



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0082241
(43) 공개일자 2019년07월09일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) A61K 35/17 (2014.01)
A61P 35/02 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 38/1774 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7014739
(22) 출원일자(국제) 2017년11월03일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2019년05월22일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/059989
(87) 국제공개번호 WO 2018/085690
국제공개일자 2018년05월11일
- (30) 우선권주장
62/417,840 2016년11월04일 미국(US)
62/514,401 2017년06월02일 미국(US)

- (71) 출원인
블루버드 바이오, 인코포레이티드.
미국, 매사추세츠 02142, 캠프리지, 60 비니 스트리트
- (72) 발명자
퀴글리 트레비스
미국, 매사추세츠 02025, 코하셋, 49 엘름 코트
로스 로버트
미국, 매사추세츠 02445, 브루클라인, 9 서머셋 로드
- (74) 대리인
손민

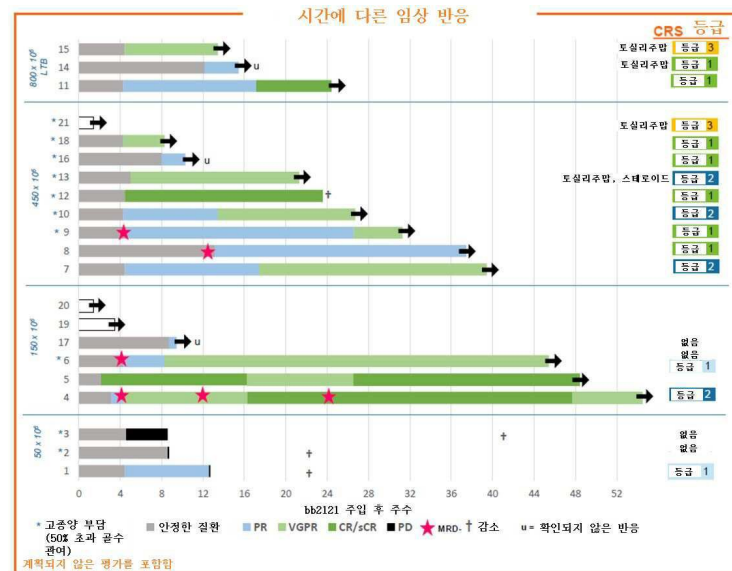
전체 청구항 수 : 총 40 항

(54) 발명의 명칭 항-BCMA CAR T 세포 조성물

(57) 요약

본 발명은 재발/불응성 다발성 골수종에 대한 입양 T 세포 요법을 위한 개선된 항-BCMA CAR T 세포 조성물을 제공한다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61P 35/02 (2018.01)

C07K 14/7051 (2013.01)

C07K 14/70517 (2013.01)

C07K 14/70578 (2013.01)

C12N 2740/10041 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

치료적 유효량의 항-B 세포 성숙 항원(anti-B cell maturation antigen: BCMA) 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor: CAR) T 세포를 포함하는 조성물로서, 상기 치료적 유효량은 약 5.0×10^7 개 초과인 항-BCMA CAR T 세포이고, 그리고 상기 항-BCMA CAR은 서열번호 9에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 약제학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함하는, 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 50:50의 플라즈마라이트 A(PlasmaLyte A) 대 크라이오스토르 CS10(CryoStor CS10)을 포함하는 용액 중에서 제형화된, 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료적 유효량은 적어도 약 15.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포인, 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료적 유효량은 적어도 약 45.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포인, 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료적 유효량은 적어도 약 80.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포인, 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료적 유효량은 적어도 약 12.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포인, 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료적 유효량은 약 5.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포 내지 약 15.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포인, 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료적 유효량은 약 5.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포 내지 약 45.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포인, 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료적 유효량은 약 5.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포 내지 약 80.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포인, 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료적 유효량은 약 5.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포 내지 약 12.0×10^8 개의 항-BCMA CAR T 세포인, 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료적 유효량은 약 15.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포 내지 약 45.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포인, 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료적 유효량은 약 15.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포 내지 약 80.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포인, 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료적 유효량은 약 15.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포 내지 약 12.0×10^8 개의 항-BCMA CAR T 세포인, 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항-BCMA CAR T 세포는 상기 항-BCMA CAR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터로 형질도입된, 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 렌티바이러스 벡터 복제수(lentiviral vector copy number: VCN)는 항-BCMA CAR T 세포 당 약 2.0개의 복제물인, 조성물.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 있어서, 상기 렌티바이러스 벡터는 인간 면역결핍 바이러스 1(HIV-1) 벡터인, 조성물.

청구항 18

항-BCMA CAR을 암호화하는 렌티바이러스로 형질도입된 T 세포 집단을 포함하는 약제학적 조성물로서, T 세포의 집단은 약 5.0×10^7 개 초과인 항-BCMA CAR T 세포를 포함하고, 상기 항-BCMA CAR은 서열번호 9에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 치료적으로 허용 가능한 담체를 더 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 20

제18항 또는 제19항에 있어서, 상기 조성물은 적어도 약 15.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 21

제18항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 적어도 약 45.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 22

제18항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 적어도 약 80.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 23

제18항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 적어도 약 12.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 24

제18항 또는 제19항에 있어서, 상기 조성물은 약 5.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포 내지 약 15.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 25

제18항 또는 제19항에 있어서, 상기 조성물은 약 5.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포 내지 약 45.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 26

제18항 또는 제19항에 있어서, 상기 조성물은 약 5.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포 내지 약 80.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 27

제18항 또는 제19항에 있어서, 상기 조성물은 약 5.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포 내지 약 12.0×10^8 개의 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 28

제18항 또는 제19항에 있어서, 상기 조성물은 약 15.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포 내지 약 45.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 29

제18항 또는 제19항에 있어서, 상기 조성물은 약 15.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포 내지 약 80.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 30

제18항 또는 제19항에 있어서, 상기 조성물은 약 15.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포 내지 약 12.0×10^8 개의 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 31

제18항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 세포는 $CD8^+$ T 세포를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 32

재발/불응성 다발성 골수종으로 진단된 대상체의 치료 방법으로서, 상기 대상체에게 제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 치료 방법.

청구항 33

재발/불응성 다발성 골수종을 갖는 대상체의 치료 방법으로서, 상기 대상체에게 제1항 내지 제31항 중 어느 한 항의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 치료 방법.

청구항 34

제32항 또는 제33항에 있어서, 상기 조성물은 단일 용량으로 투여되는, 치료 방법.

청구항 35

제32항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 정맥내로 투여되는, 치료 방법.

청구항 36

제32항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다발성 골수종은, 상기 조성물의 투여 전에, 프로테아좀 억제제 및 면역조절제를 포함하는 적어도 3가지 치료 요법에 대해 불응성인, 치료 방법.

청구항 37

제32항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다발성 골수종은, 상기 조성물의 투여 전에, 1가지 이상의 치료 요법에 대해 이중 불응성(double-refractory)인, 치료 방법.

청구항 38

제32항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는, 상기 조성물의 투여 전에, 다라투무맙, 레날리도마이드, 포말리도마이드, 보르테조미드 및/또는 카르필조미드로 치료된, 치료 방법.

청구항 39

제32항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는, 상기 조성물의 투여 전에, 자가 조혈 줄기 세포 이식을 받은, 치료 방법.

청구항 40

제32항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 사이클로포스파마이드 300mg/m² 및 플루다라빈 30 mg/m²로 림프구고갈된(lymphodepleted), 치료 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 미국 특허법(35 U.S.C. § 119(e)) 하에서 2017년 6월 2일자로 출원된 미국 가출원 특허 제 62/514,401호 및 2016년 11월 4일자로 출원된 미국 가출원 특허 제 62/417,840호의 이익을 주장하며, 이들 각각은 본 명세서에 이들의 전문이 참고로 포함된다.

[0003] 서열목록에 관한 언급

[0004] 본 출원에 관한 서열목록은 종이 사본 대신 텍스트 형식으로 제공되며, 이에 따라서 본 명세서에 참고로 편입된다. 서열목록을 포함하는 텍스트 파일의 명칭은 BLBD_079_02WO_ST25.txt이다. 텍스트 파일은 27KB이며, 2017년 11월 3일자로 생성되었고, 본 명세서의 출원과 동시에 EFS-Web을 통해 전자적으로 제출되었다.

[0005] 기술 분야

[0006] 본 발명은 B 세포 관련 병태를 치료하기 위한 개선된 조성물 및 방법에 관한 것이다. 더 구체적으로는, 본 발명은 재발/불응성 다발성 골수종을 치료하기 위한 치료적 용량의 항-BCMA 키메라 항원 수용체(Chimeric Antigen Receptor: CAR) T 세포를 포함하는 개선된 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] 키메라 항원 수용체(CAR) T-세포는 특정 항암 면역 활성을 나타내는 키메라 단백질을 생성하기 위해 목적으로 하는 항원에 대한 항체-기반 특이성을 T 세포 수용체-활성화 세포내 도메인과 조합하는 분자이다. CAR은 환자

자신의 T 세포에 암세포를 직접적으로 인식하고 사멸시키는 능력을 부여한다. CAR T 세포 기술은 빠르게 개발되었지만, 그의 치료 가능성은 아직 인식되지 않았다. 혈액학적 악성종양에 대한 CAR T 세포의 임상 적용에 대한 몇몇 장애물이 남아있다.

[0008] 혈액학적 악성종양에 적용된 대부분의 CAR T 세포 요법은 사이토카인 방출 증후군(cytokine release syndrome: CRS) 또는 사이토카인 폭풍과 관련된다. CRS는 임상 세포 면역요법에 특이적이고, 패혈 쇼크-유사 증상을 나타내며, 궁극적으로 환자 사망을 야기할 수 있다. 사실, 다수의 임상 시험은 CAR T-세포 시험에서의 CRS-관련 사멸에 기인하여 FDA에 의해 일시적으로 유예되었다. CRS는 빠르고, 예측 가능하지 않을 수 있고 현재 CRS의 예방 및 관리에 대한 합의가 없다. 그러나, CRS에 기여하는 한 가지 특징은 CAR T 세포의 치료적 세포 용량이다.

[0009] CAR T 세포는 주입후 생체내에서 증식하고 골수로 귀소하는 능력을 갖는 "생활 약물(living drug)"이다. 예를 들어, 2011년에 공개된 유펜(UPenn)으로부터의 세미나 사례 연구에서, 만성 림프구성 백혈병(CLL) 환자에게 주어진 1.5×10^5 개 만큼 낮은 CAR T 세포는 시간에 따라 생체내에서 1000배 초과로 확장되었다. 따라서, CAR T 세포 요법은 투약에 관해 독특한 도전의 세트를 제시한다. CAR T 세포 주입 투약량에 대한 일정한 합의는 없으며, 종양 부하, 효능 및 부작용을 포함하는 인자에 영향을 미친다. 소용량 주입이 이상적인 근치적 효과를 얻을 수는 없지만, 대신에 종양 항원 결실 및 항원 탈출을 유도할 수 있다. 대용량 주입 및 심각한 종양 부하는 CRS 및 종양 용해 증후군을 증가시킬 것이다. 그것이 생활 약물이기 때문에, 정확한 치료 용량을 결정하는 것은 예측 불가능하다. 약력학 및 약물동태학의 통상적인 약물-신체 상호작용 개념은 CAR T 세포가 역학적, 생활 및 지속적 약물이기 때문에 CAR T 세포요법에 용이하게 적용될 수 없다.

[0010] 용량 선택에 대한 일부 도전은 상관적 동물 모델의 결핍, (처음에 인간 생성물에서 "선행적" 정보로 제한되었고, 인간 세포의 생체내 확장은 예측 불가능함), 1세대 CAR T 생성물로부터 "차용하는(borrowing)" 안전성 데이터의 제한, 관련된 생성물로부터 안전성 데이터의 추론(TIL), "유사한" TCR 전향(redirected) 세포, CAR T 생성물의 "유사한" 부류, 및 조직학적으로 상이한 종양 유형(들)에서 동일한 생성물을 이용하는 안전성 데이터의 추론을 포함하지만, 이것으로 제한되지 않는다.

[0011] 따라서, CAR T 세포 투약에 대한 현재의 접근은 동일한 적응증에서 사용을 위해 상이한 CAR을 보유하는 T 세포 중에서 그리고 상이한 적응증에서 사용을 위해 동일한 CAR T 세포 중에서 치료적으로 유효한 CAR T 세포를 예측하기에 충분히 성숙한 것으로 나타나지 않는다.

발명의 내용

[0012] 본 발명은 일반적으로 개선된 항-BCMA CAR T 세포 조성물 및 재발/불응성 다발성 골수종을 치료하기 위해 이를 이용하는 방법을 제공한다.

[0013] 다양한 실시형태에서, 치료적 유효량의 항-B 세포 성숙 항원(BCMA) 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포를 포함하는 조성물이 상정되되, 치료적 유효량은 약 5.0×10^7 개 초과인 항-BCMA CAR T 세포이고, 항-BCMA CAR은 서열번호 9에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0014] 특정 실시형태에서, 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함한다.

[0015] 특정 실시형태에서, 조성물은 50:50 플라스마라이트 A(PlasmaLyte A) 대 크라이오스토르(CryoStor) CS10을 포함하는 용액 중에서 제형화된다.

[0016] 다양한 실시형태에서, 치료적 유효량은 적어도 약 15.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포.

[0017] 특정 실시형태에서, 치료적 유효량은 적어도 약 45.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포이다.

[0018] 일부 실시형태에서, 치료적 유효량은 적어도 약 80.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포이다.

[0019] 특정 실시형태에서, 치료적 유효량은 적어도 약 12.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포이다.

[0020] 특정 실시형태에서, 치료적 유효량은 약 5.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포 내지 약 15.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포이다.

[0021] 다양한 실시형태에서, 치료적 유효량은 약 5.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포 내지 약 45.0×10^7 개의 항-BCMA

CAR T 세포이다.

- [0022] 일부 실시형태에서, 치료적 유효량은 약 5.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포 내지 약 80.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포이다.
- [0023] 특정 실시형태에서, 치료적 유효량은 약 5.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포 내지 약 12.0×10^8 개의 항-BCMA CAR T 세포이다.
- [0024] 특정 실시형태에서, 치료적 유효량은 약 15.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포 내지 약 45.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포이다.
- [0025] 일부 실시형태에서, 치료적 유효량은 약 15.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포 내지 약 80.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포이다.
- [0026] 다양한 실시형태에서, 치료적 유효량은 약 15.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포 내지 약 12.0×10^8 개의 항-BCMA CAR T 세포이다.
- [0027] 특정 실시형태에서, 항-BCMA CAR T 세포는 항-BCMA CAR를 암호화하는 렌티바이러스 벡터로 형질도입된다.
- [0028] 특정 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터 복제수(vector copy number: VCN)는 항-BCMA CAR T 세포당 약 2.0개의 복제수이다.
- [0029] 특정 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터는 인간 면역결핍 바이러스 1(HIV-1) 벡터이다.
- [0030] 특정 실시형태에서, 항-BCMA CAR를 암호화하는 렌티바이러스로 형질도입된 T 세포 집단을 포함하는 약제학적 조성물이 상정되되, T 세포 집단은 약 5.0×10^7 개 초과인 항-BCMA CAR T 세포를 포함하고, 항-BCMA CAR은 서열번호 9에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0031] 일부 실시형태에서, 상기 조성물은 치료적으로 허용 가능한 담체를 더 포함한다.
- [0032] 다양한 실시형태에서, 조성물은 적어도 약 15.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포를 포함한다.
- [0033] 특정 실시형태에서, 조성물은 적어도 약 45.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포를 포함한다.
- [0034] 일부 실시형태에서, 조성물은 적어도 약 80.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포를 포함한다.
- [0035] 특정 실시형태에서, 조성물은 적어도 약 12.0×10^8 개의 항-BCMA CAR T 세포를 포함한다.
- [0036] 다양한 실시형태에서, 조성물은 약 15.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포를 포함한다.
- [0037] 특정 실시형태에서, 조성물은 약 45.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포를 포함한다.
- [0038] 일부 실시형태에서, 조성물은 약 80.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포를 포함한다.
- [0039] 특정 실시형태에서, 조성물은 약 12.0×10^8 개의 항-BCMA CAR T 세포를 포함한다.
- [0040] 특정 실시형태에서, 조성물은 약 5.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포 내지 약 15.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포를 포함한다.
- [0041] 다양한 실시형태에서, 조성물은 약 5.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포 내지 약 45.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포를 포함한다.
- [0042] 특정 실시형태에서, 조성물은 약 5.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포 내지 약 80.0×10^7 항-BCMA CAR T 세포를 포함한다.
- [0043] 일부 실시형태에서, 조성물은 약 5.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포 내지 약 12.0×10^8 개의 항-BCMA CAR T 세포를 포함한다.

- [0044] 다양한 실시형태에서, 조성물은 약 15.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포 내지 약 45.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포를 포함한다.
- [0045] 특정 실시형태에서, 조성물은 약 15.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포 내지 약 80.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포를 포함한다.
- [0046] 일부 실시형태에서, 조성물은 약 15.0×10^7 개의 항-BCMA CAR T 세포 내지 약 12.0×10^8 개의 항-BCMA CAR T 세포를 포함한다.
- [0047] 특정 실시형태에서, T 세포는 $CD8^+$ T 세포를 포함한다.
- [0048] 다양한 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 재발/불응성 다발성 골수종으로 진단된 대상체의 치료 방법이 제공된다.
- [0049] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 재발/불응성 다발성 골수종을 갖는 대상체의 치료 방법이 제공된다.
- [0050] 특정 실시형태에서, 조성물은 단일 용량으로 투여된다.
- [0051] 특정 실시형태에서, 조성물은 정맥내로 투여된다.
- [0052] 일부 실시형태에서, 다발성 골수종은 조성물의 투여 전에 프로네아즘 저해제 및 면역조절제를 포함하는 적어도 3가지의 치료 요법에 대해 불응성이다.
- [0053] 특정 실시형태에서, 다발성 골수종은 조성물의 투여 전에 1가지 이상의 치료 요법에 대해 이중-불응성(double-refractory)이었다.
- [0054] 일부 실시형태에서, 대상체는 조성물의 투여 전에 다라투무맙, 레날리도마이드, 포말리도마이드, 보르테조밋, 및/또는 카르필조밋으로 치료되었다.
- [0055] 특정 실시형태에서, 대상체는 조성물의 투여 전에 자가 조혈 줄기 세포 이식을 받았다.
- [0056] 특정 실시형태에서, 대상체는 사이클로포스파마이드 $300\text{mg}/\text{m}^2$ 및 플루다라빈 $30\text{mg}/\text{m}^2$ 로 림프구고갈되었다(lymphodepleted).

도면의 간단한 설명

- [0057] **도 1**은 뮤린 B 세포 성숙 항원(muBCMA) CAR 작제물의 개략도를 도시한 도면.
- 도 2a**는 비형질도입 공여자 T 세포의 매칭 배양물에 비교하여 11명의 개개 공여자의 PBMC로부터 제조된 항-BCMA CAR T 세포에 대한 비슷한 수준의 확장을 도시한 도면.
- 도 2b**는 11명의 개개 공여자의 PBMC로부터 제조된 항-BCMA CAR T 세포에서 비슷한 수준의 렌티바이러스 형질도입 효율(VCN)을 도시한 도면.
- 도 2c**는 11명의 개개 공여자의 PBMC로부터 제조된 항-BCMA CAR T 세포에서 유세포분석에 의한 비슷한 항-BCMA CAR 발현을 도시한 도면.
- 도 2d**는 11명의 개개 공여자의 PBMC로부터 제조된 항-BCMA CAR T 세포가 BCMA-발현 K562 세포에 노출될 때 비슷한 수준의 $IFN\gamma$ 방출을 도시한 도면.
- 도 3**는 항-BCMA CAR T 세포로 처리된 재발 불응성 다발성 골수종 환자의 시간에 따른 임상 반응을 도시한 도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0058] **서열번호 1 내지 3**은 본 명세서에 상정된 BCMA CAR에 대한 예시적 경쇄 CDR 서열의 아미노산 서열을 제시한다.
- [0059] **서열번호 4 내지 6**은 본 명세서에 상정된 BCMA CAR에 대한 예시적 중쇄 CDR 서열의 아미노산 서열을 제시한다.
- [0060] **서열번호 7**은 본 명세서에 상정된 BCMA CAR에 대한 예시적 경쇄 서열의 아미노산 서열을 제시한다.
- [0061] **서열번호 8**은 본 명세서에 상정된 BCMA CAR에 대한 예시적 중쇄 서열의 아미노산 서열을 제시한다.

- [0062] 서열번호 9는 본 명세서에 상정된 BCMA CAR의 아미노산 서열을 제시한다.
- [0063] 서열번호 10은 본 명세서에 상정된 BCMA CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 제시한다.
- [0064] 서열번호 11은 인간 BCMA의 아미노산 서열을 제시한다.
- [0065] 서열번호 12 내지 22는 다양한 링커의 아미노산 서열을 제시한다.
- [0066] 서열번호 23 내지 35는 프로테아제 절단 부위 및 자기-절단 폴리펩타이드 절단 부위의 아미노산 서열을 제시한다.
- [0067] 서열번호 36은 BCMA CAR을 암호화하는 벡터의 폴리뉴클레오타이드 서열을 제시한다.
- [0068] **A. 개요**
- [0069] 특정 CAR 및 그의 표적 적응증에 관해 치료적으로 유효한 CAR T 세포를 예측하기 위한 기술에서 상당한 도전이 존재한다. 본 개시내용은 일반적으로 재발/불응성 다발성 골수종을 치료하기 위한 개선된 항-BCMA CAR T 세포 조성물 및 방법에 관한 것이다.
- [0070] B 세포 성숙 항원(BCMA, 또한 CD269 또는 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리, 구성원 17로 알려짐; TNFRSF17은 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼패밀리의 구성원인(예를 들어, 문헌[Thompson *et al.*, *J. Exp. Medicine*, 192(1): 129-135, 2000, and 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 들어, 문헌[Mackay *et al.*, 2003 and Kalled *et al.*, *Immunological Reviews*, 204: 43-54, 2005] 참조). 비악성 세포 중에서, BCMA는 대부분 혈장 세포 및 성숙 B-세포의 서브세트에서 발현되는 것으로 보고되었다(예를 들어, 문헌[Laabi *et al.*, *EMBO J.*, 77(1): 3897-3904, 1992; Laabi *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 22(7): 1147-1154, 1994; Kalled *et al.*, 2005; O'Connor *et al.*, *J. Exp. Medicine*, 199(1): 91-97, 2004; 및 Ng *et al.*, *J. Immunol.*, 73(2): 807-817, 2004] 참조). BCMA가 결핍된 마우스는 건강하며 정상적인 수의 B 세포를 갖지만, 장기간 생존한 혈장 세포의 생존은 손상된다(예를 들어, 문헌[O'Connor *et al.*, 2004; Xu *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 21(12): 4067-4074, 2001; 및 Schiemann *et al.*, *Science*, 293(5537): 2111-2114, 2001] 참조). BCMA RNA는 다발성 골수종 세포에서 그리고 다른 림프종에서 보편적으로 검출되었고, BCMA 단백질은 몇몇 연구자에 의해 다발성 골수종 환자로부터의 혈장 세포 표면 상에서 검출되었다(예를 들어, 문헌[Novak *et al.*, *Blood*, 103(2): 689-694, 2004; Neri *et al.*, *Clinical Cancer Research*, 73(19): 5903-5909, 2007; Bellucci *et al.*, *Blood*, 105(10): 3945-3950, 2005; and Moreaux *et al.*, *Blood*, 703(8): 3148-3157, 2004] 참조).
- [0071] 다양한 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 개선된 입양 세포 요법 조성물은 중증의 사이토카인 방출 증후군 CRS의 부재 하에서, 생체내 임상 반응을 예상치 못하게 확장시키고 유발하는 치료적으로 유효한 용량의 항-BCMA CAR T 세포를 포함한다.
- [0072] 특정 실시형태에서, 재발/불응성 다발성 골수종을 치료하기 위해 본 명세서에 상정된 치료적으로 유효한 용량의 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는 개선된 조성물이 사용된다.
- [0073] 본 발명의 실행은 달리 구체적으로 나타내지 않는 한, 대조적으로, 당업계의 기술 내인 화학, 생화학, 유기 화학, 분자 생물학, 미생물학, 재조합 DNA 기법, 유전자학, 면역학 및 세포 생물학의 통상적인 방법을 사용할 것이며, 이들 중 다수는 예시 목적을 위해 이하에 기재된다. 이러한 기법은 문헌에서 완전히 확장된다. 예를 들어, 문헌[Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Edition, 2001); Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); Maniatis *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, updated July 2008); *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover, *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (IRL Press, Oxford, 1985); Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, New York, 1992); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); Harlow and Lane, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998) *Current Protocols in Immunology* Q. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober, eds., 1991); *Annual Review of Immunology*]; 뿐만 아니라 문헌[*Advances in Immunology*]과 같은 저널의 논문을 참조.

[0074] B.정의

[0075] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 또는 동일한 임의의 방법 및 물질은 본 발명의 실행 또는 시험에서 사용될 수 있지만, 조성물, 방법 및 물질의 바람직한 실시형태가 본 명세서에 기재된다. 본 발명의 목적을 위해, 다음의 용어를 이하에 정의한다.

[0076] 단수의 항목은 본 명세서에서 항목의 문법적 대상 중 하나 또는 하나 초과(즉, 적어도 하나 또는 하나 이상)을 지칭하기 위해 사용된다. 예로서, "요소"는 하나의 요소 또는 하나 이상의 요소를 의미한다.

[0077] 대안의 사용(예를 들어, "또는")은 대안 중 하나, 둘 다 또는 이들의 임의의 조합을 의미하는 것으로 이해되어야 한다.

[0078] 용어 "및/또는"은 대안 중 하나, 또는 둘 다를 의미하는 것으로 이해되어야 한다.

[0079] 본 명세서에서 사용되는 용어 "약" 또는 "대략"은 기준 양, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1%만큼 다른 양, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 지칭한다. 일 실시형태에서, 용어 "약" 또는 "대략"은 기준 양, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해 $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 9\%$, $\pm 8\%$, $\pm 7\%$, $\pm 6\%$, $\pm 5\%$, $\pm 4\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2\%$ 또는 $\pm 1\%$ 인 기준 양, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이의 범위를 지칭한다.

[0080] 본 명세서 전체적으로, 달리 요구되지 않는 한, 단어 "포함하다(comprise)", "포함하다(comprises)" 및 "포함하는(comprising)"은 단계들 또는 요소들의 임의의 다른 단계 또는 요소를 제외하지 않고 언급된 단계 또는 요소 또는 단계들 또는 요소들의 그룹을 포함하는 것을 의미하는 것으로 이해될 것이다. "이루어진"은 어구 "이루어진"에 따르는 어떤 것이나 포함하지만, 이들로 제한되지 않음을 의미한다. 따라서, 어구 "이루어진"은 열거된 요소가 필요하거나 또는 의무적이라는 것과, 다른 요소가 존재하지 않을 수도 있다는 것을 나타낸다. "본질적으로 이루어진"은 어구 다음에 열거된 임의의 요소를 포함하는 것을 의미하며, 열거된 요소에 대해 본 개시내용에 구체화된 활성 또는 작용을 방해하지 않는 또는 기여하지 않는 다른 요소로 제한된다. 따라서, 어구 "본질적으로 이루어진"은 열거된 요소가 필요하거나 또는 의무적이지만, 열거된 요소의 활성 또는 작용에 실질적으로 영향을 미치는 다른 요소가 존재하지 않는다는 것을 나타낸다.

[0081] 본 명세서 전체적으로 "일 실시형태", "실시형태", "특정 실시형태", "관련된 실시형태", "특정 실시형태", "추가 실시형태" 또는 "추가적인 실시형태" 또는 이들의 조합에 관한 언급은 실시형태와 관련하여 기재된 특정 특성, 구조 또는 특징이 본 발명의 적어도 하나의 실시형태에 포함된다는 것을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체적으로 다양한 곳에서 앞서 언급한 어구의 출현은 동일한 실시형태에 관해 모두 필수적이지는 않다. 더 나아가, 특정 특성, 구조 또는 특징은 하나 이상의 실시형태에서 임의의 적합한 방식으로 조합될 수 있다. 또한 일 실시형태에서 특징의 긍정적 인용은 특정 실시형태에서 특징을 제외하기 위한 기준으로서 작용한다는 것이 이해된다.

[0082] "폴리펩타이드", "폴리펩타이드 단편", "펩타이드" 및 "단백질"은 달리 대조적으로 구체화되지 않는 한, 통상적인 의미에 따라, 즉, 아미노산의 서열로서 상호호환적으로 사용된다. 폴리펩타이드는 특정한 길이로 제한되지 않으며, 예를 들어, 그들은 전장 단백질 서열 또는 전장 단백질의 단편을 포함할 수 있고, 폴리펩타이드의 번역후 변형, 예를 들어, 글리코실화, 아세틸화, 포스포릴화 등뿐만 아니라 당업계에 공지된 다른 변형(천연 유래와 비천연 유래 둘 다)을 포함할 수 있다. 다양한 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 CAR 폴리펩타이드는 단백질의 N-말단 단부에서 신호(또는 리더) 서열을 포함하며, 이는 공변역 또는 번역후 단백질의 전달을 지시한다. 본 명세서에 개시된 CAR에서 유용한 적합한 신호 서열의 예시적 예는 IgG1 중쇄 신호 서열 및 CD8 α 신호 서열을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 폴리펩타이드는 임의의 다양한 잘 공지된 재조합 및/또는 합성 기법을 이용하여 제조될 수 있다. 본 명세서에 상정된 폴리펩타이드는 본 개시내용의 CAR, 또는 본 명세서에 개시된 바와 같은 CAR 중 하나 이상의 아미노산으로부터의 결실, 이에 대한 첨가, 및/또는 이의 치환을 갖는 서열을 구체적으로 포함한다. 특정 실시형태에서, 용어 "폴리펩타이드"는 추가로 변이체, 단편 및 융합 폴리펩타이드를 포함한다.

[0083] 본 명세서에 사용된 바와 같은 "단리된 펩타이드" 또는 "단리된 폴리펩타이드" 등은 세포 환경으로부터 펩타이드 또는 폴리펩타이드 분자의 시험관내 단리 및/또는 정제를 지칭하며, 즉, 이는 시험관내 물질과 상당히 관련되지 않는다. 유사하게, "단리된 세포"는 생체내 조직 또는 기관으로부터 얻어지거나 또는 세포외 기질이 실

질적으로 없는 세포를 지칭한다.

- [0084] 폴리펩타이드 변이체는 하나 이상의 치환, 결실, 첨가 및/또는 삽입에서 천연 유래 폴리펩타이드와 상이할 수 있다. 이러한 변이체는 천연 유래일 수 있거나 또는 합성에 의해, 예를 들어 상기 폴리펩타이드 서열 중 하나 이상을 변형시킴으로써 생성될 수 있다. 예를 들어, 특정 실시형태에서, CAR 폴리펩타이드의 결합 도메인, 힌지, TM 도메인, 공자극 신호전달 도메인 또는 1차 신호전달 도메인 내로 하나 이상의 치환, 결실, 첨가 및/또는 삽입을 도입함으로써 CAR의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 폴리펩타이드는 이에 대해 적어도 약 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.
- [0085] 폴리펩타이드는 "폴리펩타이드 단편"을 포함한다. 폴리펩타이드 단편은 단량체 또는 다량체일 수 있고 천연-유래 또는 재조합적으로 생성된 폴리펩타이드의 아미노-말단 결실, 카복실-말단 결실 및/또는 내부 결실 또는 치환을 갖는 폴리펩타이드를 지칭한다. 특정 실시형태에서, 폴리펩타이드 단편은 적어도 5 내지 약 500개의 아미노산 길이의 아미노산 쇄를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 단편은 적어도 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 또는 450개의 아미노산 길이인 것이 인식될 것이다.
- [0086] 융합 폴리펩타이드 및 융합 단백질은 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 이상의 폴리펩타이드 세그먼트를 갖는 폴리펩타이드를 지칭한다.
- [0087] 본 명세서에서 사용되는 용어 "폴리뉴클레오타이드" 또는 "핵산"은 전령 RNA(mRNA), RNA, 게놈 RNA (gRNA), 플러스 가닥 RNA (RNA(+)), 마이너스 가닥 RNA(RNA(-)), 게놈 DNA(gDNA), 상보성 DNA(cDNA) 또는 재조합 DNA를 지칭한다. 폴리뉴클레오타이드는 단일 및 이중 가닥 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 본 명세서에 기재된 임의의 기준 서열(예를 들어, 서열목록)에 대해 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오타이드 또는 변이체를 포함하며, 전형적으로 변이체는 기준 서열의 적어도 하나의 생물학적 활성을 유지한다. 다양한 예시적 실시형태에서, 본 발명은 부분적으로 발현 벡터, 바이러스 벡터 및 전달 플라스미드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드, 및 이를 포함하는 조성물 및 세포를 상정한다.
- [0088] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "단리된 폴리뉴클레오타이드"는 천연 유래 상태로 그에 측접하는 서열로부터 정제된 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어, 정상적으로는 단편에 인접한 서열로부터 제거된 DNA 단편을 지칭한다. "단리된 폴리뉴클레오타이드"는 또한 천연에서 존재하지 않고 사람의 손에 의해 만들어진 상보성 DNA(cDNA), 재조합 DNA, 또는 다른 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다.
- [0089] 발현 벡터에 존재하는 "제어 요소" 또는 "조절 서열"은 벡터의 비-번역 영역-복제 기점, 선택 카세트, 프로모터, 인핸서, 번역 개시 신호(샤인 달가노 서열(Shine Dalgarno sequence) 또는 코작 서열(Kozak sequence)) 인트론, 폴리아데닐화 서열, 5' 및 3' 비번역 영역(이는 전사 및 번역을 수행하기 위해 숙주 세포 단백질과 상호작용함)이다. 이러한 요소는 그들의 강도 및 특이성이 다를 수 있다. 이용되는 벡터 시스템 및 숙주에 따라서, 흔한 프로모터 및 유도성 프로모터를 포함하는 다수의 적합한 전사 및 번역 요소가 사용될 수 있다.
- [0090] "내인성" 제어 서열은 게놈 내 주어진 유전자와 자연적으로 연결된 것이다. "외인성" 제어 서열은 연결된 인핸서/프로모터에 의해 해당 유전자의 전사가 지시되도록 유전자 조작(즉, 분자 생물학 기법)에 의해 유전자에 대해 병치로 위치된 것이다. "이종성" 제어 서열은 유전자 조작 중인 세포와 상이한 종으로부터 유래된 외인성 서열이다.
- [0091] 본 명세서에서 사용되는 용어 "프로모터"는 RNA 중합효소가 결합하는 폴리뉴클레오타이드(DNA 또는 RNA)의 인식 부위를 지칭한다. RNA 중합효소는 프로모터에 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오타이드를 개시하고 전사한다. 특정 실시형태에서, 포유류 세포에서 작동하는 프로모터는 전사가 개시되는 부위로부터 상류의 대략 25 내지 30 개 염기에 위치되는 AT-풍부 영역 및/또는 전사 개시로부터 상류의 70 내지 80개 염기에서 발견되는 다른 서열, N이 임의의 뉴클레오타이드일 수 있는 CNCAAT 영역을 포함한다.
- [0092] 용어 "인핸서"는 향상된 전사를 제공할 수 있는 서열을 함유하고, 일부 경우에 다른 제어 서열에 대해 그들의 배향이 독립적으로 작용할 수 있는 DNA의 세그먼트를 지칭한다. 인핸서는 프로모터 및/또는 다른 인핸서 요소와 협응하여 또는 상가적으로 작용할 수 있다. 용어 "프로모터/인핸서"는 프로모터와 인핸서 기능을 둘 다 제공할

수 있는 서열을 함유하는 DNA의 세그먼트를 지칭한다.

- [0093] 용어 "작동 가능하게 연결된"은 기재된 성분이 그들의 의도된 방식으로 작용하도록 허용하는 관계에 있는 병치를 지칭한다. 일 실시형태에서, 상기 용어는 핵산 발현 제어 서열(예컨대 프로모터 및/또는 인핸서)과 제2 폴리뉴클레오타이드 서열, 예를 들어, 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드 사이의 기능성 결합을 지칭하되, 발현 제어 서열은 제2 서열에 대응하는 핵산의 전사를 지시한다.
- [0094] 용어 "벡터"는 본 명세서에서 다른 핵산 분자를 전달하거나 또는 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭하기 위해 사용된다.
- [0095] 용어 "렌티바이러스 벡터"는 주로 렌티바이러스로부터 유래된 LTR을 포함하는 구조적 및 기능적 유전자 요소, 또는 이의 일부를 함유하는 바이러스 벡터 또는 플라스미드를 지칭한다.
- [0096] 특정 실시형태에서, 용어 "렌티바이러스 벡터", "렌티바이러스 발현 벡터"는 렌티바이러스 전달 플라스미드 및/또는 감염성 렌티바이러스 입자를 지칭하기 위해 사용될 수 있다. 본 명세서에서 클로닝 부위, 프로모터, 조절 요소, 이중성 핵산 등과 같은 요소가 언급되는 경우에, 이들 요소의 서열은 렌티바이러스 입자에서 RNA 형태로 존재하고 DNA 플라스미드에서 DNA 형태로 존재한다는 것이 이해되어야 한다.
- [0097] "자기-불활성화"(SIN) 벡터는 복제-결합 벡터, 예를 들어, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터를 지칭하며, 이때 U3 영역으로서 알려진 우측(3') LTR 인핸서-프로모터 영역은 바이러스 복제의 제1 라운드를 지나서 바이러스 전사를 방지하도록(예를 들어, 결실 또는 치환에 의해) 변형되었다. 자기-불활성화는 벡터 DNA 3' LTR의 U3 영역 내 결실의 도입을 통해 바람직하게 달성되며, 즉, DNA는 벡터 RNA를 생성하기 위해 사용된다. 따라서, 역전사 동안, 이 결실은 프로바이러스 DNA의 5' LTR에 전달된다. 특정 실시형태에서, LTR의 전사 활성화와 함께 크게 감소되거나 또는 제거되도록 충분한 U3 서열을 제거함으로써, 형질도입 세포 내 전장 벡터의 생성을 크게 감소 또는 제거하는 것이 바람직하다. HIV 기반 렌티벡터의 경우에, 이러한 벡터가 벡터 역가의 상당한 감소 없이 LTR TATA 박스의 제거(예를 들어, -418 내지 -18의 결실)를 포함하는 상당한 U3 결실을 용인한다는 것을 발견하였다.
- [0098] **C. 항-BCMA 키메라 항원 수용체**
- [0099] 다양한 실시형태에서, BCMA 발현 세포에 대해 T 세포의 세포독성을 전향시키는 유전자 조작된 수용체가 제공된다. 이들 유전자 조작된 수용체는 본 명세서에서 항-BCMA 키메라 항원 수용체(CAR)로 지칭된다.
- [0100] 특정 실시형태에서 상정된 항-BCMA CAR은 신호 펩타이드, 항-BCMA scFv, CD8 α 힌지 도메인, CD8 α 막관통 도메인, 4-1BB 공자극 도메인 및 CD3 ζ 1차 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0101] "단일쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하되, 이들 도메인은 단일 폴리펩타이드쇄에 그리고 배향 중 하나로(예를 들어, VL-VH 또는 VH-VL) 존재한다. 일반적으로, scFv 폴리펩타이드는 VH와 VL 도메인 사이에 폴리펩타이드 링커를 더 포함하는데, 이는 scFv가 항원 결합을 위한 목적으로 하는 구조를 형성하는 것을 가능하게 한다.
- [0102] "V_H" 또는 "VH"는 면역글로불린 중쇄의 가변 영역을 지칭한다. "V_L" 또는 "VL"은 면역글로불린 경쇄의 가변 영역을 지칭한다. 다양한 실시형태에서, scFv는 서열번호 7에 제시된 경쇄 서열 및 서열번호 8에 제시된 중쇄 서열을 포함한다.
- [0103] 경쇄 및 중쇄 가변 영역은 "상보성-결정 영역" 또는 "CDR"로도 불리는 3개의 초가변 영역을 함유한다. 특정 실시형태에서, scFv 경쇄는 서열번호 1 내지 3에 제시된 CDR1-3 서열을 포함하고, scFv 중쇄는 서열번호 4 내지 6에 제시된 CDRH1-3 서열을 포함한다.
- [0104] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 CAR은 다양한 도메인 사이에 링커 잔기를 포함할 수 있으며, 예를 들어, 분자의 적절한 간격 및 입체배치를 위해 첨가될 수 있다. 특정 실시형태에서, 링커는 다음의 아미노산 서열을 포함한다: GSTSGSGKPGSGEGSTKG(서열번호 22)(Cooper *et al.*, *Blood*, 101(4): 1637-1644 (2003)).
- [0105] 특정 실시형태에서, 힌지 도메인은 CD8 α 힌지 영역을 포함한다.
- [0106] "막관통 도메인"은 세포의 결합 부분 및 세포내 신호전달 도메인에 융합하고 T 세포의 혈장막에 CAR을 고정시키는 CAR의 부분이다. 특정 실시형태에서, 막관통 도메인은 CD8 α 막관통 영역을 포함한다.
- [0107] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 CAR은 "공자극 신호전달 도메인" 및 "1차 신호전달 도메인"을

포함한다. 본 명세서에서 사용되는 용어, "공자극 신호전달 도메인" 또는 "공자극 도메인"은 공자극 분자의 세포내 신호전달 도메인을 지칭한다. 1차 신호전달 도메인은 자극 방법으로 또는 저해 방법으로 TCR 복합체의 1차 활성화를 조절한다. 자극 방법으로 작용하는 1차 신호전달 도메인은 면역수용체 타이로신계 활성화 모티프 또는 ITAM으로서 알려진 신호전달 모티프를 함유할 수 있다. 특정 실시형태에서, 항-BCMA CAR은 CD137 공자극 신호전달 도메인 및 CD3 3' 1차 신호전달 도메인을 포함한다.

[0108] 바람직한 실시형태에서, 항-BCMA CAR은 서열번호 9에서 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0109] 특정 실시형태에서, 서열번호 9에 제시된 항-BCMA CAR 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 제공된다.

[0110] 암호 서열 그 자체의 길이와 상관없이 특정 실시형태에서 상정된 폴리뉴클레오타이드는 그들의 전반적인 길이가 상당히 변할 수 있도록 본 명세서의 다른 곳에 개시된 바와 같은 또는 당업계에 공지된 바와 같은 다른 DNA 서열, 예컨대 프로모터 및/또는 인핸서, 비번역 영역(UTR), 신호 서열, 코작 서열, 폴리아데닐화 신호, 추가적인 제한 효소 부위, 다중 클로닝 부위, 내부 리보솜 유입 부위(IRES), 재조합효소 인식 부위(예를 들어, LoxP, FRT 및 Att 부위), 종결 코돈, 전사 종결 신호 및 자기-절단 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 에피토프 태그와 조합될 수 있다. 따라서 거의 임의의 길이의 폴리뉴클레오타이드 단편이 사용될 수 있으며, 총 길이는 바람직하게는 제조의 용이함 및 의도된 재조합 DNA 프로토콜에서의 사용에 의해 제한된다는 것이 상정된다.

[0111] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 항-BCMA CAR을 암호화하는 벡터는 바이러스 벡터이며, 외인성, 내인성, 또는 이중성 제어 서열, 예컨대 프로모터 및/또는 인핸서를 포함할 것이다.

[0112] 특정 실시형태에서, 벡터는 본 명세서에 상정된 항-BCMA CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결된 골수증식성 육종 바이러스 인핸서, 결실된 음성 제어 영역, d1587rev 프라이머-결합 부위 치환(MND) 프로모터(Challita *et al.*, *J Virol.* 69(2):748-55 (1995))를 포함한다.

[0113] 특정 실시형태에서, 세포(예를 들어, T 세포)는 본 명세서에 상정된 항-BCMA CAR을 암호화하는 레트로바이러스 벡터, 예를 들어, 렌티바이러스 벡터로 형질도입된다. 바람직한 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터는 HIV(인간 면역결핍 바이러스; HIV 1형을 포함). 특정 바람직한 실시형태에서, 렌티바이러스 벡터는 SIN HIV-1 벡터이다.

[0114] D. 항-BCMA CAR T 세포

[0115] 본 개시내용은, 특정 실시형태에서, 항-BCMA CAR을 포함하는 T 세포, 예를 들어, 항-BCMA CAR T 세포를 상정한다. 용어 "T 세포" 또는 "T 림프구"는 당업계에 인식되어 있고, 가슴샘세포, 미숙 T 림프구, 성숙 T 림프구, 휴지 T 림프구, 또는 활성화된 T 림프구를 포함하도록 의도된다. T 세포는 T 헬퍼(Th) 세포, 예를 들어, T 헬퍼 1(Th1) 또는 T 헬퍼 2(Th2) 세포일 수 있다. T 세포는 헬퍼 T 세포(HTL; CD4⁺ T 세포) CD4⁺ T 세포, 세포독성 T 세포(CTL; CD8⁺ T 세포), CD4⁺CD8⁺ T 세포, CD4⁺CD8⁻ T 세포 또는 T 세포의 임의의 다른 서브세트일 수 있다. 특정 실시형태에서 사용하기에 적합한 T 세포의 다른 예시적 집단은 미경험 T 세포 및 기억 T 세포를 포함한다.

[0116] 본 발명의 T 세포는 자가/자율("자기") 또는 비-자가("비-자기", 예를 들어, 동종이계, 동질유전자적 또는 이종발생성)일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 "자가"는 동일한 대상체로부터의 세포를 지칭한다. 본 명세서에서 사용되는 "동종이계"는 비교 시 세포와 유전적으로 상이한 동일한 종의 세포를 지칭한다. 본 명세서에서 사용되는 "동질유전자적"은 비교 시 세포와 유전적으로 동일한 상이한 대상체의 세포를 지칭한다. 본 명세서에서 사용되는 "이종발생성"은 비교 시 세포에 대해 상이한 종의 세포를 지칭한다. 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 세포는 동종이계이다.

[0117] T 세포는 말초혈액 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위로부터의 조직, 복수, 흉수, 비장 조직 및 종양을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 다수의 공급원으로부터 얻어질 수 있다. 특정 실시형태에서, T 세포는 당업자에게 공지된 다수의 기법, 예컨대 침강, 예를 들어, FICOLL(상표명) 분리를 이용하여 대상체로부터 수집된 혈액 단위로부터 얻을 수 있다. 일 실시형태에서, 개체의 순환 혈액으로부터의 세포는 분리반출법에 의해 얻는다. 분리반출법 생성물은 전형적으로 T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포, 다른 유핵 백혈구, 적혈구 및 혈소판을 포함하는, 림프구를 함유한다. 일 실시형태에서, 분리반출법에 의해 수집된 세포는 혈장 분획을 제거하기 위해 그리고 후속적 가공을 위해 적절한 완충제 또는 배지에 세포를 두기 위해 세척될 수 있다. 세포는 PBS로 또는 칼슘, 마그네슘 및 대부분, 그렇지 않다면 모든 다른 2가 양이온이 없는 다른 적합한 용액으로 세척될 수 있다. 당업자에 의해 인식될 바와 같이, 세척 단계는 당업자에게 공지된 방법에 의해, 예컨대 반

자동화된 통과액 원심분리를 이용하여 달성될 수 있다. 예를 들어, 코브(Cobe) 2991 세포 처리기, 박스터 사이토메이트(Baxter CytoMate) 등. 세척 후에, 세포는 다양한 생체 적합 완충제 또는 완충제가 있는 또는 완충제 없이 다른 식염수 용액 중에서 재현탁될 수 있다. 특정 실시형태에서, 분리반출법 샘플의 바람직하지 않은 성분은 직접 재현탁된 배양 배지에서 제거될 수 있다.

[0118] T 세포는 공지된 방법을 이용하여 단리 후에 유전자 변형될 수 있고, 또는 T 세포는 유전자 변형되기 전에 시험관내에서 활성화 및 확장될 수 있다(또는 전구체의 경우에 분화됨). 특정 실시형태에서, T 세포는 본 명세서에 상정된 키메라 항원 수용체로 유전자 변형되고(예를 들어, CAR을 암호화하는 핵산을 포함하는 바이러스 벡터로 형질도입됨), 이어서, 시험관내에서 활성화 및 확장된다. 다양한 실시형태에서, T 세포는 CAR을 발현시키기 위한 유전자 변형 전에 또는 후에 활성화 및 확장될 수 있다.

[0119] 일 실시형태에서, 세포가 해동 시 생존한 채로 남아있도록 항-BCMA CAR을 발현시키는 T 세포는 동결보존된다. 본 명세서에서 사용되는 "동결보존하는"은 0도 아래의 온도, 예컨대(전형적으로) 77K 또는 -196℃(액체 질소의 비등점)로 냉각시키는 것에 의한 세포의 보존을 지칭한다. 동결보존제는 저온에서의 냉동 또는 실온으로 가온에 기인하여 보존 중인 세포가 손상되는 것을 방지하기 위해 0도 아래의 온도에서 종종 사용된다. 동결보존제 및 최적의 냉각 속도는 세포 손상에 대해 보호할 수 있다. 사용될 수 있는 동결보존제는 다이메틸 설폭사이드(DMSO)(Lovelock and Bishop, Nature, 1959; 183: 1394-1395; Ashwood-Smith, Nature, 1961; 190: 1204-1205), 글리세롤, 폴리비닐피롤리돈(Rinfret, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1960; 85: 576), 및 폴리에틸렌 글리콜(Sloviter and Ravdin, Nature, 1962; 196: 48)을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 바람직한 냉각속도는 1° 내지 3℃/분이다. 적어도 2시간 후에, T 세포는 -80℃의 온도에 도달되었고, 영구 저장을 위해, 예컨대 장기간 극저온 저장 용기 내에서 액체 질소에(-196℃) 직접 배치될 수 있다.

[0120] E. 조성물 및 제형

[0121] 본 명세서에 상정된 조성물은 치료적 유효량의 항-BCMA CAR T 세포를 포함한다. 조성물은 약제학적 조성물을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. "약제학적 조성물"은 단독으로 또는 요법의 하나 이상의 다른 양상과 조합하여 세포 또는 동물에 대한 투여를 위한 약제학적으로 허용 가능한 또는 생리적으로 허용 가능한 용액 중에서 제형화된 조성물을 지칭한다. 또한 원한다면, 조성물은 마찬가지로 다른 제제, 예를 들어, 사이토카인, 성장인자, 호르몬, 소분자, 화학치료제, 프로드러그, 약물, 항체 또는 다른 다양한 약제학적 활성제와 조합하여 투여될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 또한 조성물 중에 포함될 수 있는 다른 성분에 대한 제한은 사실상 없으며, 단, 추가적인 제제는 의도된 요법을 전달하기 위한 조성물의 능력에 유해하게 영향을 미치지 않는다.

[0122] 어구 "약제학적으로 허용 가능한"은 타당한 의학적 판단의 범주 내에서 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 다른 문제 또는 합병증 없이, 합리적인 유해/유익비에 비례하여 인간 및 동물 조직과 접촉되어 사용하기에 적합한 해당 화합물, 물질, 조성물 및/또는 제형을 지칭하기 위해 본 명세서에서 사용된다.

[0123] 본 명세서에서 사용되는 "약제학적으로 허용 가능한 담체"는 인간 또는 가축 동물에서의 사용에 대해 허용 가능한 임의의 보조제, 담체, 부형제, 활택제, 감미제, 희석제, 보존제, 염료/착색제, 향미 증진제, 계면활성제, 습윤제, 분산제, 현탁제, 안정제, 등장제, 용매, 계면활성제 또는 유화제를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 예시적인 약제학적으로 허용 가능한 담체는 당, 예컨대 락토스, 글루코스 및 수크로스; 전분, 예컨대 옥수수 전분 및 감자 전분; 셀룰로스 및 그의 유도체, 예컨대 카복시메틸셀룰로스나트륨, 에틸 셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트; 트래거캔스; 맥아, 젤라틴; 탭크; 코코아 버터, 왁스, 동물성 및 식물성 지방, 파라핀, 실리콘, 벤토나이트, 규산, 산화아연; 오일, 예컨대 땅콩유, 면실유, 홍화유, 참깨유, 올리브유, 옥수수유 및 대두유; 글리세롤, 예컨대 프로필렌 글리콜; 폴리올, 예컨대 글리세린, 솔비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜; 에스터, 예컨대 올레산에틸 및 라우르산에틸; 한천; 완충제, 예컨대 수산화마그네슘 및 수산화알루미늄; 알긴산; 무발열원수; 등장 식염수; 링거액; 에틸 알코올; 인산염 완충 용액; 및 약제학적 제형 중에서 사용된 임의의 다른 적합한 물질을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0124] 특정 실시형태에서, 조성물은 본 명세서에 상정된 항-BCMA CAR-발현 T 세포의 양, 더 바람직하게는 치료적 유효량을 포함한다.

[0125] 본 명세서에서 사용되는 용어 "양" 또는 "용량"은 임상 결과를 포함하는 유리한 또는 목적으로 하는 예방적 또는 치료적 결과를 달성하기에 충분한 항-BCMA CAR T 세포의 "유효한 양", "유효한 용량", "유효량"을 지칭한다.

[0126] 항-BCMA CAR T 세포의 "치료적 유효량" 또는 "치료적으로 유효한 용량"은 또한 항-BCMA CAR T 세포의 임의의 독성 또는 유해한 효과가, 예를 들어, CRS가 치료적으로 유리한 효과보다 더 큰 것이다. 용어 "치료적 유효량"은

대상체(예를 들어, 환자)를 치료하는 데 효과적인 양을 포함한다. 일 실시형태에서, 치료적으로 유효한 용량은 대상체에서 다발성 골수종을 치료하기 위한 항-BCMA CAR T 세포의 최소 유효 용량(minimal effective dose: MED)이다. 일 실시형태에서, 치료적으로 유효한 용량은 대상체에서 해결 가능하지 않은 CRS를 야기하지 않는 항-BCMA CAR T 세포의 최대허용용량(maximum tolerated dose: MTD)이다.

- [0127] 특정 실시형태에서, 조성물은 바람직하게는 비경구 투여, 예를 들어, 혈관내(정맥내 또는 동맥내) 투여를 위해 제형화된다. 바람직한 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 조성물은 단일 용량으로 대상체에 정맥내로 주입된다.
- [0128] 일 실시형태에서, 대상체에게 투여되는 조성물 중의 항-BCMA CAR+ T 세포의 양은 적어도 약 5.0×10^7 개의 세포, 적어도 약 15.0×10^7 개의 세포, 적어도 약 45.0×10^7 개의 세포, 적어도 약 80.0×10^7 개의 세포, 또는 적어도 약 12.0×10^8 개의 세포이다.
- [0129] 일 실시형태에서, 대상체에게 투여되는 조성물 중의 항-BCMA CAR+ T 세포의 양은 약 5.0×10^7 개 초과인 세포, 약 15.0×10^7 개 초과인 세포, 약 45.0×10^7 개 초과인 세포, 약 80.0×10^7 개 초과인 세포 또는 약 12.0×10^8 개 초과인 세포이다.
- [0130] 일 실시형태에서, 대상체에게 투여될 조성물 중의 항-BCMA CAR+ T 세포의 양은 약 5.0×10^7 개의 세포 내지 약 15.0×10^7 개의 세포, 약 5.0×10^7 개의 세포 내지 약 45.0×10^7 개의 세포, 약 5.0×10^7 개의 세포 내지 약 80.0×10^7 개의 세포, 또는 약 5.0×10^7 개의 세포 내지 약 12.0×10^8 개의 세포이다.
- [0131] 일 실시형태에서, 대상체에게 투여될 조성물 중의 항-BCMA CAR+ T 세포의 양은 약 15.0×10^7 개의 세포 내지 약 45.0×10^7 개의 세포, 약 15.0×10^7 개의 세포 내지 약 80.0×10^7 개의 세포, 또는 약 15.0×10^7 개의 세포 내지 약 12.0×10^8 개의 세포이다.
- [0132] 일 실시형태에서, 대상체에게 투여될 조성물 중의 항-BCMA CAR+ T 세포의 양은 적어도 5.0×10^7 개의 세포 $\pm$ 20%, 적어도 15.0×10^7 개의 세포 $\pm$ 20%, 적어도 45.0×10^7 개의 세포 $\pm$ 20%, 적어도 80.0×10^7 개의 세포, $\pm$ 20% 또는 적어도 12.0×10^8 개의 세포 $\pm$ 20%이다.
- [0133] 일 실시형태에서, 대상체에게 투여될 조성물 중의 항-BCMA CAR+ T 세포의 양은 5.0×10^7 개 초과인 세포 $\pm$ 20%, 적어도 15.0×10^7 개의 세포 $\pm$ 20%, 적어도 45.0×10^7 개의 세포 $\pm$ 20%, 적어도 80.0×10^7 개의 세포 $\pm$ 20%, 또는 적어도 12.0×10^8 개의 세포 $\pm$ 20%이다.
- [0134] 일 실시형태에서, 대상체에게 투여될 조성물 중의 항-BCMA CAR+ T 세포의 양은 5.0×10^7 개의 세포 $\pm$ 20% 내지 15.0×10^7 개의 세포 $\pm$ 20%, 5.0×10^7 개의 세포 $\pm$ 20% 내지 45.0×10^7 개의 세포 $\pm$ 20%, 5.0×10^7 개의 세포 $\pm$ 20% 내지 80.0×10^7 개의 세포 $\pm$ 20%, 또는 5.0×10^7 개의 세포 $\pm$ 20% 내지 12.0×10^8 개의 세포 $\pm$ 20%이다.
- [0135] 일 실시형태에서, 대상체에게 투여될 조성물 중의 항-BCMA CAR+ T 세포의 양은 15.0×10^7 개의 세포 $\pm$ 20% 내지 45.0×10^7 개의 세포 $\pm$ 20%, 15.0×10^7 개의 세포 $\pm$ 20% 내지 80.0×10^7 개의 세포 $\pm$ 20%, 또는 15.0×10^7 개의 세포 $\pm$ 20% 내지 12.0×10^8 개의 세포 $\pm$ 20%이다.
- [0136] 본 명세서에 제공되는 용도를 위해, 세포는 일반적으로 1리터 이하의 용적이며, 500 mL 이하, 심지어 250 mL 또는 100 mL 이하일 수 있다.
- [0137] 특정 실시형태에서, 약제학적 조성물은 1종 이상의 약제학적 또는 생리학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제와 조합한 치료적 유효량의 항-BCMA CAR T 세포를 포함한다.
- [0138] 치료적으로 유효한 용량의 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는 약제학적 조성물은 완충제, 예컨대 중성 완충 식염수, 인산염 완충 식염수 등; 탄수화물, 예컨대 글루코스, 만노스, 수크로스 또는 텍스트란, 만니톨; 단백질; 폴리펩타이드 또는 아미노산, 예컨대 글리신; 항산화제; 킬레이트제, 예컨대 EDTA 또는 글루타티온; 보

조제(예를 들어, 수산화알루미늄); 및 보존제를 포함할 수 있다.

- [0139] 액체 약제학적 조성물은, 그들이 용액이든, 현탁액이든 또는 다른 유사한 형태이든 다음 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 멸균 희석제, 예컨대 주사용수, 식염수 용액, 바람직하게는 생리 식염수, 링거액, 등장성 염화나트륨, 고정유, 예컨대 용매 또는 현탁 매질로서 작용할 수 있는 합성 모노 또는 다글리세라이드, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 용매; 항균제, 예컨대 벤질 알코올 또는 메틸 파라벤; 항산화제, 예컨대 아스코르브산 또는 아황산수소나트륨; 킬레이트제, 예컨대 에틸렌다이아민테트라아세트산; 완충제, 예컨대 아세트산염, 시트르산염 또는 인산염 및 염화나트륨 또는 텍스트로스와 같은 독성 조절을 위한 제제. 비경구 제제는 유리 또는 플라스틱으로 만들어진 앰플, 일회용 주사기 또는 다회 용량 바이알에 밀봉될 수 있다. 주사용 약제학적 조성물은 바람직하게는 멸균이다.
- [0140] 일 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 항-BCMA CAR T 세포 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 세포 배양 배지에 제형화된다. 이러한 조성물은 인간 대상체에 대한 투여에 적합하다. 특정 실시형태에서, 약제학적으로 허용 가능한 세포 배양 배지는 무혈청 배지이다.
- [0141] 무혈청 배지는 단순화된 그리고 더 양호하게 정해진 조성물, 감소된 정도의 오염물질, 감염제의 잠재적 공급원의 제거, 및 더 낮은 비용을 포함하는, 혈청 함유 배지 이상의 몇몇 이점을 가진다. 다양한 실시형태에서, 무혈청 배지는 무-동물이고, 선택적으로 무 단백질일 수 있다. 선택적으로, 배지는 생약제학적으로 허용 가능한 재조합 단백질을 함유할 수 있다. "무-동물" 배지는 성분들이 비-동물 공급원으로부터 유래된 배지를 지칭한다. 재조합 단백질은 무혈청 배지에서 천연 동물 단백질을 대신하며, 영양소는 합성, 식물 또는 미생물 공급원으로부터 얻어진다. "무단백질" 배지는 대조적으로 실질적으로 단백질이 없는 것으로 정의된다.
- [0142] 특정 조성물에서 사용되는 무혈청 배지의 예시적 예는 QBSF-60(Quality Biological, Inc.), 스템프로(StemPro)-34(라이프 테크놀로지스(Life Technologies)) 및 X-VIVO 10을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0143] 하나의 바람직한 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는 조성물은 플라즈마라이트 A를 포함하는 용액 중에서 제형화된다.
- [0144] 다른 바람직한 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는 조성물은 동결보존 배지를 포함하는 용액 중에서 제형화된다. 예를 들어, 동결보존제를 이용하는 동결보존 배지는 해동후 높은 세포 생존도 결과를 유지하기 위해 사용될 수 있다. 특정 조성물에서 사용되는 동결보존 배지의 예시적 예는 CryoStor CS10, CryoStor CS5, 및 CryoStor CS2를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0145] 더 바람직한 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는 조성물은 50:50의 플라즈마라이트 A 대 크라이오스토르 CS10을 포함하는 용액 중에서 제형화된다.
- [0146] **F. 치료 방법**
- [0147] 본 명세서에 상정된 다발성 골수종의 치료 방법은 항-BCMA CAR을 발현시키는 치료적 유효량의 T 세포를 포함하는 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함한다.
- [0148] 본 명세서에서 사용되는 용어 "개체" 및 "대상체"는 종종 상호 호환적으로 사용되고, 다발성 골수종을 갖는 인간을 지칭한다. 바람직한 실시형태에서, 대상체는 재발/불응성 다발성 골수종을 갖는 인간을 지칭한다.
- [0149] 본 명세서에서 사용되는 용어 "환자"는 다발성 골수종 및 더 바람직하게는, 재발/불응성 다발성 골수종으로 진단된 대상체를 지칭한다.
- [0150] 본 명세서에서 사용되는 "치료" 또는 "치료하는"은 다발성 골수종 및 더 바람직하게는, 재발/불응성 다발성 골수종의 증상 또는 병리에 대해 임의의 유리한 또는 바람직한 효과를 포함하고, 다발성 골수종 및 더 바람직하게는, 재발/불응성 다발성 골수종의 하나 이상의 측정 가능한 마커의 심지어 최소의 감소를 포함할 수 있다. 치료는 선택적으로 다발성 골수종 증상의 감소 또는 개선, 또는 다발성 골수종 진행의 지연을 수반할 수 있다. "치료"는 다발성 골수종, 또는 이의 관련된 증상의 완전한 근절 또는 치유를 반드시 나타내지는 않는다.
- [0151] 본 명세서에서 사용되는 "예방하다" 및 유사한 단어, 예컨대 "예방된", "예방하는" 등은 다발성 골수종의 재발 가능성을 예방하거나, 저해하거나 또는 감소시키기 위한 접근을 나타낸다.
- [0152] 다발성 골수종은 이들 세포 유형의 단일 클론의 신생물 형질전환을 특징으로 하는 성숙 혈장 세포 형태의 B 세포 악성종양이다. 이들 혈장 세포는 BM에서 증식하고, 인접한 뼈 및 때때로 혈액을 침윤할 수 있다. 다발성 골수종의 변이체 형태는 현성 다발성 골수종, 무증상 다발성 골수종, 혈장 세포 백혈병, 비-분비성 골수종, IgD

골수종, 골경화증 골수종, 뼈의 고립성 형질세포종 및 골수의 형질세포종을 포함한다(예를 들어, 문헌 [Braunwald, et al. (eds), *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 15th Edition (McGraw-Hill 2001)] 참조).

- [0153] 특정 실시형태에서, 치료적 유효량의 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는 조성물은 재발/불응성 다발성 골수종을 치료하기 위해 대상체에게 투여된다. "재발"은 개선 또는 관해 기간 후에 암의 복귀의 진단, 또는 암의 복귀 징후 및 증상을 지칭한다. "불응성"은 특정 치료제에 대한 요법에 내성이거나 또는 비반응성인 암을 지칭한다. 암은 제1 치료 기간의 과정에 걸쳐 또는 후속적 치료 기간 동안에 치료 개시로부터 불응성(즉, 치료제에 대한 개시 노출에 대해 비반응성)이거나 또는 치료제에 대한 내성 발현 결과로서 불응성일 수 있다.
- [0154] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 상정된 조성물은 적어도 하나의 프로테아좀 저해제 및/또는 면역조절 약물(IMiD)을 포함하는, 1, 2, 3회 이상의 치료로 비성공적으로 치료된 재발/불응성 다발성 골수종을 갖는 대상체에게 투여된다. 일 실시형태에서, 대상체의 다발성 골수종은 적어도 1종의 프로테아좀 저해제 및 IMiD를 포함하는 3가지 치료 요법에 대해 불응성이다. 일 실시형태에서, 대상체의 다발성 골수종은 하나 이상의 치료 요법에 대해 이중-불응성이다.
- [0155] 대상체의 다발성 골수종이 불응성인 프로테아좀 저해제의 예시적 예는 보르테조미드 및 카르필조미를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0156] 대상체의 다발성 골수종이 불응성인 IMiD의 예시적 예는 탈리도마이드, 레날리도마이드, 및 포말리도마이드를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0157] 다발성 골수종이 불응성일 수 있는 다른 치료의 예시적 예는 텍사메타손, 및 에플루주맵, 다라투무맵, MOR3087, 이사툽시맵, 베바시주맵, 세툽시맵, 실툽시맵, 토실리주맵, 엘실리모맵, 아진트렐, 리툽시맵, 토시투모맵, 밀라투주맵, 루카투무맵, 다세투주맵, 피기투무맵, 달로투주맵, AVE1642, 타발루맵, 캄프롤리주맵, 피딜리주맵 및 니볼루맵으로 이루어진 군으로부터 선택된 항체-기반 요법을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0158] 일 실시형태에서, 대상체의 다발성 골수종은 다라투무맵에 의한 치료에 대해 불응성이다.
- [0159] 특정 실시형태에서, 대상체의 다발성 골수종은 IMiD, 프로테아좀 저해제 및 텍사메타손에 의한 치료에 대해 불응성이다.
- [0160] 본 명세서에 상정된 방법은 항-BCMA CAR T 세포 조성물의 투여 전에 자가 조혈 줄기 세포 이식을 이용하여 재발/불응성 다발성 골수종을 갖는 대상체를 치료하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0161] 본 명세서에 상정된 방법은 본 명세서에 상정된 항-BCMA CAR T 세포의 투여 전에, 예를 들어, 투여 전 림프구고갈 화학요법 종료 1 내지 4일(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4일)에 대상체의 림프구고갈 단계를 더 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 림프구고갈은 멜팔란, 사이토산, 사이클로포스파마이드 및 플루다라빈 중 하나 이상을 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시형태에서, 대상체는 본 명세서에 상정된 항-BCMA CAR T 세포 조성물의 투여 전에 사이클로포스파마이드 300mg/m² 및 플루다라빈 30mg/m²로 림프구고갈된다.
- [0162] 본 명세서에 인용된 모든 간행물, 특허 출원 및 발행된 특허는 각각의 개개 간행물, 특허 출원 또는 발행된 특허가 참고로 포함되는 것으로 구체적이고 개별적으로 나타나는 것과 같이 본 명세서에 참고로 편입된다.
- [0163] 앞서 언급한 발명은 이해의 분명함의 목적을 위해 예시 및 실시예의 방법으로 일부 상세하게 기재되었지만, 특정 변화 및 변형이 첨부하는 청구범위의 정신 또는 범주로부터 벗어나는 일 없이 본 발명의 교시에 비추어 당업자에게 용이하게 분명하게 될 것이다. 다음의 실시예는 단지 예시의 방법으로 그리고 제한에 의하지 않고 제공된다. 당업자는 본질적으로 유사한 결과를 수득하기 위해 변화 또는 변형될 수 있는 다양한 중요하지 않은 매개변수를 용이하게 인식할 것이다.
- [0164] 실시예
- [0165] 실시예 1
- [0166] BCMA CAR의 구성
- [0167] 무린 항-BCMA scFv 항체를 함유하는 CAR을 설계하여 항-BCMA scFv, 힌지 및 CD8α로부터의 막관통 도메인 및 CD137 공자극 도메인 다음에 CD3ζ쇄의 세포내 신호전달 도메인에 작동 가능하게 연결된 MND 프로모터를 함유하도록 설계하였다. 예를 들어, 도 1 참조. 도 1에 나타난 항-BCMA CAR은 T 세포 상의 표면 발현을 위한 CD8α

신호 펩타이드(SP) 서열을 포함한다. 예시적인 항-BMCA CAR의 폴리뉴클레오타이드 서열을 서열번호 10에 제시하고; 항-BMCA CAR의 예시적 폴리펩타이드 서열을 서열번호 9에 제시하고; 그리고 예시적 CAR 작제물의 벡터맵을 도 1에 나타낸다. 표 3은 항-BMCA CAR 렌티바이러스 벡터의 다양한 뉴클레오타이드 세그먼트에 대한 식별자, 제뱅크 참조번호, 공급원 명칭 및 인용을 나타낸다.

[표 3]

뉴클레오타이드	식별자	제뱅크 참조번호	공급원 명칭	인용
1-185	pUC19 플라스미드 골격	수탁번호 L09137.2 nt 1-185	pUC19	뉴 잉글랜드 바이오랩스 (New England Biolabs)
185-222	링커	해당 없음	합성	해당 없음
223-800	CMV	해당 없음	pHCMV	(1994) PNAS 91: 9564-68
801-1136	R, U5, PBS, 및 패키징 서열	수탁번호 M19921.2 nt 454-789	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
1137-1139	Gag 개시 코돈(ATG)을 정지 코돈(TAG)으로 바꿈	해당 없음	합성	해당 없음
1140-1240	HIV-1 gag 서열	수탁번호 M19921.2 nt 793-893	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
1241-1243	HIV-1 gag 서열을 제 2 정지 코돈으로 바꿈	해당 없음	합성	해당 없음
1244-1595	HIV-1 gag 서열	수탁번호 M19921.2 nt 897-1248	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
1596-1992	HIV-1 pol cPPT/CTS	수탁번호 M19921.2 nt 4745-5125	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
1993-2517	HIV-1, HXB3 env 영역(RRE)을 단리	수탁번호 M14100.1 nt 1875-2399	PgTAT-CMV	Malim, M. H. Nature (1988) 335:181-183
2518-2693	HIV-1 env 서열 S/A	수탁번호 M19921.2 nt 8290-8470	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991)

뉴클레오타이드	식별자	젠뱅크 참조번호	공급원 명칭	인용
				J Virol: 65(11):5732-43
2694-2708	링커	해당 없음	합성	해당 없음
2709-3096	MND	해당 없음	pccl-c-MNDU3c-x2	Challita et al. (1995) J.Virol. 69: 748-755
3097-3124	링커	해당 없음	합성	해당 없음
3125-3187	단일 펩타이드	수탁번호 NM_001768	CD8a 단일 펩타이드	해당 없음
3188-3934	BCMA02 scFv (VL1-링커-VH0)	해당 없음	합성	해당 없음
3935-4141	CD8a 힌지 및 TM	수탁번호 NM_001768	CD8a 힌지 및 TM	Milone et al (2009) Mol Ther 17(8):1453-64
4144-4269	CD137 (4-1BB) 신호전달 도메인	수탁번호 NM_001561	CD137 신호전달 도메인	Milone et al (2009) Mol Ther 17(8):1453-64
4270-4606	CD3-ζ 신호전달 도메인	수탁번호 NM_000734	CD3-ζ 신호전달 도메인	Milone et al (2009) Mol Ther 17(8):1453-64
4607-4717	HIV-1 ppt 및 3' U3 의 부분	수탁번호 M19921.2 nt 9005-9110	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
4718-4834	U3 의 HIV-1 부분 (399bp 결실) 및 R	수탁번호 M19921.2 nt 9511-9627	pNL4-3	Maldarelli, et.al. (1991) J Virol: 65(11):5732-43
4835-4858	합성 폴리 A	해당 없음	합성	Levitt, N. Genes & Dev (1989) 3:1019-1025

뉴클레오타이드	식별자	젠뱅크 참조번호	공급원 명칭	인용
4859-4877	링커	해당 없음	합성	해당 없음
4878-7350	pUC19 골격	수탁번호 L09137.2 nt 2636-2686	pUC19	뉴 잉글랜드 바이오랩스

실시예 2

항-BCMA CAR T 세포 제조 과정

각각의 환자 치료를 위해 독특한 항-BCMA02 CAR T 세포 생성물을 제조한다. 11명의 개개 정상 공여자 PBMC로부터 항-BCMA02 CAR T 세포를 생성함으로써 항-BCMA02 CAR T 세포 생성물에 대한 제조 과정의 신뢰도를 평가하였다. 각각의 공여자로부터의 항-BCMA02 CAR T 세포 확장은 동시에 수행한 매칭된 비형질도입 배양물과 비슷하였다(도 2a).

배양 기간(제10일)의 마지막에, qPCR 및 렌티바이러스-특이적 프라이머 세트(벡터 복제수, VCN)를 이용하여 통

합된 렌티바이러스 수를 정량화함으로써 T 세포 형질도입 효율을 평가하였다. 11명의 공여자로부터의 항-BCMA02 CAR T 세포 배양물은 비슷한 렌티바이러스 형질도입 효율을 나타내었다(도 2b). 항-BCMA02 CAR 양성 T 세포의 빈도를 유세포분석에 의해 측정하였고, BCMA 발현은 모든 공여자에 걸쳐 비슷한 것으로 발견되었다(도 2c).

[0176] BCMA를 발현시키도록 조작된 K562 세포와 함께 공동배양 후에 IFN γ -방출에 의해 각각의 항-BCMA02 CAR T 세포 생성물의 활성을 평가하였다. BCMA-발현 K562 세포에 노출되었을 때 모든 항-BCMA CAR02 T 세포 생성물은 치료적으로 적절한 수준의 IFN γ 방출을 나타내었다(도 2d).

[0177] 실시예 3

[0178] 항-BCMA02 CAR T 세포는 재발/불응성 다발성 골수종의 인간 임상 시험에서 치료 활성을 나타낸다

[0179] 도입

[0180] 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포 요법은 몇몇 혈액학적 악성종양에서 관찰된 강한 그리고 지속적 임상 반응을 입증하였다. 그러나, CD19 밖에서, CAR T 세포의 유망함을 뒷받침 하는 임상 데이터는 제한되었다. CAR T 세포 안전성 및 효능에 대한 잠재력을 치료 선택사항이 제한된 환자 집단인 재발/불응성 다발성 골수종(MM)에서 시험하였다. T 세포를 MM으로 전향시키기 위해, 본 발명자들은 악성 골수종 세포, 혈장 세포, 및 일부 성숙 B 세포에 의해서만 거의 균일하게 발현된 종양 괴사 인자 슈퍼패밀리의 구성원인 표적화된 B 세포 성숙 항원(BCMA)을 가진다. 항-BCMA 활성의 초기 증거는 CD28 공자극 도메인을 갖는 항-BCMA CAR을 암호화하는 감마-레트로바이러스 벡터로 형질도입된 T 세포를 이용하여 최근에 입증되었지만, 높은 질병 부담을 갖는 환자에서 상당한 사이토카인 방출 증후군이 발생되었다(Ali *et al.*, *Blood* 2016). 인간에서 항-BCMA02 CAR T 세포의 치료적으로 유효한 용량은 예측 불가능하기 때문에, 용량-상승 시험을 수행하였다.

[0181] 방법

[0182] 프로테아좀 저해제 및 면역조절제를 포함하는 적어도 3회의 사전 요법을 받거나 또는 이중-불응성인 재발 및/또는 불응성 BCMA-양성 MM을 갖는 환자에게 항-BCMA02 CAR T 세포를 투여하였다. 간략하게, 백혈구분리반출법을 통해 말초 혈액 단핵 세포를 수집하였고, 형질도입 및 확장을 위해 집중 제조 시설로 옮겼다. 환자를 연구 -제5일, -제4일 및 -제3일에 사이클로포스파마이드 300mg/m² 및 플루다라빈 30mg/m²로 림프구고갈시키고, 이어서, 제0일에 항-BCMA02 CAR T 세포의 단일 주입을 받았다.

[0183] CAR T 세포에 대한 평균 백터 복제수(VCN)를 9명의 환자에 대해 결정하였다. 표 4.

[0184] [표 4]

CAR T 세포 VCN	
환자	VCN
1	2.08
2	1.97
3	2.11
4	5.98
5	3.01
6	4.13
7	3.38
8	4.01
9	ND

ND = 아직 결정되지 않음

[0186] 결과

[0187] 9명의 환자에게 5.0×10⁷개의 CAR+ T 세포, 15.0×10⁷개의 CAR+ T 세포, 및 45.0×10⁷개의 CAR+ T 세포의 3 용량 코호트에서 항-BCMA02 CAR T 세포로 주입하였다. 세포를 수집하고 나서, 성공적으로 제조하고, 모든 환자에서 방출하였다. 9명의 주입 대상체에 대한 등록 시 중위 연령은 58세(43 내지 68세)였고, 67%는 남성이었다. 진단으로부터의 중위 시간은 6년(1.3 내지 8.6)이었다. 사전 요법 계통의 중위 수는 6(4 내지 10)이고, 100%의 환자가 자가 줄기 세포 이식 전에 적어도 1회 받았고, 67%는 다라투무맙 또는 CD38 mab 전에 받았으며, 89%는 레날리도마이드 전에 받았고, 78%는 포말리도마이드 전에 받았으며, 100%는 보르테조맙 전에 받았고, 78%는 카르필조밍 전에 받았다.

[0188] 지금까지 용량 제한적 독성 없음, 2등급 초과의 신경독소 또는 3등급 이상의 사이토카인 방출 증후군(CRS)이 관찰되었다. 게다가, 혈관수축제, 토실리루맵 또는 코르티코스테로이드에 의한 치료가 필요한 환자는 없다. 등급 1 또는 2 CRS는 치료 환자의 6/9(67%)에서 발견되었다. CRS에 추가로, 가장 통상적인 치료 신생 유해 사건은 중성구감소증(89%), 백혈구감소증(67%) 및 빈혈증(44%)이었다.

[0189] 모든 용량 코호트에서 임상 반응을 관찰하였다. 초기 코호트 후에, 모든 환자는 연구일에 남아있었고, 2명의 엄중 완전 반응(complete response: CR)을 포함하여, 15.0×10^7 개 이상의 CAR+ T 세포로 치료한 6명 환자에서 전반적인 반응률은 83%였다(표 5 참조). 놀랍게도, 5.0×10^7 개 초과와 CAR+ T 세포 용량 수준에서, 기준에서 골수 관여가 있는 모든 환자는 14일 후의 임의의 시점에 검출된 골수 질환이 없었다.

[0190] [표 5]

용량 수준 및 지속기간에 따른 반응

용량	환자	반응	bb2121 주입 이후의 시간(주수)
5.0×10^7	1	PR	13
	2*	SD	9
	3*	PD	8
15.0×10^7	4	sCR	28+
	5	sCR	21+
	6*	VGPR	19+
45.0×10^7	7	PR	13+
	8	SD	11+
	9*	PR	4+

*는 기준에서 50% 이상의 골수 관여를 나타낸다. 반응을 다발성 골수종에 대한 IMiG 균일 반응 기준을 이용하여 등급화하였다. PR: 부분적 반응, SD: 안정한 질환, PD: 진행성 질환, sCR:엄중 완전 반응, VGPR:매우 양호한 부분적 반응, NE: 아직 평가하지 않음. +는 진행중인 반응을 나타냄.

[0191]

[0192] CAR+ T 세포 확장은 지속적으로 입증되었고, 다른 공개된 CAR T 세포 시험과 유사하다. 데이터를 입수 가능한 5.0×10^7 개 초과와 CAR+ T 세포로 치료한 5명의 환자에서, 유세포분석에 의한 최대 CAR+ T 세포의 범위는 말초 혈액 중에서 10 내지 686개의 CAR+ 세포/ μl 및 골수에서 4 내지 527개의 CAR+ 세포/ μl 였고, 말초 혈액 중의 최대 복제수 범위/ μg 게놈 DNA는 PCR에 의해 34,231 내지 860,204였다.

[0193] 결론

[0194] 항-BCMA02 CAR T 세포는 6개월에 2CR 및 진행중인 임상 반응을 포함하여 5.0×10^7 개 초과와 CAR+ T 세포의 용량 수준에서 현저한 효능을 나타내었다. 다른 CAR T 세포 요법에 의한 결과와 대조적으로, 항-BCMA02 CAR T 세포의 효능은 50% 이상의 골수 관여를 갖는 환자를 포함하여, 예상치 못하게 경증이었으며 관리 가능한 CRS를 수반하였다. 이들 데이터는 재발/불응성 다발성 골수종에 대한 항-BCMA02 CAR T 세포의 치료 효능을 뒷받침한다.

[0195] 추가적인 용량 코호트는 80.0×10^7 개 및 12.0×10^8 개의 CAR+ T 세포의 용량 수준으로 계획한다.

[0196] 실시예 4

[0197] 항-BCMA02 CAR T 세포는 재발/불응성 다발성 골수종의 인간 임상 시험에서 치료 활성을 계속해서 나타낸다

[0198] 21명의 환자에게 5.0×10^7 개의 CAR+ T 세포(3명 환자), 15.0×10^7 개의 CAR+ T 세포(6명의 환자), 45.0×10^7 개의 CAR+ T 세포(9명의 환자), 및 80.0×10^7 개의 CAR+ T 세포(3명의 환자)의 3용량 코호트에서 항-BCMA02 CAR T 세포를 주입하였다. 세포를 수집하고 나서, 성공적으로 제조하고, 모든 환자에서 방출한다. 9명의 주입 대상체에 대해 등록 시 중위 연령은 58세(37 내지 74)였고, 62%는 남성이었다. 진단으로부터의 중위 시간은 5년(1.0 내지 16.0)이었다. 사전 계통 요법의 중위 수는 7(3 내지 14)이었고, 100%의 환자는 적어도 1회의 사전 자가 줄기 세포 이식을 받았고, 100%가 이전에 레날리도마이드 및 보르테조미드로 치료되었고, 91%는 이전에 포말리도마이드 및 카르필조미드로 치료되었으며, 71%는 이전에 다라투무맵으로 치료되었고, 29%의 환자는 펜타-불응성(보르테조미드, 레날리도마이드, 카르필조미드, 포말리도마이드, 다라투무맵)이었다.

[0199] 활성 용량 코호트의 모든 환자는 54주까지의 지속기간에 목적반응을 달성하였다. 도 3. CAR T 세포 용량, 평균

가능한 환자의 수, 전체 반응률, 최고의 반응, 사전 요법의 중위 계통, 및 각각의 코호트에 대한 안전성을 표 6에 제시한다.

[표 6]

코호트 데이터				
코호트	1	2	3	4
CAR+ T 세포 용량	50 x 10 ⁶	150 x 10 ⁶	450 x 10 ⁶	800 x 10 ⁶
효능에 대해 평가 가능한 환자의 수	3	4	8	3
코호트 내 전반적 반응률	33%	100%	100%	100%
최고 반응	PD (1 명의 환자) SD (1 명의 환자) PR (1 명의 환자)	CR (2 명의 환자, 1 명의 환자 MRD 음성) VGPR (1 명의 환자 MRD 음성) PR (1 명의 환자)	CR (1 명의 환자 *) VGPR (5 명의 환자; 1 명의 환자 MRD 음성) PR (2 명의 환자; 1 명의 환자 MRD 음성) *환자가 관련없는 심폐 정지로 사망함	VGPR (1 명의 환자) PR (1 명의 환자) CR (1 명의 환자)
골수 관여		기준에서 골수 관여를 갖는 코호트 2, 3 및 4의 모든 환자는 제 14일 이후로 그들 골수에서 검출 가능한 다발성 골수종이 없었다. MRD 상태에 대해 평가 가능한 4명의 환자 중에서, 4명 모두가 MRD-음성인 것을 발견하였다.		
중위 사전 요법 계통	7 (범위: 3-14); 모든 환자는 적어도 1 회의 사전 자가 줄기 세포 이식뿐만 아니라 프로테아좀 저해제 및 면역조절제에 대한 사전 노출이 있었고; 71%의 환자는 이전에 다라투무맙 또는 CD38 항체를 받았다			
안전성	15/21(71%)의 환자는 CRS(대부분 1 및 2 등급)를 가지며; 2명의 환자는 24 시간 내에 해결되는 3등급을 가진다. 4명의 환자는 토실리주맙을 받았고, 1명(2 등급 CRS)은 스테로이드를 받았다. 21 명의 주입 환자 중 가장 통상적인 치료-응급 등급 3 내지 4 AE는 림프구고갈과 관련된 혈구감소증뿐만 아니라 저나트륨혈증(n=4), 사이토카인 방출 증후군 (n=2), 상부 호흡기 감염(n=2), 및 실신(n=2)의 등급 3 사건을 포함한다.			

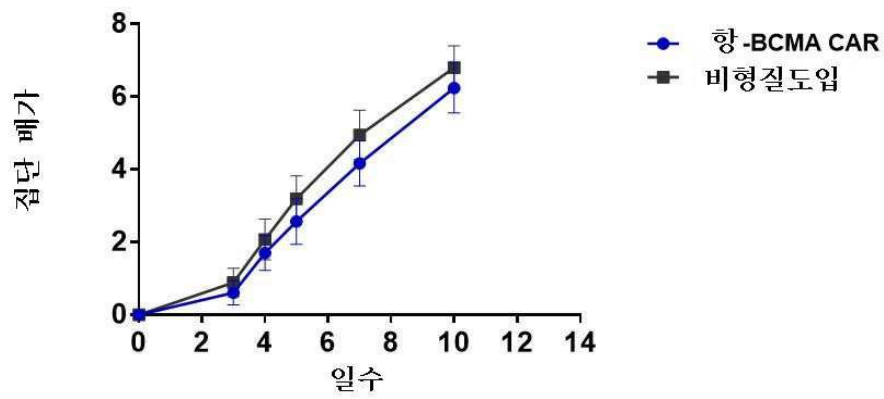
일반적으로, 다음의 청구범위에서, 사용되는 용어는 청구범위를 본 명세서에 개시된 특정 실시형태 및 청구범위로 제한하는 것으로 해석되어서는 안 되지만, 그러나 이러한 청구범위가 자격을 부여하는 동등물의 완전한 범위와 함께 모든 가능한 실시형태를 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 따라서, 청구범위는 개시내용에 의해 제한되지 않는다.

도면

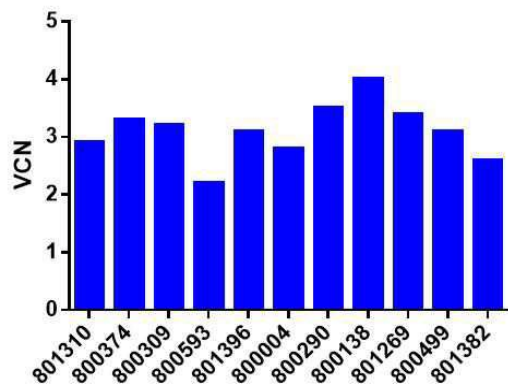
도면1



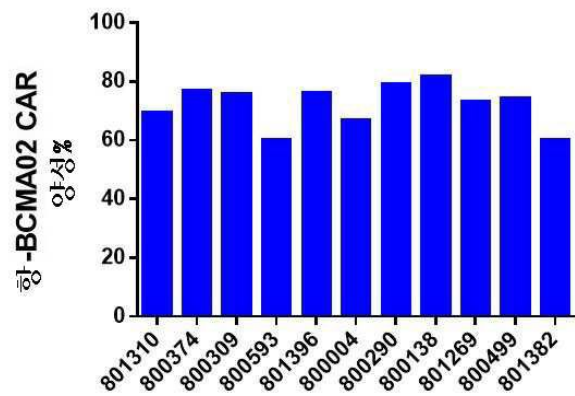
도면2a



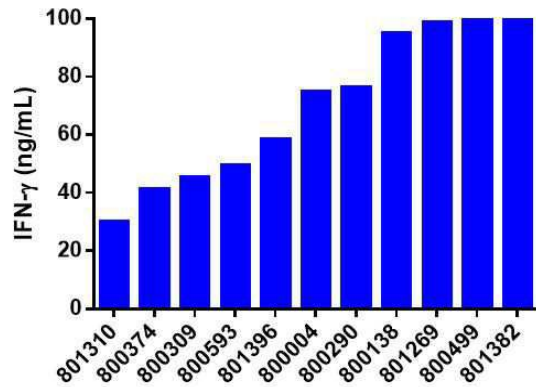
도면2b



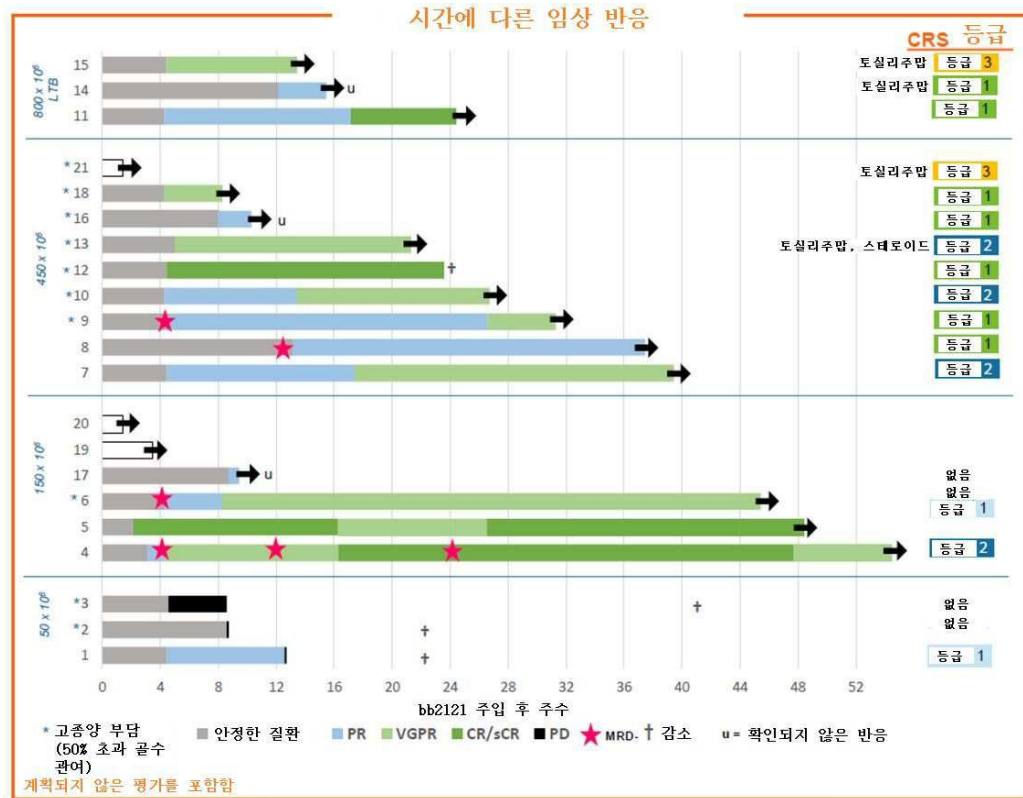
도면2c



도면2d



도면3



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> BLUEBIRD BIO, INC.

<120> ANTI-BCMA CAR T CELL COMPOSITIONS

<130> IPA190582-US

<150> US 62/417,840

<151> 2016-11-04

<150> US 62/514,401

<151> 2017-06-02

<160> 36

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Arg Ala Ser Glu Ser Val Thr Ile Leu Gly Ser His Leu Ile His

1 5 10 15

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 2

Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> mus musculus

<400> 3

Leu Gln Ser Arg Thr Ile Pro Arg Thr

1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Asp Tyr Ser Ile Asn

1 5

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe Arg

1 5 10 15

Gly

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 7

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu Ala Met Ser Leu Gly

1 5 10 15

Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Thr Ile Leu

20 25 30

Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp

65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg

85 90 95

Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 8

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 9

<211> 493

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-BCMA02 CAR

<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 Thr Thr
 260 265 270
 Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln
 275 280 285

Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala
290 295 300

Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala
305 310 315 320

Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr
325 330 335

Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln
340 345 350

Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser
355 360 365

Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys
370 375 380

Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln
385 390 395 400

Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu
405 410 415

Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg
420 425 430

Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met
435 440 445

Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly
450 455 460

Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp
465 470 475 480

Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
485 490

<210> 10

<211> 1485

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-BCMA02 CAR

<400> 10

atggcactcc ccgtcaccgc ctttctcttg ccctcgcgcc tgctgctgca tgctgccagg 60
cccgacattg tgctcactca gtcacctccc agcctggcca tgagcctggg aaaaagggcc 120
accatctcct gtagagccag tgagtcggtc acaatcttgg ggagccatct tattcactgg 180
tatcagcaga agcccgggca gcctccaacc cttcttattc agctcgcgtc aaacgtccag 240
acgggtgtac ctgccagatt ttctggtagc gggtcccgca ctgatattac actgaccata 300
gatccagtgg aagaagacga tgtggccgtg tattattgtc tgcagagcag aacgattcct 360

cgcacatttg gtgggggtac taagctggag attaaggga gcacgtccgg ctgaggaag 420
ccgggctccg gcgaggggaag cacgaagggg caaattcagc tggctcagag cggacctgag 480
ctgaaaaaac ccggcgagac tgtaagatc agttgtaaag catctggcta taccttcacc 540
gactacagca taaattgggt gaaacgggcc cctggaaagg gcctcaaatg gatgggttgg 600
atcaataccg aaactagga gcctgcttat gcatatgact tccgcgggag attcgctttt 660
tactcgaga catctgcctc tactgcttac ctccaaataa acaacctcaa gtatgaagat 720
acagccactt acttttgcgc cctcgactat agttacgcca tggactactg gggacaggga 780

acctccgtta ccgtcagttc cgcggccgca accacaacac ctgctccaag gccccccaca 840
cccgtccaa ctatagccag ccaaccattg agcctcagac ctgaagcttg caggcccga 900
gcaggaggcg ccgtccatac gcgaggcctg gacttcgcgt gtgatattta tatttgggcc 960
cctttggccg gaacatgtgg ggtgttgcct ctctcccttg tgatcactct gtattgtaag 1020
cgcgggagaa agaagctcct gtacatcttc aagcagcctt ttatgcgacc tgtgcaaacc 1080
actcaggaag aagatgggtg ttcatgccgc ttccccgagg aggaagaagg aggggtgtgaa 1140
ctgagggtga aattttctag aagcgcgat gctcccgcat atcagcaggg tcagaatcag 1200

ctctacaatg aattgaatct cggcaggcga gaagagtacg atgttctgga caagagacgg 1260
ggcagggatc ccgagatggg gggaaagccc cggagaaaaa atcctcagga ggggttgtac 1320
aatgagctgc agaaggacaa gatgctgaa gcctatagcg agatcggaat gaaaggcgaa 1380
agacgcagag gcaaggggca tgacggtctg taccagggtc tctctacagc caccaaggac 1440
acttatgatg cgttgcatat gcaagccttg ccaccccgct aatga 1485

<210> 11

<211> 184

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser

1 5 10 15
 Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr
 20 25 30
 Pro Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser
 35 40 45
 Val Lys Gly Thr Asn Ala Ile Leu Trp Thr Cys Leu Gly Leu Ser Leu
 50 55 60
 Ile Ile Ser Leu Ala Val Phe Val Leu Met Phe Leu Leu Arg Lys Ile

65 70 75 80
 Asn Ser Glu Pro Leu Lys Asp Glu Phe Lys Asn Thr Gly Ser Gly Leu
 85 90 95
 Leu Gly Met Ala Asn Ile Asp Leu Glu Lys Ser Arg Thr Gly Asp Glu
 100 105 110
 Ile Ile Leu Pro Arg Gly Leu Glu Tyr Thr Val Glu Glu Cys Thr Cys
 115 120 125
 Glu Asp Cys Ile Lys Ser Lys Pro Lys Val Asp Ser Asp His Cys Phe

130 135 140
 Pro Leu Pro Ala Met Glu Glu Gly Ala Thr Ile Leu Val Thr Thr Lys
 145 150 155 160
 Thr Asn Asp Tyr Cys Lys Ser Leu Pro Ala Ala Leu Ser Ala Thr Glu
 165 170 175
 Ile Glu Lys Ser Ile Ser Ala Arg
 180

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible peptide linker

<400> 12

Asp Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible peptide linker

<400> 13

Thr Gly Glu Lys Pro

1 5

<210> 14

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible peptide linker

<400> 14

Gly Gly Arg Arg

1

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible peptide linker

<400> 15

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 16

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible peptide linker

<400> 16

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Val Asp

1 5 10

<210> 17

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible peptide linker

<400> 17

Lys Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Gln Leu Ala Gln Phe Arg Ser

1 5 10 15

Leu Asp

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible peptide linker

<400> 18

Gly Gly Arg Arg Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible peptide linker

<400> 19

Leu Arg Gln Arg Asp Gly Glu Arg Pro

1 5

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flexible peptide linker

<400> 20

Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly Gly Ser Glu Arg Pro

1 5 10

<210> 21
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Flexible peptide linker
 <400> 21
 Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Arg Pro
 1 5 10 15

<210> 22
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Flexible peptide linker
 <400> 22
 Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 23
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> protease cleavage site
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(3)
 <223> Xaa = Any amino acid
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa = Any amino acid
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa is Gly or Ser
 <400> 23
 Glu Xaa Xaa Tyr Xaa Gln Xaa

1 5
 <210> 24
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> protease cleavage site

<400> 24
 Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly

1 5
 <210> 25
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> protease cleavage site
 <400> 25

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser

1 5
 <210> 26
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> protease cleavage site
 <400> 26

Leu Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn

1 5 10 15
 Pro Gly Pro

<210> 27
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> protease cleavage site
 <400> 27

Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn

1 5 10 15

Pro Gly Pro

<210> 28

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> protease cleavage site

<400> 28

Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro

1 5 10

<210>

> 29

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> protease cleavage site

<400> 29

Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly

1 5 10 15

Pro

<210> 30

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> protease cleavage site

<400> 30

Gln Leu Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser

1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro

20

<210> 31

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> protease cleavage site

<400> 31

Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly

1 5 10 15

Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro

20

<210> 32

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> protease cleavage site

<400> 32

Val Thr Glu Leu Leu Tyr Arg Met Lys Arg Ala Glu Thr Tyr Cys Pro

1 5 10 15

Arg Pro Leu Leu Ala Ile His Pro Thr Glu Ala Arg His Lys Gln Lys

20 25 30

Ile Val Ala Pro Val Lys Gln Thr

35 40

<210> 33

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> protease cleavage site

<400> 33

Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro

1 5 10 15

Gly Pro

<210> 34

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> protease cleavage site

<400> 34

Leu Leu Ala Ile His Pro Thr Glu Ala Arg His Lys Gln Lys Ile Val

1 5 10 15

Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly

20 25 30

Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro

35 40

<210> 35

<211> 33

<212> PRT

<213>

Artificial Sequence

<220><223> protease cleavage site

<400> 35

Glu Ala Arg His Lys Lys Gln Lys Ile Val Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu

1 5 10 15

Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly

20 25 30

Pro

<210> 36

<211> 7350

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-BCMA02 CAR vector

<400> 36

tcgcgcgttt cggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacggtca 60

cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 120

ttggcgggtg tcggggtgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 180

accatcatat gccagcctat ggtgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat 240

tacgggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa 300

tgccccgcct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt	360
tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta	420
aactgcccac ttggcagtac atcaagtgtat tcatatgccca agtacgcccc ctattgacgt	480
caatgacggt aaatggcccg cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc	540
tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc atggtgatgc ggttttggca	600
gtacatcaat gggcgtggat agcggtttga ctcacgggga tttccaagtc tccaccccat	660
tgacgtcaat gggagtttgt tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa	720
caactccgcc ccattgacgc aaatgggcgg taggcgtgta cgggtggagg tctatataag	780
cagagctcgt ttagtgaacc gggctctctt ggtagacca gatctgagcc tgggagctct	840
ctggctaact agggaaccca ctgcttaagc ctcaataaag cttgccttga gtgctcaaag	900
tagtgtgtgc ccgtctgttg tgtgactctg gtaactagag atccctcaga cccttttagt	960
cagtgtggaa aatctctagc agtggcgccc gaacaggac ttgaaagcga aagtaagcc	1020
agaggagatc tctcgacgca ggactcggct tgctgaagcg cgcacggcaa gaggcgaggg	1080
gcggcgactg gtgagtacgc caaaaatttt gactagcgga ggctagaagg agagagtagg	1140
gtgcgagagc gtcggtatta agcgggggag aattagataa atgggaaaaa attcggttaa	1200
ggccaggggg aaagaaacaa tataaactaa aacatatagt tagggcaagc agggagctag	1260
aacgattcgc agttaatcct ggccttttag agacatcaga aggcgtgtaga caaatactgg	1320
gacagctaca accatccctt cagacaggat cagaagaact tagatcatta tataatacaa	1380
tagcagtcct ctattgtgtg catcaaagga tagatgtaaa agacaccaag gaagccttag	1440
ataagataga ggaagagcaa aacaaaagta agaaaaaggc acagcaagca gcagctgaca	1500
caggaacaaa cagccaggtc agccaaaatt accctatagt gcagaacctc caggggcaaa	1560
tggtacatca ggccatatca cctagaactt taaattaaga cagcagtaca aatggcagta	1620
ttcatccaca attttaaaag aaaagggggg attggggggg acagtgcagg ggaaagaata	1680
gtagacataa tagcaacaga catacaaaact aaagaattac aaaaacaaat tacaaaaatt	1740
caaaattttc gggttttatta caggacagc agagatccag tttggaaagg accagcaaag	1800
ctcctctgga aaggtgaagg ggcagtagta atacaagata atagtacat aaaagtagtg	1860
ccaagaagaa aagcaaagat catcagggat tatggaaaac agatggcagg tgatgattgt	1920
gtggcaagta gacaggatga ggattaacac atggaaaaga ttagtaaaac accatagctc	1980
tagagcgatc ccgatcttca gacctggagg aggagatatg agggacaatt ggagaagtga	2040
attatataaa tataaagtag taaaaattga accattagga gtagcaccca ccaaggcaaa	2100

gagaagagtg gtgcagagag aaaaaagagc agtgggaata ggagctttgt tccttgggtt 2160

cttgggagca gcaggaagca ctatgggcgc agcgtcaatg acgctgacgg tacaggccag 2220

acaattattg tctggtatag tgcagcagca gaacaatttg ctgagggcta ttgaggcgca 2280

acagcatctg ttgcaactca cagtctgggg catcaagcag ctccaggcaa gaatcctggc 2340

tgtggaaaga tacctaaagg atcaacagct cctggggatt tggggttgct ctggaaaact 2400

catttgcacc actgctgtgc cttggaatgc tagttggagt aataaatctc tggaacagat 2460

ttggaatcac acgacctgga tggagtggga cagagaaatt aacaattaca caagcttggc 2520

aggtttaaga atagtttttg ctgtactttc tatagtgaat agagttaggc agggatattc 2580

accattatcg tticagaccc acctcccaac cccgagggga cccgacaggc ccgaaggaat 2640

agaagaagaa ggtggagaga gagacagaga cagatccatt cgattagtga acggatccat 2700

ctcgacggaa tgaagaccc cacctgtagg tttggcaagc taggatcaag gttaggaaca 2760

gagagacagc agaatatggg ccaaacagga tatctgtggt aagcagttcc tgccccggct 2820

cagggccaaag aacagttgga acagcagaat atgggccaaa caggatatct gtggtaaagca 2880

gttctgccc cggtcaggg ccaagaacag atggtcccca gatgcggtcc cgccctcagc 2940

agtttctaga gaaccatcag atgtttccag ggtgccccaa ggacctgaaa tgacctgtg 3000

ccttatttga actaaccaat cagttcgctt ctgcgttctg ttcgcgcgct tctgctcccc 3060

gagctcaata aaagagccca caaccctca ctcggcgcga ttcacctgac gcgtctacgc 3120

cacatggca ctccccgta ccgcccctct cttgccctc gccctgctgc tgcattctgc 3180

caggccccgac attgtgtca ctcagtcacc tcccagcctg gccatgagcc tgggaaaaag 3240

ggccaccatc tctgtagag ccagtgagtc cgtcacaatc ttggggagcc atcttattca 3300

ctggtatcag cagaagcccc ggcagcctcc aaccttctt attcagctcg cgtcaaacgt 3360

ccagacgggt gtacctgcca gattttctgg tagcgggtcc cgcactgatt ttacactgac 3420

catagatcca gtggaagaag acgatgtggc cgtgtattat tgtctgcaga gcagaacgat 3480

tcctcgaca tttggtgggg gtactaagct ggagattaag ggaagcacgt ccggctcagg 3540

gaagccgggc tccggcgagg gaagcacgaa ggggcaaatt cagctggtcc agagcggacc 3600

tgagctgaaa aaaccggcg agactgttaa gatcagttgt aaagcatctg gctatacctt 3660

caccgactac agcataaatt gggtgaaacg ggccctgga aagggcctca aatggatggg 3720

ttggatcaat accgaaacta gggagcctgc ttatgcatat gacttccgcg ggagattcgc 3780

cttttcactc gagacatctg cctctactgc ttacctcaa ataaacaacc tcaagtatga 3840

agatacagcc acttactttt gcgccctcga ctatagttac gccatggact actggggaca	3900
gggaacctcc gttaccgtca gttccgcggc cgcaaccaca acacctgtct caaggccccc	3960
cacacccgct ccaactatag ccagccaacc attgagcctc agacctgaag ctitgcaggcc	4020
cgcagcagga ggcgccgtcc atacgcgagg cctggacttc gcgtgtgata ttatattttg	4080
ggcccctttg gccggaacat gtgggggtgt gcttctctcc ctttgtatca ctctgtattg	4140
taagcgcggg agaaagaagc tcctgtacat cttcaagcag ccttttatgc gacctgtgca	4200
aaccactcag gaagaagatg ggtgttcatg ccgcttcccc gaggaggaag aaggagggtg	4260
tgaactgagg gtgaaatfff ctagaagcgc cgatgctccc gcatacagc agggtcagaa	4320
tcagctctac aatgaattga atctcggcag gcgagaagag tacgatgttc tggacaagag	4380
acggggcagg gatccccaga tggggggaaa gccccggaga aaaaatcctc agggagggtt	4440
gtacaatgag ctgcagaagg acaagatggc tgaagcctat agcgagatcg gaatgaaagg	4500
cgaaagacgc agaggcaagg ggcatgacgg tctgtaccag ggtctctcta cagccaccaa	4560
ggacacttat gatgcgttgc atatgcaagc cttgccaccc cgctaatagc aggtaccttt	4620
aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac tttttaaag aaaagggggg	4680
actggaaggg ctaattcact cccaaagaag acaagatctg ctttttgctt gtactgggtc	4740
tctctggtta gaccagatct gagcctggga gctctctggc taactaggga acccactgct	4800
taagcctcaa taaagcttgc cttgagtgtc tcaatgtgtg tgttggtttt ttgtgtgtcg	4860
aaattctagc gattctagct tggcgtaatc atggatcatag ctgtttcctg tgtgaaattg	4920
ttatccgtc acaattccac acaacatacg agccggaagc ataaagtgt aagcctgggg	4980
tgcctaata gtgagctaac tcacattaat tgcgttgccg tccactgccg ctttccagtc	5040
gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg aatcgcccaa cgcgcgggga gaggcggttt	5100
gcgtattggg cgtctttccg cttctctgct cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggt	5160
gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga	5220
taacgcagga aagaacatgt gagcaaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc	5280
cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg	5340
ctcaagttag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt ttccccctgg	5400
aagctccctc gtgcgtctc ctgttccgac cctgccgtt accggatacc tgtccgcctt	5460
tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggt	5520
gtaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg	5580
cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatcgccact	5640
ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggtat gtaggcggtg ctacagagtt	5700

cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaagaaca gtatttggta tctgcgctct	5760
gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac	5820
cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc	5880
tcaagaagat cctttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaaacg aaaactcacg	5940
ttaagggatt ttggtcatga gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta	6000
aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa acttggctctg acagttacca	6060
atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc	6120
ctgactcccc gtctgttaga taactacgat acgggagggc ttaccatctg gccccagtgc	6180
tgcaatgata ccgcgagacc cacgtcacc ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc	6240
agccggaagg gccgagcgca gaagtggctc tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat	6300
taattgttgc cggaagcta gagtaagtag ttcgccagtt aatagtttgc gcaacgttgt	6360
tgccattgct acaggcatcg tgggtgcacg ctctctgttt ggtatggctt cattcagctc	6420
cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg atccccatg ttgtgcaaaa aagcggttag	6480
ctccttcggt cctccgatcg ttgtcagaag taagttaggc gcagtgttat cactcatggt	6540
tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac	6600
tggtagtagt tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg	6660
cccggcgtca atacgggata ataccgcgc acatagcaga actttaaaag tgctcatcat	6720
tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga gatccagttc	6780
gatgtaacce actcgtgcac ccaactgac ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc	6840
tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggc cgacacggaa	6900
atgttgaata ctacatact tcttttttca atattattga agcattttatc agggttattg	6960
tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg	7020
cacatttccc cgaaaagtgc cacctgggac tagctttttg caaaagccta ggcctccaaa	7080
aaagcctcct cactacttct ggaatagctc agaggccgag gcggcctcgg cctctgcata	7140
aataaaaaaa attagtcagc catggggcgg agaatgggcg gaactgggcg gagttagggg	7200
cgggatgggc ggagttaggg gcgggactat ggttgctgac taattgagat gagcttgcac	7260
gccgacattg attattgact agtccctaag aaaccattct tatcatgaca ttaacctata	7320
aaaataggcg tatcacgagg ccttttcgtc	7350