



등록특허 10-2697827



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

**(45) 공고일자** 2024년08월23일  
**(11) 등록번호** 10-2697827  
**(24) 등록일자** 2024년08월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 5/0786* (2010.01) *A61K 35/14* (2015.01)  
*A61K 39/00* (2006.01) *C07K 14/725* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01) *C07K 16/30* (2006.01)  
*C07K 16/32* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C12N 5/0645* (2023.05)  
*A61K 35/14* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7005871
- (22) 출원일자(국제) 2016년07월28일  
 심사청구일자 2021년07월19일
- (85) 번역문제출일자 2018년02월27일
- (65) 공개번호 10-2018-0028533
- (43) 공개일자 2018년03월16일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2016/044440
- (87) 국제공개번호 WO 2017/019848  
 국제공개일자 2017년02월02일
- (30) 우선권주장  
 62/197,675 2015년07월28일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
 Gene Therapy, Vol.13, pp.602-610(2006)\*  
 PNAS, Vol.109(17), pp.6662-6667(2012)\*  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
 더 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 펜실베니아  
 미국 펜실바니아주 19104 필라델피아 씨비 센터  
 불리바드 3600, 9플로어
- (72) 발명자  
 길 자르  
 미국, 펜실베니아 19123, 필라델피아, 438 포풀러  
 스트리트  
 클리친스키 마이클  
 미국, 펜실베니아 19103, 필라델피아, 1810 스프루스 스트리트  
 준 칼 에이치.  
 미국, 펜실베니아 19066, 메리언 스테이션, 409  
 베어드 로드
- (74) 대리인  
 특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 30 항

심사관 : 정이든

(54) 발명의 명칭 키메릭 항원 수용체를 발현하는 변형된 단핵세포/대식세포 및 그의 용도

**(57) 요약**

본 발명은 고형 종양이든 혈액암이든, 암을 치료하기 위한 방법 및 조성물을 포함한다. 단핵세포, 대식세포 또는 수지상 세포에서 키메릭 항원 수용체를 발현시킴으로써, 변형된 세포를 종양 미세환경으로 모집하며 여기에서 상기는 종양을 침윤시키고 표적 세포를 살해함으로써 효능 있는 면역 효과기로서 작용한다. 하나의 태양은 입양 세포 치료법 및 면역억제와 관련된 질병 또는 상태의 치료를 위한 변형된 세포 및 상기 변형된 세포를 포함하는 약학 조성물을 포함한다.

**대 표 도** - 도1a

세포외	TM	세포내	분비된/증발현된
CARMA 개념 사이토킨 CARMA	표적화 노폐인(蛊)	한지 도메인(蛊)	TM 도메인 신호전달 도메인(蛊)
mAb CARMA	표적화 노폐인(蛊)	한지 도메인(蛊)	TM 도메인 신호전달 도메인(蛊) 2A mAb(s)/scFv(s)
pep CARMA	표적화 노폐인(蛊)	한지 도메인(蛊)	TM 도메인 신호전달 도메인(蛊) 2A 강속작용성 헬퍼T
Enz CARMA	표적화 노폐인(蛊)	한지 도메인(蛊)	TM 도메인 신호전달 도메인(蛊) 2A 효소
DN CARMA	표적화 노폐인(蛊)	한지 도메인(蛊)	TM 도메인 신호전달 도메인(蛊) 2A 유색한 광성 수용체
TAA CARMA	표적화 노폐인(蛊)	한지 도메인(蛊)	TM 도메인 신호전달 도메인(蛊) 2A 종양 관련 항ody
CRISPR CARMA	표적화 노폐인(蛊)	한지 도메인(蛊)	CRISPR 유전자 편집

(52) CPC특허분류

*C07K 14/7051* (2013.01)

*C07K 16/2803* (2013.01)

*C07K 16/30* (2013.01)

*C07K 16/32* (2013.01)

*A61K 2039/505* (2013.01)

*C07K 2317/622* (2013.01)

*C07K 2317/73* (2013.01)

*C07K 2319/03* (2013.01)

*C12N 2510/00* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

키메릭 항원 수용체(CAR)를 포함하는 변형된 세포로서, 상기 CAR이 항원 결합 도메인, 막관통 도메인 및 자극 및/또는 보조-자극 분자의 세포내 도메인을 포함하고, 상기 세포가 표적화된 효과기 활성을 가지며, Ad5f35 아데노바이러스 성분을 포함하는 단핵세포 또는 대식세포인, 변형된 세포.

#### 청구항 2

키메릭 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 변형된 세포로서, 상기 핵산 서열이 항원 결합 도메인을 암호화하는 핵산 서열, 막관통 도메인을 암호화하는 핵산 서열 및 자극 및/또는 보조-자극 분자의 세포내 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 포함하고, 상기 세포가 상기 CAR을 발현하고, 표적화된 효과기 활성을 가지며, Ad5f35 아데노바이러스 성분을 포함하는 단핵세포 또는 대식세포인, 변형된 세포.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

CAR의 항원 결합 도메인이 단클론 항체, 다클론 항체, 합성 항체, 인간 항체, 인간화된 항체, 단일 도메인 항체, 단체 가변 단편, 및 이들의 항원-결합 단편으로 이루어지는 그룹 중에서 선택된 항체를 포함하는, 변형된 세포.

#### 청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서,

CAR의 항원 결합 도메인이 항-CD19 항체, 항-HER2 항체 및 이들의 단편으로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는, 변형된 세포.

#### 청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서,

CAR의 세포내 도메인이 이중 신호전달 도메인을 포함하는, 변형된 세포.

#### 청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서,

표적화된 효과기 활성이, CAR의 항원 결합 도메인에 특이적으로 결합하는 표적 세포상의 항원에 대한 것인, 변형된 세포.

#### 청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서,

표적화된 효과기 활성이 식균작용, 표적화된 세포 세포독성, 항원 제시, 및 사이토kin 분비로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는, 변형된 세포.

#### 청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서,

핵산, 항생제, 소염제, 항체 또는 그의 항체 단편, 성장 인자, 사이토킨, 효소, 단백질, 펩티드, 용합 단백질, 합성 분자, 유기 분자, 탄수화물 등, 지질, 호르몬, 마이크로솜, 이들의 유도체 또는 변이체, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 작용제를 또한 포함하는, 변형된 세포.

### 청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서,

비변형된 세포와 비교하여, 적어도 하나의 상향조절된 M1 마커 및 적어도 하나의 하향조절된 M2 마커를 갖는, 변형된 세포.

### 청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서,

CAR을 발현하도록 유전자 변형된, 변형된 세포.

### 청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서,

표적화된 효과기 활성이 CD47 또는 SIRP $\alpha$  활성의 억제에 의해 증대되는, 변형된 세포.

### 청구항 12

제1항 또는 제2항의 세포 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물.

### 청구항 13

제1항 또는 제2항의 변형된 세포를 포함하는, 면역 반응의 치료가 필요한 피험자에서 면역 반응의 치료를 위한 약학 조성물.

### 청구항 14

제1항 또는 제2항의 변형된 세포를 포함하는, 암의 치료가 필요한 피험자에서 암의 치료를 위한 약학 조성물.

### 청구항 15

제1항 또는 제2항의 변형된 세포를 포함하는, 피험자에서 종양 또는 암과 관련된 질병 또는 상태를 치료하기 위한 약학 조성물.

### 청구항 16

제1항 또는 제2항의 변형된 세포를 포함하는, 피험자에서 종양을 치료하기 위한 약학 조성물.

### 청구항 17

제1항 또는 제2항의 변형된 세포를 포함하는, 피험자에서 표적 종양 세포 또는 종양 조직에 대한 면역반응을 자극하기 위한 약학 조성물.

### 청구항 18

세포의 시험관 내(*in vitro*) 변형 방법으로서,

키메릭 항원 수용체(CAR)를 세포내로 도입하는 단계를 포함하며,

상기 CAR이 항원 결합 도메인, 막관통 도메인 및 자극 및/또는 보조-자극 분자의 세포내 도메인을 포함하고, 상기 세포가 상기 CAR을 발현하고, 표적화된 효과기 활성을 갖는 단핵세포 또는 대식세포이며, 변형된 상기 세포가 Ad5f35 아데노바이러스 성분을 포함하는 것인, 방법.

### 청구항 19

제18항에 있어서,

CAR을 세포내로 도입하는 단계가, 상기 CAR을 암호화하는 핵산 서열을 도입하는 단계를 포함하는, 방법.

### 청구항 20

제19항에 있어서,

핵산 서열을 도입하는 단계가, CAR을 암호화하는 mRNA를 전기천공하는 단계를 포함하는, 방법.

### 청구항 21

제19항에 있어서,

핵산 서열을 도입하는 단계가, CAR을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 바이러스 벡터를 세포에 형질도입하는 단계를 포함하는, 방법.

### 청구항 22

제18항에 있어서,

표적화된 효과기 활성이, CAR의 항원 결합 도메인에 특이적으로 결합하는 표적 세포상의 항원에 대한 것인, 방법.

### 청구항 23

제18항에 있어서,

표적화된 효과기 활성이 식균작용, 표적화된 세포 세포독성, 항원 제시, 및 사이토kin 분비로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는, 방법.

### 청구항 24

제18항에 있어서,

CD47 또는 SIRP α 활성을 억제하여 표적화된 효과기 활성을 증대시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

### 청구항 25

제24항에 있어서,

CD47 또는 SIRP α 활성을 억제하는 것이, 세포를 항-CD47 또는 항-SIRP α 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

### 청구항 26

제18항에 있어서,

CAR의 세포내 도메인이 이중 신호전달 도메인을 포함하는, 방법.

### 청구항 27

제18항에 있어서,

CAR의 항원 결합 도메인이 합성 항체, 인간 항체, 인간화된 항체, 단일 도메인 항체, 단쇄 가변 단편, 및 이들의 항원-결합 단편으로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 항체를 포함하는, 방법.

### 청구항 28

제18항에 있어서,

CAR의 항원 결합 도메인이 항-CD19 항체, 항-HER2 항체, 및 이들의 단편으로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는, 방법.

### 청구항 29

제18항에 있어서,

작용제를 표적에 전달하기 위해 세포를 시험관 내(*in vitro*) 변형시키는 단계를 또한 포함하며, 상기 작용제가 핵산, 항생제, 소염제, 항체 또는 그의 항체 단편, 성장 인자, 사이토kin, 효소, 단백질, 펩티드, 융합 단백질,

합성 분자, 유기 분자, 탄수화물 등, 지질, 호르몬, 마이크로솜, 이들의 유도체 또는 변이체, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는, 방법.

### 청구항 30

제18항에 따라 변형된 세포를 포함하는 조성물.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001]

본 출원은 2015년 7월 28일자로 출원된 미국 가특허출원 제 62/197,675 호에 대해 35 U.S.C. § 119(e)하에서 우선권이 있으며, 상기 출원은 내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된다.

### 배경 기술

[0002]

암 면역요법은 다수의 고형 종양 및 혈액암의 상황에서 흥분되는 임상 결과를 입증하였다. 내인성 면역계는 전형적으로 암세포에 비-반응성이거나, 또는 암세포의 존재에 대한 신체의 반응에 관하여 능동적으로 면역억제성일 수 있다. 종양의 치료를 증대시키는 한 가지 방식은 백혈구의 유전공학을 통해 상기 면역계에 의한 종양 인식을 끌어내는 것이다. T 세포를, 세포외 표적화된 항체 및 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 합성 면역수용체(키메릭 항원 수용체(CAR)로서 공지됨)를 발현하도록 조작할 수 있다. CD19에 대한 CAR을 발현하는 T 세포는 현저한 백혈병치료 효능을 갖는 것으로 나타났으며, 이때 치료된 급성 림프모구성 백혈병 환자의 90%에서 완전한 경감이 성취되었다(Maude, et al., NEJM, vol. 371:1507-17, 2014). 상기 결과는 그렇게 치료된 백혈병 환자에서 확고한 T 세포 증식 및 명백히 증명된 종양 부위내로의 T 세포 침윤을 동반한다. 조혈성 암에서 입증된 높은 반응률에도 불구하고, 고형 종양(뿐만 아니라 몇몇 림프 종양)에서 CAR T 세포 효능은 제한될 수 있다. 이에 가능한 설명은 고형 종양을 침윤하는 T 세포의 잠재적으로 손상된 능력, 불충분한 수송, 면역억제성 종양 미세환경, 및 고형 종양세포상에서 극히 소수의 종양 특이성 항원의 발현을 포함한다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0003]

당해 분야에서는 고형 종양 및 혈액암 모두에서 종양세포에 대한 특이성을 개선시키고 종양 부위내로의 침윤을 개선시킴으로써 암을 치료하는 보다 유효한 조성물 및 방법이 필요하다. 본 발명은 상기 필요성을 충족시킨다.

#### 과제의 해결 수단

[0004]

본 명세서에 개시되는 바와 같이, 본 발명은 표적화된 효과기 활성을 갖는 식세포를 사용하는 조성물 및 방법을 포함한다.

[0005]

하나의 태양에서, 본 발명은 키메릭 항원 수용체(CAR)를 포함하는 변형된 세포를 포함하며, 여기에서 상기 CAR은 항원 결합 도메인, 막관통 도메인 및 자극 및/또는 보조-자극(co-stimulatory) 분자의 세포내 도메인을 포함하고, 세포는 표적화된 효과기(effectector) 활성을 갖는 단핵세포, 대식세포, 또는 수지상 세포이다.

[0006]

또 다른 태양에서, 본 발명은 키메릭 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 변형된 세포를 포함하며, 여기에서 핵산 서열은 항원 결합 도메인을 암호화하는 핵산 서열, 막관통 도메인을 암호화하는 핵산 서열 및 자극 및/또는 보조-자극 분자의 세포내 도메인을 포함하고, 상기 세포는 상기 CAR을 발현하고 표적화된 효과기 활성을 갖는 단핵세포, 대식세포, 또는 수지상 세포이다.

[0007]

더욱 또 다른 태양에서, 본 발명은 키메릭 항원 수용체(CAR)를 단핵세포, 대식세포 또는 수지상 세포내로 도입시킴을 포함하는 세포의 변형 방법을 포함하며, 여기에서 상기 CAR은 항원 결합 도메인, 막관통 도메인 및 자극 및/또는 보조-자극 분자의 세포내 도메인을 포함하고, 상기 세포는 상기 CAR을 발현하고 표적화된 효과기 활성을 갖는 단핵세포, 대식세포, 또는 수지상 세포이다.

[0008]

더욱 또 다른 태양에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 방법에 따라 변형된 세포를 포함하는 조성물을 포함한다.

- [0009] 본 명세서에 묘사된 본 발명의 상기 태양들 또는 임의의 다른 태양들의 다양한 실시태양에서, 상기 CAR의 항원 결합 도메인은 단클론 항체, 다클론 항체, 합성 항체, 인간 항체, 인간화된 항체, 단일 도메인 항체, 단쇄 가변 단편, 및 이들의 항원-결합 단편으로 이루어지는 그룹 중에서 선택된 항체를 포함한다. 또 다른 실시태양에서, 상기 CAR의 항원 결합 도메인은 항-CD19 항체, 항-HER2 항체 및 이들의 단편으로 이루어지는 그룹 중에서 선택된다. 더욱 또 다른 실시태양에서, 상기 CAR의 세포내 도메인은 이중 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0010] 또 다른 실시태양에서, 상기 표적화된 효과기 활성은 상기 CAR의 항원 결합 도메인에 특이적으로 결합하는 표적 세포상의 항원에 대한 것이다. 더욱 또 다른 실시태양에서, 상기 표적화된 효과기 활성은 식균작용(phagocytosis), 표적화된 세포 세포독성, 항원 제시(antigen presentation), 및 사이토kin 분비로 이루어지는 그룹 중에서 선택된다.
- [0011] 또 다른 실시태양에서, 상기 조성물은 혁산, 항생제, 소염제, 항체 또는 그의 항체 단편, 성장 인자, 사이토킨, 효소, 단백질, 웨티드, 융합 단백질, 합성 분자, 유기 분자, 탄수화물 등, 지질, 호르몬, 마이크로솜, 이들의 유도체 또는 변이체(variation), 및 이들의 임의의 조합으로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 작용제를 추가로 포함한다.
- [0012] 또 다른 실시태양에서, 상기 변형된 세포는 적어도 하나의 상향조절된 M1 마커 및 적어도 하나의 하향조절된 M2 마커를 갖는다. 더욱 또 다른 실시태양에서, 상기 변형된 세포는 상기 CAR을 발현하도록 유전자 변형된다. 더욱 또 다른 실시태양에서, 상기 표적화된 효과기 활성은 CD47 또는 SIRPa 활성의 억제에 의해 증대된다.
- [0013] 또 다른 실시태양에서, 상기 CAR을 세포내로 도입시키는 것은 상기 CAR을 암호화하는 혁산 서열을 도입시킴, 예를 들어 상기 CAR을 암호화하는 mRNA를 전기천공시키거나 또는 상기 세포를 상기 CAR을 암호화하는 혁산 서열을 포함하는 바이러스 벡터로 형질도입시킴을 포함한다.
- [0014] 또 다른 실시태양에서, 상기 표적화된 효과기 활성은 상기 CAR의 항원 결합 도메인에 특이적으로 결합하는 표적 세포상의 항원에 대한 것이다. 더욱 또 다른 실시태양에서, 상기 표적화된 효과기 활성은 식균작용, 표적화된 세포 세포독성, 항원 제시, 및 사이토kin 분비로 이루어지는 그룹 중에서 선택된다.
- [0015] 또 다른 실시태양에서, 본 명세서에 기재된 방법은 예를 들어 세포를 차단 항-CD47 또는 차단 항-SIRPa 항체와 접촉시킴으로써, 상기 표적화된 효과기 활성을 증대시키기 위해 CD47 또는 SIRPa 활성을 억제시킴을 추가로 포함한다. 더욱 또 다른 실시태양에서, 상기 방법은 상기 세포를, 표적에 작용제를 전달하도록 변형시킴을 추가로 포함하며, 여기에서 상기 작용제는 혁산, 항생제, 소염제, 항체 또는 그의 항체 단편, 성장 인자, 사이토킨, 효소, 단백질, 웨티드, 융합 단백질, 합성 분자, 유기 분자, 탄수화물 등, 지질, 호르몬, 마이크로솜, 이들의 유도체 또는 변이체, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어지는 그룹 중에서 선택된다.
- [0016] 하나의 태양에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 세포를 포함하는 약학 조성물을 포함한다.
- [0017] 또 다른 태양에서, 본 발명은 면역반응의 치료가 필요한 피험자에서 상기 면역반응을 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서 본 명세서에 기재된 변형된 세포의 용도를 포함한다. 더욱 또 다른 태양에서, 본 발명은 종양 또는 암 치료가 필요한 피험자에서 상기 종양 또는 암을 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서 본 명세서에 기재된 변형된 세포의 용도를 포함한다.
- [0018] 더욱 또 다른 태양에서, 본 발명은 피험자에게 치료학적 유효량(therapeutically effective amount)의 본 명세서에 기재된 변형된 세포를 포함하는 약학 조성물을 투여함을 포함하는, 상기 피험자에서 종양 또는 암과 관련된 질병 또는 상태를 치료하는 방법을 포함한다.
- [0019] 더욱 또 다른 태양에서, 본 발명은 피험자에게 치료학적 유효량의 본 명세서에 기재된 변형된 세포를 포함하는 약학 조성물을 투여함을 포함하는, 상기 피험자에서 종양을 치료하는 방법을 포함한다.
- [0020] 또 다른 태양에서, 본 발명은 피험자에게 치료학적 유효량의 본 명세서에 기재된 변형된 세포를 포함하는 약학 조성물을 투여함을 포함하는, 상기 피험자에서 표적 종양 세포 또는 종양 조직에 대한 면역반응을 자극하기 위한 방법을 포함한다.

### 도면의 간단한 설명

- [0021] 본 발명의 바람직한 실시태양의 하기 상세한 기재는 첨부된 도면과 함께 판독시 보다 양호하게 이해될 것이다. 본 발명을 예시하기 위해서, 도면에 현재 바람직한 실시태양을 도시한다. 그러나, 본 발명은 상기 도면에 도시된 실시태양의 정확한 배열 및 수단으로 제한되지 않음은 물론이다.

도 1A는 표적화 기능을 갖는 세포의 도메인, 헌지 도메인, 막관통 도메인, 세포내 신호전달 도메인(들), 및/또는 분비될 수 있거나 분비되지 않을 수도 있는 추가적인 유전자 산물(비제한적으로 사이토킨, 단클론 항체, 항체 단편, 단쇄 가변 단편, 효소, 추가적인 수용체, 우세한 음성 수용체, 종양 관련 항원(들), 및 이들의 임의의 조합을 포함한 임의의 유전자/전사물/단백질 포함)의 화학량론적 공-발현을 위한 2A(P2A, T2A)를 함유하는 유전자/유전자-산물을 구성된 키메릭 항원 수용체(CAR)의 개념도를 도시하는 일련의 상들이다. 또한, 상기 CAR 구조물은 CRISPR/Cas9 유전자 편집 물질의 공-전달을 포함하거나, 또는 CRISPR/Cas9 예비-편집된 세포와 관련하여 도입될 수 있다.

도 1B는 CARMA- $\zeta$ , CARMA- $\gamma$ , 및 CARMA-렉틴(이들은 항원 특이성 scFv, CD8 헌지, CD8 막관통, 및 각각 CD3  $\zeta$ , Fc  $\epsilon$  RI 공통  $\gamma$  서브유닛, 또는 렉틴-1의 세포내 도메인을 함유한다)을 포함하는 CAR 구조물의 특정한 예를 도시하는 일련의 상들이다.

도 2A는 렌티바이러스 형질도입 후 골수세포의 표면상에서 발현된 CAR19z를 도시하는 그래프이다. CAR19z 렌티바이러스를 3배 희석인자로 적정하고 사용하여 1e5/0.1 ml mRFP + THP1 세포를 형질도입시켰다. mRFP는 상기 골수세포주 THP1의 렌티바이러스 형질도입에 의해 발현된 리포터 유전자(적색 형광 단백질)이다. 상기 세포는 화학적 PMA에 노출시 대식세포로 분화하도록 유도될 수 있다. THP1 세포를 형질도입-24시간 후에 수확하고 비오텐화된-단백질 L에 이어서 스트렙트아비딘-APC로 CAR 표면 발현에 대해 염색하였다.

도 2B는 100% CAR19z 양성 mRFP + THP1 하위계통을 생성하도록 확대되고 FACS에 의해 분류된 형질도입된 THP1 세포를 도시하는 그래프이다.

도 2C는 THP1 대식세포상의 항-CD19, 항-HER2, 및 항-메소텔린 렌티바이러스 CAR 구조물의 발현을 나타내며, 이 때 CAR(+) 사건은 상부 우측 사분면에 있다.

도 3A는 THP1 대식세포 모델, 1 ng/ml 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트(PMA)에 의한 분화, 및 시험관내 식균작용 분석을 사용하는 CARMA 하위계통 생성의 개요를 도시하는 흐름도이다.

도 3B는 형광 현미경검사 기반 식균작용 분석에 의해 입증된 바와 같은, 항-CD19 CAR 대식세포(야생형(Wt) 대식 세포는 아님), CD19를 발현하는 포식된 K562 종양세포를 도시하는 그래프이다.

도 3C는 형광 현미경검사 기반 식균작용 분석에 의해 입증된 바와 같은, 항-HER2 CAR 대식세포(야생형(Wt) 대식 세포는 아님), HER2를 발현하는 포식된 K562 종양세포를 도시하는 그래프이다.

도 3D는 형광 현미경검사 기반 식균작용 분석에 의해 입증된 바와 같은, 항-메소텔린 CAR 대식세포(야생형(Wt) 대식 세포는 아님), 메소텔린을 발현하는 포식된 K562 종양세포를 도시하는 그래프이다.

도 3E는 CARMA 종양 식균작용이 유식 세포측정 기반 분석에 의해 확인된 전형적인 FACS 플롯이며, 여기에서 CD19에 대한 mRFP+ CARMA가 CD19+ GFP+ K562 세포와 공-배양되었고 이중 양성 사건들이 정량분석되었다.

도 3F는 CARMA 식균작용 기능의 집계분석에 사용된 표준 10x 시야에서 mRFP를 도시하는 상이다.

도 3G는 CARMA 식균작용 기능의 집계분석에 사용된 표준 10x 시야에서 오버레이를 도시하는 상이다.

도 3H는 포식 사건으로서 정의되고 그대로 암니스 이미지스트림(Amnis Imagestream) FACS 분석에 의해 확인된 FACS 기반 mRFP/GFP 이중 양성 사건들을 도시하는 일련의 상이다. 도시된 사건들은 이중 양성 사건에 대해 통문되고 암니스 이미지스트림 식균작용-미란 알고리즘에 의해 높은 곳에서 낮은 곳으로 정렬된다.

도 3I는 공초점 현미경검사에 의해 추가로 입증된 THP-1 세포주 모델에서 mRFP+ CARMA에 의한 종양 세포의 식균작용을 도시하는 일련의 상들이며, GFP+ 종양 세포가 3-차원 공초점 z-스택 복원을 통해 파고솜내에 완전히 둘러싸였음이 확인되었다.

도 3J는 공초점 현미경검사에 의해 추가로 입증된 THP-1 세포주 모델에서 mRFP+ CARMA에 의한 종양 세포의 식균작용을 도시하는 일련의 상들이며, GFP+ 종양 세포가 3-차원 공초점 z-스택 복원을 통해 파고솜내에 완전히 둘러싸였음이 확인되었다.

도 3K는 시간에 따른 단일 CARMA 세포의 운명을 입증하는 일련의 상으로 - 접촉 및 면역학적 시냅스 형성이 첫 번째 단계이며, 이는 포식성 탐식, 세포사의 마커로서 GFP의 상실을 사용하는 종양의 분해, 파고솜 붕괴, 및 파고솜 수복을 유도한다 - CARMA가 종양 세포 식균작용 후 생존함을 입증한다.

도 4A는 CD19+(표적) 또는 CD19-(대조용) GFP+ K562 종양 세포에 대한 시험관내 식균작용 분석을 사용하여 시험

된 항-CD19 CAR 대식세포를 도시하는 그래프이다. CARMA의 항원 특이성을 입증하며, 오직 항원-함유 종양 세포만이 포식되었다. CARMA 기능에서 세포내 신호전달 도메인의 필요성을 입증하기 위해서, CAR19- $\Delta$   $\zeta$  구조물(세포내 신호전달 도메인이 없음)을 사용하였다.

도 4B는 CAR19- $\Delta$   $\zeta$  대식세포가 종양세포를 포식하지 못함을 도시하는 그래프이다.

도 4C는 상기 CAR19- $\Delta$   $\zeta$  대식세포가 시험관내 루시페라제 기반 비용해 분석을 통해 항-종양 기능을 현저하게 감소시켰음을 도시하는 그래프이다.

도 4D는 R406(Syk 억제제)의 존재하에서 수행된 시험관내 CARMA 식균작용 분석을 도시하는 그래프이다. R406은 CARMA의 포식 기능을 독립적으로 무효화하며, 이는 대식세포에서 CAR 신호전달이 Syk 의존적이며 액틴 중합 및 NMIIA 매개된 포식 기능을 생성시킴을 가리킨다.

도 4E는 사이토칼라신 D(액틴 중합 억제제)의 존재하에서 수행된 시험관내 CARMA 식균작용 분석을 도시하는 그래프이다. 사이토칼라신 D는 CARMA의 포식 기능을 독립적으로 무효화하며, 이는 대식세포에서 CAR 신호전달이 Syk 의존적이고 액틴 중합 및 NMIIA 매개된 포식 기능을 생성시킴을 가리킨다.

도 4F는 블레비스타틴(비-근육 미오신 IIA 억제제)의 존재하에서 수행된 시험관내 CARMA 식균작용 분석을 도시하는 그래프이다. 블레비스타틴은 CARMA의 포식 기능을 독립적으로 무효화하며, 이는 대식세포에서 CAR 신호전달이 Syk 의존적이고 액틴 중합 및 NMIIA 매개된 포식 기능을 생성시킴을 가리킨다.

도 5A는 아이소타입 대조용과 비교하여 표적 종양 세포주상에서 CD47의 발현을 도시하는 유식 세포측정 그래프이다. K562 및 K562-CD19+ (K19)가 상기 실험들에 사용되었으며, 이들은 둘 다 높은 CD47 발현 세포주이다.

도 5B는 항-CD47 단클론 항체의 첨가가 표적 항원 함유 종양 세포의 CAR(Wt는 아님) 대식세포 매개된 식균작용을 선택적으로 증대시켰음을 도시하는 그래프이다. Wt 또는 CAR19  $\zeta$  대식세포를 0, 0.01, 0.10, 1.00 또는 10.0 mcg/ml 항-CD47 단클론 항체와 함께 CD19+ K562 종양 세포와 배양하였다.

도 5C는 항-SIRP  $\alpha$  단클론 항체의 첨가가 표적 항원 함유 종양 세포의 CAR(Wt는 아님) 대식세포 매개된 식균작용을 선택적으로 증대시켰음을 도시하는 그래프이다. Wt 또는 CAR19  $\zeta$  대식세포를 0, 0.01, 0.10, 1.00 또는 10.0 mcg/ml 항-SIRP  $\alpha$  단클론 항체와 함께 CD19+ K562 종양 세포와 배양하였다.

도 5D는 항-SIRP  $\alpha$  단클론 항체에 의한 CD47/SIRP  $\alpha$  축의 봉쇄가 CAR 대식세포에 의한 다중포식(한 번에 2개 이상의 종양 세포를 탐식한 대식세포로서 정의됨)을 증대시켰음을 입증하는 그래프이다.

도 5E는 시험관내 식균작용 분석을 도시하는 그래프이다. 상기 CD47/SIRP  $\alpha$  차단 단클론 항체에 의한 가중된 읍소닌작용을 억제하기 위해서, 대조용 항-CD47 단클론 항체(클론 2D3)(CD47에는 결합하지만 상기 CD47 대 SIRP  $\alpha$  결합 부위는 차단하지 않는다)를 시험관내 식균작용 분석에 사용하였다. 오직 상기 결합 부위를 차단한 클론(항-CD47, 클론 B6H12) 또는 상기 SIRP  $\alpha$  수용체의 봉쇄만이 CARMA 종양 식균작용의 증대를 직접적으로 유도한다.

도 5F는 항-음성(CD19 음성) 종양 세포에 대한 시험관내 식균작용을 도시하는 그래프이다. CAR 대식세포상의 CD47/SIRP  $\alpha$  축의 봉쇄가 항원 특이성의 상실을 유도하는지의 여부를 시험하기 위해서, 항원-음성(CD19 음성) 종양 세포에 대한 시험관내 식균작용을 항-CD47 또는 항-SIRP  $\alpha$  단클론 항체의 존재하에서 수행하였으며, 관찰 가능한 식균작용은 존재하지 않았다.

도 5G는 THP1 대식세포상의 SIRP  $\alpha$  수용체를 녹아웃시키고 항-SIRP  $\alpha$  항체의 부재 또는 존재하에서 CARMA 또는 SIRP  $\alpha$ -KO CARMA에 의한 종양 식균작용을 비교함으로써 시험된 SIRP  $\alpha$  차단 단클론 항체 존재하에서의 CARMA 포식 증대의 특이성을 도시하는 그래프이다. CRISPR/Cas9가 SIRP  $\alpha$  결실에 사용되었으며, 세포는 기능 분석에 앞서 SIRP  $\alpha$  음성에 대해 분류되었다. SIRP  $\alpha$  녹아웃은 CARMA 기능을 증대시켰으며, 상기 녹아웃 세포에 다시 항-SIRP  $\alpha$ 의 부가는 식균작용을 추가로 증대시키지 못하였다.

도 6A는 48시간째에 용량 의존적인 방식의 시험관내 루시페라제 기반 살해 분석에서 CAR19  $\zeta$  CARMA(Wt는 아님) 대식세포(THP-1 대식세포 모델 사용)에 의한 CD19+ GFP+ 루시페라제+ K562 세포의 비용해를 도시하는 그래프이다.

도 6B는 48시간째에 용량 의존적인 방식의 시험관내 루시페라제 기반 살해 분석에서 CAR19  $\zeta$  또는 Wt THP-1 단핵세포(미분화된, 따라서 대식세포라기보다는 단핵세포의 모델)에 의한 종양세포의 비용해를 입증하는 그래프이다.

도 6C는  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  항-SIRP $\alpha$  단클론 항체의 부재 또는 존재하에서 시험관내에서 Wt 또는 CAR19 $\zeta$  대식세포와 48-시간 공-배양 후, 루시페라제 양성 CD19+ K562 종양 세포로부터 유래된, 루시페라제 구동된 생물발광을 도시하는 상들의 패널이다.

도 6D는 Wt 또는 CAR19 $\zeta$  대식세포 +/- 항-SIRP $\alpha$  단클론 항체의 비용해를 입증하는 그래프이다.

도 7A는 Fc $\epsilon$  RI 공통  $\gamma$  (CAR19 $\gamma$ , CARMA19 $\gamma$ ) 서브유닛 세포내 도메인을 갖는 CAR 구조물이 생성되었고, 렌티바이러스내에 패키징되었으며, 3배 연속 바이러스 희석으로 사용되어 THP-1 골수세포를 형질도입시켰음을 도시하는 일련의 그래프이다. CAR19 $\gamma$ 는 THP-1 대식세포상에서 발현되었다.

도 7B는 100% CAR 양성에 대해 분류되고 시험관내 기능 특성화에 사용된 CAR19 $\gamma$  대식세포 또는 CAR19 $\zeta$  대식세포를 도시하는 그래프이다. CAR19 $\zeta$  및 CAR19 $\gamma$  대식세포는 둘 다 CD19+ 종양세포를 포식하였으며, 둘 다 항-SIRP $\alpha$  단클론 항체의 첨가에 의해 CD47/SIRP $\alpha$  축의 봉쇄와 상승작용을 나타내었다.

도 7C는 CAR19 $\zeta$  및 CAR19 $\gamma$  대식세포가 둘 다 Syk를 통해 신호를 전달하여 종양 식균작용을 구동함을 입증하는 R406 Syk 억제 시험관내 식균작용 분석을 도시하는 그래프이다.

도 7D는 CAR19 $\zeta$  및 CAR19 $\gamma$  THP1 대식세포(Wt THP1 대식세포는 아님)가 모두 다양한 E:T 비로 24시간 공-배양 후 시험관내 루시페라제-기반 비용해 분석에서 CD19+ 종양 세포를 효율적으로 살해했음을 도시하는 그래프이다.

도 8A는 구성적으로 발현된 병원체 인식 수용체를 통해, 병원체 관련된 분자 패턴과 같은 감염의 보존된 분자 신호에 반응한 대식세포를 도시하는 그래프이다.

도 8B는 CARMA의 종양 포식 기능을 증대시키기 위해 독립적으로 TLR1-9에 대한 리간드로 초회항원자극된 CAR 대식세포, 또는 대조용 배지를 사용하여 수행된 시험관내 식균작용 분석을 도시하는 그래프이다. TLR1, 2, 4, 5 및 6에 대한 리간드가 CARMA의 포식 기능을 증대시켰다.

도 8C는 TLR3 또는 TLR6 리간드 농도 범위에서 종양 세포의 CARMA 식균작용을 증대시켰거나 증대시키지 않은 TLR 리간드간의 차이를 도시하는 그래프이다.

도 9A는 대식세포의 표면상의 텍틴-1에 결합되고 활성화 및 효과기 기능을 생성시킨 효모 생성물인  $\beta$ -글루칸을 도시하는 그래프이다. CARMA 기능을 증대시키는  $\beta$ -글루칸의 능력을 시험하기 위해서, 시험관내 종양 식균작용 분석을  $5 \mu\text{cg}/\text{ml}$   $\beta$ -글루칸의 부재 또는 존재하에서 수행하였다.  $\beta$ -글루칸은 CAR(그러나 Wt는 아님) 대식세포의 포식 능력을 증대시켰다.

도 9B는 CARMA 종양 살해를 증대시키는  $\beta$ -글루칸의 능력을 시험하기 위해 0, 0.5, 5 또는  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$   $\beta$ -글루칸의 존재하에서 다양한 효과기(E):표적(T)비로 수행된 시험관내 루시페라제 기반 비용해 분석을 도시하는 일련의 그래프이다.  $\beta$ -글루칸은 CAR(그러나 Wt는 아님) THP-1 대식세포에 의한 항원 함유 종양 세포의 비용해를 증대시켰다.

도 10A는 텍틴-1 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 CAR 구조물이 생성되었음을 도시하는 일련의 상이다. 이들 구조물은 렌티바이러스내에 패키징되고 렌티바이러스 역가의 3배 연속 희석으로 THP-1 골수세포를 형질도입시키는데 사용되었다.

도 10B는 CAR이 CD8TM-텍틴1 CAR 구조물을 발현하는 대식세포의 표면상에서 검출되었음을 도시하는 그래프이다.

도 10C는 CAR이 텍틴TM-텍틴1 CAR 구조물을 발현하는 대식세포의 표면상에서 검출되었음을 도시하는 그래프이다.

도 10D는 CD8TM-텍틴1 CAR 및 텍틴TM-텍틴1 CAR 대식세포가 시험관내 루시페라제 살해 분석에서 시험되었음을 도시하는 그래프이다. 상기 두 구조물은 모두 종양세포의 비용해를 입증하였다.

도 10E는 K562(대조용) 또는 K19(표적) 종양세포에 대한 시험관내 종양 식균작용 분석에서 시험된 텍틴1-CAR 대식세포를 도시하는 그래프이다. 텍틴1-CAR 대식세포는 동족-항원 함유 종양 세포를 선택적으로 포식하였다.

도 10F는 텍틴-1 CAR 대식세포가 다수의 종양 세포의 식균작용 능력을 나타내었음을 도시하는 일련의 상이다.

도 10G는 시험관내 종양 식균작용 분석을 도시하는 그래프이다. 텍틴1-CAR 대식세포는 SIRP $\alpha$ 의 봉쇄, 또는 TLR 리간드에 의한 초회항원자극과 상승작용을 나타내었다.

도 11A는 아이소타입 대조용과 비교된 3개의 상이한 CD19+ 표적 세포주에서의 칼레티큘린 수준을 도시하는 일련

의 그래프이다.

도 11B는 3개의 상이한 CD19+ 표적 세포주에서 칼레티큘린 발현의 표준화된 평균 형광 강도를 도시하는 그래프이다.

도 11C는 낮은 수준의 칼레티큘린이 CAR19z 대식세포 식균작용으로부터 표적 세포, 구체적으로 Nalm6 및 JEKO 세포주를 보통으로 보호함을 도시하는 그래프이다. 상기 데이터는 칼레티큘린 침착/유도의 이용이 추가적인 주성으로 사용되어 CARMA 효과기 기능을 증대시킬 수 있음을 암시한다.

도 12A는 mRNA 발현 플라스미드내로 클로닝되고, 시험관내에서 전사된 항-HER2 CAR 구조물, 및 1차 인간 단핵세포내로 직접 전기천공된 상기 mRNA를 도시하는 일련의 그래프이다.

도 12B는 79.7%의, 1차 인간 단핵세포 유래된 대식세포(완전히 분화된)내로의 항-HER2 CAR mRNA 전기천공 효율을 도시하는 일련의 그래프이다.

도 12C는 mRNA 전기천공이 단핵세포 및 대식세포 모두의 높은 CAR 형질감염 효율을 생성시키는 반면, CAR 발현은 mRNA 분해로 인해 일시적이었으며, 2일째에 절정이었다가 시험관내 전기천공 후 7일까지 소멸됨을 도시하는 그래프이다.

도 13A는 HER2+ 난소암의 전이성 복강내 암종증의 모델인, IP 주사를 통해 1E6 SKOV3 CBG/GFP+ 인간 난소암 세포가 주사된 NSGS 마우스를 도시하는 그래프이다. 마우스에게 모의 전기천공된 또는 항-HER2 CAR mRNA 전기천공된 1차 인간 대식세포(1:1 E:T 비)가 동시-주사되었으며 종양 크기가 영상화되었다. CAR 대식세포는 대략 2 주에 걸쳐 종양 성장의 약간의 감소를 나타내었다. 종양 크기가 생물발광에 의해 정량분석된 첫 번째 시점은 처리-후 24시간째였으며, 이는 CAR 단핵세포 및 대식세포가 처음 24시간 후에 활성을 가졌음을 입증한다.

도 13B는 HER2+ 난소암의 전이성 복강내 암종증의 모델인, IP 주사를 통해 1E6 SKOV3 CBG/GFP+ 인간 난소암 세포가 주사된 NSGS 마우스를 도시하는 그래프이다. 마우스에게 모의 전기천공된 또는 항-HER2 CAR mRNA 전기천공된 1차 인간 단핵세포(1:1 E:T 비)가 동시-주사되었으며 종양 크기가 영상화되었다. CAR 단핵세포는 대략 2 주에 걸쳐 종양 성장의 약간의 감소를 나타내었다. 종양 크기가 생물발광에 의해 정량분석된 첫 번째 시점은 처리-후 24시간째였으며, 이는 CAR 단핵세포 및 대식세포가 처음 24시간 후에 활성을 가졌음을 입증한다.

도 14A는 다수의 CAR 구조물을 사용하여 시험된 1차 인간 단핵세포 유래된 대식세포로의 CAR 트랜스유전자의 렌티바이러스 전달을 도시하는 일련의 그래프이다. CAR19는 렌티바이러스 형질도입을 통해 인간 대식세포로 전달되었으며, 이는 대조용 대 CAR19 렌티바이러스(MOI 10) 그룹에서 각각 4.27% 및 38.9% 형질도입 효율을 나타내었다.

도 14B는 1차 인간 대식세포에서 항-HER2 CAR의 발현을 도시하는 일련의 전형적인 FACS 플롯으로, 대조용 및 MOI 10 CAR LV 조건간에 각각 1.47 및 18.1% 형질도입 효율을 갖는다.

도 15A는 항-CD19에 대한, 형질도입 중간점(4일)에서 절정인 형질도입 효율을 도시하는 일련의 그래프이다. 7 일 동안 GM-CSF 순화배지에서 CD14+ 선택된 세포(정상적인 공여자 성분채집술 생성물로부터)를 분화시킴으로써 단핵세포 유래된 대식세포를 생성시켰다. 렌티바이러스 형질도입을 통한 CAR의 전달을 최적화하기 위해서, 항-CD19 렌티바이러스를 사용하여 상기 단핵세포에서 대식세포로의 분화 과정의 상이한 시점들에서 대식세포를 형질도입시켰다.

도 15B는 항-HER2에 대한, 형질도입 중간점(4일)에서 절정인 형질도입 효율을 도시하는 일련의 그래프이다. 7 일 동안 GM-CSF 순화배지에서 CD14+ 선택된 세포(정상적인 공여자 성분채집술 생성물로부터)를 분화시킴으로써 단핵세포 유래된 대식세포를 생성시켰다. 렌티바이러스 형질도입을 통한 CAR의 전달을 최적화하기 위해서, 항-HER2 렌티바이러스를 사용하여 상기 단핵세포에서 대식세포로의 분화 과정의 상이한 시점들에서 대식세포를 형질도입시켰다.

도 15C는 식균작용의 효능이 CAR 형질도입 효율에 따라 기울며, 분화 과정 중 4일째에 대식세포 형질도입이 절정임을 도시하는 일련의 그래프이다.

도 16A는 1차 인간 대식세포로 트랜스유전자를 전달하기 위한 선택적인 형질도입 접근법의 시험을 도시하는 일련의 그래프로, mRNA 전기천공은 일시적이었으며 렌티바이러스는 단지 보통으로 효율적이었고 높은 역가가 요구되었음이 고려되었다. 아데노바이러스(재조합, 복제 결합)는 1차 인간 대식세포 형질도입에 효율적인 접근법으로서 확인되었다. 콕삭키 아데노바이러스 수용체(Ad5에 대한 도킹 단백질) 및 CD46(Ad35에 대한 도킹 단백질)

의 발현을 1차 인간 대식세포상의 아이소타입 대조용과 비교 시험하였으며, CD46(콕삭키 아데노바이러스 수용체는 아님)이 고도로 발현되었다. 따라서, 키메릭 Ad5f35 아데노바이러스가 1차 인간 대식세포 형질도입에 사용되었으며, HER2에 대한 키메릭 항원 수용체(GFP 및 빈 Ad5f35 바이러스가 대조용으로서 사용되었다)를 발현하도록 표준 분자 생물학 기법을 통해 조작되었다.

도 16B는 1000의 MOI에서, Ad5f35가 트랜스유전자(GFP가 모델 트랜스유전자로서 사용되었다)를 인간 대식세포내로 유효하게 전달하였으며, IVIS 스펙트럼상에서 GFP 신호 정량분석에 의해 모니터된 바와 같이 발현이 시간에 따라 상승됨을 도시하는 그래프이다.

도 16C는 10,000 이하의 넓은 범위의 MOI에 걸쳐 상이한 시점들에서 1차 인간 대식세포의 형질도입 동역학의 비교를 도시하는 그래프이다.

도 16D는 넓은 범위의 바이러스 MOI에서, 형질도입 후 48시간째에 Ad5f35 형질도입된 인간 대식세포상에서의 항-HER2 CAR 발현의 일련의 전형적인 FACS 플롯이다.

도 16E는 Ad5f35-GFP 형질도입된 1차 인간 대식세포의 일련의 전형적인 형광 현미경검사 상으로, 최고의 형질도입 효율이 1000의 MOI에서 입증되었다.

도 17A는 FACS 분석을 통해 시험관내 식균작용 분석에서 시험된 1차 인간 CARMA를 도시하는 일련의 그래프이다. 대식세포(형질도입되지 않았거나 항-HER2 CAR)를 GFP+ SKOV3 난소암 세포와 공-배양 전에 DiI로 염색하였다. DiI/GFP 이중 양성 사건에 의해 정의된 식균작용이 CAR 그룹에서 26.6% 및 대조용 그룹에서 4.55%의 수준으로 측정되었다.

도 17B는 상기 이중 양성 사건이 식균작용을 나타냄을 시각적으로 입증하는 일련의 상이다. 상기 DiI/GFP 이중 양성 사건이 포식 사건이고 이중이 아님을 확인하기 위해서, 사이토칼라신 D(식균작용 억제제)를 상기 실험 부문에 가하였으며, 완전히 무효화된 CAR이 식균작용을 1.74%로 낮게 매개하였다. 1차 인간 CAR 대식세포가 종양 세포를 포식할 수 있음을 추가로 확인하기 위해서, 이중 양성 사건을 암니스 이미지스트림 FACS에 의해 통문하고 암니스 식균작용-미란 알고리즘에 의해 높은 곳에서 낮은 곳으로 정렬시켰다.

도 17C는 SKOV3-GFP와 공-배양된 DiI 염색된 CAR-HER2 대식세포의 공초점 현미경 상을 도시하는 일련의 상이다.

도 18은 CAR(UTD는 아님) 인간 대식세포가 유방암 세포를 포식함을 도시하는 그래프이다. 항-HER2 CAR 1차 인간 대식세포를 단핵세포 유래된 대식세포의 Ad5f35-CAR 형질도입을 사용하여 생성시켰다. 상기 세포(또는 대조용의 형질도입되지 않은 세포)를 SKBR3 인간 유방암 세포의 시험관내 FACS 기반 식균작용 분석에서 효과기로서 사용하였다. 또한, 항-SIRP $\alpha$  단클론 항체의 첨가는 유방암 세포의 CARMA(UTD는 아님) 대식세포 식균작용을 증대시켰다. 상기 결과는 THP-1 모델에서 CARMA에 의해 관찰된 CD47/SIRP $\alpha$  축의 봉쇄간의 상승작용이 1차 인간 대식세포 연구로 해석됨을 입증한다.

도 19는 CARMA가 pH-로도 그런 이 콜라이(Rodo Green E. Coli) 입자의 완전한 식균작용을 나타냄을 도시하는 일련의 전형적인 FACS 플롯이다. CAR 대식세포가 항균의 의미에서 여전히 기능적으로 타고난 면역세포이며 감염성 자극에 반응하는 능력을 상실하지 않았음을 입증하기 위해서, 대조용의 형질도입되지 않은 또는 CAR 대식세포를 FACS 기반 이 콜라이 식균작용 분석에 사용하였다.

도 20A는 시험관내 루시페라제 기반 살해 분석에서 효과기 세포로서 시험된 1차 인간 항-HER2 CARMA를 도시하는 그래프이다. 항-HER2 CARMA(대조용 UTD는 아님) 대식세포는 48시간의 공-배양 후 HER2+ K562 세포의 비용해를 유도하지만, HER2 발현이 없는 대조용 K562 세포는 아니다.

도 20B는 표적으로서 SKBR3 유방암 세포를 사용하는 시험관내 루시페라제 기반 살해 분석을 도시하는 그래프이다. CARMA(대조용 UTD 또는 대조용 Empty Ad5f35는 아님) 형질도입된 대식세포는 48시간 공-배양 후 2개의 모델 모두에 대해 현저한 항-종양 활성을 가졌다.

도 20C는 표적으로서 SKOV3 난소암 세포를 사용하는 시험관내 루시페라제 기반 살해 분석을 도시하는 그래프이다. CARMA(대조용 UTD 또는 대조용 Empty Ad5f35는 아님) 형질도입된 대식세포는 48시간 공-배양 후 2개의 모델 모두에 대해 현저한 항-종양 활성을 가졌다.

도 20D는 살해 분석에서 CD47/SIRP $\alpha$  축의 봉쇄간의 상승작용을 도시하는 그래프이다. SKOV3 난소암 세포를 배지, 대조용의 형질도입되지 않은 대식세포, 항-HER2 CARMA, 항-HER2 CARMA + 항CD47 mAB(10 mcg/ml), 또는 항-HER2 CARMA + 항-SIRP $\alpha$  (10 mcg/ml)와 공-배양하고 루시페라제 신호를 연속해서 측정하였다. CARMA는 13일까지

완전한 종양 근절을 유도한 반면, 종양 근절의 동역학은 상기 CD47/SIRP $\alpha$  축의 봉쇄하에서 훨씬 더 빨랐다.

도 20E는  $\beta$ -글루칸과의 상승작용을 도시하는 그래프이며, 이는 THP-1 대식세포 CARMA 모델에서 입증되었고 상기 CARMA의  $\beta$ -글루칸 초회항원자극은 증대된 종양 살해 동역학을 유도하였다.

도 20F는 CARMA의 LPS(TLR-4 리간드) 또는 폴리-IC(TLR-3 리간드)에의 노출이 항-종양 효과의 조절을 유도했음을 도시하는 그래프이다.

도 21은 시험관내 루시페라제 분석에서 1차 인간 CARMA의 종양을 제거하는 능력을 도시하는 일련의 상이다. GFP+ SKOV3 난소암 세포를 대조용 UTD 대식세포, 대조용 UTD 대식세포 + 10 mcg/ml 트라스투주맙, 대조용 빈 Ad5f35 바이러스 형질도입된 대식세포, 또는 항-HER2 1차 인간 CARMA와 공-배양하였다. CARMA(대조용 조건은 아님)는 종양 세포를 제거할 수 있었다.

도 22A는 M1 마커 CD80/CD86의 용량 의존적인 상향 조절, 및 M2 마커 CD163의 용량 의존적인 하향-조절이 FACS에 의해 측정되었음을 도시하는 그래프 패널이다. 대식세포는 통상적으로 M1 및 M2 대식세포 분류로 분리되는 다양한 기능적 특징을 채용할 수 있는 표현형적으로 가소성인 세포이며, 이때 M1은 염증성/활성화되고, M2는 면역억제성/종양-촉진성이다. M1 및 M2 마커를 Ad5f35 CAR 바이러스로 1차 인간 대식세포를 형질도입시킨 후 48시간째에 측정하였다.

도 22B는 M1 및 M2 마커에 대한 효과가 CAR 발현의 결과인지 또는 Ad5f35 형질도입의 결과인지의 여부를 도시하는 일련의 그래프이다. 대식세포를 아무것도 없는 빈 Ad5f35, 또는 항-HER2 Ad5f35로 형질도입시켰으며, 빈 /CAR Ad5f35는 동일한 패턴의 표현형 이동을 나타내었다.

도 22C는 억제성 사이토킨에 노출된 CARMA가 48시간째에 루시페라제 기반 시험관내 비용해 분석에서 그의 살해 활성을 유지하였음을 도시하는 그래프이다. 대조용 UTD 대식세포는 억제성 사이토킨으로 컨디셔닝되었으며 증대된 종양 성장을 나타내었다.

도 22D는 인간 CAR 대식세포의 면역억제에 대한 내성을 도시하는 그래프 패널, 대조용 UTD, Empty Ad5f35, 또는 항-HER2 CAR Ad5f35 형질도입된 대식세포를 10 ng/ml의 IL-4, 표준 M2 유도 사이토킨, 또는 공-배양 중 대식세포가 M2로 파괴되었음을 앞서 나타낸 암세포(SKOV3, 난소암 세포주; HDLM2, 호지킨 림프종 세포주)에 노출시켰다. 대조용 UTD 대식세포는 CD206, STAT6 인산화를 통해 IL-4 자극에 특이적으로 반응하는 M2 마커를 상향조절하였다. Empty Ad5f35, 및 훨씬 CAR-Ad5f35 형질도입된 대식세포는 IL-4에 대한 내성 및 상기 M2 표현형으로의 종양 유도된 파괴를 나타내었다.

도 22E는 24시간 동안 IL-4에 노출되어 M2로 분극된(또는 그렇지 않은) 대조용 UTD 또는 항-HER2 CAR 대식세포의 대사 표현형, 및 산소 소비율을 도시하는 그래프이다.

도 22F는 CARMA가 M2 파괴에 내성을 가리키는 표현형, 대사, 및 기능 분석을 도시하는 그래프이다.

도 23A는 0(UTD) 내지 1000 범위의 MOI에서 Ad5f35-CAR-HER2로 형질도입된 1차 인간 정상 공여자 단핵세포(CD14 양성 선택을 통해 정제됨)를 도시하는 그래프 패널이다. CAR 발현을 형질도입 후 48시간째에 FACS를 통해 측정하였다. CAR 단핵세포는 Ad5f35로 효율적으로 생성되었으며, 발현은 1000의 MOI에서 절정이었다.

도 23B는 1차 단핵세포 형질도입 효율을 도시하는 그래프이다.

도 23C는 단핵세포가 1000 이하의 MOI에서 높은 생육력(FACS 생/사 아쿠아(Live/Dead Aqua) 분석에 의해 측정됨)을 유지하였음을 도시하는 그래프이다.

도 23D는 CAR(그러나 형질도입되지 않은 것(UTD)은 아님) 인간 단핵세포가 M1 활성화 마커를 상향조절하였음을 도시하는 일련의 그래프이다.

도 23E는 CAR(그러나 형질도입되지 않은 것(UTD)은 아님)로 인해 인간 단핵세포가 M2 마커를 하향조절하였음을 도시하는 일련의 그래프이다.

도 24A는 시험관내 루시페라제 기반 살해 분석을 통해 평가된 HER2+ SKBR3 세포(인간 유방암)의 항-HER2 CAR 단핵세포 살해를 도시하는 그래프이다.

도 24B는 시험관내 루시페라제 기반 살해 분석을 통해 평가된 HER2+ SKOV3 세포(인간 난소암)의 항-HER2 CAR 단핵세포 살해를 도시하는 그래프이다.

도 25A는 생체내에서 인간 HER2(+) 난소암 이종이식편의 모델링에 사용된 NOD-scid IL2Rg-null-IL3/GM/SF,

NSG-SGM3(NSGS) 마우스의 개략도이다. 0일째에 마우스에게 고형암의 공격적인 선천적인 전이성 모델인 복강내 암종증의 모델로서 7.5E5 방아별레 녹색 루시페라제(CBG luc) 양성/녹색 형광 단백질(GFP) 양성 SKOV3 난소암 세포를 복강내(IP) 주사하였다. 마우스를 처리하지 않거나(종양 단독) 또는 0일째에 IP 주사를 통해 단일 용량의 4E6 형질도입되지 않은(UTD) 또는 CAR-HER2(CARMA) 인간 대식세포를 주사하였다.

도 25B는 종양 크기의 대용률로서 생물발광(전체 플러스; 광자/초)을 사용하여 연속적으로 영상화한 마우스를 도시하는 그래프이다.

도 25C는 CARMA 처리를 수용한 마우스의 생존 퍼센트를 도시하는 그래프이다. CARMA 처리된 마우스는 대략 두 자릿수의 종양 크기 감소를 가졌다.

도 25D는 CARMA로 처리된 마우스가, 처리되지 않거나 또는 UTD 대식세포 처리된 마우스에 비해 30일 생존 이점 ( $p=0.018$ )을 가졌음을 도시하는 상들의 패널이다.

도 25E는 36일째에 죽은 마우스로부터 수확되고, FACS 분석시 인간 CD45 발현을 통해 채용 전달된 인간 대식세포의 존재에 대해 평가된 종양을 도시하는 그래프 패널이다.

도 26A는 1000의 감염 배수에서 트랜스유전자가 없는 빈 Ad5f35 비리온(Empty) 또는 Ad5f35-CAR-HER2- $\zeta$  (CARMA)로 형질도입된 또는 형질도입되지 않은(UTD) 인간 대식세포의 형질도입 후 48시간째 FACS 분석에 의해 확인된 표면 CAR 발현을 도시하는 그래프이다.

도 26B는 빈 Ad5f35 또는 CAR-HER2- $\zeta$  Ad5f35에 의해 형질도입된 세포에서 M1 대식세포 분극을 입증하기 위해 평가된 표면 마커들을 도시하는 그래프 패널이다. M1 마커(HLA DR, CD86, CD80, PDL1)는 상향조절된 반면 M2 마커(CD206, CD163)는 하향조절되었다.

도 26C는 HER2+ 전이성 난소암의 IP 모델에 사용되고 4개의 처리 부문(부문당  $n=5$ )으로 분류된 NSGS 마우스의 개략도이다. 마우스를 처리하지 않은 채로 두거나 또는 0일째에 1E7 형질도입되지 않은, 빈-Ad5f35 형질도입된 대식세포, 또는 CAR-HER2- $\zeta$  형질도입된 대식세포의 IP 주사를 제공하였다.

도 26D는 종양 이식후 27일째에 나타난 전형적인 데이터와 함께, 일련의 생물발광 영상화를 통해 모니터된 종양 크기를 도시하는 상들의 패널이다.

도 26E는 종양 이식후 27일째에 나타난 전형적인 데이터와 함께, 일련의 생물발광 영상화를 통해 모니터된 종양 크기를 도시하는 그래프이다.

도 27A는 HER2+ 전이성 난소암의 IP 모델에 사용되고 4개의 처리 부문(부문당  $n=5$ )(처리되지 않음, 및 0일째에 IP 투여된 3E6, 1E7, 또는 2E7 CAR-HER2- $\zeta$  인간 대식세포 포함)으로 분류된 NSGS 마우스의 개략도이다.

도 27B는 일련의 생물발광 영상화를 통해 모니터된 종양 크기를 도시하는 그래프이다. 대식세포의 수에 대한 용량-의존적인 반응이 상기 모델에서 관찰되었다.

도 27C는 마우스당 3E6, 1E7, 또는 2E7 대식세포의 단일 용량의 CAR-HER2 대식세포가 이식후 36일까지 용량의 존적인 종양 근절(처리되지 않은 마우스에 비해)을 유도하였음을 도시하는 그래프이다.

도 28은 CARMA에 대해 제안된 치료학적 접근법의 도해이다. 간단히, 환자 단핵세포를 말초 혈액으로부터 선택하고, 생체외 분화시키고 형질도입시켜 CAR을 발현시키고, 상승작용성 화합물로 보조-자극하고(또는 하지 않고), 다시 환자에게 정맥내, 복강내, 종양내로, 중재적 방사선술을 통해, 또는 다른 경로에 의해 주사할 것이다. 중요하게, 상기 분화된 과정을 견너뛸 수 있으며 단핵세포를 형질도입시키고 상기 환자에게 다시 주입 할 수 있다. 상기 단핵세포 공급원은 또한 HLA 합치된 공여자일 수 있다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 정의

[0023] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 과학기술 용어들은 본 발명이 속하는 분야의 통상적인 숙련가에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서에 기재된 바와 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 물질을 본 발명의 시험을 위한 실시에 사용할 수 있지만, 본 명세서에는 바람직한 물질 및 방법이 기재된다. 본 발명의 기재 및 청구에서, 하기의 용어가 사용될 것이다.

[0024] 본 명세서에 사용된 용어는 오직 특정한 실시태양을 기재하기 위한 것이며 제한을 의도하는 것은 아님을 또한

이해해야 한다.

- [0025] 본 명세서에 사용된 "하나"란 관사는 상기 관사의 하나 또는 하나 초과(즉 적어도 하나)의 문법적 목적어를 지칭한다. 예로서, "하나의 요소"는 하나의 요소 또는 하나 초과의 요소를 의미한다.
- [0026] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "약"은 양, 시간의 지속기간 등과 같은 측정 가능한 값을 언급할 때 명시된 값의 ±20% 또는 ±10%, 보다 바람직하게는 ±5%, 훨씬 더 바람직하게는 ±1%, 및 더욱 더 바람직하게는 ±0.1%의 변화(상기와 같은 변화는 개시된 방법을 수행하기에 적합하므로)를 포함하고자 한다.
- [0027] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "활성화"는 검출 가능한 세포 증식을 유도하기에 충분히 자극되었거나 또는 그의 효과기 기능을 발휘하도록 자극된 단핵세포/대식세포의 상태를 지칭한다. 활성화는 또한 유도된 사이토킨 생성, 식균작용, 세포 신호전달, 표적세포 살해, 또는 항원 가공 및 제공과 관련될 수 있다. "활성화된 단핵세포/대식세포"란 용어는 다른 것들 중에서도 세포 분열을 겪거나 효과기 기능을 발휘하고 있는 단핵세포/대식세포를 지칭한다.
- [0028] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "작용제", 또는 "생물학적 작용제" 또는 "치료학적 작용제"란 용어는 본 명세서에 기재된 변형된 세포에 의해 발현되거나, 방출되거나, 또는 표적으로 전달될 수 있는 분자를 지칭한다. 상기 작용제는 비제한적으로 핵산, 항생제, 소염제, 항체 또는 그의 항체 단편, 성장 인자, 사이토킨, 효소, 단백질, 웹티드, 융합 단백질, 합성 분자, 유기 분자(예를 들어 소분자), 탄수화물 등, 지질, 호르몬, 마이크로솜, 이들의 유도체 또는 변이체, 및 이들의 임의의 조합을 포함한다. 상기 작용제는 임의의 세포 부분, 예를 들어 수용체, 항원 결정인자, 또는 표적 또는 표적 세포상에 존재하는 다른 결합 부위에 결합할 수 있다. 상기 작용제는 세포내로 확산되거나 수송될 수 있으며, 이때 상기 작용제는 세포내에서 작용할 수 있다.
- [0029] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "항체"란 용어는 항원과 특이적으로 결합하는 면역글로불린 분자를 지칭한다. 항체는 천연 공급원으로부터 또는 재조합 공급원으로부터 유래된 완전한 면역글로불린일 수 있으며 완전한 면역글로불린의 면역반응성 부분일 수 있다. 항체는 전형적으로 면역글로불린 분자의 사량체이다. 본 발명에서 항체는 다양한 형태, 예를 들어 다클론 항체, 단클론 항체, Fv, Fab 및 F(ab)<sub>2</sub>뿐만 아니라 단쇄 항체(scFv) 및 인간화된 항체로 존재할 수 있다(Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426).
- [0030] "항체 단편"이란 용어는 완전 항체의 일부를 지칭하며 완전 항체의 항원 결정 가변 영역을 지칭한다. 항체 단편의 예는 비제한적으로 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, 및 Fv 단편, 선형 항체, scFv 항체, 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이성 항체를 포함한다.
- [0031] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "항체 중쇄"는 모든 항체 분자 중에 천연 형태로 존재하는 2가지 유형의 폴리웹티드쇄 중 보다 큰 것을 지칭한다.
- [0032] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "항체 경쇄"는 모든 항체 분자 중에 천연 형태로 존재하는 2가지 유형의 폴리웹티드쇄 중 보다 작은 것을 지칭한다. α 및 β 경쇄는 상기 2개의 주요 항체 경쇄 아이소타입을 지칭한다.
- [0033] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "합성 항체"란 용어는 재조합 DNA 기술을 사용하여 생성되는 항체, 예를 들어 본 명세서에 기재된 바와 같이 박테리오파지에 의해 발현된 항체를 의미한다. 상기 용어는 또한 상기 항체를 암호화하는 DNA 분자의 합성에 의해 생성되고 상기 DNA 분자가 항체 단백질 또는 상기 항체를 명시하는 아미노산 서열을 발현하는 항체를 의미하는 것으로 해석되어야 하며, 여기에서 상기 DNA 또는 아미노산 서열은 당해 분야에서 입수할 수 있고 당해 분야에 주지된 합성 DNA 또는 아미노산 서열 기술을 사용하여 획득되었다.
- [0034] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "항원" 또는 "Ag"란 용어는 면역반응을 일으키는 분자로서 정의된다. 상기 면역반응은 항체 생산, 또는 특이적인 면역-적격 세포의 활성화, 또는 이 둘 모두를 수반할 수 있다. 숙련가는 실질적으로 모든 단백질 또는 웹티드를 포함한 임의의 거대분자가 항원으로서 작용할 수 있음을 알 것이다. 더욱 또한, 항원은 재조합 또는 계놈 DNA로부터 유래될 수 있다. 숙련가는 따라서 면역반응을 이끌어내는 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 또는 부분 뉴클레오티드 서열을 포함하는 임의의 DNA가 "항원"을, 상기 용어가 본 명세서에 사용되는 바와 같이 암호화함을 알 것이다. 더욱 또한, 당해 분야의 숙련가는 항원이 오직 유전자의 완전길이 뉴클레오티드 서열에 의해서만 암호화될 필요는 없음을 이해할 것이다. 본 발명이 비제한적으로 하나 초과의 유전자의 부분적인 뉴클레오티드 서열의 사용을 포함하며 상기 뉴클레오티드 서열을 다양한 조

합으로 배열하여 목적하는 면역반응을 이끌어냄은 쉽게 자명하다. 더욱이, 숙련가는 항원이 "유전자"에 의해 암호화될 필요가 전혀 없음을 알 것이다. 항원은 합성되어 생성되거나 또는 생물학적 샘플로부터 유래될 수 있음은 쉽게 자명하다. 상기와 같은 생물학적 샘플은 비제한적으로 조직 샘플, 종양 샘플, 세포 또는 생물학적 유체를 포함할 수 있다.

[0035] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "항-종양 효과"란 용어는 종양 부피의 감소, 종양 세포수의 감소, 전이수의 감소, 기대 수명의 증가, 또는 암성 상태와 관련된 다양한 생리학적 증상들의 개선에 의해 나타날 수 있는 생물학적 효과를 지칭한다. "항-종양 효과"는 또한 우선 종양 발생의 예방에 있어서 본 발명의 웹티드, 폴리뉴클레오티드, 세포 및 항체의 능력에 의해 나타날 수 있다.

[0036] "자가-항원"이란 용어는 본 발명에 따르면, 면역계에 의해 이질적인 것으로서 인식되는 임의의 자기-항원을 의미한다. 자가-항원은 비제한적으로 세포 표면 수용체를 포함하여, 세포 단백질, 인단백질, 세포 표면 단백질, 세포 지질, 핵산, 당단백질을 포함한다.

[0037] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "자가면역 질병"이란 용어는 자가면역 반응으로부터 생성되는 질환으로서 정의된다. 자가면역 질병은 자기-항원의 부적합하고 과도한 반응의 결과이다. 자가면역 질병의 예는 비제한적으로, 특히 애디슨병(Addison's disease), 원형 탈모증(alpecia areata), 강직성 척추염(ankylosing spondylitis), 자가면역 간염(autoimmune hepatitis), 자가면역 이하선염(autoimmune parotitis), 크론병(Crohn's disease), 당뇨병(diabetes)(I형), 이영양성 수포성 표피 박리증(dystrophic epidermolysis bullosa), 부고환염(epididymitis), 사구체신염(glomerulonephritis), 그레이브스병(Graves' disease), 길랑-바雷 증후군(Guillain-Barr syndrome), 하시모토병(Hashimoto's disease), 용혈성 빈혈(hemolytic anemia), 전신 홍반성 루푸스(systemic lupus erythematosus), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 종종 근무력증(myasthenia gravis), 심상성 천포창(pemphigus vulgaris), 건선(psoriasis), 류머티스열(rheumatic fever), 류머티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 유육종증(sarcoidosis), 경피증(scleroderma), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 척추관절증(spondyloarthropathies), 갑상선염(thyroiditis), 혈관염(vasculitis), 백반증(vitiligo), 점액수종(myxedema), 악성 빈혈(pernicious anemia), 궤양성 대장염(ulcerative colitis)을 포함한다.

[0038] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "자기유래"란 용어는 나중에 개인에게 재-도입되는 상기 동일한 개인으로부터 유래되는 임의의 물질을 지칭하고자 한다.

[0039] "동종이계"는 동일한 종의 상이한 동물로부터 유래되는 이식편을 지칭한다.

[0040] "이종발생성"은 상이한 종의 동물로부터 유래되는 이식편을 지칭한다.

[0041] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "암"이란 용어는 이상 세포의 급속하고 통제되지 않는 성장을 특징으로 하는 질병으로서 정의된다. 암세포는 국소적으로 또는 혈류 및 림프계를 통해 신체의 다른 부분으로 확산될 수 있다. 다양한 암의 예는 비제한적으로 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 피부암, 혀장암, 결장직장암, 신장암, 간암, 뇌암, 림프종, 백혈병, 폐암 등을 포함한다. 몇몇 실시태양에서, 상기 암은 갑상선 수질암종(medullary thyroid carcinoma)이다.

[0042] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "키메릭 항원 수용체" 또는 "CAR"이란 용어는 면역 효과기 세포상에서 발현되도록 조작되고 항원에 특이적으로 결합하는 인공 T 세포 표면 수용체를 지칭한다. CAR은 입양세포 전달과 함께 치료법으로서 사용될 수 있다. 단핵세포를 환자(혈액, 종양 또는 복수)로부터 제거하고 상기가 특정 형태의 항원에 특이적인 수용체를 발현하도록 변형시킨다. 일부 실시태양에서, 상기 CAR은 예를 들어 종양 관련된 항원에 대한 특이성으로 발현되었다. CAR은 또한 세포내 활성화 도메인, 막관통 도메인 및 종양 관련된 항원 결합 영역을 포함하는 세포외 도메인을 포함할 수 있다. 일부 태양에서, CAR은 CD3-제타 막관통 및 세포내 도메인에 융합된, 단쇄 가변 단편(scFv) 유래된 단클론 항체의 융합물을 포함한다. CAR 설계의 특이성은 수용체(예를 들어 웹티드)의 리간드로부터 유래될 수 있다. 일부 실시태양에서, CAR은 종양 관련 항원에 특이적인 CAR을 발현하는 단핵세포/대식세포를 재지향(redirecting)시킴으로써 암을 표적화할 수 있다.

[0043] "키메릭 세포내 신호전달 분자"란 용어는 하나 이상의 자극 및/또는 보조-자극 분자의 하나 이상의 세포내 도메인을 포함하는 재조합 수용체를 지칭한다. 상기 키메릭 세포내 신호전달 분자는 세포외 도메인이 실질적으로 없다. 일부 실시태양에서, 상기 키메릭 세포내 신호전달 분자는 추가적인 도메인, 예를 들어 막관통 도메인, 검출 가능한 태그, 및 이격자 도메인을 포함한다.

[0044] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "보존적인 서열 변형"이란 용어는 아미노산 서열을 함유하는 항체의 결합 특

성에 그다지 영향을 미치지 않거나 상기 특성을 변경시키지 않는 아미노산 변형을 지칭하고자 한다. 상기와 같은 보존적인 변형은 아미노산 치환, 부가 및 결실을 포함한다. 변형을 당해 분야에 공지된 표준 기법, 예를 들어 부위-지향된 변이유발 및 PCR-매개된 변이유발에 의해 본 발명의 항체에 도입시킬 수 있다. 보존적인 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체되는 것이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 과는 당해 분야에서 정의되었다. 이들 과는 염기성 측쇄(예를 들어 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들어 아스파트산, 글루탐산), 비극성 측쇄(예를 들어 글리신, 아스파라진, 글루타민, 세린, 쓰레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측쇄(예를 들어 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타-분지된 측쇄(예를 들어 쓰레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예를 들어 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 갖는 아미노산들을 포함한다. 따라서, 항체의 CDR 영역내의 하나 이상의 아미노산 잔기는 동일한 측쇄 과로부터의 다른 아미노산 잔기로 대체될 수 있고 상기 변경된 항체를 본 명세서에 기재된 기능 분석을 사용하여 항원에 결합하는 능력에 대해 시험할 수 있다.

[0045] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "보조-자극 리간드"란 용어는 단핵세포/대식세포상의 동족 보조-자극 분자에 특이적으로 결합하여 단핵세포/대식세포 반응, 예를 들어 비제한적으로 증식, 활성화, 분화 등을 매개하는 신호를 제공하는 항원 제시세포(예를 들어 aAPC, 수지상 세포, B 세포 등)상의 분자를 포함한다. 보조-자극 리간드는 비제한적으로 CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, 유도성 보조자극 리간드 (ICOS-L), 세포간 부착 분자(ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, 림프독소 베타 수용체, 3/TR6, ILT3, ILT4, HVEM, 틀리간드 수용체에 결합하는 작용물질 또는 항체 및 B7-H3과 특이적으로 결합하는 리간드를 포함한다. 보조-자극 리간드는 또한, 특히 단핵세포/대식세포상에 존재하는 보조-자극 분자와 특이적으로 결합하는 항체, 예를 들어 비제한적으로 CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능-관련 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 및 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드를 포함한다.

[0046] "보조-자극 분자"는 초기 자극을 강화하거나 또는 약화시키는데 사용되는 내재적인 면역 세포상의 분자를 지칭한다. 예를 들어, 병원체-관련 패턴 인식 수용체, 예를 들어 TLR(강화) 또는 CD47/SIRP $\alpha$  측(약화)은 내재적인 면역세포상의 분자이다. 보조-자극 분자는 비제한적으로 TCR, CD3 제타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 입실론, CD86, 통상적인 FcR 감마, FcR 베타 (Fc 입실론 R1b), CD79a, CD79b, Fc감마 RIIa, DAP10, DAP12, T 세포 수용체(TCR), CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능-관련 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, CD83과 특이적으로 결합하는 리간드, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), CD127, CD160, CD19, CD4, CD8알파, CD8베타, IL2R 베타, IL2R 감마, IL7R 알파, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (촉각), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D, 본 명세서에 기재된 다른 보조-자극 분자, 이들의 임의의 유도체, 변이체 또는 단편, 동일한 기능상 능력을 갖는 보조-자극 분자의 임의의 합성 서열, 및 이들의 임의의 조합을 포함한다.

[0047] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "보조-자극 신호"는 1차 신호, 예를 들어 대식세포상의 CAR의 활성화와 함께 상기 대식세포의 활성화를 유도하는 신호를 지칭한다.

[0048] "세포독성" 또는 "세포독성"이란 용어는 세포를 살해하거나 손상시킴을 지칭한다. 하나의 실시태양에서, 대사적으로 증대된 세포의 세포독성은 대식세포의 개선된, 예를 들어 증가된 세포용해 활성이다.

[0049] "질병"은, 동물이 항상성을 유지할 수 없고 상기 질병이 개선되지 않는다면 상기 동물의 건강이 계속해서 나빠지는 상기 동물의 건강 상태이다. 대조적으로, "질환"은, 동물이 항상성을 유지할 수는 있지만 상기 동물의 건강 상태가 상기 질환이 없는 경우보다 덜 유리한 상기 동물의 건강 상태이다. 질환은 치료되지 않은 채로 두는 경우 상기 동물의 건강 상태에서 추가적인 질환을 반드시 야기하지는 않는다.

[0050] "유효량" 또는 "치료학적 유효량"은 본 명세서에서 호환적으로 사용되며, 특정한 생물학적 결과를 성취하거나 치료학적 또는 예방학적 이점을 제공하기에 유효한, 본 명세서에 기재된 바와 같은 화합물, 제형, 물질 또는 조성의 양을 지칭한다. 상기와 같은 결과는 비제한적으로 당해 분야에 적합한 임의의 수단에 의해 측정되는 바와 같은 항-종양 활성을 포함할 수 있다.

[0051] "암호화"는 뉴클레오티드(즉 rRNA, tRNA 및 mRNA)의 한정된 서열 또는 아미노산의 한정된 서열을 갖는 생물학적

과정에서 다른 중합체 및 거대분자의 합성을 위한 주형으로서 작용하기 위한 유전자, cDNA 또는 mRNA와 같은 폴리뉴클레오티드 중의 뉴클레오티드의 특정한 서열들의 고유의 성질 및 이로부터 생성되는 생물학적 성질을 지칭한다. 따라서, 유전자는 상기 유전자에 상응하는 mRNA의 전사 및 번역이 세포 또는 다른 생물계에서 단백질을 생성하는 경우 상기 단백질을 암호화한다. 암호화 가닥(그의 뉴클레오티드 서열은 mRNA 서열과 동일하며 대개는 서열 목록에 제공된다) 및 비-암호화 가닥(유전자 또는 cDNA의 전사를 위한 주형으로서 사용된다)은 모두 상기 유전자 또는 cDNA의 단백질 또는 다른 생성물을 암호화하는 것으로서 지칭될 수 있다.

- [0052] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "내인성"은 유기체, 세포, 조직 또는 계로부터의 또는 상기 내부에서 생성되는 임의의 물질을 지칭한다.
- [0053] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "외인성"은 유기체, 세포, 조직 또는 계로부터 도입되거나 또는 상기의 외부에서 생성되는 임의의 물질을 지칭한다.
- [0054] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "확대"란 용어는 단핵세포/대식세포 수의 증가에서와 같은 수의 증가를 지칭한다. 하나의 실시태양에서, 생체외에서 확대되는 단핵세포/대식세포는 배양물 중에 원래 존재하는 수에 비해 수가 증가한다. 또 다른 실시태양에서, 생체외에서 확대되는 단핵세포/대식세포는 배양물 중의 다른 세포 유형에 비해 수가 증가한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "생체외"란 용어는 살아있는 유기체(예를 들어 인간)로부터 제거되고 상기 유기체 밖에서(예를 들어 배양 디쉬, 시험관, 또는 생물반응기내에서) 번식된 세포를 지칭한다.
- [0055] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "발현"이란 용어는 프로모터에 의해 구동된 특정 뉴클레오티드 서열의 전사 및 /또는 번역으로서 정의된다.
- [0056] "발현 벡터"는 발현시키고자 하는 뉴클레오티드 서열에 작동적으로 연결된 발현 조절 서열을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 지칭한다. 발현 벡터는 발현에 충분한 시스-작용 요소들을 포함하며; 다른 발현 요소들은 숙주 세포 또는 시험관내 발현 시스템에 의해 공급될 수 있다. 발현 벡터는 상기 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하는 당해 분야에 공지된 모든 벡터들, 예를 들어 코스미드, 플라스미드(예를 들어 네이 키드 또는 리포솜 중에 함유된) 및 바이러스(예를 들어 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스)를 포함한다.
- [0057] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "상동성"은 2개의 중합체성 문자간, 예를 들어 2개의 핵산 문자, 예를 들어 2개의 DNA 문자 또는 2개의 RNA 문자간, 또는 2개의 폴리펩ти드 문자간의 서브유닛 서열 일치성을 지칭한다. 상기 2개 문자 모두 중의 서브유닛 위치가 동일한 단량체성 서브유닛에 의해 점유되는 경우; 예를 들어 2개의 각각의 DNA 문자 중의 위치가 아데닌에 의해 점유되는 경우, 이들은 상기 위치에서 상동성이다. 2개 서열간의 상동성은 정합되거나 상동성인 위치의 수의 직접적인 함수이다; 예를 들어 2개 서열 중의 위치들의 절반(예를 들어 10 서브유닛 길이의 중합체 중 5개의 위치)이 상동성인 경우, 상기 두 서열은 50% 상동성이고; 상기 위치들 중 90%(예를 들어 10 중 9)가 정합되거나 상동성인 경우, 상기 두 서열은 90% 상동성이다. 핵산 또는 단백질에 적용되는 바와 같이, 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "상동성"은 약 50% 서열 일치성을 갖는 서열을 지칭한다. 보다 바람직하게, 상기 상동성 서열은 약 75% 서열 일치성을 가지며, 훨씬 더 바람직하게는 약 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 일치성을 갖는다.
- [0058] 비-인간(예를 들어 쥐) 항체의 "인간화된" 형태는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메릭 면역글로불린, 그의 면역글로불린 쇄 또는 단편(예를 들어 Fv, Fab, Fab', F(ab')2 또는 항체의 다른 항원-결합 하위서열)이다. 대부분의 경우에, 인간화된 항체는 수용자의 상보성-결정 영역(CDR)으로부터의 잔기가, 목적하는 특이성, 친화성 및 능력을 갖는 비-인간 종(공여자 항체), 예를 들어 마우스, 래트 또는 토끼의 CDR로부터의 잔기에 의해 대체된 인간 면역글로불린(수용자 항체)이다. 일부의 경우에, 상기 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 영역(FR) 잔기는 상응하는 비-인간 잔기에 의해 대체된다. 더욱 또한, 인간화된 항체는 수용자 항체에서도 또는 수입된 CDR 또는 프레임워크 서열에서도 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체 성능을 추가로 개선 및 최적화하기 위해 이루어진다. 일반적으로, 상기 인간화된 항체는 적어도 하나, 및 전형적으로 2개의 실질적으로 모든 가변 도메인을 포함할 것이며, 상기 도메인에서 상기 CDR 영역의 전부 또는 실질적으로 전부는 비-인간 면역글로불린의 것들에 상응하고 상기 FR 영역의 전부 또는 실질적으로 전부는 인간 면역글로불린 서열의 것들이다. 상기 인간화된 항체는 최적으로 또한 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부, 전형적으로는 인간 면역글로불린의 것을 포함할 것이다. 추가의 상세한 내용에 대해서 문헌[Jones et al., Nature, 321: 522-525, 1986]; 문헌[Reichmann et al., Nature, 332: 323-329, 1988]; 문헌[Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596, 1992]을 참조하시오.

- [0059] "완전한 인간"은 전체 분자가 인간 기원의 것이거나 또는 항체의 인간 형태와 동일한 아미노산 서열로 이루어지는 면역글로불린, 예를 들어 항체를 지칭한다.
- [0060] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "일치성"은 2개의 중합체성 분자간의, 특히 2개의 아미노산 분자간의, 예를 들어 2개의 폴리펩티드 분자간의 서브유닛 서열 일치성을 지칭한다. 2개의 아미노산 서열이 동일한 위치에서 동일한 잔기를 가질 때; 예를 들어 2개의 각각의 폴리펩티드 분자 중의 위치가 아르기닌에 의해 점유되는 경우, 이들은 상기 위치에서 일치한다. 2개의 아미노산 서열이 정렬 중 동일한 위치에서 동일한 잔기를 갖는 일치성 또는 정도를 종종 비율로서 나타낸다. 2개 아미노산 서열간의 일치성은 정합되거나 일치하는 위치의 수의 직접적인 함수이다; 예를 들어 2개 서열 중의 위치들의 절반(예를 들어 10 아미노산 길이의 중합체 중 5개의 위치)이 일치하는 경우, 상기 두 서열은 50% 일치하고; 상기 위치들 중 90%(예를 들어 10 중 9)가 정합되거나 일치하는 경우, 상기 두 아미노산 서열은 90% 일치한다.
- [0061] "실질적으로 일치하는"은 참조 아미노산 서열(예를 들어 본 명세서에 기재된 아미노산 서열들 중 어느 하나) 또는 핵산 서열(예를 들어 본 명세서에 기재된 핵산 서열 중 어느 하나)에 적어도 50% 일치성을 나타내는 폴리펩티드 또는 핵산 분자를 의미한다. 바람직하게, 상기와 같은 서열은 비교에 사용되는 서열에 대해 아미노산 수준 또는 핵산에서 적어도 60%, 보다 바람직하게는 80% 또는 85%, 및 보다 바람직하게는 90%, 95% 또는 심지어 99% 일치한다.
- [0062] 안내 핵산 서열은 이중 가닥 DNA 표적 부위 중 하나의 가닥(뉴클레오티드 서열)에 상보성일 수 있다. 상기 안내 핵산 서열과 표적 서열간의 상보성 비율은 적어도 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 63%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%일 수 있다. 상기 안내 핵산 서열은 적어도 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 이상의 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 일부 실시태양에서, 상기 안내 핵산 서열은 10 내지 40 뉴클레오티드의 연속적인 신장부를 포함한다. 가변 표적화 도메인은 DNA 서열, RNA 서열, 변형된 DNA 서열, 변형된 RNA 서열(예를 들어 본 명세서에 기재된 변형을 참조하시오), 또는 이들의 임의의 조합으로 구성될 수 있다.
- [0063] 서열 일치성을 전형적으로는 서열 분석 소프트웨어(예를 들어 위스콘신 대학 생물공학 센터(미국 위스콘신주 53705 매디슨 유니버시티 애비뉴 1710 소재) 유전학 컴퓨터 그룹의 서열 분석 소프트웨어 패키지, BLAST, BESTFIT, GAP, 또는 PILEUP/Prettybox 프로그램)를 사용하여 측정한다. 상기와 같은 소프트웨어는 상동성 정도를 다양한 치환, 결실, 및/또는 다른 변형에 할당함으로써 동일하거나 유사한 서열들을 정합시킨다. 보존적인 치환은 전형적으로 하기 그룹들 내 치환을 포함한다: 글리신, 알라닌; 발린, 이소류신, 류신; 아스파르산, 글루탐산, 아스파라진, 글루타민; 세린, 쓰레오닌; 리신, 아르기닌; 및 페닐알라닌, 티로신. 일치성 정도를 측정하기 위한 예시적인 접근법에서, BLAST 프로그램을  $e^{-3}$  내지  $e^{-100}$ (밀접하게 관련된 서열을 가리킨다)의 확률 점수로 사용할 수 있다.
- [0064] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "면역글로불린" 또는 "Ig"란 용어는 항체로서 기능하는 단백질들의 부류로서 정의된다. B 세포에 의해 발현되는 항체를 때때로 BCR(B 세포 수용체) 또는 항원 수용체로서 지칭한다. 상기 부류의 단백질에 포함되는 5개의 구성원은 IgA, IgG, IgM, IgD 및 IgE이다. IgA는 체 분비액, 예를 들어 타액, 눈물, 젖, 위장 분비액 및 호흡기관 및 비뇨생식기관의 점막 분비액 중에 존재하는 1차 항체이다. IgG는 가장 통상적인 순환 항체이다. IgM은 대부분의 피험자에서 1차 면역 반응에서 생성되는 주요 면역글로불린이다. 상기는 응집반응, 보체 고정 및 다른 항체 반응에서 가장 효율적인 면역글로불린이며, 세균 및 바이러스에 대한 방어에 중요하다. IgD는 공지된 항체 기능은 갖지 않지만 항원 수용체로서 작용할 수도 있는 면역글로불린이다. IgE는 알레르겐에 노출시 호염기구 및 비만세포로부터 매개체의 방출을 유발시킴으로써 즉시 과민증을 매개하는 면역글로불린이다.
- [0065] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "면역 반응"이란 용어는 림프구가 항원 분자를 인식하여 항체의 형성을 유도하고/하거나 림프구를 활성화시켜 상기 항원을 제거할 때 발생하는 상기 항원에 대한 세포 반응으로서 정의된다.
- [0066] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "설명서"는 본 발명의 조성물 및 방법의 유용성을 전달하는데 사용될 수 있는 간행물, 기록물, 도해, 또는 임의의 다른 표현 매체를 포함한다. 예를 들어 본 발명의 키트의 설명서는 본 발명의 핵산, 웹티드 및/또는 조성물을 함유하는 용기에 부착되거나 또는 상기 핵산, 웹티드 및/또는 조성물을 함

유하는 용기와 함께 발송될 수 있다. 한편으로, 상기 설명서를, 수령자가 상기 설명서 및 화합물을 협력하여 사용하게 하고자 상기 용기와 별도로 발송할 수도 있다.

[0067] "단리된"은 자연 상태로부터 변경되거나 제거됨을 의미한다. 예를 들어 살아있는 동물 중에 자연적으로 존재하는 핵산 또는 웨티드는 "단리된" 것이 아니고, 자연 상태의 공존하는 물질로부터 부분적으로 또는 완전히 분리된 동일한 핵산 또는 웨티드는 "단리된" 것이다. 단리된 핵산 또는 단백질은 실질적으로 정제된 형태로 존재하거나 또는 예를 들어 숙주 세포와 같은 비-고유 환경에 존재할 수 있다.

[0068] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "렌티바이러스"는 레트로비리다에과의 속을 지칭한다. 렌티바이러스는 레트로바이러스들 중에서도, 분열하지 않는 세포를 감염시킬 수 있음이 독특하며; 상기는 상당량의 유전 정보를 숙주 세포의 DNA내로 전달할 수 있고, 따라서 상기는 유전자 전달 벡터의 가장 효율적인 방법 중 하나이다. HIV, SIV 및 FIV가 렌티바이러스의 모든 예이다. 렌티바이러스로부터 유래된 벡터는 생체내에서 유의수준의 유전자 전달을 성취하기 위한 수단을 제공한다.

[0069] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "변형된"이란 용어는 본 발명의 문자 또는 세포의 변화된 상태 또는 구조를 의미한다. 문자를 다수의 방식, 예를 들어 화학적으로, 구조적으로 및 기능적으로 변형시킬 수 있다. 세포를 핵산의 도입을 통해 변형시킬 수 있다.

[0070] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "조절"이란 용어는 치료 또는 화합물 부재하에서의 피험자의 반응 수준과 비교하여, 및/또는 다른 것은 동일하지만 치료되지 않은 피험자에서의 반응 수준과 비교하여, 상기 피험자에서 반응 수준의 검출 가능한 증가 또는 감소를 매개함을 의미한다. 상기 용어는 피험자, 바람직하게는 인간에서 고유 신호 또는 반응을 교란시키고/시키거나 상기에 영향을 미치고 이에 의해 이로운 치료학적 반응을 매개함을 포함한다.

[0071] 본 발명과 관련하여, 통상적으로 존재하는 핵산 염기에 대한 하기의 약어들이 사용된다. "A"는 아데노신을 지칭하고, "C"는 시토신을 지칭하고, "G"는 구아노신을 지칭하고, "T"는 티미딘을 지칭하고, "U"는 유리딘을 지칭한다.

[0072] 달리 명시되지 않는 한, "아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열"은, 서로의 축퇴 버전이고 동일한 아미노산 서열을 암호화하는 모든 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 단백질 또는 RNA를 암호화하는 뉴클레오티드 서열이란 어구는 또한 일부 버전에서 상기 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 인트론(들)을 함유할 수 있는 정도로 인트론을 포함할 수 있다.

[0073] "작동적으로 연결된"이란 용어는 이종 핵산 서열의 발현을 생성시키는, 조절 서열과 상기 핵산 서열간의 기능적 결합을 지칭한다. 예를 들어, 제1 핵산 서열은 상기 제1 핵산 서열이 제2 핵산 서열과 기능적인 관계로 놓일 때 상기 제2 핵산 서열과 작동적으로 연결된다. 예를 들어, 프로모터는 상기 프로모터가 암호화 서열의 전사 또는 발현에 영향을 미치는 경우 상기 암호화 서열에 작동적으로 연결된다. 일반적으로, 작동적으로 연결된 DNA 서열들은 연속적이며, 필요한 경우 2개의 단백질 암호화 영역들을 동일한 판독 프레임 중에서 연결시킨다.

[0074] "과발현된" 종양 항원 또는 종양 항원의 "과발현"이란 용어는 환자의 특정한 조직 또는 기관내 고형 종양과 같은 질병 영역으로부터의 세포 중의 종양 항원의, 상기 조직 또는 기관으로부터의 정상 세포 중의 발현 수준에 비해 비정상적인 발현 수준을 가리키고자 한다. 종양 항원의 과발현을 특징으로 하는 고형 종양 또는 혈액암을 갖는 환자를 당해 분야에 공지된 표준 분석에 의해 판정할 수 있다.

[0075] 면역원성 조성물의 "비경구" 투여는 예를 들어 피하(s.c.), 정맥내(i.v.), 근육내(i.m.), 종양내(i.t.) 또는 복장내(i.p.), 또는 흉골내 주사, 또는 주입 기법을 포함한다.

[0076] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "폴리뉴클레오티드"란 용어는 뉴클레오티드의 쇄로서 정의된다. 더욱 또한, 핵산은 뉴클레오티드의 중합체이다. 따라서, 본 명세서에 사용되는 바와 같은 핵산 및 폴리뉴클레오티드는 호환 가능하다. 당해 분야의 숙련가는 핵산이 폴리뉴클레오티드(상기는 단량체성 "뉴클레오티드"로 가수분해될 수 있다)라는 일반적인 지식을 갖는다. 상기 단량체성 뉴클레오티드는 뉴클레오시드로 가수분해될 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이 폴리뉴클레오티드는 비제한적으로, 당해 분야에서 입수할 수 있는 임의의 수단, 예를 들어 비제한적으로 재조합 수단, 즉 재조합 라이브러리 또는 세포 계놈으로부터의 핵산 서열의 클로닝, 통상적인 클로닝 기술 및 PCR(상표) 등의 사용, 및 합성 수단에 의해 획득되는 모든 핵산 서열을 포함한다.

[0077] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "웨티드", "폴리웨티드" 및 "단백질"이란 용어들은 호환 가능하게 사용되며, 웨티드 결합에 의해 공유 결합된 아미노산 잔기들로 구성되는 화합물을 지칭한다. 단백질 또는 웨티드는 적어

도 2개의 아미노산을 함유해야 하며, 단백질 또는 웨티드의 서열을 포함할 수 있는 아미노산의 최대수에 대한 제한은 없다. 폴리웨티드는 웨티드 결합에 의해 서로에 결합된 2개 이상의 아미노산을 포함하는 임의의 웨티드 또는 단백질을 포함한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 상기 용어는 단쇄(또한 통상적으로 당해 분야에서 예를 들어 웨티드, 올리고웨티드 및 올리고머로서 지칭됨), 및 보다긴 쇄(일반적으로 당해 분야에서 단백질로서 지칭됨) 모두를 지칭하며, 이들 중 다수의 유형이 존재한다. "폴리웨티드"는 특히, 예를 들어 생물학적으로 활성인 단편, 실질적으로 상동성인 폴리웨티드, 올리고웨티드, 동종이량체, 이종이량체, 폴리웨티드의 변이체, 변형된 폴리웨티드, 유도체, 유사체, 융합 단백질을 포함한다. 상기 폴리웨티드는 천연 웨티드, 재조합 웨티드, 합성 웨티드, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0078] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "프로모터"란 용어는 폴리뉴클레오티드 서열의 특정한 전사를 개시시키기 위해 필요한, 세포의 합성 기구 또는 도입된 합성 기구에 의해 인식되는 DNA 서열로서 정의된다.

[0079] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "프로모터/조절 서열"이란 용어는 상기 프로모터/조절 서열에 작동적으로 연결된 유전자 산물을 발현에 필요한 핵산 서열을 의미한다. 일부 예에서, 상기 서열은 코어 프로모터 서열일 수 있으며, 다른 경우에 상기 서열은 또한 상기 유전자 산물의 발현에 필요한 인핸서 서열 및 다른 조절 요소를 포함할 수 있다. 상기 프로모터/조절 서열은 예를 들어 조직 특이적인 방식으로 상기 유전자 산물을 발현하는 것일 수 있다.

[0080] "구성적" 프로모터는, 유전자 산물을 암호화하거나 명시하는 폴리뉴클레오티드와 작동적으로 연결시, 세포의 대부분의 또는 모든 생리적 조건하에서 상기 세포 중에서 상기 유전자 산물이 생성되게 하는 뉴클레오티드 서열이다.

[0081] "유도성" 프로모터는, 유전자 산물을 암호화하거나 명시하는 폴리뉴클레오티드와 작동적으로 연결시, 실질적으로 오직 상기 프로모터에 상응하는 유도물질이 세포 중에 존재하는 경우에만 상기 세포 중에서 상기 유전자 산물이 생성되게 하는 뉴클레오티드 서열이다.

[0082] "조직-특이성" 프로모터는, 유전자를 암호화하거나 유전자에 의해 명시되는 폴리뉴클레오티드와 작동적으로 연결시, 실질적으로 오직 세포가 상기 프로모터에 상응하는 조직 유형의 세포인 경우에만 상기 세포 중에서 상기 유전자 산물이 생성되게 하는 뉴클레오티드 서열이다.

[0083] "면역억제에 대한 내성"이란 용어는 면역계 활성 또는 활성화의 억제의 결여 또는 감소된 억제를 지칭한다.

[0084] "신호 전달 경로"는 세포의 한 부분으로부터 세포의 또 다른 부분으로의 신호의 전달에 한 역할을 하는 다양한 신호 전달 분자들간의 생화학적 관계를 지칭한다. "세포 표면 수용체"란 어구는 신호를 수용하고 세포의 원형 질막을 가로질러 신호를 전송할 수 있는 분자 및 분자들의 복합체를 포함한다.

[0085] "단쇄 항체"는 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 단편을 아미노산의 조작된 스판을 통해 Fv 영역에 연결하는 재조합 DNA 기법에 의해 형성된 항체를 지칭한다. 단쇄 항체를 생성시키는 다양한 방법들이 공지되어 있으며, 미국특허 제 4,694,778 호; 문헌[Bird (1988) Science 242:423-442]; 문헌[Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883]; 문헌[Ward et al. (1989) Nature 334:54454]; 문헌[Skerra et al. (1988) Science 242:1038-1041]에 개시된 것들을 포함한다.

[0086] 항체에 관하여 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "특이적으로 결합하다"란 용어는, 샘플 중 특정한 항원을 인식하지만 다른 분자를 실질적으로 인식하거나 결합하지 않는 항체를 의미한다. 예를 들어, 하나의 종으로부터의 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 하나 이상의 종으로부터의 상기 항원에도 또한 결합할 수 있다. 그러나, 상기와 같은 이종간 교차 반응성은 그 자체가 항체의 분류를 특이적인 것으로서 변경시키지 않는다. 또 다른 예에서, 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 상기 항원의 상이한 대립유전자 형태에 또한 결합할 수 있다. 그러나, 상기와 같은 교차 반응성은 그 자체가 항체의 분류를 특이적인 것으로서 변경시키지 않는다. 일부 예에서, "특이적인 결합" 또는 "특이적으로 결합하는"이란 용어는 항체, 단백질 또는 웨티드의 제2 화학 종파의 상호작용과 관련하여, 상기 상호작용이 상기 화학 종파의 특정한 구조(예를 들어 항원 결정인자 또는 에피토프)의 존재에 따라 변함을 의미하기 위해 사용된다; 예를 들어 항체는 일반적으로 단백질보다는 특정한 단백질 구조를 인식하고 이에 결합한다. 항체가 에피토프 "A"에 특이적인 경우, 표지된 "A" 및 상기 항체를 함유하는 반응에서 에피토프 A(또는 자유로운, 표지되지 않은 A)를 함유하는 분자의 존재는 상기 항체에 결합된 표지된 A의 양을 감소시킬 것이다.

[0087] "자극"이란 용어는 자극 분자(예를 들어 TCR/CD3 복합체)가 그의 동족 리간드와 결합하여 신호 전달 사건, 예를 들어 비제한적으로 Fc 수용체 기구를 통한 또는 합성 CAR을 통한 신호 전달을 매개함으로써 유도되는 1차적인

반응을 의미한다. 자극은 몇몇 분자의 변경된 발현, 예를 들어 TGF-베타의 하향조절 및/또는 세포골격 구조의 재구성 등을 매개할 수 있다.

[0088] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어로서 "자극 분자"는 항원 제시 세포상에 존재하는 동족 자극 리간드와 특이적으로 결합하는 단핵세포/대식세포상의 분자를 의미한다.

[0089] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "자극 리간드"는 항원 제시 세포(예를 들어 aAPC, 수지상 세포, B-세포 등) 또는 중양 세포상에 존재시 단핵세포/대식세포상의 동족 결합 짹(본 명세서에서 "자극 분자"로서 지칭됨)과 특이적으로 결합하고, 이에 의해 면역 세포에 의한 반응, 예를 들어 비제한적으로 활성화, 면역 반응의 개시, 증식 등을 매개할 수 있는 리간드를 의미한다. 자극 리간드는 당해 분야에 주지되어 있으며, 특히 톨형 수용체(TLR) 리간드, 항-톨형 수용체 항체, 작용물질 및 단핵세포/대식세포 수용체에 대한 항체를 포함한다. 또한, 사이토킨, 예를 들어 인터페론-감마는 대식세포의 효능 있는 자극물질이다.

[0090] "피험자"란 용어는 면역 반응을 이끌어낼 수 있는 살아있는 유기체(예를 들어 포유동물)를 포함하고자 한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "피험자" 또는 "환자"는 인간 또는 비-인간 포유동물일 수 있다. 비-인간 포유동물은 예를 들어 가축 및 애완 동물, 예를 들어 양, 소, 돼지, 개, 고양이 및 젖과 포유동물을 포함한다. 바람직하게, 상기 피험자는 인간이다.

[0091] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "실질적으로 정제된" 세포는 다른 세포 유형이 본질적으로 없는 세포이다. 실질적으로 정제된 세포는 또한 자연적으로 발생하는 상태에서 통상적으로 관련되는 다른 세포 유형으로부터 분리된 세포를 지칭한다. 일부 예에서, 실질적으로 정제된 세포의 집단은 세포의 동종 집단을 지칭한다. 다른 예에서, 상기 용어는 단순히 자연 상태에서 자연적으로 관련된 세포로부터 분리된 세포를 지칭한다. 일부 실시태양에서, 상기 세포는 시험관내에서 배양된다. 다른 실시태양에서, 상기 세포는 시험관내에서 배양되지 않는다.

[0092] "표적 부위" 또는 "표적 서열"은 결합이 발생하기에 충분한 조건하에서 결합 분자가 특이적으로 결합할 수 있는 핵산의 일부를 한정하는 계획 핵산 서열을 지칭한다.

[0093] "표적"은 치료가 필요한 신체내의 세포, 기관 또는 부위를 의미한다.

[0094] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "T 세포 수용체" 또는 "TCR"이란 용어는 항원의 제공에 반응하여 T 세포의 활성화에 관여하는 막 단백질의 복합체를 지칭한다. 상기 TCR은 주조직적합성 복합체 분자에 결합된 항원의 인식을 담당한다. TCR은 알파( $\alpha$ ) 및 베타( $\beta$ ) 쇄의 이종이량체로 구성되지만, 일부 세포에서 상기 TCR은 감마 및 델타( $\gamma / \delta$ ) 쇄로 이루어진다. TCR은 알파/베타 및 감마/델타 형태로 존재할 수 있으며, 이들 형태는 구조적으로 유사하지만 특유의 해부학적 위치 및 기능을 갖는다. 각 쇄는 2개의 세포외 도메인인 가변 및 불변 도메인으로 구성된다. 일부 실시태양에서, 상기 TCR은 TCR을 포함하는 임의의 세포, 예를 들어 헬퍼 T 세포, 세포독성 T 세포, 기억 T 세포, 조절 T 세포, 천연 살해 T 세포, 및 감마 델타 T 세포상에서 변형될 수 있다.

[0095] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "치료학적"이란 용어는 치료 및/또는 예방학을 의미한다. 치료학적 효과는 질병 상태의 억제, 경감 또는 근절에 의해 획득된다.

[0096] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "형질감염된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된"이란 용어는 외인성 핵산을 숙주 세포내로 전달하거나 도입하는 과정을 지칭한다. "형질감염된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된" 세포는 외인성 핵산으로 형질감염되거나, 형질전환되거나 또는 형질도입된 것이다. 상기 세포는 1차 피실험 세포 및 그의 자손을 포함한다.

[0097] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 질병의 "치료"란 용어는 피험자에 의해 경험된 질병 또는 질환의 적어도 하나의 징후 또는 증상의 빈도 또는 중증도를 감소시킴을 의미한다.

[0098] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "종양"이란 용어는 양성, 전-암성, 악성 또는 전이성일 수 있는 조직의 이상 성장을 지칭한다.

[0099] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "전사 조절하의" 또는 "작동적으로 연결된"이란 어구는 프로모터가 RNA 폴리머라제 및 폴리뉴클레오티드의 발현에 의한 전사의 개시를 조절하기 위해 상기 폴리뉴클레오티드와 관련하여 정확한 위치 및 배향 중에 있음을 의미한다.

[0100] "벡터"는, 단리된 핵산을 포함하고 세포의 내부로 상기 단리된 핵산을 전달하는데 사용될 수 있는 물질의 조성물이다. 다수의 벡터, 예를 들어 비제한적으로 선형 폴리뉴클레오티드, 이온성 또는 양친성 화합물과 관련된

폴리뉴클레오티드, 플라스미드 및 바이러스가 당해 분야에 공지되어 있다. 따라서, "벡터"란 용어는 자율 복제 플라스미드 또는 바이러스를 포함한다. 상기 용어는 또한 핵산의 세포내로의 전달을 촉진하는 비-플라스미드 및 비-바이러스 화합물, 예를 들어 폴리리신 화합물, 리포솜 등을 포함하도록 해석되어야 한다. 바이러스 벡터의 예는 비제한적으로 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련된 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터 등을 포함한다.

[0101] 범위: 본 명세 전체를 통해서, 본 발명의 다양한 태양들을 범위 포맷으로 나타낼 수 있다. 범위 포맷의 기재는 단지 편의성 및 간략성을 위한 것이며 본 발명의 범위에 대한 불변의 제한으로서 해석해서는 안 됨은 물론이다. 상응하게, 범위의 기재는 구체적으로 개시된 모든 가능한 하위범위뿐만 아니라 상기 범위내의 개별적인 수치를 갖는 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 1 내지 6과 같은 범위의 기재는 구체적으로 개시된 하위범위, 예를 들어 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6 등뿐만 아니라 상기 범위내의 개별적인 숫자들, 예를 들어 1, 2, 2.7, 3, 4, 5, 5.3 및 6을 갖는 것으로 간주되어야 한다. 이를 상기 범위의 폭과 관계 없이 적용한다.

#### [0102] 설명

[0103] 축적 중인 증거는 대식세포가 다수암의 종양 미세환경 중에 풍부하며 이때 상기 암은 고전적으로 활성화된(M1, 항종양) 또는 선택적으로 활성화된(M2, 프로-종양) 표현형을 채용할 수 있음을 암시한다. 대식세포는 고유 면역계의 효능 있는 효과기이며 적어도 3개의 특유의 항-종양 기능: 식균작용, 세포 세포독성, 및 항원 제시가 가능하여 적응 면역 반응을 조직화한다. T 세포는 상기 T 세포 수용체 또는 키메릭 면역수용체를 통해 항원-의존적인 활성화를 요구하는 반면, 대식세포는 다양한 방식으로 활성화될 수 있다. 직접적인 대식세포 활성화는 항원-독립적이며, 틀형 수용체(TLR)에 의한 병원체 관련된 분자 패턴 인식과 같은 기전에 의존한다. 면역-복합체 매개된 활성화는 항원 의존적이나, 항원-특이성 항체의 존재 및 억제성 CD47-SIRP $\alpha$  상호작용의 부재를 필요로 한다.

[0104] 종양-관련된 대식세포는 종양 미세환경에 의해 재프로그래밍화 가능하여 상기 미세환경에서 핵심적인 면역억제성 플레이어로 됨이 입증되었다. 따라서, 면역억제성 유전자 재프로그래밍의 발생을 방지하도록 대식세포를 유전자 조작하는 능력은 당해 분야에서 수직적인 진보를 나타낼 것이다.

[0105] 본 발명은 피험자에서 암을 치료하기 위한 조성물 및 방법을 포함한다. 본 발명은 단핵세포, 대식세포 또는 수지상세포에서의 키메릭 항원 수용체의 발현을 포함한다. 상기와 같은 변형된 세포는 종양 미세환경으로 모집되고 여기에서 상기 종양을 침윤시키고 표적 세포를 살해함으로써 효능 있는 면역 효과기로서 작용한다.

#### [0106] 키메릭 항원 수용체(CAR)

[0107] 본 발명의 하나의 태양에서, 변형된 단핵세포, 대식세포 또는 수지상 세포는 상기 중에서 CAR을 발현시킴으로써 생성된다. 따라서, 본 발명은 CAR 및 CAR을 암호화하는 핵산 구조물을 포함하며, 여기에서 상기 CAR은 항원 결합 도메인, 막관통 도메인 및 세포내 도메인을 포함한다.

[0108] 하나의 태양에서, 본 발명은 키메릭 항원 수용체(CAR)를 포함하는 변형된 세포를 포함하며, 여기에서 상기 CAR은 항원 결합 도메인, 막관통 도메인 및 보조-자극 분자의 세포내 도메인을 포함하고, 세포는 표적화된 효과기 활성을 갖는 단핵세포, 대식세포, 또는 수지상 세포이다. 또 다른 태양에서, 본 발명은 키메릭 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 변형된 세포를 포함하며, 여기에서 핵산 서열은 항원 결합 도메인을 암호화하는 핵산 서열, 막관통 도메인을 암호화하는 핵산 서열 및 보조-자극 분자의 세포내 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 포함하고, 상기 세포는 상기 CAR을 발현하고 표적화된 효과기 활성을 갖는 단핵세포, 대식세포, 또는 수지상 세포이다. 하나의 실시태양에서, 상기 표적화된 효과기 활성은 상기 CAR의 항원 결합 도메인과 특이적으로 결합하는 표적 세포상의 항원에 대한 것이다. 또 다른 실시태양에서, 상기 표적화된 효과기 활성은 식균작용, 표적화된 세포 세포독성, 항원 제시, 및 사이토kin 분비로 이루어지는 그룹 중에서 선택된다.

#### [0109] 항원 결합 도메인

[0110] 하나의 실시태양에서, 본 발명의 CAR은 표적 세포상의 항원에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함한다. 상기 CAR의 항원 결합 도메인에 결합하는 항원으로서 작용할 수 있는 세포 표면 마커의 예는 바이러스, 세균 및 기생충 감염, 자가면역 질병 및 암세포와 관련된 것들을 포함한다.

[0111] 항원 결합 도메인의 선택은 표적 세포의 표면상에 존재하는 항원의 유형 및 수에 따라 변한다. 예를 들어, 상기 항원 결합 도메인은 특정 질병 상태와 관련된 표적 세포상의 세포 표면 마커로서 작용하는 항원을 인식하도

록 선택될 수 있다.

[0112]

하나의 실시태양에서, 상기 항원 결합 도메인은 종양 항원, 예를 들어 관심 종양 또는 암에 특이적인 항원에 결합한다. 하나의 실시태양에서, 본 발명의 종양 항원은 하나 이상의 항원성 암 에피토프를 포함한다. 종양 관련된 항원의 비제한적인 예는 CD19; CD123; CD22; CD30; CD171; CS-1 (또한 CD2 부분집합 1로서 지칭된다, CRACC, SLAMF7, CD319, 및 19A24); C-형 렉틴-유사 분자-1 (CLL-1 또는 CLECL1); CD33; 표피 성장인자 수용체 변이체 III (EGFRvIII); 강글리오사이드 G2 (GD2); 강글리오사이드 GD3 (aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGAlp(1-4)bDG1cp(1-1)Cer); TNF 수용체과 구성원 B 세포 성숙화 (BCMA); Tn 항원 ((Tn Ag) 또는 (GalNAc α-Ser/Thr)); 전립선-특이성 막 항원 (PSMA); 수용체 티로신 키나제-유사 희귀 수용체 1 (ROR1); Fms-유사 티로신 키나제 3 (FLT3); 종양-관련된 당단백질 72 (TAG72); CD38; CD44v6; 암태아성 항원 (CEA); 상피세포 부착 분자 (EPCAM); B7H3 (CD276); KIT (CD117); 인터류킨-13 수용체 서브유닛 알파-2 (IL-13Ra2 또는 CD213A2); 메소텔린; 인터류킨 11 수용체 알파 (IL-11Ra); 전립선 줄기세포 항원 (PSCA); 프로테아제 세린 21 (테스티신 또는 PRSS21); 혈관 내피 성장인자 수용체 2 (VEGFR2); 루이스(Y) 항원; CD24; 혈소판-유래된 성장인자 수용체 베타 (PDGFR-beta); 발생단계-특이성 태아 항원-4 (SSEA-4); CD20; 폴레이트 수용체 알파; 수용체 티로신-단백질 키나제 ERBB2 (Her2/neu); 뮤신 1, 세포 표면 관련된 (MUC1); 표피 성장인자 수용체 (EGFR); 신경세포 부착 분자 (NCAM); 프로스타제; 전립선산 포스파타제 (PAP); 연장인자 2 돌연변이된 (ELF2M); 에프린 B2; 섬유아세포 활성화 단백질 알파 (FAP); 인슐린-유사 성장인자 1 수용체 (IGF-I 수용체), 카보닐 안하이드라제 IX (CAIX); 프로테아솔 (프로솔, 마크로파인) 서브유닛, 베타 유형, 9 (LMP2); 당단백질 100 (gp100); 중지점 군집 영역 (BCR) 및 아멜슨 쥐 백혈병 바이러스 종양유전자 동족체 1 (Ab1)으로 이루어지는 종양유전자 융합 단백질 (bcr-ab1); 티로시나제; 에프린 유형-A 수용체 2 (EphA2); 푸코실 GM1; 시알릴 루이스 부착 분자 (sLe); 강글리오사이드 GM3 (aNeu5Ac(2-3)bDGAlp(1-4)bDG1cp(1-1)Cer); 트랜스글루타미나제 5 (TGS5); 고분자량-흑색종-관련된 항원 (HMWMAA); o-아세틸-GD2 강글리오사이드 (OAcGD2); 폴레이트 수용체 베타; 종양내피 마커 1 (TEM1/CD248); 종양내피 마커 7-관련된 (TEM7R); 클라우딘 6 (CLDN6); 갑상선 자극 호르몬 수용체 (TSHR); G 단백질-결합된 수용체 부류 C 그룹 5, 구성원 D (GPRC5D); 염색체 X 개방 판독 프레임 61 (CXorf61); CD97; CD179a; 역형성 립프종 키나제 (ALK); 폴리시알산; 태반-특이성 1 (PLAC1); 글로보H 글리코세라미드의 핵사사카라이드 부분 (GloboH); 유선 분화 항원 (NY-BR-1); 유로플라킨 2 (UPK2); A형 간염 바이러스 세포 수용체 1 (HAVCR1); 아드레날린 수용체 베타 3 (ADRB3); 판넥신 3 (PANX3); G 단백질-결합된 수용체 20 (GPR20); 립프구 항원 6 복합체, 유전자좌 K 9 (LY6K); 후각 수용체 51E2 (OR51E2); TCR 감마 교변 판독 프레임 단백질 (TARP); 월름 종양 단백질 (WT1); 암/고환 항원 1 (NY-ESO-1); 암/고환 항원 2 (LAG-1a); 흑색종-관련 항원 1 (MAGE-A1); ETS 역위-변형 유전자 6, 염색체 12p상에 위치됨 (ETV6-AML); 정액 단백질 17 (SPA17); X 항원과, 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-관련된 항원 1; 종양 단백질 p53 (p53); p53 돌연변이체; 프로스테인; 서바이빙; 텔로머라제; 전립선 암종 종양 항원-1 (PCTA-1 또는 갈랙틴 8), T 세포 1에 의해 인식된 흑색종 항원 (MelanA 또는 MART1); 래트 육종 (Ras) 돌연변이체; 인간 텔로머라제 역전사효소 (hTERT); 육종 역위 중지점; 세포사멸의 흑색종 억제제 (ML-IAP); ERG (막관통 프로테아제, 세린 2 (TMPRSS2) ETS 융합 유전자); N-아세틸 글루코스 아미닐-트랜스퍼라제 V (NA17); 한쌍의 상자 단백질 Pax-3 (PAX3); 안드로겐 수용체; 사이클린 B1; v-myc 조류 골수세포증 바이러스 종양유전자 신경모세포종 유래된 동족체 (MYCN); Ras 동족체과 구성원 C (RhoC); 티로시나제-관련된 단백질 2 (TRP-2); 시토크롬 P450 1B1 (CYP1B1); CCCTC-결합 인자 (아연 집게 단백질)-유사 (BORIS 또는 임프린트된 부위의 조절인자의 동료), T 세포 3에 의해 인식된 편평세포 암종 항원 (SART3); 한쌍의 상자 단백질 Pax-5 (PAX5); 프로아크로신 결합 단백질 sp32 (OY-TES1); 립프구-특이성 단백질 티로신 키나제 (LCK); 키나제 고정 단백질 4 (AKAP-4); 활액 육종, X 중지점 2 (SSX2); 진행된 당화반응 최종생성물의 수용체 (RAGE-1); 신장 유비쿼터스 1 (RU1); 신장 유비쿼터스 2 (RU2); 레구메인; 인 유두종 바이러스 E6 (HPV E6); 인 유두종 바이러스 E7 (HPV E7); 장 카복실 에스테라제; 열 충격 단백질 70-2 돌연변이된 (mut hsp70-2); CD79a; CD79b; CD72; 백혈구-관련된 면역글로불린-유사 수용체 1 (LAIR1); IgA 수용체의 Fc 단편 (FCAR 또는 CD89); 백혈구 면역글로불린-유사 수용체 아파 A 구성원 2 (LILRA2); CD300 분자-유사과 구성원 f (CD300LF); C-형 렉틴 도메인과 12 구성원 A (CLEC12A); 골수 기질 세포 항원 2 (BST2); EGF-유사 모듈-함유 뮤신-유사 호르몬 수용체-유사 2 (EMR2); 립프구 항원 75 (LY75); 글리피칸-3 (GPC3); Fc 수용체-유사 5 (FCRL5); 및 면역글로불린 람다-유사 폴리펩티드 1 (IGLL1)을 포함한다.

[0113]

상기 항원 결합 도메인은 항원에 결합하는 임의의 도메인을 포함할 수 있으며 비제한적으로 단클론 항체, 다클론 항체, 합성 항체, 인간 항체, 인간화된 항체, 비-인간 항체, 및 이들의 임의의 단편을 포함할 수 있다. 따라서, 하나의 실시태양에서, 상기 항원 결합 도메인 부분은 포유동물 항체 또는 그의 단편을 포함한다. 또 다

른 실시태양에서, 상기 CAR의 항원 결합 도메인은 항-CD19 항체, 항-HER2 항체 및 이들의 단편으로 이루어지는 그룹 중에서 선택된다.

[0114] 일부의 경우에, 상기 항원 결합 도메인은 상기 CAR이 최종적으로 사용되는 동일한 종들로부터 유래된다. 예를 들어, 인간에 사용하는 경우, 상기 CAR의 항원 결합 도메인은 인간 항체, 인간화된 항체, 또는 이들의 단편을 포함한다.

[0115] 본 발명의 일부 태양에서, 상기 항원 결합 도메인은 세포에서의 발현을 위해 상기 CAR의 또 다른 도메인, 예를 들어 막관통 도메인 또는 세포내 도메인에 작동적으로 연결된다. 하나의 실시태양에서, 상기 항원 결합 도메인을 암호화하는 핵산은 막관통 도메인을 암호화하는 핵산 및 세포내 도메인을 암호화하는 핵산에 작동적으로 연결된다.

#### 막관통 도메인

[0117] 상기 막관통 도메인에 관하여, 상기 CAR을, 상기 CAR의 항원 결합 도메인을 상기 세포내 도메인에 연결하는 막관통 도메인을 포함하도록 설계할 수 있다. 하나의 실시태양에서, 상기 막관통 도메인은 상기 CAR 중의 도메인들 중 하나 이상과 자연적으로 결합된다. 일부 예에서, 상기 막관통 도메인을, 동일하거나 상이한 표면 막 단백질의 막관통 도메인에의 상기와 같은 도메인의 결합을 위하여 상기 수용체 복합체의 다른 구성원들과의 상호 작용을 최소화하도록 선택하거나 또는 아미노산 치환에 의해 변형시킬 수 있다.

[0118] 상기 막관통 도메인은 천연 또는 합성 공급원으로부터 유래될 수 있다. 상기 공급원이 천연인 경우, 상기 도메인은 임의의 막-결합된 또는 막관통 단백질로부터 유래될 수 있다. 본 발명에서 특히 유용한 막관통 영역은 T-세포 수용체, CD28, CD3 입실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, 툴형 수용체 1 (TLR1), TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, 및 TLR9의 알파, 베타 또는 제타 쇄로부터 유래될 수 있다(즉 적어도 이들의 막관통 영역(들)을 포함할 수 있다). 일부 예에서, 인간 Ig(면역글로불린) 헌지를 포함하여 다양한 인간 헌지를 또한 사용할 수 있다.

[0119] 하나의 실시태양에서, 상기 막관통 도메인은 합성일 수 있으며, 이 경우에 상기는 류신 및 발린과 같은 우세하게 소수성인 잔기를 포함할 것이다. 바람직하게는 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의 트리플렛이 합성 막관통 도메인의 각 단부에서 발견될 것이다.

#### 세포내 도메인

[0121] 상기 CAR의 세포내 도메인, 또는 달리 세포질 도메인은 본 명세서의 다른 어딘가에 기재된 키메릭 세포내 신호 전달 분자와 유사하거나 동일한 세포내 도메인을 포함하며, 상기 도메인은 상기 CAR이 발현되는 세포의 활성화를 담당한다.

[0122] 하나의 실시태양에서, 상기 CAR의 세포내 도메인은 신호 활성화 및/또는 전달을 담당하는 도메인을 포함한다.

[0123] 본 발명에 사용하기 위한 세포내 도메인의 예는 비제한적으로 표면 수용체의 세포질 부분, 보조-자극 분자, 및 단핵세포, 대식세포 또는 수지상 세포에서 신호 전달을 개시하기 위해 협력하여 작용할 수 있는 임의의 분자뿐만 아니라 이들 요소의 임의의 유도체 또는 변이체 및 동일한 기능상 능력을 갖는 임의의 합성 서열을 포함한다.

[0124] 상기 세포내 도메인의 예는 비제한적으로 TCR, CD3 제타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 입실론, CD86, 통상적인 FcR 감마, FcR 베타 (Fc 입실론 R1b), CD79a, CD79b, Fc감마 RIIa, DAP10, DAP12, T 세포 수용체 (TCR), CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 립프구 기능-관련된 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, CD83과 특이적으로 결합하는 리간드, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), CD127, CD160, CD19, CD4, CD8알파, CD8베타, IL2R 베타, IL2R 감마, IL7R 알파, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D, 툴형 수용체 1 (TLR1), TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, 본 명세서에 기재된 다른 보조-자극 분자, 이들의 임의의 유도체, 변이체 또는 단편, 동일한 기능상 능력을 갖는 보조-자극 분자의 임의의 합성 서열, 및 이들의 임의의 조합을 포함하는 하나 이상의 분자 또는 수용체로부터의 단편 또는 도메인을 포함한다.

[0125] 하나의 실시태양에서, 상기 CAR의 세포내 도메인은 이중 신호전달 도메인, 예를 들어 41BB, CD28, ICOS, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, TLR11, CD116 수용체 베타 쇄, CSF1-R, LRP1/CD91, SR-A1, SR-A2, MARCO, SR-CL1, SR-CL2, SR-C, SR-E, CR1, CR3, CR4, 엑틴 1, DEC-205, DC-SIGN, CD14, CD36, LOX-1, CD11b를, 상기 단락에 나열된 신호전달 도메인들 중 어느 하나와 임의의 조합으로 함께 포함한다. 또 다른 실시태양에서, 상기 CAR의 세포내 도메인은 하나 이상의 보조-자극 분자의 임의의 부분, 예를 들어 CD3으로부터의 적어도 하나의 신호전달 도메인, Fc 입실론 RI 감마 쇄, 이들의 임의의 유도체 또는 변이체, 동일한 기능상 능력을 갖는 이들의 임의의 합성 서열, 및 이들의 임의의 조합을 포함한다.

[0126] 상기 CAR의 항원 결합 도메인과 막관통 도메인 사이, 또는 상기 CAR의 세포내 도메인과 막관통 도메인 사이에 이격자 도메인을 통합시킬 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "이격자 도메인"이란 용어는 일반적으로 상기 막관통 도메인을 폴리펩티드 쇄 중의 항원 결합 도메인 또는 세포내 도메인에 연결시키는 기능을 하는 임의의 올리고- 또는 폴리펩티드를 의미한다. 하나의 실시태양에서, 상기 이격자 도메인은 300 이하의 아미노산, 바람직하게는 10 내지 100 아미노산 및 가장 바람직하게는 25 내지 50 아미노산을 포함할 수 있다. 또 다른 실시태양에서, 짧은 올리고- 또는 폴리펩티드 링커, 바람직하게는 2 내지 10 아미노산 길이의 상기 링커는 상기 CAR의 막관통 도메인과 세포내 도메인 사이에 연결을 형성할 수 있다. 링커의 일례는 글리신-세린 더블릿을 포함한다.

#### 인간 항체

[0128] CAR의 항원 결합 도메인을 사용하는 경우 인간 항체 또는 그의 단편을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 완전한 인간 항체가 인간 피험자의 치료학적 치료에 특히 바람직할 수 있다. 인간 항체는 인간 면역글로불린 서열로부터 유래된 항체 라이브러리를 사용하는 과지 디스플레이 방법을 포함하여 당해 분야에 공지된 다양한 방법들 및 이들 기법에 대한 개선에 의해 제조될 수 있다. 또한 미국특허 제 4,444,887 및 4,716,111 호; 및 PCT 공보 WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, 및 WO 91/10741을 참조하시오(이들은 각각 내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된다).

[0129] 인간 항체를 또한, 기능적 내인성 면역글로불린을 발현할 수 없지만 인간 면역글로불린 유전자를 발현할 수 있는 트랜스제닉 마우스를 사용하여 생성시킬 수 있다. 예를 들어, 상기 인간 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자 복합체를 무작위로 또는 상동성 재조합에 의해 마우스 배아 줄기 세포내로 도입시킬 수 있다. 한편으로, 상기 인간 가변 영역, 불변 영역 및 다양성 영역을 상기 인간 중쇄 및 경쇄 유전자 외에 마우스 배아 줄기 세포내에 도입시킬 수 있다. 상기 마우스 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자를 상동성 재조합에 의한 인간 면역글로불린 유전자좌의 도입과 별도로 또는 상기와 동시에 비-기능성으로 만들 수 있다. 예를 들어, 키메릭 및 생식세포계열 돌연변이 마우스에서 항체 중쇄 결합 영역(JH) 유전자의 동형접합성 결설이 내인성 항체 생성의 완전한 억제를 생성시킴이 기재되었다. 상기 변형된 배아 줄기 세포를 확대시키고 배반포내에 미세주입하여 키메릭 마우스를 생성시킨다. 이어서 상기 키메릭 마우스를 번식시켜 인간 항체를 발현하는 동형접합성 자손을 생성시킨다. 상기 트랜스제닉 마우스를 선택된 항원, 예를 들어 본 발명의 폴리펩티드의 전부 또는 일부로 통상적인 방식으로 면역시킨다. 선택 표적에 대한 항체를 통상적인 하이브리도마 기술을 사용하여 상기 면역된 트랜스제닉 마우스로부터 수득할 수 있다. 상기 인간 면역글로불린 트랜스유전자는 B 세포 분화 중 상기 트랜스제닉 마우스 재배열에 의해 잡복되며, 후속으로 종류변환 및 체세포 돌연변이를 겪는다. 따라서, 상기와 같은 기법을 사용하여, 치료학적으로 유용한 IgG, IgA, IgM 및 IgE 항체, 예를 들어 비제한적으로 IgG1(감마 1) 및 IgG3을 생성시킬 수 있다. 인간 항체의 생성을 위한 상기 기술의 개요에 대해서, 문헌[Lonberg and Huszar (Int. Rev. Immunol., 13:65-93 (1995))]을 참조하시오. 인간 항체 및 인간 단클론 항체의 상기 생성 기술 및 상기와 같은 항체의 생성을 위한 프로토콜에 대한 상세한 논의에 대해서, 예를 들어 PCT 공보 WO 98/24893, WO 96/34096, 및 WO 96/33735; 및 미국특허 제 5,413,923; 5,625,126; 5,633,425; 5,569,825; 5,661,016; 5,545,806; 5,814,318; 및 5,939,598 호(이들은 각각 내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된다)를 참조하시오. 또한, 아브제닉스 인코포레이티드(Abgenix, Inc.)(미국 캘리포니아주 프리몬트 소재) 및 젠팜(Genpharm)(미국 캘리포니아주 산호세 소재)과 같은 회사가 상술한 바와 유사한 기술을 사용하여 선택된 항원에 대한 인간 항체를 제공하는데 종사할 수 있다. 항원 공격시 인간 항체를 생성시키는 생식세포계열 돌연변이 마우스에서 인간 생식세포계열 면역글로불린 유전자 배열의 전달에 대한 구체적인 논의에 대해서, 예를 들어 문헌[Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993)]; [Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993)]; [Bruggermann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993)]; 및 [Duchosal et al., Nature, 355:258 (1992)]을 참조하시오.

[0130] 인간 항체는 또한 과지-디스플레이 라이브러리로부터 유래될 수 있다(Hoogenboom et al., J. Mol. Biol.,

227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Vaughan et al., Nature Biotech., 14:309 (1996)). 파지 디스플레이 기술(McCafferty et al., Nature, 348:552-553 (1990))을, 인간 항체 및 항체 단편을 시험관에서, 면역되지 않은 공여자로부터의 면역글로불린 가변(V) 도메인 유전자 레퍼토리로부터 생성시키는데 사용할 수 있다. 상기 기법에 따라, 항체 V 도메인 유전자를 섬유상 박테리오파지, 예를 들어 M13 또는 fd의 주 또는 부 외피 단백질 유전자내로 인-프레임 클로닝시키고 상기 파지 입자의 표면상에 기능성 항체 단편으로서 나타낼 수 있다. 상기 섬유상 입자는 상기 파지 계놈의 단일-가닥 DNA 사본을 함유하기 때문에, 상기 항체의 기능적 성질에 근거한 선택은 또한 상기 성질을 나타내는 항체를 암호화하는 유전자의 선택을 발생시킨다. 따라서, 상기 파지는 상기 B 세포의 성질 중 일부를 모방한다. 파지 디스플레이를 다양한 포맷으로 수행할 수 있으며; 이의 리뷰에 대해서, 예를 들어 문헌[Johnson, Kevin S, and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993)]을 참조하시오. V-유전자 조각의 다수의 공급원이 파지 디스플레이에 사용될 수 있다. 클랙슨 등(Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991))은 면역되지 않은 마우스의 비장으로부터 유래된 V 유전자의 작은 랜덤한 조합적 라이브러리로부터 항-옥사졸론 항체의 다양한 배열을 단리하였다. 면역되지 않은 인간 공여자로부터의 V 유전자의 레퍼토리를 구성할 수 있으며 항원(자기-항원 포함)의 다양한 배열에 대한 항체를 본질적으로 문헌[Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)], 또는 문헌[Griffith et al., EMBO J., 12:725-734 (1993)]에 기재된 기법에 따라 단리할 수 있다. 또한 미국특허 제 5,565,332 및 5,573,905 호(이들은 각각 내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된다)를 참조하시오.

[0131]

인간 항체를 또한 시험관내 활성화된 B 세포에 의해 생성시킬 수 있다(미국특허 제 5,567,610 및 5,229,275 호(이들은 각각 내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된다)를 참조하시오). 인간 항체를 또한 하이브리도마 기법, 예를 들어 비제한적으로 문헌[Roder et al. (Methods Enzymol., 121:140-167 (1986))]에 기재된 것과 같은 기법을 사용하여 시험관내에서 생성시킬 수 있다.

[0132]

### 인간화된 항체

[0133]

한편으로, 일부 실시태양에서, 비-인간 항체를 인간화할 수 있으며, 여기에서 상기 항체의 특정 서열 또는 영역을 인간에서 자연적으로 생성되는 항체에 대한 유사성을 증가시키기 위해 변형시킨다. 예를 들어, 본 발명에서, 상기 항체 또는 그의 단편은 비-인간 포유동물 scFv를 포함할 수 있다. 하나의 실시태양에서, 상기 항원 결합 도메인 부분을 인간화시킨다.

[0134]

인간화된 항체는 당해 분야에 공지된 다양한 기법들, 예를 들어 비제한적으로 CDR-그래프트화 (예를 들어 유럽 특허 EP 239,400; 국제 공보 WO 91/09967; 및 미국특허 제 5,225,539, 5,530,101, 및 5,585,089 호(이들은 각각 내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된다)를 참조하시오), 베니어링(veneering) 또는 리설피싱(resurfacing) (예를 들어 유럽 특허 EP 592,106 및 EP 519,596; 문헌[Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498]; [Studnicka et al., 1994, Protein Engineering, 7(6):805-814]; 및 [Roguska et al., 1994, PNAS, 91:969-973](이들은 각각 내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된다)을 참조하시오), 쇄 셔플링 (예를 들어 미국 특허 제 5,565,332 호(상기는 내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된다)), 및 예를 들어 미국특허 출원 공보 제 US2005/0042664 호, 미국특허 출원 공보 제 US2005/0048617 호, 미국특허 제 6,407,213 호, 미국특허 제 5,766,886 호, 국제 공보 WO 9317105, 문헌[Tan et al., J. Immunol., 169:1119-25 (2002)], [Caldas et al., Protein Eng., 13(5):353-60 (2000)], [Morea et al., Methods, 20(3):267-79 (2000)], [Baca et al., J. Biol. Chem., 272(16):10678-84 (1997)], [Roguska et al., Protein Eng., 9(10):895-904 (1996)], [Couto et al., Cancer Res., 55 (23 Supp):5973s-5977s (1995)], [Couto et al., Cancer Res., 55(8):1717-22 (1995)], [Sandhu J S, Gene, 150(2):409-10 (1994)], 및 문헌[Pedersen et al., J. Mol. Biol., 235(3):959-73 (1994)](이들은 각각 내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된다)에 개시된 기법들을 사용하여 생성시킬 수 있다. 종종, 프레임워크 영역 중의 프레임워크 잔기를 상기 CDR 공여자 항체로부터의 상응하는 잔기로 치환시켜 항원 결합을 변경, 바람직하게는 개선시킬 것이다. 이를 프레임워크 치환은 특정 위치에서 통상적이지 않은 프레임워크 잔기를 확인하기 위해 당해 분야에 주지된 방법들에 의해, 예를 들어 상기 CDR과 프레임워크 잔기와의 상호작용의 모델링에 의해 확인된다 (예를 들어 퀸(Queen) 등의 미국특허 제 5,585,089 호; 및 문헌[Riechmann et al., 1988, Nature, 332:323](이들은 내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된다)을 참조하시오).

[0135]

인간화된 항체는 비인간인 공급원으로부터 상기 항체내로 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 상기 비인간 아미노산 잔기를 종종 "수입" 잔기(전형적으로는 "수입" 가변 도메인으로부터 취한다)라 칭한다. 따라서, 인간화된 항체는 비인간 면역글로불린 분자로부터의 하나 이상의 CDR 및 인간으로부터의 프레임워크 영역을 포함한다. 항체의 인간화는 당해 분야에 주지되어 있으며 본질적으로 원터(Winter)와 동료들의 방법 (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al.,

Science, 239:1534-1536 (1988))에 따라, 설치류 CDR 또는 CDR 서열을 인간 항체의 상응하는 서열 대신 치환시킴으로써, 즉 CDR-그래프트화 (EP 239,400; PCT 공보 WO 91/09967; 및 미국특허 제 4,816,567; 6,331,415; 5,225,539; 5,530,101; 5,585,089; 6,548,640 호)(이들의 내용은 전체가 본 발명에 참고로 인용된다)에 의해 수행될 수 있다. 상기와 같은 인간화된 키메릭 항체에서, 완전한 인간 가변 도메인보다 실질적으로 적게 비인간 종으로부터의 상응하는 서열에 의해 치환되었다. 실제로, 인간화된 항체는 전형적으로는 일부 CDR 잔기 및 가능하게는 일부 프레임워크(FR) 잔기가 설치류 항체 중의 유사한 부위로부터의 잔기에 의해 치환된 인간 항체이다. 항체의 인간화를 또한 베니어링 또는 리설피싱 (EP 592,106; EP 519,596; Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., Protein Engineering, 7(6):805-814 (1994); and Roguska et al., PNAS, 91:969-973 (1994)) 또는 쇄 셔플링 (미국특허 제 5,565,332 호)(이들의 내용은 전체가 본 발명에 참고로 인용된다)에 의해 성취할 수 있다.

[0136]

상기 인간화된 항체의 제조에 사용되는 인간 가변 도메인(중쇄 및 경쇄 모두)의 선택은 항원성을 감소시키기 위한 것이다. 소위 "최적합" 방법에 따라, 설치류 항체의 가변 도메인의 서열을 공지된 인간 가변-도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 선별한다. 이어서 상기 설치류의 서열에 가장 가까운 인간 서열을 상기 인간화된 항체에 대한 인간 프레임워크(FR)로서 수용한다 (Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987), 이들의 내용은 전체가 본 발명에 참고로 인용된다). 또 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 하위그룹의 모든 인간 항체의 공통 서열로부터 유래된 특정 프레임워크를 사용한다. 같은 프레임워크를 다수의 상이한 인간화된 항체에 사용할 수도 있다 (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993), 이들의 내용은 전체가 본 발명에 참고로 인용된다).

[0137]

항체를, 표적 항원에 대해 높은 친화성을 유지하고 다른 유리한 생물학적 성질을 갖도록 인간화시킬 수 있다. 본 발명의 하나의 태양에 따라, 인간화된 항체를, 모 서열의 분석 과정 및 상기 모 및 인간화된 서열의 3차원 모델을 사용하는 다양한 개념상 인간화된 생성물에 의해 제조한다. 3차원 면역글로불린 모델을 통상적으로 입수할 수 있으며 이는 당해 분야의 숙련가에게 친숙하다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 있음직한 3차원 입체구조를 예시하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램을 입수할 수 있다. 상기 디스플레이의 검사는 상기 후보 면역글로불린 서열의 기능화에서 상기 잔기의 있음직한 역할의 분석, 즉 상기 표적 항원에 결합하는 상기 후보 면역글로불린의 능력에 영향을 미치는 잔기의 분석을 허용한다. 이렇게 하여, FR 잔기들을, 목적하는 항체 특징, 예를 들어 표적 항원에 대한 증가된 친화성이 성취되도록 수용 및 수입 서열로부터 선택하고 조합할 수 있다. 일반적으로, 상기 CDR 잔기는 항원 결합의 영향에 직접적이고 가장 실질적으로 관련된다.

[0138]

인간화된 항체는 원래 항체와 유사한 항원 특이성을 유지한다. 그러나, 몇몇 인간화 방법들을 사용하는 경우, 상기 표적 항원에 대한 상기 항체의 결합 친화성 및/또는 특이성을 문헌[Wu et al., J. Mol. Biol., 294:151 (1999)](내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된다)에 기재된 바와 같은 "방향 진화"의 방법을 사용하여 증가시킬 수 있다.

[0139]

### 벡터

[0140]

벡터를, 본 명세서의 다른 어딘가에 기재된 바와 같이 CAR을 단핵세포, 대식세포 또는 수지상 세포내로 도입시키는데 사용할 수 있다. 하나의 태양에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같이 CAR을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함한다. 하나의 실시태양에서, 상기 벡터는 플라스미드 벡터, 바이러스 벡터, 레트로트랜스포손(예를 들어 피기백, 슬리핑 뷰티), 부위 지향 삽입 벡터(예를 들어 CRISPR, Zn 집게 뉴클레아제, TALEN) 또는 자살 발현 벡터, 또는 당해 분야에 공지된 다른 벡터를 포함한다.

[0141]

상기에 언급한 모든 구조물은 인간 세포에 사용이 승인된 3세대 렌티바이러스 벡터 플라스미드, 다른 바이러스 벡터, 또는 RNA와 사용이 가능하다. 하나의 실시태양에서, 상기 벡터는 바이러스 벡터, 예를 들어 렌티바이러스 벡터이다. 또 다른 실시태양에서, 상기 벡터는 RNA 벡터이다.

[0142]

본 명세서에 기재된 문자들 중 어느 하나의 생성을 서열분석에 의해 확인할 수 있다. 완전길이 단백질의 발현을 면역블릿, 면역조직화학, 유식 세포측정 또는 당해 분야에 주지되고 입수할 수 있는 다른 기술을 사용하여 확인할 수 있다.

[0143]

본 발명은 또한 본 발명의 DNA가 삽입되는 벡터를 제공한다. 레트로바이러스, 예를 들어 렌티바이러스로부터 유래된 것들을 포함한 벡터는 딸 세포에서 트랜스유전자의 장기적이고 안정한 통합 및 그의 번식을 허용하므로 장기적인 유전자 전달을 성취하기에 적합한 도구이다. 렌티바이러스 벡터는 종양-레트로바이러스, 예를 들어

즉 백혈병 바이러스로부터 유래된 벡터에 비해 추가된 장점을 갖는다, 즉 상기 벡터는 비-증식성 세포, 예를 들어 간세포를 형질도입시킬 수 있다. 상기 벡터는 또한 상기가 도입되는 피험자에서 낮은 면역원성을 생성시키는 추가된 장점을 갖는다.

[0144] 천연 또는 합성 핵산의 발현은 전형적으로는 프로모터에 핵산 또는 그의 일부를 작동적으로 연결시키고, 상기 구조물을 발현 벡터내에 통합시킴으로써 성취된다. 상기 벡터는 일반적으로 포유동물 세포에서 복제가 가능하고/하거나 또한 상기 포유동물의 세포 계놈내로의 통합이 가능하다. 전형적인 벡터는 전사 및 번역 종결자, 개시 서열, 및 목적하는 핵산 서열의 발현의 조절에 유용한 프로모터를 함유한다.

[0145] 상기 핵산을 임의의 수의 상이한 유형의 벡터내에 클로닝할 수 있다. 예를 들어, 상기 핵산을 비제한적으로 플라스미드, 파지미드, 파지 유도체, 동물 바이러스 및 코스미드를 포함한 벡터내에 클로닝할 수 있다. 특히 중요한 벡터는 발현 벡터, 복제 벡터, 탐침 생성 벡터, 및 서열분석 벡터를 포함한다.

[0146] 상기 발현 벡터를 바이러스 벡터의 형태로 세포에 제공할 수 있다. 바이러스 벡터 기술은 당해 분야에 주지되어 있으며, 예를 들어 문헌[Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1 -4, Cold Spring Harbor Press, NY] 및 다른 바이러스학 및 문자 생물학 매뉴얼에 기재되어 있다. 벡터로서 유용한 바이러스는 비제한적으로 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 헤르페스 바이러스 및 렌티 바이러스를 포함한다. 일반적으로, 적합한 벡터는 적어도 하나의 유기체에서 기능성인 복제 기원, 프로모터 서열, 편리한 제한 엔도뉴클레아제 부위, 및 하나 이상의 선택성 마커를 함유한다(예를 들어 WO 01/96584; WO 01/29058; 및 미국특허 제 6,326,193 호).

[0147] 추가적인 프로모터 요소, 예를 들어 인핸서는 전사 개시의 빈도를 조절한다. 전형적으로, 상기는 상기 출발 부위의 상류 30 내지 110 bp 영역에 위치하지만, 다수의 프로모터가 최근에 상기 출발 부위의 하류에도 또한 기능성 요소들을 함유하는 것으로 나타났다. 프로모터 요소들간의 간격은 빈번히 유연하며, 따라서 요소들이 서로에 대해 역전되거나 이동되는 경우 프로모터 기능이 보존된다. 티미딘 키나제(tk) 프로모터에서, 프로모터 요소들간의 간격은 활성의 감소가 시작되기 전 50 bp 떨어져 증가될 수 있다. 상기 프로모터에 따라, 개별적인 요소들은 협력하여 또는 독립적으로 기능하여 전사를 활성화시킬 수 있는 것으로 보인다.

[0148] 프로모터의 일례는 전초기 거대세포바이러스(CMV) 프로모터 서열이다. 상기 프로모터 서열은 상기에 작동적으로 연결된 임의의 폴리뉴클레오티드 서열의 높은 수준의 발현을 구동할 수 있는 강한 구성적 프로모터 서열이다. 그러나, 다른 구성적 프로모터 서열, 예를 들어 비제한적으로 유인원 바이러스 40(SV40) 초기 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV), 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 긴 말단 반복(LTR) 프로모터, MoMuLV 프로모터, 조류 백혈병 바이러스 프로모터, 앱스타인-바 바이러스 전초기 프로모터, 라우스 육종 바이러스 프로모터, 연장인자-1α 프로모터뿐만 아니라 인간 유전자 프로모터, 예를 들어 비제한적으로 액틴 프로모터, 미오신 프로모터, 헤모글로빈 프로모터 및 크레아틴 키나제 프로모터를 또한 사용할 수 있다. 더욱이, 본 발명은 구성적 프로모터의 사용으로 제한되어서는 안 된다. 유도성 프로모터가 또한 본 발명의 부분으로서 고려된다. 유도성 프로모터의 사용은 폴리뉴클레오티드 서열의 발현이 요구될 때 작동적으로 연결되는 상기 서열의 발현을 켜거나, 또는 발현이 요구되지 않을 때 상기 발현을 끌 수 있는 문자 스위치를 제공한다. 유도성 프로모터의 예는 비제한적으로 메탈로티오닌 프로모터, 글루코코르티코이드 프로모터, 프로제스테론 프로모터, 및 테트라사이클린 프로모터를 포함한다.

[0149] 폴리펩티드 또는 그의 부분들의 발현을 평가하기 위해서, 세포내로 도입되는 발현 벡터는 또한 선택성 마커 유전자 또는 리포터 유전자 또는 이 둘 모두를 함유하여 바이러스 벡터를 통해 형질감염시키거나 감염시키고자 하는 세포의 집단으로부터의 발현 세포의 확인 및 선택을 용이하게 할 수 있다. 다른 태양에서, 상기 선택성 마커를 DNA의 별도의 조각상에 싣고 동시-형질감염 과정에 사용할 수 있다. 선택성 마커 및 리포터 유전자는 모두 적합한 조절 서열들과 접하고 있어 숙주 세포에서의 발현이 가능할 수 있다. 유용한 선택성 마커는 예를 들어 항생제-내성 유전자, 예를 들어 neo 등을 포함한다.

[0150] 리포터 유전자를 잠재적으로 형질감염된 세포의 확인 및 조절 서열의 기능성 평가에 사용한다. 일반적으로, 리포터 유전자는 수용 유기체 또는 조직 중에 존재하지 않거나 또는 상기에 의해 발현되지 않고 일부 용이하게 검출가능한 성질, 예를 들어 효소 활성에 의해 발현이 나타나는 폴리펩티드를 암호화하는 유전자이다. 상기 리포터 유전자의 발현을, DNA를 수용 세포에 도입시킨 후 적합한 시간에 평가한다. 적합한 리포터 유전자는 루시페라제, 베타-갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸 트랜스페라제, 분비된 알칼리성 포스파타제, 또는 녹색 형광 단백질 유전자를 암호화하는 유전자를 포함할 수 있다(예를 들어 Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82). 적합한 발현 시스템은 주지되어 있으며 공지된 기법을 사용하여 제조되거나 또는 상업적으로 수득될 수

있다. 일반적으로, 리포터 유전자의 최고 수준의 발현을 나타내는 최소 5' 인접 영역을 갖는 구조물은 프로모터로서 확인된다. 상기와 같은 프로모터 영역을 리포터 유전자에 연결시키고 작용제를 프로모터-구동된 전사를 조절하는 능력에 대해 평가하는데 사용할 수 있다.

#### [0151] 핵산의 도입

하나의 태양에서, 본 발명은 키메릭 항원 수용체(CAR)를 단핵세포, 대식세포 또는 수지상 세포내로 도입시킴을 포함하는 세포의 변형 방법을 포함하며, 여기에서 상기 CAR은 항원 결합 도메인, 막관통 도메인 및 보조-자극 분자의 세포내 도메인을 포함하고, 상기 세포는 상기 CAR을 발현하고 표적화된 효과기 활성을 갖는 단핵세포, 대식세포 또는 수지상 세포이다. 하나의 실시태양에서, 상기 CAR을 세포내로 도입시킴은 상기 CAR을 암호화하는 핵산 서열을 도입시킴을 포함한다. 또 다른 실시태양에서, 상기 핵산 서열을 도입시킴은 상기 CAR을 암호화하는 mRNA를 전기천공시킴을 포함한다.

[0153] 유전자, 예를 들어 CAR을 세포내로 도입시키고 발현시키는 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 발현 벡터와 관련하여, 상기 벡터는 당해 분야의 임의의 방법에 의해 숙주 세포, 예를 들어 포유동물, 세균, 효모 또는 곤충 세포내로 쉽게 도입될 수 있다. 예를 들어, 상기 발현 벡터를 물리적, 화학적 또는 생물학적 수단에 의해 숙주 세포내로 이동시킬 수 있다.

[0154] 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포내로 도입시키기 위한 물리적인 방법은 칼슘 포스페이트 침전, 리포펙션, 유전자 총법, 미세주입, 전기천공 등을 포함한다. 벡터 및/또는 외인성 핵산을 포함하는 세포의 생성 방법은 당해 분야에 주지되어 있다. 예를 들어 문헌[Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1 -4, Cold Spring Harbor Press, NY]을 참조하시오. 핵산을 전기천공(아막사 뉴클레오펩터(Amaxa Nucleofector)-II (아막사 바이오시스템스(Amaxa Biosystems), 독일 쾰른 소재)), (ECM 830 (BTX) (하버드 인스트루먼츠(Harvard Instruments), 미국 매사추세츠 보스톤 소재) 또는 더 진 펠서(the Gene Pulser) II (바이오래드(BioRad), 미국 콜로라도주 덴버 소재), 멀티포레이터(에펜도르트(Eppendorf), 독일 함부르크 소재)를 포함하는 상업적으로 입수할 수 있는 방법을 사용하여 표적 세포내로 도입시킬 수 있다. 핵산을 또한 리포펙션을 사용하는 양이온성 리포솜 매개된 형질감염을 사용하거나, 중합체 캡슐화를 사용하거나, 웹티드 매개된 형질감염을 사용하거나, 또는 유전자총법에 의한 입자 전달 시스템, 예를 들어 "유전자 총"(예를 들어 문헌[Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12(8):861-70 (2001)]을 참조하시오)을 사용하여 세포내에 도입시킬 수 있다.

[0155] 관심 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포내로 도입시키기 위한 생물학적 방법은 DNA 및 RNA 벡터의 사용을 포함한다. RNA 벡터는 RNA 프로모터 및/또는 RNA 전사물의 생성을 위한 다른 관련 도메인을 갖는 벡터를 포함한다. 바이러스 벡터, 및 특히 레트로바이러스 벡터는 유전자를 포유동물, 예를 들어 인간 세포내로 삽입하는데 가장 널리 사용되는 방법이 되었다. 다른 바이러스 벡터는 렌티바이러스, 폭스바이러스, 헤르페스 단순 바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-관련된 바이러스 등으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어 미국특허 제 5,350,674 및 5,585,362 호를 참조하시오.

[0156] 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포내로 도입시키기 위한 화학적 수단은 콜로이드성 분산 시스템, 예를 들어 거대분자 복합체, 나노캡슐, 미소구, 비드, 및 지질-기재 시스템, 예를 들어 수중 유적형 유화액, 미셀, 혼합 미셀 및 리포솜을 포함한다. 시험관내 및 생체내에서 전달 비히클로서 사용하기 위한 예시적인 콜로이드 시스템은 리포솜(예를 들어 인공 막 소낭)이다.

[0157] 바이러스 전달 시스템이 사용되는 경우에, 예시적인 전달 비히클은 리포솜이다. 지질 제형의 사용이 상기 핵산의 숙주 세포내로의 도입에 고려된다(시험관내, 생체외 또는 생체내). 또 다른 태양에서, 상기 핵산을 지질과 결합시킬 수도 있다. 지질과 결합된 핵산을 리포솜의 수성 내부에 캡슐화시키거나, 리포솜의 지질 이중층 내에 산재시키거나, 상기 리포솜 및 상기 올리고뉴클레오티드 모두와 결합하는 연결 분자를 통해 리포솜에 부착시키거나, 리포솜 중에 포집하거나, 리포솜과 복합체화하거나, 지질을 함유하는 용액에 분산시키거나, 지질과 혼합하거나, 지질과 결합시키거나, 지질 중의 혼탁액으로서 함유하거나, 미셀과 함께 함유하거나 또는 미셀과 복합체화하거나, 또는 지질과 달리 결합시킬 수 있다. 지질, 지질/DNA 또는 지질/발현 벡터 결합된 조성물은 용액 중의 임의의 특정한 구조로 제한되지 않는다. 예를 들어, 상기는 이중층 구조 중에, 미셀로서 존재하거나, 또는 "붕괴된" 구조로 존재할 수 있다. 상기는 또한 단순히 용액 중에 산재되어, 가능하게는 크기나 모양이 규칙하지 않은 응집체를 형성할 수도 있다. 지질은 천연 또는 합성 지질일 수 있는 지방 물질이다. 예를 들어, 지질은 세포질 중에 자연적으로 존재하는 지방 소적뿐만 아니라 장쇄 지방족 탄화수소 및 그의 유도체, 예를 들어 지방산, 알콜, 아민, 아미노 알콜 및 알데히드를 함유하는 화합물 부류를 포함한다.

[0158]

사용에 적합한 지질은 상업적인 공급원으로부터 수득될 수 있다. 예를 들어, 디미리스틸 포스파티딜콜린 ("DMPC")을 시그마(Sigma)(미국 미주리주 세인트루이스 소재)로부터 수득할 수 있고; 디세틸 포스페이트("DCP")를 K&K 레보라토리즈(Laboratories)(미국 뉴욕주 플레인뷰 소재)로부터 수득할 수 있고; 콜레스테롤("Cholesterol")을 칼바이오켐-베링(Calbiochem-Behring)으로부터 수득할 수 있고; 디미리스틸 포스파티딜글리세롤("DMPG") 및 다른 지질을 아반티 폴라 리피즈 인코포레이티드(Avantipolar Lipids, Inc.)(미국 앨라배마주 베밍햄 소재)로부터 수득할 수 있다. 클로로포름 또는 클로로포름/메탄을 중의 지질의 모액을 약 -20 °C에서 보관할 수 있다. 클로로포름은 메탄을보다 더 쉽게 증발되기 때문에 유일한 용매로서 사용된다. "리포솜"은 둘러싸인 지질 이중층 또는 응집체의 생성에 의해 형성된 다양한 단일 및 다중라멜라 지질 비히클을 포함하는 일반적인 용어이다. 리포솜은 인지질 이중층 막 및 내부 수성 매질을 갖는 소낭 구조를 가짐을 특징으로 할 수 있다. 다중라멜라 리포솜은 수성 매질에 의해 분리된 다중 지질층을 갖는다. 상기는 인지질이 과잉의 수성 용액 중에 혼탁될 때 자발적으로 형성된다. 상기 지질 성분들은 폐쇄된 구조의 형성전에 자기-재배열을 겪고 물을 포집하고 지질 이중층 사이의 용질을 용해시킨다(Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5: 505-10). 그러나, 통상적인 소낭 구조보다는 용액 중의 상이한 구조를 갖는 조성물이 또한 포함된다. 예를 들어, 상기 지질은 미셀 구조를 띠거나 또는 단지 지질 분자의 불균일한 응집체로서 존재할 수 있다. 또한 리포펙타민-핵산 복합체가 고려된다.

[0159]

외인성 핵산을 숙주 세포내에 도입시키거나 또는 달리 세포를 본 명세서에 기재된 분자에 노출시키는데 사용되는 방법과 관계 없이, 상기 숙주 세포 중의 상기 핵산의 존재를 확인하기 위해서, 다양한 분석들이 수행될 수 있다. 상기와 같은 분석은 예를 들어 당해 분야의 숙련가들에게 주지된 "분자 생물학적" 분석, 예를 들어 서던 및 노던 블로팅, RT-PCR 및 PCR; "생화학적" 분석, 예를 들어 면역학적 수단(ELISA 및 웨스턴 블로팅)에 의한 또는 본 발명의 범위내에 있는 작용제를 확인하기 위한 본 명세서에 기재된 분석에 의한 특정 펩티드의 존재 또는 부재의 검출을 포함한다.

[0160]

하나의 실시태양에서, 상기 핵산 서열 중 하나 이상을, 세포 점단의 형질도입, 세포 점단의 형질감염, 및 세포 점단의 전기천공으로 이루어지는 그룹 중에서 선택되는 방법에 의해 도입시킨다. 하나의 실시태양에서, 세포 점단은 본 명세서에 기재된 핵산 서열 중 하나 이상을 포함한다.

[0161]

하나의 실시태양에서, 상기 세포내에 도입된 핵산은 RNA이다. 또 다른 실시태양에서, 상기 RNA는 시험관내 전사된 RNA 또는 합성 RNA를 포함하는 mRNA이다. 상기 RNA를 폴리머라제 쇄 반응(PCR)-생성된 주형을 사용하는 시험관내 전사에 의해 생성시킨다. 임의의 공급원으로부터의 관심 DNA를, 적합한 프라이머 및 RNA 폴리머라제를 사용하여 시험관내 mRNA 합성을 위한 주형으로 PCR에 의해 직접 전환시킬 수 있다. 상기 DNA의 공급원은 예를 들어 게놈 DNA, 플라스미드 DNA, 과지 DNA, cDNA, 합성 DNA 서열 또는 DNA의 임의의 다른 적합한 공급원일 수 있다. 시험관내 전사에 바람직한 주형은 CAR이다.

[0162]

PCR을 사용하여 mRNA의 시험관내 전사를 위한 주형을 생성시킬 수 있으며 이어서 상기를 세포내에 도입시킨다. PCR을 수행하기 위한 방법은 당해 분야에 주지되어 있다. PCR에 사용하기 위한 프라이머는 상기 PCR을 위한 주형으로서 사용되는 상기 DNA의 영역에 실질적으로 상보성인 영역들을 갖도록 설계된다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "실질적으로 상보성"은 상기 프라이머 서열 중의 염기의 대부분 또는 전부가 상보성이거나, 또는 하나 이상의 염기가 비-상보성이거나, 또는 부정합되는 뉴클레오티드의 서열들을 지칭한다. 실질적으로 상보성인 서열은 PCR에 사용되는 어닐링 조건하에서 의도하는 DNA 표적과 어닐링되거나 하이브리드화될 수 있다. 상기 프라이머는 상기 DNA 주형의 임의의 부분과 실질적으로 상보성으로 설계될 수 있다. 예를 들어, 상기 프라이머는 5' 및 3' UTR을 포함하여, 세포 중에서 통상적으로 전사되는 유전자의 부분(개방 판독 프레임)을 증폭시키도록 설계될 수 있다. 상기 프라이머는 또한 특정 관심 도메인을 암호화하는 유전자의 일부를 증폭시키도록 설계될 수 있다. 하나의 실시태양에서, 상기 프라이머는 5' 및 3' UTR의 전부 또는 일부를 포함하여, 인간 cDNA의 암호화 영역을 증폭시키도록 설계된다. PCR에 유용한 프라이머를 당해 분야에 주지된 합성 방법에 의해 생성시킨다. "순방향 프라이머"는 증폭시키고자 하는 DNA 서열의 상류인 DNA 주형상의 뉴클레오티드에 실질적으로 상보성인 뉴클레오티드의 영역을 함유하는 프라이머이다. 본 명세서에 사용되는 "상류"는 암호화 가닥에 비해 증폭시키고자 하는 DNA 서열에 대해 5' 위치를 지칭한다. "역방향 프라이머"는 증폭시키고자 하는 DNA 서열의 하류인 이중가닥 DNA 주형에 실질적으로 상보성인 뉴클레오티드 영역을 함유하는 프라이머이다. 본 명세서에 사용되는 "하류"는 상기 암호화 가닥에 비해 증폭시키고자 하는 DNA 서열에 대해 3' 위치를 지칭한다.

[0163]

상기 RNA의 안정성 및/또는 번역 효율을 촉진하는 능력을 갖는 화학 구조물이 또한 사용될 수 있다. 상기 RNA는 5' 및 3' UTR을 갖는다. 하나의 실시태양에서, 상기 5' UTR은 길이가 0 내지 3000 뉴클레오티드이다. 상기 암호화 영역에 첨가되는 5' 및 3' UTR 서열의 길이를 상이한 방법들, 예를 들어 비제한적으로 상기 UTR의 상이

한 영역에 어닐링되는 PCR용 프라이머의 설계에 의해 변경시킬 수 있다. 상기 접근법을 사용하여, 당해 분야의 통상적인 숙련가는 상기 전사된 RNA의 형질감염에 이은 최적의 번역 효율을 성취하는데 요구되는 상기 5' 및 3' UTR 길이를 변형시킬 수 있다.

[0164] 상기 5' 및 3' UTR은 상기 관심 유전자에 대한 천연의 내인성 5' 및 3' UTR일 수 있다. 한편으로, 상기 관심 유전자에 내인성이 아닌 UTR 서열을, 상기 UTR 서열을 상기 순방향 및 역방향 프라이머에 통합시키거나 또는 상기 주형의 임의의 다른 변형에 의해 첨가할 수 있다. 관심 유전자에 내인성이 아닌 UTR 서열의 사용은 상기 RNA의 안정성 및/또는 번역 효율을 변형시키기에 유용할 수 있다. 예를 들어, 3' UTR 서열 중 AU-풍부 요소는 mRNA의 안정성을 감소시킬 수 있는 것으로 공지되어 있다. 따라서, 3' UTR을 당해 분야에 주지된 UTR의 성질에 근거하여 전사된 RNA의 안정성을 증가시키도록 선택하거나 설계할 수 있다.

[0165] 하나의 실시태양에서, 상기 5' UTR은 내인성 유전자의 코작 서열을 함유할 수 있다. 한편으로, 관심 유전자에 내인성이 아닌 5' UTR을 상술한 바와 같이 PCR에 의해 첨가하려고 할 때, 공통 코작 서열을 상기 5'UTR 서열의 첨가에 의해 재설계할 수 있다. 코작 서열은 일부 RNA 전사물의 번역 효율을 증가시킬 수 있지만, 효율적인 번역을 위해 모든 RNA에 요구되는 것으로 보이지는 않는다. 다수의 mRNA에 대한 코작 서열의 요건은 당해 분야에 공지되어 있다. 다른 실시태양에서, 상기 5' UTR은 RNA 계놈이 세포 중에서 안정성인 RNA 바이러스로부터 유래될 수 있다. 다른 실시태양에서 다양한 뉴클레오티드 유사체들이 상기 mRNA의 엑소뉴클레아제 분해를 방해하도록 상기 3' 또는 5' UTR에 사용될 수 있다.

[0166] 유전자 클로닝의 필요 없이 DNA 주형으로부터 RNA를 합성할 수 있기 위해서, 전사의 프로모터를 전사하려는 서열 상류의 DNA 주형에 부착시켜야 한다. RNA 폴리머라제에 대한 프로모터로서 기능하는 서열이 순방향 프라이머의 5' 단부에 첨가되는 경우, 상기 RNA 폴리머라제 프로모터는 전사시키고자 하는 개방 판독 프레임 상류의 PCR 생성물내에 통합되게 된다. 하나의 실시태양에서, 상기 프로모터는 본 명세서의 다른 어딘가에 기재된 바와 같이, T7 폴리머라제 프로모터이다. 다른 유용한 프로모터는 비제한적으로 T3 및 SP6 RNA 폴리머라제 프로모터를 포함한다. T7, T3 및 SP6 프로모터의 공통 뉴클레오티드 서열은 당해 분야에 공지되어 있다.

[0167] 하나의 실시태양에서, 상기 mRNA는 5' 단부 및 3' 폴리(A) 꼬리상의 캡을 모두 가지며, 이들은 세포에서 리보솜 결합, 번역의 개시 및 mRNA 안정성을 결정한다. 환상 DNA 주형, 예를 들어 플라스미드 DNA상에서, RNA 폴리머라제는 긴 연쇄 생성물(이는 진핵생물 세포에서의 발현에 적합하지 않다)을 생성시킨다. 상기 3' UTR의 단부에서 선형화된 플라스미드 DNA의 전사는 통상적인 크기의 mRNA를 생성시키며, 이는 상기가 전사 후에 폴리아데닐화되는 경우에조차 원핵생물 형질감염에 유효하지 않다.

[0168] 선형 DNA 주형상에서, 과거 T7 RNA 폴리머라제는 전사물의 3' 단부를 상기 주형의 최종 염기 이상으로 연장시킬 수 있다(Schenborn and Mierendorf, Nuc Acids Res., 13:6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, Eur. J. Biochem., 270:1485-65 (2003)).

[0169] DNA 주형내로의 폴리A/T 신장부의 통상적인 통합 방법은 문자 클로닝이다. 그러나 플라스미드 DNA내에 통합된 폴리A/T 서열은 플라스미드 불안정성을 야기할 수 있으며, 이는 세균 세포로부터 획득된 플라스미드 DNA 주형이 종종 결실 및 다른 이상으로 고도로 오염되는 이유이다. 이는 클로닝 과정을 고되고 시간 소모적으로 만들 뿐만 아니라 신뢰할 수 없게 한다. 이는 클로닝 없이 폴리A/T 3' 신장부를 갖는 DNA 주형의 구성을 허용하는 방법이 매우 바람직한 이유이다.

[0170] 상기 전사적 DNA 주형의 폴리A/T 조각을, 폴리T 꼬리, 예를 들어 100T 꼬리(크기가 50 내지 5000 T일 수 있다)를 함유하는 역방향 프라이머를 사용함으로써 PCR 중에, 또는 임의의 다른 방법, 예를 들어 비제한적으로 DNA 결찰 또는 시험관내 재조합에 의해 PCR 후에 생성시킬 수 있다. 폴리(A) 꼬리는 또한 RNA에 대한 안정성을 제공하며 그의 분해를 감소시킨다. 일반적으로, 폴리(A) 꼬리의 길이는 전사된 RNA의 안정성과 긍정적으로 상관된다. 하나의 실시태양에서, 상기 폴리(A) 꼬리는 100 내지 5000 아데노신이다.

[0171] RNA의 폴리(A) 꼬리를 폴리(A) 폴리머라제, 예를 들어 이 콜라이 폴리A 폴리머라제(E-PAP)의 사용과 함께 시험관내 전사에 이어서 추가로 연장시킬 수 있다. 하나의 실시태양에서, 100 뉴클레오티드로부터 300 내지 400 뉴클레오티드로의 폴리(A) 꼬리의 길이 증가는 상기 RNA의 번역 효율을 약 2배 증가시킨다. 추가로, 3' 단부에 상이한 화학기들의 부착은 mRNA 안정성을 증가시킬 수 있다. 상기와 같은 부착은 변형된/인공 뉴클레오티드, 앱타미 및 다른 화합물을 함유할 수 있다. 예를 들어, ATP 유사체를 폴리(A) 폴리머라제를 사용하여 상기 폴리(A) 꼬리에 통합시킬 수 있다. ATP 유사체는 상기 RNA의 안정성을 추가로 증가시킬 수 있다.

[0172] 5' 캡은 또한 RNA 분자에 안정성을 제공한다. 바람직한 실시태양에서, 본 명세서에 개시된 방법에 의해 생성된

RNA는 5' 캡을 포함한다. 상기 5' 캡을 당해 분야에 공지되고 본 명세서에 기재된 기법들을 사용하여 제공한다 (Cougot, et al., Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., RNA, 7:1468-95 (2001); Elango, et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005)).

[0173] 본 명세서에 개시된 방법들에 의해 생성된 RNA는 또한 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 서열을 함유할 수 있다. 상기 IRES 서열은 mRNA에의 캡-독립적인 리보솜 결합을 개시시키고 번역의 개시를 촉진하는 임의의 바이러스, 염색체 또는 인공적으로 설계된 서열일 수 있다. 세포 투과성 및 생육성을 촉진하는 인자를 함유할 수 있는 세포 전기천공에 적합한 임의의 용질, 예를 들어 당, 펩티드, 지질, 단백질, 산화방지제 및 계면활성제가 포함될 수 있다.

[0174] 시험관내 전사를 위한 주형으로서 표준화된 방식으로 사용되고 안정화된 RNA 전사물을 생성시키는 방식으로 유전적으로 변형된 일부 시험관내-전사된 RNA(IVT-RNA) 백터들이 문헌에 공지되어 있다. 당해 분야에 사용되는 현행 프로토콜은 하기의 구조를 갖는 플라스미드 백터를 기본으로 한다: RNA 전사를 가능하게 하는 5' RNA 폴리머라제 프로모터에 이어서, 번역되지 않은 영역(UTR)에 의해 3' 및/또는 5' 인접된 관심 유전자, 및 50 내지 70 A 뉴클레오티드를 함유하는 3' 폴리아데닐 카세트. 시험관내 전사에 앞서, 상기 환상 플라스미드는 II형 제한효소(인식 서열은 절단 부위에 상응한다)에 의해 상기 폴리아데닐 카세트의 하류에서 선형화된다. 따라서 상기 폴리아데닐 카세트는 상기 전사물 중의 나중의 폴리(A) 서열에 상응한다. 상기 과정의 결과로서, 일부 뉴클레오티드는 선형화 후 상기 효소 절단 부위의 부분으로서 남고 3' 단부에서 상기 폴리(A) 서열을 연장시키거나 가린다. 상기 비생리학적 오버행이 상기와 같은 구조물로부터 세포내적으로 생성되는 단백질의 양에 영향을 미치는지의 여부는 분명하지 않다.

[0175] 하나의 태양에서, 상기 RNA 구조물은 전기천공에 의해 세포내로 전달된다. 예를 들어 US 2004/0014645, US 2005/0052630A1, US 2005/0070841A1, US 2004/0059285A1, US 2004/0092907A1에 교시된 바와 같은 포유동물 세포내로의 핵산 구조물의 전기천공의 제형화 및 방법을 참조하시오. 임의의 공지된 세포 유형의 전기천공에 필요한 전계 강도를 포함한 다양한 매개변수들은 관련 연구 문헌뿐만 아니라 당해 분야의 다양한 특허 및 출원에 일반적으로 공지되어 있다. 예를 들어 미국특허 제 6,678,556 호, 미국특허 제 7,171,264 호, 및 미국특허 제 7,173,116 호를 참조하시오. 전기천공의 치료학적 적용을 위한 장치, 예를 들어 MedPulser(상표) DNA 전기천공 쎄라피 시스템(Electroporation Therapy System)(이노비오/제네트로닉스(Inovio/Genetronics), 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재)을 상업적으로 입수할 수 있으며, 이들은 특허, 예를 들어 미국특허 제 6,567,694 호; 미국 특허 제 6,516,223 호, 미국특허 제 5,993,434 호, 미국특허 제 6,181,964 호, 미국특허 제 6,241,701 호, 및 미국특허 제 6,233,482 호에 기재되어 있고; 전기천공을 또한 예를 들어 US20070128708A1에 기재된 바와 같이 시험관내에서 세포의 형질감염에 사용할 수 있다. 전기천공을 또한 시험관내에서 핵산의 세포내로의 전달에 사용할 수도 있다. 상응하게, 다수의 입수 가능한 장치들 중 임의의 장치 및 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 전기천공 시스템을 사용하는, 발현 구조물을 포함한 핵산의 세포내로의 전기천공-매개된 투여는 관심 RNA의 표적 세포로의 전달에 흥분되는 새로운 수단을 제공한다.

#### 세포의 공급원

[0176] 하나의 실시태양에서, 식세포가 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법에 사용된다. 식세포, 예를 들어 단핵세포, 대식세포 및/또는 수지상 세포의 공급원을 피험자로부터 수득한다. 피험자의 비체한적인 예는 인간, 개, 고양이, 마우스, 래트 및 이들의 트랜스제닉 종들을 포함한다. 바람직하게, 상기 피험자는 인간이다. 상기 세포를 다수의 공급원, 예를 들어 말초 혈액 단핵세포, 골수, 림프절 조직, 비장 조직, 텃줄, 및 종양으로부터 수득할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 당해 분야에서 입수할 수 있는 임의의 수의 단핵세포, 대식세포, 수지상 세포 또는 선조 세포주를 사용할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 세포를 숙련가에게 공지된 임의의 수의 기법, 예를 들어 피콜 분리를 사용하여 피험자로부터 수집한 혈액 단위로부터 수득할 수 있다. 하나의 실시태양에서, 개인의 순환 혈액으로부터의 세포를 성분채집술 또는 백혈구성분채집술에 의해 수득한다. 상기 성분채집술 산물은 전형적으로 림프구, 예를 들어 T 세포, 단핵세포, 과립구, B 세포, 다른 유핵 백혈구, 적혈구 및 혈소판을 함유한다. 성분채집술에 의해 수집된 세포를 후속의 처리 단계들을 위해 세척하여 혈장 분획을 제거하고 상기 세포를 적합한 완충제 또는 매질, 예를 들어 포스페이트 완충된 염수(PBS), 또는 칼슘이 없고 마그네슘이 없거나 또는 다수의(전부는 아니라도) 2가 양이온이 없을 수도 있는 세척액에 넣을 수 있다. 세척 후에, 상기 세포를 다양한 생체적합성 완충제, 예를 들어 무-Ca, 무-Mg PBS에 재현탁시킬 수 있다. 한편으로, 상기 성분채집술 샘플의 바람직하지 못한 성분들을 제거할 수 있으며 상기 세포를 배양 배지에 직접 재현탁시킬 수도 있다.

[0178] 또 다른 실시태양에서, 세포를, 적혈구를 용해시키고 예를 들어 PERCOLL(상표) 구배를 통한 원심분리에 의해 림

프구 및 적혈구를 고갈시킴으로써 말초 혈액으로부터 단리한다. 한편으로, 세포를 텃줄로부터 단리할 수도 있다. 어쨌든, 상기 단핵세포, 대식세포 및/또는 수지상 세포의 특정한 하위집단을 양성 또는 음성 선택 기법에 의해 추가로 단리할 수 있다.

[0179] 그렇게 단리된 단핵세포는 몇몇 항원, 예를 들어 비체한적으로 CD34, CD3, CD4, CD8, CD14, CD19 또는 CD20을 발현하는 세포가 고갈될 수 있다. 이를 세포의 고갈은 단리된 항체, 항체를 포함하는 생물학적 샘플, 예를 들어 복수, 물리적 지지체에 결합된 항체, 및 세포 결합된 항체를 사용하여 수행될 수 있다.

[0180] 음성 선택에 의한 단핵세포, 대식세포 및/또는 수지상 세포 집단의 농축을, 음성적으로 선택된 세포에 특유한 표면 마커에 대한 항체들의 조합을 사용하여 수행할 수 있다. 바람직한 방법은 음성적으로 선택된 세포상에 존재하는 세포 표면 마커에 대한 단클론 항체들의 카테일을 사용하는 음성 자기 면역부착 또는 유식 세포측정을 통한 세포 분류 및/또는 선택이다. 예를 들어, 음성 선택에 의한 단핵세포, 대식세포 및/또는 수지상 세포의 세포 집단의 농축을 전형적으로 CD34, CD3, CD4, CD8, CD14, CD19 또는 CD20에 대한 항체를 포함하는 단클론 항체 카테일을 사용하여 수행할 수 있다.

[0181] 양성 또는 음성 선택에 의한 세포의 목적하는 집단의 단리 중에, 세포의 농도 및 표면(예를 들어 비드와 같은 입자)은 변화될 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 비드 및 세포가 함께 혼합되는 부피를 현저하게 감소시켜(즉 세포의 농도를 증가시켜) 세포 및 비드의 최대 접촉을 보장하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 하나의 실시태양에서, 20억 세포/ $\text{mL}$ 의 농도가 사용된다. 하나의 실시태양에서 10억 세포/ $\text{mL}$ 의 농도가 사용된다. 추가의 실시태양에서, 1억 세포/ $\text{mL}$  초과가 사용된다. 추가의 실시태양에서, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는  $50 \times 10^6$  세포/ $\text{mL}$ 의 세포의 농도가 사용된다. 더욱 또 다른 실시태양에서, 75, 80, 85, 90, 95, 또는  $100 \times 10^6$  세포/ $\text{mL}$ 의 세포의 농도가 사용된다. 추가의 실시태양에서,  $125$  또는  $150 \times 10^6$  세포/ $\text{mL}$ 의 농도가 사용될 수 있다. 고 농도 세포의 사용은 증가된 세포 수율, 세포 활성화 및 세포 확대를 생성시킬 수 있다.

[0182] 하나의 실시태양에서, 세포 집단은 본 발명의 단핵세포, 대식세포 또는 수지상 세포를 포함한다. 세포 집단의 예는 비체한적으로 말초 혈액 단핵세포, 텃줄 세포, 정제된 단핵세포, 대식세포 또는 수지상 세포의 집단 및 세포주를 포함한다. 또 다른 실시태양에서, 말초 혈액 단핵세포는 단핵세포, 대식세포 또는 수지상 세포의 집단을 포함한다. 더욱 또 다른 실시태양에서, 정제된 세포는 단핵세포, 대식세포 또는 수지상 세포의 집단을 포함한다.

[0183] 또 다른 실시태양에서, 상기 세포는 상향조절된 M1 마커 및 하향조절된 M2 마커를 갖는다. 예를 들어, 적어도 하나의 M1 마커, 예를 들어 HLA DR, CD86, CD80 및 PDL1은 식세포에서 상향조절된다. 또 다른 예에서, 적어도 하나의 M2 마커, 예를 들어 CD206, CD163은 식세포에서 하향조절된다. 하나의 실시태양에서, 상기 세포는 적어도 하나의 상향조절된 M1 마커 및 적어도 하나의 하향조절된 M2 마커를 갖는다.

[0184] 더욱 또 다른 실시태양에서, 상기 식세포 중의 표적화된 효과기 활성을 CD47 또는 SIRP $\alpha$  활성의 억제에 의해 증대시킨다. CD47 및/또는 SIRP $\alpha$  활성을, 상기 식세포를 항-CD47 또는 항-SIRP $\alpha$  항체로 처리함으로써 억제할 수 있다. 한편으로, CD47 또는 SIRP $\alpha$  활성을 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 임의의 방법에 의해 억제할 수 있다.

#### 세포의 확대

[0185] 하나의 실시태양에서, 단핵세포, 대식세포 또는 수지상 세포를 포함하는 세포 또는 세포의 집단을 확대를 위해 배양한다. 또 다른 실시태양에서, 선조 세포를 포함하는 세포 또는 세포의 집단을 단핵세포, 대식세포 또는 수지상 세포의 분화 및 확대를 위해 배양한다. 본 발명은 본 명세서에 기재된 바와 같은 키메릭 항원 수용체를 포함하는 단핵세포, 대식세포 또는 수지상 세포의 집단을 확대시킴을 포함한다.

[0187] 본 명세서에 개시된 데이터에 의해 입증되는 바와 같이, 본 명세서에 개시된 방법들에 의한 세포의 확대는 약 10배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배, 200배, 300배, 400배, 500배, 600배, 700배, 800배, 900배, 1,000배, 2,000배, 3,000배, 4,000배, 5,000배, 6,000배, 7,000배, 8,000배, 9,000배, 10,000배, 100,000배, 1,000,000배, 10,000,000배 또는 그 이상, 및 그 사이의 모든 전체 또는 부분 정수배까지 증가될 수 있다. 하나의 실시태양에서, 상기 세포는 약 20배 내지 약 50배의 범위로 확대된다.

[0188] 배양에 이어서, 상기 세포를 또 다른 배양 장치로 넘기기 전에 상기 세포가 최적의 계대를 위해 일정 기간 동안 또는 융합 또는 높은 세포 밀도에 도달할 때까지 상기 세포를 배양 장치 종의 세포 배지에서 배양할 수 있다. 상기 배양 장치는 시험관내에서 세포 배양에 통상적으로 사용되는 임의의 배양 장치일 수 있다. 바람직하게,

융합 수준은 상기 세포를 또 다른 배양 장치로 넘기기 전에 70% 이상이다. 보다 바람직하게 상기 융합 수준은 90% 이상이다. 일정 기간은 시험관내에서 세포의 배양에 적합한 임의의 시간일 수 있다. 상기 배양 배지를 상기 세포의 배양 중 언제라도 교체할 수 있다. 바람직하게, 상기 배양 배지를 대략 2 내지 3일마다 교체한다. 이어서 상기 세포를 상기 배양 장치로부터 수확하고 그 후에 상기 세포를 바로 사용하거나 또는 나중에 사용하기 위해 보관할 수 있다.

[0189] 본 명세서에 기재된 바와 같은 배양 단계(본 명세서에 기재된 바와 같은 작용제와의 접촉)는 매우 짧을 수 있다, 예를 들어 24시간 미만, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 또는 23시간일 수 있다. 추가로 본 명세서에 기재된 바와 같은 배양 단계(본 명세서에 기재된 바와 같은 작용제와의 접촉)는 보다 길 수 있다, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14일 이상일 수 있다.

[0190] 하나의 실시태양에서, 상기 세포를 수시간(약 3시간) 내지 약 14일 동안 또는 그 사이의 임의의 시간 정수값 동안 배양할 수 있다. 세포 배양에 적합한 조건은 증식 및 생육력에 필요한 인자들, 예를 들어 혈청(예를 들어 소 태아 또는 인간 혈청), L-글루타민, 인슐린, M-CSF, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF-베타 및 TNF- $\alpha$ , 또는 숙련가에게 공지된 세포의 생육을 위한 임의의 다른 첨가제를 함유할 수 있는 적합한 배지(예를 들어 대식세포 완전 배지, DMEM/F12, DMEM/F12-10(인비트로젠(Invitrogen))를 포함한다. 상기 세포의 생육을 위한 다른 첨가제는 비제한적으로 계면활성제, 플라스마네이트, 및 환원제, 예를 들어 N-아세틸-시스테인 및 2-머캅토에탄올을 포함한다. 배지는 아미노산, 나트륨 피루베이트, 및 비타민이 첨가되거나, 혈청이 없거나 또는 적합한 양의 혈청(또는 혈장) 또는 한정된 조합의 호르몬, 및/또는 상기 세포의 생육 및 확대에 충분한 양의 사이토킨(들)이 보충된, RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM,  $\alpha$ -MEM, F-12, X-Vivo 15, 및 X-Vivo 20, 옵티마이저(Optimizer)를 포함할 수 있다. 항생제, 예를 들어 페니실린 및 스트렙토마이신을, 피험자에게 주입하고자 하는 세포 배양물이 아닌, 오직 실험 배양물에만 포함시킨다. 상기 표적 세포를 생육을 지지하는데 필요한 조건, 예를 들어 적합한 온도(예를 들어 37 °C) 및 분위기(예를 들어 공기 + 5% CO<sub>2</sub>) 하에서 유지시킨다.

[0191] 상기 세포의 배양에 사용되는 배지는 상기 세포를 활성화시킬 수 있는 작용제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 단핵세포, 대식세포 또는 수지상 세포를 활성화시키는 것으로 당해 분야에 공지된 작용제를 상기 배양 배지에 포함시킨다.

## 치료법

[0193] 본 명세서에 기재된 변형된 세포를 피험자의 치료를 위한 조성물에 포함시킬 수 있다. 하나의 태양에서, 상기 조성물은 본 명세서에 기재된 키메릭 항원 수용체를 포함하는 변형된 세포를 포함한다. 상기 조성물은 약학 조성물을 포함할 수 있으며 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 치료학적 유효량의 상기 변형된 세포를 포함하는 약학 조성물을 투여할 수 있다.

[0194] 하나의 태양에서, 본 발명은 피험자에게 치료학적 유효량의 본 명세서에 기재된 변형된 세포를 포함하는 약학 조성물을 투여함을 포함하는, 상기 피험자에서 종양 또는 암과 관련된 질병 또는 상태를 치료하는 방법을 포함한다. 또 다른 태양에서, 본 발명은 피험자에게 치료학적 유효량의 본 명세서에 기재된 변형된 세포를 포함하는 약학 조성물을 투여함을 포함하는, 상기 피험자에서 고령 종양을 치료하는 방법을 포함한다. 또 다른 태양에서, 본 발명은 피험자에게 치료학적 유효량의 본 명세서에 기재된 변형된 세포를 포함하는 약학 조성물을 투여함을 포함하는, 상기 피험자에서 표적 종양 세포 또는 종양 조직에 대한 면역 반응을 자극하기 위한 방법을 포함한다. 더욱 또 다른 태양에서, 본 발명은 면역 반응의 치료가 필요한 피험자에서 상기 치료를 위한 약제의 제조에 있어서 본 명세서에 기재된 변형된 세포의 용도를 포함한다. 더욱 또 다른 태양에서, 본 발명은 종양 또는 암의 치료가 필요한 피험자에서 상기 치료를 위한 약제의 제조에 있어서 본 명세서에 기재된 변형된 세포의 용도를 포함한다.

[0195] 본 명세서에 기재된 바와 같이 생성된 변형된 세포는 표적화된 효과기 활성을 갖는다. 하나의 실시태양에서, 상기 변형된 세포는 예를 들어 CAR의 항원 결합 도메인에의 특이적인 결합을 통해 표적 세포상의 항원에 대해 표적화된 효과기 활성을 갖는다. 또 다른 실시태양에서, 상기 표적화된 효과기 활성은 비제한적으로 식균작용, 표적화된 세포 세포독성, 항원 제시, 및 사이토킨 분비를 포함한다.

[0196] 또 다른 실시태양에서, 본 명세서에 기재된 변형된 세포는 상기 표적에 작용제, 생물학적 작용제 또는 치료제를 전달하는 능력을 갖는다. 상기 세포를 작용제를 표적에 전달하도록 변형시키거나 조작할 수 있으며, 여기에서 상기 작용제는 핵산, 항생제, 소염제, 항체 또는 그의 항체 단편, 성장 인자, 사이토킨, 효소, 단백질, 웹티드,

융합 단백질, 합성 분자, 유기 분자, 탄수화물 등, 지질, 호르몬, 마이크로솜, 이들의 유도체 또는 변이체, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어지는 그룹 중에서 선택된다. 비제한적인 예로서, 종양 항원을 표적화하는 CAR로 변형된 대식세포는 대식세포 기능을 지원하기 위해서 작용제, 예를 들어 사이토kin 또는 항체를 분비할 수 있다. 항체, 예를 들어 항-CD47/항 SIRP $\alpha$  mAB가 또한 대식세포 기능을 도울 수 있다. 더욱 또 다른 예에서, 종양 항원을 표적화하는 CAR로 변형된 대식세포는 억제 유전자(즉 SIRP $\alpha$ )를 하향조절함으로써 대식세포 기능을 지원하는 siRNA를 암호화하도록 조작된다. 또 다른 예로, 상기 CAR 대식세포를, 대식세포 기능을 지원하는 수용체 또는 효소의 우세한 음성(또는 달리 돌연변이된) 버전을 발현하도록 조작한다.

[0197]

하나의 실시태양에서, 상기 대식세포를 다중 유전자로 변형시키며, 여기에서 적어도 하나의 유전자는 CAR을 포함하고 적어도 하나의 다른 유전자는 CAR 대식세포 기능을 증대시키는 유전 요소를 포함한다. 또 다른 실시태양에서, 상기 대식세포를 다중 유전자로 변형시키며, 여기에서 적어도 하나의 유전자는 CAR을 포함하고 적어도 하나의 다른 유전자는 다른 면역 세포(예를 들어 종양 미세환경내의 T 세포)의 기능을 지원하거나 재프로그래밍화 한다.

[0198]

더욱이, 상기 변형된 세포를 동물, 바람직하게는 포유동물, 훨씬 더 바람직하게는 인간에게 투여하여 면역 반응, 예를 들어 자가면역 질병, 예를 들어 당뇨병, 건선, 류머티스성 관절염, 다발성 경화증, GVHD, 증대되는 동종이식 내성 유도, 이식편 거부 등에 통상적인 반응을 억제할 수 있다. 또한, 본 발명의 세포를, 감소되거나 또는 달리 억제된 면역 반응, 특히 세포-매개된 면역 반응이 질병의 치료 또는 경감에 바람직한 임의의 상태의 치료에 사용할 수 있다. 하나의 태양에서, 본 발명은 피험자에게 치료학적 유효량의 본 명세서에 기재된 세포 집단을 포함하는 약학 조성물을 투여함을 포함하는, 상기 피험자에서 자가면역 질병과 같은 상태를 치료함을 포함한다. 또한, 본 발명의 세포를 대체 항-암 면역요법, 예를 들어 CAR T 세포, 종양-침윤성 림프구, 또는 체크 포인트 억제제로 치료하기 전의 전-처리 또는 컨디셔닝으로서 투여할 수 있다.

[0199]

자가면역 질병의 예는 비제한적으로 후천성 면역 결핍증(Acquired Immunodeficiency Syndrome) (AIDS, 자가면역 성분을 갖는 바이러스 질병이다), 원형 탈모증(alpecia areata), 강직성 척추염(ankylosing spondylitis), 항인지질 증후군(antiphospholipid syndrome), 자가면역 애디슨병(autoimmune Addison's disease), 자가면역 용혈성 빈혈(autoimmune hemolytic anemia), 자가면역 간염(autoimmune hepatitis), 자가면역 내이증(autoimmune inner ear disease) (AIED), 자가면역 림프증식성 증후군(autoimmune lymphoproliferative syndrome) (ALPS), 자가면역 혈소판감소성 자반병(autoimmune thrombocytopenic purpura) (ATP), 베체트병(Behcet's disease), 심근병증(cardiomyopathy), 셀리악 스프루-포진형 피부염(celiac sprue-dermatitis hepetiformis); 만성 피로 면역 기능장애 증후군(chronic fatigue immune dysfunction syndrome) (CFIDS), 만성 염증성 탈수초성 다발성 신경병증(chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy) (CIPD), 반흔성 유천포창(cicatricial pemphigoid), 한랭응집소증(cold agglutinin disease), 크레스트 증후군(crest syndrome), 크론병(Crohn's disease), 디고스병(Degos' disease), 소아기 피부근염(dermatomyositis-juvenile), 원판성 루푸스(discoid lupus), 본태성 혼합 한랭글로불린혈증(essential mixed cryoglobulinemia), 섬유근육통-섬유근염(fibromyalgia-fibromyositis), 그레이브스병(Graves' disease), 길랑-바레 증후군(Guillain-Barre syndrome), 하시모토 갑상선염(Hashimoto's thyroiditis), 특발성 폐 섬유증(idiopathic pulmonary fibrosis), 특발성 혈소판감소성 자반병(idiopathic thrombocytopenic purpura) (ITP), IgA 신장병증(nephropathy), 인슐린-의존성 당뇨병(insulin-dependent diabetes mellitus), 소아기 만성 관절염(juvenile chronic arthritis) (스틸병( Still's disease)), 소아기 류머티스성 관절염(juvenile rheumatoid arthritis), 메니에르병(Meniere's disease), 혼합 결합조직병(mixed connective tissue disease), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 중증 근무력증(myasthenia gravis), 악성 빈혈(pernicious anemia), 결절성 다발동맥염(polyarteritis nodosa), 다발연골염(polychondritis), 다선성 증후군(polyglandular syndromes), 류머티스성 다발성근육통(polymyalgia rheumatica), 다발근염 및 피부근염(polymyositis and dermatomyositis), 원발성 무감마글로불린혈증(primary agammaglobulinemia), 원발성 담즙성 간경변증(primary biliary cirrhosis), 건선(psoriasis), 건선성 관절염(psoriatic arthritis), 레이노 현상(Raynaud's phenomena), 라이터 증후군(Reiter's syndrome), 류머티스열(rheumatic fever), 류머티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 유육종증(sarcoidosis), 피부경화증(scleroderma) (진행성 전신 경화증(progressive systemic sclerosis) (PSS), 또한 전신 경화증 (SS)으로서 공지됨), 쇼그伦 증후군(Sjogren's syndrome), 근강직 증후군(stiff-man syndrome), 전신 홍반성 루푸스(systemic lupus erythematosus), 타카야수 동맥염(Takayasu arteritis), 측두동맥염/거대 세포 동맥염(temporal arteritis/giant cell arteritis), 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 포도막염(uveitis), 백반증(vitiligo) 및 베게너 육아종증(Wegener's granulomatosis)을 포함한다.

- [0200] 상기 세포를 또한 염증 질환의 치료에 사용할 수 있다. 염증 질환의 예는 비제한적으로 만성 및 급성 염증 질환을 포함한다. 염증 질환의 예는 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 천식(asthma), 아토피성 알러지(atopic allergy), 알러지(allergy), 죽상동맥경화증(atherosclerosis), 기관지 천식(bronchial asthma), 습진(eczema), 사구체신염(glomerulonephritis), 이식편대 숙주병(graft vs. host disease), 용혈성 빈혈(hemolytic anemias), 골관절염(osteoarthritis), 패혈증(sepsis), 뇌졸중(stroke), 조직 및 기관의 이식(transplantation of tissue and organs), 혈관염(vasculitis), 당뇨병성 망막병증(diabetic retinopathy) 및 인공호흡기 유발 폐손상(ventilator induced lung injury)을 포함한다.
- [0201] 본 발명의 세포를 암 치료에 사용할 수 있다. 암은, 혈관화되지 않거나 또는 아직 실질적으로 혈관화되지 않은 종양뿐만 아니라 혈관화된 종양을 포함한다. 상기 암은 비-고형 종양(예를 들어 혈액성 종양, 예를 들어 백혈병 및 림프종)을 포함하거나 또는 고형 종양을 포함할 수 있다. 본 발명의 세포로 치료되는 암의 유형은 비제한적으로 암종, 모세포종 및 육종, 및 일부 백혈병 또는 림프구성 암, 양성 및 악성 종양, 및 악성, 예를 들어 육종, 암종 및 흑색종을 포함한다. 성인 종양/암 및 소아기 종양/암이 또한 포함된다.
- [0202] 고형 종양은 대개 낭종 또는 액체 영역을 함유하지 않는 조직의 이상 덩어리이다. 고형 종양은 양성 또는 악성일 수 있다. 상이한 유형의 고형 종양을, 상기 종양을 형성하는 세포의 유형에 따라 명명한다(예를 들어 육종, 암종 및 림프종). 고형 종양, 예를 들어 육종 및 암종의 예는 섬유육종(fibrosarcoma), 점액육종(myxosarcoma), 지방육종(liposarcoma), 연골육종(chondrosarcoma), 골육종(osteosarcoma), 및 다른 육종, 활막종(synovioma), 중피종(mesothelioma), 유잉 종양(Ewing's tumor), 평활근육종(leiomyosarcoma), 횡문근육종(rhabdomyosarcoma), 결장 암종(colon carcinoma), 악성 림프구(lymphoid malignancy), 췌장암(pancreatic cancer), 유방암(breast cancer), 폐암(lung cancers), 난소암(ovarian cancer), 전립선암(prostate cancer), 간세포 암종(hepatocellular carcinoma), 편평세포 암종(squamous cell carcinoma), 기저세포 암종(basal cell carcinoma), 선암종(adenocarcinoma), 땀샘 암종(sweat gland carcinoma), 수질 갑상선 암종(medullary thyroid carcinoma), 유두 갑상선 암종(papillary thyroid carcinoma), 크롬친화세포종 피지선 암종(pheochromocytomas sebaceous gland carcinoma), 유두 암종(papillary carcinoma), 유두 선암종(papillary adenocarinomas), 수질 암종(medullary carcinoma), 기관지유래 암종(bronchogenic carcinoma), 신세포 암종(renal cell carcinoma), 간세포암/hepatoma), 담관암종(bile duct carcinoma), 읉모막암종(choriocarcinoma), 빌름 종양(Wilms' tumor), 자궁경부암(cervical cancer), 고환 종양(testicular tumor), 정상피종(seminoma), 방광 암종(bladder carcinoma), 흑색종(melanoma), 및 CNS 종양(예를 들어 신경교종(glioma) (예를 들어 뇌간 신경교종(brainstem glioma) 및 혼합 신경교종(mixed gliomas)), 교모세포종(glioblastoma) (또한 다형성 교모세포종(glioblastoma multiforme)으로서 공지됨), 성상세포종(astrocytoma), CNS 림프종(lymphoma), 배아세포종(germinoma), 수모세포종(medulloblastoma), 슈반종(Schwannoma) 두개인두종(craniopharygioma), 상의세포종(ependymoma), 송과체종(pinealoma), 혈관모세포종(hemangioblastoma), 청신경 종양(acoustic neuroma), 펩지교종(oligodendrogloma), 뇌수막종(menangioma), 신경모세포종(neuroblastoma), 망막모세포종(retinoblastoma) 및 뇌 전이(brain metastases)를 포함한다.
- [0203] 혈액암은 혈액 또는 골수의 암이다. 혈액(또는 조혈)암의 예는 백혈병, 예를 들어 급성 백혈병(acute leukemia) (예를 들어 급성 림프구성 백혈병(acute lymphocytic leukemia), 급성 골수구성 백혈병(acute myelocytic leukemia), 급성 골수성 백혈병(acute myelogenous leukemia) 및 골수모구성(myeloblastic), 전골수구성(promyelocytic), 골수단핵구성(myelomonocytic), 단핵구성(monocytic) 및 적백혈병(erythroleukemia)), 만성 백혈병(chronic leukemia) (예를 들어 만성 골수구성(chronic myelocytic) (과립구성(granulocytic)) 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 및 만성 골수구성 백혈병), 진성 적혈구증가증(polycythemia vera), 림프종(lymphoma), 호지킨병(Hodgkin's disease), 비-호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma) (지연성 및 고등급 형태), 다발성 골수종(multiple myeloma), 발렌스트롬 마크로글로불린혈증(Waldenstrom's macroglobulinemia), 중쇄 질병(heavy chain disease), 골수이형성 증후군(myelodysplastic syndrome), 텔세포 백혈병(hairy cell leukemia) 및 골수이형성증(myelodysplasia)을 포함한다.
- [0204] 본 발명의 세포를 적합한 전-임상 및 임상 실험 및 시험에서 측정하고자 하는 투여량 및 경로 및 시기에 투여할 수 있다. 세포 조성물을 이를 범위내의 투여량에서 수회 투여할 수 있다. 본 발명의 세포의 투여를 당해 분야의 숙련가들에 의해 판정되는 바와 같은 목적하는 질병 또는 상태의 치료에 유용한 다른 방법과 병용할 수 있다.
- [0205] 상기 투여하고자 하는 본 발명의 세포는 치료법을 겪고 있는 피험자에 관하여 자가유래, 동종이계 또는 이종발

생성일 수 있다.

[0206] 본 발명의 세포의 투여를 당해 분야의 숙련가들에게 공지된 임의의 편리한 방식으로 수행할 수 있다. 본 발명의 세포를 에어로졸 흡입, 주사, 섭취, 수혈, 주입 또는 이식에 의해 피험자에게 투여할 수 있다. 본 명세서에 기재된 조성물을 환자에게 경동맥, 피하, 경피, 종양내, 결절내, 골수내, 근육내, 정맥내(i.v.) 주사에 의해, 또는 복강내로 투여할 수 있다. 다른 경우에, 본 발명의 세포를 피험자의 염증 부위, 상기 피험자 중의 국소질병 부위, 림프절, 기관, 종양 등에 직접 주사한다.

#### 약학 조성물

[0208] 본 발명의 약학 조성물은 본 명세서에 기재된 바와 같은 세포를 하나 이상의 약학적으로 또는 생리학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제와 함께 포함할 수 있다. 상기와 같은 조성물은 완충제, 예를 들어 중성완충 염수, 포스페이트 완충 염수 등; 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스, 슈크로스 또는 텍스트란, 만니톨; 단백질; 폴리펩티드 또는 아미노산, 예를 들어 글리신; 산화방지제; 킬레이트제, 예를 들어 EDTA 또는 글루타치온; 항원보강제(예를 들어 수산화 알루미늄); 및 보존제를 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물을 바람직하게는 정맥내 투여를 위해 제형화한다.

[0209] 본 발명의 약학 조성물을 치료하고자(또는 예방하고자) 하는 질병에 적합한 방식으로 투여할 수 있다. 투여량 및 투여 빈도는 환자의 상태, 및 환자 질병의 유형 및 중증도와 같은 인자에 의해 결정될 것이지만, 적합한 투여량은 임상 시험에 의해 결정될 수도 있다.

[0210] "면역학적 유효량", "항-면역 반응 유효량", "면역 반응-억제 유효량" 또는 "치료량"이 지시될 때, 투여되는 본 발명의 조성물의 정확한 양은 환자(피험자)의 연령, 체중, 면역 반응 및 상태의 개별적인 차이를 고려하여 의사에 의해 결정될 수 있다. 일반적으로는 본 명세서에 기재된 세포를 포함하는 약학 조성물을  $10^4$  내지  $10^9$  세포/체중 kg, 바람직하게는  $10^5$  내지  $10^6$  세포/체중 kg(이들 범위내의 모든 정수값 포함)의 투여량으로 투여할 수 있다. 본 명세서에 기재된 세포 조성물을 또한 이들 투여량에서 수회 투여할 수 있다. 상기 세포를 면역요법에 통상적으로 공지된 주입 기법을 사용하여 투여할 수 있다(예를 들어 문헌[Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988]을 참조하시오). 특정 환자에 대한 최적의 투여량 및 치료 섭생은 상기 환자를 질병의 정후에 대해 모니터하고 상응하게 치료를 조절함으로써 의학 분야의 숙련가에 의해 쉽게 결정될 수 있다.

[0211] 몇몇 실시태양에서, 단핵세포, 대식세포 또는 수지상 세포를 피험자에게 투여하고 이어서 후속으로 혈액을 다시 채혈하고(또는 성분채집술을 수행하고), 본 발명에 따라 상기로부터 단핵세포, 대식세포 또는 수지상 세포를 활성화시키고, 상기 환자에게 상기 활성화된 세포를 다시주입하는 것이 바람직할 수 있다. 이 과정을 몇주마다 수회 수행할 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 세포를 10 ml 내지 400 ml의 채혈로부터 활성화시킬 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 세포를 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml, 60 ml, 70 ml, 80 ml, 90 ml, 또는 100 ml의 채혈로부터 활성화시킨다. 이론에 얹매이고자 하는 것은 아니지만, 상기 다중 채혈/다중 재주입 프로토콜을 사용하여, 세포의 특정 집단을 선택할 수 있다.

[0212] 본 발명의 몇몇 실시태양에서, 세포를 본 명세서에 기재된 방법, 또는 상기 세포를 치료 수준으로 확대시키는 당해 분야에 공지된 다른 방법을 사용하여 변형시키고, 임의의 수의 관련된 치료 양상, 예를 들어 비제한적으로 항바이러스 요법, 시도포비어 및 인터류킨-2와 같은 작용제에 의한 치료, MS 환자를 위한 시타라빈(또한 ARA-C로서 공지됨) 또는 나탈리주맙 치료 또는 PML 환자를 위한 치료와 함께(예를 들어 상기 치료 전에, 상기 치료와 동시에 또는 상기 치료에 이어서) 환자에게 투여한다. 추가의 실시태양에서, 본 발명의 세포를 CART 세포요법, 화학요법, 방사선, 면역억제제, 예를 들어 사이클로스포린, 아자티오프린, 메토트렉세이트, 마이코페놀레이트, 및 FK506, 항체, 또는 다른 면역제거제, 예를 들어 항-CD52 항체 알렘투주맙(CAM PATH), 항-CD3 항체 또는 다른 항체 요법, 사이토신, 플루다리빈, 사이클로스포린, FK506, 라파마이신, 마이코페놀산, 스테로이드, FR901228, 사이토킨 및 방사선조사와 함께 사용할 수 있다. 이들 약물은 칼슘 의존성 포스파타제 칼시뉴린(사이클로스포린 및 FK506)을 억제하거나 또는 성장인자 유도된 신호전달에 중요한 p70S6 키나제를 억제한다(라파마이신)(Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993). 추가의 실시태양에서, 본 발명의 세포 조성물을 환자에게 골수 이식, 화학요법제, 예를 들어 플루다라빈, 외부-빔 조사요법(XRT), 사이클로포스파미드, 리툭산, 또는 항체, 예를 들어 OKT3 또는 CAMPATH를 사용하는 림프구 제거 요법과 함께(예를 들어 상기 요법 전에, 상기 요법과 동시에 또는 상기 요법에 이어서) 투여한다. 예를 들어, 하나의 실시태양에서, 피험자는 고용량의 화학요법에 의한 표준 치료에 이어서 말초 혈액 줄기세포 이식을 겪을 수 있다. 몇몇 실시태양에서, 상기 이식에 이어서, 피험자는

본 발명의 세포의 주입을 수용한다. 추가적인 실시태양에서, 상기 세포를 수술 전에 또는 수술에 이어서 투여할 수 있다.

[0213] 피험자에게 투여하고자 하는 상기 치료의 투여량은 치료되는 상태의 정확한 성질 및 치료 수용자에 따라 변할 것이다. 인간 투여에 대한 투여량의 크기조정을 당해 분야-승인된 실시에 따라 수행할 수 있다. 예를 들어 CAMPATH에 대한 용량은 일반적으로 성인 환자에 대해 1 내지 약 100 mg의 범위이고, 대개 1 내지 30일 동안 매일 투여될 것이다. 바람직한 1일 용량은 하루에 1 내지 10 mg이나, 일부의 경우에 하루에 40 mg 이하의 보다 큰 용량이 사용될 수도 있다(미국특허 제 6,120,766 호에 기재됨).

[0214] 본 발명에 유용한 방법 및 조성물이 실시예들에 제시된 특정 제형들로 제한되지 않음은 물론이다. 하기의 실시예들을, 당해 분야의 통상적인 숙련가들에게 상기 세포, 확대 및 배양 방법을 어떻게 제조하고 사용하는지에 대한 완전한 명세 및 설명을 제공하기 위해 제시하며, 이들 실시예는 발명자들이 그들의 발명으로서 간주하는 것의 범위를 제한하고자 하지 않는다.

[0215] 본 발명의 실시는 달리 나타내지 않는 한 문자 생물학(제조합 기법 포함), 미생물학, 세포 생물학, 생화학 및 면역학의 통상적인 기법들을 사용하며, 이들은 충분히 숙련가의 이해 범위내에 있다. 상기와 같은 기법들은 예를 들어 하기의 문헌들에 충분히 설명되어 있다: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", fourth edition (Sambrook, 2012); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Culture of Animal Cells" (Freshney, 2010); "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1997); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller and Calos, 1987); "Short Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 2002); "Polymerase Chain Reaction: Principles, Applications and Troubleshooting", (Babar, 2011); "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 2002). 이들 기법을 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드의 생성에 적용할 수 있으며, 그 자체를 본 발명의 제조 및 실시에 고려할 수 있다. 특정 실시태양들에 특히 유용한 기법들을 하기의 섹션들에서 논의할 것이다.

#### 0216] 실험 실시예

[0217] 본 발명을 하기의 실험 실시예들을 참조하여 상세히 추가로 기재한다. 이들 실시예는 단지 예시를 목적으로 제공되며, 달리 명시되지 않는 한 제한을 의도하지 않는다. 따라서 본 발명을 결코 하기의 실시예들로 제한되는 것으로서 해석해서는 안 되며, 오히려 본 명세서에 제공된 교시의 결과로서 자명해지는 모든 변화를 포함하는 것으로서 해석해야 한다.

[0218] 추가의 설명 없이도, 당해 분야의 통상적인 숙련가는 선행 설명 및 하기의 예시적인 실시예들을 사용하여 본 발명의 화합물을 제조 및 사용하고, 청구된 방법을 실시할 수 있는 것으로 생각된다. 따라서 하기의 실행 실시예들은 본 발명의 바람직한 실시태양들을 구체적으로 언급하며, 본 명세의 나머지를 어떤식으로도 제한하는 것으로서 해석해서는 안 된다.

[0219] 이제 이들 실험에 사용되는 물질 및 방법을 기재한다.

[0220] 세포 배양물: THP1, K562, SKOV3, SKBR3, HDLM2, MD468, 및 모든 세포주를 10% 소 태아 혈청 및 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 RPMI 1640에서 5% CO<sub>2</sub> 중에서 37°C에서 배양하였다. THP1 mRFP+ 하위계통(Wt)을 mRFP+ 세포주의 렌티바이러스 형질도입 및 FACS 정제에 의해 생성시켰다. 상기 THP1 mRFP+ 하위계통을 사용하여 THP1 mRFP+ CAR19z+ (CAR19z; CARMA19z), THP1 mRFP+ CAR19 Δ z+ (CAR19 Δ z; CARMA19 Δ z), THP1 mRFP+ MesoZ+ 및 THP1 mRFP+ CARHer2z+ (CARHer2z; CARMAHer2z) 하위계통을 생성시켰다. 세포를 48시간 동안 배양 배지에서 1 ng/ml 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트와 함께 배양함으로써 단핵세포 분화를 유도하였다.

[0221] 1차 인간 대식세포: 1차 인간 단핵세포를 밀테니(Miltenyi) CD14 마이크로비즈(MicroBeads)(밀테니, 130-050-201)를 사용하여 통상적인 공여자 성분채집술 생성물로부터 정제하였다. 단핵세포를 5% 인간 AB 혈청이 보충된 X-Vivo 배지 또는 10% 소 태아 혈청이 보충된 RPMI 1640에서, 페니실린/스트렙토마이신, 글루타맥스 및 10 ng/ml 재조합 인간 GM-CSF(페프로테크(PeproTech), 300-03)와 함께 MACS GMP 세포 분화 주머니(밀테니, 170-076-400)에서 7일 동안 배양하였다. 대식세포를 7일째에 수확하고 후속 사용시까지 FBS + 10% DMSO 중에서 저온보존하였다.

[0222] 식균작용 분석: Wt 또는 CARMA mRFP + THP1 하위계통을 48시간 동안 1 ng/ml 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트와 함께 분화시켰다. GFP+ 항원 함유 종양 하위계통, 즉 K562 CD19+ GFP+ 세포를 상기 분화된 THP1 대식세포에, PMA 세척에 이어서 1:1 비로 가하였다. 대식세포를 4시간 동안 표적 종양 세포와 공-배양하고, 식균작용을 EVOS FL 오토 셀 이미징 시스템(Auto Cell Imaging System)을 사용하여 형광 현미경검사에 의해 정량분석하

였다. 3개 시야의 평균을 n으로서 간주하였으며, 모든 상태를 3회 중복하여 정량분석하였다. FACS 기반 식균작용을 BD LSR-포르테사(Fortessa)상에서 분석하였다. 플로우조(FlowJo)(트리스타 인코포레이티드(Treestar, Inc.))를 사용하여 유식 세포측정 데이터를 분석하였다. 생생한, 단일선 통문된 mRFP/GFP 이중 양성 사건들을 식균작용으로 간주하였다. CD47/SIRP $\alpha$  측 봉쇄를 지시된 농도에서 공-배양의 개시시에 차단 단클론 항체의 첨가를 통해 수행하였다(마우스 항-인간 CD47 클론 B6H12, 이바이오사이언스(eBioscience) #14-0479-82; 음성 대조용으로서 마우스 항-인간 CD47 클론 2D3, 이바이오사이언스 #14-0478-82; 마우스 항-인간 SIRP $\alpha$  클론 SE5A5, 바이오레전드(BioLegend) #323802). TLR 보조-자극을 공-배양시에 TLR1-9 작용물질(인간 TLR 1-9 작용물질 키트; 인비보젠(Invivogen) #tlrl-kit1hw)의 첨가에 의해 수행하였다.

[0223] 시험관내 살해 분석: Wt 또는 CAR 함유 대식세포를 항원-함유 또는 대조용 방아벌레 녹색 루시페라제(CBG)/녹색 형광 단백질(GFP) 양성 표적 종양 세포와 다양한 효과기 대 표적비(30:1로 출발하여 3배 희석인자로 감소시킴)로 공-배양하였다. IVIS 스펙트럼 이미징 시스템(퍼킨 엘머(Perkin Elmer))을 사용하여, 생물발광 영상화로 종양 크기를 측정하였다. 비용해 퍼센트는 하기와 같이 계산되었다:

$$\% \text{ 비용해} = ((\text{처리된 웰} - \text{종양 단독 웰}) / (\text{최대 살해} - \text{종양 단독 웰}) * 100)$$

[0225] 타임-랩스 현미경검사: CAR 매개된 식균작용의 형광 타임-랩스 비디오 현미경검사를 EVOS FL 오토 셀 이미징 시스템을 사용하여 수행하였다. 상들을 18시간 동안 40초마다 포착하였다. 상 분석을 FIJI 영상화 소프트웨어로 수행하였다.

[0226] 렌티바이러스 생성 및 형질감염: 키메릭 항원 수용체 구조물을 진아트(GeneArt)(라이프 테크놀로지스(Life Technologies))에 의해 드노보 합성하고 앞서 기재된 바와 같이 렌티바이러스 벡터내에 클로닝하였다. 농축된 렌티바이러스를 앞서 기재된 바와 같이 HEK293T 세포를 사용하여 생성시켰다.

[0227] 아데노바이러스 생성 및 형질감염: CMV 프로모터하에서 GFP, CAR을 암호화하거나 트랜스유전자는 없는 Ad5f35 키메릭 아데노바이러스 벡터를 표준 분자 생물학 과정에 따라 생성시키고 적정하였다. 1차 인간 대식세포를 다양한 감염 배수로 형질도입시키고 EVOS FL 오토 셀 이미징 시스템을 사용하여 GFP 발현 및 생육력에 대해 연속해서 영상화하였다. CAR 발현을 His-태그된 항원 및 항-His-APC 2차 항체(R&D 바이오시스템스 클론(Biosystems Clone) AD1.1.10)를 사용하여 표면 CAR 발현의 FACS 분석에 의해 평가하였다.

[0228] 유식 세포측정: FACS를 BD LSR 포르테사상에서 수행하였다. 표면 CAR 발현을 비오틴화된 단백질 L(젠크립트(GenScript) M00097) 및 스트렙트아비딘 APC(바이오레전드, #405207) 또는 His-태그된 항원 및 항-His-APC 2차 항체(R&D 바이오시스템스 클론 AD1.1.10)로 검출하였다. Fc 수용체를 염색에 앞서 인간 트루스테인(Trustain) FcX(바이오레전드, #422301)로 차단하였다. CD47 발현을 배경 측정을 위해서 마우스 IgG1 카파 APC 아이소타입 대조용과 함께 마우스 항-인간 CD47 APC(이바이오사이언스 #17-0479-41)를 사용하여 측정하였다. 칼레티큘린 발현을 마우스 항-칼레티큘린 PE 클론 FMC75(아브캠(Abcam) #ab3220)로 측정하였다. 모든 유동 결과를 살아있는(라이브/데드 아쿠아 핏서블 데드 셀 스테인(Live/Dead Aqua Fixable Dead Cell Stain), 라이프 테크놀로지스(Life Technologies) L34957) 단세포상에서 통문시킨다.

[0229] 이미지스트림(Imagestream) 세포측정: 단세포 형광 영상화와 함께 FACS를 이미지스트림 마크 II 이미징 플로우 사이토미터(ImageStream Mark II Imaging Flow Cytometer)(EMD 밀리포어(Millipore))상에서 수행하였다. 간단히, mRFP+ 또는 DiI 염색된 대식세포(CAR 또는 대조용)를, 고정화 및 이미지스트림 데이터 획득에 앞서 4시간 동안 GFP+ 종양 세포와 공-배양하였다. 데이터를 이미지스트림 소프트웨어(EMD 밀리포어)를 사용하여 분석하였다.

[0230] RNA 전기천공: CAR 구조물을 표준 분자 생물학 기법을 사용하여 T7 프로모터의 조절하에서 시험관내 전사 플라스미드내로 클로닝하였다. CAR mRNA를 mMessag mMachine T7 울트라 인 비트로 트랜스크립션 키트(Ultra In Vitro Transcription Kit)(써모 피셔(Thermo Fisher))를 사용하여 시험관내 전사시키고, RNEasy RNA 정제 키트(퀴아젠(Qiagen))를 사용하여 정제시키고, BTX ECM850 일렉트로포레이터(BTX 하버드 아파라투스(Harvard Apparatus))를 사용하여 인간 대식세포내로 전기천공시켰다. CAR 발현을 FACS 분석을 사용하여 전기천공-후 다양한 시점들에서 분석하였다.

[0231] TLR/넥틴-1 프라이밍: 시험관내 식균작용 또는 살해 분석에 앞서 Wt 또는 CAR 대식세포에서 TLR 또는 넥틴-1 프라이밍을, 상기 세포를 공-배양에 앞서 30분 동안 각각 권장된 용량의 TLR 1-9 작용물질(인간 TLR1-9 작용물질 키트, 인비보젠) 또는 베타-글루칸(MP 바이오메디칼스(Biomedicals), LLC)과 예비-배양시킴으로써 수행하였다. Wt 또는 CAR 대식세포의 시험관내 기능을 초회항원자극된 상태 및 초회항원자극되지 않은 상태간에 비교하였다.

- [0232] 대식세포/단핵세포 표현형: 하기의 표면 마커들을 M1/M2 구별을 위해 대식세포/단핵세포 면역표현형 FACS 패널의 부분으로서 평가하였다: CD80, CD86, CD163, CD206, CD11B, HLA-DR, HLA-A/B/C, PDL1, 및 PDL2 (바이오레전드). 트루스테인 FcX를 면역염색에 앞서 Fc 수용체 봉쇄에 사용하였다. 대식세포/단핵세포를 표현형 평가에 앞서, 48시간 동안 활성화 조건, 즉 Ad5f35 형질도입에 노출시키거나, 노출시키지 않았다.
- [0233] 해마 분석: 대식세포의 대사 표현형 및 산소 소비를 해마 분석(씨홀스(Seahorse) XF, 에이질런트(Agilent))을 사용하여 측정하였다. 대조용 또는 CAR 대식세포를 분석에 앞서 24시간 동안 대조용 배지 또는 면역억제성 사이토킨에 노출시켰다. 세포를 올리고마이신, FCCP, 및 로테논으로 상기 해마 분석 전체를 통해 연속적으로 처리하였다. 상기 분석을 조건당 6회 반복해서 수행하였다.
- [0234] 생체내 분석: NOD-scid IL2Rg-null-IL3/GM/SF, NSG-SGM3(NSGS) 마우스를 인간 이종이식편 모델에 사용하였다. CBG-루시페라제 양성 인간 SKOV3 난소암 세포가 이식된 마우스를 처리하지 않은 채로 두거나, 또는 상이한 용량의, 형질도입되지 않은, 빈 Ad5f35 형질도입된, 또는 Ad5f35 CAR-HER2 형질도입된 인간 대식세포로 처리하였다. 일련의 생물발광 영상화를 수행하여 종양 크기를 모니터하였다(IVIS 스펙트럼, 퍼킨 엘머). 기관 및 종양을 FACS 분석을 위해 희생시 수확하였다. 전체 생존을 모니터하고 카플란-마이어 분석을 사용하여 비교하였다.
- [0235] 이제 상기 실험들의 결과를 기재한다.
- [0236] 도 1A는 표적화 기능을 갖는 세포의 도메인, 힌지 도메인, 막관통 도메인, 세포내 신호전달 도메인(들), 및/또는 분비될 수 있거나 분비되지 않을 수도 있는 추가적인 유전자 산물(비체한적으로 사이토킨, 단클론 항체, 항체 단편, 단쇄 가변 단편, 효소, 추가적인 수용체, 우세한 음성 수용체, 종양 관련 항원(들), 및 이들의 임의의 조합을 포함한 임의의 유전자/전사물/단백질 포함)의 화학량론적 공-발현을 위한 2A(P2A, T2A)를 함유하는 유전자/유전자-산물로 구성된 키메릭 항원 수용체(CAR)의 개념도이다. 또한, 상기 CAR 구조물은 CRISPR/Cas9 유전자 편집 물질의 공-전달을 포함하거나, 또는 CRISPR/Cas9 예비-편집된 세포와 관련하여 도입될 수 있다. 도 1B에서 CARMA- $\zeta$ , CARMA- $\gamma$ , 및 CARMA-렉틴(이들은 항원 특이성 scFv, CD8 힌지, CD8 막관통, 및 각각 CD3  $\zeta$ , Fc  $\epsilon$  RI 공통  $\gamma$  서브유닛, 또는 택틴-1의 세포내 도메인을 함유한다)을 포함하는 CAR 구조물의 특정한 예들이 모델링된다.
- [0237] 도 2A는 렌티바이러스 형질도입 후 골수세포의 표면상에서 발현된 CAR19z를 도시하는 그래프이다. CAR19z 렌티바이러스를 3배 희석인자로 적정하고 사용하여 1e5/0.1 ml mRFP + THP1 세포를 형질도입시켰다. mRFP는 상기 골수세포주 THP1의 렌티바이러스 형질도입에 의해 발현된 리포터 유전자(적색 형광 단백질)이다. 상기 세포는 화학적 PMA에 노출시 대식세포로 분화하도록 유도될 수 있다. THP1 세포를 형질도입-24시간 후에 수확하고 비오틴화된-단백질 L에 이어서 스트렙트아비딘-APC로 CAR 표면 발현에 대해 염색하였다. 형질도입된 THP1 세포를 확대시키고 FACS에 의해 분류하여 100% CAR19z 양성 mRFP + THP1 하위계통을 생성시켰다(도 2B). 도 2C는 THP1 대식세포상의 항-CD19, 항-HER2, 및 항-메소텔린 렌티바이러스 CAR 구조물의 발현을 나타내며, 이때 CAR(+) 사건은 상부 우측 사분면에 있다.
- [0238] 도 3A는 THP1 대식세포 모델, 1 ng/ml 포르볼 12-미리스테이트(PMA)에 의한 분화, 및 시험관내 식균작용 분석을 사용하는 CARMA 하위계통 생성의 개요를 도시하는 흐름도이다. 형광 현미경검사 기반 식균작용 분석에 의해 입증된 바와 같은, 각각 CD19, HER2, 또는 메소텔린을 발현하는 항-CD19, 항-HER2, 및 항-메소텔린 CAR 대식세포(야생형(Wt) 대식세포는 아님), 포식된 K562 종양세포(도 3B 내지 3D). CARMA 종양 식균작용이 유식 세포측정 기반 분석에 의해 추가로 확인되었으며, 여기에서 CD19에 대한 mRFP+ CARMA가 CD19+ GFP+ K562 세포와 공-배양되었고 이중 양성 사건들이 정량분석되었다(전형적인 FACS 플롯 도시됨 - 도 3E). CARMA 식균작용 기능의 집계분석에 사용된 표준 10x 시야는 mRFP 단독(도 3F) 또는 오버레이(도 3G)를 도시한다. FACS 기반 mRFP/GFP 이중 양성 사건들이 포식 사건으로서 정의되고 그대로 암니스 이미지스트림(Amnis Imagestream) FACS 분석에 의해 확인되었다. 도시된 사건들은 이중 양성 사건에 대해 통문되고 암니스 이미지스트림 식균작용-미란 알고리즘에 의해 높은 곳에서 낮은 곳으로 정렬된다(도 3H). THP-1 세포주 모델에서 mRFP+ CARMA에 의한 종양 세포의 식균작용이 공초점 현미경검사에 의해 추가로 입증되었으며, 이는 GFP+ 종양 세포가 3-차원 공초점 z-스택 복원을 통해 파고솜내에 완전히 둘러싸였음을 입증한다(도 3I 및 3J). 도 3K는 시간에 따른 단일 CARMA 세포의 운명을 입증하는 일련의 상으로 - 접촉 및 면역학적 시냅스 형성이 첫 번째 단계이며, 이는 포식성 탐식, 세포사의 마커로서 GFP의 상실을 사용하는 종양의 분해, 파고솜 봉괴, 및 파고솜 수복을 유도한다 - CARMA가 종양 세포 식균작용 후 생존함을 입증한다. 도 3L은 한 번에 다수의 종양 세포를 다중 포식하는 CARMA의 능력을 입증한다.
- [0239] 항-CD19 CAR 대식세포를 CD19+(표적) 또는 CD19-(대조용) GFP+ K562 종양 세포에 대한 시험관내 식균작용 분석

을 사용하여 시험하였다. CARMA의 항원 특이성을 입증하며, 오직 항원-함유 종양 세포만이 포식되었다(도 4A). CARMA 기능에서 세포내 신호전달 도메인의 필요성을 입증하기 위해서, CAR19- $\Delta$ ζ 구조물(세포내 신호전달 도메인이 없음)을 사용하였다. CAR19- $\Delta$ ζ 대식세포는 종양세포를 포식하지 못하였으며 시험관내 루시페라제 기반 비용해 분석을 통해 항-종양 기능을 현저하게 감소시켰다(도 4B 및 4C). 시험관내 CARMA 식균작용 분석을 R406(Syk 억제제), 사이토칼라신 D(액틴 중합 억제제), 또는 블레비스타틴(비-근육 미오신 IIA 억제제)의 존재 하에서 수행하였다. R406, 사이토칼라신 D 및 블레비스타틴은 CARMA의 포식 기능을 독립적으로 무효화하며, 이는 대식세포에서 CAR 신호전달이 Syk 의존적이고 액틴 중합 및 NMIIA 매개된 포식 기능을 생성시킴을 가리킨다(도 4D 내지 4F).

[0240] 도 5A는 아이소타입 대조용과 비교하여 표적 종양 세포주상에서 CD47의 발현을 도시하는 유식 세포측정 그래프이다. K562 및 K562-CD19+ (K19)가 상기 실험들에 사용되었으며, 이들은 둘 다 높은 CD47 발현 세포주이다.

[0241] 도 5B는 항-CD47 단클론 항체의 첨가가 표적 항원 함유 종양 세포의 CAR(Wt는 아님) 대식세포 매개된 식균작용을 선택적으로 증대시켰음을 도시하는 그래프이다. Wt 또는 CAR19 ζ 대식세포를 0, 0.01, 0.10, 1.00 또는 10.0 mcg/ml 항-CD47 단클론 항체와 함께 CD19+ K562 종양 세포와 배양하였다.

[0242] 도 5C는 항-SIRP α 단클론 항체의 첨가가 표적 항원 함유 종양 세포의 CAR(Wt는 아님) 대식세포 매개된 식균작용을 선택적으로 증대시켰음을 도시하는 그래프이다. Wt 또는 CAR19 ζ 대식세포를 0, 0.01, 0.10, 1.00 또는 10.0 mcg/ml 항-SIRP α 단클론 항체와 함께 CD19+ K562 종양 세포와 배양하였다.

[0243] 도 5D는 항-SIRP α 단클론 항체에 의한 CD47/SIRP α 축의 봉쇄가 CAR 대식세포에 의한 다중포식(한 번에 2개 이상의 종양 세포를 탐식한 대식세포로서 정의됨)을 증대시켰음을 입증하는 그래프이다.

[0244] 상기 CD47/SIRP α 차단 단클론 항체에 의한 가중된 옵소닌작용을 억제하기 위해서, 대조용 항-CD47 단클론 항체(클론 2D3)(CD47에는 결합하지만 상기 CD47 대 SIRP α 결합 부위는 차단하지 않는다)를 시험관내 식균작용 분석에 사용하였다. 오직 상기 결합 부위를 차단한 클론(항-CD47, 클론 B6H12) 또는 상기 SIRP α 수용체의 봉쇄만이 CARMA 종양 식균작용의 증대를 직접적으로 유도한다(도 5E).

[0245] CAR 대식세포상의 CD47/SIRP α 축의 봉쇄가 항원 특이성의 상실을 유도하는지의 여부를 시험하기 위해서, 항원-음성(CD19 음성) 종양 세포에 대한 시험관내 식균작용을 항-CD47 또는 항-SIRP α 단클론 항체의 존재하에서 수행하였으며, 관찰가능한 식균작용은 존재하지 않았다(도 5F).

[0246] THP1 대식세포상의 SIRP α 수용체를 녹아웃시키고 항-SIRP α 항체의 부재 또는 존재하에서 CARMA 또는 SIRP α-KO CARMA에 의한 종양 식균작용을 비교함으로써 SIRP α 차단 단클론 항체 존재하에서의 CARMA 포식 증대의 특이성을 시험하였다. CRISPR/Cas9가 SIRP α 결실에 사용되었으며, 세포는 기능 분석에 앞서 SIRP α 음성에 대해 분류되었다. SIRP α 녹아웃은 CARMA 기능을 증대시켰으며, 상기 녹아웃 세포에 다시 항-SIRP α의 부가는 식균작용을 추가로 증대시키지 못하였다(도 5G).

[0247] 도 6A는 48시간째에 용량 의존적인 방식의 시험관내 루시페라제 기반 살해 분석에서 CAR19 ζ CARMA(Wt는 아님) 대식세포(THP-1 대식세포 모델 사용)에 의한 CD19+ GFP+ 루시페라제+ K562 세포의 비용해를 나타낸다.

[0248] 도 6B는 48시간째에 용량 의존적인 방식의 시험관내 루시페라제 기반 살해 분석에서 CAR19 ζ 또는 Wt THP-1 단핵세포(미분화된, 따라서 대식세포라기보다는 단핵세포의 모델)에 의한 종양세포의 비용해를 입증하는 그래프이다.

[0249] 도 6C는 10 mcg/ml 항-SIRP α 단클론 항체의 부재 또는 존재하에서 시험관내에서 Wt 또는 CAR19 ζ 대식세포와 48-시간 공-배양 후, 루시페라제 양성 CD19+ K562 종양 세포로부터 유래된, 루시페라제 구동된 생물발광을 도시하는 상들의 패널이다. 도 6D는 Wt 또는 CAR19 ζ 대식세포 +/- 항-SIRP α 단클론 항체의 비용해를 입증하는 그래프이다.

[0250] Fc ε RI 공통 γ (CAR19 γ, CARMA19 γ) 서브유닛 세포내 도메인을 갖는 CAR 구조물을 생성시키고, 렌티바이러스내에 패키징시키고, 3배 연속 바이러스 희석으로 사용하여 THP-1 골수세포를 형질도입시켰다. CAR19 γ는 THP-1 대식세포상에서 발현되었다(도 7A).

[0251] CAR19 γ 대식세포 또는 CAR19 ζ 대식세포를 100% CAR 양성에 대해 분류하고 시험관내 기능 특성화에 사용하였다. CAR19 ζ 및 CAR19 γ 대식세포는 둘 다 CD19+ 종양세포를 포식하였으며, 둘 다 항-SIRP α 단클론 항체의 첨가에 의해 CD47/SIRP α 축의 봉쇄와 상승작용을 나타내었다(도 7B).

- [0252] R406 Syk 억제 시험관내 식균작용 분석에서 입증된 바와 같이, CAR19  $\zeta$  및 CAR19  $\gamma$  대식세포는 둘 다 Syk를 통해 신호를 전달하여 종양 식균작용을 구동하였다(도 7C).
- [0253] CAR19  $\zeta$  및 CAR19  $\gamma$  THP1 대식세포(Wt THP1 대식세포는 아님)가 모두 다양한 E:T 비로 24시간 공-배양 후 시험관내 루시페라제-기반 비용해 분석에서 CD19+ 종양 세포를 효율적으로 살해하였다(도 7D).
- [0254] 고유 면역계의 백혈구로서 대식세포는 구성적으로 발현된 병원체 인식 수용체를 통해 감염의 보존된 문자 신호, 예를 들어 병원체 관련된 문자 패턴에 반응한다. 톨형 수용체가 가장 잘 특성화된 병원체 인식 수용체이며, 대식세포를 활성화시키는 것으로 공지되어 있다.
- [0255] CARMA의 종양 포식 기능을 증대시키기 위해, 독립적으로 TLR1-9에 대한 리간드로 초회항원자극된 CAR 대식세포, 또는 대조용 배지를 사용하여 시험관내 식균작용 분석을 수행하였다. TLR1, 2, 4, 5 및 6에 대한 리간드가 CARMA의 포식 기능을 증대시켰다(도 8A). 이는 TLR 리간드가 상기 생성 과정 동안 CARMA를 초회항원자극하는데 사용될 수 있거나, 또는 TLR 신호전달 도메인이 상기 CAR 구조물로 암호화되어 신규의 제2/후속 세대 CARMA 구조물로서 CAR 신호전달 및 하류 효과기 기능을 증대시킬 수 있음을 암시한다.
- [0256] 도 8B 및 도 8C는 종양 세포의 CARMA 식균작용을 증대시키거나 증대시키지 않는 TLR 리간드간의 차이가 TLR3 또는 TLR6 리간드의 넓은 농도 범위에서 정말로 유지됨을 입증한다.
- [0257] 효모 생성물인  $\beta$ -글루칸은 대식세포의 표면상의 텍틴-1에 결합하여 활성화 및 효과기 기능을 생성시킨다. CARMA 기능을 증대시키는  $\beta$ -글루칸의 능력을 시험하기 위해서, 시험관내 종양 식균작용 분석을 5 mcg/ml  $\beta$ -글루칸의 부재 또는 존재하에서 수행하였다.  $\beta$ -글루칸은 CAR(그러나 Wt는 아님) 대식세포의 포식 능력을 증대시켰다(도 9A).
- [0258] CARMA 종양 살해를 증대시키는  $\beta$ -글루칸의 능력을 시험하기 위해 0, 0.5, 5 또는 50 mcg/ml  $\beta$ -글루칸의 존재하에서 다양한 효과기(E):표적(T)비로 시험관내 루시페라제 기반 비용해 분석을 수행하였다.  $\beta$ -글루칸은 CAR(그러나 Wt는 아님) THP-1 대식세포에 의한 항원 함유 종양 세포의 비용해를 증대시켰다(도 9B). 이들 결과는  $\beta$ -글루칸이 CARMA의 생성 과정 동안 항원보강제로서 사용될 수 있거나, 또는 텍틴-1 세포내 신호전달 도메인이 CAR 트랜스유전자로 암호화될 수 있음을 가리킨다.
- [0259]  $\beta$ -글루칸이 CARMA의 기능을 증대시켰음을 고려하여, 텍틴-1 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 CAR 구조물이 생성되었다(도 10A). 이들 구조물은 렌티바이러스내에 패키징되고 렌티바이러스 역가의 3배 연속 희석으로 THP-1 골수세포를 형질도입시키는데 사용되었다. CAR이 CD8TM-텍틴1 CAR 및 텍틴TM-텍틴1 CAR 구조물 모두의 표면상에서 검출되었다(도 10B 및 10C). 세포를 100% 양성에 대해 분류하였으며 하류 시험관내 기능 실험에 사용하였다.
- [0260] CD8TM-텍틴1 CAR 및 텍틴TM-텍틴1 CAR 대식세포를 시험관내 루시페라제 살해 분석에서 시험하였다. 상기 두 구조물은 모두 종양세포의 비용해를 입증하였다(10D).
- [0261] 텍틴1-CAR 대식세포를 K562(대조용) 또는 K19(표적) 종양세포에 대한 시험관내 종양 식균작용 분석에서 시험하였으며, 텍틴1-CAR 대식세포는 동족-항원 함유 종양 세포를 선택적으로 포식하였다(도 10E). 텍틴-1 CAR 대식세포는 다수의 종양 세포의 식균작용 능력을 나타내었다(도 10F).
- [0262] 시험관내 종양 식균작용 분석에서, 텍틴1-CAR 대식세포는 SIRP  $\alpha$ 의 봉쇄, 또는 TLR 리간드에 의한 초회항원자극과 상승작용을 나타내었다(도 10G).
- [0263] 도 11A는 아이소타입 대조용과 비교된 3개의 상이한 CD19+ 표적 세포주에서 칼레티큘린 수준을 도시하는 그래프이다. 도 11B는 3개의 상이한 CD19+ 표적 세포주에서 칼레티큘린 발현의 표준화된 평균 형광 강도를 도시하는 그래프이다.
- [0264] 도 11C는 낮은 수준의 칼레티큘린이 CAR19z 대식세포 식균작용으로부터 표적 세포, 구체적으로 Nalm6 및 JEKO 세포주를 보통으로 보호함을 도시하는 그래프이다. 상기 데이터는 칼레티큘린 침착/유도의 이용이 추가적인 주성으로 사용되어 CARMA 효과기 기능을 증대시킬 수 있음을 암시한다.
- [0265] 1차 인간 단핵세포 유래된 대식세포에서 CAR의 기능을 확인하고 시험하기 위해서, 다수의 유전자 전달 접근법들을 시험하였다. 도 12A에서, 항-HER2 CAR 구조물을 mRNA 발현 플라스미드내로 클로닝하고, 시험관내에서 전사시켰으며, 상기 mRNA를 1차 인간 단핵세포내로 직접 전기천공시켰다. 도 13A는 통문 전략, 생육력, 및 모의 전기천공된 세포와 비교된 84.3%의 형질감염 효율을 나타낸다. 도 12B는 79.7%의, 1차 인간 단핵세포 유래된 대

식세포(완전히 분화된)내로의 항-HER2 CAR mRNA 전기천공 효율을 나타낸다.

[0266] 도 12C는 mRNA 전기천공이 단핵세포 및 대식세포 모두의 높은 CAR 형질감염 효율을 생성시키는 반면, CAR 발현은 mRNA 분해로 인해 일시적이었으며, 2일째에 절정이었다가 시험관내 전기천공 후 7일까지 소멸됨을 도시하는 그래프이다.

[0267] NSGS 마우스에게 IP 주사를 통해 HER2+ 난소암의 전이성 복강내 암종증의 모델인, 1E6 SKOV3 CBG/GFP+ 인간 난소암 세포를 주사하였다. 마우스에게 모의 전기천공된 또는 항-HER2 CAR mRNA 전기천공된 1차 인간 단핵세포 또는 1차 인간 대식세포(1:1 E:T 비)가 동시에 주사되었으며 종양 크기가 영상화되었다. CAR 대식세포(도 13A) 및 CAR 단핵세포(도 13B)는 대략 2주에 걸쳐 종양 성장의 약간의 감소를 나타내었다. 종양 크기가 생물발광에 의해 정량분석된 첫 번째 시점은 처리-후 24시간째였으며, 이는 CAR 단핵세포 및 대식세포가 처음 24시간 후에 활성을 가졌음을 입증한다.

[0268] 다수의 CAR 구조물을 사용하여 1차 인간 단핵세포 유래된 대식세포로의 CAR 트랜스유전자의 렌티바이러스 전달을 시험하였다. 도 14A에서, CAR19는 렌티바이러스 형질도입을 통해 인간 대식세포로 전달되었으며, 이는 대조용 대 CAR19 렌티바이러스(MOI 10) 그룹에서 각각 4.27% 및 38.9% 형질도입 효율을 나타내었다. FACS 통문 전략을 도시한다.

[0269] 도 14B는 1차 인간 대식세포에서 항-HER2 CAR의 발현을 도시하는 전형적인 FACS 플롯으로, 대조용 및 MOI 10 CAR LV 조건간에 각각 1.47 및 18.1% 형질도입 효율을 갖는다.

[0270] 7일 동안 GM-CSF 순화배지에서 CD14+ 선택된 세포(정상적인 공여자 성분채집술 생성물로부터)를 분화시킴으로써 단핵세포 유래된 대식세포를 생성시켰다. 렌티바이러스 형질도입을 통한 CAR의 전달을 최적화하기 위해서, 항-CD19 및 항-HER2 렌티바이러스를 사용하여 상기 단핵세포에서 대식세포로의 분화 과정의 상이한 시점들에서 대식세포를 형질도입시켰다. 형질도입 효율은 항-CD19 및 항-HER2 CAR 구조물 모두에 대해, 형질도입 중간점(4일)에서 절정이었다(도 15A 및 15B). 항-CD19 CAR 1차 인간 대식세포를 CD19+ GFP+ K562 종양 세포에 대한 시험관내 FACS 기반 식균작용 분석에 사용하였으며, 이때 CD11b+/GFP+ 사건을 포식사건으로서 정의한다. 도 15A에서와 같이 상이한 시점들에서 형질도입된 대식세포를 상기 분석에 사용하였다. 도 15C는 식균작용의 효능이 CAR 형질도입 효율에 따라 기울며, 분화 과정 중 4일째에 대식세포 형질도입이 절정임을 나타낸다.

[0271] 1차 인간 대식세포로 트랜스유전자를 전달하기 위한 선택적인 형질도입 접근법을 시험하였으며, 이때 mRNA 전기천공은 일시적이었고 렌티바이러스는 단지 보통으로 효율적이었으며 높은 역가가 요구되었음이 고려되었다. 아데노바이러스(재조합, 복제 결합)는 1차 인간 대식세포 형질도입에 효율적인 접근법으로서 확인되었다. 콕삭키 아데노바이러스 수용체(Ad5에 대한 도킹 단백질) 및 CD46(Ad35에 대한 도킹 단백질)의 발현을 1차 인간 대식세포상의 아이소타입 대조용과 비교 시험하였으며, CD46(콕삭키 아데노바이러스 수용체는 아님)이 고도로 발현되었다(도 16A). 따라서, 키메릭 Ad5f35 아데노바이러스가 1차 인간 대식세포 형질도입에 사용되었으며, HER2에 대한 키메릭 항원 수용체(GFP 및 빈 Ad5f35 바이러스가 대조용으로서 사용되었다)를 발현하도록 표준 분자생물학 기법을 통해 조작되었다.

[0272] 도 16B는 1000의 MOI에서, Ad5f35가 트랜스유전자(GFP가 모델 트랜스유전자로서 사용되었다)를 인간 대식세포내로 유효하게 전달하였으며, IVIS 스펙트럼상에서 GFP 신호 정량분석에 의해 모니터된 바와 같이 발현이 시간에 따라 상승됨을 도시한다. 도 16C는 10,000 이하의 넓은 범위의 MOI에 걸쳐 상이한 시점들에서 1차 인간 대식세포의 형질도입 동역학을 비교한다.

[0273] 도 16C는 넓은 범위의 바이러스 MOI에서, 형질도입 후 48시간째에 Ad5f35 형질도입된 인간 대식세포상에서의 항-HER2 CAR 발현의 전형적인 FACS 플롯을 도시한다.

[0274] 도 16D는 Ad5f35-GFP 형질도입된 1차 인간 대식세포의 전형적인 형광 현미경검사상을 도시하며, 최고의 형질도입 효율이 1000의 MOI에서 입증된다.

[0275] FACS 분석을 통해 시험관내 식균작용 분석에서 1차 인간 CARMA를 시험하였다. 대식세포(형질도입되지 않았거나 항-HER2 CAR)를 GFP+ SKOV3 난소암 세포와 공-배양 전에 DiI로 염색하였다. DiI/GFP 이중 양성 사건에 의해 정의된 식균작용이 CAR 그룹에서 26.6% 및 대조용 그룹에서 4.55%의 수준으로 측정되었다(도 17A). 상기 DiI/GFP 이중 양성 사건이 포식 사건이고 이중이 아님을 확인하기 위해서, 사이토칼라신 D(식균작용 억제제)를 상기 실험 부문에 가하였으며, 완전히 무효화된 CAR이 식균작용을 1.74%로 낮게 매개하였다. 1차 인간 CAR 대식세포가 종양 세포를 포식할 수 있음을 추가로 확인하기 위해서, 이중 양성 사건을 암니스 이미지스트림 FACS에 의해 통문하고 암니스 식균작용-미란 알고리즘에 의해 높은 곳에서 낮은 곳으로 정렬시켰으며, 이는 상기 이

중 양성 사건이 식균작용을 나타냄을 시작적으로 입증한다(도 17B). 또한, DiI 염색된 CAR-HER2 대식세포를 SKOV3-GFP와 공-배양하였으며 공초점 현미경에 의해 영상화하고 식균작용을 확인하였다.

[0276] 항-HER2 CAR 1차 인간 대식세포를 단핵세포 유래된 대식세포의 Ad5f35-CAR 형질도입을 사용하여 생성시켰다. 상기 세포(또는 대조용의 형질도입되지 않은 세포)를 SKBR3 인간 유방암 세포의 시험관내 FACS 기반 식균작용 분석에서 효과기로서 사용하였다. 도 18은 CAR(UTD는 아님) 인간 대식세포가 유방암 세포를 포식함을 나타낸다. 또한, 항-SIRP $\alpha$  단클론 항체의 첨가는 유방암 세포의 CARMA(UTD는 아님) 대식세포 식균작용을 증대시켰다. 상기 결과는 THP-1 모델에서 CARMA에 의해 관찰된 CD47/SIRP $\alpha$  측의 봉쇄간의 상승작용이 1차 인간 대식세포 연구로 해석됨을 입증한다.

[0277] 대식세포는 고유 면역계의 백혈구이며 따라서 감시 항균 성질을 갖는다. CAR 대식세포가 항균의 의미에서 여전히 기능적으로 타고난 면역세포이며 감염성 자극에 반응하는 능력을 상실하지 않았음을 입증하기 위해서, 대조용의 형질도입되지 않은 또는 CAR 대식세포를 FACS 기반 이 콜라이 식균작용 분석에 사용하였다. 도 19는 CARMA가 pH-로도 그린 이 콜라이(Rodo Green E. Coli) 입자의 완전한 식균작용을 나타냄을 도시하는 전형적인 FACS 플롯이다.

[0278] 1차 인간 항-HER2 CARMA를 시험관내 루시페라제 기반 살해 분석에서 효과기 세포로서 시험하였다. 항-HER2 CARMA(대조용 UTD는 아님) 대식세포는 48시간의 공-배양 후 HER2+ K562 세포의 비용해를 유도하지만, HER2 발현이 없는 대조용 K562 세포는 아니다(도 20A). CARMA 살해가 생리학적 수준에서 HER2를 발현하는 종양 세포로 번역될 수 있음(렌티바이러스에 의해 형질도입되어 HER2를 과발현하는 K562-HER2와 상반되게)을 입증하기 위해서, SKBR3 유방암 세포 및 SKOV3 난소암 세포를 표적으로서 사용하였다. CARMA(대조용 UTD 또는 대조용 Empty Ad5f35는 아님) 형질도입된 대식세포는 48시간 공-배양 후 2개의 모델 모두에 대해 현저한 항-종양 활성을 가졌다(도 20B 및 20C). 살해 분석에서 CD47/SIRP $\alpha$  측의 봉쇄간의 상승작용을 시험하기 위해서, SKOV3 난소암 세포를 배지, 대조용의 형질도입되지 않은 대식세포, 항-HER2 CARMA, 항-HER2 CARMA + 항CD47 mAB(10 mcg/ml), 또는 항-HER2 CARMA + 항-SIRP $\alpha$  (10 mcg/ml)와 공-배양하고 루시페라제 신호를 연속해서 측정하였다. CARMA는 13일까지 완전한 종양 근절을 유도한 반면, 종양 근절의 동역학은 상기 CD47/SIRP $\alpha$  측의 봉쇄하에서 훨씬 더 빨랐다(도 20D).  $\beta$ -글루칸과의 상승작용(이는 THP-1 대식세포 CARMA 모델에서 입증되었다)을 유사한 실험에서 시험하였으며, 상기 CARMA의  $\beta$ -글루칸 초회항원자극은 증대된 종양 살해 동역학을 유도하였다(도 20E). CARMA의 LPS(TLR-4 리간드) 또는 폴리-IC(TLR-3 리간드)에의 노출이 항-종양 효과의 조절을 유도하였다(도 20F).

[0279] 도 20A 내지 20F에서, 시험관내에서 종양을 제거하는 1차 인간 CARMA의 능력을 루시페라제 분석에 의해 입증하였다. 상기 결과를 확인하기 위해서, GFP+ SKOV3 난소암 세포를 대조용 UTD 대식세포, 대조용 UTD 대식세포 + 10 mcg/ml 트拉斯투주맙, 대조용 빈 Ad5f35 바이러스 형질도입된 대식세포, 또는 항-HER2 1차 인간 CARMA와 공-배양하였다. CARMA(대조용 조건은 아님)는 종양 세포를 제거할 수 있었다(도 21).

[0280] 대식세포는 통상적으로 M1 및 M2 대식세포 분류로 분리되는 다양한 기능적 특징을 채용할 수 있는 표현형적으로 가소성인 세포이며, 이때 M1은 염증성/활성화된이고, M2는 면역억제성/종양-촉진성이다. Ad5f35 CAR 바이러스로 1차 인간 대식세포를 형질도입시킨 후 48시간째에, M1 마커 CD80/CD86의 용량 의존적인 상향 조절, 및 M2 마커 CD163의 용량 의존적인 하향-조절을 FACS에 의해 측정하였다(도 22A). 상기 효과가 CAR 발현의 결과인지 또는 Ad5f35 형질도입의 결과인지의 여부를 시험하기 위해서, 대식세포를 아무것도 없는 빈 Ad5f35, 또는 항-HER2 Ad5f35로 형질도입시켰으며, 빈/CAR Ad5f35는 동일한 패턴의 표현형 이동을 나타내었다(도 22B).

[0281] 고형 종양 미세환경은 일반적으로 면역억제성이며 M2 상태로 대식세포 분극을 유도할 수 있다. 바이러스 형질도입으로 인해 M1 분극된 CARMA가 M2에 대한 면역억제성 사이토kin 매개된 파괴에 내성인지의 여부를 시험하기 위해서, 대조용 형질도입되지 않은 또는 항-HER2 CAR 인간 대식세포를 SKOV3 난소암세포와의 공-배양에 앞서 24시간 동안 IL-4, IL-10 또는 IL-13에 노출시켰다. 억제성 사이토kin으로 컨디셔닝된 대조용 UTD 대식세포는 증대된 종양 성장을 유도한 반면, 억제성 사이토kin에 노출된 CARMA는 48시간째에 루시페라제 기반 시험관내 비용해 분석에서 그의 살해 활성을 유지하였다(도 22C).

[0282] 인간 CAR 대식세포의 면역억제에 대한 내성을 추가로 시험하기 위해서, 대조용 UTD, Empty Ad5f35, 또는 항-HER2 CAR Ad5f35 형질도입된 대식세포를 10 ng/ml의 IL-4, 표준 M2 유도 사이토kin, 또는 공-배양 중 대식세포가 M2로 파괴되었음을 앞서 나타낸 암세포(SKOV3, 난소암 세포주; HDLM2, 호지킨 림프종 세포주)에 노출시켰다. 대조용 UTD 대식세포는 CD206, STAT6 인산화를 통해 IL-4 자극에 특이적으로 반응하는 M2 마커를 상향조절하였다. Empty Ad5f35, 및 훨씬 CAR-Ad5f35 형질도입된 대식세포는 IL-4에 대한 내성 및 상기 M2 표현형으로의 종양 유도된 파괴를 나타내었다(도 22D).

- [0283] CAR 대식세포의 표현형을 추가로 특성화하기 위해서, 대사적 표현형을 산소 소비를 측정하는 해마 분석을 사용하여 탐침분석하였다. M2 대식세포는 APT 생산을 위한 산화성 인산화에 대한 보다 높은 의존성으로 인해, M0 또는 M1 대식세포보다 더 높은 기본 산소 소비율을 갖는다. 대조용 UTD 또는 항-HER2 CAR 대식세포는 24시간 동안 IL-4에 노출되어 M2로 분극되었으며(또는 그렇지 않았으며), 산소 소비율을 측정하였다. 대조용 UTD 대식 세포는 M2 대식세포의 특징적인 증가된 기본 산소 소비 특성을 나타낸 반면, CARMA는 IL-4에 반응하지 않았으며, 이는 상기가 M2 파괴에 대해 내성임을 암시한다(도 22E). 표현형, 대사 및 기능 분석을 사용하여 조합된 상기 데이터는 CARMA가 M2 파괴에 내성임을 예시한다.
- [0284] 1차 인간 정상 공여자 단핵세포(CD14 양성 선택을 통해 정제됨)를 0(UTD) 내지 1000 범위의 MOI에서 Ad5f35-CAR-HER2로 형질도입시켰다. CAR 발현을 형질도입 후 48시간째에 FACS를 통해 측정하였다. CAR 단핵세포는 Ad5f35로 효율적으로 생성되었으며, 발현은 1000의 MOI에서 절정이었다(도 23A 및 23B). 단핵세포는 1000 이하의 MOI에서 높은 생육력(FACS 생/사 아쿠아(Live/Dead Aqua) 분석에 의해 측정됨)을 유지하였다. CAR(그러나 형질도입되지 않은 것(UTD)은 아님) 인간 단핵세포는 FACS에 의해 분석된 바와 같이, M1 활성화 마커를 상향조절하였으며(도 23D) M2 마커를 하향조절하였고(도 23E), 이는 형질도입 후 48시간째의 M1 단핵세포 표현형을 나타낸다.
- [0285] 항-HER2 CAR 단핵세포 살해를 일련의 효과기:표적(E:T) 비에서 시험관내 루시페라제 기반 살해 분석을 통해 평가하였다. 형질감염되지 않은(UTD) 또는 CAR-HER2-제타(CAR) 단핵세포를 시험관내에서 HER2+ SKBR3(인간 유방암) 또는 HER2+ SKOV3(인간 난소암) 세포와 공-배양하였다. 비용해를 계산하고 공-배양의 개시 후 24, 48 및 96시간째에 측정하였다. CAR(그러나 UTD) 단핵세포는 시험관내에서 유방암 및 난소암 세포를 모두 용해시켰다(도 24A 및 24B).
- [0286] NOD-scid IL2Rg-null-IL3/GM/SF, NSG-SGM3(NSGS) 마우스를 생체내에서 인간 HER2(+) 난소암 이종이식편의 모델링에 사용하였다. 0일째에 마우스에게 고형암의 공격적인 선천적인 전이성 모델인 복강내 암종증의 모델로서 7.5E5 방아벌레 녹색 루시페라제(CBG luc) 양성/녹색 형광 단백질(GFP) 양성 SKOV3 난소암 세포를 복강내(IP) 주사하였다. 마우스를 처리하지 않거나(종양 단독) 또는 0일째에 IP 주사를 통해 단일 용량의 4E6 형질도입되지 않은(UTD) 또는 CAR-HER2(CARMA) 인간 대식세포를 주사하였다(개략도, 도 25A). 종양 크기의 대용물로서 생물발광(전체 플럭스; 광자/초)을 사용하여 마우스를 연속적으로 영상화하였다. CARMA 처리를 수용한 마우스는 대략 두자릿수의 종양 크기 감소를 가졌다(도 25B 및 25C). CARMA로 처리된 마우스는, 처리되지 않거나 또는 UTD 대식세포 처리된 마우스에 비해 30일 생존 이점(p=0.018)을 가졌다(도 25D). 대식세포의 고형 종양 결절내로의 수송을 입증하기 위해서, 종양을 36일째에 죽은 마우스로부터 수확하고, FACS 분석시 인간 CD45 발현을 통해 채용 전달된 인간 대식세포의 존재에 대해 평가하였다(도 25E).
- [0287] 인간 대식세포를 1000의 감염 배수에서 트랜스유전자가 없는 빈 Ad5f35 비리온(Empty) 또는 Ad5f35-CAR-HER2- $\zeta$  (CARMA)로 형질도입시키지 않거나(UTD) 또는 형질도입시켰다. 표면 CAR 발현을 형질도입 후 48시간째 FACS 분석에 의해 확인하였다(도 26A). 표면 마커들을 빈 Ad5f35 또는 CAR-HER2- $\zeta$  Ad5f35에 의해 형질도입된 세포에서 M1 대식세포 분극을 입증하기 위해 평가하였다. M1 마커(HLA DR, CD86, CD80, PDL1)는 상향조절된 반면 M2 마커(CD206, CD163)는 하향조절되었다(도 26B). NSGS 마우스를 다시 HER2+ 전이성 난소암의 IP 모델에 사용하였으며, 4개의 처리 부문(부문당 n=5)으로 분류하였다. 마우스를 처리하지 않은 채로 두거나 또는 0일째에 1E7 형질도입되지 않은, 빈-Ad5f35 형질도입된 대식세포, 또는 CAR-HER2- $\zeta$  형질도입된 대식세포의 IP 주사를 제공하였다(도 26C). 종양 이식후 27일째에 나타난 전형적인 데이터와 함께, 일련의 생물발광 영상화를 통해 종양 크기를 모니터하였다(도 26D 및 26E). CARMA 처리된 마우스는 처리후 20일째에, 처리되지 않은 마우스보다 대략 2,400배 적은 종양 크기를 가졌다.
- [0288] NSGS 마우스를 HER2+ 전이성 난소암의 IP 모델에 사용하고 4개의 처리 부문(부문당 n=5)(처리되지 않음, 및 0일째에 IP 투여된 3E6, 1E7, 또는 2E7 CAR-HER2- $\zeta$  인간 대식세포 포함)으로 분류하였다(도 27A). 종양 크기를 일련의 생물발광 영상화를 통해 모니터하고, 대식세포 수의 의존적인 용량 반응이 상기 모델에서 관찰되었다(도 27B). 마우스당 3E6, 1E7, 또는 2E7 대식세포의 단일 용량의 CAR-HER2 대식세포가 이식후 36일까지 용량 의존적인 종양 근절(처리되지 않은 마우스에 비해)을 유도하였다(도 27C).
- [0289] 도 28은 CARMA에 대해 제안된 치료학적 접근법의 도해이다. 간단히, 환자 단핵세포를 말초 혈액으로부터 선택하고, 생체외 분화시키고 형질도입시켜 CAR을 발현시키고, 상승작용성 화합물로 보조-자극하고(또는 하지 않고), 다시 환자에게 정맥내, 복강내, 종양내로, 중재적 방사선술을 통해, 또는 다른 경로에 의해 주사할 것이다. 중요하게, 상기 분화된 과정을 견너월 수 있으며 단핵세포를 형질도입시키고 상기 환자에게 다시 주입

할 수 있다. 상기 단핵세포 공급원은 또한 HLA 합치된 공여자일 수 있다.

#### [0290] 다른 실시태양들

본 명세서에서 변수의 임의의 정의에서 요소들의 목록의 인용은 상기 변수의 정의를 임의의 단일 요소 또는 나열된 요소들의 조합(또는 하위조합)으로서 포함한다. 본 명세서의 실시태양의 인용은 상기 실시태양을 임의의 단일 실시태양으로서 또는 임의의 다른 실시태양 또는 그의 일부와 함께 포함한다.

본 명세서에 인용된 모든 특허, 특히 출원, 및 공보의 명세는 내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된다. 본 발명을 특정한 실시태양을 참조하여 개시하였지만, 본 발명의 다른 실시태양 및 변화들이 본 발명의 진정한 진의 및 범위로부터 이탈됨 없이 당해 분야의 숙련가들에 의해 고안될 수 있음은 자명하다. 첨부된 청구항들을 모든 상기와 같은 실시태양 및 동등한 변화를 포함하는 것으로서 해석하고자 한다.

### 도면

#### 도면 1a

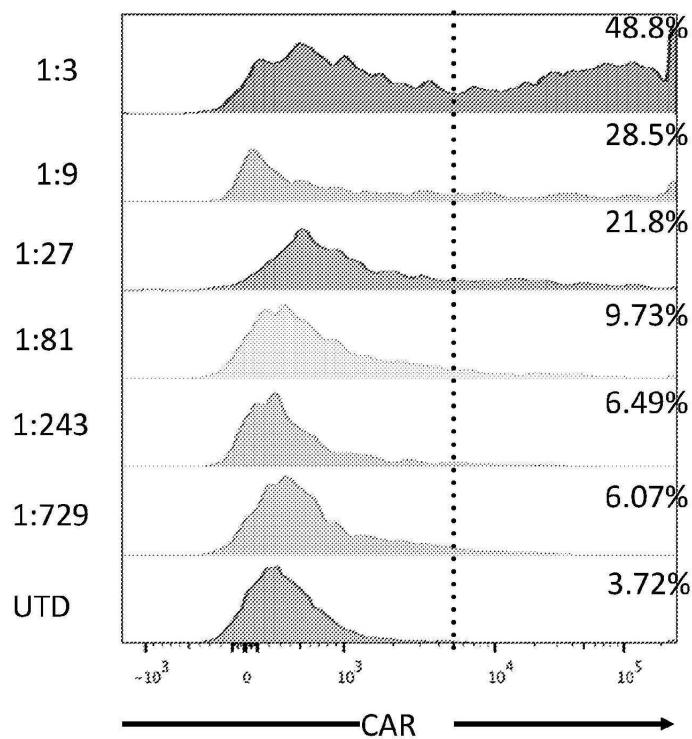
	세포외	TM	세포내	분비된/공-발현된
CARMA 개념 사이토킨	표적화 도메인(들)	신자 도메인(들)	TM 도메인 신호전달 도메인(들)	
CARMA	표적화 도메인(들)	신자 도메인(들)	TM 도메인 신호전달 도메인(들)	CAR(Cytokine)
mAb CARMA	표적화 도메인(들)	신자 도메인(들)	TM 도메인 신호전달 도메인(들)	mAb(s)/scFv(s)
pep CARMA	표적화 도메인(들)	신자 도메인(들)	TM 도메인 신호전달 도메인(들)	pep 상승식 풍선 펌터드
Enz CARMA	표적화 도메인(들)	신자 도메인(들)	TM 도메인 신호전달 도메인(들)	Enz 효소
DN CARMA	표적화 도메인(들)	신자 도메인(들)	TM 도메인 신호전달 도메인(들)	DN 우세한 음성 수용체
TAA CARMA	표적화 도메인(들)	신자 도메인(들)	TM 도메인 신호전달 도메인(들)	TAA 종양 관련 항원
CRISPR CARMA	표적화 도메인(들)	신자 도메인(들)	TM 도메인 신호전달 도메인(들)	CRISPR 유전자 편집

#### 도면 1b

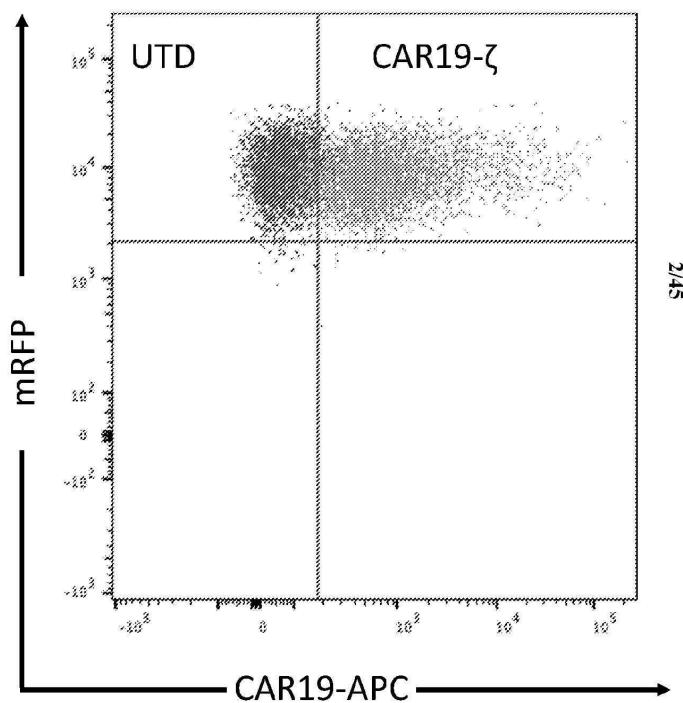
CARMA- $\zeta$	항원 특이성	CD8 Hinge	CD8 TM	CD3- $\zeta$
* CARMA- $\gamma$	항원 특이성	CD8 Hinge	CD8 TM	FCeRI- $\gamma$
CARMA-텍틴	항원 특이성	CD8 Hinge	CD8 TM	Dectin-1

\* 대식세포 CAR 구조물 설계의 구체적이지만 독점적이지 않은 예들

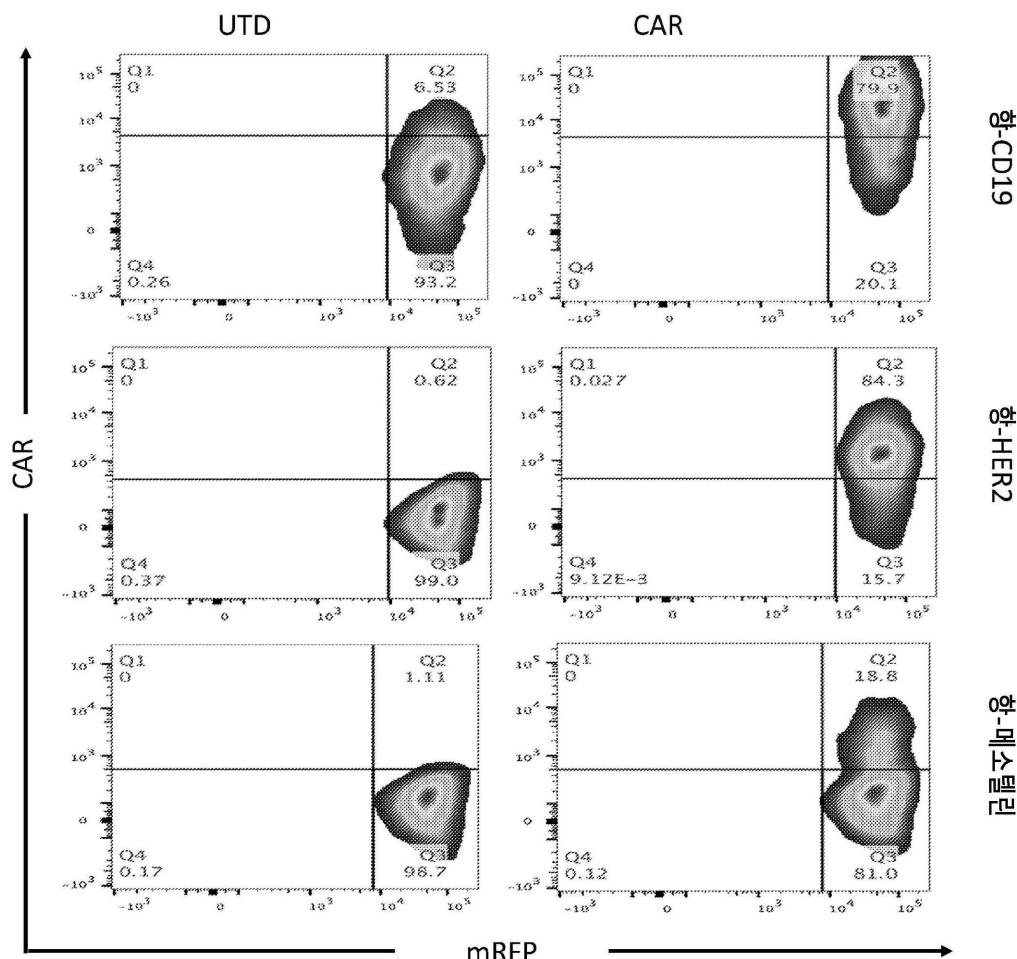
도면2a



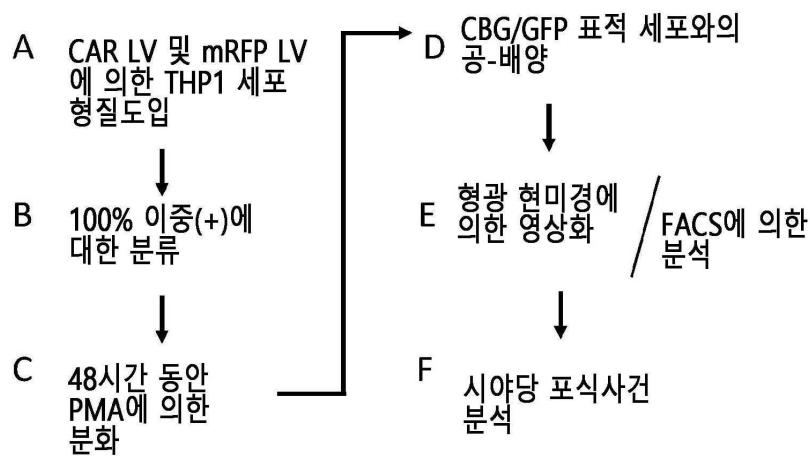
도면2b



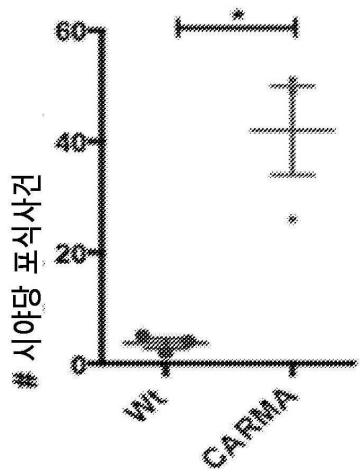
## 도면2c



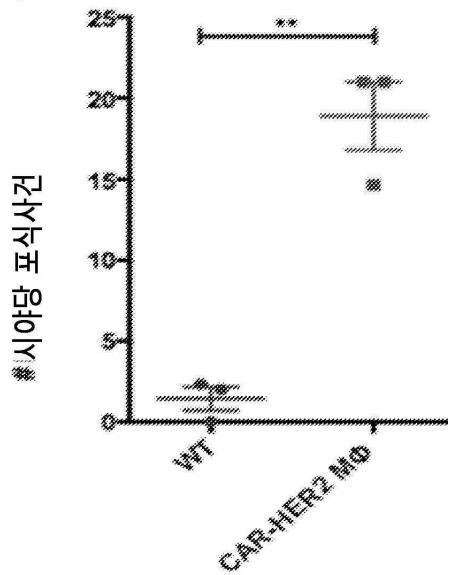
## 도면3a



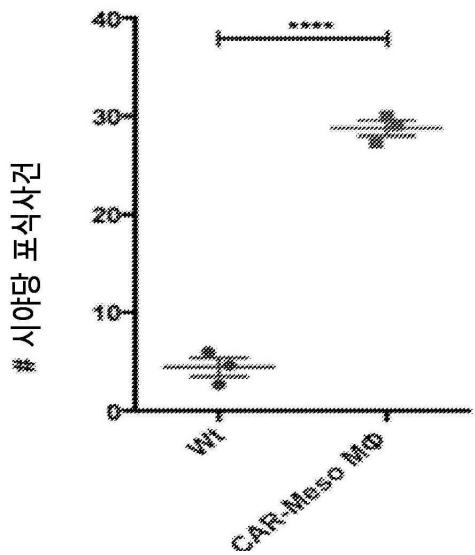
도면3b



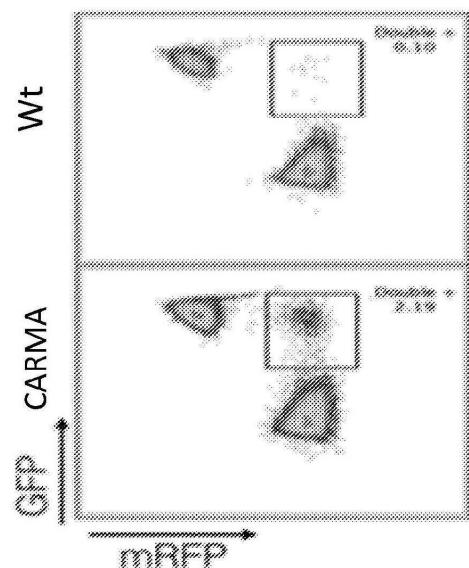
도면3c



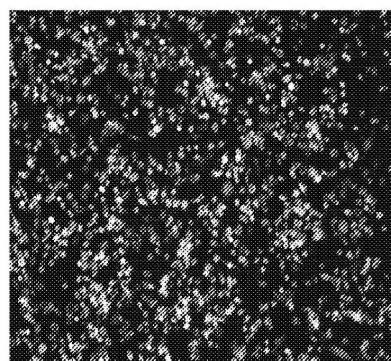
도면3d



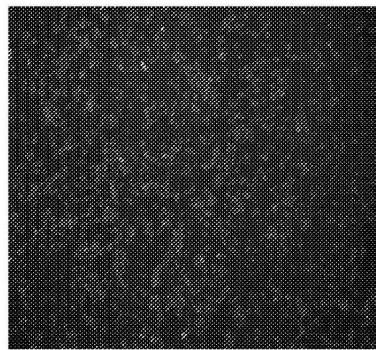
도면3e



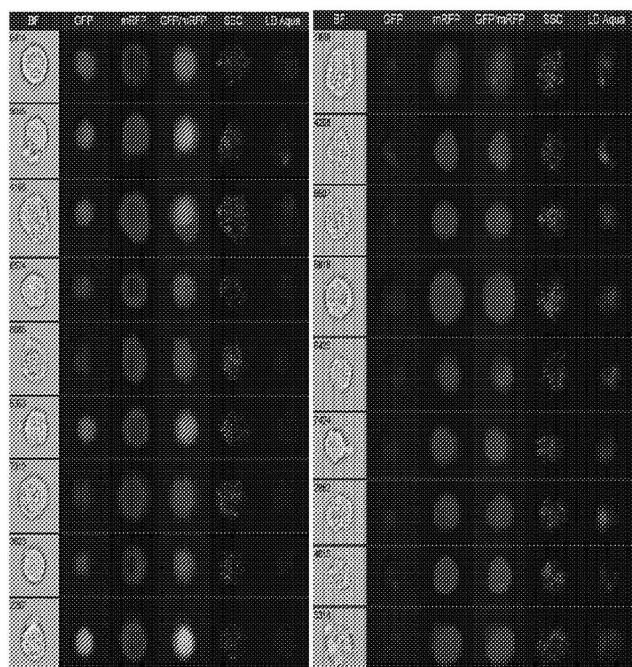
도면3f



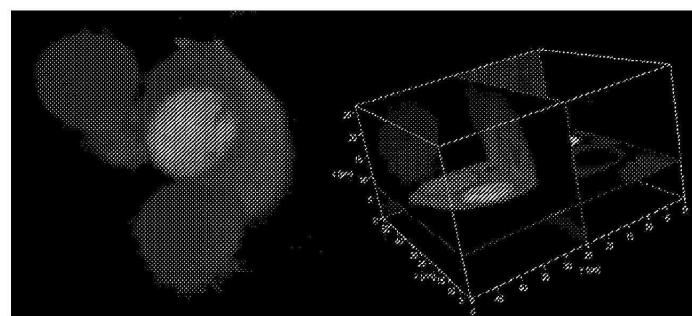
도면3g



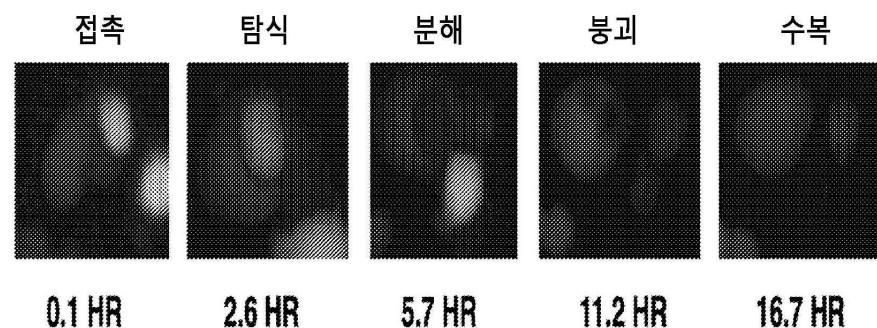
도면3h



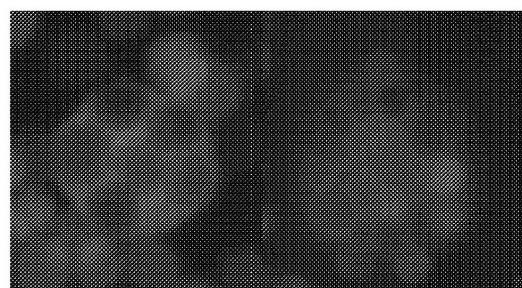
도면3i



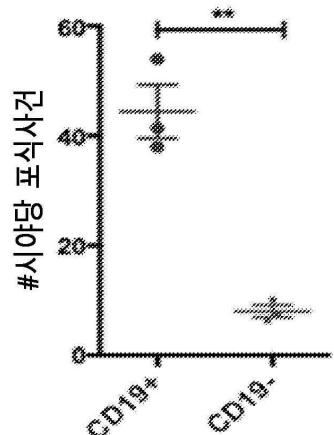
도면3j



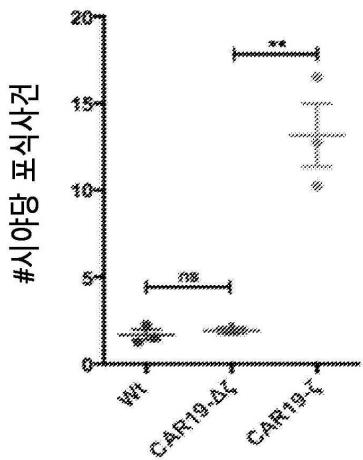
도면3k



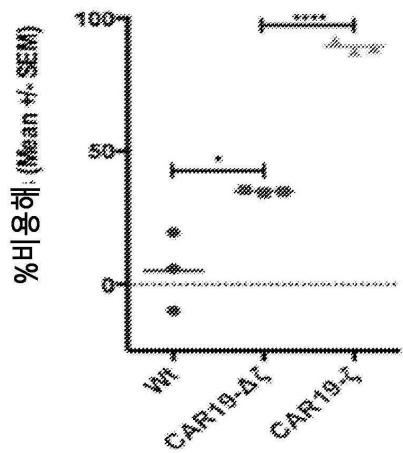
도면4a



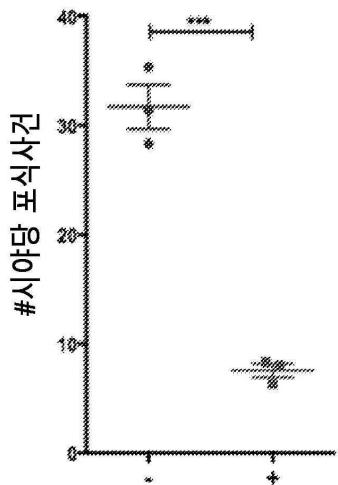
도면4b



도면4c

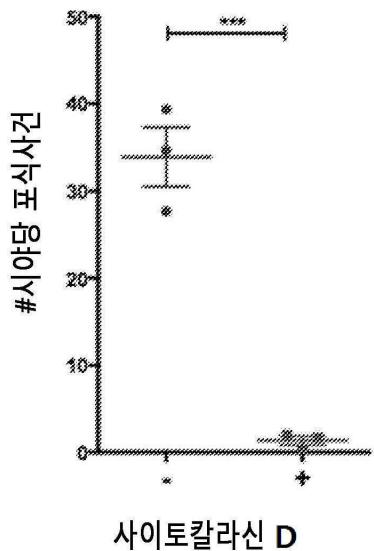


도면4d

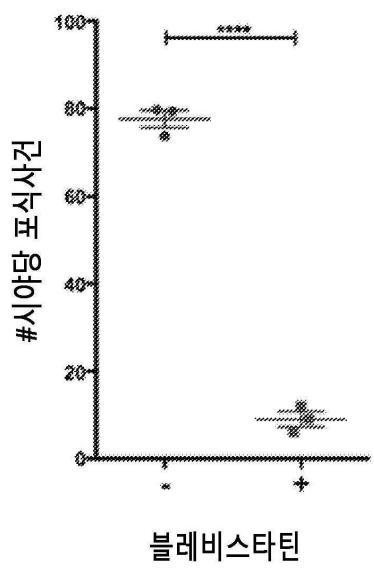


R406

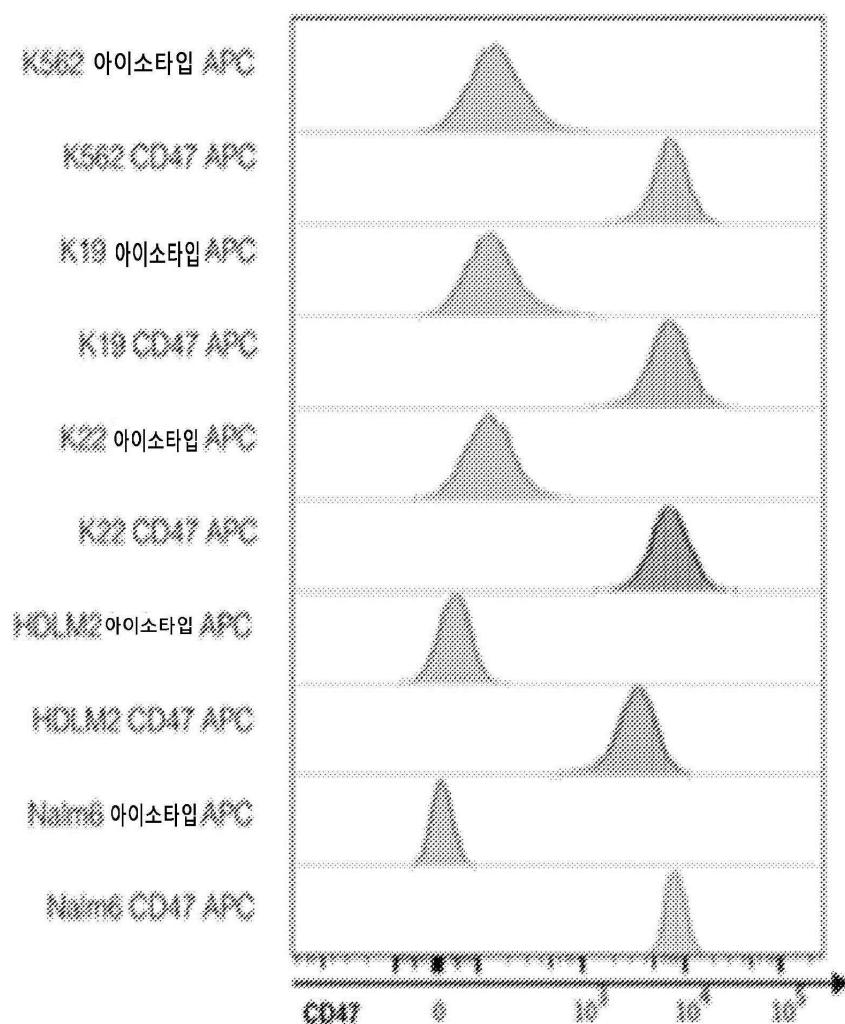
도면4e



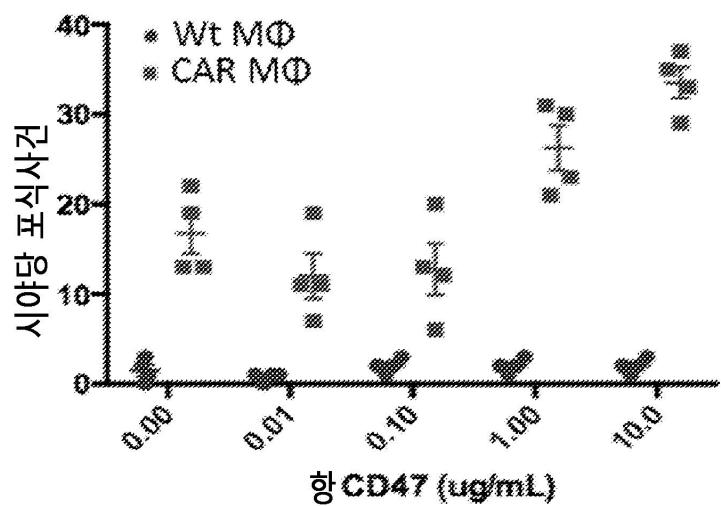
도면4f



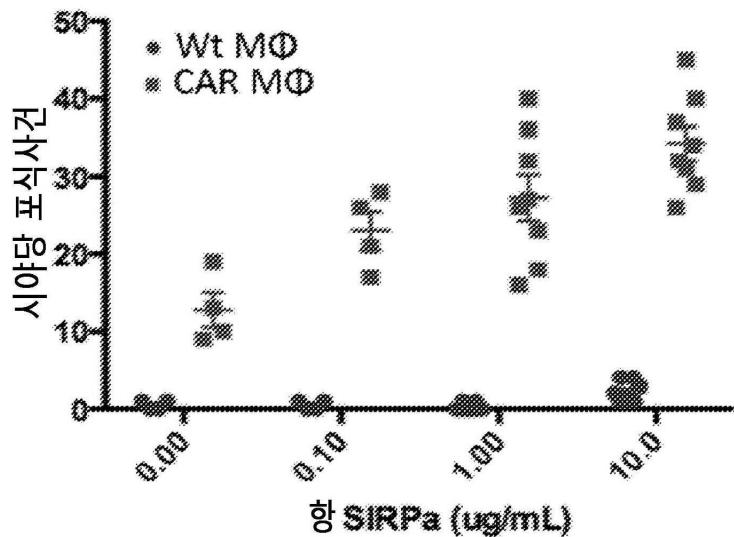
## 도면5a



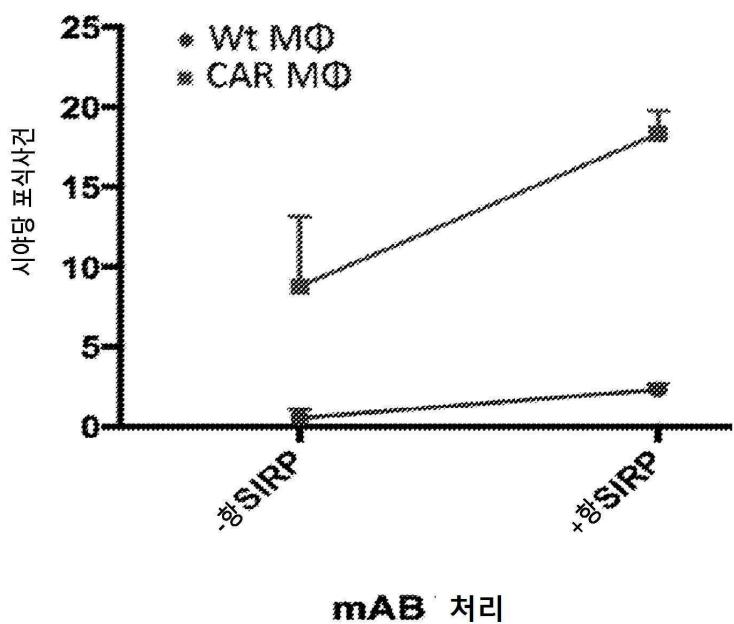
## 도면5b



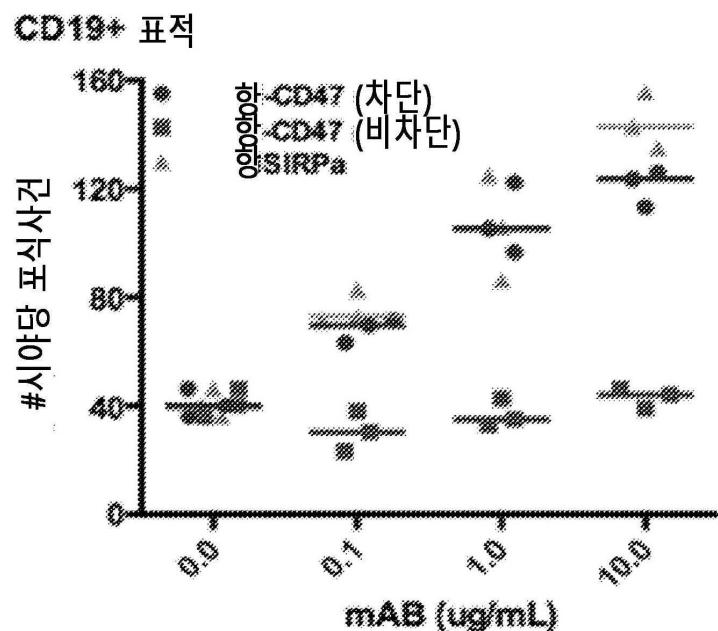
도면5c



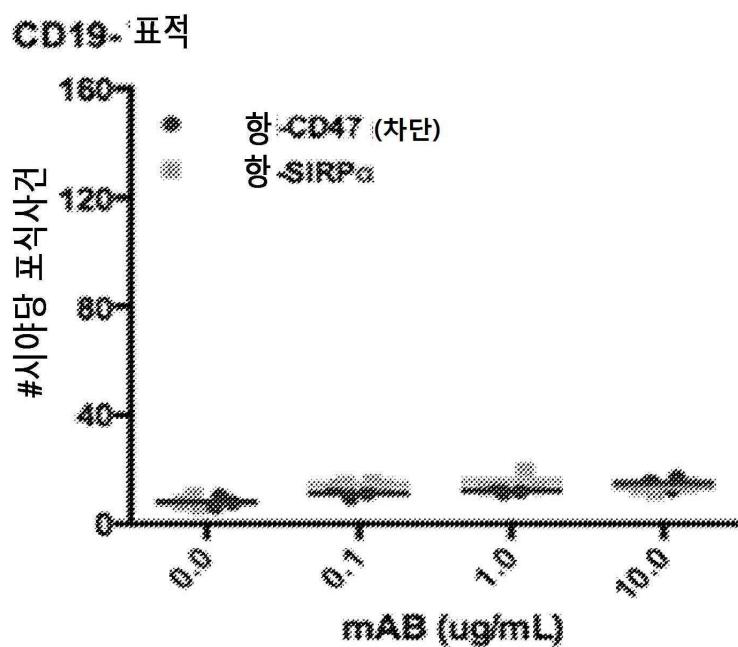
도면5d



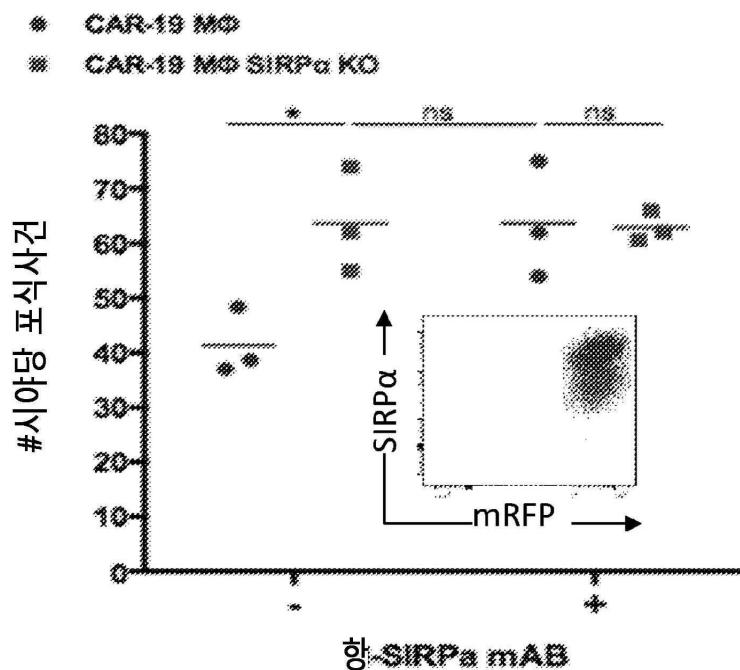
도면5e



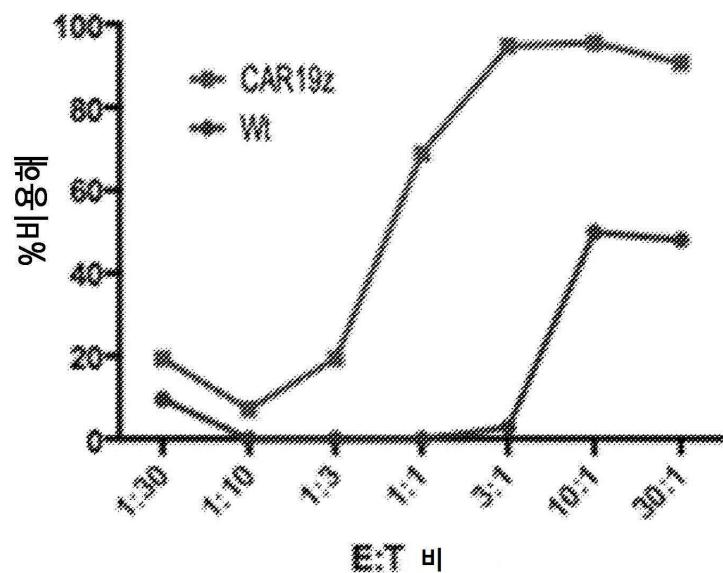
도면5f



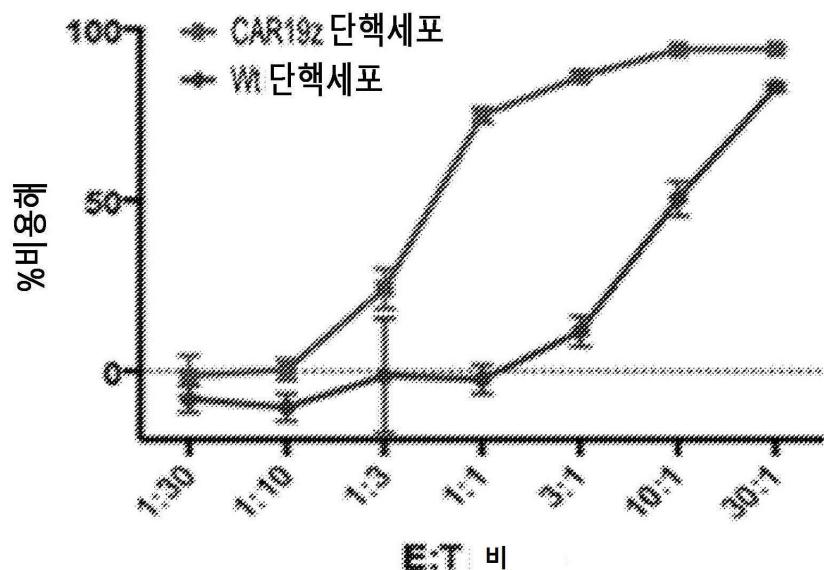
도면5g



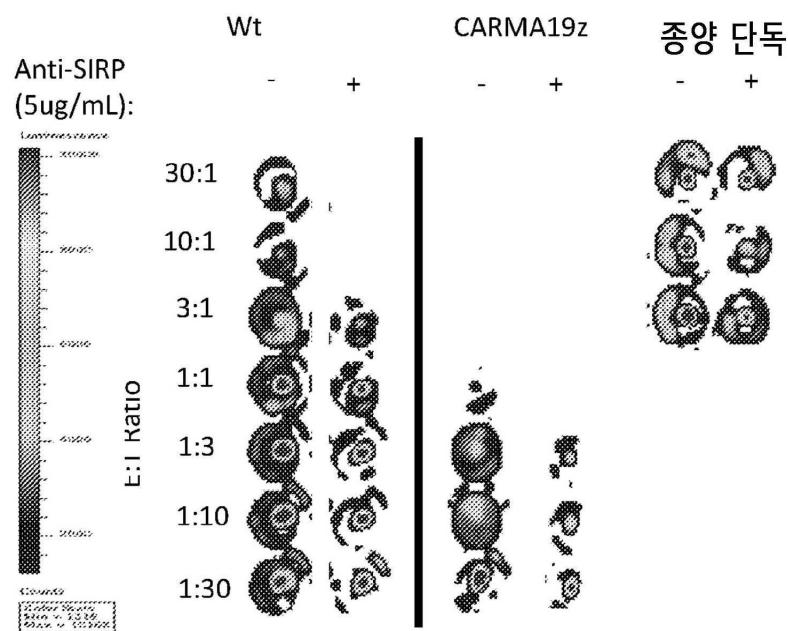
도면6a



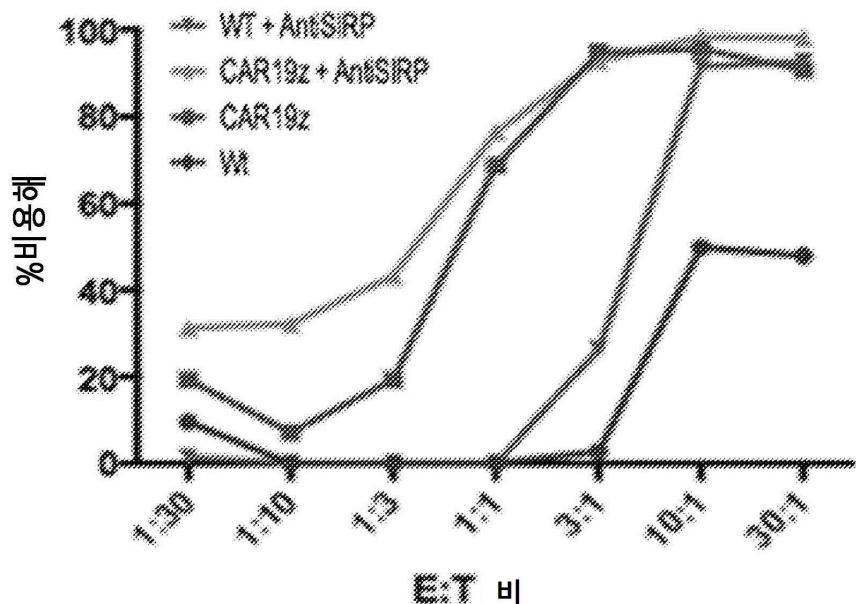
## 도면 6b



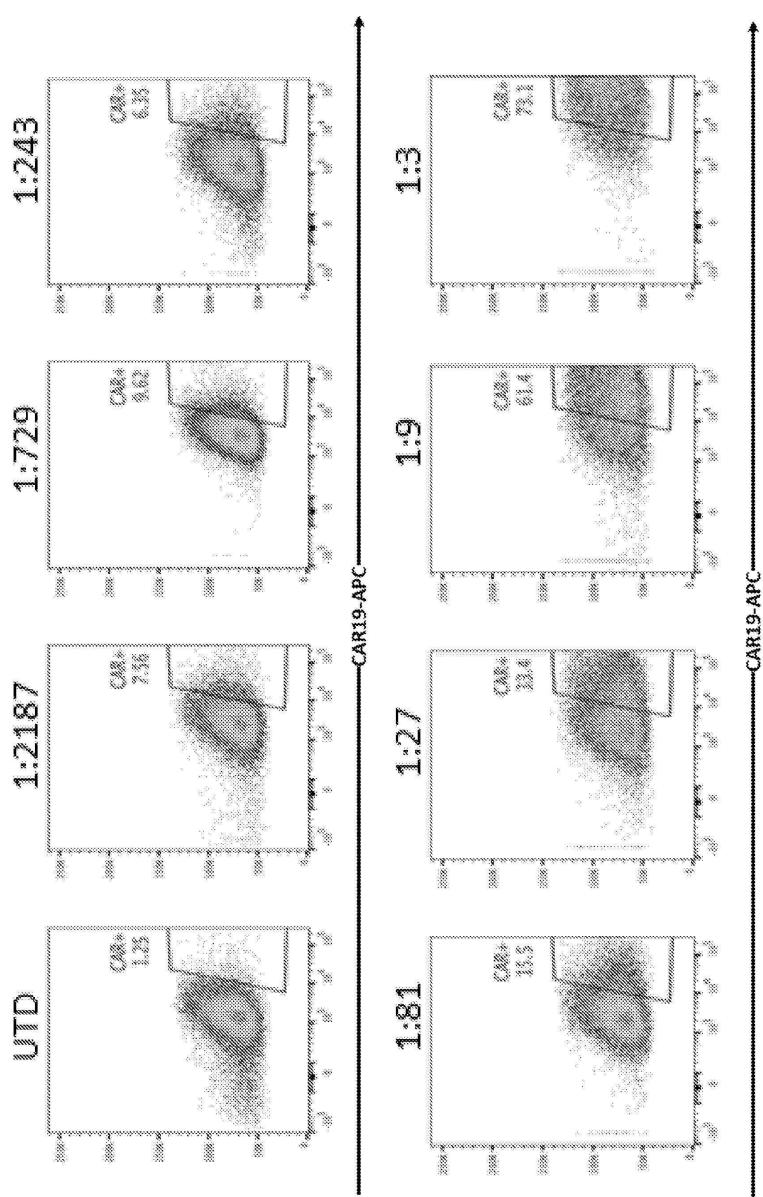
도면6c



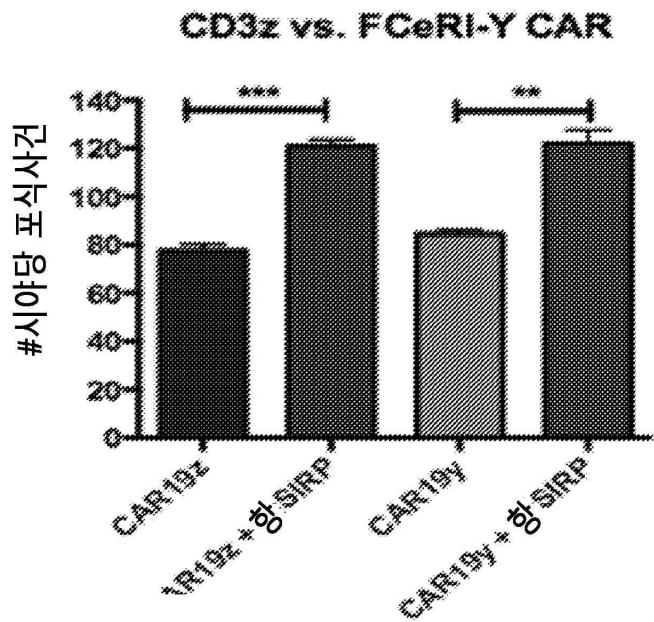
도면6d



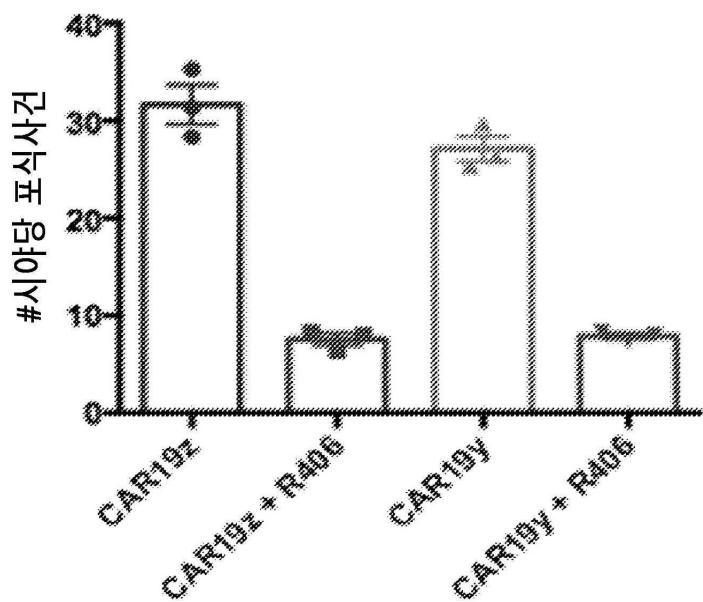
도면 7a



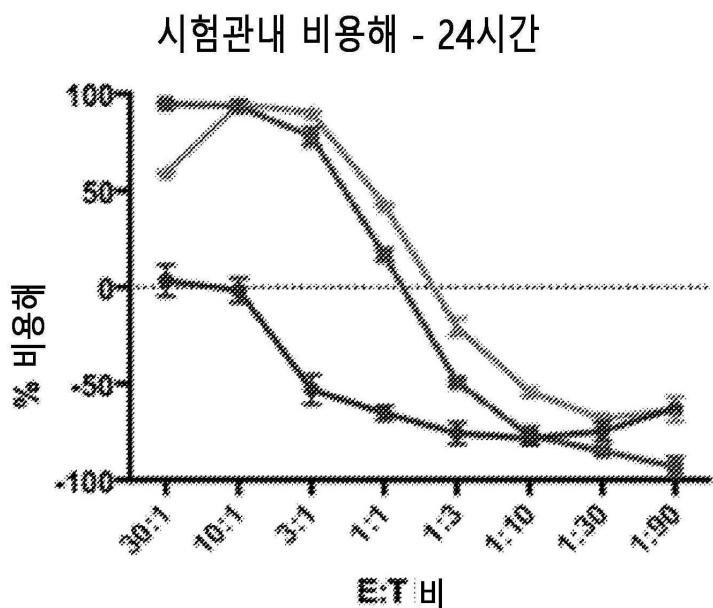
도면7b



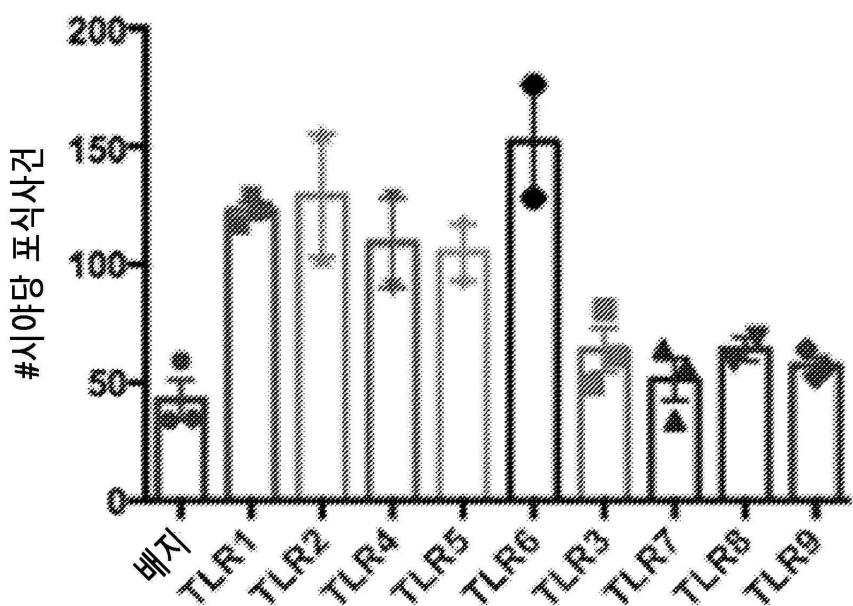
도면7c



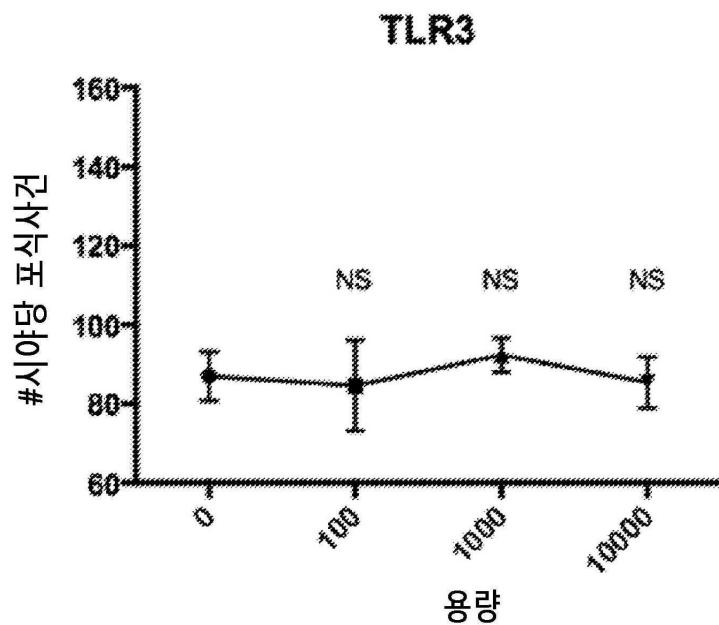
## 도면7d



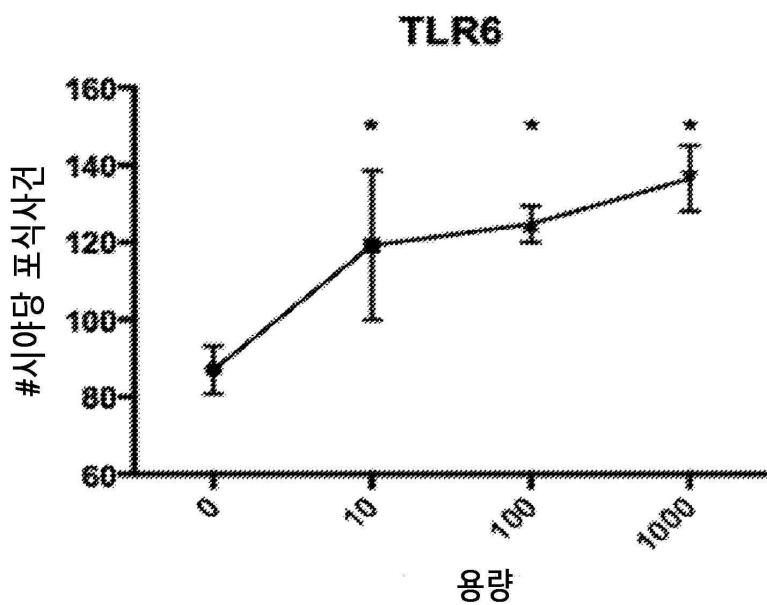
### 도면8a



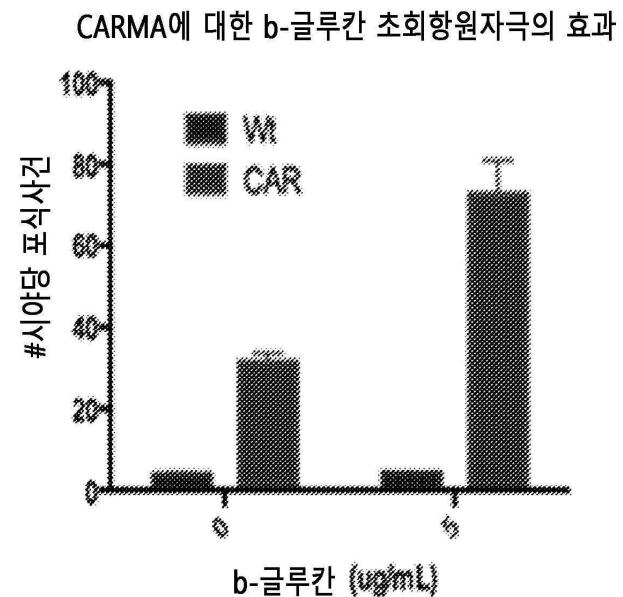
도면8b



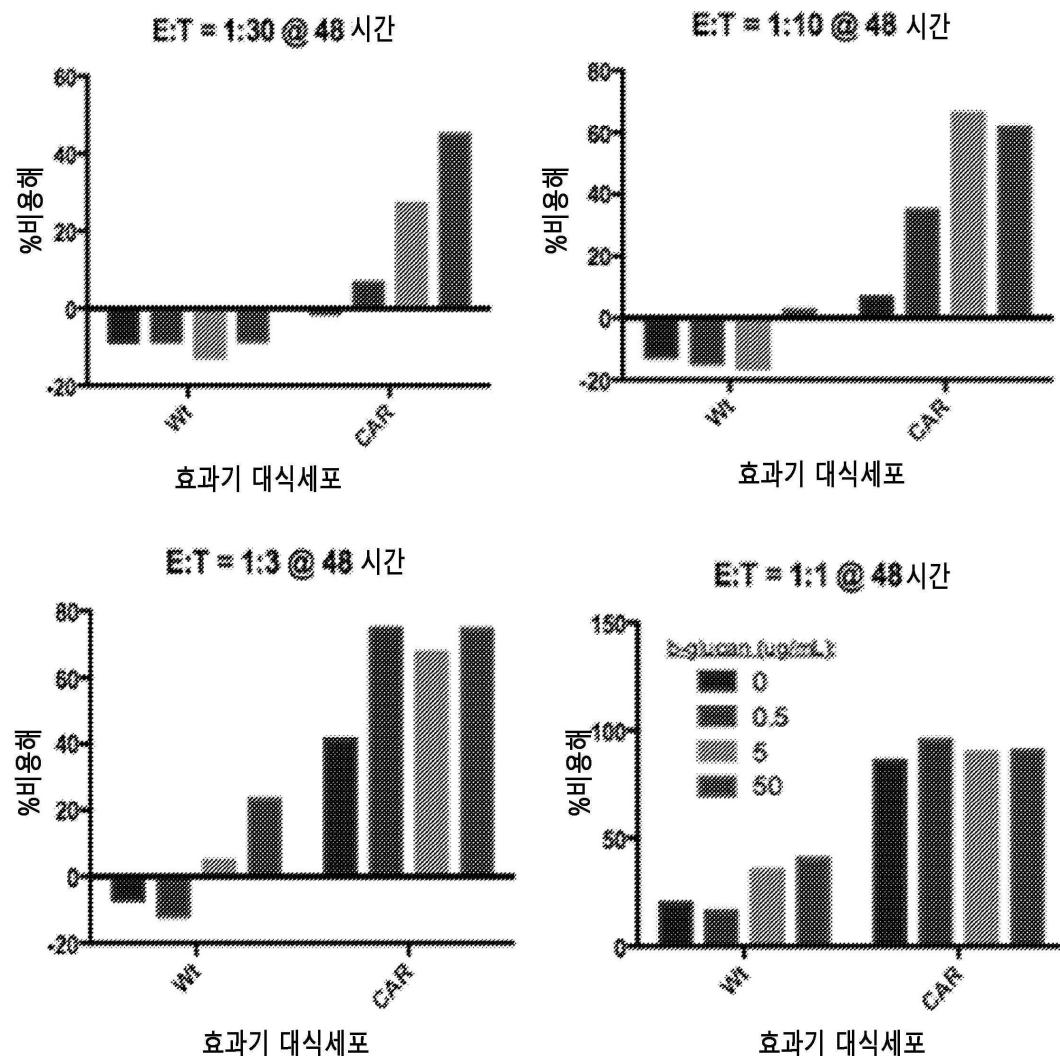
도면8c



도면9a



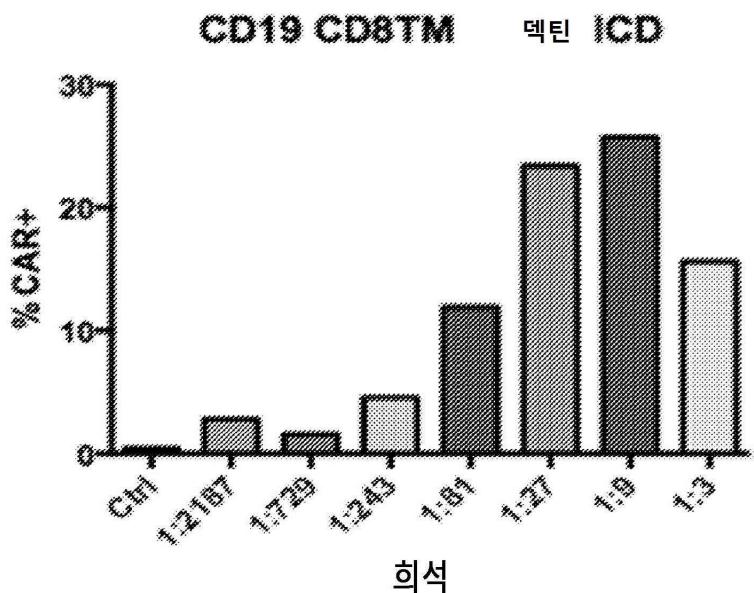
도면9b



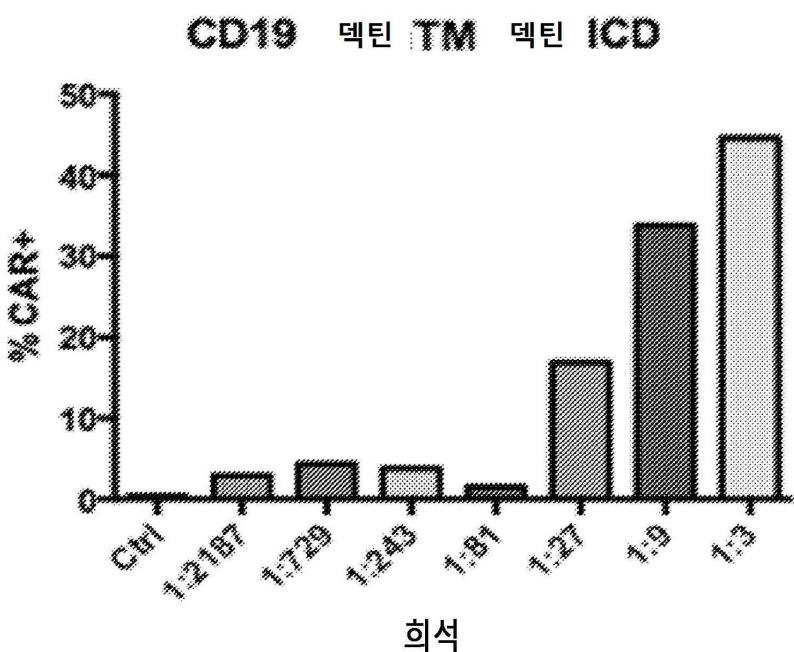
도면10a



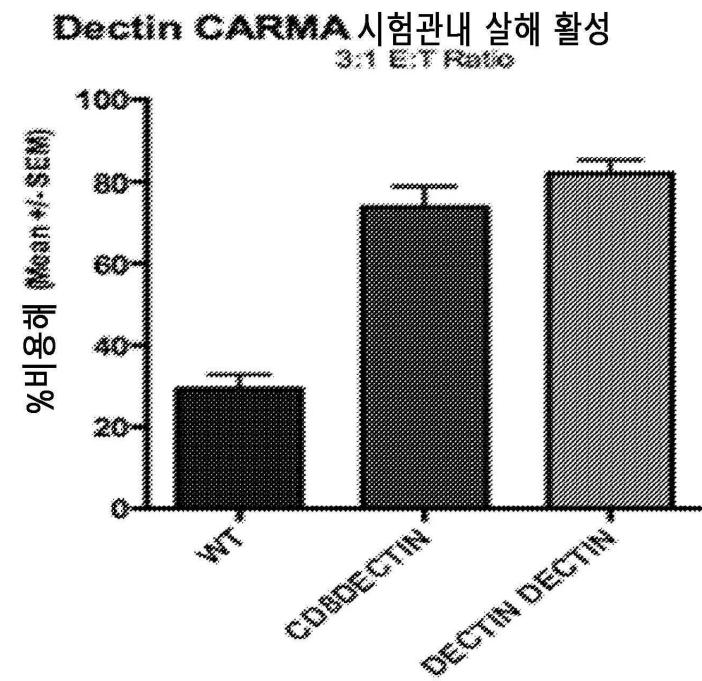
도면10b



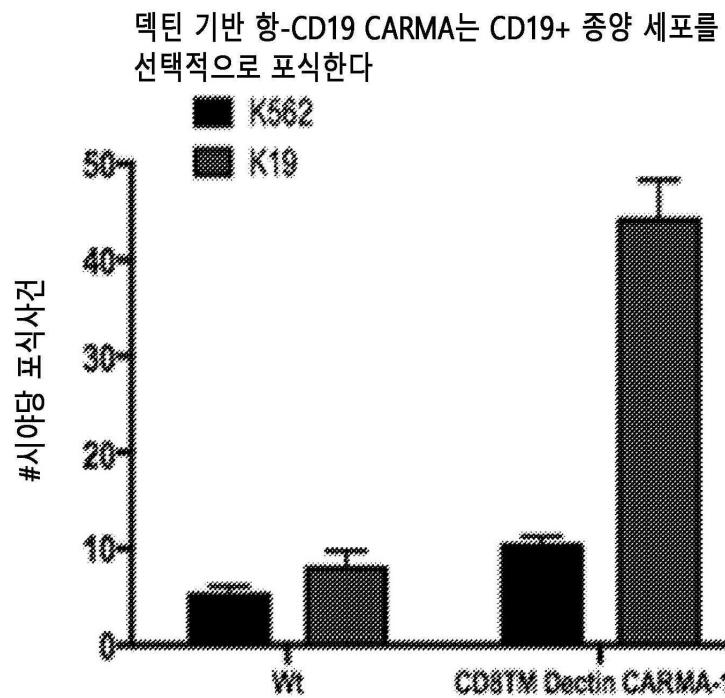
도면10c



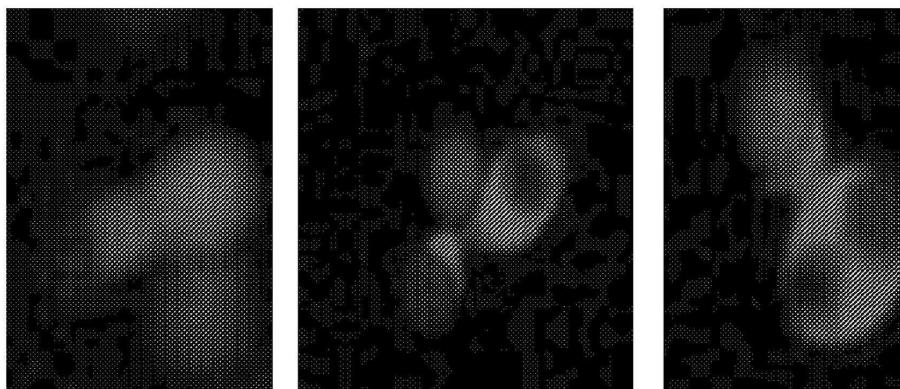
도면 10d



도면 10e

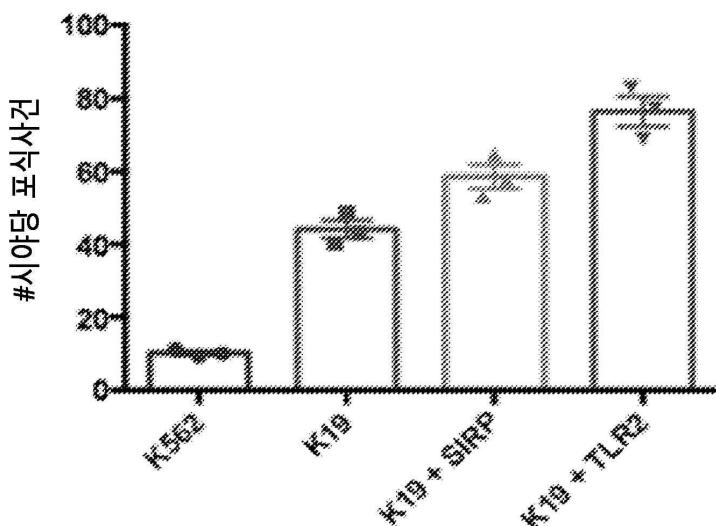


도면10f

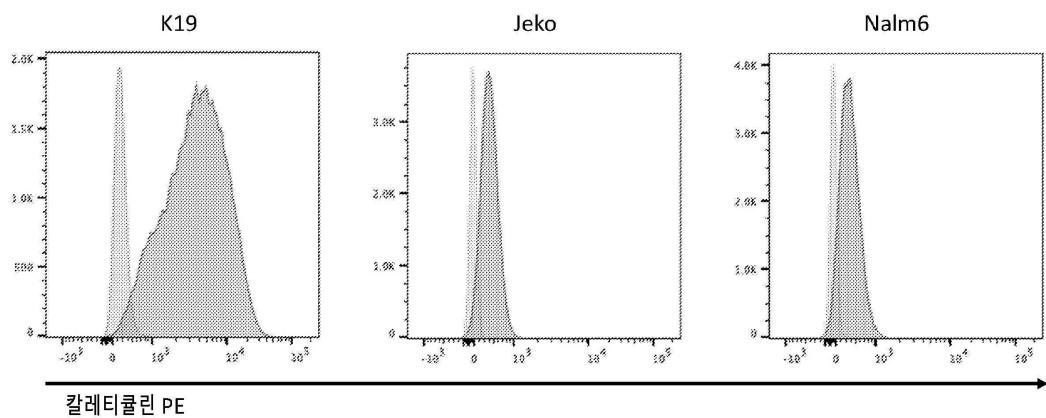


도면10g

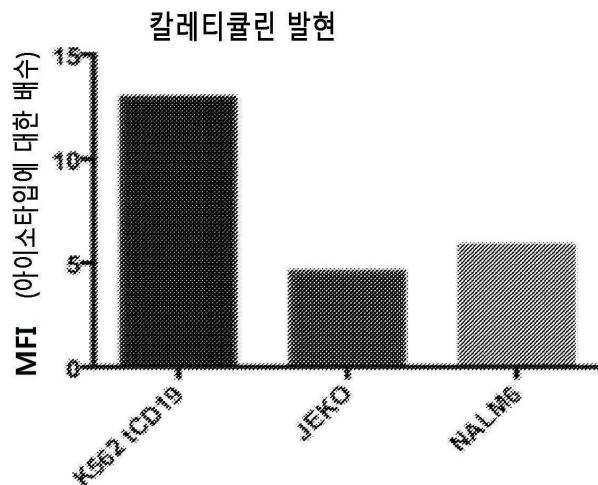
텍틴 CARMA에 대한 TLR2 리간드 HKLM 또는 SIRPa 차단 mAB의 첨가



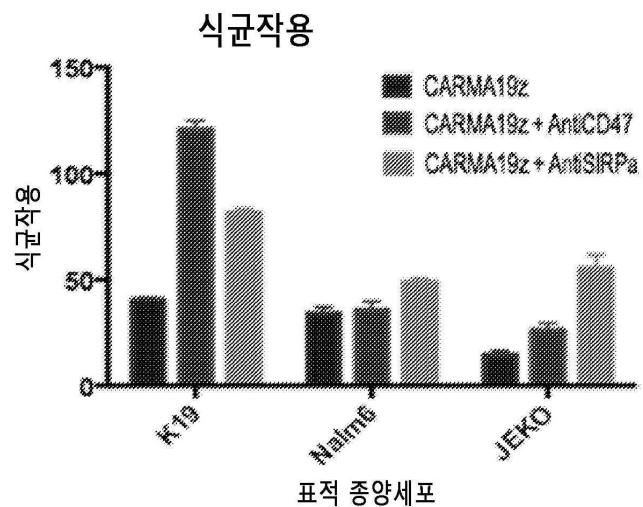
도면11a



도면11b

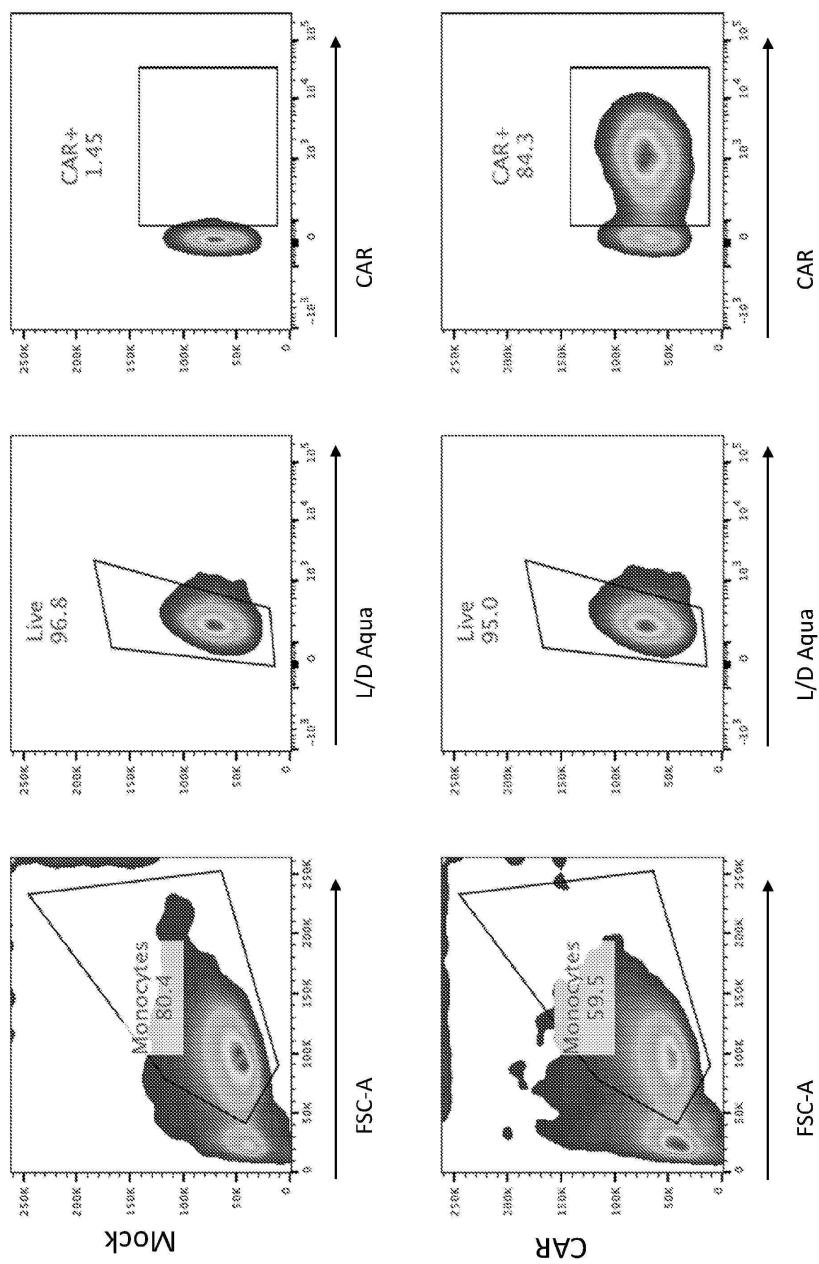


도면11c



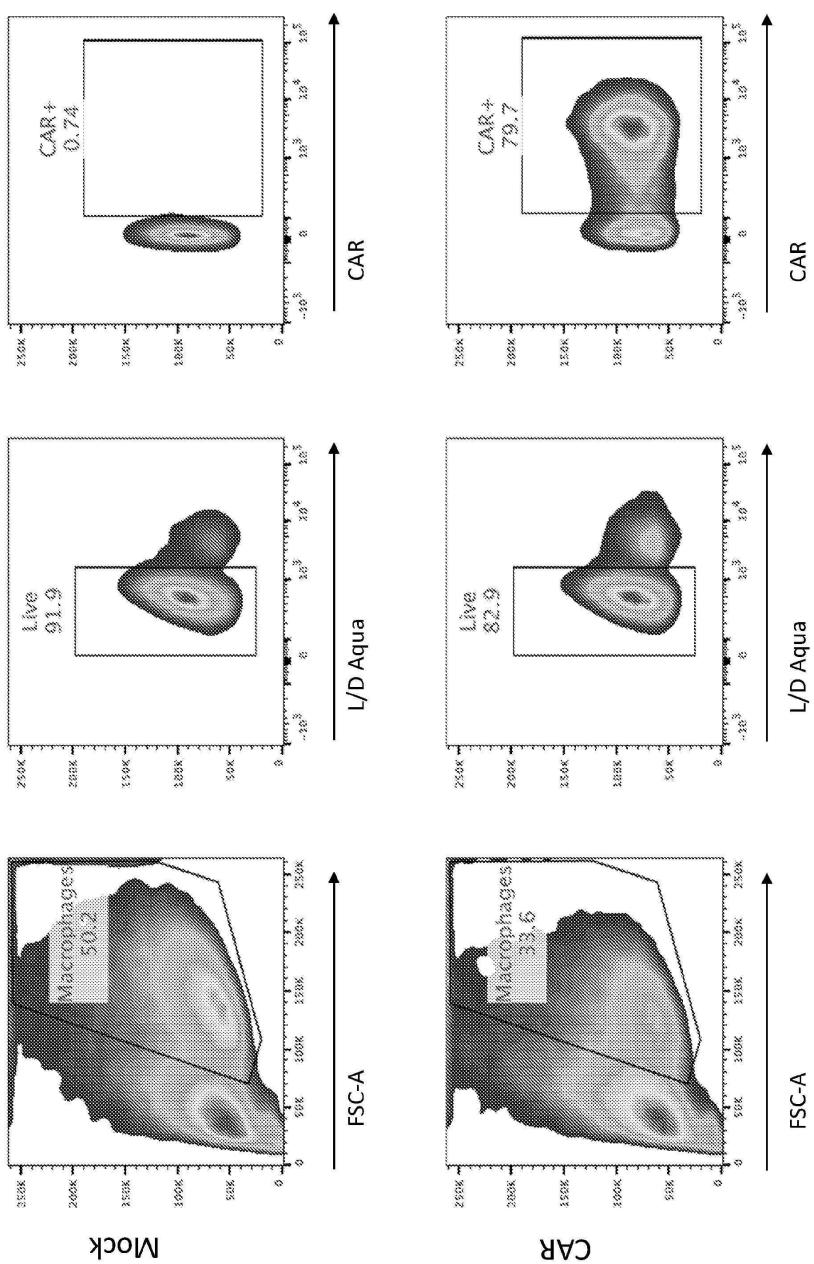
도면 12a

## 1차 인간 단핵세포 통문 전략, 생육력, 및 항-HER2 CAR 발현



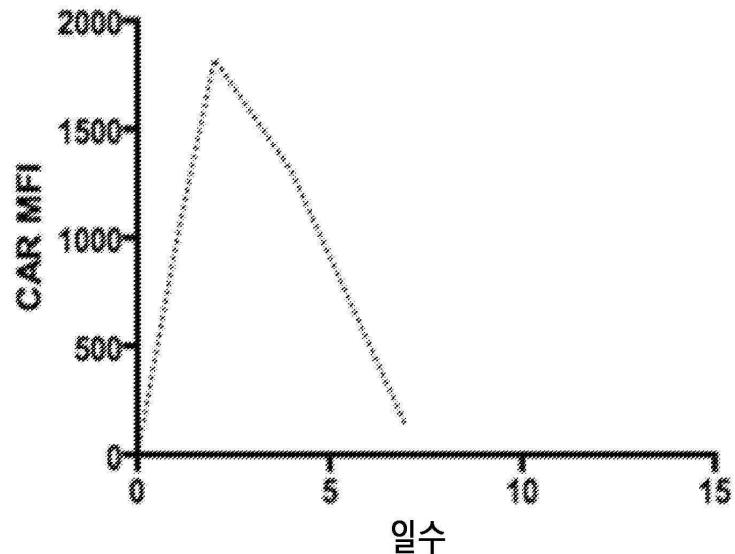
## 도면 12b

1차 인간 대식세포 통문 전략, 생육력, 및 항-HER2 CAR 발현

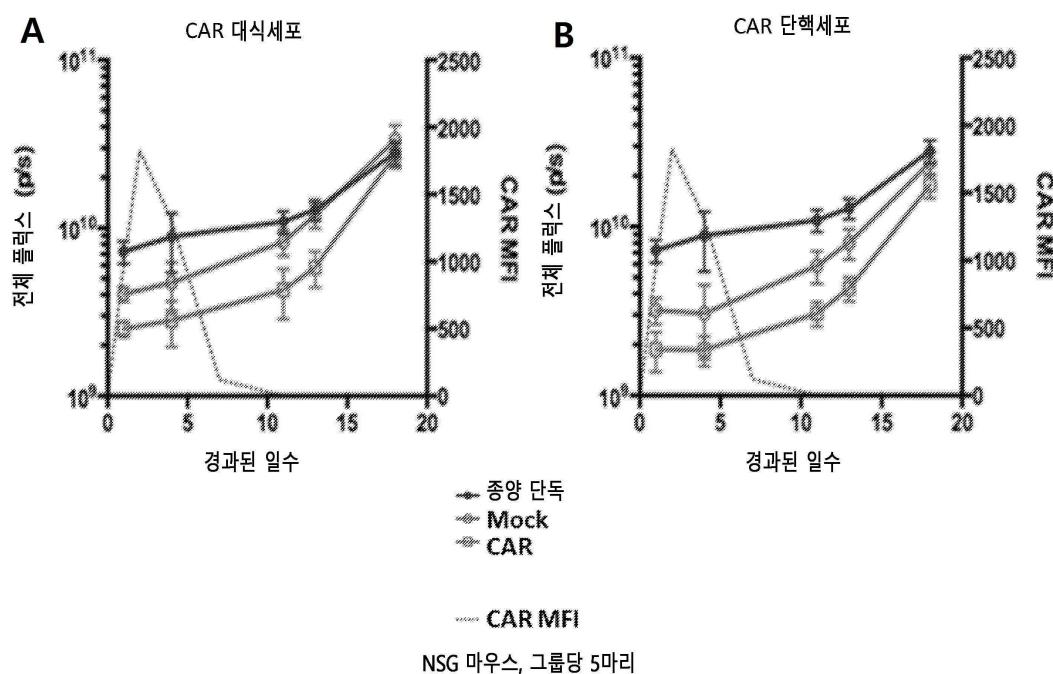


도면12c

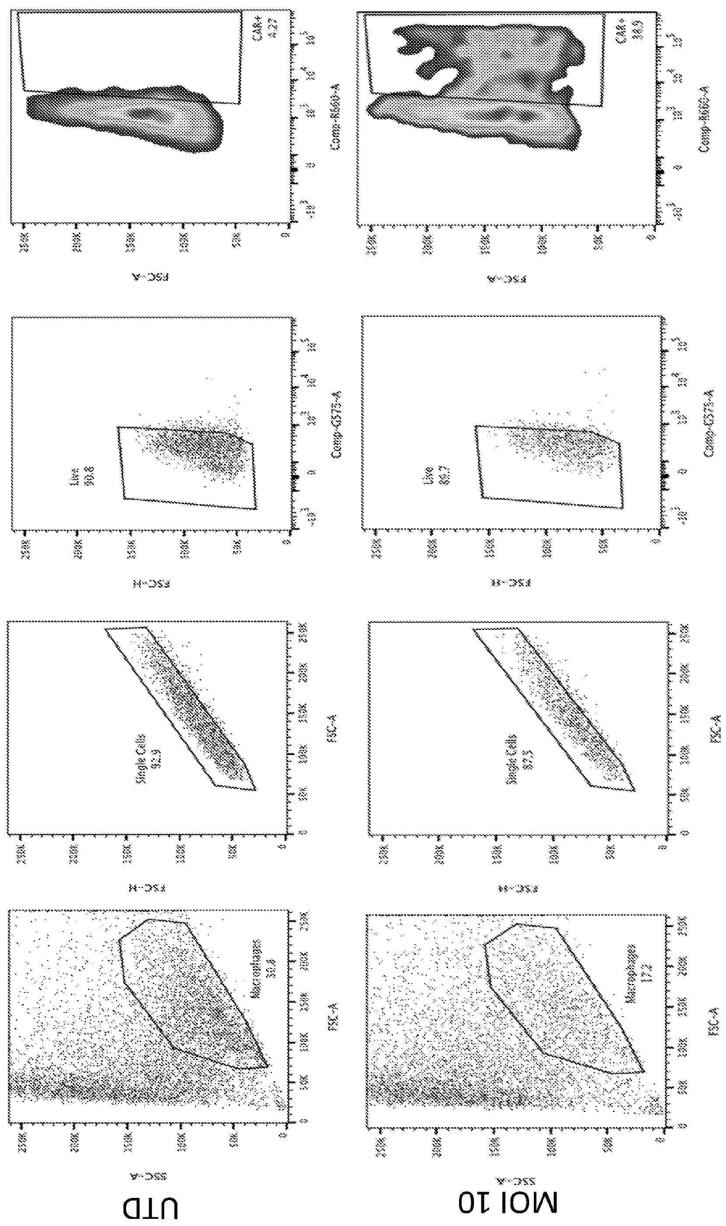
## 대식세포에서 RNA CAR 내성



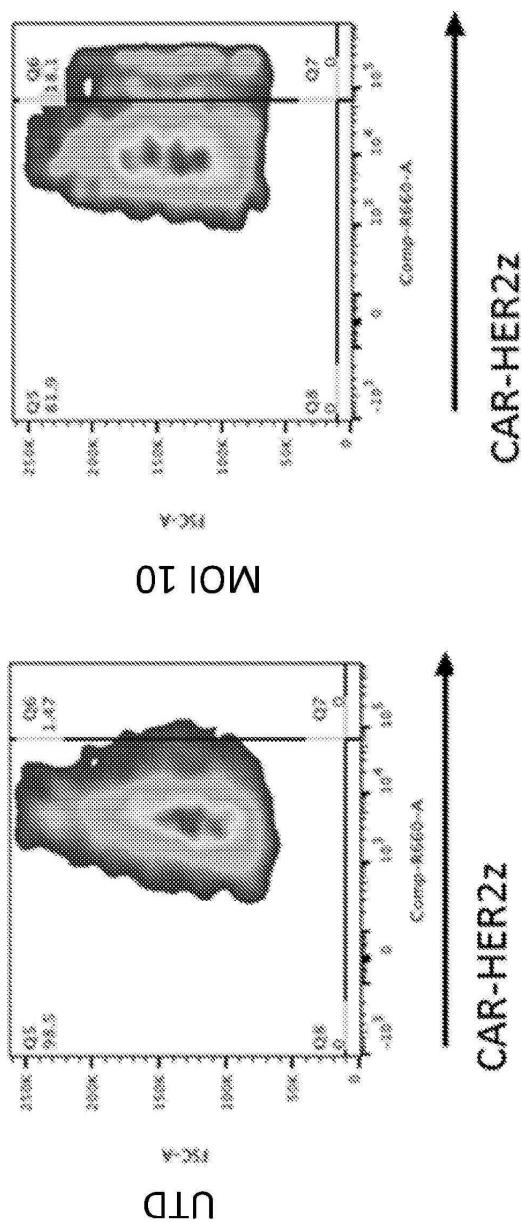
도면13



도면 14a

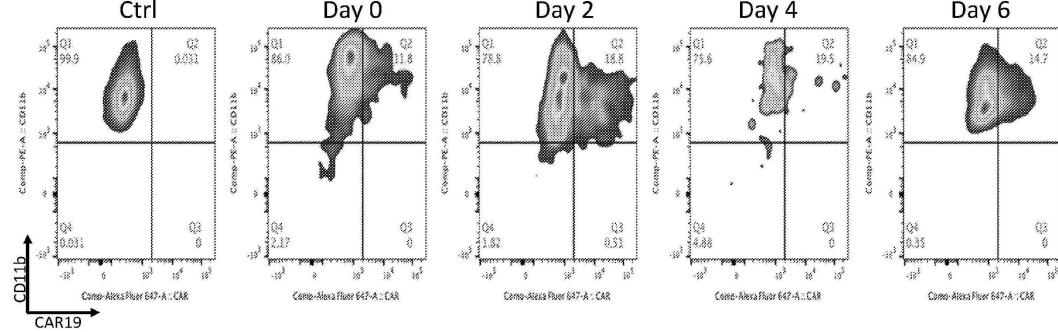


도면14b

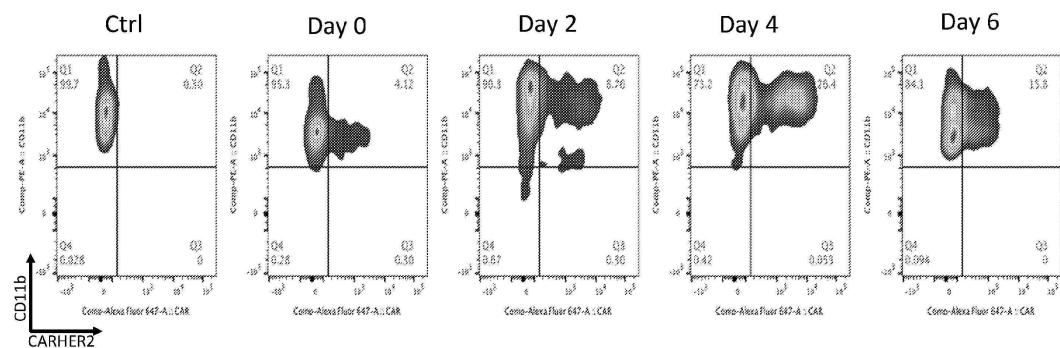


UD

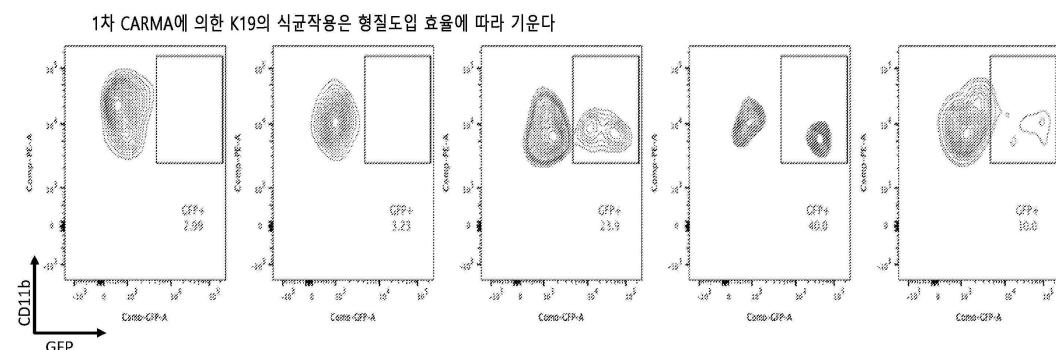
도면15a



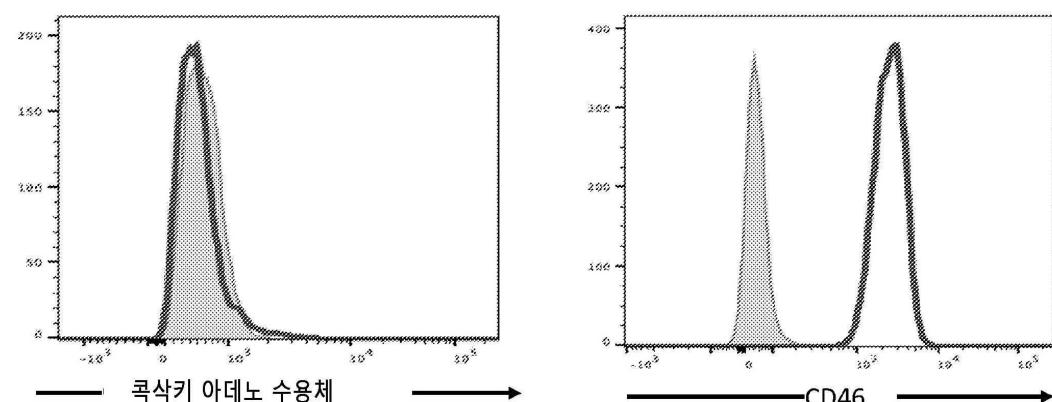
## 도면 15b



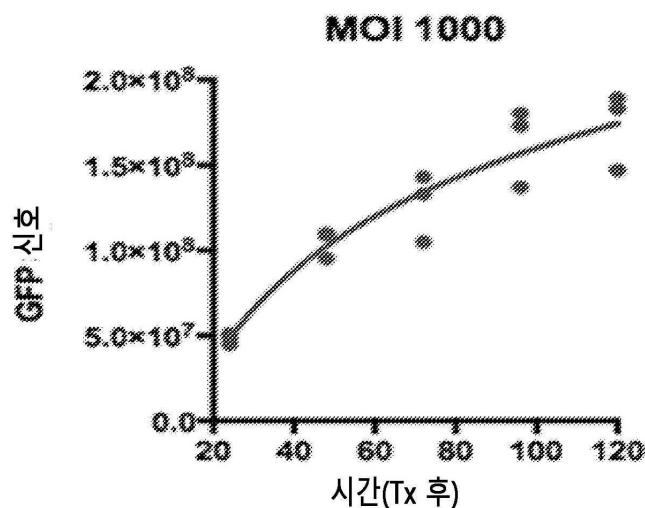
## 도면 15c



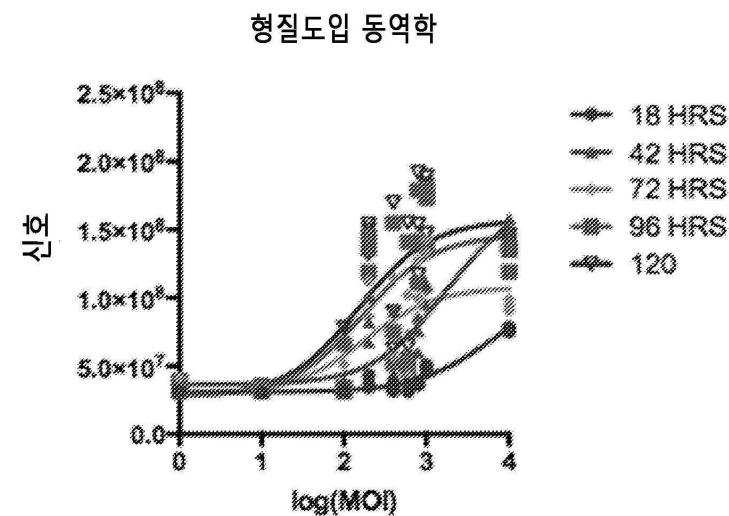
## 도면 16a



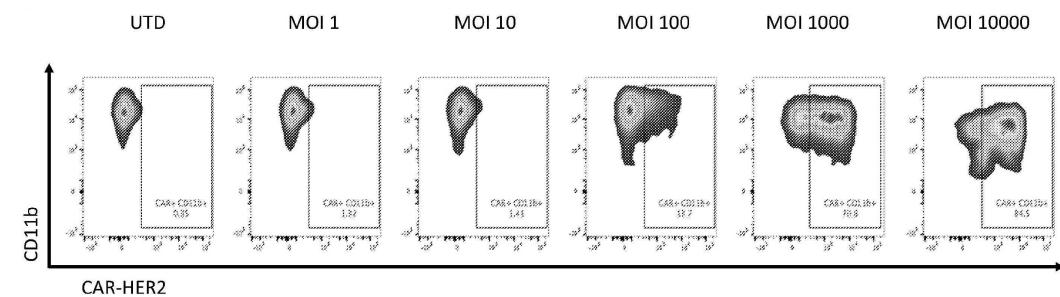
도면16b



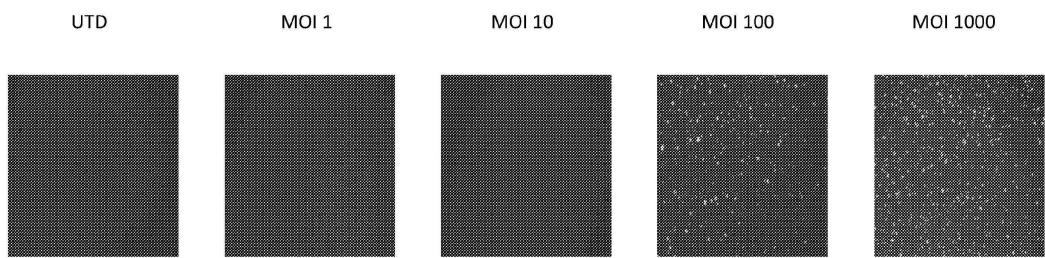
도면16c



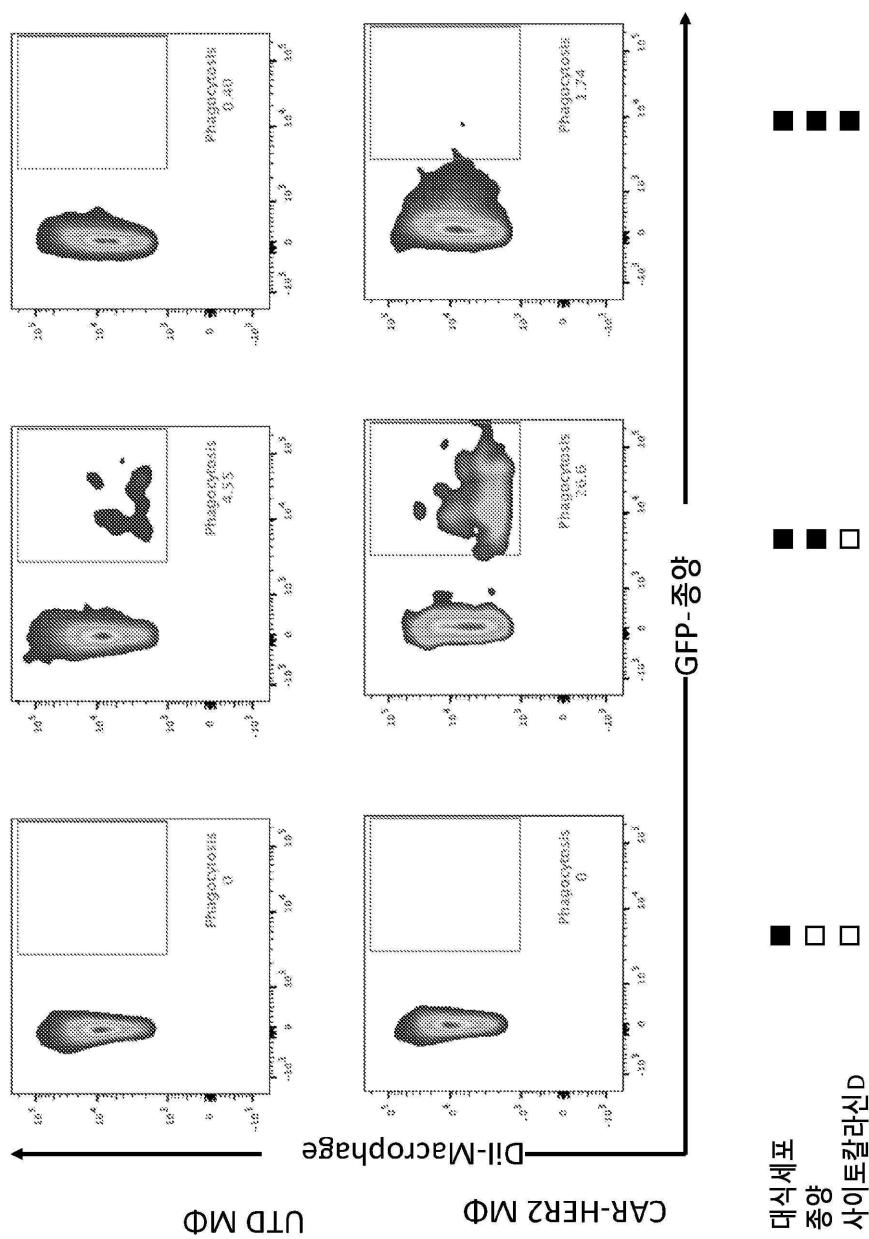
도면16d



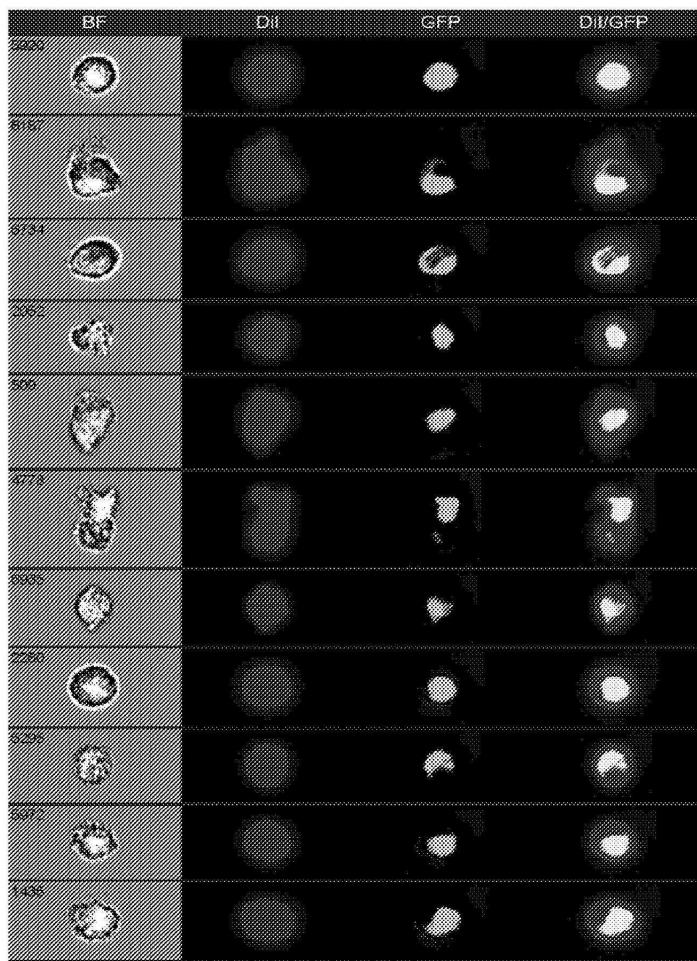
도면 16e



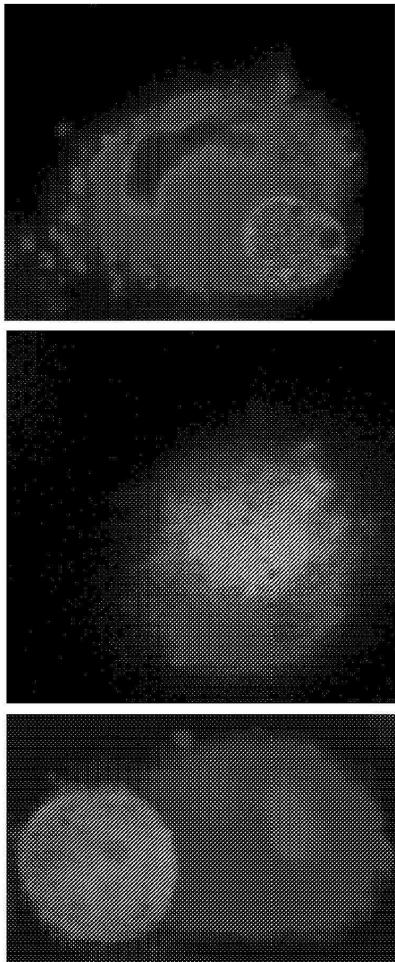
도면 17a



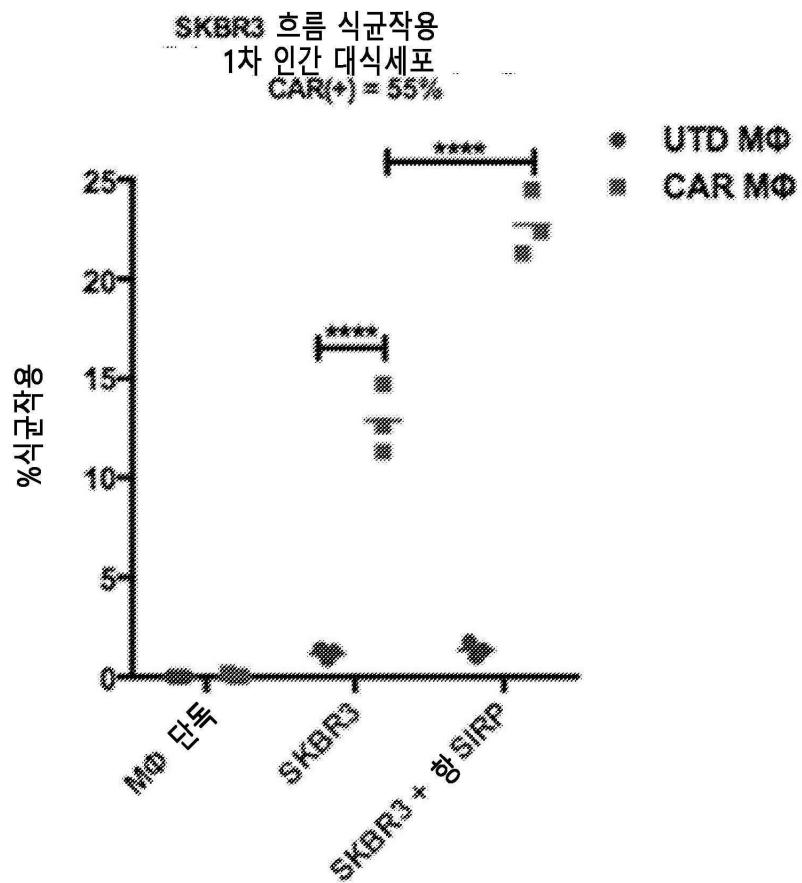
도면 17b



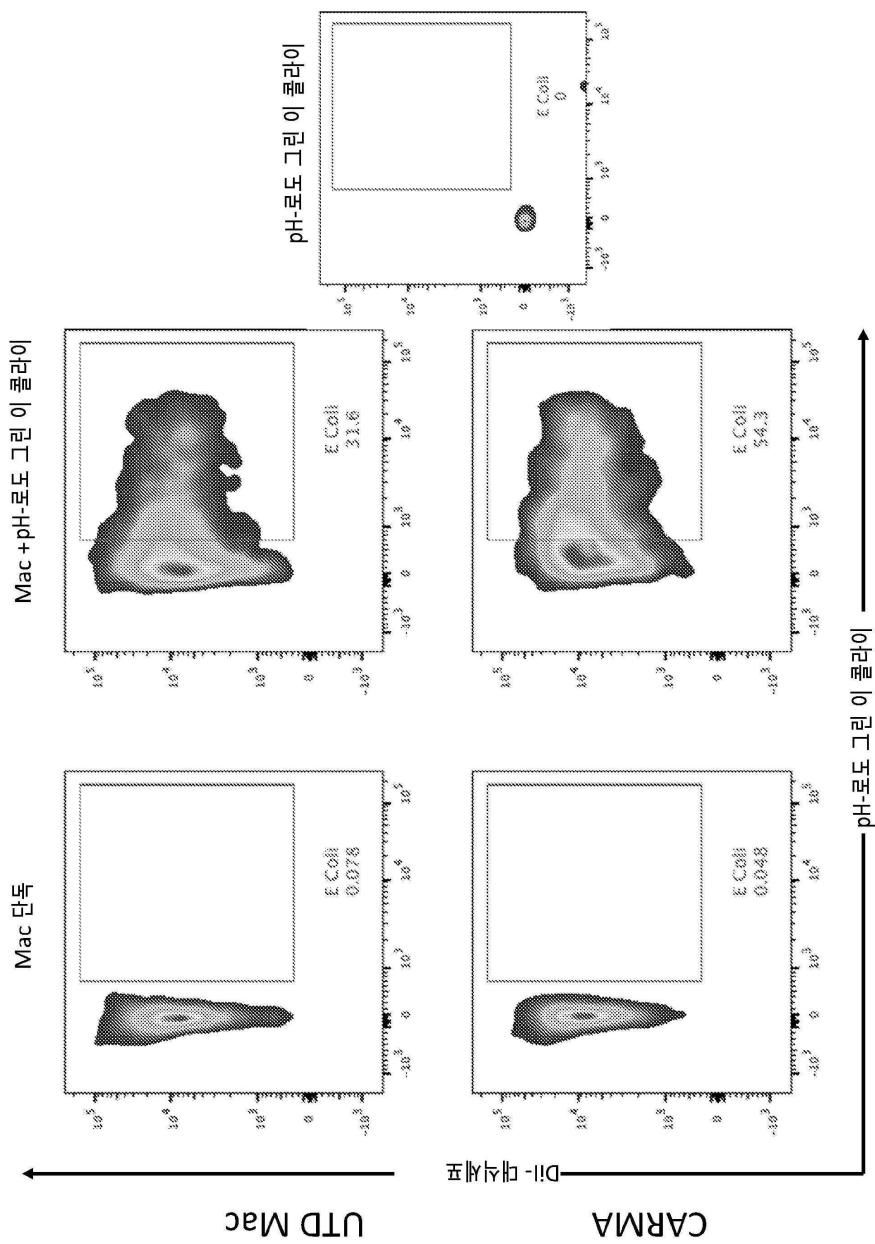
도면 17c



## 도면18

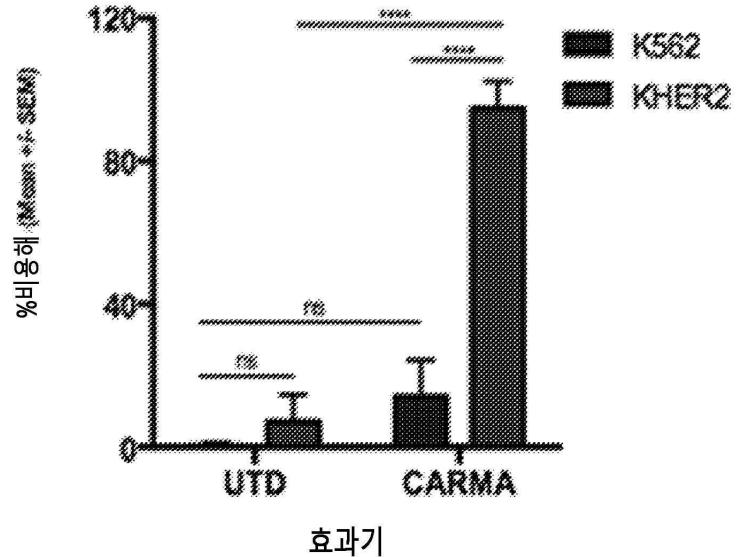


## 도면19



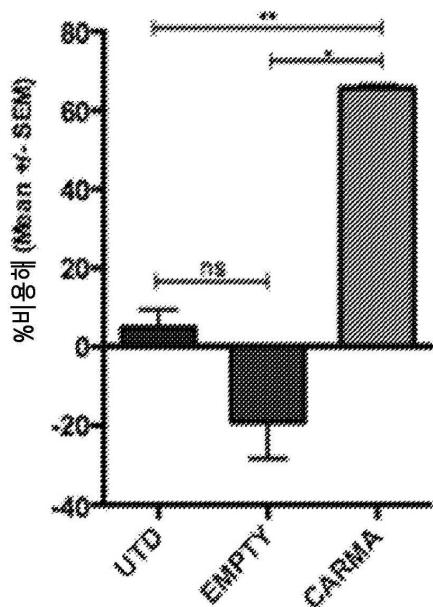
## 도면20a

1차 ~ 살해는 항원 특이적이다

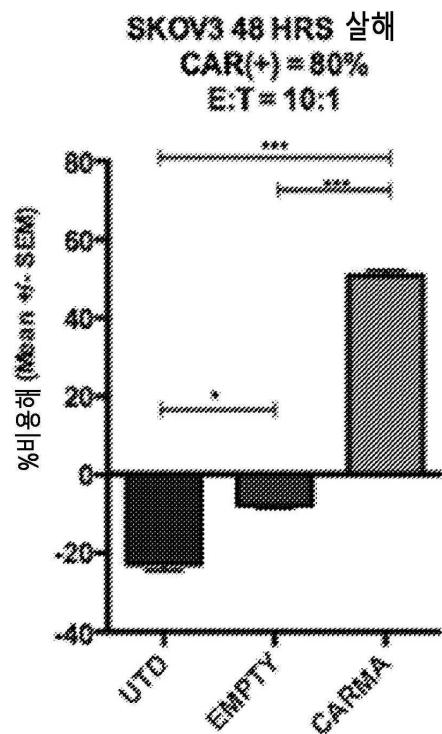


## 도면20b

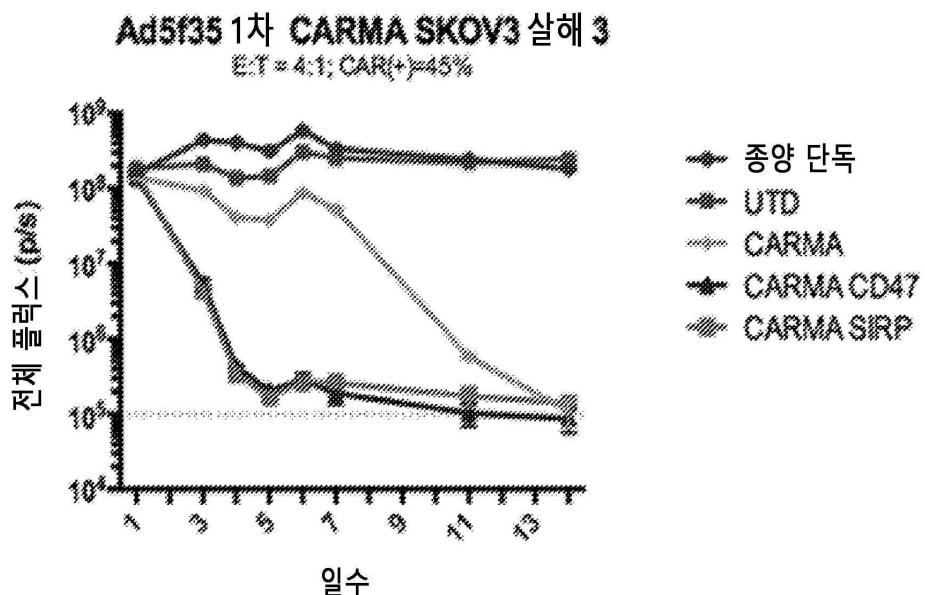
SKBR3 48 HRS 살해  
CAR(+) ≈ 80%  
E:T = 10:1



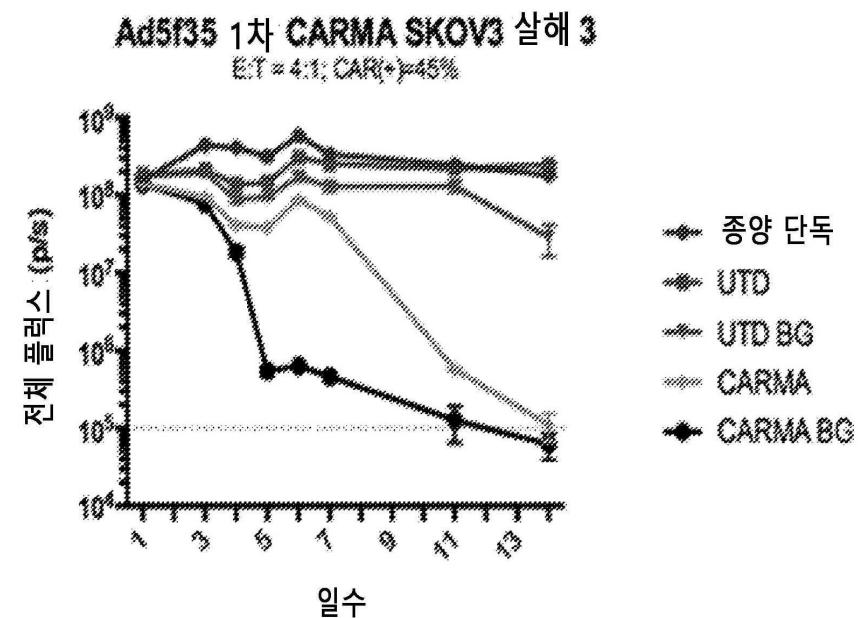
도면20c



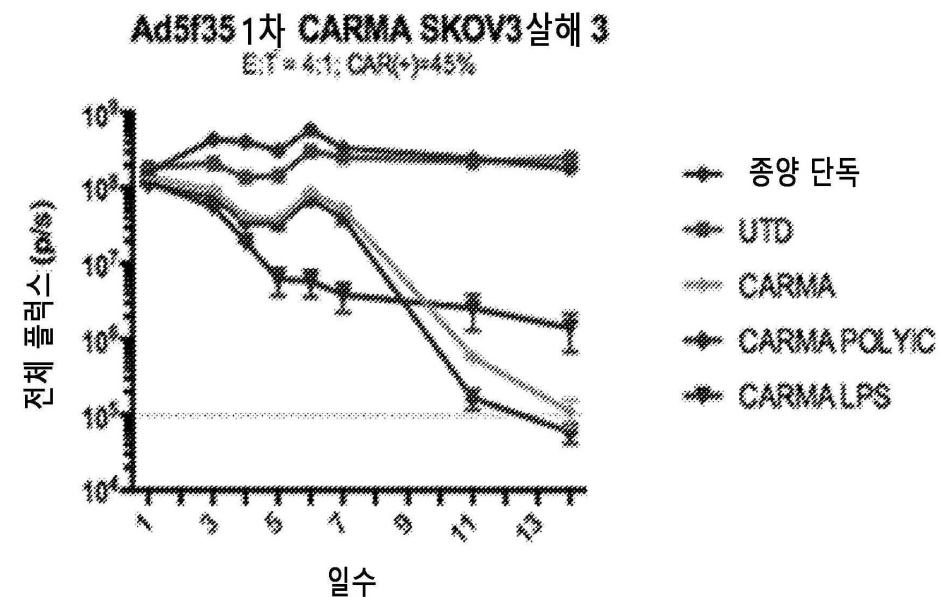
도면20d



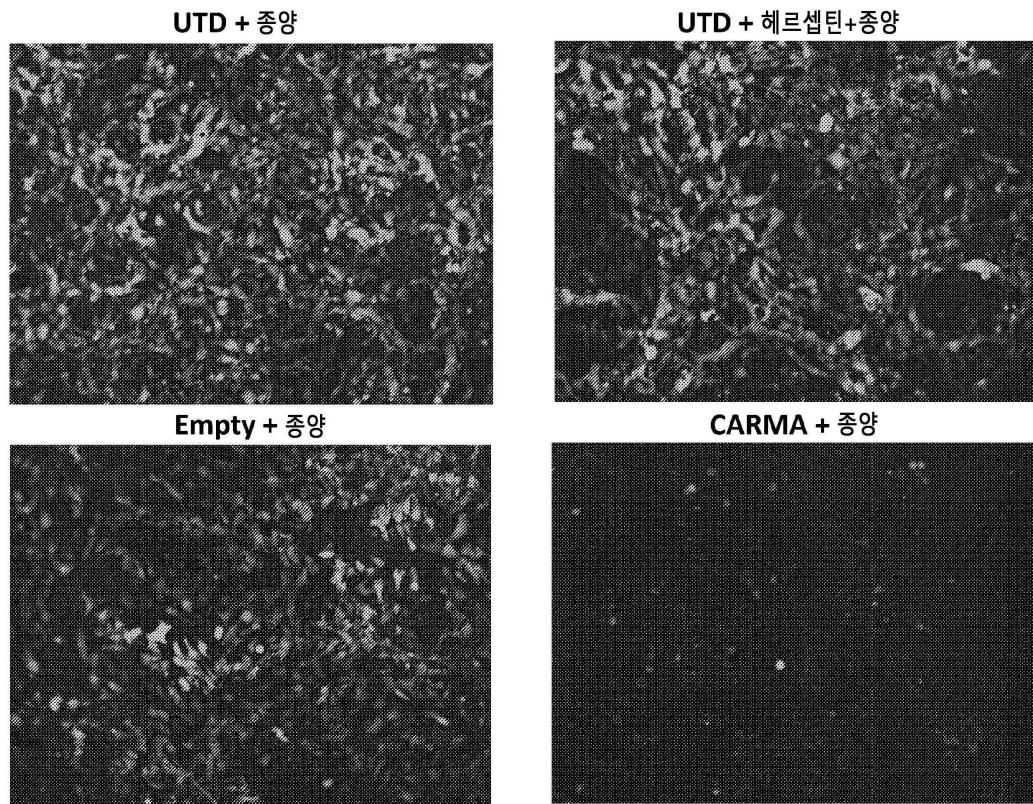
도면20e



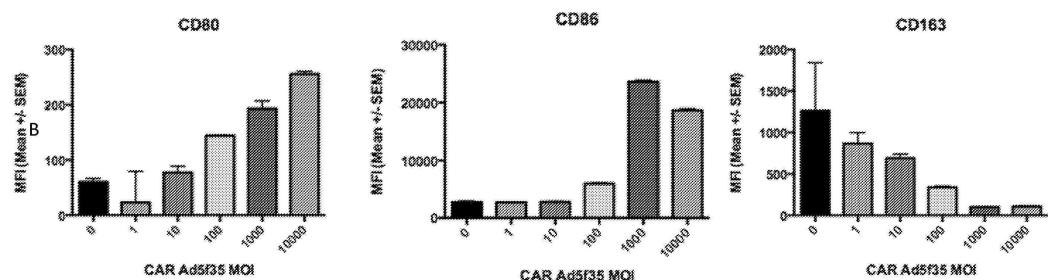
도면20f



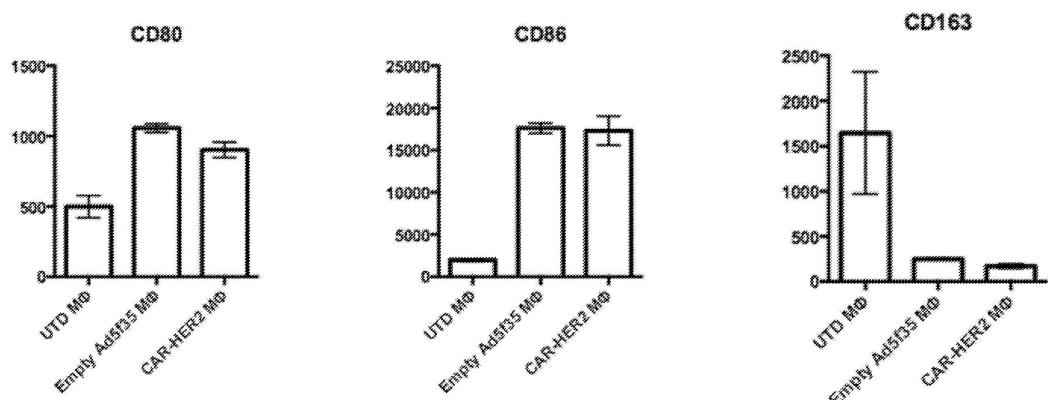
도면21



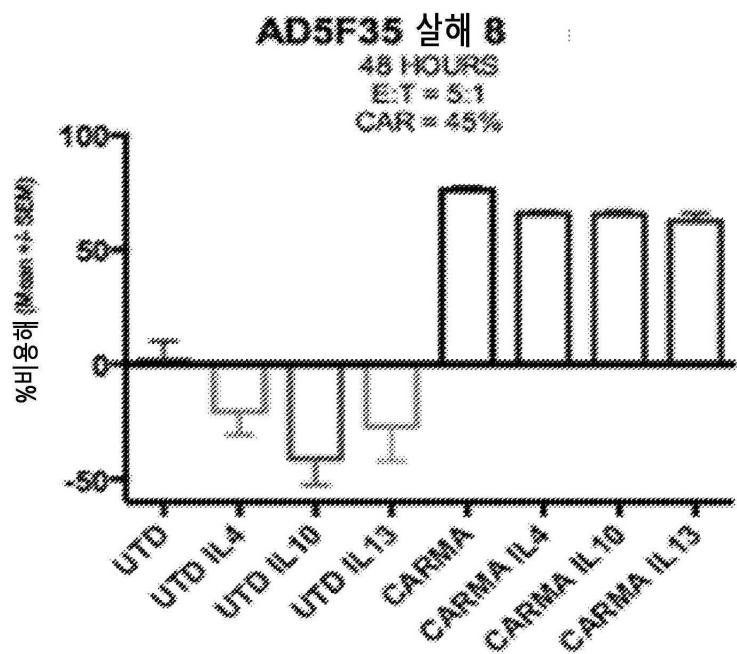
도면22a



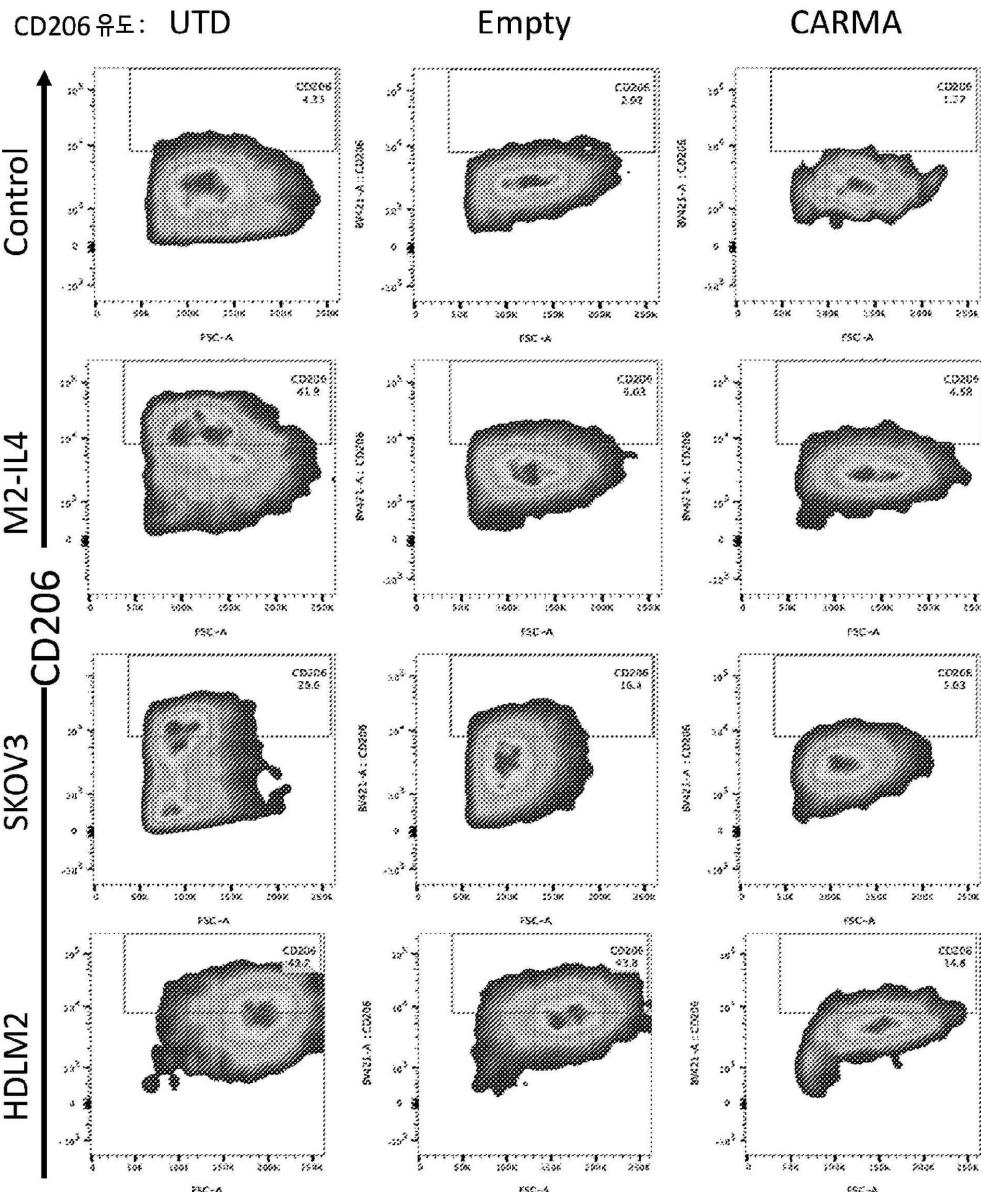
도면22b



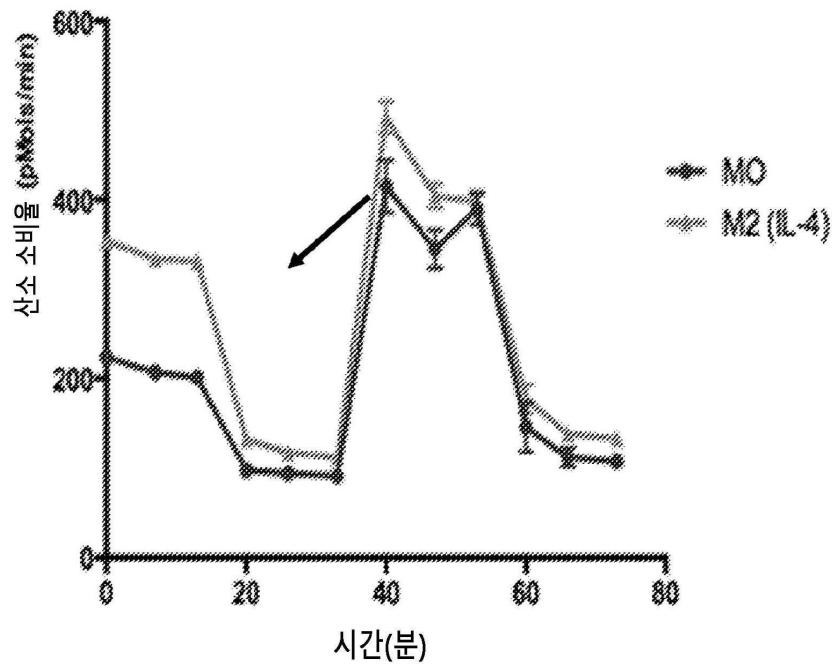
도면22c



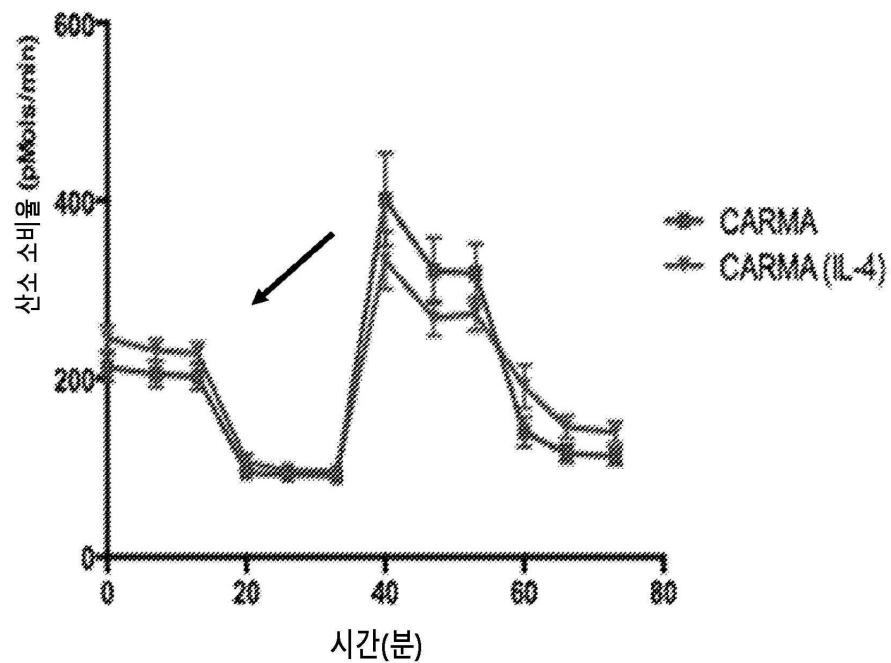
도면22d



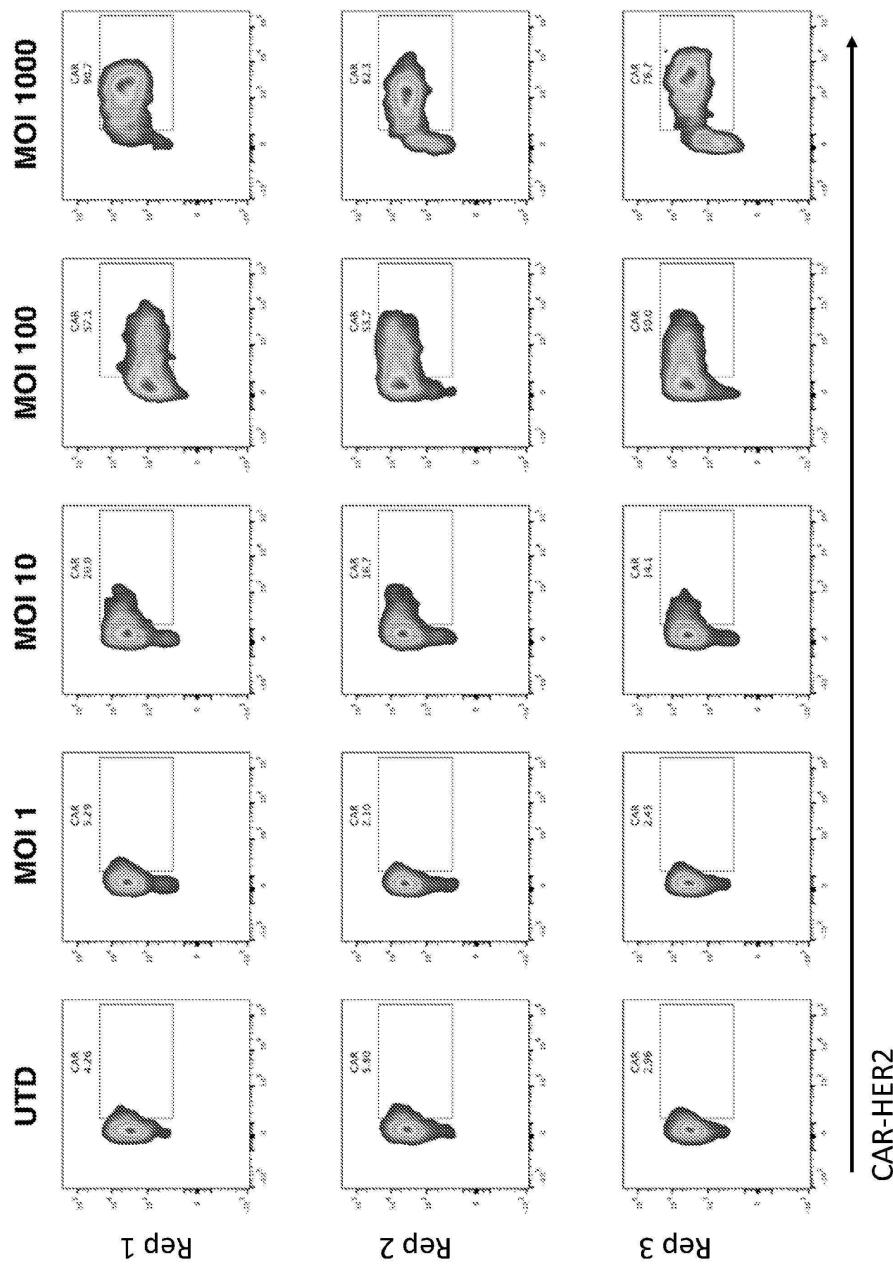
도면22e



도면22f

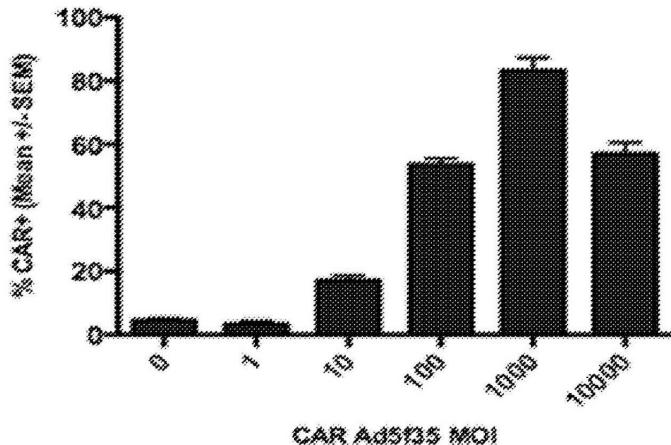


도면23a



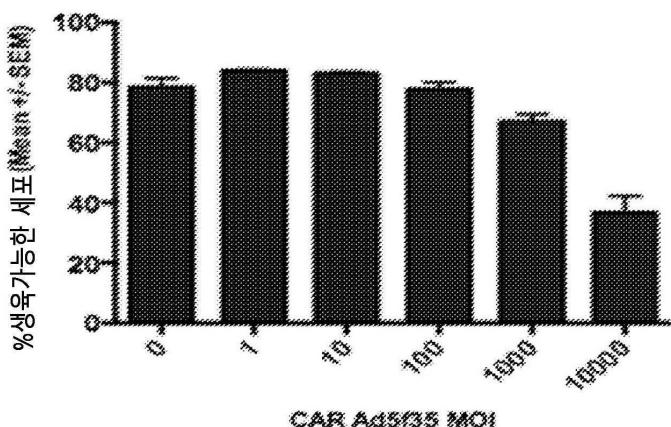
도면23b

## 1차 단핵세포 CAR 형질도입 효율

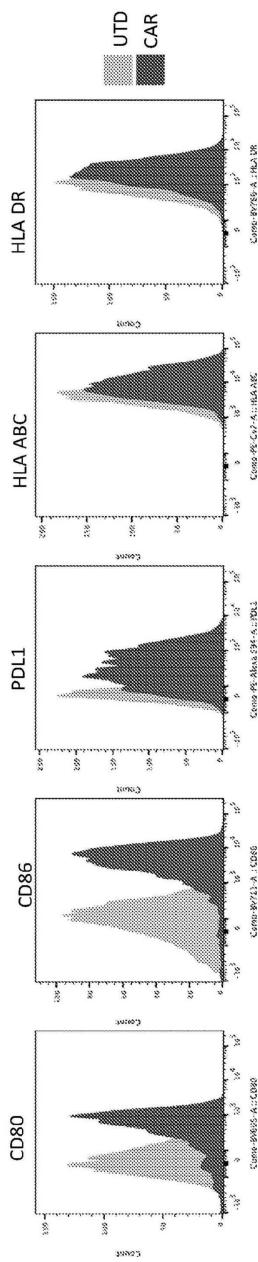


도면23c

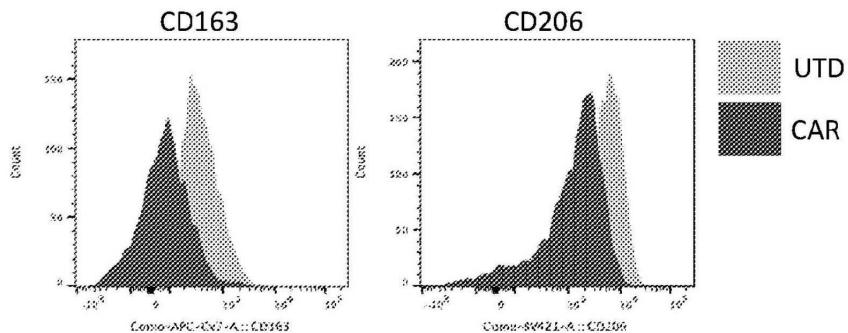
## 1차 단핵세포 생육력



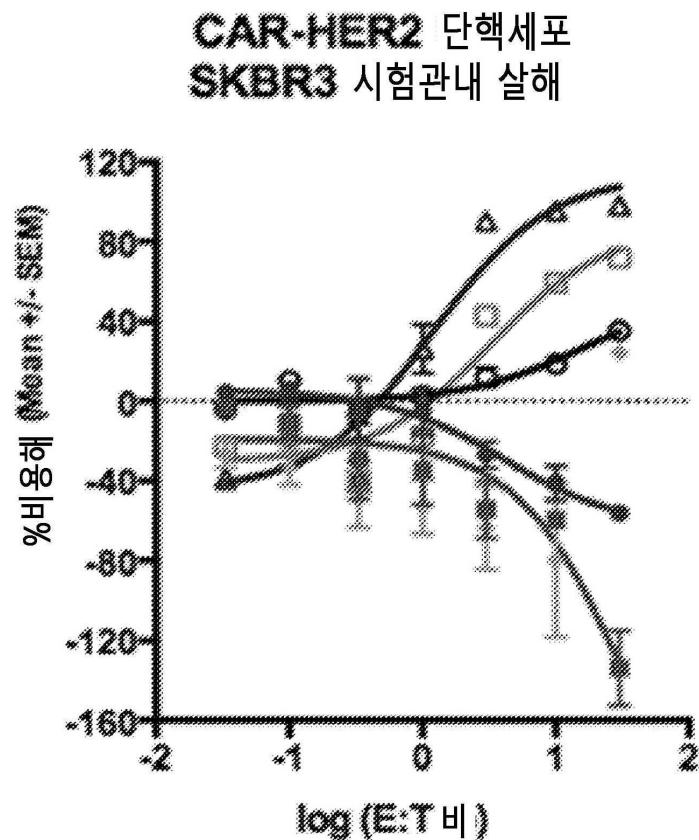
도면23d



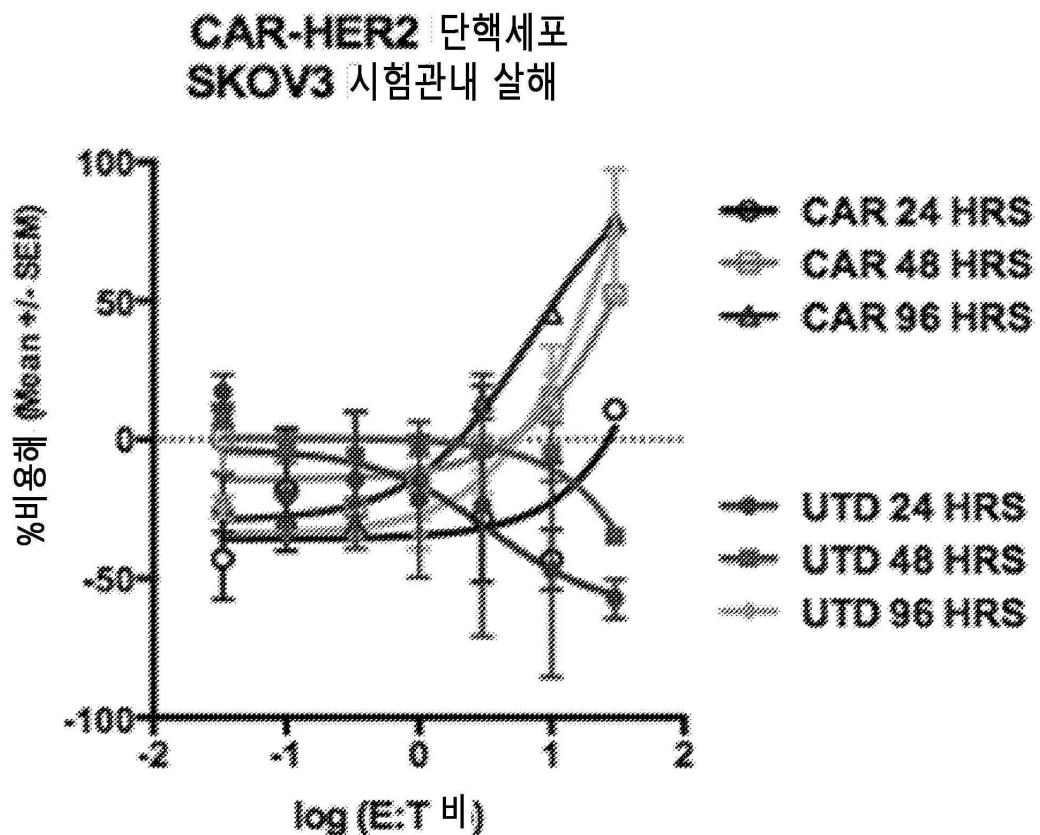
도면23e



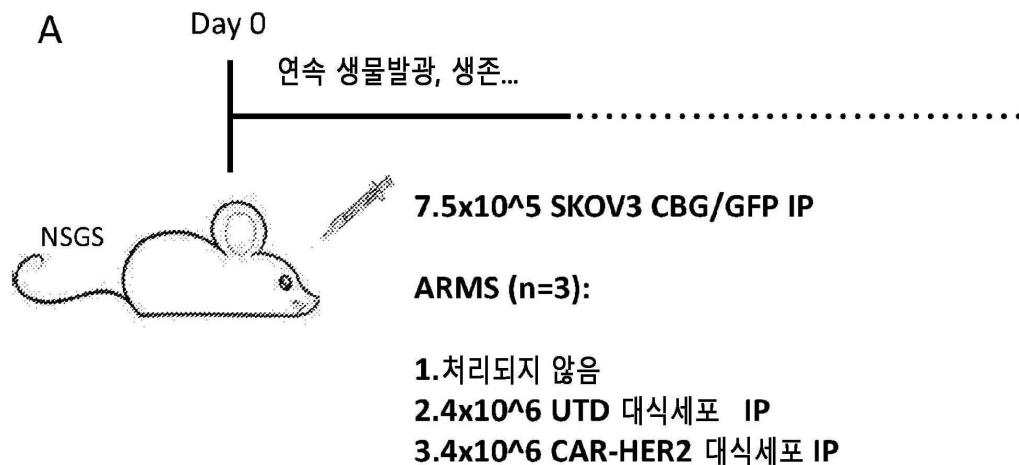
도면24a



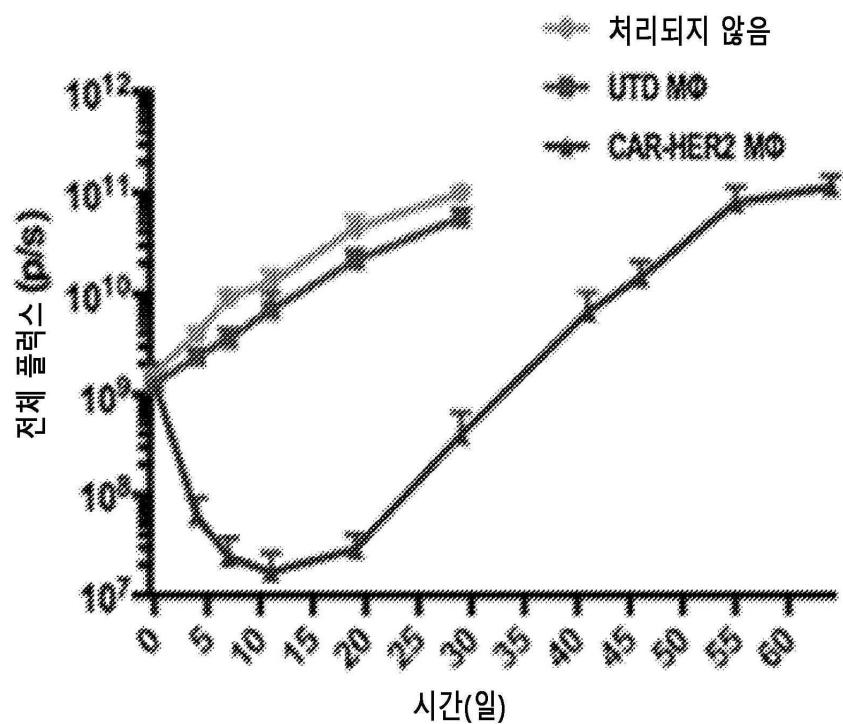
도면24b



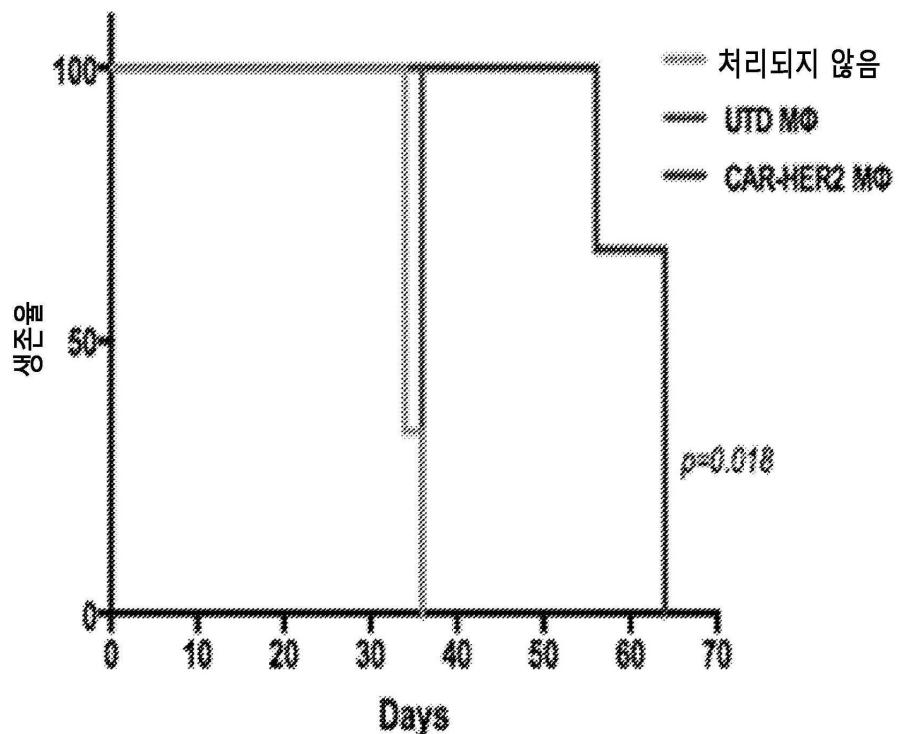
## 도면25a



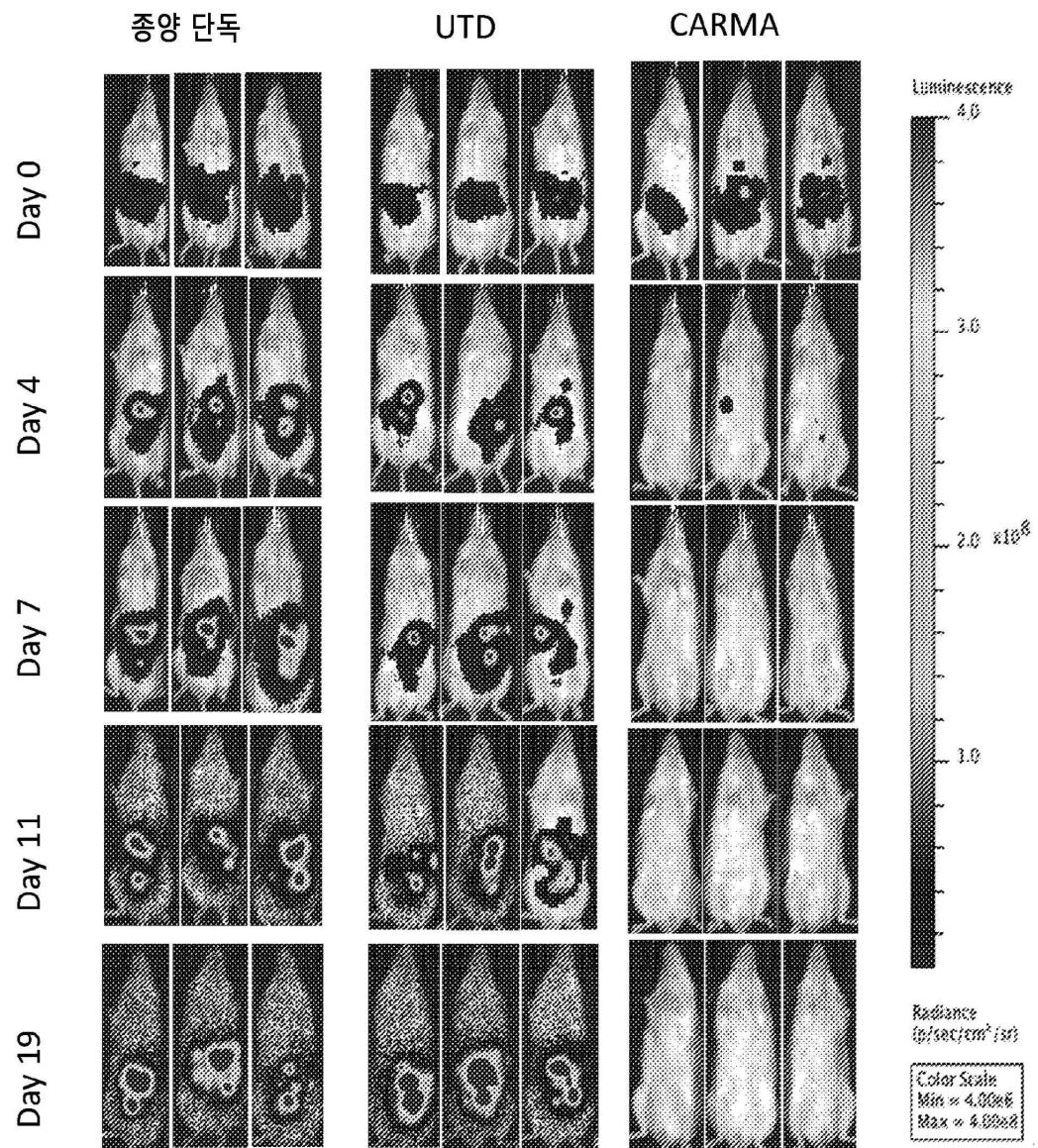
## 도면25b



도면25c

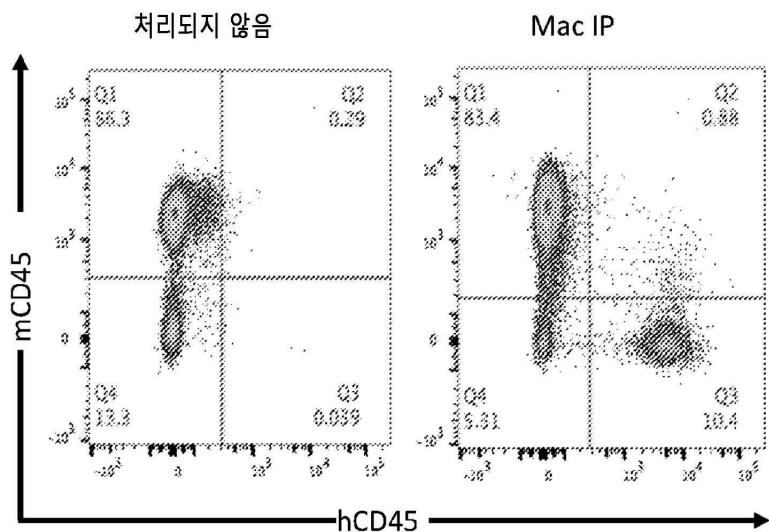


도면25d

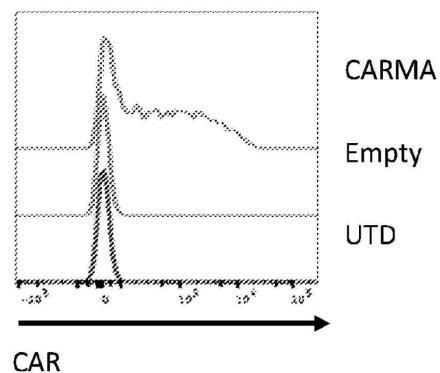


## 도면25e

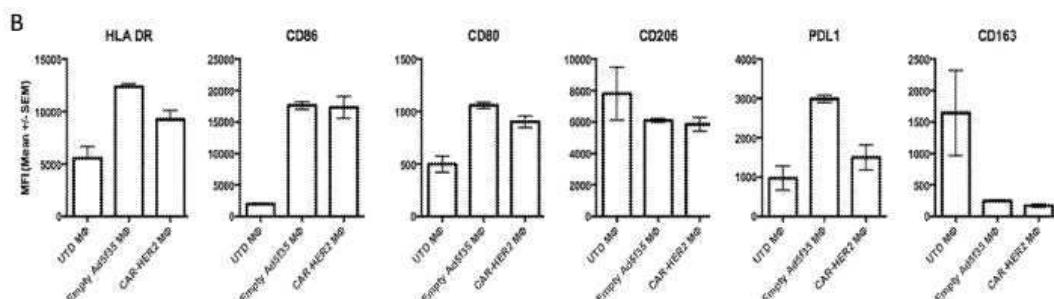
SKOV3 종양 결절 (Day 36):



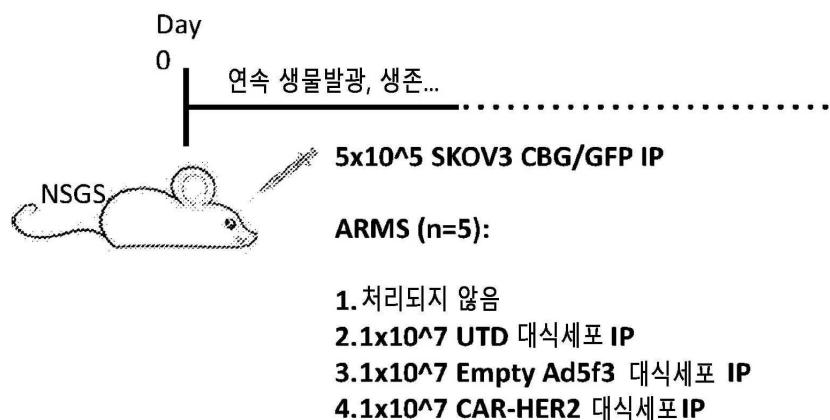
## 도면26a



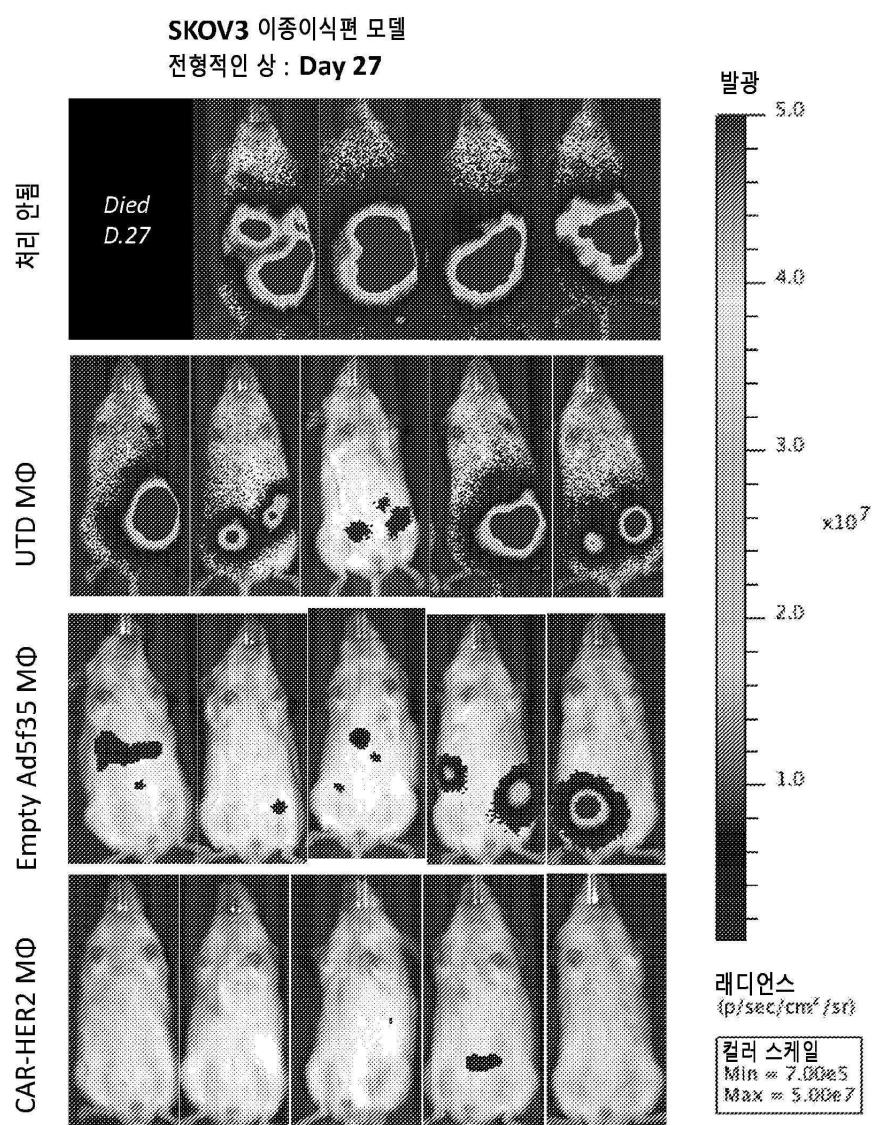
## 도면26b



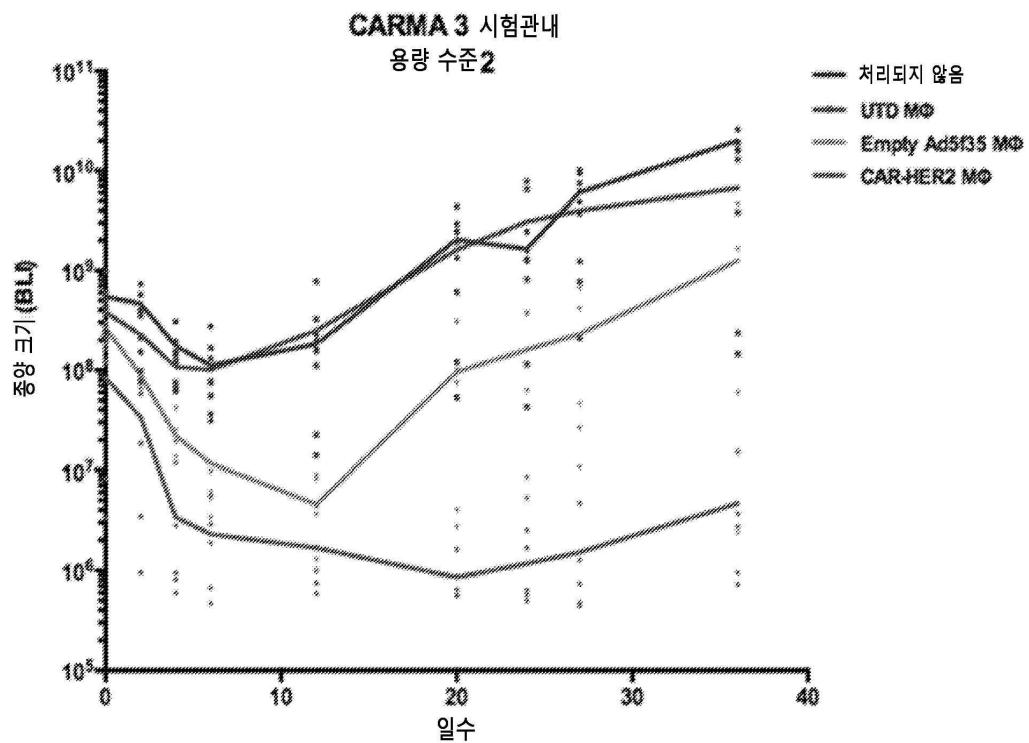
## 도면26c



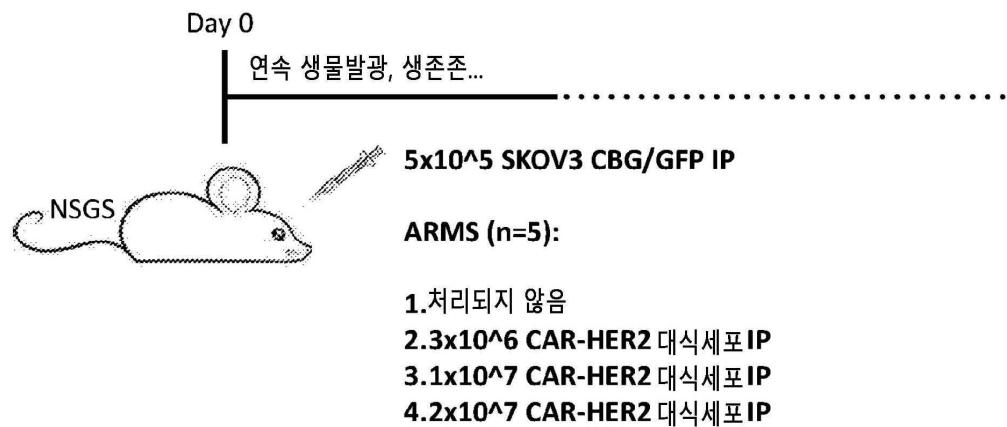
## 도면26d



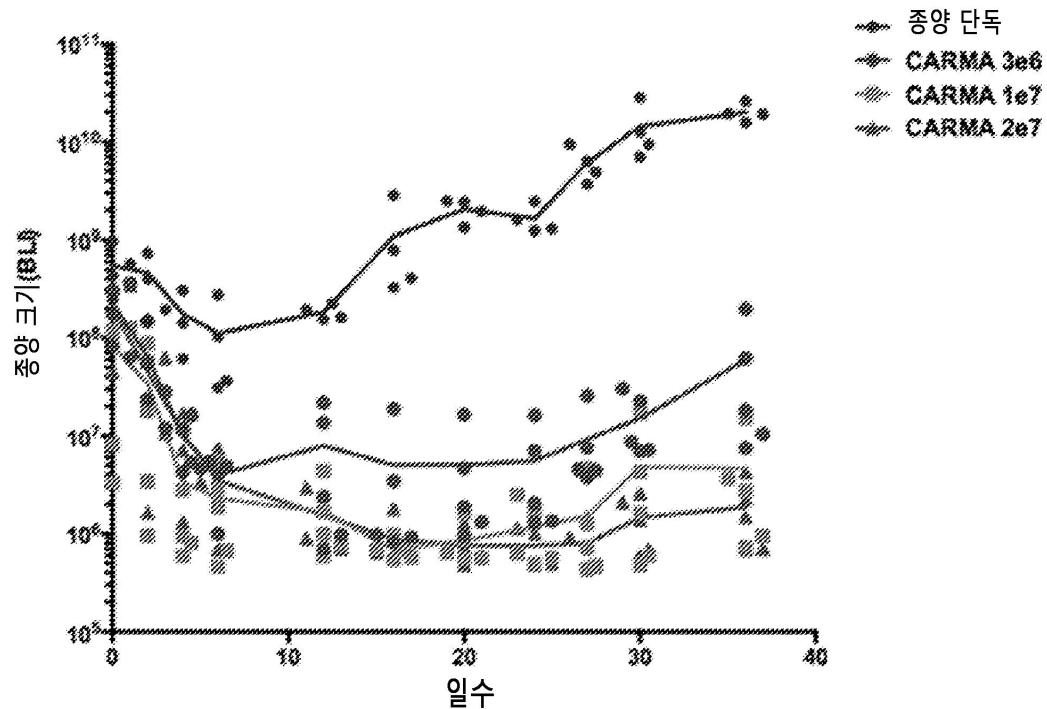
## 도면26e



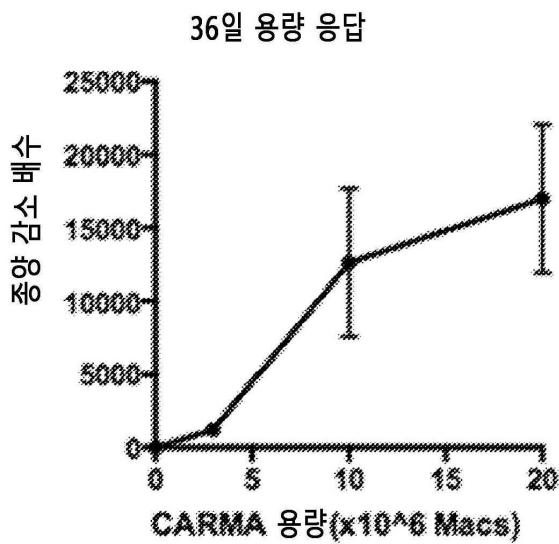
### 도면27a



도면27b



도면27c



도면28

