



등록특허 10-2098985



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년04월09일
(11) 등록번호 10-2098985
(24) 등록일자 2020년04월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 19/00 (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01) **C07K 14/725** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) **C12N 15/85** (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)

(52) CPC특허분류
C07K 19/00 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)

(21) 출원번호 **10-2015-7033493**

(22) 출원일자(국제) **2014년05월02일**
 심사청구일자 **2019년04월29일**

(85) 번역문제출일자 **2015년11월24일**

(65) 공개번호 **10-2016-0003071**

(43) 공개일자 **2016년01월08일**

(86) 국제출원번호 **PCT/US2014/036684**

(87) 국제공개번호 **WO 2014/179759**
 국제공개일자 **2014년11월06일**

(30) 우선권주장
 61/819,141 2013년05월03일 미국(US)
 61/876,492 2013년09월11일 미국(US)

(56) 선행기술조사문현

(73) 특허권자
오하이오 스테이트 이노베이션 파운데이션
 미국 오하이오주 43201 컬럼버스 1524 노스 하이
 스트리트

(72) 발명자
유, 지안후아
 미국, 오하이오주 43235, 컬럼버스 돈나헤이 스트
 리트 1295

호프메이스터, 크레이그
 미국, 오하이오주 43221, 컬럼버스 리지뷰 로드
 2213

추, 지안홍
 미국, 오하이오주 43202, 컬럼버스 리버뷰 드라이
 브 684 아파트 117

(74) 대리인
한인열

전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 김지윤

(54) 발명의 명칭 CS1-특이적 키메라 항원 수용체 가공된 면역 작동체 세포

(57) 요약

다발성 골수종 (MM) 세포에서 종양-연관된 항원 (TAA)을 특이적으로 인식할 수 있는 키메라 항원 수용체 (CAR)가 본원에서 개시된다. 이들 CAR을 발현하도록 가공된 면역 작동체 세포, 예를 들면, T 세포 또는 자연 킬러 (NK) 세포 또한 개시된다. 이런 이유로, MM을 앓는 개체에서 항종양 면역성을 제공하는 방법이 또한 개시되고, 상기 방법은 개시된 CAR을 발현하도록 가공된 개시된 면역 작동체 세포의 입양 전달을 수반한다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

C07K 14/7051 (2013.01)

C07K 14/70521 (2013.01)

C07K 16/2803 (2013.01)

C12N 15/85 (2013.01)

C12N 5/0636 (2013.01)

C07K 2317/55 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2319/02 (2013.01)

C07K 2319/03 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

CS1 항원 결합 도메인, 막경유 도메인, 세포내 신호전달 도메인, 그리고 동시자극성 신호전달 영역을 포함하고, 상기 항원 결합 도메인은 CS1에 특이적으로 결합하는 항체의 단일 사슬 가변 단편 (scFv)인 것을 특징으로 하는, 키메라 항원 수용체 (CAR) 폴리펩티드.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 동시자극성 신호전달 영역은 CD28 및 4-1BB으로 구성된 군에서 선택되는 동시자극성 분자의 세포질 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 3

청구항 1에 있어서, CAR 폴리펩티드는 다음 화학식에 의해 규정된 것을 특징으로 하는 폴리펩티드:

SP-CS1-HG-TM-CSR-ISD;

여기서 "SP"는 신호 웨პ티드를 나타내고,

여기서 "CS1"은 CS1 항원 결합 도메인을 나타내고,

여기서 "HG"는 임의선택적 힌지 도메인을 나타내고,

여기서 "TM"은 막경유 도메인을 나타내고,

여기서 "CSR"은 동시자극성 신호전달 영역을 나타내고,

여기서 "ISD"는 세포내 신호전달 도메인을 나타내고, 그리고

여기서 "--"는 이가 링커를 나타낸다.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타 (CD3 ζ) 신호전달 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리펩티드.

청구항 5

청구항 1의 재조합 폴리펩티드를 인코딩하는 단리된 핵산 서열.

청구항 6

청구항 5의 단리된 핵산 서열을 포함하는 벡터.

청구항 7

청구항 6의 벡터를 포함하는 세포.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 세포는 T 세포 및 자연 킬러 (NK) 세포로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 세포.

청구항 9

청구항 4의 키메라 항원 수용체 (CAR) 폴리펩티드를 발현하도록 유전적으로 변형된 다발성 골수종 (MM) 치료 용도의 T 세포 또는 자연 킬러 (NK) 세포.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 세포는 다발성 골수종 (MM)을 앓는 포유동물에서 항종양 면역성을 제공하는, 세포.

청구항 11

청구항 9 또는 10에 있어서, 상기 동시자극성 신호전달 영역은 CD28 및 4-1BB으로 구성된 군에서 선택되는 동시 자극성 분자의 세포질 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 세포.

청구항 12

청구항 9에 있어서, CAR 폴리펩티드는 다음 화학식에 의해 규정된 것을 특징으로 하는 세포:

SP-CS1-HG-TM-CSR-ISD;

여기서 "SP"는 신호 웨პ티드를 나타내고,

여기서 "CS1"은 CS1 항원 결합 도메인을 나타내고,

여기서 "HG"는 임의선택적 힌지 도메인을 나타내고,

여기서 "TM"은 막경유 도메인을 나타내고,

여기서 "CSR"은 동시자극성 신호전달 영역을 나타내고,

여기서 "ISD"는 세포내 신호전달 도메인을 나타내고, 그리고

여기서 "--"는 이가 링커를 나타낸다.

청구항 13

청구항 9에 있어서, CAR은 아미노산 서열 번호:28, 또는 서열 번호:28에 최소한 65% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함하는 세포.

청구항 14

청구항 9에 있어서, CAR은 아미노산 서열 번호:29의 핵산 서열, 또는 서열 번호:29에 최소한 65% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체에 의해 인코딩되는, 세포.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

본 출원은 2013년 5월 3일자 제출된 U.S. 가출원 번호 61/819,141, 그리고 2013년 9월 11일자 제출된 U.S. 가출원 번호 61/876,492에 우선권을 주장하고, 이들은 전체적으로 본원에 참조로서 편입된다.

배경기술

[0003] 배경

다발성 골수종 (MM)은 골수 내에서 형질 세포 (PCs)의 이상 클론 확장에 의해 특징화되는 B-세포 악성인데, 2012년에 미국에서 확인된 MM로부터 21,700건의 새로운 사례 및 10,710명 사망이 추정된다 (Siegel R, et al. Cancer J Clin 2012 62:10-29). 2013년에, 22,350명의 개체가 미국에서 MM로 새로 진단되고, 그리고 10,710명의 사람들이 이것으로 사망하여, 모든 혈액학적 악성으로부터 사망의 20%를 차지할 것으로 추정되었다. 전반적인 생존을 향상시키는 프로테아좀 저해제 및 면역-조정 약물의 이용 (Palumbo A, et al. Leukemia 2009 23:449-456)에도 불구하고, MM은 불치의 악성으로 남아있고 (Podar K, et al. Leukemia 2009 23:10-24), 이에 대한 신규한 치료적 접근법이 시급하게 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 요약

다발성 골수종 (MM) 세포를 표적으로 하고 사멸시키기 위한 입양 세포 전달에서 이용될 수 있는 키메라 항원 수용체 (CAR) 폴리펩티드가 본원에서 개시된다. 세포 표면 당단백질 CS1은 골수종 세포의 표면 상에서 고도로 및 편재성으로 발현되는 반면, 대다수의 면역 작동체 세포에서는 매우 낮은 수준에서 발현된다. 이런 이유로, 개시된 CAR 폴리펩티드는 CS1-발현 MM 세포에 결합할 수 있는 항-CS1 결합 작용제를 엑토도메인 내에 내포한다. 다른 CAR에서처럼, 개시된 폴리펩티드는 또한, 면역 작동체 세포를 활성화할 수 있는 막경유 도메인 및 엔도도메인을 내포할 수 있다. 가령, 엔도도메인은 세포내 신호전달 도메인 및 임의선택적으로, 동시자극성 신호전달 영역을 내포할 수 있다.

항-CS1 결합 작용제는 일부 구체예에서, CS1에 특이적으로 결합하는 항체 단편 또는 항원 결합 단편이다. 가령, 항원 결합 도메인은 CS1에 특이적으로 결합하는 항체의 Fab 또는 단일 사슬 가변 단편 (scFv)일 수 있다. 항-CS1 결합 작용제는 일부 구체예에서, CS1에 특이적으로 결합하는 앱타머이다. 가령, 항-CS1 결합 작용제는 CS1에 결합하는 능력에 기초하여 무작위 서열 풀에서 선택되는 펩티드 앱타머일 수 있다. 항-CS1 결합 작용제는 또한, CS1의 자연 리간드, 또는 CS1에 결합할 수 있는 이의 변이체 및/또는 단편일 수 있다.

일부 구체예에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타 (CD3 ζ) 신호전달 도메인이고, 그리고 동시자극성 신호전달 영역은 CD28, 4-1BB, 또는 이들의 조합의 세포질 도메인을 포함한다. 일부 경우에, 동시자극성 신호전달 영역은 하나 또는 그 이상의 세포내 신호전달 및/또는 동시자극성 분자의 1, 2, 3, 또는 4개 세포질 도메인을 내포한다.

개시된 CAR 폴리펩티드를 인코딩하는 단리된 핵산 서열, 이를 단리된 핵산을 포함하는 벡터, 그리고 이를 벡터를 내포하는 세포가 또한 개시된다. 가령, 세포는 T 세포, 자연 킬러 (NK) 세포, 세포독성 T 럼프구 (CTL), 그리고 조절 T 세포로 구성된 군에서 선택되는 면역 작동체 세포일 수 있다. 일부 구체예에서, 상기 세포는 CAR의 항원 결합 도메인이 CS1에 결합할 때 항종양 면역성을 전시한다.

다발성 골수종 (MM)을 앓는 개체에서 항종양 면역성을 제공하는 방법이 또한 개시되고, 상기 방법은 개시된 CS1-특이적 CAR로 유전적으로 변형된 면역 작동체 세포의 효과량을 개체에 투여하는 것을 수반한다.

본 발명의 하나 또는 그 이상의 구체예의 세부사항은 첨부한 도면 및 하기 설명에서 제시된다. 본 발명의 다른 특징, 목적, 그리고 이점은 설명 및 도면으로부터, 그리고 청구항으로부터 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도면의 간단한 설명

도면 1a 내지 1c는 CAR-형질도입된 T 세포에서 CS1-특이적 CAR의 산출 및 이의 발현을 보여준다. 도면 1a는 CD28과 CD3ζ 엔도도메인에 연결된 CS1에 대한 scFv를 내포하는 Pinco-CS1-CAR 레트로바이러스 구조체의 계통도이다. LTR, 긴 말단 반복; SP, 신호 웨티드; VH, 가변적 H 사슬; L, 링커; VL, 가변적 L 사슬. 도면 1b에서, PBMC (말초혈 단핵 세포)는 CD3과 CD28 비드로 활성화되고, 그리고 Pinco-CS1-CAR 또는 Pinco 구조체로 형질도입되었다. GFP-양성 세포는 분류되고, 그리고 세포 용해물은 항인간 CD3ζ 일차 항체로 환원 조건 하에 면역불로 분석에 종속되었다. 도면 1c에서, 건강한 공여자로부터 모의1- 또는 CS1-CAR1-형질도입된 T 세포는 비오틴-표지화된 염소 항생쥐 Fab-특이적 또는 아이소타입-정합된 대조 항체로 염색되고, 그 이후에 스트렙타비딘과 CD3 항체 염색이 수행되었다.

도면 2a 내지 2c는 CS1-전향된 T 세포가 CS1-발현 골수종 세포주에 대한 응답으로 모의 T 세포보다 더욱 많은 IFN-γ과 IL-2를 분비한다는 것을 보여준다. 도면 2a는 골수종 세포주의 표면 상에서 CS1 발현의 유세포 계측 분석을 보여준다. 지시된 이들 4가지 골수종 세포주는 PE-접합된 항-CS1 mAb 항체 (실선) 또는 아이소타입-정합된 대조 항체 (점선)로 염색되었다. 도면 2b와 2c는 단독으로 (표적 없음) 배양되거나 또는 상이한 수준의 CS1을 발현하는 동등한 숫자의 골수종 세포로 24 시간 동안 자극된 모의- 또는 CS1-CAR-형질도입된 건강한 공여자 T 세포 (2×10^5)에서 IFN-γ (도면 2b, ng/ml)과 IL-2 (도면 2c, pg/ml) 분비를 보여주는 막대 그래프이다.

도면 3a 내지 3d는 CS1-전향된 T 세포가 CS1 단백질을 명백히 발현하는 골수종 세포를 우선적으로 근절한다는 것을 보여준다. 도면 3a에서, ^{51}Cr -표지화된 NCI-H929, IM9, MM.1S, 그리고 RPMI-8226 골수종 세포 (5×10^3)는 지정된 E/T 비율에서 4 시간 동안 모의- 또는 CS1-CAR-형질도입된 T 세포와 공동배양되고, 그리고 표적 용해 (^{51}Cr 방출)가 계측되었다. 도면 3b에서, 모의- 또는 CS1-CAR 형질도입된 T 세포 상에서 탈파립 마커 CD107a와 T-세포 활성화 마커 CD69의 발현이 NCI-H929 세포와 4 시간 공동배양 이후에 유세포분석법에 의해 평가되었다. 모의-형질도입된 T 세포와 비교하여, CS1-CAR-형질도입된 T 세포는 CS1-발현 NCI-H929 세포에 대한 응답으로, 우수한 탈파립과 더욱 높은 T-세포 활성화를 전시하였다. 도면 3c에서, 모의-와 CS1-CAR-형질도입된 T 세포는 그랜자임 B와 퍼포린에 특이적인 mAb로 세포내 염색을 위해 투파화되고, 그리고 유세포분석법에 의해 분석되었다.

도면 4a 내지 4d는 MM 세포에서 CS1의 이소성 과다발현이 CS1-CAR T 세포에 의한 인식 후 증강된 세포독성과 사이토킨 분비를 촉발한다는 것을 보여준다. 도면 4a는 CS1 (RPMI-8226-CS1, 고형 굽은 선) 또는 빈 벡터 대조 (RPMI-8226-PCDH, 고형 가는 선)를 과다발현하는 RPMI-8226 세포의 표면 상에서 CS1 단백질 또는 IgG 아이소타입 대조 (점선)에 대한 유세포 계측 염색을 보여준다. 도면 4b는 RPMI-8226-CS1과 RPMI-8226-PCDH 세포에 대하여 모의- 또는 CS1-CAR-형질도입된 T 세포의 세포독성을 보여주는 그래프이다. RPMI-8226-CS1과 RPMI-8226-PCDH 세포는 지시된 E/T 비율에서 4 시간 동안 모의- 또는 CS1-CAR-형질도입된 T 세포와 함께 배양되었고, 그리고 특정한 용해가 표준 ^{51}Cr 방출 검정을 이용하여 결정되었다. 도면 4c와 4d는 단독으로 배양된 또는 동등한 숫자의 RPMI-8226-CS1 또는 RPMI-8226-PCDH 세포로 자극된 모의- 또는 CS1-CAR-형질도입된 T 세포 (1×10^5)에서 IFN-γ (도면 4c, pg/ml)과 IL-2 (도면 4d, pg/ml) 분비를 보여주는 막대 그래프이다.

도면 5a 내지 5d는 CS1-CAR T 세포가 CS1-발현 인간 원발성 골수종 세포를 탈체에서 특이적으로 인식하고 제거한다는 것을 보여준다. 도면 5a는 항-CD3과 항-CD28 비드로 활성화되고, Pinco-CS1-CAR 또는 Pinco 구조체 (모의)로 형질도입되고, 그리고 항생쥐 Fab와 항인간 CD3 항체로 염색된, MM을 앓는 환자로부터 PBMC의 유세포 계측 결과를 보여준다. 유사한 데이터를 갖는 4명 환자 중에서 1명의 결과가 도시된다. 도면 5b는 MM을 앓는 환자로부터 새로 단리된 CD138⁺ 골수종 세포에서 CS1 단백질에 대한 유세포 계측 염색을 보여준다. 유사한 데이터를 갖는 10명 환자 중에서 3명으로부터 결과가 도시된다. 도면 5c는 지시된 E/T 비율에서 4 시간 동안 (A)에서 자가 모의- 또는 CS1-CAR-형질도입된 T 세포와 공동배양된 (B)에서 CD138⁺ 골수종 세포의 특정한 용해 (^{51}Cr 방출 검정)를 보여주는 일련의 그래프이다. 도면 5d는 E/T 비율이 1:1이고 배양 시간이 24 시간으로 연장되었다는 점을 제외하고, (C)에서처럼 처리된 세포에 의한 IFN-γ 분비 (pg/ml)를 보여주는 막대 그래프이다.

도면 6a와 6b는 CS1-전향된 T 세포가 정위 MM.1S 이종이식편 생쥐 모델에서 종양 성장을 저해하고 생쥐 생존을 연장한다는 것을 보여준다. 도면 6a는 각 지시된 군으로부터 MM.1S 종양을 보유하는 5마리의 대표적인 생쥐의 일련의 등면과 복면 생물발광 이미지이다. NSG 생쥐는 루시페라아제를 발현하는 8×10^6 MM.1S 세포로 정맥내 접종되었다 (0 일자). 접종 후 7 일자와 14 일자에, 각 생쥐는 PBS (위약 대조군), 10×10^6 모의 T 세포 (모의

대조군) 또는 CS1-CAR T 세포 (CAR 처리군)를 투여 받았다. 도면 6b는 PBS, 모의 T 세포, 또는 CS1-CAR T 세포로 처리된 MM.1S 보유 생쥐의 카플란 마이어 생존 곡선을 보여준다.

도면 7a 내지 7e는 CS1을 발현하는 293T 형질전환된 세포가 CS1-CAR T 세포에 의한 인식과 용해에 감수성이었다는 것을 보여준다. 도면 7a는 293T 부모 세포가 CS1 발현에 대해 음성이었다는 것을 보여준다. 293T 세포는 PE-접합된 항-CS1 mAb 항체 (실선) 또는 아이소타입-정합된 대조 Ab (점선)로 염색되고 유세포분석법에 의해 분석되었다. 도면 7b는 CS1 (293T-CS1, 어두운 고형 굵은 선) 또는 빈 벡터 (293T-PCDH, 회색 고형 굵은 선)을 과다발현하는 293T 세포의 표면 상에서 CS1 단백질에 대한 유세포 계측 염색을 보여준다. IgG 아이소타입으로 염색된 CS1을 발현하는 293T 세포 (점선)는 비특이적 결합 대조로서 역할하였다. 도면 7c는 293T-CS1과 293T-PCDH 세포에 대한 모의- 또는 CS1-CAR-형질도입된 T 세포의 세포독성을 보여준다. 293T-CS1과 293T-PCDH 세포는 지시된 E/T 비율에서 4 시간 동안 모의- 또는 CS1-CAR-형질도입된 T 세포와 함께 배양되었고, 그리고 특정한 용해가 표준 ^{51}Cr 방출 검정을 이용하여 결정되었다. 도면 7d와 7e는 단독으로 배양된 또는 293T-CS1 또는 293T-PCDH 세포로 자극된 모의- 또는 CS1-CAR-형질도입된 T 세포에 의한 IFN- γ 분비 (도면 7d, pg/ml) 또는 IL-2 분비 (도면 7e, pg/ml)를 보여주는 막대 그래프이다.

도면 8a와 8b는 CD4 $^+$ 와 CD8 $^+$ CS1-CAR T 세포 둘 모두 골수종 세포에 대한 응답으로 활성화되었다는 것을 보여준다. 도면 8a에서, 모의- 또는 CS1-CAR-형질도입된 T 세포는 단독으로 배양되거나 또는 NCI-H929와 MM.1S 세포로 12 시간 동안 자극되고, 이후 CD3과 CD8의 표면 발현뿐만 아니라 세포내 IFN- γ 가 유세포분석법에 의해 평가되었다. 이들 플롯은 CD3+ 럼프구에서 게이팅되었다. 유사한 결과를 갖는 3가지 실험 중에서 한 가지 대표적인 실험이 도시된다. 도면 8b에서, 모의- 또는 CS1-CAR-형질도입된 T 세포는 단독으로 배양되거나 또는 NCI-H929와 MM.1S 세포로 4 시간 동안 자극되고, 그리고 CD3, CD8과 탈파립 마커 CD107a의 발현이 유세포분석법에 의해 평가되었다. 이들 플롯은 살아있는 CD3 $^+$ 럼프구에서 게이팅되었다. 유사한 결과를 갖는 3가지 실험 중에서 한 가지 대표적인 실험이 도시된다.

도면 9a와 9b는 CS1-전향된 T 세포가 정위 IM-9 이종이식편 생쥐 모델에서 종양 성장을 저해하고 생쥐 생존을 연장한다는 것을 보여준다. 도면 9a는 각 지시된 군으로부터 IM9 종양을 보유하는 5마리의 대표적인 생쥐의 등면과 복면 생물발광 이미지를 보여준다. NSG 생쥐는 루시페라아제를 발현하는 5×10^5 IM9로 i.v. 접종되었다 (0 일자). 접종 후 7 일자와 21 일자에, 각 생쥐는 PBS (위약 대조군), 10×10^6 모의 T 세포 (모의 대조군) 또는 CS1-CAR T 세포 (CAR 처리군)를 투여 받았다. 백색 십자가 "+"는 영상의 시점에서 PBS-처리군에서 MM 질환으로 죽은 생쥐를 나타낸다. 도면 9b는 PBS, 모의 T 세포, 또는 CS1-CAR T 세포로 처리된 IM9-보유 생쥐의 카플란 마이어 생존 곡선이다.

도면 10a 내지 10c는 CS1-CAR T 세포가 MM.1S 세포-합체된 NSG 생쥐의 골수 (BM)에서 존속하고 증식하였다는 것을 보여준다. NSG 생쥐는 0 일자에 8×10^6 MM.1S 세포로 접종되었고, 그리고 7 일자에, 생쥐는 10×10^6 CS1-CAR T 세포로 처리되었다. 20 일자에, 생쥐는 DPBS 용액에서 1.5 mg Brdu로 i.p. 주사되었다. 생쥐는 그 다음날 희생되었고, 그리고 BM 세포가 제조업체의 프로토콜에 따라서, CD45와 CD3 인간-특이적 항체 및/또는 항-BrdU 항체 (BD Biosciences)로 표면 염색을 위해 단리되었다. 도면 10a는 대표적인 생쥐의 BM에서 인간 T 세포 (CD45 $^+$ /CD3 $^+$)의 백분율을 보여준다. 도면 10b에서, 게이팅된 인간 T 세포 (CD45 $^+$ /CD3 $^+$)는 CAR 발현을 실증하기 위해, IgG (왼쪽 패널) 또는 항-Fab Ab (오른쪽 패널)로 염색되었다. 도면 10c에서, 게이팅된 인간 T 세포 (CD45 $^+$ /CD3 $^+$)는 IgG (왼쪽 패널) 또는 항-BrdU Ab로 염색되었고, 그리고 Brdu-통합된 T 세포의 백분율이 전시된다.

도면 11a 내지 11c는 CS1-CAR T 세포가 일차성 NK와 T 세포에 대한 낮은 수준의 반응성을 전시하였다는 것을 보여준다. ^{51}Cr -표지화된 인간 일차성 NK와 T 세포 (5×10^3)는 지정된 작동체/표적 (E/T) 비율에서 4 시간 동안 모의- 또는 CS1-CAR-형질도입된 T 세포와 공동배양되었고, 그리고 NK 세포 (도면 11a)와 T 세포 (도면 11b)의 표적 용해 (^{51}Cr 방출)가 계측되었다. 도면 11c는 단독으로 배양된 또는 일차성 NK 세포, T 세포 또는 골수종 세포로 24 시간 동안 자극된 모의- 또는 CS1-CAR-형질도입된 T 세포에 의한 IFN- γ 분비를 보여주는 막대 그래프이다.

도면 12는 일차성 NK 세포 또는 T 세포가 CS1-CAR T 세포에서 명백한 활성화 유도된 세포 사멸 (AICD)을 촉발

하지 않았다는 것을 보여준다. 일차성 NK 세포와 T 세포는 동등한 숫자의 ^{51}Cr -표지화된 모의- 또는 CS1-CAR-형 질도입된 T 세포와 함께 12 시간 동안 배양되었다. 특정한 용해가 이후, ^{51}Cr 방출 검정을 이용하여 결정되었다.

도면 13a 내지 13c는 CAR-형질도입된 NK 세포에서 CS1-특이적 CAR의 산출 및 이의 발현을 보여준다. 도면 13a는 CS1-CAR 렌티바이러스 구조체의 계통적 표시이다. 도면 13b는 CD3 ζ -특이적 Ab를 이용한, CS1-CAR 발현의 웨스턴 블로팅 분석을 보여준다. 도시된 데이터는 유사한 결과를 갖는 3가지 실험을 대표한다. 도면 13c는 세포가 항-myc 항체 또는 IgG1 아이소타입 대조로 염색된 후, 유세포분석법에 의해 분석된, CS1-CAR 구조체 또는 빈 벡터 (EV)로 형질도입된 FACS-분류된 NK-92와 NKL 세포의 표면 상에서 키메라 CS1 scFv의 발현을 보여준다. 도시된 데이터는 유사한 결과를 갖는 3가지 실험을 대표한다.

도면 14a 내지 14d는 CS1-CAR NK 세포가 CS1 $^+$ MM 세포를 균질하지만 CS1 $^-$ MM 세포를 균질하지는 못한다는 것을 보여준다. 도면 14a는 세포가 항-CS1 mAb 또는 아이소타입-정합된 대조 항체로 염색된 후, 유세포분석법에 의한 L363, IM9와 U266 MM 세포주의 표면 상에서 CS1 발현의 결정을 보여준다. 도면 14b 내지 13d는 표준 ^{51}Cr 방출 검정을 이용하여, IM9 (도면 14b), L363 (도면 14c) 및 U266 (도면 13d) 세포에 대한 모의-형질도입된 또는 CS1-CAR-형질도입된 NK-92 또는 NKL 세포의 세포독성을 활성을 보여준다. NK-92-EV와 NKL-EV는 각각, 빈 벡터 (EV) 대조-형질도입된 NK-92와 NKL 세포를 지시한다. NK-92-CS1-CAR과 NKL-CS1-CAR은 각각, CS1-CAR 구조체로 NK-92와 NKL 세포의 형질도입을 지시한다. *와 **는 각각, P<0.05와 P<0.01을 지시한다.

도면 15a 내지 15c는 CS1 $^+$ MM 세포의 인식이 대조 NK 세포보다 CS1-CAR NK 세포로부터 더욱 강한 반응을 유도한다는 것을 보여준다. 도면 15a 내지 15c는 동등한 숫자의 IM9 (도면 15a), L363 (도면 15b) 또는 U266 (도면 15c) 골수종 세포와 24 시간 동안 공동배양된 모의-형질도입된 또는 CS1-CAR 형질도입된 NK-92 또는 NKL 작동체 세포에 의한 IFN- γ 분비를 보여주는 막대 그래프이다. NK-92-EV와 NKL-EV는 각각, 빈 벡터 (EV) 대조-형질도입된 NK-92와 NKL 세포를 지시한다. NK-92-CS1-CAR과 NKL-CS1-CAR은 각각, CS1-CAR 구조체로 NK-92와 NKL 세포의 형질도입을 지시한다.

도면 16a 내지 16c는 NK-92-CS1-CAR 세포의 증강된 표적 인식이 MM 세포 상에서 CS1의 발현에 의존한다는 것을 보여준다. 도면 16a는 CS1 (U266-CS1, 고형 굵은 선) 또는 빈 벡터 대조 (U266-벡터, 고형 가는 선)를 과다발현하는 U266 세포의 표면 상에서 CS1 단백질 또는 IgG 대조 (점선)에 대한 유세포 계측 염색을 보여준다. 도면 16b는 U266-벡터와 U266-CS1 세포에 대한 모의- 또는 CS1-CAR-형질도입된 NK-92 세포 (각각, NK-92-EV와 NK-92-CS1-CAR)의 세포독성을 보여준다. U266-벡터 또는 U266-CS1 세포는 상이한 작동체/표적 (E/T) 비율에서 4 시간 동안 NK-92-CS1-CAR 또는 NK-92-EV 세포와 함께 배양되었다. 특정한 용해가 표준 ^{51}Cr 방출 검정을 이용하여 결정되었다. *는 P<0.05를 지시한다. (c) NK-92-CS1-CAR 또는 NK-92-EV 세포는 동등한 숫자의 U266-벡터 또는 U266-CS1 골수종 세포와 24 시간 동안 공동배양되었다. 상층액은 이후, ELISA를 이용한 IFN- γ 분비의 계측을 위해 수확되었다.

도면 17a 내지 17c는 CS1-CAR 변형된 NK 세포의 표현형 특성화를 보여준다. 도면 17a에서, 모의- 또는 CS1-CAR-형질도입된 NK-92 세포 (각각, NK-92-EV와 NK-92-CS1-CAR)는 단독으로 배양되거나, 또는 IM9 MM 세포와 함께 4 시간 동안 배양되었다. NKP30, NKP46, NKG2C, NKG2D, CD69와 HLA-DR의 표면 발현은 상응하는 mAb로 염색 이후에 유세포분석법에 의해 사정되었고, 그리고 평균 형광 강도 (MFI)가 기록되었다. *는 P<0.05를 지시한다. 도면 17b에서, NK-92-EV와 NK-92-CS1-CAR 세포는 퍼포린 또는 그랜자임 B에 특이적인 mAb로 세포내 염색을 위해 투파화되고, 그리고 유세포분석법에 의해 분석되었다. 과선은 NK-92-EV 대조 세포를 대조 IgG 항체로 염색하는 것을 나타내고, 고형 굵은 선은 NK-92-CS1-CAR 세포를 퍼포린 또는 그랜자임 B 항체로 염색하는 것을 표시하고, 그리고 고형 가는 선은 NK-92-EV 대조 세포를 퍼포린 또는 그랜자임 B 항체로 염색하는 것을 표시한다. 도면 17c는 도면 17b에서 도시된 히스토그램에 대한 MFI를 보여준다. *는 P<0.05를 지시한다.

도면 18a 내지 18c는 CS1-CAR-형질도입된 NK-92 세포가 원발성 인간 골수종 세포의 사멸을 증강한다는 것을 보여준다. 도면 18a는 CS1 단백질 또는 IgG 아이소타입 대조에 대한 유세포 계측 염색을 보여주고, CD138 $^+$ 원발성 골수종 세포가 CS1을 고도로 발현한다는 것을 증명한다. 속이 빈 히스토그램과 속이 채워진 히스토그램은 각각, 아이소타입-정합된 대조 항체 및 항-CS1 항체로 염색을 나타낸다. 도시된 데이터는 유사한 결과를 갖는 6개 환자 표본 중에서 2개를 나타낸다. 도면 18b는 표준 ^{51}Cr 방출 검정을 이용하여, 유사한 결과를 갖는 6명 환자 중

에서 3명으로부터 CD138⁺ 원발성 골수종 세포에 대한 모의- 또는 CS1-CAR-형질도입된 NK-92 세포 (각각, NK-92-EV 및 NK-92-CS1-CAR)의 세포독성 활성을 보여준다. E/T는 작동체 세포/표적 세포 비율을 지시한다. *는 P<0.05를 지시한다. 도면 18c는 5:1의 E/T 비율에서 24 시간 동안 NK-92-EV 또는 NK-92-CS1-CAR 세포와 공동배양된 CD138⁺ 원발성 골수종 세포에 의한 IFN-γ 분비를 보여준다. 도시된 데이터는 유사한 결과를 갖는 3개 환자 표본 중에서 1개를 나타낸다.

도면 19a 내지 19d는 CS1-CAR NK 세포가 정위 인간 MM 세포의 생체내 성장을 억제하고 MM-보유 생쥐의 생존을 연장한다는 것을 보여준다. 도면 19a (왼쪽)는 IM9 세포로 i.v. 주사된 후, 뒷다리 마비를 전시하는 1마리 대표적인 생쥐의 요추 뼈 병변에서, 혜마톡실린-에오신 (H&E) 염색에 의해 검출된, 인간 IM9 세포의 대량 침윤을 보여주는 이미지이다. 도면 19a (오른쪽)는 항인간 CD138 mAb로 생쥐 요추 뼈 병변의 면역조직화학 염색을 보여준다. 도면 19b는 IM9 종양을 보유하는 생쥐의 등면 생물발광 영상을 보여준다. NSG 생쥐는 꼬리 정맥 주사를 통해 5×10^5 루시페라아제-발현 IM9 세포로 접종되었다 (0 일자). 접종 후 7 일에, 생쥐는 모의-형질도입된 NK-92 세포 (NK-92-EV), CS1-CAR 형질도입된 NK-92 세포 (NK-92-CS1-CAR) 또는 인산염 완충된 식염수 (음성 대조)로 처리되었다. 도면 19c는 도면 19b로부터 생쥐마다 초당 광양자의 단위의 정량 요약을 보여주는 막대 그래프이다. *는 P<0.05를 지시한다; **는 P<0.01을 지시한다. 도면 19d는 NK-92-EV 세포로 처리된 생쥐와 비교하여 NK-92-CS1-CAR 세포로 처리된 IM9-보유 생쥐의 카플란 마이어 생존 곡선을 보여준다. *는 P<0.05를 지시한다.

도면 20은 CS1 CAR의 도입이 NK 세포주에서 실제적인 아폽토시스를 야기하지 않는다는 것을 보여준다. 모의- 또는 CS1-CAR-형질도입된 NK92 또는 NKL 세포는 7AAD와 아넥신 V-V450으로 염색되고, 그 이후에 유세포 계측 분석이 수행되었다. NK-92-EV와 NKL-EV는 각각, 빈 백터 (EV) 대조-형질도입된 NK-92와 NKL 세포를 지시한다. NK-92-CS1-CAR과 NKL-CS1-CAR은 각각, CS1-CAR 구조체로 NK-92와 NKL 세포의 형질도입을 지시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013]

상세한 설명

[0014]

다발성 골수종 (MM) 세포에서 종양-연관된 항원 (TAA)을 특이적으로 인식할 수 있는 키메라 항원 수용체 (CAR)가 본원에서 개시된다. 이들 CAR을 발현하도록 가공된 면역 작동체 세포, 예를 들면, T 세포 또는 자연 킬러 (NK) 세포 또한 개시된다. 이런 이유로, MM을 앓는 개체에서 항종양 면역성을 제공하기 위한 방법이 또한 개시되고, 상기 방법은 개시된 CS1-특이적 CAR을 발현하도록 가공된 개시된 면역 작동체 세포의 입양 전달을 수반한다.

[0015]

CS1-특이적 키메라 항원 수용체 (CAR)

[0016]

CAR은 일반적으로, 램프구 활성화에 관련된 막경유 신호전달 모티프를 갖는 단일클론 항체 (mAb)의 단일 사슬 가변 단편 (scFv)으로부터 항원 인식 도메인을 함입한다 (Sadelain M, et al. Nat Rev Cancer 2003 3:35-45). 세포 표면 당단백질 CS1은 골수종 세포의 표면 상에서 고도로 및 편재성으로 발현된다 (Hsi ED, et al. Clin Cancer Res 2008 14:2775-84). CS1은 자연 킬러 (NK) 세포, T 세포의 일부 부분집합, 그리고 정상적인 B 세포를 비롯한 대다수의 면역 작동체 세포에서 매우 낮은 수준으로 발현되고, 그리고 골수 세포에서 거의 검출되지 않는다 (Hsi ED, et al. Clin Cancer Res 2008 14:2775-84). 특히, CS1은 인간 조혈 줄기 세포에서 무시될 정도로 발현되는데 (Hsi ED, et al. Clin Cancer Res 2008 14:2775-84), 이것은 MM을 비롯한 혈액학적 악성을 치료하기 위한 줄기 세포 이식에 이용될 수 있다. MM에서 CS1의 기능은 여전히 불충분하게 이해된 채로 남아있고, 그리고 CS1은 골수종 세포 부착, 클론원성 성장, 그리고 종양형성에서 일정한 역할을 수행할 수 있는 것으로 방증되었다 (Benson DM Jr, et al. J Clin Oncol 2012 30:2013-5; Tai YT, et al. Blood 2009 113:4309-18). CS1을 인간화 mAb 엘로투주맙으로 표적화하는 것은 임상에서 안전한 것으로 증명되었다 (Benson DM Jr, et al. J Clin Oncol 2012 30:2013-5; Tai YT, et al. Blood 2009 113:4309-18). 전임상 연구는 이러한 항체가 골수 간질 세포에 골수종 세포 부착을 저해하고, NK 세포-매개된 항체-의존성 세포 세포독성을 유도하고, 그리고 면역결핍 생쥐에서 인간 골수종 세포에 의해 시작된 이종이식편 종양을 근절한다는 것을 보여준다 (Benson DM Jr, et al. J Clin Oncol 2012 30:2013-5; Tai YT, et al. Blood 2009 113:4309-18; Tai YT, et al. Blood 2008 112:1329-37). 이런 이유로, 인간 다발성 골수종에 대항하여 항종양 활성을 증강하기 위해 면역 작동체 세포에서 발현될 수 있는 CS1-특이적 키메라 항원 수용체 (CAR)가 본원에서 개시된다.

[0017]

개시된 CAR은 일반적으로, 3가지 도메인으로 구성된다: 엑토도메인, 막경유 도메인, 그리고 엔도도메인. 엑토도

메인은 CS1-결합 영역을 포함하고 항원 인식을 책임진다. 또한, 이것은 일반적으로, CAR이 면역 작동체 세포의 세포막에서 당화되고 고정될 수 있도록 신호 웨티드 (SP)를 내포한다. 막경유 도메인 (TD)은 그 명칭에서 암시하는 바와 같이, 엑토도메인을 엔도도메인에 연결하고, 그리고 세포에 의해 발현될 때 세포막 내에 체류한다. 엔도도메인은 항원 인식 후, 활성화 신호를 면역 작동체 세포에 전파하는 CAR의 업무 단부이다. 가령, 엔도도메인은 세포내 신호전달 도메인 (ISD) 및 임의선택적으로, 동시자극성 신호전달 영역 (CSR)을 내포할 수 있다.

[0018] 일부 구체예에서, 개시된 CAR은 하기 화학식에 의해 규정된다:

SP-CS1-HG-TM-CSR-ISD; 또는

SP-CS1- HG-TM-ISD-CSR

[0021] 여기서 "SP"는 신호 웨티드를 나타내고,

[0022] 여기서 "CS1"은 CS1-결합 영역을 나타내고,

[0023] 여기서 "HG"는 임의선택적 힌지 도메인을 나타내고,

[0024] 여기서 "TM"은 막경유 도메인을 나타내고,

[0025] 여기서 "CSR"은 동시자극성 신호전달 영역을 나타내고,

[0026] 여기서 "ISD"는 세포내 신호전달 도메인을 나타내고, 그리고

[0027] 여기서 "--"는 이가 링커를 나타낸다.

[0028] 개시된 CAR의 항원 인식 도메인은 통상적으로 scFv이다. 하지만 많은 대안이 있다. 선천적 T 세포 수용체 (TCR) 알파와 베타 단일 사슬로부터 항원 인식 도메인은 단순한 엑토도메인 (가령, HIV 감염된 세포를 인식하는 CD4 엑토도메인) 및 더욱 이질적 인식 성분, 예를 들면, 연결된 사이토킨 (이것은 사이토킨 수용체를 보유하는 세포의 인식을 야기한다)을 갖는 것으로 설명되었다. 실제로, 소정의 표적에 높은 친화성으로 결합하는 거의 모든 것이 항원 인식 영역으로서 이용될 수 있다.

[0029] 엔도도메인은 항원 인식 (즉, CS1) 후, 신호를 면역 작동체 세포에 전파하고, 면역 작동체 세포의 정상적인 작동체 기능 중에서 최소한 한 가지를 활성화하는 CAR의 업무 단부이다. T 세포의 작동체 기능은 예로서, 세포용 해 활성 또는 사이토킨의 분비를 비롯한 보조 활성일 수 있다. 이런 이유로, 엔도도메인은 T 세포 수용체 (TCR) 및 임의선택적 공동수용체의 "세포내 신호전달 도메인"을 포함할 수 있다. 통상적으로 전체 세포내 신호전달 도메인이 이용될 수 있긴 하지만, 많은 경우에 전체 사슬을 이용하는 것이 필요하지 않다. 세포내 신호전달 도메인의 절두된 부분이 이용되는 정도까지, 이런 절두된 부분은 작동체 기능 신호를 전달하기만 하면, 본래 사슬 대신에 이용될 수 있다.

[0030] 자극성 방식에서 행동하는 TCR 복합체의 일차성 활성화를 조절하는 세포질 신호전달 서열은 면역수용체 티로신-기초된 활성화 모티프 (ITAMs)로서 알려져 있는 신호전달 모티프를 내포할 수 있다. 세포질 신호전달 서열을 내포하는 ITAM의 실례는 TCR 제타, FcR 감마, FcR 베타, CD3 감마, CD3 텔타, CD3 엡실론, CD5, CD22, CD79a, CD79b, 그리고 CD66d로부터 유래된 것들을 포함한다. 하지만, 바람직한 구체예에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 제타 (CD3 ζ)로부터 유래된다.

[0031] T 세포 수용체 T3 제타 사슬 또는 CD247 (분화 무리 247)로서 또한 알려져 있는 T-세포 표면 당단백질 CD3 제타 (CD3 ζ) 사슬은 인간에서 CD247 유전자에 의해 인코딩되는 단백질이다.

[0032] 1-세대 CAR은 전형적으로, CD3 ζ 사슬로부터 세포내 도메인을 가졌는데, 이것은 내인성 TCR로부터 신호의 일차성 전달물질이다. 2-세대 CAR은 추가 신호를 T 세포에 제공하기 위해, 다양한 동시자극성 단백질 수용체 (가령, CD28, 41BB, ICOS)로부터 세포내 신호전달 도메인을 CAR의 엔도도메인에 추가한다. 전임상 연구는 2 세대의 CAR 설계가 T 세포의 항종양 활성을 향상시킨다는 것을 지시하였다. 더욱 최근에, 3-세대 CAR은 효능을 더욱 증대하기 위해 복수 신호전달 도메인을 합동한다. 이를 CAR과 합체된 T 세포는 동시자극성 수용체/리간드 상호작용과는 관계없이, 향상된 화장, 활성화, 존속, 그리고 종양-근절 효율을 증명하였다 (Imai C, et al. Leukemia 2004 18:676-84; Maher J, et al. Nat Biotechnol 2002 20:70-5).

[0033] 가령, CAR의 엔도도메인은 CD3 ζ 신호전달 도메인을 그것만으로 또는 본 발명의 CAR의 배경에서 유용한 임의의 다른 원하는 세포질 도메인(들)과 합동으로 포함하도록 설계될 수 있다. 가령, CAR의 세포질 도메인은 CD3 제타 사슬 부분 및 동시자극성 신호전달 영역을 포함할 수 있다. 동시자극성 신호전달 영역은 동시자극성 분자의 세

포내 도메인을 포함하는 CAR의 부분을 지칭한다. 동시자극성 분자는 항원에 대한 램프구의 효율적인 반응을 위해 필요한 항원 수용체 또는 이들의 리간드 이외의 세포 표면 분자이다. 이런 분자의 실례는 CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, ICOS, 램프구 기능-연관된 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 그리고 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드 등을 포함한다. 따라서, CAR이 동시자극성 신호전달 원소로서 CD28로 일차적으로 예시되긴 하지만, 다른 동시자극성 원소가 단독으로 또는 다른 동시자극성 신호전달 원소와 협동으로 이용될 수 있다.

[0034] 일부 구체예에서, CAR은 헌지 서열을 포함한다. 헌지 서열은 항체 유연성을 조장하는 아미노산의 짧은 서열이다 (가령, Woof et al., Nat. Rev. Immunol., 4(2): 89-99 (2004)를 참조한다). 헌지 서열은 항원 인식 모이어티 (가령, 항- CS1 scFv) 및 막경유 도메인 사이에 배치될 수 있다. 헌지 서열은 임의의 적절한 분자로부터 유래되거나 또는 획득된 임의의 적절한 서열일 수 있다. 일부 구체예에서, 예로서, 헌지 서열은 CD8a 분자 또는 CD28 분자로부터 유래된다.

[0035] 막경유 도메인은 자연 또는 합성 공급원으로부터 유래될 수 있다. 공급원이 자연인 경우에, 도메인은 임의의 막-결합된 또는 막경유 단백질로부터 유래될 수 있다. 가령, 막경유 영역은 T 세포 수용체, CD28, CD3 엠실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, 또는 CD154의 알파, 베타 또는 제타 사슬로부터 유래될 수 있다 (즉, 이것의 최소한 막경유 영역(들)을 포함한다). 대안으로, 막경유 도메인은 합성일 수 있는데, 이러한 경우에 막경유 도메인은 두드러지게 소수성 잔기, 예를 들면, 류신과 발린을 포함할 것이다. 일부 경우에, 페닐알라닌, 트립토판과 발린의 삼중향이 합성 막경유 도메인의 각 단부에서 발견될 것이다. 짧은 올리고- 또는 폴리펩티드 링커, 예를 들면, 길이에서 2 내지 10개 아미노산 사이에 링커는 CAR의 막경유 도메인과 내형질 도메인 사이에 연쇄를 형성할 수 있다.

[0036] 이가 링커는 화합물 또는 핵산을 폴리뉴클레오티드 서열에 연결하는데 적합한 임의의 분자일 수 있다. 생체분자, 예를 들면, 폴리뉴클레오티드를 접합하기 위한 방법과 조성물은 G.T. Hermanon, Bioconjugate Techniques (2nd ed.), Academic Press (2008)에서 개시되고, 이것은 이들 기술의 교시를 위해 전체적으로 참조로서 편입된다. 일부 경우에, 이가 링커는 하나 또는 그 이상의 아미노산을 포함한다. 하지만, 이것은 또한, 개시된 도메인들을 직접적으로 연결하는 웹티드 결합을 포함할 수 있다.

[0037] 일부 구체예에서, 개시된 CS1-특이적 CAR은 표 1에서 진술된 SP, CS1, HG, TM, CSR, ISD, 및/또는 링커 성분, 또는 표 1에서 진술된 서열에 최소한 65%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖는 이들의 변이체 중에서 하나 또는 그 이상을 포함한다.

표 1

상이한 CAR CS1 성분에 대한 예시적인 서열

기능적 도메인	서열 번호 #	아미노산 서열/ 핵산 서열
SP	서열 번호:1	MGWSSIILFLVATATGVH
	서열 번호:2	ATGGGATGGAGCTCTATCATCCTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCAC
CD8 a SP	서열 번호:3	MALPVTLALLPLALLHAARP
대안적 SP	서열 번호:4	METDTLLLWVLLWVPGSTG
헌지 도메인	서열 번호:5	LEPKSCDKTHTCPCCP
	서열 번호:6	CTCGAGCCCAAATCTGTGACAAAACTCACACATGCCACCGTGCCCC
CD8 a TM	서열 번호:7	IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYC
41BB TM	서열 번호:8	IISFFLALTSTALLFLFFLTLRFSVV
CD28 TM	서열 번호:9	FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
	서열 번호:10	TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTATAGCTGCTAGAACAGTGG CCTTTATTATTTCTGGGTG
41BB CSR	서열 번호:11	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
CD28 CSR	서열 번호:12	RSKRSRLLHSMDYMMTPRRPGPTRKHYPYAPPDRFAAYRS
	서열 번호:13	AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCTGCACAGTGAATGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCC GGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCACCGACTTCGCAGCCTATCGCTC

CD3 ζ ISD	서열 번호:14	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
	서열 번호:15	AGAGTGAAAGTTCAAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCTACCAGCAGGCCAGAACAGCTCT ATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGGAGTACGATGTTGGACAAGAGACGTGGCCG GGACCCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAA CTGCAGAAAGATAAGATGGCGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCAGCGCCGGA GGGGCAAGGGGCAAGATGGCCTTACCAAGGGTCTCAGTACAGCACCAAGGACACCTACGA CGCCCTCACATGCAGGCCCTGCCCTCGCTAA
링커	서열 번호:16	GGGGSGGGGGGGGS
Luc90 CS1 ScFv	서열 번호:17	SQVQLQQPGAEI VRPGASVKLSCKASGYSFETYWMNWVKQRPGQGLEWIGMIHPSDSETRLNQKFDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCARSTMIATRAMDYWGQGTSVTVSSGGGGGGGGGSDIVMTQSQSMSTSVDRLSITCKASQDVITGVAWYQQPGQSPKLLIYSASRYTGVPDFGSGTDFTFTISNVQAEDLAVYYCQQHYSTPLTFGAGTKLELK
	서열 번호:18	TCCAGGTCCAAC TGCAGCACGCTGGGCTGAGCTGGTAGGCCCTGGAGCTTCAGTGAAAGCTGCTCAAGGCTTGGGACTCCTCACCACTGGATGAACCTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCATGATTGATGATTCACTCCTCCGATAGTGAAACTAGGTAAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCACGCCGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGAAAGATCTACTATGATTGCGACGAGGGCTATGAACTACTGGGCTCAAGGAACCTCAGTCACCGCTCCGGGGTGGCGGTCTGGCTCCGGCGTGGCGGTCTGACATTGTGATGACCCAGTCAGAAGAAATCCATGTCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTTTATTACTGGGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAATTACTGATTACTCGGCATCCTACCGGTACACTGGAGTCCCTGATCGCTCACTGGCAGTGGATCTGGGACGGATTCACTTCCACCATCAGCAATGTGCAAGGCTGGCAGTTTATTACTGTCA GCAACATTATAGTACTCCTCACTTCGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAA
Luc90 경쇄 가변 영역	서열 번호:19	DIVMTQSQSMSTSVDRLSITCKASQDVITGVAWYQQPGQSPKLLIYSASRYTGVPDFGSGTDFTFTISNVQAEDLAVYYCQQHYSTPLTFGAGTKLELK
Luc63 중쇄 가변 영역	서열 번호:20	EVKLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSRYWMSWVRQAPGKGLEWIGEINPDSSTINYTPSLKDFIISRDNAKNTLYLQMSKVRSEDTALYYCARPDGNYWYFDVWGAGTVTVSS
Luc63 경쇄 가변 영역	서열 번호:21	DIVMTQSHKFMSTSVDRLSITCKASQDVGIAVA WYQQPGQSPKLLIYWA STRHTGVPDFGSGTDFTFTISNVQSEDLADYFCQCQYSSPYTFGGGTKEIK
Luc34 중쇄 가변 영역	서열 번호:22	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTSYWMQWVKQRPGQGLEWIGAIYPGDGDTTRYTQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLASEDSA VYYCARGKVYGSNPFA YWGQGTLTVVSA
Luc34 경쇄 가변 영역	서열 번호:23	DIQMKTQSSSYLSVSLGGRVITCKASDHINNWLA WYQQPGQSPKLLISGATSLETGVPSRFSGSGSGKDYLTSITSLQTEDVATYYCQCQYWSTPWTFGGGTKEIK
LucX1 중쇄 가변 영역	서열 번호:24	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSWMNWVKQRPGQGLEWIGRIYPGDGDTKYN GKF KGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSVDLSAVYFCARSTMIATGAMDYWGQGTSVTVSS
LucX1 경쇄 가변 영역	서열 번호:25	ETTVTQSPASLSMAIGEKVIRCI TSTDIDDDMNWYQQPGEPKLLISEGNTLRPGVPSRFSSSGYGTDFVFTIENMLSEDVADYYCLQSDNPLTFGGGTKEIK
LucX2 중쇄 가변 영역	서열 번호:26	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSWMNWVKQRPGQGLEWIGRIYPGDGDTKYN GKF KGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSVDLSAVYFCARSTMIATGAMDYWGQGTSVTVSS
LucX2 경쇄 가변 영역	서열 번호:27	DIVMTQSHKFMSTSVDRLSITCKASQDVSTAVAWYQQPGQSPKLLIYSASRYTGVPDFGSGTDFTFTISNVQAEDLAVYYCQQHYSTPPYTFGGGTKEIK

[0039]

이런 이유로, 일부 구체예에서, 개시된 CS1-특이적 CAR은 아미노산 서열 서열 번호:1 (아래에 도시됨), 또는 서열 번호:28에 최소한 65%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함한다.

[0040]

CS1-CD28-CD3Z 구조체:
MGWSSIILFLVATATGVHSQVQLQQPGAEI VRPGASVKLSCKASGYSFETYWMNWVKQRPGQGLEWIGMIHPSDSETRLNQKFDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCARSTMIATRAMDYWGQGTSVTVSSGGGGGGGGGSDIVMTQSQSMSTSVDRLSITCKASQDVITGVAWYQQPGQSPKLLIYSASRYTGVPDFGSGTDFTFTISNVQAEDLAVYYCQQHYSTPLTFGAGTKLEIKLKEPLPKSCDKHTCPPCPDPKFVWL VVGGVLACYSLLVTVAIFIIFWRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (서열 번호:28).

[0041]

핵산과 벡터

[0042]

개시된 면역 작동체 세포에서 CS1-특이적 CAR의 발현을 허용하는 개시된 CS1-특이적 CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드와 폴리뉴클레오티드 벡터 역시 개시된다.

[0043]

가령, 일부 구체예에서, 개시된 CS1-특이적 CAR은 핵산 서열 서열 번호:28 (아래에 도시됨), 또는 서열 번호:29

에 최소한 65%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖는 이의 변이체에 의해 인코딩된다.

[0044] PCDH-CS1-scFv-myc 태그-CD28-CD3제타 (PCDH-CS1-CAR) 구조체:

ATGGGATGGAGCTCATCCTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGCCACTCCCAGGTCCAAC TGCGAGCAGCCTGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGG
GCTTCAGTGAAGCTGCTGCAAGGCTCGGGTACTCCTCACCACTGGATGAAC TGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTGAGTGGATTGGC
ATGATT CATCCTCCGATAGT GAAACTAGGTTAAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACAAATCCTCAGCACAGCCTACATGCAACTC
AGCAGCCGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTTACTGTGCAAGATCTACTATGATTGCGACGAGGGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACC
GTCTCCGGCGGTGGCGTTCTGGTGGCGGTGGCGGTCTGACATTGTGATGACCCAGTCTCAGAAATCCATGTCCACATCAGTAGGAGAC
AGGGTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTTACTGGGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCTAAATTACTGATTACTCGGCA
TCCTACCGGTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACGGATTCACTTACCCATCAGCAATGTGCAAGGCTGAAGACCTGGCAGTT
TATTACTGTCAGCAACATTATAGTACTCCTCTCACTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACTCGAGCCAAATCTGTGACAAAACACATG
CCACCGTGCCCGGATCCCAAATTGGGTGCTGGTGGTGGTGGAGTCTGGCTTGATAGCTGCTAGTAACAGTGGCCTTATTATTTCTGGGTG
AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCTGCACAGTGA CACTACATGA CACTCCCGCCGCCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACAGCCCTATGCCACCACGC
GACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCA CAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTAC CAGCAGGGCCAGAACCCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGA
CGAAGAGAGGAGTACGATGTTGGACAAGAGACGTGGCCGGACCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAA
CTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGATGAAAGCGAGGCCGGAGGGCAAGGGCACGATGGCCTTACAGGGTCTCAGTACA
GCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTCACATGCAGGCCCTGCCCTCGCTAA (서열 번호:29).

[0046] 개시된 CAR, 그리고 이들의 영역을 인코딩하는 핵산 서열은 당분야에서 공지된 재조합 방법을 이용하여, 예를 들면, 예로서 상기 유전자를 발현하는 세포로부터 라이브러리를 선별검사함으로써, 이를 포함하는 것으로 공지된 벡터로부터 유전자를 도출함으로써, 또는 표준 기술을 이용하여, 이를 내포하는 세포와 조직으로부터 직접적으로 단리함으로써 획득될 수 있다. 대안으로, 관심되는 유전자는 클로닝되기 보다는, 합성적으로 생산될 수 있다.

[0047] CAR을 인코딩하는 핵산의 발현은 전형적으로, CAR 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 프로모터에 작동가능하게 연결하고, 그리고 상기 구조체를 발현 벡터 내로 함입함으로써 달성된다. 전형적인 클로닝 벡터는 전사와 번역 종결인자, 개시 서열, 그리고 원하는 핵산 서열의 발현의 조절에 유용한 프로모터를 내포한다.

[0048] 개시된 핵산은 다수의 유형의 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 가령, 핵산은 플라스미드, 파지미드, 파지 유도체, 동물 바이러스, 그리고 코스미드가 포함되지만 이들에 한정되지 않는 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 특히 관심되는 벡터는 발현 벡터, 복제 벡터, 프로브 산출 벡터, 그리고 염기서열결정 벡터를 포함한다.

[0049] 게다가, 발현 벡터는 바이러스 벡터의 형태에서 세포에 제공될 수 있다. 바이러스 벡터 기술은 당분야에서 널리 공지되고 예로서, Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)에서, 그리고 다른 바이러스학과 분자생물학 편람에서 설명된다. 벡터로서 유용한 바이러스에는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노 연관된 바이러스, 헤르페스 바이러스, 그리고 렌티바이러스가 포함되지만 이들에 한정되지 않는다. 일반적으로, 적합한 벡터는 최소한 하나의 생물체에서 기능적인 복제 기점, 프로모터 서열, 편의한 제한 엔도뉴클레아제 부위, 그리고 하나 또는 그 이상의 선별가능 마커를 내포한다. 일부 구체예에서, 폴리뉴클레오티드 벡터는 렌티바이러스 또는 레트로바이러스 벡터이다.

[0050] 포유류 세포 내로 유전자 전달을 위한 다수의 바이러스 기초된 시스템이 개발되었다. 가령, 레트로바이러스는 유전자 전달 시스템을 위한 편의한 플랫폼을 제공한다. 선별된 유전자는 벡터 내로 삽입되고, 그리고 당분야에서 공지된 기술을 이용하여 레트로바이러스 입자에서 포장될 수 있다. 재조합 바이러스는 이후, 단리되고 생체내 또는 탈체에서 개체의 세포에 전달될 수 있다.

[0051] 적합한 프로모터의 한 가지 실례는 극초기 시토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터 서열이다. 이러한 프로모터 서열은 거기에 작동가능하게 연결된 임의의 폴리뉴클레오티드 서열의 높은 발현 수준을 주동할 수 있는 강한 구조성 프로모터 서열이다. 적합한 프로모터의 다른 실례는 신장 성장 인자-1a (EF-1a)이다. 하지만, 유인원 바이러스 40 (SV40) 초기 프로모터, MND (골수증식성 육종 바이러스) 프로모터, 생쥐 유방 종양 바이러스 (MMTV), 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 긴 말단 반복 (LTR) 프로모터, MoMuLV 프로모터, 조류 백혈병 바이러스 프로모터, 앰스타인-바르 바이러스 극초기 프로모터, 라우스 육종 바이러스 프로모터뿐만 아니라 인간 유전자 프로모터, 예를 들면, 하지만 제한 없이, 액틴 프로모터, 미오신 프로모터, 혈모글로빈 프로모터, 그리고 크레아틴 키나아

제 프로모터가 포함되지만 이들에 한정되지 않는 다른 구조성 프로모터 서열 역시 이용될 수 있다. 프로모터는 대안으로, 유도성 프로모터일 수 있다. 유도성 프로모터의 실례에는 금속티오닌 프로모터, 글루코코르티코이드 프로모터, 프로게스테론 프로모터, 그리고 테트라사이클린 프로모터가 포함되지만 이들에 한정되지 않는다.

[0052] 추가 프로모터 원소, 예를 들면, 인핸서는 전사 개시의 빙도를 조절한다. 전형적으로, 이들은 비록 다수의 프로모터가 출발 부위의 하류에도 기능적 원소를 내포하는 것으로 최근에 밝혀지긴 했지만, 출발 부위의 30-110 bp 상류의 영역에서 위치된다. 프로모터 원소 사이에 이격은 빈번하게는 유연하고, 따라서 원소가 서로에 반대되거나 또는 서로에 상대적으로 이동될 때 프로모터 기능이 보존된다.

[0053] CAR 폴리펩티드 또는 이의 부분의 발현을 사정하기 위해, 세포 내로 도입되는 발현 벡터는 또한, 바이러스 벡터를 통한 형질감염 또는 감염이 추구되는 세포 개체군으로부터 발현 세포의 확인과 선별을 용이하게 하기 위한 선별가능 마커 유전자 또는 리포터 유전자 또는 둘 모두를 내포할 수 있다. 다른 양상에서, 선별가능 마커는 DNA의 별개의 조각에서 운반되고 동시형질감염 절차에서 이용될 수 있다. 선별가능 마커 및 리포터 유전자 둘 모두 숙주 세포에서 발현을 할 수 있게 하는 적절한 조절 서열과 측면에서 접할 수 있다. 유용한 선별가능 마커는 예로서, 항균제-내성 유전자를 포함한다.

[0054] 리포터 유전자는 잠재적으로 형질감염된 세포를 확인하고 조절 서열의 기능성을 평가하는데 이용된다. 일반적으로, 리포터 유전자는 수용자 생물체 또는 조직에서 존재하지 않거나 또는 이것에 의해 발현되지 않고, 그리고 발현이 일부 쉽게 검출가능한 성질, 예를 들면, 효소적 활성에 의해 현성되는 폴리펩티드를 인코딩하는 유전자이다. 리포터 유전자의 발현은 DNA가 수용자 세포 내로 도입된 후, 적합한 시점에서 검정된다. 적합한 리포터 유전자는 루시페라아제, 베타-갈락토시다아제, 클로람페니콜 아세틸 전달효소, 분비된 알칼리 인산분해효소, 또는 녹색 형광 단백질 유전자를 인코딩하는 유전자를 포함할 수 있다. 적합한 발현 시스템은 널리 공지되어 있고, 그리고 공지된 기술을 이용하여 제조되거나 또는 상업적으로 획득될 수 있다. 일반적으로, 리포터 유전자의 가장 높은 발현 수준을 보여주는 최소 5' 측면 영역을 갖는 구조체는 프로모터로서 확인된다. 이런 프로모터 영역은 리포터 유전자에 연결되고, 그리고 프로모터-주동된 전사를 조정하는 능력에 대해 작용체를 평가하는데 이용될 수 있다.

[0055] 유전자를 세포 내로 도입하고 발현하는 방법은 당분야에서 공지된다. 발현 벡터의 배경에서, 이러한 벡터는 당분야에서 임의의 방법에 의해, 숙주 세포, 예를 들면, 포유류, 세균, 효모, 또는 곤충 세포 내로 쉽게 도입될 수 있다. 가령, 발현 벡터는 물리적, 화학적, 또는 생물학적 수단에 의해 숙주 세포 내로 이전될 수 있다.

[0056] 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입하기 위한 물리적 방법은 인산칼슘 침전, 리포액션, 입자 충격, 혼미주입, 전기천공, 기타 등을 포함한다. 벡터 및/또는 외인성 핵산을 포함하는 세포를 생산하기 위한 방법은 당분야에서 널리 공지된다. 가령, Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)을 참조한다.

[0057] 관심되는 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입하기 위한 생물학적 방법은 DNA와 RNA 벡터의 이용을 포함한다. 바이러스 벡터, 그리고 특히, 레트로바이러스 벡터는 유전자를 포유류, 예를 들면, 인간 세포 내로 삽입하기 위한 가장 폭넓게 이용된 방법이 되고 있다.

[0058] 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입하기 위한 화학적 수단은 콜로이드 분산 시스템, 예를 들면, 거대분자 복합체, 나노캡슐, 마이크로스피어, 비드, 그리고 수중유 유제, 미셀, 혼합된 미셀 및 리포솜을 비롯한 지질-기초된 시스템을 포함한다. 시험관내와 생체내에서 전달 운반체로서 이용을 위한 예시적인 콜로이드성 시스템은 리포솜 (가령, 인공 막 소포)이다.

[0059] 비-바이러스 전달 시스템이 활용되는 경우에, 예시적인 전달 운반체는 리포솜이다. 다른 양상에서, 핵산은 지질과 연관될 수 있다. 지질과 연관된 핵산은 리포솜의 수성 내측 내에 피포되거나, 리포솜의 지질 이중층 내에 산재되거나, 리포솜과 올리고뉴클레오티드 둘 모두와 연관되는 연결 분자를 통해 리포솜에 부착되거나, 리포솜 내에 포획되거나, 리포솜으로 복합화되거나, 지질을 내포하는 용액에서 분산되거나, 지질과 혼합되거나, 지질과 합동되거나, 지질에서 혼탁액으로서 내포되거나, 미셀로 내포 또는 복합화되거나, 또는 만약 그렇지 않으면, 지질과 연관될 수 있다. 지질, 지질/DNA 또는 지질/발현 벡터 연관된 조성물은 용해 상태에서 임의의 특정 구조에 한정되지 않는다. 가령, 이들은 이중층 구조 내에, 미셀로서, 또는 "붕괴된" 구조로 존재할 수 있다. 이들은 또한, 용액에서 단순히 산재되고, 아마도 크기 또는 모양에서 균일하지 않은 응집체를 형성할 수도 있다. 지질은 자연발생 또는 합성 지질일 수 있는 지방 물질이다. 가령, 지질은 세포질에서 자연적으로 발생하는 지방 비말뿐만 아니라 긴 사슬 지방족 탄화수소 및 이들의 유도체, 예를 들면, 지방산, 알코올, 아민, 아미노 알코올, 그리

고 알데하이드를 내포하는 한 부류의 화합물을 포함한다. 이용에 적합한 지질은 상업적인 공급원으로부터 획득될 수 있다. 가령, 디미리스틸 포스파티딜콜린 ("DMPC")은 Sigma, St. Louis, Mo.로부터 획득될 수 있다; 디세틸 인산염 ("DCP")은 K & K Laboratories (Plainview, N.Y.)로부터 획득될 수 있다; 콜레스테롤 ("Choi")은 Calbiochem-Behring로부터 획득될 수 있다; 디미리스틸 포스파티딜글리세롤 ("DMPG") 및 다른 지질은 Avanti Polar Lipids, Inc, (Birmingham, Ala.)로부터 획득될 수 있다.

[0060] 면역 작동체 세포

개시된 CAR을 발현하도록 가공되는 면역 작동체 세포가 또한 개시된다. 이들 세포는 바람직하게는, 치료되는 개체로부터 획득된다(즉, 자가이다). 하지만, 일부 구체예에서, 면역 작동체 세포주 또는 공여자 작동체 세포 (동종이계)가 이용된다. 면역 작동체 세포는 말초혈 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 감염 부위로부터 조직, 복수, 흉막 삼출물, 비장 조직, 그리고 종양을 비롯한 다수의 공급원으로부터 획득될 수 있다. 면역 작동체 세포는 당업자에게 공지된 수많은 기술, 예를 들면, Ficoll™ 분리를 이용하여 개체로부터 수집된 혈액으로부터 획득될 수 있다. 가령, 개체의 순환하는 혈액으로부터 세포는 성분채집술에 의해 획득될 수 있다. 일부 구체예에서, 면역 작동체 세포는 적혈구를 용해하고 단핵구를 고갈시킴으로써, 예를 들면, PERCOLL™ 구배를 통한 원심분리에 의해 또는 역류 원심 정화에 의해 말초혈 림프구로부터 단리된다. 면역 작동체 세포의 특정한 아개체군은 양성 또는 음성 선별 기술에 의해 더욱 단리될 수 있다. 가령, 면역 작동체 세포는 예로써, 원하는 면역 작동체 세포의 양성 선별을 위해 충분한 기간 동안 항체-접합된 비드와 함께 배양에 의해, 양성적으로 선별된 세포에 독특한 표면 마커에 지향된 항체의 조합을 이용하여 단리될 수 있다. 대안으로, 면역 작동체 세포 개체군의 농축은 음성적으로 선별된 세포에 독특한 표면 마커에 지향된 항체의 조합을 이용한 음성 선별에 의해 달성될 수 있다.

[0062] 일부 구체예에서, 면역 작동체 세포는 감염성 질환과 이물에 대항하여 신체를 방어하는데 관련된 임의의 백혈구를 포함한다. 가령, 면역 작동체 세포는 림프구, 단핵구, 대식세포, 수지상 세포, 비만 세포, 호중구, 호염기구, 호산구, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 가령, 면역 작동체 세포는 T 림프구를 포함할 수 있다.

[0063] T 세포 또는 T 림프구는 세포 표면 상에서 T 세포 수용체 (TCR)의 존재에 의해, 다른 림프구, 예를 들면, B 세포와 자연 살해 세포 (NK 세포)로부터 식별될 수 있다. 이들 세포는 그들이 흉선 (비록 일부가 편도에서 성숙하기도 하지만)에서 성숙하기 때문에, T 세포로 불린다. 각각, 상이한 기능을 갖는 T 세포의 여러 부분집합이 있다.

[0064] T 보조 세포 (T_H 세포)는 B 세포의 형질 세포와 기억 B 세포로의 성숙, 그리고 세포독성 T 세포와 대식세포의 활성화를 비롯한 면역학적 과정에서 다른 백혈구를 보조한다. 이들 세포는 또한, CD4+ T 세포로 알려져 있는데, 그 이유는 이들이 그들의 표면 상에서 CD4 당단백질을 발현하기 때문이다. 보조 T 세포는 그들이 MHC 부류 II 분자에 의해 웨პ티드 항원이 제시될 때 활성화되고, 이들 분자는 항원 제시 세포 (APCs)의 표면 상에서 발현된다. 일단 활성화되면, 이들은 급속히 분열하고, 그리고 능동 면역 반응을 조절하거나 또는 이를 보조하는 사이토kin으로 불리는 작은 단백질을 분비한다. 이들 세포는 T_{H1} , T_{H2} , T_{H3} , T_{H17} , T_{H9} , 또는 T_{FH} 를 비롯한 여러 아형 중에서 한 가지로 분화할 수 있고, 이들은 상이한 유형의 면역 반응을 조장하는 상이한 사이토kin을 분비한다.

[0065] 세포독성 T 세포 (T_C 세포, 또는 CTLs)는 바이러스로 감염된 세포 및 종양 세포를 파괴하고, 그리고 또한, 이식 거부반응에 연루된다. 이들 세포는 $CD8^+$ T 세포로서 또한 알려져 있는데, 그 이유는 이들이 그들의 표면에서 CD8 당단백질을 발현하기 때문이다. 이들 세포는 모든 유핵 세포의 표면 상에 존재하는 MHC 부류 I 분자와 연관된 항원에 결합함으로써 그들의 표적을 인식한다. IL-10, 아데노신 및 조절 T 세포에 의해 분비된 다른 분자를 통해, $CD8^+$ 세포는 무력성 상태로 비활성화될 수 있는데, 이것은 자가면역 질환을 예방한다.

[0066] 기억 T 세포는 감염이 해결된 후에 장기간 존속하는 항원 특이적 T 세포의 부분집합이다. 이들은 그들의 동계 항원에 재노출 시에 다수의 작동체 T 세포로 빠르게 확대하고, 따라서 면역계에 과거 감염에 대한 "기억"을 제공한다. 기억 세포는 $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ 일 수 있다. 기억 T 세포는 전형적으로, 세포 표면 단백질 CD45RO를 발현한다.

[0067] 억제 T 세포로서 이전에 알려진 조절 T 세포 ($T_{조절}$ 세포)는 면역 관용의 유지에 결정적이다. 이들의 주요 역할은 면역 반응의 종결을 향하여 T 세포-매개된 면역성을 정지시키고, 그리고 흉선에서 음성 선별의 과정을 탈출한

자가반응성 T 세포를 억제하는 것이다. CD4⁺ T_{조절} 세포의 2가지 주요 부류가 설명되었다 - 자연발생 T_{조절} 세포 및 적응성 T_{조절} 세포.

[0068] 자연 킬러 T (NKT) 세포 (자연 킬러 (NK) 세포와 혼동되지 않아야 함)는 적응성 면역계를 선천성 면역계와 가교 한다. 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 분자에 의해 제시된 웨티드 항원을 인식하는 전통적인 T 세포와 달리, NKT 세포는 CD1d로 불리는 분자에 의해 제시된 당지질 항원을 인식한다.

[0069] 일부 구체예에서, T 세포는 CD4+ 세포의 혼합물을 포함한다. 다른 구체예에서, T 세포는 세포 표면 발현에 기초 하여 하나 또는 그 이상의 부분집합에 대해 놓축된다. 가령, 일부 경우에, T는 세포독성 CD8⁺ T 림프구를 포함 한다. 일부 구체예에서, T 세포는 $\gamma\delta$ T 세포를 포함하는데, 이들은 1개의 γ 사슬 및 α 와 β 사슬 대신에 1 개의 δ 사슬을 갖는 상이한 T 세포 수용체 (TCR)를 소유한다.

[0070] 자연-킬러 (NK) 세포는 바이러스로 감염되고 형질전환된 세포를 사멸시킬 수 있는 CD56⁺CD3⁻ 큰 과립성 림프구이고, 그리고 선천성 면역계의 결정적인 세포 부분집합을 구성한다 (Godfrey J, et al. Leuk Lymphoma 2012 53:1666-1676). 세포독성 CD8⁺ T 림프구와 달리, NK 세포는 이전 감작화에 대한 요건 없이 종양 세포에 대항하여 세포독성을 착수하고, 그리고 또한, MHC-I-음성 세포를 근절할 수 있다 (Narni-Mancinelli E, et al. Int Immunol 2011 23:427-431). NK 세포는 더욱 안전한 작동체 세포인데, 그 이유는 이들이 사이토킨 발작의 잠재적으로 치명적인 합병증 (Morgan RA, et al. Mol Ther 2010 18:843-851), 종양 용해 증후군 (Porter DL, et al. N Engl J Med 2011 365:725-733), 그리고 적중한, 종양의 효과를 방지할 수 있기 때문이다. 비록 NK 세포가 암 세포의 킬러로서 널리 공지된 역할을 갖고, 그리고 NK 세포 장애가 MM의 진행을 위해 결정적인 것으로 광범위하게 방증되긴 했지만 (Godfrey J, et al. Leuk Lymphoma 2012 53:1666-1676; Fauriat C, et al. Leukemia 2006 20:732-733), NK 세포-매개된 항-MM 활성을 증강할지도 모르는 수단은 개시된 CAR에 앞서 거의 미개척되었다.

치료 방법

[0072] 개시된 CAR을 발현하는 면역 작동체 세포는 MM 세포에 대항하여 항종양 면역 반응을 이끌어낼 수 있다. 개시된 CAR-변형된 면역 작동체 세포에 의해 유도된 항종양 면역 반응은 능동 또는 수동 면역 반응일 수 있다. 이에 더하여, CAR-매개된 면역 반응은 입양 면역요법 접근법의 부분일 수 있는데, 여기서 CAR-변형된 면역 작동체 세포가 CS1에 특정한 면역 반응을 유도한다.

[0073] 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 작동체 세포의 입양 전달은 유망한 항암 치료법이다. 환자의 면역 작동체 세포의 수집 이후에, 이들 세포는 개시된 CS1-특이적 CAR을 발현하도록 유전적으로 조작되고, 이후 환자 내로 되돌려 주입될 수 있다.

[0074] 개시된 CAR-변형된 면역 작동체 세포는 단독으로, 또는 희석제 및/또는 다른 성분, 예를 들면, IL-2, IL-15, 또는 다른 사이토킨 또는 세포 개체군과 협동으로 제약학적 조성물로서 투여될 수 있다. 간단히 말하면, 제약학적 조성물은 하나 또는 그 이상의 제약학적으로 또는 생리학적으로 허용되는 단체, 희석제 또는 부형제와 협동으로, 본원에서 설명된 바와 같은 표적 세포 개체군을 포함할 수 있다. 이런 조성물은 완충액, 예를 들면, 중성 완충된 식염수, 인산염 완충된 식염수 등; 탄수화물, 예를 들면, 글루코오스, 만노오스, 수크로오스 또는 텍스트란, 만니톨; 단백질; 폴리펩티드 또는 아미노산, 예를 들면, 글리신; 항산화제; 퀼레이트화제, 예를 들면, EDTA 또는 글루타티온; 어쥬번트 (가령, 알루미늄 수산화물); 그리고 보존제를 포함할 수 있다. 개시된 방법에서 이용을 위한 조성물은 일부 구체예에서, 정맥내 투여를 위해 조제된다. 제약학적 조성물은 MM를 치료하는데 적절한 임의의 방식으로 투여될 수 있다. 투여의 양과 빈도는 비록 적절한 용량이 임상 시험에 의해 결정될 수도 있지만, 환자의 상태, 그리고 환자의 질환의 심각도와 같은 인자에 의해 결정될 것이다.

[0075] "면역학적으로 효과량", "항종양 효과량", "종양-저해 효과량", 또는 "치료량"이 표시될 때, 투여되는 본 발명의 조성물의 정밀한 양은 연령, 체중, 종양 크기, 감염 또는 전이의 정도에서 개별 차이, 그리고 환자 (개체)의 상태를 고려하여 주치의에 의해 결정될 수 있다. 본원에서 설명된 T 세포를 포함하는 제약학적 조성물은 10^4 내지 10^9 세포/kg 체중, 예를 들면, 10^5 내지 10^6 세포/kg 체중 범위 내에 모든 정수 값을 포함하는 용량에서 투여될 수 있는 것으로 일반적으로 언급될 수 있다. T 세포 조성물은 또한, 이들 용량에서 복수 회 투여될 수 있다. 이들 세포는 면역요법에서 통상적으로 공지되는 주입 기술을 이용함으로써 투여될 수 있다 (가령, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988을 참조한다). 특정 환자에 대한 최적 용량과 치료 섭생은 환자를 질환의 징후에 대해 모니터링하고 이에 맞게 치료를 조정함으로써, 약학 분야의 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있

다.

[0076] 일정한 구체예에서, 활성화된 T 세포를 개체에 투여하고, 그리고 이후, 혈액을 차후에 다시 뽑고 (또는 성분채집술을 수행하고), 개시된 방법에 따라 그것으로부터 T 세포를 활성화시키고, 그리고 이를 활성화되고 확대된 T 세포를 환자에 재주입하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 과정은 몇 주마다 복수 회 수행될 수 있다. 일정한 구체예에서, T 세포는 10 cc 내지 400 cc의 채혈로부터 활성화될 수 있다. 일정한 구체예에서, T 세포는 20 cc, 30 cc, 40 cc, 50 cc, 60 cc, 70 cc, 80 cc, 90 cc, 또는 100 cc의 채혈로부터 활성화된다. 이러한 복수 채혈/복수 재주입 프로토콜을 이용하는 것은 T 세포의 일정한 개체군을 선별하는데 이바지할 수 있다.

[0077] 개시된 조성물의 투여는 주사에 의해, 투입, 또는 이식을 비롯한 임의의 편의한 방식으로 수행될 수 있다. 본원에서 설명된 조성물은 환자에 피하, 피내, 종양내, 결절내, 척수내, 근육내, 정맥내 (i.v.) 주사에 의해, 또는 복막내 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 개시된 조성물은 피내 또는 피하 주사에 의해 환자에 투여된다. 일부 구체예에서, 개시된 조성물은 i.v. 주사에 의해 투여된다. 조성물은 또한, 종양, 림프절, 또는 감염 부위 내로 직접적으로 주사될 수 있다.

[0078] 일정한 구체예에서, 개시된 CAR-변형된 면역 작동체 세포는 탈리도미드, 텍사메타손, 보르테조립, 그리고 레날리도미드가 포함되지만 이들에 한정되지 않는 수많은 유관한 치료 양상과 함께 (가령, 이전에, 동시에 또는 이후에) 환자에 투여된다. 추가 구체예에서, CAR-변형된 면역 작동체 세포는 화학요법, 방사, 면역억제제, 예를 들면, 시클로스포린, 아자티오프린, 메토트렉사트, 미코페놀레이트, 그리고 FK506, 항체, 또는 다른 면역절제 작용제, 예를 들면, CAM PATH, 항-CD3 항체 또는 다른 항체 요법, 사이토신, 플루다라빈, 시클로스포린, FK506, 라파마이신, 마이코페놀산, 스테로이드, FR901228, 사이토킨, 그리고 방사선조사와 합동으로 이용될 수 있다. 일부 구체예에서, CAR-변형된 면역 작동체 세포는 골수 이식, 화학요법 작용제, 예를 들면, 플루다라빈을 이용한 T 세포 절제 요법, 외부-빔 방사선 요법 (XRT), 시클로포스파미드, 또는 항체, 예를 들면, OKT3 또는 CAMPATH와 함께 (가령, 이전에, 동시에 또는 이후에) 환자에 투여된다. 다른 구체예에서, 본 발명의 세포 조성물은 B-세포 절제 요법, 예를 들면, CD20과 반응하는 작용제, 예를 들면, 리툭산 이후에 투여된다. 가령, 일부 구체예에서, 개체는 고분량 화학요법으로 표준 치료, 그 이후에 말초혈 줄기 세포 이식을 받을 수 있다. 일정한 구체예에서, 이식 이후에, 개체는 본 발명의 확대된 면역 세포의 주입을 받는다. 추가 구체예에서, 확대된 세포는 수술 이전에 또는 이후에 투여된다.

정의

[0080] 용어 "아미노산 서열"은 아미노산 잔기를 나타내는 약어, 글자, 문자 또는 단어의 목록을 지칭한다. 본원에서 이용된 아미노산 약어는 아미노산에 대한 전통적인 1 문자 코드이고 아래와 같이 표현된다: A, 알라닌; B, 아스파라긴 또는 아스파르트산; C, 시스테인; D 아스파르트산; E, 글루타민산염, 글루타민산; F, 페닐알라닌; G, 글리신; H 히스티딘; I 이소류신; K, 리신; L, 류신; M, 메티오닌; N, 아스파라긴; P, 프롤린; Q, 글루타민; R, 아르기닌; S, 세린; T, 트레오닌; V, 발린; W, 트립토판; Y, 티로신; Z, 글루타민 또는 글루타민산.

[0081] 용어 "항체"는 표적 항원에 선별적으로 결합하는 자연 또는 합성 항체를 지칭한다. 상기 용어는 다중클론과 단일클론 항체를 포함한다. 무손상 면역글로불린 분자에 더하여, 용어 "항체"에는 이들 면역글로불린 분자의 단편 또는 중합체, 그리고 표적 항원에 선별적으로 결합하는 면역글로불린 분자의 인간 또는 인간화 이형 역시 포함된다.

[0082] 용어 "펩타미"는 특정한 표적 분자에 결합하는 올리고핵산 또는 웹티드 분자를 지칭한다. 이들 분자는 일반적으로, 무작위 서열 풀에서 선택된다. 선별된 앱타미는 독특한 삼차 구조를 적합하게 하고, 그리고 표적 분자를 높은 친화성과 특이성으로 인식할 수 있다. "핵산 앱타미"는 자신의 입체형태를 통해 표적 분자에 결합하는 DNA 또는 RNA 올리고핵산이고, 그리고 따라서, 이런 분자의 기능을 저해하거나 또는 억제한다. 핵산 앱타미는 DNA, RNA, 또는 이들의 조합에 의해 구성될 수 있다. "펩티드 앱타미"는 가변적 웹티드 서열이 일정한 골격 단백질 내에 삽입된 조합 단백질 분자이다. 웹티드 앱타미의 확인은 엄격한 효모 양성집종 조건 하에 전형적으로 수행되는데, 이것은 선별된 웹티드 앱타미가 세포내 배경에서 안정되게 발현되고 정확하게 접힘되는 확률을 증강한다.

[0083] 용어 "담체"는 화합물 또는 조성물과 합동될 때, 의도된 용도 또는 목적을 위해 상기 화합물 또는 조성물의 제조, 보관, 투여, 전달, 유용성, 선택성, 또는 임의의 다른 특질을 보조하거나 또는 조장하는 화합물, 조성물, 물질, 또는 구조를 의미한다. 가령, 담체는 활성 성분의 임의의 분해를 최소화하고 개체에서 임의의 불리한 부작용을 최소화하도록 선별될 수 있다.

- [0084] 용어 "키메라 분자"는 선천적 상태에서 별개로 존재하는 2개 또는 그 이상 분자를 연결함으로써 창출된 단일 분자를 지칭한다. 단일, 키메라 분자는 자신의 모든 성분 분자의 원하는 기능성을 갖는다. 키메라 분자의 한 가지 유형은 융합 단백질이다.
- [0085] 용어 "융합 단백질"은 한 폴리펩티드의 아미노 말단 및 다른 폴리펩티드의 카르복실 말단 사이에 형성된 웹티드 결합을 통해 2개 또는 그 이상 폴리펩티드의 연결에 의해 형성된 폴리펩티드를 지칭한다. 융합 단백질은 성분 폴리펩티드의 화학적 커플링에 의해 형성될 수 있거나 또는 단일 인접한 융합 단백질을 인코딩하는 핵산 서열로부터 단일 폴리펩티드로서 발현될 수 있다. 단일 사슬 융합 단백질은 단일 인접한 폴리펩티드 중추를 갖는 융합 단백질이다. 융합 단백질은 2개의 유전자를 단일 핵산 내로 인프레임 연결하는 분자생물학에서 전통적인 기술을 이용하고, 그리고 이후, 융합 단백질이 생산되는 조건 하에 상기 핵산을 적절한 숙주 세포에서 발현하여 제조될 수 있다.
- [0086] 용어 "동일성"은 두 핵산 분자 또는 폴리펩티드 사이에 서열 동일성을 지칭한다. 동일성은 비교 목적으로 정렬 될 수 있는 각 서열에서 위치를 비교함으로써 결정될 수 있다. 비교된 서열에서 위치가 동일한 염기에 의해 점유될 때, 이들 분자는 상기 위치에서 동일하다. 핵산 또는 아미노산 서열 사이에 유사성 또는 동일성의 정도는 이들 핵산 서열에 의해 공유된 위치에서 동일한 또는 정합 뉴클레오티드의 숫자의 함수이다. FASTA, 또는 GCG 서열 분석 패키지 (University of Wisconsin, Madison, Wis.)의 일부로서 사용한 BLAST를 비롯한 다양한 정렬 알고리즘 및/또는 프로그램이 두 서열 사이에 동일성을 계산하는데 이용될 수 있고, 그리고 예로써, 디풀트 세팅에서 이용될 수 있다. 가령, 본원에서 설명된 특정한 폴리펩티드에 최소한 70%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 동일성을 갖고 바람직하게는, 실제적으로 동일한 기능을 전시하는 폴리펩티드뿐만 아니라 이런 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드가 예기된다. 달리 지시되지 않으면, 유사성 점수는 BLOSUM62의 이용에 기초될 것이다. BLASTP가 이용될 때, 퍼센트 유사성은 BLASTP 양성 점수에 기초되고, 그리고 퍼센트 서열 동일성은 BLASTP 동일성 점수에 기초된다. BLASTP "동일성"은 동일한 높은 채점 서열 쌍에서 전체 잔기의 숫자와 분율을 보여준다; 그리고 BLASTP "양성"은 정렬 점수가 양성 값을 갖고 서로에 유사한 잔기의 숫자와 분율을 보여준다. 본원에서 개시된 아미노산 서열에 이들 정도의 동일성 또는 유사성 또는 임의의 중간 정도의 동일성 또는 유사성을 갖는 아미노산 서열이 본 발명에 의해 예기되고 포괄된다. 유사한 폴리펩티드의 폴리뉴클레오티드 서열은 유전자 코드를 이용하여 추론되고, 그리고 전통적인 수단에 의해, 특히 유전자 코드를 이용하여 이의 아미노산 서열을 역으로 번역함으로써 획득될 수 있다.
- [0087] 용어 "핵산"은 단일 뉴클레오티드 또는 한 뉴클레오티드의 3' 위치에서 인산염 기에 의해 다른 뉴클레오티드의 5' 단부에 연결된 2개 또는 그 이상 뉴클레오티드를 포함하는 자연 또는 합성 분자를 지칭한다. 핵산은 길이에 의해 제한되지 않고, 그리고 따라서, 핵산은 데옥시리보핵산 (DNA) 또는 리보핵산 (RNA)을 포함할 수 있다.
- [0088] 용어 "에 작동가능하게 연결된"은 한 핵산과 다른 핵산 서열의 기능적 관계를 지칭한다. 프로모터, 인핸서, 전사와 번역 중단 부위, 그리고 다른 신호 서열은 다른 서열에 작동가능하게 연결된 핵산 서열의 실례이다. 가령, 전사 제어 원소에 DNA의 작동가능한 연쇄는 이런 DNA의 전사가 상기 DNA를 특이적으로 인식하고, 여기에 결합하고, 이를 전사하는 RNA 중합효소에 의해 프로모터로부터 시작되도록, DNA와 프로모터 사이에 물리적 및 기능적 관계를 지칭한다.
- [0089] 용어 "펩티드", "단백질" 및 "폴리펩티드"는 한 아미노산의 카르복실 기에 의해 다른 아미노산의 알파 아미노 기에 연결된 2개 또는 그 이상 아미노산을 포함하는 자연 또는 합성 분자를 지칭하기 위해 교체가능하게 이용된다.
- [0090] 용어 "제약학적으로 허용되는"은 전전한 의학적 판단의 범위 내에서, 합리적인 이익/위험 비율에 비례하여 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응, 또는 다른 문제 또는 합병증 없이 인간과 동물의 조직과 접촉하여 이용에 적합한 화합물, 물질, 조성물, 및/또는 약형을 지칭한다.
- [0091] 용어 "단백질 도메인"은 구조적 완전성을 보여주는 단백질의 부분, 단백질의 부분들, 또는 전체 단백질을 지칭한다; 이러한 결정은 단백질의 부분, 단백질의 부분들, 또는 전체 단백질의 아미노산 조성에 기초될 수 있다.
- [0092] "스페이서"는 본원에서 이용된 바와 같이, 융합 단백질을 구성하는 단백질들을 연결하는 웹티드를 지칭한다. 일반적으로, 스페이서는 단백질들을 연결하거나 또는 이들 사이에 일부 최소 거리 또는 다른 공간적 관계를 보존하는 것 이외에 어떤 특정한 생물학적 활성도 갖지 않는다. 하지만, 스페이서의 성분 아미노산은 분자의 일부 성질, 예를 들면, 분자의 접힘, 순 전하, 또는 소수성에 영향을 주도록 선별될 수도 있다.
- [0093] 용어 "특이적으로 결합한다"는 본원에서 이용된 바와 같이, 폴리펩티드 (항체 포함) 또는 수용체를 지칭할 때,

단백질 및 다른 생물체의 비균질성 개체군에서 단백질 또는 폴리펩티드 또는 수용체의 존재를 결정하는 결합 반응을 지칭한다. 따라서, 지정된 조건 (가령, 항체의 경우에 면역검정 조건) 하에, 특정된 리간드 또는 항체는 표본 내에 존재하는 다른 단백질에 또는 생물체에서 상기 리간드 또는 항체가 접촉할 수 있는 다른 단백질에 유의미한 양으로 결합하지 않을 때, 특정 "표적"에 "특이적으로 결합한다" (가령, 항체는 내피 항원에 특이적으로 결합한다). 일반적으로, 두 번째 분자에 "특이적으로 결합"하는 첫 번째 분자는 두 번째 분자와 약 10^5 M^{-1} 보다 큰 (가령, 10^6 M^{-1} , 10^7 M^{-1} , 10^8 M^{-1} , 10^9 M^{-1} , 10^{10} M^{-1} , 10^{11} M^{-1} , 그리고 10^{12} M^{-1} 또는 그 이상)의 친화성 상수 (K_a)를 갖는다.

[0094]

용어 "특이적으로 전달한다"는 본원에서 이용된 바와 같이, 표적 분자를 결여하는 세포 또는 조직이 아닌 특정 표적 분자 또는 마커를 보유하는 세포 또는 조직과 분자의 우선적 연관을 지칭한다. 당연히, 일정한 정도의 비 특이적 상호작용이 분자와 비-표적 세포 또는 조직 사이에 일어날 수 있는 것으로 인식된다. 그럼에도 불구하고, 특정한 전달은 표적 분자의 특정한 인식을 통해 매개되는 것으로 식별될 수 있다. 전형적으로 특정한 전달은 전달된 분자 및 표적 분자를 결여하는 세포 사이에서보다 전달된 분자 및 표적 분자를 보유하는 세포 사이에 훨씬 강한 연관을 유발한다.

[0095]

용어 "개체"는 투여 또는 치료의 표적인 임의의 개체를 지칭한다. 개체는 척추동물, 예를 들면, 포유동물일 수 있다. 따라서, 개체는 인간 또는 수의학적 환자일 수 있다. 용어 "환자"는 임상의, 예를 들면, 주치의의 치료 하에 개체를 지칭한다.

[0096]

용어 "치료적으로 효과적인"은 이용된 조성물의 양이 질환 또는 장애의 하나 또는 그 이상의 원인 또는 증상을 개선하는데 충분한 양이라는 것을 지칭한다. 이런 개선은 단지, 감소 또는 변경을 필요로 하고, 반드시 제거를 필요로 하는 것은 아니다.

[0097]

용어 "형질전환"과 "형질감염"은 수용자 세포의 염색체 DNA에 핵산의 도입을 포함하는, 상기 세포 내로 핵산, 예를 들면, 발현 벡터의 도입을 의미한다.

[0098]

용어 "치료"는 질환, 병리학적 이상, 또는 장애를 치유하거나, 개선하거나, 안정시키거나, 또는 예방하는 의도로 환자의 의학적 관리를 지칭한다. 이러한 용어는 적극 치료, 다시 말하면, 질환, 병리학적 이상, 또는 장애의 향상에 특이적으로 관계하는 치료를 포함하고, 그리고 또한, 원인 치료, 다시 말하면, 연관된 질환, 병리학적 이상, 또는 장애의 원인의 제거에 관계하는 치료를 포함한다. 이에 더하여, 이러한 용어는 완화 치료, 다시 말하면, 질환, 병리학적 이상, 또는 장애를 치료하기 보다는 증상을 경감하도록 설계된 치료; 방지적 치료, 다시 말하면, 연관된 질환, 병리학적 이상, 또는 장애의 발달을 최소화하거나 또는 부분적으로 또는 완전하게 저해하는 것에 관계하는 치료; 그리고 지지 요법, 다시 말하면, 연관된 질환, 병리학적 이상, 또는 장애의 향상에 관계하는 다른 특정한 요법을 보충하는데 이용된 치료를 포함한다.

[0099]

용어 "변이체"는 보존성 아미노산 치환, 비보존성 아미노산 치환 (즉, 축중성 변이체), 아미노산을 인코딩하는 각 코돈 (즉, DNA와 RNA)의 요동 위치 내에 치환, 웨티드의 C 말단에 부가된 아미노산, 또는 참고 서열에 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 서열 동일성을 갖는 웨티드를 갖는 아미노산 또는 웨티드 서열을 지칭한다.

[0100]

용어 "벡터"는 이러한 벡터 서열이 연결된 다른 핵산을 세포 내로 수송할 수 있는 핵산 서열을 지칭한다. 용어 "발현 벡터"는 세포에 의한 발현에 적합한 (가령, 전사 제어 원소에 연결된) 형태에서 유전자 구조체를 내포하는 임의의 벡터 (가령, 플라스미드, 코스미드 또는 파지 염색체)를 포함한다.

[0101]

발명의 다수의 구체예가 설명되었다. 그럼에도 불구하고, 발명의 사상과 범위로부터 벗어나지 않으면서 다양한 변형이 만들어질 수 있는 것으로 이해될 것이다. 따라서, 다른 구체예는 다음 청구항의 범위 내에 있다.

[0102]

실시예

[0103]

실시예 1: CS1을 향하여 전향된 T 세포의 유전자 변형은 골수종 세포의 근절을 증강한다

[0104]

본 연구에서, T 세포는 CD28-CD3ζ 신호전달 모이어티를 함입하는 CS1-특이적 CAR을 발현하도록 조작되었고, CS1-특이적 CAR T 세포가 CS1-발현 골수종 세포에 대한 응답으로 증강된 사이토kin 방출과 세포독성을 매개한다는 것을 증명하였는데, 이것은 CS1-의존성 방식으로 일어났다. 게다가, 정위 MM 이종이식편 생쥐 모델에서, CS1-전향된 T 세포는 인간 골수종 세포를 효율적으로 근절하고 생쥐 생존을 유의미하게 연장시켰다. 종합하면, 이들 데이터는 CS1-특이적 CAR로 무장된 T 세포로 입양 요법이 재발된 MM에 대항하여 유망한 전략을 나타낸다는

것을 암시한다.

[0105] 재료와 방법

[0106] 세포 배양

[0107] 인간 다발성 골수종 세포주 IM9, NCI-H929, MM.1S와 RPMI-8226은 American Type Culture Collection (ATCC)으로부터 획득되고, 그리고 10% 소 태아 혈청 (FBS) (Invitrogen)으로 보충된 RPMI 1640 배지 (Invitrogen)에서 유지되었다. 293T와 phoenix 포장 세포는 10% FBS를 포함하는 DMEM 배지 (Invitrogen)에서 배양되었다. 건강한 공여자 및 다발성 골수종 환자로부터 인간 말초혈 단핵 세포 (PBMCs)가 피콜-파크 플러스 (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA) 밀도 기울기 원심분리에 의해 단리되었고, 그리고 단핵구가 플라스틱 부착에 의해 고갈되었다. 원발성 CD138⁺ 골수종 세포는 제조업체의 사용설명서에 따라, 인간 항-CD138 마이크로비드 및 자석-보조된 세포 분류 (MACS, Miltenyi Biotech)를 이용하여 환자의 골수 흡인물에서 양성적으로 선택되었다. Ohio State University Institutional Review Board에 의해 승인된 프로토콜에 따라 골수종 환자로부터 사전 동의가 획득되었다.

[0108] 생쥐

[0109] 6-내지 8-주령 수컷 NOD-scid IL-2R감마 공백 (NSG) 생쥐가 Jackson Laboratory로부터 획득되었다. 생쥐는 MM 질환 진행에 대해 빈번하게 모니터링되고, 그리고 이들이 뒷다리 마비, 기면, 또는 명백한 체중 감소의 증상으로 빈사 상태가 될 때 희생되었다. 모든 동물 작업은 Ohio State University Animal Care and Use Committee에 의해 승인되었다.

[0110] CS1-특이적 CAR 레트로바이러스 구조체의 산출

[0111] 항-CS1 scFv는 하이브리도마 세포주 Luc90으로부터 유래되었다. 무거운 (V_H) 사슬과 가벼운 (V_L) 사슬의 가변 영역에 대한 코딩 도메인 서열은 별도로 증폭되고, 그리고 중복 PCR 반응에 의해 링커를 이용하여 재조합되었다. V_H-링커-V_L 단편은 CD28-CD3 ζ 부분과 인프레임 통합되었다. 전체 항-CS1-scFv-CD28-CD3 ζ 단편은 이후, 레트로바이러스 백터 지정된 Pinco (Yu J, et al. *Immunity* 2006 24:575-90; Becknell B, et al. *J Immunol Methods* 2005 296:115-23) 새로 결찰되어 Pinco-CS1-CAR 구조체가 산출되었다.

[0112] T 림프구의 레트로바이러스 형질도입

[0113] 레트로바이러스 상층액이 기존 문헌에서 설명된 바와 같이 (Becknell B, et al. *J Immunol Methods*. 2005 296(1-2):115-123; Yu J, et al. *Immunity*. 2006 24(5):575-590), Pinco- 또는 Pinco-CS1-CAR 구조체로 일시적으로 형질감염된 phoenix 포장 세포로부터 48 시간 동안 수집되었다. PBMC는 10% FBS를 포함하는 RPMI 1640 배지에서 배양되고 인간 T-활성체 CD3/CD28 Dynabeads (Invitrogen) 및 150 IU/mL 인간 재조합 인터류킨-2 (IL-2, Hoffman-La Roche Inc.)로 2 일 동안 자극되었다. 이후, 세포는 감염성 상층액에서 재현탁되고, 그리고 제조업체의 프로토콜에 따라 RETRONECTIN (Clontech Laboratories)-코팅된 비조직 배양액-처리된 6-웰 평판 내로 적용되었다. 감염 과정은 두 번째 일자에 1회 반복되었다. 이후, 세포는 조직-배양액-처리된 플라스크 내로 이전되고 150 IU/mL IL-2의 존재에서 유지되었다. 형질도입된 T 세포는 Pinco 백터에 의해 인코딩된 세포 표면 상에서 GFP 마커의 발현에 기초하여, FACSARIA II 세포 분류기 (BD Biosciences)를 이용하여 정제되었다.

[0114] 유세포분석법 분석

[0115] 세포 표면 상에서 CS1-CAR 발현의 검출을 위해, 형질도입된 T 세포는 4% 소 혈청 알부민을 내포하는 PBS로 세척되고, 그리고 아이소타입 대조로서 비오틴-표지화된 염소 항생쥐 (Fab)2 다중클론 항체 또는 정상적인 다중클론 염소 면역글로불린 G (IgG) 항체 (Jackson ImmunoResearch)와 함께 배양되었다. 이후 세포는 알로피코시아닌 (APC)-접합된 스트렙타비딘 (Jackson ImmunoResearch) 및 V450에 접합된 항-CD3 항체 (BD Biosciences)로 염색되었다. 골수종 세포의 표면 상에서 CS1의 발현을 결정하기 위해, 이를 세포는 피코에리트린 (PE)-접합된 생쥐 항-CS1 mAb (eBiosciences) 및 APC-접합된 생쥐 항-CD138 mAb (Miltenyi Biotec)로 염색되었다. 항체 염색은 BD LSRII 유세포분석기로 모니터링되었다. 데이터 분석은 FLOWJO 소프트웨어 (Tree Star Inc.)를 이용하여 수행되었다.

[0116] 면역블로팅

[0117] 세포는 laemmli 완충액에서 용해되었다. 용해물은 SDS-PAGE 겔에 의해 분리되고 니트로셀룰로오스 막

(Millipore)으로 이전되었다. 상기 막은 생쥐 항인간 CD3 ζ mAb (BD Pharmingen)로, 그리고 이후, 양고추냉이 과산화효소-접합된 염소 항생쥐 IgG 항체로 탐침되었다. 항체 결합은 증강된 화학발광 시약 (GE Healthcare Biosciences)을 이용함으로써 드러났다.

[0118] *CS1을 안정되게 발현하는 RPMI-8226 세포의 산출*

[0119] 전장 인간 CS1 코딩 서열은 IM9 cDNA로부터 PCR-증폭되고, 그리고 렌티바이러스 벡터 지정된 PCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP (PCDH, System Biosciences) 내로 삽입되어, PCDH-CS1이 산출되었다. 렌티바이러스를 생산하기 위해, 293T 세포는 인산칼슘 형질감염 시약 (Promega)을 이용하여, PCDH-CS1 플라스미드 또는 PCDH 빈 벡터 플라스미드 + 포장 플라스미드 pCMV-VSVG와 pCMV-dr9로 동시형질감염되었다. 이후, 렌티바이러스 상충액이 수확되고, 그리고 이전에 공개된 프로토콜 (Becknell B, et al. J Immunol Methods. 2005 296(1-2):115-123; Yu J, et al. Immunity. 2006 24(5):575-590)을 이용하여 RPMI-8226 세포를 감염시키는데 이용되었다.

[0120] *세포독성 검정*

[0121] 표준 4시간 ^{51}Cr 방출 검정이 기준 문헌에서 설명된 바와 같이 수행되었다(Yu J, et al. Blood 2010 115:274-81). 간단히 말하면, 표적 세포는 ^{51}Cr 로 표지화되고, 그리고 37 °C에서 4 시간 동안 96-웰 V-바닥 평판의 웰에서 다양한 작동체/표적 비율 (E/T)에서 T 세포와 공동배양되었다. 상충액이 수확되고 액체 신틸레이션 칵테일 (Fisher Scientific)을 내포하는 신틸레이션 바이알 내로 이전되고, 그리고 ^{51}Cr 의 방출이 TOPCOUNT 계수기 (Canberra Packard)에서 계측되었다. 완전한 배지 또는 1% SDS에서 배양된 표적 세포가 자발적 또는 최대 ^{51}Cr 방출을 결정하는데 이용되었다. 특정한 용해의 백분율은 표준 공식: $100 \times (\text{cpm 실험적 방출} - \text{cpm 자발적 방출}) / (\text{cpm 최대 방출} - \text{cpm 자발적 방출})$ 을 이용하여 계산되었다.

[0122] *사이토킨 방출 검정*

[0123] 표적 세포는 37 °C에서 24 시간 동안 96-웰 V-바닥 평판에서 동등한 숫자의 작동체 세포와 공동배양되었다. 무 세포 상충액이 수확되고, 그리고 제조업체의 프로토콜에 따라 R&D system으로부터 상응하는 ELISA 키트를 이용한 ELISA에 의해 IFN-g와 인터류킨 (IL)-2 분비에 대해 사정되었다.

[0124] *CD107a 탈과립 검정*

[0125] CD107a 검정이 약간 변형된 점을 제외하고 기준 문헌에서 설명된 바와 같이 수행되었다 (He S, et al. Blood 2013 121:4663-71). 간단히 말하면, MM 표적 세포 (2.5×10^5)는 96-웰 V-바닥 평판에서 웰마다 0.2 mL에서 동등한 숫자의 작동체 세포와 공동배양되었다. 대조 세포는 표적 세포 없이 배양된 모의- 또는 CS1-CAR-형질도입된 T 세포이었다. 1 mL 모넨신 (BD Biosciences)과 함께 APC (BD Biosciences)에 접합된 항-CD107a 또는 IgG1 아이소타입 항체가 첨가되고 37 °C에서 4 시간 동안 배양되었다. 세포는 PE-접합된 CD69와 V450-접합된 CD3 항체로 더욱 염색되고, 그리고 LSRII 유세포분석기 (BD Biosciences)를 이용하여 분석되었다.

[0126] *그랜자임 B와 퍼포린의 세포내 염색*

[0127] 모의- 또는 CS1-CAR-형질도입된 T 세포는 세척되고 V450-접합된 항인간 CD3 mAb로 염색되었다. 차후에, 세포는 Cytofix/Cytoperm 키트 (BD Biosciences)를 이용하여 고정되고 투과화되며, APC-접합된 항-그랜자임 B (Invitrogen), APC-접합된 항-퍼포린 항체 (eBiosciences) 또는 생쥐 APC-접합된 아이소타입 항체로 표지화되고, 그리고 이후, BD LSRII 유세포분석기 (BD Biosciences)에서 분석되었다.

[0128] *MM-보유 생쥐의 생체내 치료 및 생물발광 영상*

[0129] MM.1S와 IM9 골수종 세포는 개똥벌레 루시페라아제를 발현하는 Pinco-pGL3-luc/GFP 바이러스로 레트로바이러스에 의해 형질도입되었고, 그리고 GFP-양성 세포는 전술한 방법을 이용하여 분류되어, 각각 MM.1S-GL3과 IM9-GL3 세포가 산출되었다. 수컷 NSG 생쥐는 이종이식편 정위 MM 모델을 확립하기 위해 0 일자에 꼬리 정맥을 통해 400 μL 의 PBS에서 8×10^6 MM.1S-GL3 세포 또는 5×10^5 IM9-GL3 세포가 정맥내 주사되었다. 7과 14 일자 (MM.1S)에 또는 21 일자 (IM-9)에, 이들 생쥐는 꼬리 정맥을 통해 400 mL의 PBS에서 10×10^6 작동체 세포, CS1-CAR-형질도입된 T 세포 또는 모의-형질도입된 대조 세포가 정맥내 투여되었다. MM 세포로 접종 후 5 주에, 이들 생쥐는 D-루시페린 (150 mg/kg 체중; Gold Biotechnology)으로 복막내 주입되고, 이소플루란으로 마취되고, 그리고 Living Image 소프트웨어 (PerkinElmer)가 설치된 생체내 영상 시스템 (IVIS)을 이용하여 영상화되었다.

[0130] 통계학적 분석

[0131] 비대칭 스튜던트 t 검정은 정상적으로 분포되는 경우에 연속적 종결점에 대한 2개의 독립된 군을 비교하는데 활용되었다. 일원 변량분석(ANOVA)은 3개 또는 그 이상 독립된 군이 비교될 때 이용되었다. 생존 데이터를 위해, 카풀란 마이어 곡선이 플로팅되고 로그 순위 검증을 이용하여 비교되었다. 모든 검사는 양쪽이었다. P 값은 Bonferroni 방법을 이용하여 복수 비교를 위해 조정되었다. 0.05 보다 적은 P 값은 통계학적으로 유의한 것으로 고려된다.

[0132] 결과

[0133] CS1-특이적 CAR을 발현하는 일차성 T 세포의 산출

[0134] CS1-특이적 CAR (Pinco-CS1-CAR)을 인코딩하는 Pinco 레트로바이러스 벡터가 작제되었는데, 이것은 항-CS1 scFv, CD8 분자의 헌지와 막경유 영역, CD28 동시자극성 신호전달 모이어티, 그리고 CD3 ζ 분자의 세포질 성분으로 구성되었다 (도면 1a). 건강한 공여자로부터 항-CD3/CD28 항체-활성화된 일차성 T 세포는 CS1-CAR을 인코딩하는 레트로바이러스 입자 또는 빈 벡터 (모의)로 형질도입되고, 그리고 상기 레트로바이러스 구조체에 의해 인코딩된 GFP의 발현에 대해 분류되었다. CS1-CAR이 성공적으로 이전되었는지를 결정하기 위해, 분류된 세포는 용해되고 항-CD3 ζ mAb로 면역블로팅에 종속되었다. 도면 1b에 나타나 있는 바와 같이, 내인성 CD3 ζ 단백질만을 발현하는 모의-형질도입된 T 세포와 대조적으로, CS1-CAR-형질도입된 T 세포는 선천적 CD3 ζ에 더하여 예측된 크기에서 키메라 CS1-scFv-CD28-CD3 ζ 융합 단백질을 발현하였다. 세포 표면 상에서 CS1-CAR의 발현은 형질도입된 T 세포를 항-CS1의 scFv 부분을 인식하는 염소 항생주 Fab 항체로 염색함으로써 증명되었는데, 이것은 CS1-CAR-형질도입된 T 세포의 70.3%에서 scFV의 발현을 검출한 반면, 모의-형질도입된 T 세포에서는 발현이 거의 검출되지 않고 남아있었다 (도면 1c).

[0135] CS1-특이적 CAR T 세포에 의한 CS1⁺ 골수종 세포주의 인식

[0136] CS1의 표면 발현이 4가지 통상적으로 이용되는 골수종 세포주 NCI-H929, IM9, MM.1S, 그리고 RPMI-8226에서 유세포분석법에 의해 평가되었는데, 이것은 CS1 단백질이 최소 CS1 발현을 갖는 RPMI-8226 세포보다 NCI-H929, IM9, 그리고 MM.1S 세포에서 훨씬 높은 발현으로 이를 세포주에서 일정치 않게 발현된다는 것을 드러냈다 (도면 2a). 음성 대조로서, 형질전환된 인간 신장 세포주, 293T는 자신의 표면 상에서 CS1을 발현하지 않았다 (도면 7a). CS1을 내생적으로 발현하는 골수종 세포의 인식을 위한 CS1-CAR T 세포의 능력을 결정하기 위해, IFN-γ, 그리고 IL-2 분비가 각 골수종 세포주의 존재 또는 부재에서 모의-형질도입된 T 세포 또는 CS1-CAR-형질도입된 T 세포로부터 상충액에서 ELISA를 통해 계측되었다. 모의-형질도입된 T 세포 및 CS1-CAR-형질도입된 T 세포는 각각 단독으로, 미미한 수준의 IFN-γ 와 IL-2를 생산하였다 (도면 2b와 c); 하지만, 높은 수준의 CS1을 발현하는 NCI-H929와 IM9 세포에 노출 후, 훨씬 큰 양의 IFN-γ 와 IL-2 단백질이 CS1-CAR T 세포에 의해 분비되었지만 모의 T 세포에서는 그러하지 않았다. 높은 수준의 CS1 발현을 갖는 MM.1S 세포에 대한 응답으로, CS1-CAR-형질도입된 T 세포는 또한, 모의-형질도입된 T 세포보다 더욱 높은 양의 IFN-γ 를 생산하였지만 (도면 2b), 알려지지 않은 이유로, CS1-CAR-형질도입된 T 세포는 모의-형질도입된 T 세포보다 더욱 높은 수준의 IL-2를 분비하도록 이러한 세포주에 의해 촉발될 수 없었다 (도면 2c). 이에 더하여, T 세포의 상응하는 모의-형질도입된 부분집합과 비교하여, CD4⁺ (CD8⁻)와 CD8⁺ CS1-CAR T 세포 둘 모두 NCI-H929 또는 MM.1S 세포에 대한 응답으로 증가된 IFN-g 분비를 전시하였다 (도면 8a). 매우 낮은 수준의 CS1 발현을 갖는 RPMI-8226 세포의 경우에, 모의-형질도입된 T 세포와 CS1-CAR-형질도입된 T 세포 둘 모두 배경과 필적하는 낮은 수준의 IFN-g와 IL-2를 생산하였다 (도면 2b와 c). 이들 조사 결과는 모의-형질도입된 T 세포와 비교하여, CS1-CAR-형질도입된 T 세포가 높은 수준의 내인성 CS1 발현을 갖는 MM 세포를 더욱 특정하게 인식할 수 있고, 그리고 이들 MM 세포의 인식 후 더욱 활성화된다는 것을 암시한다.

[0137] CS1-특이적 CAR에 의해 촉발된 골수종 세포에 대항하여 시험관내 세포용해 효능

[0138] CS1-CAR T 세포에 의한 CS1⁺ 골수종 세포의 증강된 인식이 더욱 효율적인 종양 세포 용해를 야기할 수 있는지를 결정하기 위해, 표준 4-시간 크롬-51 방출 검정이 수행되었다. 높은 수준의 CS1을 발현하는 NCI-H929, IM9, 그리고 MM.1S 세포는 심지어 높게는 20:1의 E/T 비율에서, 모의-형질도입된 T-세포-매개된 사멸에 내성이었다; 하지만, 이들 세포는 검사된 모든 E:T 비율에서 CS1-CAR T 세포에 의해 효율적으로 용해되었다 (도면 3a, 왼쪽 3개). 하지만, 모의-형질도입된 T 세포와 비교하여, 낮은 수준의 CS1을 발현하는 RPMI-8226 세포의 세포용해 활성은 CS1-CAR-형질도입된 T 세포와 공동배양 시에 단지 약간 증대될 수 있었다 (도면 3a, 오른쪽 1개). T 세포

의 탈과립과 활성화는 앞서 언급된 바와 같이, 사이토킨 방출과 세포용해 활성에 대하여 CS1-CAR T 세포에서 강한 반응을 촉발하는 NCI-H929 골수종 세포와 함께 또는 이를 세포 없이 배양 이후에, 모의-형질도입된 T 세포 및 CS1-CAR-형질도입된 T 세포에서 CD107a와 CD69의 발현을 사정함으로써 더욱 특징화되었다. 사이토킨 방출 및 세포용해 활성에 관한 전술한 데이터와 일관되게, 탈과립과 활성화는 동원된 CD107a 및 활성화 마커, CD69의 표면 공동발현의 상향조절에 의해 증거된 바와 같이, NCI-H929 세포에 대한 응답으로 모의 T 세포에서보다 CS1-CAR T 세포에서 더욱 큰 정도로 일어났다 (도면 3b).

[0139] 게다가, T 세포의 상응하는 모의-형질도입된 부분집합과 비교하여, $CD4^+$ ($CD8^-$)와 $CD8^+$ CS1-CAR T 세포 둘 모두 NCI-H929 또는 MM.1S 세포에 의해 자극될 때 증가된 수준의 탈과립을 전시하였다 (도면 8b). 이에 더하여, 세포 내 염색 접근법을 이용하여, 모의-형질도입된 T 세포와 비교하여, CS1-CAR-형질도입된 T 세포는 심지어 표적 세포의 부재에서도 훨씬 높은 수준의 그랜자임 B를 발현하지만, 퍼포린에서는 그렇지 않았는데 (도면 3c와 d), 이것은 그랜자임 B가 CS1-전향된 T 세포의 세포용해 활성을 매개하는데 두드러지게 관련될 수 있다는 것을 암시한다. 이러한 발견은 합동된 CD28-CD3ζ 신호전달 모이어티를 함입하는 암배아 항원-특이적 CAR과 합체된 T 세포가 변형되지 않은 T 세포와 비교하여 상승된 수준의 그랜자임 B를 품는다는 것을 보여주는 이전 보고서와 일치한다 (Koehler H, et al. Cancer Res 2007 67:2265-73).

[0140] 표적 세포에서 CS1의 강제된 과다발현은 CS1-특이적 CAR T 세포에 의한 인식과 사멸을 증강한다

[0141] 높은 수준의 CS1을 발현하는 골수종 세포에 의해 자극될 때 사이토킨 방출과 세포독성의 면에서 CS1-CAR T 세포에서 훨씬 강한 반응은 내생적으로 낮은 수준의 CS1 발현을 갖는 골수종 세포에서 CS1의 이소성 발현이 사이토킨 방출과 세포용해에서 증가를 이끌어낼 수 있는지의 조사를 유발하였다. 이를 위해, 낮은 수준의 내인성 CS1 발현을 갖는 RPMI-8226 골수종 세포는 인간 CS1 또는 모의-형질도입된 대조로서 PCDH 빈 벡터를 인코딩하는 렌티바이러스로 형질도입되었다. 형질도입 효율은 렌티바이러스에 의해 인코딩된 GFP 단백질의 검출에 의해 모니터링되었고, 그리고 GFP-양성 세포의 백분율은 유세포 계측 분석에 의해 90%보다 많았다. CS1의 과다발현은 형질도입된 세포의 표면을 PE-접합된 항-CS1 항체로 염색함으로써 확증되었다 (도면 4a). 크롬-51 방출 검정은 강제된 CS1 발현이 모의-형질도입된 T 세포와는 대조적으로 CS1-CAR-형질도입된 T 세포에 의한 용해에 RPMI-8226 세포의 감수성에서 식별 가능한 증가를 유발한다는 것을 지시하였다 (도면 4b). 이후, IFN-γ 와 IL-2 생산이 ELISA에 의해 사정되었는데, 이것은 모의-형질도입된 T 세포와 비교하여, CS1-CAR-형질도입된 T 세포가 CS1을 과다발현하는 RPMI-8226 세포에 대한 응답으로 훨씬 높은 양의 IFN-γ 와 IL-2를 생산한다는 것을 보여준다; 한편, CS1-CAR T 세포가 빈 벡터-변형된 RPMI-8226 세포와 공동배양될 때, 단지 IFN-γ 분비에서 중간 정도의 증가 및 IL-2 분비에서 변화 없음만 있었다 (도면 4c와 d). 유사하게, 형질전환된 세포주인 CS1⁻ 293T에서 CS1의 과다발현은 또한, CS1-CAR T 세포에 의한 증강된 사이토kin 방출과 세포용해를 촉발하였다 (도면 7b-7d). 이것은 다른 종양 항원을 표적으로 하는 CAR T 세포에 관한 다른 보고서와 일치하였다 (Sanchez C, et al. Prostate Cancer Prostatic Dis 2013 16:123-31; Chinnasamy D, et al. J Clin Invest 2010 120:3953-68). 이들 조사 결과는 CS1-CAR T 세포에 의한 표적 세포의 증가된 인식과 사멸이 CS1-의존성 방식으로 일어난다는 것을 확증하였다.

[0142] 자가 CS1-특이적 CAR T 세포에 의한 원발성 골수종 세포의 향상된 인식과 사멸

[0143] 더욱 임상적으로 유관한 배경에서 CS1-특이적 CAR T 세포의 효과를 연구하기 위해, CS1-CAR-형질도입된 자가 T 세포가 골수종을 앓는 환자로부터 새로 단리된 종양 세포를 효율적으로 인식하고 사멸시킬 수 있는지가 조사되었다. 건강한 공여자로부터 T 세포와 유사하게, 재발된 골수종을 앓는 환자로부터 T 세포는 유세포분석법에 의해 결정될 때 항생체 Fab와 항인간 CD3 항체 둘 모두로 양성으로 T 세포 염색의 60.7%에 의해 현성된 바와 같이, 레트로바이러스 감염에 의해 성공적으로 확대되고 CS1-CAR을 발현하도록 조작되었다 (도면 5a). 환자로부터 원발성 CD138⁺ 골수종 세포는 양성 자성 선별을 이용하여 단리되고, 그리고 원발성 골수종 세포는 유세포분석법을 이용하여 CS1의 표면 발현에 대해 균일하게 양성인 것으로 판찰되었다 (도면 5b). 크롬-51 방출 검정에 의해, 환자로부터 골수종 세포는 자가 모의-형질도입된 T 세포에 의한 용해에 고도로 내성이지만, 심지어 낮은 (2.5:1) (E/T) 비율에서도 자가 CS1-CAR-형질도입된 T 세포에 감수성이 되는 것으로 판찰되었다 (도면 5c). 이들 세포독성 결과와 일관되게, 자가 CS1-CAR T 세포는 자가 모의-형질도입된 T 세포와 비교하여 골수종 세포에 대한 응답으로 훨씬 높은 양의 IFN-γ 을 생산하였다 (도면 5d). 이들 조사 결과는 CS1-CAR-장비된 T 세포가 탈체에서 자가 환경에서 골수종 세포를 효율적으로 인식하고 근절할 수 있다는 것을 증명한다.

[0144] CS1-지향된 T 세포는 정위 이종이식편 골수종 모델에서 생체내 종양 성장을 억제하고 종양-보유 생쥐의 생존을

연장한다

- [0145] CS1-CAR T 세포의 치료 잠재력은 MM.1S-합체된 NSG 생쥐 모델에서 평가되었다. MM.1S 세포의 정맥내 주사는 MM의 생쥐 이종이식편 모델을 확립하는데 폭넓게 이용되었는데, 그 이유는 이것이 골수와 뼈에서 이식뿐만 아니라, 인간 MM을 가깝게 재현하는 다병소성 뼈 병변의 일관된 확립을 야기할 수 있기 때문이다 (Mitsiades CS, et al. Cancer Cell 2004 5:221-30; Runnels JM, et al. J Biomed Opt 2011 16:011006). 종양 성장의 모니터링을 용이하게 하기 위해, MM.1S 세포는 레트로바이러스 감염에 의해 GFP와 개똥벌레 루시페라아제 둘 모두를 발현하도록 가공되었고, 그리고 GFP⁺ 세포는 분류되고 종양 성장을 개시하기 위해 NSG 생쥐 내로 정맥내 합체되었다. 이들 생쥐는 이후, 모의-형질도입된 T 세포, CS1-CAR-형질도입된 T 세포 또는 PBS가 정맥내 주입되었다. 이전 보고서 (Mitsiades CS, et al. Cancer Cell 2004 5:221-30; Runnels JM, et al. J Biomed Opt 2011 16:011006)와 일관되게, IVIS를 이용한 생물발광 영상은 PBS-처리군에서 MM.1S-보유 NSG 생쥐가 두개골, 척추골, 골반, 그리고 대퇴골에서 파종성 종양 병변이 발생하고 (도면 6a), 그리고 대다수의 생쥐가 종양 세포의 접종 후 5 주에 뒷다리 마비를 전시한다는 것을 보여주었다. CS1-CAR T 세포의 주입은 생물발광 영상에 의해 결정될 때 종양 부담을 두드러지게 감소시킬 뿐만 아니라 MM.1S-보유 NSG 생쥐의 전반적인 생존을 연장한 반면, 모의-감염된 T 세포의 주입은 효율적인 종양 근절 및 생쥐의 향상된 생존을 유발하는데 실패하였다 (도면 6a와 b).
- [0146] CS1-CAR T 세포의 생체내 항-MM 능력을 더욱 검증하기 위해, CS1-CAR T 세포의 충격이 IM9-합체된 NSG 생쥐 모델을 이용하여 평가되었다. MM.1S를 이용하여 도시된 것들과 유사한 데이터가 관찰되었다. 생물발광 영상은 CS1-CAR-형질도입된 T 세포의 주입은 IM9-보유 생쥐에서 확립된 종양을 효율적으로 근절할 수 있는 반면, 모의-형질도입된 T 세포의 주입은 종양 부담을 감소시키는데 실패한다는 것을 지시하였다 (도면 9a). 초기 치료 후 44 일에, CS1-CAR T-세포 주입을 받은 IM9-보유 생쥐에 대해 100% 생존율이 관찰된 반면, 각각 모의 T 세포와 PBS를 받은 대조 생쥐의 경우에 생존율이 단지 28.6%와 16.7%이었다 (도면 9b).
- [0147] 실시예 2: CS1-특이적 키메라 항원 수용체 (CAR)-가공된 자연 살해 세포는 인간 다발성 골수종에 대항하여 시험관내와 생체내 항종양 활성을 증강한다
- [0148] 본 연구에서, 인간 NK 세포는 CS1 특이적이고, 그리고 CD28-CD3ζ 동시자극성 신호전달 도메인을 함입하는 CAR을 발현하도록 가공되었다. 이들 세포의 항-MM 기능은 시험관내에서 및 MM의 생체내 정위 이종이식편 생쥐 모델에서 평가되었다. 결과는 CS1-CAR의 발현이 시험관내와 생체내 둘 모두에서 CS1-발현 MM 세포를 특이적으로 및 효율적으로 근절하도록 NK 세포를 전향시킬 수 있고, 그리고 이러한 근절이 CS1 의존성이라는 것을 보여주었다. 상기 데이터는 이러한 CAR 전략이 난치성 또는 재발된 MM을 앓는 환자를 치료하기 위한 수단으로서 효과적인 NK 세포-기초된 면역요법의 개발에 적합하다는 것을 암시한다. 이에 더하여, CAR T 세포와 대조적으로, CAR NK 세포는 동종이계 NK 세포 공급원의 이용을 허용하는데, 이들은 이식편-대-숙주 질환을 유발할 것 같지 않고 심지어 이를 억제하는데 도움이 될 수도 있고 (Olson JA, et al. Blood 2010 115:4293-4301), 한편으로 또한, 부정합된 퀄리 면역글로불린-유사 수용체 (KIRs)로 인한 세포독성에서 증가를 강화할 수도 있다 (Ruggeri L, et al. Science 2002 295:2097-2100).
- [0149] 재료와 방법
- [0150] 세포 배양
- [0151] 인간 다발성 골수종 세포주 L363 (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany), IM9 [American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA] 및 U266 (ATCC)은 10% 소 태아 혈청 (FBS)을 포함하는 RPMI 1640 배지 (Life Technologies, Grand Island, NY, USA)에서 유지되었다. 인간 IL-2-의존성 NK 세포주 NK-92 (ATCC) 및 NKL은 20% FBS 및 150 IU/mL rhIL-2로 보충된 RPMI 1640 배지 (Hoffman-LaRoche Inc., Nutley, NJ, USA)에서 유지되었다. 293T (ATCC), 그리고 phoenix 포장 세포주는 10% FBS를 포함하는 DMEM 배지에서 유지되었다. 원발성 CD138⁺ MM 세포는 제조업체의 프로토콜에 따라, EASYSEP 인간 전혈과 골수 CD138 양성 선별 키트 (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada)를 이용하여 MM 환자의 골수 흡인물로부터 단리되었다. 모든 인간 작업은 Ohio State University Institutional Review Board에 의해 승인되었다.
- [0152] 생쥐
- [0153] 6- 내지 8-주령 NOD.Cg-prkdcscid IL2rgtm1Wjl/szJ (NSG) 생쥐는 Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME,

USA)로부터 획득되었다. 모든 동물 작업은 Ohio State University Animal Care and Use Committee에 의해 승인되었다. 생쥐는 MM 질환 진행에 대해 빈번하게 모니터링되고, 그리고 그들이 뒷다리 마비, 기면, 그리고 명백한 체중 감소의 증상으로 빈사 상태에 있을 때 희생되었다.

[0154] 항-CS1 CAR 렌티바이러스 구조체의 산출

하이브리도마 세포주 Luc90으로부터 증폭된 CS1-scFv 단편은 CS1-VL-인코딩 서열 직후에 Myc 태그를 인코딩하는 서열과 융합되었다. 융합된 DNA 서열은 레트로바이러스 백터로부터 절개된 CD28-CD3 ζ와 통합되었다. 전체 CS1-scFv-myc 태그-CD28-CD3 ζ 단편은 PCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP (PCDH, System Biosciences, Mountain View, CA, USA)로서 명명된 렌티바이러스 백터 내로 결찰되어 PCDH-CS1-scFv-myc 태그-CD28-CD3 ζ (PCDH-CS1-CAR) 구조체가 산출되었다.

[0155] NK 세포의 렌티바이러스 생산과 형질도입

VSVG-가성유형 렌티바이러스 상층액을 생산하기 위해, DMEM 배지 (Invitrogen)에서 배양된 293T 세포는 인산칼슘 형질감염 시약 (Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여, 포장 구조체, pCMV-VSVG와 pCMV-dr9와 함께 PCDH-CS1-scFv-CD28-CD3 ζ 또는 PCDH 대조 백터 (빈 백터로 모의 감염을 위한 바이러스를 산출하기 위해)로 동시형질감염되었다. 24 시간 후, DMEM 배지가 20% FBS를 내포하는 RPMI-1640 배지로 대체되었다. 형질감염 후 48 시간에, 렌티바이러스를 내포하는 적응용 배지가 수확되고, 그리고 세포 조직파편을 제거하기 위해 0.45 μm 필터 단위 (Millipore, Billerica, MA, USA)를 통해 여과되었다. 바이러스 감염이 8 μg/mL 폴리브렌 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 및 450 IU/mL rhIL-2를 내포하는 2 mL의 총 체적의 렌티바이러스 상층액에서 2×10^6 NK-92 또는 NKL 세포를 이용하여 6-웰 평판에서 수행되었다. 세포는 32 °C에서 45 분 동안 1,800 rpm에서 원심분리되고, 이후 평판이 37 °C에서 2 시간 동안 인큐베이터에서 배치되었다. 감염은 이후, 동일자에서 재차, 그리고 그 다음날 1회 추가 반복되었다. 세 번째 형질도입 후, 세포는 20% FBS 및 150 IU/mL rhIL-2로 보충된 RPMI 1640 배지에서 37 °C에서 유지되었다. 형질도입된 NK 세포는 FACS Aria II 세포 분류기 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 이용한 2 라운드의 세포 분류에 의해 놓축되었다. 양성 세포는 PCDH 백터에서 인코딩된 녹색 형광 단백질 (GFP) 표면 마커의 발현에 기초하여 선별되었다.

[0156] CS1을 안정되게 발현하는 U266 세포주의 산출

인간 CS1 코딩 서열은 PCR을 통해, IM9 세포로부터 단리된 cDNA로부터 증폭되고, 이후 PCDH 렌티바이러스 백터 내로 하위클로닝되어 PCDH-CS1 구조체가 산출되었다. U266 세포의 렌티바이러스 생산과 감염은 앞서 설명된 방법을 이용하여 수행되었다. GFP-양성 세포는 이후, FACS Aria II 세포 분류기 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 이용하여 분류되었다.

[0157] 면역블로팅 분석

세포는 PBS로 세척되고 laemmli 완충액에서 직접적으로 용해되었다. 용해물은 4% 내지 15% 구배 SDS-PAGE 겔 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)에서 전기영동적으로 분리되고 니트로셀룰로오스 막 (EMD Millipore, Billerica, MA, USA)으로 이전되었다. 상기 막은 0.1% Tween 20으로 보충된 Tris 완충된 식염수 (TBS)에서 5% 우유로 차단되었다. 생쥐 항인간 CD3 ζ 사슬 단일클론 항체 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA)는 0.1% Tween 20으로 보충된 TBS에서 5% 우유로 1:1,000 희석되었고, 그리고 이러한 항체 용액은 하룻밤 동안 상기 막과 반응하도록 첨가되었다. 상기 막은 이후, Tween 20으로 보충된 TBS에서 3회 세척되었다. HRP-접합된 이차 항체 (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA, USA)는 0.1% Tween 20으로 보충된 TBS에서 5% 우유로 1:5,000 희석되고 상기 막에 첨가되어 1 시간 동안 방치되었다. 상기 막은 Tween 20으로 보충된 TBS에서 다시 한 번 4회 세척되었고, 그리고 증강된 화학발광 시약 (ECL; GE Healthcare Biosciences)이 1 분 동안 첨가되었다. 블롯은 이후, 적절하게 노출된 이미지를 산출하기 위해 다양한 길이의 시간 동안 필름에 노출되었다.

[0158] 유세포분석법

CS1-CAR의 표면 발현을 분석하기 위해, 형질도입된 NK 세포의 단일 세포 혼탁액이 항-Myc 태그 생쥐 mAb 9E10 (Sigma-Aldrich)과 함께 4 °C에서 1 시간 동안 배양되었다. 세포는 PBS로 2회 세척되고, 그리고 이후, PE-접합된 쥐 항생쥐 IgG1 이차 항체 (BD Pharmingen)와 함께 4 °C에서 30 분 동안 배양되었다. 골수종 세포 상에서 CS1과 CD138의 표면 발현은 세포가 PE-접합된 생쥐 항-CS1 mAb (eBiosciences, San Diego, CA, USA) 및 APC-접합된 생쥐 항-CD138 mAb (BD Pharmingen)로 염색된 후에, BD LSRII 분석기를 이용한 FACS 분석에 의해 조사되었다. 데이터 분석은 FLOWJO 소프트웨어 (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA)를 이용하여 수행되었다.

[0164] 세포독성 검정

[0165] NK 세포-매개된 용해의 검출을 위해, MM 표적 세포는 100 mCi 크롬-51 (^{51}Cr)로 1.5 시간 동안 표지화되고, 정규 RPMI 배지로 4회 세척되고, 그리고 100 μl 부피의 96-웰 V-바닥 마이크로역가 평판에서 웰마다 5,000개 세포의 농도로 조정되었다. FACS-농축된 모의- 또는 CS1-CAR-형질도입된 NK 세포가 다양한 작동체 대 표적 (E:T) 비율에서 삼중 웰 내로 100 μl 부피에서 첨가되었다. 37 °C에서 4 시간 배양 후, 100 μl 의 상층액이 각 웰로부터 수확되고, 그리고 ^{51}Cr 의 방출이 TOPCOUNT 계수기 (Canberra Packard, Meriden, CT, USA)에서 계측될 수 있도록, 액체 신틸레이션 칵테일 (Fisher scientific, Pittsburgh, PA, USA)을 내포하는 신틸레이션 바이알로 이전되었다. 최대 ^{51}Cr 방출을 결정하기 위해, 표적 세포 혼탁액은 100 μl 의 SDS와 함께 배양되었다. 특정한 용해의 백분율은 표준 공식: $100 \times (\text{cpm 실험적 방출} - \text{cpm 자발적 방출}) / (\text{cpm 최고 방출} - \text{cpm 자발적 방출})$ 을 이용하여 계산되었다.

[0166] 인터페론- γ 방출 검정

[0167] 골수종 표적 세포는 96-웰 V 바닥 평판에서 24 시간 동안 NK 작동체 세포와 공동배양되었다. 모두 합쳐, 2.5×10^5 골수종 세포주 세포 또는 1.0×10^5 원발성 골수종 세포가 각각, 2.5×10^5 또는 5.0×10^5 NK 세포와 함께 배양되었다. 무세포 상층액이 제조업체의 프로토콜에 따라, R&D systems (Minneapolis, MN, USA)로부터 키트를 이용하여 효소 결합 면역흡착 검정 (ELISA)에 의해 인터페론- γ (IFN- γ) 분비에 대해 검정되었다. 도면에서 묘사된 데이터는 유사한 결과를 갖는 3가지 대표적인 실험 중에서 한 가지로부터 삼중 웰의 평균 값을 나타낸다.

[0168] 정위 MM 생쥐 모델 및 MM-보유 생쥐의 생체내 치료 및 생물발광 영상

[0169] IM9 세포는 기준 문헌에서 설명된 바와 같이 (He S, et al. Blood 2013 121:4663-4671), 개똥벌레 루시페라아제를 발현하는 Pinco-pGL3-luc/GFP 바이러스로 레트로바이러스에 의해 형질도입되었다. GFP-양성 세포는 FACS Aria II 세포 분류기 (BD Biosciences)를 이용하여 분류되고, 그리고 'IM9-Luc' 세포로서 명명되었다. 이후, 6- 내지 8-주령 수컷 NSG 생쥐는 이종이식편 정위 MM 모델을 확립하기 위해, 0 일자에 꼬리 정맥을 통해 400 μl 의 인산염 완충된 식염수에서 0.5×10^6 IM9-Luc MM 세포가 정맥내 (i.v.) 주사되었다. 7 일자에 시작하여, 이들 생쥐는 5 일마다 1회 (총 5회) 400 μl 의 인산염 완충된 식염수에서 5×10^6 작동체 세포, 다시 말하면, CS1-CAR NK-92 세포 또는 모의-형질도입된 대조 세포가 i.v. 주사되었다. IM9-Luc 접종 후 4 주에, 이들 생쥐는 D-루시페린 (150 mg/kg 체중; Gold Biotechnology, St. Louis, MO, USA)이 복막내 (i.p.) 주입되고, 이소플루란으로 마취되고, 그리고 Living Image 소프트웨어 (Perkin-Elmer)가 설치된 생체내 영상 시스템 (IVIS-100, Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA)을 이용하여 영상화되었다.

[0170] 면역조직화학 분석

[0171] 척추 척추골은 10% 완충된 포르말린 인산염에서 고정되고, 포화된 EDTA에서 탈석회화되고, 그리고 이후, 파라핀에서 포매되었다. 5-마이크론 두께 색션은 조직학적 검사를 위해 헤마톡실린 및 에오신 (H&E)으로 염색되었다. 이들 색션은 인간 MM 세포의 확인을 위해, 표준 면역조직화학 염색 절차에 따라서 생쥐 항인간 CD138 mAb (1:50 희석; Thermo-Scientific, Waltham, MA, USA)로 면역염색되었다. 양고추냉이 과산화효소-접합된 항생쥐 IgG가 이차 항체로서 이용되었고, 그 이후에 폐록시다아제 효소적 반응이 수행되었다.

[0172] 통계

[0173] 비대칭 스튜던트 t 검증은 정상적으로 분포되는 경우에 연속적 종결점에 대한 2개의 독립된 군을 비교하는데 활용되었다. 일원 변량분석(ANOVA)은 3개 또는 그 이상 독립된 군이 비교될 때 이용되었다. 비-정상적으로 분포된 종결점, 예를 들면, 생체내 생물발광 강도의 경우에, 크루스칼 왈리스 검사가 NK-92-CS1-CAR 대 NK-92-EV와 인산염 완충된 식염수 군의 중앙값을 비교하는데 활용되었다. 생존 데이터를 위해, 카플란 마이어 곡선이 플롯팅되고 로그 순위 검증을 이용하여 비교되었다. 모든 검사는 양쪽이었다. P 값은 Bonferroni 방법에 의해 복수 비교를 위해 조정되었다. <0.05의 P-값은 통계학적으로 유의한 것으로 고려된다.

[0174] 결과

[0175] CS1-CAR을 발현하는 NK-92와 NKL NK 세포의 산출

[0176] 특정한 CS1-CAR 구조체는 신호 웹티드 (SP), 중쇄 가변 영역 (VH), 링커, 경쇄 가변 영역 (VL), Myc 태그,

한지, CD28 및 CD3 ζ 를 순차적으로 내포하는 PCDH 렌티바이러스 벡터 중추로 산출되었다 (도면 13a). NK-92와 NKL 세포주는 CAR 구조체로 형질도입되고, 그리고 이후, 상기 벡터에 의해 발현된 마커인 GFP의 발현에 대해 분류되었다. 분류된 세포의 웨스턴 블로팅은 CS1-CAR이 대조 벡터보다는 CAR 구조체로 형질도입된 NK-92와 NKL 세포주 둘 모두에서 CD3 ζ 을 내포하는 키메라 CS1-scFv 수용체의 발현에 의해 증거된 바와 같이, 성공적으로 도입되고 발현된다는 것을 증명하였다 (도면 13b). 게다가, 항-Myc Ab 표면 염색 후 유세포 계측 분석은 CS1-CAR이 CS1-CAR 구조체로 형질도입된 NK-92와 NKL 세포 둘 모두의 표면 상에서 발현된다는 것을 지시하였다 (도면 13c).

[0177] CS1-CAR-변형된 NK 세포는 모의-형질도입된 NK 세포와 비교하여, 시험관내에서 CS1 $^+$ MM 세포를 더욱 효과적으로 근절하지만 CS1 $^-$ 세포에서는 그렇지 않다.

[0178] CS1-CAR NK 세포를 산출한 후에, 이들은 CS1 $^-$ MM 세포보다 CS1 $^+$ 을 더욱 선별적으로 사멸시키는지가 결정되었다. 이런 목적으로, IM9와 L363 MM 세포주는 그들의 표면 상에서 CS1 단백질을 구조성으로 발현하는 반면, U266 MM 세포에서는 CS1의 발현이 미미한 것으로 최초 확증되었다 (도면 14a). 그 다음, 4시간 크롬-51 방출 검정은 모의-형질도입된 NK-92 세포와 비교하여, CS1-CAR로 형질도입된 NK-92 세포는 CS1 $^+$ IM9와 L363 세포를 사멸시키는 그들의 능력에서 유의미하게 증강된다는 것을 지시하였다 (도면 14b와 14c, 왼쪽 패널). 유사한 데이터가 CS1-CAR로 형질도입된 NKL 세포를 이용하여 반복된 실험에서 관찰되었다 (도면 14b와 14c, 오른쪽 패널). 하지만, CS1-CAR-과 모의-형질도입된 NK-92 또는 NKL 세포 둘 모두 CS1U266 골수종 세포에 대항하여 그들의 낮은 수준의 세포독성에서 유사하였다 (도면 14d). 이에 더하여, CS1-CAR의 강제된 발현은 유세포분석법을 이용한 7AAD/아넥신 V-염색의 분석에 의해 결정될 때 NK-92 또는 NKL 세포에서 명백한 아폽토시스를 유도하지 않았는데 (도면 20), 이것은 CS1-CAR 발현이 NK-92 또는 NKL 세포 그들 자체에 대한 세포독성을 유발하지 않는다는 것을 암시하였다. 유사하게, 정제된 일차 인간 NK 세포에서 CS1-CAR 발현은 CS1 $^+$ IM9 골수종 세포에 대항하여 그들의 세포독성을 증대시켰다.

[0179] CS1-CAR-변형된 NK 세포는 CS1 $^+$ MM 세포에 노출 후 모의-형질도입된 NK 세포보다 더욱 많은 IFN- γ 을 분비한다

[0180] CAR 구조체 내에 포함된 CD28 동시자극성 분자의 신호전달 도메인은 MM 세포의 표면 상에서 CS1 항원으로 CS1 scFv의 인식 후 활성화를 증강할 수 있다. 이런 이유로, 이러한 신호전달 도메인의 포함은 더욱 높은 세포독성을 가질 뿐만 아니라 더욱 많은 IFN- γ 를 생산하기 위해 NK 세포를 활성화시키는 능력을 가질 수 있는데, 이들 중에서 후자는 또한, CD8 $^+$ T 세포와 대식세포의 종양 감시와 활성화에 중요하다 (Martin-Fontech A, et al. Nat Immunol 2004; 5:1260-1265; Tu SP, et al. Cancer Res 2011; 71:4247-4259; Ma J, et al. Cell Mol Life Sci 2003; 60:2334-2346). 이것을 검사하기 위해, CS1-CAR-변형된 또는 대조-가공된 작동체 NK 세포는 단독으로 배양되거나 또는 IM9와 L363 MM 세포주를 비롯한 CS1 $^+$ 골수종 세포와 공동배양되었다. 24시간 후, IFN- γ 생산이 ELISA에 의해 계측되었다. 도면 15에 나타나 있는 바와 같이, CS1-CAR-변형된 NK-92 또는 NKL 세포 및 모의-형질도입된 NK-92 또는 NKL 세포 둘 모두 단독으로 배양될 때 낮은 또는 미미한 수준의 IFN- γ 를 자발적으로 생산하였다. CS1 $^-$ MM 종양 세포 (IM9 또는 L363)와 공동배양은 CS1-CAR과 모의-형질도입된 NK-92 또는 NKL 세포주 둘 모두에서 IFN- γ 를 유도하였다; 하지만, 모의-형질도입된 NK-92 (도면 15a와 15b, 왼쪽 패널) 또는 NKL 세포 (도면 15a와 15b, 오른쪽 패널)보다 CAR-변형된 NK-92 또는 NKL 세포에 의해 훨씬 높은 수준의 IFN- γ 가 생산되었다. CS1 $^-$ MM 세포주, U266와 공동배양될 때, 모의-형질도입된 NK-92 세포 및 CS1-CAR-형질도입된 NK-92 세포 둘 모두 U266 세포와 공동배양되지 않은 상응하는 세포보다 더욱 높은 수준의 IFN- γ 를 생산하지만, 형질도입된 NKL 세포는 그렇지 못하였다 (도면 15c). 이것은 NK-92 세포 상에서 NK 세포 수용체 및 U266 세포 상에서 그들의 리간드 사이에 독특한 상호작용이 NK-92 세포에 의한 CS1-독립된 IFN- γ 생산을 유도할 수 있다는 것을 암시한다. 게다가, CS1-CAR-형질도입된 NK-92와 NKL 세포는 그들이 U266 세포와 공동배양될 때, 상응하는 모의-형질도입된 NK-92와 NKL 세포보다 더욱 많은 IFN- γ 를 생산하는데 실패하였다 (도면 15c). 이를 결과는 전술한 세포독성 데이터와 일치하고, 그리고 종합하면, CS1-CAR로 변형이 CS1 $^-$ 골수종 세포가 아닌 CS1 $^+$ 골수종 세포에 대한 응답으로, 세포독성과 IFN- γ 생산 둘 모두의 면에서 NK 세포 작동체 기능을 극적으로 증강할 수 있다는 것을 지시한다.

[0181] U266 세포에서 강제된 CS1 발현은 NK-92-CS1-CAR 세포의 세포독성과 IFN- γ 생산을 증강한다

[0182]

그 다음, CS1-CAR NK 세포의 이러한 증강된 활성이 MM 세포 상에서 CS1 항원 발현에 의존하는지가 탐구되었다. 전술한 관찰 - CS1-CAR의 도입이 CS1⁻ U266 골수종 세포가 아닌 CS1⁺ 골수종 세포에 대한 응답으로 증가된 세포 독성 활성 및 증강된 IFN- γ 생산을 NK-92 세포에 부여하는 것 - 은 U266 세포에서 CS1 과다발현이 NK-92-CS1-CAR 세포에 대한 U266 세포의 감수성을 변화시키는데 충분한지의 조사를 유발하였다. 이런 목적으로, CS1은 렌티바이러스 감염에 의해 U266 세포에서 이소성으로 발현되었다. 유세포 계측 분석은 CS1 단백질이 U266-CS1 세포의 표면 상에서 성공적으로 발현된다는 것을 확증하였다 (도면 16a). 크롬-51 방출 검정은 모의-형질도입된 NK-92 세포와 비교될 때, CS1을 과다발현하는 U266 세포를 향한 CS1-CAR-형질도입된 NK-92 세포의 세포독성 활성에서 유의미한 증가가 있다는 것을 지시하였다 (도면 16b). 유사하게, 모의 형질도입된 NK-92 세포를 내포하는 평행 공동배양액과 비교하여, CS1을 과다발현하는 U266 세포와 공동배양된 NK-92-CS1-CAR 세포는 훨씬 높은 수준의 IFN- γ 를 분비하였다 (도면 16c). 하지만, 도면 14d와 15c에서 데이터와 일관되게, NK-92-CS1-CAR 세포와 모의-형질도입된 NK-92 세포가 빈 벡터 대조로 형질도입된 U266 세포와 함께 배양될 때, 이들 세포 사이에 세포 독성과 IFN- γ 분비에서 차이가 없었다 (도면 16b와 16c). 이들 결과는 NK-92-CS1-CAR 세포에 의한 골수종 세포의 증가된 인식과 사멸이 CS1-의존성 방식으로 발생한다는 것을 암시하였다.

[0183]

NK-92-CS1-CAR 세포의 표현형 특성화

[0184]

그 다음, CS1-특이적 CAR의 발현이 NK 세포 표현형을 변화시킬 수 있는지가 조사되었다. 유세포분석법이 IM9 골수종 세포의 존재 또는 부재에서 배양 이후에, CS1-CAR-형질도입된 NK-92 세포와 모의-형질도입된 NK-92 세포의 표면 상에서 항원의 발현을 비교하는데 이용되었다. 도면 17a에 나타나 있는 바와 같이, IM9 세포의 존재 또는 부재에서 배양되는지와 상관없이, NKp30, NKp46, NKG2C와 NKG2D를 비롯한 NK 세포 수용체의 발현에서 CS1-CAR-과 모의-형질도입된 NK-92 세포 사이에 차이가 없었다. NK 세포 활성화 마커, CD6928과 HLA-DR (Phillips JH, et al. J Exp Med 1984 159:993-1008; Spits H, et al. Immunity 2007 26:11-16)의 발현 역시 사정되었다. IM9 세포의 인식은 모의-형질도입된 NK-92 세포에서 CD69 발현을 이끌어내지 못하였지만, CS1-CAR-형질도입된 NK-92 세포의 표면 상에서 CD69 발현에서 중간 정도, 하지만 유의미한 증가를 유도하였다 (도면 17a). 흥미롭게도, IM9 세포와 공동배양은 CS1-CAR-형질도입된 NK-92 세포와 모의-형질도입된 NK-92 세포 둘 모두에서 HLA-DR의 발현에서 극적인 증가를 유발하였다. IM9 표적 세포의 부재에서, CS1-CAR-형질도입된 NK-92 세포와 모의-형질도입된 NK-92 세포 사이에 HLA-DR 발현에서 명백한 차이가 없었다; 하지만, IM9 세포로 자극 시에, HLA-DR의 발현이 모의-형질도입된 NK-92 세포에서보다 NK-92-CS1-CAR 세포에서 훨씬 높아졌다. 따라서, NK-92-CS1-CAR 세포에서 발현된 활성화 마커, 특히 HLA-DR에서 증가는 이들 세포가 CS1⁺ MM 세포에 노출될 때 이들에 의한 증강된 세포독성과 IFN- γ 생산과 관련하여 일어났을 수도 있다. 세포내 염색을 이용하여, 모의-형질도입된 NK 세포와 비교될 때, NK-92-CS1-CAR 세포는 심지어 MM 종양 세포의 부재에서도, 훨씬 높은 수준의 퍼포린과 그랜자임 B 발현을 가졌다 (도면 17b와 17c). 이것은 CAR T 세포에서 그랜자임 B의 상승된 발현에 관한 이전 보고서 (Koehler H, et al. Cancer Res 2007 67:2265-2273)와 일치하고, 그리고 또한, 퍼포린과 그랜자임 B 발현이 NK 세포의 세포독성 활성과 전반적으로 상관된다는 사실 (Krzewski K, et al. Front Immunol 2012 3:335)과 일치한다.

[0185]

CS1-CAR-형질도입된 NK-92 세포는 탈체에서 NK-내성 원발성 MM 세포를 더욱 효과적으로 인식하고 사멸시킨다

[0186]

이들 조사 결과를 임상적으로 더욱 유관하게 만들기 위해, CS1-CAR-변형된 NK-92 세포는 또한, 탈체에서 원발성 MM 세포를 인식할 때 증강된 세포용해 활성과 IFN- γ 생산을 품는지가 조사되었다. 유세포분석법이 MM 환자로부터 원발성 CD138⁺ 자성 비드-선별된 MM 세포에서 CS1의 표면 발현을 사정하는데 이용되었다 (도면 18a). CS1 단백질이 CD138 자성 비드-정제된 MM 환자 세포에서 고도로 발현된다는 것을 보여주는 이전 보고서 (Hsi ED, et al. Clin Cancer Res 2008 14:2775-2784; Tai YT, et al. Blood 2008 112:1329-1337)에 따르면, CS1 단백질은 원발성 MM 세포의 표면 상에서 실제로 균일하게 발현되었다 (도면 18a). 크롬-51 방출 검정에 의해, MM 환자로부터 새로 단리된 원발성 골수종 세포는 심지어 높개는 40:1 및 20:1의 E:T 비율에서 NK-92 세포-매개된 용해에 고도로 내성인 것으로 나타났다; 하지만, 이러한 내성은 CS1-CAR의 NK-92 세포 발현에 의해 부분적으로 극복될 수 있었는데, 이것은 원발성 골수종 세포의 근절에서 극적인 증가를 유발하였다 (도면 18b). 세포독성 결과와 일관되게, 원발성 골수종 세포와 24 시간 공동배양 후, CS1-CAR-형질도입된 NK-92 세포는 또한, 모의-형질도입된 NK-92 세포보다 훨씬 높은 수준의 IFN- γ 를 분비하였다 (도면 18c).

[0187]

CS1-CAR-형질도입된 NK-92 세포는 정위 이종이식편 MM 모델에서 MM 종양 성장을 저해하고 종양-보유 생쥐의 생존을 연장한다

[0188]

NK-92-CS1-CAR 세포의 잠재적 치료적 적용을 더욱 해소하기 위해, 이들의 항종양 활성이 IM9-이종이식된 NSG 생쥐에서 조사되었다. 개똥벌레 루시페라아제를 발현하는 IM9 세포주 (IM9-Luc)는 개똥벌레 루시페라아제를 발현하는 바이러스로 IM9 세포를 레트로바이러스에 의해 형질도입하고, 이후 GFP-기초된 세포 분류를 수행함으로써 산출되었다. 전장 개똥벌레 루시페라아제 mRNA의 발현은 RT-PCR에 의해 확증되었다. 전형적인 골수종 세포와 유사하게, IM9-Luc 세포는 그들의 표면 상에서 CD138 단백질을 발현하였다. 이전 보고서 (Francisco JA, et al. Cancer Res 2000 60:3225-3231)와 일관되게, IM9-Luc-보유 NSG 생쥐는 뒷다리 마비 및 보행성 운동실조에 의해 현성된 파종성 질환을 전시하였다. 뒷다리 마비를 전시하는 생쥐에서 척추 척추골의 조직학적 검사는 뼈 조직 내에 다양한 종양 세포와 골용해성 병변의 존재를 보여주었다 (도면 19a, 왼쪽). 인간-특이적 항-CD138 항체로 면역조직화학 염색은 종양 세포의 존재를 더욱 확증하였다 (도면 19a, 오른쪽). 생물발광 영상이 IM9-Luc 종양 성장을 모니터링하는데 이용되었다. 도면 19b와 19c에 나타나 있는 바와 같이, 그리고 시험관내 세포독성 데이터와 일관되게, 모의-형질도입된 대조 세포로 주사를 추후 투여 받은 생쥐와 비교하여, NK-92-CS1-CAR 세포가 그 대신에 추후 투여된 생쥐에서 IM9-Luc 종양이 유의미하게 억제되었다. 게다가, NK-92-CS1-CAR 세포로 처리는 모의-형질도입된 NK-92 대조 세포로 처리와 비교하여, IM9-Luc 종양을 보유하는 생쥐의 생존을 유의미하게 연장하였다 (도면 19d). 중요하게는, NK-92-CS1-CAR 세포 또는 모의-형질도입된 NK-92 세포가 유사하지만, IM9-Luc 세포의 i.v. 주사 없이 투여될 때, 생쥐는 파종성 질환이 발생하거나 또는 폐사하지 않았다.

[0189]

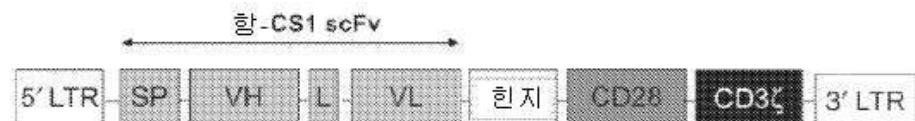
달리 정의되지 않으면, 본원에서 이용된 모든 기술 용어와 과학 용어는 개시된 발명이 속하는 당해 분야의 평균적 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에서 인용된 간행물 및 이들이 인용되는 자료는 명확히 참조로서 편입된다.

[0190]

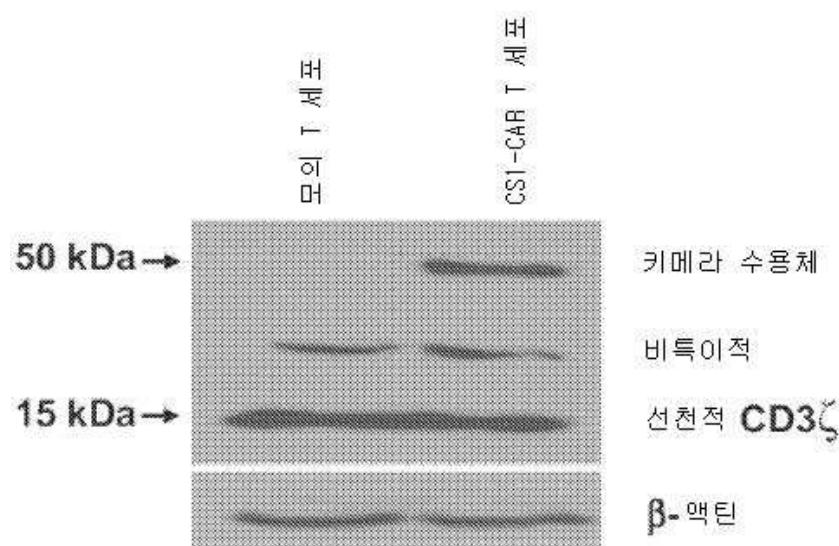
당업자는 단지 일과적인 실험을 이용하여, 본원에서 설명된 발명의 특정한 구체예에 대한 많은 등가물을 인식하거나, 또는 확인할 수 있을 것이다. 이런 등가물은 다음 청구항에 의해 포괄되는 것으로 의도된다.

도면

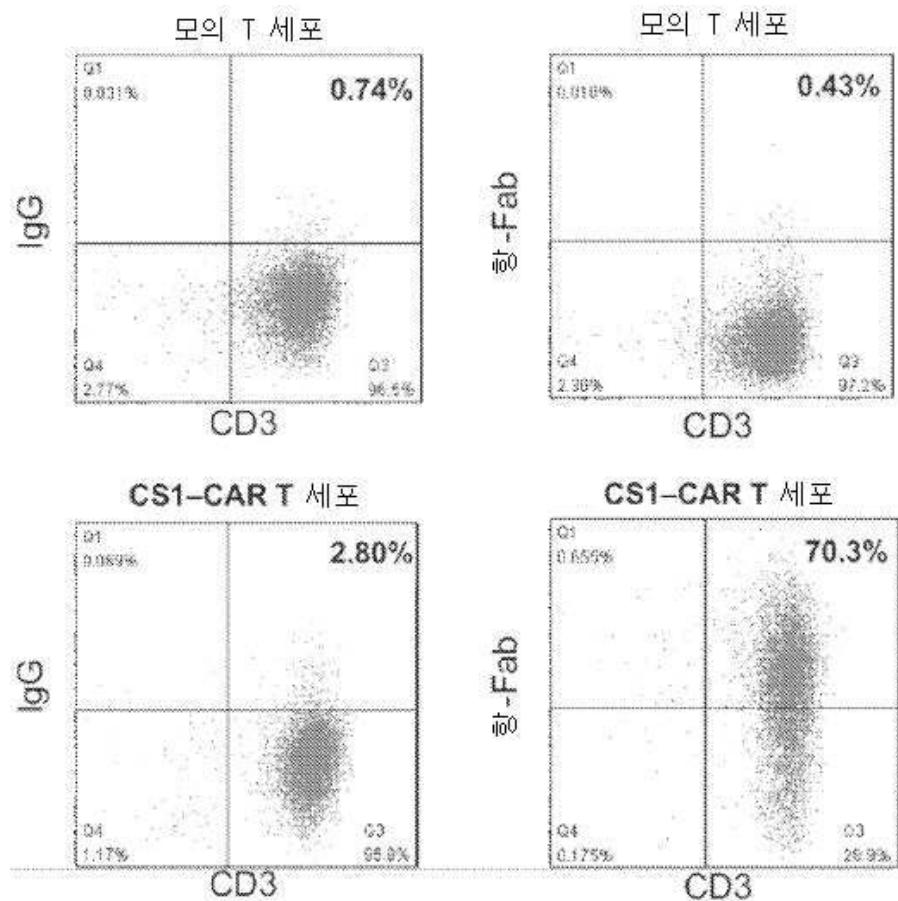
도면1a



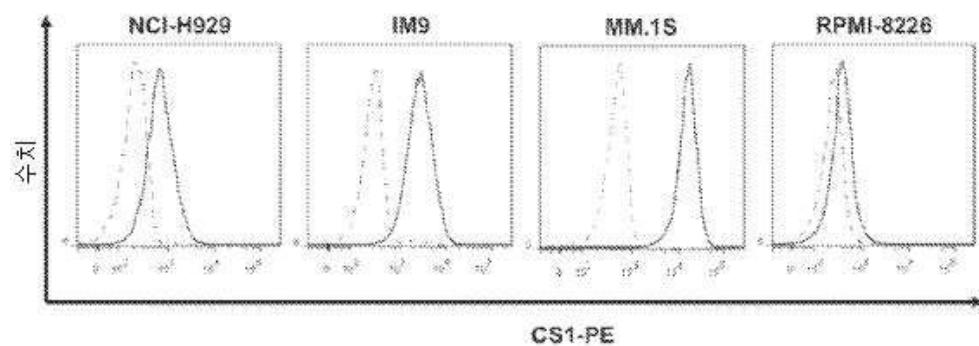
도면1b



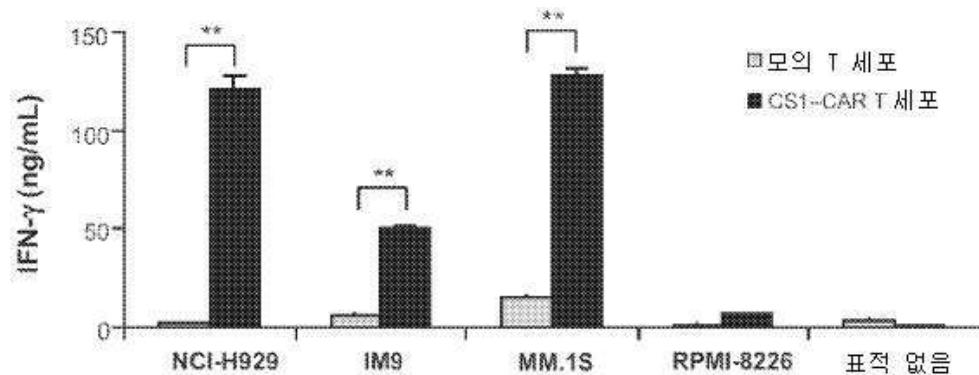
도면1c



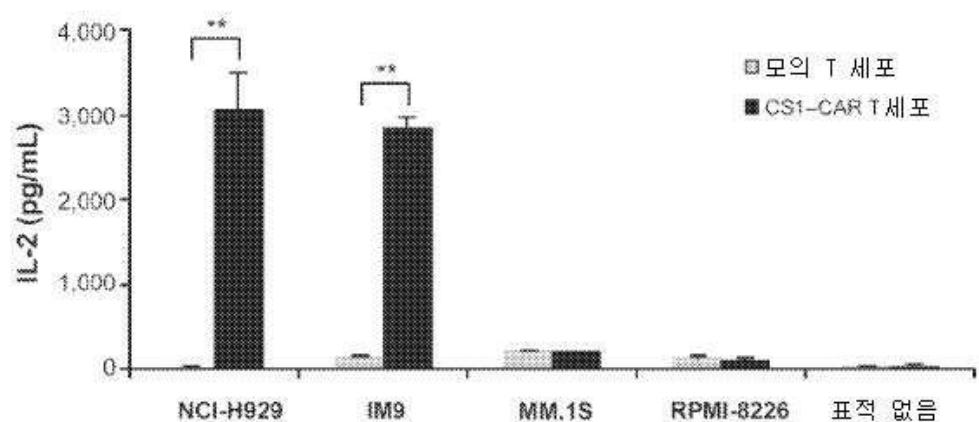
도면2a



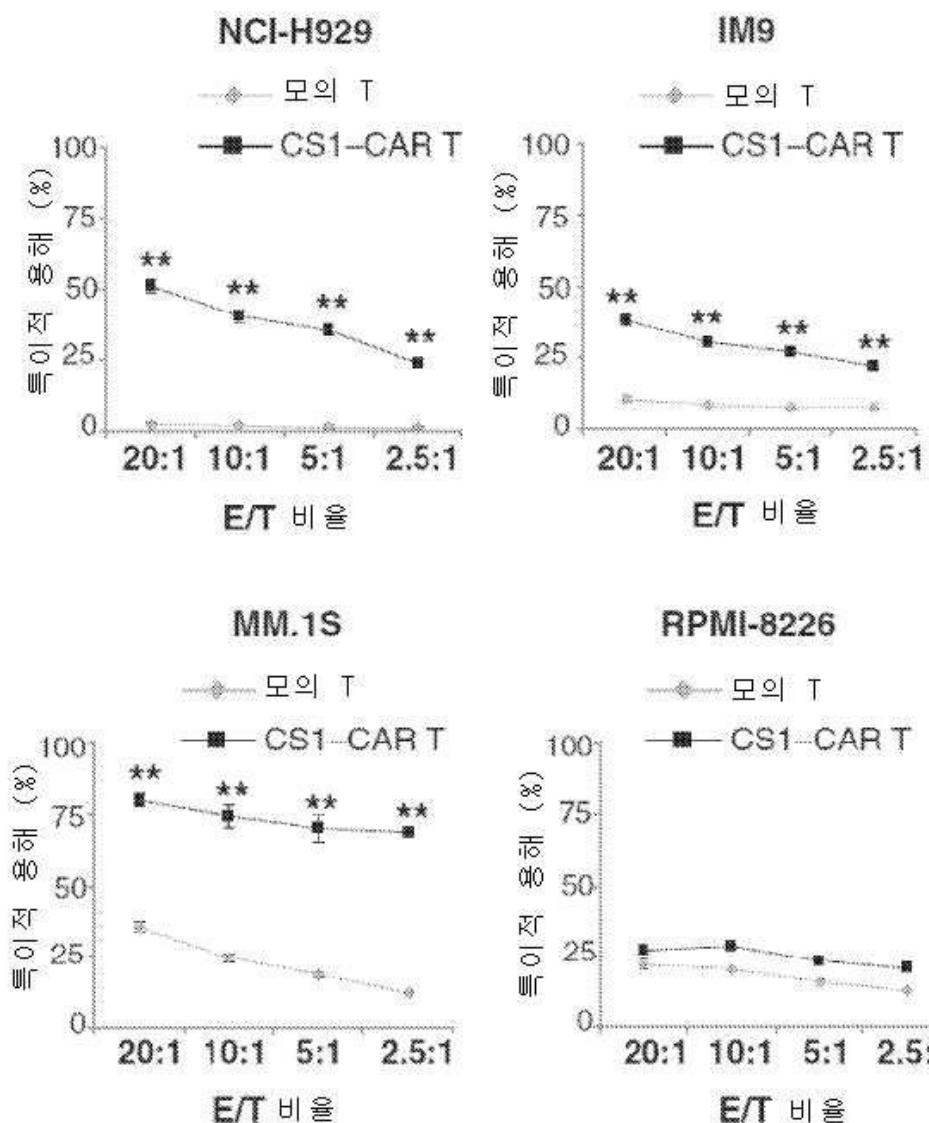
도면2b



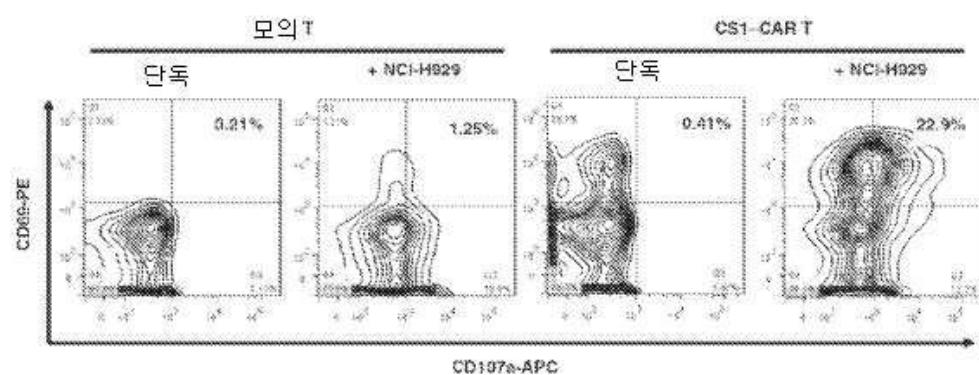
도면2c



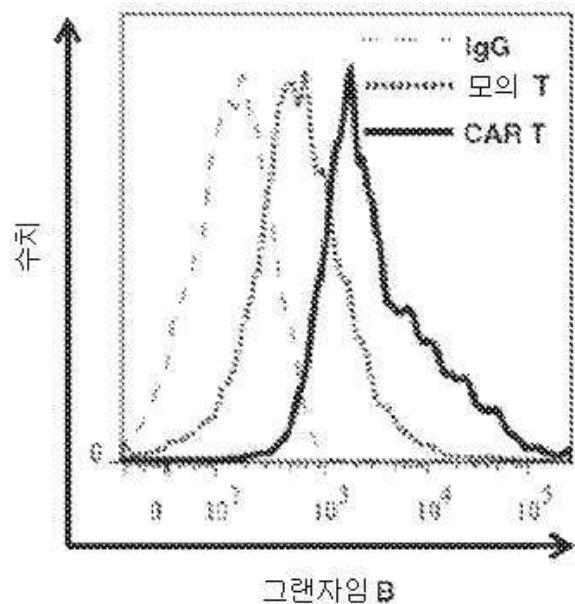
도면3a



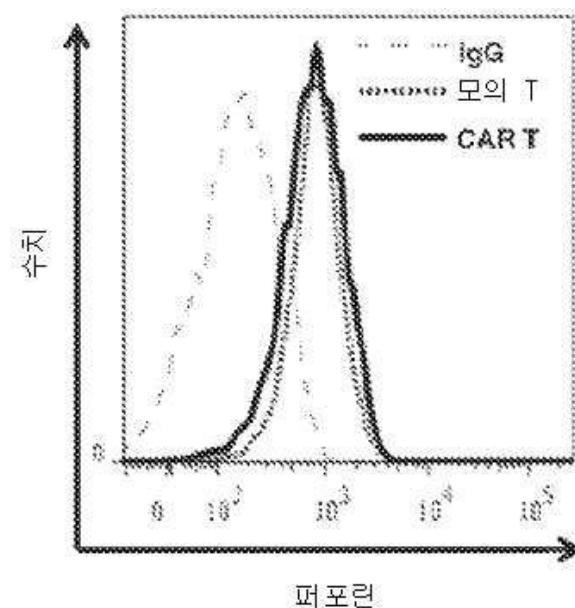
도면3b



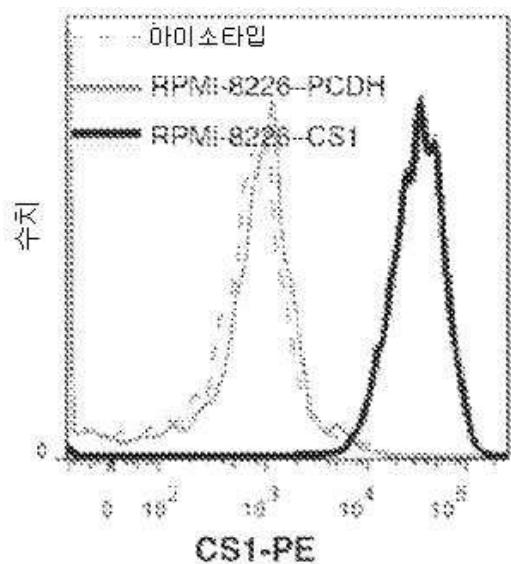
도면3c



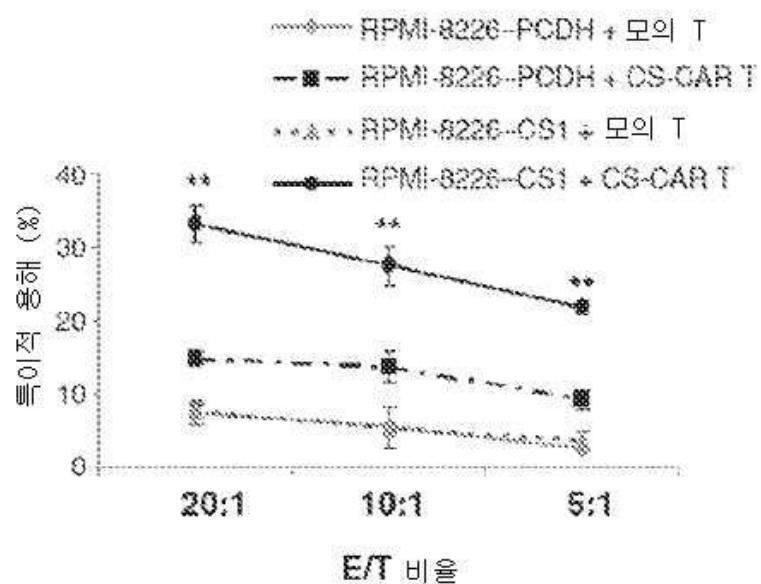
도면3d



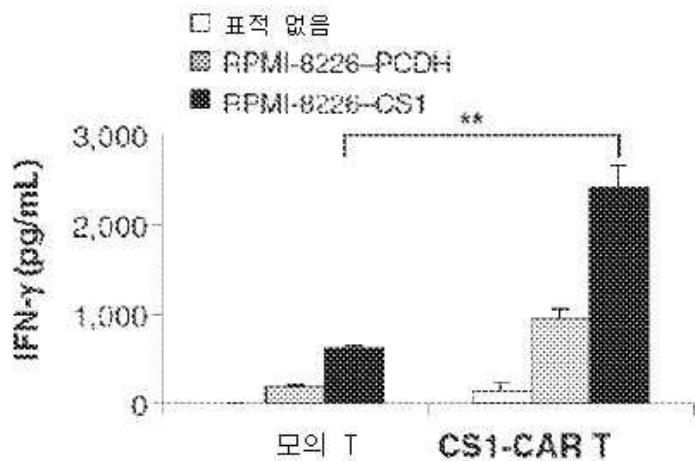
도면4a



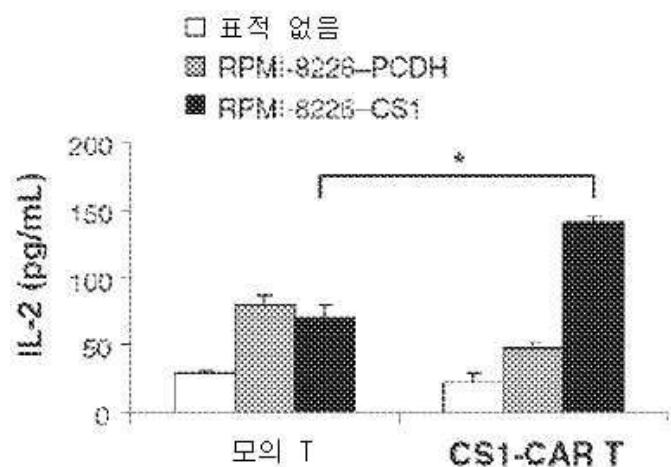
도면4b



도면4c

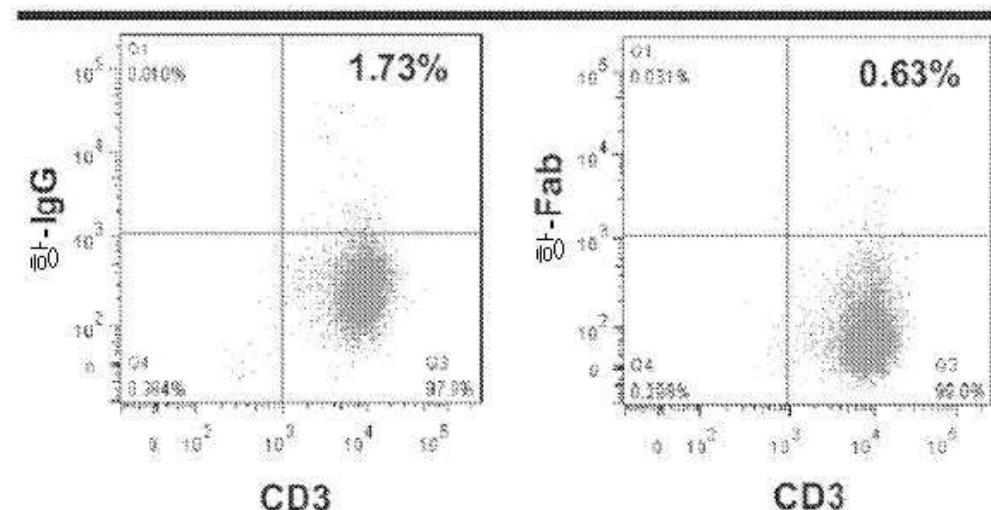


도면4d

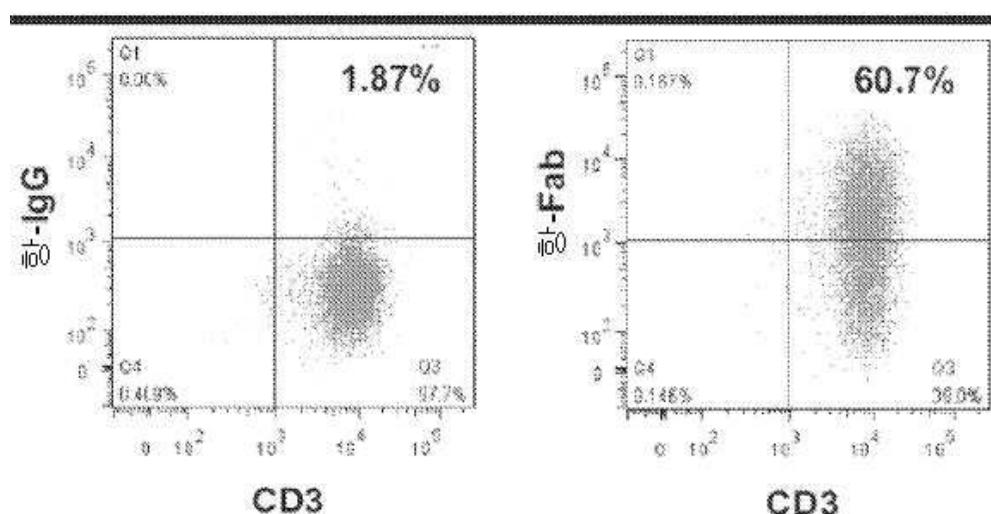


도면5a

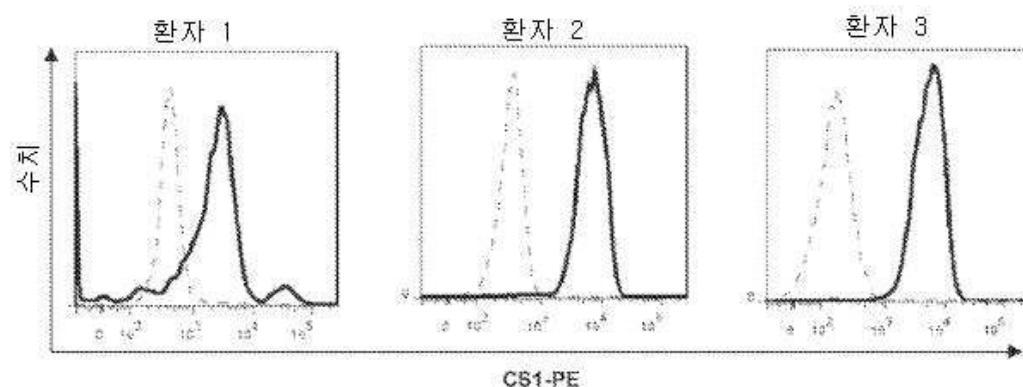
모의 T



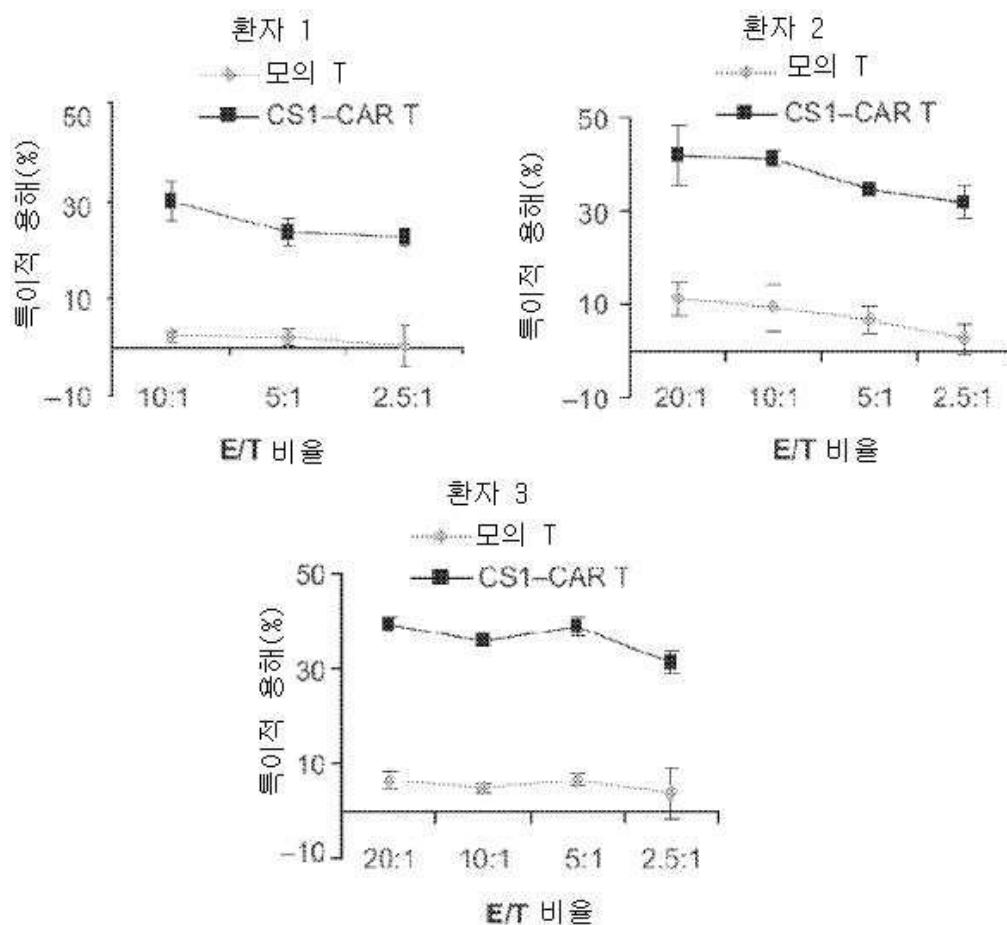
CS1-CAR T



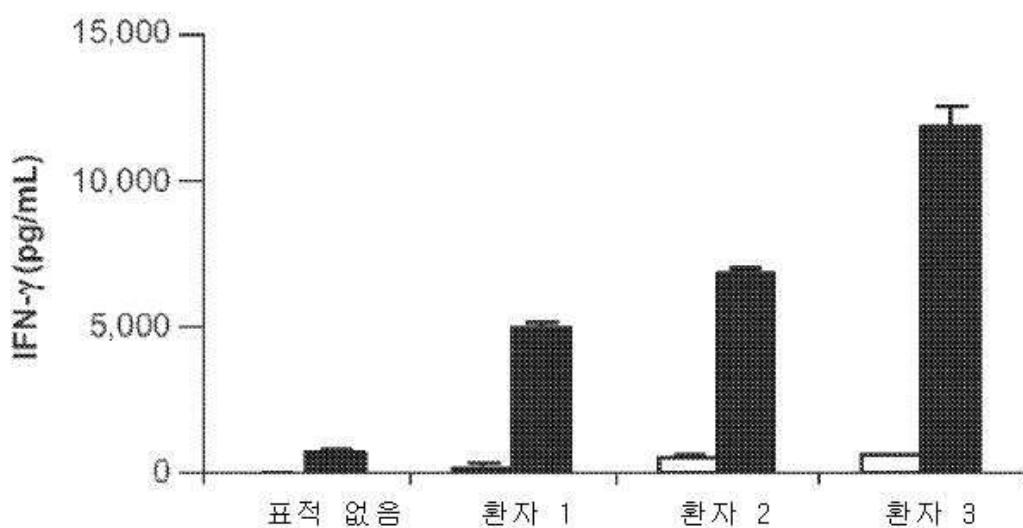
도면5b



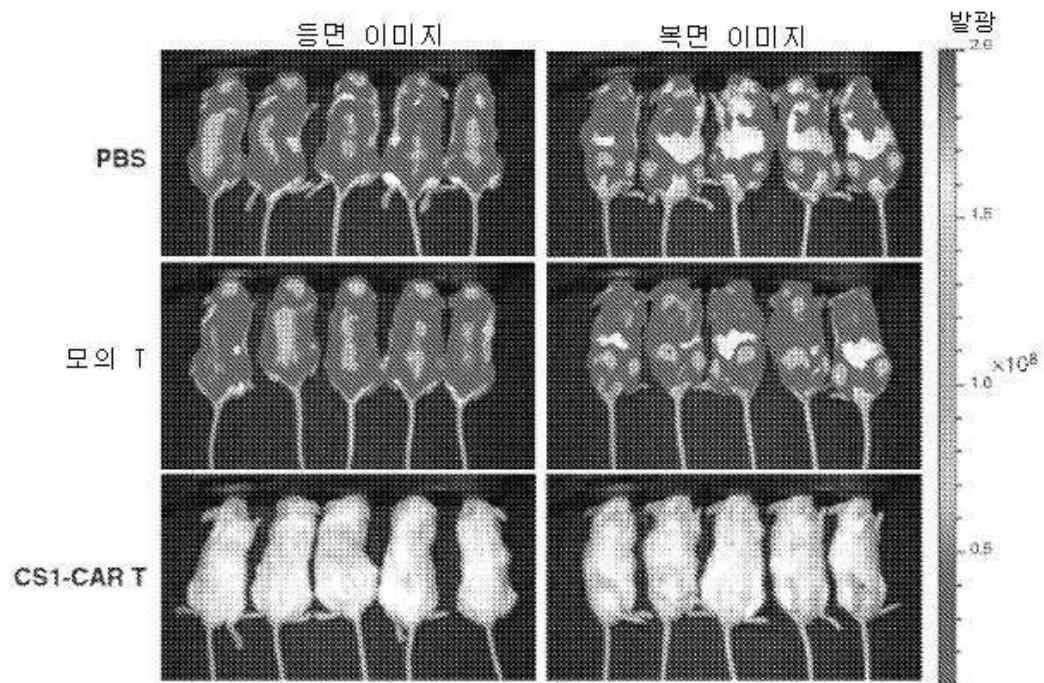
도면5c



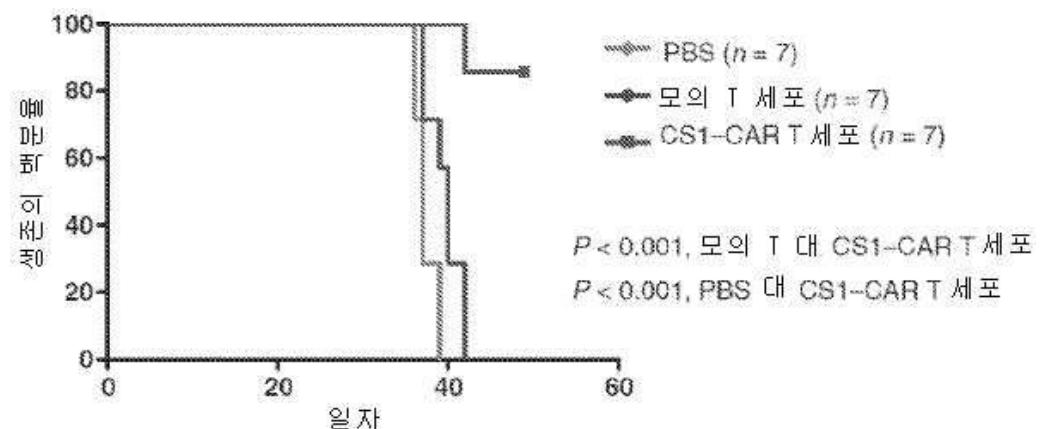
도면5d



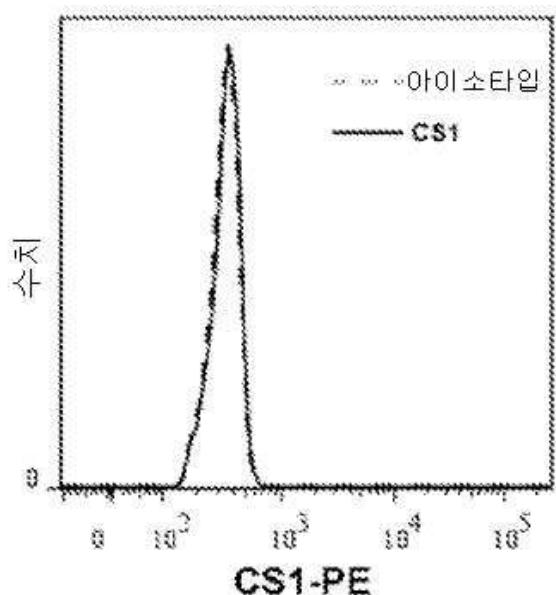
도면6a



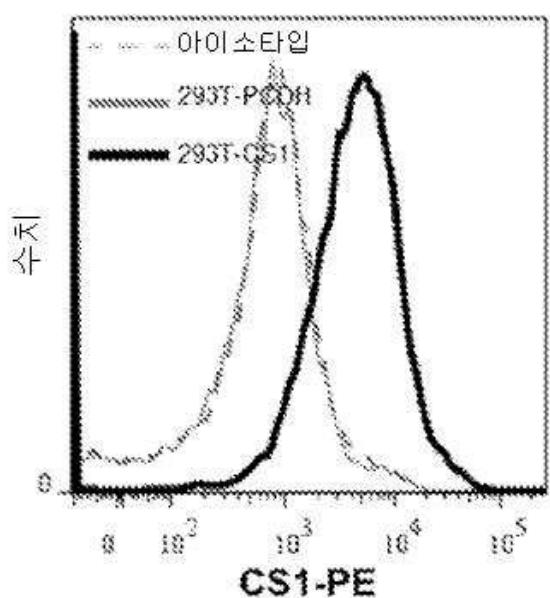
도면6b



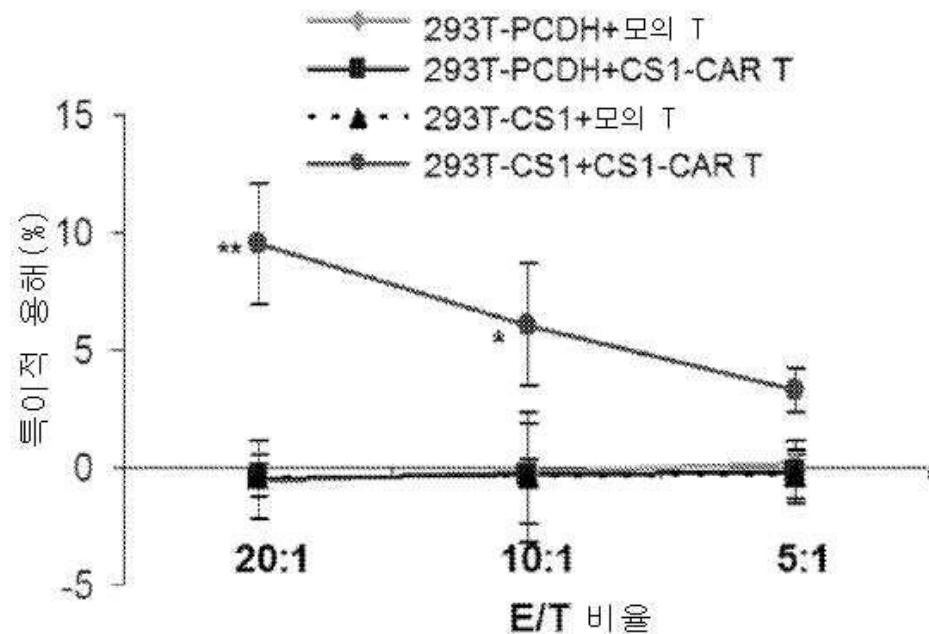
도면7a



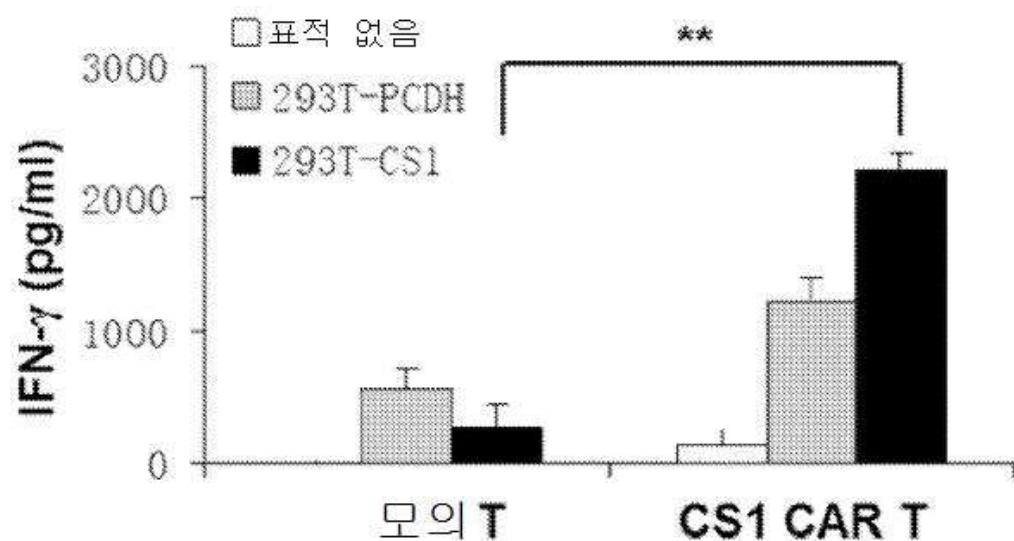
도면7b



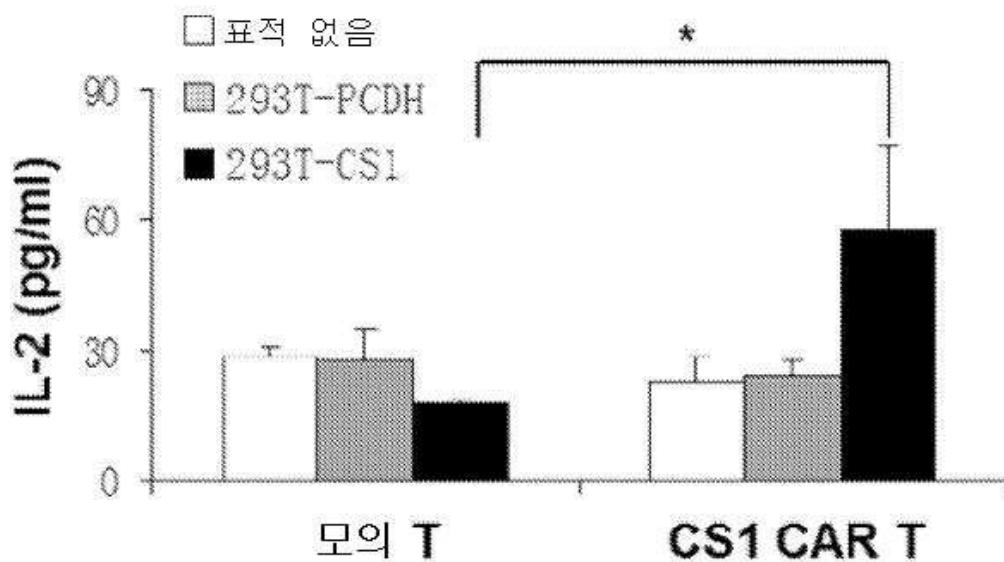
도면7c



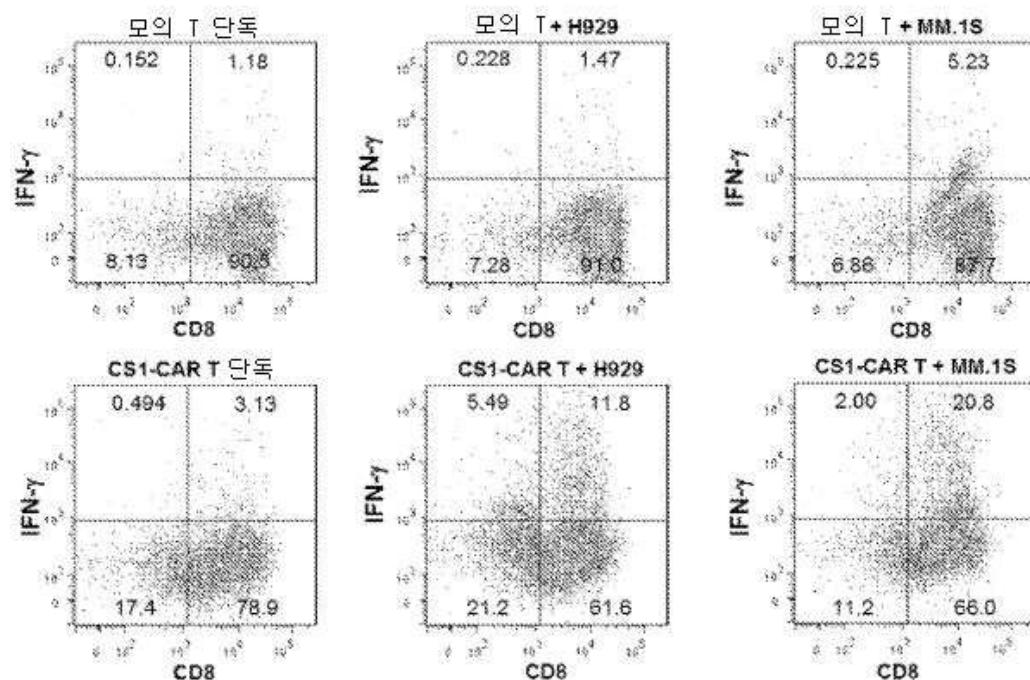
도면7d



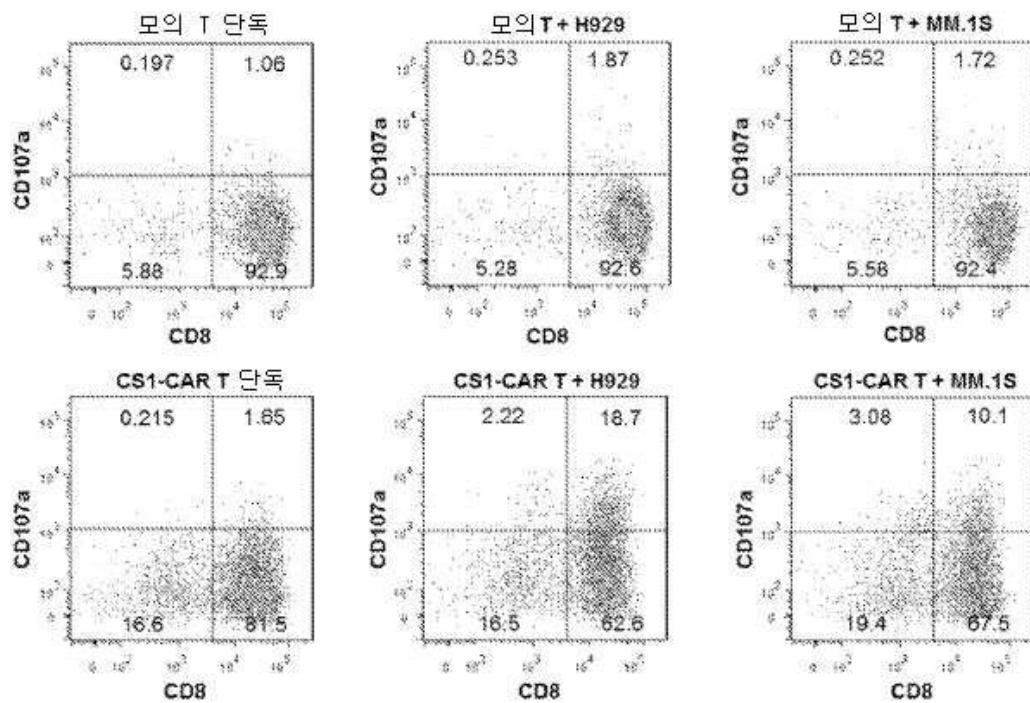
도면7e



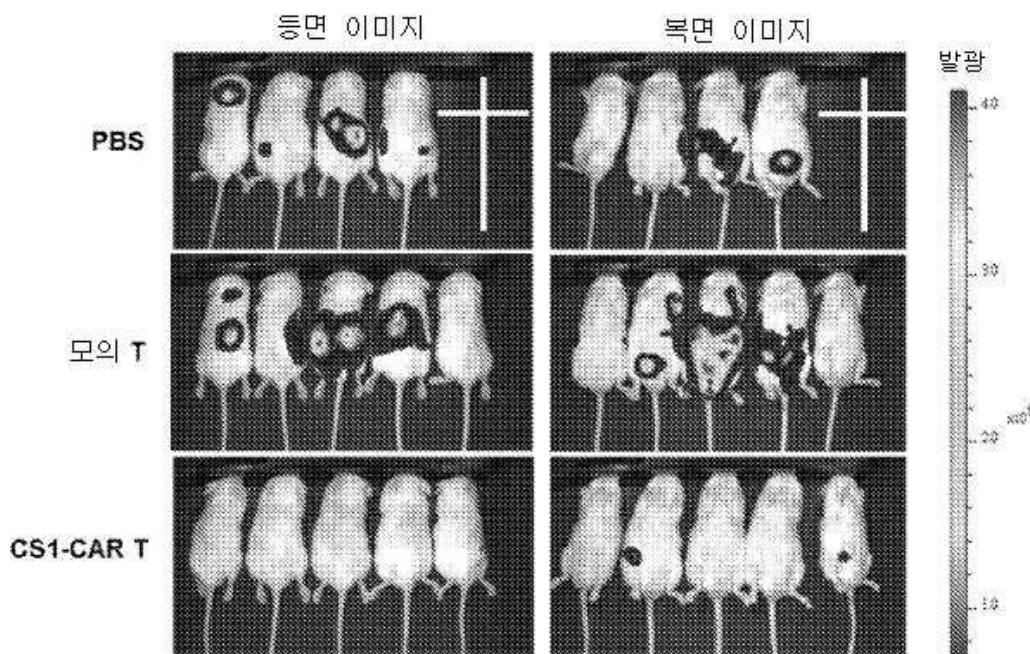
도면8a



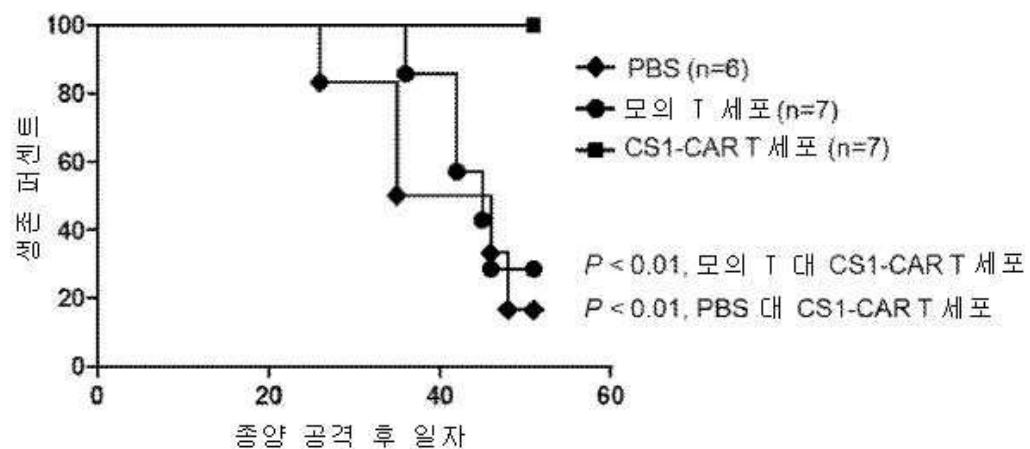
도면8b



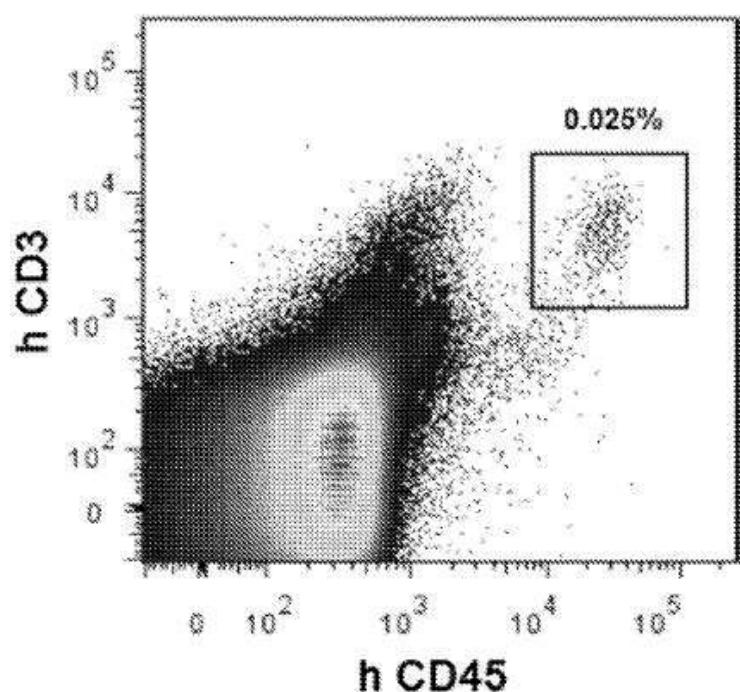
도면9a



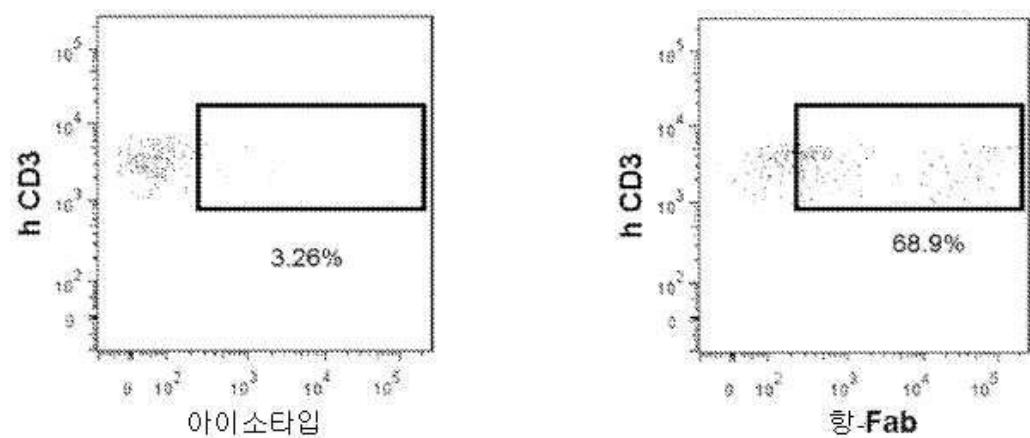
도면9b



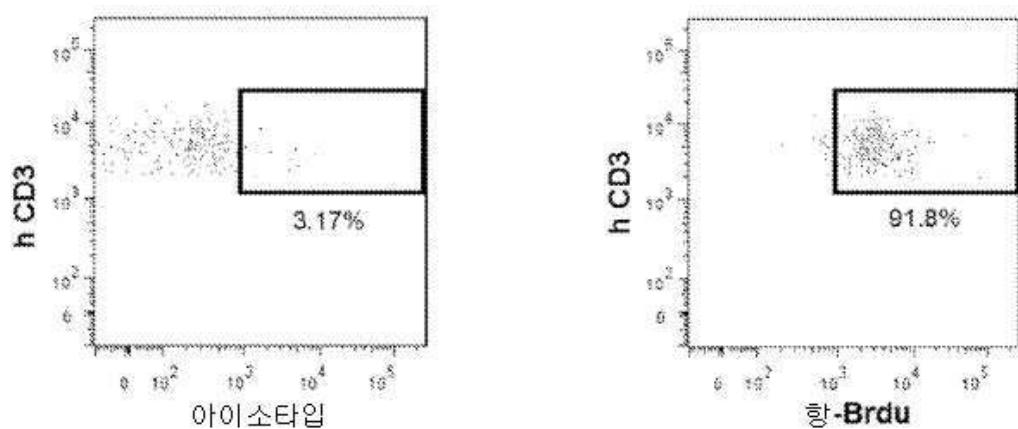
도면10a



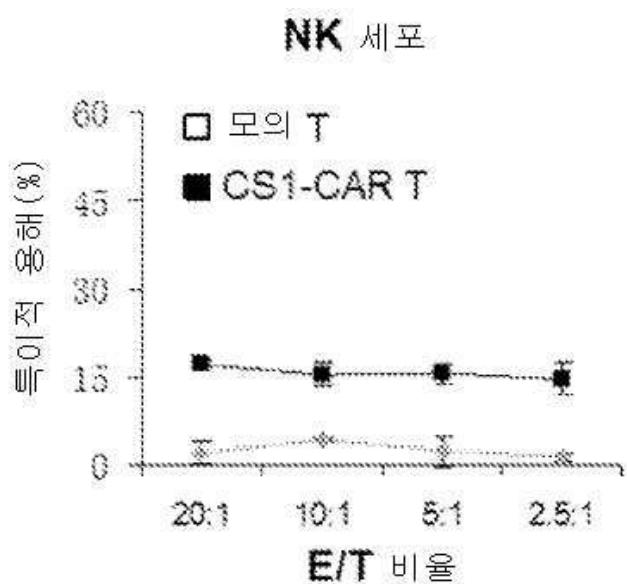
도면10b



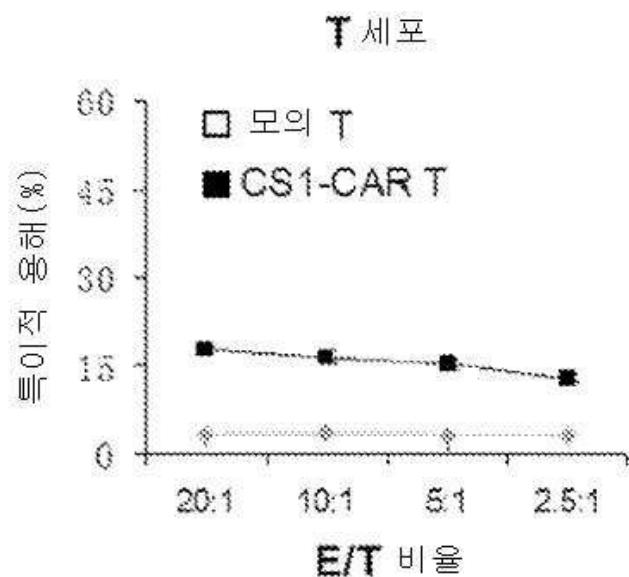
도면10c



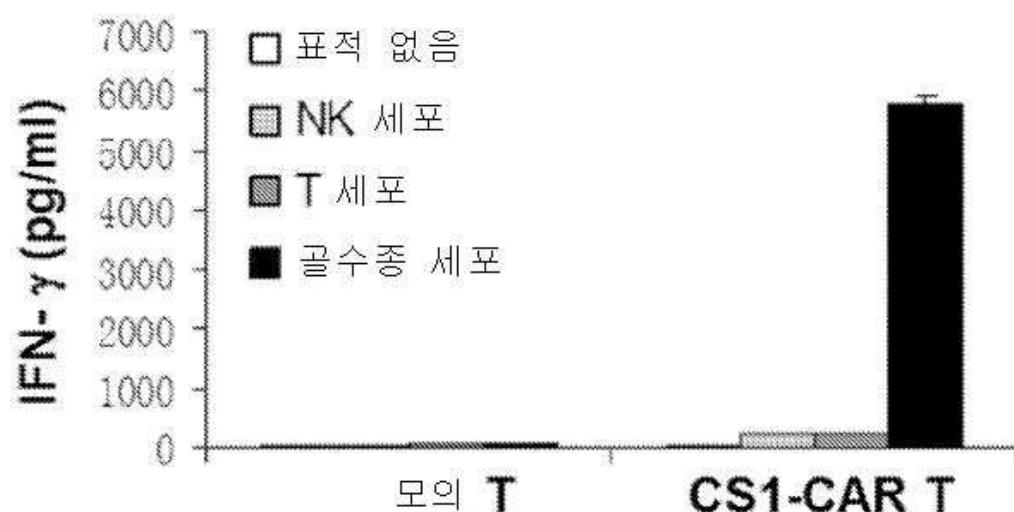
도면11a



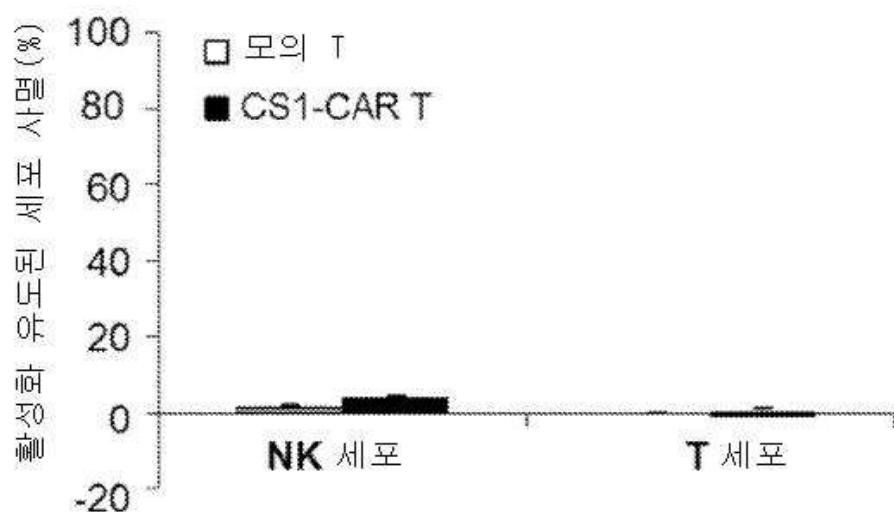
도면11b



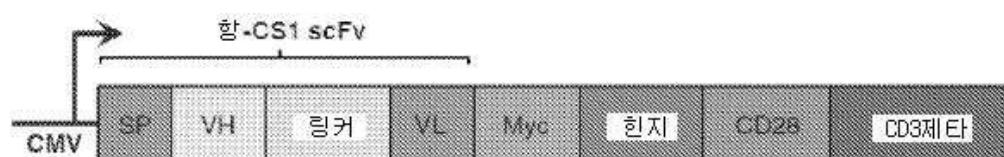
도면11c



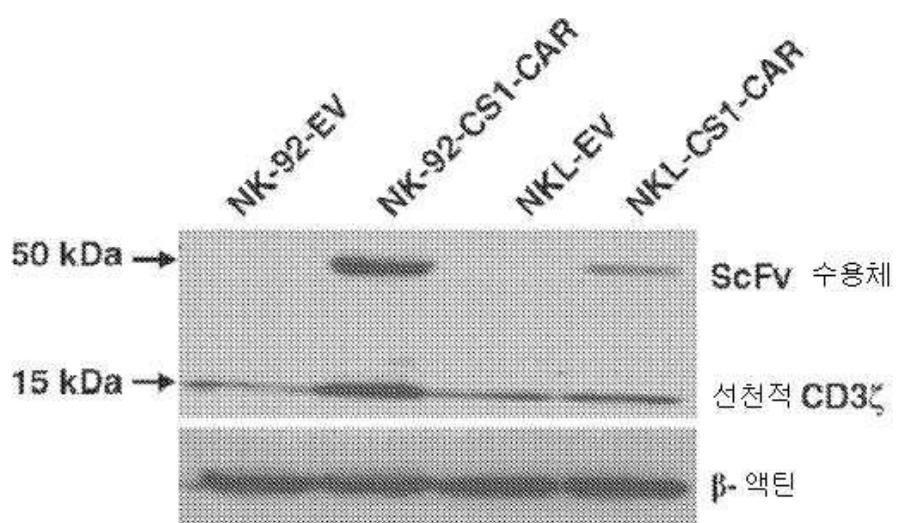
도면12



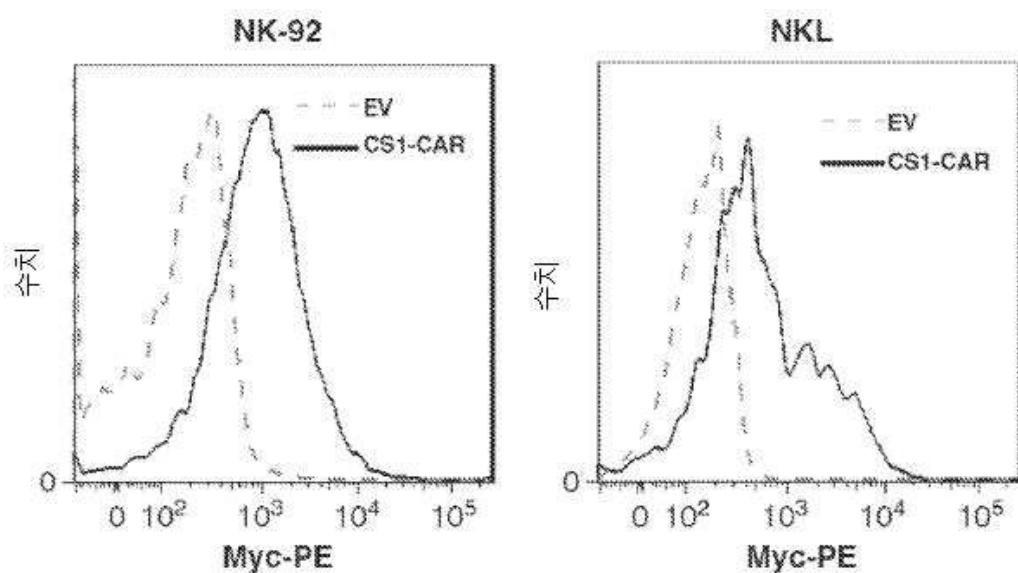
도면13a



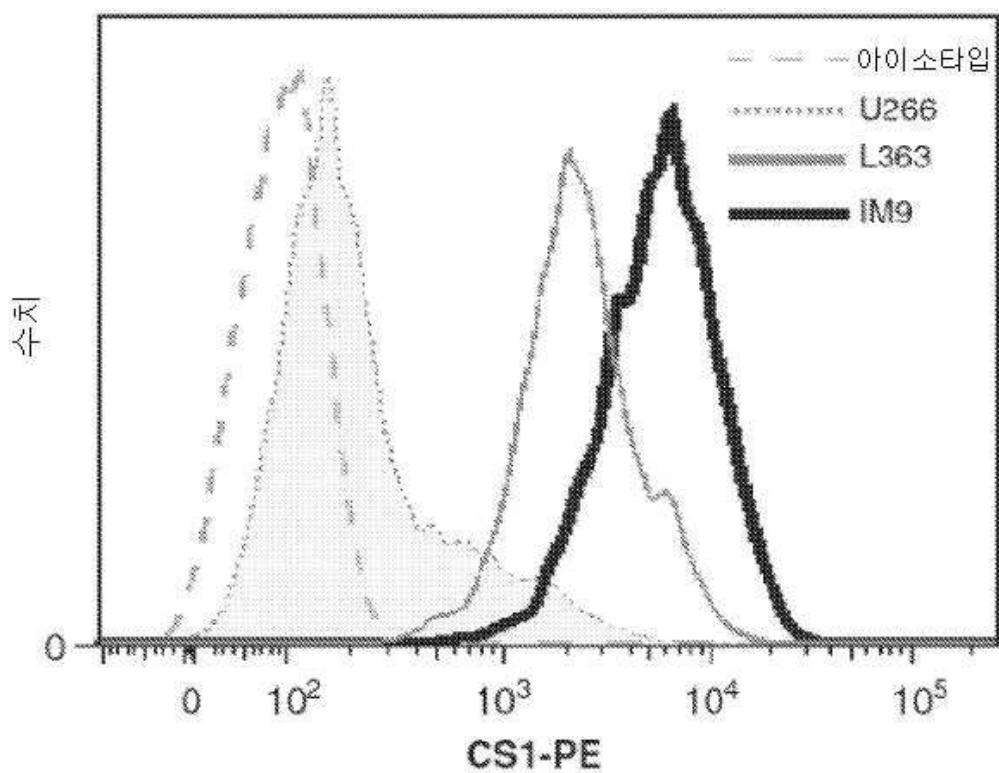
도면13b



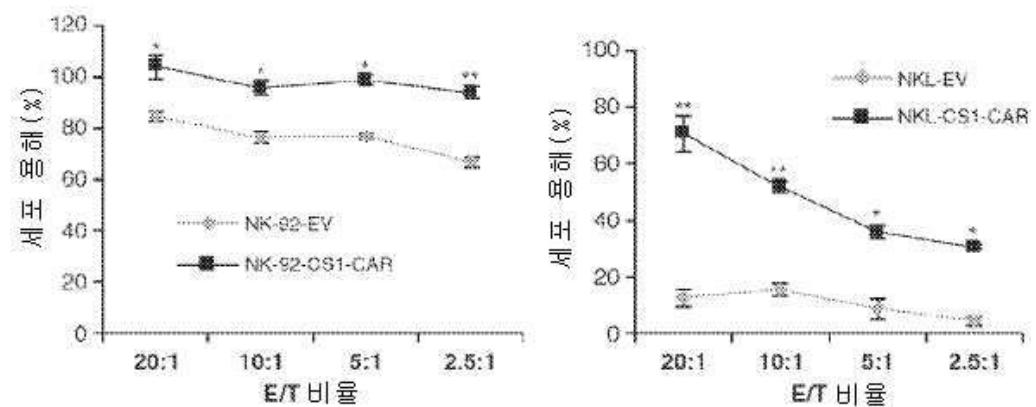
도면13c



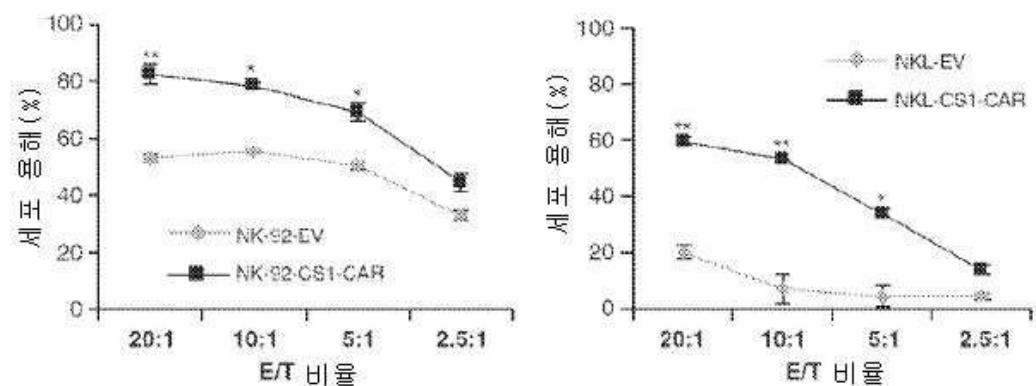
도면14a



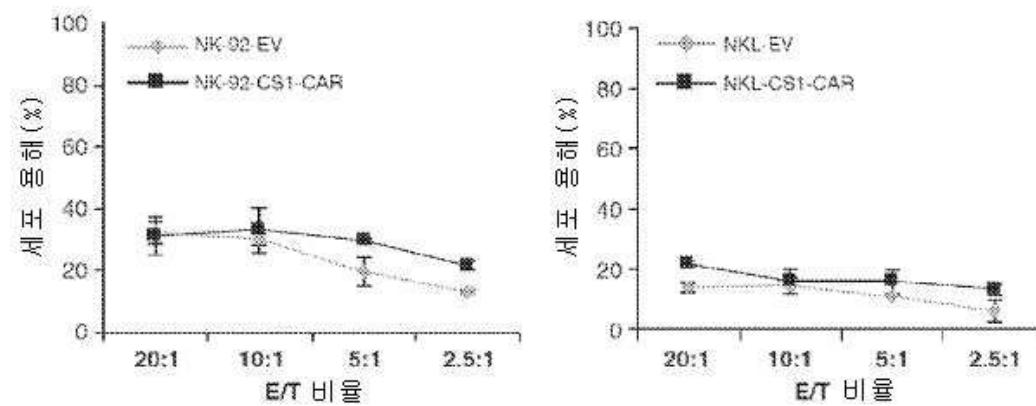
도면14b



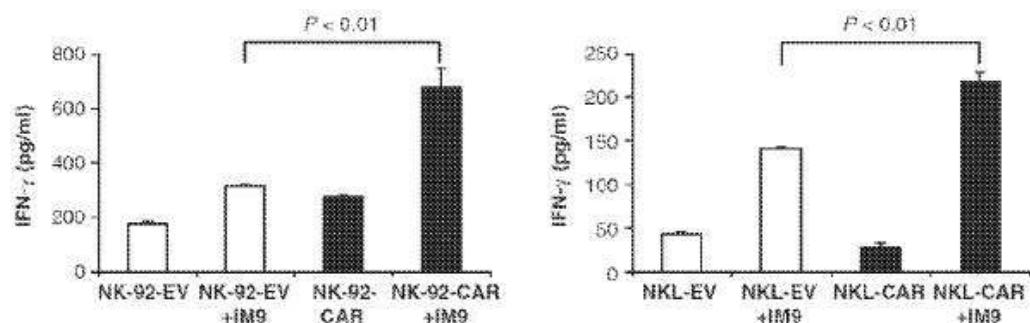
도면14c



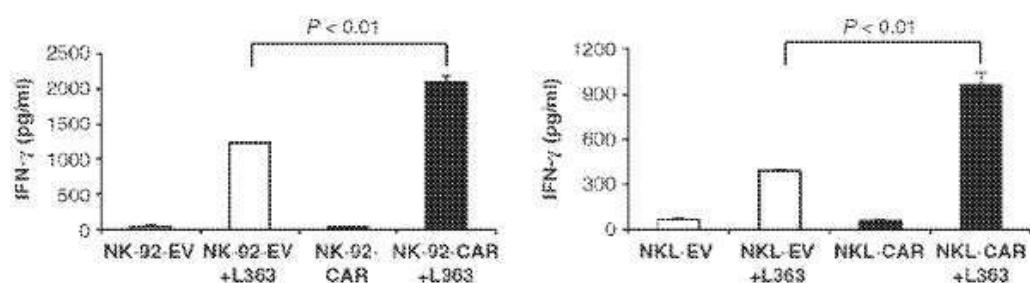
도면14d



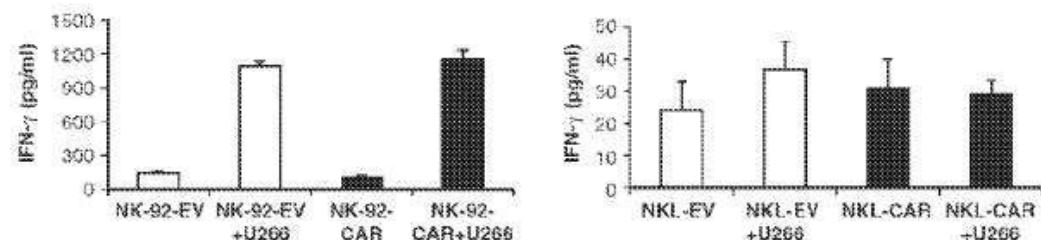
도면15a



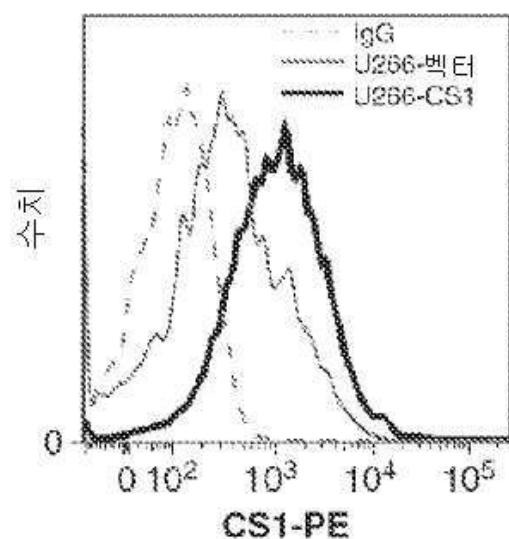
도면15b



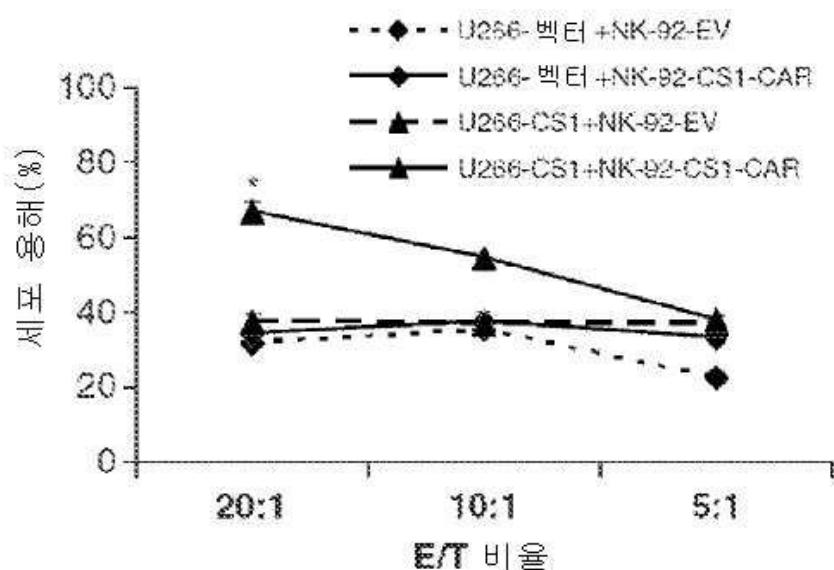
도면15c



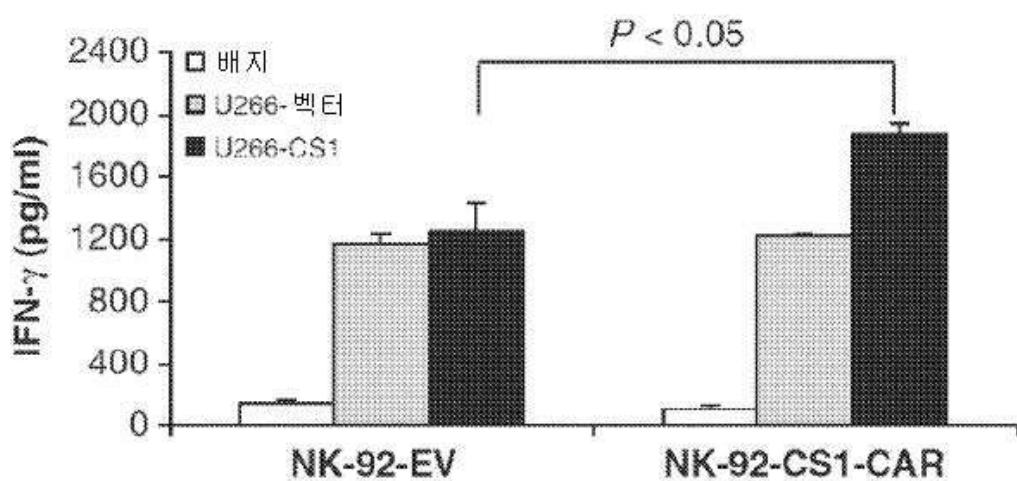
도면16a



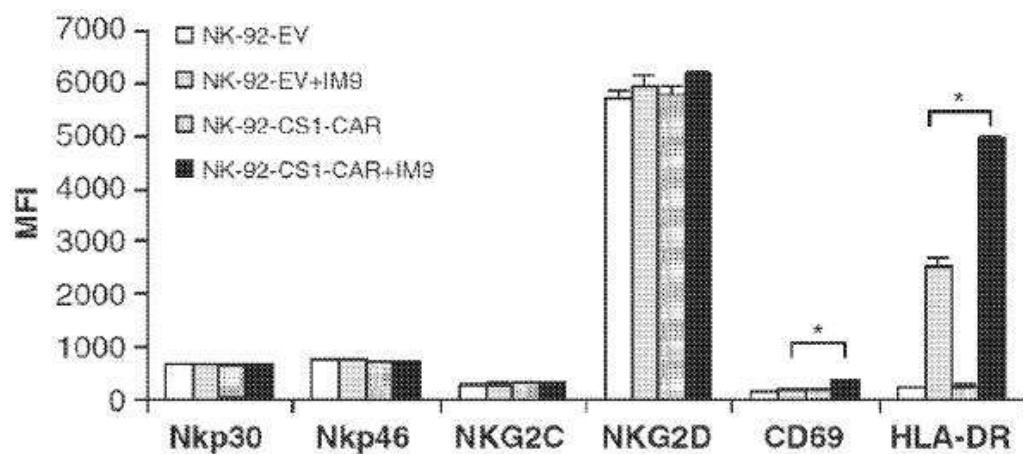
도면16b



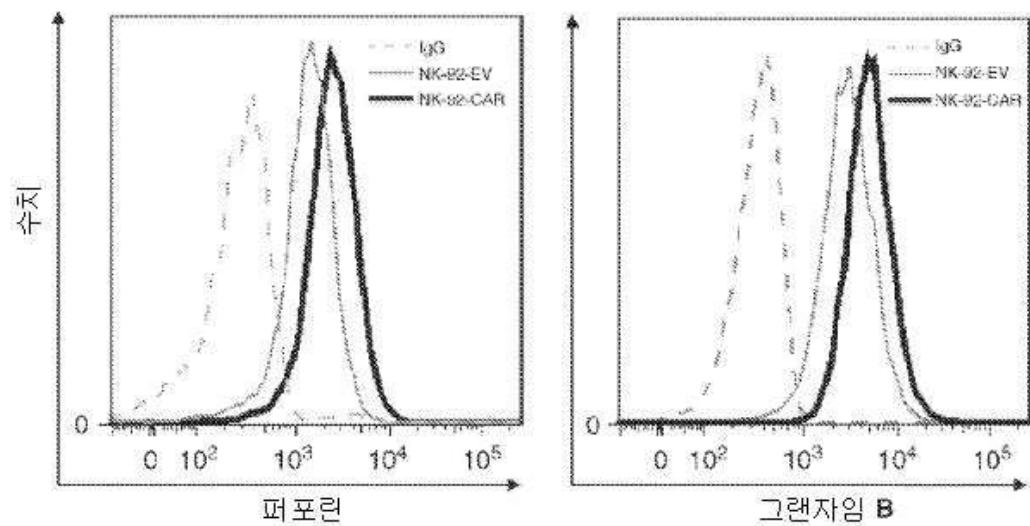
도면16c



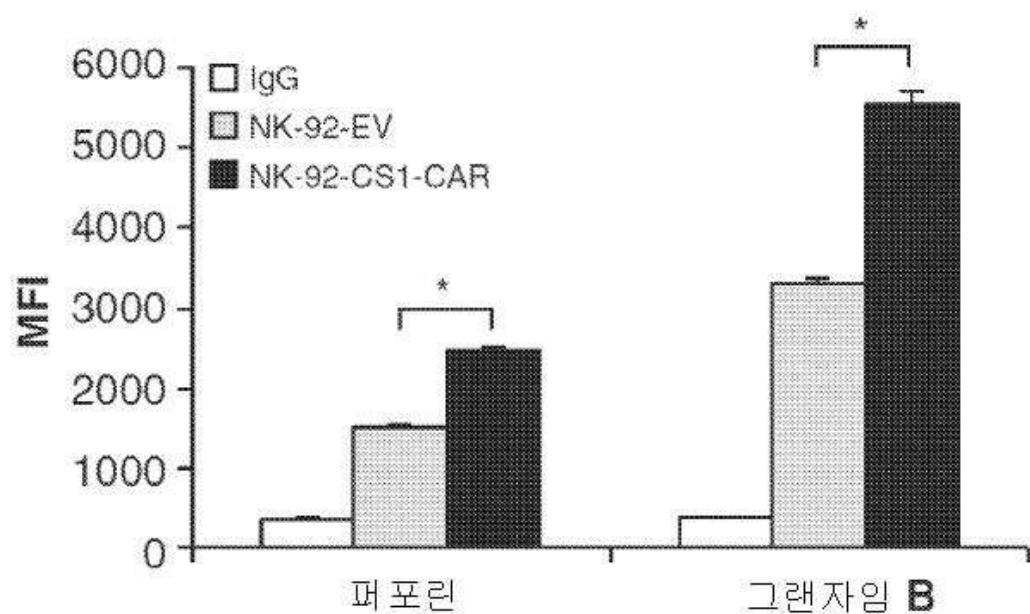
도면17a



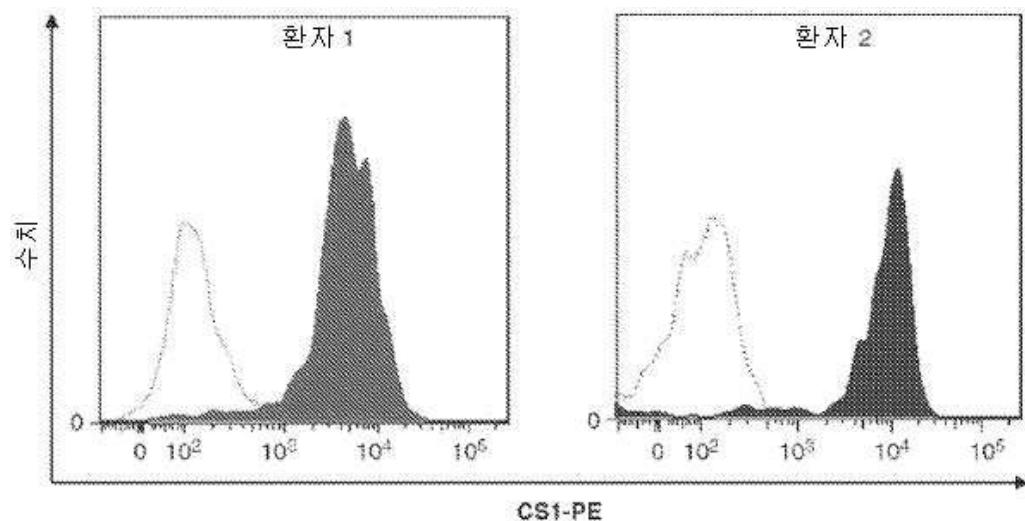
도면17b



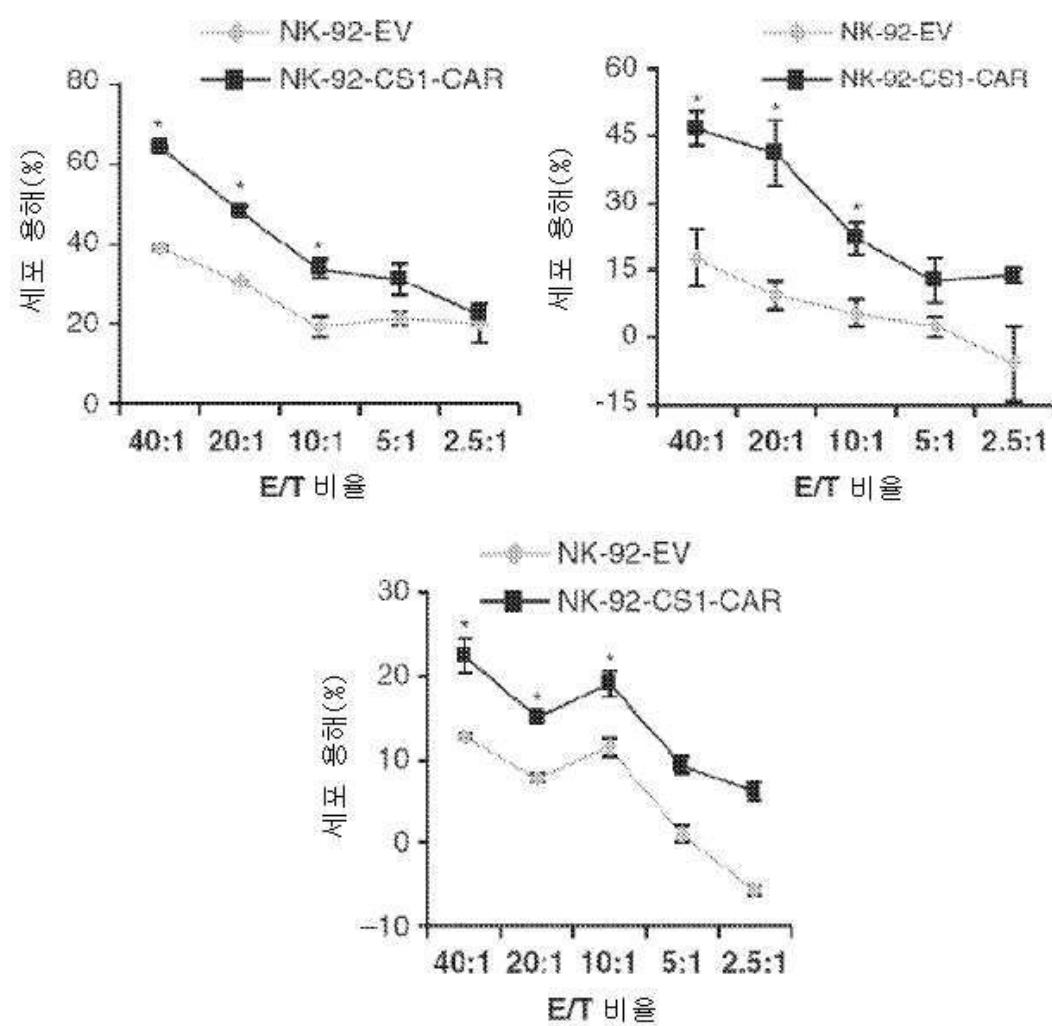
도면17c



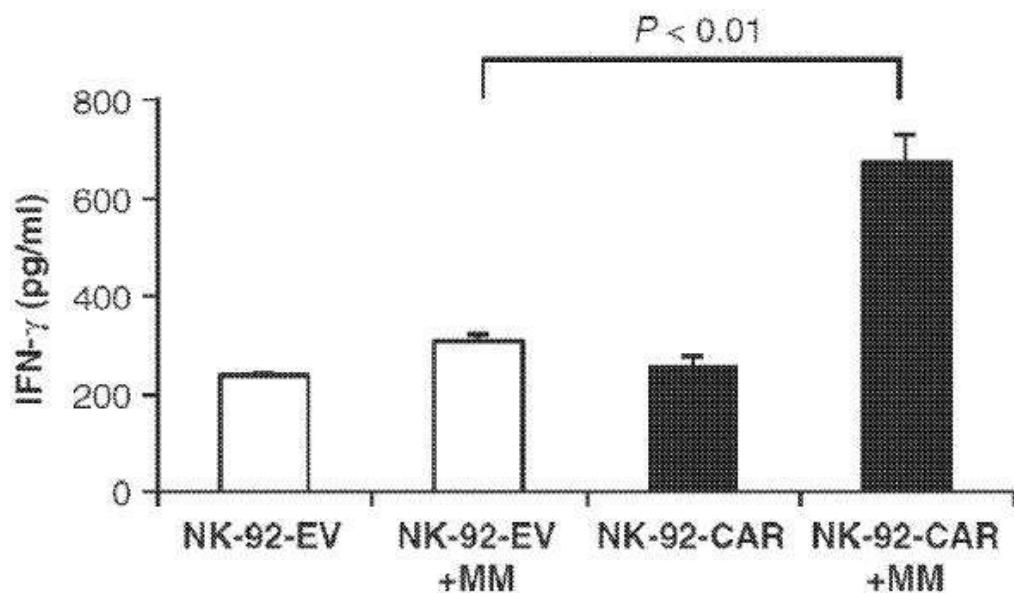
도면18a



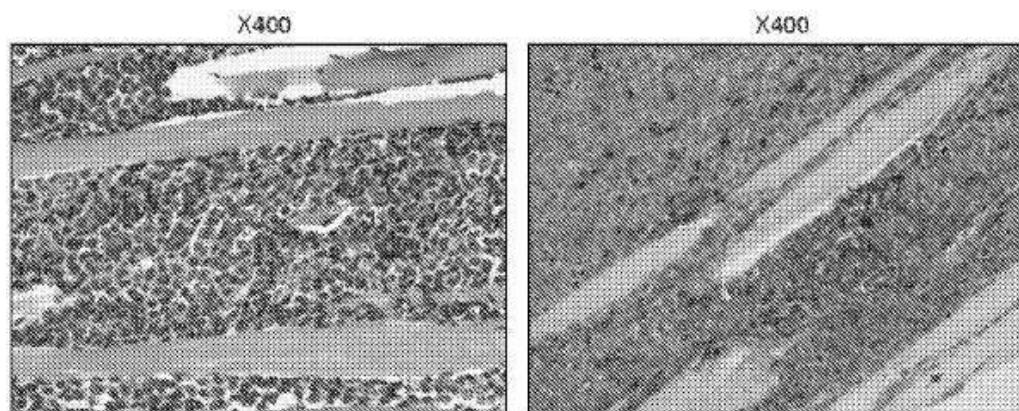
도면18b



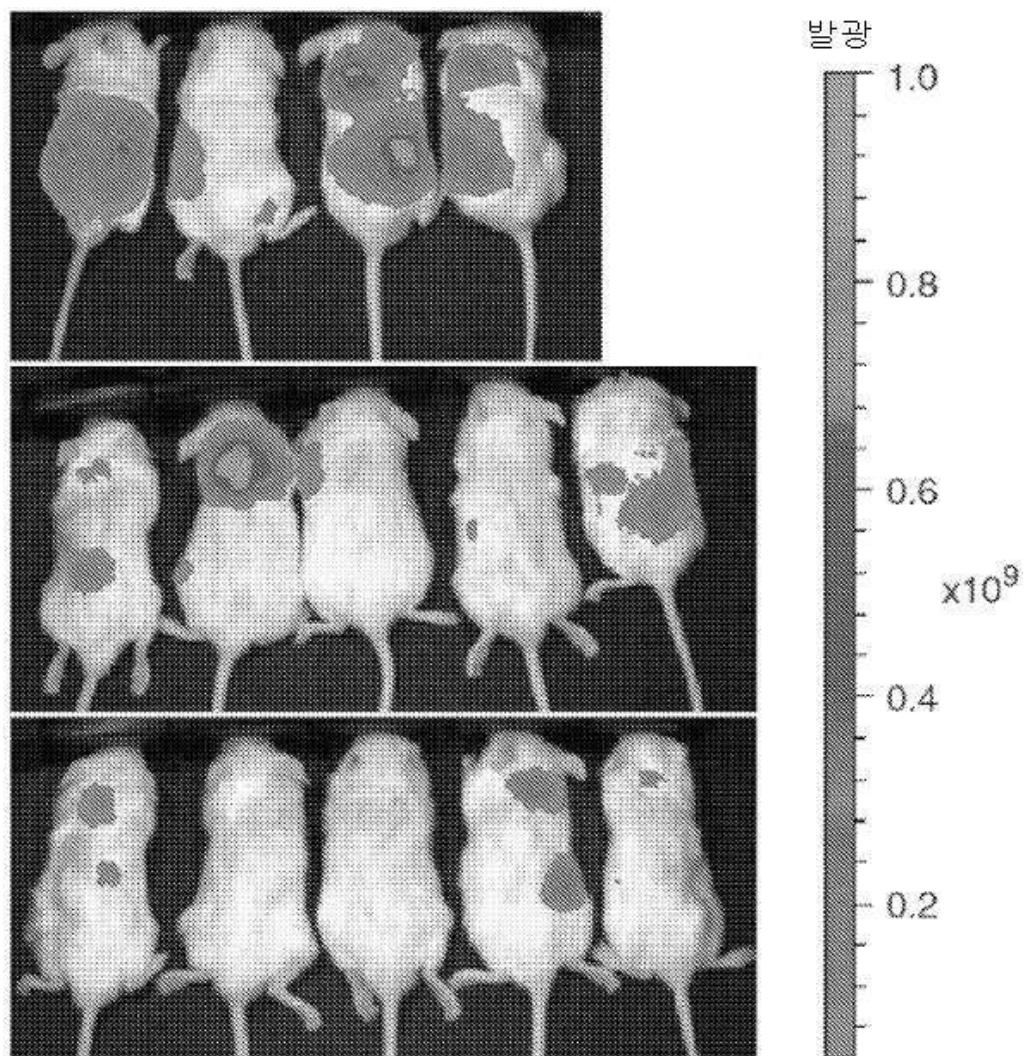
도면18c



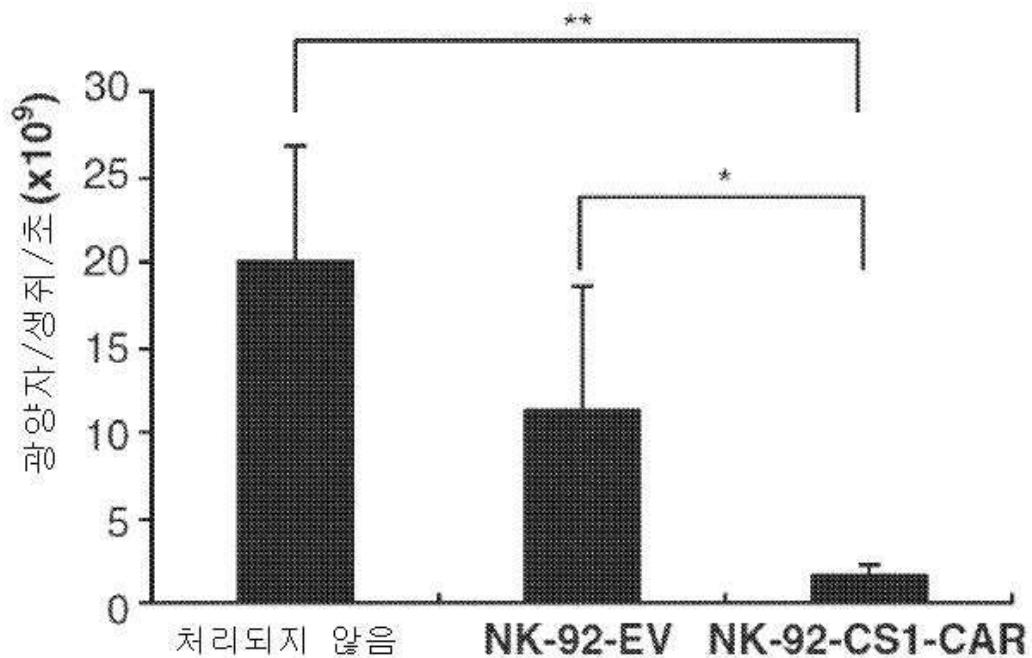
도면19a



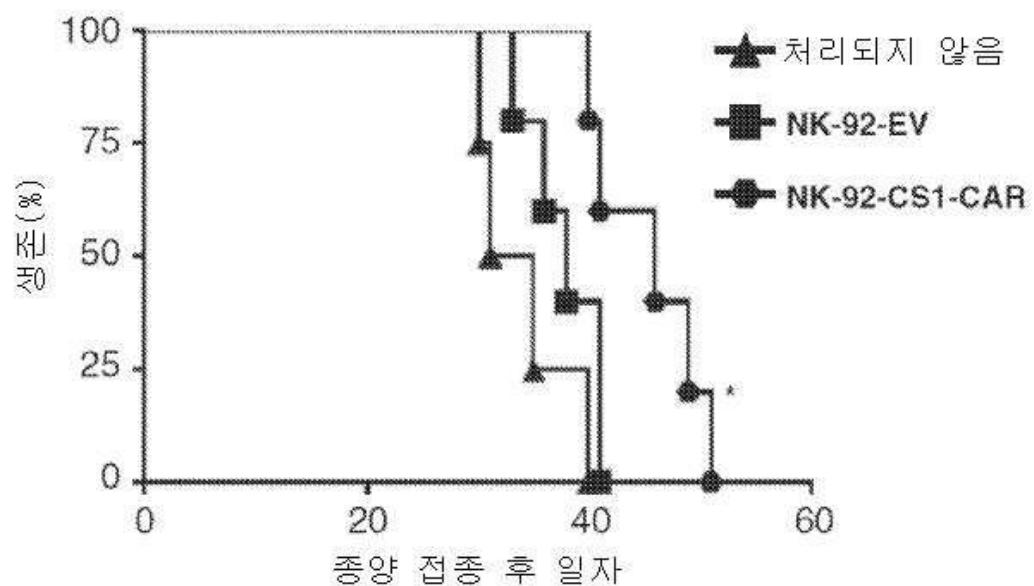
도면19b



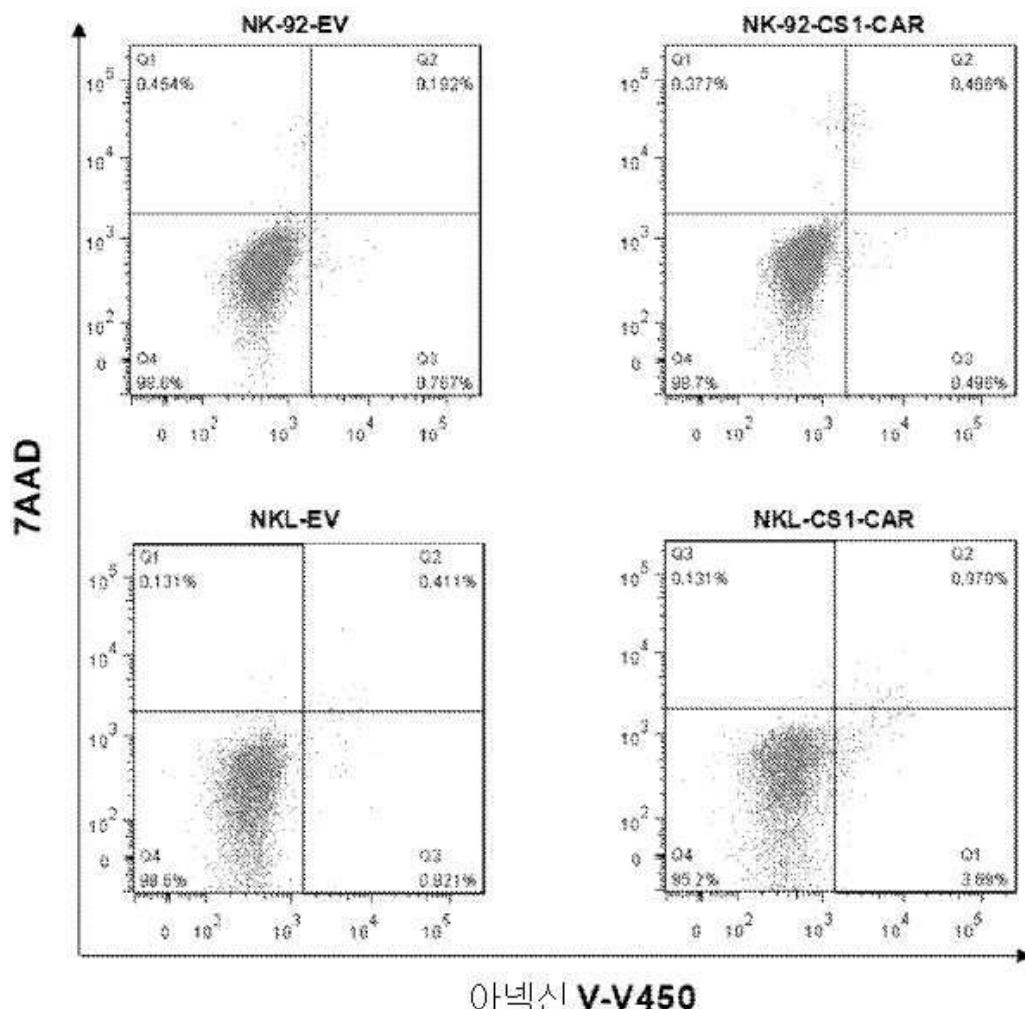
도면19c



도면19d



도면20



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Yu, Jianhua

Hofmeister, Craig

Chu, Jianhong

<120> CS1-SPECIFIC CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR ENGINEERED IMMUNE EFFECTOR
CELLS

<130> 10336-088W01

<150> US 61/819,141

<151> 2013-05-03

<150> US 61/876,492

<151> 2013-09-11

<160> 29

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 1

Met Gly Trp Ser Ser Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val His

<210> 2

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 2

atgggatgga gctctatcat cctttcttg gtagcaacag ctacagggtgt ccac 54

<210> 3

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 3

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

20

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 4

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly

20

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 5

Leu Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

<210> 6

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 6

ctcgagccca aatttgtga caaaaactcac acatgccac cgtgccccg 48

<210> 7

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 7

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu

1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys

20

<210> 8

<211

> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 8

Ile Ile Ser Phe Phe Leu Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu

1 5 10 15

Leu Phe Phe Leu Thr Leu Arg Phe Ser Val Val

20 25

<210> 9

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 9

Phe Trp Val Leu Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val

20 25

<210> 10

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 10

tttgggtgc tggtggtgt tggtggagtc ctggcttgtc atagcttgtc agtaacagtg 60

gcctttatta ttctgggt g 81

<210> 11

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 11

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met

1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe

20 25 30

Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

35 40

<210> 12

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 12

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr

1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro

20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

35 40

<210> 13

<211> 123

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 13

aggagtaaga ggagcaggct cctgcacagt gactacatga acatgactcc ccggccggcc 60

ggggcccaccc gcaaggattt ccagccatat gccccaccac gcgacttcgc agcctatcgc 120

tcc 123

<210> 14

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 14

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly

1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys

35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys

50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

100 105 110

<210> 15

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 15

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtacc agcagggcca gaaccagctc	60
---	----

tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gagtacgtatg ttttgacaa gagacgtggc	120
---	-----

cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc cttaggaagg cctgtacaat	180
---	-----

gaactgcaga aagataagat ggcggaggcc tacagtgaga ttggatgaa aggcgagcgc	240
--	-----

cggaggggca agggcacga tggccttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc	300
---	-----

tacgacgccc ttcatgca ggccctgccc cctcgtaaa	339
--	-----

<210>

16

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 16

ggggsggggs ggggs	15
------------------	----

<210> 17

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 17

Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly

1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Thr

20 25 30

Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp

35 40 45

Ile Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys

50 55 60

Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala

65 70 75 80

Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Ser Thr Met Ile Ala Thr Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

115 120 125

Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys

130 135 140

Ser Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala

145 150 155 160

Ser Gln Asp Val Ile Thr Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly

165 170 175

Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly

180 185 190

Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe

195 200 205

Thr Ile Ser Asn Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln

210	215	220
Gln His Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu		
225	230	235
Leu Lys		

<210> 18

<211> 726

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 18

tcccagggtcc aactgcagca gcctgggct gagctggta ggcctggagc ttcagtgaag	60
ctgtcctgca aggctcggt gtactccttc accacactact ggatgaactg ggtgaagcag	120
aggcctggac aaggccttga gtggattggc atgattcatc cttccatag tgaaactagg	180
ttaaatcaga agttaaaggaa caaggccaca ttgactgttag acaaattctc cagcacagcc	240

tacatgcaac tcagcagccc gacatctgag gactctgccc tctattactg tgcaagatct	300
actatgattt cgacgaggcc tatggactac tgggtcaag gaacctcagt caccgtctcc	360
ggcgttggcg gttctgtgg cgggtggctcc ggccgtggcg gttctgacat tgtgtatgacc	420
cagtcctcaga aatccatgtc cacatcgttggg tggacacaggg tcagcatcac ctgcaaggcc	480
agtcaggatg ttattactgg tggactctgg tatcaacaga aaccaggcca atctcctaaa	540
tttactgattt actcggcatac ctaccggatcc actggagttcc ctgatcgctt cactggcagt	600
ggatctggga cggatttcac tttaccatc agcaatgtgc aggctgaaga cctggcagt	660

tattactgtc agcaacatta tagtactctt ctcactttcg gtgctggac caagctggag	720
ctgaaa	726

<210> 19

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 19

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Ser Met Ser Thr Ser Val Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ile Thr Gly

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Asn Val Gln Ala

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105

<210> 20

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 20

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr

20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu

50 55 60

Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Pro Asp Gly Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly

100	105	110
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
115		
<210> 21		
<211> 107		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Synthetic Construct		
<400> 21		
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Ile Ala		
20	25	30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile		
35	40	45
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser		
65	70	75
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr		
85	90	95
Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
100	105	
<210> 22		
<211> 121		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Synthetic Construct		
<400> 22		
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala		
1	5	10
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr		
20	25	30

Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Lys Val Tyr Tyr Gly Ser Asn Pro Phe Ala Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 23

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 23

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

50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Thr Leu Ser Ile Thr Ser Leu Gln Thr
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Ser Thr Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 24

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 24

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Lys Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Thr Met Ile Ala Thr Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 25

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 25

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Arg Cys Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Asp Asp

20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Pro Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Ser Glu Gly Asn Thr Leu Arg Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser

50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Val Phe Thr Ile Glu Asn Met Leu Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 26

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 26

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Lys Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Thr Met Ile Ala Thr Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser

115

<210> 27

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 27

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Pro

85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 28

<211> 459

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 28

Met Gly Trp Ser Ser Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg

20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe

35 40 45

Thr Thr Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn

65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser

85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Met Ile Ala Thr Arg Ala Met Asp Tyr

115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Gly Gly Gly Ser Gly

130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser

145 150 155 160

Gln Lys Ser Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys

165 170 175

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ile Thr Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys

180 185 190

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr

195 200 205

Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

210 215 220

Thr Phe Thr Ile Ser Asn Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr

225 230 235 240

Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys

245 250 255

Leu Glu Leu Lys Leu Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys

260 265 270

Pro Pro Cys Pro Asp Pro Lys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly

275 280 285

Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe

290	295	300
Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn		
305	310	315
Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr		
325	330	335
Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser		
340	345	350
Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr		
355	360	365
Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys		
370	375	380
Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn		
385	390	395
Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu		
405	410	415
Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Gly Lys Gly		
420	425	430
His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr		
435	440	445
Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
450	455	
<210> 29		
<211> 1380		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Synthetic Construct		
<400> 29		
atgggatgga gctcttatcat cctttcttg gtagcaacag ctacagggtt ccactccag 60		
gtccaaactgc agcagcctgg ggctgagctg gtgaggcctg gagcttcagt gaagctgtcc 120		
tgcaaggctt cgggttactc cttcaccacc tactggatga actgggtgaa gcagaggcct 180		
ggacaaggcc ttgagtgat tggcatgatt catccttcg atagtgaaac tagtttaat 240		
cagaagttca aggacaaggc cacattgact gtagacaaat cctccagcac agcctacatg 300		

caactcagca gcccacatc tgaggactct gcggctatt actgtgcaag atctactatg	360
attgcgacga gggctatgga ctactgggt caaggaacct cagtcaccgt ctccggcggt	420
ggcggtctg gtggcggtgg ctccggcggt gcgggtctg acattgtgat gaccagct	480
cagaatcca tgtccacatc agtaggagac agggtcagca tcacctgcaa ggccagttag	540
gatgttatta ctggtgtacg ctggtatcaa cagaaccagg ggcaatctcc taaattactg	600
atttactcg catcttacccg gtacactgga gtccctgatc gtttactgg cagtggatct	660
gggacggatt tcacttcac catcagcaat gtgcaggctg aagacctggc agtttattac	720
tgtcagcaac attatagtagtac tcctctact ttggtgctg ggaccaagct ggagctgaaa	780
ctcgagccca aatttgtga caaaactcac acatgccac cgtgcccggatccaaattt	840
tgggtgtgg tgggtgtgg tggagtctcg gcttgctata gttgtctgt aacagtggcc	900
tttattatattt tctgggtgag gagtaagagg agcaggctcc tgcacagtga ctacatgaac	960
atgactcccc gccccccccgg gcccacccgc aagcattacc agccctatgc cccaccacgc	1020
gacttcgcag cctatcgctc cagagtgaag ttcatcggagacgc ccccggtac	1080
cagcaggccc agaaccagct ctataacgag ctcaatctag gacgaagaga ggagtacgat	1140
gtttggaca agagacgtgg ccgggaccct gagatggggg gaaagccgag aaggaagaac	1200
cctcaggaag gcctgtacaa tgaactgcag aaagataaga tggcgaggc ctacagttag	1260
attggatga aaggcgagcg ccggaggggc aagggcacg atggcctta ccagggtctc	1320
agtacagccca ccaaggacac ctacgacgcc ctgcacatgc aggcctgccc ccctcgtaa	1380