(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0031541
(43) 공개일자 2022년03월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) *A61K 35/17* (2014.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7035639
(22) 출원일자(국제) 2020년04월02일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년11월01일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/026300
(87) 국제공개번호 WO 2020/206061
국제공개일자 2020년10월08일
(30) 우선권주장
62/830,004 2019년04월05일 미국(US)
62/944,485 2019년12월06일 미국(US)

(71) 출원인
2세븐티 바이오, 인코포레이티드
미국, 매사추세츠 02142, 캠브리지, 60 비니 스트리트
(72) 발명자
프리드먼 케빈
미국, 메사추세츠 02176, 멜로즈, 4 클로버 서클
알론조 에릭 스콧
미국, 메사추세츠 02176, 멜로즈, 1 시월 스트리트
(74) 대리인
특허법인한얼

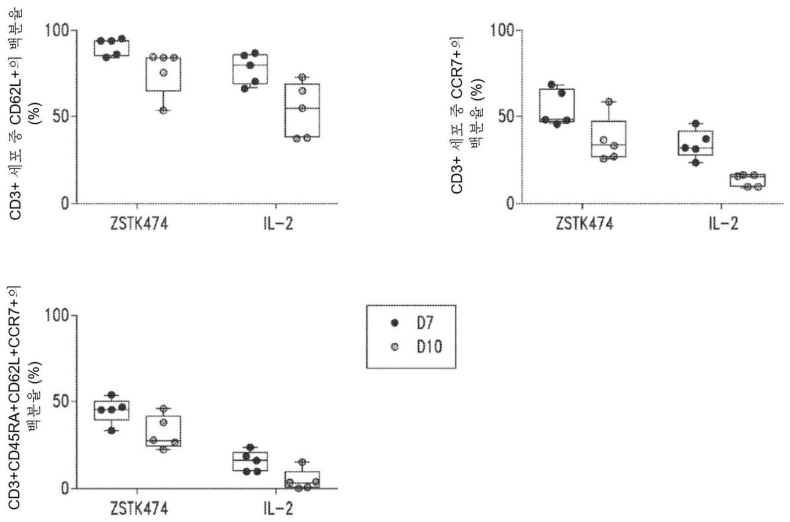
전체 청구항 수 : 총 113 항

(54) 발명의 명칭 **항-BCMA CAR T 세포의 제조**

(57) 요 약

본 발명은 개선된 항-BCMA CAR T 세포 조성물 및 항-BCMA CAR T 세포 요법을 제조하기 위한 방법을 제공한다. 보다 구체적으로, 본 발명은 보다 강력하고, 지속적이고, 효과적인 입양 T 세포 면역요법을 가능하게 하는 항-BCMA CAR T 세포를 제조하기 위한 개선된 방법에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 세포는 다발성 골수종 또는 림프종을 가진 대상체로부터 제조되었다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 39/001117 (2018.08)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 16/2878 (2013.01)
C12N 15/85 (2013.01)
A61K 2039/5156 (2013.01)
C07K 2319/02 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

cGMP에 따라 제조된 항-B 세포 성숙 항원(BCMA) 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포의 모집단으로서, 는 적어도 10%의 CDCD27^{+} 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는, cGMP에 따라 제조된 항-BCMA CAR T 세포의 모집단.

청구항 2

제1항에 있어서, 모집단은 적어도 15%의 CD27^{+} 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는, cGMP에 따라 제조된 항-BCMA CAR T 세포의 모집단.

청구항 3

제1항에 있어서, 모집단은 적어도 20%의 CD27^{+} 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는, cGMP에 따라 제조된 항-BCMA CAR T 세포의 모집단.

청구항 4

제1항에 있어서, 모집단은 적어도 25%의 CD27^{+} 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는, cGMP에 따라 제조된 항-BCMA CAR T 세포의 모집단.

청구항 5

제1항에 있어서, 모집단은 적어도 30%의 CD27^{+} 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는, cGMP에 따라 제조된 항-BCMA CAR T 세포의 모집단.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, CD27^{+} 항-BCMA CAR T 세포는 LEF1^{+} 및/또는 CCR7^{+} 및/또는 TCF1^{+} 항-BCMA CAR T 세포인, cGMP에 따라 제조된 항-BCMA CAR T 세포의 모집단.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, CD27^{+} 항-BCMA CAR T 세포는 LEF1^{+} 및 CCR7^{+} 및 TCF1^{+} 항-BCMA CAR T 세포인, cGMP에 따라 제조된 항-BCMA CAR T 세포의 모집단.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, CD27^{+} 항-BCMA CAR T 세포는 CD4^{+} 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는, cGMP에 따라 제조된 항-BCMA CAR T 세포의 모집단.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, CD27^{+} 항-BCMA CAR T 세포는 CD8^{+} 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는, cGMP에 따라 제조된 항-BCMA CAR T 세포의 모집단.

청구항 10

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, CD27^{+} 항-BCMA CAR T 세포는 CD4^{+} 및 CD8^{+} 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는, cGMP에 따라 제조된 항-BCMA CAR T 세포의 모집단.

청구항 11

적어도 10%의 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및 $TCF1^+$ 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는, cGMP에 따라 제조된 항-BCMA CAR T 세포의 모집단.

청구항 12

제11항에 있어서, 모집단은 적어도 15%의 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및 $TCF1^+$ 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는, cGMP에 따라 제조된 항-BCMA CAR T 세포의 모집단.

청구항 13

제11항에 있어서, 모집단은 적어도 20%의 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및 $TCF1^+$ 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는, cGMP에 따라 제조된 항-BCMA CAR T 세포의 모집단.

청구항 14

제11항에 있어서, 모집단은 적어도 25%의 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및 $TCF1^+$ 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는, cGMP에 따라 제조된 항-BCMA CAR T 세포의 모집단.

청구항 15

제11항에 있어서, 모집단은 적어도 30%의 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및 $TCF1^+$ 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는, cGMP에 따라 제조된 항-BCMA CAR T 세포의 모집단.

청구항 16

제11항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ 항-BCMA CAR T 세포는 $CD27^+$ 항-BCMA CAR T 세포인, cGMP에 따라 제조된 항-BCMA CAR T 세포의 모집단.

청구항 17

제11항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ 항-BCMA CAR T 세포는 $LEF1^+CCR7^+TCF1^+CD27^+$ 항-BCMA CAR T 세포인, cGMP에 따라 제조된 항-BCMA CAR T 세포의 모집단.

청구항 18

제11항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 항-BCMA CAR T 세포는 $CD4^+$ 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는, cGMP에 따라 제조된 항-BCMA CAR T 세포의 모집단.

청구항 19

제11항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 항-BCMA CAR T 세포는 $CD8^+$ 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는, cGMP에 따라 제조된 항-BCMA CAR T 세포의 모집단.

청구항 20

제11항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 항-BCMA CAR T 세포는 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는, cGMP에 따라 제조된 항-BCMA CAR T 세포의 모집단.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 세포는 다발성 골수종 또는 림프종을 가진 대상체로부터 제조된, cGMP에 따라 제조된 항-BCMA CAR T 세포의 모집단.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 세포는 재발성/불응성 다발성 골수종을 가진 대상체로부터 제조된,

cGMP에 따라 제조된 항-BCMA CAR T 세포의 모집단.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 세포는 항-BCMA CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 렌티바이러스를 포함하는, cGMP에 따라 제조된 항-BCMA CAR T 세포의 모집단.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 항-BCMA CAR은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, cGMP에 따라 제조된 항-BCMA CAR T 세포의 모집단.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 항-BCMA CAR은 서열번호 2에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는, cGMP에 따라 제조된 항-BCMA CAR T 세포의 모집단.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 세포는 자가 세포인, cGMP에 따라 제조된 항-BCMA CAR T 세포의 모집단.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 세포는 동결건조되는, cGMP에 따라 제조된 항-BCMA CAR T 세포의 모집단.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 세포는 다발성 골수종 또는 림프종을 가진 대상체에게 투여되도록 제형화되는, cGMP에 따라 제조된 항-BCMA CAR T 세포의 모집단.

청구항 29

약 5 내지 약 7일 동안 포스파티딜-이노시톨-3 키나아제(PI3K) 억제제와 생체 외에서 접촉시킨 인간 항-B 세포 성숙 항원(BCMA) 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포로서, (i) NR4A2, LY9, LIN7A, WNT5B, BCL6, EGR1, EGR2, ATF3, CCL1, IL-1A, 및 CCL5 또는 (ii) CCL1, NR4A2, ATF3, CCL5, 및 WNT5B 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 전부의 유전자 발현은 약 10일 동안 PI3K 억제제와 생체 외에서 접촉시킨 항-BCMA CAR T 세포에서보다 상기 항-BCMA CAR T 세포에서 적어도 1.5배 또는 적어도 2배 더 큰, 인간 항-BCMA CAR T 세포.

청구항 30

약 5 내지 약 7일 동안 포스파티딜-이노시톨-3 키나아제(PI3K) 억제제와 생체 외에서 접촉시킨 인간 항-B 세포 성숙 항원(BCMA) 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포로서, (i) NQO1, CCNA1, IL17F, EMP1, SNHG19, PRR 22, ILDR2, ATAD3, NKD2, 및 WDR62 또는 (ii) NKD2 및 NQO1 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개 또는 전부의 유전자 발현은 약 10일 동안 PI3K 억제제와 생체 외에서 접촉시킨 항-BCMA CAR T 세포에서보다 상기 항-BCMA CAR T 세포에서 적어도 1.5배 또는 적어도 2배 더 적은, 인간 항-BCMA CAR T 세포.

청구항 31

약 5 내지 약 7일 동안 포스파티딜-이노시톨-3 키나아제(PI3K) 억제제와 생체 외에서 접촉시킨 인간 항-B 세포 성숙 항원(BCMA) 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포로서, (i) NR4A2, LY9, LIN7A, WNT5B, BCL6, EGR1, EGR2, ATF3, CCL1, IL-1A, 및 CCL5 또는 (ii) CCL1, NR4A2, ATF3, CCL5, 및 WNT5B 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 전부의 각각의 유전자 발현은 약 10일 동안 PI3K 억제제와 생체 외에서 접촉시킨 항-BCMA CAR T 세포에서보다 상기 항-BCMA CAR T 세포에서 적어도 1.5배 또는 적어도 2배 더 크고, (i) NQO1, CCNA1, IL17F, EMP1, SNHG19, PRR 22, ILDR2, ATAD3, NKD2, 및 WDR62 또는 (ii) NKD2 및 NQO1 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개 또는 전부의 유전자 발현은 약 10일 동안 PI3K 억제제와 생체 외에서 접촉시킨 항-BCMA CAR T 세포에서보다 상기 항-BCMA CAR T 세포에서 적어도 1.5배 또는 적어도 2배 더 적은, 인간 항-BCMA CAR T 세포.

청구항 32

제29항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^+$ 항-BCMA CAR T 세포는 중앙 기억 T 세포(TCM) 유사 표현형을 갖는, 인간 항-BCMA CAR T 세포.

청구항 33

제29항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, $CD8^+$ 항-BCMA CAR T 세포는 줄기 세포 기억 T 세포(TSCM) 유사 표현형을 갖는, 인간 항-BCMA CAR T 세포.

청구항 34

제29항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, $CD4^+$ 항-BCMA CAR T 세포는 TCM 유사 표현형을 갖고, $CD8^+$ 항-BCMA CAR T 세포는 TSCM 유사 표현형을 갖는, 인간 항-BCMA CAR T 세포.

청구항 35

제29항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 세포는 다발성 골수종 또는 림프종을 가진 대상체로부터 제조된, 인간 항-BCMA CAR T 세포.

청구항 36

제29항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 세포는 재발성/불응성 다발성 골수종을 가진 대상체로부터 제조된, 인간 항-BCMA CAR T 세포.

청구항 37

제29항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 세포는 항-BCMA CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 렌티바이러스를 포함하는, 인간 항-BCMA CAR T 세포.

청구항 38

제29항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 항-BCMA CAR은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 인간 항-BCMA CAR T 세포.

청구항 39

제29항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 항-BCMA CAR은 서열번호 2에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는, 인간 항-BCMA CAR T 세포.

청구항 40

제29항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 세포는 자가 세포인, 인간 항-BCMA CAR T 세포.

청구항 41

제29항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 세포는 동결건조되는, 인간 항-BCMA CAR T 세포.

청구항 42

제29항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 세포는 다발성 골수종 또는 림프종을 가진 대상체에게 투여되도록 제형화되는, 인간 항-BCMA CAR T 세포.

청구항 43

제29항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, PI3K 억제제는 ZSTK474인, 인간 항-BCMA CAR T 세포.

청구항 44

생리학적으로 허용 가능한 부형제 및 제29항 내지 제43항 중 어느 한 항의 항-BCMA CAR T 세포의 치료적 유효량

을 포함하는 약학적 조성물.

청구항 45

제44항에 있어서, 항-BCMA CAR T 세포의 치료적 유효량은 적어도 약 5.0 x 10^7개의 항-BCMA CAR T 세포인, 조성물.

청구항 46

제44항에 있어서, 항-BCMA CAR T 세포의 치료적 유효량은 적어도 약 15.0 x 10^7개의 항-BCMA CAR T 세포인, 조성물.

청구항 47

제44항에 있어서, 치료적 유효량은 적어도 약 45.0 x 10^7개의 항-BCMA CAR T 세포인, 조성물.

청구항 48

제44항에 있어서, 치료적 유효량은 적어도 약 80.0 x 10^7개의 항-BCMA CAR T 세포인, 조성물.

청구항 49

제44항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 PlasmaLyte A와 CryoStor CS10을 50:50의 비율로 포함하는 용액 중에서 제형화되는, 조성물.

청구항 50

다발성 골수종 또는 림프종을 가진 대상체를 제44항 내지 제49항 중 어느 한 항에 따른 조성물로 치료하는 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 대상체는 재발성/불응성 다발성 골수종을 갖는, 방법.

청구항 52

항-BCMA CAR T 세포를 제조하는 방법으로서,

(a) T 세포의 모집단을 활성화시키고 T 세포의 모집단을 자극하여 증식시키는 단계;

(b) 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 항-BCMA CAR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터로 T 세포를 형질도입하는 단계;

(c) 형질도입된 T 세포를 배양하여 약 5 내지 약 7일의 기간 동안 증식시키는 단계를 포함하되,

단계 (a) 내지 (c)는 PI3K 억제제의 존재 하에 수행되고; (i) NR4A2, LY9, LIN7A, WNT5B, BCL6, EGR1, EGR2, ATF3, CCL1, IL-1A, 및 CCL5 또는 (ii) CCL1, NR4A2, ATF3, CCL5, 및 WNT5B 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 전부의 유전자 발현은, 단계 (b)에 따라 형질 도입하여 약 10일의 기간 동안 배양하여 증식시킨 T 세포와 비교해 단계 (c)의 배양된 T 세포에서 적어도 1.5배 또는 적어도 2배 더 큰, 방법.

청구항 53

항-BCMA CAR T 세포를 제조하는 방법으로서,

(a) T 세포의 모집단을 활성화시키고 T 세포의 모집단을 자극하여 증식시키는 단계;

(b) 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 항-BCMA CAR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터로 T 세포를 형질도입하는 단계;

(c) 형질도입된 T 세포를 배양하여 약 5 내지 약 7일의 기간 동안 증식시키는 단계를 포함하되,

단계 (a) 내지 (c)는 PI3K 억제제의 존재 하에 수행되고; (i) NQO1, CCNA1, IL17F, EMP1, SNHG19, PRR 22,

ILDR2, ATAD3, NKD2, 및 WDR62 또는 (ii) NKD2 및 NQO1 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개 또는 전부의 유전자 발현은, 단계 (b)에 따라 형질 도입하여 약 10일의 기간 동안 배양하여 증식시킨 T 세포와 비교해 단계 (c)의 배양된 T 세포에서 적어도 1.5배 또는 적어도 2배 더 적은, 방법.

청구항 54

항-BCMA CAR T 세포를 제조하는 방법으로서,

(a) T 세포의 모집단을 활성화시키고 T 세포의 모집단을 자극하여 증식시키는 단계;

(b) 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 항-BCMA CAR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터로 T 세포를 형질도입하는 단계;

(c) 형질도입된 T 세포를 배양하여 약 5 내지 약 7일의 기간 동안 증식시키는 단계를 포함하되,

단계 (a) 내지 (c)는 PI3K 억제제의 존재 하에 수행되고;

i) NR4A2, LY9, LIN7A, WNT5B, BCL6, EGR1, EGR2, ATF3, CCL1, IL-1A, 및 CCL5 또는 (ii) CCL1, NR4A2, ATF3, CCL5, 및 WNT5B 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 전부의 유전자 발현은, 단계 (b)에 따라 형질 도입하여 약 10일의 기간 동안 배양하여 증식시킨 T 세포와 비교해 단계 (c)의 배양된 T 세포에서 적어도 1.5배 또는 적어도 2배 더 크고; (i) NQO1, CCNA1, IL17F, EMP1, SNHG19, PRR 22, ILDR2, ATAD3, NKD2, 및 WDR62 또는 (ii) NKD2 및 NQO1 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개 또는 전부의 유전자 발현은 단계 (b)에 따라 형질 도입하여 약 10일의 기간 동안 배양하여 증식시킨 T 세포와 비교해 단계 (c)의 배양된 T 세포에서 적어도 1.5배 또는 적어도 2배 더 적은, 방법.

청구항 55

항-BCMA CAR T 세포를 제조하는 방법으로서,

(a) T 세포의 모집단을 활성화시키고 T 세포의 모집단을 자극하여 증식시키는 단계;

(b) 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 항-BCMA CAR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터로 T 세포를 형질도입하는 단계;

(c) 형질도입된 T 세포를 배양하여 약 5 내지 약 7일의 기간 동안 증식시키는 단계를 포함하되,

단계 (a) 내지 (c)는 PI3K 억제제의 존재 하에 수행되고, 증식된 세포는 $CD27^+$ 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$인, 방법.

청구항 56

제52항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 항-BCMA CAR T 세포는 적어도 10%의 $CD27^+$ 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ T 세포를 포함하는, 방법.

청구항 57

제52항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 항-BCMA CAR T 세포는 적어도 15%의 $CD27^+$ 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ T 세포를 포함하는, 방법.

청구항 58

제52항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 항-BCMA CAR T 세포는 적어도 20%의 $CD27^+$ 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ T 세포를 포함하는, 방법.

청구항 59

제52항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 항-BCMA CAR T 세포는 적어도 25%의 $CD27^+$ 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는

CCR7^{+} 및/또는 TCF1^{+} T 세포를 포함하는, 방법.

청구항 60

제52항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 항-BCMA CAR T 세포는 적어도 30%의 CD27^{+} 및/또는 LEF1^{+} 및/또는 CCR7^{+} 및/또는 TCF1^{+} T 세포를 포함하는, 방법.

청구항 61

제52항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, CD27^{+} 세포는 LEF1^{+} 및/또는 CCR7^{+} 및/또는 TCF1^{+}인, 방법.

청구항 62

제52항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, CD27^{+} 세포는 LEF1^{+} 및/또는 CCR7^{+} 및 TCF1^{+}인, 방법.

청구항 63

제52항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, CD27^{+} 항-BCMA CAR T 세포는 CD4^{+} 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는, 방법.

청구항 64

제52항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, CD27^{+} 항-BCMA CAR T 세포는 CD8^{+} 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는, 방법.

청구항 65

제52항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, CD27^{+} 항-BCMA CAR T 세포는 CD4^{+} 및 CD8^{+} 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는, 방법.

청구항 66

제52항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포는 자가 세포인, 방법.

청구항 67

제52항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 T 세포의 공급원으로서 단리하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 68

제67항에 있어서, PBMC는 다발성 골수종 또는 림프종을 가진 대상체로부터 단리되는, 방법.

청구항 69

제68항에 있어서, 대상체는 재발성/불응성 다발성 골수종을 갖는, 방법.

청구항 70

제52항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 단계 (a) 전에 PBMC를 동결 보존하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 71

제52항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포는 단계 (c) 후에 동결 보존되는, 방법.

청구항 72

제52항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포를 활성화하고 자극하여 약 18 내지 약 24시간 동안 증식시

키는, 방법.

청구항 73

제52항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포의 활성화는 T 세포를 항-CD3 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 74

제73항에 있어서, 항-CD3 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 가용성인, 방법.

청구항 75

제73항에 있어서, 항-CD3 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 표면에 결합되는, 방법.

청구항 76

제75항에 있어서, 표면은 비드이고, 임의로 상자성 비드인, 방법.

청구항 77

제52항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포의 자극은 T 세포를 항-CD28 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 78

제77항에 있어서, 항-CD28 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 가용성인, 방법.

청구항 79

제77항에 있어서, 항-CD28 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 표면에 결합되는, 방법.

청구항 80

제79항에 있어서, 표면은 비드, 임의로 상자성 비드, 임의로 항-CD3 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 결합된 상자성 비드인, 방법.

청구항 81

제52항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 세포는 HIV-1에서 유래된 렌티바이러스 벡터로 형질도입되는, 방법.

청구항 82

제52항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서, 항-BCMA CAR은 서열번호 2에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는, 방법.

청구항 83

제52항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, PI3K 억제제는 ZSTK474인, 방법.

청구항 84

양자 세포 요법에서 $CD4^+$ 유사 항-BCMA CAR T 세포 및 $CD8^+$ TSCM 유사 항-BCMA CAR T 세포를 증가시키는 방법으로서, 상기 항-BCMA CAR T 세포를 PI3K 억제제와 약 5 내지 약 7일 동안 생체 외에서 접촉시키는 단계를 포함하되, $CD4^+$ TCM 유사 항-BCMA CAR T 세포 및 $CD8^+$ TSCM 유사 항-BCMA CAR T 세포의 수는, PI3K 억제제와 생체 외에서 약 10일 동안 접촉시킨 항-BCMA CAR T 세포에서보다 상기 항-BCMA CAR T 세포에서 적어도 2배 더 많은, 방법.

청구항 85

제84항에 있어서, 항-BCMA CAR T 세포는 적어도 10%의 $CD27^+$ 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ T 세포를 포함하는, 방법.

청구항 86

제84항 또는 제85항에 있어서, 항-BCMA CAR T 세포는 적어도 15%의 $CD27^+$ 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ T 세포를 포함하는, 방법.

청구항 87

제84항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, 항-BCMA CAR T 세포는 적어도 20%의 $CD27^+$ 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ T 세포를 포함하는, 방법.

청구항 88

제84항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 항-BCMA CAR T 세포는 적어도 25%의 $CD27^+$ 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ T 세포를 포함하는, 방법.

청구항 89

제84항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 항-BCMA CAR T 세포는 적어도 30%의 $CD27^+$ 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ T 세포를 포함하는, 방법.

청구항 90

제84항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포는 자가 세포인, 방법.

청구항 91

제84항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 T 세포의 공급원으로서 단리하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 92

제91항에 있어서, PBMC는 다발성 골수종 또는 림프종을 가진 대상체로부터 단리되는, 방법.

청구항 93

제92항에 있어서, 대상체는 재발성/불응성 다발성 골수종을 갖는, 방법.

청구항 94

제84항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, 항-BCMA CAR T 세포는 HIV-1에서 유래된 렌티바이러스 벡터를 포함하는, 방법.

청구항 95

제84항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서, 항-BCMA CAR은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 96

제84항 내지 제95항 중 어느 한 항에 있어서, 항-BCMA CAR은 서열번호 2에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는, 방법.

청구항 97

약학적으로 허용 가능한 부형제 및 제52항 내지 제83항 중 어느 한 항의 방법에 따른 항-BCMA CAR T 세포의 치

료적 유효량을 포함하는 약학적 조성물.

청구항 98

약학적으로 허용 가능한 부형제 및 제84항 내지 제96항 중 어느 한 항의 방법에 따른 $CD4^+$ TCM 항-BCMA CAR T 세포 및 $CD8^+$ TSCM 항-BCMA CAR T 세포의 치료적 유효량을 포함하는 약학적 조성물.

청구항 99

다발성 골수종 또는 림프종을 가진 대상체를 제97항 또는 제98항에 따른 조성물로 치료하는 방법.

청구항 100

제99항에 있어서, 대상체는 재발성/불응성 다발성 골수종을 갖는, 방법.

청구항 101

항-BCMA CAR T 세포에서 (i) NR4A2, LY9, LIN7A, WNT5B, BCL6, EGR1, EGR2, ATF3, CCL1, IL-1A, 및 CCL5 또는 (ii) CCL1, NR4A2, ATF3, CCL5, 및 WNT5B의 각각의 유전자 발현을 증가시키는 방법으로서, 상기 방법은 항-BCMA CAR T 세포를 PI3K 억제제와 약 5 내지 약 7일 동안 생체 외에서 접촉시키는 단계를 포함하되, (i) NR4A2, LY9, LIN7A, WNT5B, BCL6, EGR1, EGR2, ATF3, CCL1, IL-1A, 및 CCL5 또는 (ii) CCL1, NR4A2, ATF3, CCL5, 및 WNT5B의 각각의 유전자 발현은 PI3K 억제제와 약 10일 동안 생체 외에서 접촉시킨 항-BCMA CAR T 세포에서보다 상기 항-BCMA CAR T 세포에서 적어도 1.5배 더 큰, 방법.

청구항 102

항-BCMA CAR T 세포에서 (i) NQO1, CCNA1, IL17F, EMP1, SNHG19, PRR 22, ILDR2, ATAD3, NKD2, 및 WDR62 또는 (ii) NKD2 및 NQO1의 각각의 유전자 발현을 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은 항-BCMA CAR T 세포를 PI3K 억제제와 약 5 내지 약 7일 동안 생체 외에서 접촉시키는 단계를 포함하되, (i) NQO1, CCNA1, IL17F, EMP1, SNHG19, PRR 22, ILDR2, ATAD3, NKD2, 및 WDR62 또는 (ii) NKD2 및 NQO1의 각각의 유전자 발현은 PI3K 억제제와 약 10일 동안 생체 외에서 접촉시킨 항-BCMA CAR T 세포에서보다 상기 항-BCMA CAR T 세포에서 적어도 약 1.5배 더 적은, 방법.

청구항 103

항-BCMA CAR T 세포에서 (i) NR4A2, LY9, LIN7A, WNT5B, BCL6, EGR1, EGR2, ATF3, CCL1, IL-1A, 및 CCL5 또는 (ii) CCL1, NR4A2, ATF3, CCL5, 및 WNT5B의 각각의 유전자 발현을 증가시키고, (i) NQO1, CCNA1, IL17F, EMP1, SNHG19, PRR 22, ILDR2, ATAD3, NKD2, 및 WDR62 또는 (ii) NKD2 및 NQO1의 각각의 유전자 발현을 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은 항-BCMA CAR T 세포를 PI3K 억제제와 약 5 내지 약 7일 동안 생체 외에서 접촉시키는 단계를 포함하되, (i) NR4A2, LY9, LIN7A, WNT5B, BCL6, EGR1, EGR2, ATF3, CCL1, IL-1A, 및 CCL5 또는 (ii) CCL1, NR4A2, ATF3, CCL5, 및 WNT5B의 각각의 유전자 발현은 PI3K 억제제와 약 10일 동안 생체 외에서 접촉시킨 항-BCMA CAR T 세포에서보다 상기 항-BCMA CAR T 세포에서 적어도 1.5배 더 크고, (i) NQO1, CCNA1, IL17F, EMP1, SNHG19, PRR 22, ILDR2, ATAD3, NKD2, 및 WDR62 또는 (ii) NKD2 및 NQO1의 각각의 유전자 발현은 PI3K 억제제와 약 10일 동안 생체 외에서 접촉시킨 항-BCMA CAR T 세포에서보다 상기 항-BCMA CAR T 세포에서 적어도 1.5배 더 적은, 방법.

청구항 104

항-BCMA CAR T 세포의 치료 효능을 증가시키는 방법으로서, 상기 방법은 항-BCMA CAR T 세포를 PI3K 억제제와 약 5 내지 약 7일 동안 생체 외에서 접촉시키는 단계를 포함하되, 치료 효능의 증가는 (i) NR4A2, LY9, LIN7A, WNT5B, BCL6, EGR1, EGR2, ATF3, CCL1, IL-1A, 및 CCL5 또는 (ii) CCL1, NR4A2, ATF3, CCL5, 및 WNT5B 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 전부의 유전자 발현이 PI3K 억제제와 약 10일 동안 생체 외에서 접촉시킨 항-BCMA CAR T 세포와 비교해 상기 항-BCMA CAR T 세포에서 적어도 1.5배 더 증가한 것에 의해 표시되는, 방법.

청구항 105

항-BCMA CAR T 세포의 치료 효능을 증가시키는 방법으로서, 상기 방법은 항-BCMA CAR T 세포를 PI3K 억제제와

약 5 내지 약 7일 동안 생체 외에서 접촉시키는 단계를 포함하되, 치료 효능의 증가는 (i) NQO1, CCNA1, IL17F, EMP1, SNHG19, PRR 22, ILDR2, ATAD3, NKD2, 및 WDR62 또는 (ii) NKD2 및 NQO1의 각각의 유전자 발현이 PI3K 억제제와 약 10일 동안 생체 외에서 접촉시킨 항-BCMA CAR T 세포와 비교해 상기 항-BCMA CAR T 세포에서 적어도 1.5배 더 감소한 것에 의해 표시되는, 방법.

청구항 106

항-BCMA CAR T 세포의 치료 효능을 증가시키는 방법으로서, 상기 방법은 항-BCMA CAR T 세포를 PI3K 억제제와 약 5 내지 약 7일 동안 생체 외에서 접촉시키는 단계를 포함하되, 치료 효능의 증가는 (i) NR4A2, LY9, LIN7A, WNT5B, BCL6, EGR1, EGR2, ATF3, CCL1, IL-1A, 및 CCL5 또는 (ii) CCL1, NR4A2, ATF3, CCL5, 및 WNT5B 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 전부의 유전자 발현이 PI3K 억제제와 약 10일 동안 생체 외에서 접촉시킨 항-BCMA CAR T 세포와 비교해 상기 항-BCMA CAR T 세포에서 적어도 1.5배 더 증가하고; (i) NQO1, CCNA1, IL17F, EMP1, SNHG19, PRR 22, ILDR2, ATAD3, NKD2, 및 WDR62 또는 (ii) NKD2 및 NQO1의 각각의 유전자 발현이 PI3K 억제제와 약 10일 동안 생체 외에서 접촉시킨 항-BCMA CAR T 세포와 비교해 상기 항-BCMA CAR T 세포에서 적어도 1.5배 더 감소한 것에 의해 표시되는, 방법.

청구항 107

제101항 내지 제106항 중 어느 한 항에 있어서, 항-BCMA CAR T 세포는 다발성 골수종 또는 림프종을 가진 대상체로부터 유래된 것인, 방법.

청구항 108

제101항 내지 제107항 중 어느 한 항에 있어서, 항-BCMA CAR T 세포는 재발성/불응성 다발성 골수종을 가진 대상체로부터 유래된 것인, 방법.

청구항 109

제101항 내지 제108항 중 어느 한 항에 있어서, 항-BCMA CAR T 세포는 항-BCMA CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 HIV-1 유래 렌티바이러스를 포함하는, 방법.

청구항 110

제101항 내지 제109항 중 어느 한 항에 있어서, 항-BCMA CAR은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 111

제101항 내지 제110항 중 어느 한 항에 있어서, 항-BCMA CAR은 서열번호 2에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는, 방법.

청구항 112

제101항 내지 제111항 중 어느 한 항에 있어서, 항-BCMA CAR T 세포는 자가 세포인, 방법.

청구항 113

제101항 내지 제112항 중 어느 한 항에 있어서, PI3K 억제제는 ZSTK474인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e)에 의거하여 2019년 12월 6일에 출원된 미국 특허 가출원 제62/944,485호 및 2019년 4월 5일에 출원된 미국 특허 가출원 제62/830,004호의 이익을 주장하며, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0003] **서열 목록에 관한 진술**

[0004] 본 출원과 연관된 서열 목록은 종이 사본 대신에 텍스트 형식으로 제공되며, 참조로서 본 명세서에 통합된다. 서열 목록이 포함된 텍스트 파일의 명칭은 BLBD_118_02WO_ST25.txt이다. 2020년 3월 27일에 생성된 텍스트 파일은 7 KB이며, 본 명세서의 출원과 동시에 EFS-Web을 통해 전자적으로 제출된다.

[0005] **기술 분야**

[0006] 본 발명은 개선된 항-BCMA CAR T 세포 조성물 및 항-BCMA CAR T 세포를 제조하기 위한 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 보다 강력하고, 지속적이고, 효과적인 입양 T 세포 면역요법을 가능하게 하는 항-BCMA CAR T 세포를 제조하기 위한 개선된 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0007] **관련 기술에 대한 설명**

[0008] 입양 면역요법은 대상체에게 T 림프구를 전달하여 질환에 대한 치료를 제공하는 것이다. 입양 면역요법은 암, 감염성 질환, 자가면역 질환, 염증성 질환, 및 면역 결핍증을 포함하는 매우 다양한 질환을 치료하기 위한 잠재력을 아직 실현하지 못했다. 그러나, 전부는 아니더라도 대부분의 입양 면역요법 전략은 임상적으로 효과가 있는 T 세포의 치료적 투여량을 생성하기 위해 T 세포 활성화 단계와 증식 단계를 필요로 한다. 조작된 T 세포를 포함하여, T 세포의 치료적 투여량을 생성하기 위한 현재의 기술은 번거로운 T 세포 제조 공정으로 인해 제한된다. 예를 들어, T 세포 증식은 치료적으로 유의미한 T 세포 수를 달성하기 위해 노동 집약적이고 고비용의 클로닝, 및/또는 여러 번의 활성화/증식 과정을 필요로 한다. 또한, 기존의 T 세포 활성화/증식 방법은 일반적으로 실질적인 T 세포 분화와 결합되며, 일반적으로 짧은 생존 기간 및 전달된 T 세포의 지속성 결여 및 생체 내 증식 결여를 포함하는 단기 생존 효과만을 생성한다. 보다 최근의 제조 방법이 보다 강력하고 지속적인 T 세포를 생성하였지만, 이들 세포는 여전히 효과기 면역 세포의 고갈 및 기능 상실에 취약하다.

[0009] T 세포의 제조를 개선하고, 보다 강력하고 지속적인 T 세포 요법를 제조하기 위한 충족되지 않은 요구가 여전히 존재한다.

발명의 내용

[0010] 본 발명은 일반적으로 개선된 효능 및 지속성을 갖는 입양 T 세포 면역요법 및 이를 제조하는 방법을 제공한다.

[0011] 다양한 구현예에서, 항-B 세포 성숙 항원(BCMA) 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포의 cGMP로 제조된 모집단이 제공되며, 상기 모집단은 적어도 10%의 $CD27^+$ 항-BCMA CAR T 세포를 포함한다.

[0012] 특정 구현예에서, 모집단은 적어도 15%의 $CD27^+$ 항-BCMA CAR T 세포를 포함한다.

[0013] 특정 구현예에서, 모집단은 적어도 20%의 $CD27^+$ 항-BCMA CAR T 세포를 포함한다.

[0014] 일부 구현예에서, 모집단은 적어도 25%의 $CD27^+$ 항-BCMA CAR T 세포를 포함한다.

[0015] 추가 구현예에서, 모집단은 적어도 30%의 $CD27^+$ 항-BCMA CAR T 세포를 포함한다.

[0016] 특정 구현예에서, $CD27^+$ 항-BCMA CAR T 세포는 $LEF1^+$ 및/또는 $TCF1^+$ 항-BCMA CAR T 세포이다.

[0017] 추가 구현예에서, $CD27^+$ 항-BCMA CAR T 세포는 $LEF1^+$ 및 $TCF1^+$ 항-BCMA CAR T 세포이다. 다양한 구현예에서, cGMP로 제조된 항-BCMA CAR T 세포의 모집단은 적어도 10%의 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및 $TCF1^+$ 항-BCMA CAR T 세포를 포함한다.

[0018] 일부 구현예에서, 모집단은 적어도 15%의 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및 $TCF1^+$ 항-BCMA CAR T 세포를 포함한다.

[0019] 특정 구현예에서, 모집단은 적어도 20%의 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및 $TCF1^+$ 항-BCMA CAR T 세포를 포함한다.

[0020] 일부 구현예에서, 모집단은 적어도 25%의 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및 $TCF1^+$ 항-BCMA CAR T 세포를 포함한다.

[0021] 추가 구현예에서, 모집단은 적어도 30%의 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및 $TCF1^+$ 항-BCMA CAR T 세포를 포함한다.

[0022] 추가 구현예에서, $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ 항-BCMA CAR T 세포는 $CD27^+$ 항-BCMA CAR T 세포이다.

[0023] 일부 구현예에서, $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ 항-BCMA CAR T 세포는 $LEF1^+CCR7^+TCF1^+CD27^+$ 항-BCMA CAR T 세포이다.

[0024] 일부 구현예에서, $CD27^+$ 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및 $TCF1^+$ 항-BCMA CAR T 세포는 $CD4^+$ 항-BCMA CAR T 세포를 포함한다.

[0025] 특정 구현예에서, $CD27^+$ 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및 $TCF1^+$ 항-BCMA CAR T 세포는 $CD8^+$ 항-BCMA CAR T 세포를 포함한다.

[0026] 특정 구현예에서, $CD27^+$ 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및 $TCF1^+$ 항-BCMA CAR T 세포는 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 항-BCMA CAR T 세포를 포함한다.

[0027] 특정 구현예에서, 세포는 다발성 골수종 또는 림프종을 가진 대상체로부터 제조되었다.

[0028] 특정 구현예에서, 세포는 재발성/불응성 다발성 골수종을 가진 대상체로부터 제조되었다.

[0029] 일부 구현예에서, 세포는 항-BCMA CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 렌티바이러스를 포함한다.

[0030] 특정 구현예에서, 항-BCMA CAR은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0031] 추가 구현예에서, 항-BCMA CAR은 서열번호 2에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된다.

[0032] 특정 구현예에서, 세포는 자가 세포이다.

[0033] 특정 구현예에서, 세포는 동결 보존된다.

[0034] 특정 구현예에서, 세포는 다발성 골수종 또는 림프종을 갖는 대상체에게 투여되도록 제형화된다.

[0035] 일부 구현예에서, 약 5 내지 약 7일 동안 포스파티딜-이노시톨-3 키나아제(PI3K) 억제제와 생체 외에서 접촉시킨 인간 항-B 세포 성숙 항원(BCMA) 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포가 제공되며, 여기서 (i) NR4A2, LY9, LIN7A, WNT5B, BCL6, EGR1, EGR2, ATF3, CCL1, IL-1A, 및 CCL5 또는 (ii) CCL1, NR4A2, ATF3, CCL5, 및 WNT5B 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 전부의 유전자 발현은 약 10일 동안 PI3K 억제제와 생체 외에서 접촉시킨 항-BCMA CAR T 세포에서보다 상기 항-BCMA CAR T 세포에서 적어도 1.5배 또는 적어도 2배 더 크다.

[0036] 특정 구현예에서, 약 5 내지 약 7일 동안 포스파티딜-이노시톨-3 키나아제(PI3K) 억제제와 생체 외에서 접촉시킨 인간 항-B 세포 성숙 항원(BCMA) 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포가 제공되며, 여기서 (i) NQO1, CCNA1, IL17F, EMP1, SNHG19, PRR 22, ILDR2, ATAD3, NKD2, 및 WDR62 또는 (ii) NKD2 및 NQO1 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개 또는 전부의 유전자 발현은 약 10일 동안 PI3K 억제제와 생체 외에서 접촉시킨 항-BCMA CAR T 세포에서보다 상기 항-BCMA CAR T 세포에서 적어도 1.5배 또는 적어도 2배 더 적다.

[0037] 추가 구현예에서, 약 5 내지 약 7일 동안 포스파티딜-이노시톨-3 키나아제(PI3K) 억제제와 생체 외에서 접촉시킨 인간 항-B 세포 성숙 항원(BCMA) 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포가 제공되며; 여기서 (i) NR4A2, LY9, LIN7A, WNT5B, BCL6, EGR1, EGR2, ATF3, CCL1, IL-1A, 및 CCL5 또는 (ii) CCL1, NR4A2, ATF3, CCL5, 및 WNT5B 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 전부의 각각의 유전자 발현은 약 10일 동안 PI3K 억제제와 생체 외에서 접촉시킨 항-BCMA CAR T 세포에서보다 상기 항-BCMA CAR T 세포에서 적어도 1.5배 또는 적어도 2배 더 크고, (i) NQO1, CCNA1, IL17F, EMP1, SNHG19, PRR 22, ILDR2, ATAD3, NKD2, 및 WDR62 또는 (ii) NKD2 및 NQO1 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개 또는 전부의 유전자 발현은 약 10일 동안 PI3K 억제제와 생체 외에서 접촉시킨 항-BCMA CAR T 세포에서보다 상기 항-BCMA CAR T 세포에서 적어도 1.5배 또는 적어도 2배 더 적다.

[0038] 특정 구현예에서, $CD4^+$ 항-BCMA CAR T 세포는 중심 기억 T 세포(TCM) 유사 표현형을 갖는다.

[0039] 추가 구현예에서, $CD8^+$ 항-BCMA CAR T 세포는 줄기 세포 기억 T 세포(TSCM) 유사 표현형을 갖는다.

[0040] 특정 구현예에서, $CD4^+$ 항-BCMA CAR T 세포는 TCM 유사 표현형을 갖고 $CD8^+$ 항-BCMA CAR T 세포는 TSCM 유사 표현형을 갖는다.

[0041] 일부 구현예에서, 세포는 다발성 골수종 또는 림프종을 가진 대상체로부터 제조되었다.

[0042] 특정 구현예에서, 세포는 재발성/불응성 다발성 골수종을 가진 대상체로부터 제조되었다.

[0043] 특정 구현예에서, 세포는 항-BCMA CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 렌티바이러스를 포함한다.

[0044] 특정 구현예에서, 항-BCMA CAR은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0045] 특정 구현예에서, 항-BCMA CAR은 서열번호 2에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된다.

[0046] 특정 구현예에서, 세포는 자가 세포이다.

[0047] 특정 구현예에서, 세포는 동결 보존된다.

[0048] 특정 구현예에서, 세포는 다발성 골수종 또는 림프종을 갖는 대상체에게 투여되도록 제형화된다.

[0049] 추가 구현예에서, PI3K 억제제는 ZSTK474이다.

[0050] 특정 구현예에서, 생리학적으로 허용 가능한 부형제 및 본원에서 고려되는 항-BCMA CAR T 세포의 치료적 유효량을 포함하는 약학적 조성물이 제공된다.

[0051] 일부 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포의 치료적 유효량은 적어도 약 5.0 x 10^7개의 항-BCMA CAR T 세포이다.

[0052] 특정 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포의 치료적 유효량은 적어도 약 15.0 x 10^7개의 항-BCMA CAR T 세포이다.

[0053] 특정 구현예에서, 치료적 유효량은 적어도 약 45.0 x 10^7개의 항-BCMA CAR T 세포이다.

[0054] 특정 구현예에서, 치료적 유효량은 적어도 약 80.0 x 10^7개의 항-BCMA CAR T 세포이다.

[0055] 추가 구현예에서, 조성물은 PlasmaLyte A와 CryoStor CS10을 50:50의 비율로 포함하는 용액 중에서 제형화된다.

[0056] 특정 구현예에서, 본원에서 고려되는 조성물로 다발성 골수종 또는 림프종을 가진 대상체를 치료하는 방법이 제공된다.

[0057] 특정 구현예에서, 대상체는 재발성/불응성 다발성 골수종을 갖는다.

[0058] 다양한 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포를 제조하는 방법이 제공되며, 상기 방법은: T 세포의 모집단을 활성화시키고 T 세포의 모집단을 자극하여 증식시키는 단계; 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 항-BCMA CAR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터를 T 세포에 형질도입하는 단계; 형질도입된 약 5 내지 약 7일의 기간 동안 증식시키는 단계를 포함하며, 여기서 이전 단계들은 PI3K 억제제의 존재 하에 수행되고, (i) NR4A2, LY9, LIN7A, WNT5B, BCL6, EGR1, EGR2, ATF3, CCL1, IL-1A, 및 CCL5 또는 (ii) CCL1, NR4A2, ATF3, CCL5, 및 WNT5B 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 전부의 유전자 발현은, 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 항-BCMA CAR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터로 형질도입하고 약 10일 동안 배양하여 증식시킨 T 세포와 비교해 상기 배양된 T 세포에서 적어도 1.5배 또는 적어도 2배 더 크다.

[0059] 특정 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포를 제조하는 방법이 제공되며, 상기 방법은: T 세포의 모집단을 활성화시키고 T 세포의 모집단을 자극하여 증식시키는 단계; 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 항-BCMA CAR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터를 T 세포에 형질도입하는 단계; 형질도입된 약 5 내지 약 7일의 기간 동안 증식시키는 단계를 포함하며, 여기서 전술한 단계들은 PI3K 억제제의 존재 하에 수행되고, (i) NQO1, CCNA1, IL17F, EMP1, SNHG19, PRR 22, ILDR2, ATAD3, NKD2, 및 WDR62 또는 (ii) NKD2 및 NQO1 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개 또는 전부의 유전자 발현은, 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 항-BCMA CAR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터로 형질도입하고 약 10일 동안 배양하여 증식시킨 T 세포와 비교해 상기 배양된 T 세포에서 적어도 1.5배 더 적다.

[0060] 다양한 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포를 제조하는 방법이 제공되며, 상기 방법은: T 세포의 모집단을 활성화시키고 T 세포의 모집단을 자극하여 증식시키는 단계; 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 항-BCMA CAR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터를 T 세포에 형질도입하는 단계; 형질도입된 약 5 내지 약 7일의 기간 동안 증식시키는 단계를 포함하며, 여기서 전술한 단계들은 PI3K 억제제의 존재 하에 수행되고, (i) NR4A2, LY9, LIN7A, WNT5B, BCL6, EGR1, EGR2, ATF3, CCL1, IL-1A, 및 CCL5 또는 (ii) CCL1, NR4A2, ATF3, CCL5, 및 WNT5B 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 전부의 유전자 발현은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하

는 항-BCMA CAR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터로 형질도입하고 약 10일 동안 배양하여 증식시킨 T 세포와 비교해 상기 배양된 T 세포에서 적어도 1.5배 또는 적어도 2배 더 크고, (i) NQO1, CCNA1, IL17F, EMP1, SNHG19, PRR 22, ILDR2, ATAD3, NKD2, 및 WDR62 또는 (ii) NKD2 및 NQO1 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개 또는 전부의 유전자 발현은, 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 항-BCMA CAR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터로 형질도입하고 약 10일 동안 배양하여 증식시킨 T 세포와 비교해 상기 배양된 T 세포에서 적어도 1.5배 더 적다.

[0061] 다양한 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포를 제조하는 방법이 제공되며, 상기 방법은: T 세포의 모집단을 활성화시키고 T 세포의 모집단을 자극하여 증식시키는 단계; 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 항-BCMA CAR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터로 T 세포를 형질도입하는 단계; 형질도입된 T 세포를 배양하여 약 5 내지 약 7일의 기간 동안 증식시키는 단계를 포함하며, 여기서 전술한 단계들은 PI3K 억제제의 존재 하에 수행되고, 증식된 세포는 $CD27^+$ 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$이다.

[0062] 특정 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포는 적어도 10%의 $CD27^+$ 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ T 세포를 포함한다.

[0063] 추가 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포는 적어도 15%의 $CD27^+$ 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ T 세포를 포함한다.

[0064] 일부 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포는 적어도 20%의 $CD27^+$ 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ T 세포를 포함한다.

[0065] 일부 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포는 적어도 25%의 $CD27^+$ 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ T 세포를 포함한다.

[0066] 특정 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포는 적어도 30%의 $CD27^+$ 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ T 세포를 포함한다.

[0067] 추가 구현예에서, $CD27^+$ 세포는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$이다.

[0068] 추가 구현예에서, $CD27^+$ 세포는 $LEF1^+$ 및 $CCR7^+$ 및 $TCF1^+$이다.

[0069] 특정 구현예에서, $CD27^+$ 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ 항-BCMA CAR T 세포는 $CD4^+$ 항-BCMA CAR T 세포를 포함한다.

[0070] 특정 구현예에서, $CD27^+$ 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ 항-BCMA CAR T 세포는 $CD8^+$ 항-BCMA CAR T 세포를 포함한다.

[0071] 추가 구현예에서, $CD27^+$ 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및 $TCF1^+$ 항-BCMA CAR T 세포는 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 항-BCMA CAR T 세포를 포함한다.

[0072] 특정 구현예에서, T 세포는 자가 세포이다.

[0073] 추가 구현예에서, 상기 방법은 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 T 세포의 공급원으로서 단리하는 단계를 추가로 포함한다.

[0074] 일부 구현예에서, PBMC는 다발성 골수종 또는 림프종을 가진 대상체로부터 단리된다.

[0075] 특정 구현예에서, 대상체는 재발성/불응성 다발성 골수종을 갖는다.

[0076] 특정 구현예에서, 상기 방법은 PBMC를 활성화하고 자극하기 전에 이를 동결 보존하는 단계를 추가로 포함한다.

[0077] 추가 구현예에서, T 세포는 동결 보존된 증식 배양물이다.

[0078] 추가 구현예에서, T 세포는 활성화되고 자극되어 약 18 내지 약 24시간 동안 증식한다.

[0079] 특정 구현예에서, T 세포의 활성화는 T 세포를 항-CD3 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0080] 특정 구현예에서, 항-CD3 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 가용성이다.

[0081] 추가 구현예에서, 항-CD3 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 표면에 결합된다.

[0082] 일부 구현예에서, 표면은 비드이고, 임의로 상자성 비드이다.

[0083] 추가 구현예에서, T 세포의 자극은 T 세포를 항-CD28 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0084] 특정 구현예에서, 항-CD28 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 가용성이다.

[0085] 추가 구현예에서, 항-CD28 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 표면에 결합된다.

[0086] 일부 구현예에서, 표면은 비드, 임의로 상자성 비드, 임의로 항-CD3 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 결합된 상자성 비드이다.

[0087] 특정 구현예에서, 세포는 HIV-1에서 유래된 렌티바이러스 벡터로 형질도입된다.

[0088] 일부 구현예에서, 항-BCMA CAR은 서열번호 2에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된다.

[0089] 추가 구현예에서, PI3K 억제제는 ZSTK474이다.

[0090] 다양한 구현예에서, 양자 세포 요법에서의 $CD4^+$ 유사 항-BCMA CAR T 세포 및 $CD8^+$ TSCM 유사 항-BCMA CAR T 세포를 증가시키는 방법이 제공되며, 상기 방법은 항-BCMA CAR T 세포를 PI3K 억제제와 약 5 내지 약 7일 동안 생체 외에서 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서 $CD4^+$ TCM 유사 항-BCMA CAR T 세포 및 $CD8^+$ TSCM 유사 항-BCMA CAR T 세포의 수는, PI3K 억제제와 생체 외에서 약 10일 동안 접촉시킨 항-BCMA CAR T 세포에서보다 상기 항-BCMA CAR T 세포에서 적어도 2배 더 많다.

[0091] 특정 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포는 적어도 10%의 $CD27^+$ 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ T 세포를 포함한다.

[0092] 추가 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포는 적어도 15%의 $CD27^+$ 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ T 세포를 포함한다.

[0093] 일부 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포는 적어도 20%의 $CD27^+$ 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ T 세포를 포함한다.

[0094] 특정 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포는 적어도 25%의 $CD27^+$ 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ T 세포를 포함한다.

[0095] 추가 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포는 적어도 30%의 $CD27^+$ 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ T 세포를 포함한다.

[0096] 특정 구현예에서, T 세포는 자가 세포이다.

[0097] 특정 구현예에서, 상기 방법은 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 T 세포의 공급원으로서 단리하는 단계를 추가로 포함한다.

[0098] 추가 구현예에서, PBMC는 다발성 골수종 또는 림프종을 가진 대상체로부터 단리된다.

[0099] 일부 구현예에서, 대상체는 재발성/불응성 다발성 골수종을 갖는다.

[0100] 추가 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포는 HIV-1에서 유래된 렌티바이러스 벡터를 포함한다.

[0101] 특정 구현예에서, 항-BCMA CAR은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0102] 추가 구현예에서, 항-BCMA CAR은 서열번호 2에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된다.

[0103] 일부 구현예에서, 약학적으로 허용 가능한 부형제 및 본원에서 고려되는 항-BCMA CAR T 세포의 치료적 유효량을 포함하는 약학적 조성물이 제공된다.

[0104] 특정 구현예에서, 약학적으로 허용 가능한 부형제 및 본원에서 고려되는 $CD4^+$ TCM 항-BCMA CAR T 세포 및 $CD8^+$

TSCM 항-BCMA CAR T 세포의 치료적 유효량을 포함하는 약학적 조성물이 제공된다.

[0105] 특정 구현예에서, 다발성 골수종 또는 림프종을 가진 대상체를 치료하는 방법은 본원에서 고려되는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0106] 추가 구현예에서, 대상체는 재발성/불응성 다발성 골수종을 갖는다.

[0107] 다양한 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포에서 (i) NR4A2, LY9, LIN7A, WNT5B, BCL6, EGR1, EGR2, ATF3, CCL1, IL-1A, 및 CCL5 또는 (ii) CCL1, NR4A2, ATF3, CCL5, 및 WNT5B의 각각의 유전자 발현을 증가시키는 방법이 제공되며, 상기 방법은 항-BCMA CAR T 세포를 PI3K 억제제와 약 5 내지 약 7일 동안 생체 외에서 접촉시키는 단계를 포함하고, 여기서 (i) NR4A2, LY9, LIN7A, WNT5B, BCL6, EGR1, EGR2, ATF3, CCL1, IL-1A, 및 CCL5 또는 (ii) CCL1, NR4A2, ATF3, CCL5, 및 WNT5B의 각각의 유전자 발현은 PI3K 억제제와 약 10일 동안 생체 외에서 접촉시킨 항-BCMA CAR T 세포에서보다 상기 항-BCMA CAR T 세포에서 적어도 1.5배 더 크다.

[0108] 특정 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포에서 (i) NQO1, CCNA1, IL17F, EMP1, SNHG19, PRR 22, ILDR2, ATAD3, NKD2, 및 WDR62 또는 (ii) NKD2 및 NQO1의 각각의 유전자 발현을 감소시키는 방법이 제공되며, 상기 방법은 항-BCMA CAR T 세포를 PI3K 억제제와 약 5 내지 약 7일 동안 생체 외에서 접촉시키는 단계를 포함하고, 여기서 (i) NQO1, CCNA1, IL17F, EMP1, SNHG19, PRR 22, ILDR2, ATAD3, NKD2, 및 WDR62 또는 (ii) NKD2 및 NQO1의 각각의 유전자 발현은 PI3K 억제제와 약 10일 동안 생체 외에서 접촉시킨 항-BCMA CAR T 세포에서보다 상기 항-BCMA CAR T 세포에서 적어도 약 1.5배 더 적다.

[0109] 특정 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포에서 (i) NR4A2, LY9, LIN7A, WNT5B, BCL6, EGR1, EGR2, ATF3, CCL1, IL-1A, 및 CCL5 또는 (ii) CCL1, NR4A2, ATF3, CCL5, 및 WNT5B의 각각의 유전자 발현을 증가시키고, (i) NQO1, CCNA1, IL17F, EMP1, SNHG19, PRR 22, ILDR2, ATAD3, NKD2, 및 WDR62 또는 (ii) NKD2 및 NQO1의 각각의 유전자 발현을 감소시키는 방법이 제공되며, 상기 방법은 항-BCMA CAR T 세포를 PI3K 억제제와 약 5 내지 약 7일 동안 생체 외에서 접촉시키는 단계를 포함하고, 여기서 (i) NR4A2, LY9, LIN7A, WNT5B, BCL6, EGR1, EGR2, ATF3, CCL1, IL-1A, 및 CCL5 또는 (ii) CCL1, NR4A2, ATF3, CCL5, 및 WNT5B의 각각의 유전자 발현은 PI3K 억제제와 약 10일 동안 생체 외에서 접촉시킨 항-BCMA CAR T 세포에서보다 상기 항-BCMA CAR T 세포에서 적어도 1.5배 더 크고, (i) NQO1, CCNA1, IL17F, EMP1, SNHG19, PRR 22, ILDR2, ATAD3, NKD2, 및 WDR62 또는 (ii) NKD2 및 NQO1의 각각의 유전자 발현은 PI3K 억제제와 약 10일 동안 생체 외에서 접촉시킨 항-BCMA CAR T 세포에서보다 상기 항-BCMA CAR T 세포에서 적어도 1.5배 더 적다.

[0110] 일부 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포의 치료 효능을 증가시키는 방법이 제공되며, 상기 방법은 항-BCMA CAR T 세포를 PI3K 억제제와 약 5 내지 약 7일 동안 생체 외에서 접촉시키는 단계를 포함하고, 여기서 치료 효능의 증가는 (i) NR4A2, LY9, LIN7A, WNT5B, BCL6, EGR1, EGR2, ATF3, CCL1, IL-1A, 및 CCL5 또는 (ii) CCL1, NR4A2, ATF3, CCL5, 및 WNT5B 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 전부의 유전자 발현이 PI3K 억제제와 약 10일 동안 생체 외에서 접촉시킨 항-BCMA CAR T 세포와 비교해 상기 항-BCMA CAR T 세포에서 적어도 1.5배 더 증가한 것에 의해 표시된다.

[0111] 특정 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포의 치료 효능을 증가시키는 방법이 제공되며, 상기 방법은 항-BCMA CAR T 세포를 PI3K 억제제와 약 5 내지 약 7일 동안 생체 외에서 접촉시키는 단계를 포함하고, 여기서 치료 효능의 증가는 (i) NQO1, CCNA1, IL17F, EMP1, SNHG19, PRR 22, ILDR2, ATAD3, NKD2, 및 WDR62 또는 (ii) NKD2 및 NQO1의 각각의 유전자 발현이 PI3K 억제제와 약 10일 동안 생체 외에서 접촉시킨 항-BCMA CAR T 세포와 비교해 상기 항-BCMA CAR T 세포에서 적어도 1.5배 더 감소한 것에 의해 표시된다.

[0112] 일부 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포의 치료 효능을 증가시키는 방법이 제공되며, 상기 방법은 항-BCMA CAR T 세포를 PI3K 억제제와 약 5 내지 약 7일 동안 생체 외에서 접촉시키는 단계를 포함하고, 여기서 치료 효능의 증가는 (i) NR4A2, LY9, LIN7A, WNT5B, BCL6, EGR1, EGR2, ATF3, CCL1, IL-1A, 및 CCL5 또는 (ii) CCL1, NR4A2, ATF3, CCL5, 및 WNT5B 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 전부의 유전자 발현이 PI3K 억제제와 약 10일 동안 생체 외에서 접촉시킨 항-BCMA CAR T 세포와 비교해 상기 항-BCMA CAR T 세포에서 적어도 1.5배 더 증가하고; (i) NQO1, CCNA1, IL17F, EMP1, SNHG19, PRR 22, ILDR2, ATAD3, NKD2, 및 WDR62 또는 (ii) NKD2 및 NQO1의 각각의 유전자 발현이 PI3K 억제제와 약 10일 동안 생체 외에서 접촉시킨 항-BCMA CAR T 세포와 비교해 상기 항-BCMA CAR T 세포에서 적어도 1.5배 더 감소한 것에 의해 표시된다.

[0113] 특정 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포는 다발성 골수종 또는 림프종을 가진 대상체에서 유래된 것이다.

[0114] 추가 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포는 재발성/불응성 다발성 골수종을 가진 대상체에서 유래된 것이다.

[0115] 특정 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포는 항-BCMA CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 HIV-1 유래 렌티바이러스 벡터를 포함한다.

[0116] 특정 구현예에서, 항-BCMA CAR은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

[0117] 추가 구현예에서, 항-BCMA CAR은 서열번호 2에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된다.

[0118] 일부 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포는 자가 세포이다.

[0119] 특정 구현예에서, PI3K 억제제는 ZSTK474이다.

도면의 간단한 설명

[0120] **도 1**은 T 세포를 PI3K 억제제와 함께 배양하는 기간에 의해 T 세포 표현형이 조절되는 것을 보여준다. 5개의 다발성 골수종 PBMC 로트를 사용하여 PI3K 억제제가 없는 상태에서 항-BCMA CAR T 세포를 제조하거나, 항-BCMA CAR을 암호화하는 렌티바이러스로 형질도입 후 7일 또는 10일 동안 PI3K 억제제와 함께 배양하였다. 7일 및 10일차에 CD3, CD62L, CCR7, 및 CD45RA에 대한 항인간 항체로 T 세포를 염색하고, 유세포 계측에 의해 분석하였다. 각각의 점도표는 생존 가능한 $CD3^+$ 림프구에 대해 게이팅한 것이다.

도 2는 T 세포를 10일 동안 배양했을 때와 비교하여 PI3K 억제제와 함께 7일 동안 배양한 후에 T 세포가 더 강력한 표현형을 나타냄을 보여준다. 7일 또는 10일 동안 PI3K 억제제의 존재 하에 5개의 다발성 골수종 PBMC 로트를 사용해 항-BCMA CAR T 세포를 제조하였다. 7일차 및 10일차에 CCR7, CD25, CD28, CD122, ICOS, CD45RO, CD57, 및 TIM3에 대한 항인간 항체로 T 세포를 염색하고, CyTOF에 의해 분석하였다. 각각의 점도표는 생존 가능한 $CD3^+$ 림프구에 대해 게이팅한 것이다.

도 3은 PI3K 억제제 중에서 7일 동안 제조한 T 세포의 경우 $CD27^+$ T 세포가 풍부함을 보여준다. PI3K 억제제의 존재 하에 5개의 다발성 골수종 PBMC 로트를 사용해 항-BCMA CAR T 세포를 제조하였다. 7일차 및 10일차에 CD4, CD8, 및 CD27에 대한 항인간 항체로 T 세포를 염색하고, CyTOF에 의해 분석하였다. VISNE 플롯은 상이한 세포 집단에서 CD27로 게이팅된 발현을 보여준다.

도 4a 내지 **도 4b**는 T 세포를 10일 동안 배양했을 때와 비교하여 PI3K 억제제와 함께 7일 동안 배양한 후에 T 세포가 더 강력한 표현형을 나타냄을 보여준다. 7일 또는 10일 동안 PI3K 억제제의 존재 하에 5개의 다발성 골수종 PBMC 로트를 사용해 항-BCMA CAR T 세포를 제조하였다. 7일차 및 10일차에 (1) CCR7, CD25, CD28, HLA-DR, 및 TIM3에 대한 항인간 항체(도 4a) 또는 CD45RO, CD57, CD70, CD244, 및 PD-1에 대한 항인간 항체(도 4b)로 T 세포를 염색하고, CyTOF에 의해 분석하였다. VISNE 플롯은 7일 배양물(상단 열) 및 10일 배양물(하단 열)에서 상이한 T 세포 표현형 마커의 발현을 보여준다. 게이팅된 모집단은 $CD27^+$ 세포를 나타낸다.

도 5는 PI3K 억제제에서 10일 동안 제조된 $CD27^+$ T 세포가 PI3K 억제제에서 7일 동안 제조된 T 세포와 비교하여 활성화 감소 및 고갈 증가로 표시됨을 보여준다. 7일 또는 10일 동안 PI3K 억제제의 존재 하에 5개의 다발성 골수종 PBMC 로트를 사용해 항-BCMA CAR T 세포를 제조하였다. VISNE 분석에 의해 식별된 $CD27^+$ T 세포를 CD28, ICOS, HLA-DR, CD25, 및 TIM3에 대한 항인간 항체로 7일차 및 10일차에 염색하고, $CD4^+$ T 세포(상단) 및 $CD8^+$ T 세포(하단)에서 CyTOF에 의해 분석하였다.

도 6은 항-BCMA CAR T 세포 제조 기간의 결과로서의 차등 유전자 발현을 보여준다. 다발성 골수종 PBMC 로트를 사용해 PI3K 억제제 없이 7일(1) 또는 10일(13) 동안, 또는 PI3K 억제제의 존재 하에 7일(10) 또는 10일(6) 동안 항-BCMA CAR T 세포를 제조하였다. T 세포로부터 RNA를 추출하고, 나노스트링 면역학 패널(Nanostring Immunology panel)을 사용하여 전사 프로파일을 분석하였다. 제조 조건에 따라 차등 발현된 상위 50개 유전자의 히트맵이 도시되어 있다.

도 7은 PI3K 억제제에서 10일 동안 제조한 항-BCMA CAR T 세포와 비교하여 PI3K 억제제에서 7일 동안 제조한 항-BCMA CAR T 세포의 효능 증가를 보여준다. 건강한 공여자 PBMC를 활성화시키고, 항-BCMA CAR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터로 형질도입하고, IL-2 및 PI3K 억제제의 존재 하에 6일(7일 공정) 또는 9일(10일 공정) 동안 증식시켰다. 입양 세포 요법 10일 전에, NSG 마우스에게 2 x 10^6개의 반딧불이 루시페라아제로 표지된 다우디

(Daudi) 종양 세포를 정맥내 주사하였다. 마우스에게 2.5, 5, 또는 10 x 10^6개의 항-BCMA CAR^+ T 세포 또는 비히클로 형질도입된 T 세포를 주사하였다. 종양 부담을 발광에 의해 모니터링하였다.

도 8은 PI3K의 존재 하에 제조된 T 세포의 경우 $CD27^+$ $CD4^+$ TCM 유사 세포 및 $CD27^+$ $CD8^+$ TSCM 유사 세포가 풍부함을 보여준다. PI3K 억제제의 존재 하에 다발성 골수종 PBMC 로트로부터 제조한 항-BCMA CAR T 세포를 약 36개의 T 세포 표현형 분석 항체 패널로 염색하고 CyTOF로 분석하였다. 미노출 T 세포(Tnaive), 중심 기억 T 세포(TCM), 효과기 기억 T 세포(EM), 효과기 T 세포(TEff), 및 줄기 세포 기억 T 세포(TSCM)가 도시되어 있다. 제시된 데이터는 $CD27^+$가 풍부한 세포 대 T 세포 하위 집합의 백분율(%)의 함수로서 분석한 각 DP 로트를 보여준다.

도 9는 FlowSOM을 사용하여 분석한 도 9의 $CD8^+$ T 세포 데이터를 보여준다. FlowSOM은 20개의 구별되는 T 세포 클러스터를 식별하였다. 클러스터 4(기억 T 세포가 풍부함 - 적합함) 및 클러스터 5(효과기 T 세포 마커가 풍부함 - 덜 적합함)에 기초하여 3개의 주요 T 세포군을 식별하였다. $CD27^+CD8^+$ T 세포 백분율(%), 제조 방법, 및 항-BCMA CAR T 세포로 치료한 대상체에 대한 임상 반응이 도시되어 있다.

도 10은 7일 또는 10일의 PI3K 제조 공정을 사용해 다발성 골수종 세포 로트로부터 제조한 항-BCMA CAR T 세포의 차등 유전자 발현 분석을 보여준다. 12개 로트의 항-BCMA CAR T 세포로부터 RNA를 추출하고, 나노스트링 면역학 패널을 사용하여 전사 프로파일을 분석하였다. 7일 및 10일 제조 공정에 따라 차등 발현된 상위 25개 유전자의 히트맵이 도시되어 있다. $CD27^+$ T 세포 백분율(%), 제조 방법, 및 항-BCMA CAR T 세포로 치료한 대상체에 대한 임상 반응이 도시되어 있다.

도 11a는 항-BCMA CAR T 세포 약물 생성물 중 cyTOF를 위해 염색한 T 세포 집단에 대한 화산 도표를 도시한 것으로서, 지속성 반응자와 비지속성 반응자를 비교하여 보여준다. 이 도표는 지속성 반응자와 및 비지속성 반응자 간의 세포 조성에 있어서 가장 유의한 차이는 미노출 T 세포 및 줄기 세포 기억 T 세포임을 보여준다. 일반화된 선형 모델 계수는 X축 상에 표시되고, p-값은 Y축 상에 도시되어 있다.

도 11b는 항-BCMA CAR T 세포 약물 생성물 중 CD4 TSCM(상단 패널) 및 CD8 TSCM(하단 패널)의 비율의 상자 그림으로서, 지속성 반응자와 비지속성 반응자를 비교하여 보여준다. TSCM 세포는 지속성 반응이 나타난 환자의 약물 생성물에서 풍부하였다.

도 12a는 항-BCMA CAR T 세포 약물 생성물 중 CD4(상단 좌측 패널) 및 CD8(상단 중앙 패널)에서 CyTOF에 의해 결정된 LEF-1 발현의 비율의 상자 그림으로서, 지속성 반응자와 비지속성 반응자를 비교하여 보여준다. LEF-1 발현 세포의 비율뿐만 아니라 LEF-1의 유전자 발현은 비지속성 반응자와 비교해 지속성 반응자에서 증가하는데, 이는 이들 약물 생성물에서 초기 기억 T 세포가 풍부함을 나타낸다.

도 12a는 항-BCMA CAR T 세포로 치료한 후 2개월차에 약물 생성물에서 LEF-1 유전자 발현과 환자 sBCMA 수준의 상관관계를 보여준다. 이들 데이터는 약물 생성물에서 초기 기억 표현형과 치료 반응의 심도 간의 연관성을 나타낸다.

도 13은 PBMC 및 항-BCMA CAR T 세포(DP)에서 CyTOF에 의해 결정된 CCR7(상단 좌측 패널), LEF1(상단 중앙 패널), 및 CD57(상단 우측 패널)을 발현하는 CD3+ 활 세포의 백분율을 보여준다. 추가로 도 13은, 항-BCMA CAR T 세포를 주입한 후 다양한 시점에 전혈로부터 추출된 CD3+ 세포 상에서 PCR에 의해 결정된 최대 벡터 카피 수(VCN)를 x 축에 보여주고, 이와 비교하여 CCR7(도 13, 하단 좌측 패널), LEF-1(도 13, 하단 중앙 패널), 및 CD57(도 13, 하단 우측 패널)을 발현하는 CD3+ 활 세포의 백분율을 y 축에 보여준다.

도 14는 CD57(노쇠 마커), LEF-1, CCR7 및 CD27(기억 세포)을 발현하는 CD3+ 활 세포의 백분율을 클러스터링된 히트맵으로서 보여준다. 평균 연결 계층적 클러스터링을 사용하여 데이터를 그룹화하고, 클러스터 계통수에 의해 결정했을 때의 상위 3개의 클러스터를 환자의 6개월차에 임상 반응과 연관시켰다.

서열 식별자의 간단한 설명

서열번호 1은 항-BCMA CAR의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 2는 항-BCMA CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 제시한다.

전술한 서열에서, X가 존재하는 경우, 이는 임의의 아미노산 또는 아미노산의 부재를 지칭한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0121] **A.개요**

[0122] 본 발명은 일반적으로 T 세포 조성물을 제조하기 위한 개선된 방법에 관한 것이다. T 세포 요법이 5년 전보다 더 널리 퍼져 있지만, 이러한 요법이 직면한 장애물은 여전히 효능이 좋지 않거나 준최적 상태에 머물러 있다. 용액은 본 발명의 방법에 의해 제공되며, 상기 방법은 세포 요법 생성물, 예를 들어, CAR T 세포 생성물의 효능을 크게 증가시킨다. 임의의 특정 이론에 구속되고자 함이 없이, 본 발명자들은 PI3K 억제제를 사용하는 T 세포 제조 기간을 감소시키는 것이 PI3K 억제제를 사용하는 보다 긴 제조 공정에 비해 세포 투여량을 감소시키고 세포 효능 및 지속성을 증가시키는 데 있어서 추가적인 개선을 가능하게 한다는 것을 예기치 않게 발견하였다. 놀랍게도, PI3K 억제제 기반의 더 짧은 공정을 사용하여 제조된 개선된 약물 생성물은 $CD27^{+}CD8^{+}$ 줄기 세포 기억 T 세포(TSCM) 및 $CD27^{+}CD4^{+}$ 중심 기억 T 세포(TCM)의 모집단을 풍부하게 하였다. 특정 구현예에서, PI3K 억제제 기반의 더 짧은 공정을 사용하여 제조된 개선된 약물 생성물은 $CD27^{+}$, $LEF1^{+}$, 및/또는 $TCF1^{+}$ T 세포의 모집단을 풍부하게 하였다. 제조된 세포는 후속하여 분화할 수 있고 지속적인 면역 효과기 세포 기능을 제공할 수 있다.

[0123] 약물 생성물 표현형 분석 및 유전자 발현 분석을 통해 임상의는 특정 약물 생성물이 기능을 수행할 가능성을 결정할 수도 있다. 또한, 풍부한 T 세포는 다음 중 하나 이상의 유전자 발현 증가를 포함하고: 핵 수용체 서브패밀리 4 그룹 A 구성원 2(NR4A2), CD229(LY9), Lin-7 동족체 A(LIN7A), 무익형(Wingless-Type) MMTV 통합 부위 패밀리, 구성원 5B(WNT5B), B 세포 CLL/림프종 6(BCL6), 조기 성장 반응 1(EGR1), 조기 성장 반응 2(EGR2), 활성화 전사 인자 3(ATF3), C-C 모티프 케모카인 1(CCL1), 인터류킨 1A(IL-1A), 및 C-C 모티프 케모카인 5(CCL5); 다음 중 하나 이상의 유전자 발현 감소를 포함한다: NAD(P)H 퀴논 탈수소효소 1(NQO1), 시클린 A1(CCNA1), 인터류킨 17F(IL17F), 상피 막 단백질 1(EMP1), 소핵 RNA 숙주 유전자 19(SNHG19), 프롤린 리치 22(PRR 22), 수용체 2를 함유하는 면역글로불린 유사 도메인(ILDR2), ATPase 패밀리, 3을 함유하는 AAA 도메인(ATAD3), 네이키드 큐티클 동족체 2(NKD2), 및 WD 반복 도메인 62(WDR62).

[0124] 특정 구현예에서, 풍부한 T 세포는 다음 중 하나 이상의 유전자 발현 증가를 포함하고: CCL1, NR4A2, ATF3, CCL5, 및 WNT5B; 다음 중 하나 이상의 유전자 발현 감소를 포함한다: NQO1 및 NKD2.

[0125] 다양한 구현예에서, T 세포를 제조하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 입양 세포 요법의 효능을 증가시킨다. 특정 바람직한 구현예에서, 조작된 CAR T 세포 조성물은 조작된 세포의 효능을 증가시키기에 충분한 기간 동안 및 조건 하에서 포스파티딜-이노시톨-3 키나아제(PI3K) 억제제(예: ZSTK474(CAS 번호 475110-96-4))의 존재 하에 제조된다. 바람직한 구현예에서, T 세포는 PI3K 억제제의 존재 하에 활성화되고 자극되고(약 24시간, 18~24시간); PI3K 억제제의 존재 하에, CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 렌티바이러스로 형질도입되고(약 24시간, 18~24시간); 형질도입 후 약 4일 내지 약 6일 동안, PI3K 억제제의 존재 하에 증식된다(예를 들어, 각각 총 6일 또는 8일).

[0126] 다양한 구현예에서, 5일의 T 세포 제조 공정의 경우, PI3K 억제제의 존재 하에 T 세포를 활성화하고 자극하고(약 24시간, 18~24시간); PI3K 억제제의 존재 하에, CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 렌티바이러스로 세포를 형질도입하고(약 24시간, 18~24시간); 약 4일 동안, PI3K 억제제의 존재 하에 세포를 증식시킨다(예를 들어, 총 6일).

[0127] 다양한 구현예에서, 7일의 T 세포 제조 공정의 경우, PI3K 억제제의 존재 하에 T 세포를 활성화하고 자극하고(약 24시간, 18~24시간); PI3K 억제제의 존재 하에, CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 렌티바이러스로 세포를 형질도입하고(약 24시간, 18~24시간); 약 6일 동안, PI3K 억제제의 존재 하에 세포를 증식시킨다(예를 들어, 총 8일).

[0128] 특정 구현예에서, T 세포 활성화 또는 효능 유전자의 발현을 증가시키고/시키거나 T 세포 분화 또는 고갈 유전자의 발현을 감소시키는 방법이 고려된다. 본원에서 고려되는 제조된 T 세포 조성물은 암(예: 혈액암)의 적어도 하나의 증상의 치료, 예방, 또는 완화에 유용하다.

[0129] 다양한 구현예에서, PI3K 억제제의 존재 하에 제조된 $CD27^{+}$ 풍부 항-B 세포 성숙 항원(BCMA) 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포로 이루어지고, 새 우수 의약품 제조 및 품질관리 기준(cGMP)에 따라 제조된 조성물이 고려된다. 특정 구현예에서, 더 짧은 5일 또는 7일의 제조 공정을 통해 $CD27^{+}$, LEF1+, $CCR7^{+}$, 및/또는 $TCF1^{+}$ 항-BCMA CAR T

세포의 풍부한 모집단이 생성된다.

[0130] 다양한 구현예에서, $CD27^+$ 풍부 $CD8^+$ TSCM 유사 T 세포 및 $CD27^+$ 풍부 $CD4^+$ TCM 유사 T 세포의 항-BCMA CAR T 세포 조성물이 고려된다.

[0131] 다양한 구현예에서, PI3K 억제제의 존재 하에 제조된 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ 붕부 항-B 세포 성숙 항원(BCMA) 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포로 이루어지고, 새 우수 의약품 제조 및 품질관리 기준(cGMP)에 따라 제조된 조성물이 고려된다. 특정 구현예에서, 풍부한 모집단은 또한 $CD27^+$ 항-BCMA CAR T 세포이다.

[0132] 다양한 구현예에서, $CD27^+$ 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ 풍부 $CD8^+$ TSCM 유사 T 세포 및 $CD27^+$ 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ 풍부 $CD4^+$ TCM 유사 T 세포의 항-BCMA CAR T 세포 조성물이 고려된다.

[0133] 따라서, 본원에서 고려되는 방법 및 조성물은 기존의 입양 세포 면역요법과 비교하여 양자 개선을 나타낸다.

[0134] 재조합(즉, 조작된) DNA, 펩티드 및 올리고뉴클레오티드 합성, 면역검정, 조직 배양, 형질변환(예: 전기천공, 리포펙션), 효소 반응, 정제를 위한 기술 및 관련 기술과 절차는 본 명세서 전반에 걸쳐 인용되고 논의된 것과 같이 미생물학, 분자 생물학, 생화학, 분자 유전학, 세포 생물학, 바이러스학, 및 면역학에 있어서의 다양한 일반적이고 보다 구체적인 참조 문헌에 기술된 바와 같이 수행될 수 있다. 예를 들어, Sambrook 등의 문헌[*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.]; [*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]; Glover의 문헌[*DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (IRL Press, Oxford Univ. Press USA, 1985)]; [*Current Protocols in Immunology* (Edited by: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober 2001 John Wiley & Sons, NY, NY)]; [*Real-Time PCR: Current Technology and Applications*, Edited by Julie Logan, Kirstin Edwards and Nick Saunders, 2009, Caister Academic Press, Norfolk, UK]; Anand의 문헌[*Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, New York, 1992)]; Guthrie와 Fink의 문헌[*Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology* (Academic Press, New York, 1991)]; [*Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, Ed., 1984)]; [*Nucleic Acid* The *Hybridization* (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1985)]; [*Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984)]; [*Animal Cell Culture* (R. Freshney, Ed., 1986); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984)]; [*Next-Generation Genome Sequencing* (Janitz, 2008 Wiley-VCH)]; [*PCR Protocols (Methods in Molecular Biology)* (Park, Ed., 3rd Edition, 2010 Humana Press)]; [*Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986)]; the treatise, [*Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.)]; [*Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory)]; Harlow와 Lane의 문헌[*Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998)]; [*Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987)]; [*Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV (D. M. Weir andCC Blackwell, eds., 1986)]; Roitt의 문헌[*Essential Immunology,* 6th Edition, (Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988)]; [*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*]를 비롯하여 *Advances in Immunology*와 같은 학술지 내의 논문들도 참조한다.

[0135] **B.정의**

[0136] 본 개시를 보다 상세히 제시하기에 앞서, 본원에서 사용될 특정 용어의 정의를 제공하는 것이 본 개시를 이해하는 데 도움이 될 수 있다.

[0137] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술된 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 물질이 특정 구현예의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 조성물, 방법 및 물질의 바람직한 구현예가 본원에 기술된다. 본 개시의 목적을 위해, 다음의 용어가 아래에 정의된다.

[0138] 단수 표현(관사 "a", "an", 및 "the")은 단수 표현된 문법적 객체의 하나 또는 둘 이상(즉, 적어도 하나)을 지

칭하도록 본원에서 사용된다. 예를 들어, "하나의 요소(an element)"는 하나의 요소 또는 둘 이상의 요소를 의미한다.

[0139] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "약(about)" 또는 "대략(approximately)"은 기준 수량, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량, 또는 길이에 대해 많게는 30%, 25%, 20%, 25%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 만큼 달라지는 수량, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량, 또는 길이를 지칭한다. 특정 구현예에서, 수치 값 앞에 있을 때 용어 "약" 또는 "대략"은 15%, 10%, 5%, 또는 1%의 범위를 더하거나 빼는 값을 나타낸다.

[0140] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "약" 또는 "대략"은 기준 수량, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량, 또는 길이의 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상인 수량, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량, 또는 길이를 지칭한다. 일 구현예에서, "실질적으로 동일한(substantially the same)"은 기준 수량, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량, 또는 길이와 대략 동일한 효과, 예를 들어 생리학적 효과를 생성하는 수량, 수준, 값, 수, 빈도, 백분율, 치수, 크기, 양, 중량, 또는 길이를 지칭한다.

[0141] 본 명세서 전반에 걸쳐, 문맥이 달리 요구하지 않는 한, "포함하다(comprise, comprises, 및 comprising)"라는 단어는 언급된 단계나 요소 또는 단계나 요소의 군을 포함하는 것을 의미하지만 임의의 다른 단계나 요소 또는 단계나 요소의 군을 배제하지 않는 것으로 이해될 것이다. "이루어지는(consisting of)"이란 "이루어지는"이라는 문구에 이어지는 것 포함하고, 이에 한정됨을 의미한다. 따라서, 문구 "이루어지는"은 열거된 요소가 요구되거나 필수적이며, 다른 요소가 존재할 수 없음을 나타낸다. "본질적으로 이루어지는(consisting essentially of)"이란, 해당 문구에 이어지는 열거된 임의의 요소를 포함하고, 열거된 요소에 대해 본 개시에서 명시된 활성 또는 작용을 방해하거나 이에 기여하지 않는 다른 요소로 제한됨을 의미한다. 따라서, 문구 "본질적으로 이루어지는"은 열거된 요소가 요구되거나 필수적이지만, 선택 가능한 다른 요소가 없고, 열거된 요소의 활성 또는 작용에 영향을 미치는 지 여부에 따라 존재하거나 존재하지 않을 수 있는 다른 요소가 없음을 나타낸다.

[0142] 본 명세서 전반에 걸쳐 "일 구현예(one embodiment, an embodiment)", "특정 구현예(a particular embodiment, a certain embodiment)", "연관 구현예(a related embodiment)", 또는 "추가 구현예(an additional embodiment 또는 a further embodiment)" 또는 이들의 조합은 구현예와 관련하여 기술된 특정 특징, 구조, 또는 특성이 본 발명의 적어도 하나의 구현예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전반에 걸쳐 다양한 위치에서 나타나는 전술한 문구 모두가 본질적으로 동일한 구현예를 지칭하는 것은 아니다. 또한, 특정 특징, 구조, 또는 특성은 하나 이상의 구현예에서 임의의 적절한 방식으로 조합될 수 있다.

[0143] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "T 세포 제조" 또는 "T 세포 제조 방법" 또는 유사한 용어는 T 세포의 치료적 조성물을 생산하는 공정을 지칭하며, 상기 제조 방법은 다음 단계 중 하나 이상 또는 전부를 포함할 수 있다: 수확하는 단계, 자극하는 단계, 활성화하는 단계, 형질도입하는 단계, 및 증식시키는 단계. 바람직한 구현예에서, 증식 단계는 형질도입 후 5일 내지 7일 이하이다. 5일의 T 세포 제조 공정은 0일차의 활성화 및 자극 단계, 1일차의 형질도입 단계, 및 5일차 종료 시까지의 증식 단계를 포함한다. 7일의 T 세포 제조 공정은 0일차의 활성화 및 자극 단계, 1일차의 형질도입 단계, 및 7일차 종료 시까지의 증식 단계를 포함한다. 10일의 T 세포 제조 공정은 0일차의 활성화 및 자극 단계, 1일차의 형질도입 단계, 및 10일차 종료 시까지의 증식 단계를 포함한다. 바람직한 구현예에서, T 세포 제조 방법은 제조 공정 전반에 걸쳐 PI3K의 사용을 포함한다.

[0144] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "PI3K 억제제"는 PI3K에 결합하여 이의 적어도 하나의 활성을 억제하는 작은 유기 분자를 지칭한다. PI3K 단백질은 3개의 클래스, 즉 클래스 1 PI3K, 클래스 2 PI3K, 및 클래스 3 PI3K로 나누어질 수 있다. 클래스 1 PI3K는 4개의 p110 촉매 서브유닛(p110α, p110β, p110δ, 및 p110γ) 중 하나 및 2개의 조절 서브유닛 패밀리 중 하나로 이루어진 이종이량체로서 존재한다. 특정 구현예에서, PI3K 억제제는 클래스 1 PI3K 억제제 중 하나 이상의 이소형에 대한 선택도(즉, p110α, p110β, p110δ, 및 p110γ 또는 p110α, p110β, p110δ, 및 p110γ 중 하나 이상에 대한 선택도)를 나타낸다. 특정 구현예에서, PI3K 억제제는 이소형 선택도을 나타내지 않게 되고, "범-PI3K 억제제"로서 간주되게 된다.

[0145] 용어 "T 세포" 또는 "T 림프구"는 당업계에서 인지되어 있으며, 흉선세포, 미노출 T 림프구, 미성숙 T 림프구, 성숙 T 림프구, 휴지기 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), 종양 침윤 세포독성 T 세포(TIL; $CD8^+$ T 세포), $CD4^+CD8^+$ T 세포,

$CD4^-CD8^-$ T 세포, 또는 T 세포의 임의의 다른 하위 집합일 수 있다. 바람직하게는, 제조된 T 세포는 $CD27^+$ T 세포, $CD27^+CD4^+$ T 세포, 및/또는 $CD27^+CD8^+$ T 세포가 풍부하다. 특정 바람직한 구현예에서, 제조된 T 세포는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ T 세포 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ $CD4^+$ T 세포 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ $CD8^+$ T 세포가 풍부하다. 특정 바람직한 구현예에서, 제조된 T 세포는 $CD27^+$ $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ T 세포 및/또는 $CD27^+$ $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ $CD4^+$ T 세포 및/또는 $CD27^+$ $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ $CD8^+$ T 세포가 풍부하다. 보다 바람직하게는, 제조된 T 세포는 줄기 세포 기억 T 세포(TSCM) 및 중심 기억 T 세포(TCM)가 풍부하다.

[0146] "유능한 T 세포(potent T cell)" 및 "젊은 T 세포"는 특정 구현예들에서 상호 교환적으로 사용되고 T 세포 표현형을 지칭하며, 여기서 T 세포는 증식할 수 있고 동시에 분화를 감소시킬 수 있다. 특정 구현예에서, 젊은 T 세포는 미노출 T 세포 TSCM, 또는 TCM의 표현형을 갖는다. 다양한 구현예에서, 본원에서 고려되는 제조 방법을 통해 더 강력한 T 세포, 예를 들어, 미노출 T 세포, TSCM, 또는 TCM이 생산된다. 특정 구현예에서, 젊은 T 세포는 다음의 생물학적 마커 중 하나 이상 또는 모두가 풍부하다: CD62L, CCR7, CD28, CD27, CD122, CD127, CD197, CD95, CD45RO, 및 CD38.

[0147] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "증식"은 세포 분열의 증가를 지칭하며, 세포 분열은 세포의 대칭 또는 비대칭 분열이다. 특정 구현예에서, "증식"은 T 세포의 대칭 또는 비대칭 분열을 지칭한다. "증식 증가"는 미치료 샘플 중 세포와 비교하여 치료 샘플 중 세포의 수가 증가할 때 발생한다.

[0148] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "분화"는 세포의 효능 또는 증식을 감소시키거나 세포를 보다 발달적으로 제한된 상태로 이동시키는 방법을 지칭한다. 특정 구현예에서, 분화된 T 세포는 면역 효과기 세포 기능을 획득한다.

[0149] "면역 효과기 세포"는 면역 체계의 임의의 세포로서, 하나 이상의 효과기 기능(예: 세포독성 세포 사멸 활성, 사이토카인의 분비, ADCC 및/또는 CDC의 유도)을 갖는다. 본원에서 고려되는 예시적인 면역 효과기 세포는 T 림프구, 구체적으로는 T 세포(CTL; $CD8^+$ T 세포), TIL, 및 헬퍼 T 세포(HTL; $CD4^+$ T 세포)이다.

[0150] "변형된 T 세포"는 본원에서 고려되는 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 도입에 의해 변형된 T 세포를 지칭한다. 변형된 T 세포는 유전적 변형 및 비유전자 변형(예를 들어, 에피솜 변형 또는 염색체 외 변형) 둘 다를 포함한다.

[0151] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "유전자 조작(genetically engineered)" 또는 "유전자 변형(genetically modified)"은 DNA 또는 RNA 형태의 추가 유전 물질을 세포 내의 총 유전 물질에 첨가하는 것을 지칭한다.

[0152] 용어 "유전자 변형 세포", "변형된 세포", 및 "재유도된 세포"는 상호 교환적으로 사용된다.

[0153] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "유전자 요법"은 유전자의 발현을 복구, 보정, 또는 변형시키기 위해, 또는 TCR 또는 CAR 및/또는 하나 이상의 사이토카인과 같은 치료 폴리펩티드의 발현을 목적으로 DNA 또는 RNA 형태의 추가 유전 물질을 세포 내 총 유전 물질 내로 도입하는 것을 지칭한다. 특정 구현예에서, T 세포는 세포의 게놈을 변형시키지 않고, 예를 들어, TCR 또는 CAR을 발현하는 에피솜 벡터를 세포 내로 도입함으로써 CAR을 발현하도록 변형된다.

[0154] 용어 "생체외(*ex vivo*)"는 일반적으로 유기체 외부에서 이루어지는 활동, 예컨대 유기체 외부의 인공 환경에서, 바람직하게는 천연 조건의 변경을 최소화한 상태로, 살아있는 조직에서 또는 살아있는 조직을 대상으로 수행되는 실험 또는 측정을 지칭한다. 특정 구현예에서, "생체외" 절차는 유기체로부터 살아있는 세포 또는 조직을 채취하고, 보통은 멸균 조건 하의 실험실 장치에서, 환경에 따라 일반적으로는 수시간 또는 약 24시간 동안(최대 48시간 또는 72시간을 포함함) 이를 배양하거나 조절하는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 이러한 조직 또는 세포는 채취되고 동결된 후에, 생체외 처리를 위해 해동될 수 있다. 살아있는 세포 또는 조직을 사용하여 며칠 이상 지속되는 조직 배양 실험 또는 절차는 일반적으로 "시험관내(*in vitro*)"로 간주되지만, 특정 구현예에서, 이 용어는 생체외와 상호 교환적으로 사용될 수 있다.

[0155] 용어 "생체내(*in vivo*)"는 일반적으로 유기체 내에서 이루어지는 활동, 예컨대 세포의 자기 재생 및 세포의 증식을 지칭한다. 일 구현예에서, 용어 "생체 내 증식"은 세포 모집단이 생체 내에서 수를 증가시키는 능력을 지칭한다.

[0156] 용어 "자극"은 자극 분자(*예를 들어*, TCR/CD3 복합체)가 동족 리간드와 결합하여, TCR/CD3 복합체를 통한 신호 전달을 포함하지만 이에 한정되지 않는 신호 전달 이벤트를 매개함으로써 유도되는 일차 반응을 지칭한다.

[0157] "자극 분자"는 동족 자극 리간드와 특이적으로 결합하는 T 세포 상의 분자를 지칭한다.

[0158] 본원에서 사용되는 바와 같이, "자극 리간드"는, 항원 제시 세포(예: aAPC, 수지상 세포, B-세포 등) 상에 존재할 때, T 세포 상의 동족 결합 파트너(본원에서 "자극 분자"로 지칭됨)와 특이적으로 결합하여, 활성화, 면역 반응의 개시, 증식, 등을 포함하되 이들로 한정되지는 않는 일차 반응을 매개할 수 있는 리간드를 의미한다. 자극 리간드는 CD3 리간드(예: 항-CD3 항체) 및 CD2 리간드(예: 항-CD2 항체), 및 펩티드(예: CMV, HPV, EBV 펩티드)를 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.

[0159] 용어 "활성화"는 T 세포가 검출 가능한 세포 증식을 유도하도록 충분히 자극된 상태를 지칭한다. 특정 구현예에서, 활성화는 유도된 사이토카인 생성 및 검출 가능한 효과기 기능과 연관이 있을 수도 있다. 용어 "활성화된 T 세포"는 특히 증식하는 T 세포를 지칭한다. TCR을 통해서만 생성된 신호는 T 세포의 완전히 활성화시키기에는 불충분하며, 하나 이상의 이차 신호 또는 공자극 신호도 필요하다. 따라서, T 세포 활성화는 TCR/CD3 복합체를 통한 일차 자극 신호 및 하나 이상의 이차 공자극 신호를 포함한다. 공자극은 일차 활성화 신호, 예컨대 CDCD3/TCR 복합체 또는 CD2를 통한 자극을 받은 T 세포의 증식 및/또는 T 세포에 의한 사이토카인 생산에 의해 입증될 수 있다.

[0160] "공자극 신호"는 TCR/CD3 연결과 같은 일차 신호와 조합하여 T 세포 증식, 사이토카인 생산, 및/또는 특정 분자(예: CD28)의 상향 조절 또는 하향 조절을 유도하는 신호를 지칭한다.

[0161] "공자극 리간드"는 공자극 분자에 결합하는 분자를 지칭한다. 공자극 리간드는 가용성이거나 표면에 제공될 수 있다. "공자극 분자"는 공자극 리간드(예: 항-CD28 항체)와 특이적으로 결합하는 T 세포 상의 동족 결합 파트너를 지칭한다.

[0162] 본원에서 사용되는 바와 같이, "자가(autologous)"는 동일한 대상체 유래의 세포를 지칭한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "동종(allogenic)"은 비교 대상 세포와 유전적으로 다른 동일한 종의 세포를 지칭한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "동계(syngeneic)"는 비교 대상 세포와 유전적으로 동일한 상이한 대상체의 세포를 지칭한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "이종(xenogeneic)"은 비교 대상 세포와 다른 종의 세포를 지칭한다. 바람직한 구현예에서, 본원에서 고려되는 방법에 의해 제조된 세포는 자가 세포이다.

[0163] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "개체" 및 "대상체"는 흔히 상호 교환적으로 사용되고, 유전자 요법 벡터, 세포 기반 치료제, 및 본원의 다른 곳에서 개시된 방법으로 치료될 수 있는 암의 증상을 나타내는 임의의 동물을 지칭한다. 적합한 대상체(예를 들어, 환자)는 실험실 동물(예를 들어, 마우스, 랫트, 토끼, 또는 기니피그), 농장 동물, 및 가축 또는 애완동물(예를 들어, 고양이 또는 개)을 포함한다. 비인간 영장류 및 바람직하게는 인간 환자가 포함된다. 전형적인 대상체는 암을 가졌거나, 암으로 진단된 적이 있거나, 암에 걸릴 위험이 있는 인간 환자를 포함한다.

[0164] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "환자"는 유전자 요법 벡터, 세포 기반 치료제, 및 본원의 다른 곳에 개시된 방법으로 치료될 수 있는 특정 적응증으로 진단된 적이 있는 대상체를 지칭한다.

[0165] 본원에서 사용되는 바와 같이, "치료(treatment 또는 treating)"은 질환 또는 병리학적 병태의 증상 또는 병리에 대한 임의의 유익하거나 바람직한 효과를 포함하며, 치료 중인 질환 또는 병태(예: 암)의 하나 이상의 측정 가능한 마커에 있어서 아주 최소한의 감소를 포함할 수 있다. 치료는 임의로 질환 또는 병태의 증상의 감소 또는 완화, 또는 질환 또는 병태의 진행의 지연을 포함할 수 있다. "치료"가 반드시 질환 또는 병태, 또는 이와 관련된 증상의 완전한 근절 또는 치유를 나타내는 것은 아니다.

[0166] 본원에서 사용되는 바와 같이, "예방(prevent 또는 prevented 또는 preventing 등과 같은 유사한 단어)"은 질환 또는 병태(예: 암)의 발병 또는 재발 가능성을 예방, 억제, 또는 감소시키기 위한 접근법을 나타낸다. 이는 또한 질환 또는 병태의 발병 또는 재발을 지연시키거나 질환 또는 병태의 증상의 발생 또는 재발을 지연시키는 것을 지칭한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "예방" 및 유사한 단어는 또한 질환 또는 병태의 발병 또는 재발 전에 질환 또는 병태의 강도, 효과, 증상, 및/또는 부담을 감소시키는 것을 포함한다.

[0167] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "암"은 일반적으로 비정상적인 세포가 조절 없이 분열하고 인접 조직을 침범할 수 있는 질환 또는 병태의 부류에 관한 것이다.

[0168] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "악성"은 종양 세포군이 조절되지 않은 성장(즉, 정상 한계를 초과하는 분

열), 침윤(즉, 인접 조직의 침입 및 파괴), 및 전이(즉, 림프 또는 혈액을 통해 신체의 다른 위치로 확산됨) 중 하나 이상을 나타내는 암을 지칭한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "전이"는 암이 신체의 일 부분으로부터 다른 부분으로 확산되는 것을 지칭한다. 확산된 세포에 의해 형성된 종양을 "전이성 종양" 또는 "전이"라고 한다. 전이성 종양은 원래(원발성) 종양에 있는 것들과 유사한 세포를 함유한다.

[0169] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "양성" 또는 "비악성"은 더 크게 자랄 수 있지만 신체의 다른 부위로 확산되지 않는 종양을 지칭한다. 양성 종양은 자기 제한적이며, 일반적으로 침입하거나 전이되지 않는다.

[0170] "암세포" 또는 "종양 세포"는 암 성장물 또는 조직의 개별 세포를 지칭한다. 종양은 세포의 비정상적인 성장에 의해 형성된 팽윤부 또는 병변을 지칭하며, 이들은 일반적으로 양성, 전악성, 또는 악성일 수 있다. 대부분의 암은 종양을 형성하지만, 백혈병과 같은 일부는 반드시 종양을 형성하지는 않는다. 종양을 형성하는 암의 경우, 암(세포) 및 종양(세포)이라는 용어는 상호 교환적으로 사용된다. 개체에서의 종양의 양은 "종양 부담(tumor burden)"이며, 이는 종양의 수, 부피, 또는 중량으로서 측정될 수 있다.

[0171] "강화(enhance)" 또는 "촉진(promote)" 또는 "증가(increase)" 또는 "증식(expand)"이라는 용어는 비히클 또는 대조군에 의해 야기된 반응과 비교하여 더 큰 생리학적 반응(즉, 하류 효과)을 생성, 유도, 또는 유발하는 본원에서 고려되는 조성물의 능력을 일반적으로 지칭한다. 측정 가능한 생리학적 반응은, 당업계에서의 이해 및 본원의 설명으로부터 명백한 것들 중에서, T 세포 증식, 활성화, 지속, 및/또는 암 세포 사멸 살해 능력의 증가를 포함할 수 있다. "증가된(increased)" 또는 "강화된(enhanced)" 양은 통상적으로 "통계적으로 유의한(statistically significant)" 양이며, 비히클 또는 대조군 조성물에 의해 생성된 반응의 1.1, 1.2, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30배 또는 그 이상으로 (예를 들어, 500배, 1000배로) 증가된 것을 포함할 수 있다(1을 초과하는 모든 정수 값 및 정수 값들 사이의 소수점 값, 예를 들어 1.5, 1.6, 1.7, 1.8 등을 포함함).

[0172] "감소(decrease 또는 lessen 또는 reduce 또는 abate)"라는 용어는 비히클 또는 대조군 분자/조성물에 의해 야기된 반응과 비교하여 더 적은 생리학적 반응(즉, 하류 효과)을 생성, 유도, 또는 유발하는 본원에서 고려되는 조성물의 능력을 일반적으로 지칭한다. "감소된(decreased 또는 reduced)" 양은 통상적으로 "통계적으로 유의한" 양이며, 비히클 또는 대조군 조성물에 의해 생성된 반응(기준 반응)의 1.1, 1.2, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30배 또는 그 이상으로 (예를 들어, 500배, 1000배로) 감소된 것을 포함할 수 있다(1을 초과하는 모든 정수 값 및 정수 값들 사이의 소수점 값, 예를 들어 1.5, 1.6, 1.7, 1.8 등을 포함함).

[0173] "유지(maintain 또는 maintenance)" 또는 "지속(preserve)" 또는 "변화 없음(no change)" 또는 "실질적인 변화 없음(no substantial change)" 또는 "실질적인 감소 없음(no substantial decrease)"은 본원에서 고려된 조성물이, 비히클 또는 대조군 분자/조성물에 의해 야기된 반응과 비교했을 때, 유사한 생리학적 반응(즉, 하류 효과)을 세포에서 생성, 유도, 또는 유발하는 능력을 일반적으로 지칭한다. 비슷한 반응(comparable response)은 기준 반응과 유의하게 다르거나 측정 가능한 차이가 없는 것이다.

[0174] "항원(Ag)"는 동물에게 주입되거나 흡수되는 조성물(예를 들어, 종양 특이적 단백질을 포함하는 조성물)을 포함하여, 동물에서 항체의 생성 또는 T 세포 반응을 자극할 수 있는 화합물, 조성물, 또는 물질을 지칭한다. 항원은, 개시된 항원과 같은 이종 항원에 의해 유도된 것들을 포함하여 특이적 체액성 또는 세포성 면역의 산물과 반응한다. "표적 항원" 또는 "관심 표적 항원"은 본원에서 고려되는 CAR의 결합 도메인이 결합하도록 설계된 항원이다.

[0175] "에피토프" 또는 "항원 결정인자"는 결합제가 결합하는 항원의 영역을 지칭한다.

[0176] "폴리펩티드", "폴리펩티드 단편 펩티드", "펩티드", 및 "단백질"은 반대로 명시되지 않는 한, 통상적인 의미에 따라, 즉 아미노산의 서열로서 상호 교환적으로 사용된다. 폴리펩티드는 특정 길이로 제한되지 않으며, 예를 들어, 이들은 전장 단백질 서열 또는 전장 단백질의 단편을 포함할 수 있고, 폴리펩티드의 번역 후 변형, 예를 들어, 당질화, 아세틸화, 인산화 등을 비롯하여 당업계에 공지된 다른 변형을 포함할 수 있으며, 자연 발생 및 비자연 발생 변형을 포함할 수 있다. 폴리펩티드는 잘 알려진 다양한 재조합 기술 및/또는 합성 기술 중 어느 하나를 사용해 제조될 수 있다. 본원에서 고려되는 폴리펩티드는 구체적으로 본 개시의 CAR, 또는 본원에 개시된 것과 같은 CAR의 하나 이상의 아미노산의 결실, 추가, 및/또는 치환을 갖는 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 용어 "폴리펩티드"는 변이체, 단편, 및 융합 폴리펩티드를 추가로 포함한다.

[0177] 본원에서 사용되는 바와 같이, "단리된 펩티드" 또는 "단리된 폴리펩티드" 등은 세포 환경으로부터 및 세포의 다른 성분과의 결합된 상태로부터 시험관 내에서 단리 및/또는 정제된 펩티드 또는 폴리펩티드 분자, 즉 생체

내 물질과 유의하게 결합되지 않은 펩티드 또는 폴리펩티드 분자를 지칭한다. 유사하게, "단리된 세포"는 생체 내 조직 또는 기관으로부터 수득되었고 세포외 기질이 실질적으로 없는 세포를 지칭한다.

[0178] 폴리펩티드 변이체는 하나 이상의 치환, 결실, 추가, 및/또는 삽입에 있어서 자연 발생 폴리펩티드와 상이할 수 있다. 이러한 변이체는 자연적으로 발생할 수 있거나, 예를 들어 상기 폴리펩티드 서열 중 하나 이상을 변형시킴으로써 합성에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 특정 구현예에서, 하나 이상의 치환, 결실, 추가, 및/또는 삽입을 CAR 폴리펩티드의 결합 도메인, 힌지, TM 도메인, 공자극 신호전달 도메인, 또는 일차 신호전달 도메인에 도입함으로써 CAR의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선하는 것이 바람직할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 폴리펩티드는 적어도 약 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99%의 아미노산 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다.

[0179] 폴리펩티드는 "폴리펩티드 단편"을 포함한다. 폴리펩티드 단편은 생물학적으로 활성인 폴리펩티드의 단편을 지칭하는데, 이는 단량체 또는 다량체일 수 있고, 아미노-말단 결실, 카르복실-말단 결실, 및/또는 자연적 발생 폴리펩티드 또는 재조합적으로 생성된 폴리펩티드의 내부 결실 또는 치환을 갖는다. 특정 구현예에서, 폴리펩티드 단편은 적어도 5 내지 약 500개 아미노산 길이의 아미노산 사슬을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 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 450개 아미노산의 길이이다.

[0180] 융합 폴리펩티드 및 융합 단백질은 적어도 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개 또는 그 이상의 폴리펩티드 분절을 갖는 폴리펩티드를 지칭한다.

[0181] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산"은 전령 RNA(mRNA), RNA, 게놈 RNA(gRNA), 플러스 가닥 RNA(RNA($^{+}$)), 마이너스 가닥 RNA(RNA($^{-}$)), 게놈 DNA(gDNA), 상보적 DNA(cDNA), 또는 재조합 DNA를 지칭한다. 폴리뉴클레오티드는 단일 및 이중 가닥 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 본원에 기술된 기준 서열(예: 서열 목록 참조) 중 어느 하나와 적어도 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 또는 변이체를 포함하며, 일반적으로 이 경우, 변이체는 기준 서열의 적어도 하나의 생물학적 활성을 유지한다. 다양한 예시적인 구현예에서, 본 발명은 발현 벡터, 바이러스 벡터, 및 전달 플라스미드를 포함하는 폴리뉴클레오티드; 및 이를 포함하는 조성물, 및 세포를 부분적으로 고려한다.

[0182] 본원에서 사용되는 바와 같이, "단리된 폴리뉴클레오티드"는 자연 발생 상태에서 측면에 위치하는 서열로부터 정제된 폴리뉴클레오티드, 예를 들어, 일반적으로 단편에 인접한 서열로부터 제거된 DNA 단편을 지칭한다. "단리된 폴리뉴클레오티드"는 또한 상보적 DNA(cDNA), 재조합 DNA, 또는 자연에서 존재하지 않고 사람의 손에 의해 만들어진 기타 폴리뉴클레오티드를 지칭한다.

[0183] 발현 벡터에 존재하는 "조절 요소(control element)" 또는 "조절 서열(regulatory sequence)"은 벡터의 비번역 영역이며 - 복제의 기원, 선택 카세트, 프로모터, 인핸서, 번역 개시 신호(Shine Dalgarno 서열 또는 코작 서열) 인트론, 폴리아데닐화 서열, 5' 및 3' 미번역 영역 - 이들 모두는 숙주 세포 단백질과 상호 작용하여 전사 및 번역을 수행한다. 이러한 요소는 강도 및 특이성에 있어서 다를 수 있다. 사용된 벡터 시스템 및 숙주에 따라, 유비쿼터스 프로모터 및 유도성 프로모터를 포함하는 임의의 수의 적절한 전사 및 번역 요소가 사용될 수 있다.

[0184] "내인성 조절 서열"은 게놈 내의 주어진 유전자와 자연적으로 연결되는 서열이다. "외인성" 조절 서열은 유전자의 전사가 연결된 인핸서/프로모터에 의해 유도되도록 유전자 조작(즉, 분자 생물학적 기술)에 의해 해당 유전자와 나란히 배치되는 서열이다. "이종성" 조절 서열은 유전적으로 조작되는 세포와 상이한 종으로부터 유래된 외인성 서열이다.

[0185] 본원에서 사용되는 용어 "프로모터"는 RNA 중합효소가 결합하는 폴리뉴클레오티드(DNA 또는 RNA)의 인식 부위를 지칭한다. RNA 중합효소는 프로모터에 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드를 개시하고 전사한다. 특정 구현예에서, 포유류 세포에서 작동하는 프로모터는 전사가 개시되는 부위로부터 대략 25 내지 30개 염기만큼 상류에 위치한 AT-풍부 영역 및/또는 전사 시작 영역으로부터 70 내지 80개의 염기만큼 상류에 위치한 CNCAAT 영역(여기서 N은 임의의 뉴클레오티드일 수 있음)서 발견되는 또 다른 서열을 포함한다.

[0186] 용어 "인핸서"는 전사를 강화할 수 있는 서열을 함유하는 DNA의 분절을 지칭하며, 이는 일부 경우에는 다른 조절 서열에 대한 배향과는 독립적으로 작용할 수 있다. 인핸서는 프로모터 및/또는 다른 인핸서 요소와 협력적으

로 또는 부가적으로 작용할 수 있다. 용어 "프로모터/인핸서"는 프로모터 기능과 인핸서 기능 둘 다를 제공할 수 있는 서열을 함유하는 DNA의 분절을 지칭한다.

[0187] 용어 "작동 가능하게 연결된"은 기술된 성분이 의도된 방식으로 기능할 수 있게 하는 관계에 있는 병치 상태(juxtaposition)를 지칭한다. 일 구현예에서, 상기 용어는 핵산 발현 조절 서열(예를 들어, 프로모터 및/또는 인핸서)과 제2 폴리뉴클레오티드 서열(예: 관심 폴리뉴클레오티드) 간의 기능적 연결을 지칭하며, 여기서 발현 조절 서열은 제2 서열에 상응하는 핵산의 전사를 유도한다.

[0188] 용어 "벡터"는 또 다른 핵산 분자를 전달 또는 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭하도록 본원에서 사용된다.

[0189] 추가의 정의는 본 개시 전체에 걸쳐 제시되어 있다.

[0190] **C.T 세포 제조 방법**

[0191] 본원에서 고려되는 방법에 의해 제조된 T 세포는 개선된 입양 면역 요법 조성물을 제공한다. 본 발명은 PI3K 억제제를 사용하는 5일 내지 7일의 T 세포 제조 공정을 고려하며, 상기 제조 공정은 이러한 억제제를 사용하는 기존의 10일의 T 세포 제조 공정과 비교해 더 강력한 T 세포를 생성한다. 임의의 특정 이론에 구속되고자 함이 없이, 본원에 고려된 방법에 의해 제조된 T 세포 조성물, 예를 들어, 항-BCMA CAR T 세포는 더 강력한 T 세포 모집단의 수의 증가(풍부함)를 포함하는 것으로 여겨진다. 특정 구현예에서, 본원에서 고려되는 5일 내지 7일의 제조 방법은 $CD27^+$ 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ T 세포의 풍부한 모집단을 생성한다. 특정 구현예에서, 본원에서 고려되는 5일 내지 7일의 제조 방법은 $CD27^+$ 및 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ T 세포의 풍부한 모집단을 생성한다. 특정 구현예에서, 본원에서 고려되는 5일 내지 7일의 제조 방법은 $CD27^+$ 및 $LEF1^+$ 및 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ T 세포의 풍부한 모집단을 생성한다. 특정 구현예에서, 본원에서 고려되는 5일 내지 7일의 제조 방법은 $CD27^+$ 및 $LEF1^+$ 및 $CCR7^+$ 및 $TCF1^+$ T 세포의 풍부한 모집단을 생성한다. 특정 구현예에서, 본원에서 고려되는 5일 내지 7일의 제조 방법은 $CD27^+CD8^+$ 줄기 세포 기억 T 세포(TSCM) 및 $CD27^+CD4^+$ 중심 기억 T 세포(TCM)의 풍부한 모집단을 생성한다. 특정 구현예에서, 본원에서 고려되는 5일 내지 7일의 제조 방법은 $LEF1^+CD8^+$ 줄기 세포 기억 T 세포(TSCM) 및 $LEF1^+CD4^+$ 중심 기억 T 세포(TCM)의 풍부한 모집단을 생성한다. 특정 구현예에서, 본원에서 고려되는 5일 내지 7일의 제조 방법은 $CD27^+LEF1^+CD8^+$ 줄기 세포 기억 T 세포(TSCM) 및 $CD27^+LEF1^+CD4^+$ 중심 기억 T 세포(TCM)의 풍부한 모집단을 생성한다. 특정 구현예에서, 본원에서 고려되는 5일 내지 7일의 제조 방법은 $CD27^+LEF1^+CCR7^+CD8^+$ 줄기 세포 기억 T 세포(TSCM) 및 $CD27^+LEF1^+CCR7^+CD4^+$ 중심 기억 T 세포(TCM)의 풍부한 모집단을 생성한다. 특정 구현예에서, 본원에서 고려되는 5일 내지 7일의 제조 방법은 $CD27^+LEF1^+TCF1^+CD8^+$ 줄기 세포 기억 T 세포(TSCM) 및 $CD27^+LEF1^+TCF1^+CD4^+$ 중심 기억 T 세포(TCM)의 풍부한 모집단을 생성한다. 특정 구현예에서, 본원에서 고려되는 5일 내지 7일의 제조 방법은 $CD27^+LEF1^+CCR7^+TCF1^+CD8^+$ 줄기 세포 기억 T 세포(TSCM) 및 $CD27^+LEF1^+CCR7^+TCF1^+CD4^+$ 중심 기억 T 세포(TCM)의 풍부한 모집단을 생성한다. 또한, PI3K 억제제를 사용하는 5일 내지 7일의 T 세포 제조 공정은 PI3K 억제제를 사용하는 10일 공정으로 제조된 T 세포와 비교하여 차등 유전자 발현 시그니처를 포함한다. 이러한 풍부한 세포 모집단을 포함하는 입양 세포 요법, 예를 들어, CAR T 세포 요법은 요법의 효능을 저해하지 않고도 임상의가 세포 투여량을 감소시킬 수 있게 하고, 세포 효능 및 지속성을 증가시킬 수 있게 한다.

[0192] 다양한 구현예에서, T 세포를 제조하는 방법은 T 세포의 모집단을 활성화시키고 T 세포의 모집단을 자극하여 증식시키는 단계; CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터로 T 세포를 형질도입하는 단계; 및 형질도입된 T 세포를 배양하여 약 4일 내지 약 6일의 기간 동안 증식시키는 단계를 포함하되, 모든 방법 단계는 PI3K 억제제의 존재 하에 수행된다.

[0193] 본원에서 고려되는 T 세포 제조 방법의 특정 구현예에서 사용하기에 적합한 PI3K 억제제의 예시적인 예는 BKM120(클래스 1 PI3K 억제제, Novartis), XL147(클래스 1 PI3K 억제제, Exelixis), (범-PI3K 억제제, GlaxoSmithKline), 및 PX-866(클래스 1 PI3K 억제제; p110α, p110β, 및 p110γ 이소형, Oncothyreon)을 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다. 선택적 PI3K 억제제의 다른 예시적인 예는 BYL719, GSK2636771, TGX-221, AS25242, CAL-101, ZSTK474, 및 IPI-145를 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다. 범-PI3K 억제제의 추가 예시

적인 예는 BEZ235, LY294002, GSK1059615, TG100713, 및 GDC-0941을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다.

[0194] 본원에서 고려되는 가장 바람직한 구현예에서, 제조 방법은 PI3K 억제제 ZSTK474(CAS 번호 475110-96-4)를 사용한다.

[0195] 다양한 구현예에서, PI3K 억제제는 제조 공정 전반에 걸쳐 적어도 1 nM, 적어도 2 nM, 적어도 5 nM, 적어도 10 nM, 적어도 50 nM, 적어도 100 nM, 적어도 200 nM, 적어도 500 nM, 적어도 1 μM, 적어도 10 μM, 적어도 50 μM, 적어도 100 μM, 또는 적어도 1 M의 농도로 사용된다.

[0196] 바람직한 구현예에서, PI3K 억제제는 제조 공정 전반에 걸쳐 약 1 μM의 농도로 사용된다.

[0197] T 세포는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위의 조직, 복수, 흉막 삼출액, 비장 조직, 및 종양을 포함하지만 이에 한정되지 않는 다수의 공급원으로부터 수득될 수 있다. 특정 구현예에서, T 세포는 당업자에게 공지된 임의의 수의 기술, 예를 들어, FICOLL쳬 분리와 같은 혈침(sedimentation)을 사용하여 대상체로부터 채취한 혈액 단위로부터 수득될 수 있다.

[0198] 특정 구현예에서, PBMC는 본원에서 고려되는 T 세포 제조 방법에서 T 세포의 공급원으로서 사용된다. PBMC는 이종 T 림프구 모집단을 형성하며, 이종 T 림프구 모집단은 $CD4^+$, CD8+, 또는 $CD4^+$와 $CD8^+$일 수 있고, 단핵구, B 세포, NK 세포, 및 NKT 세포와 같은 다른 단핵 세포를 포함할 수 있다.

[0199] 바람직한 구현예에서, T 세포 제조 공정은 성분채집술에 의해 개체의 순환 혈액으로부터 PBMC의 공급원을 수득함으로써 시작된다. 성분채집술 생성물은 일반적으로 림프구를 함유하는데, 이에는 T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포, 기타 유핵 백혈구, 적혈구, 및 혈소판이 포함된다. 일 구현예에서, 성분채집술에 의해 수집된 세포를 세척하여 혈장 분획을 제거하고, 후속 처리를 위해 세포를 적절한 완충액 또는 배지에 위치시킬 수 있다. 세포를 PBS로 세척하거나 칼슘, 마그네슘, 및 전부는 아니더라도 대부분의 이가 양이온이 없는 적절한 다른 용액으로 세척할 수 있다. 당업자가 이해할 수 있듯이, 세척 단계는 당업자에게 알려진 방법에 의해서, 예컨대, 반자동화된 관류식 원심분리기를 사용해 달성될 수 있다. (예를 들어, Cobe 2991 세포 처리기, Baxter CytoMate 등). 세척 후, 세포를 다양한 생체적합성 완충액에 재현탁하거나 완충액이 있거나 없는 다른 식염수 용액에 재현탁할 수 있다. 특정 구현예에서, 성분채집 샘플의 바람직하지 않은 성분은 세포를 직접 재현탁한 배양 배지에서 제거할 수 있다. T 세포 제조 방법은 2016년 10월 25일에 "Improved Methods for Manufacturing Adoptive Cell Therapies"의 명칭으로 출원된 미국 특허 출원 제15/306,729호, 2016년 12월 6일에 "Improved T Cell Compositions"의 명칭으로 출원된 미국 특허 출원 제15/316,792호; 및 2018년 6월 7일에 "Improved T Cell Compositions"의 명칭으로 출원된 미국 특허 출원 제16/060,184호에 개시되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 특정 구현예에서,T 세포를 포함하는 세포의 모집단, 예를 들어 PBMC가 본원에서 고려되는 제조 방법에 사용된다. 다른 구현예에서, 단리되거나 정제된 T 세포의 모집단이 본원에서 고려되는 제조 방법에 사용된다.

[0200] PBMC는, 그 안에 함유된 T 세포 모집단을 활성화하고 자극하여 T 세포 조성물의 충분한 치료 투여량을 달성하도록 처리될 수 있다. 특정 구현예에서, T 세포는 일반적으로, 예를 들어, 미국 특허 제6,352,694호; 제6,534,055호; 제6,905,680호; 제6,692,964호; 제5,858,358호; 제6,887,466호; 제6,905,681호; 제7,144,575호; 제7,067,318호; 제7,172,869호; 제7,232,566호; 제7,175,843호; 제5,883,223호; 제6,905,874호; 제6,797,514호; 및 제6,867,041호에 기술된 것과 같은 방법들을 사용해 활성화되고 증식될 수 있으며, 이들 문헌 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0201] 바람직한 구현예에서, T 세포는 PI3K 억제제, 예를 들어, ZSTK474의 존재 하에 활성화되고 자극된다. 본원에서 고려되는 방법은 단 1회의 활성화 및 자극 라운드가 수행된다는 점에서 기존의 방법과 상이하며, 여기서 당업계의 방법은 일상적으로 2, 3, 4, 또는 5회 또는 더 이상의 활성화와 증식 라운드를 사용한다.

[0202] T 세포 활성화는 T 세포 TCR/CD3 복합체를 통하거나 CD2 표면 단백질의 자극을 통해 일차 자극 신호를 제공함으로써 달성될 수 있다. TCR/CD3 복합체는 T 세포를 적절한 CD3 결합제, 예를 들어, CD3 리간드 또는 항-CD3 단클론 항체와 접촉시킴으로써 자극될 수 있다. CD3 항체의 예시적인 실시예는 OKT3, G19-4, BC3, 및 64.1을 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다. TCR/CD3 복합체를 통하거나 CD2를 통해 제공된 일차 자극 신호 이외에, T 세포 반응의 유도에는 제2 공자극 신호가 요구된다. 특정 구현예에서, CD28 결합제는 공자극 신호를 제공하는 데 사용될 수 있다. CD28 결합제의 예시적인 실시예는 다음을 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다: 천연 CD28 리간드, 예를 들어 CD28에 대한 천연 리간드(예: B7 계열 단백질의 구성원, 예컨대 B7-1(CD80) 및 B7-2 (CD86)); 및 CD28 분자를 가교 결합시킬 수 있는 항-CD28 단클론 항체 또는 이의 단편, 예를 들어, 단클론 항체 9.3, B-

T3, XR-CD28, KOLT-2, 15E8, 248.23.2, 및 EX5.3D10.

[0203] 바람직한 구현예에서, T 세포는 가용성 항-CD3 항체로 활성화되고, 항-CD28 항체로 자극되어 증식한다. 특정 구현예에서, 항-CD3 항체 및 항-CD8 항체는 비드, 예컨대 Dynabead와 같은 상자성 비드에 고정되거나, 테더링되거나, 결합된다.

[0204] 특정 구현예에서, 항-CD3 항체 및 항-CD8 항체는 세포의 표면에 국소화된다. 바람직한 구현예에서, 일차 및 공자극 리간드, 예를 들어, 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체는 PBMC 분획에 존재하는 항원 제시 세포(예: aAPC, 수지상 세포, B 세포 등) 상에 제시된다.

[0205] 특정 구현예에서, T 세포는 약 16시간, 약 17시간, 약 18시간, 약 19시간, 약 20시간, 약 21시간, 약 22시간, 약 23시간, 약 24시간, 약 25시간, 약 26시간, 약 27시간, 약 28시간, 약 29시간, 또는 약 30시간 동안 활성화되고 자극된다. 특정 구현예에서, T 세포는 약 24시간 동안 활성화되고 자극된다.

[0206] 특정 구현예에서, T 세포는 약 16시간 내지 약 30시간, 약 16시간 내지 약 24시간, 약 18시간 내지 약 24시간, 또는 약 20시간 내지 약 24시간 동안 활성화되고 자극된다.

[0207] 바람직한 구현예에서, 활성화 및 자극 단계를 거친 세포는 PI3K 억제제, 예를 들어, ZSTK474의 존재 하에 형질도입된다. 이 단계의 목적은 면역 효과기 세포를 형질도입하는 것이지만, 다른 세포가 존재하고 형질도입될 수 있으며, 예를 들어, PBMC가 출발 물질로서 사용되는 경우, $CD4^+$, $CD8^+$, 또는 $CD4^+$와 $CD8^+$가 형질도입될 뿐만 아니라 단핵구, B 세포, NK 세포, 및 NKT 세포와 같은 다른 단핵 세포도 형질도입된다. 바람직한 구현예에서, 활성화되고 자극된 T 세포는 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터로 형질도입된다. 특정 구현예들에서 고려되는 특정 구현예에서 사용하기에 적합한 바이러스 벡터 시스템의 예시적인 예는 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터, 레트로바이러스 벡터(예: 렌티바이러스 벡터), 단순 포진 바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 및 우두 바이러스 벡터를 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다.

[0208] 바람직한 구현예에서, 세포는 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 렌티바이러스 벡터로 형질도입된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "렌티바이러스"는 복잡한 레트로바이러스로 이루어진 군(또는 속)을 지칭한다. 예시적인 렌티바이러스는 HIV(인간 면역결핍 바이러스; HIV 1형 및 HIV 2형 포함); 비스나-마에디 바이러스(VMV); 카프린 관절염-뇌염 바이러스(CAVAV); 말 감염성 빈혈 바이러스(EIAV); 고양잇과 면역결핍 바이러스(FIV); 소 면역 결핍 바이러스(BIV); 및 유인원 면역결핍 바이러스(SIV)를 포함하나 이에 한정되지는 않는다. 일 구현예에서, HIV-1 기반 벡터 골격(즉, HIV 시스-작용 서열 요소)이 바람직하다.

[0209] 다양한 구현예에서, 본원에서 고려되는 렌티바이러스 벡터는 키메라 5' 장 말단 반복체(LTR), 예를 들어, 키메라 CMV/5' LTR 프로모터, 및 다음의 부속 요소 중 하나 이상, 또는 전부를 포함한다: cPPT/FLAP(Zennou 등의 문헌[2000, Cell, 101:173]), 싸이(ψ의) 패키징 신호(Clever 등의 문헌[1995. J. of Virology, Vol. 69, No. 4; pp. 2101-2109]), 내보내기 요소, 예를 들어, RRE(Cullen 등의 문헌[1991. J. Virol. 65: 1053]; 및 Cullen 등의 문헌[1991. Cell 58: 423]), 폴리 (A) 서열, 임의로 WPRE(Zufferey 등의 문헌[1999, J. Virol., 73:2886]) 또는 HPRE(Huang 등의 문헌[Mol. Cell. Biol., 5:3864]), 절연체 요소, 선택성 표지, 또는 세포 자살 유전자, 및 변형된 자기 불활성화(SIN) 3' LTR. "자가 불활성화(self-inactivation, SIN)" 벡터는, U3 영역으로서 알려진 우측(3') LTR 인핸서-프로모터 영역이 1회의 바이러스 복제 이후의 과도한 바이러스 전사를 방지하기 위해(예를 들어, 결실 또는 치환에 의해) 변형된 복제-결함 벡터, 예를 들어, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터를 지칭한다. 특정 구현예에서, 렌티바이러스 벡터는 수포성 구내염 바이러스 G-단백질(VSV-G) 외피 단백질로 위형화되어 벡터가 광범위한 세포를 감염시킬 수 있게 한다. 특정 구현예에서, 렌티바이러스 벡터는 공지된 방법에 따라 생산된다. 예를 들어, Kutner 등의 문헌[BMC Biotechnol. 2009;9:10. doi: 10.1186/1472-6750-9-10]; Kutner 등의 문헌[Nat. Protoc. 2009;4(4):495-505. doi: 10.1038/nprot.2009.22] 참조.

[0210] 특정 구현예에서, 활성화 및 자극 후, 세포는 약 16시간, 약 17시간, 약 18시간, 약 19시간, 약 20시간, 약 21시간, 약 22시간, 약 23시간, 약 24시간, 약 25시간, 약 26시간, 약 27시간, 약 28시간, 약 29시간, 또는 약 30시간 동안 형질도입된다. 특정 구현예에서, 세포는 약 24시간 동안 형질도입된다.

[0211] 특정 구현예에서, 활성화 및 자극 후, 세포는 약 16시간 내지 약 30시간, 약 16시간 내지 약 24시간, 약 18시간 내지 약 24시간, 또는 약 20시간 내지 약 24시간 동안 형질도입된다.

[0212] 바람직한 구현예에서, 형질도입 후, 면역 효과기 세포(예: T 세포, CAR T 세포, 또는 항-BCMA CAR T 세포)를 촉진하는 조건에서 세포를 배양하고, PI3K 억제제(예: ZSTK474)의 존재 하에 증식 또는 확산시킨다. 예상외로, 본

발명자들은 (형질도입 후) 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6일의 극도로 단축된 증식 또는 확산 기간이 $CD27^+$ 세포, TCM, 및 TSCM이 풍부한 매우 강력한 세포 요법 생성물을 생성한다는 것을 발견하였다.

[0213] 특정 구현예에서, T 세포 증식 또는 확산 배양에 적절한 조건은 적절한 배지(예: 최소 필수 배지(Minimal Essential Media) 또는 RPMI 배지 1640, 또는 X-vivo 15 (Lonza))에서 세포를 배양하는 것, 및 증식 및 생존에 필수적인 하나 이상의 인자, 및 당업자에게 알려진 세포 성장에 적합한 임의의 다른 첨가제를 포함하며, 여기서 증식 및 생존에 필수적인 하나 이상의 인자는 혈청(예: 소 태아 혈청 또는 인간 혈청), 인터류킨-2 (IL-2), 인슐린, IFN-γ, IL-4, IL-7, IL-21, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGFβ, 및 TNF-α를 포함하되 이들로 한정되지는 않는다. 세포 배양 배지의 추가 예시적인 예는 아미노산, 피루브산나트륨, 및 비타민이 첨가된 RPMI 1640, Clicks, AIM-V, DMEM, MEM, a-MEM, F-12, X-Vivo 15, 및 X-Vivo 20, Optimizer를 포함하지만 이들로 한정되지 않으며, 이들 배지는 무혈청 배지이거나 적정량의 혈청(또는 혈장) 또는 정의된 호르몬 세트 및/또는 T 세포의 성장 및 증식에 충분한 양의 사이토카인(들)이 이들 배지에 보충될 수 있다. T 세포 증식을 위한 다른 첨가제의 예시적인 예는 계면활성제, 플라스마네이트, HEPES와 같은 pH 완충액, 및 N-아세틸-시스테인 및 2-메르캅토에탄올과 같은 환원제를 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다.

[0214] 바람직한 구현예에서, T 세포는 증식 또는 확산을 위해 T 세포 성장 배지(TCGM)에서 1, 2, 3, 4, 5 또는 6일 동안 배양되며, TCGM은 10 mM HEPES, 2 mM GlutaMax, 및 5% 인간 AB 혈청이 보충된 X-VIVO 15로 제조하였다. 바람직한 구현예에서, 제조 공정은 하나 이상의 사이토카인, 바람직하게는 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15, 및 더 바람직하게는 IL-2의 존재 하에 수행된다.

[0215] 특정 구현예에서, 세포 증식 또는 확산 단계는 약 1일 내지 약 6일, 약 2일 내지 약 6일, 약 3일 내지 약 6일, 또는 약 4일 내지 약 6일 동안 수행된다. 바람직한 구현예에서, 세포 증식 또는 확산 단계는 약 4일 내지 약 6일 동안 수행된다.

[0216] 특정 구현예에서, 세포 증식 또는 확산 단계는 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 또는 약 6일 동안 수행된다. 바람직한 구현예에서, 세포 증식 또는 확산 단계는 약 4일 동안 수행된다. 특히 바람직한 구현예에서, 세포 증식 또는 확산 단계는 약 6일 동안 수행된다.

[0217] 다양한 구현예에서, T 세포 조성물은 하나 이상의 PI3K 경로 억제제의 존재 하에 제조된다. 억제제는 경로에서 하나 이상의 활성을 표적화하거나 단일 활성을 표적화할 수 있다. 임의의 특정 이론에 구속되고자 함이 없이, 제조 공정의 자극, 활성화, 및/또는 증식 단계 동안 T 세포를 하나 이상의 PI3K 경로 억제제로 치료하거나 이와 접촉시키면 젊은 T 세포를 우선적으로 증가시켜, 우수한 치료 T 세포 조성물이 생성되는 것으로 고려된다.

[0218] 다양한 구현예에서, T 세포를 제조하는 방법은 T 세포의 모집단을 활성화시키고 T 세포의 모집단을 자극하여 증식시키는 단계; CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 렌티바이러스 벡터로 T 세포를 형질도입하는 단계; 및 형질도입된 T 세포를 배양하여 약 4일 내지 약 6일의 기간 동안 증식시키는 단계를 포함하되, 모든 방법 단계는 PI3K 억제제의 존재 하에 수행되고, 증식된 CAR T 세포는, 형질도입된 세포를 PI3K 억제제 중에서 약 9일의 기간 동안 배양하는 제조 공정과 비교해, TCM 및 TSCM 세포가 풍부하다.

[0219] 특정 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포를 제조하는 방법으로서, 약 4일 내지 약 6일의 증식 또는 확산 배양 단계를 포함하는 방법은, 형질도입된 세포를 PI3K 억제제 중에서 약 9일의 기간 동안 배양하는 제조 공정과 비교했을 때, TCM 표현형을 갖는 $CD4^+$ T 세포를 약 1.5배, 약 2.0배, 약 2.5배, 약 3배, 약 3.5배, 약 4배, 약 4.5배, 또는 약 5배 풍부하게 하고, TSCM 표현형을 갖는 $CD8^+$ T 세포를 약 1.5배, 약 2.0배, 약 2.5배, 약 3배, 약 3.5배, 약 4배, 약 4.5배, 또는 약 5배 풍부하게 한다.

[0220] 다양한 구현예에서, T 세포를 제조하는 방법은 T 세포의 모집단을 활성화시키고 T 세포의 모집단을 자극하여 증식시키는 단계; CAR(예: 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열(예: 서열번호 2)을 포함하는 항-BCMA CAR)을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 렌티바이러스 벡터로 T 세포를 형질도입하는 단계; 및 형질도입된 T 세포를 배양하여 약 4일 내지 약 6일의 기간 동안 증식시키는 단계를 포함하되, 모든 방법 단계는 PI3K 억제제의 존재 하에 수행되고, 증식된 CAR T 세포는, 형질도입된 세포를 PI3K 억제제 중에서 약 9일의 기간 동안 배양하는 제조 공정과 비교해, $CD27^+$ 세포가 풍부하다.

[0221] 특정 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포를 제조하는 방법으로서, 약 4일 내지 약 6일의 증식 또는 확산 배양하는 단계를 포함하는 방법은, 형질도입된 세포를 PI3K 억제제 중에서 약 9일의 기간 동안 배양하는 제조 공정과 비

교해, $CD27^+$ T 세포를 약 1.5배, 약 2.0배, 약 2.5배, 약 3배, 약 3.5배, 약 4배, 약 4.5배, 또는 약 5배 풍부하게 한다.

[0222] 특정 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포를 제조하는 방법으로서, 약 4일 내지 약 6일의 증식 또는 확산 배양하는 단계를 포함하는 방법은, 형질도입된 세포를 PI3K 억제제 중에서 약 9일의 기간 동안 배양하는 제조 공정과 비교해, 하나 이상의 CD27, CD25, CD127, TCF1, LEF1, CD28, 및/또는 CCR7 발현 T 세포를 약 1.5배, 약 2.0배, 약 2.5배, 약 3배, 약 3.5배, 약 4배, 약 4.5배, 또는 약 5배 풍부하게 하거나, 상기 세포의 수를 약 1.5배, 약 2.0배, 약 2.5배, 약 3배, 약 3.5배, 약 4배, 약 4.5배, 또는 약 5배 증가시킨다. 특정 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포를 제조하는 방법으로서, 약 4일 내지 약 6일의 증식 또는 확산 배양하는 단계를 포함하는 방법은, 형질도입된 세포를 PI3K 억제제 중에서 약 9일의 기간 동안 배양하는 제조 공정과 비교해, 하나 이상의 CD27, CD25, CD127, TCF1, 및/또는 LEF1 및/또는 CCR7 발현 T 세포를 약 1.5배, 약 2.0배, 약 2.5배, 약 3배, 약 3.5배, 약 4배, 약 4.5배, 또는 약 5배 풍부하게 하거나, 상기 세포의 수를 약 1.5배, 약 2.0배, 약 2.5배, 약 3배, 약 3.5배, 약 4배, 약 4.5배, 또는 약 5배 증가시킨다. 특정 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포를 제조하는 방법으로서, 약 4일 내지 약 6일의 증식 또는 확산 배양하는 단계를 포함하는 방법은, 형질도입된 세포를 PI3K 억제제 중에서 약 9일의 기간 동안 배양하는 제조 공정과 비교해, 그랜자임 A, 그랜자임 B, 퍼포린, T-bet, 및 EOMES 중 하나 이상을 발현하는 T 세포의 수를 약 1.5배, 약 2.0배, 약 2.5배, 약 3배, 약 3.5배, 약 4배, 약 4.5배, 또는 약 5배 감소시킨다.

[0223] 다양한 구현예에서, T 세포를 제조하는 방법은 T 세포의 모집단을 활성화시키고 T 세포의 모집단을 자극하여 증식시키는 단계; 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열(예: 서열번호 2)을 포함하는 항-BCMA CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 렌티바이러스 벡터로 T 세포를 형질도입하는 단계; 및 형질도입된 T 세포를 배양하여 약 4일 내지 약 6일의 기간 동안 증식시키는 단계를 포함하되, 모든 방법 단계는 PI3K 억제제의 존재 하에 수행되고, 증식된 CAR T 세포는, 형질도입된 세포를 PI3K 억제제 중에서 약 9일의 기간 동안 배양하는 제조 공정과 비교해, $CD27^+CD4^+$ TCM 및 $CD27^+CD8^+$ TSCM 세포가 풍부하다.

[0224] 특정 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포를 제조하는 방법으로서, 약 4일 내지 약 6일의 증식 또는 확산 배양 단계를 포함하는 방법은, 형질도입된 세포를 PI3K 억제제 중에서 약 9일의 기간 동안 배양하는 제조 공정과 비교했을 때, TCM 표현형을 갖는 $CD27^+CD4^+$ T 세포를 약 1.5배, 약 2.0배, 약 2.5배, 약 3배, 약 3.5배, 약 4배, 약 4.5배, 또는 약 5배 풍부하게 하고, TSCM 표현형을 갖는 $CD27^+CD8^+$ T 세포를 약 1.5배, 약 2.0배, 약 2.5배, 약 3배, 약 3.5배, 약 4배, 약 4.5배, 또는 약 5배 풍부하게 한다.

[0225] 다양한 구현예에서, T 세포를 제조하는 방법은 T 세포의 모집단을 활성화시키고 T 세포의 모집단을 자극하여 증식시키는 단계; 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열(예: 서열번호 2)을 포함하는 항-BCMA CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 렌티바이러스 벡터로 T 세포를 형질도입하는 단계; 및 형질도입된 T 세포를 배양하여 약 4일 내지 약 6일의 기간 동안 증식시키는 단계를 포함하되, 모든 방법 단계는 PI3K 억제제의 존재 하에 수행되고, 증식된 CAR T 세포는, 형질도입된 세포를 PI3K 억제제 중에서 약 9일의 기간 동안 배양하는 제조 공정과 비교해, $CD27^+$ 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ $CD4^+$ TCM 및 $CD27^+$ 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ $CD8^+$ TSCM 세포가 풍부하다.

[0226] 특정 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포를 제조하는 방법으로서, 약 4일 내지 약 6일의 증식 또는 확산 배양 단계를 포함하는 방법은, 형질도입된 세포를 PI3K 억제제 중에서 약 9일의 기간 동안 배양하는 제조 공정과 비교했을 때, TCM 표현형을 갖는 $CD27^+$ 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ $CD4^+$ T 세포를 약 1.5배, 약 2.0배, 약 2.5배, 약 3배, 약 3.5배, 약 4배, 약 4.5배, 또는 약 5배 풍부하게 하고, TSCM 표현형을 갖는 $CD27^+$ 및/또는 $LEF1^+$ 및/또는 $CCR7^+$ 및/또는 $TCF1^+$ $CD8^+$ T 세포를 약 1.5배, 약 2.0배, 약 2.5배, 약 3배, 약 3.5배, 약 4배, 약 4.5배, 또는 약 5배 풍부하게 한다.

[0227] 다양한 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포를 제조하는 방법은 T 세포의 모집단을 활성화하고 T 세포의 모집단을 자극하여 증식시키는 단계; 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열(예: 서열번호 2)을 포함하는 항-BCMA CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 렌티바이러스 벡터로 T 세포를 형질도입하는 단계; 및 형질도입된 T 세포를 배양하여 약 4일 내지 약 6일의 기간 동안 증식시키는 단계를 포함하되; 상기 방법 단계의 전부는 PI3K 억제제의 존재 하에 수행되고, 증식된 T 세포의 유전자 발현 시그니처는, 핵 수용체 서브패밀리 4 그룹 A 구성원

2(NR4A2), CD229 (LY9), Lin-7 동족체 A(LIN7A), 무익형 MMTV 통합 부위 패밀리 멤버 5B(WNT5B), B 세포 CLL/림프종 6(BCL6), 조기 성장 반응 1(EGR1), 조기 성장 반응 2(EGR2), 활성화 전사 인자 3(ATF3), C-C 모티프 케모카인 1(CCL1), 인터류킨 1A(IL-1A), 및 C-C 모티프 케모카인 5(CCL5) 중 하나 이상 또는 전부의 풍부하게 하거나 증가시키고; NAD(P)H 퀴논 탈수소효소 1(NQO1), 사이클린 A1(CCNA1), 인터류킨 17F(IL17F), 상피 막 단백질 1(EMP1), 소핵 RNA 숙주 유전자 19(SNHG19), 프롤린 풍부 22 (PRR 22), 수용체 2를 함유하는 면역글로불린 유사 도메인(ILDR2), ATPase 패밀리, 3을 함유하는 AAA 도메인(ATAD3), 네이키드 큐티클 동족체 2(NKD2), 및 WD 반복 도메인 62(WDR62) 중 하나 이상 또는 전부의 발현을 감소시킨다.

[0228] 다양한 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포를 제조하는 방법은 T 세포의 모집단을 활성화시키고 T 세포의 모집단을 자극하여 증식시키는 단계; 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열(예: 서열번호 2)을 포함하는 항-BCMA CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 렌티바이러스 벡터로 T 세포를 형질도입하는 단계; 및 형질도입된 T 세포를 배양하여 약 4일 내지 약 6일의 기간 동안 증식시키는 단계를 포함하되, 상기 방법 단계의 전부는 PI3K 억제제의 존재 하에 수행되고, 증식된 T 세포의 유전자 발현 시그니처는, CCL1, NR4A2, ATF3, CCL5, 및 WNT5B의 발현을 풍부하게 하거나 증가시키고; NKD2 및 NQO1의 발현을 감소시킨다.

[0229] "유전자 발현"은, PI3K 억제제의 존재 또는 부재 하에 제조되었거나 PI3K 억제제의 존재 하에 상이한 기간 동안 제조된 생물학적 샘플인 T 세포, 예를 들어 항-BCMA CAR T 세포의 모집단에서 유전자의 상대 발현 수준 및/또는 발현 패턴을 지칭한다. 유전자 발현은 cDNA, RNA, mRNA, 또는 이들의 조합의 수준으로 측정할 수 있다. 유전자 발현을 측정하는 방법은 정량적 실시간 PCR, 고밀도 올리고뉴클레오티드 어레이, 나노스트링 전사체 프로파일링, 또는 RNA 시퀀싱(RNA-Seq)을 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다.

[0230] 특정 구현예에서, 본원에서 고려되는 PI3K 억제제를 사용하여 7일의 제조 공정을 사용하여 제조된 CAR T 세포, 예를 들어, 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는 T 세포는, 본원에서 고려되는 10일의 제조 공정을 사용해 제조된 T 세포와 비교해, (i) NR4A2, LY9, LIN7A, WNT5B, BCL6, EGR1, EGR2, ATF3, CCL1, IL-1A, 및 CCL5 또는 (ii) CCL1, NR4A2, ATF3, CCL5, 및 WNT5B의 발현이 적어도 1.5배 또는 적어도 2배 증가하는 것을 특징으로 한다. PI3K 억제제를 사용하여 7일의 공정을 사용하여 제조된 T 세포는 추가로 고유한 유전자 발현 시그너처를 특징으로 하며, 여기서 NR4A2, LY9, LIN7A, WNT5B, BCL6, EGR1, EGR2, ATF3, CCL1, IL-1A, 및 CCL5로 이루어진 군으로부터 선택된 시그너처 유전자 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 전체 11개의 발현은, PI3K 억제제를 사용하여 10일의 공정을 사용하여 제조된 T 세포와 비교하여, 적어도 1.5배 또는 적어도 2배 증가된다.

[0231] 특정 구현예에서, 본원에서 고려되는 PI3K 억제제를 사용하여 7일의 제조 공정을 사용하여 제조된 CAR T 세포, 예를 들어, 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는 T 세포는, 본원에서 고려되는 10일의 제조 공정을 사용해 제조된 T 세포와 비교해, (i) NQO1, CCNA1, IL17F, EMP1, SNHG19, PRR 22, ILDR2, ATAD3, NKD2, 및 WDR62 또는 (ii) NKD2 및 NQO1의 발현이 적어도 1.5배 또는 적어도 2배 감소하는 것을 특징으로 한다. PI3K 억제제를 사용하여 7일의 공정을 사용하여 제조된 T 세포는 추가로 고유한 유전자 발현 시그너처를 특징으로 하며, 여기서 NQO1, CCNA1, IL17F, EMP1, SNHG19, PRR 22, ILDR2, ATAD3, NKD2, 및 WDR62로 이루어진 군으로부터 선택된 시그너처 유전자 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개, 또는 전체 10개의 발현은, PI3K 억제제를 사용하여 10일의 공정을 사용하여 제조된 T 세포와 비교하여, 적어도 1.5배 또는 적어도 2배 감소된다.

[0232] 특정 구현예에서, 본원에서 고려되는 PI3K 억제제를 사용하여 7일의 제조 공정을 사용하여 제조된 CAR T 세포, 예를 들어, 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는 T 세포는, 본원에서 고려되는 10일의 제조 공정을 사용해 제조된 T 세포와 비교해, (i) NR4A2, LY9, LIN7A, WNT5B, BCL6, EGR1, EGR2, ATF3, CCL1, IL-1A, 및 CCL5 또는 (ii) CCL1, NR4A2, ATF3, CCL5, 및 WNT5B의 발현이 적어도 1.5배 또는 적어도 2배 증가하고; (i) NQO1, CCNA1, IL17F, EMP1, SNHG19, PRR 22, ILDR2, ATAD3, NKD2, 및 WDR62 또는 (ii) NKD2 및 NQO1의 발현이 적어도 1.5배 또는 적어도 2배 감소하는 것을 특징으로 한다. PI3K 억제제를 사용하여 7일의 공정을 사용하여 제조된 T 세포는 추가로 고유한 유전자 발현 시그너처를 특징으로 하며, 여기서 NR4A2, LY9, LIN7A, WNT5B, BCL6, EGR1, EGR2, ATF3, CCL1, IL-1A, 및 CCL5로 이루어진 군으로부터 선택된 시그너처 유전자 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 전체 11개의 발현은 PI3K 억제제를 사용하여 10일의 공정을 사용해 제조된 T 세포와 비교해 적어도 1.5배 또는 적어도 2배 증가하고; NQO1, CCNA1, IL17F, EMP1, SNHG19, PRR 22, ILDR2, ATAD3, NKD2, 및 WDR62로 이루어진 군으로부터 선택된 시그너처 유전자 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 전체 10개의 발현은 PI3K 억제제를 사용하여 10일의 공정을 사용해 제조된 T 세포와 비교해 적어도 1.5배 또는 적어도 2배 감소한다.

[0233] 다양한 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포를 제조하는 방법은 T 세포의 모집단을 활성화시키고 T 세포의 모집단을

자극하여 증식시키는 단계; 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열(예: 서열번호 2)을 포함하는 항-BCMA CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 렌티바이러스 벡터로 T 세포를 형질도입하는 단계; 및 형질도입된 T 세포를 배양하여 약 4일 내지 약 6일의 기간 동안 증식시키는 단계를 포함하되, 상기 방법 단계의 전부는 PI3K 억제제의 존재 하에 수행되고, 증식된 T 세포는 TCM 및 TSCM 세포가 풍부하고, (i) NR4A2, LY9, LIN7A, WNT5B, BCL6, EGR1, EGR2, ATF3, CCL1, IL-1A, 및 CCL5 또는 (ii) CCL1, NR4A2, ATF3, CCL5, 및 WNT5B 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 전체의 유전자 발현은 약 9일의 기간 동안 배양하여 증식시킨 T 세포와 비교해, 약 4일 내지 약 6일의 기간 동안 배양하여 증식시킨 T 세포에서 적어도 1.5배 더 크다.

[0234] 다양한 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포를 제조하는 방법은 T 세포의 모집단을 활성화시키고 T 세포의 모집단을 자극하여 증식시키는 단계; 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열(예: 서열번호 2)을 포함하는 항-BCMA CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 렌티바이러스 벡터로 T 세포를 형질도입하는 단계; 및 형질도입된 T 세포를 배양하여 약 4일 내지 약 6일의 기간 동안 증식시키는 단계를 포함하되, 상기 방법 단계의 전부는 PI3K 억제제의 존재 하에 수행되고, 증식된 T 세포는 TCM, TSCM 세포가 풍부하고, (i) NQO1, CCNA1, IL17F, EMP1, SNHG19, PRR 22, ILDR2, ATAD3, NKD2, 및 WDR62 또는 (ii) NKD2 및 NQO1 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개 또는 전체의 유전자 발현은 약 9일의 기간 동안 배양하여 증식시킨 T 세포와 비교해, 약 4일 내지 약 6일의 기간 동안 배양하여 증식시킨 T 세포에서 적어도 1.5배 더 적다.

[0235] 다양한 구현예에서, 항-BCMA CAR T 세포를 제조하는 방법은 T 세포의 모집단을 활성화시키고 T 세포의 모집단을 자극하여 증식시키는 단계; 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열(예: 서열번호 2)을 포함하는 항-BCMA CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 렌티바이러스 벡터로 T 세포를 형질도입하는 단계; 및 형질도입된 T 세포를 배양하여 약 4일 내지 약 6일의 기간 동안 증식시키는 단계를 포함하되, 상기 방법 단계의 전부는 PI3K 억제제의 존재 하에 수행되고, 증식된 T 세포는 TCM, TSCM 세포가 풍부하고, (i) NR4A2, LY9, LIN7A, WNT5B, BCL6, EGR1, EGR2, ATF3, CCL1, IL-1A, 및 CCL5 또는 (ii) CCL1, NR4A2, ATF3, CCL5, 및 WNT5B 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 전체의 유전자 발현은 약 9일의 기간 동안 배양하여 증식시킨 T 세포와 비교해, 약 4일 내지 약 6일의 기간 동안 배양하여 증식시킨 T 세포에서 적어도 1.5배 더 크고; (i) NQO1, CCNA1, IL17F, EMP1, SNHG19, PRR 22, ILDR2, ATAD3, NKD2, 및 WDR62 또는 (ii) NKD2 및 NQO1 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개 또는 전체의 유전자 발현은 약 9일의 기간 동안 배양하여 증식시킨 T 세포와 비교해, 약 4일 내지 약 6일의 기간 동안 배양하여 증식시킨 T 세포에서 적어도 1.5배 더 적다.

[0236] 본원에서 고려되는 제조 방법은 제조 공정의 개시 전에 PBMC를 동결보존하는 단계 및/또는 제조된 T 세포 조성물의 동결보존하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 입양 세포 요법의 동결보존은 상기 요법을 인간 대상체에서 사용하기 위해 치료제를 보관, 시험, 운송, 및 방출하는 것을 가능하게 한다. T 세포는 해동 시 세포가 생존가능하도록 동결보존된다. 필요한 경우, 이러한 세포를 더 많이 만들기 위해 동결보존된 세포를 해동하여, 성장시키고, 증식시킬 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "동결보존"은 세포를 영하의 온도, 예컨대 (일반적으로) 77 K 또는 -196℃?(액체 질소의 비등점)로 냉각하여 보존하는 것을 지칭한다. 동결방지제가 종종 영하의 온도에서 사용되어 보존 중인 세포가 저온에서 동결되거나 실온으로 가온됨으로 인해 손상되는 것을 방지한다. 동결방지제 및 최적 냉각 속도는 세포 손상으로부터 보호할 수 있다. 사용될 수 있는 동결방지제는 디메틸 설폭시드(DMSO) (Lovelock 및 Bishop의 문헌[*Nature*, 1959; 183: 1394-1395]; Ashwood-Smith의 문헌[*Nature*, 1961; 190: 1204-1205]), 글리세롤, 폴리비닐피롤리딘(Rinfret의 문헌[*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1960; 85: 576]), 폴리에틸렌 글리콜(Sloviter 및 Ravdin의 문헌[*Nature*, 1962; 196: 48]), 및 CryoStor CS10, CryoStor CS5, 및 CryoStor CS2를 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다. 일 구현예에서, 조성물은 PlasmaLyte A와 CryoStor CS10을 50:50의 비율로 포함하는 용액 중에서 제형화된다. 바람직한 냉각 속도는 분당 1℃ 내지 3℃이다. 적어도 2시간 후, T 세포는 -80℃의 온도에 도달하고, 예컨대 장기 극저온 저장 용기에서 영구 보관하기 위해 액체 질소(-196℃) 내에 직접 넣을 수 있다.

[0237] **D.키메라 항원 수용체**

[0238] 본원에서 고려되는 방법은 표적 항원을 발현하는 암세포를 향해 면역 효과기 세포의 세포독성을 재유도하는 보다 강력한 입양 세포 요법을 제조하는 데 사용된다. 바람직한 구현예에서, 본원에서 고려되는 제조 방법은 활성화되고 자극된 T 세포를 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 바이러스 벡터로 형질도입하여 면역 효과기 세포를 재유도하는 단계를 포함한다.

[0239] CAR은 표적 항원(예: 종양 항원)에 대한 항체 기반 특이성을 T 세포 수용체-활성화 세포내 도메인과 조합하여 특이적 항종양 세포 면역 활성을 나타내는 키메라 단백질을 생성하는 분자이다. 본원에서 고려되는 CAR은 신호

펩티드, 특정 표적 항원에 결합하는 세포외 도메인(결합 도메인 또는 항원-특이적 결합 도메인으로도 지칭됨), 막관통 도메인, 및 하나 이상의 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다.

[0240] 특정 구현예에서, CAR은 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 세포외 결합 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서, 세포외 결합 도메인은 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 하나의 바람직한 구현예에서, 결합 도메인은 scFv를 포함한다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 결합 도메인은 하나 이상의 카멜리드 항체 또는 단일 도메인 항체(sdAb)를 포함한다.

[0241] 특정 구현예에서, CAR은 알파 엽산 수용체(FRα), $\alpha_v\beta_6$ 인테그린, B 세포 성숙 항원(BCMA), B7-H3 (CD276), B7-H6, 탄산 탈수 효소 IX(CAIX), CD16, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD37, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD70, CD79a, CD79b, CD123, CD133, CD138, CD171, 암배아 항원(CEA), C형 렉틴-유사 분자-1(CLL-1), CD2 서브세트 1(CS-1), 콘드로이틴 황산염 프로테오글리칸 4(CSPG4), 피부 T 세포 림프종 연관 항원 1(CTAGE1), 표피 성장 인자 수용체(EGFR), 표피 성장 인자 수용체 변이체 III(EGFRvIII), 상피 당단백질 2(EGP2), 상피 당단백질 40(EGP40), 상피 세포 부착 분자(EPCAM), 에프린 A형 수용체 2(EPHA2), 섬유아세포 활성화 단백질(FAP), Fc 수용체 유사 5(FCRL5), 태아 아세틸콜린에스테라아제 수용체(AchR), 갱글리오시드 G2(GD2), 갱글리오시드 G3(GD3), 글리피칸-3(GPC3), ErbB2(HER2)를 포함하는 EGFR 계열, IL-10Rα, IL-13Rα2, 카파, 암/고환 항원 2(LAGE-1A), 람다, 루이스-Y(LeY), L1 세포 접착 분자(L1-CAM), 흑색종 항원 유전자(MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGEA10, T 세포에 의해 인식되는 흑색종 항원 1(MelanA 또는 MART1), 메소텔린(MSLN), MUC1, MUC16, MHC 클래스 I 사슬 관련 단백질 A(MICA), MHC 클래스 I 사슬 관련 단백질 B(MICB), 신경 세포 부착 분자(NCAM), 암/고환 항원 1(NY-ESO-1), 폴리시알산; 태반-특이적 1(PLAC1), 흑색종에서 우선적으로 발현되는 항원(PRAME), 전립선 줄기 세포 항원(PSCA), 전립선 특이적 막 항원(PSMA), 수용체 티로신 키나아제-유사 희귀 수용체 1(ROR1), 윤활막 육종, X 중단점 2(SSX2), 서바이빈, 종양 관련 당단백질 72(TAG72), 종양 내피 마커 1(TEM1/CD248), 종양 내피 마커 7 관련(TEM7R), 영양아세포 당단백질(TPBG), UL16-결합 단백질(ULBP) 1, ULBP2, ULBP3, ULBP4, ULBP5, ULBP6, 혈관 내피 성장 인자 수용체 2(VEGFR2), 및 빌름스 종양 1(WT-1)으로 이루어진 군으로부터 선택된 항원에 결합하는 세포외 도메인을 포함한다.

[0242] 바람직한 구현예에서, CAR은 B 세포 성숙 항원에 결합하는 세포외 도메인을 포함한다.

[0243] 특정 구현예에서, CAR은 힌지 도메인을 포함한다. 예시적인 힌지 도메인은: CD8α와 같은 1형 막 단백질의 세포외 영역에서 유래된 힌지 영역; 및 이들 분자 유래의 야생형 힌지 영역이거나 변경될 수 있는 CD4를 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다. 바람직한 구현예에서, CAR은 CD8α 힌지 영역을 포함한다.

[0244] CAR의 막관통(TM) 도메인은, 세포외 결합 부분과 세포내 신호전달 도메인을 융합시키고, CAR을 면역 효과기 세포의 형질막에 고정시킨다. TM 도메인은 천연, 합성, 반합성, 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다. 예시적인 TM 도메인은 T 세포 수용체의 알파, 베타, 감마, 또는 델타 사슬, CD3ε, CD3ζ, CD4, CD5, CD8α, CD9, CD 16, CD22, CD27, CD28, CD33, CD37, CD45, CD64, CD71, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD152, CD 154, AMN, 및 PDCD1로부터 유래될 수 있다(즉, 적어도 이들의 막관통 영역(들)을 포함할 수 있다).

[0245] 바람직한 구현예에서, CAR은 CD8α로부터 유래된 TM 도메인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 본원에서 고려되는 CAR은 CD8α로부터 유래된 TM 도메인, 및 TM 도메인과 CAR의 세포내 신호전달 도메인을 연결하는 바람직하게는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 아미노산 길이의 올리고-링커 또는 폴리펩티드 링커를 포함한다. 글리신-세린 링커는 특히 적합한 링커를 제공한다.

[0246] 바람직한 구현예에서, CAR은 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인 및 일차 신호 전달 도메인을 포함하는 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다.

[0247] 자극 방식으로 작용하는 일차 신호 전달 도메인은 면역수용체 티로신 기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로 알려진 신호 전달 모티프를 포함할 수 있다.

[0248] 특정 구현예에서 고려되는 CAR에 사용하기에 적합한 일차 신호 전달 도메인을 함유하는 ITAM의 예시적인 실시예는 FcRγ, FcRβ, CD3γ, CD3δ, CD3ε, CD3ζ, CD22, CD79a, CD79b, 및 CD66d로부터 유래된 것들을 포함한다. 특정 바람직한 구현예에서, CAR은 CD3ζ 일차 신호 전달 도메인 및 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인을 포함한다. 세포내 일차 신호 전달 도메인 및 공자극 신호 전달 도메인은 임의의 순서로 막관통 도메인의 카르복실 말단에 직렬 연결될 수 있다.

[0249] 특정 구현예에서, CAR은 CAR 수용체를 발현하는 T 세포의 효능 및 증식을 강화하기 위한 하나 이상의 공자극 신

호 전달 도메인을 포함한다.

[0250] 특정 구현예에서 고려되는 CAR에 사용하기에 적합한 이러한 공자극 분자의 예시적인 실시예는 TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10, CARD11, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD94, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, SLP76, TRAT1, TNFR2, 및 ZAP70을 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다. 일 구현예에서, CAR은 CD28, CD137, 및 CD134 로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인, 및 CD3ζ 일차 신호 전달 도메인을 포함한다.

[0251] 바람직한 구현예에서, CAR은 CD8α 신호 펩티드; BCMA에 결합하는 세포외 도메인; CD8α 힌지 및 막관통 도메인; CD137 공자극 도메인, 및 CD137; 및 CD3ζ 일차 신호전달 도메인을 포함한다. 더 바람직한 구현예에서, 항-BCMA CAR은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 더욱 더 바람직한 구현예에서, 항-BCMA CAR은 서열번호 2에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0252] **E.조성물 및 제형**

[0253] 본원에서 고려되는 조성물은 CAR T 세포의 치료적 유효량을 포함한다. 바람직한 구현예에서, 본원에 고려되는 조성물은 항-BCMA CAR T 세포의 치료적 유효량을 포함한다. 조성물은 약학적 조성물을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. "약학적 조성물"은 세포 또는 동물에게 단독으로 투여하거나 하나 이상의 다른 치료법과 조합하여 투여하도록 약학적으로 허용 가능한 또는 생리학적으로 허용 가능한 용액으로 제형화된 조성물을 지칭한다. 또한, 원하는 경우, 조성물은, 예를 들어, 사이토카인, 성장 인자, 호르몬, 저분자, 화학요법제, 프로드러그, 약물, 항체, 또는 다른 다양한 약학적 활성제와 같은 다른 제제와 병용 투여될 수도 있음을 이해할 것이다. 추가 제제가 의도된 요법을 전달하는 조성물의 능력에 악영향을 미치지 않는다면, 조성물에 포함될 수도 있는 다른 성분에는 사실상 제한이 없다.

[0254] 바람직한 구현예에서, 본원에서 고려되는 조성물은, cGMP에 따라 제조되고, 세포 표면에서 CD27, LEF1, 및 TCF1 중 하나 이상을 발현하는 T 세포가 풍부한 CAR T 세포의 모집단을 포함한다. 바람직한 구현예에서, PI3K 억제제의 존재 하에 5일 내지 7일의 공정을 사용하여 제조된 CAR T 세포의 풍부한 모집단은 적어도 10%의 $CD27^+$, 적어도 15%의 $CD27^+$, 적어도 20%의 $CD27^+$, 적어도 25%의 $CD27^+$, 적어도 30%의 $CD27^+$, 적어도 35%의 $CD27^+$, 적어도 40%의 $CD27^+$, 적어도 45%의 $CD27^+$, 또는 적어도 50%의 $CD27^+$ T 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, PI3K 억제제의 존재 하에 5일 내지 7일의 공정을 사용하여 제조된 CAR T 세포의 풍부한 모집단은 적어도 10%의 $CD27^+$, $LEF1^+$, 및/또는 $TCF1^+$; 적어도 15%의 $CD27^+$, $LEF1^+$, 및/또는 $TCF1^+$; 적어도 20%의 $CD27^+$, $LEF1^+$, 및/또는 $TCF1^+$; 적어도 25%의 $CD27^+$, $LEF1^+$, 및/또는 $TCF1^+$, 적어도 30%의 $CD27^+$, $LEF1^+$, 및/또는 $TCF1^+$; 적어도 35%의 $CD27^+$, $LEF1^+$, 및/또는 $TCF1^+$; 적어도 40%의 $CD27^+$, $LEF1^+$, 및/또는 $TCF1^+$; 적어도 45%의 $CD27^+$, $LEF1^+$, 및/또는 $TCF1^+$; 또는 적어도 50%의 $CD27^+$, $LEF1^+$, 및/또는 $TCF1^+$ CAR T 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, PI3K 억제제의 존재 하에 5일 내지 7일의 공정을 사용하여 제조된 CAR T 세포의 풍부한 모집단은 적어도 10%의 $CD27^+LEF1^+TCF1^+$, 적어도 15%의 $CD27^+LEF1^+TCF1^+$, 적어도 20%의 $CD27^+LEF1^+TCF1^+$, 적어도 25%의 $CD27^+LEF1^+TCF1^+$, 적어도 30%의 $CD27^+LEF1^+TCF1^+$, 적어도 35%의 $CD27^+LEF1^+TCF1^+$, 적어도 40%의 $CD27^+LEF1^+TCF1^+$, 적어도 45%의 $CD27^+LEF1^+TCF1^+$, 또는 적어도 50%의 $CD27^+LEF1^+TCF1^+$ CAR T 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, T 세포는 또한 $CCR7^+$이다.

[0255] "약학적으로 허용 가능한"이라는 구절은, 건전한 의학적 판단의 범위 내에서, 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응, 또는 다른 문제나 합병증 없이 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하고, 합리적인 이익/위험 비율에 상응하는 화합물, 물질, 조성물, 및/또는 투여 형태를 지칭하도록 본원에서 사용된다.

[0256] 본원에서 사용되는 바와 같이, "약학적으로 허용 가능한 담체"는 미국 식품의약국에 의해 인간 또는 가축에게 사용하기에 허용 가능한 것으로 승인된 임의의 보조제, 담체, 부형제, 활택제, 감미제, 희석제, 보존제, 염료/색소, 향미제, 계면활성제, 습윤제, 분산제, 현탁제, 안정화제, 등장제, 용매, 계면활성제, 또는 유화제를 제한없이 포함한다. 예시적인 약학적으로 허용 가능한 담체는: 락토오스, 포도당, 및 수크로오스와 같은 당류; 옥수수 전분 및 감자 전분과 같은 전분; 셀룰로오스 및 그 유도체, 예컨대 카복시메틸 셀룰로오스나트륨, 에틸 셀룰로오스, 및 셀룰로오스 아세테이트; 트라가칸트; 맥아; 젤라틴; 탈크; 코코아 버터, 왁스, 동물 및 식물성 지방, 파라핀, 실리콘, 벤토나이트, 규산, 산화아연; 땅콩유, 목화씨유, 홍화유, 참기름, 올리브유, 옥수수유,

및 대두유와 같은 오일류; 프로필렌 글리콜과 같은 글리콜; 글리세린, 소르비톨, 만니톨, 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 폴리올; 올레산 에틸 및 에틸 라우린산 에틸과 같은 에스테르; 한천; 수산화마그네슘 및 수산화알루미늄고 같은 완충화제; 알긴산; 발열원이 없는 물; 등장성 식염수; 링거 용액; 에틸 알코올; 인산염 완충액; 및 약학적 제형에 사용되는 임의의 다른 비슷한 물질을 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다.

[0257] 특정 구현예에서, 조성물은 본원에서 고려되는 CAR 발현 T 세포의 일정량, 더 바람직하게는 치료적 유효량을 포함한다.

[0258] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "양" 또는 "투여량"은 임상적 결과를 포함하여, 유익하거나 바람직한 예방적 또는 치료 결과를 달성하기에 충분한 CAR T 세포의 "유효한 양", "유효한 투여량", "유효량" 또는 "유효 투여량"을 지칭한다.

[0259] CAR T 세포의 "치료적 유효량" 또는 "치료적 유효 투여량"은 또한 CAR T 세포의 임의의 독성 또는 유해 효과(예: CRS)보다 치료적으로 유익한 효과보다 더 큰 투여량이다. 용어 "치료적 유효량"은 대상체(예를 들어, 환자)를 "치료"하는 데 효과적인 양을 포함한다. 일 구현예에서, 치료적 유효 투여량은 대상체에서 다발성 골수종을 치료하기 위한 CAR T 세포의 최소 유효 투여량(MED)이다. 일 구현예에서, 치료적 유효 투여량은 대상체에서 해결될 수 없는 CRS로 이어지지 않는 항-BCMA CAR T 세포의 최대 내약 투여량(MTD)이다. 바람직한 구현예에서, CAR T 세포, 예를 들어 PI3K 억제제의 존재 하에 5일 또는 7일의 제조 공정을 사용하여 제조된 항-BCMA CAR T 세포의 치료적 유효량이 대상체에게 투여되며, 여기서 세포의 양은 PI3K 억제제를 사용하여 10일의 제조 공정을 사용하여 제조된 CAR T 세포와 유사한 결과를 달성하는 데 필요한 세포의 양보다 적다.

[0260] 특정 구현예에서, 조성물은 바람직하게는 비경구 투여, 예를 들어, 혈관 내(정맥 내 또는 동맥 내) 투여용으로 제형화된다. 바람직한 구현예에서, 본원에서 고려되는 조성물은 1회 투여량으로 대상체에게 정맥내 주입된다.

[0261] 일 구현예에서, 대상체에게 투여되는 조성물 중 CAR^+ T 세포의 양은 적어도 약 5.0×10^7개의 세포, 적어도 약 15.0×10^7개의 세포, 적어도 약 45.0×10^7개의 세포, 적어도 약 80.0×10^7개의 세포, 또는 적어도 약 12.0×10^8개의 세포이다.

[0262] 일 구현예에서, 대상체에게 투여되는 조성물 중 CAR^+ T 세포의 양은 약 5.0×10^7개의 세포보다 많거나, 약 15.0×10^7개의 세포보다 많거나, 약 45.0×10^7개의 세포보다 많거나, 약 80.0×10^7개의 세포보다 많거나, 또는 약 12.0×10^8개의 세포보다 많다.

[0263] 일 구현예에서, 대상체에게 투여되는 조성물 중 CAR^+ T 세포의 양은 약 5.0×10^7개 내지 약 15.0×10^7개의 세포, 약 5.0×10^7개 내지 약 45.0×10^7개의 세포, 약 5.0×10^7개 내지 약 80.0×10^7개의 세포, 또는 약 5.0×10^7개 내지 약 12.0×10^8개의 세포이다.

[0264] 본원에서 제공된 용도를 위해, 세포는 일반적으로 1 리터 이하의 부피이며, 500 mL 이하, 심지어 250 mL 또는 100 mL 이하일 수 있다.

[0265] 특정 구현예에서, 약학적 조성물은 치료적 유효량의 CAR T 세포를 하나 이상의 약학적으로 또는 생리학적으로 허용 가능한 담체, 희석제, 또는 부형제와 조합으로 포함한다.

[0266] CAR T 세포의 치료적 유효 투여량을 포함하는 약학적 조성물은 중성 완충 식염수, 인산염 완충 식염수 등과 같은 완충화제; 글루코스, 만노오스, 수크로오스 또는 덱스트란, 만니톨과 같은 탄수화물; 단백질; 글리신과 같은 폴리펩티드 또는 아미노산; 항산화제; EDTA 또는 글루타티온과 같은 킬레이트화제; 보조제(예를 들어, 수산화알루미늄); 및 보존제를 포함할 수 있다.

[0267] 용액, 현탁액, 또는 다른 유사한 형태인지 여부와 상관없이, 액체 약학적 조성물은 다음 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 주사용수와 같은 멸균 희석제, 식염수, 바람직하게는 생리식염수, 링거 용액, 등장성 염화나트륨, 용매 또는 현탁 매질의 역할을 할 수 있는 합성 모노 또는 디글리세리드와 같은 고정 오일, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 용매; 벤질 알코올 또는 메틸 파라벤과 같은 항균제; 아스코르브산 또는 중아황산나트륨과 같은 항산화제; 에틸렌디아민테트라아세트산과 같은 킬레이트제; 아세트산염, 구연산염, 또는 인산염과 같은 완충화제, 및 염화 나트륨 또는 덱스트로스와 같은 등장성 조절제. 비경구 제제는 유리 또는 플라스틱으로 만들어진 앰플, 일회용 주사기, 또는 다회 투여 바이알에 봉입될 수 있다. 주사식 약학적 조성물은

바람직하게는 멸균 상태이다.

[0268] 특정 구현예에서, 본원에서 고려되는 CAR T 세포 조성물은 약학적으로 허용 가능한 세포 배양 배지에서 제형화된다. 이러한 조성물은 인간 대상체에게 투여하기에 적합하다. 특정 구현예에서, 약학적으로 허용 가능한 세포 배양 배지는 무혈청 배지이다.

[0269] 무혈청 배지는 세럼 함유 배지에 비해 여러 가지 장점을 갖는데, 이에는 단순화되고 더 잘 정의된 조성물, 오염도의 감소, 감염물질의 잠재적 공급원의 제거, 및 낮은 비용이 포함된다. 다양한 구현예에서, 무혈청 배지는 무동물성이며, 임의로 무단백질일 수 있다. 임의로, 배지는 생물 약학적으로 허용 가능한 재조합 단백질을 함유할 수 있다. "무동물성(animal-free)" 배지는 그 성분이 비-동물 공급원으로부터 유래된 배지를 지칭한다. 재조합 단백질은 무동물성 배지에서 천연 동물 단백질을 대체하며, 영양소는 합성, 식물, 또는 미생물 공급원으로부터 얻는다. 대조적으로, "무단백질(protein-free)" 배지는 실질적으로 단백질이 없는 것으로 정의된다.

[0270] 특정 조성물에 사용된 무혈청 배지의 예시적인 실시예는 QBSF-60(Quality Biological, Inc.), StemPro-34(Life Technologies), 및 X-VIVO 10을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0271] 바람직한 일 구현예에서, 본원에서 고려되는 CAR T 세포를 포함하는 조성물은 PlasmaLyte A를 포함하는 용액으로 제형화된다.

[0272] 또 다른 바람직한 구현예에서, 본원에서 고려되는 CAR T 세포를 포함하는 조성물은 동결보존제를 포함하는 용액으로 제형화된다. 예를 들어, 동결보존제가 포함된 동결 보존 배지를 사용해 해동 후 높은 세포 생존력 결과를 유지할 수 있다. 특정 조성물에 사용된 동결 보존 배지의 예시적인 실시예는 CryoStor CS10, CryoStor CS5, 및 CryoStor CS2를 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다.

[0273] 더 바람직한 구현예에서, 본원에서 고려된 CAR T 세포를 포함하는 조성물은 PlasmaLyte A와 CryoStor CS10을 50:50의 비율로 포함하는 용액 중에서 제형화된다.

[0274] **F.치료 방법**

[0275] 본원에서 고려되는 방법에 의해 제조된 변형된 T 세포는 암, 감염성 질환, 자가면역 질환, 염증성 질환, 및 면역 결핍증을 포함하지만 이에 한정되지 않는 다양한 병태의 치료에 사용하기 위한 개선된 입양 면역 요법을 제공한다. 특정 구현예에서, 일차 T 세포의 특이성은 본원에서 고려되는 CAR로 일차 T 세포를 유전적으로 변형시킴으로써 종양 또는 암세포에 대해 재유도된다.

[0276] 특정 구현예에서, 본원에서 고려되는 방법으로 제조된 CAR T 세포 조성물은 간암, 췌장암, 폐암, 유방암, 방광암, 뇌암, 골암, 갑상선암, 신장암, 또는 피부암을 포함하되 이들로 한정되지 않는 고형 종양 또는 암의 치료에 사용된다.

[0277] 특정 구현예에서, 본원에서 고려되는 방법으로 제조된 CAR T 세포 조성물은 급성 백혈병(예: ALL, AML, 및 골수모구성, 전골수구성, 골수단핵구성, 단핵구성, 및 적백혈병) 및 만성 백혈병(예:CLL, SLL, CML, HCL)을 포함하는 백혈병, 진성 다혈구증, 림프종, 호지킨 병, 비호지킨 림프종, 다발성 골수종, 발덴스트롬 매크로글로불린혈증, 및 중쇄 질환을 포함하되 이들로 한정되지 않는 액체 종양의 치료에 사용된다.

[0278] 특정 구현예에서, 본원에서 고려되는 방법으로 제조된 CAR T 세포 조성물은 다발성 골수종(MM), 비호지킨 림프종(NHL), 및 만성 림프구성 백혈병(CLL)을 포함하되 이들로 한정되지 않는 B 세포 악성 종양의 치료에 사용된다.

[0279] 다발성 골수종은 성숙한 형질 세포 형태의 B-세포 악성 종양으로서, 이들 세포 유형의 단일 클론의 신생물 형질 변환을 특징으로 한다. 이들 형질 세포는 BM에서 증식하며, 인접한 뼈 및 때로는 혈액을 침범할 수 있다. 다발성 골수종의 변이체 형태는 현성 다발성 골수종(overt multiple myeloma), 무증상 다발성 골수종(smoldering multiple myeloma), 형질 세포 백혈병, 비분비성 골수종, IgD 골수종, 골경화성 골수종, 골의 고립 형질세포종, 및 골수외 형질세포종을 포함한다(예를 들어, Braunwald 등(eds)의 문헌[*Harrison's Principles of Internal Medicine*, 15th Edition (McGraw-Hill 2001)] 참조).

[0280] 비호지킨 림프종은 큰 그룹의 림프구(백혈구) 암을 포함한다. 비호지킨 림프종은 모든 연령에서 발생할 수 있으며, 종종 정상보다 큰 림프절, 발열 및 체중 감소로 나타난다. 많은 상이한 유형의 비호지킨 림프종이 있다. 예를 들어, 비호지킨 림프종은 공격성(빠르게 성장) 및 무통성(느리게 성장) 유형으로 나누어질 수 있다. 비호지킨 림프종은 B 세포 및 T 세포로부터 유래될 수 있지만, 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "비호지킨 림프종"

및 "B 세포 비호지킨 림프종"은 상호 교환적으로 사용된다. B-세포 비호지킨 림프종(NHL)은 버킷 림프종, 만성 림프구성 백혈병/소림프구성 림프종(CLL/SLL), 미만성 거대 B-세포 림프종, 소포 림프종, 면역모구성 거대 세포 림프종, 전구체 B-림프모구성 림프종, 외투세포 림프종을 포함한다. 골수 또는 줄기 세포 이식 후 발생하는 림프종은 일반적으로 B-세포 비호지킨 림프종이다.

[0281] 만성 림프구성 백혈병(CLL)은 B 림프구 또는 B 세포라고 불리는 미성숙 백혈구의 느린 증가를 유발하는 무통성(느리게 성장하는) 암이다. 암세포는 혈액과 골수를 통해 확산되며, 림프절 또는 간 및 비장과 같은 다른 기관에도 영향을 미칠 수 있다. CLL은 결국 골수 부전을 유발한다. 때때로, 질환의 후기에, 질환을 소림프구성 림프종이라고 한다.

[0282] 특정 구현예에서, 치료적 유효량의 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는 조성물은 다발성 골수종 또는 림프종을 치료하기 위해 대상체에게 투여된다.

[0283] 특정 구현예에서, 치료적 유효량의 항-BCMA CAR T 세포를 포함하는 조성물은 재발성/불응성 다발성 골수종을 치료하기 위해 대상체에게 투여된다. "재발"은 일정 기간의 개선 또는 관해 후 암의 복귀, 또는 복귀의 징후 및 증상의 진단을 지칭한다. "불응성"은 특정 치료제를 사용하는 요법에 내성이 있거나 반응하지 않는 암을 지칭한다. 암은 치료 개시부터 불응성이거나(즉, 치료제에 처음 노출할 때부터 비반응성이거나), 제1 치료 기간 동안에 걸쳐 또는 후속 치료 기간 동안 치료제에 대한 내성이 생김으로써 불응성이될 수 있다.

[0284] 특정 구현예에서, 본원에서 고려되는 조성물은, 적어도 하나의 프로테아좀 억제제 및/또는 면역조절 약물(IMiD)을 포함하는, 1, 2, 3가지 이상의 치료로 성공적으로 치료되지 못한 재발성/불응성 다발성 골수종을 가진 대상체에게 투여된다. 일 구현예에서, 대상체의 다발성 골수종은, 적어도 하나의 프로테아좀 억제제 및 IMiD를 포함하는 3가지 치료 요법에 불응성이다. 일 구현예에서, 대상체의 다발성 골수종은 하나 이상의 치료 요법에 대해 이중 불응성이다.

[0285] 대상체의 다발성 골수종이 불응성인 프로테아좀 억제제의 예시적인 예는 보르테조밉 및 카르필조밉을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0286] 대상체의 다발성 골수종이 불응성인 IMiD의 예시적인 예는 탈리도미드, 레날리도미드, 및 포말리도미드를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0287] 다발성 골수종이 불응성일 수 있는 다른 치료제의 예시는, 덱사메타손(dexamethasone), 및 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 항체 기반 요법을 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다: 엘로투주맙(elotuzumab), 다라투무맙(daratumumab), MOR03087, 이사툭시맙(isatuximab), 베바시주맙(bevacizumab), 세툭시맙(cetuximab), 실툭시맙(siltuximab), 토실리주맙(tocilizumab), 엘실리모맙(elsilimomab), 아진트렐(azintrel), 리툭시맙(rituximab), 토시투모맙(tositumomab), 밀라투주맙(milatuzumab), 루카투무맙(lucatumumab), 다세투주맙(dacetuzumab), 피기투무맙(figitumumab), 달로투주맙(dalotuzumab), AVE1642, 타발루맙(tabalumab), 펨브롤리주맙(pembrolizumab), 피딜리주맙(pidilizumab), 및 니볼루맙(nivolumab).

[0288] 일 구현예에서, 대상체의 다발성 골수종은 다라투무맙을 이용한 치료에 불응성이다.

[0289] 특정 구현예에서, 대상체의 다발성 골수종은 프로테아좀 억제제인 IMiD, 및 덱사메타손을 이용한 치료에 불응성이다.

[0290] 본원에서 고려되는 방법은, 항-BCMA CAR T 세포 조성물의 투여 전에, 자가 조혈 줄기 세포 이식으로 재발성/불응성 다발성 골수종을 앓고 있는 대상체를 치료하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0291] 본원에서 고려되는 방법은, 본원에서 고려되는 항-BCMA CAR T 세포 조성물의 투여 전에 대상체의 림프구를 고갈시키는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 여기서, 예를 들어, 림프구고갈 화학요법은 투여 1~4일(예를 들어, 1, 2, 3 또는 4일) 전에 종료된다. 특정 구현예에서, 림프구고갈은 멜팔란(melphalan), 시톡산(cytoxan), 시클로포스파미드, 및 플루다라빈(fludarabin) 중 하나 이상을 투여하는 단계를 포함한다. 일 구현예에서, 본원에서 고려되는 항-BCMA CAR T 세포 조성물의 투여 전에, 시클로포스파미드 300 mg/m^2 및 플루다라빈 30 mg/m^2으로 대상체의 림프구를 고갈시킨다.

[0292] 본 명세서에 인용된 모든 간행물, 특허 출원, 및 발행된 특허는 각각의 개별 간행물, 특허 출원, 또는 발행된 특허가 구체적으로 그리고 개별적으로 참조에 의해 포함되는 것으로 표시된 것처럼 본원에 참조로서 통합된다.

[0293] 전술한 발명이 이해를 밝힐 목적으로 예시 및 예로서 일부 상세히 기술되었지만, 첨부된 청구범위의 사상 또는

범주로부터 벗어나지 않고도 소정의 변경 및 변형이 이루어질 수 있다는 것이 본 발명의 교시에 비추어 당업자에게 쉽게 명백해질 것이다. 하기 실시예들은 단지 예시로서 제공되며, 제한하기 위한 것은 아니다. 당업자는 본질적으로 유사한 결과를 얻기 위해 변경되거나 수정될 수 있는 중요하지 않은 다양한 파라미터를 쉽게 인식할 것이다.

[0294] 실시예

[0295] 실시예 1

[0296] 개선된 제조 공정

[0297] 백혈구성분채집술에 의해 세포를 다발성 골수종 공여자로부터 수확하고, Cell Saver Elite를 이용해 밀도 구배를 사용해 PBMC를 단리하였다. PBMC를 세척한 다음, 250IU/mL IL-2가 포함된 T 세포 성장 배지(TCGM)에 재현탁하였다. 세척 전 및 세척 후에, 세포 계수, 생존률 분석, 및 PBMC FACS 분석을 수행하였다. 세척된 PBMC를 활성화 시까지 동결 보존하거나 신선한 상태로 사용하였다. 0일차에, 250 IU/mL IL-2, 1 μM ZSTK474(CAS 번호 475110-96-4), 배양물에 대한 50 ng/mL의 항-CD3 항체, 및 50 ng/mL의 항-CD28 항체가 포함된 TCGM에서 PBMC를 배양하여 T 세포를 활성화하고 자극한 다음, 약 18~24시간 동안 배양하였다. PBMC 배양물을 항-BCMA CAR(예: 서열번호 1, 서열번호 2)를 암호화하는 렌티바이러스로 약 18 내지 약 24시간 동안 형질도입하였다. 그런 다음, T 세포 증식을 위해 PBMC 배양물을 250 IU/mL의 IL-2 및 1 μM ZSTK474가 포함된 TCGM에서 4일, 6일, 또는 9일 동안 배양하였다(각각 5일, 7일, 또는 10일 제조 공정). 1일 이상의 증식하는 도중 각각의 날에, 세포의 분취물을 임의로 취하고, 세포를 계수하고, 생존력을 결정하고, 동결 보존하고, FACS 분석을 사용하여 PBMC에 대해 특성을 분석하였다. 증식된 세포를 회수하고 세척하고, 속도가 조절된 냉동고에서 적어도 -80℃의 온도로 동결보존하고, 기상의 액체 질소 저장 탱크에 보관하였다.

[0298] 실시예 2

[0299] 개선된 제조 공정은 T 세포 표현형을 조절함

[0300] PI3K 억제제 ZSTK474의 존재 또는 부재 하에 실시예 1에 기술된 7일 또는 10일의 제조 공정을 사용하고, 5개의 다발성 골수종 공여자 PBMC 세포 로트를 사용하여 항-BMCA CAR T 세포를 제조하였다. T 세포 증식 배양이 종료된 후, CD3, CD62L, CCR7, 및 CD45RA에 대한 항-인간 항체로 세포를 염색하고 유세포 계측법으로 분석하였다. 각각의 점도표는 생존 가능한 $CD3^+$ 림프구에 대해 게이팅한 것이다. 7일 동안 ZSTK474의 존재 하에 제조된 항-BCMA CAR T 세포 약물 생성물(DP)은 10일 동안 ZSTK474의 존재 하에 제조되었거나 PI3K 억제제의 부재 하에 제조된 항-BCMA CAR T 세포 DP와 비교하여 보다 강력한 T 세포 표현형에 대한 마커 발현을 증가시켰다. 도 1.

[0301] 실시예 3

[0302] 개선된 제조 공정은 T 세포 분화를 조절함

[0303] PI3K 억제제 ZSTK474의 존재 하에 실시예 1에 기술된 7일 또는 10일의 제조 공정을 사용하고, 5개의 다발성 골수종 공여자 PBMC 세포 로트를 사용하여 항-BMCA CAR T 세포를 제조하였다. T 세포 증식 배양이 종료된 후, CCR7, CD25, CD28, CD122, ICOS, CD45RO, CD57, 및 TIM3에 대한 금속 표지된 항-인간 항체로 세포를 염색하고 CyTOF에 의해 분석하였다. 각각의 점도표는 생존 가능한 $CD3^+$ 림프구에 대해 게이팅한 것이다. 7일 동안 ZSTK474의 존재 하에 제조된 항-BCMA CAR T 세포 DP는 10일 동안 ZSTK474의 존재 하에 제조된 항-BCMA CAR T 세포 DP와 비교하여 덜 분화된 T 세포 표현형에 대한 마커 발현을 증가시키고 더 분화된 T 세포 표현형에 대한 마커 발현을 감소시켰다. 도 2.

[0304] 실시예 4

[0305] 개선된 제조 공정은 $CD27^+$ T 세포를 풍부하게 함

[0306] PI3K 억제제 ZSTK474의 존재 또는 부재 하에 실시예 1에 기술된 7일 또는 10일의 제조 공정을 사용하고, 5개의 다발성 골수종 공여자 PBMC 세포 로트를 사용하여 항-BMCA CAR T 세포를 제조하였다. T 세포 증식 배양이 종료된 후, CD4, CD8, 및 CD27에 대한 금속 표지된 항-인간 항체로 세포를 염색하고 CyTOF에 의해 분석하였다. VISNE 플롯은 상이한 세포 모집단에서 CD27 발현을 보여준다. 게이팅된 모집단은 $CD27^+$가 풍부한 T 세포를 나타낸다. 7일 동안 ZSTK474의 존재 하에 제조된 항-BCMA CAR T 세포 DP는 10일 동안 ZSTK474의 존재 하에 또는 PI3K 억제제의 부재 하에 제조된 항-BCMA CAR T 세포 DP와 비교하여 $CD27^+$, $LEF1^+$, 및/또는 $TCF1^+$가 풍부한 T

세포를 예상 외로 극적으로 증가시켰다. 도 3.

[0307] 실시예 5

[0308] 풍부한 $CD27^+$ T 세포 모집단은 강력한 T 세포 표현형을 갖는다

[0309] PI3K 억제제 ZSTK474의 존재 하에 실시예 1에 기술된 7일 또는 10일의 제조 공정을 사용하고, 5개의 다발성 골수종 공여자 PBMC 세포 로트를 사용하여 항-BMCA CAR T 세포를 제조하였다. T 세포 증식 배양이 종료된 후, CCR7, CD25, CD28, HLA-DR, 및 TIM3에 대한 금속 표지된 항-인간 항체(도 4a) 및 CD45RO, CD57, CD70, CD244, 및 PD-1에 대한 금속 표지된 항-인간 항체(도 4b)로 세포를 염색하고 CyTOF에 의해 분석하였다. VISNE 플롯은 상이한 세포 모집단에서 마커 발현을 보여준다. 게이팅된 모집단은 $CD27^+$가 풍부한 T 세포를 나타낸다. 7일 동안 ZSTK474의 존재 하에 제조된 항-BCMA CAR T 세포 DP는 10일 동안 ZSTK474의 존재 하에 제조된 항-BCMA CAR T 세포 DP와 비교하여 덜 분화된 T 세포 표현형에 대한 마커 발현을 증가시키고 더 분화된 T 세포 표현형에 대한 마커 발현을 감소시켰다. 도 4a 내지 도 4b.

[0310] 실시예 6

[0311] 개선된 제조 공정은 $CD27^+$ T 세포 활성화 프로파일을 조절한다

[0312] PI3K 억제제 ZSTK474의 존재 하에 실시예 1에 기술된 7일 또는 10일의 제조 공정을 사용하고, 5개의 다발성 골수종 공여자 PBMC 세포 로트를 사용하여 항-BMCA CAR T 세포를 제조하였다. T 세포 증식 배양이 종료된 후, CD27, CD28, ICOS, HLA-DR, CD25, 및 TIM3에 대한 금속 표지된 항-인간 항체로 세포를 염색하고 CyTOF에 의해 분석하였다. VISNE에 의해 식별된 $CD27^+$가 풍부한 세포의 T 세포 표현형을 $CD4^+$ T 세포(도 5, 상단) 및 $CD8^+$ T 세포(도 5, 하단)에서의 마커 발현에 대해 분석하였다. 10일 동안 ZSTK474의 존재 하에 제조된 항-BCMA CAR T 세포 DP는 7일 동안 ZSTK474의 존재 하에 제조된 항-BCMA CAR T 세포 DP와 비교하여 감소된 활성화 프로파일 및 증가된 고갈 프로파일을 갖는다.

[0313] 실시예 7

[0314] 개선된 제조 공정은 T 세포 유전자 발현을 조절함

[0315] 7일 동안(n=1) 또는 10일 동안(n=13) PI3K 억제제인 ZSTK474의 부재 하에, 또는 7일 동안(n=10) 또는 10일 동안(n=6) PI3K 억제제의 존재 하에 다발성 골수종 PBMC 로트를 사용해 실시예 1에 기술된 바와 같이 항-BCMA CAR T 세포를 제조하였다. 약 100 ng의 총 RNA를 항-BCMA CAR T 세포 DP로부터 추출하고, Nanostring의 면역학 V2 프로브 키트와 혼합하고, 전사 프로파일을 분석하였다. 제조 조건 간에 상이하게 발현된 상위 50개 유전자의 히트맵이 도 6에 도시되어 있다. 7일 동안 제조된 항-BCMA CAR T 세포 DP는 10일 동안 제조된 DP와 비교해, T 세포 활성화 및 증식과 관련된 유전자 및 T 세포 기억 표현형 유전자의 발현 증가를 나타내고, 세포 사멸과 관련된 유전자의 발현 감소를 나타낸다.

[0316] 실시예 8

[0317] Daudi 종양 마우스 모델에서의 항-BCMA CAR T 세포

[0318] Daudi 종양 마우스 모델을 확립하여 7일 및 10일 공정으로 제조된 완제의약품 간의 효능을 비교하였다. 건강한 공여자 PBMC를 활성화하여 자극하고, 항-BCMA CAR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터로 형질도입하고, IL-2 및 PI3K 억제제의 존재 하에 7일 또는 10일 동안 증식시켰다(실시예 1 참조). 입양 세포 요법 10일 전에, NSG 마우스에게 2 x 10^6개의 반딧불이 루시페라아제로 표지된 다우디(Daudi) 종양 세포를 정맥내 주사하였다. 마우스에게 2.5, 5, 또는 10 x 10^6개의 항-BCMA CAR^+ T 세포 또는 비히클로 형질도입된 T 세포를 주사하였다. 종양 부담을 발광에 의해 모니터링하였다. 7일 공정으로 제조된 항-BCMA CAR T 세포는 10일차에 제조된 세포보다 더 나은 효능을 보이는데, 이는 더 낮은 CAR^+ 투여량에서 종양 성장을 조절하는 능력의 증가에 의해 입증된다. 도 7.

[0319] 실시예 9

[0320] 항-BCMA CAR T 세포 표현형

[0321] PI3K 억제제 ZSTK474의 존재 하에 실시예 1에 기술된 7일 또는 10일의 제조 공정을 사용하고, 15개의 다발성 골수종 공여자 PBMC 세포 로트를 사용하여 항-BMCA CAR T 세포를 제조하였다. T 세포 증식 배양이 종료된 후, 약

36개의 T 세포 표현형 패널의 금속 표지된 항-인간 항체로 세포를 염색하고 CyTOF로 분석하였다. 표현형 항체는 다음의 T 세포 표현형 간의 구별을 가능하게 한다: 미노출 T 세포(Tnaive), 중심 기억 T 세포(TCM), 효과기 기억 T 세포(EM), 효과기 T 세포(TEff), 및 줄기 세포 기억 T 세포(TSCM). T 줄기 세포 기억 하위 집합은 미노출 T 세포 사분면($CCR7^+CD45RO^-$)에서 CD95 발현에 의해 식별된다. 제시된 데이터는 $CD27^+$가 풍부한 세포 대 T 세포 하위 집합의 백분율(%)의 함수로서 분석한 각 DP 로트를 보여준다. $CD27^+CD4^+$ T 세포는 TCM 유사 표현형과 양의 상관 관계가 있는 반면, $CD27^+CD8^+$ T 세포는 TSCM 유사 표현형과 양의 상관 관계가 있다. 도 8.

[0322] 실시예 10

[0323] $CD8^+$ 항-BCMA CAR T 세포 표현형

[0324] 실시예 9에서 생성된 $CD8^+$ T 세포 데이터를 FlowSOM을 사용하여 분석하였다. FlowSOM은 20개의 구별되는 T 세포 클러스터를 식별하였다. T 세포의 3개의 주요한 군을 (CD27, CD25, CD127, TCF1, LEF1, CD28, CCR7과 같은 기억 T 세포 마커가 풍부한) 클러스터 4 및 (그랜자임 A, 그랜자임 B, T-bet, EOMES와 같은 효과기 T 세포 마커가 풍부한) 클러스터 5에 기초하여 식별하였다. $CD27^+CD8^+$ 항-BCMA CAR T 세포의 비율(%), 제조 방법, 및 항-BCMA CAR T 세포로 치료한 대상체에 대한 임상 반응을 분석하였다. 7일 제조 공정은 일반적으로 10일 제조 공정과 비교해, T 세포 기억 마커의 발현이 증가하고 $CD27^+$가 풍부한 세포의 모집단이 증가된 항-BCMA CAR T 세포를 생성하였다. 도 9.

[0325] 실시예 11

[0326] 항-BCMA CAR T 세포 유전자 발현 분석

[0327] PI3K 억제제 ZSTK474의 존재 하에 실시예 1에 기술된 7일(n=8) 또는 10일(n=4)의 제조 공정을 사용하고, 12개의 다발성 골수종 공여자 PBMC 세포 로트를 사용하여 항-BMCA CAR T 세포를 제조하였다. 약 100 ng의 총 RNA를 항-BCMA CAR T 세포 DP로부터 추출하고, Nanostring의 면역학 V2 프로브 키트와 혼합하였다. 데이터의 정확도를 NSolver 소프트웨어(Nanostring)에서 검정하고(QC), 차등 유전자 발현 분석을 수행하였다. 7일 내지 10일 제조 공정 간의 상위 25개의 차등 발현된 유전자의 히트맵(p-값 0.05)을 생성하였다. $CD27^+$ 항-BCMA CAR T 세포의 비율(%), 제조 방법, 및 항-BCMA CAR T 세포로 치료한 대상체에 대한 임상 반응을 분석하였다. 7일 제조 공정은 일반적으로 10일 제조 공정과 비교해, T 세포 기억 마커의 발현이 증가하고 $CD27^+$가 풍부한 세포의 모집단이 증가된 항-BCMA CAR T 세포를 생성하였다. 도 10.

[0328] 실시예 12

[0329] 항-BCMA CAR T 세포 유전자 발현 분석

[0330] 5개의 다발성 골수종 공여자 PBMC 세포 로트를 각각 2개의 군으로 나누고, 하나의 군으로는 7일 제조 공정을 사용하여 항-BMCA CAR T 세포를 제조하고, 다른 하나의 군으로는 10일 제조 공정을 사용하여 항-BMCA CAR T 세포를 제조하였다. CAR T 세포를 실시예 1에 기술된 바와 같이 PI3K 억제제 ZSTK4의 존재 하에 제조하였다.

[0331] 약 100 ng의 총 RNA를 항-BCMA CAR T 세포 DP로부터 추출하고, Nanostring의 면역학 V2 프로브 키트와 혼합하였다. 데이터의 정확도를 NSolver 소프트웨어(Nanostring)에서 검정하고(QC), 차등 유전자 발현 분석을 수행하였다.

[0332] 항-BCMA CAR T 세포 DP 총 RNA의 분취물을 사용해 RNA 시퀀싱(RNA-Seq)도 수행하였다. 세포를 해동시키고/세척하고/계수하고 생존율에 대해 시험하였다(>70%의 생존률 필요함). TRIAZOL을 사용하여 2~3 x 10^6개 세포의 총 RNA를 추출하였다. 페놀/클로로포름 추출을 사용해 RNA를 수확하고, 총 RNA에 대해서는 Qiagen miRNA-easy 키트를 사용하였다. 폴리-A 비드 포획 전략을 사용하여 RNA를 단리하였다. RNA 품질/수량은 Tapestation 2200에 의해 결정하였다(>7의 RIN 값 필요함). 시퀀싱 라이브러리는 Illumina TruSeq RNA에 의해 제조하였다. 라이브러리의 정확도를 Tapestation 2200(DNA 키트)에 의해 확인하고 NextSeq550 기기를 사용하여 시퀀싱하였다. 데이터는 QC/정렬 방법을 사용하여 분석하였다.

[0333] 7일 제조 공정 대비, 배수 변화(FC) 기준으로 상위 11개의 상향 조절된 유전자 및 상위 9개의 하향 조절된 유전자가 표 1에 나타나 있다.

표 1

[0334]

유전자	FC 증가: 7 일차/10 일차	유전자	FC 감소: 7 일차/10 일차
NR4A2	2.6	NQO1	2.0
LY9	2.5	CCNA1	1.9
LIN7A	2.5	IL17F	1.9
WNT5B	2.3	EMP1	1.9
BCL6	2.3	SNHG19	1.9
EGR1	2.3	PRR22	1.9
EGR2	2.1	ILDR2	1.7
ATF3	2.1	ATAD3	1.7
CCL1	2.1	NKD2	1.7
IL-1A	1.9	WDR62	1.7
CCL5	1.7		

[0335] 실시예 13

[0336] 항-BCMA CAR T 세포 유전자 발현 분석

[0337] 5개의 다발성 골수종 공여자 PBMC 세포 로트를 각각 2개의 군으로 나누고, 하나의 군으로는 7일 제조 공정을 사용하여 항-BMCA CAR T 세포를 제조하고, 다른 하나의 군으로는 10일 제조 공정을 사용하여 항-BMCA CAR T 세포를 제조하였다. CAR T 세포를 실시예 1에 기술된 바와 같이 PI3K 억제제 ZSTK4의 존재 하에 제조하였다.

[0338] 항-BCMA CAR T 세포 DP 총 RNA의 분취물을 사용해 RNA 시퀀싱(RNA-Seq)을 또한 수행하였다. 세포를 해동시키고/세척하고/계수하고 생존율에 대해 시험하였다(>70%의 생존률 필요함). TRIAZOL을 사용하여 2~3 x 10^6개 세포의 총 RNA를 추출하였다. 페놀/클로로포름 추출을 사용해 RNA를 수확하고, 총 RNA에 대해서는 Qiagen miRNA-easy 키트를 사용하였다. rRNA 고갈을 위해 RiboErase를 사용하였다. RNA 품질/수량은 Tapestation 2200에 의해 결정한다(>7의 RIN 값 필요함). RNA 품질/수량은 Tapestation 2200에 의해 결정하였다(>7의 RIN 값 필요함). 시퀀싱 라이브러리는 Illumina TruSeq RNA에 의해 제조하였다. 라이브러리의 정확도를 Tapestation 2200(DNA 키트)에 의해 확인하고 NextSeq550 기기를 사용하여 시퀀싱하였다. 데이터는 QC/정렬 방법을 사용하여 분석하였다.

[0339] 7일 제조 공정 대비, 배수 변화(FC) 기준으로 상위 25개의 상향 조절된 유전자 가운데 CCL1, NR4A2, ATF3, CCL5, 및 WNT5B가 포함됐고, 상위 10개의 하향 조절된 유전자 가운데 NKD2 및 NQO1이 포함됐다.

[0340] 실시예 14

[0341] 항-BCMA CAR T 세포 요법

[0342] 다발성 골수종 환자로부터 PBMC를 수확하고, 세척한 다음, 250IU/mL IL-2가 포함된 T 세포 성장 배지(TCGM)에 재현탁하였다. 세척 전 및 세척 후에, 세포 계수, 생존률 분석, 및 PBMC 유세포 분석을 수행하였다. 세척된 PBMC를 활성화 시까지 동결 보존하거나 신선한 상태로 사용하였다. 0일차에, 250 IU/mL IL-2, 50 ng/mL의 항-CD3 항체, 및 50 ng/mL의 항-CD28 항체가 포함된 TCGM에서 PBMC를 배양하여 T 세포를 활성화하고 자극한 다음, 약 18~24시간 동안 배양하였다. PBMC 배양물을 항-BCMA CAR(예: 서열번호 1, 서열번호 2)를 암호화하는 렌티바이러스로 약 18 내지 약 24시간 동안 형질도입하였다. 그런 다음, T 세포 증식을 위해 PBMC 배양물을 250 IU/mL의 IL-2가 포함된 TCGM에서 9일 동안 배양하였다(10일 제조 공정). 증식된 세포를 회수하고, 세척하고, 속도가 조절된 냉동고에서 적어도 -80℃의 온도로 동결보존하고, 이어서 기상의 액체 질소 저장 탱크에 보관하였다.

[0343] 이어서 냉동된 세포를 해동시키고/세척하고/계수하고 생존율에 대해 시험하였다(>70%의 생존률 필요함). 그런 다음, 세포를 CyTOF 실험에 사용하거나, 세포 펠릿으로서 냉동시키고 이후의 RNA 추출 및 유전자 발현 분석을 위해 TRIzol 중에 보존하였다.

[0344] *실험 1.* T 세포 마커에 대한 금속 표지된 항-인간 항체로 세포를 염색하고, Fluidigm CyTOF Helios 질량 분석기를 사용하여 분석하였다. 항체 염색 전에 각 샘플에 첨가된 기준 샘플 내의 확립된 음성 모집단과 비교하여, 단일 마커 기준으로 단백질 마커 발현을 게이팅하였다. 마커의 조합을 사용하여 세포를 기억 세포 유형별로 분류

하고, 실루엣 방법(silhouette method)에 의해 양성 마커 발현에 대해 게이팅하였다. CD4 및 CD8 T 세포 각각에 대한 기억 모집단을 다음의 마커 조합을 사용하여 게이팅하였다: T_{Naive} (CCR7+CD45RO-CD95-), T_{SCM} (CCR7+CD45RO-CD95+), T_{CM} (CCR7+CD45RO+CD95+), T_{EM} (CCR7-CD45RO+CD95+), T_{EF} (CCR7-CD45RO-CD95+). 주요 면역 모집단을 다음의 마커 조합을 사용하여 게이팅하였다: CD4 T 세포 (CD3+CD4+CD8-CD14-CD19-CD56-), CD8 T 세포 (CD3+CD4-CD8+CD14-CD19-CD56-), NK 세포 (CD3-CD19-CD14-CD56+), NKT 세포 (CD3+CD56+CD19-CD14-), B 세포 (CD3-CD19+CD14-CD56-), 및 단핵구 (CD3-CD19-CD14+CD56-). 성별에 맞게 조정된 준이항 일반화 선형 모델을 사용하여 세포 비율의 차등 존재도를 추론하였다. 각 세포 유형에서 개별 마커에 대한 비율의 차이는 윌콕슨 순위합 검정을 사용하여 추론하였다. CAR T 세포 조성물을, 반응 지속기간이 18개월 미만인 모든 환자(비지속 반응자) 대비 반응 지속 기간이 18개월을 초과하는 환자들(지속 반응자) 간에 비교하였다. 도 11a 및 11b.

[0345] *실험 2*. LEF-1을 포함하는 T 세포 마커에 대한 금속 표지된 항-인간 항체로 세포를 염색하고 CyTOF에 의해 분석하였다. CyTOF 데이터의 정확도를 확인하고 분석하여 CD4 및 CD8 면역 세포 모집단에 대한 개별 마커의 발현을 확인하였다. 각 세포 유형에서 개별 마커에 대한 비율의 차이는 윌콕슨 순위합 검정을 사용하여 추론하였다. 지속 반응자 대 비지속 반응자 및 암컷 대 수컷의 차등 발현 분석을 사용해 약물 생성물 샘플의 유전자 수준 카운트에 대한 분석을 수행하였다. 도 12a

[0346] RNA를 페놀/클로로포름 추출을 사용하여 수확하고, Qiagen miRNA-easy 키트를 사용해 총 RNA를 확인하고, RiboErase가 포함된 Kapa RNA HyperPrep 키트를 사용해 rRNA를 고갈시켰다. RNA 품질/수량은 Tapestation 2200에 의해 결정하였다(>7의 RNA 무결성 점수 또는 RIN이 필요함). Illumina TruSeq RNA 라이브러리 준비 키트를 사용하여 시퀀싱 라이브러리를 제조하였다. Tapestation 2200(DNA 키트)에 의해 라이브러리 품질과 양을 결정하고 Illumina NextSeq550 기기를 사용하여 시퀀싱하였다. 시퀀싱 데이터를 분석하였다. 혈청 BCMA(sBCMA) 수준과 LEF1 유전자 발현의 상관관계는 Spearman 순위 상관관계를 사용하여 결정하였다. 도 12b.

[0347] 실시예 15

[0348] 항-BCMA CAR T 세포 요법

[0349] 다발성 골수종 환자로부터 PBMC를 수확하고, 세척한 다음, 250IU/mL IL-2가 포함된 T 세포 성장 배지(TCGM)에 재현탁하였다. 세척 전 및 세척 후에, 세포 계수, 생존률 분석, 및 PBMC 유세포 분석을 수행하였다. 세척된 PBMC를 활성화 시까지 동결 보존하거나 신선한 상태로 사용하였다. 0일차에, 250 IU/mL IL-2, 50 ng/mL의 항-CD3 항체, 및 50 ng/mL의 항-CD28 항체가 포함된 TCGM에서 PBMC를 배양하여 T 세포를 활성화하고 자극한 다음, 1 μM ZSTK474(PI3K 억제제, CAS 번호 475110-96-4)의 존재 하에 약 18~24시간 동안 배양하였다. PBMC 배양물을 항-BCMA CAR(예: 서열번호 1, 서열번호 2)를 암호화하는 렌티바이러스로 약 18 내지 약 24시간 동안 형질도입하였다. 그런 다음, T 세포 증식을 위해 PBMC 배양물을 250 IU/mL의 IL-2 및 1 μM ZSTK474가 포함된 TCGM에서 9일 동안 배양하였다(10일 제조 공정). 증식된 세포를 회수하고, 세척하고, 속도가 조절된 냉동고에서 적어도 -80℃의 온도로 동결보존하고, 이어서 기상의 액체 질소 저장 탱크에 보관하였다.

[0350] 동결보존된 샘플을 해동하고, CD3, CD27, CCR7, 및 CD57을 포함하는 T 세포 마커에 대한 금속 표지된 항-인간 항체로 염색하였다. 표지된 세포를 Fluidigm CyTOF Helios 질량 분석기를 사용하여 분석하였다. CyTOF 표현형 분석의 수동 분석은 FlowJo 소프트웨어 패키지를 사용하여 수행하였다. 항체 염색 전에 각 대상체 샘플에 첨가된 기준 샘플 내의 확립된 음성 모집단에 기초하여, 단일 마커 기준으로 단백질 마커 발현을 게이팅하였다. CCR7(도 13, 상단 좌측 패널), LEF1(도 13, 상단 중앙 패널), 및 CD57(도 13, 상단 우측 패널)을 발현하는 CD3+ 활 세포의 백분율을 PBMC와 DP 간에 나타냈다. 이는 PI3-K 억제제 기반 제조 공정이 조기 기억 세포, 덜 분화된 세포를 풍부하게 한다는 것을 입증하였다.

[0351] CCR7(도 13, 하단 좌측 패널), LEF-1(도 13, 하당 중앙 패널), 및 CD57(도 13, 하단 우측 패널)을 발현하는 CD3+ 활 세포의 백분율을 y축에 표시되어 있다. 주입 후 다양한 시점에 전혈로부터 추출한 CD3+ 세포에 대한 PCR에 의해 결정한 최대 벡터 카피 수(VCN)는 x 축에 표시되어 있다. 이들 그래프는, 주입 후 항-BCMA CAR+ 세포의 최대 증식이 LEF-1을 발현하는 CD3+ DP 세포의 백분율 간에 양의 상관관계가 있다는 것 뿐만 아니라, CD57을 발현하는 CD3+ DP의 백분율과 음의 상관관계가 있다는 것도 보여준다. 이는 DP에서 CCR7 및 LEF-2의 풍부함이 생체 내에서 항-BCMA CAR의 보다 강력한 증식을 유도함을 나타낸다.

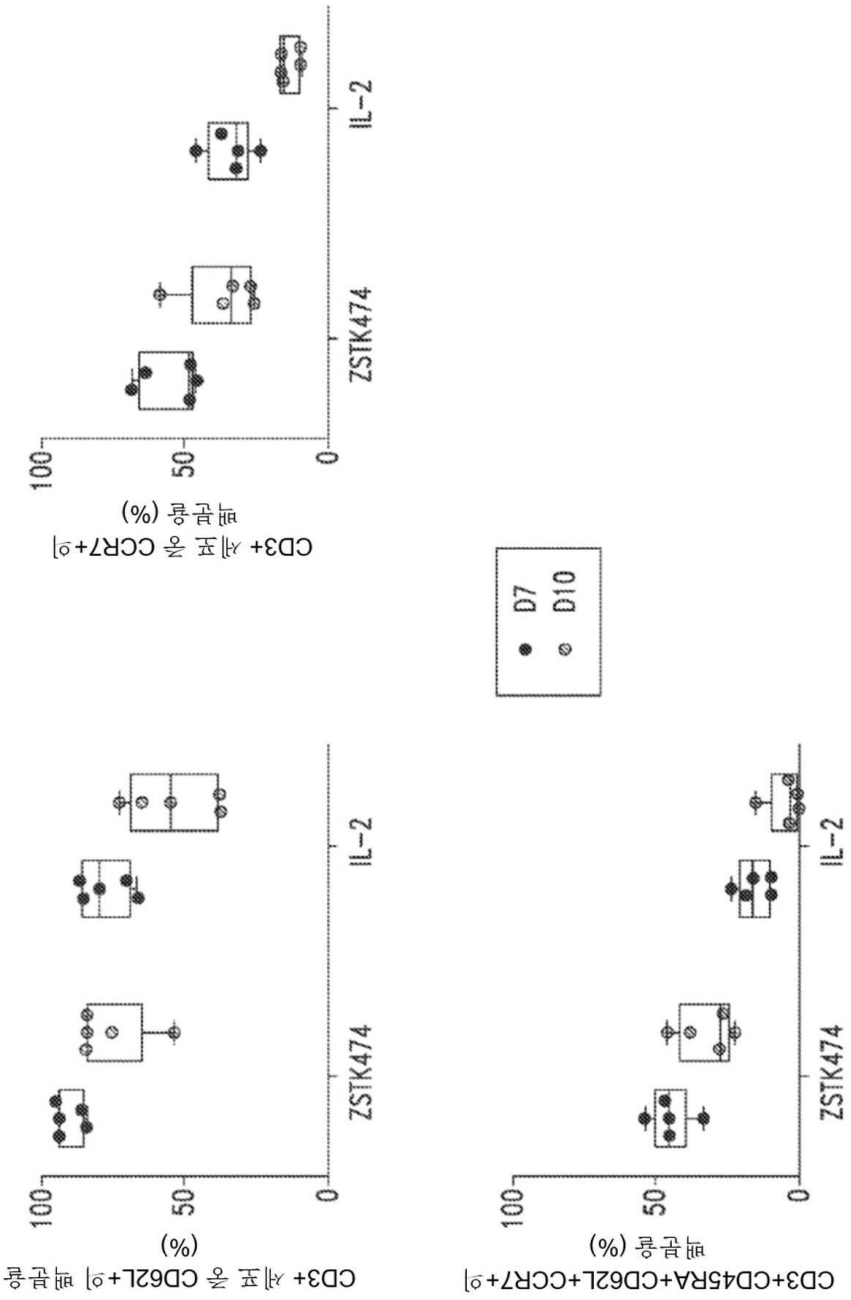
[0352] CD57(노쇠 마커), LEF-1, CCR7, 및 CD27(기억 세포)을 발현하는 CD3+ 활 세포의 백분율은 클러스터링된 히트맵으로서 표시되어 있다. 도 14. 적색은 마커에 대한 다른 샘플과 비교하여 샘플에서 세포의 비율이 상대적으로 더 높음을 나타낸다. 청색은 마커에 대한 다른 샘플과 비교하여 샘플에서 세포의 비율이 상대적으로 더 낮음을

나타낸다. 평균 연결 계층적 클러스터링을 사용하여 데이터를 그룹화하고, 클러스터 계통수에 의해 결정했을 때의 상위 3개의 클러스터를 6개월차에 환자의 임상 반응과 연관시켰다(진행성 질환 여부). 6개월차에 반응을 임상 평가하기 위해 이용 가능한 추적관찰 데이터가 있는 환자들만 이 분석에 포함시켰다. 무감독 클러스터링은, CD57 고발현 및 LEF-1/CCR7/CD27 저발현 군과 6개월 시점의 병기 진행자 간에 연관성이 있는 반면(4/6 진행), LEF-1/CCR7/CD27 고발현 및 CD57 저발현 군은 주로 비진행자(1/7 진행)임을 보여준다. 중간 군은 1/5의 진행자를 갖는다. 이는 약물 생성물 중의 기억 및 노화 마커와 지속적인 임상 반응 간의 상관 관계를 입증한다.

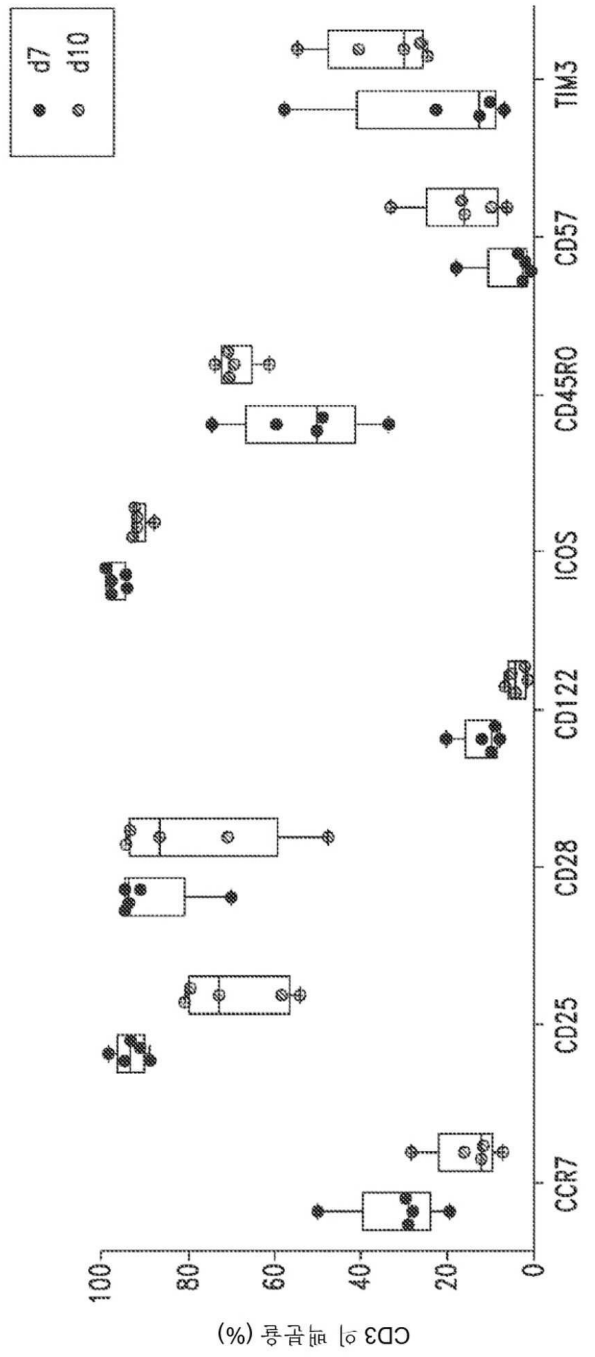
[0353] 일반적으로, 다음의 청구범위에서, 사용된 용어는 청구범위를 본 명세서 및 청구범위에 개시된 특정 구현예로 제한하는 것으로 해석되어서는 안되며, 이러한 청구범위가 부여되는 등가물의 전체 범위와 함께 모든 가능한 구현예를 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 따라서, 청구범위는 본 개시에 의해 제한되지 않는다.

도면

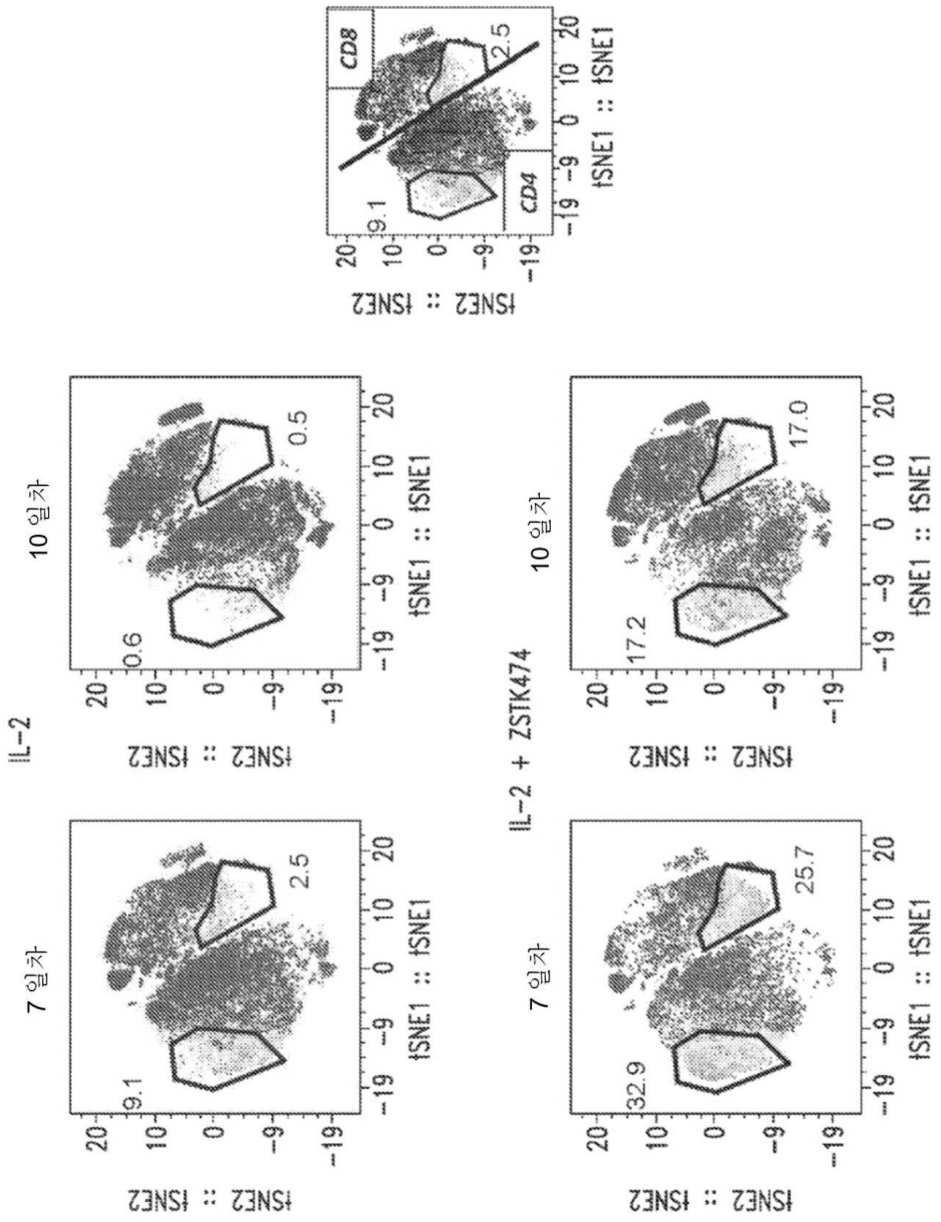
도면1



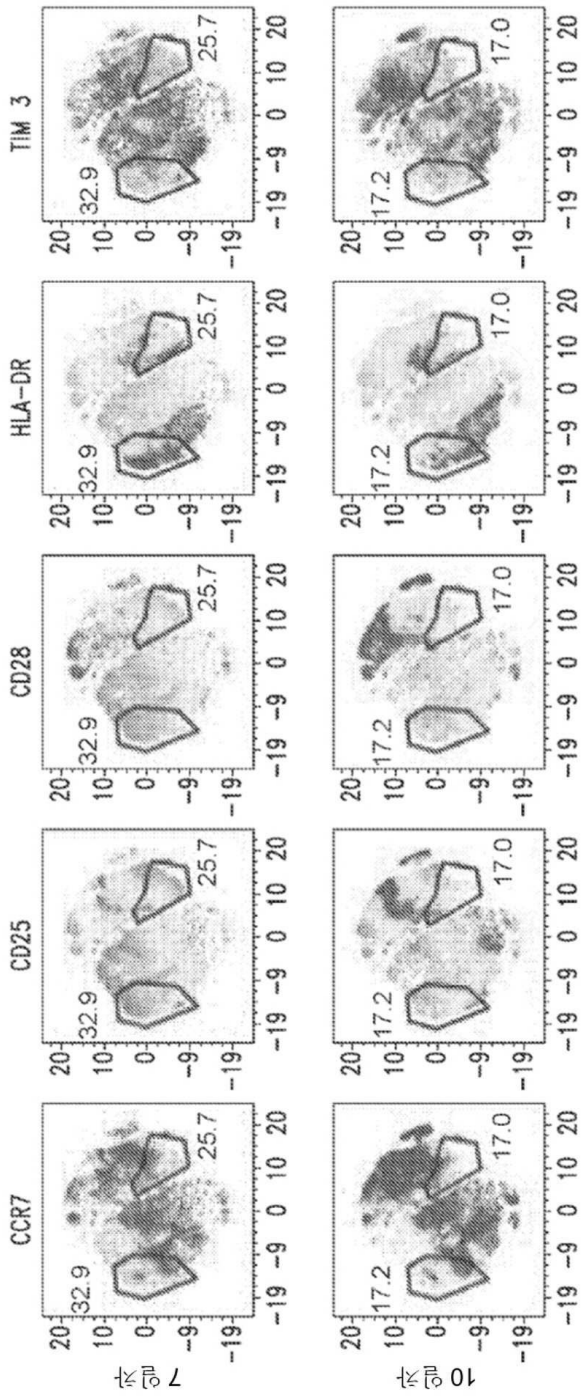
도면2


d7
d10
CCR7
CD25
CD28
CD122
ICOS
CD45RO
CD57
TIM3
0
20
40
60
80
100
CD3 양 백분율 (%)

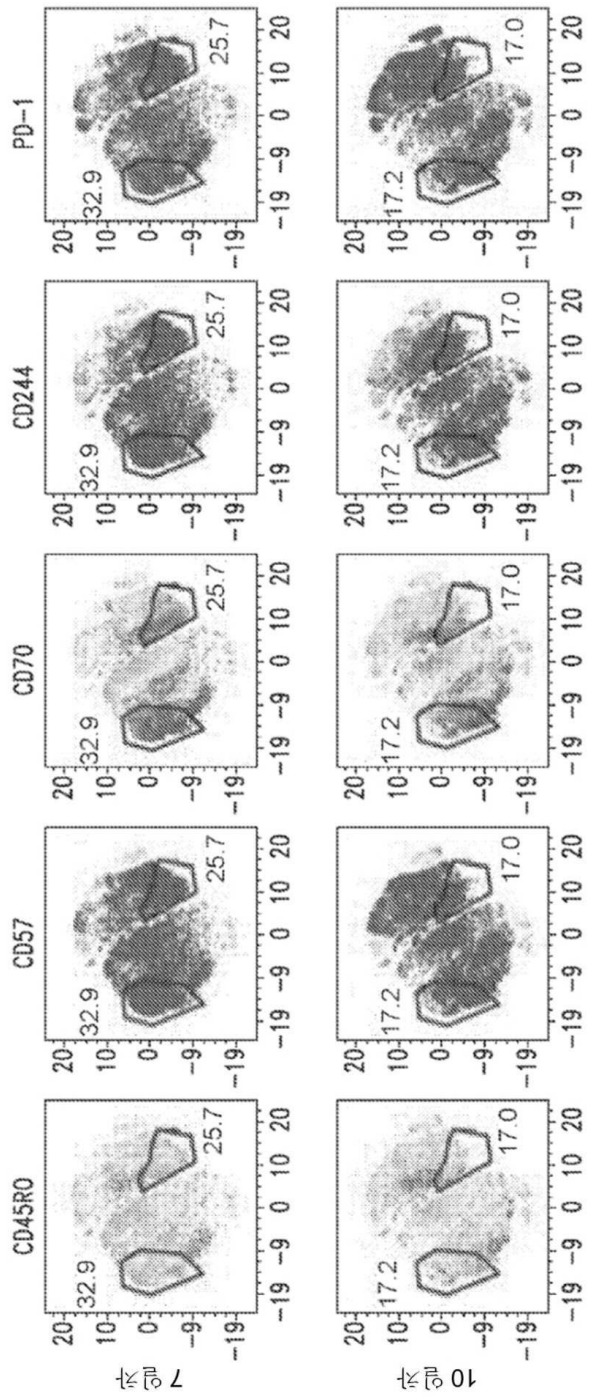
도면3


CD8
CD4
9.1
2.5
tSNE2 :: tSNE1
IL-2
IL-2 + ZSTK474
7 일차
10 일차
9.1
2.5
0.6
0.5
32.9
25.7
17.2
17.0

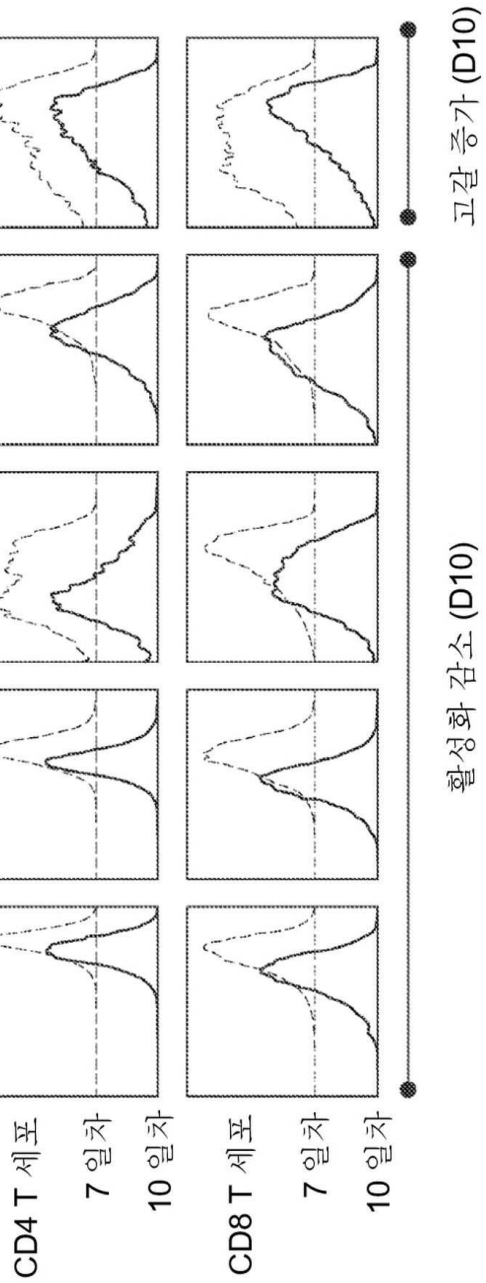
도면4a


CCR7
CD25
CD28
HLA-DR
TIM 3
7 일차
10 일차
32.9
25.7
17.2
17.0
20
10
0
-9
-19
-19 -9 0 10 20

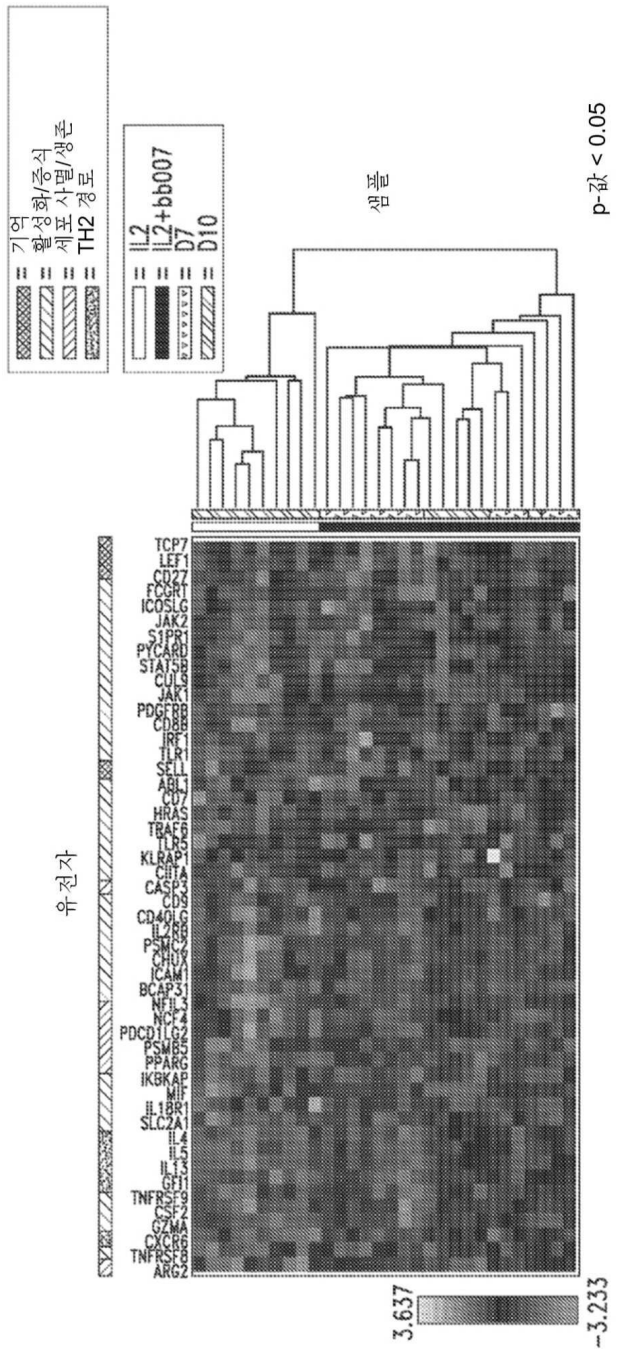
도면4b



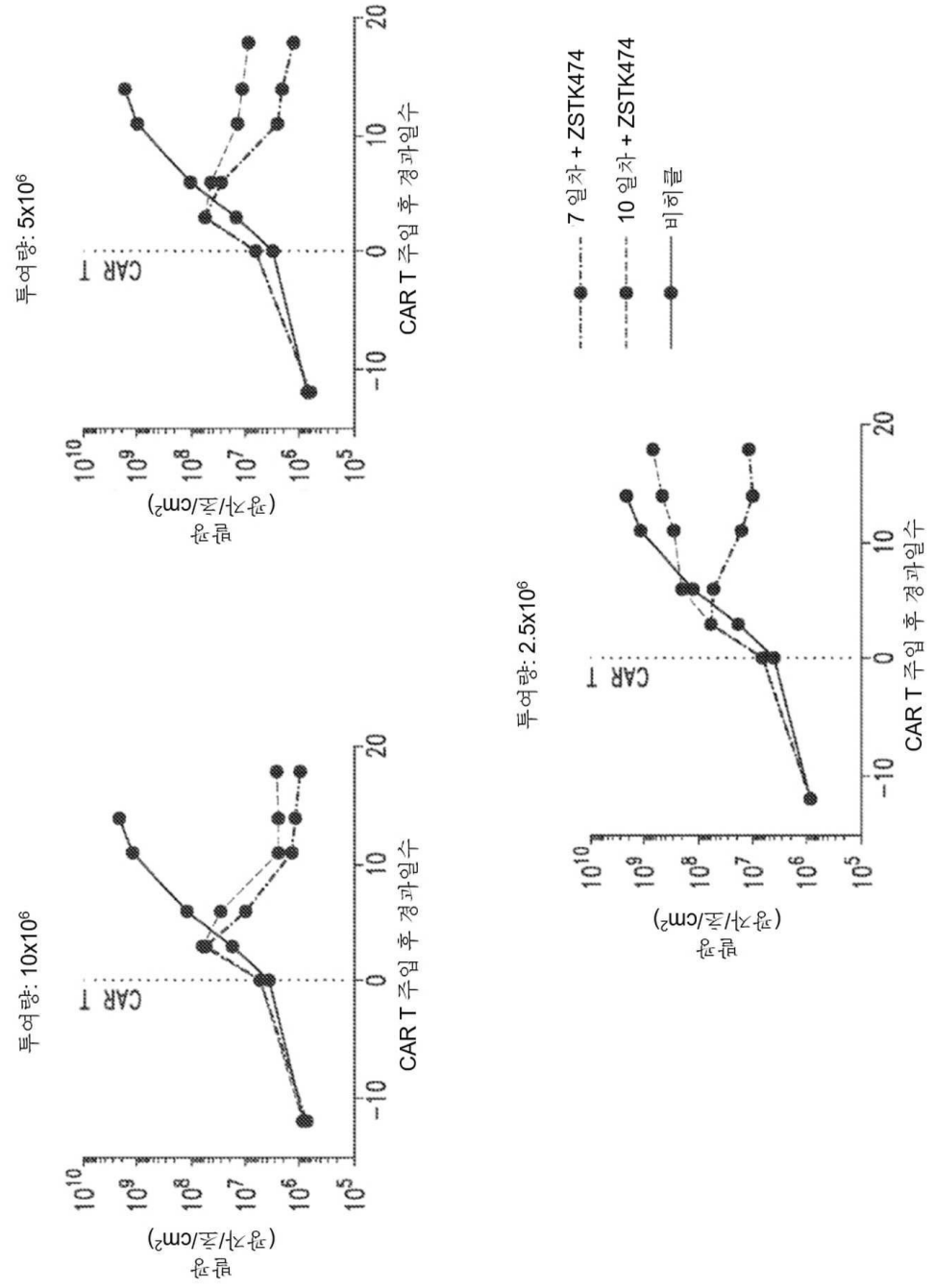
도면5


CD28
ICOS
HLA-DR
CD25
TIM-3
CD4 T 세포
7 일차
10 일차
CD8 T 세포
7 일차
10 일차
활성화 감소 (D10)
고갈 증가 (D10)

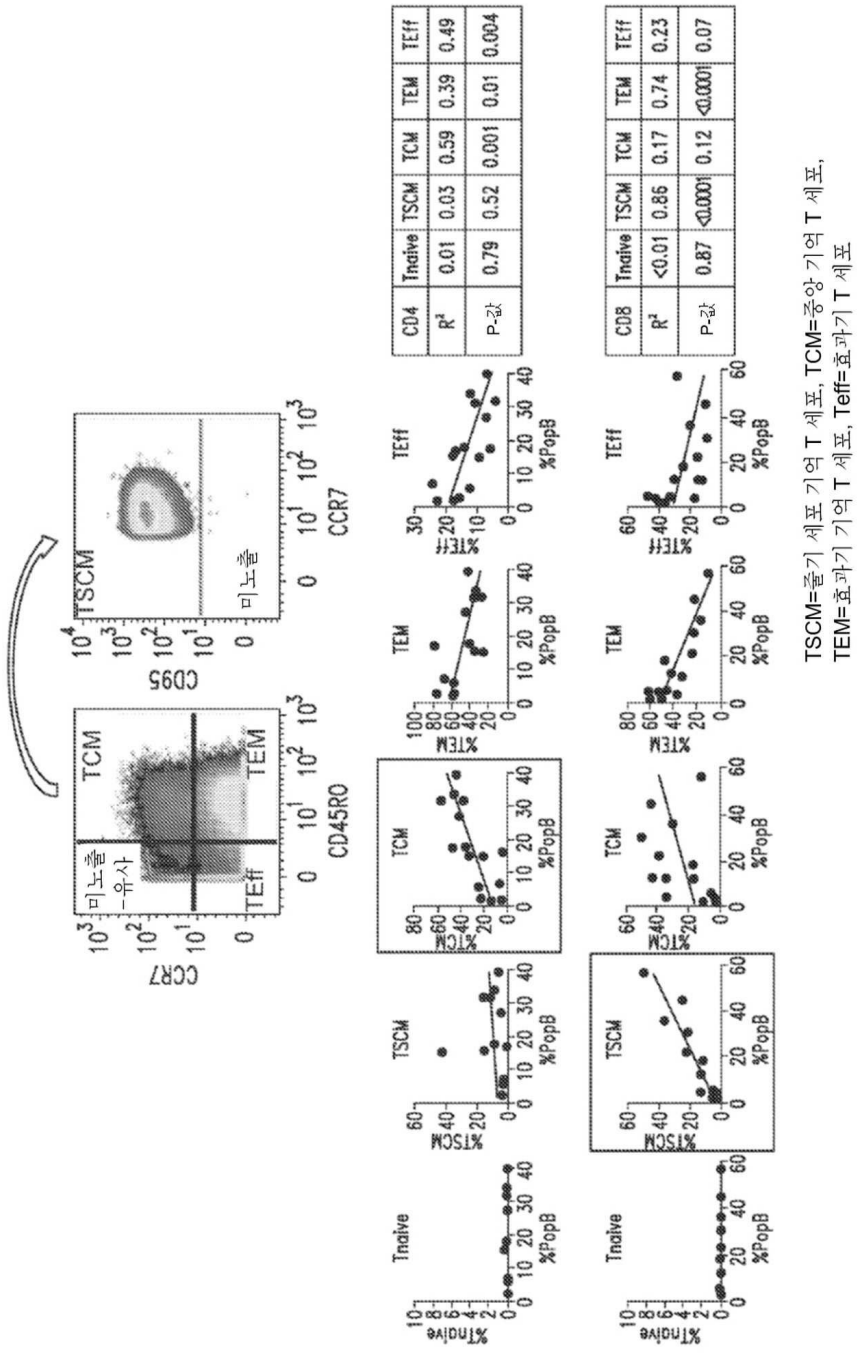
도면6


기억
활성화/증식
세포 사멸/생존
TH2 경로
IL2
IL2+bb007
D7
D10
샘플
p-값 < 0.05
유전자
TCP7
LEF1
CD27
FCGR1
ICOSLG
JAK2
S1PR1
PYCARD
STAT5B
CUL5
JAK1
PDGFRB
CD86
IRF1
TLR1
SELL
ABL1
CD7
HRAS
TRAF6
TLR5
KLRAP1
CIITA
CASP3
CD9
CD40LG
IL2RB
PSMC7
CHUK
ICAM1
BCAP31
NFIL3
NCF4
PDCD1LG2
PSMB5
PPARG
IKBKAP
MIF
IL18R1
SLC2A1
IL4
IL5
IL13
GFI1
TNFRSF9
CSF2
GZMA
CXCR6
TNFRSF8
ARG2
3.637
-3.233

도면7


투여량: 5x10⁶
투여량: 10x10⁶
투여량: 2.5x10⁶
CAR T
벌킹 (카피수/ml/cm²)
CAR T 주입 후 경과일수
7 일차 + ZSTK474
10 일차 + ZSTK474
비히클

도면8

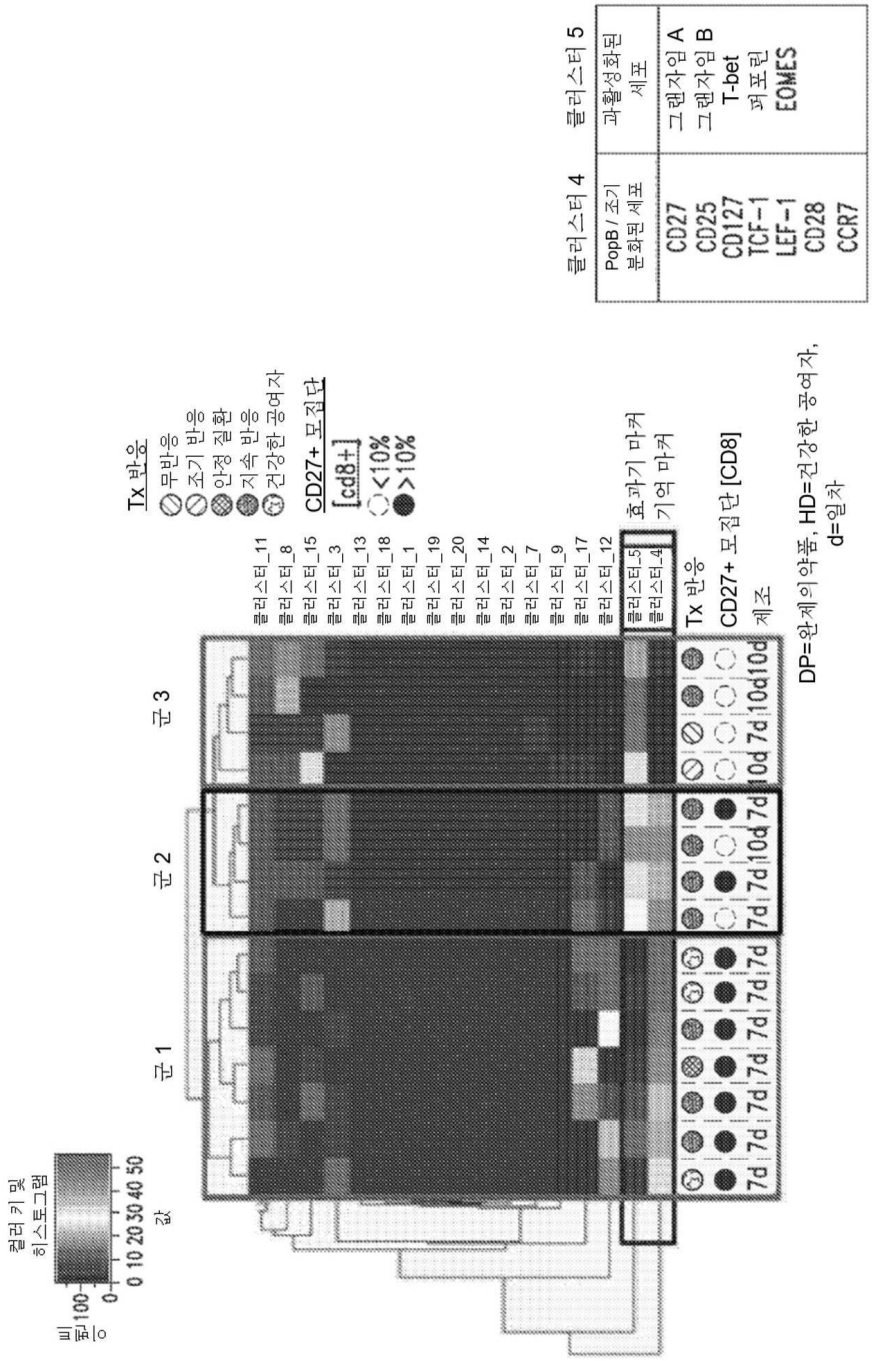


CD4	Tnaive	TSCM	TCM	TEM	TEff
R^2	0.01	0.03	0.59	0.39	0.49
P-값	0.79	0.52	0.001	0.01	0.004

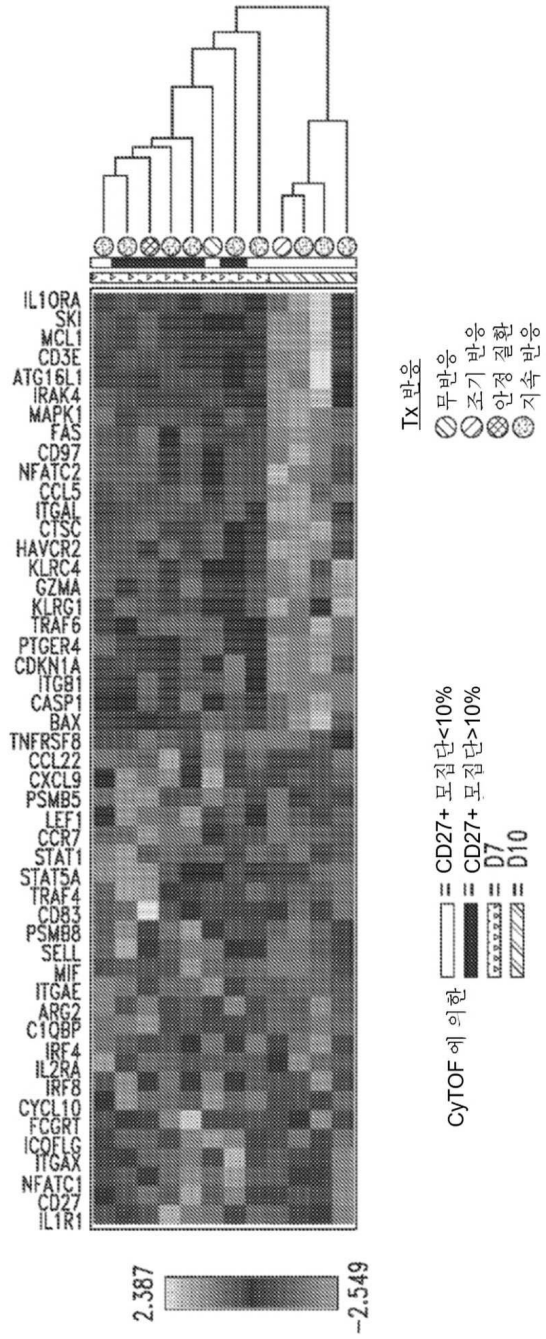
CD8	Tnaive	TSCM	TCM	TEM	TEff
R^2	<0.01	0.86	0.17	0.74	0.23
P-값	0.87	<0.0001	0.12	<0.0001	0.07

TSCM=줄기 세포 기억 T 세포, TCM=중앙 기억 T 세포,
TEM=효과기 기억 T 세포, Teff=효과기 T 세포

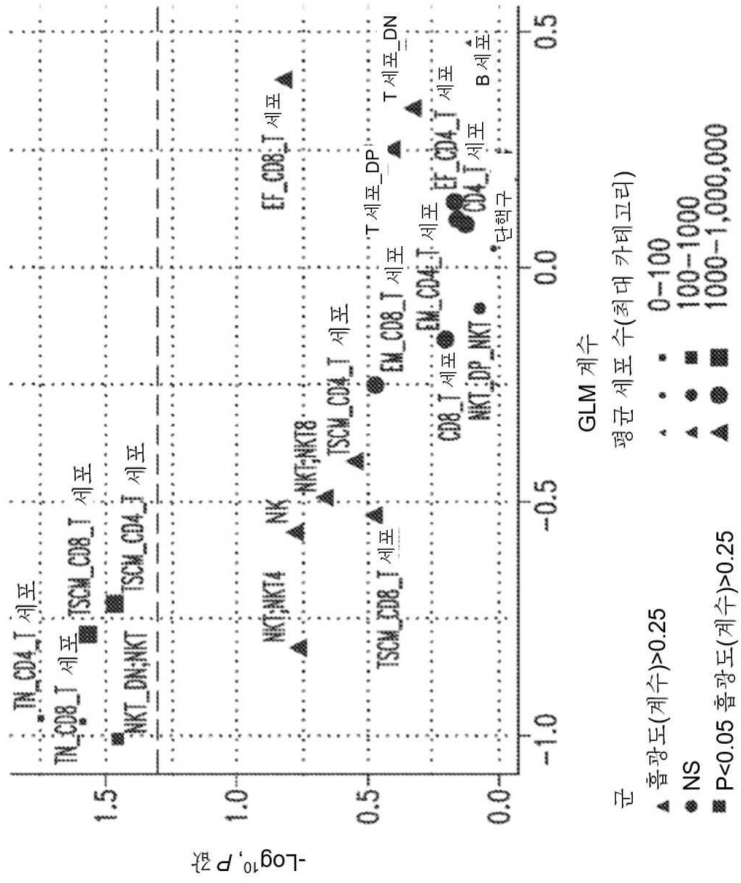
도면9


클러스터 4
PopB / 조기 분화된 세포
CD27
CD25
CD127
TCF-1
LEF-1
CD28
CCR7
클러스터 5
과활성화된 세포
그랜자임 A
그랜자임 B
T-bet
퍼포린
EOMES
Tx 반응
무반응
조기 반응
안정 질환
지속 반응
건강한 공여자
CD27+ 모집단 [cd8+]
<10%
>10%
클러스터_11
클러스터_8
클러스터_15
클러스터_3
클러스터_13
클러스터_18
클러스터_1
클러스터_19
클러스터_20
클러스터_14
클러스터_2
클러스터_7
클러스터_9
클러스터_17
클러스터_12
효과기 마커
기억 마커
클러스터_5
클러스터_4
Tx 반응
CD27+ 모집단 [CD8]
제조
군 1
군 2
군 3
컬러 키 및 히스토그램
빈도
100
0
0 10 20 30 40 50
값
DP=완제의약품, HD=건강한 공여자, d=일차

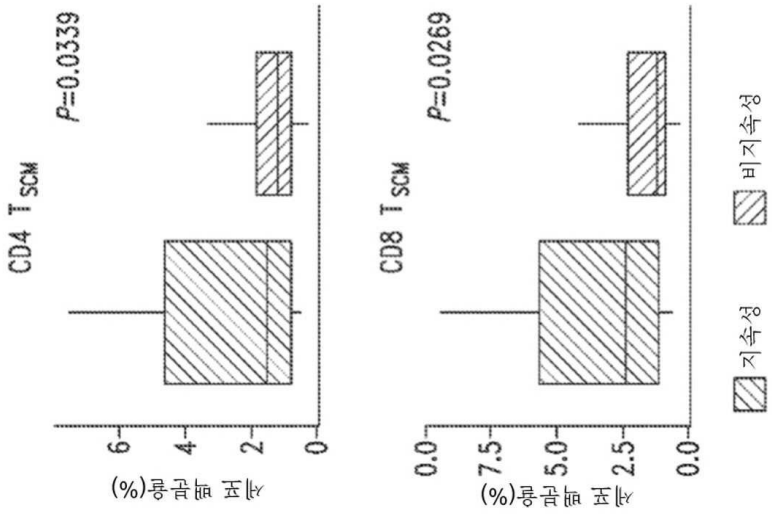
도면10


IL1ORA
SKI
MCL1
CD3E
ATG16L1
IRAK4
MAPK1
FAS
CD97
NFATC2
CCL5
ITGAL
CTSC
HAVCR2
KLRC4
GZMA
KLRG1
TRAF6
PTGER4
CDKN1A
ITGB1
CASP1
BAX
TNFRSF8
CCL22
CXCL9
PSMB5
LEF1
CCR7
STAT1
STAT5A
TRAF4
CD83
PSMB8
SELL
MIF
ITGAE
ARG2
C1QBP
IRF4
IL2RA
IRF8
CYCL10
FCGR1
ICOFLG
ITGAX
NFATC1
CD27
IL1R1
2.387
-2.549
CyTOF 에 의한
= CD27+ 모집단<10%
= CD27+ 모집단>10%
= D7
= D10
Tx 반응
무반응
조기 반응
안정 질환
지속 반응

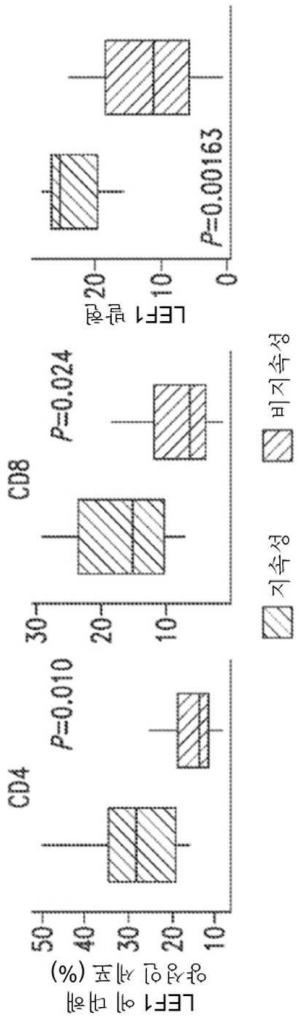
도면11a


-Log10, P 값
1.5
1.0
0.5
0.0
-1.0
-0.5
0.0
0.5
TN_CD4_T 세포
TN_CD8_T 세포
TSCM_CD8_T 세포
NKT_DN;NKT
TSCM_CD4_T 세포
NKT;NKT14
NK
NKT;NKT8
TSCM_CD4_T 세포
TSCM_CD8_T 세포
EM_CD8_T 세포
T 세포_DP
T 세포_DN
EM_CD4_T 세포
CD8_T 세포
EF_CD4_T 세포
CD4_T 세포
B 세포
NKT_DP_NKT
단핵구
GLM 계수
평균 세포 수(최대 카테고리)
군
흡광도(계수)>0.25
NS
P<0.05 흡광도(계수)>0.25
0-100
100-1000
1000-1,000,000

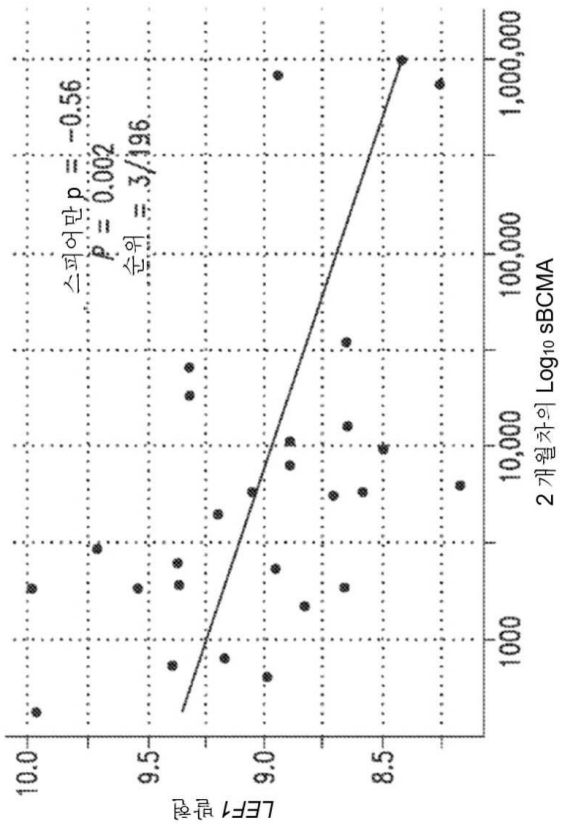
도면11b


CD4 T SCM
P=0.0339
CD8 T SCM
P=0.0269
세포 백분율(%)
세포 백분율(%)
6
4
2
0
0.0
7.5
5.0
2.5
0.0
지속성
비지속성

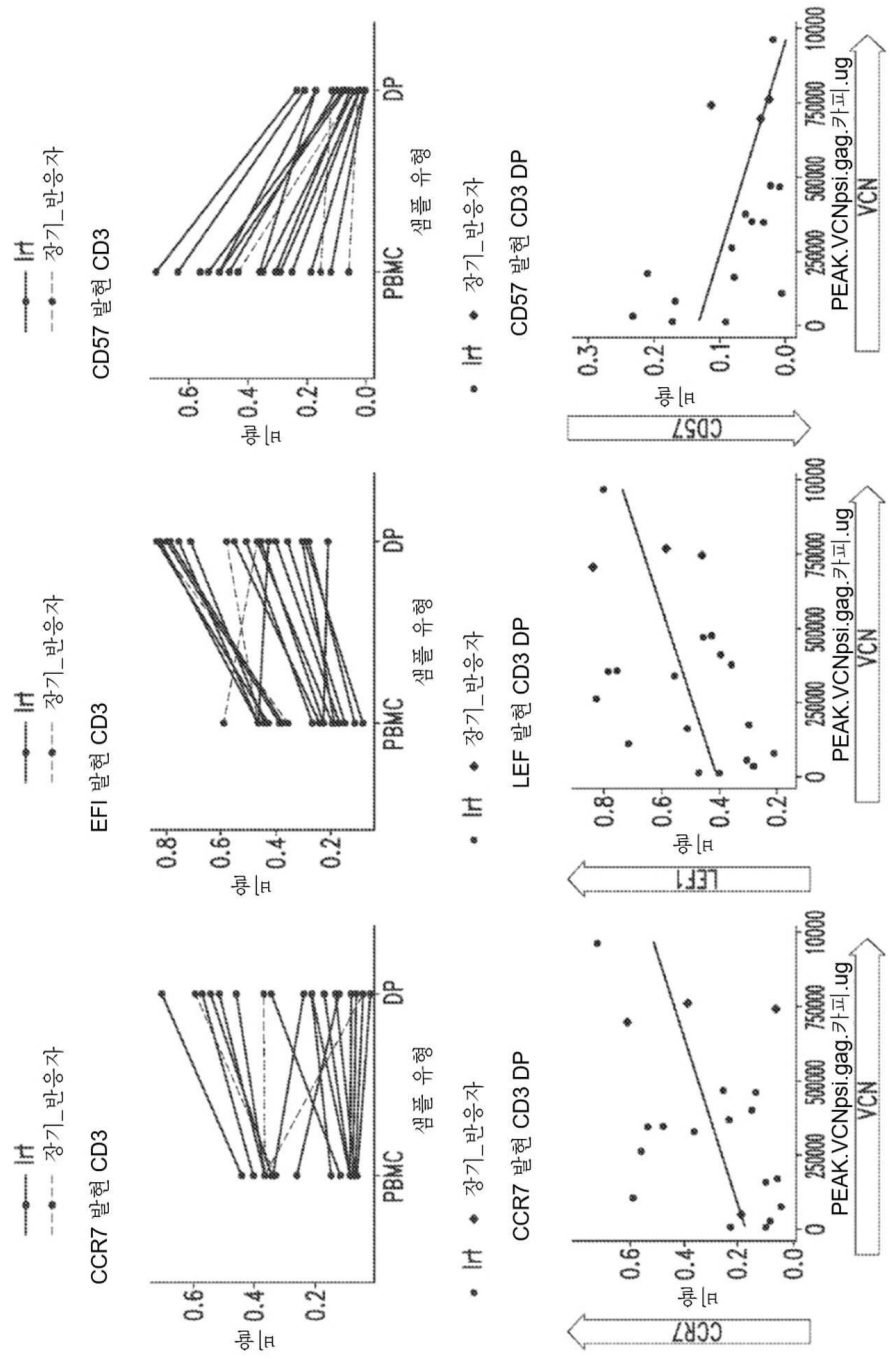
도면12a


LEF1 양성
P=0.00163
20
10
0
CD8
P=0.024
30
20
10
CD4
P=0.010
50
40
30
20
10
LEF1 양성인 세포 (%)
지속성
비지속성

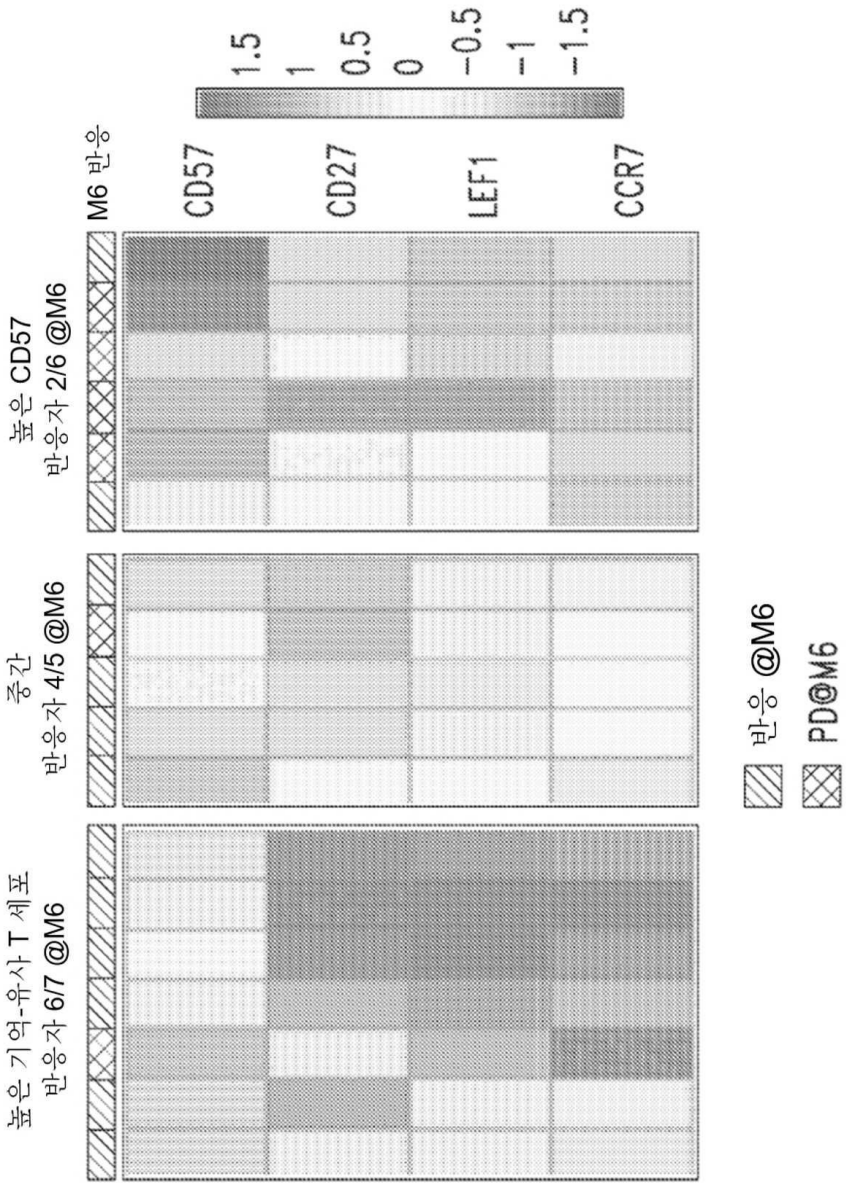
도면12b


스피어만 ρ = −0.56
p = 0.002
순위 = 3/196
LEF1 발현
10.0
9.5
9.0
8.5
1000
10,000
100,000
1,000,000
2 개월차의 Log10 sBCMA

도면13


Irt
장기_반응자
CCR7 발현 CD3
EFI 발현 CD3
CD57 발현 CD3
비율
PBMC
DP
샘플 유형
CCR7 발현 CD3 DP
LEF 발현 CD3 DP
CD57 발현 CD3 DP
CCR7
LEF1
CD57
PEAK.VCNpsi.gag.카피.ug
VCN

도면14



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> bluebird bio, Inc.

Friedman, Kevin

Alonzo, Eric Scott

<120> MANUFACTURING ANTI-BCMA CAR T CELLS

<130> BLUE-118.PC

<150> US 62/830,004

<151> 2019-04-05

<150> US 62/944,485

<151> 2019-12-06

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 493

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - synthesized anti-BMCA CAR

<400> 1

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> 2

<211> 1485

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - synthesized anti-BMCA CAR

<400> 2

atggcactcc ccgtcaccgc ccttctcttg cccctcgccc tgctgctgca tgctgccagg 60

cccgacattg tgctcactca gtcacctccc agcctggcca tgagcctggg aaaaagggcc 120

accatctcct gtagagccag tgagtccgtc acaatcttgg ggagccatct tattcactgg 180

tatcagcaga agcccgggca gcctccaacc cttcttattc agctcgcgtc aaacgtccag 240

acgggtgtac ctgccagatt ttctggtagc gggtcccgca ctgattttac actgaccata 300

gatccagtgg aagaagacga tgtggccgtg tattattgtc tgcagagcag aacgattcct 360

cgcacatttg gtgggggtac taagctggag attaagggaa gcacgtccgg ctcagggaag 420

ccgggctccg gcgagggaag cacgaagggg caaattcagc tggtccagag cggacctgag 480

ctgaaaaaac ccggcgagac tgttaagatc agttgtaaag catctggcta taccttcacc 540

gactacagca taaattgggt gaaacgggcc cctggaaagg gcctcaaatg gatgggttgg 600

atcaataccg aaactaggga gcctgcttat gcatatgact tccgcgggag attcgccttt 660

tcactcgaga catctgcctc tactgcttac ctccaaataa acaacctcaa gtatgaagat 720

acagccactt acttttgcgc cctcgactat agttacgcca tggactactg gggacaggga 780

acctccgtta ccgtcagttc cgcggccgca accacaacac ctgctccaag gccccccaca 840

cccgctccaa ctatagccag ccaaccattg agcctcagac ctgaagcttg caggcccgca 900

gcaggaggcg ccgtccatac gcgaggcctg gacttcgcgt gtgatattta tatttgggcc 960

cctttggccg gaacatgtgg ggtgttgctt ctctcccttg tgatcactct gtattgtaag 1020

cgcgggagaa agaagctcct gtacatcttc aagcagcctt ttatgcgacc tgtgcaaacc 1080

actcaggaag aagatgggtg ttcatgccgc ttccccgagg aggaagaagg agggtgtgaa 1140

ctgagggtga aattttctag aagcgccgat gctcccgcat atcagcaggg tcagaatcag 1200

ctctacaatg aattgaatct cggcaggcga gaagagtacg atgttctgga caagagacgg 1260

ggcagggatc ccgagatggg gggaaagccc cggagaaaaa atcctcagga ggggttgtac 1320

aatgagctgc agaaggacaa gatggctgaa gcctatagcg agatcggaat gaaaggcgaa 1380

agacgcagag gcaaggggca tgacggtctg taccagggtc tctctacagc caccaaggac 1440

acttatgatg cgttgcatat gcaagccttg ccaccccgct aatga 1485