



(52) CPC특허분류

*C07K 14/7051* (2013.01)

*C07K 14/70517* (2013.01)

*C07K 14/70521* (2013.01)

*C07K 14/70578* (2013.01)

*C07K 2317/73* (2013.01)

*C07K 2319/00* (2013.01)

*C07K 2319/03* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

(a) 항원 결합 도메인으로서, B-세포 성숙 항원(BCMA)에 결합하는 단일클론 항체의 항원 결합 부분 또는 BCMA에 결합하는 단일클론 항체의 가변 영역을 포함하는 항원 결합 도메인;

(b) 힌지 도메인;

(c) CD28 경막 도메인 또는 CD8 $\alpha$  경막 도메인을 포함하는 경막 도메인;

(d) 4-1BB 세포내 T-세포 신호전달 도메인; 및

(e) CD3 $\zeta$  세포내 T-세포 신호전달 도메인

을 포함하는, 키메라 항원 수용체(CAR).

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 항원 결합 도메인이 BCMA에 결합하는 단일클론 항체의 단일 쇄 가변 단편(scFv)을 포함하는, 키메라 항원 수용체.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 가변 영역이 BCMA에 결합하는 단일클론 항체의 중쇄 가변 영역을 포함하는, 키메라 항원 수용체.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 힌지 도메인이 CD8 $\alpha$  힌지 도메인을 포함하는, 키메라 항원 수용체.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 힌지 도메인이 CD28 힌지 도메인을 포함하는, 키메라 항원 수용체.

#### 청구항 6

제1항에 있어서,

경막 도메인이 CD8 $\alpha$  경막 도메인인, 키메라 항원 수용체.

#### 청구항 7

제1항에 있어서,

상기 경막 도메인은 CD28 경막 도메인인, 키메라 항원 수용체.

#### 청구항 8

제1항에 있어서,

상기 항원 결합 도메인은 BCMA에 결합하는 scFv를 포함하고, 상기 경막 도메인은 CD28 경막 도메인을 포함하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 9**

제1항에 있어서,

상기 항원 결합 도메인은 BCMA에 결합하는 단일클론 항체의 중쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 힌지 도메인은 CD8 α 힌지 도메인을 포함하고, 상기 경막 도메인은 CD8 α 경막 도메인을 포함하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 10**

- (a) BCMA에 결합하는 scFv;
  - (b) 힌지 도메인;
  - (c) 인간 CD28 경막 도메인;
  - (d) 인간 4-1BB 세포내 T-세포 신호전달 도메인; 및
  - (e) 인간 CD3 ζ 세포내 T-세포 신호전달 도메인
- 을 포함하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 11**

- (a) BCMA에 결합하는 단일클론 항체의 가변 영역;
  - (b) 인간 CD8 α 힌지 도메인;
  - (c) 인간 CD8 α 경막 도메인;
  - (d) 인간 4-1BB 세포내 T-세포 신호전달 도메인; 및
  - (e) 인간 CD3 ζ 세포내 T-세포 신호전달 도메인
- 을 포함하는, 키메라 항원 수용체.

**청구항 12**

제1항의 키메라 항원 수용체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드.

**청구항 13**

제12항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 렌티바이러스 벡터.

**청구항 14**

제1항의 키메라 항원 수용체를 발현하는 T-세포.

**청구항 15**

제14항의 T-세포를 포함하는 조성물.

**청구항 16**

제14항의 T-세포 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 다발성 골수종 또는 림프종을 치료하기 위한 약학 조성물.

**청구항 17**

제10항의 키메라 항원 수용체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드.

**청구항 18**

제17항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 렌티바이러스 벡터.

**청구항 19**

제10항의 키메라 항원 수용체를 발현하는 T-세포.

**청구항 20**

제19항의 T-세포를 포함하는 조성물.

**청구항 21**

제19항의 T-세포 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 다발성 골수종 또는 림프종을 치료하기 위한 약학 조성물.

**청구항 22**

제11항의 키메라 항원 수용체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드.

**청구항 23**

제22항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 렌티바이러스 벡터.

**청구항 24**

제11항의 키메라 항원 수용체를 발현하는 T-세포.

**청구항 25**

제24항의 T-세포를 포함하는 조성물.

**청구항 26**

제24항의 T-세포 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 다발성 골수종 또는 림프종을 치료하기 위한 약학 조성물.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 B-세포 성숙 항원(BCMA)에 대해 유도된 키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩하는 단리된 및 정제된 핵산 서열을 제공한다. 본 발명은 상기 CAR을 발현하는 숙주 세포, 예컨대, T-세포 또는 천연 살해(NK) 세포 및 다발성 골수종 세포를 파괴하는 방법도 제공한다.

[0002] 본 발명은 미국 국립보건원(NIH) 국립암연구소(NCI)에 의해 프로젝트 번호 제Z01 ZIABC011417호 하에 정부 지원을 받아 완성되었다. 미국 정부는 본 발명에 대한 특정 권리를 갖는다.

[0003] 관련 출원의 교차-참조

[0004] 본 특허출원은 전체적으로 본원에 참고로 도입되는, 2012년 4월 11일자로 출원된 미국 가특허출원 제61/622,600호를 우선권 주장한다.

[0005] 전자적으로 제출된 자료의 참고도입

[0006] 본원과 동시에 제출되었고 다음과 같이 확인되는 컴퓨터-판독가능한 뉴클레오티드/아미노산 서열목록이 전체적으로 본원에 참고로 도입된다: 2013년 3월 14일자로 생성되어 "712361\_ST25.TXT"로서 명명된 1개의 42,589 바이트 ASCII(텍스트) 파일.

**배경 기술**

[0007] 다발성 골수종(MM)은 클론 형질 세포의 축적을 특징으로 하는 악성종양이다(예를 들면, 문헌(Palumbo et al., New England J. Med., 364(11): 1046-1060 (2011)) 및 문헌(Lonial et al., Clinical Cancer Res., 77(6): 1264-1277 (2011)) 참조). MM에 대한 현재 치료는 종종 관해를 야기하지만, 거의 모든 환자들이 궁극적으로 재발하여 사망한다(예를 들면, 상기 문헌(Lonial et al.) 및 문헌(Rajkumar, Nature Rev. Clinical Oncol, 5(8): 479-491 (2011)) 참조).

[0008] 동종이계(Allogeneic) 조혈 줄기 세포 이식은 골수종 세포의 면역-매개된 제거를 유도한다고 밝혀져 있지만, 이 방법의 독성은 높고, 소수의 환자들만이 치유된다(예를 들면, 상기 문헌(Lonial et al.) 및 문헌(Salit et al., Clin. Lymphoma, Myeloma, and Leukemia, 11(3): 247-252 (2011)) 참조). 현재, MM에 대한 임상적으로 효과적인 FDA-승인된 단일클론 항체 또는 자가 T-세포 치료는 없다(예를 들면, 문헌(Richardson et al., British J. Haematology, 154(6): 745-754 (2011)) 및 문헌(Yi, Cancer Journal, 15(6): 502-510 (2009)) 참조).

[0009] 악성종양 관련 항원을 인식하도록 유전적으로 변경된 T-세포의 입양 전달이 암을 치료하기 위한 새로운 방법으로서 가능성을 보이고 있다(예를 들면, 문헌(Morgan et al., Science, 314(5196): 126-129 (2006)), 문헌(Brenner et al., Current Opinion in Immunology, 22(2): 251-257 (2010)), 문헌(Rosenberg et al., Nature Reviews Cancer, 8(4): 299-308 (2008)), 문헌(Kershaw et al., Nature Reviews Immunology, 5(12): 928-940 (2005)) 및 문헌(Pule et al., Nature Medicine, 14(11): 1264-1270 (2008)) 참조). T-세포는 항원 인식 모이어티(moiety) 및 T-세포 활성화 도메인으로 구성된 융합 단백질인 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 유전적으로 변경될 수 있다(예를 들면, 상기 문헌(Kershaw et al.), 문헌(Eshhar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90(2): 720-724 (1993)) 및 문헌(Sadelain et al., Curr. Opin. Immunol, 21(2): 215-223 (2009)) 참조).

[0010] B-세포 계통 악성종양의 경우, 항-CD19 CAR을 이용하는 입양 T-세포 방법의 개발이 상당히 진행되어 있다(예를 들면, 문헌(Jensen et al., Biology of Blood and Marrow Transplantation, 16: 1245-1256 (2010)), 문헌(Kochenderfer et al., Blood, 116(20): 4099-4102 (2010)), 문헌(Porter et al., The New England Journal of Medicine, 365(8): 725-733 (2011)), 문헌(Savoldo et al., Journal of Clinical Investigation, 121(5): 1822-1826 (2011)), 문헌(Cooper et al., Blood, 101(4): 1637-1644 (2003)), 문헌(Brentjens et al., Nature Medicine, 9(3): 279-286 (2003)) 및 문헌(Kalos et al., Science Translational Medicine, 3(95): 95ra73 (2011)) 참조). 입양 전달된 항-CD19-CAR-형질도입된 T-세포는 마우스에서 백혈병 및 림프종을 치유하였다(예를 들면, 문헌(Cheadle et al., Journal of Immunology, 184(4): 1885-1896 (2010)), 문헌(Brentjens et al., Clinical Cancer Research, 73(18 Pt 1): 5426-5435 (2007)) 및 문헌(Kochenderfer et al., Blood, 116(19): 3875-3886 (2010)) 참조). 초기 임상시험에서, 입양 전달된 항-CD19 CAR-형질도입된 T-세포는 백혈병 및 림프종을 갖는 환자에서 정상 B-세포 및 악성 B-세포를 제거하였다(예를 들면, 문헌(Kochenderfer et al., Blood, 116(20): 4099-4102 (2010)), 상기 문헌(Porter et al.), 문헌(Brentjens et al., Blood, 118(18): 4817-4828 (2011)) 및 문헌(Kochenderfer et al., Blood, December 8, 2011 (epublication ahead of print (2012)) 참조). 그러나, CD19는 다발성 골수종의 악성 형질 세포 상에서는 정말 드물게 발현된다(예를 들면, 문헌(Gupta et al., Amer. J. Clin. Pathology, 132(5): 728-732 (2009)) 및 문헌(Lin et al., Amer. J. Clin. Pathology, 121(4): 482-488 (2004)) 참조).

[0011] 따라서, 다발성 골수종을 치료하는 방법에서 사용될 수 있는 조성물에 대한 필요성이 남아있다. 본 발명은 이러한 조성물 및 방법을 제공한다.

**발명의 내용**

[0012] 본 발명은 키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩하는 단리된 또는 정제된 핵산 서열을 제공하는데, 이때 상기 CAR은 항원 인식 모이어티 및 T-세포 활성화 모이어티를 포함하고, 상기 항원 인식 모이어티는 B-세포 성숙 항원(BCMA)에 대해 유도된다.

**도면의 간단한 설명**

[0013] 도 1a 및 1b는 정량 PCR을 이용하여 측정하였을 때 다양한 종류의 인간 세포들에 걸쳐 BCMA의 발현 패턴을 보여주는 실험 데이터를 도시하는 그래프이다. 결과는 10<sup>5</sup>개의 액틴 cDNA 카피 당 BCMA cDNA의 수로서 표현되어 있다.

도 2의 A 내지 L은 실시예 1에 기재된 바와 같이 세포 표면 BCMA 발현이 다발성 골수종 세포주 상에서 검출되었지만 다른 종류의 세포 상에서는 검출되지 않았다는 것을 보여주는 실험 데이터를 도시하는 그래프이다. 모든 도표들에서, 직선은 항-BCMA 항체를 사용한 염색을 나타내고, 쇄선은 동종형-일치된 대조군 항체를 사용한 염색을 나타낸다. 모든 도표들은 살아있는 세포에 대해 게이팅되었다.

도 3의 A는 항-BCMA CAR을 코딩하는 핵산 구축물을 도시하는 도면이다. N-말단부터 C-말단까지 항-BCMA CAR은 항-BCMA scFv, CD8 α 분자의 힌지 영역 및 경막 영역, CD28 분자의 세포질 부분 및 CD3 ζ 분자의 세포질 부분을

포함한다.

도 3의 B 내지 D는 항-bcma1 CAR, 항-bcma2 CAR 및 SP6 CAR(실시에 2에 기재됨)이 T 세포의 표면 상에서 발현된다는 것을 보여주는 실험 데이터를 도시하는 그래프이다. 최소한의 항-Fab 염색이 비-형질도입(UT) 세포 상에서 일어났다. 도표는 CD3<sup>+</sup> 림프구에 대해 게이팅되어 있다. 도표 상의 숫자는 각각의 사분원 내의 세포의 백분율이다.

도 4의 A 내지 C는 실시예 3에 기재된 바와 같이 항-BCMA CAR을 발현하는 T-세포가 BCMA 특이적 방식으로 T-세포를 탈과립화시킨다는 것을 보여주는 실험 데이터를 도시하는 그래프이다. 도표는 살아있는 CD3<sup>+</sup> 림프구에 대해 게이팅되어 있다. 도표 상의 숫자는 각각의 사분원 내의 세포의 백분율이다.

도 5a 내지 5d는 실시예 3에 기재된 바와 같이 항-BCMA CAR을 발현하는 T-세포가 BCMA 특이적 방식으로 T-세포를 탈과립화시킨다는 것을 보여주는 실험 데이터를 도시하는 그래프이다. 도표는 살아있는 CD3<sup>+</sup> 림프구에 대해 게이팅되어 있다. 도표 상의 숫자는 각각의 사분원 내의 세포의 백분율이다.

도 6a 내지 6c는 실시예 3에 기재된 바와 같이 항-BCMA CAR을 발현하는 T-세포가 BCMA 특이적 방식으로 사이토카인 IFN $\gamma$ , IL-2 및 TNF를 생성한다는 것을 보여주는 실험 데이터를 도시하는 그래프이다. 도표는 살아있는 CD3<sup>+</sup> 림프구에 대해 게이팅되어 있다. 도표 상의 숫자는 각각의 사분원 내의 세포의 백분율이다.

도 7a는 항-bcma2 CAR을 발현하는 T-세포가 BCMA에 반응하여 특이적으로 증식하였다는 것을 보여주는 실험 데이터를 도시하는 그래프이다. 도 7b는 SP6 CAR을 발현하는 T-세포가 BCMA에 반응하여 특이적으로 증식하지 않았다는 것을 보여주는 실험 데이터를 도시하는 그래프이다.

도 7c 및 7d는 항-bcma2 CAR을 발현하는 공여자 A의 T-세포가 다양한 이펙터:표적 세포 비에서 4시간 동안의 세포독성 분석에서 다발성 골수종 세포주 H929(도 7c) 및 RPMI8226(도 7d)을 특이적으로 사멸시켰다는 것을 보여주는 실험 데이터를 도시하는 그래프이다. 음성 대조군 SP6 CAR로 형질도입된 T-세포는 모든 이펙터:표적 비에서 훨씬 더 낮은 수준의 세포독성을 유도하였다. 모든 이펙터:표적 비에서, 세포독성을 중복적으로 측정하였고, 결과는 평균 +/- 평균의 표준 오차로서 표시되어 있다.

도 8a는 실시예 5에 기재된 바와 같이 BCMA가 골수종 환자 3의 일차 골수 다발성 골수종 세포의 표면 상에서 발현된다는 것을 보여주는 실험 데이터를 도시하는 그래프이다. 도표는 골수 세포의 40%를 차지하는 CD38<sup>high</sup> CD56<sup>+</sup> 형질 세포에 대해 게이팅되어 있다.

도 8b는 공여자 C의 항-bcma2 CAR로 형질도입된 동종이계 T-세포가 실시예 5에 기재된 바와 같이 골수종 환자 3의 비-조작된 골수 세포와 공-배양된 후 IFN $\gamma$ 를 생성하였다는 것을 보여주는 실험 데이터를 도시하는 그래프이다. 또한, 도 8b는 항-bcma2 CAR을 발현하는 동일한 동종이계 공여자의 T-세포가 골수종 환자 3의 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)와 함께 배양되었을 때 훨씬 더 적은 IFN $\gamma$ 를 생성하였다는 것을 보여준다. 또한, SP6 CAR을 발현하는 공여자 C의 T-세포는 골수종 환자 3의 골수를 특이적으로 인식하지 않았다.

도 8c는 BCMA(직선) 및 동종형-일치된 대조군 염색(쇄선)에 대한 유동 세포측정(flow cytometry)에 의해 밝혀진 바와 같이 골수종 환자 1로부터 절제된 형질세포종이 93%의 형질 세포로 구성되었고 이들 일차 형질 세포가 BCMA를 발현하였다는 것을 보여주는 실험 데이터를 도시하는 그래프이다. 도표는 형질 세포에 대해 게이팅되어 있다.

도 8d는 항-bcma2 CAR을 발현하는 골수종 환자 1의 T-세포가 자가 형질세포종 세포에 반응하여 IFN $\gamma$ 를 특이적으로 생성하였다는 것을 보여주는 실험 데이터를 도시하는 그래프이다.

도 8e는 항-bcma2 CAR을 발현하는 골수종 환자 1의 T-세포가 낮은 이펙터:표적 비에서 자가 형질세포종 세포를 특이적으로 사멸시켰다는 것을 보여주는 실험 데이터를 도시하는 그래프이다. 대조적으로, SP6 CAR을 발현하는 골수종 환자 1의 T-세포는 자가 형질세포종 세포에 대한 낮은 수준의 세포독성을 나타내었다. 모든 이펙터:표적 비에서, 세포독성을 중복적으로 측정하였고, 결과는 평균 +/- 평균의 표준 오차로서 표시되어 있다.

도 9a는 항-bcma2 CAR로 형질도입된 T-세포가 마우스에서 확립된 다발성 골수종 종양을 파괴할 수 있다는 것을 보여주는 실험 데이터를 도시하는 그래프이다. 도 9b는 대조군에 비해 항-bcma2 CAR을 발현하는 T-세포로 치료된 종양 보유 마우스의 생존율을 도시하는 그래프이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0014] 본 발명은 키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩하는 단리된 또는 정제된 핵산 서열을 제공하고, 이때 CAR은 항원 인식 모이어티 및 T-세포 활성화 모이어티를 포함한다. 키메라 항원 수용체(CAR)는 T-세포 신호전달 또는 T-세포 활성화 도메인에 연결된 항체의 항원 결합 도메인(예를 들면, 단일쇄 가변 단편(scFv))을 함유하는 인공적으로 구축된 하이브리드 단백질 또는 폴리펩티드이다. CAR은 단일클론 항체의 항원 결합 성질을 이용하는 비-MHC-제한된 방식으로 T-세포 특이성 및 반응성을 선택된 표적 쪽으로 향하게 하는 능력을 갖는다. 비-MHC-제한된 항원 인식은 항원 프로세싱과 무관하게 항원을 인식하여 중앙 도피의 주요 기작을 우회하는 능력을, CAR을 발현하는 T-세포에게 제공한다. 더욱이, CAR은 T-세포에서 발현되었을 때 유리하게는 내재성 T-세포 수용체(TCR) 알파 및 베타쇄와 이량체화하지 않는다.
- [0015] "핵산 서열"은 DNA 또는 RNA의 중합체, 즉 비-천연 또는 변경된 뉴클레오티드를 함유할 수 있는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있는 폴리뉴클레오티드를 포괄하기 위한 것이다. 본원에서 사용된 용어 "핵산" 및 "폴리뉴클레오티드"는 임의의 길이의 리보뉴클레오티드(RNA) 또는 데옥시리보뉴클레오티드(DNA)인 뉴클레오티드의 중합체 형태를 지칭한다. 이들 용어들은 상기 분자의 일차 구조를 지칭하므로, 이중 가닥 DNA 및 단일 가닥 DNA, 및 이중 가닥 RNA 및 단일 가닥 RNA를 포함한다. 상기 용어들은 뉴클레오티드 유사체로부터 만들어진 RNA 또는 DNA의 유사체 및 변경된 폴리뉴클레오티드, 예컨대, 메틸화된 및/또는 캡핑된 폴리뉴클레오티드(그러나, 이들로 한정되지 않음)를 균등물로서 포함한다.
- [0016] "단리된"은 핵산을 그의 천연 환경으로부터 제거하는 것을 의미한다. "정제된"은 천연 환경으로부터 분리되어 있든(게놈 DNA 및 mRNA를 포함함) 아니면 실험실 조건 하에서 합성되고/되거나(cDNA를 포함함) 증폭되어 있든 관계없이 주어진 핵산이 순도에서 증가되어 있다는 것을 의미하고, 이때 "순도"는 상대적 용어이고, "절대적 순도"가 아니다. 그러나, 핵산 및 단백질은 희석제 또는 보조제로 제제화될 수 있고 실용적인 목적으로 여전히 단리될 수 있다는 것을 이해해야 한다. 예를 들면, 핵산은 전형적으로 세포 내로의 도입을 위해 사용될 때 허용가능한 담체 또는 희석제와 혼합된다.
- [0017] 본 발명의 핵산 서열은 B-세포 성숙 항원(CD269로서도 공지되어 있는 BCMA)에 대해 유도된 항원 인식 모이어티를 포함하는 CAR을 코딩한다. BCMA는 중앙 피사 인자 수용체 수퍼패밀리의 구성원이다(예를 들면, 문헌(Thompson et al., J. Exp. Medicine, 192(1): 129-135 (2000)) 및 문헌(Mackay et al., Annu. Rev. Immunol, 21: 231-264 (2003)) 참조). BCMA는 B-세포 활성화 인자(BAFF) 및 증식 유도 리간드(APRIL)에 결합한다(예를 들면, 상기 문헌(Mackay et al.) 및 문헌(Kalled et al., Immunological Reviews, 204: 43-54 (2005)) 참조). BCMA는 비-악성 세포들 중에서 주로 형질 세포 및 성숙 B-세포의 서브세트에서 발현된다고 보고되어 있다(예를 들면, 문헌(Laabi et al., EMBO J., 11(11): 3897-3904 (1992)), 문헌(Laabi et al., Nucleic Acids Res., 22(7): 1147-1154 (1994)), 상기 문헌(Kalled et al.), 문헌(O'Connor et al., J. Exp. Medicine, 199(1): 91-97 (2004)) 및 문헌(Ng et al., J. Immunol., 173(2): 807-817 (2004)) 참조). BCMA를 결핍한 마우스는 건강하고 정상적인 수의 B-세포를 갖지만, 장기 생존된 형질 세포의 생존이 손상된다(예를 들면, 상기 문헌(O'Connor et al.), 문헌(Xu et al., Mol. Cell. Biol, 21(12): 4067-4074 (2001)) 및 문헌(Schiemann et al., Science, 293(5537): 2111-2114 (2001)) 참조). BCMA RNA는 다발성 골수종 세포에서 보편적으로 검출되었고, BCMA 단백질은 여러 연구자들에 의해 다발성 골수종 환자의 형질 세포의 표면 상에서 검출되었다(예를 들면, 문헌(Novak et al., Blood, 103(2): 689-694 (2004)), 문헌(Neri et al., Clinical Cancer Research, 13(19): 5903-5909 (2007)), 문헌(Bellucci et al., Blood, 105(10): 3945-3950 (2005)) 및 문헌(Moreaux et al., Blood, 103(8): 3148-3157 (2004)) 참조).
- [0018] 본 발명의 핵산 서열은 BCMA에 대해 유도된 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 함유하는 항원 인식 모이어티를 포함하는 CAR을 코딩한다. 본원에서 사용된 용어 "단일클론 항체"는 B-세포의 단일 클론에 의해 생성되고 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 지칭한다. 대조적으로, "다중클론 항체"는 상이한 B-세포들에 의해 생성되고 동일한 항원의 상이한 에피토프들에 결합하는 항체들의 집단을 지칭한다. 본 발명의 핵산 서열에 의해 코딩된 CAR의 항원 인식 모이어티는 전체 항체 또는 항체 단편일 수 있다. 전체 항체는 전형적으로 4개의 폴리펩티드들로 구성된다: 중쇄(H) 폴리펩티드의 2개 동일한 카피 및 경쇄(L) 폴리펩티드의 2개 동일한 카피. 각각의 중쇄는 1개의 N-말단 가변(VH) 영역 및 3개의 C-말단 불변(CH1, CH2 및 CH3) 영역을 함유하고, 각각의 경쇄는 1개의 N-말단 가변(VL) 영역 및 1개의 C-말단 불변(CL) 영역을 함유한다. 경쇄 및 중쇄의 각각의 쌍의 가변 영역은 항체의 항원 결합 부위를 형성한다. VH 영역과 VL 영역은 동일한 일반 구조를 갖는데, 이때 각각의 영역은 상대적으로 보존되어 있는 서열을 갖는 4개의 골격 영역을 포함한다. 골격 영역은 3개의 상보성 결

정 영역(CDR)에 의해 연결되어 있다. CDR1, CDR2 및 CDR3으로서 공지되어 있는 3개의 CDR은 항원 결합을 담당하는 항체의 "초가변 영역"을 형성한다.

- [0019] 용어 "항체의 단편", "항체 단편", "항체의 기능성 단편" 및 "항원 결합 부분"은 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 부분을 의미하기 위해 본원에서 상호교환가능하게 사용된다(예를 들면, 일반적으로 문헌(Holliger et al., Nat. Biotech., 23(9): 1126-1129 (2005)) 참조). 본 발명의 핵산 서열에 의해 코딩된 CAR의 항원 인식 모이어티는 임의의 BCMA 결합 항체 단편을 함유할 수 있다. 항체 단편은 바람직하게는 예를 들면, 하나 이상의 CDR, 가변 영역(또는 이의 부분), 불변 영역(또는 이의 부분), 또는 이들의 조합물을 포함한다. 항체 단편의 예에는 하기 (i) 내지 (v)가 포함되나 이들로 한정되지 않는다: (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 구성된 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 이황화 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편들을 포함하는 2가 단편인 F(ab')<sub>2</sub> 단편; (iii) 항체의 단일 아암(arm)의 VL 도메인 및 VH 도메인으로 구성된 Fv 단편; (iv) Fv 단편의 2개의 도메인들(즉, VL 및 VH)이 단일 폴리펩티드 쇠로서 합성될 수 있게 하는 합성 연결체에 의해 연결된 상기 2개의 도메인들로 구성된 1가 분자인 단일 쇠 Fv(scFv)(예를 들면, 문헌(Bird et al., Science, 242: 423-426 (1988)), 문헌(Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5879-5883 (1988)) 및 문헌(Osbourn et al., Nat. Biotechnol., 16: 778 (1998)) 참조); 및 (v) 동일한 폴리펩티드 쇠 상의 VH와 VL 사이에 페어링을 허용하기에 너무 짧은 상이한 VH-VL 폴리펩티드 쇠 상의 상보적 도메인들 사이의 페어링을 유도하여 2개의 기능성 항원 결합 부위를 갖는 이량체 분자를 발생시키는 펩티드 연결체에 의해 VL에 연결된 VH를 포함하는 각각의 폴리펩티드 쇠의 이량체인 다이아바다. 항체 단편은 당분야에서 공지되어 있고, 예를 들면, 미국 특허출원 공개 제2009/0093024 A1호에 더 상세히 기재되어 있다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 핵산 서열에 의해 코딩된 CAR의 항원 인식 모이어티는 항-BCMA 단일 쇠 Fv(scFv)를 포함한다.
- [0020] 단일클론 항체의 항원 결합 부분 또는 단편은, 이 부분 또는 단편이 BCMA에 결합하는 한, 임의의 크기를 가질 수 있다. 이와 관련하여, BCMA에 대해 유도된 단일클론 항체(본원에서 "항-BCMA 단일클론 항체"로서도 지칭됨)의 항원 결합 부분 또는 단편은 바람직하게는 약 5개 내지 18개(예를 들면, 약 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 또는 상기 값들 중 임의의 2개 값들에 의해 한정된 범위)의 아미노산을 포함한다.
- [0021] 한 실시양태에서, 본 발명의 핵산 서열은 항-BCMA 단일클론 항체의 가변 영역을 포함하는 항원 인식 모이어티를 코딩한다. 이와 관련하여, 항원 인식 모이어티는 항-BCMA 단일클론 항체의 경쇄 가변 영역, 중쇄 가변 영역, 또는 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역 둘다를 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 핵산 서열에 의해 코딩된 CAR의 항원 인식 모이어티는 항-BCMA 단일클론 항체의 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함한다. BCMA에 결합하는 중쇄 및 경쇄 단일클론 항체 아미노산 서열은 예를 들면, 국제 특허출원 공개 제WO 2010/104949호에 개시되어 있다.
- [0022] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 핵산 서열은 신호 서열을 포함하는 CAR을 코딩한다. 신호 서열은 항원 인식 모이어티(항-BCMA 항체의 가변 영역)의 아미노 말단에 위치할 수 있다. 신호 서열은 임의의 적합한 신호 서열을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 신호 서열은 인간 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF) 수용체 서열 또는 CD8 $\alpha$  신호 서열이다.
- [0023] 또 다른 실시양태에서, CAR은 힌지 서열을 포함한다. 당업자는 힌지 서열이 항체 유연성을 용이하게 하는 아미노산의 짧은 서열이라는 것을 인식할 것이다(예를 들면, 문헌(Woof et al., Nat. Rev. Immunol., 4(2): 89-99 (2004)) 참조). 힌지 서열은 항원 인식 모이어티(예를 들면, 항-BCMA scFv)와 T-세포 활성화 모이어티 사이에 위치할 수 있다. 힌지 서열은 임의의 적합한 분자로부터 유래되거나 수득된 임의의 적합한 서열일 수 있다. 한 실시양태에서, 예를 들면, 힌지 서열은 인간 CD8 $\alpha$  분자 또는 CD28 분자로부터 유래된다.
- [0024] 본 발명의 핵산 서열은 T 세포 활성화 모이어티를 포함하는 CAR을 코딩한다. T-세포 활성화 모이어티는 임의의 적합한 분자로부터 유래되거나 수득된 임의의 적합한 모이어티일 수 있다. 한 실시양태에서, 예를 들면, T-세포 활성화 모이어티는 경막 도메인을 포함한다. 경막 도메인은 당분야에서 공지되어 있는 임의의 분자로부터 유래되거나 수득된 임의의 경막 도메인일 수 있다. 예를 들면, 경막 도메인은 CD8 $\alpha$  분자 또는 CD28 분자로부터 수득될 수 있거나 유래될 수 있다. CD8은 T-세포 수용체(TCR)에 대한 보조수용체로서 작용하고 주로 세포독성 T-세포의 표면 상에서 발현되는 경막 당단백질이다. CD8의 가장 흔한 형태는 CD8 $\alpha$  및 CD8 $\beta$  쇠로 구성된 이량체로서 존재한다. CD28은 T-세포 상에서 발현되고 T-세포 활성화를 위해 요구되는 보조자극 신호를 제공한다. CD28은 CD80(B7.1) 및 CD86(B7.2)에 대한 수용체이다. 바람직한 실시양태에서, CD8 $\alpha$  및 CD28은 인간으로부터 유래된다.

- [0025] T-세포 활성화 모이어티는 경막 도메인 이외에 세포내(즉, 세포질) T-세포 신호전달 도메인을 추가로 포함한다. 세포내 T-세포 신호전달 도메인은 CD28 분자, CD3제타( $\zeta$ ) 분자 또는 이의 변경된 버전, 인간 Fc 수용체 감마(FcR $\gamma$ )쇄, CD27 분자, OX40 분자, 4-1BB 분자, 또는 당분야에서 공지되어 있는 다른 세포내 신호전달 분자로부터 취득될 수 있거나 유래될 수 있다. 상기 논의된 바와 같이, CD28은 T-세포 보조자극에 있어서 중요한 T-세포 마커이다. CD3  $\zeta$ 는 TCR과 결합하여 신호를 생성하고 면역수용체 티로신-기초 활성화 모티프(ITAM)를 함유한다. CD137로서도 공지되어 있는 4-1BB는 분화를 촉진하고 T 림프구의 장기간 생존을 향상시키는 강력한 보조자극 신호를 T-세포에게 전달한다. 바람직한 실시양태에서, CD28, CD3  $\zeta$ , 4-1BB, OX40 및 CD27은 인간으로부터 유래된다.
- [0026] 본 발명의 핵산 서열에 의해 코딩된 CAR의 T-세포 활성화 도메인은 전술된 경막 도메인들 중 어느 하나 및 전술된 세포내 T-세포 신호전달 도메인들 중 어느 하나 이상을 임의의 조합으로 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 핵산 서열은 CD28 경막 도메인, 및 CD28 및 CD3  $\zeta$ 의 세포내 T-세포 신호전달 도메인을 포함하는 CAR을 코딩할 수 있다. 대안적으로, 예를 들면, 본 발명의 핵산 서열은 CD8  $\alpha$  경막 도메인, 및 CD28, CD3  $\zeta$ , Fc 수용체 감마(FcR $\gamma$ )쇄 및/또는 4-1BB의 세포내 T-세포 신호전달 도메인을 포함하는 CAR을 코딩할 수 있다.
- [0027] 한 실시양태에서, 본 발명의 핵산 서열은 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자 수용체(GM-CSF 수용체) 신호 서열, 항-BCMA scFv, 인간 CD8  $\alpha$  분자의 힌지 영역 및 경막 영역, 인간 CD28 분자의 세포질 T-세포 신호전달 도메인, 및 인간 CD3  $\zeta$  분자의 T-세포 신호전달 도메인을 5'에서 3' 방향으로 포함하는 CAR을 코딩한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 핵산 서열은 인간 CD8  $\alpha$  신호 서열, 항-BCMA scFv, 인간 CD8  $\alpha$  분자의 힌지 영역 및 경막 영역, 인간 CD28 분자의 세포질 T-세포 신호전달 도메인, 및 인간 CD3  $\zeta$  분자의 T-세포 신호전달 도메인을 5'에서 3' 방향으로 포함하는 CAR을 코딩한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 핵산 서열은 인간 CD8  $\alpha$  신호 서열, 항-BCMA scFv, 인간 CD8  $\alpha$  분자의 힌지 영역 및 경막 영역, 인간 4-1BB 분자의 세포질 T-세포 신호전달 도메인 및/또는 인간 OX40 분자의 세포질 T-세포 신호전달 도메인, 및 인간 CD3  $\zeta$  분자의 T-세포 신호전달 도메인을 5'에서 3' 방향으로 포함하는 CAR을 코딩한다. 예를 들면, 본 발명의 핵산 서열은 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3의 핵산 서열을 포함하거나 이러한 핵산 서열로 구성된다.
- [0028] 본 발명은 본 발명의 핵산 서열에 의해 코딩된 단리된 또는 정제된 키메라 항원 수용체(CAR)도 제공한다.
- [0029] CAR이 그의 생물학적 활성, 예를 들면, 항원에 특이적으로 결합하는 능력, 포유동물에서 병든 세포를 검출하는 능력, 또는 포유동물에서 질환을 치료하거나 예방하는 능력 등을 보유하는 한, 본 발명의 핵산 서열은 임의의 길이의 CAR을 코딩할 수 있다(즉, CAR은 임의의 수의 아미노산을 포함할 수 있다). 예를 들면, CAR은 50개 이상(예를 들면, 60개 이상, 100개 이상 또는 500개 이상)의 아미노산 내지 1,000개 미만(예를 들면, 900개 미만, 800개 미만, 700개 미만 또는 600개 미만)의 아미노산을 포함할 수 있다. 바람직하게는, CAR은 약 50개 내지 약 700개의 아미노산(예를 들면, 약 70개, 약 80개, 약 90개, 약 150개, 약 200개, 약 300개, 약 400개, 약 550개 또는 약 650개의 아미노산), 약 100개 내지 약 500개의 아미노산(예를 들면, 약 125개, 약 175개, 약 225개, 약 250개, 약 275개, 약 325개, 약 350개, 약 375개, 약 425개, 약 450개 또는 약 475개의 아미노산), 또는 상기 값들 중 임의의 2개 값들에 의해 한정된 범위의 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0030] 본원에 기재된 CAR의 기능성 부분을 코딩하는 핵산 서열도 본 발명의 범위에 포함된다. CAR의 언급에서 사용될 때 용어 "기능성 부분"은 본 발명의 CAR의 임의의 부분 또는 단편을 지칭하는데, 이때 상기 부분 또는 단편은 그의 기원이 되는 CAR(또는 CAR)의 생물학적 활성을 보유한다. 예를 들면, 기능성 부분은 모 CAR과 유사한 정도, 동일한 정도 또는 더 높은 정도로 표적 세포를 인식하거나, 질환을 검출하거나, 치료하거나 예방하는 능력을 보유하는 CAR의 부분을 포괄한다. 모 CAR을 코딩하는 핵산 서열의 언급에서, CAR의 기능성 부분을 코딩하는 핵산 서열은 예를 들면, 모 CAR의 약 10%, 25%, 30%, 50%, 68%, 80%, 90% 또는 95% 이상을 포함하는 단백질질을 코딩할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 핵산 서열은 그의 아미노 또는 카복시 말단, 또는 이들 양 말단에서 추가 아미노산을 함유하는 CAR의 기능성 부분을 코딩할 수 있는데, 이때 상기 추가 아미노산은 모 CAR의 아미노산 서열에서 발견되지 않는다. 바람직하게는, 상기 추가 아미노산은 기능성 부분의 생물학적 기능, 예를 들면, 표적 세포를 인식하는 기능, 암을 검출하는 기능, 암을 치료하거나 예방하는 기능 등을 방해하지 않는다. 보다 바람직하게는, 상기 추가 아미노산은 모 CAR의 생물학적 활성에 비해 CAR의 생물학적 활성을 향상시킨다.
- [0032] 본 발명은 전술된 CAR의 기능성 변이체를 코딩하는 핵산 서열도 제공한다. 본원에서 사용된 용어 "기능성 변이체"는 본 발명의 핵산 서열에 의해 코딩된 CAR에 대한 실질적인 또는 상당한 서열 동일성 또는 유사성을 갖는 CAR, 폴리펩티드 또는 단백질을 지칭하는데, 이때 이 기능성 변이체는 그의 CAR의 생물학적 활성을 보유한다.

기능성 변이체는 예를 들면, 모 CAR과 유사한 정도, 동일한 정도 또는 더 높은 정도로 표적 세포를 인식하는 능력을 보유하는, 본원에 기재된 CAR(모 CAR)의 변이체를 포괄한다. 모 CAR을 코딩하는 핵산 서열의 언급에서, CAR의 기능성 변이체를 코딩하는 핵산 서열은 예를 들면, 모 CAR을 코딩하는 핵산 서열과 약 10%, 약 25%, 약 30%, 약 50%, 약 65%, 약 80%, 약 90%, 약 95% 또는 약 99% 동일할 수 있다.

[0033] 기능성 변이체는 예를 들면, 하나 이상의 보존적 아미노산 치환을 갖는 본 발명의 핵산 서열에 의해 코딩된 CAR의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 어구 "보존적 아미노산 치환" 또는 "보존적 돌연변이"는 공통된 성질을 갖는 또 다른 아미노산에 의한 한 아미노산의 치환을 지칭한다. 개별 아미노산들 사이의 공통된 성질을 정의하는 기능적 방법은 상동성 유기체들의 상응하는 단백질들 사이의 아미노산 변화의 표준화된 빈도를 분석하는 것이다(Schulz, G. E. and Schirmer, R. H., Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, New York (1979)). 이러한 분석에 따르면, 아미노산의 군은 군 내의 아미노산들이 서로 우선적으로 교환되어 전체 단백질 구조에 대한 그들의 영향 면에서 서로 가장 유사한 경우 정의될 수 있다(상기 문헌(Schulz, G. E. and Schirmer, R. H.)). 보존적 돌연변이의 예에는 상기 하위군 내의 아미노산들의 아미노산 치환, 예를 들면, 양성 전하가 유지될 수 있도록 라이신에 의한 아르기닌의 치환 및 아르기닌에 의한 라이신의 치환; 음성 전하가 유지될 수 있도록 글루탐산에 의한 아스파르트산의 치환 및 아스파르트산에 의한 글루탐산의 치환; 자유 -OH가 유지될 수 있도록 세린에 의한 쓰레오닌의 치환 및 쓰레오닌에 의한 세린의 치환; 및 자유 -NH<sub>2</sub>가 유지될 수 있도록 글루타민에 의한 아스파라긴의 치환 및 아스파라긴에 의한 글루타민의 치환이 포함된다.

[0034] 대안적으로 또는 추가로, 기능성 변이체는 하나 이상의 비-보존적 아미노산 치환을 갖는 모 CAR의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. "비-보존적 돌연변이"는 상이한 군들 사이의 아미노산 치환, 예를 들면, 라이신에 의한 트립토판의 치환, 페닐알라닌에 의한 세린의 치환 등을 포함한다. 이 경우, 비-보존적 아미노산 치환이 기능성 변이체의 생물학적 활성을 방해하지 않거나 억제하지 않는 것이 바람직하다. 비-보존적 아미노산 치환은 기능성 변이체의 생물학적 활성이 모 CAR에 비해 증가되도록 기능성 변이체의 생물학적 활성을 향상시킬 수 있다.

[0035] 본 발명의 핵산 서열은 하나 이상의 천연 아미노산 대신에 합성 아미노산을 포함하는 CAR(이의 기능성 부분 및 기능성 변이체를 포함함)을 코딩할 수 있다. 이러한 합성 아미노산은 당분야에서 공지되어 있고, 예를 들면, 아미노사이클로헥산 카복실산, 노르류신, α-아미노 n-데칸산, 호모세린, S-아세틸아미노메틸-시스테인, 트랜스-3-하이드록시프로린 및 트랜스-4-하이드록시프로린, 4-아미노페닐알라닌, 4-니트로페닐알라닌, 4-클로로페닐알라닌, 4-카복시페닐알라닌, β-페닐세린, β-하이드록시페닐알라닌, 페닐글리신, α-나프틸알라닌, 사이클로헥실알라닌, 사이클로헥실글리신, 인돌린-2-카복실산, 1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린-3-카복실산, 아미노말론산, 아미노말론산 모노아미드, N'-벤질-N'-메틸-라이신, N',N'-다이벤질-라이신, 6-하이드록시라이신, 오르니틴, α-아미노사이클로헥탄 카복실산, α-아미노사이클로헥산 카복실산, α-아미노사이클로헥탄 카복실산, α-(2-아미노-2-노르보르난)-카복실산, α, γ-다이아미노부티르산, α, β-다이아미노프로피온산, 호모페닐알라닌 및 α-tert-부틸글리신을 포함한다.

[0036] 본 발명의 핵산 서열은 글리코실화되어 있거나, 아미드화되어 있거나, 카복실화되어 있거나, 인산화되어 있거나, 에스터화되어 있거나, N-아실화되어 있거나, 예를 들면, 이황화 가교를 통해 고리화되어 있거나, 산부가염으로 전환되어 있고/있거나 임의적으로 이량체화되어 있거나 중합되어 있거나, 접합되어 있는 CAR(이의 기능성 부분 및 기능성 변이체를 포함함)을 코딩할 수 있다.

[0037] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 핵산 서열은 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11 또는 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하거나 이러한 아미노산 서열로 구성된 CAR을 코딩한다.

[0038] 본 발명의 핵산 서열은 당분야에서 공지되어 있는 방법을 이용함으로써 발생될 수 있다. 예를 들면, 핵산 서열, 폴리펩티드 및 단백질은 표준 제조법 DNA 방법을 이용함으로써 제조법적으로 제조될 수 있다(예를 들면, 문헌(Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3<sup>rd</sup> ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2001) 및 문헌(Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994) 참조). 추가로, CAR을 코딩하는 합성적으로 제조된 핵산 서열은 공급원, 예컨대, 식물, 세균, 곤충 또는 포유동물, 예를 들면, 래트, 인간 등으로부터 단리될 수 있고/있거나 정제될 수 있다. 단리 및 정제 방법은 당분야에서 잘 공지되어 있다. 대안적으로, 본원에 기재된 핵산 서열은 상업적으로 합성될 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명의 핵산 서열은 합성, 제조법, 단리된 및/또는 정제된 핵산 서열일 수 있다.

- [0039] 본 발명은 본 발명의 CAR을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터도 제공한다. 상기 벡터는 예를 들면, 플라스미드, 코스미드, 바이러스 벡터(예를 들면, 레트로바이러스 또는 아데노바이러스) 또는 파지일 수 있다. 적합한 벡터 및 벡터 제조 방법은 당분야에서 잘 공지되어 있다(예를 들면, 상기 문헌(Sambrook et al.) 및 상기 문헌(Ausubel et al.) 참조).
- [0040] 벡터는 CAR을 코딩하는 본 발명의 핵산 서열 이외에 바람직하게는 숙주 세포에서 상기 핵산 서열의 발현을 제어하는 발현 조절 서열, 예컨대, 프로모터, 인핸서, 폴리아데닐화 신호, 전사 종결요소, 내부 리보솜 도입 부위(IRES) 등을 포함한다. 예시적인 발현 조절 서열은 당분야에서 공지되어 있고, 예를 들면, 문헌(Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Vol. 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990))에 기재되어 있다.
- [0041] 다양한 상이한 공급원들로부터의 항시성 프로모터, 유도성 프로모터 및 억제성 프로모터를 비롯한 다수의 프로모터들이 당분야에서 잘 공지되어 있다. 프로모터의 대표적인 공급원은 예를 들면, 바이러스, 포유동물, 곤충, 식물, 효모 및 세균을 포함하고, 이들 공급원들로부터의 적합한 프로모터는 용이하게 입수될 수 있거나, 예를 들면, 수탁기관, 예컨대, ATCC뿐만 아니라 다른 상업적 또는 개별 공급원으로부터 공개적으로 입수가능한 서열에 근거하여 합성적으로 제조될 수 있다. 프로모터는 일방향 프로모터(즉, 한 방향으로 전사를 개시함) 또는 이방향 프로모터(즉, 3' 또는 5' 방향으로 전사를 개시함)일 수 있다. 프로모터의 비-한정적 예에는 예를 들면, T7 세균 발현 시스템, pBAD(araA) 세균 발현 시스템, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, SV40 프로모터 및 RSV 프로모터가 포함된다. 유도성 프로모터는 예를 들면, Tet 시스템(미국 특허 제5,464,758호 및 제5,814,618호), 엑다이손(Ecdysone) 유도성 시스템(문헌(No et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 93: 3346-3351 (1996))), T-REX™ 시스템(인비트로젠(Invitrogen), 미국 캘리포니아주 칼스바드 소재), LACSWITCH™ 시스템(스트라타진(Stratagene), 미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재) 및 Cre-ERT 타목시펜 유도성 재조합효소 시스템(문헌(Indra et al., Nuc. Acid. Res., 27: 4324-4327 (1999)); 문헌(Nuc. Acid. Res., 28: e99 (2000)); 미국 특허 제7,112,715호; 및 문헌(Kramer & Fussenegger, Methods Mol. Biol., 308: 123-144 (2005)))을 포함한다.
- [0042] 본원에서 사용된 용어 "인핸서"는 예를 들면, 그 자신과 작동가능하게 연결되어 있는 핵산 서열의 전사를 증가시키는 DNA 서열을 지칭한다. 인핸서는 핵산 서열의 코딩 영역으로부터 수 킬로염기만큼 떨어져 위치할 수 있고, 조절 인자의 결합, DNA 메틸화의 패턴 또는 DNA 구조의 변화를 매개할 수 있다. 다양한 상이한 공급원들로부터의 많은 수의 인핸서들이 당분야에서 잘 공지되어 있고, (예를 들면, 수탁기관, 예컨대, ATCC뿐만 아니라 다른 상업적 또는 개별 공급원으로부터) 클로닝된 폴리뉴클레오티드로서 입수될 수 있거나 클로닝된 폴리뉴클레오티드 내에 존재한다. 프로모터(예컨대, 통상적으로 사용되는 CMV 프로모터)를 포함하는 다수의 폴리뉴클레오티드도 인핸서 서열을 포함한다. 인핸서는 코딩 서열의 업스트림, 내부 또는 다운스트림에 위치할 수 있다. 용어 "Ig 인핸서"는 면역글로불린(Ig) 좌위 내에 맵핑된 인핸서 영역으로부터 유래된 인핸서 요소를 지칭한다(이러한 인핸서는 예를 들면, 중쇄(뮤) 5' 인핸서, 경쇄(카파) 5' 인핸서, 카파 및 뮤 인트론성 인핸서, 및 3' 인핸서를 포함한다)(일반적으로 문헌(Paul W.E. (ed), Fundamental Immunology, 3<sup>rd</sup> Edition, Raven Press, New York (1993), pages 353-363) 및 미국 특허 제5,885,827호 참조).
- [0043] 벡터는 "선별가능한 마커 유전자"도 포함할 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "선별가능한 마커 유전자"는 핵산 서열이 상응하는 선별제의 존재 하에서 이 핵산 서열을 발현하는 세포의 특이적 선별을 가능하게 하는 경우 이러한 핵산 서열을 지칭한다. 적합한 선별가능한 마커 유전자는 당분야에서 공지되어 있고, 예를 들면, 국제 특허출원 공개 제WO 1992/08796호 및 제WO 1994/28143호; 문헌(Wigler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 3567 (1980)); 문헌(O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 1527 (1981)); 문헌(Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 2072 (1981)); 문헌(Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol., 150: 1 (1981)); 문헌(Santerre et al., Gene, 30: 147 (1984)); 문헌(Kent et al., Science, 237: 901-903 (1987)); 문헌(Wigler et al., Cell, 11: 223 (1977)); 문헌(Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48: 2026 (1962)); 문헌(Lowy et al., Cell, 22: 817 (1980)); 및 미국 특허 제5,122,464호 및 제5,770,359호에 기재되어 있다.
- [0044] 일부 실시양태에서, 벡터는 숙주 세포에서 복제할 수 있고 적절한 선별 압력의 존재 하에서 숙주 세포 내에서 DNA의 염색체외 분절로서 존속하는 "에피솜 발현 벡터" 또는 "에피솜"이다(예를 들면, 문헌(Conese et al., Gene Therapy, 11: 1735-1742 (2004)) 참조). 대표적인 상업적으로 입수가능한 에피솜 발현 벡터는 엡스테인 바(Epstein Barr) 핵 항원 1(EBNA1) 및 엡스테인 바 바이러스(EBV) 복제기점(oriP)을 이용하는 에피솜 플라스미

드를 포함하나 이것으로 한정되지 않는다. 인비트로젠(미국 캘리포니아주 칼스바드 소재)의 벡터 pREP4, pCEP4, pREP7 및 pcDNA3.1, 및 스트라타진(미국 캘리포니아주 라 줄라 소재)의 pBK-CMV는 EBNA1 및 oriP 대신에 T-항원 및 SV40 복제기점을 이용하는 에피솜 벡터의 비-한정적 예를 대표한다.

[0045] 다른 적합한 벡터는 숙주 세포의 DNA 내로 무작위적으로 삽입될 수 있거나 발현 벡터와 숙주 세포의 염색체 사이의 특이적 재조합을 가능하게 하는 재조합 부위를 포함할 수 있는 삽입 발현 벡터를 포함한다. 이러한 삽입 발현 벡터는 원하는 단백질의 발현을 수행하기 위해 숙주 세포의 염색체의 내재성 발현 조절 서열을 이용할 수 있다. 부위 특이적 방식으로 삽입하는 벡터의 예에는 예를 들면, 인비트로젠(미국 캘리포니아주 칼스바드 소재)의 flp-in 시스템(예를 들면, pcDNA<sup>TM</sup>5/FRT), 또는 예컨대, 스트라타진(미국 캘리포니아주 라 줄라 소재)의 pExchange-6 코어 벡터에서 발견될 수 있는 cre-lox 시스템의 성분들이 포함된다. 숙주 세포의 염색체 내로 무작위적으로 삽입하는 벡터의 예에는 예를 들면, 인비트로젠(미국 캘리포니아주 칼스바드 소재)의 pcDNA3.1(T-항원의 부재 하에서 도입될 때), 및 프로메가(Promega)(미국 위스콘신주 매디슨 소재)의 pCI 또는 pFN10A(ACT) FLEXI<sup>TM</sup>가 포함된다.

[0046] 바이러스 벡터도 사용될 수 있다. 대표적인 바이러스 발현 벡터는 아데노바이러스-기초 벡터(예를 들면, 크루셀 인코포레이티드(Crucell, Inc.)(네덜란드 레이덴 소재)로부터 입수가능한 아데노바이러스-기초 Per.C6 시스템), 렌티바이러스-기초 벡터(예를 들면, 라이프 테크놀로지스(Life Technologies)(미국 캘리포니아주 칼스바드 소재)로부터 입수가능한 렌티바이러스-기초 pLP1), 및 레트로바이러스 벡터(예를 들면, 스트라타진(미국 캘리포니아주 라 줄라 소재)으로부터 입수가능한 pFB-ERV 플러스 pCFB-EGSH)를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 바람직한 실시양태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터이다.

[0047] CAR을 코딩하는 본 발명의 핵산을 포함하는 벡터는 그에 의해 코딩된 CAR을 발현할 수 있는 숙주 세포(임의의 적합한 원핵 또는 진핵 세포를 포함함) 내로 도입될 수 있다. 바람직한 숙주 세포는 용이하게 및 신뢰가능하게 성장될 수 있고, 적절하게 빠른 성장 속도를 갖고, 잘 특징구명된 발현 시스템을 갖고, 용이하게 및 효율적으로 형질전환될 수 있거나 형질감염될 수 있는 숙주 세포이다.

[0048] 본원에서 사용된 용어 "숙주 세포"는 발현 벡터를 함유할 수 있는 임의의 종류의 세포를 지칭한다. 숙주 세포는 진핵 세포, 예컨대, 식물, 동물, 진균 또는 조류일 수 있거나, 원핵 세포, 예를 들면, 세균 또는 원생동물일 수 있다. 숙주 세포는 배양된 세포 또는 일차 세포일 수 있다(즉, 유기체, 예를 들면, 인간으로부터 직접적으로 단리될 수 있다). 숙주 세포는 부착된 세포 또는 현탁된 세포, 즉 현탁액에서 성장하는 세포일 수 있다. 적합한 숙주 세포는 당분야에서 공지되어 있고, 예를 들면, DH5 $\alpha$  에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 세포, 중국 햄스터 난소 세포, 원숭이 VERO 세포, COS 세포, HEK293 세포 등을 포함한다. 재조합 발현 벡터를 증폭하거나 복제하기 위해, 숙주 세포는 원핵 세포, 예를 들면, DH5 $\alpha$  세포일 수 있다. 재조합 CAR을 생성하기 위해, 숙주 세포는 포유동물 세포일 수 있다. 숙주 세포는 바람직하게는 인간 세포이다. 숙주 세포는 임의의 종류의 세포일 수 있고 임의의 종류의 조직으로부터 유래될 수 있고 임의의 발생 단계의 세포일 수 있다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 말초 혈액 림프구(PBL), 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 또는 천연 살해(NK) 세포일 수 있다. 바람직하게는, 숙주 세포는 천연 살해(NK) 세포이다. 보다 바람직하게는, 숙주 세포는 T-세포이다. 적합한 포유동물 숙주 세포를 선별하는 방법, 세포의 형질전환, 배양, 증폭, 스크리닝 및 정제 방법은 당분야에서 공지되어 있다.

[0049] 본 발명은 본원에 기재된 CAR을 코딩하는 본 발명의 핵산 서열을 발현하는 단리된 숙주 세포를 제공한다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 T-세포이다. 본 발명의 T-세포는 임의의 T-세포, 예컨대, 배양된 T-세포, 예를 들면, 일차 T-세포, 배양된 T-세포주로부터의 T-세포, 또는 포유동물로부터 획득된 T-세포일 수 있다. T-세포가 포유동물로부터 획득되는 경우, T-세포는 혈액, 골수, 림프절, 흉선, 또는 다른 조직 또는 체액을 포함하나 이들로 한정되지 않는 다수의 공급원으로부터 획득될 수 있다. T-세포는 농축될 수도 있거나 정제될 수도 있다. T-세포는 바람직하게는 인간 T-세포이다(예를 들면, 인간으로부터 단리된다). T-세포는 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 이중 양성 T-세포, CD4<sup>+</sup> 헬퍼 T-세포, 예를 들면, Th<sub>1</sub> 세포 및 Th<sub>2</sub> 세포, CD8<sup>+</sup> T-세포(예를 들면, 세포독성 T-세포), 중앙 침습 세포, 기억 T-세포, 무경험 T-세포 등을 포함하나 이들로 한정되지 않는 임의의 발생 단계의 T-세포일 수 있다. 한 실시양태에서, T-세포는 CD8<sup>+</sup> T-세포 또는 CD4<sup>+</sup> T-세포이다. T-세포주는 예를 들면, 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(ATCC, 미국 버지니아주 마나사스 소재) 및 저먼 콜렉션 오프 마이크로오가니즘 앤드 셀 컬처(DSMZ)로부터 입수가능하고, 예를 들면, Jurkat 세포(ATCC TIB-152), Sup-T1 세포(ATCC CRL-1942), RPMI 8402 세포(DSMZ ACC-290), Karpas 45 세포(DSMZ ACC-545) 및 이들의 유도체를 포함한다.

- [0050] 또 다른 실시양태에서, 숙주 세포는 천연 살해(NK) 세포이다. NK 세포는 선천성 면역 시스템에서 일정한 역할을 수행하는 세포독성 림프구의 일종이다. NK 세포는 큰 과립 림프구로서 정의되고, B 림프구 및 T 림프구도 발생시키는 공통된 림프 원시세포로부터 분화된 세 번째 종류의 세포를 구성한다(예를 들면, 문헌(Immunobiology, 5<sup>th</sup> ed., Janeway et al., eds., Garland Publishing, New York, NY (2001)) 참조). NK 세포는 골수, 림프절, 비장, 편도 및 흉선에서 분화하고 성숙한다. 성숙 후, NK 세포는 구별되는 세포독성 과립을 갖는 큰 림프구로서 순환계 내로 들어간다. NK 세포는 일부 비정상 세포, 예를 들면, 일부 종양 세포 및 바이러스에 감염된 세포를 인식하여 사멸시킬 수 있고, 세포내 병원체에 대한 선천성 면역 방어에 있어서 중요한 것으로 생각된다. T-세포와 관련하여 전술된 바와 같이, NK 세포는 임의의 NK 세포, 예컨대, 배양된 NK 세포, 예를 들면, 일차 NK 세포, 배양된 NK 세포주로부터의 NK 세포, 또는 포유동물로부터 수득된 NK 세포일 수 있다. NK 세포가 포유동물로부터 수득되는 경우, NK 세포는 혈액, 골수, 림프절, 흉선, 또는 다른 조직 또는 체액을 포함하나 이들로 한정되지 않는 다수의 공급원들로부터 수득될 수 있다. NK 세포는 농축될 수도 있거나 정제될 수도 있다. NK 세포는 바람직하게는 인간 NK 세포일 수 있다(예를 들면, 인간으로부터 단리될 수 있다). NK 세포주는 예를 들면, 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(ATCC, 미국 버지니아주 마나사스 소재)으로부터 입수가 가능하고, 예를 들면, NK-92 세포(ATCC CRL-2407), NK92MI 세포(ATCC CRL-2408) 및 이들의 유도체를 포함한다.
- [0051] CAR을 코딩하는 본 발명의 핵산 서열은 "형질감염", "형질전환" 또는 "형질도입"에 의해 세포 내로 도입될 수 있다. 본원에서 사용된 "형질감염", "형질전환" 또는 "형질도입"은 물리적 또는 화학적 방법을 이용하여 하나 이상의 외재성 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입하는 것을 지칭한다. 많은 형질감염 기법들이 당분야에서 공지되어 있고, 예를 들면, 칼슘 포스페이트 DNA 공-침전(예를 들면, 문헌(Murray E.J. (ed.), Methods in Molecular Biology, Vol. 7, Gene Transfer and Expression Protocols, Humana Press (1991)) 참조); DEAE-덱스트란; 전기천공; 양이온성 리포솜-매개된 형질감염; 텅스텐 입자-촉진된 마이크로입자 충격(문헌(Johnston, Nature, 346: 776-777 (1990))); 및 스트론튬 포스페이트 DNA 공-침전(문헌(Brash et al., Mol. Cell Biol., 7: 2031-2034 (1987)))을 포함한다. 파지 또는 바이러스 벡터는 적합한 패키징 세포(이의 대다수가 상업적으로 입수가 가능함)에서의 감염성 입자의 성장 후 숙주 세포 내로 도입될 수 있다.
- [0052] 특정 이론 또는 기작에 구속되지 않지만, 본 발명의 핵산 서열에 의해 코딩된 CAR은 BCMA에 대한 항원 특이적 반응을 이끌어냄으로써 하기 활성들 중 하나 이상의 활성을 제공한다: BCMA 발현 암세포를 표적화하여 파괴하는 활성, 암세포를 감소시키거나 제거하는 활성, 종양 부위(들)로의 면역 세포의 침습을 용이하게 하는 활성, 및 항암 반응을 향상/연장시키는 활성. 따라서, 본 발명은 전술된 단리된 T-세포들 또는 천연 살해 세포들 중 하나 이상의 세포를, BCMA를 발현하는 다발성 골수종 세포의 집단과 접촉시키는 단계를 포함하는, 다발성 골수종 세포를 파괴하는 방법을 제공하고, 이때 CAR이 생성되어 다발성 골수종 세포 상의 BCMA에 결합하고 다발성 골수종 세포가 파괴된다. 본원에 논의된 바와 같이, 형질 세포 골수종 또는 칼러병(Kahler's disease)으로서도 공지되어 있는 다발성 골수종은 통상적으로 항체의 생성을 담당하는 백혈구 세포의 일종인 형질 세포의 암이다(문헌(Raab et al., Lancet, 374: 324-329 (2009))). 다발성 골수종은 해마다 100,000명 당 1명 내지 4명에게 영향을 미친다. 이 질환은 남성에서 더 흔하고, 아직 미궁지된 원인으로 백인 미국인보다 흑인 미국인에서 2배 더 흔하다. 다발성 골수종은 적어도 흔한 혈액 악성종양(14%)이고 모든 암의 1%를 차지한다(상기 문헌(Raab et al.)). 다발성 골수종의 치료는 전형적으로 고용량 화학치료에 이어서 조절 줄기 세포 이식(동종이계 또는 자가)을 포함하나, 이러한 치료를 받은 다발성 골수종 환자들에서 높은 재발률이 흔하다. 상기 논의된 바와 같이, BCMA는 다발성 골수종 세포에 의해 고도로 발현된다(예를 들면, 상기 문헌(Novak et al.), 상기 문헌(Neri et al.), 상기 문헌(Bellucci et al.) 및 상기 문헌(Moreaux et al.) 참조).
- [0053] 본원에 기재된 항-BCMA CAR을 코딩하는 본 발명의 핵산 서열을 발현하는 하나 이상의 단리된 T-세포는 생체외, 생체내 또는 시험관내에서 BCMA를 발현하는 다발성 골수종 세포의 집단과 접촉될 수 있다. "생체외" 방법은 천연 조건의 최소한의 변경을 갖는 유기체 외부의 인공 환경 내의 세포 또는 조직 내에서 또는 상에서 수행되는 방법을 지칭한다. 대조적으로, 용어 "생체내" 방법은 정상적인 온전한 상태로 존재하는 살아있는 유기체 내에서 수행되는 방법을 지칭하는 반면, "시험관내 방법"은 그의 통상적인 생물학적 환경으로부터 단리되어 있는 유기체의 성분들을 사용함으로써 수행된다. 본 발명의 방법은 바람직하게는 생체외 및 생체내 성분을 사용한다. 이와 관련하여, 예를 들면, 전술된 단리된 T-세포는 항-BCMA CAR을 코딩하는 본 발명의 핵산 서열을 발현하는 조건 하에서 생체외에서 배양된 후, 다발성 골수종에 의해 영향을 받은 포유동물(바람직하게는 인간)에게 전달될 수 있다. 이러한 세포 전달 방법은 공여자 면역 유래의 세포의 기능성을 새로운 숙주에게 전달하기 위해 면역 유래의 세포를 새로운 수용자 숙주에게 수동적으로 전달하는 "입양 세포 전달(ACT)"로서 당분야에서 지칭된다. 혈액암, 예컨대, 골수종을 비롯한 다양한 종류의 암들을 치료하기 위한 입양 세포 전달 방법은 당분야에서

공지되어 있고, 예를 들면, 문헌(Gattinoni et al., Nat. Rev. Immunol, 6(5): 383-393 (2006)), 문헌(June, CH, J. Clin. Invest., 117(6): 1466-76 (2007)), 문헌(Rapoport et al., Blood, 117(3): 788-797 (2011)) 및 문헌(Barber et al., Gene Therapy, 18: 509-516 (2011))에 개시되어 있다.

[0054] 본 발명은 호지킨 림프종 세포를 파괴하는 방법도 제공한다. 호지킨 림프종(종래 호지킨병으로서 공지됨)은 리드-스틴버그(Reed-Sternberg) 세포로서 지칭되는 일종의 다핵 세포의 존재를 특징으로 하는 면역 시스템의 암이다. 2종의 주요 호지킨 림프종은 고전적인 호지킨 림프종 및 결절성 림프구-우세 호지킨 림프종을 포함한다. 호지킨 림프종은 현재 방사선치료, 화학치료 또는 조절 줄기 세포 이식으로 치료되는데, 이때 치료는 환자의 연령 및 성별, 및 질환의 단계, 용적 및 조직학적 하위종류에 따라 선택된다. BCMA 발현은 호지킨 림프종 세포의 표면 상에서 검출되었다(예를 들면, 문헌(Chiu et al., Blood, 109(2): 729-739 (2007)) 참조).

[0055] T-세포 또는 NK 세포가 포유동물에게 투여될 때, 상기 세포는 상기 포유동물에 대한 동종이계 또는 자가 세포일 수 있다. "자가" 투여 방법에서, 세포(예를 들면, 혈액 형성 줄기 세포 또는 림프구)는 포유동물로부터 제거되고 저장되고(그리고 임의적으로 변경되고) 동일한 포유동물에게 다시 돌려보내진다. "동종이계" 투여 방법에서, 포유동물은 유전적으로 유사하지만 동일하지 않은 공여자로부터 세포(예를 들면, 혈액 형성 줄기 세포 또는 림프구)를 제공받는다. 바람직하게는, 세포는 포유동물에 대한 자가 세포이다.

[0056] T-세포 또는 NK 세포는 바람직하게는 조성물, 예컨대, 약학 조성물의 형태로 인간에게 투여된다. 대안적으로, CAR을 코딩하는 본 발명의 핵산 서열 또는 CAR 코딩 핵산 서열을 포함하는 벡터는 조성물, 예컨대, 약학 조성물로 제제화되어 인간에게 투여될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 본 발명의 CAR을 발현하는 T-세포 또는 NK 세포의 집단을 포함할 수 있다. 상기 약학 조성물은 본 발명의 CAR을 발현하는 본 발명의 핵산 서열 또는 숙주 세포 이외에 다른 약학적 활성제 또는 약물, 예컨대, 화학치료제, 예를 들면, 아스파라기나제, 부설판, 카보플라틴, 시스플라틴, 다우노루비신, 독소루비신, 플루오로우라실, 젬시타빈, 하이드록시우레아, 메토타렉세이트, 파클리탁셀, 리톡시맵, 빈블라스틴, 빈크리스틴 등을 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 약학 조성물은 본 발명의 CAR을 발현하는 단리된 T-세포 또는 NK 세포, 보다 바람직하게는 본 발명의 CAR을 발현하는 T-세포 또는 NK 세포의 집단을 포함한다.

[0057] 본 발명의 T-세포 또는 NK 세포는 염, 예를 들면, 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 제공될 수 있다. 적합한 약학적으로 허용가능한 산부가염은 무기산, 예컨대, 염화수소산, 브롬화수소산, 인산, 메타인산, 질산 및 황산, 및 유기산, 예컨대, 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 말산, 락트산, 푸마르산, 벤조산, 글리콜산, 글루콘산, 석신산 및 아릴설폰산, 예를 들면, *p*-톨루엔설폰산으로부터 유도된 산부가염을 포함한다.

[0058] 담체의 선택은 부분적으로 CAR을 발현하는 본 발명의 구체적인 핵산 서열, 벡터 또는 숙주 세포뿐만 아니라, CAR을 발현하는 본 발명의 핵산 서열, 벡터 또는 숙주 세포를 투여하는 데에 이용되는 구체적인 방법에 의해 결정될 것이다. 따라서, 본 발명의 약학 조성물의 다양한 적합한 제제들이 존재한다. 예를 들면, 약학 조성물은 보존제를 함유할 수 있다. 적합한 보존제는 예를 들면, 메틸파라벤, 프로필파라벤, 나트륨 벤조에이트 및 벤즈알코늄 클로라이드를 포함할 수 있다. 임의적으로 2종 이상의 보존제들의 혼합물이 사용될 수 있다. 보존제 또는 이의 혼합물은 전형적으로 총 조성물의 중량을 기준으로 약 0.0001% 내지 약 2%의 양으로 존재한다.

[0059] 추가로, 완충제가 조성물에서 사용될 수 있다. 적합한 완충제는 예를 들면, 시트르산, 나트륨 시트레이트, 인산, 칼슘 포스페이트, 및 다양한 다른 산 및 염을 포함한다. 임의적으로 2종 이상의 완충제들의 혼합물이 사용될 수 있다. 완충제 또는 이의 혼합물은 총 조성물의 중량을 기준으로 약 0.001 % 내지 약 4%의 양으로 존재한다.

[0060] 투여가능한(예를 들면, 비경구 투여가능한) 조성물의 제조 방법은 당업자에게 공지되어 있고, 예를 들면, 문헌(Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21<sup>st</sup> ed. (May 1, 2005))에 더 상세히 기재되어 있다.

[0061] CAR을 코딩하는 본 발명의 핵산 서열, 또는 CAR을 발현하는 숙주 세포를 포함하는 조성물은 봉입 복합체, 예컨대, 사이클로덱스트린 봉입 복합체 또는 리포솜으로서 제제화될 수 있다. 리포솜은 숙주 세포(예를 들면, T-세포 또는 NK 세포) 또는 본 발명의 핵산 서열을 특정 조직으로 표적화하는 기능을 수행할 수 있다. 리포솜은 본 발명의 핵산 서열의 반감기를 증가시키는 데에 사용될 수도 있다. 많은 방법들, 예컨대, 문헌(Szoka et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9: 467 (1980)), 및 미국 특허 제4,235,871호, 제4,501,728호, 제4,837,028호 및 제5,019,369호에 기재된 방법들이 리포솜의 제조를 위해 이용될 수 있다.

[0062] 본 발명의 조성물의 전달이 치료될 부위의 감각 전에 이러한 감각을 야기하기에 충분한 시간 동안 일어나도록

상기 조성물은 시간-방출, 지연 방출 및 지속 방출 전달 시스템을 이용할 수 있다. 많은 종류의 방출 전달 시스템이 당업자에게 의해 이용될 수 있고 당업자에게 공지되어 있다. 이러한 시스템은 조성물의 반복된 투여를 피함으로써 대상체 및 의사의 편의를 증가시킬 수 있고, 본 발명의 특정 조성물 실시양태에 특히 적합할 수 있다.

[0063] 상기 조성물은 바람직하게는 CAR을 코딩하는 본 발명의 핵산 서열을 발현하는 숙주 세포, 또는 본 발명의 핵산 서열을 포함하는 벡터를 골수종 또는 호지킨 림프종의 치료 또는 예방에 효과적인 양으로 포함한다. 본 발명에서 사용된 용어 "치료", "치료하는" 등은 원하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 수득하는 것을 지칭한다. 바람직하게는, 상기 효과는 치료, 즉 질환 및/또는 이 질환에 기인하는 불리한 증상을 부분적으로 또는 완전히 치유하는 효과이다. 이를 위해, 본 발명의 방법은 CAR을 코딩하는 본 발명의 핵산 서열을 발현하는 숙주 세포, 또는 본 발명의 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는 조성물을 "치료 유효량"으로 투여하는 단계를 포함한다. "치료 유효량"은 필요한 용량에서 필요한 시간 동안 원하는 치료 결과를 달성하는 데에 효과적인 양을 지칭한다. 치료 유효량은 질환 상태, 개체의 연령, 성별 및 체중, 및 개체에서 원하는 반응을 이끌어내는 CAR의 능력과 같은 인자에 따라 상이할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 CAR의 치료 유효량은 다발성 골수종 세포상의 BCMA에 결합하여 이를 파괴하는 양이다.

[0064] 대안적으로, 약리학적 및/또는 생리학적 효과는 예방, 즉 질환 또는 이의 증상을 완전히 또는 부분적으로 예방하는 효과일 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명의 방법은 CAR을 코딩하는 본 발명의 핵산 서열을 발현하는 숙주 세포, 또는 본 발명의 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는 조성물을 "예방 유효량"으로 다발성 골수종 또는 호지킨 림프종에 취약한 포유동물에게 투여하는 단계를 포함한다. "예방 유효량"은 필요한 용량에서 필요한 시간 동안 원하는 예방 결과(예를 들면, 질환 발병의 예방)를 달성하는 데에 효과적인 양을 지칭한다.

[0065] 포유동물(예를 들면, 인간)에게 투여되는 숙주 세포의 전형적인 양은 예를 들면, 100만 내지 1000억 개의 세포일 수 있으나, 이 예시적 범위보다 낮거나 높은 양도 본 발명의 범위 내에 있다. 예를 들면, 본 발명의 숙주 세포의 1일 용량은 약 100만 내지 약 500억 개의 세포(예를 들면, 약 500만 개의 세포, 약 2500만 개의 세포, 약 5억 개의 세포, 약 10억 개의 세포, 약 50억 개의 세포, 약 200억 개의 세포, 약 300억 개의 세포, 약 400억 개의 세포, 또는 상기 값들 중 임의의 2개 값들에 의해 한정된 범위), 바람직하게는 약 1000만 내지 약 1000억 개의 세포(예를 들면, 약 2000만 개의 세포, 약 3000만 개의 세포, 약 4000만 개의 세포, 약 6000만 개의 세포, 약 7000만 개의 세포, 약 8000만 개의 세포, 약 9000만 개의 세포, 약 100억 개의 세포, 약 250억 개의 세포, 약 500억 개의 세포, 약 750억 개의 세포, 약 900억 개의 세포, 또는 상기 값들 중 임의의 2개 값들에 의해 한정된 범위), 보다 바람직하게는 약 1억 내지 약 500억 개의 세포(예를 들면, 약 1.2억만 개의 세포, 약 2.5억만 개의 세포, 약 3.5억만 개의 세포, 약 4.5억만 개의 세포, 약 6.5억만 개의 세포, 약 8억 개의 세포, 약 9억 개의 세포, 약 30억 개의 세포, 약 300억 개의 세포, 약 450억 개의 세포, 또는 상기 값들 중 임의의 2개 값들에 의해 한정된 범위)일 수 있다.

[0066] 치료 또는 예방 효능은 치료된 환자의 주기적 평가에 의해 모니터링될 수 있다. 수일 또는 이보다 오랜 기간에 걸친 반복된 투여의 경우, 치료는 상태에 따라 질환 증상의 원하는 억제가 일어날 때까지 반복된다. 그러나, 다른 투약 요법이 유용할 수 있고 본 발명의 범위 내에 있다. 원하는 용량은 조성물의 단위 볼루스 투여, 조성물의 다회 볼루스 투여 또는 조성물의 연속 관주 투여에 의해 전달될 수 있다.

[0067] 본 발명의 CAR 코딩 핵산 서열을 발현하는 숙주 세포, 또는 본 발명의 CAR 코딩 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는 조성물은 경구, 정맥내, 복강내, 피하, 폐, 경피, 근육내, 비내, 협측, 설하 또는 좌약 투여를 비롯한 표준 투여 기법의 이용을 통해 포유동물에게 투여될 수 있다. 상기 조성물은 바람직하게는 비경구 투여에 적합하다. 본원에서 사용된 용어 "비경구"는 정맥내, 근육내, 피하, 직장, 질 및 복강내 투여를 포함한다. 보다 바람직하게는, 조성물은 정맥내, 복강내 또는 피하 주사에 의한 말초 시스템 전달의 이용을 통해 포유동물에게 투여된다.

[0068] 본 발명의 CAR 코딩 핵산 서열을 발현하는 숙주 세포, 또는 본 발명의 CAR 코딩 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는 조성물은 포유동물에게 공-투여될 수 있는 하나 이상의 추가 치료제와 함께 투여될 수 있다. "공-투여"는 본 발명의 CAR이 하나 이상의 추가 치료제의 효과를 향상시킬 수 있거나 하나 이상의 추가 치료제가 본 발명의 CAR의 효과를 향상시킬 수 있기에 충분히 가까운 시간 동안 상기 하나 이상의 추가 치료제, 및 본 발명의 숙주 세포 또는 본 발명의 벡터를 포함하는 조성물을 투여하는 것을 의미한다. 이와 관련하여, 본 발명의 숙주 세포 또는 본 발명의 벡터를 포함하는 조성물이 첫 번째로 투여될 수 있고 하나 이상의 추가 치료제가 두 번째로 투여될 수 있거나, 하나 이상의 추가 치료제가 첫 번째로 투여될 수 있고 본 발명의 숙주 세포 또는 본

발명의 백터를 포함하는 조성물이 두 번째로 투여될 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 숙주 세포 또는 본 발명의 백터를 포함하는 조성물 및 하나 이상의 추가 치료제는 동시에 투여될 수 있다. 본 발명의 숙주 세포 또는 본 발명의 백터를 포함하는 조성물과 공-투여될 수 있는 치료제의 일례는 IL-2이다.

[0069] 본 발명의 CAR 코딩 핵산 서열을 발현하는 숙주 세포, 또는 본 발명의 CAR 코딩 핵산 서열을 포함하는 백터를 포함하는 조성물이 일단 포유동물(예를 들면, 인간)에게 투여되면, CAR의 생물학적 활성은 당분야에서 공지되어 있는 임의의 적합한 방법에 의해 측정될 수 있다. 본 발명의 방법에 따르면, CAR은 다발성 골수종 세포 상의 BCMA에 결합하고, 다발성 골수종 세포는 파괴된다. 다발성 골수종 세포의 표면 상에서의 CAR과 BCMA의 결합은 예를 들면, ELISA 및 유동 세포측정을 비롯한, 당분야에서 공지되어 있는 임의의 적합한 방법을 이용함으로써 분석될 수 있다. 다발성 골수종 세포를 파괴하는 CAR의 능력은 당분야에서 공지되어 있는 임의의 적합한 방법, 예컨대, 문헌(Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009)) 및 문헌(Herman et al. J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004))에 기재된 세포독성 분석을 이용함으로써 측정될 수 있다. CAR의 생물학적 활성은 일부 사이토카인, 예컨대, CD107a, IFN  $\gamma$ , IL-2 및 TNF의 발현을 분석함으로써 측정될 수 있다.

[0070] 당업자는 CAR의 치료 또는 예방 효능이 변경을 통해 증가되도록 본 발명의 CAR 코딩 핵산 서열을 임의의 수의 방식으로 변경할 수 있다는 것을 용이하게 인식할 것이다. 예를 들면, CAR은 직접적으로 또는 연결체를 통해 간접적으로 표적화 모이어티에 접합될 수 있다. 화합물, 예를 들면, CAR을 표적화 모이어티에 접합시키는 절차는 당분야에서 공지되어 있다. 예를 들면, 문헌(Wadwa et al., J. Drug Targeting 3: 111 (1995)) 및 미국 특허 제5,087,616호를 참조한다.

[0071] 하기 실시예는 본 발명을 더 설명하지만, 당연히 본 발명의 범위를 어떠한 방식으로든 한정하는 것으로서 해석되어서는 안 된다.

[0072] **실시예**

[0073] **실시예 1**

[0074] 본 실시예는 인간 세포에서 BCMA의 발현 패턴을 입증한다.

[0075] BCMA 특이적 프라이머 및 프로브 세트(라이프 테크놀로지스(Life Technologies), 미국 캘리포니아주 칼스바드 소재)를 사용하여 인간 주요 조직 qPCR 패널 II(오리진 테크놀로지스(Origine Technologies), 미국 매릴랜드주 록빌 소재)에 포함된 다양한 정상 조직들의 cDNA 샘플의 패널에 대한 정량 증합효소 연쇄 반응(qPCR)을 수행하였다. 진행된 다발성 골수종을 갖는 환자로부터 절제된 형질세포종의 세포로부터 수득된 cDNA를 양성 대조군으로서 분석하였다. RNeasy 미니 키트(키아젠 인코포레이티드(Qiagen, Inc.), 미국 캘리포니아주 발렌시아 소재)를 사용하여 형질세포종 세포로부터 RNA를 추출하였고, 표준 방법을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 전장 BCMA cDNA(오리진 테크놀로지스, 미국 매릴랜드주 록빌 소재)을 코딩하는 플라스미드를 담체 DNA로 희석함으로써 BCMA qPCR에 대한 표준 곡선을 생성하였다. qPCR은 반응 당  $10^2$ 개 내지  $10^9$ 개 카피 수의 BCMA를 정확히 검출하였다. 택만(Taqman)  $\beta$ -액틴 프라이머 및 프로브 키트(라이프 테크놀로지스, 미국 캘리포니아주 칼스바드 소재)를 사용하여 동일한 조직에서  $\beta$ -액틴 cDNA 카피의 수를 정량하였다.  $\beta$ -액틴 플라스미드의 일련의 희석물을 증폭함으로써  $\beta$ -액틴 표준 곡선을 생성하였다. 모든 qPCR 반응을 로슈 라이트사이클러(Roche LightCycler)480 기계(로슈 어플라이드 사이언시스(Roche Applied Sciences), 미국 인디애나주 인디애나폴리스 소재) 상에서 수행하였다.

[0076] qPCR 분석의 결과는 도 1a 및 1b에 도시되어 있다. 형질세포종 샘플의 93%의 세포가 유동 세포측정에 의해 확인되었을 때 형질 세포이었다. 형질세포종 샘플에서의 BCMA 발현은 임의의 다른 조직에서의 BCMA 발현보다 현저히 더 높았다. BCMA cDNA를 여러 조혈 조직, 예컨대, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 골수, 비장, 림프절 및 편도에서 검출하였다. 낮은 수준의 BCMA cDNA를 대다수의 위장 장기, 예컨대, 십이지장, 직장 및 위에서 검출하였다. 위장 장기에서의 BCMA 발현은 장 관련 림프 조직, 예컨대, 고유판(lamina propria) 및 페이어 패치(Peyer's Patches)에 존재하는 형질 세포 및 B-세포의 결과일 수 있다(예를 들면, 문헌(Brandtzaeg, Immunological Investigations, 39(4-5): 303-355 (2010)) 참조). 낮은 수준의 BCMA cDNA는 정소 및 기관에서도 검출되었다. 기관에서 검출된 낮은 수준의 BCMA cDNA는 기관의 고유판에서의 형질 세포의 존재에 기인할 수 있다(예를 들면, 문헌(Soutar, Thorax, 31(2): 158-166 (1976)) 참조).

[0077] 유동 세포측정을 이용하여 다발성 골수종 세포주 H929, U266 및 RPMI8226을 비롯한 다양한 종류의 세포들의 표면 상에서의 BCMA의 발현을 더 특징구명하였다(도 2의 A 내지 L 참조). 다발성 골수종 세포주 H929, U266 및

RPMI8226 모두가 세포 표면 BCMA를 발현하였다. 대조적으로, 육종 세포주 TC71, T-세포 백혈병 세포주 CCRF-CEM 및 신장 세포주 293T-17은 세포 표면 BCMA를 발현하지 않았다. 일차 CD34<sup>+</sup> 조혈 세포, 일차 작은 기도 상피 세포, 일차 기관지 상피 세포 및 일차 장 상피 세포 모두가 세포 표면 BCMA 발현을 결여하였다.

[0078] 본 실시예의 결과는 BCMA가 다발성 골수종 세포의 표면 상에서 발현되고 정상 조직에서 제한된 발현 패턴을 갖는다는 것을 입증한다.

[0079] 실시예 2

[0080] 본 실시예는 항-BCMA 키메라 항원 수용체(CAR)를 코딩하는 본 발명의 핵산 서열의 구축을 기술한다.

[0081] "C12A3.2" 및 "C11D5.3"으로서 명명된 2개의 마우스 항-인간-BCMA 항체들의 항체 서열을 국제 특허출원 공개 제 WO 2010/104949호(Kalled et al.)로부터 입수하였다. 이들 항체들의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 사용하여 하기 일반 구조를 갖는 단일쇄 가변 단편(scFv)을 디자인하였다:

[0082] 경쇄 가변 영역 - 연결체 - 중쇄 가변 영역

[0083] 연결체는 하기 아미노산 서열을 가졌다: GSTSGSGKPGSGEGSTKG(서열번호 7)(예를 들면, 문헌(Cooper et al., Blood, 101(4): 1637-1644 (2003)) 참조).

[0084] 2개의 키메라 항원 수용체들을 코딩하는 DNA 서열들을 디자인하였는데, 이들 각각은 5'에서 3' 방향으로 하기 요소들을 함유하였다: CD8 $\alpha$  신호 서열, 전술된 항-BCMA scFv, 인간 CD8 $\alpha$  분자의 힌지 영역 및 경막 영역, CD28 분자의 세포질 부분 및 CD3 $\zeta$  분자의 세포질 부분. 이들 CAR 코딩 핵산 서열의 개략도는 도 3의 A에 제시되어 있다. C12A3.2 및 C11D5.3의 가변 영역을 포함하는 CAR들을 각각 항-bcma1 및 항-bcma2로서 명명하였다.

[0085] 전술된 항-bcma2 CAR에 근거한 5개의 추가 키메라 항원 수용체들을 코딩하는 DNA 서열들을 디자인하였고, 이들 각각은 상이한 신호 서열 및 T-세포 활성화 도메인을 함유하였다. 이와 관련하여, 8ss-항-bcma2 CAR은 5'에서 3' 방향으로 하기 요소들을 함유하였다: CD8 $\alpha$  신호 서열, scFv, 인간 CD8 $\alpha$  분자의 힌지 영역 및 경막 영역, CD28 분자의 세포질 부분 및 CD3 $\zeta$  분자의 세포질 부분. G-항-bcma2 CAR은 5'에서 3' 방향으로 하기 요소들을 함유하였다: 인간 GM-CSF 수용체 신호 서열, scFv, 인간 CD8 $\alpha$  분자의 힌지 영역 및 경막 영역, CD28 분자의 세포질 부분 및 CD3 $\zeta$  분자의 세포질 부분. 항-bcma2-BB CAR은 5'에서 3' 방향으로 하기 요소들을 함유하였다: CD8 $\alpha$  신호 서열, scFv, 인간 CD8 $\alpha$  분자의 힌지 영역 및 경막 영역, 4-1BB 분자의 세포질 부분 및 CD3 $\zeta$  분자의 세포질 부분. 항-bcma2-OX40 CAR은 5'에서 3' 방향으로 하기 요소들을 함유하였다: CD8 $\alpha$  신호 서열, scFv, 인간 CD8 $\alpha$  분자의 힌지 영역 및 경막 영역, OX40 분자의 세포질 부분(예를 들면, 문헌(Latza et al., European Journal of Immunology, 24: 677-683 (1994)) 참조) 및 CD3 $\zeta$  분자의 세포질 부분. 항-bcma2-BBOX40은 5'에서 3' 방향으로 하기 요소들을 함유하였다: CD8 $\alpha$  신호 서열, scFv, 인간 CD8 $\alpha$  분자의 힌지 영역 및 경막 영역, 4-1BB 분자의 세포질 부분, OX40 분자의 세포질 영역 및 CD3 $\zeta$  분자의 세포질 부분. 7개의 CAR 서열들 각각에 존재하는 요소들은 표 1에 기재되어 있다.

표 1

CAR	서열번호 (아미노산)	신호 서열	힌지 영역 및 경막 영역	세포내 T-세포 신호전달 도메인
항-bcma1	4	인간 CD8 $\alpha$	인간 CD8 $\alpha$	CD28 CD3 $\zeta$
항-bcma2	5	인간 CD8 $\alpha$	인간 CD8 $\alpha$	CD28 CD3 $\zeta$
G-항-bcma2	8	GM-CSF 수용체	인간 CD8 $\alpha$	CD28 CD3 $\zeta$
8ss-항-bcma2	9	인간 CD8 $\alpha$	인간 CD8 $\alpha$	CD28 CD3 $\zeta$
항-bcma2-BB	10	인간 CD8 $\alpha$	인간 CD8 $\alpha$	4-1BB CD3 $\zeta$
항-bcma2-OX40	11	인간 CD8 $\alpha$	인간 CD8 $\alpha$	OX40 CD3 $\zeta$
항-bcma2-BBOX40	12	인간 CD8 $\alpha$	인간 CD8 $\alpha$	4-1BB OX40 CD3 $\zeta$

[0086]

- [0087] CD8  $\alpha$ , CD28, CD3  $\zeta$ , 4-1BB(CD137) 및 OX40(CD134)을 위해 사용된 서열들을 공개적으로 이용가능한 국립 생물공학 정보 센터(NCBI) 데이터베이스로부터 입수하였다.
- [0088] 당분야에서 공지되어 있는 방법, 예컨대, 문헌(Kochenderfer et al., J. Immunology, 32(7): 689-702 (2009)) 및 문헌(Zhao et al., J. Immunology, 183(9): 5563-5574 (2009))에 기재된 방법을 이용하여 CAR 코딩 핵산 서열을 발생시켰다. 적절한 제한 부위와 함께 진아트(GeneArt)<sup>TM</sup> 기술(라이프 테크놀로지스, 미국 캘리포니아주 칼스바드 소재)을 이용하여 각각의 CAR을 코딩하는 핵산 서열을 코돈 최적화하고 합성하였다.
- [0089] 항-bcma1 CAR 및 항-bcma2 CAR을 코딩하는 서열들을 pRRLSIN.cPPT.MSCV.coDMF5.oPRE로서 명명된 렌티바이러스 벡터 플라스미드 내로 라이게이션시켰다(예를 들면, 문헌(Yang et al., J. Immunotherapy, 33(6): 648-658 (2010)) 참조). 표준 방법을 이용하여 이 벡터의 coDMF5 부분을 CAR 코딩 핵산 서열로 치환시켰다. 2개의 발생된 항-BCMA CAR 벡터들을 pRRLSIN.cPPT.MSCV.항-bcma1.oPRE 및 pRRLSIN.cPPT.MSCV.항-bcma2.oPRE로서 명명하였다. 헵텐 2,4,6-트라이니트로페닐을 인식하는 SP6 scFv를 함유하는 음성 대조군 CAR도 구축하였다(예를 들면, 문헌(Gross et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86(24): 10024-10028 (1989)) 참조). 이 CAR을 SP6 으로서 지칭하였다. SP6 CAR을 항-BCMA CAR과 동일한 렌티바이러스 벡터 내로 클로닝하였고, 이 SP6 CAR은 항-bcma1 및 항-bcma2와 동일한 신호전달 도메인을 함유하였다. 각각의 CAR을 코딩하는 렌티바이러스를 함유하는 상청액을 상기 문헌(Yang et al.)에 기재된 프로토콜로 생성하였다. 구체적으로, 293T-17 세포(ATCC CRL-11268)를 하기 플라스미드들로 형질감염시켰다: pMDG(수포성 구내염 바이러스 외피 단백질을 코딩함), pMDLg/pRRE(HIV Gag 및 Pol 단백질을 코딩함), pRSV-Rev(RSV Rev 단백질을 코딩함), 및 항-bcma CAR을 코딩하는 플라스미드(예를 들면, 상기 문헌(Yang et al.) 참조).
- [0090] 표준 방법, 예컨대, 문헌(Hughes et al., Human Gene Therapy, 16: 457-472 (2005))에 기재된 방법을 이용하여 G-항-bcma2, 8ss-항-bcma2, 항-bcma2-BB, 항-bcma2-OX40 및 항-bcma2-BBOX40 CAR들을 코딩하는 서열들을 MSGV(마우스 줄기 세포 바이러스-기초 스플라이스-gag 벡터)로서 명명된 감마레트로바이러스 벡터 내로 각각 라이게이션시켰다. CAR 코딩 감마레트로바이러스 플라스미드를 발생시킨 후, RD114 외피를 갖는 복제 불능 레트로바이러스를 문헌(Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009))에 기재된 바와 같이 293-기초 팩키징 세포의 일시적인 형질감염으로 생성하였다.
- [0091] 전술된 CAR들을 코딩하는 복제 불능 렌티바이러스 및 레트로바이러스를 사용하여 인간 T-세포를 형질도입시켰다. 항-bcma1 및 항-bcma2의 경우, T-세포를 종래 기재된 바와 같이(예를 들면, 문헌(Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009)) 참조) 배양하고 5% 인간 AB 혈청(밸리 바이오메디칼(Valley Biomedical), 미국 버지니아주 윈체스터 소재) 및 300 국제 단위(IU)/ml의 인터류킨-2(노바티스 다이아그노스틱스(Novartis Diagnostics), 미국 캘리포니아주 에머리빌 소재)를 함유하는 AIM V<sup>TM</sup> 배지(라이프 테크놀로지스, 미국 캘리포니아주 칼스바드 소재)에서 항-CD3 단일클론 항체 OKT3(오르토-바이오텍(Ortho-Biotech), 미국 펜실베이니아주 호르삼 소재)으로 자극하였다. 배양을 시작한 지 36시간 후, 활성화된 T-세포를, 프로타민 설페이트 및 300 IU/ml IL-2를 갖는 렌티바이러스 상청액에 현탁하였다. 상기 세포를 1200xg에서 1시간 동안 원심분리하였다. 그 다음, 상기 T-세포를 37°C에서 3시간 동안 배양하였다. 그 다음, 상청액을 RPMI 배지(메디아텍 인코포레이티드(Mediatech, Inc.), 미국 버지니아주 마나사스 소재) + 10% 태아 소 혈청(라이프 테크놀로지스, 미국 캘리포니아주 칼스바드 소재) 및 IL-2로 1:1 희석하였다. T-세포를 희석된 상청액에서 밤새 배양한 후, IL-2를 갖는 AIM V<sup>TM</sup> 배지(라이프 테크놀로지스, 미국 캘리포니아주 칼스바드 소재) + 5% 인간 AB 혈청에서 다시 배양하였다. T-세포를 바이오틴-표지된 다중클론 염소 항-마우스-F(ab)<sub>2</sub> 항체(잭슨 이뮤노리서치 라보라토리스 인코포레이티드(Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.), 미국 펜실베이니아주 웨스트 그로브 소재)로 염색하여 항-BCMA CAR을 검출하였다. 도 3의 B 내지 D에 나타난 바와 같이, 형질도입된 T-세포 상에서 항-bcma1 CAR, 항-bcma2 CAR 및 SP6 CAR의 높은 수준의 세포 표면 발현이 관찰되었다.
- [0092] G-항-bcma2, 8ss-항-bcma2, 항-bcma2-BB, 항-bcma2-OX40 및 항-bcma2-BBOX40 CAR들의 경우, 말초 혈액 단핵 세포를, 50 ng/ml의 항-CD3 단일클론 항체 OKT3(오르토(Ortho), 미국 뉴저지주 브리지워터 소재) 및 300 IU/ml의 IL-2를 함유하는 T-세포 배지에 ml 당 1x10<sup>6</sup>개 세포의 농도로 현탁하였다. 바이러스 및 세포 표면 단백질에 결합하는 인간 피브로넥틴 단편의 제조합 폴리펩티드인 레트로넥틴(RETRONECTIN)<sup>TM</sup> 폴리펩티드(타카라 바이오 인코포레이티드(Takara Bio Inc.), 일본 시가 소재)를 포스페이트 완충 식염수(PBS) 용액에 11  $\mu$ g/ml의 농도로 용해시키고, 2 ml의 PBS 용액 중의 레트로넥틴<sup>TM</sup> 폴리펩티드를 비-조직 배양물-코딩된 6웰 플레이트(비디 바이오사이언시스(BD Biosciences), 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스 소재)의 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를

실온(RT)에서 2시간 동안 항온처리하였다. 항온처리 후, 레트로넵틴™ 용액을 흡입하고, 헝크의 균형잡힌 염 용액(HBSS) + 2% 소 혈청 알부민(BSA)으로 구성된 2 ml의 차단 용액을 각각의 레트로넵틴™-코팅된 웰에 첨가하였다. 플레이트를 실온(RT)에서 30분 동안 항온처리하였다. 상기 차단 용액을 흡입하고, 웰을 HBSS + 2.5% (4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진에탄설폰산)(HEPES)으로 구성된 용액으로 세정하였다. 레트로바이러스 상청액을 신속히 해동시키고 T-세포 배지로 1:1 희석한 후, 2 ml의 희석된 상청액을 각각의 레트로넵틴™-코팅된 웰에 첨가하였다. 상청액의 첨가 후, 플레이트를 32°C에서 2시간 동안 2000xg로 원심분리하였다. 그 다음, 상청액을 웰로부터 흡입하고, OKT3 항체 및 IL-2와 함께 2일 동안 배양된  $2 \times 10^6$ 개의 T-세포를 각각의 웰에 첨가하였다. T-세포가 레트로바이러스-코팅된 플레이트에 첨가되었을 때, T-세포를 T-세포 배지 + 300 IU/ml의 IL-2에 ml 당  $0.5 \times 10^6$ 개 세포의 농도로 현탁하였다. T-세포를 각각의 웰에 첨가한 후, 플레이트를 1000xg에서 10분 동안 원심분리하였다. 플레이트를 37°C에서 밤새 항온처리하였다. 다음 날 형질도입을 반복하였다. 18시간 내지 24시간 동안 항온처리한 후, T-세포를 플레이트로부터 제거하고 300 IU/ml의 IL-2를 갖는 새로운 T-세포 배지에 ml 당  $0.5 \times 10^6$ 개 세포의 농도로 현탁하고 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다. 형질도입된 T-세포 상에서 항-bcma2-BBOX40, 항-bcma2-BB 및 8ss-항-bcma2의 높은 수준의 세포 표면 발현이 관찰되었다.

[0093] 본 실시예의 결과는 본 발명의 CAR 코딩 핵산 서열을 제조하는 방법 및 T-세포의 표면 상에서 CAR을 발현시키는 방법을 입증한다.

[0094] **실시예 3**

[0095] 본 실시예는 BCMA에 대한 본 발명의 CAR의 특이성을 측정하는 데에 사용되는 일련의 실험들을 기술한다.

[0096] 세포

[0097] NCI-H929, U266 및 RPMI8226은 모두 ATCC(각각 ATCC 번호 CRL-9068, TIB-196 및 CCL-155)로부터 입수된 모든 BCMA<sup>+</sup> 다발성 골수종 세포주이다. A549(ATCC 번호 CCL-185)는 BCMA 음성 폐 암세포주이다. TC71은 BCMA 음성 육종 세포주이다. CCRF-CEM은 BCMA 음성 T-세포주(ATCC 번호 CCL-119)이다. BCMA-K562는 전장 BCMA를 코딩하는 핵산 서열로 형질도입된 K562 세포(ATCC 번호 CCL-243)이다. NGFR-K562는 저친화성 신경 성장인자를 코딩하는 유전자로 형질도입된 K562 세포이다(예를 들면, 문헌(Kochenderfer et al., J. Immunotherapy., 32(7): 689-702 (2009)) 참조). 다발성 골수종을 갖는 3명의 환자들(즉, 골수종 환자 1 내지 3)의 말초 혈액 림프구(PBL)를 3명의 다른 대상체들, 즉 공여자 A, 공여자 B 및 공여자 C의 PBL로서 사용하였다. 공여자 A 내지 C는 모두 흑색종을 가졌다. CD34<sup>+</sup> 일차 세포를 3명의 정상 건강한 공여자들로부터 수득하였다. 형질세포종 세포의 샘플을 골수종 환자 1로부터 수득하였고, 골수의 샘플을 골수종 환자 3으로부터 수득하였다. 전술된 모든 인간 샘플들을 국립 암연구소에서 IRB-승인된 임상시험에 등록된 환자들로부터 수득하였다. 하기 일차 인간 상피 세포를 론자 인코포레이티드(Lonza, Inc.)(스위스 바젤 소재)로부터 수득하였다: 작은 기도 상피 세포, 기관지 상피 세포 및 장 상피 세포.

[0098] 인터페론-γ 및 TNF ELISA

[0099] BCMA 양성 또는 BCMA 음성 세포를 96웰 환자 플레이트(코닝 라이프 사이언시스(Corning Life Sciences), 미국 매사추세츠주 로웰 소재)의 이중 웰 내의 AIM V™ 배지(라이프 테크놀로지스, 미국 캘리포니아주 칼스바드 소재) + 5% 인간 혈청에서 CAR-형질도입된 T-세포와 조합하였다. 상기 플레이트를 37°C에서 18시간 내지 20시간 동안 항온처리하였다. 항온처리 후, 표준 방법(피어스(Pierce), 미국 일리노이주 록포드 소재)을 이용하여 IFN γ 및 TNF에 대한 ELISA를 수행하였다.

[0100] 표 2에 표시된 바와 같이(모든 단위는 pg/ml IFN γ 임), 항-bcma1 또는 항-bcma2 CAR로 형질도입된 T-세포는 BCMA 발현 세포주 BCMA-K562와 함께 밤새 배양되었을 때 다량의 IFN γ를 생성하였지만, 상기 CAR-형질도입된 T-세포는 음성 대조군 세포주 NGFR-K562와 함께 배양되었을 때에는 단지 배경 수준의 IFN γ를 생성하였다.

**표 2**

	BCMA 발현 표적**			BCMA 음성 표적				T-세포	
	BCMA-K562	H929	RPMI-8226	NGFR-K562	CCRF-CEM	A549	TC71	293T	단독
<b>이펙터 세포*</b>									
항-bcma1	15392	11306	5335	76	76	52	65	54	112
항-bcma2	25474	23120	10587	62	67	32	31	28	41
SP6	32	60	149	27	28	21	361	73	27
비-형질도입	<12	<12	<12	<12	<12	<12	<12	12	<12
표적 단독	<12	<12	<12	<12	<12	<12	<12	13	

\* 이펙터 세포는 다발성 골수종을 갖는 환자(골수종 환자 2)의 T-세포이었다. 상기 T-세포는 표시된 CAR로 형질도입되었거나 비-형질도입 상태로 남아있었다.

\*\* 표시된 표적 세포를 밤샘 항온처리를 위해 이펙터 세포와 조합하였고, IFN $\gamma$  ELISA 를 수행하였다.

[0101]

[0102]

표 3에 표시된 바와 같이(모든 단위는 pg/ml IFN  $\gamma$  임), 8ss-항-bcma2, 항-bcma2-BB 및 항-bcma2-OX40 CAR들을 발현하는 T-세포들은 T-세포와 표적 세포를 밤새 공-배양하였을 때 BCMA<sup>+</sup> 표적 세포에 반응하여 IFN  $\gamma$  를 특이적으로 생성하였다.

**표 3**

	BCMA 양성 표적		BCMA 음성 표적			T-세포
	BCMA-K562	RPMI-8226	NGFR-K562	CCRF-CEM	A549	단독
<b>이펙터 세포</b>						
항-bcma2-OX40	17704	4875	42	44	24	40
항-bcma2-BB	25304	8838	404	602	350	706
8ss-항-bcma2	9671	2168	100	120	49	171
비-형질도입	<12	57	15	17	<12	20

[0103]

[0104]

항-BCMA CAR로 형질도입된 T-세포는 BCMA 발현 다발성 골수종 세포주와 함께 밤새 배양되었을 때 다량의 IFN  $\gamma$  를 생성하였다. 대조적으로, 항-BCMA CAR은 다양한 BCMA 음성 세포주와 함께 배양되었을 때 훨씬 더 낮은 양의 IFN  $\gamma$  를 생성하였다. 항-bcma1 CAR로 형질도입된 T-세포에 비해, 항-bcma2 CAR 및 이의 변이체(즉, 8ss-항-bcma2, 항-bcma2-BB 및 항-bcma2-OX40)로 형질도입된 T-세포는 BCMA 양성 세포와 함께 배양되었을 때 보다 많은 IFN  $\gamma$  를 생성하였고, BCMA 음성 세포와 함께 배양되었을 때 보다 적은 IFN  $\gamma$  를 생성하였다.

[0105]

표 4에 표시된 바와 같이(모든 단위는 pg/ml 종양 괴사 인자(TNF)임), 항-bcma2 CAR 변이체로 형질도입된 T-세포는 T-세포와 표적 세포를 밤새 공-배양하였을 때 BCMA<sup>+</sup> 표적 세포에 반응하여 TNF를 특이적으로 생성하였다.

**표 4**

	BCMA 양성 표적		BCMA 음성 표적			T-세포
	BCMA-K562	RPMI-8226	NGFR-K562	CCRF-CEM	A549	단독
<b>이펙터 세포</b>						
항-bcma2-OX40	4913	3406	<40	47	<40	74
항-bcma2-BB	6295	2723	56	164	89	252
8ss-항-bcma2	5340	1354	<40	121	<40	191
비-형질도입	<40	<40	47	<40	<40	<40

[0106]

- [0107] 항-bcma2 CAR 및 이의 변이체로 형질도입된 T-세포가 항-bcma1 CAR로 형질도입된 T-세포보다 BCMA 발현 세포의 다소 더 강하고 더 많은 특이적 인식을 나타내었기 때문에, 항-bcma2 CAR 및 항-bcma2 CAR 변이체들만을 하기 실험들에서 사용하였다.
- [0108] CD107a 분석
- [0109] 2개의 T-세포 집단을 2개의 별도의 튜브에서 제조하였다. 한 튜브는 BCMA-K562 세포를 함유하였고, 다른 튜브는 NGFR-K562 세포를 함유하였다. 이들 두 튜브들은 항-bcma2 CAR 변이체 및 항-bcma2 CAR 변이체로 형질도입된 T-세포, 1 ml의 AIM V™ 배지(라이프 테크놀로지스, 미국 캘리포니아주 칼스바드 소재) + 5% 인간 혈청, 적정된 농도의 항-CD107a 항체(이바이오사이언시스 인코포레이티드(eBioscience, Inc.), 미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재; 클론 eBioH4A3), 및 1 μl의 골지 스탱(Golgi Stop)(비디 바이오사이언시스, 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스 소재)도 함유하였다. 모든 튜브들을 37°C에서 4시간 동안 항온처리한 후 CD3, CD4 및 CD8의 발현에 대해 염색하였다.
- [0110] 3명의 상이한 대상체들로부터 수득된 CAR-형질도입된 T-세포는 BCMA 발현 표적 세포를 사용한 자극에 반응하여 CD107a를 특이적으로 상향조절하였다(도 4의 A 내지 C 참조). 이것은 퍼포린(perforin)-매개된 세포독성에 대한 전제조건인 T-세포의 BCMA 특이적 탈과립화의 발생을 시사한다(예를 들면, 문헌(Rubio et al., Nature Medicine, 9(11): 1377-1382 (2003)) 참조). 또한, 항-bcma2 CAR 변이체 8ss-항-bcma2, 항-bcma2-BB 또는 항-bcma2-0X40을 발현하는 T-세포는 도 5의 A 내지 D에 나타난 바와 같이 시험관내에서 표적 세포로 자극되었을 때 BCMA 특이적 방식으로 탈과립화하였다.
- [0111] 세포내 사이토카인 염색 분석(ICCS)
- [0112] BCMA-K562 세포 집단 및 NGFR-K562 세포 집단을 전술된 바와 같이 2개의 별도의 튜브에서 제조하였다. 상기 두 튜브들은 골수종 환자 2로부터 수득된 항-bcma2 CAR로 형질도입된 T-세포, 1 ml의 AIM V™ 배지(라이프 테크놀로지스, 미국 캘리포니아주 칼스바드 소재) + 5% 인간 혈청, 및 1 μl의 골지 스탱(비디 바이오사이언시스, 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스 소재)도 함유하였다. 모든 튜브들을 37°C에서 6시간 동안 항온처리하였다. 세포를 항-CD3 항체, 항-CD4 항체 및 항-CD8 항체로 표면 염색하였다. 세포를 투과가능하게 만들고, 사이토폭스/사이토펜(Cytofix/Cytoperm) 키트(비디 바이오사이언시스, 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스 소재)의 설명서에 따라 IFN γ (비디 바이오사이언시스, 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스 소재, 클론 B27), IL-2(비디 바이오사이언시스, 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스 소재, 클론 MQ1-17H12) 및 TNF(비디 바이오사이언시스, 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스 소재, 클론 Mab11)에 대한 세포내 염색을 수행하였다.
- [0113] 도 6a 내지 6c에 나타난 바와 같이, 골수종 환자 2로부터 수득된 항-bcma2 CAR로 형질도입된 큰 T-세포 집단은 BCMA 발현 표적 세포를 사용한 6시간의 자극 후 BCMA 특이적 방식으로 사이토카인 IFN γ, IL-2 및 TNF를 특이적으로 생성하였다.
- [0114] 증식 분석
- [0115] 항-bcma2 CAR로 형질도입된 T-세포가 BCMA 발현 표적 세포로 자극되었을 때 증식하는 능력을 평가하였다. 구체적으로,  $0.5 \times 10^6$  개의 방사선조사된 BCMA-K562 세포 또는  $0.5 \times 10^6$  개의 방사선조사된 NGFR-K562 세포를 항-bcma2 CAR 또는 SP6 CAR로 형질도입된 총  $1 \times 10^6$  개의 T-세포와 공-배양하였다. 상기 T-세포를 문헌(Mannering et al., J. Immunological Methods, 283(1-2): 173-183 (2003))에 기재된 바와 같이 카복시플루오레세인 다이아세테이트 석신이미딜 에스터(CFSE)(라이프 테크놀로지스, 미국 캘리포니아주 칼스바드 소재)로 표지하였다. 상기 공-배양에서 사용된 배지는 AIM V™ 배지(라이프 테크놀로지스, 미국 캘리포니아주 칼스바드 소재) + 5% 인간 AB 혈청이었다. IL-2는 상기 배지에 첨가되지 않았다. 시작한 지 4일 후, 각각의 공-배양에서 살아있는 세포의 수를 사멸된 세포 배제용 트립판 블루로 계수하였다. 그 다음, T-세포를 다중클론 바이오틴-표지된 염소-항-인간 BCMA 항체(알앤디 시스템스(R&D Systems), 미국 미네소타주 미네아폴리스 소재)에 이어서 스트렙타비딘(비디 바이오사이언시스, 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스 소재), 항-CD38 항체(이바이오사이언시스 인코포레이티드, 미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재) 및 항-CD56 항체(비디 바이오사이언시스, 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스 소재)로 염색함으로써 유동 세포측정을 수행하였다. 플로우조(FlowJo) 소프트웨어(트리 스타 인코포레이티드(Tree Star, Inc.), 미국 오레곤주 애쉬랜드 소재)를 이용하여 유동 세포측정 데이터 분석을 수행하였다.

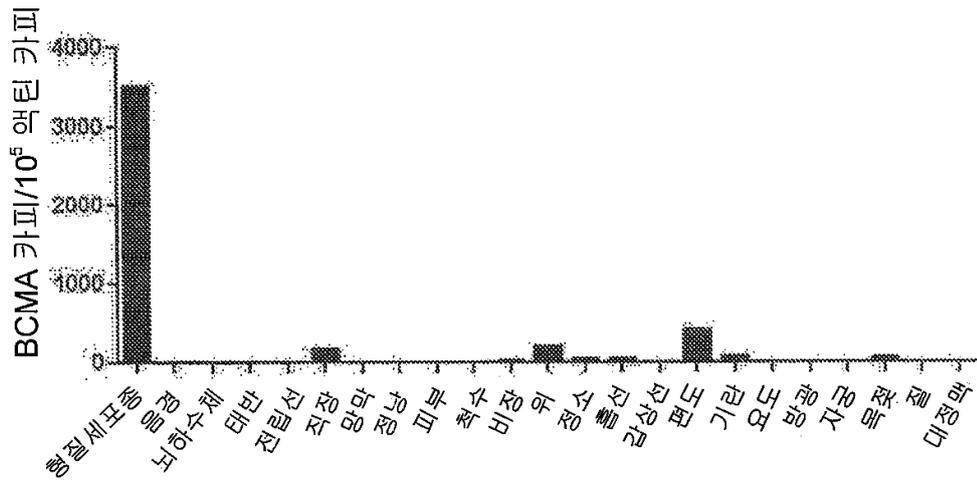
- [0116] 도 7a에 나타낸 바와 같이, 항-bcma2 CAR을 발현하는 T-세포는 음성 대조군 NGFR-K562 세포와 함께 배양되었을 때보다 BCMA-K562 세포와 함께 배양되었을 때 CFSE의 더 큰 회석을 나타내었다. 이들 결과는 항-bcma2 CAR로 형질도입된 T-세포가 BCMA 발현 표적 세포로 자극되었을 때 특이적으로 증식하였다는 것을 시사한다. 대조적으로, SP6 CAR을 발현하는 T-세포가 BCMA-K562 표적 세포 또는 NGFR-K562 표적 세포와 함께 배양되었을 때 CFSE 회석의 유의한 차이는 없었는데(도 7b 참조), 이것은 SP6 CAR을 발현하는 T-세포에 의한 BCMA 특이적 증식의 결여를 입증한다.
- [0117] 증식 분석의 초기에, 항-bcma2 CAR을 발현하는  $0.8 \times 10^6$ 개의 T-세포를 BCMA-K562 세포 또는 NGFR-K562 세포와 함께 배양하였다. 4일 동안의 배양 후, 항-bcma2 CAR을 발현하는  $2.7 \times 10^6$ 개의 T-세포가 BCMA-K562 세포를 함유하는 배양물에 존재한 반면, 항-bcma2 CAR을 발현하는  $0.6 \times 10^6$ 개의 T-세포만이 NGFR-K562 세포를 함유하는 배양물에 존재하였다. 항-bcma2 CAR을 발현하는 T-세포의 절대적인 수에서의 이 BCMA 특이적 증가는 이들 T-세포가 BCMA에 반응하여 증식하였다는 것을 시사한다.
- [0118] 본 실시예의 결과는 본 발명의 CAR을 발현하는 T-세포가 BCMA 특이적 사이토카인 생성, 탈과립화 및 증식을 나타낸다는 것을 입증한다.
- [0119] **실시예 4**
- [0120] 본 실시예는 본 발명의 항-BCMA CAR을 발현하는 T-세포가 다발성 골수종 세포주를 파괴할 수 있다는 것을 입증한다.
- [0121] 세포독성 분석을 수행하여 실시예 2 및 3에 기재된 항-bcma2 CAR로 형질도입된 T-세포가 BCMA 발현 다발성 골수종(MM) 세포주를 파괴할 수 있는지를 확인하였다. 구체적으로, 예를 들면, 문헌(Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009)) 및 문헌(Hermans et al., J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004))에 기재된 분석을 이용하여 BCMA 발현 표적 세포(즉, 다발성 골수종 세포주 H929 및 RPMI8226)의 생존을 음성 대조군 CCRF-CEM 세포의 생존과 비교함으로써 표적 세포의 세포독성을 측정하였다.
- [0122] 상이한 수의 CAR-형질도입된 T-세포를 갖는 동일한 튜브에서 약 50,000개의 BCMA 발현 표적 세포와 50,000개의 CCRF-CEM 세포를 조합하였다. CCRF-CEM 음성 대조군 세포를 형광 염료 5-(및-6)-(((4-클로로메틸)벤조일)아미노)테트라메틸로다민(CMTMR)(라이프 테크놀로지스, 미국 캘리포니아주 칼스바드 소재)으로 표지하고, BCMA 발현 표적 세포를 CFSE로 표지하였다. 모든 실험들에서, 항-bcma2 CAR로 형질도입된 이펙터 T-세포의 세포독성을 SP6 CAR로 형질도입된 동일한 대상체의 음성 대조군 이펙터 T-세포의 세포독성과 비교하였다. 공-배양물을 하기 T-세포 대 표적 세포 비에서 중복적으로 멸균 5 ml 시험 튜브(비디 바이오사이언시스, 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스 소재)에서 확립하였다: 20.0:1, 7:1, 2:1 및 0.7:1. 배양물을 37°C에서 4시간 동안 항온처리하였다. 항온처리 직후, 7-아미노-악티노마이신 D(7AAD; 비디 바이오사이언시스, 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스 소재)를 첨가하였다. 살아있는 BCMA 발현 표적 세포 및 살아있는 CCRF-CEM 음성 대조군 세포의 백분율을 각각의 T-세포/표적 세포 공-배양물에 대해 측정하였다.
- [0123] 각각의 T-세포/표적 세포 공-배양물에 대하여, % BCMA 발현 세포를 % CCRF-CEM 음성 대조군 세포로 나눔으로써 CCRF-CEM 음성 대조군 세포에 비해 상대적인 BCMA 발현 표적 세포의 % 생존율을 측정하였다. 각각의 T-세포/표적 세포 공-배양물에서의 BCMA 발현 표적 세포의 % 생존율을, 이펙터 T-세포 없이 BCMA 발현 표적 세포 및 CCRF-CEM 음성 대조군 세포만을 함유하는 튜브에서의 % BCMA 발현 표적 세포 대 % CCRF-CEM 음성 대조군 세포의 비로 나눔으로써 BCMA 발현 표적 세포의 보정된 % 생존율을 계산하였다. 이 보정은 출발 세포 수의 변동 및 자발적 표적 세포 사멸을 설명하기 위해 필요하였다. 세포독성을 다음과 같이 계산하였다:
- [0124] BCMA 발현 표적 세포의 % 세포독성 =  $100 - \text{BCMA 발현 표적 세포의 보정된 \% 생존율}$ .
- [0125] 세포독성 분석의 결과는 도 7c 및 7d에 제시되어 있다. 항-bcma2 CAR로 형질도입된 T-세포는 BCMA 발현 다발성 골수종 세포주 H929 및 RPMI8226을 특이적으로 사멸시켰다. 대조적으로, SP6 CAR로 형질도입된 T-세포는 이들 세포주들에 대한 훨씬 더 낮은 수준의 세포독성을 나타내었다.
- [0126] 본 실시예의 결과는 항-BCMA CAR을 코딩하는 본 발명의 핵산 서열이 다발성 골수종 세포주를 파괴하는 방법에서 사용될 수 있다는 것을 입증한다.
- [0127] **실시예 5**
- [0128] 본 실시예는 본 발명의 항-BCMA CAR을 발현하는 T-세포가 일차 다발성 골수종 세포를 파괴할 수 있다는 것을 입

증한다.

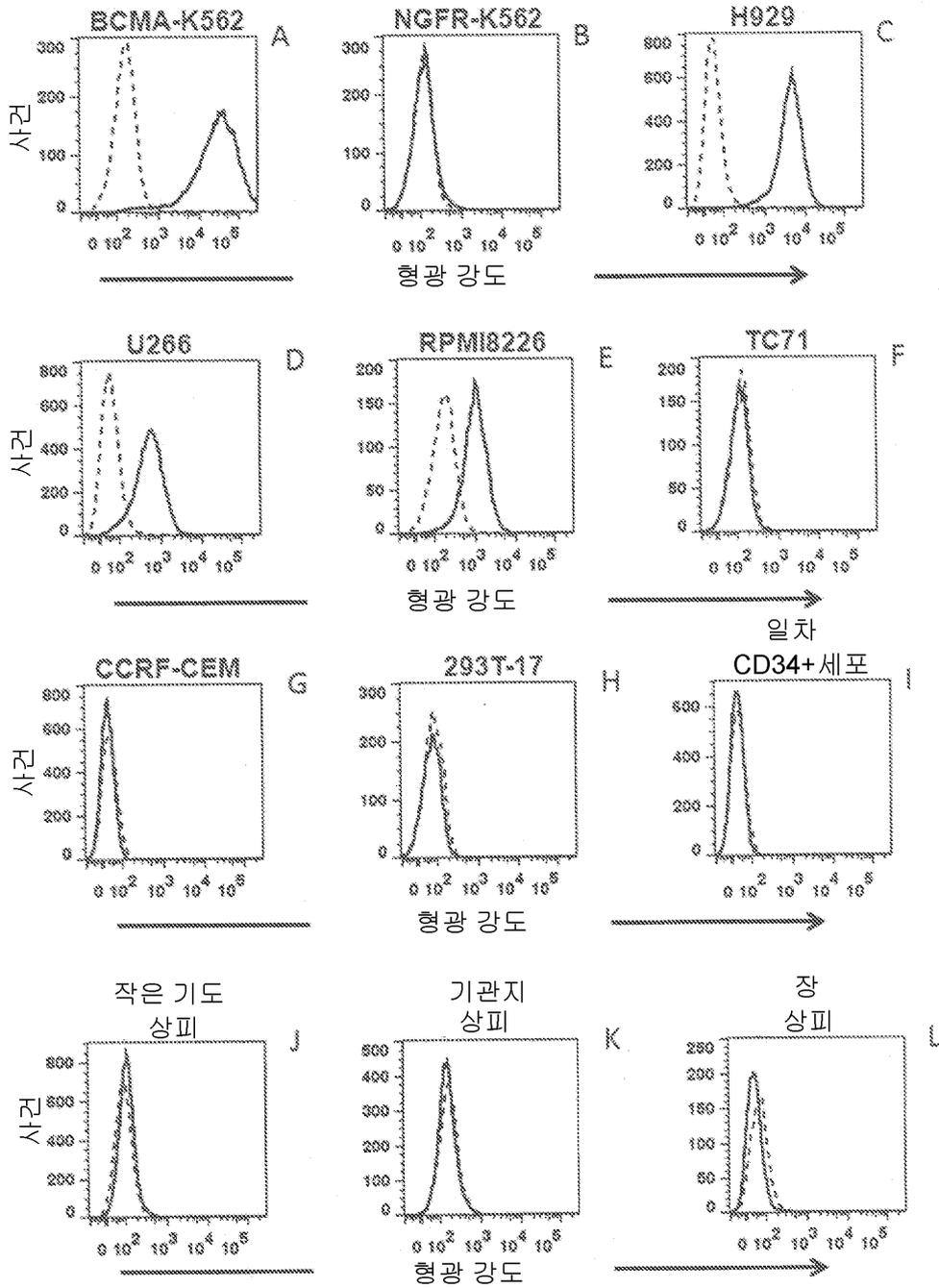
- [0129] 전술된 방법을 이용하여 실시예 2에 기재된 일차 다발성 골수종 세포를 BCMA 발현뿐만 아니라, BCMA 특이적 사이토카인 생성, 탈과립화 및 증식에 대해 평가하였다.
- [0130] 세포 표면 BCMA 발현을 4개의 일차 다발성 골수종 샘플들뿐만 아니라 골수종 환자 3의 일차 골수 다발성 골수종 세포 상에서 검출하였다(도 8a 참조). BCMA 발현 형질 세포는 골수종 환자 3의 골수 샘플 중의 세포의 40%를 차지하였다. 도 8b에 나타난 바와 같이, 공여자 C의 항-bcma2 CAR로 형질도입된 동종이계 T-세포는 골수종 환자 3의 비-조작된 골수 세포와의 공-배양 후 IFN  $\gamma$ 를 생성하였다. 동일한 동종이계 공여자의 항-bcma2 CAR-형질도입된 T-세포는 골수종 환자 3의 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)와 함께 배양되었을 때 훨씬 더 적은 IFN  $\gamma$ 를 생성하였다. 또한, 공여자 C의 SP6 CAR-형질도입된 T-세포는 골수종 환자 3의 골수를 특이적으로 인식하지 않았다. 정상 PBMC가 BCMA를 발현하는 세포를 함유하지 않는다는 것은 이미 보고되어 있다(예를 들면, 문헌(Ng et al., J. Immunology, 173(2): 807-817 (2004)) 참조). 이 관찰결과를 확인하기 위해, 환자 3의 PBMC를 유동 세포측정으로 BCMA 발현에 대해 평가하였다. 환자 3의 PBMC는 PBMC의 약 0.75%를 차지하는 작은 CD56<sup>+</sup> CD38<sup>high</sup> 세포 집단 외에는 BCMA 발현 세포를 함유하지 않았다. 이 집단은 아마도 순환하는 다발성 골수종 세포로 구성되었다.
- [0131] 도 8c에 나타난 바와 같이, 골수종 환자 1로부터 절제된 형질세포종은 93%의 형질 세포로 구성되었고, 이들 일차 형질 세포는 BCMA를 발현하였다. 골수종 환자 2의 T-세포는 골수종 환자 1의 동종이계 비-조작된 형질세포종 세포와 함께 배양되었을 때 IFN  $\gamma$ 를 생성하였다. 골수종 환자 2의 T-세포는 골수종 환자 1의 PBMC와 함께 배양되었을 때 유의한 양의 IFN  $\gamma$ 를 생성하지 않았다. SP6 CAR로 형질도입된 골수종 환자 2의 T-세포는 형질세포종 세포 또는 골수종 환자 1의 PBMC와 함께 배양되었을 때 유의한 양의 IFN  $\gamma$ 를 생성하지 않았다. 골수종 환자 1의 PBMC는 유동 세포측정에 의해 측정되었을 때 BCMA를 발현하지 않았다.
- [0132] 8회 주기의 골수종 치료를 사전에 제공받은 골수종 환자 1의 T-세포를 성공적으로 배양하고 항-bcma2 CAR을 코딩하는 렌티바이러스 벡터로 형질도입시켰다. 배양을 시작한 지 8일 후, 항-bcma2 CAR의 발현을 65%의 T-세포 상에서 검출하였다. 항-bcma2 CAR을 발현하는 골수종 환자 1의 T-세포는 자가 형질세포종 세포에 반응하여 IFN  $\gamma$ 를 특이적으로 생성하였다(도 8d). SP6 CAR을 발현하는 골수종 환자 1의 T-세포는 자가 형질세포종 세포를 인식하지 않았다. 항-bcma2 CAR을 발현하는 T-세포 및 SP6 CAR을 발현하는 T-세포는 자가 PBMC를 인식하지 않았다. 항-bcma2 CAR을 발현하는 골수종 환자 1의 T-세포도 낮은 이펙터 대 표적 비에서 자가 형질세포종 세포를 특이적으로 사멸시켰다. 대조적으로, SP6 CAR을 발현하는 골수종 환자 1의 T-세포는 자가 형질세포종 세포에 대한 낮은 수준의 세포독성을 나타내었다(도 8e).
- [0133] 본 실시예의 결과는 본 발명의 항-BCMA CAR이 일차 다발성 골수종 세포를 파괴하는 방법에서 사용될 수 있다는 것을 입증한다.
- [0134] **실시예 6**
- [0135] 본 실시예는 본 발명의 항-BCMA CAR을 발현하는 T-세포가 마우스에서 확립된 종양을 파괴할 수 있다는 것을 입증한다.
- [0136]  $8 \times 10^6$ 개의 RPMI8226 세포를 면역결핍 NSG 마우스(NOD.Cg-Prkdcscid I12rgtmlWj1/SzJ, 잭슨 연구소)에게 피내 주사하였다. 종양을 17일 내지 19일 동안 성장시킨 후, 항-bcma2 CAR 또는 SP6 CAR로 형질도입된  $8 \times 10^6$ 개의 인간 T-세포의 정맥내 관주를 상기 마우스에게 제공하였다. 종양을 3일마다 칼리퍼(caliper)로 측정하였다. 가장 긴 길이와, 가장 긴 길이에 수직인 길이를 곱하여 mm<sup>2</sup> 단위로 종양 크기(면적)를 측정하였다. 가장 긴 길이가 15 mm에 도달하였을 때, 마우스를 희생시켰다. 동물 연구는 국립 암연구소 동물 관리 및 사용 위원회에 의해 승인받았다.
- [0137] 본 실시예의 결과는 도 9a 및 9b에 제시되어 있다. 약 6일째 날, 항-bcma2-형질도입된 T-세포로 치료된 마우스는 종양 크기의 감소를 보였고, 종양은 15일째 날 제거되었다. 또한, 항-bcma2-형질도입된 T-세포로 치료된 모든 마우스들은 T-세포 관주 후 30일째 날까지 생존하였다.
- [0138] 본 실시예의 결과는 본 발명의 항-BCMA CAR이 생체내에서 다발성 골수종 세포를 파괴할 수 있다는 것을 입증한다.
- [0139] 본원에서 인용된 공개문헌, 특허출원 및 특허를 비롯한 모든 참고문헌들은 각각의 참고문헌이 참고로 도입되는



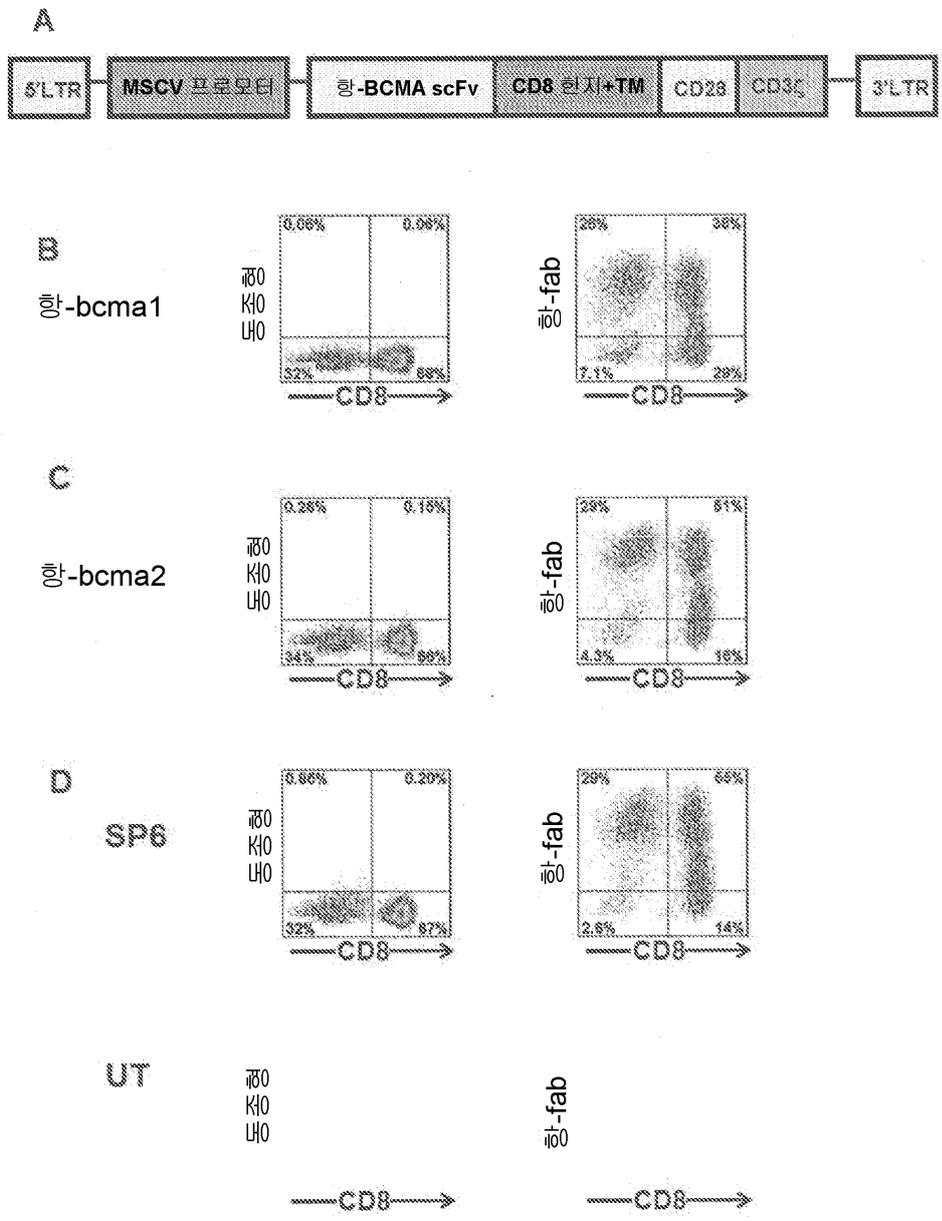
도면1b



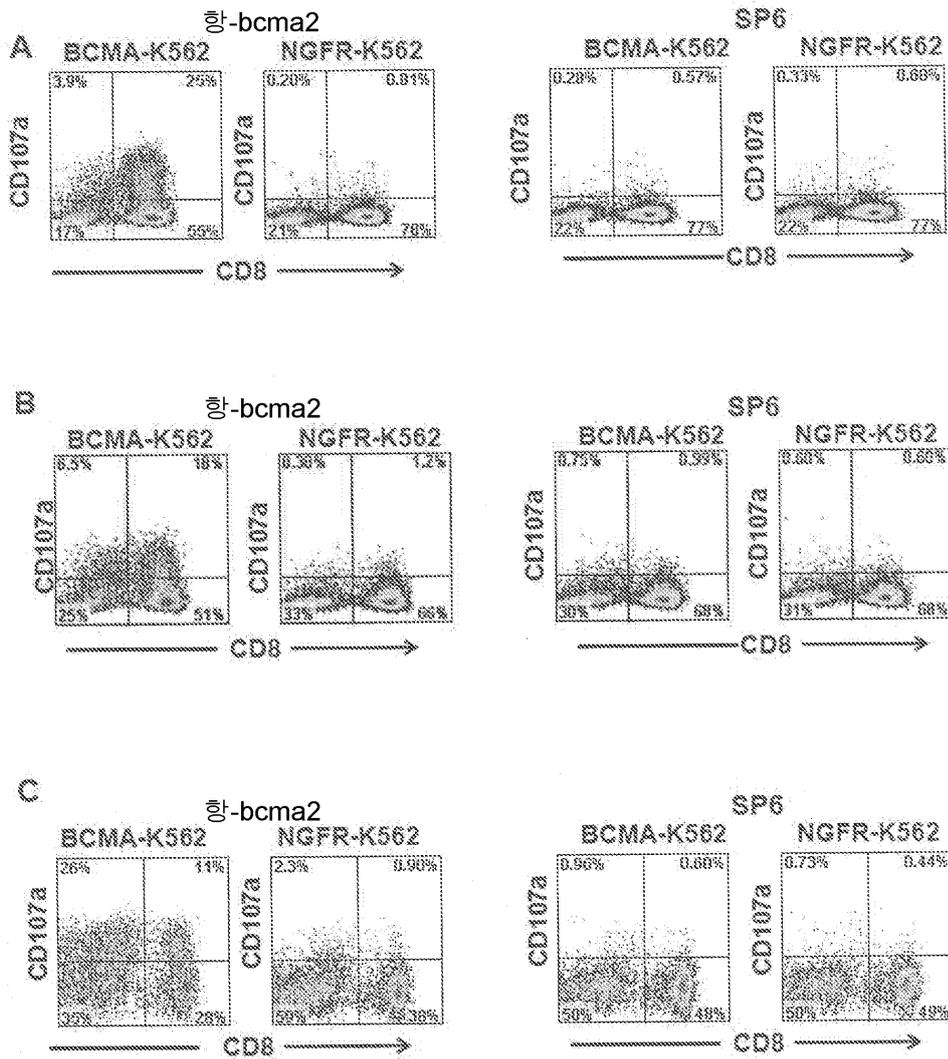
도면2



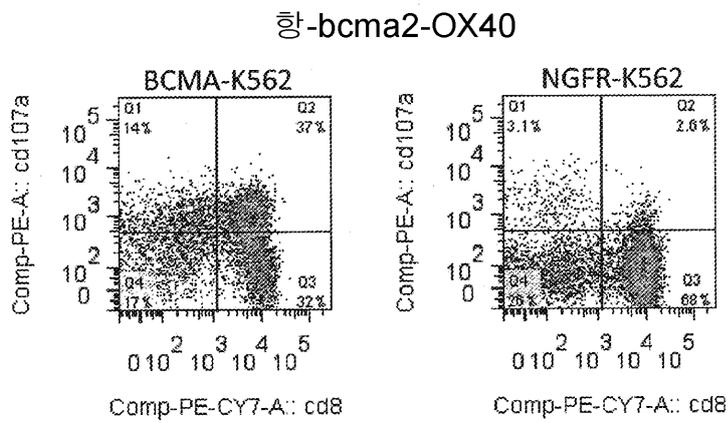
도면3



도면4

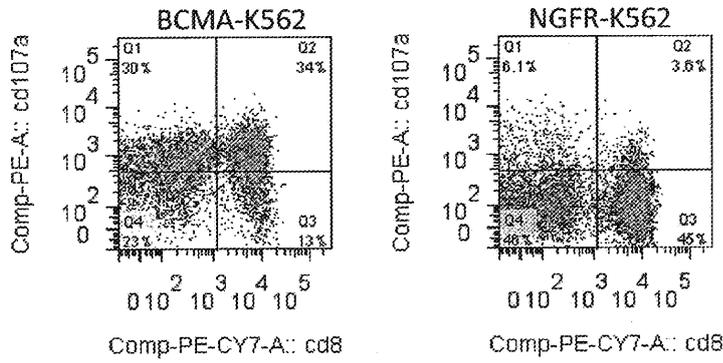


도면5a



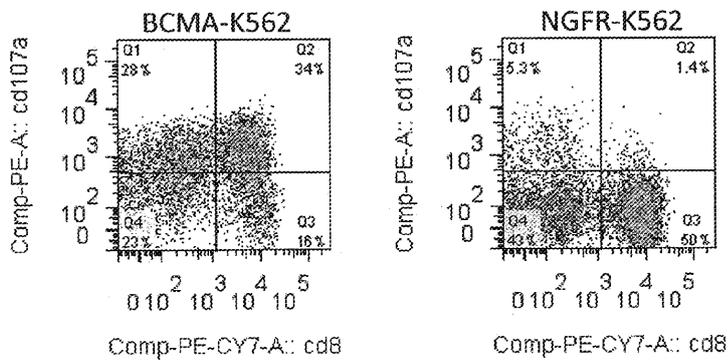
도면5b

항-bcma2-BB



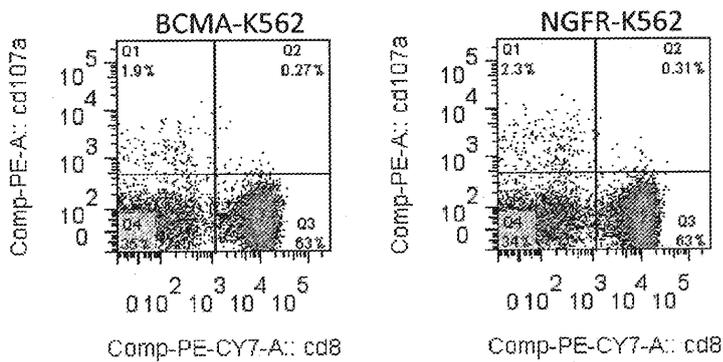
도면5c

8ss-항-bcma2

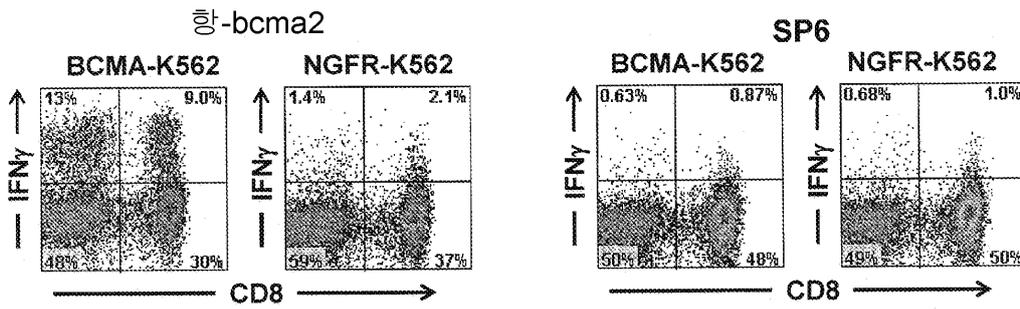


도면5d

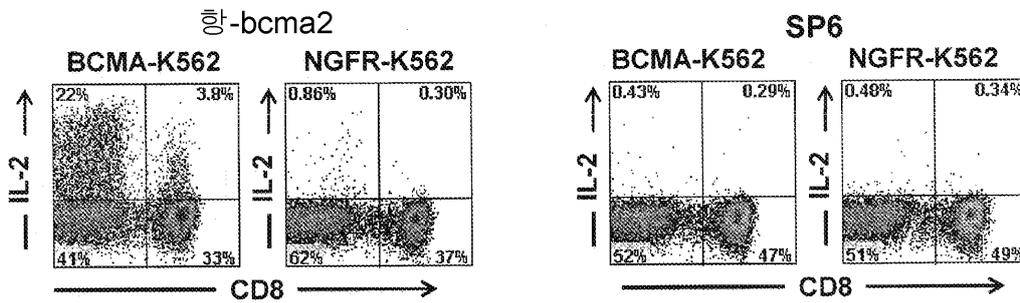
비-항 bcma2 도입



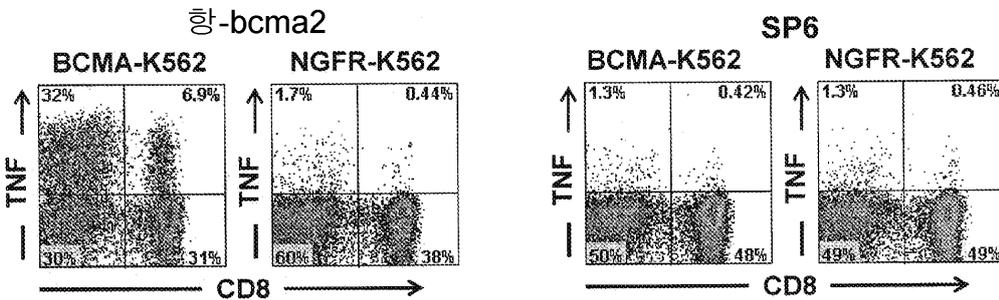
도면6a



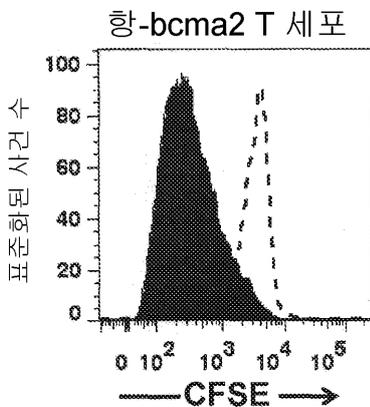
도면6b



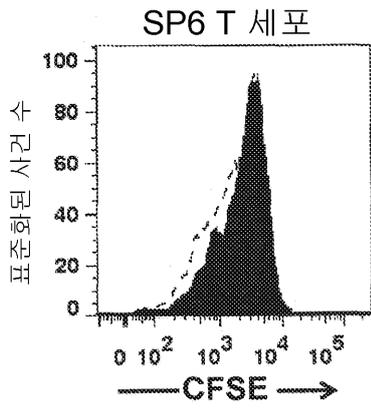
도면6c



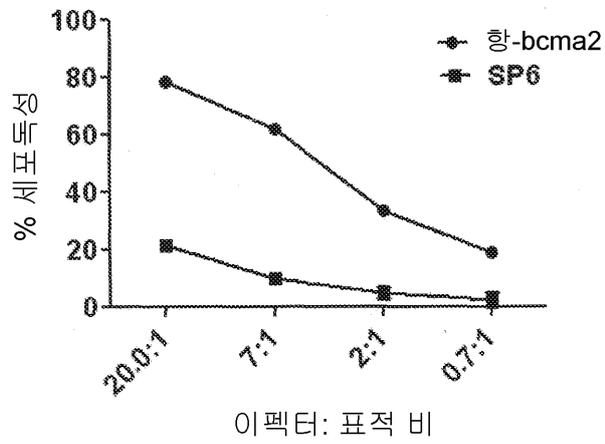
도면7a



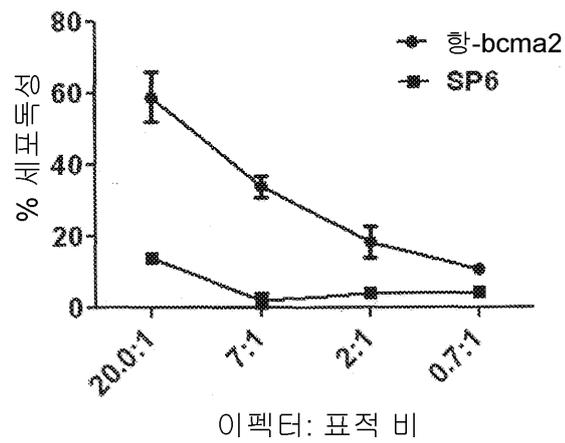
도면7b



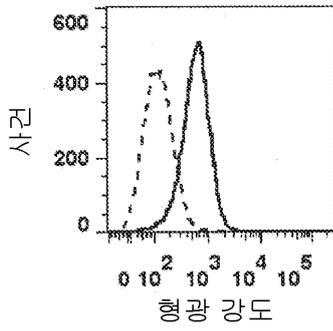
도면7c



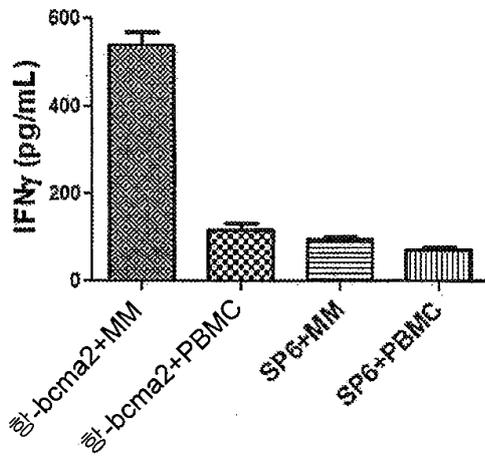
도면7d



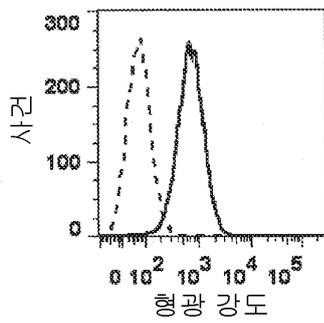
도면8a



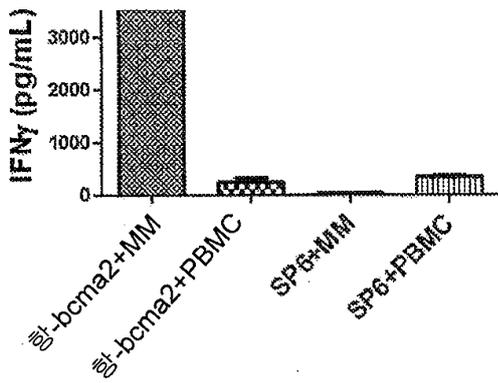
도면8b



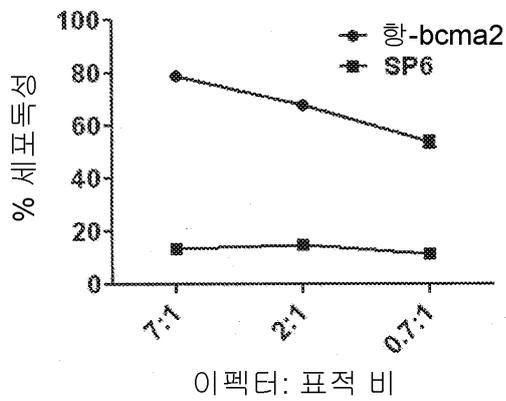
도면8c



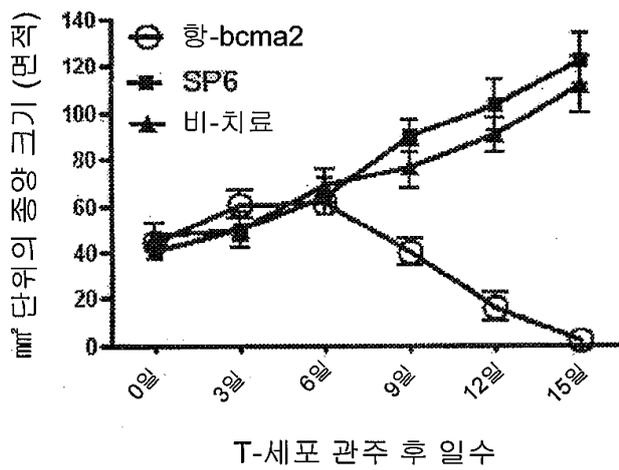
도면8d



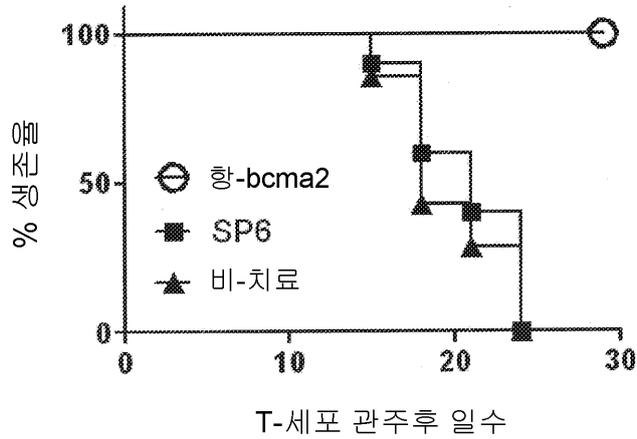
도면8e



도면9a



도면9b



서열목록

<110> THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES

<120> CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS TARGETING B-CELL MATURATION ANTIGEN

<130> 712361

<140> PCT/US2013/032029

<141> 2013-03-15

<150> US 61/622,600

<151> 2012-04-11

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1512

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 1

atggccctgc ctgtgacagc tctgtctgtg cccttgcccc tctgtctcca tgccgccaga 60

cccgacatcg tgctgaccca gagcccccc agcctggcca tgtctctggg caagagagcc 120

accatcagct gccgggccag cgagagcgtg accatcctgg gcagccacct gatctactgg 180

tatcagcaga agcctggcca gccccacc ctgctgatcc agctggctag caatgtgcag 240

accggcgtgc ccgccagatt cagcggcagc ggcagcagaa ccgacttac cctgaccatc 300

gacccctgg aagaggacga cgtggccgtg tactactgcc tgcagagccg gaccatcccc 360  
 cggacctttg gcggaggaac aaagctggaa atcaaggga gcaccagcgg ctccggcaag 420  
 cctggctctg gcgagggcag cacaaagga cagattcagc tggcagag cggccctgag 480  
  
 ctgaagaaac ccggcgagac agtgaagatc agctgcaagg cctccggcta caccttccgg 540  
 cactacagca tgaactgggt gaaacaggcc cctggcaagg gcctgaagt gatgggccgg 600  
 atcaacaccg agagcggcgt gcccatctac gccgacgact tcaagggcag attcgccttc 660  
 agcgtggaaa ccagcggcag caccgcctac ctggtgatca acaacctgaa ggacaggat 720  
 accgccagct acttctgcag caacgactac ctgtacagcc tggacttctg gggccagggc 780  
 accgcccga cctgtccag ctctgtgct gtgttctgc ccgccaagcc caccaccacc 840  
 cctgcccta gacctccac ccagccca acaatgccca gccagcctct gtccctgagg 900  
  
 cccgaagcct gtagacctgc tgccggcga gccgtgcaca ccagaggcct ggatttccgc 960  
 tgcgacatct acatctgggc ccctctggcc ggcacctgtg gcgtgctgct gctgagcctg 1020  
 gtgatcacc tgtactgcaa ccaccggaac agaagcaagc ggagccggct gctgcacagc 1080  
 gactacatga acatgacccc aagacggcct ggccccaccc ggaagcaacta ccagccttac 1140  
 gccctccca gagacttgc cgcctaccgg tccagagtga agttcagcag atccgccgac 1200  
 gccctgct accagcagg acagaaccag ctgtacaac agctgaacct gggcagacgg 1260  
 gaagagtac agtgctgga caagcggaga ggccgggacc ccgagatggg cggaaagccc 1320  
  
 agacggaaga acccccagga aggcctgtat aacgaactgc agaaagaca gatggccgag 1380  
 gcctacagcg agatcgcat gaagggcgag cggaggcgcg gcaaggcca cgatggcctg 1440  
 taccaggcc tagcaccgc caccaaggac acctacgac ccctgcacat gcaggcctg 1500  
 cccccagat ga 1512  
 <210> 2  
 <211> 1512  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <400> 2  
 atggcctgc ctgtgacagc tctgctctc cctctggccc tgctgctcca tgccgcaga 60  
 cccgacatcg tgctgaccca gagcccccc agcctggcca tgtctctggg caagagagcc 120  
  
 accatcagct gccggccag cgagagcgtg accatcctgg gcagccacct gatccactgg 180  
 tatcagcaga agccccgcca gccccacc ctgctgatcc agctgccag caatgtgcag 240

accggcgtgc ccgccagatt cagcggcagc ggcagcagaa ccgacttcac cctgaccatc 300  
gacccctggg aagaggacga cgtggccgtg tactactgcc tgcagagccg gaccatcccc 360  
cggacctttg gcggaggcac caaactggaa atcaaggga gcaccagcgg ctccgcaag 420  
cctggctctg gcgaggcgag cacaaaggga cagattcagc tggcagag cggccctgag 480  
ctgaagaaac ccggcgagac agtgaagatc agctgcaagg cctccggcta caccttacc 540

gactacagca tcaactgggt gaaaagagcc cctggcaagg gcctgaagtg gatgggctgg 600  
atcaacaccg agacaagaga gcccgcctac gcctacgact tccggggcag attcgcttc 660  
agcctggaaa ccagcggcag caccgcctac ctgcagatca acaacctgaa gtacaggac 720  
accgccacct acitttgctc cctggactac agctacgcca tggactactg gggccagggc 780  
accagcgtga ccgtgtccag ctctgtgcc gtgttcctgc ccgcaaacc taccaccacc 840  
cctgccccta gacctccac cccagccca acaatcgcca gccagcctct gtctctcggg 900  
cccgaagcct gtagacctgc tgccggcgga gccgtgcaca ccagaggcct ggacttcgcc 960

tgcgacatct acatctgggc cctctggcc ggcacctgtg gcgtgctgct gctgagcctg 1020  
gtgatcacce tgtactgcaa ccaccggaac agaagcaagc ggagccggct getgcacagc 1080  
gactacatga acatgacccc aagacggcct ggccccacc ggaagcacta ccagccttac 1140  
gccccccca gagacttcgc cgctaccgg tccagagtga agttcagcag atccgccgac 1200  
gccccctgct accagcaggg acagaaccag ctgtacaacg agctgaacct gggcagacgg 1260  
gaagagtacg acgtgctgga caagcggaga ggccgggacc ccgagatggg cggaaagccc 1320  
agacggaaga acccccagga aggctgtat aacgaactgc agaaagaca gatggccgag 1380

gcctacagcg agatcgcat gaaggcgag cggaggcgcg gcaaggcca cgatggcctg 1440  
taccagggcc tagcaccgc caccaaggac acctacgacg ccctgacat gcaggcctg 1500  
ccccccagat ga 1512

<210> 3  
<211> 1512  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Synthetic  
<400> 3

atggctctgc ctgtgacagc tctgtctgtg cctctggccc tgctgctgca tgcccagca 60  
cctgatatcg tgetgaccca gagcctccc agcctggcca tgtctctggg caagagagcc 120  
accatcagct gcagagccag cgagagcgtg accatcctgg gcagccacct gatctactgg 180

tatcagcaga agccccgcca gccccccaca ctgctgattc agctggcctc caatgtgcag 240  
 accggcgtgc cagccagatt ttccggcagc ggcagcagaa ccgacttcac cctgaccatc 300  
 gaccccgtgg aagaggacga cgtggccgtg tactactgcc tgcagagcag aaccatcccc 360  
 cggacctttg gcggaggcac caagctggaa atcaagggca gcaccagcgg ctccggcaag 420  
 cctggatctg gcgagggatc taccaaggga cagatccagc tgggtcagag cggccctgag 480  
 ctgaagaaac ccggcgagac agtgaagatc tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc 540  
 cactacagca tgaactgggt caagcaggcc cctggcaagg gcctgaagtg gatgggccgg 600

atcaacaccg agacaggcga gccctgtac gccgacgact ttaagggcag attcgccttc 660  
 agcctggaaa ccagcggcag caccgcctac ctctgatca acaacctgaa gaacaggac 720  
 accgccacct ttttctgctc caacgactac ctgtacagct gcgactactg gggccagggc 780  
 accaccctga cagtgtctag cttcgtgccc gtgttcctgc ccgccaagcc tacaacaacc 840  
 cctgccccta gacctccac cccagcccct acaattgcct ctacgcctct gacccctgagg 900  
 cccgaggctt gtagaccagc tgctggcggg gccgtgcaca ccagaggact ggatttcgcc 960  
 tgcgacatct acatctgggc ccctctggcc ggcacctgtg gcgtgctgct gctgagcctg 1020

gtgatcacc tgiactgcaa ccaccggaac agaagcaagc ggagccggct gctgcacagc 1080  
 gactacatga acatgacccc aagacggcct ggccccaccc ggaagcacta ccagccttac 1140  
 gccccccca gagacttcgc cgcctaccgg tccagagtga agttcagcag atccgccgac 1200  
 gcccctgcct accagcaggg acagaaccag ctgtacaacg agctgaacct gggcagacgg 1260  
 gaagagtacg acgtgctgga caagcggaga ggccgggacc ccgagatggg cggaaagccc 1320  
 agacggaaga acccccagga aggctgtat aacgaactgc agaaagacaa gatggccgag 1380  
 gcctacagcg agatcgcat gaagggcgag cggaggcgcg gcaaggcca cgatggcctg 1440

taccagggcc tgagcacgc caccaaggac acctacgacg ccctgcacat gcaggccctg 1500  
 cccccagat ga 1512

<210> 4

<211> 503

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 4

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu



Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro  
 275 280 285

Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys  
 290 295 300

Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala  
 305 310 315 320

Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu  
 325 330 335

Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Ser  
 340 345 350

Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg  
 355 360 365

Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg  
 370 375 380

Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp  
 385 390 395 400

Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn  
 405 410 415

Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg  
 420 425 430

Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly  
 435 440 445

Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu  
 450 455 460

Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu  
 465 470 475 480

Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His  
 485 490 495

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 500

<210> 5

<211> 503

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 5

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
1                    5                    10                    15

His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu  
                  20                    25                    30

Ala Met Ser Leu Gly Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu  
                  35                    40                    45

Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys  
                  50                    55                    60

Pro Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln  
65                    70                    75                    80

Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe  
                  85                    90                    95

Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Val Tyr Tyr  
                  100                    105                    110

Cys Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys  
                  115                    120                    125

Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly  
                  130                    135                    140

Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu  
145                    150                    155                    160

Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly  
                  165                    170                    175

Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro Gly  
                  180                    185                    190

Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro  
                  195                    200                    205

Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr



Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu  
 465                      470                      475                      480

Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His  
                                  485                      490                      495

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
                                  500

<210> 6

<211> 503

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 6

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 1                      5                      10                      15

His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu  
                                  20                      25                      30

Ala Met Ser Leu Gly Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu  
                                  35                      40                      45

Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys  
                                  50                      55                      60

Pro Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln  
 65                      70                      75                      80

Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe  
                                  85                      90                      95

Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Val Tyr Tyr  
                                  100                      105                      110

Cys Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys  
                                  115                      120                      125

Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly  
                                  130                      135                      140

Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu

145                      150                      155                      160  
 Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly  
    165                      170                      175  
 Tyr Thr Phe Thr His Tyr Ser Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly  
    180                      185                      190  
 Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Arg Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro  
    195                      200                      205  
 Leu Tyr Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr  
    210                      215                      220  
  
 Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Val Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp  
 225                      230                      235                      240  
 Thr Ala Thr Phe Phe Cys Ser Asn Asp Tyr Leu Tyr Ser Cys Asp Tyr  
    245                      250                      255  
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Phe Val Pro Val Phe  
    260                      265                      270  
 Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro  
    275                      280                      285  
  
 Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys  
    290                      295                      300  
 Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala  
 305                      310                      315                      320  
 Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu  
    325                      330                      335  
 Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Ser  
    340                      345                      350  
  
 Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg  
    355                      360                      365  
 Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg  
    370                      375                      380  
 Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp  
 385                      390                      395                      400

Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn  
 405 410 415

Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg  
 420 425 430

Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly  
 435 440 445

Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu  
 450 455 460

Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu  
 465 470 475 480

Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His  
 485 490 495

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 500

<210> 7

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 7

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr  
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 8

<211> 507

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 8

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro  
 1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser  
 20 25 30

Leu Ala Met Ser Leu Gly Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser  
 35 40 45

Glu Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln  
 50 55 60

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val  
 65 70 75 80

Gln Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp  
 85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Val Tyr  
 100 105 110

Tyr Cys Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr  
 115 120 125

Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser  
 130 135 140

Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro  
 145 150 155 160

Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser  
 165 170 175

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro  
 180 185 190

Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu  
 195 200 205

Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu  
 210 215 220

Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu  
 225 230 235 240

Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp  
 245 250 255

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Phe



<211> 506

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 9

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 1                    5                    10                    15  
 His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu  
                   20                    25                    30  
 Ala Met Ser Leu Gly Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu  
                   35                    40                    45  
 Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys  
  
                   50                    55                    60  
 Pro Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln  
 65                    70                    75                    80  
 Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe  
                   85                    90                    95  
 Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Val Tyr Tyr  
                   100                    105                    110  
 Cys Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys  
  
                   115                    120                    125  
 Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly  
                   130                    135                    140  
 Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu  
 145                    150                    155                    160  
 Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly  
                   165                    170                    175  
 Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro Gly  
  
                   180                    185                    190  
 Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro  
                   195                    200                    205

Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr  
 210 215 220

Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu Asp  
 225 230 235 240

Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr  
 245 250 255

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Phe Val  
 260 265 270

Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro  
 275 280 285

Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro  
 290 295 300

Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu  
 305 310 315 320

Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys  
 325 330 335

Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg  
 340 345 350

Asn Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met  
 355 360 365

Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala  
 370 375 380

Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg  
 385 390 395 400

Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn  
 405 410 415

Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg  
 420 425 430

Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro  
 435 440 445

Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala



145                    150                    155                    160  
 Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly  
                                  165                    170                    175  
 Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro Gly  
                                  180                    185                    190  
 Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro  
                                  195                    200                    205  
 Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr  
                                  210                    215                    220  
 Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu Asp  
 225                    230                    235                    240  
 Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr  
                                  245                    250                    255  
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Phe Val  
                                  260                    265                    270  
 Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro  
                                  275                    280                    285  
 Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro  
                                  290                    295                    300  
 Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu  
                                  305                    310                    315                    320  
 Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys  
                                  325                    330                    335  
 Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg  
                                  340                    345                    350  
 Asn Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile  
                                  355                    360                    365  
 Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp  
                                  370                    375                    380  
 Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu  
 385                    390                    395                    400

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly  
 405 410 415

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr  
 420 425 430

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys  
 435 440 445

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys  
 450 455 460

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg  
 465 470 475 480

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala  
 485 490 495

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 500 505 510

<210> 11  
 <211> 502  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <400> 11

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu  
 20 25 30

Ala Met Ser Leu Gly Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu  
 35 40 45

Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys  
 50 55 60

Pro Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln  
 65 70 75 80

Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe  
 85 90 95

Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Val Tyr Tyr  
 100 105 110  
  
 Cys Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys  
 115 120 125  
 Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly  
 130 135 140  
 Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu  
 145 150 155 160  
 Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly  
 165 170 175  
  
 Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro Gly  
 180 185 190  
 Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro  
 195 200 205  
 Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr  
 210 215 220  
 Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu Asp  
 225 230 235 240  
  
 Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr  
 245 250 255  
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Phe Val  
 260 265 270  
 Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro  
 275 280 285  
 Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro  
 290 295 300  
  
 Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu  
 305 310 315 320  
 Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys  
 325 330 335  
 Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg

340 345 350  
 Asn Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly  
 355 360 365

Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His  
 370 375 380  
 Ser Thr Leu Ala Lys Ile Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala  
 385 390 395 400  
 Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu  
 405 410 415  
 Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp  
 420 425 430

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu  
 435 440 445  
 Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile  
 450 455 460  
 Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr  
 465 470 475 480  
 Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met  
 485 490 495

Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 500

<210> 12

<211> 549

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 12

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu  
 1 5 10 15  
 His Ala Ala Arg Pro Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu  
 20 25 30

Ala Met Ser Leu Gly Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu



Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro  
 290 295 300

Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu  
 305 310 315 320

Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys  
 325 330 335

Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg  
 340 345 350

Asn Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile  
 355 360 365

Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp  
 370 375 380

Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu  
 385 390 395 400

Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly  
 405 410 415

Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser  
 420 425 430

Thr Leu Ala Lys Ile Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro  
 435 440 445

Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly  
 450 455 460

Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro  
 465 470 475 480

Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr  
 485 490 495

Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly  
 500 505 510

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln  
 515 520 525

Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln

530

535

540

Ala Leu Pro Pro Arg

545