



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0100612
(43) 공개일자 2022년07월15일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 39/00</i> (2006.01) <i>A61P 35/00</i> (2006.01)
 <i>C07K 14/705</i> (2006.01) <i>C07K 14/725</i> (2006.01)
 <i>C07K 16/28</i> (2006.01) <i>C12N 5/0783</i> (2010.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 39/001111</i> (2018.08)
 <i>A61P 35/00</i> (2018.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2022-7018771
 (22) 출원일자(국제) 2020년11월04일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2022년06월02일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2020/058788
 (87) 국제공개번호 WO 2021/091945
 국제공개일자 2021년05월14일</p> <p>(30) 우선권주장
 62/931,065 2019년11월05일 미국(US)
 62/943,627 2019년12월04일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 얀센 바이오테크 인코포레이티드
 미국 펜실베이니아주 19044 호삼 릿지뷰 드라이브
 800/850</p> <p>(72) 발명자
 주다이레, 유바니, 앤리케
 미국 펜실베이니아 19477 스프링 하우스 맥킨 로드
 1400</p> <p>(74) 대리인
 특허법인한성</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 65 항

(54) 발명의 명칭 **다발성 골수종의 BCMA-표적화 CAR-T 세포 요법**

(57) 요약

암을 갖는 대상체를 치료하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 폴리펩티드를 포함하는 CAR을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR)-T 세포의 하나 이상의 용량이 대상체에게 투여된다. 펩티드는 2개 이상의 BCMA-결합 모이어티, 막관통 도메인, 및 세포내 신호전달 도메인을 갖는 세포외 항원 결합 도메인을 포함한다. 대상체에게 투여되는 CAR-T 세포의 용량은 대상체의 질량 킬로그램당 4.0×10^5 내지 1.0×10^6 개의 CAR-T 세포이다. 대안적으로, 용량은 1×10^6 내지 1×10^8 개의 CAR-T 세포를 포함한다.

(52) CPC특허분류

C07K 14/7051 (2013.01)

C07K 14/70517 (2013.01)

C07K 16/2878 (2013.01)

C12N 5/0636 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

A61K 2039/5156 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/569 (2013.01)

C07K 2319/02 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

암을 갖는 대상체를 치료하는 방법으로서,

- a) 제1 항-BCMA 결합 모이어티 및 제2 BCMA 결합 모이어티를 포함하는 세포의 항원 결합 도메인;
- b) 막관통 도메인; 및
- c) 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드를 포함하는 세포의 하나 이상의 용량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며,

임의로 여기서 세포는 CAR-T 세포인, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 세포가 주입 전에 시험관내에서 확장되는, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 세포가 T 세포, NK 세포, iPSC-NK 세포인, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 세포가 CAR-T 세포인, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 세포가 NKT 세포, iPSC-T 세포, 또는 감마-텔타 T 세포인, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 이종유래(heterologous) 또는 자가유래(autologous)인, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 용량이 대상체의 질량 킬로그램당 4.0×10^5 내지 1.0×10^6 개의 CAR-T 세포를 포함하는, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 용량이 대상체의 질량 킬로그램당 5.5×10^5 내지 8×10^5 개의 CAR-T 세포를 포함하는, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 용량이 대상체의 질량 킬로그램당 7.5×10^5 개의 CAR-T 세포를 포함하는, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 용량이 1×10^6 내지 1×10^8 개의 CAR-T 세포를 포함하는, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 용량이 2×10^7 내지 8×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함하는, 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 용량이 약 5.25×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함하는, 방법.

청구항 13

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 대상체의 질량 킬로그램당 4.0×10^5 내지 1.0×10^6 개의 CAR-T 세포를 유발하는 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 14

제1항 내지 제6항 및 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 대상체의 질량 킬로그램당 5.5×10^5 내지 8×10^5 개의 CAR-T 세포를 유발하는 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 15

제1항 내지 제6항, 제13항, 및 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 대상체의 질량 킬로그램당 약 7.5×10^5 개의 CAR-T 세포를 유발하는 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 16

제1항 내지 제7항 및 제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 대상체에서 1×10^6 내지 1×10^8 개의 CAR-T 세포를 유발하는 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 17

제1항 내지 제7항 및 제13항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 대상체에서 2×10^7 내지 8×10^7 개의 CAR-T 세포를 유발하는 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 18

제1항 내지 제7항 및 제13항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 대상체에서 약 5.25×10^7 개의 CAR-T 세포를 유발하는 용량으로 투여되는, 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, CAR-T 세포의 용량이 치료 과정 중에 1회만 투여되는, 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, CAR-T 세포의 용량이 정맥내 투여되는, 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 다발성 골수종인, 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 다발성 골수종이 불응성 다발성 골수종 또는 재발성 다발성 골수종인, 방법.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, CAR-T 세포의 용량 내의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 CD4+ CAR-T 세포의 비가 4 미만인, 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, CAR-T 세포의 용량 내의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 CD4+ CAR-T 세포의 비가 2 미만인, 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, CAR-T 세포의 용량 내의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 CD4+ CAR-T 세포의 비가 1.8 미만인, 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, CAR-T 세포의 용량 내의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 CD4+ CAR-T 세포의 비가 1.7 미만인, 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, CAR-T 세포의 용량 내의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 CD4+ CAR-T 세포의 비가 1.6 미만인, 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, CAR-T 세포의 용량 내의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 CD4+ CAR-T 세포의 비가 1.4 미만인, 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, CAR-T 세포의 용량 내의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 CD4+ CAR-T 세포의 비가 1.2 미만인, 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, CAR-T 세포의 용량 내의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 CD4+ CAR-T 세포의 비가 1.0 미만인, 방법.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, C_{max}에서의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 C_{max}에서의 CD4+ CAR-T 세포의 비가 3.5 미만인, 방법.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, C_{max}에서의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 C_{max}에서의 CD4+ CAR-T 세포의 비가 2.0 미만인, 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, C_{max}에서의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 C_{max}에서의 CD4+ CAR-T 세포의 비가 1.2 미만인, 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, C_{max}에서의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 C_{max}에서의 CD4+ CAR-T 세포의 비가 0.8 미만인, 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, C_{max}에서의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 C_{max}에서의 CD4+ CAR-T 세포의 비가 0.6 미만인, 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, C_{max}에서의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 C_{max}에서의 CD4+ CAR-T 세포의 비가 0.4 미만인, 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, C_{max}에서의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 C_{max}에서의 CD4+ CAR-T 세포의 비가 0.3 미만인, 방법.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에서 CD4+ CAR-T 세포 및/또는 CD8+ CAR-T 세포의 양을 검정하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 39

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 BCMA 결합 모이어티 및/또는 제2 BCMA 결합 모이어티가 항-BCMA sdAb인, 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 제1 BCMA 결합 모이어티가 제1 항-BCMA sdAb이고 제2 BCMA 결합 모이어티가 제2 항-BCMA sdAb인, 방법.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 BCMA 결합 모이어티가 QVKLEESGGGLVQAGRSLRLSCAASEHTFSSHVMGWFRQAPGKERESVAVIGWRDISTSYADSVKGRFTISRDNAKKTLYLQMNLSKPEDTAVYYCAARRIDAADFDSWGGTQVTVSS(서열 번호 1)의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 42

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 BCMA 결합 모이어티가 CAGGTCAAATGGAAGAATCTGGCGGAGGCCCTGGTGCAGGCAGGACGGAGCCTGCGCTGAGCTGCGCAGCATCCGAGCACACCTTCAGCTCCACGTGATGGCTGGTTTCGGCAGGCCCCAGGCAAGGAGAGAGAGAGCGTGGCCGTGATCGCTGGAGGGACATCTCCACATTTACGCCGATCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGACAACGCCAAGAAGACTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAAGCCCGAGGACACCGCCGTACTATTGCGCAGCAAGGAGAATCGACGCAGCAGACTTTGATTCTGGGGCCAGGGCACCCAGGTGACAGTGTCTAGC(서열 번호 2)의 핵산 서열에 의해 인코딩되는 폴리펩티드를 포함하는, 방법.

청구항 43

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 BCMA 결합 모이어티가 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTTMGWFRQAPGKEREFVAAISLSPTLAYYAESVKGRFTISRDNAKNTVVLQMNLSKPEDTALYYCAADRKSVMVSIKPDYWGQGTQVTVSS(서열 번호 3)의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 44

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 BCMA 결합 모이어티가 GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGCGGCCCTGGTGCAGGCCGAGGCTCTCTGAGGCTGAGCTGTGCAGCATCCGGAAGAACCTTCAATGGGCTGGTTTAGGCAGGCACCAGGAAAGGAGAGGGAGTTTCGTGGCAGCAATCAGCCTGTCCCTACCCTGGCCTACTATGCCGAGAGCGTGAAGGGCAGGTTTACCATCTCCGCGATAACGCCAAGAATACAGTGGTGTGCAGATGAACTCCCTGAAACCTGAGGACACAGCCCTGTACTATTGTGCCCGCATCGGAAGAGCGTGATGAGCATTAGACCAGACTATTGGGGCAGGGAACACAGGTGACCGTGAGCAGC(서열 번호 4)의 핵산 서열에 의해 인코딩되는 폴리펩티드를 포함하는, 방법.

청구항 45

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 BCMA 결합 모이어티 및 제2 BCMA 결합 모이어티가 펩티드 링커를 통해 서로에게 연결되는, 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 펩티드 링커가 GGGGS(서열 번호 5)의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 47

제1항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, CAR 폴리펩티드가 폴리펩티드의 N-말단에 위치하는 신호 펩티드를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 신호 펩티드가 CD8 a로부터 유래되는, 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 신호 펩티드가 MALPVTALLLPLALLLHAARP(서열 번호 6)의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 50

제48항에 있어서, 신호 펩티드가

ATGGCTCTGCCGTCACCGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCACGCTGCTGCCCT(서열 번호 7)의 핵산 서열에 의해 인코딩되는 폴리펩티드를 포함하는, 방법.

청구항 51

제1항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC(서열 번호 8)의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 52

제1항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 막관통 도메인이 ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGC(서열 번호 9)의 핵산 서열에 의해 인코딩되는 폴리펩티드를 포함하는, 방법.

청구항 53

제1항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인이 면역 이펙터 세포의 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함하는, 방법.

청구항 54

제1항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인이 CD3 ζ로부터 유래되는, 방법.

청구항 55

제1항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인이 하나 이상의 공동-자극(co-stimulatory) 신호전달 도메인을 포함하는, 방법.

청구항 56

제55항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인이 RVKFSRSADAPAYQQGNQLYLNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR(서열 번호 10)의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 57

제55항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인이 AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGTACCAGCAGGGCCAGAACCGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGCAAGGGCCACGATGGCCCTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTGCTAA(서열 번호 11)의 핵산 서열에 의해 인코딩되는 폴리펩티드를 포함하는, 방법.

청구항 58

제55항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인이 KRGRKLLYIFKQPMRVPQTTQEEDGCSRFPEEEEGGCEL(서열 번호 12)의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 59

제55항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인이 AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATCAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG(서열 번호 13)의 핵산 서열에 의해 인코딩되는 폴리펩티드를 포함하는, 방법.

청구항 60

제1항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, CAR 폴리펩티드가 세포의 항원 결합 도메인의 C-말단과 막관통 도메인의 N-말단 사이에 위치하는 힌지(hinge) 도메인을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 61

제60항에 있어서, 힌지 도메인이 TTPAPRPPTPTPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD(서열 번호 15)의 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 62

제60항에 있어서, 힌지 도메인이 ACCACGACGCCAGCGCCGACCACCAACACCGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCTGTCCCTGCGCCAGAGCGGTGCCGCCAGCGGGGGGCGCATGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCTGTGAT(서열 번호 14)의 핵산 서열에 의해 인코딩되는 폴리펩티드를 포함하는, 방법.

청구항 63

제1항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포가 자가유래 T 세포인, 방법.

청구항 64

제1항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포가 동종이계(allogeneic) T 세포인, 방법.

청구항 65

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 인간인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원과의 상호 참조

[0002] 본 출원은 2019년 11월 5일자로 출원된 미국 가특허 출원 제62/931,065호, 및 2019년 12월 4일자로 출원된 제 62/943,627호에 대한 우선권을 주장하며, 이들 둘 모두는 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본 출원은 ASCII 서식으로 전자적으로 제출된 서열 목록을 포함하며, 이는 본 명세서에 전체적으로 참고로 포함된다. 2020년 10월 30일자로 생성된 상기 ASCII 카피는 파일명이 253505_000091_SL.txt 이고 크기가 9,516 바이트이다.

배경 기술

[0005] 다발성 골수종은 공격적인 형질 세포의 신생물이다. 다발성 골수종은 골수에서 제거가능하지 않게 증식하는 B-세포 신생물인 것으로 간주된다. 증상은 고칼슘혈증, 신부전, 빈혈, 골 병변, 박테리아 감염, 과점도, 및 아밀로이드증 중 하나 이상을 포함한다. 프로테아좀 억제제, 면역조절 약물, 및 유의하게 개선된 환자 결과를 갖는 단일클론 항체를 포함하는 새로운 요법에도 불구하고, 다발성 골수종은 여전히 불치의 질환이다. 대부분의 환자가 재발하거나 치료에 대해 불응성이 될 것이므로, 다발성 골수종에 대한 새로운 요법에 대한 지속적인 필요성이 있다.

발명의 내용

[0006] 다발성 골수종을 치료하기 위한 개선된 요법이 본 명세서에 제공된다.

[0007] 일 태양에는, 암을 갖는 대상체를 치료하는 방법으로서,

[0008] a) 제1 항-BCMA 결합 모이어티 및 제2 BCMA 결합 모이어티를 포함하는 세포의 항원 결합 도메인;

[0009] b) 막관통 도메인; 및

[0010] c) 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체(CAR) 폴리펩티드를 포함하는 세포의 하나 이상의 용

량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

- [0011] 일부 실시 형태에서, 세포는 주입 전에 시험관내에서 확장된다. 일부 실시 형태에서, 세포는 T 세포, NK 세포, iPSC-NK 세포이다. 일부 실시 형태에서, 세포는 CAR-T 세포이다. 일부 실시 형태에서, 세포는 NKT 세포, iPSC-T 세포, 또는 감마-델타 T 세포이다. 일부 실시 형태에서, 세포는 이종유래(heterologous) 또는 자가유래 (autologous)이다.
- [0012] 일부 실시 형태에서, 용량은 대상체의 질량 킬로그램당 4.0×10^5 내지 1.0×10^6 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 용량은 대상체의 질량 킬로그램당 4.0×10^5 내지 1.0×10^6 개의 생존가능 CAR-T 세포를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 용량은 대상체의 질량 킬로그램당 4.0×10^5 내지 6.0×10^5 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 용량은 대상체의 질량 킬로그램당 5.0×10^5 내지 7.0×10^5 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 용량은 대상체의 질량 킬로그램당 5.5×10^5 내지 6.0×10^5 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 용량은 대상체의 질량 킬로그램당 6.0×10^5 내지 8.0×10^5 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 용량은 대상체의 질량 킬로그램당 7.0×10^5 내지 9.0×10^5 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 용량은 대상체의 질량 킬로그램당 8.0×10^5 내지 1.0×10^6 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 용량은 대상체의 질량 킬로그램당 약 5.0×10^5 , 약 6.0×10^5 , 약 7.0×10^5 , 약 8.0×10^5 , 약 9.0×10^5 , 또는 약 1.0×10^6 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 용량은 대상체의 질량 킬로그램당 약 7.1×10^5 , 약 7.2×10^5 , 약 7.3×10^5 , 약 7.4×10^5 , 약 7.5×10^6 , 약 7.6×10^6 , 약 7.7×10^6 , 약 7.8×10^6 , 또는 약 7.9×10^6 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 일 실시 형태에서, 용량은 대상체의 질량 킬로그램당 약 7.5×10^5 개의 CAR-T 세포를 포함한다.
- [0013] 일부 실시 형태에서, 용량은 1×10^6 내지 1×10^8 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 용량은 1×10^6 내지 5×10^6 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 용량은 4×10^6 내지 1.5×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 용량은 1×10^7 내지 2.5×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 용량은 2×10^7 내지 4×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 용량은 3×10^7 내지 5×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 용량은 4×10^7 내지 6×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 용량은 5×10^7 내지 7×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 용량은 6×10^7 내지 8×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 용량은 7×10^7 내지 9×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 용량은 8×10^7 내지 1×10^8 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 용량은 2×10^7 내지 8×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 용량은 약 1×10^7 , 약 2×10^7 , 약 3×10^7 , 약 4×10^7 , 약 5×10^7 , 약 6×10^7 , 약 7×10^7 , 약 8×10^7 , 약 9×10^7 , 또는 약 1×10^8 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 용량은 약 5.1×10^7 , 약 5.2×10^7 , 약 5.25×10^7 , 약 5.3×10^7 , 약 5.4×10^7 , 약 5.5×10^7 , 약 5.6×10^7 , 약 5.7×10^7 , 약 5.8×10^7 , 또는 약 5.9×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 일 실시 형태에서, 용량은 약 5.25×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다.
- [0014] 일부 실시 형태에서, 세포는 대상체의 질량 킬로그램당 4.0×10^5 내지 1.0×10^6 개의 CAR-T 세포를 유발하는 용량으로 투여된다. 일부 실시 형태에서, 세포는 대상체의 질량 킬로그램당 4.0×10^5 내지 1.0×10^6 개의 생존가능 CAR-T 세포를 유발하는 용량으로 투여된다. 일부 실시 형태에서, 세포는 대상체의 질량 킬로그램당 4.0×10^5 내지 6.0×10^5 개의 CAR-T 세포를 유발하는 용량으로 투여된다. 일부 실시 형태에서, 세포는 대상체의 질량 킬로그램당 5.0×10^5 내지 7.0×10^5 개의 CAR-T 세포를 유발하는 용량으로 투여된다. 일부 실시 형태에서, 세포는 대상체의 질량 킬로그램당 5.5×10^5 내지 6.0×10^5 개의 CAR-T 세포를 유발하는 용량으로 투여된다. 일

부 실시 형태에서, 세포는 대상체의 질량 킬로그램당 6.0×10^5 내지 8.0×10^5 개의 CAR-T 세포를 유발하는 용량으로 투여된다. 일부 실시 형태에서, 세포는 대상체의 질량 킬로그램당 7.0×10^5 내지 9.0×10^5 개의 CAR-T 세포를 유발하는 용량으로 투여된다. 일부 실시 형태에서, 세포는 대상체의 질량 킬로그램당 8.0×10^5 내지 1.0×10^6 개의 CAR-T 세포를 유발하는 용량으로 투여된다. 일부 실시 형태에서, 세포는 대상체의 질량 킬로그램당 약 5.0×10^5 , 약 6.0×10^5 , 약 7.0×10^5 , 약 8.0×10^5 , 약 9.0×10^5 , 또는 약 1.0×10^6 개의 CAR-T 세포를 유발하는 용량으로 투여된다. 일부 실시 형태에서, 세포는 대상체의 질량 킬로그램당 약 7.1×10^5 , 약 7.2×10^5 , 약 7.3×10^5 , 약 7.4×10^5 , 약 7.5×10^5 , 약 7.6×10^5 , 약 7.7×10^5 , 약 7.8×10^5 , 또는 약 7.9×10^5 개의 CAR-T 세포를 유발하는 용량으로 투여된다. 일 실시 형태에서, 세포는 대상체의 질량 킬로그램당 약 7.5×10^5 개의 CAR-T 세포를 유발하는 용량으로 투여된다.

[0015] 일부 실시 형태에서, 세포는 대상체에서 1×10^6 내지 1×10^8 개의 CAR-T 세포를 유발하는 용량으로 투여된다. 일부 실시 형태에서, 세포는 대상체에서 1×10^6 내지 5×10^6 개의 CAR-T 세포를 유발하는 용량으로 투여된다. 일부 실시 형태에서, 세포는 대상체에서 4×10^6 내지 1.5×10^7 개의 CAR-T 세포를 유발하는 용량으로 투여된다. 일부 실시 형태에서, 세포는 대상체에서 1×10^7 내지 2.5×10^7 개의 CAR-T 세포를 유발하는 용량으로 투여된다. 일부 실시 형태에서, 세포는 대상체에서 2×10^7 내지 4×10^7 개의 CAR-T 세포를 유발하는 용량으로 투여된다. 일부 실시 형태에서, 세포는 대상체에서 3×10^7 내지 5×10^7 개의 CAR-T 세포를 유발하는 용량으로 투여된다. 일부 실시 형태에서, 세포는 대상체에서 4×10^7 내지 6×10^7 개의 CAR-T 세포를 유발하는 용량으로 투여된다. 일부 실시 형태에서, 세포는 대상체에서 5×10^7 내지 7×10^7 개의 CAR-T 세포를 유발하는 용량으로 투여된다. 일부 실시 형태에서, 세포는 대상체에서 6×10^7 내지 8×10^7 개의 CAR-T 세포를 유발하는 용량으로 투여된다. 일부 실시 형태에서, 세포는 대상체에서 7×10^7 내지 9×10^7 개의 CAR-T 세포를 유발하는 용량으로 투여된다. 일부 실시 형태에서, 세포는 대상체에서 8×10^7 내지 1×10^8 개의 CAR-T 세포를 유발하는 용량으로 투여된다. 일부 실시 형태에서, 세포는 대상체에서 2×10^7 내지 8×10^7 개의 CAR-T 세포를 유발하는 용량으로 투여된다. 일부 실시 형태에서, 세포는 대상체에서 약 1×10^7 , 약 2×10^7 , 약 3×10^7 , 약 4×10^7 , 약 5×10^7 , 약 6×10^7 , 약 7×10^7 , 약 8×10^7 , 약 9×10^7 , 또는 약 1×10^8 개의 CAR-T 세포를 유발하는 용량으로 투여된다. 일부 실시 형태에서, 세포는 대상체에서 약 5.1×10^7 , 약 5.2×10^7 , 약 5.25×10^7 , 약 5.3×10^7 , 약 5.4×10^7 , 약 5.5×10^7 , 약 5.6×10^7 , 약 5.7×10^7 , 약 5.8×10^7 , 또는 약 5.9×10^7 개의 CAR-T 세포를 유발하는 용량으로 투여된다. 일 실시 형태에서, 세포는 대상체에서 약 5.25×10^7 개의 CAR-T 세포를 유발하는 용량으로 투여된다.

[0016] 일부 실시 형태에서, CAR-T 세포의 용량은 치료 과정 중에 1회만 투여된다. 일부 실시 형태에서, CAR-T 세포의 용량은 정맥내로 투여된다. 다양한 실시 형태에서, 암은 다발성 골수종이다. 소정 실시 형태에서, 다발성 골수종은 불응성 다발성 골수종 또는 재발성 다발성 골수종이다.

[0017] 다양한 실시 형태에서, CAR-T 세포의 용량 내의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 CD4+ CAR-T 세포의 비는 4 미만이다. 일부 실시 형태에서, CAR-T 세포의 용량 내의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 CD4+ CAR-T 세포의 비는 2 미만이다. 일부 실시 형태에서, CAR-T 세포의 용량 내의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 CD4+ CAR-T 세포의 비는 1.8 미만이다. 일부 실시 형태에서, CAR-T 세포의 용량 내의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 CD4+ CAR-T 세포의 비는 1.7 미만이다. 일부 실시 형태에서, CAR-T 세포의 용량 내의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 CD4+ CAR-T 세포의 비는 1.6 미만이다. 일부 실시 형태에서, CAR-T 세포의 용량 내의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 CD4+ CAR-T 세포의 비는 1.4 미만이다. 일부 실시 형태에서, CAR-T 세포의 용량 내의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 CD4+ CAR-T 세포의 비는 1.2 미만이다. 일부 실시 형태에서, CAR-T 세포의 용량 내의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 CD4+ CAR-T 세포의 비는 1.0 미만이다.

[0018] 일부 실시 형태에서, 이펙터 기억 CAR+ T 세포는 CAR-T 세포의 용량 내의 CAR+ T 세포의 총량의 20% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 이펙터 기억 CAR+ T 세포는 CAR-T 세포의 용량 내의 CAR+ T 세포의 총량의 25%

이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 이펙터 기억 CAR+ T 세포는 CAR-T 세포의 용량 내의 CAR+ T 세포의 총량의 30% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 이펙터 기억 CAR+ T 세포는 CAR-T 세포의 용량 내의 CAR+ T 세포의 총량의 35% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 이펙터 기억 CAR+ T 세포는 CAR-T 세포의 용량 내의 CAR+ T 세포의 총량의 40% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 중심 기억 CAR+ T 세포는 CAR-T 세포의 용량 내의 CAR+ T 세포의 총량의 3% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 중심 기억 CAR+ T 세포는 CAR-T 세포의 용량 내의 CAR+ T 세포의 총량의 5% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 중심 기억 CAR+ T 세포는 CAR-T 세포의 용량 내의 CAR+ T 세포의 총량의 6% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 중심 기억 CAR+ T 세포는 CAR-T 세포의 용량 내의 CAR+ T 세포의 총량의 10% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 중심 기억 CAR+ T 세포는 CAR-T 세포의 용량 내의 CAR+ T 세포의 총량의 15% 이상을 차지한다.

- [0019] 상기 방법의 다양한 실시 형태에서, Cmax에서의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 Cmax에서의 CD4+ CAR-T 세포의 비는 3.5 미만이다. 일부 실시 형태에서, Cmax에서의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 Cmax에서의 CD4+ CAR-T 세포의 비는 2.0 미만이다. 일부 실시 형태에서, Cmax에서의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 Cmax에서의 CD4+ CAR-T 세포의 비는 1.2 미만이다. 일부 실시 형태에서, Cmax에서의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 Cmax에서의 CD4+ CAR-T 세포의 비는 0.8 미만이다. 일부 실시 형태에서, Cmax에서의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 Cmax에서의 CD4+ CAR-T 세포의 비는 0.6 미만이다. 일부 실시 형태에서, Cmax에서의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 Cmax에서의 CD4+ CAR-T 세포의 비는 0.4 미만이다. 일부 실시 형태에서, Cmax에서의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 Cmax에서의 CD4+ CAR-T 세포의 비는 0.3 미만이다.
- [0020] 상기의 다양한 실시 형태에서, 본 방법은 대상체에서 CD4+ CAR-T 세포 및/또는 CD8+ CAR-T 세포의 양을 검정하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0021] 상기 방법의 다양한 실시 형태에서, 용량이 투여된 후에 중심 기억 CAR+ T 세포는 CAR+ T 세포의 총량의 75% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 용량이 투여된 후에 중심 기억 CAR+ T 세포는 CAR+ T 세포의 총량의 80% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 용량이 투여된 후에 중심 기억 CAR+ T 세포는 CAR+ T 세포의 총량의 85% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 용량이 투여된 후에 중심 기억 CAR+ T 세포는 CAR+ T 세포의 총량의 90% 이상을 차지한다.
- [0022] 상기 방법의 다양한 실시 형태에서, 본 방법은 용량이 투여된 후에 대상체에서 CAR+ T 세포의 총량에 대한 중심 기억 CAR+ T 세포의 비를 검정하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0023] 상기 방법의 다양한 실시 형태에서, 용량이 투여된 후에 이펙터 기억 CAR+ T 세포는 CAR+ T 세포의 총량의 2% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 용량이 투여된 후에 이펙터 기억 CAR+ T 세포는 CAR+ T 세포의 총량의 3% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 용량이 투여된 후에 중심 기억 CAR+ T 세포는 CAR+ T 세포의 총량의 5% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 용량이 투여된 후에 중심 기억 CAR+ T 세포는 CAR+ T 세포의 총량의 8% 이상을 차지한다.
- [0024] 상기 방법의 다양한 실시 형태에서, 본 방법은 용량이 투여된 후에 대상체에서 CAR+ T 세포의 총량에 대한 이펙터 기억 CAR+ T 세포의 비를 검정하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0025] 상기 방법의 다양한 실시 형태에서, 용량이 투여된 후에 Cmax에서의 대상체에서 중심 기억 CAR+ CD8+ T 세포는 CAR+ CD8+ T 세포의 총량의 30% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 용량이 투여된 후에 Cmax에서의 대상체에서 중심 기억 CAR+ CD8+ T 세포는 CAR+ CD8+ T 세포의 총량의 50% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 용량이 투여된 후에 Cmax에서의 대상체에서 중심 기억 CAR+ CD8+ T 세포는 CAR+ CD8+ T 세포의 총량의 70% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 중심 기억 CAR+ CD8+ T 세포는 CAR+ CD8+ T 세포의 총량의 80% 이상을 차지한다.
- [0026] 일부 실시 형태에서, 본 방법은 용량이 투여된 후에 Cmax에서의 대상체에서 CAR+ CD8+ T 세포의 총량에 대한 중심 기억 CAR+ CD8+ T 세포의 비를 검정하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0027] 일부 실시 형태에서, 이펙터 기억 CAR+ CD8+ T 세포는 CAR+ CD8+ T 세포의 총량의 2% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 이펙터 기억 CAR+ CD8+ T 세포는 CAR+ CD8+ T 세포의 총량의 5% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 이펙터 기억 CAR+ CD8+ T 세포는 CAR+ CD8+ T 세포의 총량의 8% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 이펙터 기억 CAR+ CD8+ T 세포는 CAR+ CD8+ T 세포의 총량의 10% 이상을 차지한다.
- [0028] 상기 방법의 다양한 실시 형태에서, 본 방법은 용량이 투여된 후에 Cmax에서의 대상체에서 CAR+ CD8+ T 세포의

ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCAGTGGTTATCACCCCTTACTGC(서열 번호 9)의 핵산 서열에 의해 인코딩되는 폴리펩티드를 포함한다.

[0039] 일부 실시 형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 면역 이펙터 세포의 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 ζ 로부터 유래한다. 일부 실시 형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 하나 이상의 공동-자극(co-stimulatory) 신호전달 도메인을 포함한다. 소정 실시 형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 RVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRKGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQUALPPR(서열 번호 10)의 아미노산 서열을 포함한다.

[0040] 소정 실시 형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTT TTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCG GAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGCGAGCGCCGGAGGGCAAGGGGCAGATGGCCCTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGAC GCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCTCGCTAA(서열 번호 11)의 핵산 서열에 의해 인코딩되는 폴리펩티드를 포함한다. 소정 실시 형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSFRPEEEEGGCEL(서열 번호 12)의 아미노산 서열을 포함한다. 소정 실시 형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATCAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAA GAAGAAGAAGGAGATGTGAACTG(서열 번호 13)의 핵산 서열에 의해 인코딩되는 폴리펩티드를 포함한다.

[0041] 일부 실시 형태에서, CAR 폴리펩티드는 세포의 항원 결합 도메인의 C-말단과 막관통 도메인의 N-말단 사이에 위치하는 힌지(hinge) 도메인을 추가로 포함한다. 소정 실시 형태에서, 힌지 도메인은 TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD(서열 번호 15)의 아미노산 서열을 포함한다. 소정 실시 형태에서, 힌지 도메인은 ACCACGACGCCAGCGCCGACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGACGCCCTGTCCCTGCGCCAGAGCGGTGCCGCCAGCGCGGGGGCGCA GTGCACACGAGGGGCTGGACTTCGCTGTGAT(서열 번호 14)의 핵산 서열에 의해 인코딩되는 폴리펩티드를 포함한다.

[0042] 다양한 실시 형태에서, T 세포는 자가유래 T 세포이다. 일부 실시 형태에서, T 세포는 동종이계(allogeneic) T 세포이다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 인간이다.

도면의 간단한 설명

[0043] **도 1**은 배 중심(GC), 림프절 내의 기억 및 형질아세포, 골수 LN 및 MALT 내의 장수 형질 세포, 및 다발성 골수종 세포의 표면 상의 BCMA 항원의 발현을 나타낸다. BAFF-R 항원은 형질아세포, 장수 형질 세포, 또는 다발성 골수종 세포 상에서 발현되지 않는다. TACI는 기억 및 형질아세포, 장수 형질 세포, 및 다발성 골수종 세포 상에서 발현된다. CD138은 장수 형질 세포 및 다발성 골수종 세포 상에서만 발현된다.

도 2a는 LCAR-B38M CAR의 설계를 나타낸다. LCAR-B38M은, 다양한 다른 CAR 상에서 발견되는 단일 VL 도메인 및 단일 VH 도메인과는 반대로, 링커를 통해 연결된 2개의 VHH 도메인을 포함한다. LCAR-B38M은 세포내 CD137 및 인간 CD3 ζ 도메인을 포함한다. **도 2b**는 LCAR-B38M CAR을 인코딩하는 바이러스의 제조, 환자로부터의 T 세포 내로의 바이러스의 형질도입, 및 이어서 LCAR-B38M을 발현하는 CAR T 세포의 제조를 위한 개략도를 나타낸다.

도 3은 LCAR-B38M CAR T-세포(LCAR-B38M)에 대한 MMY2001 연구 설계의 개략도를 나타낸다. 환자 집단은 프로테아좀 억제제(PI)/면역조절 약물(IMiD) 및 이전의 PI, IMiD, α CD38 노출에 대한 3개의 이전 라인 또는 이중 불응성을 갖는 재발성 또는 불응성 다발성 골수종을 갖는 사람들을 포함한다. 1차 목적은 권장되는 II상 용량(RP2D)의 안전성 및 확립, 예컨대 유해 사건의 발생률 및 중증도의 연구이다(1b상). 다른 1차 목적은 효능이다: 국제 골수종 작업 그룹(IMWG)에 의해 정의된 바와 같은 전체 반응률(ORR) - 부분 반응(PR) 이상(2상). 하기는 2차 목적이다: 유해 사건의 발생률 및 중증도(2상), 면역원성의 평가, 치료-후 PRO 및 건강-관련 삶의 질(HRQoL) 평가, 약동학(PK) 및 약력학(PD)의 특성화, 및 임의의 추가의 효능 특성화.

도 4는 도 3에 기재된 MMY2001 연구에서의 임상 반응을 요약한다. 연구에서 개별 환자로부터의 결과를, 치료 간격 및 나타난 사건과 함께 차트에 나타낸다.

도 5a 및 도 5b는 제28일, 제56일, 제184일, 및 제365일 각각에서의 연구 환자의 예비 최소 잔류 질환(MRD) 상태를 요약한다. 굵은체로 된 항목은 음성 MRD 상태이고, 박스로 된 항목은 양성 MRD 상태이고, "indet."는 불

명확한 MRD 상태를 나타낸다. NGS는 ClonoSeq 차세대 서열분석을 지칭하고, F는 유세포 분석을 지칭한다.

도 6은 연구 MMY2001에서 CAR-T 세포 요법에 대한 중개 연구를 요약한다.

도 7은 MMY2001 연구에서 수행된 다양한 바이오마커 평가를 요약한다.

도 8a는 MMY2001 연구에서 각각의 환자에 대해 마이크로그램 gDNA당 이식유전자 카피의 수에 대한 qPCR 검정의 결과를 나타내는 그래프이다. C_{max} 및 확장의 피크 시간(T_{max})은 그래프로부터 확인될 수 있다. C_{max} 는 환자들 사이에 고도로 가변적인 반면에, T_{max} 는 환자들 사이에 일관적이다. 개방 도트는 8 주 이상의 추적조사를 갖는 16명의 환자 중 11명에서 CAR+ T 세포의 수가 정량 하한(LLOQ)(5개의 세포/ μ l; 범위 2 내지 7개) 미만임을 나타낸다.

도 8b는 MMY2001 연구에서 각각의 환자에 대해 총 T 세포 중의 CD3 CAR+ T 세포의 백분율에 대한 유세포 분석 검정의 결과를 나타내는 그래프이다. C_{max} 및 확장의 피크 시간(T_{max})은 그래프로부터 확인될 수 있다. C_{max} 는 환자들 사이에 고도로 가변적인 반면에, T_{max} 는 환자들 사이에 일관적이다. 개방 도트는 8 주 이상의 추적조사를 갖는 16명의 환자 중 11명에서 CAR+ T 세포의 수가 LLOQ(5개의 세포/ μ l; 범위 2 내지 7개) 미만임을 나타낸다.

도 8c는 MMY2001 연구에서 각각의 환자에 대해 마이크로리터당 CAR+ CD3 T 세포의 수를 나타내는 유세포 분석 검정의 결과를 나타내는 그래프이다. C_{max} 및 확장의 피크 시간(T_{max})은 그래프로부터 확인될 수 있다. C_{max} 는 환자들 사이에 고도로 가변적인 반면에, T_{max} 는 환자들 사이에 일관적이다. 개방 도트는 8 주 이상의 추적조사를 갖는 16명의 환자 중 11명에서 CAR+ T 세포의 수가 LLOQ(5개의 세포/ μ l; 범위 2 내지 7개) 미만임을 나타낸다.

도 9a는 bb2121 CAR-T 확장 및 지속성이 용량-의존적임을 나타내는 검정의 결과를 나타낸다. 5.0×10^7 개의 세포는 2 개월 후에 LLOQ를 초과하여 지속되지 않았다. 1.50×10^8 내지 8.00×10^8 개의 세포에 의해 더 큰 지속성이 관찰되었다.

도 9b는 5.25×10^7 개의 세포에서의 LCAR-B38M 지속성의 검정 결과를 나타내며, 이는 0.75×10^6 개의 CAR-양성 생존가능 T 세포/kg에 상응한다. 지속성은 **도 9a**의 bb2121 검정에서 5.0×10^7 개의 세포에 의해 나타난 것과 유사하다.

도 10a 및 도 10b는 CAR-T 세포 확장의 지속성 대 지표를 나타내는 그래프이다. **도 10a**의 그래프의 X-축은 T 세포의 백분율로서의 CAR+ T 세포의 검정의 C_{max} 를 나타낸다. **도 10b**의 그래프의 X-축은 gDNA의 마이크로그램당 이식유전자 카피의 검정의 C_{max} 를 나타낸다. CAR-T 세포 확장의 정도는 지속성을 예측하지 않는다.

도 11a는 bb2121 CAR-T 요법에 대한 반응자 및 무반응자의 C_{max} (계놈 DNA의 마이크로그램당 벡터 이식유전자 카피에 의해 결정된 바와 같음)를 플롯팅하는 그래프이다. bb2121에 대한 반응과 C_{max} 사이의 관계를 알 수 있다.

도 11b는 LCAR-B38M CAR-T 요법에 대한 다양한 부류의 반응자(SD, PR, VGPR, CR, 및 sCR)의 C_{max} (qPCR 및 유세포 분석 검정 둘 모두에 의해 결정된 바와 같음)를 플롯팅하는 그래프를 예시한다. bb2121과는 달리, 임상 반응과 C_{max} 또는 지속성 중 어느 하나 사이에 상관관계가 없다.

도 11c는 이중 양성(DP) CD4/CD8 비 대 카피/마이크로그램 DNA를 플롯팅하는 그래프이다. **도 11d**는 C_{max} 에서의 백분율 CD3 대 DP CD4/CD8 비를 플롯팅하는 그래프이다. DP CD4/CD8 비는 확장과 상관관계가 없다.

도 12는 C_{max} 에서의 백분율 CD3 대 종양 부담을 플롯팅하는 그래프를 나타낸다. 결과는 종양 부담이 LCAR-B38M 확장(C_{max})과 상관관계가 없음을 나타낸다.

도 13a는 C_{max} 에서의 마이크로리터당 CD3 세포의 농도 대 종양 부담을 플롯팅하는 그래프를 나타낸다. 결과는 종양 부담이 LCAR-B38M 확장(C_{max})과 상관관계가 없음을 나타낸다.

도 13b는 C_{max} 에서의 gDNA의 마이크로그램당 이식유전자의 카피 대 종양 부담을 플롯팅하는 그래프를 나타낸다. 결과는 종양 부담이 C_{max} 에 의해 나타나는 바와 같은 LCAR-B38M 확장과 상관관계가 없음을 나타낸다.

도 14a는 피크 CAR T-세포 확장에서의 CD4:CD8 비(Y-축) 대 bb2121 최종 세포 생성물 내의 CD4:CD8 비(X-축)를 나타내는 그래프이다. 최종 bb2121 CAR+ T-세포 생성물은 가변 비율의 CAR+ CD4 및 CD8 T 세포로

구성되었으며, 중위값은 85%(범위, 42 내지 98)의 CAR+ CD4+ T 세포 및 13%(범위, 2 내지 47)의 CAR+ CD8+ T 세포였다. DP 세포 내의 CD4:CD8 비는 6.54이다. 최종 생성물 내의 CAR+ CD4:CD8 T-세포 비와 피크 확장에서 관찰된 것 사이에 상관관계가 관찰되었다.

도 14b는 피크 CAR T-세포 확장에서의 CD4:CD8 비(Y-축) 대 DP CART+ 생성물 내의 CD4:CD8 비(X-축)를 나타내는 그래프이다. DP 세포 내의 중위 CD4:CD8 비는 1.54이다. Cmax에서의 세포에서의 중위값 CD4:CD8 비는 0.35이다.

도 15는 주입 전 및 후 소정의 날(제0일)에 MMY2001 연구에서 다양한 환자에서의 LCAR-B38M에 대한 CD4:CD8 비를 나타내는 그래프이다. 대부분의 환자에서, CD4:CD8 비는 피크 확장에서 1 미만이었다.

도 16a 내지 도 16c는 골수에서의 확장의 피크에서 LCAR-B38M이 CD8 CAR+ T 세포에 풍부함을 나타낸다. **도 16a**는 말초 혈액에서 CART Cmax에서의 CD4/CD8 비 대 DP CART+에서의 CD4/CD8 비를 나타내는 그래프이다. **도 16b**는 골수에서 CART Cmax에서의 CD4/CD8 비 대 DP CART+에서의 CD4/CD8 비를 나타내는 그래프이다. **도 16c**는 제 28일(피크 확장)에 말초 혈액 내의 CD4/CD8 비 대 골수에서의 것 사이의 상관관계를 나타내는 그래프이다.

도 17는 다양한 T 세포 분화 상태에서 표현형의 변화를 나타낸다: 미접촉, 줄기 기억(Tscm), 중심 기억(Tcm), 이펙터 기억(Tem), 이펙터(Teff), 및 이펙터 기억 RA(Temra). T 세포 활성화 및 분화는 당분해에 대한 증가된 의존 및 증가된 미토콘드리아 막 전위와 상관관계가 있으며, 이들 둘 모두는 암에 반응하여 T 세포의 이펙터 기능을 매개할 수 있다. 이미지는 문헌[Kiston, R.J. et al., Cell Metabolism, 2017, 26(1):94-109] 제공이다.

도 18는 LCAR-B38M CAR-T에 대한 T 세포 서브세트 각각에 대한 표현형 마커를 나타낸다. 줄기 기억 세포(Tscm)는 CCR7+, CD45RO-, 및 CD95+이다. 중심 기억 세포(Tcm)는 CCR7+ 및 CD45RO+이다.

도 19는 주입 전 제-57일 및 제-7일에, 그리고 MMY2001 CAR-T 세포의 주입-후 제14일, 제21일, 제28일, 및 제 56일에, 환자 세포(MMY2001에서의) 연구의 표현형 특성화 결과를 나타낸다. CAR-T+ 및 CAR-T- 세포 둘 모두의 표현형을 제14일, 제21일, 제28일, 및 제56일에 특성화하였다. CAR-T+ 세포는 CAR-T- 세포에 비교하여 중심 기억 세포(Tcm)에 대해 실질적으로 더 풍부하다는 것이 명백하다. 제21일 내지 제28일 및 제56일에, CAR-T+ 세포는 Tcm 세포와 비교하여 줄기 기억 세포(Tscm)에 대해 더 풍부해진다.

도 20a는 Cmax에서의 MMY2001 연구에서 다양한 환자 CD8 T 세포(CD27+)의 표현형 특성화 결과를 나타낸다. 대부분의 환자에서, Cmax에서 대부분의 CAR+ CD8+ T 세포는 중심 기억 세포이다. **도 20b**는 Cmax에서의 MMY2001 연구에서 다양한 환자 CD4 T 세포의 표현형 특성화 결과를 나타낸다. Cmax에서 대부분의 CAR+ CD4+ T 세포는 이펙터 기억 세포이다. **도 20c**는 CD8+ CD45RO- CD27+인 세포의 퍼센트가 임상 반응을 예측함을 나타내는 그래프이다. CR 또는 PRD를 갖는 환자는 PR 또는 NR을 가진 환자보다 CD8+ CD45RO- CD27+ 세포의 백분율이 더 높았다. **도 20c**는 문헌[Fraietta et al., 2018 Nature Medicine 24, 563-71]으로부터 개작된다. **도 20d**는 임상 반응에 의해 그룹화된 각각의 환자에서 백분율 CD8 줄기 세포 기억 T 세포(좌측 패널) 또는 미접촉 T 세포(우측 패널)의 상관관계를 나타내는 그래프를 예시한다.

도 21a는 연구 기간에 걸쳐 총 백혈구에 대비한 다발성 골수종 세포인 세포의 퍼센트를 나타내는 그래프를 도시한다. CD38+ MM 세포 및 CD38dim MM 세포는 도면에 나타낸 바와 같다. **도 21b**는 연구 기간에 걸쳐 CD38+ 및 CD38 dim BCMA 및 GPRC5D 백혈구에서 검출된 MESF 항원의 양, 및 항원 + MM의 백분율을 나타내는 그래프를 도시한다. CD38+ BCMA 세포, CD38dim BCMA 세포, CD38+ GPRC5D 세포, 및 CD38dim GPRC5D 세포는 도면에 나타낸 바와 같다. **도 21c**는 연구 기간에 걸쳐 둘 모두 개별 환자에서의, PD1+ CAR+ CD8+ T 세포의 백분율(CD8 CAR의 백분율로서의)을 나타내는 그래프 및 CD4 T 세포의 백분율로서의 Treg를 나타내는 그래프를 도시한다. 결과는 CAR-T 고갈 및 조절 기전에 대한 이해를 제공한다.

도 22는 bb2121과 유사하게, LCAR-B38M의 확장(게놈 DNA의 마이크로그램당 이식유전자 카피의 Cmax에 의해 측정됨)이 CRS 등급과 상관관계가 있음을 나타내는 데이터를 예시한다.

도 23은 연구 기간에 걸쳐 개별 대상체에서의 2개의 혈청 전염증성 사이토카인 IL6 및 IFN- γ 각각의 양을 나타내는 2개의 그래프를 나타낸다. IL-6의 양은 주입 후 대부분의 환자에서 증가하였다.

도 24는 연구 기간에 걸쳐 개별 대상체에서의 2개의 혈청 전염증성 사이토카인 IL-10 및 TNF- α 각각의 양을 나타내는 2개의 그래프를 나타낸다. 둘 모두의 양은 주입 후 대부분의 환자에서 증가하였다.

도 25는 연구 기간에 걸쳐 개별 대상체에서의 2개의 혈청 전염증성 사이토카인 IL-2 및 IL- 2R α 각각의 양을

나타내는 2개의 그래프를 나타낸다.

도 26a는 IL-6 혈청 사이토카인 수준이 CRS와 상관관계가 있음을 나타내는 그래프이다. 도 26b는 IL-6 혈청 사이토카인 수준이 임상 반응과 상관관계가 없음을 나타내는 그래프이다.

도 27은 IL-6 혈청 Cmax가 피크 LCAR-B38M과 상관관계가 있을 수 있음을 나타내는 데이터를 예시한다. 좌측 패널은 문헌[Fraietta et al., 2018 *Nature Medicine* 24, 563-71]으로부터 개작된 도면이다.

도 28은 기준선 sBCMA의 수준이 종양 세포의 기준선 골수 백분율과 상관관계가 없음을 나타내는 데이터를 예시한다.

도 29는 LCAR-B38M을 갖는 치료 프로토콜을 예시하며, LCAR-B38M이 각각의 개별 환자의 동적 환경에서 "살아있는 약물"임을 예시한다.

도 30은 LCAR-B38M이 2개의 BCMA-표적화 도메인을 갖는 CAR-T 세포 요법임을 예시한다. 문헌[D'Agostino *Curr Hematol Malig Rep.* 2017;12:344]; 문헌[O'Connor *J Exp Med.* 2004;199:91]; 문헌[Friedman *Hum Gene Ther.* 2018;29:585]. 문헌[Sanchez *Br J Haematol* 2012;158:727]을 참조한다. BCMA=B-세포 성숙 항원; CD=분화 클러스터; MM=다발성 골수종; NKG2D=자연 살해 그룹 2D; SLAMF7=신호전달 림프구성 활성화 분자 패밀리에 속한 구성원 7; VHH=중쇄 상의 단일 가변 도메인.

도 31은 LCAR-B38M 치료의 전체 반응률을 예시한다. a: PR 이상; 독립적인 검토 위원회-평가; b: 최상의 반응으로서 안정한 질환 또는 진행성 질환을 가진 환자는 없다. CR=완전 반응; ORR=전체 반응률; NGS=차세대 서열 분석; PR=부분 반응; sCR=엄격한 완전 반응; VGPR=매우 양호한 부분 반응.

도 32는 LCAR-B38M 약물 생성물이 이펙터 기억 T 세포에 풍부함을 예시한다. Tcm=중심 기억 T 세포; Tem=이펙터 기억 T 세포; Temra=최종 분화된 T 세포; Tn=미접촉 T 세포.

도 33은 LCAR-B38M이 가변적 확장 및 지속성을 나타냄을 예시한다. 말초 혈액에서의 검출가능한 지속성. gDNA=게놈 DNA; LOQ=정량 하한.

도 34는 혈중 LCAR-B38M의 지속성의 손실 후의 내구성 반응을 예시한다.

도 35는 확장과 지속성이 최상의 반응과 연관되지 않음을 예시한다. T_{last}=CAR-T 세포 수준이 LOQ 초과인 마지막 연구일.

도 36은 혈액 및 골수에서 CAR+ CD8 T 세포의 우선적인 확장을 예시한다. DP=주입 전의 약물 생성물; WB=전혈.

도 37은 CAR-T 기억 표현형이 임상 활성화와 연관될 수 있음을 예시한다. ¹문헌[Blaeschke *Cancer Immunol Immunother* 2018;67:1053]. Tscm=줄기 중심 기억 T 세포.

도 38은 LCAR-B38M이 CD8 중심 기억 T 세포의 우선적인 확장을 나타냄을 예시한다. 확장의 피크에서 분석한다.

도 39는 반응이 기준선 BCMA 발현의 수준에 독립적임을 예시한다. MESF=등가의 가용성 플루오로코크롬의 분자.

도 40은 연구 MMY2001로부터의 LCAR-B38M에 대한 결론을 예시한다.

도 41은 혈중 LCAR-B38M의 지속성의 손실 후의 내구성 반응을 예시한다.

도 42는 T 세포 Cmax(Tmax)에서의 CAR+ CD4/CD8 비를 예시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 예시적인 실시 형태에 대한 설명이 후술된다.

[0045] 본 발명은 또한 관련 핵산, 재조합 발현 벡터, 숙주 세포, 세포 집단, 항체, 또는 이의 항원 결합 부분, 및 본 발명의 면역 세포 및 CAR-발현 T 세포에 관련된 약제학적 조성물을 제공한다. CAR-T 세포의 표현형을 특성화하는 방법, 투여 계획, 및 투여 형태가 또한 제공된다.

[0046] 본 발명의 몇몇 태양이 단지 예시적인 목적을 위한 예를 참조하여 하기에 기재된다. 본 발명의 완전한 이해를 제공하기 위해 많은 구체적인 상세사항, 관계 및 방법이 제시되어 있음이 이해되어야 한다. 그러나, 당업자는 본 발명이 구체적인 상세사항 중 하나 이상 없이도 실시될 수 있거나 다른 방법, 프로토콜, 시약, 세포주 및 동물을 사용하여 실시될 수 있음을 용이하게 인식할 것이다. 본 발명은 행위 또는 사건의 예시된 순서에 의해 제

한되지 않는데, 그 이유는, 일부 행위가 상이한 순서로 일어날 수 있고/있거나, 다른 행위 또는 사건과 병행적으로 일어날 수 있기 때문이다. 더욱이, 본 발명에 따른 방법을 구현하기 위해 모든 예시된 행위, 단계 또는 사건이 요구되는 것은 아니다. 본 명세서에 기재되거나 언급된 많은 기법 및 절차는 당업자에게 잘 이해되고 통상의 방법을 사용하여 일반적으로 사용된다.

[0047] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용되는 모든 기술 용어, 표기 및 다른 과학 용어 또는 전문용어는 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖는 것으로 의도된다. 일부 경우에, 일반적으로 이해되는 의미를 갖는 용어가 명확성을 위해 그리고/또는 용이한 참조를 위해 본 명세서에 정의되어 있으며, 본 명세서에의 그러한 정의의 포함은 본 기술 분야에서 일반적으로 이해되는 것과 상당한 차이를 나타내는 것으로 반드시 해석되어야 하는 것은 아니어야 한다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의된 것들과 같은 용어들은 관련 기술과 관련하여 그리고/또는 본 명세서에 달리 정의된 바와 같은 그들의 의미와 일치하는 의미를 갖는 것으로 해석되어야 한다는 것이 또한 이해될 것이다.

[0048] 정의

[0049] 용어 "약" 또는 "대략"은 소정 값의 통계학적으로 의미있는 범위 이내에 있음을 포함한다. 그러한 범위는 주어진 값 또는 범위의 10배 크기 이내, 바람직하게는 50% 이내, 더 바람직하게는 20% 이내, 훨씬 더 바람직하게는 10% 이내, 그리고 더욱 더 바람직하게는 5% 이내일 수 있다. 용어 "약" 또는 "대략"에 의해 포함되는 허용가능한 변동은 연구 중인 특정 시스템에 좌우되며, 당업자에 의해 용이하게 이해될 수 있다.

[0050] 용어 "항체"는 단일클론 항체(면역글로불린 Fc 영역을 갖는 전장 4-사슬 항체 또는 전장 중쇄 단독 항체를 포함함), 폴리페피토프 특이성을 갖는 항체 조성물, 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체, 다이아바디, 및 단일-사슬 분자)뿐만 아니라 항체 단편(예를 들어, Fab, F(ab')₂, 및 Fv)을 포함한다. 용어 "면역글로불린(Ig)은 본 명세서에서 "항체"와 상호교환 가능하게 사용된다. 본 명세서에서 고려되는 항체는 단일-도메인 항체, 예컨대 중쇄 단독 항체를 포함한다.

[0051] 용어 "중쇄-단독 항체" 또는 "HCAb"는 중쇄를 포함하지만, 보통 4-사슬 항체에서 발견되는 경쇄가 결여된 기능성 항체를 지칭한다. 낙타과 동물(예컨대 낙타, 라마, 또는 알파카)은 HCAb를 생성하는 것으로 알려져 있다.

[0052] 용어 "단일-도메인 항체" 또는 "sdAb"는 3개의 상보성 결정 영역(CDR)을 갖는 단일 항원-결합 폴리펩티드를 지칭한다. sdAb 단독은 상응하는 CDR-함유 폴리펩티드와의 페어링 없이 항원에 결합할 수 있다. 일부 경우에, 단일-도메인 항체는 낙타과 HCAb로부터 조작되며, 이들의 중쇄 가변 도메인은 본 명세서에서 "VHH"로 지칭된다. 일부 VHH는 또한 나노바디로 알려져 있을 수 있다. 낙타과 sdAb는 가장 작은 알려진 항원-결합 항체 단편 중 하나이다(예를 들어, 문헌[Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-8 (1993)]; 문헌[Greenberg et al., Nature 374:168-73 (1995)]; 문헌[Hassanzadeh-Ghassabeh et al., Nanomedicine (Lond), 8:1013-26 (2013)] 참조). 염기성 VHH는 N-말단으로부터 C-말단으로 하기 구조를 갖는다: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, 여기서 FR1 내지 FR4는 각각 프레임워크 영역 1 내지 4를 지칭하고, 여기서 CDR1 내지 CDR3은 상보성 결정 영역 1 내지 3을 지칭한다.

[0053] 항체의 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체의 중쇄 또는 경쇄의 아미노-말단 도메인을 지칭한다. 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각 "VH" 및 "VL"로 지칭될 수 있다. 이들 도메인은 일반적으로 항체의 가장 가변적인 부분(동일한 부류의 다른 항체에 비해)이며 항원 결합 부위를 함유한다. 낙타과 종으로부터의 중쇄 단독 항체는 "VHH"로 지칭되는 단일 중쇄 가변 영역을 갖는다. 따라서 VHH는 특별한 유형의 VH이다.

[0054] 용어 "가변"은 가변 도메인의 소정 세그먼트가 항체들 사이에서 서열이 광범위하게 상이하다는 사실을 지칭한다. V 도메인은 항원 결합을 매개하며, 특정 항체의 그의 특정 항원에 대한 특이성을 정의한다. 그러나, 가변성은 가변 도메인의 전체 스펠에 걸쳐 균일하게 분포되지 않는다. 대신에, 이는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 둘 모두 내의 초가변 영역(HVR)으로 불리는 3개의 세그먼트에 농축된다. 가변 도메인의 더 고도로 보존된 부분은 프레임워크 영역 (FR)으로 불린다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은, 베타-시트 구조를 연결하고 일부 경우에는 그의 일부를 형성하는 루프를 형성하는, 3개의 HVR에 의해 연결된, 베타-시트 구성을 주로 채택하는 4개의 FR 영역을 각각 포함한다. 각각의 사슬 내의 HVR은 FR 영역에 의해 근접하여 함께 유지되고, 다른 사슬로부터의 HVR과 함께, 항체의 항원 결합 부위의 형성에 기여한다(문헌[Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)] 참조). 불변 도메인은 항원에 대한 항체의 결합에 직접적으로 관여하지 않지만, 항체-의존성 세포 독성에서의 항체의 참여와 같은 다양한 이펙터 기능을 나타낸다.

- [0055] 용어 "항체의 단편", "항체 단편", "항체의 기능성 단편", 및 "항원-결합 부분"은 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편 또는 부분을 의미하기 위해 본 명세서에서 상호교환 가능하게 사용된다 (일반적으로, 문헌[Holliger et al., Nat. Biotech., 23(9): 1126-1129 (2005)] 참조). 본 발명의 핵산 서열에 의해 인코딩되는 CAR의 항원 인식 모이어티는 임의의 BCMA-결합 항체 단편을 함유할 수 있다. 항체 단편은 바람직하게는, 예를 들어, 하나 이상의 CDR, 가변 영역(또는 이의 일부), 불변 영역(또는 이의 일부), 또는 이들의 조합을 포함한다. 항체 단편의 예는, (i) VL, VH, CL, 및 CHI 도메인으로 이루어진 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 다이설파이드 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편; (iii) 항체의 단일 아암의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (iv) 단일 폴리펩티드 사슬로서 2개의 도메인이 합성되는 것을 가능하게 하는 합성 링커에 의해 연결된 Fv 단편(즉, VL 및 VH)의 2개의 도메인으로 이루어진 1가 분자인 단일 사슬 Fv(scFv)(예를 들어, 문헌[Bird et al., Science, 242: 423-426 (1988)]; 문헌[Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5879-5883 (1988)]; 및 문헌[Osborn et al., Nat. Biotechnol, 16: 778 (1998)] 참조), 및 (v) 폴리펩티드 사슬의 이량체인 다이아바디로서, 각각의 폴리펩티드 사슬은 동일한 폴리펩티드 사슬 상에서 VH와 VL 사이의 페어링을 허용하기에는 너무 짧은 펩티드 링커에 의해 VL에 연결된 VH를 포함함으로써, 2개의 기능성 항원 결합 부위를 갖는 이량체 분자를 생성하기 위해 상이한 VH-VL 폴리펩티드 사슬 상의 상보적 도메인들 사이의 페어링을 구동하는, 다이아바디를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 항체 단편은 당업계에 알려져 있고, 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제2009/0093024 A1호에 더욱 상세하게 기재되어 있다.
- [0056] 본 명세서에서 용어 "C_{max}"는 약물이 투여된 후 및 제2 용량의 투여 전에 혈중의 이펙터 CAR-T 세포의 최대 농도를 지칭하기 위해 사용된다. 대상체에서 "C_{max}에서"에 대한 언급은 혈중의 이펙터 CAR-T 세포의 최대 농도가 대상체에서 달성되는 날을 지칭한다.
- [0057] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "특이적으로 결합하다", "특이적으로 인식하다", 또는 "~에 특이적인"은, 생물학적 분자를 포함하는 불균질한 분자 집단의 존재 하에 표적의 존재를 결정하는, 표적과 항원 결합 단백질(예컨대 CAR 또는 sdAb) 사이의 결합과 같은 측정가능하고 재현가능한 상호작용을 지칭한다.
- [0058] 용어 "특이성"은 항원의 특정 에피토프에 대한 항원 결합 단백질(예컨대 CAR 또는 sdAb)의 선택적 인식을 지칭한다. 천연 항체는, 예를 들어, 단일특이적이다. 용어 "다중특이적"은 항원 결합 단백질(예컨대 CAR 또는 sdAb)이 2개 이상의 항원-결합 부위를 가지며, 이 중의 2개 이상이 상이한 항원에 결합함을 나타낸다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "이중특이적"은 항원 결합 단백질(예컨대 CAR 또는 sdAb)이 2개의 상이한 항원-결합 특이성을 가짐을 나타낸다.
- [0059] 키메라 항원 수용체(CAR)는 T-세포 신호전달 도메인에 연결된 항체(scFv)의 항원-결합 도메인을 함유하는 인공적으로 작제된 하이브리드 단백질 또는 폴리펩티드이다. CAR의 특성은, 비-MHC-제한된 방식(non-MHC-restricted manner)으로, 선택된 표적에 대한 T-세포 특이성 및 반응성을 재유도하여, 단일클론 항체의 항원-결합 특성을 이용하는 그의 능력을 포함할 수 있다. 비-MHC-제한된 항원 인식은, 항원 처리와 무관하게 항원을 인식하여 종양 회피의 주요 기전을 우회하는 능력을 CAR을 발현하는 T 세포에게 제공한다. 더욱이, T-세포에서 발현되는 경우, CAR은 유리하게도 내인성 T 세포 수용체(TCR) 알파 및 베타 사슬과 이량체화되지 않는다. CAR을 발현하는 T 세포는 본 명세서에서 CAR T 세포, CAR-T 세포 또는 CAR 변형된 T 세포로 지칭되며, 이들 용어는 본 명세서에서 상호교환 가능하게 사용된다. 이러한 세포는 그의 표면 상에 항체 결합 도메인을 안정하게 발현하도록 유전자 변형되어, MHC 독립적인 신규한 항원 특이성을 부여할 수 있다. "BCMA CAR"은 BCMA에 특이적인 세포외 결합 도메인을 갖는 CAR을 지칭한다. "바이-에피토프 CAR"은 BCMA의 2개의 상이한 에피토프에 특이적인 세포외 결합 도메인을 갖는 CAR을 지칭한다.
- [0060] "LCAR-B38M"은 결합력을 부여하도록 설계된 2개의 B-세포 성숙 항원(BCMA)-표적화 단일-도메인 항체를 함유하는 키메라 항원 수용체 T 세포(CAR-T) 요법이다. LCAR-B38M은 렌티바이러스 벡터에 의해 인코딩되는 CAR인 LCAR-B38M CAR로 형질도입된 T 림프구를 포함할 수 있다. CAR은 인간 B 세포 성숙 항원(항-BCMA CAR)을 표적화한다. LCAR-B38M CAR을 인코딩하는 렌티바이러스 벡터의 다이어그램을 도 2a에 제공한다.
- [0061] 용어 "발현하다" 및 "발현"은 유전자 또는 DNA 서열에서의 정보가 생성될 수 있게 하거나 생성되게 하는 것을, 예를 들어, 상응하는 유전자 또는 DNA 서열의 전사 및 번역에 관여하는 세포 기능을 활성화시킴으로써 단백질을 생성하는 것을 의미한다. DNA 서열은 세포에서 또는 세포에 의해 발현되어 "발현 생성물", 예컨대 단백질을 형성한다. 발현 생성물 그 자체, 예를 들어, 생성된 단백질 또한 세포에 의해 "발현된" 것이라 할 수 있다. 발현 생성물은 세포내, 세포외 또는 막관통으로서 특징지어질 수 있다.

- [0062] 용어 "치료하다" 또는 "치료"는, 원치 않는 생리학적 변화 또는 질병을 둔화(감퇴)시키거나, 치료 동안 유익하거나 원하는 임상 결과를 제공하는 것이 목적인 치료적 처리를 지칭한다. 유익하거나 원하는 임상 결과는, 검출가능하던 검출 불가능하던 어느 것이든 간에, 증상의 경감, 질병 정도의 저하, 안정화된(즉, 악화되지 않는) 질병 상태, 질병 진행의 지연 또는 둔화, 질병 상태의 개선 또는 고식, 및/또는 관해(부분 또는 전체 어느 것이든)를 포함한다. "치료"는 또한 대상체가 치료를 받지 않고 있을 경우에 예상되는 생존과 비교할 때 연장되는 생존을 의미할 수 있다. 치료를 필요로 하는 대상체는 원치 않는 생리학적 변화 또는 질병을 이미 가진 대상체 뿐만 아니라 생리학적 변화 또는 질병을 갖기 쉬운 대상체도 포함한다.
- [0063] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "대상체"는 동물을 지칭한다. 용어 "대상체"와 "환자"는 대상체에 대해 언급할 때 본 명세서에서 상호교환 가능하게 사용될 수 있다. 이와 같이, "대상체"는 환자로서, 질병 또는 질병의 예방을 위해 처리되고 있는 인간을 포함한다. 본 명세서에 기재된 방법은 임의의 분류에 속하는 동물 대상체를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 그러한 동물의 예는 포유동물을 포함한다. 포유동물은 설치목(order Rodentia)의 포유동물, 예컨대 마우스 및 햄스터, 및 토끼목(order Logomorpha)의 포유동물, 예컨대 토끼를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 포유동물은 식육목(order Carnivora)의 것일 수 있으며, 이에는 고양이과(feline)(고양이) 및 개과(canine)(개)가 포함된다. 포유동물은 소과(bovine)(소) 및 돼지과(swine)(돼지)를 포함하는 우제목(order Artiodactyla), 또는 말과(equine)(말)를 포함하는 말목(order Perissodactyla)으로부터의 것일 수 있다. 포유동물은 영장목(order Primate), 세보이드목(order Ceboid), 또는 시모이드목(order Simoid)(원숭이) 또는 유인원목(order Anthropoid)(인간 및 유인원)의 것일 수 있다. 일 실시 형태에서, 포유동물은 인간이다.
- [0064] 용량 또는 양에 적용되는 용어 "유효한"은 필요로 하는 대상체에게 투여 시에 원하는 활성을 가져오기에 충분한 화합물 또는 약제학적 조성물의 양을 지칭한다. 활성 성분들의 병용물이 투여되는 경우, 병용물의 유효량은 각각의 성분이 개별적으로 투여되는 경우에 유효하였을 각각의 성분의 양을 포함할 수 있거나 포함하지 않을 수 있다는 것에 유의한다. 정확한 필요량은 대상체의 종, 연령, 및 전신 상태, 치료되는 질환의 중증도, 사용되는 특정 약물 또는 약물들, 투여 방식 등에 따라 대상체마다 다를 것이다.
- [0065] 본 명세서에 기재된 조성물과 관련하여 사용되는 바와 같이, 어구 "약제학적으로 허용되는"은, 생리학적 내약성을 나타내고, 포유동물(예를 들어, 인간)에게 투여될 때 전형적으로 원치않는 반응을 생성하지 않는, 그러한 조성물의 분자 실체 및 다른 성분을 지칭한다. 바람직하게는, 용어 "약제학적으로 허용되는"은 포유동물에서의, 그리고 더 특히는 인간에서의 사용에 대해 미연방 또는 주 정부의 규제 기관에 의해 승인되어 있거나 미국 약전 또는 다른 일반적으로 인식되는 약전에 열거되어 있음을 의미한다.
- [0066] 본 명세서에서 사용되는 용어는 단지 특정 실시 형태들을 설명하기 위한 것이며, 한정하는 것으로 의도되지 않는다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 부정 관사("a", "an", 및 "the")는 문맥이 명확하게 달리 나타내지 않는 한 복수의 지시 대상을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0067] 본 발명 전체에 걸쳐, 본 발명의 다양한 태양이 범위 형식으로 제시될 수 있다. 범위 형식의 기재는 단지 편의 및 간결함을 위한 것이며 본 발명의 범주에 대한 유연성 없는 제한으로서 해석되어서는 안 된다는 것이 이해되어야 한다. 따라서, 범위의 기재는 모든 가능한 하위범위뿐만 아니라 그 범위 내의 개별적인 수치를 구체적으로 개시하는 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 1 내지 6과 같은 범위의 기재는 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6 등과 같은 구체적으로 개시된 하위범위뿐만 아니라 그 범위 내의 개별적인 수, 예를 들어 1, 2, 2.7, 3, 4, 5, 5.3, 및 6을 갖는 것으로 간주되어야 한다. 다른 예로서, 95 내지 99% 동일성과 같은 범위는 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 갖는 것을 포함하며, 96 내지 99%, 96 내지 98%, 96 내지 97%, 97 내지 99%, 97 내지 98%, 및 98 내지 99% 동일성과 같은 하위범위를 포함한다. 이는 범위의 폭에 관계없이 적용된다.
- [0068] **벡터**
- [0069] 본 출원에 기재된 CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 표준 재조합 기술을 사용하여 얻을 수 있다. 하이브리도마 세포와 같은 항체 생성 세포로부터 원하는 폴리뉴클레오티드 서열이 단리되고 서열분석될 수 있다. 대안적으로, 뉴클레오티드 합성기 또는 PCR 기술을 사용하여 폴리뉴클레오티드를 합성할 수 있다. 다양한 잠재적 숙주 세포에 의해 인식되는 다수의 프로모터가 잘 알려져 있다. 제한 효소 분해를 통해 공급원 DNA로부터 프로모터를 제거하고 단리된 프로모터 서열을 본 출원의 벡터 내로 삽입함으로써 경쇄 또는 중쇄를 인코딩하는 시스트론 DNA에 선택된 프로모터를 작동가능하게 연결할 수 있다.

- [0070] 본 발명은 또한 본 발명의 CAR을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터를 제공한다. 벡터는, 예를 들어, 플라스미드, 코스미드, 바이러스 벡터(예를 들어, 레트로바이러스 또는 아데노바이러스), 또는 파지일 수 있다. 적합한 벡터 및 벡터 제조 방법은 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Sambrook et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York]; 문헌[Ausubel et al. eds. (2005) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, NJ] 참조).
- [0071] CAR을 인코딩하는 본 발명의 핵산 서열에 더하여, 벡터는 바람직하게는 숙주 세포에서 핵산 서열의 발현을 제공하는 프로모터, 인핸서, 폴리아데닐화 신호, 전사 종결자, 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 등과 같은 발현 제어 서열을 포함한다. 예시적인 발현 제어 서열은 당업계에 알려져 있고, 예를 들어, 문헌[Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology*, Vol. 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)]에 기재되어 있다.
- [0072] 다양한 상이한 공급원으로부터의 구성적, 유도성, 및 억제성 프로모터를 포함하는 다수의 프로모터가 당업계에 잘 알려져 있다. 대표적인 프로모터 공급원은, 예를 들어, 바이러스, 포유동물, 곤충, 식물, 효모, 및 박테리아를 포함하며, 이들 공급원으로부터의 적합한 프로모터는 용이하게 입수가능하거나, 예를 들어, ATCC와 같은 기탁기관뿐만 아니라 다른 상업적 또는 개별적 공급원으로부터 공개적으로 입수가능한 서열에 기초하여 합성적으로 제조될 수 있다. 프로모터는 단방향성(즉, 한 방향으로 전사를 개시함) 또는 양방향성(즉, 3' 또는 5' 방향으로 전사를 개시함)일 수 있다. 프로모터의 비제한적인 예는, 예를 들어, T7 박테리아 발현 시스템, pBAD(araA) 박테리아 발현 시스템, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, SV40 프로모터, 및 RSV 프로모터를 포함한다. 유도성 프로모터는, 예를 들어, Tet 시스템(미국 특허 제5,464,758호 및 제5,814,618호), 엑디손 유도성 시스템(Ecdysone inductive system)(문헌[No et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93: 3346-3351 (1996)]), T-REX™ 시스템(Invitrogen, 미국 캘리포니아주 칼스배드 소재), LACSWITCH™ 시스템(Stratagene, 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재), 및 Cre-ERT 타목시펜 유도성 재조합효소 시스템(문헌[Indra et al., *Nuc. Acid. Res.*, 27: 4324-4327 (1999)]; 문헌[*Nuc. Acid. Res.*, 28: e99 (2000)]; 미국 특허 제7,112,715호; 및 문헌[Kramer & Fussenegger, *Methods Mol. Biol.*, 308: 123-144 (2005)])을 포함한다.
- [0073] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "인핸서"는, 예를 들어, 그것이 작동가능하게 연결된 핵산 서열의 전사를 증가시키는 DNA 서열을 지칭한다.
- [0074] 인핸서는 핵산 서열의 코딩 영역으로부터 다수의 킬로베이스 떨어져 위치할 수 있으며, 조절 인자의 결합, DNA 메틸화의 패턴, 또는 DNA 구조의 변화를 매개할 수 있다. 다양한 상이한 공급원으로부터의 다수의 인핸서가 당업계에 잘 알려져 있으며, 클로닝된 폴리뉴클레오티드로서 또는 그 안에 입수가능하다(예를 들어, ATCC와 같은 기탁기관뿐만 아니라 다른 상업적 또는 개별적 공급원으로부터). 프로모터(예컨대 일반적으로 사용되는 CMV 프로모터)를 포함하는 다수의 폴리뉴클레오티드가 또한 인핸서 서열을 포함한다. 인핸서는 코딩 서열의 상류, 내부, 또는 하류에 위치할 수 있다. 용어 "Ig 인핸서"는 면역글로불린(Ig) 유전자와 내에 맵핑된 인핸서 영역으로부터 유래된 인핸서 요소를 지칭한다(그러한 인핸서는, 예를 들어, 중쇄(mu) 5' 인핸서, 경쇄(카파) 5' 인핸서, 카파 및 뮤 인트론 인핸서, 및 3' 인핸서를 포함함(일반적으로 문헌[Paul W.E. (ed), *Fundamental Immunology*, 3rd Edition, Raven Press, New York (1993), pages 353-363]; 및 미국 특허 제5,885,827호 참조)).
- [0075] 벡터는 또한 "선택가능한 마커 유전자"를 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "선택가능한 마커 유전자"는 상응하는 선택제의 존재 하에 핵산 서열을 발현하는 세포가 이를 위해 또는 이에 대해 특이적으로 선택되도록 하는 핵산 서열을 지칭한다. 적합한 선택가능한 마커 유전자는 당업계에 알려져 있으며, 예를 들어, 국제 특허 출원 공개 제WO 1992/08796호 및 제WO 1994/28143호; 문헌[Wigler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 3567 (1980)]; 문헌[O'Hare et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 1527 (1981)]; 문헌[Mulligan & Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 2072 (1981)]; 문헌[Colberre-Garapin et al., *J. Mol. Biol.*, 150: 1 (1981)]; 문헌[Santerre et al., *Gene*, 30: 147 (1984)]; 문헌[Kent et al., *Science*, 237: 901-903 (1987)]; 문헌[Wigler et al., *Cell*, 1P. 223 (1977)]; 문헌[Szybalska & Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 48: 2026 (1962)]; 문헌[Lowy et al., *Cell*, 22: 817 (1980)]; 및 미국 특허 제5,122,464호 및 제5,770,359호에 기재되어 있다.
- [0076] 일부 실시 형태에서, 벡터는 숙주 세포에서 복제할 수 있고, 적절한 선택 압력의 존재 하에 숙주 세포 내에서 DNA의 염색체의 세그먼트로서 지속되는 "에피솜 발현 벡터" 또는 "에피솜"이다(예를 들어, 문헌[Conese et al.,

Gene Therapy, 11: 1735-1742 (2004)] 참조). 대표적인 상업적으로 입수가 가능한 에피솜 발현 벡터는 엡스타인 바 핵 항원 1(EBNA1) 및 엡스타인 바 바이러스(EBV) 복제 기점(oriP)을 이용하는 에피솜 플라스미드를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. Invitrogen(미국 캘리포니아주 칼스배드 소재)으로부터의 벡터 pREP4, pCEP4, pREP7, 및 pcDNA3.1 및 Stratagene(미국 캘리포니아주 라호이아 소재)으로부터의 pB-CMV는 EBNA1 및 oriP 대신에 SV40 복제 기점 및 T-항원을 사용하는 에피솜 벡터의 비제한적인 예를 나타낸다.

[0077] 다른 적합한 벡터는, 숙주 세포의 DNA 내로 무작위로 통합될 수 있거나, 발현 벡터와 숙주 세포의 염색체 사이의 특이적 재조합을 가능하게 하는 재조합 부위를 포함할 수 있는, 통합 발현 벡터를 포함한다. 그러한 통합 발현 벡터는 원하는 단백질의 발현을 달성하기 위해 숙주 세포의 염색체의 내인성 발현 제어 서열을 이용할 수 있다. 부위 특이적 방식으로 통합되는 벡터의 예는, 예를 들어, Invitrogen(미국 캘리포니아주 칼스배드 소재)으로부터의 플립-인(flp-in) 시스템(예를 들어, pcDNATM5/FRT), 또는 cre-lox 시스템의 구성요소를 포함하며, 예컨대 Stratagene(미국 캘리포니아주 라호이아 소재)으로부터의 pExchange-6 코어 벡터에서 확인할 수 있다. 숙주 세포 염색체 내로 무작위로 통합되는 벡터의 예는, 예를 들어, Invitrogen(미국 캘리포니아주 칼스배드 소재)으로부터의 pcDNA3.1(T-항원의 부재 하에 도입되는 경우), 및 Promega(미국 위스콘신주 매디슨 소재)로부터의 pCI 또는 pFNI OA(ACT) FLEXITM를 포함한다.

[0078] 바이러스 벡터가 또한 사용될 수 있다. 대표적인 바이러스 발현 벡터는 아데노바이러스-기반 벡터(예를 들어, Crucell, Inc.(네덜란드 라이덴 소재)로부터 입수가 가능한 아데노바이러스-기반 Per.C6 시스템), 렌티바이러스-기반 벡터(예를 들어, Life Technologies(미국 캘리포니아주 칼스배드 소재)로부터의 렌티바이러스-기반 pLP1), 및 레트로바이러스 벡터(예를 들어, Stratagene(미국 캘리포니아주 라호이아 소재)으로부터의 pFB-ERV + pCFB-EGSH)를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 바람직한 실시 형태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터이다.

[0079] CAR을 인코딩하는 본 발명의 핵산을 포함하는 벡터는, 이에 의해 인코딩되는 CAR을 발현할 수 있는, 임의의 적합한 원핵 또는 진핵 세포를 포함하는 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 바람직한 숙주 세포는, 용이하고 신뢰성 있게 성장할 수 있고, 합리적으로 빠른 성장 속도를 가지며, 잘 특성화된 발현 시스템을 갖고, 용이하고 효율적으로 형질전환되거나 형질감염될 수 있는 것들이다.

[0080] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "숙주 세포"는 발현 벡터를 함유할 수 있는 임의의 유형의 세포를 지칭한다. 숙주 세포는 진핵 세포, 예를 들어, 식물, 동물, 진균, 또는 조류일 수 있거나, 원핵 세포, 예를 들어, 박테리아 또는 원생동물일 수 있다. 숙주 세포는 배양된 세포이거나 또는 1차 세포, 즉, 유기체, 예를 들어 인간으로부터 직접 분리된 세포일 수 있다. 숙주 세포는 부착성 세포이거나 또는 부유된 세포, 즉 부유 상태로 성장하는 세포일 수 있다. 적합한 숙주 세포는 당업계에서 알려져 있으며, 예를 들어, DH5a E. 콜라이(*E. coli*) 세포, 중국 햄스터 난소 세포, 원숭이 VERO 세포, COS 세포, HE 293 세포 등을 포함한다. 재조합 발현 벡터를 증폭 또는 복제할 목적상, 숙주 세포는 원핵 세포, 예를 들어 DH5a 세포일 수 있다. 재조합 CAR을 생성하는 목적을 위해, 숙주 세포는 포유동물 세포일 수 있다. 바람직하게는 숙주 세포는 인간 세포이다. 숙주 세포는 임의의 세포 유형일 수 있고, 임의의 유형의 조직으로부터 유래될 수 있으며, 임의의 발달 단계의 것일 수 있다. 일 실시 형태에서, 숙주 세포는 말초 혈액 림프구(PBL), 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 또는 자연 살해(NK)일 수 있다. 바람직하게는, 숙주 세포는 자연 살해(NK) 세포이다. 더욱 바람직하게는, 숙주 세포는 T-세포이다. 적합한 포유동물 숙주 세포의 선택 방법 및 세포의 형질전환, 배양, 증폭, 스크리닝, 및 정제 방법은 당업계에서 알려져 있다.

[0081] 본 발명은 본 명세서에 기재된 CAR을 인코딩하는 본 발명의 핵산 서열을 발현하는 분리된 숙주 세포를 제공한다. 일 실시 형태에서, 숙주 세포는 T-세포이다. 본 발명의 T-세포는 배양된 T 세포, 예를 들어, 1차 T-세포, 또는 배양된 T-세포주로부터의 T-세포, 또는 포유동물로부터 얻어진 T-세포와 같은 임의의 T-세포일 수 있다. 포유동물로부터 얻어지는 경우, T-세포는 혈액, 골수, 림프절, 흉선, 또는 다른 조직 또는 체액을 포함하지만 이로 제한되지 않는 다수의 공급원으로부터 얻어질 수 있다. T-세포는 또한 풍부화되거나 정제될 수 있다. T-세포는 바람직하게는 인간 T-세포이다(예를 들어, 인간으로부터 분리됨). T-세포는 CD4+/CD8+ 이중 양성 T-세포, CD4+ 헬퍼 T-세포, 예를 들어 Th₁ 및 Th₂ 세포, CD8+ T-세포(예를 들어, 세포독성 T-세포), 종양 침윤 세포, 기억 T-세포, 미접촉 T-세포 등을 포함하지만 이로 제한되지 않는 임의의 발달 단계의 것일 수 있다. 일 실시 형태에서, T-세포는 CD8+ T-세포 또는 CD4+ T-세포이다. T-세포주는, 예를 들어 ATCC(American Type Culture Collection; 미국 버지니아주 머내서스 소재), 및 DSMZ(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)로부터 입수가 가능하며, 예를 들어 Jurkat 세포(ATCC TIB-152), Sup-T1 세포(ATCC CRL-1942), RPMI 8402 세포(DSMZ ACC-290), Karpas 45 세포(DSMZ ACC-545), 및 이들의 유도체가 포함된다. 다른 실시 형태에서, 숙주 세포는 자연 살해(NK) 세포이다. NK 세포는 선천성 면역 시스템에서 역할을 하

는 세포독성 림프구의 유형이다. NK 세포는 대과립 림프구로서 정의되며, B 및 T 림프구를 또한 생성하는 일반적인 림프성 선조 세포로부터 분화된 제3 종류의 세포를 구성한다(예를 들어, 문헌[Immunobiology, 5th ed., Janeway et al., eds., Garland Publishing, New York, NY (2001)] 참조). NK 세포는 골수, 림프절, 비장, 편도선, 및 흉선에서 분화되고 성숙된다. 성숙 후에, NK 세포는 독특한 세포독성 과립을 갖는 큰 림프구로서 순환 내로 들어간다. NK 세포는 일부 비정상 세포, 예컨대 일부 종양 세포 및 바이러스-감염된 세포를 인식하고 사멸시킬 수 있으며, 세포내 병원체에 대한 선천성 면역 방어에서 중요한 것으로 여겨진다. T-세포에 관하여 전술된 바와 같이, NK 세포는 임의의 NK 세포일 수 있으며, 예컨대 배양된 NK 세포, 예를 들어 1차 NK 세포, 또는 배양된 NK 세포주로부터의 NK 세포, 또는 포유동물로부터 얻어진 NK 세포일 수 있다. 포유동물로부터 얻어지는 경우, NK 세포는 혈액, 골수, 림프절, 흉선, 또는 다른 조직 또는 체액을 포함하지만 이로 한정되지 않는 다수의 공급원으로부터 얻어질 수 있다. NK 세포는 또한 풍부화되거나 정제될 수 있다. NK 세포는 바람직하게는 (예를 들어, 인간으로부터 단리된) 인간 NK 세포이다. NK 세포주는, 예를 들어 ATCC(American Type Culture Collection; 미국 버지니아주 머내서스 소재)로부터 입수가 가능하며, 예를 들어 NK-92 세포(ATCC CRL-2407), NK92MI 세포(ATCC CRL-2408), 및 이들의 유도체가 포함된다.

[0082] CAR을 인코딩하는 본 발명의 핵산 서열은 "형질감염", "형질전환", 또는 "형질도입"에 의해 세포 내로 도입될 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "형질감염", "형질전환", 또는 "형질도입"은 물리적 또는 화학적 방법을 사용하는 단계에 의한 숙주 세포 내로의 하나 이상의 외인성 폴리뉴클레오티드의 도입을 지칭한다. 많은 형질감염 기술이 당업계에 알려져 있으며, 예를 들어, 갈슘 포스페이트 DNA 공동-침전(예를 들어, 문헌[Murray E.J. (ed.), Methods in Molecular Biology, Vol. 7, Gene Transfer and Expression Protocols, Humana Press (1991)]); DEAE-텍스트란; 전기천공; 양이온성 리포솜-매개 형질감염; 텅스텐 입자-촉진 미세입자 충돌(문헌[Johnston, Nature, 346: 776-777 (1990)]); 및 스트론튬 포스페이트 DNA 공동-침전(문헌[Brash et al., Mol. Cell Biol., 7: 2031-2034 (1987)])을 포함한다. 파지 또는 바이러스 벡터가, 적합한 패키징 세포 내에서의 감염성 입자의 성장 후에, 숙주 세포 내로 도입될 수 있으며, 이들 중 다수는 구매가능하다.

[0083] **키메라 항원 수용체**

[0084] 국제 특허 공개 제WO 2018/028647호는 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다. 미국 특허 공개 제 2018/0230225호는 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0085] 본 발명은 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 세포를 갖는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. CAR은 하나 이상의 단일-도메인 항체(예컨대 VH)를 포함하는 세포의 항원 결합 도메인을 포함한다. 다양한 실시 형태에서, 하기를 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 CAR 표적화 BCMA(본 명세서에서 "BCMA CAR"로도 지칭됨)가 제공된다: (a) 항-BCMA sdAb를 포함하는 세포의 항원 결합 도메인; (b) 막관통 도메인; 및 (c) 세포내 신호전달 도메인. 일부 실시 형태에서, 항-BCMA sdAb는 낙타과, 키메라, 인간, 또는 인간화이다. 일부 실시 형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 면역 이펙터 세포(예컨대 T 세포)의 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 1차 세포내 신호전달 도메인은 CD4로부터 유래된다. 일부 실시 형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 공동-자극 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 공동-자극 신호전달 도메인은 CD27, CD28, CD137, OX40, CD30, CD40, CD3, LFA-1, ICOS, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, CD83의 리간드, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동-자극 분자로부터 유래된다. 소정 실시 형태에서, 막관통 도메인은 CD137로부터 유래된다.

[0086] 일부 실시 형태에서, BCMA CAR은 세포의 항원 결합 도메인의 C-말단과 막관통 도메인의 N-말단 사이에 위치하는 힌지 도메인(예컨대 CD8 α 힌지 도메인)을 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, BCMA CAR은 폴리펩티드의 N-말단에 위치하는 신호 펩티드(예컨대 CD8 α 신호 펩티드)를 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단으로 하기를 포함한다: CD8 α 신호 펩티드, 세포의 항원-결합 도메인, CD8 α 힌지 도메인, CD28 막관통 도메인, CD28로부터 유래된 제1 공동-자극 신호전달 도메인, CD137로부터 유래된 제2 공동-자극 신호전달 도메인, 및 CD4로부터 유래된 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 폴리펩티드는 N-말단으로부터 C-말단으로 하기를 포함한다: CD8 α 신호 펩티드, 세포의 항원-결합 도메인, CD8 α 힌지 도메인, CD8 α 막관통 도메인, CD137로부터 유래된 제2 공동-자극 신호전달 도메인, 및 CD3 ζ로부터 유래된 1차 세포내 신호전달 도메인. 일부 실시 형태에서, BCMA CAR은 단일특이적이다. 일부 실시 형태에서, BCMA CAR은 1가이다.

[0087] 본 출원은 또한, BCMA와 같은 항원에 특이적으로 결합하는 2개 이상의(2, 3, 4, 5, 6개 이상 중 어느 하나를 포함하지만 이로 제한되지 않음) 결합 모이어티를 갖는 CAR을 제공한다. 일부 실시 형태에서, 결합 모이어티 중

하나 이상은 항원 결합 단편이다. 일부 실시 형태에서, 결합 모이어티 중 하나 이상은 단일-도메인 항체를 포함한다.

- [0088] 일부 실시 형태에서, CAR은 하기를 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 다가(예컨대 2가, 3가, 또는 더 높은 결합가) CAR이다: (a) 항원(예컨대 종양 항원)에 특이적으로 결합하는 복수(예컨대 약 2, 3, 4, 5, 6개 이상 중 어느 하나 이상)의 결합 모이어티를 포함하는 세포외 항원 결합 도메인; (b) 막관통 도메인; 및 (c) 세포내 신호 전달 도메인.
- [0089] 일부 실시 형태에서, 결합 모이어티, 예컨대 sdAb(복수의 sdAb, 또는 제1 sdAb 및/또는 제2 sdAb를 포함함)는 낙타과, 키메라, 인간, 또는 인간화이다. 일부 실시 형태에서, 결합 모이어티 또는 sdAb는 펩티드 결합 또는 펩티드 링커를 통해 서로에게 연결된다. 일부 실시 형태에서, 각각의 펩티드 링커는 약 50개 이하(예컨대 약 35, 25, 20, 15, 10, 또는 5개 중 어느 하나 이하)의 아미노산 길이이다.
- [0090] 일부 실시 형태에서, CAR은 세포외 항원 결합 도메인의 C-말단과 막관통 도메인의 N-말단 사이에 위치하는 힌지 도메인(예컨대 CD8 α 힌지 도메인)을 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, CAR은 폴리펩티드의 N-말단에 위치하는 신호 펩티드(예컨대 CD8 α 신호 펩티드)를 추가로 포함한다.
- [0091] 이론에 구애되지 않음이 없이, 다가인 CAR, 또는 제1 항-BCMA 결합 모이어티 및 제2 BCMA 결합 모이어티를 포함하는 세포외 항원 결합 도메인을 포함하는 CAR은, 상이한 항원 결합 부위에 의한 상승적 결합을 통한 다량체성 항원의 표적화에, 또는 항원에 대한 결합 친화성 또는 결합력의 향상에 특별히 적합할 수 있다. 개선된 결합력은 치료 효과를 달성하기 위해 필요한 CAR-T 세포의 용량, 예컨대 대상체의 질량 킬로그램당 4.0×10^5 내지 1.0×10^6 개의 CAR-T 세포, 또는 3.0×10^7 내지 1.0×10^8 개의 CAR-T 세포의 범위의 용량의 실질적인 감소를 가능하게 할 수 있다. bb2121과 같은 단일가 CAR은 유사한 효과를 달성하기 위해 이러한 양의 5 내지 10배로 투여할 필요가 있을 수 있다. 다양한 실시 형태에서, 감소된 투여량 범위는 CAR-T 요법의 사이토카인 방출 증후군(CRS) 및 다른 잠재적으로 위험한 부작용의 실질적인 감소를 제공할 수 있다.
- [0092] 본 명세서에 기재된 CAR 내의 다양한 결합 모이어티(예를 들어, 제1 항-BCMA 결합 모이어티 및 제2 BCMA 결합 모이어티를 포함하는 세포외 항원 결합 도메인)는 펩티드 링커를 통해 서로에게 연결될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 결합 모이어티(예컨대 sdAb)는 임의의 펩티드 링커 없이 서로에게 직접 연결된다. 상이한 결합 모이어티(예컨대 sdAb)를 연결하는 펩티드 링커는 동일하거나 상이할 수 있다. CAR의 상이한 도메인은 또한 펩티드 링커를 통해 서로에게 연결될 수 있다.
- [0093] 본 명세서에 기재된 CAR 내의 펩티드 링커는 임의의 적합한 길이의 것일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 펩티드 링커는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100개 이상 중 임의의 것 이상의 아미노산 길이이다. 일부 실시 형태에서, 펩티드 링커는 약 100, 75, 50, 40, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5개 이하 중 임의의 것 이하의 아미노산 길이이다. 일부 실시 형태에서, 펩티드 링커의 길이는 약 1개 아미노산 내지 약 10개 아미노산, 약 1개 아미노산 내지 약 20개 아미노산, 약 1개 아미노산 내지 약 30개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 15개 아미노산, 약 10개 아미노산 내지 약 25개 아미노산, 약 5개 아미노산 내지 약 30개 아미노산, 약 10개 아미노산 내지 약 30개 아미노산 길이, 약 30개 아미노산 내지 약 50개 아미노산, 약 50개 아미노산 내지 약 100개 아미노산, 또는 약 1개 아미노산 내지 약 100개 아미노산 중 임의의 것이다.
- [0094] 본 출원의 CAR은 세포외 항원 결합 도메인에 직접적으로 또는 간접적으로 연결될 수 있는 막관통 도메인을 포함한다.
- [0095] CAR은 T-세포 활성화 모이어티를 포함할 수 있다. T-세포 활성화 모이어티는 임의의 적합한 분자로부터 유래되거나 얻어진 임의의 적합한 모이어티일 수 있다. 일 실시 형태에서, 예를 들어, T-세포 활성화 모이어티는 막관통 도메인을 포함한다. 막관통 도메인은 당업계에 알려진 임의의 분자로부터 유래되거나 얻어진 임의의 막관통 도메인일 수 있다. 예를 들어, 막관통 도메인은 CD8 α 분자 또는 CD28 분자로부터 얻어지거나 유래될 수 있다. CD8은 T-세포 수용체(TCR)에 대한 공동-수용체로서 작용하는 막관통 당단백질이며, 세포독성 T-세포의 표면 상에서 주로 발견된다. CD8의 가장 일반적인 형태는 CD8 α 및 CD8β 사슬로 구성된 이량체로서 존재한다. CD28은 T-세포 상에서 발견되며, T-세포 활성화에 필요한 공동-자극 신호를 제공한다. CD28은 CD80(B7.1) 및 CD86(B7.2)에 대한 수용체이다. 바람직한 실시 형태에서, CD8 α 및 CD28은 인간이다.
- [0096] 막관통 도메인에 더하여, T-세포 활성화 모이어티는 세포내(즉, 세포질) T-세포 신호전달 도메인을 추가로 포함

한다. 세포간 T-세포 신호전달 도메인은 CD28 분자, CD3 제타(ζ) 분자 또는 이의 변형된 버전, 인간 Fc 수용체 감마(FcR γ) 사슬, CD27 분자, OX40 분자, 4-1BB 분자, 또는 당업계에 알려진 다른 세포내 신호전달 분자로부터 얻어지거나 유래될 수 있다. 상기 논의된 바와 같이, CD28은 T-세포 공동-자극에서 중요한 T-세포 마커이다. CD3 ζ 는 TCR과 회합하여 신호를 생성하며, 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM)를 함유한다. CD137로도 알려진 4-1BB는 강력한 공동자극 신호를 T-세포에 전달하여, T 림프구의 분화를 촉진하고 장기간 생존을 향상시킨다. 바람직한 실시 형태에서, CD28, CD3 ζ , 4-1BB, OX40, 및 CD27은 인간이다.

[0097] 본 발명의 핵산 서열에 의해 인코딩되는 CAR의 T-세포 활성화 도메인은 전술한 막관통 도메인 중 어느 하나 및 전술한 세포간 T-세포 신호전달 도메인 중 어느 하나 이상을 임의의 조합으로 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 핵산 서열은 CD28 막관통 도메인 및 CD28 및 CD3 ζ 의 세포내 T-세포 신호전달 도메인을 포함하는 CAR을 인코딩할 수 있다. 대안적으로, 예를 들어, 본 발명의 핵산 서열은 CD8 α 막관통 도메인 및 CD28, CD3 ζ , Fc 수용체 감마(FcR γ) 사슬, 및/또는 4-1 BB의 세포내 T-세포 신호전달 도메인을 포함하는 CAR을 인코딩할 수 있다.

[0098] 일부 실시 형태에서, 제1 BCMA 결합 모이어티 및/또는 제2 BCMA 결합 모이어티는 항-BCMA sdAb이다. 일부 실시 형태에서, 제1 BCMA 결합 모이어티는 제1 항-BCMA sdAb이고 제2 BCMA 결합 모이어티는 제2 항-BCMA sdAb이다. 소정 실시 형태에서, 제1 BCMA 결합 모이어티는 QVKLEESGGGLVQAGRSLRLSCAASEHTFSSHVMGWFRRQAPGKERESVAVIGWRDISTSYADSVKGRFTISRDNAKKTLYLQMNLSKPEDTAVYYCAARRID AADFDSWGGTQVTVSS(서열 번호 1)의 아미노산 서열을 포함한다. 소정 실시 형태에서, 제1 BCMA 결합 모이어티는 CAGGTCAAACCTGGAAGAATCTGGCGGAGGCCTGGTGCAGGCAGGACGGAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCAGCATCCGAGCACACCTTCAGTCCCACGTGATGGCTGGTTTCGGCAGGCCCCAGGCAAGGAGAGAGAGAGCGTGGCCGTGATCGCTGGAGGGACATCTCCACATCTTACGCCGATTCCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATCAGCCGGACAACGCCAAGAAGACACTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAAGCCCGAGGACACCCCGTGTACTATTGCGCAGCAAGGAGAATCGAC GCAGCAGACTTTGATTCTGGGGCCAGGGCACCCAGGTGACAGTGTCTAGC(서열 번호 2)의 핵산 서열에 의해 인코딩되는 폴리펩티드를 포함한다.

[0099] 소정 실시 형태에서, 제2 BCMA 결합 모이어티는 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTTMGWFRQAPGKEREFVAAISLPTLAYYAESVKGRFTISRDNAKNTVVLQMNLSKPEDTALYYCAADRKSVM S IRPDYWGQGTQVTVSS(서열 번호 3)의 아미노산 서열을 포함한다. 소정 실시 형태에서, 제2 BCMA 결합 모이어티는 GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGCCCTGGTGCAGGCCGAGGCTCTCTGAGGCTGAGCTGTGCAGCATCCGGAAGAACCTTACAATGGGTGGTTT AGGCAGGCACCAGGAAAGGAGAGGGAGTTCTGTGGCAGCAATCAGCCTGTCCCTACCCTGGCCTACTATGCCGAGAGCGTGAAGGGCAGGTTTACCATCTCC CGCGATAACGCCAAGAATACAGTGGTGTGCAGATGAACCTCCGAAACCTGAGGACACAGCCCTGTACTATTGTGCCCGATCCGGAAGAGCGTGTGAGC ATTAGACCAGACTATTGGGGCAGGGAACACAGGTGACCGTGAGCAGC(서열 번호 4)의 핵산 서열에 의해 인코딩되는 폴리펩티드를 포함한다.

[0100] 일부 실시 형태에서, 제1 BCMA 결합 모이어티 및 제2 BCMA 결합 모이어티는 펩티드 링커를 통해 서로에게 연결된다. 소정 실시 형태에서, 펩티드 링커는 GGGGS(서열 번호 5)의 아미노산 서열을 포함한다.

[0101] 일부 실시 형태에서, CAR 폴리펩티드는 폴리펩티드의 N-말단에 위치하는 신호 펩티드를 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 신호 펩티드는 CD8 α 로부터 유래한다. 소정 실시 형태에서, 신호 펩티드는 MALPVTALLLPLALLHAARP(서열 번호 6)의 아미노산 서열을 포함한다. 소정 실시 형태에서, 신호 펩티드는 ATGGCTCTGCCGTCACCGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCACGCTGCTGCCT(서열 번호 7)의 핵산 서열에 의해 인코딩되는 폴리펩티드를 포함한다.

[0102] 소정 실시 형태에서, 막관통 도메인은 IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYC(서열 번호 8)의 아미노산 서열을 포함한다.

[0103] 소정 실시 형태에서, 막관통 도메인은 ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGACTTGTGGGTCCTTCTCTGTCAGTGGTTATCACCCTTACTGC(서열 번호 9)의 핵산 서열에 의해 인코딩되는 폴리펩티드를 포함한다.

[0104] 일부 실시 형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 면역 이펙터 세포의 1차 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 ζ 로부터 유래한다. 일부 실시 형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 하나 이상의 공동-자극 신호전달 도메인을 포함한다. 소정 실시 형태에서, 세포내 신호전달 도메인은 RVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDYD ALHMQUALPPR(서열 번호 10)의 아미노산 서열을 포함한다.

[0105] 소정 실시 형태에서, 세포내 신호전달 도메인은

모이어티, 및 BCMA의 제2 에피토프에 특이적으로 결합하는 제2 BCMA 결합 모이어티를 포함하는 세포의 항원 결합 도메인; (b) 막관통 도메인; 및 (c) 세포내 신호전달 도메인(여기서 제1 에피토프 및 제2 에피토프는 상이함). 소정 실시 형태에서, 투여 형태는 3.0×10^7 내지 4.0×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 소정 실시 형태에서, 투여 형태는 3.5×10^7 내지 4.5×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 소정 실시 형태에서, 투여 형태는 4.0×10^7 내지 5.0×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 소정 실시 형태에서, 투여 형태는 4.5×10^7 내지 5.5×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 소정 실시 형태에서, 투여 형태는 5.0×10^7 내지 6.0×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 소정 실시 형태에서, 투여 형태는 5.5×10^7 내지 6.5×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 소정 실시 형태에서, 투여 형태는 6.0×10^7 내지 7.0×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 소정 실시 형태에서, 투여 형태는 6.5×10^7 내지 7.5×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 소정 실시 형태에서, 투여 형태는 7.0×10^7 내지 8.0×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 소정 실시 형태에서, 투여 형태는 7.5×10^7 내지 8.5×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 소정 실시 형태에서, 투여 형태는 8.0×10^7 내지 9.0×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 소정 실시 형태에서, 투여 형태는 8.5×10^7 내지 9.5×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 소정 실시 형태에서, 투여 형태는 9.0×10^7 내지 1.0×10^8 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 투여 형태는 2×10^7 내지 8×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 투여 형태는 약 1×10^7 , 약 2×10^7 , 약 3×10^7 , 약 4×10^7 , 약 5×10^7 , 약 6×10^7 , 약 7×10^7 , 약 8×10^7 , 약 9×10^7 , 또는 약 1×10^8 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 투여 형태는 약 5.1×10^7 , 약 5.2×10^7 , 약 5.25×10^7 , 약 5.3×10^7 , 약 5.4×10^7 , 약 5.5×10^7 , 약 5.6×10^7 , 약 5.7×10^7 , 약 5.8×10^7 , 또는 약 5.9×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 일 실시 형태에서, 투여 형태는 약 5.25×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다.

[0114]

일부 실시 형태에는, 하기를 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 CAR을 포함하는 3.0×10^6 내지 1.0×10^8 개의 조각된 면역 이펙터 세포(예컨대 T-세포)를 포함하는 투여 형태가 제공된다: (a) BCMA의 제1 에피토프에 특이적으로 결합하는 제1 항-BCMA sdAb, 및 BCMA의 제2 에피토프에 특이적으로 결합하는 제2 항-BCMA sdAb를 포함하는 세포의 항원 결합 도메인; (b) 막관통 도메인; 및 (c) 세포내 신호전달 도메인(여기서 제1 에피토프 및 제2 에피토프는 상이함). 소정 실시 형태에서, 투여 형태는 3.0×10^7 내지 4.0×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 소정 실시 형태에서, 투여 형태는 3.5×10^7 내지 4.5×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 소정 실시 형태에서, 투여 형태는 4.0×10^7 내지 5.0×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 소정 실시 형태에서, 투여 형태는 4.5×10^7 내지 5.5×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 소정 실시 형태에서, 투여 형태는 5.0×10^7 내지 6.0×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 소정 실시 형태에서, 투여 형태는 5.5×10^7 내지 6.5×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 소정 실시 형태에서, 투여 형태는 6.0×10^7 내지 7.0×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 소정 실시 형태에서, 투여 형태는 6.5×10^7 내지 7.5×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 소정 실시 형태에서, 투여 형태는 7.0×10^7 내지 8.0×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 소정 실시 형태에서, 투여 형태는 7.5×10^7 내지 8.5×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 소정 실시 형태에서, 투여 형태는 8.0×10^7 내지 9.0×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 소정 실시 형태에서, 투여 형태는 8.5×10^7 내지 9.5×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 소정 실시 형태에서, 투여 형태는 9.0×10^7 내지 1.0×10^8 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 투여 형태는 2×10^7 내지 8×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 투여 형태는 약 1×10^7 , 약 2×10^7 , 약 3×10^7 , 약 4×10^7 , 약 5×10^7 , 약 6×10^7 , 약 7×10^7 , 약 8×10^7 , 약 9×10^7 , 또는 약 1×10^8 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 투여 형태는 약 5.1×10^7 , 약 5.2×10^7 , 약 5.25×10^7 , 약 5.3×10^7 , 약 5.4×10^7 , 약 5.5×10^7 , 약 5.6×10^7 , 약 5.7×10^7 , 약 5.8×10^7 , 또는 약 5.9×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다. 일 실시 형태에서, 투여 형태는 약 5.25×10^7 개의 CAR-T 세포를 포함한다.

[0115] **약제학적 조성물 및 제형**

[0116] 본 명세서에 기재된 바와 같은 항-BCMA 단일-도메인 항체 중 어느 하나, 또는 CAR(예컨대 BCMA CAR) 중 어느 하나를 포함하는 조작된 면역 이펙터 세포 중 어느 하나, 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물이 본 출원에 의해 추가로 제공된다. 약제학적 조성물은, 원하는 정도의 순도를 갖는 본 명세서에 기재된 면역 이펙터 세포 중 임의의 것을 임의의 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는 안정화제(문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)])와 혼합함으로써, 동결건조된 제형 또는 수용액의 형태로 제조될 수 있다.

[0117] 본 명세서에 기재된 조성물은 하나 이상의 담체를 포함하는 약제학적 조성물의 일부로서 투여될 수 있다. 담체의 선택은 CAR을 발현하는 본 발명의 특정 핵산 서열, 벡터, 또는 숙주 세포뿐만 아니라 CAR을 발현하는 본 발명의 핵산 서열, 벡터, 또는 숙주 세포를 투여하기 위해 사용되는 특정 방법에 의해 부분적으로 결정될 것이다. 따라서, 본 발명의 약제학적 조성물의 다양한 적합한 제형이 존재한다. 예를 들어, 약제학적 조성물은 보존제를 함유할 수 있다. 적합한 보존제는, 예를 들어, 메틸파라벤, 프로필파라벤, 소듐 벤조에이트, 및 벤즈알코늄 클로라이드를 포함할 수 있다. 2개 이상의 보존제의 혼합물이 임의로 사용될 수 있다. 보존제 또는 이들의 혼합물은 전형적으로 총 조성물의 약 0.0001 중량% 내지 약 2 중량%의 양으로 존재한다.

[0118] 또한, 완충제가 조성물에 사용될 수 있다. 적합한 완충제는, 예를 들어, 시트르산, 소듐 시트레이트, 인산, 포타슘 포스페이트, 및 다양한 다른 산 및 염을 포함한다. 2개 이상의 완충제의 혼합물이 임의로 사용될 수 있다. 완충제 또는 이들의 혼합물은 전형적으로 총 조성물의 약 0.001 중량% 내지 약 4 중량%의 양으로 존재한다.

[0119] CAR을 인코딩하는 본 발명의 핵산 서열, 또는 CAR을 발현하는 숙주 세포를 포함하는 조성물은 사이클로텍스트린 포접 복합체와 같은 포접 복합체로서, 또는 리포솜으로서 제형화될 수 있다. 리포솜은 숙주 세포(예를 들어, T-세포 또는 NK 세포) 또는 본 발명의 핵산 서열을 특정 조직에 표적화하는 작용을 할 수 있다. 리포솜은 또한 본 발명의 핵산 서열의 반감기를 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Szoka et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9: 467 (1980)], 및 미국 특허 제4,235,871호; 제4,501,728호; 제4,837,028호; 및 제5,019,369호에 기재된 것들과 같은, 리포솜의 제조를 위한 다수의 방법이 입수가 가능하다. 치료하고자 하는 부위의 감각화 전에, 그리고 이를 야기하기에 충분한 시간을 두고 본 발명의 조성물의 전달이 일어나도록, 조성물은 시한 방출(time-released), 지연 방출, 및 지속 방출 전달 시스템을 사용할 수 있다. 많은 유형의 방출 전달 시스템이 입수가 가능하고 당업자에게 알려져 있다. 그러한 시스템은 조성물의 반복 투여를 피할 수 있으며, 그럼으로써 대상체 및 의사에 대한 편의성을 증가시킬 수 있고, 본 발명의 소정의 조성물 실시 형태에 특히 적합할 수 있다.

[0120] **치료 방법**

[0121] 추가로 본 출원은 세포 면역요법에 사용하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 일부 실시 형태에서, 세포 면역요법은 혈액학적 악성 종양 및 고형 종양을 포함하지만 이로 제한되지 않는 암을 치료하기 위한 것이다. 본 방법은 연령의 모든 서브셋을 포함하여 성인 및 소아 집단의 치료에 적합하며, 제1 라인 또는 후속 라인을 포함하는 임의의 치료 라인으로서 사용될 수 있다.

[0122] 본 명세서에 기재된 항-BCMA sdAb, CAR, 및 조작된 면역 이펙터 세포(예컨대 CAR-T 세포) 중 임의의 것은 암을 치료하는 방법에 사용될 수 있다.

[0123] 소정 실시 형태에서, CAR-T 세포는 약 4.0×10^5 내지 5.0×10^5 개의 세포/kg, 4.5×10^5 내지 5.5×10^5 개의 세포/kg, 5.0×10^5 내지 6.0×10^5 개의 세포/kg, 5.5×10^5 내지 6.5×10^5 개의 세포/kg, 6.0×10^5 내지 7.0×10^5 개의 세포/kg, 6.5×10^5 내지 7.5×10^5 개의 세포/kg, 7.0×10^5 내지 8.0×10^5 개의 세포/kg, 7.5×10^5 내지 8.5×10^5 개의 세포/kg, 8.0×10^5 내지 9.0×10^5 개의 세포/kg, 8.5×10^5 내지 9.5×10^5 개의 세포/kg, 9.0×10^5 내지 1.0×10^6 개의 세포/kg의 용량으로 투여된다. 소정 실시 형태에서, CAR-T 세포는 약 7.1×10^5 개의 세포/kg, 약 7.2×10^5 개의 세포/kg, 약 7.3×10^5 개의 세포/kg, 약 7.4×10^5 개의 세포/kg, 약 7.5×10^5 개의 세포/kg, 약 7.6×10^5 개의 세포/kg, 약 7.7×10^5 개의 세포/kg, 약 7.8×10^5 개의 세포/kg, 또는 약 7.9×10^5 개의 세포/kg의 용량으로 투여된다. 일 실시 형태에서, CAR-T 세포는 약 7.5×10^6 개의 세포/kg의 용량으로 투

$x 10^7$, 약 5.4×10^7 , 약 5.5×10^7 , 약 5.6×10^7 , 약 5.7×10^7 , 약 5.8×10^7 , 또는 약 5.9×10^7 개의 세포를 유발하는 용량으로 투여된다. 일 실시 형태에서, CAR-T 세포는 대상체에서 약 5.25×10^7 개의 세포를 유발하는 용량으로 투여된다.

[0125] 본 명세서에 기재된 방법은 고형 암 및 액상 암 둘 모두를 포함하는 다양한 암의 치료에 사용될 수 있다. 소정 실시 형태에서, 본 방법은 다발성 골수종을 치료하기 위해 사용된다. 본 명세서에 기재된 방법은 제1 요법, 제2 요법, 제3 요법, 또는 보조 요법(adjuvant setting) 또는 신보조 요법(neoadjuvant setting)에서 화학요법, 수술, 방사선, 유전자 요법, 면역요법, 골수 이식, 줄기 세포 이식, 표적화 요법, 동결요법, 초음파 요법, 광역학적 요법, 고주파 열치료 등과 같은 당업계에 알려진 다른 유형의 암 요법과의 조합 요법으로서 사용될 수 있다.

[0126] 일부 실시 형태에서, 암은 다발성 골수종이다. 일부 실시 형태에서, 암은 I기, II기, 또는 III기, 및/또는 듀리-새먼(Durie-Salmon) 병기 결정 시스템에 기초하는 A기 또는 B기 다발성 골수종이다. 일부 실시 형태에서, 암은 국제 골수종 작업 그룹(IMWG)에 의해 공개된 국제 병기 결정 시스템에 기초한 I기, II기, 또는 III기 다발성 골수종이다.

[0127] 본 발명의 CAR-인코딩 핵산 서열을 발현하는 숙주 세포, 또는 본 발명의 CAR-인코딩 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는 조성물은 경구, 정맥내, 복강내, 피하, 폐, 경피, 근육내, 비강내, 협측, 설하, 또는 좌제 투여를 포함하는 표준 투여 기술을 사용하여 포유동물에게 투여할 수 있다. 조성물은 바람직하게는 비경구 투여에 적합하다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "비경구"는 정맥내, 근육내, 피하, 직장, 질, 및 복강내 투여를 포함한다. 더욱 바람직하게는, 조성물은 정맥내, 복강내, 또는 피하 주사에 의한 말초 전신 전달을 사용하여 포유동물에게 투여된다.

[0128] 본 발명의 CAR-인코딩 핵산 서열을 발현하는 숙주 세포, 또는 본 발명의 CAR-인코딩 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는 조성물은 포유동물에게 공동투여될 수 있는 하나 이상의 추가의 치료제와 함께 투여될 수 있다. "공동투여"는 본 발명의 CAR이 하나 이상의 추가의 치료제의 효과를 향상시키거나 그 역 또한 성립할 수 있도록 하나 이상의 추가의 치료제 및 본 발명의 숙주 세포 또는 본 발명의 벡터를 포함하는 조성물을 시간적으로 충분히 근접하여 투여하는 것을 의미한다. 이와 관련하여, 본 발명의 숙주 세포 또는 본 발명의 벡터를 포함하는 조성물을 먼저 투여하고 하나 이상의 추가의 치료제를 두번째로 투여하거나 그 역 또한 성립할 수 있다.

[0129] 본 명세서에 기재된 CAR-발현 세포 및 적어도 하나의 추가의 치료제는 동일한 조성물로 또는 별개의 조성물로 동시에, 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 순차적 투여의 경우, 본 명세서에 기재된 CAR-발현 세포가 먼저 투여될 수 있고, 추가의 작용제는 두 번째로 투여될 수 있거나, 또는 투여 순서는 역전될 수 있다.

[0130] 본 발명의 CAR-인코딩 핵산 서열을 발현하는 숙주 세포, 또는 본 발명의 CAR-인코딩 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는 조성물이 포유동물(예를 들어, 인간)에게 일단 투여되면, 당업계에 알려진 임의의 적합한 방법에 의해 CAR의 생물학적 활성이 측정될 수 있다. 본 발명의 방법에 따라, CAR은 다발성 골수종 세포 상의 BCMA에 결합하고, 다발성 골수종 세포는 파괴된다. 다발성 골수종 세포의 표면 상의 BCMA에 대한 CAR의 결합은, 예를 들어, ELISA 및 유세포 분석을 포함하는 당업계에 알려진 임의의 적합한 방법을 사용하여 검정할 수 있다. 다발성 골수종 세포를 파괴하는 CAR의 능력은, 예를 들어, 문헌[Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009)], 및 문헌[Herman et al. J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004)]에 기재된 세포독성 검정과 같은, 당업계에 알려진 임의의 적합한 방법을 사용하여 측정할 수 있다. CAR의 생물학적 활성은 또한 CD 107a, IFN- γ , IL-2, 및 TNF와 같은 소정 사이토카인의 발현을 검정함으로써 측정할 수 있다.

[0131] **T 세포 표현형 특성화**

[0132] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 CAR-T 투여 형태의 세포 집단은, 예를 들어, 다양한 분화 단계에서의 T 세포 또는 T 세포의 집단을 포함한다. T 세포 분화의 단계는, 최소 내지 최대로 분화된 미접촉 T 세포, 줄기 중심 기억 T 세포, 중심 기억 T 세포, 이펙터 기억 T 세포, 및 최종 이펙터 T 세포를 포함한다. 항원 노출 후에, 미접촉 T 세포는 증식하고 기억 T 세포, 예를 들어, 줄기 중심 기억 T 세포 및 중심 기억 T 세포로 분화하며, 이어서 이는 이펙터 기억 T 세포로 분화된다. 적절한 T 세포 수용체가 공동자극 및 염증성 신호를 받을 시에, 기억 T 세포는 최종 이펙터 T 세포로 추가로 분화된다. 예를 들어, 문헌[Restifo. Blood. 124.4(2014):476-77]; 및 문헌[Josh et al. J. Immunol. 180.3(2008):1309-15]을 참조한다.

[0133] 미접촉 T 세포는 하기 세포 표면 마커의 발현 패턴을 가질 수 있다: CCR7+, CD62L+, CD45RO-, CD95-. 줄기 중

심 기억 T 세포(Tscm)는 하기 세포 표면 마커의 발현 패턴을 가질 수 있다: CCR7+, CD62L+, CD45RO-, CD95+. 중심 기억 T 세포(Tcm)는 하기 세포 표면 마커의 발현 패턴을 가질 수 있다: CCR7+, CD62L+, CD45RO+, CD95+. 이펙터 기억 T 세포(Tem)는 하기 세포 표면 마커의 발현 패턴을 가질 수 있다: CCR7-, CD62L-, CD45RO+, CD95+. 최종 이펙터 T 세포(Teff)는 하기 세포 표면 마커의 발현 패턴을 가질 수 있다: CCR7-, CD62L-, CD45RO-, CD95+. 예를 들어, 문헌[Gattinoni et al. Nat. Med. 17(2011):1290-7]; 및 문헌[Flynn et al. Clin. Translat. Immunol. 3(2014):e20]을 참조한다. 도 17 및 도 18은 또한 이들 및 추가의 부류의 T 세포 각각 상에서 발현되는 마커를 나타낸다.

[0134] 이론에 구애되고자 함이 없이, 주입-전 T 세포 표현형은 CAR+ T 세포의 확장 및 지속성, 독성 프로파일, 및 임상 반응과 상관관계가 있을 수 있다. 약물 생성물(DP) 및 주입-후 CD4: CD8 비 및 CAR-T 기억 표현형은 또한 CAR+ T 세포의 확장 및 지속성, 독성 프로파일, 및 임상 반응에 대한 정보를 제공할 수 있다. DP 자체의, 성분 채집술에 의한 환자의 T 세포의 초기 수집을 포함하는 다양한 단계에서, 그리고 주입-후 다양한 시점에서, CD4 및 CD8 T 세포 서브세트의 면역표현형 분석을 수행할 수 있다(예를 들어, 서브세트, 활성화 상태, 비를 특성화 하기 위함).

[0135] 다양한 실시 형태에서, CAR-T 세포의 용량 내의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 CD4+ CAR-T 세포의 비는 4 미만이다. 일부 실시 형태에서, CAR-T 세포의 용량 내의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 CD4+ CAR-T 세포의 비는 2 미만이다. 일부 실시 형태에서, CAR-T 세포의 용량 내의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 CD4+ CAR-T 세포의 비는 1.8 미만이다. 일부 실시 형태에서, CAR-T 세포의 용량 내의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 CD4+ CAR-T 세포의 비는 1.7 미만이다. 일부 실시 형태에서, CAR-T 세포의 용량 내의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 CD4+ CAR-T 세포의 비는 1.6 미만이다. 특이적 실시 형태에서, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20명 이상의 환자에서, CAR-T 세포의 용량 내의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 CD4+ CAR-T 세포의 중위 비는 1.6 미만이다. 특이적 실시 형태에서, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20명 이상의 환자에서, CAR-T 세포의 용량 내의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 CD4+ CAR-T 세포의 중위 비는 약 1.54이다. 특이적 실시 형태에서, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20명 이상의 환자에서, CAR-T 세포의 용량 내의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 CD4+ CAR-T 세포의 중위 비는 1.54이다.

[0136] 상기 방법의 다양한 실시 형태에서, 본 방법은 Cmax에서 대상체 내의 CD4+ CAR-T 세포의 양을 검정하는 단계, Cmax에서 대상체 내의 CD8+ CAR-T 세포의 양을 검정하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서 Cmax에서의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 Cmax에서의 CD4+ CAR-T 세포의 비는 3.5 미만이다. 일부 실시 형태에서, Cmax에서의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 Cmax에서의 CD4+ CAR-T 세포의 비는 2.0 미만이다. 일부 실시 형태에서, Cmax에서의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 Cmax에서의 CD4+ CAR-T 세포의 비는 1.2 미만이다. 일부 실시 형태에서, Cmax에서의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 Cmax에서의 CD4+ CAR-T 세포의 비는 0.8 미만이다. 일부 실시 형태에서, Cmax에서의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 Cmax에서의 CD4+ CAR-T 세포의 비는 0.6 미만이다. 일부 실시 형태에서, Cmax에서의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 Cmax에서의 CD4+ CAR-T 세포의 비는 0.4 미만이다. 일부 실시 형태에서, Cmax에서의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 Cmax에서의 CD4+ CAR-T 세포의 비는 0.3 미만이다. 일부 실시 형태에서, Cmax에서의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 Cmax에서의 CD4+ CAR-T 세포의 비는 약 0.3이다. 특이적 실시 형태에서, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20명 이상의 환자에서, CAR-T 세포의 용량 내의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 CD4+ CAR-T 세포의 중위 비는 1.6 미만이다. 특이적 실시 형태에서, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20명 이상의 환자에서, Cmax에서의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 CD4+ CAR-T 세포의 중위 비는 약 0.35이다. 특이적 실시 형태에서, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20명 이상의 환자에서, Cmax에서의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 CD4+ CAR-T 세포의 중위 비는 0.35이다. 특이적 실시 형태에서, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20명 이상의 환자에서, Cmax에서의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 CD4+ CAR-T 세포의 중위 비는 약 0.3이다. 특이적 실시 형태에서, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20명 이상의 환자에서, Cmax에서의 CD8+ CAR-T 세포에 대한 CD4+ CAR-T 세포의 중위 비는 0.3이다.

[0137] 상기 방법의 다양한 실시 형태에서, 용량이 투여된 후 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 또는 65 일에 중심 기억 CAR+ T 세포는 CAR+ T 세포의 총량의 85% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 용량이 투여된 후 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59,

60, 61, 62, 63, 64, 또는 65 일에 중심 기억 CAR+ T 세포는 CAR+ T 세포의 총량의 90% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 용량이 투여된 후 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 또는 45 일에 중심 기억 CAR+ T 세포는 CAR+ T 세포의 총량의 95% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 용량이 투여된 후 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30 일에 중심 기억 CAR+ T 세포는 CAR+ T 세포의 총량의 97% 이상을 차지한다.

[0138] 소정 실시 형태에서, 중심 기억 CAR+ T 세포는 CAR+ T 세포의 총량의 85 내지 86%, 86 내지 87%, 87 내지 88%, 88 내지 89%, 89 내지 90%, 90 내지 91%, 91 내지 92%, 92 내지 93%, 93 내지 94%, 94 내지 95%, 95 내지 96%, 96 내지 97%, 97 내지 98%, 또는 98 내지 99%를 차지한다.

[0139] 상기 방법의 다양한 실시 형태에서, 용량이 투여된 후 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 또는 65 일에 이펙터 기억 CAR+ T 세포는 CAR+ T 세포의 총량의 2% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 용량이 투여된 후 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 또는 65 일에 이펙터 기억 CAR+ T 세포는 CAR+ T 세포의 총량의 5% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 용량이 투여된 후 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 또는 45 일에 이펙터 기억 CAR+ T 세포는 CAR+ T 세포의 총량의 7% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 용량이 투여된 후 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30 일에 이펙터 기억 CAR+ T 세포는 CAR+ T 세포의 총량의 8% 이상을 차지한다.

[0140] 상기 방법의 다양한 실시 형태에서, 본 방법은 용량이 투여된 후에 Cmax에서의 대상체에서 CAR+ CD8+ T 세포의 총량에 대한 중심 기억 CAR+ CD8+ T 세포의 비를 검정하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서 중심 기억 CAR+ CD8+ T 세포는 CAR+ CD8+ T 세포의 총량의 30% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 중심 기억 CAR+ CD8+ T 세포는 CAR+ CD8+ T 세포의 총량의 50% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 중심 기억 CAR+ CD8+ T 세포는 CAR+ CD8+ T 세포의 총량의 50% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 중심 기억 CAR+ CD8+ T 세포는 CAR+ CD8+ T 세포의 총량의 80% 이상을 차지한다. 소정 실시 형태에서, 중심 기억 CAR+ CD8+ T 세포는 CAR+ CD8+ T 세포의 총량의 55 내지 70%, 56 내지 71%, 57 내지 72%, 58 내지 73%, 59 내지 74%, 60 내지 75%, 61 내지 76%, 62 내지 77%, 63 내지 78%, 64 내지 79%, 65 내지 80%, 66 내지 81%, 67 내지 82%, 68 내지 83%, 70 내지 85%, 72 내지 87%, 74 내지 89%, 76 내지 91%, 78 내지 93%, 또는 80 내지 100%를 차지한다.

[0141] 상기 방법의 다양한 실시 형태에서, 본 방법은 용량이 투여된 후에 Cmax에서의 대상체에서 CAR+ CD4+ T 세포의 총량에 대한 중심 기억 CAR+ CD4+ T 세포의 비를 검정하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서 중심 기억 CAR+ CD4+ T 세포는 CAR+ CD4+ T 세포의 총량의 60% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 중심 기억 CAR+ CD4+ T 세포는 CAR+ CD4+ T 세포의 총량의 65% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 중심 기억 CAR+ CD4+ T 세포는 CAR+ CD4+ T 세포의 총량의 70% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 중심 기억 CAR+ CD4+ T 세포는 CAR+ CD4+ T 세포의 총량의 75% 이상을 차지한다. 소정 실시 형태에서, 중심 기억 CAR+ CD4+ T 세포는 CAR+ CD8+ T 세포의 총량의 65 내지 80%, 66 내지 81%, 67 내지 82%, 68 내지 83%, 69 내지 84%, 70 내지 85%, 71 내지 86%, 72 내지 87%, 73 내지 88%, 74 내지 89%, 75 내지 90%, 76 내지 91%, 77 내지 92%, 78 내지 93%, 80 내지 90%, 82 내지 92%, 84 내지 94%, 86 내지 96%, 88 내지 98%, 또는 90 내지 100%를 차지한다.

[0142] 상기 방법의 다양한 실시 형태에서, 본 방법은 용량이 투여된 후에 Cmax에서의 대상체에서 CAR+ CD8+ T 세포의 총량에 대한 이펙터 기억 CAR+ CD8+ T 세포의 비를 검정하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서 이펙터 기억 CAR+ CD8+ T 세포는 CAR+ CD8+ T 세포의 총량의 2% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 이펙터 기억 CAR+ CD8+ T 세포는 CAR+ CD8+ T 세포의 총량의 5% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 이펙터 기억 CAR+ CD8+ T 세포는 CAR+ CD8+ T 세포의 총량의 8% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 이펙터 기억 CAR+ CD8+ T 세포는 CAR+ CD8+ T 세포의 총량의 10% 이상을 차지한다.

[0143] 상기 방법의 다양한 실시 형태에서, 본 방법은 용량이 투여된 후에 Cmax에서의 대상체에서 CAR+ CD4+ T 세포의 총량에 대한 이펙터 기억 CAR+ CD4+ T 세포의 비를 검정하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서 이펙터 기억 CAR+ CD4+ T 세포는 CAR+ CD4+ T 세포의 총량의 70% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 이펙터 기억 CAR+ CD4+

T 세포는 CAR+ CD4+ T 세포의 총량의 75% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 이펙터 기억 CAR+ CD4+ T 세포는 CAR+ CD4+ T 세포의 총량의 80% 이상을 차지한다. 일부 실시 형태에서, 이펙터 기억 CAR+ CD4+ T 세포는 CAR+ CD4+ T 세포의 총량의 90% 이상을 차지한다. 소정 실시 형태에서, 이펙터 기억 CAR+ CD4+ T 세포는 CAR+ CD8+ T 세포의 총량의 70 내지 80%, 70 내지 85%, 71 내지 86%, 72 내지 87%, 73 내지 88%, 74 내지 89%, 75 내지 90%, 76 내지 91%, 77 내지 92%, 78 내지 93%, 80 내지 90%, 82 내지 92%, 84 내지 94%, 86 내지 96%, 88 내지 98%, 또는 90 내지 100%를 차지한다.

[0144] 이론에 구애되고자 함이 없이, 도 22c 및 도 22d에 나타낸 바와 같이 환자에서 세포의 백분율은 임상 반응을 예측할 수 있다.

[0145] 치료 중의 다양한 지점에, 예를 들어, 약물 생성물(DP)의 투여 또는 주입 전 10 일에, DP의 투여 또는 주입 시점에, 그리고 DP의 투여 후 임의의 시점에(예를 들어, DP 투여 후 10 일, 20 일, 30 일, 40 일, 60 일, 80 일, 및 100 일) 사이토카인(예를 들어, IL-6, IFN- γ , IL-10, TNF- α , IL-2, 및 IL-2R α)의 검정을 수행할 수 있다. 이론에 구애되고자 함이 없이, 도 26a 및 도 26b의 데이터에 나타낸 바와 같이, IL-6 혈청 사이토카인 수준은 임상 반응이 아니라 사이토카인 방출 증후군과 상관관계가 있을 수 있다.

[0146] **키트 및 제조 물품**

[0147] 본 명세서에 기재된 조성물 중 임의의 것이 키트 내에 포함될 수 있다. 일부 실시 형태에서는, 조각된 불멸화 CAR-T 세포가 키트 내에 제공되며, 이는 또한 세포를 확장시키기 위해 적합한 시약, 예컨대 배지를 포함할 수 있다.

[0148] 비제한적인 예로서, 키메라 수용체 발현 작제물, 키메라 수용체 발현 작제물을 생성하기 위한 하나 이상의 시약, 발현 작제물의 형질감염을 위한 세포, 및/또는 발현 구조물의 형질감염을 위한 불멸화 T 세포를 얻기 위한 하나 이상의 기구를 포함할 수 있다(그러한 기구는 주사기, 피펫, 겐자, 및/또는 임의의 그러한 의학적으로 승인된 장치일 수 있음).

[0149] 일부 태양에서, 키트는 세포의 전기천공을 위한 시약 또는 장치를 포함한다.

[0150] 일부 실시 형태에서, 키트는 인공 항원 제시 세포를 포함한다.

[0151] 키트는 본 발명의 조성물을 생성하기 위하여 본 발명의 하나 이상의 적합하게 분취된 조성물 또는 시약을 포함할 수 있다. 키트의 성분들은 수성 매질 내에 또는 동결건조된 형태로 패키징될 수 있다. 키트의 용기 수단은, 성분이 안으로 넣어질 수 있으며, 바람직하게는 적합하게 분취될 수 있는 적어도 하나의 바이알, 시험관, 플라스크, 병, 주사기, 또는 다른 용기 수단을 포함할 수 있다. 키트 내에 하나 초과 성분은 존재하는 경우, 일반적으로 키트는 또한, 추가의 성분이 개별적으로 안으로 넣어질 수 있는 제2, 제3, 또는 다른 추가의 용기를 수용할 것이다. 그러나, 성분들의 다양한 배합물이 바이알 내에 포함될 수 있다. 본 발명의 키트는 또한 전형적으로 시판용으로 엄중하게 관리된 상태로 키메라 수용체 작제물을 수용하기 위한 수단 및 임의의 다른 시약 용기를 포함할 것이다. 그러한 용기는 예를 들어 원하는 바이알이 내부에 보유되어 있는 사출 또는 블로우 성형된 플라스틱 용기를 포함할 수 있다.

[0152] **실시예**

[0153] 하기 실시예는 본 명세서에 개시된 실시 형태들 중 일부를 추가로 설명하기 위해 제공된다. 실시예는 개시된 실시 형태를 제한하는 것이 아니라 예시하도록 의도된다.

[0154] **실시예 1**

[0155] LCAR-B38M(JNJ-4528)은 결합력을 부여하도록 설계된 2개의 B-세포 성숙 항원(BCMA)-표적화 단일-도메인 항체를 함유하는 키메라 항원 수용체 T 세포(CAR-T) 요법이다. 작제물의 지도, 및 LCAR-B38M에 대한 개략도를 도 2a에 나타낸다. 본 명세서에서 시험된 LCAR-B38M 세포를 제조하기 위해 사용된 LCAR-B38M 작제물은 표 2에 열거된 서열을 포함한다:

[0156] [표 2]

CAR 요소	아미노산 서열
CD8 α 신호 펩티드, CD8 α SP	MALPVTALLLPLALLLHAARP(서열 번호 6)
BCMA 결합 도메인	VHH1(A37353) aa 서열 QVKLEESGGGLVQAGRSLRLSACAASEHTFSSHVMGWFRQAPGKERESV AVIGWRDISTSYADSVKGRFTISRDNAKKTLYLQMNSLKPEDTAVYYCA ARRIDAADFDSWGQGTQVTVSS(서열 번호 1) G4S 링커 aa 서열 GGGGS(서열 번호 5) VHH2(A37917) aa 서열 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSACAASGRFTFTMGWFRQAPGKEREFVAAIS LSPTLAYYAESVKGRFTISRDNAKNTVVLQMNSLKPEDTALYYCAADRK SVMISIRPDYWGQGTQVTVSS(서열 번호 3)
CD8 α 힌지	TTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD(서열 번호 15)
CD8 α 막관통	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC(서열 번호 8)
CD137 세포질	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL(서열 번호 12)
CD3 ζ 세포질	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGG KPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLST ATKDTYDALHMQUALPPR(서열 번호 10)

[0157]

[0158]

성분채집술 샘플을 25명의 환자로부터 수집하고, T 세포를 선택하고, LCAR-B38M CAR을 발현하는 BCMA CAR 작제물을 인코딩하는 렌티바이러스로 형질도입하였다. 실험의 개략도를 도 2b에 나타낸다. 이어서, 도 3에 개관된 바와 같이 25명의 환자가 MMY2001 연구에 따랐다. 환자 집단은 재발성 또는 불응성 다발성 골수종을 가지며, PI/IMiD에 대한 이중 불응성 또는 3개의 이전 라인 및 이전 PI, IMiD, αCD38 노출을 갖는 사람들을 포함하였다. MMY2001 연구의 1차 목적은 안전성 및 RP2D의 확립, 예컨대 유해 사건의 발생률 및 중증도의 연구이다(1b상). 다른 1차 목적은 효능이다: IMWG에 의해 정의된 바와 같이 부분 반응(PR) 이상으로서의 객관적 반응률(ORR)(2상). 하기는 2차 목적이다: 유해 사건의 발생률 및 중증도(2상), 면역원성의 평가, 치료-후 PRO 및 HRQoL 평가, PK 및 PD의 특성화, 및 임의의 추가의 효능 특성화. 환자로부터의 임상 반응은 도 4에 요약되어 있다.

[0159]

T 세포가 대략 3 내지 4 주 기간에 걸쳐 형질도입되고 확장되는 동안, 25명의 환자가 가교 요법(필요에 따라) 및 사이클로포스파미드 및 플루타라빈을 이용한 컨디셔닝 계획을 받았다. 이 기간 중에, 환자의 T 세포의 다양한 검정을 수행하였다. 성분채집술 샘플 및 확장 후에 형질도입된 세포들 모두의 면역 세포 조성물(본 명세서에서 "약물 생성물" 또는 "DP"로 지칭됨)을 다중 매개변수 유세포 분석에 의해 평가하였다.

[0160]

DP 내의 CAR+ T 세포의 중위 비율은 총 세포의 16%(범위 6 내지 28%)였으며, 12%(범위 4 내지 22%) CD4+ CAR+ 및 7%(범위 3 내지 20%) CD8+ CAR+ T 세포의 중위 비율을 가졌다. DP 내의 CAR+ T 세포의 CD4:CD8 비를 검정하였으며, 결과는 도 14b에서 X-축 상에 나타낸다. 도 19에 나타낸 바와 같이, 환자의 T 세포의 표현형을 또한 주입 전에 검정하였다. 이러한 프로파일은 각각의 환자 내의 CAR- 및 CAR+ T 세포 하위집단에서 유사하였지만, T 세포 서브세트(즉, 미접촉, Tscm, Tcm, Tem, Teff, 및 Temra)에 관한 DP의 조성에서 환자들 사이의 유의한 가변성이 관찰되었다.

[0161]

0.75×10^6 개의 CAR+ T 세포/kg(표적 범위 0.5 내지 1.0×10^6 개)(표 3 참조(1b상))의 표적 용량으로 LCAR-B38M DP의 단일 주입을 환자에게 투여하였다. 기준선 후 질환 평가를 갖는 21명의 환자 중에서, 전체 반응률은 3개월의 중위 추적조사(범위 1 내지 10)에서 91%였다. 차세대 유세포 분석 및/또는 차세대 서열분석에 의해 주입-후 제28일에 평가가능한 골수(BM) 샘플을 갖는 15명의 환자 중에서, 10명은 10^{-5} 감도 수준에서, 2명은 10^{-4} 감도 수준에서 최소 잔류 질환 음성이었고, 3명은 미확인 클론을 가졌다. 유세포 분석에 의해 평가된 바와 같이, 모든 환자가 기준선에서 BM 중앙 세포 내에 BCMA를 발현하였지만, 수준은 환자들 사이에서 변동되었다. 임상 반응은 BM BCMA 발현에 독립적으로 나타난다.

[0162]

연구 기간에 걸쳐 Cmax뿐만 아니라 전혈 중의 LCAR-B38M의 확장 및 지속성의 정도가 검정되었다. 이론에 구애되고자 함이 없이, Cmax는 반응(지속기간 또는 깊이)과 연관된다. 피크에서 세포 확장의 충분성 및 불충분성의 정도는 용량 증량을 개선하기 위한 정보를 제공할 수 있다. 지속성은 반응(지속기간 또는 깊이)과 연관된다. 지속성의 충분성 및 불충분성의 정도는 용량 계획을 개선하기 위한 정보를 제공할 수 있다. 약물 생성물(DP)의 특징은 또한 확장 또는 지속성에 대한 정보를 제공할 수 있다.

- [0163] 도 8b에 나타낸 바와 같이, 주입 후에, CAR+ T 세포는 확장되어 주입-후 제10일 내지 제14일에 혈중 총 T 세포의 20 내지 87%의 피크에 도달하였다. 도 8a에 나타낸 바와 같이, 마이크로그램 gDNA당 이식유전자 카피의 수를 나타내는 qPCR 검정을 또한 수행하였다. Cmax는 환자들 사이에 고도로 가변적인 반면에, Tmax는 환자들 사이에 일관적이다. 최종 DP 내의 T 세포 기억 서브세트의 CD4:CD8 비 및 비율은 피크 CAR+ T 세포 확장과 상관관계가 없었다. 피크 CAR+ T 세포 확장은 반응과 상관관계가 없었다. 도 8a 내지 도 8c에 나타낸 바와 같이, 11 주 이상의 추적조사를 갖는 15/28 명의 환자에서 CAR+ T 세포의 수/ μ l는 11주에서 LOQ(2개의 세포/ μ l) 미만이다. 예비적이지만, 8 주 후에 측정가능한 CAR+ T 세포를 갖는 환자와 비교하여 이들 환자 사이의 반응물에서는 차이가 관찰되지 않았다. 도 10a, 도 10b, 및 도 11b의 데이터에 의해 나타낸 바와 같이, 이식유전자 수준을 측정함으로써 확장 및 지속성을 평가할 때 유사한 경향이 관찰되었다. 비교 bb2121 CAR과는 달리, 임상 반응과 Cmax 또는 지속성 사이에 상관관계가 없다.
- [0164] CD4+ 및 CD8+ CAR+ T 세포 둘 모두가 생체내에서 확장되었지만, CD4:CD8 CAR+ 비는 최종 DP와 비교하여 피크 확장에서 감소하였으며(도 14b에 나타낸 바와 같이, 1.54 내지 0.35의 중위값으로부터), 이는 혈중의 CD8+ CAR+ T 세포의 우선적인 확장을 나타낸다. 탐색적 분석에 기초한 계산은 CAR+ T 세포 Cmax의 시간(Tmax)에 CD4/CD8 비가 0.29의 중위값 및 0.08 내지 3.4의 범위를 갖는다는 것을 나타낸다(도 42 참조). 피크 확장에서, CD8+ CAR+ T 세포는 주로 중심 기억(Tcm) 표현형을 나타냈다(도 20a에 나타낸 바와 같이, CCR7+ CD45RO+; 90%의 중위값[범위 29.3 내지 98.5%]). 반면에, 피크 확장에서 CD4+ CAR+ T 세포는 이펙터 기억(Tem) 세포에 풍부했다(도 20b에 나타낸 바와 같이, CCR7- CD45RO+; 87%의 중위값[범위 69.5 내지 98.1%]). 제28일에 평가가능한 샘플을 갖는 11명의 환자 모두의 BM에서 CD4:CD8 비뿐만 아니라 T 세포 기억 서브세트 조성물에서의 유사한 경향이 관찰되었다.
- [0165] 도 20a 및 도 20b에 나타낸 바와 같이, CD8+ CAR- T 세포는 대략 50:50 비의 줄기 기억(Tscm): Tcm 서브세트를 나타낸 반면에 CD4+ CAR- T 세포는 대략 50:50 비의 Tcm:Tem 서브세트를 나타냈으며, 이는 CD4+ 및 CD8+ CAR+ 및 CAR- T 세포에 대한 차등 T 세포 성숙 과정을 나타낸다.
- [0166] 도 20c에 나타낸 바와 같이, CD8+ CD45RO- CD27+인 세포의 비는 임상 반응을 예측한다. CR 또는 PRTD를 갖는 환자는 PR 또는 NR을 가진 환자보다 CD8+ CD45RO- CD27+ 세포의 백분율이 더 높았다. 도 20d는 임상 반응에 의해 그룹화된 각각의 환자에서 CD8 줄기 세포 기억 T 세포(좌측 패널) 또는 미접촉 T 세포(우측 패널)의 백분율의 상관관계를 나타내는 그래프를 예시한다.
- [0167] 연구 기간에 걸쳐 다발성 골수종 세포인 세포 대 총 백혈구의 비를 검정하였으며, 결과는 도 21a에 나타낸다. 제56일까지, 다발성 골수종 세포 대 총 백혈구의 비는 주입 시점(제0일)에서의 것 미만의 수준으로 감소되었다.
- [0168] 말초 전염증성 사이토카인 수준은 CAR+ T 세포 확장, T 세포 서브세트, 및 환자 독성 프로파일과 상관관계가 있음이 가정되었다. CRS 및 HLH/MAS는 말초 사이토카인(IL-6, IL2-RA)의 높은 수준과 상관관계가 있을 수 있다. IL-6 수준은 CAR-T 세포의 피크 확장과 상관관계가 있을 수 있다(문헌[Fraietta et al., 2018 Nature medicine 24, 563-571]). 선택된 혈청 사이토카인은 MoA 및 T 세포 서브세트 빈도를 나타낼 수 있다. CAR-T 세포 확장 및 CRS 발병에서 말초 사이토카인의 평가를 시험하였다. 도 23 내지 도 25에 나타낸 바와 같이, CAR+ T 세포의 확장은 혈청 사이토카인 수준(즉, IL-6, IFN- γ , IL-10)의 증가와 상관관계가 있었으며, 이는 CAR+ T 세포의 최대 확장과 일치하는 제10일 부근에 피크였다. 도 22의 검정에 나타낸 바와 같이, 사이토카인 방출 증후군의 등급과 LCAR-B38M의 확장 사이의 상관관계가 관찰되었다. 도 26a에 나타낸 바와 같이, 일반적으로, 일부 전염증성 사이토카인(즉, IL-6)의 증가는 사이토카인 방출 증후군 증상의 발병과 상관관계가 있다(발병까지의 중위 시간 7 일[2 내지 12]).
- [0169] 추가의 검정을 수행하였다. CD8 CAR에 비교하여, PD1+ CAR+ CD8+ T 세포의 백분율의 검정, 및 CD4 T 세포의 백분율의 검정을 각각의 환자에 대해 연구 기간 전체에 걸쳐 몇몇 날에 수행하였으며, 결과는 도 21c에 나타낸다. 결과는 CAR-T 고갈 및 조절 기전에 대한 이해를 제공할 수 있다.
- [0170] 상기 발견은 LCAR-B38M이, 다른 CAR-T 요법과 비교하여, 상대적으로 낮은 용량에서 고도로 활성인 분화된 CAR-T 세포 요법임을 시사한다. 이론에 구애되고자 함이 없이, 상대적으로 낮은 용량에서의 LCAR-B38M의 높은 활성은 중심 기억 표현형을 나타내는 CD8+ CAR+ T 세포의 우선적이고 일관적인 생체내 확장에 잠재적으로 관련된다.
- [0171] 하기 표 3은 상기 제시된 MMY2001 연구 및 관련 2상 연구에서 수행된 주입 절차를 요약한다.

[0172] [표 3]

JNJ-4528 주입의 요약; 전체 치료 분석 세트(연구 MMY2001)			
	1b 상	2 상	1b 상+2 상
분석 세트: 전체 치료	29	68	97
초기 성분채집술 이후로 JNJ-4528 주입까지의 시간(일)			
N	29	68	97
평균 (SD)	52.2(17.74)	52.3(19.74)	52.2(19.07)
중위값	44.0	47.0	47.0
범위	(42; 120)	(41; 167)	(41; 167)
성분채집술로부터 JNJ-4528 주입까지의 시간(일) ^a			
N	29	68	97
평균 (SD)	49.0(15.00)	52.3(19.74)	51.3(18.44)
중위값	44.0	47.0	46.0
범위	(41; 120)	(41; 167)	(41; 167)
JNJ-4528 주입의 지속기간(분)			
N	29	68	97
평균 (SD)	21.2(6.29)	20.3(11.86)	20.6(10.48)
중위값	20.0	17.0	19.0
범위	(14; 38)	(5; 71)	(5; 71)
주입된 총 부피(mL)			
N	29	68	97
평균 (SD)	66.6(10.45)	69.1(16.28)	68.4(14.77)
중위값	70.0	70.0	70.0
범위	(30; 70)	(30; 140)	(30; 140)
주입된 총 CAR-양성 생존가능 T 세포(x10E6 개의 세포)			
N	29	68	97
평균 (SD)	59.81(13.409)	54.69(13.696)	56.22(13.744)
중위값	59.00	51.45	54.30
범위	(35.7; 82.0)	(23.5; 93.1)	(23.5; 93.1)
제형화된 JNJ-4528 용량(x10E6 개의 세포/kg) ^b			
N	29	68	97
평균 (SD)	0.698(0.0844)	0.694(0.0821)	0.695(0.0823)
중위값	0.709	0.687	0.693
범위	(0.54; 0.88)	(0.52; 0.94)	(0.52; 0.94)
투여된 JNJ-4528 용량(x10E6 개의 세포/kg) ^c			
N	29	68	97
평균 (SD)	0.710(0.877)	0.710(0.0904)	0.710(0.0892)
중위값	0.722	0.707	0.709
범위	(0.52; 0.89)	(0.51; 0.95)	(0.51; 0.95)

^a 다중의 성분채집술 시도가 있는 경우에는 JNJ-4528 의 완전한 제조를 유발하는 성분채집술이 사용된다.
^b 성분채집술에서 중량에 의해 조정된 CAR-양성 생존가능 T 세포.
^c JNJ-4528 주입에서 중량에 의해 조정된 CAR-양성 생존가능 T 세포(JNJ-4528 주입일에, 또는 주입 전 1 일 이내에).
 주의: 주입의 지속기간은 실제 주입 시간 및, 존재하는 경우, 중단 시간 둘 모두를 포함한다.

[0173]

[0174] 본 명세서에 인용된 모든 특허, 공개된 출원 및 참고문헌의 교시 내용은 전체적으로 참고로 포함된다.

[0175] 예시적인 실시 형태가 구체적으로 제시되어 있고 기재되어 있지만, 첨부된 청구범위에 의해 포함되는 실시 형태의 범주로부터 벗어남이 없이 형태 및 세부 사항에 있어서의 다양한 변화들이 예시적인 실시 형태 내에서 이루어질 수 있음이 당업자에 의해 이해될 것이다.

[0176] 서열

[0177] LCAR-B38M CD8 α 신호 펩티드, CD8 α SP 아미노산

[0178] MALPVTALLLPLALLLHAARP(서열 번호 6)

[0179] LCAR-B38M BCMA 결합 도메인, VHH1 아미노산 서열

[0180] QVKLEESGGGLVQAGRSLRLSCAASEHTFSSHVMGWFRRQAPGKERESVAVIGWRDI STSYADSVKGRFTI SRDNAKKTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAARRID AADFDSWGQGTQVTVSS(서열 번호 1)

- [0181] LCAR-B38M BCMA 결합 도메인, G4S 링커 아미노산 서열
- [0182] GGGGS(서열 번호 5)
- [0183] LCAR-B38M BCMA 결합 도메인, VHH2 아미노산 서열
- [0184] EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTFMGWFRQAPGKEREFVAAI SLSPTLAYYAESVKGRFTI SRDNAKNTVVLQMNSLKPEDTALYYCAADRKSVMS IRPDYWGQGTQVTVSS(서열 번호 3)
- [0185] LCAR-B38M CD8 α 힌지 아미노산 서열
- [0186] TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD(서열 번호 15)
- [0187] LCAR-B38M CD8 α 막관통 아미노산 서열
- [0188] IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC(서열 번호 8)
- [0189] LCAR-B38M CD137 세포질 아미노산 서열
- [0190] KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL(서열 번호 12)
- [0191] LCAR-B38M CD3 ζ 세포질 아미노산 서열
- [0192] RVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYD ALHMQALPPR(서열 번호 10)
- [0193] LCAR-B38M CD8 α 신호 펩티드 CD8 α SP 핵산 서열
- [0194] ATGGCTCTGCCCGTACCCTCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCACGCTGCTCGCCCT(서열 번호 7)
- [0195] LCAR-B38M BCMA 결합 도메인, VHH1 핵산 서열
- [0196] CAGGTCAAACCTGGAAGAATCTGGCGGAGGCCTGGTGCAGGCAGGACGGAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCAGCATCCGAGCACACCTTCAGCTCCCACGTGATG GGCTGGTTTCGGCAGGCCCCAGGCAAGGAGAGAGAGAGCGTGGCCGTGATCGGCTGGAGGCATCTCCACATCTTACCCGATTCCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAAGACACTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAAGCCCGAGGACACCCCGGTACTATTGCGCAGCAAGGAGAATCGAC GCAGCAGACTTTGATTCTGGGGCCAGGGCACCCAGGTGACAGTGTCTAGC(서열 번호 2)
- [0197] LCAR-B38M BCMA 결합 도메인, G4S 링커(서열 번호 5) 핵산 서열
- [0198] GGAGGAGGAGGATCT(서열 번호 16)
- [0199] LCAR-B38M BCMA 결합 도메인, VHH2 핵산 서열
- [0200] GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGAGGCGCCTGGTGCAGGCCGAGGCTCTCTGAGGCTGAGCTGTGCAGCATCCGGAAGAACCTTCACAATGGGCTGGTTT AGGCAGGCACCAGGAAAGGAGAGGGAGTTTCGTGGCAGCAATCAGCCTGTCCCTACCCTGGCCTACTATGCCGAGAGCGTGAAGGGCAGGTTTACCATCTCC CGCGATAACGCCAAGAATACAGTGGTGTGCAGATGAATCCCTGAAACCTGAGGACACAGCCCTGTACTATTGTGCCCGGATCGGAAGAGCGTGATGAGC ATTAGACCAGACTATTGGGGCAGGGAACACAGGTGACCGTGAGCAGC(서열 번호 4)
- [0201] LCAR-B38M CD8 α 힌지 핵산 서열
- [0202] ACCACGACGCCAGCGCCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGCGCA GTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT(서열 번호 14)
- [0203] LCAR-B38M CD8 α 막관통 핵산 서열
- [0204] ATCTACATCTGGGCGCCCTTGCCGGGACTTGTGGGTCTTCTCTGTCAGTGGTTATCACCCCTTACTGC(서열 번호 9)
- [0205] LCAR-B38M CD137 세포질 핵산 서열
- [0206] AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCGGATTCCAGAA GAAGAAGAAGGAGGATGTGAAGT(서열 번호 13)
- [0207] LCAR-B38M CD3 ζ 세포질 핵산 서열
- [0208] AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTT TTGGACAAGAGACGTGGCCGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCTGTACAATGAAGTGCAGAAAGATAAGATGGCG

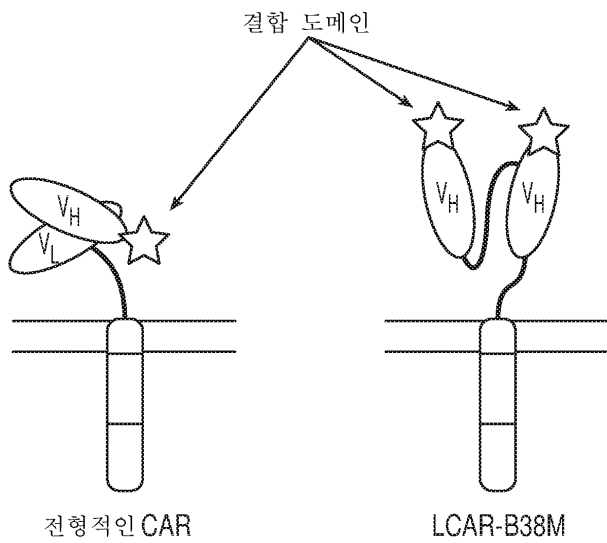
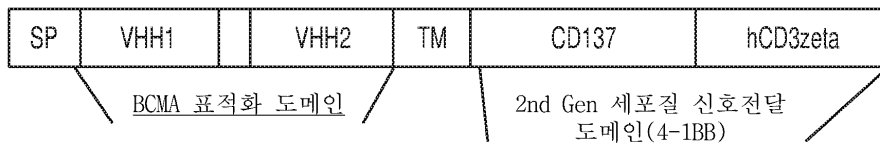
GAGGCCTACAGTGTGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGAC
 GCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCTCGCTAA(서열 번호 11)

도면

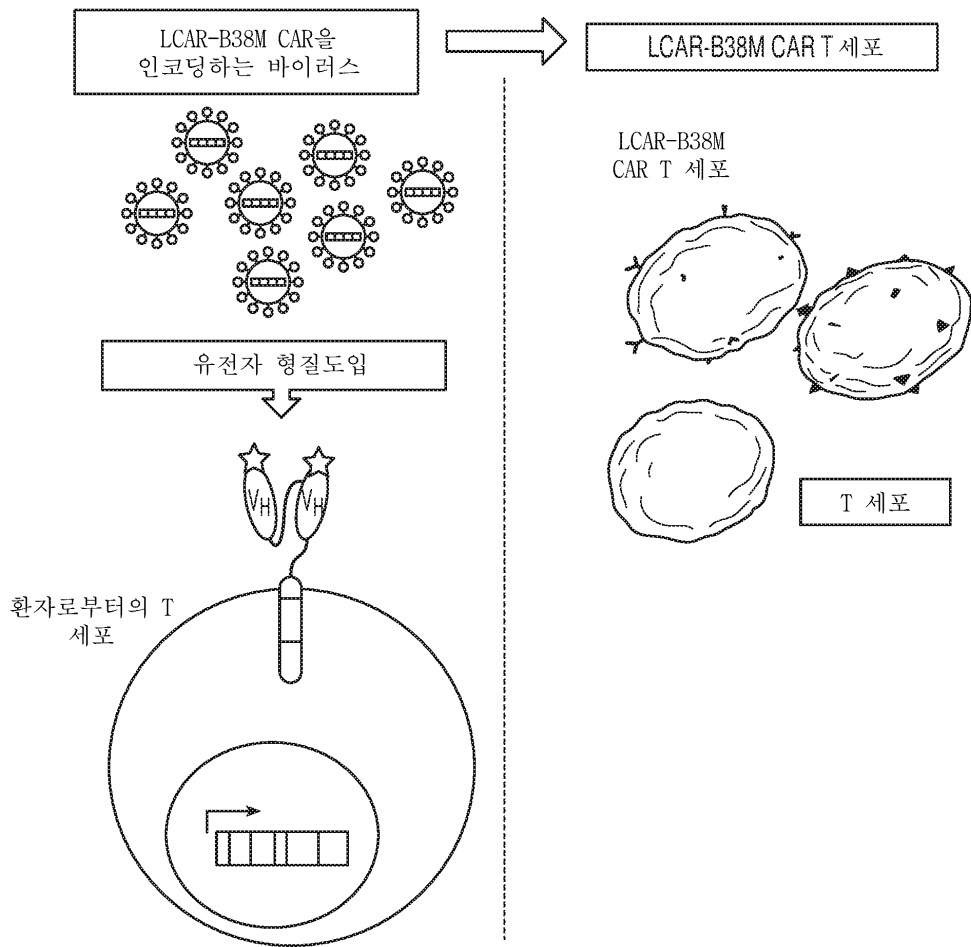
도면1

골수	혈액 BM, 비장	림프절				골수 LN, MALT	다발성 골수종
미성숙 B 세포	이행 B 세포	미접촉	GC	기억	형질아세포	장수 형질 세포	다발성 골수종
BAFF-R	BAFF-R	BAFF-R	BAFF-R BCMA	BAFF-R BCMA TACI	BCMA TACI	BCMA TACI CD138	BCMA +/- TACI CD138

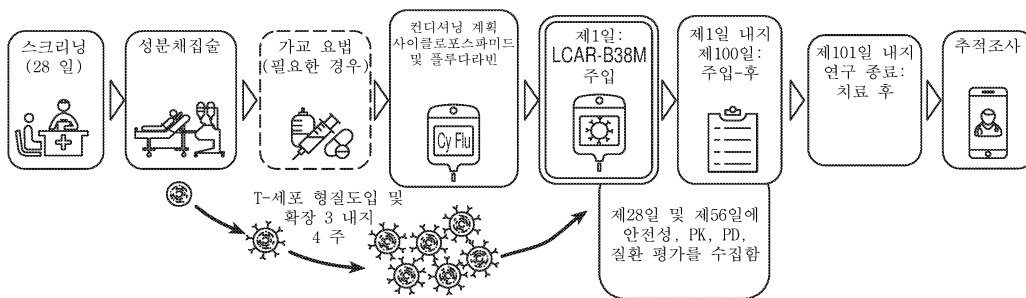
도면2a



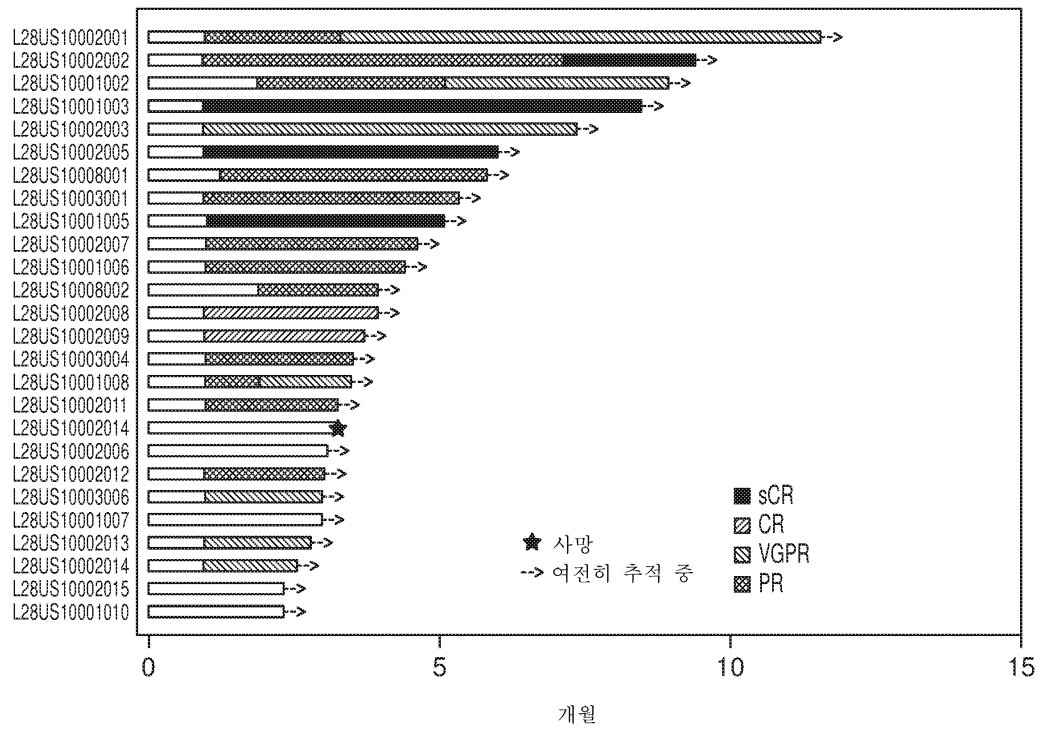
도면2b



도면3



도면4



도면5a

대상체 Id	D28			D56			D184			D365		
	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
L28US10002001		F-					NGS-	NGS-	NGS-	NGS-	NGS-	NGS-
L28US10002002	NGS-	NGS-/F-	NGS+				NGS-	NGS-/F-	Indet.			
L28US10001002	NGS-	Indet.	Indet.									
L28US10001003	NGS-	Indet.	Indet.									
L28US10002004	샘플이 수집되지 않음											
L28US10002003	NGS-	NGS-/F-	NGS-				NGS-	NGS-/F-	Indet.			
L28US10002005	Cal. Fail.	F-					보냄	보냄	보냄			
L28US10008001	Cal. Fail.											
L28US10003001	NGS-	NGS-/F-	NGS-									
L28US10001005	Cal. Fail.											
L28US10002007	NGS-	NGS-/F-	NGS-									
L28US10001006	NGS-	NGS-	Indet.									
L28US10002008	NGS-	NGS-/F-	NGS-									
L28US10008002	Cal. Fail.											
L28US10002009	NGS-	NGS-/F-	NGS-		/F-							
L28US10003004	NGS-	NGS-	Indet.	NGS-	NGS-	NGS-						
L28US10001008	NGS-	NGS-	Indet.									
L28US10002011	NGS-	NGS-/F-	NGS-									
L28US10002006	NGS-	NGS-/F-	NGS-									
L28US10002012	NGS-	NGS-/F-	Indet.									

F = 유세포 분석
 NGS = ClonoSeq

XXX = 음성
 XXXX = 양성
 Indet. = 불명확함

도면5b

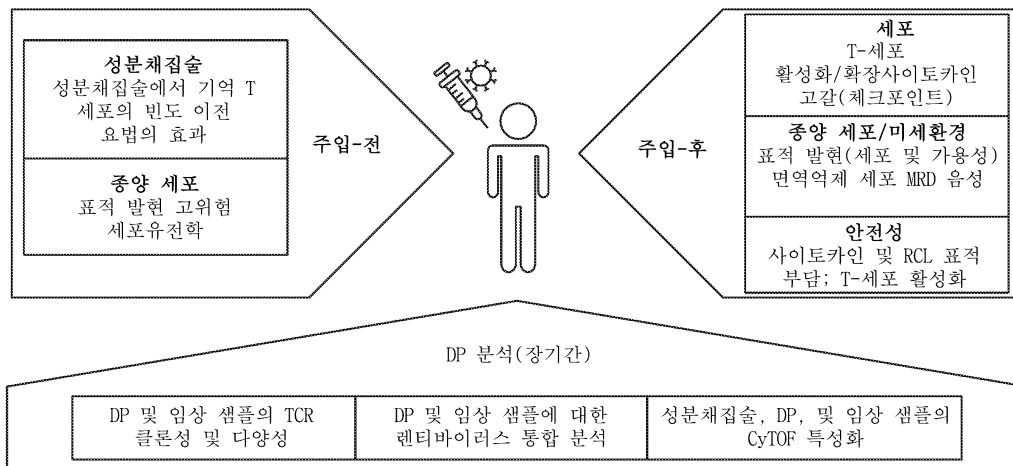
대상체 Id	D28			D56			D184			D365		
	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
L28US10001007	보냄	보냄 /F-	보냄									
L28US10001010	NGS-	Indet.	Indet.									
L28US10002013	NGS-	NGS-/F-	NGS-									
L28US10002014		/F-			/F-							
L28US10002015	NGS-	NGS-	NGS-									
L28US10003006	보냄	보냄	보냄	NGS-	NGS-	NGS-						
L28US10003010	NGS-	Indet.	Indet.									
L28US10004001	NGS-	NGS-	Indet.									
L28US10008004	NGS-	NGS-	Indet.									
L28US10008005	NGS-	NGS-	NGS-									

F = 유세포 분석
NGS = ClonoSeq

XXX = 음성
XXX = 양성
Indet. = 불명확함

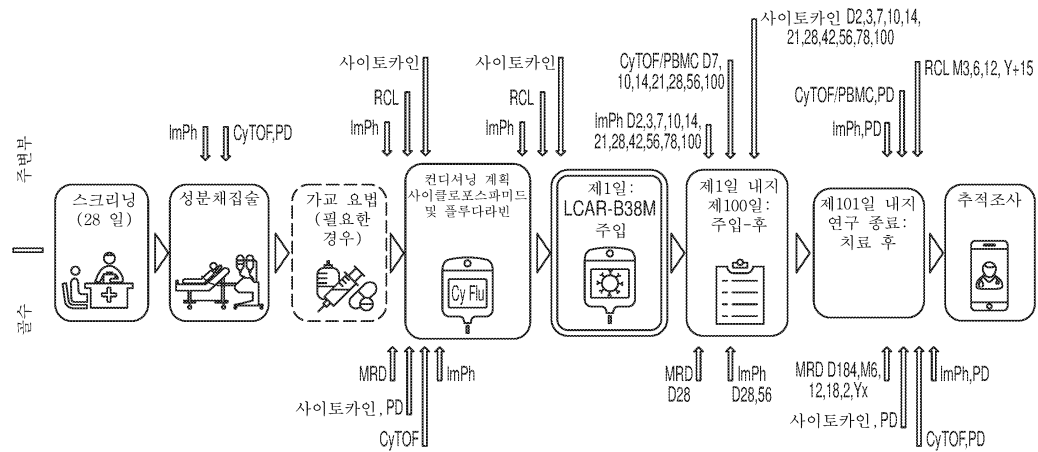
도면6

CAR-T 세포 요법(MMY2001)에 대한 증개 연구

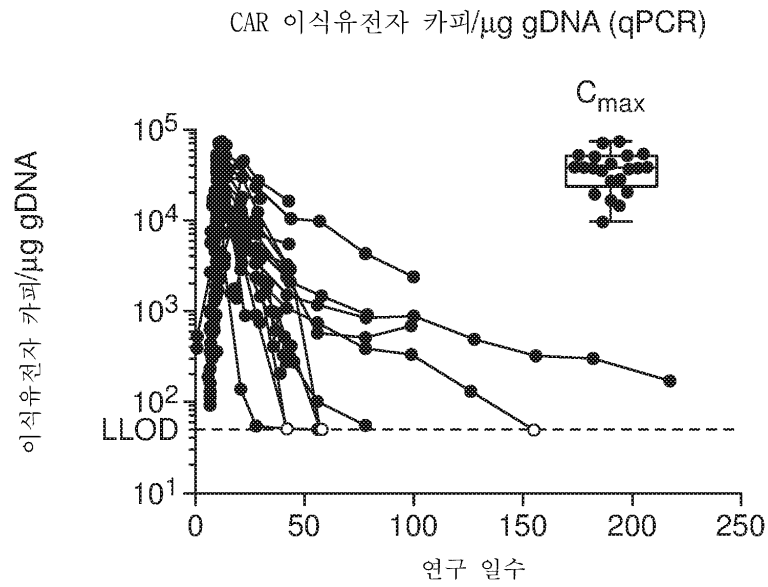


CytoF, 비행 시간에 의한 세포분석; DP, 약물 생성물; TCR, T-세포 수용체.

도면7

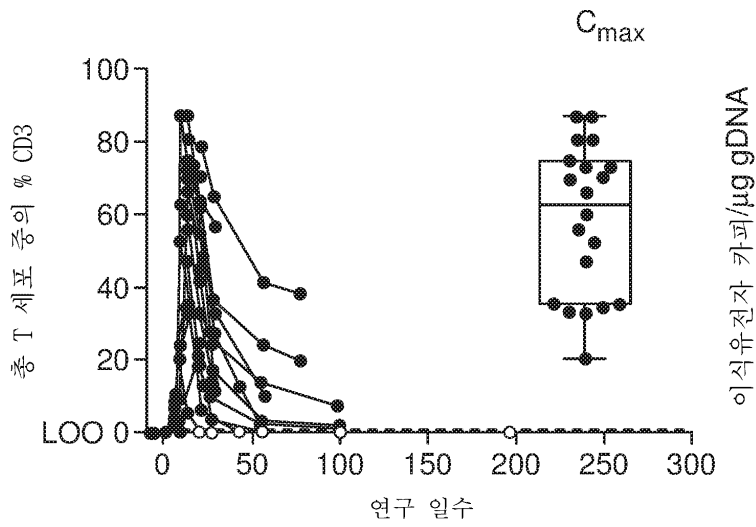


도면8a



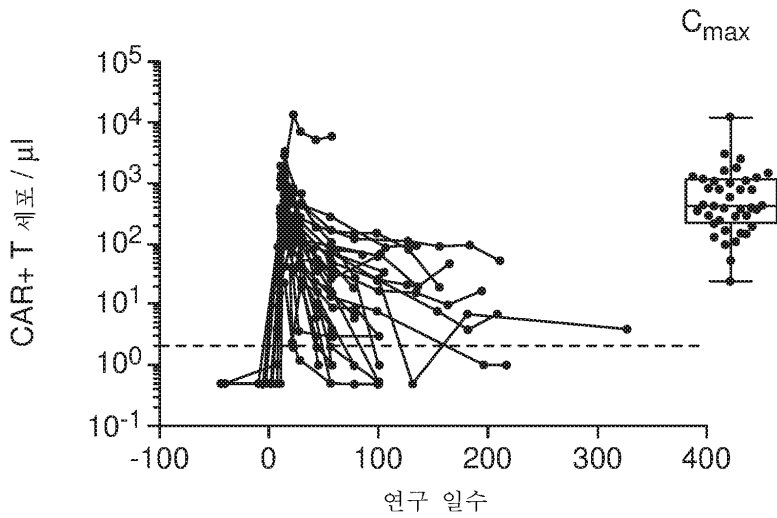
도면8b

총 T 세포 중의 % CD3 CAR+ T 세포(유세포 분석)

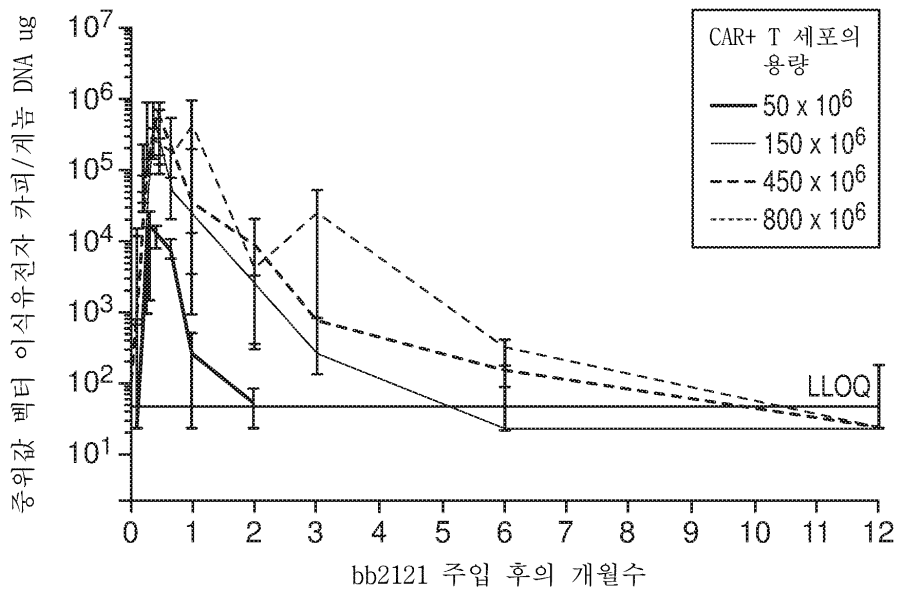


도면8c

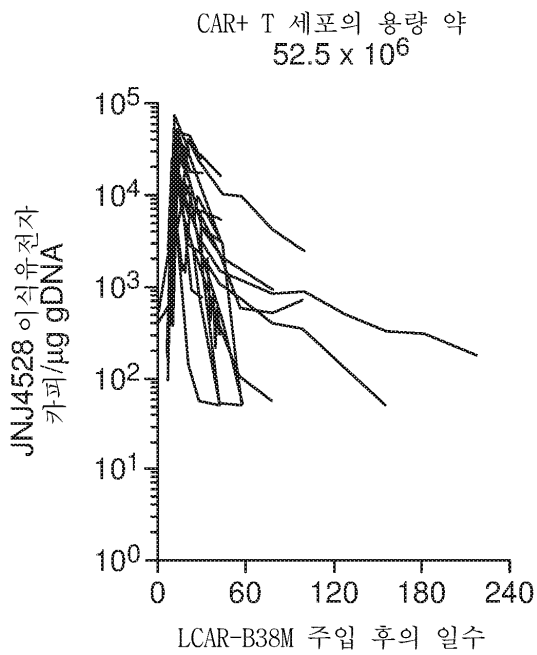
CD3 CAR+ / μl (유세포 분석)



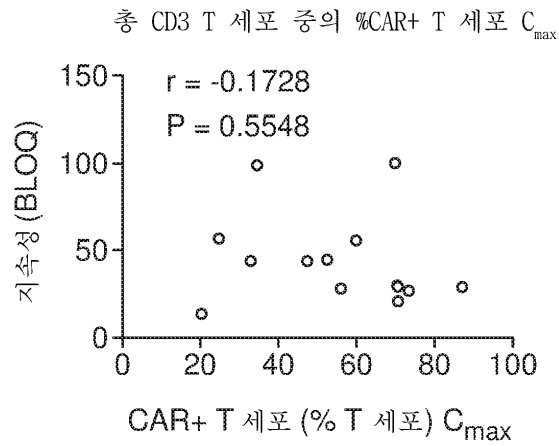
도면9a



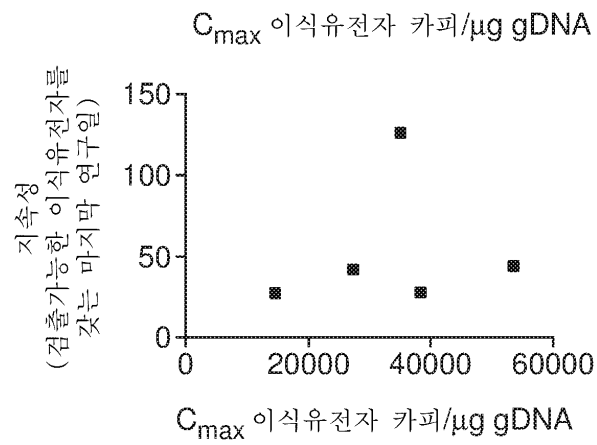
도면9b



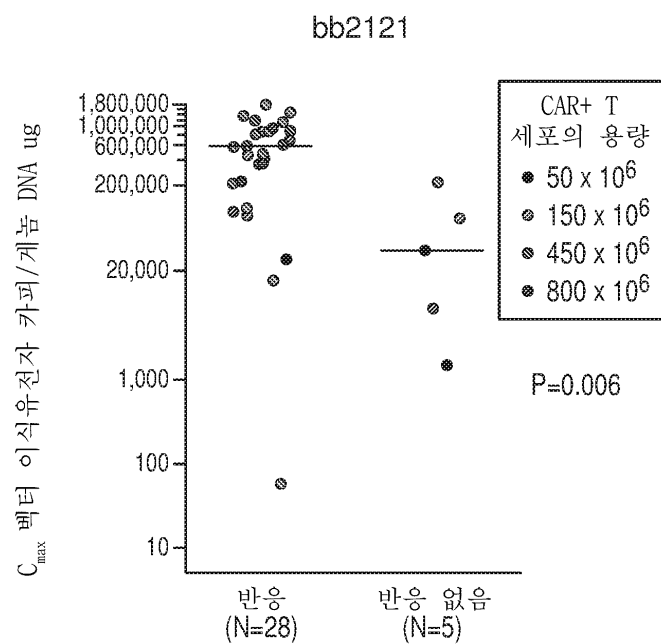
도면10a



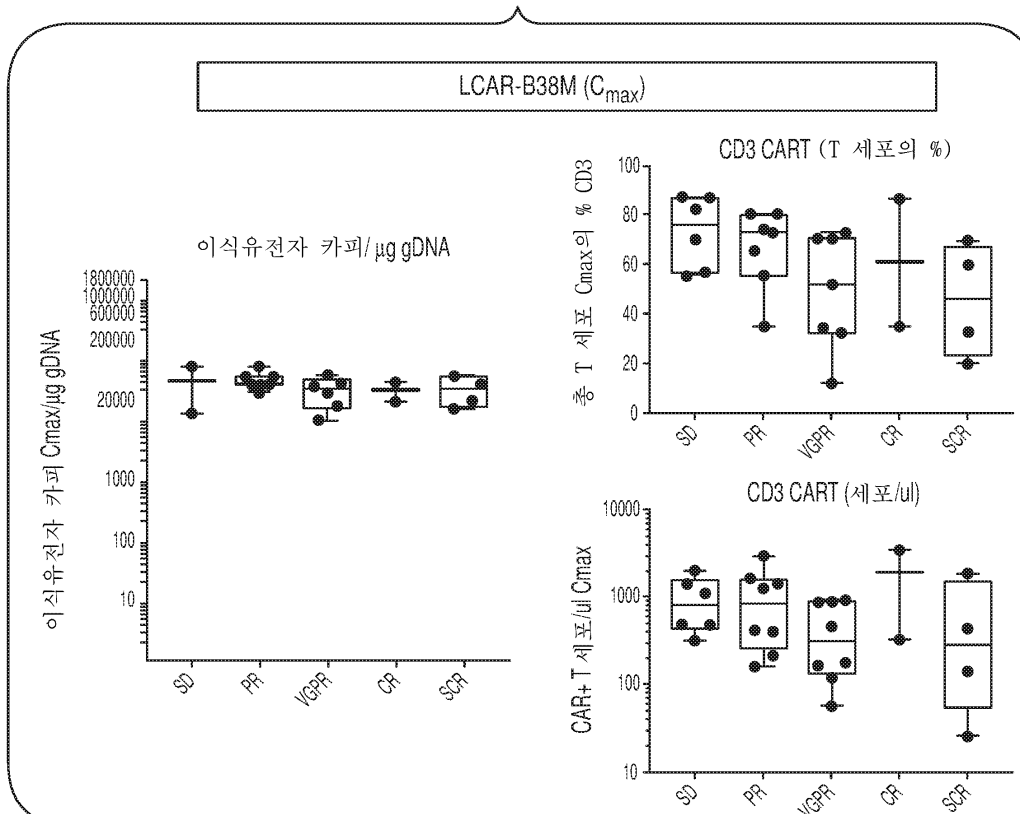
도면10b



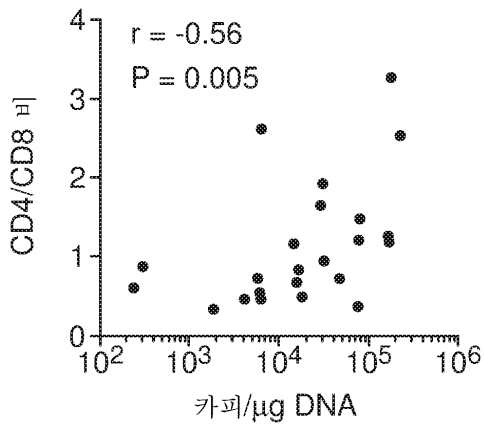
도면11a



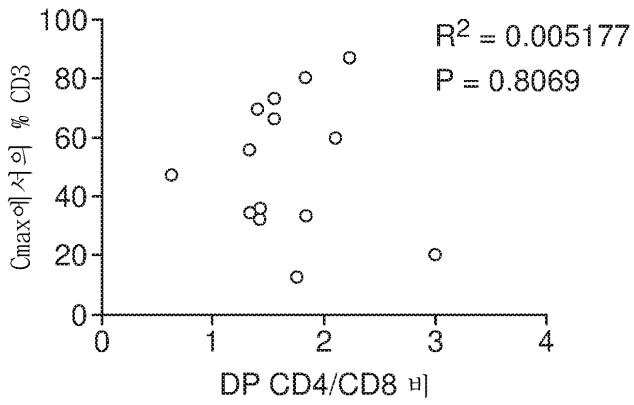
도면11b



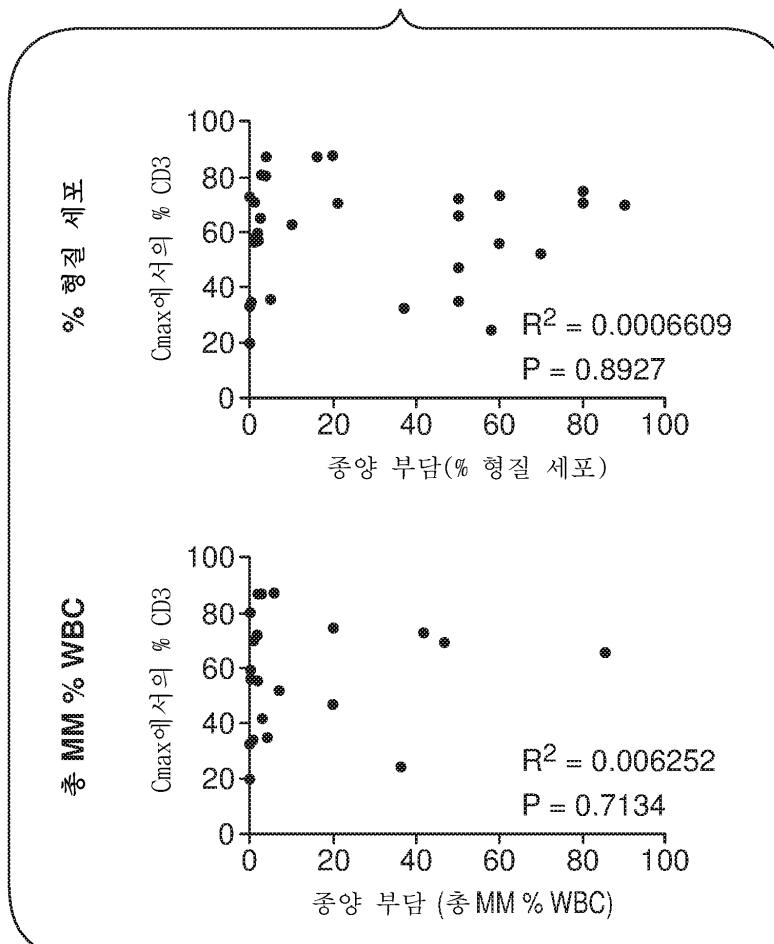
도면11c



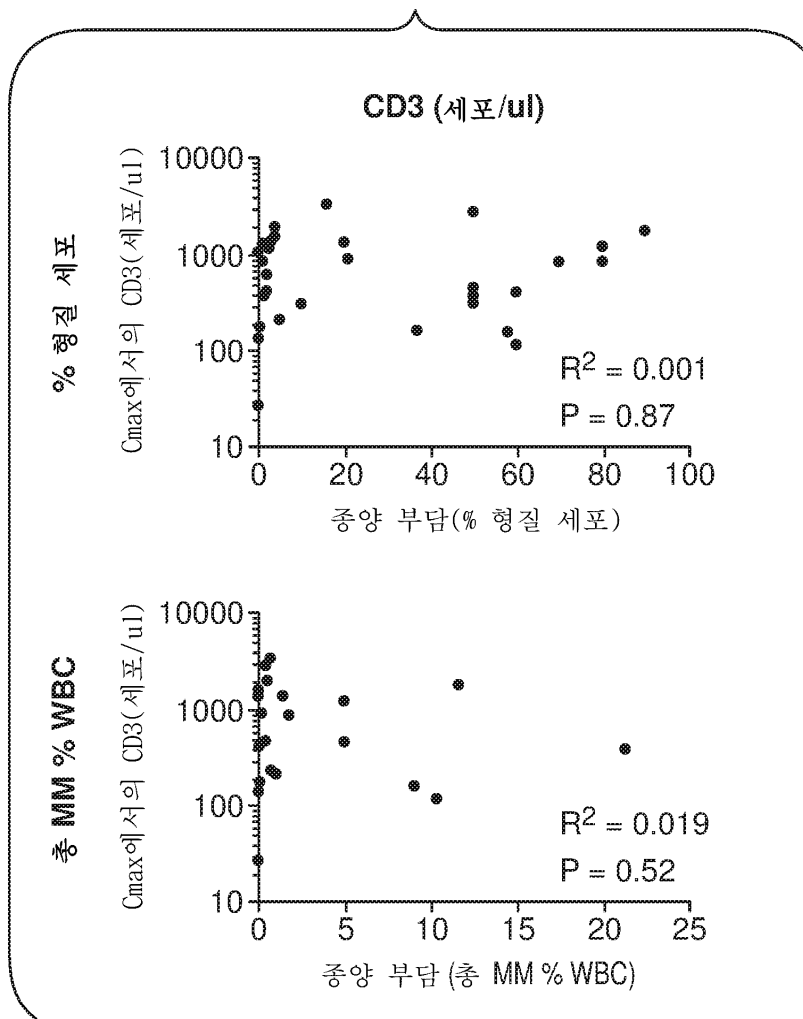
도면11d



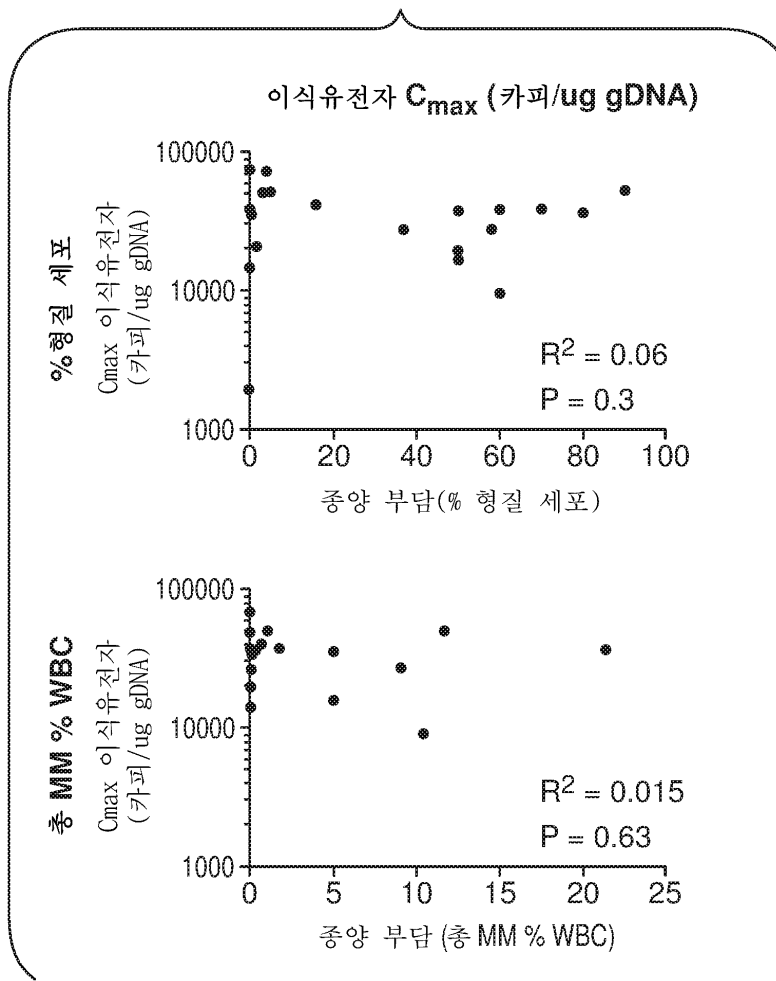
도면12



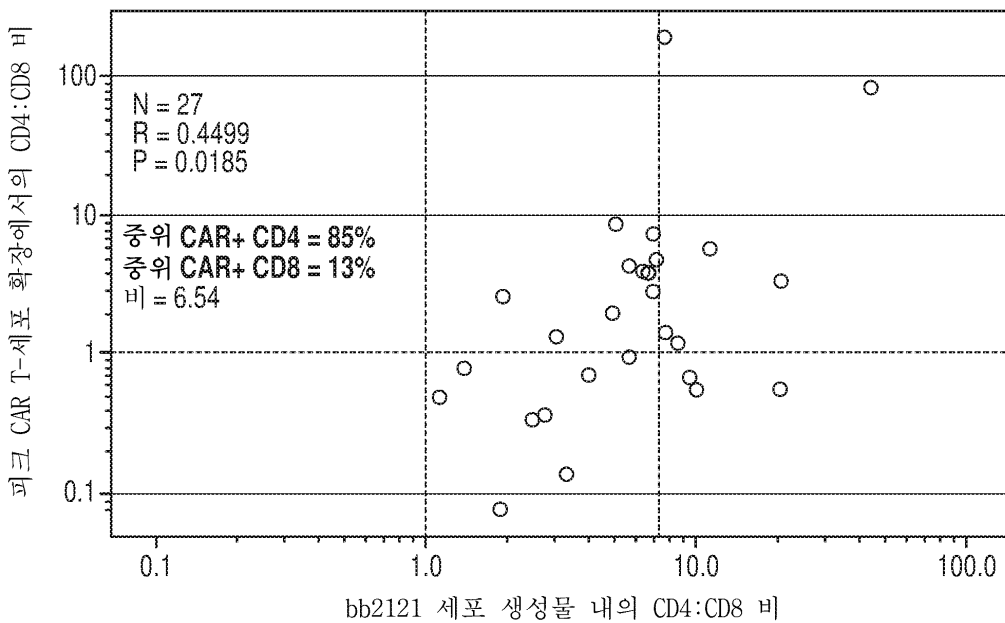
도면13a



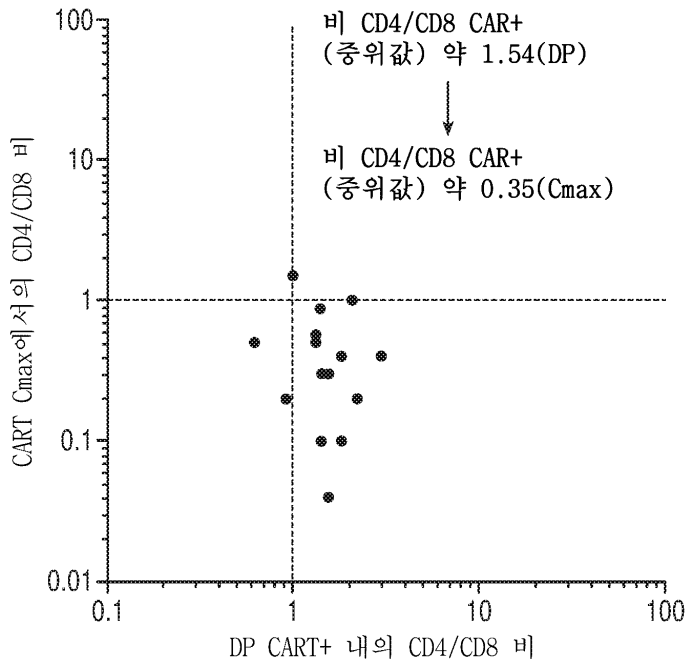
도면13b



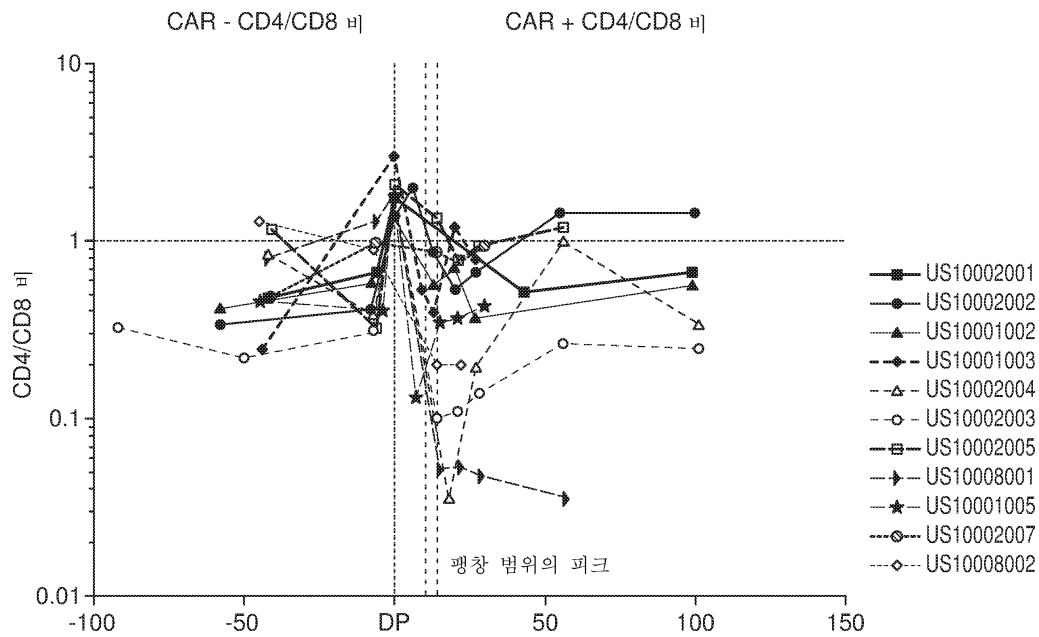
도면14a



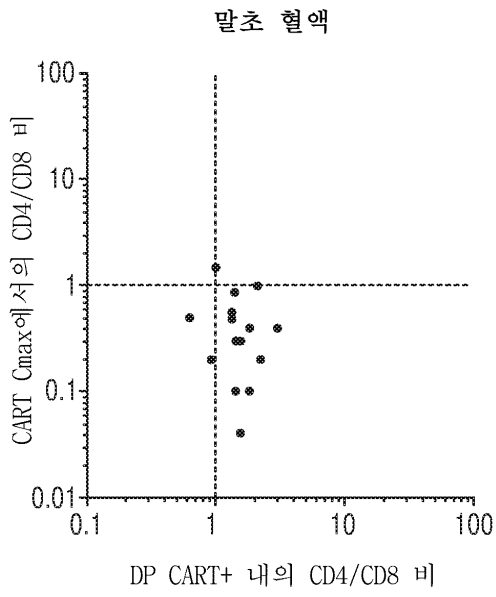
도면14b



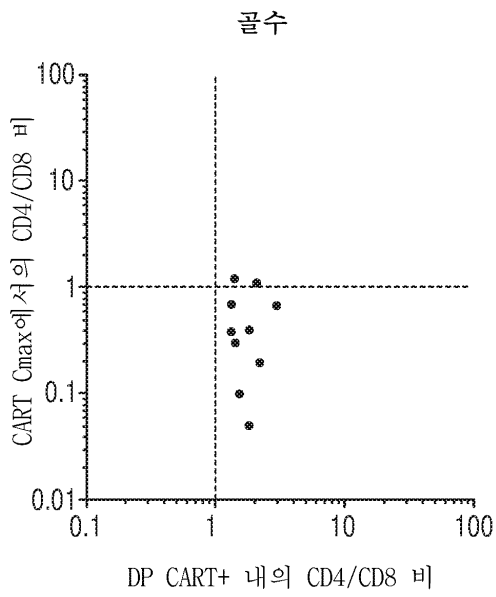
도면15



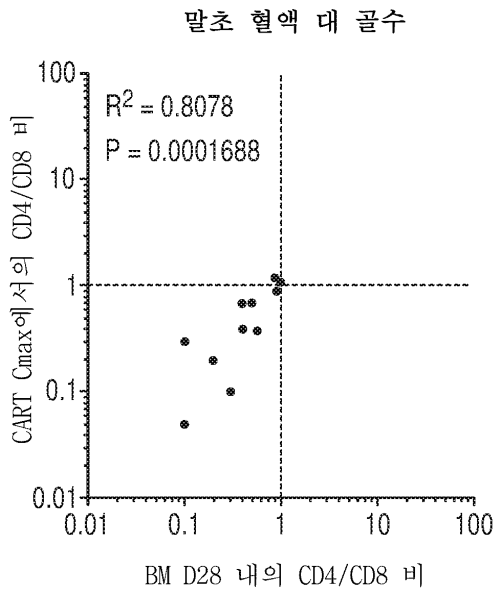
도면16a



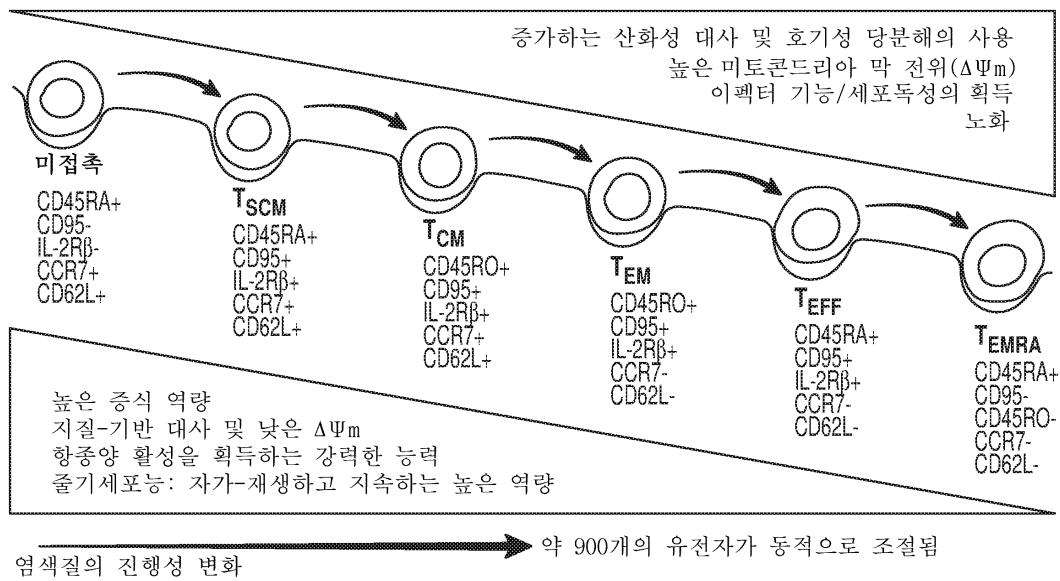
도면16b



도면16c



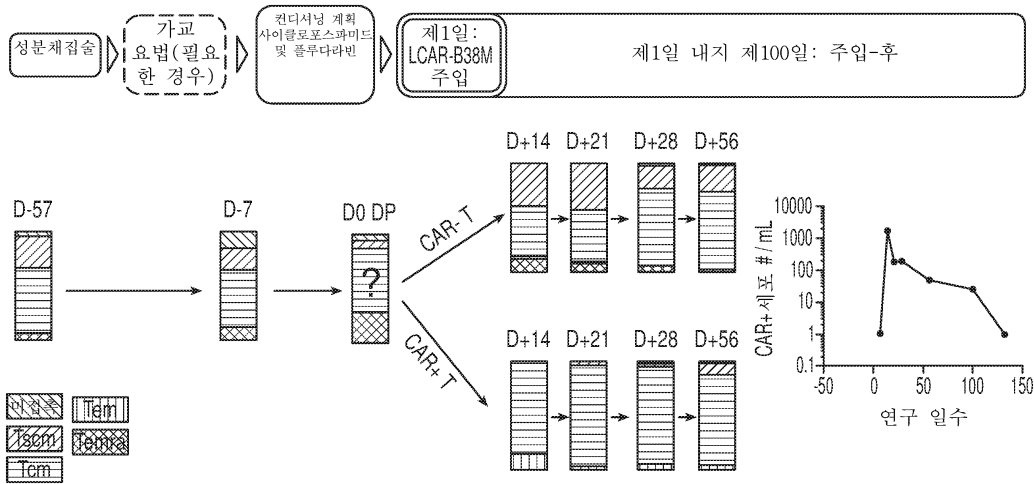
도면17



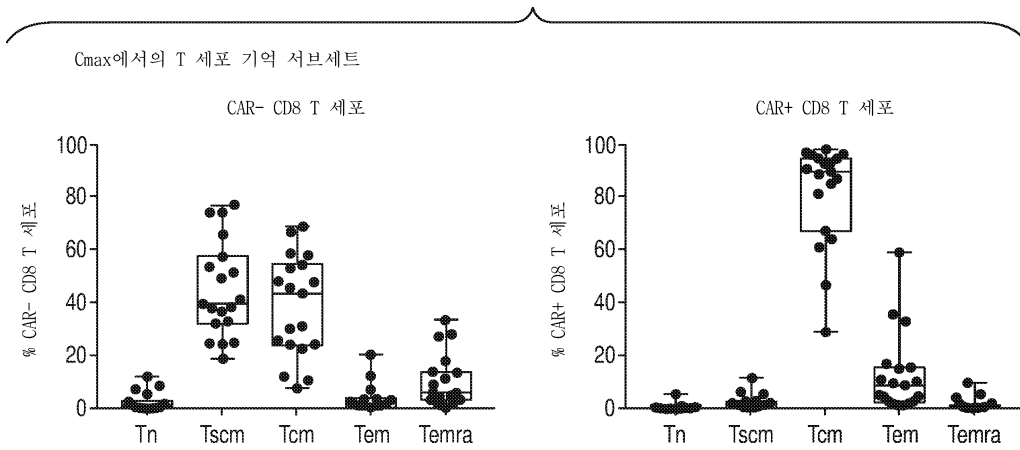
도면18

- 미접촉 CD3+ CAR+ CD4- CD8+ CCR7+ CD45RO- CD95- 림프구
- Tscm CD3+ CAR+ CD4- CD8+ CCR7+ CD45RO- CD95+ 림프구
- Tcm CD3+ CAR+ CD4- CD8+ CCR7+ CD45RO+ 림프구
- Tem CD3+ CAR+ CD4- CD8+ CCR7- CD45RO+ 림프구
- Temra CD3+ CAR+ CD4- CD8+ CCR7- CD45RO- 림프구

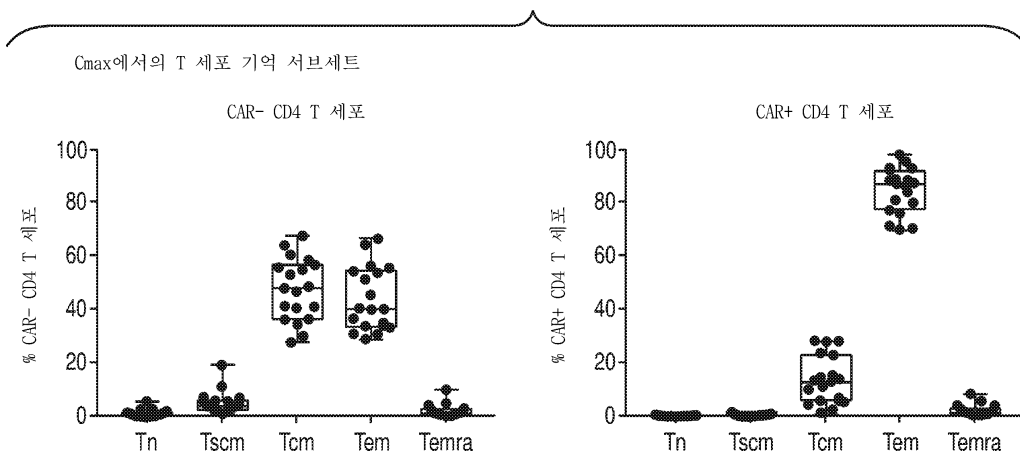
도면19



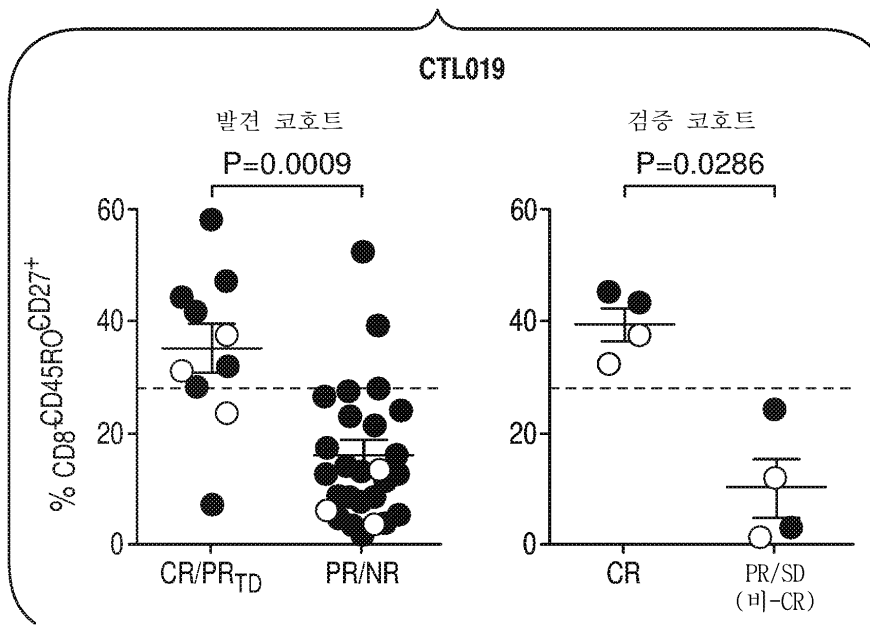
도면20a



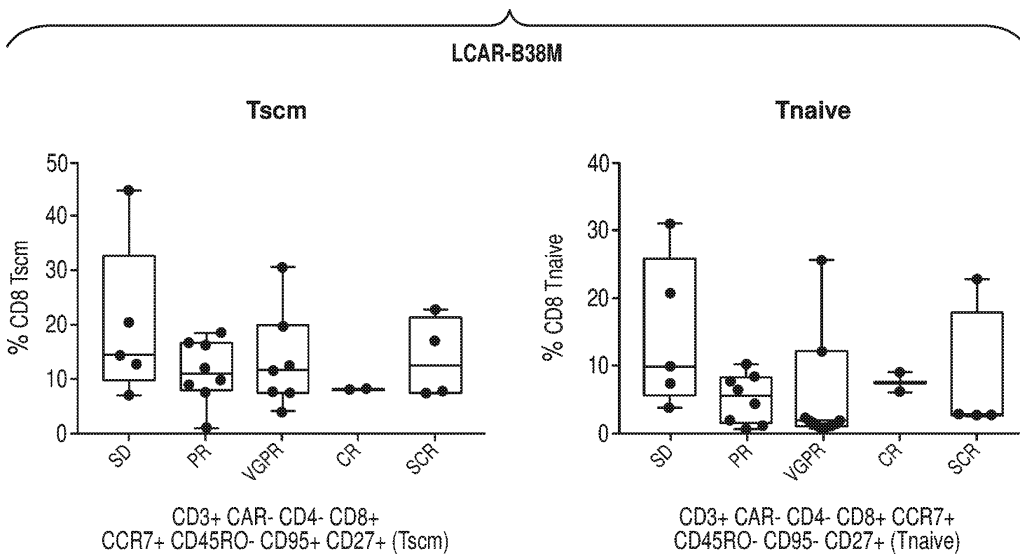
도면20b



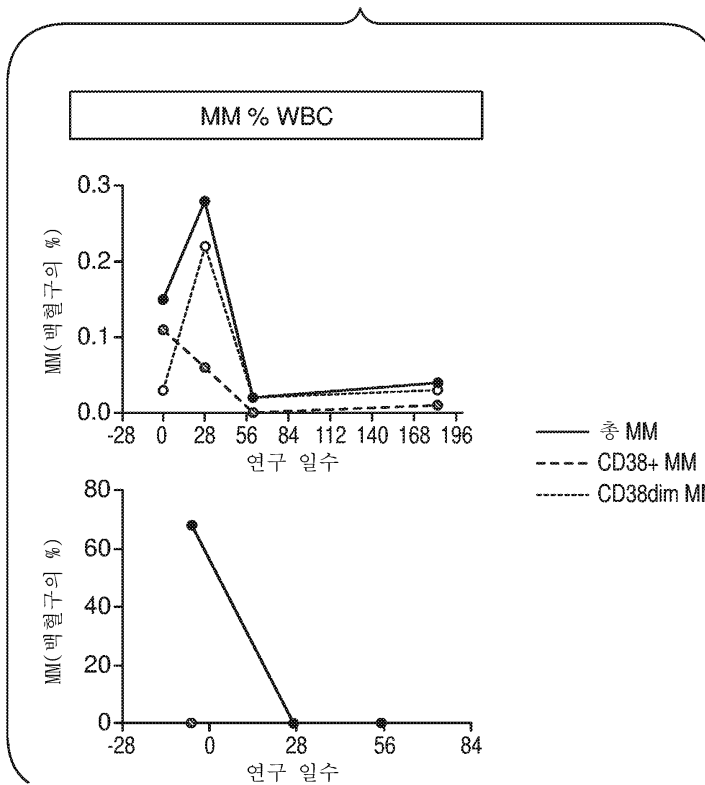
도면20c



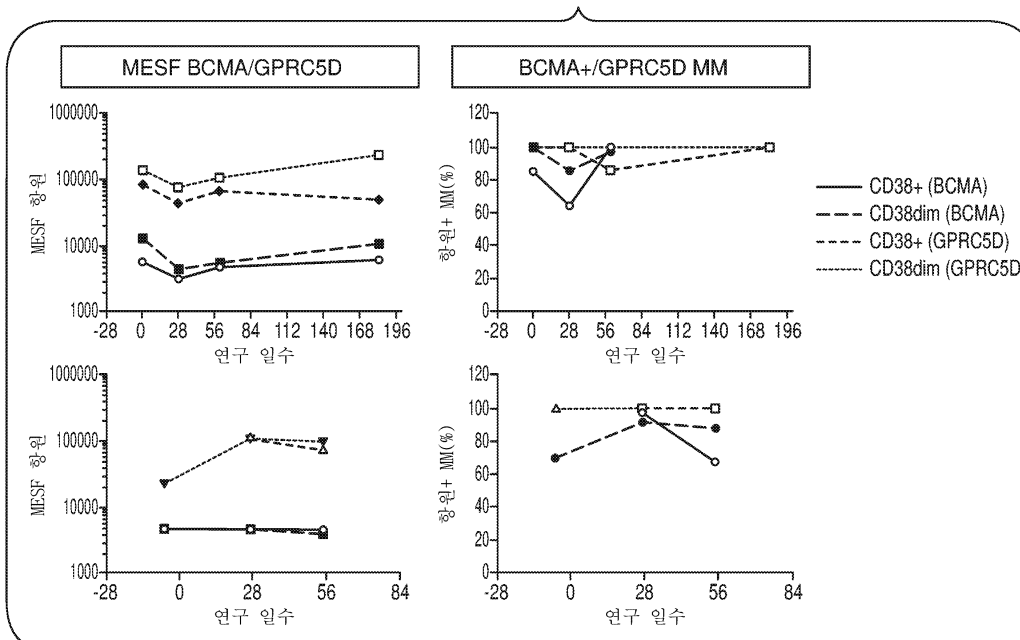
도면20d



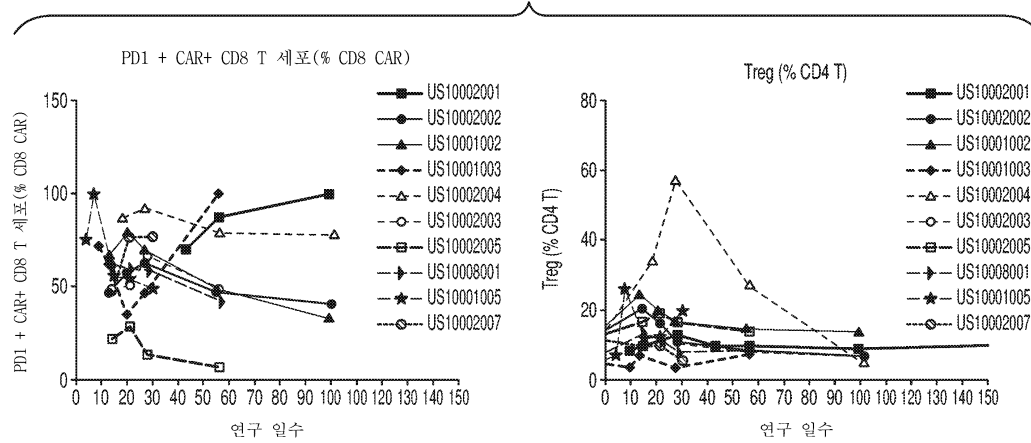
도면21a



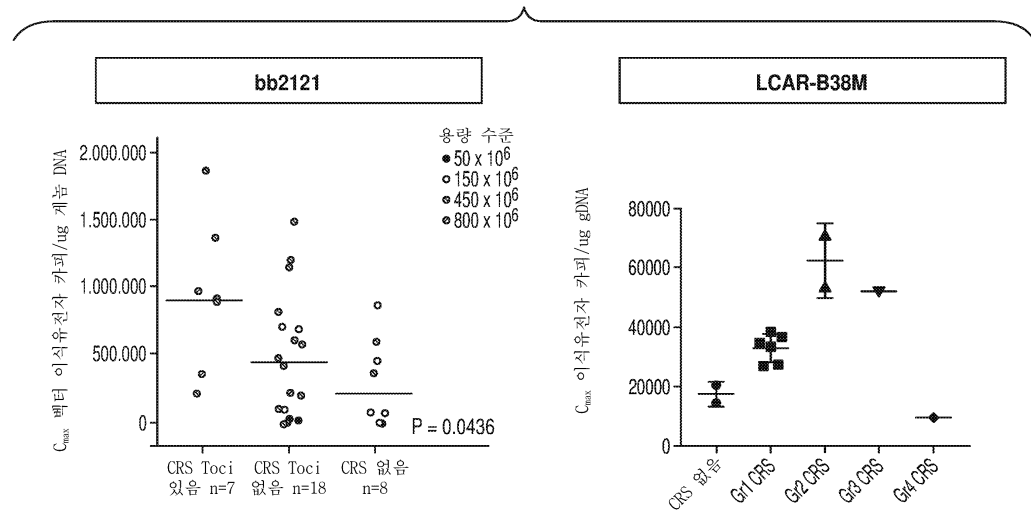
도면21b



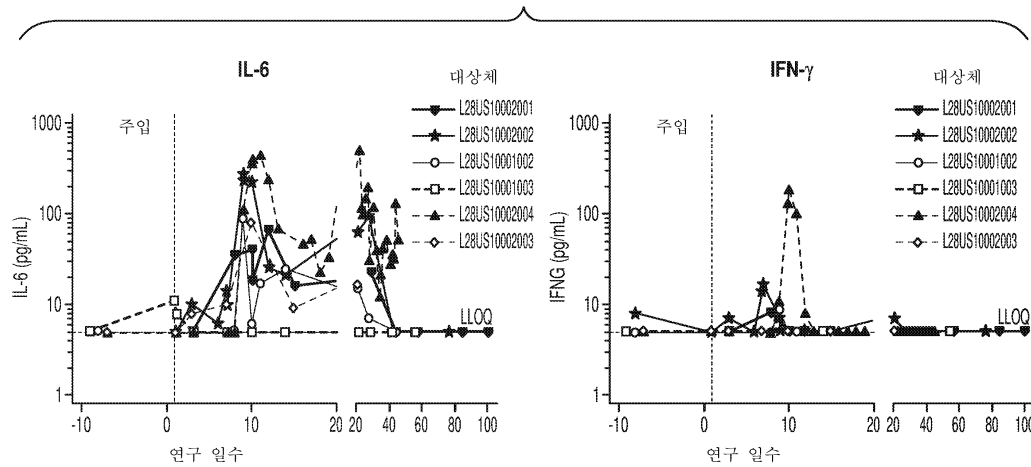
도면21c



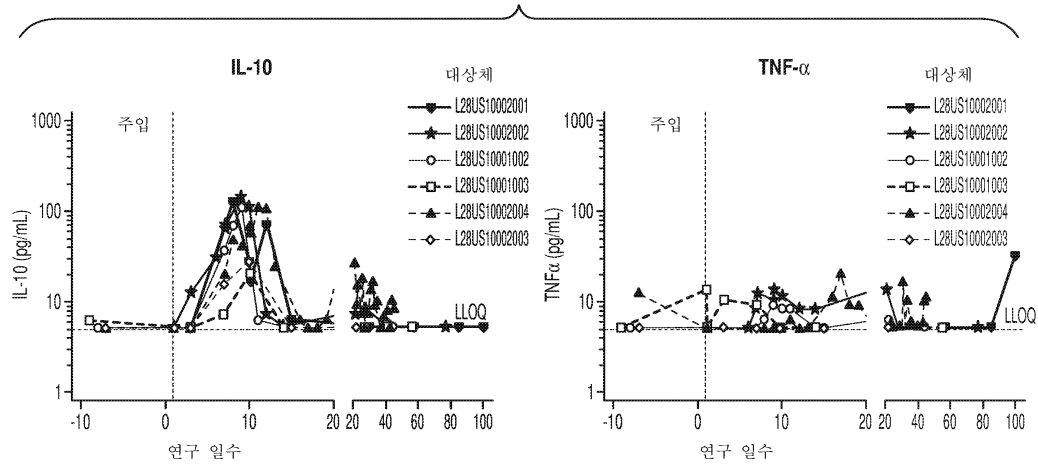
도면22



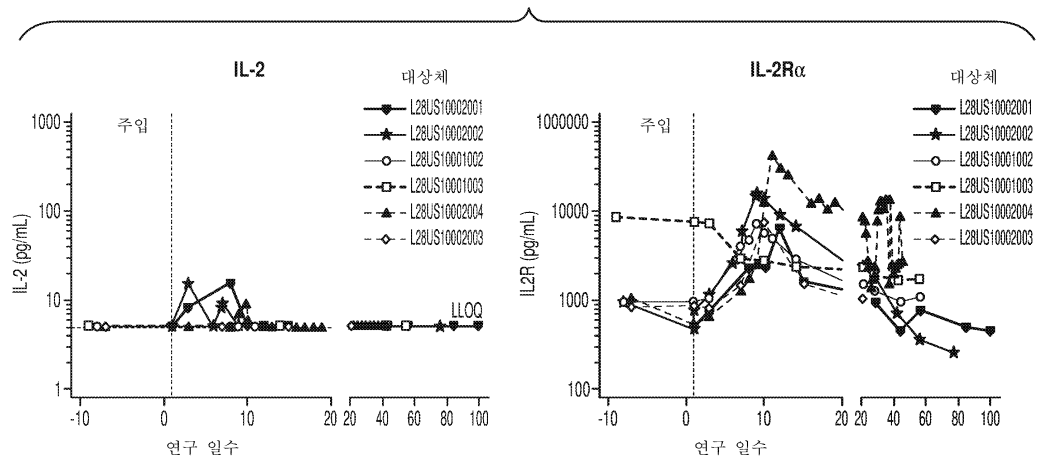
도면23



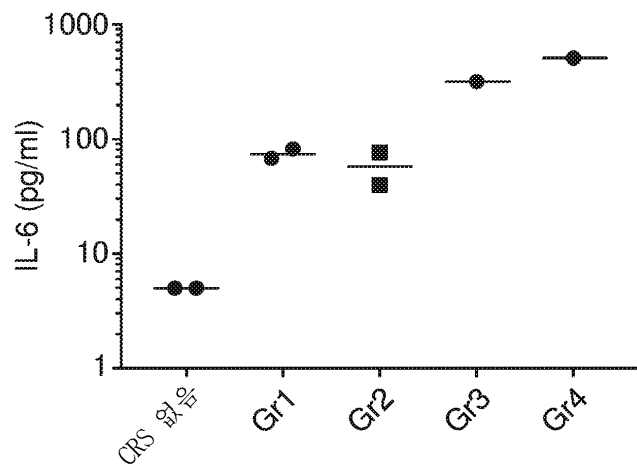
도면24



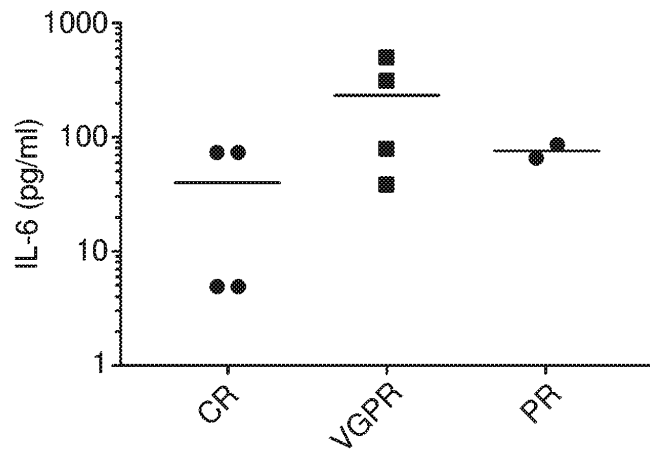
도면25



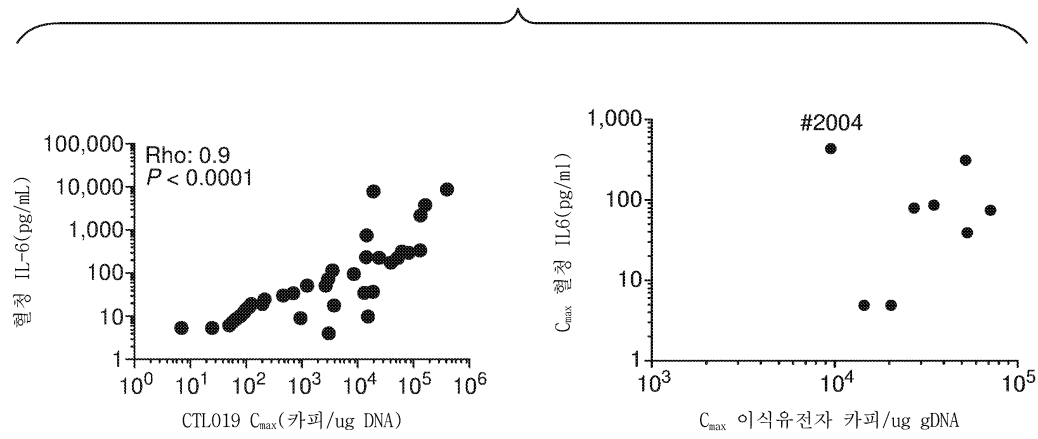
도면26a



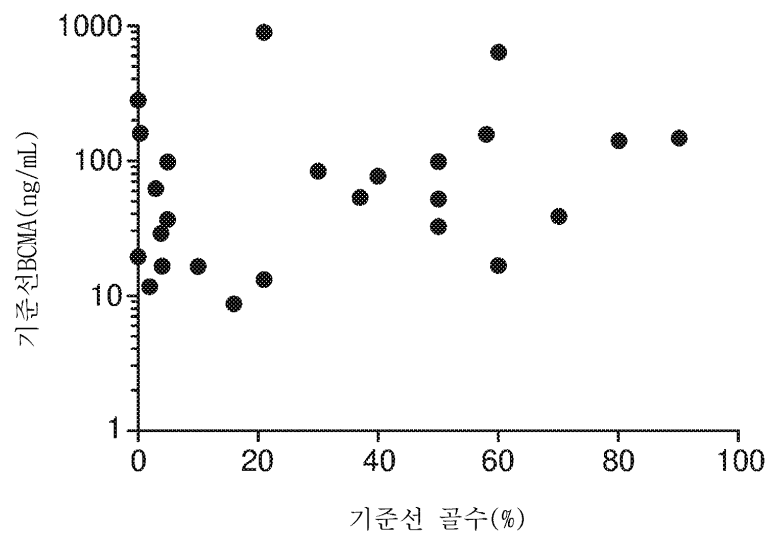
도면26b



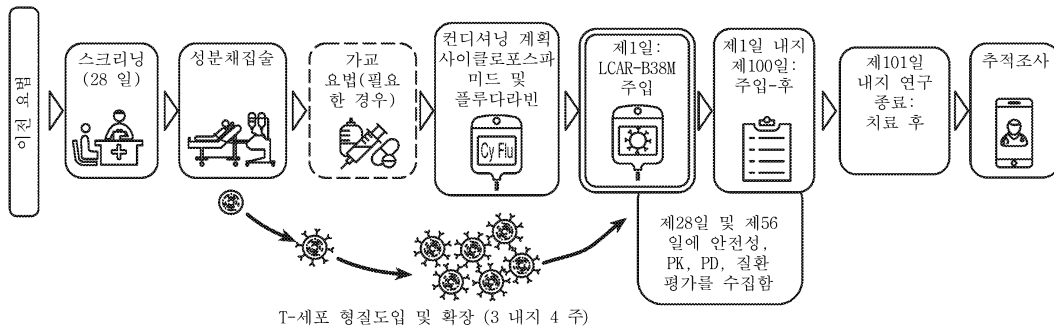
도면27



도면28

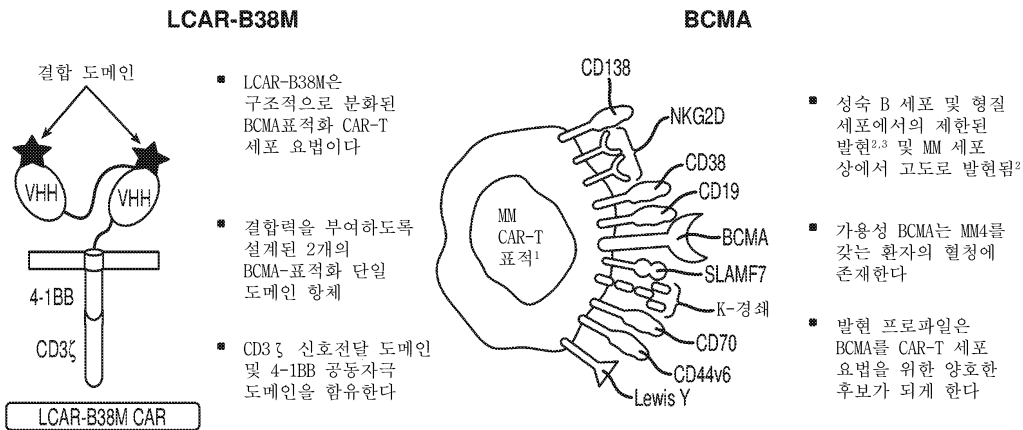


도면29



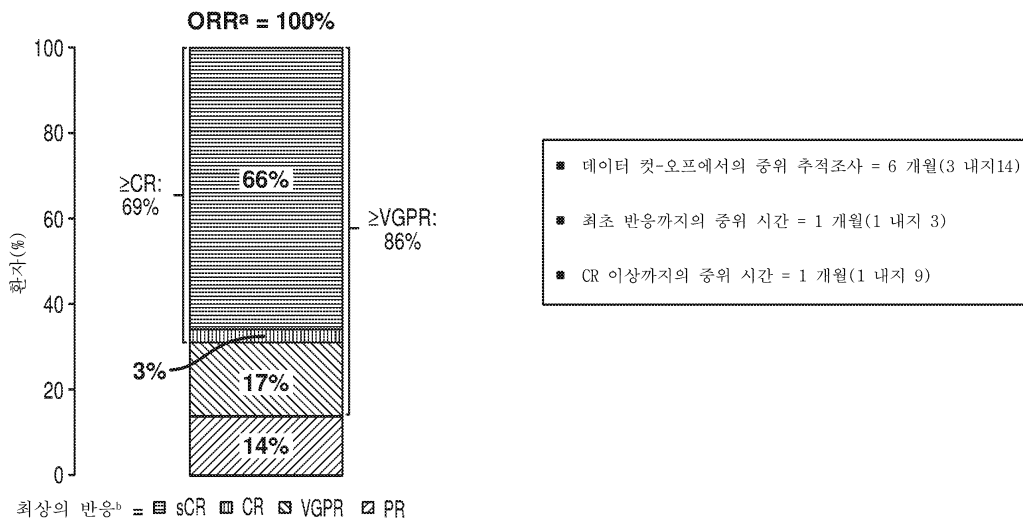
도면30

2개의 BCMA-표적화 도메인을 이용한 LCAR-B38M CAR-T 세포 요법



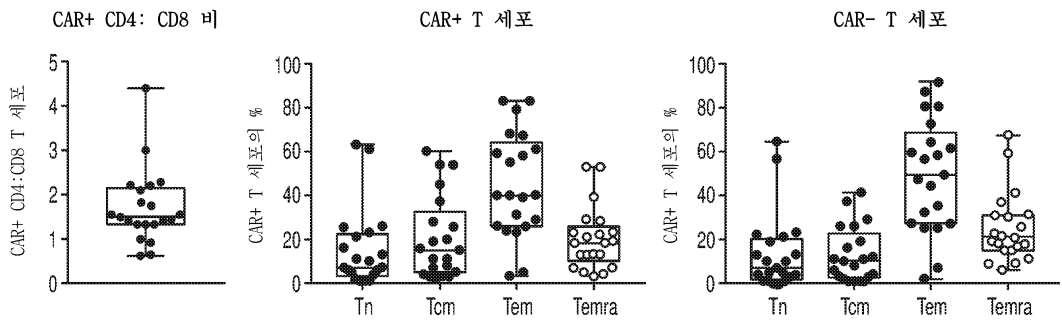
도면31

LCAR-B38M 효능: 전체 반응률



도면32

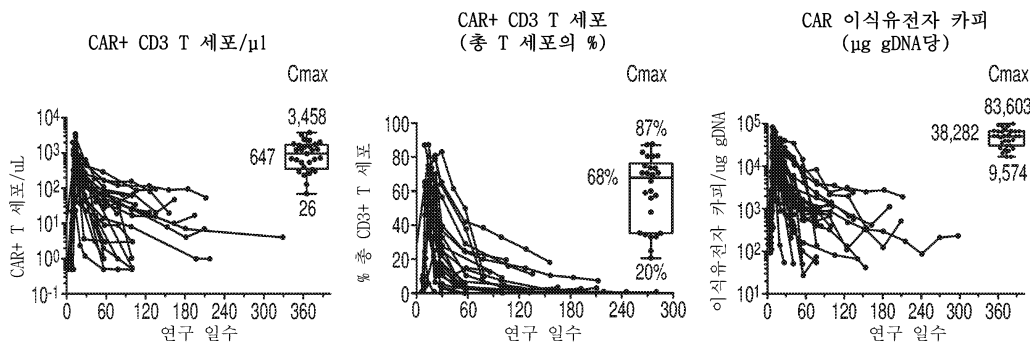
LCAR-B38M 약물 생성물은 이펙터 기억 T 세포에 풍부하다



■ 약물 생성물에서 CAR+ T 세포의 중위 비율은 총 세포의 16%(범위 6 내지 28%)였다

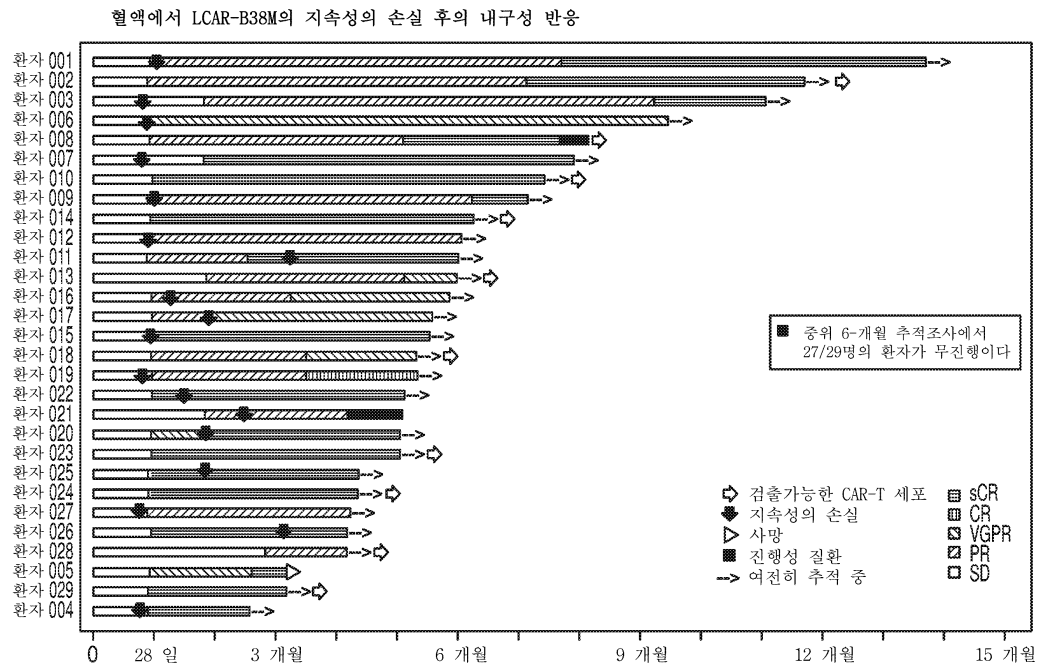
도면33

LCAR-B38M은 가변적인 확장 및 지속성을 나타냄



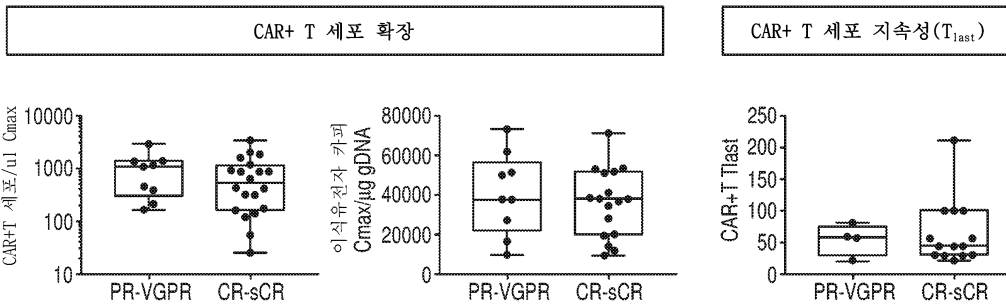
■ 확장의 피크 시간(T_{max})은 환자들 사이에서 일관적이다
 ■ 18/28명의 환자에서, 3 개월의 추적조사에서 CAR+ T 세포의 수/μl는 LOQ(2개의 세포/μl) 미만이다

도면34



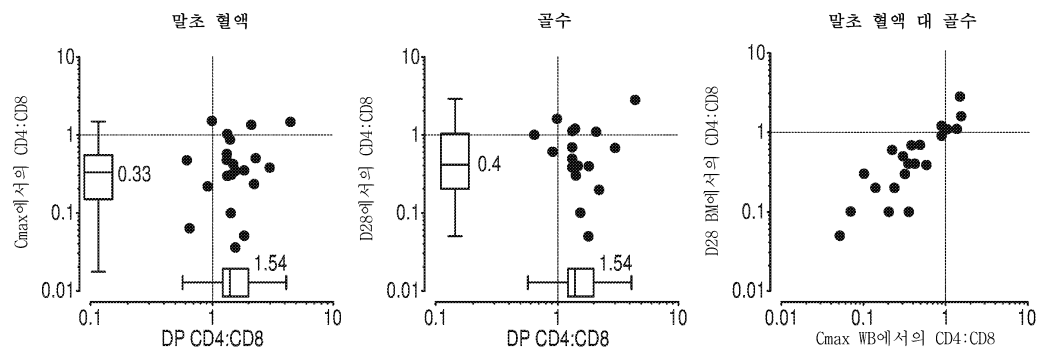
도면35

확장 및 지속성은 최상의 반응과 연관되지 않는다

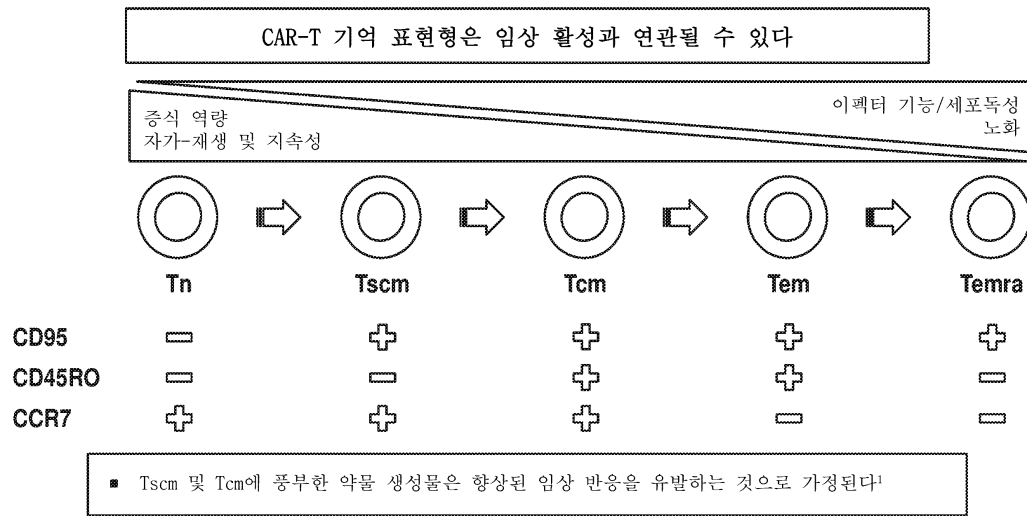


도면36

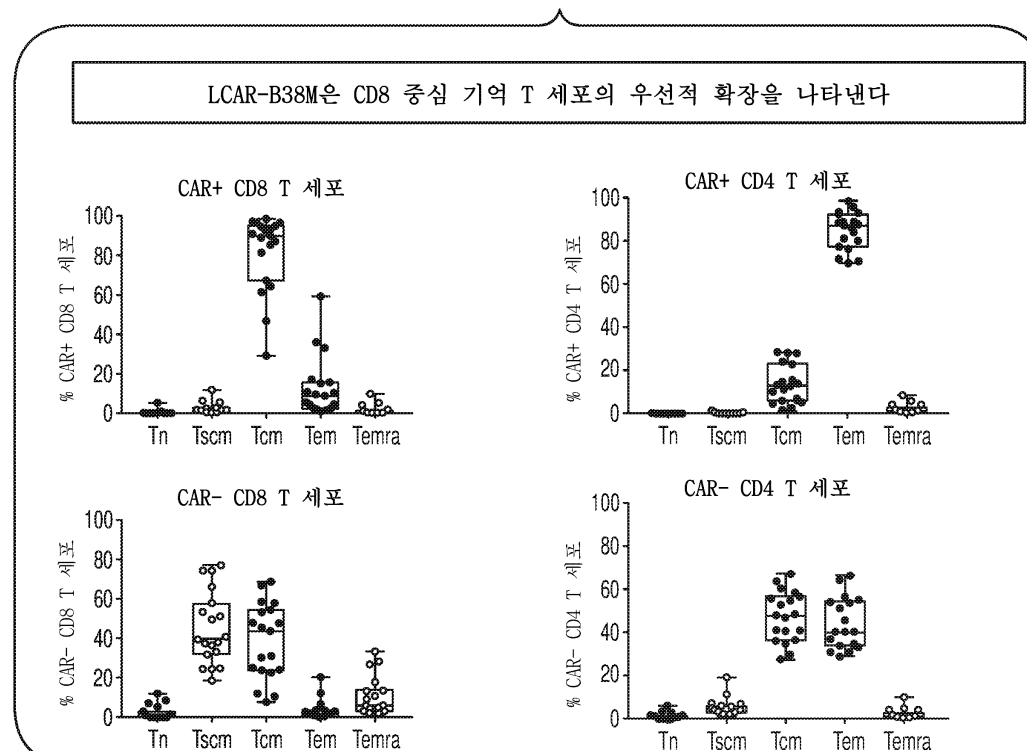
LCAR-B38M: 혈액 및 골수에서의 CAR+ CD8 T 세포의 우선적 확장



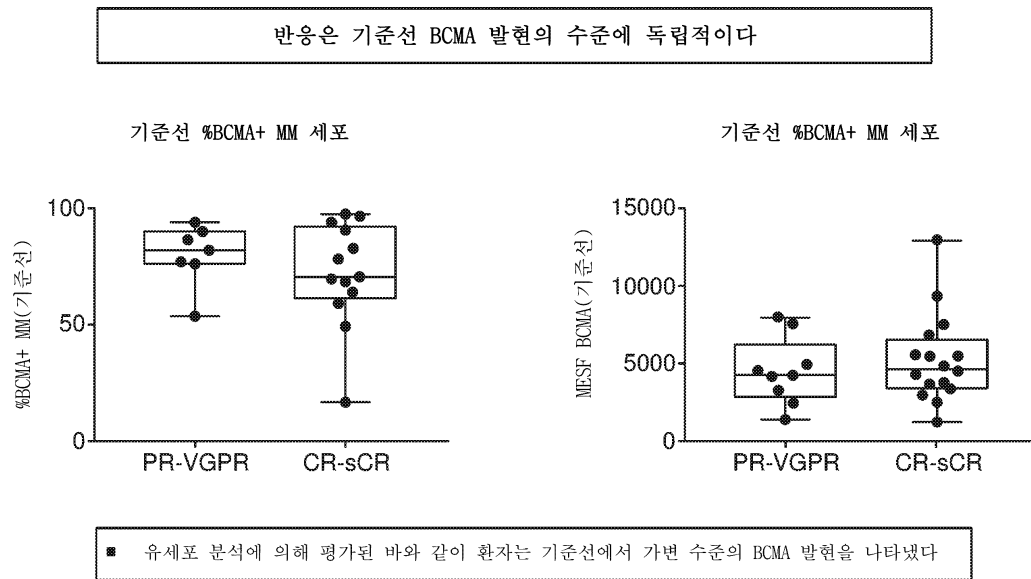
도면37



도면38



도면39

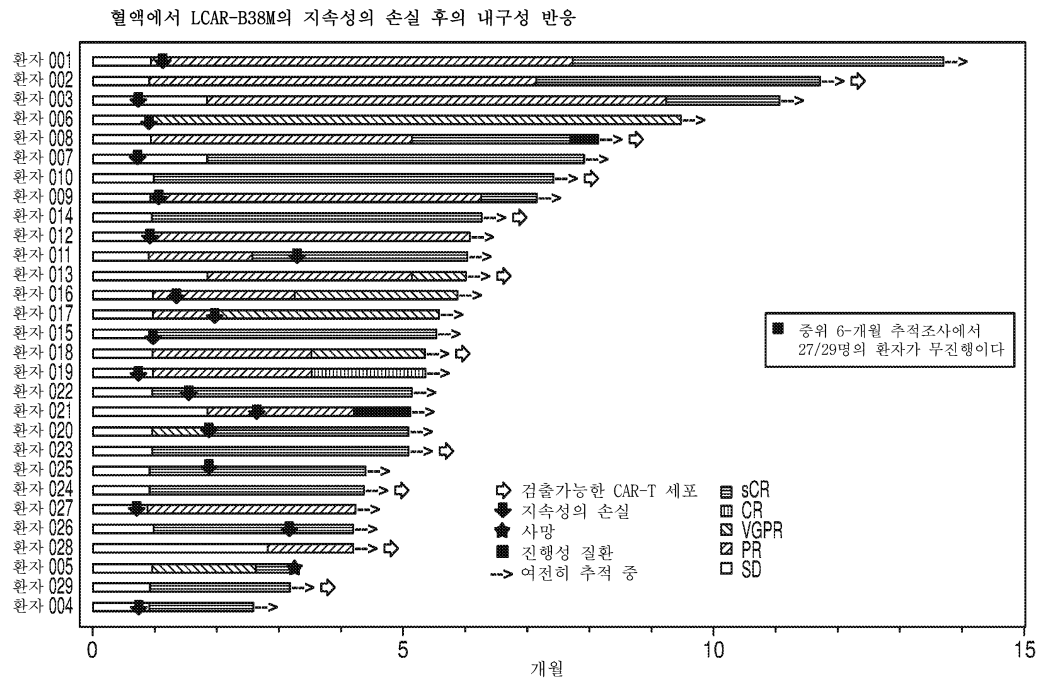


도면40

Conclusions for LCAR-B38M

- LCAR-B38M CAR-T 세포의 주입-후 확장(C_{max})은 고도로 가변적이며, 일반적으로 제10일 내지 제14일 부근에서 피크이다(T_{max})
- 18/28명의 환자에서, 3 개월의 추적조사에서 CAR+ T 세포의 수/ μ l는 LOQ(2개의 세포/ μ l) 미만이다
- 최상의 반응은 데이터 컷-오프 시점에 주변부에서의 CD3 CAR-T 피크 확장 및 지속성에 독립적이다
- 최상의 반응은 MM 세포에서 BCMA 발현의 수준에 독립적이다
- LCAR-B38M은 중심 기억 표현형을 나타내는 CAR+ CD8 T 세포의 우선적이고 일관적인 생체내 확장에 잠재적으로 관련되는 상대적으로 낮은 용량에서 고도로 활성화된 분화된 CAR-t 세포 요법이다

도면41



도면42

