

**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)**(11) 공개번호** 10-2022-0017914
(43) 공개일자 2022년02월14일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/725 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C07K 16/2878 (2013.01)
A61K 39/001117 (2018.08)</p> <p>(21) 출원번호 10-2021-7039584</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2020년05월06일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2021년12월02일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/CN2020/088836</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2020/224606
국제공개일자 2020년11월12일</p> <p>(30) 우선권주장
201910376652.8 2019년05월07일 중국(CN)</p> | <p>(71) 출원인
그라셀 바이오테크놀로지스 (상하이) 컴퍼니, 리미티드
중국 200233 상하이 쉬후이 디스트릭트 이산 로드
넘버 926 빌딩 1 12층</p> <p>(72) 발명자
장, 후아
중국 200233 상하이 쉬후이 디스트릭트 이산 로드
926 빌딩 1 트웰브쓰 플로어
쉬, 후안
중국 200233 상하이 쉬후이 디스트릭트 이산 로드
926 빌딩 1 트웰브쓰 플로어
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
양영준, 이상영</p> |
|---|---|

전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 BCMA를 표적으로 하는 조작된 면역 세포 및 그의 용도**(57) 요약**

본 발명은 BCMA를 표적으로 하는 조작된 면역 세포 및 그의 용도를 제공한다. 특히, 본 발명은 BCMA를 특이적으로 표적으로 하는 CAR로서, S-유래 scFv이고 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 항체 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 항체 경쇄 가변 영역을 갖는 항원-결합 도메인을 포함하는 CAR을 제공한다. 또한 본 발명은 이러한 CAR을 포함하는 CAR-T 세포, S-유래 scFv를 포함하는 이중 CAR 및 CAR T 세포, 및 관련된 그의 용도를 제공한다. 다른 scFv를 사용하여 구축된 CAR-T 세포에 비교하여, 본 발명에서 구축된 CAR-T 세포는 더 양호한 사멸 효과 및 종양 제거 능력을 갖는다.

(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 16/2803 (2013.01)
A61K 2039/5156 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)

(72) 발명자

웬, 리안준

중국 200233 상하이 쉬후이 디스트릭트 이산 로드
926 빌딩 1 트웰브쓰 플로어

카오, 웨이

중국 200233 상하이 쉬후이 디스트릭트 이산 로드
926 빌딩 1 트웰브쓰 플로어

리우, 리펑

중국 200233 상하이 쉬후이 디스트릭트 이산 로드
926 빌딩 1 트웰브쓰 플로어

명세서

청구범위

청구항 1

키메라 항원 수용체 (CAR)이며, 그의 항원 결합 도메인 (scFv)이 서열식별번호(SEQ ID NO): 9에 제시된 바와 같은 항체 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 항체 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 CAR.

청구항 2

제1항에 있어서, scFv가 하기 화학식 A 또는 화학식 B에 제시된 바와 같은 것인 CAR:

V_H-V_L (A); V_L-V_H (B)

화학식에서, V_H 는 항체 중쇄 가변 영역이고, V_L 는 항체 경쇄 가변 영역이고, "-"는 링커 펩티드 또는 펩티드 결합이다.

청구항 3

BCMA 및 제1 표적을 표적으로 하는 이중특이적 CAR이며,

여기서 이중특이적 CAR 내의 BCMA를 표적으로 하는 항원 결합 도메인 (scFv)이 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 항체 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 항체 경쇄 가변 영역을 포함하고;

제1 표적이

CD138, 카파 경쇄, NKG2D-리간드, TAC1, GPRC5D, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD19, CD20, CD22, CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD44V6, CD47, CD52, CD56, CD57, CD58, CD79b, CD80, CD86, CD81, CD123, CD133, CD137, CD151, CD171, CD276, CLL1, B7H4, BCMA, VEGFR-2, EGFR, GPC3, PMSA, CEACAM6, c-Met, EGFRvIII, ErbB2/HER2, ErbB3, HER-2, HER3, ErbB4/HER-4, EphA2, IGF1R, GD2, O-아세틸 GD2, O-아세틸 GD3, GHRHR, GHR, Flt1, KDR, Flt4, Flt3, CEA, CA125, CTLA-4, GITR, BTLA, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR1, IL6R, gp130, 루이스(Lewis), TNFR1, TNFR2, PD1, PD-L1, PD-L2, PSCA, HVEM, MAGE-A, MSLN, NY-ESO-1, PSMA, RANK, ROR1, TNFRSF4, TWEAK-R, LTPR, LIFRP, LRP5, MUC1, MUC16, TCR α , TCR β , TLR7, TLR9, PTCH1, WT-1, 로볼 (Robol), 프리즐드(Frizzled), OX40, 노치(Notch)-1-4, APRIL, CS1, MAGE3, 클라우딘(Claudin) 18.2, 플레이트 수용체 α , 플레이트 수용체 β , GPC2, CD70, BAFF-R, TROP-2, 또는 그의 조합

으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 이중특이적 CAR.

청구항 4

제3항에 있어서, 제1 표적이 CD19이고, 이중특이적 CAR 내의 CD19를 표적으로 하는 항원 결합 도메인 (scFv)이 서열식별번호: 11, 및 21-30 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 항체 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 12, 및 31-36 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 항체 경쇄 가변 영역을 포함하는 것인 이중특이적 CAR.

청구항 5

제3항에 있어서, 이중특이적 CAR이 하기 화학식 II에 제시된 바와 같은 구조를 갖는 것인 이중특이적 CAR:

$L-scFv1-I-scFv2-H-TM-C-CD3$ (II)

화학식에서,

"-"는 각각 독립적으로 링커 펩티드 또는 펩티드 결합이고;

L은 부재하거나 또는 신호 펩티드 서열이고;

I는 가요성 링커이고;

H는 부재하거나 힌지 영역이고;

TM은 막횡단 도메인이고;

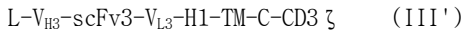
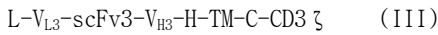
C는 공동자극 신호 분자이고;

CD3 ζ는 CD3 ζ로부터 유래된 세포질 신호전달 서열이고;

scFv1 및 scFv2 중 하나는 제1 표적을 표적으로 하는 항원 결합 도메인이고, 다른 하나는 BCMA를 표적으로 하는 항원 결합 도메인이다.

청구항 6

제3항에 있어서, 이중특이적 CAR이 하기 화학식 III 또는 III'에 제시된 바와 같은 구조를 갖는 것인 이중특이적 CAR:



화학식에서,

"-"는 각각 독립적으로 링커 펩티드 또는 펩티드 결합이고;

L, H, TM, C 및 CD3 ζ 요소는 상기 기술된 바와 같고;

scFv3은 BCMA를 표적으로 하는 항원 결합 도메인이고, V_{H3}은 제1 표적에 대한 항체 중쇄 가변 영역이고, V_{L3}은 제1 표적에 대한 항체 경쇄 가변 영역이거나; 또는

scFv3은 제1 표적을 표적으로 하는 항원 결합 도메인이고, V_{H3}은 BCMA에 대한 항체 중쇄 가변 영역이고, V_{L3}은 BCMA에 대한 항체 경쇄 가변 영역이다.

청구항 7

제1항에 따른 CAR 또는 제3항에 따른 이중특이적 CAR을 코딩하는 핵산 분자.

청구항 8

제7항에 따른 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 9

제8항에 따른 벡터, 또는 염색체 내로 외인성으로 통합된 제7항에 따른 핵산 분자를 포함하거나, 또는 제1항에 따른 CAR 또는 제3항에 따른 이중특이적 CAR을 발현하는 조작된 면역 세포.

청구항 10

조작된 면역 세포이며, 면역 세포가 외인성인 제1 발현 카세트 및 제2 발현 카세트를 포함하고, 여기서 제1 발현 카세트는 제1 표적을 표적으로 하는 제1 CAR을 발현시키는 데 사용되고, 제2 발현 카세트는 BCMA를 표적으로 하는 제2 CAR을 발현시키는 데 사용되거나; 또는

면역 세포가 제1 표적을 표적으로 하는 제1 CAR 및 BCMA를 표적으로 하는 제2 CAR을 발현하고,

여기서 제2 CAR 내의 BCMA를 표적으로 하는 항원 결합 도메인 (scFv)이 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 항체 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 항체 경쇄 가변 영역을 포함하고;

제1 표적이

CD138, 카파 경쇄, NKG2D-리간드, TACI, GPRC5D, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD19, CD20, CD22, CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD44V6, CD47, CD52, CD56, CD57, CD58, CD79b, CD80, CD86, CD81, CD123, CD133, CD137, CD151, CD171, CD276, CLL1, B7H4, BCMA, VEGFR-2, EGFR, GPC3, PMSA, CEACAM6, c-Met, EGFRvIII, ErbB2/HER2, ErbB3, HER-2, HER3, ErbB4/HER-4, EphA2, IGF1R, GD2, O-아세틸 GD2, O-아세틸 GD3, GHRHR, GHR, Flt1, KDR, Flt4, Flt3, CEA, CA125, CTLA-4, GITR, BTLA, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR1, IL6R, gp130, 루이스, TNFR1, TNFR2, PD1, PD-L1, PD-L2, PSCA, HVEM, MAGE-A, MSLN, NY-ESO-1, PSMA, RANK, ROR1, TNFRSF4, TWEAK-R, LTPR, LIFRP, LRP5, MUC1, MUC16, TCR α, TCR β, TLR7, TLR9, PTCH1, WT-1, 로블, 프리즐

드, OX40, 노치-1-4, APRIL, CS1, MAGE3, 클라우딘 18.2, 플레이트 수용체 α , 플레이트 수용체 β , GPC2, CD70, BAFF-R, TROP-2, 또는 그의 조합

으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조작된 면역 세포.

청구항 11

제1항에 따른 CAR, 제3항에 따른 이중특이적 CAR, 또는 제9항 또는 제10항에 따른 조작된 면역 세포, 및 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 제형.

청구항 12

암 또는 종양을 예방 및/또는 치료하기 위한 약물 또는 제형의 제조에서의 제1항에 따른 CAR, 제3항에 따른 이중특이적 CAR, 또는 제9항 또는 제10항에 따른 조작된 면역 세포의 용도.

청구항 13

제12항에 있어서, 약물 또는 제형이 클론 증식이 가능한 종양 세포를 사멸시키는 것에 의해 암 또는 종양을 치료하는 것인 용도.

청구항 14

제13항에 있어서, 클론 증식이 가능한 종양 세포가 클론-형성 세포, 종양 세포 전구체 세포, 및 종양 전구 세포를 포함하는 것인 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 기술 분야

[0002] 본 발명은 면역요법의 분야, 더욱 구체적으로는 BCMA를 표적으로 하는 조작된 면역 세포 및 그의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 발명의 배경

[0004] 다발성 골수종 (MM)은 악성 형질 세포 종양이다. 골수 내의 형질 세포로부터 종양 세포가 유래되고, 형질 세포는 B 림프구의 최종 기능 단계로 발달되는 세포이다. 기본적으로 다발성 골수종은 높은 이환율 및 높은 사망률의 특징을 갖는 불치병이다. 2017년 통계에서, 미국에서 30,000명의 새로 진단된 다발성 골수종 환자가 있었고, 그 중 12,000명은 사망에 직면할 수 있었다. 현재, 다발성 골수종에 대한 통상적인 요법은 세포독성 약물 요법, 프로테아제 억제제 (보르테조미프(Bortezomib) 등), 레날리도미드, 모노클로날 항체, 코르티코스테로이드 등을 포함한다. 그러나, 현재의 요법은 모두 부분적으로 효과적이고, 지속적인 완화 효과가 없으며, 재발 위험이 높다. 따라서, 다발성 골수종의 요법에서의 개선이 특히 중요한 것으로 보인다.

[0005] 따라서, 다발성 골수종에 대한 효과적이고, 재발률이 낮으며, 안전한 요법이 관련 기술 분야에서 시급하게 요구된다.

발명의 내용

[0006] 발명의 개요

[0007] 본 발명의 목적은 BCMA를 표적으로 하는 조작된 면역 세포 및 그의 용도를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 CD19 및 BCMA 양쪽 모두를 표적으로 하는 조작된 면역 세포 및 그의 용도를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 제1 측면에서, 키메라 항원 수용체 (CAR) 또는 TCR이 제공되고, CAR 또는 TCR의 항원 결합 도메인 (scFv)은 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 항체 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 항체 경쇄 가변 영역을 포함한다.

- [0010] 또 다른 바람직한 실시양태에서, scFv는 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역 사이에 위치하는 링커 펩티드를 추가로 포함한다.
- [0011] 또 다른 바람직한 실시양태에서, scFv는 하기 화학식 A 또는 화학식 B에 제시된 바와 같다:
- [0012] V_H-V_L (A); V_L-V_H (B)
- [0013] [화학식에서, V_H 는 항체 중쇄 가변 영역이고, V_L 는 항체 경쇄 가변 영역이고, "-"는 링커 펩티드 또는 펩티드 결합이다].
- [0014] 또 다른 바람직한 실시양태에서, V_H 와 V_L 사이의 링커 펩티드는 1 내지 4개, 바람직하게는 1 내지 4개, 더욱 바람직하게는 3 내지 4개의 연속적인 서열식별번호: 7 (GGGGS)에 제시된 바와 같은 서열이다.
- [0015] 또 다른 바람직한 실시양태에서, CAR은 하기 화학식 I에 제시된 바와 같은 구조를 갖는다:
- [0016] L-scFv-H-TM-C-CD3 ζ (I)
- [0017] [화학식에서,
- [0018] "-"는 각각 독립적으로 링커 펩티드 또는 펩티드 결합이고;
- [0019] L은 부재하거나 또는 신호 펩티드 서열이고;
- [0020] H는 부재하거나 힌지 영역이고;
- [0021] TM은 막횡단 도메인이고;
- [0022] C는 공동자극 신호 분자이며;
- [0023] CD3 ζ 는 CD3 ζ 로부터 유래된 세포질 신호전달 서열이다].
- [0024] 본 발명의 제2 측면에서, 이중특이적 CAR 또는 TCR이 제공되고, 이중특이적 CAR 또는 TCR은 BCMA 및 제1 표적을 표적으로 하며,
- [0025] 여기서 이중특이적 CAR 내의 BCMA를 표적으로 하는 항원 결합 도메인 (scFv)은 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 항체 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 항체 경쇄 가변 영역을 포함하고;
- [0026] 제1 표적은 CD138, 카파 경쇄, NKG2D-리간드, TAC1, GPRC5D, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD19, CD20, CD22, CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD44V6, CD47, CD52, CD56, CD57, CD58, CD79b, CD80, CD86, CD81, CD123, CD133, CD137, CD151, CD171, CD276, CLL1, B7H4, BCMA, VEGFR-2, EGFR, GPC3, PMSA, CEACAM6, c-Met, EGFRvIII, ErbB2/HER2, ErbB3, HER-2, HER3, ErbB4/HER-4, EphA2, IGF1R, GD2, O-아세틸 GD2, O-아세틸 GD3, GHRHR, GHR, Flt1, KDR, Flt4, Flt3, CEA, CA125, CTLA-4, GITR, BTLA, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR1, IL6R, gp130, 루이스, TNFR1, TNFR2, PD1, PD-L1, PD-L2, PSCA, HVEM, MAGE-A, MSLN, NY-ESO-1, PSMA, RANK, ROR1, TNFRSF4, TWEAK-R, LTPR, LIFRP, LRP5, MUC1, MUC16, TCR α , TCR β , TLR7, TLR9, PTCH1, WT-1, 로볼 (Robol), 프리즐드(Frizzled), OX40, (Notch)-1-4, APRIL, CS1, MAGE3, 클라우딘(Claudin) 18.2, 플레이트 수용체 α , 플레이트 수용체 β , GPC2, CD70, BAFF-R, TROP-2, 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 이중특이적 CAR 또는 TCR은 CD19를 표적으로 하는 항원 결합 도메인을 포함한다.
- [0027] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 제1 표적은 CD19이고, 이중특이적 CAR 내의 CD19를 표적으로 하는 항원 결합 도메인 (scFv)은 서열식별번호: 11에 제시된 바와 같은 항체 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 12에 제시된 바와 같은 항체 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0028] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 제1 표적은 CD19이고, 이중특이적 CAR 내의 CD19를 표적으로 하는 항원 결합 도메인 (scFv)은 서열식별번호: 21-30 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 항체 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 31-36 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 항체 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0029] 구체적인 서열을 하기 제시된 바와 같다:
- [0030] 서열식별번호: 21에 제시된 바와 같은 CD19 항체 중쇄 가변 영역 (H9)
- [0031] QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWLVGIWGSETTYNSALKSRLTISKDTSKSQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYYG

GSYAMDYWGQGLTVTVSS;

- [0032] 서열식별번호: 22에 제시된 바와 같은 CD19 항체 중쇄 가변 영역 (H1)
- [0033] QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYNSALKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARHYHYG
GSYAMDYWGQGLTVTVSS;
- [0034] 서열식별번호: 23에 제시된 바와 같은 CD19 항체 중쇄 가변 영역 (H8)
- [0035] QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYNSALKSRVTISKDTSKSQVFLKLSVTAADTAVYYCAKHYYYG
GSYAMDYWGQGLTVTVSS;
- [0036] 서열식별번호: 24에 제시된 바와 같은 CD19 항체 중쇄 가변 영역 (H10)
- [0037] QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYNSALKSRLTISKDTSKSQVFLKLSVTAADTAVYYCAKHYYYG
GSYAMDYWGQGLTVTVSS;
- [0038] 서열식별번호: 25에 제시된 바와 같은 CD19 항체 중쇄 가변 영역 (H2)
- [0039] QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYNSALKSRVTISKDTSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYYG
GSYAMDYWGQGLTVTVSS;
- [0040] 서열식별번호: 26에 제시된 바와 같은 CD19 항체 중쇄 가변 영역 (H3)
- [0041] QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYNSALKSRLTISKDTSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYYG
GSYAMDYWGQGLTVTVSS;
- [0042] 서열식별번호: 27에 제시된 바와 같은 CD19 항체 중쇄 가변 영역 (H4)
- [0043] QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYNSALKSRLTISKDTSKNQVSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYYG
GSYAMDYWGQGLTVTVSS;
- [0044] 서열식별번호: 28에 제시된 바와 같은 CD19 항체 중쇄 가변 영역 (H5)
- [0045] QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYNSALKSRLTISKDTSKNQVSLKLSLTAADTAVYYCAKHYYYG
GSYAMDYWGQGLTVTVSS;
- [0046] 서열식별번호: 29에 제시된 바와 같은 CD19 항체 중쇄 가변 영역 (H6)
- [0047] QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYNAALKSRLTISKDTSKNQVSLKLSLTAADTAVYYCAKHYYYG
GSYAMDYWGQGLTVTVSS;
- [0048] 서열식별번호: 30에 제시된 바와 같은 CD19 항체 중쇄 가변 영역 (H7)
- [0049] QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPGKGLEWIGVIWGSETTYNSALKSRLTISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAKHYYYG
GSYAMDYWGQGLTVTVSS;
- [0050] 서열식별번호: 31에 제시된 바와 같은 CD19 항체 경쇄 가변 영역 (L5)
- [0051] DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDISKYLNWYQQKPGKAPKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSDYFTFTISSLQPEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGT
KLEIK;
- [0052] 서열식별번호: 32에 제시된 바와 같은 CD19 항체 경쇄 가변 영역 (L1)
- [0053] DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDISKYLNWYQQKPGKAPKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSDYFTFTISSLQPEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGT
KLEIK;
- [0054] 서열식별번호: 33에 제시된 바와 같은 CD19 항체 경쇄 가변 영역 (L6)
- [0055] DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDISKYLNWYQQKPGAVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSDYFTFTISSLQPEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGT
KLEIK;
- [0056] 서열식별번호: 34에 제시된 바와 같은 CD19 항체 경쇄 가변 영역 (L2)
- [0057] DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDISKYLNWYQQKPGKAPKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSDYFTFTISSLQPEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGT
KLEIK;

- [0058] 서열식별번호: 35에 제시된 바와 같은 CD19 항체 경쇄 가변 영역 (L3)
- [0059] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISKYLNWYQQKPGKAPKLLIYHTRGLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYYCQQGNTLPYTFGGGT KLEIK; 및
- [0060] 서열식별번호: 36에 제시된 바와 같은 CD19 항체 경쇄 가변 영역 (L4)
- [0061] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISKYLNWYQQKPGKAPKLLIYHTRGLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYYCQQANTLPYTFGGGT KLEIK.
- [0062] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 이중특이적 CAR은 제1 표적을 표적으로 하는 항원 결합 도메인 및 BCMA를 표적으로 하는 항원 결합 도메인 양쪽 모두를 포함한다.
- [0063] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 이중특이적 CAR은 하기 화학식 II에 제시된 바와 같은 구조를 갖는다:
- [0064] L-scFv1-I-scFv2-H-TM-C-CD3 ζ (II)
- [0065] [화학식에서,
- [0066] "-"는 각각 독립적으로 링커 펩티드 또는 펩티드 결합이고;
- [0067] L은 부재하거나 또는 신호 펩티드 서열이고;
- [0068] I는 가요성 링커이고;
- [0069] H는 부재하거나 힌지 영역이고;
- [0070] TM은 막횡단 도메인이고;
- [0071] C는 공동자극 신호 분자이고;
- [0072] CD3 ζ는 CD3 ζ로부터 유래된 세포질 신호전달 서열이며;
- [0073] scFv1 및 scFv2 중 하나는 제1 표적을 표적으로 하는 항원 결합 도메인이고, 다른 하나는 BCMA를 표적으로 하는 항원 결합 도메인이다].
- [0074] 또 다른 바람직한 실시양태에서, scFv1 및 scFv2는 서로 독립적일 수 있고, 또한 일렬일 수 있거나 또는 루프 구조일 수 있다.
- [0075] 또 다른 바람직한 실시양태에서, scFv1는 제1 표적을 표적으로 하는 항원 결합 도메인이고, scFv2는 BCMA를 표적으로 하는 항원 결합 도메인이다.
- [0076] 또 다른 바람직한 실시양태에서, scFv1은 BCMA를 표적으로 하는 항원 결합 도메인이고, scFv2는 제1 표적을 표적으로 하는 항원 결합 도메인이다.
- [0077] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 가요성 링커 I의 서열은 1-6개, 바람직하게는 3-5개의 연속적인 서열식별번호: 7 (GGGS)에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다.
- [0078] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 가요성 링커 I는 서열식별번호: 17, 18 또는 19에 제시된 바와 같은 서열을 갖는다.
- [0079] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 제1 표적을 표적으로 하는 항원 결합 도메인은 하기 화학식 C 또는 화학식 D에 제시된 바와 같은 구조를 갖는다:
- [0080] V_{L1}-V_{H1} (C); V_{H1}-V_{L1} (D)
- [0081] [식 중, V_{L1}은 제1 표적에 대한 항체 경쇄 가변 영역이고; V_{H1}은 제1 표적에 대한 항체 중쇄 가변 영역이며; "-"는 링커 펩티드 또는 펩티드 결합이다].
- [0082] 또 다른 바람직한 실시양태에서, CD19를 표적으로 하는 항원 결합 도메인은 하기 화학식 C 또는 화학식 D에 제시된 바와 같은 구조를 갖는다:
- [0083] V_{L1}-V_{H1} (C); V_{H1}-V_{L1} (D)
- [0084] [식 중, V_{L1}은 CD19에 대한 항체 경쇄 가변 영역이고; V_{H1}은 CD19에 대한 항체 중쇄 가변 영역이며; "-"는 링커

펩티드 또는 펩티드 결합이다].

- [0085] 또 다른 바람직한 실시양태에서, CD19를 표적으로 하는 항원 결합 도메인은 모노클로날 항체 FMC63의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0086] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 항-CD19 항체의 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 11에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는다.
- [0087] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 항-CD19 항체의 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 12에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는다.
- [0088] 또 다른 바람직한 실시양태에서, BCMA를 표적으로 하는 항원 결합 도메인은 하기 화학식 A 또는 화학식 B에 제시된 바와 같은 구조를 갖는다:
- [0089] V_H-V_L (A); V_L-V_H (B)
- [0090] [화학식에서, V_H 는 항체 중쇄 가변 영역이고; V_L 는 항체 경쇄 가변 영역이며; "-"는 링커 펩티드 또는 펩티드 결합이다].
- [0091] 또 다른 바람직한 실시양태에서, scFv1은 서열식별번호: 11에 제시된 바와 같은 항체 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 12에 제시된 바와 같은 항체 경쇄 가변 영역을 포함하고, scFv2는 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 항체 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 항체 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0092] 또 다른 바람직한 실시양태에서, scFv1은 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 항체 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 항체 경쇄 가변 영역을 포함하고, scFv2는 서열식별번호: 11에 제시된 바와 같은 항체 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 12에 제시된 바와 같은 항체 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0093] 또 다른 바람직한 실시양태에서, scFv1 및/또는 scFv2는 무린-유래이거나, 인간-유래이거나, 인간- 및 무린-유래 키메라이거나, 또는 완전히 인간화된 단일쇄 항체 가변 영역 단편이다.
- [0094] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 이종특이적 CAR은 하기 화학식 III 또는 III'에 제시된 바와 같은 구조를 갖는다:
- [0095] $L-V_{L3}-scFv3-V_{H3}-H-TM-C-CD3\zeta$ (III)
- [0096] $L-V_{H3}-scFv3-V_{L3}-H1-TM-C-CD3\zeta$ (III')
- [0097] [화학식에서,
- [0098] "-"는 각각 독립적으로 링커 펩티드 또는 펩티드 결합이고;
- [0099] L, H, TM, C 및 $CD3\zeta$ 요소는 상기 기술된 바와 같고;
- [0100] scFv3은 BCMA를 표적으로 하는 항원 결합 도메인이고, V_{H3} 는 제1 표적에 대한 항체 중쇄 가변 영역이고, V_{L3} 는 제1 표적에 대한 항체 경쇄 가변 영역이거나; 또는 scFv3은 제1 표적을 표적으로 하는 항원 결합 도메인이고, V_{H3} 는 BCMA에 대한 항체 중쇄 가변 영역이고, V_{L3} 는 BCMA에 대한 항체 경쇄 가변 영역이다].
- [0101] 또 다른 바람직한 실시양태에서, scFv3은 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 항체 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 항체 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0102] 또 다른 바람직한 실시양태에서, V_{H3} 는 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 항체 중쇄 가변 영역을 갖고, V_{L3} 는 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 항체 경쇄 가변 영역을 갖는다.
- [0103] 또 다른 바람직한 실시양태에서, scFv3은 서열식별번호: 11에 제시된 바와 같은 항체 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 12에 제시된 바와 같은 항체 경쇄 가변 영역을 포함하고; V_{H3} 는 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 항체 중쇄 가변 영역을 갖고, V_{L3} 는 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 항체 경쇄 가변 영역을 갖는다.
- [0104] 또 다른 바람직한 실시양태에서, scFv3은 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 항체 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 항체 경쇄 가변 영역을 포함하고; V_{H3} 는 서열식별번호: 11에 제시된 바와 같은

항체 중쇄 가변 영역을 갖고, V_{L3} 은 서열식별번호: 12에 제시된 바와 같은 항체 경쇄 가변 영역을 갖는다.

- [0105] 또 다른 바람직한 실시양태에서, CAR은 도 1에 제시된 바와 같은 구조를 갖는다.
- [0106] 또 다른 바람직한 실시양태에서, L은 CD8, CD28, GM-CSF, CD4, CD137, 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 신호 펩티드이다.
- [0107] 또 다른 바람직한 실시양태에서, L은 CD8로부터 유래된 신호 펩티드이다.
- [0108] 또 다른 바람직한 실시양태에서, L은 서열식별번호: 16 또는 1에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는다.
- [0109] 또 다른 바람직한 실시양태에서, H는 CD8, CD28, CD137, 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 힌지 영역이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, H는 각각 독립적으로 CD8로부터 유래된 힌지 영역이다.
- [0110] 또 다른 바람직한 실시양태에서, H는 서열식별번호: 8에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는다.
- [0111] 또 다른 바람직한 실시양태에서, TM은 CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 막횡단 영역이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, TM은 각각 독립적으로 CD8 또는 CD28로부터 유래된 막횡단 영역이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, CD8-유래 막횡단 영역은 서열식별번호: 7에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는다.
- [0112] 또 다른 바람직한 실시양태에서, CD28-유래 막횡단 영역은 서열식별번호: 6에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는다.
- [0113] 또 다른 바람직한 실시양태에서, C는 OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD70, CD134, 4-1BB (CD137), PD1, Dap10, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), NKG2D, GITR, TLR2, 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질의 공동자극 신호 분자이다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, C는 CD28 및/또는 4-1BB로부터 유래된 공동자극 신호 분자이다.
- [0114] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 4-1BB-유래 공동자극 신호 분자는 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는다.
- [0115] 또 다른 바람직한 실시양태에서, CD28-유래 공동자극 신호 분자는 서열식별번호: 4에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는다.
- [0116] 또 다른 바람직한 실시양태에서, CD3 ζ 는 서열식별번호: 3에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는다.
- [0117] 또 다른 바람직한 실시양태에서, CAR (바람직하게는 C-말단 또는 N-말단)은 세포 자살 요소를 추가로 포함한다.
- [0118] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 세포 자살 요소는 T2A를 통해 CAR 또는 이중특이적 CAR의 L 또는 CD3 ζ 에 연결된다.
- [0119] 본 발명의 제3 측면에서, 핵산 분자가 제공되고, 이러한 핵산 분자는 본 발명의 제1 측면에 따른 CAR 또는 TCR, 또는 본 발명의 제2 측면에 따른 이중특이적 CAR 또는 TCR을 코딩한다.
- [0120] 본 발명의 제4 측면에서, 벡터가 제공되고, 이러한 벡터는 본 발명의 제3 측면에 따른 핵산 분자를 포함한다.
- [0121] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 벡터는 DNA, RNA, 플라스미드, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 트랜스포존, 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0122] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 벡터는 렌티바이러스 벡터이다.
- [0123] 본 발명의 제5 측면에서, 숙주 세포가 제공되고, 이러한 숙주 세포는 본 발명의 제4 측면에 따른 벡터, 또는 염색체 내로 외인성으로 통합된 본 발명의 제3 측면에 따른 핵산 분자를 포함하거나; 또는 본 발명의 제1 측면에 따른 CAR 또는 TCR, 또는 본 발명의 제2 측면에 따른 이중특이적 CAR 또는 TCR을 발현한다.
- [0124] 본 발명의 제6 측면에서, 조작된 면역 세포가 제공되고, 이러한 면역 세포는 본 발명의 제4 측면에 따른 벡터, 또는 염색체 내로 외인성으로 통합된 본 발명의 제3 측면에 따른 핵산 분자를 포함하거나; 또는 본 발명의 제1 측면에 따른 CAR 또는 TCR, 또는 본 발명의 제2 측면에 따른 이중특이적 CAR 또는 TCR을 발현한다.
- [0125] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 면역 세포는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 특징을 갖는다:

- [0126] (a) 면역 세포의 PD-1 유전자 발현이 침묵화됨;
- [0127] (b) 면역 세포가 T 세포이고, T 세포의 TCR 유전자 발현이 침묵화됨;
- [0128] (c) 면역 세포가 외인성 세포 자살 요소를 발현함;
- [0129] (d) 면역 세포가 PD-1 항체, PD-L1 항체, CD47 항체, Tim3 항체, Lag3 항체, Tigit 항체, OX40 항체, ICOS 항체, IL7, CXCL19, IL21, IL15, IL2, IL18, 또는 그의 조합을 발현하거나 또는 분비함; 및
- [0130] (e) 면역 세포의 시토카인-관련 신호전달 경로가 강화되고, 시토카인은 IL7, CXCL19, IL21, IL15, IL2, IL18, 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택됨.
- [0131] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:
- [0132] (i) 키메라 항원 수용체 T 세포 (CAR-T 세포); 또는
- [0133] (ii) 키메라 항원 수용체 NK 세포 (CAR-NK 세포).
- [0134] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 면역 세포는 외인성 세포 자살 요소를 발현한다.
- [0135] 또 다른 바람직한 실시양태에서, CAR 및 세포 자살 요소는 면역 세포에서 공동-발현된다.
- [0136] 또 다른 바람직한 실시양태에서, CAR 및 세포 자살 요소는 자가-절단 요소에 의해 연결된다.
- [0137] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 세포 자살 요소는 CAR의 N-말단 또는 C-말단에 위치한다.
- [0138] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 자가-절단 요소는 2A 서열 또는 IRES 서열, 바람직하게는 P2A 및 T2A를 포함한다.
- [0139] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 세포 자살 요소는 HSV-TK, iCasp9, Δ CD20, mTMPK, Δ CD19, RQR8, EGFRt, 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0140] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 세포 자살 요소는 하기 화학식 IV에 제시된 바와 같은 구조를 갖는다:
- [0141] L2-D-F (IV)
- [0142] [화학식에서,
- [0143] "-"은 각각 독립적으로 링커 펩티드 또는 펩티드 결합이고;
- [0144] L2는 임의적인 신호 펩티드 서열이고;
- [0145] D는 자살 스위치 요소이며;
- [0146] F는 막횡단 요소이다].
- [0147] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 신호 펩티드는 GM-CSFR로부터 유래된 신호 펩티드이다.
- [0148] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 세포 자살 요소는 말단절단된 표피 성장 인자 수용체 (EGFRt), 말단절단된 CD19 (CD19t) 유전자, 유도성 카스파제 9 유전자 (iCasp9), HSV-TK, Δ CD20, mTMPK, 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0149] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 세포 자살 요소는 EGFRt이다.
- [0150] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 자가 면역요법 및/또는 동종이형 면역요법에 사용된다.
- [0151] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 조작된 면역 세포는 클론 증식이 가능한 종양 세포를 사멸시킬 수 있다.
- [0152] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 제1 측면에 따른 CAR을 발현하는 면역 세포와 비교하여, 본 발명의 제2 측면에 따른 이중특이적 CAR을 발현하는 면역 세포는 생체 내에서 더 오래 생존한다.
- [0153] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 생체 내는 자가적으로 생체 내인 것 또는 동종이형적으로 생체 내인 것을 포함한다.
- [0154] 본 발명의 제7 측면에서, 조작된 면역 세포가 제공되고, 이러한 면역 세포는 외인성인 제1 발현 카세트 및 제2 발현 카세트를 포함하고, 여기서 제1 발현 카세트는 제1 표적을 표적으로 하는 제1 CAR 또는 제1 외인성 TCR을 발현시키는 데 사용되고, 제2 발현 카세트는 BCMA를 표적으로 하는 제2 CAR 또는 제2 외인성 TCR을 발현시키는

데 사용되거나; 또는

- [0155] 면역 세포는 제1 표적을 표적으로 하는 제1 CAR 또는 제1 외인성 TCR 및 BCMA를 표적으로 하는 제2 CAR 또는 제2 외인성 TCR을 발현하고,
- [0156] 여기서 제2 CAR 또는 제2 외인성 TCR 내의 BCMA를 표적으로 하는 항원 결합 도메인 (scFv)은 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 항체 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 항체 경쇄 가변 영역을 포함하고;
- [0157] 제1 표적은
- [0158] CD138, 카파 경쇄, NKG2D-리간드, TAC1, GPRC5D, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD19, CD20, CD22, CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD44V6, CD47, CD52, CD56, CD57, CD58, CD79b, CD80, CD86, CD81, CD123, CD133, CD137, CD151, CD171, CD276, CLL1, B7H4, BCMA, VEGFR-2, EGFR, GPC3, PMSA, CEACAM6, c-Met, EGFRvIII, ErbB2/HER2, ErbB3, HER-2, HER3, ErbB4/HER-4, EphA2, IGF1R, GD2, O-아세틸 GD2, O-아세틸 GD3, GHRHR, GHR, Flt1, KDR, Flt4, Flt3, CEA, CA125, CTLA-4, GITR, BTLA, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR1, IL6R, gp130, 루이스, TNFR1, TNFR2, PD1, PD-L1, PD-L2, PSCA, HVEM, MAGE-A, MSLN, NY-ESO-1, PSMA, RANK, ROR1, TNFRSF4, TWEAK-R, LTPR, LIFRP, LRP5, MUC1, MUC16, TCR α , TCR β , TLR7, TLR9, PTCH1, WT-1, 로블, 프리즐드, OX40, 노치-1-4, APRIL, CS1, MAGE3, 클라우딘 18.2, 플레이트 수용체 α , 플레이트 수용체 β , GPC2, CD70, BAFF-R, TROP-2, 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0159] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 제1 표적은 CD19이고, 제1 CAR 내의 CD19를 표적으로 하는 항원 결합 도메인 (scFv)은 서열식별번호: 11에 제시된 바와 같은 항체 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 12에 제시된 바와 같은 항체 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0160] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 제2 CAR은 본 발명의 제1 측면에 따른 CAR이다.
- [0161] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 제1 CAR 및 제2 CAR은 면역 세포의 세포막 상에 위치한다.
- [0162] 또 다른 바람직한 실시양태에서, CD19를 표적으로 하는 제1 CAR 및 BCMA를 표적으로 하는 제2 CAR은 면역 세포의 세포막 상에서 발현된다.
- [0163] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 제1 발현 카세트 및 제2 발현 카세트는 동일하거나 상이한 벡터 상에 위치한다.
- [0164] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 제1 발현 카세트 및 제2 발현 카세트는 동일한 벡터 상에 위치한다.
- [0165] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 제1 CAR은 하기 화학식 V에 제시된 바와 같은 구조를 갖는다:
- [0166] L-scFv1'-H-TM-C-CD3 ζ (V)
- [0167] [화학식에서,
- [0168] "-"는 각각 독립적으로 링커 펩티드 또는 펩티드 결합이고;
- [0169] L, H, TM, C 및 CD3 ζ 요소는 상기 기술된 바와 같고;
- [0170] scFv1'는 CD19를 표적으로 하는 항원 결합 도메인이다].
- [0171] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 제1 CAR 및 제2 CAR은 2A 펩티드를 통해 연결된다.
- [0172] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 2A 펩티드는 서열식별번호: 2에 제시된 바와 같은 서열을 갖는다.
- [0173] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 면역 세포는 세포 자살 요소를 추가로 포함한다.
- [0174] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 세포 자살 요소 및 이중특이적 CAR은 T2A를 통해 연결된다 (또는 일렬이다).
- [0175] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 세포 자살 요소는 T2A를 통해 제1 CAR 및/또는 제2 CAR에 연결된다.
- [0176] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 면역 세포의 PD1 유전자 발현이 침묵화된다.
- [0177] 또 다른 바람직한 실시양태에서, "PD-1 유전자 발현이 침묵화됨"은 PD-1 유전자가 발현되지 않거나 또는 과소 발현된다는 것을 의미한다.
- [0178] 또 다른 바람직한 실시양태에서, "과소 발현"은 면역 세포의 PD-1 유전자의 발현 수준 G1 대 정상적인 면역 세

포의 PD-1 유전자의 발현 수준 G0의 비 (즉, G1/G0) ≤ 0.5 , 바람직하게는 $G1/G0 \leq 0.3$, 더욱 바람직하게는 ≤ 0.2 , 더욱 바람직하게는 ≤ 0.1 , 가장 바람직하게는 0을 지칭한다.

- [0179] 또 다른 바람직한 실시양태에서, "과소 발현"은 CAR-T 세포의 PD-1 유전자의 발현 수준 G1 대 정상적인 T 세포의 PD-1 유전자의 발현 수준 G0의 비 (즉, G1/G0) ≤ 0.5 , 바람직하게는 $G1/G0 \leq 0.3$, 더욱 바람직하게는 ≤ 0.2 , 더욱 바람직하게는 ≤ 0.1 , 가장 바람직하게는 0을 지칭한다.
- [0180] 본 발명의 제8 측면에서, 제형이 제공되고, 이러한 제형은 본 발명의 제1 또는 제2 측면에 따른 CAR 또는 TCR, 또는 본 발명의 제6 또는 제7 측면에 따른 조작된 면역 세포, 및 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함한다.
- [0181] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 제형은 액체 제형이다.
- [0182] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 제형의 투여 형태는 주사이다.
- [0183] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 제형 내의 조작된 면역 세포는 $1 \times 10^3 - 1 \times 10^8$ 개의 세포/ml, 바람직하게는 $1 \times 10^4 - 1 \times 10^7$ 개의 세포/ml의 농도를 갖는다.
- [0184] 또 다른 바람직한 실시양태에서, CAR은 이중특이적 CAR을 포함한다.
- [0185] 본 발명의 제9 측면에서, 암 또는 종양을 예방 및/또는 치료하기 위한 약물 또는 제형의 제조에서의 본 발명의 제1 또는 제2 측면에 따른 CAR 또는 TCR, 또는 본 발명의 제6 또는 제7 측면에 따른 조작된 면역 세포의 용도가 제공된다.
- [0186] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 종양은 혈액 종양이다.
- [0187] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 혈액 종양은 급성 골수성 백혈병 (AML), 다발성 골수종 (MM), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 미만성 거대 B-세포 림프종 (DLBCL), 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0188] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 암 또는 종양은 다발성 골수종이다.
- [0189] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 암 또는 종양은 림프종이다.
- [0190] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 림프종은 호지킨 림프종 (HL), 미만성 거대 B-세포 림프종 (DLBCL), 여포성 림프종 (FL), 만성 림프구성 백혈구 (CLL), 소림프구성 림프종 (SLL), 변연대 림프종 (MZL), 외투 세포 림프종 (MCL), 버킷 림프종 (BL) 및 복합 B-세포 비-호지킨 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0191] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 암 또는 종양은 재발성 암 또는 종양을 포함한다.
- [0192] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 약물 또는 제형은 클론 증식이 가능한 종양 세포를 사멸시키는 것에 의해 암 또는 종양을 치료한다.
- [0193] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 클론 증식이 가능한 종양 세포는 클론-형성 세포, 종양 세포 전구체 세포, 및 종양 전구 세포를 포함한다.
- [0194] 본 발명의 제10 측면에서, 하기 단계를 포함하는, 조작된 면역 세포를 제조하는 방법이 제공되고, 조작된 면역 세포는 본 발명의 제1 또는 제2 측면에 따른 CAR 또는 TCR을 발현한다: 본 발명의 제3 측면에 따른 핵산 분자 또는 본 발명의 제4 측면에 따른 벡터를 면역 세포 내로 형질도입하고, 이에 의해 조작된 면역 세포를 획득하는 단계.
- [0195] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 면역 세포는 T 세포 또는 NK 세포이다.
- [0196] 본 발명의 제11 측면에서,
- [0197] (1) 조작될 면역 세포를 제공하는 단계;
- [0198] (2) 제1 표적을 표적으로 하는 제1 CAR을 발현하기 위한 제1 발현 카세트를 면역 세포 내로 도입하는 단계; 및
- [0199] (3) BCMA를 표적으로 하는 제2 CAR을 발현하기 위한 제2 발현 카세트를 면역 세포 내로 도입하고, 이에 의해 조작된 면역 세포를 획득하는 단계
- [0200] 를 포함하는, 조작된 면역 세포를 제조하는 방법이며,

- [0201] 여기서 제2 CAR 내의 BCMA를 표적으로 하는 항원 결합 도메인 (scFv)이 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 항체 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 항체 경쇄 가변 영역을 포함하고;
- [0202] 제1 표적이
- [0203] CD138, 카파 경쇄, NKG2D-리간드, TAC1, GPRC5D, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD19, CD20, CD22, CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD44V6, CD47, CD52, CD56, CD57, CD58, CD79b, CD80, CD86, CD81, CD123, CD133, CD137, CD151, CD171, CD276, CLL1, B7H4, BCMA, VEGFR-2, EGFR, GPC3, PMSA, CEACAM6, c-Met, EGFRvIII, ErbB2/HER2, ErbB3, HER-2, HER3, ErbB4/HER-4, EphA2, IGF1R, GD2, O-아세틸 GD2, O-아세틸 GD3, GHRHR, GHR, Flt1, KDR, Flt4, Flt3, CEA, CA125, CTLA-4, GITR, BTLA, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR1, IL6R, gp130, 루이스, TNFR1, TNFR2, PD1, PD-L1, PD-L2, PSCA, HVEM, MAGE-A, MSLN, NY-ESO-1, PSMA, RANK, ROR1, TNFRSF4, TWEAK-R, LTPR, LIFRP, LRP5, MUC1, MUC16, TCR α , TCR β , TLR7, TLR9, PTCH1, WT-1, 로볼, 프리즐드, OX40, 노치-1-4, APRIL, CS1, MAGE3, 클라우딘 18.2, 플레이트 수용체 α , 플레이트 수용체 β , GPC2, CD70, BAFF-R, TROP-2, 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법이 제공된다.
- [0204] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 단계 (2)는 단계 (3) 전에, 단계 (3) 후에, 단계 (3)과 동시에, 또는 단계 (3)과 교대로 수행될 수 있다.
- [0205] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 단계 (1)에서 조작될 면역 세포가 제1 CAR 또는 제2 CAR을 발현하면, 단계 (2) 또는 단계 (3)이 생략될 수 있다.
- [0206] 본 발명의 제12 측면에서, 키트가 제공되고, 이러한 키트는 본 발명의 제6 또는 제7 측면에 따른 조작된 면역 세포를 제조하기 위해 사용되며, 키트는 용기, 및 용기 내에 위치하는 본 발명의 제3 측면에 따른 핵산 분자 또는 본 발명의 제4 측면에 따른 벡터를 포함한다.
- [0207] 본 발명의 제13 측면에서, 키트가 제공되고, 이러한 키트는 본 발명의 제6 또는 제7 측면에 따른 조작된 면역 세포를 제조하기 위해 사용되며, 키트는 용기 및 용기 내에 위치하는 하기의 것들을 포함하고:
- [0208] (1) 제1 표적을 표적으로 하는 제1 CAR을 발현시키는 데 사용되는 제1 발현 카세트를 포함하는 제1 핵산 서열; 및
- [0209] 2) BCMA를 표적으로 하는 제2 CAR을 발현시키는 데 사용되는 제2 발현 카세트를 포함하는 제2 핵산 서열;
- [0210] 여기서 제2 CAR 내의 BCMA를 표적으로 하는 항원 결합 도메인 (scFv)은 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 항체 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 항체 경쇄 가변 영역을 포함하고;
- [0211] 제1 표적은
- [0212] CD138, 카파 경쇄, NKG2D-리간드, TAC1, GPRC5D, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD19, CD20, CD22, CD25, CD28, CD30, CD33, CD38, CD40, CD44V6, CD47, CD52, CD56, CD57, CD58, CD79b, CD80, CD86, CD81, CD123, CD133, CD137, CD151, CD171, CD276, CLL1, B7H4, BCMA, VEGFR-2, EGFR, GPC3, PMSA, CEACAM6, c-Met, EGFRvIII, ErbB2/HER2, ErbB3, HER-2, HER3, ErbB4/HER-4, EphA2, IGF1R, GD2, O-아세틸 GD2, O-아세틸 GD3, GHRHR, GHR, Flt1, KDR, Flt4, Flt3, CEA, CA125, CTLA-4, GITR, BTLA, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR1, IL6R, gp130, 루이스, TNFR1, TNFR2, PD1, PD-L1, PD-L2, PSCA, HVEM, MAGE-A, MSLN, NY-ESO-1, PSMA, RANK, ROR1, TNFRSF4, TWEAK-R, LTPR, LIFRP, LRP5, MUC1, MUC16, TCR α , TCR β , TLR7, TLR9, PTCH1, WT-1, 로볼, 프리즐드, OX40, 노치-1-4, APRIL, CS1, MAGE3, 클라우딘 18.2, 플레이트 수용체 α , 플레이트 수용체 β , GPC2, CD70, BAFF-R, TROP-2, 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0213] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 제1 및 제2 핵산 서열은 동일하거나 상이한 용기에 위치한다.
- [0214] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 제1 및 제2 핵산 서열은 동일한 발현 벡터 내에 위치한다.
- [0215] 본 발명의 제14 측면에서, 암 또는 종양의 예방 및/또는 치료를 위한 본 발명의 제6 또는 제7 측면에 따른 조작된 면역 세포의 용도가 제공된다.
- [0216] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 암 또는 종양은 다발성 골수종이다.
- [0217] 본 발명의 제15 측면에서, 적합한 양의 본 발명의 제6 또는 제7 측면에 따른 세포 또는 본 발명의 제5 측면에 따른 제형을 질환 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 질환을 치료하는 방법이 제공된다.

- [0218] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 질환은 암 또는 종양이다.
- [0219] 본 발명의 제16 측면에서, (a) 면역 세포에서 외인성인 제1 발현 카세트 및 제2 발현 카세트 양쪽 모두를 발현 시키고, 여기서 제1 발현 카세트는 CD19를 표적으로 하는 제1 CAR을 발현시키는 데 사용되고, 제2 발현 카세트는 BCMA를 표적으로 하는 제2 CAR을 발현시키는 데 사용되는 단계; 또는 (b) 면역 세포에서 제2 측면에 따른 이중특이적 CAR을 발현시키는 단계를 포함하는, 면역 세포의 생체 내 생존 능력을 강화하거나 또는 클론 증식이 가능한 종양 세포에 대한 면역 세포의 사멸 능력을 강화하는 방법이 제공된다.
- [0220] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 방법에 의해 구축된 면역 세포는 본 발명의 제6 및 제7 측면에 기술된 바와 같다.
- [0221] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 제1 발현 카세트 및 제2 발현 카세트는 본 발명의 제7 측면에서의 제1 발현 카세트 및 제2 발현 카세트와 동일한 의미를 갖는다.
- [0222] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 생체 내는 자가적으로 생체 내인 것 또는 동종이형적으로 생체 내인 것을 포함한다.
- [0223] 본 발명의 제17 측면에서, 조작된 면역 세포에서 외인성 제1 발현 카세트를 발현시키고, 여기서 제1 발현 카세트가 CD19를 표적으로 하는 제1 CAR을 발현시키는 데 사용되는 단계를 포함하는, BCMA를 표적으로 하는 조작된 면역 세포의 생체 내 생존 능력 또는 클론 증식이 가능한 종양 세포에 대한 사멸 능력을 강화하는 방법이 제공된다.
- [0224] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 제1 발현 카세트는 본 발명의 제7 측면에서의 제1 발현 카세트 및 제2 발현 카세트와 동일한 의미를 갖는다.
- [0225] 또 다른 바람직한 실시양태에서, BCMA를 표적으로 하는 조작된 면역 세포는 본 발명의 제1 측면에 따른 CAR을 발현하는 면역 세포이다.
- [0226] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 생체 내는 자가적으로 생체 내인 것 또는 동종이형적으로 생체 내인 것을 포함한다.
- [0227] 본 발명의 제18 측면에서, 제1 발현 카세트의 용도가 제공되고, 이러한 제1 발현 카세트는 CD19를 표적으로 하는 제1 CAR을 발현시키는 데 사용되거나, BCMA를 표적으로 하는 조작된 면역 세포의 생체 내 생존 능력 또는 클론 증식이 가능한 종양 세포에 대한 사멸 능력을 강화하는 데 사용되거나, 또는 BCMA를 표적으로 하는 조작된 면역 세포의 생체 내 생존 능력 또는 클론 증식이 가능한 종양 세포에 대한 사멸 능력을 강화하는 데 사용되는 키트를 제조하는 데 사용된다.
- [0228] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 생체 내는 자가적으로 생체 내인 것 또는 동종이형적으로 생체 내인 것을 포함한다.
- [0229] 본 발명의 범주 내에서, 본 발명의 상기 언급된 기술적 특색 각각 및 하기에 구체적으로 기술된 다양한 기술적 특색 (예컨대 실시양태) 각각이 서로 조합되어 새롭거나 바람직한 기술적 해법을 형성할 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 제한된 공간을 고려하여, 이들은 본원에서 반복되지 않을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0230] **도면의 간단한 설명**

- 도 1은 본 발명에 따른 CAR 및 세포 자살 요소를 함유하는 구조의 개략도를 나타내고, 여기서 이중특이적 CAR 및 자살 스위치 요소는 2A를 통해 연결된다.
- 도 2는 본 발명에 따른 Jurkat 세포 및 1차 T 세포 각각의 표면 상에서의 CAR-BB 및 CAR-S1의 발현의 유동 세포 측정법의 분석 결과를 나타낸다.
- 도 3은 HeLa 세포 및 BCMA-과발현 세포 (HeLa-BCMA) 각각에 대한 CAR-BB 및 CAR-S1의 사멸 결과 (RTCA 방법), 및 본 발명에 따른 HeLa 세포 및 BCMA-과발현 세포 (HeLa-BCMA) 각각에 대한 CAR-April 및 CAR-S1의 사멸 결과 (RTCA 방법)를 나타낸다.
- 도 4는 본 발명에서 사용된 표적 세포의 BCMA 발현을 나타낸다.
- 도 5는 본 발명에 따른 MM.1s 세포 및 RPMI-8226 세포 각각에 대한 CAR-BB 및 CAR-S1의 상이한 배치들의 시험관

내 사멸 실험 (루시퍼라제 방법)의 결과를 나타낸다.

도 6은 본 발명에 따른 HeLa 세포 및 BCMA-과발현 세포 (HeLa-BCMA) 각각에 대한 CAR-BB 및 CAR-S1의 사멸 프로세스 동안의 시토카인 IFN γ 방출을 나타낸다.

도 7은 본 발명에 따른 면역결핍 마우스 RPMI-8226 피하 모델링 모델에서의 정맥내 재주입 후의 CAR-BB 및 CAR-S1의 종양 제거 능력을 나타낸다.

도 8은 본 발명에 따른 이중특이적 CAR-T 세포에서의 CD19-CAR 및 BCMA-CAR의 발현을 나타낸다.

도 9는 본 발명에 따른 안전 스위치가 추가된 이중특이적 CAR-T 세포에서의 CD19-CAR 및 BCMA-CAR의 발현 및 EGFRt의 발현의 분석을 나타낸다.

도 10은 본 발명에 따른 CAR-19, CAR-BCMA 및 이중특이적 CAR-T의 상이한 배치들에 의한 HeLa 세포 및 항원-과발현 HeLa 세포주인 HeLa-BCMA, HeLa-CD19 및 HeLa-BCMA-CD19의 사멸의 비교를 나타낸다.

도 11은 본 발명에 따른 MM.1s 세포, RPMI-8226 세포 및 Nalm6 세포에 대한 CAR-CD19, CAR-BCMA 및 이중특이적 CAR-T의 상이한 배치들의 시험관 내 사멸 실험 (루시퍼라제 방법)의 결과를 나타낸다.

도 12는 본 발명에 따른 BCMA-과발현 HeLa 세포 (HeLa-BCMA)에 대한 CAR-BCMA 및 이중특이적 CAR-T 세포의 사멸 프로세스 동안의 시토카인 방출을 나타낸다.

도 13은 MM.1s 또는 Raji 종양 표적 세포와 공동-배양된 후의 이중 CAR-T 세포의 표면 상에서의 CD107a 분자의 발현의 분석을 나타낸다.

도 14는 본 발명에 따른 면역결핍 마우스 RPMI-8226 피하 모델링 모델에서의 정맥내 재주입 후의 CAR-S1, 이중 특이적 CAR-S2 및 CAR-S4의 종양 제거 능력을 나타낸다.

도 15는 본 발명에 따른 면역결핍 마우스 MM.1s-luc 정맥내 모델링 모델에서의 정맥내 재주입 후의 상이한 용량의 이중특이적 CAR-S2 및 CAR-S4 세포의 종양 제거 능력을 나타낸다.

도 16은 MM 환자의 골수에서의 CD34-음성 단핵구의 클론 형성에 대한 상이한 CAR-T 세포들의 억제 능력을 나타낸다.

도 17은 Nalm6-Luc 세포 모델링 NOG 마우스에 대한 상이한 CAR-T 세포들의 생체 내 종양 제거 능력을 나타낸다.

도 18은 T 세포의 표면에서의 CAR-T 세포의 CAR 및 안전 스위치의 발현을 나타낸다.

도 19는 Nalm6 또는 RPMI 8226 세포에 대한 상이한 CAR-T 세포들의 사멸 효과 (루시퍼라제 방법)를 나타낸다. 단일 CAR-T 세포에 비교하여, 이중 CAR 쌍이 더욱 강력한 표적 세포 사멸 능력을 갖는다. 도 20은 상이한 CAR-T 세포들이 음성 표적 세포 (K562, Raji-KO19, Nalm6-KO19, 및 CCRF)에 대한 사멸 능력을 갖지 않는다는 것을 나타낸다.

도 21은 Raji-Luc 모델링의 NOG 세포에 대한 상이한 CAR-T 세포들의 생체 내 종양 제거 능력을 나타낸다. 단일 CAR-T 세포에 비교하여, 이중 CAR 쌍이 더욱 강력한 표적 세포 사멸 능력을 갖는다.

도 22는 Raji 림프종 세포에 대한 CAR-S1의 시험관 내 사멸 실험 (루시퍼라제 방법)의 결과를 나타내고, 여기서 도 22A는 Raji 림프종 표적 세포의 표면 상에서의 BCMA 항원의 발현을 나타내고, 도 22B는 상이한 E:T 비에서의 CAR-S1 세포에 의한 Raji 림프종 표적 세포의 사멸을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0231] 발명의 상세한 설명

[0232] 광범위하고 심도 있는 연구 후에, 본 발명가들은 BCMA를 표적으로 하는 신규한 조작된 면역 세포를 최초로 구축하였고, 내부에 함유된 CAR 내의 항원 결합 도메인은 S-유래 scFv이다. 실험에서, BB scFv 및 April-유래 BCMA 결합 도메인을 사용하여 구축된 CAR-T 세포에 비교하여, 본 발명에서 구축된 CAR-T 세포가 더 높은 사멸 효과 및 종양 제거 능력을 갖는 것으로 나타났다. 본 발명은 또한 S scFv 및 CD19 scFv를 사용하여 이중 CAR-T 세포를 구축하고, 이는 BCMA-양성 CAR-T 세포 및 CD19-양성 CAR-T 세포 양쪽 모두를 사멸시킬 수 있다.

[0233] 구체적으로, 상이한 BCMA 항체들의 scFv를 사용하여 본 발명의 CAR-T 세포가 구축된다. 이들을 비교함으로써, S-유래 scFv에 의해 구축된 CAR-T 세포가 BB scFv 및 April-유래 BCMA 결합 도메인에 의해 구축된 것들보다 더

높은 BCMA-과발현 세포 및 BCMA-양성 종양 표적 세포 사멸 능력을 갖는다는 것이 뜻밖에 발견되었다. 생체 내 마우스 동물 모델 또한 이것이 BB-유래 CAR-T보다 더 높은 종양 제거 능력을 갖는다는 것을 나타낸다. 관련 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 BCMA를 표적화하는 일부 다른 scFv로 구축된 CAR-T 세포는 이상적인 시험관 내 및 생체 내 기능을 나타내지 않는다.

[0234] 용어

[0235] 본 개시내용을 더 잘 이해하기 위해, 특정 용어가 먼저 정의된다. 본 출원에서 사용된 바와 같이, 본원에서 명시적으로 달리 언급되지 않는 한, 각각의 하기 용어는 하기에서 제공된 의미를 갖는다. 출원 전체에 걸쳐 기타 정의가 기재된다.

[0236] 용어 "약"은 관련 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 결정된 특정 값 또는 조성의 허용가능한 오차 범위 내의 값 또는 조성을 지칭할 수 있고, 이는 값 또는 조성이 어떻게 측정 또는 결정되는지에 부분적으로 의존할 것이다.

[0237] 용어 "투여"는 정맥내, 근육내, 피하, 복막내, 척수내 또는 기타 비경구 투여 경로, 예컨대 주사 또는 주입을 통한 경로를 포함하여, 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지된 다양한 방법 및 전달 시스템 중 임의의 것을 사용하여 본 발명의 제품을 대상체에게 물리적으로 도입하는 것을 지칭한다.

[0238] 용어 "항체" (Ab)는 항원에 특이적으로 결합하고, 디설피드 결합에 의해 상호연결된 적어도 2개의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L)를 포함하는 면역글로불린, 또는 그의 항원 결합 부분을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 각각의 H 쇠는 중쇄 가변 영역 (본원에서 VH로 약칭됨) 및 중쇄 불변 영역을 함유한다. 중쇄 불변 영역은 3개의 불변 도메인 CH1, CH2 및 CH3을 함유한다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 (본원에서 VL로 약칭됨) 및 경쇄 불변 영역을 함유한다. 경쇄 불변 영역은 불변 도메인 CL을 함유한다. VH 및 VL 영역은 상보성 결정 영역 (CDR)으로 칭해지는 추가변 영역으로 추가로 세분될 수 있고, 프레임워크 영역 (FR)으로 칭해지는 더욱 보존된 영역이 이에 산재된다. 각각의 VH 및 VL는 아미노 말단에서 카르복실 말단으로 하기 순서로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR을 함유한다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, 및 FR4. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다.

[0239] 본원에서의 아미노산 명칭은 국제적으로 허용되는 단일 영문자로 확인된다는 것을 이해하여야 하고, 아미노산 명칭의 상응하는 3문자 약어는 각각 Ala (A), Arg (R), Asn (N), Asp (D), Cys (C), Gln (Q), Glu (E), Gly (G), His (H), Ile (I), Leu (L), Lys (K), Met (M), Phe (F), Pro (P), Ser (S), Thr (T), Trp (W), Tyr (Y), Val (V)이다.

[0240] B 세포 성숙 항원 (BCMA)

[0241] BCMA는 성숙된 B 림프구의 표면, 즉 형질모세포 및 형질 세포의 표면에서 발현되는 막형단 단백질이다. 다발성 골수종은 형질 세포의 비정상적인 증식 및 골수 내로의 침습에 의해 야기된다. BCMA가 다발성 골수종 세포에서 발현된다는 것이 연구에서 나타났다. BCMA를 표적으로 하는 Car-T 세포가 골수종 세포를 특이적으로 사멸시키는 것으로 나타났다. 그러나, 일부 환자에게 BCMA를 표적으로 하는 CAR-T 세포 요법이 제공된 후에, 여전히 재발 과정이 있을 것이다. 이러한 재발 환자의 경우, 치료를 계속하기 위해 BCMA와 상이한 또 다른 표적을 찾는 것이 필요하다.

[0242] CD19

[0243] CD19 분자는 B 세포 활성화, 신호 전달 및 성장 조절과 밀접하게 관련되는, B 세포의 표면 상의 막형단 단백질이다. 도 1에 나타난 바와 같이, CD19는 모든 B 세포의 표면에서 대부분 발현되고, CD19를 표적으로 하는 CAR-T 세포는 현재 백혈병 및 림프종의 치료에서 상당한 효능을 갖는다. 일반적으로, 형질 세포의 99.95%는 표면에 CD19를 발현하지 않는 것으로 여겨지고, 따라서 다발성 골수종의 치료를 위해 CD19를 사용하는 것의 가능성이 무시된다.

[0244] 키메라 항원 수용체 (CAR)

[0245] 본 발명의 키메라 항원 수용체 (CAR)는 세포외 도메인, 막형단 도메인, 및 세포내 도메인을 포함한다. 세포외 도메인은 표적-특이적 결합 요소 (항원 결합 도메인으로도 지칭됨)를 포함한다. 세포내 도메인은 공동자극 신호전달 영역 및 3 쇠 부분을 포함한다. 공동자극 신호전달 영역은 공동자극 분자를 포함하는 세포내 도메인의 부분을 지칭한다. 공동자극 분자는 항원에 대한 림프구의 효과적인 반응에 요구되는 세포 표면 분자이고, 항원

수용체 또는 그의 리간드가 아니다.

- [0246] CAR의 세포외 도메인과 막횡단 도메인의 사이에, 또는 CAR의 세포질 도메인과 막횡단 도메인 사이에, 링커가 혼입될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 일반적으로 용어 "링커"는 막횡단 도메인을 폴리펩티드 쇠의 세포외 도메인 또는 세포질 도메인에 연결하는 기능을 하는 임의의 올리고펩티드 또는 폴리펩티드를 지칭한다. 링커는 0 내지 300개의 아미노산, 바람직하게는 2 내지 100개의 아미노산, 가장 바람직하게는 3 내지 50개의 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0247] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 의해 제공되는 CAR의 세포외 도메인은 BCMA (또는 BCMA 및 CD19)를 표적으로 하는 항원 결합 도메인을 포함한다. 본 발명의 CAR이 T 세포에서 발현되는 경우, 이는 항원 결합 특이성을 기초로 항원 인식을 수행할 수 있다. 이의 연관된 항원에 결합하면, 이는 종양 세포에 영향을 미쳐, 종양 세포가 성장을 멈추게 하거나, 사멸이 촉진되게 하거나, 또는 다른 방식으로 영향을 받게 하고, 환자에서 종양 부하 감소 또는 제거를 야기한다. 항원 결합 도메인은 바람직하게는 공동자극 분자 및 ζ 쇠 중 하나 이상으로부터의 세포내 도메인에 융합된다. 바람직하게는, 항원 결합 도메인은 4-1BB 신호전달 도메인 및 CD3 ζ 신호전달 도메인과 조합된 세포내 도메인에 융합된다.
- [0248] 본원에서 사용된 바와 같이, "항원 결합 도메인" 및 "단일쇄 항체 단편" 양쪽 모두는 항원 결합 활성을 갖는 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편 또는 단일 Fv 단편을 지칭한다. Fv 항체는 항체 중쇄 가변 영역 및 항체 경쇄 가변 영역을 함유하지만, 불변 영역이 없고, 모든 항원 결합 부위를 갖는 가장 작은 항체 단편이다. 일반적으로, Fv 항체는 VH 도메인과 VL 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 또한 함유하고, 항원 결합에 요구되는 구조를 형성할 수 있다. 항원 결합 도메인은 일반적으로 scFv (단일쇄 가변 단편)이다. scFv의 크기는 일반적으로 완전한 항체의 크기의 1/6이다. 바람직하게는 단일쇄 항체는 뉴클레오티드 쇠에 의해 코딩되는 아미노산 쇠 서열이다. 본 발명의 바람직한 실시양태로서, 항원 결합 도메인은 BCMA를 특이적으로 인식하는 항체를 포함하고, 임의적으로, 항원 결합 도메인은 CD19를 특이적으로 인식하는 항체 (바람직하게는 단일쇄 항체)를 추가로 포함한다.
- [0249] 힌지 영역 및 막횡단 영역 (막횡단 도메인)의 경우, CAR은 CAR의 세포외 도메인에 융합된 막횡단 도메인을 포함하도록 디자인될 수 있다. 한 실시양태에서, CAR 내의 도메인 중 하나와 천연적으로 회합되는 막횡단 도메인이 사용된다. 일부 예에서, 막횡단 도메인은 이같은 도메인이 동일하거나 또는 상이한 표면 막 단백질의 막횡단 도메인에 결합하는 것을 방지하도록 선택되거나 또는 아미노산 치환에 의해 변형될 수 있고, 이에 의해 수용체 복합체의 다른 구성원과의 상호작용을 최소화한다.
- [0250] 본 발명의 CAR 내의 세포내 도메인은 4-1BB의 신호전달 도메인 및 CD3 ζ 의 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0251] 바람직하게는, 본 발명의 CAR은 세포 자살 요소를 또한 포함한다.
- [0252] 바람직하게는, 본 발명의 BCMA를 표적으로 하는 scFv는 S scFv이고, 실시예에서의 BB scFv 및 April 쇠는 대조군으로서 사용된다. BB scFv 및 April 쇠 양쪽 모두 BCMA를 표적으로 하기 위해 관련 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 결합 서열이고, BB scFv는 PCT 출원 WO 2010104949 A3에 기술되어 있고, April 쇠는 CN105658671A에 기술되어 있다.
- [0253] **CD19 및 BCMA를 표적으로 하는 이중특이적 CAR**
- [0254] 다발성 골수종 (MM)은 악성 형질 세포 종양이다. 골수 내의 형질 세포로부터 종양 세포가 유래되고, 형질 세포는 B 림프구에 의해 최종 기능 단계에서 발달되는 세포이다. 기본적으로 다발성 골수종은 높은 이환율 및 높은 사망률의 특징을 갖는 불치병이다. 2017년 통계에서, 미국에서 30,000명의 새로 진단된 다발성 골수종 환자가 있었고, 그 중 12,000명은 사망에 직면할 수 있었다. 현재, 다발성 골수종에 대한 통상적인 요법은 세포독성 약물 요법, 프로테아제 억제제 (보르테조미드 등), 레날리도미드, 모노클로날 항체, 코르티코스테로이드 등을 포함한다. 그러나, 현재의 요법은 모두 부분적으로 효과적이고, 지속적인 완화 효과가 없으며, 재발 위험이 높다. 따라서, 다발성 골수종의 요법에서의 개선이 특히 중요한 것으로 보인다.
- [0255] CD19는 프리(pre)-B 세포 및 성숙된 B 세포의 막 표면에서 발현되는 분자량 95 kDa의 당단백질이고, B 세포 Ca⁺⁺의 막횡단 신호전달 경로와 밀접하게 관련되며, B 세포의 증식 및 분화에 대한 조절 효과를 갖는다. CD19는 고도의 조직 발현 특이성으로 주로 정상 B 세포 및 암성 B 세포에서 발현되고, 항체 또는 CAR-T 면역요법의 좋은 표적이다. 그러나, 면역요법의 과정에서, B 세포의 CD19 에피토프가 종종 상실되어, 환자에서 면역요법에 대한 반응 실패 또는 재발을 야기한다.

- [0256] 이중특이성은 동일한 CAR이 2개의 상이한 항원에 특이적으로 결합하여 이들을 면역학적으로 인식할 수 있다는 것을 의미하고, 이러한 CAR은 항원 중 어느 하나와 조합되었을 때 면역 반응을 일으킬 수 있다.
- [0257] 또 다른 바람직한 실시양태에서, CD19 및 BCMA를 표적으로 하는 이중특이적 CAR은 본 발명의 제2 측면에서 기술된 바와 같다.
- [0258] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 의해 제공되는 CAR의 세포의 도메인은 항-CD19 scFv 및 항-BCMA scFv를 포함하는, CD19 및 BCMA를 표적으로 하는 항원 결합 도메인을 포함한다.
- [0259] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 CD19 및 BCMA 항원에 대해 지시된 이중특이적 키메라 항원 수용체를 제공한다. CD19 및 BCMA 양쪽 모두를 표적으로 하는 CAR의 구조적 성분은 신호 펩티드, 항-CD19 scFv, 항-BCMA scFv, 힌지 영역, 막횡단 영역, 및 세포내 T 세포 신호전달 영역을 포함할 수 있고, 여기서 CD19 scFv 및 BCMA scFv는 짧은 펩티드 분절 (G4S)_xN을 통해 연결된다. CD19 및 BCMA 양쪽 모두를 표적으로 하는 CAR 구조는 본 발명의 제2 측면에서 기술된 바와 같다.
- [0260] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 CD19- 및 BCMA-이중특이적 CAR은 단일 구조를 갖고, CD19 및 BCMA에 대한 scFv를 함유하며, 여기서 CAR은 CD19 scFv 및 BCMA scFv를 함유하고, CD19 scFv 및 BCMA scFv의 순서 및 힌지가 그의 기능의 주요 영향 요인이다.
- [0261] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 BCMA scFv의 서열을 최적화한다. BCMA scFv (S scFv)는 BCMA와의 높은 친화력 및 양호한 특이성을 갖고, BCMA의 전장 항원 및 세포의 영역을 특이적으로 표적으로 할 수 있다.
- [0262] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, (G4S)_x3이 CD19 scFv와 BCMA ScFv를 연결시키는 데 사용된다. 이러한 CAR은 최상의 활성 및 사멸 능력을 갖는다.
- [0263] CD19 및 BCMA를 표적으로 하는 이중특이적 CAR이 본 발명에서 사용된다. 단일 항원을 표적으로 하는 CAR에 비교하여, CAR의 친화력이 유의하게 강화되고, 면역 세포의 활성이 유의하게 증가되며, 상승작용적 효과가 수득된다. 추가적으로, 종양 세포에서의 CD19 및 BCMA의 균일하지 않은 발현 수준으로 인해, 이중 표적화 CAR-T는 더 넓은 치료 범위를 갖는다. CD19 및 BCMA 양쪽 모두를 표적으로 하는 CAR-면역 세포는 단일 표면 항원의 하향 조절 또는 결핍에 의해 야기되는 항원 탈출의 가능성을 감소시킬 수 있다. 추가적으로, CD19 및 BCMA의 이중특이적 CAR-T는 골수종 환자의 골수에서의 CD34-음성 단핵구의 시험관 내 클론 형성을 억제하는 능력이 단일 CAR-T의 것보다 유의하게 더 양호하고, 이는 종양 전구 세포를 억제하는 능력이 단일 CAR-T의 것보다 유의하게 더 양호하다는 것을 지시한다. 마지막으로, CD19 항원의 부가는 CD19 및 BCMA의 이중특이적 CAR-T의 지속적인 생존 능력을 증가시킬 수 있다.
- [0264] **키메라 항원 수용체 T 세포 (CAR-T 세포)**
- [0265] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "CAR-T 세포", "CAR-T" 및 "본 발명의 CAR-T 세포"는 본 발명의 제3 측면에 포함되는 CAR-T 세포를 포함한다.
- [0266] CAR-T 세포는 다른 T 세포-기반 요법에 비해 하기의 장점을 갖는다: (1) CAR-T 세포의 작용 프로세스는 MHC에 의해 제한되지 않고; (2) 다수의 종양 세포가 동일한 종양 항원을 발현한다는 점에서, 특정 항원에 대해 지시된 CAR 유전자의 구축이 완료되면, 널리 사용될 수 있고; (3) CAR은 종양 단백질 항원 및 당지질 비-단백질 항원 양쪽 모두를 사용할 수 있어, 종양 항원 표적의 범위를 확장시킬 수 있고; (4) 환자의 자가 세포를 사용함으로써 거부 위험을 감소시킬 수 있으며; (5) CAR-T 세포는 면역학적 기억 기능을 갖고, 신체에서 장기간 동안 생존할 수 있다.
- [0267] **키메라 항원 수용체 NK 세포 (CAR-NK 세포)**
- [0268] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "CAR-NK 세포", "CAR-NK" 및 "본 발명의 CAR-NK 세포"는 모두 본 발명의 제3 측면에 포함되는 CAR-NK 세포를 지칭한다. 본 발명의 CAR-NK 세포는 BCMA 발현이 높은 종양, 예컨대 다발성 골수종을 치료하는 데 사용될 수 있다.
- [0269] 천연 킬러 (NK) 세포는 비-항원-특이적 경로를 통해 바이러스 감염 및 종양 세포 침습으로부터 신체를 보호하는 면역 이펙터 세포의 주요 유형이다. 조작된 (유전자 변형된) NK 세포는 종양 항원을 특이적으로 인식하는 능력 및 강화된 항종양 세포독성을 포함하여 새로운 기능을 획득할 수 있다.
- [0270] 자가 CAR-T 세포에 비교하여, CAR-NK 세포는, 예를 들어, 하기의 장점을 추가로 갖는다: (1) 신체 내의 정상 세포에 대한 사멸 효과를 갖지 않으면서, 퍼포린 및 그랜자임을 방출함으로써 직접적으로 종양 세포를

사멸시키고; (2) 소량의 시토카인을 방출하고, 이에 의해 시토카인 폭풍의 위험을 감소시키며; (3) 매우 용이하게 시험관 내에서 "기성품" 제품으로 확장 및 개발됨. 추가적으로, 이는 CAR-T 세포 요법과 유사하다.

[0271] **자살 유전자 스위치**

[0272] CAR-T 세포의 유해 반응 예컨대 비-종양 표적화 및 시토카인 방출 증후군을 추가로 제어하기 위해, 본 발명의 CAR-T 세포는 모두 자살 유전자 스위치를 갖고, 이는 외인성 약물의 작용 하에 신체 내의 CAR-T 세포를 효과적으로 제거할 수 있으며, 이에 의해 알려지지 않았거나 또는 제어불가능한 장기 독성을 차단하여 환자의 안전을 보장한다.

[0273] 본 발명에서 사용되는 자살 스위치는 헤르페스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나제 (HSV-TK), 유도성 카스파제 9 (iCasp9), CD20, 돌연변이된 인간 티미딜레이트 키나제 (mTMPK) 등일 수 있다. 비교하면, HSV-TK, iCasp9 및 CD20이 CAR-세포에 대한 동일한 제거 능력을 갖지만, iCasp9 및 CD20은 제거 속도가 더 빠르고, HSV-TK는 제거 속도가 더 느리다.

[0274] iCasp9 자살 스위치는 FKBP12-F36V 도메인을 포함하고, 이는 가요성 링커를 통해 동원 도메인을 함유하지 않는 카스파제 9에 연결될 수 있다. FKBP12-F36V는 36번째 아미노산 잔기 위치에서 페닐알라닌이 발린으로 치환된 FKBP 도메인을 포함한다. 이는 높은 선택성 및 나노몰 미만의 친화력을 갖고, 이량체화 리간드, 예컨대 다른 불활성 소형 분자 AP1903에 결합할 수 있다. 소형 분자는 첨가되었을 때 그의 이량체화를 촉진하고, 이에 의해 세포 아팍토시스를 유도할 수 있지만, 소형 분자는 자살 스위치를 보유하지 않는 정상 세포에 대해서는 효과적이지 않다.

[0275] 유도성 안전 스위치 카스파제 9 (iCasp9)는 FK506 결합 단백질 (FKBP)에 융합된 인간 카스파제 9를 사용하고, 이는 화학적 유도제 (AP1903/리미두시드(Rimiducid), 벨리쿰 파마슈티컬(Bellicum Pharmaceutical))와 이량체를 형성하도록 유도되어, 융합 단백질을 발현하는 세포의 아팍토시스에 이를 수 있다.

[0276] CD19 및 BCMA는 종양 세포에서 고도로 발현되지만, 정상 B 세포에서도 발현된다. 따라서, 본 발명의 조작된 면역 세포는 생체 내에서 정상 B 세포를 공격할 수 있다.

[0277] CAR-세포의 안전성을 제어하는 방법은 항상 해결해야 할 시급한 문제였다. CAR-세포에 안전 스위치를 부가하는 것은 CAR-세포의 활성을 종결시키는 가장 안전한 방식이다. CAR-세포가 중증 독성 (CRS/신경독성)을 일으킨 후 또는 환자가 장기 지속 관해에 도달한 후, 유도성 iCasp9 안전 스위치가 CAR-세포의 제거를 제어할 것이다.

[0278] **벡터**

[0279] 관련 기술 분야에 공지된 재조합 방법을 사용하여, 예를 들어, 유전자를 발현하는 세포로부터의 라이브러리를 스크리닝함으로써, 유전자를 포함하는 것으로 공지된 벡터로부터 유전자를 수득함으로써, 또는 유전자를 포함하는 세포 및 조직으로부터 직접 분리하는 표준 기술을 사용함으로써, 원하는 분자를 코딩하는 핵산 서열을 수득할 수 있다. 임의적으로, 관심 유전자가 합성으로 생산될 수 있다.

[0280] 본 발명은 본 발명의 발현 카세트가 삽입된 벡터를 또한 제공한다. 트랜스진의 장기적이고 안정적인 통합 및 딸 세포에서의 트랜스진의 증식을 허용하기 때문에 레트로바이러스 예컨대 렌티바이러스로부터 유래된 벡터가 장기 유전자 전달을 달성하는 데 적절한 도구이다. 렌티바이러스 벡터는 비-중식 세포, 예컨대 간세포에 형질 도입될 수 있기 때문에 종양발생 레트로바이러스 예컨대 무린 백혈병 바이러스로부터 유래된 벡터에 비해 장점을 갖는다. 이는 낮은 면역원성의 장점을 또한 갖는다.

[0281] 일반적으로, 본 발명의 발현 카세트 또는 핵산 서열은 통상적으로 프로모터에 작동가능하게 연결되고, 발현 벡터 내로 혼입된다. 이러한 벡터는 진핵생물에서의 복제 및 통합에 적절하다. 전형적인 클로닝 벡터는 원하는 핵산 서열의 발현을 조절하는 데 사용될 수 있는 전사 및 번역 종결인자, 초기 서열 및 프로모터를 함유한다.

[0282] 본 발명의 발현 구축물은 또한 핵산 번역화 및 유전자 요법을 위한 표준 유전자 전달 프로토콜을 이용할 수 있다. 유전자 전달 방법이 관련 기술 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 전문이 본원에 참조로 포함된 미국 특허 번호 5,399,346, 5,580,859 및 5,589,466을 참조한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 유전자 요법 벡터를 제공한다.

[0283] 핵산은 다수의 유형의 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 예를 들어, 플라스미드, 파지미드, 파지 유도체, 동물 바이러스 및 코스미드를 포함하지만 이에 제한되지 않는 벡터 내로 핵산이 클로닝될 수 있다. 특정한 관심 벡터는 발현 벡터, 복제 벡터, 프로브 생성 벡터 및 시퀀싱 벡터를 포함한다.

- [0284] 추가로, 발현 벡터는 바이러스 벡터의 형태로 세포에 제공될 수 있다. 바이러스 벡터 기술은 관련 기술 분야에 널리 공지되어 있고, 예를 들어, 문헌 [Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)] 및 기타 바이러스학 및 분자생물학 편람에 기술되어 있다. 벡터로서 사용될 수 있는 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 헤르페스 바이러스 및 렌티바이러스를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일반적으로, 적절한 벡터는 복제 기원, 프로모터 서열, 편리한 제한 부위, 및 적어도 하나의 생물에서 기능하는 1개 이상의 선별성 마커를 함유한다 (예를 들어, W001/96584; W001/29058; 및 미국 특허 번호 6,326,193을 참조한다).
- [0285] 다수의 바이러스-기반 시스템이 포유동물 세포 내로의 유전자 전달을 위해 개발되었다. 예를 들어, 레트로바이러스가 유전자 전달 시스템을 위한 편리한 플랫폼을 제공한다. 선택된 유전자를 관련 기술 분야에 공지된 기술을 사용하여 벡터 내로 삽입하고 레트로바이러스 입자 내로 패키징할 수 있다. 그 후, 재조합 바이러스를 단리하고, 생체 내에서 또는 생체 외에서 표적 세포에 전달할 수 있다. 다수의 레트로바이러스 시스템이 관련 기술 분야에 공지되어 있다. 일부 실시양태에서, 아데노바이러스 벡터가 사용된다. 다수의 아데노바이러스 벡터가 관련 기술 분야에 공지되어 있다. 한 실시양태에서, 렌티바이러스 벡터가 사용된다.
- [0286] 추가적인 프로모터 요소, 예컨대 인헨서가 전사가 시작되는 빈도를 조절할 수 있다. 일반적으로, 이러한 요소는 개시 부위의 30-110 bp 상류 영역에 위치하지만, 최근에 다수의 프로모터가 개시 부위의 하류에 기능성 요소를 또한 포함한다는 것으로 나타났다. 프로모터 요소들 사이의 간격은 요소들이 반전되거나 또는 서로에 대해 이동될 때 프로모터의 기능을 유지하기 위하여 종종 탄력적이다. 티미딘 키나제 (tk) 프로모터에서, 활성 감소가 시작되기 전에 프로모터 요소들 사이의 간격이 50 bp만큼 증가될 수 있다. 프로모터에 따라, 개별적인 요소들이 전사를 개시시키기 위해 협력적으로 또는 독립적으로 작용할 수 있는 것으로 보인다.
- [0287] 적절한 프로모터의 예는 극초기 사이토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터 서열이다. 이러한 프로모터 서열은 이에 작동가능하게 연결된 임의의 폴리뉴클레오티드 서열의 고수준 발현을 구동시킬 수 있는 강력한 구성적 프로모터 서열이다. 적절한 프로모터의 또 다른 예는 신장 성장 인자-1 α (EF-1 α)이다. 그러나, 다른 구성적 프로모터 서열 또한 사용될 수 있고, 이는 시미안 바이러스 40 (SV40) 초기 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스 (MMTV), 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 긴 말단 반복물 (LTR) 프로모터, MoMuLV 프로모터, 조류 백혈병 바이러스 프로모터, 엡스타인-바 바이러스 극초기 프로모터, 라우스 육종 바이러스 프로모터, 및 액틴 프로모터, 미오신 프로모터, 헴 프로모터 및 크레아틴 키나제 프로모터와 같지만 이에 제한되지 않는 인간 유전자 프로모터를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 추가로, 본 발명은 구성적 프로모터의 사용에 제한되지 않아야 한다. 유도성 프로모터 또한 본 발명의 일부로서 구성된다. 유도성 프로모터의 사용은 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 원하는 경우 이같은 발현을 켜거나, 또는 바람직하지 않은 경우 발현을 끌 수 있는 분자 스위치를 제공한다. 유도성 프로모터의 예는 메탈로티오네인 프로모터, 글루코코르티코이드 프로모터, 프로게스테론 프로모터 및 테트라사이클린 프로모터를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0288] CAR 폴리펩티드 또는 그의 일부분의 발현을 평가하기 위해, 세포 내로 도입된 발현 벡터는 바이러스 벡터로 형질감염 또는 감염시키려는 세포 집단으로부터 발현 세포의 확인 및 선별을 용이하게 하도록 선별성 마커 유전자 및 리포터 유전자 중 하나 또는 양쪽 모두를 또한 포함할 수 있다. 다른 측면에서, 선별성 마커가 DNA의 단일 단편 상에서 운반되어, 공동-형질감염 절차에서 사용될 수 있다. 선별성 마커 및 리포터 유전자 양쪽 모두에 숙주 세포에서 발현될 수 있도록 적합한 조절 서열이 플랭킹된다. 유용성 선별성 마커는, 예를 들어, 항생제 저항성 유전자, 예컨대 neo 등을 포함한다.
- [0289] 리포터 유전자는 잠재적으로 형질감염된 세포를 확인하고 조절 서열의 기능성을 평가하는 데 사용된다. 일반적으로, 리포터 유전자는 수용자 생물 또는 조직에 존재하지 않거나 또는 수용자 또는 조직에 의해 발현되지 않는 유전자이고, 용이하게 검출가능한 일부 성질 예컨대 효소 활성에 의해 유전자의 발현이 명확하게 지시될 수 있는 폴리펩티드를 코딩한다. DNA가 수용자 세포 내로 도입된 후, 리포터 유전자의 발현이 적합한 시간에 측정된다. 적절한 리포터 유전자는 루시퍼라제, β -갈라톡시다제, 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제, 분비형 알칼리성 포스파타제 또는 녹색 형광 단백질을 코딩하는 유전자를 포함할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479:79-82]). 적절한 발현 시스템이 널리 공지되어 있고, 공지된 기술을 사용하여 제조될 수 있거나, 또는 상업적으로 이용가능하다. 일반적으로, 가장 높은 수준의 리포터 유전자 발현을 나타내는 최소 5개의 플랭킹 영역이 있는 구축물이 프로모터로서 확인된다. 이같은 프로모터 영역은 리포터 유전자에 연결될 수 있고, 프로모터-구동 전사를 조절하는 시약의 능력을 평가하는 데 사용될 수 있다.
- [0290] 유전자를 세포 내로 도입하고 유전자를 세포 내로 발현시키는 방법이 관련 기술 분야에 공지되어 있다. 발현

백터의 맥락에서, 백터는 관련 기술 분야의 임의의 방법에 의해 숙주 세포, 예를 들어, 포유동물, 박테리아, 효모 또는 곤충 세포 내로 쉽게 도입될 수 있다. 예를 들어, 발현 백터는 물리적, 화학적 또는 생물학적 수단에 의해 숙주 세포 내로 전달될 수 있다.

[0291] 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입하기 위한 물리적 방법은 인산칼슘 침전, 리포펙션, 입자 포격, 미세주입, 전기천공 등을 포함한다. 백터 및/또는 외인성 핵산을 포함하는 세포를 생산하는 방법이 관련 기술 분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)]을 참조한다. 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입하는 바람직한 방법은 인산칼슘 형질감염이다.

[0292] 관심 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입하기 위한 생물학적 방법은 DNA 및 RNA 백터의 사용을 포함한다. 바이러스 백터, 특히 레트로바이러스 백터가 유전자를 포유동물 세포 예컨대 인간 세포 내로 삽입하는 가장 널리 사용되는 방법이 되었다. 렌티바이러스, 폭스바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스 I, 아데노바이러스 및 아데노-연관 바이러스 등으로부터 다른 바이러스 백터가 유래될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,350,674 및 5,585,362를 참조한다.

[0293] 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 도입하기 위한 화학적 수단은 콜로이드 분산 시스템, 예컨대 거대분자 복합체, 나노캡슐, 마이크로스피어, 비드; 및 수중유 에멀션, 마이셀, 혼합 마이셀 및 리포솜을 포함하는 지질-기반 시스템을 포함한다. 시험관 내 및 생체 내에서 전달 비히클로서 사용되는 예시적인 콜로이드 시스템은 리포솜 (예를 들어, 인공 막 소포)이다.

[0294] 비-바이러스 전달 시스템을 사용하는 경우, 예시적인 전달 도구는 리포솜이다. 지질 제형의 사용이 핵산을 (시험관 내에서, 생체 외에서, 또는 생체 내에서) 숙주 세포 내로 도입하는 데 고려된다. 다른 한편으로, 이러한 핵산이 지질과 회합될 수 있다. 지질-회합 핵산은 리포솜의 수성 내부에 캡슐화되거나, 리포솜의 지질 이중층 내에 분산되거나, 리포솜 및 올리고뉴클레오티드 양쪽 모두와 회합된 연결 분자를 통해 리포솜에 부착되거나, 리포솜 내로 포획되거나, 리포솜과 복합체를 이루거나, 지질을 함유하는 용액 내에 분산되거나, 지질과 혼합되거나, 지질과 조합되거나, 현탁액으로서 지질 내에 함유되거나, 마이셀 내에 함유되거나 또는 마이셀과 복합체를 이루거나, 또는 다른 방식으로 지질과 회합될 수 있다. 조성물과 연관된 지질, 지질/DNA 또는 지질/발현 백터는 용액에서의 임의의 특정 구조에 제한되지 않는다. 예를 들어, 이는 마이셀과 같은 이중층 구조로 존재할 수 있거나, 또는 "붕괴된" 구조를 가질 수 있다. 또한 이는 용액에 단순히 분산될 수 있고, 가능하게는 균일하지 않은 크기 또는 모양의 응집체를 형성한다. 지질은 천연 발생 또는 합성 지질일 수 있는 지방 물질이다. 예를 들어, 지질은 세포질, 및 장쇄 지방족 탄화수소 및 그의 유도체 예컨대 지방산, 알콜, 아민, 아미노 알콜 및 알데히드를 함유하는 화합물에서 천연적으로 발생하는 지방 액적을 포함한다.

[0295] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 백터는 렌티바이러스 백터이다.

[0296] **제형**

[0297] 본 발명은 본 발명의 제1 측면에 따른 CAR-T 세포, 및 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 제형을 제공한다. 한 실시양태에서, 제형은 액체 제형이다. 바람직하게는, 제형은 주사이다. 바람직하게는, 제형 내의 CAR-T 세포의 농도는 $1 \times 10^3 - 1 \times 10^8$ 개의 세포/ml, 더욱 바람직하게는 $1 \times 10^4 - 1 \times 10^7$ 개의 세포/ml이다.

[0298] 한 실시양태에서, 제형은 완충제 예컨대 중성 완충제 염수, 슬레이트 완충제 염수 등; 탄수화물 예컨대 글루코스, 만노스, 수크로스 또는 텍스트란, 만니톨; 단백질; 폴리펩티드 또는 아미노산 예컨대 글리신; 항산화제; 킬레이팅제 예컨대 EDTA 또는 글루타티온; 아주반트 (예를 들어, 수산화알루미늄); 및 보존제를 포함할 수 있다. 본 발명의 제형은 바람직하게는 정맥내 투여용으로 제형된다.

[0299] **치료 용도**

[0300] 본 발명은 본 발명의 발현 카세트를 코딩하는 렌티바이러스 백터 (LV)가 형질도입된 세포 (예를 들어, T 세포)로의 치료 용도를 포함한다. 형질도입된 T 세포는 종양 세포의 BCMA 및/또는 CD19 마커를 표적으로 할 수 있고, 상승작용적으로 T 세포를 활성화시켜, T 세포 면역 반응을 야기하고, 이에 의해 종양 세포에 대한 사멸 효율을 유의하게 개선시킬 수 있다.

[0301] 따라서, 본 발명은 본 발명의 CAR-T 세포를 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물에서 표적 세포 집단 또는 조직에 대한 T 세포-매개 면역 반응을 자극하는 방법을 또한 제공한다.

- [0302] 한 실시양태에서, 본 발명은 환자의 자가 T 세포 (또는 동종이형 공여자로부터의 것)가 단리되고, 활성화되고, CAR-T 세포를 생산하도록 유전자 변형된 후, 동일한 환자 내로 주사되는 세포 요법 유형을 포함한다. 이러한 방식으로, 이식편-대-숙주 질환을 앓을 가능성이 매우 낮고, 항원이 비-MHC-제한 방식으로 T 세포에 의해 인식된다. 추가적으로, 1개의 CAR-T가 항원을 발현하는 모든 암을 치료할 수 있다. 항체 요법과 달리, CAR-T 세포는 생체 내에서 복제될 수 있어, 지속적인 종양 제어에 이를 수 있는 장기 지속성을 일컫는다.
- [0303] 한 실시양태에서, 본 발명의 CAR-T 세포는 안정적인 생체 내 T 세포 확장이 진행될 수 있고, 연장된 시간 동안 지속될 수 있다. 추가적으로, CAR-매개 면역 반응은 CAR-변형 T 세포가 CAR 내의 항원 결합 도메인에 대해 특이적인 면역 반응을 유도하는 입양 면역요법 절차의 일부일 수 있다. 예를 들어, BCMA 및/또는 CD19에 대한 CAR-T 세포가 BCMA 및/또는 CD19를 발현하는 세포에 대한 특이적인 면역 반응을 유발한다.
- [0304] 본원에 개시된 데이터가 항-BCMA 및/또는 CD19 scFv, 힌지 및 막횡단 영역, 및 4-1BB/CD28 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하는 렌티바이러스 벡터를 구체적으로 개시하지만, 본 발명이 각각의 구축물 성분의 수에서의 임의의 변화를 포함하는 것으로 해석되어야 한다.
- [0305] 치료가능한 암은 혈관이 형성되지 않았거나 또는 실질적으로 혈관이 형성되지 않은 종양, 뿐만 아니라 혈관이 형성된 종양을 포함한다. 암은 비-고형 종양 (예컨대 혈액 종양, 예를 들어 백혈병 및 림프종)을 포함할 수 있거나 또는 고형 종양을 포함할 수 있다. 본 발명의 CAR로 치료되는 암의 유형은 암종, 모세포종 및 육종, 및 특정 백혈병 또는 림프성 악성종양, 양성 및 악성 종양, 악성종양 예컨대 육종, 암종 및 흑색종을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 성인 종양/암 및 소아 종양/암이 또한 포함된다.
- [0306] 혈액암은 혈액 또는 골수의 암이다. 혈액암 (또는 조혈성 암)의 예는 급성 백혈병 (예컨대 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 급성 골수 기원 백혈병 및 골수모구성 백혈병, 전골수구성 백혈병, 과립단핵구성 백혈병, 단핵구성 백혈병 및 적백혈병), 만성 백혈병 (예컨대 만성 골수성 (과립구성) 백혈병, 만성 골수 기원 백혈병 및 만성 림프구성 백혈병), 진성 적혈구증가증, 림프종, 호지킨병, 비-호지킨 림프종 (무통 및 진행 형태), 다발성 골수종, 발렌스트롬 거대글로불린혈증, 중쇄 질환, 골수형성이상 증후군, 모발상 세포 백혈병 및 골수이형성증을 포함하는 백혈병을 포함한다.
- [0307] 고형 종양은 일반적으로 낭종 또는 체액 영역을 포함하지 않는 비정상적인 조직 덩어리이다. 고형 종양은 양성 또는 악성일 수 있다. 여러 유형의 고형 종양이 이들이 형성되는 세포 유형 (예컨대 육종, 암종 및 림프종)의 명칭을 따서 명명된다. 고형 종양 예컨대 육종 및 암종의 예는 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 중피종, 림프성 악성종양, 췌장암 및 난소암을 포함한다.
- [0308] 본 발명의 CAR-변형 T 세포는 포유동물의 생체 외 면역화 및/또는 생체 내 요법을 위한 백신 유형으로서 사용될 수도 있다. 바람직하게는, 포유동물은 인간이다.
- [0309] 생체 외 면역화의 경우, 세포를 포유동물 내로 투여하기 전에 하기 중 적어도 하나가 시험관 내에서 발생한다: i) 세포 확장, ii) 세포 내로의 CAR-코딩 핵산 도입, 및/또는 iii) 세포의 냉동보존.
- [0310] 생체 외 절차는 관련 기술 분야에 널리 공지되어 있고, 하기에서 더욱 충분하게 논의된다. 간략하게, 세포가 포유동물 (바람직하게는 인간)로부터 단리되고, 본원에 개시된 CAR을 발현하는 벡터로 유전적으로 변형된다 (즉, 시험관 내에서 형질도입 또는 형질감염된다). CAR-변형 세포가 포유동물 수용자에게 투여되어 치료적 이점을 제공할 수 있다. 포유동물 수용자는 인간일 수 있고, CAR-변형 세포는 수용자에 대해 자가일 수 있다. 대안적으로, 세포는 수용자에 대해 동종이형, 동계 또는 이종일 수 있다.
- [0311] 생체 외 면역화를 위해 세포-기반 백신을 사용하는 것에 더하여, 본 발명은 환자에서 항원에 대한 면역 반응을 유발하기 위한 생체 내 면역화를 위한 조성물 및 방법을 또한 제공한다.
- [0312] 본 발명은 치료적 유효량의 본 발명의 CAR-변형 T 세포를 종양 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 종양을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0313] 본 발명의 CAR-변형 T 세포는 단독으로 또는 희석제 및/또는 다른 성분 예컨대 IL-2, IL-17 또는 다른 시토카인 또는 세포 집단과 조합된 제약 조성물로서 투여될 수 있다. 간략하게, 본 발명의 제약 조성물은 하나 이상의 제약상 또는 생리학상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 조합된 본원에 기술된 바와 같은 표적 세포 집단을 포함할 수 있다. 이같은 조성물은 완충제 예컨대 중성 완충제 염수, 술페이트 완충제 염수 등; 탄수화물 예컨대 글루코스, 만노스, 수크로스 또는 텍스트란, 만니톨; 단백질; 폴리펩티드 또는 아미노산 예컨대 글리신; 항산화제; 킬레이팅제 예컨대 EDTA 또는 글루타티온; 아주반트 (예를 들어, 수산화알루미늄); 및 보존제를 포함할

수 있다. 본 발명의 조성물은 바람직하게는 정맥내 투여용으로 제형된다.

- [0314] 본 발명의 제약 조성물은 치료 (또는 예방)될 질환에 적절한 방식으로 투여될 수 있다. 투여의 양 및 빈도는 환자의 장애, 및 환자 질환의 유형 및 중증도와 같은 요인에 의해 결정될 것이지만, 적합한 투여량은 임상 시험에 의해 결정될 수 있다.
- [0315] "면역학적 유효량", "항종양 유효량", "종양 억제 유효량" 또는 "치료량"을 언급할 때, 투여될 본 발명의 조성물의 정확한 양은 의사에 의해 결정될 수 있고, 의사는 환자 (대상체)의 연령, 체중, 종양 크기, 감염 또는 전이 정도, 및 장애에서의 개별적인 차이를 고려한다. 일반적으로, 본원에 기술된 T 세포를 포함하는 제약 조성물이 10^4 내지 10^9 개의 세포/체중 kg의 용량, 바람직하게는 10^5 내지 10^6 개의 세포/체중 kg의 용량 (이러한 범위 내의 모든 정수 값을 포함함)으로 투여될 수 있는 것으로 언급될 수 있다. 또한 T 세포 조성물은 이러한 용량으로 여러 번 투여될 수 있다. 세포는 면역요법에서 널리 공지된 주사 기술을 사용하여 투여될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988]을 참조한다). 특정 환자에 대한 최적의 투여량 및 치료 요법은 환자의 질환 징후를 모니터링하고 이에 따라 요법을 조정하는 것을 통해 의료 분야의 통상의 기술자에 의해 쉽게 결정될 수 있다.
- [0316] 조성물을 대상체에게 투여하는 것은 분무, 주사, 연하, 주입, 착상 또는 이식을 포함하는 임의의 편리한 방식으로 수행될 수 있다. 본원에 기술된 조성물은 환자에게 피하, 피내, 종양내, 결절내, 척수내, 근육내, 정맥내 (i.v.) 주사에 의해 또는 복막내로 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 T 세포 조성물은 환자에게 피내 또는 피하 주사에 의해 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 T 세포 조성물은 바람직하게는 i.v. 주사에 의해 투여된다. T 세포 조성물은 종양, 림프절 또는 감염 부위 내로 직접적으로 주사될 수 있다.
- [0317] 본 발명의 특정 실시양태에서, T 세포를 치료 수준으로 확장시키기 위해 본원에 기술된 방법 또는 관련 기술 분야에 공지된 다른 방법을 사용하여 활성화 및 확장된 세포가 환자에게 임의의 개수의 관련된 치료 형태와 조합되어 (예를 들어, 이전에 동시에 또는 후속적으로) 투여되고, 치료 형태는 하기 시약으로의 요법을 포함하지만 이에 제한되지 않는다: 시약 예컨대 항바이러스 요법, 시도포비어 및 인터루킨-2, 시타라빈 (일명 ARA-C), 또는 MS 환자에 대한 나탈리주맙 요법, 또는 건선 환자에 대한 에팔리주맙 요법, 또는 PML 환자에 대한 기타 요법. 추가 실시양태에서, 본 발명의 T 세포는 하기와 조합되어 사용될 수 있다: 화학요법, 방사선, 면역억제제 예컨대 시클로스포린, 아자티오프린, 메토트렉세이트, 미코페놀레이트 모페틸 및 FK506, 항체 또는 다른 면역치료제. 추가 실시양태에서, 화학요법제 예컨대 플루다라빈, 외부 빔 방사선요법 (XRT), 및 시클로포스파미드를 사용하여, 본 발명의 세포 조성물은 환자에게 골수 이식과 조합되어 (예를 들어, 이전에 동시에 또는 후속적으로) 투여된다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 대상체에게 고용량 화학요법에 이어지는 말초혈 줄기 세포 이식의 표준 치료가 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 이식 후, 대상체는 본 발명의 확장된 면역 세포의 주입을 받는다. 추가적인 실시양태에서, 확장된 세포는 수술 전 또는 후에 투여된다.
- [0318] 환자에게 투여되는 상기 치료의 투여량은 치료되는 장애의 정확한 성질 및 치료되는 수용자에 따라 변할 것이다. 인간에게 투여되는 투여량 비는 관련 기술 분야에서 허용되는 관행에 따라 시행될 수 있다. 일반적으로 치료 당 또는 치료 과정 당 1×10^6 내지 1×10^{10} 개의 본 발명의 변형된 T 세포 (예를 들어 CAR-T20 세포), 예를 들어, 정맥내 재주입에 의해, 환자에게 투여될 수 있다.
- [0319] **본 발명의 주요 장점은 하기를 포함한다:**
- [0320] (a) 본 발명에 따라 구축된 S scFv를 포함하는 CAR-T 세포는 BB 및 April CAR-T보다 더 높은 생체 내 및 시험관 내 종양 사멸 활성 및 기능적 활성을 갖는다.
- [0321] (b) 본 발명에 따라 구축된 이중특이적 CAR-T는 BCMA를 포함하는 2개 이상의 표적을 인식할 수 있다.
- [0322] 하기의 구체적인 실시예와 관련하여 본 발명이 추가로 기술될 것이다. 이러한 실시예는 단지 본 발명을 기술하기 위해서만 사용된 것이고, 본 발명의 범주를 제한하기 위해 사용되지 않는다는 것을 이해하여야 한다. 하기 실시예에서 특정 조건이 지시되지 않은 실험 방법은 일반적으로 통상적인 조건에 따르거나, 또는 제조사가 권장하는 조건에 따른다. 달리 언급되지 않는 한, 백분율 및 부는 중량 기준으로 계산된다.
- [0323] **실시예 1 공여자 혈액으로부터의 PBMC 단리 및 T 세포 확장**
- [0324] 공여자 혈액으로부터 단핵 세포를 단리한 후, 히스토파크(Histopaque)-1077 (시그마-알드리치(Sigma-Aldrich))로 밀도 구배 원심분리를 수행하고, T 세포 (이지셉(EasySep) 인간 T 세포 농축 키트, 스텐셀 테크놀

러지스(Stemcell Technologies)를 농축하였다. 커플링된 항-CD3/항-CD28 자기 비드를 사용하여 T 세포를 활성화시키고, 배양하고, 확장시켰고, 엑스-비보(X-vivo) 15 (300 IU/ml rhIL2)가 배지로 사용되었으며, 그 후 모든 세포를 37°C, 5% CO₂의 항온 인큐베이터에서 배양하였다.

[0325] 실시예 2 세포 배양 및 구축

[0326] BCMA-발현 세포주 MM.1s 및 RPMI 8226, MM.1s-ffluc 세포, RPMI 8226-ffluc 세포, 및 BCMA, CD19 또는 BCMA 및 CD19 양쪽 모두를 발현하는 HeLa 세포를 모두 RPMI 1640 배지에서 배양하였고, 293T (인간 신장 상피 세포주 세포, ATCC® CRL-3216)를 DMEM 배지로 배양하였다. 모든 배지에 10% (v/v) 소 태아 혈청, 100 U/ml 페니실린 및 스트렙토마이신, 2 mM L-글루타민, 및 1 mM 피루브산나트륨이 보충되었다.

[0327] 이들 중에서, BCMA, CD19 또는 BCMA 및 CD19 양쪽 모두를 발현하는 HeLa 세포는 렌티바이러스 벡터를 통해 BCMA 및/또는 CD19 항원을 전달함으로써 획득된 안정적으로 형질감염된 세포주였고, BCMA 또는/및 CD19 단백질을 특이적으로 발현할 수 있다. MM.1s-ffluc 세포 및 RPMI 8226-ffluc 세포는 반딧불이 루시페라제 렌티바이러스 감염 후에 스크리닝함으로써 획득된 안정적으로 형질감염된 세포주였다.

[0328] 실시예 3 구조 디자인 및 CAR 형질도입

[0329] BCMA를 표적으로 하는 단일 CAR 및 BCMA 및 CD19 양쪽 모두를 표적으로 하는 이중 CAR을 디자인하여 구축하였고, 구조적 개략도는 도 1에 나타난 바와 같았다. 이들 중에서, CAR, CD19 CAR 및 자살 스위치-EGFRt 요소는 2A 펩티드를 통해 연결되었다. 구체적으로, 본 발명에서 수반되는 CAR 구조가 도 1에 제시되었고, 명칭 및 조성이 표 1에서 제시되었다.

[0330] 표 1 CAR의 구조

구조 명칭	구조 조성	CAR-T 명칭
S1	단일 S scFv	CAR-S1
S2	평행 CD19 CAR + S CAR (이중 CAR)	CAR-S2
S3	평행 S CAR + CD19 CAR (이중 CAR)	CAR-S3
S4	루프 구조 CD19 scFv + S scFv	CAR-S4
S5	일렬 CD19 scFv + S scFv	CAR-S5
BB	단일 BB scFv	CAR-BB
4월	단일 April 체	CAR-April
19	단일 CD19 scFv	CAR-19
S6	평행 CD19 CAR + S CAR + EGFRt	CAR-S6
S7	평행 S CAR + CD19 CAR + EGFRt	CAR-S7

[0331]

도 1 및 표 1에 기술된 CAR에서 수반되는 각각의 요소의 구체적인 서열은 하기와 같다:

[0333] S scFv (S scFv) 중쇄

[0334] QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFDYIHWVRQAPGQGLEWIGYINPNSGYTNYAQKFQGRATMTADKSIINTAYVELSRLRSDDTAVYFCTRYMWERVTGFFDFWQGQTMVTVSS (서열식별번호: 9)

- [0335] S scFv (S scFv) 경쇄
- [0336] DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCLASEDISDDLAWYQQKPKGKAPKVLVYTTSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQTYKFPPTFGGGT
KVEIKR (서열식별번호: 10)
- [0337] BB scFv 중쇄
- [0338] DIVLTQSPPLAMSLGKRATISCRASESVTILGSHLIHWYQQKPGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEEDDVAVYYCLQSRTIPRTF
GGGTKLEIK (서열식별번호: 13)
- [0339] BB scFv 경쇄
- [0340] QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFDYSINWVKRAPGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYLQINNLYEDTATYFCALDYSY
AMDYWGQGTSVTVSSAAA (서열식별번호: 14)
- [0341] April 쇠
- [0342] SVLHLVPIINATSKDDSDVTEVMWQPALRRRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMGQVVSREGQGRQETLFRICRSMPSHPDRAYNSCYSAGVF
HLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHGTFGLGFVKLSGGGSDP (서열식별번호: 15)
- [0343] CD8 신호 펩티드
- [0344] MALPVTALLPLALLHAARP (서열식별번호: 16)
- [0345] (G4S)3 링커 펩티드
- [0346] GGGSGGGSGGGGS (서열식별번호: 17)
- [0347] (G4S)5 링커 펩티드
- [0348] GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (서열식별번호: 18)
- [0349] 218 링커 펩티드
- [0350] GSTSGSGKPGSGEGSTKG (서열식별번호: 19)
- [0351] CD8 힌지 영역
- [0352] TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (서열식별번호: 8)
- [0353] 또는 KPTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEASRPAAGGAVHTRGLDFASDKP (서열식별번호: 37)
- [0354] 또는 SGTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (서열식별번호: 38)
- [0355] CD8 막횡단 영역
- [0356] IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYC (서열식별번호: 7)
- [0357] CD28 막횡단 영역
- [0358] FWLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV (서열식별번호: 6)
- [0359] 41BB 신호전달 영역
- [0360] KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (서열식별번호: 5)
- [0361] CD28 신호전달 영역
- [0362] RSKRSRLHSDYMNTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (서열식별번호: 4)
- [0363] CD3z 신호전달 영역
- [0364] RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYD
ALHMALPPR (서열식별번호: 3)
- [0365] 또는
- [0366] RVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTY

DALHMQUALPPR (서열식별번호: 39)

- [0367] 2A 펩티드
- [0368] GSGATNFSLLKQAGDVEENP (서열식별번호: 2)
- [0369] FMC63 scFv (CD19 scFv) 중쇄
- [0370] EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLVGIWGSETTYNSALKSRLTI IKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYG GSYAMDYWGQGTSTVTVSS (서열식별번호: 11)
- [0371] FMC63 scFv (CD19 scFv) 경쇄
- [0372] DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGT KLEIT (서열식별번호: 12)
- [0373] GM-CSF 신호 펩티드
- [0374] MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP (서열식별번호: 1)
- [0375] EGFRt 서열
- [0376] RKVCGNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSI SGLDLHLPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQ FSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEDRVCVSCRNVSRGRECD KCNLEGEPRFVENSEC IQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCAGVMGENTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGTGPGLEGCPIN GPKIPSIATGMVGALLLVVALGIGLFM (서열식별번호: 20)
- [0377] 표 1의 CAR 유전자를 Fuw 렌티바이러스 벡터 백본 내로 클로닝하여, T 세포를 감염시키는 데 사용될 수 있는 완전한 렌티바이러스 발현 벡터를 구축하였다. 구체적으로, BCMA CAR 유전자를 상세한 설명을 위한 예로 들면, BCMA CAR 유전자를 EF1 α (EF-1 α) 프로모터의 작용 하에 놓아 Fuw-EF1 α -BCMA CAR을 형성시키고, 3개의 플라스미드, 즉 Fuw-EF1 α -BCMA CAR, 렌티바이러스 외피 플라스미드 pMD2.G (애드진(Addgene)), 플라스미드 #12259) 및 렌티바이러스 패키징 플라스미드 psPAX2 (애드진, 플라스미드 #12260)를 리포펙타민(Lipofectamine) 3000을 사용하여 293T 내로 전달하여 완전한 렌티바이러스 발현 벡터를 제조하고, 48h 및 72h에 바이러스 상청액을 수집하고, 초원심분리를 통해 농축하였으며, 농축된 바이러스를 T 세포를 형질감염시키는 데 사용할 수 있다.
- [0378] 유동 세포측정법 분석의 결과는 구축된 CAR 유전자로부터 BCMA CAR을 발현하는 렌티바이러스 벡터가 제조될 수 있다는 것을 나타냈다.
- [0379] **실시예 4 CAR-T 세포의 제조**
- [0380] 실험 방법은 하기와 같다:
- [0381] 4.1 렌티바이러스 감염
- [0382] 단리 및 정제된 1차 T 세포가 활성화되고 나서 2일 후, 이를 실시예 3에서 구축된 렌티바이러스를 사용하여 렌티바이러스 벡터로 감염시키고, 세포 배양 플라스크로 옮기고, 37°C, 5% CO₂의 항온 인큐베이터에서 배양하였다.
- [0383] 4.2 세포 증식 및 CAR 양성 비율의 검출
- [0384] 감염 3일 후 및 냉동보존 전에, BCMA 항원을 사용하여 세포 수 및 BCMA-양성세포의 백분율을 검출하기 위해, 즉 T 세포의 CAR-양성 비율을 검출하기 위해 샘플을 취하였다. 2 내지 3일마다 배지 절반을 교체하였다.
- [0385] 결과는 실시예 3에서 구축된 렌티바이러스 벡터를 사용하여, 각각의 CAR-T 세포가 성공적으로 구축되었다는 것을 나타냈고, 이의 명칭이 표 1에서 제시된다.
- [0386] 구체적으로, BCMA CAR-T 세포의 구축 결과가 도 2에서 제시된다. 바이러스 형질감염 후 CAR-BB 및 CAR-S1 CAR-T 세포 양쪽 모두에서 BCMA CAR의 발현이 검출될 수 있고, CAR 발현은 50% 초과에 도달할 수 있다.
- [0387] **실시예 5 시험관 내에서의 세포 사멸**
- [0388] 실시예 4에서 수득된 CAR-S1 CAR-T 세포, CAR-BB CAR-T 세포 및 CAR-April CAR-T 세포로 시험관 내 사멸 실험을 수행하였다. RTCA 방법을 사용하여, 표적 세포인 BCMA를 과발현하는 Hela 세포주에 대한 CAR-T 세포의 사멸

을 테스트하였다.

- [0389] 결과가 도 3에서 제시되고 (RTCA 방법을 사용하여 테스트됨), NT 대조군 (형질감염되지 않은 T 세포 대조군) 및 배지 대조군 (블랭크 대조군)에서는 HeLa-BCMA 세포에 대한 사멸이 없었던 한편, CAR-S1 세포는 BCMA에 대해 특이적인 사멸 기능을 수행할 수 있고, CAR-S1 세포는 BCMA-양성 HeLa-BCMA 세포를 사멸시키는 것에서 CAR-BB 세포보다 더 양호한 결과를 나타냈다.
- [0390] 루시페라제-표지 종양 표적 세포가 사멸 능력의 검출에 사용되었다. 루시페라제 유전자를 표적 세포 내로 전달함으로써, 안정적으로 형질감염된 세포주 MM.1s-Luc 및 RPMI 8226-Luc가 클론 스크리닝 후에 획득되었다. 실험 동안, 루시페린 기질을 첨가함으로써, 루시페라제가 루시페린과 반응하여 형광을 생산하고, 형광 강도를 검출함으로써, 루시페라제의 활성을 측정할 수 있으며, 그 후 세포의 생존 비를 검출할 수 있고, CAR-T 세포의 사멸 효과를 측정할 수 있다.
- [0391] 도 4는 표적 세포의 표면 상에서의 항원 발현을 나타낸다. 도 5는 동일한 E:T 비 하에, NT 세포는 사멸 기능을 갖지 않고, CAR-S1 세포는 MM.1S-Luc 세포 (루시페라제 유전자로 형질감염된 MM.1S 세포) 및 RPMI 8226-Luc 세포 (루시페라제 유전자로 형질감염된 RPMI 8226 세포)에 대한 용량-의존적 사멸 효과를 갖는다는 것을 나타내고, CAR-S1 세포는 CAR-BB 및 CAR-April보다 더 양호한 사멸 능력을 나타냈다.
- [0392] 추가적으로, 출원인은 또한 관련 기술 분야에서 통상적으로 발견되는 다양한 표적화된 BCMA scFv를 사용하여 CAR-T 세포를 구축하였고, 테스트 시, 이러한 CAR-T 세포 중 어느 것도 이상적인 사멸 기능을 나타내지 않았다.
- [0393] 요약하면, CAR-T 세포가 표적 세포 (BCMA 과발현 세포, 및 BCMA-양성 종양 세포 MM.1s-Luc 및 RPMI 8226 세포)와 공동-배양된 후, 표적 세포가 BCMA를 표적으로 하는 CAR-T 세포에 의해 용해될 수 있고, CAR-S1은 CAR-BB보다 더 높은 사멸 능력을 나타냈다. 관련 기술 분야에서 통상적으로 발견되는 BCMA를 표적으로 하는 scFv에 의해 구축된 일부 다른 CAR-T 세포는 이상적인 사멸 기능을 나타내지 않았다.
- [0394] **실시예 6 시토카인 방출의 검출**
- [0395] 실시예 4에서 획득된 BCMA를 표적으로 하는 CAR T 세포 (CAR-S1 CAR-T 세포 및 CAR-BB CAR-T 세포)를 종양 세포 (HeLa, HeLa-BCMA, HeLa-CD19, 또는 HeLa-BCMA-CD19)와 혼합하고, RPMI 배지에 놓았다. 각각의 세포 밀도가 1×10^4 개의 세포/ml이도록 제조하였다. 100 ul의 각각의 CAR-T 세포 및 종양 세포를 96웰 플레이트에 놓고, 철야로 공동-배양하였다. 상청액을 수집하고, 원심분리 후, 상청액을 취하여 시토카인 IFN- γ 등의 방출 수준을 검출하였다. Elisa 키트가 검출에 사용되었다.
- [0396] 결과가 도 6에서 제시된다. HeLa-BCMA 표적 세포에 의해 공동-자극된 후, CAR-S1의 시토카인 INF- γ 분비가 CAR-BB의 것보다 유의하게 더 높았던 한편, NT 및 배지 군에서는 유의한 분비가 없었다.
- [0397] **실시예 7 생체 내 약물 효능에 대한 연구**
- [0398] 6-12주령의 NOG 마우스를 선택하고, 1×10^7 개의 RPMI 8226 세포를 피하 주사하였다. 2일 후, 종양 이식편 부하를 측정하였다. 10일 후, 군 분류를 수행하고, 군 분류 1일 후에 CAR-S1 CAR-T 세포 및 CAR-BB CAR-T 세포를 주사하였다. CAR-T 처리 후, 마우스의 종양 부피 부하를 주 2회 평가하였다.
- [0399] 결과가 도 7에서 제시된다. 대조군과 비교하여, CAR-S1 세포가 주사된 마우스의 종양 부하가 유의하게 억제되었다. CAR-S1 세포는 CAR-BB보다 약간 더 높은 항종양 효과를 가졌다.
- [0400] **실시예 8 이중 CAR-T 세포의 제조**
- [0401] 실험 방법은 하기와 같다:
- [0402] 본 실시예는 BCMA 및 CD19 양쪽 모두를 표적으로 하는 CAR-T 세포를 수반하였고, CAR의 구조가 도 1에 제시되었다 (CAR S2, CAR S3, CAR S4, CAR S5, CAR S6 및 CAR S7). 이들 중에서, BCMA CAR, CD19 CAR 및 자살 스위치-EGFRt 요소는 2A 펩티드를 통해 연결되었다. 이들 중에서, BCMA CAR 구조 내의 scFv는 S 및 BB의 scFv 중쇄 및 경쇄로 구성되었고, 여기서 S scFv는 서열식별번호: 9 및 서열식별번호: 10으로 구성되고, BB scFv는 서열식별번호: 13 및 서열식별번호: 14로 구성되고, CD19 scFv는 서열식별번호: 11 및 서열식별번호: 12로 구성되며, 추가적으로, scFv는 April 서열 (서열식별번호: 15)의 일부분으로 구성된 BCMA 결합 영역으로 교체되어 새로운 CAR 구조를 형성할 수 있다.
- [0403] BCMA-CD19 CAR 유전자를 벡터 백본 내로 클로닝하고, EF1 α (EF-1 α) 프로모터의 작용 하에 놓아 EF1 α -BCMA-

CD19-EGFRt CAR을 형성시키고, EF1 α -BCMA-CD19-EGFRt CAR 및 렌티바이러스 외피 플라스미드를 리포펙타민 3000을 사용하여 293T 내로 전달하여 완전한 렌티바이러스 발현 벡터를 제조하고, 48h 및 72h에 바이러스 상청액을 수집하고, 초원심분리를 통해 농축하였으며, 농축된 바이러스를 T 세포를 형질감염시키는 데 사용할 수 있다.

[0404] 렌티바이러스 감염: 단리 및 정제된 1차 T 세포가 활성화되고 나서 2일 후, 이를 MOI (1-10)로 상기와 같이 구축된 렌티바이러스를 사용하여 렌티바이러스 벡터로 감염시키고, 세포 배양 플라스크로 옮기고, 37°C, 5% CO₂의 항온 인큐베이터에서 배양하였다.

[0405] 세포 증식 및 CAR 양성 비율의 검출: 감염 3일 후 및 냉동보존 전에, 세포 수 및 BCMA/CD19 이중 양성 세포를 검출하기 위해, 즉 T 세포의 CAR-양성 비율을 검출하기 위해 샘플을 취하였다. 2 내지 3일마다 배지 절반을 교체하였다.

[0406] 결과는 BCMA-CD19 CAR 렌티바이러스 벡터를 사용하여, 도 1 및 표 1에 구체적으로 제시된 바와 같이, BCMA-CD19 CAR-T 세포가 성공적으로 구축되었음을 나타냈다.

[0407] 결과가 도 8에서 제시된다. BCMA CAR 및 CD19 CAR의 발현이 BCMA 항원 및 CD19 항원 양쪽 모두를 사용하여 바이러스-형질감염 T 세포의 표면에서 검출될 수 있다.

[0408] 도 9는 BCMA CAR, CD19 CAR 및 EGFRt의 발현이 CAR-S6 및 CAR-S7 세포의 표면에서 모두 검출될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0409] **실시예 9 시험관 내에서의 세포 사멸**

[0410] 실시예 8에서 획득된 CAR-T 세포로 시험관 내 사멸 실험을 수행하였다. BCMA 및 CD19를 과발현하는 과발현 HeLa 세포주가 RTCA에 사용되거나, 또는 루시페라제-표지 종양 표적 세포가 검출에 사용되었다. 루시페라제 유전자를 표적 세포 내로 전달함으로써, 안정적으로 형질감염된 세포주 (RPMI 8226, MM.1s 및 Nalm6)가 클론 스크리닝 후에 획득되었다. 실험 동안, 루시페린 기질을 첨가함으로써, 루시페라제가 루시페린과 반응하여 형광을 생산하고, 형광 강도를 검출함으로써, 루시페라제의 활성을 측정할 수 있으며, 그 후 세포의 생존 비를 검출할 수 있고, CAR T 세포의 사멸 효과를 획득할 수 있다.

[0411] 결과는 CAR-T 세포가 표적 세포 (CD19/BCMA 이중 양성, CD19 단일 양성, 및 BCMA 단일 양성 세포)와 공동-배양된 후, 모든 표적 세포가 용해될 것임을 나타냈고, 이는 BCMA-CD19 CAR-T가 CD19/BCMA 이중 양성, CD19 단일 양성, 및 BCMA 단일 양성 세포 모두에 대한 사멸 효과를 가졌음을 지시한다.

[0412] 구체적인 결과가 도 10에서 제시된다. 이중특이적 CAR-T가 단일-양성 CD19-양성 표적 세포 (HeLa-CD19) 또는 단일-양성 BCMA-양성 표적 세포 (HeLa-BCMA)를 유의하게 사멸시킬 수 있고, 이는 또한 CD19/BCMA 이중 양성 표적 세포 HeLa-BCMA-CD19를 유의하게 사멸시킬 수 있다. 이는 BCMA 및 CD19가 조합된 이중특이적 CAR-T 세포가 단일-표적 및 이중-표적 세포 양쪽 모두에 대한 사멸 효과를 가졌음을 나타냈다. 단일 CAR-T (CAR-19 또는 CAR-S1)는 1개의 표적 항원에 대해서만 사멸 효과를 가졌다.

[0413] 도 11은 이중 CAR-T가 BCMA 단일-양성 종양 표적 세포인 MM.1s 및 RPMI 8226을 유의하게 사멸시킬 수 있음을 나타낸다. 이는 또한 CD19-양성 종양 표적 세포인 Raji 및 Nalm6을 유의하게 사멸시켰다. 이는 BCMA 및 CD19가 조합된 이중 CAR이 BCMA- 및 CD19-양성 종양 표적 세포 양쪽 모두에 대한 사멸 효과를 갖는다는 것을 나타냈다.

[0414] **실시예 10 시토카인 방출의 검출**

[0415] BCMA-CD19 CAR-T 세포 (실시예 8에서 획득됨)를 종양 세포 (HeLa-BCMA)와 혼합하고, RPMI 배지에 놓았다. 각각의 세포의 밀도가 1×10⁴개의 세포/ml이도록 제조하였다. 100 uL의 각각의 CAR-T 세포 및 종양 세포를 96웰 플레이트에 놓고, 철야로 공동-배양하였다. 상청액을 수집하고, 원심분리 후, 상청액을 취하여 시토카인의 방출 수준을 검출하였다. CBA 방법이 검출에 사용되었다.

[0416] 결과가 도 12에서 제시된다. BCM-양성 표적 세포에 의해 자극된 후 BCMA-CD19 CAR-T가 다량의 시토카인을 분비할 수 있고, NT는 소량의 시토카인만 분비하였다. 이는 BCMA-CD19 CAR-T가 BCMA에 의해 활성화될 수 있다는 것을 나타냈다.

[0417] **실시예 11 자극된 후의 CD107의 상향-조절**

[0418] 실시예 8에서 획득된 CAR-T 세포를 활성화시킨 후, CD107a 발현에서의 변화에 대한 유동 세포측정법 분석에 적

용하였고, CD19 또는 BCMA를 발현하는 종양 세포주가 공동-인큐베이션 활성화 실험에 사용되었다. 공동-인큐베이션 후, 세포를 CD3, CD8 및 CD107a에 대한 항체로 표지하고, 유동 세포측정법 분석에 적용하였다.

[0419] 결과가 도 13에서 제시된다. 이중 CAR-T 세포가 BCMA-양성 종양 표적 세포인 MM.1s 및 CD19-양성 Raji와 공동-배양된 후, CAR-T 세포의 표면 상의 CD107a 분자가 유의하게 상향 조절되었다.

[0420] **실시예 12 생체 내 약물 효능에 대한 연구**

[0421] 6-12주령의 NOG 마우스를 선택하고, 1×10^7 개의 RPMI 8226 세포를 피하 주사하였다. 2일 후, 종양 이식편 부하를 측정하였다. 10일 후, 이를 종양 부하가 유사한 군으로 나누고, 군 분류 1일 후에 CAR-T 세포를 각각 주사하였다. CAR-T 처리 후, 마우스의 종양 부피 부하를 주 2회 평가하였다.

[0422] 도 14의 결과는 CAR-S2 및 CAR-S4가 RPMI 8226 세포-피하 모델링 마우스에서 종양을 제거할 수 있음을 나타내고, 이는 이들의 유의한 항종양 효능을 지시한다.

[0423] 동시에, 6-12주령 NOG 마우스를 선택하고, 1×10^7 개의 MM.1s 세포를 정맥내 주사하였다. 종양 이식편 부하를 검출하고, 마우스를 종양 부하에 따라 균일하게 군으로 나누었다. 군 분류 1일 후에 CAR-T 세포를 주사하였다. CAR-T 처리 후, 마우스의 종양 부하를 평가하였다. 각각의 마우스에 3 mg d-루시페린 (퍼킨 엘머 라이프 사이언시스(Perkin Elmer Life Sciences))을 복막내 주사한 후, 4분 뒤에 30초의 노출 시간으로 제노젠(Xenogen) IVIS 영상화 시스템 (퍼킨 엘머 라이프 사이언시스)으로 촬영하였다. 방출된 광자의 양에 따라 생물발광 신호를 계산하고, 광자의 양을 노출 시간 및 표면적으로 정규화하고, 최종적으로 광자의 양/s/cm²/스테라디안 (p/s/cm²/sr)을 획득하였다.

[0424] 도 15의 결과는 대조군과 비교하여, 이중 CAR-T 세포가 주사된 마우스의 종양 부하가 사라질 때까지 유의하게 감소되었음을 나타내고, 이는 BCMA-CD19 CAR-T 세포가 유의한 항종양 효과를 가졌다는 것을 지시한다.

[0425] **실시예 13 종양-형성 세포의 사멸에 대한 연구**

[0426] 골수종 (MM) 환자의 재발은 통상적인 임상 현상이고, 임상 소견은 일반적으로 대부분의 종양 세포는 제거될 수 있지만, 종양 재발에 이르는 클론 증식이 가능한 종양 세포는 상대적으로 더 높은 약물 저항성을 갖는 경향이 있다는 것이다. 클론 증식이 가능한 종양 세포에 대한 CAR-T 세포의 사멸 능력을 조사하고, 이중특이적 CAR-T 및 단일 CAR-T 세포의 장점을 비교하기 위해, 본 연구는 골수종 클론 형성 실험의 방법을 확립하였고, 클론 형성에 대한 CAR-T의 억제 능력을 조사하였다.

[0427] 증식이 가능한 MM 종양 세포는 클론 증식 배지에서 성장할 수 있지만, 실험 동안, 실험을 방해할 수 있는 증식이 가능한 CD34+ 조혈 줄기 세포를 제거할 필요가 있다. 수확된 세포에서 종양 증식 세포가 우세하여야 한다는 것은 이러한 실험에 대해 제어되어야 하는 중요한 문제이다.

[0428] 구체적인 실험 방법은 하기와 같다:

[0429] 제1 단계에서, 골수 단핵 세포를 피콜(Ficoll)을 사용하여 분리 및 추출하고, 유동 세포측정법에 의해 표현형에 대해 분석하였다. 제2 단계에서, CD34+ 세포 분류 키트를 사용하여 CD34+ 세포를 제거하였다. 제3 단계에서, 수득된 세포에서 상이한 CAR-T 세포 군 (이중 CAR-T, 및 단일 CAR-T)을 사용하여 사멸 실험을 수행하였다. 사멸 완료 후, T 세포-제거 분류 키트를 사용하여 CAR-T 세포를 제거하였다. 제4 단계에서, 반고체 클로닝 증식 배지를 클론 성장에 사용하였고, 1주 내지 2주 후에 통계, 카운팅 및 결과 요약을 수행하였다.

[0430] 결과가 도 16에서 제시된다. CAR-S2 및 CAR-S4가 클론 형성 세포 또는 종양 세포 전구체 세포를 사멸시키는 것에서 CAR-19 및 CAR-S1보다 더 유의하게 장점을 가졌고, 이는 이들이 골수종 세포의 클론 형성을 억제하는 능력이 단일 CAR보다 더 높았다는 것을 지시한다.

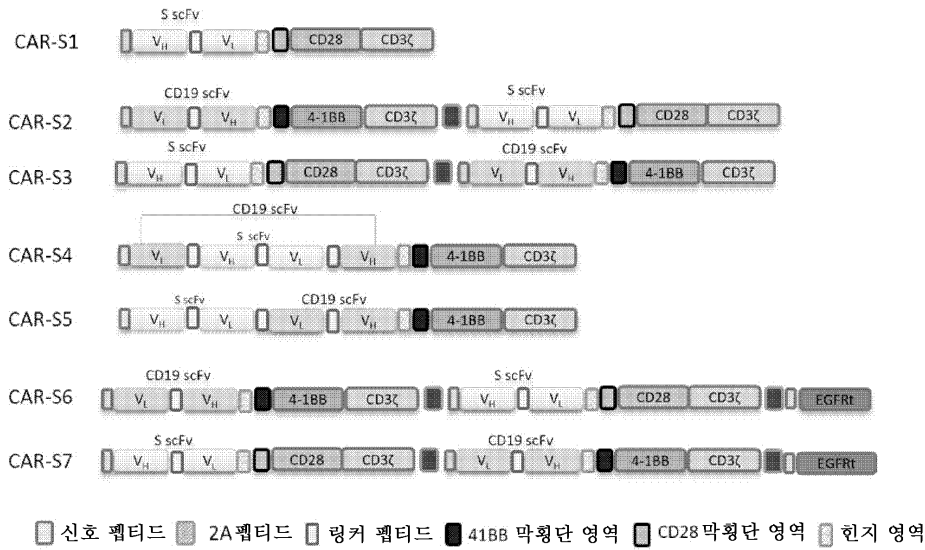
[0431] **실시예 14 Nalm6의 생체 내 정맥 모델링 실험**

[0432] 6-12주령 NOG 마우스를 선택하였고, 1×10^7 개의 Nalm6 세포를 정맥내 주사하였다. 6일 후, 종양 이식편 부하를 검출하고, 마우스를 종양 부하에 따라 균일하게 군으로 나누었다. 군 분류 1일 후에 CAR-T 세포를 주사하였다. CAR-T 처리 후, 마우스의 종양 부하를 평가하였다. 각각의 마우스에 3 mg d-루시페린 (퍼킨 엘머 라이프 사이언시스)을 복막내 주사한 후, 4분 뒤에 30초의 노출 시간으로 제노젠 IVIS 영상화 시스템 (퍼킨 엘머 라이프 사이언시스)으로 촬영하였다. 방출된 광자의 양에 따라 생물발광 신호를 계산하고, 광자의 양을 노출 시간 및 표면적으로 정규화하고, 최종적으로 광자의 양/s/cm²/스테라디안 (p/s/cm²/sr)을 획득하였다.

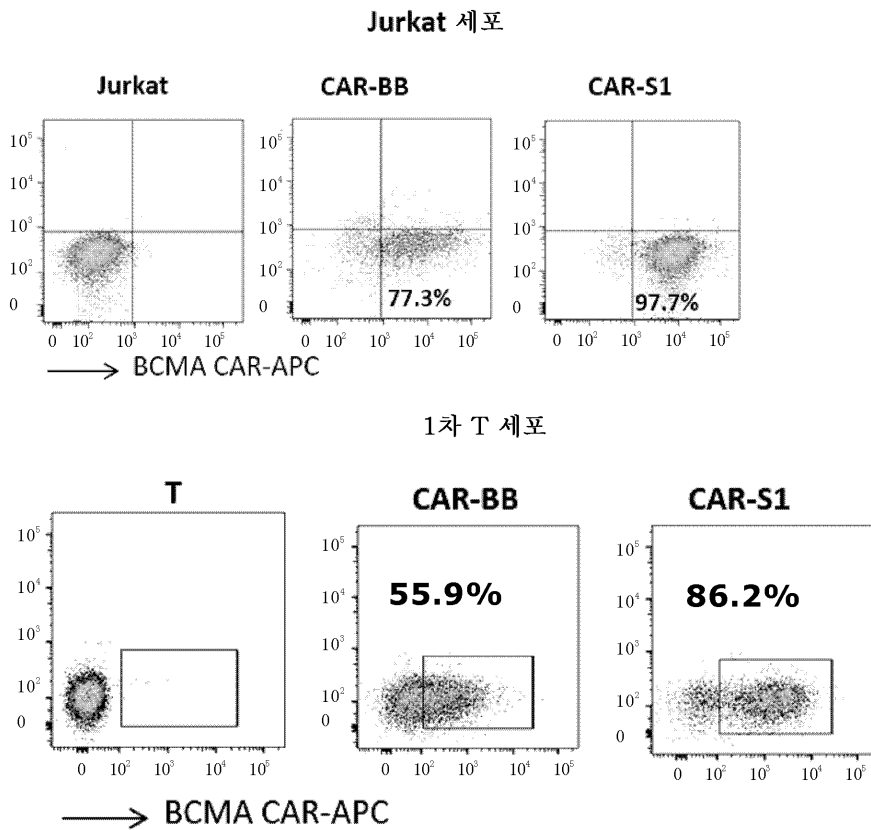
- [0433] 결과가 도 17에서 제시된다. CAR-S2 및 CAR-S4가 주사된 마우스의 종양 부하가 사라질 때까지 유의하게 감소되었고, BCMA-CD19 CAR-T 세포가 CAR-19보다 더욱 유의한 항-CD19-양성 종양 효과를 가졌다.
- [0434] **실시예 15 CAR-T 세포의 안전 스위치 실험**
- [0435] EGFRt 요소를 함유하는 CAR-T를 EGFR 항체로 염색하여, 유동 세포측정법으로 분석하였고, 동시에 CAR 발현을 분석하였다.
- [0436] 결과가 도 18에서 제시된다. CAR-T 세포에서 안전 스위치의 발현이 검출되었다.
- [0437] **실시예 16 인간화 CAR-T 세포의 제조 및 사멸 효과의 검출**
- [0438] 실시예 3 및 4의 방법을 사용하여 인간화 CAR-T 세포 (CAR-h19) 및 인간화 이중 CAR-T 세포 (CAR-hS2, 및 CAR-hS4)를 구축하였다. 인간화 CAR-T 세포의 구조는 CAR-19의 것과 유사하였다. 인간화 이중 CAR-T 세포 CAR-hS2의 구조는 CAR-S2의 것과 유사하였고, CAR-hS4의 구조는 CAR-S4의 것과 유사하였으며, 유일한 차이는 인간화 CD19 scFv가 원래의 구조에서 무린-유래 scFv를 교체하는 데 사용되었다는 것이었다. 인간화 CD19 scFv는 서열 식별번호: 21-30 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 항체 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 31-36 중 어느 하나에 제시된 바와 같은 항체 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0439] 실시예 9의 방법을 사용하여 인간화 이중 CAR-T 세포의 시험관 내 사멸 효과를 검출하였다.
- [0440] 시험관 내 사멸 결과가 도 19 및 도 20에서 제시된다. 인간화 CAR-T 세포 및 인간화 이중 CAR-T 세포가 비-표적 세포를 사멸시키지 않으면서 표적 세포에 대한 유의한 사멸 효과를 나타냈다.
- [0441] **실시예 17 인간화 CAR-T 세포의 생체 내 약물 효능에 대한 연구**
- [0442] 6-12주령 NOG 마우스를 선택하였고, 3×10^5 개의 Raji 세포를 피하 주사하였다. 6일 후, 종양 이식편 부하를 측정하고, 마우스를 종양 부하가 유사한 군으로 나누고, 군 분류 1일 후에 상기와 같이 제조된 이중 CAR-T 세포를 각각 주사하였다. CAR-T 처리 후, 마우스의 종양 부피 부하를 평가하였다. 각각의 마우스에 3 mg d-루시페린 (퍼킨 엘머 라이프 사이언시즈)을 복막내 주사한 후, 4분 뒤에 30초의 노출 시간으로 제노젠 IVIS 영상화 시스템 (퍼킨 엘머 라이프 사이언시즈)으로 촬영하였다. 방출된 광자의 양에 따라 생물발광 신호를 계산하고, 광자의 양을 노출 시간 및 표면적으로 정규화하고, 최종적으로 광자의 양/s/cm²/스테라디안 (p/s/cm²/sr)을 획득하였다.
- [0443] 결과가 도 21에서 제시된다. 인간화 CAR-hS2 세포가 Raji 세포-모델링 마우스에서 CAR-S2보다 더욱 강력한 종양 제거 능력을 가졌고, 이는 이들의 유의한 항종양 효능을 지시한다.
- [0444] **실시예 18 CAR-T 세포에 의한 Raji 림프종 세포의 사멸**
- [0445] 루시페라제-표지 Raji 림프종 표적 세포가 사멸 능력의 검출에 사용되었다. 루시페라제 유전자를 Raji 표적 세포 내로 전달함으로써, 안정적으로 형질감염된 세포주 Raji-Luc가 클론 스크리닝 후에 획득되었다. 실험 동안, 루시페린 기질을 첨가함으로써, 루시페라제가 루시페린과 반응하여 형광을 생산하고, 형광 강도를 검출함으로써, 루시페라제의 활성을 측정할 수 있으며, 그 후 세포의 생존 비를 검출할 수 있고, CAR-T 세포의 사멸 효과를 획득할 수 있다.
- [0446] 결과가 도 22에서 제시된다. NT 세포는 사멸 기능이 없었고, CAR-S1 세포는 Raji-Luc 세포 (루시페라제 유전자가 전달된 Raji 세포)에 대한 용량-의존적 사멸 효과를 가졌으며, 이는 림프종과 같은 적응증에 대한 이들의 잠재적인 적용 가치를 지시한다.
- [0447] 본 발명에서 언급된 모든 문서는 각각의 문서가 개별적으로 참고문헌으로서 포함된 것과 같이 본 출원에서 참고 문헌으로서 인용된다. 추가적으로, 본 발명의 상기 교시 내용을 읽은 후, 관련 기술 분야의 통상의 기술자가 본 발명에 다양한 변화 또는 변형을 가할 수 있고, 이러한 등가 형태 또한 본 출원의 첨부된 청구범위에 의해 정의되는 범주 내에 속한다는 것을 이해하여야 한다.

도면

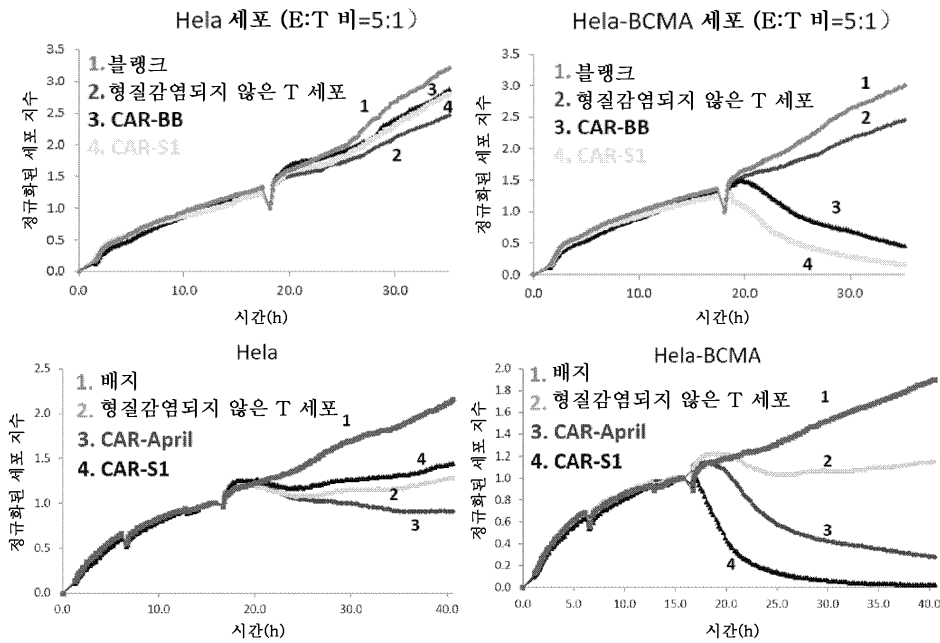
도면1



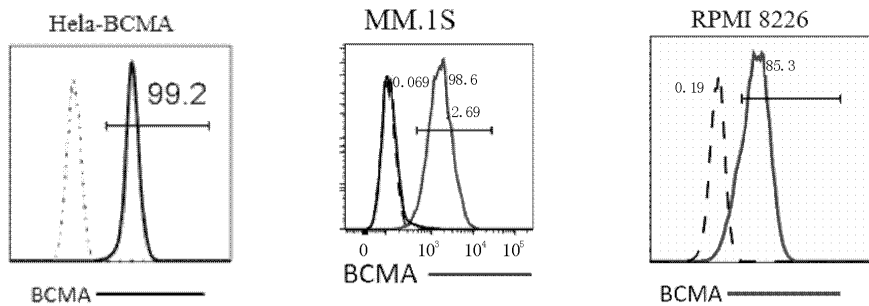
도면2



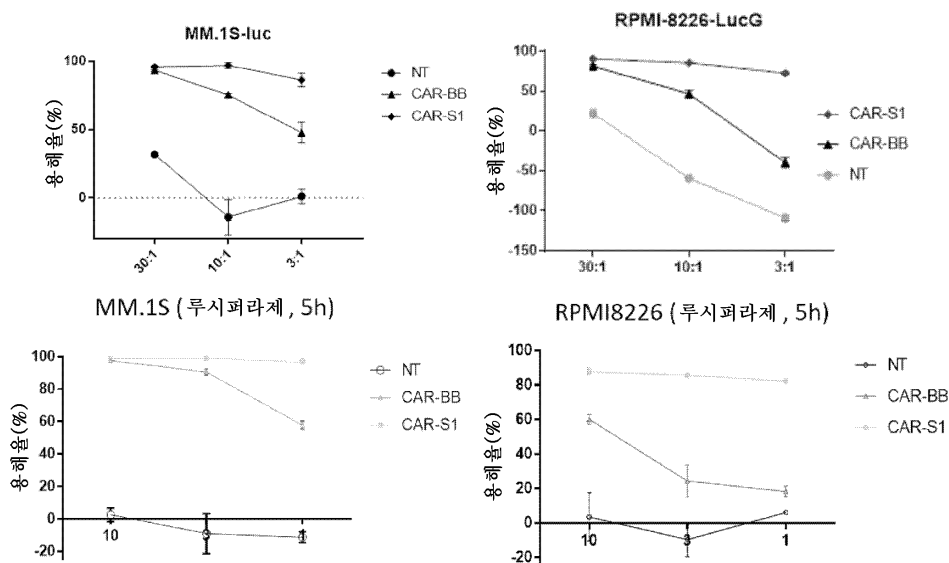
도면3



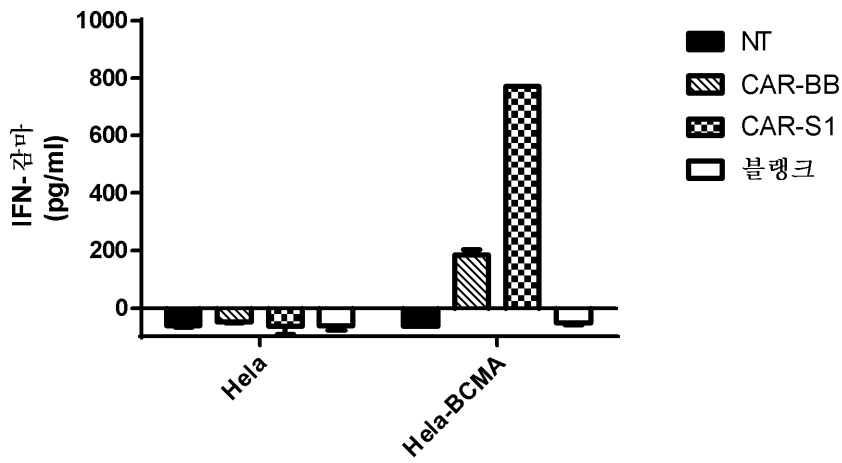
도면4



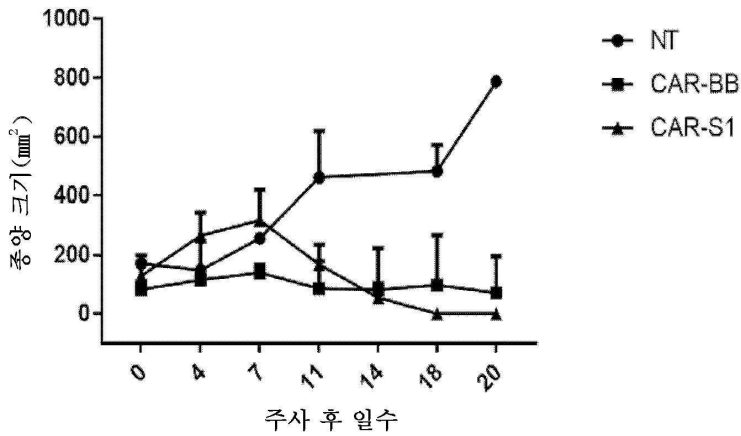
도면5



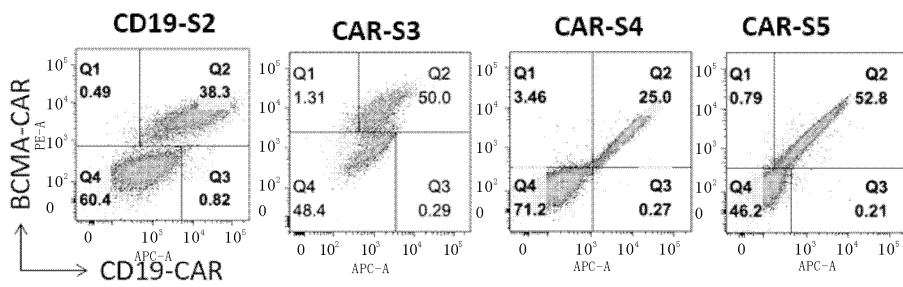
도면6



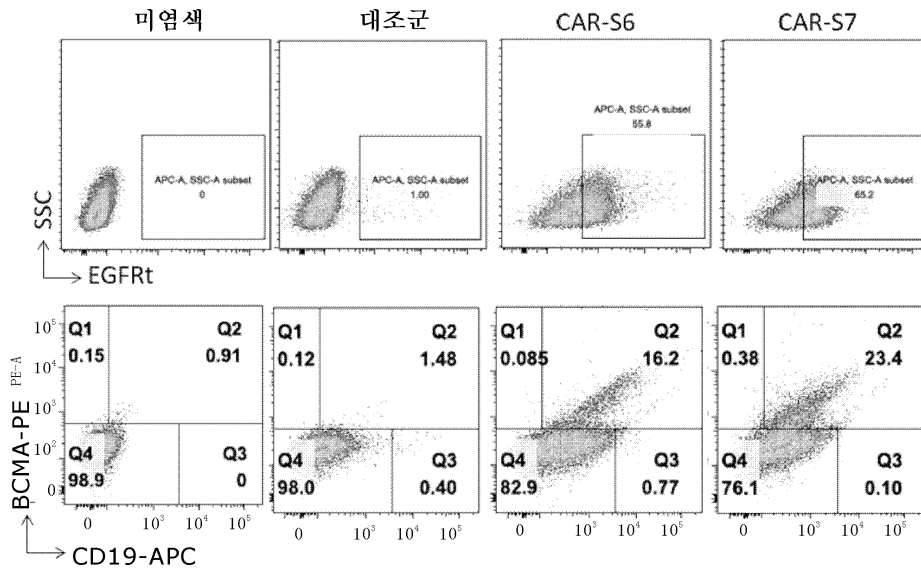
도면7



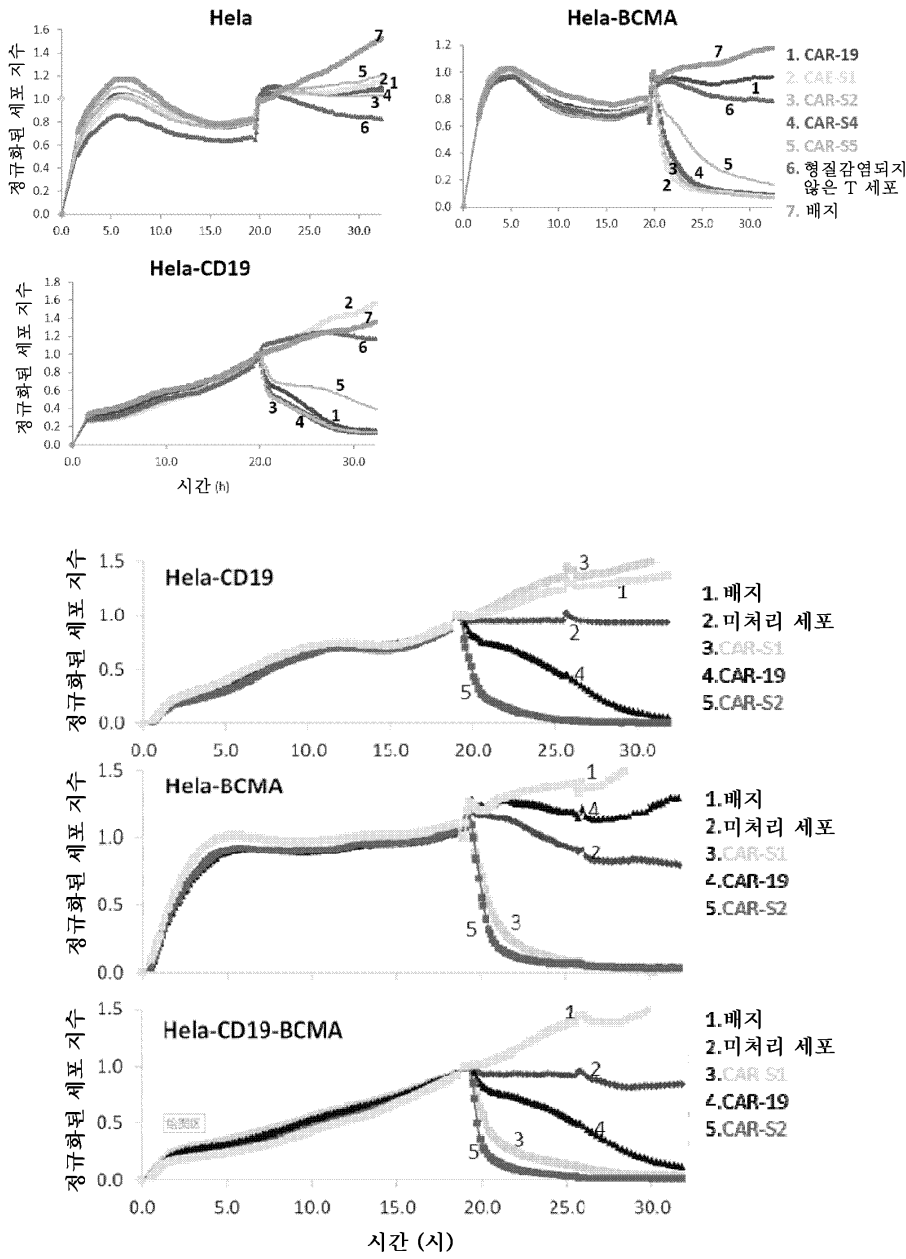
도면8



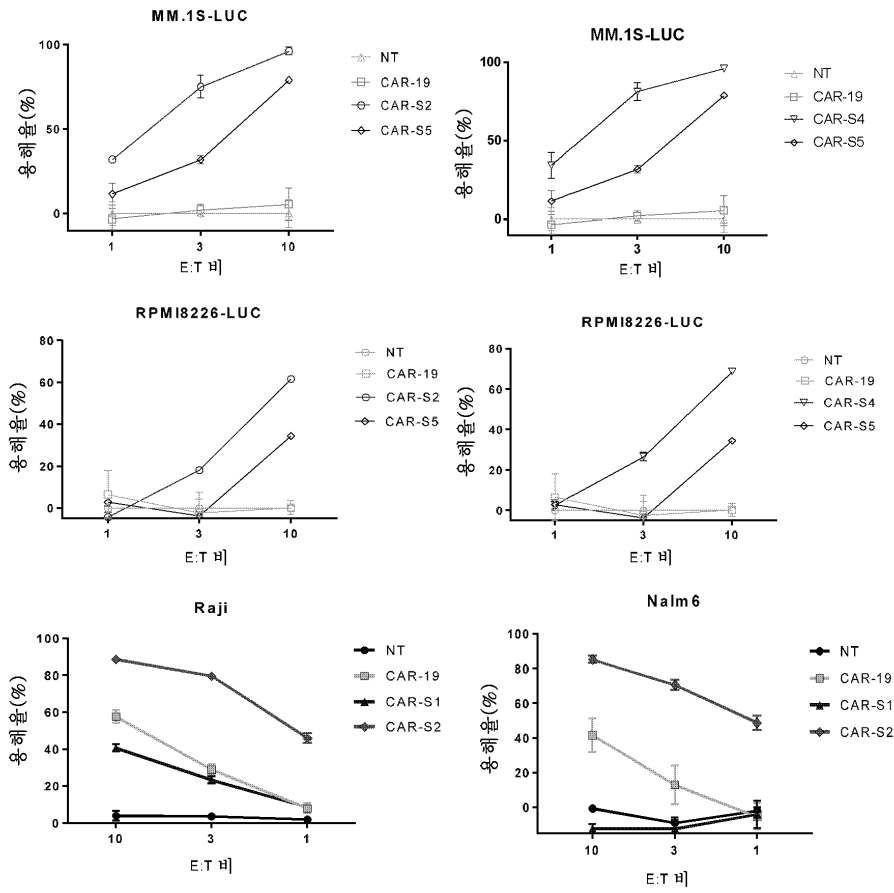
도면9



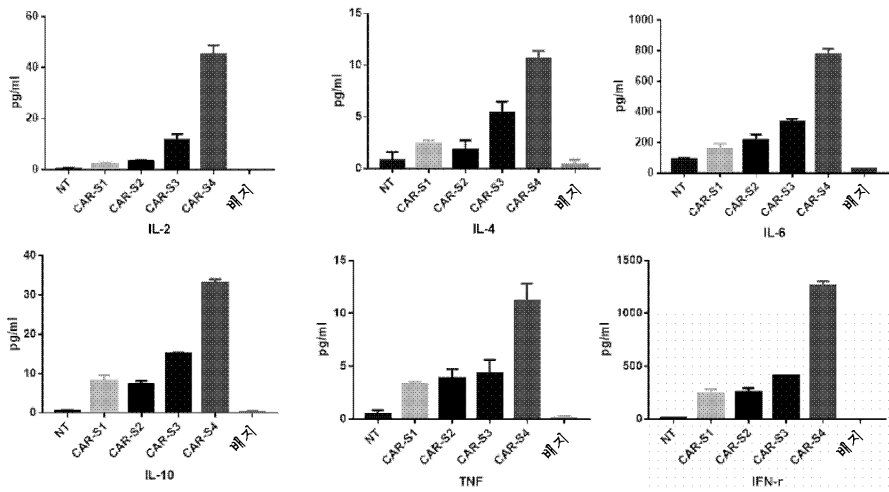
도면10



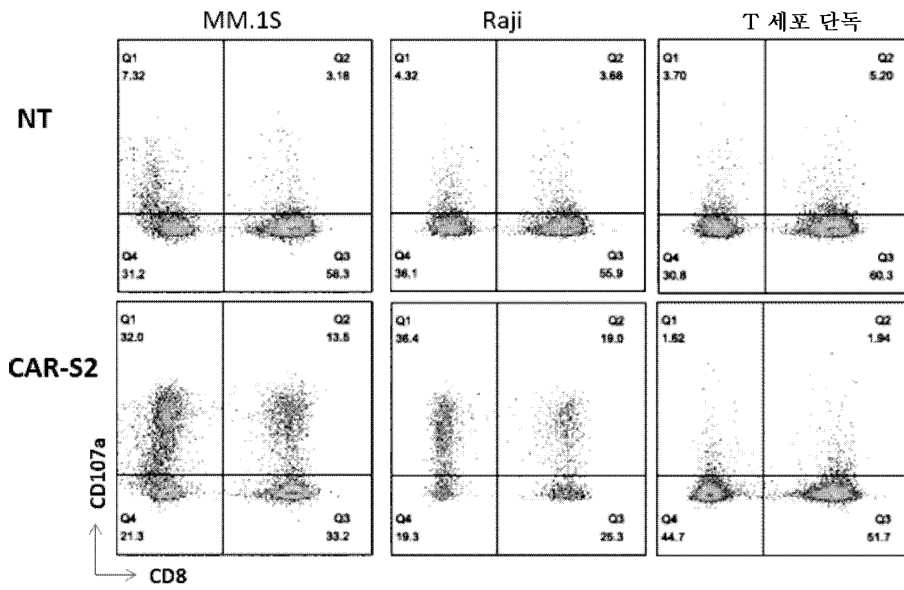
도면11



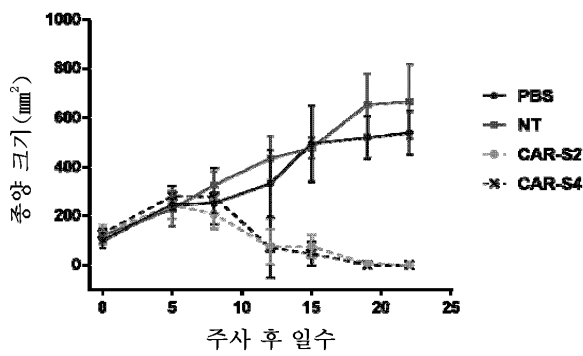
도면12



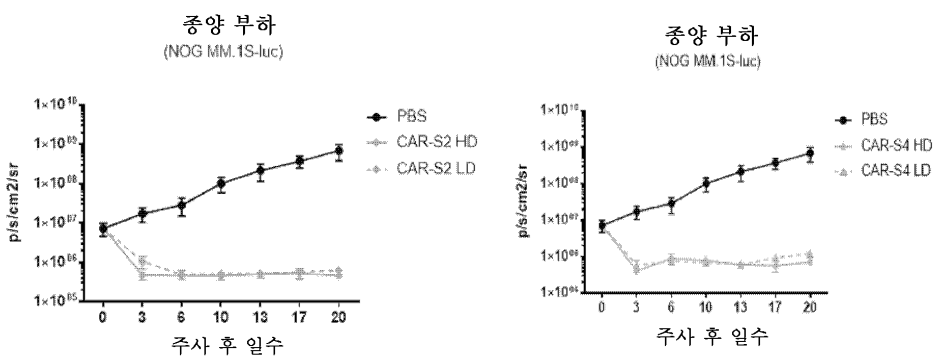
도면13



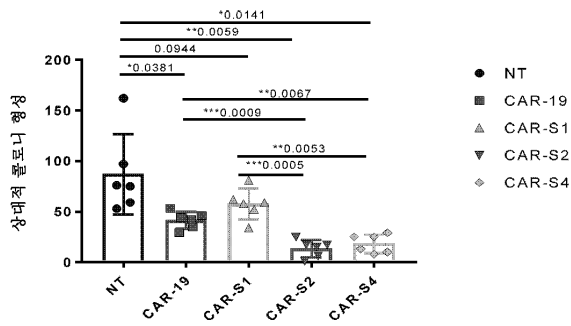
도면14



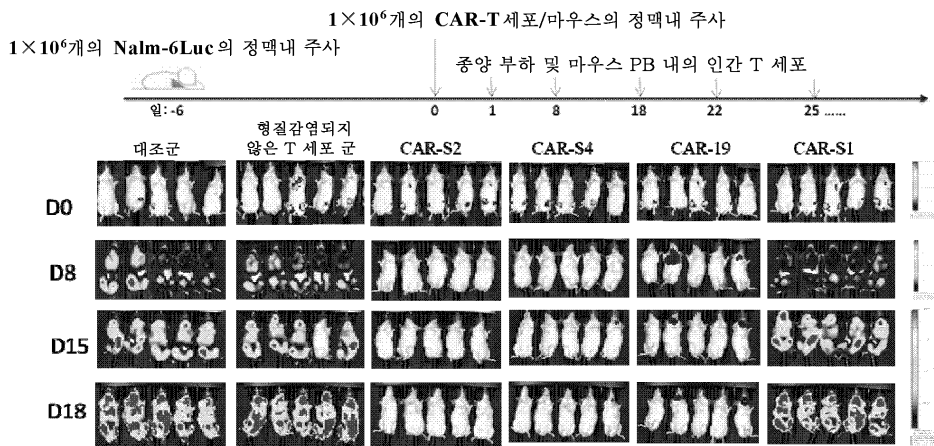
도면15



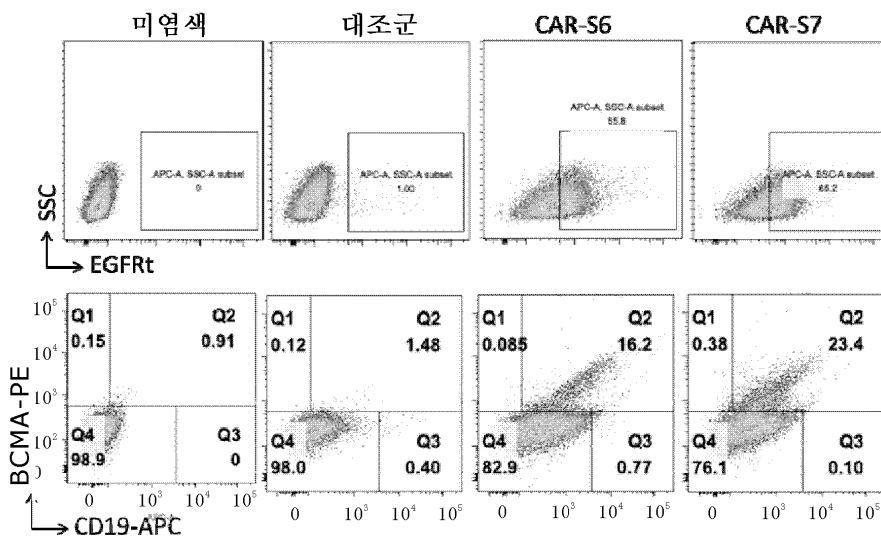
도면16



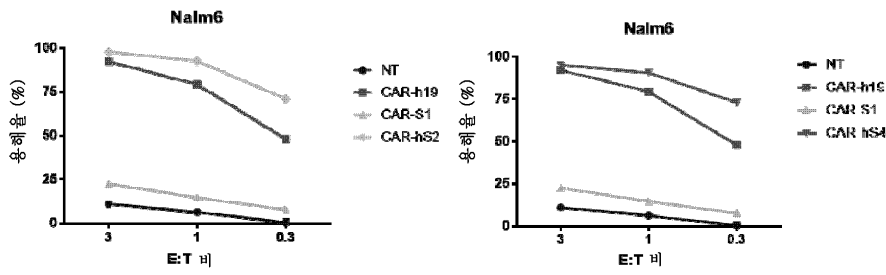
도면17



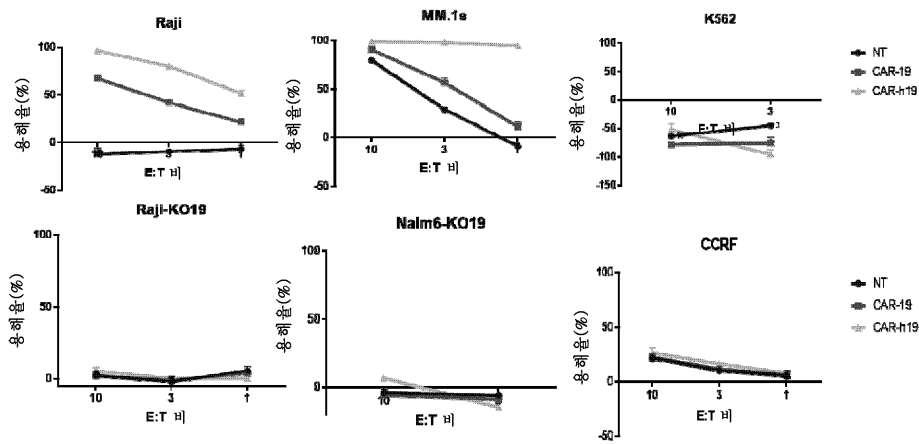
도면18



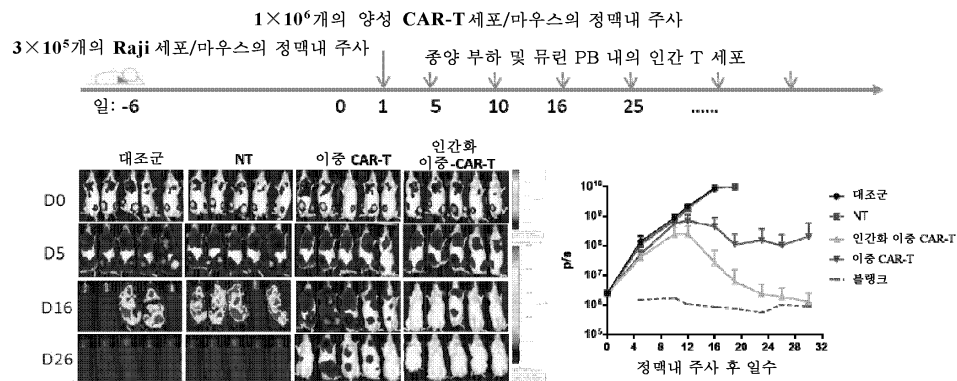
도면19



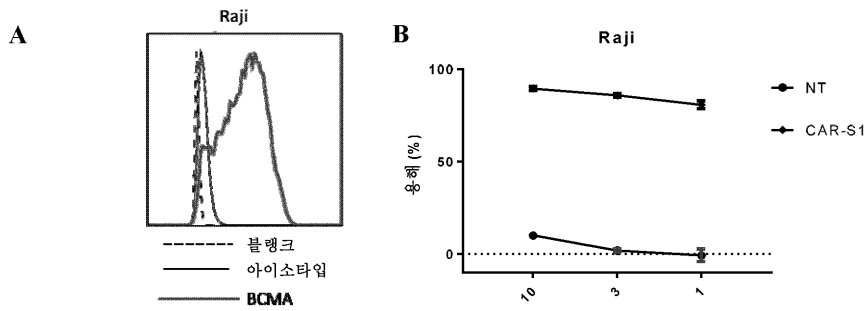
도면20



도면21



도면22



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> GRACELL BIOTECHNOLOGIES (SHANGHAI) CO., LTD.

<120> ENGINEERED IMMUNE CELL TARGETING BCMA AND USE THEREOF

<130> P2020-0671

<150> CN201910376652.8

<151> 2019-05-07

<160> 39

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GM-CSF signal peptide

<400> 1

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro

20

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 2A peptide

<400> 2

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

1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro

20

<210> 3

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3z signaling region

<400> 3

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys 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> 4

<211> 41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 signaling region

<400> 4

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> 5

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 41BB signaling region

<400> 5

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 Glu Gly Gly Cys Glu Leu

35 40

<210> 6

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD28 transmembrane region

<400> 6

Phe Trp Val Leu Val 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> 7

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD8 transmembrane region

<400> 7

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys
 20

<210> 8

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD8 hinge region

<400> 8

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
 1 5 10 15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
 20 25 30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
 35 40 45

<210> 9

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S scFv heavy chain

<400> 9

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Ala Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Ile Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Val Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Thr Arg Tyr Met Trp Glu Arg Val Thr Gly Phe Phe Asp Phe Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 10

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> S scFv light chain

<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Val
 35 40 45

Tyr Thr Thr Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Thr Tyr Lys Phe Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 11

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FMC63 scFv heavy chain

<400> 11

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

1 5 10 15
 Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30

Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> FMC63 scFv light chain

<400> 12

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr

100 105

<210> 13

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> BB scFv heavy chain

<400> 13

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 14

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> BB scFv light chain

<400> 14

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

1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe
 50 55 60
 Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala
 115 120
 <210> 15
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> April chain
 <400> 15
 Ser Val Leu His Leu Val Pro Ile Asn Ala Thr Ser Lys Asp Asp Ser
 1 5 10 15
 Asp Val Thr Glu Val Met Trp Gln Pro Ala Leu Arg Arg Gly Arg Gly
 20 25 30
 Leu Gln Ala Gln Gly Tyr Gly Val Arg Ile Gln Asp Ala Gly Val Tyr
 35 40 45
 Leu Leu Tyr Ser Gln Val Leu Phe Gln Asp Val Thr Phe Thr Met Gly
 50 55 60
 Gln Val Val Ser Arg Glu Gly Gln Gly Arg Gln Glu Thr Leu Phe Arg
 65 70 75 80
 Cys Ile Arg Ser Met Pro Ser His Pro Asp Arg Ala Tyr Asn Ser Cys
 85 90 95

Tyr Ser Ala Gly Val Phe His Leu His Gln Gly Asp Ile Leu Ser Val

100 105 110

Ile Ile Pro Arg Ala Arg Ala Lys Leu Asn Leu Ser Pro His Gly Thr

115 120 125

Phe Leu Gly Phe Val Lys Leu Ser Gly Gly Gly Ser Asp Pro

130 135 140

<210> 16

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD8 signal peptide

<400> 16

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> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> (G4S)3 linker peptide

<400> 17

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 18

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> (G4S)5 linker peptide

<400> 18

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20 25

<210> 19

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 218 linker peptide

<400> 19

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 20

<211> 335

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFRt sequence

<400> 20

Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu

1 5 10 15

Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile

20 25 30

Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe

35 40 45

Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr

50 55 60

Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn

65 70 75 80

Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg

85 90 95

Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile

100 105 110

Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val

115 120 125
 Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp

130 135 140
 Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn
 145 150 155 160

Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu
 165 170 175

Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser
 180 185 190

Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu

195 200 205
 Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln

210 215 220
 Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly

225 230 235 240
 Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro

245 250 255
 His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr

260 265 270
 Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His

275 280 285
 Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro

290 295 300
 Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala

305 310 315 320
 Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met

325 330 335

<210> 21

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD19 antibody heavy chain variable region

<400> 21

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr

 20 25 30

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

 35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys

 50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Ser Leu

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

 85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

 115 120

<210> 22

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD19 antibody heavy chain variable region

<400> 22

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr

 20 25 30

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

 35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD19 antibody heavy chain variable region

<400> 24

Gln Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30

Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 25

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD19 antibody heavy chain variable region

<400> 25

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30

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

35 40 45
 Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys

50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu

65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95
 Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 26

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD19 antibody heavy chain variable region

<400> 26

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

1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr

20 25 30
 Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45
 Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys

50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu

65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95
 Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<400> 26

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

1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr

20 25 30
 Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45
 Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys

50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu

65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95
 Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

115 120

<210> 27

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD19 antibody heavy chain variable region

<400> 27

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 28

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD19 antibody heavy chain variable region

<400> 28

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr

20 25 30
 Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 29

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD19 antibody heavy chain variable region

<400> 29

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
 20 25 30

Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

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

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 30

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD19 antibody heavy chain variable region

<400> 30

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 31

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD19 antibody light chain variable region

<400> 31

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr

 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 32

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD19 antibody light chain variable region

<400> 32

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Thr Lys Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 33

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD19 antibody light chain variable region

<400> 33

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 34

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD19 antibody light chain variable region

<400> 34

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

1

5

10

15

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

20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

<210> 35

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD19 antibody light chain variable region

<400> 35

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 36

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD19 antibody light chain variable region

<400> 36

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

 35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Thr Leu Pro Tyr

 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

 100 105

<210> 37

<211> 49

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD8 hinge region

<400> 37

Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr

1 5 10 15

Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Ser Arg Pro Ala

 20 25 30

Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Ser Asp Lys

 35 40 45

Pro

<210> 38

<211> 47

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD8 hinge region

<400> 38

Ser Gly Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr

1 5 10 15
Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala

 20 25 30
Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp

 35 40 45

<210> 39

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3z signaling region

<400> 39

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 Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
 50 55 60

Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
65 70 75 80

Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
 85 90 95

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

100

105

110

Arg