



공개특허 10-2020-0076732



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0076732  
(43) 공개일자 2020년06월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C07K 16/28* (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C07K 16/2896* (2013.01)  
*A61P 35/00* (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7015716
- (22) 출원일자(국제) 2018년11월02일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2020년06월01일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2018/058642
- (87) 국제공개번호 WO 2019/087151  
국제공개일자 2019년05월09일
- (30) 우선권주장  
62/581,466 2017년11월03일 미국(US)

- (71) 출원인  
소렌토 쎄라퓨틱스, 인코포레이티드  
미국 캘리포니아주 92121 샌 디에이고 디렉터스  
플레이스 4955
- (72) 별명자  
장 옐량  
미국 캘리포니아 92130 샌디에고 코르테 메질로네  
스 10945  
저우 허웨  
미국 캘리포니아 92127 샌디에고 포토맥 럿지 로  
드 15732  
마 첸중  
미국 캘리포니아 92121 샌디에고 디렉터스 플레이  
스 4955
- (74) 대리인  
장훈

전체 청구항 수 : 총 30 항

(54) 발명의 명칭 CD38-지시된 키메라 항원 수용체 작제물

### (57) 요 약

항-CD38 항체와 관련되거나 이로부터 유래된 조성물 및 방법이 개시되어 있다. 보다 구체적으로, CD38에 결합하는 사람 항체, 이러한 항체의 CD38-항체 결합 단편 및 유도체, 및 이러한 단편을 포함하는 CD38-결합 폴리펩타이드가 충분히 개시되어 있다. 보다 추가로, 질병의 치료 방법을 비롯하여, 이러한 항체, 항체 단편 및 유도체, 및 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산, 이러한 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 세포, 이러한 항체의 제조 방법, 항체 단편 및 유도체 및 폴리펩타이드, 및 이러한 항체, 항체 단편 및 유도체 및 폴리펩티드를 사용하는 방법이 개시되어 있다.

(52) CPC특허분류

*A61K 2039/505* (2013.01)  
*C07K 2317/30* (2013.01)  
*C07K 2317/73* (2013.01)  
*C07K 2319/00* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

하기를 포함하는 항-CD38 키메라 항원 수용체 (chimeric antigen receptor: CAR) 작제물:

- i) CD38에 결합하는 항원 결합 단백질로서, 여기서, 상기 항원 결합 단백질이 서열 번호 1의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인을 포함하며, 서열 번호 3의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질;
- ii) 막관통 도메인; 및
- iii) 세포내 도메인.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 중쇄 가변 (VH) 도메인과 상기 경쇄 가변 (VL) 도메인 사이에 웨타이드 링커를 추가로 포함하고, 여기서, 상기 웨타이드 링커가 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는, 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질이 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는, 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질과 상기 막관통 도메인 사이에 힌지 영역을 추가로 포함하고, 여기서, 상기 힌지 영역이 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CD8 힌지 영역인, 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질과 상기 막관통 도메인 사이에 CD28 세포외 도메인을 추가로 포함하고, 여기서, 상기 CD28 세포외 도메인이 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는, 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 상기 막관통 도메인이 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 CD28 막관통 도메인인, 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, 상기 세포내 도메인이 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 CD28 세포내 도메인 및 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 CD3-제타 세포내 도메인을 포함하는, 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, 서열 번호 20의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물.

#### 청구항 9

- i) CD38에 결합하는 항원 결합 단백질로서, 여기서, 상기 항원 결합 단백질이 서열 번호 1의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인을 포함하며, 서열 번호 3의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질;

ii) 막관통 도메인; 및

iii) 세포내 도메인

을 포함하는 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현하는 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단으로서,

상기 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단이 상기 항-CD38 CAR 작제물을 암호화하는 핵산에 작동 가능하게 연결된 발현 벡터로 형질 도입되며,

상기 발현 벡터가 상기 숙주 세포에서 상기 항-CD38 CAR 작제물의 발현을 지시하는, 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단.

#### 청구항 10

iv) CD38에 결합하는 항원 결합 단백질로서, 여기서, 상기 항원 결합 단백질이 서열 번호 1의 아미노산 서열에 제시된 CDR을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인을 포함하며, 서열 번호 3의 아미노산 서열에 제시된 CDR을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질;

v) 막관통 도메인; 및

vi) 세포내 도메인

을 포함하는 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현하는 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단으로서,

상기 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단이 상기 항-CD38 CAR 작제물을 암호화하는 핵산에 작동 가능하게 연결된 발현 벡터로 형질 도입되며,

상기 발현 벡터가 상기 숙주 세포에서 상기 항-CD38 키메라 CAR 작제물의 발현을 지시하는, 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단.

#### 청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 발현 벡터가 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 발현 벡터를 포함하는, 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단.

#### 청구항 12

제9항 또는 제10항에 있어서, T 숙주 세포 (또는 이의 집단), 태반 유래 자연 살해 숙주 세포 (또는 이의 집단) 및 제대혈 유래 자연 살해 숙주 세포 (또는 이의 집단)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단.

#### 청구항 13

제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물이 상기 중쇄 가변 (VH) 도메인과 상기 경쇄 가변 (VL) 도메인 사이에 웹타이드 링커를 추가로 포함하고, 여기서, 상기 웹타이드 링커가 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는, 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단.

#### 청구항 14

제9항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질이 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는, 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단.

#### 청구항 15

제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물이 상기 항원 결합 단백질과 상기 막관통 도메인 사이에 힌지 영역을 추가로 포함하고, 여기서, 상기 힌지 영역이 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CD8 힌지 영역인, 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단.

#### 청구항 16

제9항에 있어서, 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물이 상기 항원 결합 단백질과 상기 막관통 도메인 사이에 CD28 세포외 도메인을 추가로 포함하고, 여기서, 상기 CD28 세포외 도메인이 서열 번호 7의 아미노산

서열을 포함하는, 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단.

#### 청구항 17

제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 막관통 도메인이 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 CD28 막관통 도메인인, 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단.

#### 청구항 18

제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 세포내 도메인이 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 CD28 세포내 도메인 및 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 CD3-제타 세포내 도메인을 포함하는, 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단.

#### 청구항 19

제9항에 있어서, 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물이 서열 번호 20의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단.

#### 청구항 20

항-CD38 CAR 작제물을 암호화하는 단리된 핵산으로서, 상기 항-CD38 CAR 작제물이

- a. 서열 번호 1의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인을 포함하고 서열 번호의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인을 포함하는 세포외 항원 결합 단백질;
- b. 막관통 도메인; 및
- c. 세포내 도메인

을 포함하는, 단리된 핵산.

#### 청구항 21

항-CD38 CAR 작제물을 암호화하는 단리된 핵산으로서, 상기 항-CD38 CAR 작제물이

- a. 서열 번호 1의 아미노산 서열에 제시된 CDR을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인을 포함하고 서열 번호의 아미노산 서열에 제시된 CDR을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인을 포함하는 세포외 항원 결합 단백질;
- b. 막관통 도메인; 및
- c. 세포내 도메인

을 포함하는, 단리된 핵산.

#### 청구항 22

제20항 또는 제21항에 있어서, 상기 항-CD38 CAR 작제물이 상기 중쇄 가변 (VH) 도메인과 상기 경쇄 가변 (VL) 도메인 사이에 웹타이드 링커를 추가로 포함하고, 여기서, 상기 웹타이드 링커가 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함하는, 단리된 핵산.

#### 청구항 23

제20항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질이 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는, 단리된 핵산.

#### 청구항 24

제20항 또는 제21항에 있어서, 상기 항-CD38 CAR 작제물이 상기 항원 결합 단백질과 상기 막관통 도메인 사이에 힌지 영역을 추가로 포함하고, 여기서, 상기 힌지 영역이 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CD8 힌지 영역인, 단리된 핵산.

#### 청구항 25

제20항 또는 제21항에 있어서, 상기 항-CD38 CAR 작제물이 상기 항원 결합 단백질과 상기 막관통 도메인 사이에 CD28 세포외 도메인을 추가로 포함하고, 여기서, 상기 CD28 세포외 도메인이 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함하는, 단리된 핵산.

#### 청구항 26

제20항 또는 제21항에 있어서, 상기 막관통 도메인이 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 CD28 막관통 도메인인, 단리된 핵산.

#### 청구항 27

제20항 또는 제21항에 있어서, 상기 세포내 도메인이 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 CD28 세포내 도메인 및 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 CD3-제타 세포내 도메인을 포함하는, 단리된 핵산.

#### 청구항 28

제20항 또는 제21항에 있어서, 서열 번호 20의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 단리된 핵산.

#### 청구항 29

제20항 또는 제21항에 있어서, 상기 세포외 항원 결합 단백질이 scFv인, 단리된 핵산.

#### 청구항 30

제20항 또는 제21항의 핵산을 포함하는 발현 벡터.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 출원은 2017년 11월 3일자로 출원되고 발명의 명칭이 "CD38-지시된 CAR 작제물"인 미국 가출원 62/581,466에 대한 우선권의 이익을 35 U.S.C. § 119 하에 주장하며, 이의 내용은 그 전문이 본 출원에 참조로 포함된다.

[0002] 본 출원 전체에 걸쳐, 다양한 공보, 특히 및/또는 특허 출원을 참조한다. 상기 공보, 특히 및/또는 특허 출원의 개시 내용은 본 개시 내용이 속하는 분야의 기술을 보다 충분하게 설명하기 위해 그 전문이 본 출원에 참조로 포함된다.

#### 서열 목록

[0004] 본 출원은 ASCII 형식으로 전자적으로 제출된 서열 목록을 포함하며, 이로써 그 전체가 참조로 포함된다. 2018년 10월 31일자로 생성된 상기 ASCII 사본은 T103019\_1210WO\_SL.txt로 명명되며, 크기가 24,560 byte이다.

#### 기술분야

[0006] 본 개시 내용은 서열 번호 1의 아미노산 서열과 적어도 95% 상동인 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인 및 서열 번호 3의 아미노산 서열과 적어도 95% 상동인 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인을 갖는 scFv 항체에 의해 지시된 키메라 항원 수용체 (chimeric antigen receptor: CAR)를 제공함으로써 CD38 CAR 형질 도입을 수행할 때 T 세포 살해 (fratricide)의 문제에 대한 해결책을 제공한다. 보다 구체적으로, 본 개시 내용은 보다 높은 CD38-발현 종양 세포에 우선적으로 결합하고 CAR-형질 도입된 T 세포를 비롯하여 보다 낮은 CD38 발현 정상 T 세포를 표적화하지 않음으로써 보다 높은 안전성을 나타내는 CD38-지시된 CAR 작제물을 제공한다.

#### 배경 기술

[0007] T-세포에서의 신규한 특이성은 트랜스제닉 T-세포 수용체 또는 키메라 항원 수용체 (CAR)의 유전적 전달을 통해 생성되었다. CAR은 단일 융합 분자에서 하나 이상의 신호 전달 도메인과 관련된 표적화 모이어티 (moiety)로 이루어진 합성 수용체이다. 일반적으로, CAR의 결합 모이어티는 가요성 링커에 의해 연결된 단클론 항체의 경

쇄 및 중쇄 가변 단편을 포함하는 단일 쇄 항체 (scFv)의 항원 결합 도메인으로 이루어진다. 제1 세대 CAR에 대한 신호 전달 도메인은 CD3제타 또는 Fc 수용체 감마 쇄의 세포질 영역로부터 유래된다. 제1 세대 CAR은 T 세포 세포독성을 성공적으로 재지시하는 것으로 보여져 왔지만, 생체내에서 연장된 확장 및 항종양 활성을 제공하는데 실패하였다. CD28, OX-40 (CD134) 및 4-1BB (CD137)를 포함하는 공동 자극 분자로부터의 신호 전달 도메인이 CAR 변형된 T 세포의 생존을 증진시키고 증식을 증가시키기 위해 단독으로 (제2 세대) 또는 조합하여 (제3 세대) 부가되어 왔다. CAR은 림프종 및 고형 종양을 비롯한 다양한 악성 종양으로부터의 종양 세포의 표면에서 발현된 항원에 대해 T 세포가 성공적으로 재지시될 수 있도록 하였다.

[0008] 양자 면역 요법을 사용하는 환자의 치료를 위한 현재 프로토콜은 자가 세포 전달에 기반한다. 이러한 접근법에서, T 림프구를 환자로부터 회수하고, 유전적으로 변형하거나 생체외에서 선택하고, 필요에 따라 세포의 수를 증폭시키기 위해 시험관내에서 배양하고, 최종적으로 환자 내로 주입한다. 림프구 주입에 추가하여, 숙주 (환자)는 T 세포의 생착 또는 면역 반응을 지원하는 다른 방법, 예를 들어, (방사선 또는 화학 요법에 의한) 사전-컨디셔닝 (pre-conditioning)에서 이의 참여 및 림프구 성장 인자 (예를 들어, IL-2)의 투여에서 조작될 수 있다. 각 환자는 환자 자신의 림프구를 이용하여 개별적으로 가공된 치료 (즉, 자가 요법)를 받는다. 자가 요법은 실제 적용에 있어 상당한 기술적 및 로지스틱 (logistic) 장애에 직면하고 있는데, 이들의 발생은 고가의 전용 시설 및 전문 인력을 필요로 하고, 이것은 환자의 진단 후 단시간 내에 발생되어야 하고, 다수의 경우에는 환자의 전처리가 저하된 면역 기능을 초래하여, 환자의 림프구가 기능적으로 불량하고 매우 적은 수로 존재할 수 있다. 이러한 장애 때문에, 각 환자의 자가 세포 제제는 사실상 새로운 제품이므로, 효능 및 안전성에서 상당한 차이를 초래한다.

[0009] CAR 또는 트랜스제닉 TCR을 발현하는 조작된 T 세포의 경우, 표적 항원이 T 세포 자체에 의해 발현된다면, 온-표적 오프-종양 (on-target off-tumor) 부작용은 "T 세포 살해"를 포함할 수 있다. CD38 CAR-T의 경우, T 세포 살해가 시험관내 배양 동안 관찰되었다. 이것은 CAR-표적 상호 작용을 차단하는 항-CD38 항체를 사용하여 어느 정도 경감되었다. 그러나, 이러한 접근법은 생체내에서 시험되지 않았다. 생체내 살해의 항체 매개성 차단은 CD244에 대해 단클론 항체를 사용하는 쥐과 동물 모델에서 NK 세포에 대해서만 보여졌다 (문헌 [Taniguchi et al., (2007) *Blood* 110, 2020-2023]).

[0010] 트랜스제닉 TCR을 발현하는 T 세포의 경우, 표적화된 HLA-타입에 대해 음성인 동종 이계 T 세포 공여자가 사용된다면, 살해는 잠재적으로 회피될 수 있다 (문헌 [Leisegang, M., Wilde, S., Spranger, S., Milosevic, S., Frankenberger, B., Uckert, W., and Schendel, D. J. (2010), MHC-restricted fratricide of human lymphocytes expressing surviving-specific transgenic T cell receptors, *The Journal of Clinical Investigation* 120, 3869-3877] 및 [Schendel, D. J., and Frankenberger, B. (2013), Limitations for TCR gene therapy by MHC-restricted fratricide and TCR-mediated hematopoietic stem cell toxicity, *Oncimmunology* 2, e22410]).

[0011] CD38은 긴 C-말단 세포의 도메인 및 짧은 N-말단 세포질 도메인을 갖는 45 kD II형 막관통 당단백질이다. CD38 단백질은 NAD<sup>+</sup>의 사이클리 ADP-리보오스 (cADPR)로의 전환을 촉매하고 또한 cADPR을 ADP-리보오스로 가수분해할 수 있는 이작용성 체외효소 (ectoenzyme)이다. 개체 발생 (ontogeny) 동안, CD38은 림프구, 적혈구 및 골수 세포의 CD34<sup>+</sup> 위탁 줄기 세포 (committed stem cell) 및 직계-위탁 (lineage-committed) 선조 세포 상에서 나타난다. CD38 발현은 T 및 B 세포 발달의 다양한 단계에서 다양한 발현 수준으로 림프계에서 주로 지속된다.

[0012] CD38은 비호지킨 림프종 (non-Hodgkin's lymphoma: NHL), 벼킷 림프종 (Burkitt's lymphoma: BL), 다발성 골수종 (multiple myeloma: MM), B 만성 림프구성 백혈병 (B chronic lymphocytic leukemia: B-CLL), B 및 T 급성 림프구성 백혈병 (acute lymphocytic leukemia: ALL), T 세포 림프종 (T cell lymphoma: TCL), 급성 골수성 백혈병 (acute myeloid leukemia: AML), 모발상 세포 백혈병 (hairy cell leukemia: HCL), 호지킨 림프종 (Hodgkin's Lymphoma: HL) 및 만성 골수성 백혈병 (chronic myeloid leukemia: CML)을 비롯하여 다수의 조혈 악성 종양 및 다양한 조혈 악성 종양으로부터 유래된 세포주에서 상향 조절된다. 다른 한편으로, 조혈계의 원시 만능 줄기 세포의 대부분은 CD38<sup>-</sup>이다. 조혈 악성 종양에서의 CD38 발현 및 이의 질병 진행과의 상관 관계는 CD38을 항-CD38 항체 요법에 대한 매력적인 표적으로 만든다.

[0013] 다발성 골수종 (MM)은 항체-생산 형질 세포의 악성 종양이며, 림프종 및 백혈병 다음으로 세계에서 세 번째로 가장 흔한 혈액암이다 (문헌 [Ferlay et al., *Int. J. Cancer* 136(5): E359-386. 2015]). 2016년에, 추정되는 새로운 MM 사례는 30,330건이며, 추정 사망은 미국에서는 12,650건이다 (문헌 [Howlader et al., "SEER Cancer

Statistics Review, 1975–2013, National Cancer Institute, Bethesda, MD, [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2013/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/), based on November 2015 SEER data submission, posted to the SEER web site." 2016]). 현재 이러한 질병에 대한 치료법은 없으며, 5년 생존율은 신규한 면역 조절제, 프로테아제 억제제 및 자가 조혈 줄기 세포 이식을 비롯한 MM의 치료에서 상당한 발전에도 불구하고 단지 45%이다 (문헌 [Kumar et al., *Blood* 111(5): 2516–2520, 2008] 및 [Kharfan-Dabaja et al. *J. Hematol. Oncol.* 6:2, 2013]). 신규하고 효과적인 치료 옵션의 개발은 MM 환자에 대한 중요한 필요성으로 남아 있다. 본 발명은 이러한 필요성을 다루기 위해 제공된다.

[0014] T 세포는 사실상 모든 생물학적 공간에 침투할 수 있고, 바이러스 및 자가 면역 질환에서 보여지는 바와 같이 정상 또는 악성 세포를 처리할 수 있는 능력을 가지며, 드문 자발적인 암의 관해에서도 또한 나타난다. 그러나, T 세포는 자신 또는 종양 항원에 대해 쉽게 내성이 있으며, "면역 감시"는 임상적으로 명백한 모든 암에서 명백히 실패하였다. CAR-T 연구의 목표는, 항체-정의된 항-악성 세포 마커 인식을 제공하여 CAR에 의해 인식된 항원의 발현에 기초하여 악성 세포를 사멸시킴으로써, 이의 "내인성" T 세포 수용체 (T cell receptor: TCR) 레퍼토리에 관계 없이 환자의 T 세포에 특이성 및 친화성을 제공하는 것이다.

[0015] 재지정된 살종양 활성에 대한 T 세포 조작된 CAR의 주입에 의한 양자 면역 요법이 전이암의 치료를 위해 탐색되었다. CAR은 항체의 항원 인식 도메인을 T 세포로부터의 수용체의 신호 전달 도메인과 결합시킴으로써 작게된다. CAR 유전자에 의한 T 세포의 변형은 T 세포가 재표적화된 항체 항종양 세포독성을 갖도록 한다. 살해가 주요 조직적 합성 복합체 (Major Histocompatibility Complex: MHC)-제한되지 않기 때문에, 상기 접근법은 동일한 항원을 갖는 모든 환자에게 일반적인 요법을 제공한다. 항원 특이적 CAR로 조작된 T 세포는 "T 세포", "CAR-T 세포" 또는 "T-바디"로 호칭된다 (문헌 [Eshar, et al., 1993 Proc. Nat'l. Acad. of Sci. USA 90(2): 720–724]). 면역글로불린-T 세포 수용체 (IgTCR)인 제1 세대 CAR은 활성화 자극 (신호 1)만을 전달하는 신호 전달 도메인 (TCR-CD3 ζ)을 함유하도록 조작되었다 (문헌 [Gross, et al., 1989 Proc. Nat'l. Acad. of Sci. USA 86(24): 10024–10028], [Eshar, et al., 1993 Proc. Nat'l. Acad. of Sci. USA 90(2): 720–724], [Haynes, et al., 2001 The Journal of Immunology 166(1): 182–187]). 제1 세대 CAR 단독으로 이식된 T 세포는 차선 활성화 (suboptimal activation)로 인해 제한된 항종양 효능을 나타낸다. 면역글로불린 CD28-CD3 ζ-T 세포 수용체 (IgCD28TCR)인 제2 세대 CAR은 CAR-T 세포가 보다 큰 항종양 능력을 갖도록 하는 제1 세대 수용체에 공동 자극성 CD28 (신호 2)을 포함시켰다 (문헌 [Finney, et al., 1998 Journal of Immunology 161(6): 2791–2797], [Hombach, et al., 2001 Journal of Immunology 167(11): 6123–6131], [Maher, et al., 2002 Nature Biotechnology 20(1): 70–7], [Emtage, et al., 2008 Clinical Cancer Research 14(24): 8112–812], [Lo, et al., 2010 Clinical Cancer Research 16(10): 2769–2780]).

## 발명의 내용

### 발명의 개요

[0016] 본 개시 내용은 낮은 CD38 발현 세포를 회피하면서 CD38의 높은 발현인 종양 세포를 우선적으로 표적화할 수 있는 CD38 결합 동력학을 제공하는 항-CD38 항체를 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 제공한다. 보다 구체적으로, 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물 A2를 암호화하는 핵산 서열을 제공하며, 여기서, 상기 CAR 작제물은 서열 번호 1의 아미노산 서열과 적어도 95% 상동인 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인 및 서열 번호 3의 아미노산 서열과 적어도 95% 상동인 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인을 갖는 scFv 항체; 막관통 도메인; 및 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다. 바람직하게는, 상기 scFv 항체는 서열 번호 5로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 VH와 VL 사이에 웹타이드 링커를 추가로 포함한다. 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하는 scFv 항체 영역을 가질 수 있다. 바람직하게는, 상기 CAR 작제물은 서열 번호 6의 CD38 힌지 영역을 포함하는 힌지 영역을 상기 항원 결합 단백질과 상기 막관통 도메인 사이에 추가로 포함한다. 바람직하게는, 상기 CAR 작제물은 서열 번호 7의 CD28 세포외 도메인을 포함하는 CD28 세포외 도메인을 상기 항원 결합 단백질과 상기 막관통 도메인 사이에 추가로 포함한다. 바람직하게는, 상기 막관통 도메인은 서열 번호 8의 CD28 막관통 도메인이다. 바람직하게는, 2개의 신호 전달 도메인이 존재한다. 보다 바람직하게는, 제1 신호 전달 도메인은 서열 번호 9의 아미노산 서열을 갖는 CD28 신호 전달 도메인이다. 보다 바람직하게는, 제2 신호 전달 도메인은 서열 번호 10의 아미노산 서열을 갖는 CD3-ζ 신호 전달 도메인이다. 바람직하게는, 상기 CAR 작제물은 N-말단에 신호 웹타이드를 추가로 포함한다.

[0018] 또 다른 구체적인 실시형태에서, 핵산 서열은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물 D8을 암호화하며, 여기

서, 상기 CAR 작제물은 서열 번호 2의 아미노산 서열과 적어도 95% 상동인 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인 및 서열 번호 4의 아미노산 서열과 적어도 95% 상동인 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인을 갖는 scFv 항체; 막관통 도메인; 및 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다. 바람직하게는, 상기 scFv 항체는 서열 번호 5로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 VH와 VL 사이에 웨타이드 링커를 추가로 포함한다. 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하는 scFv 항체 영역을 가질 수 있다. 바람직하게는, 상기 CAR 작제물은 서열 번호 6의 CD38 힌지 영역을 포함하는 힌지 영역을 상기 항원 결합 단백질과 상기 막관통 도메인 사이에 추가로 포함한다. 바람직하게는, 상기 CAR 작제물은 서열 번호 7의 CD28 세포외 도메인을 포함하는 CD28 세포외 도메인을 상기 항원 결합 단백질과 상기 막관통 도메인 사이에 추가로 포함한다. 바람직하게는, 상기 막관통 도메인은 서열 번호 8의 CD28 막관통 도메인이다. 바람직하게는, 2개의 신호 전달 도메인이 존재한다. 보다 바람직하게는, 제1 신호 전달 도메인은 서열 번호 9의 아미노산 서열을 갖는 CD28 신호 전달 도메인이다. 보다 바람직하게는, 제2 신호 전달 도메인은 서열 번호 10의 아미노산 서열을 갖는 CD3-ζ 신호 전달 도메인이다. 바람직하게는, 상기 CAR 작제물은 N-말단에 신호 웨타이드를 추가로 포함한다.

[0019] 본 개시 내용은 CD38에 결합하는 단일 쇄 항체로서, 여기서, 항원 결합 단백질이 서열 번호 1의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일하거나 적어도 96% 동일하거나 적어도 97% 동일하거나 적어도 98% 동일하거나 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인을 포함하고 서열 번호 3의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일하거나 적어도 96% 동일하거나 적어도 97% 동일하거나 적어도 98% 동일하거나 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인을 포함하는, 단일 쇄 항체; 막관통 도메인; 및 세포내 신호 전달 도메인을 포함하는, 항-CD38 CAR을 암호화하는 핵산 서열을 추가로 제공한다.

[0020] 본 개시 내용은 CD38에 결합하는 항원 결합 단백질로서, 여기서, 상기 항원 결합 단백질이 서열 번호 2의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일하거나 적어도 96% 동일하거나 적어도 97% 동일하거나 적어도 98% 동일하거나 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인을 포함하고 서열 번호 4의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일하거나 적어도 96% 동일하거나 적어도 97% 동일하거나 적어도 98% 동일하거나 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질; 막관통 도메인; 및 세포내 신호 전달 도메인을 포함하는, 항-CD38 CAR을 암호화하는 핵산 서열을 제공한다.

[0021] 본 개시 내용은 상기 제공된 항-CD38 CAR 작제물을 발현하는 유전자 조작된 세포를 대상체에게 투여함으로써 양자 세포 요법을 수행하는 방법을 추가로 제공한다.

[0022] 본 개시 내용은 유해한 CD38 발현과 관련된 장애를 갖는 사람 대상체를 치료하는 방법을 추가로 제공한다. 이러한 방법은, 예를 들어, 본 출원에서 기재된 항-CD38 CAR을 발현하는 숙주 세포 (또는 본 출원에서 기재된 바와 같은 항-CD38 CAR을 암호화하는 핵산 서열로 형질 도입된 숙주 세포)를 사람 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 바람직하게는, 상기 장애는 혈액 유방암, 난소암, 전립선암, 두경부암, 폐암, 방광암, 흑색종, 대장암, 췌장암, 폐암, 간암, 신장암, 식도암, 평활근종, 평활근 육종, 신경교종 및 교모세포종을 포함하지만 이들에 한정되지 않는 암이다.

[0023] 바람직하게는, 상기 암은 비호지킨 림프종 (NHL), 버켓 림프종 (BL), B 만성 림프구성 백혈병 (B-CLL), B 및 T 급성 림프구성 백혈병 (ALL), T 세포 림프종 (TCL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 모발상 세포 백혈병 (HCL), 호지킨 림프종 (HL) 및 만성 골수성 백혈병 (CML)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 혈액암이다. 가장 바람직하게는, 상기 암은 다발성 골수종 (MM)이다.

[0024] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열을 제공하며, 여기서, 상기 암호화된 작제물은 (i) CD38에 결합하는 항원 결합 단백질로서, 여기서, 상기 항원 결합 단백질이 서열 번호 1의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인을 포함하며, 상기 CD38에 결합하는 항원 결합 단백질이 서열 번호 3의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질; (ii) 막관통 도메인; 및 (iii) 세포내 도메인을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산은 분리된 핵산이다.

[0025] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열을 제공하며, 여기서, 상기 암호화된 작제물은 (i) CD38에 결합하는 항원 결합 단백질로서, 여기서, 상기 항원 결합 단백질이 서열 번호 2의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인을 포함하며, 상기 CD38에 결합하는 항원 결합 단백질이 서열 번호 4의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함

하는 경쇄 가변 (VL) 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질; (ii) 막관통 도메인; 및 (iii) 세포내 도메인을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산은 분리된 핵산이다.

[0026] 본 개시 내용은 상기 중쇄 가변 (VH) 도메인과 상기 경쇄 가변 (VL) 도메인 사이에 웨타이드 링커를 추가로 포함하는 암호화된 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 제공하며, 여기서, 상기 웨타이드 링커는 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함한다.

[0027] 본 개시 내용은 암호화된 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 항원 결합 단백질은 서열 번호 12 또는 16의 아미노산 서열을 포함한다.

[0028] 본 개시 내용은 상기 항원 결합 단백질과 상기 막관통 도메인 사이에 헌지 영역을 추가로 포함하는 암호화된 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 헌지 영역은 서열 번호 6의 아미노산 서열 또는 이의 기능성 부분을 포함하는 CD8 헌지 영역이다.

[0029] 본 개시 내용은 상기 항원 결합 단백질과 상기 막관통 도메인 사이에 CD28 세포외 도메인을 추가로 포함하는 암호화된 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 CD28 세포외 도메인은 서열 번호 7의 아미노산 서열 또는 이의 기능성 부분을 포함한다.

[0030] 본 개시 내용은 암호화된 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 막관통 도메인은 서열 번호 8의 아미노산 서열 또는 이의 기능성 부분을 포함하는 CD28 막관통 도메인을 포함한다.

[0031] 본 개시 내용은 암호화된 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 세포내 도메인은 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 CD28 세포내 도메인을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포내 도메인은 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 CD3-제타 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포내 도메인은 CD28, CD3-제타, OX-40 (CD134) 또는 4-1BB (CD137)로부터의 세포내 도메인(들) 또는 공동 자극 도메인 중 임의의 하나 또는 임의의 조합을 추가로 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 핵산은 상기 세포내 도메인이 CD3-제타를 포함하는 제1 세대 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화한다. 하나의 실시형태에서, 상기 핵산은 상기 세포내 도메인이 CD3-제타 및 CD28 세포내 도메인 또는 4-1BB를 포함하는 제2 세대 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화한다. 하나의 실시형태에서, 상기 핵산은 상기 세포내 도메인이 CD3-제타 및 CD28 세포내 도메인 및 4-1BB 또는 OX-40을 포함하는 제3 세대 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화한다.

[0032] 본 개시 내용은 서열 번호 20 또는 21의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열을 추가로 제공한다. 하나의 실시형태에서, 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산은 분리된 핵산이다.

[0033] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 발현 벡터를 추가로 제공하며, 여기서, 상기 암호화된 작제물은 (i) CD38에 결합하는 항원 결합 단백질로서, 여기서, 상기 항원 결합 단백질이 서열 번호 1의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인을 포함하며, 상기 CD38에 결합하는 항원 결합 단백질이 서열 번호 3의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질; (ii) 막관통 도메인; 및 (iii) 세포내 도메인을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 발현 벡터는 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단에서 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물의 발현을 지시한다. 하나의 실시형태에서, 상기 발현 벡터는 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 발현 벡터를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 발현 벡터는 숙주 세포 형질 도입 및/또는 폐키징을 위한 하나 이상의 추가의 벡터를 갖는 발현 벡터 시스템의 일부이다.

[0034] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 발현 벡터를 추가로 제공하며, 여기서, 상기 암호화된 작제물은 (i) CD38에 결합하는 항원 결합 단백질로서, 여기서, 상기 항원 결합 단백질이 서열 번호 2의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인을 포함하며, 상기 CD38에 결합하는 항원 결합 단백질이 서열 번호 4의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질; (ii) 막관통 도메인; 및 (iii) 세포내 도메인을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 발현 벡터는 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단에서 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물의 발현을 지시한다. 하나의 실시형태에서, 상기 발현 벡터는 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 발현 벡터를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 발현 벡터는 숙

주 세포 형질 도입 및/또는 패키징을 위한 하나 이상의 추가의 벡터를 갖는 발현 벡터 시스템의 일부이다.

[0035] 하나의 실시형태에서, 상기 발현 벡터는 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단에서 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현을 지시한다. 하나의 실시형태에서, 상기 발현 벡터는 레트로바이러스 또는 렌티바이러스로부터 유래된 핵산 백본 서열을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 발현 벡터는 하나 이상의 패키징 벡터 및/또는 외피 (envelope) 벡터를 포함하는 바이러스 형질 도입 시스템의 일부이며, 이를 벡터는 함께 숙주 세포에서 전이유전자의 발현을 지시한다.

[0036] 본 개시 내용은 제1 또는 제2 세대 레트로바이러스 발현 벡터 시스템의 일부인 발현 벡터를 추가로 제공한다. 하나의 실시형태에서, 제1 세대 발현 벡터 시스템은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산에 작동 가능하게 연결된 레트로바이러스 발현 벡터 (전달 벡터), 레트로바이러스 env 서열을 보유하는 외피 벡터, 및 레트로바이러스 gag 및 pol 서열을 보유하는 패키징 벡터를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 제2 세대 발현 벡터 시스템은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산에 작동 가능하게 연결된 발현 벡터, 및 패키징 세포주에서 안정하게 발현되는 레트로바이러스 gag, pol 및 env 서열을 포함한다.

[0037] 본 개시 내용은 제1, 제2 또는 제3 세대 렌티바이러스 발현 벡터 시스템의 일부인 발현 벡터를 추가로 제공한다. 하나의 실시형태에서, 제1 세대 발현 벡터 시스템은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산에 작동 가능하게 연결된 렌티바이러스 발현 벡터 (전달 벡터), 렌티바이러스 env 서열을 보유하는 외피 벡터, 및 gag, pol, tat 및 rev 서열을 보유하는 렌티바이러스 패키징 벡터를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 제2 세대 발현 벡터 시스템은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산에 작동 가능하게 연결된 렌티바이러스 발현 벡터, 비-렌티바이러스 env 서열 (자가 env 서열)을 보유하는 외피 벡터, 및 렌티바이러스 gag, pol, tat 및 rev 서열을 보유하는 패키징 벡터를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 제3 세대 발현 벡터 시스템은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산에 작동 가능하게 연결되고 3' LTR, 제1 패키징 플라스미드 (gag 및 pol), 제2 패키징 플라스미드 (rev) 및 외피 플라스미드 (이종 env 서열 보유)로부터 제거된 렌티바이러스 tat 서열을 갖는 렌티바이러스 발현 벡터를 포함한다.

[0038] 본 개시 내용은 전이유전자의 숙주 세포로의 일시적인 도입 또는 전이유전자의 숙주 세포 계놈으로의 안정한 삽입을 지시할 수 있는 발현 벡터 및 하나 이상의 패키징 벡터를 추가로 제공한다. 상기 발현 벡터 및 하나 이상의 패키징 벡터는 숙주 세포에서 전이유전자의 전사 및/또는 번역을 지시할 수 있다. 상기 하나 이상의 패키징 벡터와 함께 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산에 작동 가능하게 연결되는 발현 벡터는, 형질 도입된 숙주 세포의 표면 상에 디스플레이될 수 있는 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물의 생산을 지시할 수 있다.

[0039] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 발현 벡터를 추가로 제공하며, 여기서, 상기 CAR 작제물은 상기 중쇄 가변 (VH) 도메인과 상기 경쇄 가변 (VL) 도메인 사이에 웹타이드 링커를 추가로 포함하고, 상기 웹타이드 링커는 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함한다.

[0040] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 발현 벡터를 추가로 제공하며, 여기서, 상기 항원 결합 단백질은 서열 번호 12 또는 16의 아미노산 서열을 포함한다.

[0041] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 발현 벡터를 추가로 제공하며, 여기서, 상기 CAR 작제물은 상기 항원 결합 단백질과 상기 막관통 도메인 사이에 힌지 영역을 추가로 포함하고, 상기 힌지 영역은 서열 번호 6의 아미노산 서열 또는 이의 기능성 부분을 포함하는 CD8 힌지 영역이다.

[0042] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 발현 벡터를 추가로 제공하며, 여기서, 상기 CAR 작제물은 상기 항원 결합 단백질과 상기 막관통 도메인 사이에 CD28 세포외 도메인을 추가로 포함하고, 상기 CD28 세포외 도메인은 서열 번호 7의 아미노산 서열 또는 이의 기능성 부분을 포함한다.

[0043] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 발현 벡터를 추가로 제공하며, 여기서, 상기 막관통 도메인은 서열 번호 8의 아미노산 서열 또는 이의 기능성 부분을 포함하는 CD28 막관통 도메인을 포함한다.

[0044] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 발

현 벡터를 추가로 제공하며, 여기서, 상기 세포내 도메인은 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 CD28 세포내 도메인을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포내 도메인은 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 CD3-제타 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포내 도메인은 CD28, CD3-제타, OX-40 (CD134) 또는 4-1BB (CD137)로부터의 세포내 도메인(들) 또는 공동 자극 도메인 중 임의의 하나 또는 임의의 조합을 추가로 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포내 도메인은 CD28 세포내 도메인, CD3-제타, OX-40 및/또는 4-1BB 중 임의의 하나 또는 임의의 조합을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 핵산은 상기 세포내 도메인이 CD3-제타를 포함하는 제1 세대 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화한다. 하나의 실시형태에서, 상기 핵산은 상기 세포내 도메인이 CD3-제타 및 CD28 세포내 도메인 또는 4-1BB를 포함하는 제2 세대 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화한다. 하나의 실시형태에서, 상기 핵산은 상기 세포내 도메인이 CD3-제타 및 CD28 세포내 도메인 및 4-1BB 또는 OX-40을 포함하는 제3 세대 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화한다.

[0045] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 발현 벡터를 추가로 제공하며, 여기서, 상기 CAR 작제물은 서열 번호 20 또는 21의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산은 분리된 핵산이다.

[0046] 본 개시 내용은 보다 낮은 CD38 발현을 나타내는 세포와 비교하여 CD38의 높은 발현을 나타내는 세포 (예를 들어, 표적 세포)에 우선적으로 결합하는 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 추가로 제공한다.

[0047] 본 개시 내용은 하기를 포함하는 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 제공한다: (i) CD38에 결합하는 항원 결합 단백질로서, 여기서, 상기 항원 결합 단백질이 서열 번호 1의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인을 포함하며, 상기 CD38에 결합하는 항원 결합 단백질이 서열 번호 3의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질; (ii) 막관통 도메인; 및 (iii) 세포내 도메인. 하나의 실시형태에서, 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 단리된 폴리펩타이드이다.

[0048] 본 개시 내용은 하기를 포함하는 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 제공한다: (i) CD38에 결합하는 항원 결합 단백질로서, 여기서, 상기 항원 결합 단백질이 서열 번호 2의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인을 포함하며, 상기 CD38에 결합하는 항원 결합 단백질이 서열 번호 4의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질; (ii) 막관통 도메인; 및 (iii) 세포내 도메인. 하나의 실시형태에서, 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 단리된 폴리펩타이드이다.

[0049] 본 개시 내용은 상기 중쇄 가변 (VH) 도메인과 상기 경쇄 가변 (VL) 도메인 사이에 웹타이드 링커를 추가로 포함하는 항원 결합 단백질을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 웹타이드 링커는 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함한다.

[0050] 본 개시 내용은 암호화된 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 항원 결합 단백질은 서열 번호 12 또는 16의 아미노산 서열을 포함한다.

[0051] 본 개시 내용은 상기 항원 결합 단백질과 상기 막관통 도메인 사이에 힌지 영역을 추가로 포함하는 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 힌지 영역은 서열 번호 6의 아미노산 서열 또는 이의 기능성 부분을 포함하는 CD8 힌지 영역이다.

[0052] 본 개시 내용은 상기 항원 결합 단백질과 상기 막관통 도메인 사이에 CD28 세포외 도메인을 추가로 포함하는 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 CD28 세포외 도메인은 서열 번호 7의 아미노산 서열 또는 이의 기능성 부분을 포함한다.

[0053] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 막관통 도메인은 서열 번호 8의 아미노산 서열 또는 이의 기능성 부분을 포함하는 CD28 막관통 도메인을 포함한다.

[0054] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 세포내 도메인은 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 CD28 세포내 도메인을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포내 도메인은 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 CD3-제타 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포내 도메인은 CD28, CD3-제타, OX-40 (CD134) 또는 4-1BB (CD137)로부터의 세포내 도메인(들) 또는 공동 자극 도메인 중 임의의 하나 또는 임의의 조합을 추가로 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기

세포내 도메인은 CD28 세포내 도메인, CD3-제타, OX-40 및/또는 4-1BB 중 임의의 하나 또는 임의의 조합을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 핵산은 상기 세포내 도메인이 CD3-제타를 포함하는 제1 세대 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화한다. 하나의 실시형태에서, 상기 핵산은 상기 세포내 도메인이 CD3-제타 및 CD28 세포내 도메인 또는 4-1BB를 포함하는 제2 세대 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화한다. 하나의 실시형태에서, 상기 핵산은 상기 세포내 도메인이 CD3-제타 및 CD28 세포내 도메인 및 4-1BB 또는 OX-40을 포함하는 제3 세대 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화한다.

[0055] 본 개시 내용은 서열 번호 20 또는 21의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 추가로 제공한다. 하나의 실시형태에서, 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 단리된 폴리펩타이드이다.

[0056] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열로 형질 도입된 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 암호화된 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 (i) CD38에 결합하는 항원 결합 단백질로서, 여기서, 상기 항원 결합 단백질이 서열 번호 1의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인을 포함하며, 상기 항원 결합 단백질이 서열 번호 3의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질; (ii) 막관통 도메인; 및 (iii) 세포내 도메인을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단은 T 숙주 세포, 태반 유래 자연 살해 숙주 세포 (또는 이의 집단) 및 제대혈 유래 자연 살해 숙주 세포 (또는 이의 집단)로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 하나의 실시형태에서, 상기 형질 도입된 숙주 세포 또는 형질 도입된 세포 집단에서, 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열은 상기 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단에서 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물의 발현을 지시하는 발현 벡터에 작동 가능하게 연결된다.

[0057] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열로 형질 도입된 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 암호화된 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 (i) CD38에 결합하는 항원 결합 단백질로서, 여기서, 상기 항원 결합 단백질이 서열 번호 2의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인을 포함하며, 상기 항원 결합 단백질이 서열 번호 4의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질; (ii) 막관통 도메인; 및 (iii) 세포내 도메인을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단은 T 숙주 세포, 태반 유래 자연 살해 숙주 세포 (또는 이의 집단) 및 제대혈 유래 자연 살해 숙주 세포 (또는 이의 집단)로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 하나의 실시형태에서, 상기 형질 도입된 숙주 세포 또는 형질 도입된 세포 집단에서, 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열은 상기 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단에서 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물의 발현을 지시하는 발현 벡터에 작동 가능하게 연결된다.

[0058] 본 개시 내용은 상기 중쇄 가변 (VH) 도메인과 상기 경쇄 가변 (VL) 도메인 사이에 웹타이드 링커를 추가로 포함하는 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열로 형질 도입된 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 웹타이드 링커는 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함한다.

[0059] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열로 형질 도입된 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 항원 결합 단백질은 서열 번호 12 또는 16의 아미노산 서열을 포함한다.

[0060] 본 개시 내용은 상기 항원 결합 단백질과 상기 막관통 도메인 사이에 힌지 영역을 추가로 포함하는 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열로 형질 도입된 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 힌지 영역은 서열 번호 6의 아미노산 서열 또는 이의 기능성 부분을 포함하는 CD8 힌지 영역이다.

[0061] 본 개시 내용은 상기 항원 결합 단백질과 상기 막관통 도메인 사이에 CD28 세포외 도메인을 추가로 포함하는 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열로 형질 도입된 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 CD28 세포외 도메인은 서열 번호 7의 아미노산 서열 또는 이의 기능성 부분을 포함한다.

[0062] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열로 형질 도입된 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 막관통 도메인은 서열 번호 8의 아미노산 서열 또는 이의

기능성 부분을 포함하는 CD28 막판통 도메인을 포함한다.

[0063] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열로 형질 도입된 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 세포내 도메인은 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 CD28 세포내 도메인을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포내 도메인은 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 CD3-제타 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포내 도메인은 CD28, CD3-제타, OX-40 (CD134) 또는 4-1BB (CD137)로부터의 세포내 도메인(들) 또는 공동 자극 도메인 중 임의의 하나 또는 임의의 조합을 추가로 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포내 도메인은 CD28 세포내 도메인, CD3-제타, OX-40 및/또는 4-1BB 중 임의의 하나 또는 임의의 조합을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 핵산은 상기 세포내 도메인이 CD3-제타를 포함하는 제1 세대 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화한다. 하나의 실시형태에서, 상기 핵산은 상기 세포내 도메인이 CD3-제타 및 CD28 세포내 도메인 또는 4-1BB를 포함하는 제2 세대 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화한다. 하나의 실시형태에서, 상기 핵산은 상기 세포내 도메인이 CD3-제타 및 CD28 세포내 도메인 및 4-1BB 또는 OX-40을 포함하는 제3 세대 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화한다.

[0064] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열로 형질 도입된 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 암호화된 작제물은 서열 번호 20 또는 21의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0065] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열로 형질 도입되는 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 핵산 서열은 상기 숙주 세포에서 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물의 발현을 지시하는 발현 백터에 작동 가능하게 연결된다.

[0066] 본 개시 내용은 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현하는 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단 상에 발현된 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 보다 낮은 CD38 발현을 나타내는 세포와 비교하여 CD38의 높은 발현을 나타내는 세포 (예를 들어, 표적 세포)에 우선적으로 결합한다.

[0067] 본 개시 내용은 (i) CD38에 결합하는 항원 결합 단백질로서, 여기서, 상기 항원 결합 단백질이 서열 번호 1의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인을 포함하며 서열 번호 3의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질; (ii) 막판통 도메인; 및 (iii) 세포내 도메인을 포함하는 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현하는 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단을 추가로 제공한다. 하나의 실시형태에서, 상기 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단은 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산에 작동 가능하게 연결된 발현 백터로 형질 도입된다. 하나의 실시형태에서, 상기 발현 백터는 상기 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단에서 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물의 발현을 지시한다. 하나의 실시형태에서, 상기 발현 백터는 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 발현 백터를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단은 T 숙주 세포, 태반 유래 자연 살해 숙주 세포 (또는 이의 집단) 및 제대혈 유래 자연 살해 숙주 세포 (또는 이의 집단)로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0068] 본 개시 내용은 (i) CD38에 결합하는 항원 결합 단백질로서, 여기서, 상기 항원 결합 단백질이 서열 번호 2의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인을 포함하며 서열 번호 4의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질; (ii) 막판통 도메인; 및 (iii) 세포내 도메인을 포함하는 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현하는 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단을 추가로 제공한다. 하나의 실시형태에서, 상기 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단은 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산에 작동 가능하게 연결된 발현 백터로 형질 도입된다. 하나의 실시형태에서, 상기 발현 백터는 상기 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단에서 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물의 발현을 지시한다. 하나의 실시형태에서, 상기 발현 백터는 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 발현 백터를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단은 T 숙주 세포, 태반 유래 자연 살해 숙주 세포 (또는 이의 집단) 및 제대혈 유래 자연 살해 숙주 세포 (또는 이의 집단)로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0069] 하나님의 실시형태에서, 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현하는 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단에서, 상기 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단은 T 숙주 세포 (또는 이의 집단), 태반 유래 자연 살해 숙주 세포 (또는 이의 집단) 및 제대혈 유래 자연 살해 숙주 세포 (또는 이의 집단)로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

- [0070] 하나의 실시형태에서, 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현하는 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단에서, 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 상기 중쇄 가변 (VH) 도메인과 상기 경쇄 가변 (VL) 도메인 사이에 웹타이드 링커를 추가로 포함하고, 여기서, 상기 웹타이드 링커는 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0071] 하나의 실시형태에서, 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현하는 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단에서, 상기 항원 결합 단백질은 서열 번호 12 또는 16의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0072] 하나의 실시형태에서, 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현하는 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단에서, 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 상기 항원 결합 단백질과 상기 막관통 도메인 사이에 힌지 영역을 추가로 포함하고, 여기서, 상기 힌지 영역은 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 CD8 힌지 영역이다.
- [0073] 하나의 실시형태에서, 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현하는 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단에서, 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 상기 항원 결합 단백질과 상기 막관통 도메인 사이에 CD28 세포외 도메인을 추가로 포함하고, 여기서, 상기 CD28 세포외 도메인은 서열 번호 7의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0074] 하나의 실시형태에서, 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현하는 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단에서, 상기 막관통 도메인은 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하는 CD28 막관통 도메인이다.
- [0075] 하나의 실시형태에서, 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현하는 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단에서, 상기 세포내 도메인은 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 CD28 세포내 도메인을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포내 도메인은 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 CD3-제타 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포내 도메인은 CD28, CD3-제타, OX-40 (CD134) 또는 4-1BB (CD137)로부터의 세포내 도메인(들) 또는 공동 자극 도메인 중 임의의 하나 또는 임의의 조합을 추가로 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포내 도메인은 CD28 세포내 도메인, CD3-제타, OX-40 및/또는 4-1BB 중 임의의 하나 또는 임의의 조합을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 핵산은 상기 세포내 도메인이 CD3-제타를 포함하는 제1 세대 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화한다. 하나의 실시형태에서, 상기 핵산은 상기 세포내 도메인이 CD3-제타 및 CD28 세포내 도메인 또는 4-1BB를 포함하는 제2 세대 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화한다. 하나의 실시형태에서, 상기 핵산은 상기 세포내 도메인이 CD3-제타 및 CD28 세포내 도메인 및 4-1BB 또는 OX-40을 포함하는 제3 세대 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화한다.
- [0076] 하나의 실시형태에서, 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현하는 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단에서, 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 서열 번호 20 또는 21의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0077] 하나의 실시형태에서, 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현하는 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단에서, 상기 발현 벡터는 본 개시 내용의 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물 중 임의의 것을 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된다. 하나의 실시형태에서, 상기 발현 벡터는 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단에서 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물의 발현을 지시하는 발현 벡터를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 발현 벡터는 레트로바이러스 또는 렌티바이러스로부터 유래된 핵산 백본 서열을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 발현 벡터는 하나 이상의 패키징 벡터를 포함하는 바이러스 형질 도입 시스템의 일부이며, 상기 발현 벡터 및 패키징 벡터(들)는 함께 상기 숙주 세포에서 전이유전자의 발현을 지시한다. 상기 발현 벡터 및 하나 이상의 패키징 벡터는 전이유전자의 숙주 세포로의 일시적인 도입 또는 전이유전자의 숙주 세포 게놈으로의 안정한 삽입을 지시할 수 있다. 상기 발현 벡터 및 하나 이상의 패키징 벡터는 상기 숙주 세포에서 전이유전자의 전사 및/또는 번역을 지시할 수 있다. 상기 하나 이상의 패키징 벡터와 함께 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산에 작동 가능하게 연결되는 발현 벡터는, 형질 도입된 숙주 세포의 표면 상에 디스플레이될 수 있는 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물의 생산을 지시할 수 있다.
- [0078] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열로 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단을 적합한 조건하에 형질 도입하는 단계를 포함하는, 형질 도입된 숙주 세포 또는 형질 도입된 세포 집단을 제조하는 방법을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 암호화된 작제물은 (i) CD38에 결합하는 항원 결합

단백질로서, 여기서, 상기 항원 결합 단백질이 서열 번호 1의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인을 포함하며, 상기 CD38에 결합하는 항원 결합 단백질이 서열 번호 3의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질; (ii) 막관통 도메인; 및 (iii) 세포내 도메인을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열은 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단에서 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물의 발현을 지시하는 발현 벡터에 작동 가능하게 연결된다. 하나의 실시형태에서, 상기 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단은 T 숙주 세포, 태반 유래 자연 살해 숙주 세포 (또는 이의 집단) 및 제대혈 유래 자연 살해 숙주 세포 (또는 이의 집단)로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0079] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열로 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단을 적합한 조건하에 형질 도입하는 단계를 포함하는, 형질 도입된 숙주 세포 또는 형질 도입된 세포 집단을 제조하는 방법을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 암호화된 작제물은 (i) CD38에 결합하는 항원 결합 단백질로서, 여기서, 상기 항원 결합 단백질이 서열 번호 2의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인을 포함하며, 상기 CD38에 결합하는 항원 결합 단백질이 서열 번호 4의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질; (ii) 막관통 도메인; 및 (iii) 세포내 도메인을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열은 상기 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단에서 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물의 발현을 지시하는 발현 벡터에 작동 가능하게 연결된다. 하나의 실시형태에서, 상기 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단은 T 숙주 세포, 태반 유래 자연 살해 숙주 세포 (또는 이의 집단) 및 제대혈 유래 자연 살해 숙주 세포 (또는 이의 집단)로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0080] 하나의 실시형태에서, 형질 도입된 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단을 제조하는 방법에서, 상기 암호화된 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 상기 중쇄 가변 (VH) 도메인과 상기 경쇄 가변 (VL) 도메인 사이에 웨브타이드 링커를 추가로 포함하고, 여기서, 상기 웨브타이드 링커는 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함한다.

[0081] 하나의 실시형태에서, 형질 도입된 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단을 제조하는 방법에서, 상기 암호화된 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 서열 번호 12 또는 16의 아미노산 서열을 포함하는 항원 결합 단백질을 포함한다.

[0082] 하나의 실시형태에서, 형질 도입된 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단을 제조하는 방법에서, 상기 암호화된 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 상기 항원 결합 단백질과 상기 막관통 도메인 사이에 헌지 영역을 추가로 포함하고, 여기서, 상기 헌지 영역은 서열 번호 6의 아미노산 서열 또는 이의 기능성 부분을 포함하는 CD8 헌지 영역이다.

[0083] 하나의 실시형태에서, 형질 도입된 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단을 제조하는 방법에서, 상기 암호화된 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 상기 항원 결합 단백질과 상기 막관통 도메인 사이에 CD28 세포외 도메인을 추가로 포함하고, 여기서, 상기 CD28 세포외 도메인은 서열 번호 7의 아미노산 서열 또는 이의 기능성 부분을 포함한다.

[0084] 하나의 실시형태에서, 형질 도입된 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단을 제조하는 방법에서, 상기 막관통 도메인은 서열 번호 8의 아미노산 서열 또는 이의 기능성 부분을 포함하는 CD28 막관통 도메인을 포함한다.

[0085] 하나의 실시형태에서, 형질 도입된 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단을 제조하는 방법에서, 상기 세포 도메인은 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 CD28 세포내 도메인을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포내 도메인은 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 CD3-제타 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포내 도메인은 CD28, CD3-제타, OX-40 (CD134) 또는 4-1BB (CD137)로부터의 세포내 도메인 (들) 또는 공동 자극 도메인 중 임의의 하나 또는 임의의 조합을 추가로 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포내 도메인은 CD28 세포내 도메인, CD3-제타, OX-40 및/또는 4-1BB 중 임의의 하나 또는 임의의 조합을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 핵산은 상기 세포내 도메인이 CD3-제타를 포함하는 제1 세대 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화한다. 하나의 실시형태에서, 상기 핵산은 상기 세포내 도메인이 CD3-제타 및 CD28 세포내 도메인 또는 4-1BB를 포함하는 제2 세대 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화한다. 하나의 실시형태에서, 상기 핵산은 상기 세포내 도메인이 CD3-제타 및 CD28 세포내 도메인 및 4-1BB 또는 OX-40을 포함하는 제3 세대 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화한다.

[0086] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열로 숙주 세포 또는 숙주 세포

집단을 적합한 조건하에 형질 도입하는 단계를 포함하는, 형질 도입된 숙주 세포 또는 형질 도입된 세포 집단을 제조하는 방법을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 암호화된 작제물은 서열 번호 21 또는 22의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일하다. 하나의 실시형태에서, 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열은 상기 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단에서 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물의 발현을 지시하는 발현 벡터에 작동 가능하게 연결된다. 하나의 실시형태에서, 상기 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단은 T 숙주 세포, 태반 유래 자연 살해 숙주 세포 (또는 이의 집단) 및 제대혈 유래 자연 살해 숙주 세포 (또는 이의 집단)로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0087] 하나의 실시형태에서, 형질 도입된 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단을 제조하는 방법에서, 상기 발현 벡터는 본 개시 내용의 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물 중 임의의 것을 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된다. 하나의 실시형태에서, 상기 발현 벡터는 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단에서 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물의 발현을 지시하는 발현 벡터를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 발현 벡터는 레트로바이러스 및 렌티바이러스 벡터를 포함하는 레트로바이러스과 (*Retroviridae*)의 바이러스과로부터 유래된 핵산 백본 서열을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 발현 벡터는 하나 이상의 패키징 벡터를 포함하는 바이러스 형질 도입 시스템의 일부이며, 상기 발현 벡터 및 패키징 벡터(들)는 함께 상기 숙주 세포에서 전이유전자의 발현을 지시한다. 상기 발현 벡터 및 하나 이상의 패키징 벡터는 전이유전자의 숙주 세포로의 일시적인 도입 또는 전이유전자의 숙주 세포 게놈으로의 안정한 삽입을 지시할 수 있다. 상기 발현 벡터 및 하나 이상의 패키징 벡터는 상기 숙주 세포에서 전이유전자의 전사 및/또는 번역을 지시할 수 있다. 상기 하나 이상의 패키징 벡터와 함께 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산에 작동 가능하게 연결되는 발현 벡터는, 형질 도입된 숙주 세포의 표면 상에 디스플레이될 수 있는 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물의 생산을 지시할 수 있다.

[0088] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열로 형질 도입된 숙주 세포 집단을 상기 핵산 서열을 보유하는 숙주 세포의 수를 확장시키기에 적합한 조건하에 장기간 안정하게 배양시키는 방법을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 배양된 숙주 세포는 생체내에서 감소된 T-세포 살해를 나타내고, 상기 숙주 세포는 보다 낮은 CD38 발현을 나타내는 세포와 비교하여 CD38의 높은 발현을 나타내는 세포에 우선적으로 결합하여 이를 사멸시킨다.

[0089] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열로 형질 도입된 숙주 세포 집단을 상기 핵산 서열을 보유하는 숙주 세포의 수를 확장시키기에 적합한 조건하에 배양시키는 단계를 포함하는, 숙주 세포 집단을 배양시키는 방법을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 암호화된 작제물은 (i) CD38에 결합하는 항원 결합 단백질로서, 여기서, 상기 항원 결합 단백질이 서열 번호 1의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인을 포함하며, 상기 CD38에 결합하는 항원 결합 단백질이 서열 번호 3의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질; (ii) 막관통 도메인; 및 (iii) 세포내 도메인을 포함한다.

[0090] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열로 형질 도입된 숙주 세포 집단을 상기 핵산 서열을 보유하는 숙주 세포의 수를 확장시키기에 적합한 조건하에 배양시키는 단계를 포함하는, 숙주 세포 집단을 배양시키는 방법을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 암호화된 작제물은 (i) CD38에 결합하는 항원 결합 단백질로서, 여기서, 상기 항원 결합 단백질이 서열 번호 2의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인을 포함하며, 상기 CD38에 결합하는 항원 결합 단백질이 서열 번호 4의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질; (ii) 막관통 도메인; 및 (iii) 세포내 도메인을 포함한다.

[0091] 하나의 실시형태에서, 숙주 세포 집단을 배양시키는 방법에서, 상기 암호화된 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 상기 중쇄 가변 (VH) 도메인과 상기 경쇄 가변 (VL) 도메인 사이에 웹타이드 링커를 추가로 포함하고, 여기서, 상기 웹타이드 링커는 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함한다.

[0092] 하나의 실시형태에서, 숙주 세포 집단을 배양시키는 방법에서, 상기 암호화된 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 서열 번호 12 또는 16의 아미노산 서열을 포함하는 항원 결합 단백질을 포함한다.

[0093] 하나의 실시형태에서, 숙주 세포 집단을 배양시키는 방법에서, 상기 암호화된 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 상기 항원 결합 단백질과 상기 막관통 도메인 사이에 힌지 영역을 추가로 포함하고, 여기서, 상기 힌지 영역은 서열 번호 6의 아미노산 서열 또는 이의 기능성 부분을 포함하는 CD8 힌지 영역이다.

- [0094] 하나의 실시형태에서, 숙주 세포 집단을 배양시키는 방법에서, 상기 암호화된 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 상기 항원 결합 단백질과 상기 막관통 도메인 사이에 CD28 세포외 도메인을 추가로 포함하고, 여기서, 상기 CD28 세포외 도메인은 서열 번호 7의 아미노산 서열 또는 이의 기능성 부분을 포함한다.
- [0095] 하나의 실시형태에서, 숙주 세포 집단을 배양시키는 방법에서, 상기 막관통 도메인은 서열 번호 8의 아미노산 서열 또는 이의 기능성 부분을 포함하는 CD28 막관통 도메인을 포함한다.
- [0096] 하나의 실시형태에서, 숙주 세포 집단을 배양시키는 방법에서, 상기 세포내 도메인은 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 CD28 세포내 도메인을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포내 도메인은 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 CD3-제타 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포내 도메인은 CD28, CD3-제타, OX-40 (CD134) 또는 4-1BB (CD137)로부터의 세포내 도메인(들) 또는 공동 자극 도메인 중 임의의 하나 또는 임의의 조합을 추가로 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포내 도메인은 CD28 세포내 도메인, CD3-제타, OX-40 및/또는 4-1BB 중 임의의 하나 또는 임의의 조합을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 핵산은 상기 세포내 도메인이 CD3-제타를 포함하는 제1 세대 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화한다. 하나의 실시형태에서, 상기 핵산은 상기 세포내 도메인이 CD3-제타 및 CD28 세포내 도메인 또는 4-1BB를 포함하는 제2 세대 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화한다. 하나의 실시형태에서, 상기 핵산은 상기 세포내 도메인이 CD3-제타 및 CD28 세포내 도메인 및 4-1BB 또는 OX-40을 포함하는 제3 세대 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화한다.
- [0097] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열로 형질 도입된 숙주 세포 집단을 상기 핵산 서열을 보유하는 숙주 세포의 수를 확장시키기에 적합한 조건하에 배양시키는 단계를 포함하는, 숙주 세포 집단을 배양시키는 방법을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 암호화된 작제물은 서열 번호 21 또는 22의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0098] 하나의 실시형태에서, 숙주 세포 집단을 배양시키는 방법에서, 상기 숙주 세포 집단은 숙주 T 세포, 태반 유래 자연 살해 숙주 세포 집단 및 제대혈 유래 자연 살해 숙주 세포 집단으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 하나의 실시형태에서, 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산은 발현 벡터에 작동 가능하게 연결된다. 하나의 실시형태에서, 상기 발현 벡터는 상기 숙주 세포 집단에서 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물의 발현을 지시한다.
- [0099] 본 개시 내용은 숙주 세포 집단을 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현하기에 적합한 조건에 처리하는 단계를 포함하는, 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현시키는 방법을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 숙주 세포 집단은 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터로 형질 도입되고, 상기 암호화된 작제물은 (i) CD38에 결합하는 항원 결합 단백질로서, 여기서, 상기 항원 결합 단백질이 서열 번호 1의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인을 포함하며, 상기 CD38에 결합하는 항원 결합 단백질이 서열 번호 3의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질; (ii) 막관통 도메인; 및 (iii) 세포내 도메인을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 발현 벡터는 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되어 있으며, 여기서, 상기 발현 벡터는 상기 숙주 세포 집단에서 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물의 발현을 지시한다. 하나의 실시형태에서, 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현하는 숙주 세포 집단은 보다 낮은 CD38 발현을 나타내는 세포와 비교하여 CD38의 높은 발현을 나타내는 세포 (예를 들어, 표적 세포)에 우선적으로 결합한다.
- [0100] 본 개시 내용은 숙주 세포 집단을 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현하기에 적합한 조건에 적용하는 단계를 포함하는, 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현시키는 방법을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 숙주 세포 집단은 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터로 형질 도입되고, 상기 암호화된 작제물은 (i) CD38에 결합하는 항원 결합 단백질로서, 여기서, 상기 항원 결합 단백질이 서열 번호 2의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인을 포함하며, 상기 CD38에 결합하는 항원 결합 단백질이 서열 번호 4의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질; (ii) 막관통 도메인; 및 (iii) 세포내 도메인을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 발현 벡터는 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되어 있으며, 여기서, 상기 발현 벡터는 상기 숙주 세포 집단에서 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물의 발현을 지시한다. 하나의 실시형태에서, 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현하는 숙주 세포 집단은 보다 낮은 CD38 발현을 나타내는 세포

와 비교하여 CD38의 높은 발현을 나타내는 세포 (예를 들어, 표적 세포)에 우선적으로 결합한다.

- [0101] 하나의 실시형태에서, 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현시키는 방법에서, 상기 암호화된 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 상기 중쇄 가변 (VH) 도메인과 상기 경쇄 가변 (VL) 도메인 사이에 웨브타이드 링커를 추가로 포함하고, 여기서, 상기 웨브타이드 링커는 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0102] 하나의 실시형태에서, 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현시키는 방법에서, 상기 암호화된 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 서열 번호 12 또는 16의 아미노산 서열을 포함하는 항원 결합 단백질을 포함한다.
- [0103] 하나의 실시형태에서, 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현시키는 방법에서, 상기 암호화된 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 상기 항원 결합 단백질과 상기 막관통 도메인 사이에 힌지 영역을 추가로 포함하고, 여기서, 상기 힌지 영역은 서열 번호 6의 아미노산 서열 또는 이의 기능성 부분을 포함하는 CD8 힌지 영역이다.
- [0104] 하나의 실시형태에서, 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현시키는 방법에서, 상기 암호화된 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 상기 항원 결합 단백질과 상기 막관통 도메인 사이에 CD28 세포외 도메인을 추가로 포함하고, 여기서, 상기 CD28 세포외 도메인은 서열 번호 7의 아미노산 서열 또는 이의 기능성 부분을 포함한다.
- [0105] 하나의 실시형태에서, 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현시키는 방법에서, 상기 막관통 도메인은 서열 번호 8의 아미노산 서열 또는 이의 기능성 부분을 포함하는 CD28 막관통 도메인을 포함한다.
- [0106] 하나의 실시형태에서, 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현시키는 방법에서, 상기 세포내 도메인은 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 CD28 세포내 도메인을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포내 도메인은 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 CD3-제타 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포내 도메인은 CD28, CD3-제타, OX-40 (CD134) 또는 4-1BB (CD137)로부터의 세포내 도메인(들) 또는 공동 자극 도메인 중 임의의 하나 또는 임의의 조합을 추가로 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포내 도메인은 CD28 세포내 도메인, CD3-제타, OX-40 및/또는 4-1BB 중 임의의 하나 또는 임의의 조합을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 핵산은 상기 세포내 도메인이 CD3-제타를 포함하는 제1 세대 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화한다. 하나의 실시형태에서, 상기 핵산은 상기 세포내 도메인이 CD3-제타 및 CD28 세포내 도메인 또는 4-1BB를 포함하는 제2 세대 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화한다. 하나의 실시형태에서, 상기 핵산은 상기 세포내 도메인이 CD3-제타 및 CD28 세포내 도메인 및 4-1BB 또는 OX-40을 포함하는 제3 세대 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화한다.
- [0107] 본 개시 내용은 숙주 세포 집단을 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현하기에 적합한 조건에 처리하는 단계를 포함하는, 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현시키는 방법을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 숙주 세포 집단은 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터로 형질 도입되고, 상기 암호화된 작제물은 서열 번호 21 또는 22의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일하다.
- [0108] 하나의 실시형태에서, 숙주 세포 집단에서 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현시키는 방법에서, 상기 숙주 세포 집단은 숙주 T 세포, 태반 유래 자연 살해 숙주 세포 집단 및 제대혈 유래 자연 살해 숙주 세포 집단으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 하나의 실시형태에서, 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산은 발현 벡터에 작동 가능하게 연결된다. 하나의 실시형태에서, 상기 발현 벡터는 상기 숙주 세포 집단에서 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물의 발현을 지시하는 발현 벡터를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 발현 벡터는 레트로바이러스 및 렌티바이러스 벡터를 포함하는 레트로바이러스과 (*Retroviridae*)의 바이러스과로부터 유래된 핵산 백본 서열을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 발현 벡터는 하나 이상의 패키징 벡터를 포함하는 바이러스 형질 도입 시스템의 일부이며, 상기 발현 벡터 및 패키징 벡터(들)는 함께 상기 숙주 세포에서 전이유전자의 발현을 지시한다. 상기 발현 벡터 및 하나 이상의 패키징 벡터는 전이유전자의 숙주 세포로의 일시적인 도입 또는 전이유전자의 숙주 세포 계놈으로의 안정한 삽입을 지시할 수 있다. 상기 발
- [0109] 하나의 실시형태에서, 숙주 세포 집단에서 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현시키는 방법에서, 상기 발현 벡터는 본 개시 내용의 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물 중 임의의 것을 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된다. 하나의 실시형태에서, 상기 발현 벡터는 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단에서 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물의 발현을 지시하는 발현 벡터를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 발현 벡터는 레트로바이러스 및 렌티바이러스 벡터를 포함하는 레트로바이러스과 (*Retroviridae*)의 바이러스과로부터 유래된 핵산 백본 서열을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 발현 벡터는 하나 이상의 패키징 벡터를 포함하는 바이러스 형질 도입 시스템의 일부이며, 상기 발현 벡터 및 패키징 벡터(들)는 함께 상기 숙주 세포에서 전이유전자의 발현을 지시한다. 상기 발현 벡터 및 하나 이상의 패키징 벡터는 전이유전자의 숙주 세포로의 일시적인 도입 또는 전이유전자의 숙주 세포 계놈으로의 안정한 삽입을 지시할 수 있다. 상기 발

현 벡터 및 하나 이상의 패키징 벡터는 상기 숙주 세포에서 전이유전자의 전사 및/또는 번역을 지시할 수 있다. 상기 하나 이상의 패키징 벡터와 함께 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산에 작동 가능하게 연결되는 발현 벡터는, 형질 도입된 숙주 세포의 표면 상에 디스플레이될 수 있는 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물의 생산을 지시할 수 있다.

[0110] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현하는 숙주 세포 집단을 사이토카인 방출을 유도하기에 적합한 조건하에 CD38을 발현하는 표적 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는, 사이토카인 방출을 유도시키는 방법을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 (i) CD38에 결합하는 항원 결합 단백질로서, 여기서, 상기 항원 결합 단백질이 서열 번호 1의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인을 포함하며, 상기 CD38에 결합하는 항원 결합 단백질이 서열 번호 3의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질; (ii) 막관통 도메인; 및 (iii) 세포내 도메인을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 사이토카인은 인터페론-γ 또는 IL-2를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현하는 숙주 세포는 보다 낮은 CD38 발현을 나타내는 세포와 비교하여 CD38의 높은 발현을 나타내는 세포 (예를 들어, 표적 세포)에 우선적으로 결합한다.

[0111] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현하는 숙주 세포 집단을 사이토카인 방출을 유도하기에 적합한 조건하에 CD38을 발현하는 표적 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는, 사이토카인 방출을 유도시키는 방법을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 (i) CD38에 결합하는 항원 결합 단백질로서, 여기서, 상기 항원 결합 단백질이 서열 번호 2의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인을 포함하며, 상기 CD38에 결합하는 항원 결합 단백질이 서열 번호 4의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질; (ii) 막관통 도메인; 및 (iii) 세포내 도메인을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 사이토카인은 인터페론-γ 또는 IL-2를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현하는 숙주 세포는 보다 낮은 CD38 발현을 나타내는 세포와 비교하여 CD38의 높은 발현을 나타내는 세포 (예를 들어, 표적 세포)에 우선적으로 결합한다.

[0112] 하나의 실시형태에서, 사이토카인 방출을 유도시키는 방법에서, 상기 암호화된 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 상기 중쇄 가변 (VH) 도메인과 상기 경쇄 가변 (VL) 도메인 사이에 웹타이드 링커를 추가로 포함하고, 여기서, 상기 웹타이드 링커는 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함한다.

[0113] 하나의 실시형태에서, 사이토카인 방출을 유도시키는 방법에서, 상기 암호화된 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 서열 번호 12 또는 16의 아미노산 서열을 포함하는 항원 결합 단백질을 포함한다.

[0114] 하나의 실시형태에서, 사이토카인 방출을 유도시키는 방법에서, 상기 암호화된 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 상기 항원 결합 단백질과 상기 막관통 도메인 사이에 힌지 영역을 추가로 포함하고, 여기서, 상기 힌지 영역은 서열 번호 6의 아미노산 서열 또는 이의 기능성 부분을 포함하는 CD8 힌지 영역이다.

[0115] 하나의 실시형태에서, 사이토카인 방출을 유도시키는 방법에서, 상기 암호화된 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 상기 항원 결합 단백질과 상기 막관통 도메인 사이에 CD28 세포외 도메인을 추가로 포함하고, 여기서, 상기 CD28 세포외 도메인은 서열 번호 7의 아미노산 서열 또는 이의 기능성 부분을 포함한다.

[0116] 하나의 실시형태에서, 사이토카인 방출을 유도시키는 방법에서, 상기 막관통 도메인은 서열 번호 8의 아미노산 서열 또는 이의 기능성 부분을 포함하는 CD28 막관통 도메인을 포함한다.

[0117] 하나의 실시형태에서, 사이토카인 방출을 유도시키는 방법에서, 상기 세포내 도메인은 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 CD28 세포내 도메인을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포내 도메인은 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 CD3-제타 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포내 도메인은 CD28, CD3-제타, OX-40 (CD134) 또는 4-1BB (CD137)로부터의 세포내 도메인(들) 또는 공동 자극 도메인 중 임의의 하나 또는 임의의 조합을 추가로 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포내 도메인은 CD28 세포내 도메인, CD3-제타, OX-40 및/또는 4-1BB 중 임의의 하나 또는 임의의 조합을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 핵산은 상기 세포내 도메인이 CD3-제타를 포함하는 제1 세대 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화한다. 하나의 실시형태에서, 상기 핵산은 상기 세포내 도메인이 CD3-제타 및 CD28 세포내 도메인 또는 4-1BB를 포함하는 제2 세대 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화한다. 하나의 실시형태에서, 상기 핵산은 상기 세포내 도메인이 CD3-제타 및 CD28 세포내 도메인 및 4-1BB 또는 OX-40을 포함하는 제3

세대 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화한다.

- [0118] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현하는 T 숙주 세포 집단을 사이토카인 방출을 유도하기에 적합한 조건하에 CD38을 발현하는 표적 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는, 사이토카인 방출을 유도시키는 방법을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 서열 번호 21 또는 22의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일하다. 하나의 실시형태에서, 상기 사이토카인은 인터페론-γ 또는 IL-2를 포함한다.
- [0119] 하나의 실시형태에서, 사이토카인 방출을 유도시키는 방법에서, 상기 숙주 세포 집단은 숙주 T 세포, 태반 유래 자연 살해 숙주 세포 집단 및 제대혈 유래 자연 살해 숙주 세포 집단으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0120] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현하는 T 숙주 세포 집단을 표적 세포 사멸을 유도하기에 적합한 조건하에 CD38을 발현하는 표적 세포와 접촉시키는 단계
- [0121] 를 포함하는, T 세포 세포독성을 유도시키는 방법을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 암호화된 작제물은 (i) CD38에 결합하는 항원 결합 단백질로서, 여기서, 상기 항원 결합 단백질이 서열 번호 1의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인을 포함하며, 상기 CD38에 결합하는 항원 결합 단백질이 서열 번호 3의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질; (ii) 막관통 도메인; 및 (iii) 세포내 도메인을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현하는 숙주 세포 집단은 보다 낮은 CD38 발현을 나타내는 세포와 비교하여 CD38의 높은 발현을 나타내는 세포 (예를 들어, 표적 세포)에 우선적으로 결합한다.
- [0122] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현하는 T 숙주 세포 집단을 표적 세포 사멸을 유도하기에 적합한 조건하에 CD38을 발현하는 표적 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는, T 세포 세포독성을 유도시키는 방법을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 암호화된 작제물은 (i) CD38에 결합하는 항원 결합 단백질로서, 여기서, 상기 항원 결합 단백질이 서열 번호 2의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인을 포함하며, 상기 CD38에 결합하는 항원 결합 단백질이 서열 번호 4의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질; (ii) 막관통 도메인; 및 (iii) 세포내 도메인을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현하는 숙주 세포 집단은 보다 낮은 CD38 발현을 나타내는 세포와 비교하여 CD38의 높은 발현을 나타내는 세포 (예를 들어, 표적 세포)에 우선적으로 결합한다.
- [0123] 하나의 실시형태에서, T 세포 세포독성을 유도시키는 방법에서, 상기 암호화된 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 상기 중쇄 가변 (VH) 도메인과 상기 경쇄 가변 (VL) 도메인 사이에 웨بت아이드 링커를 추가로 포함하고, 여기서, 상기 웨بت아이드 링커는 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0124] 하나의 실시형태에서, T 세포 세포독성을 유도시키는 방법에서, 상기 암호화된 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 서열 번호 12 또는 16의 아미노산 서열을 포함하는 항원 결합 단백질을 포함한다.
- [0125] 하나의 실시형태에서, T 세포 세포독성을 유도시키는 방법에서, 상기 암호화된 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 상기 항원 결합 단백질과 상기 막관통 도메인 사이에 힌지 영역을 추가로 포함하고, 여기서, 상기 힌지 영역은 서열 번호 6의 아미노산 서열 또는 이의 기능성 부분을 포함하는 CD8 힌지 영역이다.
- [0126] 하나의 실시형태에서, T 세포 세포독성을 유도시키는 방법에서, 상기 암호화된 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 상기 항원 결합 단백질과 상기 막관통 도메인 사이에 CD28 세포외 도메인을 추가로 포함하고, 여기서, 상기 CD28 세포외 도메인은 서열 번호 7의 아미노산 서열 또는 이의 기능성 부분을 포함한다.
- [0127] 하나의 실시형태에서, T 세포 세포독성을 유도시키는 방법에서, 상기 막관통 도메인은 서열 번호 8의 아미노산 서열 또는 이의 기능성 부분을 포함하는 CD28 막관통 도메인을 포함한다.
- [0128] 하나의 실시형태에서, T 세포 세포독성을 유도시키는 방법에서, 상기 세포내 도메인은 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 CD28 세포내 도메인을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포내 도메인은 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 CD3-제타 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포내 도메인은 CD28, CD3-제타, OX-40 (CD134) 또는 4-1BB (CD137)로부터의 세포내 도메인(들) 또는 공동 자극 도메인 중 임의의 하나 또는 임의의 조합을 추가로 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포내 도메인은 CD28 세포내 도메인, CD3-제타, OX-40 및/또는 4-1BB 중 임의의 하나 또는 임의의 조합을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 핵산은 상기 세포내 도메인이 CD3-제타를 포함하는 제1 세대 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제

물을 암호화한다. 하나의 실시형태에서, 상기 핵산은 상기 세포내 도메인이 CD3-제타 및 CD28 세포내 도메인 또는 4-1BB를 포함하는 제2 세대 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화한다. 하나의 실시형태에서, 상기 핵산은 상기 세포내 도메인이 CD3-제타 및 CD28 세포내 도메인 및 4-1BB 또는 OX-40을 포함하는 제3 세대 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화한다.

[0129] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현하는 T 숙주 세포 집단을 표적 세포 사멸을 유도하기에 적합한 조건하에 CD38을 발현하는 표적 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는, T 세포 세포독성을 유도시키는 방법을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 T 숙주 세포는 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 핵산 서열로 형질 도입되고, 상기 암호화된 작제물은 서열 번호 21 또는 22의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일하다.

[0130] 하나의 실시형태에서, T 세포 세포독성을 유도시키는 방법에서, 상기 표적 세포는 CD38을 발현하는 암 표적 세포를 포함한다.

[0131] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현하는 T 숙주 세포 집단을 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하거나 종양 성장을 억제하는 방법을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 작제물은 (i) CD38에 결합하는 항원 결합 단백질로서, 여기서, 상기 항원 결합 단백질이 서열 번호 1의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인을 포함하며, 상기 CD38에 결합하는 항원 결합 단백질이 서열 번호 3의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질; (ii) 막관통 도메인; 및 (iii) 세포내 도메인을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 대상체에서의 암 또는 종양 성장은 상향 조절된 CD38 발현을 나타낸다. 하나의 실시형태에서, 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현하는 T 숙주 세포 집단은 보다 낮은 CD38 발현을 나타내는 세포와 비교하여 CD38의 높은 발현을 나타내는 세포 (예를 들어, 표적 종양 세포)에 우선적으로 결합한다.

[0132] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현하는 T 숙주 세포 집단을 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하거나 종양 성장을 억제하는 방법을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 작제물은 (i) CD38에 결합하는 항원 결합 단백질로서, 여기서, 상기 항원 결합 단백질이 서열 번호 2의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인을 포함하며, 상기 CD38에 결합하는 항원 결합 단백질이 서열 번호 4의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인을 포함하는, 항원 결합 단백질; (ii) 막관통 도메인; 및 (iii) 세포내 도메인을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 대상체에서의 암 또는 종양 성장은 상향 조절된 CD38 발현을 나타낸다. 하나의 실시형태에서, 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현하는 숙주 세포 집단은 보다 낮은 CD38 발현을 나타내는 세포와 비교하여 CD38의 높은 발현을 나타내는 세포 (예를 들어, 표적 종양 세포)에 우선적으로 결합한다.

[0133] 하나의 실시형태에서, 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하거나 종양 성장을 억제하는 방법에서, 상기 암호화된 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 상기 중쇄 가변 (VH) 도메인과 상기 경쇄 가변 (VL) 도메인 사이에 웨타이드 링커를 추가로 포함하고, 여기서, 상기 웨타이드 링커는 서열 번호 5의 아미노산 서열을 포함한다.

[0134] 하나의 실시형태에서, 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하거나 종양 성장을 억제하는 방법에서, 상기 암호화된 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 서열 번호 12 또는 16의 아미노산 서열을 포함하는 항원 결합 단백질을 포함한다.

[0135] 하나의 실시형태에서, 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하거나 종양 성장을 억제하는 방법에서, 상기 암호화된 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 상기 항원 결합 단백질과 상기 막관통 도메인 사이에 힌지 영역을 추가로 포함하고, 여기서, 상기 힌지 영역은 서열 번호 6의 아미노산 서열 또는 이의 기능성 부분을 포함하는 CD8 힌지 영역이다.

[0136] 하나의 실시형태에서, 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하거나 종양 성장을 억제하는 방법에서, 상기 암호화된 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 상기 항원 결합 단백질과 상기 막관통 도메인 사이에 CD28 세포외 도메인을 추가로 포함하고, 여기서, 상기 CD28 세포외 도메인은 서열 번호 7의 아미노산 서열 또는 이의 기능성 부분을 포함한다.

[0137] 하나의 실시형태에서, 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하거나 종양 성장을 억제하는 방법에서, 상기

막관통 도메인은 서열 번호 8의 아미노산 서열 또는 이의 기능성 부분을 포함하는 CD28 막관통 도메인을 포함한다.

[0138] 하나의 실시형태에서, 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하거나 종양 성장을 억제하는 방법에서, 상기 세포내 도메인은 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 CD28 세포내 도메인을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포내 도메인은 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 CD3-제타 세포내 도메인을 추가로 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포내 도메인은 CD28, CD3-제타, OX-40 (CD134) 또는 4-1BB (CD137)로부터의 세포내 도메인(들) 또는 공동 자극 도메인 중 임의의 하나 또는 임의의 조합을 추가로 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 세포내 도메인은 CD28 세포내 도메인, CD3-제타, OX-40 및/또는 4-1BB 중 임의의 하나 또는 임의의 조합을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 상기 핵산은 상기 세포내 도메인이 CD3-제타를 포함하는 제1 세대 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화한다. 하나의 실시형태에서, 상기 핵산은 상기 세포내 도메인이 CD3-제타 및 CD28 세포내 도메인 또는 4-1BB를 포함하는 제2 세대 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화한다. 하나의 실시형태에서, 상기 핵산은 상기 세포내 도메인이 CD3-제타 및 CD28 세포내 도메인 및 4-1BB 또는 OX-40을 포함하는 제3 세대 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화한다.

[0139] 본 개시 내용은 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 발현하는 T 숙주 세포 집단을 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하거나 종양 성장을 억제하는 방법을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 작제물은 서열 번호 21 또는 22의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일하다.

[0140] 하나의 실시형태에서, 대상체에서 암을 치료하거나 종양 성장을 억제하는 방법에서, 상기 치료를 필요로 하는 대상체는 CD38의 과발현 또는 유해한 발현과 관련된 장애를 갖는다.

[0141] 본 개시 내용은 치료를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하거나 종양 성장을 억제하는 방법을 추가로 제공하며, 여기서, 상기 암은 비호지킨 림프종 (NHL), 버킷 림프종 (BL), B 만성 림프구성 백혈병 (B-CLL), B 및 T 급성 림프구성 백혈병 (ALL), T 세포 림프종 (TCL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 모발상 세포 백혈병 (HCL), 호지킨 림프종 (HL) 및 만성 골수성 백혈병 (CML)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 혈액암을 포함한다.

## 도면의 간단한 설명

[0142] 도 1은 개시된 "항-CD38 A2 CAR" 및 레트로바이러스 벡터의 구조이다.

도 1a는 항-CD38 A2 CAR의 개략도이다.

도 1b 항-CD38 A2 CAR을 발현하는 레트로바이러스 벡터의 개략도이다. 항-CD38 A2 CAR은, CD8  $\alpha$ 의 헌지 부분으로부터 유래된 개재 스페이셔를 사용하여, 항-CD38 항체 클론 A2의 scFv를 CD28 막관통 도메인 (transmembrane domain: D) 및 세포내 신호 전달 도메인 및 CD3  $\zeta$  세포내 신호 전달 도메인에 연결함으로써 생성되었다. 사람 항체 중쇄로부터의 신호 웹타이드 및 CAR의 발현을 식별하기 위한 myc 태그를 N-말단에 부가하였다.

도 2a는 유세포 계측법에 의해 형질 도입 후 분석된 비-형질 도입된 대조군 T 세포 및 항-CD38 A2 CAR 형질 도입된 T 세포의 데이터를 도시한 것이다. 상기 데이터는 형질 도입된 T 세포가 항-CD38 A2 작제물을 발현한다는 것을 입증한다.

도 2b는 CAR-T 세포에서 CAR2-항CD38A2 CAR의 동종 이량체 형성을 보여주는 웨스턴 블롯이다. 비환원 및 환원 조건하에 비-형질 도입된 대조군 및 CAR2-항CD38A2 CAR 형질 도입된 활성화 T 세포의 막 분획은 CD3  $\zeta$  항체를 사용하여 웨스턴 블롯에 의해 검출되었다. CAR 및 TCR  $\zeta$ 의 단량체 및 이량체의 위치는 우측에 표시되어 있다. 분자 질량 마커 (kDa)는 좌측에 표시되어 있다. CAR2-항CD38A2 CAR은 환원 조건하에 약 70 kDa의 분자량을 갖는 단량체 및 비환원 조건하에 140 kDa의 분자량을 갖는 동종 이량체로서 검출되었다. 이를 결과는 CAR2-항CD38A2 CAR이 CAR-T 세포 표면 상에서 동종 이량체를 형성한다는 것을 보여준다.

도 3은 결합 데이터를 도시한 것이다. 비-형질 도입된 대조군 및 항CD38 A2 CAR 형질 도입된 T 세포를 2  $\mu$  g/ml CD38-Fc 융합 단백질과 함께 배양하고, CD38-Fc 결합을 검출하기 위해 PE-컨쥬게이트된 염소 항-사람 IgG를 사용하고 T 세포 상에서 CAR 발현을 검출하기 위해 FITC-컨쥬게이트된 염소 항-Myc 항체를 사용하여 유세포 계측법으로 검출하였다. 이들 데이터는 항-CD38 A2 CAR T 세포가 자신의 표적화된 항원 CD38에 결합할 수 있다는 것을 확인한다.

도 4는 다양한 세포 유형 상에서의 상대적 CD38 발현을 도시한 것이다. 비-형질 도입된 대조군 및 항-CD38 A2 CAR 형질 도입된 T 세포를, 마우스 항-사람 CD38 mAb에 의한 염색 후 APC-컨쥬게이트된 염소 항-마우스 IgG 항체에 의한 염색에 의해 유세포 계측법으로 분석하였다. 항-CD38 CAR-T 세포 상에서의 CD38 발현을 평가하여 항-CD38 A2 CAR-T 살해 활성을 조사하였다 (도 5에 도시됨).

도 5는 항-CD38 A2 CAR 형질 도입된 T 세포에 의한 살해의 감소를 나타내는 배양된 항-CD38 A2 CAR 형질 도입된 T 세포의 안정성 및 생존력 데이터를 도시한 것이다. 비-형질 도입된 대조군 및 항-CD38 A2 CAR 형질 도입된 T 세포를, (도 5a) PE-컨쥬게이트된 항-myc 항체로 염색에 의한 CAR-T 세포의 안정성 및 (도 5b) 전방 산란 (forward scatter: FSC) 및 측방 산란 (side scatter: SSC)에 의한 생존 세포의 케이팅에 의한 T 세포의 생존력에 대해 유세포 계측법으로 형질 도입 후 15일째에 분석하였다.

도 5a는 15일 배양 후 비-형질 도입된 대조군 및 항-CD38 A2 CAR 형질 도입된 T 세포의 안정성을 도시한 것이며, 여기서, 상기 형질 도입된 T 세포 중 CAR-양성 세포의 백분율은 4일째 74% (도 5a)에서 15일째에 65%로 약간만 감소하였다.

도 5b는 상기 형질 도입된 T 세포의 생존력 (85%)이 대조군 T 세포 (91%)에 필적하였다는 것을 도시한 것이다. 유사한 결과가 다른 공여자로부터 수득되었다.

도 6은 항-CD38 CAR A2 형질 도입된 T 세포로부터의 사이토카인 생산을 도시한 것이다. 비-형질 도입된 대조군 T 세포 및 항-CD38 CAR A2 형질 도입된 T 세포를 대조군 CD38-음성 K562 세포 (대조군 T) 또는 CD38-발현 RPMI 8226 종양 세포 (CAR-T)와 함께 24 시간 동안 인큐베이션시켰다. 히스토그램에 묘사된 막대는 종양 세포 없음, K562 또는 RPMI 8226 세포 (좌측에서 우측으로)를 나타낸다. 상청액을 수확하고, ELISA에 의해 IFN $\gamma$  (도 6, 좌측) 및 IL2 (도 6, 우측) 생산에 대해 분석하였다. CD38-음성 대조군 종양 세포 K562가 아닌 이의 표적화된 CD38-양성 MM 종양 세포 RMPI8622과 관여시, 항-CD38 A2 CAR-T 세포는 다양한 사이토카인 IFN $\gamma$  및 IL2를 생산하였는데, 이는 상기 항-CD38 A2 CAR-T 세포가 표적화된 종양 세포 관여시 특이적으로 활성화될 수 있다는 것을 나타낸다.

도 7은 항-CD38 CAR A2 형질 도입된 T 세포로부터의 세포 독성 데이터를 도시한 것이다. 비-형질 도입된 대조군 및 항-CD38 A2 CAR 형질 도입된 T 세포 (E)를 형광 증강 리간드-라벨링된 CD38-음성 K562 (도 7, 좌측) 또는 CD38-발현 RPMI8226 (도 7, 우측) 종양 세포 (T)와 함께 2 시간 동안 표시된 비로 인큐베이션시키고, DELFIA 세포독성 검정으로 처리 및 분석하였다. 이를 데이터는 상기 개시된 항-CD38 A2 CAR-T 세포의 CD38-특이적 세포 독성을 보여준다.

도 8은 이종 이식 동물 모델에서 평가된 항-CD38 A2 CAR-T 세포의 살종양 활성을 도시한 것이다.  $1 \times 10^7$  개의 Luc-GFP 라벨링된 CD38-발현 RPMI8226 MM 종양 세포를 면역약화 NSG 마우스에 정맥내 접종하였다. 3주 후, IVIS 측정 가능한 전신 종양이 모든 접종된 마우스에서 형성되었다. 마우스를 다양한 용량의 항-CD38 A2 CAR-T 세포로 정맥내 처리하고, 비처리된 마우스를 대조군으로 제공하였다. 종양 부하를 생물 발광 이미징 (IVIS)에 의해 매주 평가하였다. 결론적으로, 이를 데이터는 상기 항-CD38 A2 CAR-T 세포가 MHC-비제한된 방식으로 CD38의 높은 발현 세포를 인식하여 T-세포 활성화, 시험관내 표적 세포 용해 및 생체내 MM 종양의 근절을 초래할 수 있는 항체-타입 특이성을 나타낸다는 것을 입증한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0143] 개시된 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물은 CD38의 높은 발현을 갖는 종양 세포에 우선적으로 결합하지만, 보다 낮은 CD38 발현 수준을 나타내는 정상 세포에는 그러하지 않는다. 자가 용해 문제를 다루는 것은 이러한 차등 결합이다. 이론에 의해 구속되는 것은 아니지만, 개시된 CAR은 우수한 부작용 프로파일을 나타내며, 개시된 CAR 작제물이 형질 도입될 때 보다 낮은 CD38 발현 및 중간 CD38 발현을 갖는 세포에서 자가 용해를 회피하면서 보다 높은 CD38 발현을 갖는 이러한 세포를 용해시키는 것으로 보이기 때문에 배양에서 성장할 수 있다. 달리 명시된다면, CAR 작제물의 항체 성분의 결합 특징은 CD38에 대한 보다 낮고 보다 유리한 결합 특징을 달성한다.

### 정의

[0144] "단리된"이라는 용어는 다른 세포 물질이 실질적으로 없는 단백질 (예를 들어, 항체) 또는 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 단백질은 당해 분야에 널리 공지된 단백질 정제 기술을 사용하여 단리에 의해 천연적으로 관련된 성분 (또는 항체를 생산하는데 사용된 세포 발현 시스템과 관련된 성분)이 실질적으로 없을 수 있다. 하나의

실시형태에서, 본 개시 내용의 항-CD38 키메라 항원 수용체, 항체 또는 항원 결합 단편은 단리된다.

[0146] "핵산", "폴리뉴클레오타이드" 및 "올리고뉴클레오타이드"라는 용어는 상호 교환적으로 사용되며 뉴클레오타이드의 중합체를 지칭한다. 핵산은 자연 발생 및 재조합 형태를 포함한다. 핵산은 DNA 분자 (예를 들어, cDNA 또는 게놈 DNA), RNA 분자 (예를 들어, mRNA), 뉴클레오타이드 유사체를 사용하여 생성된 DNA 또는 RNA의 유사체 (예를 들어, 웨타이드 핵산 및 비자연 발생 뉴클레오타이드 유사체), 및 이들의 하이브리드를 포함한다. 핵산 분자는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 하나의 실시형태에서, 본 개시 내용의 핵산 분자는 항체, 또는 이의 단편 또는 scFv, 유도체, 뮤테인 또는 변이체를 암호화하는 연속적인 오픈 리딩 프레임을 포함한다.

[0147] "펩타이드", "폴리펩타이드" 및 "단백질"이라는 용어는 상호 교환적으로 사용되며, 아미노산의 중합체를 지칭하며, 임의의 특정 길이로 한정되지 않는다. 폴리펩타이드는 천연 및 비천연 아미노산을 포함한다. 폴리펩타이드는 자연 발생 또는 재조합 형태일 수 있다. 이를 용어는 본래 및 인공 단백질, 단백질 단편 및 단백질 서열의 폴리펩타이드 유사체 (예를 들어, 뮤테인, 변이체, 키메라 단백질 및 융합 단백질) 뿐만 아니라 번역후 변형된 단백질 또는 그렇지 않으면 공유적으로 또는 비공유적으로 변형된 단백질을 포함한다. 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질은 단량체 또는 중합체일 수 있다. 폴리펩타이드는 항체, 항체 쇄, scFv 및 키메라 항원 수용체 작제물을 포함한다.

[0148] "퍼센트 동일성" 또는 "퍼센트 상동성"은 2개의 폴리펩타이드 서열들 사이 또는 2개의 폴리뉴클레오타이드 서열들 사이의 유사성의 정량적 측정을 지칭한다. 2개의 폴리펩타이드 서열들 사이의 퍼센트 동일성은, 캡의 수를 고려하여 2개의 폴리펩타이드 서열들 사이에 공유되는 정렬된 위치에서 동일한 아미노산의 수, 및 2개의 폴리펩타이드 서열들의 정렬을 최적화하기 위해 도입될 필요가 있을 수 있는 각 캡의 길이의 함수이다. 유사한 방식으로, 2개의 폴리뉴클레오타이드 서열들 사이의 퍼센트 동일성은, 캡의 수를 고려하여 2개의 폴리뉴클레오타이드 서열들 사이에 공유되는 정렬된 위치에서 동일한 뉴클레오타이드의 수, 및 2개의 폴리뉴클레오타이드 서열들의 정렬을 최적화하기 위해 도입될 필요가 있을 수 있는 각 캡의 길이의 함수이다. 2개의 폴리펩타이드 서열들 사이 또는 2개의 폴리뉴클레오타이드 서열들 사이의 서열의 비교와 퍼센트 동일성의 측정은 수학적 알고리즘을 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 2개의 폴리펩타이드 또는 2개의 폴리뉴클레오타이드 서열의 "퍼센트 동일성" 또는 "퍼센트 상동성"은 디풀트 파라미터를 이용하는 GAP 컴퓨터 프로그램 (GCG Wisconsin Package의 일부, 버전 10.3 (Accelrys, San Diego, Calif.))을 사용하여 서열을 비교함으로써 결정될 수 있다.

[0149] "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR"이라는 용어는, 면역 세포를 활성화 또는 자극할 수 있는 세포내 신호 전달 도메인에 융합되는, 세포외 항원 결합 단백질, 바람직하게는 단클론 항체의 가변 중쇄 및 경쇄 영역의 융합으로부터 유래된 단일 쇄 가변 단편 (scFv 또는 sFv)을 포함하는 융합 단백질을 기술한다. 대안으로, Fab (예를 들어, Fab 라이브러리로부터 수득된 항체 대신)로부터 유래되는 scFv가 사용될 수 있다.

[0150] "항체"라는 용어는 2개의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L)인 4개의 폴리펩타이드 쇄로 구성된 면역글로불린 (Ig) 분자, 또는 Ig 분자의 필수 에피토프 결합 특징을 보유하는 이의 임의의 기능성 단편, 돌연변이체, 변이체 또는 유도체를 기술한다.

[0151] "항-CD38 항체" 및 "CD38에 결합하는 항체"라는 용어는 CD38에 결합할 수 있는 항체를 지칭한다.

[0152] Fab 단편은  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C^L$  및  $C_{H1}$  도메인을 갖는 1가 단편이고;  $F(ab')_2$  단편은 헌지 영역에서 이황화 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 갖는 2가 단편이고; Fd 단편은  $V_H$  및  $C_{H1}$  도메인을 가지고; Fv 단편은 항체의 단일 아암 (arm)의  $V_L$  및  $V_H$  도메인을 가지고; dAb 단편은  $V_H$  도메인,  $V_L$  도메인, 또는  $V_H$  또는  $V_L$  도메인의 항원 결합 단편을 갖는다 (미국 특허 6,846,634 및 6,696,245).

[0153] "벡터"는 외래 유전자 물질 (예를 들어, 핵산 전이유전자)에 작동 가능하게 연결될 수 있는 핵산 분자 (예를 들어, DNA 또는 RNA)를 지칭한다. 벡터는 단일 가닥 또는 이중 가닥의 핵산 분자일 수 있다. 벡터는 선형 또는 환형 핵산 분자일 수 있다. 벡터는 외래 유전자 물질을 세포 (예를 들어, 숙주 세포) 내로 도입하기 위한 비히클로서 사용될 수 있다. 벡터의 한 유형은, 전이유전자에 연결될 수 있으며 숙주 세포에서 복제되어 전이유전자를 전사 및 번역할 수 있는 선형 또는 원형 이중 가닥 염색체와 DNA 분자를 지칭하는 "플라스미드"이다. 바이러스 벡터는 전형적으로 전이유전자에 연결될 수 있는 바이러스 RNA 또는 DNA 백본 서열을 함유한다. 바이러스 백본 서열은 감염을 불가능하게 하지만 바이러스 백본 및 공-연결된 전이유전자의 숙주 세포 게놈 내로의 삽입을 유지하도록 변형될 수 있다. 바이러스 벡터의 예는 레트로바이러스, 렌티바이러스 및 아데노바이러스 벡터를 포함한다. 특정 벡터는 이들이 도입되는 숙주 세포 내에서 자체적으로 복제할 수 있다(예를 들어, 박테리

아 복제 원점을 포함하는 박테리아 벡터 및 에피솜 포유동물 벡터). 다른 벡터들 (예를 들어, 비-에피솜 포유동물 벡터)은 숙주 세포 내로 도입시 숙주 세포의 계놈 내로 통합되어 상기 숙주 계놈과 함께 복제된다. "발현 벡터"는, 숙주 세포 내로 형질 도입되는 발현 벡터에 연결된 전이유전자의 전사, 또는 전사 및 번역을 지시하는 유도성 및/또는 항시성 프로모터, 또는 리보솜 결합 부위와 같은 하나 이상의 조절 서열을 함유할 수 있는 벡터의 유형이다.

[0154] 전이유전자는 벡터에 함유된 벡터 서열의 기능 또는 발현을 허용하기 위해 전이유전자와 벡터 사이의 연결이 있을 때 벡터에 "작동 가능하게 연결된다". 벡터 서열은 복제 원점 서열, 유도성 또는 항시성 프로모터 또는 인핸서 서열, 적어도 하나의 선택 마커 서열, 5' 및 3'LTR 서열, 및 임의로 바이러스 env, pol 및/또는 gag 서열 중 임의의 하나 또는 임의의 조합일 수 있다.

[0155] 전이유전자는, 조절 서열이 전이유전자의 발현 (예를 들어, 발현의 수준, 시기 또는 위치)에 영향을 미칠 때 상기 조절 서열에 "작동 가능하게 연결된다". "조절 서열"은 작동 가능하게 연결되는 전이유전자의 발현 (예를 들어, 발현의 수준, 시기 또는 위치)에 영향을 미치는 핵산 서열이다. 상기 조절 서열은, 예를 들어, 조절되는 핵산에 대해 직접적으로, 하나 이상의 다른 분자들 (예를 들어, 조절 서열 및/또는 핵산에 결합하는 폴리펩타이드)의 작용을 통해 자신의 영향을 발휘한다. 조조절 서열은 벡터의 일부일 수 있다. 조절 서열의 예는 프로모터, 인핸서, 리보솜 결합 부위 및 다른 발현 조절 요소 (예를 들어, 폴리아데닐화 신호)를 포함한다. 조절 서열의 추가의 예들은, 예를 들어, 문헌 [Goeddel, 1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif.] 및 [Baron et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23:3605-3606]에 기재되어 있다.

[0156] "숙주 세포" 또는 "숙주 세포 집단"은 외래 (외인성) 핵산이 도입된 세포 (또는 이의 집단)를 지칭한다. 상기 외래 핵산은 전이유전자에 작동 가능하게 연결된 발현 벡터를 포함할 수 있으며, 상기 숙주 세포는 외래 핵산 (전이유전자)을 발현하는데 사용될 수 있다. 하나의 예에서, 상기 숙주 세포 (또는 이의 집단)는 본 출원에서 기재된 키메라 항원 수용체 (CAR)를 암호화하는 핵산에 작동 가능하게 연결된 발현 벡터로 형질 도입될 수 있다. 숙주 세포 (또는 이의 집단)는 배양 세포일 수 있거나 대상체로부터 추출될 수 있다. 상기 숙주 세포 (또는 이의 집단)는 계대의 횟수에 관계 없이 일차 대상체 세포 및 이의 자손을 포함한다. 자손 세포는 모 세포와 비교하여 동일한 유전 물질을 보유하거나 보유하지 않을 수 있다. 숙주 세포는 자손 세포를 포함한다.

[0157] 숙주 세포는 원핵 세포, 예를 들어, 이. 콜라이 (*E. coli*)일 수 있거나, 진핵 세포, 예를 들어, 단세포 진핵 생물 (예를 들어, 효모 또는 다른 진균류), 식물 세포 (예를 들어, 담배 또는 토마토 식물 세포), 동물 세포 (예를 들어, 사람 세포, 원숭이 세포, 햄스터 세포, 래트 세포, 마우스 세포 또는 곤충 세포) 또는 하이브리도마일 수 있다. 숙주 세포의 예는 RPMI8226 (문헌 [Gentry et al., 2004 Leuk. Res. 28(3): 307-313]) 및 사람 만성 골수성 백혈병 세포주 K562를 포함한다. 다른 예는 원숭이 신장 세포의 COS-7 세포주 (ATCC CRL 1651) (문헌 [Gluzman et al., 1981, Cell 23: 175]), L 세포, C127 세포, 3T3 세포 (ATCC CCL 163), 중국 햄스터 난소 (Chinese hamster ovary: CHO) 세포 또는 이의 유도체, 예를 들어, 무혈청 배지에서 성장하는 Veggie CHO 및 관련 세포주 (문헌 [Rasmussen et al., 1998, Cytotechnology 28: 31]) 또는 DHFR이 결핍된 CHO 세포주 DX-B11 (문헌 [Ur laub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-20]), HeLa 세포, BHK (ATCC CRL 10) 세포주, 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포주 CV1으로부터 유래된 CV1/EBNA 세포주 (ATCC CCL 70) (문헌 [McMahan et al., 1991, EMBO J. 10: 2821]), 사람 배아 신장 세포, 예를 들어, 293,293 EBNA 또는 MSR 293, 사람 표피 A431 세포, 사람 Colo205 세포, 형질 전환된 다른 영장류 세포주, 정상 이배체 세포, 일차 조직의 시험관내 배양으로부터 유래된 세포주, 일차 체외이식편, HL-60, U937, HaK 또는 Jurkat 세포를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 숙주 세포는 포유 동물 숙주 세포, 예를 들어, 사람 숙주 세포이다. 전형적으로, 숙주 세포는, 차후에 당해 숙주 세포에서 발현될 수 있는 외인성 폴리펩타이드-암호화 핵산으로 도입될 수 있는 일차 세포 또는 배양 세포이다. 숙주 세포라는 용어는 특정 대상체 세포와 또한 이러한 세포의 자손 또는 잠재적 자손을 지칭하는 것으로 이해된다. 특정 변형들이, 예를 들어, 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인해 다음 세대에서 발생할 수 있기 때문에, 이러한 자손들은 사실상 모 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 이들도 여전히 본 출원에서 사용되는 바와 같은 용어의 범위 내에 포함된다.

[0158] 숙주 세포는 본 출원에서 개시된 바와 같이 항-CD38-CAR 작제물을 발현시키기 위해 임의의 방식으로 변형, 형질 감염, 형질 도입, 형질 전환 및/또는 조작된 임의의 세포 (이의 자손 포함)를 기술한다. 바람직하게는, 상기 숙주 세포는 사람 T 세포, 태반 세포 또는 NK 세포이다.

[0159] "형질 감염된" 또는 "형질 전환된" 또는 "형질 도입된"이라는 용어는, 외인성 핵산 (예를 들어, 전이유전자)이

숙주 세포 내로 전달되거나 도입되는 과정을 지칭한다. "형질 감염된" 또는 "형질 전환된" 또는 "형질 도입된" 숙주 세포는 외인성 핵산으로 형질 감염, 형질 전환 또는 형질 도입된 세포이다. 상기 숙주 세포는 일차 대상체 세포 및 이의 자손을 포함한다.

[0160] 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 암호화하는 개시된 핵산 서열과 같은 전이유전자는 전이유전자를 숙주 세포 내로 도입하기 위한 비히클로서 사용되는 바이러스 벡터를 포함하여 벡터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 숙주 세포 내로 (예를 들어, 형질 도입, 형질 감염 또는 형질 전환을 통해) 도입된 전이유전자는 일시적으로 도입되거나 바람직하게는 숙주 세포의 게놈 내로 안정하게 통합될 수 있다. 숙주 세포 내로 도입된 전이유전자는 자손 세포에서 증식될 수 있다. 벡터는 단일 가닥 또는 이중 가닥의 DNA 또는 RNA 벡터일 수 있다. 벡터는 숙주 세포에서 전이유전자의 발현을 지시하는 발현 벡터를 포함한다. 적합한 벡터는 복제 원점 서열, 유도성 또는 항시성 프로모터 서열, 및 적어도 하나의 선택 마커 서열을 함유할 수 있는 발현 벡터를 포함하며, 여기서, 이들 서열은 패키징 세포 및/또는 숙주 세포에서 기능적이다. 전이유전자를 숙주 세포 내로 도입하는데 사용된 바이러스 벡터는 레트로바이러스 및 렌티바이러스 벡터를 포함하는 레트로바이러스과의 바이러스과로부터 유래된 벡터를 포함한다. 레트로바이러스 벡터는 분열 숙주 세포를 형질 도입하는데 사용될 수 있으며, 렌티바이러스 벡터는 비-분열 숙주 세포를 형질 도입하는데 사용될 수 있다. 발현 벡터에 연결된 목적하는 전이유전자로 형질 도입된 숙주 세포는 T 세포, 태반 유래 자연 살해 숙주 세포 및 제대혈 유래 자연 살해 숙주 세포를 포함한다.

[0161] 레트로바이러스 벡터는 임의의 조류 또는 포유 동물 공급원으로부터 유래될 수 있다. 레트로바이러스 벡터는 마우스, 래트 및 사람을 비롯하여 몇몇 상이한 종의 숙주 세포를 감염시킬 수 있거나 (예를 들어, 암포트로픽), 한정된 숙주 범위를 가질 수 있다 (예를 들어, 에코트로픽). 레트로바이러스 벡터는 Moloney 쥐과 동물 백혈병 바이러스 (Moloney murine leukemia: MoMLV), 골수증식성 육종 바이러스 (myeloproliferative sarcoma virus: MPSV), 쥐과 동물 배아 줄기 세포 바이러스 (murine embryonic stem cell virus: MESV), 쥐과 동물 줄기 세포 바이러스 (murine stem cell virus: MSCV), 비장 병소 형성 바이러스 (spleen focus forming virus: SFFV)로부터 유래될 수 있다.

[0162] 전형적인 제1 세대 레트로바이러스 전달 벡터 (예를 들어, 감마 레트로바이러스 벡터) 시스템에서, 레트로바이러스 gag, pol 및 env를 암호화하는 서열은 목적하는 전이유전자로 대체될 수 있으며, 상기 전이유전자는 시스-작용성 긴 말단 반복체 (long terminal repeat: LTR) 서열에 의해 양측면 상에서 플랭킹될 수 있다. 상기 gag 및 pol 서열은 패키징 플라스미드 상에 보유될 수 있고, 상기 env 서열은 외피 플라스미드 상에 개별적으로 보유될 수 있고, 이들 3개의 바이러스 서열의 발현은 트랜스로 (*in-trans*) 작용한다. 상기 패키징 및 외피 플라스미드와 함께 전달 벡터 (전이유전자 함유)를 형질 감염 시약의 존재하에 패키징 세포와 반응시켜 상기 벡터 및 플라스미드를 상기 패키징 세포 내로 형질 도입시킨다. 상기 형질 도입된 패키징 세포는 상기 전이유전자를 갖는 전달 벡터를 보유하는 감염성 비리온을 함유하는 세포 배양 상청액을 생성한다. 형질 도입된 숙주 세포는 상기 숙주 세포를 비리온 상청액과 반응시킴으로써 생성된다. 형질 도입시, 레트로바이러스 전달 벡터 (전이유전자 보유)는 숙주 세포의 게놈 내로 통합된다 (문헌 [Morgan and Boyerinas 2016 *BioMedicines* 4(2):9 "Review: Genetic Modification of T Cells"]). 레트로바이러스 전달 벡터는 또한 전이유전자의 유도성 또는 항시성 전사를 지시하는 프로모터를 함유할 수 있다. 제2 세대 레트로바이러스 벡터 시스템은 전형적으로, 개별적인 패키징 및 외피 플라스미드에 대한 필요성을 제거하는 패키징 세포주에서 안정하게 발현되는 gag, pol 및 env 서열을 포함한다. 상기 패키징 세포주는 상기 패키징 벡터 (전이유전자 보유)와 반응하여 형질 도입된 패키징 세포 및 비리온 상청액을 생성한다. Phoenix 헬퍼 무함유 레트로바이러스 패키징 세포주는 제2 세대 레트로바이러스 시스템의 예이다. 레트로바이러스 벡터는 숙주 세포 형질 도입에 사용된다 (WO 2014/055668).

[0163] HIV, SIV 또는 FIV로부터 유래된 렌티바이러스 벡터를 사용하여 전이유전자를 숙주 세포 내로 도입할 수 있다. 여러 세대의 렌티바이러스 벡터가 개발되었다. 제1 세대 렌티바이러스 시스템은 전달 벡터 (전이유전자 보유), 패키징 플라스미드 (gag, pol, tat, rev 및 보조 서열 보유), 외피 플라스미드 (이중 env 서열 보유)를 이용한다는 점에서 제1 세대 레트로바이러스 시스템과 유사한다. 제2 세대 렌티바이러스 시스템은 전달 벡터 (전이유전자), 패키징 플라스미드 (gag, pol, tat 및 rev 및 보조 서열 제거), 외피 플라스미드 (이중 env 서열 보유)를 이용한다. 자가 불활성화 (self-Inactivating: SIN) 시스템으로도 가끔 불리는 제3 세대 렌티바이러스 시스템은 전달 벡터 (전이유전자 및 tat를 갖는 3' LTR 제거), 제1 패키징 플라스미드 (gag 및 pol), 제2 패키징 플라스미드 (rev) 및 외피 플라스미드 (이중 env 서열 보유)를 이용한다. 레트로바이러스 시스템과 유사하게, 이들 렌티바이러스 시스템 중 임의의 것은 벡터/플라스미드를 패키징 세포 및 형질 도입 시약과 반응시켜 결국 숙주 세포를 형질 도입하는데 사용되는 비리온을 함유하는 세포 배양 상청액을 생성시키는 것을 포함한다. 렌티

바이러스 벡터는 숙주 세포를 형질 도입하는데 사용된다 (WO 2012/031744; 미국 특허 8,802,374; 및 미국 공개 특허 2016/0152723).

[0164] 전이유전자를 숙주 세포 내로 도입하는데 사용되는 다른 바이러스 벡터는 시미안 바이러스 40 (SV40), 단순 헤르페스 바이러스 1, 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스 (adeno-associated virus: AAV) 및 라우스 육종 바이러스 (Rous sarcoma virus: RSV)를 포함한다 (문헌 [Gross 1989 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 10024-10028]).

[0165] 발현 벡터는 전형적으로 전이유전자와 도입되는 패키징 세포 및/또는 숙주 세포에서 유도성 또는 항시성 발현 (예를 들어, 전사)을 지시하는 프로모터 및/또는 인핸서 서열을 포함한다. 항시성 프로모터는 레트로바이러스 LTR, 급초기 사이토메갈로바이러스 (cytomegalovirus: CMV) 프로모터, 연장 성장 인자 1 알파 (EF-1 $\alpha$ ), 시미안 바이러스 40 (simian virus 40: SV40) 초기 프로모터, 마우스 유선 종양 바이러스 (mouse mammary tumor virus: MMTV) 프로모터, 사람 면역 결핍 바이러스 (human immunodeficiency virus: HIV) 긴 말단 반복체 (long terminal repeat: LTR) 프로모터, 몰로니 쥐과 동물 백혈병 바이러스 (Moloney murine leukemia virus: MoMuLV) 프로모터, 조류 백혈병 바이러스 프로모터, 엡스타인-바 바이러스 급초기 프로모터, 라우스 육종 바이러스 프로모터, PGK (포스포글리세레이트 키나아제), UbC (유비퀴틴 C), MLV (몰로니 백혈병 바이러스) 및 CAG (사이토메갈로바이러스 조기 인핸서 요소, 닫 베타-액틴의 제1 엑손 및 인트론으로부터의 프로모터, 및 토끼 베타-글로빈의 스플라이스 수용체) 인핸서 서열을 포함한다. 유도성 프로모터 서열은 테트라사이클린 작동유전자 (TetO) 부위 (문헌 [Sakemura 2016 *Cancer Immunology Research* 4(8): 658-668]) 및 이. 콜라이로부터의 lac 억제 물질 시스템을 포함한다. 렌티바이러스 벡터로부터의 높은 발현에 적합한 프로모터는 사람 유비퀴틴, MHC 클래스 I, MHC 클래스 II 및  $\beta$ 2 마이크로글로불린 프로모터를 포함한다 (WO 2016/012623). 레트로바이러스 및 렌티바이러스 발현 벡터는 Applied Biological Materials (ABM) (Vancouver, Canada) 및 Addgene (Watertown, Massachusetts)을 비롯하여 여러 공급원으로부터 시판된다.

[0166] "표적 세포"라는 용어는 항체 또는 항체 유도체에 의해 인식될 수 있도록 하는 하나 이상의 표적 폴리펩타이드를 발현하는 세포이다. 하나의 실시형태에서, 표적 세포는 본 개시 내용의 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물에 의해 결합되는 것으로 인식되는 CD38 폴리펩타이드를 발현하는 암 표적 세포를 포함한다.

[0167] "약" 또는 "대략"이라는 용어는, 값이 측정되거나 결정되는 방법에 부분적으로 의존하는 당해 분야의 통상의 기술자에 의해 결정된 특정 값에 대해 허용 가능한 오차를 의미한다. 예를 들어, "약" 또는 "대략"이라는 용어는 주어진 값 또는 범위의 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1% 또는 0.05% 이내를 의미한다.

#### 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR)

[0169] 본 개시 내용은 공지된 항-CD38 완전 사람 항체 A2 (미국 공개특허 2016/0297888에 기재되어 있으며, 이의 개시 내용은 본 출원에 참조로 포함됨)를 제2 세대 CAR 작제물 스캐폴드 상에 포함하고 일반적으로 상이한 성분 막판통 도메인 및 세포내 도메인을 갖는 새로운 CAR 작제물을 기재한다. 상기 성분들의 상기 개시된 CAR 작제물 내로의 편집은 "T 세포 살해"를 우아한 방식으로 희피함으로써 놀라운 결과를 생성하였다. 보다 구체적으로, 개시된 CD38- 지정 키메라 항원 수용체 (CAR)는 CD38 표적의 T 세포 디스플레이로 인한 자기-용해를 피할 수 있다. 보다 구체적으로, 본 개시 내용은 T 세포, 배양된 NK 세포 또는 태반 유래 NK 세포로 형질 도입하기 위한 항-CD38 CAR을 암호화하는 핵산 서열을 제공하며, 여기서, 상기 CAR은 다소 보다 낮은 결합 친화성의 항체 결합 영역에 의해 지시된다. 이러한 보다 낮은 결합 친화성은 상기 개시된 CAR 형질 도입된 숙주 세포가 표면 CD38의 중간 또는 보다 낮은 디스플레이를 갖는 T 또는 NK 세포의 실질적인 용해를 회피할 수 있도록 한다. 따라서, 상기 개시된 표적화 항체를 갖는 개시된 CAR 작제물은 우수한 안전성 프로파일을 탈성하며 개선된 특징적인 CAR 작제물로서 자가 용해 없이 성장할 수 있다.

[0170] CAR 작제물은 일반적으로 세포외 영역, 예를 들어, 종양 항원 (예를 들어, CD38)을 인식하는 항체의 단일 쇄 가변 단편 (scFv), 및 세포내 영역, 예를 들어, TCR 활성화를 모방하는 T-세포 수용체 (TCR) 제타 쇄 및 공동 자극을 모방하는 CD28 또는 4-ABB로부터 유도된 신호 전달 도메인을 함유한다. CAR은 일반적으로 항체의 항원 인식 도메인을 T 세포로부터의 수용체의 신호 전달 도메인과 결합시킴으로써 작제된다. CAR을 암호화하는 핵산 서열에 의한 T 세포의 변형은 T 세포가 재표적화된 항체-타입 항종양 세포독성을 갖도록 한다. 살해가 MHC-제한되지 않기 때문에, 상기 접근법은 동일한 항원을 갖는 모든 환자에게 일반적인 요법을 제공한다. CAR로 조작된 이를 T 세포는 종종 "디자이너 T 세포", "CAR-T 세포" 또는 "T-바디"로 불려진다 (문헌 [Eshhar et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(2): 720-724, 1993], [Ma et al., *Cancer Chemother. Bio. I Response Modif.*

20: 315-341, 2002]).

[0171] 구체적으로, 상기 항-CD38 A2 항체 종쇄는 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄는 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함한다. 항-CD38 scFv A2 항체는 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함한다.

[0172] 대안으로, 상기 항-CD38 CAR의 항원 결합 영역은 항-CD38 항체 D8의 경쇄 및 중쇄 가변 영역에 상응하는 CDR 서열을 포함하는 scFv를 포함한다. 상기 항-CD38 D8 항체 종쇄는 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하며, 상기 경쇄는 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함한다. 항-CD38 scFv는 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함한다.

[0173] 상기 개시된 항-CD38 CAR은 헌지 영역, 바람직하게는 CD8 헌지 영역 (서열 번호 6 또는 17), 또는 이의 기능성 단편을 추가로 포함한다. 상기 개시된 항-CD38 CAR은 세포외 도메인, 바람직하게는 CD28 세포외 도메인 (서열 번호 7), 또는 이의 기능성 단편을 추가로 포함한다. 상기 개시된 항-CD38 CAR은 막관통 도메인, 바람직하게는 T-세포 수용체의 알파 쇄, T-세포 수용체의 베타 쇄, T-세포 수용체의 제타 쇄, CD28, CD3 임실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, LFA-1 T-세포 공동 수용체, CD2 T-세포 공동 수용체/유착 분자, CD8 알파 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 단백질의 막관통 도메인으로부터의 막관통 도메인을 추가로 포함한다. 바람직하게는, 상기 막관통 도메인은 CD28 막관통 도메인 (서열 번호 8) 또는 이의 기능성 단편으로부터 유래된다.

[0174] 상기 개시된 항-CD38 CAR은 CD3-제타 쇄, 4-1BB, CD28 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터의 신호 전달 도메인을 포함하는 세포내 신호 전달 도메인을 추가로 포함한다. 2개의 신호 도메인이 있는 경우, 제2 도메인은 공동 자극 신호 전달 도메인으로 불린다. 바람직하게는, 상기 공동 자극 신호 전달 도메인은 다음 단백질들의, 그러나 이들에 제한되지 않는, 세포내 도메인 또는 이의 단편을 포함한다: CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능-관련 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, CD83 리간드 및 이들의 임의의 조합. 일부 실시형태에서, 상기 세포내 신호 전달 도메인은 CD28 신호 전달 도메인을 포함한다. 추가의 실시형태에서, 상기 CD28 신호 전달 도메인은 서열 번호 9의 아미노산 서열 또는 이의 기능성 단편을 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 세포내 신호 전달 도메인은 CD3- $\zeta$  신호 전달 도메인을 포함한다. 추가의 실시형태에서, 상기 CD3- $\zeta$  신호 전달 도메인은 서열 번호 10의 아미노산 서열 또는 이의 기능성 단편을 포함한다.

[0175] 따라서, 본 개시 내용은 상기 개시된 항-CD38 CAR 작제물을 암호화하는 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자를 포함한다. 아미노산 서열이 기술되는 경우, 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열도 또한 포함된다는 것에 유의해야 한다.

### 1. 세포외 항-CD38 결합 단백질

[0177] 본 개시 내용은 CD38에 결합하는 항원 결합 단백질을 포함하는 항-CD38 CAR을 제공하며, 여기서, 상기 항원 결합 단백질은 서열 번호 1의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인을 포함한다. 바람직하게는, 상기 VH 도메인은 서열 번호 1의 아미노산 서열과 적어도 96% 상동인 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 VH 도메인은 서열 번호 1의 아미노산 서열과 적어도 97% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 VH 도메인은 서열 번호 1의 아미노산 서열과 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 VH 도메인은 서열 번호 1의 아미노산 서열과 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0178] 또한, 본 개시 내용은 CD38에 결합하는 항원 결합 단백질을 포함하는 CAR을 제공하며, 여기서, 상기 항원 결합 단백질은 서열 번호 3의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인을 포함하거나, 상기 VL 도메인은 서열 번호 3의 아미노산 서열과 적어도 96% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 VL 도메인은 서열 번호 3의 아미노산 서열과 적어도 97% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 VL 도메인은 서열 번호 3의 아미노산 서열과 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 VL 도메인은 서열 번호 3의 아미노산 서열과 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0179] 바람직하게는, 상기 개시된 항-CD38 CAR은 서열 번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 가변 도메인을 갖는 경쇄; 및 서열 번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 가변 도메인을 갖는 중쇄를 포함하는 scFv를 포함한다.

[0180] 본 개시 내용은 CD38에 결합하는 항원 결합 단백질을 포함하는 항-CD38 CAR을 제공하며, 여기서, 상기 항원 결합 단백질은 서열 번호 2의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 (VH) 도메인을 포함한다. 바람직하게는, 상기 VH 도메인은 서열 번호 2의 아미노산 서열과 적어도 96% 상동인 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 VH 도메인은 서열 번호 2의 아미노산 서열과 적어도 97% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 VH 도메인은 서열 번호 2의 아미노산 서열과 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 상

기 VH 도메인은 서열 번호 2의 아미노산 서열과 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0181] 또한, 본 개시 내용은 CD38에 결합하는 항원 결합 단백질을 포함하는 CAR을 제공하며, 여기서, 상기 항원 결합 단백질은 서열 번호 4의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 (VL) 도메인을 포함하거나, 상기 VL 도메인은 서열 번호 4의 아미노산 서열과 적어도 96% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 VL 도메인은 서열 번호 4의 아미노산 서열과 적어도 97% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 VL 도메인은 서열 번호 4의 아미노산 서열과 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 VL 도메인은 서열 번호 4의 아미노산 서열과 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0182] 본 개시 내용은, 변이체 CAR 작제물이 서열 번호 20 또는 21과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 한, 본 출원에서 기재된 CAR 작제물의 아미노산 서열과 비교하여, 아미노산 치환, 결실 및/또는 삽입을 포함하는 하나 이상의 변이를 갖는 항-CD38 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물을 제공한다.

[0183] 바람직하게는, 상기 개시된 항-CD38 CAR은 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 가변 도메인을 갖는 경쇄; 및 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 가변 도메인을 갖는 중쇄를 포함하는 scFv를 포함한다.

[0184] 단일 쇄 항체는 아미노산 브릿지 (짧은 웨타이드 링커)를 통해 중쇄 및 경쇄 가변 도메인 (Fv 영역) 단편들을 연결시켜 단일 폴리웨타이드 쇄를 생성시킴으로써 형성될 수 있다. 이러한 단일 쇄 Fv (scFv)는 2개의 가변 도메인 폴리웨타이드 (VL 및 VH)를 암호화하는 DNA 사이의 웨타이드 링커를 암호화하는 DNA를 융합시킴으로써 제조되었다. 상기 생성된 폴리웨타이드들은 자체적으로 다시 폴딩되어 항원 결합 단량체를 형성할 수 있거나, 이들은 2개의 가변 도메인들 사이의 가요성 링커의 길이에 따라 다량체 (예를 들어, 이량체, 삼량체 또는 사량체)를 형성할 수 있다 (문헌 [Kortt et al., 1997, *Prot. Eng.* 10: 423], [Kortt et al., 2001, *Biomol. Eng.* 18: 95-108]). 상이한 VL 및 VH 포함 폴리웨타이드들을 조합시킴으로써, 누구든지 상이한 에피토프들에 결합하는 다량체 scFv를 형성시킬 수 있다 (문헌 [Kriangkum et al., 2001, *Biomol. Eng.* 18: 31-40]). 단일 쇄 항체의 제조를 위해 개발된 기술들은 미국 특허 4,946,778, 문헌 [Bird, 1988, *Science* 242: 423], [Huston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879], [Ward et al., 1989, *Nature* 334: 544] 및 [de Graaf et al., 2002, *Methods Mol. Biol.* 178: 379-87]에 기재된 기술들을 포함한다.

## 2. 막관통 도메인

[0185] 상기 개시된 항-CD38 CAR 작제물의 막관통 도메인은 세포막, 바람직하게는 포유 동물의 세포막에서 열역학적으로 안정한 임의의 폴리웨타이드 구조를 기술한다. 상기 개시된 항-CD38 CAR 작제물에 사용하기에 적합한 막관통 도메인은 임의의 천연 막관통 단백질 또는 이의 단편으로부터 수득될 수 있다. 대안으로, 상기 막관통 도메인은 합성, 비-자연 발생 막관통 단백질 또는 이들의 단편, 예를 들어, 세포막 (예를 들어, 포유 동물의 세포막)에서 열역학적으로 안정한 소수성 단백질 절편일 수 있다.

[0186] 바람직하게는, CAR에서 사용되는 막관통 도메인은 CD8 α, CD8 β, 4-1BB/CD137, CD28, CD34, CD4, Fc ε RI γ, CD16, OX40/CD134, CD3 ζ, CD3 ε, CD3 γ, CD3 δ, TCR α, TCR β, TCR ζ, CD32, CD64, CD64, CD45, CD5, CD9, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD137, CD154, LFA-1 T 세포 보조 수용체, CD2 T 세포 보조 수용체/부착분자, CD40, CD40L/CD154, VEGFR2, FAS 및 FGFR2B로 이루어진 그룹으로부터 선택된 막 단백질로부터 유래된다. 바람직하게는, 상기 막관통 도메인은 CD8 α, 4-1BB/CD137, CD28 또는 CD34로부터 유래된다.

[0187] 바람직하게는, 항-CD38 CAR의 상기 막관통 도메인은 서열 번호 8의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 막관통 도메인은 서열 번호 8의 아미노산 서열과 적어도 96% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 막관통 도메인은 서열 번호 8의 아미노산 서열과 적어도 97% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 막관통 도메인은 서열 번호 8의 아미노산 서열과 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 막관통 도메인은 서열 번호 8의 아미노산 서열과 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

## 3. 세포내 도메인

[0188] 본 출원에서 개시된 항-CD38 CAR은 세포내 신호 전달 도메인을 포함한다. 신호 전달 도메인은 일반적으로 세포의 정상적인 효과기 (effector) 기능들 중 적어도 하나의 활성화를 담당하고 있다. "효과기 기능"이라는 용어는 세포의 전문적인 기능을 기술한다. 예를 들어, T 세포 또는 NK 세포의 효과기 기능은 세포 용해 활성 또는 헬퍼 활성을 포함한다. "신호 전달 도메인"이라는 용어는 효과기 기능 신호를 전달하고 세포가 전문적인 기능을 수행하도록 지시하는 단백질의 부분을 기술한다. 일반적으로 전체 세포내 신호 전달 도메인이 사용될 수 있지만, 다수의 경우에는 전체 쇄 또는 도메인을 사용하는 것이 반드시 필요한 것은 아니다. 상기 세포내 신호 전달 도메인의 절단된 부분이 사용되는 정도까지, 이러한 절단된 부분은 효과기 기능 신호를 전달하는 한 온전

한 도메인 대신에 사용될 수 있다.

[0191] 주요 신호 전달 도메인은 자극 방식 또는 억제 방식으로 TCR 복합체의 주요 활성화를 조절한다. 자극 방식으로 작용하는 주요 신호 전달 도메인은 면역수용체 타이로신 기반 활성화 모티프 (immunoreceptor tyrosine-based activation motif: ITAM)로서 공지되어 있는 신호 전달 모티프를 함유할 수 있다. 상기 항-CD38 CAR에서 사용하기 위한 ITAM을 함유하는 주요 신호 전달 도메인은 TCR 제타, FcR 감마, FcR 베타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD5, CD22, CD79a, CD79b 및 CD66d의 신호 전달 도메인을 포함한다. 바람직하게는, 주요 신호 전달 도메인은 CD3 ζ 또는 CD28이다.

[0192] 바람직하게는, 상기 항-CD38 CAR의 주요 신호 전달 도메인은 서열 번호 9의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 주요 신호 전달 도메인은 서열 번호 9의 아미노산 서열과 적어도 96% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 주요 신호 전달 도메인은 서열 번호 9의 아미노산 서열과 적어도 97% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 주요 신호 전달 도메인은 서열 번호 9의 아미노산 서열과 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 주요 신호 전달 도메인은 서열 번호 9의 아미노산 서열과 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0193] 바람직하게는, 상기 항-CD38 CAR의 주요 신호 전달 도메인은 서열 번호 10의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 주요 신호 전달 도메인은 서열 번호 10의 아미노산 서열과 적어도 96% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 주요 신호 전달 도메인은 서열 번호 10의 아미노산 서열과 적어도 97% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 주요 신호 전달 도메인은 서열 번호 10의 아미노산 서열과 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 주요 신호 전달 도메인은 서열 번호 10의 아미노산 서열과 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0194] 또한, 상기 개시된 항-CD38 CAR 작제물은 공동 자극 신호 전달 도메인을 추가로 포함한다. 상기 키메라 수용체에서 사용하기 위한 공동 자극 신호 전달 도메인의 예는 B7/CD28 계열의 구성원 (예를 들어, B7-1/CD80, B7-2/CD86, B7-H1/PD-L1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H6, B7-H7, BTLA/CD272, CD28, CTLA-4, Gi24/VISTA/B7-H5, ICOS/CD278, PD-1, PD-L2/B7-DC 및 PDCD6); TNF 상위 계열의 구성원 (예를 들어, 4-1BB/TNFSF9/CD137, 4-1BB 리간드/TNFSF9, BAFF/BLyS/TNFSF13B, BAFF R/TNFRSF13C, CD27/TNFRSF7, CD27 리간드/TNFSF7, CD30/TNFRSF8, CD30 리간드/TNFSF8, CD40/TNFRSF5, CD40/TNFSF5, CD40 리간드/TNFSF5, DR3/TNFRSF25, GITR/TNFRSF18, GITR 리간드/TNFSF18, HVEM/TNFRSF14, LIGHT/TNFSF14, 림프독소-알파/TNF-베타, OX40/TNFRSF4, OX40 리간드/TNFSF4, RELT/TNFRSF19L, TACI/TNFRSF13B, TL1A/TNFSF15, TNF-α 및 TNF RII/TNFRSF1B); 인터루킨-1 수용체/톨 유사 수용체 (toll-like receptor: TLR) 상위 계열의 구성원 (예를 들어, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 및 TLR10); SLAM 계열의 구성원 (예를 들어, 2B4/CD244/SLAMF4, BLAME/SLAMF8, CD2, CD2F-10/SLAMF9, CD48/SLAMF2, CD58/LFA-3, CD84/SLAMF5, CD229/SLAMF3, CRACC/SLAMF7, NTB-A/SLAMF6 및 SLAM/CD150); 및 CD2, CD7, CD53, CD82/Kai-1, CD90/Thy1, CD96, CD160, CD200, CD300a/LMIR1, HLA 클래스 I, HLA-DR, 이카로스 (ikaros), 인테그린 알파 4/CD49d, 인테그린 알파 4 베타 1, 인테그린 알파 4 베타 7/LPAM-1, LAG-3, TCL1A, TCL1B, CRTAM, DAP10, DAP12, MYD88, TRIF, TIRAP, TRAF, 텍틴-1/CLEC7A, DPPIV/CD26, EphB6, TIM-1/KIM-1/HAVCR, TIM-4, TSLP, TSLP R, 림프구 기능 관련 항원-1 (lymphocyte function associated antigen-1: LFA-1) 및 NKG2C로 이루어진 그룹으로부터 선택된 공동 자극 단백질의 세포질 신호 전달 도메인이다. 바람직하게는, 상기 공동 자극 도메인은 α<sub>4</sub>β<sub>1</sub> 인테그린, β<sub>2</sub> 인테그린 (CD11a-CD18, CD11b-CD18, CD11b-CD18), CD226, CRTAM, CD27, NKp46, CD16, NKp30, NKp44, NKp80, NKG2D, KIR-S, CD100, CD94/NKG2C, CD94/NKG2E, NKG2D, PEN5, CEACAM1, BY55, CRACC, Ly9, CD84, NTBA, 2B4, SAP, DAP10, DAP12, EAT2, FcRγ, CD3 ζ 및 ERT로 이루어진 그룹으로부터 선택된 활성화 수용체 단백질의 세포내 도메인을 포함한다. 바람직하게는, 상기 공동 자극 도메인은 KIR-L, LILRB1, CD94/NKG2A, KLRG-1, NKR-P1A, TIGIT, CEACAM, SIGLEC 3, SIGLEC 7, SIGLEC9 및 LAIR-1로 이루어진 그룹으로부터 선택된 억제 수용체 단백질의 세포내 도메인을 포함한다. 바람직하게는, 상기 공동 자극 도메인은 CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD1, ICOS, 림프구 기능 관련 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, 및 CD83과 특이적으로 결합하는 리간드로 이루어진 그룹으로부터 선택된 단백질의 세포내 도메인을 포함한다.

#### 4. 힌지 영역

[0195] 항-CD38 CAR은 힌지 영역을 추가로 포함한다. 상기 힌지 영역은 scFv 항체 영역과 막관통 도메인 사이에 위치한다. 힌지 영역은, 일반적으로 단백질의 2개 도메인들 사이에서 발견되고 상기 항-CD38 CAR의 유연성 및 상기 도메인들 중 하나 또는 둘 다의 서로에 대한 상대적인 이동을 가능하게 하는 아미노산 절편이다.

바람직하게는, 상기 헌지 영역은 약 10 내지 약 100개의 아미노산, 예를 들어, 약 15 내지 약 75개의 아미노산, 약 20 내지 약 50개의 아미노산 또는 약 30 내지 약 60개의 아미노산을 포함한다. 또는, 상기 헌지 영역은 자연 발생 단백질의 헌지 영역이다. 바람직하게는, 상기 헌지 영역은 CD8 헌지 영역 및 CD8a 헌지 영역으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 CD8a 헌지 영역이다. 바람직하게는, 상기 헌지 영역은 상기 CAR의 scFv의 C-말단과 막관통 도메인의 N-말단 사이에 배치된다.

[0197] 바람직하게는, 상기 항-CD38 CAR의 상기 헌지 영역은 서열 번호 6의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 헌지 영역은 서열 번호 6의 아미노산 서열과 적어도 96% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 헌지 영역은 서열 번호 6의 아미노산 서열과 적어도 97% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 헌지 영역은 서열 번호 6의 아미노산 서열과 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 헌지 영역은 서열 번호 6의 아미노산 서열과 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0198] 바람직하게는, 상기 항-CD38 CAR의 상기 헌지 영역은 서열 번호 17의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 헌지 영역은 서열 번호 17의 아미노산 서열과 적어도 96% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 헌지 영역은 서열 번호 17의 아미노산 서열과 적어도 97% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 헌지 영역은 서열 번호 17의 아미노산 서열과 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 헌지 영역은 서열 번호 17의 아미노산 서열과 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

## 5. 신호 웨타이드

[0200] 신호 서열은, 폴리펩타이드를 세포 내의 목적하는 부위, 예를 들어, 세포의 분비 경로로 표적화하며 상기 항-CD38 CAR이 세포막의 지질 이중층 내로 통합 및 앵커링 (anchoring)을 가능하게 하는 웨타이드 서열이다. 바람직하게는, 상기 신호는 CD8a, CD28 및 CD16으로 이루어진 그룹으로부터의 신호 서열이다.

[0201] 바람직하게는, 상기 항-CD38 CAR의 상기 신호 서열은 서열 번호 19의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 신호 서열은 서열 번호 19의 아미노산 서열과 적어도 96% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 신호 서열은 서열 번호 19의 아미노산 서열과 적어도 97% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 신호 서열은 서열 번호 19의 아미노산 서열과 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 상기 신호 서열은 서열 번호 19의 아미노산 서열과 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

## **숙주 세포**

[0203] 단리된 숙주 세포 또는 숙주 세포 집단은 상기 개시된 항-CD38 작제물로 형질 도입되어 상기 항-CD38 CAR을 발현시킨다. 숙주 세포에는 2개의 특유의 그룹들이 있다. 제1 그룹은 자가 T 세포로도 불리는 환자 유래의 단리된 T 세포이다. 이러한 자가 T 세포 집단은 환자로부터 수득되고, 단리되고, 확장된다. 이어서, 상기 확장된 T 세포는 상기 개시된 항-CD38 CAR 작제물로 형질 도입되어, 확장되고 개별 환자에게 되돌려지는 (투여되는) 형질 도입된 T 세포의 가능한 한 많은 집단을 달성한다. 상기 개시된 항-CD38 CAR 작제물은 높은 CD38 발현 종양 세포, 주로 다발성 골수종 (MM) 종양 세포로만 세포 용해를 달성할 수 있었다.

[0204] 숙주 세포의 제2 그룹은 바람직하게는 임신 후의 태반 또는 제대 조직으로부터 유래된, 태아 기원의 배양된 T 또는 NK 세포이다. 숙주 세포의 상기 제2 그룹은 자가가 아니라 배양되며, 모든 사람 환자 전체에 걸쳐 보편적으로 사용된다.

[0205] 본 개시 내용은, T 세포, 배양된 NK 세포 또는 태반 유래 NK 세포를 형질 도입할 수 있으며 표면 CD38의 중간 또는 보다 낮은 디스플레이를 갖는 T 또는 NK 세포의 용해를 회피할 수 있는 CAR 작제물을 제공한다.

## **항-CD38 CAR의 치료법 방법 및 용도**

[0207] 본 개시 내용은 이를 필요로 하는 대상체에서 암을 치료하거나 종양 성장을 억제하는 방법을 제공하며, 여기서, 상기 방법은 항-CD38 CAR을 포함하는 단리된 숙주 세포, 또는 형질 도입된 숙주 세포 집단을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 혈액암은 본 출원에서 개시된 항-CD38 CAR을 사용하여 치료될 수 있다. 본 개시 내용의 방법을 사용하여 치료될 수 있는 혈액암의 예는 비호지킨 림프종 (NHL), 베켓 림프종 (BL), B 만성 림프구성 백혈병 (B-CLL), B 및 T 급성 림프구성 백혈병 (ALL), T 세포 림프종 (TCL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 모발상 세포 백혈병 (HCL), 호지킨 림프종 (HL) 및 만성 골수성 백혈병 (CML)을 포함한다. 바람직하게는, 상기 혈액암은 다발성 골수종 (MM)이다.

[0208] 다발성 골수종 (MM)은 형질 세포의 악성 종양이며, 세계에서 두 번째로 가장 흔한 혈액암이다. 현재, 이러한 질병에 대한 치료법은 없으며, 이의 5년 생존율은 45%에 불과하다. 지난 10년 동안, 신규한 면역 조절제, 프로

테아좀 억제제 및 자가 조혈 줄기 세포 이식을 비롯하여 MM을 치료하는데 상당한 발전이 있었다 (문헌 [Kumar et al. *Blood* 111(5): 2516-2520, 2008], [Barosi, et al. *Ann. Hematol.* 91(6): 875-888, 2012], [Kharfan-Dabaja et al. *J. Hematol. Oncol.* 6: 2, 2013]).

[0209] 본 개시 내용은, 종양의 암 세포를 항-CD38 CAR을 포함하는 형질 도입된 숙주 세포 또는 형질 도입된 숙주 세포 집단과 접촉시키는 단계를 포함하는, 암 관련 항원을 발현하는 종양의 성장을 억제하는 방법을 제공하며, 여기서, 상기 숙주 세포는 태반 NK 세포와 같은 NK 세포이다.

[0210] 상기 형질 도입된 숙주 세포는 약  $10^1$  내지 약  $10^9$  개 세포/체중 kg의 투약량으로 투여될 수 있다. 상기 언급된 투약량의 중간 범위, 예를 들어, 약  $10^2$  내지 약  $10^8$  개 세포/체중 kg, 약  $10^4$  내지 약  $10^7$  개 세포/체중 kg, 약  $10^5$  내지 약  $10^6$  개 세포/체중 kg도 또한 본 개시 내용의 일부인 것으로 의도된다.

[0211] 상기 형질 도입된 숙주 세포는 매일 또는 바람직하게는 덜 빈번하게 투여될 수 있다.

#### 항-CD38 A2 CAR을 발현하는 레트로바이러스 벡터의 작제

[0213] 제2 세대 항-CD38 A2 CAR은 등록 상표가 붙은 사람 단일 쇄 가변 영역 (scFv) 항체 라이브러리로부터 스크리닝된 사람 항-CD38 항체를 사용하여 생성되었다. 사람 cmyc 유전자로부터의 10개의 아미노산 myc 태그 (아미노산: EQQLISEEDL (서열 번호 12), DNA: GAGCAGAAGCTTATCTCCGAGGAAGATCTG (서열 번호 22))를 CAR 발현의 검출을 위해 scFv의 N-말단 영역에 첨가하였다.

[0214] 이러한 개시된 작제된 항-CD38 CAR은 "항-CD38 A2 CAR"로 명명된다. 이것은 마우스 항체 중쇄로부터의 신호 펩타이드의 19개 아미노산 잔기, 이어서 2개의 추가의 아미노산 잔기 Asp 및 Ile, 사람 myc 태그의 10개 아미노산 잔기, 상기 항-CD38 항체의 VH의 118개 아미노산 잔기, ((G4)S)3의 형태의 링커의 15개 아미노산 잔기, 항-CD38 항체의 VL의 110개 아미노산 잔기, CD8 α 헌자의 46개 아미노산 잔기, CD28 세포외 도메인의 40개 아미노산 잔기 (스페이서로서의 역할), CD28 막관통 도메인의 27개 아미노산 잔기, CD28 세포내 신호 전달 도메인의 41개 아미노산 잔기 및 TCR ζ 세포내 도메인의 112개 아미노산 잔기를 비롯하여 542개 아미노산 잔기를 포함하는 제2 세대 IgCD28TCR CAR이다 (도 1). 성숙한 개시된 항-CD38 A2 CAR은 약 57 kDa의 예상 단량체 단백질 중량을 갖는 523개 아미노산 잔기를 포함한다.

[0215] 항-CD38 A2 CAR-T 세포는 상기 항-CD38 CAR 발현 레트로바이러스 벡터에 의한 항-CD3 항체 (OKT3) (Miltenyi Biotech) 활성화된 T 세포의 형질 도입에 의해 생성되었다 (도 2a). 웨스턴 블로팅에 의해 분석될 때, 상기 항-CD38 CAR은 환원 조건하에 약 70 kD 및 비환원 조건하에 약 140 kD의 분자량으로 이동하였으며, 이는 T 세포 표면 상의 동종 이량체 형성을 확인시켜 준다. 보다 느린 이동 벤드는 상기 분자의 글리코실화 형태를 나타낼 수 있다. 상기 CAR2-항CD38A2 CAR은 환원 조건하에 약 70 kDa의 분자량을 갖는 단량체 및 비환원 조건하에 140 kDa의 분자량을 갖는 동종 이량체로서 검출되었다. 이를 결과는 CAR2-항CD38A2 CAR이 CAR-T 세포 표면 상에서 동종 이량체를 형성한다는 것을 시사한다.

[0216] CD38-Fc 융합 단백질과 함께 배양될 때, 상기 항-CD38 A2 CAR-T 세포는 상기 CAR 발현과 상관 관계가 있는 강력한 CD38 결합 활성을 나타냈다 (도 3a 및 3b). 이를 결과는 상기 항-CD38 A2 CAR-T 세포가 상기 발현된 CAR을 통해 CD38과 특이적이고 효율적으로 결합할 수 있다는 것을 확인시켜 준다. 항-CD38 A2 CAR T 세포가 이의 표적화된 항원 CD38에 결합할 수 있다는 것을 확인하기 위해, 비-형질 도입된 대조군 및 항CD38 A2 CAR 형질 도입된 T 세포를 2 μg/ml CD38-Fc 융합 단백질과 함께 배양하고, CD38-Fc 결합을 검출하기 위해 PE-컨쥬게이트된 염소 항-사람 IgG를 사용하고 T 세포 상에서 CAR 발현을 검출하기 위해 FITC-컨쥬게이트된 염소 항-Myc 항체를 사용하여 유세포 계측법으로 검출하였다.

[0217] 항-CD38 A2 CAR-T 세포는 CD38 상향 조절된 세포를 선택적으로 사멸시킨다. CD38은 활성화된 T 세포 상에서 발현되며 T 세포 활성화 마커로서 간주되는 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Deaglio et al., *J. Immunol.* 160(1): 395-402, 1998] 및 [Sandoval-Montes and Santos-Argumedo, *J. Leukocyte Biol.* 77(4): 513-521, 2005]). 본 발명자들은 항-CD38 CAR-T 세포에서 상기 CD38-발현 집단을 검사하였으며, 상기 CD38 상향 조절된 집단만이 상기 항-CD38 CAR-T 세포에서 제거되었다는 것을 발견하였다 (도 3). 나머지 CD38 음성 및 낮은 발현 CAR-T 세포 집단은 장기간 세포 배양 동안 대조군 T 세포에 필적하는 생존력으로 안정하였다. 항-CD38 CAR-T 세포의 이러한 특징은 상기 CAR-T 세포가 배양에서 잘 생존하고, 자가 용해를 회피하고, CAR-T 세포와 관련된 제한된 온-표적/오프-종양 부작용에 대한 임상적 이점을 제공하는데, 이는 상기 항-CD38 CAR-T 세포가 CD38 정상 발현 세포가 아닌 CD38 상향 조절된 MM 세포를 선택적으로 사멸시킬 것이기 때문이다.

- [0218] 상기 항-CD38 A2 CAR-T 살해 활성을 조사하기 위해, 상기 항-CD38 CAR-T 세포 상에서 상기 CD38 발현을 평가하였다 (도 4). 비-형질 도입된 대조군 및 항-CD38 A2 CAR 형질 도입된 T 세포를, 마우스 항-사람 CD38 mAb에 의한 염색 후 APC-컨쥬게이트된 염소 항-마우스 IgG 항체에 의한 염색에 의해 유세포 계측법으로 분석하였다.
- [0219] 살해를 회피하는 능력이 장기간 세포 배양에서 상기 A2 항체를 갖는 상기 개시된 항-CD38 CAR 세포의 안정성 및 생존력에 의해 나타냈다. 비-형질 도입된 대조군 및 항-CD38 A2 CAR 형질 도입된 T 세포를, (도 5a) PE-컨쥬게이트된 항-myc 항체로 염색에 의한 CAR-T 세포의 안정성 및 (도 5b) 전방 산란 (FSC) 및 측방 산란 (SSC)에 의한 생존 세포의 케이팅에 의한 T 세포의 생존력에 대해 유세포 계측법으로 형질 도입 후 15일째에 분석하였다. 배양 15일 후, 형질 도입된 T 세포 중 CAR-양성 세포의 백분율은 형질 도입 후 4일째에 74% (도 5a)에서 15일째에 65%까지 약간만 감소하였으며, 생존력은 대조군 T 세포와 유사하였다 (85% 대 91%). 유사한 결과가 다른 공여자로부터 수득되었다.
- [0220] 항-CD38 A2 CAR-T 세포가 사이토카인 생산에 대해 CD38-발현 종양 세포에 의해 활성화될 수 있는지를 시험하기 위해, 비-형질 도입된 대조군 T 세포 및 항-CD38 A2 CAR 형질 도입된 T 세포를 대조군 CD38-음성 K562 세포 (대조군 T) 또는 CD38-발현 RPMI 8226 종양 세포 (CAR-T)와 함께 24 시간 동안 인큐베이션시켰다. CD38-음성 대조군 종양 세포 K562가 아닌 이의 표적화된 CD38-양성 MM 종양 세포 RPMI8622과 관여시, 항-CD38 A2 CAR-T 세포는 다량의 사이토카인 IFN $\gamma$  및 IL2를 생산하였는데, 이는 상기 항-CD38 A2 CAR-T 세포가 표적화된 종양 세포 관여시 특이적으로 활성화될 수 있다는 것을 나타낸다 (도 6). 비-형질 도입된 대조군 T 세포 및 항-CD38 CAR A2 형질 도입된 T 세포를 대조군 CD38-음성 K562 세포 (대조군 T) 또는 CD38-발현 RPMI 8226 종양 세포 (CAR-T)와 함께 24 시간 동안 인큐베이션시켰다. 상청액을 수확하고, ELISA에 의해 IFN $\gamma$  및 IL2 생산에 대해 분석하였다.
- [0221] CAR-T 세포에 대한 중요한 기능적 기준은 표적 항원-발현 종양 세포를 특이적으로 사멸시키는 이의 능력이다. 항-CD38 A2 CAR-T 세포의 상기 CD38-특이적 세포독성을 확인하기 위해, 세포독성 검정을 수행하였다. 비-형질 도입된 대조군 및 CAR 형질 도입된 T 세포 (E)를 CD38-음성 K562 또는 CD38-발현 RPMI 8226 종양 세포 (T)와 함께 2 시간 동안 인큐베이션시켰다. CD38-음성 K562 종양 세포에 대한 비-형질 도입된 대조군 T 세포와 형질 도입된 CAR-T 세포 둘 다의 세포 독성은 없었다 (도 7, 좌측). 대조적으로, 상기 비-형질 도입된 대조군 T 세포가 아닌 상기 항-CD38 A2 CAR-T 세포는 세포-용량 의존적 방식으로 CD38-발현 RPMI8226 MM 종양 세포를 효과적으로 용해시켰다 (도 7, 우측). 이들 결과는 항-CD38 CAR-T 세포의 세포 용해 활성이 CD38-발현 MM 종양 세포에 대해 매우 강력하고 특이적이었다는 것을 확인시켜 준다. 도 7은 비-형질 도입된 대조군 및 항-CD38 A2 CAR 형질 도입된 T 세포 (E)가 형광 증강 리간드-라벨링된 CD38-음성 K562 또는 CD38-발현 RPMI8226 종양 세포 (T)와 함께 2 시간 동안 표시된 비로 인큐베이션되고, DELFIA 세포독성 검정으로 처리 및 분석되었다는 것을 도시한 것이다. 이들 데이터는 상기 항-CD38 A2 CAR-T 세포의 CD38-특이적 세포독성을 보여준다.
- [0222] 도 8은 이종 이식 동물 모델에서 평가된 항-CD38 A2 CAR-T 세포의 살종양 활성을 도시한 것이다.  $1 \times 10^7$  개의 Luc-GFP 라벨링된 CD38-발현 RPMI8226 MM 종양 세포를 면역약화 NSG 마우스에 정맥내 접종하였다. 3주 후, IVIS 측정 가능한 전신 종양이 모든 접종된 마우스에서 형성되었다. 마우스를 다양한 용량의 항-CD38 A2 CAR-T 세포로 정맥내 처리하고, 비처리된 마우스를 대조군으로 제공하였다. 종양 부하를 생물 발광 이미징 (IVIS)에 의해 매주 평가하였다. 결론적으로, 이들 데이터는 상기 항-CD38 A2 CAR-T 세포가 MHC-비제한된 방식으로 CD38의 높은 발현 세포를 인식하여 T-세포 활성화, 시험관내 표적 세포 용해 및 생체내 MM 종양의 근절을 초래할 수 있는 항체-타입 특이성을 나타낸다는 것을 입증한다. 본 생체내 연구는 항-CD38 A2 CAR-T 세포에 의한 CD38-발현 MM 종양의 용량-의존적 근절을 결정하였다. 본 연구의 목적은 CD38 높은 발현 MM의 양자 면역 요법에 대해 상이한 용량으로 CD38-특이적 CAR-T 세포를 개발하는 것이다. CD38 상향 조절된 MM 환자에서 용량-의존적 항-CD38 A2 CAR-T 세포의 잠재적 치료 적용을 모방하기 위해, 이종 이식 동물 모델에서 상기 항-CD38 A2 CAR-T 세포의 살종양 활성을 시험하였다. 확립된 전신성 이종 이식편 사람 RPMI8226 MM 종양을 갖는 면역 결핍 NSG 마우스에게 항-CD38 A2 CAR-T 세포를 상이한 용량으로 정맥내 투여하였다. 도 8은 본 실험의 결과를 도시한 것이다. CAR-T 세포 처리 후 1주일째에, 모든 상기 확립된 RPMI8226 MM 종양을  $1 \times 10^7$  개의 CAR-T 세포로 처리된 마우스로부터 근절하였으며, 10 마리의 마우스 모두는 12주에 종양이 없어졌다 (현재).  $1 \times 10^6$  개의 CAR-T 세포에서, 평균 종양 부하가 CAR-T 세포 처리 후 1 주일째에 85% (파일 상의 데이터) 감소하였으며; 2주 후, 94%의 종양 부하가 감소하였다. 그러나, 상기 종양은 3주째부터 점진적으로 성장하였는데, 이는 불완전한 처리로 인한 종양의 재발을 나타낸다. 대조적으로, 상기 RPMI8226 MM 종양은, 모든 마우스가  $81 \pm 2.7$  일 내에 종양으로 사망할 때까지, 미처리 마우스와  $1 \times 10^5$  개의 CAR-T 세포로 처리된 마우스 모두에서 점진적으로 성장하였다.

이들 결과는 항-CD38 A2 CAR-T 세포가 CD38 상향 조절로 MM 종양을 생체내에서 효과적으로 근절시킬 수 있다는 것을 입증한다.

[0223] 결론적으로, 상기 결과는 항-CD38 A2 CAR-T 세포가 MHC-비제한된 방식으로 CD38의 높은 발현 세포를 인식하여 T-세포 활성화, 시험관내 표적 세포 용해 및 생체내 MM 종양의 근절을 초래할 수 있는 항체-타입 특이성을 나타낸다는 것을 입증한다.

[0224] CAR2-항CD38 CAR-T 세포의 가능한 살해 활성을 조사하기 위해, 2가지 검정을 수행하였다. 제1 분석에서, CAR2-항CD38 CAR-T 세포 상에서 CD38 발현을 모니터링하였다. CD38 음성 및 높은 발현 대조군으로서 K562 및 RPMI8226을 각각 사용함으로써, 상기 CD38 발현 수준에 따라, 상기 활성화된 T 세포를 다음 3개의 집단으로 나눌 수 있다: CD38 음성, CD38 낮은 및 CD38 높은 발현 집단. 공여자들 중 하나에서, 상기 T 세포 집단은 대조군 비-형질 도입된 T 세포에서 각각 12%, 77% 및 11%이었으며, 상기 CAR-T 세포에서 각각 17%, 82% 및 1%이었다 (도 4). 유사한 결과가 다른 공여자로부터 수득되었다. 상기 CAR-T 세포로부터의 CD38 높은 발현 집단의 소멸은 살해 활성을 나타내며, 상기 CAR-T 세포에서의 CD38 음성 및 낮은 발현 집단의 유지는 상기 CAR2-항CD38 CAR-T 세포가 상기 CD38 높은 발현 세포를 선택적으로 용해시킨다는 것을 암시한다.

[0225] 제2 분석에서, 장기간 세포 배양에서 상기 CAR-T 세포의 안정성 및 생존력을 모니터링하였다 (도 5a 및 5b). 배양 15일 후, 상기 형질 도입된 T 세포 중 CAR-양성 세포의 백분율은 형질 도입 후 4일째에 74%에서 15일째에 65%까지 약간만 감소하였으며, 생존력은 대조군 T 세포와 유사하였다 (85% 대 91%). 유사한 결과가 다른 공여자로부터 수득되었다. 이들 결과는 상기 CAR2-항CD38 CAR-T 세포가 제한된 살해 활성을 나타내며 장기간 세포 배양 후에 비교적 안정하고 생존 가능하게 유지된다는 것을 추가로 확인시켜 준다.

[0226] 상기 CAR2-항CD38 CAR-T 세포의 제2의 독특한 특성은 상기 CAR2-항CD38 CAR-T 세포가 CD38 높은 발현 세포를 선택적으로 용해시키며 CD38 낮은 발현 세포를 온전하게 남겨둔다는 것이다. 이러한 특징은 상기 CAR-T 세포가 제한된 살해 활성으로 배양에서 잘 생존하며 CAR-T 세포와 관련된 제한된 온-표적/오프-종양 부작용에 대한 임상적 이점을 제공할 수 있게 하는데, 이는 상기 CAR2-항CD38 CAR-T 세포가 CD38 낮은 발현 정상 세포가 아닌 CD38 높은 발현 MM 세포를 선택적으로 사멸시킬 것이기 때문이다.

[0227] 마우스 항-CD38 mAb, THB-7 (문헌 [Mihara et al., *J. Immunother.* 32(7): 737-743, 2009], [Mihara et al., *Br. J. Haematol.* 151(1): 37-46, 2010] 및 [Bhattacharyya et al., *Blood Cancer J.* 2(6): e75, 2012])에 기반하는 항-CD38 CAR의 생성은 상기 항-CD38 CAR-T 세포가 단독으로 생존할 수 없다는 것을 보여주었다. 이것은 아마도 상기 활성화된 T 세포 표면 상에 발현된 내인성 CD38과 상기 항-CD38 CAR의 결합에 기인하는 높은 살해 활성 때문이다. 드렌트 등 (Drent et al.)은, CD38 음성 항-CD38 CAR-T 세포만이 배양에서 생존한 사람 항-CD38 항체에 기반하는 항-CD38 CAR-T 연구를 보고하였다 (문헌 [Drent et al., *Haematologica* 101(5): 616-625, 2016]). 그러나, 본 상기 데이터는 상기 개시된 CAR2-항CD38 CAR-T 세포 (A2 및 D8 항체에 기반)만이 CD38 높은 발현 T 세포의 분획을 용해시키고 CD38 낮거나 음성인 대부분의 T 세포를 온전하게 남겨 두어 매우 제한된 살해 활성을 초래하며, 상기 형질 도입된 T 세포의 생존력이 장기간 세포 배양에서 높게 유지되었다는 것을 보여 주었다. 이론에 의해 구속되는 것은 아니지만, 이러한 선호도는 사용된 사람 항체 A2의 비교적 낮은 친화성으로 인한 것일 수 있다. 이론에 의해 구속되는 것은 아니지만, 낮은 친화성 사람 항-CD38 항체는 상기 CAR-T 세포에 대해 효과적이어서 효과적이고 강력한 시험관내 표적 세포 용해 활성을 나타내고 생체내에서 CD38 높은 발현 MM 종양을 근절시킨다. CD38-음성이고 단지 일시적으로 종양 성장 억제된, MM에서 시험된 다른 항-CD38 CAR-T 세포와는 달리 (문헌 [Drent et al. 상동]), 상기 CAR2-항CD38 CAR-T 세포는 동물 모델에서 재발 없이 CD38-발현 종양 세포를 근절시켰다. 낮은 CD38 발현 세포와 높은 CD38 발현 세포를 구별하는, 즉, CD38 낮은 발현 정상 세포가 아닌 CD38 높은 발현 종양 세포를 선택적으로 사멸시키는 상기 CAR2-항CD38 CAR-T 세포의 능력은 중요한 임상적 이점을 제공한다.

## 실시예

[0229] 하기 실시예는 예시를 위한 것으로 여겨지며, 본 개시 내용의 실시형태를 더 이해하기 위해 사용될 수 있으며, 어떠한 방식으로든 본 교시 내용의 범위를 제한하는 것으로 해석되지 말아야 한다.

### 실시예 1: 세포주, 항체 및 CD38-Fc 융합 단백질

[0231] 비교적 높은 수준으로 CD38을 발현하는 (문헌 [Genty et al., *Leuk Res* 28(3): 307-313, 2004]) 사람 형질세포 종/다발성 골수종 세포주 RPMI8226 (문헌 [Dalton et al., 1986 *Cancer Research* 46: 5125-5130]) 및 CD38 음성인 (문헌 [Gregorini, Tomasetti et al., 2006, *Cell Biology International* 30(9): 727-732]) 사람 만성

골수성 백혈병 세포주 K562는 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션 (American Type Culture Collection) (Rockville, MD)으로부터 구입하였다. 루시퍼라아제 및 녹색 형광 단백질 융합 단백질 (Luc-GFP)을 발현하는 RPMI8226 세포는 본 발명자들에 의해 생성된 Luc-GFP 발현 레트로바이러스 벡터로 레트로바이러스 매개된 형질 도입에 의해 생성되었다. 모든 세포를 10% 열-불 활성화된 소 테아 혈청, 100 U/ml 페니실린, 100  $\mu$ g/ml 스트렙토마이신으로 보충된 RPMI1640 배지에서 성장시켰다.

[0232] R-피코에리트린 (PE)-컨쥬게이트된 마우스 항-myc 태그 단클론 항체 (mAb)는 R & D Systems (Minneapolis, MN)로부터 구입하였다. FITC-컨쥬게이트된 염소 항-Myc 태그 다클론 항체는 Abcam (Cambridge, MA)으로부터 구입하였다. 마우스 항-사람 CD38 mAb는 Biologen (San Diego, CA)로부터 구입하였다. PE-컨쥬게이트된 염소 항-사람 IgG 항체는 Southern Biotech (Birmingham, AL)로부터 구입하였다. APC-컨쥬게이트된 마우스 항-사람 CD3은 BD Bioscience (San Diego, CA)로부터 구입하였다.

[0233] 아미노산 19 내지 238의 사람 CD38 세포외 도메인 및 N-말단의 사람 IgG1 Fc 영역으로 이루어진 CD38-Fc 융합 단백질은 Creative BioMart (Shirley, NY)로부터 구입하였다

#### 실시예 2: CAR2-항CD38 CAR에 의한 T 세포의 레트로바이러스 매개개된 형질 도입

[0235] CAR에 의한 T 세포의 레트로바이러스 매개된 형질 도입을 문헌 [Ma et al., 2004 *The Prostate* 61:12-25; and Ma et al., *The Prostate* 74(3):286-296, 2014] (이)의 개시 내용은 그 전문이 본 출원에 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같이 수행하였다. 간단히 말하자면, FuGene 시약 (Promega, Madison, WI)을 사용하여 상기 레트로바이러스 벡터 DNA를 Phoenix Ecotropic 293 세포 내로 형질 감염시키고, 일시적인 바이러스 상청액을 사용하여 PG13 패키징 세포를 형질 도입하였다. PG13 세포로부터의 바이러스 상청액을 사용하여, CAR2-항CD38 CAR을 안정적으로 발현시키기 위해 활성화된 T 세포를 형질 도입시켰다.  $5 \times 10^6$  개의 활성화된 사람 T 세포를 3 ml의 바이러스 상청액으로 10  $\mu$ g/ml 레트로넥틴 (Clontech, Mountain View, CA) 사전-코팅된 6-웰 플레이트에 형질 도입하고, 1000 g로 1 시간 동안 32°C에서 원심 분리하였다. 필요에 따라 형질 도입 절차를 반복하였다. 5% FBS로 보충된 AIM-V 성장 배지 (GIBCO-Thermo Fisher Scientific, MA, Waltham, MA)에서 2일 동안 100 ng/ml 마우스 항-사람 CD3 항체 OKT3 (Orth Biotech, Rartian, NJ) 및 300~1000 U/ml IL2로 정상적인 건강한 공여자 말초 혈액 단핵 세포 (peripheral blood mononuclear cell: PBMC)를 활성화시킴으로써 활성화된 사람 T 세포를 제조하였다. 형질 도입 후, 5% FBS 및 300~1000 U/ml IL2로 보충된 AIM-V 성장 배지에서 상기 형질 도입된 T 세포를 확장시켰다.

#### 실시예 3: 웨스턴 블로트

[0237] 막 추출 키트 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)를 사용하여 비-형질 도입된 T 세포 및 CAR2-항CD38 CAR 형질 도입된 T 세포의 막 분획을 추출하였다. 샘플을 나트륨 도데실 살파이트 (sodium dodecyl sulfate: SDS) 샘플 완충액 중에서 10% 2-머캅토에탄올 ( $\beta$ -ME)의 존재 (환원 조건) 또는 부재 (비환원 조건)하에 변성시키고, 4~12% SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기 영동 겔 상에서 분해한 후 폴리비닐 덴 디플루오라이드 (polyvinyl Dene difluoride: PVDF) 막 (Thermo Fisher Scientific, MA, Waltham, MA) 상으로 전기 이동시켰다. 상기 막을 1~2 시간 동안 Tris-완충된 식염수 (20 mM Tris/500 mM NaCl, pH 7.5) 중의 5% 탈지 분유로 차단하였다. 막을 TBST (0.05% Tween-20을 함유하는 Tris-완충된 식염수)로 세척하고, 이어서 1 시간 동안 1:1000의 희석으로 항-CD3  $\zeta$  항체 (BD, San Jose, CA)와 함께 인큐베이션시킨 후, 1 시간 동안 1:5000의 희석으로 서양 고추냉이 페옥시다아제 (horseradish peroxidase: HRP)-컨쥬게이트된 염소 항-마우스 IgG 항체 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)와 함께 인큐베이션시키고, 모두를 TBST 중의 5% 탈지 분유 중에서 수행하였다. 상기 막을 ECL 화학 발광 기판 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)으로 개발하였으며, 화학 발광 신호를 ChemiDoc Imaging Systems (Bio-Rad, Hercules, CA)로 검출하였다 (도 2).

#### 실시예 4: 유세포 계측 분석

[0239] 세포 표면 상에서 CD38의 발현을 검출하기 위해, 유세포 계측 검정을 수행하였다. 세포를 30분 동안 50  $\mu$ l의 결합 완충액 (10% 말 혈청을 함유하는 RPMI 1640) 중의 마우스 항-사람 CD38 mAb와 함께 인큐베이션시켰다. 이어서, 상기 세포를 PBS로 세척하고, 동일한 조건하에 APC-컨쥬게이트된 염소 항-마우스 IgG 항체와 함께 인큐ベ이션시켰다. PBS로 세척한 후, 상기 샘플을 Attune NxT 유세포 측정기 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 상에서 분석하였다. 상기 형질 도입된 T 세포 상에서 상기 CAR2-항CD38 CAR을 검출하기 위해, 세포를 PE-컨쥬게이트된 마우스 항-myc 태그 mAb로 30분 동안 염색하고, 유세포 측정기로 분석하였다. CAR2-항CD38 CAR-T 세포의 항원 결합 활성의 분석을 위해,  $1 \times 10^6$  개의 비-형질 도입된 대조군 T 세포 또는 형질 도입된 CAR-T 세

포를 CD38-Fc 융합 단백질과 함께 인큐베이션시킨 후, PE-컨쥬게이트된 염소 항-사람 IgG 항체 및 FITC-컨쥬게이트된 염소 항-myc 항체를 염색하고, 상기 샘플을 유세포 측정기로 분석하였다.

#### [0240] 실시예 5: T 세포 활성화 검정

비-형질 도입된 대조군 T 세포 및 CAR2-항CD38 CAR-형질 도입된 T 세포를 K562 또는 RPMI8226 종양 세포로 마이크로타이터 플레이트에서 자극하였다. 사이토카인 생산 검정을 위해,  $1 \times 10^5$  세포/웰의 비-형질 도입된 대조군 T 세포 또는 CAR2-항CD38 CAR-형질 도입된 T 세포를 성장 배지에서  $1 \times 10^5$  세포/웰의 K562 또는 RPMI8226과 혼합하였다. 24 시간 동안 배양한 후, 배양 상청액을 수확하고, eBioscience (San Diego, CA)로부터의 ELISA 검정 키트로 IL2 및 IFN $\gamma$ 에 대해 측정하였다. CAR-T 세포 항원-특이적 클론 확장 검정을 위해, K562 및 RPMI8226 종양 세포를 먼저 37°C에서 1.5 시간 동안 50 uM의 미토마이신 C (MMC, R & D, Minneapolis, MN)로 처리하여 상기 세포를 증식으로부터 정지시킨 후,  $2.5 \times 10^5$  세포/웰로 48-웰 플레이트에 씨딩하였다.  $1 \times 10^6$  세포/웰의 형질 도입된 CAR-T 세포를 상기 종양 세포에 첨가하고, 300 U/ml IL2와 함께 37°C에서 7일 동안 공동 배양하였다. 세포를 수확하고, APC-컨쥬게이트된 항-CD3 및 FITC-컨쥬게이트된 항-myc 항체로 염색하고, 항원-특이적 CAR-T 세포 클론 확장에 대해 유세포 측정기로 분석하였다. 모든 실험을 3회 수행하였다.

#### [0242] 실시예 6: T 세포 세포독성 검정

CAR2-항CD38 CAR-T 세포의 세포독성을 DELFIA 세포독성 검정 (PerkinElmer, Waltham, MA)으로 측정하였다. K562 및 RPMI8226 종양 세포를 37°C에서 25분 동안 형광 증진 리간드로 먼저 로딩하였다. 이어서,  $2.5 \times 10^3$  세포/웰의 K562 또는  $5 \times 10^3$  세포/웰의 RPMI8226 종양 세포를 다양한 효과기:표적 (E:T) 비로 비-형질 도입된 대조군 또는 형질 도입된 T 세포와 혼합하고, 2 시간 동안 배양하였다. 20  $\mu$ l/웰의 상청액을 수확하고, 유로퓸 용액을 첨가하여 형광 킬레이트를 형성함으로써 방출된 리간드에 대해 분석하였다. 시간 분해 형광 (Time-Resolved Fluorescence: TRF)을 TRF 가능한 플레이트 판독기 Cytaion 5 (BioTek instruments, Winooski, VT) 상에서 측정하였다. 다음 수학식을 사용하여 세포독성을 계산하였다: % 비용해 (Specific Lysis) = (실험 - 자발) / (최대 - 자발) \* 100.

#### [0244] 실시예 7: NSG 마우스에서 MM 이종 이식의 처리

실험실 동물의 관리 및 사용에 대한 지침에 따라 모든 동물 실험을 수행하였다. Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME)로부터 구입한 8주령 암컷 NSG 면역 결핍 마우스에 꼬리 정맥을 통해  $1 \times 10^7$  개의 Luc-GFP 라벨링된 RPMI8226 세포를 정맥내 (i.v.) 접종하였다. IVIS Spectrum In Vivo Imaging System (PerkinElmer, Waltham, MA)을 사용하는 생물 발광 이미징에 의해 종양 부하를 매주 측정하였다. IVIS 측정 가능한 전신성 종양이 23일 째에 형성된 후, 마우스에  $1 \times 10^7$  개의 비-형질 도입된 대조군 T 세포 또는 형질 도입된 CAR-T 세포로 정맥내 주사하였다. 1  $\mu$ g의 사람 IL15를 T 세포 주사 전날부터 5일 연속으로 복강내 주사를 통해 매일 투여하여 T 세포 생착을 증진시켰다. 종양 부하를 매주 측정하였다. T 세포 주사 후 3 시간째에, 1일째에, 2일째에, 이어서 매주 말초 혈액 샘플을 꼬리 정맥 출혈에 의해 채취하고, 그룹별로 함께 폴링하였다. APC-컨쥬게이트된 마우스 항-사람 CD3 및 PE-컨쥬게이트된 마우스 항-myc 항체를 사용하여 유세포 분석에 의해 T 세포 생착 및 확장을 측정하였다. Bio-Rad Luminex Assays (Bio-Rad, Hercules, CA)를 사용하여 사람 사이토카인 IFN $\gamma$ , IL2 및 TNF $\alpha$ 의 혈액 수준을 측정하였다. 체중의 > 15% 손실, 털의 손실 및 빈사 상태로 입증되는 바와 같이, 질병 진행 및 명백한 독성, 예를 들어, GVHD의 징후에 대해 동물을 모니터링하였다. 생존 연구에 대한 종료점은, 마우스가 체중의 15% 초과를 손실하거나 빈사 상태가 된 날이었다.

[0246]

## [표 1]

서열 번호	서열	설명
	APGKGLEWVASVSNGRPTYYADSVRGRFTISRDNAKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCAREDWGGEFTDWGRGLVT VSSGGGGSGGGSGGGGSQAGLTQPPSASGTSGQRVTIS CSGSSNIGINFVYWYQHLPGTAPKLLIYKNNQRPSGVPD RFSGSKSGNSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGYV FGSGTKVTVL	
13	FS1 5'- ACACAGTCCTGCTGACCA -3'	서열 분석 프라이머
14	FS5 5'- GGGAGTCATGTTCATGTAG-3'	서열 분석 프라이머
15	BS2 5'- TGGTGATATTGTTGAGT -3'	서열 분석 프라이머
16	QVQLVESGGVVQPGGSLRLSCAASGFIVSTNYVHWVR QAPGKGLEWVSGIYSDPYTSYAYSDSVKGRFTISRDMSK NTVYLQMNRRLRAEDTAVYYCARENTGFSNSWYLD FW GQGTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSQVLTQPPSASGTP GQRVTISCGSSSNIGRNIVNWYQQLPGTPKLLIYSNNQ RPSGVPDFSGSKSGTSASLAISGLHSEDEADYYCATWD DSLNGWVFGGGTKLTVL	CD38D8 scFv
17	AKPTTTPAPRPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHT RGLDFAPRKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKP	힌지 서열 - 아미노산
18	KIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPF WVLVVVGGVLACYSLLTVAFIIFWVRSKRSRLLHS DY MNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	CD28 전장 - 아미노산
19	MEWSWVFLFLSVTTGVHS DIEQKLISEDLQVQLVESG GGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDDYMSWIRQAPGKGLE WVASVSNGRPTYYADSVRGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREDWGGEFTDWGRGLVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSQAGLTQPPSASGTSGQRVTISCGSSSN IGINFVYWYQHLPGTAPKLLIYKNNQRPSGVPDFSGSKS GNSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGYVFGSGTKV	마우스 항체 중쇄 유래의 신호 펩타이드
20	MEWSWVFLFLSVTTGVHS DIEQKLISEDLQVQLVESG GGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDDYMSWIRQAPGKGLE WVASVSNGRPTYYADSVRGRFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREDWGGEFTDWGRGLVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSQAGLTQPPSASGTSGQRVTISCGSSSN IGINFVYWYQHLPGTAPKLLIYKNNQRPSGVPDFSGSKS GNSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGYVFGSGTKV	CD38A2 CAR - 아미노산

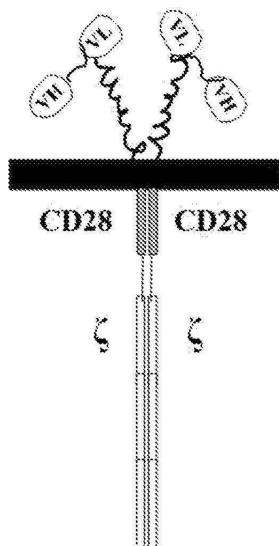
[0247]

서열 번호	서열	설명
	TVLAKPTTPAPRPPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFAKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKFWVLVVGGVLACYSLLVTVAIFIWFVRSKRS RLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPQYAPPRDFAAYRSRV KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG RDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	
21	MEWSWVFLFLSVTTGVHSDIEQKLISEEDLQVQLVESG GGVVPGGSLRLSCAASGFIVSTNYVHWVRQAPGKGLE WVSGIYSDPYTSYAYSDSVKGRFTISRDMSKNTVYLQMN RLRAEDTAVYYCARENTNTGFSNSWYLDFWGQGTLVTVS SGGGGSGGGGSGGGGSQPVLTQPPSASGTPGQRTISCS GSSSNIGRNIVNWYQQLPGTPKLLIYSNNQRPSGVPDRF SGSKSGTSASLAISGLHSEDEADYYCATWDDSLNGWVFG GGTKLTVLAKPTTPAPRPPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAHVTRGLDFAKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGK HLCPSPPLFPGPSKFWVLVVGGVLACYSLLVTVAIFIWF VRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPQYAPPRDFA AYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDV LDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR	CD38D8 CAR - 아미노산
22	GAGCAGAACGCTTATCTCCAGGAAGATCTG	사람 cmyc 태그를 암호화하는 DNA 서열

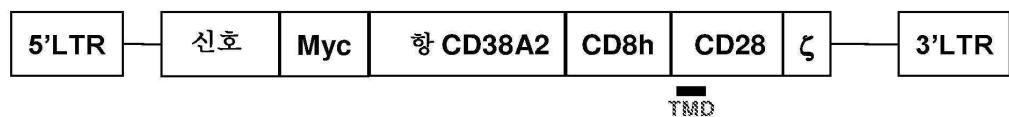
## 도면

### 도면 1a

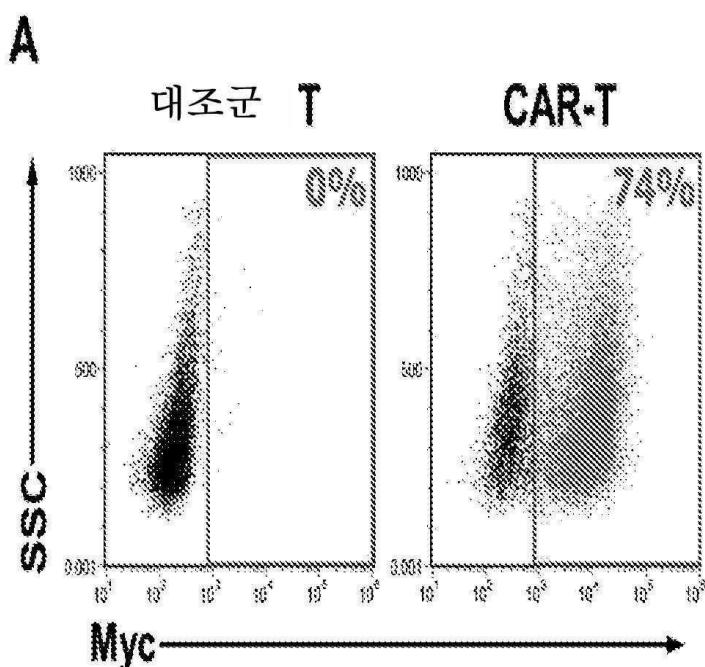
#### IgCD28TCR



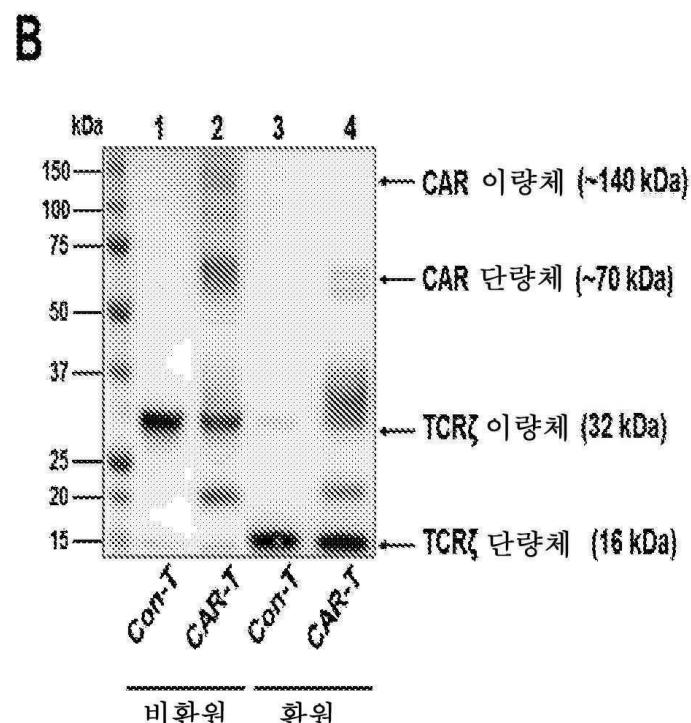
도면1b



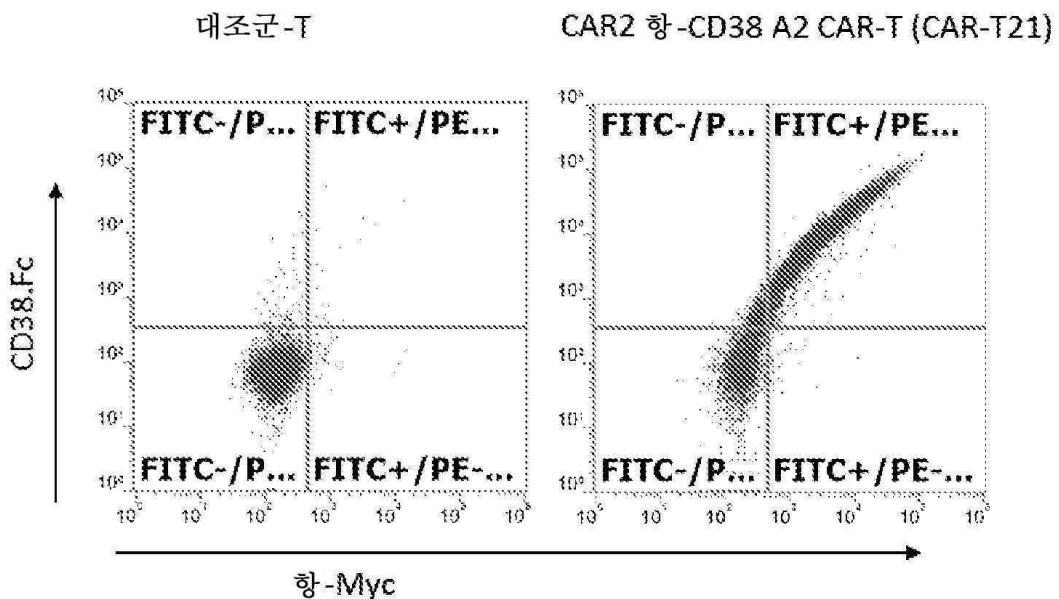
도면2a



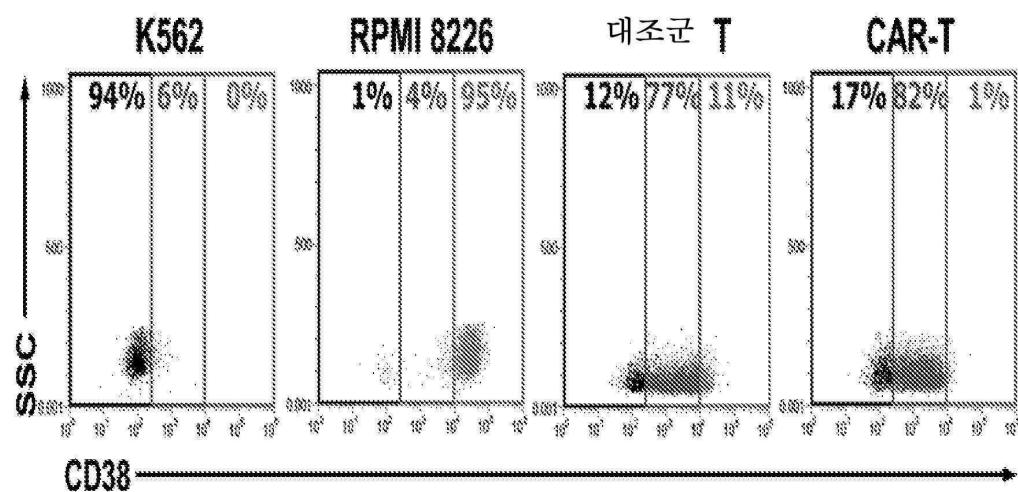
도면2b



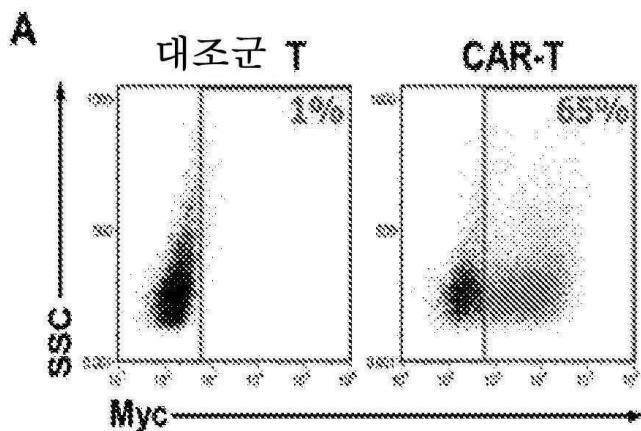
## 도면3



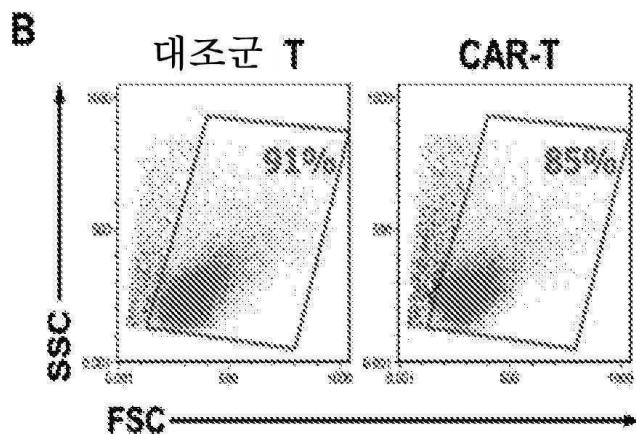
도면4



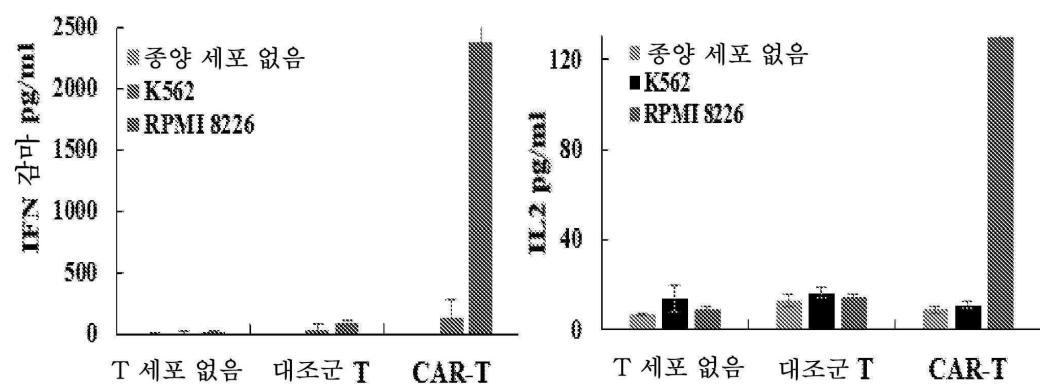
### 도면5a



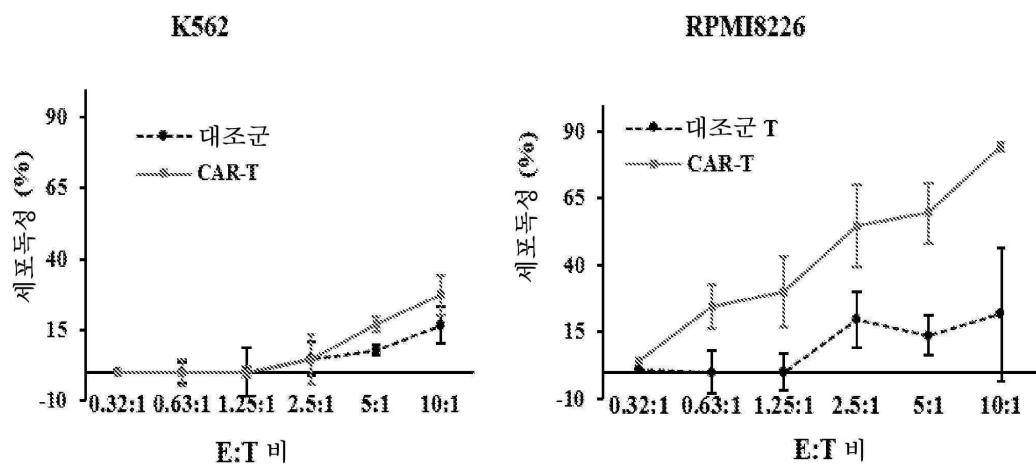
도면5b



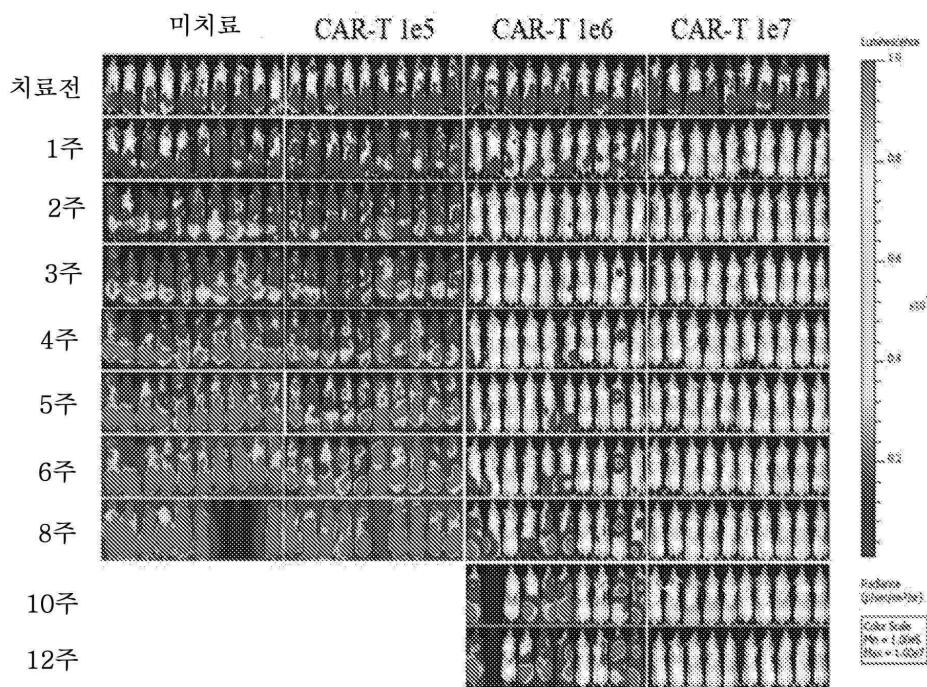
도면6



도면7



## 도면8



## 서 열 목록

<110> SORRENTO THERAPEUTICS, INC.

<120> CD38-DIRECTED CAR CONSTRUCTS

<130> T103019 1210W0

<140> Not Yet Assigned

<141> 2018-11-02

<150> 62/581,466

<151> 2017-11-03

<160> 22

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asp

20                    25                    30

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

35                    40                    45

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

50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

85                    90                    95

Ala Arg Glu Asp Trp Gly Gly Glu Phe Thr Asp Trp Gly Arg Gly Thr

100                  105                  110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 2

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

1                    5                    10                    15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Val Ser Thr Asn

20                    25                    30

Tyr Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35                    40                    45

Ser Gly Ile Tyr Ser Asp Pro Tyr Thr Ser Tyr Ala Tyr Ser Asp Ser

50                    55                    60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Met Ser Lys Asn Thr Val

65                    70                    75                    80

Tyr Leu Gln Met Asn Arg Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85                    90                    95

Cys Ala Arg Glu Thr Asn Thr Gly Phe Ser Asn Ser Trp Tyr Leu Asp

100	105	110
Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
115	120	
<210> 3		
<211> 110		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 3		
Gln Ala Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Ser Gly Gln		
1	5	10
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Asn Ile Gly Ile Asn		
20	25	30
Phe Val Tyr Trp Tyr Gln His Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu		
35	40	45
Ile Tyr Lys Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser		
50	55	60
Gly Ser Lys Ser Gly Asn Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg		
65	70	75
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu		
85	90	95
Ser Gly Tyr Val Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr Val Leu		
100	105	110
<210> 4		
<211> 110		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 4		
Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln		
1	5	10
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Asn Ile Gly Arg Asn		
20	25	30
Ile Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Thr Pro Lys Leu Leu		

35	40	45
Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser		
50	55	60
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu His		
65	70	75
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu		
85	90	95
Asn Gly Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu		

100	105	110
-----	-----	-----

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

&lt;400&gt; 5

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

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

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 46

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 6

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

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

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

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 7

Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser

1 5 10 15

Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro

20 25 30

Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro

35 40

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 8

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

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val

20 25

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 41

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

35 40

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 113

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 10

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Arg

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1 5 10

<210> 12

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 12

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

1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asp			
20	25	30	
Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35	40	45	
Ala Ser Val Ser Asn Gly Arg Pro Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
50	55	60	
Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Glu Asp Trp Gly Glu Phe Thr Asp Trp Gly Arg Gly Thr			
100	105	110	
Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser			
115	120	125	
Gly Gly Gly Ser Gln Ala Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser			
130	135	140	
Gly Thr Ser Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser			
145	150	155	160
Asn Ile Gly Ile Asn Phe Val Tyr Trp Tyr Gln His Leu Pro Gly Thr			
165	170	175	
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val			
180	185	190	
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Ser Ala Ser Leu Ala			
195	200	205	
Ile Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala			
210	215	220	
Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Tyr Val Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val			
225	230	235	240
Thr Val Leu			

&lt;210&gt; 13

<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><221> source  
<223>  
> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide"  
<400> 13  
acacagtcc gctgacca 18  
<210> 14  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><221> source  
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide"  
<400> 14  
gggagtcatg ttcatgttag 19  
<210> 15  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><221> source  
<223>  
/note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
oligonucleotide"  
<400> 15  
tggtgatatt gtttgagt 17  
<210> 16  
<211> 249  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><221> source  
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide"

&lt;400&gt; 16

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Val Ser Thr Asn

20 25 30

Tyr Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Gly Ile Tyr Ser Asp Pro Tyr Thr Ser Tyr Ala Tyr Ser Asp Ser

50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Met Ser Lys Asn Thr Val

65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Arg Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Glu Thr Asn Thr Gly Phe Ser Asn Ser Trp Tyr Leu Asp

100 105 110

Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly

115 120 125

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Pro Val Leu Thr

130 135 140

Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser

145 150 155 160

Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Arg Asn Ile Val Asn Trp Tyr

165 170 175

Gln Gln Leu Pro Gly Thr Thr Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Asn Asn

180 185 190

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

195 200 205

Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu His Ser Glu Asp Glu Ala

210 215 220

Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Trp Val Phe

225 230 235 240

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

245

<210> 17

<211> 88

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Pro Arg

35 40 45

Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser

50 55 60

Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro

65 70 75 80

Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro

85

<210> 18

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser

1 5 10 15

Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro

20 25 30

Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly

35 40 45

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

50 55 60

Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met  
 65                    70                    75                    80  
 Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro  
 85                    90                    95  
 Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser  
 100                  105

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus sp.

&lt;400&gt; 19

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly

1                    5                    10                    15  
 Val His Ser

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 541

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide"

&lt;400&gt; 20

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly

1                    5                    10                    15  
 Val His Ser Asp Ile Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gln  
 20                  25                  30

Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser  
 35                  40                  45

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asp Tyr  
 50                  55                  60

Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala  
 65                  70                  75                  80

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

85	90	95
----	----	----

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

100	105	110
-----	-----	-----

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

115	120	125
-----	-----	-----

Arg Glu Asp Trp Gly Gly Glu Phe Thr Asp Trp Gly Arg Gly Thr Leu

130	135	140
-----	-----	-----

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

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Gly Gly Gly Ser Gln Ala Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly

165	170	175
-----	-----	-----

Thr Ser Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Asn

180	185	190
-----	-----	-----

Ile Gly Ile Asn Phe Val Tyr Trp Tyr Gln His Leu Pro Gly Thr Ala

195	200	205
-----	-----	-----

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro

210	215	220
-----	-----	-----

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Ser Ala Ser Leu Ala Ile

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp

245	250	255
-----	-----	-----

Asp Asp Ser Leu Ser Gly Tyr Val Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Thr

260	265	270
-----	-----	-----

Val Leu Ala Lys Pro Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro

275	280	285
-----	-----	-----

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

290	295	300
-----	-----	-----

Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser

325	330	335
Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro		
340	345	350
Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly		
355	360	365
Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile		
370	375	380
Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met		
385	390	395
Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro		
400	405	410
Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe		
420	425	430
Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu		
435	440	445
Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp		
450	455	460
Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg		
465	470	475
Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met		
480	485	490
Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly		
500	505	510
Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp		
515	520	525
Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg		
530	535	540
<210>		
21		
<211> 547		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		

&lt;220&gt;&lt;221&gt; source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide"

&lt;400&gt; 21

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gln

20 25 30

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

35 40 45

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Val Ser Thr Asn Tyr

50 55 60

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

65 70 75 80

Gly Ile Tyr Ser Asp Pro Tyr Thr Ser Tyr Ala Tyr Ser Asp Ser Val

85 90 95

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Met Ser Lys Asn Thr Val Tyr

100 105 110

Leu Gln Met Asn Arg Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

115 120 125

Ala Arg Glu Thr Asn Thr Gly Phe Ser Asn Ser Trp Tyr Leu Asp Phe

130 135 140

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

145 150 155 160

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Pro Val Leu Thr Gln

165 170 175

Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys

180 185 190

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Arg Asn Ile Val Asn Trp Tyr Gln

195 200 205

Gln Leu Pro Gly Thr Thr Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Asn Asn Gln

210 215 220

Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr  
 225 230 235 240

Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu His Ser Glu Asp Glu Ala Asp  
 245 250 255

Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Trp Val Phe Gly  
 260 265 270

Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala  
 275 280 285

Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser  
 290 295 300

Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr  
 305 310 315 320

Arg Gly Leu Asp Phe Ala Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr  
 325 330 335

Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys  
 340 345 350

His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp  
 355 360 365

Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val  
 370 375 380

Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu  
 385 390 395 400

Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr  
 405 410 415

Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr  
 420 425 430

Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln  
 435 440 445

Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu  
 450 455 460

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

465                  470                  475                  480

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

485                  490                  495

Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys

500                  505                  510

Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu

515                  520                  525

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

530                  535                  540

Pro Pro Arg

545

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

gagcagaagg ttatctccga ggaagatctg                  30