

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-515282

(P2020-515282A)

(43) 公表日 令和2年5月28日(2020.5.28)

(51) Int.Cl.	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 N A Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 7 6
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 41 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2019-556410 (P2019-556410)
 (86) (22) 出願日 平成29年12月27日 (2017.12.27)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年8月26日 (2019.8.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2017/118980
 (87) 国際公開番号 W02018/121604
 (87) 国際公開日 平成30年7月5日 (2018.7.5)
 (31) 優先権主張番号 201611246563.4
 (32) 優先日 平成28年12月29日 (2016.12.29)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 中国 (CN)

(71) 出願人 519236941
 天津天▲銳▼生物科技有限公司
 TIMMUNE BIOTECH INC
 .
 中国天津市自▲賢▼区 (空港▲経▼▲済▼
 区) ▲環▼河北路76号空港商▲務▼▲園
 ▼西区19号楼2▲層▼204
 Room 204, Building
 19, West Region air
 port business park,
 76 Huanhe North Roa
 d, Airport Economic
 Zone Tianjin 30000
 O China

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多標的キメラ抗原受容体

(57) 【要約】

本発明において、多標的キメラ抗原受容体を開示する。本発明において、主ペプチド鎖および補助ペプチド鎖からなる多標的キメラ抗原受容体であって、主ペプチド鎖が、抗原結合ドメインA、補助ペプチド鎖連結ドメインB、膜貫通ドメインCおよび細胞内シグナル伝達ドメインDを含み；補助ペプチド鎖が、主ペプチド鎖連結ドメインFを含み；抗原結合ドメインAが、抗原結合機能を有するポリペプチドであり；補助鎖連結ドメインBおよび主ペプチド連結ドメインFが、互いに組み合わせることができ；膜貫通ドメインCが、任意の膜結合タンパク質または膜貫通タンパク質の膜貫通ドメインであり；細胞内シグナル伝達ドメインDが、一次シグナル伝達領域を含む、多標的キメラ抗原受容体を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

主ペプチド鎖および補助ペプチド鎖で構成される多標的キメラ抗原受容体であって、前記主ペプチド鎖が、抗原結合ドメイン A、補助ペプチド鎖連結ドメイン B、膜貫通ドメイン C および細胞内シグナル伝達構造ドメイン D からなり；前記補助ペプチド鎖が、主ペプチド鎖連結ドメイン F を含み；前記抗原結合ドメイン A が、抗原と結合する能力を有するポリペプチドであり；前記補助ペプチド鎖連結ドメイン B が、互いに前記主ペプチド鎖連結ドメイン F と結合することができ；前記補助ペプチド鎖連結ドメイン B および前記主ペプチド鎖連結ドメイン F が、互いに結合することができる、サイトカインおよび完全長の対応するサイトカイン受容体、またはサイトカインおよび対応するサイトカイン受容体断片であり；前記膜貫通ドメイン C が、任意の膜結合性タンパク質の膜貫通領域または膜貫通タンパク質の膜貫通領域であり；前記細胞内シグナル伝達ドメイン D が、一次シグナル伝達領域を含む、多標的キメラ抗原受容体。

10

【請求項 2】

前記補助ペプチド鎖が、抗原結合ドメイン E をさらに含み；前記抗原結合ドメイン E が、抗原結合機能を有するポリペプチドであり；前記抗原結合ドメイン E および前記抗原結合ドメイン A が、同一または相違し得る、請求項 1 に記載の多標的キメラ抗原受容体。

【請求項 3】

前記細胞内シグナル伝達ドメイン D が、共刺激シグナル伝達領域をさらに含む、請求項 1 または 2 に記載の多標的キメラ抗原受容体。

20

【請求項 4】

抗原結合能力を有する前記ポリペプチドが、抗原と結合することが可能な抗体、抗原と結合することが可能なリガンドまたは抗原と結合する能力を有する受容体である、請求項 2 または 3 に記載の多標的キメラ抗原受容体。

【請求項 5】

抗原と結合することが可能な前記抗体が、完全長抗体、抗体の F a b、抗体の F c、s c F v、V H H、抗体の V H、抗体の V L の完全長ポリペプチドまたは抗体の V L の部分断片であり；前記抗原結合リガンドまたは前記抗原結合受容体が、リガンドまたは受容体の完全長ポリペプチドまたは部分断片である、請求項 4 に記載の多標的キメラ抗原受容体。

30

【請求項 6】

前記抗原結合ドメイン A または前記抗原結合ドメイン E によって結合される前記抗原が、細胞表面抗原またはペプチドを有する M H C 分子のいずれかである、請求項 2 ～ 5 のいずれか一項に記載の多標的キメラ抗原受容体。

【請求項 7】

前記抗原が、がん関連抗原であるか；あるいは、前記抗原が、脳がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、結腸直腸がん、肝臓がん、腎臓がん、リンパ腫、白血病、肺がん、メラノーマ、転移性メラノーマ、中皮腫、神経芽細胞腫、卵巣がん、前立腺がん、膵臓がん、腎臓がん、皮膚がん、胸腺腫、肉腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、子宮がんまたはこれらの任意の組合せに関する抗原である、請求項 6 に記載の多標的キメラ抗原受容体。

40

【請求項 8】

前記抗原結合ドメイン A および前記抗原結合ドメイン E によって結合される前記抗原が、以下：C D 1 2 3、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 2、C D 3 7、R O R 1、メソテリン、C D 3 3 / I L 3 R a、c - M e t、B C M A、P S M A、E G F R v I I I、G D - 2、N Y - E S O - 1、M A G E A 3、 β -ヒト絨毛性ゴナドトロピン、A F P、R A G E - 1、M N - C A I X、ヒトテロメラゼ逆転写酵素、R U 1、R U 2 (A S)、h s p 7 0 - 2、M - C S F、P S A、P A P、L A G E - l a、p 5 3、プロステイン、P S M A、H e r 2 / n e u、テロメラゼ、P C T A - 1、M A G E、E L F 2 M、I G F - I、I G F - I I、I G F - I 受容体、B C R - A B L、E 2 A - P R L、H 4 -

50

RET、IGH-IgK、MYL-RAR、GP100、Mart1、TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、RAGE、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、TAG-72、CA19-9、CA72-4、CAM17.1、NuMa、K-ras、 β -カテニン、CDK4、Mum-1、p15、p16、43-9F、5T4、791Tgp72、 β -HCG、BCA225、BTAA、CA125、CA15-3\CA27.29\BCAA、CA195、CA242、CA-50、WT1、CD68、FGF-5、G250、EpCAM、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB/70K、RCAS1、SDCAG16、TA-90、TAAL6、TAG72、TLP、p53、Ras、TPS、エプスタインバーウイルス抗原EBVAならびにヒトパピローマウイルス（HPV）抗原E6およびE7、またはこれらの組合せであるか；あるいは前記抗原結合ドメインAおよび前記抗原結合ドメインEによって結合される前記抗原が、MHCおよび上述のいずれか1つの抗原の短いペプチドの複合体である、請求項2～7のいずれか一項に記載の多標的キメラ抗原受容体。

10

【請求項9】

前記抗原結合ドメインAおよび前記抗原結合ドメインEによって結合される前記抗原が、CD19、CD20、BCMA、CD22、CD33/IL3Ra、Her2、PDL1、NY-ESO-1、GP100、Mart1、WT1、またはこれらの任意の組合せであるか；あるいは前記抗原結合ドメインAおよび前記抗原結合ドメインEによって結合される前記抗原が、MHCおよび上記の抗原の1つの短いペプチドの複合体である、請求項8に記載の多標的キメラ抗原受容体。

20

【請求項10】

前記サイトカインおよび前記対応するサイトカイン受容体が、 γ cサイトカインファミリーにおけるサイトカインおよび対応するサイトカインならびにその受容体である、請求項1～9のいずれか一項に記載の多標的キメラ抗原受容体。

【請求項11】

γ cサイトカインファミリーにおける前記サイトカインおよび前記対応するサイトカイン受容体が、IL15およびIL15Ra、IL4およびIL4Ra、またはIL2およびIL2Raであるか；あるいは γ cサイトカインファミリーにおける前記サイトカインおよび前記対応するサイトカイン受容体が、IL15およびIL15Ra、IL4およびIL4Ra、IL2またはIL2Raと75%より高い相同性を有するポリペプチドである、請求項10に記載の多標的キメラ抗原受容体。

30

【請求項12】

前記一次シグナル伝達領域が、以下のタンパク質の1つ、または複数の以下のタンパク質の任意の組合せのシグナル伝達領域：CD3- ζ 、Fc ϵ RI γ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79bおよびCD66dであるか；あるいは前記一次シグナル伝達領域が、配列6で示されるCD3- ζ シグナル伝達領域のアミノ酸配列を有するCD3- ζ シグナル伝達領域、または配列6で示されるCD3- ζ シグナル伝達領域と75%より高い相同性を有するポリペプチドである、請求項1～11のいずれか一項に記載の多標的キメラ抗原受容体。

40

【請求項13】

前記共刺激シグナル伝達領域が、以下：CD27、CD28、4-1BB（CD137）、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、およびCD83と特異的に結合するシグナル伝達領域の分子のうちの1つまたは複数の任意の組合せであるか、あるいは前記共刺激シグナル伝達領域が、特に、アミノ酸配列7のCD28シグナル伝達領域またはアミノ酸配列8の4-1BBシグナル伝達領域の1つまたは両方の組合せであるか；あるいは、前記共刺激シグナル伝達領域が、CD28シグナル伝達領域および4-1BBシグナル伝達領域のそれぞれと75%より高い相同性を有する2つのポリペプチドの1つまたは組合せである、請求項3～12のいずれか一項に記載の多標的キメラ抗原受容体。

50

【請求項 14】

前記多標的キメラ抗原受容体において、前記抗原結合ドメインAまたはEが、抗CD19-ScFv、抗MHC/GP100-VHH、抗MHC/WT1-VH、抗CD20-ScFv、抗CD22-ScFvまたはPD1細胞外領域の1つまたは両方の組合せであり；前記補助ペプチド鎖連結ドメインが、IL15R α sushi、IL4R α -NFN3、IL15またはIL4であり；前記膜貫通ドメインが、CD8の膜貫通領域またはCD28の膜貫通領域であり；前記細胞内シグナル伝達ドメインが、CD3 ζ シグナル伝達領域、CD3 ζ シグナル伝達領域および4-1BBシグナル伝達領域が融合することによって得られるポリペプチド、またはCD3 ζ シグナル伝達領域がCD28シグナル伝達領域と融合することによって得られるポリペプチドであり；前記主ペプチド鎖連結ドメインが、IL15、IL4、IL15R α sushiまたはIL4R α もしくはNFN3であるか；あるいは、前記多標的キメラ抗原受容体において、前記抗原結合ドメインAが、抗CD19-ScFvであり；前記補助ペプチド鎖連結ドメインが、IL15R α sushiであり；前記膜貫通ドメインが、CD8の膜貫通領域であり；前記細胞内シグナル伝達ドメインが、CD3 ζ シグナル伝達領域が4-1BB（CD137）シグナル伝達領域と融合することによって得られるポリペプチドであり；前記抗原結合ドメインEが、PD1の細胞外領域であり；前記主ペプチド鎖連結ドメインが、IL15である、請求項2～12のいずれか一項に記載の多標的キメラ抗原受容体。

10

【請求項 15】

前記抗CD19-ScFvのアミノ酸配列が、配列1であり；前記抗MHC/GP100-VHHのアミノ酸配列が、配列15であり；抗MHC/Mart1-VHHのアミノ酸配列が、配列16であり；前記抗CD20-ScFvのアミノ酸配列が、配列17であり；前記抗CD22-ScFvのアミノ酸配列が、配列18であり；前記抗MHC/WT1-VHのアミノ酸配列が、配列19であり；PD1の細胞外領域のアミノ酸配列が、配列2であり；IL15R α sushiのアミノ酸配列が、配列4であり；前記IL4R α -NFN3のアミノ酸配列が、配列20であり；CD8の膜貫通領域のアミノ酸配列が、配列5であり；CD28の膜貫通領域のアミノ酸配列が、配列22であり；前記CD3 ζ シグナル伝達領域のアミノ酸配列が、配列6であり；4-1BBシグナル伝達領域のアミノ酸配列が、配列8であり；CD28シグナルのアミノ酸配列が、配列7であり；IL15のアミノ酸配列が、配列3であり；IL4のアミノ酸配列が、配列21である、請求項14に記載の多標的キメラ抗原受容体。

20

30

【請求項 16】

前記多標的キメラ抗原受容体の前記主ペプチド鎖のアミノ酸配列が、配列9、配列23、配列24、配列25、配列26、配列27、配列28または配列29の1つであり；前記受容体の前記補助ペプチド鎖のアミノ酸配列が、配列3、配列4、配列10、配列30、配列31、配列32、配列33または配列34の1つである、請求項1～15のいずれか一項に記載の多標的キメラ抗原受容体。

【請求項 17】

主ペプチド鎖をコードする核酸分子および補助ペプチド鎖をコードする核酸分子で構成される、請求項1～16のいずれか一項に記載の多標的キメラ抗原受容体をコードする核酸分子。

40

【請求項 18】

組換えベクター、発現カセット、組換え微生物株、細胞または組換えウイルスに含まれる、請求項17に記載の核酸分子。

【請求項 19】

前記細胞が、原核細胞、酵母細胞もしくは哺乳動物細胞であるか；または前記哺乳動物細胞が、特に、ヒト細胞であるか；または前記ヒト細胞が、特に、免疫細胞であるか；あるいは前記免疫細胞が、特に、T細胞もしくはNK細胞である、請求項18に記載の細胞。

【請求項 20】

50

請求項 1～16 のいずれか一項に記載の多標的キメラ抗原受容体、請求項 16、17 に記載の核酸分子、または請求項 18 に記載の組換えベクター、発現カセット、組換え微生物株、細胞または組換えウイルス、組換えプラスミドを含む、キット。

【請求項 21】

免疫療法の適用のための、請求項 1～16 のいずれか一項に記載の多標的キメラ抗原受容体、請求項 17 に記載の核酸分子、または請求項 18 に記載の組換えベクター、発現カセット、組換えプラスミド、細胞もしくは組換えウイルスまたは請求項 20 に記載のキットの使用；あるいは、免疫療法製品の調製のための、請求項 1～16 のいずれかに記載の多標的キメラ抗原受容体、請求項 17 に記載の核酸分子、または請求項 18 に記載の組換えベクター、発現カセット、組換え微生物株、細胞もしくは組換えウイルス、または請求項 20 に記載のキットの使用。

10

【請求項 22】

免疫細胞を培養するため、および／または免疫細胞の増殖を促進するための、請求項 1～16 のいずれか一項に記載の多標的キメラ抗原受容体、請求項 17 に記載の核酸分子、または請求項 18 に記載の組換えベクター、発現カセット、組換えプラスミド、細胞もしくは組換えウイルスまたは請求項 20 に記載のキットの使用；あるいは、免疫細胞の培養の調製の製品のため、および／または免疫細胞の増殖を促進するための、請求項 1～16 のいずれか一項に記載の多標的キメラ抗原受容体、請求項 17 に記載の核酸分子、または請求項 18 に記載の組換えベクター、発現カセット、組換え微生物株、細胞もしくは組換えウイルス、または請求項 20 に記載のキットの使用。

20

【請求項 23】

イムノアッセイの適用のための、請求項 1～16 のいずれか一項に記載の多標的キメラ抗原受容体、請求項 17 に記載の核酸分子、または請求項 18 に記載の組換えベクター、発現カセット、組換えプラスミド、細胞もしくは組換えウイルスまたは請求項 20 に記載のキットの使用；あるいは、免疫検出製品の調製のための、請求項 1～16 のいずれかに記載の多標的キメラ抗原受容体、請求項 17 に記載の核酸分子、または請求項 18 に記載の組換えベクター、発現カセット、組換え微生物株、細胞もしくは組換えウイルス、または請求項 20 に記載のキットの使用。

【請求項 24】

腫瘍の処置または検出のための、請求項 1～16 のいずれか一項に記載の多標的キメラ抗原受容体、請求項 17 に記載の核酸分子、または請求項 18 に記載の組換えベクター、発現カセット、組換え微生物株、細胞もしくは組換えウイルスまたは請求項 20 に記載のキットの使用；あるいは、腫瘍治療製品または腫瘍検出製品の調製のための、請求項 1～16 のいずれかに記載の多標的キメラ抗原受容体、請求項 17 に記載の核酸分子、請求項 18 に記載の組換えベクター、発現カセット、組換え微生物株、細胞もしくは組換えウイルス、または請求項 20 に記載のキットの使用。

30

【請求項 25】

腫瘍細胞を阻害または死滅させる適用のための、請求項 1～16 のいずれか一項に記載の多標的キメラ抗原受容体、請求項 17 に記載の核酸分子、または請求項 18 に記載の組換えベクター、発現カセット、組換え微生物株、細胞もしくは組換えウイルス、請求項 20 に記載のキットの使用；あるいは、腫瘍細胞を阻害または死滅させるための製品の調製のための、請求項 1～16 のいずれかに記載の多標的キメラ抗原受容体、請求項 17 に記載の核酸分子、請求項 18 に記載の組換えベクター、発現カセット、組換え微生物株、細胞もしくは組換えウイルス、または請求項 20 に記載のキットの使用。

40

【請求項 26】

言及した抗原を発現する標的細胞を阻害または死滅させるための、請求項 1～19 のいずれか一項に記載の多標的キメラ抗原受容体、請求項 17 に記載の核酸分子、または請求項 18 に記載の組換えベクター、発現カセット、組換え微生物株、トランスジェニック細胞もしくは組換えウイルス、請求項 20 に記載のキットの使用；あるいは、前記抗原を阻害または死滅させるための標的細胞製品の調製における使用のための、請求項 1～16 の

50

いずれか一項に記載の多標的キメラ抗原受容体、請求項 17 に記載の核酸分子、請求項 18 に記載の組換えベクター、発現カセット、組換え微生物株、トランスジェニック細胞、もしくは組換えウイルス、または請求項 20 に記載のキットの使用。

【請求項 27】

前記免疫療法が、免疫細胞によって腫瘍細胞を阻害または死滅させるためであるか；あるいは前記免疫細胞が、T 細胞またはNK 細胞であるか；あるいは前記抗原が、がん関連抗原であるか；あるいは前記抗原が、脳がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、結腸直腸がん、肝臓がん、腎臓がん、リンパ腫、白血病、肺がん、メラノーマ、転移性メラノーマ、中皮腫、神経芽細胞腫、卵巣がん、前立腺がん、膵臓がん、腎臓がん、皮膚がん、胸腺腫、肉腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、子宮がんに関する抗原またはこれらの任意の組合せであるか；前記腫瘍が、脳がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、結腸直腸がん、肝臓がん、腎臓がん、リンパ腫、白血病、肺がん、メラノーマ、転移性メラノーマ、中皮腫、神経芽細胞腫、卵巣がん、前立腺がん、膵臓がん、腎臓がん、皮膚がん、胸腺腫、肉腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、子宮がん、またはこれらの 1 つもしくはは任意の組合せであるか；あるいは前記標的細胞が、原核細胞、酵母細胞または哺乳動物細胞であるか；あるいは特に、前記哺乳動物細胞が、ヒト細胞であるか；あるいは特に、ヒト細胞が、前記免疫細胞であるか；あるいは免疫細胞が、T 細胞またはNK 細胞である、請求項 21～26 のいずれか一項に記載の使用。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は、バイオテクノロジーの分野、特に、多標的キメラ抗原受容体に関する。

【背景技術】

【0002】

キメラ抗原受容体 (CAR) は、通常、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインから主になる膜貫通融合タンパク質である (特許 CN 105392888 A)。免疫細胞 (例えば、T 細胞またはNK 細胞) は、キメラ抗原受容体の発現の際に、抗原特異性をもたらす。

【0003】

CAR 分子の抗原結合ドメインは、免疫細胞の特異的な標的化を決定する。最も典型的な CAR は、しばしば、抗体の重鎖の可変領域およびリンカーによって結合される軽鎖可変領域からなるその抗原結合ドメインとして単鎖可変断片 (scFv) を使用する。その単純な構造のために、たった 1 本のペプチド鎖が存在し、これは、融合タンパク質の部分として CAR 分子への組み込みに適切である。腫瘍抗原それ自体が受容体である場合、CAR の抗原結合ドメインはまた、受容体に特異的なそのリガンドによって置き換えられ得る。

30

【0004】

CAR 分子の第 2 の単位構造は、細胞表面から膜にわたって CAR 分子が発現することを可能にする、膜貫通型 (TM) である。通常、CAR 分子は、腫瘍の処置のための T 細胞上で武装されており、したがって、CD3ζ、CD4、CD8 または CD28 などの T 細胞発現タンパク質の多くの膜貫通領域は、CAR 膜貫通ドメインとして使用され得る。CD28 の膜貫通領域を有する CAR の発現レベルが CD3ζ の膜貫通領域を有するものよりも高いことが文献に報告されている。加えて、一部の CAR 分子構造では、スパーサー／ヒンジ領域が、抗原ドメインおよび膜貫通ドメインの間に挿入され得、これは、抗原構造および標的化された抗原の立体障害を低減し得る。IgG1、IgG4、IgD および CD8 の断片ペプチドは、しばしば、このような目的のために使用される。

40

【0005】

細胞内シグナル伝達領域は、CAR 分子の最も重要な部分である。これは、細胞内シグナルを伝達し、免疫細胞の活性化および増殖を担う。第 1 世代 CAR としても公知である、初期の設計の細胞内シグナル伝達ドメインは、1 種の CD3ζ 刺激シグナルのみを使用

50

していた。CD3 ζ 分子と同じく、共刺激の第2のシグナルなしの3つのITAMのみが存在する。したがって、第1世代のCARは、T細胞が腫瘍の抗原と結合したときに第2のシグナルを欠くことに起因してT細胞は増殖が困難であるので、弱い抗腫瘍効果しか有さず、臨床適用においてあまり有効ではない。これに基づいて、CARは、CAR中に第2のシグナルを伝達するCD28分子の活性ドメインを組み込むように改変され、それ故、第2世代のCARと呼ばれている。CAR-T細胞への共刺激シグナルの付加は、*in vivo*でCAR-T細胞の生存を増強することができ、細胞が、増殖を維持しながらこれらの腫瘍細胞を死滅させることを可能にし、CAR-T細胞の抗腫瘍能を改善する。したがって、第2世代のCARは、臨床適用において良好な抗腫瘍効果を示した。例えば、Alvarez-VallinaおよびHawkinsらは、CAR分子に共刺激分子のCD28シグナル断片を挿入し、T細胞が対応する抗原によって刺激を受け得ることを実証した（Alvarezvallina L、Hawkins R E.、1996年）。したがって、第2世代のCARは、臨床適用において良好な抗腫瘍効果を示した。しかしながら、外因性の共刺激分子の欠如で、すべての第2世代のCARがT細胞の増殖を促進するのに十分なIL-2を産生できなかった。しかしながら、トランスジェニックB7共刺激分子を与えると、これらのトランスジェニックCAR-T細胞は、IL-2を産生して、それら自体の増殖を促進することができた。これに基づいて、第3世代のCARが生み出され、これは、細胞内シグナル領域が、CD28分子に加えて、別の共刺激分子、通常、OX40または4-1BBを有する（Till BG、Jensen MC、Wang Jら、2012年）。第2世代のCARと比較して、第3世代のCARは、*in vivo*で拡大増殖し、サイトカインを産生する能力が良好である一方、相当の細胞毒性を有する（Pule MA、Straathof KC、Dotti Gら、2005年）。しかしながら、最近の研究は、CAR-T細胞の機能活性が、これらの細胞内シグナル配列に加えて標的細胞によって提供される細胞内受容体に関連していることを示している。第3世代のCARが第2世代のCARより優れているか否かは、臨床的に検証されていないままである。

【0006】

キメラ抗原受容体T細胞療法は、B細胞由来腫瘍において良好な結果を達成している。CAR-T19に基づくマウス抗体（「CTL019」）による処置の臨床転帰は、CLLの患者および小児ALLについて、完全奏効の確立において、有望な結果を示している。軽減（Kalos M、Levine BL、Porter DLら、2011年；Porterら、2011年；Gruppら、2013年）は、がんの適合処置の新たな時代を開いた。

【0007】

キメラ抗原受容体-免疫細胞療法のT細胞またはNK細胞の*in vitro*拡大増殖は、IL-2刺激に依拠しており、したがって、ある程度の量のIL-2を、T細胞およびNK細胞の培養培地に添加しなければならない（Bodnarら、2008年；Grundら、2005年）。NK細胞の培養を平易にするため、および臨床適用におけるIL-2による毒性の副作用を考慮して、研究者らは、IL-2を安定的に発現させるためにIL-2依存NK92細胞を遺伝子操作し、これは、培養培地中へのIL-2の添加を不必要にする（Shigeki Nagashima、1998年；Y.K. TAM、1999年）。IL-15はIL-2と機能的に類似しており、同じベータおよびガンマ受容体単位を共有している。研究は、IL-2またはIL-15が、NK細胞およびCD8+T細胞の生存および増殖のために必要であることを示している（Boymanら、2007年）。したがって、研究者らは、IL-15発現NK細胞株を構築し、IL-15発現NK92細胞が、培地中で必要なIL-2の量を大幅に低減し得ることを見出した（JIAN ZHANG、2004年；Jiangら、2008年；03152968.2）。IL-15およびIL-2は同じ $\beta\gamma$ 受容体単位を共有するが、それぞれ、特異的な α 受容体を有し、IL-15R α -sushi（IL-15受容体 α のsushiドメイン）がIL-15のスーパーアゴニストであることが見出された。アゴニストは、IL-15の機能を大いに増強することができ（Hanら、2011年；Mortierら、2006年）（特許：201280037114.2；201510358540.1）、IL-15およびIL-15R α -sushiの複合体は、T/NK

細胞の成長のサポートにおいて I L - 2 の役割に代わって完全に使用することができ (Peter S. Kim 1、2016 年; Rosarioら、2016 年)、NK / C D 8 + T 細胞は活性化され、腫瘍を死滅させるそれらの細胞毒性が増加する。したがって、細胞の免疫療法の有効性を改善するために、C A R 構築物において、I L - 1 5 および I L - 1 5 R α - s u s h i 複合体または他の機能性サイトカインならびに受容体複合体の融合を使用する傾向がある。

【0008】

同時に、腫瘍は単一の標的によって処置され、腫瘍細胞はこの標的の発現レベルをダウンレギュレーションすることによって回避し、2つの標的によって腫瘍を処置することは、この問題を緩和するだろう (特許: 201710005395. 8; 201510733585. 2; 201710640609; 201610353118. 1)。例えば、研究者は、C a r - T 細胞が2つの標的を認識することを可能にする、キメラ抗原受容体の細胞外部分として、2つの異なる抗体または抗原リガンドの配列を一緒に連結するリンカーを使用することができ、これは、腫瘍免疫回避に起因する有効性の減少を止める (Hegde M、Mukherjee M、Grada Zら、2016 年; Schneider D、Xiong Y、Wu Dら、2017 年)。さらにまた、研究者らは、C A R - T の細胞外ドメインとして 5 B 9 タグという名称のバイオマーカーに対する抗体を使用し、異なる腫瘍標的を標的化する抗体の群を 5 B 9 タグに融合した。C a r - T は、それぞれの抗原への異なる抗体の結合によって異なる標的を認識する能力を得ることができる (Cartellieri M、Feldmann A、Koristka Sら、2016 年)。

加えて、キメラ抗原受容体の1つが免疫チェックポイント関連部位になる場合、免疫細胞の活性は、免疫学的チェックポイントによって伝達される負のシグナルを遮断することによって大きく増強され得る。例えば、P D - 1 (プログラム細胞死 1) およびその受容体の P D - L 1、P D - L 2 は、T 細胞の活性の重要な調節因子である (Okazaki および Honjo、2007 年)。他の細胞における P D - L 1 / 2 に対して、T 細胞の表面における P D - 1 の結合は、T 細胞の阻害を引き起こし、これは、ヒトにおける自己免疫疾患の回避および免疫寛容を生じさせるプロセスにおいて重要な役割を果たすが、病原微生物に感染した一部の細胞およびがん細胞は、これらの P D - L 1 / 2 のアップレギュレーション、次いで、または T 細胞における P D - 1 発現によって T 細胞の監視から逃れることもでき、疾患をもたらす (Freemanら、2000 年; Keirら、2008 年; Parryら、2005 年)。したがって、研究者らは、このシグナル伝達経路を遮断するために、抗原と結合する P D - 1 または P D - L 1 に対する抗体を探索し、これは、T 細胞の活性を有意に改善し、病原微生物およびがんに対する身体の抵抗性を増強することができる (Topalianら、2012 年; Yanan Guo1、2016 年)。M S L N を標的とする C A R - T 療法と P D 1 抗体の組合せは、この組合せが腫瘍細胞を死滅させる C A R - T 細胞の能力を向上させることを示している (Cherkassky L、Morello A、Villanavargas Jら、2016 年)。さらにまた、研究者らは、免疫チェックポイント分子である P D 1 または C T L A - 4 を細胞内シグナル領域と連結させることによって、いわゆるキメラ抗原受容体スイッチングシステムを構築した。この方法では、腫瘍細胞および腫瘍内微小環境からの免疫チェックポイントによる負のシグナルが変化して、処置する腫瘍における C A R - T 細胞の有効性を向上させ、オフターゲット効果の危険性を低減する (Liu X、Ranganathan R、Jiang Sら、2016 年; Fedorov VD、Themeli M、Sadelain M.、2013 年)。多くの臨床試験は、メラノーマ (Choら、2016 年; Hamidら、2013 年)、多発性骨髄腫 (Badrosら、2015 年)、白血病 (Porkkaら、2014 年) の処置のための P D - 1 / P D - L 1 抗体が良好な治療効果を有することを実証している (特許番号: 200380109929. 8、201310258289. 2、201180019629. 5)。したがって、複数の標的を認識する C A R 分子の改変は、細胞の免疫療法において重要な役割を果たす。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】中国特許出願公開200380109929号明細書

【特許文献2】中国特許出願公開201310258289号明細書

【特許文献3】中国特許出願公開201180019629号明細書

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明の目的は、多標的キメラ抗原受容体（図1）を提供することである。

【0011】

本発明によって提供される多標的キメラ抗原受容体は、主ペプチド鎖および補助ペプチド鎖からなり； 10

【0012】

主ペプチド鎖は、抗原結合ドメインA、補助ペプチド鎖連結ドメインB、膜貫通ドメインCおよび細胞内シグナル伝達ドメインDを含み；

【0013】

補助ペプチド鎖は、主ペプチド鎖連結ドメインFを含み；

【0014】

抗原結合ドメインAは、抗原と結合する機能を有するポリペプチドであり；

【0015】

補助ペプチド鎖連結ドメインBおよび主ペプチド鎖連結ドメインFは、互いに組み合わせられ； 20

【0016】

補助ペプチド鎖連結ドメインBおよび主ペプチド鎖連結ドメインFは、互いに結合することができる、サイトカインおよび対応するサイトカイン受容体、またはサイトカインおよび対応するサイトカイン受容体断片であり；

【0017】

膜貫通ドメインCは、任意の膜結合性タンパク質の膜貫通領域または膜貫通タンパク質の膜貫通領域であり；

【0018】

細胞内シグナル伝達ドメインDは、一次シグナル伝達領域を含む。 30

【0019】

上記の多標的キメラ抗原受容体の中で、

【0020】

補助ペプチド鎖が、抗原結合ドメインEをさらに含み；

【0021】

抗原結合ドメインEが、抗原と結合する機能を有するポリペプチドであり；

【0022】

抗原結合ドメインEおよび抗原結合ドメインAが、同一または相違する。

【0023】

上記の多標的キメラ抗原受容体の中で、 40

【0024】

細胞内シグナル伝達ドメインDが、共刺激シグナル伝達領域も含む。

【0025】

上記の多標的キメラ抗原受容体の中で、

【0026】

抗原と結合する機能を有するポリペプチドが、抗原と結合することが可能な抗体、抗原と結合することが可能なりガンドまたは抗原と結合する能力を有する受容体である。

【0027】

上記の多標的キメラ抗原受容体の中で、

【0028】 50

抗原と結合することが可能な抗体が、インタクト抗体、抗体の F a b、抗体の F c、s c F v、V H H、抗体の V L または V H の完全長ポリペプチドまたは部分断片であり；

【0029】

抗原結合リガンドまたは抗原結合受容体が、リガンドまたは受容体の完全長ポリペプチドまたは部分断片である。

【0030】

上記の多標的キメラ抗原受容体の中で、

【0031】

抗原結合ドメイン A および抗原結合ドメイン E と結合することができる抗原が、細胞表面抗原または M H C 分子とポリペプチドの複合体である。

10

【0032】

上記の多標的キメラ抗原受容体の中で、

【0033】

抗原が、がん関連抗原であるか；

【0034】

あるいは、一実施形態では、抗原が、脳がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、結腸直腸がん、肝臓がん、腎臓がん、リンパ腫、白血病、肺がん、メラノーマ、転移性メラノーマ、中皮腫、神経芽細胞腫、卵巣がん、前立腺がん、膵臓がん、腎臓がん、皮膚がん、胸腺腫、肉腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、子宮がんの関連抗原またはこれらの任意の組合せである。

20

【0035】

上記の多標的キメラ抗原受容体の中で、

【0036】

抗原結合ドメイン A および抗原結合ドメイン E によって結合される抗原が、以下：C D 1 2 3、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 2、C D 3 7、R O R 1、メソテリン、C D 3 3 / I L 3 R a、c - M e t、B C M A、P S M A、E G F R v I I I、G D - 2、N Y - E S O - 1、M A G E A 3、β - ヒト絨毛性ゴナドトロピン、A F P、R A G E - 1、M N - C A I X、ヒトテロメラゼ逆転写酵素、R U 1、R U 2 (A S)、h s p 7 0 - 2、M - C S F、P S A、P A P、L A G E - 1 a、p 5 3、プロステイン (P r o s t e i n)、P S M A、H e r 2 / n e u、テロメラゼ、P C T A - 1、M A G E、E L F 2 M、I G F - I、I G F - I I、I G F - I 受容体、B C R - A B L、E 2 A - P R L、H 4 - R E T、I G H - I G K、M Y L - R A R、G P 1 0 0、M a r t 1、T S P - 1 8 0、M A G E - 4、M A G E - 5、M A G E - 6、R A G E、p 1 8 5 e r b B 2、p 1 8 0 e r b B - 3、c - m e t、n m - 2 3 H 1、T A G - 7 2、C A 1 9 - 9、C A 7 2 - 4、C A M 1 7. 1、N u M a、K - r a s、β - カテニン、C D K 4、M u m - 1、p 1 5、p 1 6、4 3 - 9 F、5 T 4、7 9 1 T g p 7 2、β - H C G、B C A 2 2 5、B T A A、C A 1 2 5、C A 1 5 - 3 \ C A 2 7. 2 9 \ B C A A、C A 1 9 5、C A 2 4 2、C A - 5 0、W T 1、C D 6 8、F G F - 5、G 2 5 0、E p C A M、M A - 5 0、M G 7 - A g、M O V 1 8、N B / 7 0 K、R C A S 1、S D C C A G 1 6、T A - 9 0、T A A L 6、T A G 7 2、T L P、p 5 3、R a s、T P S、エプスタインバーウイルス抗原 E B V A ならびにヒトパピローマウイルス (H P V) E 6 および E 7、またはこれらの任意の組合せであるか；

30

40

【0037】

あるいは、抗原結合ドメイン A および抗原結合ドメイン E によって結合される抗原が、M H C および上記の抗原の短いペプチドの複合体であり、抗原は、結合ドメイン A および抗原結合ドメイン E を結合することができる抗原である。

【0038】

上記の多標的キメラ抗原受容体の中で、

【0039】

抗原結合ドメイン A および抗原結合ドメイン E によって結合される抗原が、C D 1 9、

50

CD20、BCMA、CD22、CD33／IL3Ra、Her2、PD-L1、NY-ESO-1、GP100、Mart1、WT1、またはこれらの任意の組合せであるか；

【0040】

あるいは、抗原結合ドメインAおよび抗原結合ドメインEによって結合される抗原が、MHCおよび抗原の上記の短いペプチドの複合体である。

【0041】

上記の多標的キメラ抗原受容体の中で、

【0042】

サイトカインおよび対応するサイトカイン受容体が、ガンマ鎖サイトカインファミリーにおけるサイトカインおよび対応するサイトカイン受容体である。

10

【0043】

上記の多標的キメラ抗原受容体の中で、

【0044】

γ c サイトカインファミリーにおけるサイトカインおよび対応するサイトカイン受容体が、IL15およびIL15Ra、IL4およびIL4Ra、またはIL2およびIL2Raであるか；

【0045】

あるいは、 γ c サイトカインファミリーにおけるサイトカインおよび対応するサイトカイン受容体が、IL15およびIL15Ra、IL4およびIL4Ra、またはIL2およびIL2Raと75%より高い相同性を有するポリペプチドである。

20

【0046】

上記の多標的キメラ抗原受容体の中で、

【0047】

一次シグナル伝達領域が、CD3- ζ 、Fc ϵ RI γ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79bおよびCD66dのシグナル伝達領域、または上記シグナル伝達領域の組合せであるか；

【0048】

あるいは、一次シグナル伝達領域が、配列6のタンパク質配列を有するCD3- ζ シグナル伝達領域、またはCD3- ζ シグナル伝達領域と75%より高い相同性を有するポリペプチドである。

30

【0049】

上記の多標的キメラ抗原受容体の中で、

【0050】

共刺激シグナル伝達領域が、CD27、CD28、4-1BB（CD137）、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3シグナル伝達領域、もしくはCD83と特異的に結合するリガンドのシグナル伝達領域、または上記の1つもしくは複数の任意の組合せであるか；

【0051】

あるいは、共刺激シグナル伝達領域が、特に、CD28シグナル伝達領域および4-1BBシグナル伝達領域の1つまたは両方の組合せであるか；

40

【0052】

あるいは、共刺激シグナル伝達領域が、CD28シグナル伝達領域、4-1BBシグナル伝達領域と75%より高い相同性を有する2つのポリペプチドの1つまたは両方の組合せである。

【0053】

上記の多標的キメラ抗原受容体の中で、

【0054】

多標的キメラ抗原受容体において、抗原結合ドメインAまたはEが、抗CD19-ScFv、抗MHC／GP100-VHH、抗MHC／WT1-VH、抗CD20-ScFv

50

、抗CD22-ScFvまたはPD1細胞外ドメインの1つまたは2つの組合せであり；
【0055】

補助ペプチド連結ドメインが、IL15R α sushi、IL4R α -N-FN3、IL15またはIL4であり；

【0056】

膜貫通ドメインが、CD8の膜貫通領域またはCD28の膜貫通領域であり；

【0057】

細胞内シグナル伝達ドメインが、CD3 ζ シグナル伝達領域が4-1BBシグナル伝達領域と、またはCD3 ζ シグナル伝達領域がCD28シグナル伝達領域と融合することによって得られるポリペプチドであり；

【0058】

主ペプチド鎖連結ドメインが、IL15、IL4、IL15R α sushiまたはIL4R α -N-FN3であるか；

【0059】

あるいは、多標的キメラ抗原受容体において、抗原結合ドメインAが、抗CD19-ScFvであり；

【0060】

補助ペプチド鎖連結ドメインが、IL15R α sushiであり；

【0061】

膜貫通ドメインが、CD8の膜貫通領域であり；

【0062】

細胞内シグナル伝達ドメインが、CD3 ζ シグナル伝達領域が4-1BB（CD137）シグナル伝達領域と融合することによって得られるポリペプチドであり；

【0063】

抗原結合ドメインEが、PD1の細胞外領域であり；

【0064】

主ペプチド鎖連結ドメインが、IL15である。

【0065】

補助ペプチド鎖ドメインおよび主ペプチド鎖ドメインは、最も好ましくは、IL15およびIL15R α sushiである。IL15およびIL15R α sushiが、補助ペプチド鎖ドメイン（B）および主ペプチド鎖ドメイン（F）として使用される場合、これらは、NK細胞またはT細胞の増殖を刺激して、NK細胞またはT細胞におけるこの多標的キメラ受容体の発現を可能にする。

【0066】

共刺激シグナル伝達領域は、以下のタンパク質の1つのシグナル伝達領域に由来するのが特に好ましい：CD28および4-1BB（CD137）または両方の組合せ。

【0067】

上記の多標的キメラ抗原受容体の中で、

【0068】

抗CD19-ScFvのアミノ酸配列が、配列1として記載され；

【0069】

抗MHC/GP100-VHHのアミノ酸配列が、配列15として記載され；

【0070】

抗MHC/Mart1-VHHのアミノ酸配列が、配列16として記載され；

【0071】

抗CD20-ScFvのアミノ酸配列が、配列17として記載され；

【0072】

抗CD22-ScFvのアミノ酸配列が、配列18として記載され；

【0073】

抗MHC/WT1-VHのアミノ酸配列が、配列19として記載され；

10

20

30

40

50

【0074】

PD1の細胞外ドメインの配列が、配列2として記載され；IL15R α sushiのアミノ酸配列は、配列4として記載され；

【0075】

IL4R α -N-FN3のアミノ酸配列が、配列20として記載され；

【0076】

CD8の膜貫通領域のアミノ酸配列が、配列5として記載され；

【0077】

CD28の膜貫通領域のアミノ酸配列が、配列22として記載され；

【0078】

CD3 ζ シグナル伝達領域のアミノ酸配列が、配列6として記載され；

【0079】

4-1BBシグナル伝達領域のアミノ酸配列が、配列8として記載され；

【0080】

CD28シグナルのアミノ酸配列が、配列7として記載され；

【0081】

IL15のアミノ酸配列が、配列3として記載され；

【0082】

IL4のアミノ酸配列が、配列21として記載される。

【0083】

上記の多標的キメラ抗原受容体の中で、

【0084】

多標的キメラ抗原受容体の主ペプチド鎖のアミノ酸配列が、配列9、配列23、配列24、配列25、配列26、配列27、配列28または配列29のいずれか1つであり；

【0085】

受容体の補助ペプチド鎖のアミノ酸配列が、配列3、配列4、配列10、配列30、配列31、配列32、配列33または配列34のいずれか1つである。

【0086】

本発明の別の目的は、上記に記載の多標的キメラ抗原受容体をコードする核酸分子を提供することである。

【0087】

本発明によって提供される多標的キメラ抗原受容体をコードする核酸分子は、主ペプチド鎖をコードする核酸分子または補助ペプチド鎖をコードする核酸分子を含む。

【0088】

受容体分子をコードする核酸配列は、例えば、遺伝子を発現する細胞から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公知のベクターから遺伝子を得ることによって、または遺伝子を含む細胞および組織から直接単離するための標準的技術もしくは化学的にポリヌクレオチドの合成を利用することによってなどの本技術分野における公知の組換え方法を使用して得ることができる。

【0089】

上記の核酸分子を含む、組換えベクター、発現カセット、組換えバクテリア、細胞または組換えウイルスも本発明の範囲内である。

【0090】

上記の組換えベクターは、上記の核酸配列または組合せを含む。一実施形態では、主ペプチド鎖(X)または補助ペプチド鎖(Y)をコードする核酸は、プロモーターにライゲーションされ、構築物は、主ペプチド鎖(X)または補助ペプチド鎖(Y)を発現させるために、発現ベクターに組み込まれる。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することができる、転写および翻訳ターミネーター、初期配列およびプロモーターを含む。例えば、レンチウイルスベクターは、これらが長期間の安定な遺伝子の組み込みおよび娘細胞におけるこれらの複製を可能にするので、遺伝子の

10

20

30

40

50

長期間の安定な遺伝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、これらが肝細胞などの非分裂細胞に形質導入することができるので、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を超える追加の利点を有する。これらはまた、低免疫原性という追加の利点を有する。本発明によって提供されるキメラ抗原受容体は、限定されるものではないが、主ペプチド鎖（X）および補助ペプチド鎖（Y）をコードするそれぞれのベクターの共トランスフェクション、または、主ペプチド鎖（X）をコードする核酸配列および補助ペプチド鎖（Y）をコードする核酸配列を有する発現フレームワークの2つのセットを含有する発現ベクター、または主ペプチド鎖（X）および補助ペプチド鎖（Y）をコードする核酸配列が発現フレームワークにタンデムでライゲーションされること、ならびに両方のペプチド鎖が、主ペプチド鎖（X）および補助ペプチド鎖（Y）の核酸配列の間のリボソーム結合部位を挿入することによって発現されることを含む、公知の手法で、同じ細胞中で発現することができる2つのペプチド鎖を含む。

【0091】

上述の細胞が、原核細胞、酵母細胞もしくは哺乳動物細胞であるか；

【0092】

または、哺乳動物細胞が、特に、ヒト細胞であるか；

【0093】

または、ヒト細胞が、特に、免疫細胞であるか、

【0094】

あるいは、免疫細胞が、特に、T細胞もしくはNK細胞である。

【0095】

免疫療法における、上記に記載の多標的キメラ抗原受容体、上記の核酸分子、または上記の組換えベクター、発現カセット、組換え株、細胞もしくは組換えウイルス、あるいはキットの使用も、本発明の保護の範囲内であり；

【0096】

あるいは、免疫療法製品を調製するための、上記に記載の多標的キメラ抗原受容体、上記の核酸分子、または上記の組換えベクター、発現カセット、組換え株、細胞もしくは組換えウイルス、あるいはキットの使用も、本発明の保護の範囲内である。

【0097】

免疫細胞の培養および／または免疫細胞の増殖の促進のための、上記の多標的キメラ抗原受容体、上記の核酸分子、または上記の組換えベクター、発現カセット、組換え株、細胞もしくは組換えウイルス、あるいはキットの使用は、本発明の範囲であり；

【0098】

免疫細胞の培養および／または免疫細胞の増殖を促進するための製品の調製における、上述の多標的キメラ抗原受容体、上記の核酸分子、または上記の組換えベクター、発現カセット、組換え株、細胞もしくは組換えウイルス、あるいはキットの使用も、本発明の範囲内である。

【0099】

イムノアッセイのための、上記に記載の多標的キメラ抗原受容体、上記の核酸分子、または上記の組換えベクター、発現カセット、組換え株、細胞もしくは組換えウイルス、あるいはキットの使用も、本発明の保護の範囲内であり；

【0100】

あるいは、本発明において、免疫検出キットを作成するための、多標的キメラ抗原受容体、核酸分子、または組換えベクターおよび発現カセット、組換えバクテリア、細胞もしくは組換えウイルス、あるいはキットの使用も、本発明の保護範囲であり；

【0101】

あるいは、腫瘍の診断のための、多標的キメラ抗原受容体、核酸分子、または組換えベクターおよび発現カセット、組換えバクテリア、細胞もしくは組換えウイルス、あるいはキットの使用も、本発明の保護の範囲内であり；

【0102】

10

20

30

40

50

腫瘍の処置または診断のための製品の調製における、多標的キメラ抗原受容体、核酸分子、または組換えベクター、発現カセットおよび組換えバクテリア、組換え細胞もしくは組換えウイルス、あるいはキットの使用も、本発明の保護範囲であり；

【0103】

腫瘍細胞の阻害または死滅における、多標的キメラ抗原受容体、核酸分子、または組換えベクター、発現カセットおよび組換えバクテリア、組換え細胞もしくは組換えウイルス、あるいはキットの使用も、本発明の保護範囲であり；

【0104】

腫瘍細胞を阻害または死滅させるための製品の調製における、多標的キメラ抗原受容体、核酸分子、または組換えベクター、発現カセットおよび組換えバクテリア、組換え細胞もしくは組換えウイルス、あるいはキットの使用も、本発明の保護範囲であり；

10

【0105】

抗原を発現する標的細胞の阻害または死滅における、多標的キメラ抗原受容体、核酸分子、または組換えベクター、発現カセットおよび組換えバクテリア、組換え細胞もしくは組換えウイルス、あるいはキットの使用も、本発明の保護範囲であり；

【0106】

抗原を有する標的細胞を阻害または死滅させるための標的細胞製品の調製における、多標的キメラ抗原受容体、核酸分子、または組換えベクター、発現カセットおよび組換えバクテリア、トランスジェニック細胞もしくは組換えウイルス、あるいはキットの使用も、本発明の保護範囲である。

20

【0107】

免疫療法が、免疫細胞によって腫瘍細胞を阻害または死滅させるために使用されるか；

【0108】

あるいは、免疫細胞が、T細胞またはNK細胞などであるか；

【0109】

あるいは、抗原が、がん関連抗原であるか；

【0110】

あるいは、抗原が、脳がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、結腸直腸がん、肝臓がんおよび腎臓がん、リンパ腫、白血病、肺がん、メラノーマ、転移性メラノーマ、中皮腫および神経芽細胞腫、卵巣がん、前立腺がん、膵臓がん、腎臓がん、皮膚がん、胸腺腫および肉腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、子宮がん、またはこれらの任意の組合せの関連抗原であるか；

30

【0111】

あるいは、腫瘍が、以下：脳がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、結腸直腸がん、肝臓がんおよび腎臓がん、リンパ腫、白血病、肺がん、メラノーマ、転移性メラノーマ、中皮腫および神経芽細胞腫、卵巣がん、前立腺がん、膵臓がん、腎臓がん、皮膚がん、胸腺腫および肉腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、ならびに子宮がん、または上記の組合せのいずれか1つであるか；

【0112】

あるいは、標的細胞が、原核細胞、酵母細胞または哺乳動物細胞であるか；

40

【0113】

あるいは、哺乳動物細胞が、特に、ヒト細胞であるか；

【0114】

あるいは、ヒト細胞が、免疫細胞であるか；

【0115】

あるいは、免疫細胞が、特に、T細胞またはNK細胞である。

【0116】

抗原を発現する標的細胞中の抗原は、多標的キメラ抗原受容体によって結合され得る抗原である。

【0117】

50

本発明における I L 1 5 R a s u s h i は、I L 1 5 受容体のアルファ鎖の s u s h i 断片、略して I L 1 5 R a s u s h i であり、I L 1 5 と結合する能力を有する。

【0118】

本発明において、I L 4 R a - N - F N 3 は、I L 4 と結合する機能を有する、I L 4 受容体のアルファ鎖由来の断片である。

【0119】

本発明の主ペプチド鎖の抗原結合ドメイン（A）および補助ペプチド鎖連結ドメイン（E）は、抗原と結合する機能を有する。抗原結合ドメインによって結合される抗原は、免疫応答、特に、T細胞介在免疫応答を引き起こす腫瘍細胞によって産生されるタンパク質である。本発明の抗原結合ドメインの選択は、処置される疾患の具体的な種類に依存する。腫瘍抗原は、本分野において周知である。

10

【0120】

一実施形態では、本明細書で言及される腫瘍抗原としては、例えば、神経膠腫関連抗原、がん胚抗原（CEA）、ベーターヒト絨毛性ゴナドトロピンおよびアルファ胎児性タンパク質（AFP）、レクチン反応性AFP、サイログロブリン、RAGE-1、MNC A / I X、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、RU1、RU2（AS）、エンテロカルボキシルエステラーゼ、mut h s p 7 0 - 2、M-CSF、前立腺酵素、前立腺特異抗原（PSA）、PAP、NY-ESO-1、LAGE-1 a、p53、プロステイン、PSMA、Her2/neu、サバイビン、テロメラーゼ、前立腺がん腫瘍抗原-1（PCTA-1）、MAGE、ELF2M、中性白血球エラスターゼ、エフリンB2、CD22、インスリン成長因子（IGF）-I、IGF-II、IGF-I受容体およびメソテリンが挙げられる。

20

【0121】

一実施形態では、腫瘍抗原は、悪性腫瘍と関連する1つまたは複数の抗原がんエピトープを含む。悪性腫瘍は、免疫攻撃のための標的抗原として使用することができる多くのタンパク質を発現する。これらの分子としては、限定されるものではないが、メラノーマにおけるMART-1、チロシナーゼおよびGP100、ならびに前立腺がんにおける前立腺酸性ホスファターゼ（PAP）および前立腺特異抗原（PSA）などの組織特異抗原が挙げられる。他の標的分子は、がん遺伝子であるHER-2/Neu/ErB-2などの形質転換関連分子の群に属する。他の群の標的抗原は、癌胎児性抗原（CEA）などの胎児性のがん抗原である。B細胞リンパ腫では、腫瘍特異的な個体の遺伝子型の免疫グロブリンは、個体の腫瘍に固有の、真の腫瘍特異免疫グロブリン抗原を形成する。CD19、CD20およびCD37などのB細胞分化抗原は、B細胞リンパ腫における標的抗原の他の候補である。これらの抗原（CEA、HER-2、CD19、CD20、個体の遺伝子型）の一部は、モノクローナル抗体を使用する受動的療法のための標的として成功裏に使用されている。

30

【0122】

一実施形態では、本発明において言及される腫瘍抗原はまた、腫瘍特異抗原（TSA）または腫瘍関連抗原（TAA）であり得る。TSAは、腫瘍細胞に対して固有であり、身体の他の細胞において生じない。対照的に、TAA関連抗原は、腫瘍細胞に対して固有ではなく、抗原の免疫寛容状態が誘導され得ない条件下で正常細胞において発現することもできる。腫瘍における抗原の発現は、免疫系が抗原に応答することができる疾患の状態下で生じ得る。TAAは、免疫系が未成熟で応答できない場合に、胚発生の中に現れ、正常細胞において発現する抗原であり得るか、またはこれらは、腫瘍細胞においてより高いレベルで発現する一方で、正常細胞において極めて低いレベルで正常に存在する抗原であり得る。

40

【0123】

TSAまたはTAA抗原の例としては、限定されるものではないが、以下のものが挙げられる：分化抗原、例えば、MART-1/MelanA（MART-1）、gp100（Pmel 17）、チロシナーゼ、TRP-1、TRP-2；腫瘍特異多系統抗原、例

50

えば、MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15；過剰発現した胚抗原、例えば、CEA；過剰発現した発がん性遺伝子および変異した腫瘍抑制遺伝子、例えば、p53、Ras、HER-2/neu；染色体転座によって発生した固有の腫瘍抗原、例えば、BCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR；ならびにウイルス抗原、例えば、エプスタインバーウイルス抗原EBVAおよびヒトパピローマウイルス（HPV）抗原E6およびE7。他のタンパク質抗原は、TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、RAGE、NY-ESO、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、PSA、TAG-72、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、Numa、K-ras、ベータカテニン、CDK4、Mum-1、p15、p16、43-9F、5T4、791Tgp72、アルファ胎児性タンパク質、ベータHCG、BCA225、BTAA、CA 125、CA 15-3/CA、27.29/BCAA、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、CD68/P1、CO-029、FGF-5、G250、Ga733/EpCAM、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB/70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90\Mac-2結合タンパク質\輪状親和性タンパク質C関連タンパク質、TAAL6、TAG72、TPSおよびTLPを含む。

【0124】

一実施形態では、本明細書において言及される腫瘍抗原は、MHCと前記抗原ペプチド断片の複合体であり得、限定されるものではないが、HLA-GP100複合体、HLA-Mart-1複合体およびHLA-WT1複合体などが挙げられる。

【0125】

一実施形態では、前記主ペプチド鎖中の抗原結合ドメイン（A）または補助ペプチド鎖中の抗原結合ドメイン（E）は、抗原、リガンド、受容体、抗原結合能を有するポリペプチドまたはこれらの任意の組合せと組み合わせることができる抗体である。

【0126】

抗体は、完全ペプチド鎖、もしくはIg、FabおよびscFvのペプチド断片、またはこれらの任意の組合せであり得る。リガンドまたは受容体は、完全ペプチド鎖、ペプチド断片、またはこれらの任意の組合せであり得る。

【0127】

補助ペプチド鎖連結ドメイン（B）および主ペプチド鎖連結ドメイン（F）は、相互結合機能を有するペプチド断片のペアである。相互結合機能を有するペプチド断片は、互いと組み合わせられ得る受容体およびリガンドのペア、または互いと組み合わせられ得る抗体および抗原のペアであり得る。相互に組み合わせられる受容体およびリガンドとしては、限定されるものではないが、IL15およびIL15Rアルファ、IL4およびIL4R、IL2およびIL2Rアルファ、CD16およびIgG Fc、CD32およびIgG Fc、CD64およびIgG Fcが挙げられる。

【0128】

ここで、膜貫通ドメイン（C）は、任意の膜結合タンパク質または膜貫通タンパク質の膜貫通領域に由来し得る。膜貫通ドメインに関して、一部の例では、構造ドメインが、立体障害を低減するために、表面で発現する膜タンパク質の同一または相違する膜貫通領域と結合することを防止することができるように、膜貫通ドメインが選択されてもよく、または改変がアミノ酸置換によって行われる。膜貫通ドメインは、天然供給源または合成供給源に由来し得る。天然供給源において、ドメインは、任意の膜結合タンパク質または膜貫通タンパク質に由来し得る。本発明において特に使用される膜貫通領域は、限定されるものではないが、T細胞受容体のアルファ、ベータまたはゼータ鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154およびICOSを含むものに由来し得る。

【0129】

ここで、細胞内シグナル伝達ドメイン（D）は、シグナル伝達領域を含み、共刺激シグナル伝達領域またはこれらの組合せも含んでいてもよい。細胞内シグナル伝達ドメインは、エフェクター機能のシグナルを伝達し、細胞が特異的な機能を実行するのを導く、タンパク質断片を指す。例えば、T細胞のエフェクター機能は、サイトカイン分泌による細胞の溶解活性または補助的活性であり得る。細胞内シグナル伝達構造ドメイン全体を使用することができるが、多くの例では、鎖全体を使用する必要はない。細胞内シグナル伝達ドメインの切断型は、これが伝達エフェクターの機能シグナルを有する限り、鎖全体に代えて使用することができる。

【0130】

一次細胞血漿シグナル伝達配列は、刺激の様式または阻害の様式で免疫細胞の一次活性化を刺激する。刺激の様式で作用する一次細胞シグナル伝達配列は、免疫受容活性化チロシンモチーフすなわちITAMとして公知のシグナル伝達モチーフを含んでいてもよい。

【0131】

本発明において一次細胞質シグナル伝導を有するITAMの例としては、TCR ζ 、Fc ϵ RI γ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、またはこれらの組合せが挙げられる。好ましくは、本発明によって開示されるCAR構築物の細胞質シグナル伝達分子は、CD3 ζ に由来する。

【0132】

本発明における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を指す。共刺激分子は、抗原に対するが、抗原受容体またはそのリガンドに対してではない、リンパ球の有効な応答によって必要とされる細胞表面分子である。このような分子の例としては、CD27、CD28および4-1BB（CD137）、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1（LFA-1）、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、およびCD83と特異的に結合するリガンドなどが挙げられる。したがって、本発明は、共刺激シグナル分子として4-1BBおよびCD28を主に使用するが、他の共刺激要素も本発明の範囲内である。

【0133】

多標的キメラ抗原受容体の細胞シグナル伝達部分の細胞質シグナル伝達配列は、ランダムまたは特定の配列で、互いと連結され得る。

【0134】

一実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3-ゼータシグナル伝達ドメインを含む。別の実施形態では、細胞内シグナル伝達領域は、CD3-ゼータ、および4-1BBのシグナル断片を含む。別の実施形態では、細胞内シグナル伝達構造は、CD3-ゼータのシグナル部分およびCD28のシグナル伝達構造を含む。

【0135】

短いオリゴペプチドまたはポリペプチドは、多標的キメラ抗原受容体の機能に影響を与え得ないように、多標的キメラ抗原受容体中のモジュールの間を連結するペプチドとして使用することができ、好ましくは、連結するペプチドの長さは、2～10アミノ酸の間であり、連結するペプチドのアミノ酸は、好ましくは、グリシンおよびセリンである。

【図面の簡単な説明】

【0136】

【図1】図1は、多標的キメラ抗原受容体の模式図である。多標的キメラ抗原受容体は、主ペプチド鎖および補助ペプチド鎖からなり、主ペプチド鎖は、抗原結合ドメインA、補助ペプチド鎖連結ドメインB、膜貫通ドメインCおよび細胞内シグナル伝達ドメインDを含み、補助ペプチド鎖は主ペプチド鎖連結ドメインFを含み、これは抗原結合ドメインEを含むこともできる。

【0137】

【図2】図2は、RaceCar-1発現カセットの模式図である。本発明は、プロモーターおよびRaceCar-1をコードする遺伝子で構成されるRaceCar-1発現

10

20

30

40

50

カセットを開示する。

【0138】

【図3-1】図3は、異なるRaceCar発現カセットの模式図である。他のRaceCar発現カセットは、プロモーターおよびRaceCarをコードする遺伝子で構成される。

【図3-2】同上

【0139】

【図4-1】図4は、細胞表面で発現するRaceCarを検証するためのFACS分析である。図中の水平の座標はIL15のレベルを表し、T細胞およびNK92細胞は、影響を受けず、陰性対照として使用され、表面でのIL15の発現は検出されなかった。IL15の異なるレベルの発現は、RaceCarウイルスで感染したT細胞およびNK92細胞の表面で検出することができる。IL15は、RaceCar (RaceCar-8、RaceCar-12およびRaceCar-13を除く)の補助ペプチド鎖中のドメイン分子であるので、IL-15は、これが細胞の表面で発現した主ペプチド鎖のドメインと結合した場合に、細胞の表面でのみ検出ことができ、これは、RaceCarが、T細胞およびNK92細胞の表面で発現することができ、発現したIL15が免疫学的活性を有することを実証した。その一方で、IL15は、RaceCar-12およびRaceCar-13における主ペプチド鎖にあり、直接的に検出することができる。

【図4-2】同上

【0140】

【図5】図5は、ウェスタンブロットによって実証されたRaceCar発現である。RaceCar-1-293T、RaceCar-2-293T、RaceCar-6-293T、RaceCar-7-293TおよびRaceCar-10-293Tの試料を、それぞれ、レーン1~5にロードした。第6レーンは、陰性対照として使用したトランスフェクションなしの293T細胞である。下側のストリップは、ベータアクチン参照である。PD1の特異的ストリップは、レーン1~レーン5において見ることができ、これは、RaceCarがトランスフェクトされた細胞で発現していることを示す。

【0141】

【図6-1】図6は、RaceCar-NK92細胞の実証された死滅能力である。グラフの水平の座標は、エフェクター細胞の標的細胞に対する比であり、垂直の座標は、死滅効率である。RaceCar-1-NK92、RaceCar-2-NK92、RaceCar-3-NK92、RaceCar-4-NK92およびRaceCar-5-NK92はすべて、3m-CD19-luc細胞を死滅させることができ、死滅効率は、NK92の死滅効率よりも高く、これは、CD19およびPD-L1を標的にする多標的キメラ抗原受容体のRaceCar-1がNK92細胞で発現し、生物学的機能を有していることを実証する。これらは、RaceCar-1-NK92に対する抗CD19抗体の添加を伴う実験群の死滅能力を低減する一方で、抗CD19抗体がRaceCar-1の標的細胞への結合を遮断するので、RaceCar-2-NK92の死滅能力は、変化せず、その結果、標的細胞におけるラセマーゼ-1-NK92の死滅能力が阻害され、これは、RaceCar-NK92が3m-CD19-luc細胞の死滅に対する特異性を有することを証明する。

【図6-2】同上

【0142】

【図7】図7は、RaceCar-T細胞およびCar-T細胞の間の標的細胞に対する死滅効率の比較である。グラフの水平の座標は、エフェクター細胞の標的細胞に対する比であり、垂直の座標は、死滅効率である。RaceCar-1-T細胞、RaceCar-4-T細胞、RaceCar-5-T細胞は、k562-cd19-luc細胞を死滅させることができ、これは、RaceCar-1、RaceCar-4およびRaceCar-5が、T細胞において発現し、生物学的機能を有すること、ならびにRaceCar-T細胞の死滅能力が、通常のCar-T細胞の死滅能力よりも高いことを実証する。

【0143】

【図8】図8は、MHC／WT-1複合体を標的にするRaceCar-TおよびRaceCar-NK92の異なる形態の機能確認である。グラフの水平の座標は、エフェクター細胞の種類であり、垂直の座標は、死滅効率である。RaceCar-NK92細胞およびRaceCar-T細胞は両方ともBV173-luc細胞を死滅させることができ、死滅効率は、未感染T細胞またはNK92細胞の死滅効率よりも高く、RaceCar-6、RaceCar-7、RaceCar-8、RaceCar-9、RaceCar-10、RaceCar-11、RaceCar-12、RaceCar-13およびRaceCar-14が、T細胞およびNK92細胞の両方で発現することができ、対応する標的細胞についての死滅を誘導する生物学的機能を有することを実証する。

10

【0144】

【図9】図9は、免疫細胞の増殖を誘導するRaceCarの能力についてのFACS分析である。0日目では、4群の細胞の蛍光シグナルはほぼ同じである。T細胞群は陰性対照群であり、5日目のその蛍光強度は、0日目のものと比較して、基本的に変化していない。5日目の陽性対照としてのT細胞+IL-2群のFACS分析は、図において見られ得、蛍光シグナルが、0日目のものと比較して弱くなり、細胞は異なる蛍光染色を示し、細胞が、分裂および増殖の表現型を示すことを実証する。RaceCar-1-TおよびRaceCar-2-Tの蛍光シグナルの分布は、陽性対照群のものと同様であり、RaceCar-1-TおよびRaceCar-2-Tが、IL2なしでも培養培地中で増殖することができ、RaceCarがT細胞などのような免疫細胞の増殖を促進する能力を有することを示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0145】

以下の実施例において使用される実験方法は、特に記載がなければ、従来の方法である。

【0146】

本発明の実施形態で使用される材料、試薬などは、特に説明がなければ、市販の供給業者から入手することができる。

【実施例】

【0147】

(実施例1 多標的キメラ抗原受容体の構造および発現ベクターの構築)

1. 多標的キメラ抗原受容体(RaceCar)タンパク質を、主ペプチド鎖Xおよび補助ペプチド鎖Yを複合体化することによって得る。

【0148】

主ペプチド鎖(X)は、抗原結合ドメイン(A)、補助ペプチド鎖連結ドメイン(B)および膜貫通ドメイン(C)、ならびに細胞内シグナル伝達ドメイン(D)を含み、補助ペプチド鎖(Y)は、抗原結合ドメイン(E)および主ペプチド鎖連結ドメイン(F)を含む。補助ペプチド鎖連結ドメイン(B)および主ペプチド鎖連結ドメイン(F)は、互いに相補的に結合し、主ペプチド鎖Xおよび補助ペプチド鎖Yが重合して多標的キメラ抗原受容体(RaceCar)を形成することを可能にする。

40

【0149】

CD19およびPD-L1の陽性細胞の両方を標的にする多標的キメラ抗原受容体(RaceCar-1)は、主ペプチド鎖X1および補助ペプチド鎖Y1を重合することによって得られる。

【0150】

RaceCar-1において、抗CD19のScFv(配列1)を、主ペプチド鎖X1の抗原結合ドメイン(A1)として選択し、補助ペプチド鎖連結ドメイン(B)は、IL15R[アルファ]のsushi断片(配列4)を採用し、膜貫通のCD8(配列5)を膜貫通ドメイン(C)として選択し、細胞内シグナル伝達ドメイン(D)を、41BBシグナル伝達ドメイン(配列8)をCD3ゼータシグナル伝達領域(配列6)に連結させる

50

ことによって構築し、補助ペプチド鎖 Y 1 の抗原結合ドメイン (E) は、P D L 1 の受容体である P D 1 の細胞外領域 (配列 2) を採用する。I L 1 5 (配列 3) は、主ペプチド鎖連結ドメイン (F) として使用される。最後に、補助ペプチド鎖 Y 1 (配列 1 0) と連結した主ペプチド鎖 X 1 (配列 9) を作成する。

【0151】

2. 分泌性シグナルペプチド (配列 1 1) を、主ペプチド鎖 X 1 の N 末端の前に挿入し、これを、コード核酸の D N A - X 1 (配列 1 3) として人工的に合成し、同様に、2 A シグナルペプチド (配列 1 2) を、補助ペプチド鎖 Y 1 の N 末端の前に追加し、コード配列を、配列 D N A - X 2 (配列 1 4) として合成する。

【0152】

3. B a m H I および H i n d I I I 部位を、D N A - X 1 の各末端に追加し、B a m H I および H i n d I I I によって切断して、D N A - X 1 の断片を得、同様に、H i n d I I I 部位を、D N A - X 2 配列の 5' 末端に追加し、3' 末端に E c o R I 部位を追加し、H i n d I I I および E c o R I によって切断して、D N A - X 2 の核酸断片を得る。

【0153】

4. 3 で得られた 2 つの核酸断片を、同じ酵素の組合せによって切断されたベクター p F U G W (a d d g e n e、U S A) に挿入し、ライゲーションされた生成物を e s c h e r i c h i a c o l i に形質転換し、個々のコロニーを取り出し、P C R (ポリメラーゼ連鎖反応) 分析を使用してスクリーニングし、最後に、組換えベクターである p F U G W - R a c e C a r - 1 を得る。組換えベクターの p F U G W - R a c e C a r - 1 を、p F U G W ベクターの B a m H I 切断部位および E c o R I 切断部位の間の断片について、R a c e C a r - 1 (コード核酸は、配列 1 3、A A G C T T および配列 1 4 で構成され、配列 1 3 の最後のヌクレオチドは、A A G C T T の最初の塩基に隣接し、配列 1 4 の最初のヌクレオチドは、H i n d I I I のための消化部位である A A G C T T の最後の塩基に隣接する) を発現させるための核酸と置き換える。R a c e C a r 発現カセットを、R a c e C a r - 1 のコード核酸および p F U G W 中のプロモーターによって形成する (図 2)。

【0154】

5. 同じ方法での他の多標的キメラ抗原受容体の設計を表 1 に示す。

【0155】

10

20

30

【表 1】

表 1.多標的キメラ抗原受容体(RaceCar)構造の構造

ドメイン 名称	抗原結合 ドメイン A	補助ペプチ ド鎖連結ド メイン B	膜貫通ド メイン C	細胞内シ グナル伝 達構造ド メイン D	抗原結 合ドメ イン E	主ペプチド 鎖連結ドメ イン F
RaceCar-1	抗 CD19- ScFv	IL15Rasushi	CD8 の膜 貫通ドメ イン	41BB+CD 3ζ	PD1 の 細胞外 領域	IL15
RaceCar-2	抗 MHC/GP10 0-VHH	IL15Rasushi	CD8 の膜 貫通ドメ イン	41BB+CD 3ζ	PD1 の 細胞外 領域	IL15
RaceCar-3	抗 MHC/GP10 0-VHH	IL15Rasushi	CD8 の膜 貫通ドメ イン	41BB+CD 3ζ	抗 MHC /Mart1-V HH	IL15
RaceCar-4	抗 CD19- ScFv	IL15Rasushi	CD8 の膜 貫通ドメ イン	41BB+CD 3ζ	抗 CD20- ScFv	IL15
RaceCar-5	抗 CD19- ScFv	IL15Rasushi	CD8 の膜 貫通ドメ イン	41BB+CD 3ζ	抗 CD22- ScFv	IL15
RaceCar-6	抗 MHC/W T1-VH	IL15Rasushi	CD8 の膜 貫通ドメ イン	41BB+CD 3ζ	PD1 の 細胞外 領域	IL15
RaceCar-7	抗 MHC/WT1- VH	IL15Rasushi	CD8 の膜 貫通ドメ イン	CD28+CD 3ζ	PD1 の 細胞外 領域	IL15
RaceCar-8	抗 MHC/WT1- VH	IL4Rα-N-FN3	CD8 の膜 貫通ドメ イン	41BB+CD 3ζ	PD1 の 細胞外 領域	IL4
RaceCar-9	抗 MHC/WT1- VH	IL15Rasushi	CD28 の 膜貫通ド メイン	41BB+CD 3ζ	PD1 の 細胞外 領域	IL15
RaceCar-10	PD1 の細胞 外領域	IL15Rasushi	CD8 の膜 貫通ドメ イン	41BB+CD 3ζ	抗 MHC/W T1-VH	IL15
RaceCar-11	抗 MHC/WT1- VH	IL15Rasushi	CD8 の膜 貫通ドメ イン	41BB+CD 3ζ	-	IL15
RaceCar-12	抗 MHC/WT1- VH	IL15	CD8 の膜 貫通ドメ イン	41BB+CD 3ζ	-	IL15Rasushi
RaceCar-13	抗 MHC/W T1-VH	IL15	CD8 の膜 貫通ドメ イン	41BB+CD 3ζ	PD1 の 細胞外 領域	IL15Rasushi
RaceCar-14	抗 MHC/W T1-VH	IL15Rasushi	CD8 の膜 貫通ドメ イン	41BB+CD 3ζ	抗 MHC/W T1-VH	IL15

【 0 1 5 6 】

表 1 において、抗 MHC / GP100-VHH のアミノ酸配列を配列 15 に記載し、抗 MHC / Mart1-VH のアミノ酸配列を配列 16 に記載し、抗 CD20-ScFv のアミノ酸配列を配列 17 に記載し、抗 CD22-ScFv のアミノ酸配列を配列 18 に記載し、抗 MHC / WT1-VH のアミノ酸配列を配列 19 に記載し、IL4Rα-N-FN3 アミノ酸配列の配列を配列 20 に示し、IL4 の配列を配列 21 に記載し、

C D 2 8 膜貫通領域の配列を配列 2 2 に記載する。

【0157】

異なる主ペプチド鎖 X の配列は、以下の通り記載する：主ペプチド鎖 X 2（アミノ酸配列は配列 2 3 である）；主ペプチド鎖 X 3（アミノ酸配列は配列 2 4 である）；X 4（アミノ酸配列は配列 2 5 である）；X 5（アミノ酸配列は配列 2 6 である）；X 6（アミノ酸配列は配列 2 7 である）；X 7（アミノ酸配列は配列 2 8 である）；X 8（アミノ酸配列は配列 2 9 である）；ならびに、補助ペプチド鎖 Y 2（アミノ酸配列は配列 3 0 である）；Y 3（アミノ酸配列は配列 3 1 である）；Y 4（アミノ酸配列は配列 3 2 である）；Y 5（アミノ酸配列は配列 3 3 である）；Y 6（アミノ酸配列は I L 1 5 の配列であり、配列 3 に記載する）；Y 7（I L 1 5 R アルファー s u s h i、アミノ酸配列は配列 4 である）；Y 8（アミノ酸配列は配列 3 4 である）；および Y 9（アミノ酸配列は配列 3 9 である）。

10

【0158】

ここで、

【0159】

R a c e C a r - 2 は、主ペプチド鎖 X 2 および補助ペプチド鎖 Y 1 で構成され；

【0160】

R a c e C a r - 3 は、主ペプチド鎖 X 2 および補助ペプチド鎖 Y 2 で構成され；

【0161】

R a c e C a r - 4 は、主ペプチド鎖 X 1 および補助ペプチド鎖 Y 3 で構成され；

20

【0162】

R a c e C a r - 5 は、主ペプチド鎖 X 1 および補助ペプチド鎖 Y 4 で構成され；

【0163】

R a c e C a r - 6 は、主ペプチド鎖 X 3 および補助ペプチド鎖 Y 1 で構成され；

【0164】

R a c e C a r - 7 は、主ペプチド鎖 X 4 および補助ペプチド鎖 Y 1 で構成され；

【0165】

R a c e C a r - 8 は、主ペプチド鎖 X 5 および補助ペプチド鎖 Y 9 によって形成され；

【0166】

R a c e C a r - 9 は、主ペプチド鎖 X 6 および補助ペプチド鎖 Y 1 で構成され；

30

【0167】

R a c e C a r - 1 0 は、主ペプチド鎖 X 7 および補助ペプチド鎖 Y 5 で構成され；

【0168】

R a c e C a r - 1 1 は、主ペプチド鎖 X 3 および補助ペプチド鎖 Y 6 で構成され；

【0169】

R a c e C a r - 1 2 は、主ペプチド鎖 X 8 および補助ペプチド鎖 Y 7 で構成され；

【0170】

R a c e C a r - 1 3 は、主ペプチド鎖 X 8 および補助ペプチド鎖 Y 8 で構成され；

【0171】

R a c e C a r - 1 4 は、主ペプチド鎖 X 3 および補助ペプチド鎖 Y 5 で構成される。

40

【0172】

R a c e C a r 1 と同じく、他の R a c e C a r についての発現ベクターを構築する場合、分泌リーダー配列（配列 1 1）が、他の R a c e C a r の主ペプチド鎖の N 末端配列の前に追加することが必要であり、ここで、2 A シグナルペプチドが、補助ペプチド鎖のアミノ酸配列の前に追加され、特異的なコード核酸配列は以下の通りである。

【0173】

R a c e C a r 2 を発現する核酸配列は、D N A - X 2（配列 4 0）、A A G C T T および D N A - Y 1（配列 1 4）で構成され；

【0174】

50

R a c e C a r 3を発現するための核酸配列は、D N A - X 2（配列 4 0）、A A G C T TおよびD N A - Y 2（配列 4 7）で構成され；

【0175】

R a c e C a r 4を発現する核酸配列は、D N A - X 1（配列 1 3）、A A G C T TおよびD N A - Y 3（配列 4 8）で構成され；

【0176】

R a c e C a r 5を発現する核酸配列は、D N A - X 1（配列 1 3）、A A G C T TおよびD N A - Y 4（配列 4 9）で構成され；

【0177】

R a c e C a r 6を発現する核酸配列は、D N A - X 3（配列 4 1）、A A G C T TおよびD N A - Y 1（配列 1 4）で構成され；

【0178】

R a c e C a r 7を発現するための核酸配列は、D N A - X 4（配列 4 2）、A A G C T TおよびD N A - Y 1（配列 1 4）からなり；

【0179】

R a c e C a r 8を発現するための核酸配列は、D N A - X 5（配列 4 3）、A A G C T TおよびD N A - Y 9（配列 5 0）からなり；

【0180】

R a c e C a r 9を発現する核酸配列は、D N A - X 6（配列 4 4）、A A G C T TおよびD N A - Y 1（配列 1 4）で構成され；

【0181】

R a c e C a r 1 0を発現するための核酸配列は、D N A - X 7（配列 4 5）、A A G C T TおよびD N A - Y 5（配列 5 1）で構成され；

【0182】

R a c e C a r 1 1を発現するための核酸配列は、D N A - X 3（配列 4 1）、A A G C T TおよびD N A - Y 6（配列 5 2）で構成され；

【0183】

R a c e C a r 1 2を発現するための核酸配列は、D N A - X 8（配列 4 6）、A A G C T TおよびD N A - Y 7（配列 5 3）で構成され；

【0184】

R a c e C a r 1 3を発現するための核酸配列は、D N A - X 8（配列 4 6）、A A G C T TおよびD N A - Y 8（配列 5 4）で構成され；

【0185】

R a c e C a r 1 4を発現するための核酸配列は、D N A - X 3（核酸配列 4 1）、A A G C T TおよびD N A - Y 5（配列 5 1）で構成される。

【0186】

他の多標的キメラ抗原受容体を発現するための核酸配列は、同様の方法で得られ、p F U G W - R a c e C a r - 2からp F U G W - R a c e C a r - 1 4の範囲の組換えベクターが構築される。組換えベクターにおいて、他の個々の多標的キメラ抗原受容体R a c e C a rに対する発現カセットが存在する（図3）。

【0187】

p F U G W - R a c e C a r - 2からp F U G W - R a c e C a r - 1 4の範囲の組換えベクターは、p F U G WベクターのB a m H IおよびE c o R I切断部位の間の断片の、それぞれ、R a c e C a r 2からR a c e C a r 1 4を発現するための核酸配列による置き換えに由来する。

【0188】

（実施例2 細胞におけるR a c e C a r発現を確認するためのF A C S分析）

【0189】

1. 実施例4で得られたR a c e C a r - 1 - N K 9 2細胞、R a c e C a r - 2 - N K 9 2細胞、R a c e C a r - 3 - N K 9 2細胞、R a c e C a r - 4 - N K 9 2細胞、

10

20

30

40

50

R a c e C a r - 5 - N K 9 2 細胞、R a c e C a r - 6 - N K 9 2 細胞、R a c e C a r - 7 - N K 9 2 細胞、R a c e C a r - 9 - N K 9 2 細胞、R a c e C a r - 1 0 - N K 9 2 細胞、R a c e C a r - 1 1 - N K 9 2 細胞、R a c e C a r - 1 2 - N K 9 2 細胞、R a c e C a r - 1 3 - N K 9 2 細胞、R a c e C a r - 1 4 - N K 9 2 細胞、R a c e C a r - 1 - T 細胞、R a c e C a r - 2 - T 細胞、R a c e C a r - 3 - T 細胞、R a c e C a r - 4 - T 細胞、R a c e C a r - 5 - T 細胞、R a c e C a r - 6 - T 細胞、R a c e C a r - 7 - T 細胞、R a c e C a r - 9 - T 細胞、R a c e C a r - 1 0 - T 細胞、R a c e C a r - 1 1 - T 細胞、R a c e C a r - 1 2 - T 細胞、R a c e C a r - 1 3 - T 細胞、R a c e C a r - 1 4 - T 細胞を、それぞれ、P B S (リン酸緩衝食塩水) に懸濁させ、細胞の濃度を、 $1 \times 10^6 / \text{ml}$ の範囲になるように制御する。

10

【0190】

2. 1. 5 μl の抗 h I L - 1 5 P E コンジュゲート (R & D、I C 2 4 7 1 P) を、2 0 0 μl の処理細胞に添加し、氷上で 3 0 分間インキュベートする。上清を遠心分離によって除去し、細胞を、等量の P B S (リン酸緩衝食塩水) を添加することによって再懸濁する。

【0191】

3. 細胞表面で発現する R a c e C a r を検証するための F A C S 分析 (図 4)。図中の水平の座標は I L 1 5 のレベルを表し、T 細胞および N K 9 2 細胞は、感染せず、陰性対照として使用され、表面での I L 1 5 の発現は検出されなかった。I L 1 5 の異なるレベルの発現は、R a c e C a r ウイルスで感染した T 細胞および N K 9 2 細胞の表面で検出することができる。I L 1 5 は、R a c e C a r (R a c e C a r - 8、R a c e C a r - 1 2 および R a c e C a r - 1 3 を除く) の補助ペプチド鎖中のドメイン分子であるので、I L - 1 5 は、これが細胞の表面で発現した主ペプチド鎖のドメインと結合した場合に、細胞の表面でのみ検出することができ、これは、R a c e C a r が、T 細胞および N K 9 2 細胞の表面で発現することができ、発現した I L 1 5 が免疫学的活性を有することを実証した。その一方で、I L 1 5 は、R a c e C a r - 1 2 および R a c e C a r - 1 3 における主ペプチド鎖にあり、直接的に検出することができる。

20

【0192】

(実施例 3 ウェスタンブロットによって実証された R a c e C a r の発現)

【0193】

1. 1.2×10^6 の L e n t i - X - 2 9 3 T 細胞 (C l o n e t e c h、6 3 2 1 8 0、本明細書の以下で、略して、2 9 3 T と称する) を 6 ウェルプレートに入れ、3 7 °C の温度および 5 % の C O ₂ で、終夜培養する。

30

【0194】

2. 上記 1 に記載の 2 9 3 T 細胞を、l i p o f e c t a m i n e 3 0 0 0 を使用して、実施例 1 に列挙した p F U G W - R a c e C a r - 1、p F U G W - R a c e C a r - 2、p F U G W - R a c e C a r - 6、p F U G W - R a c e C a r - 7 および p F U G W - R a c e C a r - 1 0 のベクターで、それぞれトランスフェクトし、R a c e C a r - 1 - 2 9 3 T、R a c e C a r - 2 - 2 9 3 T、R a c e C a r - 6 - 2 9 3 T、R a c e C a r - 7 - 2 9 3 T および R a c e C a r - 1 0 - 2 9 3 T と名付け、3 7 °C の温度で、5 % の C O ₂ で 4 8 時間培養する。

40

【0195】

3. 5×10^6 の R a c e C a r - 1 - 2 9 3 T、R a c e C a r - 2 - 2 9 3 T、R a c e C a r - 6 - 2 9 3 T、R a c e C a r - 7 - 2 9 3 T および R a c e C a r - 1 0 - 2 9 3 T を取り、1 5 0 0 R で 1 0 分間遠心分離し、上清を廃棄した。

【0196】

4. 2 0 0 μl の細胞溶解液 (B e y o t i m e、S h a n g h a i、P 0 0 1 3 B) をそれぞれの細胞に添加し、氷上で 3 0 分間インキュベートした。細胞を 8 0 0 0 g で 5 分間遠心分離した。それぞれの試料について 2 0 μl の上清を 5 倍のタンパク質電気泳動緩衝液と混合し、9 5 °C で 5 分間インキュベーションして、電気泳動試料として使用した

50

。

【0197】

5. SDS-PAGE電気泳動を行い、ゲルを、100V、200mAで1時間、膜に移した。

【0198】

6. タンパク質を移したPVDF（ポリフッ化ビニリデン）膜を、5%のPBSのスキムミルクで終夜ブロッキングした。膜を、シェーカーでPBSTを用いて各回15分間で、3回洗浄した。

【0199】

7. 移したタンパク質を有するPVDFを、1%のスキムミルクのPBS溶液に溶解した0.1%の抗PD1抗体（R&D MAB1086-100）とともに、振とう条件で1時間、インキュベートした。膜を、PBSTを用いて、3回、それぞれ15分間洗浄した。

10

【0200】

8. 洗浄した膜を、1%のスキムミルクのPBS溶液に溶解した0.1%のHRPコンジュゲート抗マウスIgG（H+L）抗体（Beyotime、Shanghai、A0216）とともに、振とう条件で1時間、インキュベートした。膜を、PBSTを用いて、3回、それぞれ15分間洗浄した。

【0201】

9. 膜をW-TMBキット（Sangon Biotech、Shanghai、C510025-0005）で可視化し、結果を図5に示す。第1～第5レーンの試料は、それぞれ、RaceCar-1-293T、RaceCar-2-293T、RaceCar-6-293T、RaceCar-7-293TおよびRaceCar-10-293Tに属し、トランスフェクションなしの陰性対照の293T細胞は第6レーンに位置する。下部の染色ラインは、ベーターアクチン参照である。図5に示されるように、PD1染色としての特異的なラインをレーン1～レーン5で見ることができ、RaceCarがトランスフェクトされた細胞の表面で十分に発現していたことを実証する。

20

【0202】

（実施例4 pFUGW-RaceCarを有するレンチウイルスのパッケージングおよび細胞感染）

30

【0203】

1. 例としてRaceCar-1を挙げ、293T細胞を、トランスフェクションのために70～80%の密度まで終夜培養した。ウイルス殻タンパク質を提供するpCMV-VSV-g、pCMV-デルタR8.91（pCMV-VSV-GおよびpCMV-デルタR8.91はAddgeneの製品であった）を、実施例1で調製したpFUGW-RaceCar-1と、pCMV-VSV-g：pCMV-デルタR8.91：pFUGW-RaceCar-1=1：3：4の比に従って混合して、40μgの共トランスフェクションプラスミドを得た。

【0204】

2. チューブ1と印をつけた15mlの遠心分離チューブに、上記1に記載の共トランスフェクションプラスミドを添加し、無血清DMEMを1.5mlまで添加し、チューブ2と印をつけた別の15mlの遠心分離チューブに、120μlのPEI溶液（Sigma、GF70215825、1mg/ml）を添加し、無血清DMEM（DMEM）を1.5mlまで添加した。チューブ1およびチューブ2の両方の試薬を、それぞれ、適切に混合した。次いで、チューブ1をボルテックスし、チューブ2中のPEIをチューブ1に1滴ずつ添加して、プラスミド-PEI混合物溶液を得て、溶液を、30分間室温に保ち、混合物を、細胞を懸濁させていないトランスフェクション用の293T培養物に添加した。トランスフェクトされた細胞を、37℃/CO₂インキュベーター中で24時間培養した。次いで、細胞の培養培地を廃棄し、20mlの新たな10%FBS-DMEMを補充した。最後に、酪酸ナトリウムを、酪酸ナトリウムの最終濃度が10mMまで、添加し

40

50

た。細胞を、5% CO₂ のインキュベーター中、37℃で48時間さらに培養した。

【0205】

3. 細胞培養上清を4000g/分で15分間遠心分離することによって収集し、上清を0.45ミクロンのフィルターを通して濾過して、 1×10^6 TU/mlのウイルス溶液を得た。元のウイルス溶液に、1/3容積の40%PEG溶液(g/g)を添加し、混合後、4℃の温度で終夜静置する。翌日、ウイルスの沈殿物を1800g、4℃で45分間遠心分離し、上清を廃棄した。ウイルス沈殿物を元の容積の1/10の培養培地(T細胞についてX-VIVO15、NK92細胞についてMEM-Alpha)で再懸濁して、10倍濃縮のウイルス懸濁物を得た。

【0206】

4. 3×10^5 のNK92細胞(ATCC、CRL-2407)および 1×10^6 のT細胞(健康な血液ドナーからのT細胞、勾配遠心分離によって分離、OKT3を使用することによって刺激および培養)を、それぞれ、 1×10^7 のウイルス粒子で感染させ、8μg/mlのポリブレン(Sigma、H9268-5G)を添加した。感染細胞を24ウェルプレートの1つのウェルに移し、1500R、32℃で45分間遠心分離した。プレートを、37℃、5%のCO₂で3時間インキュベートし、培地を、100U/mlのIL-2(T細胞のために、100ng/mlのOKT3が必要であった)を含有する培地で交換し、プレートを上記と同じ条件でインキュベートして、以下の実験のためのRaceCar-1-NK92およびRaceCar-1-Tを得た。

【0207】

5. 上記の記載の方法と同じく、pFUGW-RaceCar-1ベクターのみを、pFUGW-RaceCar-2からpFUGW-RaceCar-14のうちの1つとそれぞれ置き換えて、対応する、RaceCar-2-NK92細胞、RaceCar-3-NK92細胞、RaceCar-4-NK92細胞、RaceCar-5-NK92細胞、RaceCar-6-NK92細胞、RaceCar-7-NK92細胞、RaceCar-8-NK92細胞、RaceCar-9-NK92細胞、RaceCar-10-NK92細胞、RaceCar-11-NK92細胞、RaceCar-12-NK92細胞、RaceCar-13-NK92細胞、RaceCar-14-NK92細胞、ならびにRaceCar-2-T細胞、RaceCar-3-T細胞、RaceCar-4-T細胞、RaceCar-5-T細胞、RaceCar-6-T細胞、RaceCar-7-T細胞、RaceCar-8-T細胞、RaceCar-9-T細胞、RaceCar-10-T細胞、RaceCar-11-T細胞、RaceCar-12-T細胞、RaceCar-13-T細胞およびRaceCar-14-T細胞を得た。

【0208】

(実施例5 NK92におけるRaceCarの発現およびRaceCar-NK92の標的化死滅の確認)

【0209】

1. 標的細胞の3m-CD19-lucを、CD19(配列36)およびルシフェラーゼ(配列37)の導入遺伝子をMalme-3M細胞(ATCC、HTB-64)のゲノムに組み込むことによって調製した。実験群を以下の通り分けた: 1、実施例4を使用することによって調製した、エフェクター細胞として働くRaceCar-1-NK92; 2、実施例4を使用することによって調製した、エフェクター細胞として働くRaceCar-2-NK92; 3、実施例4を使用することによって調製した、エフェクター細胞として働くRaceCar-3-NK92; 4、実施例4を使用することによって調製した、エフェクター細胞として働くRaceCar-4-NK92; 5、実施例4を使用することによって調製した、エフェクター細胞として使用されるRaceCar-5-NK92; 6、エフェクター細胞として使用されるNK92; 7、エフェクター細胞として使用されるRaceCar-1-NK92; 8、エフェクター細胞としてのRaceCar-2-NK92。抗CD19抗体(ビオチン標識化マウス抗ヒトCD19抗体、Beijing biodragon immunetechnologies、Beijing、

10

20

30

40

50

B D L S - 1 9 6 8 - 1 0 0) を群 7 および 8 に添加した後に、細胞毒性アッセイを行った。標的細胞のみを陰性対照群として使用した。

【0210】

2. エフェクター細胞を、96 ウェルプレート中で、100 μ l 中の 1×10^4 標的細胞と、10 : 1、5 : 1、1 : 1 の比で混合し、37 $^{\circ}$ C で、5 % の CO_2 インキュベーター中、24 時間インキュベートした。50 μ l の 1 % の T r i t o n 溶解物と 1 μ l の基質 (3 : 1 の容積比での 300 μ g / mL の L u c 溶液および 2 mg / mL の A T P 溶液の混合物) をそれぞれのウェルに添加し、細胞を 5 分間溶解し、ルシフェラーゼの蛍光強度を検出した。死滅効率を以下の通り計算した。死滅効率 = { (陰性対照の蛍光値 - 実験群の蛍光値) / 陰性対照の蛍光値 } $\times$ 100 %。

10

【0211】

3. 結果を図 6 に示す。R a c e C a r - 1 - N K 9 2、R a c e C a r - 2 - N K 9 2、R a c e C a r - 3 - N K 9 2、R a c e C a r - 4 - N K 9 2 および R a c e C a r - 5 - N K 9 2 は、N K 9 2 よりも効率的に 3 m - C D 1 9 - l u c 細胞を死滅させることができ、これは、C D 1 9 および P D - L 1 を標的にする多標的キメラ抗原受容体の R a c e C a r - 1 が N K 9 2 細胞で発現し、生物学的機能を有していることを実証した。C D 1 9 抗体を添加した実験群では、標的細胞に対する抗 C D 1 9 抗体がエフェクター細胞における C A R の標的細胞への結合を遮断し、それによって死滅を阻害するので、R a c e C a r - 1 - N K 9 2 の死滅能力が減少した一方、R a c e C a r - 2 - N K 9 2 の死滅能力はほとんど変化しなかった。標的細胞に対する R a c e C a r - 1 - N K 9 2 の死滅能力は、R a c e C a r - N K 9 2 が 3 m - C D 1 9 - l u c 細胞の死滅に対して特異的であることを実証した。

20

【0212】

(実施例 6 T 細胞における R a c e C a r の発現および R a c e C a r - T および C a r - T の間の標的化死滅の比較)

【0213】

1. k 5 6 2 - c d 1 9 - l u c 細胞株を、C D 1 9 抗原およびルシフェラーゼを発現させるために、C D 1 9 抗原をコードする核酸配列 (配列 36) およびルシフェラーゼをコードする核酸配列 (配列 37) を k 5 6 2 細胞株 (A T C C) のゲノムに組み込むことによって得て、標的細胞として使用した。使用したエフェクター細胞は、実施例 4 で得られた R a c e C a r - 1 - T、R a c e C a r - 4 - T および R a c e C a r - 5 - T であり、使用した対照のエフェクター細胞は、従来の抗 C D 1 9 S c F v - C D 8 T M - 4 1 B B - C D 3 ζ キメラ抗原受容体を発現するように上記に従って T 細胞へのウイルストランスフェクションによって得られた C a r - T 細胞 (抗 C D 1 9 S c F v - C D 8 T M - 4 1 B B - C D 3 ζ キメラ抗原受容体、配列 38) であり、エフェクター細胞の添加なしの標的細胞のみを細胞死滅実験のための陰性対照として使用した。

30

【0214】

2. k 5 6 2 - c d 1 9 - l u c 細胞を、 1×10^4 細胞 / ウェルで蒔き、エフェクター細胞を、エフェクター細胞の標的細胞に対する比が、それぞれ、5 : 1、10 : 1 および 20 : 1 で添加した。24 時間後、50 μ l の 1 % の T r i t o n 溶解物と 1 μ l の基質 (3 : 1 の容積比での 300 μ g / mL の L u c 水溶液および 2 mg / mL の A T P 水溶液の混合物) を細胞に添加し、5 分間溶解した。ルシフェラーゼのルミネセンスを、マイクロプレートリーダーによって検出して、死滅を計算した。効率 = { (陰性対照の蛍光値 - 実験群の蛍光値) / 陰性対照の蛍光値 } $\times$ 100 %。

40

【0215】

結果を図 7 に示す。図において、横軸は、エフェクター細胞の標的細胞に対する比であり、縦軸は死滅効率である。R a c e C a r - 1 - T 細胞、R a c e C a r - 4 - T 細胞および R a c e C a r - 5 - T 細胞は、k 5 6 2 - c d 1 9 - l u c 細胞を死滅させることができることが分かり、これは、R a c e C a r - 1、R a c e C a r - 4 - T および R a c e C a r - 5 - T が、T 細胞において発現し、生物学的機能を有すること、ならび

50

に Race Car-T細胞の死滅能力が、通常の Car-T細胞の死滅能力よりも高いことを実証する。

【0216】

(実施例7 MHC/WT1を標的とする異なる種類の Race Car-T細胞および Race Car-NK92細胞の細胞死滅)

【0217】

1. BV173-luc細胞株を、ルシフェラーゼ(配列番号37)をコードする核酸配列を、GP100/MHC分子複合体を表面で発現し、かつ標的細胞としてのBV173細胞株(DSMZ、ACC20)のゲノムに組み込むことによって得た。使用したエフェクター細胞株は、実施例4で得られた Race Car-6-NK92、Race Car-7-NK92、Race Car-8-NK92、Race Car-9-NK92、Race Car-10-NK92、Race Car-11-NK92および Race Car-12-NK92であった。Race Car-13-NK92、Race Car-14-NK92および Race Car-6-T、Race Car-7-T、Race Car-8-T、Race Car-9-T、Race Car-10-T、Race Car-11-T、Race Car-12-T、Race Car-13-T、Race Car-14-T、対照のエフェクター細胞は、未感染のNK92細胞またはT細胞であり、細胞死滅実験を、陰性対照としてエフェクター細胞の添加なしで行った。

10

【0218】

2. BV173-luc細胞を、 1×10^4 細胞/ウェルで蒔き、エフェクター細胞を、5:1の比で標的細胞に添加した。24時間後、50 μ lの1%のTriton溶解物と1 μ lの基質(300 μ g/mLのルシフェリン溶液および2mg/mLのATPを3:1の容積比で混合した)を細胞に添加し、5分間溶解した。ルシフェラーゼのルミネセンスを、マイクロプレートリーダーによって検出した。死滅効率 = {(陰性対照の蛍光値 - 実験群の蛍光値) / 陰性対照の蛍光値} $\times 100\%$ 。

20

【0219】

結果を図8に示す。図において、横軸は、異なるエフェクター細胞であり、縦軸は死滅効率である。Race Car-NK92細胞および Race Car-T細胞は両方ともBV173-luc細胞を死滅させることができ、効率は、未感染T細胞またはNK92細胞による効率よりも高いことが分かり、これは、Race Car-6、Race Car-7、Race Car-8、Race Car-9、Race Car-10、Race Car-11、Race Car-12、Race Car-13および Race Car-14が、NK92細胞またはT細胞において発現することができ、標的細胞を死滅させるために、エフェクター細胞を媒介する生物学的機能を有することを実証する。

30

【0220】

(実施例8 免疫細胞の増殖に対する Race Carの効果)

【0221】

1. 実施例4で得られた 1×10^6 の Race Car-1-T細胞および Race Car-2-T細胞を2.5mLのX-VIVO培地に置き、 1×10^6 のT細胞を2.5mLのX-VIVO培地に陰性対照として置いた。別の 1×10^6 のT細胞を、最終濃度100U/mLのIL-2を補充した2.5mLのX-VIVO培地に陽性対照として置いた。4群の細胞を37 $^{\circ}$ C、5%CO₂でインキュベートした。

40

【0222】

2. 作業用溶液を、CSFE染料をDMSOに5 μ mol/L溶液として溶解することによって調製した。培養の開始および培養の5日目に、 1×10^4 細胞を4群の細胞から取り出し、CSFE染料を、CSFE作業用溶液:培地の容積比が1:2000の比に従って、各群の細胞に添加し、37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした。

【0223】

3. 上清を、1000gで5分間の遠心分離によって廃棄し、細胞を、等容量のX-VIVO培地を使用して再懸濁させた。この手順を2回繰り返した。

50

【0224】

4. CSFEで染色された細胞は、緑色の蛍光を有し、緑色の蛍光の強度は細胞の分裂につれて減少する。異なる世代の細胞は異なる蛍光シグナルを示す。FACSスペクトルを使用して、細胞の蛍光を分析した。図9において、0日目では、4群の細胞の蛍光シグナルは基本的に同じであることが分かった。T細胞群は陰性対照群であった。5日目のフロー検出の蛍光強度は、0日目の蛍光強度と比較して、基本的に変化していなかった。T細胞+IL2は陽性対照群であり、細胞は、5日目と0日目の間で異なる蛍光シグナルを示し、これにより、培養の5日の間に細胞が増殖したことを確認した。図に示されるように、RaceCar-1-TおよびRaceCar-2-Tの蛍光シグナルの分布は、5日目に、IL-2を有する陽性対照群のものと同様であり、RaceCar-1-TおよびRaceCar-2-TがIL2なしの培地中で正常に増殖することができることも実証する。全体の結果は、RaceCarがT細胞などの免疫細胞の増殖を促進する能力を有することを証明する。

【産業上の利用可能性】

【0225】

本発明の実験は、本発明の多標的キメラ抗原受容体が、その2つの抗原結合ドメインによって異なる抗原と結合することができ、特異的な細胞の死滅を媒介することができ、治療標的化の精度を改善することもでき、単一の標的の発現のダウンレギュレーションによって引き起こされる疾患の再発を回避することができることを証明し；本発明の多標的キメラ抗原受容体は、その2つの抗原結合ドメインによって異なる抗原と結合することができ、免疫抑制シグナルを遮断することができ、抗原結合ドメインの1つが免疫チェックポイントタンパク質と関連する抗原と結合する場合、腫瘍を死滅する能力を改善することができる。本発明の多標的キメラ抗原受容体は、サイトカインおよびサイトカイン受容体の複合体を導入し、これは、サイトカインの機能を生じさせることができ、例えば、IL-15およびIL15R α -sushiの複合体の導入は、T細胞およびNK細胞の増殖を刺激し、これらをサイトカイン依存性活性化から免除する。

10

20

【図 1】

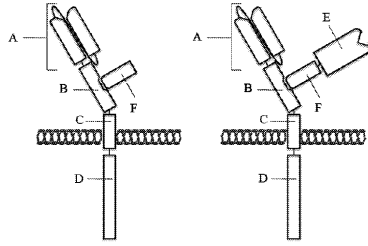


図 1

【図 2】



図 2

【図 3-1】

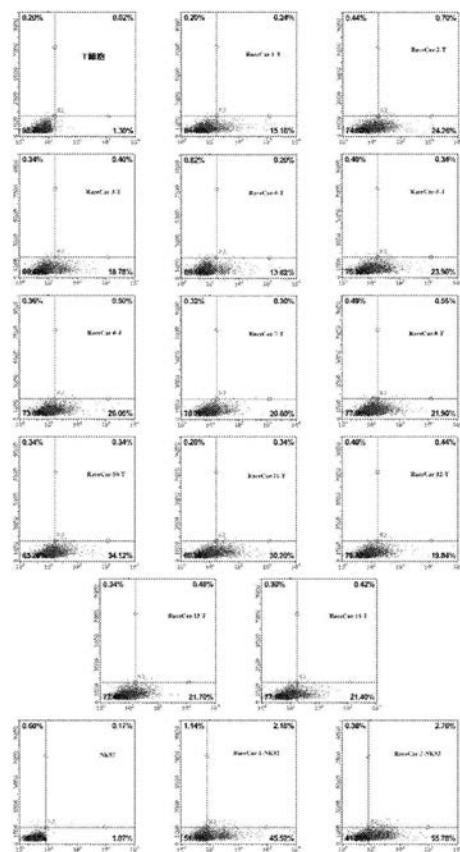


【図 3-2】



図 3

【図 4-1】



【図 4-2】

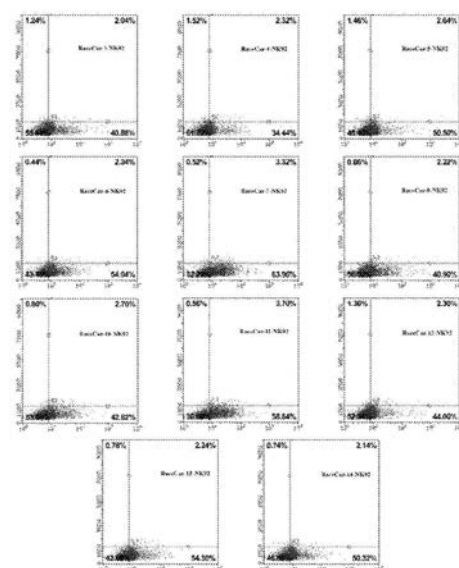


図 4

【図 5】

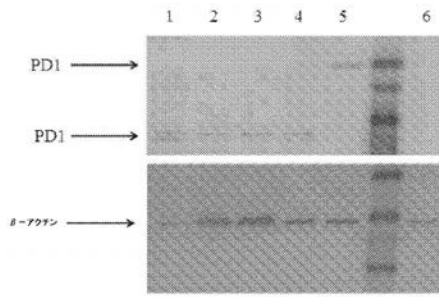
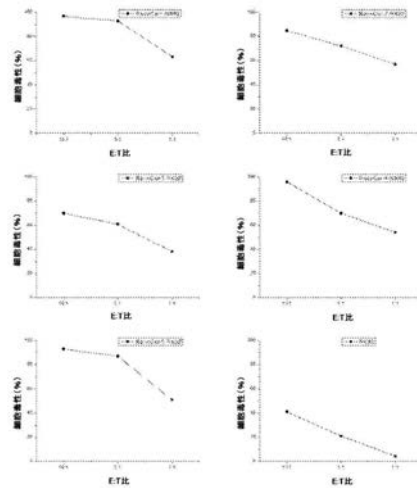


図 5

【図 6 - 1】



【図 6 - 2】

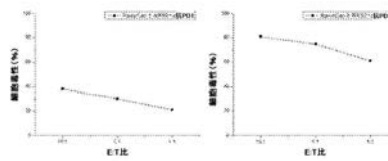


図 6

【図 7】

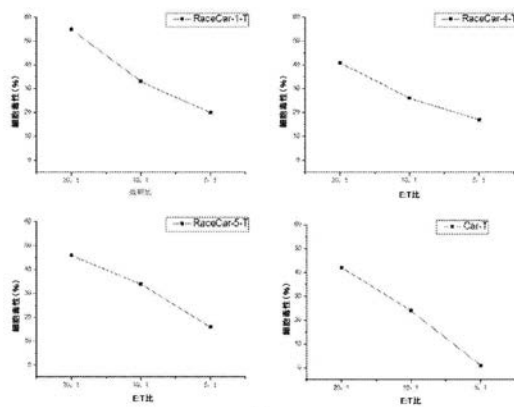


図 7

【図 9】

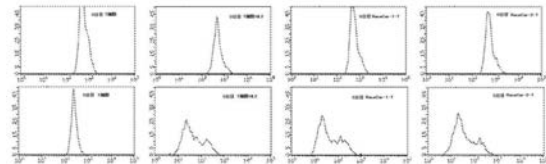


図 9

【図 8】

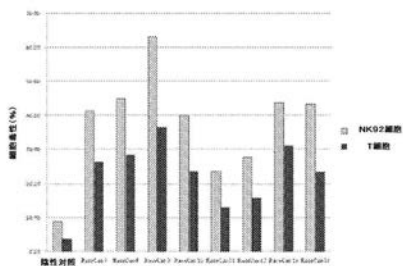


図 8

【配列表】

2020515282000001.app

【国际调查报告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2017/118980		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
C07K 19/00 (2006.01) i; C12N 15/62 (2006.01) i; C12N 15/63 (2006.01) i; C12N 5/10 (2006.01) i; G01N 33/68 (2006.01) i; A61K 35/17 (2015.01) 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; A61K; A61P; G01N				
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) CPRSABS, SIPOABS, CNTXT, CNKI and keywords: 嵌合抗原受体, CAR, 双特异性, 多特异性, 双链, 多链, 细胞因子, 衔接体, 等 DWPI, WOTXT, EPTXT, USTXT, ISI_Web of Science and keywords: chimeric antigen receptor, CAR, bispecific, multi-specific, double-chain, multi-chain, engager, 等 Genbank; EMBL; National Bio-sequence Database of Chinese Patent and retrieved sequence: sequences 3, 4, 9, 10 and 23-34				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
A	WO 2013123061 A1 (SEATTLE CHILDREN S HOSPITAL DBA SEATTLE CHILDREN S RES INST), 22 August 2013 (22.08.2013), entire document	1-27		
A	WO 2016120216 A1 (CELLECTIS et al.), 04 August 2016 (04.08.2016), entire document	1-27		
A	GRADA, Z. et al., "TanCAR: A Novel Bispecific Chimeric Antigen Receptor for Cancer Immunotherapy.", Molecular Therapy-Nucleic Acids, 2(e105), 09 July 2013 (09.07.2013), entire document	1-27		
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.				
<table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> * 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 </td> <td style="vertical-align: top;"> "T" 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 </td> </tr> </table>			* 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	"T" 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
* 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	"T" 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 16 March 2018		Date of mailing of the international search report 02 April 2018		
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451		Authorized officer YANG, Zhenyu Telephone No. (86-10) 62089435		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/118980

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 21-22, 24-27
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] PCT Rule 39.1(iv)—a surgical method or a treatment method, and a diagnostic method for the treatment of a human body or animal body.
[2] The international search will be directed to the other subject matter in said claims, namely, the application in the preparation of a corresponding product.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/118980

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2013123061 A1	22 August 2013	US 9447194 B2	20 September 2016
		US 2015038684 A1	05 February 2015
		AU 2013221672 B2	09 November 2017
		HK 1205144 A1	11 December 2015
		JP 2015513394	14 May 2015
		EP 2814846 A4	04 November 2015
		AU 2013221672 A1	07 August 2014
		CA 2861491 A1	22 August 2013
		EP 2814846 A1	24 December 2014
		AU 2017264982 A1	07 December 2017
		US 2017107285 A1	20 April 2017
		CN 107438618	05 December 2017
		WO 2016120217 A1	04 August 2016
		WO 2016120220 A1	04 August 2016
WO 2016120216 A1	04 August 2016	CA 2973532 A1	04 August 2016
		WO 2016120218 A1	04 August 2016
		US 2018002435 A1	04 January 2018
		CA 2973529 A1	04 August 2016
		US 2018000914 A1	04 January 2018
		US 2018009895 A1	11 January 2018
		WO 2016120219 A1	04 August 2016
		AU 2016212159 A1	13 July 2017
		KR 20170134331	06 December 2017
		AU 2016212162 A1	13 July 2017
		CN 107406516	28 November 2017
		AU 2016212158 A1	13 July 2017
		AU 2016212161 A1	13 July 2017
		EP 3250607 A1	06 December 2017
		MX 2017009181	22 November 2017
		AU 2016212160 A1	13 July 2017
		CA 2973525 A1	04 August 2016
		CA 2973642 A1	04 August 2016
		EP 3250606 A1	06 December 2017
		CA 2973524 A1	04 August 2016
		EP 3250605 A1	06 December 2017
		US 2018002427 A1	04 January 2018
		EP 3250604 A1	06 December 2017
		KR 20170135824 A	08 December 2017
		KR 20170135822 A	08 December 2017
		EP 3250602 A1	06 December 2017
		CN 107531801 A	02 January 2018
		MX 2017009349 A	26 September 2017

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2017/118980
A. 主题的分类 C07K 19/00(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i; A61K 35/17(2015.01)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; A61K; A61P; G01N 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)) CPRSABS, SIPOABS, CNTXT, CNKI和关键词: 嵌合抗原受体, CAR, 双特异性, 多特异性, 双链, 多链, 细胞因子, 衔接体, 等 DWPI, WOTXT, EPTXT, USTXT, ISI Web of Science和关键词: chimeric antigen receptor, CAR, bispecific, multi-specific, double-chain, multi-chain, engager, 等 Genbank; EMBL; 中国专利生物序列检索系统和检索的序列: 序列3, 4, 9, 10, 23-34		
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	WO 2013123061 A1 (SEATTLE CHILDREN S HOSPITAL D B A SEATTLE CHILDREN S RES INST) 2013年 8月 22日 (2013 - 08 - 22) 全文	1-27
A	WO 2016120216 A1 (COLLECTIS等) 2016年 8月 4日 (2016 - 08 - 04) 全文	1-27
A	GRADA, Z等. "TanCAR: A Novel Bispecific Chimeric Antigen Receptor for Cancer Immunotherapy." Molecular Therapy - Nucleic Acids, 第2卷, 第e105期, 2013年 7月 9日 (2013 - 07 - 09), 全文	1-27
☐ 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 2018年 3月 16日		国际检索报告邮寄日期 2018年 4月 2日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(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 杨振宇 电话号码 (86-10)62089435

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2017/118980
第II栏	某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第I页第2项) 根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下： 1. ☒ 权利要求： 21-22, 24-27 因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即： [1] PCT细则39.1(iv)——处置人体或者动物体的外科手术方法或治疗方法，以及诊断方法。 [2] 国际检索将针对上述各权利要求中的另一个主题，即，在制备相应产品中的应用。 2. ☐ 权利要求： 因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说： 3. ☐ 权利要求： 因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。	

表 PCT/ISA/210 (第I页续页) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/118980

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)
WO	2013123061	A1	2013年 8月 22日	US	9447194 B2	2016年 9月 20日
				US	2015038684 A1	2015年 2月 5日
				AU	2013221672 B2	2017年 11月 9日
				HK	1205144 A1	2015年 12月 11日
				JP	2015513394 A	2015年 5月 14日
				EP	2814846 A4	2015年 11月 4日
				AU	2013221672 A1	2014年 8月 7日
				CA	2861491 A1	2013年 8月 22日
				EP	2814846 A1	2014年 12月 24日
				AU	2017264982 A1	2017年 12月 7日
				US	2017107285 A1	2017年 4月 20日
WO	2016120216	A1	2016年 8月 4日	CN	107438618 A	2017年 12月 5日
				WO	2016120217 A1	2016年 8月 4日
				WO	2016120220 A1	2016年 8月 4日
				CA	2973532 A1	2016年 8月 4日
				WO	2016120218 A1	2016年 8月 4日
				US	2018002435 A1	2018年 1月 4日
				CA	2973529 A1	2016年 8月 4日
				US	2018000914 A1	2018年 1月 4日
				US	2018009895 A1	2018年 1月 11日
				WO	2016120219 A1	2016年 8月 4日
				AU	2016212159 A1	2017年 7月 13日
				KR	20170134331 A	2017年 12月 6日
				AU	2016212162 A1	2017年 7月 13日
				CN	107406516 A	2017年 11月 28日
				AU	2016212158 A1	2017年 7月 13日
				AU	2016212161 A1	2017年 7月 13日
				EP	3250607 A1	2017年 12月 6日
				MX	2017009181 A	2017年 11月 22日
				AU	2016212160 A1	2017年 7月 13日
				CA	2973525 A1	2016年 8月 4日
				CA	2973642 A1	2016年 8月 4日
				EP	3250606 A1	2017年 12月 6日
				CA	2973524 A1	2016年 8月 4日
				EP	3250605 A1	2017年 12月 6日
				US	2018002427 A1	2018年 1月 4日
				EP	3250604 A1	2017年 12月 6日
				KR	20170135824 A	2017年 12月 8日
				KR	20170135822 A	2017年 12月 8日
				EP	3250602 A1	2017年 12月 6日
				CN	107531801 A	2018年 1月 2日
				MX	2017009349 A	2017年 9月 26日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/28 (2006.01)		C 0 7 K 16/28		4 H 0 4 5
C 1 2 N 15/12 (2006.01)		C 1 2 N 15/12		
C 0 7 K 19/00 (2006.01)		C 0 7 K 19/00		
C 0 7 K 14/705 (2006.01)		C 0 7 K 14/705		
C 1 2 N 15/63 (2006.01)		C 1 2 N 15/63	Z	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)		C 1 2 N 15/13		
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00		
A 6 1 P 37/04 (2006.01)		A 6 1 P 37/04		
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 0 7	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)		A 6 1 P 35/02		
A 6 1 P 35/04 (2006.01)		A 6 1 P 35/04		
A 6 1 K 35/17 (2015.01)		A 6 1 K 35/17	Z	
A 6 1 K 47/68 (2017.01)		A 6 1 K 47/68		
A 6 1 K 47/55 (2017.01)		A 6 1 K 47/55		
A 6 1 K 35/76 (2015.01)		A 6 1 K 35/76		
A 6 1 K 48/00 (2006.01)		A 6 1 K 48/00		
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	D	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	E	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	N	
G 0 1 N 33/566 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	T	
		G 0 1 N 33/574	A	
		G 0 1 N 33/53	D	
		G 0 1 N 33/566		

(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, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, 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, NE, 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, JO, JP, KE, 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, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 王▲れい▼

中国天津市自▲貿▼区 (空港▲経▼▲済▼区) ▲環▼河北路76号空港商▲務▼▲園▼西区19号

楼2▲層▼204

(72)発明者 高斌

中国天津市自▲貿▼区（空港▲経▼▲済▼区）▲環▼河北路76号空港商▲務▼▲園▼西区19号
楼2▲層▼204

(72)発明者 ▲吳▼▲亞▼松

中国天津市自▲貿▼区（空港▲経▼▲済▼区）▲環▼河北路76号空港商▲務▼▲園▼西区19号
楼2▲層▼204

(72)発明者 司▲遠▼

中国天津市自▲貿▼区（空港▲経▼▲済▼区）▲環▼河北路76号空港商▲務▼▲園▼西区19号
楼2▲層▼204

(72)発明者 ▲呂▼丹

中国天津市自▲貿▼区（空港▲経▼▲済▼区）▲環▼河北路76号空港商▲務▼▲園▼西区19号
楼2▲層▼204

(72)発明者 魏▲卿▼

中国天津市自▲貿▼区（空港▲経▼▲済▼区）▲環▼河北路76号空港商▲務▼▲園▼西区19号
楼2▲層▼204

Fターム(参考) 4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA24 CA44 CA46

4C076 AA95 CC27 CC41 EE41 EE59

4C084 AA13 NA05 NA14 ZB021 ZB091 ZB221 ZB261 ZB271

4C085 AA13 AA14 BA76 BA78 BB01 BB08 BB11 BB12 BB17 BB22

BB50 CC01 CC31 DD62 EE01

4C087 AA01 AA02 BB37 BC83 CA04 CA12 NA05 NA14 ZB02 ZB09

ZB22 ZB26 ZB27

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA76 EA20

EA54 FA72 FA74