(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0009461
(43) 공개일자 2024년01월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0787 (2010.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 14/725* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) *C12N 15/86* (2006.01)
C12N 5/0786 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0642 (2013.01)
A61K 39/4614 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2023-7043356
(22) 출원일자(국제) 2022년05월19일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년12월14일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/030109
(87) 국제공개번호 WO 2022/246112
국제공개일자 2022년11월24일
(30) 우선권주장
63/190,387 2021년05월19일 미국(US)

(71) 출원인
유니버시티 오브 써던 캘리포니아
미국, 캘리포니아주 90015, 로스앤젤레스, 사우스 올리브 스트리트 1150, 스위트 2300
(72) 발명자
잉 치-롱
미국 90033 캘리포니아주 로스앤젤레스 비씨씨512 산 파블로 스트리트 1425 유니버시티 오브 써던 캘리포니아 케크 스쿨 오브 메디슨
유에 시
미국 90033 캘리포니아주 로스앤젤레스 비씨씨512 산 파블로 스트리트 1425 유니버시티 오브 써던 캘리포니아 케크 스쿨 오브 메디슨
징 수에유안
미국 90033 캘리포니아주 로스앤젤레스 비씨씨512 산 파블로 스트리트 1425 유니버시티 오브 써던 캘리포니아 케크 스쿨 오브 메디슨
(74) 대리인
김진희, 김태홍

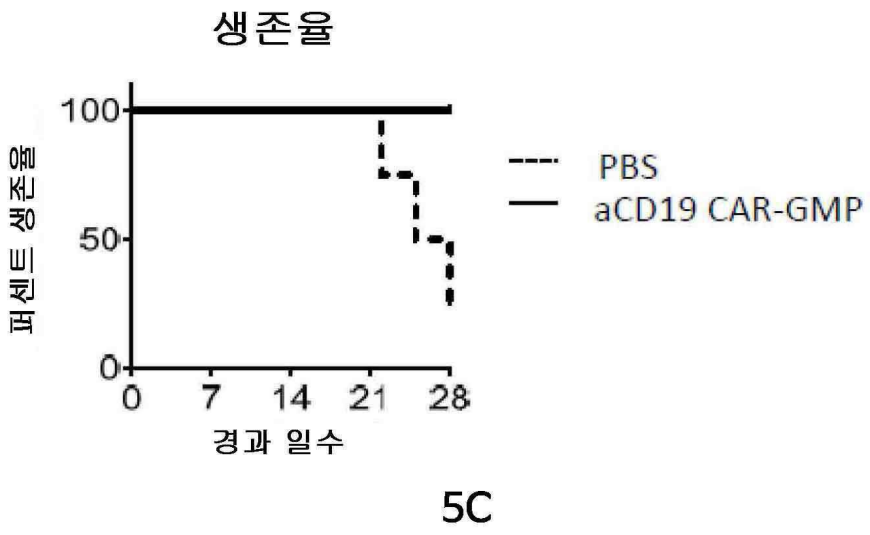
전체 청구항 수 : 총 30 항

(54) 발명의 명칭 **암 면역요법을 위한 키메라 항원 수용체-변형된 과립구-대식세포 전구세포**

(57) 요 약

본 개시 내용은 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 과립구-대식세포 전구세포(GMP)를 유전적으로 조작하는 방법, 및 암 면역요법을 포함하는 이의 용도를 제공한다. 특정 실시 양태에서, 본 개시 내용은 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 GMP를 유전적으로 조작하는 방법으로서, CAR을 포함하는 벡터를 GMP에 도입하여 CAR을 발현하는 GMP(CAR-GMP)를 형성하는 단계; 규정된 배양 조건에서 복수 계대를 위해 CAR-GMP를 확장 및 배양하여 CAR-GMP 집단을 생성하는 단계; 및 시험관 내에서 CAR-GMP 집단이 CAR을 발현하는 과립구, 대식세포 또는 수지상 세포로 분화하도록 유도하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도5c



5C

(52) CPC특허분류
A61K 39/4631 (2023.05)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 16/2803 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 5/0645 (2023.05)
C12N 2501/22 (2013.01)
C12N 2506/11 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 과립구-대식세포 전구세포(GMP)를 유전적으로 조작하는 방법으로서,

CAR을 포함하는 벡터를 GMP에 도입하여 CAR을 발현하는 GMP(CAR-GMP)를 형성하는 단계;

규정된 배양 조건에서 CAR-GMP를 복수 계대를 위해 확장 및 배양하여 CAR-GMP 집단을 생성하는 단계; 및

시험관 내에서 CAR-GMP 집단이, CAR을 발현하는 과립구, 대식세포 또는 수지상 세포로 분화하도록 유도하는 단계

를 포함하는, CAR을 발현하도록 GMP를 유전적으로 조작하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, GMP는 줄기세포로부터 획득되는 것인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 줄기세포는 조혈 줄기세포인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 조혈 줄기세포는 대상체의 골수로부터 단리되는 것인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 대상체는 포유류 대상체인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 대상체는 인간 환자인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 있어서, CAR은 항원에 결합할 수 있는 세포 외 도메인, 막 횡단 도메인, 및 포식작용 및/또는 염증유발성 사이토카인 분비를 증가시킴으로써 과립구, 대식세포 및 수지상 세포의 항종양 활성을 증가시키도록 설계된 적어도 하나의 세포 내 도메인을 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 하나의 항에 있어서, 벡터는 바이러스 벡터인 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 바이러스 벡터는 복제성 또는 비복제성일 수 있고, 아데노바이러스 벡터, 아데노 관련 바이러스(AAV) 벡터, 홍역 벡터, 헤르페스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 랍도바이러스 벡터, 레오바이러스 벡터, 세네카 밸리 바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터, 파보바이러스 벡터, 또는 알파바이러스 벡터일 수 있는 것인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 하나의 항에 있어서, 규정된 배양 조건은

(i) 성장 인자,

(ii) B-Raf 키나아제 억제제, 및

(iii) Wnt 활성화제 및/또는 GSK-3 억제제

를 포함하는 배양 배지에서 CAR-GMP를 배양하는 단계를 포함하며,

CAR-GMP는 복수회 세포 계대 및/또는 클론 확장을 거친 후에도 실질적으로 형태학적으로 변하지 않은 상태로 유지되는 것인 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 배양 배지는 DMEM/F12 및 신경 기초 배지를 포함하는 것인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 배양 배지는 DMEM/F12 및 신경 기초 배지를 약 5:1 내지 약 1:5의 비로 포함하는 것인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 배양 배지는 DMEM/F12 및 신경 기초 배지를 약 1:1의 비로 포함하는 것인 방법.

청구항 15

제11항 내지 제14항 중 어느 하나의 항에 있어서, 배양 배지는 인슐린, 트랜스페린, 소 혈청 알부민(BSA) 분획 V, 푸트레신, 아셀렌산나트륨, DL-α 토코페롤, 및 리놀렌산 및/또는 리놀레산으로부터 선택된 하나 이상의 보충제를 포함하는 것인 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 배양 배지는 인슐린, 트랜스페린, BSA 분획 V, 푸트레신, 아셀렌산나트륨, DL-α 토코페롤, 및 리놀렌산 및/또는 리놀레산으로 보충되는 것인 방법.

청구항 17

제11항 내지 제16항 중 어느 하나의 항에 있어서, 성장 인자는 줄기세포 인자(SCF)인 방법.

청구항 18

제11항 내지 제17항 중 어느 하나의 항에 있어서, B-Raf 키나아제 억제제는 GDC-0879, PLX4032, GSK2118436, BMS-908662, LGX818, PLX3603, RAF265, RO5185426, 베무라페닙, PLX8394, SB590885 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 19

제11항 내지 제17항 중 어느 하나의 항에 있어서, Wnt 활성화제는 SKL 2001, BML-284, WAY 262611, CAS 853220-52-7, QS11 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 20

제11항 내지 제17항 중 어느 하나의 항에 있어서, GSK-3 억제제는 CHIR99021, CHIR98014, SB216763, BIO, A1070722, AR-A014418 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 하나의 항에 있어서,

CAR-GMP를 대식세포 콜로니-자극 인자(MCSF)를 포함하는 대식세포 분화 배지로 배양하는 단계를 포함하는

CAR-GMP를 CAR을 발현하는 대식세포로 분화하도록 유도하는 것인 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 대식세포 분화 배지는 RPMI 1640, 우태 혈청(FBS) 및 MCSF를 포함하는 것인 방법.

청구항 23

제21항 또는 제22항의 방법에 의해 제조된 CAR를 발현하는 대식세포.

청구항 24

제1항 내지 제20항 중 어느 하나의 항에 있어서,

GMP를 과립구 콜로니 자극 인자(GCSF)를 포함하는 과립구 분화 배지로 배양하는 단계를 포함하는

CAR-GMP를 CAR을 발현하는 과립구로 분화시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 과립구 분화 배지는 RPMI 1640, FBS 및 GCSF를 포함하는 것인 방법.

청구항 26

제24항 또는 제25항의 방법에 의해 제조된 CAR을 발현하는 과립구.

청구항 27

제21항의 대식세포 또는 제24항의 과립구를 포함하는 조성물을 암을 가진 대상체에게 투여하는, 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 대식세포 또는 과립구를 사용하여 암을 가진 대상체를 치료하기 위한 면역치료 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 조성물은 정맥 내로 또는 종양 간에 투여되는 것인 면역치료 방법.

청구항 29

제27항 또는 제28항에 있어서, 대상체는 부신피질 암종, AIDS 관련 암, AIDS 관련 림프종, 항문암, 항문직장암, 항문관암, 충수암, 소아 소뇌 성상세포종, 소아 대뇌 성상세포종, 기저 세포 암종, 피부암(비흑색종), 담도암, 간외 담관암, 간내 담관암, 방광암, 비뇨 방광암, 뼈 및 관절 암, 골육종 및 악성 섬유성 조직구종, 뇌암, 뇌종양, 뇌간 신경교종, 소뇌 성상세포종, 대뇌 성상세포종/악성 신경교종, 상의세포종, 수모세포종, 천막상 원시 신경외배엽 종양, 시각 경로 및 시상하부 신경교종, 삼중 음성 유방암을 포함한 유방암, 기관지 선종/카르시노이드, 카르시노이드 종양, 위장관, 신경계암, 신경계 림프종, 중추 신경계암, 중추신경계 림프종, 자궁경부암, 소아암, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 골수증식성 장애, 결장암, 대장암, 피부 T 세포 림프종, 림프계 신생물, 균상 식육종, 세자리 증후군, 자궁내막암, 식도암, 두개외 생식세포 종양, 생식선외 생식세포 종양, 간외 담관암, 안암, 안내 흑색종, 망막모세포종, 담낭암, 위(위장)암, 위장관 카르시노이드 종양, 위장관 간질 종양(GIST), 생식세포 종양, 난소 생식세포 종양, 임신성 영양막 종양 신경교종, 두경부암, 간세포(간)암, 호지킨 림프종, 하인두암, 안구내 흑색종, 안구암, 도세포 종양(내분비 췌장), 카포시 육종, 신장암, 신세포암, 후두암, 급성 림프모구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 털세포 백혈병, 구순 및 구강 암(lip and oral cavity cancer), 간암, 폐암, 비소세포 폐암, 소세포 폐암, AIDS 관련 림프종, 비호지킨 림프종, 원발성 중추신경계 림프종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 수모세포종, 흑색종, 안내(눈) 흑색종, 메르켈 세포 암종, 악성 중피종, 중피종, 전이성 편평 경부암, 입암, 설암, 다발 내분비샘 종양 증후군, 균상 식육종, 골수이형성 증후군, 골수이형성/골수증식성 질환, 만성 골수성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 다발성 골수종, 만성 골수증식성 장애, 비인두암, 신경모세포종, 경구암, 구강암, 구인두암, 난소암, 난소 상피암, 난소 저악성 잠재 종양, 췌장암, 도세포 췌장암, 부비동 및 비강 암, 부갑상선암, 음경암, 인두암, 크롬친화세포종, 송과체모세포종 및 천막상 원시 신경외배엽 종양, 뇌하수체 종양, 형질세포 신생물/다발성 골수종, 흉막폐모세포종, 전립선암, 직장암, 신우 및 요관, 이행세포암, 망막모세포종, 횡문근육종, 타액선암, 유잉 육종계 종양, 연조직 육종, 자궁암, 자궁육종, 피부암(비흑색종), 피부암(흑색종), 유두종, 광선 각화증 및 각질가시세포종, 메르켈 세포 피부 암종, 소장암, 연조직 육종, 편평 세포 암종, 위(위장)암, 천막상 원시 신경외배엽 종양, 고환암, 인후암, 흉선종, 흉선종 및 흉선암종, 갑상선암, 신우 및 요관 및 기타 비뇨 기관의 이행세포암, 임신성 영양막 종양, 요도암, 자궁내막 자궁암, 자궁 육종, 자궁체부암, 질암, 외음부암 및 윌름스 종양으로부터 선택된 암을 갖는 것인 면역치료 방법.

청구항 30

제27항 내지 제29항 중 어느 하나의 항에 있어서, 암을 가진 대상체에게 하나 이상의 항암제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 면역치료 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. §119 하에 2021년 5월 19일에 출원된 가출원 일련 번호 63/190,387의 우선권을 주장하며, 그 개시 내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0003] **기술분야**

[0004] 본 개시 내용은 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 과립구-대식세포 전구세포(GMP)를 유전적으로 조작하는 방법, 및 암 면역요법을 포함하는 이의 용도를 제공한다.

배 경 기 술

[0005] 과립구, 대식세포 및 수지상 세포는 인간의 선천성 면역계의 필수 구성요소이다. 이들은 병원균에 대한 1차 방어선이자 우리 몸의 항상성을 유지하고 감염, 대사질환 및 암을 비롯한 각종 질환을 예방하는 데 핵심적인 역할을 한다. 이들 세포는 골수의 공통 전구세포인 과립구-대식세포 전구세포(GMP)로부터 유래한다.

발명의 내용

[0006] **요약**

[0007] 과립구-단핵구 전구세포(GMP)는 선천성 면역계의 두 가지 주요 구성요소인 과립구 및 대식세포의 공통 전구세포이다. GMP 및 그 유도체의 장기간 확장을 수행할 수 없기 때문에 이러한 면역 세포의 치료 적용이 크게 제한되어왔다. 본원에 제시된 연구에서, 균질한 GMP는 완전히 정의된 조건에서 장기간 기하급수적으로 확장될 수 있음을 보였다. 확장된 GMP는 기능성 과립구와 대식세포로 분화하는 능력을 포함하여 GMP의 주요 특징을 유지하였다. 확장된 GMP의 이식은 면역결핍 마우스의 박테리아 감염을 효과적으로 예방하였다. 더욱이, 확장된 GMP는 유전적으로 조작되어 암세포를 특이적으로 포식하는 대식세포를 생산할 수 있다. 본원에 기재된 방법 및 조성물은 기하급수적인 확장 및 유전적으로 조작된 GMP를 가능하게 하였다. 본 개시 내용의 방법 및 조성물에 의해 제조된 GMP는 광범위한 질환, 특히 감염성 질환 및 암을 치료하기 위한 면역요법의 개발에 유용하다.

[0008] 특정 실시 양태에서, 본 개시 내용은 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 과립구-대식세포 전구세포(GMP)를 유전적으로 조작하는 방법으로서, CAR을 포함하는 벡터를 GMP에 도입하여 CAR(CAR)을 발현하는 GMP(CAR-GMP)를 형성하는 단계; 규정된 배양 조건에서 복수 계대를 위해 CAR-GMP를 확장 및 배양하여 CAR-GMP 집단을 생성하는 단계; 및 시험관 내에서 CAR-GMP 집단이 CAR을 발현하는 과립구, 대식세포 또는 수지상 세포로 분화하도록 유도하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 추가 실시 양태에서, GMP는 줄기세포로부터 획득된다. 추가 실시 양태에서, 줄기세포는 조혈 줄기세포이다. 다른 실시 양태에서, 조혈 줄기세포는 대상체의 골수로부터 단리된다. 또 다른 실시 양태에서, 대상체는 포유류 대상체이다. 추가 실시 양태에서, 대상체는 인간 환자이다. 추가 실시 양태에서, CAR은 항원에 결합할 수 있는 세포 외 도메인, 막 횡단 도메인, 및 포식작용 및/또는 염증유발성 사이토카인 분비를 증가시킴으로써 과립구, 대식세포 및 수지상 세포의 항종양 활성을 증가시키도록 설계된 적어도 하나의 세포 내 도메인을 포함한다. 다른 실시 양태에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 또 다른 실시 양태에서, 바이러스 벡터는 복제성 또는 비복제성일 수 있고, 아데노바이러스 벡터, 아데노 관련 바이러스(AAV) 벡터, 홍역 벡터, 헤르페스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 랍도바이러스 벡터, 레오바이러스 벡터, 세네카 밸리 바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터, 파보바이러스 벡터 또는 알파바이러스 벡터일 수 있다. 특정 실시 양태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터이다. 다른 실시 양태에서, 규정된 배양 조건은 (i) 성장 인자, (ii) B-Raf 키나아제 억제제, 및 (iii) Wnt 활성화제 및/또는 GSK-GMP3 억제제를 포함하는 배양 배지에서 CAR-GMP를 배양하는 단계를 포함하며, 여기서 CAR-GMP는 복수회 세포 계대 및/또는 클론 확장을 거친 후에도 실질적으로 형태학적으로 변하지 않은 상태로 유지된다. 추가 실시 양태에서, 배양 배지는 DMEM/F12 및 신경 기초 배지를 포함한다. 추가 실시 양태에서, 배양 배지는 DMEM/F12 및 신경 기초 배지를 약 5:1 내지 약 1:5의 비로

포함한다. 다른 실시 양태에서, 배양 배지는 DMEM/F12 및 신경 기초 배지를 약 1:1의 비로 포함한다. 또 다른 실시 양태에서, 배양 배지는 인슐린, 트랜스페린, 소 혈청 알부민(BSA) 분획 V, 푸트레신, 아셀렌산나트륨, DL-α 토코페롤 및/또는 리놀렌산으로부터 선택된 하나 이상의 보충제를 포함한다. 추가 실시 양태에서, 배양 배지는 인슐린, 트랜스페린, BSA 분획 V, 푸트레신, 아셀렌산나트륨, DL-α 토코페롤 및 리놀렌산으로 보충된다. 특정 실시 양태에서, 성장 인자는 줄기세포 인자(SCF)이다. 다른 실시 양태에서, B-Raf 키나아제 억제제는 GDC-0879, PLX4032, GSK2118436, BMS-908662, LGX818, PLX3603, RAF265, RO5185426, 베무라페닙, PLX8394, SB590885 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시 양태에서, Wnt 활성화제는 SKL 2001, BML-284, WAY 262611, CAS 853220-52-7, QS11 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가 실시 양태에서, GSK-3 억제제는 CHIR99021, CHIR98014, SB216763, BIO, A1070722, AR-A014418 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 실시 양태에서, 규정된 배양 조건은 (i) 성장 인자; (ii) B-Raf 키나아제 억제제; (iii) 미토겐 활성화 키나아제 상호작용 단백질 키나아제 1 및 2(Mnk1/2)를 억제하는 작용제; (iv) PI3K 경로를 억제하는 작용제; (v) 경우에 따라, 하나 이상의 혈청 성분을 포함하는 배양 배지에서 CAR-GMP를 배양하는 단계를 포함하며, 여기서 CAR-GMP는 복수회 세포 계대 및/또는 클론 확장을 거친 후에도 실질적으로 형태학적으로 변하지 않은 상태가 유지된다. 추가 실시 양태에서, 배양 배지는 DMEM/F12 및 신경 기초 배지를 포함한다. 추가 실시 양태에서, 배양 배지는 DMEM/F12 및 신경 기초 배지를 약 5:1 내지 약 1:5의 비로 포함한다. 다른 실시 양태에서, 배양 배지는 DMEM/F12 및 신경 기초 배지를 약 1:1의 비로 포함한다. 또 다른 실시 양태에서, 배양 배지는 인슐린, 트랜스페린, 소 혈청 알부민(BSA) 분획 V, 푸트레신, 아셀렌산나트륨, DL-α 토코페롤 및/또는 리놀렌산으로부터 선택된 하나 이상의 보충제를 포함한다. 추가 실시 양태에서, 배양 배지는 인슐린, 트랜스페린, BSA 분획 V, 푸트레신, 아셀렌산나트륨, DL-α 토코페롤 및 리놀렌산으로 보충된다. 추가 실시 양태에서, 성장 인자는 줄기세포 인자(SCF)이다. 다른 실시 양태에서, B-Raf 키나아제 억제제는 GDC-0879, PLX4032, GSK2118436, BMS-908662, LGX818, PLX3603, RAF265, RO5185426, 베무라페닙, PLX8394, SB590885 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가 실시 양태에서, Mnk1/2를 억제하는 작용제는 CGP-57380, 세르코스포르아미드, BAY 1143269, 토미보세르팁, ETC-206, SLV-2436 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가 실시 양태에서, PI3K 경로를 억제하는 작용제는 3-메틸아데닌, LY294002, 알펠리십, 워트만닌, 케르세틴, hSMG-1 억제제 11j, 잔델리십, 알펠리십 염산염, 이델랄리십, 부팔리십, 코판리십, IPI549, 닥톨리십, 픽틸리십, SAR405, 두벨리십, 피메피노스타트, GDC-0077, PI-103, YM-20163, PF-04691502, 타셀리십, 오미팔리십, 사모톨리십, 이소르함네틴, ZATK474, 파르사클리십, 리고세르팁, AZD8186, GSK2636771, 디시테르티드, TG100-115, AS-605240, PI3K-IN-1, 닥톨리십 토실레이트, 게다톨리십, TGX-221, 움브랄리십, AZD 6482, 세라벨리십, 비미랄리십, 아피톨리십, 알파-리놀렌산, Vps34-PIK-III, PIK-93, Vps34-IN-1, CH5132799, 레니올리십, 복스탈리십, GSK1059615, 소놀리십, PKI-402, PI4KIII베타-IN-9, HS-173, BGT226 말레인산염, 픽틸리십 디메탄 설폰산염, VS-5584, IC-87114, 케르세틴 이수화물, CNX-1351, SF2523, GDC -0326, 셀레탈리십, 아칼리십, SAR-260301, ZAD-8835, GNE-317, AMG319, 네미랄리십, IITZ-01, PI-103 염산염, 오록신 B, 필라랄리십, AS-252424, 코판리십 이염산염, AMG 511, 디시테르티드 TFA, PIK-90, 테날리십, 에스쿨레틴, CGS 15943, GNE-477, PI-3065, A66, AZD3458, 진세노시드 Rk1, 소포카르핀, 부팔리십 염산염, Vps34-IN-2, 린페를리십, 아르니콜리드 D, KP372-1, CZC24832, PF- 4989216, (R)-두벨리십, PQR530, P11δ-IN-1, 움브랄리십 염산염, MTX-211, PI3K/mTOR 억제제-2, LX2343, PF-04979064, 폴리갈라사포닌 F, 글라우코칼릭신 A, NSC781406, MSC2360844, CAY10505, IPI-3063, TG 100713, BEBT-908, PI-828, 브레비안아미드 F, ETP-46321, PIK-294, SRX3207, 소포카르핀 일수화물, AS-604850, 데스메틸글리시테인, SKI V, WYE-687, NVP-QAV-572, GNE- 493, CAL-130 염산염, GS-9901, BGT226, IHMT-PI3Kδ-372, PI3Kα-IN-4, 파사클리십 염산염, PF-06843195, PI3K-IN-6, (S)-PI3Kα-IN-4, PI3K(감마)-IN-8, BAY1082439, CYH33, PI3Kɣ 억제제 2, PI3Kδ 억제제 1, PARP/PI3K-IN-1, LAS191954, PI3K-IN-9, CHMFL-PI3KD-317, PI3K/HDAC-IN-1, MSC2360844 헤미푸마레이트, PI3K-IN-2, PI3K/mTOR 억제제-1, PI3Kδ-IN-1, 유스카프산, KU-0060648, AZD 6482, WYE-687 이염산염, GSK2292767, (R)-움브랄리십, PIK-293, 이델랄리십 D5, PIK-75, 히르수테논, 케르세틴 D5, PIK-108, hSMG-1 억제제 11e, PI3K-IN-10, NVP-BAG956, PI3Kɣ 억제제 1, CAL-130, ON 146040, PI3kδ 억제제 1, PI3Kα/mTOR-IN-1, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 실시 양태에서, CAR-GMP를 대식세포 콜로니-자극 인자(MCSF)를 포함하는 대식세포 분화 배지로 배양하는 단계를 포함하여 CAR-GMP는 CAR을 발현하는 대식세포로 분화하도록 유도된다. 또 다른 실시 양태에서, 대식세포 분화 배지는 RPMI 1640, 우태 혈청(FBS) 및 MCSF를 포함한다. 대안적인 실시 양태에서, 방법은 GMP를 과립구 콜로니 자극 인자(GCSF)를 포함하는 과립구 분화 배지로 배양하는 단계를 포함하여 CAR-GMP를 CAR을 발현하는 과립구로 분화시키는 단계를 추가로 포함한다. 추가 실시 양태에서, 과립구 분화 배지는 RPMI 1640, FBS 및 GCSF를 포함한다.

[0009] 특정 실시 양태에서, 본 개시 내용은 또한 본 개시 내용의 방법에 의해 제조된 CAR을 발현하는 대식세포를 제공한다.

[0010] 특정 실시 양태에서, 본 개시 내용은 본 개시 내용의 방법에 의해 제조된 CAR을 발현하는 과립구를 추가로 제공한다.

[0011] 다른 실시 양태에서, 본 개시 내용은 CAR을 발현하는 대식세포 또는 과립구를 사용하여 암을 가진 대상체를 치료하기 위한 면역치료 방법으로서, 본 개시 내용의 방법에 의해 제조된 CAR을 발현하는 대식세포 또는 본 개시 내용의 방법에 의해 제조된 CAR을 발현하는 과립구를 포함하는 조성물을 암을 가진 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 면역치료 방법을 제공한다. 추가 실시 양태에서, 조성물은 정맥 내로 또는 종양 간에 투여된다. 추가 실시 양태에서, 대식세포 또는 과립구는 면역치료 방법으로 치료될 대상체의 줄기세포로부터의 GMP로부터 획득된다. 다른 실시 양태에서, 대상체는 부신피질 암종, AIDS 관련 암, AIDS 관련 림프종, 항문암, 항문직장암, 항문관암, 충수암, 소아 소뇌 성상세포종, 소아 대뇌 성상세포종, 기저 세포 암종, 피부암(비흑색종), 담도암, 간외 담관암, 간내 담관암, 방광암, 비뇨 방광암, 뼈 및 관절 암, 골육종 및 악성 섬유성 조직구종, 뇌암, 뇌종양, 뇌간 신경교종, 소뇌 성상세포종, 대뇌 성상세포종/악성 신경교종, 상의세포종, 수모세포종, 천막상 원시 신경외배엽 종양, 시각 경로 및 시상하부 신경교종, 삼중 음성 유방암을 포함한 유방암, 기관지 선종/카르시노이드, 카르시노이드 종양, 위장관, 신경계암, 신경계 림프종, 중추 신경계암, 중추신경계 림프종, 자궁경부암, 소아암, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 골수증식성 장애, 결장암, 대장암, 피부 T 세포 림프종, 림프계 신생물, 균상 식육종, 세자리 증후군, 자궁내막암, 식도암, 두개외 생식세포 종양, 생식선외 생식세포 종양, 간외 담관암, 안암, 안내 흑색종, 망막모세포종, 담낭암, 위(위장)암, 위장관 카르시노이드 종양, 위장관 간질 종양(GIST), 생식세포 종양, 난소 생식세포 종양, 임신성 영양막 종양 신경교종, 두경부암, 간세포(간)암, 호지킨 림프종, 하인두암, 안구내 흑색종, 안구암, 도세포 종양(내분비 췌장), 카포시 육종, 신장암, 신세포암, 후두암, 급성 림프모구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 털세포 백혈병, 구순 및 구강 암(lip and oral cavity cancer), 간암, 폐암, 비소세포 폐암, 소세포 폐암, AIDS 관련 림프종, 비호지킨 림프종, 원발성 중추신경계 림프종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 수모세포종, 흑색종, 안내(눈) 흑색종, 메르켈 세포 암종, 악성 중피종, 중피종, 전이성 편평 경부암, 입암, 설암, 다발 내분비샘 종양 증후군, 균상 식육종, 골수이형성 증후군, 골수이형성/골수증식성 질환, 만성 골수성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 다발성 골수종, 만성 골수증식성 장애, 비인두암, 신경모세포종, 경구암, 구강암, 구인두암, 난소암, 난소 상피암, 난소 저악성 잠재 종양, 췌장암, 도세포 췌장암, 부비동 및 비강 암, 부갑상선암, 음경암, 인두암, 크롬친화세포종, 송과체모세포종 및 천막상 원시 신경외배엽 종양, 뇌하수체 종양, 형질세포 신생물/다발성 골수종, 흉막폐모세포종, 전립선암, 직장암, 신우 및 요관, 이행세포암, 망막모세포종, 횡문근육종, 타액선암, 유잉 육종계 종양, 연조직 육종, 자궁암, 자궁육종, 피부암(비흑색종), 피부암(흑색종), 유두종, 광선 각화증 및 각질가시세포종, 메르켈 세포 피부 암종, 소장암, 연조직 육종, 편평 세포 암종, 위(위장)암, 천막상 원시 신경외배엽 종양, 고환암, 인후암, 흉선종, 흉선종 및 흉선암종, 갑상선암, 신우 및 요관 및 기타 비뇨 기관의 이행세포암, 임신성 영양막 종양, 요도암, 자궁내막 자궁암, 자궁 육종, 자궁체부암, 질암, 외음부암 및 윌름스 종양으로부터 선택된 암에 걸려 있다. 또 다른 실시 양태에서, 면역치료 방법은 암을 가진 대상체에게 하나 이상의 항암제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0012] [**도 1A-E**]는 조작된 SCF/2i GMP로부터 생성된 αCD19 CAR-대식세포가 인간 B-ALL 세포를 효과적으로 포식한다는 것을 입증한다. **(A)** SCF/2i GMP를 GFP mRNA로 전기천공하거나 GFP 렌티바이러스(pSin-GFP)로 형질도입하였다. GFP 발현은 형질감염 48시간 후 형광 현미경(상부 패널) 및 유세포 측정법(하부 패널)으로 분석하였다. 유세포 측정 데이터는 5회의 독립적인 실험으로부터 평균 ± SD로 표시된다. **(B)** CAG-Cas9-GFP 마우스로부터 유래된 SCF/2i GMP는 대조군 또는 GFP sgRNA로 전기천공하였고, GFP 발현은 전기천공 48시간 후 유세포 측정법으로 분석하였다. 데이터는 3회의 독립적인 실험으로부터 평균 ± SD로 표시된다. **(C)** CarP-RFP, CarPFc-19-RFP 및 CarPzFc-19-RFP의 구조를 보여주는 개략도. **(D)** SCF/2i GMP를 CarP-RFP 또는 CarPzFc19-RFP 렌티바이러스로 형질도입하고 RFP 양성 GMP를 분류하고 SCF/2i에서 추가로 확장시켰다. RFP 양성 GMP로부터 유래된 1 x 10^5개 대식세포를 항CD47 항체로 전처리되거나 전처리되지 않은 1 x 10^6개 GFP 양성 인간 B-ALL 세포와 공동 배양하였다. 공동 배양 1시간 후 세포를 PBS로 세척하고 위상차 및 형광 이미지를 촬영하였다. **(E)** **(D)**의 세포를 트립신 처리하고 GFP 및 RFP 발현을 유세포 측정법으로 분석하였다. 포식작용성 대식세포의 백분율을 정량화하였다. 데이터는 3회의 독립적인 실험으로부터 평균 ± SD로 표시된다.

[**도 2A-C**]는 GMP의 확장, 분화 및 유전적 조작을 보여준다. **(A)** GFP 표지된 이. 콜라이(*E. coli*)와 함께 1시간 동안 인큐베이션하여 GMP 유래 대식세포의 포식작용 분석. 대식세포에 의해 삼켜진 GFP 표지된 박테리아를 보여주는 대표적인 위상차 및 형광 이미지와 GFP 표지된 박테리아와 함께(빨간색) 또는 없이(파란색) 인큐베이션된 GMP 유래 대식세포의 유세포 측정 분석의 대표적인 플롯. 유세포 측정 데이터는 3회의 독립적인 실험으로부터 평균 ± SD로 표시된다. **(B)** 분화된 세포를 2 x 10^4개 세포/웰의 밀도로 96웰 플레이트에 플레이팅하고 500 ng/ml LPS로 또는 없이 6시간 동안 자극한 후 상층액의 사이토카인 분비를 ELISA로 측정하였다. 데이터는 3회의 독립적인 실험으로부터 평균 ± SD로 표시된다. **(C)** 변형된 SCF/2i에서 확장된 GMP를 CarP-RFP 또는 인간 CarPzFc19-RFP 렌티바이러스로 형질도입하였다. RFP 양성 GMP를 분류하고 변형된 SCF/2i에서 추가로 확장시켰다. RFP 양성 GMP로부터 유래된 대식세포를 1 x 10^5개 세포/웰의 밀도로 24웰 플레이트에 플레이팅하고 DMEM/10% FBS에서 밤새 배양한 후 항-CD47 항체로 전처리하거나 전처리하지 않은 1 x 10^6개 GFP 양성 인간 B-ALL 세포를 각 웰에 첨가하였다. 공동배양 1시간 후, 세포를 PBS로 세척하고 트립신 처리하고 GFP 및 RFP 발현을 유세포 측정법으로 분석하였다. 포식작용성 대식세포의 백분율을 정량화하였다. 데이터는 3회의 독립적인 실험으로부터 평균 ± SD로 표시된다.

[**도 3A-D**]는 [**도 1**]과 관련하여 유전적으로 조작된 SCF/2i GMP 유래 대식세포에 의한 인간 B-ALL 세포의 포식작용을 입증한다. **(A)** SCF/2i 마우스 GMP를 CarP-RFP 또는 CarPFc19-RFP 렌티바이러스로 형질도입하고 RFP 양성 세포를 분류하고 SCF/2i에서 확장시켰다. RFP 양성 마우스 GMP로부터 유래된 대식세포를 1 x 10^5개 세포/웰의 밀도로 24웰 플레이트에 플레이팅하고 DMEM/10% FBS에서 밤새 배양한 후 1 x 10^6개 GFP 양성 인간 B-ALL 세포를 각 웰에 첨가하였다. 공동배양 1시간 후, 세포를 PBS로 세척하고 트립신 처리하고 GFP 및 RFP 발현을 유세포 측정법으로 분석하였다. 포식작용성 대식세포의 백분율을 정량화하였다. 데이터는 3회의 독립적인 실험으로부터 평균 ± SD로 표시된다. **(B)** 다양한 시점에서 CarPzFc19-RFP 발현 대식세포의 포식작용 과정을 보여주는 저속 촬영 이미지. 시간은 분 단위로 표시된다. 화살표는 포식되기 전후의 GFP 양성 B-ALL 세포를 가리킨다. 이미지는 비디오에서 추출되었다. **(C)** SCF/2i 마우스 GMP를 αHER2 CarPzFc19-RFP 렌티바이러스로 형질도입하였다. RFP 양성 GMP를 분류하고 SCF/2i에서 확장시켰다. RFP 양성 GMP로부터 유래된 대식세포를 1 x 10^5개 세포/웰의 밀도로 24웰 플레이트에 플레이팅하고 DMEM/10% FBS에서 밤새 배양한 후 1 x 10^6개 GFP 양성 SK-BR-3 세포를 각 웰에 첨가하였다. 공동배양 1시간 후, 위상차 및 형광 이미지를 촬영하였다. **(D)** SCF/2i GMP를 αCD19 CarPzFc19-RFP 또는 αHER2 CarPzFc19-RFP 렌티바이러스로 형질도입하고 RFP 양성 GMP를 분류하고 SCF/2i에서 추가로 확장시켰다. αCD19 CarPzFc19-RFP 또는 αHER2 CarPzFc19-RFP를 발현하는 1x10^5개 대식세포를 GFP 양성 인간 B-ALL 세포 또는 SKBR-3 세포와 공동 배양하였다. 공동배양 1시간 후, 세포를 PBS로 세척하고 트립신 처리하고 GFP 및 RFP 발현을 유세포 측정법으로 분석하였다. 포식작용성 대식세포의 백분율을 정량화하였다. 데이터는 3회의 독립적인 실험으로부터 평균 ± SD로 표시된다.

[**도 4A-B**]는 조작된 GMP로부터 유래된 αCD19 CAR-대식세포가 [**도 2C**]와 관련하여 인간 B-ALL 세포를 효과적으로 포식한다는 것을 입증한다. **(A)** GMP를 변형된 SCF/2i에서 확장시켰고 인간 CarPzFc19-RFP(h CarPzFc19-RFP) 렌티바이러스로 형질도입하였다. hCarPzFc19-RFP 발현 GMP로부터 유래된 대식세포를 GFP 표지된 인간 B-ALL 세포와 공동 배양하였다. 공동 배양 1시간 후 위상차 및 형광 이미지를 촬영하였다. **(B)** 항-CD47 항체와 함께 사전 인큐베이션된 GFP 표지된 인간 B-ALL 세포와 공동 배양된 hCarPzFc19-RFP 발현 대식세포의 순차적 형광 이미지.

[**도 5A-D**]는 αCD19 CAR-GMP의 이식이 마우스의 백혈병 세포를 약화시키는 것을 보여준다. **(A)** GFP 표지된 인간 B 세포 급성 림프모구성 백혈병(B-ALL) 세포를 NSG 마우스에 주입하여 B-ALL 마우스 모델을 만들었다. B-ALL 주입 21일 후, aCD19 CAR-GMP 또는 PBS를 주입하고 FACS 분석을 매주 수행하여 말초혈액 내 GFP 양성 B-ALL 세포의 비율을 확인하였다. **(B)** 대표적인 FACS 분석 결과. **(c)** 대조군(PBS) 및 처리(aCD19 CAR-GMP)에 대한 생존율. **(D)** 대조 마우스와 처리된 마우스의 혈액 내 GFP 양성 B-ALL 세포의 백분율.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본원 및 첨부된 청구범위에 사용되는 바와 같이, 단수형 "a", "an" 및 "the"는 문맥상 명백하게 달리 지시하지 않는 한 복수형을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "세포"에 대한 언급은 복수의 세포를 포함하고, "과립구-대식세포 전구세포"에 대한 언급은 하나 이상의 과립구-대식세포 전구세포 및 당업자에게 공지된 이의 등가물에 대

한 언급 등을 포함한다.

[0014] 또한, "또는"의 사용은 달리 명시되지 않는 한 "및/또는"을 의미한다. 유사하게, "포함한다(comprise, comprises)", "포함하는(comprising)", "포함한다(include, includes)" 및 "포함하는(including)"은 상호교환 가능하며 제한하려는 의도가 아니다.

[0015] 다양한 실시 양태의 설명이 "포함하는(comprising)"이라는 용어를 사용하는 경우, 당업자는 일부 특정한 경우에 실시 양태가 "로 본질적으로 이루어진" 또는 "로 이루어진"이라는 언어를 사용하여 대안적으로 설명될 수 있음을 이해할 것임이 추가로 이해되어야 한다.

[0016] 다르게 정의되지 않는 한, 본원에 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 개시 내용이 속하는 기술 분야의 숙련자에게 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 많은 방법 및 시약이 본원에 기술된 것과 유사하거나 동등하지만, 예시적인 방법 및 재료가 본원에 개시되어 있다.

[0017] 본원에 언급된 모든 간행물은 본원의 설명과 관련하여 사용될 수 있는 방법론을 기술하고 개시할 목적으로 전체가 본원에 참고로 포함된다. 또한, 본 개시 내용에 명시적으로 정의된 용어와 유사하거나 동일한 하나 이상의 간행물에 제시된 임의의 용어와 관련하여, 본 개시 내용에 명시적으로 제공된 용어의 정의가 모든 측면에서 우선할 것이다.

[0018] 본 발명은 본원에 기술된 특정 방법론, 프로토콜 및 시약 등에 제한되지 않고 다양할 수 있음을 이해해야 한다. 본원에서 사용된 용어는 단지 특정한 실시 양태를 설명하기 위한 것으로, 청구범위에 의해서만 정의되는 본 발명의 범위를 제한하려는 의도가 아니다.

[0019] 작동 실시예에서 또는 다르게 표시된 경우 외에, 본원에 사용된 성분 또는 반응 조건의 양을 표현하는 모든 수는 모든 경우에 "약"이라는 용어로 수식되는 것으로 이해되어야 한다. 백분율과 관련하여 본 개시 내용을 기술하기 위해 사용되는 용어 "약"은 ±1%를 의미한다. 다른 경우에, 본원에서 사용되는 바와 같이 용어 "약"은 양, 지속 시간 등과 같은 측정 가능한 값을 지칭하며, 지정된 값에서 ±20%, ±10%, ±5%, ±1%, ±0.5% 또는 ±0.1%의 변동을 포함한다.

[0020] 본원에서 사용되는 바와 같이 용어 "투여"는 본원에 개시된 바와 같은 작용제(예를 들어 조작된 GMP 또는 이로부터 유래된 대식세포 또는 과립구)를 원하는 부위에서 작용제의 적어도 부분적인 국소화를 초래하는 방법 또는 경로에 의해 대상체에게 배치하는 것을 의미한다.

[0021] 본원에 사용되는 바와 같이 "자가" 세포는 나중에 세포가 재투여될 동일한 개인으로부터 유래된 세포를 의미한다.

[0022] 본원에서 사용되는 바와 같이 용어 "항체 단편"은 온전한 항체의 일부만을 포함하는 단백질 단편으로 일반적으로 온전한 항체의 항원 결합 부위를 포함하여 항원에 결합하는 능력을 유지하는 단백질 단편을 의미한다. 본 정의에 포함되는 항체 단편의 예로는 (i) VL, CL, VH 및 CH1 도메인을 갖는 Fab 단편; (ii) CH1 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 갖는 Fab 단편인 Fab' 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인을 갖는 FDA 단편; (iv) VH 및 CH1 도메인 및 CH1 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 갖는 Fd' 단편; (v) 항체의 단일 아암의 VL 및 VH 도메인을 갖는 Fv 단편; (vi) VH 도메인으로 이루어진 dAb 단편(Ward *et al.*, Nature 341, 544-546 (1989)); (vii) 단리된 CDR 영역; (viii) 힌지 영역에서 이황화 가교에 의해 연결된 2개의 Fab' 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')2 단편; (ix) 단일 사슬 항체 분자(예를 들어, 단일 사슬 Fv; scFv)(Bird *et al.*, Science 242:423-426 (1988); 및 Huston *et al.*, PNAS (USA) 85:5879-5883 (1988)); (x) 동일한 폴리펩티드 사슬 내의 경쇄 가변 도메인(VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함하는, 2개의 항원 결합 부위를 갖는 "디아바디"(예를 들어, EP 404,097; WO 93/11161; 및 Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) 참조); (xi) 상보적인 경쇄 폴리펩티드와 함께 한 쌍의 항원 결합 영역을 형성하는 한 쌍의 직렬 Fd 세그먼트(VH-CH1-VH-CH1)를 포함하는 "선형 항체"(Zapata *et al*. Protein Eng. 8(10)): 1057-1062(1995) 및 미국 특허 제5,641,870호)가 포함된다.

[0023] "B-Raf" 키나아제 억제제는 B-Raf 키나아제라고 불리는 단백질의 활성을 차단 또는 감소시키거나, B-Raf 키나아제의 양을 감소시키는 물질, 예를 들어 화합물 또는 분자를 지칭한다. B-Raf는 세포 성장과 신호전달을 조절하는 데 도움이 되는 키나아제 효소이다. 이는 흑색종 및 대장암을 포함한 일부 유형의 암에서 돌연변이(변경된) 형태로 발견될 수 있다. 일부 B-Raf 키나아제 억제제는 암 치료에 사용된다. B-Raf 키나아제 억제제의 예에는 GDC-0879, PLX4032, GSK2118436, BMS-908662, LGX818, PLX3603, RAF265, RO5185426, 베무라페닙, PLX8394 및 SB590885가 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시 양태에서, 본원에 개시된 방법은 B-Raf 키나아제 억

제제 GDC-0879의 사용을 포함한다.

[0024] "유익한 결과"에는 질환 상태의 중증도 경감 또는 완화, 질환 상태의 악화 방지, 질환 상태의 치료, 질환 상태의 발생 방지, 환자의 질환 상태 발생 가능성의 저하 및 환자 수명 또는 기대 수명 연장이 포함될 수 있지만 이에 제한되지는 않는다. 비제한적인 예로서, "유익한 결과" 또는 "원하는 결과"는 하나 이상의 증상(들)의 완화, 결핍 정도의 감소, 암 진행의 안정화된(즉, 악화되지 않는) 상태, 전이 및 침습성의 지연 또는 둔화, 및 암과 관련된 증상의 개선 또는 경감일 수 있다.

[0025] 본 개시 내용의 목적을 위해, 용어 "암"은 달리 구체적으로 기술되지 않는 한, 세포 증식성 장애, 신생물, 전암성 세포 장애 및 암을 포함하는 데 사용될 것이다. 따라서, "암"은 전이 또는 종양 성장을 초래할 수 있는 비정상적인 세포 증식을 겪는 모든 세포를 의미한다. 예시적인 암에는 부신피질 암종, AIDS 관련 암, AIDS 관련 림프종, 항문암, 항문직장암, 항문관암, 충수암, 소아 소뇌 성상세포종, 소아 대뇌 성상세포종, 기저 세포 암종, 피부암(비흑색종), 담도암, 간외 담관암, 간내 담관암, 방광암, 비뇨 방광암, 뼈 및 관절 암, 골육종 및 악성 섬유성 조직구종, 뇌암, 뇌종양, 뇌간 신경교종, 소뇌 성상세포종, 대뇌 성상세포종/악성 신경교종, 상의세포종, 수모세포종, 천막상 원시 신경외배엽 종양, 시각 경로 및 시상하부 신경교종, 삼중 음성 유방암을 포함한 유방암, 기관지 선종/카르시노이드, 카르시노이드 종양, 위장관, 신경계암, 신경계 림프종, 중추 신경계암, 중추신경계 림프종, 자궁경부암, 소아암, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 골수증식성 장애, 결장암, 대장암, 피부 T 세포 림프종, 림프계 신생물, 균상 식육종, 세자리 증후군, 자궁내막암, 식도암, 두개외 생식세포 종양, 생식선외 생식세포 종양, 간외 담관암, 안암, 안내 흑색종, 망막모세포종, 담낭암, 위(위장)암, 위장관 카르시노이드 종양, 위장관 간질 종양(GIST), 생식세포 종양, 난소 생식세포 종양, 임신성 영양막 종양 신경교종, 두경부암, 간세포(간)암, 호지킨 림프종, 하인두암, 안구내 흑색종, 안구암, 도세포 종양(내분비 췌장), 카포시 육종, 신장암, 신세포암, 후두암, 급성 림프모구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 털세포 백혈병, 구순 및 구강 암(lip and oral cavity cancer), 간암, 폐암, 비소세포 폐암, 소세포 폐암, AIDS 관련 림프종, 비호지킨 림프종, 원발성 중추신경계 림프종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 수모세포종, 흑색종, 안내(눈) 흑색종, 메르켈 세포 암종, 악성 중피종, 중피종, 전이성 편평 경부암, 입암, 설암, 다발 내분비샘 종양 증후군, 균상 식육종, 골수이형성 증후군, 골수이형성/골수증식성 질환, 만성 골수성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 다발성 골수종, 만성 골수증식성 장애, 비인두암, 신경모세포종, 경구암, 구강암, 구인두암, 난소암, 난소 상피암, 난소 저악성 잠재 종양, 췌장암, 도세포 췌장암, 부비동 및 비강 암, 부갑상선암, 음경암, 인두암, 크롬친화세포종, 송과체모세포종 및 천막상 원시 신경외배엽 종양, 뇌하수체 종양, 형질세포 신생물/다발성 골수종, 흉막폐모세포종, 전립선암, 직장암, 신우 및 요관, 이행세포암, 망막모세포종, 횡문근육종, 타액선암, 유잉 육종계 종양, 연조직 육종, 자궁암, 자궁육종, 피부암(비흑색종), 피부암(흑색종), 유두종, 광선 각화증 및 각질가시세포종, 메르켈 세포 피부 암종, 소장암, 연조직 육종, 편평 세포 암종, 위(위장)암, 천막상 원시 신경외배엽 종양, 고환암, 인후암, 흉선종, 흉선종 및 흉선암종, 갑상선암, 신우 및 요관 및 기타 비뇨 기관의 이행세포암, 임신성 영양막 종양, 요도암, 자궁내막 자궁암, 자궁육종, 자궁체부암, 질암, 외음부암 및 윌름스 종양이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다.

[0026] 본원에서 사용되는 바와 같이 "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR" 또는 "CARs"은 항원 특이성을 세포(예를 들어 GMP 세포)에 이식하는 조작된 수용체를 의미한다. CAR은 인공 T 세포 수용체, 키메라 T 세포 수용체 또는 키메라 면역수용체로도 알려져 있다. 다양한 실시 양태에서, CAR은 항원 특이적 도메인(ASD), 힌지 영역(HR), 막 횡단 도메인(TMD), 공자극 도메인(CSD) 및 세포 내 신호전달 도메인(ISD)을 포함하는 재조합 폴리펩티드이다.

[0027] "CAR 결합 도메인"은 표적 세포 상의 항원에 특이적으로 결합하는 CAR의 부분을 지칭한다. 일부 실시 양태에서, CAR의 결합 도메인은 항체 또는 이의 기능적 등가물 또는 이의 단편 또는 이의 유도체를 포함하는 CAR 구축물(예를 들어 PCT/US2017/064379 참조)에 사용되는 임의의 공지된 결합 도메인 중 임의의 것을 포함한다. 표적화 영역은 전장 중쇄, Fab 단편, 단일 사슬 Fv(scFv) 단편, 2가 단일 사슬 항체 또는 디아바디를 포함할 수 있으며, 이들 각각은 표적 항원에 특이적이다.

[0028] 본원에서 사용되는 바와 같이 "병태" 및 "질환 상태"에는 암, 종양 또는 감염성 질환이 포함될 수 있다. 예시적 실시 양태에서, 질환은 임의의 형태의 악성 신생물 세포 증식성 장애 또는 질환을 포함하지만 결코 이에 제한되지는 않는다.

[0029] 본원에서 사용되는 바와 같이 "공자극 도메인"은 세포의 증식, 생존 및/또는 발생을 향상시키는 폴리펩티드 도메인을 포함하는 CAR의 부분을 의미한다. 공자극 도메인은 선택적 도메인 또는 CAR이다. 본 발명의 CAR은 공자극 도메인을 포함하지 않을 수 있거나 하나 이상의 공자극 도메인을 포함할 수 있다. 각 공자극 도메인은 일반

적으로 TNFR 수퍼패밀리의 구성원인 CD28, CD137 (4-1BB), CD134 (OX40), Dap10, CD27, CD2, CD5, ICAM-1, LFA-1(CD11a/CD18), Lck, TNFR-I, TNFR-II, Fas, CD30, CD40 또는 이들의 조합을 포함한다. 다른 공자극 도메인(예를 들어, 다른 단백질로부터의)은 당업자에게 명백할 것이다.

[0030] 본원에서 사용되는 바와 같이 "유전적으로 변형된 GMP에 의해 표적화되는 질환"은 치료적으로 유익한 결과를 유발하는 지의 여부와 무관하게 본 개시 내용의 유전적으로 변형된 GMP 세포(또는 이로부터 유래된 과립구 또는 대식세포)에 의한 임의의 질환에서 임의의 방식으로 관련된 임의의 세포의 표적화를 포함한다. 유전적으로 변형된 세포는 CAR을 발현하며, CAR은 표적 세포의 표면에 발현된 임의의 항원을 표적화할 수 있다. 표적화될 수 있는 항원의 예에는 암종, 육종, 림프종, 백혈병, 생식세포 종양 및 모세포종에서 발현되는 항원; 다양한 면역 세포에서 발현되는 항원; 및 다양한 혈액학적 질환, 자가면역 질환 및/또는 염증성 질환과 관련된 세포에서 발현되는 항원이 포함된다. 표적화될 수 있는 다른 항원은 당업자에게 명백할 것이며 본 개시 내용의 CAR에 의해 표적화될 수 있다.

[0031] 본원에서 사용되는 바와 같이 용어 "유효량" 또는 "치료 유효량"은 CAR을 발현하고 질환 또는 장애의 적어도 하나 이상의 증상을 감소시키도록 조작된 GMP(이로부터 유래된 대식세포 또는 과립구)를 포함하는 조성물의 양을 의미하며, 원하는 효과를 제공하기 위한 조성물의 충분한 양과 관련된다. 본원에서 사용되는 바와 같이 "치료 유효량"이라는 표현은 임의의 의학적 치료에 적용할 수 있는 합리적인 이익/위험 비로 장애를 치료하기 위한 조성물의 충분한 양을 의미한다.

[0032] 증상의 치료적 또는 예방적으로 유의한 감소는 예를 들어 대조군 또는 비치료 대상체 또는 본원에 기재된 세포 조성물을 투여하기 전 대상체의 상태와 비교하여 측정된 매개변수에서 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 100%, 적어도 약 125%, 적어도 약 150% 이상이다. 측정되거나 측정 가능한 매개변수에는 질환의 임상적으로 검출 가능한 마커, 예를 들어 생물학적 마커의 상승되거나 저하된 수준이 포함된다. 필요한 정확한 양은 치료할 질환의 유형, 대상체의 성별, 연령 및 체중과 같은 요인에 따라 달라질 것이다.

[0033] "이펙터 기능"은 분화된 세포의 특화된 기능을 의미한다. 예를 들어, 과립구 또는 대식세포의 이펙터 기능은 세포용해 활성 또는 사이토카인 분비일 수 있다.

[0034] 용어 "발현 벡터"는 발현시키고자 하는 뉴클레오티드 서열에 작동적으로 연결된 발현 조절 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 의미한다. 발현 벡터는 발현을 위한 충분한 시스-작용 요소를 포함하며; 발현을 위한 다른 요소가 숙주 세포에 의해 또는 시험관 내 발현 시스템에서 공급될 수 있다. 발현 벡터에는 재조합 폴리뉴클레오티드를 통합하는 코스미드, 플라스미드(예를 들어, 네이키드 또는 리포솜에 함유됨) 및 바이러스(예를 들어, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노 관련 바이러스 등)를 포함하여 당업계에 공지된 모든 것들이 포함된다.

[0035] "과립구 콜로니 자극 인자" 또는 "GCSF"(콜로니 자극 인자 3(CSF 3)로도 알려짐)은 골수를 자극하여 과립구와 줄기세포를 생성하는 당단백질이다. 다양한 종에 걸친 유전자 서열, 단백질 서열 및 오솔로그는 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, 본원에 참고로 포함된 NCBI 참조 서열: NP_000750.1 참조).

[0036] "성장 인자"는 세포, 예를 들어 줄기세포의 성장을 촉진하는 데 효과적인 물질, 예를 들어 화합물 또는 분자를 의미하며, 이는 보충제로서 배양 배지에 첨가되지 않는 한 기초 배지의 구성요소가 아니다. 성장 인자에는 줄기세포 인자(SCF), 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF), 산성 섬유아세포 성장 인자(aFGF), 표피 성장 인자(EGF), 인슐린 유사 성장 인자-I(IGF-I), 인슐린 유사 성장 인자-II(IGF-II), 혈소판 유래 성장 인자-AB(PDGF), 및 혈관 내피 세포 성장 인자(VEGF), 액티빈-A, Wnt 및 골형성 단백질(BMP), 인슐린, 사이토카인, 케모카인, 모르포겐, 중화 항체, 기타 단백질 및 소분자가 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 외인성 성장 인자는 또한 실질적으로 미분화된 상태의 GMP 배양 유지를 돕기 위해 본 개시 내용에 따른 배지에 첨가될 수 있다. 이러한 인자 및 이들의 유효 농도는 본원의 다른 곳에 기술된 바와 같이 또는 세포 배양 분야의 당업자에게 공지된 기술을 사용하여 확인될 수 있다. 특정 실시 양태에서, GMP는 SCF를 포함하는 배양 배지에서 배양된다.

[0037] 본원에 사용되는 바와 같이 "힌지 영역"은 CAR의 막 횡단 도메인과 CAR 결합 도메인 사이에 있는 친수성 영역을 지칭한다. 힌지 영역에는 항체의 Fc 단편 또는 이의 단편 또는 유도체, 항체의 힌지 영역 또는 이의 단편 또는 유도체, 항체의 CH2 영역, 항체의 CH3 영역, 인공 스페이서 서열 또는 이들의 조합이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 힌지 영역의 예에는 CD8a 힌지, 및 예를 들어 Gly3 또는 IgG(예컨대 인간 IgG4)의 CH1 및 CH3 도메인만큼 작을 수 있는 폴리펩티드로 만들어진 인공 스페이서가 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 다른 힌지

영역은 당업자에게 명백할 것이며 본 발명의 대안적인 실시 양태와 관련하여 사용될 수 있다.

[0038] 본원에 사용되는 바와 같이 "세포 내 신호전달 도메인" 또는 "세포질 도메인"은 이펙터 기능 신호를 전달하고 세포가 이의 특화된 기능을 수행하도록 지시하는 도메인을 포함하는 CAR의 부분을 지칭한다. 이펙터 기능 신호를 전달하는 도메인의 예에는 T 세포 수용체 복합체의 z 사슬 또는 임의의 이의 동족체(예를 들어, h 사슬, FceR1g 및 b 사슬, MB1(Iga) 사슬, B29(Igb) 사슬 등), 인간 CD3 제타 사슬, CD3 폴리펩티드(D, d 및 e), syk 패밀리 티로신 키나아제(Syk, ZAP 70 등), src 패밀리 티로신 키나아제(Lck, Fyn, Lyn 등) 및 CD2, CD5 및 CD28과 같은 T 세포 형질도입과 관련된 기타 분자가 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 다른 세포 내 신호전달 도메인이 당업자에게 명백할 것이다.

[0039] 본원에서 사용되는 바와 같이 용어 "단리된"은 일반적으로 관련되는 다른 물질이 실질적으로 없는 분자, 생물학적 물질, 세포 또는 세포 물질을 의미한다. 한 측면에서, 용어 "단리된"은 천연 공급원에 존재하는 다른 DNA 또는 RNA, 또는 단백질 또는 폴리펩티드, 또는 세포 또는 세포 소기관 각각으로부터 분리된 DNA 또는 RNA와 같은 핵산, 또는 단백질 또는 폴리펩티드(예를 들어, 항체 또는 이의 유도체), 또는 세포 또는 세포 소기관을 의미한다. "단리된"이라는 용어는 또한 재조합 DNA 기술에 의해 생산될 때 세포 물질, 바이러스 물질 또는 배양 배지가 실질적으로 없거나, 화학적으로 합성될 때 화학적 전구체 또는 기타 화학물질이 실질적으로 없는 핵산 또는 펩티드를 의미한다. 또한, "단리된 핵산"은 단편으로서 자연적으로 발생하지 않고 자연 상태에서는 발견되지 않는 핵산 단편을 포함하는 것을 의도된다. 용어 "단리된"은 또한 다른 세포 단백질로부터 단리된 폴리펩티드를 지칭하기 위해 본원에서 사용되며, 정제된 폴리펩티드와 재조합 폴리펩티드를 모두 포함하는 것으로 의도된다. 용어 "단리된"은 또한 다른 세포 또는 조직으로부터 단리된 세포 또는 조직을 지칭하기 위해 본원에서 사용되며, 배양된 또는 조작된 세포 또는 조직을 모두 포함하는 것으로 의도된다.

[0040] 본원에서 사용되는 바와 같이 "링커" 또는 "링커 도메인"은 본 개시 내용의 CAR의 임의의 도메인/영역을 함께 연결하는 약 1 내지 100개 아미노산 길이의 올리고- 또는 폴리펩티드 영역을 지칭한다. 링커는 글리신 및 세린과 같은 유연한 잔기로 구성되어 인접한 단백질 도메인이 서로에 대해 자유롭게 움직일 수 있다. 2개의 인접한 도메인이 서로 입체적으로 간섭하지 않도록 하는 것이 바람직할 경우 더 긴 링커를 사용할 수 있다. 링커는 절단 가능하거나 절단 불가능할 수 있다. 절단 가능한 링커의 예에는 2A 링커(예를 들어, T2A), 2A-유사 링커 또는 이의 기능적 등가물 및 이들의 조합이 포함된다. 일부 실시 양태에서, 링커에는 피코르나바이러스 2A-유사 링커, CHYSEL 서열의 돼지 테스코바이러스(P2A), 토세아 아시그나 바이러스(T2A) 또는 이들의 조합, 변이체 및 기능적 등가물이 포함된다. 다른 링커는 당업자에게 명백할 것이다.

[0041] 용어 "렌티바이러스 벡터"는 문헌[Milone *et al.*, Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009)]에 제공된 바와 같은 자가 불활성화 렌티바이러스 벡터를 포함하여 렌티바이러스 게놈의 적어도 일부로부터 유래된 벡터를 의미한다. 임상에서 사용될 수 있는 렌티바이러스 벡터의 다른 예는 예를 들어 Oxford BioMedica의 LENTIVECTOR® 유전자 전달 기술, Lentigen의 LENTIMAX™ 벡터 시스템 등을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 비임상 유형의 렌티바이러스 벡터도 이용 가능하며 이는 당업자에게 공지되어 있을 것이다.

[0042] 본원에서 사용되는 바와 같이 "장기 배양" 또는 "장기 확장"은 세포의 수가 증가하고/거나 실질적인 생존력 및 실질적으로 유사한 형태를 유지하도록 제어된 조건 하에서 세포가 증식되는 것을 의미한다. 일부 실시 양태에서, 이 용어는 원하는 형태 및 세포 수를 유지하는 동안(예를 들어, 약 2개월 이상 동안) 배양 기간을 지칭하거나, 적어도 10회 배지 계대의 계대 횟수(예를 들어, 배지 교체)와 연관될 수 있다. 다른 실시 양태에서, 이 용어는 일정 기간에 걸쳐 수의 증가(예를 들어, 약 2개월 기간에 적어도 1백만 배의 증가)를 의미한다. 일부 실시 양태에서, 장기 배양은 4개월 초과, 6개월 초과 또는 1년 초과 동안 배양된다. 다른 실시 양태에서, 장기 배양물은 15회 초과 계대, 18회 초과 계대 또는 20회 초과 계대 동안 계대배양된다.

[0043] "대식세포 콜로니 자극 인자" 또는 "MCSF"(콜로니 자극 인자 1(CSF 1)로도 알려짐)은 단핵구, 대식세포 및 골수 전구 세포의 증식, 분화 및 생존에 관여한다. 다양한 종에 걸친 유전자 서열, 단백질 서열 및 오솔로그가 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, 본원에 참고로 포함된 NCBI 참조 서열: NP_000748.4 참조).

[0044] 본원에서 사용되는 바와 같이 "폴리뉴클레오티드"에는 DNA, RNA, cDNA(상보적 DNA), mRNA(전령 RNA), rRNA(리보솜 RNA), shRNA(소형 헤어핀 RNA), snRNA(소형 핵 RNA), snoRNA(짧은 핵소체 RNA), miRNA(마이크로RNA), 게놈 DNA, 합성 DNA, 합성 RNA 및/또는 tRNA가 포함되지만 이에 제한되지는 않는다.

[0045] 다른 서열에 대해 특정 백분율(예를 들어, 80%, 85%, 90% 또는 95%)의 "서열 동일성"을 갖는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드 영역(또는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 영역)은 정렬될 때 염기(또는 아미노산)의 해당

백분율이 두 서열의 비교 시 동일함을 의미한다. 정렬 및 퍼센트 상동성 또는 서열 동일성은 당업계에 공지된 소프트웨어 프로그램, 예를 들어 문헌[Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, eds. 1987) 부록 30, 섹션 7.7.18, 표 7.7.1]에 기술된 프로그램을 사용하여 결정될 수 있다. 바람직하게는, 정렬에 기본 매개변수가 사용된다. 일반적인 정렬 프로그램은 기본 매개변수를 사용하는 BLAST이다. 특히, 일반적인 프로그램은 다음 기본 매개변수를 사용하는 BLASTN 및 BLASTP이다: 유전자 코드=표준; 필터=없음; 가닥=양가닥; 컷오프=60; 기대값=10; 매트릭스=BLOSUM62; 설명=50개 서열; 정렬 기준=높은 점수; 데이터베이스=비중복, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS translations+SwissProtein+SPupdate+PIR. 이러한 프로그램에 대한 자세한 내용은 다음 인터넷 주소에서 확인할 수 있다: ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST.

[0046] 명시적인 언급 없이, 달리 의도하지 않는 한, 본 개시 내용이 폴리펩티드, 단백질, 폴리뉴클레오티드, 항체 또는 이의 단편에 관한 경우, 이들의 등가물 또는 생물학적 등가물이 본 개시 내용의 범위 내에서 의도되는 것으로 추론되어야 한다. 본원에서 사용되는 바와 같이 용어 "이의 생물학적 등가물"은 참조 단백질, 항체 또는 이의 단편, 폴리펩티드 또는 핵산을 언급할 때 "이의 등가물"과 동의어로 의도되며, 원하는 구조 또는 기능성을 여전히 유지하면서 최소한의 상동성을 갖는 것을 의도한다. 본원에 구체적으로 언급되지 않는 한, 상기 중 임의의 것은 또한 그 등가물을 포함하는 것으로 고려된다. 예를 들어, 등가물은 적어도 약 70% 상동성 또는 동일성, 또는 적어도 80% 상동성 또는 동일성 및 대안적으로, 적어도 약 85%, 또는 대안적으로 적어도 약 90%, 또는 대안적으로 적어도 약 95%, 또는 대안적으로 적어도 98%의 상동성 또는 동일성을 의도하며 참조 단백질, 폴리펩티드, 항체 또는 이의 단편 또는 핵산과 실질적으로 동등한 생물학적 활성을 나타낸다. 대안적으로, 폴리뉴클레오티드를 언급할 때, 그 등가물은 엄격한 조건 하에서 참조 폴리뉴클레오티드 또는 그 상보체에 혼성화하는 폴리뉴클레오티드이다. 대안적으로, 폴리펩티드 또는 단백질을 언급할 때, 이의 등가물은 참조 폴리펩티드 또는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보체에 엄격한 조건 하에서 혼성화하는 폴리뉴클레오티드로부터의 발현된 폴리펩티드 또는 단백질이다.

[0047] "레트로바이러스 벡터"라는 용어는 레트로바이러스 게놈의 적어도 일부로부터 유래된 벡터를 의미한다. 레트로바이러스 벡터의 예에는 Addgene 또는 Clontech에서 입수할 수 있는 MSCVneo, MSCV-pac(또는 MSCV-puro), MSCV-hygro가 포함된다. 레트로바이러스 벡터의 다른 예는 MSCV-Bgl2-AvrII-Bam-EcoR1-Xho-BstB1-Mlu-Sal-ClaI.IO(서열번호 872)이다.

[0048] 용어 "잠자는 숲속의 미녀 트랜스포존" 또는 "잠자는 숲속의 미녀 트랜스포존 벡터"는 잠자는 숲속의 미녀 트랜스포존 게놈의 적어도 일부로부터 유래된 벡터를 지칭한다.

[0049] "줄기세포 인자" 또는 "SCF"(KIT-리간드, KL 또는 강철 인자로도 알려짐)는 c-KIT 수용체(CD117)에 결합하는 사이토카인이다. SCF는 막 횡단 단백질과 가용성 단백질 두 가지 모두로 존재할 수 있다. 이 사이토카인은 조혈(혈구 형성), 정자 형성, 멜라닌 생성에 중요한 역할을 한다. 다양한 종에 걸친 유전자 서열, 단백질 서열 및 오솔로그는 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, 본원에 참고로 포함된 NCBI 참조 서열 NP_000890.1 참조).

[0050] 본원에서 사용되는 바와 같이 "실질적으로 균일한 집단"은 세포의 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 90%, 95%, 또는 심지어 98% 이상이 표시된 유형인 세포 집단을 의미한다.

[0051] 본원에 사용되는 바와 같이 "막 횡단 도메인"은 원형질막을 가로지르는 CAR의 영역을 의미한다. CAR의 막 횡단 도메인은 막 횡단 단백질(예를 들어 유형 I 막 횡단 단백질)의 막 횡단 영역, 인공의 소수성 서열 또는 이들의 조합이다. 다른 막 횡단 도메인은 당업자에게 명백할 것이다. 일부 실시 양태에서, 막 횡단 도메인은 T 세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 사슬의 막 횡단 도메인, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1(CD1 la, CD18), ICOS(CD278), 4-1BB(CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM(LIGHTR), SLAMF7, NKp80(KLRF1), CD160, CD19, IL2R 베타, IL2R 감마, IL7R a, ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD1 ld, ITGAE, CD103, ITGAL, CD1 la, LFA-1, ITGAM, CD1 lb, ITGAX, CD1 lc, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1(CD226), SLAMF4(CD244, 2B4), CD84, CD96(Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D, 및/또는 NKG2C로부터 선택된 단백질로부터 유래되거나 클로닝된 막 횡단 도메인을 포함할 수 있다.

[0052] 본원에서 사용되는 바와 같이 용어 "치료하다", "치료", "치료하는" 또는 "개선"은 치료적 조치를 지칭하며, 여기서 목적은 질환 또는 장애와 관련된 상태의 진행 또는 중증도를 역전시키거나, 완화시키거나, 개선시키거나, 억제하거나, 늦추거나, 중단시키는 것이다. "치료"라는 용어는 암과 같은 병태, 질환 또는 장애의 적어도 하나

의 유해 효과 또는 증상을 감소시키거나 완화시키는 것을 포함한다. 하나 이상의 증상이나 임상 지표가 감소하면 치료는 일반적으로 "효과적"이다. 또는 질환의 진행이 감소되거나 중단되면 치료가 "효과적"이다. 즉, "치료"에는 증상이나 지표의 개선뿐만 아니라 치료가 없을 경우 예상되는 증상의 진행 지연 또는 증상 악화의 중단도 포함된다. 유익하거나 원하는 임상 결과에는 검출 가능 여부와 무관하게 하나 이상의 증상(들)의 완화, 질환 범위의 감소, 질환의 안정화된(즉, 악화되지 않는) 상태, 질환 진행의 지연 또는 둔화, 질환 상태의 개선 또는 완화, 및 관해(부분적이든 전체적이든)가 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 질환의 "치료"라는 용어에는 질환의 증상이나 부작용의 완화를 제공하는 것도 포함된다(완화 치료 포함). 일부 실시 양태에서, 암의 치료에는 종양 부피 감소, 암세포 수 감소, 암 전이 억제, 기대 수명 증가, 암세포 증식 감소, 암세포 생존 감소, 또는 암성 상태와 연관된 다양한 생리학적 증상의 개선이 포함된다.

[0053] "Wnt 활성화제"는 Wnt 신호전달 경로를 유도하는 화합물 또는 분자를 의미한다. Wnt 신호전달 경로는 세포 표면 수용체를 통해 세포 내로 신호를 전달하는 단백질로 시작하는 신호전달 경로 그룹이다. 세 가지 Wnt 신호전달 경로는 표준 Wnt 경로, 비표준 평면 세포 극성 경로, 및 비표준 Wnt/칼슘 경로로 특성화되었다. 세 가지 경로 모두 Wnt 단백질 리간드가 프리즐드(Frizzled) 패밀리 수용체에 결합하여 활성화되며, 이는 생물학적 신호를 세포 내부의 디쉐블드(Disheveled) 단백질에 전달한다. Wnt는 350-400개 아미노산 길이인 분비된 지질 변형 신호전달 당단백질의 다양한 패밀리로 구성된다. 이들 단백질에서 발생하는 지질 변형의 유형은 23-24개 시스테인 잔기의 보존된 패턴으로 시스테인의 팔미토일화이다. 팔미토일화는 분비를 위해 Wnt 단백질의 원형질막 표적화를 시작하고 지방산의 공유적 부착으로 인해 Wnt 단백질이 이의 수용체에 결합할 수 있도록 하기 때문에 필요하다. Wnt 단백질은 또한 적절한 분비를 보장하기 위해 탄수화물을 부착시키는 글리코실화를 거친다. Wnt 신호전달에서, 이들 단백질은 주변분비 경로와 자가분비 경로를 통해 다양한 Wnt 경로를 활성화하는 리간드로서 역할을 한다. 이 단백질은 종 전체에 걸쳐 고도로 보존되어 있다. 이들은 마우스, 인간, 제노푸스(Xenopus), 제브라피시(zebrafish), 초파리(Drosophila) 및 기타 여러 동물에서 발견될 수 있다. Wnt 활성화제의 예로는 SKL 2001, BML-284, WAY 262611, CAS 853220-52-7 및 QS11이 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시 양태에서, 본원에 개시된 방법은 Wnt 활성화제 활성을 갖는 본 개시 내용의 화합물의 사용을 포함한다.

[0054] 과립구와 대식세포는 선천성 면역계의 두 가지 주요 세포 유형이다. 이들은 병원체에 대한 1차 방어선이자 우리 몸의 항상성을 유지하고, 감염과 대사질환 및 암을 비롯한 각종 질환을 예방하는 데 핵심적인 역할을 한다. 과립구와 대식세포는 포식작용이라는 과정에서 침입 미생물을 삼켜 분해한다. 포식작용 외에도, 대식세포는 림프구와 같은 다른 면역 세포를 동원하여 특이적 방어 메커니즘(적응 면역)을 시작하는 항원 제시자로서 중요한 역할을 한다. 최근에는 대식세포도 암 퇴치를 위한 매력적인 치료 표적이 되었다. 엄청난 치료 잠재력에도 불구하고 과립구와 대식세포를 확장하고 유전적으로 변형하는 효과적인 방법이 없어 이들의 임상 적용이 크게 제한된다.

[0055] 더욱 유망한 접근법은 과립구와 대식세포가 유래하는 골수의 공통 전구세포인 과립구-단핵구 전구세포(GMP)를 확장하고 유전적으로 변형시키는 것이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, GMP는 포유동물 종(예를 들어, 소, 개, 말, 고양이, 인간, 마우스, 영장류, 래트 등)으로부터 유래되거나 얻어질 수 있다. 생체 외 확장된 GMP는 치료 용도를 위한 충분한 대식세포를 생성하는 능력을 가능하게 할 수 있다. 확장된 GMP는 또한 가장 풍부한 유형의 과립구인 호중구로 분화하도록 유도될 수 있으며, 호중구 감소증 또는 호중구 기능 장애가 있는 환자에서 감염과 싸우기 위해 혈액 순환에 주입될 수 있다. 더 중요하게는, GMP를 쉽게 변형하여 향상된 항종양 또는 항균 활성을 갖는 유전적으로 조작된 대식세포를 생성할 수 있다. 대식세포는 이를 조작하는 데 사용되는 유전 물질을 포함한 모든 외래 입자를 삼켜 분해하지만 GMP는 포식 활성이 없으므로 훨씬 더 유리한 표적이 된다. 그러나 수십 년간의 집중적인 연구에도 불구하고 조혈계의 다른 줄기/전구 세포뿐만 아니라 GMP의 장기적인 생체 외 확장은 아직 실현되지 않았다.

[0056] 조혈계의 세포는 상단에 조혈 줄기세포(HSC), 하단에 다양한 성숙한 혈액 세포, 사이에 GMP와 같은 중간 조혈 줄기 및 전구 세포(HSPC)가 있는 계층 구조로 구성된다. HSPC의 뛰어난 치료 잠재력에 이끌려 수많은 그룹이 지난 20년 동안 생체 외 확장을 위한 배양 조건을 개발하려고 시도해왔다. 지금까지 모든 조건에는 근본적인 한계가 있다. 즉, 모든 유형의 HSPC의 동종 집단을 지속적이고 기하급수적으로 확장할 수 없다.

[0057] 고유한 과제는 한 유형의 HSPC를 다른 유형, 특히 이의 바로 상류 전구세포 및 하류 자손과 구별하고 분리하는 어려움이었다. 실제로, 기존의 면역표현형 분석은 하나의 HSPC 유형을 바로 상류 전구세포 및 하류 자손과 구별할 수 없다. 클론 수준에서 전향적으로 정제된 HSC는 여전히 매우 이질적이며 다양한 유전자 발현 패턴과 뚜렷이 다른 세포 기능을 가진 세포를 포함한다. 이는 예상되는데, HSPC가 세포 표면 마커 발현이 다소 유사하지만 이질적인 기능을 갖는 세포 연속체를 포괄하고 있기 때문이다. 이러한 이질적인 세포 집단 내에서 단일 줄기/전

구 세포 유형의 확장을 촉진할 수 있는 성장 인자/사이토카인 및 소분자를 식별하는 것은 기술적으로 매우 어렵다.

[0058] 과립구, 대식세포 및 수지상 세포는 골수의 공통 전구세포인 과립구-대식세포 전구세포(GMP)로부터 유래된다. 선천성 면역 세포의 막대한 치료 잠재력에도 불구하고, 현재 이들 세포 또는 그 전구세포 GMP를 효과적으로 확장하고 유전적으로 변형시킬 수 없기 때문에 임상에서의 적용은 크게 제한되어왔다. GMP의 장기간 확장을 위한 방법이 본원에 제공된다. 생체 외 확장된 GMP는 시험관 내 및 생체 내 모두에서 성숙하고 기능적인 과립구, 대식세포 및 수지상 세포로 효율적으로 분화할 수 있다. 이러한 생체 외 확장된 GMP는 유전적으로 변형될 수도 있다. 본원에 개시된 GMP 생산 방법 및 이로부터 생산된 GMP는 다음과 같은 이유로 큰 유용성을 갖는다: (1) GMP의 장기간 확장은 기본 연구 및 임상 적용 모두를 위해 무제한의 균질한 세포 집단을 제공하고; (2) GMP의 장기간 확장은 GMP 유전자 및 그 발현을 변형하여 면역 반응의 조절을 연구할 수 있게 하고; (3) 생체 외 확장된 GMP는 이식을 포함한 임상 적용에 사용될 수 있다. 예를 들어, 생체 외 확장된 GMP는 호중구감소증을 치료하는 데 쉽게 사용될 수 있다. 더욱이, 본 개시 내용은 또한 대식세포 및 수지상 세포로 분화하도록 추가로 유도될 수 있는 GMP의 유전적 변형(예를 들어, SIRPα 및/또는 PI3Kγ 유전자 녹아웃, 안지오텐신 전환 효소의 과발현)을 제공한다. 본원에 제시된 연구에서 이러한 조작된 대식세포 및 수지상 세포는 향상된 항종양 효과를 나타내며 단독 요법 또는 항PD-1/PD-L1 항체 및 키메라 항원 수용체 T(CAR-T) 세포와 같은 다른 면역제와의 병용 요법으로 암을 치료하기 위해 임상적으로 사용될 수 있다. GMP는 또한 CAR-대식세포를 생산하도록 조작되었다. 이러한 CAR-대식세포는 암 및 기타 질환을 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0059] 대식세포는 원래 M1 또는 M2 극성으로 분류되었던 다양한 표현형을 나타낸다. M1 극성 대식세포는 항원을 제시하고, IL-12, IL-23, 인터페론 감마(IFNγ) 및 활성 산소종(ROS)을 생성하는 능력을 나타낸다. M1 대식세포는 항종양에 더 효과적이며 T 헬퍼 유형 1(Th1) 또는 세포 매개 면역 반응 쪽으로 T 세포 반응이 기울어지게 한다. 대조적으로, M2 대식세포는 IL-10 및 TGF-β를 생산하고 조직 재형성에 참여하고, 면역억제 특성을 가지며, Th2 또는 항체 매개 면역 반응을 촉진한다. 종양 관련 대식세포(TAM)는 종양 미세환경의 주요 구성요소를 구성한다. 이들 세포는 종양 면역억제를 촉진하는 우세한 M2 표현형 대식세포이다. 최근 연구는 면역 체크포인트 차단의 사용에 의해 제거되지 않는 T 세포 기능 억제에 대한 이들의 기여를 뒷받침한다. 따라서 대식세포는 암 퇴치를 위한 매력적인 치료 표적이 되었다. 대식세포의 엄청난 치료 잠재력에도 불구하고, 현재 대식세포 또는 그 전구세포 GMP를 확장하고 유전적으로 변형시키는 효과적인 방법이 없기 때문에 임상에서의 적용은 크게 제한되어 왔다. GMP의 장기간 확장은 유전자 변형을 가능하게 하여 이들 세포를 보다 치료적으로 적용 가능하게 만든다.

[0060] 특정 실시 양태에서, 본 개시 내용은 복수회 세포 계대 및 클론 확장을 거친 후에도 형태학적으로 변하지 않은 상태로 남아 있는 균일한 과립구/대식세포 전구세포(GMP) 세포 집단의 장기간 확장을 위한 방법을 제공한다. 추가 실시 양태에서, 본원에 개시된 방법은 성장 인자(예를 들어, SCF), B-Raf 키나아제 억제제(예를 들어, GDC-0879), Mnk1/2를 억제하는 작용제, PI3K 경로를 억제하는 작용제, 및 경우에 따라 하나 이상의 혈청 성분을 포함하지만 이에 제한되지 않는 인자와 작용제의 조합을 포함하는 배양 배지에서 GMP를 배양하는 단계를 포함한다. 또 다른 실시 양태에서, GMP의 장기간 배양물은 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 유전적으로 조작된다.

[0061] 줄기세포는 특정한 특수 기능을 갖는 세포(예를 들어, 조직 특이적 세포, 실질 세포 및 이의 전구 세포)를 포함하여 다른 세포 유형으로 분화할 수 있는 세포이다. 전구 세포(즉, "다능성")는 최종적으로 분화된 다양한 세포 유형을 생성할 수 있는 세포, 및 다양한 전구 세포를 생성할 수 있는 세포이다. 유기체의 세포 유형 중 전부는 아니지만 일부 또는 다수를 생성하는 세포는 종종 "만능성" 줄기세포라고 불리며, 이는 성숙한 유기체의 체내에서 모든 세포 유형으로 분화할 수 있지만, 리프로그래밍 없이 자신이 유래된 세포로 역분화할 수 없다. 인식되는 바와 같이, "다능성" 줄기/전구 세포(예를 들어, 과립구/대식세포 전구 세포(GMP))는 만능성 줄기세포보다 더 좁은 분화 잠재력을 갖는다. GMP로 유도되기 전에, 본원에 개시된 줄기세포는 예를 들어 유전자 치료, 유전자 편집 시스템, 상동 재조합 등과 같은 많은 유전 공학 기술을 사용하여 유전적으로 변형될 수 있다. 이러한 변형된 줄기세포는 향상된 치료법을 제공할 수 있다(예를 들어, Nowakowski *et al.*, *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 73(1):1-18 (2013) 참조). 특정 실시 양태에서, 줄기세포 또는 전구 세포는 키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현하거나 함유하도록 조작될 수 있다.

[0062] 추가 실시 양태에서, 본원에 개시된 GMP는 줄기세포로부터 유래된다. 줄기세포에는 배아 줄기세포, 유도 만능 줄기세포, 비배아(성체) 줄기세포 및 제대혈 줄기세포가 포함될 수 있다. 본 개시 내용의 배지를 사용하여 배양될 수 있는 줄기세포 유형에는 인간, 마우스, 래트, 원숭이 및 유인원을 비롯한 임의의 포유동물 종으로부터 유래된 줄기세포가 포함된다(예를 들어, *Nature* 448:313-318, July 2007; 및 Takahashi *et al.*, *Cell*

131(5):861-872, 이들은 본원에 참고로 포함됨).

[0063] 특정 실시 양태에서, 본 개시 내용의 GMP는 유도 만능 줄기세포(iPS 또는 iPSC)로부터 유래된다. iPSC는 선택적 유전자 발현(내인성 유전자의) 또는 이종 유전자를 이용한 형질감염을 통해 비만능성 세포로부터 얻은 만능성 줄기세포의 한 종류이다. 유도 만능 줄기세포는 일본 교토 대학의 Shinya Yamanaka 팀에 의해 기술되었다. Yamanaka 연구자들은 배아 줄기세포에서 특히 활성이 있는 유전자를 식별하고 레트로바이러스를 사용하여 선택된 유전자를 마우스 섬유아세포에 형질감염시켰다. 결국, 만능성 줄기세포 생산에 필수적인 네 가지 주요 만능성 유전자인 Oct-3/4, SOX2, c-Myc 및 Klf4가 단리되었다. 보다 최근의 연구에서는 특정 배양 조건과 조합된 더 적은 수의 이러한 인자뿐만 아니라 추가 인자가 만능 줄기세포를 유도할 수 있음이 제공되었다. $Fbx15^{+}$ 세포에 대한 항생제 선택에 의해 세포를 단리하였다. 동일 그룹은 하버드, MIT, 캘리포니아 대학, 로스앤젤레스의 다른 2개의 독립적인 연구 그룹과 함께 연구를 발표하여 마우스 섬유아세포를 iPS로 성공적으로 리프로그래밍하고 심지어 생존 가능한 키메라를 생산하는 것을 보여주었다.

[0064] 대안적인 실시 양태에서, 본원에 개시된 GMP는 배아 줄기세포(ESC)로부터 유래된다. ESC는 인간 배아의 미분화 내부 덩어리 세포로부터 유래된 줄기세포이다. 배아 줄기세포는 만능성이며, 이는 세 가지 주요 배엽층(외배엽, 내배엽 및 중배엽)의 모든 파생물로 성장(즉, 분화)할 수 있음을 의미한다. 만능성은 배아 줄기세포를 성체에서 발견되는 성체 줄기세포와 구별한다. 배아 줄기세포는 신체의 모든 세포 유형을 생성할 수 있는 반면, 성체 줄기세포는 다능성을 가지며 제한된 수의 세포 유형만 생성할 수 있다. 또한, 정의된 조건하에서 배아줄기세포는 무제한 증식할 수 있다. 이를 통해 배아 줄기세포는 연구와 재생의학 모두에 유용한 도구로 사용될 수 있는데, 그 이유는 이들이 지속적인 연구나 임상 용도를 위해 무한 개수의 자신을 생산할 수 있기 때문이다.

[0065] 또 다른 대안적인 실시 양태에서, 본원에 개시된 GMP는 제대혈 줄기세포로부터 유래된다. 제대혈은 아기가 태어난 후 태반과 탯줄에 남아 있는 혈액이다. 제대혈은 전혈에서 발견되는 모든 성분으로 구성된다. 이는 적혈구, 백혈구, 혈장, 혈소판을 함유하고 있으며 조혈 줄기세포도 풍부하다. 조혈 줄기세포는 문헌[Chularojmontri *et al.*, *J Med Assoc Thai* 92(3):S88-94 (2009)]에 교시된 방법을 포함하여, 당업계에 교시된 많은 분리 방법을 사용하여 제대혈로부터 단리될 수 있다. 또한, 인간 제대혈로부터 CD34+ 세포(즉, 조혈 줄기세포)를 단리하기 위한 상용 키트가 STEMCELL Technologies, Thermo Fisher Scientific, Zen-Bio 등을 포함한 여러 판매업체로부터 이용 가능하다.

[0066] 또 다른 대안적인 실시 양태에서, 본원에 개시된 GMP는 비배아 줄기세포로부터 유래된다. 비배아 줄기세포는 스스로 재생할 수 있고 분화하여 조직이나 기관의 주요 특수 세포 유형 중 일부 또는 전부를 생성할 수 있다. 살아있는 유기체에서 비배아 줄기세포의 주요 역할은 그가 발견되는 조직을 유지하고 복구하는 것이다. 과학자들은 또한 비배아 줄기세포 대신 체세포 줄기세포라는 용어를 사용하며, 여기서 체세포는 신체의 세포(생식세포, 정자 또는 난자가 아님)를 의미한다. 비배아 줄기세포는 뇌, 골수, 말초혈액, 혈관, 골격근, 피부, 치아, 심장, 내장, 간, 난소 상피 및 고환을 포함한 많은 기관 및 조직에서 확인되었다. 그들은 각 조직의 특정 영역("줄기세포 니치(niche)"라고 함)에 존재하는 것으로 생각된다. 살아있는 동물에서, 비배아 줄기세포는 필요할 때 장기간 분열할 수 있으며, 특정 조직의 특징적인 모양과 특수한 구조 및 기능을 가진 성숙한 세포 유형을 생성할 수 있다.

[0067] 특정 실시 양태에서, 본원에 개시된 GMP는 조혈 줄기세포(HSC)로부터 유래된다. HSC는 제대혈과 골수에서 쉽게 단리될 수 있다. 이러한 단리 프로토콜은 당업계에 공지되어 있으며 일반적으로 HSC 단리를 위한 세포 선택 마커로서 CD34+를 사용한다(예를 들어 Lagasse *et al.*, *Nat Med.* 6:1229 - 1234(2000) 참조).

[0068] 본원에 개시된 방법에서, GMP는 성장 인자(예를 들어, SCF), B-Raf 키나아제 억제제(예를 들어, GDC-0879), Mnk1/2를 억제하는 작용제, PI3K 경로를 억제하는 작용제, 및 경우에 따라 하나 이상의 혈청 성분을 포함하지만 이에 제한되지 않는 인자와 작용제의 조합을 포함하는 배양 배지에서 성장 및 확장될 수 있다. 배양 배지는 다양한 기타 생물학적 작용제가 보충되는 변형된 기초 배지일 수 있다. 기초 배지는 배양물에서 세포 성장을 지원하는 데 효과적인 아미노산, 비타민, 염분 및 영양소의 용액을 의미하지만 일반적으로 이러한 화합물은 추가 화합물을 보충하지 않는 한 세포 성장을 지원하지 않는다. 영양소에는 세포에서 대사될 수 있는 탄소원(예를 들어, 글루코오스와 같은 당)뿐만 아니라 세포의 생존에 필요한 기타 화합물도 포함된다. 이는 화합물을 합성하는 데 필요한 단백질(들)(예를 들어, 필수 아미노산)을 코딩하는 유전자(들) 중 하나 이상이 없기 때문에 세포 자체에서 합성할 수 없는 화합물이거나, 세포가 합성할 수 있는 화합물의 경우, 특정 발달 상태로 인해 필요한 생합성 단백질을 코딩하는 유전자(들)가 충분한 수준으로 발현되고 있지 않는 화합물이다. DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Media), RPMI 1640, Knockout-DMEM(KO-DMEM) 및 DMEM/F12와 같은 다수의 기초 배지가 포유동물

세포 배양 분야에 알려져 있지만, 실질적으로 미분화 상태에서 줄기세포의 성장을 지원하는 작용제가 보충될 수 있는 모든 기초 배지가 사용될 수 있다. 위에서 예시한 기초 배지 중 하나(예를 들어, DMEM/F12)와 신경 기초 배지(또는 대안적으로 IMDM 및/또는 StemSpan™ SFEMII와 같은 다른 기초 배지)의 일정 비율을 포함하는 배양 배지가 예기치 않게 GMP의 개선된 성장을 제공하였음이 본원에서 추가로 발견되었다. 특히, 위에 예시된 기초 배지 중 하나(예를 들어, DMEM/F12) 대 신경 기초 배지를 약 5:1 내지 약 1:5의 비로 사용하여 GMP를 배양할 수 있다. 추가 실시 양태에서, GMP를 성장시키기 위한 배양 배지는 DMEM/F12 대 신경 기초 배지를 약 1:1로 포함한다.

[0069] 위에서 지적한 바와 같이, GMP를 성장시키기 위해 본원에 개시된 배양 배지는 인슐린, 트랜스페린, BSA 분획 V, 푸트레신, 아셀렌산나트륨, DL-α 토코페롤 및 리놀렌산을 포함하지만 이에 제한되지 않는 하나 이상의 추가 작용제로 보충될 수 있다. 특정 실시 양태에서, GMP를 성장시키기 위한 본원에 개시된 배양 배지는 인슐린, 트랜스페린, BSA 분획 V, 푸트레신, 아셀렌산나트륨, DL-α 토코페롤 및 리놀렌산으로 보충된다.

[0070] 이해되는 바와 같이, 사용한 배양 배지를 새로운 배양 배지로 지속적으로 또는 주기적 간격으로, 전형적으로 1 내지 3일마다 교체하는 것이 바람직하다. 신선한 배지를 사용하는 것의 한 가지 이점은 세포가 기존 기술에 따라 영양 세포에서 배양될 때나 조건화된 배지에서 배양될 때보다 더 균일하고 빠르게 확장하도록 조건을 조정할 수 있다는 것이다.

[0071] 이전 시작 세포 집단과 비교했을 때 4배, 10배, 20배, 50배, 100배, 1000배, 또는 그 이상 확장된 GMP 집단을 얻을 수 있다. 적합한 조건하에서, 배양을 시작하는 데 사용된 GMP와 비교하여 미분화 상태에서 있는 확장된 집단의 세포는 50%, 70% 또는 그 이상이 될 것이다. 계대당 확장 정도는 배양 종료 시 수거된 대략적인 세포 수를 원래 배양액에 접종한 대략적인 세포 수로 나누어 계산할 수 있다. 성장 환경의 기하학적 구조가 제한적이거나 다른 이유로 인해 세포는 경우에 따라 추가 확장을 위해 유사한 성장 환경으로 계대될 수 있다. 전체 확장은 각 계대의 모든 확장의 산물이다. 물론 각 계대에서 확장된 세포를 모두 유지할 필요는 없다. 예를 들어, 세포가 각 배양에서 2배로 확장되지만 각 계대에서 세포의 약 50%만 유지되는 경우 대략 동일한 수의 세포가 앞으로 전달된다. 그러나 4번의 배양 후에는 세포가 16배의 확장을 거쳤다고 한다. 세포는 당업계에 공지된 극저온 동결 기술에 의해 저장될 수 있다.

[0072] 본원에 더욱 상세히 나타낸 바와 같이, GMP는 성장 인자(예를 들어, SCF), B-Raf 키나아제 억제제(예를 들어, GDC-0879), Mnk1/2를 억제하는 작용제, PI3K 경로를 억제하는 작용제, 및 경우에 따라 하나 이상의 혈청 성분을 포함하지만 이에 제한되지 않는 인자와 작용제의 조합을 포함하는 배양 배지에서 성장 및 확장될 수 있다.

[0073] 본 개시 내용은 유전 공학 기술을 사용하여 본원에 개시된 GMP를 유전적으로 변형시키는 방법을 제공한다. 특히 본 개시 내용의 GMP는 유전적 변형 기술에 민감하여 기초 과학 연구 및 임상 치료 적용에서 GMP의 사용을 가능하게 한다는 것을 본원에서 보였다. 따라서 확장되고 유전적으로 변형된 GMP는 광범위한 임상 적용으로 쉽게 전환될 수 있다. 따라서, 본 개시 내용은 본원에 개시된 GMP를 유전적으로 변형시키는 방법을 추가로 제공한다. 이러한 방법에는 유전자 편집 시스템, 상동성 재조합, 또는 부위 지정 돌연변이 유발을 사용하여 GMP로 변형을 유전적으로 조작하는 단계가 포함될 수 있다. 유전자 편집 시스템의 특정 예로는 징크 핑거 뉴클레아제, TALEN 및 CRISPR가 있다.

[0074] 특정 실시 양태에서, CRISPR 시스템은 유형 II CRISPR 시스템이고 Cas 효소는 DNA 절단을 촉매하는 Cas9이다. 스트렙토코쿠스 피오게네스(Streptococcus pyogenes) 또는 밀접하게 연관된 Cas9에서 유래된 Cas9에 의한 효소 작용은 가이드 서열의 20개 뉴클레오티드에 혼성화되고 표적 서열의 20개 뉴클레오티드 다음에 프로토스페이서 인접 모티프(PAM) 서열을 갖는 표적 부위 서열에서 이중 가닥 절단을 생성한다(예로는 본원에 기술된 바와 같이 결정될 수 있는 PAM 또는 NGG/NRG가 포함됨). 부위 특이적 DNA 인식 및 절단을 위한 Cas9를 통한 CRISPR 활성은 가이드 서열, 가이드 서열과 부분적으로 혼성화되는 tracr 서열 및 PAM 서열에 의해 정의된다. CRISPR 시스템의 더 많은 측면은 문헌[Karginov and Hannon, The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea, *Mole Cell* 2010, January 15; 37(1): 7에 기술되어 있다.

[0075] 스트렙토코쿠스 피오게네스 SF370의 유형 II CRISPR 유전자좌는 4개의 유전자 Cas9, Cas1, Cas2 및 Csn1뿐만 아니라 2개의 비코딩 RNA 요소인 tracrRNA 및 비반복적 서열(스페이서, 각각 약 30bp)의 짧은 스트레치로 간격을 둔 특징적인 반복 서열 배열(직접 반복부)의 클러스터를 포함한다. 이 시스템에서는 표적화된 DNA 이중 가닥 절단(DSB)이 4개의 순차적 단계로 생성된다. 첫째, 2개의 비코딩 RNA인 pre-crRNA 어레이와 tracrRNA가 CRISPR 유전자좌로부터 전사된다. 둘째, tracrRNA가 pre-crRNA의 직접 반복부에 혼성화되고, 그런 다음 개별 스페이서 서열을 포함하는 성숙한 crRNA로 처리된다. 셋째, 성숙한 crRNA:tracrRNA 복합체는 crRNA의 스페이서 영역과 프

로토스페이서 DNA 사이의 헤테로듀플렉스 형성을 통해 Cas9를 프로토스페이서 및 상응하는 PAM을 포함하는 표적 서열로 보낸다. 마지막으로 Cas9는 PAM의 표적 서열 절단을 매개하여 프로토스페이서 내에서 DSB를 생성한다. 특정 실시 양태에서, RNA 폴리머라제 III 기반 U6 프로모터가 tracrRNA의 발현을 유도한다.

[0076] 전형적으로, 내인성 CRISPR 시스템의 맥락에서, CRISPR 복합체(표적 서열에 혼성화되고 하나 이상의 Cas 단백질과 복합체화된 가이드 서열을 포함함)의 형성은 표적 서열에 또는 근처에(표적 서열로부터 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50개 이상의 염기쌍 이내에) 한 가닥 또는 두 가닥 모두의 절단을 초래한다. 이론에 구애됨이 없이, 야생형 tracr 서열의 전부 또는 일부를 포함하거나 이로 이루어질 수 있는 tracr 서열(예를 들어 약 20, 26, 32, 45, 48, 54, 63, 67, 85개 이상의 뉴클레오티드 또는 그에 초과하는 야생형 tracr 서열)은 예를 들어 tracr 서열의 적어도 일부를 따라 가이드 서열에 작동 가능하게 연결된 tracr 메이트 서열 전부 또는 일부에 혼성화함으로써 CRISPR 복합체의 일부를 형성할 수도 있다. 일부 실시 양태에서, CRISPR 시스템의 하나 이상의 요소의 발현을 유도하는 하나 이상의 벡터는 CRISPR 시스템의 요소의 발현이 하나 이상의 표적 부위에서 CRISPR 복합체의 형성을 지시하도록 숙주 세포(예를 들어, GMP 또는 줄기세포)에 도입된다. 예를 들어, Cas 효소, tracr-메이트 서열에 연결된 가이드 서열, 및 tracr 서열은 각각 별도의 벡터 상의 별도의 조절 요소에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 대안적으로, 동일하거나 상이한 조절 요소로부터 발현된 2개 이상의 요소는 하나 이상의 추가 벡터가 첫 번째 벡터에 포함되지 않은 CRISPR 시스템의 임의의 구성요소를 제공하면서 단일 벡터로 결합될 수 있다. 단일 벡터로 결합된 CRISPR 시스템 요소는 임의의 적절한 방향으로 배열될 수 있다. 예를 들어 하나의 요소가 두 번째 요소에 대해 5'(두 번째 요소의 "상류") 또는 3'(두 번째 요소의 "하류")에 위치한다. 한 요소의 코딩 서열은 두 번째 요소의 코딩 서열과 동일 가닥 또는 반대 가닥에 위치할 수 있고, 동일 방향 또는 반대 방향으로 배향될 수 있다. 일부 실시 양태에서, 단일 프로모터는 CRISPR 효소, 및 하나 이상의 인트론 서열 내에 삽입된 가이드 서열, tracr 메이트 서열(경우에 따라 가이드 서열에 작동 가능하게 연결됨), 및 tracr 서열 중 하나 이상(예를 들어, 상이한 인트론에 2개 이상, 적어도 하나의 인트론에 2개 이상, 또는 단일 인트론에 모두)을 코딩하는 전사체의 발현을 유도한다. 일부 실시 양태에서, CRISPR 효소, 가이드 서열, tracr 메이트 서열, 및 tracr 서열은 동일한 프로모터에 작동 가능하게 연결되고 이로부터 발현된다.

[0077] 일부 실시 양태에서, CRISPR 발현 벡터는 제한 엔도뉴클레아제 인식 서열("클로닝 부위"라고도 함)과 같은 하나 이상의 삽입 부위를 포함한다. 일부 실시 양태에서, 하나 이상의 삽입 부위(예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상, 또는 그에 초과하는 삽입 부위)는 하나 이상의 벡터의 하나 이상의 서열 요소의 상류 및/또는 하류에 위치한다. 일부 실시 양태에서, 벡터는 tracr 메이트 서열의 상류에, 경우에 따라 tracr 메이트 서열에 작동 가능하게 연결된 조절 요소의 하류에 삽입 부위를 포함하여, 가이드 서열을 삽입 부위에 삽입한 후와 발현 시 가이드 서열은 진핵 세포(예를 들어, GMP 또는 줄기세포)에서 표적 서열에 대한 CRISPR 복합체의 서열 특이적 결합을 지시한다. 일부 실시 양태에서, 벡터는 2개 이상의 삽입 부위를 포함하며, 각 삽입 부위는 각 부위에서 가이드 서열이 삽입될 수 있도록 2개의 tracr 메이트 서열 사이에 위치한다. 이러한 배열에서, 2개 이상의 가이드 서열은 2개 이상의 카피의 단일 가이드 서열, 2개 이상의 상이한 가이드 서열, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 다수의 상이한 가이드 서열이 사용되는 경우, 단일 발현 구축물을 사용하여 CRISPR 활성을 세포 내의 다수의 상이한 상응하는 표적 서열에 표적화할 수 있다. 예를 들어, 단일 벡터는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20개 이상 또는 그에 초과하는 가이드 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상 또는 그에 초과하는 이러한 가이드 서열 함유 벡터가 제공될 수 있고, 경우에 따라 세포에 전달될 수 있다.

[0078] 일부 실시 양태에서, 벡터는 Cas 단백질과 같은 CRISPR 효소를 코딩하는 효소 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 조절 요소를 포함한다. Cas 단백질의 비제한적인 예에는 Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9(Csn1 및 Csx12로도 알려짐), Cas10, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, 이들의 동족체 또는 이들의 변형된 버전이 포함된다. 일부 실시 양태에서, 변형되지 않은 CRISPR 효소는 Cas9와 같이 DNA 절단 활성을 갖는다. 일부 실시 양태에서, CRISPR 효소는 표적 서열 내 및/또는 표적 서열의 상보체 내와 같은 표적 서열의 위치에서 가닥 중 한 가닥 또는 두 가닥 모두의 절단을 지시한다. 일부 실시 양태에서 CRISPR 효소는 표적 서열의 첫 번째 또는 마지막 뉴클레오티드로부터 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 200, 500개, 또는 그 이상의 염기쌍 내의 한 가닥 또는 두 가닥 모두의 절단을 지시한다. 일부 실시 양태에서, 벡터는 돌연변이된 CRISPR 효소가 표적 서열을 함유하는 표적 폴리뉴클레오티드의 한 가닥 또는 두 가닥 모두를 절단하는 능력이 결여되도록 상응하는 야생형 효소에 대해 돌연변이된 CRISPR 효소를 코딩한다. 예를 들어, S. 피오게네스의 Cas9의 RuvC I 촉매 도메인에서 아스파르테이트에서 알라닌으로의 치환(D10A)은 Cas9를 두 가닥을 모두 절단하

는 뉴클레아제에서 니카아제(단일 가닥을 절단함)로 전환시킨다. Cas9a 니카아제를 만드는 돌연변이의 다른 예에는 H840A, N854A 및 N863A가 제한 없이 포함된다. 추가 예로서, Cas9의 2개 이상의 촉매 도메인(RuvC I, RuvC II 및 RuvC III 또는 HNH 도메인)이 돌연변이되어 모든 DNA 절단 활성이 실질적으로 결여된 돌연변이된 Cas9를 생성할 수 있다. 일부 실시 양태에서, D10A 돌연변이는 H840A, N854A 또는 N863A 돌연변이 중 하나 이상과 조합되어 모든 DNA 절단 활성이 실질적으로 결여된 Cas9 효소를 생성한다. 일부 실시 양태에서, CRISPR 효소는 돌연변이된 효소의 DNA 절단 활성이 변형되지 않은 형태에 대하여 약 25%, 10%, 5%, 1%, 0.1%, 0.01% 미만이거나 더 낮은 경우 모든 DNA 절단 활성이 실질적으로 결여된 것으로 간주된다. 효소가 SpCas9가 아닌 경우, 돌연변이는 SpCas9의 위치 10, 762, 840, 854, 863 및/또는 986(이는 예를 들어 표준 서열 비교 도구에 의해 확인될 수 있음)에 해당하는 임의의 또는 모든 잔기에서 만들어질 수 있다. 특히, 다음 돌연변이 D10A, E762A, H840A, N854A, N863A 및/또는 D986A 중 임의의 것 또는 전부가 SpCas9에서 선호될 뿐만 아니라 임의의 대체 아미노산에 대한 보존적 치환도 예상된다. 다른 Cas9의 해당 위치에서도 동일한 것(또는 이들 돌연변이의 보존적 치환)이 나타난다.

[0079] 표시된 오솔로그도 본원에 기재된다. Cas 효소는 유형 II CRISPR 시스템의 다중 뉴클레아제 도메인이 있는 가장 큰 뉴클레아제와 상동성을 공유하는 일반적인 부류의 효소를 나타낼 수 있으므로 Cas9로 식별될 수 있다. 가장 바람직하게는, Cas9 효소는 spCas9 또는 saCas9로부터의 것이거나 이로부터 유래된다. 유래되었다는 것은 유래된 효소가 주로 야생형 효소와 높은 정도의 서열 상동성을 갖는다는 의미에서 기반을 두지만, 본원에 기재된 바와 같은 일부 방식으로 돌연변이(변형)되었다는 것을 의미한다.

[0080] Cas 및 CRISPR 효소라는 용어는 달리 명백하지 않는 한 일반적으로 본원에서 상호교환적으로 사용된다는 것이 인식될 것이다. 위에서 언급한 바와 같이, 본원에 사용된 잔기 넘버링 중 다수는 스트렙토코쿠스 피오게네스의 II형 CRISPR 유전자좌로부터의 Cas9 효소를 나타낸다. 그러나 본 개시 내용이 SpCas9, SaCa9, St1Cas9 등과 같은 다른 미생물 종으로부터의 더 많은 Cas9를 포함한다는 것을 이해할 것이다.

[0081] 유전자 편집 시스템(예를 들어, 징크 핑거 뉴클레아제, CRISPR 및 TALEN)은 GMP 또는 줄기세포에서 발견되는 기존 유전자를 대체하거나 파괴하는 것(녹아웃)과 같이 GMP 또는 줄기세포 내로 변형을 유전적으로 조작하는 데 사용될 수 있다. 본원에 제시된 실시예에 나타난 바와 같이, 본 개시 내용의 GMP는 녹아웃 돌연변이에 특히 취약하다. 또한, SIRPα 유전자 녹아웃 및/또는 PI3Kγ 유전자 녹아웃과 같은 추가 녹아웃이 본 개시 내용의 GMP로부터 쉽게 생성될 수 있을 것으로 예상된다. 대안적으로, 동일한 편집 시스템(예를 들어, CRISPR 및 TALEN)을 사용하여 유전자 좌위에서 발견되지 않은 서열 정보를 포함하도록 유전자 좌위를 변경할 수 있다(녹인 돌연변이). 이러한 변형은 "기능 획득" GMP를 생성하는 데 사용될 수 있다. 이러한 변형된 GMP는 예를 들어 질환 또는 장애와 관련된 생체분자를 발현함으로써, 질환 상태를 모방하는 데 특히 유용하다.

[0082] 다른 실시 양태에서, GMP 세포는 벡터를 사용하여 조작된다. 예를 들어, 본 개시 내용의 CAR은 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노 관련 바이러스 벡터, 바큘로바이러스 벡터, 잠자는 숲속의 미녀 트랜스포존, 피기백 트랜스포존을 포함하지만 이에 제한되지 않는 많은 수의 기술을 사용하여, mRNA 형질감염에 의해, 또는 상기 방법의 조합을 사용하여 세포 내로 도입될 수 있다. CAR은 내인성 프로모터(예를 들어, TCRα 또는 TCRβ 프로모터)의 제어하에 있도록 발현될 수 있다. 일부 실시 양태에서, CAR은 외래 프로모터(예를 들어 CMV 프로모터)를 사용하여 발현된다.

[0083] 일부 실시 양태에서, CAR을 코딩하는 핵산 분자의 도입은 CAR을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터를 형질도입하거나, CAR을 코딩하는 핵산 분자를 본원에 기재된 바와 같이 배양된 GMP에 형질감염시키는 것을 포함한다.

[0084] 일부 실시 양태에서, 방법은 a) GMP의 배양물을 확장하고 유지하기 위해 배양된 GMP 집단을 제공하는 단계; b) CAR 구축물을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터를 GMP에 도입하는 단계; 및 c) 형질전환/형질감염된 GMP를 배양하는 단계를 포함한다. 일부 실시 양태에서, 방법은 골수 및 림프 계통의 혈액 세포, 예컨대 단핵구, 대식세포, 과립구, 호중구, 호염기구, 호산구, 적혈구, 거핵구, 혈소판, T 세포, B 세포 및 자연 살해 세포로 GMP의 분화를 추가로 제공한다. 특정 실시 양태에서, 본원에 개시된 방법은 GMP를 MCSF를 포함하는 대식세포 분화 배지로 배양함으로써 본 개시 내용의 GMP를 대식세포로 분화시키는 단계를 추가로 포함한다. 추가 실시 양태에서, 대식세포 분화 배지는 RPMI 1640, 10% FBS 및 20 ng/mL의 MCSF를 포함한다. 대안적인 실시 양태에서, 본원에 개시된 방법은 GMP를 GCSF를 포함하는 과립구 분화 배지로 배양하는 단계를 포함하여 본 개시 내용의 GMP를 과립구로 분화시키는 단계를 추가로 포함한다. 추가 실시 양태에서, 과립구 분화 배지는 RPMI 1640, 10% FBS 및 20 ng/mL의 GCSF를 포함한다.

[0085] 특정 실시 양태에서, 본 개시 내용은 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 과립구-대식세포 전구세포(GMP)를

유전적으로 조작하는 방법으로서, CAR을 포함하는 벡터를 GMP에 도입하여 CAR을 발현하는 GMP(CAR-GMP)를 형성하는 단계; 규정된 배양 조건에서 복수 계대를 위해 CAR-GMP를 확장 및 배양하여 CAR-GMP 집단을 생성하는 단계; 및 시험관 내에서 CAR-GMP 집단이 CAR을 발현하는 과립구, 대식세포 또는 수지상 세포로 분화하도록 유도하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 추가 실시 양태에서, GMP는 줄기세포로부터 획득된다. 추가 실시 양태에서, 줄기세포는 조혈 줄기세포이다. 다른 실시 양태에서, 조혈 줄기세포는 대상체의 골수로부터 단리된다. 또 다른 실시 양태에서, 대상체는 포유류 대상체이다. 추가 실시 양태에서, 대상체는 인간 환자이다. 추가 실시 양태에서, CAR은 항원에 결합할 수 있는 세포 외 도메인, 막 횡단 도메인, 및 포식작용 및/또는 염증유발성 사이토카인 분비를 증가시킴으로써 과립구, 대식세포 및 수지상 세포의 항종양 활성을 증가시키도록 설계된 적어도 하나의 세포 내 도메인을 포함한다. 다른 실시 양태에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 또 다른 실시 양태에서, 바이러스 벡터는 복제성 또는 비복제성 벡터일 수 있고, 아데노바이러스 벡터, 아데노 관련 바이러스(AAV) 벡터, 홍역 벡터, 헤르페스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 랍도바이러스 벡터, 레오바이러스 벡터, 세네카 밸리 바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터, 파보바이러스 벡터 또는 알파바이러스 벡터일 수 있다. 특정 실시 양태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터이다. 또 다른 실시 양태에서, 규정된 배양 조건은 (i) 성장 인자, (ii) B-Raf 키나아제 억제제, 및 (iii) Wnt 활성화제 및/또는 GSK-3 억제제를 포함하는 배양 배지에서 CAR-GMP를 배양하는 단계를 포함하며, 여기서 CAR-GMP는 복수회 세포 계대 및/또는 클론 확장을 거친 후에도 실질적으로 형태학적으로 변하지 않은 상태로 유지된다. 추가 실시 양태에서, 배양 배지는 DMEM/F12 및 신경 기초 배지를 포함한다. 추가 실시 양태에서, 배양 배지는 DMEM/F12 및 신경 기초 배지를 약 5:1 내지 약 1:5의 비로 포함한다. 다른 실시 양태에서, 배양 배지는 DMEM/F12 및 신경 기초 배지를 약 1:1의 비로 포함한다. 또 다른 실시 양태에서, 배양 배지는 인슐린, 트랜스페린, 소 혈청 알부민(BSA) 분획 V, 푸트레신, 아셀렌산나트륨, DL-α 토코페롤 및/또는 리놀렌산으로부터 선택된 하나 이상의 보충제를 포함한다. 추가 실시 양태에서, 배양 배지는 인슐린, 트랜스페린, BSA 분획 V, 푸트레신, 아셀렌산나트륨, DL-α 토코페롤 및 리놀렌산으로 보충된다. 특정 실시 양태에서, 성장 인자는 줄기세포 인자(SCF)이다. 또 다른 실시 양태에서, B-Raf 키나아제 억제제는 GDC-0879, PLX4032, GSK2118436, BMS-908662, LGX818, PLX3603, RAF265, RO5185426, 베무라페닙, PLX8394, SB590885 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시 양태에서, Wnt 활성화제는 SKL 2001, BML-284, WAY 262611, CAS 853220-52-7, QS11 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가 실시 양태에서, GSK-3 억제제는 CHIR99021, CHIR98014, SB216763, BIO, A1070722, AR-A014418 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시 양태에서, 규정된 배양 조건은 (i) 성장 인자; (ii) B-Raf 키나아제 억제제; (iii) 미토겐 활성화 키나아제 상호작용 단백질 키나아제 1 및 2(Mnk1/2)를 억제하는 작용제; (iv) PI3K 경로를 억제하는 작용제; (v) 경우에 따라, 하나 이상의 혈청 성분을 포함하는 배양 배지에서 CAR-GMP를 배양하는 단계를 포함하며, 여기서 CAR-GMP는 복수회 세포 계대 및/또는 클론 확장을 거친 후에도 실질적으로 형태학적으로 변하지 않은 상태로 유지된다. 추가 실시 양태에서, 배양 배지는 DMEM/F12 및 신경 기초 배지를 포함한다. 추가 실시 양태에서, 배양 배지는 DMEM/F12 및 신경 기초 배지를 약 5:1 내지 약 1:5의 비로 포함한다. 다른 실시 양태에서, 배양 배지는 DMEM/F12 및 신경 기초 배지를 약 1:1의 비로 포함한다. 또 다른 실시 양태에서, 배양 배지는 인슐린, 트랜스페린, 소 혈청 알부민(BSA) 분획 V, 푸트레신, 아셀렌산나트륨, DL-α 토코페롤 및/또는 리놀렌산으로부터 선택된 하나 이상의 보충제를 포함한다. 추가 실시 양태에서, 배양 배지는 인슐린, 트랜스페린, BSA 분획 V, 푸트레신, 아셀렌산나트륨, DL-α 토코페롤 및 리놀렌산으로 보충된다. 추가 실시 양태에서, 성장 인자는 줄기세포 인자(SCF)이다. 또 다른 실시 양태에서, B-Raf 키나아제 억제제는 GDC-0879, PLX4032, GSK2118436, BMS-908662, LGX818, PLX3603, RAF265, RO5185426, 베무라페닙, PLX8394, SB590885 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0086] 추가 실시 양태에서, Mnk1/2를 억제하는 작용제는 CGP-57380, 세르코스포르아미드, BAY 1143269, 토미보세르팁, ETC-206, SLV-2436 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 추가 실시 양태에서, PI3K 경로를 억제하는 작용제는 33-메틸아데닌, LY294002, 알펠리십, 워트만닌, 케르세틴, hSMG-1 억제제 11j, 잔델리십, 알펠리십 염산염, 이델랄리십, 부팔리십, 코판리십, IPI549, 닥톨리십, 픽틸리십, SAR405, 두벨리십, 피메피노스타트, GDC-0077, PI-103, YM-20163, PF-04691502, 타셀리십, 오미팔리십, 사모톨리십, 이소르함네틴, ZATK474, 파르사클리십, 리고세르팁, AZD8186, GSK2636771, 디시테르티드, TG100-115, AS-605240, PI3K-IN-1, 닥톨리십 토실레이트, 게다톨리십, TGX-221, 움브랄리십, AZD 6482, 세라벨리십, 비미랄리십, 아피톨리십, 알파-리놀렌산, Vps34-PIK-III, PIK-93, Vps34-IN-1, CH5132799, 레니올리십, 복스탈리십, GSK1059615, 소놀리십, PKI-402, PI4KIII베타-IN-9, HS-173, BGT226 말레인산염, 픽틸리십 디메탄 설폰산염, VS-5584, IC-87114, 케르세틴 이수화물, CNX-1351, SF2523, GDC -0326, 셀레탈리십, 아칼리십, SAR-260301, ZAD-8835, GNE-317, AMG319, 네미랄리십, IITZ-01, PI-103 염산염, 오록신 B, 필라랄리십, AS-252424, 코판리십 이염산염, AMG

511, 디시테르티드 TFA, PIK-90, 테날리십, 에스쿨레틴, CGS 15943, GNE-477, PI-3065, A66, AZD3458, 진세노시드 Rk1, 소포카르핀, 부팔리십 염산염, Vps34-IN-2, 린페를리십, 아르니콜리드 D, KP372-1, CZC24832, PF-4989216, (R)-두벨리십, PQR530, P11δ-IN-1, 움브랄리십 염산염, MTX-211, PI3K/mTOR 억제제-2, LX2343, PF-04979064, 폴리갈라사포닌 F, 글라우코칼릭신 A, NSC781406, MSC2360844, CAY10505, IPI-3063, TG 100713, BEBT-908, PI-828, 브레비안아미드 F, ETP-46321, PIK-294, SRX3207, 소포카르핀 일수화물, AS-604850, 데스메틸글리시테인, SKI V, WYE-687, NVP-QAV-572, GNE- 493, CAL-130 염산염, GS-9901, BGT226, IHMT-PI3Kδ-372, PI3Kα-IN-4, 파사클리십 염산염, PF-06843195, PI3K-IN-6, (S)-PI3Kα-IN-4, PI3K(감마)-IN-8, BAY1082439, CYH33, PI3Kγ 억제제 2, PI3Kδ 억제제 1, PARP/PI3K-IN-1, LAS191954, PI3K-IN-9, CHMFL-PI3KD-317, PI3K/HDAC-IN-1, MSC2360844 헤미푸마레이트, PI3K-IN-2, PI3K/mTOR 억제제-1, PI3Kδ-IN-1, 유스카프산, KU-0060648, AZD 6482, WYE-687 이염산염, GSK2292767, (R)-움브랄리십, PIK-293, 이델랄리십 D5, PIK-75, 히르수테논, 케르세틴 D5, PIK-108, hSMG-1 억제제 11e, PI3K-IN-10, NVP-BAG956, PI3Kγ 억제제 1, CAL-130, ON 146040, PI3kδ 억제제 1, PI3Kα/mTOR-IN-1 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, CAR-GMP를 대식세포 콜로니-자극 인자(MCSF)를 포함하는 대식세포 분화 배지로 배양하는 단계를 포함하여 CAR-GMP는 CAR을 발현하는 대식세포로 분화하도록 유도된다. 또 다른 실시 양태에서, 대식세포 분화 배지는 RPMI 1640, 우태 혈청(FBS) 및 MCSF를 포함한다. 대안적인 실시 양태에서, 방법은 GMP를 과립구 콜로니 자극 인자(GCSF)를 포함하는 과립구 분화 배지와 함께 배양하는 단계를 포함하여 CAR-GMP를 CAR을 발현하는 과립구로 분화시키는 단계를 추가로 포함한다. 추가 실시 양태에서, 과립구 분화 배지는 RPMI 1640, FBS 및 GCSF를 포함한다.

[0087] 본원에 제시된 연구에서, 생체 외 확장된 GMP가 높은 효율 및 특이성으로 암세포를 표적화하는 CAR-대식세포를 생성하도록 조작될 수 있다는 것이 밝혀졌다. 따라서, 본 개시 내용은 암 면역요법의 사용을 위해 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 과립구-대식세포 전구세포(GMP)를 유전적으로 조작하는 방법을 제공한다. 키메라 항원 수용체는 항원에 결합할 수 있는 세포 외 도메인, 막 횡단 도메인 및 적어도 하나의 세포 내 도메인을 포함한다. 세포 내 도메인은 포식작용 및/또는 염증유발성 사이토카인 분비를 증가시켜 과립구, 대식세포 및 수지상 세포의 항종양 활성을 증가시키도록 설계된다. CAR-GMP는 확장되고 시험관 내 또는 생체 내에서 과립구, 대식세포 또는 수지상 세포로 분화하도록 유도될 수 있다. CAR-GMP 또는 그 파생물인 과립구, 대식세포 및 수지상 세포는 환자에게 입양 전달되어 종양에 침투하고 표적 세포를 살해함으로써 강력한 면역 이펙터로서 작용한다.

[0088] CAR-GMP는 또한 암이 있는 대상체를 치료하기 위해 하나 이상의 항암제와 조합하여 투여될 수 있다. 본원에 개시된 CAR-GMP와 함께 사용될 수 있는 항암제의 예에는 티오테파 및 CYTOXAN® 시클로포스파미드와 같은 알킬화제; 부설판, 임프로설판, 피포설판과 같은 알킬 설폰산염; 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파, 및 우레도파와 같은 아지리딘; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드 및 트리메틸올로멜라민을 포함하는 에틸렌이민 및 메틸아멜라민; 아세토게닌(예를 들어, 불라타신 및 불라타시논); 캄프토테신(합성 유사체 토포테칸 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065(이의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 크립토피신(특히 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 돌라스타틴; 듀오카마이신(합성 유사체 KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘류테로빈; 판크라티스타틴; 사르코딕틴; 스폰지스타틴; 클로람부실, 클로르나파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노벰비친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드와 같은 질소 머스타드; 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라니무스틴과 같은 니트로소우레아; 빈카 알칼로이드; 에피포도필로톡신; 에네디인 항생제(예를 들어, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마1I 및 칼리케아미신 오메가1I; L-아스파라기나제; 안트라세네디온 치환 요소; 메틸 히드라진 유도체; 디네미신 A를 포함한 디네미신; 클로드로네이트와 같은 비스포스포네이트; 에스페라미신; 게다가 네오카르지노스타틴 발색단 및 관련 발색 단백질 에네디인 항생제 발색단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 칵티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이시니스, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, ADRIAMYCIN® 독소루비신(모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신C(예컨대, 미토마이신 C), 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 켈라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 유베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 메토트렉세이트 및 5-플루오로우라실(5-FU)과 같은 항대사물질; 데노프테린, 메토트렉세이트, 프테롭테린, 트리메트렉세이트와 같은 엽산 유사체; 플루다라빈, 6-머캅토퓨린, 티아미프린, 티오구아닌과 같은 퓨린 유사체; 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘과 같은 피리미딘 유사체; 칼루스테론, 드로모스타놀론 프

로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤과 같은 안드로겐; 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스테인과 같은 항부신제; 프롤린산과 같은 엽산 보충제; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레불린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지콘; 엘포르니틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 질산갈륨; 수산화요소; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄신 및 안사미토신과 같은 메이탄시노이드; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단몰; 니티에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산티온; 포도필린산; 2-에틸히드라지드; 프로카바진; PSK® 다당류 복합체(JHS Natural Products, 미국 오리건주 유진 소재); 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지콘; 2,2 2''-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센(특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 게이시토신; 아라비노시드("Ara-C"); 시클로포스파미드; 티오테파; 탁소이드, 예를 들어 TAXOL® 파클리탁셀(Bristol-Myers Squibb Oncology, 미국 뉴저지주 프린스턴 소재), ABRAXANE® 발색단 무함유, 알부민 조작된 파클리탁셀의 나노입자 제제(American Pharmaceutical Partners, 미국 일리노이주 샴버그 소재) 및 TAXOTERE®(도세탁셀)(Rhone-Poulenc Rorer), 프랑스 안토니 소재); 클로란부실; GEMZAR®(젬시타빈); 6-티오구아닌; 메르캅토퓨린; 메토트렉세이트; 시스플라틴, 옥살리플라틴 및 카르보플라틴과 같은 백금 배위 착물; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드(VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴; NAVELBINE® 비노렐빈; 노반트론; 테니포시드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; 이리노테칸(예를 들어, CPT-11); 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴(DFMO); 레티노산과 같은 레티노이드; 카페시타빈; 류코보린(LV); 이레노테칸; 부신피질 억제제; 부신피질스테로이드; 프로게스틴; 에스트로겐; 안드로겐; 성선 자극 호르몬 방출 호르몬 유사체; 및 상기 중 임의의 것의 약학적으로 허용 가능한 염, 산 또는 유도체가 포함되지만 이에 제한되지는 않는다. 또한, 포함되는 항암제는 예를 들어 타목시펜(NOLVADEX® 타목시펜 포함), 랄록시펜, 드롤록시펜, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤 및 FARESTON-토레미펜을 비롯한 항에스트로겐 및 선택적 에스트로겐 수용체 조절제(SERM)와 같이 종양에 대한 호르몬 작용을 조절 또는 억제하는 작용을 하는 항호르몬제; 부신에서 에스트로겐 생산을 조절하는 아로마타제 효소를 억제하는 아로마타제 억제제, 예를 들어 4(5)-이미다졸, 아미노글루테티미드, MEGASE® 메게스트롤 아세테이트, AROMASL® 엑세메스탄, 포르메스타니, 파드로졸, RIVISOR® 보로졸, FEMARA® 레트로졸 및 ARTMIDEX® 아나스트로졸; 및 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드 및 고세렐린과 같은 항안드로겐; 뿐만 아니라 트록사시타빈(1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 이상 세포 증식과 관련된 신호전달 경로에서 유전자의 발현을 억제하는 것들, 예를 들어 PKC-알파, Ralf 및 H-Ras; VEGF-A 발현 억제제(예를 들어, ANGIOZYME® 리보자임) 및 HER2 발현 억제제와 같은 리보자임; 유전자 치료 백신과 같은 백신, 예를 들어, ALLOVECTIN® 백신, LEUVECTIN® 백신, 및 VAXID® 백신; PROLEUKIN® rJL-2; LURTOTECAN® 토포이소머라제 1 억제제; ABARELLX® rmRH; 트라스투주맙과 같은 항체 및 상기 임의의 것의 약학적으로 허용 가능한 염, 산 또는 유도체이다.

[0089] CAR-T 요법과 같은 다른 유형의 세포 면역요법에 비해 이 GMP 기반 암 면역요법에는 여러 가지 장점이 있다. GMP의 장기간 확장은 면역요법을 위한 기성품 CAR 대식세포를 생산할 수 있는 기회를 제공한다. 기성품 CAR 대식세포의 임상 적용에 있어 주요 장애물은 인간 백혈구 항원(HLA) 적합성이다. GMP를 장기간 확장하고 유전적으로 조작할 수 있는 능력을 통해 건강한 기증자 및/또는 제대혈로부터 수집한 GMP의 마스터 세포 은행을 구축하여 면역요법을 위한 기성품 CAR 대식세포를 생성할 수 있다. 대안적으로, HLA-보편적 GMP는 위에서 설명한 바와 같은 유전자 변형 기술을 사용하여 생성될 수 있다. GMP의 장기간 확장은 GMP에 대한 정교하고 다중적인 유전적 조작을 허용하여 이들 세포를 보다 치료적으로 적용 가능하게 만든다. 예를 들어, 신호 조절 단백질-α(SIRPα) 및 포스파티딜이노시톨 3-키나아제-γ(PI3Kγ) 유전자를 녹아웃시켜 GMP 유래 CAR-대식세포의 항종양 활성을 더욱 강화할 수 있다. 대식세포의 SIRPα 녹아웃은 종양 세포와 대식세포 사이의 CD47-SIRPα 상호작용을 방해함으로써 이들의 항종양 활성을 강화할 것으로 예상된다. PI3Kγ는 대식세포에서 풍부하게 발현되며 면역 자극(M1 대식세포)과 억제(M2 대식세포) 사이의 대식세포 전환을 직접 제어한다. 대식세포에서 PI3Kγ의 활성화는 염증 및 종양 성장 동안 면역 억제를 촉진하는 전사 프로그램을 유도하는 반면, 대식세포 PI3Kγ의 불활성화는 면역 자극 전사 프로그램을 촉진한다. PI3Kγ-/- 대식세포는 면역 자극성 M1 표현형으로 분극화되어 향상된 항종양 활성을 가질 것으로 예상된다.

[0090] 유전적으로 조작된 GMP의 입양 전달은 면역억제성 종양 미세환경(TME)을 역전시킬 가능성이 있다. 종양 관련 대식세포(TAM)는 TME의 주요 구성 요소이다. 실험 및 임상 연구에서 대부분의 TAM은 종양 세포가 자연 살해(NK) 및 T 세포의 공격을 받는 것을 방지하는 면역억제성 M2 대식세포라는 것이 밝혀졌다. 이러한 관찰 결과는 최대의 항종양 효과를 달성하기 위해 다른 면역요법과 함께 TAM을 표적화할 필요가 있음을 시사한다. 한 가지 전략은 면역억제성 M2 대식세포에 항종양 활성이 있는 면역자극성 M1 대식세포를 보충하는 것이다. 이는 TAM을 고갈

시킨 후 *PI3Kγ-/-* GMP 또는 IL-12를 과발현하는 GMP로부터 생성된 면역자극성 M1 대식세포의 입양 전달을 통해 달성될 수 있다. IL-12를 발현하는 단핵구 및 대식세포는 TME를 면역억제성에서 면역자극성으로 변화시키는 것으로 나타났다.

[0091] GMP는 CAR-T 세포보다 더 완전하고 강력한 면역 반응을 일으킬 가능성이 있는 대식세포를 생성하도록 조작될 수 있다. 대식세포는 염증성 사이토카인의 분비, 암세포의 포식작용, 그리고 더 중요하게는 NK 및 T 세포에 대한 암 항원의 처리 및 제시를 통해 항종양 활성을 나타낸다. 대식세포는 전문적인 항원 제시 세포(APC)이다. 대식세포에 의해 활성화된 내인성 NK 및 T 세포는 높은 선택성과 효율성으로 면역 반응을 일으킬 가능성이 높다. 따라서 유전공학을 통해 GMP/대식세포의 힘을 활용하는 것은 차세대 암 면역요법을 개발하기 위한 유망한 접근 방식을 나타낸다.

[0092] 본 개시 내용은 대상체에서 질환 관련 항원의 발현과 관련된 질환을 치료 또는 예방하는 방법으로서, 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 GMP(예를 들어 이로부터 유래된 대식세포 또는 과립구 등)의 유효량을 대상체에게 투여하여 대상체를 치료하거나 대상체에서 질환을 예방하는 단계를 포함하고, CAR은 질환과 관련된 질환 관련 항원에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하고, 상기 질환 관련 항원은 CD5, CD19; CD123; CD22; CD30; CD171; CS-1(CD2 서브세트 1, CRACC, SLAMF7, CD319, 및 19A24라고도 함); C형 렉틴 유사 분자-1(CLL-1 또는 CLECL1); CD33; 표피 성장 인자 수용체 변이체 III(EGFRviii); 강글리오시드 G2(GD2); 강글리오시드 GD3(aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlcp(1-1)Cer); TNF 수용체 패밀리 구성원 B 세포 성숙(BCMA); Tn 항원((Tn Ag) 또는 (GalNAcα-Ser/Thr)); 전립선 특이적 막 항원(PSMA); 수용체 티로신 키나아제 유사 고아 수용체 1(ROR1); Fms 유사 티로신 키나아제 3(FLT3); 종양 관련 당단백질 72(TAG72); CD38; CD44v6; 급성 백혈병 또는 림프종에서는 발현되지만 조혈 전구세포에서는 발현되지 않는 글리코실화된 CD43 에피토프, 비조혈암에서 발현되는 글리코실화된 CD43 에피토프, 암배아 항원(CEA); 상피 세포 접착 분자(EPCAM); B7H3(CD276); KIT(CD117); 인터루킨-13 수용체 서브유닛 알파-2(IL-13Ra2 또는 CD213A2); 메조텔린; 인터루킨 11 수용체 알파(IL-11Ra); 전립선 줄기세포 항원(PSCA); 프로테아제 세린 21(테스티신 또는 PRSS21); 혈관 내피 성장 인자 수용체 2 VEGFR2); 루이스(Y) 항원; CD24; 혈소판 유래 성장 인자 수용체 베타(PDGFR-베타); 단계 특이적 배아 항원-4(SSEA-4); CD20; 엽산 수용체 알파; 수용체 티로신-단백질 키나아제 ERBB2(Her2/neu); 뮤신 1, 세포 표면 관련(MUC1); 표피 성장 인자 수용체(EGFR); 신경 세포 접착 분자(NCAM); 프로스타제; 전립선 산 포스파타제(PAP); 신장 인자 2 돌연변이(ELF2M); 에프린 B2; 섬유아세포 활성화 단백질 알파(FAP); 인슐린 유사 성장 인자 1 수용체(IGF-I 수용체), 탄산탈수효소 IX(CA1X); 프로테아좀(Prosome, Macropain) 서브유닛, 베타 유형, 9(LMP2); 당단백질 100(gp100); 절단점 클러스터 영역(BCR) 및 아벨슨 뮤린 백혈병 바이러스성 종양유전자 동족체1(Abl)로 이루어진 종양유전자 융합 단백질(bcr-abl); 티로시나제; 에프린 A형 수용체 2(EphA2); 푸코실 GM1; 시알릴 루이스 접착 분자(sLe); 강글리오시드 GM3(aNeu5Ac(2-3)bDClalp(1-4)bDGlcp(1-1)Cer); 트랜스글루타미나제 5(TGS5); 고분자량 흑색종 관련 항원(HMWMAA); o-아세틸-GD2 강글리오시드(OAcGD2); 엽산 수용체 베타; 종양 내피 마커 1(TEM1/CD248); 종양 내피 마커 7 관련(TEM7R); 클라우딘 6(CLDN6); 갑상선 자극 호르몬 수용체(TSHR); G 단백질 결합 수용체 클래스 C 그룹 5, 멤버 D(GPRC5D); 염색체 X 오픈 리딩 프레임 61(CXORF61); CD97; CD179a; 역형성 림프종 키나아제(ALK); 폴리시알산; 태반 특이적 1(PLAC1); globoH 글리코세라미드(GloboH)의 6당류 부분; 유선 분화 항원(NY-BR-1); 유로플라킨 2(UPK2); A형 간염 바이러스 세포 수용체 1(HAVCR1); 아드레날린 수용체 베타 3(ADRB3); 파넥신 3(PANX3); G 단백질 결합 수용체 20(GPR20); 림프구 항원 6 복합체, 유전자좌 K 9(LY6K); 후각 수용체 51E2(OR51E2); TCR 감마 선택적 판독 프레임 단백질(TARP); 윌름스 종양 단백질(WT1); 암/고환 항원 1(NY-ESO-1); 암/고환 항원 2(LAGE-1a); 흑색종 관련 항원 1(MAGE-A1); 염색체 12p에 위치한 ETS 전위 변이 유전자 6(ETV6-AML); 정자 단백질 17(SPA17); X 항원 패밀리, 구성원 1A(XAGE1); 안지오포이에틴-결합 세포 표면 수용체 2(Tie 2); 흑색종 암 고환 항원-1(MAD-CT-1); 흑색종 암 고환 항원-2(MAD-CT-2); Fos 관련 항원 1; 종양 단백질 p53(p53); p53 돌연변이; 프로스테인; 서바이빙; 텔로머라제; 전립선 암종 종양 항원-1(PCT A-1 또는 갈렉틴 8), T 세포 1에 의해 인식되는 흑색종 항원(MelanA 또는 MARTI); 래트 육종(Ras) 돌연변이; 인간 텔로머라제 역전사효소(hTERT); 육종 전위 중단점; 흑색종 아폽토시스 억제제(ML-IAP); ERG(막 횡단 프로테아제, 세린 2(TMPRSS2) ETS 융합 유전자); N-아세틸 글루코사미닐-트랜스퍼라제 V(NA17); 페어드 박스 단백질 Pax-3(PAX3); 안드로겐 수용체; 사이클린 B1; v-myc 조류 골수세포종증 바이러스성 종양유전자 신경모세포종 유래 동족체(MYCN); Ras 동족체 패밀리 구성원 C(RhoC); 티로시나제 관련 단백질 2(TRP-2); 시토크롬 P450 1B 1(CYP1B 1); CCCTC- 결합 인자(아연 핑거 단백질)-유사(BORIS 또는 Brother of the Regulator of Imprinted Sites), T 세포 3에 의해 인식되는 편평 세포 암종 항원(SART3); 페어드 박스 단백질 Pax-5(PAX5); 프로아크로신 결합 단백질 sp32(OY-TES1); 림프구 특이적 단백질 티로신 키나아제(LCK); 키나아제 앵커 단백질 4(AKAP-4); 윤활막 육종, X 중단점 2(SSX2); 최종 당화 산물 수용체(RAGE-1); 신장 편재성 1(RU1); 신장 편재성(RU2); 레

구메인; 인간 유두종 바이러스 E6(HPV E6); 인간 유두종 바이러스 E7(HPV E7); 장 카르복실 에스테라제; 열 충격 단백질 70-2 돌연변이(mut hsp70-2); CD79a; CD79b; CD72; 백혈구 관련 면역글로불린 유사 수용체 1(LAIR1); IgA 수용체의 Fc 단편(FCAR 또는 CD89); 백혈구 면역글로불린 유사 수용체 서브패밀리 A 구성원 2(LILRA2); CD300 분자 유사 패밀리 구성원 f(CD300LF); C형 렉틴 도메인 패밀리 12 구성원 A(CLEC12A); 골수간질 세포 항원 2(BST2); EGF-유사 모듈 함유 뮤신 유사 호르몬 수용체 유사 2(EMR2); 림프구 항원 75(LY75); 글리피칸-3(GPC3); Fc 수용체-유사 5(FCRL5); 및 면역글로불린 람다 유사 폴리펩티드 1(IGLL1), MPL, 비오틴, c-MYC 에피토프 태그, CD34, LAMP1 TROP2, GFR알파4, CDH17, CDH6, NYBR1, CDH19, CD200R, Slea(CA19.9; 시알릴 루이스 항원) 푸코실-GM1, PTK7, gpNMB, CDH1-CD324, DLL3, CD276/B7H3, IL11Ra, IL13Ra2, CD179b-IGL11, ALK TCR 감마-델타, NKG2D, CD32(FCGR2A), CSPG4-HMW-MAA, Tim1-/HVCR1, CSF2RA(GM-CSFR-알파), TGF베타R2, VEGFR2/KDR, 루이스 Ag, TCR-베타1 사슬, TCR-베타2 사슬, TCR-감마 사슬, TCR-델타 사슬, FITC, 황체형성 호르몬 수용체(LHR), 난포 자극 호르몬 수용체(FSHR), 융모성 성선 자극 호르몬 호르몬 수용체(CGHR), CCR4, SLAMF6, SLAMF4, HIV1 엔벨로프 당단백질, HTLV1-Tax, CMV pp65, EBV-EBNA3c, 인플루엔자 A 헤마글루티닌(HA), GAD, PDL1, 구아닐릴 시클라제 C(GCC),KSHV-K8.1 단백질, KSHV-gH 단백질, 데스모글레인 3(Dsg3)에 대한 자가 항체, 데스모글레인 1 (Dsg1)에 대한 자가 항체, HLA, HLA-A, HLA-A2, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, HLA-G, IGE, CD99, RAS G12V, 조직 인자1(TF1), AFP, GPRC5D, 클라우딘 18.2(CLD18A2 또는 CLDN18A.2)), P-당단백질, STEAP1, LIV1, NECTIN-4, CRIPTO, GPA33, BST1/CD157, 낮은 전도도의 클로라이드 채널, 및 TNT 항체가 인식하는 항원으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법을 제공한다.

[0093] 다른 측면에서, 대상체를 치료하는 방법으로서, 대상체에서 과다증식성 장애 또는 병태(예를 들어, 암), 예를 들어 고형 종양, 연조직 종양, 혈액암 또는 전이성 병변을 감소 또는 개선하기 위해 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 GMP(또는 이로부터 유래된 대식세포, 과립구 등)의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 본원에 사용되는 바와 같이 용어 "암"은 조직병리학적 유형 또는 침습 단계에 관계없이 모든 유형의 암성 성장 또는 발암성 과정, 전이성 조직 또는 악성으로 변형된 세포, 조직 또는 기관을 포함하는 것으로 의도된다. 예시적인 고형 종양에는 유방, 간, 폐, 뇌, 림프, 위장(예를 들어, 결장), 비뇨생식관(예를 들어, 신장, 요로세포), 전립선 및 인두에 영향을 미치는 것과 같은 다양한 기관계의 악성종양, 예를 들어 선암종, 육종 및 암종이 포함된다. 선암종에는 대부분의 결장암, 직장암, 신세포 암종, 간암, 폐의 비소세포 암종, 소장암 및 식도암과 같은 암이 포함된다. 한 실시 양태에서, 암은 흑색종, 예를 들어 진행 단계의 흑색종이다. 전술한 암의 전이성 병변은 또한 본 개시 내용의 방법 및 조성물을 사용하여 치료 또는 예방될 수 있다. 치료 또는 예방될 수 있는 다른 암의 예에는 췌장암, 골암, 피부암, 피부 또는 안구내 악성 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 두경부암, 항문 부위의 암, 위암, 고환암, 자궁암, 나팔관 암종, 자궁내막 암종, 자궁경부 암종, 질 암종, 외음부 암종, 호지킨병, 비호지킨 림프종, 식도암, 소장암, 내분비계암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병을 포함한 만성 또는 급성 백혈병, 소아기 고형 종양, 림프구성 림프종, 방광암, 신장암 또는 요관암, 신우암종, 중추신경계(CNS)의 신생물, 원발성 CNS 림프종, 종양 혈관신생, 척추 축 종양, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종, 카포시 육종, 표피암, 편평 세포암, T 세포 림프종, 석면에 의해 유발된 암을 포함하는 환경적으로 유발된 암, 및 상기 암의 조합이 포함된다.

[0094] 다른 측면에서, 대상체를 치료하는 방법으로서, 대상체에서 과다증식성 장애 또는 병태(예를 들어, 암), 예를 들어 고형 종양, 연조직 종양, 혈액암 또는 전이성 병변을 감소 또는 개선하기 위해 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 GMP(또는 이로부터 유래된 대식세포, 과립구 등)의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 본원에 사용되는 바와 같이 용어 "암"은 조직병리학적 유형 또는 침습 단계에 관계없이 모든 유형의 암성 성장 또는 발암성 과정, 전이성 조직 또는 악성으로 변형된 세포, 조직 또는 기관을 포함하는 것으로 의도된다. 예시적인 고형 종양에는 유방, 간, 폐, 뇌, 림프, 위장(예를 들어, 결장), 비뇨생식관(예를 들어, 신장, 요로세포), 전립선 및 인두에 영향을 미치는 것과 같은 다양한 기관계의 악성종양, 예를 들어 선암종, 육종 및 암종이 포함된다. 선암종에는 대부분의 결장암, 직장암, 신세포 암종, 간암, 폐의 비소세포암종, 소장암 및 식도암과 같은 암이 포함된다. 한 실시 양태에서, 암은 흑색종, 예를 들어 진행 단계의 흑색종이다. 전술한 암의 전이성 병변은 또한 본 개시 내용의 방법 및 조성물을 사용하여 치료 또는 예방될 수 있다. 치료 또는 예방될 수 있는 다른 암의 예에는 췌장암, 골암, 피부암, 피부 또는 안구내 악성 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 두경부암, 항문 부위의 암, 위암, 고환암, 자궁암, 나팔관 암종, 자궁내막 암종, 자궁경부 암종, 질 암종, 외음부 암종, 호지킨병, 비호지킨 림프종, 식도암, 소장암, 내분비계암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병

을 포함한 만성 또는 급성 백혈병, 소아기 고형 종양, 림프구성 림프종, 방광암, 신장암 또는 요관암, 신우암종, 중추신경계(CNS)의 신생물, 원발성 CNS 림프종, 종양 혈관신생, 척추 축 종양, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종, 카포시 육종, 표피암, 편평 세포암, T 세포 림프종, 석면에 의해 유발된 암을 포함하는 환경적으로 유발된 암, 및 상기 암의 조합이 포함된다.

[0095] 다음 실시예는 본 개시 내용을 설명하기 위한 것이지 제한하려는 것이 아니다. 이는 사용될 수 있는 전형적인 절차이지만, 당업자에게 공지된 다른 절차가 대안적으로 사용될 수 있다.

[0096] **실시예**

[0097] **마우스.** C57BL/6J(JAX 스톡 #000664), B6.129(Cg)-Gt(ROSA)26Sortm4(ACTB-tdTomato,-EGFP) Luo/J(mTmG, JAX 스톡 #007676), B6.129S-Cybbtm1Din/J(gp91phox-, JAX 스톡 #002365), NOD.Cg-Prkdcscid I12rgtm1Wjl(NSG, JAX 스톡 #05557) 및 B6J.129(Cg)-Gt(ROSA)26Sortm1.1(CAG-cas9*,-EGFP)Fezh/J(CAG-Cas9-EGFP, JAX 스톡 #026179) 마우스는 Jackson Laboratory에서 구입하였다. 모든 마우스(수컷 및 암컷)는 6 내지 12주령 사이에 사용하였다. 모든 동물 실험은 University of Southern California 동물 관리 및 사용 위원회의 승인을 받은 프로토콜에 따라 수행하였다. 동물(케이지당 ≤5마리 마우스)에게 음식과 물을 제공하고 규칙적인 12시간 명암 주기를 유지하였다. NSG 마우스는 무균 상태에서 사육하였다.

[0098] **CGD 마우스 모델.** gp91phox-마우스(CGD 마우스) 에 치사 선량(950 cGy)을 조사하고 5 X 10^6개 tdTomato-양성 GMP 및 2.5 X 10^4개 gp91phox-전골수 세포(헬퍼 세포) 또는 2.5 X 10^4개 헬퍼 세포를 꼬리 정맥 주사를 통해서만 이식하였다. 이식 2일 후, 마우스에게 2 X 10^8개S 아우레우스(*S aureus*) 균주 502A(ATCC No. 27217; ATCC) 또는 200개 B 세파시아(*B cepacia*) 바실리(ATCC No. 25609; ATCC)를 복강 내 주사하였다. 접종물 내 박테리아 수는 연속 희석 및 플레이팅을 통해 확인하였다. PBS 또는 5 X 10^6개 tdTomato-양성 GMP를 박테리아 접종 직후 꼬리 정맥을 통해 주사하고 그 후 3일마다 주사를 반복하였다. 마우스를 매일 검사하고 빈사 상태일 경우 또는 복막 공격 7일 후 안락사시켰다. 복강 내 농양의 존재는 육안 검사로 평가하였다. 일부 실험에서는 꼬리 정맥 혈액 샘플로부터 혈액 배양물을 채취하고, 플레이트 배양을 통해 균혈증을 정량화하였다.

[0099] **배지 및 시약.** DMEM/F-12(12400024) 및 Neurobasal(21103049) 배지는 Thermo Fisher Scientific에서 구입하였다. 인간 인슐린(91077C-250MG), 인간 홀로-트랜스페린(T0665-100MG), 푸트레신(P5780-5G), 아셀렌산나트륨(S9133-1MG), 리놀레산(L1012-100MG), DL-알파 토코페롤(vit E, T3251-5G), 및 소 혈청 알부민(A8806-5G)은 Sigma에서 구입하였다. 재조합 뮤린 SCF(250-03), 재조합 인간 M-CSF(300-25), 및 재조합 인간 G-CSF(300-23)는 PeproTech에서 구입하였다. GDC-0879(S1104) 및 SKL2001(S8302)은 Selleck에서 구입하였다.

[0100] B7 배지를 제조하기 위해, 500 ml의 DMEM/F-12 및 500 mL의 Neurobasal 배지를 혼합하고 4 mg 인간 인슐린, 20 mg 인간 홀로-트랜스페린, 16 mg 푸트레신, 12.5 μg 아셀렌산나트륨, 1 mg 리놀레산, 1 mg vit E, 및 2.5 g 소 혈청 알부민으로 보충하였다. 인슐린은 쉽게 용해되지 않는다. 인슐린을 멸균 0.01 M HCl에 4℃에서 밤새 용해하여 10 mg/mL 스톡 용액을 생성한다. 1 mL 분취액으로 -20℃에서 보관한다. 현탁액을 잘 혼합한 후 분취하였다.

[0101] **마우스 GMP 유도, 확장, 및 분화.** 세포를 5% CO_2 워터 재킷 인큐베이터(Thermo Scientific)에서 37℃에서 배양하였다. C57BL/6J, mTmG 또는 CAG-Cas9-EGFP 마우스로부터 단리된 골수 세포를 2 X 10^6개 세포/웰의 밀도로 6웰 플레이트에 플레이팅하고 50 ng/mL SCF, 1 μM GDC-0879 및 10 μM SKL2001(SCF/2i)가 보충된 2 mL B7 배지에서 배양하였다. 3-4일 후, 세포를 위아래로 피펫팅하여 단일 세포 현탁액으로 분리하고 2 X 10^6개 세포/웰의 밀도로 6웰 플레이트에 다시 플레이팅하고 SCF/2i가 보충된 2 mL B7 배지에서 배양하였다. SCF/2i에서 2회 계대배양 후, 대부분의 세포는 GMP였다. GMP는 3일마다 정기적으로 계대하였다. 분화를 유도하기 위해, GMP를 10 cm 조직 배양 접시에 플레이팅하고 10% FBS를 함유하고 20 ng/mL M-CSF(대식세포 분화용) 또는 20 ng/mL G-CSF(과립구 분화용)가 보충된 RPMI-1640 배지에서 배양하였다. GMP 유래 대식세포는 제7일에 수거하고(배지는 제4일에 한 번 교체하였음), GMP 유래 과립구는 제3일에 수거하여 추가 실험에 사용하였다.

[0102] 골수 유래 대식세포를 생성하기 위해, C57BL/6J 마우스로부터 단리된 2 X 10^6개 골수 세포를 10 cm 조직 배양 접시에 플레이팅하고 10% FBS 및 20 ng/ml M-CSF를 함유하는 RPMI-1640 배지에서 배양하였다. 제4일에 배지를 교체하고 제7일에 세포를 수거하였다.

[0103] tdTomato 양성 GMP를 이식한 직후 1 mL의 2% Bio-Gel P-100(Bio-Rad, 1504174)을 마우스 복막강에 주입하여 복막 대식세포를 생성한 후 4일 후 멸균 PBS로 복막 세척을 수행하였다. 복막강으로부터 수집된 세포를 형광 이미징 및 유세포 측정 분석에 사용하였다.

[0104] **GMP 세포 유도 및 확장.** 제대혈 샘플은 StemCyte(미국 캘리포니아주 볼드윈 파크 소재)에서 얻었고, 전골수는 Stemcell Technologies(카탈로그 #70502.2)에서 구입하였으며, 가동화 말초혈은 StemExpress(카탈로그 # MLE4GCSF5)에서 구입하였다. 단핵 세포는 Ficoll-Paque™ PLUS 키트(GE Healthcare Life Sciences, 17-1440-03)를 사용하여 단리하였다. 간략하게, 혈액을 PBS로 1:3 비로 희석하고 15 ml Ficoll-Paque™ PLUS가 미리 로드된 SepMate™-50 튜브(Stemcell Technologies, 85460)에 첨가하였다. 실온에서 1200 g에서 20분 동안 원심분리한 후, 상단 층을 수집하고 4℃에서 300 x g에서 10분 동안 원심분리하였다. ACK 용해 완충액을 사용하여 잔류 적혈구를 제거하였다. 세포는 즉시 사용하거나 액체 질소에 냉동보존하였다.

[0105] GMP의 확장을 위해, 제대혈, 전골수 또는 가동화 말초혈로부터 단리된 단핵 세포로부터 Lin^-(CD3, CD14, CD19 및 CD56) CD34+CD38+ CD45RA+ GMP를 분류하였다. 분류된 GMP를 4 X 10^4개 세포/웰의 밀도로 96웰 플레이트에 플레이팅하고 SCF(50 ng/mL. AF-300-07, PeproTech), GDC-0879(1 μM)가 보충된 B6 배지에서 배양하였다.

[0106] 초기 플레이팅 5일 후, GMP를 1 x 10^5개 세포/웰의 밀도로 48웰 플레이트에 다시 플레이팅하여 3일마다 정기적으로 계대배양하고 변형된 SCF/2i에서 배양하였다. GDC-0879를 SB590885(0.5 μM. S2220, Selleck)로 교체하면 GMP 증식 속도가 약간 증가할 수 있었다. B6 배지를 준비하기 위해, 500 mL의 DMEM/F-12 와 500 mL의 Neurobasal 배지를 혼합하고 4 mg 인슐린, 20 mg 홀로-트랜스페린, 12.5 μg 아셀렌산나트륨, 1 mg 리놀레산, 1 mg vit E, 및 2.5 g 혈청 알부민으로 보충한다.

[0107] **인간 백혈병 세포 유래.** 성인 B 세포 급성 림프모구성 백혈병(B-ALL) 환자로부터 임상 표본을 얻었다. 인간 $CD45^+$ 및 $CD19^+$ 세포를 분류하여 B-ALL 환자의 골수 흡인물로부터 인간 B-ALL 세포를 단리하였다. 인간 B-ALL 세포를 GFP 렌티바이러스로 형질도입하였다. 세포를 NSG 마우스에 이식하고, 이식 6주 후 마우스 비장으로부터 GFP^+ 백혈병 세포를 분류하였다.

[0108] **대식세포 포식작용을 위한 키메라 항원 수용체(CarP).** 마우스 GMP에 사용된 CarP 구축물은 인간 CD19 scFv 또는 HER2 scFV를 인간 CD8 힌지 및 막 횡단 영역에 융합하여 구축하고 P2A-RFP(CarP-RFP), 마우스 Fcer1g(NM_010185.4, aa19-86)-마우스 CD19(NM_009844.2, aa491-535)-P2A-RFP($CarP^{Fc19}$-RFP), 또는 마우스 CD3ζ(NM_001113391.2, aa52-164)-마우스 Fcer1g(aa45-86)-마우스 CD19-P2A-RFP($CarP^{zFc19}$-RFP)에 연결하였다. GMP에 사용된 αCD19 CarP 구축물의 세포 내 도메인은 인간 CD3ζ(NM_198053.2, aa52-164)-인간 Fcer1g(NM_004106.1, aa45-86)-인간 CD19(NM_001178098.1, aa498-544)이었다. 모든 CarP 수용체는 막 표적화를 위한 N-말단 CD8a 신호 펩티드(MALPVTALLLPLALLLHAARP(서열 번호 1))를 함유한다. 모든 수용체는 통합 DNA 기술(Integrated DNA Technologies)에 의해 코돈 최적화하고 합성하였으며 제한 효소 절단 및 T4 결찰을 통해 변형된 pSin-EF2 렌티바이러스 백본에 클로닝하였다.

[0109] **전기천공, 렌티바이러스 생산 및 GMP 형질도입.** GFP mRNA(TriLink, L7601-100) 및 단일 가이드-RNA(Synthego, 서열: CCGUCCAGCUCGACCAGGAU(서열 번호2))를 Neon 형질감염 시스템(ThermoFisher, MPK5000)을 사용하여 GMP에 전기천공하였다. 간략하게, WT 또는 CAG-Cas9-EGFP 마우스로부터 유래된 GMP를 SCF/2i에서 확장시켰다. 형질감염을 위해, GMP를 수거하고 PBS로 2회 세척하고 완충액 R에 1 x 10^7개/mL 농도로 재현탁하였다. 5 μg GFP mRNA 또는 sgRNA를 WT 또는 CAG-Cas9-EGFP GMP의 10 μl 현탁액에 첨가하고, 1600V 20ms 1 펄스로 전기천공하였다. 전기천공 후, GMP를 플레이팅하고 SCF/2에서 배양하였다. 48시간 후, 형광 현미경 및 유세포 측정법을 사용하여 GFP 발현을 조사하였다.

[0110] 렌티바이러스는 약 80% 합류도로 10 cm 접시에 플레이팅된 Lenti-X 293T 세포(Takara, 632180)에서 플러스 형질감염 시약(ThermoFisher, 15338100)과 함께 리포펙타민 LTX를 사용하여 pSin 플라스미드와 포장 단백질을 코딩하는 벡터(pSPAX 및 pVSVG)의 공동 형질감염에 의해 생산하였다. 형질감염 2일 후 바이러스 상층액을 수집하고 0.45 μM 여과하고 Lenti-X 농축기(Takara, 631232)로 농축하였다. 농축된 바이러스를 즉시 형질도입에 사용하거나 장기 보관을 위해 냉동하였다. GMP 형질도입을 위해, 렌티바이러스를 GMP 배양물에 첨가하고 32℃에서 800 g에서 1.5시간 동안 원심분리하였다. 세포를 새로운 배지에 재현탁하고 48시간 동안 배양하였다. RFP 양성 세포를 FACS로 분류하였다.

[0111] **정량화 및 통계 분석.** 통계 분석(RNA-seq 실험 제외)은 PRISM 프로그램(GraphPad)을 사용하여 수행하였다. 비대응 t 검정을 사용하여 두 그룹을 비교하였다. 두 가지 초과의 치료법 간의 차이에 대한 통계적 유의성을 평가하기 위해 이원 변량 분석을 활용하였다.

[0112] **암세포를 선택적으로 표적화하기 위한 SCF/2i GMP의 유전적 조작.** 대식세포는 암 치료에 있어 매력적인 치료 표적이다. 대식세포는 암세포의 포식작용과 그에 따른 T 세포에 대한 암 항원 제시를 통해 항암 효과를 나타낸다. 대식세포는 형질감염이 어려운 세포이기 때문에 SCF/2i GMP에서 유전공학을 수행할 수 있는지와 이러한 유전적으로 조작된 GMP로부터의 대식세포를 사용하여 암세포를 선택적으로 표적화할 수 있는지 평가하였다. 첫째, SCF/2i GMP에서 유전자 변형의 높은 효율성을 달성할 수 있다는 것을 입증하였다. 다음으로, 원리 증명 연구로서 GMP를 특히 인간 B 세포 림프종을 표적화하도록 유전적으로 조작하였다. 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포 치료법은 B 세포 림프종 치료를 위해 미국 식품의약국(FDA)의 승인을 받았다. 더 최근 연구에서는 포식작용을 위한 CAR(CarP)을 발현하는 대식세포 조작을 통해 암세포의 대식세포 매개 포식작용이 강화될 수 있음이 입증되었다. 인간 B 세포 항원 CD19를 인식하는 세포 외 단일 사슬 항체 가변 단편(scFv)(αCD19 scFv), 인간 CD8 막 횡단 도메인, 및 Fc 수용체의 마우스 공통 서브유닛 γ(FcRγ)와 융합된 마우스 CD19 세포질 도메인을 포함하는 CarP를 생성하였다. 이 $CarP^{Fc19}$ 전이유전자를 적색 형광 단백질(RFP)($CarP^{Fc19}$-RFP)에 연결하여 전이유전자 발현의 모니터링을 용이하게 하였다. 세포 외 αCD19 scFv 항체 단편, CD8 막 횡단 도메인 및 세포질 RFP를 함유하지만 세포질 신호전달 도메인은 없는 대조 CarP(CarP-RFP)를 구축하였다(**도 1C** 참조).

[0113] 렌티바이러스 감염에 의해 $CarP^{Fc19}$-RFP 및 CarP-RFP를 SCF/2i GMP에 도입한 후, RFP 양성 GMP를 분류하고 SCF/2i에서 확장시켰다. 포식작용을 평가하기 위해, $CarP^{Fc19}$-RFP 및 CarP-RFP GMP로부터 대식세포를 생성하고 GFP 표지된 인간 B 세포 급성 림프모구성 백혈병(B-ALL) 세포와 공동 배양하였다. 예상한 대로 CarP-RFP 그룹에서 매우 드물게(0.21±0.08%) 포식작용이 관찰되었는데, CarP-RFP에는 포식작용 신호 활성화를 담당하는 세포질 도메인이 없기 때문이다. 대조적으로, $CarP^{Fc19}$-RFP 대식세포의 5.23 ± 1.32%가 공동 배양 1시간 이내에 GFP 양성 인간 B-ALL 세포를 삼켰다(도 S2A 참조).

[0114] $CarP^{Fc19}$-RFP를 발현하는 대식세포의 포식작용 효율이 여전히 상대적으로 낮기 때문에, 포식작용을 촉진할 수 있는 신호전달 모티프를 결합함으로써 효율이 개선될 수 있는 지의 여부를 테스트하였다. CD3ζ 세포 내 도메인이 FcRγ와 동일한 면역수용체 티로신 기반 활성화 모티프(ITAM)를 포함하고 포식작용을 향상시킬 수 있음을 보였기 때문에(Isakov, 1997), 마우스 CD3ζ 세포질 도메인($CarP^{zFc19}$-RFP)을 추가하여 $CarP^{Fc19}$-RFP의 세포질 도메인을 변형시켰다(**도 1C** 참조). 인간 B-ALL 세포와 공동 배양했을 때 $CarP^{zFc19}$-RFP 발현 대식세포는 즉시 백혈병 세포를 삼키기 시작하였다. 일부 대식세포는 다발성 백혈병 세포를 포식하였다(**도 1D** 및 **도 3B** 참조). 유세포 측정 분석은 $CarP^{zFc19}$-RFP-발현 대식세포의 41.57 ± 9.26%가 공동 배양 1시간 이내에 백혈병 세포를 삼켰다는 것을 보여주었다(**도 1E** 참조).

[0115] 다음으로, 암세포 표적화에 있어 CarP 대식세포의 특이성을 평가하였다. $CarP^{zFc19}$-RFP의 αCD19 scFv 카세트를 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER2) scFv로 대체하여 αHER2 CarP를 생성하였다. αHER2 CarP GMP로부터 생성된 αHER2 CarP 대식세포를 HER2를 과발현하는 인간 유방암 세포주인 GFP 표지된 SK-BR-3 세포와 공동 배양하였다. 30.8 ± 6.3% αHER2 CarP 대식세포는 공동 배양 1시간 이내에 SK-BR-3-GFP 세포를 삼켰지만, αHER2를 발현하지 않는 GFP 표지된 인간 B-ALL 세포와 공동 배양한 경우 포식작용은 매우 드물었다(**도 3C-D** 참조). 대조적으로, $CarP^{zFc19}$-RFP 대식세포는 CD19-발현 인간 B-ALL 세포를 효율적으로 삼켰지만, CD19 음성인 SK-BR-3 세포는 삼키지 못했다(**도 3D** 참조). 이러한 결과는 CarP 대식세포가 매우 특이적 방식으로 암세포를 표적화한다는 것을 시사한다.

[0116] **CD47 차단은 CarP 대식세포의 포식작용을 상승적으로 향상시킨다.** 이전 연구에서는 대식세포의 "나를 먹지 마세요" 신호인 CD47을 차단함으로써 대식세포의 포식작용 효율성을 증가시킬 수 있음을 시사하였다. $CarP^{zFc19}$ 및 항-CD47 항체가 상승적으로 작용하여 대식세포 포식작용을 향상시킬 수 있는 지의 여부를 테스트하였다. 공동 배양 1시간 이내에, $CarP^{zFc19}$-RFP 발현 대식세포의 86.2 ± 13.8%가 사전 인큐베이션 없는 경우 41.6 ± 9.3%와 비교하여 20 μg/ml 항-CD47 항체와 30분 동안 사전 인큐베이션된 인간 B-ALL 세포를 삼켰다. CarP-RFP를 발현하는 대식세포의 경우, 인간 B-ALL 세포를 항-CD47 항체와 사전 인큐베이션하였을 때 포식작용 효율이 0.21 ±

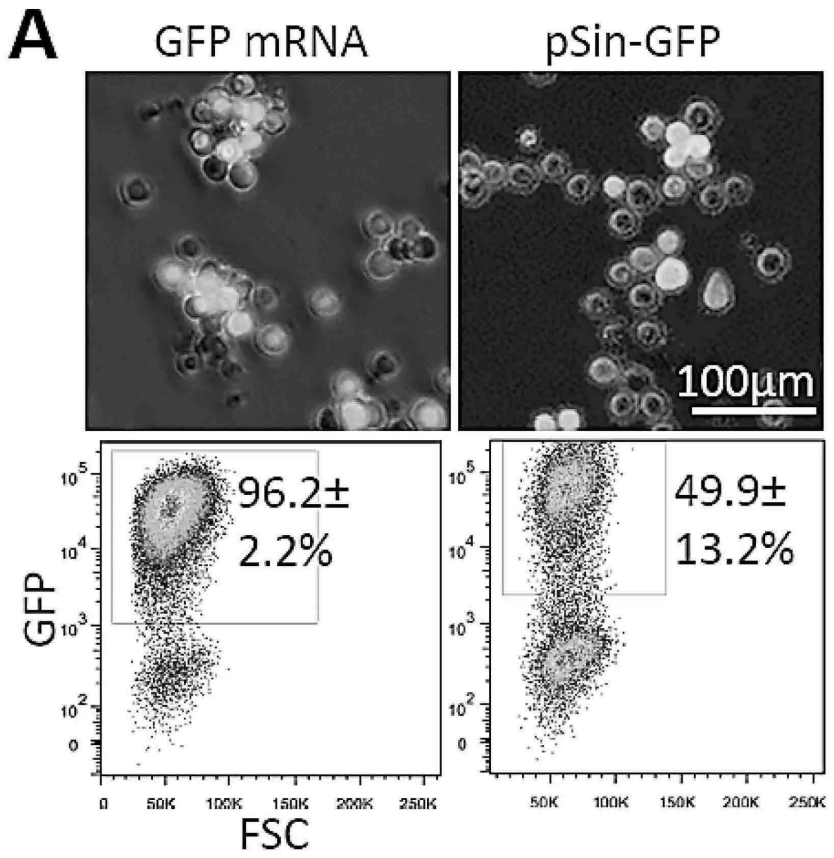
0.08%에서 18.57 ± 2.85%로 증가하였다. 더 중요하게는, 항-CD47 항체와 사전 인큐베이션된 거의 모든 인간 B-ALL 세포가 공동 배양 24시간 후에 $CarP^{zFc19}$-RFP 발현 대식세포에 의해 삼켜지고 분해되었다. 이들 데이터는 CarP와 항-CD47 항체가 상승적으로 작용하여 암세포의 대식세포 포식작용을 개선한다는 것을 입증한다.

[0117] **암세포를 선택적으로 표적화하기 위해 생체 외 확장된 GMP의 조작.** 생체 외 확장된 GMP를 인간 B-ALL 세포를 선택적으로 포식하도록 유전적으로 조작할 수 있는지 확인하기 위해, $CarP^{zFc19}$-RFP 발현 GMP를 생성하고 변형된 SCF/2i에서 확장시켰다. 포식작용을 평가하기 위해, $CarP^{zFc19}$-RFP GMP로부터 생성된 대식세포를 GFP 표지된 인간 B-ALL 세포와 공동 배양하였다. 유세포 측정 분석에서, CarP-RFP를 발현하는 대식세포의 0.87 ± 0.2%와 비교하여 $CarP^{zFc19}$-RFP 발현 대식세포의 28.6 ± 4.5%가 공동 배양 1시간 이내에 백혈병 세포를 삼켰음을 보였다(**도 2C** 및 **도 4A** 참조). $CarP^{zFc19}$-RFP 및 CarP-RFP 대식세포에 대한 포식작용 효율은 인간 B-ALL 세포를 항-CD47 항체와 사전 인큐베이션한 경우 각각 69.5 ± 5.6% 및 32.8 ± 5.5%로 추가로 증가하였다(**도 2C** 참조). 더욱 중요하게는, $CarP^{zFc19}$-RFP 대식세포는 36시간의 공동 배양 후에 항-CD47 항체와 사전 인큐베이션된 거의 모든 인간 B-ALL 세포를 삼켜 분해하였다(**도 4B** 참조).

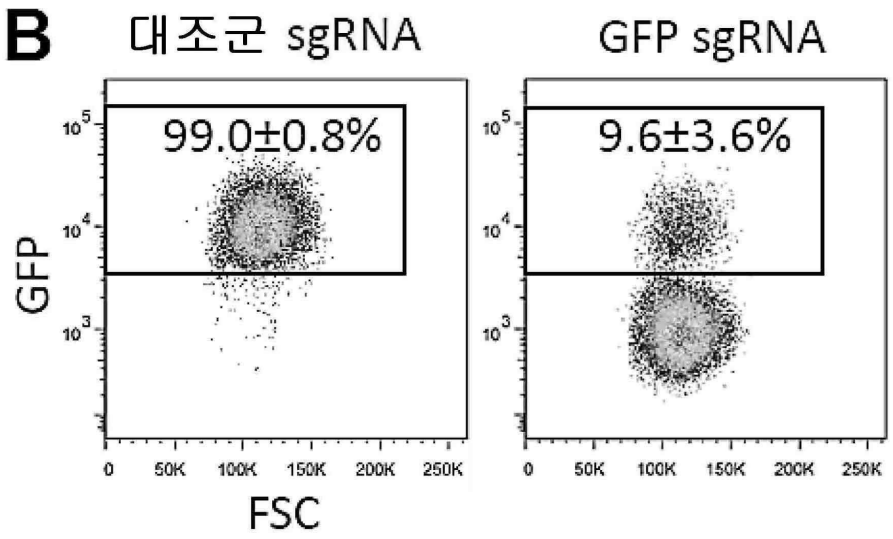
[0118] 본 개시 내용의 취지 및 범위를 벗어나지 않고 다양한 변형이 이루어질 수 있다는 것이 이해될 것이다. 따라서, 다른 실시 양태는 다음 청구범위의 범위 내에 있다.

도면

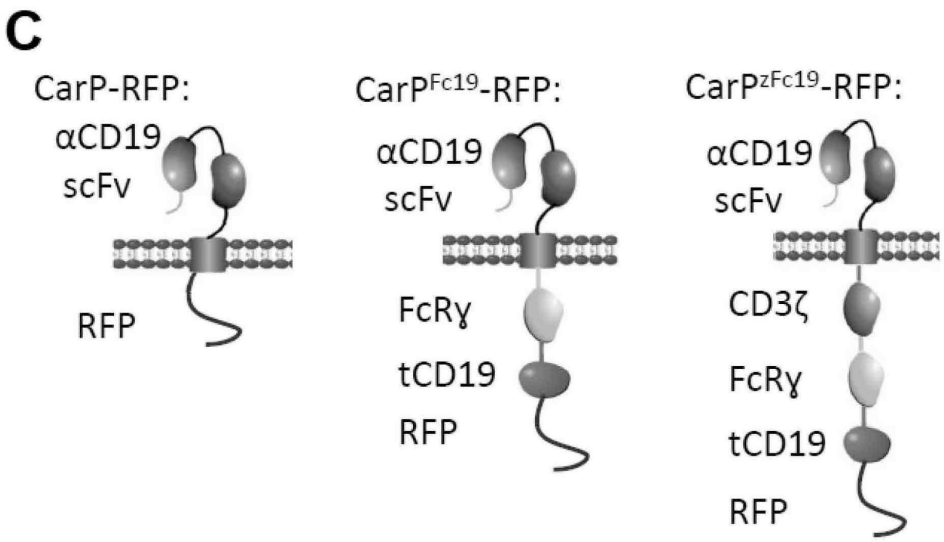
도면1a



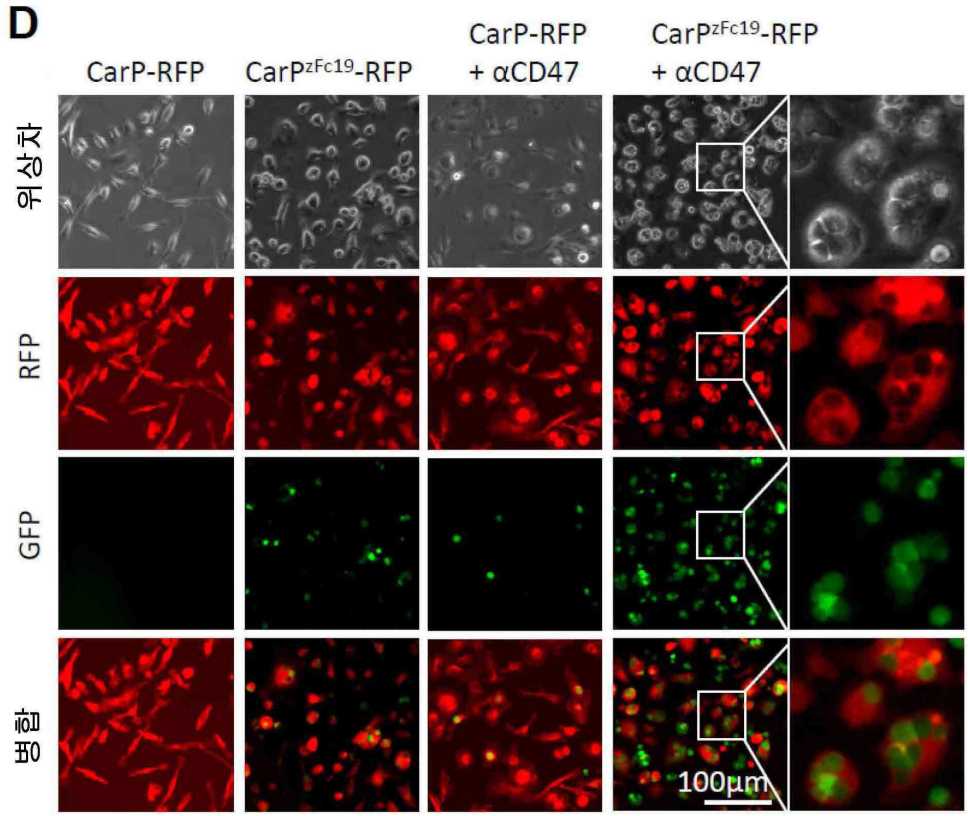
도면1b


B
대조군 sgRNA
GFP sgRNA
99.0±0.8%
9.6±3.6%
GFP
FSC
0
50K
100K
150K
200K
250K

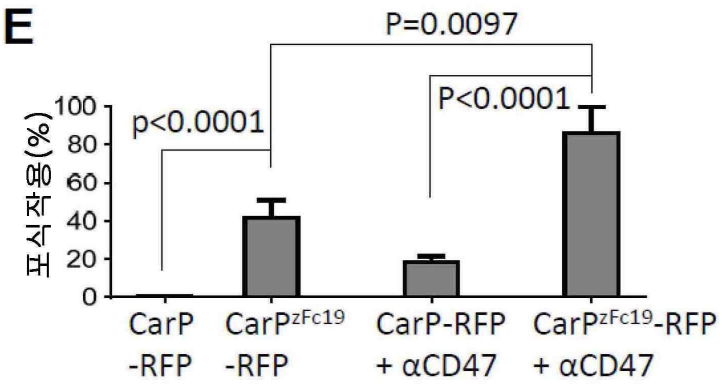
도면1c


C
CarP-RFP:
αCD19
scFv
RFP
CarP^Fc19-RFP:
αCD19
scFv
FcRɣ
tCD19
RFP
CarP^zFc19-RFP:
αCD19
scFv
CD3ζ
FcRɣ
tCD19
RFP

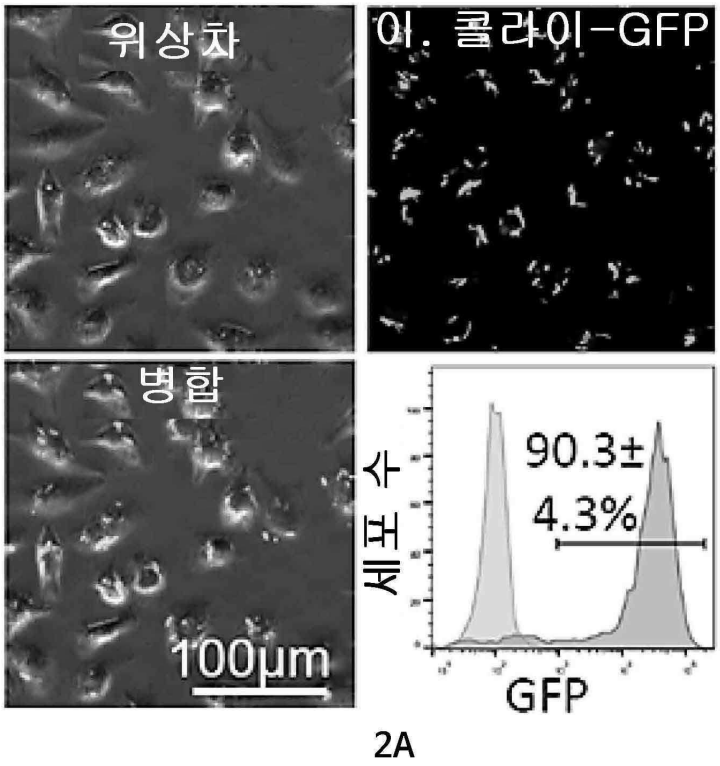
도면1d


D
CarP-RFP
CarPzFc19-RFP
CarP-RFP + αCD47
CarPzFc19-RFP + αCD47
위상차
RFP
GFP
병합
100μm

도면1e

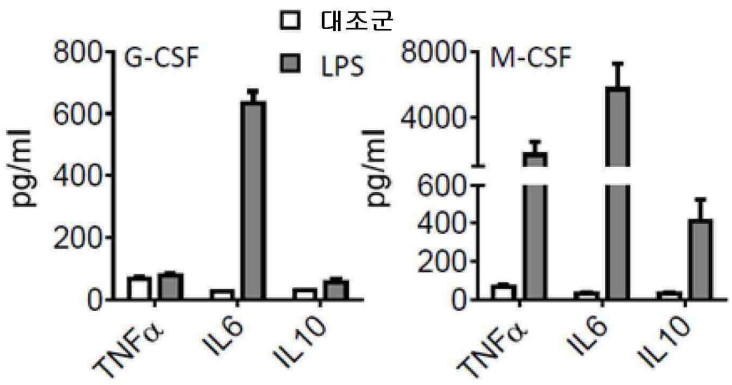

E
P=0.0097
P<0.0001
p<0.0001
포식작용(%)
100
80
60
40
20
0
CarP -RFP
CarPzFc19 -RFP
CarP-RFP + αCD47
CarPzFc19-RFP + αCD47

도면2a



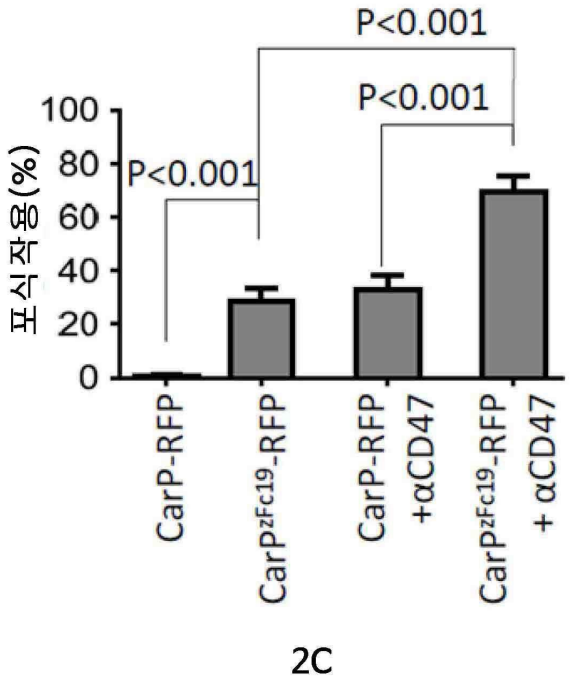
2A

도면2b



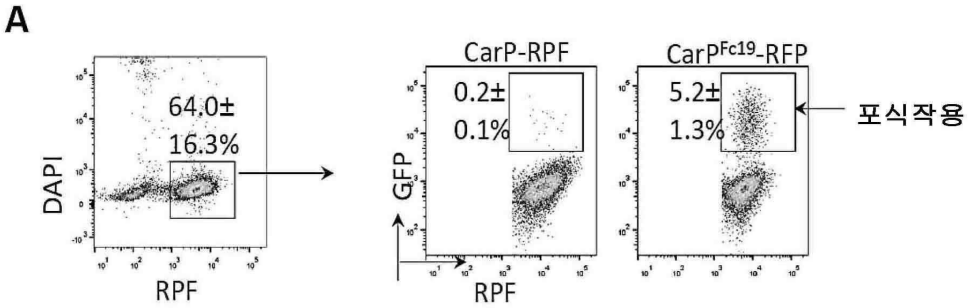
2B

도면2c

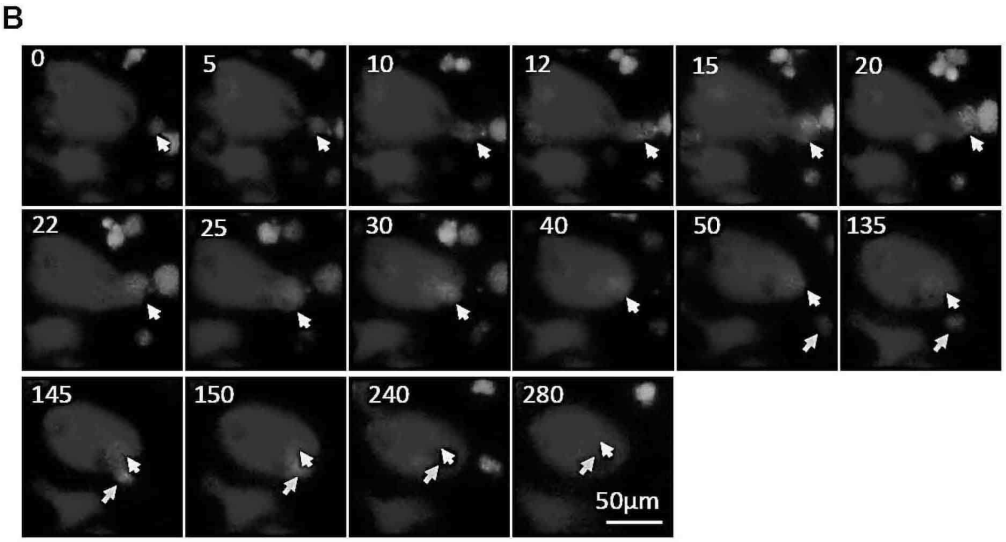


2C

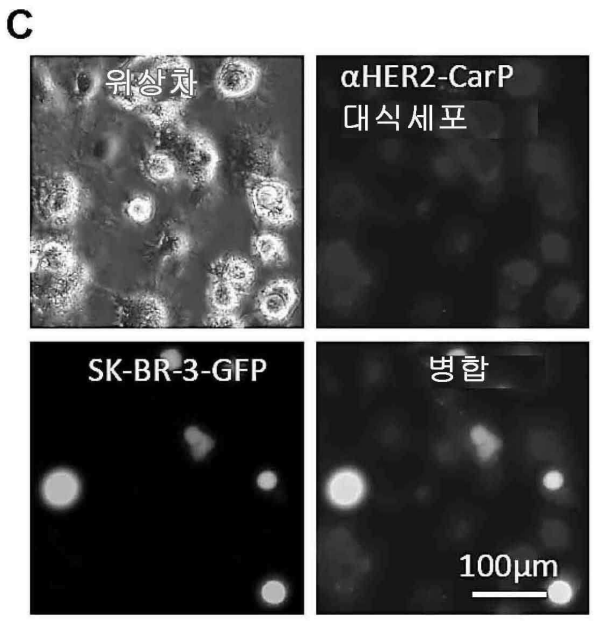
도면3a



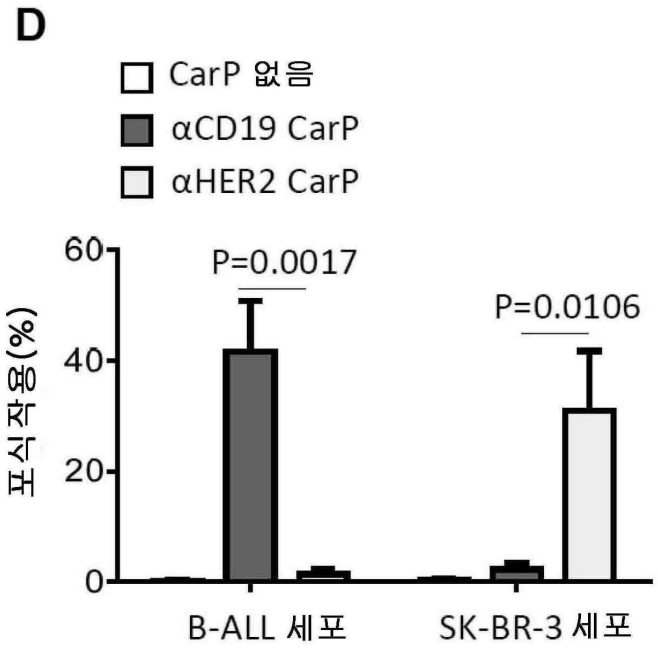
도면3b



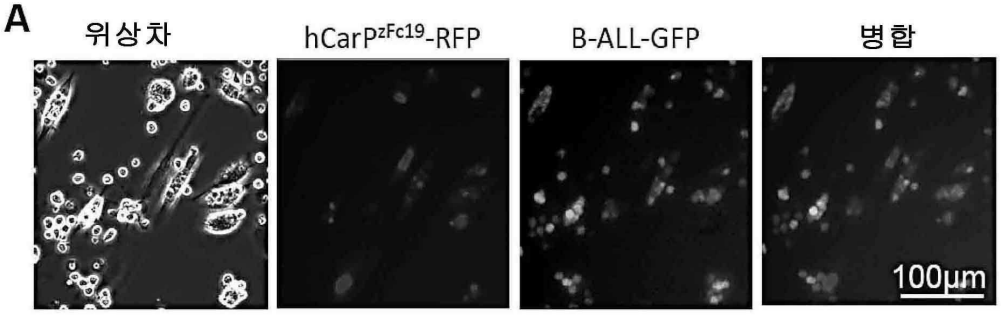
도면3c



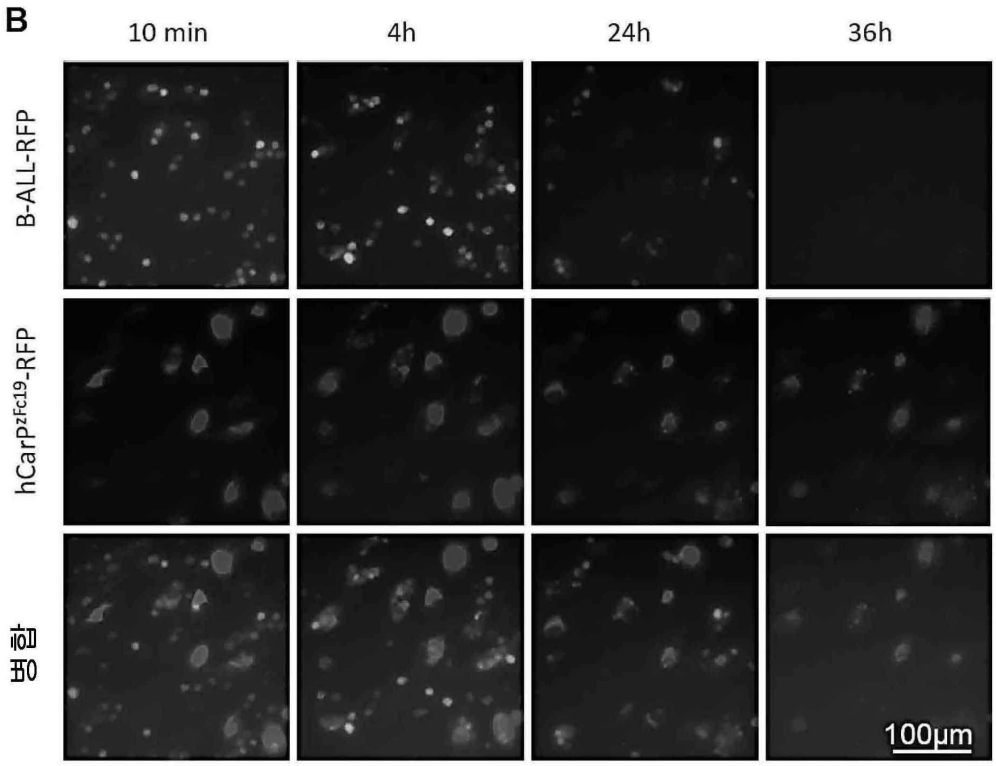
도면3d



도면4a



도면4b

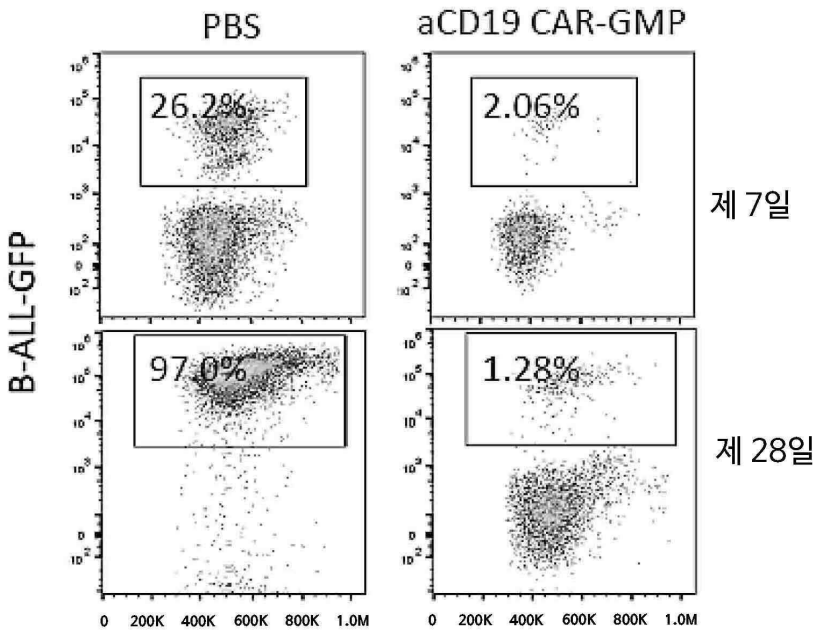

B
10 min
4h
24h
36h
B-ALL-RFP
hCarP2Fc19-RFP
병합
100μm

도면5a


1.5x10⁶ B-ALL-GFP IV
PBS IV
n=4
1x10⁷ aCD19
CAR-GMP IV
n=4
제-21일
제0일
FACS 분석
매주
제28일

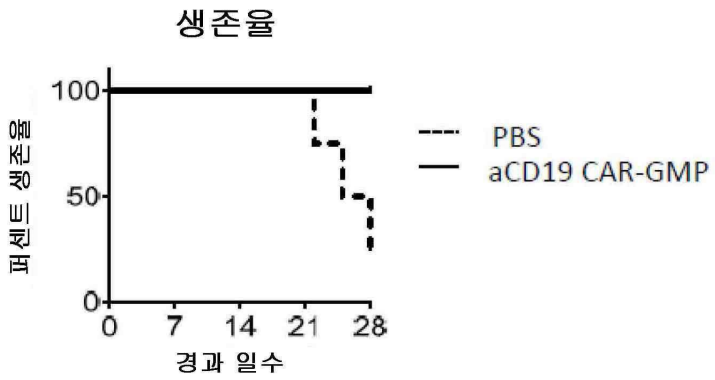
5A

도면5b



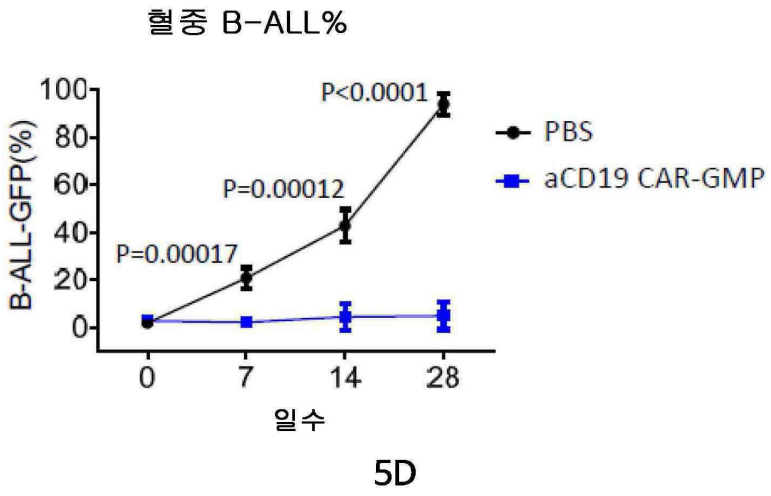
5B

도면5c



5C

도면5d


혈중 B-ALL%
B-ALL-GFP(%)
100
80
60
40
20
0
P<0.0001
P=0.00012
P=0.00017
0
7
14
28
일수
PBS
aCD19 CAR-GMP

5D