

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-521218

(P2023-521218A)

(43)公表日 令和5年5月23日(2023.5.23)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z 4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	Z N A 4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z 4 C 0 8 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C 0 8 6
C 0 7 K 14/725 (2006.01)	C 0 7 K 14/725	4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全37頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2022-562556(P2022-562556)	(71)出願人	520370577
(86)(22)出願日	令和3年4月1日(2021.4.1)		シャンハイ・セルラー・バイオフィーマ
(85)翻訳文提出日	令和4年11月16日(2022.11.16)		シューティカル・グループ・リミテッド
(86)国際出願番号	PCT/CN2021/085062		中華人民共和国、2 0 1 2 1 0・シャン
(87)国際公開番号	WO2021/208750		ハイ、プードン・ニュー・ディストリク
(87)国際公開日	令和3年10月21日(2021.10.21)		ト、ファラディ・ロード・ナンバー・8
(31)優先権主張番号	202010301357.9		5、ビルディング・3
(32)優先日	令和2年4月16日(2020.4.16)	(71)出願人	520370588
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)		ウーシー・セルラー・バイオフィーマシ
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		シューティカル・グループ・リミテッド
			中華人民共和国、2 1 4 1 7 4・ジャン
			スー、ウーシー、ウーシー・フーシャン
			・エコノミック・デベロプメント・ゾー
			ン、ファースト・フロア・エー・エリア
			、フーシャン・ロード・1 6 9 9、ビル
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C D 2 2 標的キメラ抗原受容体、その調製方法、及びその適用

(57)【要約】

C D 2 2 標的キメラ抗原受容体、その調製方法、及びその適用が提供される。キメラ抗原受容体は、リーダー配列、C D 2 2 標的 s c F v、ヒンジ領域、膜貫通領域、及び細胞内シグナルドメインを含む。キメラ抗原受容体をコードする核酸分子及び対応する発現ベクター、C A R-T細胞、並びにそれらの適用が提供される。キメラ抗原受容体は、C D 2 2 陽性細胞を標的とし、C D 2 2 陽性B細胞性白血病、並びに抗 C D 1 9 C A R-T治療後に急性B細胞性白血病が再発した一部のC D 1 9 陰性及びC D 2 2 陽性患者の治療に使用され得る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

キメラ抗原受容体（CAR）であって、前記キメラ抗原受容体の抗原結合ドメイン（すなわち、scFv）が、配列番号 1 又は 3 に示される抗体重鎖可変領域、及び配列番号 2 又は 4 に示される抗体軽鎖可変領域を含むことを特徴とする、キメラ抗原受容体（CAR）。

【請求項 2】

前記抗原結合ドメインの構造が、以下の式 I 又は II で示されることを特徴とし、
 $V_L - V_H$ （I）、 $V_H - V_L$ （II）

式中、 V_H は、抗原重鎖可変領域であり、 V_L は、抗原軽鎖可変領域であり、「-」は、連結ペプチド又はペプチド結合であり、好ましくは、前記抗原結合ドメインの構造が、式 I で示されるとおりである、請求項 1 に記載の CAR。

【請求項 3】

前記 V_L のアミノ酸配列が、配列番号 1 で示され、前記 V_H のアミノ酸配列が、配列番号 2 で示されることを特徴とする、請求項 2 に記載の CAR。

【請求項 4】

前記 V_L のアミノ酸配列が、配列番号 3 で示され、前記 V_H のアミノ酸配列が、配列番号 4 で示されることを特徴とする、請求項 2 に記載の CAR。

【請求項 5】

前記キメラ抗原受容体の構造が、以下の式 III で示されることを特徴とし、

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

式中、

L は、任意選択的なリーダー配列、すなわち、シグナルペプチドであり、

H は、ヒンジ領域であり、

TM は、膜貫通ドメインであり、

C は、共刺激シグナル分子であり、

CD3 ζ は、CD3 ζ に由来する細胞質シグナル伝達配列であり、

V_H 、 V_L 、及び「-」は、上記に定義されるとおりである、請求項 1 に記載の CAR。

【請求項 6】

請求項 1 に記載のキメラ抗原受容体（CAR）をコードすることを特徴とする、核酸分子。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の核酸分子を含有することを特徴とする、ベクター。

【請求項 8】

請求項 7 に記載のベクター、又は請求項 6 に記載の外因性核酸分子と一体化しているか、若しくは請求項 1 に記載の CAR を発現させる染色体を含有することを特徴とする、宿主細胞。

【請求項 9】

請求項 1 に記載のキメラ抗原受容体、請求項 6 に記載の核酸分子、請求項 7 に記載のベクター、又は請求項 8 に記載の宿主細胞と、薬学的に許容される担体、希釈剤、又は賦形剤と、を含有することを特徴とする、製剤。

【請求項 10】

がん若しくは腫瘍を予防及び／又は治療するための薬物又は調製物を調製するために使用される、請求項 1 に記載のキメラ抗原受容体、請求項 6 に記載の核酸分子、請求項 7 に記載のベクター、若しくは請求項 8 に記載の宿主細胞、又は請求項 9 に記載の製剤の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生物医学の分野に関し、より具体的には、CD22標的キメラ抗原受容体、その調製方法、及びその適用に関する。

【背景技術】

【0002】

血液悪性腫瘍は、ヒトの悪性腫瘍の約10%を占め、血液悪性腫瘍の95%は、Bリンパ球に由来する。従来の化学療法及び放射線療法は、血液悪性腫瘍の治療に重要な役割を果たすが、従来のがん治療法は、障壁に直面しており、手術、放射線療法、及び化学療法は、特異性が不十分であり、副作用が明らかで、再発及び転移が多い。一部の患者は、有意な応答を有するが、ほとんどの患者を治療することは、困難であることが証明されている。したがって、より有効な新しい治療法が、常にこの分野の探究の焦点となっている。

10

【0003】

がん治療の焦点は、最も有望な腫瘍免疫療法へと向かっている。これまでのところ、2つのCD19標的キメラ抗原受容体T細胞療法(CAR-T)製品が、小児及び若年成人患者における急性リンパ芽球性白血病の治療、並びに成人における再発性又は難治性大細胞型B細胞性リンパ腫のための第二選択療法又は多選択全身療法について承認され、海外で販売されている。しかしながら、抗CD19 CAR-T治療後、患者の40%が、1か月の治療で完全寛解を達成した後に再発し、再発した患者の60%超が、CD19陰性腫瘍細胞エスケープを示している。一部の患者では、腫瘍細胞中のCD19の発現が制限され、抗CD19 CAR-T細胞療法を受けた場合、応答又は薬剤耐性が観察されないことが多い。したがって、悪性リンパ腫患者を治療するために、CD19以外のB細胞性白血病関連抗原を標的とするCAR-T構造をスクリーニングすることが急務である。

20

【0004】

抗CD19 CAR-Tは、優れた有効性を有するが、B細胞中のCD19抗原の発現がない一部の白血病患者にとっては効果がない。一部の患者は、抗CD19 CAR-T治療後にCD19抗原の発現が減少しているか、又は更には失われており、満足のいく治療結果が得られず、CD22の持続的な発現を伴い再発しやすい。

【0005】

したがって、腫瘍を治療するための新しく、かつ有効な薬物を開発することが、この分野において急務である。

【発明の概要】

30

【0006】

本発明の目的は、CD22標的キメラ抗原受容体、その調製方法、及びその適用を提供することである。

【0007】

具体的には、本発明の目的は、CD22標的キメラ抗原受容体の配列、それによって改変されたT細胞(CART-CD22)を調製するための方法、及びその活性アッセイを提供することである。本発明は、CD22陽性B細胞性リンパ腫の治療のためのキメラ抗原受容体構造を提供する。

【0008】

本発明の第1の態様では、キメラ抗原受容体(CAR)が提供され、キメラ抗原受容体の抗原結合ドメイン(すなわち、scFv)は、配列番号1又は3に示される抗体重鎖可変領域、及び配列番号2又は4に示される抗体軽鎖可変領域を含む。

40

【0009】

別の好ましい例では、抗原重鎖可変領域及び抗原軽鎖可変領域は、連結ペプチドによって接続されている。

【0010】

別の好ましい例では、抗原結合ドメインの構造は、以下の式I又はIIに示される。

$$V_L - V_H \text{ (I)}、V_H - V_L \text{ (II)}$$

式中、 V_H は、抗原重鎖可変領域であり、 V_L は、抗原軽鎖可変領域であり、「-」は、連結ペプチド又はペプチド結合である。

50

【0011】

別の好ましい例では、抗原結合ドメインの構造は、式 I に示される。

【0012】

別の好ましい例では、 V_L のアミノ酸配列は、配列番号 1 に示され、 V_H のアミノ酸配列は、配列番号 2 に示される。（注：CAR-T22.13）

別の好ましい例では、 V_L のアミノ酸配列は、配列番号 3 に示され、 V_H のアミノ酸配列は、配列番号 4 に示される。（注：CAR-T22.14）

別の好ましい例では、連結ペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 16 に示される。

【0013】

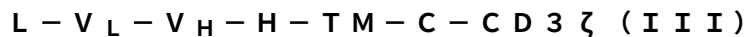
別の好ましい例では、抗原結合ドメインは、CD22、好ましくはヒト CD22 に結合する。 10

【0014】

別の好ましい例では、抗原結合ドメインの重鎖可変領域及び軽鎖可変領域は、ヒト化抗体又はヒト抗体に由来する。

【0015】

別の好ましい例では、キメラ抗原受容体の構造は、以下の式 III に示される。



【0016】

式中、

L は、任意選択的なリーダー配列、すなわち、シグナルペプチドであり、 20

H は、ヒンジ領域であり、

TM は、膜貫通ドメインであり、

C は、共刺激シグナル分子であり、

CD3 は、CD3 ζ に由来する細胞質シグナル伝達配列であり、

V_H 、 V_L 、及び「-」は、上記に定義されるとおりである。

【0017】

別の好ましい例では、L は、CD8、CD28、GM-CSF、CD4、及び CD137、又はそれらの組み合わせの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。

【0018】

別の好ましい例では、L は、CD8 に由来するシグナルペプチドである。 30

【0019】

別の好ましい例では、L のアミノ酸配列は、配列番号 9 に示される。

【0020】

別の好ましい例では、H は、CD8、CD28、及び CD137、又はそれらの組み合わせの群から選択されるタンパク質のヒンジ領域である。

【0021】

別の好ましい例では、H は、CD8 α に由来するヒンジ領域である。

【0022】

別の好ましい例では、H のアミノ酸配列は、配列番号 10 に示される。

【0023】

別の好ましい例では、TM は、CD28、CD3 イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、及び CD154、又はそれらの組み合わせの群から選択されるタンパク質の膜貫通領域である。 40

【0024】

別の好ましい例では、TM は、CD8 α に由来する膜貫通領域である。

【0025】

別の好ましい例では、TM の配列は、配列番号 11 に示される。

【0026】

別の好ましい例では、C は、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD3 50

0、CD40、CD70、CD134、4-1BB（CD137）、PD1、Dap10、CDS、ICAM-1、LFA-1（CD11a／CD18）、ICOS（CD278）、NKG2D、GITR、及びTLR2、又はそれらの組み合わせの群から選択されるタンパク質の共刺激シグナル分子である。

【0027】

別の好ましい例では、Cは、4-1BB又はCD28に由来する共刺激シグナル分子であり、好ましくは、4-1BBに由来する共刺激シグナル分子である。

【0028】

別の好ましい例では、Cのアミノ酸配列は、配列番号12に示される。

【0029】

別の好ましい例では、CD3ζのアミノ酸配列は、配列番号13に示される。

【0030】

別の好ましい例では、キメラ抗原受容体のアミノ酸配列は、配列番号14又は15に示される。

【0031】

本発明の第2の態様では、本発明の第1の態様に記載のキメラ抗原受容体（CAR）をコードする核酸分子が提供される。

【0032】

別の好ましい例では、核酸分子は、単離される。

【0033】

本発明の第3の態様では、本発明の第2の態様に記載の核酸分子を含有するベクターが提供される。

【0034】

別の好ましい例では、ベクターは、DNA、RNA、プラスミド、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（AAV）、レトロウイルスベクター、及びトランスポゾン、又はそれらの組み合わせの群から選択される。

【0035】

別の好ましい例では、ベクターは、プラスミド及びウイルスベクターの群から選択される。

【0036】

別の好ましい例では、ベクターは、ウイルス粒子の形態である。

【0037】

別の好ましい例では、ベクターは、レンチウイルスベクターである。

【0038】

別の好ましい例では、ベクターは、核酸配列、エンハンサー、転写終結シグナル、ポリアダニル化配列、複製起点、選択可能なマーカー、核酸制限部位、及び／又は相同組換え部位に作動可能に連結された、1つ以上のプロモーターを含む。

【0039】

本発明の第4の態様では、本発明の第3の態様に記載のベクター、又は本発明の第2の態様に記載の外来性核酸分子と一体化しているか、若しくは本発明の第1の態様に記載のCARを発現させる染色体を含有する宿主細胞が提供される。

【0040】

別の好ましい例では、宿主細胞は、単離された細胞である。

【0041】

別の好ましい例では、宿主細胞は、遺伝子操作された細胞である。

【0042】

別の好ましい例では、宿主細胞は、哺乳動物細胞である。

【0043】

別の好ましい例では、宿主細胞は、T細胞又はNK細胞、好ましくはT細胞である。

【0044】

10

20

30

40

50

別の好ましい例では、宿主細胞は、CAR-T細胞又はCAR-NK細胞、好ましくはCAR-T細胞である。

【0045】

本発明の第5の態様では、操作された免疫細胞を調製するための方法が提供され、免疫細胞は、本発明の第1の態様に記載のCARを発現させ、本方法は、以下の工程を含む：

(a) 操作される免疫細胞を提供する工程、及び

(b) 本発明の第2の態様に記載の核酸分子又は本発明の第3の態様に記載のベクターを免疫細胞に形質導入して、操作された免疫細胞を得る工程。

【0046】

別の好ましい例では、操作された免疫細胞は、CAR-T細胞又はCAR-NK細胞である。

【0047】

別の好ましい例では、工程(a)において、本方法は、0.1～10%（好ましくは0.5%～5%、より好ましくは0.8%～2%）のヒトアルブミンを含有するGT-551無血清培地中で操作される免疫細胞を培養することを含み、ヒトアルブミンの含有量は、培地の総重量に基づいて計算される。

【0048】

別の好ましい例では、本方法は、得られた操作された免疫細胞の機能及び有効性を試験する工程を更に含む。

【0049】

本発明の第6の態様では、本発明の第1の態様に記載のキメラ抗原受容体、本発明の第2の態様に記載の核酸分子、本発明の第3の態様に記載のベクター、又は本発明の第4の態様に記載の宿主細胞と、薬学的に許容される担体、希釈剤、又は賦形剤と、を含有する製剤が提供される。

【0050】

別の好ましい例では、製剤は、液体製剤である。

【0051】

別の好ましい例では、製剤の剤形は、注射液である。

【0052】

別の好ましい例では、製剤中のCAR-T細胞の濃度は、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^8$ 細胞/ml、好ましくは $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$ 細胞/mlである。

【0053】

本発明の第7の態様では、本発明の第1の態様に記載のキメラ抗原受容体、本発明の第2の態様に記載の核酸分子、本発明の第3の態様に記載のベクター、若しくは本発明の第4の態様に記載の宿主細胞、又は本発明の第6の態様に記載の製剤の使用が提供され、本使用は、がん若しくは腫瘍を予防及び／又は治療するための薬物又は調製物を調製するためのものである。

【0054】

別の好ましい例では、腫瘍は、血液腫瘍及び固形腫瘍、又はそれらの組み合わせの群から選択される。

【0055】

別の好ましい例では、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)、及びびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫(DLBCL)、又はそれらの組み合わせの群から選択される。

【0056】

別の好ましい例では、固形腫瘍は、胃がん、胃がんの腹膜転移、肝臓がん、白血病、腎がん、肺がん、小腸がん、骨がん、前立腺がん、結腸及び直腸がん、乳がん、結腸直腸がん、子宮頸がん、卵巣がん、リンパ腫、鼻咽頭がん、副腎腫瘍、膀胱腫瘍、非小細胞肺癌(NSCLC)、神経膠腫、並びに子宮内膜がん、又はそれらの組み合わせの群から選択される。

10

20

30

40

50

【0057】

別の好ましい例では、腫瘍は、CD22陽性腫瘍、好ましくはCD22陽性B細胞性リンパ腫、多発性骨髄腫、又は形質細胞白血病である。

【0058】

本発明の第8の態様では、本発明の第4の態様に記載の宿主細胞を調製するために使用されるキットが提供され、これは、容器と、容器内に位置する本発明の第2の態様に記載の核酸分子又は本発明の第3の態様に記載のベクターと、を含む。

【0059】

本発明の第9の態様では、疾患を治療するための方法が提供され、本方法は、適切な量の本発明の第3の態様に記載のベクター、本発明の第4の態様に記載の宿主細胞、又は本発明の第6の態様に記載の製剤を、それを必要とする対象に投与することを含む。

10

【0060】

別の好ましい例では、疾患は、がん又は腫瘍である。

【0061】

本発明の範囲内で、本発明の上記の技術的特徴及び以下に詳述される技術的特徴（例えば、実施形態）を組み合わせ、新しい又は好ましい技術的解決法を形成し得ることを理解されたい。紙面の制約上、ここでは詳述されない。

【図面の簡単な説明】

【0062】

【図1】CD22標的キメラ抗原受容体の概略的構造図である。CARの構造は、リーダ配列、抗原認識配列、接続領域、膜貫通領域、共刺激分子シグナル領域、及びCD3ゼータシグナル伝達領域を含む。

20

【図2】CD22標的キメラ抗原受容体によって操作されたT細胞のトランスフェクション効率の測定を示す。CART-CD22細胞中の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、組換えヒトCD22タンパク質のFc断片での染色を介して、培養6日目のフローサイトメトリーによって分析した。

【図3A】T細胞膜の表面上のCD137の発現レベルを示す。

【図3B】培養上清中のIFN γ の分泌レベルを示す。具体的には、6日目まで培養した 1×10^5 個のCART-CD22細胞を採取し、CD22陽性K562-CD22+C7、K562-CD22+A4、H929-CD22+E12、Raji株腫瘍細胞、及びCD22陰性K562株腫瘍細胞、又は無腫瘍細胞とそれぞれ、200 μ lのGT-551培地中で1:1の比率において18時間培養し、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測定した。

30

【図4】CART-CD22によって誘導された腫瘍細胞傷害性のアッセイを示す。具体的には、 1×10^4 個のCD22陰性腫瘍細胞（K562株）又はCD22陽性腫瘍細胞（K562-CD22+A4株、H929-CD22+E12株、及びRaji株）を採取し、対応するCART細胞とそれぞれ、100 μ lのGT-551培地中で図面に示される比率において8時間共培養し、50 μ lの培地上清を採取し、50 μ lの発色基質混合物を添加し、30分間の共役酵素反応を実施して、CAR-T細胞によって認識及び殺滅された後の、腫瘍細胞の溶解中に放出された乳酸脱水素酵素（LDH）の量を検出し、ここで、産生された赤色生成物の量は、溶解細胞の数に比例する。この図は、CART-CD22によって誘導された腫瘍細胞傷害性のパーセンテージを示す。

40

【図5-1】CART-CD22によって誘導された腫瘍細胞の後期アポトーシスプロセス中のCD107a放出レベルのアッセイを示す。具体的には、 2×10^5 個のCD22陰性腫瘍細胞（K562株）又はCD22陽性腫瘍細胞（K562-CD22+A4株、H929-CD22+E12株、及びRaji株）、並びに 1×10^5 個のCAR-T細胞を採取し、200 μ lのGT-551培地中で1:1の体積比において5時間培養し、CAR-T細胞がCD22陽性腫瘍細胞によって活性化された後のT細胞脱顆粒に関連する膜タンパク質CD107aの発現レベルの変化を検出した。

【図5-2】CART-CD22によって誘導された腫瘍細胞の後期アポトーシスプロセ

50

ス中のCD107a放出レベルのアッセイを示す。具体的には、 2×10^5 個のCD22陰性腫瘍細胞（K562株）又はCD22陽性腫瘍細胞（K562-CD22+A4株、H929-CD22+E12株、及びRaji株）、並びに 1×10^5 個のCAR-T細胞を採取し、200 μ lのGT-551培地中で1:1の体積比において5時間培養し、CAR-T細胞がCD22陽性腫瘍細胞によって活性化された後のT細胞脱顆粒に関連する膜タンパク質CD107aの発現レベルの変化を検出した。

【図6A】図6A、図6B及び図6Cは、CAR-T-CD22比較例のスクリーニング結果である。図6Aは、CD22標的キメラ抗原受容体によって操作されたT細胞のトランスフェクション効率の測定を示す。6日目まで培養したCAR-T-CD22細胞中の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、プロテインL染色によって検出した。6日目まで培養した 1×10^5 個のCAR-T-CD22細胞を採取し、CD22陽性K562-CD22+腫瘍細胞、天然CD22発現Raji株腫瘍細胞、及びCD22陰性K562腫瘍細胞、又は無腫瘍細胞とそれぞれ混合し、200 μ lのGT-551培地中で1:1の比率において18時間培養し、T細胞膜の表面上のCD137の発現レベル（図6B）及び培養上清中のIFN γ の分泌レベル（図6C）をそれぞれ検出した。

10

【図6B】図6A、図6B及び図6Cは、CAR-T-CD22比較例のスクリーニング結果である。図6Aは、CD22標的キメラ抗原受容体によって操作されたT細胞のトランスフェクション効率の測定を示す。6日目まで培養したCAR-T-CD22細胞中の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、プロテインL染色によって検出した。6日目まで培養した 1×10^5 個のCAR-T-CD22細胞を採取し、CD22陽性K562-CD22+腫瘍細胞、天然CD22発現Raji株腫瘍細胞、及びCD22陰性K562腫瘍細胞、又は無腫瘍細胞とそれぞれ混合し、200 μ lのGT-551培地中で1:1の比率において18時間培養し、T細胞膜の表面上のCD137の発現レベル（図6B）及び培養上清中のIFN γ の分泌レベル（図6C）をそれぞれ検出した。

20

【図6C】図6A、図6B及び図6Cは、CAR-T-CD22比較例のスクリーニング結果である。図6Aは、CD22標的キメラ抗原受容体によって操作されたT細胞のトランスフェクション効率の測定を示す。6日目まで培養したCAR-T-CD22細胞中の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、プロテインL染色によって検出した。6日目まで培養した 1×10^5 個のCAR-T-CD22細胞を採取し、CD22陽性K562-CD22+腫瘍細胞、天然CD22発現Raji株腫瘍細胞、及びCD22陰性K562腫瘍細胞、又は無腫瘍細胞とそれぞれ混合し、200 μ lのGT-551培地中で1:1の比率において18時間培養し、T細胞膜の表面上のCD137の発現レベル（図6B）及び培養上清中のIFN γ の分泌レベル（図6C）をそれぞれ検出した。

30

【発明を実施するための形態】

【0063】

広範囲かつ徹底的な研究及び繰り返しのスクリーニングを通して、本発明者らは、CD22を効果的に標的とすることができるキメラ抗原受容体を初めて発見した。キメラ抗原受容体の細胞外抗原結合ドメインは、配列番号1に示される抗体重鎖可変領域及び配列番号2に示される抗体軽鎖可変領域、又は配列番号3に示される抗体重鎖可変領域及び配列番号4に示される抗体軽鎖可変領域を含む。本発明では、キメラ抗原受容体を含むCAR-T細胞も調製した。実験結果は、本発明によって提供されるキメラ抗原受容体及びそのCAR-T細胞が、腫瘍細胞に対して著しく高い殺滅能力を示し、放出されたCD107aの発現レベルが上昇し、特異性が良好であり、それによってCD22陽性腫瘍細胞のアポトーシス、したがって本発明を効果的に誘導したことを示す。

40

【0064】

具体的には、本発明でスクリーニングされた抗体には、CAR-T22.3、CAR-T22.5、CAR-T22.7、CAR-T22.8、CAR-T22.9、CAR-

50

T 2 2 . 1 0、C A R-T 2 2 . 1 1、C A R-T 2 2 . 1 2、C A R-T 2 2 . 1 3、C A R-T 2 2 . 1 4、C A R-T 2 2 . 1 5、C A R-T 2 2 . 1 6、及び C A R-T 2 2 . 1 7 が含まれた。その中で、C A R-T 2 2 . 3 及び C A R-T 2 2 . 5 は、公開されている C A R-T 配列であり、スクリーニングの陽性対照として使用した。スクリーニングの結果は、C A R-T 2 2 . 1 3、C A R-T 2 2 . 1 4、及び C A R-T 2 2 . 5 によって得られた C A R-T 細胞が、同様のインビトロ機能を有したことを示し、これら 3 つの C A R-T について更なる実験研究を行って、初代 T 細胞中のこれらのキメラ抗原受容体の発現レベル、インビトロ活性化能力、及び腫瘍細胞殺滅効果を検出及び分析した。これらの研究は、本発明のキメラ抗原受容体が、C D 2 2 陽性細胞を標的とし、抗 C D 1 9 C A R-T 治療後に急性 B 細胞性白血病が再発した一部の C D 1 9 陰性及び C D 2 2 陽性患者を含む、C D 2 2 陽性 B 細胞性白血病を治療するために使用され得ることを示す。

10

【 0 0 6 5 】

具体的には、本発明は、ウイルス感染後の細胞膜の表面上の異なる C A R 構造の発現時間と発現強度との間の相関を決定し、次いで、異なる C A R 構造のタンパク質の発現の容易さの差を特定した。この発見は、同じ感染条件下での異なる C A R 構造が、膜表面上の C A R タンパク質の発現レベル、及びインビボでの C A R T 活性の持続性において異なったことを示唆した。広範囲のスクリーニングの後、本発明の C A R 構造 (C A R-T 2 2 . 1 3 及び C A R-T 2 2 . 1 4) が得られた。結果は、本発明の C A R 構造によってコードされるタンパク質が、十分に発現し、膜上に局在し得ることを示す。更に、それらは、腫瘍細胞の後期アポトーシスを誘導する強力な能力、より高い C D 1 3 7 活性化レベル及び C D 1 0 7 a 放出レベル、並びにより良好な殺滅効果を有した。

20

【 0 0 6 6 】

本発明はまた、C D 2 2 標的 C A R 構造によって改変された T 細胞の調製プロセスを、主に 1 % ヒトアルブミンを補充した G T-5 5 1 無血清培地を選択して、リンパ球をインビトロで培養することによって改善した。

【 0 0 6 7 】

用語

本開示をよりよく理解するために、いくつかの用語を最初に定義する。本出願で 사용되는場合、本明細書に別段の明示的な記載がない限り、以下の用語の各々は、以下に挙げられる意味を有するものとする。追加の定義も本出願全体を通して挙げられる。

30

【 0 0 6 8 】

「およそ」という用語は、当業者によって決定されるような特定の値又は組成の許容誤差範囲内の値又は組成を指し得、これは、その値又は組成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。

【 0 0 6 9 】

「投与」という用語は、静脈内、筋肉内、皮下、腹腔内、脊髄、又は注射若しくは注入などの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を使用して、本発明の生成物を対象に物理的に導入することを指す。

【 0 0 7 0 】

「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相互接続された少なくとも 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むが、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 と略される) 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 を含有する。各軽鎖は、軽鎖可変領域 (本明細書では V L と略される) 及び軽鎖定常領域を含む。軽鎖定常領域は、1 つの定常ドメイン、C L を含有する。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、この超可変領域は、フレームワーク領域 (F R) と呼ばれる分散した、より保存された領域を含有する。各 V H 及び V L は、次の順序でアミノ末端からカルボキシ末端に配置された 3 つの C D R 及び 4 つの F R を含有する: F R 1、C D R 1、F R 2、C

40

50

D R 2、F R 3、C D R 3、F R 4。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有する。

【0071】

C D 2 2

I型膜貫通タンパク質として、及びシアル酸結合免疫グロブリン様レクチンファミリーの重要なメンバーとして、C D 2 2は、B細胞活性化を調節する細胞表面接着分子を有し、抗原応答に対するB細胞の感受性を制御するのに役立ち、正常なB細胞及びB細胞悪性腫瘍中によく見られる。これは、B L - C A M、B 3、L e u - 1 4、L y b - 8などとしても既知である。ヒトC D 2 2遺伝子は、少なくとも15個のエクソンを伴い19番染色体(19q13.1)の長腕上に位置し、そのうちエクソン4~10は、一本鎖I gドメインをコードし、エクソン11~15は、膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインをコードする。C D 2 2は、2つのサブタイプ、すなわち、C D 2 2 α及びC D 2 2 βを有し、それぞれ細胞外ドメイン中に5つ及び7つのI g Gドメインがある。

10

【0072】

C D 2 2は、最初に後期プレB細胞の細胞質中で発現し、次いで、細胞表面に移動する。これは、プレB細胞及び未成熟B細胞中で少量発現し、分化した成熟免疫グロブリン(I g) M+及びI g D+B細胞中で高度に発現する。B細胞悪性腫瘍の約60~80%がC D 2 2を発現させ、C D 2 2は、B細胞の表面上に比較的特異的に発現し、C D 1 9標的C A R T療法が失敗し、悪性腫瘍が再発する場合でも、比較的高いレベルで発現する。多くの実験により、C D 2 2を標的とするモノクローナル抗体が白血病の治療に有意な有効性を有することが証明されている。したがって、これは、B細胞免疫の調節及びB細胞悪性腫瘍の免疫療法の標的となっている。

20

【0073】

抗C D 1 9 C A R - Tは、優れた有効性を有するが、B細胞中のC D 1 9抗原の発現がない一部の白血病患者にとっては効果がない。一部の患者は、抗C D 1 9 C A R - T治療後にC D 1 9抗原の発現が減少しているか、又は更には失われており、満足のいく治療結果が得られず、C D 2 2の持続的な発現がまだあるうちに再発しやすい。C D 2 2は、抗C D 1 9 C A R - T療法後の一部のC D 1 9陰性患者を含む、B細胞性急性リンパ芽球性白血病のほとんどの患者において発現する。F r yらは、C D 2 2抗原を標的とするC A R - T療法の臨床試験を行い、患者の73%(11/15)が、 1×10^6 個以上の抗C D 2 2 C A R - T細胞療法を受けた後に完全寛解を達成した。R a m a k r i s h n aらは、腫瘍細胞中のC D 2 2抗原の発現を増加させることによって、低いC D 2 2発現を伴うB細胞性白血病/リンパ腫の治療における抗C D 2 2 C A R - Tの有効性が改善され得ると信じていたが、その更なる有効性は、動物実験及び臨床試験で検証される必要がある。

30

【0074】

近年、免疫療法、特に養子T細胞療法は、血液悪性腫瘍の治療のための臨床試験で強力な有効性及び有望性を示している。T細胞は、抗原認識部分及びT細胞活性化ドメインを含むキメラ抗原受容体(C A R)を発現させるように遺伝子改変され得る。C A Rは、モノクローナル抗体の抗原結合特性を使用して、T細胞の特異性及び反応性を変えて、M H Cに制限されない方法で標的を狙う。このM H Cに制限されない抗原認識により、C A R発現T細胞は、抗原処理なしで抗原を認識することができ、したがって腫瘍エスケープの主要な機序を回避する。更に、C A Rは、内因性T C Rのα鎖及びβ鎖と二量体化しない。

40

【0075】

キメラ抗原受容体(C A R)

本発明のキメラ抗原受容体(C A R)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、標的特異的結合要素(抗原結合ドメインとしても既知)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部分を含む。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。抗原受容体又は

50

そのリガンドではなく、共刺激分子が、抗原に対する効率的なリンパ球応答に必要とされる細胞表面分子である。

【0076】

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、膜貫通ドメインをポリペプチド鎖の細胞外ドメイン又は細胞質ドメインに連結するように機能する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個のアミノ酸、好ましくは2～100個のアミノ酸、最も好ましくは3～50個のアミノ酸を含み得る。

【0077】

本発明の好ましい実施形態では、本発明によって提供されるCARの細胞外ドメインは、CD22を標的とする抗原結合ドメインを含む。本発明のCARは、T細胞中で発現した場合、抗原結合特異性に基づいて抗原認識が可能である。それがその同種抗原に結合すると、腫瘍細胞に影響を与え、腫瘍細胞を成長させないか、死滅させるか、又はその他の影響を与え、患者の腫瘍量の低減又は排除をもたらす。抗原結合ドメインは、好ましくは、共刺激分子及び鎖の1つ以上の細胞内ドメインに融合されている。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CD3ζシグナル伝達ドメインとの組み合わせの細胞内ドメインに融合されている。

【0078】

本明細書で使用される場合、「抗原結合ドメイン」及び「一本鎖抗体断片」は両方とも、抗原結合活性を有するFab断片、Fab'断片、F(ab')₂断片、又は単一Fv断片を指す。Fv抗体は、抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含有するが、定常領域を含有せず、全ての抗原結合部位を有する最小の抗体断片である。典型的には、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も含有し、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（一本鎖可変断片）である。scFvのサイズは一般に、完全抗体のサイズの1/6である。一本鎖抗体は、好ましくは、1つのヌクレオチド鎖によってコードされる1つのアミノ酸鎖配列である。本発明の好ましい態様として、scFvは、CD22を特異的に認識する抗体を含む。

【0079】

ヒンジ領域及び膜貫通領域（膜貫通ドメイン）について、CARは、CARの細胞外ドメインに融合し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中のドメインのうちの1つと天然に会合した膜貫通ドメインが使用される。いくつかの例では、膜貫通ドメインは、そのようなドメインを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するように選択されるか、又はそのようにアミノ酸置換によって改変され、それによって受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小限に抑え得る。

【0080】

本発明のCAR中の細胞内ドメインは、4-1BBのシグナル伝達ドメイン及びCD3ζのシグナル伝達ドメインを含む。

【0081】

好ましくは、本発明のCARの構造は、リーダー配列、抗原認識配列（抗原結合ドメイン）、接続領域、膜貫通領域、共刺激分子シグナル領域、及びCD3ゼータシグナル伝達領域（ζ鎖部分）を含み、これらは、以下の順番で接続されている：

[CD8 L S] - [VL-リンカー-VH] - [ヒンジ-CD8 TM] - [4-1BB] - [CD3ゼータ]

具体的には、以下の配列が本発明において選択される：

(1) リーダー配列は、CD8抗原のものである：

MA L P V T A L L L P L A L L L H A A R P（配列番号9）

(2) CAR22.5抗原認識配列：

10

20

30

40

50

【化 1】

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVRQVPGKGLEWVSYISSGGGTTYYPDTVKG
RFTISRDNRSNTLDLQMNSLRVEDTAVYYCARHSGYGSSYGVLFAFWGQGTLLTVSS (配列番号 5)

VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNLQKPKGKAPKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSG
SGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKLEIK (配列番号 6)

10

(3) CAR 22.3 抗原認識配列:

【化 2】

VH

LQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRYYRSKWYNDYAVSVKS
RITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDAFDIWGQGTMTVS (配列番号 7)

VL

IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTIWSYLNWYQQRPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGRGSG
TDFTLTISSLQAEDFATYYCQQSYSIPQTFGQGTKLEI (配列番号 8)

20

(4) CAR 22.13 抗原認識配列:

【化 3】

VH

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYNFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIITYPGSDSTRYSPSFQG
QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCATPTYYFGSVAFDIWGQGTMTVS (配列番号 1)

VL

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSFSGVPSRFSGSG
SGTDFTLTINSLEAEDAAAYYCHQSSSLPYTFGQGTKLEIK (配列番号 2)

30

(5) CAR 22.14 抗原認識配列:

【化 4】

VH

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCPSGDTFSNYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGMAIYAPKFQG
RVTITADKSTNTAFMDLTSLYFEDTAVYYCARAPTYWGSKDYFDYWQGTLLTVSS (配列番号 3)

VL

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSGLAWYQQKPGTAPKLLIYDASSLESVPSRFSGSG
SGTDFTLTISSLQPDFATYYCQQFNSFPYTFGQGTKLEIK (配列番号 4)

40

【0082】

上記の抗原認識配列において、VHとVLとの間の接続配列は、配列番号16に示されるとおりであり、配列は、GGGGSGGGGSである。

【0083】

(6) ヒンジ領域及び接続領域の配列:

【化 5】

FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD (配列番号 10)

50

(7) 膜貫通領域に対するCD8の膜貫通領域(CD8TM)の配列:

IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC (配列番号11)

(8) 共刺激分子シグナル領域は、4-1BBの細胞内シグナル伝達配列モチーフの配列に由来する:

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC
EL (配列番号12)

(9) CD3ゼータのシグナル伝達領域は、TCR複合体中のCD3ゼータの免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ(ITAM)の配列に由来する:

【化6】

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD
KMAEAYSEIGMKGERRRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号13)

10

【0084】

好ましくは、本発明のCARは、CAR-T 22.13又はCAR-T 22.14であり、CAR構造中のVL及びVHは、米国特許第9499632B2号から得られ、ここで、16F7は、22.13であり、4G6は、22.14である。

【0085】

CAR-T 22.13のアミノ酸配列は、以下のとおりである:

【化7】

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYNFTSYWIGWVRQMPCKGLE
WMGLIYPGSDSTRYSPSFQGVITISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCATPTYYFGSVAFDIWGQGT
TVSSGGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLIKYAS
QSFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAAAYYCHQSSSLPYTFGQGTKLEIKFVPVFLPAKPTTTPAP
RPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLL
YIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDR
RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR (配列番号14)

20

30

【0086】

CAR-T 22.14のアミノ酸配列は、以下のとおりである:

【化8】

MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKPSGDTFSNYAISWVRQAPGQGLE
WMGRIIPILGMAIYAPKFQGRVTITADKSTNTAFMDLTSYFEDTAVYYCARAPTYWGSKDYFDYWGQGT
LTVSSGGGGSGGGSGGGGSAIQLTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDISGLAWYQQKPGTAPKLLIYDA
SSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPDFAFYCCQQFNSFPYTFGQGTKLEIKFVPVFLPAKPTTTPA
PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLL
LYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDR
RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
ALPPR (配列番号15)

40

【0087】

キメラ抗原受容体T細胞(CAR-T細胞)

本明細書で使用される場合、「CAR-T細胞」、「CAR-T」、「CART」、及び「本発明のCAR-T細胞」という用語は全て、本発明の第4の態様に記載のCAR-T細胞を指す。

50

【0088】

本発明は、CD22 標的キメラ抗原受容体構造の構築、CD22 標的キメラ抗原受容体操作T細胞を調製するための方法、及びその活性アッセイに関する。

【0089】

本発明では、CD22 の配列に基づいて、CD22 抗原を標的とする様々なタイプのキメラ抗原受容体構造を構築し、初代T細胞中のこれらのキメラ抗原受容体の発現レベル、インビトロ活性化能力、及び腫瘍細胞殺滅効果を測定及び分析した。本発明は、CAR22.13 及び22.14 に基づいて構築された異なるタイプのCAR 改変T細胞が、CD22 抗原を担持する悪性腫瘍を除去するためにインビトロ及びインビボで殺滅する能力の差を見出し、これは、CD22 陽性白血病及びリンパ腫の治療におけるCAR-T の臨床応用のための新しい有効な方法及び製剤を提供する。

10

【0090】

ベクター

所望の分子をコードする核酸配列は、当該技術分野で既知の組換え方法を使用して、例えば、遺伝子を発現させる細胞からのライブラリー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既知のベクターから遺伝子を得ることによって、又は遺伝子を含有する細胞及び組織から遺伝子を直接単離する標準的な技術を使用することによって得られ得る。代替的に、目的の遺伝子は、合成的に産生され得る。

【0091】

本発明はまた、本発明の発現キットが挿入されたベクターも提供する。レンチウイルスなど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、及びその娘細胞中のその増殖を可能にするため、長期的な遺伝子導入に好適なツールである。レンチウイルスベクターは、肝細胞などの非増殖細胞に形質導入することができるため、マウス白血病ウイルスなどの発がん性レトロウイルスに由来するベクターよりも優れた利点がある。それらはまた、免疫原性が低いという利点もある。

20

【0092】

簡潔に、本発明の発現キット又は核酸配列は、典型的には、プロモーターに作動可能に連結されており、発現ベクターに組み込まれている。このベクターは、真核細胞の複製及び組み込みに好適である。典型的なクローニングベクターは、所望の核酸配列の発現を調節するために使用され得る転写及び翻訳ターミネーター、初期配列、並びにプロモーターを含む。

30

【0093】

本発明の発現構築物は、標準的な遺伝子送達解決法を使用する核酸免疫化及び遺伝子療法にも使用され得る。遺伝子送達のための方法は、当該技術分野で既知であり、例えば、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（これらは、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）。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。

【0094】

核酸は、多くのタイプ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、ファージ誘導体、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。目的の特定のベクターとしては、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が挙げられる。

40

【0095】

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、当該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) によって、並びにウイルス学及び分子生物学の他のマニュアルに記載されている。ベクターとして使用され得るウイルスとしては、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挙げられるが、これらに限定され

50

ない。典型的には、好適なベクターは、少なくとも1つの生物において機能的な複製起点、プロモーター配列、便利な制限酵素部位、及び1つ以上の選択可能なマーカーを含有する（例えば、WO 01 / 9 6 5 8 4、WO 01 / 2 9 0 5 8、及び米国特許第 6 , 3 2 6 , 1 9 3 号）。

【0096】

遺伝子を哺乳動物細胞に導入するために、多くのウイルスベースの系が開発されている。例えば、レトロウイルスは、遺伝子送達系のための便利なプラットフォームを提供する。選択された遺伝子は、当該技術分野で既知の技術を使用して、ベクターに挿入され、レトロウイルス粒子にパッケージングされ得る。次いで、組換えウイルスは、単離され、インビボ又はエクスピボで対象細胞に送達され得る。多くのレトロウイルス系が、当該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。多くのアデノウイルスベクターが、当該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。

10

【0097】

エンハンサーなどの追加のプロモーター要素は、転写開始時の頻度を調節することができる。典型的には、これらは、開始部位の30～110bp上流の領域に位置しているが、多くのプロモーターが、開始部位の下流にも機能要素を含有することが最近示されている。プロモーター要素間の間隔は、多くの場合、要素が互いに対して反転又は移動しているときに、プロモーター機能が維持されるように柔軟である。チミジンキナーゼ（tk）プロモーターでは、活性が低下し始める前に、プロモーター要素間の間隔は、50bp増加し得る。プロモーターに応じて、個々の要素が転写を開始するために、協調的な又は独立した作用を示す。

20

【0098】

好適なプロモーターの例は、即時初期サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター配列である。プロモーター配列は、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発現を駆動することができる、強力な構成的プロモーター配列である。好適なプロモーターの別の例は、伸長成長因子-1 α （EF-1 α ）である。しかしながら、シミアンウイルス40（SV40）初期プロモーター、マウス乳がんウイルス（MMTV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）長末端反復（LTR）プロモーター、MoMuLVプロモーター、トリ白血病ウイルスプロモーター、エプスタイン・バーウイルス即時初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、並びにヒト遺伝子プロモーター、例えば、限定されないがアクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、ヘメ（heme）プロモーター、及びクレアチンキナーゼプロモーターが挙げられるがこれらに限定されない、他の構成的プロモーター配列も使用され得る。更に、本発明は、構成的プロモーターの使用に限定されるべきではない。誘導性プロモーターもまた、本発明の一部として企図される。誘導性プロモーターの使用は、誘導性プロモーターに作動可能に連結されたポリヌクレオチド配列の発現が望まれる場合に、その発現をオンにし得るか、又は発現が望まらない場合にその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。誘導性プロモーターの例としては、メタロチオネインプロモーター、グルココルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモーター、及びテトラサイクリンプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。

30

40

【0099】

CARポリペプチド又はその一部分の発現を評価するために、細胞に導入された発現ベクターはまた、ウイルスベクターを介してトランスフェクトされた又は感染した細胞集団中の発現細胞の特定及び選択の検索を容易にするために、選択可能なマーカー遺伝子及びレポーター遺伝子のうちの一方又は両方も含有し得る。他の態様では、選択可能なマーカーは、DNAの単一セクション上で担持され、共トランスフェクション手順で使用され得る。宿主細胞中の発現を可能にするために、選択可能なマーカー及びレポーター遺伝子の両方には、適切な調節配列が隣接し得る。有用な選択可能なマーカーは、例えば、neoなどの抗生物質耐性遺伝子を含む。

50

【0100】

レポーター遺伝子は、潜在的にトランスフェクトされた細胞を特定し、調節配列の機能性を評価するために使用される。典型的には、レポーター遺伝子は、レシピエント生物若しくは組織中に存在しないか、又はそれらによって発現せず、かつその発現が酵素活性などのいくつかの容易に検出可能な特性によって明確に示されるポリペプチドをコードする遺伝子である。DNAがレシピエント細胞に導入された後、レポーター遺伝子の発現が適切な時に測定される。好適なレポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼ、 β -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をコードする遺伝子が挙げられ得る（例えば、Uiet al., 2000 F E B S L e t t e r s 479: 79-82）。好適な発現系は周知であり、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。典型的には、最高レベルのレポーター遺伝子発現を示す最小で5つの隣接領域を有する構築物は、プロモーターとして特定される。そのようなプロモーター領域は、レポーター遺伝子に連結され、プロモーター駆動転写を調節する薬剤の能力を評価するために使用され得る。

10

【0101】

遺伝子を細胞に導入して発現させるための方法は、当該技術分野で既知である。発現ベクターの内容に関して、ベクターは、当該技術分野で既知の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導入され得る。

20

【0102】

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としては、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、粒子衝撃、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどが挙げられる。ベクター及び／又は外因性核酸を含む細胞を産生するための方法は、当該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。ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための好ましい方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションである。

【0103】

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としては、DNA及びRNAベクターの使用が挙げられる。ウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターは、遺伝子を哺乳動物、例えば、ヒト細胞に挿入する最も広く使用されている方法になっている。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型、アデノウイルス、及びアデノ随伴ウイルスなどに由来し得る。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。

30

【0104】

ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入する化学的手段としては、高分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズなどのコロイド分散系、並びに水中油エマルジョン、ミセル、混合ミセル、及び脂質プラスチドなどの脂質ベースの系が挙げられる。インビトロ及びインビボ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、リポソーム（例えば、人工膜小胞）である。

40

【0105】

非ウイルス送達系が使用される場合、例示的な送達ビヒクルは、リポソームである。脂質製剤の使用は、宿主細胞への核酸の導入（インビトロ、エクスビボ、又はインビボ）のために企図される。別の態様では、核酸は、脂質と会合し得る。脂質と会合した核酸は、リポソームの水性内部に封入されるか、リポソームの脂質二重層中に散在するか、リポソーム及びオリゴヌクレオチドの両方に会合したリンカー分子を介してリポソームに付着するか、リポソーム中に取り込まれるか、リポソームと複合体化するか、脂質含有溶液中に分散するか、脂質と混合されるか、脂質と会合するか、懸濁液として脂質中に含有される

50

か、ミセル中に含有される若しくはミセルと複合体化するか、又は別の方法で脂質と会合することができる。組成物と会合した脂質、脂質／DNA、又は脂質／発現ベクターは、溶液中の任意の特定の構造に限定されない。例えば、それらは、ミセルとして二重層構造で存在し得るか、又は「崩壊した」構造を有し得る。それらはまた、溶液中に単純に分散し得、サイズ又は形状が均一ではない凝集体を形成する可能性がある。脂質は、自然に生じ得るか、又は合成であり得る脂肪物質である。例えば、脂質としては、細胞質中で、並びに長鎖脂肪族炭化水素及びそれらの誘導体、例えば、脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコール、及びアルデヒドを含む化合物中で自然に生じる脂質滴が挙げられる。

【0106】

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。

10

【0107】

製剤

本発明は、本発明の第1の態様のCAR-T細胞、及び薬学的に許容される担体、希釈剤、又は賦形剤を提供する。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、注射液である。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、より好ましくは $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$ 細胞／mlである。

【0108】

一実施形態では、製剤は、中性緩衝生理食塩水、硫酸緩衝生理食塩水などの緩衝液；グルコース、マンノース、スクロース、又はデキストラン、マンニトールなどの炭水化物；タンパク質；ポリペプチド又はグリシンなどのアミノ酸；抗酸化物質；EDTA又はグルタチオンなどのキレート剤；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。

20

【0109】

治療的使用

本発明は、本発明の発現キットでコードされた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）の治療的使用を含む。形質導入されたT細胞は、腫瘍細胞マーカーCD22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し、それによって腫瘍細胞に対するその殺滅効率を有意に改善する。

【0110】

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方法も提供し、本方法は、本発明のCAR-T細胞を哺乳動物に投与する工程を含む。

30

【0111】

一実施形態では、本発明は、細胞療法を含み、患者の自己T細胞（又は同種異系ドナー）が単離され、活性化され、遺伝子操作されてCAR-T細胞を産生し、次いで、CAR-T細胞が患者に注入される。このように、移植片対宿主病の可能性は、極めて低く、抗原は、MHCに制限されない方法でT細胞によって認識される。更に、1つのCAR-T細胞が、この抗原を発現させる全てのがん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、インビボで複製し、長期にわたる持続的な腫瘍制御をもたらし得る。

40

【0112】

一実施形態では、本発明のCAR-T細胞は、長期間にわたってT細胞の強力なインビボ増殖を有することができる。更に、CAR媒介性免疫応答は、CAR改変T細胞がCAR中の抗原結合ドメインに特異的な免疫応答を誘導する養子免疫療法工程の一部であり得る。例えば、CD22発現腫瘍細胞は、抗CD22 CAR-T細胞の特異的な免疫応答を誘導する。

【0113】

本開示のデータは、抗CD22 scFv、ヒンジ及び膜貫通領域、並びに4-1BB及びCD3ζ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するが、本発明は、構築物の構成要素の各々の数の任意の変動を含むと解釈されるべきである。

50

【0114】

治療され得るがんには、血管が新生されていないか、又は実質的に血管が新生されていない腫瘍、並びに血管が新生されている腫瘍が含まれ得る。がんには、非固形腫瘍（血液腫瘍、例えば、白血病及びリンパ腫など）が含まれ得るか、又は固形腫瘍が含まれ得る。本発明のCARで治療されるがんのタイプとしては、がん腫、芽細胞腫、及び肉腫、並びにある特定の白血病性又はリンパ性悪性腫瘍、良性及び悪性腫瘍、並びに肉腫、がん腫、及び黒色腫などの悪性塊が挙げられるが、これらに限定されない。成人の腫瘍／がん及び小児の腫瘍／がんも含まれる。

【0115】

血液がんは、血液又は骨髄のがんである。血液（又は血行性）がんの例としては、急性白血病（急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病（acute myeloid leukemia）、急性骨髄性白血病（acute myelogenous leukemia）、並びに骨髄芽球性、前骨髄球性、顆粒球性、単球性、及び赤白血病など）、慢性白血病（慢性骨髄性（顆粒球性）白血病、慢性骨髄性白血病、及び慢性リンパ球性白血病）を含む白血病、真性多血症、リンパ腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫（無痛性及び高悪性度型）、多発性骨髄腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、重鎖病、骨髄異形成症候群、有毛細胞白血病、並びに骨髄異形成が挙げられる。

【0116】

固形腫瘍は、典型的には嚢胞又は流体領域を含有し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。異なるタイプの固形腫瘍が、それらを形成する細胞型にちなんで名付けられる（肉腫、がん種、及びリンパ腫など）。肉腫及びがん腫など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、リンパ性悪性腫瘍、膵臓がん、及び卵巣がんが挙げられる。

【0117】

本発明のCAR改変T細胞はまた、哺乳動物のエキスピボ免疫化及び／又はインビボ療法用のワクチンの1つのタイプとして使用され得る。好ましくは、哺乳動物は、ヒトである。

【0118】

エキスピボ免疫化の場合、細胞を哺乳動物に投与する前に、以下のうちの少なくとも1つがインビトロで行われる：i) 細胞の増殖、ii) CARをコードする核酸の細胞への導入、及び／又はiii) 細胞の凍結保存。

【0119】

エキスピボ手順は、当該技術分野で周知であり、以下でより十分に考察される。簡潔に、細胞が哺乳動物（好ましくはヒト）から単離され、本明細書に開示されるCARを発現させるベクターで遺伝子改変（すなわち、インビトロで形質導入又はトランスフェクト）される。CAR改変細胞は、哺乳動物レシピエントに投与されて、治療効果をもたらし得る。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であり得る。代替的に、細胞は、レシピエントに対して同種異系、同系、又は異種であってもよい。

【0120】

エキスピボ免疫用の細胞ベースのワクチンの使用に加えて、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も提供する。

【0121】

本発明は、腫瘍を治療する方法を提供し、本方法は、本発明の治療有効量のCAR改変T細胞を、それを必要とする対象に投与することを含む。

【0122】

本発明のCAR改変T細胞は、単独で、あるいは希釈剤と、及び／又はIL-2、IL-17、若しくは他のサイトカイン、又は細胞集団などの他の構成成分と組み合わせた医薬組成物として投与され得る。簡潔に、本発明の医薬組成物は、本明細書に記載の標的細

10

20

30

40

50

胞集団を、1つ以上の薬学的若しくは生理学的に許容される担体、希釈剤、又は賦形剤と組み合わせて含み得る。そのような組成物は、中性緩衝生理食塩水、硫酸緩衝生理食塩水などの緩衝液；グルコース、マンノース、スクロース、又はデキストラン、マンニトールなどの炭水化物；タンパク質；ポリペプチド又はグリシンなどのアミノ酸；抗酸化物質；EDTA又はグルタチオンなどのキレート；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。

【0123】

本発明の医薬組成物は、治療（又は予防）される疾患に適した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タイプ及び重症度などの要因によって決定されるが、適切な投与量は、臨床試験によって決定され得る。

10

【0124】

「免疫学的有効量」、「腫瘍に対する有効量」、「有効腫瘍抑制量」、又は「治療量」に言及する場合、投与される本発明の組成物の正確な量は、年齢、体重、腫瘍サイズ、感染又は転移の程度、及び病状に関する患者（対象）の個人差を考慮して、医師によって決定され得る。一般に、本明細書に記載の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体重の範囲（それらの範囲内の全ての整数値を含む）の用量で投与され得ることに留意されたい。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、免疫療法において周知の注入技術を使用して投与され得る（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投与量及び治療レジメンは、疾患の徴候について患者を監視し、それに応じて治療を調整することによって、医療分野の当業者によって容易に決定され得る。

20

【0125】

対象への組成物の投与は、噴霧、注射、嚥下、注入、埋め込み、又は移植によるものを含む任意の便利な方法で行われ得る。本明細書に記載の組成物は、皮下、皮内、腫瘍内、結節内、脊髄内、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。

30

【0126】

本発明のいくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法又は当該技術分野で既知の他の方法を使用して、治療レベルまで活性化及び増幅されたT細胞が、患者に対する任意の数の関連する治療法と組み合わされ（例えば、前、同時又は後に）、治療法としては、MS患者に対する抗ウイルス療法、シドフォビル及びインターロイキン-2、シタラビン（ARA-Cとしても既知）、若しくはナタリズマブ療法、又は乾癬患者に対するエルファジズマブ（elafazizumab）療法、又はPML患者に対する他の治療などの薬剤による治療が挙げられるが、これらに限定されない。更なる実施形態では、本発明のT細胞は、化学療法、放射線、免疫抑制剤、例えば、シクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキセート、ミコフェノール酸モフェチル、及びFK506、抗体、又は他の免疫療法剤と組み合わせて使用されてもよい。更なる実施形態では、本発明の細胞組成物は、骨髄移植、フルダラビンなどの化学療法剤の使用、外照射療法（XRT）、及びシクロホスファミドと組み合わせて（例えば、前、同時、又は後に）、患者に投与される。例えば、一実施形態では、対象は、高用量の化学療法による標準治療、及びそれに続く末梢血幹細胞移植を受け得る。いくつかの実施形態では、移植後、対象は、本発明の増幅された免疫細胞の注入を受ける。追加の実施形態では、増幅された細胞は、手術の前又は後に投与される。

40

【0127】

患者に施される上記の治療の投与量は、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応じて変化する。ヒトへの投与の投与量比は、当該技術分野で受け入れられ

50

ている慣行に従って実施され得る。典型的には、各治療又は各治療過程について、本発明の $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{10}$ 個の改変 T 細胞（例えば、CAR-T CD22 細胞）が、例えば静脈内注入によって患者に投与され得る。

【0128】

本発明の主な利点：

(a) 本発明のキメラ抗原受容体の細胞外抗原結合ドメインは、特異的な抗 CD22 scFv であり、特異的なヒンジ領域及び細胞内ドメインと組み合わせた特異的な抗 CD22 scFv によって形成された CAR は、優れた腫瘍細胞殺滅能力、良好な特異性、T 細胞に対する低い細胞傷害性、及び低い副作用を示した。

【0129】

(b) 本発明によって提供されるキメラ抗原受容体は、CAR 遺伝子を担持するレンチウイルスが T 細胞に感染した後、CAR タンパク質の安定した発現及び膜局在化を実現することができた。

【0130】

(c) 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、及びより強力な抗腫瘍効果を有した。本発明で使用される抗原結合ドメインは、ヒト化抗体又はヒト由来抗体であり、これらは、種特異的な免疫拒絶反応を生じさせる可能性が低かった。

【0131】

本発明は、いくつかの実施形態を参照することによって更に説明される。実施形態は、本発明の範囲を限定するためではなく、本発明を説明するためにのみ使用されることを理解されたい。実験方法について条件が指定されていない以下の実施形態では、従来の条件、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)、又は製造業者の推奨に記載される条件が、一般に使用される。特に指定のない限り、パーセンテージ及び部は、重量で計算される。

【0132】

実施例 1

レンチウイルス発現ベクターの構築

Shanghai Boyi Biotechnology Co., Ltd. は、完全長 DNA 合成及びクローニングを行って、コードプラスミドを構築するよう委託された。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、BamH I 及び Mlu I であった。具体的な配列は、上記のとおりであった。

【0133】

実施例 2

CAR-T 細胞の調製

(1) 健康なヒトから静脈血を採取し、密度勾配遠心法によって末梢血単核細胞 (PBMC) を単離した。

【0134】

(2) 0 日目に、 $1,000 \text{ U/ml}$ の最終濃度の組換えヒトインターロイキン 2 (IL-2) を補充した 1 % ヒト血中アルブミンを含有する GT-551 細胞培養培地中、 $5 \mu\text{g/ml}$ の最終濃度の CD3 モノクローナル抗体 (OKT3) 及び $5 \mu\text{g/ml}$ の最終濃度の Retronectin (TAKARA から購入) でプレコーティングされた細胞培養フラスコに、PBMC を播種し、5 % CO_2 の飽和湿度で 37°C において、インキュベーターで培養した。

【0135】

(3) 1 日目に、培養した PBMC の上清をゆっくりとピペットで移し、廃棄し、1 % ヒトアルブミンを含有する新しい GT-551 細胞培養培地を添加し、 $1,000 \text{ U/ml}$ の最終濃度の組換えヒトインターロイキン 2 (IL-2) を培地に添加し、5 % CO_2 の飽和湿度で 37°C において、インキュベーターで培養を再開した。

【0136】

(4) 3日目に、新しい培地を添加し、精製CAR-CD22レンチウイルス液を濃縮し、硫酸プロタミン(12 µg/ml)及び1,000 U/mlの最終濃度のIL-2を添加した。これを12時間の感染のために、5% CO₂で37℃において、インキュベーター内に置き、培養液を廃棄し、新鮮な培地を添加し、5% CO₂で37℃において、インキュベーターで培養を再開した。

【0137】

(5) 6日目から、インビトロ活性アッセイで必要とされる分、CART-CD22細胞を採取した。

【0138】

10

実施例3

CAR遺伝子のT細胞ゲノムへの組み込み率、及びそれによってコードされるタンパク質の膜表面上での発現レベルのアッセイ

実施例2(図2)で6日目まで培養した0.2×10⁶個のCART-CD22.5、CART-CD22.13、及びCART-CD22.14試料細胞を採取し、組換えヒトCD22タンパク質のFcセグメントを染色した後、非形質導入T細胞(NT細胞)を対照として使用して、T細胞膜の表面上のCAR-CD22タンパク質の発現レベルをフローサイトメトリーによって分析した。

【0139】

結果を図2に示す。3つのCAR-T細胞のCAR構造は、対応して改変されたT細胞中で発現し、細胞膜表面上に局在することができ、高い発現率を有した。その中で、CART-CD22.5及びCART-CD22.14の発現率は、CART-CD22.13よりも高かった。

20

【0140】

実施例4

CART-CD22のインビトロ活性化能力のアッセイ

実施例2で培養したCART-CD22細胞(CART-CD22.5、CART-CD22.13、及びCART-CD22.14)を、細胞活性化レベル指標タンパク質CD137及びIFNγの検出に使用した。6日目まで培養した1×10⁵個のCART-CD22細胞を採取し、CD22陽性K562-CD22+C7、K562-CD22+A4、H929-CD22+E12及びRaji腫瘍細胞、並びにCD22陰性K562腫瘍細胞、又は無腫瘍細胞とそれぞれ、200 µlのGT-551培地中で1:1の比率において18時間培養し、T細胞膜の表面上のCD137の発現レベルをフロー法によって検出し、培養上清中のIFNγの分泌レベルELISA法によって検出した。

30

【0141】

結果を図3Aに示す。CD137の発現を3つのCAR-T細胞全ての表面上で検出することができ、IFNγの発現を培養上清中で検出することができた。その中で、CART-CD22.13及びCART-CD22.14は、CART-CD22.5よりも良好なCD137活性化レベルを有したが、CART-CD22.5のIFNγ放出レベルは、CART-CD22.13及びCART-CD22.14よりも高かった。

40

【0142】

実施例5

腫瘍細胞の後期アポトーシスを誘導するCART-CD22の活性のアッセイ

実施例2の14日目までのCART-CD22細胞を、1×10⁴個のRaji株のCD22陰性細胞(K562)又はCD22陽性細胞、並びに自己細胞であるK562-CD22過剰発現腫瘍細胞株とそれぞれ、5:1、10:1、20:1、及び40:1のそれぞれの比率で混合し、100 µlのGT-551培養系で8時間共培養し、培地の50 µlの上清をピペットで移し、発色基質混合物を添加し、30分間の共役酵素反応を実施して、CAR-T細胞によって認識及び殺滅された後の、腫瘍細胞の溶解中に放出された乳酸脱水素酵素(LDH)の量を検出し、ここで、産生された赤色生成物の量は、溶解細胞

50

胞の数に比例していた。

【0143】

結果を図4に示す。CD22陰性腫瘍細胞株K562を殺滅する能力を有するT細胞はなく、3つのCAR-T細胞は、CD22陽性腫瘍細胞のアポトーシスを十分に誘導することができた。その中で、CAR-T22.13及びCAR-T22.14は、CAR-T22.5よりもCD22陽性腫瘍細胞の後期アポトーシスを良好に誘導することができた。CAR-T22.14は、CAR-T22.13におけるCD22陽性腫瘍細胞の後期アポトーシスを誘導する能力がわずかにより良好であった。

【0144】

実施例6

T細胞脱顆粒に関連する膜タンパク質CD107aの発現レベルのアッセイ

2×10⁵個のCD22陰性腫瘍細胞(K562株)又はCD22陽性腫瘍細胞(K562-CD22+A4株、H929-CD22+E12株、及びRaji株)、並びに1×10⁵個のCAR-T細胞を採取し、200μlのGT-551培地中で1:1の体積比において5時間培養し、CAR-T細胞がCD22陽性腫瘍細胞によって活性化された後のT細胞脱顆粒に関連する膜タンパク質CD107aの発現レベルの変化を検出した。

【0145】

結果を図5に示す。3つのCAR-T細胞をCD22陽性腫瘍細胞(K562-CD22+C7、K562-CD22+A4、及びH929-CD22+E12)によって活性化した後、放出されたCD107aの発現レベルが上昇した一方で、Raji細胞との共培養後、CAR-T細胞中のCD107aの発現は、有意に増加しなかった。その中で、CAR-T22.14のCD107a放出は、CAR-T22.13及びCAR-T22.5よりも高く、より強力な殺滅効果を示した。

【0146】

比較例1

本発明者らは、本出願のキメラ抗原受容体構造のスクリーニング中に多数の候補配列を試験した。候補CAR-T細胞には、CAR-T22.3、CAR-T22.5、CAR-T22.7、CAR-T22.8、CAR-T22.9、CAR-T22.10、CAR-T22.11、CAR-T22.12、CAR-T22.15、CAR-T22.16、及びCAR-T22.17が含まれ、CAR-T細胞の調製方法は、実施例2と同じであり、アッセイ法は、実施例3及び4と同じであった。

【0147】

候補CAR-Tに含まれる抗体配列は、公開された文献及び特許から得られた。その中で、CAR-T22.3で使用されるCD22抗体(m971)の軽鎖及び重鎖の配列は、米国特許第8591889B2号から得られ、CAR-T22.5のCD22抗体(KM196172)の軽鎖及び重鎖の配列は、<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KM196172>から得られ、CAR-T22.7で使用されるCD22抗体(VM1000)の軽鎖及び重鎖の配列は、米国特許第9856323B2から得られ、CAR-T22.8で使用されるCD22抗体(LL2)の軽鎖及び重鎖の配列は、文献(Pawlak Byczkowska, E. J. et al., Cancer Res. 49:4568-4577 (1989))から得られ、CAR-T22.9で使用されるCD22抗体(10F4)の軽鎖及び重鎖の配列は、米国特許第2014/0127197A1から得られ、CAR-T22.10で使用されるCD22抗体(19A3)、22.11の抗体(23C6)、22.12の抗体(16F7)、22.15(4G6)の抗体、22.16の抗体(21F4)、及び22.17の抗体(21F4)の軽鎖及び重鎖の配列は、米国特許第9499632B2から得られた。

【0148】

CART細胞のアッセイ結果を図6A、6B、及び6Cに示す。陽性率(図6A)、インビトロでのCD137活性化能力(図6B)、及び標的細胞との共培養後の上清中のIFNγ放出レベル(図6C)のアッセイにより、CAR-T22.3、CAR-T22.

10

20

30

40

50

7、CAR-T22.8、CAR-T22.9、CAR-T22.10、CAR-T22.16、及びCAR-T22.17の陽性率が非常に低かったことが分かり、それらは、効果がないとみなされ、IFN γ 試験において、CAR-T22.5、CAR-T22.11、CAR-T22.13、及びCAR-T22.14をCD22陽性腫瘍細胞と共培養した後、IFN γ の放出が非常に高く、CD137の発現も高かったことが分かり、これらのCAR-T細胞が特異的に活性化されたことを示す。したがって、22.13及び22.14を更なる研究のために選択した。

【0149】

本発明で言及された全ての文献は、あたかも各文献が個別に引用されているかのように、本出願において参考文献として引用されている。更に、本発明の上記の教示を読んだ後、当業者が本発明に対して様々な変更又は修正を加えることができ、これらの均等形態も本出願の添付の特許請求の範囲によって定義される範囲内に入ることを理解されたい。

【図面】

【図1】

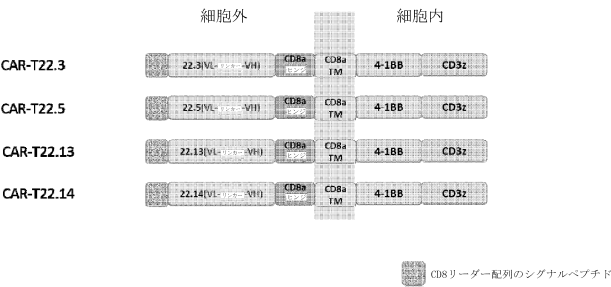


図 1

【図2】

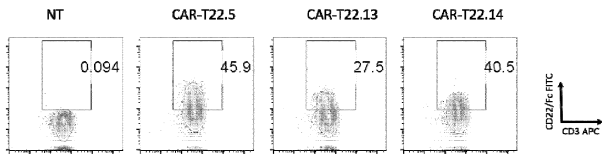


図 2

【図3A】

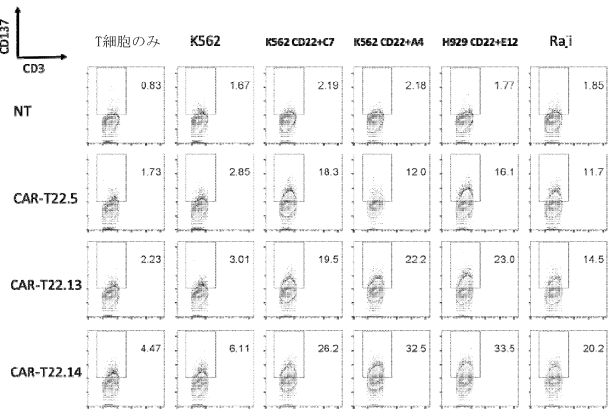


図 3A

【図3B】

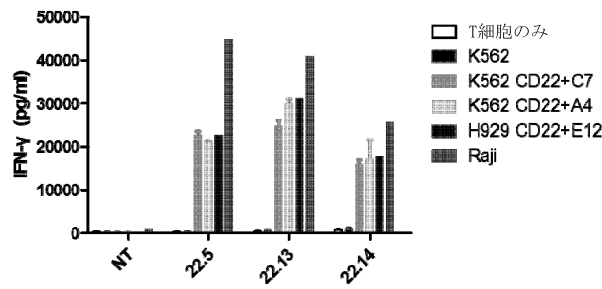


図 3B

10

20

30

40

50

【図 4】

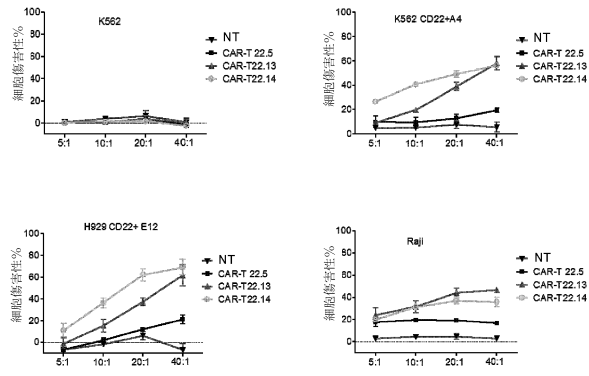


図 4

【図 5 - 1】

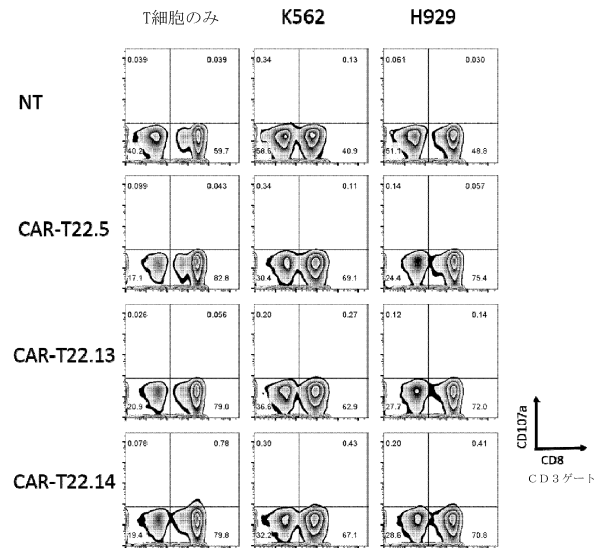


図 5

【図 5 - 2】

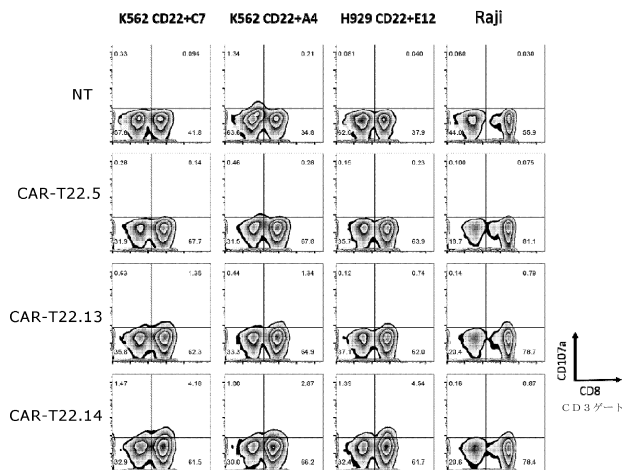


図 5 (続き)

【図 6 A】

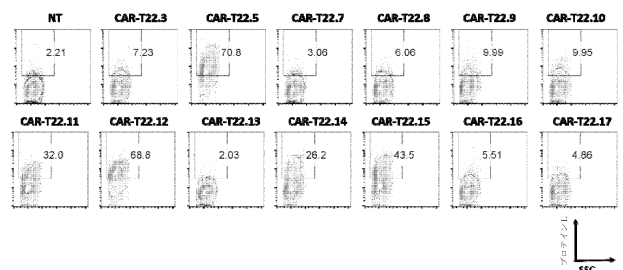


図 6A

10

20

30

40

50

【図 6 B】

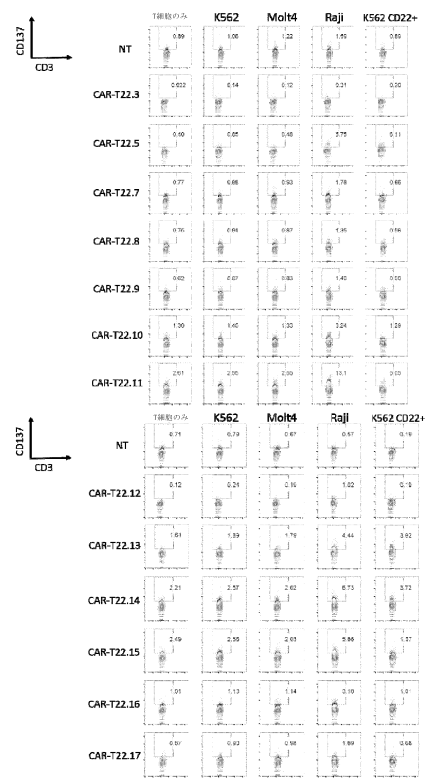


图 6B

【図 6 C】

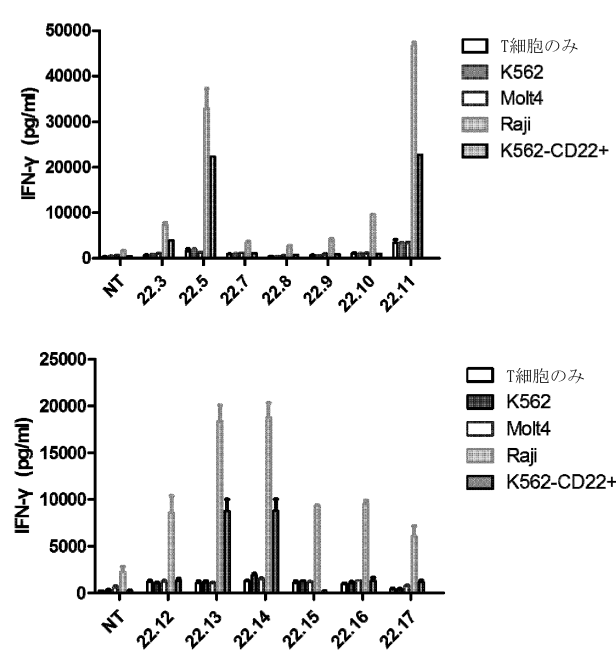


图 6C

【配列表】

202352121800001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2021/085062
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C12N 15/867(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; C12N; A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, CNTXT, SIPOABS, DWPI, WOTXT, USTXT, EPTXT, CNKI, 万方数据库, NCBI, EBI, STN: CD22, 嵌合抗原受体, chimeric antigen receptor, CAR, CART, scFV, 抗体, 癌症, 肿瘤, cancer, tumor, SEQ ID NOs: 1-4, 14-15		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 101626782 A (MEDAREX INC.) 13 January 2010 (2010-01-13) description page 2 paragraph 3, page 7 lines 3-8, figures 3A, 3C, 17A, 17B, embodiments 3-5	1-10
Y	CN 109836495 A (SHENZHEN BINDE BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 04 June 2019 (2019-06-04) description paragraphs 0009-0033, 0046-0056	1-10
Y	CN 107964549 A (SHANGHAI HENGRUN DASHENG BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 27 April 2018 (2018-04-27) description paragraphs 0013-0017	1-10
Y	CN 108715859 A (INSTITUTE OF HEMATOLOGY, BLOOD DISEASES HOSPITAL OF CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES) 30 October 2018 (2018-10-30) description, paragraphs 0007-0028	1-10
Y	WO 2020010235 A1 (H. LEE MOFFITT CANCER CENTER AND RESEARCH INSTITUTE INC.) 09 January 2020 (2020-01-09) description, page 5 line 18 to page 6 line 12	1-10
Y	WO 2018067992 A1 (NOVARTIS AG et al.) 12 April 2018 (2018-04-12)	1-10
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 June 2021		Date of mailing of the international search report 25 June 2021
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China		Authorized officer Telephone No.
Facsimile No. (86-10)62019451		

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/085062

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 108137703 A (THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 08 June 2018 (2018-06-08) entire document	1-10
A	WO 2017222593 A1 (ICELL GENE THERAPEUTICS LLC et al.) 28 December 2017 (2017-12-28) entire document	1-10
A	SHAH, N. N. et al. "CD4/CD8 T-Cell Selection Affects Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-Cell Potency and Toxicity: Updated Results From a Phase I Anti-CD22 CAR T-Cell Trial" <i>Journal of Clinical Oncology</i> , Vol. 38, No. 17, 14 April 2020 (2020-04-14), pp. 1938-1951	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/085062

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/085062

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	101626782	A	13 January 2010	US	9499632	B2	22 November 2016
				US	2010143368	A1	10 June 2010
				EP	2097097	A2	09 September 2009
				KR	20150067395	A	17 June 2015
				KR	20090088920	A	20 August 2009
				JP	5398538	B2	29 January 2014
				US	2017058031	A1	02 March 2017
				US	2013230530	A1	05 September 2013
				ES	2678060	T3	08 August 2018
				WO	2008070569	A2	12 June 2008
				EP	2097097	A4	09 March 2011
				BR	PI0717902	A2	29 October 2013
				SG	177168	A1	30 January 2012
				CA	2671457	A1	12 June 2008
				AU	2007329529	A1	12 June 2008
				WO	2008070569	A3	20 November 2008
				CN	101626782	B	27 March 2013
				IL	199036	A	30 November 2014
				JP	2010511388	A	15 April 2010
				JP	2014039548	A	06 March 2014
				NZ	578064	A	12 January 2012
				US	8481683	B2	09 July 2013
				MX	2009005776	A	10 June 2009
				EP	2097097	B1	30 May 2018
				CL	2007003479	A1	23 January 2009
				TW	1447124	B	01 August 2014
				TW	200840823	A	16 October 2008
				CA	2671457	C	26 September 2017
				JP	5846695	B2	20 January 2016
				CN	103172743	A	26 June 2013
				ZA	200904079	B	28 April 2010
				IL	199036	D0	28 March 2010
				CN	103172743	B	08 April 2015
				KR	101552735	B1	14 September 2015
				AR	064109	A1	11 March 2009
				ZA	200904079	A	28 April 2010
CN	109836495	A	04 June 2019	None			
CN	107964549	A	27 April 2018	CN	107964549	B	08 December 2020
CN	108715859	A	30 October 2018	None			
WO	2020010235	A1	09 January 2020	None			
WO	2018067992	A1	12 April 2018	PH	12019500750	A1	15 July 2019
				CN	110225927	A	10 September 2019
				IL	265755	D0	30 June 2019
				JP	2019537433	A	26 December 2019
				SG	10201913823V	A	30 March 2020
				US	2018125892	A1	10 May 2018
				AR	110676	A1	24 April 2019
				BR	112019006781	A2	30 July 2019
				US	10525083	B2	07 January 2020

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/085062

Patent document cited in search report				Publication date (day/month/year)		Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
				CA	3039646	A1		12 April 2018	
				MX	2019003886	A		05 August 2019	
				RU	2019113504	A		09 November 2020	
				US	2020113941	A1		16 April 2020	
				EP	3523331	A1		14 August 2019	
				TW	201827597	A		01 August 2018	
				AU	2017341047	A1		02 May 2019	
				KR	20190057366	A		28 May 2019	
CN	108137703	A	08 June 2018	IL	258527	D0		31 May 2018	
				WO	2017066122	A1		20 April 2017	
				EP	3362476	A1		22 August 2018	
				KR	20180057723	A		30 May 2018	
				AU	2016338747	A1		26 April 2018	
				US	2019062426	A1		28 February 2019	
				BR	112018006995	A2		30 October 2018	
				JP	2018531014	A		25 October 2018	
				CA	3002000	A1		20 April 2017	
				EP	3362476	B1		27 May 2020	
WO	2017222593	A1	28 December 2017	MX	2018004503	A		15 April 2019	
				US	10815301	B2		27 October 2020	
				EP	3474867	A4		20 May 2020	
				CN	109562126	A		02 April 2019	
				US	2020283534	A1		10 September 2020	
				CA	3029197	A1		28 December 2017	
				EP	3474867	A1		01 May 2019	
				JP	2019522973	A		22 August 2019	
				US	2018162939	A1		14 June 2018	
				US	2020024342	A9		23 January 2020	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2021/085062
A. 主题的分类 C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C12N 15/867(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07K; C12N; A61P 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, CNTXT, SIPOABS, DWPI, WOTXT, USTXT, EPTXT, CNKI, 万方数据库, NCBI, EBI, STN; CD22, 嵌合抗原受体, chimeric antigen receptor, CAR, CART, scFV, 抗体, 癌症, 肿瘤, cancer, tumor, SEQ ID NOs: 1-4, 14-15		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 101626782 A (梅达雷克斯公司) 2010年 1月 13日 (2010 - 01 - 13) 说明书第2页第3段, 第7页第3-8行, 图3A、3C、17A、17B, 实施例3-5	1-10
Y	CN 109836495 A (深圳宾德生物技术有限公司) 2019年 6月 4日 (2019 - 06 - 04) 说明书第0009-0033、0046-0056段	1-10
Y	CN 107964549 A (上海恒润达生生物科技有限公司) 2018年 4月 27日 (2018 - 04 - 27) 说明书第0013-0017段	1-10
Y	CN 108715859 A (中国医学科学院血液病医院血液学研究所) 2018年 10月 30日 (2018 - 10 - 30) 说明书第0007-0028段	1-10
Y	WO 2020010235 A1 (H. LEE MOFFITT CANCER CENTER AND RESEARCH INSTITUTE INC.) 2020年 1月 9日 (2020 - 01 - 09) 说明书第5页第18行至第6页第12行	1-10
Y	WO 2018067992 A1 (NOVARTIS AG等) 2018年 4月 12日 (2018 - 04 - 12)	1-10
A	CN 108137703 A (美国卫生和人力服务部) 2018年 6月 8日 (2018 - 06 - 08) 全文	1-10
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2021年 6月 14日		国际检索报告邮寄日期 2021年 6月 25日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 武雪梅 电话号码 86-(10)-53961961

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2021/085062
C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	W0 2017222593 A1 (ICELL GENE THERAPEUTICS LLC等) 2017年 12月 28日 (2017 - 12 - 28) 全文	1-10
A	SHAH, N.N. 等. "CD4/CD8 T-Cell Selection Affects Chimeric Antigen Receptor (CAR) T-Cell Potency and Toxicity: Updated Results From a Phase I Anti-CD22 CAR T-Cell Trial" Journal of Clinical Oncology, 第38卷, 第17期, 2020年 4月 14日 (2020 - 04 - 14), 第1938-1951页	1-10

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2021/085062
第I栏	核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)	
1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的: a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的: ☒ 附件C/ST. 25文本文件形式 ☐ 纸件或图形文件形式 b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的: c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的: ☐ 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a)) ☐ 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段) 2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围 (如适用) 的所需声明。 3. 补充意见:		

10

20

30

40

50

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/085062

检索报告引用的专利文件				公布日 (年/月/日)		同族专利		公布日 (年/月/日)	
CN	101626782	A	2010年 1月 13日	US	9499632	B2	2016年 11月 22日	10	
				US	2010143368	A1	2010年 6月 10日		
				EP	2097097	A2	2009年 9月 9日		
				KR	20150067395	A	2015年 6月 17日		
				KR	20090088920	A	2009年 8月 20日		
				JP	5398538	B2	2014年 1月 29日		
				US	2017058031	A1	2017年 3月 2日		
				US	2013230530	A1	2013年 9月 5日		
				ES	2678060	T3	2018年 8月 8日		
				WO	2008070569	A2	2008年 6月 12日		
				EP	2097097	A4	2011年 3月 9日	20	
				BR	PI0717902	A2	2013年 10月 29日		
				SG	177168	A1	2012年 1月 30日		
				CA	2671457	A1	2008年 6月 12日		
				AU	2007329529	A1	2008年 6月 12日		
				WO	2008070569	A3	2008年 11月 20日		
				CN	101626782	B	2013年 3月 27日		
				IL	199036	A	2014年 11月 30日		
				JP	2010511388	A	2010年 4月 15日		
				JP	2014039548	A	2014年 3月 6日		
				NZ	578064	A	2012年 1月 12日	30	
				US	8481683	B2	2013年 7月 9日		
				MX	2009005776	A	2009年 6月 10日		
				EP	2097097	B1	2018年 5月 30日		
				CL	2007003479	A1	2009年 1月 23日		
				TW	1447124	B	2014年 8月 1日		
				TW	200840823	A	2008年 10月 16日		
				CA	2671457	C	2017年 9月 26日		
				JP	5846695	B2	2016年 1月 20日		
				CN	103172743	A	2013年 6月 26日		
				ZA	200904079	B	2010年 4月 28日	40	
				IL	199036	DO	2010年 3月 28日		
				CN	103172743	B	2015年 4月 8日		
				KR	101552735	B1	2015年 9月 14日		
				AR	064109	A1	2009年 3月 11日		
				ZA	200904079	A	2010年 4月 28日		
CN	109836495	A	2019年 6月 4日	无					
CN	107964549	A	2018年 4月 27日	CN	107964549	B	2020年 12月 8日		
CN	108715859	A	2018年 10月 30日	无					
WO	2020010235	A1	2020年 1月 9日	无					
WO	2018067992	A1	2018年 4月 12日	PH	12019500750	A1	2019年 7月 15日		
				CN	110225927	A	2019年 9月 10日		
				IL	265755	DO	2019年 6月 30日		
				JP	2019537433	A	2019年 12月 26日		
				SG	10201913823V	A	2020年 3月 30日		
				US	2018125892	A1	2018年 5月 10日		
				AR	110676	A1	2019年 4月 24日		
				BR	112019006781	A2	2019年 7月 30日		
				US	10525083	B2	2020年 1月 7日		

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2015年1月)

10

20

30

40

50

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/085062

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		CA 3039646 A1	2018年 4月 12日
		MX 2019003886 A	2019年 8月 5日
		RU 2019113504 A	2020年 11月 9日
		US 2020113941 A1	2020年 4月 16日
		EP 3523331 A1	2019年 8月 14日
		TW 201827597 A	2018年 8月 1日
		AU 2017341047 A1	2019年 5月 2日
		KR 20190057366 A	2019年 5月 28日
		IL 258527 D0	2018年 5月 31日
		WO 2017066122 A1	2017年 4月 20日
		EP 3362476 A1	2018年 8月 22日
		KR 20180057723 A	2018年 5月 30日
		AU 2016338747 A1	2018年 4月 26日
		US 2019062426 A1	2019年 2月 28日
		BR 112018006995 A2	2018年 10月 30日
		JP 2018531014 A	2018年 10月 25日
		CA 3002000 A1	2017年 4月 20日
		EP 3362476 B1	2020年 5月 27日
		MX 2018004503 A	2019年 4月 15日
		US 10815301 B2	2020年 10月 27日
		EP 3474867 A4	2020年 5月 20日
		CN 109562126 A	2019年 4月 2日
		US 2020283534 A1	2020年 9月 10日
		CA 3029197 A1	2017年 12月 28日
		EP 3474867 A1	2019年 5月 1日
		JP 2019522973 A	2019年 8月 22日
		US 2018162939 A1	2018年 6月 14日
		US 2020024342 A9	2020年 1月 23日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2015年1月)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

4 H 0 4 5

C 0 7 K 16/28 (2006.01)
C 0 7 K 19/00 (2006.01)
C 1 2 N 15/12 (2006.01)
C 1 2 N 1/15 (2006.01)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)
A 6 1 K 31/7088(2006.01)
A 6 1 K 35/12 (2015.01)
A 6 1 K 35/76 (2015.01)
A 6 1 K 39/395(2006.01)

C 0 7 K 16/28
C 0 7 K 19/00
C 1 2 N 15/12
C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21
A 6 1 P 35/00
A 6 1 K 48/00
A 6 1 K 31/7088
A 6 1 K 35/12
A 6 1 K 35/76
A 6 1 K 39/395
A 6 1 K 39/395

D
N

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
 E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
 CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
 E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
 G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
 TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

ディング・7

(74)代理人 100114188
 弁理士 小野 誠
 (74)代理人 100119253
 弁理士 金山 賢教
 (74)代理人 100124855
 弁理士 坪倉 道明
 (74)代理人 100129713
 弁理士 重森 一輝
 (74)代理人 100137213
 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

中華人民共和國、201210・シャンハイ、プードン・ニュー・エリア、チャイナ (シャンハイ)

-)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 チュー, リン
 中華人民共和国、201210・シャンハイ、プードン・ニュー・エリア、チャイナ（シャンハイ）
)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・シャンハイ、プードン・ニュー・エリア、チャイナ（シャンハイ）
)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 ウエイ, ユーチャン
 中華人民共和国、201210・シャンハイ、プードン・ニュー・エリア、チャイナ（シャンハイ）
)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・シャンハイ、プードン・ニュー・エリア、チャイナ（シャンハイ）
)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 チュー, シーグイ
 中華人民共和国、201210・シャンハイ、プードン・ニュー・エリア、チャイナ（シャンハイ）
)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, ジアチー
 中華人民共和国、201210・シャンハイ、プードン・ニュー・エリア、チャイナ（シャンハイ）
)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 チャン, リ
 中華人民共和国、201210・シャンハイ、プードン・ニュー・エリア、チャイナ（シャンハイ）
)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
 F ターム（参考） 4B065 AA90X AA90Y AA93X AB01 AC14 BA02 BB19 BC03 BC07 BC10
 CA24 CA25 CA44
 4C084 AA13 NA05 NA14 ZB26
 4C085 AA13 AA14 CC22 DD61 EE01
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA05 NA14 ZB26
 4C087 AA01 AA02 BB64 BC83 NA05 NA14 ZB26
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 EA20 FA74