

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7624967号
(P7624967)

(45)発行日 令和7年1月31日(2025.1.31)

(24)登録日 令和7年1月23日(2025.1.23)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13 Z N A
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62 Z
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46
請求項の数 13 (全51頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2022-506548(P2022-506548)	(73)特許権者	522043220
(86)(22)出願日	令和2年8月17日(2020.8.17)		アベルゼータ・インコーポレイテッド
(65)公表番号	特表2023-518134(P2023-518134 A)		アメリカ合衆国、メリーランド・2 0 8
(43)公表日	令和5年4月28日(2023.4.28)		5 0、ロックビル、メディカル・センタ
(86)国際出願番号	PCT/CN2020/109645		ー・ドライブ・9 6 0 5、スイート・1
(87)国際公開番号	WO2021/184673	(74)代理人	0 0
(87)国際公開日	令和3年9月23日(2021.9.23)		100114188
審査請求日	令和5年8月15日(2023.8.15)	(74)代理人	弁理士 小野 誠
(31)優先権主張番号	202010188038.1	(74)代理人	100119253
(32)優先日	令和2年3月17日(2020.3.17)		弁理士 金山 賢教
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)	(74)代理人	100124855
(31)優先権主張番号	16/877,069		弁理士 坪倉 道明
(32)優先日	令和2年5月18日(2020.5.18)	(74)代理人	100129713
	最終頁に続く	(74)代理人	弁理士 重森 一輝
		(74)代理人	100137213
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C D 1 9 及び C D 2 0 を標的とする組み合わされたキメラ抗原受容体並びにその適用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

キメラ抗原受容体 (C A R) であって、その構造が以下の式 I I で表され、

L - V_{L 1} - V_{H 1} - I - V_{H 2} - V_{L 2} - H - T M - C - C D 3 (I I)

式中、

各「 - 」は独立して、リンカーペプチド又はペプチド結合であり、

L は任意のシグナルペプチド配列であり、

V_{L 1} は抗 C D 2 0 抗体軽鎖可変領域であり、

V_{H 1} は抗 C D 2 0 抗体重鎖可変領域であり、

I は可動性リンカーであり、

V_{H 2} は抗 C D 1 9 抗体重鎖可変領域であり、

V_{L 2} は抗 C D 1 9 抗体軽鎖可変領域であり、

H は任意のヒンジ領域であり、

T M は膜貫通ドメインであり、

C は共刺激シグナル伝達分子であり、

C D 3 は、C D 3 に由来する細胞質シグナル伝達配列である、キメラ抗原受容体。

【請求項 2】

前記 V_{H 1} のアミノ酸配列が配列番号 3 に示され、前記 V_{L 1} のアミノ酸配列が配列番号 4 に示される、請求項 1 に記載の C A R。

【請求項 3】

請求項 1 に記載のキメラ抗原受容体を発現する細胞。

【請求項 4】

前記細胞が C A R - T 細胞及び / 又は C A R - N K 細胞である、請求項 3 に記載の細胞。

【請求項 5】

請求項 3 に記載の細胞を含む、疾患を治療するための医薬組成物。

【請求項 6】

前記疾患が癌又は腫瘍である、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

二重特異性キメラ抗原受容体 (C A R) であって

(i) それぞれ配列番号 4 及び配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域 (V _L 1) 及び重鎖可変領域 (V _H 1) を含み、 V _L 1 が V _H 1 の N 末端に位置する抗 C D 2 0 抗原結合領域 ;

(i i) それぞれ配列番号 5 及び配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域 (V _L 2) 及び重鎖可変領域 (V _H 2) を含み、 V _H 2 が V _L 2 の N 末端に位置する抗 C D 1 9 抗原結合領域 ;

(i i i) 配列番号 1 1 に記載のアミノ酸配列を有する膜貫通ドメイン ;

(i v) 配列番号 1 2 に記載のアミノ酸配列を有する共刺激シグナル伝達領域 ; 及び

(v) 配列番号 1 4 に記載のアミノ酸配列を有する細胞質シグナル伝達ドメイン

を含む、二重特異性 C A R 。

【請求項 8】

前記抗 C D 2 0 抗原結合領域が C D 2 0 に特異的に結合する単鎖可変フラグメント (s c F v) であり、前記抗 C D 1 9 抗原結合領域が C D 1 9 に特異的に結合する s c F v である、請求項 7 に記載の二重特異性 C A R 。

【請求項 9】

(a) 配列番号 8 に記載のアミノ酸配列を有するシグナルペプチド ; 及び

(b) 配列番号 9 に記載のアミノ酸配列を有するヒンジ領域

をさらに含む、請求項 7 に記載の二重特異性 C A R 。

【請求項 1 0】

N 末端から C 末端の方向に、前記シグナルペプチド、 V _L 1、 V _H 1、 V _H 2、 V _L 2、前記ヒンジ領域、前記膜貫通ドメイン、前記共刺激シグナル伝達領域、及び前記細胞質シグナル伝達ドメインを含む、請求項 9 に記載の二重特異性 C A R 。

【請求項 1 1】

請求項 7 に記載の二重特異性 C A R を発現する免疫細胞。

【請求項 1 2】

T 細胞又はナチュラルキラー (N K) 細胞である、請求項 1 1 に記載の免疫細胞。

【請求項 1 3】

請求項 1 1 に記載の免疫細胞を含む医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1】

本発明は、生物医学の分野に関し、より詳細には、 C D 1 9 及び C D 2 0 を標的とする組み合わされたキメラ抗原受容体並びにその用途に関する。

【背景技術】

【 0 0 0 2】

血液系の悪性腫瘍はヒト悪性腫瘍の約 1 0 % を占め、血液系の悪性腫瘍の 9 5 % は B リンパ球に由来する。伝統的な化学療法及び放射線療法は、血液系の悪性腫瘍の治療において重要な役割を果たす。一部の患者は有意な効果を有するが、ほとんどの患者にとって治療することは困難である。新規かつ効果的な治療は、この分野で関心の的のトピックとなっている。

【 0 0 0 3】

10

20

30

40

50

養子T細胞療法は、悪性腫瘍の臨床治療においてその強力な有効性及び明るい見通しを示している。現在、養子T細胞療法は血液腫瘍を治療するための最も有望な方法の1つとして見なされている。CD19は、ほとんどのB細胞悪性腫瘍の表面に高度に発現される。キメラ抗原受容体(CAR)-改変T細胞を独立して使用して、CD19発現B細胞の再発性難治性悪性腫瘍を標的とする複数の施設が、前例のない成功を達成した。現在、FDAによって承認された2つのCAR-T製品の両方は、CD19抗原を標的とし、慢性リンパ性白血病適等の適応症も拡大している。抗CD19CAR-Tの有効性は顕著であるが、多くの研究は、CD19キメラ抗原受容体(CAR)T細胞療法に多くの問題も存在することを示している。治療結果が悪く、再発しやすい一部の患者が依然として存在する。この理由には、腫瘍細胞が抗原エスケープを起こしやすいことが含まれる。例えば、CD19 CAR-細胞療法の実験は、患者の90%が完全寛解を達成したが、これらの患者の11%が最終的に再発し、再発患者は主にCD19陰性腫瘍を有する患者であったことを示した。特に、再発性難治性急性B細胞リンパ腫(R/R B-ALL)の治療においてCAR-T19を使用して、ペンシルベニア大学医学大学院で行われた臨床試験では、患者の最大94%が完全寛解を達成した。この臨床試験の初期の奏効率は高かったが、完全寛解を達成した治療の1ヶ月後にほぼ40%の患者が再発し、再発患者の60%超がCD19陰性腫瘍細胞エスケープを有していた。抗原エスケープは、NY-ESO1を発現する養子移入特異性T細胞受容体及びメラノーマを治療する癌ワクチンで見出されている。自然突然変異及び選択的拡大が抗原エスケープの主な理由である。

【0004】

したがって、腫瘍を効果的に治療し、抗原エスケープを防止する方法を発展させる当技術分野における緊急の必要性が存在する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の目的は、腫瘍を効果的に治療し、抗原エスケープを防止する方法を提供することである。

【0006】

本発明の目的は、CD19及びCD20を標的とする組み合わせられたキメラ抗原受容体及びその調製方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

具体的には、CD19及びCD20を標的とする組み合わせられたキメラ抗原受容体の配列、並びにその改変T細胞(CAR-T-19/20)の調製方法及び活性同定を提供することが本発明の目的である。本発明は、CD19及びCD20陽性B細胞リンパ腫の治療に使用するためのキメラ抗原受容体構造を提供する。

【0008】

本開示は、二重特異性キメラ抗原受容体(CAR)を提供する。二重特異性CARは、(i)それぞれ配列番号4及び配列番号3に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域(V_L1)及び重鎖可変領域(V_H1)を含む抗CD20抗原結合領域と、(ii)それぞれ配列番号5及び配列番号6に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域(V_L2)及び重鎖可変領域(V_H2)を含む抗CD19抗原結合領域と、とを含む。

【0009】

特定の実施形態では、V_L1はV_H1のN末端に位置する。特定の実施形態では、V_H2はV_L2のN末端に位置する。

【0010】

抗CD20抗原結合領域は、CD20に特異的に結合する単鎖可変フラグメント(scFv)であり得る。抗CD19抗原結合領域は、CD19に特異的に結合するscFvであり得る。特定の実施形態では、CD20に特異的に結合するscFvは、CD19に特異的に結合するscFvのN末端に位置する。

【 0 0 1 1 】

二重特異性 C A R は、(a) リーダー配列、(b) ヒンジ領域、(c) 膜貫通ドメイン、(d) 少なくとも 1 つの共刺激シグナル伝達領域、(e) 細胞質シグナル伝達ドメイン、又は(f) それらの組合わせを更に含み得る。

【 0 0 1 2 】

共刺激シグナル伝達領域は、4 - 1 B B (C D 1 3 7)、C D 2 8、O X 4 0、C D 2、C D 7、C D 2 7、C D 3 0、C D 4 0、C D 7 0、C D 1 3 4、P D 1、D a p 1 0、C D 5、I C A M - 1、L F A - 1 (C D 1 1 a / C D 1 8)、I C O S (C D 2 7 8)、N K G 2 D、G I T R、T L R 2、又はそれらの組合わせに由来し得る。

【 0 0 1 3 】

細胞質シグナル伝達ドメインは、C D 3 に由来し得る。

【 0 0 1 4 】

ヒンジ領域は、I g 4、C D 8、C D 2 8、C D 1 3 7、又はそれらの組合わせに由来し得る。

【 0 0 1 5 】

膜貫通ドメインは、C D 8、C D 2 8、C D 3、C D 4 5、C D 4、C D 5、C D 9、C D 1 6、C D 2 2、C D 3 3、C D 3 7、C D 6 4、C D 8 0、C D 8 6、C D 1 3 4、C D 1 3 7、C D 1 5 4、又はそれらの組合わせに由来し得る。

【 0 0 1 6 】

特定の実施形態では、二重特異性 C A R は、配列番号 1 6 に記載のアミノ酸配列を有し得る。

【 0 0 1 7 】

本開示は、本発明の二重特異性 C A R を発現する免疫細胞を提供する。免疫細胞は、T 細胞又はナチュラルキラー (N K) 細胞であり得る。免疫細胞は、同種又は自己由来であり得る。

【 0 0 1 8 】

本発明の二重特異性 C A R をコードする核酸も本開示に包含される。

【 0 0 1 9 】

本開示は更に、本発明の核酸を含むベクターを提供する。

【 0 0 2 0 】

本開示は、癌を治療する方法を提供する。方法は、免疫細胞を、それを必要とする対象に投与することを含み得る。

【 0 0 2 1 】

癌は血液癌であり得る。癌は、B 細胞悪性腫瘍であり得る。癌は、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、白血病、及び / 又は多発性骨髄腫であり得る。癌は、急性骨髄性白血病 (A M L)、多発性骨髄腫 (M M)、慢性リンパ性白血病 (C L L)、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病 (A L L)、びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (D L B C L)、又はそれらの組合わせであり得る。

【 0 0 2 2 】

本発明の第 1 の態様では、キメラ抗原受容体 (C A R) を提供し、キメラ抗原受容体の構造は以下の式 I で示され、

$$L - s c F v 1 - I - s c F v 2 - H - T M - C - C D 3 \quad (I)$$

式中、

各「 - 」は独立して、リンカーペプチド又はペプチド結合であり、

L は任意のシグナルペプチド配列であり、

I は可動性リンカーであり、

H は任意のヒンジ領域であり、

T M は膜貫通ドメインであり、

C は共刺激シグナル伝達分子であり、

C D 3 は、C D 3 に由来する細胞質シグナル伝達配列であり、

10

20

30

40

50

s c F v 1 及び s c F v 2 のうち 1 つは C D 1 9 を標的とする抗原結合ドメインであり、他方は C D 2 0 を標的とする抗原結合ドメインである。

【 0 0 2 3 】

別の好ましい実施形態では、s c F v 1 は、C D 2 0 を標的とする抗原結合ドメインであり、s c F v 2 は、C D 1 9 を標的とする抗原結合ドメインである。

【 0 0 2 4 】

別の好ましい実施形態では、C D 2 0 を標的とする抗原結合ドメインの構造は、以下の式 A 又は式 B に示され、

$V_{H1} - V_{L1} (A) ; V_{L1} - V_{H1} (B)$

V_{H1} は抗 C D 2 0 抗体重鎖可変領域であり、 V_{L1} は抗 C D 2 0 抗体軽鎖可変領域であり、「 - 」はリンカーペプチド又はペプチド結合である。

10

【 0 0 2 5 】

別の好ましい実施形態では、C D 2 0 を標的とする抗原結合ドメインの構造は、式 B に示される。

【 0 0 2 6 】

別の好ましい実施形態では、 V_{H1} のアミノ酸配列は配列番号 1 に示され、 V_{L1} のアミノ酸配列は配列番号 2 に示されるか、又は

V_{H1} のアミノ酸配列は配列番号 3 に示され、 V_{L1} のアミノ酸配列は配列番号 4 に示される。

【 0 0 2 7 】

20

別の好ましい実施形態では、 V_{H1} 及び V_{L1} は、可動性リンカー（又はリンカーペプチド）と連結され、可動性リンカー（又はリンカーペプチド）は、配列番号 7（G G G G S）に示されるような 1 ~ 4、好ましくは 2 ~ 4、より好ましくは 3 ~ 4 の連続した配列である。

【 0 0 2 8 】

別の好ましい実施形態では、 V_{L1} 及び V_{H1} は、配列番号 1 9 に示されるような可動性リンカーと連結される。

【 0 0 2 9 】

別の好ましい実施形態では、C D 1 9 を標的とする抗原結合ドメインの構造は、以下の式 C 又は式 D に示され、

30

$V_{L2} - V_{H2} (C) ; V_{H2} - V_{L2} (D)$

式中、 V_{L2} は抗 C D 1 9 抗体軽鎖可変領域であり、 V_{H2} は抗 C D 1 9 抗体重鎖可変領域であり、「 - 」はリンカーペプチド又はペプチド結合である。

【 0 0 3 0 】

別の好ましい実施形態では、C D 1 9 を標的とする抗原結合ドメインの構造は、式 D に示される。

【 0 0 3 1 】

別の好ましい実施形態では、 V_{L2} のアミノ酸配列は配列番号 5 に示され、 V_{H2} のアミノ酸配列は配列番号 6 に示される。

【 0 0 3 2 】

40

別の好ましい実施形態では、 V_{H2} 及び V_{L2} は、可動性リンカー（又はリンカーペプチド）と連結され、可動性リンカー（又はリンカーペプチド）は、配列番号 7（G G G G S）に示されるような 1 ~ 4、好ましくは 2 ~ 4、より好ましくは 3 ~ 4 の連続した配列である。

【 0 0 3 3 】

別の好ましい実施形態では、 V_{H2} 及び V_{L1} は、配列番号 2 0 に示されるように可動性リンカーと連結される。

【 0 0 3 4 】

別の好ましい実施形態では、s c F v 1 及び / 又は s c F v 2 は、マウス由来、ヒト化、ヒト化及びマウス由来のキメラ、又は完全ヒト化一本鎖抗体可変領域フラグメントであ

50

る。

【 0 0 3 5 】

別の好ましい実施形態では、キメラ抗原受容体の構造は、以下の式 I I に示され、
 $L - V_{L1} - V_{H1} - I - V_{H2} - V_{L2} - H - T M - C - C D 3$ (I I)
 式中、各要素は上記の通りである。

【 0 0 3 6 】

別の好ましい実施形態では、可動性リンカー I の配列は、配列番号 7 (G G G G S) に示されるような 2 ~ 6、好ましくは 3 ~ 4 の連続した配列を含む。

【 0 0 3 7 】

別の好ましい実施形態では、可動性リンカー I の配列は、配列番号 7 に示される通りである。 10

【 0 0 3 8 】

別の好ましい実施形態では、L は、C D 8、C D 2 8、G M - C S F、C D 4、C D 1 3 7、及びそれらの組合わせからなる群から選択されるタンパク質のシグナルペプチドである。

【 0 0 3 9 】

別の好ましい実施形態では、L は、C D 8 に由来するシグナルペプチドである。

【 0 0 4 0 】

別の好ましい実施形態では、L のアミノ酸配列は配列番号 8 に示される。

【 0 0 4 1 】

別の好ましい実施形態では、H は、C D 8、C D 2 8、C D 1 3 7、I g 4、及びそれらの組合わせからなる群から選択されるタンパク質のヒンジ領域である。 20

【 0 0 4 2 】

別の好ましい実施形態では、H は、I g 4 に由来するヒンジ領域である。

【 0 0 4 3 】

別の好ましい実施形態では、H のアミノ酸配列は配列番号 9 に示される。

【 0 0 4 4 】

別の好ましい実施形態では、T M は、C D 2 8、C D 3、C D 4 5、C D 4、C D 5、C D 8、C D 9、C D 1 6、C D 2 2、C D 3 3、C D 3 7、C D 6 4、C D 8 0、C D 8 6、C D 1 3 4、C D 1 3 7、C D 1 5 4、及びそれらの組合わせからなる群から選択されるタンパク質の膜貫通領域である。 30

【 0 0 4 5 】

別の好ましい実施形態では、T M は、C D 8 又は C D 2 8 に由来する膜貫通領域である。

【 0 0 4 6 】

別の好ましい実施形態では、T M の配列は配列番号 1 0 又は 1 1 に示される。

【 0 0 4 7 】

別の好ましい実施形態では、C は、O X 4 0、C D 2、C D 7、C D 2 7、C D 2 8、C D 3 0、C D 4 0、C D 7 0、C D 1 3 4、4 - 1 B B (C D 1 3 7)、P D 1、D a p 1 0、C D S、I C A M - 1、L F A - 1 (C D 1 1 a / C D 1 8)、I C O S (C D 2 7 8)、N K G 2 D、G I T R、T L R 2、及びそれらの組合わせからなる群から選択されるタンパク質の共刺激シグナル伝達分子である。 40

【 0 0 4 8 】

別の好ましい実施形態では、C は、4 - 1 B B 又は C D 2 8 に由来する共刺激シグナル伝達分子である。

【 0 0 4 9 】

別の好ましい実施形態では、C のアミノ酸配列は配列番号 1 2 又は 1 3 に示される。

【 0 0 5 0 】

別の好ましい実施形態では、C D 3 のアミノ酸配列は配列番号 1 4 に示される。

【 0 0 5 1 】

別の好ましい実施形態では、C A R のアミノ酸配列は配列番号 1 5 又は 1 6 に示される。 50

【 0 0 5 2 】

特定の実施形態では、抗 C D 2 0 抗原結合領域が、配列番号 3 又は配列番号 1 に記載のアミノ酸配列と、少なくとも又は約 7 0 %、少なくとも又は約 7 5 %、少なくとも又は約 8 0 %、少なくとも又は約 8 5 %、少なくとも又は約 9 0 %、少なくとも又は約 9 5 %、少なくとも又は約 9 9 %、少なくとも又は約 8 1 %、少なくとも又は約 8 2 %、少なくとも又は約 8 3 %、少なくとも又は約 8 4 %、少なくとも又は約 8 5 %、少なくとも又は約 8 6 %、少なくとも又は約 8 7 %、少なくとも又は約 8 8 %、少なくとも又は約 8 9 %、少なくとも又は約 9 0 %、少なくとも又は約 9 1 %、少なくとも又は約 9 2 %、少なくとも又は約 9 3 %、少なくとも又は約 9 4 %、少なくとも又は約 9 5 %、少なくとも又は約 9 6 %、少なくとも又は約 9 7 %、少なくとも又は約 9 8 %、少なくとも又は約 9 9 %、あるいは約 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

10

【 0 0 5 3 】

特定の実施形態では、抗 C D 2 0 抗原結合領域が、配列番号 4 又は配列番号 2 に記載のアミノ酸配列と、少なくとも又は約 7 0 %、少なくとも又は約 7 5 %、少なくとも又は約 8 0 %、少なくとも又は約 8 5 %、少なくとも又は約 9 0 %、少なくとも又は約 9 5 %、少なくとも又は約 9 9 %、少なくとも又は約 8 1 %、少なくとも又は約 8 2 %、少なくとも又は約 8 3 %、少なくとも又は約 8 4 %、少なくとも又は約 8 5 %、少なくとも又は約 8 6 %、少なくとも又は約 8 7 %、少なくとも又は約 8 8 %、少なくとも又は約 8 9 %、少なくとも又は約 9 0 %、少なくとも又は約 9 1 %、少なくとも又は約 9 2 %、少なくとも又は約 9 3 %、少なくとも又は約 9 4 %、少なくとも又は約 9 5 %、少なくとも又は約 9 6 %、少なくとも又は約 9 7 %、少なくとも又は約 9 8 %、少なくとも又は約 9 9 %、あるいは約 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

20

【 0 0 5 4 】

特定の実施形態では、抗 C D 1 9 抗原結合領域が、配列番号 6 に記載のアミノ酸配列と、少なくとも又は約 7 0 %、少なくとも又は約 7 5 %、少なくとも又は約 8 0 %、少なくとも又は約 8 5 %、少なくとも又は約 9 0 %、少なくとも又は約 9 5 %、少なくとも又は約 9 9 %、少なくとも又は約 8 1 %、少なくとも又は約 8 2 %、少なくとも又は約 8 3 %、少なくとも又は約 8 4 %、少なくとも又は約 8 5 %、少なくとも又は約 8 6 %、少なくとも又は約 8 7 %、少なくとも又は約 8 8 %、少なくとも又は約 8 9 %、少なくとも又は約 9 0 %、少なくとも又は約 9 1 %、少なくとも又は約 9 2 %、少なくとも又は約 9 3 %、少なくとも又は約 9 4 %、少なくとも又は約 9 5 %、少なくとも又は約 9 6 %、少なくとも又は約 9 7 %、少なくとも又は約 9 8 %、少なくとも又は約 9 9 %、あるいは約 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

30

【 0 0 5 5 】

特定の実施形態では、抗 C D 1 9 抗原結合領域が、配列番号 5 に記載のアミノ酸配列と、少なくとも又は約 7 0 %、少なくとも又は約 7 5 %、少なくとも又は約 8 0 %、少なくとも又は約 8 5 %、少なくとも又は約 9 0 %、少なくとも又は約 9 5 %、少なくとも又は約 9 9 %、少なくとも又は約 8 1 %、少なくとも又は約 8 2 %、少なくとも又は約 8 3 %、少なくとも又は約 8 4 %、少なくとも又は約 8 5 %、少なくとも又は約 8 6 %、少なくとも又は約 8 7 %、少なくとも又は約 8 8 %、少なくとも又は約 8 9 %、少なくとも又は約 9 0 %、少なくとも又は約 9 1 %、少なくとも又は約 9 2 %、少なくとも又は約 9 3 %、少なくとも又は約 9 4 %、少なくとも又は約 9 5 %、少なくとも又は約 9 6 %、少なくとも又は約 9 7 %、少なくとも又は約 9 8 %、少なくとも又は約 9 9 %、あるいは約 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

40

【 0 0 5 6 】

抗 C D 2 0 抗原結合領域の重鎖可変領域は、オフアツムマブ抗体の重鎖可変領域の相補性決定領域 (C D R) (配列番号 3 の 3 0 ~ 3 5 位、5 0 ~ 6 6 位、9 9 ~ 1 1 1 位にそれぞれ記載の C D R 1、C D R 2 及び C D R 3)、又は L e u 1 6 抗体の重鎖可変領域の C D R (配列番号 1 の 3 1 ~ 3 5 位、5 0 ~ 6 6 位、9 9 ~ 1 1 1 位にそれぞれ記載の C D R 1、C D R 2 及び C D R 3) と、少なくとも又は約 7 0 %、少なくとも又は約 7 5 %

50

、少なくとも又は約 80 %、少なくとも又は約 85 %、少なくとも又は約 90 %、少なくとも又は約 95 %、少なくとも又は約 99 %、少なくとも又は約 81 %、少なくとも又は約 82 %、少なくとも又は約 83 %、少なくとも又は約 84 %、少なくとも又は約 85 %、少なくとも又は約 86 %、少なくとも又は約 87 %、少なくとも又は約 88 %、少なくとも又は約 89 %、少なくとも又は約 90 %、少なくとも又は約 91 %、少なくとも又は約 92 %、少なくとも又は約 93 %、少なくとも又は約 94 %、少なくとも又は約 95 %、少なくとも又は約 96 %、少なくとも又は約 97 %、少なくとも又は約 98 %、少なくとも又は約 99 %、あるいは約 100 % 同一である、1 つ、2 つ、又は 3 つの CDR を含み得る。

【0057】

抗 CD20 抗原結合領域の軽鎖可変領域は、オフアツムマブ抗体の軽鎖可変領域の相補性決定領域 (CDR) (配列番号 4 の 24 ~ 34 位、50 ~ 56 位、89 ~ 97 位にそれぞれ記載の CDR1、CDR2 及び CDR3)、又は Leu16 抗体の軽鎖可変領域の CDR (配列番号 2 の 24 ~ 33 位、49 ~ 55 位、88 ~ 96 位にそれぞれ記載の CDR1、CDR2 及び CDR3) と、少なくとも又は約 70 %、少なくとも又は約 75 %、少なくとも又は約 80 %、少なくとも又は約 85 %、少なくとも又は約 90 %、少なくとも又は約 95 %、少なくとも又は約 99 %、少なくとも又は約 81 %、少なくとも又は約 82 %、少なくとも又は約 83 %、少なくとも又は約 84 %、少なくとも又は約 85 %、少なくとも又は約 86 %、少なくとも又は約 87 %、少なくとも又は約 88 %、少なくとも又は約 89 %、少なくとも又は約 90 %、少なくとも又は約 91 %、少なくとも又は約 92 %、少なくとも又は約 93 %、少なくとも又は約 94 %、少なくとも又は約 95 %、少なくとも又は約 96 %、少なくとも又は約 97 %、少なくとも又は約 98 %、少なくとも又は約 99 %、あるいは約 100 % 同一である、1 つ、2 つ、又は 3 つの CDR を含み得る。

【0058】

抗 CD20 抗原結合領域の重鎖可変領域は、オフアツムマブ抗体の重鎖可変領域の相補性決定領域 (CDR) (配列番号 40、配列番号 41、配列番号 42 にそれぞれ記載の CDR1、CDR2 及び CDR3)、又は Leu16 抗体の重鎖可変領域の CDR (配列番号 47、配列番号 49、配列番号 51 にそれぞれ記載の CDR1、CDR2 及び CDR3) と、少なくとも又は約 70 %、少なくとも又は約 75 %、少なくとも又は約 80 %、少なくとも又は約 85 %、少なくとも又は約 90 %、少なくとも又は約 95 %、少なくとも又は約 99 %、少なくとも又は約 81 %、少なくとも又は約 82 %、少なくとも又は約 83 %、少なくとも又は約 84 %、少なくとも又は約 85 %、少なくとも又は約 86 %、少なくとも又は約 87 %、少なくとも又は約 88 %、少なくとも又は約 89 %、少なくとも又は約 90 %、少なくとも又は約 91 %、少なくとも又は約 92 %、少なくとも又は約 93 %、少なくとも又は約 94 %、少なくとも又は約 95 %、少なくとも又は約 96 %、少なくとも又は約 97 %、少なくとも又は約 98 %、少なくとも又は約 99 %、あるいは約 100 % 同一である、1 つ、2 つ、又は 3 つの CDR を含み得る。

【0059】

抗 CD20 抗原結合領域の軽鎖可変領域は、オフアツムマブ抗体の軽鎖可変領域の相補性決定領域 (CDR) (配列番号 43、配列番号 44、配列番号 45 にそれぞれ記載の CDR1、CDR2 及び CDR3)、又は Leu16 抗体の軽鎖可変領域の CDR (配列番号 54、配列番号 56、配列番号 58 にそれぞれ記載の CDR1、CDR2 及び CDR3) と、少なくとも又は約 70 %、少なくとも又は約 75 %、少なくとも又は約 80 %、少なくとも又は約 85 %、少なくとも又は約 90 %、少なくとも又は約 95 %、少なくとも又は約 99 %、少なくとも又は約 81 %、少なくとも又は約 82 %、少なくとも又は約 83 %、少なくとも又は約 84 %、少なくとも又は約 85 %、少なくとも又は約 86 %、少なくとも又は約 87 %、少なくとも又は約 88 %、少なくとも又は約 89 %、少なくとも又は約 90 %、少なくとも又は約 91 %、少なくとも又は約 92 %、少なくとも又は約 93 %、少なくとも又は約 94 %、少なくとも又は約 95 %、少なくとも又は約 96 %、少

なくとも又は約 97%、少なくとも又は約 98%、少なくとも又は約 99%、あるいは約 100% 同一である、1 つ、2 つ、又は 3 つの CDR を含み得る。

【0060】

特定の実施形態では、抗 CD20 抗原結合領域の重鎖可変領域が、オファツムマブ抗体の重鎖可変領域の CDR と同一の 3 つの CDR (配列番号 3 の 30 ~ 35 位、50 ~ 66 位、99 ~ 111 位に記載の CDR1、CDR2 及び CDR3) を含み、抗 CD20 抗原結合領域の軽鎖可変領域が、オファツムマブ抗体の軽鎖可変領域の CDR と同一の 3 つの CDR (配列番号 4 の 24 ~ 34 位、50 ~ 56 位、89 ~ 97 位のそれぞれに記載の CDR1、CDR2 及び CDR3) を含む。

【0061】

特定の実施形態では、抗 CD20 抗原結合領域の重鎖可変領域が、オファツムマブ抗体の重鎖可変領域の CDR と同一の 3 つの CDR (配列番号 40、配列番号 41、配列番号 42 のそれぞれに記載の CDR1、CDR2 及び CDR3) を含み、抗 CD20 抗原結合領域の軽鎖可変領域が、オファツムマブ抗体の軽鎖可変領域の CDR と同一の 3 つの CDR (配列番号 43、配列番号 44、配列番号 45 にそれぞれ記載の CDR1、CDR2 及び CDR3) を含む。

【0062】

特定の実施形態では、抗 CD20 抗原結合領域の重鎖可変領域が、Leu16 抗体の重鎖可変領域の CDR と同一の 3 つの CDR (配列番号 1 の 31 ~ 35 位、50 ~ 66 位、99 ~ 111 位のそれぞれに記載の CDR1、CDR2 及び CDR3) を含み、抗 CD20 抗原結合領域の軽鎖可変領域が、Leu16 抗体の軽鎖可変領域の CDR と同一の 3 つの CDR (配列番号 2 の 24 ~ 33 位、49 ~ 55 位、88 ~ 96 位のそれぞれに記載の CDR1、CDR2 及び CDR3) を含む。

【0063】

特定の実施形態では、抗 CD20 抗原結合領域の重鎖可変領域が、Leu16 抗体の重鎖可変領域の CDR と同一の 3 つの CDR (配列番号 47、配列番号 49、配列番号 51 のそれぞれに記載の CDR1、CDR2 及び CDR3) を含み、抗 CD20 抗原結合領域の軽鎖可変領域が、Leu16 抗体の軽鎖可変領域の CDR と同一の 3 つの CDR (配列番号 54、配列番号 56、配列番号 58 のそれぞれに記載の CDR1、CDR2 及び CDR3) を含む。

【0064】

抗 CD19 抗原結合領域の重鎖可変領域は、FMC63 抗体の重鎖可変領域の相補性決定領域 (CDR) (配列番号 6 の 31 ~ 35 位、50 ~ 65 位、98 ~ 109 位のそれぞれに記載の CDR1、CDR2 及び CDR3) と、少なくとも又は約 70%、少なくとも又は約 75%、少なくとも又は約 80%、少なくとも又は約 85%、少なくとも又は約 90%、少なくとも又は約 95%、少なくとも又は約 99%、少なくとも又は約 81%、少なくとも又は約 82%、少なくとも又は約 83%、少なくとも又は約 84%、少なくとも又は約 85%、少なくとも又は約 86%、少なくとも又は約 87%、少なくとも又は約 88%、少なくとも又は約 89%、少なくとも又は約 90%、少なくとも又は約 91%、少なくとも又は約 92%、少なくとも又は約 93%、少なくとも又は約 94%、少なくとも又は約 95%、少なくとも又は約 96%、少なくとも又は約 97%、少なくとも又は約 98%、少なくとも又は約 99%、あるいは約 100% 同一である、1 つ、2 つ、又は 3 つの CDR を含み得る。

【0065】

抗 CD19 抗原結合領域の軽鎖可変領域は、FMC63 抗体の軽鎖可変領域の相補性決定領域 (CDR) (配列番号 5 の 24 ~ 34 位、50 ~ 56 位、89 ~ 97 位のそれぞれに記載の CDR1、CDR2 及び CDR3) と、少なくとも又は約 70%、少なくとも又は約 75%、少なくとも又は約 80%、少なくとも又は約 85%、少なくとも又は約 90%、少なくとも又は約 95%、少なくとも又は約 99%、少なくとも又は約 81%、少なくとも又は約 82%、少なくとも又は約 83%、少なくとも又は約 84%、少なくとも又は

10

20

30

40

50

は約 85%、少なくとも又は約 86%、少なくとも又は約 87%、少なくとも又は約 88%、少なくとも又は約 89%、少なくとも又は約 90%、少なくとも又は約 91%、少なくとも又は約 92%、少なくとも又は約 93%、少なくとも又は約 94%、少なくとも又は約 95%、少なくとも又は約 96%、少なくとも又は約 97%、少なくとも又は約 98%、少なくとも又は約 99%、あるいは約 100% 同一である、1つ、2つ、又は3つの CDR を含み得る。

【0066】

抗 CD19 抗原結合領域の重鎖可変領域は、FMC63 抗体の重鎖可変領域の相補性決定領域 (CDR) (配列番号 60、配列番号 61、配列番号 62 のそれぞれに記載の CDR1、CDR2 及び CDR3) と、少なくとも又は約 70%、少なくとも又は約 75%、少なくとも又は約 80%、少なくとも又は約 85%、少なくとも又は約 90%、少なくとも又は約 95%、少なくとも又は約 99%、少なくとも又は約 81%、少なくとも又は約 82%、少なくとも又は約 83%、少なくとも又は約 84%、少なくとも又は約 85%、少なくとも又は約 86%、少なくとも又は約 87%、少なくとも又は約 88%、少なくとも又は約 89%、少なくとも又は約 90%、少なくとも又は約 91%、少なくとも又は約 92%、少なくとも又は約 93%、少なくとも又は約 94%、少なくとも又は約 95%、少なくとも又は約 96%、少なくとも又は約 97%、少なくとも又は約 98%、少なくとも又は約 99%、あるいは約 100% 同一である、1つ、2つ、又は3つの CDR を含み得る。

【0067】

抗 CD19 抗原結合領域の軽鎖可変領域は、FMC63 抗体の軽鎖可変領域の相補性決定領域 (CDR) (配列番号 63、配列番号 64、配列番号 39 のそれぞれに記載の CDR1、CDR2 及び CDR3) と、少なくとも又は約 70%、少なくとも又は約 75%、少なくとも又は約 80%、少なくとも又は約 85%、少なくとも又は約 90%、少なくとも又は約 95%、少なくとも又は約 99%、少なくとも又は約 81%、少なくとも又は約 82%、少なくとも又は約 83%、少なくとも又は約 84%、少なくとも又は約 85%、少なくとも又は約 86%、少なくとも又は約 87%、少なくとも又は約 88%、少なくとも又は約 89%、少なくとも又は約 90%、少なくとも又は約 91%、少なくとも又は約 92%、少なくとも又は約 93%、少なくとも又は約 94%、少なくとも又は約 95%、少なくとも又は約 96%、少なくとも又は約 97%、少なくとも又は約 98%、少なくとも又は約 99%、あるいは約 100% 同一である、1つ、2つ、又は3つの CDR を含み得る。

【0068】

特定の実施形態では、抗 CD19 抗原結合領域の重鎖可変領域が、FMC63 抗体の重鎖可変領域の CDR と同一の3つの CDR (配列番号 6 の 31~35 位、50~65 位、98~109 位のそれぞれに記載の CDR1、CDR2 及び CDR3) を含み、抗 CD19 抗原結合領域の軽鎖可変領域が、FMC63 抗体の軽鎖可変領域の CDR と同一の3つの CDR (配列番号 5 の 24~34 位、50~56 位、89~97 位のそれぞれに記載の CDR1、CDR2 及び CDR3) を含む。

【0069】

特定の実施形態では、抗 CD19 抗原結合領域の重鎖可変領域が、FMC63 抗体の重鎖可変領域の CDR と同一の3つの CDR (配列番号 60、配列番号 61、配列番号 62 のそれぞれに記載の CDR1、CDR2 及び CDR3) を含み、抗 CD19 抗原結合領域の軽鎖可変領域が、FMC63 抗体の軽鎖可変領域の CDR と同一の3つの CDR (配列番号 63、配列番号 64、配列番号 39 のそれぞれに記載の CDR1、CDR2 及び CDR3) を含む。

【0070】

本発明の第2の態様では、本発明の第1の態様のキメラ抗原受容体をコードする核酸分子を提供する。

【0071】

10

20

30

40

50

別の好ましい実施形態では、核酸分子が単離される。

【 0 0 7 2 】

別の好ましい実施形態では、核酸分子のヌクレオチド配列は、配列番号 1 7 又は 1 8 に示される。

【 0 0 7 3 】

本発明の第 3 の態様では、本発明の第 2 の態様の核酸分子を含むベクターを提供する。

【 0 0 7 4 】

別の好ましい実施形態では、ベクターは DNA 及び RNA を含む。

【 0 0 7 5 】

別の好ましい実施形態では、ベクターは、プラスミド、ウイルスベクター、トランスポゾン、及びそれらの組合わせからなる群から選択される。

10

【 0 0 7 6 】

別の好ましい実施形態では、ベクターは DNA ウイルス及びレトロウイルスベクターを含む。

【 0 0 7 7 】

別の好ましい実施形態では、ベクターは、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、及びそれらの組合わせからなる群から選択される。

【 0 0 7 8 】

別の好ましい実施形態では、ベクターはレンチウイルスベクターである。

【 0 0 7 9 】

20

本発明の第 4 の態様では、本発明の第 3 の態様のベクターを含むか、又は本発明の第 2 の態様の外因性核酸分子がそのゲノムに組み込まれているか、又は本発明の第 1 の態様のキメラ抗原受容体を発現する、宿主細胞を提供する。

【 0 0 8 0 】

別の好ましい実施形態では、細胞は単離された細胞である。

【 0 0 8 1 】

別の好ましい実施形態では、細胞は遺伝子操作された細胞である。

【 0 0 8 2 】

別の好ましい実施形態では、細胞は哺乳動物細胞である。

【 0 0 8 3 】

30

別の好ましい実施形態では、細胞は CAR - T 細胞及び / 又は CAR - NK 細胞である。

【 0 0 8 4 】

別の好ましい実施形態では、細胞は CD 1 9 及び CD 2 0 の両方を標的とする。

【 0 0 8 5 】

本発明の第 5 の態様では、本発明の第 1 の態様のキメラ抗原受容体を発現する CAR - T 細胞を調製するための方法を提供し、該方法は、本発明の第 2 の態様の核酸分子又は本発明の第 3 の態様のベクターを、T 細胞に形質導入し、それにより CAR - T 細胞を得る工程を含む。

【 0 0 8 6 】

別の好ましい実施形態では、方法は、得られた CAR - T 細胞の機能及び有効性を検出する工程を更に含む。

40

【 0 0 8 7 】

本発明の第 6 の態様では、本発明の第 1 の態様のキメラ抗原受容体、本発明の第 2 の態様の核酸分子、本発明の第 3 の態様のベクター、又は本発明の第 4 の態様の宿主細胞、及び薬学的に許容可能な担体、希釈剤若しくは賦形剤を含む製剤を提供する。

【 0 0 8 8 】

別の好ましい実施形態では、製剤は液体製剤である。

【 0 0 8 9 】

別の好ましい実施形態では、製剤の調合は注射剤である。

【 0 0 9 0 】

50

別の好ましい実施形態では、製剤は、本発明の第4の態様の宿主細胞を含み、宿主細胞の濃度は、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^8$ 細胞 / ml、好ましくは $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$ 細胞 / ml である。

【0091】

本発明の第7の態様では、腫瘍又は癌を予防及び／又は治療するための薬品又は製剤を調製するための、本発明の第1の態様のキメラ抗原受容体、本発明の第2の態様の核酸分子、本発明の第3の態様のベクター、又は本発明の第4の態様の宿主細胞の使用を提供する。

【0092】

別の好ましい実施形態では、腫瘍は、血液腫瘍、固形腫瘍、及びそれらの組合わせからなる群から選択され、好ましくは、腫瘍は血液腫瘍である。

10

【0093】

別の好ましい実施形態では、血液腫瘍は、急性骨髄性白血病 (AML)、多発性骨髄腫 (MM)、慢性リンパ性白血病 (CLL)、急性リンパ性白血病 (ALL)、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫 (DLBCL)、及びそれらの組合わせからなる群から選択される。

【0094】

別の好ましい実施形態では、固形腫瘍は、胃癌、胃癌の腹膜転移、肝臓癌、白血病、腎臓癌、肺癌、小腸癌、骨癌、前立腺癌、結腸直腸癌、乳癌、大腸癌、子宮頸癌、卵巣癌、リンパ腫、上咽頭癌、副腎腫瘍、膀胱腫瘍、非小細胞肺癌 (NSCLC)、神経膠腫、子宮内膜癌、及びそれらの組合わせからなる群から選択される。

20

【0095】

本発明の第8の態様では、本発明の第4の態様の細胞を調製するためのキットを提供し、該キットは、容器、及び容器内に配置された、本発明の第2の態様の核酸分子又は本発明の第3の態様のベクターを含む。

【0096】

本発明の第9の態様では、癌又は腫瘍の予防及び／又は治療のための、本発明の第4の態様の細胞、又は本発明の第6の態様の製剤の使用を提供する。

【0097】

本発明の第10の態様では、適切な量の本発明の第4の態様の細胞又は本発明の第6の態様の製剤を、治療を必要とする対象に投与することを含む、疾患を治療する方法を提供する。

30

【0098】

別の好ましい実施形態では、疾患は癌又は腫瘍である。

【0099】

上記の本発明の様々な技術的特徴及び（実施例のような）以下に具体的に説明される様々な技術的特徴は、本発明の範囲内で互いに組み合わされて、新たな又は好ましい技術的解決策を構成することができ、紙面の制限のために1つずつ説明する必要はないことを理解されたい。

【図面の簡単な説明】

40

【0100】

【図1】図1は、CD19及びCD20を標的とする組み合わされたキメラ抗原受容体の構造を示す。CARの構造は、リーダー配列、抗原認識配列、ヒンジ領域、膜貫通領域、共刺激因子シグナル領域、及びCD3シグナル伝達領域を含む。

【図2A】図2Aは、T細胞膜の表面上のCD137の発現レベルを示す。

【図2B】図2Bは、培養上清中のIFNの分泌レベルを示す。具体的には、7日間培養した 1×10^5 の CAR-T19/20細胞を採取し、CD19陽性K562-CD19+腫瘍細胞株、CD20陽性K562-CD20+腫瘍細胞株、CD19及びCD20二重陽性K562-CD19+CD20+腫瘍細胞株、CD19及びCD20を天然に発現するRAJI腫瘍細胞株、並びにCD19及びCD20二重陰性K562腫瘍細胞株と

50

共に、又は腫瘍細胞なしで、 $200\mu\text{l}$ のGT-551培地中で、1:1の比で18時間、それぞれ培養した。次いで、T細胞膜の表面上のCD137の発現レベル及び培養上清中のIFN γ の分泌レベルをそれぞれ検出した。

【図3A】図3Aは、主に共培養後の上清中のLDHの分泌レベルを検出することによる、CAR-T19/20細胞の殺腫瘍活性の検出を示す。具体的には、 1×10^4 細胞のCD19陽性K562-CD19+腫瘍細胞株、CD20陽性K562-CD20+腫瘍細胞株、CD19及びCD20二重陽性K562-CD19+CD20+腫瘍細胞株、CD19及びCD20を天然に発現するRAJI若しくはRAMOS腫瘍細胞株、又はCD19及びCD20二重陰性K562腫瘍細胞株を、 $100\mu\text{l}$ のGT-551培地中で、図に示す比率で8時間、それぞれ対応するT細胞と共培養した。次いで、LDHの分泌レベルを検出し、この図は、対応する共培養試料におけるLDH放出の百分率の統計分析結果を示す。

10

【図3B】図3Bは、主にT細胞膜の表面上のCD107aの発現レベルを検出することによる、CAR-T19/20細胞の殺腫瘍活性の検出を示す。具体的には、 1×10^5 のCAR-T19/20細胞を採取し、CD19陽性K562-CD19+腫瘍細胞株、CD20陽性K562-CD20+腫瘍細胞株、CD19及びCD20二重陽性K562-CD19+CD20+腫瘍細胞株、CD19及びCD20を天然に発現するRAJI若しくはRAMOS腫瘍細胞株、並びにCD19及びCD20二重陰性K562腫瘍細胞株と共に、又は腫瘍細胞なしで、 $200\mu\text{l}$ のGT-551培地中で、1:2の比で4時間培養した。次いで、T細胞膜の表面上のCD137の発現レベルをそれぞれ検出した。

20

【図4A】図4Aは、21日間以内にCAR-T19/20細胞を注射したマウスの平均体重変化及び平均蛍光強度変化を示し、7日ごとに記録される。

【図4B】図4Bは、3群のマウスの平均蛍光強度を示す。

【図4C】図4Cは、CAR-T19/20細胞を注射したマウスの、注射後0日目(D0)、7日目(D7)、14日目(D14)及び21日目(D21)のインビボイメージングを示す。

【図5A】図5Aは、二重特異性TN-OF-19 CAR-T細胞が、インビボでCD19特異性CAR-T細胞よりも良好に腫瘍細胞を阻害又は死滅させることができることを示す。

【図5B】図5Bは、4つのCAR-T細胞群及びNT群における蛍光強度のIVISイメージングを示す。

30

【図6】図6は、CD19若しくはCD20又は両方を有する細胞に結合するが、両方の抗原を欠く細胞には結合されないキメラ抗体を示し、二重特異性結合ドメインが結合のために1つのみの同族抗原を必要とし、新しい特異性認識部位は形成されなかったことを示している。

【図7】図7は、6つの異なるscFv及び異なるヒンジ/TM/シグナル伝達ドメインを有する16のCD20特異性CARの構造を示す。

【図8A】図8Aは、CAR-T20.1、CAR-T20.5、CAR-T20.6、CAR-T20.7、CAR-T20.8、CAR-T20.9及びCAR-T20.10をスクリーニングするためのIFN γ 放出アッセイの結果を示し、これらのCAR-Tの中で、CAR-T20.9(Leu16)及びCAR-T20.10(Leu16)のみが、より高い陽性IFN γ 放出を示した。

40

【図8B】図8Bは、CAR-T20.1、CAR-T20.9、CAR-T20.10、CAR-T20.11、CAR-T20.12、CAR-T20.13、CAR-T20.14、CAR-T20.15及びCAR-T20.16をスクリーニングするためのIFN γ 放出アッセイの結果を示す。これらのCAR-Tの中で、CAR-T20.10(Leu16)及びCAR-T20.14(OF)が、より高い陽性IFN γ 放出を示した。

【図8C】図8Cは、CAR-T20.9、CAR-T20.12、CAR-T20.14、CAR-T20.17、CAR-T20.18、及びCAR-T20.19をスクリ

50

ーニングするための I F N 放出アッセイの結果を示す。これらの C A R - T の中で、C A R - T 2 0 . 1 4 (O F) 及び C A R - T 2 0 . 1 9 (O F) は、より高い陽性 I F N 放出を示した。

【図 9 A】図 9 A は、L D H 放出アッセイによって細胞傷害性について試験した、C A R - T 2 0 . 1 7 (L e u 1 6 の第 3 世代)、C A R - T 2 0 . 1 8 (L e u 1 6 の第 2 世代)、C A R - T 2 0 . 1 9 (O F の第 2 世代) 細胞の結果を示す。

【図 9 B】図 9 B は、N S G マウス研究における腫瘍成長のインビボ阻害を示す。動物に注射した腫瘍細胞は、ルシフェラーゼを発現する R a j i である。

【図 1 0】図 1 0 は、C A R 0 3 9 r / r N H L 研究設計及びフローチャートを示す。

【図 1 1】図 1 1 は、C - C A R 0 3 9 臨床結果の要約を示す。

【図 1 2】図 1 2 は、C - C A R 0 3 9 治療前後の患者の例を示す。

【図 1 3】図 1 3 は、患者の血液における C - C A R 0 3 9 の増殖及び拡大を示す。結果は、C - C A R 0 0 8 細胞が注射後に効果的に増殖したことを示した。

【図 1 4】図 1 4 は、C - C A R 0 6 6 - N H L 試験設計を示す。

【図 1 5】図 1 5 は、C - C A R 0 6 6 による治療の前後の患者の P E T - C T の一例を示す。

【発明を実施するための形態】

【0101】

広範かつ集中的な研究の後、本発明者等は、予想外にも、C D 1 9 及び C D 2 0 を同時に標的とする C A R - T 細胞を得た。具体的には、本発明は、C D 1 9 及び C D 2 0 を同時に標的とするキメラ抗原受容体であって、シグナルペプチド、抗 C D 2 0 s c F v、抗 C D 1 9 s c F v、ヒンジ領域、膜貫通領域、及び細胞内 T 細胞シグナル伝達領域を含む、キメラ抗原受容体を提供する。更に、抗 C D 2 0 s c F v 及び抗 C D 1 9 s c F v は、多数のスクリーニングによって得られ、多重反復構造を有するペプチドフラグメント (G 4 S) と連結された。本発明の C A R - T 細胞は、C D 1 9 抗原及び C D 2 0 抗原の両方を同時に認識することができ、単一標的 C A R - T 細胞の治療中に、抗原発現の下方制御又は欠失によって引き起こされる免疫エスケープのリスクを低下させる。単一抗原を標的とする C A R - T 細胞及び他の二重標的 C A R - T 細胞 (C D 1 9 及び C D 2 0 を標的とする) と比較して、2 つの標的を同時に認識する本発明の C A R - T 細胞は、腫瘍細胞に対するより強力な殺傷能力、より少ない細胞傷害性、より低い副作用、より広い治療範囲、より低い再発率及びより良好な有効性を有する。本発明は、これに基づき完成された。

【0102】

用語

本開示をより理解しやすくするために、いくつかの用語が最初に定義される。本出願で使用される場合、本明細書で特に明記されない限り、以下の各用語は以下に示される意味を有するものとする。他の定義は、本出願を通して記載される。

【0103】

「約」という用語は、当業者によって決定される特定の値又は組成物について許容可能な誤差範囲内の値又は組成物を指すことができ、これは値又は組成物がどのように測定又は決定されるかに部分的に依存するであろう。

【0104】

「投与する」という用語は、注射又は注入等による、静脈内、筋肉内、皮下、腹腔内、脊髄、又は他の非経口投与を含む、当業者に既知の様々な方法及び送達システムのうちのいずれか 1 つを使用する、対象への本発明の生成物の物理的導入を指す。

【0105】

「抗体」(A b) という用語は、抗原に特異的に結合し、ジスルフィド結合によって連結された少なくとも 2 つの重 (H) 鎖及び 2 つの軽 (L) 鎖を含む免疫グロブリン、又はその抗原結合部分を含み得るが、これらに限定されない。各 H 鎖は、重鎖可変領域 (本明細書では V H と略す) 及び重鎖定常領域を含む。重鎖定常領域は、3 つの定常ドメイン、C H 1、C H 2、及び C H 3 を含む。各軽鎖は、軽鎖可変領域 (本明細書では V L と略す)

）及び軽鎖定常領域を含む。軽鎖定常領域は、定常ドメインC Lを含む。V H及びV L領域は、相補性決定領域（C D R）と呼ばれる超可変領域に更に細分され得、これらはフレームワーク領域（F R）と呼ばれるより保存的な領域内に散在される。各V H及びV Lは、3つのC D R及び4つのF Rを含み、これらはアミノ末端からカルボキシ末端に向かって、以下の順序、F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3、及びF R 4で配置される。重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。

【0106】

C D 2 0

抗C D 1 9 C A R - Tの有効性は顕著であるが、多くの研究は、C D 1 9キメラ抗原受容体（C A R）T細胞療法に今なお多くの問題が存在することを示している。治療結果が悪く、再発しやすい一部の患者が依然として存在する。これには、腫瘍細胞が抗原エスケープを起こしやすいことが含まれる。

【0107】

C D 1 9 C A R - T抗原のエスケープを防止するために、本発明者等は、C D 1 9及びC D 2 0の両方を標的とする組み合わせられた二重特異性C A R（すなわち、B I C A R）を設計して、C D 1 9抗原がエスケープし、腫瘍細胞で発現されない場合に、C D 2 0が認識されて、インビボで腫瘍細胞を取り除くことができる。

【0108】

C D 2 0は、抗C D 1 9 C A R - T治療後の一部のC D 1 9陰性患者を含む、B細胞急性リンパ性白血病を有するほとんどの患者において発現される。C D 2 0は、グリコシル化タンパク質であり、最初に同定されたB細胞膜マーカーである。C D 2 0はB 1としても知られており、M S 4 A遺伝子によってコードされる。C D 2 0分子は4つの膜貫通疎水性領域を有し、そのN末端及びC末端は細胞質側に位置し、細胞の外側に2つの閉ループを形成し、それぞれ大ループ及び小ループと呼ばれる。C D 2 0は、正常及び癌性B細胞の95%超で特異的に発現される。これらの細胞はプレB細胞段階及びその後の発達段階にあり、C D 2 0は、細胞が形質細胞に分化するまで発現を停止する。本発明は、B細胞悪性腫瘍の免疫療法のために別の標的としてC D 2 0を使用する。

【0109】

C D 1 9及びC D 2 0を標的とする二重特異性キメラ抗原受容体

細胞免疫療法は、新しく非常に効果的な腫瘍治療モデルであり、癌の新しい種類の自己免疫治療である。細胞免疫療法は、バイオテクノロジー及び生物学的薬剤を使用して患者から採取された免疫細胞をインビトロで培養及び増幅し、次いで細胞を患者に注入し戻して、身体の自己免疫機能を刺激及び増強し、それによって腫瘍を治療する目的を達成する方法である。当業者は、有効性を高め、副作用を低減するための新しい細胞免疫療法を開発することに取り組んできた。

【0110】

本発明は、初代ヒトT細胞に効果的に組み込むことができ、T細胞が活性化された時にC D 1 9及びC D 2 0を同時に標的化することができる、合理的かつ最適化された単鎖設計及びシステム、すなわち、組み合わせられた二重特異性C A Rを提案する。本発明のC A R - T細胞は、2つの抗原（C D 1 9及びC D 2 0）を認識することができる。本発明は、抗原エスケープを防止するための非常に有効な潜在的方法を提供する。

【0111】

本発明は、C D 1 9及びC D 2 0を同時に標的とするC A Rを使用する。単一の抗原を標的とするC A Rと比較して、親和性が増強され、T細胞の活性が増加し、標的は相加効果又は相乗効果を有する。加えて、腫瘍細胞におけるC D 1 9及びC D 2 0の不均一な発現レベルのために、二重標的C A R - T療法はより広い範囲を有する。腫瘍細胞の表面上のC D 1 9及びC D 2 0を同時に標的とするC A R - Tは、単一表面抗原の下方制御又は欠失によって引き起こされる抗原エスケープの可能性を低減することができる。

【0112】

二重特異性は、同じC A Rが2つの異なる抗原に特異的に結合し、免疫認識することが

10

20

30

40

50

でき、CARが抗原のいずれか1つに結合することによって免疫応答を生成することができることを意味する。

【0113】

本発明のCD19及びCD20二重特異性CARは、単一の構造を有し、抗CD19 scFv及び抗CD20 scFvを含む。ここで、CARはCD19 scFv及びCD20 scFvを含み、CD19 scFv及びCD20 scFvのアミノ酸配列、配列決定及びヒンジは、その機能に影響を及ぼす主な因子である。

【0114】

具体的には、本発明のキメラ抗原受容体(CAR)は、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞内ドメインを含む。細胞外ドメインは、標的的特異的結合エレメント(抗原結合ドメインとしても知られる)を含む。細胞内ドメインは、共刺激シグナル伝達領域及び鎖を含む。共刺激シグナル伝達領域は、共刺激分子を含む細胞内ドメインの一部を指す。共刺激分子は、抗原受容体又はそのリガンドではなく、抗原に対するリンパ球の効率的な応答に必要な細胞表面分子である。

【0115】

リンカーは、CARの細胞外ドメインと膜貫通ドメインとの間、又はCARの細胞質ドメインと膜貫通ドメインとの間に組み込まれ得る。本明細書で使用される場合、「リンカー」という用語は、一般に、ポリペプチド鎖において膜貫通ドメインを細胞外ドメイン又は細胞質ドメインに連結させる役割を果たす任意のオリゴペプチド又はポリペプチドを指す。リンカーは、0~300のアミノ酸、好ましくは2~100のアミノ酸、最も好ましくは3~50のアミノ酸を含み得る。

【0116】

本発明の好ましい実施形態では、本発明で提供されるCARの細胞外ドメインは、CD19及びCD20を標的とする抗原結合ドメインを含む。本発明のCARがT細胞で発現される場合、抗原結合特異性に基づいて抗原認識が行われ得る。CARがその会合した抗原に結合すると、CARは腫瘍細胞に影響を及ぼし、腫瘍細胞が成長することができず、死に至るか、又は他の方法で影響を受け、患者の腫瘍負荷を縮小又は排除する。抗原結合ドメインは、好ましくは、共刺激分子及び鎖のうち1つ以上からの細胞内ドメインに融合される。好ましくは、抗原結合ドメインは、4-1BBシグナル伝達ドメイン及びCD3シグナル伝達ドメインの組合わせの細胞内ドメインと融合される。

【0117】

本明細書で使用される場合、「抗原結合ドメイン」及び「単鎖抗体フラグメント」は、抗原結合活性を有する、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント、又は単一Fvフラグメントを指す。Fv抗体は、抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含むが、定常領域を含まない。Fv抗体は、全ての抗原結合部位を有する最小の抗体フラグメントを有する。一般に、Fv抗体はまた、VHドメインとVLドメインとの間にポリペプチドリンカーを含み、抗原結合に必要な構造を形成することができる。抗原結合ドメインは、通常、scFv(単鎖可変フラグメント)である。scFvの大きさは、典型的には完全抗体の1/6である。単鎖抗体は、好ましくは、ヌクレオチド鎖によってコードされるアミノ酸鎖配列である。本発明の好ましい実施形態として、scFvは、CD19及びCD20を特異的に認識する抗体を含む。

【0118】

ヒンジ領域及び膜貫通領域(膜貫通ドメイン)に関して、CARは、CARの細胞外ドメインに融合された膜貫通ドメインを含むように設計され得る。一実施形態では、CAR中のドメインの1つと天然に会合する膜貫通ドメインが使用される。いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、そのようなドメインが同じ又は異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインに結合することを回避し、それによって受容体複合体の他のメンバとの相互作用を最小限に抑えるために、アミノ酸置換によって選択又は修飾され得る。

【0119】

本発明のCARにおける細胞内ドメインは、4-1BBのシグナル伝達ドメイン及びC

10

20

30

40

50

D 3 のシグナル伝達ドメインを含む。

【0120】

好ましくは、本発明のCAR構造は、同様に、シグナルペプチド配列（リーダー配列としても知られる）、抗原認識配列（抗原結合ドメイン）、ヒンジ領域、膜貫通領域、共刺激因子シグナル領域、及びCD3ゼータシグナル伝達領域（鎖部分）を含む。接続の順序を図1に示す。

【0121】

別の好ましい実施形態では、本発明のCARはTN-LEU-19である。CD20を標的とする抗原結合ドメインは、Leu16抗体由来の単鎖可変領域の重鎖配列（配列番号1）及び軽鎖（VL）配列（配列番号2）を含む。

【0122】

Leu16抗体由来の単鎖可変領域の重鎖配列（VH）：

EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQT
TPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTA
YMQQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVT
VSS（配列番号1）

LEU-VH-CDR1：配列番号1、位置31～35；

LEU-VH-CDR2：配列番号1、位置50～66；

LEU-VH-CDR3：配列番号1、位置99～111。

【0123】

Leu16抗体由来の単鎖可変領域の軽鎖配列（VL）：

DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVNYMDWYQKKP
GSSPKPWIIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSSYSLTISRVEA
EDAATYYCQQWSFNPPPTFGGGTKLEIK（配列番号2）

LEU-VL-CDR1：配列番号2、位置24～33；

LEU-VL-CDR2：配列番号2、位置49～55；

LEU-VL-CDR3：配列番号2、位置88～96。

【表1】

Leu16 領域	配列	残基	長さ
HFR1	EVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFT (SEQ ID NO:46)	1-30	30
VH-CDR1	SYNMH (SEQ ID NO:47)	31-35	5
HFR2	WVKQTPGQGLEWIG (SEQ ID NO:48)	36-49	14
VH-CDR2	AIYPGNGDTSYNQKFKG (SEQ ID NO:49)	50-66	17
HFR3	KATLTADKSSSTAYMQQLSSLTSEDSADYYCAR (SEQ ID NO:50)	67-98	32
VH-CDR3	SNYYGSSYWFFDV (SEQ ID NO:51)	99-111	13
HFR4	WGAGTTVTVSS (SEQ ID NO:52)	112-122	11
Leu16 VH			122

10

20

30

40

50

【表 2】

Leu16 領域	配列	残基	長さ
LFR1	DIVLTQSPAILSASPGEKVTMTC (SEQ ID NO:53)	1-23	23
V _L -CDR1	RASSSVNYMD (SEQ ID NO:54)	24-33	10
LFR2	WYQKKPGSSPKPWIY (SEQ ID NO:55)	34-48	15
V _L -CDR2	ATSNLAS (SEQ ID NO:56)	49-55	7
LFR3	GVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYC (SEQ ID NO:57)	56-87	32
V _L -CDR3	QQWSFNPPT (SEQ ID NO:58)	88-96	9
LFR4	FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:59)	97-106	10
Leu16 V _L			106

10

【0124】

別の好ましい実施形態では、本発明のCARはTN-OF-19である。CD20を標的とする抗原結合ドメインは、オフアツムマブ抗体由来の単鎖可変領域の重鎖配列（配列番号3）及び軽鎖配列（配列番号4）を含む。

【0125】

オフアツムマブ抗体に由来する単鎖可変領域の重鎖配列（VH）：

20

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTTFNDYAMHWVRQ
APGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKKSL
YLQMNSLRAEDTALYYCAKDDIQYGNYYYGMDVWVGQGTTVT
VSS（配列番号3）

OF-VH-CDR1：配列番号3、位置30～35。OF-VH-CDR1の配列は、NDYAMH（配列番号40）である。

【0126】

OF-VH-CDR2：配列番号3、位置50～66。OF-VH-CDR2の配列は、TISWNSGSI

30

【0127】

OF-VH-CDR3：配列番号3、位置99～111。OF-VH-CDR3の配列は、DIQYGNYYYGMDV（配列番号42）である。

【0128】

オフアツムマブ抗体に由来する単鎖可変領域の軽鎖配列（VL）：

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK
PGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLE
PEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIK（配列番号4）

OF-VL-CDR1：配列番号4、位置24～34。OF-VL-CDR1の配列は、RASQSVSSSYLA（配列番号43）である。

【0129】

40

OF-VL-CDR2：配列番号4、位置50～56。OF-VL-CDR2の配列は、DASN

【0130】

OF-VL-CDR3：配列番号4、位置89～97。OF-VL-CDR3の配列は、QQR

【0131】

別の好ましい実施形態では、本発明のCARにおけるCD19を標的とする抗原結合ドメインは、FMC63抗体に由来する単鎖可変領域の軽鎖（VL）配列（配列番号5）及び重鎖配列（配列番号6）を含む。

【0132】

50

FMC63抗体に由来する単鎖可変領域の軽鎖(VL)のアミノ酸配列:

DIQMTQTTSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQK
PDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLE
QEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTTKLEIT(配列番号5)

FMC63-VL-CDR1:配列番号5、位置24~34。FMC63-VL-CDR1の配列は、RASQDISKYLN(配列番号63)である。

【0133】

FMC63-VL-CDR2:配列番号5、位置50~56。FMC63-VL-CDR2の配列は、HTSRLHS(配列番号64)である。

【0134】

FMC63-VL-CDR3:配列番号5、位置89~97。FMC63-VL-CDR3の配列は、QQGNTLPYT(配列番号39)である。

【0135】

FMC63抗体に由来する単鎖可変領域の軽鎖(VL)のヌクレオチド配列:

gacatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctg
cct ctctgggaga cagagtcacc 60

atcagtttgca gggcaagtca ggacattagt aaatat
taaat ttgggtatca gcagaaacca 120

gatggaaactg ttaaaactcct gatctaccat acatcaa
gat tacactcagg agtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggttc tggaacagat tattctc
tca ccattagcaa cctggagcaa 240

gaagataattg ccacttactt ttgccaaacag ggtaat
cgc ttccgtacac gttcggagg 300

gggaccaagc tggagatcac a 321(配列番号21)

【0136】

FMC63抗体に由来する単鎖可変領域(VH)の重鎖のアミノ酸配列:

EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQ
PPRKGLEWLGVIWGSETTYYNLSALKSRLTI IKDNSKSKSVF
LKMNSLQTTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTS
S(配列番号6)

FMC63-VH-CDR1:配列番号6、位置31~35。FMC63-VH-CDR1の配列は、DYGV(配列番号60)である。

【0137】

FMC63-VH-CDR2:配列番号6、位置50~65。FMC63-VH-CDR2の配列は、VIWGSETTYYNLSALKS(配列番号61)である。

【0138】

FMC63-VH-CDR3:配列番号6、位置98~109。FMC63-VH-CDR3の配列は、HYYYGGSYAMDY(配列番号62)である。

【0139】

FMC63抗体に由来する単鎖可変領域の重鎖(VH)のヌクレオチド配列:

gagggtgaaac tgcaggagtc aggaacctggc ctgggtgg
cgc cctcacagag cctgtccgtc 60

acatgcactg tctcagggtt ctcatctacc gactatg
gtg taagctggat tcgccagcct 120

ccacgaaagg gtctggagtg gctgggagta atatggg
gta gtgaaaccac atactataat 180

tcagctctca aatccagact gaccatcatc aaggaca
act ccaagagcca agttttctta 240

aaaaatgaaca gtctgc aaac tgatgacaca gccattt

a c t a c t g t g c c a a a c a t t a t t a c 3 0 0
t a c g g t g g t a g c t a t g c t a t g g a c t a c t g g g g c c a a g
g a a c c t c a g t c a c c g t c t c c t c a 3 6 0
(配列番号 2 2)

【 0 1 4 0 】

具体的には、本発明の C A R における他のエレメントの配列は以下の通りである。

【 0 1 4 1 】

リーダー配列は、C D 8 抗原のリーダー配列である。

【 0 1 4 2 】

M A L P V T A L L L P L A L L L H A A R P (配列番号 8)

10

【 0 1 4 3 】

単鎖可変領域の重鎖と軽鎖との間のリンカー配列(すなわち、可動性リンカー I)は以下の通りである。

【 0 1 4 4 】

C D 2 0 s c f v の V L と V H との間のリンカーのアミノ酸配列 :

G S T S G G G S G G G S G G G S S (配列番号 1 9)

C D 1 9 s c F v の V H と V L との間のリンカーのアミノ酸配列 :

G S T S G S G K P G S G E G S T K G (配列番号 2 0)

【 0 1 4 5 】

ヒンジ領域は、I g G 4 ヒンジの短い形態の配列から選択される。

20

【 0 1 4 6 】

E S K Y G P P C P P C P (配列番号 : 9)

【 0 1 4 7 】

膜貫通領域は、C D 8 (C D 8 T M) 又は C D 2 8 (C D 2 8 T M) 抗原の膜貫通領域配列である。

【 0 1 4 8 】

C D 8 T M : I Y I W A P L A G T C G V L L L S L V I T L Y C (配列番号 1 0)

C D 2 8 T M : M F W V L V V V G G V L A C Y S L L V T V A F I I F W V (配列番号 1 1)

【 0 1 4 9 】

30

共刺激因子シグナル領域は、4 - 1 B B 又は C D 2 8 細胞質シグナル伝達モチーフの配列に由来する。

【 0 1 5 0 】

4 - 1 B B : K R G R K K L L Y I F K Q P F M R P V Q T T Q E E D G C S C R F P
E E E E G G C E L (配列番号 1 2)

C D 2 8 : R S K R S R L L H S D Y M N M T P R R P G P T R K H Y Q P Y A P P R
D F A A Y R S (配列番号 1 3)

【 0 1 5 1 】

C D 3 のシグナル伝達領域は、T C R 複合体中の C D 3 の免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ(I T A M) の配列に由来する。

40

【 0 1 5 2 】

R V K F S R S A D A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E L N L G R R E E Y D V L D K R R
G R D P E M G G K P R R K N P Q E G L Y N E L Q K D K M A E A Y S E I G M K G E
R R R G K G H D G L Y Q G L S T A T K D T Y D A L H M Q A L P P R (配列番号 1 4)

【 0 1 5 3 】

好ましい実施形態では、本発明で構築される 2 つの C A R の完全な核酸配列及びアミノ酸配列は以下の通りである。

【 0 1 5 4 】

T N - O F - 1 9 の完全な核酸配列は以下の通りである。

【 0 1 5 5 】

50

ATGGGCCTTACCAGTGACCGGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCC
TTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGGAAATTGTGTTGACAC
AGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGC
CACCCCTCTCCTGCAGGGGCCAGTCCAGAGTGTTAGCAGCTAC
TTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGGCTCCCAGGC
TCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGGCCACTGGGCATCCC
AGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACT
CTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTT
ATTACTGTTCAGCAGCGTAGCAACTGGGCCGATCACCTTTCGG
CCAAGGGACACGACTGGAGATTAAAGGCAGTACTAGCGGT
GGTGGCTCCGGGGGGCGGTTCGGGTGGGGGGCGGCAGCAGCG
AAGTGACAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTTGGTACAGCC
TGGCAGGTCCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCT
ACCTTTAATGATTATGCCATGCACCTGGGTCCGGCAAGCTC
CAGGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAACTATTAGTTGGAA
TAGTGGTTCCATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGA
TTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCCCTGTATC
TGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCCTTGTA
TTACTGTGCAAAAGATATACAGTACGGCAACTACTACTAC
GGTATGGACGTCTGGGGGCCAAGGGACCACGGTCAACCGTCT
CCTCAGGAGGTGGTGGATCCGAGGTGAAGCTGCAGGAAAG
CGGCCCTGGCCTGGTGGCCCCCAGCCAGAGCCTGAGCGTG
ACCTGCACCGTGAGCGGCCTGAGCCTGCCCGACTACGGCG
TGAGCTGGATCCGGCAGCCCCCCCCAGGAAGGGCCCTGGAATG
GCTGGGCGTGATCTGGGGGCAGCGAGACCACCTACTACAAC
AGCGCCCTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACA
GCAAGAGCCAGGTGTTCTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGAC
CGACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAGCACTACTAC
TACGGCGGGCAGCTACGCCATGGACTACTGGGGGCCAGGGCA
CCAGCGTGACCGTGAGCAGCGGCAGCACCTCCGGGCAGCGG
CAAGCCTGGCAGCGGCAGGGGCAGCACCAAGGGCGACATC
CAGATGACCCAGACCACTCTCAGCCTGAGCGCCAGCCTGG
GCGACCGGGGTGACCATCAGCTGCCGGGGCCAGCCAGGACAT
CAGCAAGTACCTGAACCTGGTATCAGCAGAAAGCCCCGACGGC
ACCGTCAAGCTGCTGATCTACCACACCAGCCGGGCTGCACA
GCGGCGTGCCCAAGCCGGTTTATAGCGGCAGCGGCTCCGGGCAC
CGACTACAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAACAGGAAGAT
ATCGCCACCTACTTTTGGCCAGCAGGGCAACACACTGCCCT
ACACCTTTTGGCGGCGGGAACAAGCTGGAAATCACCGAGAG
CAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCCCTTGCCCTATGTTCTGG
GTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGGCGTGCTGGCCTGCTACAGCC
TGCTGGTTCACCGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGGTGAAACG
GGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTTCAAACAACCAATTT
ATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTA
GCTGCCGATTTTCCAGAAAGAAAGAAAGGAGGATGTGAAC
GCGGGTGAAAGTTTCAGCAGAAAGCGCCGACGCCCTGCTAC
CAGCAGGGCCAGAATCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGG
GCAGAAAGGGAAAGAGTACGACGTCTCTGGATAAGCGGAGAGG
CCGGGACCCCTGAGATGGGCGGGCAAGCCTCGGCGGGAAGAAC
CCCCAGGAAGGCCCTGTATAACGAACCTGCAGAAAGACAAAG

10

20

30

40

50

TGGCCGAGGCTACAGCGAGATCGGGCATGAAGGGCGAGCG
GAGGCGGGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTATCAGGGCCTG
TCCACCGCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATGC
AGGCCCTGCCCCCAAGG (配列番号18)

【0156】

TN - OF - 19の完全なアミノ酸配列は以下の通りである。

【0157】

MALPVTALLLP LALLHAARPEIVLTQSPATLSLSPGER
ATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRL LIYDASN RATGI
PARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQR SNWPITF
GQGTRLEIKGSTSGGGSGGGSGGGGSSEVQLVESGGGLVQ
PGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISW
NSG SIGYADSVKGRFTISRDN AKKSLYLQMNSLR AEDTAL
YYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGT TVTVSSGGGGSEVKLQE
SGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQP PRKGLE
WLGVIWGSETTYNSALKSRLTI IKDNSKSQVFLKMNSLQ
TDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGT SVTVSSGSTSGS
GKPGSGEGSTKGD IQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQD
ISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFS GSGSG
TDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGG TKLEITE
SKYGP PCPPCPMFWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVK
RGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCE
LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE LNLGRREEYDVL DKRR
GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGE
RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号16)

【0158】

TN - LEU - 19の完全な核酸配列は以下の通りである。

【0159】

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTGCTGCTGCTC
TGGGTTC CAGGTTC CACAGGTGACATTGTGCTGACCCAAT
CTCCAGCTATCCTGTCCTGCATCTCCAGGGGAGAAAGGTCAC
AATGACTTG CAGGGCCAGCTCAAGTGTA AATTACATGGAC
TGGTACCAGAAAGAAAGCCAGGATCCTCCCCCAAACCCTGGA
TTTATATGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCG
CTTCAGTG GGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACA
ATCAGCAGAGTG GAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACT
GCCAGCAGTGGAGTTTTAATCCACCCACGTTTCGGAGGGGG
GACCAAGCTGGAAATAAAAAGGCAGTACTAGCGGTGGTGGC
TCCGGGGGGCGGTTC CGGTG GGGGGCGGCAGCAGCGAGGTGC
AGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAAAGCCTGGGGC
CTCAGTGAAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATTT
ACCAGTTACAATATGCACTGGGTAAAGCAGACACCTGGAC
AGGGCCTGGAAATGGATTGGAGCTATTTATCCAGGAAATGG
TGATACTTCTCTACAATCAGAAAGTTCAAAGGCAAGGCCACA
TTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGC
TCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGACTATTACTG
TGCAAGATCTAATTATTACGGTAGTAGCTACTGGTTCTTC
GATGTCTGGGGCGCAGGGACCAACGGTCAACGTCTCTCTCAG
GAGGTGGTGGATCCGAGGTGAAGCTGCAGGAAAGCGGCC
TGGCCTGGTGGCCCCCAGCCAGAGCCTGAGCGTGACCTGC

ACCGTGAGCGGGCGTGAGCCTGCCCGACTACGGCGTGAGCT
GGATCCGGCAGCCCCCAGGAAGGGCCTGGAATGGCTGGG
CGTGATCTGGGGCAGCGAGACCACCTACTACAACAGCGCC
CTGAAGAGCCGGCTGACCATCATCAAGGACAACAGCAAGA
GCCAGGTGTTCTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGACCAGCA
CACCGCCATCTACTACTGCGCCAAGCACTACTACTACGGC
GGCAGCTACGCCATGGACTACTTGGGGCCAGGGCACCAGCG
TGACCGTGAGCAGCGGCAGCACCTCCGGCAGCGGCAAGCC
TGGCAGCGGGCAGGGGCAGCACCAAGGGCGACATCCAGATG
ACCCAGACCACCTCCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGACC
GGGTGACCATCAGCTGCCCGGGCCAGCCAGGACATCAGCAA
GTACCTGAACCTGGTATCAGCAGAAAGCCCCGACGGCACCGT
AAGCTGCTGATCTACCACACCAGCCGGCTGCACAGCGGCG
TGCCCCAGCCGGTTTAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTA
CAGCCTGACCATCTCCAACCTGGAACAGGAAGATATCGCC
ACCTACTTTTGGCCAGCAGGGGCAACACACTGCCCTACACCT
TTGGCGGGCGGAACAAGCTGGAAATCACCGAGAGCAAGTA
CGGACCGGCCCTGCCCCCTTGCCCTATGTTCTGGGTGCTG
GTGGTGGTTCGGAGGCGTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTGG
TCACCGTGGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGAAACGGGGCAG
AAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGA
CCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCC
GATTTCCAGAAAGAAAGAAAGGAGGATGTGAACTGCGGGT
GAAGTTCAGCAGAAAGCGCCGACGCCCTGCTTACCAGCAG
GGCCAGAAATCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGGCAGAA
GGGAAGAGTACGACGTCCTGGATAAGCGGAGAGGGCCGGGA
CCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTCGGCGGAAGAACCCCCAG
GAAGGCCCTGTATAACGAACCTGCAGAAAGACAAGATGGCCG
AGGCCCTACAGCGAGATCGGCCATGAAGGGCGAGCGGAGGCG
GGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTATCAGGGCCTGTCCACC
GCCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCC
TGCCCCCAAGG (配列番号17)

10

20

30

【0160】

TN - LEU - 19の完全アミノ酸配列は以下の通りである。

【0161】

METDTLLLVLLLVPGSTGDIVLTQSPAILSASPGEKV
TMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWIIYATSNLASGVPA
RFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPPFTGG
GTKLEIKGSTSGGGSGGGSGGGGSSEVQLQQSGAELVKPG
ASVKMCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGN
GDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSLSTSEDSADYY
CARSNYYGSSSYWFFDVWGAGTTVTVSSGGGGSEVKLQESG
PGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWL
GVIWGSSETTYYNLSALKSRLTIKDNSKSKQVFLKMNSLQTD
DTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSGSTSGSGK
PGSGEGSTKGDIQMTQTTSLSASLGDRTVITSCRASQDIS
KYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTD
YSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFFGGGTKLEITESK
YGPPCPPCPMFVVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWVKRG
RKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS CRFP EEEEGGCELR

40

50

V K F S R S A D A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E L N L G R R E E Y D V L D K R R G R
D P E M G G K P R R K N P Q E G L Y N E L Q K D K M A E A Y S E I G M K G E R R
R G K G H D G L Y Q G L S T A T K D T Y D A L H M Q A L P P R (配列番号 1 5)

【 0 1 6 2 】

本発明の B I C A R の設計は、以下の利点を有する。

【 0 1 6 3 】

第 1 に、C D 1 9 及び C D 2 0 は、ほとんどの悪性 B 細胞腫瘍で発現される。第 2 に、一般に、T 細胞認識能を高めるために C A R 構造を拡大する場合、有害な標的化の増加、細胞傷害性の増加、及び副作用の増加等の問題に遭遇することが多い。しかし、C D 1 9 及び C D 2 0 の両方は同じ腫瘍毒性曲線を有する B 細胞においてのみ発現されるため、これは C D 1 9 及び C D 2 0 には当てはまらない。最後に、B 細胞における C D 1 9 及び C D 2 0 の発現は、B 細胞の生存を促進することができる。また、治療中の両抗原の喪失は、非常に低い確率の事象である。したがって、C D 1 9 及び C D 2 0 を標的とすることにより、悪性 B 細胞の抗原エスケープの効果的な防止をもたらすことが期待される。

【 0 1 6 4 】

C D 1 9 又は C D 2 0 の単一 C A R と比較して、B I C A R は以下の利点を有する。

【 0 1 6 5 】

第 1 に、2 つの独立した C A R を発現させる場合と比較して、単一の T 細胞において B I C A R を発現する場合、DNA フットプリントが有意に減少する (DNA 長が 4 0 % 減少する) 。構造の大きさ及び長さは、ウイルスベクターのパッケージング及び形質導入効率に有意に影響を及ぼし得、したがって臨床的有効性に直接影響を及ぼす。第 2 に、2 つの異なる単一 C A R の混合物と比較して、B I C A R は、治療コストを有意に削減でき (B I C A R は、更なる負担を加えることなく、現在の T 細胞製造プロセスと完全に適合する) 、臨床的治癒率を増加させることができる。最後に、C D 1 9 及び C D 2 0 は多数の臨床研究で検証されており、比較的安全である。

【 0 1 6 6 】

本発明では、C D 1 9 マウス由来モノクローナル抗体 F M C 6 3 の配列、並びに C D 2 0 マウス由来モノクローナル抗体 l e u - 1 6 及びオファツムマブの配列に基づいて、C D 1 9 及び C D 2 0 を標的とする 2 種類のキメラ抗原受容体構造 (T N - L E U - 1 9 、 T H - O F - 1 9) を構築した。我々は、初代 T 細胞におけるこれらの 2 つのキメラ抗原受容体の発現レベル、インビトロ活性化能、及び腫瘍細胞殺傷有効性の分析及び同定を完了した。最後に、T N - L E U - 1 9 又は T H - O F - 1 9 キメラ抗原受容体で改変された T 細胞は、C D 1 9 及び C D 2 0 陽性抗原を保有する悪性腫瘍をインビトロで殺傷し、インビボで除去する強力な能力を有し、オファツムマブは l e u 1 6 よりも良好であることが見出された。これは、C D 1 9 及び C D 2 0 陽性白血病及びリンパ腫の治療における C A R - T の臨床適用のための新しい有効な方法及び調製を提供する。

【 0 1 6 7 】

本発明は、単一特異性及び二重特異性 C A R を設計及び最適化した。これらの C A R は、C D 1 9 又は C D 2 0 を発現する B 細胞悪性腫瘍に対して強力な殺傷能力を有する。B I C A R は、単一の T 細胞生成物が B 細胞白血病及びリンパ腫に関連する 2 つの臨床的に検証された抗原を標的とすることを可能にし、最終的に単一の抗原の喪失又はエスケープに起因する腫瘍再発のリスクを低下させる。本発明は、新しい B I C A R の設計で更に使用することができ、したがって抗原の適用性を高め、癌に対する T 細胞療法の有効性を高める。

【 0 1 6 8 】

キメラ抗原受容体 T 細胞 (C A R - T 細胞)

本明細書で使用される場合、「C A R - T 細胞」、「C A R - T」、「C A R T」、「本発明の C A R - T 細胞」という用語は全て、本発明の第 4 の態様の C D 1 9 及び C D 2 0 の両方を標的とする C A R - T 細胞を指す。具体的には、C A R - T 細胞の C A R 構造は、抗 C D 1 9 s c F v、抗 C D 2 0 s c F v、ヒンジ領域、膜貫通領域、及び細胞内

10

20

30

40

50

T細胞シグナル伝達領域を順に含み、抗CD20 scFv及び抗CD19 scFvは、複数の反復構造を有するペプチド(G4S)と連結される。単一の抗原を標的とするCAR-Tと比較して、2つの標的を同時に認識するCAR-T細胞はより致死的であり、治療の範囲がより広範囲である。

【0169】

ベクター

所望の分子をコードする核酸配列は、当技術分野で既知の組換え方法を使用して、例えば、遺伝子を発現する細胞からライブラリをスクリーニングすることによって、遺伝子を含むことが知られているベクターから遺伝子を誘導することによって、又は標準的な技術を使用して、遺伝子を含む細胞及び組織から直接単離することによって得ることができる。あるいは、目的の遺伝子を合成的に作製することができる。

10

【0170】

また、本発明は、本発明の発現カセットが挿入されたベクターを提供する。レンチウイルス等のレトロウイルスに由来するベクターは、導入遺伝子の長期的で安定した組み込み及び娘細胞におけるその増殖を可能にするため、長期の遺伝子移入を達成するための適切なツールである。レンチウイルスベクターは、肝細胞等の非増殖性細胞を形質導入することができるという点で、マウス白血病ウイルス等のオンコ・レトロウイルスに由来するベクターを超える利点を有する。レンチウイルスベクターはまた、免疫原性が低いという利点を有する。

【0171】

要約すると、本発明の発現カセット又は核酸配列は、典型的かつ作動可能的にプロモータに連結され、発現ベクターに組み込まれる。ベクターは、真核生物における複製及び組み込みに適し得る。典型的なクローニングベクターは、転写及び翻訳ターミネータ、開始配列、並びに所望の核酸配列の発現の調節に有用なプロモータを含む。

20

【0172】

本発明の発現構築物はまた、標準的な遺伝子送達プロトコルを使用して、核酸免疫及び遺伝子療法に使用され得る。遺伝子送達のための方法は当技術分野で公知である。例えば、明細書全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,399,346号、同第5,580,859号、同第5,589,466号を参照されたい。別の実施形態では、本発明は遺伝子療法ベクターを提供する。

30

【0173】

核酸は、多数の種類のベクターにクローニングされ得る。例えば、核酸は、プラスミド、ファージミド、ファージ誘導體、動物ウイルス及びコスミドを含むがこれらに限定されないベクターにクローニングされ得る。特定の目的のベクターは、発現ベクター、複製ベクター、プローブ生成ベクター、及び配列決定ベクターを含む。

【0174】

更に、発現ベクターは、ウイルスベクターの形態で細胞に提供され得る。ウイルスベクター技術は当技術分野で周知であり、例えば、Sambrook et al (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)、並びに他のウイルス学及び分子生物学のマニュアルに記載されている。ベクターとして有用なウイルスには、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、及びレンチウイルスが含まれるが、これらに限定されない。一般に、適切なベクターは、少なくとも1つの生物において機能的な複製起点、プロモータ配列、好都合な制限エンドヌクレアーゼ部位、及び1つ以上の選択マーカを含む(例えば、国際公開第01/96584号、国際公開第01/29058号、及び米国特許第6,326,193号)。

40

【0175】

哺乳動物細胞への遺伝子移入のために、多数のウイルスベースのシステムが開発されている。例えば、レトロウイルスは、遺伝子送達システムのための便利なプラットフォームを提供する。当該分野で既知の技術を使用して、選択された遺伝子をベクターに挿入し、

50

レトロウイルス粒子にパッケージングすることができる。次いで、組換えウイルスを単離し、インビボ又はエキスピボのいずれかで対象の細胞に送達することができる。多数のレトロウイルスシステムが当技術分野で既知である。いくつかの実施形態では、アデノウイルスベクターが使用される。多数のアデノウイルスベクターが当技術分野で既知である。一実施形態では、レンチウイルスベクターが使用される。

【0176】

更なるプロモータ要素、例えばエンハンサは、転写開始の頻度を調節する。典型的には、これらは、開始部位の10bp上流の領域30-1に位置するが、多くのプロモータは、開始部位の下流にも機能的要素を含有することが最近示されている。プロモータエレメント間の間隔は柔軟であることが多く、その結果、エレメントが他方に対して反転又は移動する場合、プロモータ機能が保存される。チミジinkinナーゼ(tk)プロモータでは、活性が低下し始める前に、プロモータエレメント間の間隔が50bpまで増加され得る。プロモータに応じて、個々のエレメントは、転写を活性化するために協調的又は独立して機能することができるとみられる。

【0177】

適切なプロモータの一例は、前初期サイトメガロウイルス(CMV)プロモータ配列である。このプロモータ配列は、それに作動可能に連結された任意のポリヌクレオチド配列の高レベルの発現を駆動することができる強力な構成的プロモータ配列である。適切なプロモータの別の例は、伸長成長因子-1(EF-1)である。しかし、シミアンウイルス40(SV40)初期プロモータ、マウス乳癌ウイルス(MMTV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)末端反復配列(LTR)プロモータ、MoMuLVプロモータ、トリ白血病ウイルスプロモータ、エプスタイン・バーウイルス前初期プロモータ、ラウス肉腫ウイルスプロモータ、並びにアクチンプロモータ、ミオシンプロモータ、ヘモグロビンプロモータ、及びクレアチンキンナーゼプロモータ等であるがこれらに限定されないヒト遺伝子プロモータを含むがこれらに限定されない、他の構成的プロモータ配列も使用され得る。更に、本発明は構成的プロモータの使用に限定されるべきではなく、誘導性プロモータも本発明の一部として企図される。誘導性プロモータの使用は、そのような発現が望まれる場合に作動可能に連結されるポリヌクレオチド配列の発現をオンにすることができるか、又は発現が望まれない場合に発現をオフにすることができる分子スイッチを提供する。誘導性プロモータの例としては、メタロチオネインプロモータ、グルココルチコイドプロモータ、プロゲステロンプロモータ、及びテトラサイクリンプロモータが挙げられるが、これらに限定されない。

【0178】

CARポリペプチド又はその一部の発現を評価するために、細胞に導入される発現ベクターはまた、選択マーカー遺伝子若しくはレポーター遺伝子のいずれか又は両方を含有して、ウイルスベクターを介して遺伝子導入されること、又は感染されることが求められる細胞の集団からの発現細胞の同定及び選択を容易にすることができる。他の態様では、選択マーカーは、別個のDNA片に担持され得、同時遺伝子導入手順で使用され得る。選択マーカー及びレポーター遺伝子の両方を、適切な制御配列に隣接させて、宿主細胞における発現を可能にすることができる。有用な選択マーカーとしては、例えば、neo等の抗生物質耐性遺伝子が挙げられる。

【0179】

レポーター遺伝子は、潜在的に遺伝子導入された細胞を同定し、制御配列の機能性を評価するために使用される。一般に、レポーター遺伝子は、レシピエント生物若しくは組織に存在しないか、又は発現されない遺伝子であり、ポリペプチドをコードし、その発現が何らかの容易に検出可能な特性、例えば酵素活性によって明らかにされる遺伝子である。レポーター遺伝子の発現は、DNAがレシピエント細胞に導入された後の適切な時点でアッセイされる。適切なレポーター遺伝子は、ルシフェラーゼ、-ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、分泌型アルカリホスファターゼ、又は緑色蛍光タンパク質遺伝子をコードする遺伝子を含み得る(例えば、Ui-Tei et

10

20

30

40

50

al., 2000 FEBS Letters 479:79-82)。適切な発現システムは周知であり、既知の技術を使用して調製され得るか、又は商業的に入手され得る。一般に、レポーター遺伝子の最高レベルの発現を示す最小5'フランキング領域を有する構築物がプロモータとして同定される。そのようなプロモータ領域は、レポーター遺伝子に連結されてもよく、プロモータ駆動転写を調節する能力について薬剤を評価するために使用され得る。

【0180】

遺伝子を細胞に導入及び発現させる方法は、当技術分野で既知である。発現ベクターに関連して、ベクターは、当技術分野における任意の方法によって宿主細胞、例えば哺乳動物、細菌、酵母、又は昆虫細胞に容易に導入され得る。例えば、発現ベクターは、物理的、化学的、又は生物学的手段によって宿主細胞に移入され得る。

10

【0181】

ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための物理的方法は、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、微粒子銃、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション等を含む。ベクター及び/又は外因性核酸を含む細胞を製造する方法は、当技術分野で周知である。例えば、Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)を参照されたい。宿主細胞にポリヌクレオチドを導入するための好ましい方法は、リン酸カルシウム法である。

【0182】

目的のポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための生物学的方法は、DNA及びRNAベクターの使用を含む。ウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターは、哺乳動物、例えばヒト細胞に遺伝子を挿入するための最も広く使用されている方法となっている。他のウイルスベクターは、レンチウイルス、ポックスウイルス、単純ヘルペスウイルスI、アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルス等に由来し得る。例えば、米国特許第5,350,674号及び同第5,585,362号を参照されたい。

20

【0183】

ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための化学的手段は、コロイド分散系、例えば、高分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズ、及び脂質ベースのシステム、例えば、水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル、及びリボソームを含む。インビトロ及びインビボで送達ビヒクルとして使用するための例示的なコロイド系は、リボソーム(例えば、人工膜小胞)である。

30

【0184】

非ウイルス送達システムが利用される場合、例示的な送達ビヒクルはリボソームである。宿主細胞への核酸の導入(インビトロ、エキスピボ又はインビボ)のために、脂質製剤の使用が企図される。別の態様では、核酸は脂質と会合していてもよい。脂質と会合した核酸は、リボソームの水性内部にカプセル化されていてもよく、リボソームの脂質二重層内に散在していてもよく、リボソーム及びオリゴヌクレオチドの両方と会合した連結分子を介してリボソームに付着していてもよく、リボソームに封入されていてもよく、リボソームと複合体を形成していてもよく、脂質を含有する溶液中に分散されていてもよく、脂質と混合されていてもよく、脂質と組み合わせられていてもよく、脂質中に懸濁液として含まれていてもよく、ミセルを含有若しくはミセルと複合体を形成していてもよく、又は他の方法で脂質と会合していてもよい。脂質、脂質/DNA又は脂質/発現ベクター関連組成物は、溶液中のいずれかの特定の構造に限定されない。例えば、それらは、二重層構造、ミセルとして、又は「崩壊した」構造で存在し得る。それらはまた、溶液中に単に散在していてもよく、場合によっては大きさ又は形状が均一でない凝集体を形成する。脂質は、天然に存在するか、又は合成脂質でもよい脂肪物質である。例えば、脂質は、細胞質に天然に存在する脂肪滴、並びに脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコール、及びアルデヒド等の長鎖脂肪族炭化水素及びそれらの誘導体を含有する化合物のクラスを含む。

40

【0185】

50

本発明の好ましい実施形態では、ベクターはレンチウイルスベクターである。

【0186】

調製

本発明は、本発明の第4の態様のCAR-T細胞、及び薬学的に許容可能な担体、希釈剤又は賦形剤を含む製剤を提供する。一実施形態では、製剤は液体製剤である。好ましくは、製剤は注射剤である。好ましくは、製剤中のCAR-T細胞の濃度は $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^8$ 細胞/mlであり、より好ましくは $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$ 細胞/mlである。

【0187】

一実施形態では、製剤は、中性緩衝食塩水、リン酸緩衝食塩水等の緩衝液；グルコース、マンノース、スクロース又はデキストラン、マンニトール等の炭水化物；タンパク質；グリシン等のポリペプチド又はアミノ酸；酸化防止剤；EDTA又はグルタチオン等のキレート剤；アジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）；及び防腐剤を含み得る。本発明の製剤は、好ましくは静脈内投与用に製剤化される。

【0188】

治療用途

本発明は、本発明の発現カセットをコードするレンチウイルスベクター（LV）で形質導入された細胞（例えば、T細胞）を使用する治療用途を含む。形質導入されたT細胞は、腫瘍細胞マーカCD19及びCD20を標的とし、T細胞を相乗的に活性化し、T細胞免疫応答を引き起こし、それによって腫瘍細胞に対する殺傷有効性を有意に高めることができる。

【0189】

したがって、本発明はまた、哺乳動物における標的細胞集団又は組織に対するT細胞媒介性免疫応答を刺激するための方法であって、本発明のCAR-T細胞を哺乳動物に投与する工程を含む方法を提供する。

【0190】

一実施形態では、本発明は、自己由来の患者（又は異種ドナー）からのT細胞を単離し、活性化し、遺伝子改変して、CAR-T細胞を生成し、次いで同じ患者に注射する、細胞療法のクラスを含む。この方法では、移植片対宿主病の確率は極めて低く、抗原は非MHC拘束的にT細胞によって認識される。更に、1つのCAR-Tは、抗原を発現する全ての癌を治療することができる。抗体療法とは異なり、CAR-T細胞はインビボで複製することができ、長期持続性がもたらされて、持続的な腫瘍制御を導くことができる。

【0191】

一実施形態では、本発明のCAR-T細胞は、強いインビボT細胞増殖を経ることができ、長期間持続することができる。更に、CAR媒介性免疫応答は、CAR改変T細胞がCAR中の抗原結合部分に特異的な免疫応答を誘導する養子免疫療法手法の一部であり得る。例えば、抗CD19CD20 CAR-T細胞は、CD19及びCD20を発現する細胞に対して特異的に免疫応答を誘発する。

【0192】

本明細書に開示されるデータは、CD19CD20 scFv、ヒンジ及び膜貫通ドメイン、並びに4-1BB及びCD3 シグナル伝達ドメインを含むレンチウイルスベクターを具体的に開示しているが、本発明は、本明細書の他の箇所に記載されるように、構築物の各成分について任意の数の変異を含むと解釈されるべきである。

【0193】

治療され得る癌は、血管新生されない又は大部分が血管新生されない腫瘍、及び血管新生される腫瘍を含む。癌は、非固形腫瘍（例えば白血病及びリンパ腫である血液腫瘍等）又は固形腫瘍を含み得る。本発明のCARで治療される癌の種類には、癌腫、芽細胞腫及び肉腫、並びに特定の白血病又はリンパ性悪性腫瘍、良性及び悪性腫瘍、並びに悪性腫瘍、例えば肉腫、癌腫及び黒色腫が含まれるが、これらに限定されない。成人腫瘍/癌及び小児腫瘍/癌も含まれる。

【0194】

血液癌は、血液又は骨髓の癌である。血液（又は血行性）の癌の例には、急性白血病（例えば、急性リンパ性白血病、急性骨髓球性白血病、急性骨髓性白血病及び骨髓芽球、前骨髓球性、骨髓単球性、単球性及び赤白血病）、慢性白血病（例えば、慢性骨髓性（顆粒球性）白血病、慢性骨髓性白血病及び慢性リンパ性白血病）を含む白血病、真性赤血球増加症、リンパ腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫（緩徐進行型及び高悪性度型）、多発性骨髄腫、ワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症、重鎖病、骨髄異形成症候群、ヘアリー細胞白血病及び骨髄形成異常症が含まれる。

【0195】

固形腫瘍は、通常嚢胞又は液体領域を含まない組織の異常な塊である。固形腫瘍は良性又は悪性であり得る。様々な種類の固形腫瘍が、それらを形成する細胞の種類に対して命名される（肉腫、癌腫、及びリンパ腫等）。肉腫及び癌腫等の固形腫瘍の例としては、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、中皮腫、悪性リンパ腫、膵臓癌及び卵巣癌が挙げられる。

【0196】

本発明のCAR改変T細胞はまた、哺乳動物におけるエキスピボ免疫化及び/又はインビボ療法のためのワクチンの一種として役立ち得る。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【0197】

エキスピボ免疫化に関して、以下の少なくとも1つが、哺乳動物に細胞を投与する前にインビトロで行われる。i)細胞を増殖させること、ii)CARをコードする核酸を細胞に導入すること、及び/又はiii)細胞の凍結保存。

【0198】

エキスピボ手順は当技術分野で周知であり、以下でより完全に考察される。簡潔には、細胞を哺乳動物（好ましくはヒト）から単離し、本明細書に開示されるCARを発現するベクターで遺伝子改変する（すなわち、インビトロで形質導入又は遺伝子導入する）。CAR改変細胞は、治療上の利益を提供するために哺乳動物レシピエントに投与され得る。哺乳動物レシピエントはヒトであり得、CAR改変細胞はレシピエントに対して自己由来であり得る。あるいは、細胞は、レシピエントに対して同種、同系又は異種であり得る。

【0199】

エキスピボ免疫化に関して細胞ベースのワクチンを使用することに加えて、本発明はまた、患者において抗原に対する免疫応答を誘発するためのインビボ免疫化のための組成物及び方法を提供する。

【0200】

本発明は、腫瘍を治療するための方法であって、それを必要とする対象に、治療有効量の本発明のCAR改変T細胞を投与することを含む方法を提供する。

【0201】

本発明のCAR改変T細胞は、単独で、あるいは希釈剤及び/又はIL-2、IL-17若しくは他のサイトカイン若しくは細胞集団等の他の成分と組み合わせて医薬組成物として投与され得る。簡潔には、本発明の医薬組成物は、1つ以上の薬学的又は生理学的に許容可能な担体、希釈剤又は賦形剤と組み合わせて、本明細書に記載の標的細胞集団を含み得る。このような組成物は、中性緩衝食塩水、リン酸緩衝食塩水等の緩衝液；グルコース、マンノース、スクロース又はデキストラン、マンニトール等の炭水化物；タンパク質；グリシン等のポリペプチド又はアミノ酸；酸化防止剤；EDTA又はグルタチオン等のキレート剤；アジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）；及び防腐剤を含み得る。本発明の組成物は、好ましくは静脈内投与用に製剤化される。

【0202】

本発明の医薬組成物は、治療（又は予防）される疾患に適切な方法で投与され得る。投与の量及び頻度は、患者の状態、並びに患者の疾患の種類及び重症度等の要因によって決定されるが、適切な用量は臨床試験によって決定され得る。

【0203】

「免疫学的有効量」、「抗腫瘍有効量」、「腫瘍阻害有効量」又は「治療量」が示される場合、投与される本発明の組成物の正確な量は、年齢、体重、腫瘍の大きさ、感染又は

10

20

30

40

50

転移の程度、及び患者（対象）の状態の個人差を考慮して医師によって決定され得る。本明細書に記載されるT細胞を含む医薬組成物は、 $10^4 \sim 10^9$ 細胞/kg体重、好ましくは $10^5 \sim 10^6$ 細胞/kg体重の用量で投与され得、それらの範囲内の全ての整数値を含むことが一般に示され得る。T細胞組成物はまた、これらの用量で複数回投与され得る。細胞は、免疫療法において一般に知られている注入技術を使用することによって投与することができる（例えば、Rosenberg et al, New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988を参照されたい）。特定の患者に対する最適な用量及び治療レジメンは、疾患の徴候について患者をモニタリングし、それに応じて治療を調整することによって、医学の当業者によって容易に決定され得る。

【0204】

主題組成物の投与は、エアロゾル吸入、注射、摂取、注入、埋込又は移植を含む任意の好都合な様式で行われ得る。本明細書に記載の組成物は、皮下、皮内、腫瘍内、リンパ節内、髄内、筋肉内、静脈内（i.v.）注射、又は腹腔内で患者に投与され得る。一実施形態では、本発明のT細胞組成物は、皮内又は皮下注射によって患者に投与される。別の実施形態では、本発明のT細胞組成物は、好ましくはi.v.注射によって投与される。T細胞の組成物は、腫瘍、リンパ節、又は感染部位に直接注射され得る。

【0205】

本発明の特定の実施形態では、本明細書に記載の方法、又はT細胞が治療レベルまで増殖される当技術分野で既知の他の方法を使用して、活性化及び増殖された細胞が、（例えば、前に、同時に、又は後に）抗ウイルス療法、シドホビル及びインターロイキン-2、シタラピン（ARA-Cとしても知られる）又はMS患者のためのナタリズマブ治療又は乾癬患者のためのエファリズマブ治療又はPML患者のための他の治療等の薬剤による治療を含むが、これらに限定されない任意の数の関連する治療様式と併せて患者に投与される。更なる実施形態では、本発明のT細胞は、化学療法、放射線照射、シクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノレート、及びFK506等の免疫抑制剤、抗体、又は他の免疫療法剤と組み合わせて使用され得る。更なる実施形態では、本発明の細胞組成物は、（例えば、前に、同時に、又は後に）骨髄移植、又はフルダラビン、外照射療法（XRT）、シクロホスファミド等の化学療法剤の使用と併せて患者に投与される。例えば、一実施形態では、対象は、高用量化学療法による標準的な治療を受け、その後、末梢血幹細胞移植を受ける場合がある。特定の実施形態では、移植後、対象は、本発明の増殖免疫細胞の注入を受ける。更なる実施形態では、増殖細胞は、手術の前又は後に投与される。

【0206】

患者に投与される上記治療の用量は、治療されている状態及び治療のレシピエントの正確な性質によって変化するであろう。患者投与のための用量のスケールリングは、当技術分野で認められている慣例に従って行うことができる。一般に、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{10}$ の本発明の改変T細胞（例えば、CAR-T-19/20細胞）を、例えば、静脈内注入による各治療又は各治療過程の手段によって患者に適用することができる。

【0207】

本発明の利点は以下の通りである。

【0208】

（1）本発明のキメラ抗原受容体に関して、細胞外抗原結合ドメインは、特異性抗CD20 s c F v及び抗CD19 s c F vであり、特定の抗CD20 s c F v及び抗CD19 s c F vを特定のヒンジ領域及び細胞内ドメインに組み合わせることによって形成されたCARは、低い細胞傷害性及び低い副作用で腫瘍細胞を殺傷する大きな能力を示す。

【0209】

（2）本発明によって提供されるキメラ抗原受容体は、T細胞がCAR遺伝子を有するレンチウイルスに感染した後、CARタンパク質の安定な発現及び膜局在化を達成することができる。

【0210】

(3) 本発明のCAR改変T細胞は、インビボでのより長い生存時間及び強力な抗腫瘍有効性を有し、IgG4ヒンジ-CH2-CH3リンカー領域を有する最適化されたCARは、Fc受容体の結合及びその後のADCC作用(抗体依存性細胞障害)を回避することができる。

【0211】

(4) 2つの独立したCARと比較して、本発明の二重特異性キメラ抗原受容体は、抗CD20 s c F v及び抗CD19 s c F vの両方を含み、DNAフットプリントが有意に減少し(DNA長が40%減少する)、構造の大きさが小さく、ウイルスベクターのパッケージング及び形質導入有効性に有益であり、したがって臨床的有效性が直接改善する。更に、本発明の二重特異性CARは、コストがより低く、治癒率がより高く、より安全である。

10

【0212】

(5) 本発明のTN-LEU-19又はTH-OF-19キメラ抗原受容体で改変されたT細胞は、CD19及びCD20陽性抗原を保有する悪性腫瘍をインビトロで殺傷し、インビボで除去する非常に強力な能力を有し、オフアツムマブがより強力である。これは、CD19及びCD20陽性白血病及びリンパ腫の治療におけるCAR-Tの臨床適用のための新しい有効な方法及び調製を提供する。

【0213】

(6) 本発明のCAR-T細胞は、大部分の悪性B細胞腫瘍に対して殺傷効果を有し、より広い治療範囲及びより大きな適用率を有し、腫瘍細胞のエスケープをより効果的に防止することができる。

20

【0214】

本発明を、具体例を参照して以下に更に説明する。これらの実施例は例示のみを目的としており、本発明の範囲を限定することを意図していないことを理解されたい。以下の実施例に記載される特定の条件のない実験方法は、一般に、従来の条件下で、又は製造業者の指示に従って行われる。百分率及び部分は、特に明記しない限り重量によるものである。

【0215】

[実施例1]

レンチウイルス発現ベクターの構築

全長DNAを合成し、クローニングして、プラスミドコードを構築した。pWPTレンチウイルスベクターをクローニングベクターとして選択し、クローニング部位はBamHI及びSalI部位であった。ここで、本発明で設計された2つのCARの構造を図1に示す。TN-LEU-19のアミノ酸配列を配列番号15に示し、TN-OF-19のアミノ酸配列を配列番号16に示す(L-(OF)VL-(OF)VH-I-(FMC63)VH-(FMC63)VL-H-TM-C-CD3の構造を有する)。

30

【0216】

[実施例2]

二重特異性CARのインビトロ活性化能の検出

PBMCを、密度勾配遠心分離によって健康なドナーの静脈血から単離した。0日目に、CD3モノクローナル抗体(OKT3)及びレトロネクチン(TAKARA)で予めコーティングした細胞培養フラスコ中でPBMCを活性化した。培地は、1%ヒトアルブミン及び300U/mL組換えヒトインターロイキン2(IL-2)を含有するGT-551細胞培養培地であった。3日目に、活性化PBMCに精製TN-LEU-19又はTN-OF-19レンチウイルス溶液を形質導入した。6日目から、TN-OF-19及びTN-LEU-19のCAR-T細胞を対応する活性アッセイのために採取することができる。プロテインL法を使用して、7日間培養したCAR-T細胞におけるT細胞膜の表面上のCAR遺伝子コードタンパク質の発現レベルを決定した。

40

【0217】

T細胞活性化マーカーCD137及びIFN 放出を、7日間培養したCD19/20二重特異性CAR-T細胞を使用して検出した。1×10⁵のCAR-T細胞を、CD19

50

、C D 2 0 陽性 K 5 6 2 - C D 1 9 +、K 5 6 2 - C D 2 0 +、K 5 6 2 - C D 1 9 + C D 2 0 + 及び R a j i (天然に C D 1 9 及び C D 2 0 を発現する) 腫瘍細胞株、並びに C D 1 9 C D 2 0 陰性 K 5 6 2 腫瘍細胞株、又は腫瘍細胞なしで、2 0 0 μ l の G T - 5 5 1 培地中で、1 : 1 の比で 1 8 時間、それぞれ共培養した。次いで、T 細胞の表面上の C D 1 3 7 の発現レベル及び培養上清中の I F N の分泌レベルをそれぞれ検出した。

【0218】

結果を図 2 A 及び図 2 B に示す。2 つの C A R T 細胞の表面上の C D 1 3 7 の発現を検出し、培養上清中の I F N の発現を検出した。ここで、T N - O F - 1 9 細胞は、T N - L E U - 1 9 よりも高い C D 1 3 7 活性化レベル及び I F N 放出レベルを有する。

【0219】

[実施例 3]

インピトロでの C D 1 9 / 2 0 二重特異性 C A R - T 細胞の細胞傷害性の検出

実施例 2 で調製した C A R - T 細胞を、L D H 放出アッセイによって細胞傷害性について試験した。標的細胞は、K 5 6 2、K 5 6 2 - C D 1 9 +、K 5 6 2 - C D 2 0 +、K 5 6 2 - C D 1 9 + C D 2 0 +、及び R a j i 細胞であり、エフェクター細胞は N T、T N - L E U - 1 9、及び T N - O F - 1 9 細胞である。エフェクター細胞数 : 標的細胞数 = 5 : 1、1 0 : 1、2 0 : 1、4 0 : 1 とするエフェクター - 標的比を設定した。結果を図 3 A に示す。T N - L E U - 1 9 C A R - T 細胞及び T N - O F - 1 9 C A R - T 細胞の両方は、C D 1 9 / 2 0 陽性腫瘍細胞においてアポトーシスを良好に誘導し、L D H を放出することができる。

【0220】

C A R - T 1 9 / 2 0 細胞によって誘導される腫瘍細胞殺傷中の C D 1 0 7 a (T 細胞脱顆粒のマーカー) 放出レベルをフローサイトメトリによって分析した。1 \times 1 0 ⁵ 細胞の有効細胞 C A R - T 1 9 / 2 0 (T N - O F - 1 9 及び T N - L E U - 1 9) を、2 \times 1 0 ⁵ の標的腫瘍細胞とそれぞれ共培養した。標的細胞は、それぞれ K 5 6 2 - C D 1 9 +、K 5 6 2 - C D 2 0 +、K 5 6 2 - C D 1 9 + C D 2 0 +、及び K 5 6 2 細胞、R a j i 細胞、R o m a s 細胞 (C D 1 9 + C D 2 0 +) である。結果を図 3 B に示す。両方の C A R T 細胞は、腫瘍細胞殺傷中に C D 1 0 7 a の放出を良好に誘導することができる。ここで、T N - O F - 1 9 細胞は、T N - L E U - 1 9 細胞よりも細胞傷害性のマーカーとしての C D 1 0 7 a の放出がわずかに高い。

【0221】

[実施例 4]

マウスにおける移植腫瘍細胞に対する C A R - T 1 9 / 2 0 の阻害効果

動物に注射した腫瘍細胞は、ルシフェラーゼレポーター遺伝子を有する R a j i 細胞 (ルシフェラーゼ発現 R a j i) であった。この実験では、腫瘍細胞 R a j i を注射し、マウスにおいて 1 週間成長させ、次いでエフェクター T 細胞を注射した。エフェクター T 細胞を 3 つの群 : N T、T N - L E U - 1 9、及び T N - O F - 1 9 に分けた。増殖したエフェクター T 細胞を尾静脈を通して N S G マウスに注射し、次いでマウスの蛍光強度 (I V I S 蛍光イメージングによる) 及びマウスの体重を 7 日ごとに記録した。実験を 2 1 日目に中止し、統計結果を分析した。

【0222】

結果を図 4 に示す。図 4 A は、3 群のマウスへのエフェクター T 細胞の注射後のマウスの体重変化を示す。C A R T - T N - O F - 1 9 及び C A R T - T N - L E U - 1 9 の 2 種類の C A R T 細胞と比較して、N T のマウスは体重の有意な減少を示し、両方の C A R T 細胞群のマウスは体重がわずかに増加した。図 4 B は、3 群のマウスの平均蛍光強度を示す。結果は、N T 群のマウスの平均蛍光強度が有意に増加したが、2 つの C A R T 細胞群のマウスの蛍光強度の平均は減少したことを示し、T N - O F - 1 9 及び T N - L E U - 1 9 C A R T 細胞の両方が、N T と比較して腫瘍の成長を阻害することができることを示している。ここで、T N - O F - 1 9 細胞は、1 4 日後に T N - L E U - 1 9 細胞よりも腫瘍成長に対するより良好な阻害を有し、T N - L E U - 1 9 群の腫瘍成長曲線は有意

10

20

30

40

50

に再発した。図4Cは、2つのCAR-T細胞群及びNT群における蛍光強度のIVISイメージングを示す。TN-OF-19CAR-T細胞は、インビボでTN-LEU-19細胞よりも良好に腫瘍細胞を阻害又は殺傷することができる。

【0223】

[実施例5]

インビボでのTN-OF-19CAR-T細胞及びCD19特異性CAR-T細胞の阻害効果の比較

1×10⁶のホタルルシフェラーゼ発現Raji細胞を、尾静脈注射によって6～8週齢のNPGマウス(NOD-Cg.PrkdcSCID IL-2Rgcnu11/vst)に投与した。7日後、腫瘍生着を、D-ルシフェリンのi.p.注射及び180秒間のBruker In Vivo Xtremeイメージングシステム(Bruker, Xtreme BI)での10～15分後のイメージングによって測定した。マウスを、腫瘍負荷に基づいて試験群(n=6/群)に等しく分配した。TN-OF-19(L)、TN-OF-19(M)、TN-OF-19(H)群を、尾静脈注射によって、1×10⁶、2.5×10⁶、及び5×10⁶のCAR+T細胞で別々に処置した。1×10⁶の形質導入されていないT細胞(NT)及び同じドナー由来の単一標的CD19特異的CAR-T細胞を対照として用いた。腫瘍成長を、注射後7、10、21日目のマウス全身平均放射輝度に基づいて評価した。図5Aは、二重特異性TN-OF-19CAR-T細胞が、インビボでCD19特異性CAR-T細胞よりも良好に腫瘍細胞を阻害又は死滅させることができることを示す。特に処置の初期段階において、二重特異性TN-OF-19CAR-Tは、有意により速い阻害効果を示す。図5Bは、4つのCAR-T細胞群及びNT群における蛍光強度のIVISイメージングを示す。

【0224】

[実施例6]

TN-OF-19CARにおけるCD20/CD19二重特異性scFVの抗原特異性
TN-OF-19CARにおける二重特異性scFVの親和性及び特異性を調べるために、インフレイムでCD20-scFv(オファツムマブmAbに由来する)及びCD19-scFv(FMC63mAbに由来する)を、ウサギIgG1のFc領域と連結させることによって、キメラウサギモノクローナル抗体を作製した。CD19及びCD20-scFvを、G4Sリンカーによって交互に連結した。分子の順序はOF-VL-VH-G4S-FMC63-VH-VLであり、これはTN-OF-19のscFvと同じである。一過性遺伝子導入後に293T細胞でキメラ抗体を発現させた。染色の特異性に対するこのキメラ抗体の検証をフローサイトメトリによって行った。簡潔には、3つの安定細胞株(A549-CD19、A549-CD20、A549-CD19-CD20)を標的として使用し、CD19-CD20-A549細胞及びCD19+CD20+Raji細胞を対照として使用した。全ての細胞を洗浄し、再懸濁し、2%血清で30分間ブロックした。5×10⁵の細胞をFACSバイアルに移し、洗浄し、組換え抗体(最終濃度20µg/mL)で4で1時間染色した。洗浄後、二次抗体(ヤギ抗ウサギIgG)を4、暗所で30分間添加した。最後に、細胞を洗浄し、FACS分析のために200µLのFACS緩衝液に再懸濁した。図6は、CD19若しくはCD20又は両方を有する細胞に結合するが、両方の抗原を欠く細胞には結合されないキメラ抗体を示し、二重特異性結合ドメインが結合のために1つのみの同族抗原を必要とし、新しい特異性認識部位は形成されなかったことを示している。

【0225】

[実施例7]

CD20特異性CARの(CD20/19二重特異性CARを作製するための)スクリーニング及び機能の検証

CD20/CD19二重特異性CARの構築前に、我々は、CD20特異性scFV候補をスクリーニングし、絞り込むための広範な研究を行った。図7は、6つの異なるscFv及び異なるヒンジ/TM/シグナル伝達ドメインを有する16のCD20特異性CA

Rの構造を示す。全長DNAを合成し、クローニングして、プラスミドコードの構築を達成し、我々は、これらのCARの抗腫瘍活性を様々なCD20発現標的細胞で試験した。

【0226】

図8Aは、CAR-T20.1、CAR-T20.5、CAR-T20.6、CAR-T20.7、CAR-T20.8、CAR-T20.9及びCAR-T20.10をスクリーニングするためのIFN 放出アッセイの結果を示し、これらのCAR-Tの中で、CAR-T20.9 (Leu16) 及びCAR-T20.10 (Leu16) のみが、より高い陽性IFN 放出を示した。

【0227】

図8Bは、CAR-T20.1、CAR-T20.9、CAR-T20.10、CAR-T20.11、CAR-T20.12、CAR-T20.13、CAR-T20.14、CAR-T20.15及びCAR-T20.16をスクリーニングするためのIFN 放出アッセイの結果を示す。これらのCAR-Tの中で、CAR-T20.10 (Leu16) 及びCAR-T20.14 (OF) が、より高い陽性IFN 放出を示した。

【0228】

図8Cは、CAR-T20.9、CAR-T20.12、CAR-T20.14、CAR-T20.17、CAR-T20.18、及びCAR-T20.19をスクリーニングするためのIFN 放出アッセイの結果を示す。これらのCAR-Tの中で、CAR-T20.14 (OF) 及びCAR-T20.19 (OF) は、より高い陽性IFN 放出を示した。

【0229】

図9Aは、LDH放出アッセイによって細胞傷害性について試験した、CAR-T20.17 (Leu16の第3世代)、CAR-T20.18 (Leu16の第2世代)、CAR-T20.19 (OFの第2世代) 細胞の結果を示す。標的細胞は、CD20陽性細胞株Raji及びRamos、並びにCD20陰性Molt4である。3つ全てのCD20 CAR-T細胞は、CD20陽性腫瘍細胞においてアポトーシスを誘導し、LDHを放出することができ、CAR-T20.17、CAR-T20.18、及びCAR-T20.19が、標的細胞CD20陽性Raji及びRamos細胞に対して強力な殺傷効果を有したことを示している。

【0230】

図9Bは、NSGマウス研究における腫瘍成長のインビボ阻害を示す。動物に注射した腫瘍細胞は、ルシフェラーゼを発現するRajiである。この実験では、腫瘍細胞Rajiを注射し、マウスにおいて1週間成長させ、次いで、エフェクターT細胞を尾静脈を通して注射し、次いで、マウスの蛍光強度 (IVIS蛍光イメージングによる) 及びマウスの体重を7日ごとに記録した。実験を21日目に中止し、統計結果を分析した。結果は、CAR-T20.19 (OF) 細胞が、14日後に、CAR-T20.17 (Leu16) 及びCAR-T20.18 (Leu16) 細胞よりも腫瘍成長に対する良好な阻害を有することを示す。

【0231】

実施例7 (図7~9) の要約では、多数の実験及び比較を通して、20.1、20.2、20.4、20.5、20.6、20.7、20.8及び20.15は基本的に無効であり、20.11、20.12及び20.13は特定の効果を有するが、それらの効果は20.9、20.10、20.14、20.16、20.17、20.18及び20.19の効果よりも小さく、20.19 (OF) の効果が最良であることが見出された。上記の構造に基づいて、CD20 scFv (OF) 及びCD19 scFv (FMC63) を、新しい二重特異性キメラ抗原受容体TN-OF-19においてタンデムに使用し、更なる分析のための最良の候補と見なした。

【0232】

実施例7に關与するCD20特異性CARのアミノ酸配列を表1に示す。

10

20

30

40

50

【表 3】

表 1 キメラ抗原受容体及びその配列

CAR-T	配列	配 列 番 号:
CAR-T 20.1	MDIQLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSLSFMHWYQQKPGSSPK PWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISTVEAEDAASYFCHQ WSSNPLTFGAGTKLEISSGGGGSGGGSGDVMGVDSGGGLVQPG GSRKLSCAAPGFTFSSFGMHVVRQAPEKGLEWVAYISSPSSTLHY ADRVKGRFTISRDNPKNTLFLQMKLPSLCYGLLGPRDHVHRLK TRLNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRP EACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCR SKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELE FRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	23
CAR-T 20.5	MALPVTALLPLALLLHAARPDQLTQSPAILSASPGEKVTMTCR ASSSLSFMHWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTS YSLTISTVEAEDAASYFCHQWSSNPLTFGAGTKLEIGGGSGGGG SGGGSGDVMGVDSGGGLVQPGGSRKLSCAAPGFTFSSFGMHV RQAPEKGLEWVAYISSPSSTLHYADRVKGRFTISRDNPKNTLFLQ MKLPSLCYGLLGPRDHVHRLTRTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY CRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCE LEFELGTFKTNDLQGSCRS	24
CAR-T 20.6	MALPVTALLPLALLLHAARPDVMGVDSGGGLVQPGGSRKLSCA APGFTFSSFGMHVVRQAPEKGLEWVAYISSPSSTLHYADRVKGR FTISRDNPKNTLFLQMKLPSLCYGLLGPRDHVHRLGGGGSGGG GSGGGSDIQLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSLSFMHWYQQK PGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISTVEAEDAAS YFCHQWSSNPLTFGAGTKLEITRTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLR PEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC RSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL EFELGTFKTNDLQGSCRS	25
CAR-T 20.7	MALPVTALLPLALLLHAARPQIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCR ASSSVSYIHWFFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTS YSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKGGGGSGGG GSGGGGSQVQLQKPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHW VKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSATRT TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY IWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCELEFELGTFKTNDLQGSCRS	26
CAR-T 20.8	MALPVTALLPLALLLHAARPQVQLQKPGAELVKPGASVKMSCK ASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKG KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVW GAGTTVTVSAGGGSGGGSGGGGSQIVLSQSPAILSASPGEKVT MTCRASSSVSYIHWFFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSG SGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKTRTT TPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCRSKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCELEFELGTFKTNDLQGSCRS	27
CAR-T 20.9	MALPVTALLPLALLLHAARPEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCK ASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKG KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFDDV WGAGTTVTVSAGGGSGGGSGGGGSQIVLSQSPAILSASPGEKV TMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSG SGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPTFGGGTKLEIKES	28

10

20

30

40

50

	KYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSLKGKFWVLVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDY MNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQPF MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQ NQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR	
CAR-T 20.10	MALPVTALLPLALLLHAARPEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCK ASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKG KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDV WGAGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKV TMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSG SGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPTFGGGTKLEIKES KYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSLKGKFWVLVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDY MNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQPF MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQ NQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR	29
CAR-T 20.11	MALPVTALLPLALLLHAARPDIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCR ASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTS YSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPTFGGGTKLEIKGGGGSGGG GSGGGSEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHW VKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAY MQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDVWGAGTTVTVSS KYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSLGIKIYIAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQN QLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR	30
CAR-T 20.12	MALPVTALLPLALLLHAARPEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCK ASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKG KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDV WGAGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKV TMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSG SGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPTFGGGTKLEIKES KYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSLGIKIYIAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQN QLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDAL	31

10

20

30

40

50

	HMQUALPPR	
CAR-T 20.13	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGYAFSYSWINWVRQAPGGGLEWVGRIFFPGDGD TDYNGKFKG RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQ GTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVMTQTPLSLPVTGPGEPA CRSSKSLHLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRF SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLLELPYTFGGGTKEIK RTVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYI FKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPA YKQGQNLQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPENGGKPRRKNPQ EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKD TYDALHMQALPPR	32
CAR-T 20.14	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAA SGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIYADSVKGRF TISRDNAAKSLYLQMSNLRAEDTALYYCAKDIIYGNYYYGMDVW GGGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAATGIPARFSGS SGGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTREIKESKY GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHNTQKSL LSLGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNLQ LYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR	33
CAR-T 20.15	MALPVTALLLPLALLLHAARPGDVMGVDSGGGLVQPGGSRKLSC AAPGFTFSSFGMHWRQAPKGLEWVAYISSPSTLHYADRVKG RFTISRDNPKNTLFLQMKLPSLCYGLLGRPDHVRLLKGGGGSG GGGSGGGGSDIQLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSLSFHWYQ QKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISTVEAEDA ASYFCHQWSSNPLTFGAGTKLEIESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHNTQKSLSLSLGKIYIWAPLAGTCGV LLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE EEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNLQLYNELNLGRREEYDVLDR RRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	34
CAR-T 20.16	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQPGAEVLPKPGASVKMSCK ASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKG KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVW GAGTTVTVSAGGGSGGGSGGGGSIIVLSQSPAILSASPGEKVT MTCRASSSVSYIHWFAQKPGSSPKPWIYATSNLASGVVPRFSGSG SGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQWTSNPPTFGGGTKLEIESKY GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL	35

10

20

30

40

50

	DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSLGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNNQ LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR	
CAR-T 20.17	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCK ASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKG KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDV WGAGTTVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKV TMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSG SGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPTFGGGTKLEIKES KYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVL HQLDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSLSLGKFWLVVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDY MNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSKRGRKKLLYIFKQPF MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQ NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDAL HMQALPPR	36
CAR-T 20.18	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGAELVKPGASVKMSCK ASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKG KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSADYYCARSNYYGSSYWFFDV WGAGTTVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSDIVLTQSPAILSASPGEKV TMTCRASSSVNYMDWYQKKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSG SGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSFNPTFGGGTKLEIKES KYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVL HQLDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSLSLGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPF MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQ NQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTY	37
CAR-T 20.19	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGSRSLRSCAA SGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSGIGYADSVKGRF TISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVW GQGTTVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGRLEIKESKY GPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLH QDNLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSLGKIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMR PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNNQ LYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL QKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALH MQALPPR	38

10

20

30

40

【 0 2 3 3 】

[実施例 8]

TN - OF - 19 CAR - T細胞の第I相臨床試験

第I相試験を、Shanghai Tongji Hospitalにおいて、r / r
NHL患者で実施して、C - CAR039（すなわち、TN - OF - 19 CAR - T細胞
、NCT04317885）の安全性及び有効性を評価した。T細胞を採取するためのア
フェレーシスの後、C - CAR039を製造し、標準的な3日間のシクロホスファミド/
フルダラビン移植前処置後に単回静脈内投与として注入した。C - CAR039を、18
日間の静脈間（vein to vein）時間中央値を有する、無血清、半自動化デジタ

50

ル閉鎖システムで製造した。製造成功率は100%であった。2020年8月3日現在、16名の患者に、 $1.0 \times 10^6 \sim 5.0 \times 10^6$ のCAR-T細胞/kgの用量範囲でC-CAR039を注入した。14名の患者は、少なくとも1ヶ月の評価可能な安全性データを有し、13名の患者(DLBCL患者11名、FL患者2名)は、1ヶ月以上の有効性データを有していた。図10は、CAR039 r/r NHL研究設計及びフローチャートを示す。

【0234】

投与された患者の年齢の中央値は58.5歳(範囲:28~71歳)であった。前治療のライン数中央値は2であった(範囲:2~5回の前治療)。3名(21%)の患者が以前に自家幹細胞移植(ASCT)を受けていた。

【表4】

表2 患者のベースライン臨床特性の概要

特徴	N=14	特徴	N=14
年齢中央値、歳(範囲) ・年齢 ≥ 65 、n(%)	58.5(28-71) 4(28.6)	前治療のライン数中央値、n(範囲) ・1、n(%) ・2、n(%) ・3~5、n(%)	2(1-5) 1(7.1) 7(50.0) 6(42.9)
男性/女性、n	8/6	以前のASCT、n(%)	3(21.4)
NHL サブタイプ、 n(%) ・DLBCL ・FL	12(85.7) 2(14.3)	最後の前治療に対するPDとしての 最良効果、n(%)	6(42.9)
ECOG PS、n(%) ・0 ・1	5(35.7) 9(64.3)	ブリッジ療法を受けた、n(%)	3(21.4)
IPI スコア 3/4、n(%)	3(21.4)		
Ann Arbor ステージ III/IV、n(%)	8(57.1)		

【表5】

表3 治療下で発現した有害事象(TEAE)の概要

TEAE	全グレード(n=14)	グレード3/4(n=14)
サイトカイン放出症候群、n(%)	12(85.7)	0(0)
神経細胞毒性、n(%)	1(7.1)	0(0)
好中球減少症、n(%)	11(78.6)	11(78.6)
血小板減少症、n(%)	6(42.9)	2(14.3)
貧血、n(%)	9(64.3)	5(35.7)
感染、n(%)	2(14.3)	2(14.3)

【0235】

C-CAR039治療は、グレード3以上のCRSがなく、神経細胞毒性事象もなく、良好に許容された。可逆的グレード1~2のCRSが患者のうち9名(82%)で観察された。移植前処置による血球減少症は一般的であり、可逆的であった。

【0236】

1ヶ月の評価では、12/13の患者が臨床的改善を示し(ORR=92%)、DLBCL患者の11/11が治療に应答した(ORR=100%)。追跡期間中央値は70日(範囲:35~257日)であった。最良総合効果(BOR)には、10例の完全奏効(CR)及び2例の部分应答(PR)が含まれる。

【 0 2 3 7 】

図 1 1 は、C - C A R 0 3 9 臨床結果の要約を示す。

【 0 2 3 8 】

図 1 2 は、C - C A R 0 3 9 治療前後の患者の例を示す。

【 0 2 3 9 】

[実施例 9]

C - C A R 0 3 9 の P K プロファイル

末梢血における C - C A R 0 3 9 の増殖及び拡大は、腫瘍退縮と正の相関があった。C - C A R 0 3 9 A U C (0 ~ 2 8 日) 及び C m a x と臨床応答との間の相関の正の初期傾向が観察される。

【 0 2 4 0 】

図 1 3 は、患者の血液における C - C A R 0 3 9 の増殖及び拡大を示す。結果は、C - C A R 0 0 8 細胞が注射後に効果的に増殖したことを示した。

【表 6 】

表 4 PK プロファイル(AUC_{0~28 日}、C_{max}、T_{max}、T_{last})、CAR-T 細胞用量
及び臨床応答の関係

対象 ID	用 量 (10 ⁶ CAR-T/kg)	最良効果	AUC _{0~28 日}	C _{max}	T _{max}	T _{last}	経 過 観 察 (日)
Pt.No.8	3	SD	7,530	708	10	60	60+
Pt.No.13	3	CR	201,811	30,290	10	28	28+
Pt.No.7	4	UE	223,932	57,478	31	60	60+
Pt.No.9	3	PR	537,713	38,316	7	57	57+
Pt.No.4	3	PR	607,007	89,655	12	84	84+
Pt.No.12	5	CR	727,947	83,494	8	28	28+
Pt.No.2	2	CR	747,101	114,041	14	187	187+
Pt.No.3	2	CR	1,154,844	139,497	10	182	182+
Pt.No.5	3	CR	1,673,877	183,427	8	85	85+
Pt.No.6	3	CR	2,437,574	223,644	13	55	55+
Pt.No.1	1	CR	2,580,272	259,462	14	104	257+
Pt.No.10	2	CR	2,953,074	308,343	11	55	55+
Pt.No.14	4	CR	3,143,662	302,300	14	28	28+
Pt.No.11	5	CR	8,117,064	715,187	28	28	28+

【 0 2 4 1 】

末梢血における C - C A R 0 3 9 の増殖及び拡大は、腫瘍退縮と正の相関があった。C - C A R 0 3 9 A U C (0 ~ 2 8 日) 及び C m a x と臨床応答との間の相関の正の初期傾向が観察される。

【表 7 】

表 5 他の CD19/CD20 二重特異性 CAR-T 製品と比較した C-CAR039

製品	DLBCL					
	Pt 番号	CR	PR	SD	PD	BOR
C-CAR039	11	9(80%)	2(20%)	0(0%)	0(0%)	(11)100%
Tong et al, PMID:32556247	16					
Shah, NN et al.,/CO.2019.37.15_suppl.2510	8					

10

20

30

40

50

【表 8】

製品	r/r NHL							静脈間 (vein to vein)時間 の中央値
	Pt 番号	CR	PR	SD	PD	評価前 の死亡	BOR	
C-CAR039	13	10(77%)	2(15%)	1(8%)	0(0%)	0(0%)	11(92%)	18 日間
Tong et al, PMID:32556247	28	20(71%)	2(7%)	0(0%)	5(18%)	1(4%)	22(79%)	26 日間
Shah, NN et al.,/CO.2019.37.15_suppl.2510	17	11(65%)	3(18%)	0(0%)	3(18%)	0(0%)	14(82%)	

10

【0242】

C-CAR039は、r/r NHL患者の初期臨床試験において有望な有効性及び好ましい安全性プロファイルを示す。初期の臨床的有効性シグナルは有望であり、抗CD19 CAR-T療法と好都合に比較される。これらの所見は、安全性、有効性及び奏効期間を確認するために、より長い追跡期間でより多くの患者において評価する必要がある。

【0243】

[実施例10]

C-CAR066(すなわち、CAR-T20.19(OF))の第I相臨床試験

CD19標的化エピトープの喪失による再発は、CD19 CAR-T療法の治療上の課題を提示する。これらの患者は、一般に予後不良である。CD20は、B細胞非ホジキンリンパ腫(B-NHL)のための証明された治療標的であり、以前に承認され、広く使用されているモノクローナル抗体療法によって支持されている。C-CAR066は、新規な第2世代キメラ抗原受容体T(CAR-T)療法である。前臨床研究は、C-CAR066(オフアツムマブのscFVに由来する)が、Leu16、リツキシマブ、及びオビヌツズマブのscFVに由来するCAR-Tと比較して優れた抗腫瘍活性を有することを示唆する。

20

【0244】

NCT04036019は、抗CD19 CAR-T療法で以前に治療されたr/r B細胞リンパ腫を有する対象におけるC-CAR066の安全性及び有効性を評価するための単一群、単施設、非ランダム化第I相臨床試験である。この試験の主な目的は、治療下で発現する有害事象の発生率及び重症度を評価することである。第2の目的は、全奏効率(ORR)、PFS、及びOSを決定することを含む。C-CAR066は、無血清半自動化デジタル閉鎖系で製造される。C-CAR066は、標準的な3日間のシクロホスファミド/フルダラビン移植前処置後に、単回静脈内用量として患者に投与される。

30

【0245】

図14は、C-CAR066-NHL試験設計を示す。

【0246】

2020年8月3日現在、7名の患者(全てDLBCL)が登録され、 2.0×10^6 ~ 5.0×10^6 のCAR-T細胞の用量範囲を有するC-CAR039が注入された。製造成功率は100%であった。全ての患者が抗CD19 CAR-T治療後に再発し、患者のうちの1名のみが抗CD19 CAR-T療法後にCRを達成した。

40

【表 9】

表 6 患者の臨床的特徴

パラメータ	Shanghai Tongji Hospital						
	C006	C007	C010	C012	C013	C014	C015
年齢	51	41	62	60	61	49	45
性別	男性	男性	女性	女性	男性	女性	女性
用量群	3	3	2	3	3	4.8	3
NHL 型	DLBCL	DLBCL	DLBCL	DLBCL	DLBCL	DLBCL	DLBCL
ECOG	1	1	1	1	1	1	1
ステージ	IVB	IIIA	IIIA	IVA	IIIA	UK	IVA
IPI	UK	2	UK	UK	UK	UK	2
前レジメン の数	4	5	6	3	5	4	6
前治療	1.R- CHOP*3 PR 2.CHOP*1 PD 3.ESHAP*1 4.R- ESHAP*1 PR 5.ESHAP*1 PD 6.CD19 CART PR 7.Len+Ibr*6 PD	1.R- CHOP*6 CR 2.R- MINE*2 PR 3.L-ICE*1 SD 4.CD19 CART SD 5.R2-ICE*1 PD	1.R- CHOPE*2 SD 2.R- DHAP*1 SD 3.R- ESHAP*1 SD 4.R- Gemox*1 5.R2 6.CD19 CART SD	1.R- CHOP*8 CR 2.ASCT*1 CR 3.CD19 CART CR 6.CD19 CART SD	1.R- CHOP*6 CR 2.Radiation 3.R- ESHAP*2 4.R2- ESHAP*1 PR 5.IR- ESHAP*1 SD; 6.CD19 CART SD	1.R- CHOP*6 +R*2 CR 2.R2- ICE*6 CR 3.CD19 CART PR 4.PD-1 SD 7 苯达莫司汀 *1PD	1.LEN*4 PR(FL) 2.R2- EPOCH*3 PR(DLBCL) 3.Hyper- CVAD-B*1 PD 4.R2- GEMOX*2 SD 5.CD19/22 CART SD 6.R- GEMOX*1 PD
最良効果	PR	CR	SD	CR	CR	CR	PR
CART-19 の日付	2019 年 1 月 20 日	2019 年 11 月 11 日	2019 年 12 月 7 日	2019 年 7 月 17 日	2019 年 12 月 30 日	2020 年 1 月 13 日	2019 年 6 月 12 日
CART-19 に対する応 答	PR	SD	SD	CR	SD	PR	SD
初診	2018 年 3 月 31 日	2018 年 10 月 31 日	2019 年 5 月	2018 年 2 月	2016 年 6 月 8 日	2015 年 10 月	2017 年 2 月 23 日

【 0 2 4 7 】

C - C A R O 6 6 治療は、6 名の患者において可逆的なグレード 1 ~ 2 の C R S、別の患者においてグレード 3 の C R S で良好に許容され、神経細胞毒性事象はなかった。6 / 7 の患者が臨床的改善を示した（最良総合効果率、O R R = 8 5 . 7 %）。最良総合効果には、3 C R 及び 3 P R が含まれる。全ての患者が C - C A R O 6 6 処置に应答し、異なる程度の腫瘍退縮（4 5 ~ 1 0 0 %）を示した。

10

20

30

40

50

【表 10】

表 7 C-CAR066 治療下で発現した有害事象の概要

パラメータ	Shanghai Tongji Hospital						
	C006	C007	C010	C012	C013	C014	C015
サイトカイン放出症候群	グレード 1	グレード 3	グレード 2	グレード 1	グレード 1	グレード 1	グレード 1
神経細胞毒性	なし	なし	なし	なし	なし	なし	なし
好中球減少症	グレード 3	グレード 4	グレード 4	グレード 2	グレード 3	グレード 3	
血小板減少症	なし	グレード 4	グレード 4	グレード 2	なし	グレード 2	
貧血	グレード 3	グレード 3	グレード 3	グレード 1	グレード 1	グレード 2	
感染	なし	グレード 2	なし	なし	なし	グレード 2	

10

【0248】

6 / 7 の患者が臨床的改善を示した（最良総合効果率、ORR = 85.7%）。最良総合効果には、3 CR 及び 3 PR が含まれる。全ての患者が C - C A R 0 6 6 処置にตอบสนองし、異なる程度の腫瘍退縮（45 ~ 100%）を示した。

【表 11】

表 8 C-CAR066 臨床的有効性の概要

パラメータ	Shanghai Tongji Hospital						
	C006	C007	C010	C012	C013	C014	C015
4w	PR 減少 74.8%	PR 減少 53.9%	SD 減少 40.7%	SD 減少 45.5%	PR 減少 51.6%	PR 減少 70.3%	PR 減少 84%
8w	PR 減少 77.2%	PR 減少 73.3%	SD 減少 49.5%	SD	PR		
12w	PD(PET-CT) 新たな病変	CR(PET-CT) 減少 70.7%					

20

【0249】

図 15 は、C - C A R 0 6 6 による治療の前後の患者の PET - CT の一例を示す。

【0250】

C - C A R 0 6 6 は好ましい安全性プロファイルを有し、CD19 CAR - T 療法後の r / r NHL 患者において有望な初期有効性を示す。これは、C - C A R 0 6 6 が抗 CD - 19 CAR - T 療法と比較して異なる作用機序を有することを示す。CD20 及び CD19 腫瘍抗原の両方を標的化することにより、B 細胞悪性腫瘍患者において CD19 又は CD20 のいずれかを単独で標的化するよりも優れた臨床的利益を導くことができる。

【0251】

本出願で言及される全ての文献は、あたかもそれぞれが個別に参照により組み込まれるかのように、参照により本明細書に組み込まれる。更に、本発明の上記の教示を読んだ後、当業者は様々な変更又は修正を行うことができ、その同等物は添付の特許請求の範囲に定義される特許請求の範囲に含まれることも理解されるべきである。

40

【図面】

【図 1】



Figure 1

【図 2 A】

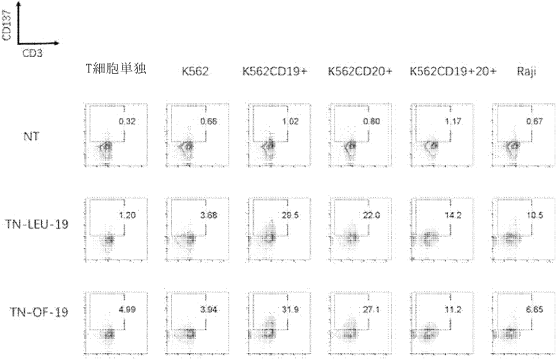


Figure 2A

【図 2 B】

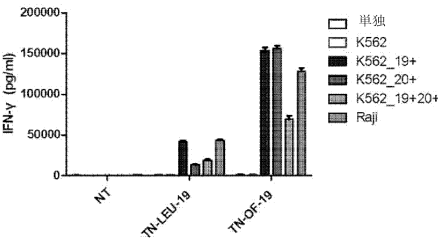


Figure 2B

【図 3 A】

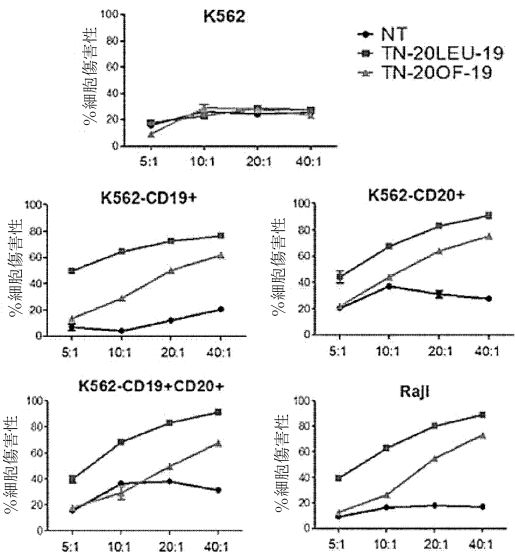


Figure 3A

【図 3 B】

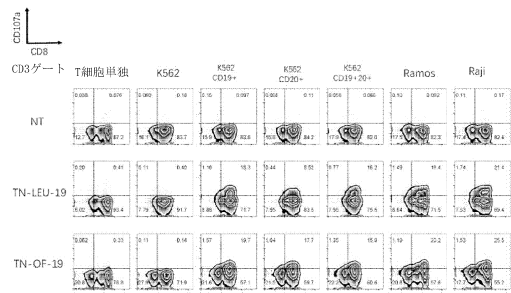


Figure 3B

【図 4 A】

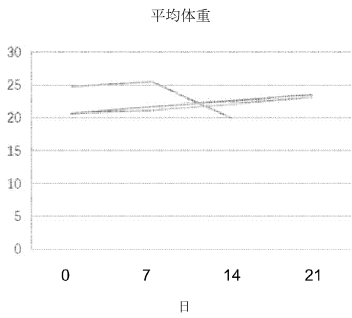


Figure 4A

【図 4 B】

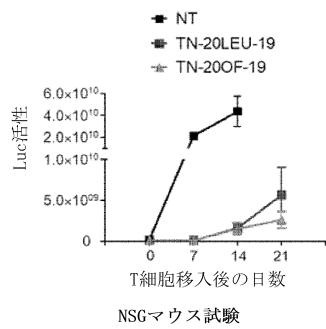


Figure 4B

【図 4 C】

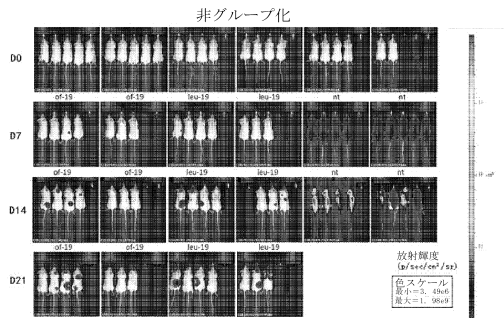


Figure 4C

【図 5 A】

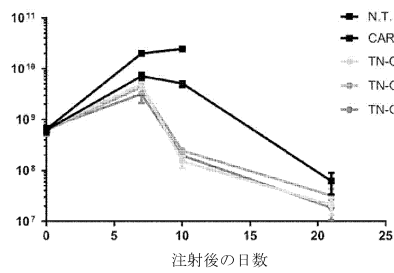


Figure 5A

【図 5 B】



Figure 5B

10

20

30

40

50

【図 8 C】

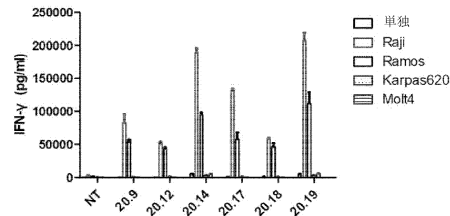


Figure 8C

【図 9 A】

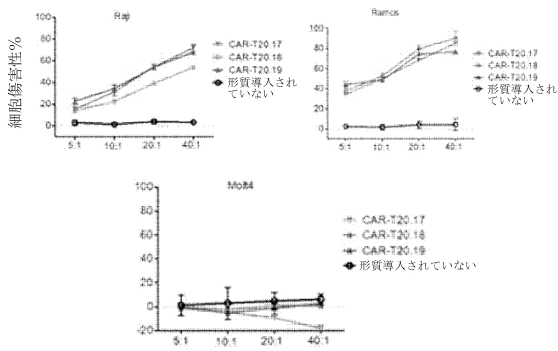


Figure 9A

【図 9 B】

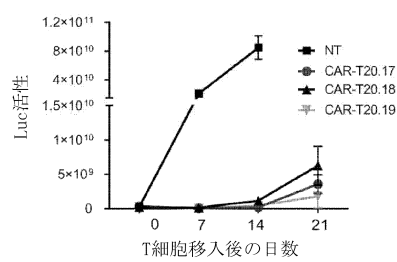


Figure 9B

【図 10】

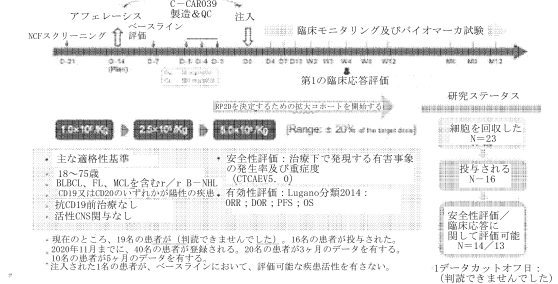


Figure 10

10

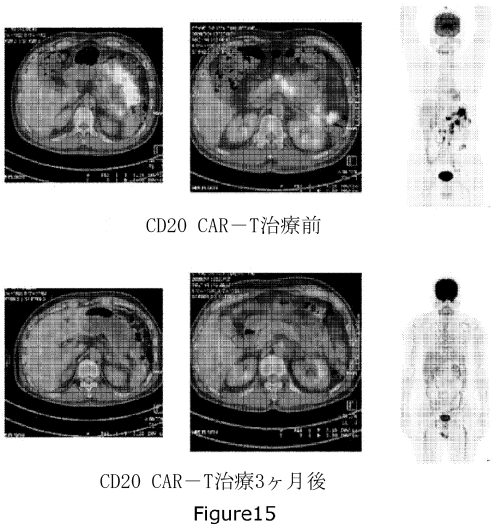
20

30

40

50

【図 15】



10

【配列表】

0007624967000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 K 35/17 (2025.01)
 C 1 2 P 21/08 (2006.01)

F I

C 1 2 N 5/10
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 K 35/17
 C 1 2 P 21/08

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

弁理士 安藤 健司

(74)代理人 100143823

弁理士 市川 英彦

(74)代理人 100183519

弁理士 櫻田 芳恵

(74)代理人 100196483

弁理士 川崎 洋祐

(74)代理人 100160749

弁理士 飯野 陽一

(74)代理人 100160255

弁理士 市川 祐輔

(74)代理人 100172683

弁理士 綾 聡平

(74)代理人 100219265

弁理士 鈴木 崇大

(74)代理人 100146318

弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 100127812

弁理士 城山 康文

(72)発明者 ヤオ, イーホン

中華人民共和国、201210・シャanghai、プードン・ニュー・エリア、チャイナ(シャanghai)
)パイロット・フリー・トレード・ゾーン、ファラディ・ロード・85、ビルディング・3

(72)発明者 リ, ヤンフェン

中華人民共和国、201210・シャanghai、プードン・ニュー・エリア、チャイナ(シャanghai)
)パイロット・フリー・トレード・ゾーン、ファラディ・ロード・85、ビルディング・3

(72)発明者 ウェイ, ユーティアン

中華人民共和国、201210・シャanghai、プードン・ニュー・エリア、チャイナ(シャanghai)
)パイロット・フリー・トレード・ゾーン、ファラディ・ロード・85、ビルディング・3

(72)発明者 デュー, シギユイ

中華人民共和国、201210・シャanghai、プードン・ニュー・エリア、チャイナ(シャanghai)
)パイロット・フリー・トレード・ゾーン、ファラディ・ロード・85、ビルディング・3

(72)発明者 ヤオ, シン

中華人民共和国、201210・シャanghai、プードン・ニュー・エリア、チャイナ(シャanghai)
)パイロット・フリー・トレード・ゾーン、ファラディ・ロード・85、ビルディング・3

(72)発明者 ファン, ジャーチャー

中華人民共和国、201210・シャanghai、プードン・ニュー・エリア、チャイナ(シャanghai)
)パイロット・フリー・トレード・ゾーン、ファラディ・ロード・85、ビルディング・3

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 米国特許出願公開第2017/0368098(US, A1)

特表2018-508215(JP, A)

特表2019-537433(JP, A)

(58)調査した分野 Cancer Immunology Research , 2016年 , Vol.4, No.6 , pp.498-508
(Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C 1 2 P 1 / 0 0 - 4 1 / 0 0

C A p l u s / B I O S I S / M E D L I N E / E M B A S E (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

U n i P r o t / G e n e S e q

P u b M e d