



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2018-0102108  
(43) 공개일자 2018년09월14일

- |   |  |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/><i>C12N 5/0783</i> (2010.01) <i>A61K 35/17</i> (2014.01)<br/><i>C07K 14/705</i> (2006.01) <i>C07K 14/725</i> (2006.01)<br/><i>C12N 7/00</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/><i>C12N 5/0646</i> (2013.01)<br/><i>A61K 35/17</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2018-7022005</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2017년02월03일<br/>심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2018년07월30일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2017/016543</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2017/136748<br/>국제공개일자 2017년08월10일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>62/291,999 2016년02월05일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인<br/>난트 홀딩스 아이피, 엘엘씨<br/>미국, 캘리포니아, 컬버 시티, 제퍼슨 블러바드 9922 (우: 90232)</p> <p>난트셀, 인크.<br/>미국 90232 캘리포니아 컬버 시티 제퍼슨 블러바드 9920</p> <p>(72) 발명자<br/>순-시용, 패트릭<br/>미국 90232 캘리포니아 컬버 시티 제퍼슨 블러바드 9920</p> <p>라비자데, 샤루즈<br/>미국 90232 캘리포니아 컬버 시티 제퍼슨 블러바드 9920</p> <p>니아지, 케이반<br/>미국 90232 캘리포니아 컬버 시티 제퍼슨 블러바드 9920</p> <p>(74) 대리인<br/>이대호, 박건홍</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 42 항

**(54) 발명의 명칭 재조합 CXADR 발현을 위한 조성물 및 방법 (Compositions And Methods For Recombinant CXADR Expression)**

**(57) 요약**

세포에서의, 특히 면역 수용성 세포에서의, CXADR의 재조합 발현은 아데노바이러스에 의한 세포로의 유전자 전달을 가능하게 하거나 또는 개선시키기 위하여 사용된다. 특히 바람직한 양태들에서, 면역 수용성 세포는 NK 세포, T-세포, B-세포, 대식 세포 또는 수지상 세포이고, 그리고 유전자 전달은 예컨대 환자 특이적 네오에피토프 또는 종양 관련 항원과 같은 질환-특이적 항원을 인코딩하는 재조합 핵산을 포함한다.

**대표도 - 도1**



피크 (pBAK) 8-퓨토마이신에서의 CXADR 서열 (HindIII to NotI):  
(AAGCTT) ATGGCGCTCCTGCTGTGCTTCGTGCTCCTGTGCGGAGTAGTGGATTTCCGCCAGAAGTTTGAGTATCACT  
ACTCCTGAAGAGATGATTGAAAAGCCAAAGGGGAACTGCCTATCTGCCATGCAAATTTACGCTTAGTCCCAGA  
CCAGGGACCCGCTGGACATCGAGTGGCTGATATCACCAGCTGATAATCAGAAAGTGGATCAAGTGATTTTATATT  
CTGGAGACAAAATTTATGATGACTACTATCCAGATCTGAAAGGCCGAGTACATTTACGAGTAATGATCTCAAATCT  
GGTGATGCATCAATAAATGTAACGAATTTACAACCTGTCAGATATTGGCACAATATCAGTGCAAAGTGAAAAAGCTCC  
TGSTGTTGCAATAAAGAGATTCTCTGGTAGTTCCTGTTAAGCCTTCAGGTGCGAGATGTTACGTTGATGGATCTG  
AAGAAATGGGAAGTGAATTTAAGATAAAATGTAACCAAAAAGAGTTCACTTCCATTACAGTATGAGTGGCAAAA  
TTGTCTGACTCACAGAAAATGCCCACTTTCATGGTTAGCAGAAATGACTTCATCTGTTATATCTGTA AAAAATGCCCTC  
TTCTGAGTACTCTGGGACATACAGCTGTACAGTCAGAAACAGAGTGGGCTCTGATCAGTGCCTGTTGCGTCTAAACG  
TTGTCCCTCCTTCAAATAAAGCTGGACTAATGTCAGGAGCCATATAGGAACCTTGCTTGCTCTAGCCCTCATTGGT  
CTTATCATCTTTGCTGTCGTA AAAAGCGCAGAGAAGAAAATATGAAAAGGAAGTTCATCAGGATATCAGGGAAGA  
TGTGCCACCTCCAAAAGAGCCGTACGTCCACTGCCAGAAGCTACATCGGCAGTAATCATTCATCCCTGGGGTCCATGT  
CTCCTTCCAACATGGAAGGATATCCAAGACTCAGTATAACCAAGTACCAAGTGAAGACTTTGAACGCACTCCTCAG  
AGTCCGACTCTCCCACTGCTAAGGTAGCTGCCCTAATCTAAGTCGAATGGGTGCGATTCCCTGTGATGATCCAGC  
ACAGAGCAAGGATGGGTCTATAGTATAG (GGCGCCGC)

(52) CPC특허분류

*C07K 14/705* (2013.01)

*C07K 14/7051* (2013.01)

*C12N 7/00* (2013.01)

*C07K 2317/622* (2013.01)

*C07K 2319/00* (2013.01)

*C12N 2710/10011* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

면역 수용성 세포(immune competent cell)를 변형시키는 방법으로서,  
면역 수용성 세포에 CXADR을 인코딩하는 재조합 핵산을 도입시켜 변형된 면역 수용성 세포를 생성하는 단계; 및  
CXADR을 발현시키는 조건들 하에서 제 1 배지(medium)에서 변형된 면역 수용성 세포를 배양하는 단계;  
를 포함하며,  
상기 면역 수용성 세포는 NK 세포 또는 수지상 세포인,  
방법.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서,  
상기 재조합 핵산은 RNA인,  
방법.

#### 청구항 3

제 2 항에 있어서,  
상기 NK 세포는 무한증식(immortalized) 세포 또는 NK92 세포 또는 유전자 조작된 NK92 세포인,  
방법.

#### 청구항 4

제 3 항에 있어서,  
NK 세포는 (a) 적어도 하나의 킬러(killer) 세포 면역글로불린-유사 수용체 (KIR:killer cell immunoglobulin-like receptor)의 발현이 감소되거나 폐지되도록 유전적으로 조작되거나, (b) 고-친화성(high-affinity) Fc $\gamma$  수용체를 발현하도록 유전자 조작되거나, 또는 (c) 키메라 T-세포 수용체를 발현하도록 조작되는,  
방법.

#### 청구항 5

제 1 항에 있어서,  
CXADR을 인코딩하는 재조합 핵산은, 구성적 활성 프로모터(constitutively active promoter), NK 세포 특이적 프로모터 또는 저산소증 유도성 프로모터의 제어 하에 있는,  
방법.

#### 청구항 6

제 1 항에 있어서,  
상기 변형된 면역 수용성 세포를 재조합 아데노바이러스(adenovirus)로 감염시키는 단계를 더 포함하는,  
방법.

#### 청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 재조합 아데노바이러스는 E2b 결실을 가지며 그리고 네오에피토프(neoepitope), 공동-자극 분자(co-stimulatory molecule), 사이토카인(cytokine) 및 체크포인트 억제제(checkpoint inhibitor) 중 적어도 하나를 인코딩하는 재조합 핵산을 포함하는,

방법.

#### 청구항 8

제 6 항에 있어서,

상기 변형된 면역 수용성 세포를 환자에게 투여하는 단계;

를 더 포함하며,

상기 감염시키는 단계는 상기 변형된 면역 수용성 세포를 상기 환자에게 투여한 이후 생체내에서(in vivo) 수행되는,

방법.

#### 청구항 9

제 6 항에 있어서,

상기 변형된 면역 수용성 세포를 환자에게 투여하는 단계;

를 더 포함하며,

상기 감염시키는 단계는 상기 변형된 면역 수용성 세포를 상기 환자에게 투여하기 이전에 생체외에서(in vitro) 수행되는,

방법.

#### 청구항 10

제 1 항에 있어서,

상기 변형된 면역 수용성 세포를 환자에게 투여하는 단계;

를 더 포함하며,

상기 변형된 면역 수용성 세포는 상기 변형된 면역 수용성 세포가 투여되는 환자에게 자가세포(autologous)인,

방법.

#### 청구항 11

제 1 항에 있어서,

상기 변형된 면역 수용성 세포는 요구되는 양으로 상기 제 1 배지에서 증식되며, 그리고

상기 변형된 면역 수용성 세포의 투여에 적합한 제 2 배지로 상기 제 1 배지를 대체하는 단계;

를 더 포함하는,

방법.

#### 청구항 12

유전적으로 변형된 면역 수용성 세포로서,

상기 면역 수용성 세포에서 CXADR의 발현을 위한 조절 서열(regulatory sequence)에 동작가능하게 결합되는 상기 CXADR을 인코딩하는 재조합 핵산을 포함하며, 그리고

상기 유전적으로 변형된 면역 수용성 세포는 NK 세포 또는 수지상 세포(dendritic cell)인,

유전적으로 변형된 면역 수용성 세포.

**청구항 13**

제 12 항에 있어서,  
상기 세포는 NK 세포인,  
유전적으로 변형된 면역 수용성 세포.

**청구항 14**

제 12 항에 있어서,  
상기 세포는, 유전적으로 변형된 NK 세포, NK92 세포 또는 NK92 유도체인,  
유전적으로 변형된 면역 수용성 세포.

**청구항 15**

제 12 항에 있어서,  
상기 세포는, 고-친화성 Fc $\gamma$  수용체를 발현하도록 유전적으로 변형되는,  
유전적으로 변형된 면역 수용성 세포.

**청구항 16**

제 15 항에 있어서,  
상기 Fc $\gamma$  수용체는 항체에 결합되고, 그리고 상기 항체는, 암 네오에피토프(cancer neoepitope), 종양 특이적 항원 또는 종양 관련 항원에 대한 결합 특이성(binding specificity)을 갖는,  
유전적으로 변형된 면역 수용성 세포.

**청구항 17**

제 12 항에 있어서,  
상기 세포는, 키메라 T-세포 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형되는,  
유전적으로 변형된 면역 수용성 세포.

**청구항 18**

제 17 항에 있어서,  
상기 키메라 T-세포 수용체는 scFv 부분을 포함하는,  
유전적으로 변형된 면역 수용성 세포.

**청구항 19**

제 17 항에 있어서,  
상기 키메라 T-세포 수용체는, 암 네오에피토프, 종양 특이적 항원 또는 종양 관련 항원에 대한 결합 특이성을 갖는 세포외영역(ectodomain)을 갖는,  
유전적으로 변형된 면역 수용성 세포.

**청구항 20**

제 12 항에 있어서,  
상기 재조합 핵산은, 상기 면역 수용성 세포의 게놈에 혼입되는,  
유전적으로 변형된 면역 수용성 세포.

**청구항 21**

제 12 항에 있어서,  
상기 재조합 핵산은 RNA인,  
유전적으로 변형된 면역 수용성 세포.

**청구항 22**

제 12 항에 있어서,  
상기 조절 서열은, NK 세포 특이적 프로모터, 또는 저산소증 유도성 프로모터를 포함하는,  
유전적으로 변형된 면역 수용성 세포.

**청구항 23**

제 12 항에 있어서,  
상기 세포는 상기 세포를 수용하는 환자에 대해 자가세포인,  
유전적으로 변형된 면역 수용성 세포.

**청구항 24**

제 12 항에 있어서,  
상기 면역 수용성 세포는 유전자 변형 이전에 CXADR을 발현하지 않는,  
유전적으로 변형된 면역 수용성 세포.

**청구항 25**

제 12 항에 있어서,  
상기 CXADR은 CXADR 이소형 1(isoform 1) 인,  
유전적으로 변형된 면역 수용성 세포.

**청구항 26**

암의 면역요법을 위한 환자의 컨디셔닝 방법으로서,  
CXADR을 발현하도록 유전적으로 변형된 면역 수용성 세포를 환자에게 투여하는 단계를 포함하며,  
상기 면역 수용성 세포는 NK 세포 또는 수지상 세포인,  
방법.

**청구항 27**

제 26 항에 있어서,  
상기 면역 수용성 세포는 NK 세포인,  
방법.

**청구항 28**

제 26 항에 있어서,  
네오에피토프, 공동-자극 분자, 사이토카인 및 체크포인트 억제제 중 적어도 하나를 인코딩하는 핵산을 포함하  
는 재조합 아데노바이러스로 상기 면역 수용성 세포를 감염시키는 단계;  
를 더 포함하는,

방법.

**청구항 29**

제 26 항에 있어서,

네오에피토프, 공동-자극 분자, 사이토카인 및 체크포인트 억제제 중 적어도 하나를 인코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노바이러스를 환자에게 투여하는 단계;

를 더 포함하는

방법.

**청구항 30**

제 28 항 또는 제 29 항에 있어서,

상기 재조합 아데노바이러스는 결실 또는 비-기능성 E2b 유전자를 갖는,

방법.

**청구항 31**

암으로 진단 된 환자를 치료하는 방법으로서,

CXADR을 인코딩하는 재조합 핵산을 포함하는 유전적으로 변형된 면역 수용성 세포를 상기 환자에게 투여하는 단계 - 상기 CXADR을 인코딩하는 재조합 핵산은 상기 면역 수용성 세포에서 CXADR의 발현을 위한 조절 서열에 동작가능하게 결합됨-; 및

네오에피토프, 공동-자극 분자, 사이토카인 및 체크포인트 억제제 중 적어도 하나를 인코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노바이러스를 상기 환자에게 투여하는 단계;

를 포함하며,

상기 유전적으로 변형된 면역 수용성 세포는 NK 세포 또는 수지상 세포이며, 그리고

상기 재조합 아데노바이러스는 상기 환자의 유전적으로 변형된 면역 수용성 세포에서 CXADR의 발현시 투여되는,

방법.

**청구항 32**

제 31 항에 있어서,

상기 유전적으로 변형된 면역 수용성 세포는 NK 세포인,

방법.

**청구항 33**

제 31 항에 있어서,

상기 재조합 아데노바이러스는 결실 또는 비-기능성 E2b 유전자를 갖는,

방법.

**청구항 34**

제 31 항에 있어서,

상기 유전적으로 변형된 면역 수용성 세포는 상기 환자의 자가세포인,

방법.

**청구항 35**

제 31 항에 있어서,

상기 유전적으로 변형된 면역 수용성 세포는, 청구항 제12항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 유전적으로 변형된 면역 수용성 세포인,

방법.

#### 청구항 36

암으로 진단된 환자를 치료하는 방법으로서,

재조합 아데노바이러스로 유전적으로 변형된 면역 수용성 세포를 감염시키는 단계; 및

상기 감염된 면역 수용성 세포를 상기 환자에게 투여하는 단계;

를 포함하며,

상기 유전적으로 변형된 면역 수용성 세포는, CXADR을 인코딩하는 재조합 핵산을 포함하며 그리고 상기 CXADR을 인코딩하는 핵산은 상기 면역 수용성 세포에서 CXADR의 발현을 위한 조절 서열에 동작가능하게 결합되며,

상기 유전적으로 변형된 면역 수용성 세포는 NK 세포 또는 수지상 세포이며, 그리고

상기 재조합 아데노바이러스는 네오에피토프, 공동-자극 분자, 사이토카인 및 체크포인트 억제제 중 적어도 하나를 인코딩하는 핵산을 포함하는,

방법.

#### 청구항 37

제 36 항에 있어서,

상기 유전적으로 변형된 면역 수용성 세포는 NK 세포인,

방법.

#### 청구항 38

제 36 항에 있어서,

상기 재조합 아데노바이러스는 결길 또는 비-기능성 E2b 유전자를 갖는,

방법.

#### 청구항 39

제 36 항에 있어서,

상기 유전적으로 변형된 면역 수용성 세포는 상기 환자의 자가세포인,

방법.

#### 청구항 40

제 36 항에 있어서,

상기 네오에피토프는 암 및 환자-특이적 네오에피토프인,

방법.

#### 청구항 41

암을 치료하기 위한 유전적으로 변형된 면역 수용성 세포의 용도로서,

상기 유전적으로 변형된 면역 수용성 세포는 청구항 제12항 내지 제25항 중 어느 한 항에 따른 유전적으로 변형된 면역 수용성 세포인,

암을 치료하기 위한 유전적으로 변형된 면역 수용성 세포의 용도.

**청구항 42**

제 41 항에 있어서,

상기 유전적으로 변형된 면역 수용성 세포는 네오에피토프, 공동-자극 분자, 사이토카인 및 체크포인트 억제제 중 적어도 하나를 인코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노바이러스로 감염된 세포인

암을 치료하기 위한 유전적으로 변형된 면역 수용성 세포의 용도.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 세포의 유전적 변형의 조성물 및 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 세포를 바이러스 감염에 민감하게 만드는 변형의 조성물 및 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 배경 기술에 대한 설명은 본 발명을 이해하는데 유용할 수 있는 정보를 포함한다. 본 개시내용에 제공된 정보 중 임의의 것이, 선행 기술이거나 현재 청구되는 발명과 관련이 있거나 또는 구체적으로 또는 암시적으로 언급된 임의의 간행물이 선행 기술임을 인정하는 것은 아니다.

[0003] 본 개시내용의 모든 간행물들 및 특히 출원들은 각각의 개별 간행물 또는 특히 출원이 구체적으로 그리고 개별적으로 참조로 통합되는 것으로 지시된 것과 같이 동일한 정도로 참조로 본원에 통합된다. 통합된 참조에서의 용어의 정의 또는 사용이 일관성이 없거나 본원에 제공된 상기 용어의 정의와 상반되는 경우, 본원에 제공된 상기 용어의 정의가 적용되며, 참조에서의 상기 용어의 정의는 적용되지 않는다.

[0004] 아데노바이러스는 양호하게 특성화된 이중 가닥 DNA 바이러스이며 사람에서 호흡 감염을 유발하는 능력으로 알려져 있다. 더욱 최근에, 아데노바이러스 계통은 관심 대상의 많은 세포 유형에 전달하기 위한 다양한 도입 유전자를 함유하는 아데노바이러스 입자의 생산을 가능하게 하는 조성물을 생성하도록 변형되었다. 아데노바이러스 유형 5는 이용자 결정 바이러스(예컨대, Vector BioLabs, 미국, 말번, 펜실베이니아, 19355 또는 Thermo Fisher Scientific, 미국, 월섬, 매사추세츠 02451)를 생산하도록 상업적 공간에서 이용가능한 다수의 키트들과 함께 이 점에 관하여 가장 잘 연구된 플랫폼 중 하나이다. 이러한 방식으로 생산된 아데노바이러스 유형 5는 세포 배양, 동물 및 심지어 임상 시험에 사용되어, 이 시스템으로 과학 및 임상 종사자의 친숙함을 더 뒷받침한다. 세포 내로의 바이러스의 유입은 콕사키(Coxsackie) 및 아데노바이러스 수용체 (CXADR)를 통해 매개되는 것으로 생각된다.

[0005] CXADR을 생성하지 못하거나 바이러스 유입을 위해 불충분한 양의 CXADR을 생산하는 세포 또는 조직은 이러한 세포에서 아데노바이러스 유형 5 기술의 사용을 제한하여 줄기 세포 및 면역 세포를 포함한 많은 임상적으로 관련된 세포 및 조직의 형질 도입을 방지한다. CXADR(Swiss-Prot 수탁 번호: P78310)은 유형 I 막 수용체 및 면역글로불린 슈퍼패밀리의 일원(member)이다 (*Science* (1997) 275; 1320-1323). CXADR은 통상적으로 크기가 200 아미노산보다 큰 세포의 도메인을 가지며, 치밀 이음 통합성(tight junction integrity)에 필수적인 상피 접합 복합체(epithelial apical junction complex)의 성분으로 여겨진다 (*J Biol Chem* (1999) 274; 10219-10226). CXADR은 세포간 접촉 부위에 세포내 PDZ 도메인 함유 단백질 LNX (리간드(Ligand)-of-넘 단백질(Numb Protein)-X)를 조달한다(*J Biological Sci* (2003) 278; 7439-7444). CXADR은 또한 호모필릭(homophilic) 세포 접착 분자로서 기능할 수 있으며(*Molecular Brain Research* (2000) 77, 19-28), PMN의 형질막에 위치한 JAML과의 접착 상호 작용을 통해 PMN의 상피 이동에서 관찰되었다(*Mol Biol Cell* (2005) 16; 2694-703). CXADR 녹아웃 마우스는 심장 결함과 관련된 배아의 치명적인 표현형을 나타냈다(*Genesis* (2005) 42; 77-85). 이러한 다수의 기능 및 개입에 기초하여, CXADR의 주요 생리학적 역할은 바이러스성 진입 수용체가 아닐 것이다.

[0006] CXADR의 과발현이 골육종 및 악성 갑상선 종양에서 관찰되었고(*Cancer Sci* (2003) 94; 70-75; Thyroid (2005) 15; 977-87), CXADR은 또한 미국 특허 제2014/0193419호에 기재된 바와 같이 유방, 신장 및 폐암 세포주에서, 그리고 결장 종양 조직에서 과발현되었다. 특히, CXADR 안티센스 플라스미드 벡터는 고 발현 폐암 세포에 의해 매개되는 이종 이식물(xenograft)을 폐기하고 연관 한천 콜로니 형성을 억제하였다(*Cancer Res* (2004) 64; 6377-80). CXADR 발현은 동족이식(syngeneic) 마우스 종양 모델에서 종양전(preneoplastic) 전구 병변에서 중

양성 유방암 외성장(neoplastic mammary cancer outgrowth)으로 전이된 후에 증진된다(*Clin Cancer Res* (2005) 11; 4316-20). 유방암 세포의 3D 조직 배양 모델에서, 악성 형질 전환에서와 같이 극성 및 완전성의 파괴는 CXADR의 상향 조절로 이어질 수 있다(*Proc. Natl. Acad. Sci.* (2003) 100, 1943-1948). 난소 및 자궁 경부암 세포주에서의 CXADR 과발현은 세포자살로부터 보호함으로써 세포 생존을 증진시켰다(*Clin Cancer Res* (2005) 11; 4316-20). 위장암에서 CXADR의 발현은 중앙 분화와 관련이 있었다(*Cancer Gene Ther* (2006) Epub). 진행성 방광암과 관련된 CXADR 발현의 상실 (*Urology* (2005) 66; 441-6). 난소암 세포주에서 CXADR의 과발현은 세포 이동을 억제하였다(*Exp Cell Res* (2004) 298; 624-31). CXADR의 발현은 1차 전립선암에서는 감소되었지만, 전이 시에는 고도로 발현된다 (*Cancer Res* (2002) 62; 3812-8).

[0007] US2015/0140018호에 개시된 바와 같이, CXADR의 공지된 용도에서, 인간 CXADR의 위치 181 내지 230에 존재하는 에피토프에 결합할 수 있는 항체는 전립선암 세포, 췌장암 세포, 및 대장암 세포에 대한 항암 활성을 가지는 것으로 보고되었다. 또한, '018 출원은 항체가 ADCC 및 CDC 활성을 갖는다는 것을 개시하였다. 또한, US 제 2008/0124360호에 기재된 바와 같이, 아데노바이러스 벡터는 수지상 세포를 표적화하기에 적합한 변형되거나 이종의 섬유 단백질을 생성하여 보다 구체적으로 T 세포에 대한 가공 및 제시를 위한 수지상 세포에 항원을 전달하도록 구성되었다. 이를 위해, 바이러스 입자는 특정 천연 수용체(예컨대, Ad5 및 Ad2에 대한 콕사키-아데노바이러스 수용체)에 결합하는 것으로부터 표적화되지 않고, 수지상 세포상에 발현되는 수용체에 재표적화 된다. 이러한 재표적화는 감염의 방향 전환에 대하여 적어도 개념적으로는 유익하지만, 새로운 어려움이 발생한다. 다른 것들 중에서도, 확립된 아데노바이러스 숙주 세포에서의 바이러스 증식은 숙주 세포의 감염에 필요한 CXADR 수용체에 대한 손실 결합으로 인해 더 이상 선택이 아니다.

[0008] 그러나, 주목할 만하게는, 치료 세포에서의 CXADR의 발현 또는 과발현은 암 치료 또는 심지어 암으로 진단된 환자의 치료를 보조하는 역할에 사용된 것으로 보이지 않는다. 그러므로, 이러한 세팅에서 CXADR을 사용하는 조성물 및 방법에 대한 요구가 여전히 존재한다.

**발명의 내용**

[0009] 본 출원은 2016 년 2월 5일자로 출원된 일련 번호 제62/291,999호의 미국 가출원의 우선권을 주장한다.

[0010] 본 발명의 주제는 면역 수용성 세포에서 CXADR의 재조합 발현이 세포의 바이러스 형질 감염, 특히 재조합 아데노바이러스로의 형질 감염에 대한 감수성을 증가시키는데 사용되는 암 치료 조성물 및 방법에 관한 것이다. 변형된 세포는 직접적(예컨대, 환자 및 종양 특이적 네오에피토프를 인코딩하는 재조합 아데노바이러스로 감염된 수지상 또는 NK 세포) 또는 간접적(예컨대, 공동-자극 분자 또는 체크포인트 억제제를 인코딩하는 재조합 아데노바이러스로 감염된 NK 세포) 방식으로 치료 기능을 제공하는 것이 고찰된다.

[0011] 본 발명의 주제 중 하나의 양태에서, 본 발명자는 면역 수용성 세포에 CXADR을 인코딩하는 재조합 핵산을 도입하여 변형된 면역 수용성 세포를 생산하는 단계를 포함하는 면역 수용성 세포를 변형시키는 방법을 고찰한다. 다른 단계에서, 변형된 면역 수용성 세포는 CXADR을 발현시키는 조건들 하에서 제 1 배지에서 배양된다.

[0012] 가장 통상적으로, 면역 수용성 세포는 NK 세포(예컨대, 무한증식 또는 NK92 세포, 또는 유전적으로 조작된 NK92 세포), T 세포(예컨대, CD8+), B-세포, 대식 세포 또는 수지상 세포이다. 예를 들어, NK 세포는 적어도 하나의 킬러 세포 면역글로불린-유사 수용체(KIR: killer cell immunoglobulin-like receptor)의 발현이 감소되거나 폐지되도록 유전적으로 조작될 수 있고, 고-친화성 Fcγ 수용체를 발현하도록 유전적으로 조작될 수 있거나, 키메라 T 세포 수용체를 발현하도록 유전적으로 조작될 수 있다. 적합한 조절 요소에 대하여, CXADR 유전자는 구성적 활성 프로모터, NK 세포 특이적 프로모터, 또는 저산소증 유도성 프로모터의 제어 하에 있을 수 있음이 고찰된다. 또한, 적합한 NK 세포가 특정 아데노바이러스에 대해 자연적으로 허용될 수 있거나 또는 NK 세포가 하나 이상의 특이적 아데노바이러스에 대한 허용도를 증가시키거나 나타내도록 변형되거나 선택되는 것으로 고찰된다.

[0013] 추가로 이해되는 바와 같이, 고찰되는 방법은 (통상적으로 환자 및 종양 특이적) 네오에피토프, 공동-자극 분자, 사이토카인 및/또는 체크포인트 억제제를 인코딩하는 재조합 핵산을 포함할 (바람직하게는 E2b 결실을 갖는)재조합 아데노바이러스로 변형된 면역 수용성 세포를 감염시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 적합한 아데노바이러스에 대하여, 바람직한 아데노바이러스는 면역 수용성 세포를 용이하게 감염시킬 수 있고/있거나 감염된 세포 내로 이송된 하나 이상의 유전자의 발현을 허용할 수 있음에 주목해야 한다. 고찰된 방법은 변형된 면역 수용성 세포를 환자에게 투여하는 단계를 더 포함할 수 있으며, 감염시키는 단계는 변형된 면역 수용성 세포를 환자에게 투여한 이후 생체내(in vivo)에서 수행되는 것을 더 알게 된다. 대안적으로, 고찰된 방법은 변형된 면

역 수용성 세포를 환자에게 투여하는 단계도 포함할 수 있으며, 감염시키는 단계는 변형된 면역 수용성 세포를 환자에게 투여하기 이전에 생체외(in vitro)에서 수행된다.

- [0014] 원하는 경우, 변형된 면역 수용성 세포는 변형된 면역 수용성 세포가 투여되는 환자에게 자가세포(autoologous) 이고/이거나 요구되는 양으로 제1 배지에서 증식될 수 있으며, 이후 변형된 면역 수용성 세포의 투여에 적합한 제2 배지로 제1 배지가 대체된다.
- [0015] 그러므로, 본 발명자들은 또한 면역 수용성 숙주 세포에서 CXADR의 발현을 위한 조절 서열에 동작가능하게 결합되는 CXADR(예컨대, 이소형(isoform) 1)을 인코딩하는 재조합 핵산을 포함하는 유전적으로 변형된 면역 수용성 세포를 고찰한다. 상술한 바와 같이, 적합한 면역 수용성 세포는 NK 세포, T-세포, B-세포, 대식 세포, 및 수지상 세포를 포함한다. 그러나, 또 다른 고찰 양태들에서, 대안 세포는 반드시 면역 수용성 세포일 필요는 없으며, 적합한 다른 세포는 CHO 세포, HEK-293 세포, 마우스 골수종 림프구 세포, BHK 세포, Sf9 세포 등을 명시적으로 포함한다.
- [0016] 유전적으로 변형된 면역 수용성 세포가 NK 세포인 경우, 이러한 NK 세포는 유전적으로 변형된 NK 세포, NK92 세포 또는 NK92 유도체일 수 있다. 예를 들어, 세포는 (암 네오에피토프, 종양 특이적 항원 또는 종양 관련 항원에 대한 결합 특이성을 갖는 항체에 결합될 수 있는) 고-친화성 Fc $\gamma$  수용체를 발현하도록 유전적으로 변형될 수 있거나, (예컨대, scFv 부분을 포함하는) 키메라 T-세포 수용체를 발현하도록 유전적으로 변형될 수 있다. 바람직한 키메라 T-세포 수용체는 통상적으로 암 네오에피토프, 종양 특이적 항원 또는 종양 관련 항원에 대한 결합 특이성을 갖는 세포외영역(ectodomain)을 가질 것이다.
- [0017] 유전적으로 변형된 면역 수용성 세포에서의 재조합 핵산은 숙주 세포의 게놈에 혼입될 수 있거나, 또는 염색체 외 DNA 또는 RNA로서 존재할 수 있다. 가장 통상적이지만 반드시 그러하지는 않게, 조절 서열은 NK 세포 특이적 프로모터 또는 저산소증 유도성 프로모터를 포함할 수 있다.
- [0018] 다른 관점에서 볼 때, 본 발명자들은 또한 암의 면역 치료를 위해 환자를 컨디셔닝하는 방법을 고찰한다. 바람직한 방법은 CXADR을 발현하도록 유전적으로 변형된 면역 수용성 세포(예컨대, NK 세포, T-세포, B-세포, 대식 세포, 또는 수지상 세포)를 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0019] 또한, 이러한 방법은 네오에피토프, 공동-자극 분자, 사이토카인 및 체크포인트 억제제 중 적어도 하나를 인코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노바이러스로 면역 수용성 세포를 감염시키는 추가 단계를 포함할 수 있거나, 네오에피토프, 공동-자극 분자, 사이토카인, 및 체크포인트 억제제 중 적어도 하나를 인코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노바이러스를 환자에게 투여하는 추가 단계를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 재조합 아데노바이러스는 결실 또는 비-기능성 E2b 유전자를 가질 것이다.
- [0020] 본 발명의 주제의 또 다른 양태들에서, CXADR을 인코딩하는 재조합 핵산을 포함하는 유전적으로 변형된 면역 수용성 세포를 환자에게 투여하는 단계를 포함하며, CXADR을 인코딩하는 핵산은 면역 수용성 숙주 세포에서 CXADR의 발현을 위한 조절 서열에 동작가능하게 결합되는, 암으로 진단된 환자를 치료하는 방법이 고찰된다. 또 다른 단계에서, 네오에피토프, 공동-자극 분자, 사이토카인 및/또는 체크포인트 억제제를 인코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노바이러스가 환자에게 투여된다. 가장 통상적으로, 재조합 아데노바이러스는 환자의 유전적으로 변형된 면역 수용성 세포에서 CXADR의 발현시 투여된다.
- [0021] 바람직한 면역 수용성 세포는 NK 세포, T-세포, B-세포, 대식 세포 및 수지상 세포를 포함하며, 재조합 아데노바이러스는 결실 또는 비-기능성 E2b 유전자를 갖고/갖거나 유전적으로 변형된 면역 수용성 세포는 환자의 자가 세포인 것이 일반적으로 바람직하다.
- [0022] 여전히 고찰되는 양태들에서, 암으로 진단된 환자를 치료하는 방법이 고찰된다. 이러한 방법은 통상적으로 유전적으로 변형된 면역 수용성 세포를 재조합 아데노바이러스로 감염시키는 단계를 포함할 것이며, 유전적으로 변형된 면역 수용성 세포는, CXADR을 인코딩하는 재조합 핵산을 포함하며 그리고 CXADR을 인코딩하는 핵산은 면역 수용성 숙주 세포에서 CXADR의 발현을 위한 조절 서열에 동작가능하게 결합되며, 재조합 아데노바이러스는 네오에피토프, 공동-자극 분자, 사이토카인 및 체크포인트 억제제 중 적어도 하나를 인코딩하는 핵산을 포함한다. 또 다른 단계에서, 감염된 면역 수용성 세포는 환자에게 투여된다.
- [0023] 따라서, 암 치료에서 유전적으로 변형된 면역 수용성 세포의 용도는 또한 고찰되며, 유전적으로 변형된 면역 수용성 세포는 본원에 제시된 바와 같은 유전적으로 변형된 면역 수용성 세포이다. 유전적으로 변형된 면역 수용성 세포는 네오에피토프, 공동-자극 분자, 사이토카인, 및 체크포인트 억제제 중 하나 이상을 인코딩하는 핵산

을 포함하는 재조합 아데 바이러스로 감염된 세포일 수 있음을 추가로 알게 된다.

[0024] 본 발명의 주제의 다양한 목적, 특징, 양태 및 장점은 첨부된 도면과 함께 바람직한 실시형태의 하기 상세한 설명으로부터 더욱 명백해질 것이며, 도면에서 동일한 도면 부호는 동일한 구성 요소를 나타낸다.

**도면의 간단한 설명**

[0025] 도 1은 본 개시내용의 설명과 함께 사용하기에 적합한 CXADR 서열 카세트의 예시적인 개략도이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0026] 재조합 아데노바이러스 (AdV) 유형 5는 허용성세포 유형에서 양호하게 특성화되고 통상적으로 사용되는 바이러스 유전자 전달 플랫폼을 제공한다. 그러나, AdV 유형 5에 대한 주어진 세포 유형의 형질 전환 가능성은 대개의 경우 CXADR 또는 그의 충분한 양의 발현에 의존한다. 불행하게도, 이 수용체의 발현은 많은 암 유형, 줄기 세포 또는 (세포 독성 T 세포 또는 NK 세포와 같은) 입양 전이된(adoptively transferred) 면역 세포에서 악명 높게 부재되어 있다.

[0027] 본 발명자들은 이제 이해 대상의 세포에 대한 CXADR 유전자의 발현을 용이하게 하고, 생체의 및 생체내에서 AdV 유형 5 형질 감염에 민감성을 부여하도록 세포가 핵산 구조물(construct)로 형질 감염될 수 있음을 발견했다. 가장 바람직하게는, CXADR의 재조합 발현에 적합한 세포는 NK 세포, T-세포 (CD8+, CD4+ 등), B-세포, 대식 세포, 및 특정 수지상 세포군과 같은 면역 수용성 세포를 포함한다. CXADR의 발현에 의해, 이들 유전적으로 조작된 세포는 이제 재조합 핵산을 감염된 세포에 전달하기 위해 유전적으로 변형된 아데노바이러스로 감염되기 쉽다는 것이 고찰된다. 가장 바람직하게는, 전달은 면역 원성을 감소시키거나 폐지시킨 아데노바이러스 구조물을 사용하여 수행되며, 특히 고찰되는 아데노바이러스는 E2b 유전자가 비 기능적이거나 결실된 것들을 포함한다(예컨대, *Journal of Virology*, Feb. 1998, 926-933 페이지 참조).

[0028] 이러한 맥락에서, 숙주 세포(예컨대, NK 세포 또는 단백질 생산 세포와 같은 면역 수용성 세포)를 CXADR 유전자로 형질 감염시키는 것은 다양한 바이러스로 감염을 허용하는 일반 허용성 세포를 반드시 초래할 필요는 없다는 것을 이해해야 한다. 실제로, 형질 감염된 세포의 (예컨대, 사용된 CXADR의 이소 타입에 따라) 감염은 바이러스의 특정 서브세트(subset) 및 심지어 아데노바이러스의 서브 세트로 제한될 수 있다는 것을 이해해야 한다. 예를 들어, 일부 형질 감염된 면역 수용성 세포(예컨대, NK92 세포)는 영장류 (예컨대, 고릴라) 유래 아데노바이러스로 용이하게 감염될 수 있는 반면에, 인간 또는 변형된 아데노바이러스로의 형질 감염에 덜 민감할 수 있다. 반면, 일부 변형된 아데노바이러스(예컨대, NK92 유도체)는 이들의 변형으로 인해 면역 수용성 세포를 용이하게 감염시킬 수 있다(예컨대, 특정 초기 유전자가 제거되어 선천적인 면역성을 제거하였다).

[0029] 또한, 그리고 특히 형질 감염된 세포가 바이러스 감염에 덜 허용적인 상황에서, 세포가 허용성에 대해 적응/선택될 수 있다는 것이 고찰된다. 이러한 선택은 세포가 무한증식된 클론성 팽창일 수 있거나, 세포가 최초로 무한증식된 다음 형질 감염되고 허용성에 대해 선택될 수 있다. 대안적으로, 형질 감염된 허용성 세포를 또한 허용성을 확립하는 하나 이상의 형질에 대해 분석 할 수 있으며, 이들 형질은 허용성 개선을 위해 추가의 세포에 부여될 수 있다.

[0030] 본 발명의 주제의 하나의 예시적인 양태에서, CXADR을 인코딩하는 cDNA를 HEK-293T 총 cDNA 제조물로부터 증폭시킨 후, 이어서 도 1에 예시적으로 나타낸 바와 같이 피크(peak) 8-퓨로마이신(puromycin) 플라스미드로 클로닝 하였다. 유전자 발현은 인간 신장 인자 1 프로모터인 EF-1α로부터 구동되었다. 이렇게 제조된 재조합 서열은 DNA 염기 서열 분석에 의해 검증되었고 참조 데이터 세트(NP\_001329.1)에서 인간 CXADR 이소형 1에 대한 공지된 서열과 완벽하게 정렬되었다. 이후, 발현 플라스미드는 당업계에 주지된 표준 형질 감염 프로토콜을 사용하여 NK92 세포로 형질 감염되었다. 퓨로마이신을 사용하여 세포 스탁(stock) 제조를 위한 형질 감염된 세포의 선택이 수행되었다. 그러한 형질 전환된 세포는 인간 NK 세포주가 아데노바이러스, 특히 AdV 유형 5로 형질 도입하기 어렵다는 것이 일반적으로 알려져 있기 때문에 특히 유리하다.

[0031] 물론, 본 발명의 주제는 상기 특이적 발현 벡터에 한정되지 않으며, 실제로 세포 내 재조합 핵산으로부터의 모든 발현 방식이 본원에서의 사용에 적합하다고 간주된다는 것을 이해해야 한다. 일반적으로, 핵산 서열을 인코딩하는 적합한 CXADR은 많은 유형의 벡터로 클로닝될 수 있다. 예를 들어, CXADR 핵산은 플라스미드, 파지미드, 파아지 유도체, 동물 바이러스, 및 코스미드와 같은 원형 벡터로 클로닝될 수 있다. 특히 관심 대상의 벡터는 발현 벡터, 복제 벡터, 프로브 생성 벡터, 및 시퀀싱 벡터를 포함한다. 또한, 발현 벡터는 바이러스 벡터의 형태로 세포에 제공될 수 있다. 바이러스 벡터 기술은 당해 기술 분야에 주지되어 있으며, 예를 들어, Sambrook

등, 2012, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 1 권-4 권, Cold Spring Harbor Press, 뉴욕) 및 기타 바이러스학 및 분자 생물학 매뉴얼에 기재되어 있다. 벡터로서 유용한 바이러스는 다양한 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 헤르페스 바이러스, 및 렌티 바이러스를 포함한다. 일반적으로, 적합한 벡터는 적어도 하나의 유기체에서 기능적인 복제 기점, 프로모터 서열, 편리한 제한 효소 부위, 및 하나 이상의 선택가능한 마커를 함유할 것이다(예컨대, WO 01/96584; WO 01/29058; 및 미국 특허 제6,326,193호).

[0032] 많은 주지된 바이러스 기반 시스템이 포유류 세포로의 유전자 이송을 위해 개발되었다. 예를 들어, 레트로바이러스는 유전자 전달 시스템을 위한 편리한 플랫폼을 제공한다. 선택된 유전자는 벡터에 삽입되고 당업계에 공지된 기술을 사용하여 레트로바이러스 입자에 패키징될 수 있다. 이후, 재조합 바이러스는 단리되고 생체내 또는 생체외에서 피검자의 세포로 전달될 수 있다. 일부 실시형태들에서, 아데노바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터가 사용된다. 물론, 본 발명의 주제는 특이적 벡터에 한정되지 않으며, 실제로 세포 내 재조합 핵산으로부터의 모든 발현 방식이 벡터 이외의 구조물의 발현 형태를 포함하여, 본원에서의 사용에 적합하다고 간주되는 것을 이해해야 한다. 예를 들어, 일과성 발현이 요구되는 경우, 재조합 핵산은 진행 생물 복제 서열 없이 RNA 또는 염색체의 DNA로서 전달될 수 있다. 반면, 영구 발현이 요구되는 경우, 핵산이 세포의 게놈으로 통합시키기 위해 전달될 수 있거나 세포는 게놈에 발현 카세트를 설치하도록 (예컨대, CRISPR/Cas9 기술을 사용하여) 게놈 편집을 거칠 수 있다.

[0033] 마찬가지로, 전사 및 번역 제어는 상당히 변할 수 있고, 발현은 구성적 활성 프로모터로부터, 해당 유도 작용제를 이용한 유도성 프로모터로부터, 또는 선택된 조직 또는 배양 조건들 하에서 활성화된 프로모터로부터 추진될 수 있다는 것을 이해해야 한다. 당 업계에 공지된 바와 같이, 다양한 프로모터 요소(예컨대, 개시 인자 결합 부위, 중합효소 결합 부위, 인핸서, 등)는 전사 개시의 빈도를 조절한다. 통상적으로, 이들은 다수의 프로모터가 출발 부위의 하류에 기능적 요소를 함유하는 것으로 나타났지만, 개시 부위의 상류 30-110bp 영역에 위치한다. 프로모터 요소 사이의 간격은 종종 유연하기 때문에, 프로모터 기능이 요소가 서로 반전되거나 서로에 대하여 이동할 때 보존된다. 예를 들어, 티미딘 키나아제(tk: thymidine kinase) 프로모터에서, 프로모터 요소 사이의 간격은 활성이 감소하기 시작하기 전에 50 bp 간격으로 증가될 수 있다.

[0034] 프로모터에 따라, 개별 요소가 전사를 활성화시키기 위해 협력적으로 또는 독립적으로 기능할 수 있다는 것도 또한 이해해야 된다. 예시적인 프로모터는 CMV IE 유전자, EF-1a, 유비퀴틴 C 또는 포스포글리세로 키나제(PGK: phosphoglycerokinase) 프로모터를 포함한다. 추가로 고찰되는 양태들에서, 프로모터는 PGK 프로모터, 또는 EF-1a 프로모터와 같은 포유류 T 세포에서 CXADR 도입 유전자를 발현할 수 있는 프로모터이다. 천연 EF-1a 프로모터는 아미노아실 tRNA를 리보솜으로의 효소 전달을 담당하는 신장 인자-1 복합체의 알파 서브유닛의 발현을 추진한다. EF-1a 프로모터는 포유류 발현 플라스미드에서 광범위하게 사용되어 왔고, 다양한 바이러스 벡터에 클로닝된 도입 유전자로부터의 발현을 추진하는데 효과적이라는 것이 증명되었다(예컨대, *Mol. Ther.* (2009), 17 (8): 1453- 1464 참조).

[0035] 적합한 프로모터의 추가의 예는 이미디어트 얼리(immediate early) 사이토메갈로바이러스(CMV: cytomegalovirus) 프로모터를 포함한다. 이 프로모터 서열은 동작가능하게 연결된 임의의 폴리뉴클레오티드 서열의 높은 수준의 발현을 추진할 수 있는 강력한 구성적 프로모터 서열이다. 그러나, 액틴 프로모터, 미오신 프로모터, 헤모글로빈 프로모터, 및 크레아틴 키나아제 프로모터와 같은 인간 유전자 프로모터뿐만 아니라 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, Epstein-Barr 바이러스 이미디어트 얼리 프로모터, Rous 육종 바이러스 프로모터를 포함하여, 다른 구성적 프로모터 서열도 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 주제는 구성적 프로모터에 한정되지 않지만, 유도성 프로모터도 본원에서 명백하게 고찰될 수 있음을 이해해야 된다. 유도성 프로모터의 사용은 유리하게는 (유도성 프로모터에 동작가능하게 연결된) 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 그러한 발현이 요구될 때 턴 온(turn on)할 수 있고, 발현이 바람직하지 않을 때 발현을 턴 오프(turn off)시킬 수 있는 분자 스위치를 제공한다. 유도성 프로모터의 예는 메탈로티오닌 프로모터, 글루코코르티코이드 프로모터, 프로게스테론 프로모터, 및 테트라사이클린 프로모터를 포함한다.

[0036] 재조합 CXADR의 발현이 NK 세포 특이적 발현에 제한될 것이 요구되는 경우, NK 세포에서 우선적으로 (The Human Protein Atlas에 열거된 바와 같이 10 개 미만, 또는 6 개 미만이지만, 2 개 초과 조직에서의 발현, URL : [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)) 또는 심지어 배타적으로 발현되는 (Human protein Atlas에 열거된 바와 같이 3 개 미만이지만 0 개 초과 조직에서의 발현) 유전자에 특이적인 프로모터를 포함하는 발현 구조물이 고찰된다. 유사하게도, 다른 면역 수용체 또는 항원 제시 세포(예컨대, CD8+ T 세포, CD4+ T 세포, 대식 세포, 수지상 세포)에

대한 조직 또는 세포 특이적 발현을 갖는 프로모터는 또한 본원에서의 사용에 적합하다고 명백하게 간주된다.

[0037] 예를 들어, CXADR의 발현이 NK 세포 특이적 발현에서 바람직하거나 발현에만 제한되는 경우, 포유류 NK 세포 수용체 프로모터는 CXADR 서열에 동작가능하게 연결될 수 있다. 적합한 프로모터는 NKp30 프로모터로부터(예컨대, J Exp Med (1999), 190:1505-1516 참조), NKp44 프로모터로부터(예컨대, J Exp Med (1999), 189:787-796 참조) 및 NKp46 프로모터로부터(예컨대, J. Exp. Med (1997), 186:1129-1136; J Exp Med (1998), 188(5):953-60; 또는 Nature (2001), 409:1055-1060 참조) (유도)될 수 있다. 인간 서열이 바람직한 반면에, 대안적인 공급원 및 특히 포유 동물 공급원이 또한 본원에 적합하다고 간주된다. 그러한 유전자에 대한 다른 유기체에서의 동족체에 관한 정보를 포함하는 서열, 유전자 및 모터프 정보, 상동성 및 기타 관련 정보가 용이하게 이용 가능하다(예컨대, 인간 NKp30 유전자 ID: 259197; NKp44 유전자 ID: 9436; NKp46 유전자 ID: 9437). 또한, 추가 요소, 예를 들어, 유전자의 코딩 서열의 하류에 위치하는 인핸서는 본원에 제시된 교지와 함께 사용될 수 있다.

[0038] 또 다른 고찰되는 양태들에서, 고찰되는 프로모터는 또한 CXADR 유전자의 전사를 추진하기 위한 하나 이상의 환경 조건들에 민감할 수 있다. 예를 들어, 발현은 온도 민감성 프로모터의 제어 하에 (예컨대, BMC Biotechnol.211; 12;11:51 참조) 또는 저산소증 및 금속 민감성 프로모터의 제어 하에(예컨대, Gene Ther 2006, 13 (10) : 857-68] 참조) 추진될 수 있다. 이러한 제어는 많은 종양이 저산소 미세 환경을 나타냄에 따라 암 치료에 세포가 사용되는 경우에 특히 유리할 수 있다.

[0039] 프로모터의 특정 유형 및 성질에 관계없이, 프로모터는 CXADR 서열에 동작가능하게 연결되어 숙주 세포(즉, 벡터 또는 다른 발현 구조물로 형질 전환된 세포)에서 발현을 추진하게 되는 것이 고찰된다. 용이하게 이해되는 바와 같이, 재조합 핵산 구조물은 전사 종결 인자, 인트론 서열 및/또는 폴리아데닐화 신호를 포함하는 다양한 추가 요소를 포함할 수 있다. 발현 구조물의 제작은 특히, 제한 엔도뉴클레아제 분해, 절찰, 형질 전환, 플라스미드 정제, 및 DNA 시퀀싱을 포함하는 임의의 적합한 유전 공학 기법을 사용하여 달성될 수 있다. 이러한 기법은 당해 분야에 주지되어 있으며, 다른 곳에 기재되어 있다 (예컨대, Sambrook 등, Molecular Cloning에서: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, 뉴욕, (1989) 참조).

[0040] 본 발명의 주제의 또 다른 고려되는 양태들에서, CXADR의 발현은 상기 예시적으로 설명된 바와 같이 이소형 1에 한정되지 않는다는 것을 알아야 한다. 실제로, 적합한 CXADR 단백질은 콕 사키 바이러스 및 아데노 바이러스 수용체로서 작용하고 콕사키바이러스 및/또는 아데노바이러스 (및 특히 아데노바이러스 유형 5)의 세포 내로의 진입을 그 자체로 매개하는 모든 단백질을 포함한다. 예를 들어, 하나의 적합한 인간 CXADR 이소형 1 단백질 서열은 (대응하는 핵산 서열 NM\_001338에 의해 코딩된) NP\_001329에 기재되어 있다.

[0041] 그러나, 인간 CXADR 단백질에 대한 다수의 대안적인 이소형 및 전구체가 또한 적절하다고 간주되며, 이소형 4 전구체(예컨대: NP\_001193994.1), 이소형 2 전구체(예컨대: NP\_001193992.1), 이소형 3 전구체(예컨대: NP\_001193993.1), 이소형 X1(예컨대: XP\_011527778.1), 이소형 X2 (예컨대: XP\_011527779.1), 이소형 X3(예컨대: XP\_011527780.1), 이소형 X4(예컨대: XP\_011527781.1), 이소형 CRA\_b(예컨대: EAX10031.1), 이소형 CRA\_d (예컨대, EAX10033.1) 등을 포함한다. 마찬가지로, CXADR은 인간 단백질에 한정될 필요는 없지만, 쥐 CXADR 단백질(예컨대, NP\_001020363.1), 생쥐 CXADR 단백질(예컨대, NP\_446022.1), 또는 소 CAXDR 단백질(예컨대, NP\_776723.1)일 수도 있다. 물론, 그리고 CXADR 단백질을 인코딩하는 핵산에 대하여, 모든 대응하는 핵산 서열이 적절하다고 간주된다. 가장 바람직하게는, 핵산 서열은 인간 코돈 사용 및/또는 증가된 발현을 위해 최적화될 것이다.

[0042] 또한, 본원에서 고찰되는 모든 단백질 서열 및 대응하는 핵산 서열은 전술한 바와 같은 임의의 서열로부터 어느 정도 변할 수 있고, 변형은 합리성-기반 염기 변화(예컨대, 제한 부위 도입, 코돈의 최적화, 이후의 변형을 위한 기능성 추가 등)로 인한 것 또는 부주의한 돌연변이로 인한 것일 수 있다. 그러므로, 발현된 CXADR 단백질은 기재된 바와 같은 서열에 대하여 적어도 약 30%, 35%, 40%, 45% 또는 50%, 바람직하게는 적어도 약 55%, 60%, 65% 또는 70%, 및 더욱 바람직하게는 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93% 또는 94% 및 가장 바람직하게는 적어도 약 95%, 97%, 98%, 99% 이상 상동일 것이다.

[0043] 본원에 기재된 발현 벡터는 새로이 단리되거나, 전구체 또는 줄기 세포로부터 또는 (유전적으로 변형될 수 있는) 기존의 배양물로부터 배양될 수 있는 재조합 비-포유류 NK 세포 및 인간 NK 세포를 생성하는데 유용하다는 것을 알아야 할 것이다. 당업계에서 공지된 세포 내로 유전자를 도입하고 발현시키는 수많은 방법이 있다. 발현 벡터의 맥락에서, 벡터는 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 NK 세포 또는 다른 숙주 세포 (및 특히 MHC 복합체를 통해 항원을 제시할 수 있는 면역 수용성 세포)로 용이하게 도입될 수 있다. 예를 들어, 발현 벡터는 물리적, 화학적 또는 생물학적 수단에 의해 숙주 세포로 이송될 수 있다.

- [0044] 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에 도입시키는 물리적 방법은 인산 칼슘 침전, 리포펙션, 입자 충격(particle bombardment), 마이크로인젝션(microinjection), 전기 천공(electroporation) 등을 포함한다. 벡터 및/또는 외인성 핵산을 포함하는 세포를 생산하는 방법은 당 업계에 주지되어 있다. 예를 들어, Sambrook 등, 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1 권-4 권, Cold Spring Harbor Press, 뉴욕 참조). 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에 도입하기 위한 적합한 방법은 칼슘 포스페이트 형질 감염 또는 리포펙션이다.
- [0045] 이해 대상의 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에 도입시키는 생물학적 방법은 DNA 및 RNA 벡터의 사용을 포함한다. 바이러스 벡터 및 특히 레트로바이러스 벡터는 포유 동물, 예컨대, 인간 세포에 유전자를 삽입하는 가장 널리 사용되는 방법이 되었다. 다른 바이러스 벡터는 렌티바이러스, 폭스바이러스, 단순 포진 바이러스 I, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스 등으로부터 유도될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 제5,350,674호 및 제 5,585,362호 참조).
- [0046] 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에 도입하기 위한 화학적 수단은 거대 분자 복합체, 나노캡슐, 미소구, 비드 및 수-중-유 에멀전, 미셀, 혼합된 미셀, 및 리포솜을 포함하는 지질-기반 시스템과 같은 콜로이드성 분산 시스템을 포함한다. 생체의 및 생체내 전달 비히클(vehicle)로서 사용하기 위한 예시적인 콜로이드성 시스템은 리포솜(예컨대, 인공 막 소포)이다. 표적화된 나노 입자 또는 다른 적합한 서브-미크론 크기의 전달 시스템을 이용한 폴리뉴클레오티드의 전달과 같은 핵산의 최첨단 표적화된 전달의 다른 방법이 이용가능하다. 비-바이러스 전달 시스템이 활용되는 경우, 예시적인 전달 비히클은 리포솜이다. 지질 제형의 사용은 핵산을 숙주 세포 내로 (생체의, 생체의 또는 생체내) 도입하기 위해 고찰된다. 다른 양태에서, 핵산은 지질과 회합될 수 있다. 지질과 회합된 핵산은 리포솜의 수성 내부에 캡슐화 되고, 리포솜의 지질 이중층 내에 산재되어 있고, 리포솜과 올리고뉴클레오티드 양쪽 모두와 회합된 연결 분자를 통해 리포솜에 부착되고, 리포솜 내에 포획되고, 리포솜과 복합화 되고, 지질을 함유하는 용액에 분산되고, 지질과 혼합되고, 지질과 조합되고, 지질 중 현탁액으로서 함유되고, 미셀과 함께 함유되거나 복합화되거나 또는 그렇지 않으면 지질과 회합될 수 있다. 지질, 지질/DNA 또는 지질/발현 벡터 관련 조성물은 용액 중 임의의 특정 구조로 제한되지 않는다. 예를 들어, 이들은 미셀로서 이중층 구조 내 또는 "붕괴된" 구조로 존재할 수 있다. 이들은 또한 단지 용액 내에 산재되어, 크기 또는 형태가 균일하지 않은 응집체를 형성할 수 있다. 지질은 자연 발생 또는 합성 지질일 수 있는 지방 물질이다. 예를 들어, 지질은 지방산, 알코올, 아민, 아미노 알코올 및 알데히드와 같은 장쇄 지방족 탄화수소 및 이들의 유도체를 함유하는 화합물의 클래스(class)뿐만 아니라 세포질에서 자연적으로 발생하는 지방 방울을 포함한다.
- [0047] 또한, 리포펙타민-핵산 복합체가 고찰된다. 외인성 핵산을 숙주 세포에 도입하거나 또는 본 발명의 억제제에 세포를 노출시키는 데 사용되는 방법에 관계없이, 숙주 세포에서 재조합 DNA 서열의 존재를 확인하기 위해, 다양한 분석법이 수행될 수 있다. 이러한 분석법은 예를 들어, Southern 및 Northern blotting, RT-PCR 및 PCR과 같은 당업자에게 주지된 "분자 생물학적" 분석법; 예컨대, 면역학적 수단 (ELISA 및 웨스턴 블롯)에 의해 또는 본 발명의 범위에 속하는 작용제를 동정하기 위해 본원에 기재된 분석법에 의해 특정 펩티드의 존재 또는 부재를 검출하는 것과 같은 "생화학적" 분석법을 포함한다.
- [0048] 형질 감염을 위한 세포에 대하여, 모든 세포, 특히 내인성 CXADR이 전혀 없거나 비교적 낮은 발현만을 갖는 세포가 본원에서 사용하기에 적합하다고 간주되는 것으로 고찰된다. 예를 들어, 적합한 세포는 NK 세포, T-세포 (CD8+, CD4+, 등), B-세포, 대식 세포 및 수지상 세포와 같은 면역 수용성 세포뿐만 아니라 신장, 태반, 흉선, 및 비장으로부터의 세포 및 CXADR 발현 수준이 낮은 특정 종양 세포(진행성 방광암, 원발성 전립선 암 등)를 포함한다. 일반적으로 그리고 다른 관점에서 볼 때, 모든 세포는 나중에 (즉, 재조합 CXADR을 발현시킨 후) 아데노바이러스 벡터로 형질 감염되기를 원하는 형질 감염에 적합하다는 것이 고찰된다. 그러나, 이러한 세포에서 CXADR의 발현이 하나 이상의 항원 (및 특히, 신생 항원, 종양 관련 항원 또는 그러한 항원을 포함하는 키메라 분자)을 숙주 내 면역 시스템에 전달할 수 있는, (아데노바이러스 전달을 통한) 재조합 핵산으로 생체내 형질 감염을 가능하도록 하기 때문에 면역 수용성 세포 및 특히 NK 세포 및 변형된 NK 세포는 특히 바람직하다.
- [0049] NK 세포는 인간 NK 세포에 대한 CD56 및/또는 CD16을 포함하는 특이적인 표면 항원의 발현, 세포 표면 상의 알파/베타 또는 감마/델타 TCR 복합체의 부재, 특이적인 세포 용해 기관의 활성화에 의해 "자가" MHC/HLA 항원을 발현하지 못하는 세포에 결합하고 죽이는 능력, NK 활성화 수용체에 대한 리간드를 발현하는 종양 세포 또는 다른 질병 세포를 죽이는 능력, 그리고 면역 반응을 자극하거나 억제하는 사이토카인이라고 불리는 단백질 분자를 방출하는 능력과 같은 특정 특성 및 생물학적 성질에 의해 용이하게 동정될 수 있다. 당업계에 주지된 방법을 사용하여 NK 세포를 동정하기 위해 이들 특성 및 활성 중 임의의 것이 사용될 수 있다. 물론, 적합한 숙주 세포 및 특히 NK 세포는 종양으로 진단된 환자로부터 획득되거나, 또는 하기에 더 상세히 기재된 바와 같이 이미 확

립된 세포주로부터 수득된다는 것에 주목해야 한다.

[0050] 예를 들어, 본 발명의 주제 중 하나의 특히 바람직한 양태에서, NK 세포는 NK-92 유도체이고 바람직하게는 그러한 세포를 (저해 결핍 또는 감소된 저해를 통해) 구성적으로 활성화되도록 할 적어도 하나의 킬러 세포 면역글로불린-유사 수용체 (KIR)의 감소되거나 폐지되는 발현을 갖도록 유전적으로 변형된다. 그러므로, 적합한 변형된 세포는 MHC 클래스 I 분자와의 상호 작용을 감소시키거나 폐지시키기 위한 것과 같이 돌연변이된 하나 이상의 변형된 킬러 세포 면역글로불린-유사 수용체를 가질 수 있다. 물론, 하나 이상의 KIR이 또한 결실될 수 있거나 (예컨대, miRNA, siRNA 등을 통해) 발현이 억제될 수 있음에 주목해야 한다. 가장 통상적으로, 하나를 초과하는 KIR이 돌연변이, 결실 또는 침묵될 것이며, 특히 고찰되는 KIR은 짧은 또는 긴 세포질 꼬리를 갖는 2 개 또는 3 개의 도메인을 갖는 것을 포함한다. 상이한 관점에서 볼 때, 변형, 침묵 또는 결실된 KIR은 KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DL5A, KIR2DL5B, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3 및 KIR3DS1을 포함할 것이다. 이러한 변형된 세포는 당업계에 주지된 프로토콜을 사용하여 제조될 수 있다. 대안적으로, 이러한 세포는 NK 세포('활성화된 자연 킬러 세포')로서 NantKwest (URL [www.nantkwest.com](http://www.nantkwest.com) 참조)에서 상업적으로 수득할 수도 있다.

[0051] 또 다른 실시예에서, 유전적으로 조작된 NK 세포는 또한 고-친화성 Fc $\gamma$  수용체 (CD16)를 발현하도록 변형된 NK-92 유도체 일 수도 있다. Fc $\gamma$  수용체의 고-친화성 변이체에 대한 서열은 당 업계에 주지되어 있으며, 발생 및 발현의 모든 방식이 본원에서의 사용에 적합하다고 간주된다. 이러한 수용체의 발현은 환자의 종양 세포(예컨대, 네오에피토프), 특정 종양 유형(예컨대, her2neu, PSA, PSMA, 등)에 특이적이거나 암과 관련된(예컨대, CEA-CAM) 항체를 사용하여 종양 세포를 특이적으로 표적화할 수 있다고 여겨진다. 유리하게는, 이러한 항체는 상업적으로 이용 가능하며 세포와 함께 사용될 수 있다(예컨대, Fc $\gamma$  수용체에 결합됨). 대안적으로, 이러한 세포는 또한 haNK 세포('고-친화성 천연 킬러 세포')로서 NantKwest로부터 상업적으로 수득될 수 있다. 이후, 이러한 세포는 더 변형되어 CXCL12 또는 그 일부를 발현시키거나 또는 하기에 또한 더 논의되는 바와 같이 CXCR4의 감소되거나 폐지된 발현을 가질 수 있다.

[0052] 본 발명의 주제의 또 다른 양태에서, 유전적으로 조작된 NK 세포는 또한 키메라 T-세포 수용체를 발현하도록 유전적으로 조작될 수 있다. 특히 바람직한 양태들에서, 키메라 T-세포 수용체는 scFv 부분 또는 암 네오에피토프, 종양 특이적 항원 또는 종양 관련 항원에 대한 결합 특이성을 갖는 다른 세포외영역을 가질 것이다. 이전에 주목된 바와 같이, 이러한 키메라 T-세포 수용체를 발현시키도록 NK 세포를 유전적으로 조작하는 수 많은 방식이 있으며, 모든 방식이 본원에서의 사용에 적합하다고 간주된다. 대안적으로, 이러한 세포는 또한 taNK 세포('표적-활성화된 천연 킬러 세포')로서 NantKwest로부터 상업적으로 수득될 수 있다. 이후, 이러한 세포는 더 변형되어 CXCL12 또는 그 일부를 발현시키거나 또는 하기에 논의되는 바와 같이 CXCR4의 감소되거나 폐지된 발현을 가질 수 있다.

[0053] 암 관련 항원 또는 암 관련 항원에 대한 특이성을 갖는 항체에 대한 친화도를 갖도록 세포가 조작되는 경우, 모든 공지된 암 관련 항원이 사용에 적절한 것으로 고려되는 것으로 고찰된다. 예를 들어, 암 관련 항원은 CEA, MUC-1, CYPB1, 등을 포함한다. 마찬가지로, 암 특이적 항원 또는 암 특이적 항원에 대한 특이성을 갖는 항체에 대해 친화력을 갖도록 세포가 조작되는 경우, 공지된 모든 암 특이적 항원은 사용에 적절한 것으로 간주되는 것으로 고찰된다. 예를 들면, 암 특이적 항원은 PSA, Her-2, PSA, 단미(brachyury), 등을 포함한다.

[0054] 또한, NK 또는 다른 숙주 세포(예컨대, 면역 수용성 세포)는 형질 감염된 세포를 지지, 활성화 시키거나 또는 형질 감염된 세포에 원하는 기능을 제공하는 하나 이상의 단백질을 발현하도록 유전적으로 변형될 수 있다고 고찰된다. 이러한 추가적인 유전자 변형은 따로 수행될 수 있고, 즉, CXADR을 인코딩하는 핵산으로 형질 감염시키기 전에 또는 동시에, 즉, (예컨대, 동일한 재조합 핵산으로부터 또는 제2 재조합 핵산으로부터) CXADR을 인코딩하는 핵산으로 형질 감염과 함께 수행될 수 있다.

[0055] 예를 들어, NK 또는 다른 숙주 세포는 NK 세포 활성화를 위한 여분의 통로를 제공하고 따라서 보다 견고한 면역 반응을 증진시키기 위해 IL2RA의 적어도 일부를 선택적으로 IL2RB 및 IL2RG의 하나 이상과 함께 발현시킬 수 있다. 유전적으로 조작된 NK 세포는 가장 바람직하게는 활성화 된 NK 세포, 고-친화성 NK 세포 또는 표적 활성화된 NK 세포일 것이다. 바람직한 IL2RA는 IL2RA의 전장 또는 고-친화성 변형체를 포함한다. 또한, 유전적으로 조작된 NK 세포는 또한 하나 이상의 사이토카인 및 특히 IL-12를 발현할 수 있는 것으로 고찰된다. 따라서, 이렇게 제조된 NK 세포는 IL2에 대한 숙주 T-세포와 경쟁할 수 있다는 것을 이해해야 한다. 또한, 고찰된 NK 또는 다른 숙주 세포는 증가된 활성화를 제공하기 위해 IL-15 또는 IL-15 초작용제(superagonist)(예컨대, ALT-803)를 또한 발현할 수 있다. 최종적으로, 필요한 경우, NK 또는 다른 숙주 세포는 숙주 면역 반응을 더 증진

시키거나 자극하도록 하나 이상의 면역 체크포인트 억제제를 발현할 수 있다.

- [0056] 또 다른 실시예에서, 본 발명자들은 면역 반응을 향상시키기 위해 하나 이상의 공동-자극 분자를 발현하도록 유전적으로 조작된 NK 또는 다른 숙주 세포의 형질 감염을 고찰한다. 한번 더, 유전적으로 조작된 NK 세포는 가장 바람직하게는 활성화 된 NK 세포, 고-친화성 NK 세포 또는 표적 활성화된 NK 세포일 것이다. 바람직한 공동-자극 분자는 B7.1 (CD80), ICAM-1 (CD54), ICOS-L, 및/또는 LFA-3 (CD58)일 수 있다. 다른 실시예에서, 바람직한 공동-자극 분자는 선택적으로는 B7.1 (CD80), ICAM-1 (CD54), ICOS-L, 및/또는 LFA-3 (CD58) 중 임의의 하나와 조합된 4-1BBL, CD30L, CD40, CD40L, CD48, CD70, CD112, CD155, GITRL, OX40L, 및/또는 TL1A일 수 있다.
- [0057] 필요한 경우, 변형된 NK 세포는 또한 CXCL12의 적어도 일부, 보다 바람직하게는 전장 CXCL12를 제시할 수 있고/있거나, NK 세포가 CXCR4의 발현을 감소시키거나 심지어 완전히 침묵시키도록 유전적으로 변형된다는 것을 제시할 수 있다. NK 세포의 표면 상에 CXCL12의 적어도 일부의 제시 및/또는 CXCR4의 제거에 의해, 그렇게 변형된 세포는 숙주에 의한 인식 및 동종 이식 거부를 덜 받게 될 것이며, NK 세포-특이적 경로를 통한 킬링(killing) 활성을 여전히 유지하면서도 응집에 대한 성향이 감소될 것으로 여겨진다.
- [0058] 또한, 면역 수용성 세포가 일반적으로 CXADR의 발현에 바람직한 반면에, 수 많은 비-면역 수용성 세포가 또한 적합하다고 간주되며, 특히 재조합 단백질 생산에 적합한 확립된 세포주를 포함하는 것으로 인식되어야 한다. 따라서, CHO 세포, HEK-293 세포, 마우스 골수종 림프아구성 세포, BHK 세포, Sf9, CV-1, COS-1 세포 등을 포함하는 다양한 포유류 및 곤충 세포주가 특히 고찰된다.
- [0059] 본원의 설명 및 후속하는 청구범위 전체에 걸쳐 사용된 바와 같이, 단수 형태("a", "an", 그리고 "the")의 의미는 문맥이 달리 지시하지 않는 한 복수 대상을 포함한다. 또한, 본원의 설명에서 사용된 바와 같이, "내(in)"의 의미는 문맥이 달리 명시하지 않으면 "내" 및 "상(on)"을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 그리고 문맥이 달리 지시하지 않는 한, "에 결합된(coupled to)"이란 용어는 (서로 결합된 두 개의 요소가 서로 접촉하는) 직접 커플링 및 (적어도 하나의 추가 요소가 두 요소 사이에 위치되는) 간접 커플링을 모두 포함하려는 것이다. 그러므로, "에 결합된" 및 "와 결합된(coupled with)"이라는 용어는 동의어로 사용된다.
- [0060] 본원에 기재된 모든 방법은 본원에서 달리 지시하지 않거나 달리 문맥에 의해 명백하게 부인되지 않는 한 임의의 적합한 순서로 수행될 수 있다. 본원의 특정 실시형태에 대하여 제공되는 임의의 및 모든 예 또는 예시적인 언어 (예컨대, "~ 같은")의 사용은 단지 본 발명을 보다 잘 예시하려는 것이며, 달리 청구된 본 발명의 범위에 제한을 가하지 않는다. 본 명세서에서 어떠한 언어도 본 발명의 실시예 필수적인 임의의 청구되지 않은 요소를 지시하는 것으로 해석되어서는 안 된다.
- [0061] 본원에 개시된 본 발명의 대안적인 요소 또는 실시형태의 그룹은 제한으로 해석되어서는 안 된다. 각각의 그룹 멤버는 개별적으로 또는 본원에서 발견되는 그룹 또는 다른 요소의 다른 멤버와 임의의 조합으로 참조되고 청구될 수 있다. 그룹의 하나 이상의 멤버는 편의 및/또는 특허 가능성의 이유로 그룹에 포함되거나 그룹으로부터 삭제될 수 있다. 임의의 그러한 포함 또는 삭제가 발생하는 경우, 본 명세서는 그룹을 수정되어 첨부된 청구범위에서 사용된 모든 마쿠쉬(Markush) 그룹의 서술된 설명을 이행하는 그룹을 포함하는 것으로 본원에서 간주된다.
- [0062] 본원에서 본 발명의 개념으로부터 벗어나지 않고 이미 기재된 것들 이외의 더 많은 수정이 가능하다는 것이 당업자에게 명백할 것이다. 그러므로, 본 발명의 주제는 첨부된 청구범위의 범위를 제외하고는 제한되지 않는다. 또한, 명세서 및 청구범위 모두를 해석함에 있어서, 모든 용어는 맥락과 일치하는 가능한 가장 넓은 방식으로 해석되어야 한다. 특히, "포함한다" 및 "포함하는"이라는 용어는 참조된 구성 요소, 성분 또는 단계가 존재할 수 있거나 활용될 수 있거나 명시적으로 참조되지 않은 다른 구성 요소, 성분 또는 단계와 조합될 수 있다는 것을 나타내는 비-배타적인 방식으로 구성 요소, 성분 또는 단계를 언급하는 것으로 해석되어야 한다. 명세서의 청구범위가 A, B, C ... 및 N으로 구성된 그룹으로부터 선택된 것의 적어도 하나를 언급하는 경우, 텍스트(text)는 A와 N 또는 B와 N, 등이 아닌 그룹으로부터의 구성 요소 하나만 필요로 하는 것으로 해석되어야 한다.
- [0063] 서열 목록
- [0064] <110> NantCell
- [0065] <120> 재조합 CXADR 발현을 위한 조성물 및 방법
- [0066] <130> 102538.0008PCT

[0067] <150> US 62/291,999

[0068] <151> 2016-02-05

[0069] <160> 1

[0070] <170> PatentIn 버전 3.5

[0071] <210> 1

[0072] <211> 1112

[0073] <212> DNA

[0074] <213> 호모 사피엔스

[0075] <220>

[0076] <221> 유전자

[0077] <222> (7)..(1110)

[0078] <223> CXADR 이소형 1

[0079] <400> 1

[0080] aagcttatgg cgctcctgct gtgcttcgtg ctctctgtcg gagtagtgga ttctgccaga 60

[0081] agtttgagta tcontactcc tgaagagatg attgaaaaag ccaaagggga aactgcctat 120

[0082] ctgccatgca aatttacgct tagtcccga gaccagggac cgctggacat cgagtggctg 180

[0083] atatcaccag ctgataatca gaaggtggat caagtgatta ttttatattc tggagacaaa 240

[0084] atttatgatg actactatcc agatctgaaa ggccgagtac attttacgag taatgatctc 300

[0085] aaatctggtg atgcatcaat aatgtaacg aatttacaac tgtcagatat tggcacatat 360

[0086] cagtgcгааг tгаааааагс tсctggtgtt gcaataааа agattcatct ggtagttctt 420

[0087] gttaaгсctt caggtgсgag atgttacgtt gatggatctg aагааattgg aagtгacttt 480

[0088] aagataааat gtгаacсaaa агаaggttca cttccattac agtatgagtg gсaaааattg 540

[0089] tctgactcac агаааatgcc cacttсatgg ttagcаgaaa tgacttсatc tgttatatct 600

[0090] gtаааааatg cctcttctga gtactctggg acatacagct gtacagtcag ааacagagtg 660

[0091] ggctctgac agtgсctgtt gcgtctaaac gttgtcctc cttcaataa agctggacta 720

[0092] attgcaggag ccattatagg aactttgctt gctctagcgc tcattggtct tatcatcttt 780

[0093] tgctgtcgta аааagсgсag агааааааа tatgаааagg aagtтсatca cgatatcagg 840

[0094] gaagatgtgc cacctсaaa gagccgtacg tccactgcca gaagctacat cggcagtaat 900

[0095] cattcatccc tggggtccat gtctctcttc aacatggaag gatattсcaa gactcagtat 960

[0096] аacсаagtac caagtgaаа ctttgaacgc actcctcаga gtccgactct cccacctgct 1020

[0097] аaggtagctg ccсtаatct аagtсgaatg ggtgсgattc ctgtgatgat tccagcacag 1080

[0098] agcaaggatg ggtctatagt ataggcggcc gc 1112

도면

도면1



피크 (pBAK) 8-퓨로마이신에서의 CXADR 서열 (HindIII to NotI):

(AAGCTT) ATGGCGCTCCTGCTGTGCTTCGTGCTCCTGTGCGGAGTAGTGGATTCGCCAGAAAGTTTGAGTATCACT  
 ACTCCTGAAGAGATGATTGAAAAAGCCAAAGGGGAACTGCCTATCTGCCATGCAAATTTACGCTTAGTCCCGAAGA  
 CCAGGGACCGCTGGACATCGAGTGGCTGATATCACCAGCTGATAATCAGAAGGTGGATCAAGTGATTATTTATATT  
 CTGGAGACAAAATTTATGATGACTACTATCCAGATCTGAAAGGCCGAGTACATTTTACGAGTAATGATCTCAAATCT  
 GGTGATGCATCAATAAATGTAACGAATTTACAACGTGAGATATTGGCACATATCAGTGCAAAGTGAAAAAGCTCC  
 TGGTGTGCAAATAAGAAGATTCATCTGGTAGTCTTGTTAAGCCTTCAGGTGCGAGATGTTACGTTGATGGATCTG  
 AAGAAATGGAAAGTGACTTTAAGATAAAAATGTGAACCAAAAGAAGGTTCACTCCATTACAGTATGAGTGGCAAAA  
 TTGTCTGACTCACAGAAAATGCCCACTTCATGGTTAGCAGAAATGACTTCATCTGTTATATCTGAAAAAATGCCTC  
 TTCTGAGTACTCTGGGACATACAGCTGTACAGTCAGAAACAGAGTGGGCTCTGATCAGTGCCTGTTGCGTCTAAACG  
 TTGTCCCTCCTTCAAATAAAGCTGGACTAATTGCAGGAGCCATTATAGGAACTTTGCTTGCTCTAGCGCTCATTGGT  
 CTTATCATCTTTTGCTGTCGTA AAAAGCGCAGAGAA GAAAAATATGAAAAGGAAGTTCATCACGATATCAGGGAAGA  
 TGTGCCACCTCCAAAGAGCCGTACGTCCACTGCCAGAAGCTACATCGGCAGTAATCATTATCCCTGGGGTCCATGT  
 CTCCTTCCAACATGGAAGGATATTC AAGACTCAGTATAACCAAGTACCAAGTGAAGACTTTGAACGCCTCCTCAG  
 AGTCCGACTCTCCACCTGCTAAGGTAGCTGCCCTAATCTAAGTCGAATGGGTGCGATTCTGTGATGATTCCAGC  
 ACAGAGCAAGGATGGGTCTATAGTATAG (GCGGCCGC)