

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2022-0167330
(43) 공개일자 2022년12월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/725 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/7051 (2013.01)
A61K 39/001113 (2018.08)
- (21) 출원번호 10-2022-7039524
- (22) 출원일자(국제) 2021년04월01일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년11월11일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2021/085062
- (87) 국제공개번호 WO 2021/208750
국제공개일자 2021년10월21일
- (30) 우선권주장
202010301357.9 2020년04월16일 중국(CN)

- (71) 출원인
상하이 셀룰라 바이오파마슈티칼 그룹 엘티디.
중국 상하이 (우편번호 201210) 푸둥 뉴 디스트릭트 팔라디 로드 넘버 85 빌딩 3
- 우시 셀룰라 바이오파마슈티칼 그룹 리미티드
중국 214174 장쑤 우시 우시 후이산 이코노믹 디벨롭먼트 존 후이산 로드 1699 빌딩 7 퍼스트 플로어 에이 에리어 세컨드 플로어 에이 에리어 세컨드 플로어 비 에리어
- (72) 발명자
야오, 이홍
중국 201210 상하이 푸둥 뉴 에리어 차이나 (상하이) 파일럿 프리 트레이드 존 팔라디 로드 85 빌딩 3
- 주, 린
중국 201210 상하이 푸둥 뉴 에리어 차이나 (상하이) 파일럿 프리 트레이드 존 팔라디 로드 85 빌딩 3
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 이상영

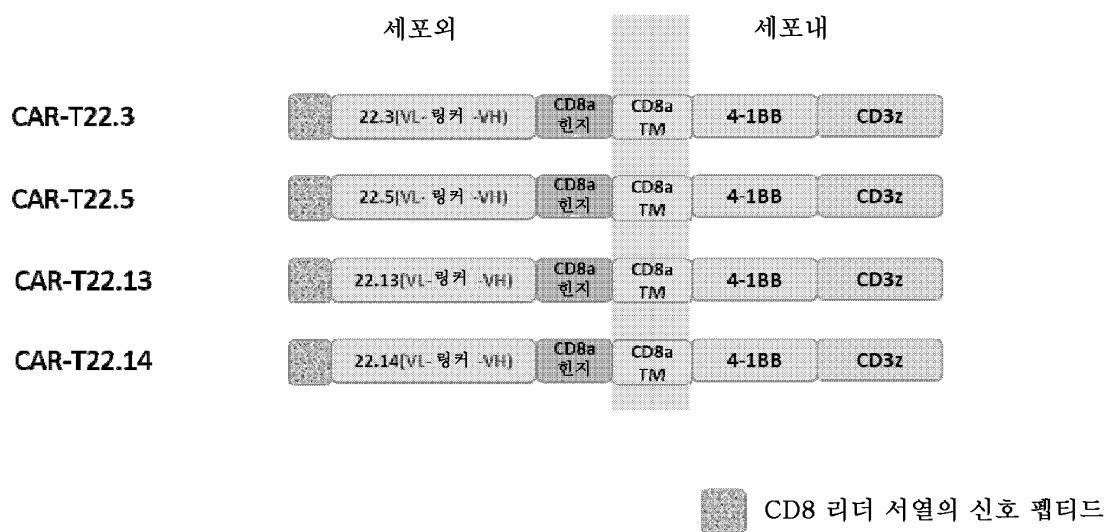
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 CD22-표적화된 키메라 항원 수용체, 그의 제조 방법 및 그의 적용

(57) 요약

CD22-표적화된 키메라 항원 수용체, 그의 제조 방법 및 그의 적용이 제공된다. 키메라 항원 수용체는 리더 서열, CD22-표적화된 scFv, 힌지 영역, 막횡단 영역 및 세포내 신호 도메인을 포함한다. 상기 키메라 항원 수용체를 코딩하는 핵산 분자 및 해당 발현 벡터, CAR-T 세포 및 그의 적용이 제공된다. 상기 키메라 항원 수용체는 CD22 양성 세포를 표적화하며, CD22-양성 B-세포 백혈병, 및 항-CD19 CAR-T 치료 후 급성 B-세포 백혈병이 재발된 일부 CD19-음성 및 CD22-양성 환자를 치료하는데 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/2803 (2013.01)

C07K 2317/53 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2319/02 (2013.01)

C07K 2319/03 (2013.01)

(72) 발명자

리, 옌펑

중국 201210 상하이 푸둥 뉴 에리어 차이나 (상하이) 파일럿 프리 트레이드 존 팔라디 로드 85 빌딩 3

웨이, 위톈

중국 201210 상하이 푸둥 뉴 에리어 차이나 (상하이) 파일럿 프리 트레이드 존 팔라디 로드 85 빌딩 3

야오, 신

중국 201210 상하이 푸둥 뉴 에리어 차이나 (상하이) 파일럿 프리 트레이드 존 팔라디 로드 85 빌딩 3

주, 스구이

중국 201210 상하이 푸둥 뉴 에리어 차이나 (상하이) 파일럿 프리 트레이드 존 팔라디 로드 85 빌딩 3

황, 자치

중국 201210 상하이 푸둥 뉴 에리어 차이나 (상하이) 파일럿 프리 트레이드 존 팔라디 로드 85 빌딩 3

장, 리

중국 201210 상하이 푸둥 뉴 에리어 차이나 (상하이) 파일럿 프리 트레이드 존 팔라디 로드 85 빌딩 3

명세서

청구범위

청구항 1

키메라 항원 수용체 (CAR)로서, 키메라 항원 수용체의 항원 결합 도메인 (즉 scFv)이 서열식별번호: 1 또는 3에 제시된 항체 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 2 또는 4에 제시된 항체 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 CAR.

청구항 2

제1항에 있어서, 항원 결합 도메인의 구조가 하기 화학식 I 또는 II에 제시되어 있으며:



여기서 V_H 는 항원 중쇄 가변 영역이고; V_L 은 항원 경쇄 가변 영역이고; "-"는 연결 펩티드 또는 펩티드 결합임;

바람직하게는, 항원 결합 도메인의 구조가 화학식 I에 제시된 바와 같은 것임을

특징으로 하는 CAR.

청구항 3

제2항에 있어서, V_L 의 아미노산 서열이 서열식별번호: 1에 제시되어 있고, V_H 의 아미노산 서열이 서열식별번호: 2에 제시되어 있는 것임을 특징으로 하는 CAR.

청구항 4

제2항에 있어서, V_L 의 아미노산 서열이 서열식별번호: 3에 제시되어 있고, V_H 의 아미노산 서열이 서열식별번호: 4에 제시되어 있는 것임을 특징으로 하는 CAR.

청구항 5

제1항에 있어서, 키메라 항원 수용체의 구조가 하기 화학식 III에 제시되어 있는 것임을 특징으로 하는 CAR:



여기서,

L은 임의적인 리더 서열, 즉 신호 펩티드이고;

H는 힌지 영역이고;

TM은 막횡단 도메인이고;

C는 공동자극 신호 분자이고;

CD3 ζ 는 CD3 ζ 로부터 유래된 세포질 신호전달 서열이고;

V_H , V_L 및 "-"는 상기 정의된 바와 같음.

청구항 6

제1항에 기재된 바와 같은 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 것을 특징으로 하는 핵산 분자.

청구항 7

제6항에 기재된 바와 같은 핵산 분자를 함유하는 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 8

제7항에 기재된 바와 같은 벡터 또는 제6항에 기재된 바와 같은 외인성 핵산 분자와 통합된 염색체를 함유하거나 또는 제1항에 기재된 바와 같은 CAR을 발현하는 것을 특징으로 하는 숙주 세포.

청구항 9

제1항에 기재된 바와 같은 키메라 항원 수용체, 제6항에 기재된 바와 같은 핵산 분자, 제7항에 기재된 바와 같은 벡터, 또는 제8항에 기재된 바와 같은 숙주 세포, 및 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 함유하는 것을 특징으로 하는 제제.

청구항 10

암 또는 종양을 예방 및/또는 치료하기 위한 약물 또는 조제물을 제조하는데 사용되는, 제1항에 기재된 바와 같은 키메라 항원 수용체, 제6항에 따른 핵산 분자, 제7항에 기재된 바와 같은 벡터, 또는 제8항에 기재된 바와 같은 숙주 세포, 또는 제9항에 기재된 바와 같은 제제의 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생물의약 분야, 보다 상세하게는 CD22-표적화된 키메라 항원 수용체, 그의 제조 방법 및 그의 적용에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 혈액 악성종양은 인간 악성종양의 대략 10%를 차지하며, 혈액 악성종양 중 95%는 B 림프구로부터 유래된다. 통상적인 화학요법 및 방사선요법이 혈액 악성종양의 치료에서 중요한 역할을 하지만, 통상적인 암 치료 방법은 장애에 직면해 있으며, 수술, 방사선요법 및 화학요법은 불량한 특이성, 분명한 부작용, 그리고 높은 재발 및 전이를 갖는다. 일부 환자가 유의한 반응을 갖기는 하지만, 대부분 치유가 어려운 것으로 입증되고 있다. 따라서, 이와 같은 분야에서는, 더 효과적인 새로운 치료 방법이 항상 탐색의 초점이 되어 왔다.

[0003] 암 치료의 초점은 가장 유망한 종양 면역요법으로 돌아서고 있다. 지금까지, 2종의 CD19-표적화된 키메라 항원 수용체 T-세포 요법 (CAR-T) 제품이 승인되었으며, 어린이 및 젊은 성인 환자에서의 급성 림프모구성 백혈병의 치료, 및 성인에서의 재발성 또는 불응성 대형 B-세포 림프종에 대한 2차-라인 또는 다중-라인 전신성 요법용으로 해외에서 판매되고 있다. 그러나, 항-CD19 CAR-T 치료 후, 환자 중 40%는 치료 1개월차에 완전 관해를 달성한 후 재발되었으며, 재발된 환자 중 60% 초과는 CD19-음성 종양 세포 회피를 나타내었다. 일부 환자에서는, 종양 세포에서의 CD19의 발현이 제한되며, 그들이 항-CD19 CAR-T 세포 요법을 받았을 때 종종 반응 없음 또는 약물 내성이 관찰된다. 따라서, 악성 림프종이 있는 환자를 치료하기 위한, CD19가 아닌 다른 B-세포 백혈병-관련 항원을 표적화하는 CAR-T 구조를 스크리닝하는 것이 시급하다.

[0004] 항-CD19 CAR-T가 뛰어난 효능을 갖기는 하지만, B 세포에서의 CD19 항원 발현이 결여되어 있는 일부 백혈병 환자에서는 그것이 비효과적이며; 일부 환자는 항-CD19 CAR-T 치료 후 CD19 항원의 발현이 감소되거나 심지어는 상실됨으로써 만족스럽지 않은 치료 결과 및 CD22의 계속 지속되는 발현을 동반한 용이한 재발로 이어지고 있다.

[0005] 이에 따라, 본 분야에서는, 종양의 치료를 위한 새롭고 효과적인 약물을 개발할 시급한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

[0006] 본 발명의 목적은 CD22-표적화된 키메라 항원 수용체, 그의 제조 방법 및 그의 적용을 제공하는 것이다.

[0007] 구체적으로, 본 발명의 목적은 CD22-표적화된 키메라 항원 수용체의 서열, 그에 의해 변형된 T 세포 (CAR-T CD22)의 제조 방법 및 그의 활성 검정을 제공하는 것이다. 본 발명은 CD22-양성 B-세포 림프종의 치료를 위한 키메라 항원 수용체 구조를 제공한다.

[0008] 본 발명의 제1 측면에서는, 키메라 항원 수용체 (CAR)가 제공되며, 상기 키메라 항원 수용체의 항원 결합 도메인 (즉 scFv)은 서열식별번호(SEQ ID NO): 1 또는 3에 제시된 항체 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 2 또는 4

에 제시된 항체 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0009] 또 다른 바람직한 예에서, 항원 중쇄 가변 영역 및 항원 경쇄 가변 영역은 연결 펩티드에 의해 연결된다.

[0010] 또 다른 바람직한 예에서, 항원 결합 도메인의 구조는 하기 화학식 I 또는 II에 제시되어 있다:

[0011] V_L-V_H (I); V_H-V_L (II)

[0012] 상기 화학식에서, V_H 는 항원 중쇄 가변 영역이고; V_L 은 항원 경쇄 가변 영역이고; "-"는 연결 펩티드 또는 펩티드 결합이다.

[0013] 또 다른 바람직한 예에서, 항원 결합 도메인의 구조는 화학식 I에 제시되어 있다.

[0014] 또 다른 바람직한 예에서, V_L 의 아미노산 서열은 서열식별번호: 1에 제시되어 있고, V_H 의 아미노산 서열은 서열식별번호: 2에 제시되어 있다. (비교: CAR-T22.13)

[0015] 또 다른 바람직한 예에서, V_L 의 아미노산 서열은 서열식별번호: 3에 제시되어 있고, V_H 의 아미노산 서열은 서열식별번호: 4에 제시되어 있다. (비교: CAR-T22.14)

[0016] 또 다른 바람직한 예에서, 연결 펩티드의 아미노산 서열은 서열식별번호: 16에 제시되어 있다.

[0017] 또 다른 바람직한 예에서, 항원 결합 도메인은 CD22, 바람직하게는 인간 CD22에 결합한다.

[0018] 또 다른 바람직한 예에서, 항원 결합 도메인의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은 인간화된 항체 또는 인간 항체로부터 유래된다.

[0019] 또 다른 바람직한 예에서, 키메라 항원 수용체의 구조는 하기 화학식 III에 제시되어 있다:

[0020] $L-V_L-V_H-H-TM-C-CD3 \zeta$ (III)

[0021] 상기 화학식에서,

[0022] L은 임의적인 리더 서열, 즉 신호 펩티드이고;

[0023] H는 힌지 영역이고;

[0024] TM은 막횡단 도메인이고;

[0025] C는 공동자극 신호 분자이고;

[0026] $CD3 \zeta$ 는 $CD3 \zeta$ 로부터 유래된 세포질 신호전달 서열이고;

[0027] V_H , V_L 및 "-"는 상기 정의된 바와 같음.

[0028] 또 다른 바람직한 예에서, L은 CD8, CD28, GM-CSF, CD4 및 CD137, 또는 이들의 조합의 군으로부터 선택된 단백질의 신호 펩티드이다.

[0029] 또 다른 바람직한 예에서, L은 CD8로부터 유래된 신호 펩티드이다.

[0030] 또 다른 바람직한 예에서, L의 아미노산 서열은 서열식별번호: 9에 제시되어 있다.

[0031] 또 다른 바람직한 예에서, H는 CD8, CD28 및 CD137, 또는 이들의 조합의 군으로부터 선택된 단백질의 힌지 영역이다.

[0032] 또 다른 바람직한 예에서, H는 CD8 α 로부터 유래된 힌지 영역이다.

[0033] 또 다른 바람직한 예에서, H의 아미노산 서열은 서열식별번호: 10에 제시되어 있다.

[0034] 또 다른 바람직한 예에서, TM은 CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 및 CD154, 또는 이들의 조합의 군으로부터 선택된 단백질의 막횡단 영역이다.

[0035] 또 다른 바람직한 예에서, TM은 CD8 α 로부터 유래된 막횡단 영역이다.

[0036] 또 다른 바람직한 예에서, TM의 서열은 서열식별번호: 11에 제시되어 있다.

[0037] 또 다른 바람직한 예에서, C는 OX40, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD70, CD134, 4-1BB (CD137), PD1,

Dap10, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), NKG2D, GITR 및 TLR2, 또는 이들의 조합의 군으로부터 선택된 단백질의 공동자극 신호 분자이다.

- [0038] 또 다른 바람직한 예에서, C는 4-1BB 또는 CD28로부터 유래된 공동자극 신호 분자, 바람직하게는 4-1BB로부터 유래된 공동자극 신호 분자이다.
- [0039] 또 다른 바람직한 예에서, C의 아미노산 서열은 서열식별번호: 12에 제시되어 있다.
- [0040] 또 다른 바람직한 예에서, CD3 ζ의 아미노산 서열은 서열식별번호: 13에 제시되어 있다.
- [0041] 또 다른 바람직한 예에서, 키메라 항원 수용체의 아미노산 서열은 서열식별번호: 14 또는 15에 제시되어 있다.
- [0042] 본 발명의 제2 측면에서는, 본 발명의 제1 측면에 기재된 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 핵산 분자가 제공된다.
- [0043] 또 다른 바람직한 예에서, 핵산 분자는 단리된 것이다.
- [0044] 본 발명의 제3 측면에서는, 본 발명의 제2 측면에 기재된 핵산 분자를 함유하는 벡터가 제공된다.
- [0045] 또 다른 바람직한 예에서, 벡터는 DNA, RNA, 플라스미드, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터 (AAV), 레트로바이러스 벡터 및 트랜스포손, 또는 이들의 조합의 군으로부터 선택된다.
- [0046] 또 다른 바람직한 예에서, 벡터는 플라스미드 및 바이러스 벡터의 군으로부터 선택된다.
- [0047] 또 다른 바람직한 예에서, 벡터는 바이러스 입자의 형태로 존재한다.
- [0048] 또 다른 바람직한 예에서, 벡터는 렌티바이러스 벡터이다.
- [0049] 또 다른 바람직한 예에서, 벡터는 핵산 서열, 인핸서, 전사 종료 신호, 폴리아데닐화 서열, 복제 기원, 선택가능 마커, 핵산 제한 부위 및/또는 동종 재조합 부위에 작용가능하게 연결된 하나 이상의 프로모터를 포함한다.
- [0050] 본 발명의 제4 측면에서는, 본 발명의 제3 측면에 기재된 벡터 또는 본 발명의 제2 측면에 기재된 바와 같은 외인성 핵산 분자와 통합된 염색체를 함유하거나 또는 본 발명의 제1 측면에 기재된 CAR을 발현하는 숙주 세포가 제공된다.
- [0051] 또 다른 바람직한 예에서, 숙주 세포는 단리된 세포이다.
- [0052] 또 다른 바람직한 예에서, 숙주 세포는 유전적으로 조작된 세포이다.
- [0053] 또 다른 바람직한 예에서, 숙주 세포는 포유동물 세포이다.
- [0054] 또 다른 바람직한 예에서, 숙주 세포는 T 세포 또는 NK 세포, 바람직하게는 T 세포이다.
- [0055] 또 다른 바람직한 예에서, 숙주 세포는 CAR-T 세포 또는 CAR-NK 세포, 바람직하게는 CAR-T 세포이다.
- [0056] 본 발명의 제5 측면에서는, 조작된 면역 세포의 제조 방법이 제공되며, 상기 면역 세포는 본 발명의 제1 측면에 기재된 CAR을 발현하고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0057] (a) 조작된 면역 세포를 제공하는 단계; 및
- [0058] (b) 본 발명의 제2 측면에 기재된 핵산 분자 또는 본 발명의 제3 측면에 기재된 벡터를 면역 세포에 형질도입하여, 조작된 면역 세포를 수득하는 단계.
- [0059] 또 다른 바람직한 예에서, 조작된 면역 세포는 CAR-T 세포 또는 CAR-NK 세포이다.
- [0060] 또 다른 바람직한 예에서, 단계 (a)에서, 방법은 0.1-10% (바람직하게는 0.5%-5%, 보다 바람직하게는 0.8%-2%)의 인간 알부민을 함유하며, 여기서 인간 알부민의 함량은 배지의 총 중량을 기준으로 하여 계산된 것인 GT-551 무혈청 배지 중에서 조작된 면역 세포를 배양하는 것을 추가로 포함한다.
- [0061] 또 다른 바람직한 예에서, 방법은 수득된 조작된 면역 세포의 기능 및 유효성을 시험하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0062] 본 발명의 제6 측면에서는, 본 발명의 제1 측면에 기재된 키메라 항원 수용체, 본 발명의 제2 측면에 기재된 핵산 분자, 본 발명의 제3 측면에 기재된 벡터, 또는 본 발명의 제4 측면에 기재된 숙주 세포, 및 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 함유하는 제제가 제공된다.

- [0063] 또 다른 바람직한 예에서, 제제는 액체 제제이다.
- [0064] 또 다른 바람직한 예에서, 제제의 투약 형태는 주사제이다.
- [0065] 또 다른 바람직한 예에서, 제제 중 CAR-T 세포의 농도는 1×10^3 - 1×10^8 개 세포/ml, 바람직하게는 1×10^4 - 1×10^7 개 세포/ml이다.
- [0066] 본 발명의 제7 측면에서는, 본 발명의 제1 측면에 기재된 키메라 항원 수용체, 본 발명의 제2 측면에 기재된 핵산 분자, 본 발명의 제3 측면에 기재된 벡터, 또는 본 발명의 제4 측면에 기재된 숙주 세포, 또는 본 발명의 제6 측면에 기재된 제제의 용도가 제공되며, 상기 용도는 암 또는 종양을 예방 및/또는 치료하기 위한 약물 또는 조제물을 제조하기 위한 것이다.
- [0067] 또 다른 바람직한 예에서, 종양은 혈액 종양 및 고형 종양, 또는 이들의 조합의 군으로부터 선택된다.
- [0068] 또 다른 바람직한 예에서, 혈액 종양은 급성 골수성 백혈병 (AML), 다발성 골수종 (MM), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL) 및 미만성 대형 B-세포 림프종 (DLBCL), 또는 이들의 조합의 군으로부터 선택된다.
- [0069] 또 다른 바람직한 예에서, 고형 종양은 위 암종, 위 암종의 복막 전이, 간세포암, 백혈병, 신장 암종, 폐 암종, 소장 암종, 골 암종, 전립선 암종, 결장 및 직장 암종, 유방 암종, 결장직장 암종, 자궁경부 암종, 난소 암종, 림프종, 비인두 암종, 부신 종양, 방광 종양, 비소세포 폐 암종 (NSCLC), 신경교종 및 자궁내막 암종, 또는 이들의 조합의 군으로부터 선택된다.
- [0070] 또 다른 바람직한 예에서, 종양은 CD22-양성 종양, 바람직하게는 CD22-양성 B-세포 림프종, 다발성 골수종 또는 형질 세포 백혈병이다.
- [0071] 본 발명의 제8 측면에서는, 용기, 및 상기 용기 내에 위치되는 본 발명의 제2 측면에 기재된 핵산 분자 또는 본 발명의 제3 측면에 기재된 벡터를 포함하는, 본 발명의 제4 측면에 기재된 숙주 세포를 제조하는데 사용되는 키트가 제공된다.
- [0072] 본 발명의 제9 측면에서는, 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에게 적절한 양의 본 발명의 제3 측면에 기재된 벡터, 본 발명의 제4 측면에 기재된 숙주 세포, 또는 본 발명의 제6 측면에 기재된 제제를 투여하는 것을 포함하는, 질환을 치료하는 방법이 제공된다.
- [0073] 또 다른 바람직한 예에서, 질환은 암 또는 종양이다.
- [0074] 본 발명의 상기 기술적 특징 및 하기에서 상세하게 기재되는 기술적 특징 (예를 들어 실시양태)이 본 발명의 범주 내에서 조합되어 새롭거나 바람직한 기술적 해결책을 형성할 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 공간상의 제한으로 인하여, 그에 대해서는 여기에서 상술하지 않을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0075] 도 1은 CD22-표적화된 키메라 항원 수용체의 개략적 다이어그램이다. CAR의 구조는 리더 서열, 항원 인식 서열, 연결 영역, 막횡단 영역, 공동자극인자 신호 영역 및 CD3 제타 신호전달 영역을 포함한다.
- 도 2는 CD22-표적화된 키메라 항원 수용체에 의해 조작된 T 세포의 형질감염 효율 측정치를 제시한다. 배양 6 일차에서의 유동 세포측정법에 의해 제조한 인간 CD22 단백질의 Fc 단편을 사용한 염색을 통하여 CART-CD22 세포에서의 T 세포 막 표면 상에서의 CAR 유전자-코딩 단백질의 발현 수준을 분석하였다.
- 도 3a는 T 세포 막 표면 상에서의 CD137의 발현 수준을 제시한다. 도 3b는 배양 상청액에서의 IFN γ 의 분비 수준을 제시한다. 구체적으로, 6일차까지 배양된 1×10^5 개의 CART-CD22 세포를 채취하고, 각각 CD22-양성 K562-CD22+C7, K562-CD22+A4, H929-CD22+E12, Raji 라인 종양 세포, 및 CD22-음성 K562 라인 종양 세포 또는 무종양 세포와 함께 200 μ l의 GT-551 배지 중에서 1:1의 비로 18시간 동안 배양한 다음, 각각 T 세포 막 표면 상에서의 CD137의 발현 수준 및 배양 상청액에서의 IFN γ 의 분비 수준을 측정하였다.
- 도 4는 CART-CD22-유도된 종양 세포독성의 검정을 제시한다. 구체적으로, 1×10^4 개의 CD22-음성 종양 세포 (라인 K562) 또는 CD22-양성 종양 세포 (라인 K562-CD22+A4, H929-CD22+E12 및 Raji)를 채취하여, 각각 100 μ l의 GT-551 배지 중에서 8시간 동안 도면에 제시된 비로 해당 CART 세포와 함께 공동-배양한 후, 50 μ l의 배지

상청액을 채취하여, 50 μ l의 색소원성 기질 혼합물을 첨가하고, 30-분 커플링된 효소 반응을 수행하여 CAR-T 세포에 의해 인식 및 사멸된 후 종양 세포의 용해 동안 방출된 락테이트 데히드로제나제 (LDH)의 양을 검출하였는데, 여기서 생성된 적색 산물의 양은 용해된 세포의 수에 비례하였다. 이와 같은 도면은 CART-CD22-유도된 종양 세포독성의 백분율을 제시한다.

도 5는 CART-CD22-유도된 종양 세포의 후기 아포토시스 프로세스 동안의 CD107a 방출 수준의 검정을 제시한다. 구체적으로, 2×10^5 개의 CD22-음성 종양 세포 (라인 K562) 또는 CD22-양성 종양 세포 (라인 K562-CD22+A4, H929-CD22+E12 및 Raji) 및 1×10^5 개의 CAR-T 세포를 채취하여, 부피 기준 1:1의 비로 5시간 동안 200 μ l의 GT-551 배지 중에서 배양하고, CAR-T 세포가 CD22-양성 종양 세포에 의해 활성화된 후의 T 세포 탈과립과 연관된 막 단백질 CD107a의 발현 수준 변화를 검출하였다.

도 6a, 6b 및 6c는 CART-CD22 비교 실시예의 스크리닝 결과이다. 도 6a는 CD22-표적화된 키메라 항원 수용체에 의해 조작된 T 세포의 형질감염 효율 측정치를 제시한다. 단백질 L 염색에 의해, 6일차까지 배양된 CART-CD22 세포에서의 T 세포 막 표면 상에서의 CAR 유전자-코딩 단백질의 발현 수준을 검출하였다. 6일차까지 배양된 1×10^5 개의 CART-CD22 세포를 채취하여, 각각 CD22-양성 K562-CD22+ 종양 세포, 자연상 CD22-발현 Raji 라인 종양 세포, 및 CD22-음성 K562 종양 세포 또는 무종양 세포와 혼합한 후, 1:1의 비로 18시간 동안 200 μ l의 GT-551 배지 중에서 배양하고, 각각 T 세포 막 표면 상에서의 CD137의 발현 수준 (도 6b) 및 배양 상청액에서의 IFN γ 의 분비 수준 (도 6c)을 검출하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0076] 광범위하고 심도있는 연구 및 반복적인 스크리닝을 통하여, 본 발명자들은 CD22를 효과적으로 표적화할 수 있는 키메라 항원 수용체를 처음으로 발견하였다. 키메라 항원 수용체의 세포외 항원 결합 도메인은 서열식별번호: 1에 제시된 항체 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 2에 제시된 항체 경쇄 가변 영역; 또는 서열식별번호: 3에 나타난 항체 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 4에 제시된 항체 경쇄 가변 영역을 포함한다. 본 발명에서는, 상기 키메라 항원 수용체를 함유하는 CAR-T 세포가 또한 제조된다. 본 발명 이후, 실험 결과는 본 발명에 의해 제공되는 키메라 항원 수용체 및 그의 CAR-T 세포가 종양 세포에 대한 현저하게 높은 사멸 능력을 나타내며, 방출되는 CD107a의 발현 수준이 증가되고, 특이성이 우수하며, 그에 의해 CD22-양성 종양 세포의 아포토시스를 효과적으로 유도한다는 것을 제시한다.

[0077] 구체적으로, 본 발명에서 스크리닝된 항체에는 CAR-T22.3, CAR-T22.5, CAR-T22.7, CAR-T22.8, CAR-T22.9, CAR-T22.10, CAR-T22.11, CAR-T22.12, CAR-T22.13, CAR-T22.14, CAR-T22.15, CAR-T22.16 및 CAR-T22.17이 포함되었다. 이들 중, CAR-T22.3 및 CAR-T22.5는 공개되어 있는 CAR-T 서열로서, 스크리닝을 위한 양성 대조로서 사용되었다. 스크리닝 결과는 CAR-T22.13, CAR-T22.14 및 CAR-T22.5에 의해 수득되는 CAR-T 세포가 유사한 시험관내 기능을 가졌다는 것을 제시하였으며, 1차 T 세포에서의 상기 키메라 항원 수용체의 발현 수준, 시험관내 활성화 능력 및 종양 세포 사멸 효율을 검출하고 분석하기 위한 추가적인 실험 연구를 이들 3종의 CAR-T 세포에서 수행하였다. 연구는 본 발명의 키메라 항원 수용체가 CD22-양성 세포를 표적화하며, 항-CD19 CAR-T 치료 후 급성 B-세포 백혈병이 재발된 일부 CD19-음성 및 CD22-양성 환자를 포함하여, CD22-양성 B-세포 백혈병을 치료하는데 사용될 수 있다는 것을 제시한다.

[0078] 구체적으로, 본 발명은 바이러스 감염 후 세포 막 표면 상에서의 서로 다른 CAR 구조의 발현 시간과 발현 강도 사이의 상관관계를 결정하였으며, 그에 따라 서로 다른 CAR 구조를 가지는 단백질의 발현 용이성에 있어서의 차이를 식별해 주었다. 이와 같은 발견은 동일한 감염 조건하에서의 서로 다른 CAR 구조가 막 표면 상에서의 CAR 단백질의 발현 수준 및 생체 내에서의 CART 활성화의 지속성을 다르게 한다는 것을 시사하였다. 광범위한 스크리닝 후, 본 발명의 CAR 구조 (CAR-T22.13 및 CAR-T22.14)를 수득하였다. 결과는 본 발명의 CAR 구조에 의해 코딩되는 단백질이 효율적으로 발현되어 막 상에 국제화될 수 있는 것으로 제시한다. 또한, 이들은 종양 세포의 후기 아포토시스, 더 높은 CD137 활성화 수준 및 CD107a 방출 수준, 그리고 더 우수한 사멸 효과를 유도하는 강한 능력을 제시한다.

[0079] 본 발명은 또한 주로 시험관내에서 림프구를 배양하는데 1% 인간 알부민이 보충된 GT-551 무혈청 배지를 선택하는 것에 의해, CD22-표적화된 CAR 구조에 의해 변형된 T 세포의 제조 프로세스를 개선시켰다.

[0080] 용어

[0081] 본 개시내용의 더 우수한 이해를 위하여, 먼저 일부 용어를 정의한다. 본 출원에서 사용될 때, 본원에서 달리

명시적으로 언급되지 않는 한, 하기 용어 각각은 하기에서 제시되는 의미를 가지게 된다. 본 출원 전체에 걸쳐, 추가적인 정의가 또한 제공된다.

[0082] "대략"이라는 용어는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 결정되었을 때의 특정한 값 또는 조성의 허용가능한 오차 범위 이내인 값 또는 조성을 지칭할 수 있는데, 부분적으로는 그 값 또는 조성이 측정 또는 결정되는 방법에 따라 달라지게 된다.

[0083] "투여"라는 용어는 주사 또는 주입에 의한 것과 같은 정맥내, 근육내, 피하, 복막내, 척추내 또는 다른 비경구 투여 경로를 포함하여, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 알려져 있는 다양한 방법 및 전달 시스템 중 어느 것을 사용한 대상체에의 본 발명의 산물의 물리적 도입을 지칭한다.

[0084] "항체" (Ab)라는 용어에는 항원에 특이적으로 결합하며 디설피드 결합에 의해 상호연결된 적어도 2개의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L), 또는 이들의 항원-결합 부분을 포함하는 이뮤노글로불린이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 각 H 쇠는 중쇄 가변 영역 (본원에서는 약어로 VH) 및 중쇄 불변 영역을 포함한다. 중쇄 불변 영역은 3개의 불변 도메인 CH1, CH2 및 CH3를 함유한다. 각 경쇄는 경쇄 가변 영역 (본원에서는 약어로 VL) 및 경쇄 불변 영역을 함유한다. 경쇄 불변 영역은 하나의 불변 도메인 CL을 포함한다. VH 및 VL 영역은 상보성 결정 영역 (CDR)으로 지칭되는 추가변 영역으로 추가 하위분할될 수 있는데, 프레임워크 영역 (FR)으로 지칭되는 분산되고 더 보존된 영역을 함유한다. 각 VH 및 VL은 하기 순서로 아미노-말단으로부터 카르복시-말단으로 배열되는 3개의 CDR 및 4개의 FR을 함유한다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다.

[0085] **CD22**

[0086] 유형 I 막형단 단백질 및 시알산-결합 이뮤노글로불린-유사 렉틴 패밀리의 중요 구성원으로서, CD22는 B 세포 활성화를 조절하고 항원 반응에 대한 B 세포의 민감성을 조절하는 것을 도우며 정상적인 B 세포 및 B 세포 악성 종양에서 흔한 세포 표면 부착 분자를 포함한다. 그것은 BL-CAM, B3, Leu-14, Lyb-8 등으로도 알려져 있다. 인간 CD22 유전자는 염색체 19의 긴 아암 (19q13.1) 상에 위치하며, 그 중 엑손 4-10은 단일-쇄 Ig 도메인을 코딩하고 엑손 11-15는 막형단 도메인 및 세포내 도메인을 코딩하는 적어도 15개의 엑손을 가진다. CD22는 각각 세포의 도메인에 5 및 7개의 IgG 도메인을 가지는 2종의 아형, 즉 CD22 α 및 CD22 β 를 포함한다.

[0087] CD22는 후기 프리-B 세포의 세포질에서 처음 발현된 다음, 세포 표면으로 전달된다. 그것은 프리-B 세포 및 미 성숙 B 세포에서는 소량으로 발현되며, 분화된 성숙한 이뮤노글로불린 (Ig) M+ 및 IgD+ B 세포에서는 고도로 발현된다. B-세포 악성종양 중 약 60-80%가 CD22를 발현하는데, B 세포의 표면 상에서 상대적으로 특이적으로 발현되며, CD19-표적화된 CART 요법이 실패하여 악성종양이 재발된 경우에도 상대적으로 높은 수준으로 발현된다. 많은 수의 실험이 CD22를 표적화하는 모노클로날 항체가 백혈병의 치료에서 유의한 효능을 나타낸다는 것을 입증하고 있다. 이에 따라, 그것은 B-세포 면역 조절 및 B-세포 악성종양의 면역요법의 표적이 되어 있다.

[0088] 항-CD19 CAR-T가 뛰어난 효능을 가지고 있기는 하지만, B 세포에서의 CD19 항원 발현이 결여되어 있는 일부 백혈병 환자에서는 그것이 비효과적이며; 일부 환자는 항-CD19 CAR-T 치료 후 CD19 항원의 발현이 감소되거나 심지어는 상실됨으로써 만족스럽지 않은 치료 결과 및 CD22의 지속적인 발현을 계속 동반하는 용이한 재발로 이어지고 있다. CD22는 항-CD19 CAR-T 요법 후의 일부 CD19-음성 환자를 포함하여 B-세포 급성 림프모구성 백혈병이 있는 대부분의 환자에서 발현된다. 프라이(Fry) 등이 CD22 항원을 표적화하는 CAR-T 요법의 임상 시험을 수행하였는데, 환자 중 73% (11/15)가 $\geq 1 \times 10^6$ 항-CD22 CAR-T 세포 요법을 투여받은 후 완전 관해를 달성하였다. 라마크리쉬나(Ramakrishna) 등은 종양 세포에서 CD22 항원 발현을 증가시키는 것에 의해 저조한 CD22 발현을 동반하는 B-세포 백혈병/림프종의 치료에 있어서의 항-CD22 CAR-T의 효능이 개선될 수 있다고 믿었으나, 동물 실험 및 임상 시험에서 그의 추가적인 효능이 검증될 필요가 있다.

[0089] 최근에는, 면역요법, 특히 입양 T-세포 요법이 혈액 악성종양의 치료를 위한 임상 시험에서 강한 효능 및 유망성을 제시한 바 있다. T 세포는 항원 인식 잔기 및 T 세포 활성화 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하도록 유전적으로 변형될 수 있다. CAR은 MHC-비제한 방식으로 표적을 겨냥하는 T 세포 특이성 및 반응성을 재유도하는 모노클로날 항체의 항원-결합 특성을 사용한다. 이와 같은 MHC-비제한 항원 인식은 CAR-발현 T 세포가 항원 프로세싱 없이 항원을 인식함으로써 종양 회피의 주요 메커니즘을 회피하는 것을 가능하게 한다. 또한, CAR은 내인성 TCR의 α 쇠 및 β 쇠와 이량체화되지 않는다.

[0090] **키메라 항원 수용체 (CAR)**

- [0091] 본 발명의 키메라 항원 수용체 (CAR)는 세포외 도메인, 막횡단 도메인 및 세포내 도메인을 포함한다. 세포외 도메인은 표적-특이적 결합 요소 (항원-결합 도메인으로도 알려져 있음)를 포함한다. 세포내 도메인은 공동자극 신호전달 영역 및 ζ 쇄 부분을 포함한다. 공동자극 신호전달 영역은 공동자극 분자를 포함하는 세포내 도메인의 부분을 지칭한다. 항원 수용체 또는 그의 리간드보다는 오히려, 공동자극 분자가 항원에 대한 효율적인 림프구 반응에 필요한 세포 표면 분자이다.
- [0092] CAR의 세포외 도메인과 막횡단 도메인의 사이 또는 CAR의 세포질 도메인과 막횡단 도메인 사이에는 링커가 도입될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "링커"라는 용어는 일반적으로 막횡단 도메인을 폴리펩티드쇄의 세포외 또는 세포질 도메인에 연결하는 기능을 하는 임의의 올리고펩티드 또는 폴리펩티드를 지칭한다. 링커는 0-300개의 아미노산, 바람직하게는 2 내지 100개의 아미노산, 가장 바람직하게는 3 내지 50개의 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0093] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 의해 제공되는 CAR의 세포외 도메인은 CD22를 표적화하는 항원 결합 도메인을 포함한다. T 세포에서 발현되는 경우, 본 발명의 CAR은 항원 결합 특이성을 기반으로 항원 인식을 할 수 있다. 그것이 그의 동계 항원에 결합하는 경우, 그것은 종양 세포에 영향을 주어, 종양 세포가 성장하지 않거나, 사멸되거나, 달리 영향을 받도록 하며, 환자 종양 부하의 감소 또는 제거를 야기한다. 항원 결합 도메인은 바람직하게는 하나 이상의 세포내 도메인의 공동자극 분자 및 ζ 쇄에 융합된다. 바람직하게는, 항원 결합 도메인은 4-1BB 신호전달 도메인, 및 세포내 도메인의 CD3 ζ 신호전달 도메인과의 조합에 융합된다.
- [0094] 본원에 사용된 바와 같이, "항원 결합 도메인" 및 "단일쇄 항체 단편"은 둘 다 항원 결합 활성을 가지고 있는 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편, 또는 단일 Fv 단편을 지칭한다. Fv 항체는 항체 중쇄 가변 영역, 경쇄 가변 영역을 함유하나, 불변 영역은 포함하지 않으며, 모든 항원-결합 부위를 포함하는 가장 작은 항체 단편이다. 전형적으로, Fv 항체는 또한 VH와 VL 도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 함유하며, 항원 결합에 필요한 구조를 형성할 수 있다. 항원 결합 도메인은 보통 scFv (단일-쇄 가변 단편)이다. scFv의 크기는 일반적으로 완전 항체의 것의 1/6이다. 단일쇄 항체는 바람직하게는 하나의 뉴클레오티드쇄에 의해 코딩되는 하나의 아미노산쇄 서열이다. 본 발명의 바람직한 양태로서, scFv는 CD22를 특이적으로 인식하는 항체를 포함한다.
- [0095] 힌지 영역 및 막횡단 영역 (막횡단 도메인)의 경우, CAR은 CAR의 세포외 도메인에 융합된 막횡단 도메인을 포함하도록 설계될 수 있다. 한 실시양태에서는, CAR의 도메인 중 하나와 원래 결합되어 있는 막횡단 도메인이 사용된다. 일부 예에서, 막횡단 도메인은 그와 같은 도메인이 동일하거나 상이한 표면 막 단백질의 막횡단 도메인에 결합하는 것을 방지하며, 그에 의해 수용체 복합체의 다른 구성원과의 상호작용을 최소화하도록 선택되거나, 또는 아미노산 치환에 의해 변형될 수 있다.
- [0096] 본 발명의 CAR의 세포내 도메인은 4-1BB의 신호전달 도메인 및 CD3 ζ 의 신호전달 도메인을 포함한다.
- [0097] 바람직하게는, 본 발명의 CAR의 구조는 하기 순서로 연결되는 리더 서열, 항원 인식 서열 (항원 결합 도메인), 연결 영역, 막횡단 영역, 공동자극인자 신호 영역 및 CD3 제타 신호전달 영역 (ζ 쇄 부분)을 포함한다:
- [0098] [CD8 LS]-[VL-링커-VH]-[힌지-CD8TM]-[4-1BB]-[CD3 제타]
- [0099] 구체적으로, 본 발명에서는 하기 서열이 선택된다:
- [0100] (1) 리더 서열은 CD8 항원의 것임:
- [0101] MALPVTALLLPLALLLHAARP (SEQ ID NO.: 9)
- [0102] (2) CAR22.5 항원 인식 서열:
- VH
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVRQVPGKGLEWVSYISSGGGTTYYPDTVKG
RFTISRDNRSRLTDLQMSRLRVEDTAVYYCARHSGYGSYGVLFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 5)
- VL
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWLQQKPGKAPKLLIYYTSLHSGVPSRFRSGSG
SGTEFTLTITSSLPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 6)
- [0103]

[0104] (3) CAR22.3 항원 인식 서열:

VH
LQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWNNDYAVSVKS
RITINPDTSKNQPSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDAFDIWGGQTMVTVS (SEQ ID NO: 7)
VL
IQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQTIWSYLNWYQQRPKGAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGRGSG
TDFTLTISSLQAEDFATYYCQQSYSTIPQTFGQGTKLEI (SEQ ID NO: 8)

[0105]

[0106] (4) CAR22.13 항원 인식 서열:

VH
EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYNFTSYWIGWVRQMPGKLEWMGIIYPGDSDRYSPSFQG
QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCATPTYFYGSAFEDIWGGQTMVTVSS (SEQ ID NO: 1)
VL
EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSFSGVPSRFSGSG
SGTDFTLTINSLEAEDAAAYYCHQSSSLPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 2)

[0107]

[0108] (5) CAR22.14 항원 인식 서열:

VH
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKPSGDTFSNYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGMAIYAPKFQG
RVTITADKSTNTAFMDLTSLYFEDTAVYYCARAPTYWGSKDYFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 3)
VL
AIQLTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDISGLAWYQQKPGTAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSG
SGTDFTLTISSLQPDFATYYCQQFNSFPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 4)

[0109]

[0110] 상기 항원 인식 서열에서, VH와 VL 사이의 연결 서열은 서열식별번호: 16에 제시된 바와 같으며, 서열이 GGGGSGGGGSGGGGS이다.

[0111] (6) 힌지 영역 및 연결 영역의 서열:

FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (SEQ ID NO: 10)

[0112]

[0113] (7) 막횡단 영역용 CD8 막횡단 영역 (CD8TM)의 서열:

IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (SEQ ID NO.: 11)

[0114]

[0115] (8) 공동자극인자 신호 영역은 4-1BB의 세포내 신호전달 서열 모티프의 서열로부터 유래함:

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO.: 12)

[0116]

[0117] (9) CD3 제타의 신호전달 영역은 TCR 복합체 CD3 제타의 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 (ITAM) 서열로부터 유래함:

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGKPKRRKNPQEGLYNELQKD
KMAEAYSEIGMKGERRRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 13)

[0118]

[0119] 바람직하게는, 본 발명의 CAR은 CAR-T 22.13 또는 CAR-T 22.14이며, CAR 구조의 V_L 및 V_H는 미국 특허 번호 US9499632B2로부터 유래하며, 여기서 16F7은 22.13이며, 4G6은 22.14이다.

[0120] CAR-T22.13의 아미노산 서열은 하기와 같다:

MALPVTALLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKSGSYNFTSYWIGWVRQMPGKGLE
WMGIIPGSDTRYSPSFQGGVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCATPTYFSGVAFDIWGQTMV
TVSSGGGGSGGGSGGGSEIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLIKYAS
QSFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAAAYYCHQSSSLPYTFGGQTKLEIKFVPVFLPAKPTTTPAP
RPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLL
YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK
RRGRDPEMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR (SEQ ID NO: 14)

[0121]

[0122] CAR-T22.14의 아미노산 서열은 하기와 같다:

MALPVTALLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKPSGDTFSNYAISWVRQAPGQGLE
WMGRIIPILGMAIYAPKFQGRVTITADKSTNTAFMDLTSLYFEDTAVYYCARPTYWGSVDYFDYWGQTL
VTVSSGGGGSGGGSGGGSAIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISGLAWYQQKPGTAPKLLIYDA
SSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPDFFATYYCQQFNSFPYTFGGQTKLEIKFVPVFLPAKPTTTPA
PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLL
LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDK
KRRGRDPEMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
ALPPR (SEQ ID NO: 15)

[0123]

[0124] **키메라 항원 수용체 T 세포 (CAR-T 세포)**

[0125] 본원에 사용된 바와 같이, "CAR-T 세포," "CAR-T," "CART" 및 "본 발명의 CAR-T 세포"라는 용어는 모두 본 발명의 제4 측면에 기재된 CAR-T 세포를 지칭한다.

[0126] 본 발명은 CD22-표적화된 키메라 항원 수용체 구조의 구축, CD22-표적화된 키메라 항원 수용체 조작된 T 세포의 제조 방법, 및 그의 활성 검정에 관한 것이다.

[0127] 본 발명에서는, CD22의 서열을 기반으로 하여, CD22 항원을 표적화하는 다양한 유형의 키메라 항원 수용체 구조를 구축하고, 1차 T 세포에서의 이들 키메라 항원 수용체의 발현 수준, 시험관내 활성화 능력 및 종양 세포 사멸 효능을 측정 및 분석하였다. 본 발명은 CD22 항원을 보유하는 악성 종양을 시험관내 및 생체 내에서 사멸시켜 제거하도록 CAR22.13 및 22.14에 기반하여 구축된 서로 다른 유형의 CAR-변형된 T 세포의 능력에 있어서의 차이를 발견하였는데, 이는 CD22-양성 백혈병 및 림프종의 치료에서의 CAR-T의 임상 적용을 위한 새로운 효과적인 방법 및 제제를 제공한다.

[0128] **벡터**

[0129] 원하는 분자를 코딩하는 핵산 서열은 관련 기술분야에 알려져 있는 재조합 방법을 사용하여 예를 들어 유전자를 발현하는 세포로부터의 라이브러리를 스크리닝하는 것에 의해, 유전자를 포함하는 것으로 알려져 있는 벡터로부터 유전자를 수득하는 것에 의해, 또는 그것을 함유하는 세포 및 조직으로부터 직접적으로 유전자를 단리하는 표준 기술을 사용하는 것에 의해 수득될 수 있다. 대안적으로, 해당 유전자는 합성에 의해 제조될 수 있다.

[0130] 본 발명은 또한 본 발명의 발현 키트가 삽입되어 있는 벡터를 제공한다. 렌티바이러스와 같은 레트로바이러스로부터 유래된 벡터가 장기 유전자 전달에 적합한 도구로서, 그것이 이전유전자의 장기적이고 안정한 통합 및 해당 딸 세포에서의 그의 증식을 가능하게 하기 때문이다. 렌티바이러스 벡터는 무인 백혈병 바이러스와 같은 종양원성 레트로바이러스로부터 유래된 벡터에 비해 이점을 가지는데, 그것이 간세포와 같은 비-증식성 세포를 형질도입할 수 있기 때문이다. 그것은 또한 낮은 면역원성이라는 이점을 가지고 있다.

[0131] 간략하게 말하자면, 본 발명의 발현 키트 또는 핵산 서열은 전형적으로 프로모터에 작용가능하게 연결되며, 발현 벡터에 도입된다. 상기 벡터는 복제성 및 통합성 진핵 세포에 적합하다. 전형적인 클로닝 벡터는 원하는 핵산 서열의 발현을 조절하는데 사용될 수 있는 전사 및 번역 종결인자, 개시 서열 및 프로모터를 포함한다.

[0132] 본 발명의 발현 구축물은 표준 유전자 전달 해법을 사용한 핵산 면역화 및 유전자 요법에서 사용될 수도 있다. 유전자 전달 방법에 대해서는 관련 기술분야에 알려져 있는 바; 예를 들어 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 번호 5,399,346, 5,580,859, 5,589,466을 참조한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 유전자 요법 벡터를 제공한다.

- [0133] 핵산은 많은 유형의 벡터로 클로닝될 수 있다. 예를 들어, 핵산은 비제한적으로 플라스미드, 파지미드, 파지 유도체, 동물 바이러스 및 코스미드를 포함한 벡터로 클로닝될 수 있다. 관심의 특정한 벡터에는 발현 벡터, 복제 벡터, 프로브 생성 벡터 및 시퀀싱 벡터가 포함된다.
- [0134] 또한, 발현 벡터는 바이러스 벡터의 형태로 세포에 제공될 수 있다. 바이러스 벡터 기술에 대해서는 관련 기술 분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 문헌 [Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)] 및 다른 바이러스학 및 분자 생물학 매뉴얼에 기재되어 있다. 벡터로 사용될 수 있는 바이러스에는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 헤르페스바이러스 및 렌티바이러스가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 전형적으로, 적합한 벡터는 적어도 1종의 생물체에서 기능성인 복제 기원, 프로모터 서열, 편리한 제한 효소 부위, 및 하나 이상의 선택가능 마커 (예를 들어 W001/96584; W001/29058; 및 미국 특허 번호 6,326,193)를 함유한다.
- [0135] 수많은 바이러스-기반 시스템이 포유동물 세포에의 유전자 전달용으로 개발되어 있다. 예를 들어, 레트로바이러스는 유전자 전달 시스템을 위한 편리한 플랫폼을 제공한다. 선택된 유전자는 벡터에 삽입될 수 있으며, 관련 기술분야에 알려져 있는 기술을 사용하여 레트로바이러스 입자에 패키징될 수 있다. 재조합 바이러스는 이후 단리되어, 생체내 또는 생체외로 대상 세포에 전달될 수 있다. 많은 레트로바이러스 시스템이 관련 기술분야에 알려져 있다. 일부 실시양태에서는, 아데노바이러스 벡터가 사용된다. 많은 아데노바이러스 벡터가 관련 기술분야에 알려져 있다. 한 실시양태에서는, 렌티바이러스 벡터가 사용된다.
- [0136] 추가적인 프로모터 요소, 예컨대 인헨서는 전사 개시 시에 빈도를 조절할 수 있다. 전형적으로, 그것은 개시 부위의 30-110 bp 상류 영역에 위치하지만, 최근에는 많은 프로모터가 또한 개시 부위의 하류에 기능성 요소를 함유하는 것으로 제시된 바 있다. 요소가 서로에 대비하여 역전되거나 제거되는 경우에 프로모터 기능이 유지 되도록, 프로모터 요소 사이의 간격은 종종 유연성이다. 티미딘 키나제 (tk) 프로모터에서는, 활성이 감쇠되기 시작하기 전에 프로모터 요소 사이의 간격이 50 bp만큼 증가될 수 있다. 프로모터에 따라서는, 전사를 개시하기 위하여, 개별 요소가 협동 또는 독립 작용을 나타낸다.
- [0137] 적합한 프로모터의 예로는 초전기 시토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터 서열이 있다. 프로모터 서열은 거기에 작용가능하게 연결된 임의의 폴리뉴클레오티드 서열의 고수준 발현을 구동할 수 있는 강한 구성적 프로모터 서열이다. 적합한 프로모터의 또 다른 예는 연장 성장 인자-1 α (EF-1 α)이다. 그러나, 다른 구성적 프로모터 서열이 사용될 수도 있으며, 거기에는 유인원 바이러스 40 (SV40) 전기 프로모터, 마우스 유선 종양 바이러스 (MMTV), 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 긴 말단 반복체 (LTR) 프로모터, MoMuLV 프로모터, 조류 백혈병 바이러스 프로모터, 엡스타인-바르 바이러스 초-전기 프로모터, 라우스 육종 바이러스 프로모터 및 인간 유전자 프로모터, 예를 들어 비제한적으로 액틴 프로모터, 미오신 프로모터, 헴 프로모터 및 크레아틴 키나제 프로모터가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 본 발명이 구성적 프로모터의 사용으로 제한되어서는 안된다. 유도성 프로모터 역시 본 발명의 일부로서 고려된다. 유도성 프로모터의 사용은 해당 발현을 원할 때 유도성 프로모터에 작용가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 작동시키고 발현을 원하지 않을 때 발현을 작동중지시킬 수 있는 분자 스위치를 제공한다. 유도성 프로모터의 예에는 메탈로티오네인 프로모터, 글루코코르티코이드 프로모터, 프로게스테론 프로모터 및 테트라사이클린 프로모터가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0138] CAR 폴리펩티드 또는 그의 일부의 발현을 평가하기 위하여, 세포에 도입되는 발현 벡터는 바이러스 벡터를 통하여 형질감염되거나 감염된 세포 집단에서의 발현 세포의 식별 및 선택을 위한 탐색을 용이하게 하기 위한 선택가능 마커 유전자 및 리포터 유전자 중 어느 하나 또는 둘 다를 함유할 수도 있다. 다른 측면에서, 선택가능 마커는 DNA의 단일 부문에 포함될 수 있으며, 공동-형질감염 절차로 사용될 수 있다. 선택가능 마커 및 리포터 유전자 둘 다에는 숙주 세포에서의 발현을 가능하게 하기 위한 적절한 조절 서열에 의해 플랜킹될 수 있다. 유용한 선택가능 마커에는 예를 들어 항생제 내성 유전자 예컨대 neo 등이 포함된다.
- [0139] 리포터 유전자는 잠재적으로 형질감염된 세포를 식별하고, 조절 서열의 기능성을 평가하는데 사용된다. 전형적으로, 리포터 유전자는 수용자 생물체 또는 조직에는 존재하지 않거나 그에 의해 발현되지 않으며 효소 활성과 같은 일부 용이하게 검출가능한 특성에 의해 그의 발현이 분명하게 표시되는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자이다. DNA가 수용자 세포에 도입된 후, 적절한 시점에 리포터 유전자의 발현이 측정된다. 적합한 리포터 유전자에는 루시페라제, β -갈락토시다제, 클로로암페니콜 아세틸트랜스퍼라제, 분비성 알칼리 포스파타제 또는 녹색 형광 단백질 (예를 들어 문헌 [Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82])을 코딩하는 유전자가 포함될 수 있다. 적합한 발현 시스템에 대해서는 잘 알려져 있으며, 공지된 기술을 사용하여 제조될 수 있

거나 또는 상업적으로 구입할 수 있다. 전형적으로, 최고 수준의 리포터 유전자 발현을 나타내는 최소 5개의 플랭킹 영역을 가지는 구축물이 프로모터로서 식별된다. 그와 같은 프로모터 영역은 리포터 유전자에 연결될 수 있으며, 프로모터-구동된 전사를 조절하는 작용제의 능력을 평가하는데 사용될 수 있다.

[0140] 세포에 유전자를 도입하고 발현하는 방법에 대해서는 관련 기술분야에 알려져 있다. 발현 벡터의 내용물과 관련하여, 벡터는 관련 기술분야에 알려져 있는 어떠한 방법에 의해서도 숙주 세포, 예를 들어 포유동물, 세균, 효모 또는 곤충 세포에 용이하게 도입될 수 있다. 예를 들어, 발현 벡터는 물리적, 화학적 또는 생물학적 수단에 의해 숙주 세포로 전달될 수 있다.

[0141] 숙주 세포에 폴리뉴클레오티드를 도입하기 위한 물리적 방법에는 칼슘 포스페이트 침전, 리포펙션, 입자 충격, 미세사출, 전기천공 등이 포함된다. 벡터 및/또는 외인성 핵산을 포함하는 세포를 제조하기 위한 방법에 대해서는 관련 기술분야에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 문헌 [Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)]을 참조한다. 숙주 세포에 폴리뉴클레오티드를 도입하기 위한 바람직한 방법은 칼슘 포스페이트 형질감염이다.

[0142] 숙주 세포에 해당 폴리뉴클레오티드를 도입하기 위한 생물학적 방법에는 DNA 및 RNA 벡터의 사용이 포함된다. 바이러스 벡터, 특히 레트로바이러스 벡터가 포유동물, 예를 들어 인간 세포에 유전자를 삽입하는 가장 광범위하게 사용되는 방법이 되어 있다. 다른 바이러스 벡터는 렌티바이러스, 폭스바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스 I, 아데노바이러스 및 아데노-연관 바이러스 등으로부터 유래할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,350,674 및 5,585,362를 참조한다.

[0143] 숙주 세포에 폴리뉴클레오티드를 도입하는 화학적 수단에는 콜로이드성 분산 시스템, 예컨대 거대분자 복합체, 나노캡슐, 미세구체, 비드; 및 수중유 에멀전, 미셀, 혼합 미셀 및 지질 색소체를 포함한 지질-기반 시스템이 포함된다. 시험관내 및 생체내 전달 비히클로 사용하기 위한 대표적인 콜로이드성 시스템은 리포솜 (예를 들어 인공 막 소포)이다.

[0144] 비-바이러스 전달 시스템이 사용되는 경우, 대표적인 전달 비히클은 리포솜이다. 지질 체제의 사용이 (시험관내, 생체외 또는 생체내에서의) 숙주 세포에의 핵산의 도입용으로 고려된다. 또 다른 측면에서, 핵산은 지질과 결합될 수 있다. 지질과 결합된 핵산은 리포솜의 수성인 내부에 캡슐화되거나, 리포솜 지질 이중층 내에 점재되거나, 리포솜 및 올리고뉴클레오티드 둘 다와 결합되는 링커 분자를 통하여 리포솜에 결합되거나, 리포솜 내에 포획되거나, 리포솜과 복합체화되거나, 지질-함유 용액 중에 분산되거나, 지질과 혼합되거나, 지질과 결합되거나, 현탁액으로서 지질 내에 함유되거나, 미셀 내에 함유되거나 미셀과 복합체화되거나, 또는 달리 지질과 결합될 수 있다. 조성물과 연관되는 지질, 지질/DNA 또는 지질/발현 벡터가 용액 중 임의의 특정한 구조로 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 그것은 미셀로서 이중층 구조 내에 존재할 수 있거나, 또는 "붕괴된" 구조를 가질 수 있다. 그것은 어떠한 크기 또는 형상이 균일하지 않은 응집물을 형성하면서 용액 중에 단순히 분산될 수도 있다. 지질은 자연적으로 발생하거나 합성될 수 있는 지방 물질이다. 예를 들어, 지질에는 세포질은 물론, 장쇄 지방족 탄화수소 및 그의 유도체 예컨대 지방산, 알콜, 아민, 아미노 알콜 및 알데히드를 포함하는 화합물에서 자연적으로 발생하는 지질 액적이 포함된다.

[0145] 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 벡터는 렌티바이러스 벡터이다.

[0146] 제제

[0147] 본 발명은 본 발명의 제1 측면의 CAR-T 세포, 및 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 제공한다. 한 실시양태에서, 제제는 액체 제제이다. 바람직하게는, 제제는 주사제이다. 바람직하게는, 제제 중 CAR-T 세포의 농도는 1×10^3 - 1×10^8 개 세포/ml, 보다 바람직하게는 1×10^4 - 1×10^7 개 세포/ml이다.

[0148] 한 실시양태에서, 제제는 완충제 예컨대 중성 완충 식염수, 술페이트 완충 식염수 등; 탄수화물 예컨대 글루코스, 만노스, 수크로스 또는 덱스트란, 만니톨; 단백질; 폴리펩티드 또는 아미노산 예컨대 글리신; 항산화제; 킬레이팅제 예컨대 EDTA 또는 글루타티온; 아주반트 (예를 들어 알루미늄 히드록시드); 및 보존제를 포함할 수 있다. 본 발명의 제제는 바람직하게는 정맥내 투여용으로 제제화된다.

[0149] 치료적 용도

[0150] 본 발명은 본 발명의 발현 키트에 의해 코딩되는 렌티바이러스 벡터 (LV)를 사용하여 형질도입된 세포 (예를 들어 T 세포)의 치료적 용도를 포함한다. 형질도입된 T 세포는 중앙 세포 마커 CD22를 표적화하고, T 세포를 상승작용적으로 활성화하며, T 세포 면역 반응을 야기하며, 그에 의해 중앙 세포에 대한 그의 사멸 효능을 유의하

게 개선시킬 수 있다.

- [0151] 이에 따라, 본 발명은 또한 본 발명의 CAR-T 세포를 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물에서의 표적 세포 집단 또는 조직에 대한 T 세포-매개 면역 반응을 자극하는 방법을 제공한다.
- [0152] 한 실시양태에서, 본 발명은 환자의 자가 T 세포 (또는 동종이형 공여자)가 단리되고, 활성화되어, CAR-T 세포를 생성시키도록 유전적으로 조작된 다음, 환자에게 주입되는 세포 요법을 포함한다. 이렇게 되면, 이식편-대-숙주 질환의 가능성이 극히 낮아지며, 항원이 MHC-비제한 방식으로 T 세포에 의해 인식된다. 또한, 1종의 CAR-T 세포가 이와 같은 항원을 발현하는 모든 암을 치료할 수 있다. 항체 요법과 달리, CAR-T 세포는 생체 내에서 복제됨으로써 오래 지속되는 지속형 종양 억제를 초래할 수 있다.
- [0153] 한 실시양태에서, 본 발명의 CAR-T 세포는 연장된 시간 기간 동안 T 세포의 강력한 생체내 증식을 나타낼 수 있다. 추가적으로, CAR-매개 면역 반응은 CAR-변형된 T 세포가 CAR의 항원 결합 도메인에 특이적인 면역 반응을 유도하는 입양 면역요법 단계의 일부가 될 수 있다. 예를 들어, CD22-발현 종양 세포는 항-CD22 CAR-T 세포의 특정 면역 반응을 유도한다.
- [0154] 본 개시내용의 데이터가 항-CD22 scFv, 힌지 및 막횡단 영역, 및 4-1BB 및 CD3 ζ 신호전달 도메인을 포함하는 렌티바이러스 벡터에 대해 구체적으로 개시하고 있기는 하지만, 본 발명은 구축물의 구성요소 각각의 수에 있어서 어떠한 변동도 포함하는 것으로 해석되어야 한다.
- [0155] 치료될 수 있는 암에는 혈관화되지 않거나 실질적으로 혈관화되지 않는 종양은 물론, 혈관화되는 종양도 포함된다. 암에는 비-고형 종양 (예컨대 혈액 종양, 예를 들어 백혈병 및 림프종)이 포함될 수 있거나, 또는 고형 종양이 포함될 수 있다. 본 발명의 CAR을 사용하여 치료되는 암 유형에는 암종, 모세포종 및 육종, 및 특정 백혈병성 또는 림프성 악성종양, 양성 및 악성 종양, 및 악성 덩어리 예컨대 육종, 암종 및 흑색종이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 성인 종양/암 및 어린이 종양/암도 포함된다.
- [0156] 혈액암은 혈액 또는 골수의 암이다. 혈액암 (또는 혈액성 암)의 예에는 급성 백혈병 (예컨대 급성 림프모구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 급성 골수형성 백혈병, 및 골수모구양, 전골수세포성, 과립구성, 단핵구성 및 적혈구 백혈병), 만성 백혈병 (예컨대 만성 골수성 (과립구성) 백혈병, 만성 골수형성 백혈병 및 만성 림프구성 백혈병)을 포함한 백혈병, 진성 적혈구증가증, 림프종, 호지킨병, 비-호지킨 림프종 (무통중이며 고등급인 형태), 다발성 골수종, 왈덴스트롬 거대글로불린혈증, 중쇄 질환, 골수형성이상 증후군, 모발상 세포 백혈병 및 골수형성이상증이 포함된다.
- [0157] 고형 종양은 전형적으로 낭 또는 유체 영역을 함유하지 않는 비정상적인 조직 덩어리이다. 고형 종양은 양성이거나 악성일 수 있다. 상이한 유형의 고형 종양은 그들을 형성하는 세포 유형에 따라 명명된다 (예컨대 육종, 암종 및 림프종). 육종 및 암종과 같은 고형 종양의 예에는 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 중피종, 림프성 악성종양, 췌장암 및 난소암이 포함된다.
- [0158] 본 발명의 CAR-변형된 T 세포는 포유동물의 생체의 면역화 및/또는 생체내 요법을 위한 백신의 유형으로 사용될 수도 있다. 바람직하게는, 포유동물은 인간이다.
- [0159] 생체의 면역화를 위해서는, 포유동물에 세포를 투여하기 전에 시험관내에서 하기 중 적어도 하나가 이루어진다: i) 세포를 증식시키는 것, ii) CAR을 코딩하는 핵산을 세포에 도입하는 것, 및/또는 iii) 세포를 냉동보존하는 것.
- [0160] 생체의 절차에 대해서는 관련 기술분야에 잘 알려져 있으며, 하기에서 더 상세하게 논의된다. 간단하게 말하자면, 포유동물 (바람직하게는 인간)로부터 세포가 단리된 후, 본원에 개시된 CAR을 발현하는 벡터를 사용하여 유전적으로 변형된다 (즉 시험관내에서 형질도입되거나 형질감염됨). CAR-변형된 세포는 치료적 이익을 제공하기 위하여 포유동물 수용자에게 투여될 수 있다. 상기 포유동물 수용자는 인간일 수 있으며, 상기 CAR-변형된 세포는 수용자 자가의 것일 수 있다. 대안적으로, 세포는 수용자에 대하여 동종이형, 동계 또는 이계의 것일 수 있다.
- [0161] 생체의 면역화를 위한 세포-기반 백신을 사용하는 것 이외에, 본 발명은 또한 환자에서 항원에 대한 면역 반응을 도출하는 생체내 면역화를 위한 조성물 및 방법을 제공한다.
- [0162] 본 발명은 치료 유효량의 본 발명의 CAR-변형된 T 세포를 그를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 종양을 치료하는 방법을 제공한다.

- [0163] 본 발명의 CAR-변형된 T 세포는 단독으로, 또는 희석제 및/또는 다른 구성요소 예컨대 IL-2, IL-17 또는 다른 시토카인 또는 세포 집단과의 조합으로서의 제약 조성물로서 투여될 수 있다. 간단하게 말하자면, 본 발명의 제약 조성물은 하나 이상의 제약상 또는 생리학상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와의 조합으로서 본원에 기재된 바와 같은 표적 세포 집단을 포함할 수 있다. 그와 같은 조성물은 완충제 예컨대 중성 완충 식염수, 스펀틴 완충 식염수 등; 탄수화물 예컨대 글루코스, 만노스, 수크로스 또는 텍스트란, 만니톨; 단백질; 폴리펩티드 또는 아미노산 예컨대 글리신; 항산화제; 킬레이트 예컨대 EDTA 또는 글루타티온; 아주반트 (예를 들어 알루미늄 히드록시드); 및 보존제를 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 바람직하게는 정맥내 투여용으로 제제화된다.
- [0164] 본 발명의 제약 조성물은 치료될 (또는 예방될) 질환에 적절한 방식으로 투여될 수 있다. 임상 시험에 의해 적절한 투약량이 결정될 수 있기는 하지만, 투여의 양 및 빈도는 환자의 상태, 및 환자 질환의 유형 및 중증도와 같은 인자에 의해 결정되게 된다.
- [0165] "면역학적 유효량", "종양에 대한 유효량", "종양-억제 유효량" 또는 "치료량"을 지칭하는 경우, 투여될 본 발명의 조성물의 정확한 양은 연령, 체중, 종양 크기, 감염 또는 전이 정도, 및 의학적 상태 면에서의 환자 (대상체)의 개별적인 차이를 고려하여 의사에 의해 결정될 수 있다. 일반적으로, 본원에 기재된 T 세포를 포함하는 제약 조성물이 10^4 내지 10^9 개 세포/kg 체중, 바람직하게는 10^5 내지 10^6 개 세포/kg 체중 범위 (해당 범위 내의 모든 정수 값 포함)의 투여량으로 투여될 수 있다는 것에 유의할 수 있다. T 세포 조성물은 이러한 투여량으로 여러번 투여될 수도 있다. 세포는 면역요법에 잘 알려져 있는 주입 기술을 사용하여 투여될 수 있다 (예를 들어 문헌 [Rosenberg et al., NewEng. J. of Med. 319: 1676, 1988] 참조). 특정한 환자에 대한 최적 투약량 및 치료 레지멘은 질환의 징후에 대하여 환자를 모니터링하는 것 및 그에 따라 치료를 조정하는 것에 의해 의학 기술분야 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0166] 대상체로의 조성물의 투여는 분무, 주사, 연하, 주입, 삽입 또는 이식에 의한 것을 포함하여 어떠한 편리한 방식으로도 수행될 수 있다. 본원에 기재된 조성물은 피하로, 피내로, 종양내로, 결절내로, 척추내로, 근육내로, 정맥내 (i.v.) 주사에 의해, 또는 복막내로 환자에게 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 T 세포 조성물은 피내 또는 피하 주사에 의해 환자에게 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 T 세포 조성물은 바람직하게는 i.v. 주사에 의해 투여된다. T 세포 조성물은 직접 종양, 림프 결절 또는 감염 부위에 주사될 수 있다.
- [0167] 본 발명의 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 또는 관련 기술분야에 알려져 있는 다른 방법을 사용하여 치료 수준으로 활성화되고 증폭된 T 세포는 (예를 들어 전, 동시 또는 후에) 환자에 대한 임의의 수의 적격 치료양태와 조합되며, 상기 치료 양태에는 비제한적으로 항바이러스 요법, 시도포비르 및 인터루킨-2, 시타라빈 (ARA-C로도 알려져 있음) 또는 MS 환자용 나탈리주맙 요법 또는 건선 환자용 엘파지주맙 요법 또는 PML 환자용 다른 치료와 같은 작용제를 사용한 치료가 포함된다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 T 세포는 화학요법, 방사선, 면역억제제 예컨대 시클로스포린, 아자티오프린, 메토트렉세이트, 미코페놀레이트 모페틸 및 FK506, 항체 또는 다른 면역요법제와의 조합으로서 사용될 수 있다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 세포 조성물은 골수 이식, 플루다라빈과 같은 화학요법제의 사용, 외부 빔 방사선 요법 (XRT) 및 시클로포스파미드와의 조합으로서 (예를 들어 전, 동시 또는 후에) 환자에게 투여된다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 대상체는 고도 투여량 화학요법 후 이어지는 말초 혈액 줄기 세포 이식을 사용한 표준 치료에 적용될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 이식 후, 대상체가 본 발명의 증폭된 면역 세포 주입을 투여받는다. 추가적인 실시양태에서, 증폭된 세포는 수술 전 또는 후에 투여된다.
- [0168] 환자에게 투여되는 상기 치료의 투약량은 치료되는 이상 및 치료 수용자의 정확한 특성에 따라 달라지게 된다. 인간 투여를 위한 투약량 비는 관련 기술분야에서 허용되는 관습에 따라 시행될 수 있다. 전형적으로, 각 치료 또는 각 치료 과정에 있어서, 본 발명의 변형된 T 세포 (예를 들어 CART-CD22 세포) 1×10^6 내지 1×10^{10} 개가 예를 들어 정맥내 주입에 의해 환자에게 투여될 수 있다.
- [0169] **본 발명의 주요 이점**
- [0170] (a) 본 발명의 키메라 항원 수용체의 세포의 항원 결합 도메인은 특이적 항-CD22 scFv이며, 특정 림프 영역 및 세포내 도메인과 조합된 특이적 항-CD22 scFv에 의해 형성되는 CAR은 커다란 종양 세포 사멸 능력, 우수한 특이성, T 세포에 대한 낮은 세포독성, 및 낮은 부작용을 나타내었다.
- [0171] (b) 본 발명에 의해 제공되는 키메라 항원 수용체는 CAR 유전자를 보유하는 렌티바이러스가 T 세포를 감염시킨

후 CAR 단백질의 안정한 발현 및 막 국제화를 실현할 수 있었다.

[0172] (c) 본 발명의 CAR-변형된 T 세포는 생체 내에서의 더 긴 생존 시간 및 더 강한 항종양 효능을 가졌으며; 본 발명에서 사용된 항원-결합 도메인은 인간화되거나 인간-유래인 항체로서, 종-특이적 면역 거부 반응을 야기할 가능성이 적었다.

[0173] 일부 실시양태를 참조하여 본 발명을 추가로 기재한다. 실시양태는 본 발명의 범주를 제한하는 것이 아니라 오로지 본 발명을 예시하는데 사용된다는 것이 이해되어야 한다. 실험 방법에 있어서 조건이 상술되지 않는 하기 실시양태에서는, 통상적인 조건, 예를 들어 문헌 [Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)]에 기재되어 있는 조건 또는 제조자의 권장사항이 일반적으로 사용된다. 달리 상술되지 않는 한, 백분율 및 부는 중량 기준으로 계산된다.

[0174] 실시예 1

[0175] 렌티바이러스 발현 벡터의 구축

[0176] 상하이 보이이 바이오테크놀로지 캄파니, 리미티드(Shanghai Boyi Biotechnology Co., Ltd.)에 코딩 플라스미드를 구축하기 위한 전체-길이 DNA 합성 및 클로닝을 수행하도록 위임하였다. pWPT 렌티바이러스 벡터를 클로닝 벡터로 선택하였으며, 클로닝 부위는 BamH I 및 Mlu I이었다. 구체적인 서열은 상기 기재된 바와 같다.

[0177] 실시예 2

[0178] CAR-T 세포의 제조

[0179] (1) 건강한 인간으로부터 정맥 혈액을 채취하여, 밀도 구배 원심분리에 의해 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 분리하였다.

[0180] (2) 0일차에, 최종 농도 1,000 U/ml의 재조합 인간 인터류킨 2 (IL-2)가 보충된 1% 인간 혈액 알부민을 함유하는 GT-551 세포 배양 배지 중 최종 농도 5 µg/ml의 CD3 모노클로날 항체 (OKT3) 및 최종 농도 5 µg/ml의 레트로넥틴(Retronectin) (타카라(TAKARA)로부터 구매)을 사용하여 사전-코팅된 세포 배양 플라스크에 상기 PBMC를 시딩하고, 인큐베이터에서 5% CO₂의 포화 습도를 사용하여 37℃로 배양하였다.

[0181] (3) 1일차에, 배양된 PBMC의 상청액을 천천히 피펫팅하여 폐기하고, 1% 인간 알부민을 함유하는 새로운 GT-551 세포 배양 배지를 첨가한 후, 최종 농도 1,000 U/ml의 재조합 인간 인터류킨 2 (IL-2)를 배지에 첨가하고, 인큐베이터에서 5% CO₂의 포화 습도를 사용하여 37℃로 배양을 재개하였다.

[0182] (4) 3일차에, 새로운 배지를 첨가하고, 정제된 CAR-CD22 렌티바이러스 유체를 농축시킨 후, 프로타민 술페이트 (12 µg/ml) 및 최종 농도 1,000 U/ml의 IL-2를 첨가하였다. 그것을 감염을 위해 5% CO₂를 사용하여 37℃로 12 시간 동안 인큐베이터에 위치시키고, 배양 용액을 폐기한 후, 새로운 배지를 첨가하고, 5% CO₂를 사용하여 37℃로 인큐베이터에서 배양을 재개하였다.

[0183] (5) 6일차부터, 필요한 시험관내 활성화 검정을 위하여, CART-CD22 세포를 채취하였다.

[0184] 실시예 3

[0185] T 세포 계능에의 CAR 유전자의 통합률 및 막 표면 상에서의 그에 의해 코딩되는 단백질의 발현 수준의 검정

[0186] 실시예 2에서 6일차까지 배양된 0.2×10^6 개의 CART-CD22.5, CART-CD22.13 및 CART-CD22.14 샘플 세포를 채취하고 (도 2), 재조합 인간 CD22 단백질의 Fc 절편을 염색한 후, 형질도입되지 않은 T 세포 (NT 세포)를 대조로 사용하여 유동 세포측정법에 의해 T 세포 막 표면 상에서의 CAR-CD22 단백질의 발현 수준을 분석하였다.

[0187] 결과는 도 2에 제시되어 있다. 3종의 CAR-T 세포의 CAR 구조는 해당 변형 T 세포에서 발현될 수 있었으며, 세포 막 표면 상에 국제화될 수 있었고, 높은 발현율을 나타내었다. 이들 중, CART-CD22.5 및 CART-CD22.14의 발현율이 CART-CD22.13의 것에 비해 더 높았다.

[0188] 실시예 4

[0189] CART-CD22의 시험관내 활성화 능력의 검정

[0190] 실시예 2에서 배양된 CART-CD22 세포 (CART-CD22.5, CART-CD22.13 및 CART-CD22.14)를 세포 활성화 수준 지표

단백질 CD137 및 IFN γ 의 검출에 사용하였다. 6일차까지 배양된 1×10^5 개의 CART-CD22 세포를 채취하고, 각각 CD22-양성 K562-CD22+C7, K562-CD22+A4, H929-CD22+E12 및 Raji 종양 세포, 및 CD22-음성 K562 종양 세포 또는 무종양 세포와 함께 1:1 비로 200 μ l의 GT-551 배지 중에서 18시간 동안 배양한 다음, 유동 방법에 의해 T 세포 막 표면 상에서의 CD137의 발현 수준을 검출하고, ELISA 방법에 의해 배양 상청액 중 IFN γ 의 분비 수준을 검출하였다.

[0191] 결과는 도 3a에 제시되어 있다. 3종의 전체 CAR-T 세포의 표면 상에서 CD137의 발현이 검출될 수 있었으며, 배양 상청액에서는 IFN γ 의 발현이 검출될 수 있었다. 이들 중, CAR-T22.13 및 CAR-T22.14가 CAR-T22.5에 비해 더 우수한 CD137 활성화 수준을 나타내었으나, CAR-T22.5의 IFN γ 방출 수준은 CAR-T22.13 및 CAR-T22.14의 것에 비해 더 높았다.

[0192] 실시예 5

[0193] 종양 세포의 후기 아포토시스를 유도하는 CART-CD22의 활성의 검정

[0194] 실시예 2에서의 14일차까지의 CART-CD22 세포를 각각 1×10^4 개의 CD22-음성 세포 (K562) 또는 Raji 라인의 CD22-양성 세포, 및 각각 5:1, 10:1, 20:1, 및 40:1 비의 종양 세포주를 과발현하는 자가 세포 K562-CD22와 혼합하고, 100 μ l의 GT-551 배양 시스템에서 8시간 동안 공동-배양한 후, 50 μ l의 배지 상청액을 피펫팅하고, 색소원성 기질 혼합물을 첨가하고, 30-분 커플링된 효소 반응을 수행하여 CAR-T 세포에 의해 인식 및 사멸된 후 종양 세포의 용해 동안 방출된 락테이트 데히드로제나제 (LDH)의 양을 검출하였는데, 여기서 생성된 적색 산물의 양은 용해된 세포의 수에 비례하였다.

[0195] 결과는 도 4에 제시되어 있다. CD22-음성 종양 세포주 K562를 사멸시키는 능력을 가진 T 세포는 없었으며, 3종의 CAR-T 세포가 CD22-양성 종양 세포 웰의 아포토시스를 유도할 수 있었다. 이들 중, CAR-T22.13 및 CAR-T22.14는 CAR-T22.5에 비해 CD22-양성 종양 세포의 후기 아포토시스를 더 잘 유도할 수 있었으며; CAR-T22.14는 CAR-T22.13에서 CD22-양성 종양 세포의 후기 아포토시스를 유도하는 약간 더 우수한 능력을 나타내었다.

[0196] 실시예 6

[0197] T 세포 탈과립과 연관된 막 단백질 CD107a의 발현 수준의 검정

[0198] 2×10^5 개의 CD22-음성 종양 세포 (라인 K562) 또는 CD22-양성 종양 세포 (라인 K562-CD22+A4, H929-CD22+E12 및 Raji) 및 1×10^5 개의 CAR-T 세포를 채취하여, 부피 기준 1:1의 비로 5시간 동안 200 μ l의 GT-551 배지 중에서 배양하고, CAR-T 세포가 CD22-양성 종양 세포에 의해 활성화된 후의 T 세포 탈과립과 연관된 막 단백질 CD107a의 발현 수준 변화를 검출하였다.

[0199] 결과는 도 5에 제시되어 있다. CD22-양성 종양 세포 (K562-CD22+C7, K562-CD22+A4 및 H929-CD22+E12)에 의해 3종의 CAR-T 세포가 활성화된 후 방출되는 CD107a의 발현 수준은 증가된 반면, CAR-T 세포에서의 CD107a의 발현은 Raji 세포와의 공동-배양 후 유의하게 증가하지 않았다. 이들 중, CAR-T22.14의 CD107a 방출은 CAR-T22.13 및 CAR-T22.5의 것에 비해 더 높아서, 더 강한 사멸 효과를 표시하였다.

[0200] 비교 실시예 1

[0201] 본 출원의 키메라 항원 수용체 구조의 스크리닝 동안, 본 발명자들은 많은 수의 후보 서열을 시험하였다. 후보 CART 세포에는 CAR-T22.3, CAR-T22.5, CAR-T22.7, CAR-T22.8, CAR-T22.9, CAR-T22.10, CAR-T22.11, CAR-T22.12, CAR-T22.15, CAR-T22.16 및 CAR-T22.17이 포함되었으며, 여기서 CAR-T 세포의 제조 방법은 실시예 2의 것과 동일하였고, 검정 방법은 실시예 3 및 4의 것과 동일하였다.

[0202] 후보 CAR-T에 포함된 항체 서열은 공개되어 있는 문헌 및 특허로부터 유래하였다. 이들 중, CAR-T22.3에 사용된 CD22 항체 (m971)의 경쇄 및 중쇄 서열은 미국 특허 번호 US8591889B2로부터 유래하였으며; CAR-T22.5의 CD22 항체 (KM196172)의 경쇄 및 중쇄 서열은 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KM196172>로부터 유래하였고; CAR-T22.7에 사용된 CD22 항체 (VM1000)의 경쇄 및 중쇄 서열은 미국 특허 번호 US9856323B2로부터 유래하였으며; CAR-T22.8에 사용된 CD22 항체 (LL2)의 경쇄 및 중쇄 서열은 문헌 [Pawlak Byczkowska, E. J. et al., Cancer Res. 49: 4568-4577(1989)]으로부터 유래하였고; CAR-T22.9에 사용된 CD22 항체 (10F4)의 경쇄 및 중쇄 서열은 미국 특허 번호 US2014/0127197A1로부터 유래하였으며; CAR-T22.10에 사용된 CD22 항체 (19A3), 22.11의 항체 (23C6), 22.12의 항체 (16F7), 22.15의 항체 (4G6), 22.16의 항체 (21F4) 및 22.17의 항체 (21F4)의

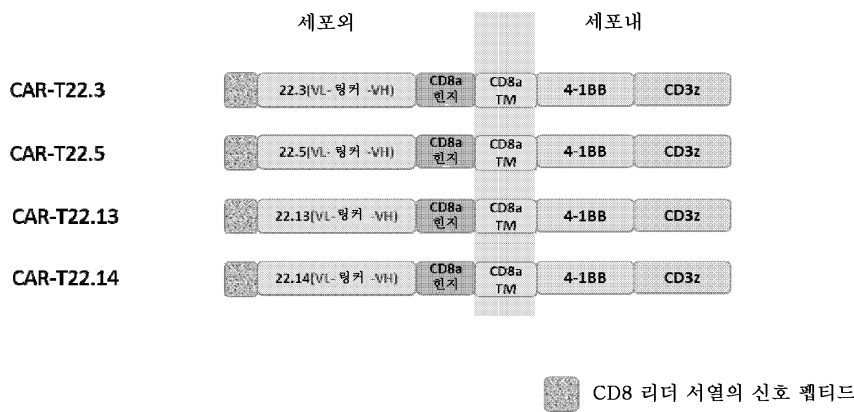
경쇄 및 중쇄 서열은 미국 특허 번호 US9499632B2로부터 유래하였다.

[0203] CART 세포의 검정 결과는 도 6a, 6b 및 6c에 제시되어 있다. 표적 세포와의 공동-배양 후의 양성률 (도 6a), 시험관내에서의 CD137 활성화 능력 (도 6b), 및 상청액 중 IFN γ 방출 수준 (도 6c)의 검정을 통하여 CAR-T22.3, CAR-T22.7, CAR-T22.8, CAR-T22.9, CAR-T22.10, CAR-T22.16 및 CAR-T22.17의 양성률이 매우 낮다는 것이 발견되었으므로, 이들은 비효과적인 것으로 간주되었으며; IFN γ 시험에서는 CAR-T22.5, CAR-T22.11, CAR-T22.13 및 CAR-T22.14를 CD22-양성 종양 세포와 공동-배양한 후 IFN γ 방출이 매우 높고 CD137 발현 역시 높다는 것이 발견됨으로써, 이들 CAR-T 세포가 특이적으로 활성화된다는 것을 표시하였다. 이에 따라, 22.13 및 22.14가 추가 연구용으로 선택되었다.

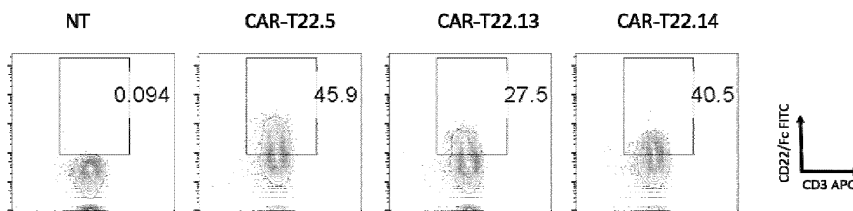
[0204] 본 발명에서 언급된 모든 문서는 각 문서가 개별적으로 인용된 것처럼 본 출원에 참조로 인용된다. 또한, 본 발명의 상기 교시를 해독한 후, 관련 기술분야의 통상의 기술자라면 본 발명에 대하여 다양한 변화 또는 변형을 가할 수 있으며, 이러한 등가물 형태 역시 본 출원의 첨부된 청구범위에 의해 한정되는 범주 내에 속한다는 것이 이해되어야 한다.

도면

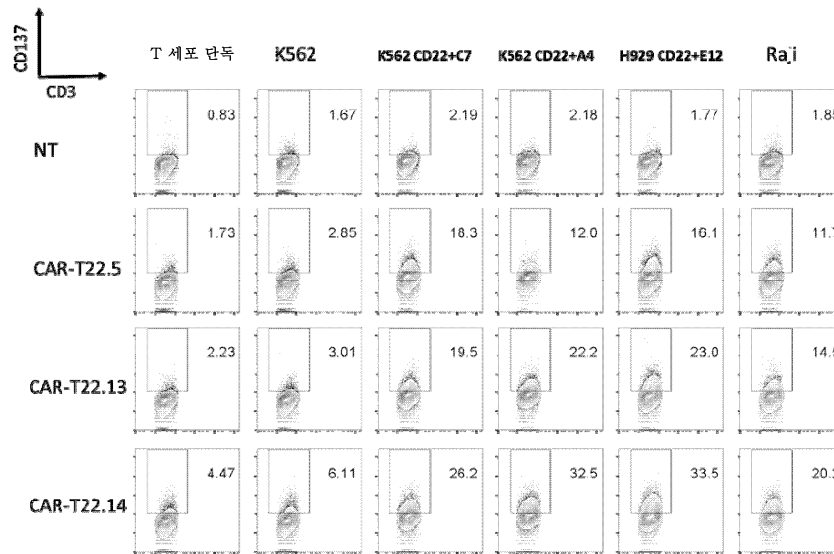
도면1



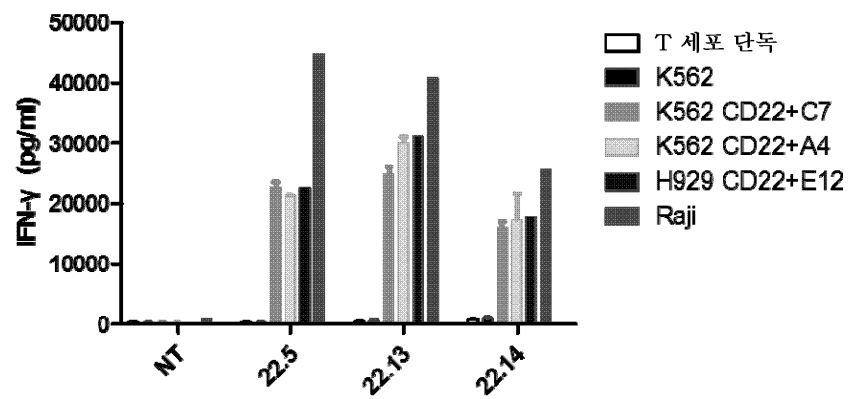
도면2



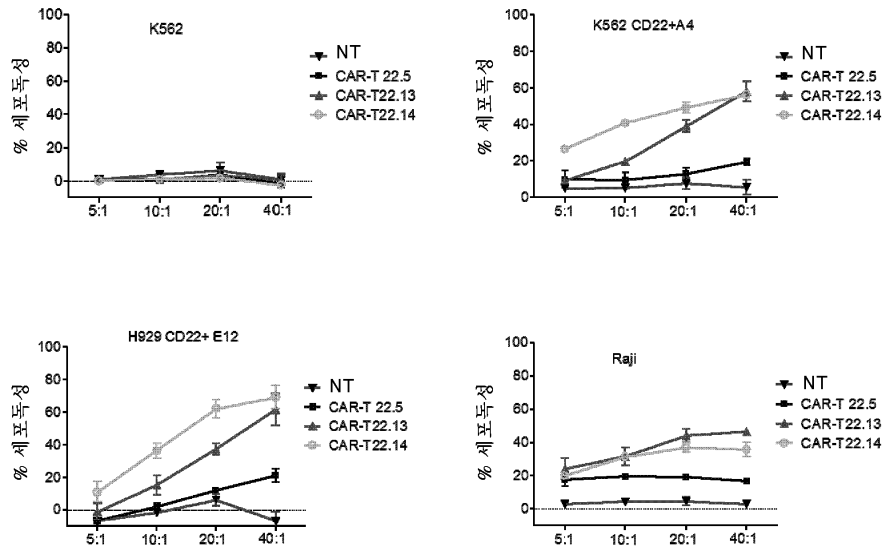
도면3a



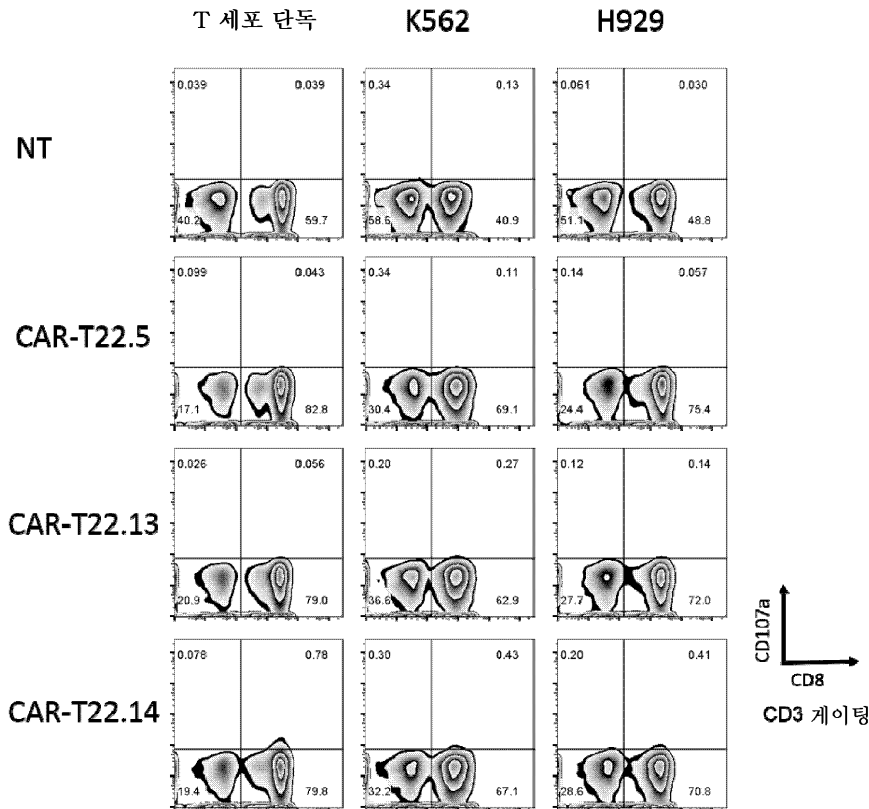
도면3b



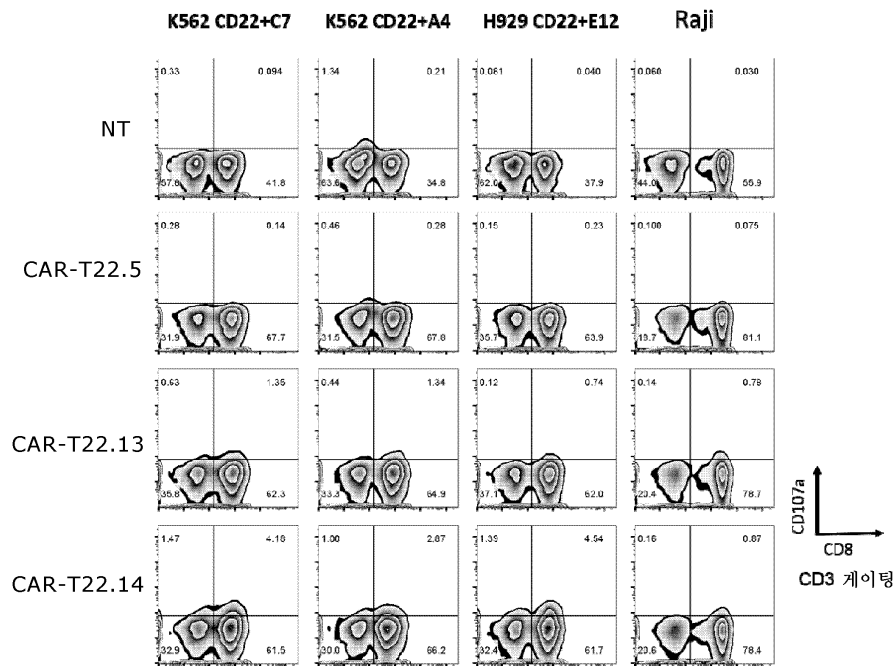
도면4



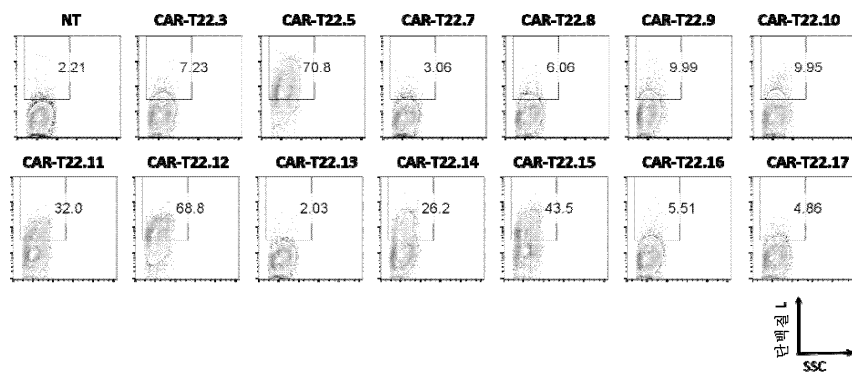
도면5i



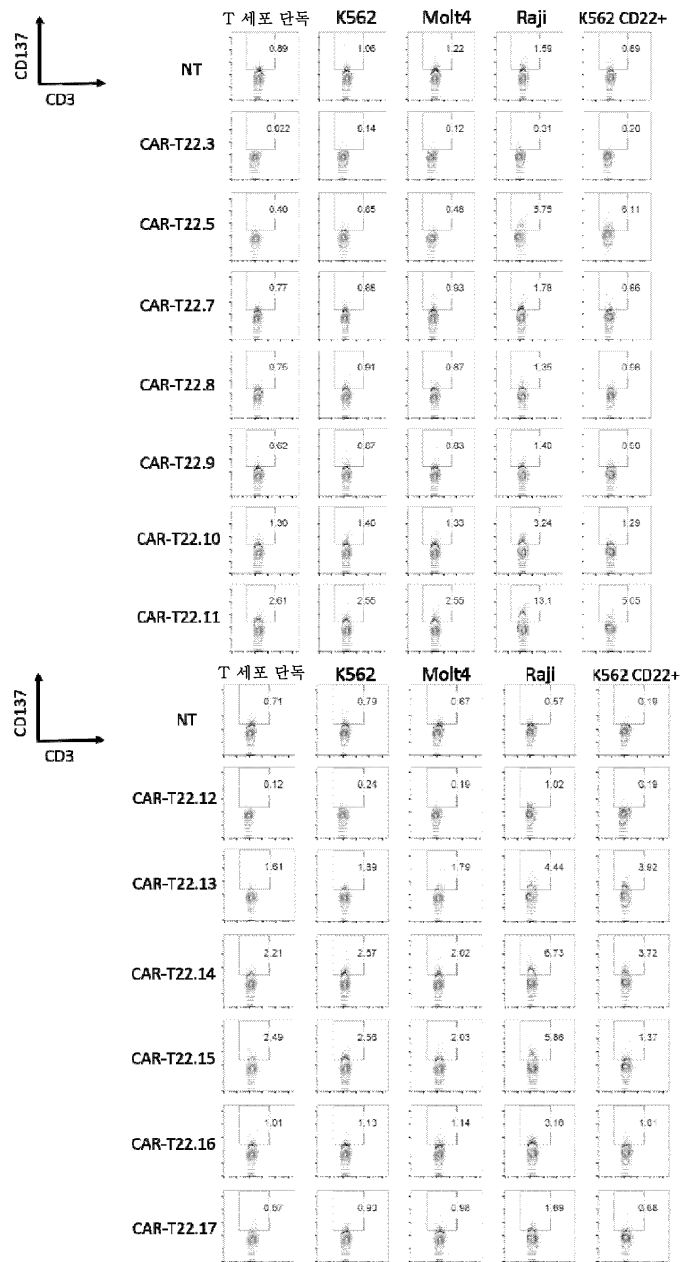
도면5i



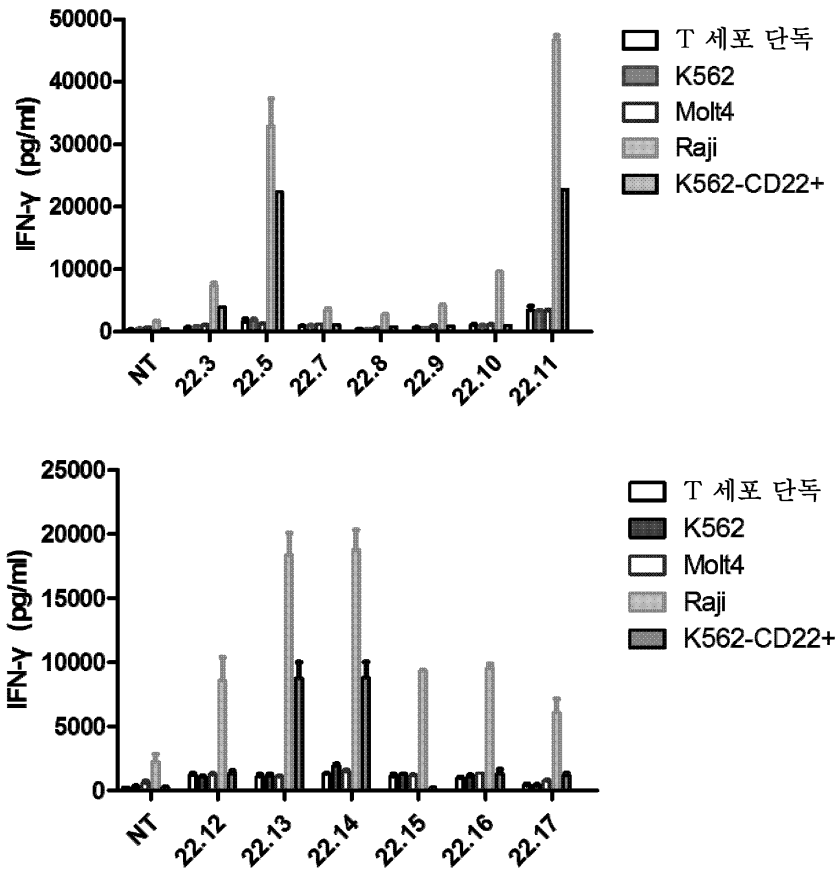
도면6a



도면6b



도면6c



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> SHANGHAI CELLULAR BIOPHARMACEUTICAL GROUP LTD.
WUXI CELLULAR BIOPHARMACEUTICAL GROUP LTD.
- <120> CD22-TARGETED CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR, PREPARATION METHOD THEREFOR AND APPLICATION THEREOF
- <130> 11299/011112-W00
- <150> CN202010301357.9
- <151> 2020-04-16
- <160> 16
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 121
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain variable domain

<400> 1

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

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

65	70	75	80
Leu	Gln	Trp	Ser
Ser	Leu	Lys	Ala
Ser	Asp	Thr	Ala
Met	Tyr	Tyr	Cys
85	90	95	
Ala	Thr	Pro	Thr
Tyr	Tyr	Phe	Gly
Ser	Val	Ala	Phe
Asp	Ile	Trp	Gly
100	105	110	
Gln	Gly	Thr	Met
Val	Thr	Val	Ser
Ser			
115	120		

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain variable domain

<400> 2

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 3

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain variable domain

<400> 3

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

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

65					70					75					80
Met	Asp	Leu	Thr	Ser	Leu	Tyr	Phe	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Ala	Pro	Thr	Tyr	Trp	Gly	Ser	Lys	Asp	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp
				100					105					110	
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
				115					120						

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain variable domain

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Phe Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 5

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain variable domain

<400> 5

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ile Tyr

20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Val Leu Phe Ala Tyr

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain variable domain

<400> 6

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 7

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heavy chain variable domain

<400> 7

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

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

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

<210> 8

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Light chain variable domain

<400>

> 8

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu

65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Gln Thr

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile

100 105

<210> 9

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Signal peptide

<400> 9

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro

20

<210> 10

<211> 55

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

$\langle 220 \rangle \langle 223 \rangle$ Hinge region

<400> 10

Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg

35 40 45

Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp

50

55

<210> 11

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Transmembrane region

<400> 11

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

1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys

20

<210> 12

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> Co-stimulatory signaling molecule

<400> 12

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

35 40

<210> 13

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD3? signaling sequence

<

400> 13

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> 14

<211> 497

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric antigen receptor

<400> 14

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

Gly Leu Glu Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg
65 70 75 80
Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser
85 90 95
Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr
100 105 110
Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Thr Pro Thr Tyr Tyr Phe Gly Ser Val Ala

115	120	125	
Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly			
130	135	140	
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val			
145	150	155	160
Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys Glu Lys Val			
165	170	175	
Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser Leu His Trp			
180	185	190	
Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala			
195	200	205	
Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser			
210	215	220	
Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala			
225	230	235	240
Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Tyr Thr Phe Gly			
245	250	255	
Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala			
260	265	270	
Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr			
275	280	285	
Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala			
290	295	300	
Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile			
305	310	315	320
Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser			
325	330	335	
Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr			
340	345	350	
Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu			
355	360	365	

Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu
370 375 380

Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln
385 390 395 400

Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu
405 410 415

Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly
420 425 430

Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
435 440 445

Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
450 455 460

Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
465 470 475 480

Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
485 490 495

Arg

<210> 15

<211> 498

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Chimeric antigen receptor

<400> 15

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val
20 25 30

Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Pro Ser Gly Asp
35 40 45

Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln

50 55 60
 Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Met Ala Ile
 65 70 75 80
 Tyr Ala Pro Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser
 85 90 95
 Thr Asn Thr Ala Phe Met Asp Leu Thr Ser Leu Tyr Phe Glu Asp Thr
 100 105 110
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Pro Thr Tyr Trp Gly Ser Lys Asp
 115 120 125

 Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly
 130 135 140
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ile
 145 150 155 160
 Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
 165 170 175
 Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Gly Leu Ala
 180 185 190

 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp
 195 200 205
 Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 210 215 220
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp
 225 230 235 240
 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Phe Pro Tyr Thr Phe
 245 250 255

 Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Phe Val Pro Val Phe Leu Pro
 260 265 270
 Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro
 275 280 285
 Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro
 290 295 300

Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp
305 310 315 320

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
325 330 335

Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu
340 345 350

Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu
355 360 365

Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys
370 375 380

Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln
385 390 395 400

Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu
405 410 415

Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly
420 425 430

Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu
435 440 445

Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly
450 455 460

Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser
465 470 475 480

Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro
485 490 495

Pro Arg

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker peptide

<400> 16

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

1

5

10

15