

명세서

발명의 명칭: HLA-DR에 결합하는 키메라 항원 수용체 및 CAR-T 세포

기술분야

- [1] 본 발명은 HLA-DR에 결합하는 키메라 항원 수용체 및 CAR-T 세포에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 키메라 항원 수용체 (Chimeric antigen receptor; CAR)를 발현하도록 만든 T 세포는 암을 치료하는데 있어서 높은 치료 가능성을 가지고 있다 (Grupp et al., 2013; Kochenderfer et al., 2010, 2015; Porter et al., 2011).
- [4] 그들의 임상 성공은 다양한 신호 도메인과 다양한 결합력을 가진 항원-결합 도메인이 인위적으로 결합된 CAR의 융합 구조의 결과로 나타난다 (Maus et al., 2014; van der Stegen et al., 2015).
- [5] CAR는 세포 외 발현된 목적하는 항원을 인지하는 항원결합도메인을 기반으로 하는 인식 부위, 막관통도메인(모듈), 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인, 그리고 활성 신호를 전달하는 키메라 세포내 신호 도메인을 포함하는 합성 분자들을 말한다 (Jensen and Riddell, 2015).
- [6] 종양 세포의 에피토프와 CAR를 가지고 있는 T 세포의 결합은 주요조직적합성복합체 (Major Histocompatibility Complex; MHC)에 의존적이지 않고, 세포독성 T 세포의 기작을 통하여 종양세포의 에이포토시스 및 세포사를 유도할 수 있다 (Ramos and Dotti, 2011).
- [7] 최근 몇 년간, CD19 (Cluster of Differentiation 19)를 타겟으로 하는 CAR-T는 재발성/불응성의 급성 림프구성 백혈병 (ALL) 환자의 치료에 괄목할 만한 결과를 나타내었다 (Kochenderfer, J. N. et al. (2010) Blood 116: 4099-4102; Porter, D. L., et al. (2011) N. Engl. J. Med. 365 : 725-733; Grupp, S. A. et al. (2013) N. Engl. J. Med. 368: 1509-1518; Kochenderfer, J. N. et al. (2015) J. Clin. Oncol. 33 : 540-549; Brown, C. E. et al. (2016) N. Engl. J. Med. 375: 2561-2569).
- [8] 비록 CD19 CAR-T 세포 치료가 재발성/불응성 B세포 비호지킨 림프종의 치료에 성공적이었지만 객관적 반응율은 20-30%에서 79%로 개선되었으며, 30-50%의 완전관해율을 나타내었다. 이것은 기존의 결과들보다 7배 높은 수치이다 (Crump et al., 2016; Locke et al., 2017).
- [9] 본 명세서에서 사용되는 Malignancy Variant Receptor (MVR)은 인간 기원의 B 세포 림프종 세포를 반복적으로 면역주사한 Balb/c 생쥐로부터 비장세포를 분리하여, SP2/0 골수종 세포와 융합하여 하이브리도마 풀을 제작하였으며, 여러 차례의 선별 과정을 통하여 상기 하이브리도마 풀로부터 B 세포 림프종에만

특이적으로 반응하며 높은 반응성을 나타내는 항-MVR 하이브리도마를 선별하였다. (WO2016-094304)

- [10] CD19는 정상세포와 암세포에 모두 발현되어 있으므로 CD19항체는 정상세포와 암세포를 정확하게 구분하지 못하지만 MVR 항체는 정상세포와 암세포를 정확하게 구분할 수 있어 높은 치료효과와 안전성을 확보할 수 있다. (Han et al., 2018).
- [11] 고친화도를 가지는 특정 HLA-DR type의 T 세포에서는 CAR-T 세포가 생산되지 않는 문제점이 있었다. 이를 개량하고자, 본 특허에서는 다양한 결합친화도를 가지는 항체를 제작하였고 CAR-T 세포치료제로 적합한 항체를 최종 선정하였다.
- [12] 본 발명은 쥐 유래 MVR 항체의 서열 변이를 통해 항원에 대해 다양한 결합친화도를 가지도록 설계된 특허이며, 항체 자체를 치료제로 이용하거나 항체를 이용한 치료제 (CAR-T 세포치료제) 등에 적용될 수 있을 것으로 기대한다. 또한 본 발명의 항체는, 쥐 유래 MVR 항체를 가지고 인간화항체를 제작하여 면역원성을 최소화하였다. 또한, 다양한 결합친화도를 가지는 항체들을 발굴하여 CAR-T 적용 시 모항체 대비 CAR-T 제작의 우월성을 기대할 수 있으며 혈액암 치료용 CAR-T 세포치료제에 적용 가능하다.

[13]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [14] 본 발명의 목적은 임상에 적용이 가능한 MVR을 만들고, 치료효과가 우수한 CAR-T 세포의 제공을 해결과제로 한다. 구체적으로는, 본 발명에서는 2 세대 CAR-T 세포에 있어서 그 기능의 주요역할을 담당하는 보조 자극 도메인으로서는 다양한 CAR-T 세포에 도입 가능한 보조 자극 도메인을 제공하는 것을 해결과제로 한다. 나아가, 특정한 암세포의 표면에 발현되는 항원과, 결합 가능하고, 또한, CAR-T 세포의 형성이 가능한 다양한 항원 결합 도메인을 제공하는 것을 해결과제로 한다.

[15]

과제 해결 수단

- [16] 1. 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1), 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항원 결합 분자로서, 상기 항원 결합 분자는 키메라 항원 수용체 (chimeric antigen receptor; CAR)인, 항원 결합 분자.

- [17] 2. 항목 1에 있어서, 서열번호 7로 표시되는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 8로 표시되는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항원 결합 분자.
- [18] 3. 항목 1에 있어서, 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는, 항원 결합 분자.
- [19] 4. 항목 1에 있어서, 서열번호 13으로 표시되는 아미노산 서열을 더 포함하는, 항원 결합 분자.
- [20] 5. 항목 1에 있어서, 서열번호 14로 표시되는 아미노산 서열을 더 포함하는, 항원 결합 분자.
- [21] 6. 항목 1에 있어서, 막관통 도메인, 및 T 세포를 활성화시키기 위한 세포내 신호전달 도메인을 더 포함하는, 항원 결합 분자.
- [22] 7. 항목 6에 있어서, 상기 막관통 도메인은 T 세포 수용체의 알파 사슬, T 세포 수용체의 베타 사슬, T 세포 수용체의 제타 사슬, CD28, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 및 CD154로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 세포내 신호전달 도메인은 CD3zeta 신호전달 도메인 및 보조자극 신호전달 도메인인, 항원 결합 분자.
- [23] 8. 항목 7에 있어서, 상기 보조자극 신호전달 도메인은 CD28, OX40, CD27, ICAM-1, CD278, 및 CD137로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항원 결합 분자.
- [24] 9. 항목 1 내지 8 중 어느 한 항목의 항원 결합 분자를 인코딩하는, 핵산 분자.
- [25] 10. 항목 9의 핵산 분자를 포함하는, 발현 벡터.
- [26] 11. 항목 9의 핵산 분자를 포함하는, 세포.
- [27] 12. 항목 11에 있어서, T 세포인, 세포.
- [28] 13. 항목 12에 있어서, 상기 T 세포는 CD8+ T 세포 및/또는 CD4+ T 세포인, 세포.
- [29] 14. 항목 11에 있어서, 키메라 항원 수용체 변형된 T 세포 (CAR-T)인, 세포.
- [30] 15. 항목 11의 세포를 약학적 유효성분으로 포함하는, 암 치료용 약학 조성물.
- [31] 16. 항목 15에 있어서, 상기 암은 식도선암, 대장암, 흑색종양, 안구흑색종, 소세포폐암, 신경모세포종, 기형암종, 태생기암, 편평상피암, 머리 및 목 편평 세포 암종, 흉선종, 림프모구백혈병, B세포림프종, 비만성거대B세포림프종, 백혈병, 급성골수성백혈병 등인, 약학 조성물.
- [32] 17. 치료적 유효량의 항목 1 내지 8 중 어느 한 항의 항원 결합 분자를 포함하는 T 세포를 포함하는 약학 조성물을 암을 가진 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 암 치료 방법.
- [33] 18. 항목 17에 있어서, 상기 약학 조성물은 CD8+ T 세포를 포함하거나, CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포를 포함하는, 암 치료 방법.
- [34] 19. 항목 18에 있어서, 세포 수를 기준으로 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포의 비율은 실질적으로 1:1인, 암 치료 방법.
- [35] 20. 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1), 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항원 결합 분자를 인코딩하는 핵산을 T 세포에 형질감염시키는 단계를 포함하는, 암 치료를 위한 키메라 항원 수용체 변형된 T 세포 (CAR-T)의 제조 방법.

- [36] 21. 항목 1 내지 8 중 어느 한 항의 항원 결합 분자를 포함하는 T 세포를 약학적 유효성분으로 포함하는, 암을 치료하기 위한 치료용 약학 조성물.
- [37] 22. 항목 21에 있어서, 상기 약학 조성물은 조성물은 CD8+ T 세포를 포함하거나, CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는, 암을 치료하기 위한 치료용 약학 조성물.
- [38] 23. 항목 18에 있어서, 세포 수를 기준으로 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포의 비율은 실질적으로 1:1인 것을 특징으로 하는, 암을 치료하기 위한 치료용 약학 조성물.

[39]

발명의 효과

- [40] 본 발명에서 개발한 MVR의 경우 종양세포에서 증가된 HLA-DR을 선택적으로 인식할 수 있으며, 이를 이용하여 CAR-T 세포를 제작하였을 때, 강한 in vitro 효능을 나타내었으며, 동물 체내에서도 높은 효능을 나타낸다.
- [41] 또한 기존의 4-1BB 보조 자극 도메인에 5개의 아미노산을 추가함으로써 그 효능이 증가되는 효과를 갖는다.

[42]

도면의 간단한 설명

- [43] 도 1은 마우스 MVR항체와 제작된 인간화 항체 2종(huMVRL1H1, huMVRL2H2)의 VH 각 아미노산 서열을 나타낸 것이다
- [44] 도 2는 마우스 MVR항체와 제작된 인간화 항체 2종(huMVRL1H1, huMVRL2H2)의 VL 각 아미노산 서열을 나타낸 것이다
- [45] 도 3은 muMVR과 인간화항체 2종(huMVRL1H1, huMVRL2H2)의 결합력 분석을 보여주는 결과이다.
- [46] 도 4는 MVR 인간화항체 huMVR.L2H2의 분자모델링 및 affinity hot-spot 예측을 도시하였다.
- [47] 도 5는 Affinity hot spot이 적용된 15종 mutant의 결합력 분석을 보여주는 결과이다.
- [48] 도 6A는 CD19 CAR, CD19CAR_euCD137, 및 huMVRL2H2CAR_euCD137 구조체의 모식도이다. CD19 CAR는 보조자극도메인에 4-1(CD137)도메인의 214-255aa활용하였고 CD19CAR_euCD137과 huMVRL2H2CAR_euCD137은

4-1(CD137)도메인의 209-255aa활용하였다.

- [49] 도 6B는 CAR-T세포의 주요 기능을 나타내는 렌티바이러스 벡터 및 관련 유전자와 CD19 CAR construct의 유전자 서열을 나타낸다. 구체적으로 EF1 alpha 프로모터를 포함하여 CD8 리더 시퀀스, scFv인 huMVRL2H2, CD α 힌지 및 인간 CD8 막 통과 도메인, CAR 발현율을 증가시키기 위한 4-1BB 및 CD3제타 신호전달 도메인을 표시하였다. 또한 렌티바이러스 제작에 필요한 안전한 등급의 렌티바이러스 관련 유전자를 도시하였다.
- [50] 도 7은 CAR-T세포의 주요 기능을 나타내는 렌티바이러스 벡터 및 관련 유전자와 CD19 CAR construct의 유전자 서열을 나타낸다. 구체적으로 EF1 alpha 프로모터를 포함하여 CD8 리더 시퀀스, scFv인 MVRL2H2, CD α 힌지 및 인간 CD8 막 통과 도메인, CAR 발현율을 증가시키기 위한 4-1BB 및 CD3제타 신호전달 도메인을 표시하였다. 또한 렌티바이러스 제작에 필요한 안전한 등급의 렌티바이러스 관련 유전자를 도시하였다.
- [51] 도 8은 MVR CAR-T 세포 생산 공정을 나타낸다.
- [52] 도 9는 MVR CAR-T의 in vitro 세포살상능을 확인한 실험 결과이다.
- [53] 도 10은 CD19CAR와 CD19CAR_euCD137 가 도입된 두 종류의 CD19 CAR-T 세포 제작 비율 및 효능평가를 나타낸 것이다. A. 2 종의 CD19 CAR-T 제작 후 14일 제 CD8과 CAR-T 세포를 염색한 후 FACS를 이용하여 CAR-T 제작 비율을 확인한 결과이다. B. 생산된 CAR-T 2종을 이용하여 target 과 반응 시킨 후 4시간 뒤 luciferase assay를 수행하여 각 CAR-T의 살상능을 비교한 결과이다.
- [54] 도 11은 huMVR CAR-T의 효력을 동물모델에서 평가하기전 FACS를 이용하여 세포주의 HLA-DR 발현 및 huMVR L2H2 scFv의 결합력을 확인한 도이다.
- [55] 도 12는 도 9에서 세포주 수준에서 CAR-T 세포 제작 비율 및 살상능을 확인한 후 이를 이용하여 동물모델에서 효력평가를 진행한 도이다. A. 루시퍼라아제를 발현하는 암세포주를 마우스 피하로 주입하여 피하동물모델을 유도한 후 CAR-T 효력을 IVIS imaging 장비를 이용하여 진행한 결과이다. B. 이미징 후 각 마우스에서 photon 값을 확인하고 그래프로 나타낸 결과이다.
- [56] 도 13은 3일 내지 4일 간격으로 마우스에서 안와채혈을 수행한 후 FACS를 이용하여 혈액 내 존재하는 CAR-T 비율 및 숫자를 확인한 도이다. A. 혈액내 존재하는 전체 CD19 CAR-T 비율을 CD8+/CAR + 세포를 FACS 염색을 통해 확인하고 그래프로 나타낸 결과이다. B. 전체 CAR-T 비율을 확인 한 후, CD8 및 CD4 CAR-T의 비율을 다시 확인 하여 그래프로 나타낸 결과이다. C. FACS 염색시 FACS용 counting beads를 이용하여 혈액내 존재하는 CAR-T 세포수를 확인한 그래프이다.
- [57] 도 14는 복강동물모델을 이용하여 CD8 huMVR CAR-T 및 CD4/CD8 huMVR CAR-T의 효력테스트를 진행한 도이다. A. 루시퍼라아제를 발현하는 암세포주를 마우스 복강으로 주입하여 동물모델을 유도한 후 CD8 huMVR CAR-T 및 CD4/CD8 huMVR CAR-T의 효력을 IVIS imaging 장비를 이용하여

진행한 결과이다. B. 복강으로 유도된 동물모델에서 암세포가 나타내는 photon 값을 확인한 후 그래프로 나타낸 결과이다.

[58] 도 15는 동물모델을 이용하여 MVR CAR-T의 효력테스트를 진행한 도이다. A. 루시퍼라아제를 발현하는 암세포주를 마우스 피하로 주입하여 동물모델을 유도한 후 MVR CAR-T의 효력을 IVIS imaging 장비를 이용하여 진행한 결과이다. B. 피하로 유도된 암덩어리의 크기를 automatic caliper로 측정한 후 그래프로 나타낸 결과이다.

[59] 도 16은 도 15를 바탕으로 각 그룹별 마우스의 생존율을 나타낸 그래프이다.

[60] 도 17은 MVR CAR-T 투여 후 3 - 4일 간격으로 마우스에서 안와채혈을 수행하여 FACS를 이용하여 혈액 내 존재하는 CAR-T 비율 및 숫자를 확인한 도이다. A. 마우스 혈액내에서 hCD45+/CAR + 세포 비율을 확인하여 그래프로 나타낸 결과이다. B. FACS 염색시 FACS 용 counting beads를 이용하여 마우스 혈액 내 존재하는 MVR CAR-T 세포수를 확인한 그래프이다.

[61]

발명의 실시를 위한 형태

[62] 본 발명은 키메라 항원 수용체를 발현하는 T세포, 이를 포함하는 약학 조성물, 및 이를 이용한 암 치료 방법에 관한 것이다.

[63] 본 발명에서 용어, “키메라 항원 수용체(Chimeric Antigen Receptor, CAR)”는 세포 외부에 노출되어 표적 분자를 인식하는 수용체인 항원 결합 도메인; 하나 이상의 힌지 도메인 또는 스페이서 도메인; 막관통 도메인; 하나 이상의 세포내 공자극성 신호전달 도메인; 및 세포내 자극성 도메인으로 기능하는 것으로 알려진 것이다

[64] 본 발명에서 용어, “T 세포”는 흉선에서 유래하는 림프구로서, 세포의 면역에 중요한 역할을 한다. T 세포는 CD4+ T세포, CD8+ T세포, 기억 T 세포, 조절 T 세포, 자연살해 T 세포 등을 포함한다. 본 발명의 일 실시예에서 CAR가 도입되는 T 세포는 CD8+ T세포, 또는 CD8+ T세포 및 CD4+ T세포이다.

[65] 본 명세서에서 “항체(antibody)” 및 “항원 결합 단백질”은 상호 교환적으로 사용 가능하고, 본 발명에 따른 항원 결합 단백질은 전체 항체(whole) 형태일 뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 전체 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합으로 연결되어 있다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함한다. 항체 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변 영역(CH1)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C 말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')₂ 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서

생성된다. Fv는 중쇄 가변부위 및 경쇄 가변부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각으로 Fv단편을 생성하는 제조합 기술은 국제공개 특허 WO 88/10649, WO 88/106630, WO 88/07085, WO 88/07086 및 WO 88/09344에 개시되어 있다. 이중쇄 Fv(dsFv)는 디설파이드 결합으로 중쇄 가변부위와 경쇄 가변부위가 연결되어 있고 단쇄 Fv(scFv)는 일반적으로 펩티드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역과 경쇄의 가변 영역이 공유 결합으로 연결되어 있다. 이러한 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하며 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있다)

- [66] 본 명세서에서 HLA-DR (Human Leukocyte Antigen - antigen D Related)은 주요조직적합성 II 분자이다 (Shackelford, D. A. et al., (1982) Immunol. Rev. 66: 133-187). 9개의 아미노산 이상의 펩티드인 HLA-DR 및 이의 리간드는 TCR에 대한 리간드를 구성한다. HLA-DR 분자는 신호전달에 반응하여 상향조절된다. 감염의 경우에 펩티드 (예를 들어 포도상 구균 장 독소 I 펩티드)는 DR 부닛에 결합되어 도움 T 세포에서 발견되는 다수의 수많은 T 세포 수용체에 제공된다. 이러한 세포는 B 세포의 증식을 자극하는 B 세포 표면 항원에 결합한다.
- [67] HLA-DR의 주요 기능은 동일한 펩티드 항원에 대한 항체의 생성을 유도하는 도움 T 세포의 반응을 유도하거나 억제하기 위해서 면역계에 본래 가지고 있지 않던 외부 펩티드 항원을 제시하는 것이다. HLA-DR은 $\alpha\beta$ 이량체이며, 세포 표면 수용체이며, 각각의 서브유닛은 2개의 세포외 도메인, 막-스패닝 도메인 및 세포질 꼬리를 포함한다. α 및 β 사슬 모두 세포막에 고정되어 있다. 성숙한 단백질의 N-말단 도메인은 결합 그룹브의 노출된 부분을 구성하는 알파-나선을 형성하고, C-말단 세포질 영역은 다른 사슬과 상호작용하여 세포막에 걸친 결합 그룹아래에 베타-시트를 형성한다. 펩티드 접촉 위치의 대부분은 각 사슬의 처음 80개 잔기에 있다.
- [68] HLA-DR은 항원 제시 세포, 예를 들어 수지상세포, 대식세포, 단핵구 및 B 세포에서 제한적으로 발현된다. 세포 표면에서 DR '항원'의 증가된 풍부함은 종종 자극에 반응하기 때문에, DR은 또한 면역 자극의 마커이다. B 세포 악성 종양에서 HLA-DR의 높은 발현 수준 및 정상 세포에서의 제한된 발현 스펙트럼으로 인해, HLA-DR에 대한 항체가 전임상 및 임상 연구에서 B 세포 악성 종양에 대해 개발되고 시험되었다 (Nagy, Z.A., et al. (2002) Nat. Med. 8: 801-807; DeNardo, G.L., et al. (2005) Clin. Cancer Res. 11 : 7075s-7079s; Ivanov, , A., et al. (2009) J. Clin. Invest. 119: 2143-2159; Lin, T.S., et al. (2009) Leuk. Lymphoma 50: 1958-1963). I/II상 시험에서는 독성이 심각하지 않았지만 제한된 효능으로 인해 추가 연구가 중단되었다 (Lin, T.S., et al. (2009) Leuk. Lymphoma 50: 1958-1963). 본 개시 내용은 항원 특이성을 대규모 T 세포 반응에 통합시킴으로써 CAR-T 세포가 단일 클론 항체의 치료 효능을 증대시킬 수 있는 가능성을 고려할 때, HLA-DR-제지항 된 CAR-T 세포는 B 세포에 악성 종양에

유용한 치료제 일 수 있다는 인식을 포함한다.

- [69] 본 발명의 일 실시예에서, 항원 결합 단백질은 scFv를 포함하고, 막관통 도메인, 보조자극 신호전달 도메인 및 세포내 신호전달 도메인이 기능적으로 연결된 형태이다. 막관통 도메인은 T 세포 수용체의 알파, 베타 혹은 제타 사슬이거나, CD28, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 또는 CD154 중 어느 하나 이상을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 세포내 신호전달 도메인은 기본적으로 CD3zeta 1차 신호전달 도메인, 및 보조자극 신호전달 도메인으로서 CD28, OXO40, CD27, ICAM-1, ICOS(CD278) 및 4-1BB (CD137) 중 어느 하나 이상을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에서 막관통 도메인은 CD8이고, 상기 보조자극 신호전달 도메인은 4-1BB이다.
- [70] 본 발명의 scFv는 경쇄 가변 영역 (VL) 및 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함하며, VL-VH 또는 VH-VL의 구조를 갖으며, VL과 VH는 링커에 의해 연결되거나 직접 연결되어 있을 수 있다. 링커를 이용하는 경우, 필요에 따라 강 염기에서 알려진 링커를 선택적으로 사용할 수 있으며, 예를 들어, (GGGGS)₂, (GGGGS)₃, (Gly)₆, (Gly)₈, 또는 (EAAAK)_n (n=1 내지 3 중 어느 하나의 정수)를 이용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에서, 항원 결합 단백질은 VL-링커-VH 구조체를 포함하고, 상기 링커는 (GGGGS)₃이다.
- [71] 본 발명의 항원 결합 분자의 scFv는 세포 표면에 제시된 항원에 특이적으로 결합하며, 상기 항원은 특히, 표적 세포, 예를 들어 암세포에서 특이적으로 발현되거나, 암세포에서 과발현되는 세포 표면 단백질이며, 예를 들어, CD30, CD20, CD19, CD22, 및 CD138로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 항원은 HLA-DR이다.
- [72] 본 발명의 일 실시예에서, scFv는 HLA-DR에 대한 항체, huMVR이다. huMVR 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1), 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 발명의 일 실시예에서, scFv는 서열번호 7로 표시되는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 8로 표시되는 경쇄 가변 영역을 포함하며, 본 발명의 또 다른 실시예에서 scFv는 huMVR 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다.
- [73] 본 발명의 항원 결합 분자는 상기 scFv를 항원 결합 부위로 하는 키메라 항원 수용체 (chimeric antigen receptor; CAR)이고, 본 발명의 일 실시예에서 항원 결합 분자는 상기 scFv의 C-말단에 막관통 도메인, 및 T 세포를 활성화시키기 위한 세포내 신호전달 도메인을 더 포함한다. 본 발명의 다른 실시예에서, 상기

CAR는 서열번호 7 또는 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 포함한다. 본 발명의 일 실시예에서 상기 막관통 도메인은 T 세포 수용체의 알파 사슬, T 세포 수용체의 베타 사슬, T 세포 수용체의 제타 사슬, CD28, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 및 CD154로 이루어진 군과 이의 변형체로부터 선택되고, 상기 세포내 신호전달 도메인은 CD3zeta 신호전달 도메인 및 보조자극 신호전달 도메인이며, 본 발명의 일 실시예에서 상기 보조자극 신호전달 도메인은 CD28, OX40, CD27, ICAM-1, CD278, 및 CD137로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [74] "분리된 폴리펩티드", "분리된 펩티드", 또는 "분리된 단백질"은 자연 상태에서 정상적으로 결합하는 화합물(예컨대, 다른 단백질 또는 폴리펩티드, 핵산, 탄수화물, 지질)이 실질적으로 없는 폴리펩티드 또는 단백질을 지칭한다. "분리된"은 다른 화합물과의 인공적 또는 합성 혼합물을 제외하거나, 생물학적 활성을 간섭하지 않는 불순물의 존재를 제외하거나, 예를 들어 불완전한 정제, 안정제의 첨가 또는 약학적으로 허용가능한 제제로의 조제로 인해 존재할 수 있는 불순물의 존재를 제외하는 것을 의미하지는 않는다.
- [75] 용어, "가변 영역"이란 항원과 특이적으로 결합하는 기능을 수행하면서 서열상의 많은 변이(variation)을 보이는 항체 분자의 부분을 의미하고, 가변영역에는 CDR1, CDR2 및 CDR3가 존재한다. "상보성 결정 영역(complementarity determining regions: CDR)"은 항원의 인식에 관여하는 부위로서 이 부위의 서열이 변함에 따라 항체의 항원에 대한 특이성이 결정되는 중요한 부위이다. CDR 사이에는, 적절한 배향으로 "프레임워크 영역(frame work: FR)"이 존재하여 CDR 고리를 지지해주는 역할을 하고, 구체적으로 FR1, FR2, FR3 및 FR4가 존재한다.
- [76] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명에 다른 항원 결합 단백질은 인간화 항체일 수 있다. 본 발명에서, 용어 "인간화 항체(humanized antibody)"란, 이상에서 설명한 바와 같이, 인간에게 비-면역원성(nonimmunogenic)이거나 또는 면역원성이 감소된 항체를 총칭한다. 인간화 항체는 아미노산 서열이 변형된 항체(altered antibody)이고 항체의 아미노산 서열은 원하는 목적에 맞게 재구성할 수 있다. 이러한 가능한 변화는 수없이 많고 하나 또는 몇 가지 아미노산을 변화시키는 것부터 항체의 가변 또는 불변 영역의 완전한 재구성까지 가능하다. 일반적으로 가변영역의 변형이 항원의 결합능과 친화도를 증대시키기 위하여 행하여지는데 비하여 불변영역에서의 변형은 보체(complement)의 고정, 막과의 상호작용 및 기타 효과제의 기능과 같은 세포내 작용을 증대시키기 위하여 행하여진다. 본 발명에서 제공하는 인간화 항체는 모든 종류의 불변영역과 재조합적인 방법으로 결합될 수 있다. 중쇄 불변 영역은 감마(γ)(μ), 알파(α), 델타(δ)(ϵ 타입을 가지고 서브클래스로 감마1(γ 1)감마2(γ 2)감마3(γ 3)감마4(γ 4)알파1(α 1) 및 알파2(α 2)를 가진다. 경쇄의 불변영역은 카파(κ) 및 람다(λ 타입을 가진다(Coleman et al., Fundamental

immunology, 2nd Ed., 1989, 55-73).

- [77] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열들에 적용되는 용어 "단편(fragment)"은 언급한 핵산 또는 단백질에 비해 길이가 감소된 핵산 서열 또는 펩티드 서열을 지칭하며, 상기 언급된 핵산 또는 단백질과 동일한 뉴클레오티드 서열 또는 펩티드 서열을 공통 부분 이상 포함한다. 이러한 본 발명에 따른 핵산 단편 및 폴리펩티드 단편은, 적절한 경우, 구성성분으로서 보다 큰 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 내에 포함될 수 있다. 이러한 단편들은 본 발명에 따른 핵산 또는 단백질의 적어도 6, 8, 9, 10, 12, 15, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 39, 40, 42, 45, 48, 50, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 70, 75, 78, 80, 90, 100, 105, 120, 135, 150, 200, 300, 500, 720, 900, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000 이상의 연속적인 뉴클레오티드 또는 펩티드 범위의 길이의 올리고뉴클레오티드 또는 올리고펩티드를 포함하거나 구성한다.
- [78] 폴리펩티드 또는 단백질의 "변형체(variant)"는 폴리펩티드 또는 단백질로부터 유래하고 상기 폴리펩티드 또는 단백질의 적어도 하나의 생물학적 특성을 유지하고 있는 임의의 유사체, 단편, 유도체 또는 돌연변이를 지칭한다. 상기 폴리펩티드 또는 단백질의 상이한 변형체들이 자연 내에 존재할 수 있다. 이들 변형체들은 단백질을 암호화하는 구조 유전자의 뉴클레오티드 서열이 다른 것에 특징이 있는 대립 유전자의 변이일 수 있거나, 차별적 스플라이싱 또는 번역 후 수식(modification)을 포함할 수 있다. 숙련된 당업자는 하나 또는 복수의 아미노산 치환, 결손, 부가 또는 대체를 갖는 변형체를 생성할 수 있다. 이들 변형체들은 그중에서도: (a) 하나 이상의 아미노산 잔기들이 보존적 또는 비보존적 아미노산들로 치환된 변형체, (b) 하나 이상의 아미노산이 폴리펩티드 또는 단백질에 부가된 변형체, (c) 아미노산 중 하나 이상이 치환기를 포함하는 변형체, 및 (d) 폴리펩티드 또는 단백질이 혈청 알부민과 같은 또 다른 폴리펩티드와 융합된 변형체를 포함할 수 있다.
- [79] 또한 보존적 변형체는 단백질의 생물학적 기능에 불리한 영향을 미치지 않는 서열 변형을 가진 아미노산 서열을 의미한다. 변경된 서열이 단백질과 관련된 생물학적 기능을 방해하거나 파괴하는 경우, 치환, 삽입 또는 결실이 단백질에 불리한 영향을 미친다고 기재된다. 예를 들어, 단백질의 총 전하, 구조 또는 소수성-친수성은 생물학적 활성에 불리한 영향을 미치지 않으면서 변경될 수 있다. 따라서, 아미노산 서열은 예를 들어, 단백질의 생물학적 활성에 불리한 영향을 미치지 않으면서 펩티드가 보다 높은 소수성 또는 친수성을 나타내도록 변경될 수 있다. 유전적(억제, 결손, 돌연변이 등), 화학적 및 효소적 기술들을 포함하는, 이러한 변형체를 수득하는 기술들이 본 기술분야에서 통상의 기술을 가진 자에게 알려져 있다.
- [80] 본 발명의 일 실시예에서는 상기 항원 결합 분자를 인코딩하는 핵산 분자를 개시한다. 상기 핵산 분자는 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열 또는 서열번호 7로 표시되는 아미노산 서열을 인코딩하는

핵산 서열을 포함할 수 있다. 본 발명의 다른 실시예에서, 핵산 분자는 서열번호 9로 표시되는 scFv를 인코딩하기 위한 서열을 포함할 수 있다. 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 핵산 분자는 CAR를 인코딩하는 서열번호 15 또는 서열번호 16으로 표시되는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 핵산 분자는 상기의 서열에서 인코딩되는 단백질과 동일한 아미노산 서열, 또는 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 상동성을 갖는 폴리펩티드를 인코딩하기 위한, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 상동성을 갖는 핵산 서열을 포함할 수 있다.

- [81] 본 발명의 "핵산", "핵산 분자", "올리고뉴클레오타이드" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 상호교환적으로 사용되고, 단일 가닥 형태나 이중 가닥 나선(helix)으로의 리보뉴클레오사이드(아데노신, 구아노신, 우리딘 또는 시티딘; "RNA 분자") 또는 데옥시리보뉴클레오사이드(데옥시아데노신, 데옥시구아노신, 데옥시티민 또는 데옥시시티딘; "DNA 분자")의 인산 에스테르의 중합체 형태 또는 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 및 티오에스테르와 같은 이의 임의의 인산 에스테르 유사체를 지칭한다. 이중 나선 DNA-DNA, DNA-RNA 및 RNA-RNA 나선이 가능하다. 용어 핵산 분자, 및 특히 DNA 또는 RNA 분자는 상기 분자의 일차 및 이차 구조만을 지칭하며 어느 특정 삼차 형태에 제한하지는 않는다. 따라서, 이 용어는 그 중에서도 선형 또는 환형 DNA 분자(예컨대, 제한효소 단편), 플라스미드, 초나선형(supercoiled) DNA 및 염색체로 발견되는 이중 가닥 DNA를 포함한다. 특정 이중 가닥 DNA 분자의 구조를 논할 때, 서열을 전사되지 않은 DNA 가닥(즉, mRNA에 일치하는 서열을 갖는 가닥)을 따라 5'에서 3' 방향으로만 제시하는 일반적인 규약에 따라 본 명세서에 서열이 기술될 수 있다. "재조합 DNA 분자"는 분자 생물학적 조작을 거친 DNA 분자이다. DNA는 cDNA, 게놈 DNA, 플라스미드 DNA, 합성 DNA 및 반합성 DNA를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [82] 본 기술분야에 알려진 바와 같이, 용어 "백분율 동일성(percent identity)"은 서열을 비교함으로써 결정된 바와 같이 둘 이상의 폴리펩티드 서열 또는 둘 이상의 폴리뉴클레오타이드 서열 간의 관계이다. 또한, 본 기술분야에서, "동일성"은 경우에 따라, 상기 서열의 문자열 간의 일치에 의해 결정되는 것과 같이, 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오타이드 서열간의 서열 관련 정도를 의미한다. "동일성" 및 "유사성"은 Computational Molecular Biology((Lesk, A. M., ed.) Oxford University Press, New York (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects (Smith, D. W., ed.) Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part I (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds.) Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology (von Heinje, G., ed.) Academic Press (1987); and Sequence Analysis Primer (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.) Stockton Press, New York (1991)에 기술된 것을 포함하나 이에 제한되지

않는, 알려진 방법들에 의해 쉽게 계산될 수 있다. 동일성을 결정하는 바람직한 방법은 시험한 서열 간의 최적의 일치율을 제공하도록 고안된다. 동일성 및 유사성을 결정하는 방법은 공공이 이용가능한 컴퓨터 프로그램에서 성문화된다. 서열 정렬 및 백분율 동일성 계산은 레이저진 바이오인포매틱스 컴퓨팅 스위트(LASERGENE bioinformatics computing suite, DNASTAR Inc., Madison, WI)의 메갈린(Megalign) 프로그램과 같은 서열 분석 소프트웨어를 이용하여 수행될 수 있다. 서열의 다중 정렬(multiple alignment)은 기본 매개변수(default parameter)(GAP PENALTY=10, GAP LENGTH PENALTY=10)을 갖는 클러스탈(Clustal) 정렬 방법 (Higgins et al., CABIOS. 5:151 (1989))을 이용하여 수행될 수 있다. 클러스탈 방법을 이용한 쌍정렬(pairwise alignment)을 위한 기본 매개변수는 KTUPLE 1, GAP PENALTY=3, WINDOW=5 및 DIAGONALS SAVED=5로부터 선택될 수 있다. 당분야에 공지되어 있는 바와 같이, 2종의 폴리펩티드들 사이의 "유사성"은 아미노산 서열, 및 폴리펩티드의 보존된 아미노산 치환을 제2 폴리펩티드의 서열과 비교함으로써 측정한다. 본원에서 이러한 서열들에 대한 동일성 또는 상동성(homology)은 서열들을 정렬하고 필요하다면 갭(gap)을 도입하여 최대 상동성(%)을 달성하고 임의의 보존적 치환을 서열 동일성의 일부로서 간주하지 않은 후, 공지되어 있는 펩티드와 동일한, 후보 서열 내의 아미노산 잔기들의 백분율로서 정의된다. 펩티드 서열에서의 N-말단, C-말단 또는 내부 연장, 결실 또는 삽입은 상동성에 영향을 미치는 것으로서 해석되지 않을 것이다.

[83] 용어 "상동성(homology)"은 두 개의 폴리뉴클레오티드 또는 두 개의 폴리펩티드 부분들간의 동일성(identity)의 백분율을 지칭한다. 한 부분 내지 다른 부분의 서열 간의 관련성(correspondence)은 본 기술분야에 알려진 기술들에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 상동성은 서열 정보를 정렬하여 그리고 즉시 이용가능한 컴퓨터 프로그램을 이용하여 두 개의 폴리펩티드 분자 간의 서열 정보를 직접적으로 비교함으로써 결정될 수 있다. 그렇지 않으면, 상동성은 동종 영역들 간에 안정적인 이중체(duplex)를 형성하는 조건 하에서 폴리뉴클레오티드들을 혼성화한 후, 단일 가닥 특이적 뉴클레아제를 이용하여 절단하고 절단된 단편들의 크기 결정에 의해 결정될 수 있다.

[84] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 모든 문법적 형태 및 철자 변형된 용어 "상동의"는 수퍼패밀리(예컨대, 면역글로불린 수퍼패밀리)로부터의 단백질 및 다른 종(예컨대, 미오신 경쇄 등)으로부터의 동종 단백질을 포함하는, "공통의 진화 기원(common evolutionary origin)"을 지니는 단백질 간의 관련성을 지칭한다(Reeck et al., Cell 50:667 (1987)). 이러한 단백질(및 이들의 암호화 유전자)은 이들의 높은 서열 유사정도에 비추어 볼 때 서열 상동성을 갖는다. 하지만, 일반적인 사용에 있어서 및 본 출원에 있어서, "매우"와 같은 부사를 이용하여 변형될 때, 용어 "상동의"는 서열 상동성을 지칭하며 공통의 진화 기원을 지칭하지는 않는다.

- [85] 따라서, 모든 문법적 형태의 용어 "서열 유사성"은 공통의 진화적 기원을 갖거나 갖지 않을 수 있는 핵산 또는 아미노산 서열들 간의 동일성 또는 관련성 정도를 지칭한다(Reeck et al., Cell 50:667 (1987) 참조). 일 구체예에 있어서, 뉴클레오티드들의 약 50%(예컨대, 적어도 약 75%, 90%, 또는 95%)가 정의된 길이의 DNA 서열 이상 일치할 때, 두 개의 DNA 서열들은 "실질적으로 상동" 또는 "실질적으로 유사"하다. 실질적으로 상동인 서열들은 서열 데이터뱅크 또는, 예를 들어, 특정 시스템을 위해 정의된 바와 같이 엄격한 조건하에서의 서던 혼성화 실험에서 이용가능한 표준 소프트웨어를 이용하여 서열을 비교함으로써 확인될 수 있다. 적절한 혼성화 조건을 정의하는 것은 본 기술분야의 기술 범주 내이다(예컨대, Sambrook et al., 1989, 참조).
- [86] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "실질적으로 유사"는 하나 이상의 뉴클레오티드 염기의 변화가 하나 이상의 아미노산의 치환을 야기하지만 상기 DNA 서열에 의해 암호화되는 단백질의 기능적 특성에는 영향을 미치는 않는 핵산 단편을 지칭한다. "실질적으로 유사"는 또한 하나 이상의 뉴클레오티드 염기의 변화가 안티센스 또는 동시억제(co-suppression) 기법에 의해 유전자 발현의 변화를 매개하는 핵산 단편의 능력에 영향을 미치지 않는 핵산 단편을 지칭한다. "실질적으로 유사"는 또한 얻어지는 전사체의 기능적 특성에는 실질적으로 영향을 주지 않는 하나 이상의 뉴클레오티드 염기의 결손 또는 삽입과 같은, 본 발명의 핵산 단편의 변형을 지칭한다. 따라서, 본 발명은 예시된 특정 서열보다 더 포함한다고 이해된다. 제안된 각각의 변형들은 암호화된 생성물의 생물학적 활성의 유지(retention)를 결정하는 것과 같이, 본 기술분야에서 통상적인 기술 내에 속한다.
- [87] 나아가, 숙련된 당업자는 엄격한 조건(0.1X SSC, 0.1% SDS, 65°C 및 2X SSC, 0.1% SDS로 세척 후, 0.1X SSC, 0.1% SDS) 하에서 본 명세서에 예시된 서열들과 혼성화하는 능력에 의해 본 발명에 의해 포함된 실질적으로 유사한 서열들이 정의된다는 것을 인식한다. 실질적으로 유사한 본 발명의 핵산 단편들은 DNA 서열들이 본 명세서에 보고된 핵산 단편의 DNA 서열과 적어도 약 70%, 80%, 90% 또는 95% 동일한 핵산 단편들이다.
- [88] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명에 따른 항원 결합 단백질을 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는, 발현 벡터를 제공한다. 용어 "발현"은 코딩 서열에 의해 인코딩된 생성물의 생물학적 생산을 지칭한다. 대부분의 경우에서, 코딩 서열을 포함하는 DNA 서열은 전사되어 메신저-RNA(mRNA)를 형성한다. 이어서, 상기 메신저 RNA는 번역되어 관련 생물학적 활성을 갖는 폴리펩티드 생성물을 형성한다. 또한, 발현 과정은 RNA 전사 생성물에 대한 추가 가공 단계(예를 들면, 인트론을 제거하기 위한 스플라이싱), 및/또는 폴리펩티드 생성물의 번역-후 가공을 포함할 수 있다.
- [89] 본 명세서에서 사용하는 용어 "발현 벡터"는 삽입된 핵산 서열을 발현한 후 숙주를 형질전환시킬 수 있도록 고안된 벡터, 플라스미드 또는 운반체를

지칭한다. 클론된 유전자, 즉, 삽입된 핵산 서열은 일반적으로 프로모터, 최소 프로모터, 인핸서 등과 같은 조절 요소의 통제 하에 놓여 진다. 원하는 숙주 세포에서의 핵산의 발현을 유도하는데 유용한 개시 조절 영역 또는 프로모터들은 무수히 많으며 본 기술분야의 숙련자들에게 잘 알려져 있다. 실질적으로 이들 유전자들의 발현을 유도할 수 있는 임의의 프로모터는 바이러스 프로모터, 박테리아 프로모터, 동물 프로모터, 포유동물 프로모터, 합성 프로모터, 구성 프로모터, 조직 특이적 프로모터, 발병(pathogenesis) 또는 질병 관련 프로모터, 발생 특이적 프로모터(developmental specific promoter), 유도성 프로모터(inducible promoter), 약하게 조절된 프로모터(light regulated promoter)를 포함하나, 이에 제한되지는 않으며; SV40 초기(SV40) 프로모터 영역, 라우스 육종 바이러스(Rous sarcoma virus, RSV)의 3' 긴 말단 반복(LTR)에 함유된 프로모터, 아데노바이러스(Ad)의 E1A 또는 주요 후기 프로모터(major late promoter, MLP), 인간 사이토메갈로바이러스 (human cytomegalovirus, HCMV) 즉시 초기 프로모터(immediate early promoter), 단순 포진 바이러스(HSV) 티미딘 키나아제(TK) 프로모터, 배콜로바이러스 IE1 프로모터, 신장 인자(elongation factor) 1 알파(EF1) 프로모터, 글리세르알데하이드-3-포스페이트 탈수소효소(GSPDH) 프로모터, 포스포글리세레이트 키나아제(PGK) 프로모터, 유비쿼틴 C(Ubc) 프로모터, 알부민 프로모터, 마우스 메탈로티오네인(metallothionein)-L 프로모터 및 전사 조절 영역의 조절 서열, 유비쿼터스 프로모터(HPRT, 비멘틴(vimentin), β 액틴, 튜불린 등), 중간필라멘트(intermediate filament)(데스민(desmin), 신경미세섬유, 케라틴, GFAP 등), 치료 유전자의 프로모터(MDR, CFTR 또는 인자 VIII 형태 등의), 발병 또는 질병 관련 프로모터, 및 췌장 선방세포(pancreatic acinar cell) 에서 활성화인 엘라스타제(elastase) I 유전자 조절 영역과 같은, 조직 특이성을 나타내며 형질전환 동물에서 이용되어 온 프로모터; 췌장 베타 세포에서 활성화인 인슐린 유전자 조절 영역, 림프계(lymphoid) 세포에서 활성화인 면역글로불린 유전자 조절 영역, 고환, 유방, 림프계 및 대식 세포에서 활성화인 마우스 유방암 바이러스 조절 영역; 간에서 활성화인 알부민 유전자, Apo AI 및 Apo AII 조절 영역, 간에서 활성화인 알파-태아단백질(fetoprotein) 유전자 조절 영역, 간에서 활성화인 알파1-안티트립신 유전자 조절 영역, 골수 세포에서 활성화인 베타-글로빈 유전자 조절 영역, 뇌에서의 희소돌기아교세포(oligodendrocyte cell)에서 활성화인 마이엘린 염기성 단백질(myelin basic protein) 조절 영역, 골격근에서 활성화인 미오신 경쇄-2 유전자 조절 영역 및 시상하부에서 활성화인 생식선 자극호르몬 방출 호르몬 (gonadotropic releasing hormone), 피루브산 키나아제 프로모터, 빌린(villin) 프로모터, 지방산 결합 장내 단백질의 프로모터, 평활근 세포 β 액틴의 프로모터 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

- [90] 용어 "백터"는 핵산을 시험관 내 (in vitro), 생체 외(ex vivo) 또는 생체 내(in vivo) 세포로 도입하기 위한 바이러스성 운반체뿐만 아니라 비바이러스성 운반체

모두를 포함한다. 벡터는 부착된 절편을 증폭시키기 위하여 또 다른 DNA 절편이 부착된 레플리콘(replicon)일 수 있다. "레플리콘"은 생체 내(in vivo) DNA 복제의 자율 단위로 작용할 수 있는, 즉 그 자신의 통제 하에 복제를 할 수 있는, 임의의 유전 요소(예컨대, 플라스미드, 파아지, 코스미드, 염색체, 바이러스)를 지칭한다. 본 기술분야에서 알려진 상당수의 벡터들이 핵산을 조작하고, 반응 요소(response element) 및 프로모터를 유전자로 혼입하는 등에 사용될 수 있다. 바람직한 벡터에는, 예를 들어, 플라스미드 또는, 예를 들어 아데노바이러스, 레트로바이러스, 아데노-관련 바이러스, 헤르페스 바이러스, 또는 pBR322 또는 pUC 플라스미드 유도체 또는 블루스크립트(Bluescript) 벡터와 같은 플라스미드를 포함하는 변형된 바이러스를 포함한다. 예를 들어, 반응 요소 및 프로모터에 해당하는 DNA 단편의 적절한 벡터로의 삽입은, 상기 적절한 DNA 단편을 상보적인 접착말단(cohesive termini)을 갖는 선택된 벡터와 결합시킴으로써 달성될 수 있다. 그렇지 않으면, DNA 분자의 말단이 효소적으로 변형될 수 있거나, 또는 뉴클레오티드 서열(링커)을 DNA 말단과 결합시킴으로써 임의의 부위가 생성될 수 있다. 그러한 벡터들은 세포 계능으로 마커를 혼입한 세포를 선별하기 위한 선별 마커 유전자를 함유하도록 조작될 수 있다. 그러한 마커들은 마커에 의해 암호화된 단백질을 혼입하여 발현하는 숙주 세포를 확인 및/또는 선별할 수 있게 한다.

- [91] 벡터는 필수 조절 서열(예를 들어, 전사 및 번역 요소)을 제공하여 적절한 숙주 세포내에서의 융합 단백질의 발현을 조절한다. 조절 서열은 프로모터 영역, 인핸서 영역, 전사 종결 부위, 리보솜 결합 부위, 개시 코돈, 스플라이스 신호, 인트론, 폴리아데닐화 신호, 샤인/달가노(Shine/Dalgarno) 번역 서열 및 코작 공통 서열(Kozak consensus sequence) 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 조절 서열은 융합 단백질이 생성될 숙주 세포를 고려하여 선택된다. 적절한 박테리아 프로모터는 박테리오파지 λ pL 또는 pR, T6, T7, T7/lacO, lac, recA, gal, trp, ara, hut 및 trp-lac을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 적절한 진핵 프로모터는 PRBI, GAPDH, 메탈로티오네인, 티미딘 키나제, 바이럴 LTR, 사이토메갈로바이러스, SV40, 또는 조직-특이적 또는 종양-특이적 프로모터, 예컨대 α -태아단백질, 아밀라제, 카텝신 E, M1 무스카린 수용체 또는 γ 글루타밀 트랜스퍼라제를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [92] 부가적인 벡터는 리포플렉스(lipoplex; 양이온성 리포솜-DNA 복합체), 폴리플렉스(polyplex; 양이온성 중합체-DNA 복합체) 및 단백질-DNA 복합체를 포함한다. 핵산에 덧붙여, 벡터는 한가지 이상의 조절 영역, 및/또는 핵산 전달 결과(어느 조직으로의 전달, 발현 지속기간 등)를 선택, 측정 및 감시하는 데 유용한 선택가능한 마커를 또한 포함할 수 있다.
- [93] 벡터는 본 기술분야에서 알려진 방법, 예컨대, 주사, 형질감염, 전기천공법, 미세주사(microinjection), 형질도입, 세포 융합, 리포펙션(lipofection), 칼슘 포스페이트 침전법 (Graham, F.L. et al., Virology, 52:456(1973); 및 Chen과

Okayama, Mol. Cell. Biol. 7:2745-2752(1987)), 리포솜-매개 형질감염법 (Wong, T.K. et al., Gene, 10:87(1980); Nicolau 및 Sene, Biochim. Biophys. Acta, 721:185-190(1982); 및 Nicolau et al., Methods Enzymol., 149:157-176(1987)), DEAE-텍스트란 처리법 (Gopal, Mol. Cell Biol., 5:1188-1190(1985)), 유전자 밤바드먼트 (Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87:9568-9572(1990)) 방법, 유전자 총의 사용 또는 DNA 벡터 전달체(DNA vector transporter)에 의하여, 원하는 숙주 세포로 도입될 수 있다(e.g., Wu et al., J. Biol. Chem. 267:963 (1992); Wu et al., J. Biol. Chem. 263:14621 (1988); and Hartmut et al., Canadian Patent Application No. 2,012,311, 참조).

- [94] 바이러스 벡터는 살아있는 동물 대상뿐만 아니라 세포에서의 광범위한 유전자 전달 적용 분야에 사용되어 왔다. 사용될 수 있는 바이러스 벡터들은 아테노바이러스, 레트로바이러스, 백신나(vaccinia) 바이러스, 수두바이러스(poxvirus), 아테노 관련 바이러스, 단순포진바이러스(herpes simplex virus), 렌티바이러스 (lentivirus), 배쿨로바이러스(baculovirus), 센다이 바이러스(sendai virus), 홍역 바이러스(measles virus), 시미안 바이러스(simian virus) 40 및 엡스타인-바(Epstein-Barr) 바이러스 벡터를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 비-바이러스성 벡터는 플라스미드, 리포플렉스(lipoplex)(양이온 리포솜-DNA 복합체), 폴리플렉스(polyplex)(양이온 중합체-DNA 복합체) 및 단백질-DNA 복합체를 포함한다. 핵산 이외에, 벡터는 핵산 전달 결과(조직으로의 전달, 발현 지속성 등)를 선별, 측정 및 추적관찰하는데 유용한 하나 이상의 조절 영역 및/또는 선별 마커를 포함할 수 있다.
- [95] 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드는 리포펙션에 의해 생체 내에서 도입될 수 있다. 과거 수십년 동안, 시험관 내(in vitro) 핵산의 캡슐화 및 형질감염을 위해 리포솜의 사용이 증가해왔다. 리포솜-매개 형질감염이 맞닥뜨린 어려움과 위험을 제한하고자 고안된 합성 양이온성 지질(synthetic cationic lipid)이 유전자의 생체 내 (in vivo) 형질감염을 위한 리포솜을 제조하는데 사용될 수 있다(Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:7413 (1987); Mackey et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8027 (1988); 및 Ulmer et al., Science 259:1745 (1993)). 양이온성 지질의 사용은 음성 전하를 띠는 핵산의 캡슐화를 촉진할 수 있고, 또한 음성 전하를 띠는 세포막과의 융합을 촉진할 수 있다(Felgner et al., Science 337:387 (1989)). 핵산의 전달을 위한 특히 유용한 지질 화합물 및 조성물이 WO95/18863, WO96/17823 및 U.S. 5,459,127에 기술되어 있다. 외인성(exogenous) 유전자를 생체 내(in vivo) 특정 조직 내로 도입하기 위한 리포펙션의 사용은 몇 가지 실용적인 장점이 있다. 리포솜의 특정 세포로의 분자 표적화는 한가지 영역의 이점을 제시한다. 특정 세포형으로의 직접적인 형질감염이, 체장, 간, 신장 및 뇌와 같이 세포 이질성을 갖는 조직에 특히 바람직할 것임이 분명하다. 지질은 표적화를 위해 다른 분자들과 화학적으로 결합할 수 있다(Mackey et al. 1988). 표적화된 펩티드, 예컨대, 호르몬 또는 신경전달물질, 및 항체와 같은

단백질, 또는 비-펩티드성 분자가 화학적으로 리포솜에 결합될 수 있다.

- [96] 본 명세서에서 사용하는 용어 "형질감염(transfection)"은 세포에 의한 외인성 또는 이종(heterologous) RNA 또는 DNA의 흡수(uptake)를 지칭한다. 외인성 또는 이종 RNA 또는 DNA가 세포 내부로 도입될 때, 이러한 RNA 또는 DNA에 의해 세포가 "형질감염"된다. 상기 형질감염된 RNA 또는 DNA가 표현형(phenotypic)의 변화를 가져올 때, 외인성 또는 이종 RNA 또는 DNA에 의해 세포는 "형질전환"된다. 상기 형질전환시키는 RNA 또는 DNA는 염색 DNA 내로 삽입(공유 결합)되어 세포의 게놈을 구성할 수 있다.
- [97] 본 명세서에서 사용하는 용어 "형질전환(transformation)"은 핵산 단편을 숙주 생물 내로 전달하여 유전학적으로 안정적인 유전(inheritance)을 일으키는 것을 지칭한다. 형질전환된 핵산 단편을 함유하는 숙주 생물은 "형질전환(transgenic)" 또는 "재조합" 또는 "형질전환된(transformed)" 생물로 지칭된다.
- [98] 본 발명에서 용어, "재조합 벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 발현 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다.
- [99] 양이온성 올리고펩티드(예컨대, WO95/21931), DNA 결합 단백질로부터 유래된 펩티드(예컨대, WO96/25508), 또는 양이온성 중합체(예컨대, WO95/21931)와 같은, 다른 분자들이 또한 생체 내 핵산의 형질감염을 용이하게 하는데 유용하다.
- [100] 생체 내(in vivo) 벡터를 순수한(naked) DNA 플라스미드로서 도입하는 것 또한 가능하다(미국 특허번호 제5,693,622호, 제5,589,466호 및 제5,580,859호 참조). 수용체-매개 DNA 전달법이 사용될 수도 있다(Curiel et al., Hum. Gene Ther. 3:147 (1992); and Wu et al., J. Biol. Chem. 262:4429 (1987)).
- [101] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명에 따른 항원 결합 단백질을 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는, 세포를 개시한다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 세포는 T 세포이고, 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 T 세포는 CD8+ T 세포 및/또는 CD4+ T 세포이며, 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 세포는 키메라 항원 수용체-T 세포 (CAR-T)이다.
- [102] 본 발명의 일 실시예에서, 항원 결합 단백질을 발현하는 세포를 약학적 유효성분으로 포함하는, 암 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [103] 본 발명에서 용어, "항암"이란 "예방" 및 "치료"를 포함하며, 여기서 "예방"이란 본 발명의 조성물 투여에 의해 암이 억제되거나 지연되는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 본 발명의 항체 투여에 의해 암의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 상기 예방은 완전한, 예컨대, 대상에서의 증상이 완전히 없어질 수 있다. 상기 예방은 또한 대상에서의 증상의 발생이 본 발명이 없으면 발생했을 것보다 적은 것과 같은, 부분적일 수 있다.
- [104] 본 발명에 기재된 "조성물"은 활성 성분으로서 본 발명에 따른 세포 독성 T 세포와 함께 천연 또는 인공의 담체, 라벨 또는 탐지제와 같은 불활성 성분 또는

애주번트, 희석제, 결합제, 안정화제, 완충제, 염, 친지방성 용매, 보존제와 같은 활성 성분과의 조합을 의미하며, 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다. 담체는 또한 약학적 부형제 및 부가적인 단백질, 펩티드, 아미노산, 지질, 및 탄수화물 (예를 들어, 단당류; 이당류; 삼당류; 사당류; 올리고당류; 알디톨, 알도산, 에스테르화된 설탕과 같은 설탕의 유도체, 폴리사카라이드, 또는 당 중합체 등)을 단독으로 또는 조합하여 포함할 수 있으며, 1 내지 99.99 중량% 또는 부피%로 포함할 수 있다. 단백질 부형제는, 예를 들어, 인간 혈청 알부민, 재조합 인간 알부민, 젤라틴, 카제인 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 완충 역할을 할 수 있는 대표적인 아미노산 성분은, 예를 들어, 알라닌, 알기닌, 글리신, 베타인, 히스티딘, 글루탐산, 아스파르트산, 시스테인, 라이신, 루신, 아이소루신, 발린, 메티오닌, 페닐알라닌, 아스파탐 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 탄수화물 부형제는 또한, 예를 들어, 프룩토스, 말토스, 갈락토스, 글루코스, D-만노스, 솔보스와 같은 단당류; 락토스, 수크로스, 트레할로스, 셀로비오스와 같은 이당류, 라피노스, 말토덱스트린, 텍스트란, 전분과 같은 다당류, 및 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 락티톨, 소르비톨, 및 마이오이노시톨과 같은 알디톨을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[105] 본 발명의 약학 조성물은 당업자에 의해 공지된 방법으로 제제화하는 것이 가능하다. 예를 들면, 필요에 따라서 물 또는 그 외의 약학적으로 허용되는 액과의 무균성 용액, 또는 현탁액제의 주사제의 형태로 비경구적으로 사용할 수 있다. 예를 들면, 약학적으로 허용되는 담체 또는 매체, 구체적으로는, 멸균수나 생리 식염수, 식물유, 유화제, 현탁제, 계면활성제, 안정제, 부형제, 비히클(vehicle), 방부제, 결합제 등과 적당 조합하여, 일반적으로 인정된 제약 실시예에 요구되는 단위 용량 형태로 혼화함으로써 제제화할 수 있다. 상기 제제에 있어서 유효 성분량은 지시받은 범위의 적당한 용량을 얻을 수 있도록 하는 것이다.

[106] 또한, 주사를 위한 무균 조성물은 주사용 증류수와 같은 부형액을 이용해 통상의 제제 실시예에 따라 처방할 수가 있다. 주사용의 수용액으로서, 예를 들면 생리 식염수, 포도당이나 그 외의 보조약을 포함한 등장용액, 예를 들면 D-소르비톨, D-만노스, D-만니톨, 염화 나트륨을 들 수 있어 적당한 용해 보조제, 예를 들면 알코올, 구체적으로는 에탄올, 폴리 알코올, 예를 들면 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 비이온성 계면활성제, 예를 들면 폴리소르베이트 80(TM), HCO-50으로 병용할 수 있다. 유성액으로서, 참기름, 콩기름을 들 수 있어 용해 보조제로서 안식향산벤질, 벤질 알코올과 병용할 수 있다.

[107] 주사제형의 예로서는 예를 들면, 정맥내 주사, 동맥내 주사, 선택적 동맥내 주사, 근육내 주사, 복강내 주사, 피하주사, 뇌실내 주사, 뇌내 주사, 골수액강내 주사 등에 의해 투여할 수가 있지만, 바람직하게는 정맥내 주사이다.

[108] 본 발명의 조성물은 약제학적 유효량의 T 세포를 포함한다. 유효량의 결정은 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 본 명세서에 개시된 내용을

기반으로 용이하게 결정될 수 있다. 일반적으로 약제학적 유효량은 유효 성분을 낮은 농도로 1차 투여한 후, 대상체에서 부작용이 없으면서도 요망되는 효과 (예를 들어, 암과 관련된 증상이 감소되거나 제거되는 것)를 얻을 때까지 점진적으로 증량시킴으로써 결정된다. 본 발명에 따른 조성물의 투여를 위한 적절한 투여량이나 투여 간격을 결정하는 방법은 예를 들어, Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Goodman et al., eds., 11th Edition, McGraw-Hill 2005, and Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th and 21st Editions, Gennaro and University of the Sciences in Philadelphia, Eds., Lippencott Williams & Wilkins (2003 and 2005)에 설명되어 있다.

- [109] 본 발명에 따른 조성물의 투여 방법은 암의 종류, 대상체의 나이, 체중, 성별, 의학적 상태, 질환의 중증도, 투여 경로, 및 별도로 투여되는 약물과 같은 다양한 인자를 고려하여 결정될 수 있다. 따라서, 투여 방법은 매우 다양하지만, 일반적으로 사용되는 방법에 따라 결정될 수 있다.
- [110] 대상체에 투여되는 본 발명에 따른 조성물의 양은 투여 방법, 대상체의 건강 상태, 체중, 의사의 처방과 같은 많은 인자에 의하여 결정될 수 있으며, 이러한 모든 인자는 당해 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자가 갖는 지식의 범위 내에 있다.
- [111] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약 1×10^6 cells/mL 이상, 약 2×10^6 cells/mL 이상, 약 3×10^6 cells/mL 이상, 약 4×10^6 cells/mL 이상, 약 8×10^6 cells/mL 이상, 약 6×10^6 cells/mL 이상, 약 7×10^6 cells/mL 이상, 약 8×10^6 cells/mL 이상, 약 9×10^6 cells/mL 이상, 약 1×10^7 cells/mL 이상, 약 2×10^7 cells/mL 이상, 약 3×10^7 cells/mL 이상, 약 4×10^7 cells/mL 이상, 약 5×10^7 cells/mL 이상, 약 6×10^7 cells/mL 이상, 약 7×10^7 cells/mL 이상, 약 8×10^7 cells/mL 이상, 약 9×10^7 cells/mL 이상, 약 1×10^8 cells/mL 이상, 약 2×10^8 cells/mL 이상, 약 3×10^8 cells/mL 이상, 약 4×10^8 cells/mL 이상, 약 5×10^8 cells/mL 이상, 약 6×10^8 cells/mL 이상, 약 7×10^8 cells/mL 이상, 약 8×10^8 cells/mL 이상, 또는 약 9×10^8 cells/mL 이상의 CAR-T 세포를 포함하나, 통상의 기술자는 동일한 효과를 얻기 위하여 변형 가능한 범위 내에서 조성물 내의 CAR-T 세포의 농도를 조절할 수 있을 것이다. 제제화 방법, 투여방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.
- [112] 또한, 완충제, 예를 들면 인산염 완충액, 초산나트륨 완충액, 무통화제, 예를 들면, 염산 프로카인, 안정제, 예를 들면 벤질 알코올, 페놀, 산화 방지제와 배합할 수 있다. 조제된 주사액은 통상, 적당한 앰플에 충전시킨다.
- [113] 현탁액 및 유탁액은, 담체로서, 예를 들어, 천연 검, 한천, 알긴산 나트륨, 펙틴, 메틸셀룰로스, 카복시메틸셀룰로스, 또는 폴리비닐알코올을 함유할 수 있다. 근육 내 주사를 위한 현탁액 또는 용액은, 활성 화합물과 함께, 약학적으로 허용되는 담체, 예를 들어, 멸균수, 올리브 오일, 에틸 올레에이트, 글리콜, 예를

들어, 프로필렌 글리콜, 및 필요하다면 적합한 양의 리도카인 염산염을 함유할 수 있다.

- [114] 본 발명에 따른 약학 조성물은 예를 들어, 정맥 주사 (bolus injection) 또는 연속 주입 (continuous infusion)으로 대상체에 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 약학 조성물은 30분 이상, 1시간 이상, 2시간 이상, 3시간 이상, 4시간 이상, 8시간 이상, 12시간 이상, 1일 이상, 2일 이상, 3일 이상, 4일 이상, 5일 이상, 6일 이상, 7일 이상, 2주 이상, 3주 이상, 4주 이상, 1개월 이상, 3개월 이상, 6개월 이상에 적어도 1회, 적어도 2회, 적어도 3회, 적어도 4회, 또는 적어도 5회에 걸쳐, 연속적으로, 또는 일정 시간 간격으로, 또는 임상적 판단에 의하여 결정된 시간 간격을 두고 투여될 수 있다. 주사제는 앰플형으로, 또는 복수회 투여 용기의 단위 용량형으로 제형화될 수 있다. 그러나 통상의 기술자는 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량은 대상체의 나이, 체중, 키, 성별, 일반적 의학적 상태 및 기존 치료 이력과 같은 다양한 인자들에 따라 변경될 수 있음을 이해할 것이다.
- [115] 본 발명에서 사용하는 용어 “암”은 비 정상적인, 제어되지 않는 세포 성장에 의해 야기되는 임의의 수 많은 질환 또는 질병을 의미한다. 암을 유발할 수 있는 세포를 암 세포라 하며, 제어되지 않은 증식, 불멸성, 전이 가능성, 빠른 성장 및 증식과 같은 특성을 갖으며, 독특한 형태적 특성을 갖는다. 종종, 암 세포는 종양의 형태에 존재할 수 있으나, 이러한 세포는 포유류에서 단독으로 존재하거나 백혈병 세포와 같은 비-종양성 세포일 수 있다. 암은 임상적 또는 방사선 의학적인 방법에 의해 종양의 존재를 검출하거나, 생검 등과 같은 수단으로 수득한 종양 또는 다른 생물학적 시료로부터의 세포를 시험하거나, CA125, PAP, PSA, CEA, AFP, HCG, CA 19-9, CA 15-3, CA 27-29, LDH, 및 NSE와 같은 암 혈액 표지를 측정하거나, TP53, 및 ATM와 같은 암 표지 유전자형을 검출함으로써 확인할 수 있다. 그러나 상기의 방법에 따라 음성으로 판별되더라도 반드시 암이 아닌 것으로 진단되는 것은 아니다: 예를 들어, 암 완치 판정을 받은 대상체는 여전히 암을 가질 수 있으며, 재발의 형태로 확인된다.
- [116] 본 명세서에서 사용된 용어 “약”은 당해 기술 분야에서 통상적으로 관용되는 범위, 예를 들어, 평균의 2 표준 편차 내로 이해될 수 있다. “약”은 언급된 값의 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05%, 또는 0.01% 이내로 이해될 수 있다.
- [117] 본 발명에서, “투여”는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하면 본 발명의 항체를 포함하는 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 그러나 경구 투여시, 단백질은 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화 하는 것이 바람직하다.

또한, 제약 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

- [118] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 암은 고형암, 또는 혈액암일 수 있다. 더욱 구체적으로, 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명에 따른 약학 조성물을 통해 _식도선암, 대장암, 흑색종양, 안구흑색종, 소세포폐암, 신경모세포종, 기형암종, 태생기암, 편평상피암, 머리 및 목 편평 세포 암종, 흉선종, 림프모구백혈병, B세포림프종, 비만성거대B세포림프종, 백혈병, 급성골수성백혈병 등과 같은 암을 치료할 수 있다.
- [119] 또한 본 발명의 일 실시예에서 상기 약학 조성물을 암을 가진 환자에게 투여하여 암을 치료하는 방법을 개시한다. 상기 약학 조성물은 CD8+ T 세포를 포함하거나, CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포를 포함하고, CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포를 모두 포함하는 경우, 세포 수를 기준으로 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포의 비율은 실질적으로 1:1이다.
- [120] 본 발명의 일 실시예에서 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1), 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항원 결합 분자를 인코딩하는 핵산을 T 세포에 형질감염시키는 단계를 포함하는, 암 치료를 위한 키메라 항원 수용체-T 세포 (CAR-T)의 제조 방법을 개시한다.
- [121] 본원에서 사용된 "구조체"는 일반적으로 자연에는 존재하지 않는 조성을 나타낸다. 구조체는 합성 기술(예를 들면 재조합 DNA의 제조 및 발현), 또는 핵산 또는 아미노산용 화학적 합성 기술에 의해 제조될 수 있다. 또한 구조체는 그 결과물이 자연에 존재하지 않는 형태가 되도록 한 물질을 다른 물질에 첨가하거나 또는 결합시킴으로써 제조될 수 있다.
- [122]
- [123] 실시예 1: 마우스 유래 항-MVR 항체의 인간화
- [124] 마우스 항-MVR 항체 (WO2015-133817 A1)의 인간화항체 제작은 결합능 최적화에 적용을 위하여, 낮은 결합력과 높은 결합력을 가지는 두가지 버전으로 각각 디자인하였다.
- [125] 1.1 중쇄 가변부위의 인간화
- [126] 인간화항체 제작에 필요한 VH의 인간항체 프레임워크를 선정하기 위하여, Blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>)를 통해 마우스 항-MVR 항체(와 유사한 서열을 가지는 VH 프레임워크를 선정하였다 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAV40168.1>
- [127] 이를 토대로 kabat numbering에 의해 VH의 3개 CDR을 정의하고, 선정된

인간항체 프레임워크와 정의된 항-MVR 항체의 CDR을 조합하여 낮은 결합력을 가지는 버전의 VH를 서열번호 제작하였다 (huMVR.H1 서열번호 10). 또한, huMVR.H1으로부터 VH27, VH29, VH48, VH67, VH71, VH73, VH78을 복귀 돌연변이(back-mutation)하여 높은 결합력을 가지는 버전의 VH를 제작하였다 (huMVR.H2 서열번호 7). (도 1)

[128] **1.2 경쇄 가변부위의 인간화**

[129] 인간화항체 제작에 필요한 VL의 인간항체 프레임워크를 선정하기 위하여, 안정성이 우수하다고 알려진 Trastuzumab (US 5821047 A 서열번호 25번의 VL 프레임워크를 선정하였다. 이를 토대로 kabat numbering에 의해 VL의 3개 CDR을 정의하고 선정된 인간항체 프레임워크와 정의된 항-MVR 항체의 CDR을 조합하였으며, 인간 공통 서열 (human consensus sequence)의 도입을 위하여 위하여 'hu4D5 프레임워크-항MVR CDR 조합'으로부터 VL24의 K를 R로, VL48의 I를 L로, VL53의 S를 R로, VL56의 T를 S로, VL66의 R을 G로, VL71의 F를 Y로, VL100의 Q를 G로 돌연변이시켜 낮은 결합력을 가지는 버전의 VL을 제작하였다 (huMVR.L1 서열번호 11). 또한 이와 별개로 'hu4D5 프레임워크-항MVR CDR 조합'으로부터 VL49, VL69, VL71을 복귀 돌연변이시키고, VL66의 R을 G로 돌연변이시켜 높은 결합력을 가지는 버전의 VL을 제작하였다 (huMVR.L2 서열번호 8). (도 2)

[130] 디자인된 인간화항체 유전자는 huMVR.L1H1(huMVR.L1 & huMVR.H1) (서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12), huMVR.L2H2(huMVR.L2 & huMVR.H2) (서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9)의 2종 항체로 제작하였다. 구체적으로 동물세포발현벡터인 pOptivec (Invitrogen) 플라스미드에 두 인간화항체를 VL-(G₄S)₃-VH의 scFv 형태로 제작하고, c-말단에 6X His tag를 접합하여 유전자를 제작하였다. 해당 유전자가 도입된 플라스미드를 Expi293 expression system (Invitrogen)을 이용하여 scFv 형태로 발현하였으며, 이를 AktaPure purifier (GE healthcare) 및 HisTrap 컬럼 (GE healthcare)를 이용하여 정제하였다.

[131]

[132] **실시예 2: 혈액암세포주에 대한 결합력 분석**

[133] PBMC 유래 B-cell lymphoma lymphoblastoid cell line을 FACS sample tube (Falcon, Cat, 352052)에 세포 수가 sample당 1X10⁵가 되도록 준비한 후, Expi293F Cell (Invitrogen, A14527)에서 생산된 muMVR scFv, huMVR.L1H1 scFv (low binder), huMVR.L2H2 scFv (high binder)를 0.5ug/ml, 0.1ug/ml, 0.05 ug/ml 농도로 처리하고, 각 sample을 4 °C에서 15분 동안 incubation하였다. 그 후, washing buffer (0.5% FBS, 0.1% sodium azide in PBS) 를 각sample tube에 3ml씩 첨가하였다. 각 Sample을 2000rpm에서 5분간 원심분리하고, 상층 액을 제거한 후, Phycoerythrin conjugated anti-His antibody (BioLegend, Cat. 362603)을 1:200의 희석비율로 total volume이 200 ul가 되도록 첨가하였다. 모든 sample을 4 °C에서 15분 동안

incubation하였다. 그 후, washing buffer (0.5% FBS, 0.1% sodium azide in PBS)를 각 sample tube에 3ml씩 첨가하고, 각 Sample을 2000rpm에서 5분간 원심분리 한 후, 상층 액을 제거하였다. 4% Paraformaldehyde (Biosessang, P2031)를 1%로 희석한 뒤에 각 sample별로 200 ul씩 넣어서 세포를 고정화하였으며, 고정화 된 sample은 FACS Celesta (BD Biosciences) 장비를 통하여 분석하였다.

- [134] 생산된 2종 (huMVR.L1H1, huMVR.L2H2)의 인간화항체 scFv는 모두 dose-dependent하게 세포에서 발현하는 target 항원에 결합하였으며, 1 ug/ml의 항체 농도에서 huMVR.L2H2는 mouse MVR scFv 대비 유사한 결합력을, huMVR.L1H1은 매우 낮은 결합력을 보였다. (도 3)

[135]

- [136] 실시예 3: 인간화항체의 결합력 최적화를 위한 affinity hot spot 예측

- [137] 두 인간화항체 사이의 다양한 결합력을 가지는 mutant를 제작하기 위하여, mouse MVR 항체를 기반으로 하여 affinity hot spot을 예측하였다. Swiss-model (<https://swissmodel.expasy.org/>)을 이용하여 분자모델링을 진행하였고 (도 4), 이와 두 인간화항체의 결합력 분석 결과를 토대로 중쇄 가변부위 framework 내의 2개 affinity hot spot (VH27, VH71) 과 경쇄 가변부위 CDR 내의 affinity hot spot (VL91, VL92)을 선정하였다 (표 1). huMVR.L2H2를 주형으로 하여 4개의 affinity hot spot에 대한 scFv 형태의 15종 single-mutant를 제작하여 위에서 언급한 내용과 동일한 방법으로 발현 및 정제하였다.

- [138] [표1]

Hot-Spot	변이 아미노산
VH_27F	Y, L, G
VH_71K	H, L, V
VL_91Y	F, S, V, W, A
VL_91W	F, Y, L, A

[139]

- [140] 실시예 4: Affinity hot spot의 mutation이 적용된 15종 mutant의 결합력 분석

- [141] PBMC 유래 B-cell lymphoma lymphoblastoid cell line을 FACS sample tube (Falcon, Cat, 352052)에 세포 수가 sample당 1×10^5 가 되도록 준비한 후, Expi293F Cell (Invitrogen, A14527)에서 생산된 muMVR scFv, huMVR.L2H2 또는 15종 mutant를 0.1ug/ml 농도로 처리하고, 각 sample을 4 °C에서 15분 동안 incubation하였다. 그 후, washing buffer (0.5% FBS, 0.1% sodium azide in PBS) 를 각 sample tube에 3ml씩 첨가하였다. 각 Sample을 2000rpm에서 5분간 원심분리하고, 상층 액을 제거한 후, Phycoerythrin conjugated anti-His antibody (BioLegend, Cat. 362603)을 1:200의 희석비율로 total volume이 200 ul가 되도록 첨가하였다. 모든 sample을 4 °C에서 15분 동안 incubation하였다. 그 후, washing

buffer (0.5% FBS, 0.1% sodium azide in PBS)를 각 sample tube에 3ml씩 첨가하고, 각 sample을 2000rpm에서 5분간 원심분리 한 후, 상층 액을 제거하였다. 4% Paraformaldehyde (Biosessang, P2031)를 1%로 희석한 뒤에 각 sample별로 200 μ l씩 넣어서 세포를 고정화하였으며, 고정화 된 sample은 FACS Celesta (BD Biosciences) 장비를 통하여 분석하였다.

- [142] 생산된 15종 huMVR.L2H2 (서열번호9) mutant scFv는 LCL cell에서 다양한 결합력을 보였고, 그 중 huMVR.L2H2.F27L, huMVR.L2H2.K71H, huMVR.L2H2.Y91F, huMVR.L2H2.Y91W가 control인 muMVR 및 huMVR.L2H2(서열번호9) 항체 대비 단계적으로 낮은 친화도를 가짐을 확인하였다 (도 5).

[143]

[144] **실시예 5: CAR_euCD137 구축**

- [145] 본 발명에서는 세포질 신호 도메인인 4-1BB에 면역학적 효능을 증가시키기 위하여 CAR-T에서 사용하는 4-1BB cytoplasmic domain 214-255aa(서열번호13)에 5개의 아미노산(4-1BB aa 209-213)을 추가한 euCD137(4-1BB aa209-255, 서열번호 14)를 보조자극 신호인자로 하여 CAR 발현 벡터(CAR_euCD137)를 새롭게 구축하였다(Kwon et al., (1989) cellularimmunology 121: 414-422, Kwon et al., (1998) Biochemical and biophysical research communication 242:613-620). 완성된 구조체는 EF1 alpha 프로모터를 포함하여 scFv인 항 CD19 또는 huMVRL2H2 항-MVR 결합 도메인, 인간 CD8의 힌지영역과 막관통 도메인, 그리고 세포내 신호전달 도메인으로 구성되어 있다. 특히 세포내 신호전달 도메인은 자극 도메인과 보조자극 신호전달 도메인으로 구성되어 있다. 막관통 도메인은 T-cell 수용체의 알파, 베타 혹은 제타 사슬이거나, CD28, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 그리고 CD154를 사용할 수 있다. 이들 중 본 발명은 CD8을 사용하였다. 세포내 신호전달 도메인은 기본적으로 CD3zeta 1차 신호전달 도메인에 보조자극 신호전달 도메인인 CD28, OX40, CD27, ICAM-1, ICOS(CD278), 4-1BB (CD137) 그리고 4-1BB 5aa (euCD137)중에 선정한다. 본 발명은 연속된 5개 아미노산이 첨가된 보조 자극 신호 도메인인 4-1BB를 사용하였으며, 이에 CD3zeta를 연결하였다. 최종적으로 제작된 CAR 유전자 단편을 BamH I 및 Sal I으로 절단된 ELPS 렌티바이러스 발현 벡터에 접합시켰다. 또한 scFv 부분만 치환하기 위해서는 BamH I/Nhe I 제한효소를 이용하여 클로닝을 진행하였다 (도 6).
- [146] 또한 마우스 MVR 항체를 기반으로 하여 면역원성을 최소화하기 위해 개발된 MVR 인간화항체(huMVR) 중 CAR-T 치료제 개발에 적합한 형태의 scFv인 huMVRL2H2를 이용하여, T 세포 활성화를 위한 세포질 신호 도메인을 2가지 (4-1BB, CD3 ζ 를 포함하는 키메라 항원 수용체를 제작하였다 (huMVRCAR). 특히 본 발명에서는 세포질 신호 도메인인 4-1BB에 면역학적 효능을 증가시키기 위하여 5개의 연속적 아미노산 RFSVV를 첨가한 구조체(MVRCAR_euCD137)는

EF1 alpha 프로모터를 포함하여 scFv인 huMVRL2H2 항-MVR 결합 도메인뿐 아니라, 인간 CD8의 힌지영역과 막관통 도메인, 그리고 euCD137 및 세포내 신호전달 도메인으로 구성되어 있다.

[147]

[148] 실시예 6: 재조합 huMVR 렌티바이러스 생산

[149] 재조합 렌티바이러스 제조에 사용되는 293T 세포배양에는 고 글루코오스 DMEM (Welgene, LM001-05)에 10% FBS (Millipore, TMS-013-BKR)와 1x P/S (Gibco, 15140-122)이 포함된 배지를 사용하였다. 293T 세포를 10% FBS가 포함된 DMEM배지로 37°C 5% CO₂ 배양기에서 형질도입 전에 24시간 동안 배양하였다. 다음 날 형질감염을 위해 형질감염 시약과 4종의 렌티바이러스 플라스미드를 적절한 비율로 혼합하여 48시간동안 배양하였다. 이후 렌티바이러스를 함유하는 상등액을 수거하여 10 분 동안 400 x g로 원심분리 하였다. 그리고 상등액을 50 mL 주사기를 이용하여 0.45 µm 주사기 필터로 여과하였다. 수득된 상등액을 렌티바이러스 농축키트(Clontech, 631231)와 3:1로 혼합한 후, 4°C에서 24 내지 48 시간동안 반응시켰다. 이 후 4°C 4,000 rpm의 조건으로 2 시간 동안 원심분리하여 바이러스를 수득하고, 이를 FBS가 포함되지 않은 0.5 mL의 RPMI (Welgene, LM001-01)에 재현탁하여 렌티바이러스를 생산하였다.

[150]

[151] 6.1: 키메라 항원 n-terminal에 접합된 Flag를 이용하여 감염된 렌티바이러스의 입자 수 체크

[152] Jurkat 세포를 이용하여 실제 형질도입 가능한 렌티바이러스의 입자 수를 분석하여 형질변환 단위 (TU/mL)을 측정하였다. 첫날에, Jurkat 세포를 각 웰 당 1×10^5 cells/100 µL로 96웰 플레이트에 시딩하였다. 둘째 날에 렌티바이러스를 96웰 플레이트에 1/3씩 순차적으로 희석하여, 이미 시딩된 Jurkat 세포에 렌티바이러스 형질도입을 수행하였다. 이때 RPMI배지 (10% FBS와 1x P/S에 polybrene (Millipore)을 넣어주어 렌티바이러스의 형질 도입이 더욱 증가할 수 있도록 하였다. 그리고 1200 x g, 25°C에서 2시간 동안 원심분리 한 후 37°C 5% CO₂ 배양기에서 3시간 배양하며 이후 RPMI 만 웰당 100 µL씩 첨가해 주었다. 5일째, 세포에 감염된 렌티바이러스의 Flag를 항-Flag-DYKDDDDK (Biolegend, Cat No. 637310)으로 염색하여, 유세포분석기로 형질도입된 세포의 퍼센트를 분석하였다. 이를 이용하여 Follenzi 및 Naldini, 2002 (Follenzi and Naldini, 2002)에 기술되어 있는 바와 같이 역가를 계산하였고, 결과는 1.4×10^{10} TU/mL이었다.

[153]

[154] 실시예 7: T 세포 해동 및 활성화

[155] 동결 말초혈액 단핵세포(PBMC)를 37°C항온 수조에서 5분간 해동하고 RPMI1640으로 부유하였다. 그리고, 1500 rpm에서 5 분간 원심분리하고 상등액을 제거하였다. 세포 수 측정 후 CD4 MicroBeads (Miltenyi Biotec, 130-045-101), CD8 MicroBeads (Miltenyi Biotec, 130-045-201)을 이용하여 T

세포를 분리하였다. CD4, CD8 T 세포 분리방법은 CD4, CD8 MicroBeads 프로토콜(DS_130-045-101, DS_130-045-201)를 참고하였다. 분리된 세포를 세포 밀도를 1×10^6 cell/ml로 맞춰서 CAR-T 배지(1L Optimizer CTS basal medium + 26ml Optimizer CTS + 50ml CTS Immune Cell SR + 10ml Penicillin streptomycin + 10ml GlutaMAX-I)를 추가하고 IL-2를 20IU/ml로 첨가하였다. 그리고, 세포 수 1×10^6 세포 당 10 μ l의 T cell TransAct(Miltenyi Biotec, 130-111-160)을 첨가하고 T75 플라스크나 24 플레이트에 넣고 배양기(37°C 5% CO₂)에서 2일 배양하였다. (도 8)

[156]

[157] **실시예 8: CAR 형질도입 및 CAR-T 세포 배양**

[158] 2일간 활성화된 T 세포를 24웰 플레이트의 1웰 당 2×10^6 세포를 넣고 CAR 유전자를 가지는 렌티바이러스를 1~3 MOI(Multiplicity of infection) 첨가하였다. 프로타민황산염 (제조번호 ADR301)를 최종농도 10 μ g/ml이 되도록 첨가 및 부유하였다. 24웰 플레이트를 400 x g, 32°C 2시간의 조건으로 원심분리를 진행하고 세포를 20ml CAR-T 배지(IL-2 200IU/ml)에 부유한 후 T75 플라스크에 넣고 배양기(37°C 5% CO₂)에서 2일 배양하였다. 2일 뒤 세포 수를 측정하고 세포밀도를 0.5×10^6 cell/ml를 맞춰서 CAR-T 배지에 첨가하고 배양액 전체 양에 대한 200 IU/ml IL-2를 첨가하였다. 0.5×10^6 cell/ml 세포밀도보다 낮은 세포밀도를 나타낸 경우에는, CAR-T 배지 추가 없이 전체 배양액에 맞춰서 200 IU/ml IL-2를 첨가하였다. 그 후, 2일마다 세포 수를 측정하여 세포밀도 0.5×10^6 cell/ml를 기준으로 CAR-T 배지(IL-2 200IU/ml)를 첨가하였다. CAR-T 세포 수확은 배양시작 후 7일에서 14일 사이에 진행하였다 (도 7).

[159]

[160] **실시예 9: 세포독성검정법**

[161] 표적 세포에 대한 CAR-T 세포의 세포독성을 루시퍼라아제 기반 검정법으로 분석하였다. 표적세포에 루시퍼라아제 유전자를 가지는 EBV 바이러스를 감염시켜 루시퍼라아제 유전자를 가지는 표적세포를 만들었다. 37°C에서 24시간 동안 이펙터 대 표적 (E/T)비로 이펙터 세포와 함께 공동-배양하였다. 공동-배양 후, CytoTox-Glo Cytotoxicity(promega, G9290) 시약을 처리하고, Fluroskan FL microplate luminometer(Thermo)로 살아있는 표적세포의 RLU값을 측정하였다.

[162] 더욱 구체적으로, 표적세포(Target cell)수를 1.5×10^4 세포를 기준으로 E/T 비율 3:1로 이펙터 세포(Effector cell)를 4.5×10^5 cell/50 μ L로 Triplicate을 96웰 white flat bottom 플레이트(COSTAR, 3917)에 준비하고 1/3씩 희석하여 E/T 비율 3:1, 1:1, 0.3:1, 0.1:1 로 준비하였다. 이펙터 세포가 준비된 각 웰에 표적세포 1.5×10^4 cell(50 μ L)을 넣어 배양기(37°C, 5% CO₂)에서 공동-배양 18~24시간 후 CytoTox-Glo Cytotoxicity(Promega, G9290) 100 μ L를 첨가하고 빛 차단하여 5분 후 Fluroskan FL microplate luminometer(Thermo)로 Luminescence 값을 측정하였다.

- [163] 그 결과 3:1 비율에서 huMVR CAR-T의 경우 95.4 %의 세포독성 활성을 나타내는 것을 확인하였다 (도 8).
- [164]
- [165] 실시예 10: 세포주 (Cell line) 배양
- [166] 국립암센터로부터 분양 받은 CBK LCL-Luc 및 KHJ LCL-Luc (이하 LCL-Luc로 사용함) 세포주는 RPMI1640 배지 (Welgene, Cat. No. LM011-01) 에 20% 우태아혈청 (FBS, Millipore, Cat. No. TMS-013-KBR) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신 (Gibco, Cat. No. 15140-122)을 넣고 배양하였다.
- [167]
- [168] 실시예 11: CD19CAR와 CD19CAR_euCD137 가 도입된 두 종류의 CD19CAR-T 세포 비율 확인
- [169] 면역학적 효능을 증가시키기 위하여 euCD137(4-1BB aa209-255, 서열번호 14)를 보조자극 신호인자로 하여 CAR 발현 벡터(CAR_euCD137)를 새롭게 구축한 효능을 확인하고자 CD19CAR, (서열번호 17, US8906682 서열번호 12)와 CD19CAR에서 4-1BB 도메인 대신 euCD137교체한 CD19CAR_euCD137(서열번호 18)을 별도로 제작하여 CD19CAR-T세포로 배양하였다.
- [170] 14일 동안 배양된 2종의 CAR-T 세포의 제작 비율을 확인하기 위해 FACS 염색을 진행하였다. 각각의 CAR-T 세포 2×10^5 세포를 FACS 튜브 (FALCON, Cat. No. 352052)로 옮긴 후, FACS 완충액 2 mL을 첨가하여 원심분리기 (Thermo, ST16)를 이용하여 2,000 rpm에서 5분동안 원심분리하였다. 상층액을 버린 후 항-CD8 APC (SK1, Biolegend, Cat. No. 344722) 0.5 μ L/tube, 항-CD4 BV650 (RPA-T4, Biolegend, Cat. No. 300536) 0.5 μ L/tube 및 항-flag PE (L5, Biolegend, Cat. No. 637310) 0.125 μ L/tube를 넣고 상온에서 30분 동안 염색하였다. FACS 완충액 2 mL을 넣은 후 2,000 rpm에서 5분동안 원심분리 한 후 이 과정을 1회 더 반복하였다. 생존/사멸 세포 염색을 위해 7-AAD (Biolegend, Cat. No. 420404) 1 μ L/tube로 넣은 후 상온에서 5분동안 방치하고 FACS (BD, FACSCelesta)를 이용하여 분석하였다.
- [171] 4-1BB 도메인(아미노산 214-255, 서열번호 13)에 다섯 개 아미노산이 추가된 euCD137(아미노산 209-255, 서열번호 14)를 도입한 CAR 구조체(CD19CAR_euCD137, 서열번호 18)와 기존의 구조체(CD19CAR, 서열번호 17, US8906682 서열번호 12)를 이용한 CD19 CAR-T의 효력을 피하동물모델에서 증명하기 전 실시예 2에 작성된 방법으로 CAR-T 세포의 비율을 확인하였다. FACS 염색을 통해 제작된 CD19 CAR-T 세포 비율을 확인한 결과 구조체가 개량된 CD19 CAR-T 세포 (5aa CD19 CAR-T)의 경우 CD4+/CAR+ 세포는 29.4%, CD8+/CAR+ 세포는 50.8%로 전체 CAR-T는 80.2%로 확인되었다. 구조체 개량이 되지 않은 CAR-T (CD19 CAR-T) 세포의 제작 비율을 확인한 결과 CD4+/CAR+ 세포는 42.7%, CD8+/CAR+ 세포는 29.3%로 전체 CAR-T는 72.0%로 확인되었다.

따라서 5aa CD19 CAR-T 세포가 CD19 CAR-T 세포에 비해 8.2% CAR의 발현이 높은 것으로 확인되었고, CD8+/CAR+ 세포의 경우 21.5%로 2배 정도 많은 것을 확인할 수 있었다. (도 9-A)

[172]

[173] 실시예 12: 제작된 CD19 CAR-T 세포의 살상능 확인

[174] 14일 동안 배양된 2종의 CAR-T 세포의 살상능을 확인하기 위해 96-웰 white 플레이트(Corning, Cat. No. 3917)에 CAR-T (E) : LCL (T) 비율을 30:1, 10:1, 3:1, 1:1 이 되도록 했다. 먼저 CAR-T 세포를 6×10^5 cells/50 μ L, 2×10^5 cells/50 μ L, 9×10^4 cells/50 μ L, 2×10^4 cells/50 μ L씩 웰에 넣었다. 다음 표적 세포주인 CBK LCL-Luc 세포주를 2×10^4 cells/50 μ L 넣고 37°C CO₂ 인큐베이터 (Mammert, INCO153med)에 넣고 4시간 동안 반응시켰다. 4시간 뒤 각 웰에 Bright-Glo™(Promega, Cat. No. E2620) 100 μ L를 넣고 5분 뒤 ELISA (Thermo, Fluorescan FL)를 이용하여 RLU (relative light unit; 상대적 발광 단위) 값을 측정했다.

[175] 그 결과 기존의 4-1BB가 도입된 CART와 4-1BB 도메인에 다섯 개 아미노산이 추가된 euCD137을 도입한 CAR-T 세포사이에 세포살상능의 차이는 없는 것을 볼 수 있었다.

[176] 본 실험 진행 결과 2 종의 CAR-T 세포와 CBK LCL-Luc 세포주를 30:1의 비율로 함께 배양했을 때, 4시간 뒤 약 80%의 살상능을 확인할 수 있었으며, 10:1로 배양했을 경우 약 50% 정도의 살상능을 가지고 있었다. 암세포와 함께 배양하는 CAR-T 세포의 수가 3배씩 감소할수록 살상능도 약 3배씩 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, in vitro 상에서 4-1BB 도메인에 5개의 아미노산이 추가되어도 CAR-T의 in vitro 살상능에는 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었다. (도 9B)

[177]

[178] 실시예 13: 세포주에서 HLA DR 발현 확인 및 huMVR L2H2 scFv 결합력 테스트

[179] 세포주에서 HLA DR의 발현을 확인하고 개발된 huMVR L2H2 scFv의 결합력 테스트를 위해, 배양된 LCL-Luc 세포주를 이용하여 FACS 분석을 진행했다. LCL-Luc 세포주 2×10^5 cells을 FACS 튜브로 옮긴 후, FACS 완충액 2 mL을 첨가하고 원심분리기를 이용하여 2,000 rpm에서 5분동안 원심분리를 했다. 상층액을 버린 후 항-HLA DR APC-H7 (G46-6, BD pharmingen™ Cat. No. 561358) 0.5 μ L/tube, 자체 생산된 MVR L2H2 1.0 μ g/tube를 넣고 상온에서 30분 동안 염색했다. 세척을 위해 FACS 완충액 2 mL을 넣은 후 2,000 rpm에서 5분동안 원심분리를 하고 상층액을 버렸다. 이 과정을 1회 더 반복하였다. huMVR L2H2 scFv의 이차 염색을 위해 항-His PE (Biolegend, Cat. No. 362603) 1 μ L/tube로 넣고 상온에서 30분 동안 염색하였다. 이후 FACS 완충액을 이용한 세척과정을 2회 반복하고 FACS 완충액 100 μ L를 넣은 후 FACS를 이용하여 분석하였다.

[180] 암세포에서 huMVR L2H2의 타겟인 HLA DR 발현과 huMVR L2H2 scFv의

결합력이 확인하기 위해 FACS 염색 및 분석을 진행하였다. LCL-Luc 세포주에 HLA DR 발현을 확인한 결과 100% HLA DR을 발현하고 있는 것을 확인할 수 있었다. 여기에 huMVR L2H2 scFv를 이용하여 결합력 테스트를 했을 때, 발현하고 있는 HLA DR에 97%이상 결합하는 것을 확인할 수 있었다. (도 10)

[181]

[182] 실시예 14: 피하동물모델 유도, 및 Automatic caliper 및 IVIS imaging을 통한 CAR-T의 효력 확인

[183] 실험동물은 NSG (NOD-scid IL2r γ μL) 마우스 (The Jackson Laboratory)를 사용하고, 동물사육실에서 일정한 조건에서 관리되었다. 온도 23 ± 2°C 12시간 명암주기, 50 ± 10% 습도를 가지는 사육실에서 관리되었으며, 사료와 음수를 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 4-1BB 도메인에 다섯 개 아미노산이 추가된 CD19 CAR-T (5aa CD19 CAR-T)를 이용한 효력 실험에서는 6주령의 암컷 마우스에 CBK LCL-Luc 세포주를 2 x 10⁶ cells/100 μL DPBS/head의 농도로 준비하여 동물의 피하에 주입하여 피하동물모델을 유도하였다. Automatic caliper (Youngbio, TM900)를 이용하여 암 크기가 50 - 100 mm³ 사이에 도달했을 때 구조체가 개량된 CD19 CAR-T 세포와 개량되지 않은 CD19 CAR-T 세포 2 x 10⁶ cells/100 μL DPBS/head (dose 1) 및 6 x 10⁶ cells/100 μL DPBS/head (dose 2)를 꼬리정맥을 통해 단회 투여하여 효력을 확인했다. 다음 실험에서는 4-1BB 도메인에 다섯 개 아미노산이 들어간 CAR 구조체에 huMVR을 발현하도록 제작한 구조체(huMVRCAR_euCD137, 도 6의 C)를 이용하여 동물모델에서 huMVR CAR-T 세포의 효력 평가를 진행하였다. 6주령 암컷 마우스에 LCL-Luc 4 x 10⁶ cells/100 μL DPBS/head의 세포를 피하에 주입하여 피하동물모델을 유도하였다. 이후 암 크기가 50 - 100 mm³ 사이에 도달했을 때 MVR CAR-T 1 x 10⁶ cells/100 μL DPBS/head, 2 x 10⁶ cells/100 μL DPBS/head (dose 1) 및 5 x 10⁶ cells/100 μL DPBS/head (dose 3)를 꼬리 정맥을 통해 단회 투여하여 효력을 확인하였다. 모든 동물실험에서 암 크기 및 생존율을 주기적으로 확인하였다.

[184] 더욱 구체적으로, CAR-T 투여 후 3일 및 4일 간격 automatic caliper 및 IVIS imaging 장비(PerkinElmer, Luna III)를 이용하여 암 크기 및 photon값을 측정했다. TM900을 이용할 경우 암 부위에 장비를 위치시킨 후 암 크기를 확인했다. IVIS imaging 장비를 이용하여 이미징 및 photon 값을 확인할 경우 먼저 마우스 복강으로 XenoLight™D-luciferin (PerkinElmer, Cat. No. 122799) 150 mg/kg을 투여하였다. 15분 뒤 이소플루란을 이용하여 흡입마취를 유도한 후 5분뒤 IVIS 장비를 이용하여 암세포 존재유무에 대한 이미징을 수행하였다. 이미징 후 표준화하여 그림으로 나타내고 이 때 루시퍼라아제 값 (photon value)을 확인하여 그래프로 나타내었다.

[185] 더욱 구체적으로, CBK LCL-Luc 세포주를 이용한 피하동물모델을 제작 후 CD19 CAR-T와 5aa CD19 CAR-T 세포의 효력을 IVIS imaging을 이용하여 비교했다. 도 11A에 보이는 결과처럼 2종의 CAR-T 세포를 투여한 시점으로부터

1주일 이내 그 효력을 확인할 수 있었다. CD19CAR_{eu}CD137이 도입된 CD19 CAR-T를 2×10^6 cells/100 μ L DPBS/head 및 6×10^6 cells/100 μ L DPBS/head를 투여한 실험군에서는 투여 후 1주 일째 IVIS imaging 상에서 암세포 거의 관찰되지 않았다. 또한 구조체가 개량되지 않은 CD19 CAR-T를 투여한 그룹에서는 6×10^6 cells/100 μ L DPBS/head를 투여했을 경우 1주일까지 imaging 상에서 암세포가 거의 관찰되지 않았다. 그러나 1주일 후에 개량되지 않은 CD19CAR-T를 투여한 실험군에서는 암세포가 확인되었다.

- [186] Imaging 진행 후 각각의 개체에서 imaging 되는 루시퍼라아제의 값을 확인한 결과 imaging에서 확인되는 것처럼 CAR-T 투여 후 1주일 이 되었을 때, CD19 CAR-T를 2×10^6 cells/100 μ L DPBS/head를 투여한 그룹에서만 루시퍼라아제 값이 확인되고 있었다. 이후 3주 이상 관찰했을 때, CAR-T 세포를 투여하지 않은 마우스의 경우 종양이 계속 커지고 있었으며, 초반에 암세포가 사라진 3개의 실험군에서는 암세포가 확인되지 않았다. 하지만 10일 이후부터는 CD19 CAR-T를 2×10^6 cells/100 μ L DPBS/head를 투여한 그룹에서도 루시퍼라아제 값이 줄어들고 있는 것을 확인할 수 있었으나 3주차가 되었을 때도 암세포가 완전히 없어지지 않았다. 암세포를 이미징한 실험을 통해서 구조체가 개량된 5aa CD19 CAR-T 2×10^6 cells/100 μ L DPBS/head를 투여했을 때도 구조체가 개량되지 않은 CD19 CAR-T 6×10^6 cells/100 μ L DPBS/head를 투여한 그룹과 유사한 효력이 확인되었다. 이를 통해서 in vitro상에서 5aa CD19 CAR-T와 CD19 CAR-T의 살상능에서는 차이가 없었으나 동물모델에서는 5aa CD19 CAR-T에서 효력이 2배 정도 더 좋은 것을 확인할 수 있었다. (도11)

[187]

- [188] 실시예 15: 동물모델 체내에서 4-1BB 도메인에 5개 아미노산이 추가된 CD19 CAR-T의 비율 확인

- [189] 구조체가 개량된 CAR-T 세포의 효력 검증을 위한 피하동물모델에서 CAR-T 세포 투여 후, 마우스 혈액으로부터 CAR-T가 얼마나 존재하는지 확인하였다.

- [190] 더욱 구체적으로, CAR-T 투여 후 3일 및 4일 간격으로 마우스로부터 안와채혈을 수행하였다. 1회 채혈시 70 μ L씩 채혈하여 이중 60 μ L를 CAR-T 세포의 비율 확인 및 세포 수 확인에 이용하였다. 5 mL FACS tube에 혈액 60 μ L를 넣고 Zombie Aqua BV510 (Biolegend, Cat. No. 423101)을 이용하여 생존/사멸 세포 염색을 진행했다. 염색 시 0.1 μ L/100 μ L DPBS/tube 농도로 넣은 후 상온에서 10분 동안 염색을 했다. 이후 counting beads (Molecular probes, Cat. No. C36950), 항-CD45 FITC (HI30, Biolegend, Cat. No. 304006), 항-CD8 BV786 (SK-1, Biolegend, Cat. No. 344740), anti-CD4 BV650 및 항-flag PE를 넣고 30분간 상온에서 염색했다. 각각의 항체는 0.5 μ L/100 μ L FACS buffer/tube씩 섞고 여기에 counting beads 25 μ L 넣어주었다. 30분 뒤 1X RBC 용해 완충액(Biolegend, Cat. No. 422401) 2 mL을 넣고 상온에서 5분간 반응시켰다. 이후 원심분리기를 이용하여 2,000 rpm에서 5분간 원심분리를 한 후 상층액은 모두 버렸다. 이

튜브에 FACS 세척 완충액 2 mL을 넣은 후 2,000 rpm에서 5분간 원심분리를 한다. 이 과정을 한 번 더 반복한 후 FACS 완충액 50 μ L를 첨가하고 FACS를 이용하여 분석하였다.

- [191] CAR-T 세포 투여 일주일 후, 5aa CD19 CAR-T 투여군에서는 2×10^6 cells/100 μ L DPBS/head 및 6×10^6 cells/100 μ L DPBS/head 두 그룹에서 모두 혈액내 약 20%의 5aa CD19 CAR-T 세포를 확인할 수 있었으나, CD19 CAR-T 투여군에서는 6×10^6 cells/100 μ L DPBS/head를 투여했을 경우에만 5% 정도 CD19 CAR-T를 확인할 수 있었다. 이후 3일 뒤 마우스 체내에서 CAR-T 세포 수 및 비율이 최대가 되었다 감소하였다. 일주일 이내 CAR-T 세포가 확인된 3개의 실험군 (5aa CD19 CAR-T; 2×10^6 cells/100 μ L DPBS/head 및 6×10^6 cells/100 μ L DPBS/head, CD19 CAR-T; 6×10^6 cells/100 μ L DPBS/head)에서는 마우스 체내에서 암세포가 많이 증식하기 이전에 상대적으로 많은 CAR-T 세포와 접촉할 수 있어서 암세포가 빨리 사멸되었다. 하지만 CD19 CAR-T 2×10^6 cells/100 μ L DPBS/head를 투여한 실험군에서는 2주차에 CAR-T 세포 비율 및 수가 최대가 되었고 상대적으로 암세포가 많이 증식한 상태에서 CAR-T 비율이 약 25%까지 증가했다. 구조체 개량된 5aa CD19 CAR-T의 경우 CD19 CAR-T 보다 초기에 CAR-T 비율이 증가되고 나중에 감소된 후 안정적으로 일정량이 유지되었다. 하지만 CD19 CAR-T의 경우 더 늦은 시기에 CAR-T 세포의 비율이 증가했다가 감소했으며 이로 인해 마우스 체내에서 종양이 사라지는데 더 많이 시간이 소요되었다. 따라서 본 실험결과도 마찬가지로 5aa CD19 CAR-T 2×10^6 cells/100 μ L DPBS/head가 CD19 CAR-T 6×10^6 cells/100 μ L DPBS/head를 투여한 그룹과 유사하게 마우스 체내에서 CAR-T가 존재하고 효력도 나타났으며 5aa CD19 CAR-T의 효력이 더 좋음을 나타내고 있다. (도 12)

[192]

- [193] 실시예 16: 복강동물모델 유도, 및 복강동물모델에서 CD8 및 CD4/CD8 huMVR CAR-T(CAR_{eu}CD137)의 효력 평가

- [194] 복강동물모델 유도에 사용한 실험동물도 실시예 14에서 사용한 동물과 같으며 같은 조건에서 관리되었다. 구조체가 개량된 CAR 구조체(CAR_{eu}CD137)를 이용하여 CD8 huMVR CAR-T 및 CD4/CD8 huMVR CAR-T를 제작하여 복강동물모델에서 효력평가를 진행하였다. 복강동물모델 유도를 위해 루시퍼라아제를 발현하는 LCL-Luc 세포주 2×10^6 cells/100 μ L DPBS/head를 복강을 통해 투여하고 9일 후 photon 값에 따라 5개 그룹으로 분류하였다. 각각의 그룹으로 나눈 후 꼬리 정맥으로 CD8 MVR CAR-T를 0.5×10^6 cells/100 μ L DPBS/head (dose 1), 2.0×10^6 cells/100 μ L DPBS/head (dose 2) 및 10×10^6 cells/100 μ L DPBS/head (dose 3) 투여하거나 CD4 및 CD8 huMVR CAR-T를 각각 0.5×10^6 cells씩 섞은 후 단회 투여했다. 모든 동물실험에서 암 크기 및 생존율을 주기적으로 확인하였다. (도 13) 구체적인 실험 방법은 실시예 14에 기재된 바와 같다.

- [195] 건강한 성인의 혈액으로부터 분리된 PBMC로부터 CD4 및 CD8을 각각 분리한 후 구조체가 개량된 CAR 구조체에 huMVR scFv를 발현하도록 하여 제작된 huMVR CAR-T를 이용하여 복강동물모델에서 효력평가를 진행하였다. 암세포가 발현하는 루시페라아제에 의해 나타나는 photon 값 및 이미징을 통해 huMVR CAR-T의 효력평가가 진행되었다.
- [196] 주 2회 IVIS 이미징 장비를 이용하여 확인한 결과, 실험군에서 CAR-T 투여 후 27일이 되기 전에 CAR-T를 투여하지 않고 암이 형성된 대조군 마우스는 모두 사망하였다. 하지만 암이 형성되고 huMVR CAR-T를 투여한 개체에서는 27일 이후까지 모두 생존하였다. 저용량 (0.5×10^6 cells/100 μ L DPBS/head)으로 CD8 huMVR CAR-T를 투여한 그룹에서는 종양이 감소하다가 10일 이후부터 다시 증가하는 경향을 보였으며 중용량 (2.0×10^6 cells/100 μ L DPBS/head)으로 CD8 huMVR CAR-T를 투여한 그룹에서는 27일째까지 천천히 photon 값이 감소하는 경향을 보였다. 하지만 고용량 (10.0×10^6 cells/head)으로 CD8 huMVR CAR-T를 투여했을 경우 13일 이후에 암이 모두 사라지는 것을 확인할 수 있었다. 또한 저용량으로 CD4 및 CD8 MVR CAR-T를 함께 투여했을 경우 CD8 huMVR CAR-T 고용량만큼의 효능은 아니지만 27일경에 대부분 마우스에서 (5마리 중 3마리) 암이 사라지는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 본 실험을 통해 huMVR CAR-T가 중용량이상에서 효력을 가지고 있으며, CD8 단독에 비해 CD4와 함께 사용할 경우 더 적은 용량의 CAR-T를 사용하여도 효력을 보이는 것을 확인할 수 있었다. (도 13)
- [197]
- [198] **실시예 17: 피하동물모델에서 CD4/8 huMVR CAR-T의 효력 평가**
- [199] 실시예 13에서 MVR CAR-T 제작시 CD4와 CD8 T 세포를 함께 사용하여 huMVR CAR-T를 생산하고 동물실험에 사용할 경우 효력이 더 좋은 것으로 확인되었다. 상기 예를 바탕으로 CD4/CD8 huMVR CAR-T를 생산하여 저용량, 중용량, 고용량으로 투여하고 CAR-T의 효력을 피하동물모델을 이용하여 평가하였다. Automatic caliper로 암성장을 확인했을 때, 고용량 (5.0×10^6 cells/100 μ L/head; dose 3)을 투여한 그룹에서 10일째 암성장이 느려지다가 14일째부터 암성장이 감소하고 17일째 대부분의 암이 사라졌다. 이는 도 14A에서 나타난 것처럼 21일째 이미징에서도 거의 확인되지 않고 있었다. 중용량 (2.0×10^6 cells/100 μ L/head; dose 2) 및 저용량 (1.0×10^6 cells/100 μ L/head; dose 1)을 투여한 군에서도 CAR-T 투여 후 17일째부터 암 성장이 느려 지다가 21일째부터 감소하기 시작하였다. 하지만 이미징 장비를 이용하여 확인한 결과 4주 이상까지 암세포가 체내에 남아 있는 개체들이 있었으며, 중용량 및 저용량에서도 효력이 나타나긴 하지만 고용량에 비해 효력이 늦게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. IVIS imaging을 통해서 암세포를 이미징 했을 때 피하로 투여하여 종양모델을 유도했으나 시간이 지날 수록 임파선 부위로 암이 전이된 것을 확인할 수 있었다. 하지만 MVR CAR-T를 투여했을 경우 전이된

암세포까지 모두 사멸시켰다. (도 15) 또한 본 실험을 통해 huMVR CAR-T 투여를 통한 동물모델의 생존율을 확인했을 때, CAR-T를 투여하지 대조군 마우스의 경우 18일째 모든 개체가 사망했으나 MVR CAR-T를 투여한 그룹에서는 모두 생존하고 있었다. (도 16)

[200]

[201] 실시예 18: 동물모델 체내에서 CD4/8 MVR CAR-T의 비율 확인

[202] 실시예 17에서 사용된 마우스로부터 획득한 혈액을 이용하여 동물 체내에 존재하는 CAR-T 비율 및 수를 확인하기 위해 혈액분석을 진행하였다. 혈액분석 결과 3일 이후부터 CAR-T를 투여한 개체에서 낮은 비율로 CAR-T가 확인되고 있었으며 10일 이후 고용량 투여군에서 CAR-T의 양이 7% 내지 31%로 급격히 증가하였다. 이는 MVR 고용량 투여군에서 암크기 및 photon 값이 감소하는 시점이었다. 또한 중용량 및 저용량의 huMVR CAR-T의 경우 투여 후 17일부터 CAR-T 비율이 증가하고 있었으며, 21일부터 암크기 및 photon 값이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. (도 17)

[203]

[표2]

서열 번호	정보
1	CDR1 of huMVR.H2 heavy chain
2	CDR2 of huMVR.H2 heavy chain
3	CDR3 of huMVR.H2 heavy chain
4	CDR1 of huMVR.L2 light chain
5	CDR2 of huMVR.L2 light chain
6	CDR3 of huMVR.L2 light chain
7	Variable region of huMVR.H2 heavy chain
8	Variable region of huMVR.L2 Light chain
9	scFv of huMVRL2H2
10	Variable region of huMVR.H1 heavy chain
11	Variable region of huMVR.L1 light chain
12	scFv of huMVRL1H1
13	4-1BB signaling domain
14	euCD137
15	MVR.L2H2 CAR
16	MVR.L2H2 CAR_euCD137
17	CD19 CAR
18	CD19 CAR_euCD137
19	EF1a-promoter
20	CD8- α leader sequence
21	Flag
22	CD19scFv
23	CD8/Hinge/Transmembrane Sequence
24	CD3z
25	Woodchuck/PRE
26	R/region

[204] 예를 들어, 청구항 구성 목적을 위해, 이하 기재되는 청구항은 어떤 식으로든 이의 문자 그대로의 언어보다 좁게 해석되어선 안 되고, 따라서 명세서로부터의 예시적 구현예가 청구항으로 읽혀서는 안 된다. 따라서, 본 발명은 예시로서 기재되었고, 청구항의 범위에 대한 제한이 아님이 이해되어야 한다. 따라서, 본 발명은 하기 청구항에 의해서만 제한된다. 본 출원에 인용된 모든 간행물, 발행된 특허, 특허 출원, 서적 및 저널 논문은 이들의 전체내용이 참조로서 본원에 각각 포함된다.

[205]

서열목록 Free Text

[206] 1. CDR1 of huMVR.H2 heavy chain

[207] RYSVH

[208]

[209] 2. CDR2 of huMVR.H2 heavy chain

[210] MIWGGGSTDYNSALKS

[211]

[212] 3. CDR3 of huMVR.H2 heavy chain

[213] NEGDTTAGTWFA Y

[214]

[215] 4. CDR1 of huMVR.L2 light chain

[216] KASDHINN WLA

[217]

[218] 5. CDR2 of huMVR.L2 light chain

[219] GATSLET

[220]

[221] 6. CDR3 of huMVR.L2 light chain

[222] QQYWSTPFT

[223]

[224] 7. Variable region of huMVR.H2 heavy chain

[225] QVQLQESGPG LVKPSETLSLTCTVSGFSLSRYSVHWIRQPPGKGLEWLGM IW
GGGSTDYNSALKSRLTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARNEGDTTA
GTWFAYWGQGTLVTVSS

[226]

[227] 8. Variable region of huMVR.L2 Light chain

[228] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASDHINNWLAWYQQKPGKAPKLLISGAT
SLETGVP SRFSGSGSGKDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYWSTPFTFGQGTKVEI
K

[229]

- [230] 9. scFv of huMVRL2H2
- [231] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASDHINNWLAWYQQKPGKAPKLLISGAT
SLETGVPSRFSGSGSGKDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYWSTPFTFGQGTKVEI
KGGGGSGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLSRYSVHWI
RQPPGKGLEWLGMWGGGSTDYNSALKSRLTISKDNSKNQVSLKLSSVTAAD
TAVYYCARNEGDTTAGTWFAFWGQGTLVTVSS
- [232]
- [233] 10. Variable region of huMVR.H1 heavy chain
- [234] QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISRYSVHWIRQPPGKGLEWIGMIW
GGGSTDYNSALKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARNEGDTTAG
TWFAFWGQGTLVTVSS
- [235]
- [236] 11. Variable region of huMVR.L1 light chain
- [237] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASDHINNWLAWYQQKPGKAPKLLLYGA
TRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYWSTPFTFGGGTKVEI
K
- [238]
- [239] 12. scFv of huMVRL1H1
- [240] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASDHINNWLAWYQQKPGKAPKLLLYGA
TRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYWSTPFTFGGGTKVEI
KGGGGSGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISRYSVHWI
RQPPGKGLEWIGMIWGGGSTDYNSALKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT
AVYYCARNEGDTTAGTWFAFWGQGTLVTVSS
- [241]
- [242] 13. 4-1BB signaling domain
- [243] KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
- [244]
- [245] 14. euCD137
- [246] RFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
- [247]
- [248] 15. sequence of MVR.L2H2 CAR
- [249] GCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG
AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACAAGCAGGGCCA
GAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATG
TTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGA
AGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGAT
GGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGC
AAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACAC

CTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA

[250]

[251] 16. sequence of MVR.L2H2 CAR_euCD137

[252] GATATTCAGATGACCCAGTCCCCGAGCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGA
TAGGGTCACCATCACCTGCAAGGCCAGTGACCACATCAACAACCTGGCTGGC
CTGGTATCAACAGAAACCAGGAAAAGCTCCGAACTACTGATCAGCGGCG
CCACCTCTCTGGAAACCGGAGTCCCTTCTCGTTCTCTGGTTCCGGATCTGG
GAAGGATTACACTCTGACCATCAGCAGTCTGCAGCCGGAAGACTTCGCAAC
TTATTACTGTCAGCAGTACTGGTCCACCCCCCTTCACCTTCGGACAGGGTACC
AAGGTGGAGATCAAAGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAGGAAGTGGCG
GAGGGGGATCTCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGCCAGGACTGGTGAAG
CCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTTTCTCCCTGAGTC
GGTACTCTGTGCATTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGG
CTGGGGATGATCTGGGGAGGCGGCAGCACCGACTACAACAGCGCCCTGAA
GTCCCGACTGACCATATCAAAGGACAACCTCCAAGAACCAGGTGTCCTTGAA
GCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAAA
TGAGGGCGATACCACCGCCGGCACTTGGTTTGCCTATTGGGGCCAGGGAAC
CCTGGTCAACGTCTCCTCAACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACC
GGCGCCCACCATCGCTAGCCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCG
GCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTG
ATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTC
ACTGGTTATCACCCCTTTACTGC
CGTTTCTCTGTTGTTAAACGGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAA
CAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAG
CTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG
AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCA
GAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATG
TTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGA
AGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGAT
GGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGC
AAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACAC
CTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA

[253]

[254] 17. sequence of CD19 CAR

[255] GACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGA
CAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAA
TTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAAGTGTAACTCCTGATCTACCATAC
ATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGG

AACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCAC
T TACTTTTGGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGAC
CAAGCTGGAGATCACAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTTCGGGTG
GCGGCGGATCTGAGGTGAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCG
CCCTCACAGAGCCTGTCCGTACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCC
GACTATGGTGTAAGCTGGATTTCGCCAGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGG
CTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCACATACTATAATTAGCTCTCAAA
TCCAGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAA
ATGAACAGTCTGCAAACCTGATGACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAACAT
TATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGAACCTCA
GTCACCGTCTCCTCA

ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCTAG
CCAGCCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCG
CAGTGCACACGAGGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGC
CCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTA
CTGC

AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAG
ACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAG
AAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG
AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCA
GAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATG
TTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGA
AGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGAT
GGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGC
AAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACAC
CTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA

[256]

[257] 18. sequence of CD19 CAR_euCD137

[258] GACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGA
CAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAA
TTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACCTGTTAACTCCTGATCTACCATAC
ATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGG
AACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCAC
T TACTTTTGGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGAC
CAAGCTGGAGATCACAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTTCGGGTG
GCGGCGGATCTGAGGTGAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCG
CCCTCACAGAGCCTGTCCGTACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCC
GACTATGGTGTAAGCTGGATTTCGCCAGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGG

CTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCACATACTATAATTCAGCTCTCAAA
TCCAGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAA
ATGAACAGTCTGCAAACCTGATGACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAACAT
TATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGAACCTCA
GTCACCGTCTCCTCA
ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCAACACCGGCGCCCACCATCGCTAG
CCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGGGGGGCG
CAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGC
CCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTA
CTGC CGTTTCTCTGTTGTT
AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAG
ACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAG
AAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG
AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCA
GAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATG
TTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGA
AGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGAT
GGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGC
AAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACAC
CTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA GTCGACA

[259]

[260] 19. EF1a-promoter

[261] gatggagttccccacactgagtgggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgaattctccttggaaatttggcc
ttttgagtttggatcttggttcattctcaagcctcagacagtgttcaaagtttttcttccatttcaggtgtcgtga

[262]

[263] 20. CD8- α leader sequence

[264] GGATCCATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCT
GCTCCACGCCGCCAGGCCG

[265]

[266] 21. Flag

[267] gactacaaggacgacgatgacaag

[268]

[269] 22. CD19scFv

[270] GACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGA
CAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAA
TTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACCTGTTAAACTCCTGATCTACCATAC
ATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGG
AACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCAC

TTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGAC
CAAGCTGGAGATCACAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGCGGTG
GCGGCGGATCTGAGGTGAACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCG
CCCTCACAGAGCCTGTCCGTCACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCC
GACTATGGTGTAAAGCTGGATTTCGCCAGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGG
CTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACACATACTATAATTGAGCTCTCAAA
TCCAGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAA
ATGAACAGTCTGCAAAGTATGACACAGCCATTTACTACTGTGCCAAACAT
TATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGAACCTCA
GTCACCGTCTCCTCA

[271]

[272] 23. CD8/Hinge/Transmembrane Sequence

[273] ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCTA
GCCAGCCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCG
GCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCG
CCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTT
ACTGC

[274]

[275] 24. CD3z

[276] AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCC
AGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGAT
GTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAG
AAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGA
TGCGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGC
AAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACAC
CTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA

[277]

[278] 25. Woodchuck/PRE

[279] Atcaacctctggattacaaaatttgtaaagattgactggattcttaactatgttgctccttttacgctatgtggatacgtgct
ttaatgcctttgtatcatgtattgcttccggtatggctttcattttctctcctgtataaatcctggttgcgtctctttatgaggagtt
gtggcccggtgtcaggcaacgtggcgtggtgtgcactgtgtttgtgcacgaacccccactggttggggcattgccaccacc
gtcagctcctttccgggactttcgtttccccctcctattgccacggcggaactcatcgccgctgcttggcgctgctgga
caggggctcggctgttgggcactgacaattccgtggtgttcggggaagctgacgtcctttccatggctgctcgcctgtgttg
ccacctggattctgcgcgggacgtccttctgtacgtcccttcggccctcaatccagcggaccttcttccccgcggcctgctg
ccggctctgcggccttctccgctcttcgccttcgcctcagacgagtcggatctcccttggggccgctccccgcctg

[280]

[281] 26. R/region

[282] GGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACT

AGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCA

[283]

청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1), 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항원 결합 분자로서, 상기 항원 결합 분자는 키메라 항원 수용체 (chimeric antigen receptor; CAR)인, 항원 결합 분자.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 서열번호 7로 표시되는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 8로 표시되는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항원 결합 분자.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 서열번호 9로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는, 항원 결합 분자.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 서열번호 13으로 표시되는 아미노산 서열을 더 포함하는, 항원 결합 분자.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 서열번호 14로 표시되는 아미노산 서열을 더 포함하는, 항원 결합 분자.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 막관통 도메인, 및 T 세포를 활성화시키기 위한 세포내 신호전달 도메인을 더 포함하는, 항원 결합 분자.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 막관통 도메인은 T 세포 수용체의 알파 사슬, T 세포 수용체의 베타 사슬, T 세포 수용체의 제타 사슬, CD28, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 및 CD154로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 세포내 신호전달 도메인은 CD3zeta 신호전달 도메인 및 보조자극 신호전달 도메인인, 항원 결합 분자.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 보조자극 신호전달 도메인은 CD28, OX40, CD27, ICAM-1, CD278, 및 CD137로 이루어진 군으로부터 선택되는, 항원 결합 분자.
- [청구항 9] 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 항원 결합 분자를 인코딩하는, 핵산 분자.
- [청구항 10] 제9항의 핵산 분자를 포함하는, 발현 벡터.
- [청구항 11] 제9항의 핵산 분자를 포함하는, 세포.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, T 세포인, 세포.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 T 세포는 CD8+ T 세포 및/또는 CD4+ T 세포인, 세포.
- [청구항 14] 제11항에 있어서, 키메라 항원 수용체 변형된 T 세포 (CAR-T)인, 세포.

- [청구항 15] 제11항의 세포를 약학적 유효성분으로 포함하는, 암 치료용 약학 조성물.
- [청구항 16] 제15항에 있어서, 상기 암은 식도선암, 대장암, 흑색종양, 안구흑색종, 소세포폐암, 신경모세포종, 기형암종, 태생기암, 편평상피암, 머리 및 목 편평 세포 암종, 흉선종, 림프모구백혈병, B세포림프종, 비만성거대B세포림프종, 백혈병, 급성골수성백혈병 등인, 약학 조성물.
- [청구항 17] 치료적 유효량의 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 항원 결합 분자를 포함하는 T 세포를 포함하는 약학 조성물을 암을 가진 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 암 치료 방법.
- [청구항 18] 제17항에 있어서, 상기 약학 조성물은 CD8+ T 세포를 포함하거나, CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포를 포함하는, 암 치료 방법.
- [청구항 19] 제18항에 있어서, 세포 수를 기준으로 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포의 비율은 실질적으로 1:1인, 암 치료 방법.
- [청구항 20] 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3를 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1), 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항원 결합 분자를 인코딩하는 핵산을 T 세포에 형질감염시키는 단계를 포함하는, 암 치료를 위한 키메라 항원 수용체 변형된 T 세포 (CAR-T)의 제조 방법.
- [청구항 21] 제 1항 내지 제 8항 중 어느 한 항의 항원 결합 분자를 포함하는 T 세포를 약학적 유효성분으로 포함하는, 암을 치료하기 위한 치료용 약학 조성물.
- [청구항 22] 제 21항에 있어서, 상기 약학 조성물은 조성물은 CD8+ T 세포를 포함하거나, CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는, 암을 치료하기 위한 치료용 약학 조성물.
- [청구항 23] 제18항에 있어서, 세포 수를 기준으로 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포의 비율은 실질적으로 1:1인 것을 특징으로 하는, 암을 치료하기 위한 치료용 약학 조성물.