 일부 실시양태에서, PFP 세포내 도메인은 2개 이상의 ITAM 모티프를 포함한다. 일부 실시양태에서, PFP 세포내 도메인은 3개 이상의 ITAM 모티프를 포함한다. 일부 실시양태에서, PFP 세포내 도메인은 4개 이상의 ITAM 모티프를 포함한다. 일부 실시양태에서, PFP 세포내 도메인은 5개 이상의 ITAM 모티프를 포함한다. 일부 실시양태에서, PFP 세포내 도메인은 6개 이상의 ITAM 모티프를 포함한다. 일부 실시양태에서, PFP 세포내 도메인은 7개 이상의 ITAM 모티프를 포함한다. 일부 실시양태에서, PFP 세포내 도메인은 8개 이상의 ITAM 모티프를 포함한다. 일부 실시양태에서, PFP 세포내 도메인은 9개 이상의 ITAM 모티프를 포함한다. 일부 실시양태에서, PFP 세포내 도메인은 10개 이상의 ITAM 모티프를 포함한다.

[0212] 일부 실시양태에서, 제1 식세포 ICD 내의 하나 이상의 도메인은 돌연변이를 포함한다.

[0213] 일부 실시양태에서, 제2 ICD 내의 하나 이상의 도메인은 키나제 결합 도메인의 증강, 인산화 부위의 생성, SH2 도킹 부위의 생성 또는 이들의 조합을 위한 돌연변이를 포함한다.

[0214] *염증 유전자의 공발현*

[0215] 한 양태에서, 재조합 핵산은 조작된 세포에서 PFP와 공발현되는, 염증유발 유전자에 대한 코딩 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 염증유발 유전자는 사이토카인이다. 예는 TNF-α, IL-1α, IL-1β, IL-6, CSF, GMCSF, IL-12 또는 인터페론을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다.

[0216] 염증유발 유전자를 코딩하는 재조합 핵산은 모노시스트론성 핵산일 수 있고, 이때 (a) PSP 및 (b) 염증유발 유전자에 대한 2개의 코딩 서열들은 독립적인 발현을 위해 전사 후 또는 번역 후 절단된다.

[0217] 일부 실시양태에서, 2개의 코딩 서열들은 예를 들면, P2A 서열을 코딩하는 자가 절단 도메인을 포함한다.

[0218] 일부 실시양태에서, 2개의 코딩 영역들은 IRES 부위에 의해 분리된다.

[0219] 일부 실시양태에서, 2개의 코딩 서열들은 바이시스트론성 유전적 요소에 의해 코딩된다. (a) PSP 및 (b) 염증유발 유전자에 대한 코딩 영역은 일방향성을 가질 수 있고, 이때 각각은 별개의 조절 제어 하에 있다. 일부 실시양태에서, 이들 둘 다에 대한 코딩 영역은 이방향성을 갖고 반대 방향으로 유도한다. 각각의 코딩 서열은 별개의 조절 제어 하에 있다.

[0220] 염증유발 유전자의 공발현은 대식세포와 같은 골수 세포의 강한 염증 자극을 부여하고 염증을 위해 주변 조직을 활성화시키도록 디자인된다.

[0221] *인테그린 활성화 도메인*

[0222] 세포-세포 및 세포-기층 부착은 인테그린 세포외 도메인과 다양한 단백질 리간드들의 결합에 의해 매개되나; 이 부착 상호작용의 세포 제어 및 동력학적 세포 반응, 예컨대, 세포 퍼짐 또는 이동으로의 그의 해석은 인테그린 세포질 꼬리를 요구한다. 이 짧은 꼬리는 수용체를 신호전달 경로 및 세포골격 네트워크에 연결하는 세포내 리간드에 결합한다(전체적으로 본원에 참고로 포함된 문헌[Calderwood DA, 2004, Integrin Activation, Journal of Cell Science 117, 657-666]). 인테그린은 α 서브유닛과 β 서브유닛의 비공유 회합에 의해 형성된 이종이량체성 부착 수용체이다. β4 서브유닛을 제외한 각각의 서브유닛은 비교적 큰 세포외 도메인 및 짧은 세포질 꼬리를 가진 I형 막횡단 당단백질이다. 개별 인테그린 패밀리 구성원은 다수의 리간드들을 인식하는 능력을 가진다. 인테그린은 다수의 세포외 매트릭스 단백질들(골 매트릭스 단백질, 콜라겐, 피브로넥틴, 피브리노겐, 라미닌, 트롬보스폰딘, 비트로넥틴 및 본 빌레브란트 인자)에 결합할 수 있는데, 이것은 세포외 매트릭스에의 세포 부착에 있어서 인테그린의 일차 기능을 반영한다. 많은 "반대-수용체들"은 리간드인데, 이것은 세포-세포 상호작용을 매개함에 있어서 인테그린의 역할을 반영한다. 인테그린은 리간드 친화성을 증가시키기 위해 입체구조

적 변화를 겪는다.

[0223] 인테그린 β_2 수퍼패밀리는 4종의 상이한 인테그린 수용체들, 즉 $\alpha_M\beta_2$(CD11b/CD18, Mac-1, CR3, Mo-1), $\alpha_L\beta_2$(CD11a/CD18, LFA-1), $\alpha_X\beta_2$(CD11c/CD18) 및 $\alpha_D\beta_2$(CD11d/CD18)로 구성된다. 이 백혈구 인테그린들은 면역 반응, 내피에의 부착 및 내피를 통한 횡단이동, 병원체의 식세포작용 및 백혈구 활성화를 포함하는, 백혈구 기능의 사실상 모든 양태에 관여한다.

[0224] 모든 β_2 인테그린들의 α 서브유닛은 I 또는 A 도메인으로서 지칭되는, 약 200개 아미노산의 삽입된 영역을 함유한다. 고도로 보존된 I 도메인은 여러 다른 인테그린 α 서브유닛들 및 다른 단백질, 예컨대, 특정 응고 및 보체 단백질에서 발견된다. I 도메인은 단백질-단백질 상호작용을 매개하고, 인테그린에서 이 도메인은 단백질 리간드의 결합에 통합적으로 관여한다. I 도메인이 그의 인테그린의 리간드 결합 기능을 지배하지만, α 서브유닛의 다른 영역은 리간드 인식에 영향을 미친다. 예로서, $\alpha_M\beta_2$에서는 I 도메인 외부의 에피토프를 인식하나 α_M 서브유닛에서는 이러한 에피토프를 인식하지 않는 mAb(OKM1)는 리간드 결합을 억제하고; 그 자신의 α 서브유닛 내에 I 도메인을 가진 인테그린인 $\alpha_L\beta_2$ 및 $\alpha_2\beta_1$에서 EF-핸드 영역은 리간드 인식에 기여한다. α_M 서브유닛 및 아마도 다른 α 서브유닛은 비-단백질 리간드의 개입에 관여하는 렉틴 유사 도메인을 함유하고, 점유는 I 도메인의 기능을 조절할 수 있다.

[0225] 인테그린은 효소 활성을 결여하기 때문에, 신호전달은 원형질막의 세포질 면 상에서의 신호전달 복합체의 조립에 의해 유도된다. 이 복합체의 형성은 2가지 방식으로 달성된다: 첫째, 분자 상호작용의 결합력을 증가시킴으로써 이펙터 분자의 결합 속도를 증가시키는 수용체 클러스터링, 및 둘째, 이펙터 결합 부위를 생성하거나 노출시키는 수용체의 입체구조적 변화의 유도. ECM 내에서, 인테그린은 피브로넥틴, 라미닌, 콜라겐, 테나신, 비트로넥틴 및 트롬보스폰딘에 결합하는 능력을 가진다. 인테그린/ECM 상호작용의 클러스터는 국소 부착을 형성하여, 세포 내에서 세포골격 성분 및 신호전달 분자를 집중시킨다. 인테그린의 세포질 꼬리는 F-액틴을 막에 고착시키는 데 관여하는 단백질인 빈쿨린(vinculin)을 동원하는 α-액티닌(actinin) 및 탈린(talin)에 대한 결합 부위로서 작용한다. 탈린은 단백질 키나제 C(PKCα)와 같은 키나제에 의해 활성화된다.

[0226] 인테그린은 셀렉틴에 의해 활성화된다. 백혈구는 L-셀렉틴을 발현하고, 활성화된 혈소판은 P-셀렉틴을 발현하고, 활성화된 내피 세포는 E-셀렉틴 및 P-셀렉틴을 발현한다. P-셀렉틴 매개 부착은 부착을 안정화시키는, 케모카인 또는 혈소판 활성화 인자에 의해 유발된 β2 인테그린 활성화를 가능하게 한다. 이것은 또한 부착 백혈구로부터의 케모카인의 방출을 용이하게 한다. P-셀렉틴 당단백질 리간드 1의 세포질 도메인은 Nef 관련 인자 1과 함께 구성 복합체를 형성하였다. P-셀렉틴의 결합 후, Src 키나제는 포스파이노시타이드-3-OH 키나제 p85-p110δ 이종이량체를 동원하고 백혈구 인테그린의 활성화를 야기하는 Nef 관련 인자 1을 인산화한다. E-셀렉틴 리간드는 β2 인테그린 기능에도 영향을 미치는 신호를 전달도입한다. 셀렉틴은 Src 패밀리 키나제의 활성화를 유발한다. 셀렉틴 개입에 의해 활성화된 SFK는 DAP12 및 FcRγ의 세포질 도메인에서 면역수용체 티로신 기반 활성화 모티프(ITAM)를 인산화한다. 일부 경우, CD44는 E-셀렉틴으로부터 신호를 전달도입하기에 충분하다. CD44는 인테그린의 내부-외부 신호전달을 유발한다. 인테그린 활성화에 있어서 최종 공통 단계는 탈린과 β 서브유닛의 세포질 꼬리의 결합이다. 세포질 어댑터의 또 다른 군인 킨들린(Kindlin)은 인테그린 β 꼬리의 상이한 영역에 결합한다. 킨들린은 탈린에 의해 활성화된 인테그린의 클러스터링을 증가시킨다. 킨들린은 셀렉틴 신호전달에 반응하나, 킨들린은 주로 호중구와 같은 조혈 세포에서 발견된다. 케모카인 성분에 의한 인테그린 활성화 시 신호전달뿐만 아니라 셀렉틴 신호전달도 SFK, Syk 및 SLP-76을 비롯한 공유된 성분들을 가진다.

[0227] 일부 실시양태에서, 재조합 CFP의 세포내 도메인은 인테그린 활성화 도메인을 포함한다. 인테그린 활성화 도메인은 셀렉틴, 예를 들면, P-셀렉틴, L-셀렉틴 또는 E-셀렉틴의 세포내 도메인을 포함한다.

[0228] 일부 실시양태에서, 재조합 CFP의 세포내 도메인은 라미닌의 인테그린 활성화 도메인을 포함한다.

[0229] 일부 실시양태에서, 재조합 CFP의 세포내 도메인은 탈린의 활성화를 위한 인테그린 활성화 도메인을 포함한다.

[0230] 일부 실시양태에서, 재조합 CFP의 세포내 도메인은 식세포 수용체 ICD 도메인의 세포질 말단에 융합된 인테그린 활성화 도메인을 포함한다.

[0231] *항원 교차 제시를 증강시키기 위한 키메라 수용체*

[0232] 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 항원의 교차 제시를 가능하게 할 수 있는 도메인을 코딩한다. 일반적으로,

MHC 클래스 I 분자는 세포 내에서 합성된 자가 또는 병원체 유래 항원을 제시하는 반면, 엔도사이토시스 흡수를 통해 유래한 외생성 항원은 CD4+ T 세포에의 제시를 위해 MHC 클래스 II 분자 상에 로딩된다. 펩타이드가 프로테아좀에 의해 생성되는, 내생성 항원의 MHC I-제한된 제시. 그러나, 일부 경우, DC는 CD8+ T 세포에의 제시를 위해 외생성 항원을 MHC-I 경로 내로 프로세싱할 수 있다. 이것은 항원의 교차 제시로서 지칭된다. 가용성 또는 외생성 항원성 성분은 엔도사이토시스 경로를 따르는 대신에 액포 내의 라이소좀 단백질분해효소에 의해 분해되고 DC에 의해 교차 제시될 수 있다. 일부 경우, 열충격 단백질 90(Hsp90)과 같은 샤페론은 특정 APC를 통해 항원을 교차 제시하는 데 도움을 주는 것으로 확인되었다. HSP-펩타이드 복합체는 유리 폴리펩타이드에 비해 수용체들의 상이한 군에 의해 내재화되는 것으로 공지되어 있다. 이 수용체들은 스캐빈저 수용체 패밀리로부터의 수용체이었고 LOX-1, SREC-I/SCARF-I 및 FEEL1/스타빌린(Stabilin)-1을 포함하였다. SREC-I 및 LOX-1은 둘 다 분자 샤페론에 결합된 항원의 교차 제시를 매개하고 $CD8^+$ T 림프구의 활성화를 유발하는 것으로 밝혀졌다.

[0233] SREC-1(내피 세포에 의해 발현된 스캐빈저 수용체)은 다른 유형의 스캐빈저 수용체와 유의미한 상동성을 갖지 않으나 독특한 도메인 구조를 가진다. 이것은 세포외 도메인 내에 EGF 유사 시스테인 풍부 모티프의 10개 반복부를 함유한다. 최근에, SREC-I의 구조는 아폽토시스성 세포를 인식하는 세포 표면 식세포 수용체로서 작용하는, 캐노랍디티스 엘레간스(*Caenorhabditis elegans*) 유전자 *ced-I*에 의해 코딩된 16개의 EGF 유사 반복부를 가진 막횡단 단백질의 구조와 유사한 것으로 확인되었다.

[0234] 클래스-I MHC 경로를 통한 암 항원의 교차 제시는 세포독성과 관련되어 있으므로 종양 퇴행에 유리한 CD8+ T 세포 반응을 증강시킨다. 일부 실시양태에서, PFP의 세포내 도메인은 SREC1 세포내 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, PFP의 세포내 도메인은 SRECII 세포내 도메인을 포함한다.

[0235] 일부 실시양태에서, CFP는 SREC1 또는 SRECII로부터의 PSR 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함한다.

[0236] 일부 실시양태에서, CFP는 (i) 막횡단 도메인, 및 (ii) SREC1 또는 SRECII로부터의 CFP 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함한다.

[0237] 일부 실시양태에서, CFP는 (i) 막횡단 도메인, (ii) 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인, 및 (iii) SREC1 또는 SRECII로부터의 세포외 도메인을 포함한다.

[0238] *PFP 융합 단백질의 막횡단 도메인*

[0239] 일부 실시양태에서, 재조합 핵산에 의해 코딩된 TM은 스캐빈저 수용체(SR)의 도메인을 코딩하는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, TM은 렉틴, 덱틴 1, 만노스 수용체(CD206), SRA1, MARCO, CD36, CD163, MSR1, SCARA3, COLEC12, SCARA5, SCARB1, SCARB2, CD68, OLR1, SCARF1, SCARF2, SRCRB4D, SSC5D 및 CD169 중 어느 하나 이상의 단백질의 TM 도메인일 수 있거나 이러한 단백질로부터 유래할 수 있다.

[0240] 일부 실시양태에서, TM 도메인은 길이가 약 20개 내지 30개 아미노산이다. SR의 TM 도메인은 길이가 약 20개 내지 30개 아미노산이다.

[0241] 일부 실시양태에서, CFP의 TM 도메인 또는 ICD 도메인은 Megf10, Bai1 또는 MerTK로부터 유래하지 않는다. 일부 실시양태에서, CFP의 ICD는 CD3ζ 세포내 도메인을 포함하지 않는다.

[0242] 일부 실시양태에서, TM은 ICD와 동일한 식세포 수용체로부터 유래한다.

[0243] 일부 실시양태에서, TM 영역은 원형질막 단백질로부터 유래한다. TM은 Fc 수용체(FcR)로부터 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, 특이적 FcR로부터의 도메인을 코딩하는 핵산 서열은 재조합 구축물의 세포 특이적 발현에 사용된다. TM 도메인을 포함하는 FCR-알파 영역은 구축물의 골수 세포, 예컨대, 대식세포 특이적 발현에 사용될 수 있다. FcRα 재조합 단백질은 비만 세포에서 발현될 수 있다.

[0244] 일부 실시양태에서, PFP는 FcRβ의 TM을 포함한다.

[0245] 일부 실시양태에서, PFP는 FcRβ 및 ICD 도메인 둘 다를 포함한다. 일부 실시양태에서, PFP는 FcRα 및 ICD 도메인 둘 다를 포함한다.

[0246] 일부 실시양태에서, TM 도메인은 CD8로부터 유래한다.

[0247] 일부 실시양태에서, TM은 CD2로부터 유래한다.

[0248] 일부 실시양태에서, TM은 FcRα로부터 유래한다.

[0249] *PFP 융합 단백질의 세포외 도메인*

[0250] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 PFP 융합 단백질의 세포외 도메인은 하나 이상의 표적에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함한다. 결합 표적은 항원 또는 리간드일 수 있다. 예를 들면, 결합 표적은 표적 세포 상의 항원일 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 결합 도메인은 표적에 특이적이다. 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 인트라바디, 펩티바디, 나노바디, 단일 도메인 항체, SMIP 및 다중특이적 항체로부터 선택된 항체 또는 항원 결합 도메인을 포함할 수 있다.

[0251] 일부 실시양태에서, 항체 단편은 온전한 항체의 부분, 예컨대, 온전한 항체의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함한다. 본 발명의 추가 양태에서, 상기 실시양태들 중 임의의 실시양태에 따른 항-HIV 항체는 키메라 항체, 인간화된 항체 또는 인간 항체를 비롯한 단일클론 항체이다. 항체 단편은 Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, Fv, 디아바디, 선형 항체, 항체 단편 항체 및 scFv 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체, 및 이하에 기재된 다른 단편을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 전체 길이 항체, 예를 들면, 온전한 IgG1 항체, 또는 본원에 기재된 다른 항체 클래스 또는 이소타입이다(예를 들면, 문헌[Hudson et al. Nat. Med. 9:129-134 (2003)]; 문헌[Pluckthiin, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, pp. 269-315 (1994)]; 문헌[Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)]; 국제 특허출원 공개 제WO93/01161호; 및 미국 특허 제5,571,894호, 제5,869,046호, 제6,248,516호 및 제5,587,458호 참조). 전체 길이 항체, 온전한 항체 또는 전체 항체는 천연 항체 구조와 실질적으로 유사한 구조를 갖거나 본원에서 정의된 Fc 영역을 함유하는 중쇄를 가진 항체이다. 항체 단편은 본원에 기재된 바와 같이 온전한 항체의 단백질용해성 분해뿐만 아니라 재조합 숙주 세포(예를 들면, 이. 콜라이 또는 파지)에 의한 생성도 포함하나 이들로 제한되지 않는 다양한 기법들에 의해 제조될 수 있다.

[0252] Fv는 완전한 항원 인식 및 항원 결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 이 단편은 단단히 비공유적으로 회합된 1개의 중쇄 및 1개의 경쇄 가변 영역 도메인의 이량체를 함유한다. 이 2개의 도메인들의 접힘으로부터, 항원 결합을 위한 아미노산 잔기를 기여하고 항원 결합 특이성을 항체에 부여하는 6개의 초가변 루프(H 및 L 쇄로부터 각각 3개의 루프)가 나온다. 그러나, 단일 가변 영역(또는 항원에 특이적인 3개의 CDR만을 포함하는 Fv의 절반) 조차도 전체 결합 부위보다 더 낮은 친화성을 갖지만 항원을 인식하고 항원에 결합하는 능력을 가진다.

[0253] 단일 쇄 Fv(sFv 또는 scFv)는 단일 폴리펩타이드 쇄로 연결된 V_H 및 V_L 항체 도메인을 포함하는 항체 단편이다. sFv 폴리펩타이드는 sFv가 항원 결합을 위해 원하는 구조를 형성할 수 있게 하는, V_H 도메인과 V_L 도메인 사이의 폴리펩타이드 링커도 포함할 수 있다(예를 들면, 문헌[Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]; 및 하기 문헌[Borrebaeck 1995] 참조). sFv는 키메라 항원 수용체(CAR)에 사용될 수 있다.

[0254] 디아바디는 V 도메인들의 쇄간 페어링(그러나, 쇄내 페어링은 아님)이 달성되어, 2가 단편을 생성하도록 V_H 도메인과 V_L 도메인 사이에 짧은 링커(약 5개 내지 10개 잔기)를 가진 sFv 단편을 구축함으로써 제조된 작은 항체 단편이다. 이중특이적 디아바디는 2개의 항체들의 V_H 및 V_L 도메인이 상이한 폴리펩타이드 쇄에 존재하는, 2개의 교차형 sFv 단편의 이종이량체이다(예를 들면, 유럽 특허 제404,097호; 국제 특허출원 공개 제WO 93/11161호; 및 문헌[Hollinger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)] 참조).

[0255] 완전히 인간 형태로 생성될 수 있는 도메인 항체(dAb)는 약 11 kDa부터 약 15 kDa에 이르는, 항체의 가장 작은 공지된 항원 결합 단편이다. DAb는 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄(각각 V_H 및 V_L)의 강력한 가변 영역이다. 이들은 미생물 세포 배양물에서 고도로 발현되고, 예를 들면, 가용성 및 온도 안정성을 포함하나 이들로 제한되지 않는 유리한 생체물리학적 성질을 보이고, 시험관내 선택 시스템, 예를 들면, 파지 디스플레이에 의한 선택 및 친화성 성숙에 매우 적합하다. DAb는 단량체로서 생체활성을 띠고, 그의 작은 크기 및 본질적인 안정성 때문에 더 큰 분자로 포맷팅되어, 연장된 혈청 반감기 또는 다른 약리학적 활성을 가진 약물을 생성할 수 있다(예를 들면, 국제 특허출원 공개 제WO9425591호 및 미국 특허출원 공개 제US20030130496호 참조).

[0256] Fv 및 sFv는 불변 영역을 결여하는 온전한 조합 부위를 가진 유일한 종이다. 따라서, 이들은 생체내 사용 동안 감소된 비특이적 결합에 적합하다. sFv 융합 단백질은 sFv의 아미노 또는 카르복시 말단에서 이펙터 단백질의 융합체를 생성하도록 구축될 수 있다. 항체 단편은 "선형 항체"일 수도 있다(예를 들면, 미국 특허 제5,641,870

호 참조). 이러한 선형 항체 단편은 단일특이적 또는 이중특이적 항체 단편일 수 있다.

[0257] 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 Fab 결합 도메인을 포함한다. 다른 이러한 실시양태에서, 세포외 도메인은 scFv를 포함한다.

[0258] 일부 실시양태에서, 키메라 항원 수용체는 항원 결합 단편(Fab), 단일 쇄 가변 단편(scFv), 나노바디, V_H 도메인, V_L 도메인, 단일 도메인 항체(sdAb), VNAR 도메인 및 V_{HH} 도메인, 이중특이적 항체, 디아바디, 또는 이들 중 임의의 것의 기능적 단편으로 구성된 군으로부터 유래한 세포외 항원 결합 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 단편(Fab), 단일 쇄 가변 단편(scFv), 나노바디, V_H 도메인, V_L 도메인, 단일 도메인 항체(sdAb), VNAR 도메인 및 V_{HH} 도메인, 이중특이적 항체, 디아바디, 또는 이들 중 임의의 것의 기능적 단편은 하나 이상의 항원에 특이적으로 결합한다.

[0259] 일부 실시양태에서, 항원은 암 항원이고, 표적 세포는 표적 암 세포이다. 일부 실시양태에서, 표적 세포에 대한 항원은 CD3, CD4, CD5, CD7, CD19, CCR2, CCR4, CD30, CD37, TCRB1/2, TCRαβ, TCRαδ, CD22, HER2(ERBB2/neu), 메소텔린, PSCA, CD123, CD30, CD171, CD138, CS-1, CLECL1, CD33, CD79b, EGFRvIII, GD2, GD3, BCMA, PSMA, ROR1, FLT3, TAG72, CD38, CD44v6, CEA, EPCAM, B7H3(CD276), KIT(CD 117), CD213A2, IL-1 IRa, PRSS21, VEGFR2, CD24, MUC-16, PDGFR-β, SSEA-4, CD20, MUC1, EGFR, NCAM, 프로스타제, PAP, ELF2M, 에프린(Ephrin) B2, FAP, EphA2, GM3, TEM1/CD248, TEM7R, CLDN6, TSHR, GPRC5D, CD97, CD179a, ALK 및 IGLL1로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0260] 일부 실시양태에서, 표적 항원은 자가면역 항원이다. 일부 실시양태에서, 표적 세포는 B 세포이다. 일부 실시양태에서, 표적 세포는 자가항체를 생성하는 B 세포이다. 일부 실시양태에서, 표적 항원은 Dsg1 또는 Dsg3이다.

[0261] 다양한 암 항원 표적들은 당분야에서 숙련된 자에게 공지되어 있는 암 항원들로부터 선택될 수 있다. 관련된 암 및 세포 유형에 따라, 암 항원은 돌연변이된 천연 단백질이다. 항원 결합 도메인은 돌연변이된/암 항원에 대한 특이성에 대해 스크리닝되고 천연 항원이 아니다.

[0262] 일부 실시양태에서, 예를 들면, 표적 암 세포에 대한 암 항원은 돌연변이된/암 항원들 중 하나 이상일 수 있다: MUC16, CCAT2, CTAG1A, CTAG1B, MAGEA1, MAGEA2, MAGEA3, MAGEA4, MAGEA6, PRAME, PCA3, MAGEC1, MAGEC2, MAGED2, AFP, MAGEA8, MAGE9, MAGEA11, MAGEA12, IL13RA2, PLAC1, SDCCAG8, LSP1, CT45A1, CT45A2, CT45A3, CT45A5, CT45A6, CT45A8, CT45A10, CT47A1, CT47A2, CT47A3, CT47A4, CT47A5, CT47A6, CT47A8, CT47A9, CT47A10, CT47A11, CT47A12, CT47B1, SAGE1 및 CT55.

[0263] 일부 실시양태에서, 예를 들면, 표적 암 세포에 대한 암 항원은 돌연변이된/암 항원들 중 하나 이상일 수 있다: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD20, CD30, CXCR4, CD45, CD56, 이때 암은 T 세포 림프종이다.

[0264] 일부 실시양태에서, 예를 들면, 표적 암 세포에 대한 암 항원은 돌연변이된/암 항원들 중 하나 이상일 수 있다: IDH1, ATRX, PRL3 또는 ETBR, 이때 암은 교모세포종이다.

[0265] 일부 실시양태에서, 예를 들면, 표적 암 세포에 대한 암 항원은 돌연변이된/암 항원들 중 하나 이상일 수 있다: CA125, β-hCG, 요로 고나도트로핀 단편, AFP, CEA, SCC, 인히빈(inhibin) 또는 엑스트라디올(extradiol), 이때 암은 난소암이다.

[0266] 일부 실시양태에서, 표적 암 세포에 대한 암 항원은 CD5일 수 있다.

[0267] 일부 실시양태에서, 표적 암 세포에 대한 암 항원은 HER2일 수 있다.

[0268] 일부 실시양태에서, 표적 암 세포에 대한 암 항원은 EGFR 변이체 III일 수 있다.

[0269] 일부 실시양태에서, 표적 암 세포에 대한 암 항원은 CD19일 수 있다.

[0270] 일부 실시양태에서, SR 서브유닛 영역은 스캐빈저 수용체의 세포외 도메인(ECD)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 스캐빈저 수용체의 ECD는 ICD 및 TM 도메인을 포함하는 SR의 ECD 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 항원은 암 세포 상의 SR-리간드, 예를 들면, 표 2 또는 표 3으로부터의 리간드 성분들 중 어느 하나이다. 일부 실시양태에서, SR-ECD는 식세포와 표적 세포의 결합에 기여한 후, 활성화되고, 표적 세포의 식세포작용을 활성화시킨다.

[0271] 일부 실시양태에서, CFP는 스캐빈저 수용체의 ECD 또는 이의 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, CFP는 스캐

빈저 수용체의 ICD 또는 이의 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, CFP는 스캐빈저 수용체의 TM 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산에 의해 코딩된 ECD는 렉틴, 덱틴 1, 만노스 수용체(CD206), 스캐빈저 수용체 A1(SRA1), MARCO, CD36, CD163, MSR1, SCARA3, COLEC12, SCARA5, SCARB1, SCARB2, CD68, OLR1, SCARF1, SCARF2, CXCL16, STAB1, STAB2, SRCRB4D, SSC5D, CD205, CD207, CD209, RAGE, CD14, CD64, F4/80, CCR2, CX3CR1, CSF1R, Tie2, HuCRIg(L) 및 CD169로 구성된 군으로부터 선택된 도메인을 포함한다. 대다수의 스캐빈저 수용체들의 세포외 도메인은 외래 물질의 비특이적 항체 독립적 인식에 있어서 자가와 비-자가를 구별하는 데 사용될 수 있는 넓은 결합 특이성을 가진 스캐빈저 수용체를 함유한다. I형 및 II형 클래스 A 스캐빈저 수용체(SR-AI1 및 SR-AII)는 작은 NH2-말단 세포내 도메인, 및 짧은 스페이서 도메인, α-나선형 코일드-코일 도메인 및 삼중 나선형 콜라겐성 도메인을 함유하는 세포외 부분을 가진 삼량체성 막 당단백질이다. I형 수용체는 시스테인 풍부 COOH-말단(SRCR) 도메인도 함유한다. 이 수용체들은 신체 전체에 걸쳐 다양한 조직들에서 골수 세포, 예컨대, 대식세포에 존재하고 드물게 넓은 리간드 결합 특이성을 나타낸다. 이들은 화학적으로 변형된 단백질, 예컨대, 변형된 LDL을 포함하는 매우 다양한 폴리음이온에 결합하고, 죽상동맥경화증 동안 콜레스테롤 침착에 관여한다. 이들은 대식세포 관련 숙주 방어 및 염증 상태에서 세포 부착 과정에서 역할을 할 수도 있다.

[0272] 일부 실시양태에서, SR ECD는 프로아폽토시스성 세포에 결합하도록 디자인된다. 일부 실시양태에서, 스캐빈저 수용체 ECD는 암 세포 또는 감염된 세포의 세포 표면 분자에 대한 결합 도메인을 포함한다.

[0273] 일부 실시양태에서, PR 서브유닛의 세포외 도메인은 링커에 의해 암 항원에 특이적인 표적 세포 결합 도메인, 예컨대, 항체 또는 이의 부분에 연결된다.

[0274] 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 하나의 항원 결합 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 하나 초과의 결합 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 결합 도메인은 scFv이다. 도 2는 PFP가 암 세포 상의 단일 표적을 표적화하거나(좌측) 다수의 표적들을 표적화하는(우측) 실시양태의 도식적 표시를 보여준다. 하나의 또는 하나 초과의 scFv는 세포외 도메인에서 재조합 PR에 융합된다. 일부 실시양태에서, scFv 분획과 PR의 세포외 도메인은 링커를 통해 연결된다.

[0275] 일부 실시양태에서, ECD 항원 결합 도메인은 세포내 항원에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포내 항원은 암 항원이다.

[0276] 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 1000 nM 미만의 친화성으로 표적 리간드에 결합한다. 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 500 nM 미만의 친화성으로 표적 리간드에 결합한다. 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 450 nM 미만의 친화성으로 표적 리간드에 결합한다. 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 400 nM 미만의 친화성으로 표적 리간드에 결합한다. 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 350 nM 미만의 친화성으로 표적 리간드에 결합한다. 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 250 nM 미만의 친화성으로 표적 리간드에 결합한다. 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 200 nM 미만의 친화성으로 표적 리간드에 결합한다. 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 100 nM 미만의 친화성으로 표적 리간드에 결합한다. 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 200 nM 내지 1000 nM의 친화성으로 표적 리간드에 결합한다. 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 300 nM 내지 1.5 mM의 친화성으로 표적 리간드에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 > 200 nM, > 300 nM 또는 > 500 nM의 친화성으로 표적 리간드에 결합한다.

[0277] 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 T 세포인 표적 리간드에 결합하고, 결합 특성은 조작된 세포의 T 세포 매개 용해를 활성화시키는 표적 T 세포가 유발되지 않게 하는 정도이다. 일부 실시양태에서, TCR과 조작된 세포 상의 리간드의 결합은 피해지거나, 우회되거나 억제된다.

[0278] *링커*

[0279] 링커는 본 개시의 폴리펩타이드들 또는 펩타이드 도메인들 중 임의의 폴리펩타이드 또는 펩타이드 도메인을 연결하는 데 사용될 수 있다. 본원에 기재된 PFP 융합 단백질은 하나 이상의 링커를 포함할 수 있다. 예를 들면, PFP 융합 단백질의 하나 이상의 도메인 및 서브유닛은 또 다른 도메인 또는 서브유닛에 직접적으로 융합될 수 있거나, 링커를 통해 또 다른 도메인 또는 서브유닛에 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 세포 상의 항원에 특이적인 항체, 표적 세포 상의 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항체의 부분, 또는 표적 세포 상의 항원에 특이적인 scFv를 포함하는 세포외 항원 결합 도메인은 링커에 의해 TM 도메인 또는 다른 세포외 도메인에 연결된다. 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인에서 하나 초과의 scFv가 있는 경우, 하나 초과의 scFv는 링커에 의해 서로 연결된다.

[0280] 일부 실시양태에서, 링커는 짧은 펩타이드 서열이다.

[0281] 링커는 공유결합만큼 단순할 수 있거나, 길이에서 많은 원자들을 가진 중합체성 링커일 수 있다. 특정 실시양태에서, 링커는 폴리펩타이드이거나 아미노산에 기반한다. 다른 실시양태에서, 링커는 펩타이드와 유사하지 않다. 특정 실시양태에서, 링커는 공유결합(예를 들면, 탄소-탄소 결합, 디설파이드 결합, 탄소-헤테로원자 결합 등)이다.

[0282] 일부 실시양태에서, 링커는 한 아미노산 또는 복수의 아미노산들(예를 들면, 펩타이드 또는 단백질)이다. 일부 실시양태에서, 링커는 결합(예를 들면, 공유결합), 유기 분자, 기, 중합체 또는 화학적 모이어티이다. 일부 실시양태에서, 링커는 길이가 약 3개 내지 약 104개(예를 들면, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 31개, 32개, 33개, 34개, 35개, 36개, 37개, 38개, 39개, 40개, 41개, 42개, 43개, 44개, 45개, 46개, 47개, 48개, 49개, 50개, 55개, 60개, 65개, 70개, 75개, 80개, 85개, 90개, 95개 또는 100)개 아미노산이다. 일부 실시양태에서, 링커는 글리신 및 하나 이상의 세린 잔기의 스트레치이다. 짧은 펩타이드 링커용으로 바람직한 다른 아미노산은 쓰레오닌(Thr), 세린(Ser), 프롤린(Pro), 글리신(Gly), 아스파르트산(Asp), 라이신(Lys), 글루타민(Gln), 아스파라긴(Asn) 및 알라닌(Ala), 아르기닌(Arg), 페닐알라닌(Phe), 글루탐산(Glu)을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 이들 중 Pro, Thr 및 Gln은 천연 링커를 위해 종종 사용되는 아미노산이다. Pro은 매우 제한된 입체구조를 야기하는 고리형 측쇄를 가진 독특한 아미노산이다. Pro 풍부 서열은 피루베이트 데하이드로게나제(pyruvate dehydrogenase)($GA_2PA_3PAKQEA_3PAPA_2KAEAPA_3PA_2KA$)(서열번호 39)에서 리포일(lipoyl)과 E3 결합 도메인 사이의 링커를 비롯한 도메인간 링커로서 사용된다. 본 개시의 목적을 위해, 실험적 링커는 유연성 링커, 강성 링커 및 절단 가능한 링커일 수 있다. (G4S)x(이때, x는 1, 2, 3, 4 등으로서 표기된, 모이어티의 다중 카피임)(서열번호 40)와 같은 서열은 유연성 링커 서열을 포함한다. 본원에서 사용된 다른 유연성 서열은 글리신의 여러 반복부, 예를 들면, (Gly)6(서열번호 41) 또는 (Gly)8(서열번호 42)을 포함한다. 다른 한편으로, 강성 링커가 사용될 수 있고, 예를 들면, 링커 (EAAAK)x(이때, x는 1, 2, 3, 4 등의 정수임)(서열번호 43)는 강성 링커를 생성한다. 최적 길이를 달성하기 위해, 예를 들면, 형태 (GGGS)n(서열번호 44), (GGGGS)n(서열번호 45) 및 (G)n의 고도 유연성 링커부터 형태 (EAAAK)n(서열번호 46), (SGGS)n(서열번호 47), SGSETPGTSESATPES(서열번호 48) 및 (XP)n의 더 강성 링커까지 본원에서 제공된 융합 단백질의 도메인들 또는 서브유닛들 사이에 다양한 링커 길이 및 유연성이 사용될 수 있다(예를 들면, 전체 내용이 본원에 참고로 포함된 문헌[Guilinger JP, Thompson DB, Liu DR. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. Nat. Biotechnol. 2014; 32(6): 577-82] 참조). 일부 실시양태에서, n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15이다. 일부 실시양태에서, 링커는 (GGS)n 모티프를 포함하고, 이때 n은 1, 3 또는 7(서열번호 49)이다. 일부 실시양태에서, 링커는 아미노산 서열 SGGGGSG(서열번호 11)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 아미노산 서열 GSGS(서열번호 13)를 포함한다.

[0283] 일부 실시양태에서, 링커는 유연하다. 일부 실시양태에서, 링커는 힌지 영역을 포함한다. 이러한 스페이서 또는 링커 도메인은 포함되는 경우 적절한 세포/세포 접촉, 결합 및 활성화를 더 가능하게 하기 위해 결합 도메인을 숙주 세포 표면으로부터 떨어져 위치시킬 수 있다. 세포외 스페이서의 길이는 선택된 표적 분자, 선택된 결합 에피토프, 결합 도메인 크기 및 친화성을 기반으로 표적 분자 결합을 최적화하도록 변경될 수 있다. 특정 실시양태에서, 세포외 스페이서 도메인은 면역글로불린 힌지 영역(예를 들면, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD)이다. 면역글로불린 힌지 영역은 야생형 면역글로불린 힌지 영역 또는 변경된 야생형 면역글로불린 힌지 영역일 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에서 사용된 링커 또는 스페이서는 서열 ESKYGPPCPPCP(서열번호 50)를 가진 IgG4 힌지 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 힌지 영역은 야생형 또는 이의 변이체일 수 있는 1형 막 단백질의 세포외 영역, 예컨대, CD8a, CD4, CD28 및 CD7에 존재하는 서열을 포함하는 힌지 또는 스페이서를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포외 스페이서 도메인은 CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 또는 이들의 조합으로부터 선택된 면역글로불린 Fc 도메인의 전부 또는 일부를 포함한다. 일부 실시양태에서, 스페이서 또는 링커는 번역 후 변형, 예컨대, 글리코실화에 의해 더 변형될 수 있다.

[0284] 일부 실시양태에서, 세포외 스페이서 도메인은 II형 C-렉틴의 줄기 영역(C형 렉틴 도메인과 막횡단 도메인 사이에 위치된 세포외 도메인)을 포함할 수 있다. II형 C-렉틴은 CD23, CD69, CD72, CD94, NKG2A 및 NKG2D를 포함한다. 추가 실시양태에서, 세포외 스페이서 도메인은 스캐빈저 수용체 MERTK로부터 유래할 수 있다.

[0285] 일부 실시양태에서, 링커는 적어도 2개 또는 적어도 3개의 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 4개의 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 5개의 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는

6개의 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 7개의 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 8개의 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 9개의 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 8개의 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 10개의 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 10개 초과의 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개 또는 20개의 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커에 12개 이상의 아미노산이 있다. 일부 실시양태에서, 링커에 14개 이상의 아미노산이 있다. 일부 실시양태에서, 링커에 15개 이상의 아미노산이 있다.

[0286] *식세포작용의 증강을 위한 다른 융합 단백질*

[0287] 본 개시의 한 양태에서, 주로 억제 신호를 차단함으로써 대식세포와 같은 골수 세포에서 식세포작용을 증강시키는 하나 이상의 키메라 수용체를 코딩하는 재조합 핵산을 제조한다. 특히 종양 환경 내의 골수 세포, 예컨대, 대식세포는 식세포작용 약화 또는 억제 신호, 예컨대, 표적 세포, 예를 들면, 암 세포에 대한 CD47 매개 항-식세포작용 활성과 우연히 만난다. 식세포성 세포에서 발현될 때 CD47 신호전달을 차단하는 키메라 수용체가 생성된다.

[0288] 일부 실시양태에서, 식세포작용을 증강시킬 수 있는 다른 CAR 융합 단백질은 식세포성 세포에서 발현되도록 디자인될 수 있다. 한 실시양태에서, 본원은 (a) (i) 세포외 도메인, 및 (ii) 막횡단 도메인을 포함하는 서브유닛; (b) 표적 세포의 CD47에 특이적인 세포외 항원 결합 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR) 융합 단백질(CFP)을 코딩하는 재조합 핵산을 포함하는 조성물을 제공하는 것으로서; 이때 서브유닛의 세포외 도메인과 세포외 항원 결합 도메인은 작동 가능하게 연결되고; 서브유닛은 CD47에 결합하는 내생성 수용체의 기능적 세포내 도메인을 포함하지 않거나, 포스파타제를 활성화시키는 세포내 도메인을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 신호 조절 단백질 알파(SIRPα)로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 신호 조절 단백질 베타(SIRPβ)로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 SIRPα로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 SIRPβ로부터 유래한다.

[0289] 일부 실시양태에서, 추가 CAR 융합 단백질(CFP)은 전술된 재조합 PFP로 공형질감염될 수 있다. 일부 실시양태에서, 스캐빈저 수용체 세포내 도메인은 작동 가능하게 연결된, 식세포작용을 활성화시키는 신호전달 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인; 또는 세포질 말단에 있는 염증유발 도메인을 포함한다. 식세포작용을 활성화시키는 신호전달 도메인은 표 2에 나열된 수용체들로 구성된 군으로부터 선택된 수용체로부터 유래한다.

[0290] 일부 실시양태에서, 식세포작용 신호전달 도메인을 가진 세포내 도메인은 하나 이상의 면역수용체 티로신 기반 활성화 모티프(ITAM)를 가진 도메인을 포함한다. ITAM은 면역 시스템의 여러 수용체들, 예컨대, T 세포 수용체, 면역글로불린(Ig) 및 FcR의 세포질 꼬리에 존재하는 보존된 서열이다. 이것은 규정된 간격에 의해 분리된 페어링된 YXXL/I 모티프(Y=티로신, L=라이신 및 I=이소류신)(YXXL/I-X_{6-8}-YXXL/I)로 구성된 보존된 아미노산 서열 모티프를 가진다. 추가로, 대다수의 ITAM들은 제1 ITAM 티로신에 비해 +2 위치에서 음으로 하전된 아미노산(D/E)을 함유한다. ITAM 내의 잔기의 인산화는 식세포작용을 활성화시키는 여러 신호전달 분자들을 동원한다. ITAM 모티프는 세포내 어댑터 단백질인 12 kDa의 DNAX 활성화 단백질(DAP12)에도 존재한다.

[0291] 일부 실시양태에서, 세포내 영역 내의 식세포 신호전달 도메인은 PI3 키나제(PI3K) 동원 도메인(PI3K 결합 도메인으로서도 지칭됨)을 포함한다. 본원에서 사용된 PI3K 결합 도메인은 CD19, CD28, CSFR 또는 PDGFR의 각각의 PI3K 결합 도메인일 수 있다. 결합 도메인으로의 PI3 키나제 동원은 Akt 매개 신호전달 캐스케이드 및 식세포작용의 활성화를 유발한다. PI3K-Akt 신호전달 경로는 식세포작용, 염증 반응의 조절, 및 소포 수송 및 세포골격 재조직화를 비롯한 다른 활성에 중요하다. PI3 키나제 동원 도메인은 인산화될 수 있는 티로신 잔기를 갖고 PI3Kp85의 Src 상동성 도메인(SH2)에 의해 인식될 수 있는, 원형질막 단백질의 세포내 도메인이다. p85의 SH2 도메인은 수용체의 세포질 도메인 상의 인산화된 티로신을 인식한다. 이것은 p110의 알로스테릭 활성화, 및 플레크스트린(plekstrin) 상동성 도메인을 통해 효소 Akt 및 항시적 활성 3'-포스파이노시타이드 의존적 키나제 1(PDK1)에 의해 인식되는 포스파티딜이노시톨-3,4,5-트리스포스페이트(PIP_3)의 생성을 야기한다. Akt와 PIP_3의 상호작용은 Akt 입체구조의 변화, 및 PDK1 및 릭토르(rictor)-mTOR 복합체에 의한 각각 잔기 Thr308 및 Ser473의 인산화를 야기한다. 이들 두 잔기들의 인산화는 다른 기질들 중에서 효소 글리코겐 합성효소 키나제-3(GSK-3)을 인산화하는 Akt의 활성화를 야기한다. GSK-3은 2개의 이소폼들, 즉 GSK-3α 및 GSK-3β를 갖고, 이들 둘 다 항시적으로 활성을 나타낸다. 상기 이소폼들은 구조적으로 관련되어 있으나, 기능적으로 중복되지 않는다. GSK-3의 불활성화는 그들의 조절 N-말단 도메인에 위치된, GSK-3α의 잔기 Ser21 또는 GSK-3β의 Ser9가 Akt 및 다른 키나제에 의해 인산화될 때 관찰된다. 인산화에 의한 GSK-3의 억제는 염증의 조절 및 식세포작용 과정에

중요하다.

[0292] 일부 실시양태에서, 재조합 PFP는 (a) 세포외 CD47 결합 도메인 SIRPα, (b) SIRPβ 막횡단 도메인 및 (c) SIRPβ의 세포내 도메인을 포함한다. SIRPβ 신호전달은 DAP12 활성화에 개입함으로써 식세포 촉진 신호전달을 활성화시킬 수 있다.

[0293] 패밀리의 다양한 구성원들은 막 단백질 상의 시알릴화된 글리칸과 접촉할 때 체크포인트 신호를 전달도입한다. 일부 구성원들에서, Siglec 단백질의 세포내 도메인은 다수의 면역수용체 티로신 기반 억제 모티프(ITIM)들을 포함한다. ITIM들은 그들의 세포질 꼬리에서 컨센서스 아미노산 서열, 즉 (I/V/L/S)-X-Y-X-X-(L/V)를 공유하고, 이때 X는 임의의 아미노산을 표시하고, I는 이소류신이고, V는 발린이고, L은 라이신이고, S는 세린이고, Y는 티로신이다. ITIM 모티프에서 티로신 잔기의 인산화는 2개의 SH2 도메인 함유 음성 조절인자들 중 어느 하나를 동원한다: 이노시톨 포스파타제 SHIP(Src 상동성 2 함유 이노시톨 폴리포스페이트 5-포스파타제) 또는 티로신 포스파타제 SHP-1(Src 상동성 2 함유 단백질 티로신 포스파타제-1). (Y+2) 위치의 류신은 SHIP에의 결합에 유리한 반면, (Y-2) 위치의 이소류신은 SHP-1 결합에 유리하다. ITIM은 또 다른 티로신 포스파타제인 SHP-2에도 결합할 수 있으나, ITIM 매개 억제에 있어서 기능적 역할을 하는 SHP-2에 대한 증거는 다른 매개자에 대한 증거보다 덜 명확하다. 따라서, (예를 들면, 시알릴화된 막 글리칸 단백질에서) 시알산 잔기와 결합함으로써 세포외 리간드 결합 도메인에서 Siglec 막 단백질이 활성화되면, ITIM은 인산화된 세포내 신호를 받고, 식세포 잠재력의 감소를 비롯한 면역조절을 위해 SHP 매개 신호전달을 시작한다.

[0294] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물은 (a) (i) 막횡단 도메인, 및 (ii) 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 Siglec 수용체(SgR) 서브유닛; 및 (a) 표적 세포의 세포 표면 단백질의 시알릴화된 글리칸에 특이적인 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 키메라 SgR 융합 단백질(SgFP)을 코딩하는 재조합 핵산 구축물을 포함하고; 이때 (b) 막횡단 도메인과 세포외 도메인은 작동 가능하게 연결되고; (i) SgFP는 시알릴화된 글리칸에 결합하는 내생성 수용체의 기능적 세포내 도메인을 포함하지 않거나; (ii) SgFP는 식세포작용 또는 염증 경로를 활성화시키는 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 키메라 수용체는 세포내 도메인을 결여하므로, Siglec 유도 면역조절 세포내 신호전달에 대한 차단제로서 작용한다. 이것은 세포내 도메인을 코딩하는 핵산 영역의 결실 및 Siglec 수용체의 코딩 서열의 나머지 부분의 클로닝에 의해 달성된다. 이 구축물은 Siglec 세포내 도메인 결실 구축물[Siglec△ICD]로서 표기될 수 있다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산 구축물은 Siglec 수용체의 세포외 도메인(ECD)과 융합된 암 항원 특이적 scFv를 포함하는 재조합 키메라 항원성 수용체를 코딩한다. 이것은 상기 구축물을 암 세포에 표적화할 수 있게 한다. 키메라 수용체는 Siglec 수용체의 TM 및 ICD를 포함하고, 이때 ICD는 내생성 ICD, 또는 추가 식세포작용 촉진 도메인, 예컨대, PI3K 결합 도메인 또는 도메인들과 융합된 ICD일 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포외 Siglec 도메인을 포함하는 키메라 수용체는 시알리다제와 공발현된다. 시알리다제를 코딩하는 핵산은 분비를 위한 신호 서열을 가진 키메라 도메인을 발현하는 발현 벡터 내로 혼입될 수 있다. 시알리다제는 CAR-Siglec 수용체를 발현하는 세포와 동일한 세포에 의해 발현되기 때문에, 시알리다제의 발현은 Siglec의 ECD가 그의 천연 리간드에 결합하지 못하게 하나, scFv와 이의 수용체의 결합에 의해 활성화됨으로써, 암 항원 발현 세포에 대한 키메라 수용체의 작용의 특이성을 보장한다.

[0295] 일부 실시양태에서, 키메라 수용체는 암 항원에 특이적으로 결합될 수 있는 항원 결합 도메인, 예컨대, 암 항원 특이적 항체 또는 이의 부분 또는 단편과 세포외 영역에서 융합된, TREM 단백질로부터의 하나 이상의 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, TREM 키메라 항원 수용체를 코딩하는 재조합 핵산은 (a) 적어도 TREM 막횡단 도메인(TM) 및 TREM 세포내 도메인(ICD); 및 (b) 암 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인(ECD)을 포함하는 융합 단백질을 코딩한다. 상기 융합 단백질은 암 세포를 표적화하고 항원 결합 도메인을 포함하는 ECD를 통해 표적 암 세포에 결합하도록 디자인되고, 이 결합은 TREM TM 및/또는 세포내 도메인을 통한 신호전달을 통해 식세포작용을 유발하고 증강시킨다. TREM의 막횡단 도메인은 DAP12 막횡단 도메인과 삼량체화하고 세포내 식세포작용 촉진 신호전달 캐스케이드를 유발한다. 일부 실시양태에서, TREM 도메인은 TREM1, TREM2 또는 TREM3 구성원에 의해 기여된다. 세포외 항원 결합 도메인은 짧은 스페이서 또는 링커를 통해 TREM 도메인의 세포외 말단에 융합된다.

[0296] 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 암 항원에 특이적인 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 암 세포의 표면 상의 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 포함한다.

[0297] 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 암 항원에 특이적인 항체이다. 일부 실시양태에서, 세포외 항원

결합 도메인은 항체의 단편이고, 이때 이 단편은 암 세포 상의 암 항원에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 암 항원 결합 도메인에 특이적인 단일 쇄 가변 단편(scFv)을 포함한다.

[0298] 일부 실시양태에서, 키메라 융합 단백질(CFP)은 예를 들면, 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열을 가진 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하는, CD5에 결합하도록 표적화된 세포외 도메인(ECD)(CD5 결합 도메인)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 키메라 CFP는 서열번호 1에 대한 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 CD5 결합 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, CD5에 결합하도록 표적화된 세포외 도메인(ECD)(CD5 결합 도메인)은 서열번호 2로 기재된 아미노산 서열을 가진 경쇄 가변 도메인(V_L)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 키메라 CFP는 서열번호 2에 대한 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 CD5 결합 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0299] 일부 실시양태에서, CFP는 예를 들면, 서열번호 8로 기재된 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열 및 서열번호 9로 기재된 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열을 가진, HER2에 결합하도록 표적화된 세포외 도메인(HER2 결합 도메인)을 포함한다. 일부 실시양태에서, CFP는 서열번호 8에 대한 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 HER2 결합 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, CFP는 서열번호 9에 대한 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함하는 HER2 결합 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0300] 일부 실시양태에서, CFP는 ECD를 막횡단(TM)에 연결하는 힌지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 힌지는 CD8 수용체의 힌지 영역의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, CFP는 서열번호 7로 기재된 아미노산 서열을 가진 힌지(CD8α 쇄 힌지 도메인)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, PFP 힌지 영역은 서열번호 7에 대한 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함한다.

[0301] 일부 실시양태에서, CFP는 예를 들면, 서열번호 6으로 기재된 아미노산 서열을 가진 CD8 막횡단 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, CFP TM 영역은 서열번호 6에 대한 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함한다.

[0302] 일부 실시양태에서, CFP는 FcR 도메인을 가진 세포내 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, CFP는 서열번호 3으로 기재된 아미노산 서열, 또는 적어도 서열번호 3에 대한 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 가진 서열을 포함하는 FcR 도메인 세포내 도메인을 포함한다,

[0303] 일부 실시양태에서, CFP는 PI3K 동원 도메인을 가진 세포내 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, PI3K 동원 도메인은 서열번호 4로 기재된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PI3K 동원 도메인은 서열번호 4에 대한 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함한다.

[0304] 일부 실시양태에서, CFP는 CD40 세포내 도메인을 가진 세포내 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, CD40 ICD는 서열번호 5로 기재된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, CD40 ICD는 서열번호 5에 대한 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 가진 아미노산 서열을 포함한다.

표 4

키메라 PFP 및 이의 도메인의 서열

서열번호	PFP/도메인	서열
1	항-CD5 중쇄 가변 도메인	EIQLVQSGGGLVKPGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTHTGEPTYADSFKGRFTFSLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRRGYDWYFDVWGQGTTVTV
2	항-CD5 경쇄 가변 도메인	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSYLSWFQQKPGKAPKTLIYRANRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQYEDFGIYYCQQYDESPWTFGGGTKLEIK
33	항-CD5 scFv	EIQLVQSGGGLVKPGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTHTGEPTYADSFKGRFTFSLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRRGYDWYFDVWGQGTTVTV*SSGGGGSGGGGSGGGGS*DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSYLSWFQQKPGKAPKTLIYRANRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQYEDFGIYYCQQYDESPWTFGGGTKLEIK
3	FcRɣ 쇄 세포내 신호전달 도메인	LYCRRLKIQVRKAAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQ
20	FcRɣ 쇄 세포내 신호전달 도메인	LYCRLKIQVRKAAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQ
27	FcRɣ 쇄 세포내 신호전달 도메인	RLKIQVRKAAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQ

[0305]

서열번호	PFP/도메인	서열
28	FcRγ 쇄 세포내 신호전달 도메인	RLKIQVRKAAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEK PPQ
4	PI3K 동원 도메인	YEDMRGILYAAPQLRSIRGQPGPNHEEDADSYENM
5	CD40 세포내 도메인	KKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQET LHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ
6	CD8α 쇄 막횡단 도메인	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT
29	CD8α 쇄 막횡단 도메인	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
7	CD8α 쇄 힌지 도메인	ALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLD
8	항-HER2 중쇄 가변 도메인	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTGSTSGSGKP GSGEGSEVQLVE
9	항-HER2 경쇄 가변 도메인	LVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV ARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDVWGQGTLVTV
32	항-HER2 scFv	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTGSTSGSGKP GSGEGSEVQLVE*SSGGGGSGGGGSGGGGS*LVQPGGSLRL SCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTR YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS RWGGDGFYAMDVWGQGTLVTV

[0306]

서열번호	PFP/도메인	서열
17	GMCSF 신호 펩타이드	MWLQSLLLLGTVACSIS
18	CD28 막횡단 도메인	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
34	CD2 막횡단 도메인	IYLIIGICGGGSLLMVFVALLVFYIT
19	CD68 막횡단 도메인	ILLPLIIGLILLGLLALVLIAFCII
21	TNFR1 세포내 도메인	QRWKSKLYSIVCGKSTPEKEGELEGTTTKPLAPNPSFSPT PGFTPTLGFSPVPSSTFTSSSTYTPGDCPNFAAPRREVAPP YQGADPILATALASDPIPNPLQKWEDSAHKPQSLDTDDP ATLYAVVENVPPLRWKEFVRRLGLSDHEIDRLELQNGRC LREAQYSMLATWRRRTPRREATLELLGRVLRDMDLLGC LEDIEEALCGPAALPPAPSLLR
22	TNFR2 세포내 도메인	PLCLQREAKVPHLPADKARGTQGPEQQHLLITAPSSSSSS LESSASALDRRAPTRNQPQAPGVEASGAGEARASTGSSD SSPGGHGTQVNVTCIVNVCSSSDHSSQCSSQASSTMGDT DSSPSESPKDEQVPFSKEECAFRSQLETPETLLGSTEEKPL PLGVPDAGMKPS
23	MDA5 세포내 도메인	MSNGYSTDENFRYLISCFRARVKMYIQVEPVLDYLTFLP AEVKEQIQRTVATSGNMQAVELLLSTLEKGVWHLGWTR EFVEALRRTGSPLAARYMNPELTDLPSPSFENAHDEYLQ LLNLLQPTLVDKLLVRDVLDKCMEEELLTIEDRNRIAAA ENNGNESGVRELLKRIVQKENWFSAFLNVLRQTGNNEL VQELTGSDCSESNAEIEN
30	CD8α 쇄 힌지 도메인 + 막횡단 도메인	ALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS LRPEACRPAAGGAVHTRGLDIYIWAPLAGTCGVLLLSLV ITLYC

[0307]

서열번호	PFP/도메인	서열
31	CD8α 쇄 힌지 도메인 + 막횡단 도메인	ALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT
14	CD5-FcRγ-PI3K	MWLQSLLLLGTVACSISEIQLVQSGGGLVKPGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTHTGEPTYADSFKGRFTFSLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRRGYDWYFDVWGQGTTVTV*SSGGGGSGGGGSGGGGS*DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSYLSWFQQKPGKAPKTLIYRANRLESGVPSRF*SGSGSG*TDYTLTISSLQYEDFGIYYCQQYDESPWTFGGGTKLEIK*SGGGGSG*ALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRRLKIQVRKAAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQ*GSGS*YEDMRGILYAAPQLRSIRGQPGPNHEEDADSYENM
15	HER2-FcRγ-PI3K	MWLQSLLLLGTVACSISDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTGSTSGSGKPGSGEGSEVQLVE*SGGG*LVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDVWGQGTLVTV*SSSGGGGSG*ALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRRLKIQVRKAAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQ*GSGS*YEDMRGILYAAPQLRSIRGQPGPNHEEDADSYENM

[0308]

서열번호	PFP/도메인	서열
16	CD5-FcRγ-CD40	MWLQSLLLLGTVACSISEIQLVQSGGGLVKPGGSVRISCA ASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTHTGEPTY ADSFKGRFTFSLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRR GYDWYFDVWGQGTTVTV*SSGGGGSGGGGSGGGGS*DIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSYLSWFQQKPGK APKTLIYRANRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQYEDF GIYYCQQYDESPWTFGGGTKLEIK*SGGGGSG*ALSNSIMY FSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP AAGGAVHTRGLDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRLKI QVRKAAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQK KVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETL HGCQPVTQEDGKESRISVQERQ
24	CD5-FcRγ-MDA5	MWLQSLLLLGTVACSISEIQLVQSGGGLVKPGGSVRISCA ASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTHTGEPTY ADSFKGRFTFSLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRR GYDWYFDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSYLSWFQQKPGK APKTLIYRANRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQYEDF GIYYCQQYDESPWTFGGGTKLEIKSGGGGSGALSNSIMY FSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP AAGGAVHTRGLDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRLKI QVRKAAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQG SGSMSNGYSTDENFRYLISCFRARVKMYIQVEPVLDYLT FLPAEVKEQIQRTVATSGNMQAVELLLSTLEKGVWHLG WTREFVEALRRTGSPLAARYMNPELTDLPSPSFENAHDE YLQLLNLLQPTLVDKLLVRDVLDKCMEEELLTIEDRNRI AAAENNGNESGVRELLKRIVQKENWFSAFLNVLRQTGN NELVQELTGSDCSESNAEIEN

[0309]

서열번호	PFP/도메인	서열
25	CD5-FcRγ-TNFR1	MWLQSLLLLGTVACSISEIQLVQSGGGLVKPGGSVRISCA ASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTHTGEPTY ADSFKGRFTFSLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRR GYDWYFDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSYLSWFQQKPGK APKTLIYRANRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQYEDF GIYYCQQYDESPWTFGGGTKLEIKSGGGGSGALSNSIMY FSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP AAGGAVHTRGLDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRLKI QVRKAAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQG SGSQRWKSKLYSIVCGKSTPEKEGELEGTTTKPLAPNPSF SPTPGFTPTLGFSPVPSSTFTSSSTYTPGDCPNFAAPRREV APPYQGADPILATALASDPIPNPLQKWEDSAHKPQSLDT DDPATLYAVVENVPPLRWKEFVRRLGLSDHEIDRLELQN GRCLREAQYSMLATWRRRTPRREATLELLGRVLRDMDL LGCLEDIEEALCGPAALPPAPSLLR
26	CD5-FcRγ-TNFR2	MWLQSLLLLGTVACSISEIQLVQSGGGLVKPGGSVRISCA ASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWMGWINTHTGEPTY ADSFKGRFTFSLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRR GYDWYFDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQ MTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSYLSWFQQKPGK APKTLIYRANRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQYEDF GIYYCQQYDESPWTFGGGTKLEIKSGGGGSGALSNSIMY FSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP AAGGAVHTRGLDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRLKI QVRKAAITSYEKSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQG SGSPLCLQREAKVPHLPADKARGTQGPEQQHLLITAPSSS SSSLESSASALDRRAPTRNQPQAPGVEASGAGEARASTG SSDSSPGGHGTQVNVTCIVNVCSSSDHSSQCSSQASSTMG DTDSSPSESPKDEQVPFSKEECAFRSQLETPETLLGSTEEK PLPLGVPDAGMKPS

[0310]

표 5

링커 서열

서열번호	서열
10	SSGGGGSGGGGSGGGGS
11	SGGGGSG
12	SGGG
13	GSGS

[0311]

[0312] *PFP의 특성:*

[0313] PFP는 그 자신을 발현하는 세포의 세포막 내로 구조적으로 혼입된다. 핵산 구축물의 특정 리더 서열, 예컨대, 신호 펩타이드는 코딩된 단백질의 원형질막 발현을 유도한다. 구축물에 의해 코딩된 막횡단 도메인은 발현된 단

백질을 세포의 원형질막 내로 혼입시킨다.

[0314] 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 대식세포와 같은 골수 세포에서 내생성 FcRγ 수용체와 이량체화하여, 골수 세포 특이적 발현을 보장하는, FcR-알파 수용체의 TM 도메인을 포함한다.

[0315] 일부 실시양태에서, PFP는 그 자신을 발현하는 세포를 강력한 식세포성 세포로 만든다. PFP를 코딩하는 재조합 핵산이 세포에서 발현될 때, 세포는 재조합 핵산을 발현하지 않는 세포에 비해 표적 세포의 항원을 가진 표적 세포의 증가된 식세포작용을 나타낸다. 재조합 핵산이 세포에서 발현될 때, 세포는 재조합 핵산을 발현하지 않는 세포에 비해 표적 세포의 항원을 가진 표적 세포의 증가된 식세포작용을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산이 세포에서 발현될 때, 세포는 재조합 핵산을 발현하지 않는 세포에 비해 표적 세포의 항원을 가진 표적 세포의 적어도 2배 증가된 식세포작용을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산이 세포에서 발현될 때, 세포는 재조합 핵산을 발현하지 않는 세포에 비해 표적 세포의 항원을 가진 표적 세포의 적어도 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 20배, 30배 또는 적어도 5배 증가된 식세포작용을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 조성물은 (a) (i) 막횡단 도메인, 및 (ii) 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 식세포 또는 테더링 수용체(PR) 서브유닛; 및 (b) 표적 세포의 항원에 특이적인 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 PR 융합 단백질(PFP)을 코딩하는 재조합 핵산을 포함하고; 이때 막횡단 도메인과 세포외 도메인은 작동 가능하게 연결되고; PFP와 표적 세포의 항원의 결합 시, PFP를 발현하는 세포의 사멸 또는 식세포작용 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 10% 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 10% 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 11% 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 12% 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 13% 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 14% 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 15% 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 16% 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 17% 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 18% 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 19% 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 20% 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 30% 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 40% 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 50% 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 60% 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 70% 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 80% 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 90% 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 100% 이상 증가된다.

[0316] 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 2배 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 4배 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 6배 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 8배 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 10배 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 20배 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 50배 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 약 50배 증가된다.

[0317] 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 관련 사멸 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 10% 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 관련 사멸 활성은 PFP를 발현

하지 않는 세포에 비해 적어도 20% 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 관련 사멸 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 30% 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 관련 사멸 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 40% 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 관련 사멸 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 50% 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 관련 사멸 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 60% 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 관련 사멸 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 70% 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 관련 사멸 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 80% 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 관련 사멸 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 90% 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 관련 사멸 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 100% 이상 증가된다.

[0318] 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 관련 사멸 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 2배 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 관련 사멸 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 4배 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 관련 사멸 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 6배 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 관련 사멸 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 8배 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 관련 사멸 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 10배 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 관련 사멸 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 20배 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 관련 사멸 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 30배 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 관련 사멸 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 40배 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 관련 사멸 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 50배 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 관련 사멸 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 100배 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 관련 사멸 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 약 100배 증가된다.

[0319] 일부 실시양태에서, PFP를 발현하는 세포의 식세포작용 관련 사멸 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 2배 이상 증가된다.

[0320] 일부 실시양태에서, 재조합 핵산이 세포에서 발현될 때, 세포는 증가된 사이토카인 생성을 나타낸다. 사이토카인은 IL-1, IL-6, IL-12, IL-23, TNF, CXCL9, CXCL10, CXCL11, IL-18, IL-23, IL-27 및 인터페론 중 어느 하나를 포함할 수 있다.

[0321] 일부 실시양태에서, 재조합 핵산이 세포에서 발현될 때, 세포는 증가된 세포 이동을 나타낸다. 증가된 세포 이동은 표준 이동성 어세이에 의해 세포 배양물에서 검출될 수 있다. 일부 실시양태에서, 액틴 필라멘트 재배열은 팔로이딘(phalloidin) 염색 및 형광 현미경관찰을 이용함으로써 검출되고 모니터링될 수 있다. 일부 경우, 시간 경과 현미경관찰이 목적을 위해 이용된다.

[0322] 일부 실시양태에서, 재조합 핵산이 세포에서 발현될 때, 세포는 증가된 면역 활성을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산이 세포에서 발현될 때, 세포는 MHC II의 증가된 발현을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산이 세포에서 발현될 때, 세포는 CD80의 증가된 발현을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산이 세포에서 발현될 때, 세포는 CD86의 증가된 발현을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산이 세포에서 발현될 때, 세포는 증가된 iNOS 생성을 나타낸다.

[0323] 일부 실시양태에서, 재조합 핵산이 세포에서 발현될 때, 세포는 재조합 핵산을 발현하지 않는 세포에 비해 표적 세포의 항원을 발현하는 표적 세포의 증가된 트로고사이토시스를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산이 세포에서 발현될 때, 세포는 재조합 핵산을 발현하는 세포의 식세포작용에 비해 표적 세포의 항원을 발현하는 표적 세포의 더 적은 트로고사이토시스를 나타낸다.

[0324] 실시양태에서, 키메라 수용체는 글리코실화될 수 있고/있거나, 페길화될 수 있고/있거나, 다른 방식으로 번역 후 변형될 수 있다. 추가 실시양태에서, 글리코실화, 페길화 및/또는 다른 번역 후 변형은 생체내 또는 시험관내에서 일어날 수 있고/있거나 화학적 기법을 이용함으로써 수행될 수 있다. 추가 실시양태에서, 임의의 글리코실화, 페길화 및/또는 다른 번역 후 변형은 N-결합될 수 있거나 O-결합될 수 있다. 실시양태에서, 키메라 수용체들 중 어느 하나는 세포외 도메인이 리간드에 의해 결합될 때 신호가 전달도입되어 대식세포와 같은 골수 세

포를 분극화하도록 효소적 또는 기능적 활성을 나타낼 수 있다.

[0325] **CFP 및 조작된 골수 세포의 제조 방법**

[0326] CAR-P를 제조하는 방법은 (1) PSR 서브유닛 프레임워크에 대해 스크리닝하는 단계; (2) 항원 결합 특이성에 대해 스크리닝하는 단계; (3) CAR-P 재조합 핵산 구축; (4) 세포 조작 및 검증 단계를 포함한다.

[0327] PSR 서브유닛 프레임워크에 대한 스크리닝: 전술된 바와 같이, 수용체의 디자인은 식세포작용의 증강된 신호전달을 가능하게 하는 적어도 하나의 식세포 수용체 도메인을 포함한다. 본질적으로, 신규 식세포 기능 또는 증강 도메인에 대해 많은 원형질막 단백질들을 스크리닝할 수 있다. 식세포 수용체 서브유닛을 스크리닝하는 방법은 당분야에서 숙련된 자에게 공지되어 있다. 추가 정보는 실시예 단락에서 확인될 수 있다. 일반적으로, 기능적 유전체학 및 역조작은 기능적으로 관련된 단백질 폴리펩타이드 또는 이의 부분을 코딩하는 유전적 서열을 수득하는 데 종종 이용된다. 일부 실시양태에서, 단백질, 폴리펩타이드 또는 이의 단편, 또는 이를 코딩하는 핵산 단편의 확인 및/또는 단리를 위해 프라이머 및 프로브를 구축한다. 일부 실시양태에서, 실험적 확인을 위해 프라이머 또는 프로브에 태그를 부착시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 단백질 또는 펩타이드의 태그부착은 세포 내 또는 세포외 국소화에 유용할 수 있다.

[0328] 고친화성의 특정 항원 결합 도메인을 선택하기 위해 잠재적 항체들을 스크리닝한다. 항체 또는 항체 도메인에 대한 스크리닝 방법은 당분야에서 숙련된 자에게 공지되어 있다. 구체적인 예는 추가 정보를 제공한다. 항체 및 이의 단편의 예는 IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, Fab 단편, F(ab')2 단편, 1가 항체, scFv 단편, scRv-Fc 단편, IgNAR, hcIgG, V_{HH} 항체, 나노바디 및 알파바디를 포함하나, 이들로 제한되지 않는다.

[0329] 상업적으로 입수 가능한 항체는 키메라 수용체의 세포외 도메인을 생성하도록 개조될 수 있다. 상업적으로 입수 가능한 항체의 예는 항-HGPRT, 클론 13H11.1(EMD Millipore), 항-ROR1(ab135669)(Abcam), 항-MUC1[EP1024Y](ab45167)(Abcam), 항-MUC16[X75](ab1107)(Abcam), 항-EGFRvIII[L8A4](Absolute antibody), 항-메소텔린[EPR2685(2)](ab134109)(Abcam), HER2[3B5](ab16901)(Abcam), 항-CEA(LS-C84299-1000)(LifeSpan BioSciences), 항-BCMA(ab5972)(Abcam), 항-글리피칸 3[9C2](ab129381)(Abcam), 항-FAP(ab53066)(Abcam), 항-EphA2[RM-0051-8F21](ab73254)(Abcam), 항-GD2(LS-0546315)(LifeSpan BioSciences), 항-CD19[2E2B6B10](ab31947)(Abcam), 항-CD20[EP459Y](ab78237)(Abcam), 항-CD30[EPR4102](ab134080)(Abcam), 항-CD33 [SP266](ab199432)(Abcam), 항-CD123(ab53698)(Abcam), 항-CD133(BioLegend), 항-CD123(1A3H4)ab181789(Abcam) 및 항-CD171(L1.1)(Invitrogen antibodies)을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 공지된 항체로부터 항체 단편, 예컨대, scFv를 생성하는 기법은 당분야에서 관용적이다.

[0330] 당분야에서 숙련된 자에게 공지된 분자생물학 기법에 따라 재조합 핵산을 생성할 수 있다. 방법은 프라이머의 디자인, PCR 증폭 생성물의 생성, 제한 분해, 라이게이션, 클로닝, 클로닝된 생성물의 겔 정제, 클로닝된 DNA의 세균 증식, 클로닝된 플라스미드 또는 벡터의 단리 및 정제를 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 일반적인 지침은 문헌[Molecular Cloning of PCR Products: by Michael Finney, Paul E. Nisson, Ayoub Rashtchian in Current Protocols in Molecular Biology, Volume 56, Issue 1 (First published: 01 November 2001); Recombinational Cloning by Jaehong Park, Joshua LaBaer in Current Protocols in Molecular Biology Volume 74, Issue 1 (First published: 15 May 2006)] 등에서 확인될 수 있다. 일부 실시양태에서, 특정 증폭 기법, 예컨대, 본원에 참고로 포함된 문헌[Kwoh et al., 1989]에 기재된 TAS 기법(전사 기반 증폭 시스템); 문헌[Guatelli et al., 1990]에 기재된 3SR 기법(자가 지속 서열 복제); 문헌[Kievitis et al., 1991]에 기재된 NASBA 기법(핵산 서열 기반 증폭); SDA 기법(가닥 치환 증폭)(Walker et al., 1992); TMA 기법(전사 매개 증폭)을 이용할 수 있다.

[0331] 일부 실시양태에서, 재조합 핵산 서열은 인간에서 발현되도록 최적화된다.

[0332] DNA, mRNA 및 원형 RNA: 일부 실시양태에서, 네이키드 DNA 또는 메신저 RNA(mRNA)를 사용하여 핵산을 세포 내부로 도입할 수 있다. 일부 실시양태에서, PFP를 코딩하는 DNA 또는 mRNA를 지질 나노입자(LNP) 캡슐화로 식세포성 세포 내로 도입한다. mRNA는 단일 가닥이고 코돈 최적화될 수 있다. 일부 실시양태에서, mRNA는 하나 이상의 변형된 또는 비천연 염기, 예컨대, 5'-메틸사이토신 또는 슈도유리딘을 포함할 수 있다. mRNA는 길이가 50개 내지 10,000개 염기일 수 있다. 한 양태에서, 전이유전자는 mRNA로서 전달된다. mRNA는 약 100개, 200개, 300개, 400개, 500개, 600개, 700개, 800개, 900개, 1000개, 1100개, 1200개, 1300개, 1400개, 1500개, 1600개, 1700개, 1800개, 1900개, 2000개, 3000개, 4000개, 5000개, 6000개, 7000개, 8000개, 9000개, 10,000개 초과의 염기를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, mRNA는 길이가 10,000개 초과의 염기일 수 있다. 일부 실시양태에서,

mRNA는 길이가 약 11,000개 염기일 수 있다. 일부 실시양태에서, mRNA는 길이가 약 12,000개 염기일 수 있다. 일부 실시양태에서, mRNA는 융합 단백질을 코딩하는 전이유전자 서열을 포함한다. LNP 캡슐화된 DNA 또는 RNA는 대식세포와 같은 골수 세포를 형질감염시키는 데 사용될 수 있거나, 대상체에게 투여될 수 있다.

[0333] 일부 실시양태에서, PFP를 코딩하는 원형 RNA(circRNA)를 사용한다. 원형 RNA(circRNA)에서, 3' 말단과 5' 말단은 공유결합되고 한 부류의 RNA를 구성한다. LNP를 사용하여 circRNA를 세포 또는 대상체의 내부로 전달할 수 있다.

[0334] **키메라 항원 수용체 단백질을 발현하는 골수 세포 기능을 더 증강시키는 기작**

[0335] 특히 종양 미세환경 내의 골수 세포, 예컨대, 대식세포는 도 25에 그래프로 나타낸 바와 같이 표적 세포, 예를 들면, 암 세포에 의한 식세포작용 약화 또는 억제 신호, 예컨대, CD47 매개 항-식세포 활성을 우연히 만난다. 분화 클러스터 47(CD47)은 면역글로불린 수퍼패밀리에 속하는 수용체이다. 이것은 인테그린 및 트롬보스폰딘 1(TSP-1)에 결합할 수 있고, 인간 세포에서 편재적으로 발현된다. 종양 세포를 비롯한 표적 세포는 식세포작용 매개 사멸 및 제거를 피하기 위해 '나를 먹지마' 신호로서 CD47을 발현한다. 식세포성 세포는 CD47에 결합하는 신호 조절 단백질 알파 수용체(SIRP)를 발현할 수 있다. SIRP 패밀리 구성원은 수용체 티로신 키나제 커플링된 신호전달 과정의 음성 조절에 관여하는 수용체 유형 막횡단 당단백질이다. SIRP-α는 티로신 키나제에 의해 인산화될 수 있다. 이 PTP의 포스포-티로신 잔기는 SH2 도메인 함유 티로신 포스파타제(PTP)를 동원하고 PTP의 기질로서 작용하는 것으로 밝혀졌다. SIRP-β는 면역수용체 티로신 기반 활성화 모티프를 보유하는 단백질인 TYROBP/DAP12와 상호작용하는 것으로 확인된, SIRP 패밀리의 또 다른 구성원이다. 이것은 TYROBD와 회합될 때 골수 세포의 활성화를 유발할 수 있다. 이 단백질은 티로신 키나제 SYK의 동원에도 참여하는 것으로 보고되었다.

[0336] 한 양태에서, 본원은 식세포성 세포에서 발현될 때 CD47 신호전달을 기능적으로 차단하도록 생성된 키메라 수용체를 제공한다.

[0337] 또 다른 양태에서, 본원은 CD47 신호를 차단함으로써 조작된 골수 세포, 예컨대, 대식세포의 식세포작용을 증강시키는 조성물 및 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 면역요법에 사용될 조작된 대식세포를 생성하기 위해 본원에 기재된 CFP 수용체를 코딩하는 재조합 핵산을 단독으로 또는 다른 재조합 식세포 수용체와 함께 식세포성 세포와 같은 골수 세포 내로 형질감염시키거나 형질도입한다. 일부 다른 실시양태에서, 재조합 식세포 수용체는 스캐빈저 수용체의 세포내 도메인을 포함한다.

[0338] 일부 실시양태에서, 본원은 (a) (i) 표적 세포 상의 CD47에 특이적으로 결합할 수 있는 세포외 도메인; 및 (ii) 막횡단 도메인을 포함하는 서브유닛을 포함하는 CFP를 코딩하는 재조합 핵산을 포함하는 조성물을 제공하는 것으로서, 이때 상기 서브유닛의 세포외 도메인과 세포외 항원 결합 도메인은 작동 가능하게 연결되고; 상기 서브유닛은 CD47에 결합하는 내생성 수용체의 기능적 세포내 도메인을 포함하지 않거나, 포스파타제를 활성화시키는 세포내 도메인을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 신호 조절 단백질 알파(SIRPα)로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 신호 조절 단백질 베타(SIRPβ)로부터 유래한다. SIRPβ는 CD47에 결합하지 않는다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 SIRPα로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 SIRPβ로부터 유래한다. 이 카테고리의 재조합 핵산은 임의의 세포내 도메인을 결여하므로, CD47 신호전달의 비-신호전달 수용체 및 차단제이다. 이 구축물은 SIRP-△ICD로서 지칭된다. 이 키메라 수용체의 SIRPα 또는 SIRPβ ECD의 세포외 리간드 결합 도메인의 사용 시, 상기 수용체는 표적 세포 상의 CD47에 결합하나, 기능적 SIRPα 세포내 도메인을 갖지 않음으로써 그의 신호전달을 불활성 상태로 만듦으로써, CFP를 발현하는 골수 세포, 예컨대, 대식세포에 의한 CD47+ 세포의 CD47 신호전달 및 식세포작용 억제를 감소시킨다. 이 구축물의 과다발현은 암 세포에 의한 골수 세포, 예컨대, 대식세포의 CD47 매개 항-식세포 활성을 크게 감소시킬 수 있다.

[0339] 일부 실시양태에서, SIRP-△ICD의 과다발현 이외에 내생성 SIRPα도 억제될 수 있다. siRNA가 SIRP-△ICD의 발현을 감소시키지 않거나 영향을 미치지 않도록 SIRPα의 ICD를 코딩하는 mRNA의 부분을 특이적으로 표적화하는 siRNA를 디자인할 수 있다.

[0340] 일부 실시양태에서, SIRP-△ICD 및/또는 내생성 SIRPα의 억제제는 식세포 수용체 및 암 항원에 특이적인 세포외 항원 결합 도메인을 포함하는 융합 단백질을 발현하는 세포에서 발현될 수 있다.

[0341] *항-식세포 신호의 차단 및 식세포작용 활성화를 위한 키메라 항원 수용체*

[0342] *A. CD47 결합 신호 전달의 변경*

[0343] 한 양태에서, (a) 막횡단 도메인; (b) 표적 세포의 CD47에 특이적인 세포외 항원 결합 도메인; 및 (b) 세포내 신호전달을 활성화시켜 식세포작용을 증강시킬 수 있는, 식세포 수용체로부터의 세포내 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR) 융합 단백질(CFP)을 코딩하는 재조합 핵산을 포함하는 재조합 핵산을 생성하고; 이때 막횡단 도메인과 CD47에 특이적인 세포외 항원 결합 도메인은 작동 가능하게 연결되고; CFP는 CD47에 결합하는 내생성 수용체의 기능적 세포내 도메인을 포함하지 않거나, 포스파타제를 활성화시키는 세포내 도메인을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산 구축물은 스캐빈저 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 이 부류의 수용체는 식세포작용 억제 신호를 식세포작용 촉진 신호로 전환(또는 스위칭)하도록 디자인되기 때문에 본원에서 "스위치 수용체"로서 지칭된다. 일부 실시양태에서, 키메라 수용체의 세포내 도메인은 세포외 말단에서 SIRPα CD47 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인과 융합된, 렉틴, 덱틴 1, 만노스 수용체(CD206), 스캐빈저 수용체 A1(SRA1), MARCO, CD36, CD163, MSR1, SCARA3, COLEC12, SCARA5, SCARB1, SCARB2, CD68, OLR1, SCARF1, SCARF2, CXCL16, STAB1, STAB2, SRCRB4D, SSC5D, CD205, CD207, CD209, RAGE, CD14, CD64, F4/80, CCR2, CX3CR1, CSF1R, Tie2, HuCRIg(L) 및 CD169 수용체로부터 선택된 스캐빈저 수용체의 세포내 도메인을 포함할 수 있다.

[0344] 일부 실시양태에서, 식세포작용 신호전달 도메인을 가진 세포내 도메인은 하나 이상의 면역수용체 티로신 기반 활성화 모티프(ITAM)를 가진 도메인을 포함한다. ITAM은 면역 시스템의 여러 수용체들, 예컨대, T 세포 수용체, 면역글로불린(Ig) 및 FcR의 세포질 꼬리에 존재하는 보존된 서열이다. 이들은 규정된 간격에 의해 분리된 페어링된 YXXL/I 모티프(Y=티로신, L=라이신 및 I=이소류신)(YXXL/I-X_{6-8}-YXXL/I)로 구성된 보존된 아미노산 서열 모티프를 가진다. 추가로, 대다수의 ITAM들은 제1 ITAM 티로신에 비해 +2 위치에서 음으로 하전된 아미노산(D/E)을 함유한다. ITAM 내의 잔기의 인산화는 식세포작용을 활성화시키는 여러 신호전달 분자들을 동원한다. ITAM 모티프는 세포내 어댑터 단백질인 12 kDa의 DNAX 활성화 단백질(DAP12)에도 존재한다.

[0345] 일부 실시양태에서, 세포내 영역 내의 식세포 신호전달 도메인은 PI3 키나제(PI3K) 동원 도메인(PI3K 결합 도메인으로서도 지칭됨)을 포함할 수 있다. 본원에서 사용된 PI3K 결합 도메인은 CD19, CD28, CSFR 또는 PDGFR의 각각의 PI3K 결합 도메인일 수 있다. 결합 도메인으로의 PI3 키나제 동원은 Akt 매개 신호전달 캐스케이드 및 식세포작용의 활성화를 유발한다. PI3K-Akt 신호전달 경로는 식세포작용, 염증 반응의 조절, 및 소포 수송 및 세포골격 재조직화를 비롯한 다른 활성에 중요하다. PI3 키나제 동원 도메인은 인산화될 수 있는 티로신 잔기를 갖고 PI3Kp85의 Src 상동성 도메인(SH2)에 의해 인식될 수 있는, 원형질막 단백질의 세포내 도메인이다. p85의 SH2 도메인은 수용체의 세포질 도메인 상의 인산화된 티로신을 인식한다. 이것은 p110의 알로스테릭 활성화, 및 플레크스트린 상동성 도메인을 통해 효소 Akt 및 항시적 활성 3'-포스파이노시타이드 의존적 키나제 1(PDK1)에 의해 인식되는 포스파티딜이노시톨-3,4,5-트리스포스페이트(PIP_3)의 생성을 야기한다. Akt와 PIP_3의 상호작용은 Akt 입체구조의 변화, 및 PDK1 및 럭토르-mTOR 복합체에 의한 각각 잔기 Thr308 및 Ser473의 인산화를 야기한다. 이들 두 잔기들의 인산화는 다른 기질들 중에서 효소 글리코겐 합성효소 키나제-3(GSK-3)을 인산화하는 Akt의 활성화를 야기한다. GSK-3은 2개의 이소폼들, 즉 GSK-3α 및 GSK-3β를 갖고, 이들 둘 다 항시적으로 활성을 나타낸다. 상기 이소폼들은 구조적으로 관련되어 있으나, 기능적으로 중복되지 않는다. GSK-3의 불활성화는 그들의 조절 N-말단 도메인에 위치된, GSK-3α의 잔기 Ser21 또는 GSK-3β의 Ser9가 Akt 및 다른 키나제에 의해 인산화될 때 관찰된다. 인산화에 의한 GSK-3의 억제는 염증의 조절 및 식세포작용 과정에 중요하다.

[0346] 일부 실시양태에서, 재조합 PFP는 (a) 세포외 CD47 결합 도메인 SIRPα, (b) SIRPβ 막횡단 도메인 및 (c) SIRPβ의 세포내 도메인을 포함한다. SIRPβ 신호전달은 DAP12 활성화에 개입함으로써 식세포 촉진 신호전달을 활성화시킬 수 있다.

[0347] *B. 시알산 결합 신호 전달의 변경*

[0348] 한 양태에서, 본원은 면역 세포 상에서 발현되는 막 단백질들의 Siglec 패밀리의 구성원으로 식세포작용 조절 신호 전달을 스위칭하는 조성물 및 방법을 개시한다. 상기 패밀리의 다양한 구성원들은 막 단백질 상의 시알릴화된 글리칸과 접촉할 때 체크포인트 신호를 전달도입한다. 일부 구성원들에서, Siglec 단백질의 세포내 도메인은 다수의 면역수용체 티로신 기반 억제 모티프(ITIM)들을 포함한다. ITIM들은 그들의 세포질 꼬리에서 컨센서스 아미노산 서열, 즉 (I/V/L/S)-X-Y-X-X-(L/V)를 공유하고, 이때 X는 임의의 아미노산을 표시하고, I는 이소류신이고, V는 발린이고, L은 라이신이고, S는 세린이고, Y는 티로신이다. ITIM 모티프에서 티로신 잔기의 인산화는 2개의 SH2 도메인 함유 음성 조절인자들 중 어느 하나를 동원한다: 이노시톨 포스파타제 SHIP(Src 상동성 2 함유 이노시톨 폴리포스페이트 5-포스파타제) 또는 티로신 포스파타제 SHP-1(Src 상동성 2 함유 단백질 티로신

포스파타제-1). (Y+2) 위치의 류신은 SHIP에의 결합에 유리한 반면, (Y-2) 위치의 이소류신은 SHP-1 결합에 유리하다. ITIM은 또 다른 티로신 포스파타제인 SHP-2에도 결합할 수 있으나, ITIM 매개 억제에 있어서 기능적 역할을 하는 SHP-2에 대한 증거는 다른 매개자에 대한 증거보다 덜 명확하다. 따라서, (예를 들면, 시알릴화된 막 글리칸 단백질에서) 시알산 잔기와 결합함으로써 세포외 리간드 결합 도메인에서 Siglec 막 단백질이 활성화되면, ITIM은 인산화된 세포내 신호를 받고, 식세포 잠재력의 감소를 비롯한 면역조절을 위해 SHP 매개 신호전달을 시작한다.

[0349] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물은 (a) (i) 막횡단 도메인, 및 (ii) 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 Siglec 수용체(SgR) 서브유닛; 및 (a) 표적 세포의 세포 표면 단백질의 시알릴화된 글리칸에 특이적인 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 키메라 SgR 융합 단백질(SgFP)을 코딩하는 재조합 핵산 구축물을 포함하고; 이때 (b) 막횡단 도메인과 세포외 도메인은 작동 가능하게 연결되고; (i) SgFP는 시알릴화된 글리칸에 결합하는 내생성 수용체의 기능적 세포내 도메인을 포함하지 않거나; (ii) SgFP는 식세포작용 또는 염증 경로를 활성화시키는 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.

[0350] Siglec 패밀리 수용체는 막 단백질인 Siglec 1(CD169), Siglec 2(CD22), Siglec 3(CD33), Siglec 4(MAG), Siglec 5, Siglec 6, Siglec 7, Siglec 8, Siglec 9, Siglec 10, Siglec 11, Siglec 12, Siglec 13, Siglec 14, Siglec 15, Siglec 16을 포함한다.

[0351] 일부 실시양태에서, 재조합 핵산 구축물은 Siglec 패밀리 구성원들 중 어느 하나를 포함하는, 표적 세포의 막 단백질 상의 시알릴화된 잔기에 결합할 수 있는 Siglec 수용체의 세포외 도메인(ECD)을 포함하는 재조합 키메라 항원성 수용체를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산 구축물은 Siglec 수용체의 막횡단 단백질(TM) 도메인을 포함하는 재조합 키메라 항원성 수용체를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 키메라 수용체는 세포내 도메인을 결여하므로, Siglec 유도 면역조절 세포내 신호전달에 대한 차단제로서 작용한다. 이것은 세포내 도메인을 코딩하는 핵산 영역의 결실 및 Siglec 수용체의 코딩 서열의 나머지 부분의 클로닝에 의해 달성된다. 이 구축물은 Siglec 세포내 도메인 결실 구축물[Siglec△ICD]로서 표기될 수 있다.

[0352] 일부 실시양태에서, 재조합 핵산 구축물은 표적 세포의 막 단백질 상의 시알릴화된 잔기에 결합할 수 있는 Siglec 수용체의 세포외 도메인(ECD)을 포함하는 재조합 키메라 항원성 수용체를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산 구축물은 Siglec 수용체의 막횡단 단백질(TM) 도메인을 포함하는 재조합 키메라 항원성 수용체를 코딩한다.

[0353] 일부 실시양태에서, 키메라 수용체는 관련 없는 막 단백질의 TM 도메인, 예를 들면, CD8 TM 또는 CD2 TM 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, Siglec ECD 및/또는 Siglec TM을 포함하는 키메라 항원성 수용체는 (예를 들면, 세포내 도메인 의 결실[Siglec△ICD]에 의해 달성되는) 내생성 Siglec 세포내 도메인(ICD)을 결여하고, 관련 없는 단백질의 세포내 도메인은 구축물의 세포질 말단에 융합된다.

[0354] 특히, Siglec 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 및 12 패밀리 구성원은 2개 이상의 세포내 ITIM 모티프를 포함한다. 일부 실시양태에서, ITIM 모티프를 포함하는 Siglec 단백질의 세포내 도메인은 결실되어 Siglec△ICD를 생성하고, 식세포작용 촉진 단백질의 ICD와 융합됨으로써, Siglec과 암 세포 상의 이의 리간드(시알릴화된 글리칸)의 결합에 의해 생성된 억제 신호를 염증유발 및 식세포작용 촉진 신호로 바꾼다.

[0355] 관련 없는 단백질은 식세포작용 활성화 신호 또는 염증유발 신호를 생성할 수 있는 세포내 도메인, 예컨대, 하기 단백질들의 세포내 도메인을 포함할 수 있다: MRC1, ItgB5, MERTK, ELMO, BAIL Tyro3, Axl, Traf6, Syk, MyD88, Zap70, PI3K, FcyR1, FcyR2A, FcyR2B2, FcyR2C, FcyR3A, FcER1, FcaR1, BAFF-R, DAP12, NFAM1 및 CD79b 세포내 도메인.

[0356] 일부 실시양태에서, 키메라 수용체의 세포내 도메인은 세포외 말단에서 Siglec 시알릴화된 글리칸 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인과 융합된, 렉틴, 덱틴 1, 만노스 수용체(CD206), 스캐빈저 수용체 A1(SRA1), MARCO, CD36, CD163, MSR1, SCARA3, COLEC12, SCARA5, SCARB1, SCARB2, CD68, OLR1, SCARF1, SCARF2, CXCL16, STAB1, STAB2, SRCRB4D, SSC5D, CD205, CD207, CD209, RAGE, CD14, CD64, F4/80, CCR2, CX3CR1, CSF1R, Tie2, HuCRIg(L) 및 CD169 수용체로부터 선택된 스캐빈저 수용체의 세포내 도메인을 포함할 수 있다.

[0357] 일부 실시양태에서, 세포내 영역 내의 식세포 신호전달 도메인은 PI3 키나제(PI3K) 동원 도메인(PI3K 결합 도메인으로서도 지칭됨)을 포함할 수 있다. 본원에서 사용된 PI3K 결합 도메인은 CD19, CD28, CSFR 또는 PDGFR의 각각의 PI3K 결합 도메인일 수 있다.

[0358] 일부 실시양태에서, 식세포작용 신호전달 도메인을 가진 세포내 도메인은 하나 이상의 면역수용체 티로신 기반

활성화 모티프(ITAM)를 가진 도메인을 포함한다.

[0359] *C. 키메라 Siglec 구축물과 시알리다제의 공발현*

[0360] 일부 실시양태에서, 재조합 핵산 구축물은 Siglec 수용체의 세포외 도메인(ECD)와 융합된 암 항원 특이적 scFv를 포함하는 재조합 키메라 항원성 수용체를 코딩한다. 이것은 상기 구축물을 암 세포에 표적화할 수 있게 한다. 키메라 수용체는 Siglec 수용체의 TM 및 ICD를 포함하고, 이때 ICD는 내생성 ICD, 또는 추가 식세포작용 촉진 도메인, 예컨대, PI3K 결합 도메인 또는 도메인들과 융합된 ICD일 수 있다. Siglec ECD 영역은 함께 발현된 시알리다제에 의해 활성화되지 못하게 된다. 시알리다제는 전체 구축물이 단일 폴리펩타이드로서 발현되고 내생성 T2A 절단에 의해 용이하게 절단되는 모노시스트론성 디자인에서 상기 구축물에 의해 코딩될 수 있거나; 시알리다제 효소의 코딩 서열이 별개의 mRNA로서 전사되는 바이시스트론일 수 있다.

[0361] Siglec 수용체는 막 단백질에 편재적으로 존재하는 시알릴화된 잔기에 결합하고, 다운스트림 신호를 활성화시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 키메라 구축물은 Siglec 단백질의 세포외 도메인, 막횡단 도메인 및 세포내 도메인을 코딩하나, 세포외 말단에서 암 표적화 scFv와 융합되고, 세포내 말단에서 시알리다제를 코딩한다.

[0362] 일부 실시양태에서, 재조합 구축물이 모노시스트론이든 아니면 폴리시스트론이든 관계없이, 시알리다제 코딩 서열은 번역 시 단백질 시알리다제의 분비를 위해 신호를 보내는 N-말단 신호 펩타이드의 코딩 서열과 융합된다. 시알리다제의 발현 및 세포외 환경 내로의 그의 방출 시, 이 효소는 구축물을 발현하는 세포의 막에 인접한 환경에서 세포외 막 단백질로부터 시알산 잔기를 제거하거나 분해한다. 시알리다제가 CAR-Siglec 수용체를 발현하는 세포와 동일한 세포에 의해 발현되기 때문에, 시알리다제의 발현은 Siglec의 ECD가 그의 천연 리간드에 결합하지 못하게 하나, scFv와 이의 수용체의 결합에 의해 활성화됨으로써, 암 항원 발현 세포에 대한 키메라 수용체의 작용의 특이성을 보장한다.

[0363] 일부 실시양태에서, 키메라 항원성 수용체는 ITIM의 활성화를 통해 Siglec 수용체의 내생성 ICD 도메인을 활성화시킴으로써, 소염 및 식세포작용 조절 신호전달 단백질로서 작용한다.

[0364] 일부 실시양태에서, 키메라 항원성 수용체는 염증유발 신호전달 모이어티를 가진 내생성 ICD 도메인, 및/또는 ICD를 포함하는 내생성 Siglec ITIM의 고갈을 포함하고, 이들 각각은 전 단락에 기재되어 있고 본원에 기재된 CAR을 포함하는 scFv와 모듈 방식으로 조합될 수 있다.

[0365] *식세포작용의 증강을 위한 키메라 항원성 수용체 도메인*

[0366] *TREM 도메인*

[0367] 한 양태에서, 본원은 골수 세포에서 발현된 유발 수용체(TREM) 수용체로부터의 하나 이상의 도메인을 가진 키메라 수용체인 TREM 키메라 수용체를 코딩하는 재조합 핵산을 제공한다. TREM 수용체는 PRR 유도 신호를 증폭시키거나 감소시키는 그의 능력으로 인해 면역 반응의 중요한 조절제이다. 이 패밀리의 단백질들은 구성원 TREM 1, 2, 3을 포함한다. TREM은 V형의 단일 세포외 면역글로불린 유사 도메인, 막횡단 도메인 및 짧은 세포질 꼬리의 존재를 비롯한 공통된 구조적 성질을 공유한다. 특히, TREM 막횡단 도메인(TM)은 면역수용체 티로신 기반 활성화 모티프(ITAM)를 함유하는 막횡단 어댑터인 12 kDa의 DNAX 활성화 단백질(DAP12)의 양으로 하전된 잔기와 상호작용하는 음으로 하전된 잔기를 가진다.

[0368] 일부 실시양태에서, 키메라 항원 수용체를 코딩하는 재조합 핵산은 키메라 수용체가 DAP12와 상호작용하고 식세포작용을 활성화시키는 여러 신호전달 분자들을 동원하는, DAP12의 ITAM 내의 잔기의 인산화를 통해 식세포작용을 증강시키도록 적어도 TREM TM 도메인을 코딩하는 서열을 포함한다.

[0369] 일부 실시양태에서, 키메라 수용체는 세포외 영역에서 암 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인, 예컨대, 암 항원 특이적 항체 또는 이의 부분 또는 단편과 융합된, TREM 단백질로부터의 하나 이상의 도메인을 포함한다.

[0370] 일부 실시양태에서, TREM 키메라 항원 수용체를 코딩하는 재조합 핵산은 (a) 적어도 TREM 막횡단 도메인(TM) 및 TREM 세포내 도메인(ICD); 및 암 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인(ECD)을 포함하는 융합 단백질을 코딩한다. 상기 융합 단백질은 암 세포를 표적화하고 항원 결합 도메인을 포함하는 ECD를 통해 표적 암 세포에 결합하도록 디자인되고, 상기 결합은 TREM TM 및/또는 세포내 도메인을 통한 신호전달을 통해 식세포작용을 유발하고 증강시킨다. TREM의 막횡단 도메인은 DAP12 막횡단 도메인과 삼량체화하고 세포내 식세포작용 촉진 신호전달 캐스케이드를 유발한다. 일부 실시양태에서, TREM 도메인은 TREM1,

TREM2 또는 TREM3 구성원에 의해 기여된다. 세포외 항원 결합 도메인은 짧은 스페이서 또는 링커를 통해 TREM 도메인의 세포외 말단에 융합된다.

[0371] 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 암 항원에 특이적인 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 암 세포의 표면 상의 항원에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 포함한다.

[0372] 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 암 항원에 특이적인 항체이다. 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 항체의 단편이고, 이때 상기 단편은 암 세포 상의 암 항원에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 암 항원 결합 도메인에 특이적인 단일 쇄 가변 단편(scFv)을 포함한다.

[0373] *FcR 도메인*

[0374] 일부 양태에서, 본원은 FcR 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체를 코딩하는 재조합 핵산을 기술한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 키메라 수용체는 FcRα(FcRα1) 도메인을 포함할 수 있다. FcRα1 막횡단 도메인은 골수 세포, 예컨대, 대식세포 및 다른 식세포성 세포, 예컨대, 비만 세포에서 FcRγ 막횡단 도메인과 이종이량체화하고, 이종이량체화는 세포 표면 상의 단백질 발현을 위해 요구된다. 일부 실시양태에서, FcRα1 TM 도메인을 포함하는 재조합 단백질의 발현은 FcγR을 천연적으로 발현하는 세포에서의 발현으로 제한된다. 이 양태에서, FcRα1 TM 도메인을 가진 재조합 키메라 단백질은 FcRγ를 발현하는 식세포성 세포 이외의 임의의 세포에서 발현되지 못하게 된다. 유사하게, FcRβ 발현은 비만 세포로 제한된다. 일부 실시양태에서, 키메라 수용체는 키메라 단백질의 골수 세포 특이적 발현을 위해 FcRα1 TM 도메인을 포함하는 하나 이상의 도메인을 갖도록 디자인된다. 일부 실시양태에서, 키메라 수용체는 키메라 단백질의 비만 세포 특이적 발현을 위해 FcRβ TM 도메인을 포함하는 하나 이상의 도메인을 갖도록 디자인된다.

[0375] *프로캐스파제 도메인*

[0376] 일부 양태에서, 본원은 C-말단에서 캐스파제 절단 서열 및 프로캐스파제를 코딩하는 서열과 연결된 Src 상동성 2 도메인(SH2) 1(SH2-ccs-프로캐스파제)을 포함하는 키메라 항원 수용체 및 융합 단백질을 코딩하는 재조합 핵산을 기술한다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 (a) 암 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 세포외 항원 결합 도메인, 막횡단 도메인, 및 식세포작용을 유발할 수 있거나 증강시킬 수 있는 ITAM 모티프를 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 제1 폴리펩타이드, 및 (b) C-말단에서 캐스파제 절단 서열 및 프로캐스파제를 코딩하는 서열과 연결된 Src 상동성 2 도메인(SH2) 1(SH2-ccs-프로캐스파제)을 포함하는 세포내 폴리펩타이드인 제2 폴리펩타이드를 포함하는 키메라 항원 수용체를 코딩한다. 재조합 핵산은 모노시스트론성 또는 폴리시스트론성 재조합 핵산일 수 있다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 모노시스트론성 재조합 핵산이고, (a)를 코딩하는 서열과 (b)를 코딩하는 서열은 번역 후 내생적으로 2개의 폴리펩타이드를 절단하는 T2A 서열에 의해 분리된다. 프로캐스파제는 프로캐스파제 1, 프로캐스파제 2 또는 프로캐스파제 3일 수 있다. (a) 및 (b)의 발현 및 절단 시, SH2-ccs-프로캐스파제의 SH2 도메인은 프로캐스파제를 (a)의 ITAM 모티프의 인산화된 세포내 도메인으로 향하게 하고 활성화된다. 인산화된 ITAM 잔기와 접촉된 SH2 도메인의 활성화는 프로캐스파제의 단백질용해성 절단을 활성화시켜, 식세포작용을 통해 삼켜진 세포를 분해하는 데 요구된 활성화된 캐스파제를 생성한다.

[0377] *활성화 도메인의 유비퀴틸화*

[0378] 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인을 키메라 수용체에 추가하여 식세포작용 신호전달을 증강시킬 수 있다. 유비퀴틴 신호전달은 식세포작용의 유발에 관여한다. 엔도사이토시스 수용체의 모노유비퀴틸화는 이 수용체를 라이소좀에 의해 분해될 표적으로 만들 수 있다. 세포내 도메인에서 스캐빈저 수용체 MSR1의 IL-4 신호전달 매개 폴리유비퀴틴화는 상기 수용체의 활성화로 이어질 수 있고, 염증 유전자 활성화의 유도에 관여하는 MAP 키나제 경로 단백질과의 상호작용을 유발한다. 예를 들면, MSR1 단백질의 K63 폴리유비퀴틸화는 파고좀에서 이 단백질과 TAK1/MKK7/JNK의 상호작용을 유발한다. MSR1의 K27 잔기의 유비퀴틸화는 MSR 신호전달 및 염증유발 유전자 활성화, 예컨대, 염증유발 사이토카인의 발현에도 관여한다. 유비퀴틴 E3 리가제는 유비퀴틴과 MSR1의 세포내 신호전달 도메인 상의 특정 라이신 잔기의 라이게이션을 촉진할 수 있고, 상기 세포내 신호전달 도메인은 IL4 활성화 시 활성화된 후 TAK1, MKK7 및 JNK의 결합 및 염증유발 유전자, 예컨대, TNF-알파 및 IL-1β의 발현 유발을 통해 세포내 신호전달을 활성화시킬 수 있다.

[0379] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 재조합 키메라 항원 수용체는 유비퀴틸화되고 활성화되어 염증유발 신호를 생성할 수 있는 잔기를 포함하는 세포내 도메인을 포함할 수 있다.

[0380] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 키메라 항원 수용체의 세포내 도메인은 E3 리가제 매개 유비퀴틸화를 겪을

수 있는 잔기를 포함하는 MSR1의 세포내 도메인을 포함한다.

[0381] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 키메라 항원 수용체의 세포내 도메인은 유비퀴틸화될 수 있고 유비퀴틸화 시 TAK1에 결합할 수 있는 세포내 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 키메라 항원 수용체의 세포내 도메인은 유비퀴틸화될 수 있고 유비퀴틸화 시 MAP 키나제 단백질, 예컨대, MKK7에 결합할 수 있는 세포내 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 키메라 항원 수용체의 세포내 도메인은 유비퀴틸화될 수 있고 유비퀴틸화 시 MAP 키나제 단백질, 예컨대, MKK7을 포함하는 키나제 또는 단백질 복합체에 결합할 수 있는 세포내 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 키메라 항원 수용체의 세포내 도메인은 유비퀴틸화될 수 있고 유비퀴틸화 시 JNK를 포함하는 키나제 또는 단백질 복합체에 결합할 수 있는 세포내 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 키메라 항원 수용체의 세포내 도메인은 유비퀴틸화될 수 있고 유비퀴틸화 시 염증유발 유전자 전사를 활성화시킬 수 있는 키나제 또는 단백질 복합체에 결합할 수 있는 세포내 도메인을 포함한다.

[0382] 본원에서 예상된 바와 같이, 적합한 유비퀴틸화 도메인은 본 개시에 기재된 CARP 수용체들 중 어느 한 수용체의 세포내 부분에 라이게이션될 수 있다.

[0383] *식세포작용을 위한 다른 키메라 수용체와의 공발현*

[0384] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 하나 이상의 CFP는 암 세포의 표면 상의 암 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인을 가진 재조합 식세포 수용체 융합 단백질(PFP)과 공발현될 수 있다. 상기 융합 단백질은 막횡단 도메인 및 세포내 식세포작용 수용체 도메인을 추가로 포함하고, 추가 식세포작용 신호전달 증강 도메인, 예컨대, 키나제 결합 도메인을 포함할 수 있다. PFP는 암세포를 표적화하고 표적에 결합할 때 식세포작용을 활성화시키도록 구체적으로 디자인된다. PFP에 의한 식세포작용 증강은 CFP의 공발현에 의해 증가된다. 예를 들면, SIRP-CFP와 PFP를 공발현하는 세포는 세포의 식세포 잠재력을 증강시키고, 이때 추가로 PFP는 특이적 암 표적화를 세포에 제공한다. 예를 들면, SH2-ccs-프로캐스파제와 함께 PFP를 공발현하는 세포는 PFP를 가진 암 세포로의 특이적 표적화를 갖는 반면, 식세포 활성은 PFP 세포내 도메인에 의해 증강되고, 암 세포 사멸 활성은 캐스파제로의 프로캐스파제 활성화를 통해 SH2-ccs-프로캐스파제에 의한 아폽토시스성 세포의 제거로 인해 증강된다.

[0385] 일부 실시양태에서, 스캐빈저 수용체 세포내 도메인은 세포질 말단에서 작동 가능하게 연결된, 식세포작용을 활성화시키는 신호전달 도메인 또는 염증유발 도메인을 포함하는 제2 세포내 도메인을 포함한다. CD47 결합 도메인은 식세포 수용체의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인과 작동 가능하게 연결되기 때문에, 세포외 말단에서 CD47 리간드의 개입으로부터 유래한 신호전달 사건은 천연 CD47 결합 SIRPα 수용체의 식세포작용 억제 신호 대신에 재조합 수용체의 세포내 말단에서 식세포작용 증강 신호까지 세포내 도메인을 통과할 때 변경된다. 재조합 수용체를 발현하는 세포의 식세포 잠재력은 크게 증강되거나, SIRP-△ICD를 발현하는 세포에 비해 증강된다.

[0386] 일부 실시양태에서, 세포내 식세포작용 신호전달 도메인은 MRC1, ItgB5, MERTK, ELMO, BAIL Tyro3, Ax1, Traf6, Syk, MyD88, Zap70, PI3K, FcγR1, FcγR2A, FcγR2B2, FcγR2C, FcγR3A, FcER1, FcaR1, BAFF-R, DAP12, NFAM1 및 CD79b 세포내 도메인으로부터 선택된 도메인을 포함할 수 있다.

[0387] 한 양태에서, 키메라 수용체의 기능은 CFP 발현과 동시에 또는 무관하게 골수 세포에서 추가 재조합 단백질을 발현시킴으로써 더 증가될 수 있다. 일부 실시양태에서, 추가 재조합 단백질은 상기 CFP와 공발현되고, 이때 CFP는 표적 세포에서 발현된 항원에 결합할 수 있고, CFP는 CFP를 발현하는 골수 세포에 의한 표적 세포의 식세포작용 및 사멸을 증강시킨다. 일부 실시양태에서, 추가 재조합 단백질은 CFP 발현 세포의 기능을 더 증강시키도록 디자인된다.

[0388] 일부 실시양태에서, 추가 재조합 단백질은 제2 키메라 단백질, 예컨대, 키메라 융합 단백질, 예를 들면, 제2 키메라 단백질이다. 일부 실시양태에서, 제2 키메라 단백질은 암 항원 표적화 CFP를 발현하는 골수 세포의 집단에서 발현된다. 일부 실시양태에서, 추가 재조합 단백질은 제2 키메라 융합 단백질 또는 식세포작용 수용체 융합 단백질(PFP)이다. 일부 실시양태에서, 제2 키메라 단백질은 단축형(truncated) 단백질이다.

[0389] *골수 세포에 의한 식세포작용 및 사멸을 증가시키는 예시적인 추가 재조합 구축물:*

[0390] 한 양태에서, 본원은 (a) (i) 막횡단 도메인 및 (ii) 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 키메라 CD47 수용체(CR) 서브유닛; 및 (b) 표적 세포의 CD47에 특이적인 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 CR 융합 단백질을 코딩하는 재조합 핵산을 포함하는 조성물을 제공하는 것으로서; 이때 막횡단 도메인과 세포외 도메인은 작동 가능하게 연결되고; (i) CR은 CD47에 결합하는 내생성 수용체의 기능적

세포내 도메인을 포함하지 않거나, (ii) CR은 포스파타제 불활성화 도메인을 포함하거나, 포스파타제를 활성화시키는 세포내 도메인을 포함하지 않거나, (iii) CR은 식세포 수용체로부터 유래한 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, CR은 CD47에 결합하는 내생성 수용체의 기능적 세포내 도메인을 포함하지 않는다.

[0391] 일부 실시양태에서, CR은 포스파타제 불활성화 도메인을 포함하거나, 포스파타제를 활성화시키는 세포내 도메인을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, CR은 식세포 또는 테더링 수용체로부터 유래한 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.

[0392] 일부 실시양태에서, CD47에 특이적인 항원 결합 도메인은 CD47에 특이적인 항체 도메인을 포함한다.

[0393] 일부 실시양태에서, CD47에 특이적인 항원 결합 도메인은 SIRPα 또는 SIRPβ로부터 유래한 세포외 도메인을 포함한다.

[0394] 일부 실시양태에서, CR은 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함한다.

[0395] 한 양태에서, 본원은 (a) (i) 막횡단 도메인 및 (ii) 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 식세포 수용체(PR) 서브유닛; 및 (b) 표적 세포의 항원에 특이적인 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 PR 융합 단백질(PFP)을 코딩하는 재조합 핵산을 포함하는 조성물을 제공하는 것으로서; 이때 막횡단 도메인과 세포외 도메인은 작동 가능하게 연결되고; 세포내 신호전달 도메인은 식세포 수용체로부터 유래하고; 재조합 핵산은 (A) 염증유발 폴리펩타이드를 코딩하거나, (B) 분자와 결합 모티프의 결합 시, 재조합 핵산의 번역이 억제되도록 분자에 대한 결합 모티프를 포함하거나, (C) 프로캐스파제 도메인, 또는 (D) 프로캐스파제 결합 도메인, 또는 (E) 시알리다제를 코딩한다.

[0396] 한 양태에서, 본원은 (a) 막횡단 도메인, 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 식세포 수용체(PR) 서브유닛; 및 (b) 표적 세포의 항원에 특이적인 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 PR 융합 단백질(PFP)을 코딩하는 재조합 핵산을 포함하는 조성물을 제공하는 것으로서; 이때 막횡단 도메인과 세포외 도메인은 작동 가능하게 연결되고; PFP는 세포에서 발현될 때 FcRγ와 기능적 복합체를 형성한다.

[0397] 한 양태에서, 본원은 (a) (i) 막횡단 도메인 및 (ii) 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 식세포 수용체(PR) 서브유닛; 및 (b) 표적 세포의 항원에 특이적인 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 PR 융합 단백질(PFP)을 코딩하는 재조합 핵산을 포함하는 조성물을 제공하는 것으로서; 막횡단 도메인과 세포외 도메인은 작동 가능하게 연결되고; PFP는 세포에서 발현될 때 DAP12와 기능적 복합체를 형성한다.

[0398] 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 (A) 염증유발 폴리펩타이드를 코딩하거나, (B) 분자와 결합 모티프의 결합 시, 재조합 핵산의 번역이 억제되도록 분자에 대한 결합 모티프를 포함하거나, (C) 프로캐스파제 도메인, 또는 (D) 프로캐스파제 결합 도메인을 코딩한다.

[0399] 일부 실시양태에서, PFP는 세포에서 발현될 때 FcRγ와 기능적 복합체를 형성한다.

[0400] 일부 실시양태에서, PFP는 세포에서 발현될 때 DAP12와 기능적 복합체를 형성한다.

[0401] 일부 실시양태에서, PFP는 CD47 리간드에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하지만, CD47에 결합하는 내생성 수용체의 기능적 세포내 도메인을 포함하지 않거나, (i) PFP는 포스파타제 불활성화 도메인을 포함하거나, 포스파타제를 활성화시키는 세포내 도메인을 포함하지 않거나, (ii) PFP는 식세포 수용체로부터 유래한 세포내 신호전달 도메인을 포함한다.

[0402] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP는 FcR과 기능적 복합체를 형성한다.

[0403] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP는 FcRγ와 기능적 복합체를 형성한다.

[0404] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP는 FcR-알파 또는 FcRβ의 막횡단 도메인을 포함한다.

[0405] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP는 TREM과 기능적 복합체를 형성한다.

[0406] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP는 ITAM을 포함하는 세포내 도메인을 포함한다.

[0407] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP는 ITAM을 포함하는 세포내 도메인을 포함한다.

[0408] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CD47 매개 항-식세포작용 활성의 억제를 나타낸다.

[0409] 일부 실시양태에서, 단축형 SIRPα는 CD47에 결합하여 이를 억제한다.

[0410] 일부 실시양태에서, 결합 모티프는 재조합 핵산의 UTR 영역에 있다. 일부 실시양태에서, 결합 모티프는 ARE 서열이다.

[0411] 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 DAP12의 막횡단 도메인에 결합한다.

[0412] 일부 실시양태에서, DAP12의 막횡단 도메인에 결합하는 막횡단 도메인은 TREM으로부터 유래한다.

[0413] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP는 DAP12 단량체로부터 유래한 세포내 도메인을 포함한다.

[0414] 일부 실시양태에서, 재조합 폴리뉴클레오타이드는 제1 변형된 신호 조절 단백질α(SIRPα)를 코딩하는 서열을 추가로 포함한다.

[0415] 일부 실시양태에서, 제1 변형된 SIRPα는 야생형 SIRPα의 세포내 신호전달 도메인을 결여한다.

[0416] 일부 실시양태에서, 제1 변형된 SIRPα는 야생형 SIRPβ의 세포내 신호전달 도메인을 결여한다.

[0417] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP는 식세포작용을 차단하는 신호를 전달하지 않는다.

[0418] 일부 실시양태에서, 조성물은 제2 변형된 신호 조절 단백질 α(SIRPα)를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함하고, 이때 제2 변형된 SIRPα는 PI3K 결합 도메인을 포함한다.

[0419] 일부 실시양태에서, PI3K 결합 도메인은 CD19, CD28, CSFR 또는 PDGFR로부터 유래한다.

[0420] 일부 실시양태에서, 조성물은 제3 변형된 신호 조절 단백질 α(SIRPα)를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드도 포함하고, 이때 제3 변형된 SIRPα는 염증유발 도메인을 포함한다.

[0421] 일부 실시양태에서, 조성물은 SIRPα로부터 유래한 세포외 도메인, SIRPβ로부터 유래한 막횡단 도메인, 및 SIRPβ로부터 유래한 세포내 도메인을 포함하는 재조합 SIRP를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함한다.

[0422] 일부 실시양태에서, 조성물은 재조합 SIRP가 항원 CD47에 결합할 때 식세포작용을 차단하는 신호를 전달하지 않는 제3 변형된 SIRPα를 추가로 포함한다.

[0423] 일부 실시양태에서, 항-CD47 결합 도메인은 신호 조절 단백질 알파(SIRPα) 또는 신호 조절 단백질 베타(SIRPβ)로부터 유래한다.

[0424] 일부 실시양태에서, PFP와 표적 세포의 항원의 결합 시, PFP를 발현하는 세포의 사멸 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 20% 이상 증가된다.

[0425] 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 식세포 또는 테더링 수용체로부터 유래한다.

[0426] 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 표 2에 나열된 수용체들 중 어느 한 수용체로부터 선택된 식세포 수용체 이외의 수용체로부터 유래한다.

[0427] 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 렉틴, 덱틴 1, CD206, 스캐빈저 수용체 A1(SRA1), MARCO, CD36, CD163, MSR1, SCARA3, COLEC12, SCARA5, SCARB1, SCARB2, CD68, OLR1, SCARF1, SCARF2, CXCL16, STAB1, STAB2, SRCRB4D, SSC5D, CD205, CD207, CD209, RAGE, CD14, CD64, F4/80, CCR2, CX3CR1, CSF1R, Tie2, HuCRIg(L) 및 CD169로 구성된 군으로부터 선택된 수용체로부터 유래한다.

[0428] 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 염증유발 신호전달 도메인을 포함한다.

[0429] 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 PI3K 동원 도메인이 아닌 염증유발 신호전달 도메인을 포함한다.

[0430] 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 Megf10, MerTk, FcR-알파 또는 Bai1로부터 선택된 식세포 수용체 이외의 식세포 수용체로부터 유래한다.

[0431] 일부 실시양태에서, PFP와 표적 세포의 항원의 결합 시, PFP를 발현하는 세포의 사멸 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 20% 이상 증가된다.

[0432] 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 표 1에 나열된 단백질들 중 어느 한 단백질로 구성된 군으로부터

선택된 식세포 수용체로부터 유래한다.

[0433] 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 PI3K 동원 도메인을 포함한다.

[0434] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP는 CFP 또는 PFP가 세포에서 발현될 때 세포의 세포막 내로 기능적으로 혼입된다.

[0435] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 항원을 발현하는 표적 세포의 식세포작용의 증가를 나타낸다.

[0436] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 항원을 발현하는 표적 세포의 식세포작용의 적어도 1.1배 증가를 나타낸다.

[0437] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 항원을 발현하는 표적 세포의 식세포작용의 적어도 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 20배, 30배 또는 50배 증가를 나타낸다.

[0438] 일부 실시양태에서, 항원을 발현하는 표적 세포는 암 세포이다.

[0439] 일부 실시양태에서, 항원을 발현하는 표적 세포는 직경이 적어도 0.8 마이크론이다.

[0440] 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 스캐빈저 수용체로부터 유래한다.

[0441] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 사이토카인의 생성 증가를 나타낸다.

[0442] 일부 실시양태에서, 사이토카인은 IL-1, IL3, IL-6, IL-12, IL-13, IL-23, TNF, CCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11, IL-18, IL-23, IL-27, CSF, MCSF, GMCSF, IL17, IP-10, RANTES, 인터페론 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0443] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 이펙터 활성의 증가를 나타낸다.

[0444] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 교차 제시의 증가를 나타낸다.

[0445] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 MHC 클래스 II 단백질의 발현 증가를 나타낸다.

[0446] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 CD80의 발현 증가를 나타낸다.

[0447] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 CD86의 발현 증가를 나타낸다.

[0448] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 MHC 클래스 I 단백질의 발현 증가를 나타낸다.

[0449] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 TRAIL/TNF 패밀리 사멸 수용체의 발현 증가를 나타낸다.

[0450] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 B7-H2의 발현 증가를 나타낸다.

[0451] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 LIGHT의 발현 증가를 나타낸다.

[0452] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 HVEM의 발현 증가를 나타낸다.

[0453] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 CD40의 발현 증가를 나타낸다.

[0454] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 TL1A의 발현

증가를 나타낸다.

[0455] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 41BBL의 발현 증가를 나타낸다.

[0456] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 OX40L의 발현 증가를 나타낸다.

[0457] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 GITRL 사멸 수용체의 발현 증가를 나타낸다.

[0458] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 CD30L의 발현 증가를 나타낸다.

[0459] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 TIM4의 발현 증가를 나타낸다.

[0460] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 TIM1 리간드의 발현 증가를 나타낸다.

[0461] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 SLAM의 발현 증가를 나타낸다.

[0462] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 CD48의 발현 증가를 나타낸다.

[0463] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 CD58의 발현 증가를 나타낸다.

[0464] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 CD155의 발현 증가를 나타낸다.

[0465] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 CD112의 발현 증가를 나타낸다.

[0466] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 PDL1의 발현 증가를 나타낸다.

[0467] 일부 실시양태에서, 본원은 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 B7 내지 DC 중 임의의 세포의 조성물을 제공한다.

[0468] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 호흡 폭발의 증가를 나타낸다.

[0469] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 ROS 생성의 증가를 나타낸다.

[0470] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 iNOS 생성의 증가를 나타낸다.

[0471] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 iNOS 생성의 증가를 나타낸다.

[0472] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 세포외 소포 생성의 증가를 나타낸다.

[0473] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 항원을 발현하는 표적 세포와의 트로고사이토시스의 증가를 나타낸다.

[0474] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 식세포작용의 CD47 매개 억제에 대한 내성의 증가를 나타낸다.

[0475] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 CFP 또는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 식세포작용의

LILRB1 매개 억제에 대한 내성의 증가를 나타낸다.

[0476] 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 Rac 억제 도메인, Cdc42 억제 도메인 또는 GTPase 억제 도메인을 포함한다.

[0477] 일부 실시양태에서, Rac 억제 도메인, Cdc42 억제 도메인 또는 GTPase 억제 도메인은 CFP 또는 PFP를 발현하는 세포의 식세포 컵에서 Rac, Cdc42 또는 GTPase를 억제한다.

[0478] 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 F-액틴 해체 활성화 도메인, ARHGAP12 활성화 도메인, ARHGAP25 활성화 도메인 또는 SH3BP1 활성화 도메인을 포함한다.

[0479] 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP를 발현하는 세포는 포스파티딜이노시톨 3,4,5-트리스포스페이트 생성의 증가를 나타낸다.

[0480] 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 Ig 결합 도메인을 포함한다.

[0481] 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, FcγRIIIA, FcγRIIIB, FcRn, TRIM21, FcRL5 결합 도메인을 포함한다.

[0482] 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 FcR 세포외 도메인을 포함한다.

[0483] 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 FcRα, FcRβ, FcRε 또는 FcRγ 세포외 도메인을 포함한다.

[0484] 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 FcRα(FCAR) 세포외 도메인을 포함한다.

[0485] 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 FcRβ 세포외 도메인을 포함한다.

[0486] 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 FcRε(FCER1A) 세포외 도메인을 포함한다.

[0487] 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 FcRγ(FDGR1A, FCGR2A, FCGR2B, FCGR2C, FCGR3A, FCGR3B) 세포외 도메인을 포함한다. 세포외 도메인은 인테그린 도메인을 포함한다.

[0488] 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 하나 이상의 인테그린 α1, α2, αIIb, α3, α4, α5, α6, α7, α8, α9, α10, α11, αIIb, αD, αE, αL, αM, αV, αX, β1, β2, β3, β4, β5, β6, β7, β8 도메인을 포함한다.

[0489] 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 CD47 억제 도메인을 포함한다.

[0490] 일부 실시양태에서, PSR 서브유닛은 막횡단 도메인 및 세포외 항원 결합 도메인에 작동 가능하게 연결된 세포외 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 수용체, 힌지, 스페이서 또는 링커의 세포외 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 PSR의 세포외 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, PSR의 세포외 부분은 PSR 세포내 신호전달 도메인과 동일한 PSR로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 스캐빈저 수용체 또는 면역글로불린 도메인의 세포외 도메인을 포함한다.

[0491] 일부 실시양태에서, 면역글로불린 도메인은 면역글로불린 또는 면역글로불린 힌지 영역의 세포외 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 식세포 삼킴 마커를 포함한다.

[0492] 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 다량체 조립이 가능한 구조를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 다량체화를 위한 스카폴드를 포함한다.

[0493] 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 길이가 적어도 10개, 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 150개, 200개, 300개, 300개, 400개 또는 500개 아미노산이다. 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 길이가 최대 500개, 400개, 300개, 200개 또는 100개 아미노산이다.

[0494] 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 표적 세포의 항원에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 항체 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 수용체 도메인, 항체 도메인을 포함하고, 이때 항체 도메인은 기능적 항체 단편, 단일 쇄 가변 단편(scFv), Fab, 단일 도메인 항체(sdAb), 나노바디, V_H 도메인, V_L 도메인, VNAR 도메인, V_{HH} 도메인, 이중특이적 항체, 디아바디, 또는 이들의 기능적 단편 또는 조합을 포함한다.

[0495] 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 리간드, 수용체의 세포외 도메인 또는 어댑터를 포함한다.

[0496] 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 단일 항원에 특이적인 단일 세포외 항원 결합 도메인을 포함한

다.

[0497] 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 적어도 2개의 세포외 항원 결합 도메인들을 포함하고, 이때 적어도 2개의 세포외 항원 결합 도메인들 각각은 상이한 항원에 특이적이다. 일부 실시양태에서, 항원은 암 항원 또는 병원성 항원 또는 자가면역 항원이다. 일부 실시양태에서, 항원은 바이러스 항원을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항원은 T 림프구 항원이다. 일부 실시양태에서, 항원은 세포외 항원이다. 일부 실시양태에서, 항원은 세포내 항원이다.

[0498] 일부 실시양태에서, 항원은 타이미딘 키나제(TK1), 하이포잔틴-구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제(HPRT), 수용체 티로신 키나제 유사 오판 수용체 1(ROR1), 뮤신-1, 뮤신-16(MUC16), MUC1, 표피 성장 인자 수용체 vIII(EGFRvIII), 메소텔린, 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER2), 메소텔린, EBNA-1, LEMD1, 포스파티딜 세린, 암배아 항원(CEA), B 세포 성숙 항원(BCMA), 글리피칸 3(GPC3), 여포 자극 호르몬 수용체, 섬유모세포 활성화 단백질(FAP), 에리쓰로포이에틴 생성 간세포암종 A2(EphA2), EphB2, 천연 킬러 군 2D(NKG2D) 리간드, 디시알로강글리오사이드 2(GD2), CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD19, CD20, CD22, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44v6, CD45, CD56CD79b, CD97, CD117, CD123, CD133, CD138, CD171, CD179a, CD213A2, CD248, CD276, PSCA, CS-1, CLECL1, GD3, PSMA, FLT3, TAG72, EPCAM, IL-1, 인테그린 수용체, PRSS21, VEGFR2, PDGFR-β, SSEA-4, EGFR, NCAM, 프로스타제, PAP, ELF2M, GM3, TEM7R, CLDN6, TSHR, GPRC5D, ALK, IGLL1 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 항원은 CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CCR4, CD8, CD30, CD45, CD56으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0499] 일부 실시양태에서, 항원은 난소암 항원 또는 T 림프종 항원이다. 일부 실시양태에서, 항원은 인테그린 수용체이다. 일부 실시양태에서, 항원은 α1, α2, αIIb, α3, α4, α5, α6, α7, α8, α9, α10, α11, αD, αE, αL, αM, αV, αX, β1, β2, β3, β4, β5, β6, β7 및 β8로 구성된 군으로부터 선택된 인테그린 수용체이다.

[0500] 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인과 세포외 항원 결합 도메인은 링커를 통해 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인과 세포외 항원 결합 도메인은 CD8α□□IgG1 또는 IgG4의 힌지 영역과 같은 링커를 통해 작동 가능하게 연결된다.

[0501] 일부 실시양태에서, 세포외 도메인은 다량체화 스카폴드를 포함한다.

[0502] 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 FcR 막횡단 도메인을 포함한다.

[0503] 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 FcR-알파, FcRβ 또는 FcRɣ 막횡단 도메인을 포함한다.

[0504] 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 FcαR(FCAR) 막횡단 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 FcRε(FCER1A) 막횡단 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 FcRɣ(FDGR1A, FCGR2A, FCGR2B, FCGR2C, FCGR3A 및 FCGR3B) 막횡단 도메인을 포함한다.

[0505] 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 T 세포 수용체 서브유닛, CD3 엡실론, CD3 감마 및 CD3 델타, CD45, CD2, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD19, CD22, CD33, CD28, CD30, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 및 CD154, 또는 이들의 기능적 단편, 또는 막횡단 도메인의 적어도 1개, 2개 또는 3개의 변형 내지 20개, 10개 또는 5개 이하의 변형을 가진 아미노산 서열을 포함한다.

[0506] 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 신탁신 3 또는 신탁신 4 또는 신탁신 5와 같은 신탁신으로부터의 막횡단 도메인을 포함한다.

[0507] 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 CR 또는 PFP가 세포에서 발현될 때 내생성 수용체의 막횡단 도메인과 올리고머화한다.

[0508] 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 CR 또는 PFP가 세포에서 발현될 때 외생성 수용체의 막횡단 도메인과 올리고머화한다.

[0509] 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 CFP 또는 PFP가 세포에서 발현될 때 내생성 수용체의 막횡단 도메인과 이량체화한다.

[0510] 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 CFP 또는 PFP가 세포에서 발현될 때 외생성 수용체의 막횡단 도메인과 이량체화한다.

[0511] 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 세포내 신호전달 도메인이 유래한 단백질과 상이한 단백질로부터 유래한다.

[0512] 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 세포외 도메인이 유래한 단백질과 상이한 단백질로부터 유래한다.

[0513] 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 식세포 수용체의 막횡단 도메인을 포함한다.

[0514] 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인 및 세포외 도메인은 동일한 단백질로부터 유래한다.

[0515] 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 세포내 신호전달 도메인과 동일한 단백질로부터 유래한다.

[0516] 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 DAP12 동원 도메인을 코딩한다.

[0517] 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 DAP12와 올리고머화하는 막횡단 도메인을 포함한다.

[0518] 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 길이가 적어도 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 31개 또는 32개 아미노산이다.

[0519] 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 길이가 최대 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 31개 또는 32개 아미노산이다.

[0520] 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 포스파타제 억제 도메인을 포함한다.

[0521] 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 ARP2/3 억제 도메인을 포함한다.

[0522] 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 적어도 하나의 ITAM 도메인을 포함한다.

[0523] 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 ITAM 도메인을 포함한다.

[0524] 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 적어도 하나의 ITAM 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 CD3 제타 TCR 서브유닛, CD3 엡실론 TCR 서브유닛, CD3 감마 TCR 서브유닛, CD3 델타 TCR 서브유닛, TCR 제타 쇄, Fc 엡실론 수용체 1 쇄, Fc 엡실론 수용체 2 쇄, Fc 감마 수용체 1 쇄, Fc 감마 수용체 2a 쇄, Fc 감마 수용체 2b1 쇄, Fc 감마 수용체 2b2 쇄, Fc 감마 수용체 3a 쇄, Fc 감마 수용체 3b 쇄, Fc 베타 수용체 1 쇄, TYROBP(DAP12), CD5, CD16a, CD16b, CD22, CD23, CD32, CD64, CD79a, CD79b, CD89, CD278, CD66d, 이들의 기능적 단편, 및 이들에 대한 적어도 1개 내지 20개 이하의 변형을 가진 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 ITAM 도메인을 추가로 포함한다.

[0525] 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 ITAM 도메인은 Src 패밀리 키나제 인산화 부위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 ITAM 도메인은 Syk 동원 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 F-액틴 해중합 활성화 도메인을 포함한다.

[0526] 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 유비퀴틸화될 수 있는 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 E3 유비퀴틴 리가제에 결합할 수 있다.

[0527] 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 TAK1 키나제에 결합할 수 있다.

[0528] 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 MAP 키나제 또는 MAP 키나제 패밀리 구성원에 결합할 수 있다.

[0529] 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 유비퀴틸화 시 활성화될 수 있고 세포내 신호전달을 활성화시켜, 염증유발 유전자 전사를 야기할 수 있다.

[0530] 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 효소 활성을 결여한다.

[0531] 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 CD3 제타 세포내 도메인으로부터 유래한 도메인을 포함하지 않는다.

[0532] 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 CD47 억제 도메인을 포함한다.

[0533] 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 인테그린을 활성화시키는 도메인, 예컨대, PSGL-1의 세포내 영역을 포함한다.

[0534] 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 Rap1 GTPase를 활성화시키는 도메인, 예컨대, EPAC 및 C3G로부터의 도메인을 포함한다.

[0535] 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 팍실린으로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달

도메인은 국소 부착 키나제를 활성화시킨다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 단일 식세포 수용체로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 단일 스캐빈저 수용체로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 식세포작용 증강 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 염증유발 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 염증유발 신호전달 도메인은 키나제 활성화 도메인 또는 키나제 결합 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 염증유발 신호전달 도메인은 IL-1 신호전달 캐스케이드 활성화 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 염증유발 신호전달 도메인 TLR3, TLR4, TLR7, TLR9, TRIF, RIG-1, MYD88, MAL, IRAK1, MDA-5, IFN 수용체, NLRP 패밀리 구성원, NLRP1-14, NOD1, NOD2, 피린, AIM2, NLRC4, FCGR3A, FCERIG, CD40 또는 이들의 임의의 조합으로부터 유래한 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP는 전체 길이 세포내 신호전달 도메인을 포함하지 않는다.

[0536] 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 길이가 적어도 5개, 10개, 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 150개, 200개, 300개, 300개, 400개 또는 500개 아미노산이다.

[0537] 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 길이가 최대 10개, 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 150개, 200개, 300개, 300개, 400개 또는 500개 아미노산이다.

[0538] 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 FcRα 쇄 세포외 도메인, FcRα 쇄 막횡단 도메인 및/또는 FcRα 쇄 세포내 도메인을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 FcRβ 쇄 세포외 도메인, FcRβ 쇄 막횡단 도메인 및/또는 FcRβ 쇄 세포내 도메인을 코딩한다. 일부 실시양태에서, FcRα 쇄 또는 FcRβ 쇄는 세포에서 발현될 때 FcRγ와 복합체를 형성한다. 일부 실시양태에서, FcRα 쇄 또는 FcRβ 쇄는 세포에서 발현될 때 내생성 FcRγ와 복합체를 형성한다. 일부 실시양태에서, FcRα 쇄 또는 FcRβ 쇄는 FcRγ를 발현하지 않는 세포의 세포막 내로 혼입되지 않는다. 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP는 FcRα 쇄 세포내 신호전달 도메인을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, CFP 또는 PFP는 FcRβ 쇄 세포내 신호전달 도메인을 포함하지 않는다.

[0539] 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 TREM 세포외 도메인, TREM 막횡단 도메인 및/또는 TREM 세포내 도메인을 코딩한다. 일부 실시양태에서, TREM은 TREM1, TREM2 또는 TREM3이다.

[0540] 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 염증유발 폴리펩타이드를 코딩하는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 염증유발 폴리펩타이드를 추가로 포함한다.

[0541] 일부 실시양태에서, 염증유발 폴리펩타이드는 케모카인, 사이토카인 및 뉴클레오타이드이다. 일부 실시양태에서, 케모카인은 CCL2, CXCL1, CXCL12, CXCL9, CXCL10, CXCL11로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0542] 일부 실시양태에서, 사이토카인은 IL-1, IL3, IL5, IL-6, IL-12, IL-13, IL-23, TNF, IL-18, IL-23, IL-27, CSF, MCSF, GMCSF, IL17, IP-10, RANTES, 인터페론으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0543] 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 염증의 항상성 조절인자를 포함한다.

[0544] 일부 실시양태에서, 염증의 항상성 조절인자는 mRNA의 비번역 영역(UTR) 내의 서열이다. 일부 실시양태에서, UTR 내의 서열은 RNA 결합 단백질에 결합하는 서열이다. 일부 실시양태에서, 번역은 RNA 결합 단백질과 비번역 영역(UTR) 내의 서열의 결합 시 억제되거나 방해된다. 일부 실시양태에서, UTR 내의 서열은 컨센서스 서열인 WWWU(AUUUA)UUUW(서열번호 35)를 포함하고, 이때 W는 A 또는 U이다.

[0545] 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 바이시스트론 벡터에서 발현된다.

[0546] 일부 실시양태에서, 표적 세포는 포유동물 세포이다. 일부 실시양태에서, 표적 세포는 인간 세포이다. 일부 실시양태에서, 표적 세포는 병원체에 의해 감염된 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 세포는 암 세포이다. 일부 실시양태에서, 표적 세포는 림프구인 암 세포이다. 일부 실시양태에서, 표적 세포는 난소암 세포인 암 세포이다. 일부 실시양태에서, 표적 세포는 난소 췌장 세포인 암 세포이다. 일부 실시양태에서, 표적 세포는 교모세포종 세포인 암 세포이다.

[0547] 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 DNA이다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 RNA이다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 mRNA이다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 circRNA이다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 tRNA이다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 microRNA이다.

[0548] 본원은 전술된 조성물을 포함하는 벡터를 제공한다. 일부 실시양태에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 벡터는 하나 이상의 폴리펩타이드를 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 추가로

포함한다. 일부 실시양태에서, 벡터는 폴리시스트론성 벡터이다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 핵산 서열 각각은 별개의 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시양태에서, 벡터는 하나 이상의 내부 리보좀 진입 부위(IRES)를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 벡터는 하나 이상의 폴리펩타이드를 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열을 플랭킹하는 5' UTR 및/또는 3' UTR을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 벡터는 하나 이상의 조절 영역을 추가로 포함한다.

[0549] 본원은 전술된 조성물의 재조합 핵산에 의해 코딩된 폴리펩타이드를 제공한다.

[0550] 한 양태에서, 본원은 전술된 벡터 또는 전술된 폴리펩타이드를 포함하는 세포를 제공한다. 일부 실시양태에서, 세포는 식세포성 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 줄기 세포 유래 세포, 골수 세포, 대식세포, 수지상 세포, 림프구, 비만 세포, 단핵구, 호중구, 미세아교세포 또는 성상세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 자가 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 동종이계 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 M1 골수 세포, 예컨대, 대식세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 M2 골수 세포, 예컨대, 대식세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 골수계통의 전구체 세포이다. 일부 실시양태에서, 골수 세포는 CD14+ 세포이다. 일부 실시양태에서, 골수 세포는 CD16- 세포이다. 일부 실시양태에서, 골수 세포는 CD14+ 및 CD16- 세포이다.

[0551] 본원은 (a) 전술된 핵산 조성물, 벡터, 폴리펩타이드 또는 세포; 및 (b) 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 약학 조성물은 추가 치료제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 약학 조성물은 CD47 아고니스트, Rac를 억제하는 작용제, Cdc42를 억제하는 작용제, GTPase를 억제하는 작용제, F-액틴 해체를 촉진하는 작용제, CFP 또는 PFP로의 PI3K 동원을 촉진하는 작용제, PI3K 활성을 촉진하는 작용제, 포스파티딜이노시톨 3,4,5-트리스포스페이트의 생성을 촉진하는 작용제, ARHGAP12 활성을 촉진하는 작용제, ARHGAP25 활성을 촉진하는 작용제, SH3BP1 활성을 촉진하는 작용제 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 추가 치료제를 포함한다.

[0552] 일부 실시양태에서, 약학적으로 허용 가능한 부형제는 무혈청 배지, 지질 또는 나노입자를 포함한다.

[0553] 본원은 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 질환을 치료하는 방법으로서, 본원에 기재된 약학 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

[0554] 일부 실시양태에서, 질환은 암이다. 일부 실시양태에서, 암은 고형 암이다. 일부 실시양태에서, 고형 암은 난소암, 신장암, 유방암, 전립선암, 간암, 뇌암, 림프종, 백혈병, 피부암, 췌장암, 대장암, 폐암으로 구성된 군으로부터 선택되고, 적합한 암은 난소암을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 액형 암이다. 일부 실시양태에서, 액형 암은 백혈병 또는 림프종이다. 일부 실시양태에서, 액형 암은 T 세포 림프종이다. 일부 실시양태에서, 질환은 T 세포 악성종양이다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 추가 치료제를 대상체에게 투여하는 단계도 포함한다. 일부 실시양태에서, 추가 치료제는 CD47 아고니스트, Rac를 억제하는 작용제, Cdc42를 억제하는 작용제, GTPase를 억제하는 작용제, F-액틴 해체를 촉진하는 작용제, CFP 또는 PFP로의 PI3K 동원을 촉진하는 작용제, PI3K 활성을 촉진하는 작용제, 포스파티딜이노시톨 3,4,5-트리스포스페이트의 생성을 촉진하는 작용제, ARHGAP12 활성을 촉진하는 작용제, ARHGAP25 활성을 촉진하는 작용제, SH3BP1 활성을 촉진하는 작용제 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0555] 일부 실시양태에서, 투여는 주입 또는 주사를 포함한다. 일부 실시양태에서, 투여는 고형 암에 직접 투여하는 단계를 포함한다.

[0556] 일부 실시양태에서, 투여는 circRNA, mRNA, 바이러스, 입자, 리포좀 또는 엑소좀 기반 전달 절차를 포함한다.

[0557] 일부 실시양태에서, 대상체에서 CD4+ T 세포 반응 또는 CD8+ T 세포 반응이 유발된다.

[0558] 일부 실시양태에서, 방법은 세포를 전술된 조성물, 전술된 벡터 또는 전술된 폴리펩타이드와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 접촉은 형질도입을 포함한다. 일부 실시양태에서, 형질도입은 화학적 형질감염, 전기천공, 뉴클레오펙션 또는 바이러스 감염을 포함한다.

[0559] 일부 실시양태에서, 본원은 지질을 본원에 기재된 조성물 또는 본원에 기재된 벡터와 접촉시키는 단계를 포함하는 약학 조성물의 제조 방법을 제공한다.

[0560] 일부 실시양태에서, 접촉은 지질 나노입자를 형성하는 단계를 포함한다.

[0561] 항체를 본원에 기재된 조성물 또는 본원에 기재된 벡터와 접촉시키는 단계를 포함하는 약학 조성물의 제조 방법도 제공한다. 일부 실시양태에서, 접촉은 지질 나노입자를 형성하는 단계를 포함한다.

[0562] *재조합 핵산 구축물 내의 전사 조절 요소*

[0563] 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 코딩된 단백질의 원하는 발현 프로파일을 위해 조작될 수 있는 비코딩 영역 내에 하나 이상의 조절 요소를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비코딩 영역은 적합한 인핸서를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 인핸서는 인핸서의 영향 하에서 코딩된 단백질의 발현을 시작하기 위해 세포 또는 세포를 포함하는 시스템에 첨가될 수 있는 조절제 단백질 또는 펩타이드에 대한 결합 영역을 포함한다. 대조적으로, 조절 요소는 동족 단백질과 결합된 상태로 유지되고 단백질이 결합된 위치로부터 분리되어 단백질 합성이 시작될 수 있도록 세포외 신호가 제공될 때까지 재조합 단백질의 전사 및/또는 번역을 계속 억제하는 단백질 결합 도메인을 포함할 수 있다. 예는 당분야에서 숙련된 자에게 공지되어 있는 테트라사이클린 유도성(Tet 유도성 또는 Tet-on) 시스템 및 테트라사이클린 억제성(Tet-off) 시스템을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다.

[0564] *대사 스위치를 포함하는 구축물:*

[0565] 일부 실시양태에서, 구축물의 코딩 영역을 플랭킹하는 5' 비번역 영역 및 3' 비번역 영역은 전술된 핵산 구축물에 의해 코딩된 재조합 단백질의 발현 조절을 위해 조작될 수 있다. 예를 들면, 3' UTR은 mRNA를 안정화시키기 위해 삽입되는 하나 이상의 요소를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, mRNA를 안정화시키거나 불안정화시켜, mRNA 반감기를 조절할 수 있게 하는 RNA 결합 단백질의 결합을 야기하는 AU 풍부 요소(ARE)를 3' UTR에 삽입한다.

[0566] 일부 실시양태에서, 3' UTR은 성숙 mRNA 가닥에 결합하여 번역을 방해하는 RNA 결합 단백질(예를 들면, GAPDH)을 위한 보존된 영역을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 해당과정은 RNA 결합 단백질(예를 들면, GAPDH)의 분리를 야기하여, mRNA 가닥이 번역될 수 있게 한다. 대사 스위치의 원리는 세포가 특정 대사 상태로 들어갈 때 표적 유전자의 발현을 유발하는 것이다. 휴면 세포에서, 예를 들면, GAPDH는 RNA 결합 단백질(RBP)이다. 이것은 3' UTR 내의 ARE 서열에 결합하여, mRNA의 번역을 방해한다. 세포가 해당작용으로 들어갈 때, GAPDH는 글루코스를 ATP로 전환시켜, mRNA로부터 빠져나와 단백질 번역이 일어나게 하기 위해 요구된다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산을 포함하는 세포가 존재하는 환경은 유전자 발현으로의 대사 스위치를 제공한다. 예를 들면, 저산소 상태는 mRNA로부터의 GAPDH의 분리를 유도하는 대사 스위치를 유발할 수 있다. 따라서, mRNA의 발현은 골수 세포, 예컨대, 대식세포가 순환계를 떠나 저산소 종양 환경 내로 들어갈 때 유도될 수 있다. 이것은 핵산 또는 핵산을 포함하는 세포의 전신 투여를 허용하나, 국소 발현을 보장하여, 종양 환경을 특이적으로 표적화한다.

[0567] 일부 실시양태에서, 핵산 구축물은 예를 들면, 구축물의 일부가 항시적 발현 시스템의 조절 하에서 발현될 수 있게 하는 반면, 핵산의 또 다른 일부가 전술된 바와 같이 대사 스위치의 조절 하에서 발현되게 하는 분할 구축물일 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산은 바이시스트론 조절 하에 있을 수 있다. 일부 실시양태에서, 바이시스트론성 벡터는 항시적 조절 하에 있을 수 있는 표적 인식 모이어티의 코딩 서열을 포함하는, 제1 조절 제어 하에 있는 제1 코딩 서열; 및 대사 스위치 하에 있을 수 있는 염증 유전자 발현을 코딩하는 제2 코딩 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 바이시스트론성 벡터는 일방향 벡터일 수 있다. 일부 실시양태에서, 바이시스트론성 벡터는 양방향 벡터일 수 있다.

[0568] 일부 실시양태에서, ARE는 ADK, ALDH18A1, ALDH6A1, ALDOA, ASS1, CCBL2, CS, DUT, ENO1, FASN, FDPS, GOT2, HADHB, HK2, HSD17B10, MDH2, NME1, NQO1, PKM2, PPP1CC, SUCLG1, TP11, GAPDH 또는 LDH에 결합하는, ARE 서열에 결합하기 위한 단백질 결합 모티프를 포함한다.

[0569] *세포 내로의 핵산의 전달:*

[0570] 본원에 기재된 CFP 또는 PFP를 코딩하는 핵산은 상이한 전달 전달법을 통해 세포, 예를 들면, 골수 세포에 도입될 수 있다. 본원에 기재된 재조합 핵산은 시험관내, 생체외 또는 생체내에서 세포에 도입될 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산은 플라스미드 또는 벡터의 형태로 골수 세포에 도입된다. 일부 실시양태에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 벡터는 발현 벡터, 예를 들면, 하나 이상의 프로모터, 및 인핸서 결합 서열, 시작 및 종결 코돈, 5' UTR, 전사체 안정화 요소를 포함하는 3' UTR, 임의적 보존된 조절 단백질 결합 서열 등을 비롯한 다른 조절 성분을 포함하는 벡터이다. 일부 실시양태에서, 벡터는 파지, 코스미드 또는 인공 염색체이다.

[0571] 일부 실시양태에서, 벡터는 공지된 형질감염 방법, 예컨대, 리포펙타민 또는 인산칼슘의 사용에 의해, 또는 전기천공 또는 뉴클레오펙션과 같은 물리적 수단을 통해 세포에 도입되거나 혼입된다. 일부 실시양태에서, 벡터는 통상적으로 바이러스 형질도입으로서 공지되어 있는 과정인 감염에 의해 세포에 도입되거나 혼입된다.

[0572] 일부 실시양태에서, CFP 발현용 벡터는 바이러스로부터 유래한다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 비분열 세포를 복제할 수 있는 바이러스 벡터에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산을 코딩하는 핵산은 렌티바이러스 벡터, 예를 들면, HIV 및 FIV 기반 벡터에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 렌티바이러스 벡터는 사내 제조되고 목적을 위해 대규모로 제작된다. 일부 실시양태에서, 당분야에서 숙련된 자에게 공지되어 있는 바와 같이, 상업적으로 입수될 수 있는 렌티바이러스 벡터가 사용된다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산은 헤르페스 심플렉스 바이러스 벡터, 백시니아 바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터 또는 아데노 관련 바이러스(AAV) 벡터에 의해 코딩된다.

[0573] 일부 실시양태에서, 골수 세포, 예컨대, 대식세포 및 다른 식세포성 세포 내로의 전이유전자의 안정한 통합은 전위효소(transposase) 및 전위 가능한 요소, 특히 mRNA 코딩된 전위효소의 사용을 통해 달성될 수 있다. 한 실시양태에서, 전이유전자의 역전위 및 골수 세포, 예컨대, 대식세포 및 식세포성 세포 내로의 안정한 통합을 위해 긴 산재된 요소(Long Interspersed Element)-1(L1) RNA가 고려될 수 있다. 식세포 또는 테더링 수용체(PR) 융합 단백질(PFP)을 코딩하는 재조합 핵산의 안정한 통합을 위해 역트랜스포존이 사용될 수 있다.

[0574] 일부 실시양태에서, 골수 세포는 일시적인 발현 벡터 내로의 전이유전자의 혼입을 통해 전이유전자를 발현시킴으로써 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, 전이유전자의 발현은 세포 외부로부터의 조절제에 의해 일시적으로 조절될 수 있다. 예는 전이유전자의 발현이 테트라사이클린의 존재 또는 부재를 통해 조절되는 Tet-on Tet-off 시스템을 포함한다.

[0575] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 재조합 핵산은 원형 RNA(circRNA)이다. 원형 RNA는 RNA 분자의 5' 말단과 3' 말단이 함께 연결되어 있는 RNA 분자를 포함한다. 임의의 이론에 의해 구속받고자 하지는 않지만, circRNA는 자유 말단을 갖지 않고 일부 다른 형태의 RNA 또는 핵산에 비해 더 긴 반감기를 가질 수 있고 RNase R 엑소뉴클레아제에 의한 분해에 대한 내성을 가질 수 있고 생체내에서 그의 대응 선형 RNA보다 더 느리게 교체된다. 일부 실시양태에서, circRNA의 반감기는 20년 이상이다. 일부 실시양태에서, circRNA의 반감기는 30년 이상이다. 일부 실시양태에서, circRNA의 반감기는 40년 이상이다. 일부 실시양태에서, circRNA의 반감기는 48년 이상이다. 특정 실시양태에서, circRNA는 세포 내로 삽입되어 관심 있는 폴리펩타이드를 생성하기 위해 진핵 리보좀이 내부 리보좀 진입 부위(IRES)에 작동 가능하게 연결된 폴리펩타이드를 코딩하는 RNA 서열 요소와 만나게 하는 IRES 요소를 포함한다.

[0576] circRNA는 당분야에서 숙련된 자에게 공지되어 있는 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들면, circRNA는 화학적으로 합성될 수 있거나 효소에 의해 합성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 선형 일차 구축물 또는 선형 mRNA는 고리화되거나 콘카테머화되어 circRNA를 생성할 수 있다. 고리화 또는 콘카테머화의 기작은 화학적, 효소적 또는 리보좀 촉매작용 방법과 같은, 그러나 이들로 제한되지 않는, 방법을 통해 일어날 수 있다. 새로 형성된 5'/3' 결합은 분자내 결합 또는 분자간 결합일 수 있다. 일부 실시양태에서, 선형 일차 구축물 또는 선형 mRNA는 화학적 방법의 이용을 통해 고리화되거나 콘카테머화되어 circRNA를 형성할 수 있다. 화학적 방법에서, 핵산(예를 들면, 선형 일차 구축물 또는 선형 mRNA)의 5' 말단 및 3' 말단은 함께 가까이 있을 때 분자의 5' 말단과 3' 말단 사이에 새로운 공유결합을 형성하는 화학적 반응성 기를 함유한다. 5' 말단은 NHS-에스테르 반응성 기를 함유할 수 있고, 3' 말단은 유기 용매에서 선형 RNA 분자의 3' 말단 상의 3' 아미노 종결 뉴클레오타이드가 5' NHS-에스테르 모이어티에 대한 친핵성 공격을 받아 새로운 5'/3' 아미드 결합을 형성하도록 3' 아미노 종결 뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, DNA 또는 RNA 리가제, 예를 들면, T4 리가제는 5' 인산화된 핵산 분자(예를 들면, 선형 일차 구축물 또는 선형 mRNA)를 핵산의 3' 하이드록실 기에 효소적으로 연결하여 새로운 포스포로디에스테르 결합을 형성하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 선형 일차 구축물 또는 선형 mRNA는 적어도 하나의 비-핵산 모이어티를 사용함으로써 고리화될 수 있거나 콘카테머화될 수 있다. 예를 들면, 적어도 하나의 비-핵산 모이어티는 선형 일차 구축물 또는 선형 mRNA를 고리화하거나 콘카테머화하기 위해 선형 일차 구축물 또는 선형 mRNA의 5' 말단 근처 및/또는 3' 말단 근처에 있는 영역 또는 특징과 반응할 수 있다. 일부 실시양태에서, 선형 일차 구축물 또는 선형 mRNA는 선형 일차 구축물 또는 선형 mRNA의 5' 말단 및 3' 말단에서, 이 말단들 근처에서, 또는 이 말단들에 연결된 원자 또는 분자 표면 사이에 인력을 야기하는 비-핵산 모이어티로 인해 고리화될 수 있거나 콘카테머화될 수 있다. 예를 들면, 선형 일차 구축물 또는 선형 mRNA는 분자간 힘 또는 분자내 힘에 의해 고리화될 수 있거나 콘카테머화될 수 있다. 분자간 힘의 비제한적인 예. 일부 실시양태에서, 선형 일차 구축물 또는 선형 mRNA는 5' 말단 근처 및 3' 말단 근처에서 리보좀 RNA 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, circRNA는 DNA 단편을, 자발적 절단 및 자가 고리화 능력을 가진 서열을 함유하는 플라스미드에 삽입함으로써 합성될 수 있다. 일부 실시양태에서, circRNA는 RNA 고리화효소 리보자임을 코딩하는 DNA 구축물을 제조하고 이 DNA 구축물을 RNA로서 발현시킨 후 RNA가 자가 스플라이싱하게 하여, 시

험관내에서 인트론을 갖지 않는 circRNA를 생성함으로써 제조된다. 일부 실시양태에서, circRNA는 선형 폴리뉴클레오타이드를 합성하고 하이브리드화 조건 하에서 선형 뉴클레오타이드를 상보적 연결 올리고뉴클레오타이드와 조합하고 선형 폴리뉴클레오타이드를 라이게이션시킴으로써 생성된다.

[0577] circRNA는 변형될 수 있거나 변형되지 않을 수 있다. 일부 실시양태에서, circRNA는 화학적으로 변형된다. 예를 들면, circRNA의 A, G, U 또는 C 리보뉴클레오타이드는 화학적 변형을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, circRNA의 임의의 영역, 예를 들면, CFP 또는 PFP의 코딩 영역, 플랭킹 영역 및/또는 말단 영역은 1개 또는 2개 이상의 (임의적으로 상이한) 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드 변형을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포에 도입된 변형된 circRNA는 비변형된 circRNA에 비해 세포에서 감소된 분해를 나타낼 수 있다. 예컨대, 당, 핵염기 또는 뉴클레오사이드간 결합(예를 들면, 연결 포스페이트/포스포디에스테르 결합/포스포디에스테르 골격)에 대한 변형도 포함된다. 일부 실시양태에서, 핵염기, 예를 들면, 피리미딘 핵염기의 하나 이상의 원자는 임의적으로 치환된 아미노, 임의적으로 치환된 티올, 임의적으로 치환된 알킬(예를 들면, 메틸 또는 에틸) 또는 할로(예를 들면, 클로로 또는 플루오로)로 대체될 수 있거나 치환될 수 있다. 특정 실시양태에서, 변형(예를 들면, 하나 이상의 변형)은 당 및 뉴클레오사이드간 결합 각각에 존재한다. circRNA에 대한 추가 변형은 전체 내용이 본원에 참고로 포함된 미국 특허출원 공개 제US20170204422호에 기재되어 있다.

[0578] 일부 실시양태에서, circRNA는 다른 폴리뉴클레오타이드, 염료, 인터칼레이팅제(예를 들면, 아크리딘), 가교결합제(예를 들면, 소랄렌, 미토마이신 C), 포피린(TPPC4, 텍사피린, 사피린), 다환형 방향족 탄화수소(예를 들면, 페나진, 디하이드로페나진), 인공 엔도뉴클레아제(예를 들면, EDTA), 알킬화제, 포스페이트, 아미노, 머캡토, PEG(예를 들면, PEG-40K), MPEG, [MPEG]2, 폴리아미노, 알킬, 치환된 알킬, 방사성표지부착된 마커, 효소, 햅텐(예를 들면, 바이오틴), 수송/흡수 촉진제(예를 들면, 아스피린, 비타민 E, 엽산), 합성 리보뉴클레아제, 단백질, 예를 들면, 당단백질, 또는 펩타이드, 예를 들면, 보조리간드에 대한 특이적 친화성을 가진 분자, 또는 항체, 예를 들면, 특정된 세포 유형, 예컨대, 암 세포, 내피 세포 또는 골 세포에 결합하는 항체, 호르몬 및 호르몬 수용체, 비-펩타이드성 종, 예컨대, 지질, 렉틴, 탄수화물, 비타민 또는 보조인자에 접합된다.

[0579] 일부 실시양태에서, circRNA는 대상체의 조직에 직접적으로 투여된다. circRNA의 추가 설명은 전체적으로 본원에 각각 참고로 포함된 미국 특허 제5,766,903호, 제5,580,859호, 제5,773,244호 및 제6,210,931호, PCT 공개 제WO1992001813호, 문헌[Hsu et al., Nature (1979) 280:339-340], 문헌[Harland & Misher, Development (1988) 102:837-852], 문헌[Memczak et al. Nature (2013) 495:333-338], 문헌[Jeck et al., and RNA (2013) 19:141-157]에서 확인된다.

[0580] 일부 실시양태에서, 핵산은 나노입자(NP)에 의해 골수 세포에 도입된다. 나노입자는 다양한 모양 또는 크기를 가질 수 있고 CFP 또는 PFP를 코딩하는 핵산을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, NP는 지질 나노입자(LNP)이다. 일부 실시양태에서, NP는 폴리(아미노산), 폴리사카라이드 및 폴리(알파-하이드록시산), 금, 은, 탄소, 철, 실리카 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, NP는 폴리락타이드-코-글리콜라이드(PGLA) 입자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 예를 들면, 수/유 유화액 또는 수-유-수 유화액을 통해 NP 내로 캡슐화된다. 일부 실시양태에서, 핵산은 NP에 접합된다.

[0581] NP는 시험관내, 생체외 또는 생체내에서 세포에게 전달될 수 있다. 일부 실시양태에서, NP는 생체외에서 식세포성 세포에게 전달된다. 일부 실시양태에서, NP는 생체내에서 식세포성 세포에게 전달된다. 일부 실시양태에서, NP는 직경이 100 nm 미만이다. 일부 실시양태에서, NP는 직경이 100 nm 이상이다. 일부 실시양태에서, NP는 막대 모양 NP이다. 일부 실시양태에서, NP는 구형 NP이다. 특정 실시양태에서, NP는 식세포성 세포에게 전달될 구형 NP이다. 추가 실시양태에서, NP는 직경이 적어도 100 nm이고 세포에게 전달될 때 독성을 유발하지 않거나 감소된 독성을 유발한다.

[0582] 일부 실시양태에서, NP는 양으로 하전된다. 일부 실시양태에서, NP는 음으로 하전된다. 일부 실시양태에서, NP는 생체외 또는 생체내에서 골수 세포에게 전달되고 골수 세포에 의해 흡수되는 양이온성 NP이다.

[0583] 강성도는 NP의 생물학적 영향에 영향을 미칠 수 있다. 단단한 물질로 만들어진 NP는 색전증에 대한 증가된 잠재력과 관련될 수 있는 반면, 더 쉽게 변형될 수 있는 유연한 중합체 기반 NP는 염증과 관련된 복잡한 혈관 변화 동안 조직에 더 잘 접근할 수 있다. NP의 유동성도 항원이 로딩된 NP가 면역 반응을 자극하는 능력에 영향을 미친다. 따라서, 근육내 고체상 항원 함유 리포좀 면역화는 유사하게 투여된 유체상 리포좀보다 더 강력한 Th1/Th17 반응을 이끌어낼 수 있다. 임의의 이론에 구속받고자 하지는 않지만, 고체상 입자는 고정된 항원 입자 데포의 형성으로부터 생성될 수 있고 효율적인 T 세포 프라이밍을 뒷받침하는 양성 보조자극 분자, 예컨대,

CD80의 상향조절과도 관련된, APC를 위한 항원의 연장된 공급을 야기할 수 있다.

[0584] 일부 실시양태에서, 단백질 코로나가 NP 주위에서 형성될 수 있다. 단백질 코로나는 2-단계 과정으로 형성될 수 있다. 제1 단계에서, 고친화성 단백질은 NP에 신속히 결합하여 일차 코로나를 형성한다. 제2 단계에서, 보다 낮은 친화성의 단백질은 NP 또는 일차 코로나의 단백질에 직접적으로 결합하여 이차 코로나를 형성한다. 따라서, 단백질 코로나의 성분은 혈청의 단백질 함량에 의해 영향을 받음으로써, 이를 조절하는 항상성 또는 면역 반응에 의해 영향을 받을 수 있다. 일부 실시양태에서, 매우 풍부한 단백질, 예컨대, 알부민은 일차 코로나의 상당한 비율을 차지한다. 일부 실시양태에서, 상이한 전하를 가진 NP는 특정 환경, 예를 들면, 특정 항원 또는 항체를 가진 혈장에서 상당한 양의 덜 풍부한 단백질에 결합한다. 단백질 코로나의 생체내 형성은 NP 전하를 변경시킬 수 있거나 특정 수용체를 표적화하는 NP에 중요한 작용기를 차폐할 수 있고/있거나 식세포에 의한 NP의 제거를 증강시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, NP는 NP 전하의 변화 또는 작용기의 차폐를 감소시키고/시키거나 NP의 혈청 반감기를 증가시키도록 조작된다. 일부 실시양태에서, NP 표면 코팅은 옵소닌화 사건을 조절하도록 디자인된다. 예를 들면, NP의 표면은 중합체성 에틸렌 글리콜(PEG) 또는 이의 저분자량 유도체 폴리에틸렌 옥사이드(PEO)로 코팅될 수 있다. 임의의 이론에 의해 구속받고자 하지는 않지만, PEG는 표면 친수성을 증가시켜, 감소된 혈청 단백질 결합으로 인한 순환 NP 반감기의 개선을 야기한다. 일부 실시양태에서, PEG 또는 PEO로 코팅된 NP는 NP의 감소된 독성 또는 증가된 생체적합성을 야기하도록 조작된다. 골수 세포에 대한 추가 NP 디자인 및 NP 표적화는 전체가 본원에 참고로 포함된 문헌[Getts et al., Trends Immunol. 36(7): 419-427 (2015)]에 기재되어 있다.

[0585] 본원에 기재된 NP는 재조합 핵산을 시험관내/생체외 세포 배양물 중의 세포에 도입하거나 생체내에 투여하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, NP는 생체내 투여를 위해 변형된다. 예를 들면, NP는 간 또는 비장 식세포에 의해 흡수되기 전에 특정 독소, 단백질, 리간드 또는 이들의 임의의 조합에 결합하도록 표면 변형 또는 결합 모이어티의 부착을 포함할 수 있다. 최근 설치류 개념 증명 연구에서, 높은 음전하를 가진 주입된 '면역 변형 NP'(IMP)는 단핵 식세포 시스템의 세포에 의해 최종적으로 제거되고 파괴되기 전에 S100 패밀리 및 열충격 단백질을 비롯한 특정 혈액 단백질들을 흡수할 수 있다. 나아가, 이 기작은 특정 순환 단백질을 포획하고 농축하는 데에도 이용될 수 있다. IMP는 아넥신(Annexin) 1에 결합하는 것으로 밝혀졌다. 아넥신 1의 축적 및 특정 백혈구 서브세트에의 이의 제시는 넓은 면역 결과를 가질 수 있다. 예를 들면, 아넥신 1이 로딩된 NP는 아폽토시스의 유도를 통해 호중구를 감소시킬 수 있고/있거나 T 세포 활성화를 촉진할 수 있다. 일부 실시양태에서, NP는 세포 표면 수용체, 예를 들면, 스캐빈저 수용체를 표적화하도록 디자인된다. 일부 실시양태에서, NP는 높은 표면 음전하를 가진 입자이다.

[0586] 일부 실시양태에서, NP는 네이키드 DNA 분자인 핵산을 캡슐화한다. 일부 실시양태에서, NP는 mRNA 분자인 핵산을 캡슐화한다. 일부 실시양태에서, NP는 원형 RNA(circRNA) 분자인 핵산을 캡슐화한다. 일부 실시양태에서, NP는 벡터, 플라스미드, 또는 이의 부분 또는 단편인 핵산을 캡슐화한다.

[0587] 일부 실시양태에서, NP는 지질 나노입자(LNP)이다. LNP는 극성 및/또는 비극성 지질을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 콜레스테롤은 효율적인 전달을 위해 LNP에 존재한다. LNP는 직경이 100 내지 300 nm이고 골수 세포, 예컨대, 대식세포를 비롯한 다양한 유형의 세포들에게 mRNA를 전달하는 효율적인 수단을 제공한다. 일부 실시양태에서, LNP는 재조합 핵산을 시험관내 세포 배양물 중의 세포에 도입하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, LNP는 네이키드 DNA 분자인 핵산을 캡슐화한다. 일부 실시양태에서, LNP는 mRNA 분자인 핵산을 캡슐화한다. 일부 실시양태에서, LNP는 플라스미드 벡터와 같은 벡터 내에 삽입된 핵산을 캡슐화한다. 일부 실시양태에서, LNP는 circRNA 분자인 핵산을 캡슐화한다.

[0588] 일부 실시양태에서, LNP는 핵산을 대상체에게 전달하는 데 사용된다. LNP는 대상체에서 핵산을 전신적으로 전달하는 데 사용될 수 있다. 이것은 주사에 의해 전달될 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산을 포함하는 LNP는 정맥내 경로에 의해 주사된다. 일부 실시양태에서, LNP는 피하 주사된다.

[0589] **약학 조성물**

[0590] 본원은 CFP를 코딩하는 재조합 핵산을 포함하는 조작된 골수 세포, 예컨대, 대식세포 및 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0591] 본원은 CFP를 코딩하는 재조합 핵산 및 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약학 조성물도 제공한다. 약학 조성물은 DNA, mRNA 또는 circRNA, 또는 이들 중 어느 하나의 리포좀 조성물을 포함할 수 있다. 리포좀은 LNP이다.

[0592] 본원은 CFP를 코딩하는 재조합 핵산을 포함하는 벡터 및 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약학 조성물도 제공한다. 약학 조성물은 플라스미드 벡터 또는 바이러스 벡터에 삽입된 DNA, mRNA 또는 circRNA를 포함할 수 있다.

[0593] 일부 실시양태에서, 조작된 골수 세포, 예컨대, 대식세포는 치료적 투여 용량에 충분한 세포 배양물에서 생장되고, 세척되고, 약학 조성물로 재현탁된다.

[0594] 일부 실시양태에서, 부형제는 중성 pH의 멸균 완충제(예를 들면, HEPES 또는 PBS)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 약학 조성물의 pH는 7.5이다. 일부 실시양태에서, pH는 허용 가능한 범위 내에서 변경될 수 있다. 일부 실시양태에서, 조작된 세포는 보체 불활성화된 또는 합성 혈청을 포함하는 멸균 농후화된 세포 현탁 배지에 포함될 수 있다. 일부 실시양태에서, 약학 조성물은 세포 보존 및 기능을 위해 사이토카인, 케모카인 또는 성장 인자를 추가로 포함한다.

[0595] 일부 실시양태에서, 약학 조성물은 조작된 세포와 공투여되는 추가 치료제를 포함할 수 있다.

[0596] **치료 방법**

[0597] 본원은 CFP, 예컨대, 식세포 수용체(PR) 융합 단백질(PFP)을 코딩하는 재조합 핵산을 발현하는 조작된 골수 세포, 예컨대, 식세포성 세포(예를 들면, 대식세포)를 포함하는 약학 조성물을 사용하여 직접적으로 또는 간접적으로 암 세포를 표적화하고 공격하고 사멸시킴으로써 대상체의 암을 치료하는 방법을 제공한다. 조작된 골수 세포, 예컨대, 식세포성 세포는 본원의 설명에서 CAR-P 세포로서도 표기되어 있다.

[0598] 암은 T 세포 림프종, 피부 림프종, B 세포 암(예를 들어, 다발성 골수종, 발덴스트롬 거대글로불린혈증), 중쇄 질환(예를 들면, 알파 쇄 질환, 감마 쇄 질환 및 뮤 쇄 질환), 양성 단일클론 감마병증, 및 면역세포성 아밀로이드증, 흑색종, 유방암, 폐암, 기관지암, 대장암, 전립선암(예를 들면, 전이성, 호르몬 불응성 전립선암), 췌장암, 위암, 난소암, 방광암, 뇌암 또는 중추신경계암, 말초신경계암, 식도암, 자궁경부암, 자궁암 또는 자궁내막암, 구강암 또는 인두암, 간암, 신장암, 고환암, 담도암, 소장암 또는 맹장암, 침샘암, 갑상선암, 부신암, 골육종, 연골육종, 혈액 조직의 암 등을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 본 개시에 의해 포괄되는 방법에 적용될 수 있는 암 유형의 다른 비제한적인 예는 인간 육종 및 암종, 예를 들면, 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골형성 육종, 척색종, 혈관육종, 내피육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 활막종, 중피종, 유잉 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결장암종, 대장암, 췌장암, 유방암, 난소암, 편평세포암종, 기저세포암종, 선암종, 땀샘암종, 피지선암종, 유두암종, 유두 선암종, 낭선암종, 수질암종, 기관지암종, 신장세포암종, 간암종, 담관암종, 간암, 융모막암종, 정상피종, 배아암종, 윌름스 종양, 자궁경부암, 골암, 뇌종양, 고환암, 폐암, 소세포 폐암종, 방광암종, 상피암종, 신경교종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 뇌실막종, 송과체종, 혈관모세포종, 청각 신경종, 희소돌기아교종, 수막종, 흑색종, 신경모세포종, 망막모세포종; 백혈병, 예를 들면, 급성 림프구성 백혈병 및 급성 골수성 백혈병(골수아구성, 전골수구성, 골수단핵구성, 단핵구성 및 적백혈병); 만성 백혈병(만성 골수성(과립성) 백혈병 및 만성 림프구성 백혈병); 및 진성적혈구증가증, 림프종(호지킨병 및 비호지킨병), 다발성 골수종, 발덴스트롬 거대글로불린혈증 및 중쇄 질환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 방광암, 유방암, 자궁경부암, 결장암, 부인과암, 신장암, 후두암, 폐암, 구강암, 두경부암, 난소암, 췌장암, 전립선암 또는 피부암과 같은, 그러나 이들로 제한되지 않는, 상피암이다. 다른 실시양태에서, 암은 유방암, 전립선암, 폐암 또는 결장암이다. 다른 실시양태에서, 상피암은 비소세포 폐암, 비유두상 신장세포암종, 자궁경부암종, 난소암종(예를 들면, 장액성 난소암종), 또는 유방암종이다. 상피암은 장액성, 자궁내막모양, 점액성, 투명세포 또는 미분화를 포함하나 이들로 제한되지 않는 다양한 다른 방식으로 특징져질 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시는 맨틀 세포 림프종을 포함하나 이것으로 제한되지 않는 림프종 또는 이의 서브타입의 치료, 진단 및/또는 예후에 이용된다. 림프증식성 장애도 증식성 질환으로 간주된다.

[0599] 일반적으로, 세포 면역요법은 간 세포를 포함하는 의약을 환자에게 제공하는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 암을 가진 환자 또는 대상체는 자가 세포로 치료되고, 방법은 PBMC 유래 골수 세포, 예컨대, 대식세포를 단리하는 단계, CFP를 코딩하는 재조합 핵산을 세포에 도입함으로써 세포를 생체외에서 변형시켜, 종양을 용해시킬 수 있는 식세포성 골수 세포를 생성하는 단계, 및 변형된 골수 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0600] 일부 양태에서, 치료 골수 세포, 예컨대, 식세포성 세포를 포함하는 약학 조성물을 1회 이상의 용량으로 대상체에게 투여하고, 이때 상기 세포는 동종이계 세포이다. 세포가 이식편 대 숙주 질환인 GVHD를 유발하지 않도록 대상체와의 적합성을 위해 HLA를 일치시킬 수 있다. 진료소에 도착하는 대상체는 대상체에 의해 발현된 HLA 항원을 확인하기 위해 HLA 유형분석을 받는다.

[0601] HLA 유형분석은 통상적으로 항체를 사용하는 혈청학적 방법 또는 PCR 기반 방법, 예컨대, 서열 특이적 올리고뉴클레오타이드 프로브 하이브리드화(SSOP) 또는 서열 기반 유형분석(SBT)에 의해 수행된다.

[0602] 서열 정보는 서열분석 방법 또는 질량 분광측정, 예컨대, 액체 크로마토그래피-질량 분광측정(LC-MS 또는 LC-MS/MS, 또는 대안적으로 HPLC-MS 또는 HPLC-MS/MS)을 이용하는 방법에 의해 확인될 수 있다. 이 서열분석 방법들은 숙련된 자에게 잘 공지되어 있을 수 있고 문헌[Medzihradszky KF and Chalkley RJ. Mass Spectrom Rev. 2015 Jan-Feb;34(1):43-63]에서 검토되어 있다.

[0603] 일부 양태에서, 식세포성 세포는 대상체로부터 유래하고, 시험관내에서 재조합 핵산에 의해 형질감염되거나 형질도입되고, 투여에 적합한 수를 달성하기 위해 시험관내에서 세포 배양물에서 증폭된 후, 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 시험관내에서 재조합 핵산에 의해 형질감염되거나 형질도입되고 투여에 적합한 수를 달성하기 위해 시험관내에서 세포 배양물에서 증폭되는 단계는 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일 또는 10일이 소요된다.

[0604] 일부 실시양태에서, HLA 유형을 분석하고 생성물을 수용자 HLA 서브타입과 일치시킨 후, "기성품" 생성물로서 대상체에게 투여되는, 재조합 핵산을 포함하는 충분한 양의 형질감염된 또는 형질도입된 골수 세포, 예컨대, 대식세포는 무균 상태로 보존된다. 일부 실시양태에서, 조작된 식세포는 냉동보존된다. 일부 실시양태에서, 조작된 식세포는 세포 생존력의 상당한 손실 없이 해동을 견디기 위해 적합한 배지에 냉동보존된다.

[0605] 일부 실시양태에서, 대상체는 백터 또는 전술된 약학적으로 허용 가능한 부형제 내에 DNA, mRNA 또는 circRNA를 포함하는 약학 조성물을 투여 받는다.

[0606] 일부 실시양태에서, 기성품 세포 생성물의 투여는 즉각적일 수 있거나, 투여 전 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일 또는 7일 이상을 요구할 수 있다. 세포 또는 핵산을 포함하는 약학 조성물은 제조부터 사용할 때까지 시간에 따라 냉동 상태로 보존될 수 있다. 일부 실시양태에서, 약학 조성물은 1회 해동될 수 있다. 일부 실시양태에서, 약학 조성물은 1회 초과의 빈도로 해동될 수 있다. 일부 실시양태에서, 약학 조성물은 대상체에게 투여하기 전에 냉동-해동 주기 후 안정화된다. 일부 실시양태에서, 약학 조성물은 투여 전에 해동 후 최종 품질 조절을 위해 검사된다.

[0607] 일부 실시양태에서, 투여 용량당 10^6개의 조작된 세포를 포함하는 조성물이 투여된다. 일부 실시양태에서, 투여 용량당 10^7개의 조작된 세포를 포함하는 조성물이 투여된다. 일부 실시양태에서, 투여 용량당 5x10^7개의 조작된 세포를 포함하는 조성물이 투여된다. 일부 실시양태에서, 투여 용량당 10^8개의 조작된 세포를 포함하는 조성물이 투여된다. 일부 실시양태에서, 투여 용량당 2x10^8개의 조작된 세포를 포함하는 조성물이 투여된다. 일부 실시양태에서, 투여 용량당 5x10^8개의 조작된 세포를 포함하는 조성물이 투여된다. 일부 실시양태에서, 투여 용량당 10^9개의 조작된 세포를 포함하는 조성물이 투여된다. 일부 실시양태에서, 투여 용량당 10^10개의 조작된 세포를 포함하는 조성물이 투여된다.

[0608] 일부 실시양태에서, 조작된 골수 세포, 예컨대, 식세포성 세포는 1회 투여된다.

[0609] 일부 실시양태에서, 조작된 골수 세포, 예컨대, 식세포성 세포는 1회 초과의 빈도로 투여된다.

[0610] 일부 실시양태에서, 조작된 골수 세포, 예컨대, 식세포성 세포는 수개월 또는 1년 이상을 포함하는 기간에 걸쳐 대상체에게 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회 또는 10회 이상 투여된다.

[0611] 일부 실시양태에서, 조작된 골수 세포, 예컨대, 식세포성 세포는 주마다 2회 투여된다.

[0612] 일부 실시양태에서, 조작된 골수 세포, 예컨대, 식세포성 세포는 주마다 1회 투여된다.

[0613] 일부 실시양태에서, 조작된 골수 세포, 예컨대, 식세포성 세포는 2주마다 1회 투여된다.

[0614] 일부 실시양태에서, 조작된 골수 세포, 예컨대, 식세포성 세포는 3주마다 1회 투여된다.

[0615] 일부 실시양태에서, 조작된 골수 세포, 예컨대, 식세포성 세포는 월마다 1회 투여된다.

[0616] 일부 실시양태에서, 조작된 식세포성 세포는 2개월마다 1회, 3개월마다 1회, 4개월마다 1회, 5개월마다 1회 또는 6개월마다 1회 투여된다.

[0617] 일부 실시양태에서, 조작된 골수 세포, 예컨대, 식세포성 세포는 주사에 의해 투여된다.

[0618] 일부 실시양태에서, 조작된 골수 세포, 예컨대, 식세포성 세포는 주입에 의해 투여된다.

[0619] 일부 실시양태에서, 조작된 골수 세포, 예컨대, 식세포성 세포는 정맥내 주입에 의해 투여된다.

[0620] 일부 실시양태에서, 조작된 골수 세포, 예컨대, 식세포성 세포는 피하 주입에 의해 투여된다.

[0621] 재조합 핵산 또는 조작된 세포를 포함하는 약학 조성물은 치료적으로 효과적인 결과를 야기하는 임의의 경로에 의해 투여될 수 있다. 이 경로는 장(장 내로), 위장, 경막외(경막 내로), 경구(입을 통해), 경피, 경막주위, 뇌내(대뇌 내로), 뇌실내(뇌실 내로), 피부외(피부 상에 도포), 피내(피부 자체 내로), 피하(피부 아래), 비강 투여(코를 통해), 정맥내(정맥 내로), 정맥내 볼루스, 정맥내 점적, 동맥내(동맥 내로), 근육내(근육 내로), 심장내(심장 내로), 골내 주입(골수 내로), 척추강내(척수관 내로), 복강내(복막 내로 주입 또는 주사), 방광내 주입, 유리체내(눈을 통해), 해면체내 주사(병리학적 강(cavity) 내로), 강내(음경 기저부 내로), 질내 투여, 자궁내, 양막외 투여, 경피(전신 분포를 위해 온전한 피부를 통한 확산), 경점막(점막을 통한 확산), 경질, 흡입(코로 흡입), 설하, 순하, 관장, 점안액(결막 상으로), 점안액, 귀(귀 안 또는 귀를 통해), 협측(뺨을 향해), 결막, 피부, 치아(이빨 또는 이빨들), 전기삼투, 자궁경부내, 동내, 기관내, 체외, 혈액투석, 침윤, 간질, 복강내, 양막내, 관절내, 담즙내, 기관지내, 윤활낭내, 연골내(연골 내부), 꼬리내(마미신경 내부), 수조내(소뇌연수조 내부), 각막내(각막 내부), 치아 치관내, 관상동맥내(관상동맥 내부), 해면체내(음경의 해면체의 확장 가능한 공간 내부), 추간판내(추간판 내부), 관내(선의 관 내부), 십이지장내(십이지장 내부), 경막내(경막 내부 또는 아래), 표피내(표피로), 식도내(식도로), 위내(위 내부), 치은내(치은 내부), 회장내(소장의 원위 부분 내부), 병변내(국소화된 병변 내부 또는 국소화된 병변에의 직접 도입), 내강내(관의 내강 내부), 림프내(림프 내부), 골수내(골의 골수강 내부), 수막내(수막 내부), 안구내(눈 내부), 난소내(난소 내부), 심막내(심막 내부), 흉막내(흉막 내부), 전립선내(전립선 내부), 폐내(폐 또는 이의 기관지 내부), 부비강내(코 또는 눈주위 부비강 내부), 척수내(척추 내부), 활막내(관절의 활막강 내부), 힘줄내(힘줄 내부), 고환내(고환 내부), 경막내(뇌척수 축의 임의의 수준에서 뇌척수액 내부), 흉부내(흉부 내부), 세뇨관내(장기의 세뇨관 내부), 종양내(종양 내부), 고실내(중이 내부), 혈관내(혈관 또는 혈관들 내부), 심실내(심실 내부), 이온영동(가용성 염의 이온을 신체의 조직 내로 이동시키는 전류에 의한 것), 관류(개방된 상처 또는 체강을 세척하거나 씻어내기 위함), 후두(후두에 직접), 비위(코를 통해 위장 내로), 폐쇄성 드레싱 기법(나중에 부위를 폐쇄하는 드레싱에 의해 덮이는 국소 경로 투여), 눈(외부 눈으로), 구인두(입 및 인두에 직접), 비경구, 경피, 관절주위, 경막주위, 신경주위, 치주, 직장, 호흡기(국소 또는 전신 효과를 위해 경구 또는 비강으로 흡입함으로써 기도 내부로), 안구후부(뇌교 뒤 또는 안구 뒤), 연조직, 지주막하, 결막하, 점막하, 국소, 경태반(태반을 통과하거나 횡단함), 경기관(기관 벽을 통과함), 경고실(고실을 횡단하거나 통과함), 요관(요관으로), 요도(요도로), 질, 꼬리 차단, 진단, 신경 차단, 담도 관주, 심장 관주, 광반출 또는 척추를 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 특정 실시양태에서, 조성물은 이 조성물이 혈액-뇌 장벽, 혈관 장벽 또는 다른 상피 장벽을 횡단할 수 있게 하는 방식으로 투여될 수 있다.

[0622] 일부 실시양태에서, 대상체는 본원에 기재된 CFP 또는 PFP를 코딩하는 핵산을 포함하는 약학 조성물을 투여 받는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 DNA, mRNA 또는 circRNA를 포함하는 약학 조성물을 투여 받는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 핵산, 예를 들면, DNA, mRNA 또는 circRNA를 가진 벡터를 투여 받는다. 일부 실시양태에서, 핵산은 전술된 약학적으로 허용 가능한 부형제와 함께 투여된다.

[0623] 일부 실시양태에서, 대상체는 본원에 기재된 CFP 또는 PFP를 코딩하는 핵산, 예를 들면, DNA, mRNA 또는 circRNA와 회합된 나노입자(NP)를 투여 받는다. 일부 실시양태에서, 핵산은 나노입자 내로 캡슐화된다. 일부 실시양태에서, 핵산은 나노입자에 접합된다. 일부 실시양태에서, NP는 폴리락타이드-코-글리콜라이드(PGLA) 입자이다. 일부 실시양태에서, NP는 피하로 투여된다. 일부 실시양태에서, NP는 정맥내로 투여된다. 일부 실시양태에서, NP는 투여 경로와 관련하여 조작된다. 예를 들면, NP의 크기, 모양 또는 변화는 투여 경로에 따라 조작될 수 있다. 일부 실시양태에서, 피하로 투여되는 NP는 크기가 200 nm 미만이다. 일부 실시양태에서, 피하로 투여되는 NP는 크기가 200 nm 이상이다. 일부 실시양태에서, 피하로 투여되는 NP는 크기가 적어도 30 nm이다. 일부 실시양태에서, NP는 정맥내로 주입된다. 일부 실시양태에서, 정맥내로 주입되는 NP는 직경이 적어도 5 nm이다. 일부 실시양태에서, 정맥내로 주입되는 NP는 직경이 적어도 30 nm이다. 일부 실시양태에서, 정맥내로 주입되는 NP는 직경이 적어도 100 nm이다. 특정 실시양태에서, 투여된 NP, 예를 들면, 정맥내로 투여된 NP는 순환 단핵구에 의해 삼켜진다. 추가 NP 디자인 및 투여 방식은 전체가 본원에 참고로 포함된 문헌[Getts et al., Trends Immunol. 36(7): 419-427 (2015)]에 기재되어 있다.

[0624] 일부 실시양태에서, 대상체는 본원에 기재된 CFP 또는 PFP를 코딩하는 circRNA를 포함하는 약학 조성물을 투여 받는다. circRNA는 본원에 기재된 바와 같이 임의의 경로로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, circRNA는 직접적으로 주입될 수 있다. 일부 실시양태에서, circRNA는 염화나트륨, 염화칼슘, 포스페이트 및/또는 EDTA 중

하나 이상을 포함하는 제제 또는 용액에 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, circRNA 용액은 식염수, 2 mM 칼슘을 가진 식염수, 5% 수크로스, 2 mM 칼슘을 가진 5% 수크로스, 5% 만니톨, 2 mM 칼슘을 가진 5% 만니톨, 링거의 락테이트, 염화나트륨, 2 mM 칼슘을 가진 염화나트륨 및 만노스 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, circRNA 용액은 동결건조된다. 일관되고 재현 가능한 고농도 식염수 또는 단순 완충제 제제를 가능하게 하기 위해 각각의 성분의 양을 변경시킬 수 있다. 시간에 따라, 그리고/또는 다양한 조건 하에서 완충제 용액에서의 circRNA의 안정성을 증가시키기 위해 성분을 변경시킬 수도 있다. 일부 실시양태에서, circRNA는 동결건조된 겔상 리포좀 조성물로 제제화된다. 일부 실시양태에서, circRNA 제제는 원하는 점조도를 제제에 부여하고/하거나 제제 성분을 안정화시키기 위해 증량제, 예를 들면, 수크로스, 트레할로스, 만니톨, 글리신, 락토스 및/또는 라피노스를 포함한다. circRNA에 대한 추가 제제 및 투여 방식은 전체적으로 본원에 참고로 포함된 미국 특허출원 공개 제US2012060293호 및 제US20170204422호에 기재되어 있다.

[0625] 일부 실시양태에서, 대상체는 본원에 기재된 CFP 또는 PFP를 코딩하는 mRNA를 포함하는 약학 조성물을 투여 받는다. 일부 실시양태에서, 상기 mRNA는 지질 나노입자(LNP)와 같은 나노입자(NP) 내로 공제제화된다. 예를 들면, LNP는 양이온성 지질 또는 이온화 가능한 지질을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 mRNA는 중합체성 입자, 예를 들면, 폴리에틸렌이민 입자, 폴리(글리코아미도아민), 폴리(β-아미노)에스테르(PBAE), PEG 입자, 세라마이드-PEG, 폴리아미도아민 입자, 또는 폴리젖산-코-글리콜산 입자(PLGA) 내로 제제화된다. 일부 실시양태에서, 상기 mRNA는 직접 주사에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, 상기 mRNA는 형질감염제, 예를 들면, 리포펙타민(Lipofectamine) 2000, jetPEI, RNAiMAX 또는 인비보펙타민(Invivofectamine)과 복합체를 형성한다.

[0626] mRNA는 네이키드 mRNA일 수 있다. mRNA는 변형될 수 있거나 변형되지 않을 수 있다. 예를 들면, mRNA는 화학적으로 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, mRNA의 핵염기 및/또는 서열은 mRNA의 안정성 및 반감기를 증가시키도록 변형된다. 일부 실시양태에서, mRNA는 글리코실화된다. 추가 mRNA 변형 및 전달 방법은 전체적으로 본원에 각각 참고로 포함된 문헌[Flynn et al., BioRxiv 787614 (2019)] 및 문헌[Kowalski et al. Mol. Ther. 27(4): 710-728 (2019)]에 기재되어 있다.

[0627] **실시양태**

[0628] 1. (a) (i) 막횡단 도메인, 및 (ii) 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 식세포 또는 테더링 수용체(PR) 서브유닛; 및 (b) 표적 세포의 항원에 특이적인 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 PR 융합 단백질(PFP)을 코딩하는 재조합 핵산을 포함하는 조성물로서; 막횡단 도메인과 세포외 도메인은 작동 가능하게 연결되고; PFP와 표적 세포의 항원의 결합 시, PFP를 발현하는 세포의 사멸 또는 식세포작용 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 20% 이상 증가되는 것인 조성물.

[0629] 2. 실시양태 1에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 식세포 또는 테더링 수용체로부터 유래하거나, 세포내 신호전달 도메인은 식세포작용 활성화 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0630] 3. 실시양태 1 또는 2에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 Megf10, MerTk, FcR-알파 또는 Bai1로부터 선택된 식세포 수용체 이외의 수용체로부터 유래한 것인 조성물.

[0631] 4. 실시양태 1 내지 3 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 표 2에 나열된 수용체들로 구성된 군으로부터 선택된 수용체로부터 유래한 것인 조성물.

[0632] 5. 실시양태 1 내지 4 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 염증유발 신호전달 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0633] 6. 실시양태 5에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 PI3K 동원 도메인이 아닌 염증유발 신호전달 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0634] 7. (a) (i) 막횡단 도메인 및 (ii) 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 식세포 또는 테더링 수용체(PR) 서브유닛; 및 (b) 표적 세포의 항원에 특이적인 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 PR 융합 단백질(PFP)을 코딩하는 재조합 핵산을 포함하는 조성물로서; 막횡단 도메인과 세포외 도메인은 작동 가능하게 연결되고; 세포내 신호전달 도메인은 Megf10, MerTk, FcR-알파 또는 Bai1로부터 선택된 식세포 수용체 이외의 식세포 수용체로부터 유래한 것인 조성물.

[0635] 8. 실시양태 7에 있어서, PFP와 표적 세포의 항원의 결합 시, PFP를 발현하는 세포의 사멸 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 20% 이상 증가되는 것인 조성물.

[0636] 9. 실시양태 7 또는 8에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 렉틴, 덱틴 1, CD206, 스캐빈저 수용체 A1(SRA1),

MARCO, CD36, CD163, MSR1, SCARA3, COLEC12, SCARA5, SCARB1, SCARB2, CD68, OLR1, SCARF1, SCARF2, CXCL16, STAB1, STAB2, SRCRB4D, SSC5D, CD205, CD207, CD209, RAGE, CD14, CD64, F4/80, CCR2, CX3CR1, CSF1R, Tie2, HuCRIg(L), CD64, CD32a, CD16a, CD89, Fc-알파 수용체 I, CR1, CD35, CD3ζ, CR3, CR4, Tim-1, Tim-4 및 CD169로 구성된 군으로부터 선택된 식세포 수용체로부터 유래한 것인 조성물.

[0637] 10. 실시양태 7 내지 9 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 염증유발 신호전달 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0638] 11. (a) (i) 막횡단 도메인 및 (ii) 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 식세포 또는 테더링 수용체(PR) 서브유닛; 및 (b) 표적 세포의 항원에 특이적인 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 PR 융합 단백질(PFP)을 코딩하는 재조합 핵산을 포함하는 조성물로서; 막횡단 도메인과 세포외 도메인은 작동 가능하게 연결되고; 세포내 신호전달 도메인은 렉틴, 덱틴 1, CD206, 스캐빈저 수용체 A1(SRA1), MARCO, CD36, CD163, MSR1, SCARA3, COLEC12, SCARA5, SCARB1, SCARB2, CD68, OLR1, SCARF1, SCARF2, CXCL16, STAB1, STAB2, SRCRB4D, SSC5D, CD205, CD207, CD209, RAGE, CD14, CD64, F4/80, CCR2, CX3CR1, CSF1R, Tie2, HuCRIg(L), CD64, CD32a, CD16a, CD89, Fc-알파 수용체 I, CR1, CD35, CD3ζ, CR3, CR4, Tim-1, Tim-4 및 CD169로 구성된 군으로부터 선택된 식세포 수용체로부터 유래한 것인 조성물.

[0639] 12. 실시양태 11에 있어서, PFP와 표적 세포의 항원의 결합 시, PFP를 발현하는 세포의 사멸 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 55% 이상 증가되는 것인 조성물.

[0640] 13. 실시양태 11 또는 12에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 Megf10, MerTk, FcR-알파 또는 Bai1로부터 선택된 식세포 수용체 이외의 식세포 수용체로부터 유래한 것인 조성물.

[0641] 14. 실시양태 11 내지 13 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 염증유발 신호전달 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0642] 15. 실시양태 14에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 PI3K 동원 도메인이 아닌 염증유발 신호전달 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0643] 16. (a) (i) 막횡단 도메인 및 (ii) 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 포함하는 식세포 또는 테더링 수용체(PR) 서브유닛; 및 (b) 표적 세포의 항원에 특이적인 항원 결합 도메인을 포함하는 세포외 도메인을 포함하는 PR 융합 단백질(PFP)을 코딩하는 재조합 핵산을 포함하는 조성물로서; 막횡단 도메인과 세포외 도메인은 작동 가능하게 연결되고; 세포내 신호전달 도메인은 PI3K 동원 도메인이 아닌 염증유발 신호전달 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0644] 17. 실시양태 16에 있어서, PFP와 표적 세포의 항원의 결합 시, PFP를 발현하는 세포의 사멸 활성은 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 적어도 20% 이상 증가되는 것인 조성물.

[0645] 18. 실시양태 16 또는 17에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 식세포 수용체로부터 유래한 것인 조성물.

[0646] 19. 실시양태 16 내지 18 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 Megf10, MerTk, FcR-알파 또는 Bai1로부터 선택된 식세포 수용체 이외의 식세포 수용체로부터 유래한 것인 조성물.

[0647] 20. 실시양태 16 내지 19 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 렉틴, 덱틴 1, CD206, 스캐빈저 수용체 A1(SRA1), MARCO, CD36, CD163, MSR1, SCARA3, COLEC12, SCARA5, SCARB1, SCARB2, CD68, OLR1, SCARF1, SCARF2, CXCL16, STAB1, STAB2, SRCRB4D, SSC5D, CD205, CD207, CD209, RAGE, CD14, CD64, F4/80, CCR2, CX3CR1, CSF1R, Tie2, HuCRIg(L), CD64, CD32a, CD16a, CD89, Fc-알파 수용체 I, CR1, CD35, CD3ζ, CR3, CR4, Tim-1, Tim-4 및 CD169로 구성된 군으로부터 선택된 식세포 수용체로부터 유래한 것인 조성물.

[0648] 21. 실시양태 1 내지 15 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 PI3K 동원 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0649] 22. 실시양태 1 내지 21 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP가 세포에서 발현될 때 PFP는 세포의 세포막 내로 기능적으로 혼입되는 것인 조성물.

[0650] 23. 실시양태 1 내지 22 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 항원을 발현하는 표적 세포의 식세포작용의 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0651] 24. 실시양태 23에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 항원을 발현하는 표적 세

포의 식세포작용의 적어도 1.1배 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0652] 25. 실시양태 1 내지 24 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 항원을 발현하는 표적 세포의 식세포작용의 적어도 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 20배, 30배 또는 50배 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0653] 26. 실시양태 1 내지 25 중 어느 한 실시양태에 있어서, 항원을 발현하는 표적 세포는 암 세포인 조성물.

[0654] 27. 실시양태 1 내지 26 중 어느 한 실시양태에 있어서, 항원을 발현하는 표적 세포는 직경이 적어도 0.8 마이크론인 조성물.

[0655] 28. 실시양태 1 내지 27 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 스캐빈저 수용체로부터 유래한 것인 조성물.

[0656] 29. 실시양태 1 내지 28 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 사이토카인 생성의 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0657] 30. 실시양태 29에 있어서, 사이토카인은 IL-1, IL3, IL-6, IL-12, IL-13, IL-23, TNF, CCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11, IL-18, IL-23, IL-27, CSF, MCSF, GMCSF, IL17, IP-10, RANTES, 인터페론 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 것인 조성물.

[0658] 31. 실시양태 1 내지 30 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 이펙터 활성의 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0659] 32. 실시양태 1 내지 31 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 교차 제시의 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0660] 33. 실시양태 1 내지 32 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 MHC 클래스 II 단백질의 발현 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0661] 34. 실시양태 1 내지 33 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 CD80의 발현 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0662] 35. 실시양태 1 내지 34 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 CD86의 발현 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0663] 36. 실시양태 1 내지 35 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 MHC 클래스 I 단백질의 발현 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0664] 37. 실시양태 1 내지 36 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 TRAIL/TNF 패밀리 사멸 수용체의 발현 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0665] 38. 실시양태 1 내지 37 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 B7-H2의 발현 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0666] 39. 실시양태 1 내지 38 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 LIGH의 발현 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0667] 40. 실시양태 1 내지 39 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 HVEM의 발현 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0668] 41. 실시양태 1 내지 40 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 CD40의 발현 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0669] 42. 실시양태 1 내지 41 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 TL1A의 발현 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0670] 43. 실시양태 1 내지 42 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 41BBL의 발현 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0671] 44. 실시양태 1 내지 43 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 OX40L의 발현 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0672] 45. 실시양태 1 내지 44 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 GITRL 사멸 수용체의 발현 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0673] 46. 실시양태 1 내지 45 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 CD30L의 발현 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0674] 47. 실시양태 1 내지 46 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 TIM4의 발현 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0675] 48. 실시양태 1 내지 47 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 TIM1 리간드의 발현 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0676] 49. 실시양태 1 내지 48 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 SLAM의 발현 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0677] 50. 실시양태 1 내지 49 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 CD48의 발현 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0678] 51. 실시양태 1 내지 50 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 CD58의 발현 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0679] 52. 실시양태 1 내지 51 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 CD155의 발현 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0680] 53. 실시양태 1 내지 52 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 CD112의 발현 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0681] 54. 실시양태 1 내지 53 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 PDL1의 발현 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0682] 55. 실시양태 1 내지 54 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 B7-DC의 발현 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0683] 56. 실시양태 1 내지 55 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 호흡 폭발의 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0684] 57. 실시양태 1 내지 56 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 ROS 생성의 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0685] 58. 실시양태 1 내지 57 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 iNOS 생성의 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0686] 59. 실시양태 1 내지 58 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 iNOS 생성의 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0687] 60. 실시양태 1 내지 59 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 세포외 소포 생성의 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0688] 61. 실시양태 1 내지 60 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 항원을 발현하는 표적 세포와의 트로고사이토시스의 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0689] 62. 실시양태 1 내지 61 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 식세포작용의 CD47 매개 억제에 대한 내성의 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0690] 63. 실시양태 1 내지 62 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 PFP를 발현하지 않는 세포에 비해 식세포작용의 LILRB1 매개 억제에 대한 내성의 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0691] 64. 실시양태 1 내지 63 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포내 도메인은 Rac 억제 도메인, Cdc42 억제 도메인 또는 GTPase 억제 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0692] 65. 실시양태 64에 있어서, Rac 억제 도메인, Cdc42 억제 도메인 또는 GTPase 억제 도메인은 PFP를 발현하는 세포의 식세포 컵에서 Rac, Cdc42 또는 GTPase를 억제하는 것인 조성물.

[0693] 66. 실시양태 1 내지 65 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포내 도메인은 F-액틴 해체 활성화 도메인, ARHGAP12 활성화 도메인, ARHGAP25 활성화 도메인 또는 SH3BP1 활성화 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0694] 67. 실시양태 1 내지 66 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP를 발현하는 세포는 포스파티딜이노시톨 3,4,5-트리스포스페이트 생성의 증가를 나타내는 것인 조성물.

[0695] 68. 실시양태 1 내지 67 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포외 도메인은 Ig 결합 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0696] 69. 실시양태 1 내지 68 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포외 도메인은 IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, FcRγI, FcRγIIA, FcRγIIB, FcRγIIC, FcRγIIIA, FcRγIIIB, FcRn, TRIM21, FcRL5 결합 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0697] 70. 실시양태 1 내지 69 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포외 도메인은 FcR 세포외 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0698] 71. 실시양태 1 내지 70 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포외 도메인은 FcR-알파, FcRβ, FcRε 또는 FcRγ 세포외 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0699] 72. 실시양태 1 내지 71 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포외 도메인은 FcRα(FCAR) 세포외 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0700] 73. 실시양태 1 내지 72 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포외 도메인은 FcRβ 세포외 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0701] 74. 실시양태 1 내지 73 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포외 도메인은 FcRε(FCER1A) 세포외 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0702] 75. 실시양태 1 내지 74 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포외 도메인은 FcRγ(FDGR1A, FCGR2A, FCGR2B, FCGR2C, FCGR3A, FCGR3B) 세포외 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0703] 76. 실시양태 1 내지 75 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포외 도메인은 인테그린 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0704] 77. 실시양태 1 내지 76 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포외 도메인은 하나 이상의 인테그린 α1, α2, αIIb, α3, α4, α5, α6, α7, α8, α9, α10, α11, αD, αE, αL, αM, αV, αX, β1, β2, β3, β4, β5, β6, β7 또는 β8 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0705] 78. 실시양태 1 내지 77 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포내 도메인은 CD47 억제 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0706] 79. 실시양태 1 내지 78 중 어느 한 실시양태에 있어서, PSR 서브유닛은 막횡단 도메인 및 세포외 항원 결합 도메인에 작동 가능하게 연결된 세포외 도메인을 추가로 포함하는 것인 조성물.

[0707] 80. 실시양태 79에 있어서, 세포외 도메인은 수용체, 힌지, 스페이서 또는 링커의 세포외 도메인을 추가로 포함하는 것인 조성물.

[0708] 81. 실시양태 80에 있어서, 세포외 도메인은 PSR의 세포외 부분을 포함하는 것인 조성물.

[0709] 82. 실시양태 81에 있어서, PSR의 세포외 부분은 PSR 세포내 신호전달 도메인과 동일한 PSR로부터 유래한 것인 조성물.

[0710] 83. 실시양태 79 내지 82 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포외 도메인은 스캐빈저 수용체 또는 면역글로불린 도메인의 세포외 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0711] 84. 실시양태 83에 있어서, 면역글로불린 도메인은 면역글로불린 또는 면역글로불린 힌지 영역의 세포외 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0712] 85. 실시양태 79 내지 84 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포외 도메인은 식세포 삼킴 마커를 포함하는 것인 조성물.

[0713] 86. 실시양태 79 내지 85 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포외 도메인은 다량체 조립이 가능한 구조를 포함하

는 것인 조성물.

[0714] 87. 실시양태 79 내지 86 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포외 도메인은 다량체화를 위한 스카폴드를 포함하는 것인 조성물.

[0715] 88. 실시양태 1 내지 87 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포외 도메인은 길이가 적어도 10개, 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 150개, 200개, 300개, 300개, 400개 또는 500개 아미노산인 조성물.

[0716] 89. 실시양태 1 내지 88 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포외 도메인은 길이가 최대 500개, 400개, 300개, 200개 또는 100개 아미노산인 조성물.

[0717] 90. 실시양태 1 내지 89 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포외 항원 결합 도메인은 표적 세포의 항원에 특이적으로 결합하는 것인 조성물.

[0718] 91. 실시양태 1 내지 90 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포외 항원 결합 도메인은 항체 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0719] 92. 실시양태 1 내지 91 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포외 항원 결합 도메인은 수용체 도메인, 항체 도메인을 포함하고, 이때 항체 도메인은 기능적 항체 단편, 단일 쇄 가변 단편(scFv), Fab, 단일 도메인 항체(sdAb), 나노바디, V_H 도메인, V_L 도메인, VNAR 도메인, V_{HH} 도메인, 이중특이적 항체, 디아바디, 또는 이들의 기능적 단편 또는 조합을 포함하는 것인 조성물.

[0720] 93. 실시양태 1 내지 92 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포외 항원 결합 도메인은 리간드, 수용체의 세포외 도메인 또는 어댑터를 포함하는 것인 조성물.

[0721] 94. 실시양태 1 내지 93 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포외 항원 결합 도메인은 단일 항원에 특이적인 단일 세포외 항원 결합 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0722] 95. 실시양태 1 내지 94 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포외 항원 결합 도메인은 적어도 2개의 세포외 항원 결합 도메인을 포함하고, 이때 적어도 2개의 세포외 항원 결합 도메인 각각은 상이한 항원에 특이적인 것인 조성물.

[0723] 96. 실시양태 1 내지 95 중 어느 한 실시양태에 있어서, 항원은 암 항원 또는 병원성 항원 또는 자가면역 항원인 조성물.

[0724] 97. 실시양태 1 내지 96 중 어느 한 실시양태에 있어서, 항원은 바이러스 항원을 포함하는 것인 조성물.

[0725] 98. 실시양태 1 내지 97 중 어느 한 실시양태에 있어서, 항원은 T-림프구 항원인 조성물.

[0726] 99. 실시양태 1 내지 98 중 어느 한 실시양태에 있어서, 항원은 세포외 항원인 조성물.

[0727] 100. 실시양태 1 내지 99 중 어느 한 실시양태에 있어서, 항원은 세포내 항원인 조성물.

[0728] 101. 실시양태 1 내지 100 중 어느 한 실시양태에 있어서, 항원은 타이미딘 키나제(TK1), 하이포잔틴-구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제(HPRT), 수용체 티로신 키나제 유사 오판 수용체 1(ROR1), 뮤신-1, 뮤신-16(MUC16), MUC1, 표피 성장 인자 수용체 vIII(EGFRvIII), 메소텔린, 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER2), 메소텔린, EBNA-1, LEMD1, 포스파티딜 세린, 암배아 항원(CEA), B 세포 성숙 항원(BCMA), 글리피칸 3(GPC3), 여포 자극 호르몬 수용체, 섬유모세포 활성화 단백질(FAP), 에리쓰로포이에틴 생성 간세포암종 A2(EphA2), EphB2, 천연 킬러 군 2D(NKG2D) 리간드, 디시알로강글리오사이드 2(GD2), CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD19, CD20, CD22, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44v6, CD45, CD56CD79b, CD97, CD117, CD123, CD133, CD138, CD171, CD179a, CD213A2, CD248, CD276, PSCA, CS-1, CLECL1, GD3, PSMA, FLT3, TAG72, EPCAM, IL-1, 인테그린 수용체, PRSS21, VEGFR2, PDGFR-β, SSEA-4, EGFR, NCAM, 프로스타제, PAP, ELF2M, GM3, TEM7R, CLDN6, TSHR, GPRC5D, ALK, IGLL1 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 것인 조성물.

[0729] 102. 실시양태 1 내지 101 중 어느 한 실시양태에 있어서, 항원은 CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CCR4, CD8, CD30, CD45, CD56으로 구성된 군으로부터 선택된 것인 조성물.

[0730] 103. 실시양태 1 내지 102 중 어느 한 실시양태에 있어서, 항원은 난소암 항원 또는 T 림프종 항원인 조성물.

[0731] 104. 실시양태 1 내지 103 중 어느 한 실시양태에 있어서, 항원은 인테그린 수용체인 조성물.

[0732] 105. 실시양태 1 내지 104 중 어느 한 실시양태에 있어서, 항원은 α1, α2, αIIb, α3, α4, α5, α6, α7, α8, α9, α10, α11, αD, αE, αL, αM, αV, αX, β1, β2, β3, β4, β5, β6, β7 및 β8로 구성된 군으로부터 선택된 인테그린 수용체인 조성물.

[0733] 106. 실시양태 1 내지 105 중 어느 한 실시양태에 있어서, 항원은 2개 이상의 항원을 포함하는 것인 조성물.

[0734] 107. 실시양태 1 내지 106 중 어느 한 실시양태에 있어서, 막횡단 도메인과 세포외 항원 결합 도메인은 링커를 통해 작동 가능하게 연결된 것인 조성물.

[0735] 108. 실시양태 1 내지 107 중 어느 한 실시양태에 있어서, 막횡단 도메인과 세포외 항원 결합 도메인은 CD8α, IgG1 또는 IgG4의 힌지 영역과 같은 링커를 통해 작동 가능하게 연결된 것인 조성물.

[0736] 109. 실시양태 1 내지 108 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포외 도메인은 다량체화 스카폴드를 포함하는 것인 조성물.

[0737] 110. 실시양태 1 내지 109 중 어느 한 실시양태에 있어서, 막횡단 도메인은 FcR 막횡단 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0738] 111. 실시양태 1 내지 110 중 어느 한 실시양태에 있어서, 막횡단 도메인은 20개, 10개 또는 5개 이하의 변형을 가진 FcR-ε 막횡단 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0739] 112. 실시양태 1 내지 111 중 어느 한 실시양태에 있어서, 막횡단 도메인은 신탁신, 예컨대, 신탁신 3 또는 신탁신 4 또는 신탁신 5로부터의 막횡단 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0740] 113. 실시양태 1 내지 112 중 어느 한 실시양태에 있어서, 막횡단 도메인은 PFP가 세포에서 발현될 때 내생성 수용체의 막횡단 도메인과 올리고머화하는 것인 조성물.

[0741] 114. 실시양태 1 내지 113 중 어느 한 실시양태에 있어서, 막횡단 도메인은 PFP가 세포에서 발현될 때 외생성 수용체의 막횡단 도메인과 올리고머화하는 것인 조성물.

[0742] 115. 실시양태 1 내지 114 중 어느 한 실시양태에 있어서, 막횡단 도메인은 PFP가 세포에서 발현될 때 내생성 수용체의 막횡단 도메인과 이량체화하는 것인 조성물.

[0743] 116. 실시양태 1 내지 115 중 어느 한 실시양태에 있어서, 막횡단 도메인은 PFP가 세포에서 발현될 때 외생성 수용체의 막횡단 도메인과 이량체화하는 것인 조성물.

[0744] 117. 실시양태 1 내지 116 중 어느 한 실시양태에 있어서, 막횡단 도메인은 세포내 신호전달 도메인이 유래한 단백질과 상이한 단백질로부터 유래한 것인 조성물.

[0745] 118. 실시양태 1 내지 117 중 어느 한 실시양태에 있어서, 막횡단 도메인은 세포외 도메인이 유래한 단백질과 상이한 단백질로부터 유래한 것인 조성물.

[0746] 119. 실시양태 1 내지 118 중 어느 한 실시양태에 있어서, 막횡단 도메인은 식세포 수용체의 막횡단 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0747] 120. 실시양태 1 내지 119 중 어느 한 실시양태에 있어서, 막횡단 도메인과 세포외 도메인은 동일한 단백질로부터 유래한 것인 조성물.

[0748] 121. 실시양태 1 내지 120 중 어느 한 실시양태에 있어서, 막횡단 도메인은 세포내 신호전달 도메인과 동일한 단백질로부터 유래한 것인 조성물.

[0749] 122. 실시양태 1 내지 121 중 어느 한 실시양태에 있어서, 재조합 핵산은 DAP12 동원 도메인을 코딩하는 것인 조성물.

[0750] 123. 실시양태 1 내지 122 중 어느 한 실시양태에 있어서, 막횡단 도메인은 DAP12와 올리고머화하는 막횡단 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0751] 124. 실시양태 1 내지 123 중 어느 한 실시양태에 있어서, 막횡단 도메인은 길이가 적어도 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 31개 또는 32개 아미노산인 조성물.

[0752] 125. 실시양태 1 내지 124 중 어느 한 실시양태에 있어서, 막횡단 도메인은 길이가 최대 12개, 13개, 14개, 15

개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 31개 또는 32개 아미노산인 조성물.

[0753] 126. 실시양태 1 내지 125 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포내 도메인은 포스파타제 억제 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0754] 127. 실시양태 1 내지 126 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포내 도메인은 ARP2/3 억제 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0755] 128. 실시양태 1 내지 127 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포내 도메인은 적어도 하나의 ITAM 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0756] 129. 실시양태 1 내지 128 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포내 도메인은 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 ITAM 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0757] 130. 실시양태 1 내지 129 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포내 도메인은 적어도 하나의 ITAM 도메인을 추가로 포함하는 것인 조성물.

[0758] 131. 실시양태 1 내지 130 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포내 도메인은 CD3 제타 TCR 서브유닛, CD3 엡실론 TCR 서브유닛, CD3 감마 TCR 서브유닛, CD3 델타 TCR 서브유닛, TCR 제타 쇄, Fc 엡실론 수용체 1 쇄, Fc 엡실론 수용체 2 쇄, Fc 감마 수용체 1 쇄, Fc 감마 수용체 2a 쇄, Fc 감마 수용체 2b1 쇄, Fc 감마 수용체 2b2 쇄, Fc 감마 수용체 3a 쇄, Fc 감마 수용체 3b 쇄, Fc 베타 수용체 1 쇄, TYROBP(DAP12), CD5, CD16a, CD16b, CD22, CD23, CD32, CD64, CD79a, CD79b, CD89, CD278, CD66d, 이들의 기능적 단편, 및 이들에 대한 적어도 1개 내지 20개 이하의 변형을 가진 이들의 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 ITAM 도메인을 추가로 포함하는 것인 조성물.

[0759] 132. 실시양태 129에 있어서, 적어도 하나의 ITAM 도메인은 Src-패밀리 키나제 인산화 부위를 포함하는 것인 조성물.

[0760] 133. 실시양태 129에 있어서, 적어도 하나의 ITAM 도메인은 Syk 동원 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0761] 134. 실시양태 1 내지 133 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포내 도메인은 F-액틴 해중합 활성화 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0762] 135. 실시양태 1 내지 134 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포내 도메인은 효소 활성을 결여하는 것인 조성물.

[0763] 136. 실시양태 1 내지 135 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포내 도메인은 CD3 제타 세포내 도메인으로부터 유래한 도메인을 포함하지 않는 것인 조성물.

[0764] 137. 실시양태 1 내지 136 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포내 도메인은 CD47 억제 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0765] 138. 실시양태 1 내지 137 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 인테그린을 활성화시키는 도메인, 예컨대, PSGL-1의 세포내 영역을 포함하는 것인 조성물.

[0766] 139. 실시양태 1 내지 138 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 Rap1 GTPase를 활성화시키는 도메인, 예컨대, EPAC 및 C3G로부터의 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0767] 140. 실시양태 1 내지 139 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 팍실린으로부터 유래한 것인 조성물.

[0768] 141. 실시양태 1 내지 140 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 국소 부착 키나제를 활성화시키는 것인 조성물.

[0769] 142. 실시양태 1 내지 141 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 단일 식세포 수용체로부터 유래한 것인 조성물.

[0770] 143. 실시양태 1 내지 142 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 단일 스캐빈저 수용체로부터 유래한 것인 조성물.

[0771] 144. 실시양태 1 내지 143 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포내 도메인은 식세포작용 증강 도메인을 추가로 포함하는 것인 조성물.

[0772] 145. 실시양태 1 내지 144 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포내 도메인은 염증유발 신호전달 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0773] 146. 실시양태 145에 있어서, 염증유발 신호전달 도메인은 키나제 활성화 도메인 또는 키나제 결합 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0774] 147. 실시양태 145 또는 146에 있어서, 염증유발 신호전달 도메인은 IL-1 신호전달 캐스케이드 활성화 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0775] 148. 실시양태 145 내지 147 중 어느 한 실시양태에 있어서, 염증유발 신호전달 도메인은 TLR3, TLR4, TLR7, TLR9, TRIF, RIG-1, MYD88, MAL, IRAK1, MDA-5, IFN 수용체, NLRP 패밀리 구성원, NLRP1-14, NOD1, NOD2, 피린, AIM2, NLRC4, FCGR3A, FCERIG, CD40, 캐스파제 도메인 또는 프로캐스파제 결합 도메인, 또는 이들의 임의의 조합으로부터 유래한 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 것인 조성물.

[0776] 149. 실시양태 1 내지 148 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP는 전체 길이 세포내 신호전달 도메인을 포함하지 않는 것인 조성물.

[0777] 150. 실시양태 1 내지 149 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포내 도메인은 길이가 적어도 5개, 10개, 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 150개, 200개, 300개, 300개, 400개 또는 500개 아미노산인 조성물.

[0778] 151. 실시양태 1 내지 150 중 어느 한 실시양태에 있어서, 세포내 도메인은 길이가 최대 10개, 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 150개, 200개, 300개, 300개, 400개 또는 500개 아미노산인 조성물.

[0779] 152. 실시양태 1 내지 151 중 어느 한 실시양태에 있어서, 재조합 핵산은 FcRα 쇄 세포외 도메인, FcRα 쇄 막횡단 도메인 및/또는 FcRα 쇄 세포내 도메인을 코딩하는 것인 조성물.

[0780] 153. 실시양태 1 내지 152 중 어느 한 실시양태에 있어서, 재조합 핵산은 FcRβ 쇄 세포외 도메인, FcRβ 쇄 막횡단 도메인 및/또는 FcRβ 쇄 세포내 도메인을 코딩하는 것인 조성물.

[0781] 154. 실시양태 152 또는 153에 있어서, FcRα 쇄 또는 FcRβ 쇄는 세포에서 발현될 때 FcRɣ와 복합체를 형성하는 것인 조성물.

[0782] 155. 실시양태 154에 있어서, FcRα 쇄 또는 FcRβ 쇄는 세포에서 발현될 때 내생성 FcRɣ와 복합체를 형성하는 것인 조성물.

[0783] 156. 실시양태 152 내지 155 중 어느 한 실시양태에 있어서, FcRα 쇄 또는 FcRβ 쇄는 FcRɣ를 발현하지 않는 세포의 세포막 내로 혼입되지 않는 것인 조성물.

[0784] 157. 실시양태 152 내지 156 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP는 FcRα 쇄 세포내 신호전달 도메인을 포함하지 않는 것인 조성물.

[0785] 158. 실시양태 152 내지 157 중 어느 한 실시양태에 있어서, PFP는 FcRβ 쇄 세포내 신호전달 도메인을 포함하지 않는 것인 조성물.

[0786] 159. 실시양태 1 내지 158 중 어느 한 실시양태에 있어서, 재조합 핵산은 TREM 세포외 도메인, TREM 막횡단 도메인 및/또는 TREM 세포내 도메인을 코딩하는 것인 조성물.

[0787] 160. 실시양태 159에 있어서, TREM은 TREM1, TREM2 또는 TREM3인 조성물.

[0788] 161. 실시양태 1 내지 160 중 어느 한 실시양태에 있어서, 재조합 핵산은 염증유발 폴리펩타이드를 코딩하는 서열을 포함하는 것인 조성물.

[0789] 162. 실시양태 1 내지 161 중 어느 한 실시양태에 있어서, 염증유발 폴리펩타이드를 추가로 포함하는 조성물.

[0790] 163. 실시양태 162에 있어서, 염증유발 폴리펩타이드는 케모카인, 사이토카인 및 뉴클레오타이드인 조성물.

[0791] 164. 실시양태 163에 있어서, 케모카인은 IL-1, IL3, IL5, IL-6, i18, IL-12, IL-13, IL-23, TNF, CCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11, IL-18, IL-23, IL-27, CSF, MCSF, GMCSF, IL17, IP-10, RANTES, 인터페론으로 구성된 군으로부터 선택된 것인 조성물.

[0792] 165. 실시양태 163에 있어서, 사이토카인은 IL-1, IL3, IL5, IL-6, IL-12, IL-13, IL-23, TNF, CCL2, CXCL9, CXCL10, CXCL11, IL-18, IL-23, IL-27, CSF, MCSF, GMCSF, IL17, IP-10, RANTES, 인터페론으로 구성된 군으로부터 선택된 것인 조성물.

[0793] 166. 실시양태 163에 있어서, 뉴클레오타이드는 ATP, ADP, UTP, UDP 및/또는 UDP-글루코스로부터 선택된 것인 조성물.

[0794] 167. 실시양태 1 내지 166 중 어느 한 실시양태에 있어서, 재조합 핵산은 염증의 항상성 조절인자를 코딩하는 서열을 포함하는 것인 조성물.

[0795] 168. 실시양태 167에 있어서, 염증의 항상성 조절인자는 mRNA의 비번역 영역(UTR) 내의 서열인 조성물.

[0796] 169. 실시양태 168에 있어서, UTR 내의 서열은 RNA 결합 단백질에 결합하는 서열인 조성물.

[0797] 170. 실시양태 168 또는 169에 있어서, 번역은 RNA 결합 단백질과 비번역 영역(UTR) 내의 서열의 결합 시 억제되거나 방해되는 것인 조성물.

[0798] 171. 실시양태 169 또는 170에 있어서, UTR 내의 서열은 컨센서스 서열인 WWWU(AUUUA)UUUW(서열번호 35))를 포함하고, 이때 W는 A 또는 U인 조성물.

[0799] 172. 실시양태 1 내지 171 중 어느 한 실시양태에 있어서, 재조합 핵산은 바이시스트론성 벡터에서 발현되는 것인 조성물.

[0800] 173. 실시양태 1 내지 172 중 어느 한 실시양태에 있어서, 표적 세포는 포유동물 세포인 조성물.

[0801] 174. 실시양태 1 내지 173 중 어느 한 실시양태에 있어서, 표적 세포는 인간 세포인 조성물.

[0802] 175. 실시양태 1 내지 174 중 어느 한 실시양태에 있어서, 표적 세포는 병원체에 의해 감염된 세포를 포함하는 것인 조성물.

[0803] 176. 실시양태 1 내지 175 중 어느 한 실시양태에 있어서, 표적 세포는 암 세포인 조성물.

[0804] 177. 실시양태 1 내지 176 중 어느 한 실시양태에 있어서, 표적 세포는 림프구인 암 세포인 조성물.

[0805] 178. 실시양태 1 내지 177 중 어느 한 실시양태에 있어서, 표적 세포는 난소암 세포인 암 세포인 조성물.

[0806] 179. 실시양태 1 내지 178 중 어느 한 실시양태에 있어서, 표적 세포는 난소 췌장 세포인 암 세포인 조성물.

[0807] 180. 실시양태 1 내지 179 중 어느 한 실시양태에 있어서, 표적 세포는 교모세포종 세포인 암 세포인 조성물.

[0808] 181. 실시양태 1 내지 180 중 어느 한 실시양태에 있어서, 재조합 핵산은 DNA인 조성물.

[0809] 182. 실시양태 1 내지 181 중 어느 한 실시양태에 있어서, 재조합 핵산은 RNA인 조성물.

[0810] 183. 실시양태 1 내지 182 중 어느 한 실시양태에 있어서, 재조합 핵산은 mRNA인 조성물.

[0811] 184. 실시양태 1 내지 183 중 어느 한 실시양태에 있어서, 재조합 핵산은 circRNA인 조성물.

[0812] 185. 실시양태 1 내지 184 중 어느 한 실시양태에 있어서, 재조합 핵산은 tRNA인 조성물.

[0813] 186. 실시양태 1 내지 185 중 어느 한 실시양태에 있어서, 재조합 핵산은 microRNA인 조성물.

[0814] 187. 실시양태 1 내지 186 중 어느 한 실시양태의 조성물을 포함하는 벡터.

[0815] 188. 실시양태 187에 있어서, 바이러스 벡터인 벡터.

[0816] 189. 실시양태 188에 있어서, 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터인 벡터.

[0817] 190. 실시양태 187 내지 189 중 어느 한 실시양태에 있어서, 하나 이상의 폴리펩타이드를 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 추가로 포함하는 벡터.

[0818] 191. 실시양태 187 내지 190 중 어느 한 실시양태에 있어서, 폴리시스트론성 벡터인 벡터.

[0819] 192. 실시양태 190 또는 191에 있어서, 적어도 하나의 핵산 서열 각각은 별개의 프로모터에 작동 가능하게 연결된 것인 벡터.

[0820] 193. 실시양태 187 내지 192 중 어느 한 실시양태에 있어서, 하나 이상의 내부 리보좀 진입 부위(IRES)를 추가

로 포함하는 벡터.

[0821] 194. 실시양태 187 내지 192 중 어느 한 실시양태에 있어서, 하나 이상의 폴리펩타이드를 코딩하는 적어도 하나의 핵산 서열을 플랭킹하는 5' UTR 및/또는 3' UTR을 추가로 포함하는 벡터.

[0822] 195. 실시양태 187 내지 192 중 어느 한 실시양태에 있어서, 하나 이상의 조절 영역을 추가로 포함하는 벡터.

[0823] 196. 실시양태 1 내지 186 중 어느 한 실시양태의 조성물의 재조합 핵산에 의해 코딩된 폴리펩타이드.

[0824] 197. 실시양태 1 내지 186 중 어느 한 실시양태의 조성물, 실시양태 187 내지 195 중 어느 한 실시양태의 벡터 또는 실시양태 196의 폴리펩타이드를 포함하는 세포.

[0825] 198. 실시양태 197에 있어서, 식세포성 세포인 세포.

[0826] 199. 실시양태 197 또는 198에 있어서, 줄기 세포 유래 세포, 골수 세포, 대식세포, 수지상 세포, 림프구, 비만세포, 단핵구, 호중구, 미세아교세포 또는 성상세포인 세포.

[0827] 200. 실시양태 197 내지 199 중 어느 한 실시양태에 있어서, 자가 세포인 세포.

[0828] 201. 실시양태 197 내지 199 중 어느 한 실시양태에 있어서, 동종이계 세포인 세포.

[0829] 202. 실시양태 197 내지 201 중 어느 한 실시양태에 있어서, M1 세포인 세포.

[0830] 203. 실시양태 197 내지 201 중 어느 한 실시양태에 있어서, M2 세포인 세포.

[0831] 204. (a) 실시양태 1 내지 186 중 어느 한 실시양태의 조성물, 실시양태 187 내지 195 중 어느 한 실시양태의 벡터, 실시양태 196의 폴리펩타이드 또는 실시양태 197 내지 203 중 어느 한 실시양태의 세포; 및 (b) 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약학 조성물.

[0832] 205. 실시양태 204에 있어서, 추가 치료제를 추가로 포함하는 약학 조성물.

[0833] 206. 실시양태 204 또는 205에 있어서, 추가 치료제는 CD47 아고니스트, Rac를 억제하는 작용제, Cdc42를 억제하는 작용제, GTPase를 억제하는 작용제, F-액틴 해체를 촉진하는 작용제, PFP로의 PI3K 동원을 촉진하는 작용제, PI3K 활성을 촉진하는 작용제, 포스파티딜이노시톨 3,4,5-트리스포스페이트의 생성을 촉진하는 작용제, ARHGAP12 활성을 촉진하는 작용제, ARHGAP25 활성을 촉진하는 작용제, SH3BP1 활성을 촉진하는 작용제 및 이들의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 것인 약학 조성물.

[0834] 207. 실시양태 204 내지 206 중 어느 한 실시양태에 있어서, 약학적으로 허용 가능한 부형제는 무혈청 배지, 지질 또는 나노입자를 포함하는 것인 약학 조성물.

[0835] 208. 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 질환을 치료하는 방법으로서, 실시양태 204 내지 207 중 어느 한 실시양태의 약학 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

[0836] 209. 실시양태 208에 있어서, 질환은 암인 방법.

[0837] 210. 실시양태 209에 있어서, 암은 고형 암인 방법.

[0838] 211. 실시양태 210에 있어서, 고형 암은 난소암, 신장암, 유방암, 전립선암, 간암, 뇌암, 림프종, 백혈병, 피부암, 췌장암, 대장암, 폐암으로 구성된 군으로부터 선택되고, 적합한 암은 난소암을 포함하는 것인 방법.

[0839] 212. 실시양태 209에 있어서, 암은 액형 암인 방법.

[0840] 213. 실시양태 212에 있어서, 액형 암은 백혈병 또는 림프종인 방법.

[0841] 214. 실시양태 212에 있어서, 액형 암은 T 세포 림프종인 방법.

[0842] 215. 실시양태 208에 있어서, 질환은 T 세포 악성종양인 방법.

[0843] 216. 실시양태 208 내지 215 중 어느 한 실시양태에 있어서, 추가 치료제를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

[0844] 217. 실시양태 216에 있어서, 추가 치료제는 CD47 아고니스트, Rac를 억제하는 작용제, Cdc42를 억제하는 작용제, GTPase를 억제하는 작용제, F-액틴 해체를 촉진하는 작용제, PFP로의 PI3K 동원을 촉진하는 작용제, PI3K 활성을 촉진하는 작용제, 포스파티딜이노시톨 3,4,5-트리스포스페이트의 생성을 촉진하는 작용제, ARHGAP12 활성을 촉진하는 작용제, ARHGAP25 활성을 촉진하는 작용제, SH3BP1 활성을 촉진하는 작용제 및 이들의 임의의 조

합로 구성된 군으로부터 선택된 것인 방법.

[0845] 218. 실시양태 208 내지 217 중 어느 한 실시양태에 있어서, 투여는 주입 또는 주사를 포함하는 것인 방법.

[0846] 219. 실시양태 208 내지 218 중 어느 한 실시양태에 있어서, 투여는 고형 암에 직접적으로 투여하는 단계를 포함하는 것인 방법.

[0847] 220. 실시양태 208 내지 219 중 어느 한 실시양태에 있어서, 투여는 circRNA, mRNA, 바이러스, 입자, 리포좀 또는 엑소좀 기반 전달 절차를 포함하는 것인 방법.

[0848] 221. 실시양태 208 내지 220 중 어느 한 실시양태에 있어서, 대상체에서 CD4+ T 세포 반응 또는 CD8+ T 세포 반응이 유발되는 것인 방법.

[0849] 222. 세포를 제조하는 방법으로서, 세포를 실시양태 1 내지 186 중 어느 한 실시양태의 조성물, 실시양태 187 내지 195 중 어느 한 실시양태의 벡터 또는 실시양태 196의 폴리펩타이드와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

[0850] 223. 실시양태 222에 있어서, 접촉은 형질도입을 포함하는 것인 방법.

[0851] 224. 실시양태 223에 있어서, 형질도입은 화학적 형질감염, 전기천공, 뉴클레오펙션 또는 바이러스 감염을 포함하는 것인 방법.

[0852] 225. 약학 조성물을 제조하는 방법으로서, 지질을 실시양태 1 내지 186 중 어느 한 실시양태의 조성물 또는 실시양태 187 내지 195 중 어느 한 실시양태의 벡터와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

[0853] 226. 실시양태 225에 있어서, 접촉은 지질 나노입자를 형성하는 단계를 포함하는 것인 방법.

[0854] 227. 약학 조성물을 제조하는 방법으로서, 항체를 실시양태 1 내지 186 중 어느 한 실시양태의 조성물 또는 실시양태 187 내지 195 중 어느 한 실시양태의 벡터와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

[0855] 228. 실시양태 225에 있어서, 접촉은 지질 나노입자를 형성하는 단계를 포함하는 것인 방법.

[0856] **실시예**

[0857] **실시예 1. 신규 키메라 수용체 융합 단백질(CFP) 구축물의 생성**

[0858] 이 단락에서, 신규 CFP의 생성에 유용한 CFP ECD, TM, ICD 및 항원 결합 도메인을 확인하기 위한 예시적인 디자인이 기재되어 있다. 요약하건대, 다수의 잠재적 후보 단백질들을 증강된 식세포 성질 및 이들 각각의 식세포작용 관련 세포내 신호전달에 대해 스크리닝한다. 그 다음, 유용한 도메인을 신규 CFP의 생성에 사용한다. 스크린을 두 부분으로 나눌 수 있다: *A. PR 도메인에 대한 스크리닝; B. 세포외 항원 결합 도메인에 대한 스크리닝.*

[0859] *PR 도메인에 대한 스크리닝:*

[0860] 5,800개의 원형질막 단백질들을 이들의 식세포 잠재력에 대해 스크리닝한다. J774 대식세포를 5,800개의 원형질막 단백질의 라이브러리로 일시적으로 형질감염시킨다. 원형질막의 다양한 잠재적 기능들을 평가하기 위해 고처리율 다중체 어세이(6웰 플레이트 어세이 설정부터 로봇 핸들링을 이용하는 384웰 플레이트 어세이까지)를 설정한다. 예시적인 어세이는 식세포작용 어세이, 사이토카인 생성 어세이, 인플라마좀 활성화 어세이 및 iNOS 활성화 어세이를 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 예시적인 단순화된 방법은 하기 단락들에 기재되어 있다. 각각의 방법의 변경도 이용되고 숙련된 당업자에 의해 이해된다. 각각의 방법의 변경도 이용되고 숙련된 당업자에 의해 이해된다. 시험된 예시적인 세포내 신호전달 도메인은 하기 도메인들을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다: CD40-FcRɣ; FcRɣ-CD40; NLRP3; FcRɣ-SH2-프로캐스파제; FcRɣ-Myd88; FcRɣ-IFN 수용체; FcR-TNFR1; FcRɣ-TNFR2; FcR-AIM2; FcRɣ-TRIFN; FcRɣ-프로캐스파제; TRIFC; RIG1; MDA5; TBK; CD64; CD16A; CD89; FcRε; SIRPβ; (2개의 연속 세포내 도메인들은 하이픈으로 연결된 용어로서 표시되어 있고, 예를 들면, FcRɣ-Myd88은 신호전달 도메인 1로서 FcRɣ 세포내 신호전달 도메인; 및 신호전달 도메인 2로서 Myd88 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 지칭한다). 스크리닝된 세포외 링커 도메인은 CD64, CD16A, CD89, SIRPα, FcRε, CD8 힌지를 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 시험된 막횡단 도메인은 CD8, CD64, CD16A, CD89, FcRε, SIRPα, TNFR1 및 CD40을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. MDA5 도메인도 스크리닝하였다.

[0861] 식세포작용 어세이:

[0862] 직경이 1 nm, 5 nm 또는 10 nm인 항원-연결된 실리카 또는 폴리스티렌 비드를 대식세포의 스크리닝에 사용하였다. 불활성 비드를 지지된 지질 이중층으로 코팅하고, 항원을 지질 이중층에 라이게이션시킨다. 클로닝된 재조

합 원형질막 단백질을 각각 발현하는 J774 대식세포 세포주를 제조한다. 재조합 원형질막 단백질은 형광 태그도 발현할 수 있다. 상기 세포주를 유지하고, 열 불활성화된 혈청 및 항생제(페니실린/스트렙토마이신)를 함유하는 완전 RPMI 배지에서 증식시킨다. 어세이 당일, 세포를 웰당 1x10^6개 세포/㎖의 밀도로 6웰 플레이트에 플레이팅하거나 각각의 비율로 12웰 또는 24웰 플레이트에 플레이팅하고, 2시간 내지 6시간 동안 인큐베이션한다. 이어서, 세포를 포스페이트 완충제 식염수로 1회 세척하고, 비드를 혈청 고갈된 또는 보체 고갈된 영양분 배지에 첨가한다. 비드를 첨가한 지 30분 및 2시간 후 광학 현미경관찰로 세포를 가시화한다. 태그부착된 항체를 사용하여 면역형광 반응을 수행할 수 있고, 형광 공초점 현미경관찰을 이용하여 삼켜질 때 세포 단백질들의 상호작용 및 공국소화를 검출한다. 던(Dunn)의 다중 비교 보정을 이용한 크루스칼-왈리스(Kruskal-Wallis) 검정으로 신뢰 수준을 측정한다.

[0863] 일부 예에서, 염료 로딩된 종양 세포를 대식세포 세포주에게 공급하고 식세포작용을 현미경관찰로 평가한다.

[0864] 사이토카인 생성:

[0865] 대식세포 세포주를 전술된 바와 같이 배양한다. 한 어세이에서, 원형질막 단백질을 발현하는 각각의 J774 세포주를 다중웰에 플레이팅하고 항원-연결된 비드로 챌린징하고, 4시간 및 24시간에서 상청액을 수집함으로써 사이토카인 생성을 어세이하였다. ELISA로 상청액으로부터 사이토카인을 어세이한다. 또 다른 분획에서, 세포를 비드와 함께 인큐베이션한 지 4시간 및 24시간 후 수집하고, 사이토카인을 검출하기 위해 유세포분석을 수행한다. 각각의 경우, IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-12, IL-23, TNF-α, GMCSF, CXCL1, CXCL3, CXCL9, CXCL-10, MIP1-α 및 MIP-2로부터 선택될 수 있는 다수의 사이토카인들을 다중체 포맷으로 어세이한다. 대식세포 염증 사이토카인 어레이 키트(R&D Systems)를 사용한다.

[0866] 염증 유전자 및 사이토카인 활성화를 위한 세포내 신호전달 경로를 MAP 키나제인 JNK의 인산화, Akt 신호전달 경로, STAT-1의 인산화 및 활성화를 포함하는 인터페론 활성화 경로에 대한 웨스턴 블롯 분석으로 확인할 수 있다.

[0867] 인플라마좀 활성화 어세이:

[0868] 증가된 IL-1 생성의 ELISA 검출, 및 더 짧은 캐스파제를 생성하기 위한 프로캐스파제의 절단을 검출하는, 웨스턴 블롯에 의한 캐스파제-1 활성화 검출로 NLRP3 인플라마좀의 활성화를 어세이한다. 마이크로웰 플레이트 다중체 설정에서, 캐스파제-1 활성화를 더 빨리 판독하기 위해 캐스파제-Glo((Promega Corporation)를 사용한다.

[0869] iNOS 활성화 어세이:

[0870] 형광측정 어세이인 NOS 활성 어세이 키트(AbCAM)를 사용하여 iNOS 활성화 및 NO 생성으로 산화적 파열 잠재력의 활성화를 측정한다.

[0871] 암 세포 사멸 어세이:

[0872] Raji B 세포를 암 항원 제시 세포로서 사용한다. Raji 세포를 암 세포의 전체 세포 미정제 추출물과 함께 인큐베이션하고 J774 대식세포 세포주와 함께 공인큐베이션한다. 대식세포는 감염 1시간 후 세포를 파괴할 수 있고, 이것은 현미경관찰에 의해 검출될 수 있거나 세포 사멸 어세이에 의해 검출될 수 있다.

[0873] 고친화성 항원 결합 도메인에 대한 스크리닝:

[0874] CFP를 위한 세포외 결합 도메인을 생성하기 위해 암 리간드를 항체 경쇄 및 중쇄 가변 도메인에 대해 스크리닝한다. 인간 전체 길이 항체 또는 scFv 라이브러리를 스크리닝한다. 라마에서 신규 면역글로불린 결합 도메인을 개발하고 단일 도메인 항체를 제조하기 위해 잠재적 리간드를 라마 면역화에도 사용한다.

[0875] 그 후, 스크린으로부터 확인된 특정 유용한 도메인을 역전사하고 렌티바이러스 발현 벡터 내로 클로닝하여 CFP 구축물을 생성한다. 스크린으로부터 생성된 많은 식세포 수용체들의 세포외 영역, TM 영역 및 세포질 영역으로부터의 하나 이상의 도메인을 사용하여 CFP를 코딩하는 재조합 핵산을 생성할 수 있다. 요약하건대, 염증유발 사이토카인 생성 및 인플라마좀 활성화의 고활성화제를 보이는 원형질막 수용체를 확인한다. 세포외 활성화 도메인, 막횡단 도메인 및 세포내 신호전달 도메인, 예를 들면, 특정 키나제 활성화 부위, SH2 동원 부위를 비롯한 기능적 도메인을 확인하기 위해 생체정보학 연구를 수행한다. 그 다음, 이 스크리닝된 기능적 도메인을 모듈식 구축으로 클로닝하여 신규 CFP를 생성한다. 이들은 후보 CFP이고, 시험관내 및/또는 생체내에서 식세포 증강, 사이토카인 및 케모카인의 생성, 및/또는 종양 세포 사멸에 대해 이 키메라 구축물 각각을 시험한다. 마이크로입자 기반 식세포작용 어세이를 이용하여 식세포작용의 변화를 조사하였다. 요약하건대, 스트렙타비딘에

커플링된 형광 폴리스티렌 마이크로입자(직경 6 ㎛)를 재조합적으로 발현된 바이오티닐화 및 정제된 암 리간드와 접합시킨다. 신규 CFP를 발현하는 골수 세포를 1시간 내지 4시간 동안 리간드 코팅된 마이크로입자와 함께 인큐베이션하였고, 유세포분석을 이용하여 식세포작용의 양을 분석하고 정량하였다. 그 후, 디자이너 CFP의 플라스미드 또는 렌티바이러스 구축물을 제조하고 암 세포 용해에 대해 대식세포에서 시험한다.

[0876] 예시적인 기능적 도메인 함유 CFP는 하기 단락들에 기재되어 있다.

[0877] **실시예 2. 스캐빈저 수용체 ECD, TM 및 ICD를 가진 재조합 CFP(SR-CAR)의 생성**

[0878] 본원의 목적을 위해 디자인된 CFP는 표적, 예를 들면, CD5에 결합할 수 있는, 주로 scFv, 또는 Fab 영역 또는 V_{HH} 도메인으로 구성된 세포외 표적 결합 도메인, 짧은 힌지, 막횡단 도메인, 및 1개 또는 2개 이상의 신호전달 도메인을 포함하는 세포내 도메인을 가진 모듈식이다(도 2a 내지 2c). 추가로, 세포외 도메인은 단일 또는 다중 표적에 결합하도록 디자인될 수 있다(도 3). 식세포 스캐빈저 수용체의 예시적인 디자인은 도 4a 및 4b에 표시되어 있다. CFP를 코딩하는 재조합 핵산을 다음과 같이 구축한다: 재조합 단백질을 위한 막 국소화 신호를 코딩하는 신호 펩타이드 서열을 세포외 항원 결합 도메인의 코딩 서열의 업스트림에 배치한다. 이어서, 세포외 항원 결합 scFv 도메인을 코딩하는 핵산 서열을 합성하고 신호 펩타이드 서열의 다운스트림에서 발현 벡터 내로 클로닝한다. CFP는 scFv의 3' 말단에 라이게이션되어 있는, 바람직하게는 scFv의 3' 말단과 스캐빈저 수용체 ECD의 5' 말단 사이의 링커 펩타이드 서열에 라이게이션되어 있는, 선택된 스캐빈저 수용체의 세포외 도메인, TM 도메인 및 세포내 도메인을 코딩하는 서열로 구성된다. 예시적인 링커 펩타이드는 GGGS(서열번호 44)이고, 임의적으로 링커는 사량체의 2개 이상의 반복부를 가진 서열이다. 일단 발현되면, 스캐빈저 수용체 TM 도메인은 세포막 내로 혼입된다.

[0879] SR-CAR의 렌티바이러스 구축물을 제조하고 형질도입 연구에 사용하기 위해 정제한다.

[0880] **실시예 3. 재조합 CFG(SR-CAR)의 발현 및 기능 분석**

[0881] CFP의 기능을 시험하기 위해, 리포펙타민을 사용하여 pCMV-SRCAR을 인간 대식세포에 형질도입한다. 동시에, 빈 벡터로 대조군 세포를 형질감염시킨다. 48시간 동안 세포를 안정화시킨 후, 세포에 대한 식세포작용 어세이를 수행한다. 도 4c는 시험관내 식세포작용 어세이에서 예측된 결과를 보여준다. 대조군 빈 벡터 또는 SR-CAR이 형질도입된 인간 일차 대식세포를 염료 로딩된 종양 세포와 공배양하고, 유세포분석을 이용하여 식세포작용을 정량한다. SR-CAR 플라스미드를 가진 세포는 대조군 세포에 비해 증가된 식세포작용을 보인다.

[0882] 도 4d는 시험관내 세포 용해 어세이에서 예측된 결과를 보여준다. 대조군 벡터 또는 SR-CAR이 형질도입된 인간 일차 대식세포를, 상이한 E:T 비로 루시퍼라제를 발현하는 종양 세포와 공배양하고, 루시퍼라제 어세이를 이용하여 특이적 용해를 정량한다.

[0883] 도 4e는 마우스 이종이식편 모델에서 예측된 결과를 보여준다. 0일째 날, 루시퍼라제를 발현하는 종양 세포를 NSG 마우스에게 주사하였다. 마우스를 치료하지 않거나, SR-CAR이 형질도입된 인간 일차 대식세포를 마우스에 주사하고, 생존 곡선을 생성한다.

[0884] **실시예 4. 제2 세포내 도메인-염증 반응 도메인을 가진 재조합 CFP 단백질(IR-CAR)의 생성**

[0885] 이 실시예는 세포외 scFv 도메인, 힌지를 가진 링커, CD8 막횡단 도메인, 세포내 식세포 수용체 도메인, 및 추가로 염증유발 단백질로부터의 또 다른 세포내 염증 반응(IR) 도메인을 가진 예시적인 PFP 디자인을 보여준다(도 5a 및 5b). PFP를 코딩하는 재조합 핵산을 다음과 같이 구축한다: 재조합 단백질을 위한 막 국소화 신호를 코딩하는 신호 펩타이드 서열을 세포외 항원 결합 도메인의 코딩 서열의 업스트림에 배치한다. 그 다음, 세포외 항원 결합 scFv 도메인을 코딩하는 핵산 서열을 합성하고 신호 펩타이드 서열의 다운스트림에서 발현 벡터 내로 클로닝한다. PR 서브유닛은 CD8 수용체의 세포외 및 막횡단 도메인을 코딩하는 서열로 구성된다. scFv와 CD8 영역을 세포외 도메인에 인접한 CD8 영역에 의해 기여된 힌지로 연결한다. CD8 TM 코딩 영역의 3' 말단을 선택된 식세포 수용체의 세포내 도메인에 라이게이션시킨다. 염증유발 세포내 반응 도메인의 5' 말단을 세포내 식세포 도메인의 코딩 서열의 3' 말단에 라이게이션시킨다.

[0886] 시험을 위해, 재조합 구축물을 렌티바이러스 발현 벡터에 삽입하고 세포 발현에 사용하기 위해 정제한다.

[0887] **실시예 5. 재조합 CFP(IR-CAR)의 발현 및 기능 분석**

[0888] 대조군 빈 벡터 또는 CFP(M1-CAR)가 형질도입된 인간 일차 골수 세포를 표적 종양 세포와 공배양한다. 도 5c는 염료 로딩된 표적 종양 세포의 상대적인 식세포작용의 예측된 결과를 보여준다. 도 5d는 M1-CAR 골수 세포가 표

적 종양 세포와 공배양될 때 사이토카인 발현의 예측된 결과를 보여준다. ELISA를 이용한 사이토카인 프로파일링은 벡터 대조군에 비해 염증유발 사이토카인 및 케모카인의 증가된 분비를 보여준다. 도 5e는 벡터 대조군에 비해 M1 상태 마커 발현의 증가를 보여주는 표면 항원(MHCII, CD80, CD86)의 유세포분석의 예측된 결과를 보여주고, 유사하게 iNOS 발현(세포내)은 상향조절되었다. 도 5f 및 5g는 예측된 결과를 표시한다.

[0889] **실시예 6. 인테그린 활성화 도메인을 가진 재조합 CFP(인테그린-CAR)의 생성**

[0890] 이 실시예는 세포외 scFv 도메인, 막횡단 도메인 및 세포내 식세포 도메인, 및 추가로 세포내 인테그린 활성화 도메인을 가진 예시적인 디자인을 보여준다(도 6a 및 6b). PFP를 코딩하는 재조합 핵산을 다음과 같이 구축한다: 재조합 단백질을 위한 막 국소화 신호를 코딩하는 신호 펩타이드 서열을 세포외 항원 결합 도메인의 코딩 서열의 업스트림에 배치한다. 그 다음, 세포외 항원 결합 scFv 도메인을 코딩하는 핵산 서열을 합성하고 신호 펩타이드 서열의 다운스트림에서 발현 벡터 내로 클로닝한다. PSR 서브유닛은 CD8 수용체의 세포외 및 막횡단 도메인을 코딩하는 서열로 구성된다. scFv와 CD8 영역을 세포외 도메인에 인접한 CD8 영역에 의해 기여된 힌지로 연결한다. CD8 TM 코딩 영역의 3' 말단을 선택된 식세포 수용체의 식세포작용 도메인에 라이게이션시킨다. P-셀렉틴 세포내 인테그린 활성화 도메인의 5' 말단을 세포내 식세포 도메인의 코딩 서열의 3' 말단에 라이게이션시킨다. 재조합 핵산의 기본 디자인은 도 5a에 제시되어 있다. 예시적인 수용체의 구조적 레이아웃의 도식적 묘사는 도 5b에 표시되어 있다. 도 5b는 인테그린 활성화의 그래프 표시를 보여주는데, 이때 인테그린은 내생성 인테그린이고 활성화 시 클러스터를 형성한다. 대식세포에서 발현될 때, scFv와 종양 특이적 항원의 결합은 인테그린의 활성화뿐만 아니라 식세포작용 신호전달의 활성화도 유발한다. 이것은 개선된 대식세포 수송뿐만 아니라 더 강한 식세포작용도 이끌어낸다.

[0891] 구축물을 렌티바이러스 벡터에 삽입하고 기능 연구를 위해 정제한다.

[0892] **실시예 7. 재조합 인테그린-CAR의 발현 및 기능 분석**

[0893] 대조군 빈 벡터 또는 인테그린-CAR이 형질도입된 인간 일차 대식세포를 표적 종양 세포와 공배양한다. 도 5c는 대조군 대식세포에 비해 인테그린-CAR 형질도입된 대식세포에 의한 증가된 식세포작용의 예상된 결과를 보여준다. 도 5d는 인테그린-CAR을 발현하는 세포에 의한 종양 세포의 증가된 용해의 예상된 결과를 보여준다. 도 5e는 대조군 대식세포에 비해 인테그린-CAR 형질도입된 대식세포의 증가된 이동 및 종양 침윤의 예측된 결과를 보여준다. 도 5f는 인테그린-CAR 형질도입된 대식세포를 사용한 치료 후 또는 비치료 대조군 경우 종양의 마우스 이종이식편 모델에서 예상된 생존 곡선을 보여준다.

[0894] **실시예 8. SREC-1 교차 제시 도메인을 가진 재조합 CFP의 생성**

[0895] 이 실시예에서, 세포외 scFv 도메인, 막횡단 도메인 및 세포내 식세포 도메인, 및 추가로 신호전달 도메인을 가진 CFP를 발현하는 벡터의 예시적인 디자인이 기재되어 있다. 도 6a는 SREC 및 항원 교차 제시를 수반하는 세포내 신호전달 경로의 개략도를 제공한다. CFP를 코딩하는 재조합 핵산을 다음과 같이 구축한다: 재조합 단백질을 위한 막 국소화 신호를 코딩하는 신호 펩타이드 서열을 세포외 항원 결합 도메인의 코딩 서열의 업스트림에 배치한다. 이어서, 세포외 항원 결합 scFv 도메인을 코딩하는 핵산 서열을 합성하고 신호 펩타이드 서열의 다운스트림에서 발현 벡터 내로 클로닝한다. PR 서브유닛은 식세포 수용체의 세포외 및 막횡단 도메인을 코딩하는 서열로 구성된다. TM 코딩 영역의 3' 말단을 식세포 수용체의 식세포작용 도메인에 라이게이션시킨다. 교차 제시를 위해 세포내 신호전달 도메인의 5' 말단을 세포내 식세포 도메인의 코딩 서열의 3' 말단에 라이게이션시킨다. 예시적인 수용체의 구조적 레이아웃의 도식적 묘사는 도 6b에 표시되어 있다. 도 6c 내지 6f는 앞서 기재된 바와 같이 예측된 기능적 특성을 보여준다.

[0896] **실시예 9. 대상체로부터 골수 세포 및 대식세포를 제조하기 위한 제조 프로토콜**

[0897] PBMC로부터의 골수 세포/대식세포 단리:

[0898] 히스토파크(Histopaque) 1077(Sigma)을 이용한 밀도 원심분리로 정상 기증자 버피 코트로부터 말초혈 단핵 세포를 분리한다. 세척 후, CliniMACS GMP 등급 CD14 마이크로비드 및 LS 분리 자기 컬럼(Miltenyi Biotec)을 이용하여 단핵 세포 분획으로부터 CD14+ 단핵구를 단리한다. 요약하건대, 세포를 PEA 완충제(포스페이트 완충 식염수[PBS] 플러스 2.5 mmol/L 에틸렌디아민테트라아세트산[EDTA] 및 인간 혈청 알부민[0.5% 최종 부피의 Alburex 20%, Octopharma])에 적절한 농도로 재현탁하고 제조사의 설명서에 따라 CliniMACS CD14 비드와 함께 인큐베이션한 후, 세척하고 자기화된 LS 컬럼에 통과시켰다. 세척 후, 탈자기화된 컬럼으로부터 정제된 단핵구를 용출하고 세척하고 배양을 위해 적절한 배지에 재현탁한다. 백혈구성분채집술로부터의 CD14+ 세포의 단리: 백혈구성분채집술로 연구 참여에 대한 사전동의를 제공한 간경변 기증자로부터 PBMC를 수집한다. 멸균 수집으로 옵티아

(Optia) 성분채집술 시스템을 이용하여 단핵 세포(MNC)를 위한 말초혈의 백혈구성분채집술을 수행한다. 2.5 혈액 부피를 프로세싱하는 MNC용 표준 수집 프로그램을 이용한다. GMP 준수 기능적으로 폐쇄된 시스템((CliniMACS Prodigy system, Miltenyi Biotec)을 이용하여 CD14 세포의 단리를 수행한다. 요약하건대, 세포 계수를 위해 백혈구성분채집술 생성물을 샘플링하고 분리 전 유세포분석을 위해 분취액을 수득한다. 단핵구(CD14+)의 퍼센트 및 절대 세포 수를 측정하고, 요구되는 경우, 선택을 위해 요구된 기준을 충족시키도록 부피를 조절한다(≤ 20 x 10^9 총 백혈구; < 400 x 10^6 백혈구/㎖; ≤ 3.5 x 10^9 CD14 세포, 부피 50 내지 300 ㎖). CliniMACS CD14 마이크로비드(의료 장치 클래스 III), TS510 튜빙 세트 및 LP-14 프로그램을 이용하는 CliniMACS 프로디지(Prodigy)를 이용하여 CD14 세포 단리 및 분리를 수행한다. 과정의 말기에, 약학 등급 0.5% 인간 알부민(Alburex)을 함유하는 PBS/EDTA 완충제(CliniMACS 완충제, Miltenyi)로 선택된 CD14+ 양성 단핵구를 세척한 후, 배양을 위해 TexMACS(또는 비교대상) 배지에 재현탁한다.

[0899] *세포 계수 및 순도:*

[0900] Sysmex XP-300 자동화된 분석기(Sysmex)를 이용하여 총 MNC 및 단리된 단핵구 분획의 세포 계수를 수행한다. Sysmex가 단핵구의 수를 일관되게 과소추정하였기 때문에, 절대 세포 수를 측정하기 위해 TruCount 튜브(Becton Dickinson)를 이용한 유세포분석으로 대식세포 수의 평가를 수행한다. 인간 백혈구에 대한 항체의 패널(CD45-VioBlue, CD15-FITC, CD14-PE, CD16-APC)을 사용하는 유세포분석(FACSCanto II, BD Biosciences)을 이용하여 분리의 순도를 평가하고, 호중구 오염(CD45int, CD15pos)의 양을 측정하여 생성물 품질을 평가한다.

[0901] *세포 배양 - 건강한 기증자 샘플을 사용한 배양의 개발*

[0902] 대식세포 분화를 위한 최적 배양 배지를 조사하고, 세포 생성물을 사용하여 3개의 후보들을 시험한다. 추가로, 치료적으로 사용될 골수 세포 및 대식세포의 유도에 대한 단핵구 냉동보존의 효과를 조사한다. 본 개시의 임의의 다른 곳에 기재된 바와 같이, 기능 어세이를 수행하여 골수 세포 및 대식세포의 식세포 능력 및 추가 분극화에 대한 이들의 능력, 및 식세포 잠재력을 정량한다.

[0903] *대상체 샘플을 사용한 전체 규모 과정 검증*

[0904] 프로디지 단리로부터의 백혈구성분채집술로부터 배양된 단핵구를, GMP 등급 TexMACS(Miltenyi) 및 100 ng/㎖ M-CSF를 가진 배양 백(MACS GMP 분화 백, Miltenyi)에서 cm^2당 및 ㎖당 2 x 10^6개의 단핵구로 배양한다. 단핵구를 100 ng/㎖ GMP 준수 재조합 인간 M-CSF(R&D Systems)와 함께 배양한다. 세포를 7일 동안 37℃에서 5% CO_2를 가진 습한 대기에서 배양한다. 배양 배지의 50%를 제거한 후, (최종 농도 100 ng/㎖를 회복하기 위해) 200 ng/㎖ M-CSF로 보충된 새로운 배지를 공급함으로써 배양 동안 50% 부피 배지 재보충을 2회(2일째 날 및 4일째 날) 수행한다.

[0905] *세포 수거:*

[0906] 정상 기증자 유래 대식세포의 경우, 세포 해리 완충제(Gibco, Thermo Fisher) 및 파스테트(pastette)를 사용하여 7일째 날 웰로부터 세포를 제거한다. 세포를 PEA 완충제에 재현탁하고 계수한 후, 유세포분석을 위해 시험당 대략 1x10^6개의 세포를 염색한다. 혈청으로부터의 약학 등급 0.5% 인간 알부민(HAS; Alburex)을 함유하는 PBS/EDTA 완충제(CliniMACS 완충제, Miltenyi)를 사용하여 7일째 날에 배양 백으로부터 백혈구성분채집술 유래 대식세포를 제거한다. 수거된 세포를 2종의 허가된 제품으로 구성된 부형제에 재현탁한다: 0.5% 인간 알부민(Alburex)을 가진 주입용 0.9% 식염수(Baxter).

[0907] *유세포분석 특징규명:*

[0908] FACSCanto II(BD Biosciences) 또는 MACSQuant 10(Miltenyi) 유세포분석기를 이용하여 단핵구 및 대식세포 세포 표면 마커 발현을 분석한다. 각각의 샘플에 대해 대략 20,000개의 사건을 획득한다. 세포를 특이적 항체(최종 희석 1:100)와 함께 인큐베이션함으로써, 새로 단리되고 7일째 날 성숙된 세포에서 백혈구 마커의 세포 표면 발현을 수행한다. 세포를 FcR 블록(Miltenyi)과 함께 5분 동안 인큐베이션한 후, 항체 칵테일과 함께 20분 동안 4℃에서 인큐베이션한다. 세포를 PEA로 세척하고, 죽은 세포 배제 염료 DRAQ7(BioLegend)을 1:100으로 첨가한다. 세포를 다음과 같은 다양한 표면 마커들에 대해 염색한다: CD45-VioBlue, CD14-PE 또는 CD14-PerCP-Vio700, CD163-FITC, CD169-PE 및 CD16-APC(모두 Miltenyi), CCR2-BV421, CD206-FITC, CXCR4-PE 및 CD115-APC(모두 BioLegend), 및 25F9-APC 및 CD115-APC(eBioscience). 정방향 및 측면 산란, 및 DRAQ7 사멸 세포 식별기(BioLegend)를 이용하여 단핵구 및 대식세포를 게이팅함으로써 잔해물, 이중항 및 사멸된 세포를 제외시키

고 FlowJo 소프트웨어(Tree Star)를 이용하여 분석한다. 초기 상세한 표현형분석으로부터, 단핵구로부터의 기능적 대식세포의 발생을 정의하는 방출 기준(CD45-VB/CD206-FITC/CD14-PE/25F9 APC/DRAQ7)으로서 패널을 개발한다. 대식세포는 25F9 및 CD206 둘 다에 대해 0일째 날 단핵구에 대한 수준보다 5배 더 높은 평균 형광 강도(MFI)를 가진 것으로서 확인된다. CCR2-BV421/CD163-FITC/CD169-PE/CD14-PerCP-Vio700/CD16-APC/DRAQ7로 구성된, 연장된 패널의 부분으로서 다른 마커를 평가하는 제2 패널이 개발되어 있으나, 세포 생성물에 대한 방출 기준의 부분으로서 사용되지 않는다.

[0909] 산성 엔도좀 내로 들어갈 때에만 형광을 방출하는 pHRodo 비드를 사용하여 식세포 흡수에 대해 버피 코트 CD14 세포로부터의 단핵구 및 대식세포 둘 다를 시험한다. 요약하건대, 단핵구 또는 대식세포를 1시간 동안 1 내지 2 ㎕의 pHRodo 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 생물입자(LifeTechnologies, Thermo Fisher)와 함께 배양한 후, 배지를 버리고 세포를 세척하여 식세포작용을 통해 삼켜지지 않은 입자를 제거한다. EVOS 현미경(Thermo Fisher)을 이용하여 식세포작용을 평가하고, 영상을 포착하고 ImageJ 소프트웨어(NIH freeware)를 이용하여 비드의 세포 흡수를 정량한다. 48시간 동안 7일째 날 대식세포를 IFNγ(50 ng/㎖) 또는 IL-4(20 ng/㎖)로 처리하여 M1 또는 M2 표현형(또는 각각 M[IFNγ] 대 M[IL-4])으로의 분극화를 유도함으로써 규정된 분화된 대식세포를 향해 분극화하는 능력을 조사한다. 48시간 후, 세포를 EVOS 명시야 현미경관찰로 가시화한 후, 전술된 바와 같이 수거하고 표현형을 분석한다. 생성 후 염증 자극에 반응하는 대식세포의 사이토카인 및 성장 인자 분비 프로파일에 대한 추가 분석을 수행한다. 전술된 바와 같이 건강한 기증자 버피 코트로부터 대식세포를 생성하고, 처리되지 않은 상태로 방치하거나, 염증이 발생한 간에 존재하는 조건을 모방하기 위해 TNFα(50 ng/㎖, Peprotech) 및 폴리이노신산:폴리시티딜산(폴리 I:C, TLR3에 결합하는 바이러스 상동체, 1 g/㎖, Sigma)으로, 또는 최대 대식세포 활성화를 생성하기 위해 리포폴리사카라이드(LPS, 100 ng/㎖, Sigma) 및 IFNγ(50 IU/㎖, Peprotech)로 자극한다. 7일째 날에 대식세포를 하룻밤 동안 인큐베이션하고 상청액을 수집하고 회전시켜 잔해물을 제거한 후, 시험까지 -80℃에서 저장한다. Magpix 다중체 효소 연결된 면역어세이 플레이트 판독기(BioRad) 상에서 실행된 27-플렉스(plex) 인간 사이토카인 키트 및 9-플렉스 매트릭스 메탈로단백질분해효소 키트를 사용하여 세크레톰(secretome) 분석을 수행한다.

[0910] *생성물 안정성:*

[0911] PBS/EDTA 완충제, 0.5% HAS(Alburex)를 가진 PBS/EDTA 완충제, 0.9% 식염수 단독 또는 0.5% HAS를 가진 식염수를 비롯한 다양한 부형제들을 과정 개발 동안 시험한다. 0.5% HAS 부형제를 가진 0.9% 식염수(Baxter)는 최적 세포 생존력 및 표현형을 유지하는 것으로 발견된다(데이터는 제시되어 있지 않음). 수거 후 간경변 기증자로부터의 대식세포의 안정성을 3회의 과정 최적화 실행에서 조사하고, 더 제한된 시점 범위를 과정 검증 실행에서 평가한다(n = 3). 수거 및 부형제(주입용 0.9% 식염수, 0.5% 인간 혈청 알부민)에의 재현탁 후, 백을 주위 온도(21℃ 내지 22℃)에서 저장하고 수거 후 0시간, 2시간, 4시간, 6시간, 8시간, 12시간, 24시간, 30시간 및 48시간에서 샘플을 채취한다. 방출 기준 항체 패널을 각각의 샘플에 대해 실행하고, 0일째 날부터 생존력 및 평균 배수 변화를 25F9 및 CD206의 기하 MFI로부터 측정한다.

[0912] *통계적 분석:*

[0913] 결과는 평균 ± SD로서 표현된다. 가능한 경우 GraphPad Prism 6을 이용하여 비대응 양측 *t*-검정으로 차이의 통계적 유의성을 평가한다. 결과는 *P* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 것으로서 간주된다.

[0914] **실시예 10. CD5-FcR-PI3K CFP 구축물**

[0915] 이 실시예에서, 공지된 분자생물학 기법을 이용하여 CD5-표적화된 CFP를 구축하였다. CFP는 짧은 링커를 통해 CD8α 쇄 힌지 및 CD8α 쇄 TM 도메인에 부착된, 표적 세포 상의 CD5에 결합하는 경쇄 가변 도메인에 연결된 중쇄 가변 도메인을 함유하는 scFv에 융합된 단일 펩타이드를 포함하는 세포외 도메인을 가진다. TM 도메인을 세포질 말단에서 FcRγ 세포질 부분 및 PI3K 동원 도메인과 융합시킨다. 형광 마커 및 약물(앰피실린) 내성을 가진 벡터로 구축물을 제조하고 세균 숙주를 형질감염시킴으로써 증폭하였다. 서열은 아래에 제공되어 있다:

[0916] *CD5-FcR-PI3K*

MWLQSLLLLGTVACSISEIQLVQSGGGLVKPGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKG
LEWMGWINTHTGEPTYADSFKGRFTFSLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRRGYDWYF
DVWGQGTTVTV*SSGGGGSGGGGSGGGGS*DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSYLS
WFQQKPGKAPKTLIYRANRLESGVPSRF*SGSGSG*TDYTLTISSLQYEDFGIYYCQQYDESPWT
FGGGTKLEIK*SGGGGSG*ALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC
RPAAGGAVHTRGLDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRRLKIQVRKAAITSYEKSDGVYTG
LSTRNQETYETLKHEKPPQ*GSGS*YEDMRGILYAAPQLRSIRGQPGPNHEEDADSYENM(서열
번호 14)

[0917]

[0918] 적합한 프라이머를 사용한 정제된 플라스미드의 시험관내 역전사로 mRNA를 생성하였다. 발현 분석을 위해 정제된 mRNA를 세포주 내로 형질도입하였다.

[0919] **실시예 11. HER2-FcR-PI3K CFP 구축물**

[0920] 이 실시예에서, 공지된 분자생물학 기법을 이용하여 HER2-표적화된 CFP를 구축하였다. CFP는 짧은 링커를 통해 CD8α 쇄 힌지 및 CD8α 쇄 TM 도메인에 부착된, 표적 세포 상의 HER2에 결합하는 경쇄 가변 도메인에 연결된 중쇄 가변 도메인을 함유하는 scFv에 융합된 신호 펩타이드를 포함하는 세포외 도메인을 가진다. 이전 실시예에서와 마찬가지로, TM 도메인을 세포질 말단에서 FcRγ 세포질 부분 및 PI3K 동원 도메인과 융합시킨다. 서열은 아래에 제공되어 있다:

[0921] *HER2-FcR-PI3K*

MWLQSLLLLGTVACSISDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP
KLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKR
TGSTSGSGKPGSGEGSEVQLVE*SGGG*LVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE
WVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYA
MDVWGQGTLVTV*SSSGGGGSG*ALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLS
LRPEACRPAAGGAVHTRGLDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRRLKIQVRKAAITSYEKSD
GVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQ*GSGS*YEDMRGILYAAPQLRSIRGQPGPNHEEDADSYEN
M(서열번호 15)

[0922]

[0923] **실시예 12. CD5-FcR-CD40 CFP 구축물**

[0924] 이 실시예에서, 공지된 분자생물학 기법을 이용하여 CD40 서열을 포함하는 세포내 도메인을 가진 CD5-표적화된 CFP를 구축하였다. CFP는 짧은 링커를 통해 CD8α 쇄 힌지 및 CD8α 쇄 TM 도메인에 부착된, 표적 세포 상의 CD5에 결합하는 경쇄 가변 도메인에 연결된 중쇄 가변 도메인을 함유하는 scFv에 융합된 신호 펩타이드를 포함하는 세포외 도메인을 가진다. TM 도메인을 세포질 말단에서 FcRγ 세포질 부분과 융합시킨 후 CD40 세포질 부분과 융합시킨다. 서열은 아래에 제공되어 있다:

[0925] *CD5-FcR-CD40*

MWLQSLLLLGTVACSISEIQLVQSGGGLVKPGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKG
LEWMGWINTHTGEPTYADSFKGRFTFSLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRRGYDWYF
DVWGQGTTVTV*SSGGGGSGGGGSGGGGS*DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSYLS
WFQQKPGKAPKTLIYRANRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQYEDFGIYYCQQYDESPW
TFGGGTKLEIK*SGGGGSG*ALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEA
CRPAAGGAVHTRGLDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRLKIQVRKAAITSYEKSDGVYTG
LSTRNQETYETLKHEKPPQKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGC
QPVTQEDGKESRISVQERQ(서열번호 16)

[0926]

[0927] **실시예 13. 항-CD5 CFP 및 항-HER2 CFP의 발현**

[0928] 이 실시예에서, 단핵구 세포주 THP-1로부터의 세포를, 세포내 도메인을 갖지 않은 개별 항-CD5 CFP(CD5 CAR) 구축물(ICD 없음); 또는 CD40 신호전달 도메인 또는 FcR 신호전달 도메인; 또는 PI3 키나제(PI3K) 동원 신호전달 도메인; 또는 제1 CD40 신호전달 도메인 및 FcRɣ 세포내 도메인으로부터의 제2 신호전달 도메인, 또는 반대의 경우; 제1 FcRɣ 신호전달 도메인 및 제2 PI3K 동원 신호전달 도메인, 또는 반대의 경우를 가진 개별 항-CD5 CFP(CD5 CAR) 구축물로 전기천공하였고, CAR 구축물의 발현을 도 8에 표시된 바와 같이 유세포분석으로 측정하였다. 각각의 경우, 95% 초과의 세포의 강력한 발현이 관찰되었다. 도 9는 일차 인간 골수 세포에서 이 구축물들 중 일부의 발현을 보여준다. 표 6에는 도면의 구축물들의 도메인이 기재되어 있다.

표 6

CD5-CFP 구축물 및 HER2 CFP 구축물

명칭	세포내 도메인	TM 도메인	세포외 도메인	항원 결합 도메인
CD5-CD8h-CD8tm-CD40-FcR	CD40 및 FcRγ	CD8	CD8	항-CD5 scFv
CD5-CD8h-CD8tm-FcR-CD40	FcRγ 및 CD40	CD8	CD8	항-CD5 scFv
CD5-CD8h-CD8tm-FcR-PI3K	FcRγ 및 PI3K	CD8	CD8	항-CD5 scFv
CD5-CD8h-CD8tm-FcR	FcRγ	CD8	CD8	항-CD5 scFv
CD5-CD8h-CD8tm-no ICD	없음	CD8	CD8	항-CD5 scFv
CD5-CD28h-CD28tm-FcR-PI3K	FcRγ 및 PI3K	CD28	CD28	항-CD5 scFv
CD5-CD8h-CD68tm-FcR-PI3K	FcRγ 및 PI3K	CD68	CD8	항-CD5 scFv
CD5-CD8tm-FcR-PI3K	FcRγ 및 PI3K	CD8	-	항-CD5 scFv
CD5-CD28tm-FcR-PI3K	FcRγ 및 PI3K	CD28	-	항-CD5 scFv
CD5-CD68tm-FcR-PI3K	FcRγ 및 PI3K	CD68	-	항-CD5 scFv
CD5-CD8h-CD8tm-FcR-TNFR1	FcγR 및 TNFR2	CD8	CD8	항-CD5 scFv
CD5-CD8h-CD8tm-FcR-TNFR2	FcRγ 및 TNFR2	CD8	CD8	항-CD5 scFv
HER2-CD8h-CD8tm-CD40-FcR	CD40 및 FcRγ	CD8	CD8	항-HER2 scFv
HER2-CD8h-CD8tm-FcR-CD40	FcRγ 및 CD40	CD8	CD8	항-HER2 scFv

[0929]

HER2-CD8h-CD8tm-FcR-PI3K	FcRγ 및 PI3K	CD8	CD8	항-HER2 scFv
HER2-CD8h-CD8tm-FcR	FcRγ	CD8	CD8	항-HER2 scFv
HER2-CD8h-CD8tm-no ICD	없음	CD8	CD8	항-HER2 scFv
HER2-CD28h-CD28tm-FcR-PI3K	FcRγ 및 PI3K	CD28	CD28	항-HER2 scFv
HER2-CD8h-CD68tm-FcR-PI3K	FcRγ 및 PI3K	CD68	CD8	항-HER2 scFv
HER2-CD8tm-FcR-PI3K	FcRγ 및 PI3K	CD8	-	항-HER2 scFv
HER2-CD28tm-FcR-PI3K	FcRγ 및 PI3K	CD28	-	항-HER2 scFv
HER2-CD68tm-FcR-PI3K	FcRγ 및 PI3K	CD68	-	항-HER2 scFv
HER2-CD8h-CD8tm-FcR-TNFR1	FcRγ 및 TNFR2	CD8	CD8	항-HER2 scFv
HER2-CD8h-CD8tm-FcR-TNFR2	FcRγ 및 TNFR2	CD8	CD8	항-HER2 scFv

[0930]

[0931] **실시예 14. 식세포작용 및 활성화 어세이**

[0932] 다양한 항-CD5 CFP 발현 THP-1 대식세포들의 기능 분석을 위해, 6 ㎛ FITC-표지부착된 CD5 항원-코팅된 비드를 세포에게 공급하였고(도 10a), 세포당 FITC 비드의 식세포 삼킴을 유세포분석으로 정량하였다(도 10b). 대조군 비드를 BSA로 코팅하였다. 실험 CD5-코팅된 비드는 THP-1 세포에 의해 용이하게 삼켜졌다(도 10c). 각각의 구축물은 표적 특이적인 고수준의 식세포작용을 보였고, CD5-코팅된 비드 흡수는 BSA-코팅된 비드의 흡수에 비해 적어도 10배 더 높았다. 도 10d는 대조군 BSA-코팅된 비드 또는 실험 CD5-코팅된 비드의 존재 하에서 항-CD5 CFP 발현 세포의 사이토카인 분석을 보여준다. 사이토카인의 유도가 임의의 추가 자극의 부재 하에서 극도로 높지는 않았지만, 모의 전기천공에 비해 항-CD5 CFP 발현 세포에서 더 높은 사이토카인 반응이 관찰되었다. 항-CD5 CFP 발현 세포는 비고전적인 단핵구의 특징인, CD16 및 MHC 클래스 I 분자의 낮은 발현을 나타낸다(도 10e). 그러나, 활성화 자극의 존재 하에서, 항-CD5 CFP 발현 세포는 도 10f 내지 10h에 나타낸 바와 같이 사이토카인의 유도에 의해 고도로 활성화되는 것으로 확인되었다.

[0933] THP-1 세포를, CD5-CD8h-CD8tm-FcR-PI3K를 코딩하는 CFP 구축물로 전기천공하고 세포내 FarRed 염료로 표지부착시켰다. 이 세포를 1:3 골수 세포:종양 세포 비에서 CFSE에 의해 미리 표지부착된 H9 T 세포 암 세포와 함께 인큐베이션하였다. 4시간 후, 식세포작용을 유세포분석으로 측정하였다(도 11a). 항-CD5 CFP 발현 세포는 식세포작용을 통해 암 세포를 용이하게 삼켰다(도 11b 및 11c).

[0934] 항-CD5-CAR 구축물로 전기천공한 일차 단핵구를 전술된 바와 같이 비드 삼킴, 표적 특이성 및 사이토카인에 대해 어세이하였다. pHRodo에 의해 표지부착된 표적 세포를 사용할 때(도 12a), 모의 전기천공된 세포에 비해 임의의 CD5-결합제 구축물을 발현하는 임의의 단핵구 세포의 경우 증가된 식세포 삼킴이 인지되었다(도 12b 및 12c). 또 다른 실험에서, 일차 단핵구를 항-CD5-CAR 구축물(CD5-CD8h-CD8tm-FcR-PI3K)로 전기천공하고 식세포작용 및 사이토카인 방출에 대해 어세이하였다. 결과는 도 12d에 표시되어 있다.

[0935] THP-1 세포 및 일차 단핵구 둘 다가 시험관내에서 CCL2 투여에 잘 반응하였고 증가된 화학주성을 나타내었다(각각 도 13 및 14).

[0936] **실시예 15. CD5 T 림프종 모델에 대한 항-CD5 키메라 항원 수용체 발현 단핵구의 생체내 효능**

[0937] 이 실시예에서, 이전 단락에 기재된 방법에 따라 생성된, 항-CD5 키메라 항원 수용체를 발현하는 골수 세포를 마우스 H9 T 세포 림프종 모델에서 종양 감소의 효능에 대해 조사하였다. CD5는 T 세포 림프종의 표면에서 발현

된다. 항-CD5 키메라 항원 수용체 발현 단핵구는 CD5 발현 세포에 결합할 수 있다. 그러나, 이 항-CD5-CAR 단핵구 세포가 TME를 극복할 수 있고 임의의 항종양 잠재력을 발휘할 수 있는지를 여기서 시험하였다. CD5 양성 H9 세포가 NSG-SGM3 마우스 내로 피하 주사된 T 세포 림프종 종양 모델을 확립하였다. NSG-SGM3 마우스(Jackson Laboratory, 미국 소재)는 인간 IL3, GM-CSF 및 SCF를 발현하는 삼중 형질전환 NSG-SGM3(NSGS) 마우스이고, 고도 면역결핍 NOD SCID 감마(NSG) 마우스의 특징과 골수 계통 및 조절 T 세포 집단의 안정한 생착을 뒷받침하는 사이토카인을 겸비한다. H9-mCherry-루시퍼라제 세포주를 다음과 같이 먼저 유도하였다: H9 세포주를 Hut78 세자리(Sezary) 증후군 T 세포주로부터 유도하였고; mCherry-초파리 루시퍼라제 융합 단백질을 pGLCherry 루시퍼라제를 사용한 Hut78의 형질감염으로 안정적으로 발현시켰고 안정한 통합에 대해 선택하였다. mCherry 양성 세포를 FACS 분류로 더 농후화하였고, 현재 세포주는 80% 이상의 mCherry 양성이다.

[0938] 투여를 위한 종양 세포의 제조:

[0939] H9-mCherry-Luc 세포를, 10% FBS를 가진 RPMI1640에서 배양하였다. 종양 세포 주사 당일, 세포를 3분 동안 1000 x g에서 원심분리하였고, 상청액을 제거하였고, 세포를 1:1 희석된 매트리겔에 재현탁하였다. 마우스당 1 x 10^6개의 종양 세포를 피하 주사하였다.

[0940] CD5-CAR을 발현하는 골수 세포(CD-CAR 단핵구)를 전술된 바와 같이 제조하였다. 2억 개의 세포를 전기천공하였고; 전기천공 후(EP) 단핵구를 1시간 동안 배양하고 냉동보존하였다. 해동 후 분석은 큰 생존력(>95%)을 보여주었다. CD5 CAR 단핵구를 주사한 날은 종양의 이식 후 11일째 날이었다. 시험 제품을 사용한 치료 당일, 동물을 종양 부피에 따라 3개의 군으로 무작위배정하였다(표 7).

표 7

마우스에서의 투약 용법

[0941]

		하루에 필요한 세포의 양($1x10^6$)		
용량 #	3 일마다 주사	대조군 (5 마리 마우스)	1 회 용량 (5 마리 마우스)	3 회 용량 (5 마리 마우스)
1	0 일째 날	0	0.8	0.8
2	3 일째 날	0	0	1.4
3	6 일째 날	0	0	1.4
4	10 일째 날	0	0	1.4
5	13 일째 날	0	0	1.4
6	16 일째 날	0	0	1.4

[0942] CD5-CAR 단핵구를 CryoStor CS10(바이알당 1 ㎖, 25M 세포)에서 냉동보존하였다. 세포를 37℃ 수조에서 빨리 해동시키고 추가 프로세싱 없이 동물에 직접 주사하였다. CD5 CAR 단핵구의 주사 전, 주사될 부위를 70% 이소프로필 또는 에틸 알코올 용액으로 닦아내었다. CD5 CAR 단핵구를 정맥내로 투여하였다. CD5-CAR 단핵구 입양 전달일은 연구 0일째 날로서 간주되었다. 나머지 주사를 표 8에 따라 수행하였다. 시험 방식은 도 15a에 그래프로 도시되어 있다.

표 8

마우스에서 CD5-CAR 세포에 대한 주사 일정

군	마우스의 #	종양 (10^7 개의 세포, IP)	용량	시험 제품
1	5	H9	NA	NA
2	5	H9	0.8 x 10^6	CD5-CAR 단핵구
3	5	H9	1 회 용량의 경우 0.8 x10^6, 및 5 회 용량의 경우 1.4 x 10^6	CD5-CAR 단핵구

[0943]

[0944] 종양 측정 및 체중:

[0945] 동물을 임상 징후에 대해 매일 관찰하였다. IVIS(Perkin Elmer, 매사추세츠주 보스톤 소재)를 이용하여 영상화로 종양 부피를 측정하였다. 용량 또는 150 mg/kg(200 ㎕)의 루시페린(Biovision, 카탈로그 # 7903)을 마우스에게 복강내 주사하였고 IVIS를 이용하여 10분 후 영상화하였다. 방사 값(광자/sec/cm^2)을 기록하였다. IVIS 영상화 및 체중 측정을 사망 또는 안락사까지 모든 동물들에 대해 수행하였다. 첫 번째 용량을 주사한지 20일째 날에 종양을 제거하고 칭량하였다.

[0946] CD14+ 단핵구의 SOP 배양 및 전기천공, 및 해동 후 24시간, 48시간 및 72시간에서 결합제 검출 후, CD5-CAR 단핵구를 Alexa488-접합된 인간 CD5 단백질로 염색하였다. HER2-CAR 구축물로 전기천공한 단핵구를 음성 대조군으로서 사용하여 게이트의 위치를 확인하였다. 형질감염 효율은 24시간에서 74%인 것으로 확인되었다(도 15b). 이것은 전기천공이 mRNA를 CD14+CD16-단핵구 내로 강력히 형질감염시킬 수 있음을 시사하고; 잠재적으로 mRNA 및 수용체 단백질의 신속한 교체로 인해 CAR 구축물의 발현은 3일 내지 4일 수명을 가지면서 일시적이었다.

[0947] 상대적인 발광 신호에 의해 측정된 종양 성장은 비치료된 동물에 비해 3일 내지 4일마다 6회 용량의 1.4 x 10^6 개 CD5-CAR 세포를 제공받은 동물에서 유의미하게 더 느렸다(도 15c 및 15d). 1회 용량의 1 x 10^6개 CD5-CAR 세포를 제공받은 동물은 이러한 종양 정지 효과를 보이지 않았다(도 15c 및 15d). 6회 용량 군에서, 한 마리의 동물은 13일째 날과 16일째 날 사이에 사망하였다. 20일째 날, 여러 마우스들이 명확히 촉진될 수 있는 매우 큰 종양을 가진다. 모든 동물들을 20일째 날에 희생시켰고 이들의 종양을 절개로 제거하였다. 그 다음, 종양을 저울에서 칭량하였고, 데이터를 프리즘에 작도하였다.

[0948] 또 다른 연구에서, 도 16a에 나타낸 바와 같이, NSG-SGM3 마우스를 상이한 투약 체계로 투약하였다. 이 용법에서, 4회 주입을 11일째 날, 12일째 날, 13일째 날 및 14일째 날 매일 1회 마우스에게 투여하였다. CD5-CAR 발현은 전기천공 후 입증되었고 95% 이상인 것으로 확인되었다(도 16b). 도 16c 및 16d에 나타낸 바와 같이, 이 어세이에서, 종양 성장의 통계적으로 유의미한 감소를 기록하였다.

[0949] 이 단락에 예시된 연구로부터, CD5+ H9를 표적화하는 CD5-CAR 단핵구의 다회 주입이 종양 성장의 지연을 야기할 수 있다는 것은 분명하였다. 잠재적으로 더 높은 용량은 더 강한 항종양 반응을 이끌어낼 것이다. NSG-SGM3 마우스는 기능적 T 세포, B 세포 및 NK 세포를 갖지 않는다. 따라서, 식세포작용 및 세포독성제, 예컨대, TNFα 및 NO/ROS의 분비를 포함하는, C5-CAR 단핵구의 본질적인 항종양 활성을 조사하기 위한 모델이 디자인된다. 훨씬 더 높은 항종양 활성은 CAR 발현 단핵구가 항원을 교차 제시하여 T 세포를 활성화시키고 염증 사이토카인을 분비하여 림프구 침윤을 촉진할 수 있는 면역 완전 모델에서 예상될 수 있다.

[0950] **실시예 16. CD5-FcR-MDA5 CFP 구축물**

[0951] 이 실시예에서, 공지된 분자생물학 기법을 이용하여 MDA-5 세포내 도메인 서열의 2개의 캐스파제 활성화(CARD) 도메인을 포함하는 세포내 도메인(서열번호 23과 같은 탠덤 CARD ICD 서열)을 가진 CD5-표적화된 CFP를 구축하였다. 도 17a에 그래프로 표시된 바와 같이, CFP는 짧은 링커를 통해 CD8α 쇄 힌지 및 CD8α 쇄 TM 도메인에 부착된, 표적 세포 상의 CD5에 결합하는 경쇄 가변 도메인에 연결된 중쇄 가변 도메인을 함유하는 scFv에 융합된 신호 펩타이드를 포함하는 세포외 도메인을 가진다. TM 도메인은 세포질 말단에서 FcRγ 세포질 부분에 융합

된 후, MDA5 세포질 부분에 융합된다(서열번호 23).

MWLQSLLLLGTVACSISEIQLVQSGGGLVKPGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWV
RQAPGKGLEWMGWINTHTGEPTYADSFKGRFTFSLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTR
RGYDWYFDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA
SQDINSYLSWFQQKPGKAPKTLIYRANRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQYEDFGIYYC
QQYDESPWTFGGGTKLEIKSGGGGSGALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIAS
QPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRLKIQVRKAAITSYE
KSDGVYTGLSTRNQETYETLKHEKPPQGSGSMSNGYSTDENFRYLISCFRARVKMYIQVEP
VLDYLTFLPAEVKEQIQRTVATSGNMQAVELLLSTLEKGVWHLGWTREFVEALRRTGSPLA
ARYMNPELTDLPSPSFENAHDEYLQLLNLLQPTLVDKLLVRDVLDKCMEEELLTIEDRNRIA
AAENNGNESGVRELLKRIVQKENWFSAFLNVLRQTGNNELVQELTGSDCSESNAEIEN (서열번호 24)

[0952]

[0953] 시험관내 전사된 mRNA를 사용하여 서열번호 24를 코딩하는 서열을 포함하는 서열을 가진 mRNA 폴리뉴클레오타이드를 제조하였고, 상기 mRNA로 일차 대식세포를 전사하였다. 일차 골수 세포에서의 CD5-FcR-MDA5 키메라 항원 수용체의 성공적인 발현은 도 17b에 입증된 바와 같이 인지되었다. 도 17c에 나타낸 바와 같이, ELISA 어세이에 의해 측정되었을 때, CD5-FcR-MDA5 발현 단핵구는 형질감염되지 않은 세포보다 더 높은 수준의 IL1β, IL6, IFNγ 및 TNFα 분비, 및 케모카인 CCL5 분비를 보였다.

[0954] **실시예 17. CD5-FcR-TNFR1 또는 TNFR2 CFP 구축물**

[0955] 이 실시예에서, 공지된 분자생물학 기법을 이용하여 TNFR1 또는 TNFR2 세포내 도메인을 가진 CD5-표적화된 CFP를 구축하였다. 도 18a에 그래프로 표시된 바와 같이, CFP는 짧은 링커를 통해 CD8α 쇄 힌지 및 CD8α 쇄 TM 도메인에 부착된, 표적 세포 상의 CD5에 결합하는 경쇄 가변 도메인에 연결된 중쇄 가변 도메인을 함유하는 scFv에 융합된 신호 펩타이드를 포함하는 세포외 도메인을 가진다. TM 도메인은 세포질 말단에서 FcRγ 세포질 부분에 융합된 후, 세포내 신호전달 도메인(ICD) 서열 TNFR1(서열번호 21) 또는 TNFR2(서열번호 22)의 ICD에 융합된다. TNFR1 세포내 신호전달 도메인을 가진 CFP의 전체 길이 서열은 아래에 표시되어 있다:

MWLQSLLLLGTVACSISEIQLVQSGGGLVKPGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKG
LEWMGWINTHTGEPTYADSFKGRFTFSLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRRGYDWYF
DVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSYL
SWFQQKPGKAPKTLIYRANRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQYEDFGIYYCQQYDESP
WTFGGGTKLEIKSGGGGSGALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRP
EACRPAAGGAVHTRGLDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRLKIQVRKAAITSYEKSDGVY
TGLSTRNQETYETLKHEKPPQGSGSQRWKSKLYSIVCGKSTPEKEGELEGTTTKPLAPNPSFS
PTPGFTPTLGFSPVPSSTFTSSSTYTPGDCPNFAAPRREVAPPYQGADPILATALASDPIPNPLQ
KWEDSAHKPQSLDTDDPATLYAVVENVPPLRWKEFVRRLGLSDHEIDRLELQNGRCLREAQ
YSMLATWRRRTPRREATLELLGRVLRDMDLLGCLEDIEEALCGPAALPPAPSLLR (서열번호 25)

[0956]

[0957] TNFR2 세포내 신호전달 도메인을 가진 CFP의 전체 길이 서열은 아래에 표시되어 있다:

MWLQSLLLLGTVACSISEIQLVQSGGGLVKPGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKG
LEWMGWINTHTGEPTYADSFKGRFTFSLDDSKNTAYLQINSLRAEDTAVYFCTRRGYDWYF
DVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDINSYL
SWFQQKPGKAPKTLIYRANRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQYEDFGIYYCQQYDESP
WTFGGGTKLEIKSGGGGSGALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRP
EACRPAAGGAVHTRGLDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRLKIQVRKAAITSYEKSDGVY
TGLSTRNQETYETLKHEKPPQGSGSPLCLQREAKVPHLPADKARGTQGPEQQHLLITAPSSSS
SSLESSASALDRRAPTRNQPQAPGVEASGAGEARASTGSSDSSPGGHGTQVNVTCIVNVCSS
SDHSSQCSSQASSTMGDTDSSPSESPKDEQVPFSKEECAFRSQLETPETLLGSTEEKPLPLGVP
DAGMKPS (서열번호 26)

[0958]

[0959] TNFα 수용체 1 또는 2 세포내 도메인을 가진 CFP를 코딩하는 시험관내 전사된 mRNA의 발현을 형질감염된 일차 대식세포에서 시험하였다. 결과는 도 18b에 제시되어 있다. 도 18c 및 18d에 나타낸 바와 같이, TNFR1 세포내 신호전달 도메인을 가진 CFP의 발현은 증가된 수준의 사이토카인 분비를 보여준다. 대조적으로, TNFR2 세포내 신호전달 도메인을 가진 CFP는 형질감염되지 않은 대조군 세포에 필적할만한 사이토카인 수준을 보여주었다(도 18c 및 18d). 이론에 의해 구속받고자 하지는 않지만, TNFR2(p75)는 면역 반응 경로에서 면역관용 및 면역억제 역할을 하고 조절 세포, 예컨대, 특정 DC 서브타입 및 천연 Treg에 의해 주로 발현된다. 따라서, 여기에 표시된 결과는 CFP 구축에 사용된 개별 세포질 도메인이 CFP를 발현하는 세포의 기능에 개별적으로 영향을 미치는 유의미한 역할을 한다는 것을 명확히 표시한다. TNFR2가 CFP 발현 세포의 염증유발 활성에 대한 기능 어세이에서 음성 대조군으로서 사용될 수 있다는 것도 이 결과에서 표시된다.

[0960] 다음으로, 기능 어세이를 위해 여러 CD5-표적화된 구축물들을 시험하였다. 각각의 CFP를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 구축물로 형질감염시킨 일차 단핵구를 24시간 동안 M2 조건(IL4, IL10, TGFβ)의 존재 하에서 배양한 후, 이 세포를 CD5-코팅된 또는 비코팅된(대조군) 플레이트에 플레이팅하고 24시간 동안 배양하였다. 세포에 의한 케모카인 및 사이토카인 분비를 측정하였다. 도 19a는 CD5에 결합할 수 있고 상이한 세포내 도메인(ICD), 예를 들면, CD40 ICD, PI3K 동원 ICD, TNFR2 ICD를 가질 수 있는 예시적인 구축물의 그래프 표시를 보여준다. 도 19b는 실험 디자인을 도시하는 도면을 보여준다. IL4, IL-10 및/또는 TGFβ를 포함하는 배지에 노출시키고 CD5 항원으로 코팅된 플레이트(또는 비코팅된 대조군 플레이트)로 자극하였을 때, M2 표현형을 향한 단핵구 계통 세포의 형질전환은 ELISA에 의해 측정되는 사이토카인 및 케모카인 분비의 증가를 유발한다. 결과는 도 19c, 19d 및 19e에 도시되어 있다. PI3 키나제(PI3K) 동원 신호전달 도메인을 가진 CFP를 발현하는 세포는 CD40 ICD를 가진 CFP 또는 음성 대조군 CFP TNFR2-ICD 발현 세포에 비해 고수준의 케모카인 CCL3, CXCL12, CCL4, CCL5 및 KC를 분비한다(도 19c). PI3K 동원 도메인뿐만 아니라 일부 경우 CD40 신호전달 도메인도 가진 CFP를 발현하는 세포는 TNF-알파 및 IL8과 같은 사이토카인의 높은 분비를 나타낸다.

[0961] **실시예 18. 항-HER2 키메라 항원 수용체 발현 단핵구의 효능**

[0962] 이 실시예에서, 본 개시에 기재된 예시적인 디자인의 세포외 HER2 항원 결합 도메인을 가진 키메라 융합 단백질(CAR)을 잠재적 항암제로서의 기능적 효능에 대해 분석한다. 제1세대 렌티바이러스 벡터를 사용하여, 골수 THP1 세포주의 형질도입에 사용된 렌티바이러스를 생성하였다. PMA 처리된 THP1 세포에서의 형질도입 효율은 67% 내지 90%이었다(도 20a). 식세포작용을 분석하기 위해, PMA에 의해 활성화되거나 PMA 없이 활성화된 HER2 표적화 구축물을 발현하는 THP1 세포를 FarRed 표지부착된 SKOV3 난소 종양 세포와 함께 하룻밤 동안 인큐베이션하였다. 실험 설정은 도 20b의 개략도에 도시되어 있다. 현미경 영상화 및 유세포분석(도 20c 및 도 20d)을 이용하여 식세포작용을 측정하였다. FarRed+FLAG+ 세포는 식세포 사건인 것으로 간주되었다. 이 실험에서, FcRγ-PI3K 발현 구축물은 활성화되지 않은 THP-1 세포에서 다른 구축물에 비해 증강된 효능을 가진 것으로 관찰되었다. 활성화 시, 모든 수용체들은 식세포작용과 관련되었다(도 20d). 표적 세포 사멸을 식 [(#SKOV3 단독 - 이펙터와 함께 #SKOV3)/#SKOV3 단독] x 100로 계산하였고, 결과는 도 20e에 표시되어 있다.

[0963] FcRγ + PI3K 세포내 도메인을 코딩하는 렌티바이러스 HER2-표적화된 CFP 구축물을 건강한 기증자로부터 단리된 CD14+ 세포에 형질도입하고 CSFE-표지부착된 SCOV3 종양 세포의 식세포작용 및 사멸에 대해 분석하였다(도 21a). 결과는 도 21b 및 도 21c에 표시되어 있다. Jurkat 세포는 HER2를 발현하지 않기 때문에 표적 세포에 대

한 대조군으로서 사용되었다.

[0964] HER2 구축물을 발현하는 이 세포가 종양 환경에서 M0, M1, M2 표현형으로 분화할 수 있었는지를 시험하기 위해, 도 22a에 개략도로 요약된 바와 같이, MSTO 세포 상청액을 사용하여 시험관내 중피종 모델을 개발하였다. HER2-표적화된 키메라 항원 수용체 발현 CD14+ 세포를 6개의 배양 조건에 노출시켰다: M0(100 ng/㎖ MCSF); M1(5 ng/㎖ LPS + 100 ng/㎖ IFNγ); M2(100 ng/㎖ MCSF + 20 ng/㎖ IL-10 + 20 ng/㎖ TGFβ); DC(100 ng/㎖ GMCSF + 20 ng/㎖ IL-4); 종양 컨디셔닝된 배지(MSTO-조건 RPMI + 100 ng/㎖ MCSF); 및 대조군. 이 실험들 중 일부의 경우, FLAG 펩타이드를 코딩하는 서열을 키메라 HER2 구축물의 세포외 영역에서 scFv와 막횡단 도메인 사이에 혼입한다. 세포를 수거하였고, 세포 생존력을 시험하였고 이 생존력은 80% 이상인 것으로 확인되었다. 세포의 표현형을 24시간에서 유세포분석으로 조사하였다. 24시간, 48시간 및 72시간에서 여러 세포 마커들의 발현을 측정하였다. 형광 표지부착된 정제된 HER2 단백질을 사용하여 HER2 키메라 구축물의 발현을 검출하였다. M1 조건하에서 발현이 가장 낮았지만, 상기 구축물은 모든 조건들 하에서 발현되는 것으로 발견되었다. 모든 다른 조건들은 고수준의 키메라 수용체 발현과 관련되어 있었다. 세포는 HLA DP, DQ, DR(MHCII) 및 HLA ABC(MHC1)를 차등적으로 발현한다는 것도 관찰되었다. CD14, CD11c, CD379, CD303, CD45, CX3CR1의 발현은 모든 배양 조건들에 걸쳐 일관된 반면, 만노스 수용체(CD206), MERTK 및 CCR2는 M1 조건에서 배양된 세포에서 하향조절되었는데, 이것은 세포의 분화와 관련되어 있다. 종합하건대, 이 데이터는 HER2-CFP 발현 세포가 환경적인 단서를 기반으로 수용체 라이게이션의 부재 하에서 분화할 것임을 보여준다.

[0965] 어세이의 또 다른 확장에서, MSTO 종양 세포의 존재 하에서 상이한 배양 조건 하에서 HER2-CFP 발현 세포에서의 표면 분자의 발현. 종양 세포의 존재 하에서 CCR2의 하향조절이 관찰되었고, 이것은 수용체 라이게이션 및 세포 활성화를 시사한다. HLA 분자 발현의 유지는 항원 프로세싱 및 제시 능력의 유지를 표시할 수 있다. 이 데이터는 수용체 개입이 분극화와 관계없이 종양 파괴와 관련된 활성화 및 활성을 유발함을 시사한다.

[0966] HER2 발현 종양의 생체내 모델을 이용하여, HER2-CFP를 발현하는 세포의 종양 침투 및 활성화를 조사하였다. 실험 디자인의 개략도는 도 22a에 제시되어 있다. 세포질 염료 CSFE로 표지부착된 CFP 발현 세포의 일회 주입 후 24시간에서 HER-표적화된 CFP 발현 세포의 이동 및 침투를 측정하였다. 종양을 제거하고 조직학을 위해 프로세싱하였다. 도 22b에 나타낸 바와 같이, HER2-CFP 발현 골수 세포는 종양 내로 이동하고 종양 세포 주위에서 축적되는 것으로 관찰되었다. CFSE-표지부착된 HER2-표적화된 CFP 발현 세포를 MSTO 종양 보유 NSG 마우스에게 투여한 지 24시간 후, 비장을 제거하고 조직학을 위해 프로세싱하였다. 도 22c에 나타낸 바와 같이, HER2-표적화된 CFP 발현 골수 세포는 비장 내로 이동하는 것으로 관찰되었다. 세포를 주입한 지 24시간 후 종양 보유 마우스의 비장으로부터 CFSE-표지부착된 HER2-표적화된 CFP 발현 세포를 단리하고 유세포분석으로 조사하였다. 비장에서 HER2-표적화된 CFP 발현 세포는 HLA, CD14 및 CD303의 발현을 유지하였다. CCR2 발현은 CD370(CLEC9A)의 증가와 동시에 감소하는 것으로 관찰되었는데, 이것은 잠재적으로 이 세포가 비장 내로 이동하고 T 세포 반응을 자극할 수 있는 전문적인 APC로 발달함을 암시한다. CD206(만노스) 발현은 CD45와 마찬가지로 감소하는 것으로 관찰되었다. 만노스 수용체 발현의 감소는 M1 표현형으로의 분화와 관련되어 있을 수 있다.

[0967] 유사한 생체내 종양 모델에서, 도 23에 개략도로 표시된 바와 같이 HER2-표적화된 CFP 발현 세포의 3회 주입 후 종양 퇴행을 분석하였다. 항-HER2 키메라 항원 수용체를 발현하는 인간 일차 단핵구의 3회 주입은 대조군 치료 동물에 비해 종양 진행의 지연과 관련되어 있었다(도 24).

[0968] **실시예 19. 항-식세포 신호를 차단하고 식세포작용을 활성화시키는 물질 및 방법:**

[0969] 둘베코(Dulbecco) 변형된 이글 배지, 트립신-EDTA, 워트만닌(wortmanni)(브래드포드 시약) 및 리소스타핀(lysostaphin)을 시그마-알드리치 인코포레이티드(Sigma-Aldrich, Inc)(미조리주 세인트루이스 소재)로부터 구입한다. 감소된 혈청 Opti-MEM I 배지를 깁코-비알엘(Gibco-BRL)(메릴랜드주 게이더스버그 소재)로부터 구입한다. SH-5를 엔조 라이프 사이언시스(Enzo Life Sciences)(펜실배니아주 플리머스 소재)로부터 획득하였고, OSU-03012(OSU)를 세달레인 랩스(Cedarlane Labs)(노스캐롤라이나주 벌링톤 소재)로부터 구입하였다. FuGENE 형질감염 시약 및 50x EDTA 무함유 단백질분해효소 억제제 칵테일을 로슈 어플라이드 사이언스(Roche Applied Science)(독일 만하임 소재)로부터 구입한다. 세포를 24웰 플레이트에서 60% 내지 70% 전면생장률(confluence)까지 생장시키고, 배양 배지를 DMEM 10% FCS로 바꾸었다. 그 다음, 유사한 단백질 발현을 갖도록, 제조사의 설명서에 따라 1.2 ㎕의 FuGENE 형질감염 시약 중의 5 ng pCMV5-Akt-CA 또는 200 ng pCMV5-Akt-DN(비, 4:1 [FuGENE-플라스미드])을 환원된 혈청 Opti-MEM I 배지 중의 BEC에 첨가한다.

[0970] **실시예 20. 재조합 음성 SIRPα의 발현 및 기능 분석**

[0971] 도 26a는 우성 음성 SIRPα 수용체(SIRPa_neg)의 예시적인 개략도를 보여준다. 상기 수용체는 임의의 세포내 도메인 없이 SIRPα의 ECD 및 TM 도메인으로 구성된다. ECD: 세포외 도메인; TM: 막횡단 도메인. SIRPα_neg는 대식세포에서 발현될 때 CD47 리간드에 결합하나 신호를 보내지 못하므로, CD47 신호전달을 억제하는 우성 음성 미끼 수용체로서 작용한다.

[0972] 재조합 음성 SIRPα(SIRPα_neg)의 기능을 시험하기 위해, 재조합 음성 형태의 SIRPα를 발현하는 렌티바이러스 벡터를 인간 일차 대식세포에 형질도입한다. 동시에, 대조군 세포를 빈 벡터 또는 GFP를 발현하는 동일한 벡터로 형질감염시킨다. 도 26b는 시험관내 식세포작용 어세이에서 예상된 결과를 보여준다. 대조군 빈 벡터 또는 SIRPα_neg가 형질도입된 인간 일차 대식세포를 염료 로딩된 종양 세포와 공배양하고, 유세포분석을 이용하여 식세포작용을 정량한다. SIRPα_neg 벡터를 가진 세포는 대조군 세포에 비해 증가된 식세포작용을 보인다.

[0973] 도 26c는 시험관내 세포 용해 어세이에서 예상된 결과를 보여준다. 대조군 벡터 또는 SIRPα_neg 벡터를 인간 일차 대식세포에 형질도입하고 이 대식세포를 상이한 E:T 비에서 루시퍼라제 발현 종양 세포와 공배양하고, 루시퍼라제 어세이를 이용하여 특이적 용해를 정량한다.

[0974] 도 26d는 마우스 이종이식편 모델에서 예측된 결과를 보여준다. 0일째 날, 루시퍼라제를 발현하는 종양 세포를 NSG 마우스에게 주사한다. 마우스를 치료하지 않거나, SIRPα_neg가 형질도입된 인간 일차 대식세포를 마우스에게 주사하고, 생존 곡선을 생성한다.

[0975] **실시예 21. SIRPα-PI3K 결합 도메인 구축물을 발현하는 재조합 키메라 단백질의 발현 및 기능 분석**

[0976] 도 27a는 SIRPα-PI3K 스위치 수용체의 예시적인 개략도를 보여준다. 상기 수용체는 세포내 말단에서 PI3K BD에 융합된 SIRPα의 ECD 및 TM 도메인으로 구성된다. ECD: 세포외 도메인; TM: 막횡단 도메인; PI3K BD: PI3K 결합 도메인. 대식세포에서 발현될 때, SIRPα-PI3K는 CD47 리간드에 결합하고 PI3K 매개 식세포작용 촉진 및 생존 촉진 신호전달을 활성화시킨다.

[0977] 시험을 위해, 도 27a의 재조합 구축물을 렌티바이러스 발현 벡터에 삽입하고 형질감염에 사용하기 위해 정제한다.

[0978] SIRPα-PI3K가 형질도입된 인간 일차 대식세포를 표적 종양 세포와 공배양한다. 대조군 세트에서, GFP를 발현하는 대조군 구축물을 인간 대식세포에 형질도입한다. 도 27b는 유세포분석에 의해 정량된, 염료 로딩된 표적 종양 세포의 상대적인 식세포작용의 예상된 결과를 보여준다. SIRPα-PI3K를 발현하는 세포는 대조군 벡터를 발현하는 세포에 비해 증강된 식세포작용을 나타낸다. 도 27c는 Akt 활성화 수준 측정의 예상된 결과를 보여준다. SIRPα-PI3K뿐만 아니라 대조군 구축물(GFP) 또는 SIRPα-PI3K도 발현하는 인간 일차 대식세포를 종양 세포와 공배양하고, PI3K 활성화의 다운스트림에 있는 Akt 인산화의 수준을, pAkt 항체를 사용한 웨스턴 블롯으로 측정하고 정량한다. 도 27d는 시험관내 세포 용해 어세이에서 예측된 결과를 보여준다. SIRPα-PI3K뿐만 아니라 대조군 구축물(GFP) 또는 SIRPα-PI3K도 발현하는 인간 일차 대식세포를 상이한 E:T 비에서 루시퍼라제 발현 종양 세포와 공배양하고, 루시퍼라제 어세이를 이용하여 특이적 용해를 정량한다. 도 27e는 마우스 이종이식편 모델에서 예측된 결과를 보여준다. 0일째 날, 루시퍼라제를 발현하는 종양 세포를 NSG 마우스에게 주사한다. 마우스를 치료하지 않거나, CAR-P SIRPα-PI3K를 발현하는 인간 일차 대식세포를 마우스에게 주사한다.

[0979] **실시예 22. SIRPα-M1을 발현하는 재조합 키메라 단백질의 디자인 및 기능 분석**

[0980] 이 실시예는 SIRPα의 세포외 CD47 결합 도메인을 갖고 염증유발 신호전달을 활성화시키는 세포내 도메인과 융합된 구축물(SIRPα-M1)의 예시적인 디자인을 보여준다. 도 28a는 염증유발 신호전달을 유발하는 SIRPα 스위치 수용체(SIRPα-M1)의 예시적인 개략도를 보여준다. 상기 수용체는 TLR3, TLR4, TLR9, MYD88, TRIF, RIG-1, MDA5, CD40, IFN 수용체, 또는 이러한 염증유발 세포내 신호전달 도메인을 가진 다른 유전자 중 어느 하나의 염증유발 도메인과 융합된 SIRPα의 ECD 및 TM 도메인으로 구성된다.

[0981] 상기 구축물을 렌티바이러스 벡터에 삽입하고 기능 연구를 위해 정제한다. 대식세포에서 발현될 때, CD47 SIRPα-M1의 결합은 염증유발 신호의 활성화를 유발한다. 이것은 더 강한 식세포작용, 염증유발 사이토카인 및 표면 수용체의 발현, 및 항원 교차 제시의 증강을 이끌어낸다. 도 28b 및 28c는 SIRPα-M1을 발현하는 대식세포가 표적 종양 세포와 공배양될 때 각각 사이토카인 및 표면 항원의 유도된 발현의 예상된 결과를 보여준다. 대조군 빈 벡터 또는 SIRPα-M1이 형질도입된 인간 일차 대식세포를 종양 세포와 공배양한다. ELISA를 이용한 사이토카인 프로파일링은 벡터 대조군에 비해 염증유발 사이토카인 및 케모카인의 증가된 분비를 보여준다. 유세포분석은 벡터 대조군에 비해 M1 상태 마커 발현의 증가를 보여준다. 도 28d 및 28e는 시험관내 세포 용해 어세이 및

생체내 이종이식편 마우스 모델에서 예상된 결과를 보여준다. 도 28d에서, CAR-P 및 SIRPα-M1을 공발현하는 인간 일차 대식세포를 상이한 E:T 비에서 루시퍼라제 발현 종양 세포와 공배양하고, 루시퍼라제 어세이를 이용하여 특이적 용해를 정량한다. 도 28e에서, 0일째 날 루시퍼라제를 발현하는 종양 세포를 NSG 마우스에게 주사한다. 마우스를 치료하지 않거나, CAR-P SIRPα-M1을 공발현하는 인간 일차 대식세포를 마우스에게 주사한다.

[0982] **실시예 23. SIRPαβ-스위치 수용체를 발현하는 재조합 키메라 단백질의 디자인 및 기능 분석**

[0983] SIRPαβ 스위치 수용체를 발현하는 벡터의 예시적인 디자인이 이 실시예에 기재되어 있다. 도 29a는 SIRPαβ 스위치 수용체의 예시적인 개략도를 보여준다. 상기 수용체는 SIRPβ의 TM 및 ICD에 융합된 SIRPα의 ECD로 구성된다. ECD: 세포외 도메인; TM: 막횡단 도메인; ICD: 세포내 도메인. SIRPβ는 SIRPα와 달리 CD47에 결합하지 않는 대신에, 그의 TM 영역을 통해 DAP12와 회합하고 식세포작용을 촉진한다. 대식세포에서 발현될 때, SIRPαβ는 CD47 리간드에 결합하고 DAP12와도 회합하여 식세포 신호전달을 촉진한다. 기능 분석을 위해 SIRPαβ 및 대조군 벡터를 인간 대식세포에 형질도입한다.

[0984] 도 29b는 유세포분석에 의해 정량된, 염료 로딩된 표적 종양 세포의 상대적인 식세포작용의 예상된 결과를 보여준다. SIRPαβ를 발현하는 세포는 대조군 벡터를 발현하는 세포에 비해 증강된 식세포작용을 나타낸다. 도 29c는 염료 로딩된 표적 종양 세포의 상대적인 용해의 예측된 결과를 보여준다. SIRPαβ를 발현하는 세포는 대조군 벡터를 발현하는 세포에 비해 더 높은 표적 세포 용해를 나타낸다. 0일째 날 루시퍼라제를 발현하는 종양 세포를 NSG 마우스에게 주사한다. 마우스를 치료하지 않거나, CAR-P SIRPαβ를 공발현하는 인간 일차 대식세포를 마우스에게 주사하고, 생존 곡선을 생성한다(도 29d).

[0985] **실시예 24. Siglec 스위치 수용체를 발현하는 재조합 키메라 단백질의 디자인 및 기능 분석**

[0986] Siglec 스위치 수용체를 발현하는 벡터의 예시적인 디자인이 이 실시예에 기재되어 있다. 도 30a는 모노시스트론성 Siglec 스위치 수용체의 예시적인 개략도를 보여준다. 키메라 수용체는 2개의 부분을 가진다: 식세포작용을 위한 키메라 수용체(CARP) 및 시알리다제. CARP는 번역된 단백질의 막 국소화를 위한 신호 펩타이드, 및 항원 결합 도메인을 가진 세포외 도메인으로 구성된다. 항원 결합 도메인은 표적 세포, 예를 들면, 암 세포 상의 항원에 대해 특이적으로 유도된 scFv이다. 이 항원 결합 도메인은 Siglec 단백질의 ECD 및 TM 도메인과 융합된다. ICD 도메인은 식세포작용을 촉진하는 ICD 도메인, 예컨대, 식세포 수용체로부터의 신호전달 도메인일 수 있다. 구축물은 짧은 T2A 절단 부위, 및 시알리다제에 대한 다운스트림 코딩 서열을 코딩한다. 시알리다제는 구축물을 발현하는 세포의 세포외 환경에서 시알릴화된 잔기를 제거할 것으로 예상된 효소 시알리다제의 세포외 방출을 위해 선행 신호전달 서열을 가진다. 시알릴화된 글리칸은 Siglec 단백질에 대한 리간드이므로, 시알리다제의 발현은 Siglec 단백질에 대한 천연 리간드를 고갈시켜, 키메라 수용체에서 Siglec 단백질의 ECD를 불활성 상태로 만든다. ECD: 세포외 도메인; TM: 막횡단 도메인; ICD: 세포내 도메인. 대식세포에서 발현될 때, Siglec-시알리다제 CARP는 내생성 Siglec 신호전달과 마찬가지로 식세포작용을 억제하는 대신에 식세포작용을 증강시킨다. 기능 분석을 위해 Siglec-시알리다제 CARP 및 대조군 벡터를 인간 대식세포에 형질도입한다.

[0987] 도 30c는 염료 로딩된 표적 종양 세포의 상대적인 용해의 예상된 결과를 보여준다. Siglec-시알리다제 CARP를 발현하는 세포는 시알리다제 없이 Siglec CARP 구축물만을 발현하는 CARP 대조군 벡터를 발현하는 세포에 비해 더 높은 표적 세포 용해를 나타낸다.

[0988] 도 30d 내지 30g는 시알리다제 CARP 구축물에 대한 추가 예시적인 디자인을 보여준다. 이들은 도 30a에 기재된 구축물 내의 혼입된 구획일 수 있고, 이때 추가 요소는 시알리다제에 대한 코딩 서열의 5' 및 3' 플랭킹 말단에 있는 조절 요소이다. 도 30d에 나타낸 바와 같이, 시알리다제 구축물은 CARP와 별개의 프로모터의 조절 하에 있고(이것은 도 30a의 구축물과 대조적으로 폴리시스트론성 구축물임), 이때 프로모터 앞에 NF-κB 반응 요소가 있다. NF-κB 경로는 식세포에서 활성화된다. 따라서, 시알리다제는 NF-κB 반응 요소의 영향 하에서 발현되므로, (도 30e에 나타낸 바와 같이) 능동적으로 식세포작용을 수행하는 대식세포에서 선택적으로 발현된다. 도 30f는 특이적 ARE 단백질 결합 서열을 시알리다제 구축물의 3'-UTR에 추가하여 선택적 대식세포에서 그의 발현을 조절하는 것을 보여준다. 예를 들면, GAPDH와 mRNA의 결합을 위한 서열 모티프의 삽입은 GAPDH의 글리코실화 상태의 변화 시 유발되는 조절된 발현을 제공할 수 있다. 예시적인 GAPDH ARE 결합 서열은 WWWU(AUUUA)UUUW(서열번호 35)이다(이때, W는 A 또는 U임). GAPDH는 mRNA 결합 단백질이다. GAPDH가 mRNA에 결합된 상태로 유지될 때, mRNA는 전사가 방해되므로 침묵 상태이다. 글리코실화의 변화는 GAPDH를 활성화시키고 mRNA로부터 이를 해리시킨다. 이것은 mRNA의 전사를 유발한다. 저산소 상태는 글리코실화 상태의 변화를 유발할 수 있다. 따라서, 이 구축물은 종양 미세환경과 같은 저산소 조건에서 활성화되고 발현될 수 있다.

[0989] **실시예 25. FcR알파 수용체를 발현하는 재조합 키메라 단백질의 디자인 및 기능 분석**

[0990] 대식세포 특이적 발현을 가진 암 항원-표적화된 수용체를 발현하는 벡터의 예시적인 디자인이 이 실시예에 기재되어 있다. 이 예시적인 구축물에서, 세포외 항원 결합 도메인은 암 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 scFv이다. FcRα 쇄의 세포외 막횡단 도메인과 세포내 도메인은 링커를 통해 scFv와 융합된다(CAR-FcRɣ). FcRɣ 쇄는 대식세포에서 특이적으로 발현하는 FcRɣ의 내생성 막횡단 도메인과 이종이량체화한다. 도 31a는 암 표적화 FcRɣ 수용체의 예시적인 개략도를 보여준다.

[0991] 도 31b는 유세포분석에 의해 정량된, 염료 로딩된 표적 종양 세포의 상대적인 식세포작용의 예측된 결과를 보여준다. CAR-FcRɣ를 발현하는 세포는 대조군 벡터를 발현하는 세포에 비해 증강된 식세포작용을 나타낸다. 도 31c는 염료 로딩된 표적 종양 세포의 상대적인 용해의 예측된 결과를 보여준다. FcRɣ를 발현하는 세포는 대조군 벡터를 발현하는 세포에 비해 더 높은 표적 세포 용해를 나타낸다. 0일째 날 루시퍼라제를 발현하는 종양 세포를 NSG 마우스에게 주사한다. 마우스를 치료하지 않거나, CAR-FcRɣ를 공발현하는 인간 일차 대식세포를 마우스에게 주사하고, 생존 곡선을 생성한다(도 31d).

[0992] **실시예 26. 재조합 CFP(CAR-TREM)의 디자인 및 기능 분석**

[0993] 골수 세포 특이적 발현을 가진 암 항원-표적화된 수용체를 발현하는 벡터의 예시적인 디자인이 이 실시예에 기재되어 있다. 이 예시적인 구축물에서, 세포외 항원 결합 도메인은 암 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 scFv이다. TREM 쇄의 세포외 막횡단 도메인과 세포내 도메인은 링커를 통해 scFv와 융합된다(CAR-TREM). TREM 쇄는 DAP12의 내생성 DAP12 막횡단 도메인과 이종이량체화하고 식세포작용을 촉진하는 염증유발 신호를 생성한다. 도 32a는 암 표적화 CAR-TREM의 예시적인 개략도를 보여준다.

[0994] 도 32b는 유세포분석에 의해 정량된, 염료 로딩된 표적 종양 세포의 상대적인 식세포작용의 예상된 결과를 보여준다. CAR-TREM을 발현하는 세포는 대조군 벡터를 발현하는 세포에 비해 증강된 식세포작용을 나타낸다. 도 32c는 염료 로딩된 표적 종양 세포의 상대적인 용해의 예측된 결과를 보여준다. TREM을 발현하는 세포는 대조군 벡터를 발현하는 세포에 비해 더 높은 표적 세포 용해를 나타낸다. 0일째 날 루시퍼라제를 발현하는 종양 세포를 NSG 마우스에게 주사한다. 마우스를 치료하지 않거나, CAR-TREM을 공발현하는 인간 일차 대식세포를 마우스에게 주사하고, 생존 곡선을 생성한다(도 32d).

[0995] **실시예 27. 세포내 캐스파제 구축물을 발현하는 재조합 키메라 단백질의 디자인 및 기능 분석**

[0996] 이 실시예에서, ITAM 세포내 도메인을 가진 CAR에 대한 코딩 서열, 및 융합된 세포내 단백질, 즉 캐스파제 절단 부위에 의해 연결된 SH3 결합 도메인과 연결된 프로캐스파제를 코딩하는 별개의 코딩 서열을 포함하는 단일 구축물을 디자인한다. 상기 구축물은 도 33a(상부 패널)에 그래프로 도시되어 있다. 융합된 프로캐스파제 코딩 서열은 번역 후 T2A 부위에서 2개의 단백질을 절단하는 T2A 도메인을 가진 CAR 코딩 서열과 이격되어 있다. 도 33a는 암 항원에의 결합에 특이적인 세포외 scFv, 이전 실시예에 기재된 임의의 TM일 수 있는 막횡단 도메인, 및 SH2 결합 도메인을 포함하는 세포내 ITAM 도메인을 발현하는 CAR을 보여준다. 도 33a에 그래프로 도시된 바와 같이, 프로캐스파제 부분은 발현 후 T2A 부위에서의 절단에 의해 남은 구축물로부터 방출되고, CAR의 세포내 ITAM 도메인에서 티로신 인산화된 잔기를 포함하는 SH2 도킹 부위를 통해 세포내 ITAM 도메인과 회합한다. ITAM에 의한 SH2 도메인의 결합 및 인산화 시, 프로캐스파제는 활성화되고 캐스파제 절단 부위에서 절단되는데, 이것은 프로캐스파제를 활성화시켜 캐스파제를 형성한다. 이것은 식세포작용을 위한 세포내 신호전달 경로를 시작한다. 기능 분석을 위해 상기 구축물을 인간 일차 대식세포에서 발현시킨다. 도 33b 및 33c는 캐스파제-CAR 대식세포가 표적 종양 세포와 공배양될 때 사이토카인 및 표면 항원의 유도된 발현의 예측된 결과를 보여준다. 대조군 빈 벡터 또는 캐스파제-CAR이 형질도입된 인간 일차 대식세포를 표적 종양 세포와 공배양한다. ELISA를 이용한 사이토카인 프로파일링은 벡터 대조군에 비해 염증유발 사이토카인 및 케모카인의 증가된 분비를 보여준다. 유세포분석은 벡터 대조군에 비해 염증유발 세포 표면 마커 발현의 증가를 보여준다. 도 33d 및 33e는 각각 시험관내 세포 용해 어세이 및 생체내 이종이식편 마우스 모델에서 예측된 결과를 보여준다. 도 33d에서, 대조군 벡터 또는 캐스파제-CAR이 형질도입된 인간 일차 대식세포를 상이한 E:T 비에서 루시퍼라제 발현 종양 세포와 공배양하고, 루시퍼라제 어세이를 이용하여 특이적 용해를 정량한다. 도 33e에서, 0일째 날 루시퍼라제를 발현하는 종양 세포를 NSG 마우스에게 주사한다. 0일째 날, 마우스를 치료하지 않거나, 캐스파제-CAR이 형질도입된 인간 일차 대식세포를 마우스에게 주사한다.

[0997] **실시예 28. 대사 스위치 원리를 포함하는 벡터를 위한 모듈식 디자인**

[0998] 구축물의 특이적 증강이 이 실시예에 기재되어 있다. 당분야에서 숙련된 자에 의해 이해되는 바와 같이, 이 단

락에 기재된 디자인은 본 개시에 기재된 구축물들 중 임의의 구축물에 맞게 조정될 수 있다. 도 34a(상부 패널)에 나타낸 바와 같이, 디자인은 CAR의 일반 구축물을 예시하는데, 이때 3' UTR 내로의 AU 풍부 요소(ARE) 서열의 삽입은 RNA 결합 단백질(예를 들면, GAPDH)과 성숙 mRNA 가닥의 결합을 야기하여 번역을 방해한다. GAPDH 결합 서열은 WWWU(AUUUA)UUUW(서열번호 35)로서 표기될 수 있고, 이때 W는 A 또는 U이다. 해당작용은 RNA 결합 단백질(예를 들면, GAPDH)의 분리를 야기하여, mRNA 가닥이 번역될 수 있게 한다.

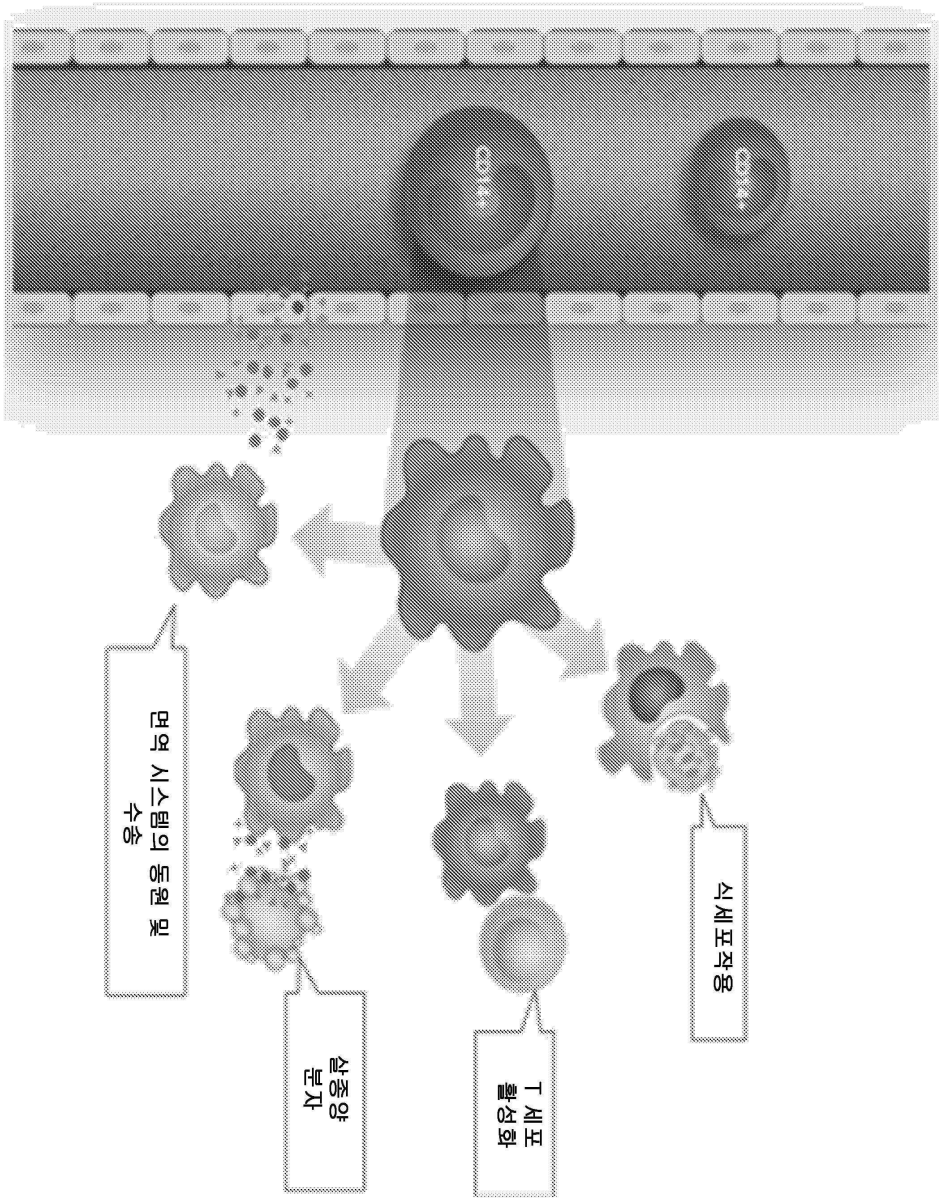
[0999] 다른 예시적인 ARE 서열을 사용하여 GAPDH 결합 서열을 대체할 수 있다. 이러한 서열은 ADK, ALDH18A1, ALDH6A1, ALDOA, ASS1, CCBL2, CS, DUT, ENO1, FASN, FDPS, GOT2, HADHB, HK2, HSD17B10, MDH2, NME1, NQO1, PKM2, PPP1CC, SUCLG1, TP11, GAPDH, LDH에 결합하는 ARE 서열일 수 있다. 도 10a(하부 패널)에 나타낸 바와 같이, 변형된 ARE는 CARP를 위한 발현 구축물의 3' 말단에서 사용된다.

[1000] 도 34b는 본원에 기재된 염증유발 단백질의 발현과 함께 CARP를 발현하기 위해 모노시스트론성 구축물 또는 폴리시스트론성 구축물의 부분으로서 염증유발 단백질을 발현하는 일반 구축물을 예시하거나; 본원에 기재된 구축물은 임의의 다른 키메라 항원성 구축물과의 공발현에 사용될 수 있다. 표시된 단락의 구축물의 남은 부분이 CAR 단백질을 코딩하는 구축물의 부분으로서 사용된다는 것은 도 34b에 표시되어 있지 않다. 인터류킨 12, 2형 인터페론, 1형 인터페론, 염증유발 매개자, 가용성 인자, 과립, 용해성 단백질, 산화질소 등 - 항종양 활성을 유발하는 임의의 것(항-PD1 항체 등), 호중구를 끌어들이는 FMLP 리간드를 포함하나 이들로 제한되지 않는 임의의 단백질은 "관심 있는 단백질"로서 표현될 수 있다. 코딩 서열의 3' 말단은 ADK, ALDH18A1, ALDH6A1, ALDOA, ASS1, CCBL2, CS, DUT, ENO1, FASN, FDPS, GOT2, HADHB, HK2, HSD17B10, MDH2, NME1, NQO1, PKM2, PPP1CC, SUCLG1, TP11, GAPDH, LDH 등 중 어느 하나에 결합할 수 있는 하나 이상의 ARE 서열을 함유한다.

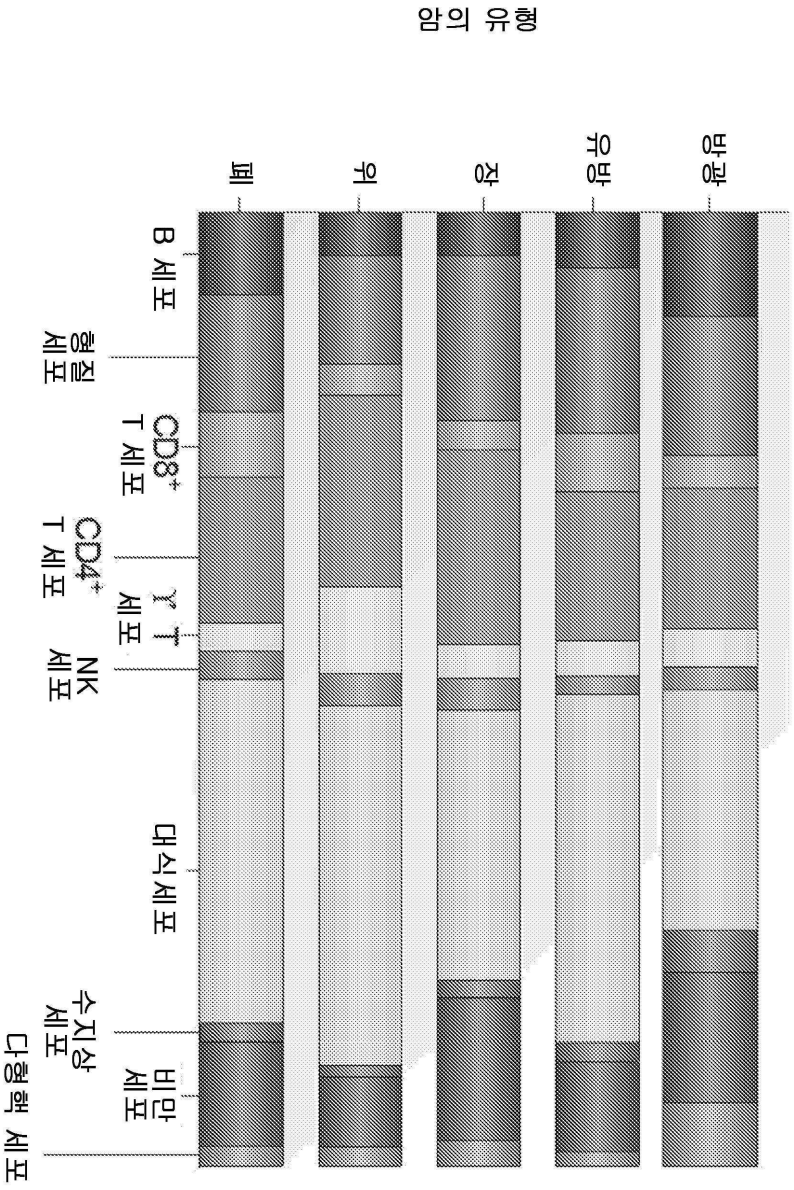
[1001] 도 34c는 본원에 개시된 디자인에 적용될 수 있는 여러 예시적인 모듈식 구축물들을 보여준다. 도 34c는 2개 이상의 코딩 서열들이 구축물((i))에 의해 코딩된 T2A 또는 T2A 절단 부위에 의해 분리되어 있는 예시적인 구축물을 도시한다. 내생성 단백질은 새로 번역된 단백질을 상기 부위에서 절단하여, 단일 구축물로부터 생성된 2개의 독립적인 단백질들을 방출한다. 도 34c는 2개의 코딩 서열들, 즉 프로모터 P1의 영향 하에 있는, 항원 특이적 결합제 및 세포내 도메인(ICD)을 포함하는 융합 단백질에 대한 코딩 서열; 및 제2 프로모터 P2의 영향 하에 있는 염증 유전자 및 3' 조절 요소를 코딩하는 다른 코딩 서열을 포함하는 예시적인 바이시스트론성 구축물도 도시한다. 상기 2개의 코딩 서열들은 서로에 대해 반대 방향으로 존재하도록 디자인된다((ii)). 도 34c는 2개의 상이한 유전자들이 바이시스트론성 벡터 구축물에 의해 코딩되고 한 방향으로 존재하는 예시적인 디자인도 도시한다((iii)). 도 34c는 2개의 유전자들이 벡터 구축물에 의해 코딩되어 있는 예시적인 디자인도 도시하는데, 이때 단일 핵산 구축물로부터 유래한 별개의 폴리펩타이드로서 독립적으로 번역되기 위해 독립적인 리보좀 진입 부위를 보장하는 IRES 구축물이 제2 코딩 서열 앞에 존재한다((iv)).

도면

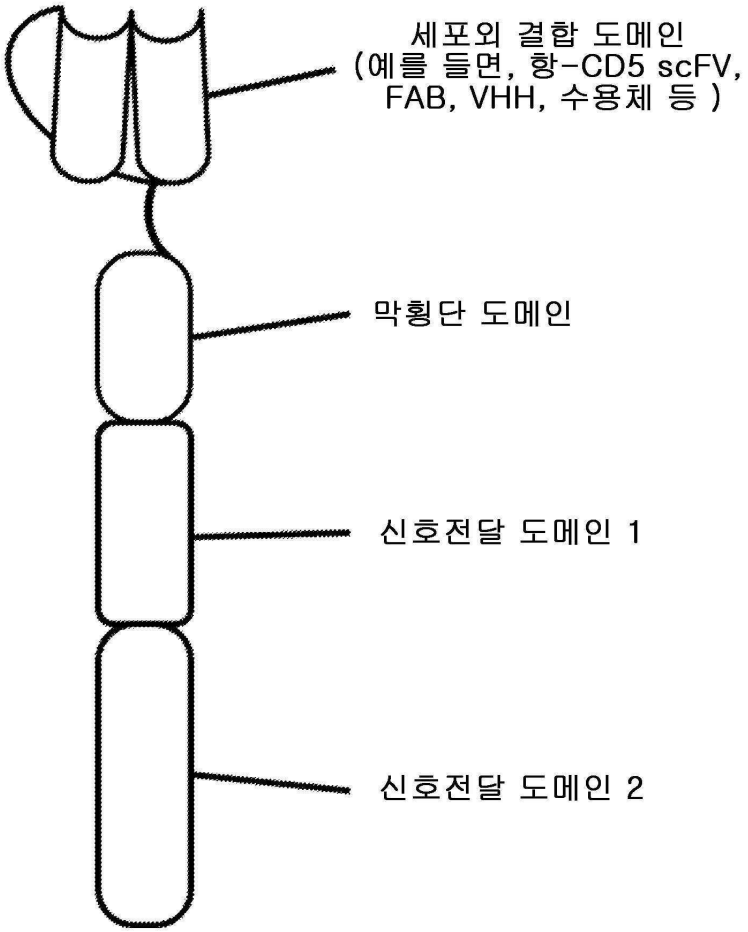
도면1a



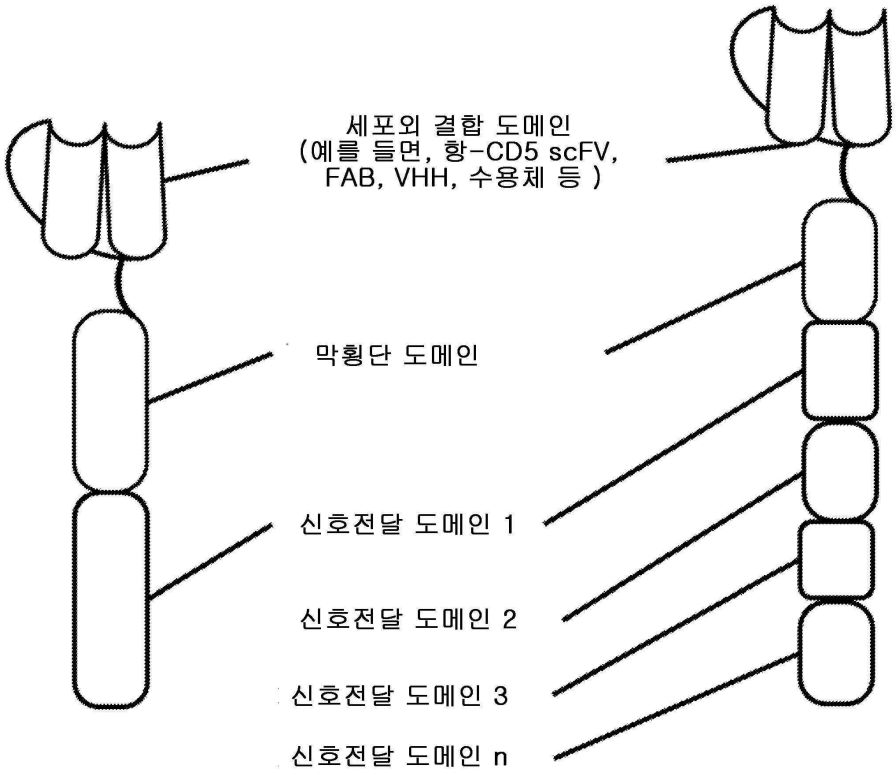
도면1b


암의 유형
폐
뇌
장
유방
림프종
B 세포
형질 세포
CD8+ T 세포
CD4+ T 세포
γ δ T 세포
NK 세포
대식세포
수지상 세포
비만 세포
다형핵 세포

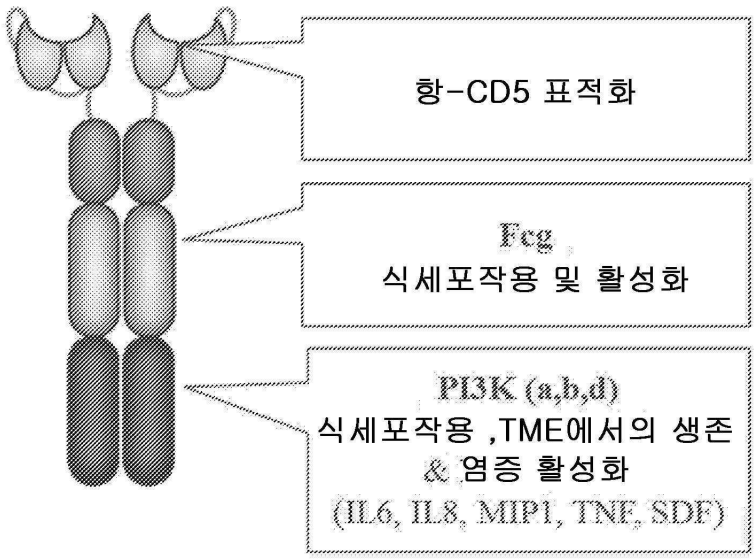
도면2a


세포외 결합 도메인
(예를 들면, 항-CD5 scFV,
FAB, VHH, 수용체 등)
막횡단 도메인
신호전달 도메인 1
신호전달 도메인 2

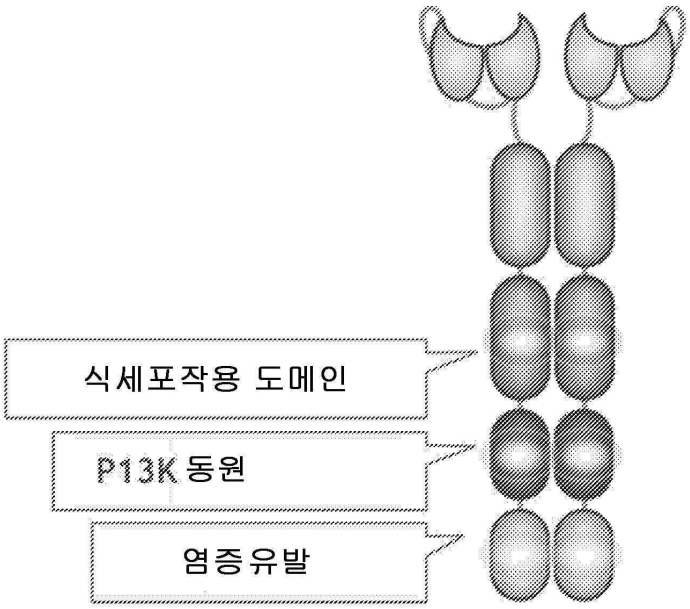
도면2b


세포외 결합 도메인
(예를 들면, 항-CD5 scFV,
FAB, VHH, 수용체 등)
막횡단 도메인
신호전달 도메인 1
신호전달 도메인 2
신호전달 도메인 3
신호전달 도메인 n

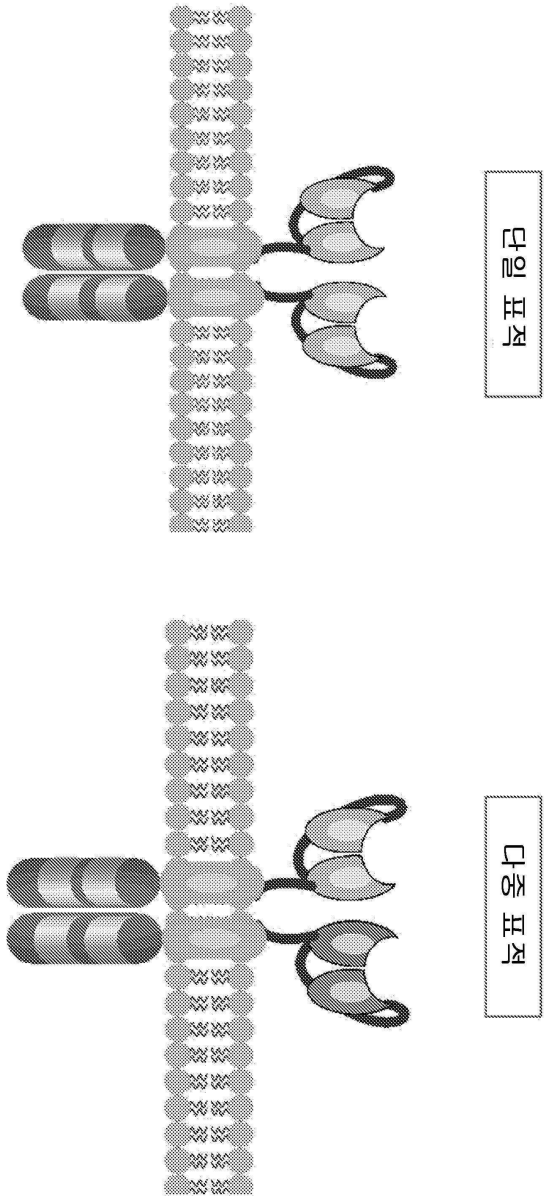
도면2c


항-CD5 표적화
Fcg
식세포작용 및 활성화
PI3K (a,b,d)
식세포작용 ,TME에서의 생존
& 염증 활성화
(IL6, IL8, MIP1, TNF, SDF)

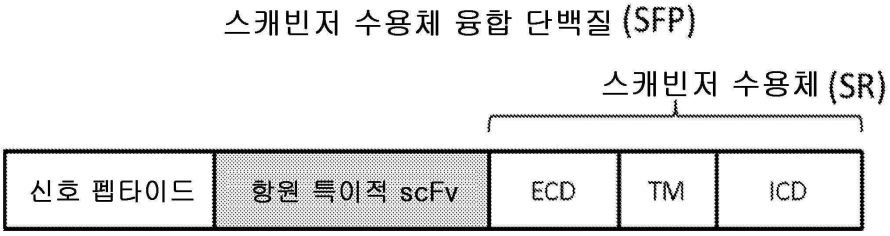
도면2d



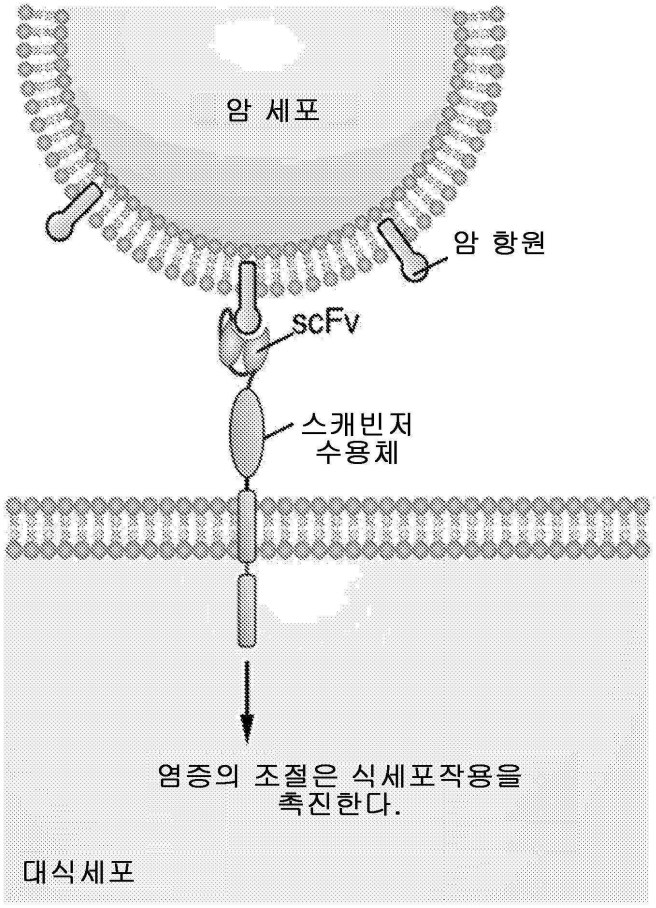
도면3


낮은 표적
높은 표적

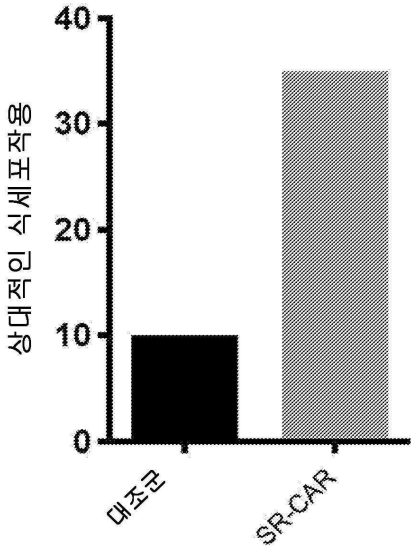
도면4a


스캐빈저 수용체 융합 단백질 (SFP)
스캐빈저 수용체 (SR)
신호 펩타이드
항원 특이적 scFv
ECD
TM
ICD

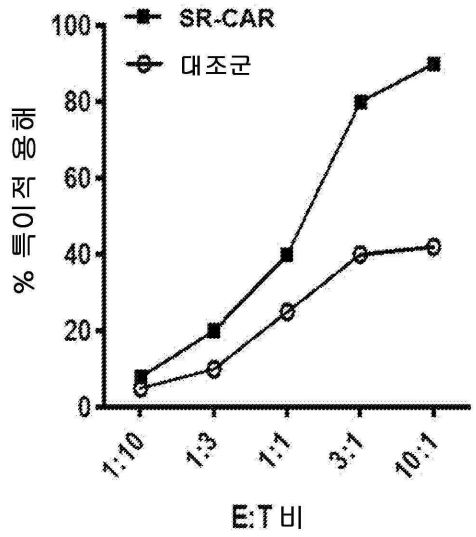
도면4b


암 세포
암 항원
scFv
스캐빈저
수용체
염증의 조절은 식세포작용을
촉진한다.
대식세포

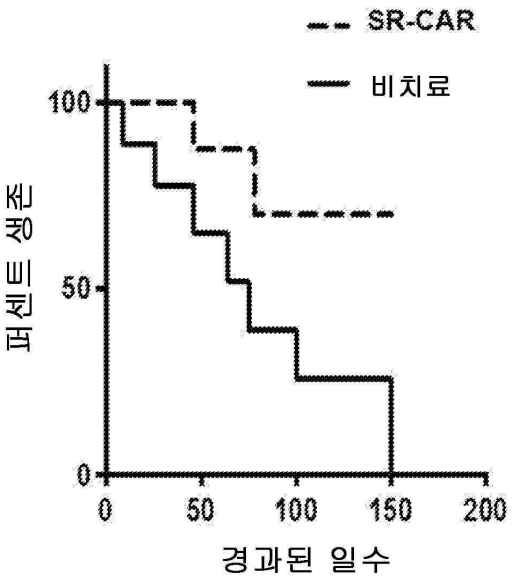
도면4c


40
30
20
10
0
상대적인 식세포작용
대조군
SR-CAR

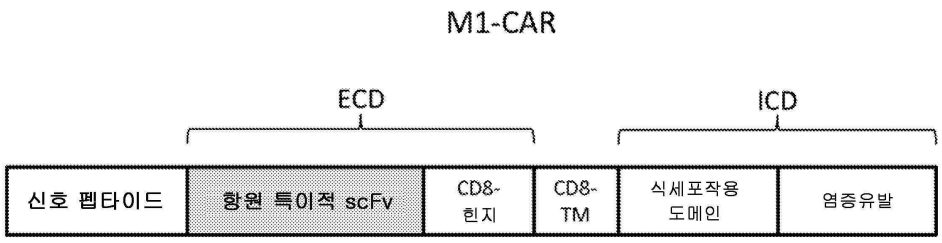
도면4d



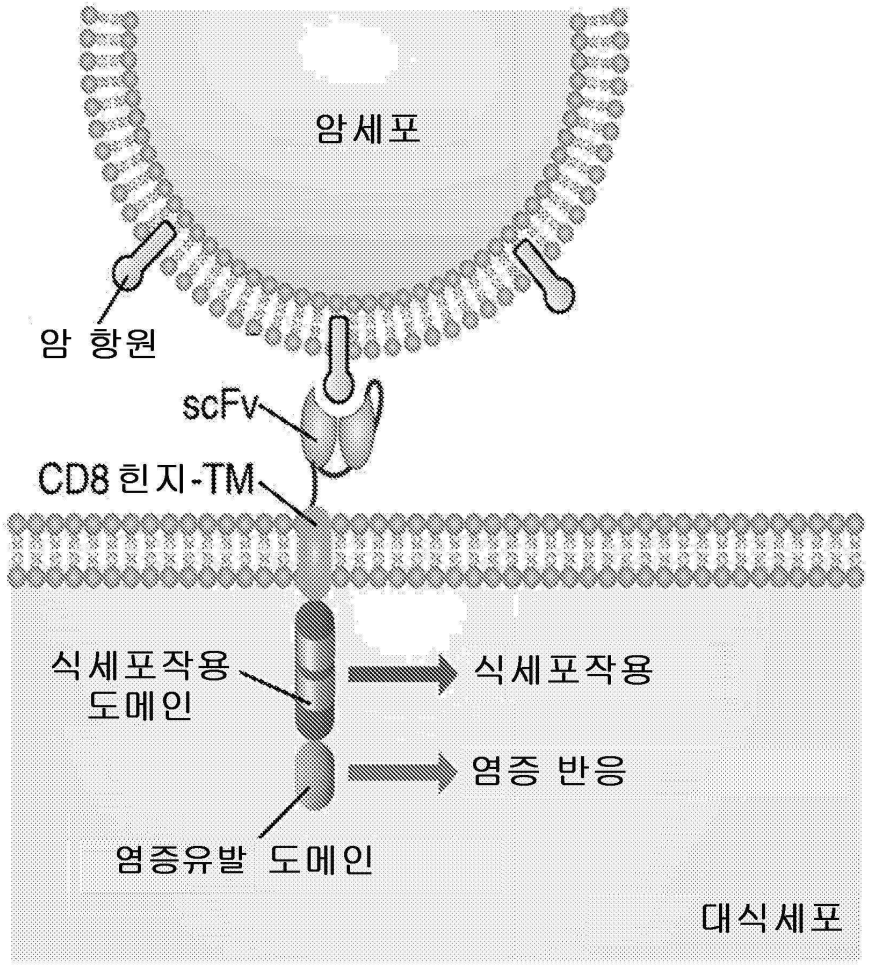
도면4e



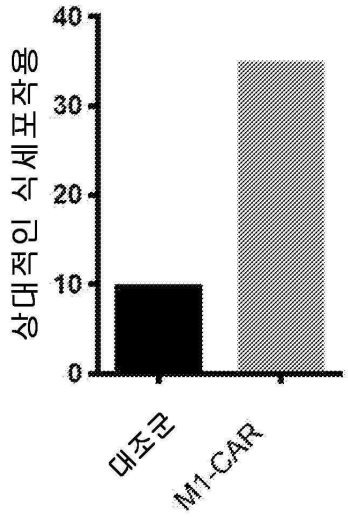
도면5a



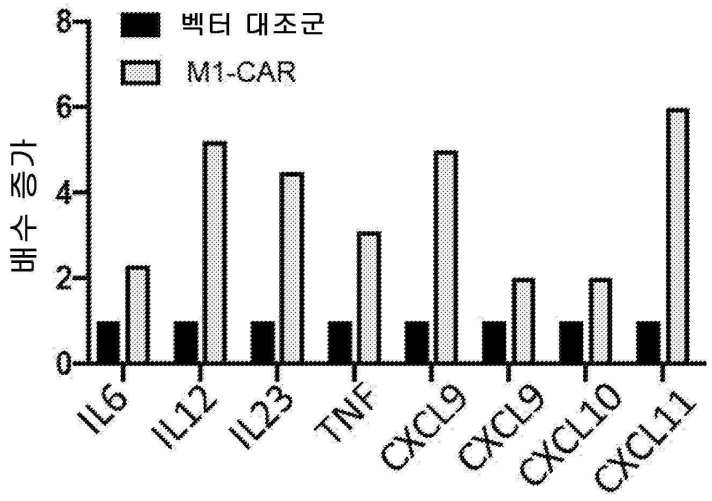
도면5b


암세포
암 항원
scFv
CD8 힌지-TM
식세포작용 도메인
식세포작용
염증 반응
염증유발 도메인
대식세포

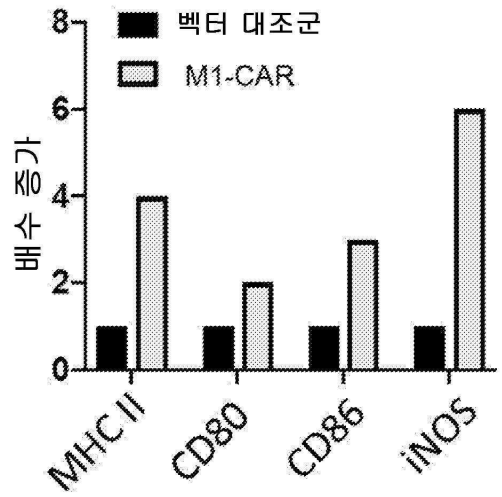
도면5c


상대적인 식세포작용
40
30
20
10
0
대조군
M1-CAR

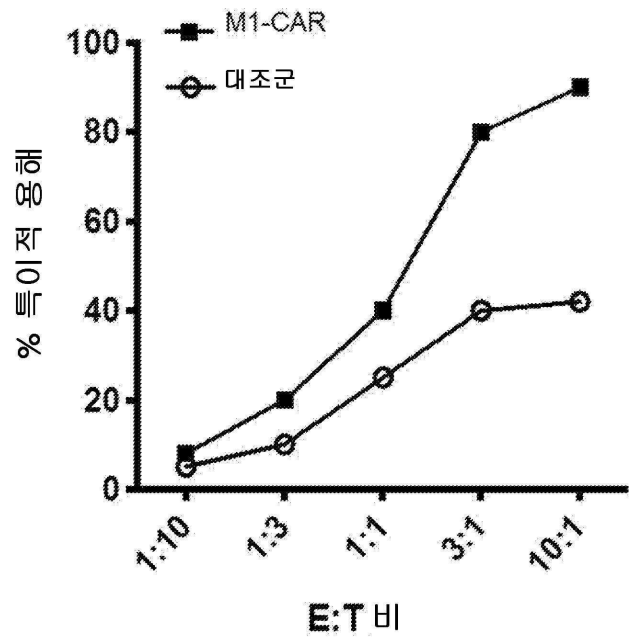
도면5d


벡터 대조군
M1-CAR
배수 증가
0
2
4
6
8
IL6
IL12
IL23
TNF
CXCL9
CXCL9
CXCL10
CXCL11

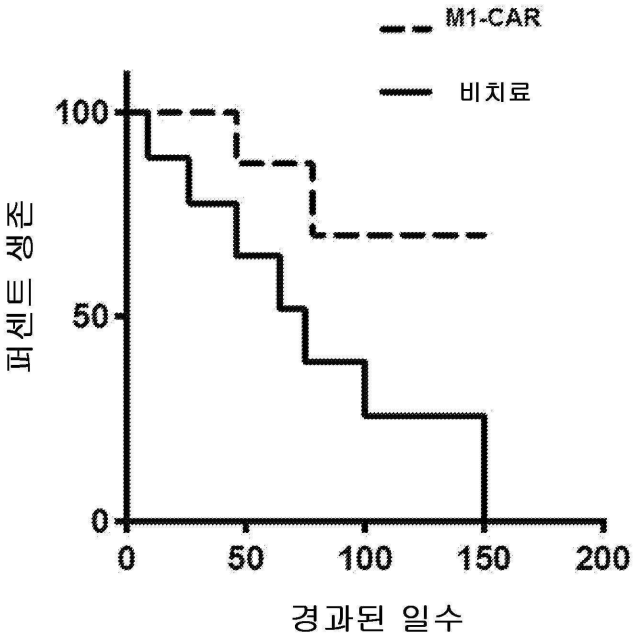
도면5e


벡터 대조군
M1-CAR
배수 증가
0
2
4
6
8
MHC II
CD80
CD86
iNOS

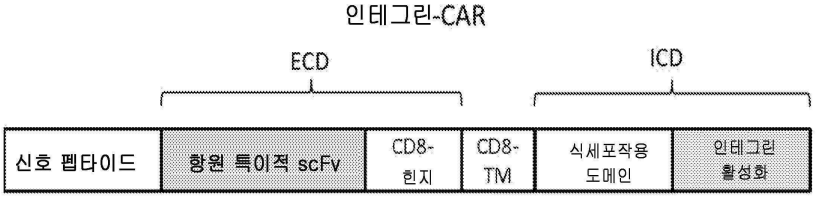
도면5f



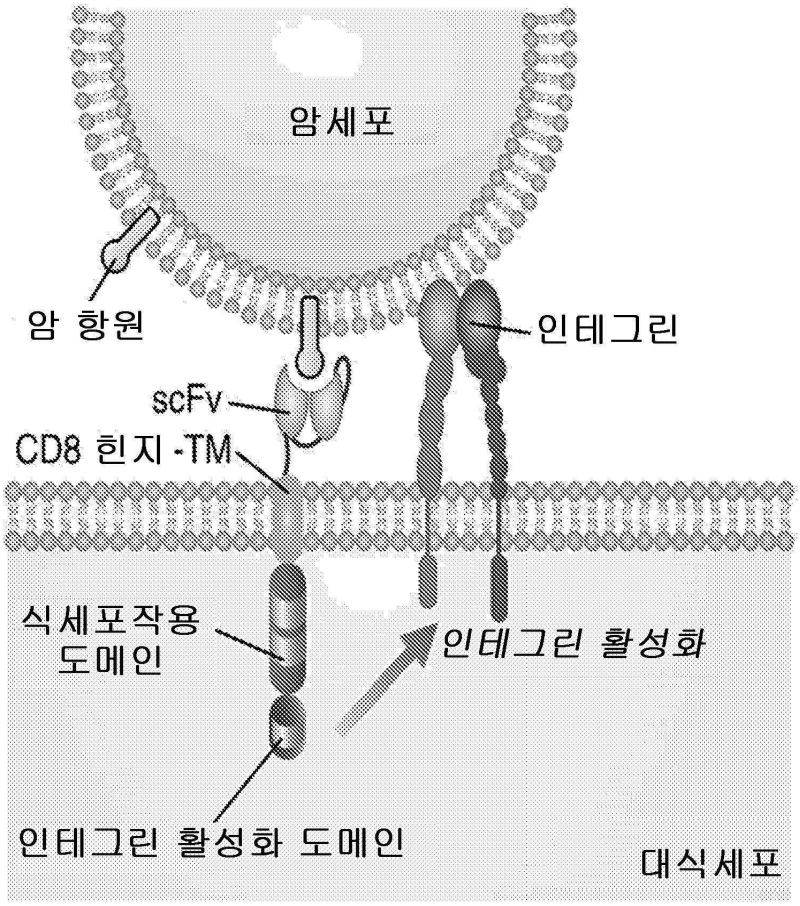
도면5g



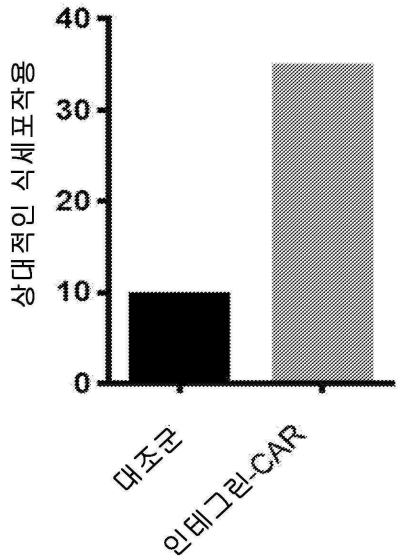
도면6a



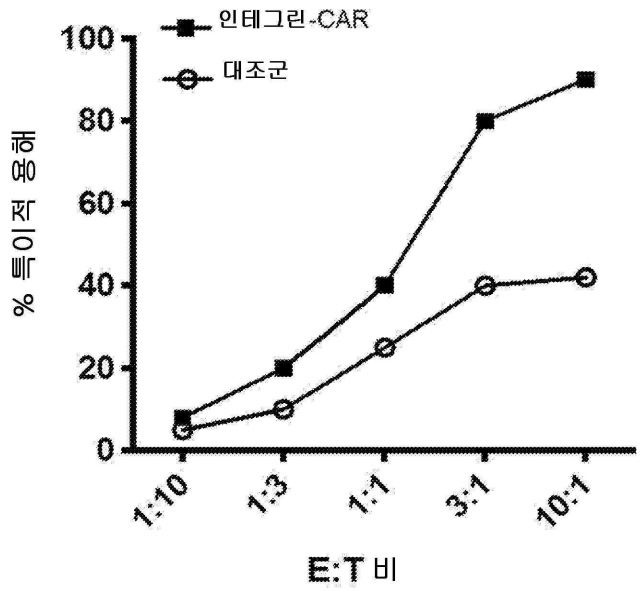
도면6b


암세포
암 항원
인테그린
scFv
CD8 힌지-TM
식세포작용
도메인
인테그린 활성화
인테그린 활성화 도메인
대식세포

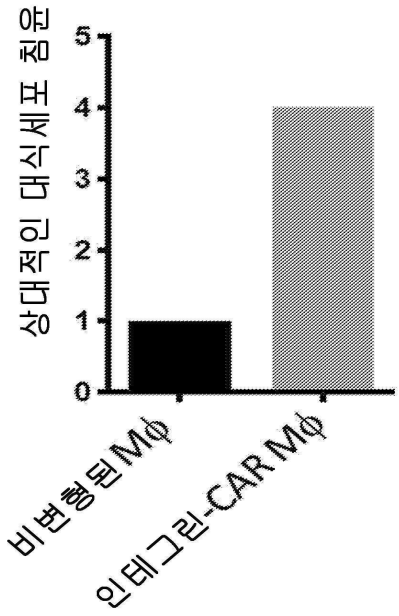
도면6c


40
30
20
10
0
상대적인 식세포작용
대조군
인테그린-CAR

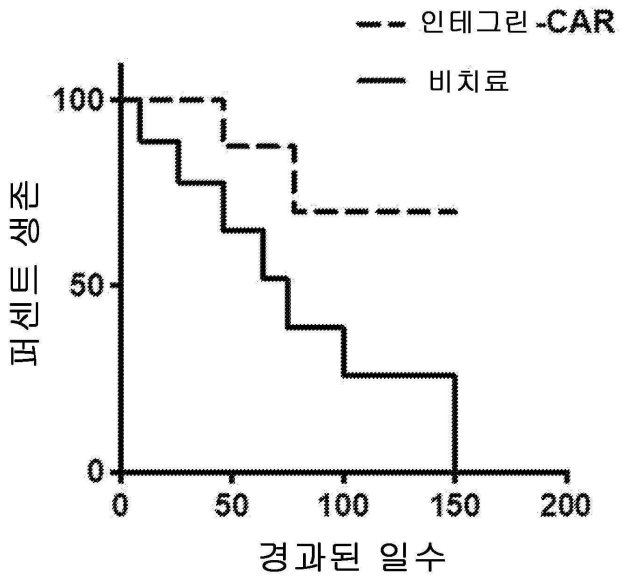
도면6d


인테그린-CAR
대조군
% 특이적 용해
100
80
60
40
20
0
1:10
1:3
1:1
3:1
10:1
E:T 비

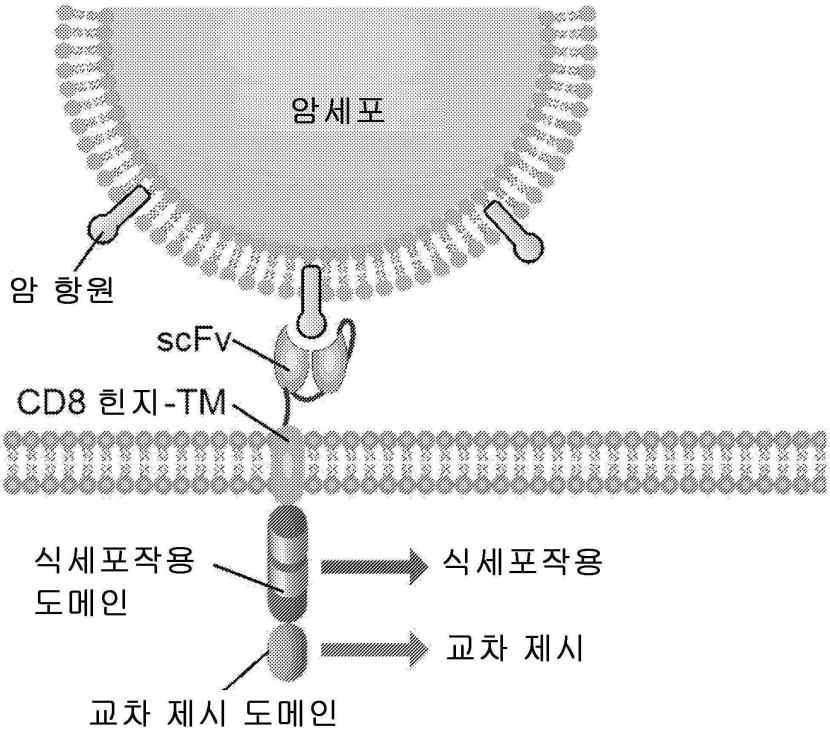
도면6e


상대적인 대식세포 침윤
5
4
3
2
1
0
비변형된Mϕ
인테그린-CAR Mϕ

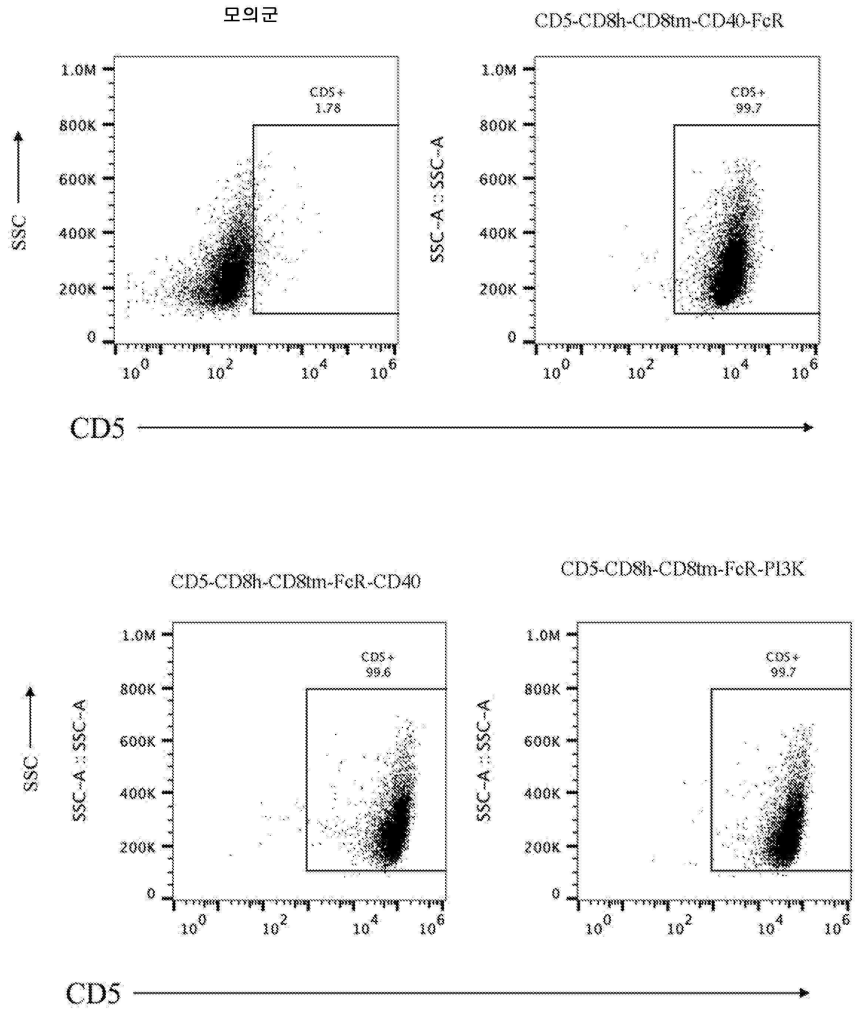
도면6f


인테그린-CAR
비치료
퍼센트 생존
100
50
0
0
50
100
150
200
경과된 일수

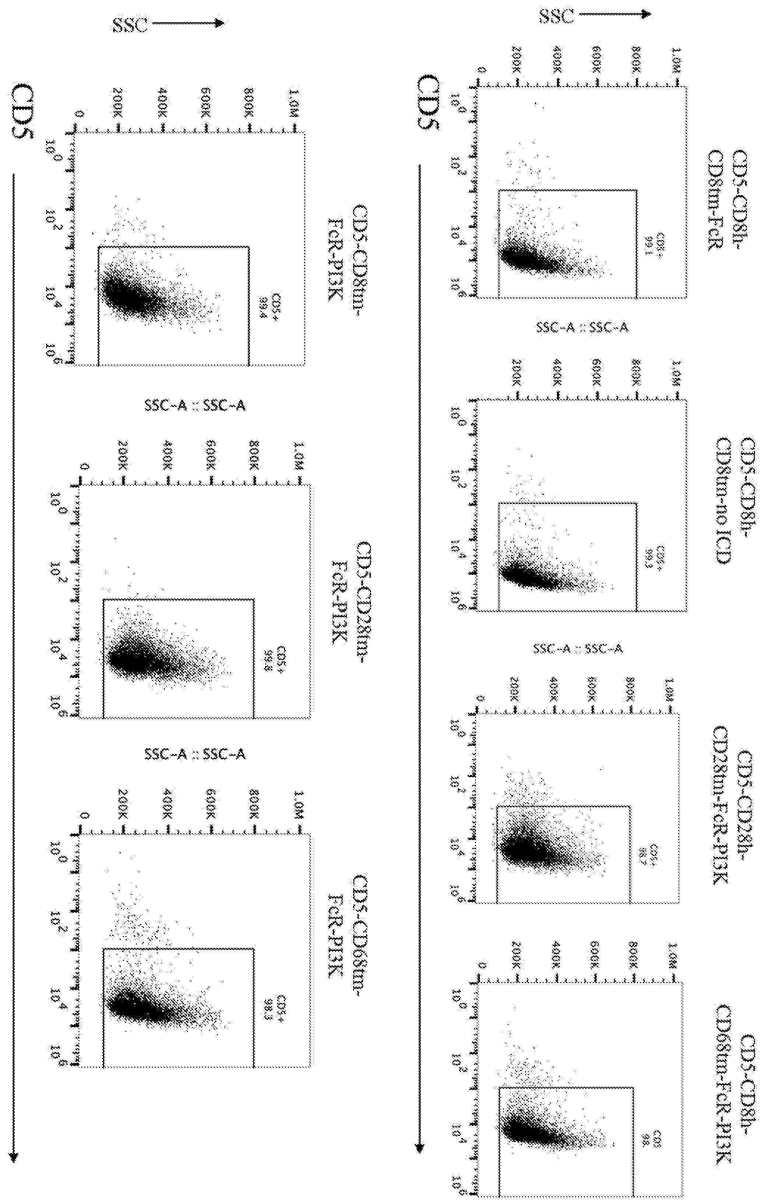
도면7


암세포
암 항원
scFv
CD8 힌지-TM
식세포작용 도메인
식세포작용
교차 제시
교차 제시 도메인
대식세포

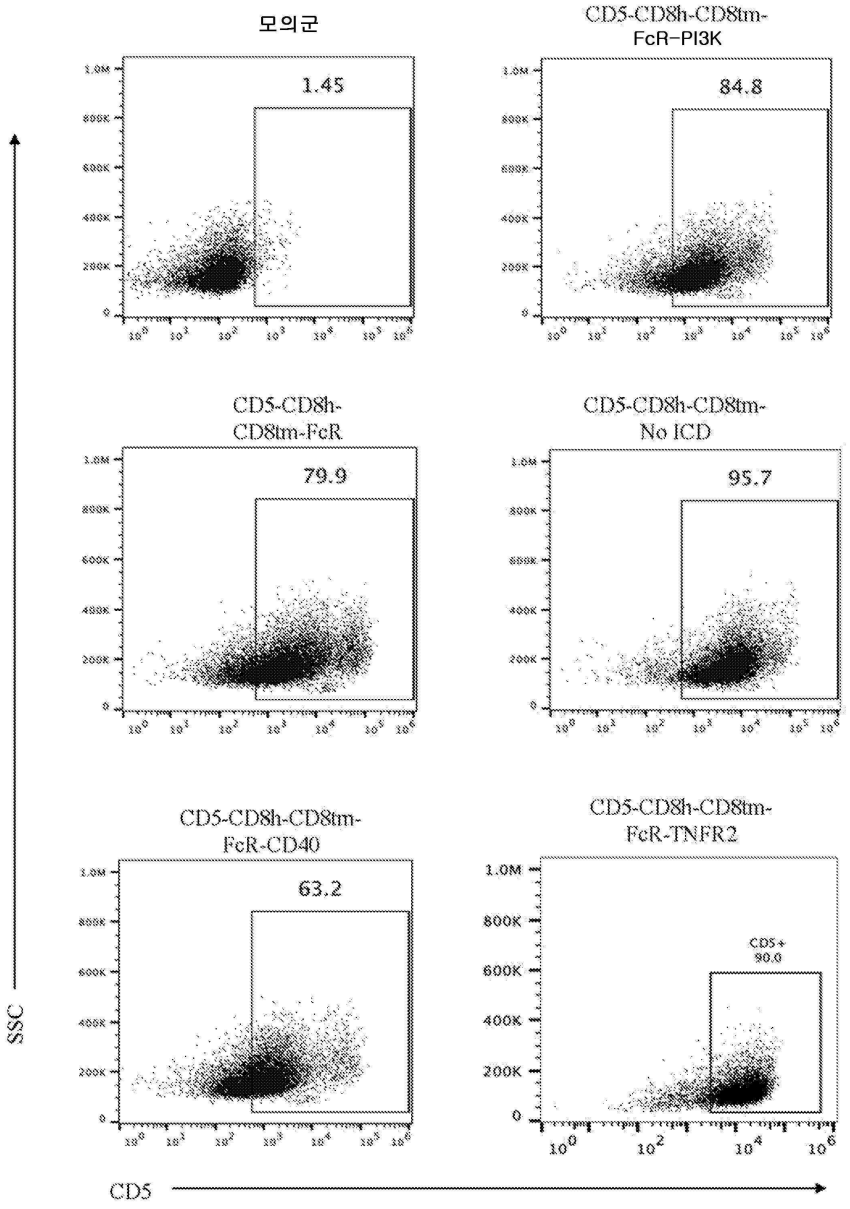
도면8


모의군
CD5-CD8h-CD8tm-CD40-FcR
CD5-CD8h-CD8tm-FcR-CD40
CD5-CD8h-CD8tm-FcR-PI3K
SSC
SSC-A :: SSC-A
CD5+
1.78
CD5+
99.7
CD5+
99.6
CD5+
99.7
1.0M
800K
600K
400K
200K
0
10^0
10^2
10^4
10^6
CD5

도면8a


CD5-CD8h-CD8tm-FcR
CD5-CD8h-CD8tm-to ICD
CD5-CD28h-CD28tm-FcR-PI3K
CD5-CD8h-CD68tm-FcR-PI3K
CD5-CD8tm-FcR-PI3K
CD5-CD28tm-FcR-PI3K
CD5-CD68tm-FcR-PI3K
SSC
CD5
SSC-A :: SSC-A

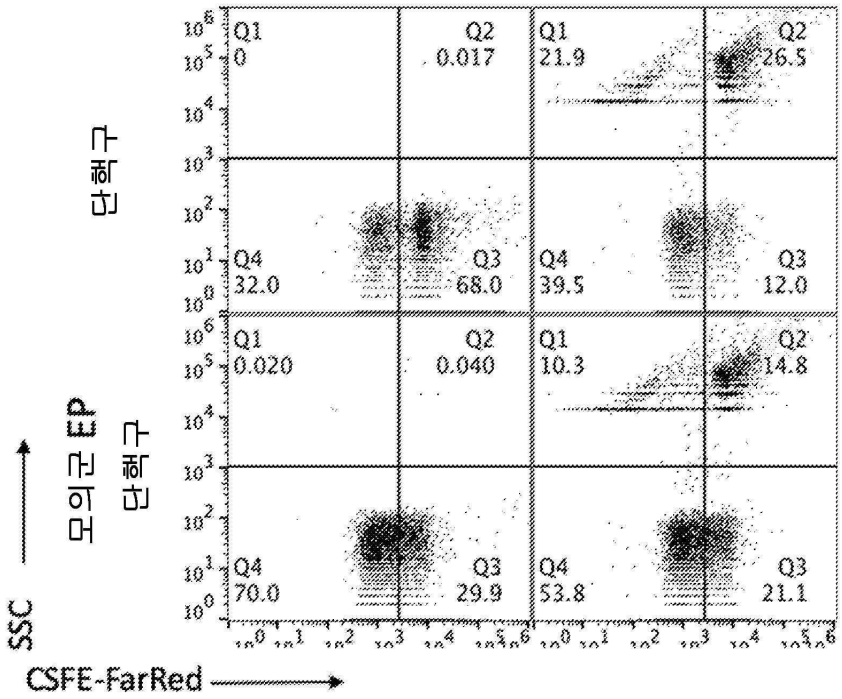
도면9


모의군
1.45
CD5-CD8h-CD8tm-FcR-PI3K
84.8
CD5-CD8h-CD8tm-FcR
79.9
CD5-CD8h-CD8tm-No ICD
95.7
CD5-CD8h-CD8tm-FcR-CD40
63.2
CD5-CD8h-CD8tm-FcR-TNFR2
CD5+
90.0
SSC
CD5

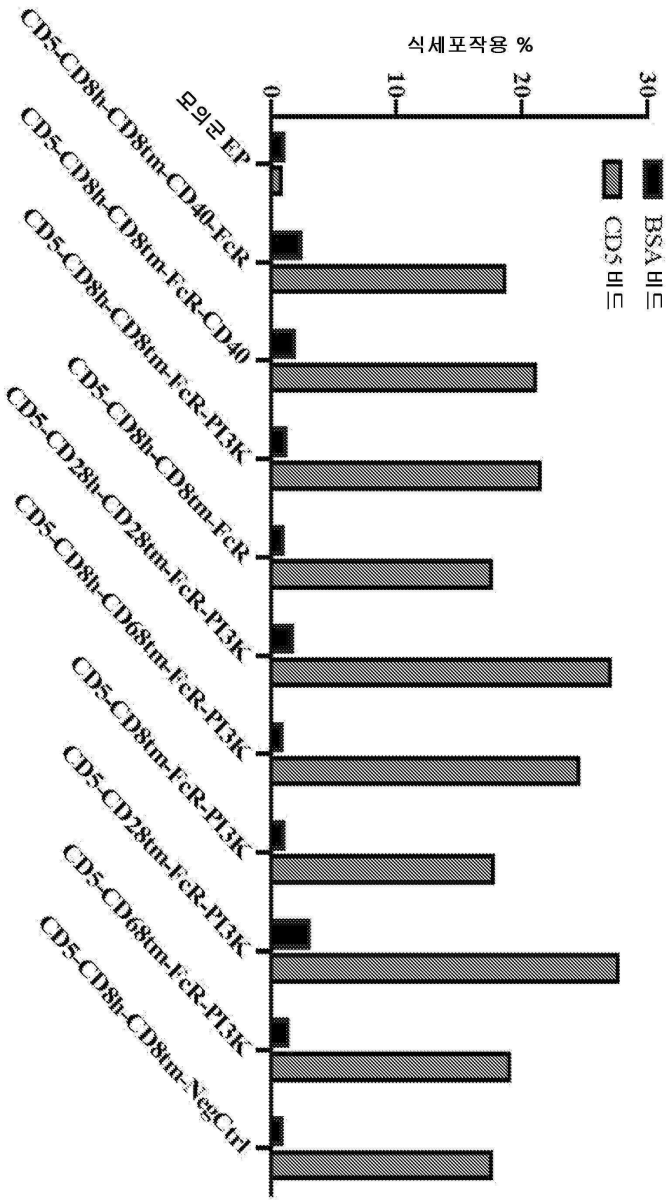
도면10a


표지부착된 ATAK
THP-1 (Far-Red)
6um
FITC-표지부착된
비드
항원으로 코팅됨
인큐베이션
식세포작용
측정

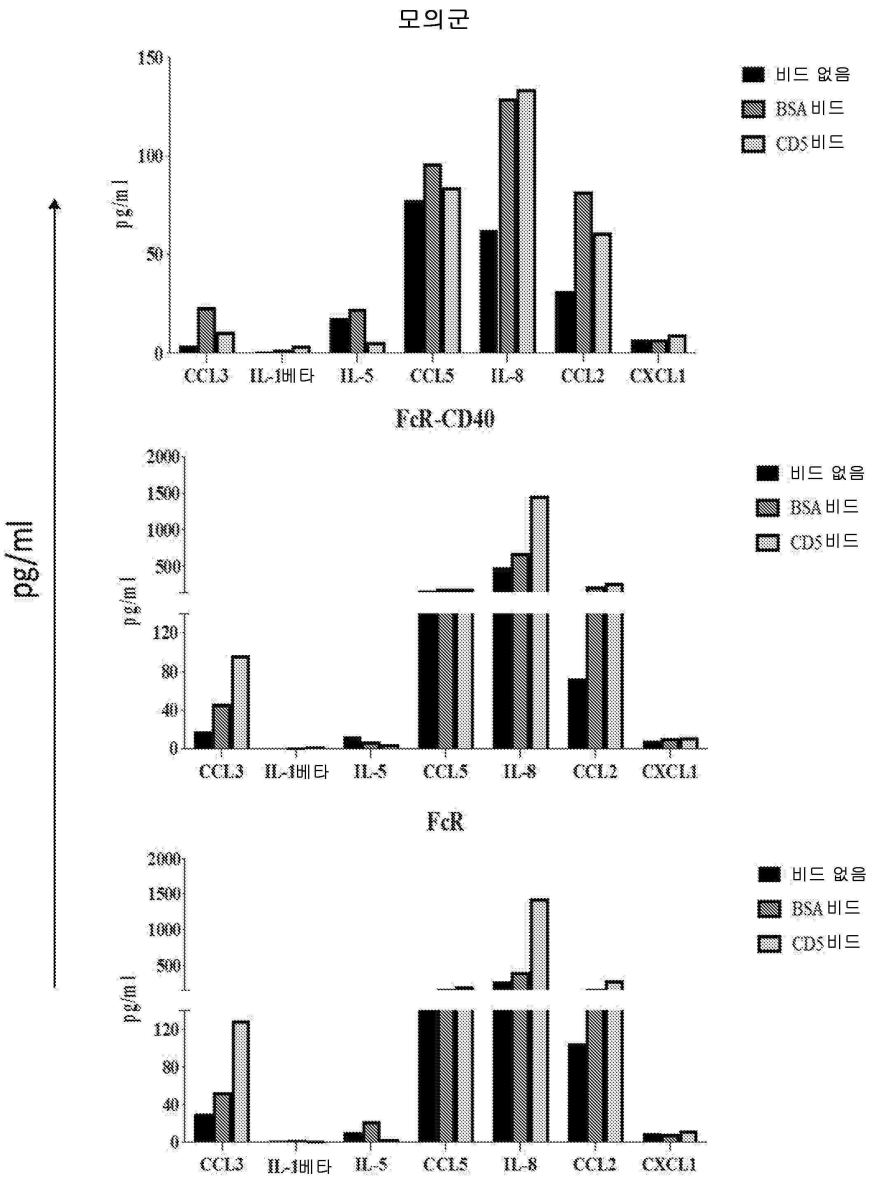
도면10b


Q1
0
Q2
0.017
Q1
21.9
Q2
26.5
Q4
32.0
Q3
68.0
Q4
39.5
Q3
12.0
Q1
0.020
Q2
0.040
Q1
10.3
Q2
14.8
Q4
70.0
Q3
29.9
Q4
53.8
Q3
21.1
SSC
CSFE-FarRed

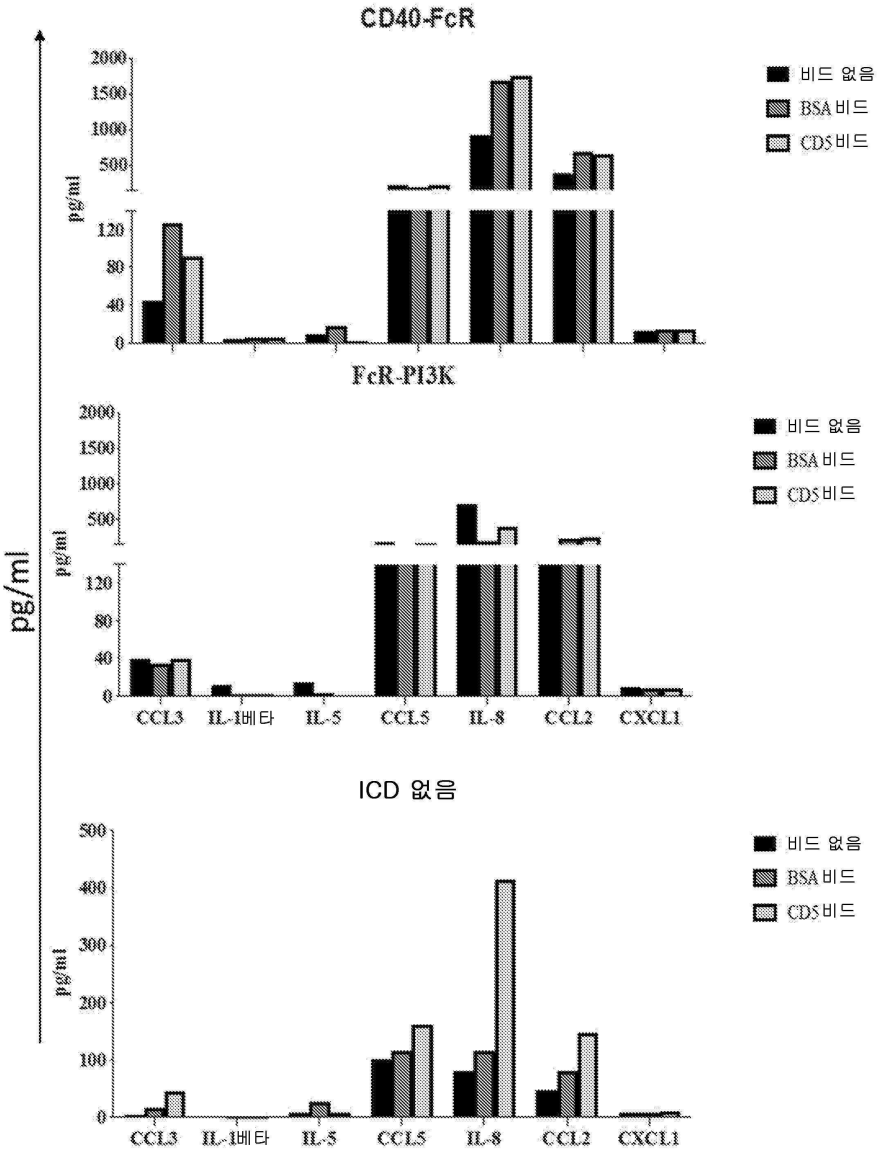
도면10c


식세포작용 %
0
10
20
30
BSA 비드
CD5 비드
모의군 EP
CD5-CD8h-CD8tm-CD40-FcR
CD5-CD8h-CD8tm-FcR-CD40
CD5-CD8h-CD8tm-FcR-PT3K
CD5-CD8h-CD8tm-FcR
CD5-CD28h-CD28tm-FcR-PT3K
CD5-CD8h-CD68tm-FcR-PT3K
CD5-CD8tm-FcR-PT3K
CD5-CD28tm-FcR-PT3K
CD5-CD68tm-FcR-PT3K
CD5-CD8h-CD8tm-NegCtrl

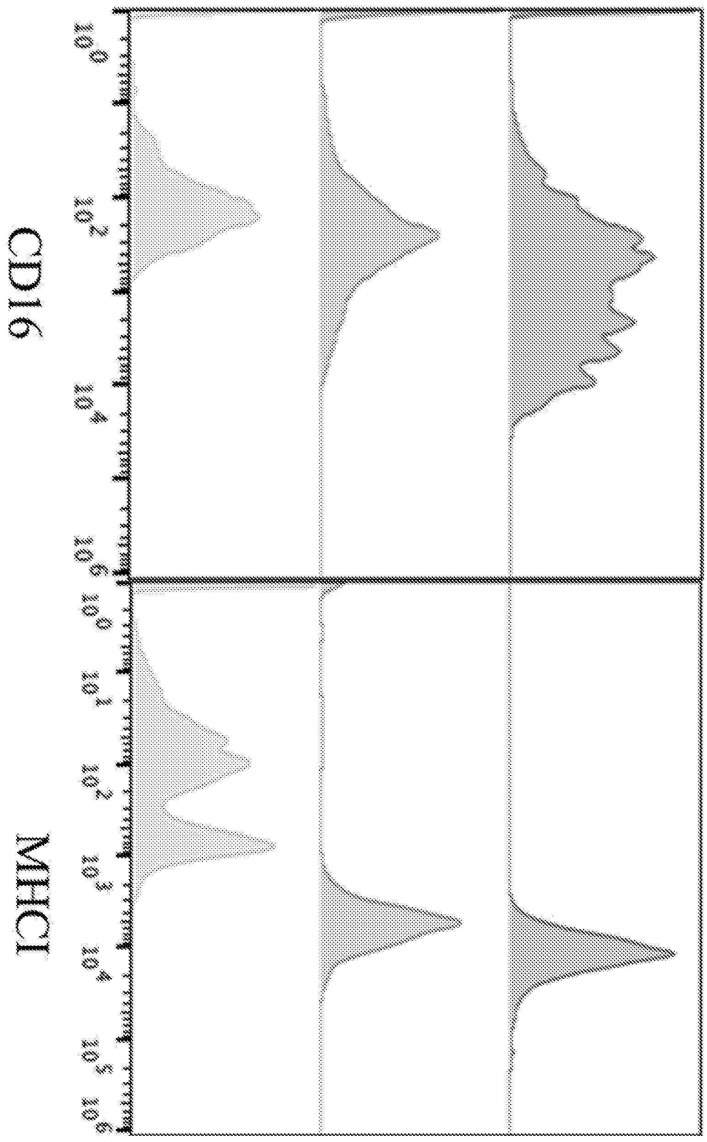
도면10d


모의군
비드 없음
BSA 비드
CD5 비드
pg/ml
150
100
50
0
CCL3
IL-1베타
IL-5
CCL5
IL-8
CCL2
CXCL1
FcR-CD40
2000
1500
1000
500
120
80
40
FcR

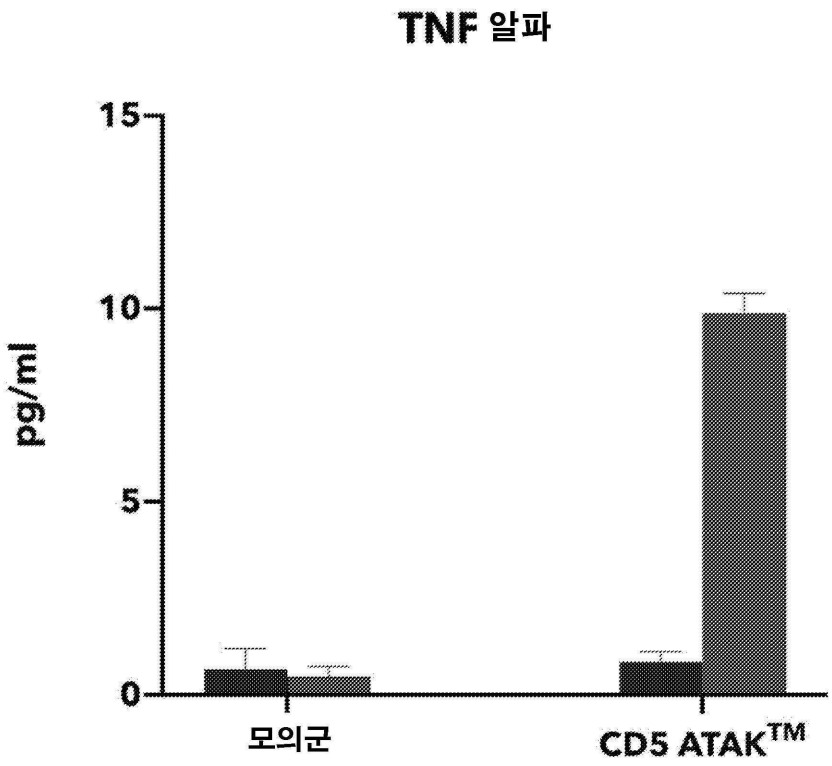
도면10dd


CD40-FcR
FcR-PI3K
ICD 없음
pg/ml
비드 없음
BSA 비드
CD5 비드
CCL3
IL-1베타
IL-5
CCL5
IL-8
CCL2
CXCL1

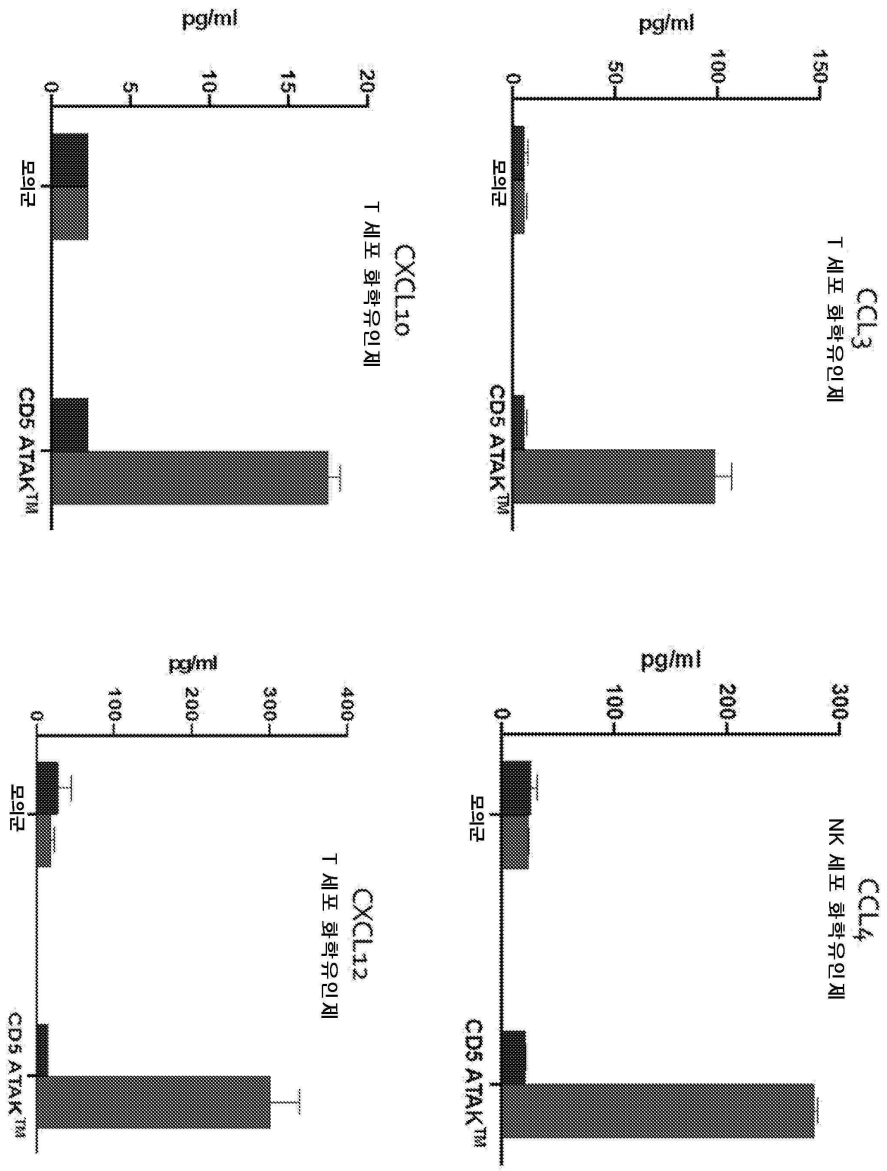
도면10e



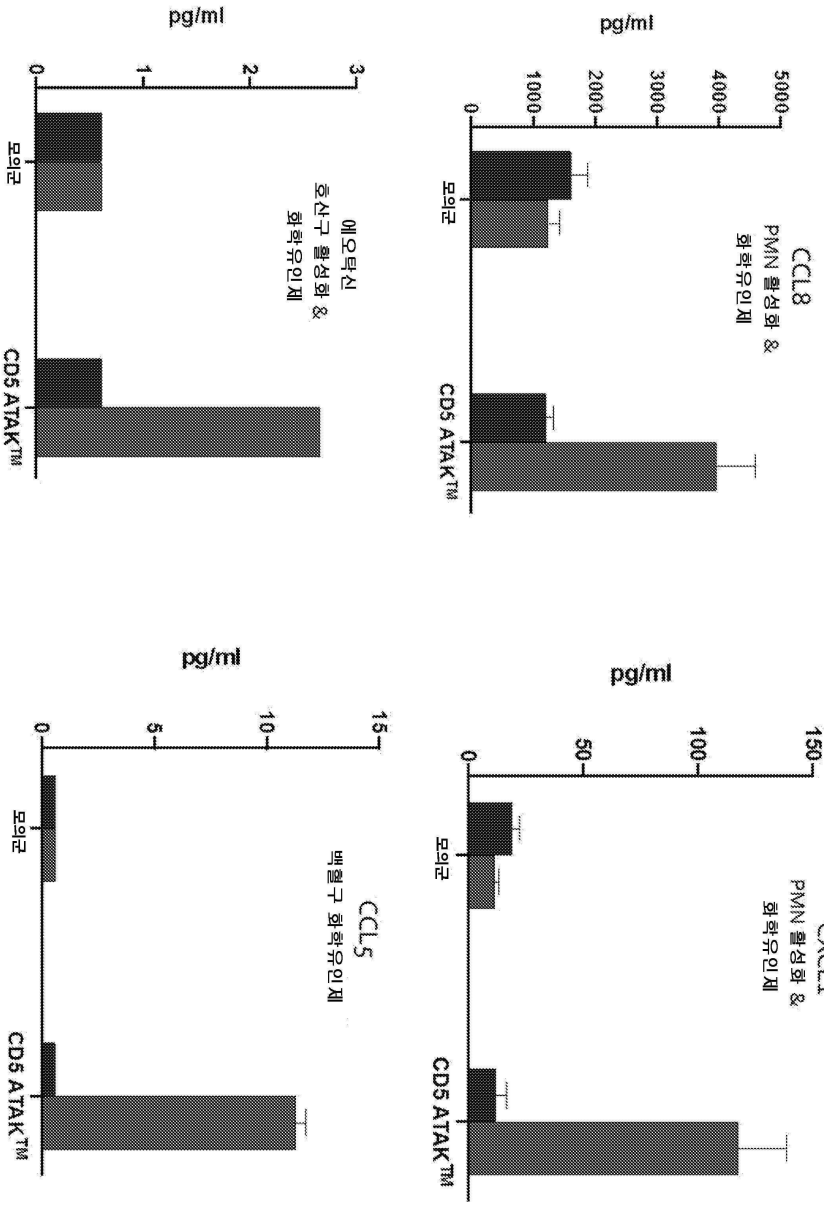
도면10f



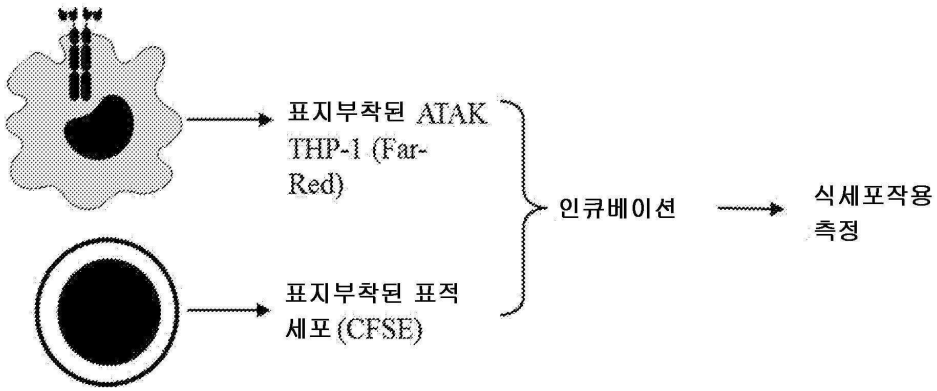
도면10g


pg/ml
0
50
100
150
모의군
CD5 ATAK™
CCL3
T 세포 화학유인제
pg/ml
0
5
10
15
20
모의군
CD5 ATAK™
CXCL10
T 세포 화학유인제
pg/ml
0
100
200
300
모의군
CD5 ATAK™
CCL4
NK 세포 화학유인제
pg/ml
0
100
200
300
400
모의군
CD5 ATAK™
CXCL12
T 세포 화학유인제

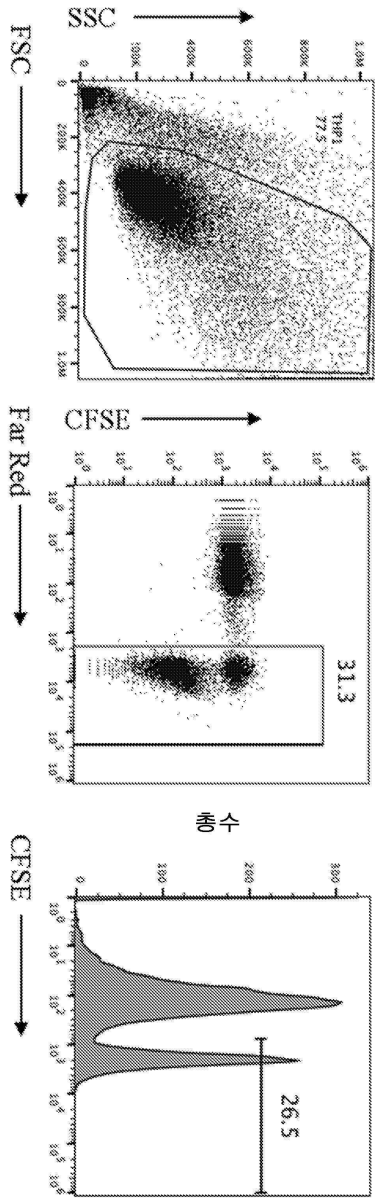
도면10h


pg/ml
0
1
2
3
모의군
CD5 ATAK™
에오탁신
호산구 활성화 &
화학유인제
pg/ml
0
1000
2000
3000
4000
5000
모의군
CD5 ATAK™
CCL8
PMN 활성화 &
화학유인제
pg/ml
0
5
10
15
모의군
CD5 ATAK™
CCL5
백혈구 화학유인제
pg/ml
0
50
100
150
모의군
CD5 ATAK™
CXCL1
PMN 활성화 &
화학유인제

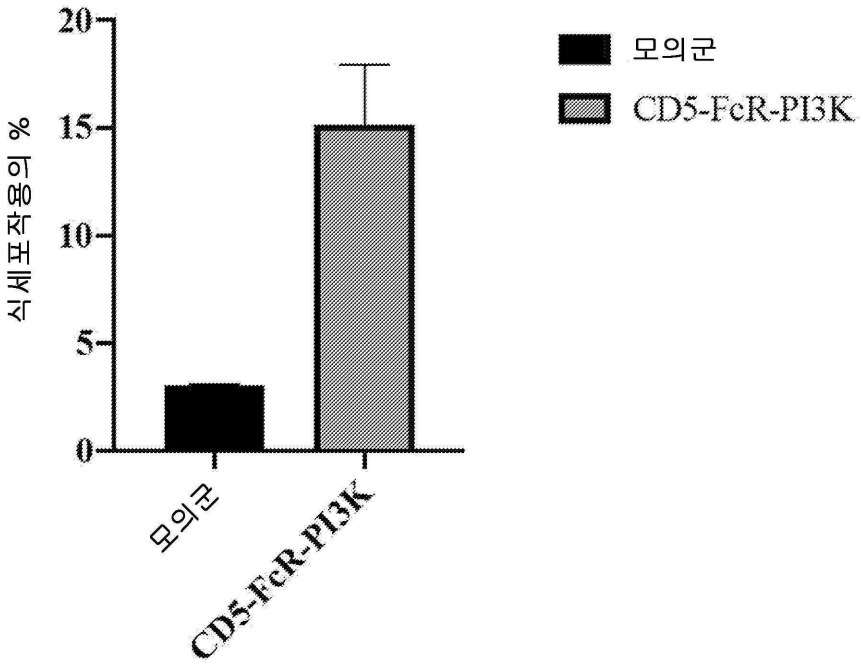
도면11a


표지부착된 ATAK
THP-1 (Far-
Red)
표지부착된 표적
세포 (CFSE)
인큐베이션
식세포작용
측정

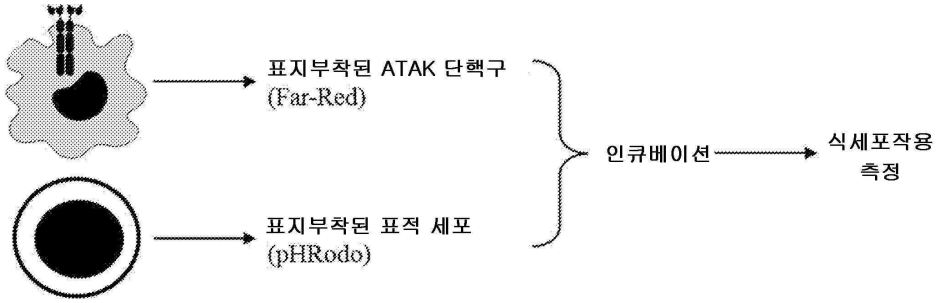
도면11b



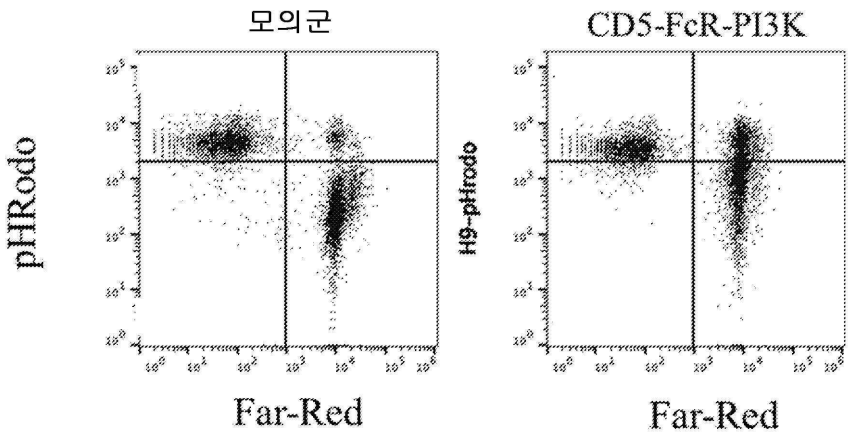
도면11c



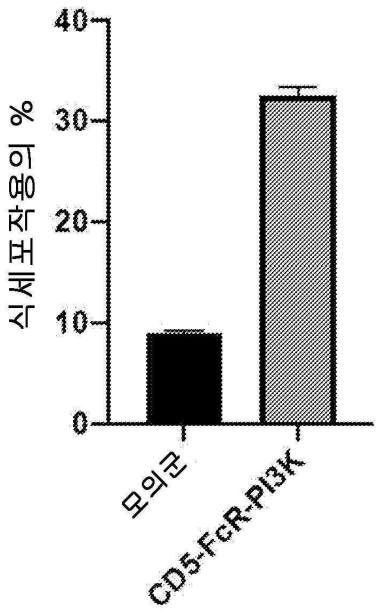
도면12a



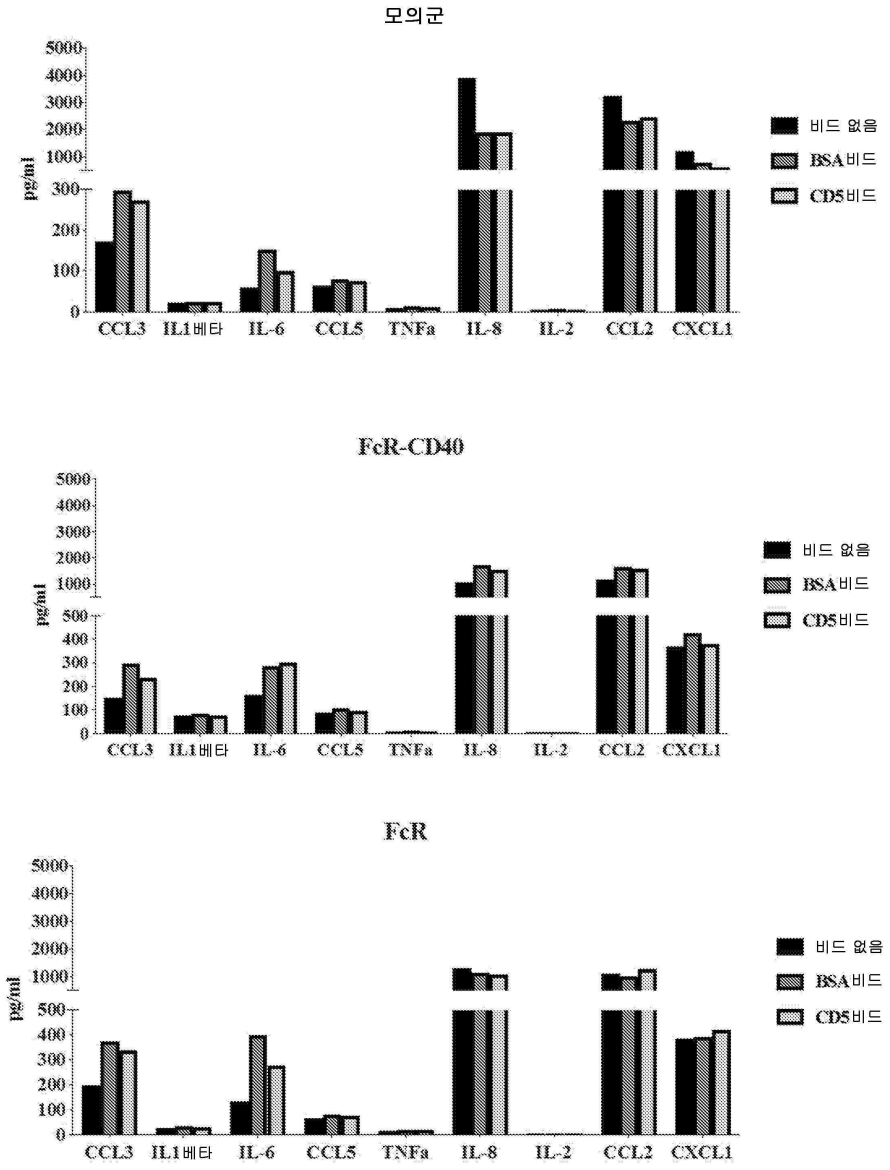
도면12b



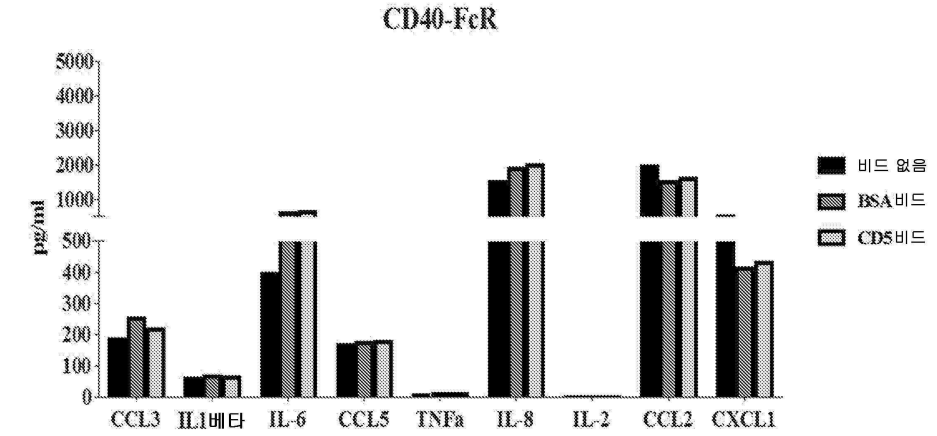
도면12c

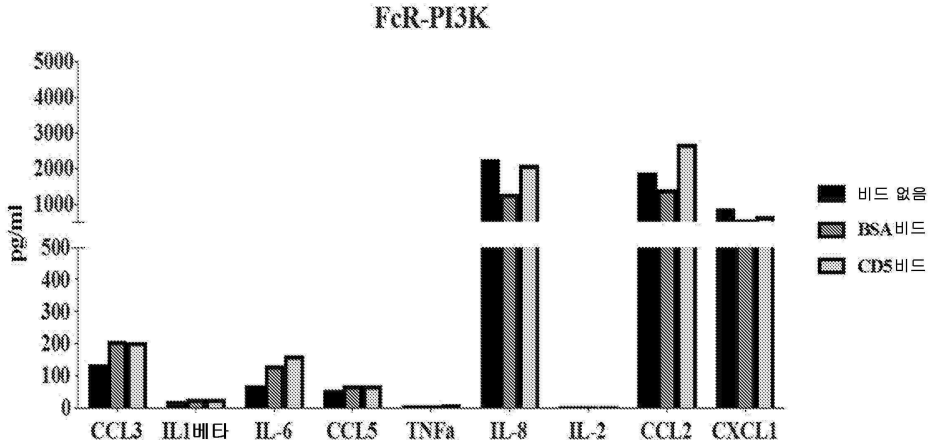


도면12d

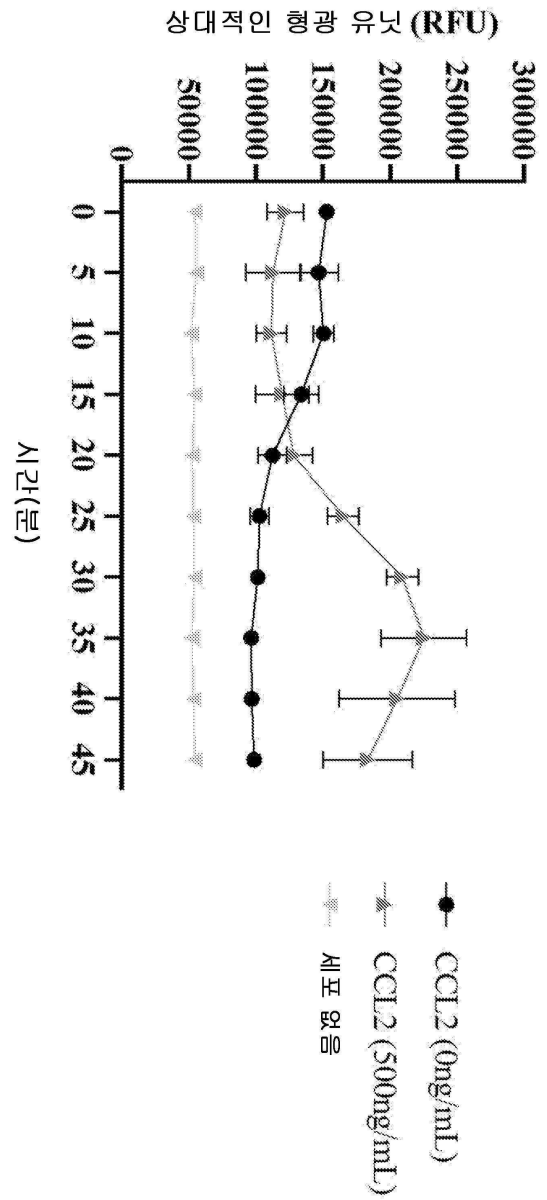

모의군
pg/ml
5000
4000
3000
2000
1000
300
200
100
0
CCL3
IL1베타
IL-6
CCL5
TNFa
IL-8
IL-2
CCL2
CXCL1
비드 없음
BSA비드
CD5비드
FcR-CD40
pg/ml
5000
4000
3000
2000
1000
500
400
300
200
100
0
CCL3
IL1베타
IL-6
CCL5
TNFa
IL-8
IL-2
CCL2
CXCL1
비드 없음
BSA비드
CD5비드
FcR
pg/ml
5000
4000
3000
2000
1000
500
400
300
200
100
0
CCL3
IL1베타
IL-6
CCL5
TNFa
IL-8
IL-2
CCL2
CXCL1
비드 없음
BSA비드
CD5비드

도면12dd

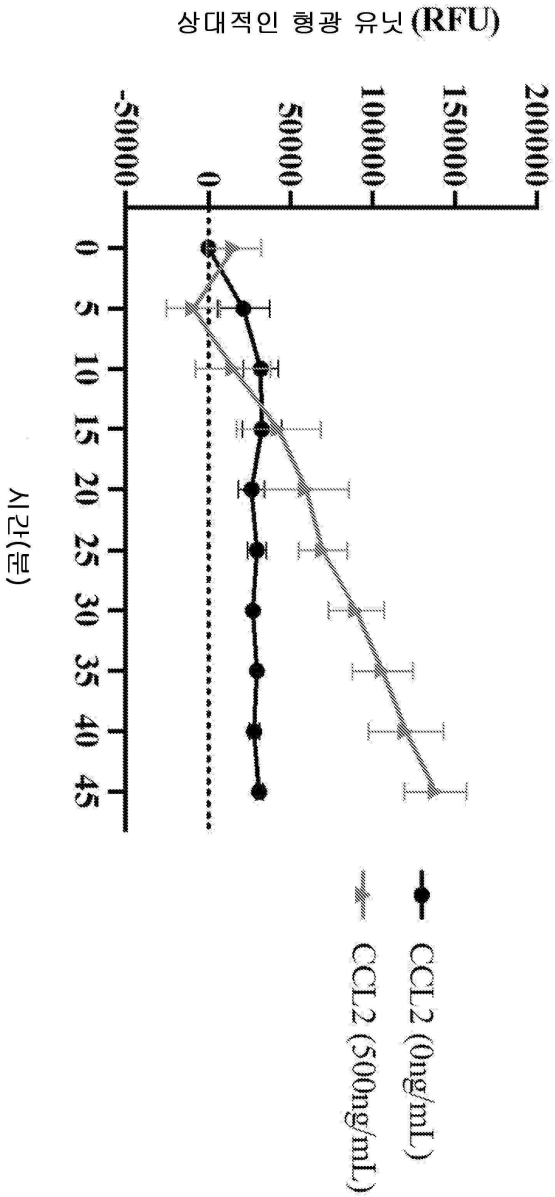

CD40-FcR
pg/ml
5000
4000
3000
2000
1000
500
400
300
200
100
0
CCL3
IL1베타
IL-6
CCL5
TNFa
IL-8
IL-2
CCL2
CXCL1
비드 없음
BSA비드
CD5비드


FcR-PI3K
pg/ml
5000
4000
3000
2000
1000
500
400
300
200
100
0
CCL3
IL1베타
IL-6
CCL5
TNFa
IL-8
IL-2
CCL2
CXCL1
비드 없음
BSA비드
CD5비드

도면13


상대적인 형광 유닛 (RFU)
0
50000
100000
150000
200000
250000
300000
시간(분)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
CCL2 (0ng/mL)
CCL2 (500ng/mL)
세포 없음

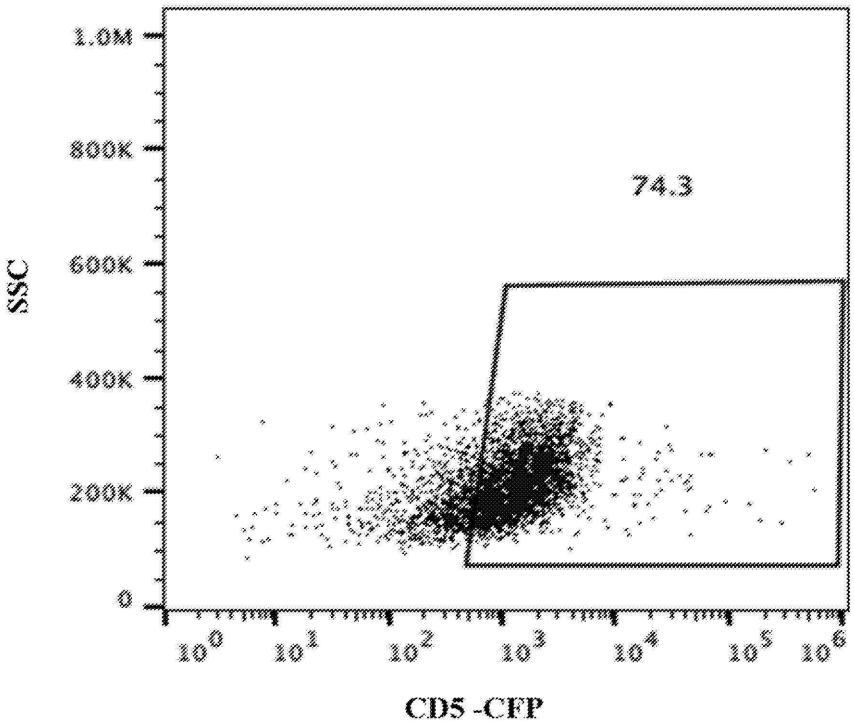
도면14


상대적인 형광 유닛 (RFU)
-50000
0
50000
100000
150000
200000
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
시간(분)
CCL2 (0ng/mL)
CCL2 (500ng/mL)

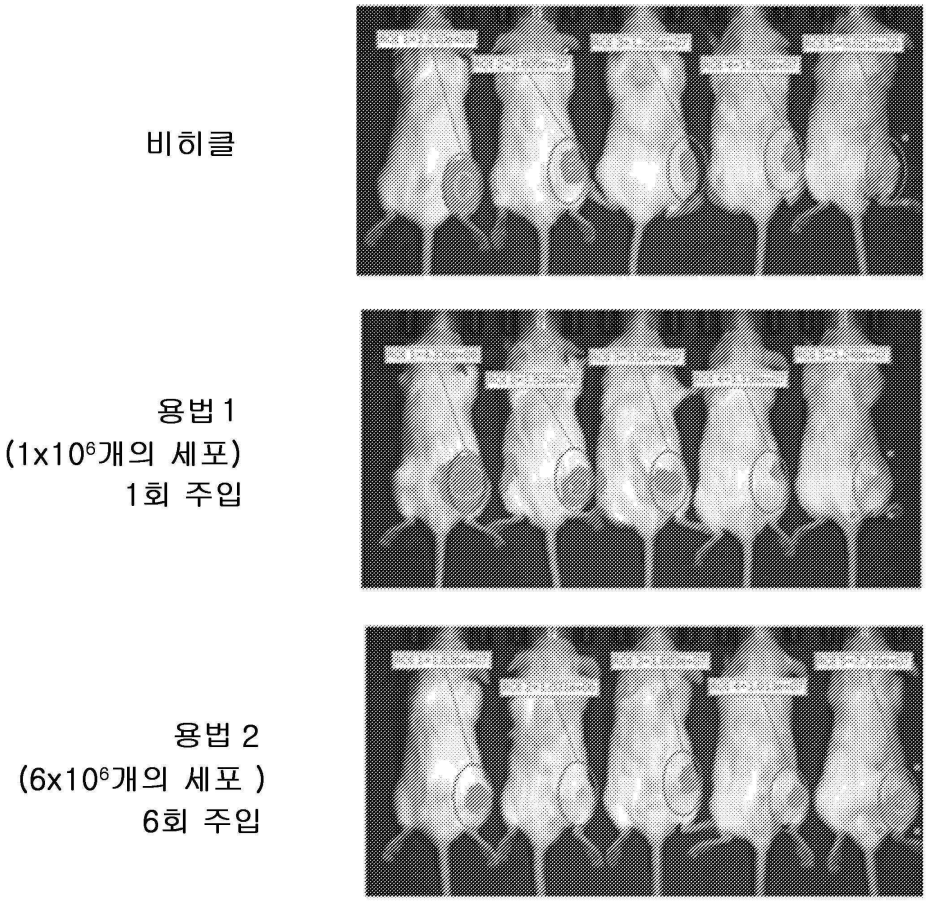
도면15a

N=15
7일 내지 10일
200mm³
무작위배정
3일마다 투여된 5회 주입
d0
d3
d6
d10
d13
d16
종결
군 1. 비히클, 5마리 마우스
군 2. 치료 - 마우스당 0.8x10⁶개의 세포, 5마리 마우스 1회 주입
군 3. 치료 - 마우스당 1.4x10⁶개의 세포, 5마리 마우스 5회 주입
CD5-HU9
세자리 종후군 종양 세포주
1x10⁶개의 세포
(SC)

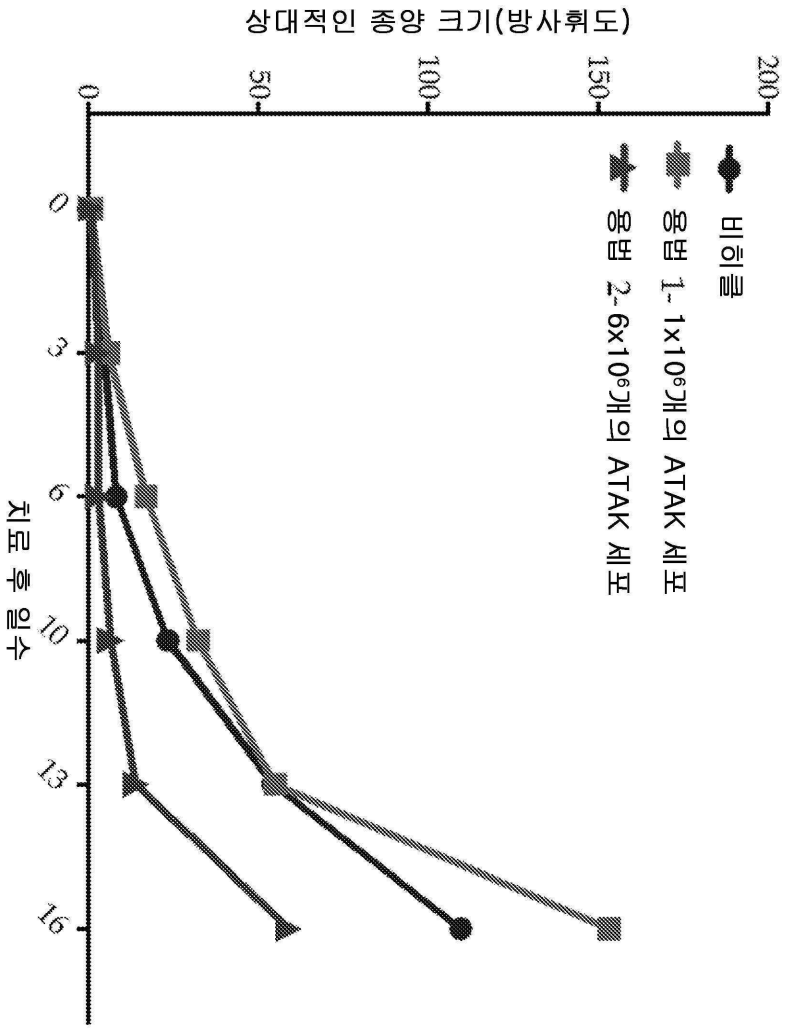
도면15b


1.0M
800K
600K
400K
200K
0
SSC
74.3
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
CD5 -CFP

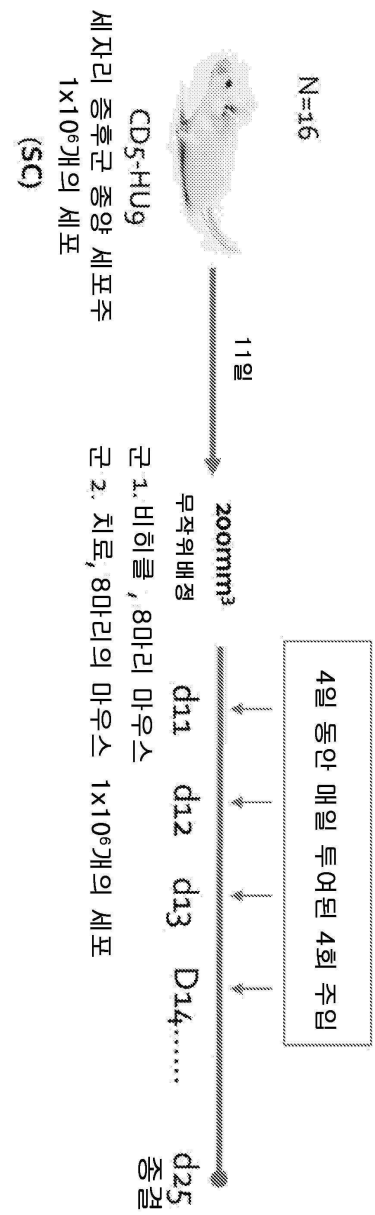
도면15c


비히클
용법 1
(1x10⁶개의 세포)
1회 주입
용법 2
(6x10⁶개의 세포)
6회 주입

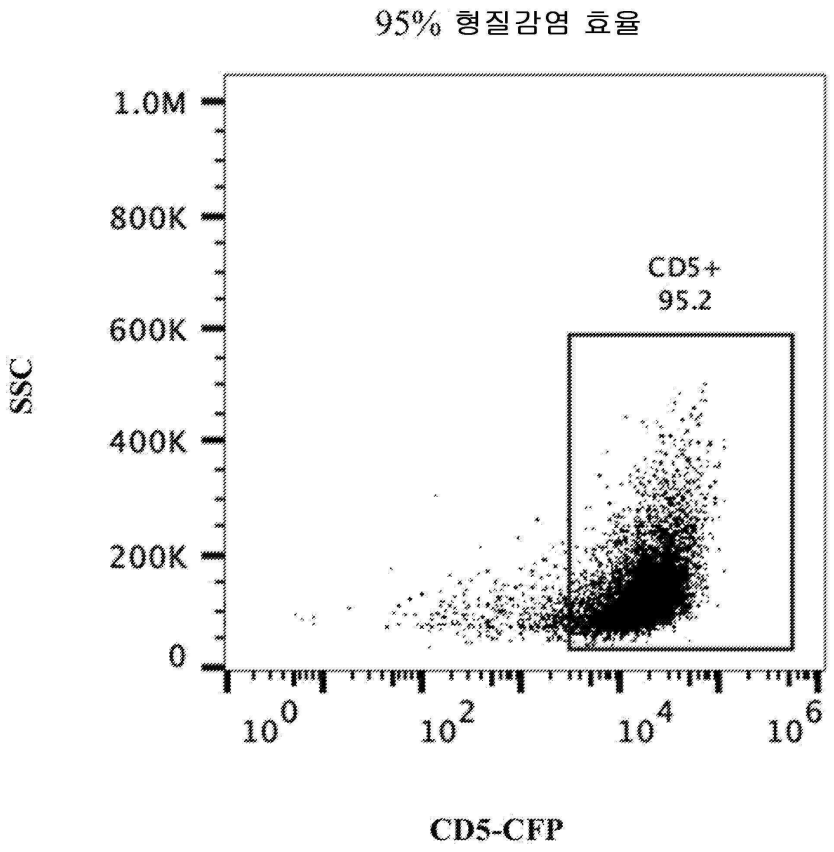
도면15d


상대적인 종양 크기(방사휘도)
0
50
100
150
200
0
3
6
10
13
16
치료 후 일수
비히클
용량 1- 1x10⁶개의 ATAK 세포
용량 2- 6x10⁶개의 ATAK 세포

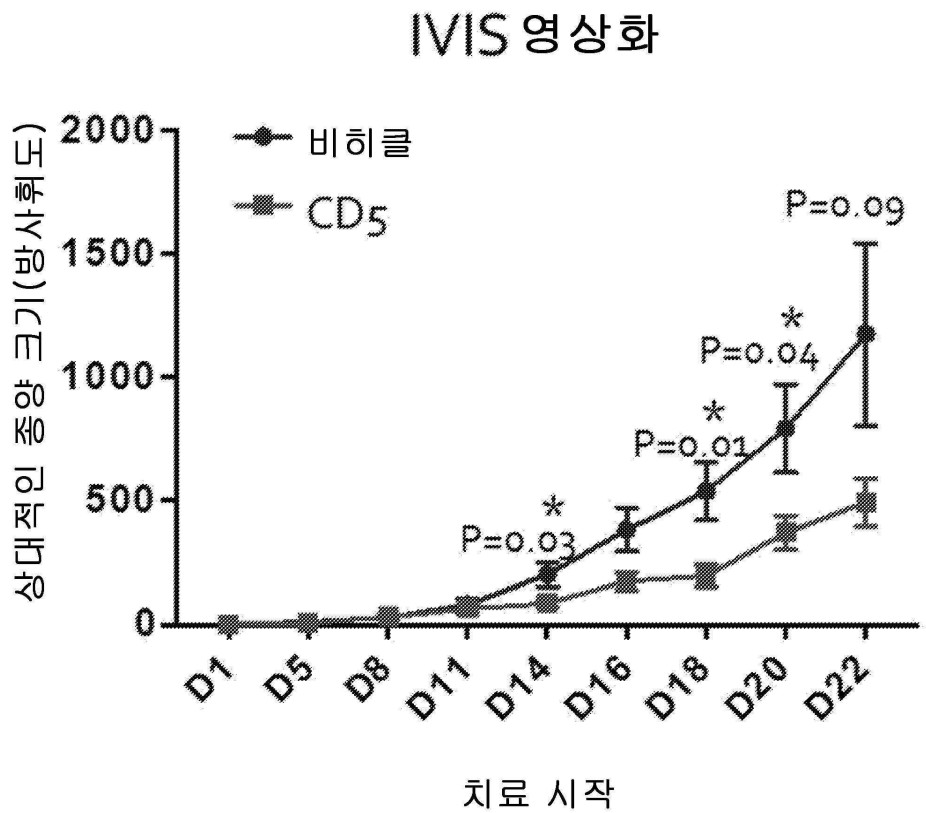
도면16a


N=16
11일
200mm³
무작위배정
4일 동안 매일 투여된 4회 주입
CD5-HUg
세자리 종후군 종양 세포주
1x10⁶개의 세포
(SC)
군 1. 비히클 , 8마리 마우스
군 2. 치료, 8마리의 마우스
1x10⁶개의 세포
d11
d12
d13
D14.....
d25
종결

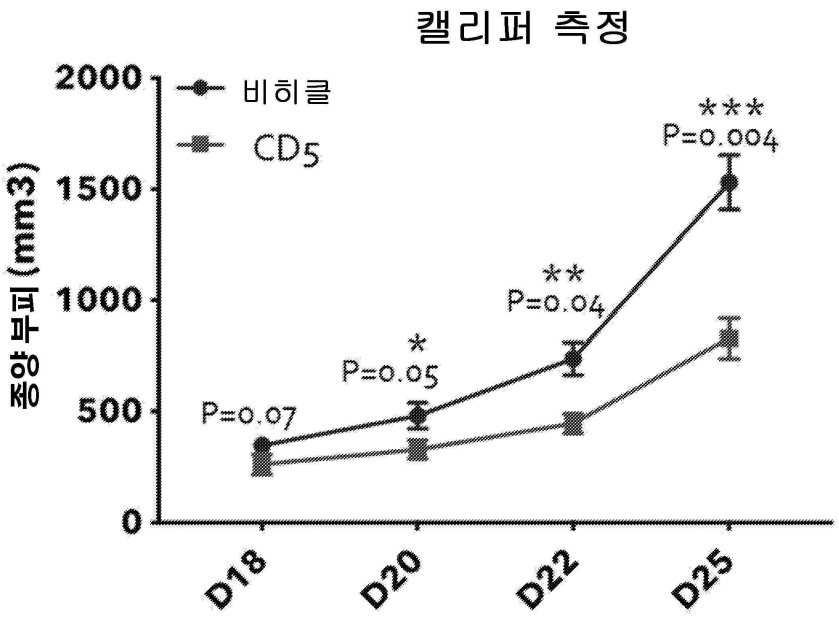
도면16b


95% 형질감염 효율
1.0M
800K
600K
400K
200K
0
SSC
CD5+
95.2
10^0
10^2
10^4
10^6
CD5-CFP

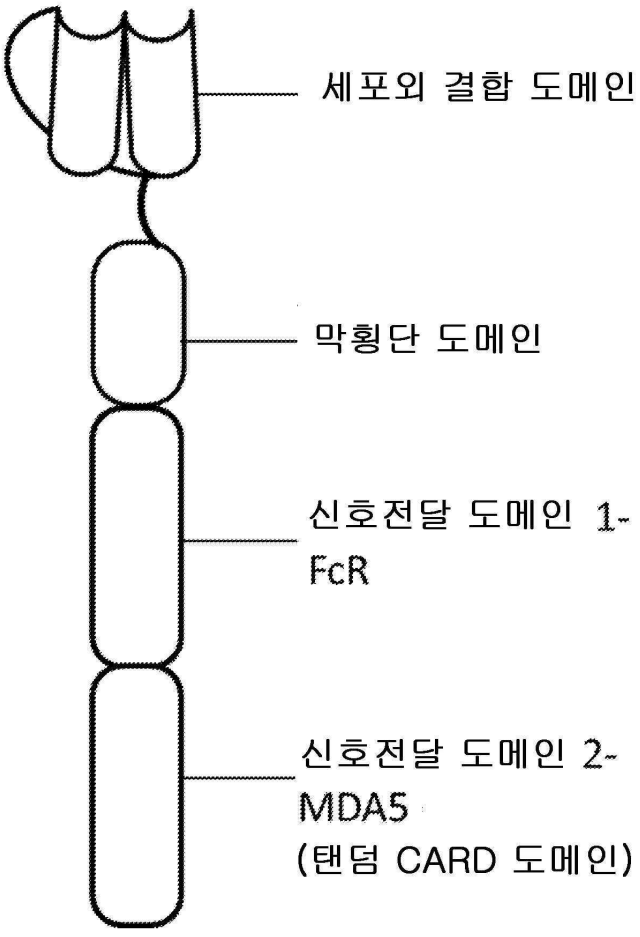
도면16c


IVIS 영상화
2000
1500
1000
500
0
상대적인 종양 크기(방사휘도)
비히클
CD5
P=0.09
P=0.04
P=0.01
P=0.03
*
*
*
D1
D5
D8
D11
D14
D16
D18
D20
D22
치료 시작

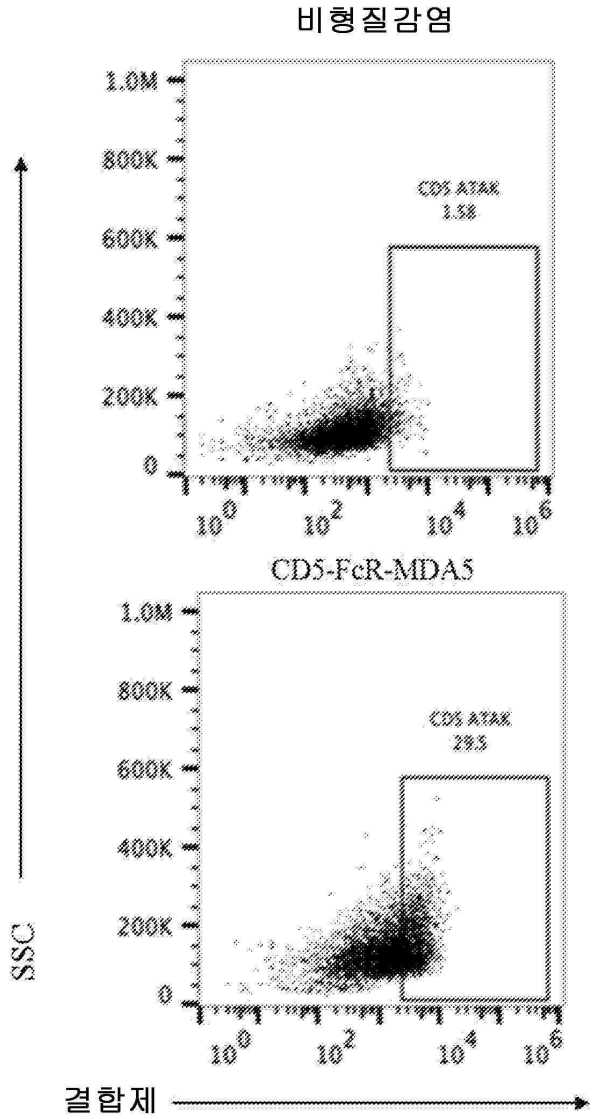
도면16d


캘리퍼 측정
2000
1500
1000
500
0
종양부피 (mm3)
비히클
CD5
P=0.07
*
P=0.05
**
P=0.04
***
P=0.004
D18
D20
D22
D25

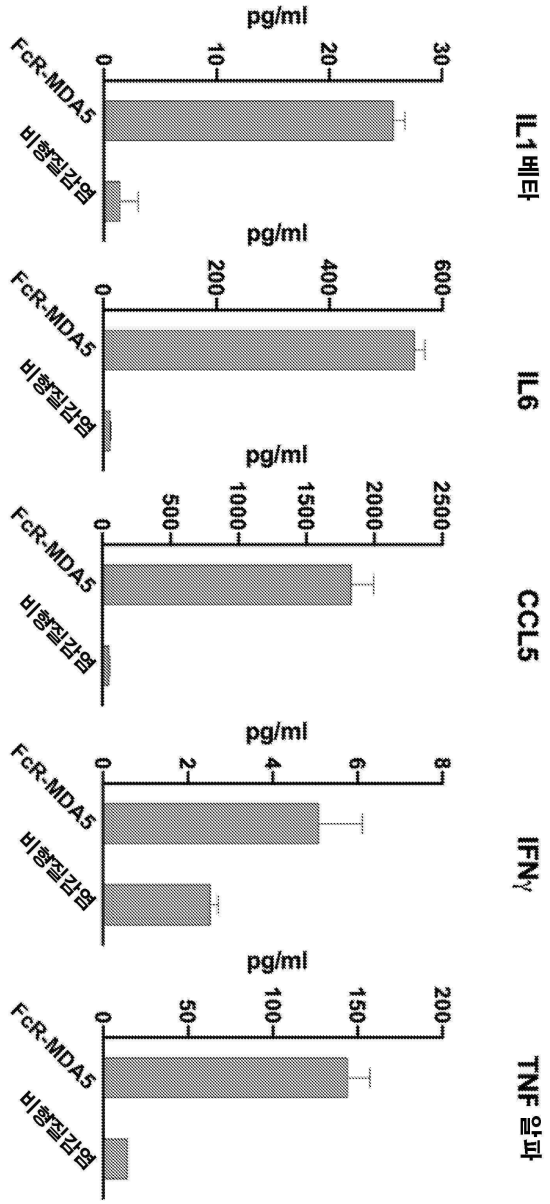
도면17a


세포외 결합 도메인
막횡단 도메인
신호전달 도메인 1-
FcR
신호전달 도메인 2-
MDA5
(탠덤 CARD 도메인)

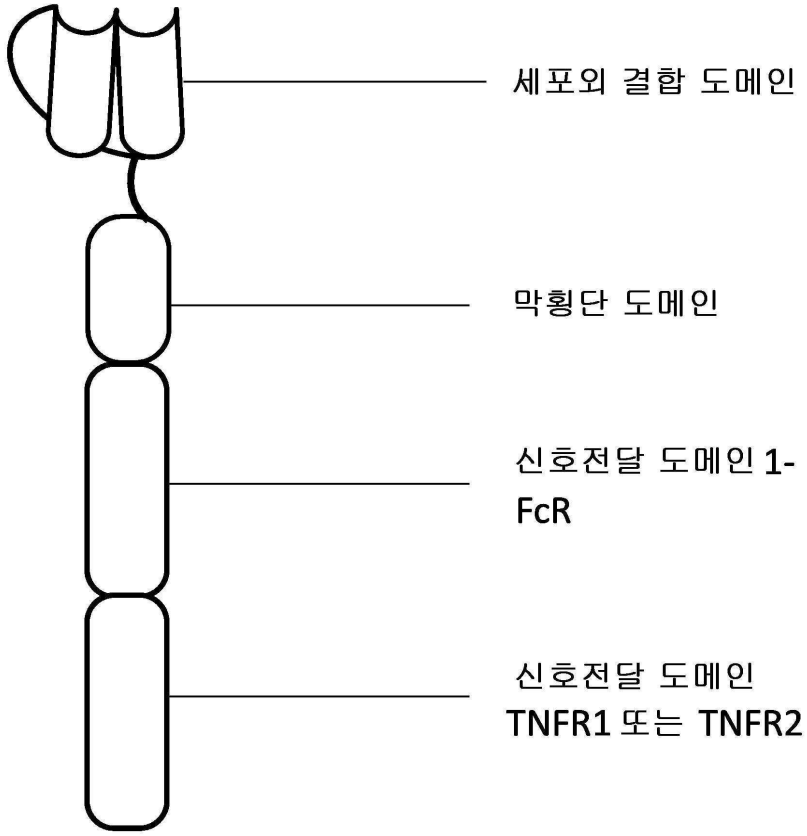
도면17b


비형질감염
1.0M
800K
600K
400K
200K
0
CD5 ATAK
1.58
10^0
10^2
10^4
10^6
CD5-FcR-MDA5
1.0M
800K
600K
400K
200K
0
CD5 ATAK
29.5
10^0
10^2
10^4
10^6
SSC
결합제

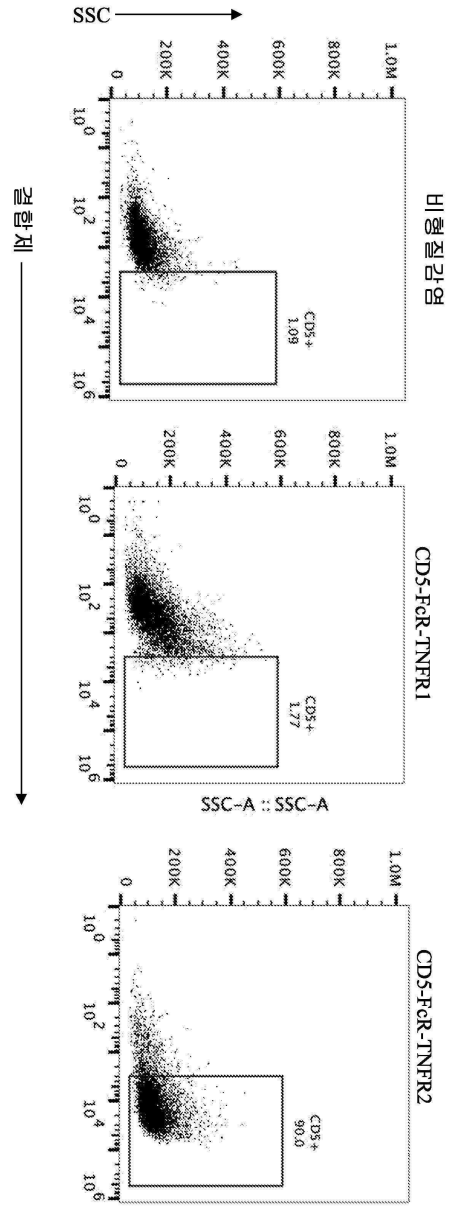
도면17c


IL1베타
pg/ml
0
10
20
30
FcR-MDA5
비형질감염
IL6
pg/ml
0
200
400
600
FcR-MDA5
비형질감염
CCL5
pg/ml
0
500
1000
1500
2000
2500
FcR-MDA5
비형질감염
IFNγ
pg/ml
0
2
4
6
8
FcR-MDA5
비형질감염
TNF 알파
pg/ml
0
50
100
150
200
FcR-MDA5
비형질감염

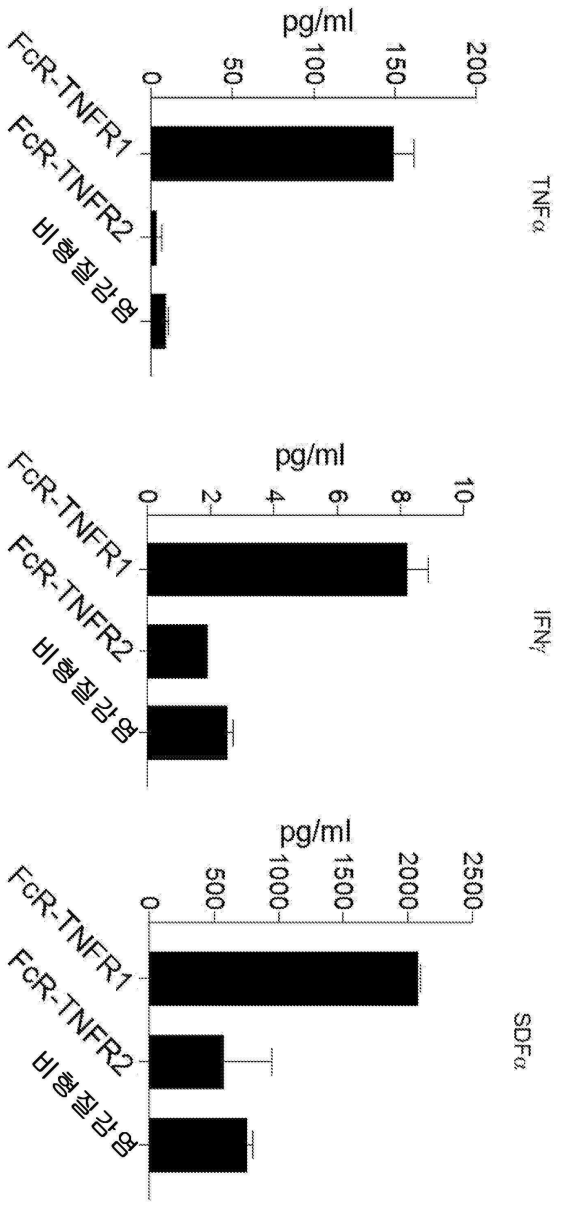
도면18a



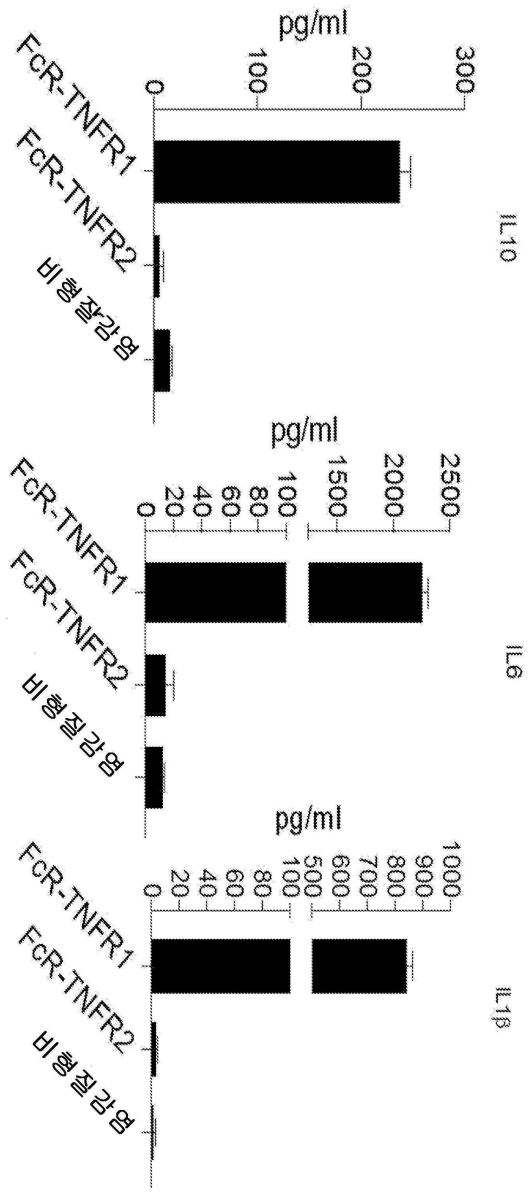
도면18b


SSC
SSC-A :: SSC-A
형광 채
비 형질감염
CD5-FcR-TNFR1
CD5-FcR-TNFR2
CD5+
1.09
CD5+
1.77
CD5+
90.0

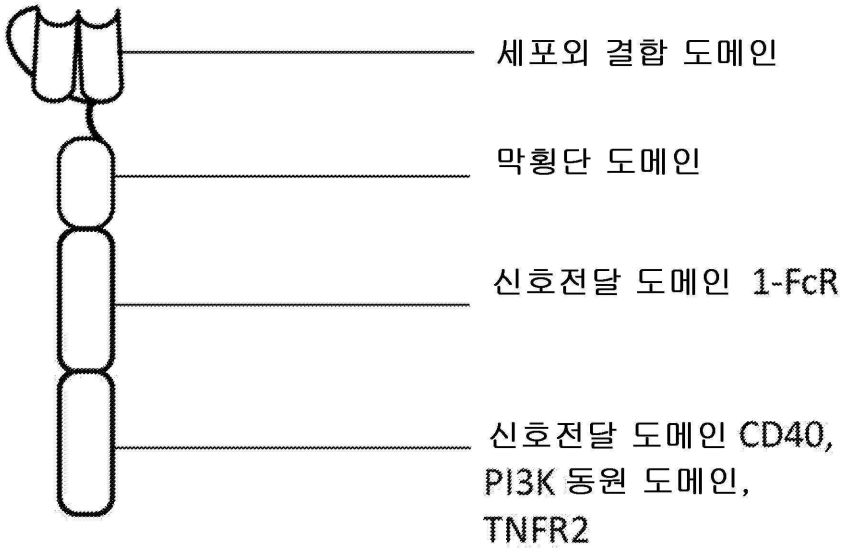
도면18c


pg/ml
0
50
100
150
200
FcR-TNFR1
FcR-TNFR2
비형질감염
TNFα
pg/ml
0
2
4
6
8
10
FcR-TNFR1
FcR-TNFR2
비형질감염
IFNγ
pg/ml
0
500
1000
1500
2000
2500
FcR-TNFR1
FcR-TNFR2
비형질감염
SDFα

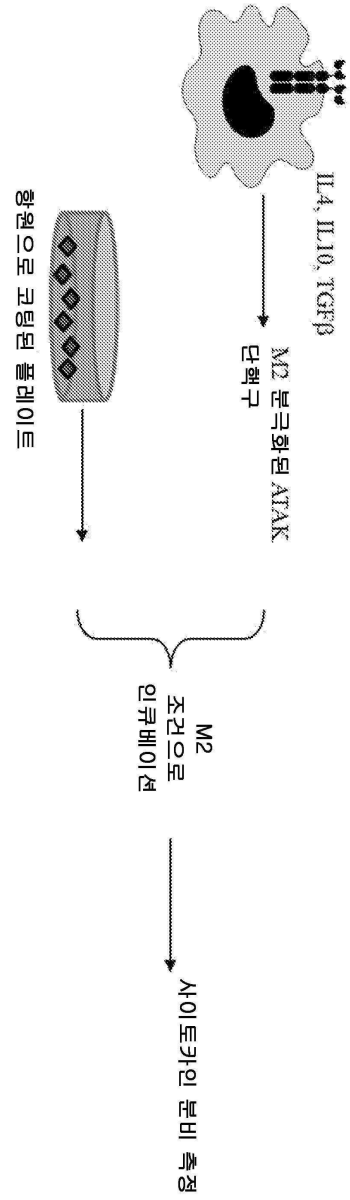
도면18cc


pg/ml
0
100
200
300
FcR-TNFR1
FcR-TNFR2
비형질감염
IL10
pg/ml
0
20
40
60
80
100
1500
2000
2500
FcR-TNFR1
FcR-TNFR2
비형질감염
IL6
pg/ml
0
20
40
60
80
100
500
600
700
800
900
1000
FcR-TNFR1
FcR-TNFR2
비형질감염
IL1β

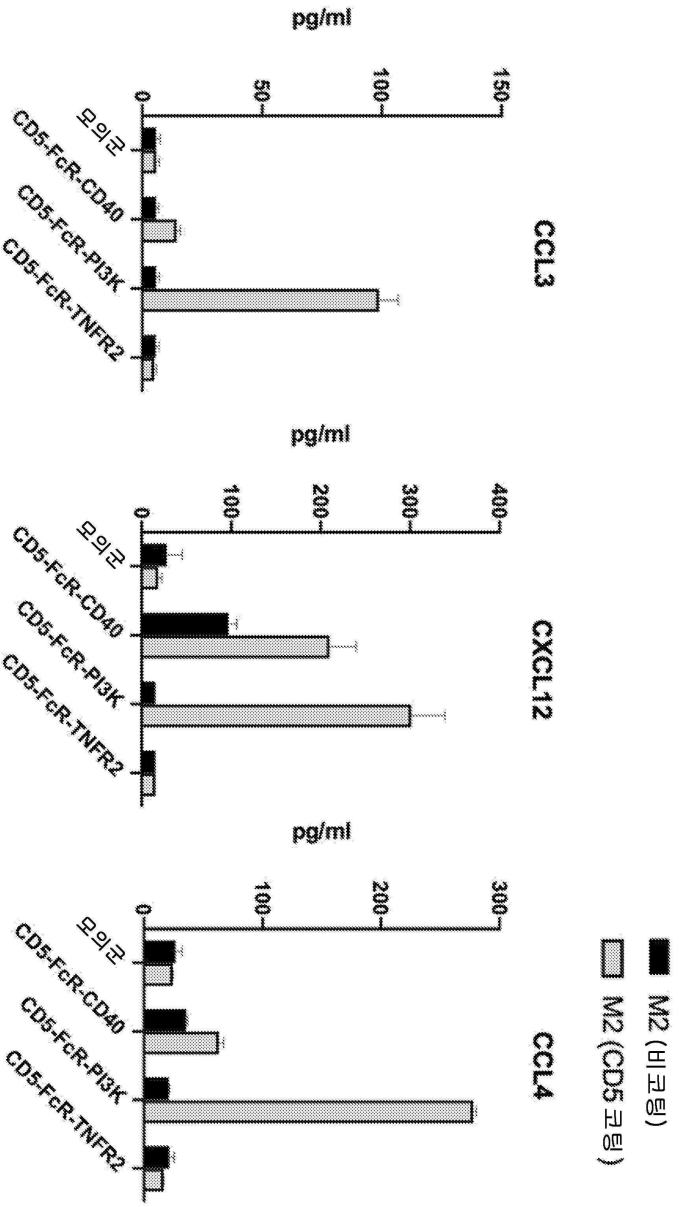
도면19a


세포외 결합 도메인
막횡단 도메인
신호전달 도메인 1-FcR
신호전달 도메인 CD40,
PI3K 동원 도메인,
TNFR2

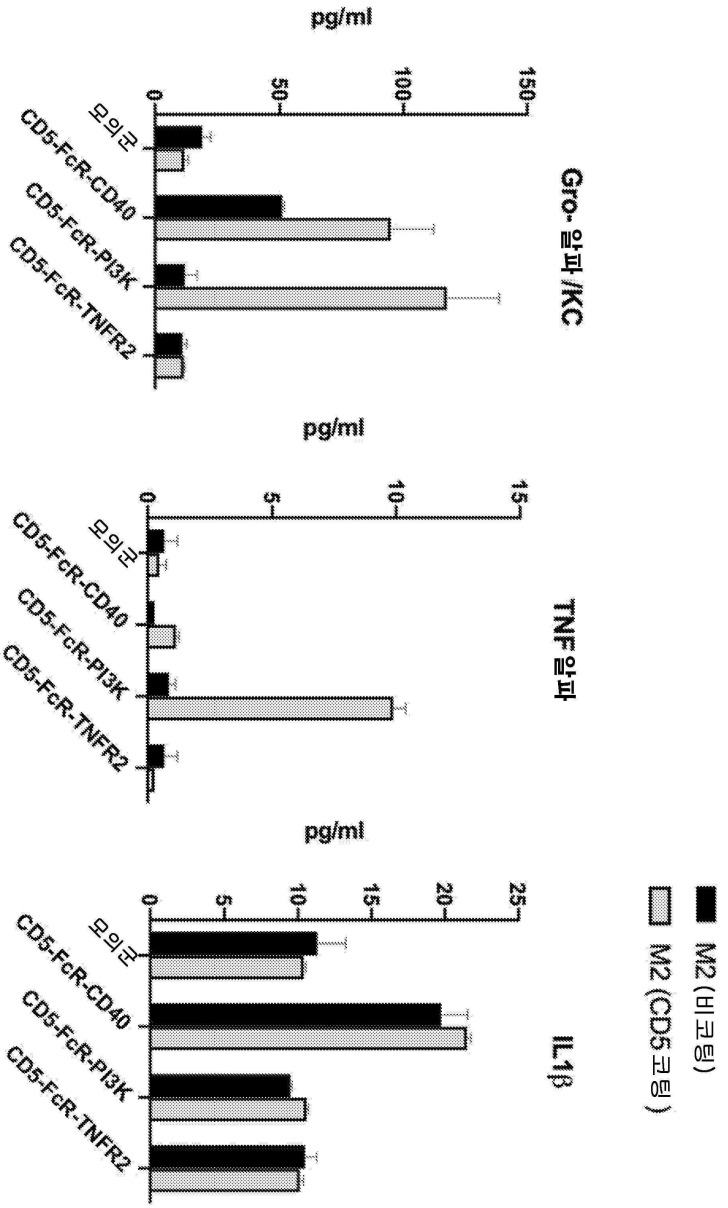
도면19b


IL4, IL10, TGFβ
M2 분극화된 ATAK 단핵구
황원으로 코팅된 플레이트
M2 조건으로 인큐베이션
사이토카인 분비 측정

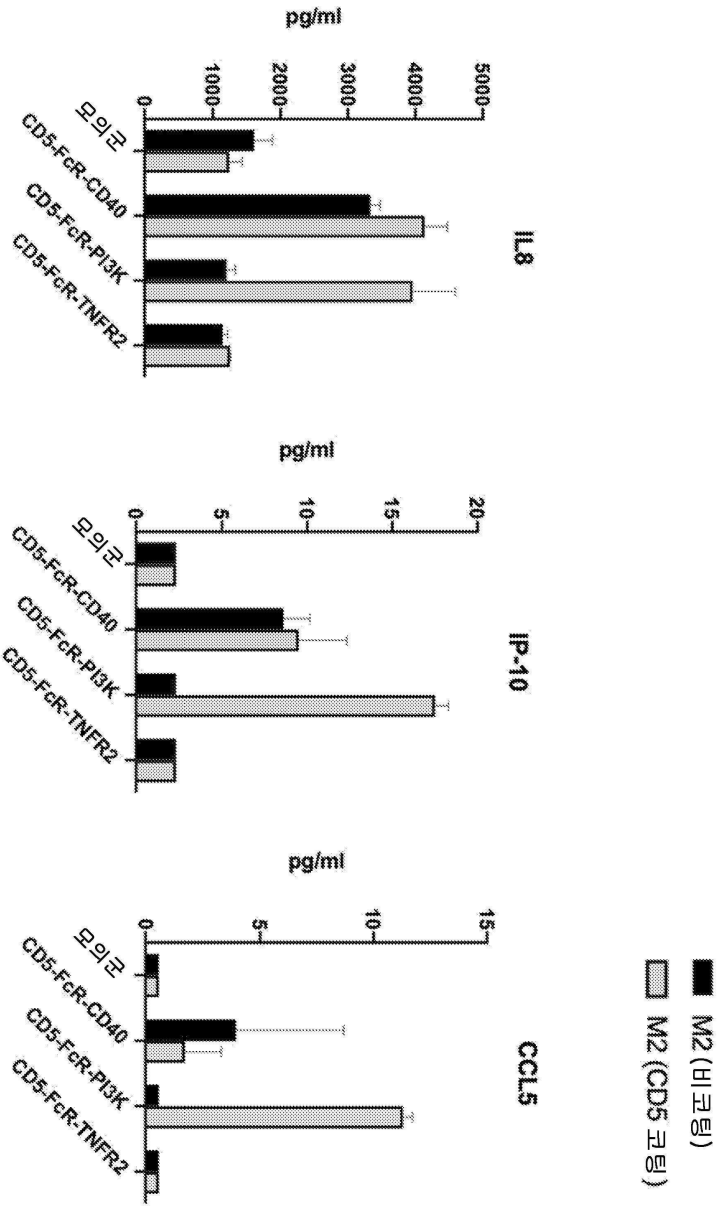
도면19c


pg/ml
0
50
100
150
모의군
CD5-FcR-CD40
CD5-FcR-PI3K
CD5-FcR-TNFR2
CCL3
pg/ml
0
100
200
300
400
모의군
CD5-FcR-CD40
CD5-FcR-PI3K
CD5-FcR-TNFR2
CXCL12
pg/ml
0
100
200
300
모의군
CD5-FcR-CD40
CD5-FcR-PI3K
CD5-FcR-TNFR2
CCL4
M2 (비코팅)
M2 (CD5 코팅)

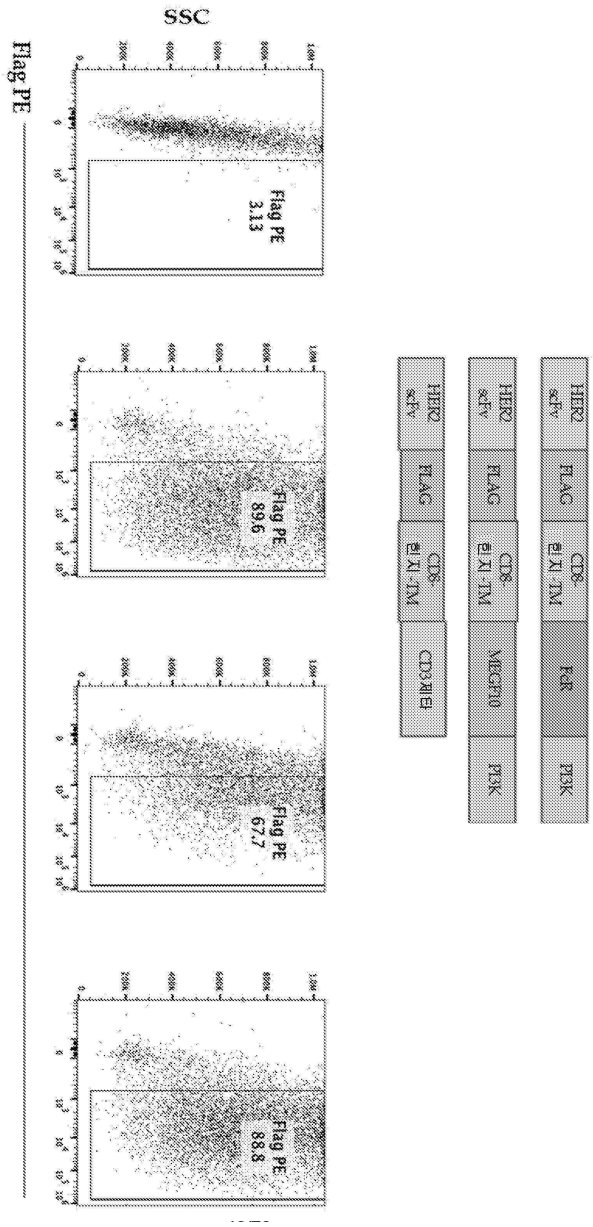
도면19cc


pg/ml
0
50
100
150
모의군
CD5-FcR-CD40
CD5-FcR-PI3K
CD5-FcR-TNFR2
Gro-알파/KC
pg/ml
0
5
10
15
모의군
CD5-FcR-CD40
CD5-FcR-PI3K
CD5-FcR-TNFR2
TNF알파
pg/ml
0
5
10
15
20
25
모의군
CD5-FcR-CD40
CD5-FcR-PI3K
CD5-FcR-TNFR2
IL1β
M2 (비코팅)
M2 (CD5코팅)

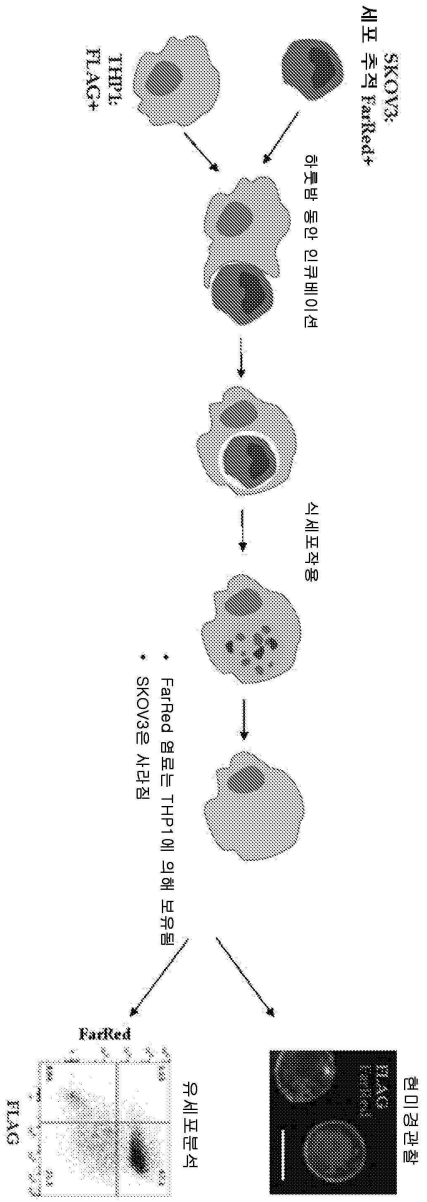
도면19ccc


pg/ml
0
1000
2000
3000
4000
5000
모의군
CD5-FcR-CD40
CD5-FcR-PI3K
CD5-FcR-TNFR2
IL8
pg/ml
0
5
10
15
20
모의군
CD5-FcR-CD40
CD5-FcR-PI3K
CD5-FcR-TNFR2
IP-10
pg/ml
0
5
10
15
모의군
CD5-FcR-CD40
CD5-FcR-PI3K
CD5-FcR-TNFR2
CCL5
M2 (비코팅)
M2 (CD5 코팅)

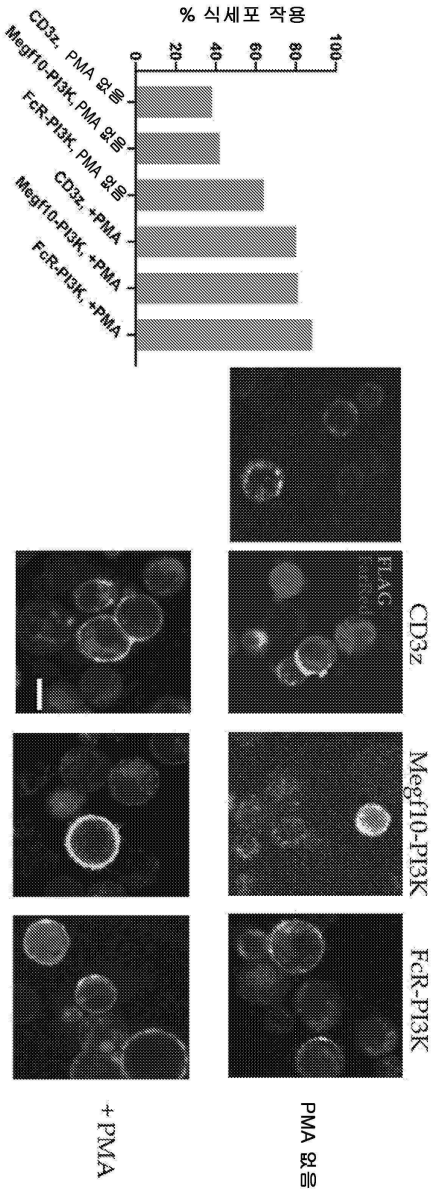
도면20a


SSC
Flag PE
Flag PE
3.13
Flag PE
89.6
Flag PE
67.7
Flag PE
88.8
HER2 scFv
FLAG
CD8 힌지-TM
CD3 제타
HER2 scFv
FLAG
CD8 힌지-TM
MPL
PDK
HER2 scFv
FLAG
CD8 힌지-TM
FcR
PDK

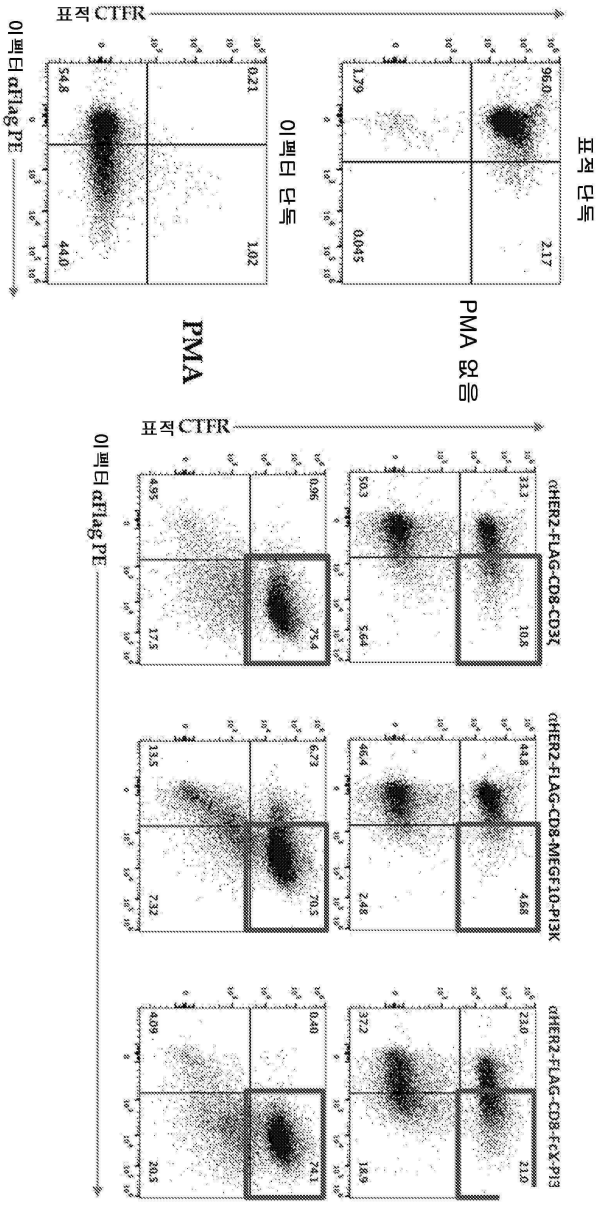
도면20b


SKOV3:
세포 추적 FarRed+
THP1:
FLAG+
하룻밤 동안 인큐베이션
식세포작용
FarRed 염료는 THP1에 의해 보유됨
SKOV3은 사라짐
FarRed
FLAG
유세포분석
형광현미경관찰

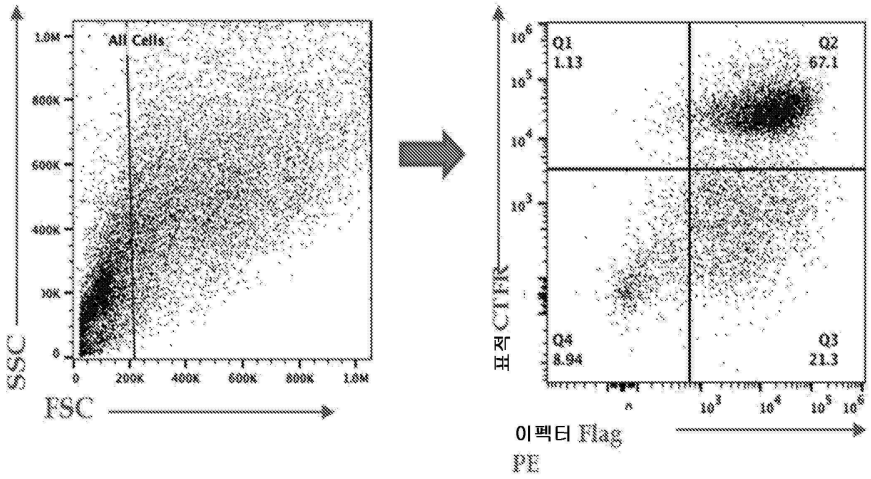
도면20c

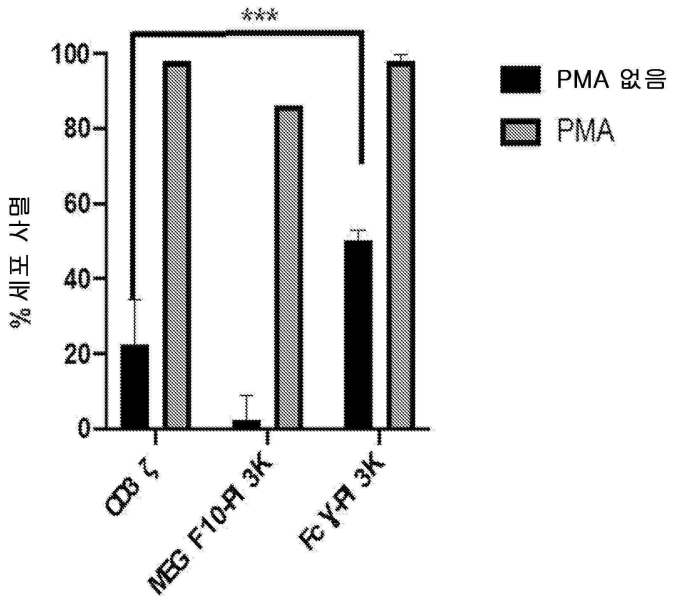

% 식세포 작용
0
20
40
60
80
100
CD3z, PMA 없음
Megf10-PI3K, PMA 없음
FcR-PI3K, PMA 없음
CD3z, +PMA
Megf10-PI3K, +PMA
FcR-PI3K, +PMA
FLAG
CD3z
Megf10-PI3K
FcR-PI3K
PMA 없음
+PMA

도면20d

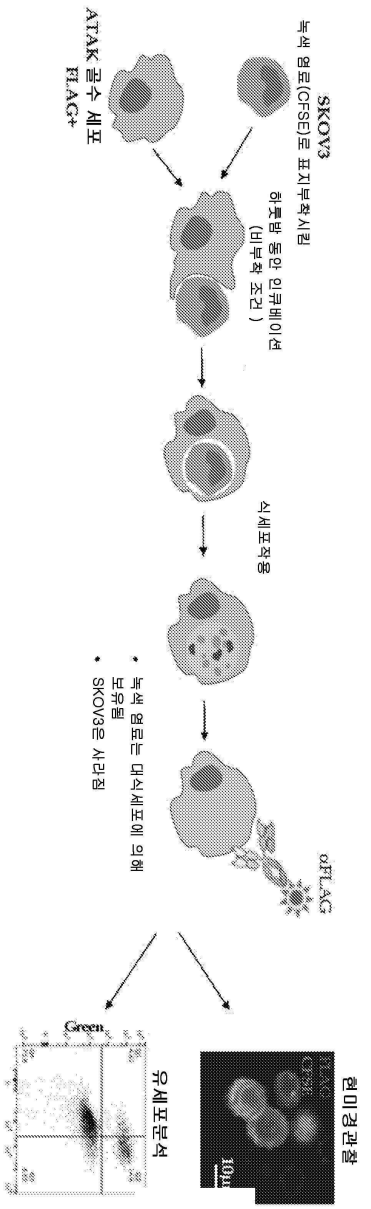

표적 CTFR
이펙터 αFlag PE
이펙터 단독
표적 단독
PMA
PMA 없음
αHER2-FLAG-CD8-CD3ζ
αHER2-FLAG-CD8-MEGF10-PI3K
αHER2-FLAG-CD8-FcX-PI3

도면20e

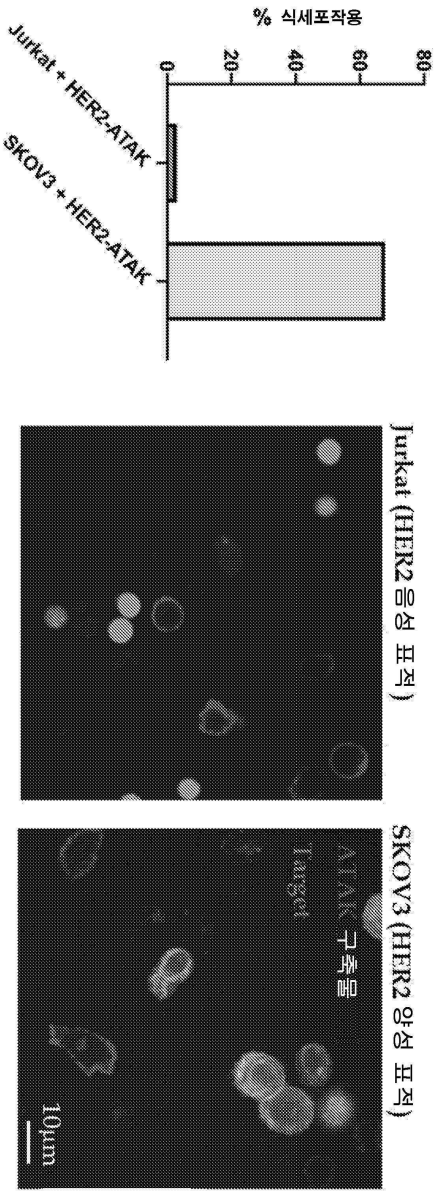

All Cells
SSC
FSC
Q1
1.13
Q2
67.1
Q4
8.94
Q3
21.3
표적 CHR
이펙터 Flag
PE


***
100
80
60
40
20
0
% 세포 사멸
PMA 없음
PMA
CD3 ζ
MEG F10-Fl 3K
Fc γ-Fl 3K

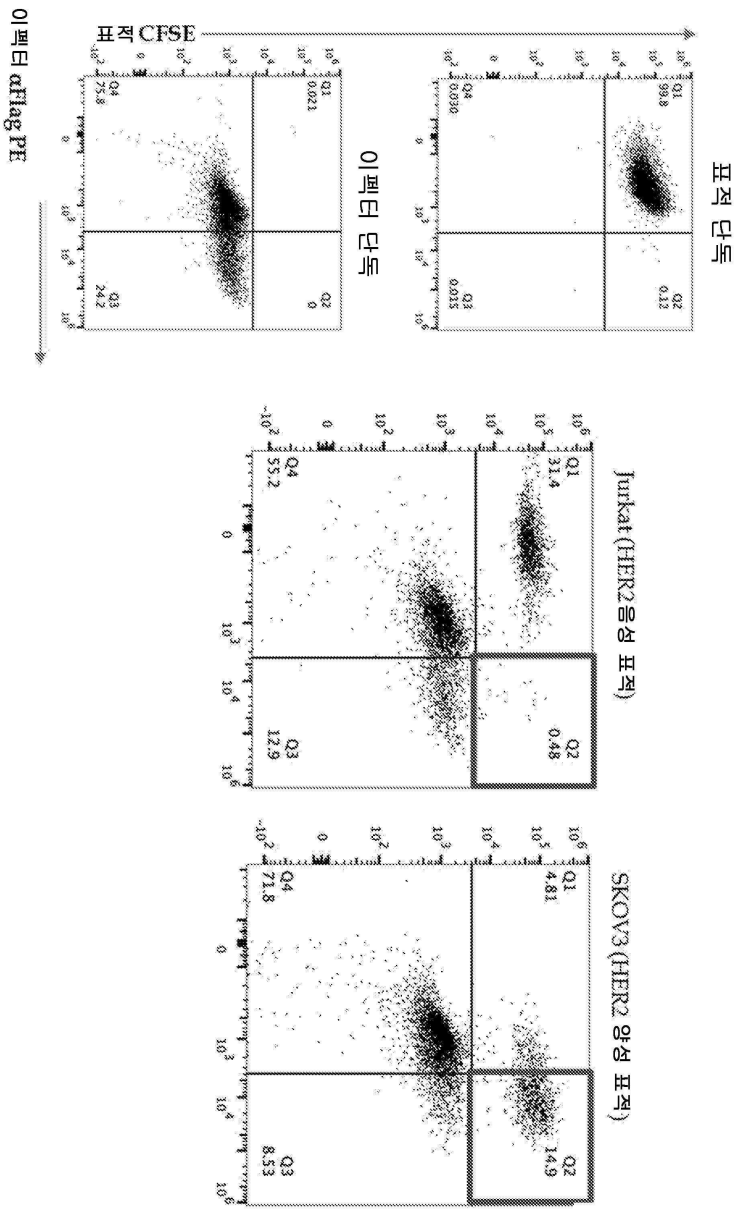
도면21a


SKOV3
녹색 염료(CFSE)로 표지부착시킴
하룻밤 동안 인큐베이션
(비부착 조건)
ATAK 공수 세포
FLAG+
식세포작용
αFLAG
• 녹색 염료는 대식세포에 의해
보유됨
• SKOV3은 사라짐
유세포분석
Green
형미경관찰
FLAG
CFSE
10μm

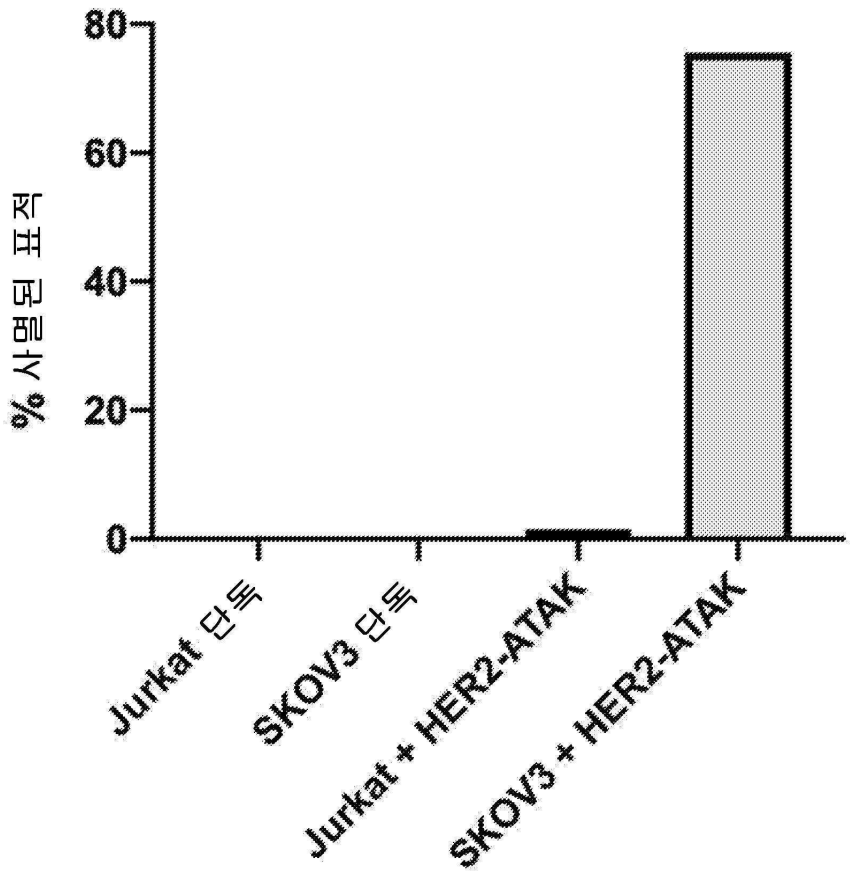
도면21b


% 식세포작용
0
20
40
60
80
Jurkat + HER2-ATAK
SKOV3 + HER2-ATAK
Jurkat (HER2 음성 표적)
SKOV3 (HER2 양성 표적)
ATAK 구축물
Target
10μm

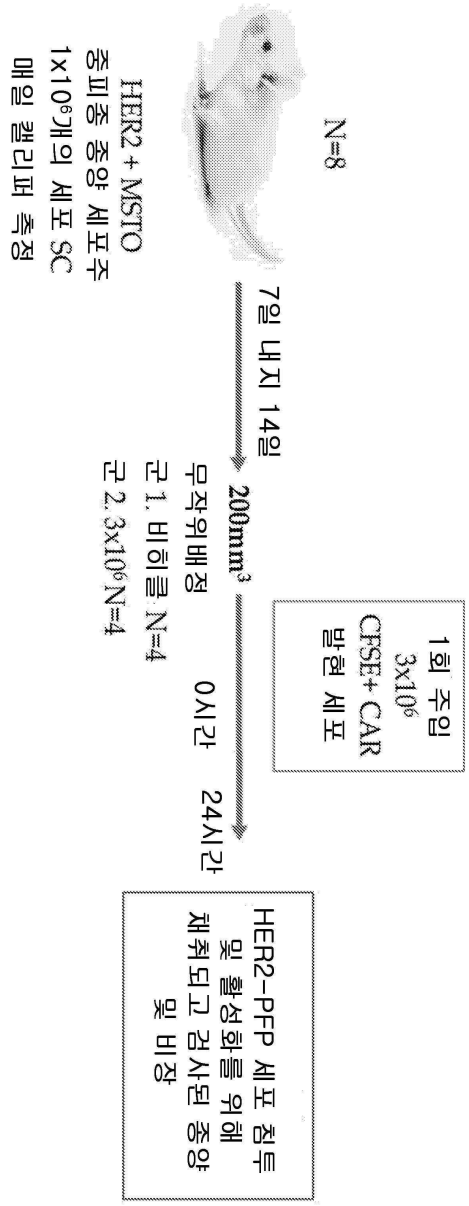
도면21c


이펙터 αFlag PE
표적 CFSE
이펙터 단독
표적 단독
Jurkat (HER2 음성 표적)
SKOV3 (HER2 양성 표적)
Q1 0.021
Q4 75.8
Q3 24.2
Q2 0
Q1 99.8
Q4 0.030
Q3 0.035
Q2 0.12
Q1 31.4
Q4 55.2
Q3 12.9
Q2 0.48
Q1 4.81
Q4 71.8
Q3 8.53
Q2 14.9

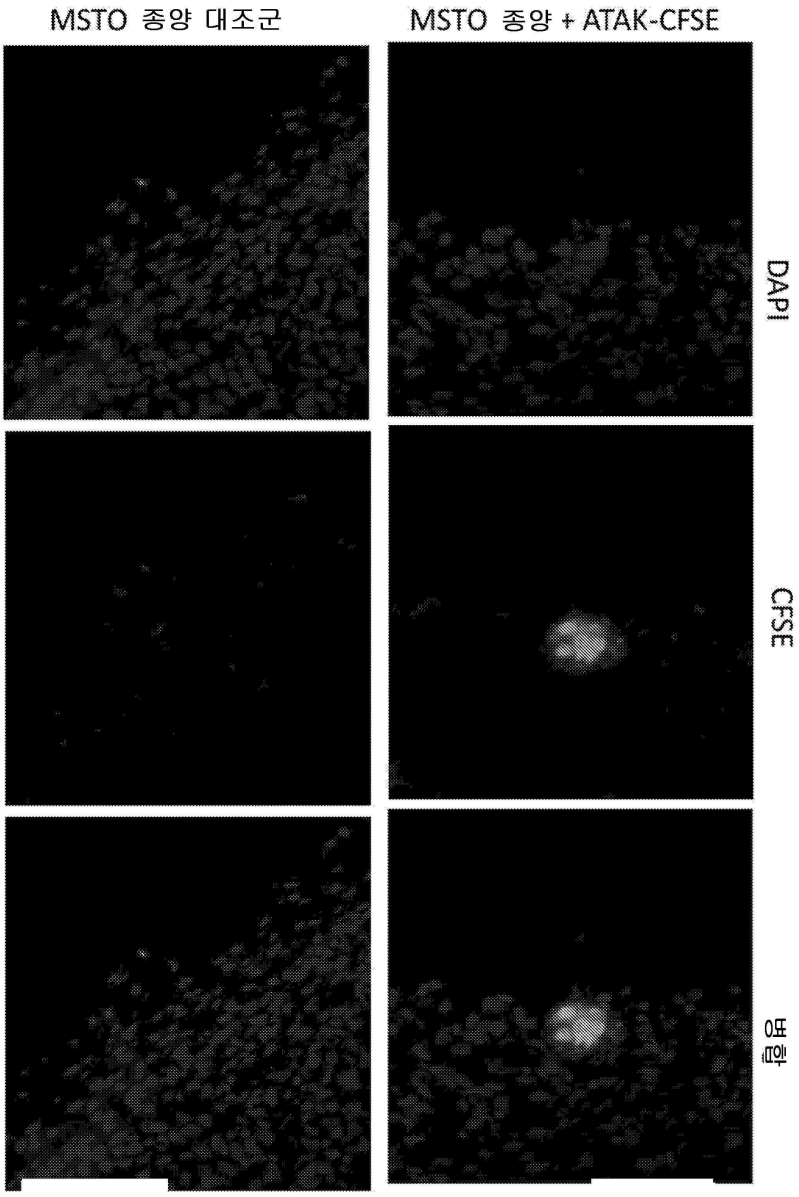
도면21cc


80
60
40
20
0
% 사멸된 표적
Jurkat 단독
SKOV3 단독
Jurkat + HER2-ATAK
SKOV3 + HER2-ATAK

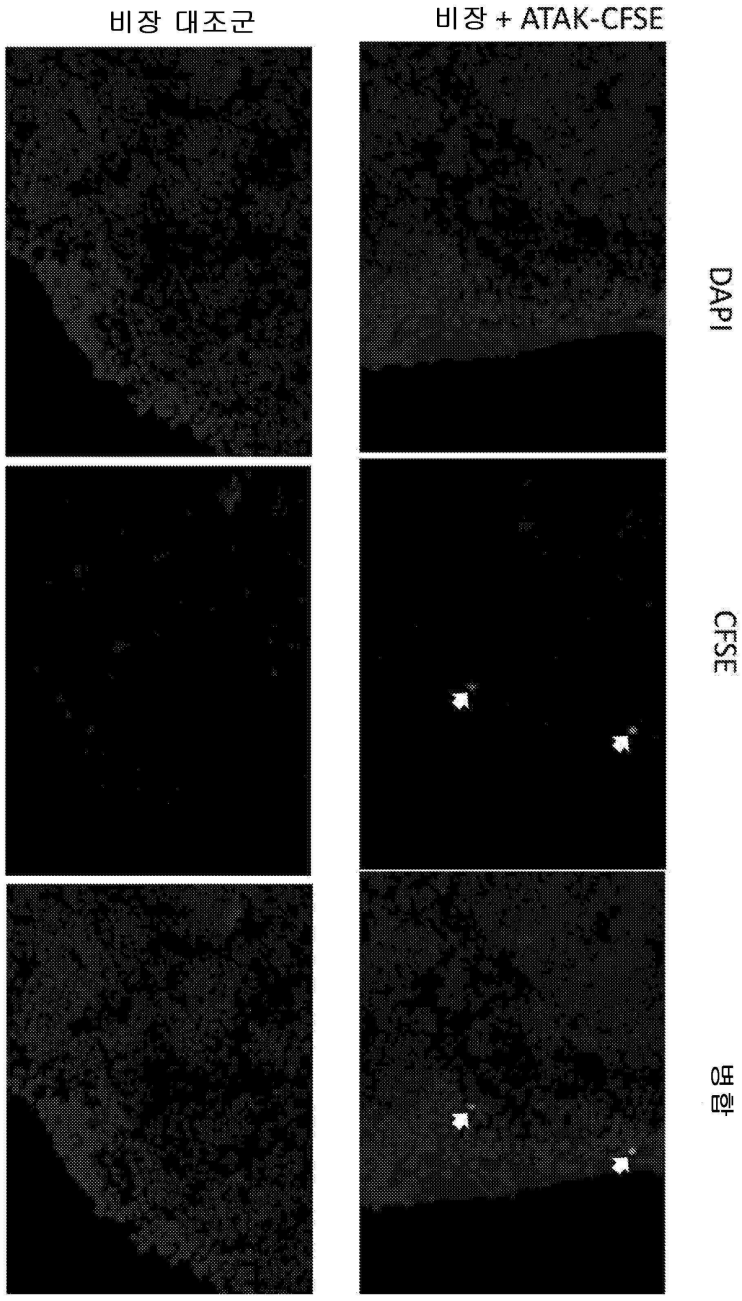
도면22a


N=8
HER2 + MSTO
중피종 종양 세포주
1x10⁶개의 세포 SC
매일 캘리퍼 측정
7일 내지 14일
200mm³
무작위배정
군 1. 비히클 N=4
군 2. 3x10⁶ N=4
0시간
24시간
1회 주입
3x10⁶
CFSE+ CAR
발현 세포
HER2-PFP 세포 침투
및 활성화를 위해
채취되고 검사된 종양
및 비장

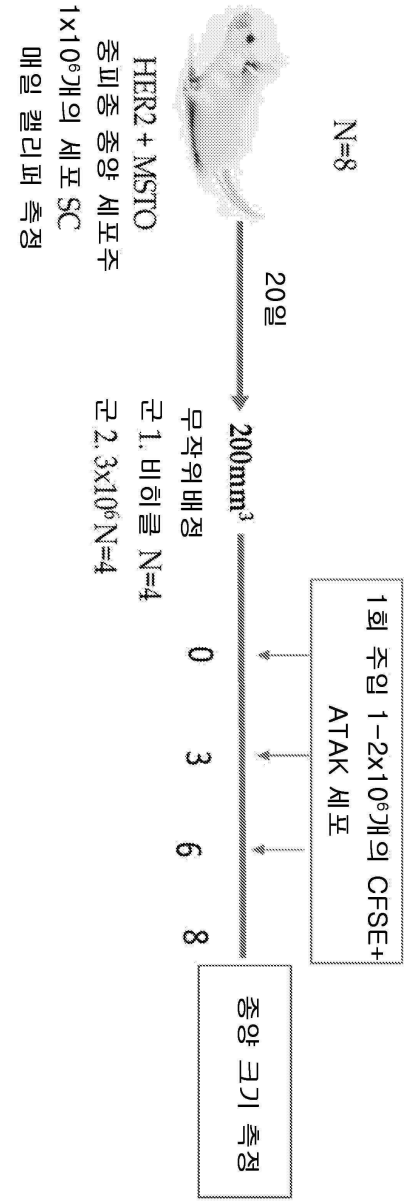
도면22b



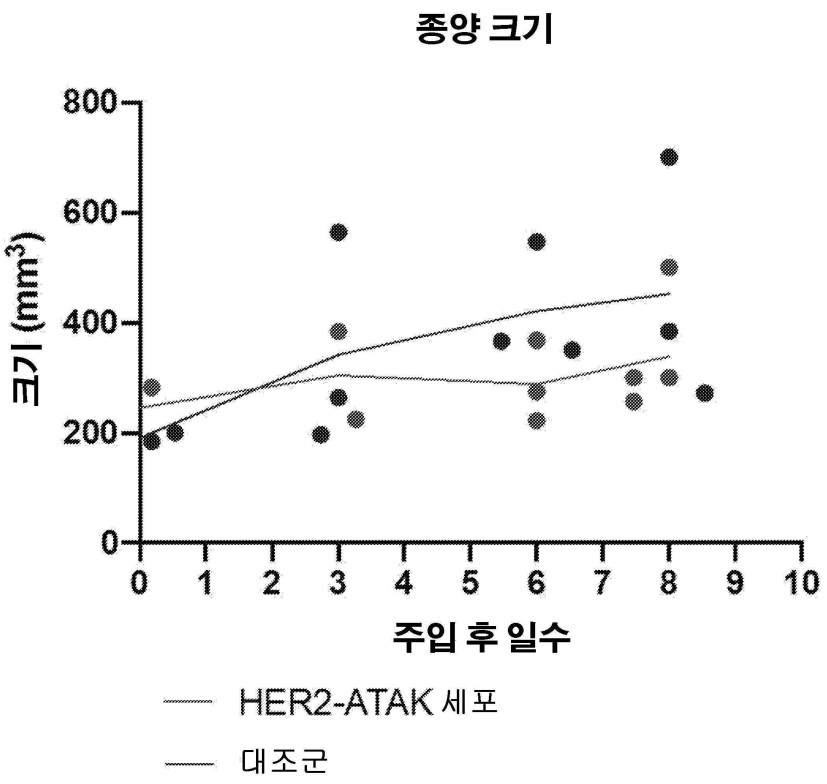
도면22c



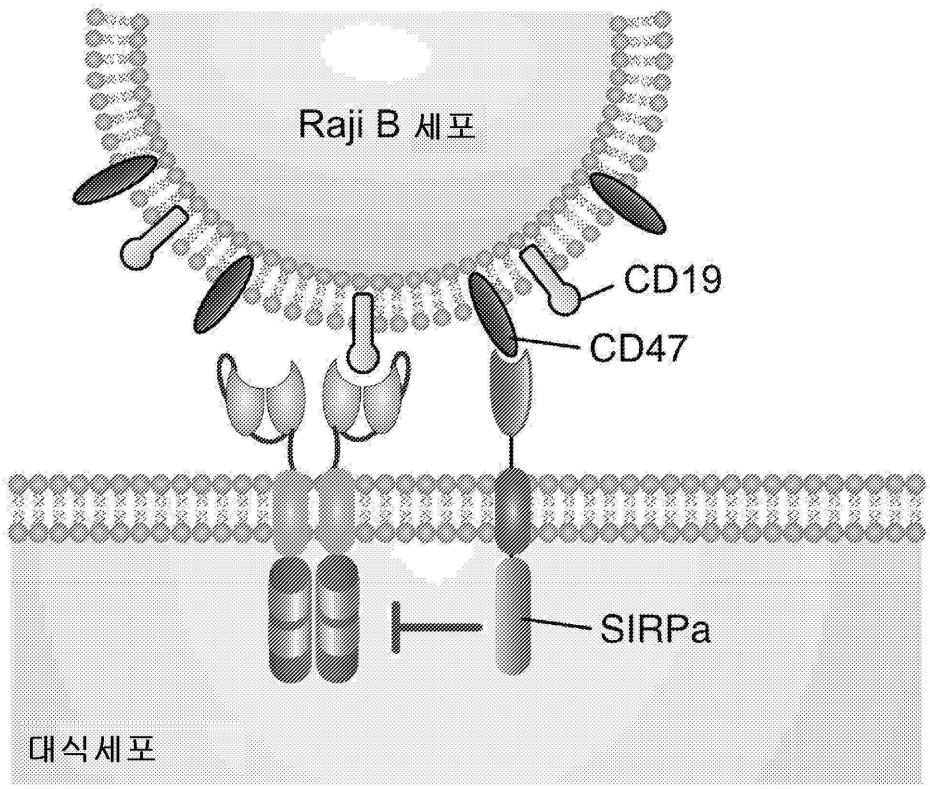
도면23


N=8
20일
200mm³
무작위 배정
군 1. 비히클 N=4
군 2. 3x10⁶ N=4
0
3
6
8
1회 주입 1-2x10⁶개의 CFSE+
ATAK 세포
종양 크기 측정
HER2+MSTO
종피종 종양 세포주
1x10⁶개의 세포 SC
매일 캘리퍼 측정

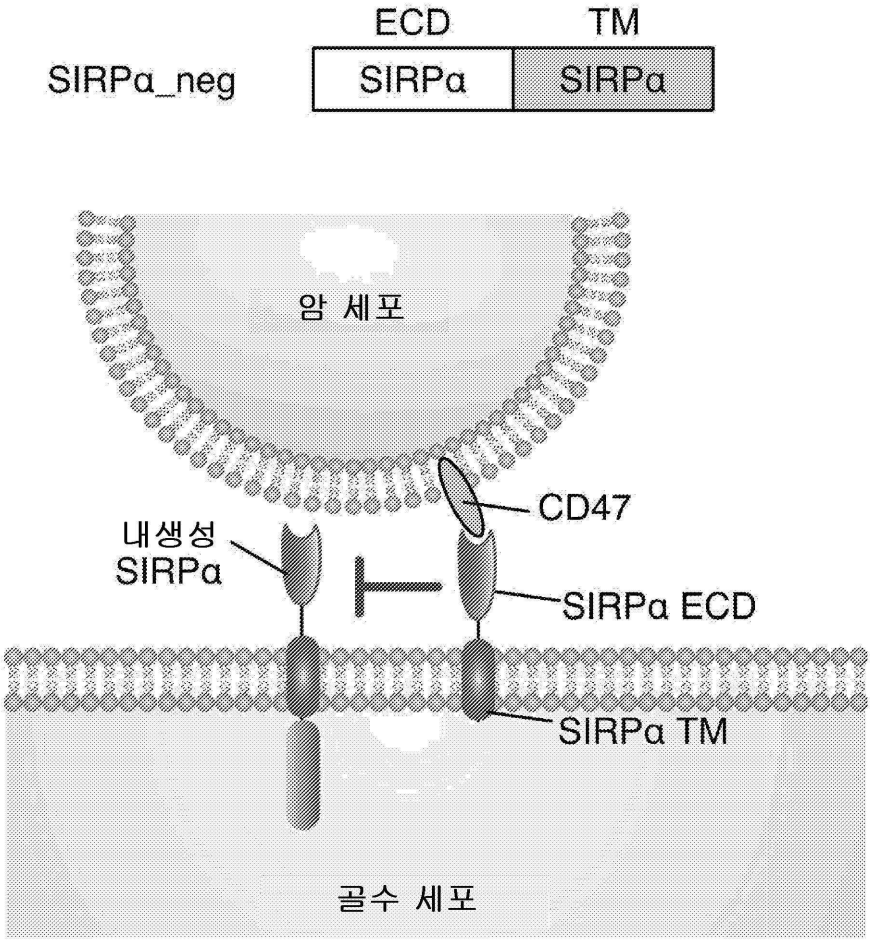
도면24


종양 크기
800
600
400
200
0
크기 (mm³)
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
주입 후 일수
HER2-ATAK 세포
대조군

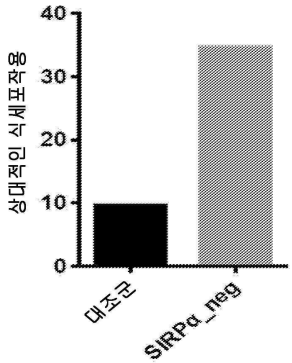
도면25


Raji B 세포
CD19
CD47
SIRPa
대식세포

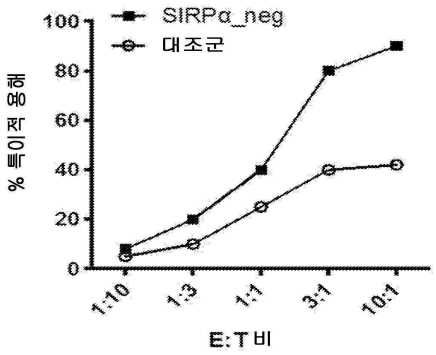
도면26a


ECD
TM
SIRPα_neg
SIRPα
SIRPα
암 세포
CD47
내생성
SIRPα
SIRPα ECD
SIRPα TM
골수 세포

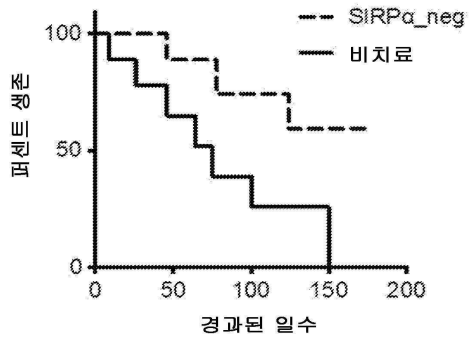
도면26b


40
30
20
10
0
상대적인 식세포작용
대조군
SIRPα_neg

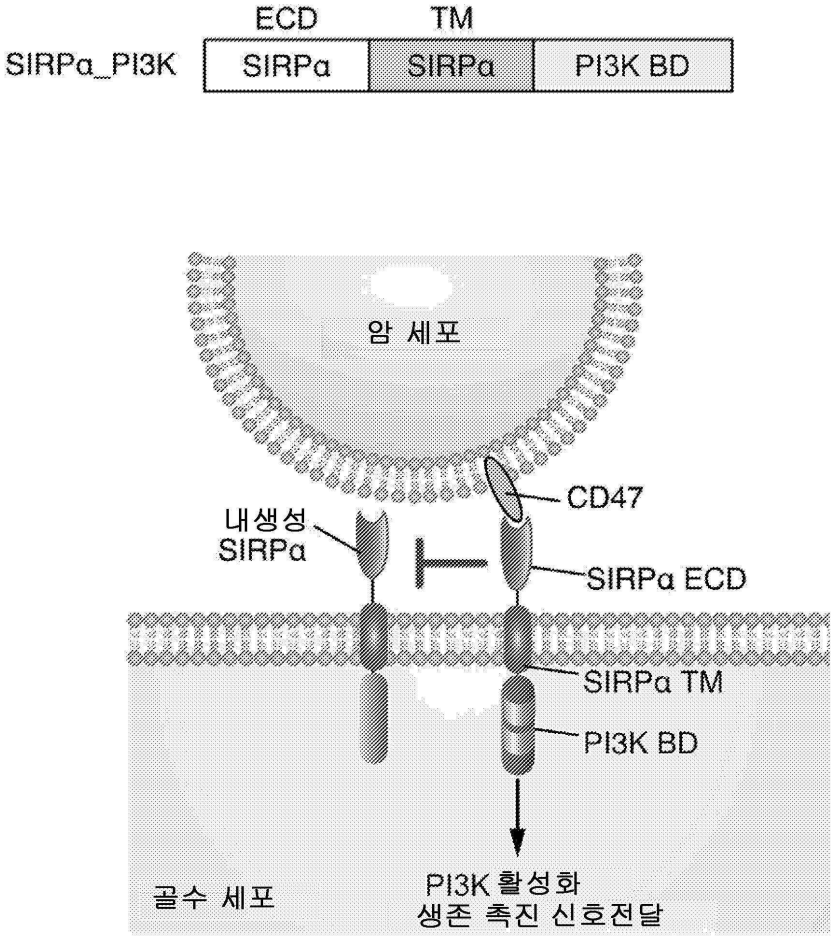
도면26c


SIRPα_neg
대조군
% 특이적 용해
100
80
60
40
20
0
1:10
1:3
1:1
3:1
10:1
E:T 비

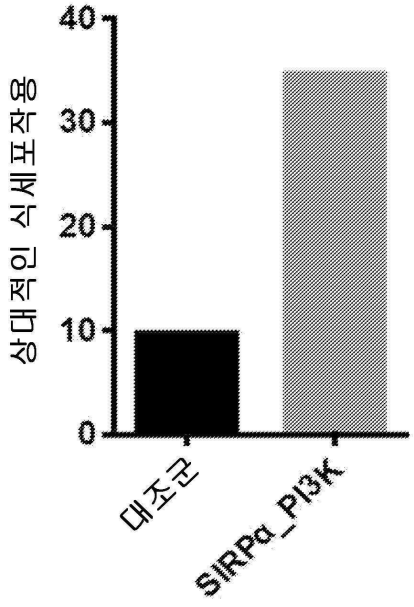
도면26d


SIRPα_neg
비치료
퍼센트 생존
100
50
0
0
50
100
150
200
경과된 일수

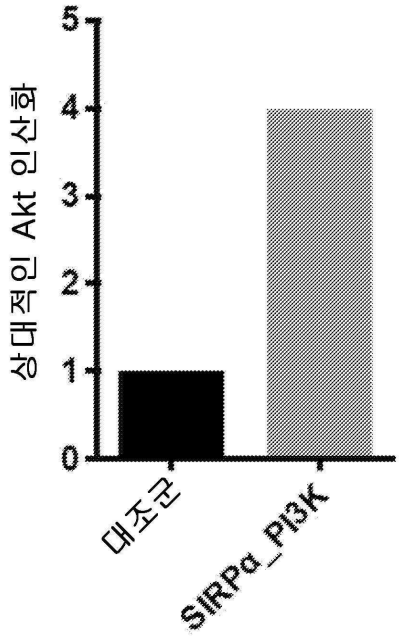
도면27a


ECD
TM
SIRPα_PI3K
SIRPα
SIRPα
PI3K BD
암 세포
CD47
내생성
SIRPα
SIRPα ECD
SIRPα TM
PI3K BD
골수 세포
PI3K 활성화
생존 촉진 신호전달

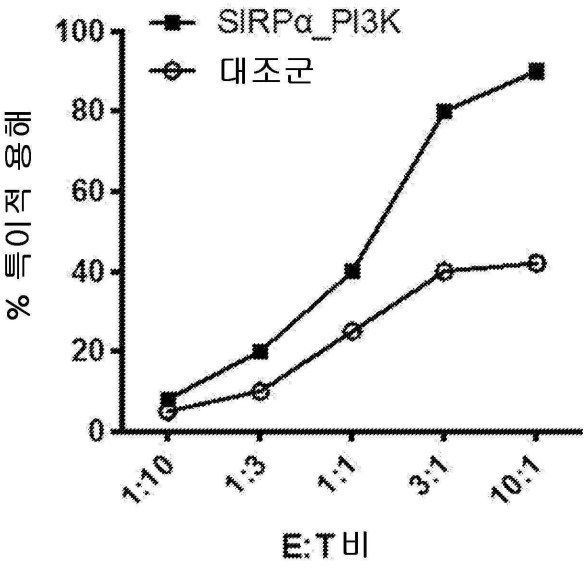
도면27b


40
30
20
10
0
상대적인 식세포작용
대조군
SIRPα_PI3K

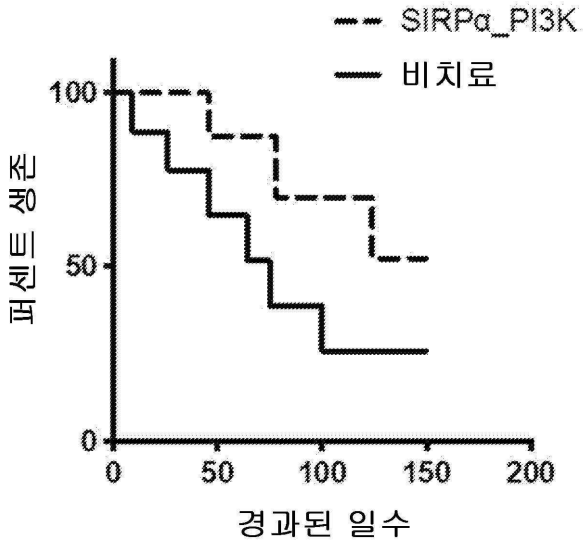
도면27c


상대적인 Akt 인산화
5
4
3
2
1
0
대조군
SIRPα_PI3K

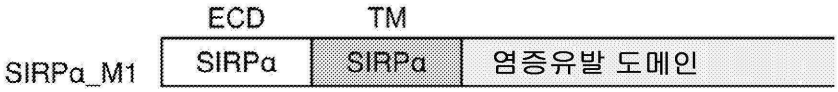
도면27d

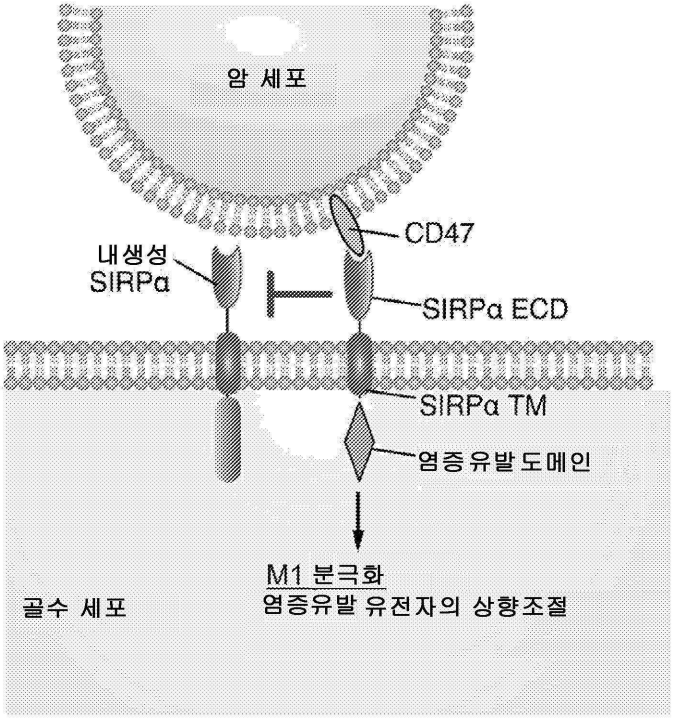

SIRPα_PI3K
대조군
% 특이적 용해
100
80
60
40
20
0
1:10
1:3
1:1
3:1
10:1
E:T 비

도면27e

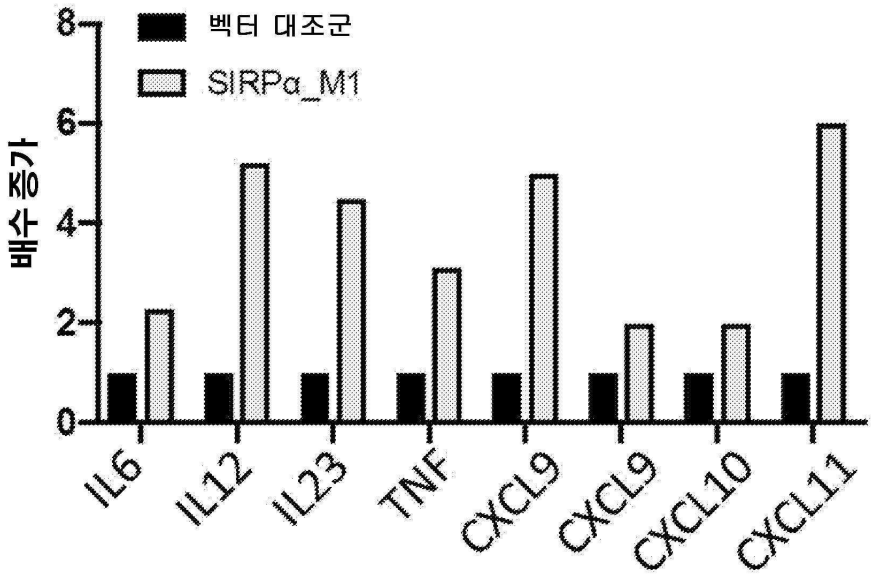

SIRPα_PI3K
비치료
퍼센트 생존
100
50
0
0
50
100
150
200
경과된 일수

도면28a

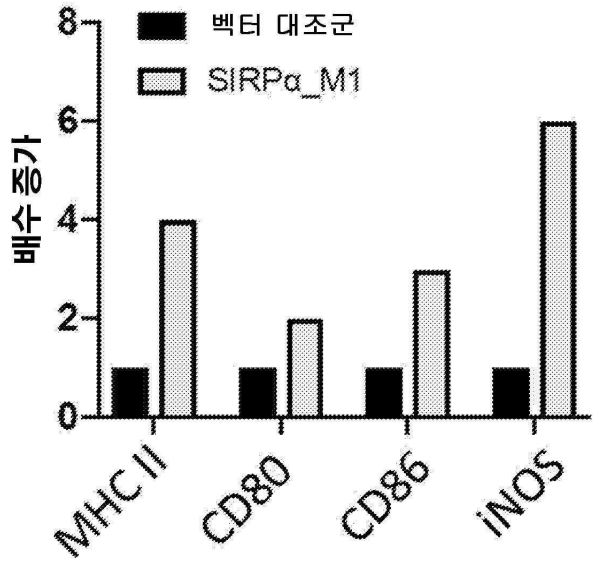

ECD
TM
SIRPα_M1
SIRPα
SIRPα
염증유발 도메인


암 세포
CD47
내생성
SIRPα
SIRPα ECD
SIRPα TM
염증유발도메인
M1 분극화
염증유발 유전자의 상향조절
골수 세포

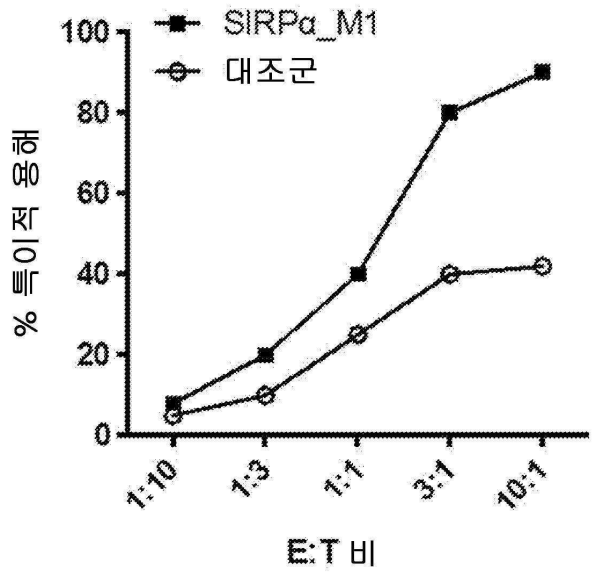
도면28b


벡터 대조군
SIRPα_M1
배수 증가
0
2
4
6
8
IL6
IL12
IL23
TNF
CXCL9
CXCL9
CXCL10
CXCL11

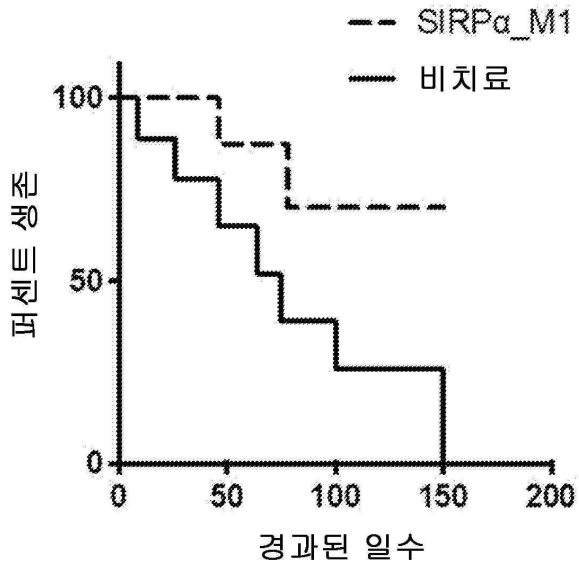
도면28c


벡터 대조군
SIRPα_M1
배수 증가
0
2
4
6
8
MHC II
CD80
CD86
iNOS

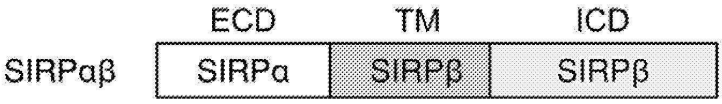
도면28d

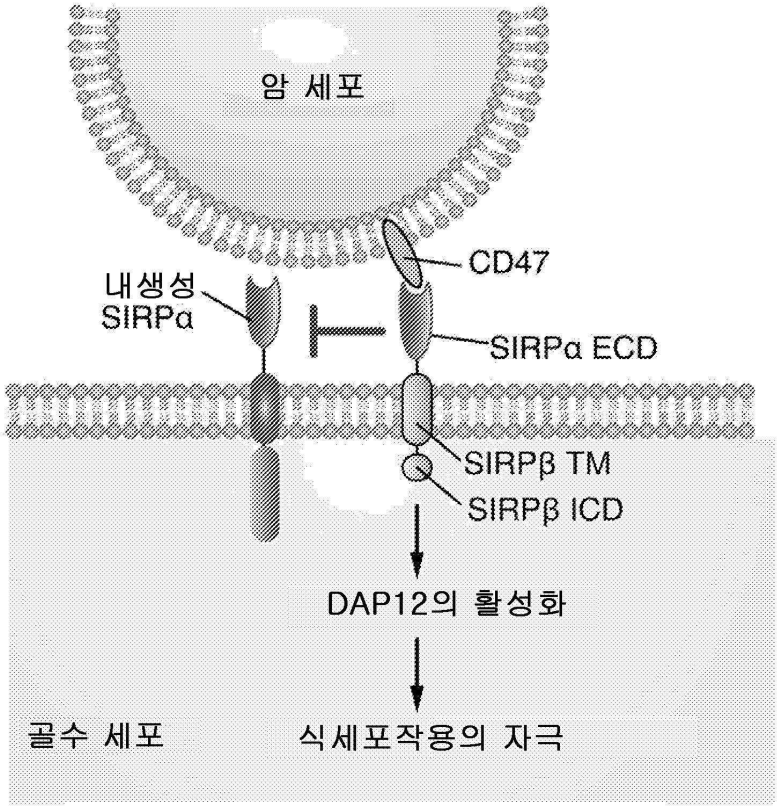

SIRPα_M1
대조군
100
80
60
40
20
0
% 특이적 용해
1:10
1:3
1:1
3:1
10:1
E:T 비

도면28e

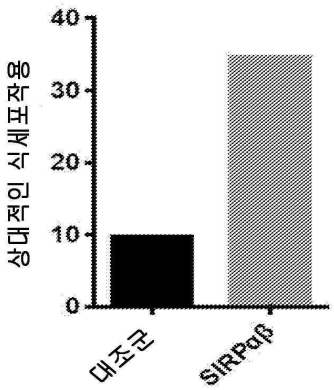

SIRPα_M1
비치료
100
50
0
퍼센트 생존
0
50
100
150
200
경과된 일수

도면29a

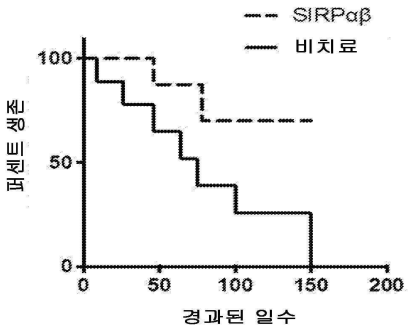

ECD
TM
ICD
SIRPαβ
SIRPα
SIRPβ
SIRPβ


암 세포
CD47
내생성
SIRPα
SIRPα ECD
SIRPβ TM
SIRPβ ICD
DAP12의 활성화
골수 세포
식세포작용의 자극

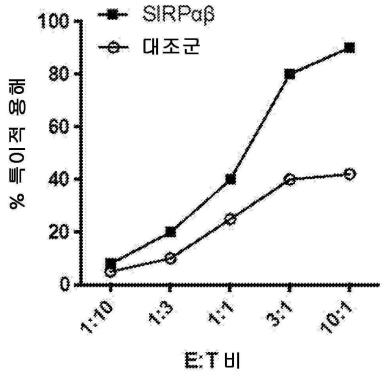
도면29b


40
30
20
10
0
상대적인 식세포작용
대조군
SIRPαβ

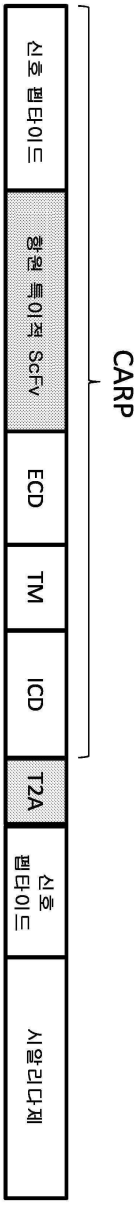
도면29c


SIRPαβ
비치료
퍼센트 생존
100
50
0
0
50
100
150
200
경과된 일수

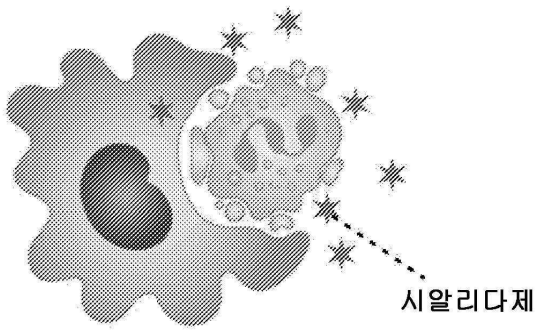
도면29d


SIRPαβ
대조군
% 특이적 용해
100
80
60
40
20
0
1:10
1:3
1:1
3:1
10:1
E:T 비

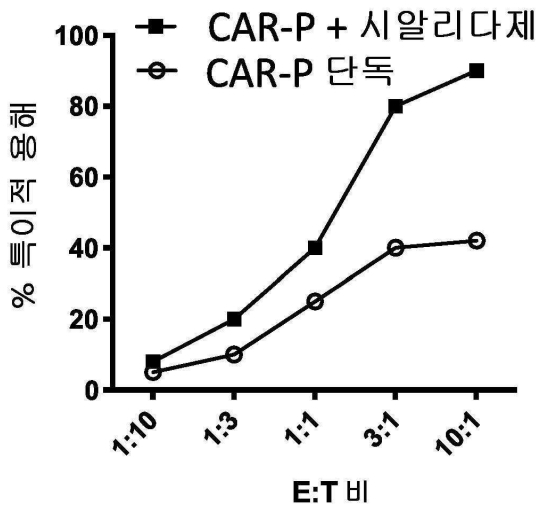
도면30a



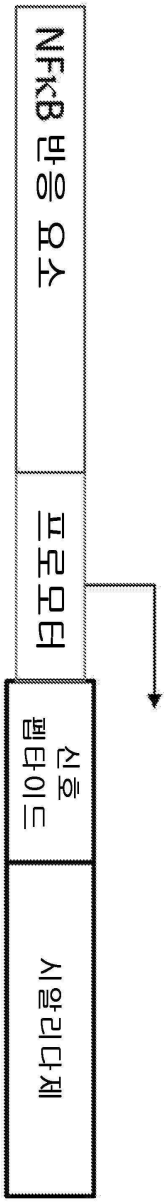
도면30b



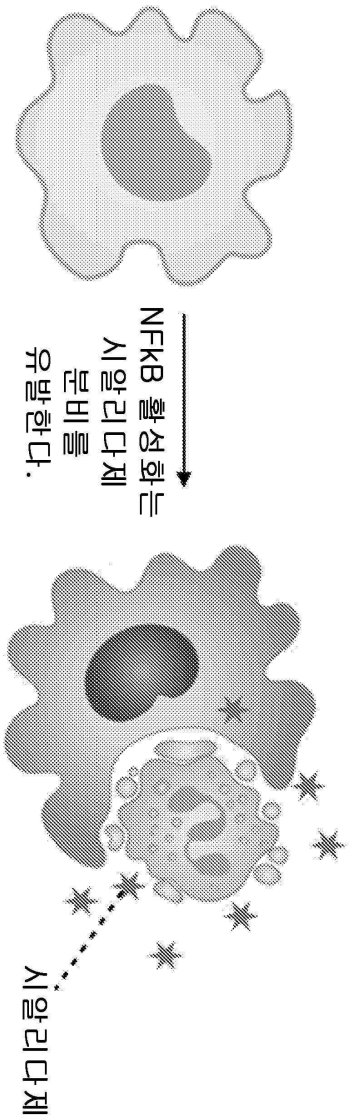
도면30c



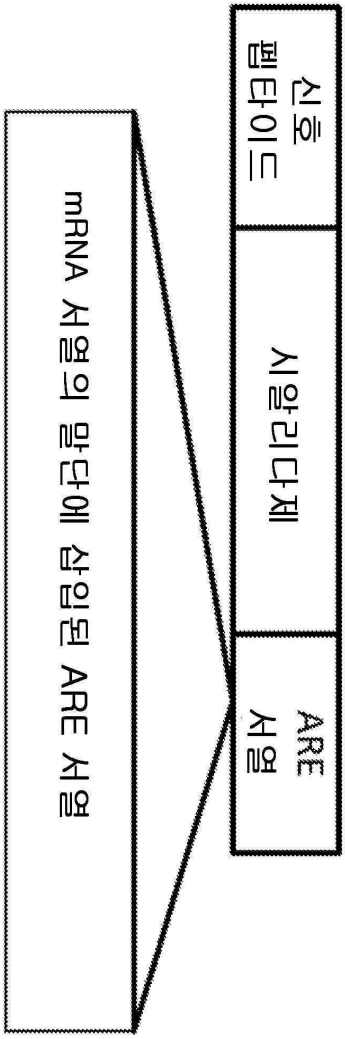
도면30d



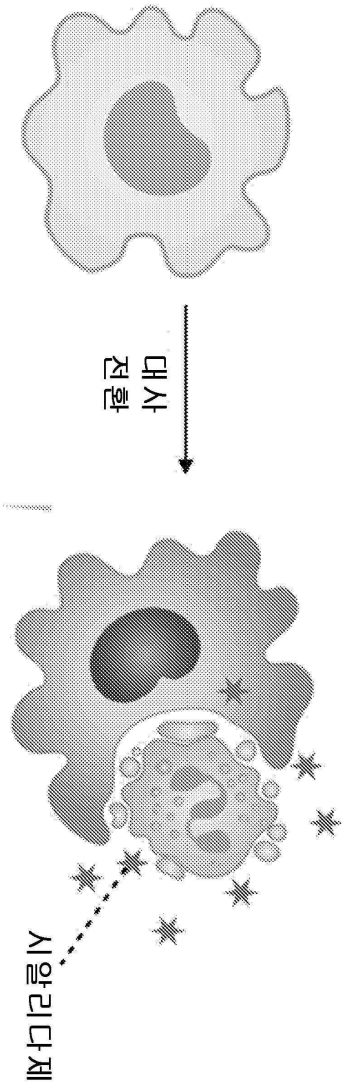
도면30e



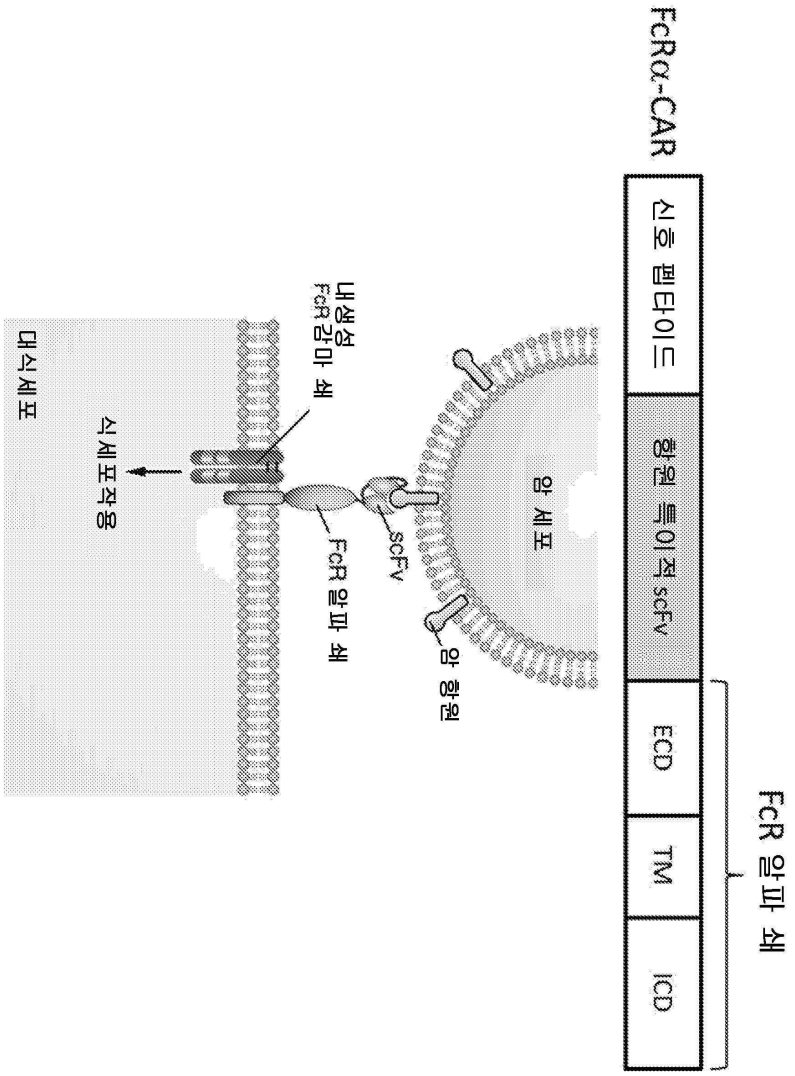
도면30f



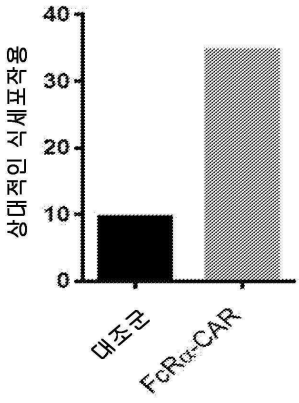
도면30g



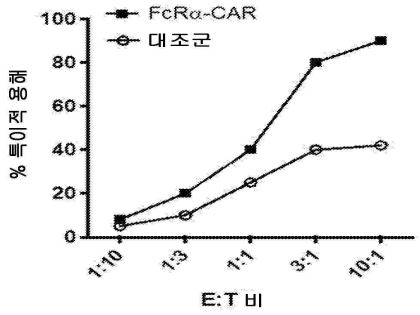
도면31a


FcRα-CAR
신호 펩타이드
항원 특이적 scFv
ECD
TM
ICD
FcR 알파 쇄
암 항원
암 세포
scFv
FcR 알파 쇄
내생성 FcR 감마 쇄
식세포작용
대식세포

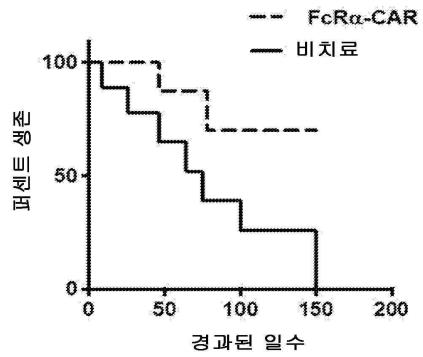
도면31b


상대적인 식세포작용
40
30
20
10
0
대조군
FcRα-CAR

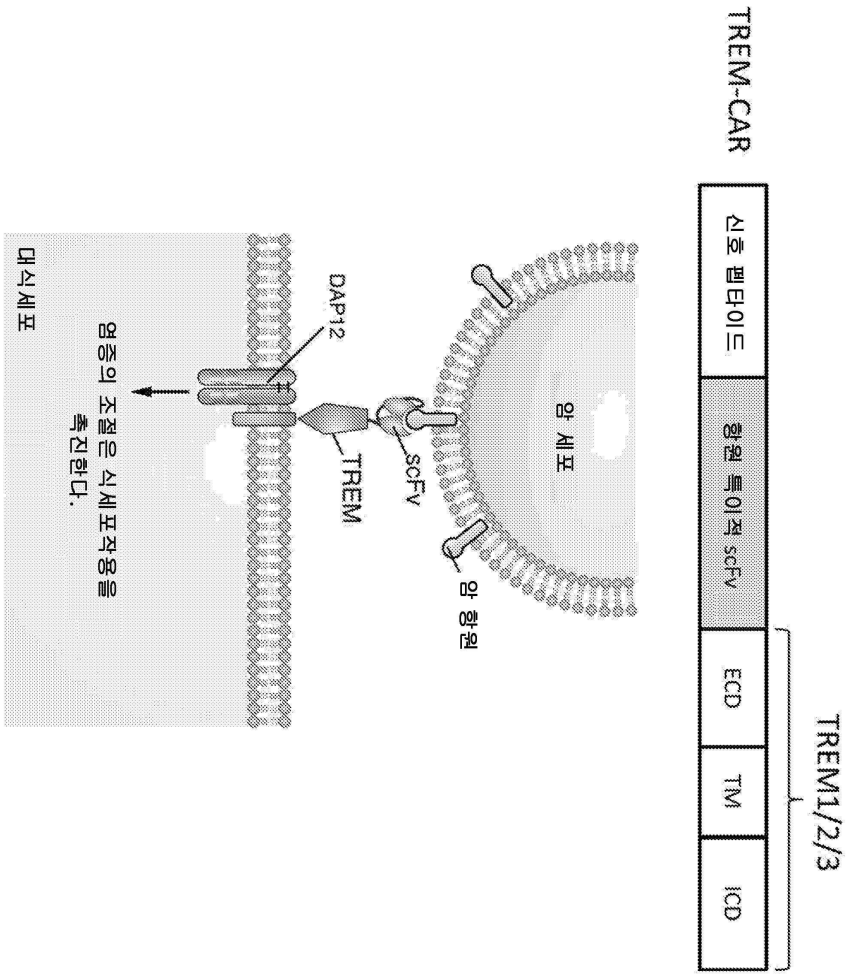
도면31c


FcRα-CAR
대조군
% 특이적 용해
100
80
60
40
20
0
1:10
1:3
1:1
3:1
10:1
E:T 비

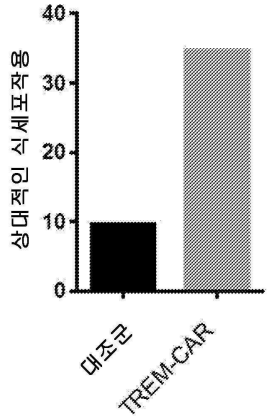
도면31d


FcRα-CAR
비치료
퍼센트 생존
100
50
0
0
50
100
150
200
경과된 일수

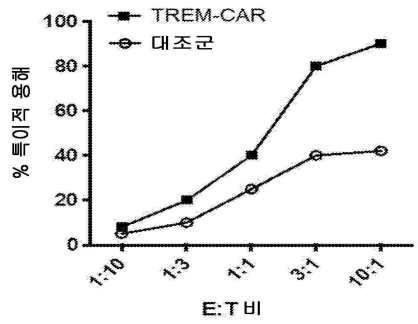
도면32a


TREM-CAR
신호 펩타이드
항원 특이적 scFv
ECD
TM
ICD
TREM1/2/3
암 항원
scFv
TREM
DAP12
암 세포
염증의 조절은 식세포작용을
촉진한다.
대식세포

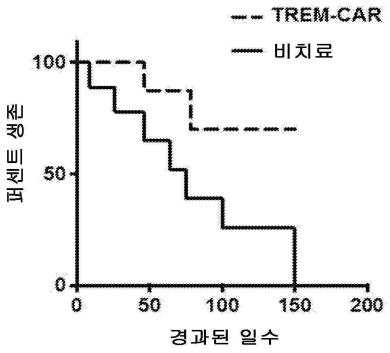
도면32b


상대적인 식세포작용
40
30
20
10
0
대조군
TREM-CAR

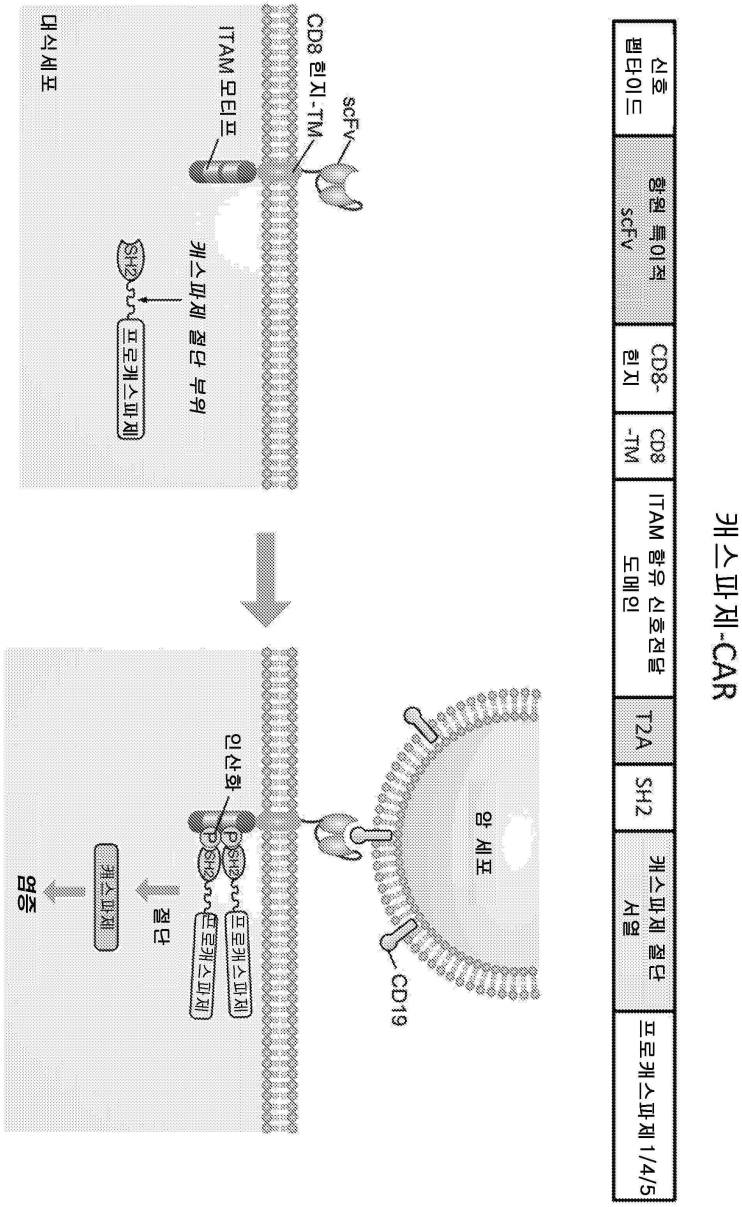
도면32c


TREM-CAR
대조군
% 특이적 용해
100
80
60
40
20
0
1:10
1:3
1:1
3:1
10:1
E:T 비

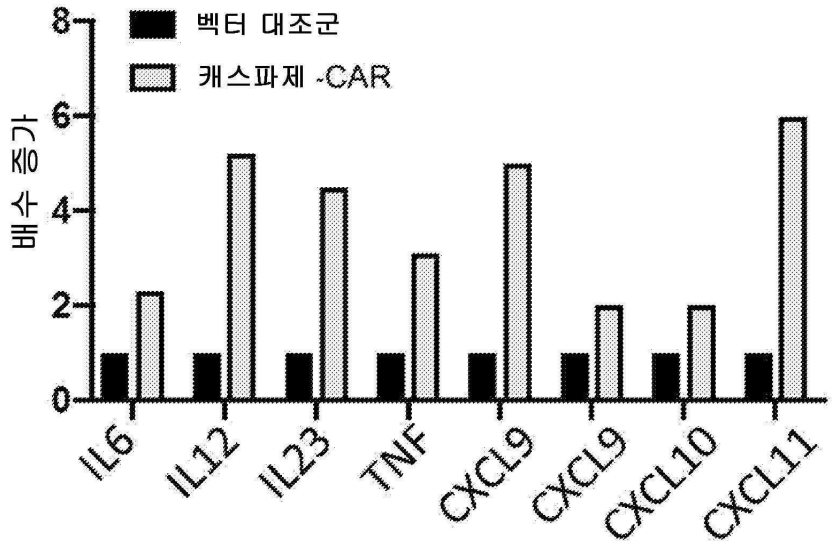
도면32d


TREM-CAR
비치료
퍼센트 생존
100
50
0
0
50
100
150
200
경과된 일수

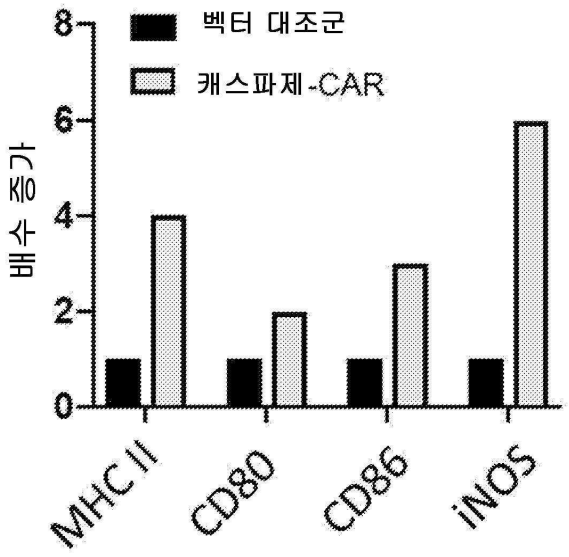
도면33a


캐스파제-CAR
신호 펩타이드
항원 특이적 scFv
CD8-힌지
CD8-TM
ITAM 함유 신호전달 도메인
T2A
SH2
캐스파제 절단 서열
프로캐스파제 1/4/5
대식세포
ITAM 모티프
CD8 힌지-TM
scFv
캐스파제 절단 부위
SH2
프로캐스파제
암 세포
CD19
인산화
P
SH2
프로캐스파제
절단
캐스파제
염증

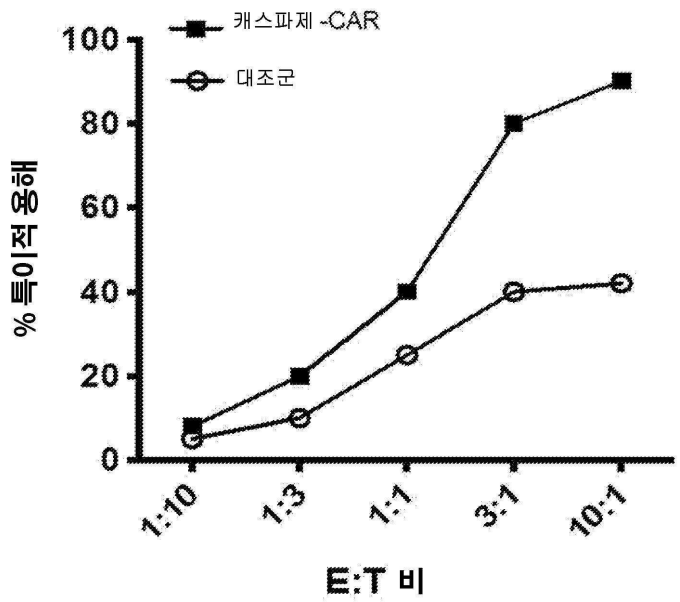
도면33b


벡터 대조군
캐스파제 -CAR
배수 증가
8
6
4
2
0
IL6
IL12
IL23
TNF
CXCL9
CXCL9
CXCL10
CXCL11

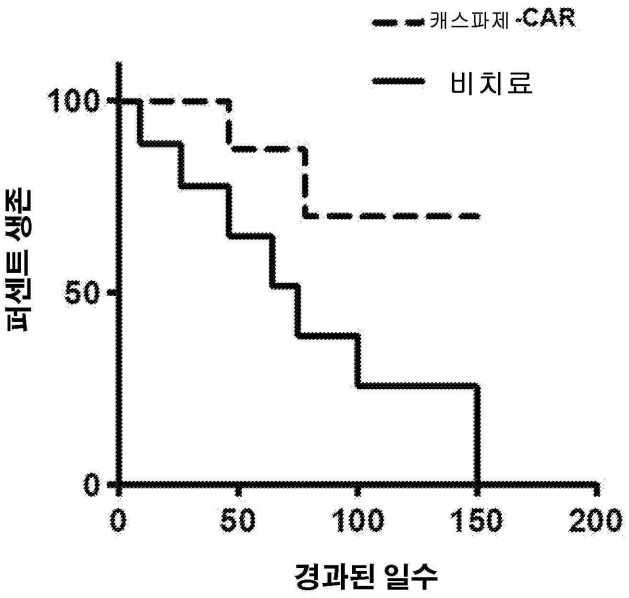
도면33c


벡터 대조군
캐스파제-CAR
배수 증가
8
6
4
2
0
MHC II
CD80
CD86
iNOS

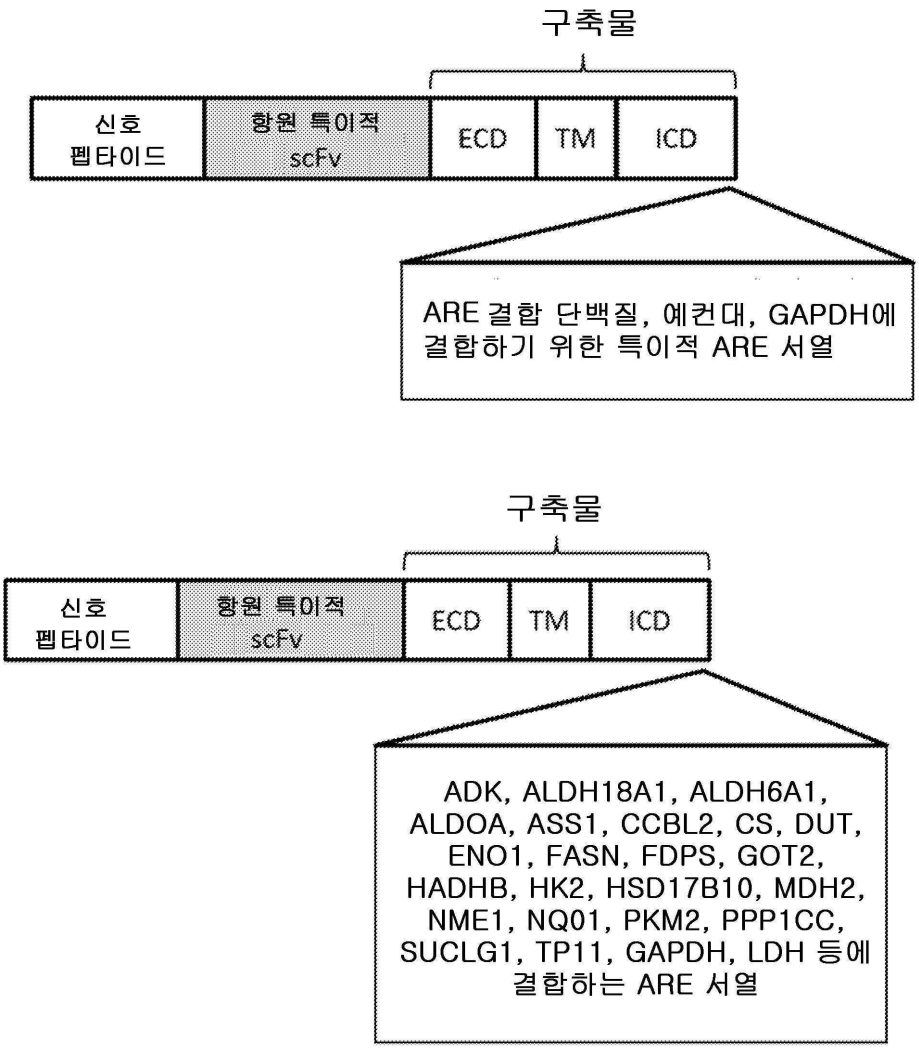
도면33d


캐스파제 -CAR
대조군
100
80
60
40
20
0
% 특이적 용해
1:10
1:3
1:1
3:1
10:1
E:T 비

도면33e


캐스파제 -CAR
비치료
100
50
0
퍼센트 생존
0
50
100
150
200
경과된 일수

도면34a


구축물
신호 펩타이드
항원 특이적 scFv
ECD
TM
ICD
ARE 결합 단백질, 예컨대, GAPDH에 결합하기 위한 특이적 ARE 서열
구축물
신호 펩타이드
항원 특이적 scFv
ECD
TM
ICD
ADK, ALDH18A1, ALDH6A1, ALDOA, ASS1, CCBL2, CS, DUT, ENO1, FASN, FDPS, GOT2, HADHB, HK2, HSD17B10, MDH2, NME1, NQ01, PKM2, PPP1CC, SUCLG1, TP11, GAPDH, LDH 등에 결합하는 ARE 서열

도면34b

염증 대사 전환 구축물

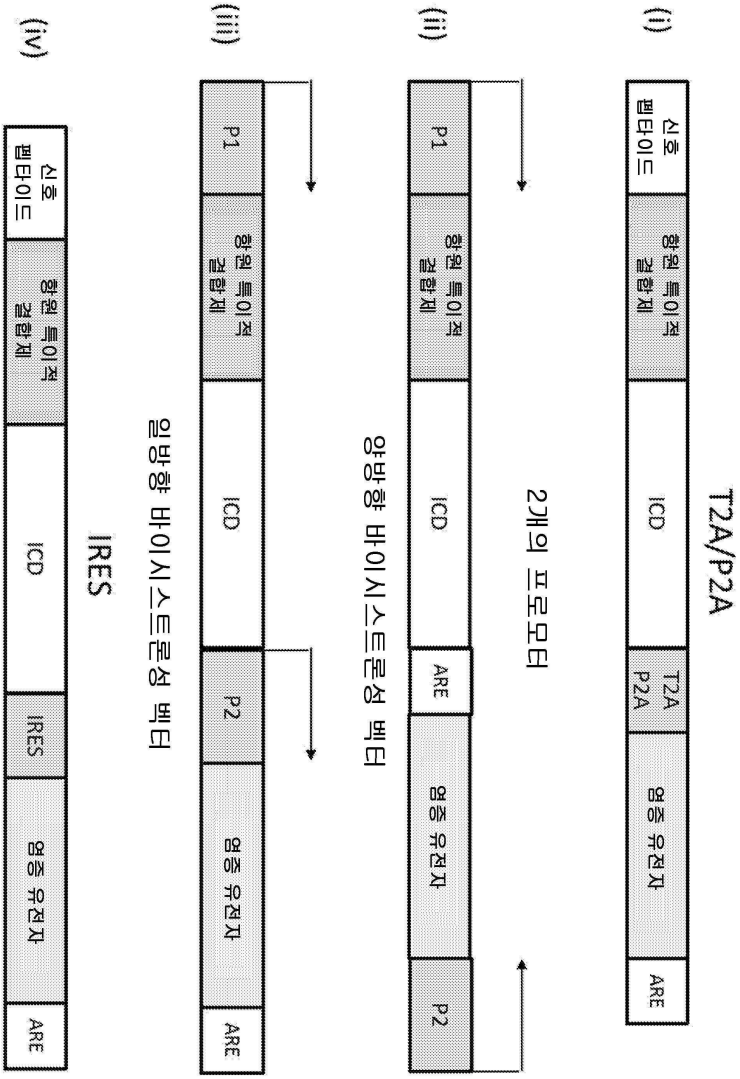
신호 펩타이드

관심 있는 단백질

관심 있는 단백질, 예컨대, 인터류킨 12, 2형 인터페론, 1형 인터페론, 염증유발 매개자, 가용성 인자, 과립, 용해성 단백질, 산화질소 등 – 항종양 활성을 유발하는 임의의 물질(항-PD1 항체 등), 호중구를 끌어들이는 FMLP 리간드

ADK, ALDH18A1, ALDH6A1, ALDOA, ASS1, CCBL2, CS, DUT, ENO1, FASN, FDPS, GOT2, HADHB, HK2, HSD17B10, MDH2, NME1, NQ01, PKM2, PPP1CC, SUCLG1, TP11, GAPDH, LDH 등에 결합하는 ARE 서열

도면34c



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> MYELOID THERAPEUTICS, INC.

<120> ENGINEERED CHIMERIC FUSION PROTEIN COMPOSITIONS AND METHODS OF USE THEREOF

<130> 56371-701.601

<140> PCT/US2020/030837

<141> 2020-04-30

<150> 16/827,381

<151> 2020-03-23

<150> 16/827,302

<151> 2020-03-23

<150> 62/841,190

<151> 2019-04-30

<150> 62/841,183

<151> 2019-04-30

<160> 50

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 1

Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Val Arg Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr His Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Ser Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Thr Arg Arg Gly Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val
115

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 2

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Tyr
65 70 75 80
Glu Asp Phe Gly Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Glu Ser Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 3

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 3

Leu Tyr Cys Arg Arg Leu Lys Ile Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr

1 5 10 15
Ser Tyr Glu Lys Ser Asp Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn
20 25 30
Gln Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys His Glu Lys Pro Pro Gln
35 40 45

<210> 4

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 4

Tyr Glu Asp Met Arg Gly Ile Leu Tyr Ala Ala Pro Gln Leu Arg Ser

1 5 10 15

Ile Arg Gly Gln Pro Gly Pro Asn His Glu Glu Asp Ala Asp Ser Tyr

20 25 30

Glu Asn Met

35

<210> 5

<211> 62

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 5

Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn Lys Ala Pro His Pro Lys Gln

1 5 10 15

Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr

20 25 30

Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln

35 40 45

Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser Val Gln Glu Arg Gln

50 55 60

<210> 6

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 6

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu

1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr

20

<210> 7

<211> 62

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 7

Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe

1 5 10 15

Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro

20 25 30

Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys

35 40 45

Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp

50 55 60

<210> 8

<211> 130

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 8

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Gly Ser Thr
100 105 110
Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Glu Val Gln Leu
115 120 125
Val Glu
130

<210> 9
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 9
Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
1 5 10 15
Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
20 25 30
Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr
35 40 45
Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr
50 55 60

Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
65 70 75 80
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala
85 90 95
Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

100 105

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 10

Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15
Ser

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 11

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

<210> 12

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 12

Ser Gly Gly Gly

1

<210> 13

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 13

Gly Ser Gly Ser

1

<210> 14

<211> 432

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 14

Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile

1 5 10 15

Ser Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly

20 25 30

Gly Ser Val Arg Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn

35 40 45

Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

50 55 60

Met Gly Trp Ile Asn Thr His Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Ser

65 70 75 80

Phe Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala

85 90 95

Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe

100 105 110

Cys Thr Arg Arg Gly Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly

115 120 125

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser

145 150 155 160

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser

165 170 175

Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys

180 185 190

Ala Pro Lys Thr Leu Ile Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Glu Ser Gly Val

195 200 205

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr

210 215 220

Ile Ser Ser Leu Gln Tyr Glu Asp Phe Gly Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln

225 230 235 240

Tyr Asp Glu Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile

245 250 255

Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr

260 265 270

Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr

275 280 285

Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro

290 295 300

Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val

305 310 315 320

His Thr Arg Gly Leu Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr

325 330 335

Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Arg

340 345 350

Leu Lys Ile Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr Glu Lys Ser

355 360 365

Asp Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu

370 375 380

Thr Leu Lys His Glu Lys Pro Pro Gln Gly Ser Gly Ser Tyr Glu Asp

385 390 395 400

Met Arg Gly Ile Leu Tyr Ala Ala Pro Gln Leu Arg Ser Ile Arg Gly

405 410 415

Gln Pro Gly Pro Asn His Glu Glu Asp Ala Asp Ser Tyr Glu Asn Met

420 425 430

<210> 15

<211> 436

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 15

Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile

1 5 10 15

Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val

20 25 30

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr

35 40 45

Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu

50 55 60

Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser

65 70 75 80

Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln

85 90 95

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro

100 105 110

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Gly Ser

115 120 125

Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Glu Val Gln

130 135 140

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg

145 150 155 160

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

210 215 220
Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp
225 230 235 240
Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
245 250 255
Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Leu Ser Asn
260 265 270
Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys

275 280 285
Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile
290 295 300
Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala
305 310 315 320
Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro
325 330 335
Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu

340 345 350
Tyr Cys Arg Arg Leu Lys Ile Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser
355 360 365
Tyr Glu Lys Ser Asp Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln
370 375 380
Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys His Glu Lys Pro Pro Gln Gly Ser Gly
385 390 395 400
Ser Tyr Glu Asp Met Arg Gly Ile Leu Tyr Ala Ala Pro Gln Leu Arg

405 410 415

Ser Ile Arg Gly Gln Pro Gly Pro Asn His Glu Glu Asp Ala Asp Ser

420 425 430

Tyr Glu Asn Met

435

<210> 16

<211> 454

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 16

Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile

1 5 10 15

Ser Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly

20 25 30

Gly Ser Val Arg Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn

35 40 45

Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

50 55 60

Met Gly Trp Ile Asn Thr His Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Ser

65 70 75 80

Phe Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala

85 90 95

Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe

100 105 110

Cys Thr Arg Arg Gly Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly

115 120 125

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser

145 150 155 160

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

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr
210 215 220
Ile Ser Ser Leu Gln Tyr Glu Asp Phe Gly Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln
225 230 235 240
Tyr Asp Glu Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
245 250 255
Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr
260 265 270

Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr
275 280 285
Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro
290 295 300
Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val
305 310 315 320
His Thr Arg Gly Leu Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr
325 330 335

Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Leu
340 345 350
Lys Ile Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr Glu Lys Ser Asp
355 360 365
Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu Thr
370 375 380
Leu Lys His Glu Lys Pro Pro Gln Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr
385 390 395 400

Asn Lys Ala Pro His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro

405 410 415

Asp Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu

420 425 430

His Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile

435 440 445

Ser Val Gln Glu Arg Gln

450

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 17

Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile

1 5 10 15

Ser

<210> 18

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 18

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val

20 25

<210> 19

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 19

Ile Leu Leu Pro Leu Ile Ile Gly Leu Ile Leu Leu Gly Leu Leu Ala
1 5 10 15

Leu Val Leu Ile Ala Phe Cys Ile Ile
20 25

<210> 20

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 20

Leu Tyr Cys Arg Leu Lys Ile Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser
1 5 10 15

Tyr Glu Lys Ser Asp Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln
20 25 30

Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys His Glu Lys Pro Pro Gln
35 40 45

<210> 21

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 21

Gln Arg Trp Lys Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr
1 5 10 15

Pro Glu Lys Glu Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala
20 25 30

Pro Asn Pro Ser Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly
35 40 45

Phe Ser Pro Val Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr

50 55 60

Pro Gly Asp Cys Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro
65 70 75 80

Pro Tyr Gln Gly Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp
85 90 95

Pro Ile Pro Asn Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro
100 105 110

Gln Ser Leu Asp Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu

115 120 125

Asn Val Pro Pro Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu
130 135 140

Ser Asp His Glu Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu
145 150 155 160

Arg Glu Ala Gln Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro
165 170 175

Arg Arg Glu Ala Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met

180 185 190

Asp Leu Leu Gly Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro
195 200 205

Ala Ala Leu Pro Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg
210 215

<210> 22

<211> 171

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 22

Pro Leu Cys Leu Gln Arg Glu Ala Lys Val Pro His Leu Pro Ala Asp
1 5 10 15

Lys Ala Arg Gly Thr Gln Gly Pro Glu Gln Gln His Leu Leu Ile Thr
20 25 30
Ala Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser Ala Leu
35 40 45
Asp Arg Arg Ala Pro Thr Arg Asn Gln Pro Gln Ala Pro Gly Val Glu
50 55 60
Ala Ser Gly Ala Gly Glu Ala Arg Ala Ser Thr Gly Ser Ser Asp Ser
65 70 75 80

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

Glu Thr Pro Glu Thr Leu Leu Gly Ser Thr Glu Glu Lys Pro Leu Pro
145 150 155 160
Leu Gly Val Pro Asp Ala Gly Met Lys Pro Ser
165 170

<210> 23
<211> 211
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide
<400> 23
Met Ser Asn Gly Tyr Ser Thr Asp Glu Asn Phe Arg Tyr Leu Ile Ser
1 5 10 15
Cys Phe Arg Ala Arg Val Lys Met Tyr Ile Gln Val Glu Pro Val Leu

20 25 30
Asp Tyr Leu Thr Phe Leu Pro Ala Glu Val Lys Glu Gln Ile Gln Arg

35 40 45

Thr Val Ala Thr Ser Gly Asn Met Gln Ala Val Glu Leu Leu Leu Ser

50 55 60

Thr Leu Glu Lys Gly Val Trp His Leu Gly Trp Thr Arg Glu Phe Val

65 70 75 80

Glu Ala Leu Arg Arg Thr Gly Ser Pro Leu Ala Ala Arg Tyr Met Asn

85 90 95

Pro Glu Leu Thr Asp Leu Pro Ser Pro Ser Phe Glu Asn Ala His Asp

100 105 110

Glu Tyr Leu Gln Leu Leu Asn Leu Leu Gln Pro Thr Leu Val Asp Lys

115 120 125

Leu Leu Val Arg Asp Val Leu Asp Lys Cys Met Glu Glu Glu Leu Leu

130 135 140

Thr Ile Glu Asp Arg Asn Arg Ile Ala Ala Ala Glu Asn Asn Gly Asn

145 150 155 160

Glu Ser Gly Val Arg Glu Leu Leu Lys Arg Ile Val Gln Lys Glu Asn

165 170 175

Trp Phe Ser Ala Phe Leu Asn Val Leu Arg Gln Thr Gly Asn Asn Glu

180 185 190

Leu Val Gln Glu Leu Thr Gly Ser Asp Cys Ser Glu Ser Asn Ala Glu

195 200 205

Ile Glu Asn

210

<210> 24

<211> 607

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 24

Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile

1 5 10 15

Ser Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly
20 25 30
Gly Ser Val Arg Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn
35 40 45

Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
50 55 60
Met Gly Trp Ile Asn Thr His Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Ser
65 70 75 80
Phe Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala
85 90 95
Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe
100 105 110

Cys Thr Arg Arg Gly Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
115 120 125
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
145 150 155 160
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
165 170 175

Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys
180 185 190
Ala Pro Lys Thr Leu Ile Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Glu Ser Gly Val
195 200 205
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr
210 215 220
Ile Ser Ser Leu Gln Tyr Glu Asp Phe Gly Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln
225 230 235 240

Tyr Asp Glu Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
245 250 255
Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr

260 265 270

Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr

275 280 285

Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro

290 295 300

Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val

305 310 315 320

His Thr Arg Gly Leu Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr

325 330 335

Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Leu

340 345 350

Lys Ile Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr Glu Lys Ser Asp

355 360 365

Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu Thr

370 375 380

Leu Lys His Glu Lys Pro Pro Gln Gly Ser Gly Ser Met Ser Asn Gly

385 390 395 400

Tyr Ser Thr Asp Glu Asn Phe Arg Tyr Leu Ile Ser Cys Phe Arg Ala

405 410 415

Arg Val Lys Met Tyr Ile Gln Val Glu Pro Val Leu Asp Tyr Leu Thr

420 425 430

Phe Leu Pro Ala Glu Val Lys Glu Gln Ile Gln Arg Thr Val Ala Thr

435 440 445

Ser Gly Asn Met Gln Ala Val Glu Leu Leu Leu Ser Thr Leu Glu Lys

450 455 460

Gly Val Trp His Leu Gly Trp Thr Arg Glu Phe Val Glu Ala Leu Arg

465 470 475 480

Arg Thr Gly Ser Pro Leu Ala Ala Arg Tyr Met Asn Pro Glu Leu Thr

485 490 495

Asp Leu Pro Ser Pro Ser Phe Glu Asn Ala His Asp Glu Tyr Leu Gln

500 505 510

Leu Leu Asn Leu Leu Gln Pro Thr Leu Val Asp Lys Leu Leu Val Arg
515 520 525

Asp Val Leu Asp Lys Cys Met Glu Glu Glu Leu Leu Thr Ile Glu Asp
530 535 540

Arg Asn Arg Ile Ala Ala Ala Glu Asn Asn Gly Asn Glu Ser Gly Val
545 550 555 560

Arg Glu Leu Leu Lys Arg Ile Val Gln Lys Glu Asn Trp Phe Ser Ala
565 570 575

Phe Leu Asn Val Leu Arg Gln Thr Gly Asn Asn Glu Leu Val Gln Glu
580 585 590

Leu Thr Gly Ser Asp Cys Ser Glu Ser Asn Ala Glu Ile Glu Asn
595 600 605

<210> 25

<211> 615

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 25

Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile
1 5 10 15

Ser Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly
20 25 30

Gly Ser Val Arg Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn
35 40 45

Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
50 55 60

Met Gly Trp Ile Asn Thr His Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Ser
65 70 75 80

Phe Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala
85 90 95

Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe

100 105 110

Cys Thr Arg Arg Gly Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly

115 120 125

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser

145 150 155 160

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser

165 170 175

Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys

180 185 190

Ala Pro Lys Thr Leu Ile Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Glu Ser Gly Val

195 200 205

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr

210 215 220

Ile Ser Ser Leu Gln Tyr Glu Asp Phe Gly Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln

225 230 235 240

Tyr Asp Glu Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile

245 250 255

Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr

260 265 270

Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr

275 280 285

Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro

290 295 300

Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val

305 310 315 320

His Thr Arg Gly Leu Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr

325 330 335

Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Leu

340 345 350

Lys Ile Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr Glu Lys Ser Asp
355 360 365
Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu Thr
370 375 380

Leu Lys His Glu Lys Pro Pro Gln Gly Ser Gly Ser Gln Arg Trp Lys
385 390 395 400
Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu
405 410 415
Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
420 425 430
Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val
435 440 445

Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys
450 455 460
Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
465 470 475 480
Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn
485 490 495
Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp
500 505 510

Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro
515 520 525
Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu
530 535 540
Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
545 550 555 560
Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala
565 570 575

Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly
580 585 590
Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro

595 600 605

Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg

610 615

<210> 26

<211> 567

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 26

Met Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile

1 5 10 15

Ser Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly

20 25 30

Gly Ser Val Arg Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn

35 40 45

Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp

50 55 60

Met Gly Trp Ile Asn Thr His Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Ser

65 70 75 80

Phe Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala

85 90 95

Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe

100 105 110

Cys Thr Arg Arg Gly Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly

115 120 125

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

130 135 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser

145 150 155 160

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser

165 170 175

Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys
180 185 190
Ala Pro Lys Thr Leu Ile Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Glu Ser Gly Val

195 200 205
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr
210 215 220
Ile Ser Ser Leu Gln Tyr Glu Asp Phe Gly Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln
225 230 235 240
Tyr Asp Glu Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
245 250 255
Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr

260 265 270
Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr
275 280 285
Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro
290 295 300
Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val
305 310 315 320
His Thr Arg Gly Leu Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr

325 330 335
Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Arg Leu
340 345 350
Lys Ile Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr Glu Lys Ser Asp
355 360 365
Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu Thr Tyr Glu Thr
370 375 380
Leu Lys His Glu Lys Pro Pro Gln Gly Ser Gly Ser Pro Leu Cys Leu

385 390 395 400
Gln Arg Glu Ala Lys Val Pro His Leu Pro Ala Asp Lys Ala Arg Gly
405 410 415
Thr Gln Gly Pro Glu Gln Gln His Leu Leu Ile Thr Ala Pro Ser Ser

420 425 430

Ser Ser Ser Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser Ala Leu Asp Arg Arg Ala

435 440 445

Pro Thr Arg Asn Gln Pro Gln Ala Pro Gly Val Glu Ala Ser Gly Ala

450 455 460

Gly Glu Ala Arg Ala Ser Thr Gly Ser Ser Asp Ser Ser Pro Gly Gly

465 470 475 480

His Gly Thr Gln Val Asn Val Thr Cys Ile Val Asn Val Cys Ser Ser

485 490 495

Ser Asp His Ser Ser Gln Cys Ser Ser Gln Ala Ser Ser Thr Met Gly

500 505 510

Asp Thr Asp Ser Ser Pro Ser Glu Ser Pro Lys Asp Glu Gln Val Pro

515 520 525

Phe Ser Lys Glu Glu Cys Ala Phe Arg Ser Gln Leu Glu Thr Pro Glu

530 535 540

Thr Leu Leu Gly Ser Thr Glu Glu Lys Pro Leu Pro Leu Gly Val Pro

545 550 555 560

Asp Ala Gly Met Lys Pro Ser

565

<210> 27

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 27

Arg Leu Lys Ile Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr Glu Lys

1 5 10 15

Ser Asp Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu Thr Tyr

20 25 30

Glu Thr Leu Lys His Glu Lys Pro Pro Gln

35 40

<210> 28

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 28

Arg Leu Lys Ile Gln Val Arg Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr Glu Lys
1 5 10 15
Ser Asp Gly Val Tyr Thr Gly Leu Ser Thr Arg Asn Gln Glu Thr Tyr
20 25 30
Glu Thr Leu Lys His Glu Lys Pro Pro Gln
35 40

<210> 29

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide

<400> 29

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu

1 5 10 15
Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
20

<210> 30

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 30

Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe
1 5 10 15

Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro
20 25 30

Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys
35 40 45
Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Ile Tyr
50 55 60
Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu
65 70 75 80
Val Ile Thr Leu Tyr Cys
85

<210> 31
<211> 83
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 31
Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe
1 5 10 15
Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro
20 25 30
Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys
35 40 45
Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Ile Tyr

50 55 60
Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu
65 70 75 80
Val Ile Thr

<210> 32
<211> 255
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 32

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Gly Ser Thr
100 105 110

Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Glu Val Gln Leu
115 120 125

Val Glu Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
130 135 140

Gly Gly Ser Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
145 150 155 160

Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln
165 170 175

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn
180 185 190

Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
195 200 205

Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg

210 215 220

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly

225 230 235 240

Phe Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

245 250 255

<210> 33

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 33

Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Val Arg Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr His Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Ser Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Asp Ser Lys Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Thr Arg Arg Gly Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu

130 135 140

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln

145 150 155 160

Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
165 170 175
Pro Lys Thr Leu Ile Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Glu Ser Gly Val Pro
180 185 190

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile
195 200 205
Ser Ser Leu Gln Tyr Glu Asp Phe Gly Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
210 215 220
Asp Glu Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
225 230 235 240

<210> 34
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 34
Ile Tyr Leu Ile Ile Gly Ile Cys Gly Gly Gly Ser Leu Leu Met Val
1 5 10 15
Phe Val Ala Leu Leu Val Phe Tyr Ile Thr
20 25

<210> 35
<211> 13
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 35
wwwuauuuau uuw 13

<210> 36
<211> 44
<212> PRT
<

213> Homo sapiens

<400> 36

Met Arg Asn Lys Lys Ile Leu Lys Glu Asp Glu Leu Leu Ser Glu Thr

1 5 10 15

Gln Gln Ala Ala Phe His Gln Ile Ala Met Glu Pro Phe Glu Ile Asn

20 25 30

Val Pro Lys Pro Lys Arg Arg Asn Gly Val Asn Phe

35 40

<210> 37

<211> 50

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Met Glu Gln Trp Asp His Phe His Asn Gln Gln Glu Asp Thr Asp Ser

1 5 10 15

Cys Ser Glu Ser Val Lys Phe Asp Ala Arg Ser Met Thr Ala Leu Leu

20 25 30

Pro Pro Asn Pro Lys Asn Ser Pro Ser Leu Gln Glu Lys Leu Lys Ser

35 40 45

Phe Lys

50

<210> 38

<211> 56

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Met Lys Val Arg Ser Ala Gly Gly Asp Gly Asp Ala Leu Cys Val Thr

1 5 10 15

Glu Glu Asp Leu Ala Gly Asp Asp Glu Asp Met Pro Thr Phe Pro Cys

20 25 30

Thr Gln Lys Gly Arg Pro Gly Pro Arg Cys Ser Arg Cys Gln Lys Asn

35 40 45

Leu Ser Leu His Thr Ser Val Arg

50 55

<210> 39

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 39

Gly Ala Ala Pro Ala Ala Ala Pro Ala Lys Gln Glu Ala Ala Ala Pro

1 5 10 15

Ala Pro Ala Ala Lys Ala Glu Ala Pro Ala Ala Ala Pro Ala Ala Lys

20 25 30

Ala

<210> 40

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(20)

<223> This sequence may encompass 1-4 "Gly Gly Gly Gly Ser" repeating units

<220>

<223> See specification as filed for detailed description of

substitutions and preferred embodiments

<400> 40

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser

20

<210> 41

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 41

Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 42

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 42

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 43

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(20)

<223> This sequence may encompass 1-4 "Glu Ala Ala Ala Lys"

repeating units

<220>

<223> See specification as filed for detailed description of

substitutions and preferred embodiments

<400> 43

Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu

1 5 10 15

Ala Ala Ala Lys

20

<210> 44

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 44

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 45

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 45

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 46

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 46

Glu Ala Ala Ala Lys

1 5

<210> 47

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 47

Ser Gly Gly Ser

1

<210> 48

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 48

Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser

1 5 10 15

<210> 49

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(21)

<223> This sequence may encompass 1, 3, or 7 "Gly Gly Ser"

repeating units

<400> 49

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Ser

20

<210> 50

<211> 12

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

hinge region sequence

<400> 50

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10