

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7593646号
(P7593646)

(45)発行日 令和6年12月3日(2024.12.3)

(24)登録日 令和6年11月25日(2024.11.25)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62 Z
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13 Z N A
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12
C 1 2 N	15/11 (2006.01)	C 1 2 N	15/11 Z
C 1 2 N	15/85 (2006.01)	C 1 2 N	15/85 Z
請求項の数 16 (全29頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-548701(P2021-548701)	(73)特許権者	598004424
(86)(22)出願日	令和2年2月20日(2020.2.20)		シティ・オブ・ホープ
(65)公表番号	特表2022-521240(P2022-521240 A)		City of Hope
(43)公表日	令和4年4月6日(2022.4.6)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1
(86)国際出願番号	PCT/US2020/019082		0 1 0 - 3 0 0 0 デュアーテ イースト
(87)国際公開番号	WO2020/172440	(74)代理人	デュアーテ ロード 1 5 0 0
(87)国際公開日	令和2年8月27日(2020.8.27)		100107766
審査請求日	令和5年2月3日(2023.2.3)		弁理士 伊東 忠重
(31)優先権主張番号	62/808,222	(74)代理人	100070150
(32)優先日	平成31年2月20日(2019.2.20)		弁理士 伊東 忠彦
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100135079
			弁理士 宮崎 修
		(72)発明者	チン, ホン
			アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1
			0 1 0 , デュアーテ, イースト デュア
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 B A F F - R / C D 1 9 を標的としたキメラ抗原受容体修飾T細胞とその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

B A F F - R 及び C D 1 9 をともに標的とするキメラ抗原受容体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子であって、前記キメラ抗原受容体は、
標的化ドメインであって、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって、以下の：
a) C D 1 9 を標的とする s c F v 及び B A F F - R を標的とする s c F v、又は
b) C D 1 9 s c F v の V L ドメイン、B A F F - R を標的とする s c F v 及び C D 1 9 s c F v の V H ドメイン、を含み、その後、
スパーサドメイン、
膜貫通ドメイン、
共刺激ドメイン、及び C D 3 ζ シグナル伝達ドメイン、
を含む、核酸分子。

【請求項 2】

B A F F - R s c F v は V H ドメイン及び V L ドメインを含み、前記 V H ドメインは、配列番号 1 3 ~ 1 6 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、前記 V L ドメインは、配列番号 1 7 ~ 2 0 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 3】

B A F F - R s c F v は V H ドメイン及び V L ドメインを含み、前記 V H ドメインは、配列番号 2 1 ~ 2 4 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、前記 V L ドメイン

は、配列番号 25 ~ 28 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の核酸分子。

【請求項 4】

前記キメラ抗原受容体は、配列番号 60、61、62 及び 63 から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 5】

前記 VL ドメインと scFv の間及び / 又は前記 VH ドメインと scFv の間に、各々 4 ~ 15 個のアミノ酸を含むリンカーが存在し、前記リンカーは、G 及び S のみを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 6】

前記共刺激ドメインは、CD28 共刺激ドメイン又はアミノ酸の 1 ~ 5 個が修飾されたその変異体、4-1BB 共刺激ドメイン又はアミノ酸の 1 ~ 5 個が修飾されたその変異体、及び OX40 共刺激ドメイン又はアミノ酸の 1 ~ 5 個が修飾されたその変異体からなる群より選択される、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 7】

前記膜貫通ドメインは、CD4 膜貫通ドメイン又はアミノ酸の 1 ~ 5 個が修飾されたその変異体、CD8 膜貫通ドメイン又はアミノ酸の 1 ~ 5 個が修飾されたその変異体、CD28 膜貫通ドメイン又はアミノ酸の 1 ~ 5 個が修飾されたその変異体、CD3ζ 膜貫通ドメイン又はアミノ酸の 1 ~ 5 個が修飾されたその変異体、共刺激ドメイン又はアミノ酸の 1 ~ 5 個が修飾されたその変異体、並びに CD3ζ シグナル伝達ドメイン又はアミノ酸の 1 ~ 5 個が修飾されたその変異体から選択される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 8】

前記スペーサドメインは、IgG4 ヒンジ (S → P)、IgG4 ヒンジ、IgG4 ヒンジ (S228P) + リンカー、CD28 ヒンジ、CD8 ヒンジ - 48aa、CD8 ヒンジ - 45aa、IgG4 (HL - CH3)、IgG4 (L235E、N297Q)、IgG4 (S228P、L235E、N297Q)、及び IgG4 (CH3)、並びに、IgG4 ヒンジ (S → P)、IgG4 ヒンジ、IgG4 ヒンジ (S228P) + リンカー、CD28 ヒンジ、CD8 ヒンジ - 48aa、CD8 ヒンジ - 45aa、IgG4 (HL - CH3)、IgG4 (L235E、N297Q)、IgG4 (S228P、L235E、N297Q)、及び IgG4 (CH3) のアミノ酸の 1 ~ 5 個が修飾された各変異体、からなる群より選択される、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 9】

前記 B A F F - R scFv は、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含み、前記軽鎖可変領域は CDR L1 (配列番号 1)、CDR L2 (配列番号 2) 及び CDR L3 (配列番号 3) を含み、かつ、前記重鎖可変領域が CDR H1 (配列番号 4)、CDR H2 (配列番号 5) 及び CDR H3 (配列番号 6) を含むか、又は

前記軽鎖可変領域は CDR L1 (配列番号 7)、CDR L2 (配列番号 8) 及び CDR L3 (配列番号 9) を含み、かつ、前記重鎖可変領域は CDR H1 (配列番号 10)、CDR H2 (配列番号 11) 及び CDR H3 (配列番号 12) を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 10】

B A F F - R scFv は、アミノ酸配列が配列番号 17 ~ 20 及び 25 ~ 28 から選択される軽鎖可変ドメインを含み、及び / 又は、B A F F - R scFv は、アミノ酸配列が配列番号 13 ~ 16 及び 21 ~ 24 から選択される重鎖可変ドメインを含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 11】

CD19 scFv は、配列番号 30 で表されるアミノ酸配列 D I Q M T Q T T S S L S A S L G D R V T I S C R A S Q D I S K Y L N W Y Q Q K P D G T V K L L I Y H T S R L H S G V P S R F S G S G S G T D Y S L T I S N L E Q E D I A T Y F C Q Q G

10

20

30

40

50

N T L P Y T F G G G T K L E I Tを含むV L、及び、配列番号31で表されるアミノ酸配列E V K L Q E S G P G L V A P S Q S L S V T C T V S G V S L P D Y G V S W I R Q P P R K G L E W L G V I W G S E T T Y Y N S A L K S R L T I I K D N S K S Q V F L K M N S L Q T D D T A I Y Y C A K H Y Y Y G G S Y A M D Y W G Q G T S V T V S Sを含むV Hを含み、かつ、ここで、
C D 19 s c F vのV Lドメインは配列番号30を含み、C D 19 s c F vのV Hは配列番号31を含む、請求項1～10のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項12】

前記請求項1～11のいずれか一項に記載の核酸分子を含む、ベクター又はレンチウイルスベクター。

【請求項13】

前記請求項1～11のいずれか一項に記載の核酸分子を含むか、又は、請求項12に記載のベクター又はレンチウイルスベクターによって形質導入されたヒトT細胞の集団又はNK細胞の集団。

【請求項14】

治療有効量を被験体に投与することで被験体のがんを治療するための方法で用いるための、請求項13に記載されたヒトT細胞の集団を含む組成物であって、がんが、リンパ腫、白血病又は骨髄腫である、組成物。

【請求項15】

リンパ腫は、マンツル細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫若しくはバーキットリンパ腫であるか、又は、白血病が急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ性白血病若しくは有毛細胞白血病であるか、又は、骨髄腫が多発性骨髄腫である、請求項14に記載の組成物。

【請求項16】

ヒトT細胞の集団は、被験体に対して自己又は同種であるか、又は前記ヒトT細胞集団は、C D 4 +細胞及びC D 8 +細胞を含む、請求項14又は15に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

腫瘍特異的T細胞を用いた免疫療法は、遺伝子操作されたT細胞を用いた療法も含めて、抗腫瘍治療について研究されている。

【背景技術】

【0002】

C D 19 C A R - T細胞療法は、多くのB - A L L及びリンパ腫患者に有効である。しかしながら、C D 19を標的としたC A R - T療法を逃れた抗原欠損変異体による再発が、患者の最大20～30%に起こりうる。C D 19陰性B - A L L患者では臨床反応が達成されたことから明らかなように、C D 22 C A R - T細胞療法は、C D 19抗原喪失からの再発の克服のための代替戦略の1つとして提案されている。しかし、C D 22の発現密度は、特に混合型白血病(M L L)では変化し、その発現はC D 22標的療法後に減少することが報告された。

【発明の概要】

【0003】

本明細書には、B細胞活性化因子受容体(B A F F - R)及びC D 19を標的とするキメラ抗原受容体(C A R)を発現するT細胞を用いて、B - A L L及びリンパ腫を含むB細胞悪性腫瘍を治療する方法が記載される。ある場合、単一のC A RはB A F F - RとC D 19をとともに標的とする。B A F F - R及びC D 19を共に標的とする単一のC A Rの場合、細胞外標的化部分には、一方の標的に対するs c F vが他方のs c F vに先行するタンデムフォーマットか、又は2つの標的の一方に対するs c F vが他方の標的に対するs c F vのV L及びV Hドメインの間に配置されるループフォーマットがあつてよい。これらのフォーマットのいずれにおいても、当該C A Rは、膜貫通ドメイン(例えば、C D

10

20

30

40

50

8 膜貫通ドメイン)、共刺激ドメイン(例えば、4 - 1 B B 共刺激ドメイン)及び C D 3 ゼータシグナル伝達ドメインを含む。当該 C A R はまた、例えば、s c F v ドメインと膜貫通ドメインとの間、膜貫通ドメインと補助刺激ドメインとの間、及び/又は補助刺激ドメインと C D 3 ゼータシグナル伝達ドメインとの間に、スペーサー配列を含んでよい。

【0004】

本明細書には、B A F F - R 及び C D 1 9 をともに標的化されるキメラ抗原受容体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子が記載され、当該キメラ抗原受容体は、アミノ末端からカルボキシ末端まで、B A F F - R 及び C D 1 9 を標的とする標的化ドメイン; スペーサードメイン; 膜貫通ドメイン; 共刺激ドメイン; 及び C D 3 ゼータシグナル伝達ドメインを含む。

10

【0005】

様々な実施形態では、(1) 当該標的化ドメインは、アミノ末端からカルボキシ末端まで: a) B A F F - R を標的化した s c F v 及び C D 1 9 を標的化した s c F v ; 又は、b) C D 1 9 を標的化した s c F v 及び B A F F - R を標的化した s c F v を含み; (2) 当該標的化ドメインは、アミノ末端からカルボキシ末端まで: a) C D 1 9 s c F v の V L ドメイン; B A F F - R を標的化した s c F v ; 及び、C D 1 9 s c F v の V H ; 又は、(b) C D 1 9 s c F v の V H ドメイン; B A F F - R を標的化した s c F v ; 及び、C D 1 9 s c F v の V L を含み、かつ、(3) 当該標的化ドメインは、アミノ末端からカルボキシ末端まで: a) B A F F - R s c F v の V L ドメイン; C D 1 9 を標的化した s c F v ; 及び、B A F F の V H ; 又は、(b) B A F F の V H ドメインを含む。- R s c F v ; C D 1 9 を標的とする s c F v ; 及び B A F F - R s c F v の V L を含む。

20

【0006】

本明細書にはまた、B A F F - R を標的とするキメラ抗原受容体と C D 1 9 を標的とするキメラ抗原受容体とともにコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子が記載され、ここで、B A F F - R を標的とするキメラ抗原受容体は、アミノ末端からカルボキシ末端まで: B A F F - R s c F v ; スペーサードメイン; 膜貫通ドメイン; 共刺激ドメイン; 及び C D 3 ゼータシグナル伝達ドメインを含み、C D 1 9 を標的とするキメラ抗原受容体は、アミノ末端からカルボキシ末端まで: C D 1 9 s c F v ; スペーサードメイン; 膜貫通ドメイン; 共刺激ドメイン; 及び C D 3 ゼータシグナル伝達ドメインを含む。

30

【0007】

様々な実施形態では、共刺激ドメインは、アミノ酸の 1 ~ 5 個が修飾された C D 2 8 共刺激ドメイン又はその変異体、アミノ酸の 1 ~ 5 個が修飾された 4 - 1 B B 同時刺激ドメイン又はその変異体、及びアミノ酸の 1 ~ 5 個が修飾された O X 4 0 共刺激ドメイン又はその変異体からなる群から選択され、膜貫通ドメインは、アミノ酸の 1 ~ 5 個が修飾された C D 4 膜貫通ドメイン又はその変異体、アミノ酸の 1 ~ 5 個が修飾された C D 8 膜貫通ドメイン又はその変異体、アミノ酸の 1 ~ 5 個が修飾された C D 2 8 膜貫通ドメイン又はその変異体、及びアミノ酸の 1 ~ 5 個が修飾された C D 3 ゼータシグナル伝達ドメイン又はその変異体から選択され、並びにスペーサードメインは、I g G 4 ヒンジ (S → P)、I g G 4 ヒンジ、I g G 4 (S 2 2 8 P) + リンカー、C D 2 8 ヒンジ、C D 8 ヒンジ - 4 8 a a、C D 8 ヒンジ - 4 5 a a、I g G 4 (H L - C H 3)、I g G 4 (L 2 3 5 E、N 2 9 7 Q)、I g G 4 (S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、N 2 9 7 Q)、I g G 4 (C H 3)、及びアミノ酸の 1 ~ 5 個が修飾された I g G 4 ヒンジ (S → P)、I g G 4 ヒンジ、I g G 4 ヒンジ (S 2 2 8 P) + リンカー、C D 2 8 ヒンジ、C D 8 ヒンジ - 4 8 a a、C D 8 ヒンジ - 4 5 a a、I g G 4 (H L - C H 3)、I g G 4 (L 2 3 5 E、N 2 9 7 Q)、I g G 4 (S 2 2 8 P、L 2 3 5 E、N 2 9 7 Q)、及び I g G 4 (C H 3) の各変異体からなる群から選択される。

40

【0008】

様々な実施形態では、(1) B A F F - R s c F v は、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含み、当該軽鎖可変領域は、C D R L 1 (配列番号 1)、C D R L 2 (配列番号 2

50

）及びCDR L3（配列番号3）を含み、当該重鎖可変領域は、CDR H1（配列番号4）、CDR H2（配列番号5）及びCDR H3（配列番号6）を含み（2）BAFF-R scFvは、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含み、当該軽鎖可変領域は、CDR L1（配列番号7）、CDR L2（配列番号8）及びCDR L3（配列番号9）を含み、当該重鎖可変領域は、CDR H1（配列番号10）、CDR H2（配列番号11）及びCDR H3（配列番号11）を含む。（3）のBAFF-R scFvは：Chi90 HC、Hu90 HC-1、Hu90 HC-2、Hu90 HC-3、Chi55 HC、Hu55 HC-1、Hu55 HC-2、及びHu55 HC-3から選択される重鎖可変ドメイン、及びChi90 LC、Hu90 LC-1、Hu90 LC-2、Hu90 LC-3、Chi55 LC、Hu55 LC-1、Hu55 LC-2、及びHu55 LC-3から選択される軽鎖可変ドメインを含み；（4）BAFF-R scFvは、配列番号17～20及び25～28から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメインを含み；（5）BAFF-R scFvは、配列番号13-16及び21-24から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメインを含み；（6）CD19 scFvは、以下のアミノ酸配列：DIQMTQTTSLSASLGDRVITISCRASQD
ISKYLNWYQQKPDQTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSG
TDYSLTISNLEQEDIATYFC QQGNTLPYTFGGGTKEIT
（配列番号30）を含むVL及びEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVS
GVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYYNLSALKS
RLTIIKDNSKSKQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYGG S
YAMDYWGQQTSTVTSS（配列番号31）を含むVHを含む。

10

20

【0009】

本明細書にはまた、上記の核酸分子の1つ以上を含むベクターも記載される。様々な実施形態では、当該ベクターはレンチウイルスベクターである。本明細書にはまた、記載のベクターによって形質導入されたヒトT細胞の集団も記載される。

【0010】

本明細書にはまた、ヒトT細胞の集団を含む組成物の治療有効量を被験体に投与することを含む、それが必要な被験体のがんの治療方法も記載される。本方法の様々な実施形態では、がんは、リンパ腫、白血病又は骨髓腫であり；リンパ腫は、マンツル細胞リンパ腫、濾胞性大B細胞型リンパ腫、辺縁帯リンパ腫又はバーキットリンパ腫であり；白血病は、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ性白血病又は有毛細胞白血病であり；骨髓腫は、多発性骨髓腫であり；T細胞の集団は、患者について自家性又は同種異系性であり；かつヒトT細胞の集団は、CD4+細胞及びCD8+細胞を含む。

30

【0011】

ある実施形態では、BAFF-R scFvとしては、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域があげられ、軽鎖可変領域としては、配列番号7で表されるCDR L1、配列番号8で表されるCDR L2、及び配列番号9で表されるCDR L3があげられ、重鎖可変領域としては、配列番号10に示すCDR H1、配列番号11に示すCDR H2、及び配列番号12に示すCDR H3があげられる。実施形態では、抗体はヒト化抗体である。

【0012】

ある実施形態では、BAFF-R scFvとしては、配列番号1又は7のCDR L1、配列番号2又は8のCDR L2、配列番号3又は9のCDR L3、配列番号4又は10のCDR H1、配列番号5又は11のCDR H2、及び配列番号7又は13のCDR H3があげられる。

40

【0013】

ある実施形態では、BAFF-R scFvの部分としては、以下の：モノクローナル抗体H90の軽鎖可変ドメイン、モノクローナル抗体H90の重鎖可変ドメイン、又はモノクローナル抗体H55の軽鎖可変ドメイン、及びモノクローナル抗体H55の重鎖可変ドメインがあげられる。重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインは、5～100個、10～50個、又は10～20個のアミノ酸（例えば、GGGGSGGGGSGGGGS）のり

50

ンカーで連結することができる。

【 0 0 1 4 】

ある実施形態では、B A F F - R s c F v は、以下の：a) モノクローナル抗体 H 9 0 の軽鎖可変ドメインのヒト化改変体、及びモノクローナル抗体 H 9 0 の重鎖可変ドメインのヒト化改変体；又は b) モノクローナル抗体 H 5 5 の軽鎖可変ドメインのヒト化改変体、及びモノクローナル抗体 H 5 5 の重鎖可変ドメインのヒト化改変体を含む。重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインは、1 0 ~ 2 0 個のアミノ酸（例えば、G G G G S G G G S G G G G S）のリンカーで連結することができる。ある場合では、H 9 0 軽鎖可変ドメインのヒト化改変体は、H u 9 0 L C - 1、H u 9 0 L C - 2 及び H u 9 0 L C - 3 から選択され、H 9 0 重鎖可変ドメインのヒト化改変体は、H u 9 0 H C - 1、H u 9 0 H C - 2 及び H u 9 0 H C - 3 から選択される。ある場合では、H 5 5 軽鎖可変ドメインのヒト化改変体は、H u 5 5 L C - 1、H u 5 5 L C - 2 及び H u 5 5 L C - 3 から選択され、H 5 5 重鎖可変ドメインのヒト化改変体は、H u 5 5 H C - 1、H u 5 5 H C - 2 及び H u 9 0 H C - 3 から選択される。

10

【 0 0 1 5 】

実施形態では、B A F F - R s c F v 軽鎖可変領域としては、カバット位置 7 に対応する位置にセリンを含む。実施形態では、軽鎖可変領域は、カバット位置 8 に対応する位置にプロリンを含む。実施形態では、軽鎖可変領域は、カバット位置 1 5 に対応する位置にバリンを含む。実施形態では、軽鎖可変領域は、カバット位置 2 2 に対応する位置にスレオニンを含む。実施形態では、軽鎖可変領域は、カバット位置 2 4 に対応する位置にグルタミンを含む。実施形態では、軽鎖可変領域は、カバット位置 4 1 に対応する位置にグリシンを含む。実施形態では、軽鎖可変領域は、カバット位置 4 2 に対応する位置にリシンを含む。実施形態では、軽鎖可変領域は、カバット位置 4 3 に対応する位置にアラニンを含む。実施形態では、軽鎖可変領域は、カバット位置 4 4 に対応する位置にプロリンを含む。実施形態では、軽鎖可変領域は、カバット位置 5 6 に対応する位置にスレオニンを含む。実施形態では、軽鎖可変領域は、カバット位置 7 2 に対応する位置にスレオニンを含む。実施形態では、軽鎖可変領域は、カバット位置 7 3 に対応する位置にフェニルアラニンを含む。実施形態では、軽鎖可変領域は、カバット位置 7 9 に対応する位置にグルタミンを含む。実施形態では、軽鎖可変領域は、カバット位置 1 0 4 に対応する位置にバリンを含む。

20

30

【 0 0 1 6 】

実施形態では、B A F F - R s c F v 軽鎖可変領域は、カバット位置 7 に対応する位置にセリン、カバット位置 8 に対応する位置にプロリン、カバット位置 1 5 に対応する位置にバリン、カバット位置 2 2 に対応する位置にスレオニン、カバット位置 2 4 に対応する位置にグルタミン若しくはセリン、カバット位置 4 1 に対応する位置にグリシン、カバット位置 4 2 に対応する位置にリシン、カバット位置 4 3 に対応する位置にアラニン若しくはスレオニン、カバット位置 4 4 に対応する位置にプロリン、カバット位置 5 6 に対応する位置にスレオニン、カバット位置 7 2 に対応する位置にスレオニン、フェニルアラニン若しくはリシン、カバット位置 7 3 に対応する位置にグルタミン、カバット位置 7 9 に対応する位置にグルタミン、又はカバット位置 1 0 4 に対応する位置にバリンを含む。

40

【 0 0 1 7 】

実施形態では、B A F F - R s c F v 軽鎖可変領域は、カバット位置 7 に対応する位置にセリン、カバット位置 8 に対応する位置にプロリン、カバット位置 1 5 に対応する位置にバリン、カバット位置 2 2 に対応する位置にスレオニン、カバット位置 2 4 に対応する位置にグルタミン若しくはセリン、カバット位置 4 1 に対応する位置にグリシン、カバット位置 4 2 に対応する位置にリシン、カバット位置 4 3 に対応する位置にアラニン若しくはスレオニン、カバット位置 4 4 に対応する位置にプロリン、カバット位置 5 6 に対応する位置にスレオニン、カバット位置 7 2 に対応する位置にスレオニン、フェニルアラニン若しくはリシン、カバット位置 7 3 に対応する位置にグルタミン、カバット位置 7 9 に対応する位置にグルタミン、又はカバット位置 1 0 4 に対応する位置にバリンを含む結合

50

【 0 0 1 8 】

20

【 0 0 1 9 】

30

【 0 0 2 0 】

50

に対応する位置にバリン、カバット位置 108 に対応する位置にリシン、又はカバット位置 109 に対応する位置にバリンを含む結合フレームワーク領域残基を含む。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】タンデム構造の2つの例及びBAFF-R/CD19二重(dual)CARのループ構造の1つの例の概略図である。また、1つの細胞がBAFF-Rを標的とし、もう1つがCD19を標的とする2つのCARを発現するニストロン性構築物の例も示される。

【0022】

【図2】シグナル配列(配列番号58)を含む、未成熟1250二重CARのアミノ酸配列を示す図である。成熟CAR(配列番号59)は、アミノ末端からカルボキシ末端まで、以下の:BAFF-R scFv、リンカー、CD19 scFv(FMC63由来)、IgG4(SmP/L235E,N297Q)スペーサードメイン、CD4膜貫通(transmembrane)ドメイン、4-1BB細胞質(cyto)ドメイン、GGリンカー、及びCD3シグナル伝達ドメインを含む。

10

【0023】

【図3】シグナル配列(配列番号60)を含む、未成熟1296二重CARのアミノ酸配列を示す図である。成熟CAR(配列番号61)は、アミノ末端からカルボキシ末端まで、以下の:CD19 scFv(FMC63由来)、リンカー、BAFF-R scFv、IgG4(SmP/L235E,N297Q)スペーサードメイン、CD4膜貫通(transmembrane)ドメイン、4-1BB細胞質(cyto)ドメイン、GGリンカー、及びCD3シグナル伝達ドメインを含む。

20

【0024】

【図4】シグナル配列(配列番号62)を含む、未成熟1316二重CARのアミノ酸配列を示す図である。成熟CAR(配列番号63)は、アミノ末端からカルボキシ末端まで、以下の:CD19 VL(FMC63由来)、GGGSリンカー、BAFF-R scFv、CD19 VH(FMC63由来)、IgG4(SmP/L235E,N297Q)スペーサードメイン、CD4膜貫通(transmembrane)ドメイン、4-1BB細胞質(cyto)ドメイン、GGリンカー、及びCD3シグナル伝達ドメインを含む。

【0025】

【図5】(A)シグナル配列(配列番号64)を含む未成熟CD19 CAR、及びシグナル配列(配列番号66)を含む未成熟BAFF-R CARのアミノ酸配列を示す図である。成熟CD19 CAR(配列番号65)は、アミノ末端からカルボキシ末端まで、以下の:CD19 scFv(FMC63由来)、IgG4(SmP/L235E,N297Q)スペーサードメイン、CD28膜貫通(transmembrane)ドメイン、CD28(GG)細胞質(cyto)ドメイン、GGリンカー、及びCD3シグナル伝達ドメインを含む。成熟BAFF-R CAR(配列番号67)は、アミノ末端からカルボキシ末端まで、以下の:BAFF-R scFv、IgG4(SmP/L235E,N297Q)スペーサードメイン、CD4膜貫通ドメイン、4-1BB細胞質ドメイン、GGGリンカー、及びCD3シグナル伝達ドメインを含む。

30

【0026】

【図6】BAFF-R/CD19二重CARを発現するベクターの例の概略図である。BAFF-R及びCD19 scFvエレメントを変えて、二重CARの配列を変えることができる。切断EGFR(EGFRt)は選択マーカーとして発現する。

40

【0027】

【図7】二重CAR発現の研究の結果を示す図である。T細胞(Jurkat)を、各CAR構築物又は空ベクター(mock)で形質導入した。当該細胞を、タンパク質L-又はEGFR-APC結合抗体で染色した。タンパク質LはscFvの可変軽鎖を標的とし、切断EGFRをCARベクターで共発現させる。二重CARを適当に発現できる構築物をさらに検討した。二重CAR 1296及び二重CAR 1316は、完全なCAR及びEGFRt選択マーカーを発現したが、二重CAR 1250は、完全CARを発現しな

50

かった。

【0028】

【図8】標的細胞とのインキュベーション後の1250二重CAR T細胞脱顆粒を評価するFACSアッセイの結果を示す図である。標的細胞は、BAFF-R単独陽性、CD19単独陽性、又はBAFF-R及びCD19二重陰性のいずれかである。対照BAFF-R単一CAR及び非形質導入T細胞（非CAR）を対照として用いた。1250二重CARはBAFF-R陽性L細胞に対する応答を誘導せず、BAFF-R標的化scFvが適当に発現していないことが示唆された。

【0029】

【図9】BAFF-R/CD19二重CARの研究モデルの開発に用いられる細胞系の発生に関連する分析の結果を示す図である。二重CARモデル開発に用いたNa1m-6ノックアウト株のFACSヒストグラム。BAFF-R（左）又はCD19（右）をノックアウトするため、Na1m-6 B-ALL腫瘍株をCRISPRで編集した。市販のBAFF-R及びCD19抗体を用いたFACS染色で、表面タンパク質の発現を確認した。Na1m-6野生型（WT）を対照として用いた。

10

【0030】

【図10】図10A～10Bは、BAFF-R/CD19二重CARのCTL機能の分析結果を示す図である。グラフは、Na1m-6 ALL腫瘍株に対する細胞傷害性Tリンパ球アッセイから算出された特異的溶解をプロットしたものである。標的細胞株Na1m-6（WT、CD19ノックアウト、又はBAFF-Rノックアウト変異体）をクロミウム-51で標識し、エフェクターCAR T細胞とインキュベートした。CARには、BAFF-R/CD19二重標的CAR：A、1296及び1250又はB、1296及び1316が含まれ、両パネルの対照には、単一標的CAR：BAFF-R CAR及びCD19 CAR並びに非形質導入T細胞（非CAR、同種対照）が含まれた。全てのT細胞は、各パネルにおいて単一の健常ドナーに由来した。エフェクターT細胞機能による標的細胞から放出されたクロムをガンマカウンターで測定し、可能な最大放出のパーセンテージとして計算した。実験は3回実施し、スチューデントt検定、A、** P<0.001、及びB、** P<0.001 c/w非CAR対照により分析した。1250のCAR CTL二重データは、BAFF-R標的欠損の可能性を示唆している。

20

【0031】

【図11】図11A-11Bは、BAFF-R plus CD19欠損型混合型B-ALL腫瘍におけるBAFF-R/CD19二重CARの活性を示す図である。A) 1×10^5 RFP陰性、ルシフェラーゼ発現Na1m-6-CD19KO + 2.5×10^5 RFP陽性、ルシフェラーゼ発現Na1m-6-BAFF-R KO腫瘍細胞の混合物による0日目のIV腫瘍誘発後のNSGマウスの生物発光イメージ。次いで、5匹の腫瘍マウス群を、各々、単回注入として、10日目に 2.5×10^6 個のCD4⁺TN CAR-T + 10^6 個のCD8⁺TN 1296又は1316の二重CAR T細胞/マウスIVのいずれかによる治療に無作為に割り付けた。同ドナー由来の非形質導入CD4/CD8 T細胞を同種対照（非CAR）として用いた。B) 全生存期間のカプランマイヤープロットを示す。ログランク検定は、示されているように実験群を比較する。1316治療の延命効果は、1296治療と比較して有意であった。

30

40

【0032】

【図12】図12は、ノックアウト腫瘍に対する1316 BAFF-R/CD19二重CARの活性を示す図である。CD107a脱顆粒アッセイにより測定したBAFF-R CAR T細胞の機能のFACSプロットである。CD4又はCD8 BAFF-R CAR T細胞を、CD19 BAFF-R + Na1m-6又はCD19 + BAFF-R Na1m-6株のいずれかと同時にインキュベートした。単一標的CD19又はBAFF-R CAR T細胞を対照として用いた。

【0033】

【図13】図13A-13Bは、混合B-ALL腫瘍におけるTN/MEM 1316 B

50

A F F - R / C D 1 9 二重 C A R の活性を示す図である。A) 1×10^5 の R F P 陰性、ルシフェラーゼ発現 N a l m - 6 - C D 1 9 K O + 1×10^5 の R F P 陽性、ルシフェラーゼ発現 N a l m - 6 - B A F F - R K O 腫瘍細胞の混合物による 0 日目の I V 腫瘍誘発後の N S G マウスの生物発光イメージ。次いで、各群 5 匹の腫瘍マウスを、低用量 (2.8×10^6 T N / M E M)、高用量 (5.6×10^6 T N / M E M) のいずれかを単回注入し、それぞれ 1×10^6 及び 2×10^6 B A F F - R C A R T 細胞を産生させ、9 日目に 1 3 1 6 の二重 C A R T 細胞 / マウス静脈内投与に無作為に割り付けた。又は同一ドナー由来の 5×10^6 個の非形質導入 T N / M E M 細胞を同種対照 (非 C A R) として用いた。B) 全生存期間のカプランマイヤープロットを示す。ログランク検定は、示されているように実験群を比較する。2 回の投与間で生存率に有意差は認められなかった。【発明を実施するための形態】

10

【 0 0 3 4 】

B A F F - R / C D 1 9 二重 C A R 及び B A F F - R / C D 1 9 ニシストロン性 C A R は、様々な B A F F - R s c F v 及び C D 1 9 s c F v のいずれかを用いることができ、第一の s c F v が第二の s c F v の可変ドメインの間に位置する B A F F - R / C D 1 9 二重 C A R の場合、様々な V L 及び V H のいずれかを用いることができる。

【 0 0 3 5 】

図 1 は、B A F F - R s c F v が C D 1 9 s c F v のアミノ末端であり、C D 1 9 s c F v が B A F F - R s c F v のアミノ末端であるタンDEM構築物の 2 つの例の概略図である。また、B A F F - R / C D 2 9 二重 C A R 用のループ構築体の一例を示す。この実施例では、B A F F - R は、C D 1 9 V L (s c F v のアミノ末端) と C D 1 9 V H ドメイン (s c F v のカルボキシ末端) の間に位置する。1 つの細胞が 2 つの C A R を発現し、1 つは B A F F - R を標的とし、もう 1 つが C D 1 9 を標的とする、ニシストロン性構築物の例もまた、示される。

20

【 0 0 3 6 】

B A F F - R s c F v 配列

B A F F - R / C D 1 9 二重 C A R で用いられる B A F F - R s c F v 配列は、2 つのモノクローナル抗体、クローン 9 0 及びクローン 5 5 から誘導することができる。これらは、米国 P C T / U S 2 0 1 7 / 0 3 6 1 8 1 に詳細に記載されている。例えば、V L は、以下に記載される C 9 0 C D R 配列又は C 5 5 C D R 配列を含んでよい。

30

【 0 0 3 7 】

C 9 0 C D R L 1 : E S V D N Y G I S F (配列番号 1)

【 0 0 3 8 】

C 9 0 C D R L 2 : A A S (配列番号 2)

【 0 0 3 9 】

C 9 0 C D R L 3 : Q Q S K E V P W T (配列番号 3)

【 0 0 4 0 】

C 9 0 C D R H 1 : G D S I T S G Y (配列番号 4)

【 0 0 4 1 】

C 9 0 C D R H 2 : I S Y S G S T (配列番号 5)

40

【 0 0 4 2 】

C 9 0 C D R H 3 : A S P N Y P F Y A M D Y (配列番号 6)

【 0 0 4 3 】

C 5 5 C D R L 1 : Q D I S N Y (配列番号 7)

【 0 0 4 4 】

C 5 5 C D R L 2 : Y T S (配列番号 8)

【 0 0 4 5 】

C 5 5 C D R L 3 : F S E L P W T (配列番号 9)

【 0 0 4 6 】

C 5 5 C D R H 1 : G F S L S T S G M G (配列番号 1 0)

50

【 0 0 4 7 】

C 5 5 C D R H 2 : I W W D D D K (配列番号 1 1)

【 0 0 4 8 】

C 5 5 C D R H 3 : A R S F G Y G L D Y (配列番号 1 2)

【 0 0 4 9 】

二重 C A R の B A F F - R s c F v で用いるのに適する重鎖可変ドメイン (V H) に
は、モノクローナル抗体クローン 9 0 (P C T / U S 2 0 1 7 / 0 3 6 1 8 1 により詳細
に記載されている) に由来する以下の重鎖可変ドメインがある。これらのうち、 H u 9 0
H C - 1、H C - 2 及び H C - 3 はヒト化されている。

【 0 0 5 0 】

C h i 9 0 H C :

【 化 1 】

[0050] Chi90 HC:

MYRMQLLSICIALSLALVTNSEVQLQESGPLVKPSQTLSTCSVTGDSITSGYWN
WIRKFPGNKLEYMGYISYSGSTYYNPSLKSRSITRDTSKNQYYLQLNSVTPEDTA
TYYCASPYPFYAMDYWGQGTSTVTVSSDI (SEQ ID NO:13)

10

(配列番号 1 3)

【 0 0 5 1 】

H u 9 0 H C - 1 :

【 化 2 】

[0051] Hu90 HC-1:

MDPKGSLSWRILLFSLAFELSYGQVQLQESGPLVKPSQTLSTCTVSGDSITSG
YWNWIRQHPPGKGLEYIGYISYSGSTYYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTA
ADTAVYYCASPYPFYAMDYWGQGTSLTVTVSS (SEQ ID NO:14)

20

(配列番号 1 4)

【 0 0 5 2 】

H u 9 0 H C - 2 :

【 化 3 】

[0052] Hu90 HC-2:

MDPKGSLSWRILLFSLAFELSYGEVQLQESGPLVKPSQTLSTCTVSGDSITSG
YWNWIRQHPPGKGLEYIGYISYSGSTYYNPSLKSRTISRDTSKNQYSLKLSSVTA
ADTAVYYCASPYPFYAMDYWGQGTSLTVTVSS (SEQ ID NO:15)

30

(配列番号 1 5)

【 0 0 5 3 】

H u 9 0 H C - 3 :

【 化 4 】

[0053] Hu90 HC-3:

MDPKGSLSWRILLFSLAFELSYGEVQLQESGPLVKPSETLSLTCVSGDSITSG
YWNWIRQPPGKGLEYIGYISYSGSTYYNPSLKSRTISRDTSKNQYSLRLSSVTAA
DTALYYCASPYPFYAMDYWGQGTRVTVSS (SEQ ID NO:16)

40

(配列番号 1 6)

50

【 0 0 5 4 】

二重 C A R の B A F F - R s c F v で用いるのに適する軽鎖可変ドメイン (V L) に
は、モノクローナル抗体クローン 9 0 (P C T / U S 2 0 1 7 / 0 3 6 1 8 1 により詳細
に記載されている) に由来する以下の重鎖可変ドメインがある。これらのうち、 H u 9 0
L C - 1、L C - 2 及び L C - 3 はヒト化されている。

【 0 0 5 5 】

C h i 9 0 L C :

【 化 5 】

[0055] Chi90 LC:

MYRMQLLSICIALSLALVTNSDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGISF
MNWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGSQGVPARFSGSGSGTDFTSLNIHPMEEDDTAMY
FCQQSKEVPWTFGGGKLEIKTMEIKR (SEQ ID NO:17)

10

(配列番号 1 7)

【 0 0 5 6 】

H u C 9 0 L C - 1 :

【 化 6 】

[0056] HuC90 LC-1:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGISF
LNWFQQKPGQAPRLLIYAASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYC
QQSKEVPWTFGGGKVEIKRTV (SEQ ID NO:18)

20

(配列番号 1 8)

【 0 0 5 7 】

H u 9 0 L C - 2 :

【 化 7 】

[0057] Hu90 LC-2:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGIS
FMNWFQQKPGQAPRLLIYAASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYY
CQQSKEVPWTFGGGKVEIKRTV (SEQ ID NO:19)

30

(配列番号 1 9)

【 0 0 5 8 】

H u C 9 0 L C - 3 :

【 化 8 】

[0058] HuC90 LC-3:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDNYGIS
FMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNLGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY
YCQQSKEVPWTFGQGTKVEIKRTV (SEQ ID NO:20)

40

(配列番号 2 0)

【 0 0 5 9 】

二重 C A R の B A F F - R s c F v で用いるのに適する重鎖可変ドメイン (V H) の
中には、モノクローナル抗体クローン 5 5 (P C T / U S 2 0 1 7 / 0 3 6 1 8 1 により詳細
に記載されている) に由来する以下の重鎖可変ドメインもある。これらのうち、 H u
5 5 H C - 1、H C - 2 及び H C - 3 はヒト化されている。

50

【 0 0 6 0 】

C h i 5 5 H C :

【 化 9 】

[0060] Chi55 HC:

MYRMQLLSICIALSLALVTNSQVTLKESGPGILKPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGV
GWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDDKYYNSSLKSHLTISKDTSRNQVFLKITSVDTA
DTATYYCARSFGYGLDYWGQGTTTLTVSSAS (SEQ ID NO:21)

(配列番号 2 1)

10

【 0 0 6 1 】

H u 5 5 H C - 1 :

【 化 1 0 】

[0061] Hu55 HC-1:

MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGQVTLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTS
GMGVGWIRQPPGKALEWLAHIWWDDDKYYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMT
NMDPVDATATYYCARSFGYGLDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:22)

20

(配列番号 2 2)

【 0 0 6 2 】

H u 5 5 H C - 2 :

【 化 1 1 】

[0062] Hu55 HC-2:

MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGQVTLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTS
GMGVGWIRQPPGKALEWLAHIWWDDDKYYNSSLKSRLTITKDTSKNQVVLMT
NMDPVDATATYYCARSFGYGLDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:23)

30

(配列番号 2 3)

【 0 0 6 3 】

H u 5 5 H C - 3 :

【 化 1 2 】

[0063] Hu55 HC-3:

MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGQVTLKESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTS
GMGVGWIRQPPGKALEWLAHIWWDDDKYYNTSLKSRLTITKDTSKNQVVLKM
TNMDPVDATATYYCARSFGYGLDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:24)

40

(配列番号 2 4)

【 0 0 6 4 】

また、二重 C A R の B A F F - R s c F v で用いるのに適する軽鎖可変ドメイン (V L) の中には、モノクローナル抗体クローン 9 0 (P C T / U S 2 0 1 7 / 0 3 6 1 8 1 により詳細に記載されている) に由来する以下の重鎖可変ドメインがある。これらのうち、 H u 5 5 L C - 1、 L C - 2 及び H C - 3 はヒト化されている。

【 0 0 6 5 】

C h i 5 5 L C :

50

【化 1 3】

[0065] Chi55 LC:

MYRMQLLSICIALSLALVTNSDIQMTQTSSLSASLGDRVITSCSASQDISNYLNW
YQKPDGTVKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISSLEPEDIATYYCHQFS
ELPWTFGGGKLEIKRT (SEQ ID NO:25)

(配列番号 2 5)

【0 0 6 6】

10

Hu 5 5 L C - 1 :

【化 1 4】

[0066] Hu55 LC-1:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQDISNYLN
WYQKPGKAPKLLIYYTSSLHTGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCHQ
FSELPWTFGGGKVEIKRTV (SEQ ID NO:26)

(配列番号 2 6)

【0 0 6 7】

20

Hu 5 5 L C - 2 :

【化 1 5】

[0067] Hu55 LC-2:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQDISNYLNW
YQKPGKAPKLLIYYTSSLHTGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYYCHQF
SELPWTFGGGKVEIKRTV (SEQ ID NO:27)

(配列番号 2 7)

【0 0 6 8】

30

Hu 5 5 L C - 3 :

【化 1 6】

[0068] Hu55 LC-3:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQDISNYLN
WYQKPGKTPKLLIYYTSSLHTGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDIATYYCHQ
FSELPWTFGGGKVEIKRTV (SEQ ID NO:28)

(配列番号 2 8)

【0 0 6 9】

40

B A F F - R s c F v の V H 及び V L ドメインを修飾することができる。従って、s c F v 中の Hu 9 0 L C - 1、Hu 9 0 L C - 2、Hu 9 0 L C - 3、Hu 9 0 H C - 1、Hu 9 0 H C - 2 及び Hu 9 0 H C - 3、Hu 5 5 L C - 1、Hu 5 5 L C - 2、Hu 5 5 L C - 3、Hu 5 5 H C - 1、Hu 5 5 H C - 2 及び Hu 9 0 H C - 3 の各々は、1、2、3、4 又は 5 個の単一アミノ酸置換を含むことができる。ある場合、置換は C D R ではなくフレームワーク領域 (F R) に限定される。ある場合の置換は、保存的置換である。

【0 0 7 0】

C D R 及び F R の位置は、カバット番号付けシステム (K a b a t ら、免疫学的に注目

50

されるタンパク質の塩基配列第5版米国保健社会福祉省、米国印刷局(1991))で特定される。同様に、抗体の軽鎖又は重鎖内の個々の残基によって占有される位置は、カバット番号付けシステムによって特定されうる。従って、ヒト化抗体のヒト化軽鎖及びヒト化重鎖内での結合に必要な残基の位置は、当技術分野で周知のように、カバット番号付けシステムによる残基の位置で特定することができる。上記のように、ヒト化抗体は、ドナー抗体(例えば、マウス)由来のCDR及びヒト抗体由来の可変領域フレームワーク(FR)がある抗体でありうる。フレームワーク領域(FR)は、ヒト化抗体中のCDRを所定の位置に保持するといわれる。これらの領域は、アミノ末端から順に、軽鎖についてはFR L1、FR L2、FR L3及びFR L4と、重鎖についてはFR H1、FR H2、FR H3及びFR H4と、命名される。

10

【0071】

CD19 scFv 配列

BAFF-R/CD19二重CARでは、CD19を標的とする様々なscFvを用いることができる。

【0072】

FMC63 scFv:

【化17】

[0072] FMC63 scFv: IPDIQMTQTTSSLSASLGDRV TISCRASQDISKYLNWYQQ
KPDGTVKLLI YHTSRLHSGV PSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC
QQGNTLPYTFGGG TKLEITGTS GSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVA
PSQSLSVTCT VSGVSLPDYG VSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSAL
KSRLTIHKDN SKSQVFLKMN SLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQG
TSVTVSS (SEQ ID NO: 29).

20

(配列番号29)

【0073】

FMC63 VL

【化18】

[0073] FMC63 VL: DIQMTQTTSSLSASLGDRV TISCRASQDISKYLNWYQQ
KPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC
QQGNTLPYTFGGG TKLEIT (SEQ ID NO: 30).

30

(配列番号30)

【0074】

FMC63 VH:

【化19】

[0074] FMC63 VH: EVK LQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYG
VSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIHKDN SKSQVFLKMN
SLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSS (SEQ ID NO: 31).

40

(配列番号31)

【0075】

CD19と結合するさらなるscFvは、米国特許出願公開第2016/015272
3号及び国際公開第2016/033570号に記載されている。

【0076】

50

スパーサー領域

本明細書に記載される二重 C A R 及びニシストロン性 C A R は、標的化ドメイン（例えば、s c F v）と膜貫通ドメインとの間に位置するスパーサーを含むことができる。様々な異なるスパーサーを用いることができる。それらのいくつかは、ヒト F c 領域の少なくとも一部、例えば、ヒト F c 領域のヒンジ部分、又は C H 3 ドメイン若しくはその変異体を含む。以下の表 1 は、本明細書に記載される C A R で用いられうる様々なスパーサーを提供する。

表 1：スパーサーの例

【表 1】

表 1：スパーサーの例

名称	長さ	配列
a3	3 aa	AAA
リンカー	10 aa	GGGSSGGGSG (配列番号 3 2)
IgG4ヒンジ(S→P) (S228P)	12 aa	ESKYGPPCPPCP (配列番号 3 3)
IgG4ヒンジ	12 aa	ESKYGPPCPSCP (配列番号 3 4)
IgG4ヒンジ(S228P) +リンカー	22 aa	ESKYGPPCPPCPGGSSGGGSG (配列番号 3 5)
CD28ヒンジ	39 aa	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKP (配列番号 3 6)
CD28ヒンジ-48aa	48 aa	AKPTTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC D (配列番号 3 7)
CD28ヒンジ-45aa	45aa	TTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (配列番号 3 8)
IgG4(HL-CH3) (ヒンジ内にS228P 含む)	129 aa	ESKYGPPCPPCPGGSSGGGSGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID (配列番号 3 9)
IgG4(L235E,N297Q)	229 aa	ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHQAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSGF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (配列番号 4 0)
IgG4(S228P, L235E,N297Q)	229 aa	ESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHQAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (配列番号 4 1)
IgG4(CH3)	107 aa	GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPVLDSGSGFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHE ALHNHYTQKSLSLSLGK (配列番号 4 2)

【 0 0 7 7 】

いくつかのスパーサー領域は、免疫グロブリン（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4）ヒンジ領域、すなわち、免疫グロブリンの C H 1 及び C H 2 ドメインの間にある配列、例えば、I g G 4 F c ヒンジ又は C D 8 ヒンジの全部又は一部を含む。いくつかのスパーサー領域は、免疫グロブリン C H 3 ドメイン又は C H 3 ドメイン及び C H 2 ドメインをともに含む。免疫グロブリン由来の配列は、1 個以上のアミノ酸修飾、例えば、1、2、3、4 又は 5 個の置換、例えば、オフターゲット結合を低下させる置換を含むことができる。

【 0 0 7 8 】

ヒンジ/リンカー領域はまた、配列 E S K Y G P P C P S C P（配列番号 3 4）又は E

S K Y G P P C P P C P (配列番号 33) を有する I g G 4 ヒンジ領域を含むことができる。

【0079】

ヒンジ/リンカーはまた、配列 E S K Y G P P C P P C P (配列番号 33)、続いてリンカー配列 G G G S S G G G S G (配列番号 32)、続いて以下の I g G 4 C H 3 配列【化20】

GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLK

10

(配列番号 41) を含むことができる。従って、リンカー/スパーサー領域全体は、以下の配列：

【化21】

ESKYGPCCPPCGGGSSGGSGGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSGDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO:_)。

(配列番号__) という配列を含むことができる。ある場合、当該スパーサーには、配列番号__と比較して、1、2、3、4、又は5個の単一アミノ酸変化(例えば、保守的变化)がある。ある場合、I g G 4 F c ヒンジ/リンカー領域は、F c 受容体(F c R) による結合を低下させるように、2つの位置(L 235 E ; N 297 Q) で変異される。

20

【0080】

膜貫通ドメイン

本明細書中に記載される二重 C A R 及びニシストロン性 C A R には、様々な膜貫通ドメインが用いられうる。表2は、適当な膜貫通ドメインの例を含む。スパーサー領域が存在する場合、膜貫通ドメインは、スパーサー領域のカルボキシ末端に位置する。

表2：膜貫通ドメインの例

【表2】

30

名称	Accession	長さ	配列
CD3z	J04132.1	21 aa	LCYLLDGILFIYGVILTALFL (配列番号43)
CD28	NM_006139	27aa	FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (配列番号44)
CD28(M)	NM_006139	28aa	MFWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (配列番号45)
CD4	M35160	22aa	MALIVLGGVAGLLFIGLGIFF (配列番号46)
CD8tm	NM_001768	21aa	IYIWAPLAGTCGVLLSLVIT (配列番号47)
CD8tm2	NM_001768	23aa	IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLY (配列番号48)
CD8tm3	NM_001768	24aa	IYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYC (配列番号49)
41BB	NM_001561	27aa	IISFFLALTSTALLFLFF LTLRFSVV (配列番号50)

40

【0081】

共刺激ドメインとCD3ゼータドメイン

共刺激ドメインは、CD3シグナル伝達ドメインと共に用いるのに適したいかなるドメインでありうる。ある場合、共刺激ドメインは、以下の配列：

50

【化 2 2】

RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS

(配列番号 5 2 : LL から GG へのアミノ酸変化に二重下線を付した)と少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 % 同一である配列を含む CD 2 8 共刺激ドメインである。ある場合、CD 2 8 共シグナル伝達ドメインには、配列番号 2 3 と比較して、5 個のアミノ酸変化(好ましくは、保存的であり、好ましくは、下線を付した GG 配列中に存在しない)のうち、1、2、3、4 個がある。ある場合、共シグナル伝達ドメインは、

10

【化 2 3】

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

(配列番号 5 4)と、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 % と同一又は同一である配列を含む 4 - 1 BB の共シグナル伝達ドメインである。ある場合、当該 4 - 1 BB 共シグナル伝達ドメインには、配列番号 2 4 と比較して 1、2、3、4 又は 5 個のアミノ酸変化(好ましくは保存的)がある。

20

【0 0 8 2】

当該共刺激ドメインは、膜貫通ドメインと CD 3 ζ シグナル伝達ドメインの間に位置する。表 3 は、CD 3 ζ シグナル伝達ドメインの配列と共に、適当な共刺激ドメインの例を含む。

表 3 : CD 3 ζ ドメインと共刺激ドメインの例

【表 3】

名称	Accession	長さ	配列
CD3ζ	J04132.1	113 aa	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDRGRDPEMGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号 5 1)
CD28	NM_006139	42aa	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (配列番号 5 2)
CD28gg*	NM_006139	42aa	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (配列番号 5 3)
4-1BB	NM_001561	42 aa	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (配列番号 5 4)
OX40		42 aa	ALYLLRRDQRLPPDAHPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI (配列番号 5 5)

30

40

【0 0 8 3】

様々な実施形態では、共刺激ドメインは、表 3 に示される共刺激ドメイン又は 1 ~ 5 個(例えば、1 又は 2 個)のアミノ酸修飾があるその変異体、1 ~ 5 個(例えば、1 又は 2 個)のアミノ酸修飾がある CD 2 8 共刺激ドメイン又はその変異体、1 ~ 5 個(例えば、1 又は 2 個)のアミノ酸修飾がある 4 - 1 BB 共刺激ドメイン又はその変異体、及び 1 ~ 5 個(例えば、1 又は 2 個)のアミノ酸修飾がある OX 4 0 共刺激ドメイン又はその変異体からなる群から選択される。特定の実施形態では、4 - 1 BB 共刺激ドメイン又はその変異体には、1 ~ 5 個(例えば、1 又は 2 個)のアミノ酸修飾がある。ある実施形態では、2 つの共刺激ドメイン、例えば、1 ~ 5 個(例えば、1 又は 2 個)のアミノ酸修飾(例えば、置換)がある CD 2 8 共刺激ドメイン又はその変異体、及び 1 ~ 5 個(例えば、1

50

又は2個)のアミノ酸修飾(例えば、置換)がある4-1BB共刺激ドメイン又はその変異体が存在する。様々な実施形態では1~5個(例えば、1又は2個)のアミノ酸修飾は置換である。当該共刺激ドメインは、CD3ζシグナル伝達ドメインのアミノ末端であり、ある場合、2~10からなる短いリンカー、例えば、3つのアミノ酸(例えば、GGG)が、共刺激ドメインとCD3ζシグナル伝達ドメインの間に位置している。

【0084】

CD3ζシグナル伝達ドメイン

CD3ζシグナル伝達ドメインは、CD3ζシグナル伝達ドメインと共に用いるのに適したいかなるドメインでありうる。ある場合、CD3ζシグナル伝達ドメインは、以下の配列：

【化24】

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRK
NPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL
HMQALPPR (配列番号51)

(配列番号51)と少なくとも90%、少なくとも95%、同一又は同一である配列を含む。ある場合、CD3ζシグナル伝達には、配列番号51と比較して、5個のアミノ酸変化のうち1、2、3、4個(好ましくは保存的)がある。

【0085】

切断型上皮成長因子受容体

CD3ζシグナル伝達ドメインの後には、リボソームスキップ配列(例えば、LEGGEGRGSLLTCTGDEVENPGPR;配列番号56)及び、以下の配列：

【化25】

LVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTISISGDLHIL
PVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGR
TKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSG
QKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKC
NLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKT
CPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKIPSIA
TGMVGALLLLLVVALGIGLFM (配列番号57)

(配列番号57と)少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%と同一又は同一である配列を有する切断型EGFRが続くことができる。ある場合、切断型EGFRには、配列番号57と比較して、5個のアミノ酸変化のうち1、2、3、4個(好ましくは保存的)がある。

【0086】

「アミノ酸修飾」とは、タンパク質又はペプチド配列におけるアミノ酸置換、挿入、及び/又は欠失を意味する。「アミノ酸置換」又は「置換」とは、親ペプチド又はタンパク質配列中の特定の位置のアミノ酸を別のアミノ酸で置換することをいう。当該置換により、非保存的様式(すなわち、コドン、特定の大きさや特徴を持つアミノ酸のグループに属するアミノ酸から、他のグループに属するアミノ酸へと変化させることにより)で、又は保存的様式(すなわち、コドン、特定の大きさや特徴を持つアミノ酸のグループに属するアミノ酸と同じグループに属するアミノ酸に変化させることにより)で、得られたタンパク質中のアミノ酸を変化させることができる。そのような保守的な変化は、一般に、

結果として生じるタンパク質の構造及び機能の変化がより小さい。以下は、アミノ酸の様々な群：1) 非極性 R 基があるアミノ酸：アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニン；2) 非荷電極性 R 基があるアミノ酸：グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミン；3) 荷電極性 R 基があるアミノ酸 (pH 6.0 で負に荷電)：アスパラギン酸、グルタミン酸；4) 塩基性アミノ酸 (pH 6.0 で正に荷電)：リジン、アルギニン、ヒスチジン (pH 6.0 で正に荷電)；の例示である。他の群はフェニル基があるアミノ酸、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシンである。

【0087】

CAR は、図 9 (配列番号 29 ~ 40) に示された成熟アミノ酸配列と少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % 同一であるか、又は同一である配列を含むことができ、G M C S F R a シグナル配列を含むか、又は含まないか、並びに T2A リボソームスキップ配列及び切断型 E G F R t を含むか、又は含まないかのいずれかである。

10

【0088】

ある場合、CAR オープンリーディングフレームの後に T2A リボソームスキップ配列と、細胞質シグナル伝達尾部欠損切断型 E G F R (E G F R t) が続くベクターを用いて CAR を産生することができる。この配列では、E G F R t の共発現により、遺伝子改変細胞が正確に測定できる、遺伝子改変細胞の正の選択、並びに養子移入後の治療 T 細胞の生体内での効率的な細胞追跡ができる不活性な非免疫原性表面マーカーを提供する。サイトカインストーム及び標的外毒性を回避するための増殖の効率的な制御は、T 細胞免疫療法の成功の重要なハードルである。CAR レンチウイルスベクターに取り込まれた E G F R t は、治療関連毒性の場合に CAR + T 細胞を除去する自殺遺伝子として作用することができる。

20

【0089】

本明細書中に記載される CAR は、好ましくは組換え DNA 技術を用いて製造されるが、当技術分野で公知のいかなる手段によって製造されうる。キメラ受容体のいくつかの領域をコードする核酸は、当技術分野で公知の分子クローニングの標準的な技術 (ゲノムライブラリースクリーニング、オーバーラップ PCR、プライマー支援ライゲーション、部位特異的突然変異誘発など) により、簡便に調製し、完全なコード配列に組み立てることができる。得られたコード領域は、好ましくは発現ベクターに挿入され、好適な発現宿主細胞系、好ましくは T リンパ球細胞系、最も好ましくは自己 T リンパ球細胞系を形質転換するために用いられる。

30

【0090】

患者から単離された様々な T 細胞サブセットを、CAR 発現用ベクターで形質導入することができる。セントラルメモリー T 細胞は、有用な T 細胞サブセットの 1 つである。セントラルメモリー T 細胞は、例えば、C l i n i M A C S (登録商標) 装置を用いて、所望の受容体を発現する細胞を免疫磁気的に選択して、C D 4 5 R O + / C D 6 2 L + 細胞を選択することにより、末梢血単核細胞 (P B M C) から単離することができる。セントラルメモリー T 細胞用に濃縮された細胞は、抗 C D 3 / C D 2 8 で活性化され得、例えば、CAR の発現を指示するレンチウイルスベクター、並びにインビボ検出、アブレーション、及び潜在的 e x v i v o 選択用の非免疫原性表面マーカーで形質導入されうる。活性化 / 遺伝子修飾されたセントラルメモリー T 細胞は、I L - 2 / I L - 1 5 を用いてインビトロで増殖させた後、凍結保存することができる。

40

【実施例 1】

【0091】

二重 CAR 発現用 T 細胞集団の調製

B A F F - C D 1 9 二重 CAR の発現用に以下の T 細胞集団：C D 4 + ナイーブ T 細胞 (C D 4 + T N)、C D 8 + ナイーブ T 細胞 (C D 8 + T N)、C D 8 + セントラルメモリー T 細胞 (C D 8 + T C M)、C D 8 + メモリー幹細胞 (C D 8 + M S C) 及び P a n T 細胞 (P a n T) を調製することができる。簡潔には、5 m L の血液試料を 5 m L の

50

ヒストパーク - 1077 (Sigma Aldrich) に加える。混合物を 2500 RPM (室温、ブレーキなし) で 20 分間遠心分離する。中期末梢血単核細胞 (PBMC) 層を収集し、50 mL の PBS (Corning) で洗浄し、1500 RPM (RT) で 5 分間遠心分離する。採取した細胞を 10 mL の赤血球溶解緩衝液 (Qiagen) と混合し、7 分間インキュベートする。次いで、細胞を PBS で洗浄し、5 分間遠心分離する (1500 RPM、RT)。

【0092】

様々な T 細胞集団は、製造業者の指示書を用いて StemCell Technologies, Inc. から入手可能な以下のキット: EasySep™ Human Naive CD4+ T 細胞増菌キット (CD4+ TN)、EasySep™ Human Naive CD8+ T 細胞増菌キット (CD8+ TN)、及び EasySep™ Human T 細胞増菌キット (Pan T); を用いて調製することができる。CD8+ TCM は、製造業者の指示書を用いて StemCell Technologies, Inc. から EasySep™ Human CD8+ T 細胞増菌キットを用いて CD8+ T 細胞を単離し、次いで、CD8 - PerCP - Cy5.5、CD45 RO - APC、及び CD62L - PE で染色することによって調製することができる。次いで、染色された細胞を選別して、CD8+ / CD45+ / CD62L+ トリプル陽性細胞を単離する。CD8+ メモリー幹細胞 (CD8+ MSC) は、表 4 に示す培養条件を用いて CD8+ TN から作製することができる。他の T 細胞集団は、表 4 に示すように培養することができる。

【表 4】

表 4				
集団	培地	血清	サイトカイン	追加の添加物
CD4+ T _N , CD8+ T _N , CD8+ T _{CM} Pan T	X-VIVO 15 (Lonza)	10% ヒト Ab 血清 (Valley Biomedical)	100 U/mL hIL-2	100 U/mL ペニシリン 100 µg/mL ストレプトマイシン
CD8+ MSC	AIM-V (Thermo Fisher)	5% ヒト Ab 血清 (Valley Biomedical)	5 ng/mL IL-7 30 ng/mL IL-21 (Cellgenix)	2 mM glutamax (Thermo Fisher Scientific) 5 mM TWS119 (Cayman Chemical)

【実施例 2】

【0093】

BAFF - R / CD19 二重 CAR の配列決定

様々な BAFF - R / CD19 二重 CAR を調製した。1250 二重 CAR (配列番号 59) は、アミノ末端からカルボキシ末端に向けて: BAFF - R scFv、リンカー、CD19 scFv (FMC63 由来)、IgG4 (SmP / L235E, N297Q) スペーサードメイン、CD4 膜貫通ドメイン、41BB 細胞質ドメイン、GG リンカー、及び CD3 ゼータシグナル伝達ドメインを含む (図 2)。1296 二重 CAR (配列番号 61) は、アミノ末端からカルボキシ末端に向けて: CD19 scFv (FMC63 由来)、リンカー、BAFF - R scFv、IgG4 (SmP / L235E, N297Q) スペーサードメイン、CD4 膜貫通ドメイン、41BB 細胞質ドメイン、GG リンカー、及び CD3 ゼータシグナル伝達ドメインを含む (図 3)。1316 二重 CAR (配列番号 63) は、アミノ末端からカルボキシ末端に向けて: CD19 VL (FMC63 由来)、GGGS リンカー、BAFF - R scFv、CD19 VH (FMC63 由来)、IgG4 (SmP / L235E, N297Q) スペーサードメイン、CD4 膜貫通ドメイン、41BB 細胞質ドメイン、GG リンカー、及び CD3 ゼータシグナル伝達ドメインを含む。

【 0 0 9 4 】

ニシストロン性CARは、レンチウイルスベクターを用いてBAFF-R CAR及びCD19 CARを発現する。2つのCARは同じT細胞で発現する。成熟CD19 CAR（配列番号65）は、アミノ末端からカルボキシ末端に向けて：CD19 scFv（FMC63由来）、IgG4（SmP/L235E, N297Q）スペーサドメイン、CD28膜貫通ドメイン、CD28（GG）細胞質ドメイン、GGGリンカー、及びCD3シグナル伝達ドメインを含むことができる。成熟BAFF-R CAR（配列番号67）は、アミノ末端からカルボキシ末端に向けて：BAFF-R scFv、IgG4（SmP/L235E, N297Q）スペーサドメイン、CD4膜貫通ドメイン、4-1BB細胞質ドメイン、GGGリンカー、及びCD3シグナル伝達ドメインを含むことができる。

10

〔実施例2〕BAFF-R/CD19二重CARを発現するレンチウイルスベクターの調製

【 0 0 9 5 】

図5は、1250二重CAR発現用レンチウイルスベクターの概略図である。1296二重CAR及び1316二重CARは、類似のレンチウイルスベクター（svFv部分の置換）を用いて作製した。

【実施例3】

【 0 0 9 6 】

CAR発現細胞の調製

CD3/CD28ヒトT細胞活性化ビーズ（Thermo Fisher）と細胞に対するビーズ比1：1で細胞を混合し、一晚インキュベート（加湿5% CO₂、37℃）することで、二重CARを発現するレンチウイルスベクターを用いて形質導入のための調製において細胞を活性化した。インキュベーション後、細胞を計数し、48穴プレート中に1×10⁶細胞/穴を分配した。細胞をMOI1で感染させた。各々の場合、全培養培地を250μLに補足し、30分間遠心分離した（800g、RT）。細胞を一晚インキュベートし（加湿5% CO₂、37℃）、次いで表1に示された培地中で10日間培養する。CD4+ TN、CD8+ TN、CD8+ TCM、及びPan T細胞の培養物は、CD3/CD28ビーズを1：1の細胞対ビーズ比で含んでいた。CD8+ T MSCの培養物は、CD3/CD28ビーズを含まなかった。CARの発現は、フローサイトメトリーを用いてGFP陽性細胞の比率によって評価した。

20

【実施例4】

【 0 0 9 7 】

CARの発現

T細胞（Jurkat）を、各CAR構築物又は空ベクターで形質導入した。CARの発現を評価するため、細胞をプロテインL-又はEGFR-APC結合抗体で染色した。タンパク質LはscFvの可変軽鎖を標的とし、切断型EGFRはCARベクターによって共発現される。二重CARを適当に発現することができる構築物をさらに検討した。図7に見られるように、二重CAR1296及び二重CAR1316は、完全型CAR及びEGFRt選択マーカーを発現したが、二重CAR1250は、完全型CARを発現しなかった。

30

【実施例5】

【 0 0 9 8 】

BAFF-R標的CAR T細胞によるインビトロ細胞殺傷

1296二重CAR、1316二重CAR、CD19 CAR又はBAFF-R CAR細胞を発現する様々なT細胞集団を用いるインビトロアッセイである。標的細胞株Na1m-6（WT、CD19ノックアウト、又はBAFF-Rノックアウト変異体）をクロミウム-31で標識し、エフェクターCAR T細胞とインキュベートした。CARには、BAFF-R/CD19二重標的CAR：1296及び1316；単一標的CAR：BAFF-R CAR及びCD19 CARが含まれた。非形質導入T細胞（非CAR）を同種対照として用いた。全T細胞は、単一の健常ドナーに由来した。エフェクターT細胞機能による標的細胞から放出されたクロムをガンマカウンターで測定し、可能な最大放出比率と

40

50

して計算した。図 8 に見られるように、1250 二重 CAR は、BAFF-R - 標的化 scFv が適当に発現されないことを示唆する BAFF-R - 陽性 L 細胞に対する応答を誘導しなかった。

【実施例 6】

【0099】

BAFF-R 及び CD19 欠損マウスモデル

Na1m-6 B - ALL 腫瘍株を CRISPR で遺伝子編集して、BAFF-R 又は CD19 をノックアウトした。市販の BAFF-R 及び CD19 抗体を用いた FACS 染色により、表面タンパク質の発現を確認した。Na1m-6 野生型 (WT) を対照として用いた。図 9 に示すように、FACS 分析はノックアウトを確認する。

10

【実施例 7】

【0100】

二重 CAR T 細胞の CTL 機能

本研究では、その結果を図 10 に示すが、標的細胞株 Na1m-6、WT、CD19 ノックアウト、又は BAFF-R ノックアウト変異体をクロミウム-51 で標識し、エフェクター CAR T 細胞とインキュベートした。CAR には BAFF-R / CD19 の二重標的 CAR が含まれた。1250 の二重 CAR CTL データは、BAFF-R 標的欠損の可能性を示唆する。

【実施例 8】

【0101】

BAFF-R 陽性 CD19 陰性混合型 B - ALL 腫瘍における BAFF-R / CD19 二重 CAR の活性

図 11 A - 11 B は、 1.5×10^5 の RFP 陰性、ルシフェラーゼを発現する Na1m-6 - CD19 KO + 2.5×10^5 の RFP 陽性、ルシフェラーゼを発現する Na1m-6 - BAFF-R KO 腫瘍細胞の混合物を用いて、0 日目の腫瘍誘発の IV 後の 1316 二重 CAR 及び 1296 NSG マウスの影響を調べる研究の結果を示す。次いで、5 匹の腫瘍マウス群を、各々、単回注入として、10 日目に 2.5×10^6 個の CD4 TN CAR-T + 10^6 個の CD8 TN 1296 又は 1316 個の二重 CAR T 細胞 / マウス IV のいずれかによる治療に無作為に割り付けた。同ドナー由来の非形質導入 CD4 / CD8 T 細胞を同種対照 (非 CAR) として用いた。図からわかるように、1316 の治療による延命効果は、1296 の治療と比較して有意であった。

30

【実施例 9】

【0102】

ノックアウト腫瘍に対する 1316 BAFF-R / CD19 二重 CAR の脱顆粒

CD107a 脱顆粒を用いて、ノックアウト腫瘍に対する 1316 二重 CAR の効力を評価した。CD4 又は CD8 BAFF-R CAR T 細胞を、CD19 BAFF-R + Na1m-6 又は CD19 + BAFF-R Na1m-6 系のいずれかとインキュベートした。単一標的 CD19 又は BAFF-R CAR T 細胞を対照として用いた。

【実施例 10】

【0103】

混合型 B - ALL 腫瘍における TN / MEM 1316 BAFF-R / CD19 二重 CAR の活性

0 日目に、NSG マウスに、 1×10^5 の RFP 陰性、ルシフェラーゼ発現 Na1m-6 - CD19 KO + 1×10^5 の RFP 陽性、ルシフェラーゼ発現 Na1m-6 - BAFF-R KO 腫瘍細胞の混合物を投与した。次いで、各群 5 匹の腫瘍マウスを、低用量 (2.8×10^6 TN / MEM)、高用量 (5.6×10^6 TN / MEM) のいずれかを単回注入し、それぞれ 1×10^6 及び 2×10^6 BAFF-R CAR T 細胞を産生させ、9 日目に 1316 二重 CAR T 細胞 / マウス静脈内投与に無作為に割り付けた。又は同ドナー由来の 5×10^6 個の非形質導入 TN / MEM 細胞を同種対照 (非 CAR) として用いた。1316 二重 CAR の延命効果は有意であった。2 回の投与間で生存率に有意

40

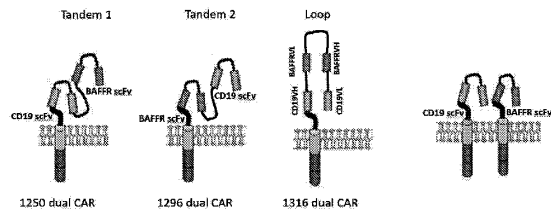
50

差は認められなかった。

【図面】

【図 1】

FIGURE 1



【図 2】

FIGURE 2

BAFFscFv-(g4s)4-CD19R-IgG4(L235E,N297Q)-41BB-Zeta

```
1  MLLLVTSLLL CELPHAPALL IPDVQLQSSG PGLVKPSQTL SLTCTVSGDS
   GMCsFv signal peptide BAFFscFv
51  ITSGYNNWIR QHPGKGLLEYI GYISYSGSTY YNPSLKSRTV ISRDTSKNQY
101 SLKLSSTVTA DTAVVYCAPS NYPFYAMDYV GQGLTVTVSS GGGSGGGSGS
151 GGGGSDIVLT QSPATLSLSP GERATLSORA SESVDNYGIS FMNWFQKQPG
201 QAPRLLIYAA SNRATGIPAR FSGSGSGTDF TLTISSLEPE DFAVYQCQS
251 KDVFWTGGG TKVEIKRGGG GSGGGSGGG GSGGGSGSDIQ MTQTSLSLA
   (g4s)4 CD19RscFv
301 SLGDRVTISC RASQDISKYL NWYQKQPDGT VKLLIYHTSR LHSVPFSPFS
351 GSGSGTDYSL TISNLEQEDI ATYFCQQNT LPYTFGGGK LEITGSTSGS
401 GKPGSGEGST KGEVKLQESG PGLVAPQSGL SVTCTVSGVS LPDYGVSWIR
451 QPPRGLEWL GVIWGSSETY YNSALKSLT IIKDNSKQV FLKMNSLQTD
501 DTAIYYCAKH YYYGGSYAMD YWQGTSTVT SSESKYGFPC PPCPAPEFEG
   IgG4SmP/L235E,N297Q
551 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT FEVTCVVVDV SQEDPEVQFN WYVDGVEVHN
601 AKTKPREQF QSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPSSIEKTI
651 SKAKGQPREP QVYTLPPSQE EMTKNQVSLT CLVKGFPYSD IAVWESNGQ
701 PENNYKTTTP VLSDSGSFFL YSRLTVDKSR WQEGNVFSCS VMHEALHNHY
751 TQKSLSLSLG KMALIVLGGV AGLLLFIFLG IFFKRGKKL LYIFKQPFMR
   CD4 transmembrane 41BB cyto
801 PVQTTQEEDG CSCRFPFEEE GGCELGGGRV KFSRSADAPA YQQGNQOLYN
   CD3 zeta
851 ELNLGRREY DVLDKRRGRD PEMGKPRRK NPQEGLYNEL QKDKMAEAYS
901 EIGMKGERRR KGHDGLYQG LSTATKDTYD ALHMQALPFR
```

10

【図 3】

FIGURE 3

CD19R-(g4s)4-BAFFscFv-IgG4(L235E,N297Q)-41BB-Zeta

```
1  MLLLVTSLLL CELPHAPALL IPDIQMTQTT SSLSASLGDR VTISCRASQD
   GMCsFv signal peptide CD19RscFv
51  ISKYLWYQQ KPDGTVKLLI YHTRLSHGV PSRFSGSGSG TDYSLTISNL
101 EQEDIATYFC QQNTLPYTF GGTGKLEITG STSGSGKPGS GEGSTKGEVK
151 LQESGPGIVA PSQSLSVICT VSGVSLPDYG VSWIRQPPRK GLEWLGVING
201 SETTYYNAL KSRLLTIKDN SKSQVFLKMN SLQTDITAI YCAKHYIYGG
251 SYAMDYWGQ TSVTVSSGGG GSGGGSGGG GSGGGSGEVQ LQESGPGLVK
   (g4s)4 BAFFscFv
301 PSQTLSTICT VSGDSITSGY WNWIRQHPGK GLEYIGYISY SGTYYNPSL
351 KSRVTISRDT SKNQYSLKLS SVTAADTAVY YCASPNYPFY AMDYWGQTL
401 VTVSSGGGS GGGSGGGGS DIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD
451 NYGISPMNWF QQKPGQAPRL LIYAASNRAT GIPARFSGS SGTDFTLTIS
501 SLEPEDFAVY YCQSKVEVPW TFGGCTKVEI KRESKYGFPC PPCPAPEFEG
   IgG4 (SmP) (L235E,N297Q)
551 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT FEVTCVVVDV SQEDPEVQFN WYVDGVEVHN
601 AKTKPREQF QSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPSSIEKTI
651 SKAKGQPREP QVYTLPPSQE EMTKNQVSLT CLVKGFPYSD IAVWESNGQ
701 PENNYKTTTP VLSDSGSFFL YSRLTVDKSR WQEGNVFSCS VMHEALHNHY
751 TQKSLSLSLG KMALIVLGGV AGLLLFIFLG IFFKRGKKL LYIFKQPFMR
   CD4 transmembrane 41BB cyto
801 PVQTTQEEDG CSCRFPFEEE GGCELGGGRV KFSRSADAPA YQQGNQOLYN
   CD3 zeta
851 ELNLGRREY DVLDKRRGRD PEMGKPRRK NPQEGLYNEL QKDKMAEAYS
901 EIGMKGERRR KGHDGLYQG LSTATKDTYD ALHMQALPFR
```

【図 4】

FIGURE 4

CD19VL-BAFFVH-linker-BAFFVL-CD19RH-IgG4(L235E,N297Q)-CD4tm-41BB-Zeta

```
1  MLLLVTSLLL CELPHAPALL IPDIQMTQTT SSLSASLGDR VTISCRASQD
   GMCsFv signal peptide CD19R VL
51  ISKYLWYQQ KPDGTVKLLI YHTRLSHGV PSRFSGSGSG TDYSLTISNL
101 EQEDIATYFC QQNTLPYTF GGTGKLEITG GGGSEVQLQE SGFGLVKPSQ
   (g4s) BAFFscFv VH
151 TSLTCTVSG DSITSGYNNW IRQHPGKGL EYIGYISYSGS TYNPSLKS
201 VTISRDTSKN QYSLKLSVT AADTAVYCA SPNYFFYAMD YWQGTTLVTV
251 SSGSTSGSCK PGSGEGSTKG DIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD
   Linker BAFFscFv VL
301 NYGISPMNWF QKPGQAPRL LIYAASNRAT GIPARFSGS SGTDFTLTIS
351 SLEPEDFAVY YCQSKVEVPW TFGGCTKVEI KRGSGSFEVK LQESGPGIVA
   (g4s)CD19RscFv VH
401 PSQSLSVICT VSGVSLPDYG VSWIRQPPRK GLEWLGVING SETTYYNAL
451 KSRLLTIKDN SKSQVFLKMN SLQTDITAI YCAKHYIYGG SYAMDYWGQ
501 TSVTVSSRES YGPPCPCPA PEFEGGPSVF LFPKPKDITL MISRTPEVTC
   IgG4 (SmP) (L235E,N297Q)
551 VVDVSOEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFQSTYR VVSVLTVLHQ
601 DWLNGKEYKC KVSNGKLPSS IEKTKSKAG OPREPOVYTL PPSOEKTKN
651 QVSLTCLVKG FYPGDIWESV ESNQEPENNY KTTTPVLDSD GSFYLYSLT
701 VKSRWQEGN VFSCVMHEA LHNHYTQKSL SLSLGKMLT VLGGVAGLLL
   CD4 transmembrane
751 FIGLGIFFKR GRKKLLYIFK QPFMRPVQTT QEEDGCSGRF PEEEGGCEL
   41BB cyto
801 GGGRVKFSRS ADAFAYQQGQ NQLYNELNLG RREYDVLDK RRGDRPEMGG
   CD3zeta
851 KPRRNPOEG LYNELQDKM AEAYSEIGMK GERRRGKGDH GLYQGLSTAT
901 KDTYDALHMQ ALPFR
```

20

30

40

50

【 5 】

FIGURE 5

CD19R-IgG4(L235E,N297Q)-CD28tm-CD28gg-Zeta_BAFFscFv-IgG4(L235E,N297Q)-41BB-Zeta bicistronic

CD19RscFv-IgG4(L235E, N297Q)-CD28tm-CD28gg-Zeta

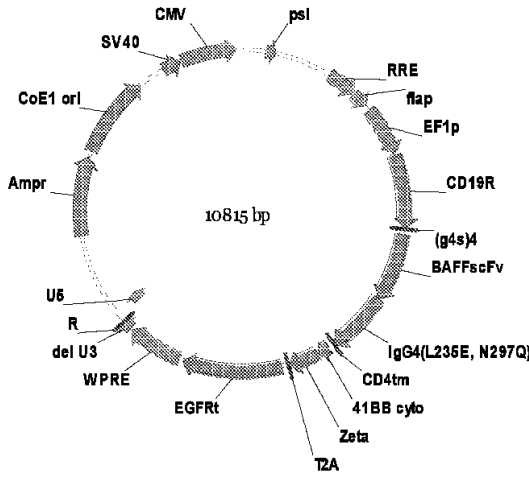
```
1 MLLVTSLLI CELPHEAPLL IPEIQMTQT SLSASLGR VTISCRASQD
  GNCFSRa signal peptide CD19scFv
51 ISKYIANWYQ KPDSTVKLLI YETSLRHSV PSRFGSGSG TDYSLTISNL
101 EQEDLITYFC QQNTLPYTF GGTGKLEITG STSGSGKPGS GEGSTKGEVK
151 LQESGPGSLVA PQSLSVICT VSGVSLFDYG VSWIRGPPRK GLOWLGVING
201 SEITYWNSL KSLTITKTM SSGVPEKWM SLQTDUDATY YQXJYVYGG
251 SYANDYWGQ TSVTVSSESK YGPPCPPCA PFEGGSPSVF LFFPKKDTL
  IgG4 (SsP) (L235E,N297Q)
301 MISRPETVC VVVDVSQDEP EVQNMWYVG VEVENAKTKE REEQPQSTYR
351 VVSVITVLRQ DWLNGKEYKC KVNKGLPSS IKTISKANG QPREQVYTL
401 PFSQEBMTKM QVSLTCLVKG FYPSDIAYEV ESNQGEENNY KTFPEVLDSO
451 GSFFLYSLRT VDKSRWQEGN VFSCVMHEA LNNHYTKQLS SLSLGNKFWV
  CD28
501 LVVVGVLAC YSLIVTAVFI IFVNSKRSR GGESDYDNT FRPFGFRKH
  Transmembrane
551 YQPYAPPRDF AAYRSGGGRV KFSRSADAPA YQQGQQLYN EILNGREEY
  CD3 Zeta
601 DVLRKRRGRD PEMGKFRPK NPQSGLYNE QKDKNABAYS EIGNKGERRR
651 SKSHDGLYQS LSTAKDTYD ALHMGALPFR
```

BAFFscFv-IgG4(L235E, N297Q)-CD4tm-41BB-Zeta

```
1 MLLVTSLLI CELPHEAPLL IPEVQJQSS PGIVKPSQTL SLTICVSGDS
  GNCFSRa signal peptide BAFFscFv
51 ITSQVNRIR QHFGKLEVI GYISVSGSTY YNPSLKRVT ISRDGKNQY
101 SIKLSVYAA DPAVYICAP NYPPYAMWY GQOLIVTSS GGGSGGGGS
151 GGGSDIVLT QSPALSLSP GERATLSRA SESVMYGIS PMWFOQKPG
201 QAPRLIYAA SNRATGIPAR PSGSGSTDF TLTISSELEP DPAVYICQGS
251 KEVPMVFGGS TKVZIKRESK YGPPCPPCA PFEGGSPSVF LFFPKKDTL
  IgG4 (SsP) (L235E,N297Q)
301 MISRPETVC VVVDVSQDEP EVQNMWYVG VEVENAKTKE REEQPQSTYR
351 VVSVITVLRQ DWLNGKEYKC KVNKGLPSS IKTISKANG QPREQVYTL
401 PFSQEBMTKM QVSLTCLVKG FYPSDIAYEV ESNQGEENNY KTFPEVLDSO
451 GSFFLYSLRT VDKSRWQEGN VFSCVMHEA LNNHYTKQLS SLSLGNKFWV
  CD4
501 LVGGVAGLL FGLGIFFRK GRKKLYIFK QPFMRVQTT QBEDGSCRF
  Transmembrane
551 FEEEDGGCEL GGGKVFERS ADAPAYQQGQ NQLYNELNLG RREZYDVLK
  CD3 Zeta
601 RRGDRFEGGS KPRRNFOEG LYNELQKKM AEAYSIGMK GERRRGKGD
651 GLYQSLSTAT KQYDALIMQ ALPFR
```

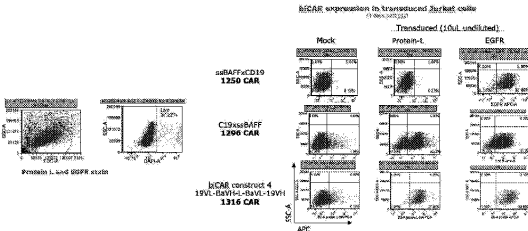
【 6 】

FIGURE 6



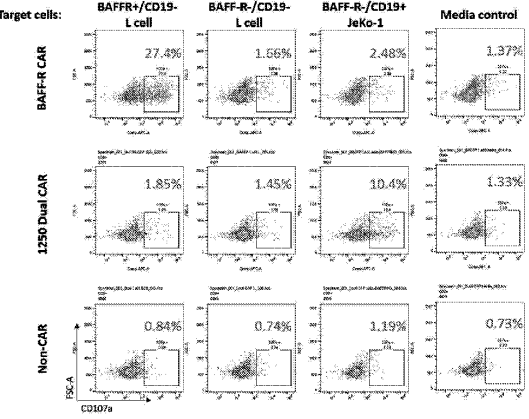
【 7 】

FIGURE 7



【 8 】

FIGURE 8



10

20

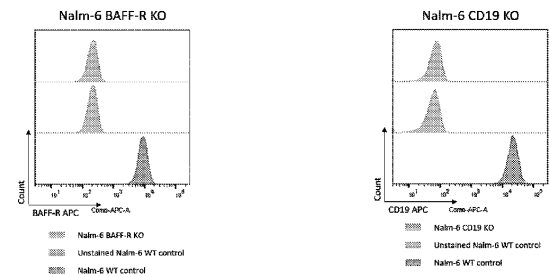
30

40

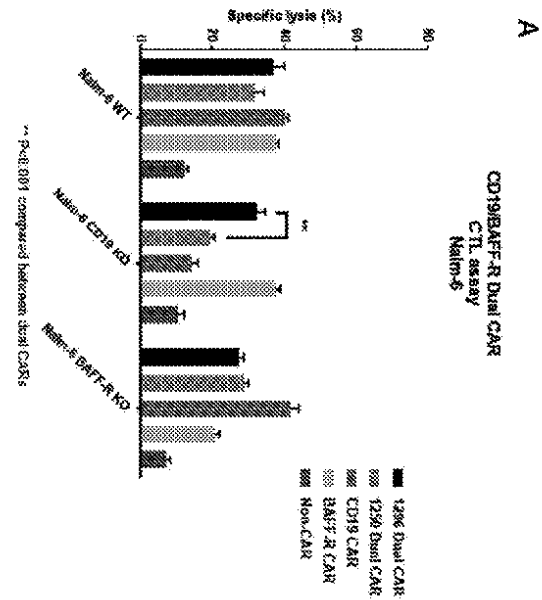
50

【 9 】

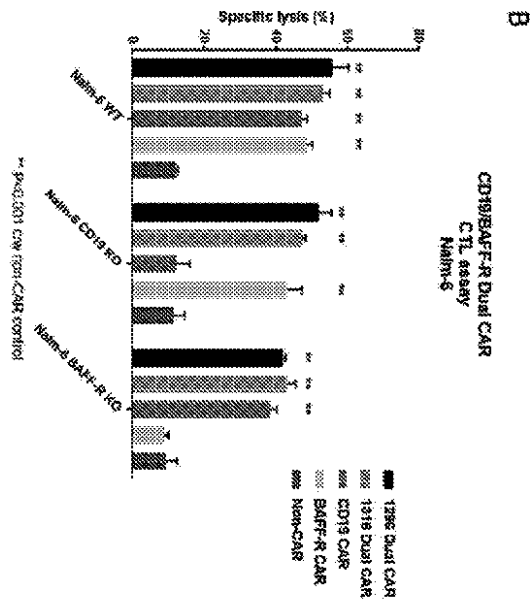
FIGURE 9



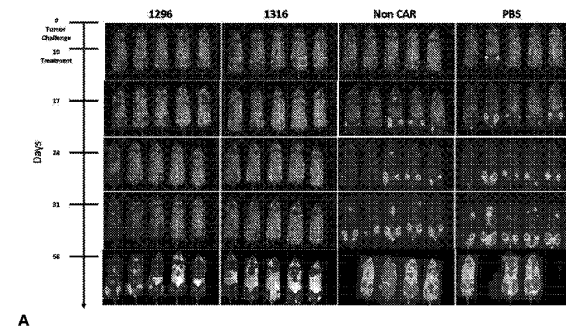
【 1 0 A 】



【 1 0 B 】



【 1 1 A 】



10

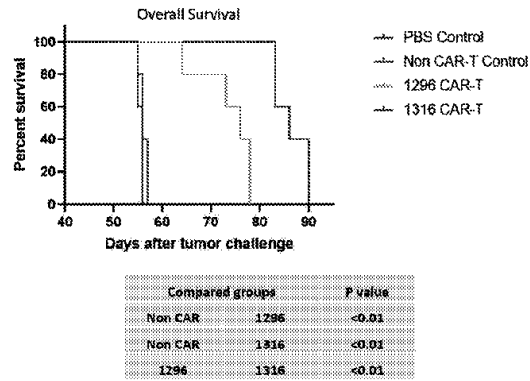
20

30

40

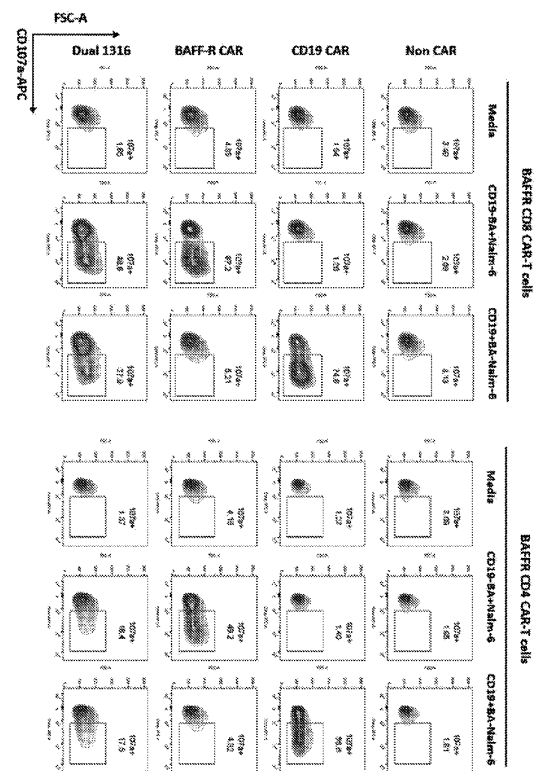
50

【 図 1 1 B 】

**B**

【 図 1 2 】

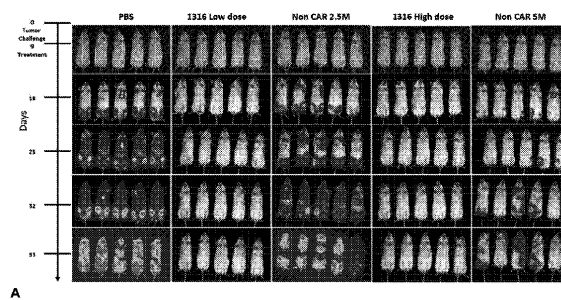
FIGURE 12



10

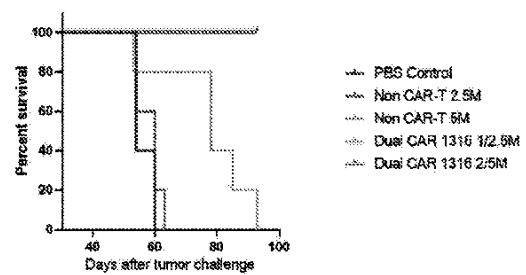
20

【 図 1 3 A 】



A

【 図 1 3 B 】



Compared groups		P value
Non CAR 2.5M	1316, 1/2.5M	<0.05
Non CAR 5	1316, 2/5M	<0.05
1316, 1/2.5M	1316, 2/5M	n.s.

B

30

40

【配列表】
0007593646000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10
C 1 2 N 5/0783(2010.01)	C 1 2 N 5/0783
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 K 39/395(2006.01)	A 6 1 K 39/395 T
	A 6 1 K 39/395 U

ーテ ロード 1 5 0 0

- (72)発明者 ワン, シウリ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1 0 1 0 , デュアーテ, イーストデュアーテ ロード 1 5 0 0
- (72)発明者 クワック, ラリー ウォンシン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1 0 1 0 , デュアーテ, イーストデュアーテ ロード 1 5 0 0
- (72)発明者 フォーマン, スティーブン ジェイ .
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1 0 1 0 , デュアーテ, イーストデュアーテ ロード 1 5 0 0

審査官 西村 亜希子

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 6 / 1 4 9 5 7 8 (W O , A 1)
国際公開第 2 0 1 8 / 2 3 7 0 2 2 (W O , A 1)
国際公開第 2 0 1 7 / 2 1 4 1 6 7 (W O , A 1)
国際公開第 2 0 1 8 / 2 1 3 3 3 7 (W O , A 1)
国際公開第 2 0 1 7 / 2 1 4 1 7 0 (W O , A 2)
中国特許出願公開第 1 0 8 7 2 8 4 5 9 (C N , A)
British Journal of Haematology , 2018年 , Vol.182 , pp.939-943

- (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)
C 1 2 N 1 5 /
C 0 7 K
C 1 2 N 5 /
A 6 1 K
A 6 1 P
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)