



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년11월05일

(11) 등록번호 10-2726269

(24) 등록일자 2024년10월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/725 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/7051 (2013.01)

A61K 39/0011 (2023.05)

(21) 출원번호 10-2019-7032371

(22) 출원일자(국제) 2018년03월30일

심사청구일자 2021년03월30일

(85) 번역문제출일자 2019년10월31일

(65) 공개번호 10-2020-0015467

(43) 공개일자 2020년02월12일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/058367

(87) 국제공개번호 WO 2018/178377

국제공개일자 2018년10월04일

(30) 우선권주장

PA201770239 2017년03월31일 덴마크(DK)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

JP2016502512 A

WO2016120216 A1

(73) 특허권자

셀렉티스 에스.에이.

프랑스, 에프-75013 파리, 뤼 드 라 크로아 재리 8

(72) 발명자

스미스, 줄리언

미국 뉴욕 10128, 뉴욕, 뉴욕 애비뉴 아파트 9케이 1675

두차타우, 필립

프랑스 드라빌 91210, 퀴 데 담, 바토 파웬

데린, 유리엘

프랑스 파리 75005, 르 생 자크 15

(74) 대리인

특허법인(유한) 대아

전체 청구항 수 : 총 22 항

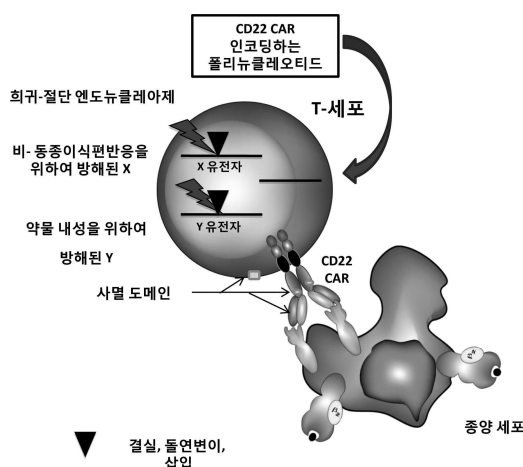
심사관 : 정지혜

(54) 발명의 명칭 범용 항-CD22 키메라 항원 수용체 조작된 면역 세포

## (57) 요약

본 발명은 선택된 면역 세포에 대한 상기 면역 세포 특이성 및 반응성을 제지향시킬 수 있는 TRAC 유전자에서의 결실을 갖는 새로운 CD22 키메라 항원 수용체 (CD22 CAR)가 부여되는 조작된 면역 세포에 관한 것이다. 이러한 CARs이 부여되는 상기 조작된 면역 세포는 특히 재발성 불응성 CD22 발현 암의 치료에 적합하다.

## 대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

*A61K 39/001113* (2023.05)  
*C07K 14/47* (2013.01)  
*C07K 14/70517* (2013.01)  
*C07K 14/70578* (2013.01)  
*C07K 16/283* (2013.01)  
*C07K 19/00* (2023.08)  
*C12N 5/0638* (2023.05)  
*C07K 2317/622* (2013.01)  
*C07K 2317/73* (2013.01)

(30) 우선권주장

PA201770240 2017년03월31일 덴마크(DK)  
PA201770542 2017년06월30일 덴마크(DK)  
PCT/EP2017/076800 2017년10월19일  
유럽특허청(EPO)(EP)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

CD22에 특이적인 키메라 항원 수용체 (CAR) (CD22 CAR)이며,

i) 하기를 포함하는 적어도 하나의 세포의 도메인:

- 서열번호: 12의 중쇄 가변 단편 (heavy chain variable fragment) (VH) 및 서열번호: 13의 경쇄 가변 단편 (light chain variable fragment) (VL)을 포함하는 단일 체인 가변 단편 (scFv)를 포함하는 CD22에 특이적인 항원 결합 도메인, 및

- CD8alpha로부터의 힌지 도메인,

ii) CD8alpha로부터의 막관통(transmembrane) 도메인, 및

iii) 세포 내 신호 전달 도메인

을 포함하는 CD22에 특이적인 키메라 항원 수용체(CAR) (CD22 CAR).

#### 청구항 2

제 1항에 있어서,

인간 CD8 alpha로부터의 힌지, 및 링커에 의하여 연결된 서열번호: 12의 중쇄 가변 단편 (VH) 및 서열번호: 13의 경쇄 가변 단편 (VL)을 포함하는 단일 체인 가변 단편 (scFv)을 포함하는 적어도 하나의 세포의 도메인;

인간 CD8alpha로부터의 막관통 도메인, 및

인간 4-1BB로부터의 공동-자극성 신호 분자 및 인간 CD3제타 신호 전달 도메인을 포함하는 세포 내 신호 전달 도메인

을 포함하는 CD22 CAR.

#### 청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 CD22 CAR는 서열번호: 15와 적어도 90%의 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열을 갖는, CD22 CAR.

#### 청구항 4

제 3항에 있어서,

안전 스위치(safety switch)를 더 포함하며, 상기 안전 스위치는

i) 펩티드 2A에 의해 상기 CD22 CAR에 일시적으로 연결된 RQR8;

ii) 상기 CD22 CAR에 연결된 적어도 두 개의 리투시맷(rituximab) mAb-특이적 에피토프들(epitopes); 및

iii) CPYSNPSLC의 아미노산 서열을 갖는 세 개의 mAb-특이적 에피토프 및 ELPTQGTFSNVSTNVSPAKPTTTA의 아미노산 서열을 갖는 하나의 mAb-특이적 에피토프

로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 어느 하나를 포함하는, CD22 CAR.

#### 청구항 5

제 1항에 있어서,  
상기 CD22 CAR는 단일-체인(single-chain) CAR인, CD22 CAR.

#### 청구항 6

단리된 조작된 인간 T 세포이며, 이때 상기 단리된 조작된 인간 T 세포는 제 1항에 따른 키메라 항원 수용체를 상기 세포 표면에서 발현하고, 그리고 TCR 서브유닛(subunit)을 인코딩하는 유전자가 불활성화되는 것을 더 특징으로 하는, 단리된 조작된 인간 T 세포.

#### 청구항 7

제 6항에 있어서,  
상기 TCR 서브유닛은 TCR 알파인, 단리된 조작된 인간 T 세포.

#### 청구항 8

제 6항에 있어서,  
상기 CD22 CAR를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드가 게놈 내로 삽입되는, 단리된 조작된 인간 T 세포.

#### 청구항 9

제 6항에 있어서,  
상기 CD22 CAR를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드가 TRAC 유전자 내로 삽입되는, 단리된 조작된 인간 T 세포.

#### 청구항 10

제 6항에 있어서,  
dCK 유전자, B2M 유전자, 및 CD52 유전자로부터 선택되는 또다른 불활성화된 유전자를 포함하는, 단리된 조작된 인간 T 세포.

#### 청구항 11

제 6항에 있어서,  
CD52를 인코딩하는 유전자가 불활성화되는 것을 더 특징으로 하는, 단리된 조작된 인간 T 세포.

#### 청구항 12

제 6항에 있어서,  
적어도 하나의 추가적인 유전자가 불활성화되고, 그리고 이때 상기 추가적인 유전자는 아릴 탄화수소 수용체 (aryl hydrocarbon receptor) (AHR), 형질 전환 성장 인자 베타 수용체 (Transforming growth factor beta receptor) (TGF 베타 수용체), 인터루킨(Interleukin) 10 수용체 (IL-10 R), 프로그램 세포 사멸 단백질 1, 그 조합을 인코딩하는 유전자로부터 선택되는, 단리된 조작된 인간 T 세포.

### 청구항 13

제 6항에 있어서,

상기 CD22 CAR는 CD19에 특이적인 항원 결합 도메인을 더 포함하거나 또는 상기 단리된 조작된 인간 T 세포는 CD19 CAR를 더 포함하는, 단리된 조작된 인간 T 세포.

### 청구항 14

제 6항에 있어서,

상기 단리된 조작된 인간 T 세포는 서열번호 25 또는 서열번호 26과 적어도 80% 동일성을 갖는 CD19 CAR를 더 포함하는, 단리된 조작된 인간 T 세포.

### 청구항 15

제 6항에 따른 상기 단리된 조작된 인간 T 세포를 포함하는 단리된 세포들의 집단(population).

### 청구항 16

CD22+-매개 암(mediated cancer) 또는 CD19+CD22+-매개 암을 예방 또는 치료하기 위한 의약으로서 사용을 위한, 제 6항에 따른 상기 단리된 조작된 인간 T 세포 또는 상기 단리된 조작된 인간 T 세포를 포함하는 세포들의 집단 및 약학적으로 허용되는 부형제(excipient)를 포함하는 약학 조성물(pharmaceutical composition)이며, 이때 상기 암은 림프종(lymphoma), 호지킨 림프종(Hodgkin lymphoma), 비호지킨 림프종(non Hodgkin lymphoma), 백혈병(leukemia), 다발성 골수종(multiple myeloma), B-만성 림프구성 백혈병(B-chronic lymphocytic leukemia), 털 세포 백혈병(hairy cell leukemia), 급성 림프구성 백혈병(acute lymphocytic leukemia) (ALL), 및 버킷트 림프종(Burkitt's lymphoma), 급성 림프구성 암(acute lymphocytic cancer), 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia)으로부터 선택되는 혈액암(hematological cancer)인, 약학 조성물.

### 청구항 17

CD22+-매개 암, CD19+-매개 암, 또는 CD19+CD22+-매개 암을 예방 또는 치료하기 위한 의약으로서 사용을 위한, TCR 서브유닛을 인코딩하는 유전자가 불활성화되는 것을 더 특징으로 하는, CD19에 특이적인 키메라 항원 수용체를 세포 표면에서 발현하는 조작된 인간 T 세포 및 제 6항에 따른 상기 단리된 조작된 인간 T 세포를 포함하는 키트이며, 이때 상기 암은 림프종(lymphoma), 호지킨 림프종(Hodgkin lymphoma), 비호지킨 림프종(non Hodgkin lymphoma), 백혈병(leukemia), 다발성 골수종(multiple myeloma), B-만성 림프구성 백혈병(B-chronic lymphocytic leukemia), 털 세포 백혈병(hairy cell leukemia), 급성 림프구성 백혈병(acute lymphocytic leukemia) (ALL), 및 버킷트 림프종(Burkitt's lymphoma), 급성 림프구성 암(acute lymphocytic cancer), 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia)으로부터 선택되는 혈액암(hematological cancer)인, 키트.

### 청구항 18

재발성(relapse) 또는 불응성(refractory) B ALL의 치료를 위한 의약으로서 사용을 위한 제 6항에 따른 상기 단리된 조작된 인간 T 세포 또는 상기 단리된 조작된 인간 T 세포를 포함하는 세포들의 집단 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학 조성물.

### 청구항 19

소아 적응증(pediatric indication)으로서 재발성 또는 불응성 B ALL의 치료를 위한 의약으로서 사용을 위한 제 18항에서 정의된 대로의 약학 조성물.

#### 청구항 20

재발성 또는 불응성 B ALL의 치료를 위한 의약으로서 사용을 위한, TCR 서브유닛을 인코딩하는 유전자가 불활성화되는 것을 더 특징으로 하는, CD19에 특이적인 키메라 항원 수용체를 세포 표면에서 발현하는 조작된 인간 T 세포 및 제 6항에 따른 상기 단리된 조작된 인간 T 세포를 포함하는 키트.

#### 청구항 21

소아 적응증(pediatric indication)으로서 재발성 또는 불응성 B ALL의 치료를 위한 의약으로서 사용을 위한, TCR 서브유닛을 인코딩하는 유전자가 불활성화되는 것을 더 특징으로 하는, CD19에 특이적인 키메라 항원 수용체를 세포 표면에서 발현하는 조작된 인간 T 세포 및 제 6항에 따른 상기 단리된 조작된 인간 T 세포를 포함하는 키트.

#### 청구항 22

제 1항에 따른 CD22 CAR를 인코딩하는 벡터 또는 폴리뉴클레오티드를 단리된 T 세포들 내로 도입하는 것을 포함하는 면역 요법을 위한 T 세포들을 제조하는 엑스 비보 (ex-vivo) 방법.

#### 청구항 23

삭제

#### 청구항 24

삭제

#### 청구항 25

삭제

#### 청구항 26

삭제

#### 청구항 27

삭제

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 면역요법 분야에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 하나이상의 조작된 유전자를 포함하는 조작된 인간 1차 면역 세포인 CD22에 특이적인 범용 키메라 항원 수용체 T 세포(UCART22)에 관한 것이며, 바람직하게는 TCR 서브유닛(subunit) 또는 CD52 유전자를 코팅하는 유전자, 및 CD22, CAR CD22에 특이적인 키메라 항원 수용체(CAR), 및 상기 세포를 조작하는 방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 재발성 불응성 혈액암의 치료제로서 세포의 초기 공여체(“동종” 또는 “자가” CD 22 CAR 조작된 1차 인간 면역 세포)이거나 아닌 환자에 사용하기 위한 UCART 22에 관한 것이다. 본 발명에 따른 CD22를 발현하는 세포는 특히 공격성 또는 재발성 암에 대한 면역요법에 효율적이고 안전하다.

### 배경 기술

- [0002] 2000년 미국의 혈액암(Hodgkin's 림프종이 아닌 백혈병)에서 45,000명 이상의 사망이 예상되었다(Greenlee et al., CA Cancer J. Clin., 50:7-33 (2000)). 2014년에 발표된 수치는 비슷했으며 화학요법과 같은 치료법의 진보에도 불구하고 이러한 암에 대한 예후는 기본적으로 변경되지 않았다.( E K Mai, U Bertsch, J DÜrig, C Kunz, M Haenel, I W Blau, M Munder, A Jauch, B Schurich, T Hielscher, M Merz, B Huegle-Doerr, A Seckinger, D Hose, J Hillengass, M S Raab, K Neben, H-W Lindemann, M Zeis, C Gerecke, I G H Schmidt-Wolf, K Weisel, C Scheid, H Salwender and H Goldschmidt. Phase III trial of bortezomib, cyclophosphamide and dexamethasone (VCD) versus bortezomib, doxorubicin and dexamethasone (PAD) in newly diagnosed myeloma. Leukemia (19 March 2015) | doi:10.1038/leu.2015.80.)
- [0003] 이들 혈액암에 대한 새로운 연구 치료법중에서 독특하게는 키메라 항원 수용체(CAR)의 유전자 전달을 통한 T 세포와 같은 세포 용해 능력을 갖는 세포의 유전자 변형이었다(Jena, Dotti et al. 2010).
- [0004] CAR는 단일 분자 또는 다량체(multimer)를 형성하는 다중 막관통(transmembrane) 도메인과 관련된 표적화 부분으로 구성된 합성 수용체이다. 특히 CAR에서, 결합 부분은 링커에 의해 연결된 단일 클론 항체의 가변 단편을 포함하는 단일-체인 항체(scFv)로부터의 항원-결합 도메인으로 구성된다. 또한 수용체 또는 리간드 도메인에 기초한 결합 부분은 CAR을 제조하는데 성공적으로 사용되었다. T 세포 수용체(TCR)의 공동-자극 분자(co-stimulatory molecules)로부터의 신호 도메인과 특정 막관통 및 힌지 도메인이 추가되어 제2 및 제3세대의 CAR을 형성하여, 인간에게서의 성공적인 치료 시험을 나타내었다. 이들 연구에서, 혈액(“액체”)암을 앓고 있는 환자로부터의 T-세포는 예를 들어 CD19 또는 CD22를(June et al., 2011, Haso et al., 2013) 발현하는 악성 세포에 대해 재지정되고(redirected), 동일한 환자에게 재주입되었다.(Haso W, Lee DW, Shah NN, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, Pastan IH, Dimitrov DS, Morgan RA, FitzGerald DJ, Barrett DM, Wayne AS, Mackall CL, Orentas RJ. Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2013 Feb 14;121(7):1165-74. doi: 10.1182/blood-2012-06-438002. Epub 2012 Dec 14).
- [0005] 일반적으로 암으로 고통받는 동일한 개인들에게 재주입하기 전에 한 개인의 면역 세포가 조작되도록하는 방법(대개 암으로 고통받는)은 특히 시간에 대해 경합일 수 있는 공격적인 형태의 암에 적합하지 않다. 또한, 이러한 방법은 면역 체계가 변경된 환자에게는 문제가 있거나 확실하지 않을 수 있다.
- [0006] 이 문제를 완화하기 위해, 최근 “동종” T 세포(유니버설 또는 “오프 더 셸프” T 세포라고도 함)로 불리는 CAR-발현을 이용한 면역요법이 시행되었고, 이러한 세포로 치료된 최초의 두 환자는 치료 후 약 2년 후에도 여전히 회복중이다.
- [0007] 그럼에도 불구하고, 항-T 세포 약물의 존재 효율, 암 세포 이탈에 대한 효율, 지속성, 제어수단 등과 같이 개선될 수 있는 요법의 측면이 여전히 존재한다. 실제로, 암 세포는 CAR에 의해 인식되는 표면 항원의 발현을 하향 조절(downregulating)함으로써, 암 세포는 치료된 환자에서 재지정된 면역의 지속성에도 불구하고 치료를 피하고 지속될 수 있는 것으로 보인다.
- [0008] 또한, 자가 또는 동종 T 세포로 치료된 환자에서 관찰되는 일차적인 부작용, 때로는 치명적인 효과 중 하나는 사이토카인 방출 증후군(cytokine release syndrome)이다. 따라서, 이들 병리에 대해 효율적이고 안전한 치료법을 개발할 필요가 있으며, 특히 공격적이거나 불응성/재발된 형태의 혈액암에 대해서는 더욱 그러하다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0009] 여기서, 본 발명자들은 CD22를 표적으로 하는 키메라 항원 수용체 및 생체 내 상기 세포의 수를 제어할 수 있는 안전 마커를 제공하는 적어도 TRAC 유전자의 결실을 갖는 조작된 1차 인간 T 세포를 포함하는 새롭고 효율적인 치료(“UCART22”)를 개발하였다.
- [0010] 적어도 TRAC 유전자의 결실을 갖는 조작된 1차 인간 T 세포를 포함하는 새롭고 효율적인 치료(“UCART22”)에서, CD52, dCK, 베타2마이크로글로불린(beta2microglobulin)에서의 하나 이상의 추가 결실의 유전자가 고려된다.
- [0011] 이들 새로운 UCART22는 상기 환자가 면역 세포의 초기 공여자인지 여부 및 상기 환자가 이미 면역에 영향을 미치는 치료법이 있는지 여부와 관계없이 CD22 매개 병리를 앓고 있는 환자에서 적응적 전송(adoptive transfer)

에 특히 효과적이다.

[0012] 본 발명의 UCART 22 세포는 CD22- 매개 병리, 예컨대 캠퍼스(Campath) 및/또는 퓨린 뉴클레오티드 유사체(PNAs)를 치료하기 위해 일반적으로 사용되는 하나 이상의 화학 또는 항체 약물에 내성이 있다. 본 발명의 UCART22 세포는 세포의 80% 이상을 사멸시키는 용량으로 사용된 상기 약물의 존재하에 생존하며 활성화될 수 있다.

[0013] 낮은 사이토카인 방출, 숙주에 대한 매우 가벼운 이식 또는 불완전한 재발 형태의 혈액암 세포에 대한 상당한 활성을 포함하여 조작되며 단리된 1차 면역 세포 UCART22의 현저하고 예상치 못한 임상적 이점이 관찰된다.

[0014] 이 연구에서는 다른 장점들도 개시된다.

### 과제의 해결 수단

[0015] 이 연구는 하기를 제공한다.

[0016] 1. CD22에 특이적인 키메라 항원 수용체(UCART22)가 부여되는(endowed) 조작된 인간 T 세포 수용체 녹아웃(Knock Out)(TCR KO) 세포, 바람직하게는 상기 세포 표면에서 발현되는 안전 스위치(safety switch)로서,

[0017] 상기 항-CD22 CAR (CD22 CAR)은

[0018] i) 적어도 하나의 세포외 도메인은

[0019] - CD8alpha의 힌지 도메인

[0020] - CD22에 특이적인 항원 결합 도메인, 선택적으로 리더 서열(leader sequence)을 포함하고,

[0021] ii) CD8alpha로부터의 막관통(transmembrane) 도메인, 및

[0022] iii) 상기 CD22 CAR이 서열번호 15와 80% 이상의 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열을 갖는 세포 내 신호 전달 도메인을 포함하고,

[0023] 상기 안전 스위치(safety switch)는

[0024] 펩티드 2A에 의해 상기 CD22 CAR에 일시적으로 연결된 RQR8, 또는

[0025] 바람직하게는 VH 및 상기 힌지 도메인 사이에 위치한 적어도 2개의 리툭시맙(rituximab) mAb-특이적 에피토프(epitopes) 또는

[0026] 3개의 리툭시맙(rituximab) mAb-특이적 에피토프(epitopes) 또는,

[0027] 3개의 리툭시맙(rituximab) mAb-특이적 에피토프(epitopes) 및 상기 CD22 CAR에 연결된 QBEN-10 mAb- 특이적 에피토프(epitopes)를 포함한다.

[0028] 2. 실시예 1에 있어서, 서열번호 11과 80%이상의 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드 서열이 게놈에 삽입되고, 서열번호 18에 삽입, 결실 또는 돌연변이를 갖는 불활성화 된 TRAC 유전자를 더 포함하며, 유세포(flow cytometry) 분석법에 의해 측정된 상기 세포 표면에서의 TCR(T Cell Receptor)의 검출 불가능한 수준, 및 가이드 서열 기술(guide sequence technique)에 의해 측정된 검출 불가능한 수준의 오프 사이트 이벤트(off site events)인 UCART22.

[0029] 상기 2에 따른 UCART22에 있어서, 상기 항-CD22 CAR은 바람직하게는 상기 TRAC 유전자에 삽입되거나, 바람직하게는 서열번호 18로 삽입된다.

[0030] 3. 실시예 1 내지 2 중 어느 하나에 있어서, dCK 유전자, B2M 유전자, CD52유전자, 바람직하게는 CD52 유전자로부터 선택된 다른 불활성된 유전자를 포함하는 UCART22.

[0031] 4. 실시예 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나 이상의 추가 유전자가 불활성화되고, 상기 유전자는 아릴 탄화수소 수용체(AHR), 형질 전환 성장 인자 베타 수용체(TGF beta receptor), 인터루킨(Interleukin) 10 수용체(IL-10R), 프로그램 세포 사멸 단백질 1의 조합으로부터 선택되는 UCART22.

[0032] 5. 실시예 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 베타 2 마이크로글로불린(B2M)을 인코딩(encoding)하는 유전자가 불활성된 UCART22.

[0033] 6. 실시예 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 아릴 탄화수소 수용체(AHR)를 인코딩하는 유전자가 불활성된



UCART22.

- [0034] 7. 실시예 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, 형질 전환 성장 인자 베타 수용체(TGF 베타 수용체)를 인코딩하는 유전자가 불활성된 UCART22.
- [0035] 8. 실시예 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 인터루킨 10 수용체(IL-10R)를 인코딩하는 유전자가 불활성된 UCART22.
- [0036] 9. 실시예 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 프로그램 세포 사멸 단백질 1(PD1)을 인코딩하는 유전자가 불활성된 UCART22.
- [0037] 5. 실시예 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, CD19, CD20, CD30, 주요 조직 적합성 복합체(MHC) 분자, 면역글로불린(Ig), CD3, CD5, CD34, CD79, 바람직하게는 CD79b, CD138, B7-1(CD80), BCMA(CD269, TNFRSF 17), FLT-3, 또는 PAX5, 바람직하게는 CD19로부터 선택된 종양 관련 표면 항원(tumor-associated surface antigens) 중 임의의 하나에 특이적인 추가의 scfv를 포함하는 UCART22.
- [0038] 6. 실시예 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 상기 CD22 CAR는 CD19에 특이적인 항원 결합 도메인을 더 포함하거나 상기 UCART22는 CD19 CAR, 바람직하게는 서열번호 25 또는 서열번호 26과 80% 이상의 동일성을 갖는 CD19 CAR를 더 포함하는 UCART22.
- [0039] UCART22.
- [0040] 7. 실시예 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 상기 항-CD22 CAR는 단일-체인(single-chain) CAR 또는 다중-체인(multi-chain) CAR인 UCART22.
- [0041] 8. 실시예 5 또는 6에 있어서, 상기 항-CD19 CAR는 단일-체인(single-chain) CAR 또는 다중-체인(multi-chain) CAR인 UCART22.
- [0042] 상기 중 어느 하나에 있어서, 항-CD22 CAR은 CD19에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 단일-체인 CAR인 UCART22.
- [0043] 상기 중 어느 하나에 있어서, 항-CD22 CAR은 CD20에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 단일-체인 CAR인 UCART22.
- [0044] 상기 중 어느 하나에 있어서, 항-CD22 CAR은 CD30에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 단일-체인 CAR인 UCART22.
- [0045] 상기 중 어느 하나에 있어서, 항-CD22 CAR은 주요 조직 적합성 복합체(MHC) 분자에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 단일-체인 CAR인 UCART22.
- [0046] 상기 중 어느 하나에 있어서, 항-CD22 CAR은 면역 글로불린(IG)에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 단일-체인 CAR인 UCART22.
- [0047] 상기 중 어느 하나에 있어서, 항-CD22 CAR은 CD3에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 단일-체인 CAR인 UCART22.
- [0048] 상기 중 어느 하나에 있어서, 항-CD22 CAR은 CD5에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 단일-체인 CAR인 UCART22.
- [0049] 상기 중 어느 하나에 있어서, 항-CD22 CAR은 CD34에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 단일-체인 CAR인 UCART22.
- [0050] 상기 중 어느 하나에 있어서, 항-CD22 CAR은 CD79, 바람직하게는 CD79b에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 단일-체인 CAR인 UCART22.
- [0051] 상기 중 어느 하나에 있어서, 항-CD22 CAR은 CD138에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 단일-체인 CAR인 UCART22.
- [0052] 상기 중 어느 하나에 있어서, 항-CD22 CAR은 CD80에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 단일-체인 CAR인 UCART22.
- [0053] 상기 중 어느 하나에 있어서, 항-CD22 CAR은 BCMA(CD269)에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 단일-체인 CAR인 UCART22.
- [0054] 상기 중 어느 하나에 있어서, 항-CD22 CAR은 TNFRSF 17에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 단일-체인 CAR인 UCART22.
- [0055] 상기 중 어느 하나에 있어서, 항-CD22 CAR은 FLT-3에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 단일-체인 CAR인 UCART22.
- [0056] 상기 중 어느 하나에 있어서, 항-CD22 CAR은 CD19에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 다중-체인 CAR인 UCART22.  
상기 중 어느 하나에 있어서, 항-CD22 CAR은 CD79 a 또는 CD79b에 특이적인 추가 scfv를 포함하는, 다중-체인

CAR인 UCART22.

- [0057] 상기 중 어느 하나에 있어서, 항-CD22 CAR은 CD20에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 다중-체인 CAR인 UCART22.
- [0058] 상기 중 어느 하나에 있어서, 항-CD22 CAR은 CD30에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 다중-체인 CAR인 UCART22.
- [0059] 상기 중 어느 하나에 있어서, 항-CD22 CAR은 주요 조직 적합성 복합체(MHC) 분자에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 다중-체인 CAR인 UCART22.
- [0060] 상기 중 어느 하나에 있어서, 항-CD22 CAR은 면역 글로불린(IG)에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 다중-체인 CAR인 UCART22.
- [0061] 상기 중 어느 하나에 있어서, 항-CD22 CAR은 CD3에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 다중-체인 CAR인 UCART22.
- [0062] 상기 중 어느 하나에 있어서, 항-CD22 CAR은 CD5에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 다중-체인 CAR인 UCART22.
- [0063] 상기 중 어느 하나에 있어서, 항-CD22 CAR은 CD34에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 다중-체인 CAR인 UCART22.
- [0064] 상기 중 어느 하나에 있어서, 항-CD22 CAR은 CD138에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 다중-체인 CAR인 UCART22.
- [0065] 상기 중 어느 하나에 있어서, 항-CD22 CAR은 CD80에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 다중-체인 CAR인 UCART22.
- [0066] 상기 중 어느 하나에 있어서, 항-CD22 CAR은 BCMA(CD269)에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 다중-체인 CAR인 UCART22.
- [0067] 상기 중 어느 하나에 있어서, 항-CD22 CAR은 TNFRSF 17에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 다중-체인 CAR인 UCART22.
- [0068] 상기 중 어느 하나에 있어서, 항-CD22 CAR은 FLT-3에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 다중-체인 CAR인 UCART22.
- [0069] 9. 실시예 1 내지 8 중 어느 하나에 따른 UCART22를 포함하는 UCART 세포 집단(a population of UCART cells).
- [0070] 10. UCART19, 바람직하게는 상기 세포 표면에서 서열번호 25 또는 서열번호 26의 서열을 포함하는 항-CD19 CAR을 발현하는 UCART19를 포함하는 실시예 9에 따른 UCART 세포 집단.
- [0071] 11. 연속적인(적어도 한번) 또는 병용하는 또는 연속적이며(적어도 한번) 그 후 그것을 필요로 하는 환자에게 병용 투여를 위해 UCART22 및 UCART19를 포함하는
- [0072] 키트.
- [0073] 12. 상기 UCART19는 적어도 1회, 2회, 3회, 4회 또는 여러 회 사용한 다음 UCART22를 단독으로 또는 상기 UCART19와 함께 사용하는 실시예 11에 따른 키트.
- [0074] 13. 상기 UCART22는 적어도 1회, 2회, 3회, 4회 또는 여러 회 사용한 다음 UCART19를 단독으로 또는 UCART22와 함께 사용하는 실시예 11 또는 12에 따른 키트.
- [0075] 14. 상기 UCART 전에 투여되는 림프구고갈(lymphodepleting) 치료를 더 포함하는
- [0076] 실시예 11 내지 13 중 어느 하나에 따른 키트.
- [0077] 15. 림프구제거(lymphodepletion)가 플루다라빈(fludarabine) 및 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 바람직하게는 -6 내지 -2일(on days 6 to 2)에 플루다라빈  $25\text{mg}/\text{m}^2$  i.v.  $\times$  5 용량(5 doses) 및 -5일(on days 5)에 1회(1 dose) 시클로포스파미드  $60\text{mg}/\text{kg}$  i.v.을 사용하여 달성되는 실시예 11 내지 14 중 어느 하나에 따른 키트.
- [0078] 16. CD79a, CD79b, CD20, CD30, CD52, CD40, CD80, CD86, CD74, VEGF로부터 선택된 암 항원에 대한 하나 이상의 다른 UCART 세포를 포함하는 실시예 11 내지 15 중 어느 하나에 따른 키트.
- [0079] 17. 실시예 1 내지 8 중 어느 하나를 포함하는 UCART22 또는 실시예 9 또는 10에 따른 UCART22 및 약학적으로 허용되는 부형제(excipient)를 포함하는 세포 집단을 포함하는 약학 조성물(A pharmaceutical composition).
- [0080] 18. 브리오스타틴(Bryostatins), 바람직하게는 브리오스타틴-1(Bryostatins-1)을 더 포함하는 실시예 17에 따른 약학 조성물.
- [0081] 19. CD22+/- 매개 암(mediated cancer) 또는 CD22+/- 매개 염증성 질환(mediated inflammatory disease)을 앓고 있는 환자를 예방 또는 치료하기 위한 약물로서 사용하기 위한 실시예 17 또는 18의 약학 조성물 또는 실시예

11 내지 16 중 어느 하나에 따른 키트.

- [0082] 20. CD19+<sup>-</sup> 매개 암(mediated cancer) 또는 CD19+<sup>-</sup> 매개 염증성 질환(mediated inflammatory disease)을 앓고 있는 환자를 예방 또는 치료하기 위한 약물로서 사용하기 위한 실시예 17 내지 18 중 어느 하나에 따른 약학 조성물 또는 실시예 11 내지 16 중 어느 하나에 따른 키트.
- [0083] 21. CD19+CD22+<sup>-</sup> 매개 암(mediated cancer) 또는 CD19+CD22+<sup>-</sup> 매개 염증성 질환(mediated inflammatory disease)을 앓고 있는 환자를 예방 또는 치료하기 위한 약물로서 사용하기 위한 실시예 17 내지 18 중 어느 하나에 따른 약학 조성물 또는 실시예 11 내지 16 중 어느 하나에 따른 키트.
- [0084] 22. 환자를 치료하는 것은 암의 재발/불응성 발생을 피하기 위해 상기 약학적 조성물을 적어도 2회(재투여) 투여하는 단계를 포함하는 실시예 19 또는 21에 따른 용도를 위한 실시예 17 내지 18 중 어느 하나에 따른 약학 조성물 또는 실시예 11 내지 16 중 어느 하나에 따른 키트.
- [0085] 23. 림프종(lymphoma), 호지킨 림프종(Hodgkin lymphoma), 비호지킨 림프종(non Hodgkin lymphoma), 백혈병(leukemia), 다발성 골수종(multiple myeloma), B-만성 림프구성 백혈병(B-chronic lymphocytic leukemia), 털 세포 백혈병(hairy cell leukemia), 급성 림프구성 백혈병(acute lymphocytic leukemia (ALL)), 및 버킵트 림프종(Burkitt's lymphoma), 급성 림프구성 암(acute lymphocytic cancer), 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia)으로부터 선택된 CD22-매개 혈액암, 바람직하게는 림프종(lymphoma), 호지킨 림프종(Hodgkin lymphoma), 비호지킨 림프종(non Hodgkin lymphoma), 백혈병(leukemia), 다발성 골수종(multiple myeloma), B-만성 림프구성 백혈병(B-chronic lymphocytic leukemia), 털 세포 백혈병(hairy cell leukemia), 급성 림프구성 백혈병(acute lymphocytic leukemia (ALL)), 및 버킵트 림프종(Burkitt's lymphoma), 급성 림프구성 암(acute lymphocytic cancer), 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia)으로부터 선택된 CD22 발현 혈액암, 더욱 바람직하게는 재발성 불응성 CD22-발현 혈액암(a relapse refractory CD22-expressing hematological cancer), 더욱더 바람직하게는 상기 CD22-관련 혈액암의 공격적인 형태를 치료하기 위한
- [0086] 실시예 19 또는 21에 따른 용도를 위한 실시예 17 내지 18 중 어느 하나에 따른 약학 조성물 또는 실시예 11 내지 16 중 어느 하나에 따른 키트.
- [0087] 24. 림프종(lymphoma), 호지킨 림프종(Hodgkin lymphoma), 비호지킨 림프종(non Hodgkin lymphoma), 백혈병(leukemia), 다발성 골수종(multiple myeloma), B-만성 림프구성 백혈병(B-chronic lymphocytic leukemia), 털 세포 백혈병(hairy cell leukemia), 급성 림프구성 백혈병(acute lymphocytic leukemia (ALL)), 및 버킵트 림프종(Burkitt's lymphoma), 급성 림프구성 암(acute lymphocytic cancer), 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia)으로부터 선택된 CD19-매개 혈액암, 바람직하게는 림프종(lymphoma), 호지킨 림프종(Hodgkin lymphoma), 비호지킨 림프종(non Hodgkin lymphoma), 백혈병(leukemia), 다발성 골수종(multiple myeloma), B-만성 림프구성 백혈병(B-chronic lymphocytic leukemia), 털 세포 백혈병(hairy cell leukemia), 급성 림프구성 백혈병(acute lymphocytic leukemia (ALL)), 및 버킵트 림프종(Burkitt's lymphoma), 급성 림프구성 암(acute lymphocytic cancer), 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia)으로부터 선택된 CD19 발현 혈액암, 더욱 바람직하게는 재발성 불응성 CD19-발현 혈액암(a relapse refractory CD22-expressing hematological cancer), 더욱더 바람직하게는 상기 CD19-관련 혈액암의 공격적인 형태를 치료하기 위한
- [0088] 실시예 20 또는 21에 따른 용도를 위한 실시예 17 내지 18 중 어느 하나에 따른 약학 조성물 또는 실시예 11 내지 16 중 어느 하나에 따른 키트.
- [0089] 25. B ALL을 발현하는 재발성 또는 불응성, 바람직하게는 소아 적응증(pediatric indication)을 치료하기 위한 실시예 19 내지 22 중 어느 하나에 따른 용도를 위한 실시예 17 내지 18 중 어느 하나에 따른 약학 조성물 또는 실시예 11 내지 16 중 어느 하나에 따른 키트.
- [0090] 26. 환자 치료는 하나 이상의 단일클론항체(mAb)를 투여하는 것을 포함하고, 바람직하게는 QBEN10 및/또는 리톡시맵을 환자에서 상기 UCART22를 적어도 하나의 특정 mAb와 접촉시키는 것을 허용하는 용량으로 투여하는 실시예 19 내지 25 중 어느 하나에 따른 용도를 위한 실시예 17 내지 18 중 어느 하나에 따른 약학 조성물 또는 실시예 11 내지 16 중 어느 하나에 따른 키트.
- [0091] **CD22 CAR의 실시예**
- [0092] 본 발명은 FcRIII α, CD8α, IgG1, IgG4 및 PD1, 바람직하게는 CD8 α 또는 IgG4로부터 선택된 힌지 도메인을 포함하는 항-CD22 CAR을 제공한다.

- [0093] 상기 항-CD22 CAR는 링커 L1, 바람직하게는 1 내지 3개의 “GGGGS” 모티프(motif), 보다 바람직하게는 하나의 “GGGGS” 모티프를 포함하는 링커에 의해 서로 연결된 VH 및 VL을 포함하는 CD22에 특이적인 scfv이다.
- [0094] 상기 어느 하나에 따른 항-CD22 CAR에서 CD22에 특이적인 상기 scfv는 FcRIIIa, CD8alpha, IgG1, 바람직하게는 CD8 alpha로부터의 힌지로부터 선택된 힌지에 의해 막관통(transmembrane) 도메인에 연결된다.
- [0095] 상기 어느 하나에 따른 항-CD22 CAR은 세포 도메인을 포함하며, 상기 세포 내 도메인은 CD3 zeta 신호 전달 도메인 및 4-1BB 신호 전달 도메인을 포함한다.
- [0096] 상기 항-CD22 CAR 중 적어도 하나에서, 상기 항-CD22 CAR은 적어도 하나, 바람직하게는 2, 3, 또는 4개의 모노클로날 항체(mAb)-특이적 에피토프, 바람직하게는 CD22에 특이적인 scfv 링커 L 및/또는 힌지에 삽입된 2개를 포함한다.
- [0097] 상기 어느 하나에 따른 항-CD22 CAR에서 상기 mAb-특이적 에피토프는 다음으로부터 선택되는 폴리펩티드이다 : CPYSNPCLC, NSELLSLINDMPITNDQKKLMSNN, CQFDLSTRRLKC, CQYNLSSRALKC, CVWQRWQKSYVC, CVWQRWQKSYVC, SFVLNWMSPSPNQTDKLAAPFEDR, SGTLYCGAISLAPKAQIKE, ELPTQGTFSNVSTNVSPAKPTTTA, ELPTQGTFSNVSTNVSPAKPTTTA, GQNDTSQTSSPS, 바람직하게는 ELPTQGTFSNVSTNVSPAKPTTTA 및/또는 CPYSNPCLC (서열번호 19).
- [0098] 본 발명은 상기 어느 하나에 따른 항-CD22 CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 상기 항-CD22 CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 어느 하나에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는 상기 폴리뉴클레오티드 중 어느 하나에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터와 적어도 80 % 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0099] 이하에 개시된 바와 같이, 다른 유전자는 상기 UCART22, 특히 dCK 유전자, B2M 유전자, CD52 유전자에서 편집된다.
- [0100] **UCART 제공**
- [0101] 상기 UCART22는 적어도 하나 이상의 추가 유전자가 편집 또는 조작되며, 상기 유전자는 아릴 탄화수소 수용체(AHR), 형질 전환 성장 인자 베타 수용체(TGF beta receptor), 인터루킨(Interleukin) 10 수용체(IL-10R), 프로그램 세포 사멸 단백질 1의 조합으로부터 선택되는 UCART 22가 제공된다.
- [0102] 상기 UCART22 에서 적어도 하나 이상의 추가 유전자는 활성 및/또는 발현을 불활성화하는 돌연변이, 결실 또는 삽입을 포함하며, 상기 유전자는 아릴 탄화수소 수용체(AHR), 형질 전환 성장 인자 베타 수용체(TGF beta receptor), 인터루킨(Interleukin) 10 수용체(IL-10R), 프로그램 세포 사멸 단백질 1의 조합으로부터 선택된다.
- [0103] 상기 UCART22 에서 적어도 하나 이상의 추가 유전자는 활성 및/또는 발현을 불활성화하는 돌연변이, 결실 또는 삽입을 포함하며, 상기 유전자는 아릴 탄화수소 수용체(AHR), 형질 전환 성장 인자 베타 수용체(TGF beta receptor), 인터루킨(Interleukin) 10 수용체(IL-10R)의 조합으로부터 선택된다.
- [0104] 상기 UCART22 에서 적어도 하나 이상의 추가 유전자는 활성 및/또는 발현을 불활성화하는 돌연변이, 결실 또는 삽입을 포함하며, 상기 유전자는 형질 전환 성장 인자 베타 수용체(TGF beta receptor), 인터루킨(Interleukin) 10 수용체(IL-10R), 프로그램 세포 사멸 단백질 1의 조합으로부터 선택된다.
- [0105] 상기 UCART22 에서 적어도 하나 이상의 추가 유전자는 활성 및/또는 발현을 불활성화하는 돌연변이, 결실 또는 삽입을 포함하며, 상기 유전자는 아릴 탄화수소 수용체(AHR), 인터루킨(Interleukin) 10 수용체(IL-10R), 프로그램 세포 사멸 단백질 1의 조합으로부터 선택된다.
- [0106] 상기 UCART22 에서 적어도 하나 이상의 추가 유전자는 활성 및/또는 발현을 불활성화하는 돌연변이, 결실 또는 삽입을 포함하며, 상기 유전자는 아릴 탄화수소 수용체(AHR), 형질 전환 성장 인자 베타 수용체(TGF beta receptor), 프로그램 세포 사멸 단백질 1의 조합으로부터 선택된다.
- [0107] 상기 CAR이 삽입될 수 있는 유전자는 하기 표 9에 기재되어 있다.
- [0108] 표 9: 본 발명의 CD22 CAR 조작된 T 세포에서 본 발명에 따라 불활성화될 수 있는 면역 체크포인트 단백질을 인코딩하는 유전자 목록.

경로(Pathway) <sup>*)</sup>		경로에서 비활성화될 수 있는 유전자 (Genes that can be inactivated In the pathway) <sup>*)</sup>
공동 억제 수용체 (Co-inhibitory receptors) <sup>*)</sup>	CTLA4 (CD152) <sup>*)</sup>	CTLA4, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22 <sup>*)</sup>
	PDCD1 (PD-1, CD279) <sup>*)</sup>	PDCD1 <sup>*)</sup>
	CD223 (lag3) <sup>*)</sup>	LAG3 <sup>*)</sup>
	HAVCR2 (tim3) <sup>*)</sup>	HAVCR2 <sup>*)</sup>
	BTLA(cd272) <sup>*)</sup>	BTLA <sup>*)</sup>
	CD160(by55) <sup>*)</sup>	CD160 <sup>*)</sup>
	IgSF 패밀리아) <sup>*)</sup>	TIGIT <sup>*)</sup>
		CD96 <sup>*)</sup>
		CRTAM <sup>*)</sup>
	LAIR1(cd305) <sup>*)</sup>	LAIR1 <sup>*)</sup>
사멸 수용체(Death receptors) <sup>*)</sup>	TRAIL <sup>*)</sup>	TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7 <sup>*)</sup>
	FAS <sup>*)</sup>	FADD, FAS <sup>*)</sup>
사이토카인 신호 (Cytokine signaling) <sup>*)</sup>	TGF-베타 신호 <sup>*)</sup>	TGFBRII, TGFBRI, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1 <sup>*)</sup>
	IL10 신호 <sup>*)</sup>	IL10RA, IL10RB, HMOX2 <sup>*)</sup>
	IL6 신호 <sup>*)</sup>	IL6R, IL6ST <sup>*)</sup>
TCR 신호 방지 <sup>*)</sup>	<sup>*)</sup>	CSK, PAG1 <sup>*)</sup>
(Prevention of TCR signaling) <sup>*)</sup>	<sup>*)</sup>	SIT1 <sup>*)</sup>
유도된 Treg(Induced Treg) <sup>*)</sup>	유도된 Treg <sup>*)</sup>	FOXP3 <sup>*)</sup>
소진을 제어하는 전사 인자 (Transcription factors controlling exhaustion) <sup>*)</sup>	소진을 제어하는 전사 인자 <sup>*)</sup>	PRDM1 (=blimp1, 이형 접합 마우스 는 wt 또는 조건부 KO 보다 만성 바 이러스 감염을 더 잘 제어) (=blimp1, heterozygotes mice control chronic viral infection better than wt or conditional KO) <sup>*)</sup>
		BATF <sup>*)</sup>
저산소 매개 내성 (Hypoxia mediated tolerance) <sup>*)</sup>	구아닐레이티드 시클라 제 유도된 iNOS <sup>*)</sup> (iNOS induced guanylated cyclase) <sup>*)</sup>	GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2, GUCY1B3 <sup>*)</sup>

\* 불드체는 본 발명의 UCART에서 불활성화된 보다 바람직한 유전자이다.\*

[0109]

[0110]

상기 UCART22는 상기 중 어느 하나에 따른 항-CD22 CAR(UCART22) 및 게놈에 삽입된 상기 항-CD22 CAR(UCART22)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 CD25 유전자로 포함한다.

[0111]

상기 어느 하나에 따른 UCART22에서 상기 항-CD22 CAR은 단일-체인 CAR 또는 다중-체인 CAR이다.

[0112]

상기 어느 하나에 따른 UCART22에서 상기 항-CD22 CAR은 CD19, CD20, CD30, 주요 조직 적합성 복합체(MHC) 분자, 면역 글로불린(Ig), CD3, CD5, CD34, CD79, 바람직하게는 CD79b, CD138, B7-1(CD80), BCMA(CD269, TNFRSF17), FLT-3, 또는 PAX5, 바람직하게는 CD19로부터 선택된 하기 종양-관련 표면 항원 중 어느 하나에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 단일-체인 CAR이다.

[0113]

상기 UCART22 중 어느 하나에 있어서, 항-CD22 CAR은 CD19에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 단일-체인 CAR이다.

[0114]

항-CD22 CAR 및 항-CD19 CAR로 발현되는 상기 UCART22 중 어느 하나는, 바람직하게는 서열번호 94 또는 서열번호 95를 나타낸다.

항-CD22 CAR가 CD20에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 단일-체인 CAR인 상기 중 어느 하나에 따른 UCART22.

항-CD22 CAR가 CD30에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 단일-체인 CAR인 상기 중 어느 하나에 따른 UCART22.

항-CD22 CAR가 주요 조직 적합성 복합체(major histocompatibility complex) (MHC) 분자에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 단일-체인 CAR인 상기 중 어느 하나에 따른 UCART22.

항-CD22 CAR가 면역글로불린(Ig)에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 단일-체인 CAR인 상기 중 어느 하나에 따른 UCART22.



항-CD22 CAR가 CD3에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 단일-체인 CAR인 상기 중 어느 하나에 따른 UCART22.

항-CD22 CAR가 CD5에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 단일-체인 CAR인 상기 중 어느 하나에 따른 UCART22.

항-CD22 CAR가 CD34에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 단일-체인 CAR인 상기 중 어느 하나에 따른 UCART22.

항-CD22 CAR가 CD79, 바람직하게는 CD79b에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 단일-체인 CAR인 상기 중 어느 하나에 따른 UCART22.

항-CD22 CAR가 CD138에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 단일-체인 CAR인 상기 중 어느 하나에 따른 UCART22.

항-CD22 CAR가 CD80에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 단일-체인 CAR인 상기 중 어느 하나에 따른 UCART22.

항-CD22 CAR가 BCMA (CD269)에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 단일-체인 CAR인 상기 중 어느 하나에 따른 UCART22.

항-CD22 CAR가 TNFRSF 17에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 단일-체인 CAR인 상기 중 어느 하나에 따른 UCART22,

항-CD22 CAR가 FLT-3에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 단일-체인 CAR인 상기 중 어느 하나에 따른 UCART22.

항-CD22 CAR가 다중-체인 CAR인 상기 중 어느 하나에 따른 UCART22.

항-CD22 CAR가 CD19에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 다중-체인 CAR인 상기 중 어느 하나에 따른 UCART22.

항-CD22 CAR가 CD79 a 또는 CD79b에 특이적인 추가 scfv를 포함하는, 다중-체인 CAR인 상기 중 어느 하나에 따른 UCART22.

항-CD22 CAR가 CD19에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 다중-체인 (mc) CAR인 상기 중 어느 하나에 따른 UCART22.

바람직하게는 서열번호 94 또는 서열번호 95의, 항-CD22 mcCAR 및 항-CD19CAR를 발현하는 상기 중 어느 하나에 따른 UCART22.

항-CD22 CAR가 CD20에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 다중-체인 CAR인 상기 중 어느 하나에 따른 UCART22.

항-CD22 CAR가 CD30에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 다중-체인 CAR인 상기 중 어느 하나에 따른 UCART22.

항-CD22 CAR가 주요 조직 적합성 복합체 (MHC) 분자에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 다중-체인 CAR인 상기 중 어느 하나에 따른 UCART22.

항-CD22 CAR가 면역글로불린 (Ig)에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 다중-체인 CAR인 상기 중 어느 하나에 따른 UCART22.

항-CD22 CAR가 CD3에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 다중-체인 CAR인 상기 중 어느 하나에 따른 UCART22.

항-CD22 CAR가 CD5에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 다중-체인 CAR인 상기 중 어느 하나에 따른 UCART22.

항-CD22 CAR가 CD34에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 다중-체인 CAR인 상기 중 어느 하나에 따른 UCART22.

항-CD22 CAR가 CD138에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 다중-체인 CAR인 상기 중 어느 하나에 따른 UCART22.

항-CD22 CAR가 CD80에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 다중-체인 CAR인 상기 중 어느 하나에 따른 UCART22.

항-CD22 CAR가 BCMA (CD269)에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 다중-체인 CAR인 상기 중 어느 하나에 따른 UCART22.

항-CD22 CAR가 TNFRSF 17에 특이적인 추가 scfv를 포함하는 다중-체인 CAR인 상기 중 어느 하나에 따른 UCART22,

항-CD22 CAR가 FLT-3에 특이적인 추가(additional) scfv를 포함하는 다중-체인 CAR인 상기 중 어느 하나에 따른 UCART22.

상기 중 어느 하나에 따른 UCART 22를 포함하는 세포들의 집단.

상기 중 어느 하나에 따른 UCART 22를 포함하는 세포들의 집단이고 여기서 상기 항-CD22 CAR를 발현하는 세포들

은 또한 항-CD19 CAR을 발현하고, 바람직하게는 상기 항-CD19 CAR는 세포 표면에서 서열번호 25 또는 서열번호 26의 서열을 포함한다.

본 발명의 약학 조성물로서 브리오스타틴 1과 같은 단백질 키나제 C 억제제에 선택적으로 조합되는(combined) CD22 CAR T 세포 (UCART22)는 CLL, ALL, 다발성 골수종(Multiple myeloma), (MM), 블라스틱 플라즈마사이토이드 수지상 세포 신생물(Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm) (BPDCN), 특히 불응성(refractory) / 재발성(relapse) ALL, 불응성(refractory) / 재발성(relapse) CLL 및 또는 이들 질병들의 공격적 형태들(aggressive forms), 더 바람직하게는 불응성(refractory) 또는 재발성(relapse) B-ALL의 치료에 특히 유용하다.

본 발명의 약학 조성물로서 브리오스타틴 1과 같은 단백질 키나제 C 억제제에 선택적으로 조합되는, m971로부터 유래되는, CD22 CAR T 세포 (UCART22)는 CLL, ALL, 다발성 골수종(Multiple myeloma), (MM), 블라스틱 플라즈마사이토이드 수지상 세포 신생물(Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm) (BPDCN), 특히 불응성(refractory) / 재발성(relapse) ALL, 불응성(refractory) / 재발성(relapse) CLL 및 또는 이들 질병들의 공격적 형태들(aggressive forms), 더 바람직하게는 불응성(refractory) 또는 재발성(relapse) B-ALL의 치료에 특히 유용하다.

본 발명의 조작된 면역 세포들은 더 적은 사이토카인 방출, 악성 세포들에 대해 높은 수준의 생체 내(in vivo) 활성을 나타낼 뿐만 아니라, 그것들의 수 및 활성이 제어되어 면역 요법에 대한 안전성 및 효율을 부여한다.

본 발명은 바람직하게는 세포 표면에서 발현되는, CD22에 특이적인 키메라 항원 수용체 (CD22 CAR)가 부여된(endowed) 조작된 인간 T 세포 수용체 녹아웃(Knock Out) (TCR KO) 세포 (UCART 22)를 제공하고,

여기서 상기 CD22 CAR는 하기를 포함한다:

i) 하기를 포함하는 적어도 하나의 세포의 도메인 :

- CD8alpha로부터의 힌지 도메인,
- CD22에 특이적인 항원 결합 도메인, 선택으로 리더(leader) 서열,

ii) CD8alpha로부터의 막관통(transmembrane) 도메인, 및

iii) 세포내(intracellular) 신호 전달(signaling) 도메인.

상기 UCART22는 적어도 하나의 추가적인(additional) 편집된(edited) 유전자, 바람직하게는 CD52 유전자에서 결실(deletion)을 포함한다.

본 발명은 또한 상기와 같은 UCART CD22를 제공하며, 여기서 항원 결합 도메인은 m917 항체 (m971)로부터 유래되는 CD22에 특이적인 scfv를 포함하고, 바람직하게는 상기 scfv는 서열번호 12, 서열번호 13, 서열번호 14로부터 그리고 서열번호 15로부터 선택되는 서열, 더 바람직하게는 서열번호 15로부터의 서열을 포함한다.

[0115] 또한 다른 실시예인 본 발명에서 CD22(CD22 CAR)에 특이적인 키메라 항원 수용체(UCART22)가 부여되는(endowed) 조작된 인간 T 세포 수용체 녹아웃(Knock Out)(TCR KO) 세포, 바람직하게는 상기 세포 표면에서 발현되며,

[0116] 상기 CD22 CAR (CD22 CAR)은

[0117] i) 적어도 하나의 세포의 도메인은

[0118] - CD8alpha의 힌지 도메인

[0119] - CD22에 특이적인 항원 결합 도메인, 선택적으로 리더 서열(leader sequence)을 포함하고,

[0120] ii) CD8alpha로부터의 막관통(transmembrane) 도메인, 및

[0121] iii) 세포 내 신호 전달 도메인을 포함하고,

[0122] 상기 UCART22는 적어도 하나의 추가 편집된 유전자, 바람직하게는 CD52 유전자 결실을 포함하며, 상기 항원 결합 도메인은 CD22의 디스탈 부분에 특이적인 scfv를 포함하고, 상기 CAR은 서열번호 20을 갖는다.

[0123] 상기에 따른 UCART CD22는 하기 서열을 포함한다:

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVK  
SRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDAFDIWGGTMVTSS  
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTIWSYLNWYQQRPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFRSGRSGTDFTLTI  
SSLQAEDFATYYCQQSYISIPQTFGGGTKLEIK 또는 상기 서열과 각각 80 내지 99 %의

[0124] 상동성을 갖는 서열.

[0125] 또한 본 발명은 서열번호 15의 폴리펩티드 및 안전 스위치를 포함하는 상기 UCART22 제공한다:

[0126] - 펩티드 2A에 의해 상기 CD22 CAR에 일시적으로 연결된 RQR8, 또는

[0127] - 적어도 2개의 리툭시맵(rituximab) mAb-특이적 에피토프(epitopes), 바람직하게는 3개의 리툭시맵(rituximab) mAb-특이적 에피토프(epitopes) 및 상기 CD22 CAR에 연결된 QBEN-10 mAb-특이적 에피토프(epitopes)를 포함한다.

[0128] [상기 CD22 CAR이 부여된 면역 세포의 분류 및/또는 결실 모두 허용].

[0129] 또한 본 발명은 하나 이상의 추가 편집된 유전자, 바람직하게는 CD52 유전자, 또는 dCK 유전자 또는 베타 2 마이크로글리블린 유전자 또는 CTIIA 유전자에서의 결실, 더 바람직하게는 CD52에서의 결실, 및/또는 저산소에 대한 내성을 부여하는 HIF-1 알파 유전자의 삽입을 포함하는 UCART22를 제공한다.

[0130] 본 발명은 알렘투주맵(alemtuzumab)과 조합하여 CD52 유전자에서 결실을 포함하는 상기 UCART 22를 제공한다.

[0131] 또한 본 발명은 상기 CD22 CAR이 저산소(5 % O<sub>2</sub> 미만, 바람직하게는 1 % O<sub>2</sub> 미만의 낮은 O<sub>2</sub> 농도) 하에서 발현되는 상기 UCART 22를 제공한다.

[0132] 또한 본 발명은 CD22 CAR 및 안전 스위치를 포함하는 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 상기 UCART 22를 제공한다.

[0133] 바람직한 실시예에서, 본 발명은 서열번호 22의 폴리뉴클레오티드 및 동일한 유전자의 서열번호 18, 바람직하게는 TRAC 유전자를 포함하는 상기 UCART22를 제공한다.

[0134] 또한 본 발명은 CD22 CAR 및 안전 스위치를 포함하는 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 상기 UCART 22를 제공한다.

[0135] 바람직한 실시예에서, 본 발명은 서열번호 20의 폴리뉴클레오티드 및 동일한 유전자의 서열번호 18, 바람직하게는 TRAC 유전자를 포함하는 상기 UCART22를 제공한다.

[0136] 본 발명은 상기 UCART22를 포함하는 세포 집단을 제공한다.

[0137] 본 발명은 상기 UCART 22 또는 상기 UCART 22 중 어느 하나를 포함하는 세포 집단 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0138] 특정 실시예에서, UCART CD19 및 약학적으로 허용되는 부형제와 조합하여 본 발명에 따른 UCART 22를 포함하는 약학 조성물 또는 상기 UCART 22를 포함하는 세포 집단이 제공된다. UCART 19 및 UCART 22는 동시에 환자의 암 세포 CD19 및 CD22 발현 수준의 함수로서 UCART 19 또는 UCART 22에 의해 동시에 또는 연속적으로 제공될 수 있다.

[0139] 특정 실시예에서, UCART 22/19 또는 UCART 19/22 (이중 특이적 CAR 단일 체인 또는 다중 체인 CAR 또는 CD19 CAR 및 CD22 CAR 둘 다를 발현하는 세포) 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물이 제공된다. 본 발명은 브리오스타틴 패밀리(bryostatin family)의 화합물, 바람직하게는 브리오스타틴 1을 추가로 포함하는 상기와 같은 약학적 조성물을 제공한다.

[0140] 본 발명은 환자를 치료하기 위한 약물로서 사용하기 위한 상기 치료 유효량의 UCART 22 또는 상기 UCART 22를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0141] 본 발명은 환자를 치료하기 위한 약물로서 사용을 위한 상기 치료 유효량의 상기 UCART 22 또는 상기와 같은 약학적 조성물을 제공하며, 환자 치료는 상기 치료 유효량의 UCART CD22를 적어도 2 회 투여(재투여)하거나 또는



재발을 피하기 위해 상기 약학적 조성물을 투여한다.

- [0142] 특정 실시예에서, 본 발명은 환자를 치료하기 위한 약물로서 사용을 위한 상기 중 어느 하나에 따른 UCART CD22 또는 상기 중 어느 하나에 따른 약학 조성물을 제공하며, 환자를 치료하는 것은 상기와 같이 UCART 22를 투여하는 것을 포함하거나 또는 재발을 피하기 위해 상기와 같은 약 2 회 이상의 제약 조성물을 투여하는 것을 포함한다.
- [0143] 본 발명은 CD22 관련 병리, 바람직하게는 CD22 관련 B-세포 악성 종양의 치료를 위해 상기와 같은 환자를 치료하기 위한 약물로서 사용을 위한 상기 치료적 유효량의 상기 UCART 22 또는 상기와 같은 약학적 조성물을 제공한다 (예 : CD22-관련 혈액 암).
- [0144] 특정 실시예에서, 본 발명은 다음을 제공한다:
- [0145] 림프종(lymphoma), 호지킨 림프종(Hodgkin lymphoma), 비호지킨 림프종(non Hodgkin lymphoma), 백혈병(leukemia), 다발성 골수종(multiple myeloma), B-만성 림프구성 백혈병(B-chronic lymphocytic leukemia), 털 세포 백혈병(hairy cell leukemia), 급성 림프구성 백혈병(acute lymphocytic leukemia (ALL)), 및 버킷트 림프종(Burkitt's lymphoma), 급성 림프구성 암(acute lymphocytic cancer), 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia)으로부터 선택된 CD22 발현 혈액암, 바람직하게는 재발성 불응성 CD22-발현 혈액암(a relapse refractory CD22-expressing hematological cancer), 더욱더 바람직하게는 상기 CD22-관련 혈액암의 공격적인 형태를 치료하기 위한 UCART22의 치료적 유효량 또는 약학 조성물.
- [0146] 바람직하게는 UCART22는 재발성 불응성 B ALL 환자를 치료하는데 사용된다.
- [0147] 본 발명은 폐포 횡문근 육종, 방광암 (예를 들어, 방광 암종), 골암, 뇌암 (예를 들어, 수 모세포종), 유방암, 항문 암, 항문관 또는 항문 직장, 눈의 암으로부터 선택된 암을 앓는 환자 간내 담관암, 관절 암, 목암, 담낭암, 담낭암, 코암, 코암, 중이 암, 구강암 외음부 암, 만성 림프 구성 백혈병, 만성 골수암, 대장 암, 식도 암, 자궁 경부암, 섬유 육종, 위장 암종 종양, 두 경부암 (예 : 두경부 편평 상피암), 갑상선암, 신장 암, 후두암, 간암, 폐암 (예를 들어, 비소 세포 폐암 종), 악성 중피종, 비만 세포종, 흑색 종, 비 인두 암, 난소 암, 췌장암, 복막 암, 복막 암, 장간막 암, 후두암, 전립선 암, 직장암, 신장 암, 피부암, 소장 암, 연조직 암, 고형 종양, 위암, 고환암, 갑상선암, 요관 암으로부터 고통받는 환자를 치료하기 위한 약물로서 사용을 위한 상기 치료 유효량의 상기 UCAR 22 또는 상기와 같은 약학적 조성물을 제공한다.
- [0148] 본 발명은 하기를 제공한다:
- [0149] 1. CD22에 특이적인 키메라 항원 수용체(UCART22)가 부여되는(endowed) 조작된 인간 T 세포 수용체 녹아웃(Knock Out)(TCR KO) 세포, 바람직하게는 상기 세포 표면에서 발현되며,
- [0150] 상기 항-CD22 CAR (CD22 CAR)은
- [0151] i) 적어도 하나의 세포외 도메인은
- [0152] - CD8alpha의 힌지 도메인
- [0153] - CD22에 특이적인 항원 결합 도메인, 선택적으로 리더 서열(leader sequence)을 포함하고,
- [0154] ii) CD8alpha로부터의 막관통(transmembrane) 도메인, 및
- [0155] iii) 세포 내 신호 전달 도메인을 포함하고,
- [0156] 상기 UCART22는 하나 이상의 추가 편집된 유전자, 바람직하게는 CD52 불활성화 된 유전자, dCK 불활성화 된 유전자, 베타 2 마이크로글로불린 불활성화 된 유전자 또는 삽입된 HIF-1 알파 유전자를 포함한다.
- [0157] 2. 제1에 따른 UCART CD22에서, 항원 결합 도메인은 CD22에 특이적인 scfv를 포함하고, 상기 scfv는 m917 항체(m971)로부터 유래되고, 바람직하게는 상기 scfv는 서열번호 12, 서열번호 13, 서열번호 14 또는 서열번호 15로부터 선택된 서열을 포함하고, 보다 바람직하게는 서열번호 15로부터 선택된 서열을 포함한다.
- [0158] 3. 제1 내지 제2 중 어느 하나에 따른 UCART 22에 있어서, 서열번호 15의 폴리펩티드 및 안전 스위치를 포함하여, 상기 안전 스위치는:
- [0159] - 펩티드 2A에 의해 상기 CD22 CAR에 일시적으로 연결된 RQR8,
- [0160] - 적어도 2개의 리톡시맵(rituximab) mAb-특이적 에피토프(epitopes), 바람직하게는 3개의 리톡시맵

(rituximab) mAb-특이적 에피토프(epitopes) 및 3개 이상의 리투시맵(rituximab) mAb-특이적 에피토프(epitopes) 및 상기 CD22 CAR에 연결된 QBEN-10 mAb-특이적 에피토프(epitopes)를 포함한다.

- [0161] [상기 CD22 CAR이 부여된 면역 세포의 분류 및/또는 결실 모두 허용].
- [0162] 4. 제1 내지 제3 중 어느 하나에 따른 UCART 22에 있어서, CD52 불활성화 유전자를 포함하고, 더 바람직하게는 CD52 불활성화 유전자 및 저항성 알렘투주맵(alemtuzumab) 및 저산소증을 부여하는 HIF-1 alpha 삽입 유전자를 포함한다.
- [0163] 5. 제1 내지 제4 중 어느 하나에 따른 UCART 22에 있어서, 상기 항-CD22 CAR은 낮은 O<sub>2</sub> 농도 (<5 % O<sub>2</sub>) 하에 세포 표면에서 발현된다.
- [0164] 6. 제1 내지 제5 중 어느 하나에 따른 UCART 22에 있어서, 제1 내지 5와 같이 항-CD22 CAR을 포함하는 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.
- [0165] 상기 중 어느 하나에 따른 UCART 22는 세포 표면에 항-CD22 CAR, TRAC 유전자에 삽입된 상기 항-CD22 CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 CD25 게놈 서열, B2M 게놈 서열 또는 PD1 게놈 서열에 삽입된 IL-12를 인코딩하는 외인성(exogenous) 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0166] 상기 중 어느 하나에 따른 UCART 22는 세포 표면에 항-CD22 CAR, TRAC 유전자에 삽입된 상기 항-CD22 CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 CD25 게놈 서열 또는 PD1 게놈 서열에 삽입된 IL-12를 인코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하고 IL-10 수용체, TGFbeta 수용체, TIM-3, LAG-3으로부터 선택된 게놈 KO 유전자를 추가로 포함한다.
- [0167] 7. 제1 내지 6 중 어느 하나에 따른 UCART 22에 있어서, 서열번호 22를 더 포함하는 폴리뉴클레오티드, 바람직하게는 동일한 TRAC 유전자에 서열번호 18 및 22의 서열을 포함한다.
- [0168] 8. 제1 내지 7 중 어느 하나에 따른 상기 UCART 22를 포함하는 세포 집단.
- [0169] 9. 제1 내지 7 중 어느 하나에 따른 UCART 22 또는 제8 에 따른 상기 UCART 22 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 세포 집단을 포함하는 약학 조성물.
- [0170] 10. 제9 에 따른 약학 조성물에 있어서, 브리오스타틴, 바람직하게는 브리오스타틴-1을 더 포함한다.
- [0171] 11. 환자를 치료하기 위한 약물로 사용하기 위한, 제1 내지 7 중 어느 하나에 따른 UCART 22의 치료 유효량 또는 제9 또는 제10에 따른 약학 조성물.
- [0172] 12. 제11 에 따른 환자를 치료하기 위한 약물로서 사용하기 위한 것으로 제1 내지 7 중 어느 하나에 따른 UCART 22의 치료 유효량 또는 제9 또는 제10에 따른 약학 조성물에 있어서, 환자를 치료하는 것은 재발을 피하기 위해 상기 치료 유효량의 UCART CD22 또는 상기 약학 조성물을 2 회 이상 (재투여) 투여하는 것을 포함한다.
- [0173] 13. 제11 또는 제12 에 따른 환자를 치료하기 위한 약물로서 사용하기 위한 것으로 제1 내지 7 중 어느 하나에 따른 UCART 22의 치료 유효량 또는 제9 또는 제10 에 따른 약학 조성물은 CD-관련 병리, 바람직하게는 CD22 관련 B-세포 악성 종양의 치료를 위한 것이다.
- [0174] 14. 혈액 암을 치료하기 위해 사용되는 제11 내지 제13 중 어느 하나에 따른 환자를 치료하기 위한 것으로 제1 내지 7 중 어느 하나에 따른 UCART 22의 치료 유효량 또는 제9 또는 제10 에 따른 약학 조성물은 약물로림프종(lymphoma), 호지킨 림프종(Hodgkin lymphoma), 비호지킨 림프종(non Hodgkin lymphoma), 백혈병(leukemia), 다발성 골수종(multiple myeloma), B-만성 림프구성 백혈병(B-chronic lymphocytic leukemia), 털 세포 백혈병(hairy cell leukemia), 급성 림프구성 백혈병(acute lymphocytic leukemia (ALL)), 및 버킷트 림프종(Burkitt's lymphoma), 급성 림프구성 암(acute lymphocytic cancer), 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia)으로부터 선택되며, 바람직하게는 CD22-발현 혈액암, 더욱 바람직하게는 재발성 불응성 CD22-발현 혈액암(a relapse refractory CD22-expressing hematological cancer), 더욱더 바람직하게는 더욱더 바람직하게는 상기 CD22-관련 혈액암의 공격적인 형태를 치료하기 위한 것이다.
- [0175] 15. 재발성 및/또는 내화성 CD22 양성 B-ALL의 치료에 사용되는 제11 내지 제13 에 따른 환자를 치료하기 위한 약물로서 사용하기 위한 것으로 제1 내지 7 중 어느 하나에 따른 UCART 22의 치료 유효량 또는 제9 또는 제10 에 따른 약학 조성물.
- [0176] 16. 제11 내지 제13 중 어느 하나에 따른 환자를 치료하기 위한 약물로서 사용하기 위한 것으로 제1 내지 제7

중 어느 하나에 따른 UCART 22의 치료 유효량 또는 제9 또는 제10에 따른 약학 조성물에 있어서, 상기 환자는 폐포 횡문근 육종, 방광암 (예를 들어, 방광 암종), 골암, 뇌암 (예를 들어, 수 모세포종), 유방암, 항문 암, 항문 암으로부터 선택된 암, 바람직하게는 CD22 + 세포에 의해 매개되는 암으로 고통 받는 또는 항문 직장, 눈 암, 간내 담관암, 관절 암, 목암, 담낭암, 담낭암, 코암, 비강 암, 비강 암 중이, 구강암, 외음부 암, 만성 림프 구성 백혈병, 만성 골수암, 결장암, 식도암, 자궁 경부암, 섬유 육종, 위장 암종 종양, 두 경부암 (예 : 두 경부 편평 세포 암종), 하인두암, 신장 암, 후두암, 간암, 폐암 (예를 들어, 비소 세포 폐암 종), 악성 중피종, 비만 세포종, 흑색 종, 비 인두 암, 난소 암, 췌장암, 복막 암, 중추 암, 장간막 암, 인두 암, 전립선 암, 직장 암, 신장 암, 피부암, 소장 암, 연조직 암, 고형 종양, 위암, 고환암, 갑상선암, 요관 암, 바람직하게는 간암 및 폐암으로부터 고통받는 환자.

## 도면의 간단한 설명

**도 1 :** 본 발명에 따른 조작된 면역 세포의 개략도

도 1에 제시된 조작된 면역 세포는 본 발명의 CAR을 인코딩(encoding)하는 폴리뉴클레오티드가 부여된 T-세포일 수 있다. 또한 이 T-세포는 환자에게 더 좋고 안전한 생착(engraftment)을 허용하도록 조작되었다. X, 또는 Y는 돌연변이, 결실 및/또는 삽입을 가질 수 있는 편집된 유전자이다. 예를 들어 T 세포 수용체(TCR)의 성분을 발현하는 유전자, 예를 들어 TCRalpha 또는 TCRbeta는 결실되거나 삽입을 포함할 수 있고, Y는 dCK(퓨린 뉴클레오티드 유사체에 대한 내성에 대해) 또는 CD52(캄파스에 대해) 또는 HPRT(6-티오구아닌에 대해)와 같은 면역 억제 약물에 대한 T-세포의 민감성에 관여하는 유전자일 수 있다.

**도 2 :** 단일 체인 및 다중 체인 CD22 CAR를 나타냄

도 2는 CD22에 특이적인 scfv, 선택적으로 안전 스위치, CD8 alpha의 힌지 및 막관통 도메인, 4-1BB 및 CD3 zeta의 세포 내 도메인, 선택적으로 저산소증에 대한 내성을 부여하는 도메인을 포함하는 본 발명에 따른 CD22 CAR의 예를 도시한다.

**도 3 :** 안전 스위치를 포함하는 본 발명의 CD22 CAR 구조체의 예이다.

적어도 리톡시맵(R)mAb-특이적 에피토프(블랙 박스), 바람직하게는 3 리톡시맵 mAb-특이적 에피토프 및 QBEN-10 (Q) mAb-특이적 에피토프(회색 박스)가 상기 CD22 CAR에 삽입된다.

R은 scfvd에, VH 및 VL 도메인 (또는 VL 및 VH 도메인) 사이 및/또는 힌지에 삽입될 수 있다.

**도 4 :** 폴리 뉴클레오티드에 의해 코딩된 폴리펩티드의 예

도 4는 안전 스위치(RQR8) 및 CD22 CAR이 세포 표면에서 발현되도록 절단될 폴리펩티드의 일예를 나타낸다.

R=CD20 미토포프(리톡시맵에 의해 결합), Q=CD34 에피토프(QBEnd10에 의해 결합)

**도 5 :** UCART22의 탈과립화 활성(Degranulating activity)

CD22 음성 SUP-T1 세포와 비교하여 CD22-양성 NALM-16 세포의 존재하에서

비 형질도입된 (NT) 또는 CD22의 원위 부분(scfv-V2)을 표적화하는 CAR로 형질 도입된 T 세포의 탈과립화 활성과 비교하여 UCART22(CD22의 프로시말(proximal) 도메인에 대한 scfv-V1)의 탈과립화 활성.

**도 6 :** UCART22의 세포 독성 활성

CD22 음성 SUP-T1 세포와 비교하여 CD22-양성 NALM-16 세포의 존재하에서

비 형질도입된 (NT) 또는 CD22의 원위 부분(scfv-V2)을 표적화하는 CAR로 형질 도입된 T 세포의 세포 독성 활성과 비교하여 UCART22(CD22의 프로시말(proximal) 도메인에 대한 scfv-V1)의 세포 독성 활성.

**도 7 :** UCART22의 인터페론 감마 생성

**도 8 :** 대조군 세포, UCART22(CD22의 프로시말(proximal) 도메인에 대한 scfv-V1) 또는 CART22(TRAC 결실 없음)의 존재하에 마우스 생존.

**도 9 :** TALEN을 사용하여 TRAC 유전자에 유전자를 삽입하는 일반 전략.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0178] 본 명세서에서는 구체적으로 정의되지 않는 한, 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 유전자 요법, 생화학, 유전학, 면역학 및 분자생물학 분야에서 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다.
- [0179] 본원 기재된 것들과 유사하거나 또는 동등한 모든 방법들 및 물질들은 여기에 기재된 적합한 방법들 및 물질들과 함께, 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있다. 여기에서 언급된 모든 공개문헌들, 특허 출원들, 특허들 및 다른 참고문헌들은 그것들 전체가 참고로서 포함된다. 상충되는 경우, 정의들을 포함하는 본 명세서가 이길 것이다. 나아가, 물질들, 방법들 및 예들은 설명적인 것일 뿐이며, 다르게 특정되지 않는 한, 제한하는 것으로 의도되지 않는다.
- [0180] 본 발명의 실시는, 다르게 표시되지 않는 한, 통상의 지식 내인, 세포생물학, 세포 배양, 분자생물학, 유전자 이식(transgenic) 생물학(biology), 미생물학, 재조합 DNA, 및 면역학의 현재 기술들을 포함할 것이다. 이러한 기술들은 문헌에서 완전히 설명된다. 예를 들어, Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, (Sambrook et al, 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al. U.S. Pat. No. 4,683,195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Harries & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the series, Methods In ENZYMOLOGY (J. Abelson and M. Simon, eds.-in-chief, Academic Press, Inc., New York), specifically, Vols.154 and 155 (Wu et al. eds.) and Vol. 185, "Gene Expression Technology" (D. Goeddel, ed.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); and Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986) 참조.
- [0181] **CD22 특이적 키메라 항원 수용체**
- [0182] 본 발명은 특히 CD22의 프로시말 도메인에 CD22에 결합할 수 있는 키메라 항원 수용체인 항-CD22 키메라 항원 수용체(CAR 또는 CD22 CAR 또는 항-CD22 CAR)의 새로운 디자인에 관한 것이다.
- [0183] 본 발명의 CD22 특이적 키메라 항원 수용체는 세포 외 리간드-결합 도메인 및 힌지, 선택적으로 자살 도메인, 막관통 도메인 및 신호 전달 도메인을 포함하는 세포 내 도메인을 포함하는 세포 외 도메인을 포함한다.
- [0184] 세포 표면에서 발현되는 본 발명에 따른 CD22 CAR은 세포 외 리간드-결합 도메인을 포함하는 세포 외 도메인을 포함한다.
- [0185] 본원에 사용된 용어 "세포 외 리간드-결합 도메인"은 CD22의 하나 이상의 에피토프에 결합할 수 있는 올리고-또는 폴리펩티드로 정의된다. 바람직하게는, 세포 외 리간드-결합 도메인은 CD22 및 다른 세포 표면 항원 또는 다른 막 결합 항원과 상호 작용하거나 CD22와 직접 상호 작용하거나 인간 CD22와 상호 작용하는 세포 표면 분자와 적어도 부분적으로 상호 작용할 수 있고, 보다 정확하게는 인간 CD22의 프로시말 영역과 직접 상호 작용하는 것이다(아미노산 243에서 아미노산 687까지).
- [0186] 일 예에서, 본 발명에 따른 CD22 CAR은 CD22의 프로시말 영역 (아미노산 243에서 아미노산 687으로) 및 CD22의 디스탈(distal) 부분과 상호 작용할 수 있는 세포 외 리간드-결합 도메인을 포함하는 세포 외 도메인을 포함한다(aa 20 내지 aa 425).
- [0187] 본 발명에서, CD22의 전장(full length) 세포 외 도메인은 아미노산 (aa) 20 내지 aa 687이고, CD22의 막 프로시말 도메인은 aa 243 내지 aa 687이며, CD22의 막 디스탈 도메인은 aa 20 내지 aa 425 이다.
- [0188] 일 예에서, 세포 외 리간드-결합 도메인은 특정 질환 상태와 관련된 표적 세포에서 세포 표면 마커로서 작용하는 특정 형태의(당화된) CD22를 인식하도록 선택될 수 있다.
- [0189] 바람직한 예에서, 상기 세포 외 리간드-결합 도메인은 링커에 의해 연결된 표적 항원 특이적 단일클론 항 CD22 항체의 경쇄(VL) 및 중쇄(VH) 가변 단편을 포함하는 하나 이상의 단일 체인 항체 단편(scFv), 특히 유연한 링커를 포함한다. 상기 VL 및 VH는 바람직하게는 하기 표 2에서와 같이 항체 m971로부터 유래된다. 이들은 바람직하게는 서열번호 10을 포함하는 유연한 링커에 의해 서로 연결된다.

[0190] 본 발명의 목적을 위해, 완전 인간 항-CD22 항체, m971 항체(m971)의 특정 부분은 파지(phage) 디스플레이 방법을 사용하여 미리 확인되고 특성화된다. (Xiao X, Ho M, Zhu Z, Pastan I, Dimitrov DS. Identification and characterization of fully human anti-CD22 monoclonal antibodies. mAbs. 2009;1(3):297-303) 본 발명에 따른 새로운 CD22 CARs를 생산하기 위해 특정 서열에 결합되었다. 또한 참조로 포함된 WO 2014065961에서 확인할 수 있다.

[0191] 본 발명의 바람직한 예는 표 1에서와 같이 m971의 항원 결합 도메인의 단일 체인 가변 단편(scFv)을 포함하는 항원-결합 도메인을 포함하거나 이로 본질적으로 이루어진 CARs를 제공한다.

### 표 1

[0192] CD22 CAR에서 다른 도메인의 서열

기능성 도메인 (Functional domains)	서열번호	로우 아미노산 서열(Raw amino acid sequence)
CD8 α 신호 펩티드 (또는 서열 리더)	서열번호 1	MALPVTALLPLALLHAARP
대체 신호 펩티드 (Alternative signal peptide)	서열번호 2	METDTLLLVLLLVPGSTG
Fc $\eta$ RIII α 힌지	서열번호 3	GLAVSTISSFFPPGYQ
CD8 α 힌지	서열번호 4	TTTPAPRPPTAPTIASQPSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD
IgG1 힌지	서열번호 5	EPKSPDKTHTCPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSMHEALHNYHTQKSLSLSPGK
CD8 α 막관통 도메인	서열번호 6	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
41BB 막관통 도메인	서열번호 7	IISFFLALTSTALLFLFLLTLRFSV
41BB 세포내 도메인	서열번호 8	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
CD3 $\xi$ 세포내 도메인	서열번호 9	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEG YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
링커	서열번호 10	GGGGSGGGSGGGGS

### 표 2

[0193] 다른 CD22 scfv VH 및 VL의 서열

ScFv 서열	서열번호	로우 아미노산 서열(Raw amino acid sequence)
m971-중쇄 가변영역	서열번호 12	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIQSPSRGLEWLGRITYYRSKWYNDYA VSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGLEDAFDIWGQGMVTVSS
m971-경쇄 가변영역	서열번호 13	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQTIWSYLNWYQQRPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFS RSGSGTDFTLTISSLQAEDFATYYCQQSYIPQTFGQGTKLEIK

### 표 3

[0194] 구조 V-1의 CD22 CAR

CAR 명칭	CAR 구조						
V-1	신호 펩티드	VH	VL	Fc $\eta$ RIII α 힌지	CD8 α TM	41BB -IC	CD3 $\xi$ CD
m971(서열번호 14)	서열번호 1	서열번호 12	서열번호 13	서열번호 3	서열번호 6	서열번호 8	서열번호 9

### 표 4



[0195]

구조 V-3의 CAR

CAR 명칭	CAR 구조						
V-3	신호펩티드	VH	VL	CD8 α 힌지	CD8 α -TM	41BB -IC	CD3 ζ CD
m971(서열번호 15)	서열번호 1	서열번호 12	서열번호 13	서열번호 4	서열번호 6	서열번호 8	서열번호 9

[0196]

바람직한 예에서, 본 발명의 CD22 CAR은 서열번호 15의 서열을 포함한다.

[0197]

바람직한 예에서, 본 발명의 CD22 CAR은 서열번호 23의 서열을 포함한다.

[0198]

본 발명의 CD22 CAR의 서열은 펩티드 신호, CD8 α의 TM 도메인 및 m971의 VH 및 VL 도메인 사이의 링커를 포함한다.

[0199]

SCFV

[0200]

본 발명에서, scfv는 면역 글로불린의 중쇄( $V_{H\text{도메인}}$ ) 및 경쇄( $V_{L\text{도메인}}$ )의 가변 영역의 융합 단백질 또는 10 내지 25개의 아미노산, 바람직하게는 서열번호 10의 짧은 링커 펩티드와 연결된 CD22에 특이적인 면역 글로불린의 일부이다.

[0201]

바람직한 실시예에서, 상기 CARs는 아미노산 서열번호 12와 적어도 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % 또는 100 % 동일성을 나타내는 폴리펩티드 서열을 포함하는 세포 외 리간드 결합 도메인을 우선적으로 포함한다. .

[0202]

바람직한 실시예에서, 상기 CARs는 아미노산 서열번호 13와 적어도 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % 또는 100 % 동일성을 나타내는 폴리펩티드 서열을 포함하는 세포 외 리간드 결합 도메인을 우선적으로 포함한다.

[0203]

바람직한 실시예에서, 상기 CARs는 아미노산 서열번호 12와 적어도 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % 또는 100 % 동일성을 나타내는 폴리펩티드 서열 및 서열번호 13으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % 또는 100 % 동일성을 나타내는 폴리펩티드 서열을 포함하는 세포 외 리간드 결합 도메인을 우선적으로 포함한다.

[0204]

힌지

[0205]

세포 외 도메인은 상기 세포 외 리간드-결합 도메인과 상기 막관통 도메인 사이의 힌지 영역을 추가로 포함할 수 있다. 본원에 사용된 용어 "힌지 영역"은 일반적으로 막관통 도메인을 세포 외 리간드-결합 도메인에 연결시키는 기능을 하는 임의의 올리고-또는 폴리펩티드를 의미한다. 특히, 힌지 영역은 세포 외 리간드-결합 도메인에 대한 더 많은 유연성 및 접근성을 제공하기 위해 사용된다. 힌지 영역은 최대 300 개의 아미노산, 바람직하게는 10 내지 100 개의 아미노산 및 가장 바람직하게는 10 내지 50 개의 아미노산을 포함할 수 있다. 힌지 영역은 CD8, 또는 CD4의 세포 외 영역의 전부 또는 일부, 또는 항체 불변 영역의 전부 또는 일부와 같이, 자연 발생 분자의 전부 또는 일부로부터 유래될 수 있다. 대안적으로, 힌지 영역은 자연 발생 힌지 서열에 상응하는 합성 서열일 수 있거나, 또는 전체 합성 힌지 서열일 수 있다. 바람직한 실시예에서, 상기 힌지 도메인은 본 명세서에서 각각 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 지칭되는 인간 CD8 α 체인, FcRIII α 수용체 또는 IgG1의 일부를 포함하거나, 보다 바람직한 실시예에서, 힌지 폴리펩티드는 서열번호 4와 80 % 이상, 바람직하게는 90 %, 95 %, 97 %, 99 % 또는 100 % 서열 동일성을 나타내며, 더욱 바람직하게는 서열번호 4와 100 % 서열 동일성을 나타낸다.

[0206]

IgG4 또는 PD1의 힌지는 본 발명의 일부이며 W02016120216에 개시되어 있으며 본 발명에 따른 CD22 CAR의 구성에 사용될 수 있다.

[0207]

본 발명에 따른 CD22 CAR은 세포의 막에 고정된다. 따라서, 이러한 CD22 CAR은 막관통 도메인을 추가로 포함한다. 적절한 막관통 도메인의 구별되는 특징은 세포, 바람직하게는 본 발명에서 면역 세포, 특히 림프구 세포 또는 자연 살해(NK) 세포의 표면에서 발현될 수 있고, 미리 정의된 표적 세포에 대한 면역 세포의 반응을 지시하기 위해 함께 상호 작용하는 능력을 포함한다. 막 통과 도메인은 천연 또는 합성 공급원으로부터 유래될 수 있다. 막관통 도메인은 막-결합 또는 막관통 단백질로부터 유래될 수 있다. 비제한적 예로서, 막관통 폴리펩티드는 CD3 복합체를 구성하는 α, β 또는 δ, 폴리펩티드, IL2 수용체 p55 (α 체인), p75 (β 체인) 또는 체인, Fc 수용체, 특히 Fc 수용체 III 또는 CD 단백질의 서브유닛 체인과 같은 T-세포 수용체의 서브유닛일 수 있다.

대안적으로, 막관통 도메인은 합성될 수 있으며, 류신 및 발린과 같은 주로 소수성 잔기를 포함할 수 있다.

- [0208] 바람직한 실시예에서, 상기 막관통 도메인은 인간 CD8 alpha 체인 (예를 들어, NP\_001139345.1)로부터 유래된다.
- [0209] 본 발명에 따른 CD22 CAR은 일반적으로 CD8 α로부터 막관통 도메인(TM)을 추가로 포함하며, 서열번호 6 또는 서열번호 7의 폴리펩티드와 동일성을 나타낸다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 CAR은 70 % 이상, 바람직하게는 80 % 이상, 보다 바람직하게는 서열번호 6의 폴리펩티드와 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % 또는 100 %의 서열 동일성을 나타내는 TM을 포함한다.
- [0210] 본 발명에 따른 CD22 CAR은 일반적으로 CD8 α로부터 막관통 도메인(TM)을 더 포함하며, 서열번호 6의 폴리펩티드와 동일성을 나타낸다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 CAR은 70 % 이상, 바람직하게는 80 % 이상, 보다 바람직하게는 서열번호 6의 폴리펩티드와 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % 또는 100 %의 서열 동일성을 나타내는 TM을 포함한다.
- [0211] 본 발명에 따른 CD22 CAR은 신호 전달 도메인 또는 세포 내 신호 전달 도메인을 포함하는 세포 내 도메인을 포함한다.
- [0212] 본 발명에 따른 CD22 CAR의 신호 전달 도메인 또는 세포 내 신호 전달 도메인은 면역 세포의 활성화 및 면역 반응을 야기하는 표적에 세포 외 리간드 결합 도메인의 결합 후 세포 내 신호 전달을 담당한다(표적 세포에 대한 세포 용해 활성화). 다시 말해, 신호 전달 도메인은 CAR이 발현되는 면역 세포의 정상 이펙터 기능 중 적어도 하나의 활성화를 담당한다. 예를 들어, T 세포의 효과기 기능은(effector function) 사이토카인의 분비를 포함하는 세포 용해 활성화 또는 헬퍼 활성화(helper activity)일 수 있다. 따라서, "신호 전달 도메인"이라는 용어는 효과기 신호 기능 신호를 형질 도입하고 세포가 특수화된 기능을 수행하도록 지시하는 단백질의 부분을 지칭한다.
- [0213] 본 발명의 CD22 CAR에서 신호 전달 도메인의 바람직한 예는 항원 수용체 결합 후 신호 전달을 개시하기 위해 협력하여 작용하는 T 세포 수용체 및 공-수용체의(co-receptors) 세포질 서열, 및 이들 서열의 임의의 유도체 또는 변이체 및 동일한 기능적 능력을 갖는 임의의 합성 서열일 수 있다. 신호 전달 도메인은 2 개의 상이한 부류의 세포질 신호 전달 서열, 항원-의존적 1 차 활성화를 개시하는 것 및 2 차 또는 공동-자극적 신호를 제공하기 위해 항원-비의존적인 방식으로 작용하는 것들을 포함한다. 1 차 세포질 신호 전달 서열은 ITAM의 면역 수용체 티로신-기반 활성화와 모티프로 알려진 신호 전달 모티프를 포함할 수 있다. ITAM은 syk/zap70 클래스 티로신 키나제(class tyrosine kinases)의 결합 부위로서 작용하는 다양한 수용체의 세포질 내 꼬리에서 발견되는 신호 전달 모티프이다. 본 발명에 사용된 ITAM의 예는 TCRzeta, FcRgamma, FcRbeta, FcRepsilon, CD3gamma, CD3delta, CD3epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b 및 CD66d로부터 유도된 것을 비 제한적인 예로서 포함할 수 있다. 바람직한 실시예에서, CAR의 신호 전달 형질 전환 도메인은 70 % 이상, 바람직하게는 80 % 이상, 보다 바람직하게는 90 % 이상, 95 % 97 % 99 % 또는 100 %의 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 서열 동일성을 갖는 CD3 제타 신호 전달 도메인을 포함할 수 있다(서열번호 9). 선택적으로 상기 CD3 제타 신호 전달 도메인은 서열번호 9와 90 %, 91 %, 92 % 93 % 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % 또는 100 % 동일성을 나타내는 폴리펩티드 서열을 포함한다.
- [0214] 보다 바람직한 실시예에서, CD22 CAR의 신호 전달 형질 전환 도메인은 서열번호 9의 CD3 제타 신호 전달 도메인으로 구성되며 인간 CD28 신호 전달 도메인으로부터 임의의 서열을 배제한다. 특정 실시예에서, 본 발명의 CAR의 신호 전달 도메인은 공동-자극성 신호 분자(co-stimulatory signal molecule)를 포함한다. 공동-자극성 분자는 효율적인 면역 반응에 필요한 항원 수용체 또는 그들의 리간드 이외의 세포 표면 분자이다. "공동-자극성 리간드"는 T-세포상의 동족 공동-자극성 분자에 특이적으로 결합하여 예를 들어, 일차 신호에 의해 제공되는 신호를 제공하는 항원 제시 세포상의 분자를 지칭하며, 펩티드가 로딩된 MHC분자와 TCR/CD3 복합체의 결합은 증식 활성화, 분화 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 T 세포 반응을 매개한다. 공동-자극성 리간드는 CD7, B7-1(CD80), B7-2(CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, 유도성 공동 자극성 리간드 (ICOS-L)를 포함 할 수 있지만 이에 제한되지는 않으며, 세포간 접촉 분자 (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, M1CB, HVEM, 림포토신 베타 수용체(lymphotoxin beta receptor), 3/TR6, ILT3, ILT4, 톨 리간드 수용체(Toll ligand receptor) 및 리간드에 결합하는 작용제 또는 항체 B7-H3에 특이적으로 결합한다. 또한 공동-자극성 리간드는 특히 CD27, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1과 같은 T 세포 상에 존재하는 공동-자극성 분자와 특이적으로 결합하는 ICOS, 림프구 기능 관련 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LTGHT, NKG2C, B7-H3, CD83과 특이적으로 결합하는 리간드 와 같은 항체를 포함한다.

- [0215] "공동-자극성 분자"는 공동-자극성 리간드와 특이적으로 결합하여 세포에 의한 공동-자극성 반응을 매개하지만, 이에 제한되지 않는 T-세포상의 동족 결합 파트너를 지칭한다. 공동-자극성 분자는 MHC 클래스 I 분자, BTLA 및 톨 리간드 수용체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 공동 자극성 분자의 예로서 CD27, CD8, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능 관련 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 및 CD83 등과 특이적으로 결합하는 리간드가 포함된다. 바람직한 실시예에서, 본 발명의 CAR의 신호 전달 도메인은 4-1BB(GenBank: AAA53133)의 단편으로 구성된 공동-자극성 신호 분자의 일부를 포함한다. 특히 본 발명의 CAR의 신호 전달 도메인은 서열번호 8로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 70 % 이상, 바람직하게는 80 % 이상, 보다 바람직하게는 90 % 이상, 95 % 97 % 99 % 또는 100 % 서열 동일성을 포함한다.
- [0216] 보다 바람직한 실시예에서, 본 발명의 CAR의 신호 전달 도메인은 CD28로부터의 서열을 포함하지 않는다(NP\_006130.1).
- [0217] 보다 바람직한 실시예에서, 본 발명의 모든 실시예는 CD28로부터의 서열을 포함하지 않는다(NP\_006130.1).
- [0218] 보다 바람직한 실시예에서, 본 발명의 CD22 CAR의 신호 전달 도메인은 공동-자극성 신호 분자 4-1BB(GenBank: AAA53133)의 일부를 포함하고 CD28로부터의 서열은 포함하지 않는다(NP\_006130.1).
- [0219] 본 발명은 다음을 포함하는 CD22 특이적 키메라 항원 수용체 (CD22 CAR)를 제공한다:
- [0220] 다음을 포함하는 세포 외 도메인:
- [0221] - CD22에 특이적인 결합 도메인, 바람직하게는 인간 CD22에 특이적인 결합 도메인, 더욱 바람직하게는 인간 CD22에 특이적인 상기 결합 도메인은 단일-체인 가변 단편(scFv),
- [0222] - 힌지, 바람직하게는 CD8 알파
- [0223] - 막관통 도메인, 바람직하게는 CD8 알파
- [0224] - 다음을 포함하는 세포 내 도메인:
- [0225] - 인간 4-1BB로부터의 공동-자극성 신호 분자, 및 인간 CD3 제타 신호 전달 도메인을 포함하는 세포 내 신호 전달 도메인.
- [0226] 바람직한 실시예에서, 본 발명의 CD22 CAR은 CD28로부터의 서열을 갖지 않는다.
- [0227] 바람직한 실시예에서, 본 발명의 CD22 CAR은 CD28로부터의 임의의 서열을 함유하지 않으며 서열 리더를 포함하고, CD8 α의 TM 도메인 및 힌지, 바람직하게는 CD28의 서열이 없고, 서열번호 1의 서열 리더, 서열번호 6의 TM 도메인 및 CD8 α의 서열번호 4의 힌지를 포함한다.
- [0228] 일 실시예에서, 본 발명의 CD22 CAR은 인간 CD8 β (서열번호 1)로부터의 리더 서열 또는 서열번호 1과 적어도 95 % 동일성을 갖는 리더 서열을 포함한다.
- [0229] 다른 실시예에서, 본 발명의 CD22 CAR은 서열번호 2의 리더 서열 또는 서열번호 2와 95 % 이상의 동일성을 갖는 리더 서열을 포함한다.
- [0230] 일 실시예에서, 본 발명은 다음을 포함하는 CD22 특이적 키메라 항원 수용체(CD22 CAR)를 제공한다:
- [0231] - CD22에 특이적인 결합 도메인, 바람직하게는 인간 CD22에 특이적인 결합 도메인, 더욱 바람직하게는 인간 CD22에 특이적인 상기 도메인은 단일-체인 가변 단편 (scFv)이며, 더욱 더 바람직하게는 m971의 VH 및 VL을 포함하고,
- [0232] - 인간 CD8 알파의 힌지(CD8 α)
- [0233] -인간 CD8 알파(α)의 막관통 도메인
- [0234] -인간 4-1BB에서 공동-자극성 신호 분자
- [0235] -인간 CD3 제타 신호 전달 도메인을 포함하는 세포 내 신호 전달 도메인.
- [0236] 일 실시예에서, 본 발명은 다음을 포함하는 CD22 특이적 키메라 항원 수용체 (CD22 CAR)를 제공한다:
- [0237] - CD22에 특이적인 결합 도메인, 바람직하게는 인간 CD22에 특이적인 결합 도메인, 더욱 바람직하게는 인간 CD22에 특이적인 상기 도메인은 단일-체인 가변 단편 (scFv)이며, 더욱 더 바람직하게는 m971의 VH 및 VL을 포



함하고,

- [0238] - 인간 FcRIII  $\alpha$  의 힌지
- [0239] - 인간 CD8 $\alpha$  (  $\alpha$  ) 의 막관통 도메인
- [0240] - 인간 4-1BB에서 공동-자극성 신호 분자
- [0241] - 인간 CD3 제타 신호 전달 도메인을 포함하는 세포 내 신호 전달 도메인.
- [0242] 또한 본 발명은 다음을 포함하는 CD22 특이적 키메라 항원 수용체 (CD22 CAR)를 제공한다:
- [0243] - CD22에 특이적인 결합 도메인, 바람직하게는 인간 CD22에 특이적인 결합 도메인, 더욱 바람직하게는 인간 CD22에 특이적인 상기 도메인은 단일-체인 가변 단편 (scFv)이며, 더욱 더 바람직하게는 m971의 VH 및 VL을 포함한다.
- [0244] - 인간 IgG1의 힌지
- [0245] - 인간 CD8 $\alpha$  (  $\alpha$  )의 막관통 도메인
- [0246] - 인간 4-1BB에서 공동-자극성 신호 분자
- [0247] - 인간 CD3 제타 신호 전달 도메인을 포함하는 세포 내 신호 전달 도메인.
- [0248] 마지막 3 개의 실시예는 서열번호 1 또는 서열번호 2, 바람직하게는 서열번호 1의 신호 펩티드를 갖는 CD22 CAR을 포함하며, 더욱 바람직하게는, 상기 CD22 CAR은 CD28로부터의 서열을 갖지 않는다.
- [0249] 본 발명의 scfv는 CD22에 특이적인 항체로부터 유래되며, 이는 링커에 의해 VL 도메인으로 분리된 VH 도메인을 포함하며, 상기 VH 및/또는 VL 도메인은 CD22에 대한 결합에 기여한다.
- [0250] 바람직한 실시예에서, 본 발명의 UCART 22는 VH와 VL 사이에 하나의 GS4 링커와 VL과 CD8 $\alpha$  힌지 사이에 2R을 갖는 m971 항체로부터의 scfv를 포함한다.
- [0251] 본 발명에서, scfv는 서열번호 12의 중쇄 ( $V_H$  도메인) 및 서열번호 13의 경쇄 ( $V_L$  도메인)의 가변 영역의 CD22, m971에 특이적인 면역 글로불린의 융합 단백질, 링커 펩티드, 바람직하게는 서열번호 10의 링커와 연결된다.
- [0252] 일 실시예에서, 본 발명의 상기 scfv는 리더 서열 (또는 신호 펩티드)을 추가로 포함하며, 바람직하게는 상기 리더 서열은 VH 도메인에 연결된다.
- [0253] 상기 리더 서열이 VL 도메인에 연결된 실시예는 본 발명의 일부이다.
- [0254] 일 실시예에서, VH 도메인은 힌지에 연결되고, 다른 실시예에서 VL 도메인은 상기 힌지에 연결된다.
- [0255] 본 발명은 상이한 길이, 바람직하게는 CD8  $\alpha$ , IgG1 또는 FcRIII  $\alpha$  (도 2 참조)로부터의 힌지, 보다 바람직하게는 CD8  $\alpha$ 로부터의 힌지에 연결된 scfv를 제공한다.
- [0256] 바람직하게는, 본 발명은 다음을 포함하는 CD22 CAR을 제공한다:
- [0257] - 신호 펩티드, 예를 들어 서열번호 2의 신호 펩티드 또는 서열번호 1의 CD8 $\alpha$ 로부터의 신호 펩티드.
- [0258] - 링커에 의해 VL 도메인으로부터 분리된 VH 도메인을 포함하는 (scFv), 상기 VH 및 VL 및 CD22에 대한 결합에 기여하는 링커.
- [0259] - 인간 CD8 알파 체인로부터의 힌지 또는 인간 IgG1로부터의 힌지 또는 FcRIII  $\alpha$ 로부터의 힌지, 바람직하게는 CD8 알파로부터의 힌지.
- [0260] - CD8 $\alpha$  (  $\alpha$  )의 막관통 도메인(TM)
- [0261] - 인간 4-1BB에서 공동-자극성 신호 분자
- [0262] - CD3 제타 신호 전달 도메인을 포함하는 세포 내 신호 전달 도메인.
- [0263] 본 발명의 CD22 CAR 중 하나는 다음으로 구성된다:
- [0264] - 리더 서열 (예를 들어, CD8  $\alpha$  리더 서열 또는 CD8  $\alpha$  신호 펩티드)
- [0265] - VH, 링커 및 VL을 포함하는 항-CD22 scfv, 또는 VL, 링커 및 VH를 포함하고, 상기 VH 및 VL은 m971에서 유래

된 것,

- [0266] CD8 α 힌지
- [0267] CD8 α TM
- [0268] 4-1BB에서 공동-자극성 신호 분자
- [0269] 세포 내 CD3 제타 신호 전달 도메인.
- [0270] 본 발명의 CD22 CAR 중 하나는 다음을 포함한다:
- [0271] - 세포 표면에서 발현 시 제거 가능한 CD8 α 신호 펩티드,
- [0272] - QBEN10에 의해 인식되는 에피토프 및 리톡시맵에 의해 인식되는 에피토프,
- [0273] - 항-CD22 scfv은 VH, 링커 및 VL을 포함하며, 상기 리톡시맵에 의해 인식되는 2 개의 연속적인 에피토프 m971 으로부터의 VH 및 VL,
- [0274] CD8 α 힌지
- [0275] CD8 α TM
- [0276] 4-1BB에서 공동-자극성 신호 분자
- [0277] 세포 내 CD3 제타 신호 전달 도메인
- [0278] 본 발명의 CD22 CAR 중 하나는 다음을 포함한다:
- [0279] - 세포 표면에서 발현 시 제거 가능한 CD8 α 신호 펩티드,
- [0280] - QBEN10에 의해 인식되는 에피토프 및 리톡시맵에 의해 인식되는 에피토프,
- [0281] - 항-CD22 scfv은 VH, 링커 및 VL을 포함하며, 상기 리톡시맵에 의해 인식되는 2 개의 연속적인 에피토프 m971 으로부터의 VH 및 VL,
- [0282] CD8 α TM
- [0283] 4-1BB에서 공동-자극성 신호 분자
- [0284] 세포 내 CD3 제타 신호 전달 도메인
- [0285] 본 발명의 CD22 CAR 중 하나는 다음을 포함한다:
- [0286] - 세포 표면에서 발현 시 제거 가능한 CD8 α 신호 펩티드,
- [0287] - 항-CD22 scfv은 VH, 링커 및 VL을 포함하며, 상기 리톡시맵에 의해 인식되는 2 개의 연속적인 에피토프 m971 으로부터의 VH 및 VL,
- [0288] CD8 α 힌지
- [0289] CD8 α TM
- [0290] 4-1BB에서 공동-자극성 신호 분자
- [0291] 세포 내 CD3 제타 신호 전달 도메인
- [0292] 본 발명의 CD22 CAR 중 하나는 다음을 포함한다:
- [0293] - 세포 표면에서 발현 시 제거 가능한 CD8 α 신호 펩티드,
- [0294] - 항-CD22 scfv은 VH, 링커 및 VL을 포함하며, 상기 리톡시맵에 의해 인식되는 2 개의 연속적인 에피토프 m971 으로부터의 VH 및 VL,
- [0295] CD8 α TM
- [0296] 4-1BB에서 공동-자극성 신호 분자
- [0297] 세포 내 CD3 제타 신호 전달 도메인

- [0298] 본 발명의 CD22 CAR 중 하나는 다음을 포함한다:
- [0299] - 세포 표면에서 발현 시 제거 가능한 CD8  $\alpha$  신호 펩티드,
- [0300] - 항-CD22 scfv은 VH, 링커 및 VL, m971으로부터의 VH 및 VL, 항-CD19 scfv를 포함하며,
- [0301] 상기 리투시맵에 의해 인식되는 2 개의 연속적인 에피토프,
- [0302] CD8  $\alpha$  힌지
- [0303] CD8  $\alpha$  TM
- [0304] 4-1BB에서 공동-자극성 신호 분자
- [0305] 세포 내 CD3 제타 신호 전달 도메인
- [0306] 본 발명의 CD22 CAR 중 하나는 다음을 포함한다:
- [0307] - 세포 표면에서 발현 시 제거 가능한 CD8  $\alpha$  신호 펩티드,
- [0308] - 항-CD22 scfv은 VH, 링커 및 VL, m971으로부터의 VH 및 VL, 항-CD19 scfv를 포함하며,
- [0309] 상기 리투시맵에 의해 인식되는 2 개의 연속적인 에피토프,
- [0310] CD8  $\alpha$  TM
- [0311] 4-1BB에서 공동-자극성 신호 분자
- [0312] 세포 내 CD3 제타 신호 전달 도메인
- [0313] 본 발명의 CD22 CAR 중 하나는 다음을 포함한다:
- [0314] - 세포 표면에서 발현 시 제거 가능한 CD8  $\alpha$  신호 펩티드,
- [0315] - 항-CD19 scfv 및 항-CD22 scfv은 VH, 링커 및 VL, m971으로부터의 VH 및 VL을 포함하며,
- [0316] 상기 리투시맵에 의해 인식되는 2 개의 연속적인 에피토프,
- [0317] CD8  $\alpha$  힌지
- [0318] CD8  $\alpha$  TM
- [0319] 4-1BB에서 공동-자극성 신호 분자
- [0320] 세포 내 CD3 제타 신호 전달 도메인
- [0321] 본 발명의 CD22 CAR 중 하나는 다음을 포함한다:
- [0322] - 세포 표면에서 발현 시 제거 가능한 CD8  $\alpha$  신호 펩티드,
- [0323] - 항-CD19 scfv 및 항-CD22 scfv은 VH, 링커 및 VL, m971으로부터의 VH 및 VL을 포함하며,
- [0324] 상기 리투시맵에 의해 인식되는 2 개의 연속적인 에피토프,
- [0325] CD8  $\alpha$  TM
- [0326] 4-1BB에서 공동-자극성 신호 분자
- [0327] 세포 내 CD3 제타 신호 전달 도메인
- [0328] 링커-SCFV
- [0329] 본 발명에 따른 링커는 예를 들어,  $n = 1$  내지 4, 바람직하게는  $n = 3$  인 펜타 펩티드(GGGGS) $n$  또는 (G4S) $n$  또는 (Gly4Ser) $n$ 의 다량체일 수 있고, 18-mer GGSSRSSSSGGGSGGGG(Andris- Widhopf 등 (2011)) 및 20-mer (G4S)4(Schaefer 등, 2010)일 수 있다. 본 발명에 따른 링커는 기능성이 부가된 서열, 예를 들어 에피토프 태그 (Sblattero & Bradbury, 2000 Nature Biotechnology 18, 75-80), 링커에 의해 분리된 적어도 서열번호 20, 바람직하게는 서열번호 2는 종종 특정 항체 서열의 맥락에서 본 발명의 scFv 특성을 개선하는 서열이다.
- [0330] 본 발명에 적합한 다른 링커 중에는 15-mer 펩티드 링커(RGRGRGRGRSGGGS) (Zhihong Shen, Heping Yan, Ying

Zhang, Raymond L. Mernaugh 및 Xiangqun Zeng (2008), Anal Chem. 80 (6) : 1910- 1917)이다.

- [0331] 바람직한 실시예에서, VH를 m971의 VL 서열(또는 VL을 VH 서열에 연결)에 연결하는 링커는 화학식(G4S)<sub>n</sub>의 링커이고, 여기서 n은 1 내지 3이고; 바람직하게는 서열 (G4S)<sub>3</sub>의 n = 3이다(서열 번호 10).
- [0332] 일 실시예에서, 본 발명은 다음을 제공한다:
- [0333] 다음을 포함하는 CD22 CAR
- [0334] - 서열번호 1의 인간 CD8 α 리더 서열(CD8 α 리더 또는 CD8 α 신호 펩티드)
- [0335] - 항-CD22 scfv는 서열번호 12의 VH, 서열번호 10의 링커, 및 서열번호 13의 VL
- [0336] 서열번호 4의 인간 CD α 힌지
- [0337] 서열번호 6의 인간 CD α Y N
- [0338] 서열번호 8의 4-1BB에서의 공동-자극성 신호 분자
- [0339] 서열번호 9의 세포 내 CD3 제타 시그널 도메인
- [0340] 또한 일 실시예에서, 본 발명은 다음을 제공한다:
- [0341] 다음을 포함하는 CD22 CAR
- [0342] - 서열번호 1의 인간 CD8 α 리더 서열(CD8 α 리더 또는 CD8 α 신호 펩티드)
- [0343] - 항-CD22 scfv는 서열번호 12의 VH, 서열번호 10의 링커, 및 서열번호 13의 VL
- [0344] 서열번호 3의 인간 Fc γRIII α 힌지
- [0345] 서열번호 6의 인간 CD8 α TM
- [0346] 서열번호 8의 4-1BB에서의 공동-자극성 신호 분자
- [0347] 서열번호 9의 세포 내 CD3 제타 시그널 도메인
- [0348] 일 실시예에서, 본 발명은 다음을 제공한다:
- [0349] 다음을 포함하는 CD22 CAR
- [0350] - 서열번호 1의 인간 CD8 α 리더 서열(CD8 α 리더 또는 CD8 α 신호 펩티드)
- [0351] - 항-CD22 scfv는 서열번호 13의 VL, 서열번호 10의 링커, 및 서열번호 12의 VH
- [0352] 서열번호 3의 인간 Fc γRIII α 힌지
- [0353] 서열번호 6의 인간 CD8 α TM
- [0354] 서열번호 8의 4-1BB에서의 공동-자극성 신호 분자
- [0355] 서열번호 9의 세포 내 CD3 제타 시그널 도메인
- [0356] 또한 일 실시예에서, 본 발명은 다음을 제공한다:
- [0357] 다음을 포함하는 CD22 CAR
- [0358] - 서열번호 1의 인간 CD8 α 리더 서열(CD8 α 리더 또는 CD8 α 신호 펩티드)
- [0359] - 항-CD22 scfv는 서열번호 13의 VL, 서열번호 10의 링커, 및 서열번호 12의 VH
- [0360] 서열번호 4의 인간 CDA α 힌지
- [0361] 서열번호 6의 인간 CD8 α TM
- [0362] 서열번호 8의 4-1BB에서의 공동-자극성 신호 분자
- [0363] 서열번호 9의 세포 내 CD3 제타 시그널 도메인
- [0364] 일 실시예에서, 본 발명은 다음을 포함하는 CD22 특이적 키메라 항원 수용체 (CD22 CAR)를 제공한다:

- [0365] - 서열번호 1 또는 2의 폴리펩티드와 서열 동일성이 80 % 이상, 보다 바람직하게는 90 %, 95 % 97 %, 99 % 또는 100 % 인 아미노산 서열을 갖는 신호 펩티드; 바람직하게는 서열번호 1 폴리펩티드와 서열 동일성이 80 % 이상, 보다 바람직하게는 90 %, 95 % 97 %, 99 % 또는 100 % 인 아미노산 서열을 갖는 신호 펩티드.
- [0366] - 링커에 의해 VL 도메인으로 분리된 VH 도메인, 상기 VH 및 VL은 CD22에 대한 결합에 기여하며; 상기 링커는 서열번호 10의 폴리펩티드와 적어도 90 %, 95 % 97 %, 99 % 또는 100 % 서열 동일성을 갖는다.
- [0367] 서열번호 12의 폴리펩티드와 90 %, 95 % 97 %, 99 % 또는 100 % 이상의 서열 동일성을 갖는 상기 VH 도메인.
- [0368] 서열번호 13의 폴리펩티드와 90 %, 95 % 97 %, 99 % 또는 100 % 이상의 서열 동일성을 갖는 상기 VL 도메인.
- [0369] - 서열번호 4의 폴리펩티드와 서열 동일성이 80 % 이상, 보다 바람직하게는 80 %, 90 % 95 %, 97 %, 99 % 또는 100 % 인 아미노산 서열을 갖는 인간 CD8 알파 체인으로부터 유래된 힌지.
- [0370] - 서열번호 6의 폴리펩티드와 서열 동일성이 적어도 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % 또는 100 % 인 아미노산 서열을 갖는 인간 CD8 알파( $\alpha$ )로부터 유래된 막관통 도메인;
- [0371] - 서열번호 8의 폴리펩티드와 서열 동일성이 적어도 90 %, 95 %, 97 %, 99 % 또는 100 % 인 아미노산 서열을 갖는 인간 4-1BB(또는 4-1BB 세포 내 도메인)로부터 유래된 동종-자극성 신호 분자.
- [0372] - 서열번호 9의 폴리펩티드와 서열 동일성이 적어도 70 %, 바람직하게는 적어도 80 %, 더욱 바람직하게는 적어도 90 %, 95 %, 97 %, 99 % 또는 100 % 인 아미노산 서열을 갖는 CD3 제타 신호 도메인을 포함하는 세포내 신호 도메인.
- [0373] 바람직한 실시예에서, 본 발명의 CD22 특이적 키메라 항원 수용체(CD22 CAR)는 인간 CD28, 특히 인간 CD28 인트라(intra) 신호 전달 도메인으로부터의 임의의 서열을 포함하지 않는다.
- [0374] 보다 바람직한 실시예에서, 본 발명의 CD22 특이적 키메라 항원 수용체(CD22 CAR)는 인간 CD28의 서열을 포함하지 않으며, 특히 인간 CD28 인트라 신호 전달 도메인으로부터 유래하고, 바람직하게는 CD22에 특이적인 scfv의 VH 도메인에 융합 CD8  $\alpha$ 로부터의 신호 펩티드를 추가로 함유한다.
- [0375] 일 실시예에서, 본 발명은 서열번호 15의 CD22 CAR를 제공한다.
- [0376] 일 실시예에서, 본 발명은 서열번호 15의 폴리펩티드와 서열 동일성이 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%인 아미노산 서열을 갖는 CD22 CAR를 제공한다.
- [0377] 일 실시예에서, 본 발명은 서열번호 22의 폴리펩티드와 서열 동일성이 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%인 아미노산 서열을 갖는 CD22 CAR를 제공한다.
- [0378] 본 발명의 CD22 CAR은 하기 서열을 포함한다:
- [0379] V1-m971 (Fc  $\eta$ RIII  $\alpha$ -CD8  $\alpha$  TM-41BB.IC-CD3  $\xi$ .IC)
- [0380] MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQ  
FSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDAFDIWQGQTMVTSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQTIWSYLNWYQQRPGKAP  
NLLIYAASSLQSGVPSRFSGRGSGTDFLTITSSLAEDFATYYCQSYSIPQTFGQGTKLEIKGLAVSTISSFFPPGYQIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLY  
CKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY  
NELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR(서열번호 14).
- [0381] V3-m971 (CD8  $\alpha$ -CD8  $\alpha$  TM-41BB.IC-CD3  $\xi$ .IC)
- [0382] MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQ  
FSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDAFDIWQGQTMVTSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQTIWSYLNWYQQRPGKAP  
NLLIYAASSLQSGVPSRFSGRGSGTDFLTITSSLAEDFATYYCQSYSIPQTFGQGTKLEIKTTTPAPRPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG  
LDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRRE  
EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR(서열번호 15).
- [0383] 바람직한 실시예에서, 본 발명의 CD22 CAR은하기 서열을 포함한다.
- [0384] MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQ  
FSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDAFDIWQGQTMVTSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQTIWSYLNWYQQRPGKAP  
NLLIYAASSLQSGVPSRFSGRGSGTDFLTITSSLAEDFATYYCQSYSIPQTFGQGTKLEIKTTTPAPRPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRG

LDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRRE  
EYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR(서열번호 15).

[0385] 서열번호 2의 펩티드 신호, CD8 α 의 TM 도메인 및 VH 및 VL 도메인 사이의 링커를 갖는 CD22 CAR 서열:

[0386] METDTLLLWVLLWVPGSTG  
EVQLVQSGGGVVRPGGSLRLPCAASGFTDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYHCARGGDD  
AFDIWGQGTMTVSS —GGGSGGGSGGGGS—  
RIVMTQSPGTLSPGETATLSCRASQFSNMLAWYQQKSGQPRLIYGVSTRAAGVPARFSGSGSGTEFTLTISNLQSEDFAVYYCQYGDWPRTYFGQG  
TKVERK  
—  
GLAVSTISSFFPPGYQIYWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGNQL  
YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0387] METDTLLLWVLLWVPGSTG  
EVQLVQSGGGVVRPGGSLRLPCAASGFTDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYHCARGGDD  
AFDIWGQGTMTVSS—GGGSGGGSGGGGS—RIVMTQSPGTLSPGETATLSCRASQFSNMLAWYQQKSGQPRLIYGVSTRAAGVPARFSGSGSG  
TEFTLTISNLQSEDFAVYYCQYGDWPRTYFGQGTKVERK—TTTPAPRPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLL  
LSLVIITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR  
KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0388] M971 V1

[0389] METDTLLLWVLLWVPGSTG  
QVQLQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAANWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARE  
VTGDLEDAFDIWGQGTMTVSS  
GGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQTIWSYLNWYQRPKGAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQAEDFATYY  
CQSYSIPQTFGQGTKLEIK  
GLAVSTISSFFPPGYQIYWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGNQL  
YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0390] M971 V3

[0391] METDTLLLWVLLWVPGSTGQVQLQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAANWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQF  
SLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDAFDIWGQGTMTVSSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQTIWSYLNWYQRPKGAPN  
LLIYAASSLQSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQAEDFATYYCQSYSIPQTFGQGTKLEIKTTTPAPRPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL  
DFACDIYWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREE  
YDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR.

[0392] 일 실시예에서, 본 발명은 하기 서열을 제공한다:

[0393] QVQLQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAANWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARE  
VTGDLEDAFDIWGQGTMTVSSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQTIWSYLNWYQRPKGAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGR  
SGTDFTLTISSLQAEDFATYYCQSYSIPQTFGQGTKLEIKTTTPAPRPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLL  
LSLVIITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR  
KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR. 이 CD22 CAR에는 신호 펩티드가 없다.

[0394] 일 실시예에서, 본 발명의 UCART22는 서열번호 20의 서열을 포함한다:  
ATGGCTCTGCCCCTCACCCTCTGCTGCTGCCACTGGCCCTGCTGCTGCACGCAGCAAGACCACAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGCCCTGGCCTGGTGAAG  
CCAAGCCAGACACTGTCCCTGACCTGCGCCATCAGCGCGGATTCCGTGAGCTCCAACCTCCGCGCTGGAATTGGATCAGGCAGTCCCTTCTCGGGGCTG  
GAGTGGCTGGGAAGGACATACTATCGGTCTAAGTGTACAACGATTATGCCGTGTCTGTGAAGAGCAGAATCACAATCAACCTGACACCTCCAAGAATCAG  
TTCTCTCTGCAGCTGAATAGCGTGACACAGAGGACACCGCGTGTACTATTGCGCAGGAGGTGACCGCGACCTGGAGGATGCCTTTGACATCTGGGGC  
CAGGGCACAATGGTGACCGTGTCTAGCGGAGGAGGAGATCCGAGGAGGAGGATCTGGCGGCGGCGGACGATATCCAGATG(서열번호 20)

[0395] 일 실시예에서, 본 발명의 UCART22는 서열번호 22의 서열을 포함한다.

[0396] 바람직한 실시예에서, 본 발명의 UCART22는 인간 TRAC 유전자(예를 들어, 인간 TRAC 유전자 염색체 14-  
NC\_000014.9에서)에 삽입된 서열번호 22의 서열을 포함하고 세포 표면에서 CD22의 프로시말(proximal) 부분에



특이적인 항-CD22 CAR을 발현한다.

- [0397] 더욱 바람직한 실시예에서, 본 발명의 UCART22는 인간 TRAC 유전자(예를 들어, 인간 TRAC 유전자 염색체 14-NC\_000014.9에서)에 삽입된 서열번호 22의 서열을 포함하고 세포 표면에서 CD22의 디스탈(distal) 부분에 특이적인 항-CD22 CAR을 발현한다.
- [0398] 일 측면에서, 본 발명의 CD22 CAR의 항-CD22 결합 도메인은 CD22의 디스탈 부분에 특이적인 항-CD22 결합 도메인이다.
- [0399] HA22-CAR
- [0400] 따라서, 본 발명은 다음 순서를 갖는 CD22 CAR을 제공한다:
- [0401] MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFAFSIYDMSWVRQTPKRLWVAYISSGGGYYPDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLSKSEDTAMYYCARHSGYGTHTWGLFAYWGGTLVTVSAGGGSGGGSGGGSDIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLIIYYTILHSGVPSRFSGSGSDYSLTISNLEQEDFATYFCQQGNLTPWTFGGGKLEIKATTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGYQLSTATKDYDALHMQALPPR(서열번호 23).
- [0402] 바람직하게는 본 발명의 UCART22는 서열을 포함한다:
- [0403] ATGGCTCTGCCGTCACCGCTCTGCTGCTGCCACTGGCCCTGCTGCTGCACGCAGCAAGGCCTGAGGTGCAGCTGGTGAATCCGGAGGAGGCCTGGTGAAGCCTGGCGGCTCTCTGAAGCTGAGCTGTGCCCTCCGGCTTCGCTTTTCCATCTACGACATGTCTTGGGTGAGGCAGACCCAGAGAAGCGCCTGGAGTGGTGCCCTATATCAGCTCCGGCGCGGCACCTACTATCCCGACACAGTGAAGGCCGGTTCACCATCTCTAGAGATAACGCCAAGAATACACTGTACCTGCAGATGTCTAGCCTGAAGAGCGAGGATACCGCCATGTACTATTGCGCAAGGCACTCCGGATACGAACACACTGGGGCGTGCTGTTTGCCTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACAGTGAGCGCGGAGGAGGAGGAAGCGCGGAGGAGGCTCCGGCGCGCGGCTCTGACATCCAGATGACCCAGACCACATCTCTGAGCGCCTCCCTGGGCGACAGGCTGACAATCTCTTGTAGAGCCAGCCAGGATATCTCCAACCTACCTGAATTGGTATCAGCAGAAGCCTGATGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACTATACATCTATCTGCACAGCGGAGTGCCATCCCGTTCTCTGAAGCGGATCCGGAACCGACTACTCTCTGACAATCAGAACCTGGAGCAGGAGGATTTCGCCACCTATTTTGGCAGCAGGCAATACCTGCCTTGGACATTTGGCGGCGGCACAAAGCTGGAGATCAAGGCCACCACAACCCCTGCACCAAGGCCACCAACACCAGCACCTACCATCGCATCTCAGCCTCTGAGCCTGAGACCAGAGGCATGTAGGCCAGCAGCAGGAGGAGCAGTGACACAAGGGGACTGGATTTTGCCTGTGATATCTACATCTGGGCACCTCTGGCAGGAACATGTGGCGTGCTCCTGCTCAGCCTGGTCATCACCTGTACTGCAAGAGAGGCAGGAAGAAGCTGCTGTATATCTTCAAGCAGCCCTTCATGAGACCCGTGCAGACAACCCAGGAGGAGCAGGCTGCTCCTGTAGGTTCCAGAAAGAGGAGGAGGAGGATGTGAGCTGCGGTGAAGTTTCCCGGTCTGCCGATGCACCTGCATACCAGCAGGACAGAAATCAGCTGTATAACGAGCTGAATCTGGGCCGAGAGAGGAGTACGACGTGTGGATAAGAGGAGGGGAGGGACCCAGAGATGGGAGGCAAGCCTCGGAGAAAGAACCCAGGAGGGCCTGTACAATGAGCTGCAGAAGGAC AAGATGGCCGAGGCTATTTCTGAGATCGGCATGAAGGGAGAGAGCGCGGGGCAAGGGACACGATGGCCTGTACCAGGGCCTGTCCACAGCCACCAAGGACACCTATGATGCCCTGCATATGCAGGCACTGCCTCAAGGTGA(서열번호 24).
- [0404] CD22의 프로시말(proximal) 부분에 특이적인 항-CD22 결합 도메인은 본 발명의 UCART22에서 단독으로 또는 CD22의 프로시말(proximal) 부분에 특이적인 항-CD22 결합 도메인으로 발현될 수 있다.
- [0405] 일 측면에서, 본 발명의 CD22 CAR의 항-CD22 결합 도메인은 최적화된 항-CD22 결합 도메인이다.
- [0406] 본원에 사용된 "최적화된" 항체 (또는 scfv)는 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 항체의 항원 결합 서브 서열을 함유하는 키메라 면역 글로불린, 면역글로불린 체인 또는 이의 단편(예컨대, Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> 또는 항체의 다른 항원 결합 서브)인 항체 (또는 scfv)의 형태를 지칭한다. 바람직하게는, 항체는 상보성 결정 영역(CDR)으로부터의 잔기가 CDR로부터의 잔기로 대체되어 원하는 특이성, 친화도 및 용량을 달성하는 인간 면역글로불린(수용체 항체)이다.
- [0407] 공여자 CDR은 본 발명의 CD22 CAR의 결합 특성에 유의하게 영향을 미치거나 또는 이를 변경할 수 있는 아미노산 변화가 거의 없을 수 있다. 실제로, 본원에 제공된 본 발명 중 하나는 CD22-발현 세포에 대한 결합(및 세포 분해 활성)이 유지되지만 반응의 강도(사이토킨 방출)를 감소시키기 위해 친화성이 변형된 CD22 CAR이다.
- [0408] 아미노산 변형은 일반적으로 상기 CAR 및/또는 상기 CAR 분자의 임의의 다른 부분에서 상기 항체 단편에서의 아미노산 치환, 첨가 및 결실을 포함하는 보존 적 변형이다. 변형은 당업계에서 공지된 표준 기술에 의해 항체, 항체 단편 또는 예를 들어, 부위-지정 돌연변이 유발(site-directed mutagenesis), PCR-매개 돌연변이 유발 또는 최적화된 생식 계열 서열을 사용함으로써 본 발명의 CAR 분자의 다른 부분에 도입될 수 있다.
- [0409] 일반적으로, 최적화된 CAR은 실질적으로 모든 하나 이상의, 전형적으로는 2 개의 가변 도메인을 포함할 것이며,

여기서 모든 또는 실질적으로 모든 CDR영역은 원래 인간 면역글로불린에 해당한다.

- [0410] 보존적 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체된 치환을 의미한다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리는 당 업계에 정의되어 있다. 이들 패밀리는 기본 측쇄 (예: 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄 (예: 아스파르트 산, 글루탐산), 하전되지 않은 극성 측쇄 (예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측쇄 (예: 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타-분 지형 측쇄 (예: 트레오닌, 발린, 이소류신) 및
- [0411] 방향족 측쇄 (예: 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)와 같은 아미노산을 포함한다.
- [0412] 따라서, 본 발명의 CAR 내의 하나 이상의 아미노산 잔기는 동일한 측쇄 패밀리로부터의 다른 아미노산 잔기로 대체될 수 있고 변형된 CAR은 본원에 기재된 기능 분석을 사용하여 시험될 수 있다.
- [0413] 바람직한 실시예에서, 본 발명은 서열번호 15의 폴리펩티드의 아미노산 서열과 비교하여 보존적 서열 변형(또는 아미노산 서열 변화)을 갖는 CD22 CAR을 제공한다.
- [0414] 바람직한 실시예에서, 본 발명은 서열번호 15의 폴리펩티드의 아미노산 서열과 비교하여 2개의 아미노산 변화를 갖는 아미노산 서열을 갖는 CD22 CAR을 제공한다.
- [0415] 바람직한 실시예에서, 본 발명은 서열번호 15의 폴리펩티드의 아미노산 서열과 비교하여 3개의 아미노산 변화를 갖는 아미노산 서열을 갖는 CD22 CAR을 제공한다.
- [0416] 바람직한 실시예에서, 본 발명은 서열번호 15의 폴리펩티드의 아미노산 서열과 비교하여 4개의 아미노산 변화를 갖는 아미노산 서열을 갖는 CD22 CAR을 제공한다.
- [0417] 바람직한 실시예에서, 본 발명은 서열번호 15의 폴리펩티드의 아미노산 서열, 선택적으로 적어도 하나의 서열번호 20의 서열을 포함하는 아미노산 서열과 비교하여 5개의 아미노산 변화를 갖는 아미노산 서열을 갖는 CD22 CAR을 제공한다.
- [0418] 바람직한 실시예에서, 본 발명은 서열번호 15의 폴리펩티드 및 서열번호 15의 하나 이상의 CDR이 보존되는 아미노산 서열과 비교하여 5개의 아미노산 변화를 갖는 아미노산 서열을 갖는 CD22 CAR을 제공한다.
- [0419] 보다 바람직한 실시예에서, 본 발명은 서열번호 15의 폴리펩티드 및 서열 번호 15의 하나 이상의 CDR이 보존되는 아미노산 서열과 비교하여 1 내지 15 개의 아미노산 변화를 갖는 아미노산 서열을 갖는 CD22 CAR을 제공한다.
- [0420] 바람직한 실시예에서, 본 발명의 CD22 CAR의 서열은 상기 CAR의 표적에 대한 결합 능력에 영향을 미치지 않고 (CD22) wt CD22 CAR과 비교하여 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개의 아미노산을 변화시켜 HAMA를 감소시킴으로써 변형된다(인간 항-마우스 반응).
- [0421] 바람직한 실시예에서, 본 발명은 wt(wt는 m971)의 아미노산 서열과 비교하여 적어도 1 개의 아미노산 변화를 갖는 아미노산 서열을 갖는 CD22 CAR을 제공하며 상기 1 개 이상의 아미노산 변화는 1 차 T 세포에서 상기 CD22 CAR의 결합 및/또는 활성화에 영향을 미치지 않거나 개선시키지 않는다.
- [0422] 결합 특성은 초기에 Mitchell Ho, Satoshi Nagata 및 Ira Pastan에 설명된 기술을 사용하여 변형될 수 있다.
- [0423] 인간 세포에서 Fv 디스플레이(Fv display)에 의해 높은 친화성을 갖는 항-CD22 Fv의 격리(Isolation) PNAS 2006 103 (25) 9637-9642; published ahead of print June 8, 2006, doi:10.1073/pnas.0603653103 는 본원에 참조로 포함된다.
- [0424] 이들 최적화된 scfv는 또한 돌연변이 Pro-91-Thr-92 (PT) Gly-91-Ala-92 및 Val-91-Phe-92와 동등한 하나 이상의 돌연변이를 보유한다.
- [0425] 일 실시예에서, 본 발명은 다음을 포함하는 항 CD22 CAR을 제공한다:
- [0426] - 세포 외 도메인은
- [0427] 신호 펩티드
- [0428] 하기 Pro-91-Thr-92 (PT), Gly-91-Ala-92, Val-91-Phe-92 중 하나를 갖는 단일 클론 항-CD22 항체로부터의 VH 도메인 및 VL 도메인, 돌연변이 또는 동등물을 포함하는 선택적으로 최적화된 리간드 결합-도메인,



- [0429] 힌지, CD8 alpha( $\alpha$ ) 포함하는 힌지를 포함하며,
- [0430] - CD8 알파 막관통 도메인 및
- [0431] - CD3 제타 신호 전달 도메인 및 4-1BB의 공동-자극성 도메인을 포함하는 세포질 도메인.
- [0432] 바람직한 실시예에서, 본 발명은 상기 단일 클론 항-CD22 항체가 CDRs에서 핫스팟(hots spot) 갖는 m971 항체로부터 유래된 상기와 같은 항 CD22 CAR을 제공한다. 바람직하게는, 다음 Pro-91-Thr-92 (PT), Gly-91-Ala-92, Val-91-Phe-92, 돌연변이 중 하나이다.
- [0433] 보다 바람직한 실시예에서, 본 발명은 항 CD22 CAR을 포함하는 단리되며 조작된 (TCR 및 dCK KO) 면역 T 세포를 제공하며,
- [0434] 항 CD22 CAR은
- [0435] 세포 외 도메인
- [0436] 신호 펩티드, 하기 Pro-91-Thr-92, Gly-91-Ala-92 돌연변이 중 하나 이상을 갖는 모노클로날 항-CD22 항체로부터의 VH 도메인 및 VL 도메인을 포함하는 리간드 결합 도메인; Val-91-Phe-92 돌연변이를 포함하고,
- [0437] 힌지, CD8 alpha( $\alpha$ )를 포함하는 힌지
- [0438] -CD8 알파 막관통 도메인 및
- [0439] -CD3 제타 신호 전달 도메인 및 4-1BB의 공동-자극성 도메인을 포함하는 세포질 도메인을 포함한다.
- [0440] 보다 바람직한 실시예에서, 본 발명은 항 CD22 CAR을 포함하는 단리되며 조작된 (TCR 및 CD52 KO) 면역 T 세포를 제공하며,
- [0441] 항 CD22 CAR은
- [0442] 세포 외 도메인
- [0443] 신호 펩티드, 하기 Pro-91-Thr-92, Gly-91-Ala-92 돌연변이 중 하나 이상을 갖는 모노클로날 항-CD22 항체로부터의 VH 도메인 및 VL 도메인을 포함하는 리간드 결합 도메인; Val-91-Phe-92 돌연변이를 포함하고,
- [0444] 힌지, CD8 alpha( $\alpha$ )를 포함하는 힌지
- [0445] -CD8 알파 막관통 도메인 및
- [0446] -CD3 제타 신호 전달 도메인 및 4-1BB의 공동-자극성 도메인을 포함하는 세포질 도메인을 포함한다.
- [0447] 보다 바람직한 실시예에서, 본 발명은 항 CD22 CAR을 포함하는 단리되며 조작된 (TCR, CD52 및 dCK KO) 면역 T 세포를 제공하며,
- [0448] 항 CD22 CAR은
- [0449] 세포 외 도메인
- [0450] 신호 펩티드, 하기 Pro-91-Thr-92, Gly-91-Ala-92 돌연변이 중 하나 이상을 갖는 모노클로날 항-CD22 항체로부터의 VH 도메인 및 VL 도메인을 포함하는 리간드 결합 도메인; Val-91-Phe-92 돌연변이를 포함하고,
- [0451] 힌지, CD8 alpha( $\alpha$ )를 포함하는 힌지
- [0452] -CD8 알파 막관통 도메인 및
- [0453] -CD3 제타 신호 전달 도메인 및 4-1BB의 공동-자극성 도메인을 포함하는 세포질 도메인을 포함한다.
- [0454] 일 측면에서, CAR 22는 세포 표면에서 적어도 하나, 바람직하게는 2 개, 보다 바람직하게는 3 개의 모노클로날 항체 (mAb)-특이적 에피토프와 함께 공동 발현될 수 있으며, 상기 mAb-특이적 에피토프는 CD8의 막관통 도메인에 융합될 수 있다. 일 실시예에서 상기 mAb-특이적 에피토프는 리톡시맵에 의해 인식 및 /또는 QBEN10으로부터 인식되는 에피토프이고 cD22 CAR과 함께 발현된 펩티드는 RQR8이다.
- [0455] 다른 실시예에서, 적어도 하나, 바람직하게는 2 개, 보다 바람직하게는 3 개의 모노클로날 항체 (mAb)-특이적 에피토프, CD22에 특이적인 scfv의 링커 L (VH에 VL에 결합) 및/또는 CD22 CAR의 힌지에 삽입될 수 있다.

- [0456] 분자 항체 (mAb)-특이적 에피토프는 이브리투모맵(ibritumomab), 티옥세탄(tiuxetan), 무로모나브-CD3(muromonab-CD3), 토시투모맵(tositumomab), 아크시시맵(abciximab), 바실릭시맵(basiliximab), 브렌톡시맵(brentuximab vedotin), 세톡시맵(cetuximab), 인플릭시맵(infliximab), 리톡시맵(rituximab), 알렘투주맵(alemtuzumab), 베바시주맵(bevacizumab), 세톨리주맵 페골(certolizumab pegol), 다클리주맵(daclizumab), 이쿨리주맵(eculizumab), 이팔리주맵(efalizumab), 겐투주맵(gemtuzumab), 나탈리주맵(natalizumab), 오말리주맵(omalizumab), 팔리비주맵(palivizumab), 라니빌리주맵(ranibizumab), 토실리주맵(tocilizumab), 트라스트주맵(trastuzumab), 베돌리주맵(vedolizumab), 아다리무맵(adalimumab), 벨리무맵(belimumab), 카나키누맵(canakinumab), 데노수맵(denosumab), 골리무맵(golimumab), 아이필리무맵(ipilimumab), 오파투무맵(ofatumumab), 파니투무맵(panitumumab), QBEND-10 및 우스테키누맵(ustekinumab)으로 선택되며, 바람직하게는 리톡시맵(R) 및/또는 QBEN10(Q)로부터 선택되는 모노클로날 항체에 의해 특이적으로 인식되는 mAb-특이적 에피토프 중 하나일 수 있다.
- [0457] 에피토프-특이적 mAb는 CD22를 발현하는 면역 세포의 체외 세포 분류 및/또는 생체 내 세포 고갈에 사용될 수 있다.
- [0458] 특정 실시예에서, 본 발명의 CD22 CAR의 세포 외 결합 도메인은 하기 서열 중 하나를 포함할 수 있다:
- [0459]  $V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -에피토프1-(L) $_x$ -;
- [0460]  $V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -에피토프1-(L) $_x$ -에피토프2-(L) $_x$ -;
- [0461]  $V_1-L_1-V_2-(L)_x$ -에피토프1-(L) $_x$ -에피토프2-(L) $_x$ -에피토프3-(L) $_x$ -;
- [0462] (L) $_x$ -에피토프1-(L) $_x$ - $V_1-L_1-V_2$ ;
- [0463] (L) $_x$ -에피토프1-(L) $_x$ -에피토프2-(L) $_x$ - $V_1-L_1-V_2$ ;
- [0464] 에피토프1-(L) $_x$ -에피토프2-(L) $_x$ -에피토프3-(L) $_x$ - $V_1-L_1-V_2$ ;
- [0465] (L) $_x$ -에피토프1-(L) $_x$ - $V_1-L_1-V_2$ -(L) $_x$ -에피토프2-(L) $_x$ ;
- [0466] (L) $_x$ -에피토프1-(L) $_x$ - $V_1-L_1-V_2$ -(L) $_x$ -에피토프2-(L) $_x$ -에피토프3-(L) $_x$ -;
- [0467] (L) $_x$ -에피토프1-(L) $_x$ - $V_1-L_1-V_2$ -(L) $_x$ -에피토프2-(L) $_x$ -에피토프3-(L) $_x$ -에피토프4-(L) $_x$ -;
- [0468] (L) $_x$ -에피토프1-(L) $_x$ -에피토프2-(L) $_x$ - $V_1-L_1-V_2$ -(L) $_x$ -에피토프3-(L) $_x$ -;
- [0469] (L) $_x$ -에피토프1-(L) $_x$ -에피토프2-(L) $_x$ - $V_1-L_1-V_2$ -(L) $_x$ -에피토프3-(L) $_x$ -에피토프4-(L) $_x$ -;
- [0470]  $V_1-(L)_x$ -에피토프1-(L) $_x$ - $V_2$ ;
- [0471]  $V_1-(L)_x$ -에피토프1-(L) $_x$ - $V_2$ -(L) $_x$ -에피토프2-(L) $_x$ ;
- [0472]  $V_1-(L)_x$ -에피토프1-(L) $_x$ - $V_2$ -(L) $_x$ -에피토프2-(L) $_x$ -에피토프3-(L) $_x$ ;
- [0473]  $V_1-(L)_x$ -에피토프1-(L) $_x$ - $V_2$ -(L) $_x$ -에피토프2-(L) $_x$ -에피토프3-(L) $_x$ -에피토프4-(L) $_x$ ;
- [0474] (L) $_x$ -에피토프1-(L) $_x$ - $V_1$ -(L) $_x$ -에피토프2-(L) $_x$ - $V_2$ ; 또는,
- [0475] (L) $_x$ -에피토프1-(L) $_x$ - $V_1$ -(L) $_x$ -에피토프2-(L) $_x$ - $V_2$ -(L) $_x$ -에피토프3-(L) $_x$ ;
- [0476] 여기서,
- [0477]  $V_1$ 은 VL, 바람직하게는 서열번호 12 및  $V_2$ 는 VH, 바람직하게는 서열번호 13 또는  $V_1$ 은 VH이고  $V_2$ 는 VL이고;
- [0478]  $L_1$ 은 VH 체인을 VL 체인에 연결하기에 적합한 링커이고; 바람직하게는 서열번호 10이며,
- [0479] L은 글리신 및 세린 잔기를 포함하는 링커이고, 세포 외 결합 도메인에서 L의 각 발생은 동일한 세포 외 결합 도메인에서 L의 다른 발생과 동일하거나 상이할 수 있고,

- [0480]  $x$ 는 0 또는 1이고  $x$ 의 각 발생은 서로 독립적으로 선택되고; 및,
- [0481] 에피토프 1, 에피토프 2 및 에피토프 3은 mAb-특이적 에피토프이며 동일하거나 상이할 수 있다.
- [0482] 특정 실시예에서, 세포 외 결합 도메인은 하기 서열 중 하나를 포함할 수 있다:
- [0483]  $V_1-L_1-V_2-L$ -에피토프1;  $V_1-L_1-V_2-L$ -에피토프1-L;  $V_1-L_1-V_2-L$ -에피토프1-L-에피토프2;  $V_1-L_1-V_2-L$ -에피토프1-L-에피토프2-L;  $V_1-L_1-V_2-L$ -에피토프1-L-에피토프2-L-에피토프3;  $V_1-L_1-V_2-L$ -에피토프1-L-에피토프2-L-에피토프3-L;  $V_1-L_1-V_2$ -에피토프1;  $V_1-L_1-V_2$ -에피토프1-L;  $V_1-L_1-V_2$ -에피토프1-L-에피토프2;  $V_1-L_1-V_2$ -에피토프1-L-에피토프2-L;  $V_1-L_1-V_2$ -에피토프1-L-에피토프2-L-에피토프3;  $V_1-L_1-V_2$ -에피토프1-L-에피토프2-L-에피토프3-L; 에피토프1- $V_1-L_1-V_2$ ; 에피토프1-L- $V_1-L_1-V_2$ ; L-에피토프1- $V_1-L_1-V_2$ ; L-에피토프1-L- $V_1-L_1-V_2$ ; 에피토프1-L-에피토프2- $V_1-L_1-V_2$ ; 에피토프1-L-에피토프2-L- $V_1-L_1-V_2$ ; L-에피토프1-L-에피토프2- $V_1-L_1-V_2$ ; L-에피토프1-L-에피토프2-L- $V_1-L_1-V_2$ ; 에피토프1-L-에피토프2-L-에피토프3- $V_1-L_1-V_2$ ; 에피토프1-L-에피토프2-L-에피토프3-L- $V_1-L_1-V_2$ ; L-에피토프1-L-에피토프2-L-에피토프3- $V_1-L_1-V_2$ ; L-에피토프1-L-에피토프2-L-에피토프3-L- $V_1-L_1-V_2$ ;  $V_1-L$ -에피토프1-L- $V_2$ ; L-에피토프1-L- $V_1-L$ -에피토프2-L- $V_2$ ;  $V_1-L$ -에피토프1-L- $V_2-L$ -에피토프2-L;  $V_1-L$ -에피토프1-L- $V_2-L$ -에피토프2-L-에피토프3;  $V_1-L$ -에피토프1-L- $V_2-L$ -에피토프2-에피토프3;  $V_1-L$ -에피토프1-L- $V_2-L$ -에피토프2-L-에피토프3-에피토프4; L-에피토프1-L- $V_1-L$ -에피토프2-L- $V_2-L$ -에피토프3-L; 에피토프1-L- $V_1-L$ -에피토프2-L- $V_2-L$ -에피토프3-L; L-에피토프1-L- $V_1-L$ -에피토프2-L- $V_2-L$ -에피토프3; L-에피토프1-L- $V_1-L_1-V_2-L$ -에피토프2-L; L-에피토프1-L- $V_1-L_1-V_2-L$ -에피토프2-L-에피토프3; L-에피토프1-L- $V_1-L_1-V_2-L$ -에피토프2-에피토프3, 또는 에피토프1-L- $V_1-L_1-V_2-L$ -에피토프2-L-에피토프3-에피토프4
- [0484] 여기서,
- [0485]  $V_1$ 은 VL이고,  $V_2$ 는 VH이거나  $V_1$ 은 VH이고,  $V_2$ 는 VL이며; VH 및 VL은 m971에서 최적화된 VH 및 VL이다.
- [0486]  $L_1$ 은 VH 체인을 VL 체인에 연결하기에 적합한 링커이고;
- [0487] L은 글리신 및 세린 잔기를 포함하는 링커이고, 세포 외 결합 도메인에서 L의 각 발생은 동일한 세포 외 결합 도메인에서 L의 다른 발생과 동일하거나 상이할 수 있고, 및
- [0488] 에피토프 1, 에피토프 2 및 에피토프 3은 mAb-특이적 에피토프이며 동일하거나 상이할 수 있다.
- [0489]  $L_1$ 은 글리신 및/또는 세린을 포함하는 링커이고, 바람직하게는  $L_1$ 은 아미노산 서열 (Gly-Gly-Gly-Ser) $_n$  또는 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser) $_n$ 을 포함하는 링커이고, 여기서  $n$ 은 1, 2, 3, 4 또는 5 또는 아미노산 서열 (Gly $_4$ Ser) $_4$  또는 (Gly $_4$ Ser) $_3$ 을 포함하는 링커이다.
- [0490] 유사하게, L은 글리신 및/또는 세린을 포함하는 링커이고, 바람직하게는 L은 SGG, GGS, SGGs, SSGS, GGG, SGGG, GGGG, SGGGG, GGGGS, GGGGS, SGGGG, SGGGG, GS, GSG, GSGG, SGGGGG, SGGGGGG, SGGGGGGG, 및 SGGGGGGGG로부터 선택되며, 바람직하게는 L은 SGGG, GGGG 또는 SGGGS인 아미노산 서열을 갖는 링커이다.
- [0491] 바람직한 예에서, 에피토프 1, 에피토프 2, 에피토프 3 및 에피토프 4는 각각 독립적으로 이브리투모맙 (ibritumomab), 티옥세탄 (tiuxetan), 무로모나브-CD3 (muromonab-CD3), 토시투모맙 (tositumomab), 아크시시맙 (abciximab), 바실릭시맙 (basiliximab), 브렌투시맙 베도틴 (brentuximab vedotin), 세투시맙 (cetuximab), 인플릭시맙 (infliximab), 리툽시맙 (rituximab), 알렘투주맙 (alemtuzumab), 베바시주맙 (bevacizumab), 세톨리주맙 페골 (certolizumab pegol), 다클리주맙 (daclizumab), 이쿨리주맙 (eculizumab), 이팔리주맙 (efalizumab), 겐투주맙 (gemtuzumab), 나탈리주맙 (natalizumab), 오말리주맙 (omalizumab), 팔리비주맙 (palivizumab), 라니빌리주맙 (ranibizumab), 토실리주맙 (tocilizumab), 트라스트주맙 (trastuzumab), 베돌리주맙 (vedolizumab), 아다리주맙 (adalimumab), 벨리무맙 (belimumab), 카나키누맙 (canakinumab), 데노수맙 (denosumab), 골리무맙 (golimumab), 아이필리무맙 (ipilimumab), 오파투무맙 (ofatumumab), 파니투무맙 (panitumumab), QBEND-10 및 우스테키누맙 (ustekinumab)으로 선택되며, 바람직하게는 에피토프 1, 에피토프 2, 에피토프 3 및 에피토프 4는 리툽시맙 (R) 또는 QBEN10(Q)에 의해 인식될 수 있다.
- [0492] 에피토프 1, 에피토프 2, 에피토프 3 및 에피토프 4는 다음에 의해 구체적으로 인식되는 mAb-특이적 에피토프이

다:

항체 (Antibody) <sup>Ⓢ</sup>	지표(Indication) <sup>Ⓢ</sup>	약 뱅크 등록 n° (Drug bank accession n°) (또는 명시된 경 우 다른 n°) <sup>Ⓢ</sup>	타겟/항원 <sup>Ⓢ</sup>
이브리투모맵 (ibritumomab) 티옥세탄 (tiuxetan) <sup>Ⓢ</sup>	비-호지킨 림프종 (이트롬 -90 또는 인둠 -111) <sup>Ⓢ</sup>	DB00078 <sup>Ⓢ</sup>	CD20 <sup>Ⓢ</sup>
무로모나브- CD3(muromonab -CD3) <sup>Ⓢ</sup>	이식 거부 <sup>Ⓢ</sup>	DB00075 <sup>Ⓢ</sup>	T 세포 CD3 수 용체 <sup>Ⓢ</sup>
토시투모맵 (tositumomab) <sup>Ⓢ</sup>	비-호지킨 림프종 <sup>Ⓢ</sup>	DB00081 <sup>Ⓢ</sup>	CD20 <sup>Ⓢ</sup>
아크시시맵 (abciximab) <sup>Ⓢ</sup>	심혈관 질환 <sup>Ⓢ</sup>	DB00054 <sup>Ⓢ</sup>	당 단백질 IIb / IIIa의 억제 <sup>Ⓢ</sup>
바실릭시맵 (basiliximab) <sup>Ⓢ</sup>	이식 거부 <sup>Ⓢ</sup>	DB00074 <sup>Ⓢ</sup>	IL-2R $\alpha$ 수용체 (CD25) <sup>Ⓢ</sup>
브렌투시맵 베 도틴 (brentuximab vedotin) <sup>Ⓢ</sup>	액 형성 대 세포 림 프종 <sup>Ⓢ</sup>	DB08870 <sup>Ⓢ</sup>	CD30 <sup>Ⓢ</sup>
세록시맵	대장 암, 두 경부암 <sup>Ⓢ</sup>	DB00002 <sup>Ⓢ</sup>	표피 성장 인

[0493]

(cetuximab)↵		↵	자 수용체↵
인플릭시맵 (infliximab)↵	여러자가 면역 질환↵	DB00065↵	TNF-α 신호의 억제↵
리툭시맵 (rituximab)↵	비-호지킨 림프종↵	DB00073↵	CD20↵
알렘투주맵 (alemtuzumab)↵	만성 림프 구성 백 혈병↵	DB00087↵	CD52↵
베바시주맵 (bevacizumab)↵	결장 직장암, 연령 관련 황반 변성 (오 프-라벨)↵	DB00112↵	혈관 내피 성 장 인자 (VEGF)↵
세톨리주맵 페 골 (certolizumab pegol)↵	크론병↵	DB08904↵	TNF-α 신호의 억제↵
다클리주맵 (daclizumab)↵	이식 거부↵	DB00111↵	IL-2Rα 수용체 (CD25)↵
이쿨리주맵 (eculizumab)↵	발작성 야행성 헤모 글로빈 뇨증↵	DB01257↵	보체 시스템 단백질↵
이팔리주맵 (efalizumab)↵	건선↵	DB00095↵	CD11a↵
젬투주맵 (gemtuzumab)↵	급성 골수성 백혈병 (캘 리케아 미신 포 함)↵	DB00056↵	CD33↵
나탈리주맵 (natalizumab)↵	다발성 경화증 및 크론 병↵	DB00108↵	alpha-4 (α4) 인테그린↵
오말리주맵 (omalizumab)↵	주로 알레르기 관련 천식↵	DB00043↵	면역글로블린 E (IgE)↵

[0494]

팔리비주맵 (palivizumab)↗	호흡기 세포 융합 바이러스↗	DB00110↗	RSV F 단백질 의 에피토프↗
라니비리주맵 (ranibizumab)↗	황반 변성↗	DB01270↗	혈관 내피 성 장 인자 A (VEGF-A)↗
토실리주맵 (tocilizumab) (또는 아틀리 주맵 (Atlizumab))↗	류마티스 관절염↗	DB06273↗	항- IL-6R↗
트라스투주맵 (trastuzumab)↗	유방암↗	DB00072↗	ErbB2↗
베돌리주맵 (vedolizumab)↗	크론 병, 궤양 성 대장염↗	CAS n°943609-66- 3↗	인테그린 α4β7↗
아다리무맵 (adalimumab)↗	여러자가 면역 질환↗	DB00051↗	TNF-α 신호의 억제↗
벨리무맵 (belimumab)↗	전신성 홍 반성 루 푸스↗	DB08879↗	B-세포 활성화 인자의 억제↗
카나키누맵 (canakinumab)↗	Cryopyrin-관련 주 기성 증후군 (CAPS)↗	DB06168↗	IL-1β↗
데노수맵 (denosumab)↗	폐경기 골다공증, 고형 종양의 뼈 전 이↗	DB06643↗	RANK 리간드 억제제↗
골리무맵 (golimumab)↗	류마티스 관절염, 건 선성 관절염 및 강직성 척추염↗	DB06674↗	TNF-alpha 억 제제↗
아이필리무맵 (ipilimumab)↗	흑색 종↗	DB06186↗	블록 CTLA-4↗

( MDX-101 )↗			
오파투무맵 (ofatumumab)↗	만성 림프 구성 백 혈병↗	CAS n° 679818- 59-8↗	CD20↗
파니투무맵 (panitumumab)↗	결장 직장암↗	DB01269↗	표피 성장 인 자 수용체↗
우스테키누맵 (ustekinumab)↗	건 선성 관절염, 플 라크 건선↗	DB05679↗	IL-12, IL-23↗
니볼루맵 (Nivolumab)↗	신장 세포 암종, 폐 암, 흑색 종 및 진 행성 또는 전이성 고형 종양↗	CAS n°946414-94- ↗	PD-1↗

따라서 mAb-특이적 에피토프는 하기로부터 선택된 하나의 폴리펩티드를 포함할 수 있다:

CPYSNPCLC, NSELLSLINDMPITNDQKKLMSNN, CQFDLSTRRLKC, CQYNLSSRALKC, CVWQRWQKSYVC, CVWQRWQKSYVC, SFVLNWMSPSNQTDKLAAPFEDR, SGTYLCGAISLAPKAQIKE, ELPTQGTFSNVSTNVSPAKPTTTA, ELPTQGTFSNVSTNVSPAKPTTTA, GQNDTSQTSSPS.



항체

mAb-특이적 에피토프

리톡시맵		
미모토프		CPYSNPSLC
팔리비주맵		
에피토프		NSLLSLINIMPITMDQKILMSNM
세톨리주맵		
미모토프 1		CQFDLSTRRLKC
미모토프 2		CQYNLSSRALKC
미모토프 3		CVWQRWQKSYVC
미모토프 4		CMWDRFSRWYKC
니볼루맵		
에피토프 1		SFVLNWMSPSPNGTDKLAAPEDR
에피토프 2		SGTYLCGATSLAPKAQIKE
QBEND-10		
에피토프		ELPTQGTFNSVSTNVSPAKPTTTA
알렘투주맵		
에피토프		GQNDTSQTSSPS

[0499]

[0500]

바람직한 실시예에서, mAb-특이적 에피토프는 아미노산 서열 ELPTQGTFNSVSTNVSPAKPTTTA 및/또는 CPYSNPSLC(서열 번호 19)를 갖는 mAb-특이적 에피토프이다.

[0501]

보다 바람직한 실시예에서, 본 발명의 CD22 CAR은 아미노산 서열 CPYSNPSLC (R) 및 아미노산 서열 ELPTQGTFNSVSTNVSPAKPTTTA (Q)를 갖는 3 mAb-특이적 에피토프를 포함한다.

[0502]

보다 바람직한 실시예에서, 본 발명의 CD22 CAR은 VL 직후 힌지의 NT 부분에 위치한 CPYSNPSLC (R)의 아미노산 서열을 갖는 2 mAb-특이적 에피토프를 포함한다.

[0503]

일 측면에서, W02016120216에 기재된 바와 같이 리톡시맵이 (R)에 결합하는 하나 이상의 서열 및/또는 QBEN10이 (Q)에 결합하는 서열은 링커 GGGSGGGSGGGGS 및/또는 힌지에 삽입될 수 있다.

[0504]

특정 실시예에서, 본 발명의 CD22 CAR은 단일 체인 CAR(scCAR)이다.

[0505]

특정 실시예에서, 본 발명의 단일 체인 항-CD22 CAR은 m971으로부터의 scfv 및 바람직하게는 CD22의 디스탈(distal)부분, 대안적으로 다른 B 세포 항원, 특히 B 세포 악성 종양에 의해 발현되는 경우에 CD34, CD10, CD79a, CD20, IgD, CD5, CD23, CD19, STAT5, CD3, CD30, BCMA와 같은 특이적인 하나 이상의 다른 결합 도메인을 포함한다. 특정 실시예에서, 본 발명의 CD22 CAR은 다중 체인 CAR(mcCAR)이다. 다중 체인 CD22 CAR은 본 발명의 일부이며 W02014039523에 상세하게 기재된 바와 같이 제조될 수 있고, 이는 본원에 참고로 포함된다. 특정 실시예에서, CD22에 특이적인 면역 글로불린 또는 면역 글로불린의 일부의  $V_H$  도메인 및  $V_L$  도메인은 다중 체인 CAR의 2 개의 상이하고 분리된 (비공유적으로 결합된) 체인에 의해 운반될 수 있다.

[0506]

다중 체인 버전에서, 본 발명의 CD22 CAR은 본 발명의 CD22에 특이적인 scfv를 포함하는 막관통 도메인 중 하나 이상과 적어도 2 개, 바람직하게는 3 개의 막관통 도메인(서로 공유적으로 결합되지 않음)을 포함한다.

[0507]

특정 실시예에서, 바람직하게는 m971로부터 CD22에 특이적인 면역 글로불린의  $V_H$  도메인 및  $V_L$  도메인은 다중 체인 CAR의 하나의 체인에 의해 운반될 수 있다.

[0508]

본 발명의 sc CD22 CAR 및 mc CD22 CAR의 예는 도 2에 제공된다.

[0509]

특정 실시예에서, CD22에 특이적인 면역 글로불린의  $V_H$  도메인 및  $V_L$  도메인, 바람직하게는 m971은 다중 체인 CAR의 하나의 체인 및 CD22에 특이적인 다른 면역 글로불린의  $V_H$  도메인 및  $V_L$  도메인 에 의해 운반될 수 있고, mc CAR의 다른 체인에 의해 수행될 수 있다.

[0510]

표적 항원의 하향 조절 또는 돌연변이는 암 세포에서 일반적으로 관찰되어 항원-손실 탈출 변이체를 생성한다. 따라서, 종양 탈출을(tumor escape) 상쇄시키고 면역 세포를 표적에 보다 특이적으로 만들도록, 본 발명에 따른 CD22 특이적 CAR은 표적 내의 다른 요소에 동시에 결합하여 면역 세포 활성화 및 기능을 증대시키기 위해 다른 세포 외 리간드-결합 도메인을 포함할 수 있다. 일 실시예에서, 세포 외 리간드-결합 도메인은 동일한 막관통 폴리펩티드 상에 탠덤(tandem)으로 배치 될 수 있고, 임의로 링커에 의해 분리될 수 있다.

[0511]

다른 실시예에서, 상기 상이한 세포 외 리간드-결합 도메인은 다중 체인 CAR을 구성하는 상이한 막관통 폴리펩티드 상에 배치될 수 있다. 다른 실시예에서, 본 발명은 상이한 세포 외 리간드 결합 도메인을 포함하는 CAR의 집단에 관한 것으로, 각각의 하나는 CD22에 특이적이다.

- [0512] 일 실시예에서 CD22에 특이적인 세포 외 결합 도메인 및 제 2 세포 외 결합 도메인은 동일한 scCAR 상에 있다.
- [0513] 다른 실시예에서, CD22에 특이적인 세포 외 결합 도메인 및 제 2 세포 외 결합 도메인은 동일한 mcCAR 상에 있고 상기 mc CAR의 동일하거나 비공유적으로 결합 된 막관통 도메인에 속한다.
- [0514] 다른 제 2 세포 외 결합 도메인은 병리학적 세포에서 CD22에 연관된 (일시적으로-발현된) 항원에 특이적인 CD34, CD10, CD79a, CD20, IgD, CD5, CD23, CD19, STAT5, CD3, CD30, BCMA, PAX5, CD19, CD20, CD30, 글리코 펑 지질(glycosphingolipids), 주요 조직 적합성 복합체 (MHC) 분자, Ig, CD3, CD34, CD79, 바람직하게는 CD79a, CD138, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), 주요 조직 적합성 복합체 (MHC) 분자, BCMA (CD269, TNFRSF 17) 또는 FLT-3, Pax5 와 같은 임의의 세포 외 결합 도메인일 수 있다.
- [0515] 본 발명은 또한 관련 CD22 CAR 핵산, CD22 CAR 재조합 발현 벡터, 조작된 TCR KO 세포, 바람직하게는 CD22 CAR 이 부여된 적어도 하나의 편집된 유전자, CD22 CAR이 부여 된 상기 TCR KO 세포의 집단을 포함하는 T 세포, 및 CD22 CAR, 단백질, 발현 벡터, 본 발명의 상기 CD22 CAR을 발현하는 조작된 TCR KO CD52 KO 세포와 관련된 약 학 조성물을 제공한다.
- [0516] 본 발명은하기 목적을 제공 한다: 본 발명의 CD22 CAR- 관련 핵산, -재조합 발현 벡터, 저산소증에 대한 내성을 부여하는 유전자, 알렘투주맵에 대한 내성을 부여하는 유전자로부터 선택된 적어도 하나의 편집된 유전자를 포 함하는 조작 된 TCR KO 세포; 프로테아제 억제제, PNA (dCK)에 대한 내성을 부여하고 CD22 CAR이 부여된 유전자 인 보르테조밐(bortezomib)과 같은 프로테아제 억제제(protease inhibitor), 및 관련 핵산, 상기 CD22 CAR이 부여된 하기와 같은 적어도 하나의 편집된 유전자를 포함하는 조작된 TCR KO 세포의 집단 의약과 동일한 목적을 포함하는 약학 조성물.
- [0517] **폴리뉴클레오티드, 벡터:**
- [0518] 본 발명은 본 발명에 따른 상기 기재된 CD22 CAR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, 벡터에 관한 것이다.
- [0519] 폴리뉴클레오티드는 발현 카세트(cassette) 또는 발현 벡터 (예를 들어 박테리아 숙주 세포로 도입하기위한 플 라스미드, 또는 곤충 숙주 세포의 형질 감염을 위한 바큇로 바이러스(baculovirus) 벡터와 같은 바이러스 벡터, 또는 렌티 바이러스(lentivirus )와 같은 플라스미드 또는 바이러스 벡터로 구성될 수 있다) 또는 포유 동물, 바람직하게는 인간 숙주 세포로의 도입을 위한 아데노 관련 바이러스로 구성될 수 있다.
- [0520] 특정 실시예에서, 상이한 핵산 서열은 2A 펩티드를 인코딩하는 서열과 같은 리보솜 스킵 서열을 암호화하는 핵 산 서열을 포함하는 하나의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터에 포함될 수 있고, 피코르나 바이러스(picornaviruse s)의 아프토 바이러스(Aphthovirus) 하위 군에서 확인된 2A 펩티드는 코돈에 의해 암호화 된 2 개의 아미노산 사이에 펩티드 결합이 형성되지 않으면서 하나의 코돈에서 다음 코돈으로 리보솜 "건너뛰기(skip)"를 일으킨다 (참조 : (Donnelly and Elliott 2001; Atkins, Wills et al. 2007; Doronina, Wu et al. 2008)).
- [0521] 따라서, 본 발명은 펩티드 2A에 의해 연결된 RQR8 및 항-CD22 CAR을 코딩하는 도 4에서와 같은 벡터를 제공한다.
- [0522] "코돈"은 리보솜에 의해 하나의 아미노산 잔기로 번역되는 mRNA (또는 DNA 분자의 센스 가닥)상의 3 개의 뉴클 레오티드를 의미한다. 따라서, 폴리펩티드가 프레임(frame)에있는 2A 올리고 펩티드 서열에 의해 분리될 때 mRNA 내의 단일의 연속 개방 관독 프레임(contiguous open reading frame)으로부터 2 개의 폴리펩티드가 합성 될 수 있다. 이러한 리보솜 스킵 메카니즘은 당 업계에 잘 알려져 있으며 단일 메신저 RNA에 의해 인코딩된 여 러 단백질의 발현을 위해 여러 벡터에 의해 사용되는 것으로 알려져 있다.
- [0523] 본 발명의 CD22 CAR이 세포에서 발현되게 하는 벡터는 본 발명의 또 다른 목적이다. 바람직한 실시예에서, 상기 벡터는 본 발명의 CD22 CAR의 일시적 발현을 허용한다. 보다 바람직한 실시예에서, 상기 벡터는 상기 CD22 CAR 을 코딩하는 서열을 세포의 게놈 내로 삽입함으로써 본 발명의 CD22 CAR의 구성 및 안정적인 발현을 허용한다.
- [0524] 본 발명의 CD22 CAR의 발현 및/또는 본 발명의 CD22 CAR을 발현하는 세포의 생존은 R. Kuhn, F. Schwenk, M. Aguet, K. Rajewsky, Science 8 September 1995: Vol. 269 no. 5229 pp. 1427-1429 DOI:10.1126/science.7660125 에 기재된 바와 같이 유도성 프로모터의 제어하에 유전자를 사용하여 제어될 수 있다.
- [0525] 일 실시예에서, 세포 외 도메인이 m971 scfv 도메인과 인간 CD8 알파로부터의 힌지 사이에 위치한 서열번호 19(CPYSNPSLC)의 2 개 이상의 CD20 미토폭(mimotopes)를 포함하는 CD22 CAR이 제공된다. 특허



WO2016120216A1은 이러한 구조를 제조하는 방법을 개시하고 있으며, 본 명세서에 참고로 포함된다.

- [0526] 일 실시예에서, 본 발명은 서열번호 22로부터 선택된 CD22 CAR을 코딩하는 서열을 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0527] 막관통 폴리펩타이드를 숙주 세포의 분비 경로로 안내하기 위해, 분비 신호 서열 (리더 서열, 프리프로 서열 또는 프리 서열이라고도 함)(also known as a leader sequence, prepro sequence or pre sequence)이 폴리뉴클레오타이드 서열 또는 벡터 서열로 제공된다. 분비 신호 서열은 막관통 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되어있다. 즉, 2 개의 서열은 정확한 관독 프레임(reading frame)에 결합되고 새로 합성된 폴리펩타이드를 숙주 세포의 분비 경로로 안내하도록 위치된다. 분비 신호 서열은(Secretory signal sequences) 관심 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열에 5'로 일반적으로 위치하지만, 특정 분비 신호 서열은 관심 핵산 서열의 다른 곳에 위치할 수 있다(예를 들어, Welch et al., U.S. Patent No. 5,037,743; Holland et al., U.S. Patent No. 5,143,830).
- [0528] 바람직한 실시예에서, 신호 펩티드는 아미노산 서열번호 1 및 2를 포함한다.
- [0529] 보다 바람직한 실시예에서, 본 발명의 CAR의 신호 펩티드는 인간 CD8 알파로부터의 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0530] 당업자는 유전자 코드의 축퇴성을 고려하여 이들 폴리뉴클레오타이드 분자 중에서 상당한 서열 변이가 가능하다는 것을 인식할 것이다. 바람직하게는, 본 발명의 핵산 서열은 포유 동물 세포에서의 발현, 바람직하게는 인간 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화(codon-optimized)된다. 코돈-최적화(codon-optimization)는 일반적으로 그러한 종의 고도로 발현된 유전자에서 빈번한 코돈에 의해 주어진 종의 고 발현(highly expressed) 유전자에서 드문 코돈의 관심 서열에서의 교환이며, 교환되는 코돈과 같은 아미노산을 인코딩하는 코돈을 지칭한다.
- [0531] CD22 CAR이 부여된 면역 세포 조작 방법:
- [0532] 본 발명은 엑스 비보(ex-vivo)를 상기 면역 세포에 본 발명의 CD22 CAR 중 하나, 바람직하게는 앞서 설명한 서열번호 15을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 도입하는 것을 포함하는 면역 요법을 위한 면역 세포의 제조 방법을 포함한다.
- [0533] 바람직한 실시예에서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 면역 세포에서 안정적으로 발현되는 관점에서 벡터에 포함된다. 추가의 실시예에 따르면, 상기 방법은 특히 이식 (동종 이식편 또는 동종 이식편이라고도 함) 단독 또는 면역 세포에 내성이 있는 약물과 병용하는 경우 상기 세포를 입양 전달(adoptive transfer) 및/또는 상기 면역 세포 생존에 영향을 미치는 약물과 함께 사용하기에 적합하도록 세포를 유전자 변형시키는 단계를 추가로 포함한다.
- [0534] 후자의 경우에, 조작된 세포는 초기에 공여자로부터 단리될 수 있고, 내성이 있는 약물과 조합하여 동일한 공여자로의 재주입에 사용될 수 있다.
- [0535] 유전자를 편집하거나 유전자를 변형하거나 유전자를 불활성화하는 것, 예를 들어 유전자 돌연변이, 유전자 삭제, 유전자에 서열 삽입, 유전자의 메틸화(유전자의 프로모터 포함) PA201670503에 기술된 방법 등은 본원에 참고로 포함되고 하기 실시예에 예시되어있다.
- [0536] 방법은 MacLeod et al., Integration of a CD19 CAR into the TCR Alpha Chain Locus Streamlines Production of Allogeneic Gene-Edited CAR T Cells, Molecular Therapy (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.02.005> 에 기술되어 있으며, 또한 HIF-1a를 과발현함으로써 저산소증에 내성인 CD22 CAR이 부여된 세포 또는 TCR KO CD22 CAR을 제조하기 위한 본 발명에 사용된 방법에 대한 대안이 본원에 참고로 포함된다.
- [0537] 본 발명의 방법은 TRAC 유전자 (TCR의 TCR 알파 서브 유닛을 인코딩 함)에서 CD22 CAR을 "노크(knock in)"하는 세포상 동성 지향 복구(HDR) 메카니즘을 기초로 하여 보다 효율적인 생성물을 생성한다.
- [0538] 이전에 기술된 T 세포에서 외인성 DNA 서열을 갖는 HDR은 CRISPR/Cas9와 쌍을 이루는 짧은 올리고 뉴클레오타이드를 사용한다. 다른 이들은 아데노-관련 바이러스 (AAV) 벡터가 HDR을 통한 유전자 삽입을 달성하기 위해 사이트-특이적 뉴클레아제 Caspr/Cas9 또는 MegaTAL과 함께 템플레이트(template)으로서 사용될 수 있음을 보여준다. 본 발명에서는 CAR을 TCR 유전자에 삽입하기 위해 아데노-관련 바이러스 (AAV) 벡터 및 TALEN을 조합하는 새로운 방법이 제공된다.
- [0539] UCART22에서, AAV6 벡터는 TRAC 유전자 (알파 서브 유닛 또는 TCR을 암호화하는 유전자) 또는 PCT/EP2017/076798에 개시된 임의의 유전자와 같은 유전자의 특정 TALEN을 사용하여 유전자 편집 후 사용될 수 있다.

- [0540] TALEN은 DNA 서열에 특이적이고 서열을 유전자에 통합할 수 있기 때문에, 바람직하게는 TRAC 유전자, 본 발명은 또한 CAR을 코딩하는 서열을 포함하는 조작된 면역 세포, 바람직하게는 사용된 TALEN에 의해 결정된 TRAC 유전자의 정확한 영역에 위치한 상기 기재된 바와 같은 CD22 CAR이다. 상기 조작된 면역 세포의 TRAC 유전자에서의 서열은 TALEN 특이성으로 인해 독특하다.
- [0541] 따라서, 본 발명은 하기 서열을 포함하는 조작된 면역 세포를 제공한다;
- [0542]  $(YYY)_n$ -ZZZ-(XXX) $_m$ .
- [0543] n은 1에서 10 이상
- [0544] m은 1 내지 100이고, 바람직하게는  $m > 100$ 이고 통합될 서열의 염기쌍의 수를 나타내고,
- [0545] ZZZ는 TRAC 인코딩 서열과 프레임으로 2A 펩티드와 같은 자가-절단 펩티드를 코딩하고,
- [0546] Y는 A 또는 T 또는 G 또는 C이고 플랭킹(flancking) 또는 적어도 **ttgtcccacagATATC**, 바람직하게는 **ttgtcccacagATATCCAG**를 포함하는 TALEN에 의해 표적화되는 TRAC 유전자의 서열을 포함하고, (XXX) $_n$ 은 TRAC 유전자에 삽입되는 A 또는 T 또는 G 또는 C이고 외인성 서열의 일부이며, 바람직하게는 CAR을 암호화하는 서열, 보다 바람직하게는 CD22 CAR을 암호화하는 서열이다.
- [0547] 일 실시예에서, TRAC 유전자는 결실되고 삽입된 유전자인 TRAC 프로모터의 제어하에 발현된다.
- [0548] IRES 내부 리보솜 진입 부위와 같은 추가적이거나 대안적인 서열; TALEN 타겟과 XXX 사이에 삽입되었을 수 있다.
- [0549] 본 발명에서, TALEN 표적은 서열번호 21이고, CAR CD22는 서열번호 22이다.
- [0550] 일 실시예에서 상기 TALEN에 의해 절단된 서열은 AGAACCTGACCCTG이다. 서열 AGAACCTGACCCTG는 삽입 서열에 따라 본 발명의 조작된 세포에서 적어도 부분적으로 보존될 수 있다 (도 9 참조).
- [0551] 본 발명은 서열번호 22를 포함하는 TRAC 유전자를 포함하는 조작된 면역 세포를 제공한다.
- [0552] 본 발명은 CD19에 특이적인 CAR을 인코딩하는 서열 또는 TRAC 유전자에 삽입된 CD22에 특이적인 CAR을 인코딩하는 서열, 바람직하게는 유전자좌: AGAACCTGACCCTG의 임의의 위치를 포함하는 조작된 면역 세포를 제공한다.
- [0553] 따라서, 특정 실시예에서, 본 발명의 조작된 면역 세포는 CAR을 암호화하는 2 개의 상이한 서열을 포함하고 상기 2 개의 상이한 CAR을 발현한다. 세포 표면에서, 검출할 수 없는 수준의 TCR.
- [0554] 따라서, 특정 실시예에서, 본 발명의 조작된 면역 세포는 CAR을 암호화하는 2 개의 상이한 서열을 포함하고 상기 2 개의 상이한 CAR을 발현한다. 세포 표면에서, 검출할 수 없는 수준의 TCR 및 MHC 클래스 I.
- [0555] 본 발명의 조작된 면역 세포는 게놈 TRAC 유전자에 CD22, 바람직하게는 서열 번호 22의 코딩 서열, 및 CD19에 특이적인 CAR을 코딩하는 다른 외인성 유전자가 삽입되는 또 다른 게놈 서열을 게놈 TRAC 유전자에 포함한다.
- [0556] 본 발명의 조작된 면역 세포는 게놈 TRAC 유전자에 CD22, 바람직하게는 서열 번호 22의 코딩 서열, 및 CD34에 특이적인 CAR을 코딩하는 다른 외인성 유전자가 삽입되는 또 다른 게놈 서열을 게놈 TRAC 유전자에 포함한다.
- [0557] 본 발명의 조작된 면역 세포는 게놈 TRAC 유전자에 CD22, 바람직하게는 서열 번호 22의 코딩 서열, 및 CD79a에 특이적인 CAR을 코딩하는 다른 외인성 유전자가 삽입되는 또 다른 게놈 서열을 게놈 TRAC 유전자에 포함한다.
- [0558] 본 발명의 조작된 면역 세포는 게놈 TRAC 유전자에 CD22, 바람직하게는 서열 번호 22의 코딩 서열, 및 CD79b에 특이적인 CAR을 코딩하는 다른 외인성 유전자가 삽입되는 또 다른 게놈 서열을 게놈 TRAC 유전자에 포함한다.
- [0559] 본 발명의 조작된 면역 세포는 게놈 TRAC 유전자에 CD22, 바람직하게는 서열 번호 22의 코딩 서열, 및 CD10에 특이적인 CAR을 코딩하는 다른 외인성 유전자가 삽입되는 또 다른 게놈 서열을 게놈 TRAC 유전자에 포함한다.
- [0560] 본 발명의 조작된 면역 세포는 게놈 TRAC 유전자에 CD22, 바람직하게는 서열 번호 22의 코딩 서열, 및 IgD에 특이적인 CAR을 코딩하는 다른 외인성 유전자가 삽입되는 또 다른 게놈 서열을 게놈 TRAC 유전자에 포함한다.
- [0561] 본 발명의 조작된 면역 세포는 게놈 TRAC 유전자에 CD22, 바람직하게는 서열 번호 22의 코딩 서열, 및 CD5에 특이적인 CAR을 코딩하는 다른 외인성 유전자가 삽입되는 또 다른 게놈 서열을 게놈 TRAC 유전자에 포함한다.
- [0562] 본 발명의 조작된 면역 세포는 게놈 TRAC 유전자에 CD22, 바람직하게는 서열 번호 22의 코딩 서열, 및 CD23에

특이적인 CAR을 코딩하는 다른 외인성 유전자가 삽입되는 또 다른 게놈 서열을 게놈 TRAC 유전자에 포함한다.

- [0563] 본 발명의 조작된 면역 세포는 게놈 TRAC 유전자에 CD22, 바람직하게는 서열 번호 22의 코딩 서열, 및 CD30에 특이적인 CAR을 코딩하는 다른 외인성 유전자가 삽입되는 또 다른 게놈 서열을 게놈 TRAC 유전자에 포함한다.
- [0564] 본 발명의 조작된 면역 세포는 게놈 TRAC 유전자에 CD22, 바람직하게는 서열 번호 22의 코딩 서열, 및 BCMA에 특이적인 CAR을 코딩하는 다른 외인성 유전자가 삽입되는 또 다른 게놈 서열을 게놈 TRAC 유전자에 포함한다.
- [0565] 본 발명의 조작된 면역 세포는 게놈 TRAC 유전자에 CD22, 바람직하게는 서열 번호 22의 코딩 서열, 및 FLT3에 특이적인 CAR을 코딩하는 다른 외인성 유전자가 삽입되는 또 다른 게놈 서열을 게놈 TRAC 유전자에 포함한다.
- [0566] 본 발명의 조작된 면역 세포는 게놈 TRAC 유전자에 CD22, 바람직하게는 서열 번호 22의 코딩 서열, 및 CD138에 특이적인 CAR을 코딩하는 다른 외인성 유전자가 삽입되는 또 다른 게놈 서열을 게놈 TRAC 유전자에 포함한다.
- [0567] 본 발명의 조작된 면역 세포는 게놈 TRAC 유전자에 CD22, 바람직하게는 서열 번호 22의 코딩 서열, 및 CD80에 특이적인 CAR을 코딩하는 다른 외인성 유전자가 삽입되는 또 다른 게놈 서열을 게놈 TRAC 유전자에 포함한다.
- [0568] 본 발명의 조작된 면역 세포는 게놈 TRAC 유전자에 CD22, 바람직하게는 서열 번호 22의 코딩 서열, 및 CD86에 특이적인 CAR을 코딩하는 다른 외인성 유전자가 삽입되는 또 다른 게놈 서열을 게놈 TRAC 유전자에 포함한다.
- [0569] 제 2 CAR을 코딩하는 다른 외인성 유전자가 삽입되는 다른 게놈 서열은 PCT/EP2017/076798 또는 WO2017069958A2에 개시된 유전자 중 어느 하나일 수 있다.
- [0570] CAR을 코딩하는 다른 외인성 유전자는 자가 절단 펩티드 및 CD22 CAR 서열, 바람직하게는 서열번호 N 또는 PCT/EP2017/076798에 개시된 것과 같은 단백질을 인코딩하는 다른 유전자와 프레임으로 TRAC 유전자에 삽입 될 수 있거나, PD1 (Uniprot Q15116), CTLA4 (Uniprot P16410), PPP2CA (Uniprot P67775), PPP2CB (Uniprot P62714), PTPN6 (Uniprot P29350), PTPN22 (Uniprot Q9Y2R2), LAG3 (Uniprot P18627), HAVCR2 (Uniprot Q8TDQ0), BTLA (Uniprot Q7Z6A9), CD160 (Uniprot O95971), TIGIT (Uniprot Q495A1), CD96 (Uniprot P40200), CRTAM (Uniprot O95727), LAIR1 (Uniprot Q6GTx8), SIGLEC7 (Uniprot Q9Y286), SIGLEC9 (Uniprot Q9Y336), CD244 (Uniprot Q9BZW8), TNFRSF10B (Uniprot O14763), TNFRSF10A (Uniprot O00220), CASP8 (Uniprot Q14790), CASP10 (Uniprot Q92851), CASP3 (Uniprot P42574), CASP6 (Uniprot P55212), CASP7 (Uniprot P55210), FADD (Uniprot Q13158), FAS (Uniprot P25445), TGFBR2 (Uniprot P37173), TGFBR1 (Uniprot Q15582), SMAD2 (Uniprot Q15796), SMAD3 (Uniprot P84022), SMAD4 (Uniprot Q13485), SMAD10 (Uniprot B7ZSB5), SKI (Uniprot P12755), SKIL (Uniprot P12757), TGIF1 (Uniprot Q15583), IL10RA (Uniprot Q13651), IL10RB (Uniprot Q08334), HMOX2 (Uniprot P30519), IL6R (Uniprot P08887), IL6ST (Uniprot P40189), EIF2AK4 (Uniprot Q9P2K8), CSK (Uniprot P41240), PAG1 (Uniprot Q9NWQ8), SIT1 (Uniprot Q9Y3P8), FOXP3 (Uniprot Q9BZS1), PRDM1 (Uniprot Q60636), BATF (Uniprot Q16520), GUCY1A2 (Uniprot P33402), GUCY1A3 (Uniprot Q02108), GUCY1B2 (Uniprot Q8BXH3) 및 GUCY1B3 (Uniprot Q02153)에서 선택될 수 있다.
- [0571] UCART 22에서 선호되는 편집된(Preferred edited) (KO) 유전자는 TNFRSF10B (Uniprot O14763), TNFRSF10A (Uniprot O00220), IL10RA (Uniprot Q13651), IL10RB (Uniprot Q08334, TGFBR2 (Uniprot P37173), TGFBR1 (Uniprot Q13582) PD10116 PD135), CTLA4 (Uniprot P16410), LAG3 (Uniprot P18627), HAVCR2 (Uniprot Q8TDQ0), TIGIT (Uniprot Q495A1)이다.
- [0572] 바람직하게는 제 2 CAR이 삽입되는 유전자는 표 A에 기재된 것 중 어느 하나로부터 선택된 T 세포 활성화 동안 활성화된 게놈 유전자이다:

[0573] 표 A

기호	유전자 설명 (Gene description)
CD3G	CD3 감마(CD3 gamma)
Rn28s1	28S 리보솜 RNA(28S ribosomal RNA)
Rn18s	18S 리보솜 RNA(18S ribosomal RNA)
Rn7sk	RNA, 7SK, 핵
Actg1	액틴, 감마, 사이토플라스믹 1(actin, gamma, cytoplasmic 1)
B2m	베타-2 미크로글로불린(beta-2 microglobulin)
Rpl18a	리보솜 단백질 L 18A(ribosomal protein L18A)
Pabpc1	폴리(A) 결합 단백질, 사이토플라스믹 1(poly(A) binding protein, cytoplasmic 1)
Gapdh	글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로제나아제 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
Rpl19	리보솜 단백질 L 19(ribosomal protein L19)
Rpl17	리보솜 단백질 L 17(ribosomal protein L17)
Rplp0	리보솜 단백질, 라지, P0(ribosomal protein, large, P0)
Cfl1	코필린 1, 비-근육(cofilin 1, non-muscle)
Pfn1	프로필린 1(profilin 1)

[0574]

[0575] 또는 PCT/EP2017/076798에 개시된 안전한 하버 로시(harbor loci) 또는 표 AA

[0576] 표 AA :

Zfp640	징크 핑거 단백질 640(zinc finger protein 640)
LOC100038422	uncharacterized LOC100038422
Zfp600	징크 핑거 단백질 600(zinc finger protein 600)
Serpinb3a	세린 (또는 시스테인) 펩티다제 억제제, 클로드 B (오발부민), 멤버 3A (serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3A)
Tas2r106	미각 수용체, 타입 2, 멤버 106 (taste receptor, type 2, member 106)
Magea3	흑색종 항원, 패밀리 A, 3 (melanoma antigen, family A, 3)
Omt2a	난 모세포 성숙, 알파 (oocyte maturation, alpha)
Cpxcr1	CPX 염색체 영역, 후보 1 (CPX chromosome region, candidate 1)
Hsf3	열 충격 전사 인자 3 (heat shock transcription factor 3)
Pbsn	프로바신 (Probasin)
Sbp	스페르민 결합 단백질 (spermine binding protein)
Wfdc6b	WAP 4-디설파이드 코어 도메인 6B (WAP four-disulfide core domain 6B)
Meio	OB 도메인에 특이적인 감수 분열 (meiosis specific with OB domains)
Dnm3os	다이너민 3, 반대 가닥 (dynamin 3, opposite strand)
Skint11	상피내 T 세포 11의 선택 및 유지 (selection and upkeep of intraepithelial T cells 11)

[0577]

[0578] 제 2 CAR이 삽입될 수 있는 다른 유전자는 하기 표 B에서 선택된 어느 하나의 단백질을 암호화하는 유전자일 수

있다.

표 B

인터루킨 21.
인터루킨 3.
아이스펜테닐-디포스포아트 엘타 아이소머라제 2.
그라자임 C.
체모킨(C-C 모티프) 수용체 8.
인터루킨 2.
인터루킨 1 수용체, 타입 I.
중양 사멸 인자(리간드) 슈퍼패밀리, 멤버 4.
뉴런 칼슘 센서 1.
CDK5 및 Abl 효소 기질 1.
막관통 및 테트라트리 펩티드 반복제 2 개 함유.
LON 펩티다제 N-말단 도메인 및 링거 1.
당 단백질 49 A.
용로 같은 키나제 2.
리파아제, 내피.
사이클린 의존성 키나제 억제제 1A (P21).
grainyhead-like 1 (Drosophila).
세포 성 레티노 산 결합 단백질 II.
아데 뉴 레이트 키나제 4.
미세 소관 관련 단백질 1B.
아실-CoA 산시 타제 장쇄 패밀리 멤버 6.
징크 링거 E- 박스 바인딩 homeobox 2.
CD200 합형.
카르복시 펩 티다 제 D.
티 오레 독신 환원 효소 3.
미오신 1E.
다중 스 플라이 성을 갖는 RNA 결합 단백질 2.
유사 분열-활성화 단백질 키나제 키나제 3, 반대 가닥.
PERP TP53 아 pop 토 시스 이펙터.
미오신 X.
축삭적인 초기 응답 3.
물리 올린 상호 작용 단백질 2.
백혈구 면역 글로불린 유사 수용체, 서브 패밀리 B, 멤버 4.
일주기 관련 전사 억 제기.
RAR-관련 오픈 수용체 감마.
프롤린 / 세린이 풍부한 크알드-코일 1.
시스테인 풍부 단백질 2.
cAMP 응답 요소 모뮬레이터.
케모카인 (C-C 모티프) 리간드 4.
핵 수용체 서브 패밀리 4, 그룹 A, 멤버 2.

트랜스 글 루타 미나 제 2, C 폴리펩티드,
시냅스 결함 1, Rho GTPase, 상동체 2 (C, 엘레간스),
sprouty 상 동체 1 (Drosophila),
전사 인자 3 활성화,
KRAB 도메인의 포고 이식 가능 요소,
종양 괴사 인자 수용체 수퍼 패밀리, 멤버 21,
사이트 카인 유도 성 SH2-함유 단백질,
림 포토 신 A,
FBI 글육종 종양 유전자,
신호 림프 구성 활성화 분자 패밀리 멤버 1,
신데칸 3,
미토콘드리아 리보솜 단백질 L47,
라디닌,
E2F 전사 인자 5,
ISG15 유비퀴틴 유사 개질제,
아릴 탄화수소 수용체,
디아 실 글리세롤 O-아실 트랜스퍼 라제 2,
FBI 글육종 종양 유전자 B,
플렉스트린 상동성 유사 도메인, 패밀리 A, 멤버 3,
칼슘 전압 게이트 채널, 서브 패밀리 Q, 멤버 5,
종양 괴사 인자 수용체 수퍼 패밀리, 멤버 10b,
Mir17 숙주 유전자 1 (비 단백질 코딩),
1을 함유하는 포도당-과당 산화 환원 효소 도메인,
플렉신 A1,
열 충격 계수 2,
탄수화물 설포트랜스퍼라제 11,
성장 정지 및 DNA 손상을 유발할 수있는 45 감마,
응집 담체 패밀리 5 (나트륨-의존성 비타민 수송체), 멤버 6,
인터페론 유도 막관통 단백질 3,
5A를 포함하는 DENN/MADD 도메인,
플라스미노겐 활성화제, 유로키나제 수용체,
응집 담체 패밀리 19 (티아민 수송체), 멤버 2,
유비퀴틴 도메인 2 포함,
핵 수용체 서브 패밀리 4, 그룹 A, 멤버 3,
징크 핑거 단백질 52,
링 핑거 1을 포함하는 SH3 도메인,
디하이드로우리딘 신타제 2,
사이클린 의존적 키나제 5, 조절 서브 유닛 1 (p35),

[0581]



전구제 7, 리보 뉴클레아제 P 패밀리의 프로세싱 (S, 세레비지애).
성장 인자 독립 1.
인터루킨 15 수용체, 알파 사슬.
BCL2-유사 1.
단백질 티로신 포스파타제, 수용체 유형, S.
혈질 세포종 변이 전좌 1.
포스-혈 항원 2.
BCL2-관련 X 단백질.
용질 담체 패밀리 4, 중탄산 나트륨 공동 수송체, 멤버 7.
종양 과사 인자 수용체 슈퍼 패밀리, 멤버 4.
케모카인 (C-X-C 주제) 리간드 10.
플로-유사 키나제 3.
CD3E 항원, 엡실론 폴리펩티드 관련 단백질.
종양 과사 인자 (리간드) 슈퍼 패밀리, 멤버 11.
폴리머라제 (RNA) III (DNA 지정) 폴리펩티드 D.
초기 성장 반응 2.
DnaJ (Hsp40) 샤페론, 서브 패밀리 C, 멤버 2.
DNA 토포이소머라제 1, 미토콘드리아.
3 중 모터프-함유 30D.
DnaJ (Hsp40) 샤페론, 서브 패밀리 C, 멤버 21.
SAM 도메인, SH3 도메인 및 핵 위치 신호, 1.
용질 캐리어 패밀리 5 (이노시톨 트랜스 포터), 멤버 3.
미토콘드리아 리보솜 단백질 L15.
이중 특이성 포스파타제 5.
아포토시스 강화 뉴클레아제.
ets 변형 6.
DIM1 디메틸아데노신 트랜스퍼라제 1-유사 (S, cerevisiae).
2'-5' 올리고아데닐레이트 합성 효소-유사 1.
UTP18, 소형 서브 유닛 (SSU) 프로세스 구성 요소, 샤페론 (효모).
BRCA2 및 CDKN1A 상호 작용 단백질.
시넵토타민- 유사 3.
5-메틸테트라하이드로플레이트-호모시스테인 메틸트랜스퍼라제 관련 효소.
URB2 리보솜 생합성 2 샤페론 (S, cerevisiae).
유비퀴틴-접합 효소 E2C 결합 단백질.
라이신 (K)-특이적 데메틸라제 2B.
1을 포함하는 큐틴 tRNA-리보솜 트랜스퍼라제 도메인.
유비퀴틴 특이적 펩티다제 31.

[0582]

진핵 생물 번역 개시 인자 2-알파 키나제 2.
ATPase 패밀리, 3A를 포함하는 AAA 도메인.
접착 분자, CXADR 항원 1과 상호 작용.
SUMO/sentrin 특정 펩티다제 3.
ESF1, nucleolar pre-rRNA 가공 단백질, 상동체 (S, cerevisiae).
데옥시뉴클레오타이드트랜스퍼라제, 말단, 상호 작용 단백질 2.
TGFB-유도 인자 Homeobox 1.
진핵 번역 개시 인자 1A.
인터페론-자극 단백질.
다발성 선종 유전자 유사 2.
PWP2 주기성 트립토판 단백질 상동체 (효모).
푸린 (쌍 염기성 아미노산 절단 효소).
중양 과사 인자.
아포토시스 결함 전사 인자.
2A와 같은 인터페론, 알파 유도성 단백질 27.
ST6 (알파-N-아세틸-뉴라미닐-2,3-베타-갈락토실-1,3)-N-아세틸갈락토사미나이드 알파-2,6-시알릴트랜스퍼라제 4.
1과 같은 메틸트랜스퍼라제.
노지리스 상동체 1 (Drosophila).
미토콘드리아 리보솜 단백질 L3.
UBX 도메인 단백질 2A.
구아닌 뉴클레오타이드 결합 단백질 유사 2 (핵산).
프로그램 된 세포 사멸 11.
사이클린 의존성 키나제 8.
진핵 생물 번역 개시 인자 5B.
RNA 말단 인산 시를 라제 유사 1.
NSFL1 (p97) 보조 인자 (p47).
B 세포 억제제, 엘타에서의 카파 경 폴리펩티드 유전자 인핸서의 핵 인자.
M-상 인단백질 10 (U3 소핵 리보핵 단백질).
1B를 포함하는 GRAM 도메인.
ERO1-유사 (S, cerevisiae).
핵 수용체 서브 패밀리 4, 그룹 A, 멤버 1.
surfeit 유전자 2.
N(알파)-아세틸트랜스퍼라제 25, NatB 보조 서브 유닛.
(E. coli)를 포함하는 yrdC 도메인.
라 리보핵단백질 도메인 패밀리, 멤버 4.
1을 포함하는 SDA1 도메인.

[0583]

임포틴 4.
유도성 T 세포 공동-자극제.
용질 담체 패밀리 7 (양이온 아미노산 수송 체, y + 시스템).
멤버 1.
arsA 비소 수송자, ATP-결합, 상동체 1 (박테리아).
폴리머라제 (RNA) I 폴리펩티드 C.
정자 형성 관련 5.
유비퀴틴 특이적 펩티다제 18.
태반-특정-8.
일반적인 전사 인자 III, 폴리펩티드 1.
B 세포 억제제, 베타에서 카파 경 폴리펩티드 유전자 인핸서의 핵 인자.
PHD 핑거 단백질 6.
RRN3 RNA 폴리머라제 I 전사 인자 상동체 (효모).
세포 독성 및 조절성 T 세포 분자.
COP9 (구성적 광합성) 상동체, 서브 유닛 6 (Arabidopsis thaliana).
아스파라긴-연결된 당화 3 (알파-1,3-만노실트랜스퍼라제).
트립토판일-tRNA 합성 효소.
저산소증-상향 조절 1.
서열 유사성을 갖는 패밀리 60, 멤버 A.
글루 간질 세포 합원 2.
B 세포 2, p49/p100에서 카파 경 폴리펩티드 유전자 인핸서의 핵 인자.
UTP20, 소형 서브 유닛 (SSU) 프로세스 구성 요소, 상동체 (효모).
CD274 합원.
프로 바이러스 통합 사이트 1.
전사 5A의 신호 변환기 및 활성화제.
CD69 합원.
피트릴린 마틸레펩티다아제 1.
사이클린 의존성 키나제 6.
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) 박스 폴리펩티드 27.
폴리머 라제 (RNA) I 폴리펩티드 B.
종양 괴사 인자, 알파 유발 단백질 3.
노드 변조기 1.
NOP14 핵 단백질.
리보솜 단백질 L7 유사 1.
메티 오닐 아미노 펩 티다 제 1.
저산소증 유발 인자 1, 알파 서브 유닛.

아누스 키나제 2.
B 세포 1, p105에서 카파 경 폴리펩티드 유전자 인핸서의 핵 인자
망상 내분비 종양 암 유전자.
격벽 2.
MKI67의 FHA 도메인과 상호 작용하는 핵산 단백질.
2를 함유하는 신장 인자 Tu GTP 결합 도메인.
글루 세포종 종양 유전자.
dyskeratosis congenita 1, 디스케린.
심실 3에서 발현되는 카르니틴 결핍 관련 유전자.
GTP 결합 단백질 4.
1을 포함하는 열 반복.
프로테아제 (프로 종, 마크로 페인) 활성화 제 서브 유닛 3 (PA28 감마, Ki).
라 리보 핵 단백질 도메인 패밀리, 구성원 1.
DNA 세그먼트, Chr. 19, Brigham & Women 's Genetics 1357 발현.
진핵 생물 번역 개시 인자 3, 서브 유닛 D.
TSR1 20S rRNA 축적.
MYB 결합 단백질 (P160) 1a.
T 세포 활성화 Rho GTPase 활성화 단백질.
RAB8B, 구성원 RAS 종양 유전자 계열.
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) 박스 폴리펩티드 21.
Tcp1, 서브 유닛 4 (텔타)를 함유하는 사 페로 빈.
2 포함 코일드-코일-헬릭스-코일드-코일-헬릭스 도메인(coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2).
WD 반복 도메인 43.

UCART22는 본원에 개시된 바와 같은 CD22 CAR 또는 다른 유전자를 삽입하기 위해 AAV 벡터, 바람직하게는 AAV6 벡터 및 훨씬 더 바람직하게는 AAV6/2 벡터를 사용하여 제조될 수 있다. AAV 벡터(들)는 특정 엔도뉴클레아제를 사용하여 TRAC 유전자 (알파 서브 유닛 또는 TCR을 코딩하는 유전자) 또는 PCT/EP2017/076798에 개시된 임의의 유전자와 같은 유전자의 유전자 편집 후에 사용될 수 있다.

- [0587] 입양 세포 전달은 환자에게 세포를 전달하는 것이다. 세포는 환자 자신으로부터 유래된 후, 다시 전이되기 전에 변경되거나 (유전자 전달), 또는 다른 개체로부터 온 것일수 있다. 세포는 개선된 면역 기능 및 특성을 세포와 함께 환자에게 다시 전달하기 위한 목적으로 면역계로부터 가장 일반적으로 유래된다. 자가 세포 또는 환자로부터의 세포를 전달하는 것은 이식편 대 숙주 병 (GVHD) 또는 조직 또는 기관 거부를 최소화한다. 유사하게 TCR-결핍 T 세포 CD22 CART 세포를 전달하는 것은 GVHD를 최소화한다. TCR 불충분한 MHC1 불충분한 CD22CART를 전송하면 GVHD 및 HVGD가 최소화된다.
- [0588] 일 구현 예에서, 상기 면역 세포를 유전자 변형(엔지니어링)하는 단계는 본 발명의 CD22 CAR 중 하나를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 상기 세포 내로 도입하는 단계 전에 수행된다. 제 1 측면에 따르면, 예를 들어 WO 2013/176915에 기재된 바와 같이 T-세포 수용체 (TCR)의 하나 이상의 성분을 발현하는 적어도 하나의 유전자를 불활성화시킴으로써 면역 세포를 덜 동종 이계로 만들수 있으며, 이는 WO2008102199 또는 WO2015136001 또는 WO2016201047에 기술된 바와 같은  $\beta 2m$  유전자와 같은 HLA 발현을 암호화 또는 조절하는 유전자의 불 성화는 모두 본원에 참고된다. 따라서, 이식 대 숙주 증후군의 위험 및 이식 거부의 위험이 상당히 감소된다.
- [0589] 또 다른 측면에 따르면, 본 발명의 면역 세포는 조작된 면역 세포의 면역 억제 약물 또는 화학 요법 치료에 대한 내성을 향상 시키도록 유전자 조작될 수 있으며, 이는 WO201575195에 개시된 바와 같이 CD22 양성 악성 세포를 치료하기 위한 표준 관리로서 사용되며 이는 본 명세서에 참고로 포함된다.
- [0590] **캄파스(Campath) (알렘투주맙)에 대한 내성**
- [0591] 하나의 바람직한 실시예에서, T-세포에 약물 내성을 부여하기 위해 불활성화될 수 있는 유전자는 글루코코르티코이드 수용체 (GR) 및 CD52이다. 유전자가 비활성화되어 세포가 이러한 치료에 내성을 갖도록 하고 특정 CD22 CAR이 부여되지 않은 환자 자신의 T-세포에 비해 경쟁 우위를 제공한다.
- [0592] 본 발명에 따른 조작된 면역 세포에서 CD52 및 TRAC 유전자의 불활성화는 TALE 뉴클레아제 또는 CRISPR CAS9 시스템을 사용하여 수행된다.
- [0593] 보다 바람직한 실시예에서, T-세포에 약물 내성을 부여하기 위해 불활성화될 수 있는 유전자는 CD22 CAR이 부여된 TCR KO 면역 T 세포에서 CD52이다.
- [0594] 바람직한 일 실시예에서, T-세포에 약물 내성을 부여하기 위해 불활성화될 수 있는 유전자는 글루코코르티코이드 수용체 (GR)이다.
- [0595] 또한 CD3 유전자의 발현은 다른 면역 억제 약물인 테플리주맙에 대한 내성을 부여하기 위해 억제되거나 감소될 수 있다. 또한 HPRT의 발현은 본 발명에 따라 억제되어 특히 급성 림프성 백혈병의 치료를 위해 화학 요법에 통상적으로 사용되는 세포 증식제인 6-티오 구아닌에 대한 내성을 부여할 수 있다.
- [0596] **인간 데옥시시티딘 키나제 (dCK) 유전자의 결실에 의한 퓨린 뉴클레오타이드 유사체에 대한 내성.**
- [0597] 바람직한 일 실시예에서, T-세포에 약물 내성을 부여하기 위해 불 활성화될 수 있는 유전자는 인간 데옥시시티딘 키나제 (dCK) 유전자이다. 이 효소는 데옥시 리보뉴클레오사이드데옥시 시티딘 (dC), 데옥시구아노신 (dG) 및 데옥시 아데노신 (dA)의 인산화에 필요하다. 퓨린 뉴클레오타이드 유사체 (PNA)는 dCK에 의해 모노-, 디- 및 트리-포스페이트 PNA로 대사된다. 그들의 트리 포스페이트 형태 및 특히 클로파라빈트리포스페이트는 DNA 합성을 위해 ATP와 경쟁하고, 세포 자멸제로서 작용하며, 트리 뉴클레오타이드 생산에 관여하는 리보 뉴클레오타이드 환원 효소 (RNR)의 강력한 억제제이다.
- [0598] 본 발명에 따른 조작된 면역 세포에서 dCK 유전자의 불 활성화는 TALE 뉴클레아제 또는 CRISPR CAS9 시스템에 의해 매개된다. 이 목표를 달성하기 위해, 몇 쌍의 dCK TALE-뉴클레아제가 폴리 뉴클레오타이드 수준에서 설계되고 조립되고 서열에 의해 검증되었다. 본 발명에 따라 사용될 수 있는 TALE-뉴클레아제 쌍의 예는 PCT/EP2014/075317에 도시되어있다.
- [0599] 본 발명의 조작된 면역 세포에서 이러한 dCK 불 활성화는 클로파라빈 및 플루 다라빈과 같은 퓨린뉴클레오시드 유사체 (PNAs)에 대한 내성을 부여한다.
- [0600] 다른 바람직한 실시예에서, 본 발명의 조작된 면역 세포에서 dCK 불 활성화는 이들 이중 녹아웃 (KO) (TCR 또는 TRAC KO 및 dCK KO) 세포가 약물에 내성을 갖도록 하는 클로파라빈 및 덜 동종이계와 같은 TRAC 유전자의 불 활성화와 조합된다.

- [0601] 다른 바람직한 실시예에서, 본 발명의 조작된 면역 세포에서 CD52 불 활성화는 이들 이중 녹아웃 (KO) (TCR 또는 TRAC KO 및 CD52 KO) 세포가 약물에 내성을 갖도록 하는 캠퍼스(CAMPATH)(알렘투주맙) 및 덜 동종이계와 같은 TRAC 유전자의 불 활성화와 조합된다.
- [0602] 이 두가지 특징은 치료 목표에 특히 유용하며, 암 치료를 필요로 하는 암 환자를 치료하기 위해 화학 요법과 함께 면역 치료를 위한 "기성품" 동종 이계 세포 (UCART22)를 허용한다. 이 두가지 KO 비활성화 dCK/TRAC 또는 CD52/TRAC는 동시에 또는 순차적으로 수행될 수 있다. 본 발명에서 성공한 TALE-뉴클레아제 dCK/TRAC 쌍의 한 예는 PCT/EP2014/075317, 특히 2 유전자좌에서의 표적 서열 (dCK 및 TRAC)에 기재되어있다. 문헌 PCT/EP2014/075317은 그 전문이 본원에 포함된다.
- [0603] 본 발명은 서열번호 15의 CD22 CAR을 발현하는 1 차 T 세포를 제공하며, 여기서 CD52 및 TRAC 유전자는 CLL, ALL, 바람직하게는 이들의 공격적인 재발성 내화성 형태의 치료에 사용하기 위해 결실에 의해 불 활성화되고, 선택적으로는 림프구 보충 환자에서, 보다 바람직하게는 재발성 내화성 형태의 B-ALL이다.
- [0604] 본 발명의 추가의 측면에 따르면, 면역 세포는 PDCD1 또는 CTLA-4과 같은 T-세포 활성화의 조절제로서 작용하는 "면역 체크 포인트"로서 작용하는 단백질을 암호화하는 유전자를 불 활성화시킴으로써 이들을 더욱 활성화 시키거나 소진을 제한하도록 추가로 조작될 수 있다.
- [0605] 발현이 감소 또는 억제 될 수있는 유전자의 예는 표 9에 제시되어있다.
- [0606] 또한 본 발명은 서열번호 15의 CD22 CAR을 발현하는 1 차 T 세포를 제공하며, 여기서 CD52, TRAC 및 dCK 유전자는 결실된다.
- [0607] 다른 실시예에서, 또한 본 발명은 저산소증에 저항성이 있는 CD22 CAR을 발현하는 1 차 T 세포를 제공한다.
- [0608] 본 발명은 또한 서열번호 15의 CD22 CAR을 발현하는 1 차 T 세포를 제공하며, 여기서 CD52, TRAC 및 dCK 유전자는 결실되고 HIF-1a의 서열은 세포가 저산소증에 내성을 갖도록 삽입된다.
- [0609] 본 발명은 또한 서열 번호 15의 CD22 CAR을 발현하는 1 차 T 세포를 제공하며, 여기서 CD52, TRAC 및 dCK 유전자는 결실된다.
- [0610] 다른 구체 예에서, 본 발명은 또한 저산소증에 저항성이있는 CD22 CAR을 발현하는 1 차 T 세포를 제공한다.
- [0611] 본 발명은 또한 서열 번호 15의 CD22 CAR을 발현하는 1 차 T 세포를 제공하며, 여기서 CD52, TRAC 및 dCK 유전자는 결실되고 HIF-1a의 서열은 세포가 저산소증에 내성을 갖도록 삽입된다.
- [0612] **저산소증에 내성이 있는 조작된 세포**
- [0613] 특정 실시예에서, 본 발명의 CD22 CAR T 세포의 발현 및 세포 용해 활성이 유지되거나, 또는 낮은 산소 조건 (저산소증) 하에서 CD22 CAR T 세포의 발현이 유도되고 활성이 유지 및 (정상적인 산소 상태 20 % O<sub>2</sub> 대 1-5 % O<sub>2</sub>와 비교) 및 상기 세포는 여전히 조직에 삽입될 때 종양 세포를 표적화하고 파괴한다.
- [0614] T 세포에서 저산소증-유도성 CAR의 예가 기재되어있다(WO2013123061 또는 Juillerat, A. et al. 산소 민감성 자기-결정 메이킹 조작된 CAR T-cell Sci. Rep. 7, 39833; doi : 10.1038 / srep39833 (2017), 둘 다 참조로 포함됨): CD22 CAR의 발현을 유도하는 OxiTF에 특이적인 합성 프로모터가 구축되었다. OxiTF는 CD22 CAR을 암호화하는 합성 유전 요소를 활성화시키도록 설계되었다. (저산소증 생성) 종양 발생시, 조작된 T 세포는 (혈중 O<sub>2</sub>의 평균 수준과 비교하여) 산소 수준의 감소를 "감지"하고 CD22 CAR의 발현을 유발할 수있다. CD22 CAR의 세포 표면 노출은 상기 CD22 CAR 내에 존재하는 활성화 및 공동-자극성 도메인을 통해 T 세포 활성화 및 증식을 궁극적으로 유발하는 저산소증 하에서 종양 항원의 인식을 가능하게 한다. 궁극적으로, 종양 항원 발현 세포는 본 발명의 UCART22에 의해 용해된다.
- [0615] 본 발명에서, 또한 면역 세포는 하나 이상의, 바람직하게는 하기 요인 모두를 과발현함으로써 낮은 O<sub>2</sub> 조건 (낮은 산소 농도는 1-5 %를 의미함)하에서 효율적으로 유지되도록 조작될 수 있다: Oct3, Oct4, Sox2, Klf4 및 c-Myc, 또는 HIF-1a 인자를 편집하여.
- [0616] 본 발명에서, 산소 민감성 CD22 단일 체인 CAR-발현 조작된 세포 및 저산소증 저항성 CD22 CAR-발현 조작된 세포가 성공적으로 구축되고 시험된다.
- [0617] CD22는 주로 "액체"종양 인 CD22-발현 B 세포 악성 종양에서 발현되므로, 고형 종양과 대조적으로 저산소증을 일으키지 않아야 하므로, 저산소증에 내성인 CD22 CAR 조작된 면역 세포가 환자로부터의 B-ALL에 대한 저산소증



에 내성이 없는 CD22 CAR 조작된 면역 세포보다 더 효율적일 것으로 예상되지 않는다. 실제로, 본 발명의 UCART22는 조직에서 클러스터링(clustered) 되거나 귀환된 중첩된 암 세포에 도달하여 이들 세포를 용해시킬 수 있다.

[0618] 표 5의 유전자와 같은 다른 유전자가 본 발명의 UCART22에서 편집될 수 있다:

**표 5**

[0619] 본 발명의 CD22 CAR 조작된 T 세포에서 본 발명에 따라 불 활성화될 수 있는 면역 체크 포인트 단백질을 인코딩하는 유전자의 목록

경로		경로에서 비활성화될 수 있는 유전자
공동-억제 수용체	CTLA4 (CD152)	CTLA4, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22
	PDCD1 (PD-1, CD279)	PDCD1
	CD223 (lag3)	LAG3
	HAVCR2 (tim3)	HAVCR2
	BTLA(cd272)	BTLA
	CD160(by55)	CD160
	IgSF 패밀리	TIGIT
		CD96
		CRTAM
	LAIR1(cd305)	LAIR1
	SIGLECs	SIGLEC7
		SIGLEC9
	CD244(2b4)	CD244
죽음 수용체	TRAIL	TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7
	FAS	FADD, FAS
사이토카인 신호	TGF-베타 신호	TGFBRII, TGFBR1, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1
	IL10 신호	IL10RA, IL10RB, HMOX2
	IL6 신호	IL6R, IL6ST
TCR 신호 방지		CSK, PAG1
		SIT1
유도된 Treg	유도된 Treg	FOXP3
소진을 컨트롤하는 전사 요인	소진을 컨트롤하는 전사 요인	PRDM1 (= blimp1, 이형 접합 생쥐는 wt 또는 조건부 KO보다 만성 바이러스 감염을 더 잘 조절함)
		BATF
저산소증 매개 허용	iNOS i도 구아닐화 시클라제	GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2, GUCY1B3

[0620] 본 발명은 서열 번호 15의 CD22 CAR을 발현하는 단리된 조작된 면역 T 세포를 제공하고, dCK 및/또는 CD52 및 TRAC 유전자는 림프절 마비 환자에서 CLL, ALL, 바람직하게는 이들의 공격적인 재발성 불응성 형태의 치료에 사용하기 위해 편집, 즉 결실에 의해 불활성화된다.

[0621] 본 발명은 서열번호 15의 CD22 CAR을 발현하는 단리된 조작된 면역 T 세포를 제공하고, b2m 및 TRAC 유전자는 림프절 마비 환자에서 CLL, ALL, 바람직하게는 이들의 공격적인 재발성 불응성 형태의 치료에 사용하기 위해 편집, 즉 결실에 의해 불활성화된다.

[0622] 본 발명은 서열번호 15의 CD22 CAR을 발현하는 단리된 조작된 면역 T 세포를 제공하고, TRAC 및 IL-10R 유전자는 림프절 마비 환자에서 CLL, ALL, 바람직하게는 이들의 공격적인 재발성 내화성 형태의 치료에 사용하기 위해 편집, 즉 결실에 의해 불활성화된다. 본 발명은 결핍 TCR 알파 유전자(TCR의 세포 표면 발현이 손상되도록), B2M 결핍 유전자 (세포 표면에서 MHC 클래스 I 분자의 발현이 손상되도록) 및 추가로 TGFbeta 수용체 KO 유전자를 포함하는 CD22 CAR (UCART22)을 발현하는 조작된 면역 T 세포를 제공한다.

[0623] 본 발명은 결핍 TCR 알파 유전자(TCR의 세포 표면 발현이 손상되도록), B2M 결핍 유전자 (세포 표면에서 MHC 클래스 I 분자의 발현이 손상되도록) 및 추가로 IL-10 수용체 KO 유전자를 포함하는 CD22 CAR (UCART22)을 발현하는 조작된 면역 T 세포를 제공한다.



- [0624] 본 발명은 결핍 TCR 알파 유전자(TCR의 세포 표면 발현이 손상되도록), B2M 결핍 유전자 (세포 표면에서 MHC 클래스 I 분자의 발현이 손상되도록) 및 추가로 AHR KO 유전자를 포함하는 CD22 CAR (UCART22)을 발현하는 조작된 면역 T 세포를 제공한다.
- [0625] 본 발명은 결핍 TCR 알파 유전자(TCR의 세포 표면 발현이 손상되도록), B2M 결핍 유전자 (세포 표면에서 MHC 클래스 I 분자의 발현이 손상되도록) 및 추가로 PD1 KO 유전자를 포함하는 CD22 CAR (UCART22)을 발현하는 조작된 면역 T 세포를 제공한다.
- [0626] 본 발명은 결핍 TCR 알파 유전자(TCR의 세포 표면 발현이 손상되도록), B2M 결핍 유전자 (세포 표면에서 MHC 클래스 I 분자의 발현이 손상되도록) 및 추가로 LAG-3 KO 유전자를 포함하는 CD22 CAR (UCART22)을 발현하는 조작된 면역 T 세포를 제공한다.
- [0627] 본 발명은 결핍 TCR 알파 유전자(TCR의 세포 표면 발현이 손상되도록), B2M 결핍 유전자 (세포 표면에서 MHC 클래스 I 분자의 발현이 손상되도록) 및 추가로 TIM-3 KO 유전자를 포함하는 CD22 CAR (UCART22)을 발현하는 조작된 면역 T 세포를 제공한다.
- [0628] 본 발명은 림프절 마비 환자에서 재발성 불응성 형태의 BALL 치료에 사용하기 위해 결실에 의해 CD52 및 TRAC 유전자가 결실 됨으로써 서열번호 15의 CD22 CAR을 발현하는 단리된 조작된 면역 T 세포를 제공한다.
- [0629] 바람직한 실시예에서, 면역 세포를 조작하는 방법은 DNA 절단에 의해 상기 언급 된 바와 같은 유전자를 선택적으로 불활성화시키기 위해 특이적 회귀-절단 엔도 뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 특히 mRNA를 상기 T 세포 내로 도입하는 것을 포함한다.
- [0630] 보다 바람직한 실시예에서, 상기 회귀-절단 엔도뉴클레아제는 TALE-뉴클레아제 또는 Cas9 엔도뉴클레아제이다. TAL-뉴클레아제는 다른 유형의 회귀 절단 엔도 뉴클레아제에 비해 지금까지 더 높은 특이성 및 절단 효율을 입증하여, 선택적인 엔도뉴클레아제가 되고, 일정한 턴-오버로 대규모로 조작된 면역 세포를 생산하는 데 선호된다.
- [0631] **전달 방법**
- [0632] 상기 기재된 상이한 방법은 본 발명의 CD22 CAR을 세포 내로 도입하는 것을 포함한다. 비-제한적 예로서, 상기 CD22 CAR은 본 발명의 하나의 플라스미드 벡터에 의해 암호화된 전이 유전자로서 도입될 수 있다. 본 발명의 CD22 CAR을 코딩하는 상기 플라스미드 벡터는 또한 상기 벡터를 수용한 세포의 확인 및/또는 선택을 제공하는 선택 마커를 함유할 수 있다.
- [0633] 본 발명에 따른 CD22 CAR이 도입된 후 단리된 면역 세포 내로 발현될 수 있게하는 방법은 다른 부분, 예를 들어 W02013126720 또는 W02015121454에 기재되어 있으며, 이는 본원에 전체적으로 참고로 포함된다.
- [0634] 본 발명의 CD22 CAR에 상응하는 폴리펩티드는 상기 폴리펩티드를 암호화하는 폴리 뉴클레오티드를 세포 내로 도입한 결과 세포 내에서 계내 합성될 수 있다.
- [0635] 대안적으로, 상기 폴리 펩타이드는 세포 외부에서 생성된 후 도입될 수 있다. 폴리 뉴클레오티드 구조를 세포 내로 도입하는 방법은 당 업계에 공지되어 있으며, 비 제한적 예로서 폴리 뉴클레오티드 구축물이 세포의 계층에 통합된 안정한 형질 전환 방법, 일시적 형질 전환 방법을 포함하며, 폴리 뉴클레오티드 구조는 세포의 계층 및 바이러스 매개 방법에 통합되지 않는다. 상기 폴리 뉴클레오티드는 예를 들어 재조합 바이러스 벡터(예를 들어, 레트로 바이러스, 에컨대 렌티 바이러스, 아데노 바이러스, 아데노 관련 바이러스), 리포좀 등에 의해 세포 내로 도입될 수 있다. 예를 들어, 일시적인 변형 방법은 예를 들어 미세 주입, 전기 천공 또는 입자 충격을 포함한다. 상기 폴리 뉴클레오티드는 세포에서 발현되는 관점에서 벡터, 보다 특히 플라스미드 또는 바이러스에 포함될 수 있다.
- [0636] 바람직한 실시예에서, CD22 CAR을 암호화하는 상기 폴리 뉴클레오티드는 AAV6 벡터에 삽입되고 주어진 유전자에 도입된다. 본 발명의 CD22 CAR이 도입된 후 단리된 T 세포로 발현될 수 있게하는 벡터를 제조하는 방법은 다른 부분에, 예를 들어 본원에 참고로 인용된 W02013126720에 기재되어 있다.
- [0637] **조작된 면역 세포 (UCART)**
- [0638] 본 발명의 다른 목적은 CD22 CAR (UCART 22)이 부여된 조작된 면역 세포이다.
- [0639] 바람직하게는 상기 면역 세포는 단리된 면역 세포, 더욱 바람직하게는 단리된 면역 T 세포, 더욱 바람직하게는

단리된 1 차 면역 T 세포이다.

- [0640] UCART 22는 의약으로서 제공되므로, 치료적으로 효율적인 양의 UCART 22가 의약으로서 제공된다.
- [0641] 본 발명에 따른 "일차 면역 세포"는 "혈액 샘플과 같은 조직 또는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMCs)로부터 유래하고, 몇몇 계대 동안 배양될 수 있으며, 결국 사용 전에 동결될 수 있는 세포, 상기 1 차 면역 세포는 형질 전환 또는 양성 세포와 비교하여 제한된 분열 능력을 갖는다. (Raulf-Heimsoth M. T 세포-말초 혈액으로부터의 1 차 배양. 방법 Mol Med. 2008; 138 : 17-30. doi : 10.1007 / 978-1-59745-366-0)
- [0642] 본 발명에 따른 면역 세포는 바람직하게는 면역 T 또는 NK 세포이다. 따라서, 본 발명에 따른 조작된 면역 세포는 혈액 샘플로부터 단리되고, 1 차 세포이며, 염증성 T-림프구, 세포 독성 T-림프구, 조절 T-림프구 또는 헬퍼 T-림프구로부터 선택된 면역 T 세포로부터 유래되고, 킬러 T-세포, 바람직하게는 세포 독성 T-림프구로부터 유래되고 추가로 조작된다.
- [0643] 조작은 일차 면역 세포가 변형되어 CD22 CAR이 부여되고 적어도 하나의 유전자가 편집됨을 의미하며, 바람직하게는 상기 세포는 CD22 CAR이 부여되고 퓨린 뉴클레오티드 유사체의 존재 하에서 TCR을 발현하거나 죽지 않도록 변형된다.
- [0644] 다시 말해, 조작된 면역 세포는 CD22 CAR을 발현하는 하나 이상의 다른 편집된 유전자를 포함하는 TCR KO 단리된 면역 T 세포를 의미한다.
- [0645] 특정 실시예에서, 조작된 것은 1 차 면역 세포가 CD22 CAR을 부여 받도록 변형되고, 바람직하게는 상기 세포가 CD22 CAR을 부여 받고 퓨린 뉴클레오티드 유사체의(1 내지 5 마이크로몰/L) 존재 또는 알렘투주맙(50 마이크로그램/mL) 하에서 죽지않도록 변형됨을 의미한다.(Valton et al., Molecular Therapy vol. 23 no. 9, 1507-1518 sep. 2015)
- [0646] 바람직하게는, 상기 T 세포에는 서열 번호 15의 CD22 CAR이 부여된다.
- [0647] 더욱 바람직하게는, 상기 T 세포에는 서열번호 15의 CD22 CAR이 부여되고, 하나 이상의 서열번호 22의 서열을 포함한다.
- [0648] 더욱 바람직하게는, 상기 T 세포에는 서열번호 15의 CD22 CAR이 부여되며, 서열번호 22의 적어도 하나의 서열 및 서열의 적어도 일부를 포함한다.
- [0649] 보다 바람직하게는, 상기 T 세포에는 하나 이상의 서열번호 20의 서열을 포함하는 서열번호 18의 CD22 CAR이 부여된다.
- [0650] 본 발명은 본 발명의 CD22 CAR을 발현하고 CD22-발현 세포에 대한 CTL 및/또는 탈과 화 활성을 나타내는 1 차 면역 T 세포를 제공한다.
- [0651] 본 발명은 또한 CD22-발현 세포, 특히 CD22-발현 양성 세포를 용해시키기 위한 본 발명의 CD22 CAR을 발현하는 1 차 T 세포를 제공한다.
- [0652] 바람직하게는 바람직하게는 재발/불응성/공격성 ALL 또는 CLL의 치료에서, 본 발명의 서열번호 16의 CD22 CAR이 부여된 T 세포에 의해 표적화된 세포는 효율적이다.
- [0653] 본 발명은 또한 세포를 조작하기 위한 상기 방법에 의해 수득될 수 있는 단리된 세포 또는 세포주에 관한 것이다. 특히, 상기 단리된 세포는 상기와 같은 본 발명의 하나 이상의 CD22 CAR을 포함한다. 다른 실시예에서, 상기 분리된 세포는 각각 상이한 세포 외 리간드 결합 도메인을 포함하는 CARs 집단을 포함한다. 특히, 상기 단리된 세포는 CAR을 암호화하는 외인성 폴리 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 본 발명의 유전자 변형 면역 세포는 활성화되며 항원 결합 메커니즘과 독립적으로 증식할 수 있다.
- [0654] 본 발명의 범위에는 또한 단리된 면역 세포, 바람직하게는 단리된 면역 T 세포 (T- 세포), 더욱 바람직하게는 전술한 방법 중 어느 하나에 따라 수득된 조작된 단리된 면역 T 세포가 포함된다. 상기 면역 세포는 선천적 및/또는 적응성 면역 반응의 개시 및/또는 실행에 기능적으로 관련된 조절 기원 세포를 지칭한다. 본 발명에 따른 상기 면역 세포는 줄기 세포로부터 유래될 수 있다. 줄기 세포는 성체 줄기 세포, 비인간 배아 줄기 세포, 보다 특히 비인간 줄기 세포, 체대혈 줄기 세포, 전구 세포, 골수 줄기 세포, 유도된 다능성 줄기 세포, 전능성 줄기 세포 또는 조절 줄기 세포일 수 있다. 대표적인 인간 세포는 CD34 + 세포이다. 상기 단리된 세포는 또한 수지상 세포, 킬러 수지상 세포, 비만 세포, NK-세포, B-세포 또는 염증성 T-림프구, 세포 독성 T-림프구, 조절 T-림프

구 또는 헬퍼 T-림프구로 이루어진 군으로부터 선택된 T-세포일 수 있다. 다른 실시예에서, 상기 세포는 CD4 + T-림프구 및 CD8 + T-림프구로 이루어진 군으로부터 유래될 수 있다.

- [0655] 본 발명의 세포의 확장 및 유전자 변형 전에, 다양한 비 제한적 방법을 통해 대상체로부터 세포 공급원을 얻을 수 있다. 세포는 말초 혈액 단핵 세포, 골수, 림프절 조직, 제대혈, 흉선 조직, 조직, 복수, 흉막 삼출액, 비장 조직 및 종양을 비롯한 다수의 비 제한적 공급원으로부터 얻을 수 있다. 본 발명의 특정 실시예에서, 당업자에게 이용 가능하고 공지된 임의의 수의 T 세포주가 사용될 수 있다. 다른 실시예에서, 상기 세포는 건강한 공여자, 암으로 진단된 환자 또는 감염으로 진단된 환자로부터 유래될 수 있다. 다른 실시예에서, 상기 세포는 상이한 표현형 특성을 나타내는 혼합 세포 집단의 일부이다. 본 발명의 범위에는 또한 기술된 방법에 따라 조작된 T-세포로부터 수득된 세포주가 포함된다. 면역 억제 치료에 내성이고 이전 방법에 의해 수득될 수 있는 변형된 세포는 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0656] 바람직한 실시예로서, 본 발명은 전술한 바와 같이 기능성 TCR을 발현하지 않으며, 환자로의 입양 전달을 위해 CD22 양성 세포에 대한 반응성을 나타내는 본 발명의 CD22 CAR이 부여된 T-세포 또는 T-세포 집단을 제공한다.
- [0657] 보다 바람직한 실시예로서, 본 발명은 전술한 바와 같이 특히 퓨린 뉴클레오타이드 유사체 (PNAs), 기능적 TCR을 나타내지 않고 화학 요법에 내성이있는 CD22 CAR이 부여된 T-세포 또는 T-세포 집단을 제공한다.
- [0658] 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, CD22 CAR이 부여된 면역 세포는 화학 요법 약물에 내성이 있도록 조작되고, 특히 퓨린 뉴클레오타이드 유사체 (PNAs)에 있어서, 입양 면역 요법 및 화학 요법을 조합한 암 치료에 적합하게 한다.
- [0659] 퓨린 뉴클레오타이드 유사체는 많은 암 치료를 위해 화학 요법 조성물에 들어간다. 백혈병이나 림프종에 대한 표준 치료법으로 사용된다. 가장 널리 사용되는 PNAs는 클로파라빈, 플루다라빈 및 시타라빈 단독 또는 조합이다. PNAs는 데옥시 시티딘 키나제 (dCK) 활성 [EC 2.7.1.74]을 갖는 효소에 의해 모노, -di 및 트리-포스페이트 PNA로 대사된다. 이들의 트리 포스페이트 형태, 특히 클로로파라빈트리포스페이트는 DNA 합성을 위해 ATP와 경쟁하고, 프로-아포포틱 작용제 및 리보 뉴클레오타이드 환원 효소 (RNR)의 강력한 억제제로 작용하며, 이는 트리 뉴클레오타이드 생산에 관여한다.
- [0660] 따라서, 본 발명은 퓨린 유사체 약물에 내성이고 CD22 양성 악성 세포를 표적으로 할 수 있는 생체 외 면역 세포, 바람직하게는 TCR을 발현하지 않는 일차 T-세포를 생성하는 방법을 포함한다.
- [0661] 본 발명에 따른 UCART22의 제조 방법은 또한 WO2013176915 또는 WO2014191128에 개시되어 있으며, 이는 본 명세서에 전체적으로 참고로 포함된다.
- [0662] UCART22를 준비하는 방법은 다음 단계로 구성된다:
- [0663] (a) 공여자, 바람직하게는 단리된 T 세포 또는 단리된 T 세포 집단으로부터 면역 세포를 제공하는 단계,
- [0664] (b) 특이적으로 표적화하는 회귀-절단 엔도뉴클레아제를 암호화하는 핵산 서열을 상기 면역 세포로 (바람직하게는 형질 감염 또는 형질 도입에 의해) 도입하는 단계
- [0665] - 데옥시시티딘 키나제 활성(dcK - EC 2.7.1.74), 특히 인간 데옥시시티딘 키나제 유전자 (NCBI 유전자 ID : 1633)를 갖는 효소를 발현하는 유전자 및/또는
- [0666] - TCR 서브 유닛 알파 및/또는 베타 중 하나를 코딩하는 유전자, 바람직하게는 알파 및/또는
- [0667] - 인간 CD52를 코딩하는 유전자
- [0668] (c) 상기 엔도뉴클레아제를 상기 면역 세포 내로 발현시켜 상기 유전자(들)의 표적화된 불 활성화를 수득하는 단계;
- [0669] (d) 선택적으로 퓨린 유사체 약물의 존재하에 단계 c)에서 수득된 조작된 면역 세포를 확장시키는 단계;
- [0670] (e) 상기 면역 세포에 본 발명의 CD22 CAR, 바람직하게는 서열번호 15의 CD22 CAR을 도입하는 단계.
- [0671] UCART22를 준비하는 방법은 다음 단계로 구성된다:
- [0672] (a) 공여자, 바람직하게는 단리된 T 세포 또는 단리된 T 세포 집단으로부터 면역 세포를 제공하는 단계,
- [0673] (b) 특이적으로 표적화하는 회귀-절단 엔도뉴클레아제를 암호화하는 핵산 서열을 상기 면역 세포 내로 (바람직하게는 형질 감염 또는 형질 도입에 의해) 도입하는 단계

- [0674] - 데옥시시티딘 키나제 활성 (dcK - EC 2.7.1.74), 특히 인간 데옥시시티딘 키나제 유전자 (NCBI 유전자 ID: 1633)를 갖는 효소를 발현하는 유전자 및/또는
- [0675] - TCR 서브 유닛 알파 및/또는 베타 중 하나를 코딩하는 유전자, 바람직하게는 알파 및/또는
- [0676] - 인간 베타 2 마이크로글로불린 (B2M)을 코딩하는 유전자
- [0677] (c) 상기 엔도뉴클레아제를 상기 면역 세포 내로 발현시켜 상기 유전자(들)의 표적화 된 불 활성화를 획득하는 단계;
- [0678] (d) 선택적으로 퓨린 유사체 약물의 존재하에 단계 c)에서 획득된 조작된 면역 세포를 확장시키는 단계;
- [0679] (e) 본 발명의 CAR, 바람직하게는 CD22 CAR을 단독으로 또는 CD19 CAR과의 조합으로, 더욱 바람직하게는 서열번호 15의 CD22 CAR을 단독으로 또는 CD19 CAR과 함께 상기 면역 세포에 도입하는 단계.
- [0680] 바람직한 실시예에서, 본 발명은 퓨린 유사체 약물에 내성이고 CD22 양성 악성 세포를 표적으로 할수 있는 생체 외 면역 세포, 바람직하게는 TCR을 발현하지 않는 1 차 T 세포를 생성하는 방법을 포함한다. 상기 방법은 다음 단계를 포함한다:
- [0681] 공여자, 바람직하게는 단리된 T 세포 (또는 단리된 T 세포 집단)로부터의 면역 세포 제공
- [0682] 상기 면역 세포에 본 발명의 CD22 CAR, 바람직하게는 서열번호 15로부터 선택된 서열번호를 도입
- [0683] 단계 b)에서 얻은 조작된 면역 세포의 확장
- [0684] (d) 특이적으로 표적화하는 회귀-절단 엔도뉴클레아제를 암호화하는 핵산 서열을 (형질 감염 또는 형질 도입에 의해) 상기 면역 세포 내로 도입하는 단계
- [0685] 데옥시시티딘 키나제 활성을 갖는 효소 (dcK - EC 2.7.1.74), 특히 인간 데옥시시티딘 키나제 유전자 (NCBI 유전자 ID: 1633)를 발현하는 유전자 및 / 또는 TCR 서브 유닛 알파 또는 베타 중 하나를 발현하는 유전자,
- [0686] (e) 상기 유전자(들)의 표적화된 불활성화를 얻기 위해 상기 엔도뉴클레아제를 상기 면역 세포 내로 발현시키는 단계;
- [0687] (f) 선택적으로 퓨린 유사체 약물의 존재하에 단계 e)에서 획득된 조작된 면역 세포를 확장시키는 단계.
- [0688] 생체 외 면역 세포의 생산 방법으로서, 바람직하게는 TCR을 발현하지 않는 1 차 T- 세포이며 퓨린 유사체 약물에 대해 내성이고 CD22 양성 악성 세포를 표적으로 할수 있는 상기 방법은 임의로 상기 면역 세포 내로 (트랜스펙션 또는 형질 도입에 의해) 바람직하게는 PD-1, CD279 및 더욱 바람직하게는 PDCD1 (PD-1, CD279) 또는 CTLA4 (CD152)이며 표 9에 언급된 유전자 중 하나를 표적으로하는 회귀-절단 엔도 뉴 클레아 제를 암호화하는 핵산 서열을 도입하는 또 다른 단계를 포함한다.
- [0689] 본 발명자들은 뉴클레아제, 특히 TAL-뉴클레아제를 사용하여 상기 세포 내로의 dcK 유전자 발현의 불활성화(결실)를 매개함으로써 퓨린 뉴클레오타이드 유사체 (dCK-KO), 보다 특히 클로로파라빈 및/또는 플루다라빈에 내성인 1 차 T 세포를 발현하는 CD22 CAR을 성공적으로 생성하였다.
- [0690] 바람직하게는 W02013176915에 기재된 바와 같은 전기 천공법을 사용하여 dCK 유전자에 대해 지시된 특이적 TAL-뉴클레아제를 암호화하는 mRNA를 사용하는 T- 세포의 형질 감염은 약물에 대한 상당한 내성을 유도하면서 CD22 보유 세포에 대한 T-세포 세포 독성 활성을 유지시켰다.
- [0691] 또한 본 출원은 백혈병 또는 림프종, 바람직하게는 이들의 공격적이고 저항성 인 재발 형, 더욱 바람직하게는 B-ALL의 치료를 위해 데옥시시티딘 키나제의 발현이 억제되거나 불 활성화 된 (dCK-KO) TCR-KO, CD22 CAR (바람직하게는 서열번호 15) 1 차 T-세포를 제공한다.
- [0692] 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, CD22 CAR이 부여된 면역 세포는 화학 요법 약물, 특히 알렘투주맙 캄파스 (CAMPATH)에 내성을 갖도록 조작되어, 입양 면역 요법 및 화학 요법을 조합한 암 치료에 적합하다.
- [0693] 알렘투주맙은 많은 암 치료에 사용된다. 백혈병 또는 림프종, 특히 만성 림프 구성 백혈병 (CLL), 피부 T 세포 림프종 (CTCL) 및 T 세포 림프종의 치료에서 표준 치료법으로 사용된다. 이는 상표명 Campath, MabCampath 및 Campath-1H로 알려져있다. 또한 골수 이식, 신장 이식 및 섬 세포 이식을위한 일부 컨디셔닝 요법에 사용된다.
- [0694] 이는 성숙한 림프구 표면에 존재하지만 이들 림프구가 유래된 줄기 세포에는 존재하지 않는 단백질인 CD52에 결



합하는 것은 단일 클론 항체이다. 알렘투주맙 으로 치료한 후, 이들 CD52-함유 림프구는 파괴를 목표로 한다.

- [0695] 알렘투주맙은 CLL의 2 차 요법으로도 사용된다. 알킬화제로 치료 받고 플루다라빈 요법에 실패한 CLL 환자에 대해 미국 식품의 약국(Food and Drug Administration)의 승인을 받았다.
- [0696] 따라서, 본 발명은 알렘투주맙에 저항성인 TCR을 발현하지 않는 생체 외 UCART22의 제조 방법을 포함한다.
- [0697] UCART22 CD52 KO를 준비하는 방법은 다음 단계로 구성된다:
- [0698] (a) 공여자, 바람직하게는 단리된 T 세포 또는 단리된 T 세포 집단으로부터 면역 세포를 제공하는 단계,
- [0699] (b) 특이적으로 표적화하는 회귀-절단 엔도뉴클레아제를 암호화하는 핵산 서열을 상기 면역 세포로 (바람직하게는 형질 감염 또는 형질 도입에 의해) 도입
- [0700] - TCR 서브 유닛 알파 및/또는 베타 중 하나를 코딩하는 유전자, 바람직하게는 알파 및/또는
- [0701] - CD52를 코딩하는 유전자,
- [0702] (c) 상기 엔도뉴클레아제를 상기 면역 세포 내로 발현시켜 상기 유전자(들)의 표적화된 불활성화를 수득하는 단계;
- [0703] (d) 선택적으로 알렘투주맙의 존재하에 단계 c)에서 수득된 조작된 면역 세포를 확장시키는 단계,
- [0704] (e) 상기 면역 세포에 본 발명의 CD22 CAR, 바람직하게는 서열번호 15를 도입.
- [0705] 바람직한 실시예에서, 본 발명은 알렘투주맙에 내성이고 CD22 양성 악성 세포를 표적으로 할 수 있는 생체 외 면역 세포, 바람직하게는 TCR을 발현하지 않는 일차 T- 세포를 생성하는 방법을 포함한다. 상기 방법은 다음 단계를 포함한다:
- [0706] 공여자, 바람직하게는 단리된 T 세포 (또는 단리된 T 세포 집단)로부터의 면역 세포 제공
- [0707] 상기 면역 세포에 본 발명의 CD22 CAR, 바람직하게는 서열번호 15를 도입
- [0708] 단계 b)에서 얻은 조작된 면역 세포의 확장
- [0709] (d) 특이적으로 표적화하는 회귀-절단 엔도뉴클레아제를 암호화하는 핵산 서열을 (형질 감염 또는 형질 도입에 의해) 상기 면역 세포 내로 도입하는 단계
- [0710] CD52를 발현하는 유전자 및 TCR 서브 유닛 알파 또는 베타 중 하나를 발현하는 유전자,
- [0711] (e) 상기 유전자(들)의 표적화된 불 활성화를 얻기 위해 상기 엔도뉴클레아제를 상기 면역 세포 내로 발현시키는 단계;
- [0712] (f) 선택적으로 푸린 유사체 약물의 존재하에 단계 e)에서 수득된 조작된 면역 세포를 확장시키는 단계.
- [0713] 일 실시예에서, UCART22를 제조하는 방법은 다음 단계를 포함한다:
- [0714] (a) 공여자, 바람직하게는 단리된 T 세포 또는 단리된 T 세포 집단으로부터 면역 세포를 제공하는 단계,
- [0715] (b) 상기 면역 세포 내로의 도입(바람직하게는 형질 감염 또는 형질 도입에 의해)
- [0716] - TCR 서브 유닛 알파 및/또는 베타 중 하나, 바람직하게는 알파 중 하나를 코딩하는 유전자를 특이적으로 표적화하는 회귀-절단 엔도뉴클레아제를 암호화하는 핵산 서열, 및
- [0717] - 삽입될 서열, 바람직하게는 HIF-1 알파를 코딩하는 핵산,
- [0718] (c) 삽입될 상기 서열의 표적화된 삽입을 얻기 위해 상기 엔도뉴클레아제를 상기 면역 세포 내로 발현시키는 단계,
- [0719] (d) 선택적으로 낮은 O<sub>2</sub> 농도 (5 % O<sub>2</sub>, 바람직하게는 1 % O<sub>2</sub>)의 존재하에 단계 c)에서 수득된 조작된 면역 세포를 확장시키는 단계;
- [0720] (e) 상기 면역 세포에 본 발명의 CD22 CAR, 바람직하게는 서열번호 15의 CD22 CAR을 도입한다.
- [0721] 바람직한 실시예에서, 본 발명은 저산소증에 내성이고 CD22 양성 악성 세포를 표적으로 할 수 있는 생체 외 면역 세포, 바람직하게는 TCR을 발현하지 않는 일차 T-세포를 생성하는 방법을 포함한다. 상기 방법은 다음 단계

를 포함한다:

- [0722] 공여자, 바람직하게는 단리된 T 세포 (또는 단리된 T 세포 집단)로부터 면역 세포를 제공하는 것,
- [0723] 상기 면역 세포에 본 발명의 CD22 CAR, 바람직하게는 서열번호 15를 도입하고,
- [0724] 단계 b)에서 얻은 조작된 면역 세포의 확장
- [0725] (d) 상기 면역 세포내로의 도입 (바람직하게는 형질 감염 또는 형질 도입에 의해)
- [0726] - TCR 서브 유닛 알파 및/또는 베타 중 하나, 바람직하게는 알파 중 하나를 코딩하는 유전자를 특이적으로 표적화하는 희귀-절단 엔도뉴클레아제를 암호화하는 핵산 서열, 및
- [0727] -HIF-1 $\alpha$ 를 코딩하여 삽입될 서열을 코딩하는 핵산,
- [0728] (e) 상기 유전자(들)의 표적화 된 삽입을 얻기 위해 상기 엔도뉴클레아제를 상기 면역 세포 내로 발현시키는 단계;
- [0729] (f) 선택적으로 낮은 O<sub>2</sub> 농도 (5 % O<sub>2</sub>, 바람직하게는 1 % O<sub>2</sub>)의 존재하에 단계 e)에서 수득된 조작된 면역 세포를 확장시키는 단계;
- [0730] 생체 외 면역 세포의 생산 방법으로서, 바람직하게는 TCR을 발현하지 않는 1 차 T-세포이며 푸린 유사체 약물, 알렘투주맙 또는 저산소증에 대해 내성이고 CD22 양성 악성 세포를 표적으로 할수 있는 상기 방법은 임의로 상기 면역 세포 내로 (트랜스펙션 또는 형질 도입에 의해) 바람직하게는 PD-1, CD279 및 더욱 바람직하게는 PDCD1 (PD-1, CD279) 또는 CTLA4 (CD152)이며 표 9에 언급된 유전자 중 하나를 표적으로하는 희귀-절단 엔도 뉴 클레 아 제를 암호화하는 핵산 서열을 도입하는 또 다른 단계를 포함한다.
- [0731] 본 발명자들은 뉴클레아제, 특히 TAL-뉴클레아제를 사용하여 상기 세포 내로의 dCK 유전자 발현의 불활성화(결실)를 매개함으로써 푸린 뉴클레오타이드 유사체 (dCK-KO), 보다 특히 클로로파라빈 및/또는 플루다라빈에 내성인 1 차 T 세포를 발현하는 CD22 CAR을 성공적으로 생성하였다.
- [0732] 바람직하게는 W02013176915에 기재된 바와 같은 전기 천공법을 사용하여 dCK 유전자에 대해 지시된 특이적 TAL-뉴클레아제를 암호화하는 mRNA를 사용하는 T- 세포의 형질 감염은 약물에 대한 상당한 내성을 유도하면서 CD22 보유 세포에 대한 T-세포 세포 독성 활성을 유지시켰다.
- [0733] 동일한 방법이 본 발명자들에 의해 기술된 바와 같이 특정 TALEN을 사용한 인간 CD52의 결실에 적용된다.
- [0734] 본 출원은 또한 TCR-KO, CD22 CAR (바람직하게는 서열번호 15의) 1 차 T- 세포,
- [0735] 백혈병 또는 림프종, 바람직하게는 공격적이고 저항성인 재발형의 치료를 위해 데옥시시티딘 키나제의 발현이 억제 또는 불활성화되고 (dCK-KO), 보다 바람직하게는 재발 B-ALL이다.
- [0736] 이러한 세포는 "범용" T 세포 (또는 UCART)이다.
- [0737] 일 실시예에서, 본 출원은 CD22 CAR (바람직하게는 서열번호 15의) 1 차 T- 세포를 제공하고, 백혈병 또는 림프종, 바람직하게는 공격적이고 저항성인 재발 형; 보다 바람직하게는 자가 전달 후 재발성 B-ALL의 치료를 위해 데옥시시티딘 키나제의 발현이 억제 또는 불활성화(dCK-KO) 된다.
- [0738] 일 실시예에서, 본 출원은 CD22 CAR (바람직하게는 서열번호 15의) 1 차 T- 세포를 제공하고, 백혈병 또는 림프종, 바람직하게는 공격적이고 저항성인 재발 형; 보다 바람직하게는 자가 전달 후 재발성 B-ALL의 치료를 위해 CD52의 발현이 억제 또는 불활성화(CD52-KO) 된다.
- [0739] 일 실시예에서, 본 출원은 CD22 CAR (바람직하게는 서열 번호 15의) 1 차 T- 세포를 제공하며 TCR을 녹아웃시키지 않고 코딩 서열을 TRAC 서열에 삽입함으로써 HIF-1 $\alpha$ 의 어느 발현이 증가되었는지를 나타낸다.
- [0740] 백혈병 또는 림프종, 바람직하게는 공격적이고 저항성인 재발 형의 치료; 보다 바람직하게는 자가 전달 후 재발성 B-ALL
- [0741] 일 실시예에서, 본 출원은 CD22 CAR (바람직하게는 서열번호 15의) 1 차 T- 세포를 제공하고, 백혈병 또는 림프종, 바람직하게는 공격적이고 저항성인 재발 형; 보다 바람직하게는 자가 전달 후 재발성 B-ALL의 치료를 위해 데옥시시티딘 키나제 및 CD52의 발현이 억제 또는 불활성화(dCK-및 CD52KO) 된다.
- [0742] 일 실시예에서, 본 출원은 CD22 CAR (바람직하게는 서열번호 15의) 1 차 T- 세포를 제공하고, 백혈병 또는 림프



중, 바람직하게는 공격적이고 저항성인 재발 형; 보다 바람직하게는 자가 전달 후 재발성 B-ALL의 치료를 위해 데옥시시티딘 키나제 및 CD52의 발현이 억제 또는 불활성화(dCK-및 CD52KO) 및 TCR를 녹아웃시키지 않고 HIF1 알파 코딩 서열을 TRAC 서열에 삽입함으로써 HIF-1 알파의 발현이 증가된다.

[0743] 생체 외 면역 세포의 생산 방법으로서, 바람직하게는 TCR을 발현하지 않는 1 차 T-세포이며 푸린 유사체 약물 및/또는 알렘투주맙 및/또는 저산소증에 대해 내성이고 CD22 양성 악성 세포를 표적으로 할수 있는 상기 방법은 선택적으로 상기 면역 세포 내로 (트랜스펙션 또는 형질 도입에 의해) 바람직하게는 PD-1, CD279 및 더욱 바람직하게는 PDCD1 (PD-1, CD279) 또는 CTLA4 (CD152)이며 표 9에 언급된 유전자 중 하나를 표적으로하는 희귀-절단 엔도뉴클레아제를 암호화하는 핵산 서열을 도입하는 또 다른 단계를 포함한다.

[0744] 본 발명자들은 뉴클레아제, 특히 TAL-뉴클레아제를 사용하여 상기 세포 내로의 dCK 유전자 발현의 불활성화(결실)를 매개함으로써 푸린 뉴클레오타이드 유사체 (dCK-KO), 보다 특히 클로로파라빈 및/또는 플루다라빈에 내성인 1 차 T 세포를 발현하는 CD22 CAR을 성공적으로 생성하였다.

[0745] 본 발명자들은 뉴클레아제, 특히 TAL-뉴클레아제를 사용하여 상기 세포 내로 HIF-1 알파 유전자의 표적화 된 삽입에 의해 저산소증에 내성인 1 차 T 세포를 발현하는 CD22 CAR을 성공적으로 생성하였다.

[0746] 바람직하게는 W02013176915에 기재된 바와 같은 전기 천공법을 사용하여 dCK 유전자에 대해 지시된 특이적 TAL-뉴클레아제를 암호화하는 mRNA를 사용하는 T- 세포의 형질 감염은 약물에 대한 상당한 내성을 유도하면서 CD22 보유 세포에 대한 T-세포 세포 독성 활성을 유지시켰다.

[0747] 본 출원은 또한 백혈병 또는 림프종의 치료를 위해 저산소증에 저항성인 TCR-KO, CD22 CAR (바람직하게는 서열 번호 15) 1 차 T-세포, 바람직하게는 이들의 공격적이고 저항성인 재발형; 더욱 바람직하게는 B-ALL이다.

[0748] T 세포의 활성화 및 확장

[0749] T 세포의 유전자 변형전 또는 후에, 본 발명의 유전자 변형 면역 세포가 항원 결합 메커니즘과 독립적으로 활성화되고 증식되더라도, 본 발명의 면역 세포, 특히 T 세포는 추가로 활성화 될 수 있고 예를 들어 미국특허 6,352,694에 기술 된 방법을 사용하여 일반적으로 확장되고; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041; 및 미국특허출원공개 US20060121005를 포함한다. T 세포는 체외 또는 생체 내에서 확장될 수 있다.

[0750] 일반적으로, 본 발명의 T 세포는 T 세포의 표면상의 CD3 TCR 복합체 및 공동 자극 분자를 자극하는 제제와의 접촉에 의해 확장되어 T 세포에 대한 활성화 신호를 생성한다. 예를 들어, 칼슘 이오노포어 A23187, 포볼 12-미리스테이트 13-아세이트(PMA)와 같은 화학 물질, 또는 파이토헤마글루티닌(PHA)과 같은 유사 분열성 력틴이 T-세포에 대한 활성화 신호를 생성하는데 사용될 수 있다.

[0751] 비 제한적 예로서, T 세포 집단은 체외에서, 예를 들어 항-CD3 항체 또는 그의 항원-결합 단편과의 접촉 또는 표면에 고정되거나, 또는 칼슘 이오노포어와 함께 단백질 키나제 C 활성화제 (예를 들어, 브리오스타틴)와의 접촉에 의해 고정된 항-CD2 항체에 의해 자극될 수 있다. T 세포의 표면에서 보조 분자의 공동-자극을 위해, 보조 분자에 결합하는 리간드가 사용된다.

[0752] 예를 들어, T 세포 집단은 T 세포의 증식을 자극하기에 적합한 조건하에서 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체와 접촉될 수 있다. T 세포 배양에 적합한 조건에는 혈청 (예 : 태아 소 또는 인간 혈청), 인터루킨-2 (IL-2), 인슐린, IFN-g, 1L-4, 1L-7, GM-CSF, -10, -2, 1L-15, TGFp 및 TNF- 또는 당업자에게 공지된 세포의 성장을위한 임의의 다른 첨가제를 포함하여 증식 및 생존에 필요한 인자가 포함되어있을 수 있는 적절한 배지 (예 : Minimal Essential Media 또는 RPMI Media 1640 또는 X-vivo 5, (Lonza))가 포함된다. 세포 성장을 위한 다른 첨가제로는 계면 활성제, 플라스마 네이트 및 환원제, 예를 들어 N-아세틸-스테인 및 2-머캅토 에탄이 포함된다. 배지에는 RPMI 1640, A1M-V, DMEM, MEM, a-MEM, F-12, X-Vivo 1 및 X-Vivo 20, Optimizer, 아미노산, 피루브산 나트륨 및 비타민이 포함될 수 있거나 또는 적절한 양의 혈청 (또는 혈장) 또는 정의 된 호르몬 세트, 및/또는 T 세포의 성장 및 확장에 충분한 양의 사이토카인(들)이 보충될 수있다. 항생제, 예를 들어 페니실린 및 스트렙토마이신은 실험 배양에만 포함되며, 대상체에 주입될 세포의 배양에는 포함되지 않는다. 표적 세포는 성장을 지지하는데 필요한 조건, 예를 들어 적절한 온도 (예를 들어, 37 °C) 및 대기(예를 들어, 공기 + 5 % CO2)하에 유지된다. 다양한 자극 시간에 노출된 T 세포는 상이한 특성을 나타낼 수있다.

[0753] 다른 특정 실시예에서, 상기 세포는 조직 또는 세포와 공동 배양함으로써 확장될 수 있다. 상기 세포는 또한 생

체 내, 예를 들어 상기 세포를 대상으로 투여한 후 대상체의 혈액에서 확장될 수 있다.

[0754] **제약 조성물**

[0755] 본 발명의 CD22 CAR (바람직하게는 서열번호 15)을 발현하는 조작된 (TCR 및 dCK KO) 또는 (TRAC 및 CD52 KO) 면역 T 세포 및 약학적으로 허용되는 비히클(vehicle) 포함하는 약학 조성물은 본 발명의 다른 목적이다.

[0756] 다른 실시예에서, 본 발명은 (상기 실시예 중 어느 하나로서) 본 발명의 UCART22를 브리오스타틴 화합물 패밀리, 바람직하게는 브리오스타틴-1과 함께 포함하는 조성물을 제공한다.

[0757] 브리오스타틴은 Bugula neritina 인 bryozoan의 macrolide lactone 그룹이다. 브리오스타틴 1의 구조는 1980 년대에 결정되었다. 현재까지 20 개의 다른 브리오스타틴이 분리되었다. 또한, 브리오 스타틴의 특정 유사체는 "브리오 로그"로 지칭되었다. 브리오 스타틴은 단백질 키나제 C의 강력한 조절제이다. (Wender, Paul A., Jeremy L. Baryza, Chad E. Bennett, F. Christopher Bi, Stacey E. Brenner, Michael O. Clarke, Joshua C. Horan, Cindy Kan, Emmanuel Lacôte, Blaise Lippa, Peter G. Nell, and, and Tim M. Turner. The Practical Synthesis of a Novel and Highly Potent Analogue of Bryostatin. Journal of the American Chemical Society 2002 124 (46), 13648-13649 DOI: 10.1021/ja027509+)

[0758] 본 발명의 UCART22와 호환되기에 적합한 브리오스타틴 화합물의 예 및 이들 화합물의 제조 방법은 WO2001040214A1 또는 EP2737904A2, WO1997034598에 참고로 포함된다.

[0759] 본 발명의 UCART22와 조합하여 사용될 수 있는 브리오스타틴-1의 용량의 예는 앞서 Varterasian ML1, Mohammad RM, Shurafa MS, Hulburd K, Pemberton PA, Rodriguez DH, Spadoni V, Eilender DS, Murgo A, Wall N, Dan M, Al-Katib AM 에 기술된 바와 같다. 재발된 저급 비-호지킨 림프종 및 만성 림프 구성 백혈병 환자에서 브리오스타틴 1의 2 상 시험. Clin Cancer Res. 2000 Mar;6(3):825-8.

[0760] 본 발명의 CD22 CAR (바람직하게는 서열번호 15) [UCART22]을 발현하는 조작된 (TRAC 및 dCK KO 또는 TRAC 및 CD52 KO) 면역 T 세포 또는 상기 UCART22를 포함하는 약학적 조성물은 의약으로서 제공된다.

[0761] 본 발명의 CD22 CAR (바람직하게는 서열번호 15) [UCART22]을 발현하는 조작된 (TRAC 및 dCK KO 또는 TRAC 및 CD52 KO) 면역 T 세포는 암의 치료에 사용되거나 염증을 약화시키기 위한 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0762] 본 발명의 CD22 CAR (바람직하게는 서열번호 15) [UCART22]을 발현하는 조작된 (TRAC 및 dCK KO 또는 TRAC 및 CD52 KO) 면역 T 세포는 ALL, CLL, 재발 성 불응 성 공격성 형태의 치료에 사용하기 위한 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0763] 본 발명의 CD22 CAR (바람직하게는 서열번호 15) [UCART22]을 발현하는 조작된 (TRAC 및 dCK KO 또는 TRAC 및 CD52 KO) 면역 T 세포는 CD19 재발 암, 바람직하게는 CD19 재발성 B-ALL의 치료에 사용하기 위한 또는 상기 UCART22를 포함하는 약학적 조성물은 의약으로서 제공된다.

[0764] 다른 실시예에서, 본 발명의 (바람직하게는 서열번호 15) [UCART22] CD22 CAR을 발현하는 저산소증 저항성 조작된 (TRAC 및 dCK KO 또는 TRAC 및 CD52 KO) 면역 T 세포 또는 상기 UCART22를 포함하는 제약 조성물은 의약으로서 제공된다.

[0765] 다른 실시예에서, 암의 치료 또는 사용에 사용하기 위한 본 발명의 CD22 CAR (바람직하게는 서열번호 15) [UCART22]을 발현하는 저산소증 저항성, 조작된 (TRAC 및 dCK KO 또는 TRAC 및 CD52 KO) 면역 T 세포 염증을 약화시키는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

[0766] 다른 실시 형태에서, ALL, CLL의 치료에 사용하기 위한 본 발명의 CD22 CAR (바람직하게는 서열 번호 15) [UCART22]를 발현하는 저산소증 저항성, 조작된 (TRAC 및 dCK KO 또는 TRAC 및 CD52 KO) 면역 T 세포, 재발성 내화성 공격적 형태의 CLL 또는 ALL은 본 발명의 다른 목적이다.

[0767] 다른 실시 양태에서, CD19 재발 암의 치료에 사용하기 위한 본 발명의 CD22 CAR (바람직하게는 서열번호 15) [UCART22]을 발현하는 저산소증 저항성, 조작된 (TRAC 및 dCK KO 또는 TRAC 및 CD52 KO) 면역 T 세포 바람직하게는 CD19 재발 B-ALL이 제공된다.

[0768] 다른 실시예에서, 본 발명의 상이한 방법에 의해 수득된 단리된 세포 또는 상기 단리된 세포로부터 유래된 세포주는 의약으로서 사용될 수 있다. 다른 실시예에서, 상기 의약은 암 치료, 특히 이를 필요로 하는 환자에서 B-세포 림프종 및 백혈병의 치료에 사용될 수 있다. 다른 실시예에서, 본 발명에 따른 상기 단리된 세포 또는 상

기 단리된 세포로부터 유래된 세포주는 이를 필요로 하는 환자에서 암 치료 용 의약의 제조에 사용될 수 있다.

[0769] 본 발명은 조작된 세포의 오토로고스(autologous) 전달을 포함한다. 이 경우 세포는 하나의 공여체, 인간 공여 자로부터 단리되고, 조작된 후 이를 필요로 하는 초기 공여자에게 전달된다. 이 특정 실시예에서, 세포는 예를 들어 알렘투주맙 캄파스(campath) 및/또는 pna와 같은 약물에 내성이 있고 선택적으로 저산소증에 내성이 있도록 조작될 수 있다.

# [0770] 치료 응용

[0771] 용어 "암"은 하나 또는 여러 유형의 세포의 제어되지 않은 성장을 특징으로 하는 질병을 지칭한다. 암의 예는 본원에 기술되어 있으며, 액체 종양 또는 혈액 암을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0772] 본 발명에 따른 혈액 암은 림프종, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 백혈병, 다발성 골수종, B- 만성 림프 구성 백혈병, 털이 세포 백혈병, 급성 림프 구성 백혈병 (ALL) 및 버킷 림프종, 급성 림프종으로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 급성 골수성 백혈병, 바람직하게는 CD22-발현 혈액암, 더욱 바람직하게는 재발 또는 불응성 CD22-발현 혈액 암, 더욱 바람직하게는 상기 CD22-관련 혈액암의 공격적인 형태이다.

[0773] 바람직한 실시예에서, 재발 또는 불응성 CD22-발현 혈액 암은 재발 및/또는 불응 성 CD22 발현 또는 양성 B-ALL 이다.

[0774] 따라서, 상기 기재된 실시 양태 중 어느 하나에 따른 치료 유효량의 UCART 22 또는 상기 기재된 바와 같은 약학적 조성물의 치료 유효량은 재발 성 및 / 또는 내화성 CD22 발현 또는 양성 B-ALL 을 겪는 환자를 치료하기 위한 약물로서 사용하기 위해 제공된다.

[0775] 다른 실시예에서, 상기 기재된 실시예 중 어느 하나에 따른 치료 유효량의 UCART 22 또는 상기 기재된 바와 같은 약학적 조성물의 치료 유효량은 백혈병 및 림프종, 털이 세포 백혈병, 급성 림프성 암, 급성 림프성 백혈병 (ALL), 급성 골수성 백혈병, 만성 림프성 백혈병, B-만성 림프성 백혈병, 만성 골수성 암, 호지킨 림프종, 비호 지킨 림프종, 다발성 골수종에서 선택된 CD22 양성 혈액 암을 앓고있는 환자를 치료하기위한 것을 위한 약물로 서 사용하기 위해 제공된다

[0776] 다른 실시예에서, 상기 기재된 실시예 중 어느 하나에 따른 치료 유효량의 UCART 22 또는 상기 기재된 바와 같은 약학적 조성물의 치료 유효량은 폐포 횡문근 육종, 방광암 (예: 방광암), 골암, 뇌암 (예: 수 모세포종), 유 방암, 항문암, 항문관 또는 항문 직장, 눈암, 간내 담관암, 관절암, 후두암, 쓸개암, 흉막암, 코의 암, 비강의 암, 중이의 암, 구강암, 외음부 암, 만성 림프 구성 백혈병, 만성 골수암, 대장 암, 식도암, 자궁 경부암, 섬유 육종, 위장 암종 종양, 두 경부암 (예: 두경부 편평 세포 암종), 갑상선 암, 신장암, 후두암, 간암, 폐암 (예: 비소 세포 폐암 종), 악성 중피종, 비만 세포종, 흑색 종, 비인두암, 난소 암, 췌장암, 복막 암, 망막 암, 장 간암, 인두 암, 전립선 암, 직장암, 신장 암, 피부암, 소장암, 연조직암, 고형 종양, 위암, 고환암, 갑상선암, 요관암에서 선택된 CD22 양성 암으로 고통받는 환자를 치료하기 위한 약물로서 사용하기 위해 제공된다.

[0777] CD22-매개 암의 다른 예는 본원에 기술되며 간암, 폐암 (예를 들어, 비소 세포 폐 암종), 난소암, 췌장암, 갑상 선암 및 요로암을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0778] 특정 실시예에서, 본 발명의 목적은 집단에서 이러한 암의 일반적인 성장 평균보다 적어도 2 배 빠르게 성장하 는 것으로 정의된, 이러한 암의 공격성 형태의 치료를 위해 제공된다.

[0779] 일 실시예에서, 본 발명의 목적은 치료의 가속화된 단계 동안 백혈병의 치료에 사용된다.

[0780] 특정 실시예에서, 본 발명의 목적은 방광 및 전립선 암종을 갖는 만성 림프 구성 백혈병으로 구성되는 폐-삼중 암에서 난치성/재발성 확산성 대형 B-세포 비호 지킨 림프종-유방 전이의 치료를 위해 제공된다.

[0781] 바람직하게는, 암은 혈액 악성 종양이다. (예를 들어, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 만성 림프 구성 백혈병, 급성 림프 구성암, 급성 골수성 백혈병, B-만성 림프구 백혈병, 털이 세포 백혈병, 급성 림프 구성 백 혈병 (ALL) 및 버킷 림프종을 포함하나 이에 제한되지 않는 백혈병 또는 림프종.)

[0782] 보다 바람직하게는, 암은 CD22의 발현을 특징으로하고, 더욱 바람직하게는 암은 암성 세포에 의한 CD22의 발현 을 특징으로하며, 더욱 더 바람직하게는 암 세포에 의한 CD22의 과발현을 특징으로한다.

[0783] 일 실시예에서 상기 암 세포는 재발성 불응성 CD19 음성 암 세포이다.

[0784] 일 실시예에서 상기 암 세포는 재발성 불응성 CD22 발현 암 세포이다.

- [0785] 바람직한 실시예에서, 상기 암 세포는 재발성 불응성 CD19 음성 CD22 양성 발현 B-ALL이다.
- [0786] B-세포 ALL은 다음을 포함한다:
- [0787] 초기 전구체 B (이전 프리-B) ALL (pro-B ALL이라고도 함)
- [0788] 공통 ALL
- [0789] Pre-B ALL
- [0790] 성숙 B 세포 ALL은 어린이의 버킷 백혈병 또는 비호지킨 림프종이라고도 한다.
- [0791] 본원에 사용된 "CD22의 발현과 관련된 질병"은 CD22의 발현과 관련된 질환 또는 B-ALL을 나타내는 CD22와 같은 다양한 암의 종양 세포, 예를 들어 CD22를 포함하는 CD22를 발현하는 세포의 활성화와 관련된 상태를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0792] 용해에 의한 세포 파괴는 본 발명의 CD22 CAR T 세포가 CD22-발현 세포에 작용하여 종양을 감소 또는 제거하고, 숙주의 면역 세포의 종양 부위로의 침투를 용이하게하고, 항 종양 응답을 강화/연장시키는 메커니즘 중 하나이다.
- [0793] 다른 측면에서, 본 발명은 이를 필요로하는 환자를 치료하는 방법에 의존하며, 상기 방법은 다음 단계 중 적어도 하나를 포함한다:
- [0794] 본 발명의 UCART22 제공
- [0795] 상기 형질 전환 된 면역 세포를 상기 환자에게 투여하는 단계,
- [0796] 일 실시예에서, 본 발명의 상기 UCART22 세포는 강력한 생체 내 T 세포 확장을 겪을 수 있고 숙주에서 연장된 시간 동안 지속될 수 있다.
- [0797] 다른 측면에서, 본 발명은 이를 필요로하는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 다음 단계 중 적어도 하나를 포함한다:
- [0798] 암 환자의 컨디셔닝
- [0799] 본 발명의 UCART22 제공
- [0800] 상기 형질 전환 된 면역 세포를 상기 환자에게 투여하는 단계,
- [0801] 컨디셔닝은 림프구 제거, 또는 당업자, 또한 바람직하게는 의사가 적절한 컨디셔닝을 포함하여 상기 환자를 치료하기위한 결정 인자로 인식할 것이다.
- [0802] 바람직한 실시예에서, 상기 방법은 골수 이식 단계를 추가로 포함한다.
- [0803] 일 실시예에서, 본 발명의 상기 UCART22 세포는 강력한 생체 내 T 세포 확장을 겪을 수 있고 숙주에서 연장된 시간 동안 지속될 수 있다.
- [0804] 상기 치료는 개선, 치료 또는 예방적일 수 있다. 자가 면역 요법의 일부이거나 동종 면역 요법의 일부일 수 있다. 자가 조직에 의해, 환자를 치료하는데 사용되는 세포, 세포주 또는 세포 집단은 상기 환자 또는 인간 백혈구 항원(HLA) 호환 공여자로부터 유래하는 것을 의미한다. 모든 균질성은 환자를 치료하는 데 사용되는 세포나 세포의 수가 해당 환자에서 비롯되는 것이 아니라 기증자로부터 발생한다는 것을 의미한다.
- [0805] 일 실시예에서, 숙주에서 본 발명의 상기 T 세포의 생존은 항 CD20(리툰시맙) 및/또는 QBEN10 치료를 사용하여 제어된다.
- [0806] **대상**
- [0807] 본 발명의 조성물 및 방법은 CD22를 발현하는 병리학적 세포 또는 조직을 갖는 것으로 특징지어졌거나 CD22를 발현하는 병리학적 세포 또는 조직을 갖는 것으로 의심되는 대상체를 치료하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 치료로부터 이익을 얻는 대상체는 B-ALL 또는 CLL, 내화성 BALL, 재발 B-ALL을 갖는 대상체를 포함한다.
- [0808] 바람직한 실시예에서, 환자는 BALL, 재발성 BALL, 불응성 BALL (소아 적응증)을 앓고있는 어린이이다.
- [0809] 본 발명에 따른 조작된 면역 세포로의 치료는 항체 요법, 화학 요법, 사이토 카인 요법, 수지상 세포 요법, 유



전자 요법, 호르몬 요법, 레이저 광선 요법 및 방사선 요법의 군으로부터 선택된 암에 대한 하나 이상의 요법과 조합될 수 있다.

- [0810] 따라서, 본 발명은 BALL, 재발성 BALL, 불응성 BALL을 앓고있는 어린이의 치료를 위한 치료적 활성량의 UCART22를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0811] 본 발명은 또한 UCART22 및 BALL, 재발성 BALL, 불응성 BALL을 앓고있는 어린이의 치료를 위한 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.
- [0812] 바람직한 실시예에서, 제약 조성물은 본 발명의 UCART22 및 브리오스타틴 패밀리의 화합물, 바람직하게는 브리오스타틴-1 및 BALL, 재발성 BALL, 내화성 BALL을 앓는 어린이의 치료를 위한 제약상 허용되는 부형제를 포함한다.
- [0813] 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 상기 치료는 면역 억제 치료 (컨디셔닝 치료), 보다 바람직하게는 림프구 제거를 겪고있는 환자에게 투여될 수 있다. 실제로, 본 발명은 바람직하게는 이러한 면역 억제제에 대한 수용체를 코딩하는 유전자의 불활성화로 인해 하나 이상의 면역 억제제에 내성이 있는 세포 또는 세포 집단에 의존한다. 이러한 측면에서, 면역 억제 치료 또는 림프구 완화는 환자 내에서 본 발명에 따른 T-세포의 선택 및 확장 및 CD22 양성 세포의 파괴를 돕는다.
- [0814] 본 발명에 따른 세포 또는 세포 집단의 투여는 에어로졸 흡입, 주사, 섭취, 수혈, 이식 또는 이식을 비롯한 임의의 편리한 방식으로 수행될 수 있다. 본원에 기재된 조성물은 피하, 피내, 종양 내, 비강 내, 골수 내, 근육 내, 정맥 내 또는 림프 내 주사, 또는 복강 내로 환자에게 투여될 수 있다. 일 실시예에서, 본 발명의 세포 조성물은 바람직하게 정맥 주사에 의해 투여된다.
- [0815] 세포 또는 세포 집단의 투여는 체중 kg 당  $10^4$ - $10^9$  세포, 바람직하게는 그 범위 내의 세포 수의 모든 정수 값을 포함하여 체중  $10^5$  내지  $10^6$  세포/kg 체중의 투여로 구성될 수 있다. 세포 또는 세포 집단은 하나 이상의 투여량, 바람직하게는 여러 연속 투여량(재실행)으로 탈출 (재발성 세포)을 피할 수 있다. 다른 실시예에서, 상기 유효량의 세포는 단일 용량으로 또는 용량으로 투여된다. 다른 실시예에서, 상기 유효량의 세포는 기간에 걸쳐 1 회 초과 용량으로 투여된다.
- [0816] 투여시기는 의사 관리의 판단 내에 있으며 환자의 임상 상태에 따라 달라진다.
- [0817] 세포 또는 세포 집단은 혈액 은행 또는 공여자와 같은 임의의 공급원으로부터 얻을 수 있다. 개인의 요구는 다양하지만, 당업자의 특정 질환 또는 상태에 대해 주어진 세포 유형의 유효량의 최적 범위의 결정이 가능하다. 유효량은 치료 적 또는 예방적 이점을 제공하는 양을 의미한다. 투여되는 투여량은 수용자의 연령, 건강 및 체중, 동시 치료의 종류(있는 경우), 치료 빈도 및 원하는 효과의 성질에 따라 달라질 것이다.
- [0818] 본 UCART22는 효율적이지만 사이토카인 스톰(storm)을 활성화하지 않고 제한하기 위해 설계되었다. 과민 반응 환자의 경우, 본 발명은 항 IL-6 약물과 같은 사이토카인 스톰(storm)을 차단하기 위한 적절한 약물과 조합될 수 있다.
- [0819] 다른 실시예에서, 상기 유효량의 세포 또는 이들 세포를 포함하는 조성물은 비경 구 투여된다. 상기 투여는 정맥 내 투여일 수 있다. 상기 투여는 종양 내 주사에 의해 직접 수행될 수 있다. 본 발명의 특정 실시예에서, 세포는 임의의 수의 관련 치료 방식과 관련하여 (예를 들어, 이전, 동시에 또는 이후) 환자에게 투여되고, 항 바이러스 요법, 시도포비르 및 인터루킨-2, 시타라빈 (ARA-C로도 알려짐) 또는 MS 환자를 위한 나탈리주맙 치료 또는 건선 환자를 위한 에팔리리맙 치료 또는 PML 환자를 위한 다른 치료제와 같은 약제로의 치료를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 추가의 실시예에서, 본 발명의 T 세포는 화학 요법, 방사선, 면역 억제제, 예컨대 사이클로스포린, 아자티오프린, 메토트렉세이트, 미코페놀 레이트 및 FK506, 항체, 또는 다른 면역 억제제, 예컨대 CAMPATH, 알렘투주맙, 항-CD3 항체 또는 다른 항체 요법, 사이토신, 플루다리빈, 시클로스포린, FK506, 라파마이신, 미코폴리놀산, 스테로이드, FR901228, 사이토카인 및 방사선조사. 이들 약물은 칼슘 의존성 포스포타제 칼시뉴린(사이클로스포린 및 FK506)을 억제하거나 성장 인자 유도 신호 전달 (라파마이신)에 중요한 p70S6 키나제를 억제한다(Henderson, Naya et al. 1991; Liu, Albers et al. 1992; Bierer, Hollander et al. 1993).
- [0820] 추가의 실시예에서, 본 발명의 세포 조성물은 플루 다 라빈, 외부 빔 방사선 요법(XRT), 시클로포스파미드 또는 OKT3 또는 캄파스와 같은 항체 화학 요법제를 사용하여 골수 이식(예를 들어, 동시에 또는 후에), T 세포 절제 요법과 함께 환자에게 투여된다. 다른 실시예에서, 본 발명의 세포 조성물은 CD20과 반응하는 작용제, 예를 들

어 리톡산 또는 BEN10과 같은 B-세포 절제 요법 후에 투여된다.

- [0821] 예를 들어, 일 실시예에서, 대상체는 고용량 화학 요법으로 말초 혈액 세포 이식에 의한 표준 치료를 받을 수 있다. 특정 실시예에서, 이식 후, 대상체는 본 발명의 확장된 면역 세포의 주입을 받는다. 추가의 실시예에서, 확장된 세포는 수술 전 또는 후에 투여된다.
- [0822] 다른 실시예에서, 이식 후, 대상체는 CD20과 반응하는 작용제, 예를 들어 리톡산 또는 리톡시맙, 바람직하게는 CD22 및 CD20과 반응하는 작용제를 받는다.
- [0823] **다른 정의**
- [0824] - 폴리펩티드 서열에서 아미노산 잔기는 본원에서 1 문자 코드에 따라 지정되며, 예를 들어 Q는 Gln 또는 글루타민 잔기, R은 Arg 또는 아르기닌 잔기, D는 Asp 또는 아스파르트 산 잔기를 의미한다.
- [0825] - 아미노산 치환은 하나의 아미노산 잔기를 다른 아미노산 잔기로 대체하는 것을 의미하며, 예를 들어 펩타이드 서열에서 아르기닌 잔기를 글루타민 잔기로 대체하는 것은 아미노산 치환이다.
- [0826] - 뉴클레오타이드는 다음과 같이 지정된다: 1 문자 코드는 뉴클레오타이드의 염기를 지정하는데 사용된다: a는 아데닌, t는 티민, c는 사이토신, g는 구아닌이다. 축퇴된 뉴클레오타이드의 경우, r은 g 또는 a (퓨린 뉴클레오타이드)를 나타내고, k는 g 또는 t를 나타내고, s는 g 또는 c를 나타내고, w는 a 또는 t를 나타내고, m은 a 또는 c를 나타내고, y는 t 또는 c (피리미딘 뉴클레오타이드)를 나타내며, d b는 g, a 또는 c를 나타내고, b는 g, t 또는 c를 나타내고, h는 a, t 또는 c를 나타내고, n은 g, a, t 또는 c를 나타낸다.
- [0827] - "본 명세서에서 사용된 "핵산" 또는 "폴리뉴클레오타이드" 는 뉴클레오타이드 및/또는 폴리 뉴클레오타이드, 예컨대 데옥시리보핵산(DNA) 또는 리보핵산(RNA), 올리고 뉴클레오타이드, 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)에 의해 생성된 단편, 및 결합, 절단, 엔도뉴클레아제 작용 및 엑소뉴클레아제 작용 중 어느 것에 의해 생성된 단편. 핵산 분자는 자연 발생 뉴클레오타이드 (예를 들어, DNA 및 RNA)인 단량체, 또는 자연 발생 뉴클레오타이드의 유사체(예를 들어, 자연 발생 뉴클레오타이드의 거울상 이성질체 형태), 또는 이 둘의 조합으로 구성될 수 있다. 변형된 뉴클레오타이드는 당모이어티(sugar moieties) 및/또는 피리미딘 또는 퓨린 염기 모이어티에서 변형을 가질 수 있다. 당 변형은 예를 들어 하나 이상의 하이드록실 그룹을 할로젠, 알킬 그룹, 아민 및 아지도 그룹으로 대체하는 것을 포함하거나, 당은 에테르 또는 에스테르로서 작용화될 수 있다. 더욱이, 전체 당모이어티는 아자-당 및 카보사이클릭당 유사체와 같은 입체적으로 및 전자적으로 유사한 구조로 대체될 수 있다. 염기 모이어티에서의 변형의 예는 알킬화된 퓨린 및 피리미딘, 아실화된 퓨린 또는 피리미딘, 또는 다른 잘 알려진 헤테로시클릭 치환기를 포함한다. 핵산 단량체는 포스포디에스테르 결합 또는 이러한 연결의 유사체에 의해 연결될 수 있다. 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다.
- [0828] - 키메라 항원 수용체 (CAR)는 표적 세포 상에 존재하는 성분에 대해 결합 도메인을 결합시키는 분자를 의도하고, 예를 들어 T 세포 수용체-활성화 세포 내 도메인을 갖는 원하는 항원 (예를 들어, 종양 항원)에 대한 항체-기반 특이성이 특이적인 항-표적 세포 면역 활성을 나타내는 키메라 단백질을 생성한다. 일반적으로, CAR은 T 세포 항원 수용체 복합체 제타 체인 (scFvFc : ζ)의 세포 내 신호 전달 도메인에 융합된 세포 외 단일 체인 항체(scFvFc)로 구성되며, T 세포에서 발현될 때 단일 클론 항체의 특이성에 기초하여 항원 인식을 재지향시키는 능력을 갖는다. 본 발명에 사용된 CAR의 한 예는 CD22 항원에 대한 CAR 지시이며, 비 제한적 예로서 아미노산 서열을 포함 할 수 있다: 서열번호 15 내지 18, 바람직하게는 서열번호 16 또는 18, 보다 바람직하게는 서열번호 16; .
- [0829] - "엔도뉴클레아제"는 DNA 또는 RNA 분자, 바람직하게는 DNA 분자 내의 핵산 사이의 결합의 가수 분해 (분해)를 촉매할 수 있는 임의의 야생형 또는 변이 효소를 의미한다. 엔도뉴클레아제는 서열에 관계없이 DNA 또는 RNA 분자를 절단하지 않지만, 추가로 "표적 서열"또는 "표적 부위"로 지칭되는 특정 폴리 뉴클레오타이드 서열에서 DNA 또는 RNA 분자를 인식하고 절단한다. 엔도뉴클레아제는 전형적으로 길이가 12 개 염기쌍 (bp), 보다 바람직하게는 14-55bp보다 큰 폴리 뉴클레오타이드 인식 부위를 가질 때 회귀-절단 엔도뉴클레아제로 분류될 수 있다. 회귀-절단 엔도뉴클레아제는 정의된 유전자좌에서 DNA 이중-가닥 파괴 (DSB)를 유도함으로써 HR을 상당히 증가시킨다 (Perrin, Buckle et al. 1993; Rouet, Smih et al. 1994; Chouluka, Perrin et al. 1995; Pingoud and Silva 2007). 회귀-절단 엔도 뉴클레아제는 예를 들어 조작된 아연-핑거 도메인(ZFN) 과 제한 효소, 예컨대 FokI(Porteus and Carroll 2005)의 촉매 도메인, CRISPR 시스템의(Gasiunas, Barrangou et al. 2012; Jinek, Chylinski et al. 2012; Cong, Ran et al. 2013; Mali, Yang et al. 2013) Cas9 엔도 뉴클레아제 또는 화학적 엔도 뉴클레아제(Eisenschmidt, Lanio et al. 2005; Arimondo, Thomas et al. 2006)와 융합하여 생성된 키메라



아연-핑거 뉴클레아제인 홈잉(homing) 엔도 뉴클레아제(Paques and Duchateau 2007)일 수 있다. 화학적 엔도 뉴클레아제에서, 화학적 또는 펩타이드 클리버는 핵산의 중합체 또는 특정 표적 서열을 인식하는 다른 DNA에 접합되어, 절단 활성을 특정 서열로 표적화한다. 화학적 엔도 뉴클레아제는 또한 오르토펜트롤린의 접합체, DNA 절단 분자 및 특정 DNA 서열에 결합하는 것으로 알려진 삼중 체-형성 올리고 뉴클레오티드(TFOs)와 같은 합성 뉴클레아제를 포함한다(Kalish and Glazer 2005). 이러한 화학적 엔도 뉴클레아제는 본 발명에 따른 "엔도 뉴클레아제"에 포함된다.

[0830] - "TALE-뉴클레아제"(TALEN)는 핵산 표적 서열을 절단하기 위해 전사 활성화제 유사효과기(TALE) 및 전형적으로 하나의 뉴클레아제 촉매 도메인으로부터 유래 된 핵산-결합 도메인으로 구성된 융합 단백질을 의미한다. 촉매 도메인은 바람직하게는 뉴클레아제 도메인이고, 더욱 바람직하게는 엔도 뉴클레아제 활성을 갖는 도메인, 예를 들어 I-TevI, ColE7, NucA 및 Fok-1이다. 특정 실시예에서, TALE 도메인은 메가뉴클레아제, 예를 들어 I-CreI 및 I-OnuI 또는 그의 기능적 변이체에 융합될 수 있다. 보다 바람직한 실시예에서, 상기 뉴클레아제는 단량체 TALE-뉴클레아제이다. 단량체 TALE-뉴클레아제는 WO2012138927에 기술된 I-TevI의 촉매 도메인과 조작된 TAL 반복체의 융합과 같은 특정 인식 및 절단을 위해 이량체화를 필요로하지 않는 TALE-뉴클레아제이다. 전사 활성화제 유사 이펙터(TALE)는 박테리아 종으로부터의 단백질 크 산토모나스(Xanthomonas)가 복수의 반복된 서열을 포함하고, 각각의 반복은 핵산 표적화된 서열의 각각의 뉴클레오티드 염기에 특이적인 12 번 및 13 번 위치 (RV D)의 잔기를 포함한다. MBBBD(modular base-per-base) 핵산 결합 특성을 갖는 결합 도메인은 또한 상이한 박테리아 종에서 출원인에 의해 최근에 발견된 새로운 모듈식 단백질로부터 유래될 수 있다. 새로운 모듈식 단백질은 TAL 반복보다 더 많은 서열 변이를 표시할 수 있는 장점이 있다. 바람직하게는, 상이한 뉴클레오티드의 인식과 관련된 RVD는 C를 인식하기 위한 HD, T를 인식하기 위한 NG, A를 인식하기 위한 NI, G 또는 A를 인식하기 위한 NN, A, C, G 또는 T를 인식하기 위한 NS, T, IG를 인식하기 위한 HG T 인식, NK 인식, C 인식 HA, C 인식 ND, C 인식 HI, G 인식 H, G 인식 NA, G 인식 SN, G 인식 SN, T 인식 Y, A 인식 Y, A 또는 G를 인식하기 위한 VT 및 A를 인식하기 위한 SW. 다른 실시예에서, 뉴클레오티드 A, T, C 및 G에 대한 특이성을 조절하고 특히 이러한 특이성을 향상시키기 위해 중요한 아미노산 12 및 13을 다른 아미노산 잔기에 대해 돌연변이시킬 수 있다. TALE-뉴클레아제는 이미 기술되어 유전자 표적화 및 유전자 변형을 자극하는데 사용되었다(Boch, Scholze et al. 2009; Moscou and Bogdanov 2009; Christian, Cermak et al. 2010; Li, Huang et al. 2011). 맞춤형 TAL-뉴클레아제는 상표명 TALENTM(Collectis, 8 rue de la Croix Jarry, 75013 Paris, France)으로 시판되고 있다.

[0831] 본 발명에 따른 회귀-절단 엔도뉴클레아제는 또한 Cas9 엔도뉴클레아제, 아연 핑거 엔도뉴클레아제, MegaTAL 엔도뉴클레아제일 수 있다. 게놈 엔지니어링 툴은(genome engineering tool) II 형 원핵 생물 CRISPR 적응 면역 시스템으로부터 RNA-안내된 Cas9 뉴클레아제(Gasiunas, Barrangou et al. 2012; Jinek, Chylinski et al. 2012; Cong, Ran et al. 2013; Mali, Yang et al. 2013)를 기초로 개발되었다(see for review (Sorek, Lawrence et al. 2013)). CRISPR Associated (Cas) 시스템은 박테리아에서 처음 발견되었으며 바이러스 또는 플라스미드 외래 DNA에 대한 방어 기능을 한다. CRISPR-매개 게놈 엔지니어링은 먼저 프로토-스페이서 인접 모티프 (PAM)로 지칭되는 짧은 서열 모티프에 의해 측면이 있는 표적 서열의 선택에 의해 진행된다. 표적 서열 선택 후, 이 표적 서열에 상보적인 특정 crRNA가 조작된다. CRISPR 타입 II 시스템에서 요구되는 트랜스-활성화 crRNA(tracrRNA)는 crRNA와 쌍을 이루고 제공된 Cas9 단백질에 결합된다. Cas9는 tracrRNA와 crRNA의 염기쌍을 용이하게 하는 분자 앵커로서 작용한다(Deltcheva, Chylinski et al. 2011). 이 3 원 복합체에서, 이중 tracrRNA:crRNA 구조는 엔도뉴클레아제 Cas9를 동족 표적 서열로 지시하는 가이드 RNA로서 작용한다. Cas9-tracrRNA:crRNA 복합체에 의한 표적 인식은 표적 서열과 crRNA 사이의 상동성을 위해 표적 서열을 스캐닝함으로써 개시된다. 표적 서열-crRNA 상보성에 더하여, DNA 표적화는 프로토 스페이스(protospacer 인접 모티프-PAM)에 인접한 짧은 모티프의 존재를 필요로 한다. 이중-RNA와 표적 서열 사이의 페어링 후에, Cas9는 이어서 PAM 모티프의 업스트림에 무딘 이중 가닥 파괴 3 염기(blunt double strand break 3 bases)를 도입한다(Garneau, Dupuis et al. 2010). 회귀-절단 엔도뉴클레아제는 메가뉴클레아제의 명칭으로도 알려진 홈잉(homing) 엔도뉴클레아제일 수 있다. 이러한 홈잉(homing) 엔도뉴클레아제는 당업계에 잘 알려져 있다(Stoddard 2005). 홈잉(homing) 엔도뉴클레아제는 DNA 표적 서열을 인식하고 단일 또는 이중 가닥 파괴를 생성한다. 홈잉(homing) 엔도뉴클레아제는 고도로 특이적이며, 길이가 12 내지 45 개의 염기쌍 (bp), 일반적으로 14 내지 40bp의 범위의 DNA 표적 부위를 인식한다. 본 발명에 따른 홈잉(homing) 엔도뉴클레아제는 예를 들어 LAGLIDADG 엔도뉴클레아제, HNH 엔도뉴클레아제 또는 GIY-YIG 엔도뉴클레아제에 해당할 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 홈잉(homing) 엔도뉴클레아제는 I-CreI 변이체 일 수 있다.

[0832] - "전달 벡터"또는 "전달 벡터"는 본 발명에서 세포 접촉(즉, "접촉")을하거나 세포 또는 세포 내 구획(즉, "도입") 작용제/화학 물질 및 분자(단백질 또는 핵산)를 전달하기 위해 본 발명에서 사용될 수 있는 전달 벡터를

의미한다. 리포솜 전달 벡터, 바이러스 전달 벡터, 약물 전달 벡터, 화학 담체, 중합체 담체, 리포 플렉스, 폴리 플렉스, 덴드리머(dendrimers), 미세 기포 (초음파 조영제), 나노 입자, 에멀전 또는 다른 적절한 전달 벡터를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이들 전달 벡터는 분자, 화학 물질, 거대 분자 (유전자, 단백질), 또는 다른 벡터, 예컨대 플라스미드, 디아토스에 의해 개발된 펩티드의 전달을 허용한다. 이러한 경우에, 전달 벡터는 분자 담체이다. "전달 벡터" 또는 "전달 벡터"는 또한 형질 감염을 수행하기 위한 전달 방법이다.

[0833] - "벡터" 또는 "벡터"라는 용어는 연결된 다른 핵산을 운반할 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 본 발명에서 "벡터"는 바이러스 벡터, 플라스미드, RNA 벡터 또는 염색체, 비염색체, 반합성 또는 합성 핵산. 바람직한 벡터는 자율 복제 (에피소벡터) 및/또는 이들이 연결된 핵산의 발현 (발현 벡터)이 가능한 벡터이다. 다수의 적합한 벡터가 당업자에게 공지되어 있으며 상업적으로 이용 가능하다. 바이러스성 벡터에는 레트로 바이러스, 아데노 바이러스, 파르보 바이러스 (예: 아데노 관련 바이러스, 특히 aav6), 코로나 바이러스, 오르토 믹소 바이러스 (예: 인플루엔자 바이러스), 람다 바이러스 (예: 광견병 및 수 포성 구내염 바이러스), 파라 믹소 바이러스 (예: 홍역 및 센다이), 피 코르 나 바이러스 및 알파 바이러스와 같은 양성 가닥 RNA 바이러스 및 아데노 바이러스, 헤르페스 바이러스 (예: 헤르페스 바이러스)를 포함한 이중 가닥 DNA 바이러스 예를 들어, 헤르페스 심플렉스 바이러스 타입 1 및 2, 엡스타인-바 바이러스, 사이토 메갈로 바이러스) 및 폭스 바이러스 (예를 들어, 백시니아, 가금류 및 카나리 폭스)와 같은 음성 가닥 RNA 바이러스가 포함된다. 다른 바이러스는 예를 들어 Norwalk 바이러스, 토가 바이러스, 폴라비 바이러스, 레오 바이러스, 파포 바 바이러스, 헤파드나 바이러스 및 간염 바이러스를 포함한다. 레트로 바이러스의 예는 조류 백혈병 육종, 포유 동물 C 형, B 형 바이러스, D 형 바이러스, HTLV-BLV 그룹, 렌티 바이러스, 스푸마 바이러스를 포함한다(Coffin, J. M., Retroviridae: The viruses and their replication, In Fundamental Virology, Third Edition, B. N. Fields, et al., Eds., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996).

[0834] - "렌티 바이러스 벡터"는 비교적 큰 패키징 용량, 감소된 면역원성(immunogenicity) 및 고효율로 다양한 범위의 상이한 세포 유형을 안정적으로 형질 도입하는 능력으로 인해 유전자 전달에 매우 유망한 HIV-기반 렌티 바이러스 벡터를 의미한다. 렌티 바이러스 벡터는 일반적으로 3 개 (패키징, 엔벨로프 및 트랜스퍼) 이상의 플라스미드를 생산자 세포로 일시적으로 형질 감염시킨 후 생성된다. HIV와 마찬가지로, 렌티 바이러스 벡터는 바이러스 표면 당 단백질과 세포 표면의 수용체의 상호 작용을 통해 표적 세포로 들어간다. 진입시, 바이러스 RNA는 역전사를 겪고, 이는 바이러스 역전사 효소 복합체에 의해 매개된다. 역전사 생성물은 이중 가닥 선형 바이러스 DNA이며, 이는 감염된 세포의 DNA에서 바이러스 통합을 위한 기질이다. "통합 렌티 바이러스 벡터 (또는 LV)"는 표적 세포의 게놈을 통합할 수 있는 비 제한적인 예와 같은 벡터를 의미한다. 반대로 "비통합 렌티 바이러스 벡터(또는 NILV)"는 바이러스 인테그라 제의 작용을 통해 표적 세포의 게놈을 통합하지 않는 효율적인 유전자 전달 벡터를 의미한다.

[0835] - 전달 벡터 및 벡터는 sonoporation 또는 electroporation 또는 이들 기법의 유도체와 같은 임의의 세포 투과 기법과 연관되거나 결합될 수 있다.

[0836] - 세포 또는 세포는 시험관 내 배양을 위해 이들 유기체로부터 유래 된 임의의 진핵 생물 세포, 1 차 세포 및 세포주를 의미한다.

[0837] - "1 차 세포" 또는 "1 차 세포"는 생체 조직 (즉, 생검 물질)으로부터 직접 취하여 체외 성장을 위해 확립된 세포를 의미하며, 이는 거의 두 배의 집단 배가를 겪어 왔고, 연속적인 증양 형성 또는 인공적으로 불멸화된 세포주와 비교하여 이들이 유래된 조직의 주요 기능적 성분 및 특성을 보다 대표한다.

[0838] 비 제한적인 예로서, 세포주(cell lines)는 CHO-K1 세포; HEK293 세포; Caco2 세포; U2-OS 세포; NIH 3T3 세포; NSO 세포; SP2 세포; CHO-S 세포; DG44 세포; K-562 세포, U-937 세포; MRC5 세포; IMR90 세포; 주르 캣 세포; HepG2 세포; HeLa 세포; HT-1080 세포; HCT-116 세포; Hu-h7 세포; 휴백 세포; 몰트 4 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0839] 이들 모든 세포주는 본 발명의 방법에 의해 변형되어 관심 유전자 또는 단백질을 생성, 발현, 정량화, 검출, 연구하기 위한 세포주 모델을 제공할 수 있고; 이들 모델은 또한 비 제한적인 예로서 연구 및 생산에 관심있는 생물학적 활성 분자 및 화학, 바이오 연료, 치료제 및 농약과 같은 다양한 분야를 스크리닝하는데 사용될 수 있다.

[0840] - "돌연변이"는 폴리 뉴클레오티드 (cDNA, 유전자) 또는 폴리펩티드 서열에서 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 또는 그 이상의 뉴클레오티드/아미노산 25의 대체, 삭제, 삽

입을 의미한다. 돌연변이는 유전자의 코딩 서열 또는 그의 조절 서열에 영향을 줄 수있다. 또한 게놈 서열의 구조 또는 코딩된 mRNA의 구조 / 안정성에 영향을 미칠 수 있다.

- [0841] - "변이체(들)"에 의해, 이는 반복 변이체, 변이체, DNA 결합 변이체, TALE-뉴클레아제 변이체, 모분자의 아미노산 서열 중 하나 이상의 잔기의 돌연변이 또는 대체에 의해 수득 된 폴리펩티드 변이체를 의미한다.
- [0842] - "기능적 변이체"는 단백질 또는 단백질 도메인의 촉매 활성 돌연변이체를 의도하고; 이러한 돌연변이체는 그의 모 단백질 또는 단백질 도메인 또는 추가 특성, 또는 더 높거나 더 낮은 활성과 비교하여 동일한 활성을 가질 수 있다.
- [0843] - "동일성"은 2 개의 핵산 분자 또는 폴리펩티드 사이의 서열 동일성을 지칭한다. 동일성은 비교를 위해 정렬될 수 있는 각각의 시퀀스에서의 위치를 비교함으로써 결정될 수 있다. 비교된 서열에서의 위치가 동일한 염기에 의해 점유될 때, 분자는 그 위치에서 동일하다. 핵산 또는 아미노산 서열 사이의 유사성 또는 동일성의 정도는 핵산 서열에 의해 공유되는 위치에서 동일하거나 일치하는 뉴클레오티드의 수의 함수이다. FASTA 또는 BLAST를 포함하여 GCG 서열 분석 패키지 (Wisconsin, Wisconsin, Wisconsin, University of Wisconsin), 및 예를 들어 기본 설정으로 사용될 수 있는 것의 일부로서 이용 가능한 2 개의 서열 사이의 동일성을 계산하기 위해 다양한 정렬 알고리즘 및/또는 프로그램이 사용될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 특정 폴리펩티드에 대해 적어도 70 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % 또는 99 %의 동일성을 갖고 바람직하게는 실질적으로 동일한 기능을 나타내는 폴리펩티드 및 이러한 폴리펩티드를 암호화하는 폴리 뉴클레오티드가 고려된다. 달리 명시되지 않는 한 유사성 점수는 BLOSUM62의 사용을 기준으로 한다. BLASTP를 사용하는 경우 유사성 백분율은 BLASTP 양성 점수를 기준으로 하며 서열 동일성 백분율은 BLASTP 아이덴티티(identities) 점수를 기반으로 한다. BLASTP "아이덴티티"는 높은 스코어링 순서쌍에서 동일한 총 잔기의 수와 분율을 보여주며; 및 BLASTP "양성"은 정렬 점수가 양수 값을 갖고 서로 유사한 잔기의 수와 분수를 보여준다. 본원에 개시된 아미노산 서열과 이들 동일성 또는 유사성 또는 유사성의 임의의 중간 정도의 유사성을 갖는 아미노산 서열이 본 발명에 의해 고려되고 포함된다. 유사한 폴리펩티드의 폴리 뉴클레오티드 서열은 유전자 코드를 사용하여 추론되고, 통상적인 수단, 특히 유전자 코드를 사용하여 그의 아미노산 서열을 역번역함으로써 수득될 수 있다.
- [0844] - "신호-전달 도메인"또는 "공동-자극성 리간드"는 항원 제시 세포상의 T-세포상의 동족 공동-자극성 분자에 특이적으로 결합하여 1 차 신호 이외에 신호를 제공하는 항원 제시 세포상의 분자를 지칭하며 예를 들어, TCR/CD3 복합체의 펩티드가 로딩된 MHC 분자와의 결합에 의해 제공되는 것은 증식 활성화, 분화 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 T 세포 반응을 매개한다. 공동-자극성 리간드는 CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, 유도 성 공동자극성리간드 (ICOS-L)를 포함할 수 있지만 이에 제한되지는 않으며 세포 간 접촉 분자 ICAM, CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, M1CB, HVEM, 림 포토신베타수용체, 3/TR6, ILT3, ILT4, 톨 리간드 수용체 및 리간드에 특이 적으로 결합하는 작용제 또는 항체 B7-H3과 결합한다. 이 목록에서 CD28은 제외된다. 공동-자극성 리간드는 특히 T 세포 상에 존재하는 공동 자극성 분자와 특이 적으로 결합하는 항체, 예를 들어 CD27, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, 림프구 기능 관련 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LTGHT, NKG2C, B7-H3, CD83과 특이 적으로 결합하는 리간드를 포함한다.
- [0845] "공동-자극성 분자"는 공동-자극성 리간드와 특이적으로 결합하여 세포에 의한 공동-자극성 반응을 매개하지만, 이에 제한되지 않는 T 세포상의 동족 결합 파트너를 지칭한다. 공동-자극성 분자는 MHC 클래스 I 분자, BTLA 및 톨 리간드 수용체를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.
- [0846] 본원에 사용된 "공동-자극성 신호"는 1 차 신호, 예컨대 TCR/CD3 결합과 조합하여 T 세포 증식 및/또는 키(key) 분자의 상향 조절 또는 하향 조절을 야기하는 신호를 지칭한다.
- [0847] 본원에 사용된 용어 "세포 외 리간드-결합 도메인"은 리간드에 결합할 수 있는 올리고- 또는 폴리펩티드로 정의된다. 바람직하게는, 도메인은 세포 표면 분자와 상호 작용할 수 있을 것이다. 예를 들어, 세포 외 리간드-결합 도메인은 특정 질환 상태와 관련된 표적 세포에서 세포 표면 마커로서 작용하는 리간드를 인식하도록 선택될 수 있다. 따라서, 리간드로서 작용할 수 있는 세포 표면 마커의 예는 바이러스, 박테리아 및 기생충 감염, 자가 면역 질환 및 암 세포와 관련된 것을 포함한다.
- [0848] 본원에 사용된 용어 "대상체" 또는 "환자"는 비인간 영장류 및 인간, 바람직하게는 인간을 포함하는 동물계의 모든 구성원을 포함한다. 일 실시예에서, 환자는 공격적이거나 불응성이거나 재발성 ALL, 또는 공격적, 불응성, 재발성 CLL을 갖는 환자이다.
- [0849] 포유 동물은 포유 동물 부류의 온혈 척추 동물, 바람직하게는 인간이다.

- [0850] "자살 도메인 또는 스위치" 또는 안전 온-오프 스위치 (on-off-off switch)는 일반적으로 발현 세포를 면역 선택하고 궁극적으로 그들의 기능 및 생존을 제어하기 위해 분자, 단백질, 화학 물질, 항체에 의해 인식되는 세포 표면 도메인을 의미한다.
- [0851] 본 발명의 상기 기술된 설명은 본 기술 분야의 당업자가 동일하게 제조하고 사용할 수 있도록 하는 방법 및 제조 방법을 제공하며, 이 구현은 특히 원래의 설명의 일부를 구성하는 첨부된 청구 범위의 주제에 대해 제공된다. 수치 한계 또는 범위가 본원에 언급된 경우, 엔드포인트(endpoints)가 포함된다. 또한 수치 한계 또는 범위 내의 모든 값과 하위 범위는 명시적으로 작성된 것처럼 구체적으로 포함된다. 상기 설명은 당업자가 본 발명을 제조 및 사용할 수 있도록 제시되며, 특정 응용 및 그 요건의 맥락에서 제공된다. 바람직한 실시 예에 대한 다양한 변형은 당업자에게 명백할 것이며, 여기에 정의된 일반적인 원리는 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않고 다른 실시예 및 응용에 적용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 도시된 실시예들로 제한되는 것이 아니라 본 명세서에 개시된 원리 및 특징과 일치하는 가장 넓은 범위에 따른다.
- [0852] **일반적인 방법**
- [0853] CAR의 선별 및 선택
- [0854] 1 차 T-세포 배양
- [0855] T 세포를 Ficoll 구배 밀도 배지를 사용하여 EFS (Etablissement Français du Sang, Paris, France)에 의해 제공된 버피 코트 샘플로부터 정제하였다. PBMC 층이 회수되었다. T 세포를 비드:세포 비 1:1 (Life Technologies)로 20ng/mL 인간 IL-2, 5 % 인간 및 Dynabeads 인간 T 활성화제 CD3 / CD28이 보충된 X-VivoTM-15 배지 (Lonza)에서 활성화시켰다.
- [0856] CAR mRNA 형질감염
- [0857] 각각의 CAR 구축물을 인코딩하는 CAR mRNAs의 형질감염은 T-세포 정제 및 활성화 후 4 일 또는 11 일에 수행되었다. 세포를 X-VivoTM-15 배지에서 즉시 회석하고 5 % CO<sub>2</sub>와 함께 37 °C에서 배양 하였다. 20ng / mL에서 전기 친공 후 2 시간에 IL-2를 첨가 하였다.
- [0858] T 세포 형질 도입
- [0859] CD22 CAR을 코딩하는 벡터는 전술한 바와 같이 T 세포에 도입된다.
- [0860] T-세포 표면에서의 CAR 검출은 뮤린 IgG1 Fc 단편과 함께 융합된 인간 CD22 단백질의 세포 외 도메인 (전체 단백질, CD22의 디스탈 부분 또는 CD22의 프로시말 부분)으로 구성된 재조합 단백질을 사용하여 수행된다. CAR 분자에 단백질의 결합은 단백질의 마우스 Fc 부분을 표적으로하는 PE-접합된 이차 항체 (Jackson Immunoresearch)에 의해 검출되고, 유세포 분석에 의해 분석된다.
- [0861] 1 차 T 세포에서 특정 유전자(들)의 불활성화
- [0862] 1 차 T 세포에서 특이적 유전자(들)의 불활성화는 바람직하게는 TAL 엔도뉴클레아제, 선택적으로 크리스프 Cas 9 엔도뉴클레아제와 같은 엔도뉴클레아제를 사용하여 세포에 CD22 CAR 도입 후 바람직하게는 CD22 CAR 도입 후 수행될 수 있다. 하나 이상의 유전자가 불활성화되고, 하나, 둘 또는 세 개의 유전자가 한 단계 또는 여러 연속 단계에서 비활성화 될 수있다.; 바람직한 실시예에서, 2 개의 유전자, 바람직하게는 TCR 알파 유전자 및 결실을 일으키는 유전자는 퓨린 뉴클레오티드 유사체, 알렘투주맙, 플라틴(시스플라틴 또는 카르 보플라틴), 항-토포이소머라제 I(이리노테칸), 항-토포이소머라제 II(에토포시드), 메토트렉세이트 (엽산 유사체), 바람직하게는 퓨린 뉴클레오티드 유사체, 알렘투주맙으로부터 선택된다.
- [0863] 일반적으로, 이중이량체 뉴클레아제, 특히 표적 유전자 내에서 스페이서에 의해 분리된 2 개의 긴 서열(하프 표적이라고 함)을 표적화하는 TALE-뉴클레아제가 설계되고 생산된다.
- [0864] 각각의 TALE-뉴클레아제 구조는 적절한 포유 동물 발현 벡터에서 클로닝될 수 있다. 표적화 된 게놈 서열을 절단하는 TALE-뉴클레아제를 코딩하는 mRNA는 프로모터 다운스트림의 코딩 서열을 운반하는 플라스미드로부터 합성될 수 있다. 항-CD3/CD28 코팅된 비드로 사전 활성화되며 정제된 T 세포를 사용하고, 반 TALE-뉴클레아제를 암호화하는 2 개의 mRNA 각각으로 형질 감염시켰다. 세포는 가용성 항-CD28로 재 활성화되어 다양한 시간 동안 세포 증식을 측정하고, 활성화 마커 CD25는 세포의 활성화 상태를 평가하기 위해 검출될 수 있다.
- [0865] 탈과립 분석 (CD107a 동원)



- [0866] 세포는 다양한 수준의 표적화된 단백질(CD22)을 발현하는 동일한 양의 세포와 함께 96-웰 플레이트에서 배양되었다. 공동 배양 물을 5 % CO<sub>2</sub>와 함께 37 °C에서 6 시간 동안 유지시켰다. CD107a 염색은 대조군으로서 항-CD49d, 항-CD28 및 1x 모넨신 용액과 함께 공동 배양 초기에 형광 항-CD107a 항체를 첨가함으로써 세포 자극 동안 수행되었다. 6 시간 인큐베이션 기간 후, 세포를 고정성 생존력 염료 및 플루오로 크롬-접합 된 항-CD8로 염색하고 유세포 분석에 의해 분석하였다. 탈과립화 활성은 CD8 + / CD107a + 세포의 %로서, 그리고 CD8 + 세포 중에서 CD107a 염색에 대한 평균 형광 강도 신호 (MFI)를 결정함으로써 결정되었다. 탈과립 분석은 mRNA 형질 감염 후 24 시간에 수행되었다.
- [0867] IFN 감마 방출 분석
- [0868] mRNA 형질 감염 24 시간 후, CD22 CAR 발현 T-세포를 37 °C에서 24 시간 동안 다양한 수준의 표적화 된 단백질을 발현하는 세포주와 함께 인큐베이션 하였다. 상청액을(supernatants) 회수하고 세포 배양 상청액에서 IFN 감마 검출을 ELISA 분석에 의해 수행 하였다.
- [0869] 세포 독성 분석
- [0870] 세포를 표적 세포 (다른 수준의 CD22를 발현) 또는 (음성 대조군) 세포와 함께 인큐베이션하였다. CAR + T-세포와 공동 배양하기 전에, 표적 및 대조군 세포를 형광 세포 내 염료 (CFSE 또는 Cell Trace Violet)로 표지하였다. 공동 배양 물을 37 °C에서 4 시간 동안 인큐베이션 하였다. 인큐베이션 기간 후, 세포를 고정성 생존력 염료로 표지하고 유세포 분석법으로 분석 하였다. 각각의 세포 집단 (표적 세포 또는 음성 대조군 세포)의 생존력을 측정하고 특이 적 세포 용해의 %를 계산 하였다. 세포 독성 분석은 mRNA 형질 감염 후 48 시간에 수행되었다.
- [0871] 항-종양 마우스 모델
- [0872] 면역 결핍 마우스는 종양 세포 (환자로부터 CD22 BALL) 또는 측면에-루시 페라 제 세포를 발현하는 표적화된 단백질을 이식된다. 이어서, 세포를 마우스 뇌에 이식하였다. 추가 세대의 마우스로의 직렬 이식은 생체내 이종 이식 세포주의 유지를 계속한다. 선택적으로, 마우스는 CAR + T-세포 (알렘투주맙 및/또는 독감) 주사 전/또는 함께 항암 치료를 받았다. 이어서, 시험 될 상이한 용량의 CAR + T-세포 또는 CD22CAR을 발현하지 않는 T-세포로 마우스에 (종양 세포주 주사 후 2 일 또는 7 일) 주사하였다. 생물 발광 신호는 상이한 동물에서 종양 진행을 따르기 위해 T-세포 주사 후 D-세포 주사 (D0), T-세포 주사 후 D7, 14, 21, 28 및 40에서 결정된다.
- [0873] 재발성 또는 불응성 또는 MRD + CD22 + B-세포 급성 림프 모구 백혈병(B-ALL) 환자에서 동종 이계 CD22 CART (UCART22)의 안전성, 확장 및 지속성을 평가하기 위한 1 상 용량-증가 연구(Phase I dose-escalation study)
- [0874] 배경 및 해석
- [0875] 현재의 다수-약 화학 요법으로, 어린 시절 급성 림프 모구 백혈병 (ALL)의 80 % 이상과 성인 ALL의 약 40 %에서 장기 생존이 관찰된다. (1) 화학 요법의 추가 강화는 효과적이지 않은 것으로 입증되었다. (2) 지난 몇 년 동안 ALL의 생물학에 대한 우리의 이해가 크게 향상되어 '표적 치료'에 대한 기회가 제공되었다.(3, 4).
- [0876] 재발 / 불응 성 ALL은 여전히 \*?\*어려운 질병이다. 재발 후 요법은 5 년만 OS가 약 10 % 인 환자의 30-40 %에서 두 번째 CR (CR2)로 이어질 것이다. Fielding과 동료들은 현재까지 재발 된 성인 ALL 환자의 가장 큰 보고서에서 MRC UKALLXII / ECOG E2993 시험에서 치료받은 재발된 성인 ALL 환자의 결과를 분석했다. (5) 1508 명의 평가 가능한 환자 중 1372 (91 %)가 CR1을 달성했으며 그 중 609 명 (CR1 환자의 44 %)이 11 개월의 중앙값에서 재발했다. 재발 환자의 5 년 OS는 7 %에 불과했다. 재발 환자의 평균 OS는 5.5 개월이었다. Tavernier와 동료들은 프랑스 LALA-94 시험에서 처음 재발을 경험 한 421 명의 모든 환자의 결과를 보고했다. (6) 평균 DFS 5.2 개월 및 OS 평균 6.3 개월인 44 % 환자에서 CR2가 달성되었다. Oriol과 동료들은 4 회 연속 PETHEMA 시험으로 치료 한 최초 재발 환자 263 명의 결과를 보고했다. (7) CR2는 프랑스 LALA 시험과 비슷한 비율로 환자의 45 %에서 달성되었다. 재발 후 평균 OS는 4.5 개월이었고 5 년 OS는 10 %였다. CD22 발현은 ALL 환자의> 90 %에서 발생하며, 유효한 치료 표적이다. 키메라 항원 수용체 (CAR) T 세포 요법과 같은 세포 요법은 혈액 악성 종양 환자를 치료하는데 점점 더 많이 사용되고 있다. (8-16) 재발성 급성 림프 모구 백혈병(ALL)이 재발된 환자에서, 자가 CD19-CART 세포에 대해 매우 높은 완전 반응률(80-90 %)이 보고되었다. (12) 유사하게, 자가 CD19 CART 치료를 받는 재발성 만성 림프 구성 백혈병 (CLL) 환자에서 40-50 %의 반응률이 보인다.(9)
- [0877] 본 연구는 재발성 및/또는 불응성 CD22 B-ALL 환자에서 CD22로 향하는 동종 이계 CART 세포를 평가한다.

- [0878] 목표
- [0879] 주요 목표
- [0880] 동종 이계 CD22 CART의 안전성 및 내약성을 평가하고 최대 내약 용량 (MTD)을 결정하기 위한
- [0881] 이차 목표
- [0882] 동종 이계 CD22 CART의 효능을 확인
- [0883] GVHD의 발생률을 확인
- [0884] 탐색 목표
- [0885] 주입된 CART 세포의 확장, 표현형, 트래피킹 및 지속성을 결정하기 위한
- [0886] 포함 기준
- [0887] 1. 재발성 또는 불응성 CD22-양성 ALL (확장기 : MRD + 질환 환자 허용)
- [0888] 2. 2 세 이상의 환자
- [0889] 3. ECOG 성능 상태  $\leq 2$
- [0890] 4. 빌리루빈  $\leq 2$  mg/dl, ALT/AST $<3$ x ULN 및 크레아티닌 $\leq 2$  mg/dl을 포함한 정상 장기 기능
- [0891] 5. 좌심실 배출 분획 (LVEF)  $\geq 40$  %
- [0892] 제외 기준
- [0893] 1. 환자가 임신 또는 모유 수유 중
- [0894] 2. 통제되지 않은 활성 감염 환자
- [0895] 3. 격리 된 골수 외 재발 (예: 고환, CNS)
- [0896] 4. 알려진 활성 CNS 백혈병. 참고: 효과적으로 치료 된 CNS 질환 병력이있는 환자는 등록 4 주 전에 CNS 완화 상태에있는 경우 자격이 있음.
- [0897] 5. B 형 간염 또는 C 형 간염
- [0898] 6. HIV 감염
- [0899] 7. 전신 스테로이드 요법이 필요한 활성 GVHD. 생리학 적 대체를 위한 스테로이드 요법이 허용된다.
- [0900] 8. CD22 CART 주입 후 4 주 이내에 DLI를 받음.
- [0901] 9. CD22 카트 주입 후 60 일 이내에 Allo-SCT.
- [0902] 연구 설명
- [0903] 이것은 단계 I 연구이다. 이 평가에는 2 단계가 있다. 복용량 증가 및 복용량 확장.
- [0904] 환자는 림프구 고갈 화학 요법을 받은 후 CD22 동종 이형 CART를 받는다.
- [0905] 복용량 증가: 표준 3x3 디자인에서 4 가지 복용량 수준을 연구한다. 총 9-18 명의 환자가 등록된다.

용량 수준 <sup>a</sup>	UCART22 세포/kg <sup>b</sup>
-1 <sup>c</sup>	$1 \times 10^4$ <sup>c</sup>
1 (시작 용량) <sup>c</sup>	$1 \times 10^5$ <sup>c</sup>
2 <sup>c</sup>	$1 \times 10^6$ <sup>c</sup>
3 <sup>c</sup>	$5 \times 10^6$ <sup>c</sup>

- [0906]
- [0907] R2PD 수준이 확인되면 용량-확장이 시작된다.
- [0908] 총 20 명의 환자가 등록되었다(10 R/R ALL; 10 MRD + SCT 이후).



[0909] 총 샘플 크기: 29-38 명의 환자

복용량 수준에서 DLT를 가진 환자의 수 <sup>a</sup>	결정 <sup>a</sup>
3 중 0 <sup>a</sup>	3 명의 후속 환자에서 이관하고 평가한다. <sup>a</sup>
3 중 1 <sup>a</sup>	이 복용량 수준에서 3 명의 추가 대상을 등록한다. <sup>a</sup>
3 중 $\geq 2$ <sup>a</sup>	MTD가 초과되었다. 용량 상승이 중단되고 이 수준은 최대 투여량으로 선언된다. 이전에 해당 용량으로 3 명만 치료한 경우 이전 용량 수준에서 3 명의 추가 환자를 평가한다. <sup>a</sup>
6 중 1 <sup>a</sup>	3 명의 후속 환자에서 용량을 증가시키고 평가한다. <sup>a</sup>
최대 투여량 미만의 최고 복용량에서 6 중 $\leq 1$ <sup>a</sup>	이것은 MTD 이다. <sup>a</sup>
6 중 $\geq 2$ <sup>a</sup>	MTD가 초과되었다. 용량 상승이 중단되고 이 수준은 최대 투여량으로 선언된다. 이전에 해당 용량으로 3 명만 치료한 경우 이전 용량 수준에서 3 명의 추가 환자를 평가한다. <sup>a</sup>

[0910]

[0911] 두 번째 연구는 CD19 + CD22 + B-ALL 환자에서 CD22로 유도된 동종 이계 CART 세포와 CD22 및 CD19로 유도된 동종 이계 CART 세포를 비교한다(2 가지 형태).

[0912] 목표

[0913] 주요 목표

[0914] 동종 이계 CD19 + CD22 CART의 안전성 및 내약성을 평가하고 최대 내약 용량 (MTD)을 결정하기 위함

[0915] 이차 목표

[0916] 동종 이계 CD22 CART의 효능을 확인

[0917] GVHD의 발생률을 확인

[0918] 탐색 목표

[0919] 주입 된 CART 세포의 확장, 표현형, 트래피킹 및 지속성을 결정하기 위함

[0920] 포함 기준

[0921] 1. 재발성 또는 불응성 CD22-양성 ALL (확장기 : MRD + 질환 환자 허용)

[0922] 2. 2 세 이상의 환자

[0923] 3. ECOG 성능 상태  $\leq 2$

[0924] 4. 빌리루빈  $\leq 2$  mg / dL, ALT/AST  $< 3 \times$  ULN 및 크레아티닌  $\leq 2$  mg / dL을 포함한 정상 장기 기능

[0925] 5. 좌심실 배출 분획 (LVEF)  $\geq 40$  %

[0926] 제외 기준

[0927] 1. 환자가 임신 또는 모유 수유 중

[0928] 2. 통제되지 않은 활성 감염 환자

[0929] 3. 격리 된 골수 외 재발 (예: 고환, CNS)

[0930] 4. 알려진 활성 CNS 백혈병. 참고: 효과적으로 치료 된 CNS 질환 병력이있는 환자는 등록 4 주 전에 CNS 완화 상태에있는 경우 자격이 있음.

[0931] 5. B 형 간염 또는 C 형 간염

[0932] 6. HIV 감염

[0933] 7. 전신 스테로이드 요법이 필요한 활성 GVHD. 생리 학적 대체를위한 스테로이드 요법이 허용됨.

[0934] 8. CD22 CART 주입 후 4 주 이내에 DLI를 받았음.

[0935] 9. CD22 카트 주입 후 60 일 이내에 Allo-SCT

[0936] 연구 설명

[0937] 이것은 단계 I 연구이다. 이 평가에는 2 단계가 있다. 복용량 증가 및 복용량 확장.

[0938] 환자는 림프구 고갈 화학 요법을 받은 후 CD22 동종 이형 CART를 받는다.

[0939] 복용량 증가: 표준 3x3 디자인에서 4 가지 복용량 수준을 연구한다. 총 9-18 명의 환자가 등록된다.

용량 수준 <sup>a</sup>	UCART22 세포/kg <sup>b</sup>
-1 <sup>c</sup>	1 x 10 <sup>4</sup> <sup>c</sup>
1 (시작 용량) <sup>c</sup>	1 x 10 <sup>5</sup> <sup>c</sup>
2 <sup>c</sup>	1 x 10 <sup>6</sup> <sup>c</sup>
3 <sup>c</sup>	5 x 10 <sup>6</sup> <sup>c</sup>

[0940]

[0941] R2PD 수준이 확인되면 용량 확장이 시작된다.

[0942] 총 20 명의 환자가 등록되었다(10 R/R ALL; 10 MRD + SCT 이후).

[0943] 총 샘플 크기: 29-38 명의 환자

복용량 수준에서 DLT를 가진 환자의 수 <sup>a</sup>	결정 <sup>a</sup>
3 중 0 <sup>c</sup>	3 명의 후속 환자에서 이관하고 평가한다. <sup>c</sup>
3 중 1 <sup>c</sup>	이 복용량 수준에서 3 명의 추가 대상을 등록한다. <sup>c</sup>
3 중 >=2 <sup>c</sup>	MTD가 초과되었다. 용량 상승이 중단되고 이 수준은 최대 투여량으로 선언된다. 이전에 해당 용량으로 3 명만 치료한 경우 이전 용량 수준에서 3 명의 추가 환자를 평가한다. <sup>c</sup>
6 중 1 <sup>c</sup>	3 명의 후속 환자에서 용량을 증가시키고 평가한다. <sup>c</sup>
최대 투여량 미만의 최고 복용량에서 6 중 </ = 1 <sup>c</sup>	이것은 MTD 이다. <sup>c</sup>
6 중 >=2 <sup>c</sup>	MTD가 초과되었다. 용량 상승이 중단되고 이 수준은 최대 투여량으로 선언된다. 이전에 해당 용량으로 3 명만 치료한 경우 이전 용량 수준에서 3 명의 추가 환자를 평가한다. <sup>c</sup>

[0944]

[0945] 참조

[0946] 1. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. Lancet. 2013;381(9881):1943-55.

[0947] 2. Faderl S, Thomas DA, O'Brien S, Ravandi F, Garcia-Manero G, Borthakur G, et al. Augmented hyper-CVAD based on dose-intensified vincristine, dexamethasone, and asparaginase in adult acute lymphoblastic leukemia salvage therapy. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2011;11(1):54-9.

[0948] 3. Mullighan CG. Genome sequencing of lymphoid malignancies. Blood. 2013;122(24):3899-907.

[0949] 4. Mullighan CG. Genomic characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia. Semin Hematol. 2013;50(4):314-24.

[0950] 5. Fielding AK, Richards SM, Chopra R, Lazarus HM, Litzow MR, Buck G, et al. Outcome of 609 adults after relapse of acute lymphoblastic leukemia (ALL); an MRC UKALL12/ECOG 2993 study. Blood. 2007;109(3):944-50.

[0951] 6. Tavernier E, Boiron JM, Huguot F, Bradstock K, Vey N, Kovacsics T, et al. Outcome of

treatment after first relapse in adults with acute lymphoblastic leukemia initially treated by the LALA-94 trial. Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K. 2007;21(9):1907-14.

- [0952] 7. Oriol A, Vives S, Hernandez-Rivas JM, Tormo M, Heras I, Rivas C, et al. Outcome after relapse of acute lymphoblastic leukemia in adult patients included in four consecutive risk-adapted trials by the PETHEMA Study Group. Haematologica. 2010;95(4):589-96.
- [0953] 8. Kochenderfer JN, Wilson WH, Janik JE, Dudley ME, Stetler-Stevenson M, Feldman SA, et al. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. Blood. 2010;116(20):4099-102.
- [0954] 9. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. N Engl J Med. 2011;365(8):725-33.
- [0955] 10. Brentjens RJ, Davila ML, Riviere I, Park J, Wang X, Cowell LG, et al. CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia. Sci Transl Med. 2013;5(177):177ra38.
- [0956] 11. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. N Engl J Med. 2013;368(16):1509-18.
- [0957] 12. Maude SL, Teachey DT, Porter DL, Grupp SA. CD19-targeted chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2015;125(26):4017-23.
- [0958] 13. Park JH, Geyer MB, Brentjens RJ. CD19-targeted CAR T-cell therapeutics for hematologic malignancies: interpreting clinical outcomes to date. Blood. 2016;127(26):3312-20.
- [0959] 14. Lee DW, Kochenderfer JN, Stetler-Stevenson M, Cui YK, Delbrook C, Feldman SA, et al. T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. Lancet. 2015;385(9967):517-28.
- [0960] 15. Kochenderfer JN, Dudley ME, Kassim SH, Somerville RP, Carpenter RO, Stetler-Stevenson M, et al. Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor. J Clin Oncol. 2015;33(6):540-9.
- [0961] 16. Kebriaei P, Singh H, Huls MH, Figliola MJ, Bassett R, Olivares S, et al. Phase I trials using Sleeping Beauty to generate CD19-specific CAR T cells. J Clin Invest. 2016;126(9):3363-76.
- [0962] 실시예
- [0963] 실시예 1: CD22-CAR을 발현하는 TCR 알파 불활성화 된 세포의 증식.
- [0964] T-세포 수용체 알파 불변 체인 영역 (TRAC) 유전자 내에서 15-bp 스페이서에 의해 분리된 2 개의 17-bp 긴 서열 (하프 표적이라고 함)을 표적으로 하는 이중인량체 TALE-뉴클레아제를 설계하고 생산한다. 각 절반 표적은 표 6에 열거된 절반 TALE-뉴클레아제의 반복에 의해 인식된다.

## 표 6

[0965] TCRalpha 유전자를 표적으로하는 TALE-뉴클레아제

표적	표적 서열	반복 서열	절반 TALE-뉴클레아제
TRAC_T01	TTGTCCACAGATATCC	반복 TRAC_T01-L	TRAC_T01-L TALEN (서열번호 16)
	Agaaccctgaccctg CCGTGTACCAGCTGAGA (서열번호 18)	반복 TRAC_T01-R	TRAC_T01-R TALEN (서열번호 17)

[0966] 각각의 TALE-뉴클레아제 구조는 T7 프로모터의 제어하에 포유 동물 발현 벡터에서 제한 효소 소화를 사용하여 서브 클로닝되었다. TALE-뉴클레아제 절단 TRAC 게놈 서열을 코딩하는 mRNA를 T7 프로모터로부터 다운스트림에

코딩 서열을 운반하는 플라스미드로부터 합성하였다.

- [0967] 항-CD3/CD28 코팅된 비드로 72 시간 동안 사전 활성화되며 정제된 T 세포를 절반의 TRAC\_T01 TALE-뉴클레아제를 암호화하는 2 개의 mRNAs 각각으로 형질 감염시켰다. 형질 감염 48 시간 후, 동일한 공여자로부터의 상이한 T 세포 그룹을 각각 본 발명의 CD22 CAR 중 하나를 코딩하는 벡터로 형질 도입하였다. 형질 도입 2 일 후, CD3NEG 세포를 항-CD3 자성 비드를 사용하여 정제하고, 형질 도입 5 일 후 세포를 가용성 항-CD28 (5 $\mu$ g / ml)로 재 활성화시켰다.
- [0968] 세포 증식은 재 활성화 후 최대 30 일 동안 일주일에 2 번 세포를 세어 추적 하였다. CD22 CAR을 발현하는 TCR 알파 불활성화 된 세포에서의 증식은 불 활성화되지 않은 세포의 것과 유사하고 특히 항-CD28로 재 활성화될 때 증가 하였다.
- [0969] **TALEN mRNA의 다중 형질 감염**
- [0970] TRAC TALEN을 암호화하는 mRNA (왼쪽 및 오른쪽) 및 B2M 유전자에 특이적인 TALEN 쌍을 암호화하는 mRNA를 활성화 된 T 세포에서 형질 감염시킨 후, CD22에 특이적인 CAR 또는 CD19에 특이적인 CAR을 암호화하는 외인성 폴리 뉴클레오티드로 형질 도입하였다.
- [0971] 이중 KO TRAC 및 B2M 또는 CD56 유전자는 검출할 수 없는 수준의 TCR 및 MHC I 또는 TCR 및 CD56을 발현하였다. 정제 후, 세포를 다시 형질 도입시켰다.
- [0972] **실시예 2: CD22 CAR-T**
- [0973] 내화성, 재발성 또는 공격적인 ALL 또는 CLL의 치료를위한 CD22를 표적으로하는 조작된 CAR T-세포의 개발.
- [0974] **CD22 CARs: (그림 2)**
- [0975] CD22에 대한 친화성이 감소하고 선택성이 높은 m971 및 m971 변형으로 구성
- [0976] CD22 CAR은 상이한 scfv를 사용하여 설계되고 제조되었다. m971 scfv는 971 항체에서 파생된다. (Haso W<sup>1</sup>, Lee DW, Shah NN, Stetler-Stevenson M, Yuan CM, Pastan IH, Dimitrov DS, Morgan RA, FitzGerald DJ, Barrett DM, Wayne AS, Mackall CL, Orentas RJ. Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2013 Feb 14;121(7):1165-74. doi: 10.1182/blood-2012-06-438002. Epub 2012 Dec 14)
- [0977] CARs 아키텍처 (도 2)는 41BB 공동 자극 도메인, CD3 $\zeta$  활성화 도메인, CD8 $\alpha$  막관통 도메인 및 힌지, CD8 $\alpha$  힌지 (서열번호 15)로 구성되었다. Fc $\eta$ R1II $\alpha$ - 힌지를 포함하는 구조는 (서열번호 14)에 상응한다.
- [0978] 설계된 CAR의 안정적인 발현 및 스크리닝을 위해 구조를 벡터에 삽입하였다.
- [0979] CD22 CAR은 m971-V3 CAR (서열번호 22)이고; 및 서열 번호 24.
- [0980] 서열은 또한 CD22 결합 및 ALL 및 CLL의 처리, 바람직하게는 내화성 재발 및 공격적인 형태에 대해 최적화될 수 있다.
- [0981] CAR 표현
- [0982] CD22 CARs을 항-CD3CD28 코팅된 비드 및 IL-2에 의해 활성화한 후 5 일에 일차 KO TCR T 세포에 도입하였다. CAR 발현은 유세포 분석에 의해 평가되었다. 모든 CAR은 세포 표면에서 발현되었다. CD22 + 형질 전환 세포주에 대한 활성 및 환자로부터의 불응성 또는 재발성 CD22 + B ALL.
- [0983] 항-CD22 CAR의 기능성을 시험하기 위해, CD22를 발현하는 B 세포(모든 라인 REH, SEM, NALM6-GL, KOPN8, Daudi, Raji 및 K562)를 사용하였다 (see Haso et al., 2013, 2013; Blood: 121 (7) : 1165 - 1174 for experimental details). 내화성 또는 재발성 CD22 + B ALL은 환자로부터 수득되었다.
- [0984] 예상한 바와 같이, CD22 CAR (HA22의 scfv2)과 같이, CD22를 발현하는 모든 세포는 본 발명의 m971로부터의 CD22 CAR에 의해 양성적으로 염색되고 표적화되었다.
- [0985] **탈과립 분석**
- [0986] CD22 CAR 구조를 확인하기 위해 본 발명의 CD22 CAR을 발현하는 T 세포를 사용하여 표적 세포에서 탈과립 분석을 수행하였다. CART 탈과립화는 유세포 분석에 의해 평가되었다. 관독은 표적 세포와 5 시간 배양 후 T 세포

원형질막에서 CD107a 발현이다. 결과는 탈과립화가 CD22 (서열번호 20) scfv-2의 디스탈 부분에 대한 CD22 CAR T 세포보다 CARm971-(scfv-1)로부터 더 중요하다는 것을 보여 주었다(도 5).

[0987] **세포 독성 분석**

[0988] 본 발명의 CD22 CAR을 발현하는 T 세포를 사용하여 이들 동일한 표적 세포에 대해 세포 독성 분석을 수행하였다. CD22 CAR은 CD22의 디스탈 부분에 대해 scfv를 발현하는 세포(scfv2)와 비교하여 본 발명의 UCART22의 CD22 세포의 강한 특이적 용해를 나타냈다(도 6).

[0989] **인터페론 감마 분석**

[0990] 존재하지 않는 CD22 (scfv-V2) 세포의 디스탈 부분을 표적으로 하는 CAR로 형질 도입된 비 형질 도입된(NT) 또는 T 세포의 것과 비교하여 UCART22 (CD22의 디스탈 도메인에 대한 scfv-V1)의 인터페론 감마 생성 CD22 음성 SUP-T1 세포와 비교한 CD22 양성 NALM-16 세포(도 7).

[0991] **생쥐 생존**

[0992] 마우스 생존은 대조군 세포와 비교하여 UCART22 (CD22의 디스탈 도메인에 대한 scfv-V1) 또는 CART22 (TRAC 비 활성화 없음)에서 개선되었다(도 8).

[0993] **저산소증 및/또는 약물에 대한 내성**

[0994] 본 발명의 조작된 세포 UCART22는 알렘투주맙 (50 마이크로 그램/mL) 또는 PNA (flu)의 존재하에서 약물의 첨가 후 48 시간 후에 사망한 조작되지 않은 세포 민감성 세포와 비교하여 크게 영향을 받지 않았으며(생존 및 CTL 활성화) 세포 배양 물에 약물을 첨가한 후 또는 저산소증 하에서 배양 조건에 따라 (48 % 미만, 바람직하게는 1 % 미만의 O2) 48 시간에 사망하였다.

[0995] 낮은 O2 조건 (<5 % 또는 <1 %)에서 수행된 테스트에서도 유사한 결과가 나타 났으며, HIF-1a 발현이 증가한 UCART22는 생존할 수 있고 CD22 CAR을 발현하며 저산소증에서 활성화 될 수 있음을 확인했다.

[0996] 약물에 대한 UCART22의 내성을 확인하는 캄파스(50 마이크로 그램 / mL)로 처리 된 마우스에서 유사한 결과 (생존, CTL 활성화)를 얻었다.

[0997] 본 발명의 UCART22 세포가 조직에 증착된 암 세포에 도달하거나 또는 생체 내 클러스터를 만드는 암 세포에 도달할 가능성은 UCART22 로의 치료가 "회복"또는 "탈출"하는 O2에 대해 비 내성 UCART22로 처리 된 마우스에서보다 양이 훨씬 적었기 때문에 제안되었다(약 15 % 감소). 따라서 액체 종양에 의해 생성된 국소 저산소증은 면역 세포가 그들과 싸우는 것을 막을 수 있다.

[0998] 원하는 경우 그리고 필요할 때 UCART22 세포를 제거할 수 있는지 여부를 결정하기위한 실험을 수행했다(그림 3 및 4). 마우스에서, 리툽시맙은 세포 단독과 비교하여 리툽시맙 및 UCART로 처리 된 마우스에서 종양 세포의 형광 강도의 증가에 의해 제안된 바와 같이 UCART의 현저한 감소를 유도하였다.

[0999] 얻은 임상 첫 데이터는 UCAR T 세포가 생체 내 및 시험관 내에서 재발 및 불응성 ALL을 유의하게 감소시키며, 조절되지 않은 사이토카인 스톱이 없거나 매우 경미한 (1 등급) GVHD와는 경미함을 보여준다.

[1000] 이러한 치료는 자가 CD22 CAR T보다 덜 "독성"이어야하고, 리툽시맙 및/또는 QBEN10을 사용하는 환자에서 조절될 수 있다.

[1001] 세포는 인간에서 (한 달 이상) 활동할 정도로 오래 지속되며 QBEN10을 사용하여 고갈될 수 있다.

[1002] **제조된 CD22 CAR 폴리펩티드 서열의 예**

[1003] 프레임된 서열은 바람직한 VH 및 VL 서열에 상응한다. VH 및 VL은 위에서 설명한 바와 같이 CAR 효율을 향상시키기 위해 교환(핫스팟에서의 수정)될 수 있다.

[1004] v1-m972 (Fc ηRIII α-CD8 α TM-41BB.IC-CD3 ξ .IC)(본 발명의 일부가 아닌 제어)

[1005] MALPVTALLPLALLLHAARP--  
EVQLVQSGGGVVRPGGSLRLPCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYHCARGGDD  
AFDIWGQGTMTVSS-----GGGSGGGSGGGGS--  
RIVMTQSPGTLSPVSGTATLSCRASQSFNSMLAWYQQKSGQPRLLIYGVSTRAAGVPARFSGSGSGTEFTLTISNLQSEDFAVYYCQQYGDWPRTYTFQGQ  
TKVERK

-

GLAVSTISSFFPPGYQIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQL  
YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[1006] V3-m972 (CD8 α-CD8 α TM-41BB, IC-CD3 ζ . IC) (본 발명의 일부가 아닌 제어)

[1007] MALPVTALLPLALLLHAARP--  
EVQLVQSGGQVVRPGGSLRLPCAASGFTDDYGMWVRQAPGKLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNLSRAEDTALYHCARGGDD  
AFDIWGQGTMTVTVSS—GGGSGGGSGGGGS—RIVMTQSPGTLVSPGETATLSCRASQSFNMLAWYQQKSGQPRLIYGVSTRAAGVPARFSGSGSG  
TEFTLTISNLSQSEDFAVYYCQYGDWPRYTFGQGTKVERK—TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLL  
LSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRR  
KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[1008] v1-m971 (Fc ηRIII α-CD8 α TM-41BB, IC-CD3 ζ . IC)

[1009] MALPVTALLPLALLLHAARP--  
QVQLQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARE  
VTGDLEDAFDIWGQGTMTVTVSS—GGGSGGGSGGGGS—  
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQTIWSYLNWYQRPKGAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQAEDFATYYCQSYSIPQTFGQGT  
KLEIK

-

GLAVSTISSFFPPGYQIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQL  
YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[1010] v3-m971 (CD8 α-CD8 α TM-41BB, IC-CD3 ζ . IC)

[1011] MALPVTALLPLALLLHAARP--  
QVQLQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARE  
VTGDLEDAFDIWGQGTMTVTVSS—GGGSGGGSGGGGS—DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQTIWSYLNWYQRPKGAPNLLIYAASSLQSGVPSR  
FSGRSGTDFTLTISSLQAEDFATYYCQSYSIPQTFGQGTKLEIK—TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAG  
TCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM  
GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPP

[1012] 결과

[1013] UCART22에서 제조하기 위해 선택된 CAR 구조는 m971 항-인간 CD22 scFv (Hase et al., 2013에 기재됨), CD8 α 힌지 (선택적) 및 막관통 도메인, 및 4-1BB 공동-자극성 도메인 및 CD3 ζ 신호 전달 도메인으로 구성된 세포질 꼬리를 포함한다(도 3).

[1014] 다른 CAR 구조는 연속적으로, m971 항-인간 CD22 scFv 서열, 리투시맵 (CD20)에 대한 2 개의 결합 도메인, CD8 α 힌지 및 막관통 도메인, 및 4-1BB 공동 자극 도메인 및 CD3 ζ 신호 전달 도메인으로 구성된 세포질 꼬리를 포함한다(도 3).

[1015] 대안적인 CAR 구조는 리투시맵(CD20)에 대한 결합 도메인, Q-BEN10 (CD34)에 대한 결합 도메인, m971 항-인간 CD22 scFv, 리투시맵(CD20)에 대한 2 개의 결합 도메인, CD8 α 힌지 및 막 횡단 도메인, 및 4-1BB 공동-자극성 도메인 및 CD3 ζ 신호 전달 도메인으로 구성된 세포질 꼬리를 포함한다(도 3).

[1016] UCART22에서 재조합 3 세대자가 불 활성화 (SIN) 렌티 바이러스 벡터 (rLV)는 인간 EF1 α 프로모터의 제어하에 항 -CD22 CAR 및 RQR8 고갈 메커니즘을 발현하는 T- 세포를 생성하는 데 사용됩니다 (그림 4). HIV로부터 유래 된 재조합 렌티 바이러스 벡터는 유 전적으로 안정적이며, 벡터에 기인 한 병리학 적 결과의 증거를 아직 나타 내지 않았다 (Chang and Sadelain, 2007; Wang et al., 2009).

[1017] 또한, rLV로 T- 세포의 형질 도입 조건은 공지되어 있고 T- 세포의 기능적 특성의 보존과 양립 할 수있다.

[1018] UCART22에서, AAV6 벡터는 TRAC 유전자 (알파 서브 유닛 또는 TCR을 코딩하는 유전자)와 같은 유전자 또는 PCT / EP2017 / 076798에 개시된 임의의 유전자의 유전자 편집 후 사용될 수있다 (도 9).

[1019] 추가 CD19 scfv (CD22 scfv 전 또는 후에)를 포함하는 본 발명의 항-CD22 CAR 구조체(construct)의 변이체들



(Variants)이 또한 제조되었고 다중체인(multichain) CD22 CAR, 다중체인 CD22, CD19 CAR (도 2)가 또한 구축되었고(constructed) 렌티바이러스 벡터아데노(Adeno)-관련(associated) 바이러스 6 (AAV6) 벡터 내로 삽입되었고 이는 하기 서술된 CD19 CAR 구조체들 또는 CD22 CAR 구조체들이 TRAC 유전자 내로 또는 CD25 유전자 내로, 또는 베타 2 마이크로글로불린(microglobulin) 유전자 내로 삽입되는 것을 가능하게 하고 만들어졌고 (CAR 서열이 서열들의 5' 및 3'에 플랭크되었고(flanked) 특이적(specific) TAL-단백질- Fok-1 (TAL-protein-Fok-1) (TALEN)을 이용하여 상기 유전자의 특이적(specific) 절단(cut) 후 TRAC 유전자 내로, CD25 유전자 내로, 또는 베타 2 마이크로글로불린 유전자 내로 상동 재조합을 가능하게 하였다.

[1020] TGFbeta 수용체 KO 유전자, IL-10 수용체 KO 유전자, AHR KO 유전자, PD1 KO 유전자, LAG-3 KO 유전자, TIM-3 KO 유전자, 또는 그것의 조합을 추가로 포함하는 UCART22가 만들어졌다.

[1021] TGFbeta 수용체 KO 유전자, 또는 IL-10 수용체 KO 유전자, 또는 아릴 탄화수소 수용체(aryl hydrocarbon receptor) (AHR) KO 유전자, 또는 PD1 KO 유전자, 또는 LAG-3 KO 유전자, 또는 TIM-3 KO 유전자,를 추가로 포함하는 각각의 UCART22의 예가 만들어졌다.

[1024] CD19 + CD22 + 암 세포를 고갈시키는 효과를 시험하기 위해, "Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. Waseem Qasim, et al., 2017. Science Translational Medicine (2017 년 1 월 25 일)에 전에 서술되었고 CD22 CAR (WO2016120216A1에 기술 된 바와 같이)에 의해 운반되는 것과는 다른 자살 유전자를 추가로 포함하는 항-CD19 구조체(construct)가 또한 제조되었다.

[1025] 본 연구에서는 세포 용해 활성의

[1026] 1) 개별 세포 단독 (5x10<sup>6</sup> 세포 모두)과 비교하여 UCART19 + UCART 22 (2 개의 단일 체인 CAR)의 조합,

[1027] 2) 개별 세포 단독 (5x10<sup>6</sup> 세포 모두)과 비교하여, 이중 특이적 항-CD22-ant-CD19 CAR (이중 특이적 단일 체인 CAR)을 발현하는 TCR-음성 세포,

[1028] 3) 또는 CD22 및 CD19 scfvs 또는 CD19 CD22scfvs 둘 다를 포함하는 다중 체인 CAR,

[1029] 개별 세포 단독 (5x10<sup>6</sup> 세포 모두)과 비교하여 측정하였다.

[1030] **리톡시맵/리톡시맵 및 QBEN10에 감수성을 부여하기 위한 RQR8, R2CD22CAR 또는 QR3CD22CAR의 발현**

[1031] CD22CAR의 발현을 유도하는 렌티 바이러스 벡터 카세트(cassette)는 (2A 펩티드 링커를 통해) RQR8을 공동-발현하도록 설계되었다. RQR8은 UCART22의 투여와 관련하여 관리할 수 없는 부작용이 발생할 경우 잠재적으로 활성화 될 수 있는 고갈 리간드이다. RQR8은 QBEN10 항체에 의해 인식되는 인간 CD34 및 인간 CD20으로부터의 항체-결합 에피토프를 조합한 136 개의 아미노산 인공 세포 표면 단백질이다 (Philip et al., 2014). 구조 내에 존재하는 CD20 에피토프는 리톡시맵에 의해 인식되므로, 리톡시맵 및 / 또는 QBEN10의 존재하에 보체-매개 세포 사멸 (CDC) 및 항체-의존성 세포-매개 세포 독성 (ADCC)을 통해 RQR8-발현 세포의 결실을 가능하게 한다.

[1032] 다른 실험에서, 리톡시맵(R)(R2 CD22 CAR : 리톡시맵에 의해 인식되고, scfv 직후 및 힌지 바로 전에 삽입되거나, 또는 힌지 대신에 힌지 대신 전체 세포 외 도메인을 단축시키는 힌지 대신에 2 개의 에피토프) 또는 "QR3"QR3 CD22 CAR에(Q : VH-링커-VL RR 힌지 TM-41BB-CD3 제타 전에 QBEN 10, Q-R -N 단자에 의해 인식되는 에피토프) 의해 인식된 2 개의 에피토프를 포함하는 항-CD22 CAR에 반응하는 구조를 제조하고 다양한 수준의 CD22를 발현하는 세포에 대해 시험하였다.

[1033] **UCART22의 alloreactivity를 제한하는 TRAC 유전자 녹아웃**

[1034] 동종 이형 입양 면역 요법 접근법의 잠재적 한계는 공여자 세포의 TCR α β 복합체를 통한 공여자와 수용자 사이의 MHC 불일치의 인식은 공여자 T-세포 활성화/증식 및 이식편 대 숙주 질병 (GvHD)의 발달로 이어질 수 있다는 것이다. TCR α β는 α 및 β 서브 유닛으로 구성되며, TCR α는 단일 유전자에 의해 암호화되고 TCR β는 2 개의 상동 유전자에 의해 암호화된다.

[1035] UCART22 세포는 T 세포 수용체 알파 불변 (TRAC) 유전자를 특이적으로 파괴하도록 유전자 변형된다. TRAC 유전자의 불 활성화는 TCR α β 복합체의 세포 표면 발현을 방지하여, GvHD를 초래할 수있는 조직 적합성 항원의 TCR-매개 인식을 제거한다. UCART22 제조 공정의 마지막에, 남아있는 TCR α β + 세포는 고갈되어 최종 제품에서 TCR α β+ 세포의 잔류 수준을 방출 기준에 따라 ≤ 3.0 %로 유지한다.

[1036] **알렘투주맵에 내성을 부여하는 CD52 유전자 녹아웃**

[1037] UCART22는 UCART22 투여 전에 림프구 보충 요법에서 알렘투주맵의 잠재적 사용을 허용하는 CD52- 및 CD52 + 세포의 혼합이되도록 조작되었다. 알렘투주맵은 인간 CD52에 결합하는 모노클로날 항체이다. UCART22의 CD52- 분획은 알렘투주맵에 내성이있다.

[1038] TALEN® 기술은 TRAC 및 CD52 유전자를 모두 파괴하는데 사용된다. UCART22 생산 공정에서, TRAC 및 CD52 TALEN®은 전기 천공 시스템을 사용하여 메신저 리보핵산 (mRNA)으로서 세포에 도입된다. 이러한 일시적인 발현은 TALEN®이 세포에 의해 분해되기 전에 효율적인 표적화 된 유전자 녹아웃을 수행할 수 있게 한다. 이 접근법은 환자에게 주사된 세포에서 뉴클레아제의 장기 발현과 관련된 잠재적 위험을 방지한다.

[1039] UCART22의 **alloreactivity**를 제한하는 B2M 유전자 녹아웃

[1040] TALEN® 기술은 TRAC 및 B2M 유전자를 모두 파괴하는 데 사용된다. UCART22 생산 공정에서, TRAC 및 B2M TALEN®은 전기 천공 시스템을 사용하여 메신저 리보핵산 (mRNA)으로서 세포에 도입된다. 이러한 일시적인 발현은 TALEN®이 세포에 의해 분해되기 전에 효율적인 표적화된 유전자 녹아웃을 수행할 수 있게 한다.

[1041] 실시예

[1042] 비 임상연구 (약리학 및 독성학)에 사용되는 T-세포의 공급원

[1043] 비 임상연구에 사용된 세포 제품에 대한 설명이 표에 요약되어 있다.

[1044] 체외 및 생체 내 전임상 연구에 사용된 조작된 T 세포.

■세포 <sup>4)</sup>	설명 <sup>4)</sup>	프로세스 <sup>4)</sup>	코멘트 <sup>4)</sup>
■NTD T- 세포 <sup>4)</sup>	형질 도입되지 않은 T- 세포 <sup>4)</sup>	-형질 도입되지 않음 <sup>4)</sup> -비 전기천공 <sup>4)</sup>	변형되지 않은 T- 세포 <sup>4)</sup>
■NTD DKO T- 세포 <sup>4)</sup>	형질 도입되지 않은 이중 KO T- 세포 <sup>4)</sup>	- 형질 도입되지 않음 <sup>4)</sup> - TRAC 및 CD52 TALEN® mRNA 전기천공 <sup>4)</sup> - TCRαβ-세포의 정제 <sup>4)</sup>	형질 도입되지 않은 TCRαβ- _CD52- T-세포 <sup>4)</sup>
■NTD DKO T- 세포 <sup>4)</sup>	형질 도입되지 않은 이중 KO T- 세포 <sup>4)</sup>	- 형질 도입되지 않음 <sup>4)</sup> - TRAC 및 B2M TALEN® mRNA 전기천공 <sup>4)</sup> - TCRαβ-세포의 정제 <sup>4)</sup>	형질 도입되지 않은 TCRαβ- _MHCI- T-cells <sup>4)</sup>
■UCART22 세포 <sup>4)</sup>	형질 도입된 이중 KO T- 세포 <sup>4)</sup>	- LV-RQR8-2A-CD22CAR 형질 도입 <sup>4)</sup> - TRAC 및 CD52 TALEN® mRNA 전기천공 <sup>4)</sup> - TCRαβ-세포의 정제 <sup>4)</sup>	CD22CAR 및 RQR8을 인코딩하는 rLV로 형질 도입되고 TCRαβ- 결핍 세포를 위해 정제된 TCRαβ- _CD52- <sup>4)</sup>
■UCART22 세포 <sup>4)</sup>	형질 도입된 이중 KO T- 세포 <sup>4)</sup>	- CD22CAR 형질 도입 <sup>4)</sup> - TRAC 및 b2M TALEN® mRNA 전기천공 <sup>4)</sup> - TCRαβ-세포의 정제 <sup>4)</sup>	CD22CAR (R2)을 인코딩하는 AAV6 또는 CD22 CD19CAR을 인코딩하는 AAV6으로 TCRαβ- _MHCI- 형질 도입되고 TCRαβ- 결핍 세포를 위해 정제됨 <sup>4)</sup>
■UCART22 /19 <sup>4)</sup> 세포 <sup>4)</sup>	형질 도입된 이중 KO T- 세포 <sup>4)</sup>	- CD22CD19CAR 형질도입 <sup>4)</sup> - TRAC 및 b2M TALEN® mRNA 전기천공 <sup>4)</sup> - TCRαβ-세포의 정제 <sup>4)</sup>	CD22CD19CAR 및 RQR8을 인코딩하는 AAV6으로 TCRαβ- _MHCI- 형질 도입되고 TCRαβ- 결핍 세포를 위해 정제됨 <sup>4)</sup>

[1045]

[1046] DKO: 이중 KO, KO : 녹아웃, rLV : 재조합 렌티바이러스 벡터

[1047] MHCI 주요 조직호환성 클래스 I

[1048] B2m 베타 2 마이크로블로블린

[1049] 요약

- [1050] UCART22 활성화는 항-CD22 키메라 항원 수용체 (CD22CAR)와 CD22 항원 사이의 접촉에 의해 구동되어 T-세포 매개 세포 독성 및 잠재적으로 전염증성 사이토카인 생성을 통한 CD22 + B-ALL 세포의 파괴를 초래한다.
- [1051] 다른 UCART 제품 (UCART19 및 UCART123)의 개발 중에 수행된 증명 연구는 UCART 세포(TCR α β-결핍 CAR T-세포)가 비 유전자-편집 CAR T-세포 (TCR α β- 양성 CAR T-세포) 및 NSG 마우스에서 종양 이종 이식편 모델의 체외 및 생체 내 만큼 활성임을 입증했다(Poirot et al., 2015).
- [1052] 이는 TCR α β- 양성 CD22 CAR T-세포와 비교하여 TCR α β-결핍 CD22 CAR T-세포 및 TCR α β-결핍 MHC I-결핍 CD22 CAR T-세포에 대해 확인되었다.
- [1053] UCART22 비 임상 개발 동안 수행된 체외 약리학 연구는 표에 요약되어있다. 연구 결과는 다음과 같다.
- [1054] - CD22 항원 의존적 세포 독성 및 사이토카인 분비 분석을 통한 UCART22의 항 종양 활성. B-ALL 세포주 및 1 차 B-ALL 샘플에 대해 활성 분석을 수행 하였다.
- [1055] - TRAC 및 CD52 유전자의 효율적인 TALEN® 매개 불활성화.
- [1056] - TRAC 및 베타2마이크로글로불린 유전자의 효율적인 TALEN® 매개 불활성화.
- [1057] - CD52- T 세포는 알렘투주맵에 내성이 있다.
- [1058] - 리툭시맵을 이용한 RQR8 + 세포 또는 R2 CD22CAR + 세포의 효율적인 제거.
- [1059] 표 D 시험 생체내 약리학 연구 목록.

연구 <sup>㉔</sup>	방법 <sup>㉔</sup>	세포 <sup>㉔</sup>	GLP <sup>㉔</sup>	결과 <sup>㉔</sup>
일차 약리학 <sup>㉔</sup>				
세포독성 분석 <sup>㉔</sup>	유세포 분석 <sup>㉔</sup>	UCART22 <sup>㉔</sup>	아니 오 <sup>㉔</sup>	CD22+ 세포 (B-ALL 세포주 또는 B-ALL 1차 샘플)를 사용한 세포 독성 분석은 UCART22 세포에 의한 CD22 특이적 세포 사멸을 보여 주었다. <sup>㉔</sup>
		GMP UCART22 <sup>㉔</sup>	예 <sup>㉔</sup>	CD22+ 종양 세포주에 대한 세포 독성 분석은 모든 GMP 배치에서 수행 될 것이다. <sup>㉔</sup>
사이토카인 분비 분석 <sup>㉔</sup>	ELISA/ 유세포 분석 <sup>㉔</sup>	UCART22 <sup>㉔</sup>	아니 오 <sup>㉔</sup>	UCART22 세포는 CD22+ 종양 세포 (B-ALL 세포주 또는 B-ALL 1차 샘플)의 존재 하에서 IFN $\gamma$ 를 특이적으로 분비한다. <sup>㉔</sup>
		GMP UCART22 <sup>㉔</sup>	예 <sup>㉔</sup>	CD22+ 종양 세포주에 대한 사이토카인 분비 분석은 모든 GMP 배치에서 수행 될 것이다. <sup>㉔</sup>
이차 약리학 <sup>㉔</sup>				
TRAC 및 CD52 유전자좌의 분자 불활성화 <sup>㉔</sup>	TRAC 및 CD52 유전자좌의 높은 처리량 서열 <sup>㉔</sup>	TRAC 및 CD52 TALEN <sup>®</sup> 을 암호화하는 mRNA로 형질 감염된 T-세포 (GMP 등급 mRNA) <sup>㉔</sup>	아니 오 <sup>㉔</sup>	TALEN <sup>®</sup> 처리된 T-세포에서 TRAC 및 CD52 유전자좌의 높은 처리량 서열 분석은 TRAC 및 CD52 유전자좌에서 높은 수준의 부위 특이적 변형을 나타냈다. <sup>㉔</sup>
TCR $\alpha\beta$ 의 기능적 불활성화 <sup>㉔</sup>	유세포 분석 <sup>㉔</sup>	UCART22 <sup>㉔</sup>	아니 오 <sup>㉔</sup>	PHA-매개 TCR 자극 후 UCART22에서 CD25 및 CD69 활성화 마커의 상당 조절은 없었다. <sup>㉔</sup>
CD8+ 세포에 대한 내성 <sup>㉔</sup>	세포 동해 분석 <sup>㉔</sup>	B2M+TRAC TALEN <sup>®</sup> 처리 T-세포 <sup>㉔</sup>	아니 오 <sup>㉔</sup>	베타2M 유전자 및 TRAC 불활성화를 함유하는 T-세포는 CD8+ T 세포의 존재 하에서 제거되지 않는다. <sup>㉔</sup>
CD52-세포의 알렘투주맵에 대한 내성 <sup>㉔</sup>	CDC 분석 <sup>㉔</sup>	CD52 TALEN <sup>®</sup> 처리 T-세포 <sup>㉔</sup>	아니 오 <sup>㉔</sup>	CD52 유전자 불활성화를 함유하는 T-세포는 알렘투주맵 및 CDC 분석에서 보체 물 다의 존재 하에서 제거되지 않는다. <sup>㉔</sup>
리툭시맵에 대한 UCART22의 민감도 <sup>㉔</sup>	CDC 분석 <sup>㉔</sup>	UCART22 (개발 배치) <sup>㉔</sup>	아니 오 <sup>㉔</sup>	CDART 분석에서 리툭시맵 및 보체 물 다의 존재 하에 UCART22 세포가 제거된다. <sup>㉔</sup>

- [1060]
- [1061] CDC = 보체-의존적 세포 독성, PHA = 피토헤마글루티닌.
- [1062] 생체 내 약리학 연구 (표에 요약)는 다음을 입증했다.
- [1063] - B-ALL 세포주를 사용하여 면역 결핍 마우스에서 종양 이종 이식편에 대한 생체 내 UCART22의 항 종양 활성. GMP 조건 하에서 제조된 UCART22의 생체 내 활성은 B-ALL 세포주에 대해 확인되었다.
- [1064] -B-ALL 세포주를 사용하여 면역 결핍 마우스에서 종양 이종 이식편에 대한 생체 내 UCART22/19의 개선된 항 종양 활성. B-ALL 세포주에 대한 GMP 조건 하에서 제조된 UCART22/19 및 19/22의 생체 내 활성.
- [1065] -면역 적격 마우스 모델에서 RQR8 + 세포를 제거하는 리툭시맵의 능력.

[1066] 표 E 시험 생체내 연구 목록.

연구 <sup>3)</sup>	세포 <sup>3)</sup>	동물 모델 <sup>3)</sup>	종양 모델 <sup>3)</sup>	GLP 연구 <sup>3)</sup>	결과 <sup>3)</sup>
일차 약리학 <sup>3)</sup>					
UCART22 의 항-종양 활성 <sup>3)</sup>	UCART22 <sup>3)</sup>	NSG 마우스의 종양 이종 이식편 모델 <sup>3)</sup>	B-ALL 세포주 (Daudi) <sup>3)</sup>	아니오 <sup>3)</sup>	B-ALL 세포주에 대한 UCART22의 항 종양 활성을 입증하기 위해 생체 내 연구를 수행 하였다.판독 : <sup>3)</sup> -종양 부담 (생체 발광 영상화에 의한) <sup>3)</sup> -생쥐의 생존 <sup>3)</sup>
	GMP UCART22 <sup>3)</sup> <sup>3)</sup>			GLP- 유사 <sup>3)</sup>	생체 내 활성을 입증하기 위해 GMP UCART22로 확인 연구가 수행되고있다. <sup>3)</sup>
이차 약리학 <sup>3)</sup>					
리튬시말에 대한 RQR8 + 세포의 민감도 <sup>3)</sup>	RQR8-2A- CD19 CAR 구조를 암호화하는 레트로 바이러스로 형질 도입 된 마우스 비장 세포 <sup>3)</sup>	C57BL/6 x <sup>3)</sup> Balb/c (F1) 마우스 <sup>3)</sup>		아니오 <sup>3)</sup>	혈액, 비장, 골수 및 림프절에서 RQR8 + 세포의 효율적인 리튬시말- 유도 고갈을 입증하는 POC 연구. Philip et al., 2014에 발표 된 연구. <sup>3)</sup>

[1067]

[1068] UCART22 세포의 활성을 입증하기 위해, CAR 구동 세포 독성 및 사이토카인 분비 분석을 종양 세포주 및 1 차 B-ALL 세포에 대해 수행하였다.

[1069] 세포 독성 분석으로 UCART22 활성 평가

[1070] B-ALL 세포주에 대한 세포 독성 활성

[1071] UCART22의 잠재적 세포 독성은 어린이 또는 성인 B-ALL 환자로부터 유래된 여러 종양 세포주에 대해 평가되었다 (표 F). 결과는 MHH-CALL-4, MUTZ-5, SEMK2, PALL-2, LAX2, BALL-1, NALM-6 및 RS4; 11은 상이한 수준의 CD22를 발현하는 모든 CD22 + 세포주이다. CD22를 발현하지 않는 2 개의 급성 골수성 백혈병 (AML) 세포주 (OCI-AML2 및 MOLM13)를 음성 대조군으로서 사용하였다.

[1072] 표 F 세포주의 특성.

세포주 <sup>3)</sup>	제공자 <sup>3)</sup>	참조 <sup>3)</sup>	질병 유형 <sup>3)</sup>	CD22 발현 <sup>3)</sup>
BALL-1 <sup>3)</sup>	DSMZ <sup>3)</sup>	ACC 742 <sup>3)</sup>	B-ALL (complex karyotype) <sup>3)</sup>	+ <sup>3)</sup>
LAX2 <sup>3)</sup>	M. Muschen <sup>3)</sup>		B-ALL (Ph-positive) <sup>3)</sup>	+ <sup>3)</sup>
MHH-CALL-4 <sup>3)</sup>	DSMZ <sup>3)</sup>	ACC 337 <sup>3)</sup>	B-ALL (Ph-like) <sup>3)</sup>	+ <sup>3)</sup>
MUTZ-5 <sup>3)</sup>	DSMZ <sup>3)</sup>	ACC 490 <sup>3)</sup>	B-ALL (Ph-like) <sup>3)</sup>	+ <sup>3)</sup>
NALM-6 <sup>3)</sup>	ATCC <sup>3)</sup>	CRL-3273 <sup>3)</sup>	B-ALL (t(5;12)) <sup>3)</sup>	+ <sup>3)</sup>
PALL-2 <sup>3)</sup>	JCRB <sup>3)</sup>	JCRB1345 <sup>3)</sup>	B-ALL (Ph-positive) <sup>3)</sup>	+ <sup>3)</sup>
RS4;11 <sup>3)</sup>	ATCC <sup>3)</sup>	CRL-1873 <sup>3)</sup>	B-ALL (t(4;11) and hyperdiploid) <sup>3)</sup>	+ <sup>3)</sup>
SEMK2 <sup>3)</sup>	DSMZ <sup>3)</sup>	ACC 546 <sup>3)</sup>	B-ALL (t(4;11)) <sup>3)</sup>	+ <sup>3)</sup>
MOLM13 <sup>3)</sup>	DSMZ <sup>3)</sup>	ACC 554 <sup>3)</sup>	AML <sup>3)</sup>	- <sup>3)</sup>
OCI-AML2 <sup>3)</sup>	DSMZ <sup>3)</sup>	ACC 99 <sup>3)</sup>	AML <sup>3)</sup>	- <sup>3)</sup>

[1073]

[1074] CD22 + 세포에 대한 UCART22의 특이적 세포 독성은 UCART22 세포와의 공동 배양 후 CD22 + 표적 세포의 생존력을 측정함으로써 평가된다. 형질 도입되지 않은 (CAR-) TRAC 및 CD52 이중 KO T 세포는 UCART22에 의한 표적 CD22 + B-ALL 세포의 특이적 세포 용해 백분율을 계산하기 위한 대조군으로서 사용된다. 도 1은 CD22 + B-ALL



중양 세포주 패널에 대한 UCART22 세포의 세포 독성 활성을 보여준다. UCART22는 심지어 가장 낮은 수준에서도 CD22를 발현하는 모든 세포주에 대한 특이적 세포 용해 활성을 보여준다.

[1075] 1 차 B-ALL 샘플에 대한 세포 독성 활성

[1076] UCART22의 세포 독성 활성은 몇몇 1 차 B-ALL 샘플에 대해 확인되었다. 1 차 샘플의 특성이 표 G에 제시되어 있다. 50 % 이상의 블라스트를 갖는 환자 샘플만이 공동 배양 연구에 사용되었고, 이는 19 개의 샘플 중 14 개를 설명 하였다.

[1077] 표 G 전임상 연구에서 평가된 모든 1 차 샘플. ND: 미결정

ID	이름	연령/성	세포유전성이상	동연변이	임상상태	% 블라스트	% CD22+ 블라스트
Pt1	PB6265310	24/M	CRLF2+ AND PH+	JAK2R683G, EZH2	진단	84	ND
Pt2	PB6296870	69/F	Ph-like ALL (CRLF2+)	TP53	진단	17	92.3
Pt3	PB3882028	29/M	Ph-like ALL (CRLF2+)	동연변이 없음	재발	32	58.7
Pt4	PB6232236	21/M	Ph-like (IGH-CRLF2)	JAK2R683S	재발	65	94.7
Pt5	PB6304576	68/M	NOT CRLF2+, NOT Ph+	TP53, IDH2	진단	69	25.7
Pt6	PB6352880	81/M	PH+ ALL	동연변이 없음	진단	48	86.5
Pt7	PB6351838	56/F	PH+ ALL	동연변이 없음	진단	68	90.2
Pt9	PB6268010	21/M	NOT CRLF2+, NOT Ph+, trisomy 4	동연변이 없음	진단	60	92.0
Pt10	BM6301348	69/F	Ph-like ALL (CRLF2+)	NRAS, EZH2	재발	93	84.3
Pt11a	PB63013941	55/F	Ph-like ALL (CRLF2+)	동연변이 없음	진단	75	89.7
Pt11b	BM6301394-2	55/F	Ph-like ALL (CRLF2+)	동연변이 없음	진단	91	98.1
Pt12	PB6300308	22/M	PH+ ALL	동연변이 없음	진단	79	47.2
Pt13	PB6124238	33/M	t(4;11)	TP53	재발	59	80.2
Pt14	PB6309102	54/F	PH+ ALL	동연변이 없음	진단	23	83.8
Pt15	PB6269878	68/M	hypodiploid complex cyto	동연변이 없음	진단	67	67
Pt16	PB6229772	70/M	Complex	TP53	재발	51	51
Pt17	BM3748646	39/M	Ph-like	미완료	진단	90	90
Pt18	BM2820966	65/F	Ph-like (IGH-CRLF2)	IKZF1 결실	진단	92	92
Pt19	BM4198594	21/M	Ph-like (IGH-CRLF2+BCR-ABL1)	CRLF2_F232C, ITPKB_P167R, ITPKB_S925G, PTPN11	재발	82.5	82.5

[1078]

[1079] CD22 및 CD19 발현 수준은 또한 Pt1을 제외한 모든 1 차 B-ALL 샘플에서 평가되었다. 도 11은 CD22-컨트롤보다 CD22 표면 발현이 있었고, 4 개의 B-ALL 환자 샘플은 B-ALL 세포주 (> 1000 CD22 분자 / 세포)에서 발견 된 범위에서 CD22 표면 발현을 나타냈다. 고 발현 CD22 (> 60 %)는 또한 2 개의 재발 샘플을 제외하고 CD19를 발현하였다.

[1080] 세포주와 동일한 접근법을 사용하여, 8 개의 B-ALL 환자 샘플 (10 % 초과 특이적 세포 용해)에 대한 CTL 활성이 확인되었다.

[1081] B-ALL 세포주 및 1 차 B-ALL 샘플에 대한 사이토카인 분비 분석

[1082] 몇몇 세포주 또는 B-ALL 환자 샘플과 함께 인큐베이션된 UCART22 세포에 의한 인터페론-감마(IFN $\gamma$ ) 및 다른 사이토카인의 방출을 BioLegend Legend PLEX 13-사이토카인 분석을 사용하여 평가하였다. IFN $\gamma$ 는 B-ALL 세포와 UCART22 또는 대조군 T-세포 (NTD DKO) 사이의 25 시간 공동 배양 후 배지로 분비된 모든 검출된 사이토카인의 (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 및 종양 괴사 인자 알파(TNF- $\alpha$ )) 최고 농도를 갖는 것으로 밝혀졌다.

[1083] UCART22가 B-ALL 세포주 및 1 차 B-ALL 샘플과 함께 인큐베이션될 때 높은 수준의 IFN $\gamma$  분비가 관찰되었다.

[1084] 제외 2 차 연구

[1085] **TRAC, B2M 및 CD52 유전자의 TALEN®에 의한 불활성화**

[1086] 동종 이계 환경에서 UCART22를 사용하는 능력은 TCR  $\alpha\beta$ , MHC CI의 세포 표면 발현을 방지하는 능력에 의존하여, GvHD를 유발하고 숙주 CD8+ 세포에 의해 공격할 수 있는 조직 적합성 항원의 TCR-매개 인식을 제거한다. 세포 표면으로부터 TCR  $\alpha\beta$  및 MHC CI를 효과적으로 제거하기 위해, TALEN®-매개 유전자-편집을 사용하여 TRAC 및 베타2마이크로글로불린 유전자 (B2M) 유전자를 불활성화시켰다. 또한, UCART22의 제조 공정 동안 다른 TALEN®을 사용하여 림프-고갈 조절 요법에서 알렘투주맵을 사용할 수 있게 하는 CD52 유전자를 불활성화시켰다. 특히, TALEN®은 UCART22의 제조 공정 동안 베타 2 마이크로 글로불린 유전자 (B2M)를 불활성화시키고, 주요 조직 적합성 클래스 I (MHC 클래스 I) 분자 발현을 변경시키고 숙주 T 세포에 의한 거부를 방지하기 위해 사용되었다.

[1087] **TRAC, CD52, B2M 유전자 파괴의 분자 분석**

[1088] 분자 수준에서 TRAC 및 CD52 유전자의 표적화된 변형을 입증하기 위해, 게놈 데옥시리보핵산(DNA)을 GMP 등급 TRAC 및 CD52 TALEN® mRNA 또는 TRAC 및 B2M TALEN® mRNA로 전기천공된 T-세포로부터 단리하고 TCR  $\alpha\beta$ -세포 MHCCI-를 위해 정제하였다. TRAC, B2M 및 CD52 TALEN® 절단 부위 주변 영역은 폴리머 라제 연쇄 반응 (PCR)에 의해 증폭되고 차세대 시퀀싱(NGS, Illumina)에 의해 분석되었다. 대조군 샘플에서, TALEN® mRNA의 전기천공 (6 일째) 전에 세포를 제거하여 동일한 분석을 수행 하였다. 이 분석은 6 일차 대조군 세포가 TRAC 및 CD52 유전자좌에서 어떠한 변형도 나타내지 않았지만, TALEN®-처리된 T-세포에서 높은 빈도의 변형이 검출되었음을 나타낸다(표).

[1089] TRAC 및 CD52 및 B2M 유전자좌에서 TALEN® 절단시 비-상동성 말단 결합 (NHEJ)의 표 H 백분율.

[1090] 백분율은 3 가지 상이한 배치로부터의 TALEN®-처리된 T-세포에서 NGS에 의해 결정된다. 모든 배치에 대해 TALEN® mRNA 전기천공 전에 대조군 세포를 샘플링하였다.

[1091] **표 H**

[1092]

	TRAC		CD52		B2M	
	평균	SD	평균	SD	평균	SD
컨트롤	0.09	0.08	0.09	0.07	0.09	0.06
TALEN	84.63	5.65	83.26	4.91	89.0	3.88

[1093] 서열의 추가 분석은 TALEN® 유도 변형이 표적 부위 주변의 작은 영역에 위치하며, 이러한 변형의 93-97 %가 결실인 것으로 나타났다. 이러한 삭제는 일반적으로 작으며 평균적으로 97 %가 150bp보다 작고 81 %가 50bp보다 작다.

[1094] **UCART22에서 TRAC 유전자 파괴를 보여주는 기능 분석**

[1095] TCR  $\alpha\beta$ 의 기능적 불활성화를 입증하기 위해, UCART22 세포를 파이토헤마글루티닌 (PHA)-매개 TCR 자극 후 CD25 및 CD69와 같은 활성화 마커를 발현하는 능력에 대해 분석하였다. 모든 GMP 원료로 수행된 UCART22는 TCR  $\alpha\beta$  + 세포의 고갈 전 (TRAC) 또는 후 (UCART22)에서 T-세포를 회수하였다. 세포를 24 시간 동안 0.5  $\mu$ g/mL PHA로 재 활성화시켰다. 활성화 마커 (CD25 및 CD69)의 발현을 유세포 분석에 의해 측정하였다. 대조군 TRAC 세포 (65.2 % TCR  $\alpha\beta$ -)가 CD25 및 CD69를 상향 조절하지만, UCART22 세포에서 TCR  $\alpha\beta$  수용체의 부재를 확인하는 UCART22 세포 (98.9 % TCR  $\alpha\beta$ -)에서는 상향 조절이 관찰되지 않았다.

[1096] **CD52-UCART22 세포의 알렘투주맵에 대한 내성**

[1097] 림프구 보충 요법에서 항-CD52 모노클로날 항체 인 알렘투주맵을 사용하는 능력은 알렘투주맵에 의한 제거를 방지하기 위해 UCART22 세포의 세포 표면으로부터 CD52 당단백질의 효과적인 제거에 의존한다. 따라서 UCART22는 CD52 TALEN®을 사용하여 CD52 +와 CD52- 세포가 혼합되도록 설계되었다. 제조 공정의 끝에서 UCART22의 개발 배치로 수행된 유세포 분석은 T-세포의 평균 72 % (CD45 + / CD4 + 또는 CD8 + 세포)가 CD52- (범위 62.3-76.5



%, N = 6)임을 나타낸다.

- [1098] CD52- 세포가 알렘투주맵에 내성이 있음을 입증하기 위해, 보체-의존적 세포 독성 (CDC) 검정을 수행하였으며 TALEN<sup>®</sup> - 매개 CD52 유전자 불활성화를 함유하는 인간 T-세포를 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 래트(rat) 항-CD52 항체로 처리하였고 상기 치료용 항체 알렘투주맵은 37  $^{\circ}\text{C}$ 에서 2 시간 동안 래빗(rabbit) 보체를 갖거나 갖지 않는 대조군으로서 래트(rat) 면역글로불린 G (IgG)에서 유래되고, 생존력 및 CD52 발현에 대해 유세포 분석법에 의해 분석된다.
- [1099] 결과는 CD52 유전자 불활성화를 함유하지 않는 세포가 알렘투주맵의 존재하에 보체-의존적 세포 독성을 통해 구체적으로 제거됨을 보여준다.
- [1100] **CD8 + T 세포 숙주에 대한 내성**
- [1101] MHC 클래스 I 결핍 UCART22 세포는 CD8 + T- 세포-매개 파괴에 내성이었다. 인터페론 - $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 처리가  $\beta$  2- 마이크로글로불린 발현을 유의하게 유도하였지만, 대조군 UCART22의 CD8 + T 세포-매개 사멸을 촉진시켰다.
- [1102] **리툭시맵으로 치료한 후 UCART22의 효과적인 고갈 시연**
- [1103] UCART22는 동종 이계 T-세포이므로 환자의 면역계가 회복되면 제거해야한다. 또한, UCART22는 인간 CD20에 특이적인 치료용 모노클로날 항체인 리툭시맵 (RTX)에 결합하는 2 개의 에피토프를 제공하는 단막 단백질인 CD22CAR 및 RQR8을 공동-발현하도록 조작된다. 따라서 RQR8은 리툭시맵의 투여를 통해 UCART22를 고갈시킬 가능성을 제공한다.
- [1104] RTX로 처리한 후 보체 의존적 세포 독성 (CDC)을 통해 UCART22 세포를 제거하는 능력을 조사하였다. 동결된 UCART22 (5 개의 상이한 개발 배치)를 해동하고 Raji CD22 + 세포와 1 : 0.25 비율로 3 일 동안 공동 배양하였다. 이 재 활성화 기간 후, CDC 분석이 수행되었다 (세포는 유아 래빗 보체 (BRC)의 존재 또는 부재하에 2 시간 동안 RTX (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )와 함께 배양되었다). 결과는 CAR + 세포의 ~ 85 %가 체외에서 RTX 및 보체 둘 다의 존재하에 효율적으로 제거됨을 입증한다.
- [1105] RQR8 + 세포의 고갈이 달성될 수 있는 RTX에 대한 다른 작용 메커니즘은 항체-의존적 세포-매개 세포 독성 (ADCC)이다(Seidel et al., 2013). 이 경우, 면역계의 이펙터세포(주로 Natural Killer -NK- 세포)는 막 표면 항원이 특정 항체에 의해 결합된 표적 세포를 적극적으로 용해시킬 수 있다.
- [1106] CDC 및 ADCC에 의한 RQR8 + T- 세포의 효과적인 생체내 제거를 입증하는 UCL의 Martin Pule (Philip et al., 2014)에 의해 보완 실험이 공개되었다 (RQR8 및 GFP를 인코딩하는 바이시스트로닉 레트로바이러스 벡터 (SFG.RQR8.IRES.eGFP)로 형질도입되고 Miltenyi QBEnd10 비드로 선택된 1 차 인간 T- 세포).
- [1107] 시간 경과 및 RTX 용량 적정은 CDC가 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상의 RTX 농도에서 매우 효과적이며, 사멸은 30분 이내에 일어난다는 것을 입증한다. 유사하게, ADCC 매개 감도는 RQR8 + T- 세포에 대해 입증되었다.
- [1108] **생체 내 연구**
- [1109] 동물 종/모델 선택의 이론적 근거
- [1110] UCART22의 인간 특이성으로 인해, 표준 면역 적격 동물 모델에서의 연구는 이종 면역 반응에 의한 인간 UCART22 세포의 신속한 표적화 및 제거로 인해 적용할 수 없다.
- [1111] 따라서, UCART22 활성의 생체 내 모델링을 위해 두 가지 접근법, 즉 면역 결핍 동물에서의 동종 동물 모델 및 인간 종양 이종 이식편 모델이 고려될 수있다.
- [1112] 동종 동물 모델 접근법은 모델 유기체에 대한 UCART22의 종 특이적 버전의 재생성/재-개발을 포함하고, 동종 숙주에 접목될 때 이 종-특이적 UCART22 대리 제품의 기능적 특성을 평가한다. 이 접근법은 개별 CAR의 특성이 상당히 다양하고, 면역 기능, 생리학 및 유전학에서의 종-특이적 차이가 인간에서 UCART22의 활성 외삽(extrapolation)을 상당히 손상시키기 때문에 관련성이 없는 것으로 간주된다.
- [1113] 면역 결핍 쥐 이종 이식편 모델은 UCART22 및 인간 종양 CD22 + 세포 (B-ALL 세포주 또는 1 차 샘플)의 생착을 허용하기 때문에 선택되었다. 이 동물 모델은 CAR T-세포 요법의 생체 내 활성의 평가에 광범위하게 사용되어 왔다. 이들 모델은 표적 내/외 종양 세포 독성 및 표적 외 세포 독성과 관련하여 상기 면역 적격 모델과 동일한 한계를 갖고 MHC 불일치의 모든 역할을 완전히 제거하지만, 생체 내 CAR T- 세포의 항-종양 효능을 평가하는데 매우 유용한 것으로 입증되었다. 이들은 CAR T-세포 생성물의 생체 내 활성을 평가하기 위한 사실상의 표준으로 등장하였다(예를 들어, Carpenito 등, 2009; Gade 등, 2005; Gill 등, 2014; Hudecek 등 참조). , 2010;

Kenderian et al., 2015; Mardiros et al., 2013; Zhou et al., 2013 (많은 출판 된 기사 중에서). 이들은 상이한 CAR의 상대 항-종양 활성을 구별할 수 있으며, 유용한 인간 생체 내 T-세포 기능을 포착하고 반 정량적으로 판독할 수 있는 능력을 강조한다(예를 들어, Milone et al., 2009 참조). 따라서, 인간 CD22 + 종양 세포를 면역 결핍 마우스(NSG 마우스)에 이식한 후, 항-종양 활성의 지수로서 종양 부담 및 생존 시간의 연속 평가와 함께 UCART22를 투여하였다.

[1114] **선택된 종양 모델**

[1115] 종양 이종 이식편과 관련하여, 생체 내 UCART22 활성은 CD22 + B-ALL 세포주 (CCL-213, ATCC)인 Daudi 세포에 대해 평가되었다. 생체 내 영상화(Daudi-Luc-GFP 세포)에 의한 종양 부담을 따르기 위해 렌티바이러스 벡터 (amsbio LVP438-PBS)로 형질 도입함으로써 파이어플라이 루시페라제(firefly luciferase) (및 GFP)를 발현하도록 세포주를 변형시켰다.

[1116] **선택된 마우스 균주**

[1117] 생체 내 비임상 연구에 사용된 마우스 균주는 다음과 같다:

[1118] 1 / 고도의 면역 결핍 NSG 마우스 (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl / SzJ; Jackson Laboratory strain # 5557)는 항-종양 활성을 나타내는 성숙한 T 세포, B 세포 및 기능성 NK 세포가 결여되어 있다.

[1119] 2 / RQR8 고갈 또는 R2 CD22CAR 메카니즘의 효능을 입증하기위한 면역 적격 마우스 모델 (C57BL / 6 x Balb / c (F1) 마우스).

[1120] **분석 방법**

[1121] 생체 내 UCART22의 활성을 다음을 사용하여 평가하였다:

[1122] - 대조군 (루시페라제를 발현하는 세포주를 갖는 이종 이식편 모델)에 대한 처리된 마우스의 생물 발광 측정,

[1123] - 임상 증상

[1124] - 마우스의 전체 생존.

[1125] **투여 경로**

[1126] 동물에서 UCART22의 투여 경로는 정맥 주사(단일 비분할 용량)이다. 인간에서, UCART 19 및 UCART 22는 또한 다음 연속 19에 따라 단독으로 또는 하나씩 차례로 2 회 또는 3 회 또는 4 회, 정맥 내(비분할 용량)주사되었다. 22 19 22 19 또는 22 19 22 19 또는 19/22 19/22.

[1127] **UCART22의 생체 내 항-종양 활성 시연**

[1128] UCART22 활성은 여러 개발 배치의 UCART22를 갖는 Daudi-Luc-GFP 인간 종양 세포로 생착된 면역 결핍 마우스에서 입증되었다. 연구의 예는 도 8에 도시되어있다. 또한, UCART22의 GMP 배치의 생체 내 활성을 평가하기 위한 확인 연구가 진행 중이다.

[1129] 간략하게, NSG 마우스에 -7 일에 0.5x10<sup>6</sup> Daudi-Luc-GFP 세포를 정맥 내 주사하고 0 일에 UCART22(정맥 주사, 2 회 용량: 3x10<sup>6</sup> 및 10x10<sup>6</sup> UCART22 세포/마우스, 5 마리 마우스/그룹)로 처리하거나 처리하지 않은 채로 두었다(비히클(vehicle) 주입). TRAC 및 CD52(NTD DKO)에 대한 형질 도입되지 않은 T-세포 이종 KO를 대조군으로서 주사하였다. UCART22 투여량은 다른 CD22CAR T-세포의 생체 내 항-종양 활성을 입증하기 위해 문헌에 사용된 CAR + T- 세포의 용량에 따라 결정되었다(Haso et al., 2013). UCART22 처리는 생체 내 이미지에 의해 나타낸 바와 같이 종양 세포의 제거 및 연장된 생존을 가져 왔으며, 연구 종료시(UCART22 처리 후 80 일) 모든 처리된 마우스가 생존 하였다. 이들 결과는 UCART22의 항-종양 활성을 입증하였다.

[1130] **CD52- 세포는 생체 내 알렘투주맵에 내성이고, CD52- CAR + T-세포는 알렘투주맵의 존재하에서 생체 내 활성을 나타낸다**

[1131] 동일한 TRAC/CD52 이종 녹-아웃을 포함하는 다른 UCART 제품인 UCART19의 개발 과정에서 수행된 연구에 따르면 CD52-T 세포는 생체 내 알렘투주맵에 내성이 있음이 증명되었다(Poirot et al., 2015).

[1132] 또한, 알렘투주맵의 존재하에 UCART19 세포의 활성은 NSG 마우스에서 종양 이종 이식 모델에서 입증되었다. 종양 세포는 받지만 UCART19 세포를 받지 않은 모든 마우스는 주사 후 13 일까지 종양 진행으로 희생이 발생하였다. 종양 및 UCART19 세포를 받은 7 마리 마우스 중 5 마리에서, 종양은 13 일째에 완전히 제어되었고, 나머지

2 마리 마우스에서는 부분 반응이 관찰되었다. 반면, 알렘투주맙 치료는 UCART19 세포 주입(6/6 마우스)없이 종양의 진행을 지연시키는 것으로 관찰되었다. UCART19 세포와 조합된 알렘투주맙으로 처리된 마우스에서, 주사 후 13 일에 단리된 골수로부터 얻은 세포 현탁액의 광도계 또는 유세포 분석에 의해 평가된 바와 같이, 골수로부터 종양 세포를 제거하였다.

[1133] 결론적으로, UCART19 세포 주입 2 일 전에 알렘투주맙 요법을 받은 마우스는 생체 내 알렘투주맙의 존재하에 UCART19 세포의 항-종양 효능을 입증한다. 또한, 13 일째의 비장 생착 데이터는 CD52-T 세포가 생체 내 알렘투주맙에 내성이 있음을 보여준다.

[1134] **생체 내 RQR8 + 세포의 효과적인 리툭시맙-유도 고갈 시연**

[1135] RQR8 + UCART22에서의 RTX의 감소 가능성은 이전에 생체 내에서 보여졌다. 또한 Martin Pule 그룹은 RTX가 인간 IgG1(mRtx-IgG2a)의 기능적 동등물인 마우스 IgG2a에 대해 재설계된 RTX를 사용하여 면역능이 우수한 마우스 모델에서 RQR8 + 세포를 제거할 수 있음을 보여 주었다(Philip et al., 2014). 이 항체는 RTX가 인간 Fc 수용체에 결합하는 것과 유사한 친화도로 murin Fc 수용체에 결합을 허용하는 murin Fc에 RTX의 결합 부분을 전달함으로써 murin 시스템에 사용하기에 적합하다. RQR8 형질 도입된 C57BL/6 비장 세포를 비 살상 방사선 조사된 C57BL/6 x Balb/c 교차 (F1) 수용자에게 옮긴 면역 적합성 반수체 입양 전달 모델을 사용하여 연구를 수행하였다. 이 모델은 동종 이계 자극에 의해 유지되는 모든 림프 조직에서 양호한 생착 수준을 허용하지만, 또한 내인성 림프구를 보존한다.

[1136] 1 일째에, C57BL/6 마우스로부터의  $1.5 \times 10^6$  RQR8 + 공여자 비장 세포를(RQR8-2A-GD2CAR 구조를 암호화하는 레트로 바이러스를 사용하여 형질 도입되고 Miltenyi CD34 비드를 사용하여 정제된 비장 세포) 5Gy X-선 조사 전 처리 후 4 시간에 F1 마우스에 정맥 내 주사(C57BL/6 x Balb/c)하였다. 7 일째에, 공여자 세포의 생착은 말초 혈액에서의 유세포 분석에 의해 확인되었다. 마우스를 미린화된(murinized) RTX (ritux-mIgG2a 150  $\mu$ g, 테일(tail) 정맥에 정맥 내 주사, 제 7 일, 제 10 일 및 제 12 일) 또는 PBS(비처리)로 3 회 처리 하였다. 각 코호트(cohort)에는 5 마리의 마우스가 있었다. 비장, 골수, 혈액 및 림프절의 유세포 분석을 위해 14 일에 동물을 희생시켰다. RTX-처리된 마우스에서, 마우스의 리툭스-mIgG2a 요법 후 6 시간 내에 각각 비장, 골수 및 혈액에서 RQR8 + 세포의 50, 60 및 70 % 고갈이 관찰되었다.

[1137] UCART19 제품에 사용된 항-CD19 CAR에 대해서도 동일한 연구를 수행하였다. UCART19는 또한 UCART22와 동일한 RQR8 구조를 포함하는 동종 이계 조작된 CAR T-세포 제품이다.

[1138] **리도싱(redosing)**

[1139] 이 연구는 UCART22의 단일 또는 다중 주사의 항-종양 활성을 평가하였다. CD22를 발현하는 B-ALL 종양 세포주(다량의 CD22를 발현하는 Daudi). GFP 및 파이어플라이(firefly) 루시페라제를 발현시키기 위해 렌티바이러스 벡터로 세포를 형질 도입하였다. -7 일에 종양 세포( $0.5 \times 10^6$  Daudi-Luc-GFP)를 테일(tail)정맥을 통해 NSG 마우스(NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ, 균주 005557, 잭슨 연구소)에 정맥 내 주사하였다. 0 일에, 마우스를 -1 일에 측정된 생체 발광 신호 및 체중에 따라 6 마리 마우스의 11 개 그룹으로 무작위화 하였다. UCART22의 1, 2 또는 3 개의 처리(1 또는 3 백만의 CAR + 세포/마우스에서)가 투여되었다. UCART22를 0 일+/- 10일+/- 20 일에 마우스에 정맥 내 주사하였다.

[1140] UCART22의 항-종양 활성은 종양 부하, 이어서 1일, 7일, 14일, 21일, 28일 및 35일의 생물 발광 이미지화, 임상 징후의 관찰 및 마우스의 생존에 의해 평가되었다.

[1141] Daudi 모델,  $1 \times 10^6$  UCART22 세포/마우스에서의 치료

[1142]  $1 \times 10^6$  UCART22로 2회 또는 3회 처리된 마우스는  $1 \times 10^6$  UCART22로 1회 처리된 마우스에 비해 종양 진행 및 생존 기간이 더 우수함을 보여준다(60 일에 60 % 생존, 1회 투여량에 대해 0 %를 초과하는 3회 투여).

[1143]

[1144] 하나의 실험에서, UCART19를 30일에 마우스에 정맥 내 주사하였다. 이들 마우스가 여전히 살아있는 상태에서, 암 세포의 수준은 90일에서는 검출 미만이었다.

[1145] **요약**

[1146] UCART22의 활성은 B-ALL 세포주에 대해 생체 외 및 생체 내에서 그리고 1 차 B-ALL 샘플에 대해 생체 외에서 입증되었다.

[1147] UCART22는 동종 T 세포이므로 환자의 면역 체계가 회복되면 제거해야 한다. 또한, UCART22는 모노클로날 항체 리톡시맙에 결합하는 2개의 에피토프를 제공하는 단막 단백질인 RQR8을 공동 발현하도록 조작된다. 따라서, RQR8은 관리할 수 없는 UCART22 관련 독성, 예컨대 CR (Cytokine Release Syndrome) 또는 GvHD 또는 알로(allo)-HSCT 이전의 리톡시맙을 투여함으로써 RQR8 + UCART22를 고갈시키는 수단을 제공한다. 생체 외에서 RQR8 + 세포를 제거하기 위한 리톡시맙의 효과는 CDC 및 ADCC 분석을 사용하여 입증되었다. 또한, RQR8 + 세포의 리톡시맙 유도 고갈의 효율은 면역 적격 마우스 모델 및 리톡시맙의 무린화 버전을 사용하여 혈액, 비장, 골수 및 림프절에의 생체 내에서 입증되었다. TCR-결핍 MHC CI-결핍 T 세포에서 발현된 R2 또는 QR3 항-CD22 CAR을 사용하여 유사한 결과를 얻었다.

[1148] CD52- 세포의 알렘투주맙에 대한 저항성은 생체 외 및 생체 내에서 입증되어 림프구 마비 요법에서 알렘투주맙의 잠재적 사용을 허용하였다.

[1149] 마지막으로, TCR-결핍 MHC CI-결핍 T 세포에서 발현된 R2-항-CD22 CAR을 사용하여 CD8 + T-세포-매개 파괴에 대한 내성을 관찰하였다.

[1150] 다양한 위험을 평가하기 위해 수행된 추가 연구는 다음에 요약되어 있다.

[1151] 표는 아래 섹션에 자세히 설명되어 있다.

[1152] 표 I 수행된 생체 외 독성 연구 목록.

연구	시험 항목	방법	GLP/GMP 연구	결과
•TALEN® 지속성	TRAC 및 CD52 또는 B2M TALEN® (GMP mRNA) 을 암호화하는 mRNA 로 형질 감염된 T-세포	Western blot	아니 오	1 차 인간 T-세포 내에서 TALEN® 단백질의 지속성을 조사한 실험은 전기천공 후 첫 24 시간 이내에만 높은 수준의 TALEN® 단백질이 검출됨을 보여 주었다.
•TALEN®에 의해 유도된 표적 외 절단	B2M, TRAC CD52 TALEN® 단독 또는 조합으로 형질 감염된 T-세포	Guide Sequencing	아니 오	비편향(unbiased) 게놈 전체 분석에 의해 잠재적 표적 외 부위를 확인하기 위해 GUIDE seq 분석을 수행하였다.
	UCART22	High throughput sequencing	아니 오	TRAC 및 CD52 TALEN®-처리 된 인간 T-세포의 높은 처리량 시퀀싱은 GUIDE-seq 방법에 의해 확인되며 추정된 오프-타겟 부위 중 3 개에서 변형의 매우 낮은 빈도 (2.1-3.9 x 10-3)를 확인했다.
	UCART22	GMP	GMP	확인된 표적 외 사이트 3 곳의 변형 수준은 모든 GMP 배치에서 평가된다.
•유전자 안정성	UCART22	Karyotype / FISH	아니 오	전이 빈도를 평가하기 위해 UCART22의 개발 배치에 대한 핵형 분석 및 FISH 분석이 수행되었다.
	UCART22	analysis	GMP	Karyotyping은 릴리스 기준으로 모든 GMP 배치에서 GMP로 수행된다. 핵형 분석에 의해 전위가 검출되면 FISH 분석이 수행될 것이다.
	UCART22	IL-2 independent	아니 오	배양 18 일 후 IL2 독립 증식은 UCART22의 개발 배치에서 관찰되지 않았다.
	UCART22	proliferation assay	GMP	유전자 변형에 의해 유발 된 클론 이점을 검출하기위한 IL2- 독립적 증식 방출 시험은 방출 기준으로서 모든 GMP 배치에 대해 수행될 것이다.

[1153]



	UCART22	qPCR	GMP	백터 카피 수는 모든 GMP 배치에서 측정될 것이다.
조직 교차 반응성	융합 펩티드 scFv-CD22(m971)-CD8-mFc	Immunohistochemical analysis against a panel of human tissues	GLP	인간 조직 패널에서, 특이적인 원형질막 scFv-CD22(m971)-CD8-mFc 결합은 림프 기관의 림프 모낭 구획 및 몇몇 다른 조직의 림프 점막 응집체/침윤 내에서 관찰되었다. 형태 및 분포에 기초하여, 표적화 된 세포는 일반적으로 B 림프구와 일치하였다. 인간 조직에서 scFv-CD22(m971)-CD8-mFc의 선택적 표적 결합은 유익하지 않았다.
레트로제닉스	인지-마우스 IgG1 Fc 단편	Cell microarray technology	아니오	scFv-CD22 (m971)-CD8-mFc 융합 단백질의 결합 특이성은 Retrogenix 플랫폼을 사용하여 평가되고 된다.

[1154]

[1155]

#### 표 J 생체 내 독성 연구의 목록

연구	시험 항목	방법	GLP 연구	결과
잠재적 GvHD	UCART22 및 대조군으로서 이전 UCART 제품 (UCART19 및 UCART123) 또는 비변형 T-세포 (NTD)	T-세포 주사 1 일전 2 Gy에서 NSG 마우스 조사	GLP-유사	TCRαβ- 양성 비변형 T-세포로 주사된 모든 마우스는 심각도 및 개시 시간에서의 용량-관계와 함께 GvHD (체중 감소 및 조직 병리학적 변화)를 암시하는 것으로 간주되는 치료 관련 변화를 보여주었다. 그러나, UCART 제품은 선택한 모델에서 최대 80 일의 후속 기간 동안 GvH의 징후를 유발하지 않았다.

[1156]

[1157]

GvHD의 잠재적 위험은 이전 UCART 제품의 개발 과정에서 면역 결핍 마우스에 평가되었다. 이 동물 모델은 인간 T-세포의 효율적인 생착을 가능하게 하고, 이전에 인간 PBMC 또는 T-세포의 주사 후 이중 GvHD를 지속적으로 개발하는 것으로 나타났다(Ali et al., 2012; Schroeder and DiPersio, 2011).

[1158]

#### CD22 CAR의 표적 외 활성화

[1159]

CD22CAR의 CD22 특이성은 인간 조직과 CD22CAR의 scFv 성분의 현저한 예상외 표적 외 결합이 없음을 나타내는 GLP-적합성 조직 교차 반응성 연구를 통해 평가되었으며, 레트로제닉스 스크린이 진행 중이다. 또한, m971 유래 CAR T-세포로 치료된 환자에 대한 공개된 임상 데이터는 표적외 독성을 나타내지 않았다(Fry et al., 2017).

[1160]

CD22가 정상 B-세포상에서 발현됨에 따라, UCART22가 지속되는 한 UCART22의 표적 외/종양 활성화로 인한 B-세포 무형성의 위험이 예상된다.

[1161]

#### UCART 22 CAR의 GVHD

[1162]

UCART22 생성물의 필수 안전 특징은 TRAC 유전자의 파괴 및 TCR α β- 세포의 정제에 의해 GvH 반응을 매개하는 UCART22의 잠재력이 제거되었는지 여부이다. 이 위험은 생체 내 전임상 연구에서 이전 UCART 제품 (UCART19 및 UCART123)의 개발 중에 평가되었다. GvHD 징후는 가장 높은 용량에서 더 심각한 결과를 갖는 변형되지 않은 T-세포를 주사한 모든 NSG 마우스에서 관찰되었지만, UCART를 주사한 마우스에서는 치료 관련 변화가 관찰되지 않았다. 클리닉에서 지금까지 UCART19로 치료한 14명의 환자 중 4명은 경증에서 중증도의 피부 GvHD (R. Benjamin et W. Qasim 에 의해 3 등급 1 및 1 등급 2(Qasim et al., 2017) 및 2017 년 ASH 회의에서 발표 된 데이터를 개발했다) 및 전신 치료없이 관리할 수 있다.

[1163]

#### CRS

[1164]

면역 치료 제품의 투여 및 기저 치료 질환과 관련된 다른 잠재적 안전 위험이 확인되었다: 주입 관련 반응, 사이토카인 방출 증후군(CRS), 종양 용해 증후군, 감염 및 신경 독성. CRS는 면역 요법 및 특히 CAR T-세포 시험에서 빈번한 부작용이다. 자가 항-CD19 CAR T-세포 임상 시험에서, 관찰된 사이토카인 방출의 강도는 주사된 CAR T-세포의 용량, CAR의 신호 전달 도메인(4-1BB/CD28), CAR T-세포의 증식 수준 및 투여 일에 환자의 종양 부담과 같은 몇몇 파라미터 조합의 결과였다. 이러한 위험은 최근에 공개된 모델과 유사한 모델에서 생체 내에



서 평가된다(Taraseviciute, A., Kean, L., Jensen, MC (2016). 키메라 항원 수용체 (CAR) T 세포-매개 사이토 카인 방출 증후군 (CRS) 및 신경 독성을 충실하게 재현하는 최초의 비인간 영장류 모델의 생성 B 세포 지향 CAR-T 세포 치료. 혈액, 128 (22), 651. 2018 년 3 월 28 일 접근. <http://www.bloodjournal.org/content/128/22/651>에서 검색됨).

[1165] FIH 연구를위한 시작 용량 권장

[1166] 임상 용량 결정을 위한 표준 방법은 동물 모델(들)의 관련성, 제품의 생체 역학적 성질 및 면역-적응 작용 메커 니즘으로 인해 CAR T-세포-기반 면역 요법에 이식할 수 없다.

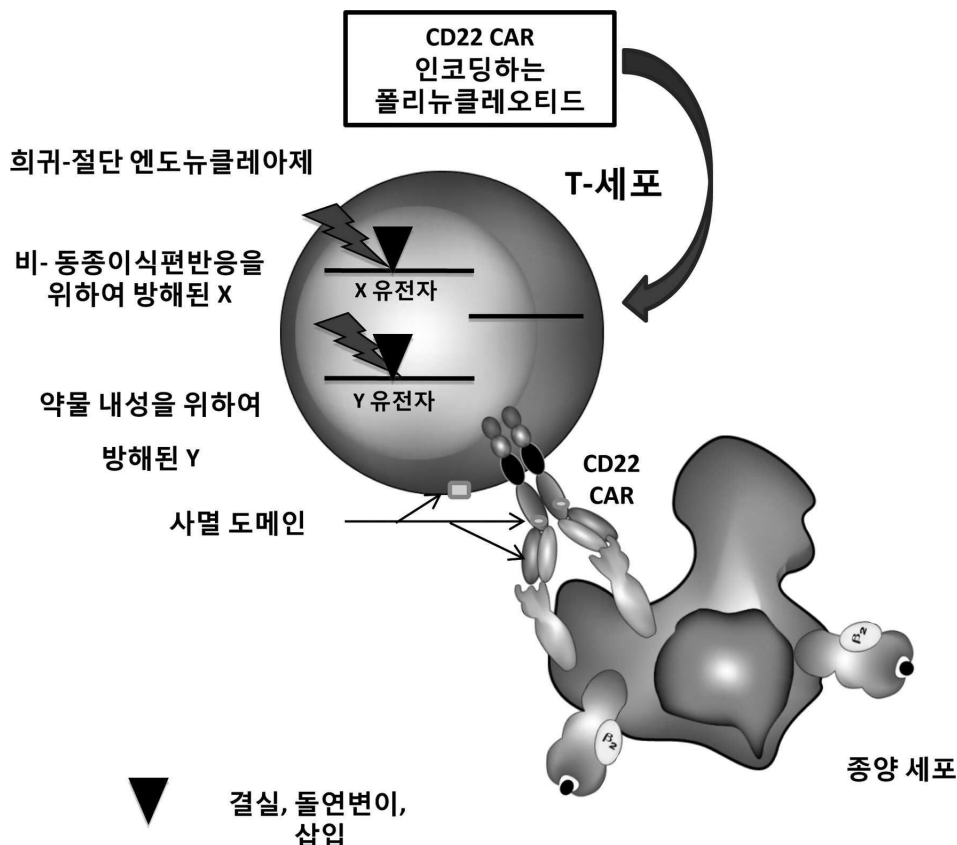
[1167] 따라서, 시작 임상 용량의 선택은 주로

[1168] (i) 인간에게 투여된 CAR T-세포 (자가 CAR-T- 세포에 대한 문헌)로 얻은 이전 경험; (ii) UCL(University College London) 및 King 's College London (KCL)에서 UCART19로 진행중인 임상 연구에서 치료를 받은 다양한 사례의(compassionate cases) 환자(Qasim et al., 2017 참조) 및 ASH 회의 2017 에서의 R. Benjamin 및 W. Qasim의 발표 및 (iii) 다른 B-ALL자가 CAR 연구에서 현재 조사되거나 승인된 용량이다.

[1169] 임상 연구의 첫 번째 결과는 UCART22로 치료한 환자의 두 가지 분석에서 (> 80 %) 종양 질량의 큰 디벌킹 (debulking)을 보여준다. 더욱이, 데이터는 (단, 2 회 복용으로 인한) 짧지만 효율적인 치료조차도 특히 UCART22 및 19의 리도싱(redosing) 및/또는 사용 후에 악성 B 세포(150 일에 73 % 완화)로부터 중단 및 자유로 워질 수 있음을 입증하고 있다.

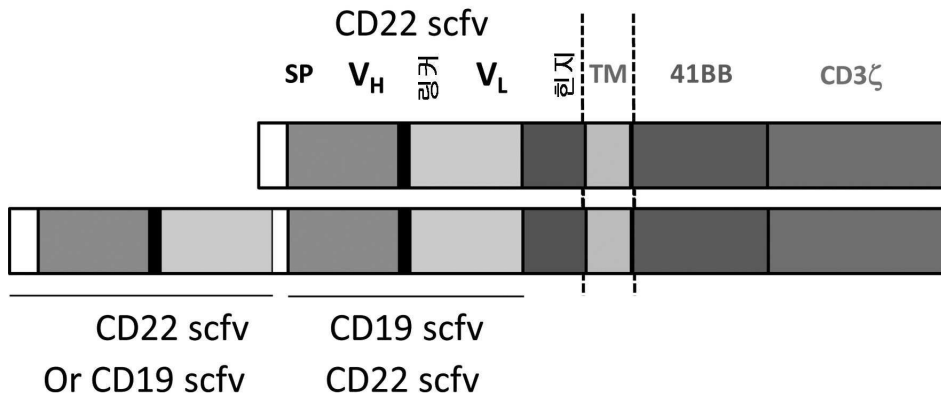
## 도면

### 도면1

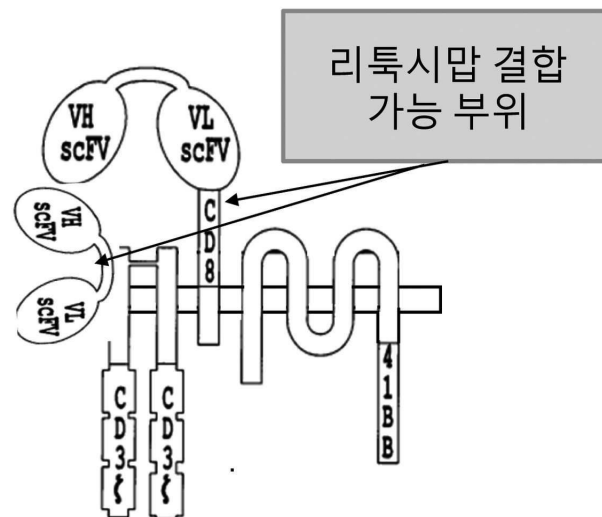


도면2

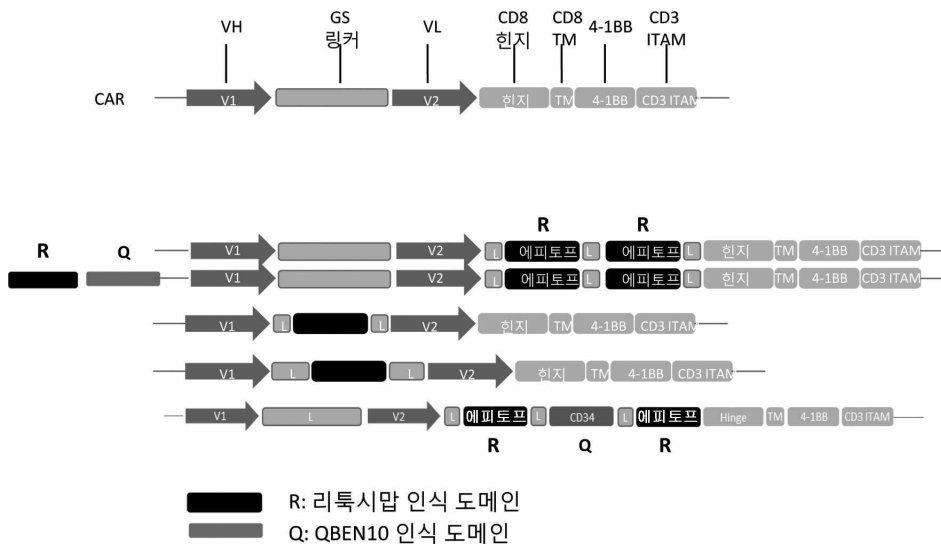
## 단일 체인 항-CD22 및/또는 CD19 CAR



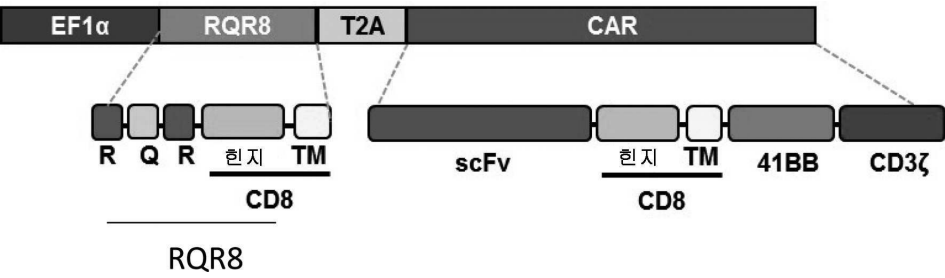
## 다중-체인 항-CD22 또는 -22/19 CAR



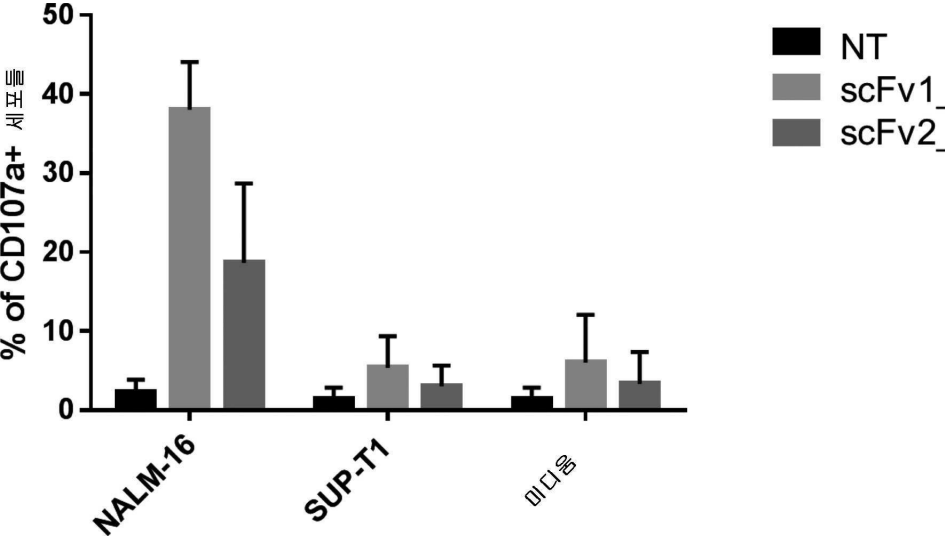
도면3



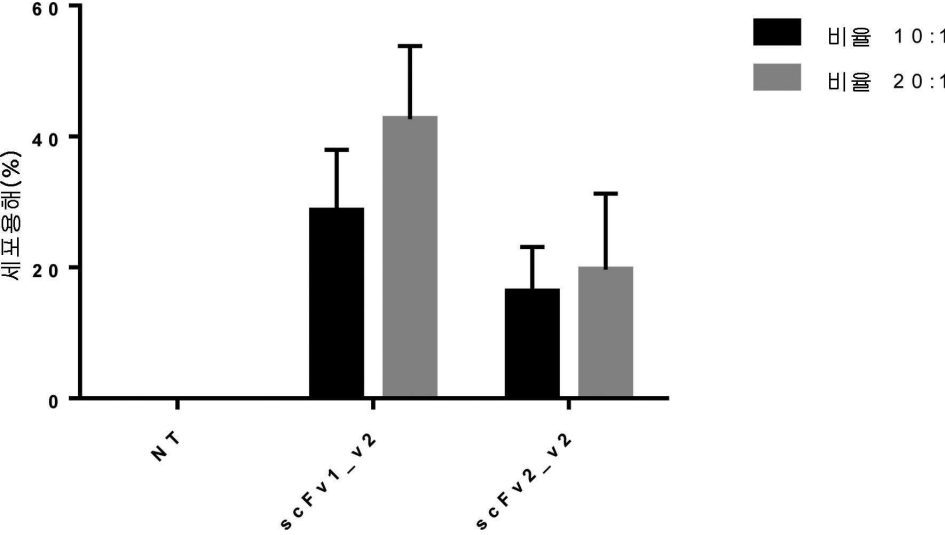
도면4



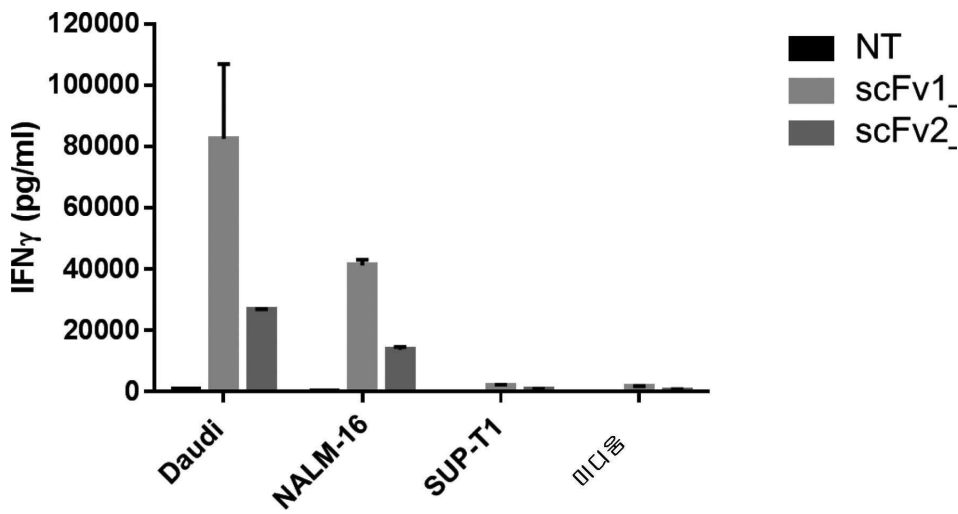
도면5



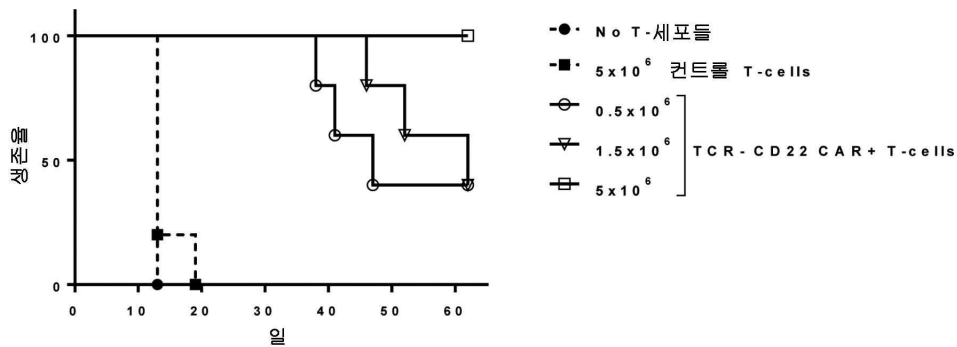
도면6



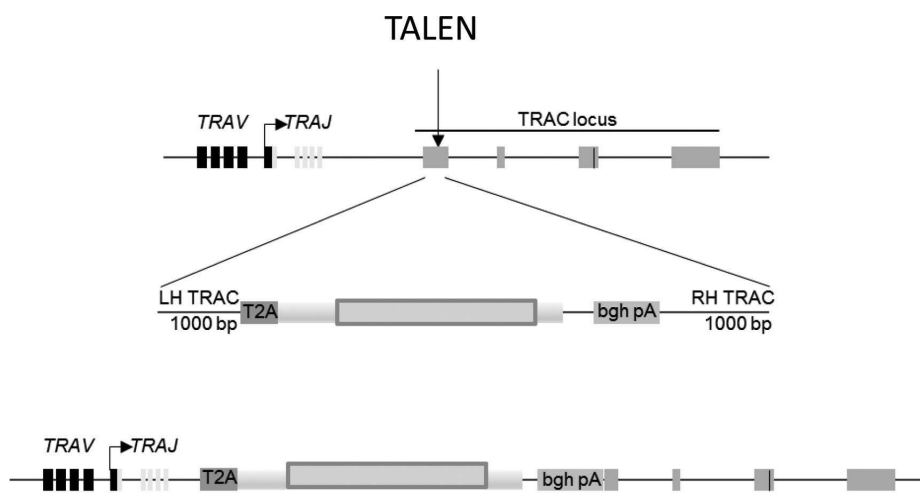
도면7



도면8



도면9



삽입되는 유전자



서열 목록

<110> Collectis

<120> Universal anti-CD22 CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR ENGINEERED IMMUNE  
CELLS

<130> P81701376PCT00

<150> PA201770239

<151> 2017-03-31

<150> PA201770240

<151> 2017-03-31

<150> PA201770542

<151> 2017-06-30

<150> PCT/EP2017/076800

<151> 2017-10-19

<160> 26

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(21)

<223> CD8alpha signal peptide

<400>

> 1

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> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(20)

<223> signal peptide

<400> 2

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

1 5 10 15



Gly Ser Thr Gly

20

<210> 3

<211>

16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(16)

<223> FcgRIIIa hinge

<400> 3

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

1 5 10 15

<210> 4

<211> 45

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(45)

<223> CD8alpha hinge

<400> 4

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

<210> 5

<211> 231

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(231)

<223> IgG1 hinge

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Asp Thr Leu Met Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

35 40 45

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp

50 55 60

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr

65 70 75 80

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

85 90 95

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

100 105 110

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

115 120 125

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys

130 135 140

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

145 150 155 160

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

165 170 175

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

180 185 190

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser

195 200 205

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

210 215 220

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

225 230

<210> 6

<211> 24

<212

> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(24)

<223> CD8alpha transmembrane domain

<400> 6

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> 7

<211> 27

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(27)

<223> 41BB transmembrane domain

<400> 7

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

1 5 10 15

Leu Phe Phe Leu Thr Leu Arg Phe Ser Val Val

20 25

<210> 8

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(42)

<223> Fragment of 4-1BB (residues 214-255)

<400> 8

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> 9

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(112)

<223> fragment of T-cell surface glycoprotein CD3 zeta chain

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> G4Sx3 linker sequence

<400> 10

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

1 5 10 15  
 <210> 11  
 <211> 1532  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220><221> gene  
 <222> (1)..(1532)  
 <223> UCART22  
 <400> 11

tgatcctctt gtccacaga tatccagaac cctgacctg ccgtgtacca gctgagagaa	60
tggtctgcc cgtaccgct ctgctgctgc cactggccct gctgctgcac gcagcaagac	120
cacaggtgca gctgcagcag agcggccctg gcctggtgaa gccaagccag aactgtccc	180
tgacctgcgc catcagcggc gattccgtga gctccaactc cgccgctgg aattggatca	240
ggcagtcccc ttctcggggc ctggagtggc tgggaaggac atactatcgg tctaagtgtt	300
acaacgatta tgccgtgtct gtgaagagca gaatcacaat caaccctgac acctccaaga	360
atcagttctc tctgcagctg aatagcgtga caccagagga caccgccgtg tactattgcg	420
ccaggagggt gaccggcgac ctggaggatg cctttgacat ctggggccag ggcacaatgg	480
tgacctgtc tagcggagga ggaggatccg gaggaggagg atctggcggc ggcggcagcg	540
atatccagat gacacagtc ccatcctctc tgagcgctc cgtggcgac agagtgacaa	600
tcacctgtag ggctcccag accatctggt cttacctgaa ctggatcag cagaggcccc	660
gcaaggcccc taatctgtg atctacgcag caagctccct gcagagcgga gtgccatcca	720
gattctctgg caggggtccc ggcacagact tcacctgac catctctagc ctgcaggccg	780
aggacttcgc cacctactat tgccagcagt cttatagcat ccccgagaca ttggccagg	840
gcaccaagct ggagatcaag accacaacc cagcaccaag gccacctaca cctgcaccaa	900
ccatgcctc tcagcccctg agcctgagac ctgaggcatg taggccagca gcaggaggag	960
cagtccatac aaggggtctg gattttgcat gcgacatcta catctgggca cctctggcag	1020
gaacatgtgg cgtgctcctg ctacgcctgg tcatcacct gtactgcaag agaggcagga	1080
agaagctgct gtatatctc aagcagccct tcatgcgcc cgtgcagaca acccaggagg	1140
aggatggctg ctctgtagg ttcccagaag aggaggaggg aggatgtgag ctgcgcgtga	1200
agttttcccg gtctgccgac gcacctgcat acccagaggg ccagaaccag ctgtataacg	1260



agctgaatct gggccggaga gaggagtacg atgtgctgga caagaggcgc ggcagagatc 1320  
cagagatggg cggcaagccc cggagaaaga accctcagga gggcctgtac aatgagctgc 1380  
agaaggataa gatggccgag gcctattctg agatcggcac gaaggagag aggcgccggg 1440  
gcaagggaca cgacggactg taccagggac tgagcacagc caccaaggat acctatgacg 1500  
ccctgcataat gcaggcactg cctccaaggt ga 1532

<210> 12

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 971- heavy chain

<400> 12

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn

20 25 30

Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala

50 55 60

Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn

65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val

85 90 95

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

100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 13

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 971- light chain

<400> 13

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 Thr Ile Trp Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 14

<211> 461

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 971-v1 polypeptide CAR sequence

<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 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu

20 25 30

Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp

35 40 45

Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro

50 55 60

Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp

65 70 75 80

Tyr Asn Asp Tyr Ala Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro

	85	90	95
Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro			
	100	105	110
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Val Thr Gly Asp Leu			
	115	120	125
Glu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser			
	130	135	140
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
145	150	155	160
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
	165	170	175
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Trp Ser Tyr			
	180	185	190
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile			
	195	200	205
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
	210	215	220
Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala			
225	230	235	240
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Gln			
	245	250	255
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Leu Ala Val Ser			
	260	265	270
Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln Ile Tyr Ile Trp Ala			
	275	280	285
Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr			
	290	295	300
Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln			
305	310	315	320
Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser			
	325	330	335
Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys			

340 345 350  
Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln  
355 360 365  
Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu

370 375 380  
Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg  
385 390 395 400  
Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met  
405 410 415  
Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly  
420 425 430  
Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp  
435 440 445

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

450 455 460

<210> 15

<211> 490

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 971-v3 polypeptide CAR sequence

<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 Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu

20 25 30

Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp

35 40 45

Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro

50 55 60

Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp

65 70 75 80

Tyr Asn Asp Tyr Ala Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro

	85	90	95
Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro			
	100	105	110
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Val Thr Gly Asp Leu			
	115	120	125
Glu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser			
	130	135	140
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
145	150	155	160
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
	165	170	175
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Trp Ser Tyr			
	180	185	190
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile			
	195	200	205
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
	210	215	220
Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala			
225	230	235	240
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Gln			
	245	250	255
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Thr Thr Thr Pro Ala			
	260	265	270
Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser			
	275	280	285
Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr			
	290	295	300
Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala			
305	310	315	320
Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys			
	325	330	335

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met  
340 345 350  
Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe  
355 360 365  
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg  
370 375 380  
Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn  
385 390 395 400

Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg  
405 410 415  
Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro  
420 425 430  
Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala  
435 440 445  
Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His  
450 455 460  
Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp

465 470 475 480  
Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
485 490

<210> 16

<211> 530

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TAL binding domain TRAC\_T01-L

<400> 16

Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys  
1 5 10 15  
Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala  
20 25 30

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly  
35 40 45



Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys  
 50 55 60  
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn  
 65 70 75 80  
 Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val  
 85 90 95  
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala  
 100 105 110  
 Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu  
 115 120 125  
 Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala  
 130 135 140  
 Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg  
 145 150 155 160  
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val  
 165 170 175  
 Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val  
 180 185 190  
 Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu  
 195 200 205  
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu  
 210 215 220  
 Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr  
 225 230 235 240  
 Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala  
 245 250 255  
 Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly  
 260 265 270  
 Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys  
 275 280 285  
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala  
 290 295 300

His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly  
305 310 315 320

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys  
325 330 335

Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn  
340 345 350

Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val  
355 360 365

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala  
370 375 380

Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu  
385 390 395 400

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala  
405 410 415

Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala  
420 425 430

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val  
435 440 445

Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val  
450 455 460

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu  
465 470 475 480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu  
485 490 495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr  
500 505 510

Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Arg Pro Ala  
515 520 525

Leu Glu

530

<210> 17

<211> 530

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> TAL binding domain TRAC\_T01-R

<400> 17

Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys

1 5 10 15

Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala

20 25 30

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

35 40 45

Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val

85 90 95

Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala

100 105 110

Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu

115 120 125

Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala

130 135 140

Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg

145 150 155 160

Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val

165 170 175

Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val

180 185 190

Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln

195 200 205

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu

210 215 220  
 Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr  
 225 230 235 240  
 Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala  
 245 250 255  
 Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly  
  
 260 265 270  
 Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys  
 275 280 285  
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala  
 290 295 300  
 His Gly Leu Thr Pro Gln Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly  
 305 310 315 320  
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys  
 325 330 335  
  
 Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn  
 340 345 350  
 Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala Leu Leu Pro Val  
 355 360 365  
 Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala Ile Ala  
 370 375 380  
 Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu  
 385 390 395 400  
 Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val Val Ala  
  
 405 410 415  
 Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Ala  
 420 425 430  
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Glu Gln Val  
 435 440 445  
 Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val  
 450 455 460  
 Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr Pro Gln

465                      470                      475                      480

Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu

485                      490                      495

Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Ala His Gly Leu Thr

500                      505                      510

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

515                      520                      525

Leu Glu

530

<210> 18

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> target TALEN TRAC\_T01

<400> 18

ttgtcccaca gatatccaga accctgaccc tgccgtgtac cagctgaga 49

&lt;210&gt; 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mimotope of CD20 antigen

<400> 19

Cys Pro Tyr Ser Asn Pro Ser Leu Cys

1 5

<210> 20

<211> 1473

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAR 11 dis 16

$\langle 400 \rangle$	20
-----------------------	----

atggctctgc cgcaccgc tctgctgtg ccactggccc tgctgctgca cgcagcaaga 60

ccacaggtgc agctgcagca gagcggccct ggcctgggtga agccaagcca gacactgtcc 120

ctgacctgcg ccatcagcgg cgattccgtg agtccaact ccgccgcctg gaattggatc 180  
aggcagtccc ctctcggggg cctggagtgg ctgggaagga catactatcg gtctaagtgg 240  
tacaacgatt atgccgtgtc tgtgaagagc agaatcaca tcaaccctga cacctccaag 300  
aatcagttct ctctgcagct gaatagcgtg acaccagagg acaccgccgt gtactattgc 360  
gccaggaggagg tgaccggcga cctggaggat gcctttgaca tctggggcca gggcacaatg 420  
gtgaccgtgt ctacggaggagg aggaggatcc ggaggaggag gatctggcgg cggcggcagc 480  
gatatccaga tgacacagtc cccatcctct ctgagcgctt ccgtgggcga cagagtgaca 540

atcacctgta gggcctccca gaccatctgg tcttacctga actggtatca gcagaggccc 600  
ggcaaggccc ctaatctgct gatctacga gcaagctccc tgcagagcgg agtgccatcc 660  
agattctctg gcaggggctc cggcacagac ttaccctga ccatctctag cctgcaggcc 720  
gaggacttcg ccacctacta ttgccagcag tcttatagca tccccagac atttggccag 780  
ggcaccaagc tggagatcaa gaccacaacc ccagcaccaa ggccacctac acctgcacca 840  
accatcgctt ctacgccctt gagcctgaga cctgaggcat gtaggccagc agcaggagga 900  
gcagtccata caaggggtct ggattttgca tgcgacatct acatctgggc acctctggca 960

ggaacatgtg gcgtgctcct gctcagcctg gtcacacccc tgtactgcaa gagaggcagg 1020  
aagaagctgc tgtatatctt caagcagccc ttcattgcgc ccgtgcagac aaccaggagg 1080  
gaggatggct gctcctgtag gtccccagaa gaggaggagg gaggatgtga gctgcgcgtg 1140  
aagttttccc ggtctgccga cgcacctgca taccagcagg gccagaacca gctgtataac 1200  
gagctgaatc tgggccggag agaggagtac gatgtgctgg acaagaggcg cggcagagat 1260  
ccagagatgg gcggcaagcc ccggagaaaag aacctcagg agggcctgta caatgagctg 1320  
cagaaggata agatggccga ggcctattct gagatcggca tgaagggaga gaggcgccgg 1380

ggcaagggac acgacggact gtaccaggga ctgagcacag ccaccaagga tacctatgac 1440  
gccctgcata tgcaggcact gcctccaagg tga 1473

<210> 21

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TARGET TALEN(R)

<400> 21

tgatcctctt gtccacaga tatccagaac cctgacctg ccgtgtacca gctgagaga 59

<210> 22

<211> 1473



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 971-v3 polynucleotide CAR sequence

<400> 22

atggctctgc ccgtcaccgc tctgtctgtg ccactggccc tgctgtgtga cgcagcaaga 60

ccacagggtgc agctgcagca gagcggccct ggccctgtga agccaagcca gacactgtcc 120

ctgacctgcg ccatcagcgg cgattccgtg agtccaact ccgccgcctg gaattggatc 180

aggcagtccc cttctcgggg cctggagtgg ctgggaagga catactatcg gtctaagtgg 240

tacaacgatt atgccgtgtc tgtgaagagc agaatcaca tcaaccctga cacctccaag 300

aatcagttct ctctgcagct gaatagcgtg acaccagagg acaccgccgt gtactattgc 360

gccagggagg tgaccggcga cctggaggat gcctttgaca tctggggcca gggcacaatg 420

gtgaccgtgt ctacggagg aggaggatcc ggaggaggag gatctggcgg cggcggcagc 480

gatatccaga tgacacagtc cccatcctct ctgagcgcct ccgtgggcga cagagtga 540

atcacctgta gggcctccca gaccatctgg tcttacctga actggtatca gcagaggccc 600

ggcaaggccc ctaatctgct gatctacga gcaagctccc tgcagagcgg agtgccatcc 660

agattctctg gcaggggctc cggcacagac ttaccctga ccatctctag cctgcaggcc 720

gaggacttgc ccactacta ttgccagcag tcttatagca tccccagac atttgccag 780

ggcaccaagc tggagatcaa gaccacaacc ccagcaccaa ggccacctac acctgcacca 840

accatcgct ctcagccct gagcctgaga cctgaggcat gtaggccagc agcaggagga 900

gcagtccata caaggggtct ggattttgca tgcgacatct acatctgggc acctctggca 960

ggaacatgtg gcgtgtctct gctcagcctg gtcatcacc tgtactgcaa gagaggcagg 1020

aagaagctgc tgtatatctt caagcagccc ttcattgcgc ccgtgcagac aaccagagg 1080

gaggatggct gctcctgtag gttccagaa gaggaggagg gaggatgtga gctgcgcgtg 1140

aagttttccc ggtctgccga cgcacctgca taccagcagg gccagaacca gctgtataac 1200

gagctgaatc tgggccggag agaggagtac gatgtgtctg acaagaggcg cggcagagat 1260

ccagagatgg gcggcaagcc ccggagaaag aacctcagg agggcctgta caatgagctg 1320

cagaaggata agatggccga ggcctattct gagatcggca tgaagggaga gaggcgccgg 1380

ggcaagggac acgacggact gtaccaggga ctgagcacag ccaccaagga tacctatgac 1440

gccctgcata tgcaggcact gcctccaagg tga 1473

<210> 23

<211> 489

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAR distal CD22

<400> 23

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 Glu Ser Gly Gly Gly Leu

20 25 30

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

35 40 45

Ala Phe Ser Ile Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys

50 55 60

Arg Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr

65 70 75 80

Pro Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys

85 90 95

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala

100 105 110

Met Tyr Tyr Cys Ala Arg His Ser Gly Tyr Gly Thr His Trp Gly Val

115 120 125

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

130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile

145 150 155 160

Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg

165 170 175

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

180 185 190

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr

195 200 205

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

210 215 220

Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp  
225 230 235 240

Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr Phe  
245 250 255

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Thr Thr Thr Pro Ala Pro  
260 265 270

Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu  
275 280 285

Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg  
290 295 300

Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly

305 310 315 320  
Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Lys  
325 330 335

Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg  
340 345 350

Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro  
355 360 365

Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser  
370 375 380

Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu  
385 390 395 400

Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg  
405 410 415

Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln  
420 425 430

Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr  
435 440 445

Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp

450 455 460

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

465	470	475	480
Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
	485		
<210>	24		
<211>	1470		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	CAR distal CD22		
<400>	24		
atggctctgc ccgtcaccgc tctgctgctg ccactggccc tgctgctgca cgcagcaagg			60
cctgaggtgc agctggtgga atccggagga ggctggtga agcctggcgg ctctctgaag			120
ctgagctgtg ccgcctccgg cttcgccttt tccatctacg acatgtcttg ggtgaggcag			180
acccagaga agcgcctgga gtgggtggcc tatatcagct ccggcggcgg cacctactat			240
cccgacacag tgaaggcgcc gtccaccatc tctagagata acgccaagaa tacactgtac			300
ctgcagatgt ctgacctgaa gagcaggat accgcatgt actattgcgc aaggcactcc			360
ggatacgga cactctgggg cgtgctgttt gcctattggg gccagggcac cctggtgaca			420
gtgagcgccg gaggaggagg aagcggcgga ggaggctccg gcggcggcgg ctctgacatc			480
cagatgaccc agaccacatc ctctctgagc gcctccctgg gcgacagggt gacaatctct			540
tgtagagcca gccaggatat ctccaactac ctgaattggt atcagcagaa gcctgatggc			600
accgtgaagc tgctgatcta ctatacatct atcctgcaca gcggagtgcc atcccgttc			660
tctggaagcg gatccggaac cgactactct ctgacaatca gcaacctgga gcaggaggat			720
ttcgccacct atttttgcca gcagggaat accctgcctt ggacatttgg cggcggcaca			780
aagctggaga tcaaggccac cacaaccct gcaccaaggc caccaacacc agcacctacc			840
atcgcatctc agcctctgag cctgagacca gaggcattga ggccagcagc aggaggagca			900
gtgcacacaa ggggactgga ttttgcctgt gatattaca tctgggcacc tctggcagga			960
acatgtggcg tgctcctgct cagcctggtc atcacctgt actgcaagag aggcaggaag			1020
aagctgctgt atatcttcaa gcagcccttc atgagaccg tgcagacaac ccaggaggag			1080
gacggctgct cctgtaggtt ccgagaagag gaggaggag gatgtgagct gcgcgtgaag			1140
ttttcccggt ctgccgatgc acctgcatac cagcaggac agaactagct gtataacgag			1200
ctgaatctgg gccggagaga ggagtacgac gtgctggata agaggagggg aagggaccca			1260
gagatgggag gcaagcctcg gagaaagaac ccacaggagg gcctgtacaa tgagctgcag			1320

aaggacaaga tggccgaggc ctattctgag atcggcata aggagagag gcgccggggc 1380

aaggacacg atggcctgta ccaggcctg tccacagcca ccaaggacac ctatgatgcc 1440

ctgcatatgc aggcactgcc tccaaggtga 1470

<210> 25

<211> 495

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> description of Artificial Sequence: synthetic polypeptide

<220><221> PEPTIDE

<222> (1)..(495)

<223> 4G7-CAR version 1

<400> 25

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ile Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr

35 40 45

Thr Phe Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln

50 55 60

Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys

65 70 75 80

Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser

85 90 95

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser

100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val

115 120 125

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

130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val

145                      150                      155                      160  
 Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly Glu Ser Val  
                                  165                      170                      175  
 Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser Asn Gly Asn  
                                  180                      185                      190  
 Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu  
                                  195                      200                      205  
 Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe  
                                  210                      215                      220  
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val  
  
 225                      230                      235                      240  
 Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Leu Glu Tyr  
                                  245                      250                      255  
 Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp  
                                  260                      265                      270  
 Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala  
                                  275                      280                      285  
 Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly  
                                  290                      295                      300  
  
 Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile  
 305                      310                      315                      320  
 Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val  
                                  325                      330                      335  
 Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe  
                                  340                      345                      350  
 Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly  
                                  355                      360                      365  
 Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg  
  
 370                      375                      380  
 Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln  
 385                      390                      395                      400



Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp  
405 410 415  
Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro  
420 425 430  
Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp  
435 440 445

Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg  
450 455 460  
Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr  
465 470 475 480  
Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
485 490 495

<210> 26  
<211> 495  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> description of Artificial Sequence: synthetic polypeptide

<220><221> PEPTIDE  
<222> (1)..(495)  
<223> 4G7-CAR version 2  
<400> 26

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

	85	90	95
Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala			
	100	105	110
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe			
	115	120	125
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly			
	130	135	140
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met			
145	150	155	160
Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser			
	165	170	175
Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser Asn Gly Asn Thr			
	180	185	190
Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu			
	195	200	205
Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser			
	210	215	220
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu			
225	230	235	240
Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro			
	245	250	255
Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ser Asp Pro			
	260	265	270
Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala			
	275	280	285
Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly			
	290	295	300
Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile			
305	310	315	320
Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val			
	325	330	335

Ile Thr Leu Tyr Cys Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe

340 345 350  
Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly

355 360 365  
Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu Arg

370 375 380  
Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln

385 390 395 400  
Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495