

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-500618
(P2025-500618A)

(43)公表日 令和7年1月9日(2025.1.9)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	Z N A	4 B 0 6 4
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28		4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	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	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		4 C 0 8 7
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全102頁) 最終頁に続く

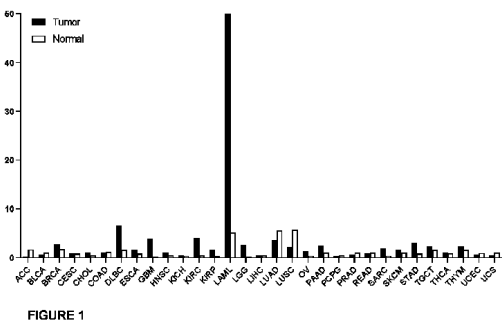
(21)出願番号	特願2024-540878(P2024-540878)	(71)出願人	524254372
(86)(22)出願日	令和5年1月5日(2023.1.5)		ギアラ セラピューティクス ソシエダ
(85)翻訳文提出日	令和6年8月23日(2024.8.23)		リミタダ
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/050194		スペイン国 0 8 0 0 7 バルセロナ, 0
(87)国際公開番号	WO2023/131657		2 ディー, 5 4, パセオ デ ガルシア
(87)国際公開日	令和5年7月13日(2023.7.13)	(71)出願人	523030500
(31)優先権主張番号	22382003.6		フンダシオ デ レセルカ クリニック バ
(32)優先日	令和4年1月5日(2022.1.5)		ルセロナーインスティテュート ディン
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		ベスティガシオンス ビオメディケス ア
			ウグスト ペイ イ スニエー
(31)優先権主張番号	22205399.3		スペイン国 0 8 0 3 6 バルセロナ カ
(32)優先日	令和4年11月3日(2022.11.3)		ジェ ロッセジョ 1 4 9 - 1 5 3
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)	(71)出願人	524254383
			ホスピタル クリニック デ バルセロナ (
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ		エイチシービー)

最終頁に続く

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗 C D 8 4 抗体およびキメラ抗原受容体

(57)【要約】
C D 8 4 に結合する抗原結合ドメイン、抗体またはキ
メラ抗原受容体。
【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) 配列：CDR1-NYWIN (配列番号 1) ; CDR2-DIYPVSGTTNYNEKFKR (配列番号 2) ; および CDR3-GTGRFAY (配列番号 3) ; またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域 (CDR) を有する重鎖可変領域 (VH) ; ならびに

配列：CDR1-RASQSVSTSSYSYMH (配列番号 4) ; CDR2-FASNLES (配列番号 5) ; および CDR3-QHSWEIPYT (配列番号 6) ; またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する CDR を有する軽鎖可変領域 (VL) ;

10

b) 配列：CDR1-NYWL G (配列番号 7) ; CDR2-DIYPGGGYTNYIEKFKG (配列番号 8) ; および CDR3-YEGGYYGNYDAMDY (配列番号 9) 、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域 (CDR) を有する重鎖可変領域 (VH) ; ならびに

配列：CDR1-RASESVDNYGISFMN (配列番号 10) ; CDR2-ASNQGS (配列番号 11) ; および CDR3-QQSKAVPRT (配列番号 12) 、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する CDR を有する軽鎖可変領域 (VL) ;

c) 配列：CDR1-GFTFSSYA (配列番号 13) ; CDR2-ISGSGGST (配列番号 14) ; および CDR3-AKWDCSDGRCYWAY (配列番号 15) 、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域 (CDR) を有する重鎖可変領域 (VH) ; ならびに

20

配列：CDR1-NIESKD (配列番号 16) ; CDR2-DDA (配列番号 17) ; および CDR3-QVWDSSSDHVV (配列番号 18) 、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する CDR を有する軽鎖可変領域 (VL) ;

d) 配列：CDR1-GFTFSSYP (配列番号 19) ; CDR2-ISYHGRNK (配列番号 20) ; および CDR3-ARDRDATPGGTGVGNHGMV (配列番号 21) 、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域 (CDR) を有する重鎖可変領域 (VH) ; ならびに

30

配列：CDR1-QSL LHS SGYNY (配列番号 22) ; CDR2-MGS (配列番号 23) ; および CDR3-MQGLQTPPT (配列番号 24) 、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する CDR を有する軽鎖可変領域 (VL) ;

e) 配列：CDR1-GFTFSDNA (配列番号 25) ; CDR2-ISGTGRTT (配列番号 26) ; および CDR3-AKWDCSDGRCYWAY (配列番号 27) 、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域 (CDR) を有する重鎖可変領域 (VH) ; ならびに

配列：CDR1-QSLVYSDGDTY (配列番号 28) ; CDR2-KVS (配列番号 29) ; および CDR3-MQGTHWPPNT (配列番号 30) 、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する CDR を有する軽鎖可変領域 (VL) ;

40

f) 配列：CDR1-TSGMGVG (配列番号 31) ; CDR2-HIWWDDVKRYNPALKS (配列番号 32) ; および CDR3-MRTSY YFDY (配列番号 33) 、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域 (CDR) を有する重鎖可変領域 (VH) ; ならびに

配列：CDR1-RASENIFSSLA (配列番号 34) ; CDR2-NAKTLE (配列番号 35) ; および CDR3-QHHYATPFT (配列番号 36) 、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する CDR を有する軽鎖可変領域 (VL) ;

50

g) 配列: CDR1-SYWIN (配列番号37); CDR2-DIYLGSGSTNYNEKFKS (配列番号38); およびCDR3-SGGYLG Y (配列番号39)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域 (CDR) を有する重鎖可変領域 (VH); ならびに

配列: CDR1-RASQSVSTSSYSYMH (配列番号40); CDR2-FASNLES (配列番号41); およびCDR3-QHSWEIPYT (配列番号42)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域 (VL);

h) 配列: CDR1-NYWIG (配列番号43); CDR2-DIYPGGGYTNYNENFKG (配列番号44); およびCDR3-STTYYSYWC F DV (配列番号45)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域 (CDR) を有する重鎖可変領域 (VH); ならびに

配列: CDR1-KSSQSLLNSGNQANYLA (配列番号46); CDR2-GASTRES (配列番号47); およびCDR3-QNDHSYPFT (配列番号48)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域 (VL);

i) 配列: CDR1-RYWMS (配列番号49); CDR2-EINPDSSSTINYTPSLKD (配列番号50); およびCDR3-PGPTVVATYWYFDV (配列番号51)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域 (CDR) を有する重鎖可変領域 (VH); ならびに

配列: CDR1-RSSQSIVHSNGNTYLE (配列番号52); CDR2-KVSSRFS (配列番号53); およびCDR3-FQGSHVPRT (配列番号54)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域 (VL);

j) 配列: CDR1-RYWIN (配列番号55); CDR2-DIYPGSGSTNYNEKFKS (配列番号56); およびCDR3-DTTIAY (配列番号57)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域 (CDR) を有する重鎖可変領域 (VH); ならびに

配列: CDR1-RASQSVTTSTRYSYMH (配列番号58); CDR2-FASNLES (配列番号59); およびCDR3-QHSWEIPYT (配列番号60)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域 (VL);

k) 配列: CDR1-GYNMN (配列番号131); CDR2-NIDPYYGGTNYNQKFKG (配列番号132); およびCDR3-GLLSGSFPY (配列番号133)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域 (CDR) を有する重鎖可変領域 (VH); ならびに

配列: CDR1-RASENIYSYLA (配列番号134); CDR2-NAKTLAE (配列番号135); およびCDR3-QHHYGSPLT (配列番号136)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域 (VL);

l) 配列: CDR1-RSWMS (配列番号137); CDR2-EINPDSSSTINYTPSLKD (配列番号138); およびCDR3-FYDGYSIYWYFDV (配列番号139)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域 (CDR) を有する重鎖可変領域 (VH); ならびに

配列: CDR1-RSSQSIVHSNGDTYLE (配列番号140); CDR2-KVSNRFS (配列番号141); およびCDR3-FQGSHVPRT (配列番号142)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域 (VL);

m) 配列: CDR1-TSGMGVG (配列番号143); CDR2-HIWWDDVKRYNPALRS (配列番号144); およびCDR3-IAVTYFFDF (配列番号145)

10

20

30

40

50

号 1 4 5)、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域 (CDR) を有する重鎖可変領域 (VH) ; ならびに

配列: CDR1-RASENIFSSFA (配列番号 1 4 6) ; CDR2-NARTLAE (配列番号 1 4 7) ; および CDR3-QHHYASPT (配列番号 1 4 8)、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する CDR を有する軽鎖可変領域 (VL) ;

n) 配列: CDR1-TSGMGVG (配列番号 1 4 9) ; CDR2-HIWWDDVKRYNPALKS (配列番号 1 5 0) ; および CDR3-MSTSYFYFDY (配列番号 1 5 1)、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域 (CDR) を有する重鎖可変領域 (VH) ; ならびに

配列: CDR1-KASQSLFTSVA (配列番号 1 5 2) ; CDR2-SASYRYT (配列番号 1 5 3) ; および CDR3-QQHYSSTPT (配列番号 1 5 4)、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する CDR を有する軽鎖可変領域 (VL) ; または

o) 配列: CDR1-IYAMN (配列番号 1 5 5) ; CDR2-RIRSKSNNYARFYADSVKD (配列番号 1 5 6) ; および CDR3-PLRSYFSMDY (配列番号 1 5 7)、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域 (CDR) を有する重鎖可変領域 (VH) ; および

配列: CDR1-KASENVDTYVS (配列番号 1 5 8) ; CDR2-GASNRYT (配列番号 1 5 9) ; および CDR3-GQTYSTPWT (配列番号 1 6 0)、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する CDR を有する軽鎖可変領域 (VL)

を含んでなる抗原結合ドメインを含んでなるキメラ抗原受容体 (CAR) 。

【請求項 2】

前記抗原結合ドメインが、

a) 配列番号 6 1 配列を有する VH ドメイン ; および配列番号 6 2 または 1 0 8 の配列を有する VL ドメイン ;

b) 配列番号 6 3 の配列を有する VH ドメイン ; および配列番号 6 4 または 1 0 9 の配列を有する VL ドメイン ;

c) 配列番号 6 5 の配列を有する VH ドメイン ; および配列番号 6 6 の配列を有する VL ドメイン ;

d) 配列番号 6 8 の配列を有する VH ドメイン ; および配列番号 6 9 の配列を有する VL ドメイン ;

e) 配列番号 7 1 の配列を有する VH ドメイン ; および配列番号 7 2 の配列を有する VL ドメイン ;

f) 配列番号 7 4 の配列を有する VH ドメイン ; および配列番号 7 5 の配列を有する VL ドメイン ;

g) 配列番号 7 6 の配列を有する VH ドメイン ; および配列番号 7 7 の配列を有する VL ドメイン ;

h) 配列番号 7 8 の配列を有する VH ドメイン ; および配列番号 7 9 の配列を有する VL ドメイン ;

i) 配列番号 8 0 の配列を有する VH ドメイン ; および配列番号 8 1 の配列を有する VL ドメイン ;

j) 配列番号 8 2 の配列を有する VH ドメイン ; および配列番号 8 3 の配列を有する VL ドメイン ;

k) 配列番号 1 6 1 の配列を有する VH ドメイン ; および配列番号 1 6 2 の配列を有する VL ドメイン ;

l) 配列番号 1 6 3 の配列を有する VH ドメイン ; および配列番号 1 6 4 の配列を有する VL ドメイン ;

m) 配列番号 1 6 5 の配列を有する VH ドメイン ; および配列番号 1 6 6 の配列を有す

10

20

30

40

50

る V L ドメイン；

n) 配列番号 167 の配列を有する V H ドメイン；および配列番号 168 の配列を有する V L ドメイン；または

o) 配列番号 169 の配列を有する V H ドメイン；および配列番号 170 の配列を有する V L ドメイン；

またはそれぞれそれと少なくとも 90 % の配列同一性を有するその変異体を含んでなる、請求項 1 に記載の C A R。

【請求項 3】

a) C A R が s c F v C A R であり；

b) C A R が C D 8 a 膜貫通ドメインを含み；

c) C A R が 4-1 B B または C D 28 共刺激ドメインを含み；かつ／または

d) C A R が C D 3-ζ シグナル伝達ドメインを含んでなる、

請求項 1 または 2 に記載の C A R。

【請求項 4】

請求項 1～3 のいずれか一項に記載の C A R をコードする 1 以上のヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド。

【請求項 5】

請求項 4 に記載のポリヌクレオチドを含んでなるベクター。

【請求項 6】

請求項 4 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 5 に記載のベクターを含んでなる細胞。

【請求項 7】

請求項 1～3 のいずれか一項に記載の C A R を含んでなる細胞。

【請求項 8】

第 1 の C A R および第 2 の C A R を含み、第 1 の C A R が請求項 1～3 のいずれか一項に記載の C A R であり、場合により、第 2 の C A R が抗 C D 19 C A R、抗 C D 20 C A R、抗 C D 22 C A R、抗 C D 33 C A R、抗 C D 123 C A R；または抗 C D 7 C A R である、細胞。

【請求項 9】

T 細胞または N K 細胞であり、場合により、自己または同種細胞である、請求項 6～8 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 10】

請求項 1～3 のいずれか一項に記載の C A R、請求項 4 に記載のポリヌクレオチド、請求項 5 に記載のベクター、または請求項 6～9 のいずれか一項に記載の細胞を含んでなる医薬組成物。

【請求項 11】

療法、場合により癌の治療である療法において使用するための、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の C A R、請求項 4 に記載のポリヌクレオチド、請求項 5 に記載のベクター、請求項 6～9 のいずれか一項に記載の細胞、または請求項 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

癌が血液悪性腫瘍、場合により、C D 8 4 を発現する血液悪性腫瘍であり、および／または癌が慢性リンパ球性白血病 (C L L)、B 細胞リンパ腫、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (D L B C L)、バーキットリンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、B 細胞急性リンパ芽球性白血病 (B-A L L)、急性骨髄性白血病 (A M L)、骨髄異形成症候群、T 細胞急性リンパ芽球性白血病／リンパ腫 (T-A L L)、慢性骨髄増殖性症候群、慢性骨髄性白血病 (C M L)、慢性骨髄単球性白血病、樹状細胞新生物および組織球性肉腫からなる群から選択される、請求項 11 に記載の使用のための C A R、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または医薬組成物。

【請求項 13】

a) 配列：C D R 1-N Y W I N (配列番号 1)；C D R 2-D I Y P V S G T T N Y

10

20

30

40

50

NEKFKR（配列番号2）；およびCDR3-GTGRFAY（配列番号3）；またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域（CDR）を有する重鎖可変領域（VH）；ならびに

配列：CDR1-RASQSVSTSSYSYMH（配列番号4）；CDR2-FASNLES（配列番号5）；およびCDR3-QHSWEIPYT（配列番号6）；またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域（VL）；

b）配列：CDR1-NYWL G（配列番号7）；CDR2-DIYPGGGYTNYIEKFKG（配列番号8）；およびCDR3-YEGGYYGNYDAMDY（配列番号9）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域（CDR）を有する重鎖可変領域（VH）；ならびに

配列：CDR1-RASESVDNYGISFMN（配列番号10）；CDR2-ASNQGS（配列番号11）；およびCDR3-QQSKAVPRT（配列番号12）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域（VL）；

c）配列：CDR1-GFTTFSSYA（配列番号13）；CDR2-ISGSGGST（配列番号14）；およびCDR3-AKWDCSDGRCYWAY（配列番号15）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域（CDR）を有する重鎖可変領域（VH）；ならびに

配列：CDR1-NIESKD（配列番号16）；CDR2-DDA（配列番号17）；およびCDR3-QVWDSSSDHVV（配列番号18）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域（VL）；

d）配列：CDR1-GFTTFSSYP（配列番号19）；CDR2-ISYHGRNK（配列番号20）；およびCDR3-ARDRDATPGGTGVGNHGMAY（配列番号21）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域（CDR）を有する重鎖可変領域（VH）；ならびに

配列：CDR1-QSL L HSSGYNY（配列番号22）；CDR2-MGS（配列番号23）；およびCDR3-MQGLQTPPT（配列番号24）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域（VL）；

e）配列：CDR1-GFTTFSDNA（配列番号25）；CDR2-ISGTGRTT（配列番号26）；およびCDR3-AKWDCSDGRCYWAY（配列番号27）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域（CDR）を有する重鎖可変領域（VH）；ならびに

配列：CDR1-QSLVYSDGDTY（配列番号28）；CDR2-KVS（配列番号29）；およびCDR3-MQGTHWPPNT（配列番号30）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域（VL）；

f）配列：CDR1-TSGMGVG（配列番号31）；CDR2-HIWWDDVKRYNPALKS（配列番号32）；およびCDR3-MRTSY YFDY（配列番号33）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域（CDR）を有する重鎖可変領域（VH）；ならびに

配列：CDR1-RASENIFSSLA（配列番号34）；CDR2-NAKT LAE（配列番号35）；およびCDR3-QHHYATPFT（配列番号36）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域（VL）；

g）配列：CDR1-SYWIN（配列番号37）；CDR2-DIYLGSGSTNYNEKFKS（配列番号38）；およびCDR3-SGGYLG Y（配列番号39）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する

10

20

30

40

50

相補性決定領域（CDR）を有する重鎖可変領域（VH）；ならびに

配列：CDR1-RASQSVSTSSYSYMH（配列番号40）；CDR2-FASNLES（配列番号41）；およびCDR3-QHSWEIPYT（配列番号42）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域（VL）；

h）配列：CDR1-NYWIG（配列番号43）；CDR2-DIYPGGGYTNYNENFKG（配列番号44）；およびCDR3-STTYYSYWCFDV（配列番号45）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域（CDR）を有する重鎖可変領域（VH）；ならびに

配列：CDR1-KSSQSLLNSGNQANYLA（配列番号46）；CDR2-GASTRES（配列番号47）；およびCDR3-QNDHSYPFT（配列番号48）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域（VL）；

i）配列：CDR1-RYWMS（配列番号49）；CDR2-EINPDSSSTINYTPSLKD（配列番号50）；およびCDR3-PGPTVVATYWYFDV（配列番号51）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域（CDR）を有する重鎖可変領域（VH）；ならびに

配列：CDR1-RSSQSIVHSNGNTYLE（配列番号52）；CDR2-KVSSRFS（配列番号53）；およびCDR3-FQGSHVPRRT（配列番号54）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域（VL）；または

j）配列：CDR1-RYWIN（配列番号55）；CDR2-DIYPGSGSTINYNEKFKS（配列番号56）；およびCDR3-DTTIAY（配列番号57）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域（CDR）を有する重鎖可変領域（VH）；ならびに

配列：CDR1-RASQSVTTSRYSYMH（配列番号58）；CDR2-FASNLES（配列番号59）；およびCDR3-QHSWEIPYT（配列番号60）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域（VL）；

k）配列：CDR1-GYNMN（配列番号131）；CDR2-NIDPYYGGTNYNQKFKG（配列番号132）；およびCDR3-GLLSGSFPY（配列番号133）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域（CDR）を有する重鎖可変領域（VH）；ならびに

配列：CDR1-RASENIYSYLA（配列番号134）；CDR2-NAKTLEAE（配列番号135）；およびCDR3-QHHYGSPLT（配列番号136）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域（VL）；

l）配列：CDR1-RSWMS（配列番号137）；CDR2-EINPDSSSTINYTPSLKD（配列番号138）；およびCDR3-FYDGYSIYWYFDV（配列番号139）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域（CDR）を有する重鎖可変領域（VH）；ならびに

配列：CDR1-RSSQSIVHSNGDNTYLE（配列番号140）；CDR2-KVSNRFS（配列番号141）；およびCDR3-FQGSHVPRRT（配列番号142）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域（VL）；

m）配列：CDR1-TSGMGVG（配列番号143）；CDR2-HIWWDDVKRYNPALRS（配列番号144）；およびCDR3-IAVTYFFDF（配列番号145）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域（CDR）を有する重鎖可変領域（VH）；ならびに

配列：CDR1-RASENIIFSSFA（配列番号146）；CDR2-NARTL

10

20

30

40

50

A E（配列番号147）；およびCDR3-QHHYASPF T（配列番号148）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域（VL）；

n）配列：CDR1-TSGMGV G（配列番号149）；CDR2-HIWWDD V KRYNPALKS（配列番号150）；およびCDR3-MSTSY YFDY（配列番号151）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域（CDR）を有する重鎖可変領域（VH）；ならびに

配列：CDR1-KASQSLFTSVA（配列番号152）；CDR2-SASYR Y T（配列番号153）；およびCDR3-QQHYS SPFT（配列番号154）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域（VL）；または

o）配列：CDR1-IYAMN（配列番号155）；CDR2-RIRSKSN NY ARFYADSVKD（配列番号156）；およびCDR3-PLRSYFSMDY（配列番号157）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域（CDR）を有する重鎖可変領域（VH）；ならびに

配列：CDR1-KASENVDTYVS（配列番号158）；CDR2-GASNR Y T（配列番号159）；およびCDR3-GQTYSPWT（配列番号160）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域（VL）

を含んでなる抗原結合ドメイン。

【請求項14】

請求項13に記載の抗原結合ドメインを含んでなる抗体。

【請求項15】

サンプルのCD84発現レベルを決定するため、場合により、対象由来のサンプルのCD84発現レベルを分析するための、請求項13に記載の抗原結合ドメイン、または請求項14に記載の抗体の使用。

【請求項16】

抗CD84 CARまたは抗体による治療に適した対象を特定するための方法であって、対象から単離されたサンプルのCD84発現レベルを決定することを含み、CD84発現レベルが請求項13に記載の抗原結合ドメイン、または請求項14に記載の抗体を用いて決定される、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、抗CD84抗体およびキメラ抗原受容体（CAR）、ならびに療法、特に、癌療法におけるそれらの使用に関する。本発明はまた、サンプルのCD84レベルを決定するため、および抗CD84抗体またはCARによる治療に適した対象を特定するための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

ヒトCD84タンパク質は、1993年に初めて同定された「分化抗原群」である。CD84の塩基配列決定により、それはSLAM（シグナル伝達リンパ球活性化分子（Signaling Lymphocyte Activation Molecule）ファミリーのメンバーと同定された。

【0003】

CD84受容体の細胞外部分は、非カノニカルなIgV遠位ドメインとIgC2g近位ドメインを含み、これはSLAMファミリーの全メンバーに共通し、CD2にも似た構造である。CD84はホモフィリック結合分子として機能し、受容体：リガンド相互作用にはIgVドメインが関与し、細胞質ドメインとは独立しており、ホモフィリック界面には

10

20

30

40

50

CD84とSLAMファミリーの他の分子との結合を妨げる特異的な違いがある。

【0004】

ヒトCD84は、様々な種類の免疫細胞で発現される。発現レベルは細胞の種類およびその分化または活性化の状態によって異なる。CD84は造血分化のごく初期に骨髓前駆細胞に見られ、ほとんどのT細胞およびB細胞に発現するが、メモリーT細胞およびBリンパ球、濾胞性ヘルパーT細胞、および胚中心B細胞ではより発現が高い。単球および単球由来樹状細胞（DC）などの骨髓性抗原提示細胞もCD84陽性である。顆粒球もかなりのレベルのCD84を発現し、好塩基球および肥満細胞での発現が最も高い。全ての造血細胞の中で、血小板が最も高いレベルのCD84を発現し、当初は血小板－血小板相互作用の安定化に参与する凝集誘導シグナル伝達受容体として提唱された。しかしながら、CD84欠損マウスを用いた研究では、CD84は止血および血栓機能において重要な役割を果たしていないことが示されている。CD84の発現はナチュラルキラー細胞（NK）では低く、赤血球では見られない。

10

【0005】

CD84シグナルは、細胞の種類およびその活性化または分化の段階に応じて、白血球の機能を活性化したり抑制したりすることができる。CD84を介したシグナル伝達は、T細胞のサイトカイン分泌、ナチュラルキラー細胞の細胞傷害性、単球の活性化、自己貪食、同族T:Bの相互作用、および胚中心レベルでのB細胞寛容を包含する多様な免疫学的プロセスを調節する。

【0006】

CD84の変異は自己免疫障害と関連している。例えば、CD84の特定の対立遺伝子変異は、全身性紅斑性狼瘡および関節リウマチ（RA）などの自己免疫疾患と関連している。このような自己免疫疾患の典型的な治療は多くの場合、疾患修飾性抗リウマチ薬（DMARDs）を含み、これらの薬物は治療的ではないが、症状および／または病勢進行を停止したり遅延させたりする。

20

【0007】

CD84は特定の癌、特に慢性リンパ性白血病（CLL）などの血液悪性腫瘍で発現している。

【発明の概要】

【0008】

血液悪性腫瘍は多くの場合、化学療法または放射線療法で治療されるが、有害な副作用が知られている。従って、血液悪性腫瘍に対する治療法の改善が依然として強く求められている。

30

【0009】

発明の概要

本発明者らは、CD84がパーキットリンパ腫、急性骨髓性白血病（AML）、慢性骨髓性白血病（CML）、B細胞急性リンパ芽球性白血病（B-ALL）、T細胞急性リンパ芽球性白血病（T-ALL）および組織球性リンパ腫を包含する悪性血液疾患に由来する一定範囲の癌細胞株で過剰発現されることを決定付けた。

【0010】

本発明者らは、CD84と結合する一定範囲の抗体およびキメラ抗原受容体（CAR）を研究および開発した。

40

【0011】

特に、本発明者らは、CARの細胞発現の特性評価を行い、例えば、CAR-T細胞の増殖、サイトカイン産生、および一定範囲の標的癌細胞株に対する細胞傷害性の測定を通じて、CAR-T細胞を機能的に特徴付けた。さらに、本発明者らは、本発明のキメラ抗原受容体が、CD84を発現する癌細胞において細胞傷害性を誘導できることを実証した。

【0012】

よって、本発明は、

50

a) 配列：CDR1-NYW I N (配列番号1) ; CDR2-D I Y P V S G T T N Y N E K F K R (配列番号2) ; および CDR3-G T G R F A Y (配列番号3) ; またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域 (CDR) を有する重鎖可変領域 (VH) ; ならびに

配列：CDR1-R A S Q S V S T S S Y S Y M H (配列番号4) ; CDR2-F A S N L E S (配列番号5) ; および CDR3-Q H S W E I P Y T (配列番号6) ; またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する CDR を有する軽鎖可変領域 (VL) ;

b) 配列：CDR1-N Y W L G (配列番号7) ; CDR2-D I Y P G G G Y T N Y I E K F K G (配列番号8) ; および CDR3-Y E G G Y Y G N Y D A M D Y (配列番号9) 、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域 (CDR) を有する重鎖可変領域 (VH) ; ならびに

配列：CDR1-R A S E S V D N Y G I S F M N (配列番号10) ; CDR2-A A S N Q G S (配列番号11) ; および CDR3-Q Q S K A V P R T (配列番号12) 、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する CDR を有する軽鎖可変領域 (VL) ;

c) 配列：CDR1-G F T F S S Y A (配列番号13) ; CDR2-I S G S G G S T (配列番号14) ; および CDR3-A K W D C S D G R C Y W A Y (配列番号15) 、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域 (CDR) を有する重鎖可変領域 (VH) ; ならびに

配列：CDR1-N I E S K D (配列番号16) ; CDR2-D D A (配列番号17) ; および CDR3-Q V W D S S S D H V V (配列番号18) 、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する CDR を有する軽鎖可変領域 (VL) ;

d) 配列：CDR1-G F T F S S Y P (配列番号19) ; CDR2-I S Y H G R N K (配列番号20) ; および CDR3-A R D R D A T P G G T G V G N H G M A V (配列番号21) 、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域 (CDR) を有する重鎖可変領域 (VH) ; ならびに

配列：CDR1-Q S L L H S S G Y N Y (配列番号22) ; CDR2-M G S (配列番号23) ; および CDR3-M Q G L Q T P P T (配列番号24) 、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する CDR を有する軽鎖可変領域 (VL) ;

e) 配列：CDR1-G F T F S D N A (配列番号25) ; CDR2-I S G T G R T T (配列番号26) ; および CDR3-A K W D C S D G R C Y W A Y (配列番号27) 、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域 (CDR) を有する重鎖可変領域 (VH) ; ならびに

配列：CDR1-Q S L V Y S D G D T Y (配列番号28) ; CDR2-K V S (配列番号29) ; および CDR3-M Q G T H W P P N T (配列番号30) 、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する CDR を有する軽鎖可変領域 (VL) ;

f) 配列：CDR1-T S G M G V G (配列番号31) ; CDR2-H I W W D D V K R Y N P A L K S (配列番号32) ; および CDR3-M R T S Y Y F D Y (配列番号33) 、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域 (CDR) を有する重鎖可変領域 (VH) ; ならびに

配列：CDR1-R A S E N I F S S L A (配列番号34) ; CDR2-N A K T L A E (配列番号35) ; および CDR3-Q H H Y A T P F T (配列番号36) 、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する CDR を有する軽鎖可変領域 (VL) ;

g) 配列：CDR1-S Y W I N (配列番号37) ; CDR2-D I Y L G S G S T N Y N E K F K S (配列番号38) ; および CDR3-S G G Y L G Y (配列番号39) 、

10

20

30

40

50

またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域(CDR)を有する重鎖可変領域(VH)；ならびに

配列：CDR1-RASQSVSTSSYSYMH(配列番号40)；CDR2-FASNLES(配列番号41)；およびCDR3-QHSWEIPYT(配列番号42)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域(VL)；

h)配列：CDR1-NYWIG(配列番号43)；CDR2-DIYPGGGYTNNENFKG(配列番号44)；およびCDR3-STTYYSYWCFDV(配列番号45)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域(CDR)を有する重鎖可変領域(VH)；ならびに

配列：CDR1-KSSQSLLNSGNQANYLA(配列番号46)；CDR2-GASTRES(配列番号47)；およびCDR3-QNDHSYPFT(配列番号48)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域(VL)；

i)配列：CDR1-RYWMS(配列番号49)；CDR2-EINPDSSSTINYTPSLKD(配列番号50)；およびCDR3-PGPTVVATYWYFDV(配列番号51)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域(CDR)を有する重鎖可変領域(VH)；ならびに

配列：CDR1-RSSQSIVHSNGNTYLE(配列番号52)；CDR2-KVSSRFS(配列番号53)；およびCDR3-FQGSHVPRT(配列番号54)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域(VL)；

j)配列：CDR1-RYWLN(配列番号55)；CDR2-DIYPGSGSTNNYNEKFKS(配列番号56)；およびCDR3-DTTIAY(配列番号57)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域(CDR)を有する重鎖可変領域(VH)；ならびに

配列：CDR1-RASQSVTTTSRYSYMH(配列番号58)；CDR2-FASNLES(配列番号59)；およびCDR3-QHSWEIPYT(配列番号60)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域(VL)；

k)配列：CDR1-GYNMN(配列番号131)；CDR2-NIDPYYGGTNNYNQKFKG(配列番号132)；およびCDR3-GLLSGSFPY(配列番号133)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域(CDR)を有する重鎖可変領域(VH)；ならびに

配列：CDR1-RASENIYSYLA(配列番号134)；CDR2-NAKTLLAE(配列番号135)；およびCDR3-QHHYGSPILT(配列番号136)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域(VL)；

l)配列：CDR1-RSWMS(配列番号137)；CDR2-EINPDSSSTINYTPSLKD(配列番号138)；およびCDR3-FYDGYSIYWYFDV(配列番号139)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域(CDR)を有する重鎖可変領域(VH)；ならびに

配列：CDR1-RSSQSIVHSNGDNTYLE(配列番号140)；CDR2-KVSNRFS(配列番号141)；およびCDR3-FQGSHVPRT(配列番号142)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域(VL)；

m)配列：CDR1-TSGMGVVG(配列番号143)；CDR2-HIWWDDVKRYNPALRS(配列番号144)；およびCDR3-IAVTYFFDF(配列番号145)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域(CDR)を有する重鎖可変領域(VH)；ならびに

10

20

30

40

50

配列：CDR1－RASENIFSSFA（配列番号146）；CDR2－NARTLAE（配列番号147）；およびCDR3－QH HYASPFT（配列番号148）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域（VL）；

n）配列：CDR1－TSGMGVVG（配列番号149）；CDR2－HIWWDDVKRYNPALKS（配列番号150）；およびCDR3－MSTSY YFDY（配列番号151）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域（CDR）を有する重鎖可変領域（VH）；ならびに

配列：CDR1－KASQSLFTSVA（配列番号152）；CDR2－SASYRYT（配列番号153）；およびCDR3－QQHYSSPFT（配列番号154）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域（VL）；または

o）配列：CDR1－IYAMN（配列番号155）；CDR2－RIRSKSNNYARFYADSVKD（配列番号156）；およびCDR3－PLRSYFSMDY（配列番号157）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域（CDR）を有する重鎖可変領域（VH）；ならびに

配列：CDR1－KASENVDTYVS（配列番号158）；CDR2－GASNRYT（配列番号159）；およびCDR3－GQTYSPWT（配列番号160）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域（VL）

を含んでなる抗原結合ドメインを提供する。

【0013】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、

a）配列番号61の配列を有するVHドメイン；および配列番号62または108の配列を有するVLドメイン；

b）配列番号63の配列を有するVHドメイン；および配列番号64または109の配列を有するVLドメイ；

c）配列番号65の配列を有するVHドメイン；および配列番号66の配列を有するVLドメイン；

d）配列番号68の配列を有するVHドメイン；および配列番号69の配列を有するVLドメイン；

e）配列番号71の配列を有するVHドメイン；および配列番号72の配列を有するVLドメイン；

f）配列番号74の配列を有するVHドメイン；および配列番号75の配列を有するVLドメイン；

g）配列番号76の配列を有するVHドメイン；および配列番号77の配列を有するVLドメイン；

h）配列番号78の配列を有するVHドメイン；および配列番号79の配列を有するVLドメイン；

i）配列番号80の配列を有するVHドメイン；および配列番号81の配列を有するVLドメイン；

j）配列番号82の配列を有するVHドメイン；および配列番号83の配列を有するVLドメイン；

k）配列番号161の配列を有するVHドメイン；および配列番号162の配列を有するVLドメイン；

l）配列番号163の配列を有するVHドメイン；および配列番号164の配列を有するVLドメイン；

m）配列番号165の配列を有するVHドメイン；および配列番号166の配列を有するVLドメイン；

n）配列番号167の配列を有するVHドメイン；および配列番号168の配列を有す

10

20

30

40

50

る V L ドメイン；もしくは

o) 配列番号 169 の配列を有する V H ドメイン；および配列番号 170 の配列を有する V L ドメイン；

またはそれとそれぞれ少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 % もしくは少なくとも 99 %、好ましくは少なくとも 90 % の配列同一性を有するその変異体

を含んでなる。

【0014】

適切には、抗原結合ドメインは、C D 8 4 結合ドメインである。

10

【0015】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、s c F v である。

【0016】

別の態様において、本発明は、本発明の抗原結合ドメインを含んでなる抗体を提供する。

【0017】

別の態様において、本発明は、本発明の抗原結合ドメインを含んでなるキメラ抗原受容体 (C A R) を提供する。

【0018】

適切には、本発明の抗原結合ドメイン、抗体または C A R は、C D 8 4 に結合する。

20

【0019】

いくつかの実施形態では、C A R は、s c F v C A R である。

【0020】

いくつかの実施形態では、C A R は、C D 8 a または C D 2 8 膜貫通ドメインを含んでなる。好ましい実施形態では、C A R は、C D 8 a 膜貫通ドメインを含んでなる。

【0021】

抗原結合ドメインおよび膜貫通ドメインは、スパーサーにより連結されてよい。いくつかの実施形態では、スパーサーは、C D 8 a ヒンジまたは C D 2 8 ヒンジを含む。好ましい実施形態では、C A R は、C D 8 a ヒンジを含む。

【0022】

C A R は、1 つ以上、例えば、2 つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインを含み得る。好ましい実施形態では、C A R は、C D 3 - ζ シグナル伝達ドメインを含む。

30

【0023】

C A R は、1 つ以上、例えば、2 つまたは 3 つの共刺激ドメインを含み得る。いくつかの実施形態では、C A R は、4 - 1 B B 共刺激ドメイン、C D 2 8 共刺激ドメイン、O X 4 0 共刺激ドメインおよび I C O S 共刺激ドメインからなる群から選択される 1 つ以上の共刺激ドメインを含む。

【0024】

好ましい実施形態では、C A R は、4 - 1 B B 共刺激ドメインを含む。いくつかの実施形態では、C A R は、C D 2 8 共刺激ドメインを含む。いくつかの実施形態では、C A R は、O X 4 0 共刺激ドメインを含む。いくつかの実施形態では、C A R は、I C O S 共刺激ドメインを含む。

40

【0025】

好ましい実施形態では、C A R は、4 - 1 B B 共刺激ドメインおよび C D 3 - ζ シグナル伝達ドメインを含む。

【0026】

好ましい実施形態では、C A R は、本発明の抗原結合ドメイン、C D 8 a 膜貫通ドメイン、4 - 1 B B 共刺激ドメインおよび C D 3 - ζ シグナル伝達ドメインを含む。

【0027】

別の態様において、本発明は、本発明の抗原結合ドメイン、抗体または C A R をコード

50

する１以上のヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。

【００２８】

別の態様において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。

【００２９】

いくつかの実施形態では、ベクターはウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、ベクターは、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクター、好ましくは、レンチウイルスベクターである。

【００３０】

別の態様において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドまたはベクターを含む細胞を提供する。

10

【００３１】

別の態様において、本発明は、本発明の抗原結合ドメインまたはCARを含む細胞を提供する。

【００３２】

細胞は、さらなる（第２の）CARを含んでもよい。

【００３３】

別の態様において、本発明は、第１のCARおよび第２のCARを含み、第１のCARが本発明のCARである細胞を提供する。

【００３４】

別の態様において、本発明は、第１の細胞および第２の細胞を含み、第１の細胞が第１のCARを含み、第２の細胞が第２のCARを含み、第１のCARが本発明のCARである組成物を提供する。

20

【００３５】

いくつかの実施形態では、第１のCARと第２のCARは異なる。いくつかの実施形態では、第１のCARと第２のCARは異なる抗原に結合する。

【００３６】

別の態様において、本発明は、タンデムCARを含んでなり、タンデムCARが第１の抗原結合ドメイン（例えば、scFv）および第２の抗原結合ドメイン（例えば、scFv）を含み、第１の抗原結合ドメイン（例えば、scFv）が本発明の抗原結合ドメイン（例えば、scFv）である細胞を提供する。

30

【００３７】

いくつかの実施形態では、第１の抗原結合ドメイン（例えば、scFv）と第２の抗原結合ドメイン（例えば、scFv）は異なる。いくつかの実施形態では、第１の抗原結合ドメイン（例えば、scFv）と第２の抗原結合ドメイン（例えば、scFv）は異なる抗原に結合する。

【００３８】

いくつかの実施形態では、第２のCARは、抗CD19 CAR、抗CD20 CARまたは抗CD22 CAR（例えば、B細胞悪性腫瘍の治療のため）；抗CD33 CARまたは抗CD123 CAR（例えば、AMLの治療のため）；または抗CD7 CAR（例えば、T-ALLの治療のため）である。

40

【００３９】

いくつかの実施形態では、第２の抗原結合ドメイン（例えば、scFv）は、抗CD19抗原結合ドメイン（例えば、scFv）、抗CD20抗原結合ドメイン（例えば、scFv）または抗CD22抗原結合ドメイン（例えば、scFv）（例えば、B細胞悪性腫瘍の治療のため）；抗CD33抗原結合ドメイン（例えば、scFv）または抗CD123抗原結合ドメイン（例えば、scFv）（例えば、AMLの治療のため）；または抗CD7抗原結合ドメイン（例えば、scFv）（例えば、T-ALLの治療のため）である。

【００４０】

いくつかの実施形態では、細胞は、T細胞またはNK細胞、好ましくは、T細胞である

50

。いくつかの実施形態では、T細胞は、自己または同種T細胞である。いくつかの実施形態では、NK細胞は、自己または同種NK細胞である。

【0041】

NK細胞は、例えば、いずれの好適な組織サンプル、細胞株または幹細胞供給源に由来してもよい。いくつかの実施形態では、NK細胞（好ましくは、同種NK細胞）は、臍帯血（CB）、誘導多能性幹細胞（iPSC）、骨髄（BM）、ヒト胚性幹細胞（hESC）、細胞株（例えば、NK92またはYT）、または末梢血（PB）（例えば、自己または同種）に由来する。好ましくは、NK細胞は、CBに由来する。

【0042】

別の態様において、本発明は、本発明の抗原結合ドメイン、抗体、CAR、ポリヌクレオチド、ベクターまたは細胞を含む医薬組成物を提供する。

10

【0043】

別の態様において、本発明は、療法において使用するための本発明の抗原結合ドメイン、抗体、CAR、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞または医薬組成物を提供する。

【0044】

いくつかの実施形態では、療法は、癌の治療である。

【0045】

別の態様において、本発明は、本発明の抗原結合ドメイン、抗体、CAR、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞または医薬組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む疾患を治療するための方法を提供する。

20

【0046】

いくつかの実施形態では、疾患は、癌である。

【0047】

別の態様において、本発明は、薬剤の製造のための本発明の抗原結合ドメイン、抗体、CAR、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞または医薬組成物を提供する。

【0048】

いくつかの実施形態では、薬剤は、疾患、好ましくは、癌を治療するためのものである。

【0049】

好ましい実施形態では、癌は、血液悪性腫瘍である。

30

【0050】

好ましい実施形態では、癌細胞は、CD84を発現し、例えば、血液悪性腫瘍は、CD84を発現する血液悪性腫瘍であり得る。

【0051】

いくつかの実施形態では、癌は、慢性リンパ球性白血病（CLL）、B細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）、バーキットリンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、B細胞急性リンパ芽球性白血病（B-ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、骨髄異形成症候群、T細胞急性リンパ芽球性白血病／リンパ腫（T-ALL）、慢性骨髄増殖性症候群、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性骨髄単球性白血病、樹状細胞新生物および組織球性肉腫からなる群から選択される。

40

【0052】

いくつかの実施形態では、癌は、慢性リンパ球性白血病（CLL）、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）、バーキットリンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、B細胞急性リンパ芽球性白血病（B-ALL）、T細胞急性リンパ芽球性白血病／リンパ腫（T-ALL）、急性骨髄性白血病（AML）および組織球性肉腫からなる群から選択される。

【0053】

好ましい実施形態では、癌は、CLL、B細胞リンパ腫、B-ALL、T-ALLおよびAMLからなる群から選択される。

【0054】

50

別の態様において、本発明は、AMLの治療において使用するための本発明の抗原結合ドメイン、抗体、CAR、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞または医薬組成物を提供する。

【0055】

別の態様において、本発明は、T-ALLの治療において使用するための本発明の抗原結合ドメイン、抗体、CAR、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞または医薬組成物を提供する。

【0056】

別の態様において、本発明は、B細胞リンパ腫の治療において使用するための本発明の抗原結合ドメイン、抗体、CAR、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞または医薬組成物を提供する。

10

【0057】

別の態様において、本発明は、バーキットリンパ腫の治療において使用するための本発明の抗原結合ドメイン、抗体、CAR、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞または医薬組成物を提供する。

【0058】

別の態様において、本発明は、サンプルのCD84発現レベルを決定するため、場合により、対象由来のサンプルのCD84発現レベルを分析するための本発明の抗原結合ドメインまたは抗体の使用を提供する。

【0059】

別の態様において、本発明は、抗CD84 CARまたは抗体による治療に適した対象を特定するための方法であって、対象から単離されたサンプルのCD84発現レベルを決定することを含み、CD84発現レベルが本発明の抗原結合ドメインまたは抗体を用いて決定される方法を提供する。

20

【0060】

いくつかの実施形態では、サンプルは、血液サンプルである。

【図面の簡単な説明】

【0061】

【図1】図1. 全ての腫瘍サンプルおよび対となる正常組織のCD84（別名LY9B、SLAMF5、hCD84、mCD84）遺伝子発現プロファイルを表す棒グラフ。棒の高さは、特定の腫瘍種または正常組織の発現中央値を表す。<http://gepia.cancer-pku.cn/detail.php?gene=CD84>から。

30

【図2】図2. 異なる腫瘍種から得られた細胞株において、RNAシーケンシングケンス（上）またはAffymetrixマイクロアレイ（下）で測定されたCD84 mRNA発現の箱ひげ（10～90パーセントイル）表示。<https://portals.broadinstitute.org/ccle>から。図は、最も高いCD84発現を示す20の腫瘍種のみを示す。

【図3】図3. 異なる細胞株のCD84発現。薄いグレーのヒストグラムは、アイソタイプ適合対照抗体による染色を表し、濃いグレーのヒストグラムは、特異的CD84抗体による染色を表す。

【図4】図4. フローサイトメトリーにより評価された、慢性リンパ球性白血病と診断された患者に由来する9サンプルにおけるCD84発現。薄いグレーのヒストグラムは、アイソタイプ適合対照抗体による染色を表し、濃いグレーのヒストグラムは、特異的CD84抗体による染色を表す。

40

【図5】図5. 急性骨髄性白血病と診断された患者由来の10サンプルのCD84発現をフローサイトメトリーにより評価した。CD84発現が中等度の患者P04に関して代表的な一例とCD84の発現が高い患者P10に関する一例を示す。薄いグレーのヒストグラムは、アイソタイプ適合対照抗体による染色を表し、濃いグレーのヒストグラムは、特異的CD84抗体による染色を表す。

【図6】図6. CD84 CAR配列が挿入されていることを示すpCCL-EF1α-CAR84プラスミドベクターのマップ（上）。抗CD84第二世代CAR構築物のスキ

50

ーム（下）。

【図 7】図 7．エフェクター：標的比 2：1 で R a m o s 細胞と共培養した C D 8 4 標的化 C A R T 細胞による、24 時間のインキュベーション後の I F N - γ 分泌。U T：非形質導入 T 細胞。統計的有意性をクラスカル・ウォリス（U T に対する多重比較）で決定した。4 回の試験の平均 $\pm$ S E M を示す。*** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

【図 8】図 8．エフェクター：標的比 2：1 で R a m o s 細胞と共培養した C D 8 4 標的化 C A R T 細胞による、24 時間のインキュベーション後の I L - 2 分泌。U T：非形質導入 T 細胞。統計的有意性をクラスカル・ウォリス（U T に対する多重比較）で決定した。4 回の試験の平均 $\pm$ S E M を示す。*** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

10

【図 9】図 9．エフェクター：標的比 2：1 で R a m o s 細胞と共培養した C D 8 4 標的化 C A R T 細胞による、24 時間のインキュベーション後の グランザイム B 分泌。U T：非形質導入 T 細胞。統計的有意性をクラスカル・ウォリス（U T に対する多重比較）で決定した。4 回の試験の平均 $\pm$ S E M を示す。*** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

【図 10】図 10．エフェクター：標的比 2：1 で R a m o s 細胞と共培養した C D 8 4 標的化 C A R T 細胞による、24 時間のインキュベーション後の T N F - γ 分泌。U T：非形質導入 T 細胞。統計的有意性をクラスカル・ウォリス（U T に対する多重比較）で決定した。4 回の試験の平均 $\pm$ S E M を示す。*** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

20

【図 11】図 11．エフェクター：標的比 2：1 で、インキュベーション期間 24 時間の後の、R a m o s - G F P + 細胞に対する種々の C D 8 4 標的化 C A R T 細胞の細胞傷害性アッセイ。非処理細胞（標的細胞単独）に対する標的生存細胞のパーセンテージを示す。8 回の独立した実験の平均 $\pm$ S E M。U T：非形質導入 T 細胞。統計的有意性を通常の一元配置 A N O V A（U T に対する多重比較）で決定した：** $p < 0.001$ 、* $p < 0.01$ 。

【図 12】図 12．エフェクター：標的比 2：1 で、インキュベーション期間 24 時間の後の、K 5 6 2 - G F P + 細胞に対する種々の C D 8 4 標的化 C A R T 細胞の細胞傷害性アッセイ。非処理細胞（標的細胞単独）に対する標的生存細胞のパーセンテージを示す。8 回の独立した実験の平均 $\pm$ S E M。U T：非形質導入 T 細胞。統計的有意性を通常の一元配置 A N O V A（U T に対する多重比較）で決定した：** $p < 0.001$ 、* $p < 0.01$ 。

30

【図 13】図 13．エフェクター：標的（E：T）細胞比 4：1、2：1、1：1 および 0.5：1 で、インキュベーション期間 24 時間および 48 時間の後の、R a m o s - G F P + 細胞に対する種々の C D 8 4 標的化 C A R T 細胞の細胞傷害性アッセイ。非処理細胞（標的細胞単独）に対する標的生存細胞のパーセンテージを示す。5 回の独立した実験の平均 $\pm$ S E M。U T：非形質導入 T 細胞。統計的有意性を通常の一元配置 A N O V A（U T に対する多重比較）で決定した：*** $p < 0.001$ 、* $p < 0.05$ 。

【図 14】図 14．エフェクター：標的（E：T）細胞比 4：1、2：1、1：1 および 0.5：1 で、インキュベーション期間 24 時間および 48 時間の後の、K 5 6 2 - G F P + 細胞に対する種々の C D 8 4 標的化 C A R T 細胞の細胞傷害性アッセイ。非処理細胞（標的細胞単独）に対する標的生存細胞のパーセンテージを示す。U T：非形質導入 T 細胞。5 回の独立した実験の平均 $\pm$ S E M。統計的有意性を通常の一元配置 A N O V A（U T に対する多重比較）で決定した：** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 、n.s.：有意差なし。

40

【図 15】図 15．エフェクター：標的（E：T）細胞比 4：1、2：1、1：1 および 0.5：1 で、インキュベーション期間 24 時間および 48 時間の後の、M O L M - 1 3 - G F P + 細胞に対する種々の C D 8 4 標的化 C A R T 細胞の細胞傷害性アッセイ。非処理細胞（標的細胞単独）に対する標的生存細胞のパーセンテージを示す。3 回の独立した

50

実験の平均±SEM、UT：非形質導入T細胞。統計的有意性を通常の一元配置ANOVA（UTに対する多重比較）で決定した：*** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

【図16】図16．エフェクター：標的（E：T）細胞比4：1、2：1、1：1および0.5：1で、インキュベーション期間24時間および48時間の後の、NALM6-GFP⁺細胞に対する種々のCD84標的化CAR T細胞の細胞傷害性アッセイ。非処理細胞（標的細胞単独）に対する標的生存細胞のパーセンテージを示す。3回の独立した実験の平均±SEM。UT：非形質導入T細胞。統計的有意性を通常の一元配置ANOVA（UTに対する多重比較）で決定した：*** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

10

【図17】図17．エフェクター：標的比4：1、2：1、1：1および0.5：1で、インキュベーション期間24時間および48時間の後の、MOLT4-GFP⁺細胞に対する種々のCD84標的化CAR T細胞の細胞傷害性アッセイ。非処理細胞（標的細胞単独）に対する標的生存細胞のパーセンテージを示す。4回の独立した実験の平均±SEM。UT：非形質導入T細胞。統計的有意性を通常の一元配置ANOVA（UTに対する多重比較）で決定した：** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 、ns：有意差なし。

【図18】図18．フローサイトメトリーにより評価した末梢血単核細胞（PBMC）におけるCD84発現。薄いグレーのヒストグラムは、アイソタイプ適合対照抗体による染色を表し、濃いグレーのヒストグラムは、特異的CD84抗体による染色を表す。PBMCは、CD4、CD8、CD19、およびCD14に対する特異的抗体で染色された。

20

【図19】図19．インキュベーション期間16時間の後の、CFSE⁺で標識されたPBMCおよびRamos-GFP⁺細胞に対する種々のCD84標的化CAR T細胞の細胞傷害性アッセイ。非処理細胞（標的細胞単独）に対する標的生存細胞のパーセンテージを示す。3名の異なるドナーからの3回の独立した実験の平均±SEM。UT：非形質導入T細胞。統計的有意性を対応のあるt検定（UTと比較）で決定した：** $p < 0.01$ 、n.s. = 有意差なし。

【図20】図20．CD84抗原のSDS PAGEゲル画像。クーマシーブルー染色を施した還元SDS PAGE。

【図21】図21．T-ALLと診断された2名の患者（P01およびP02）からの末梢血に由来する白血病細胞に対するフローサイトメトリーにより評価したCD84発現。ヒストグラムは、CD34にゲートを設定した芽細胞上のCD84発現を表し、薄いグレーのヒストグラムは、アイソタイプ適合対照抗体による染色を表し、濃いグレーのものは、特異的CD84抗体による染色を表す。

30

【図22】図22．形質導入6～7日後のCAR T細胞の拡大増殖を、培養0日目のT細胞数に対する増加倍率として示す。図は、それぞれ異なる健常ドナー由来の細胞尾用いた5～12回の独立した拡大増殖を表す。UT：非形質導入T細胞。

【図23】図23．エフェクター：標的（E：T）細胞比4：1、2：1、1：1および0.5：1で、インキュベーション期間24時間および48時間の後の、Ramos-GFP⁺細胞に対する種々のCD84標的化CAR T細胞の細胞傷害性アッセイ。非処理細胞（標的細胞単独）に対する標的生存細胞のパーセンテージを示す。5回の独立した実験の平均±SEM。UT：非形質導入T細胞。統計的有意性を二元配置ANOVA検定（UTに対する多重比較）で決定した：*** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

40

【図24】図24．エフェクター：標的（E：T）細胞比4：1、2：1、1：1および0.5：1で、インキュベーション期間24時間および48時間の後の、MOLM-13-GFP⁺細胞に対する種々のCD84標的化CAR T細胞の細胞傷害性アッセイ。非処理細胞（標的細胞単独）に対する標的生存細胞のパーセンテージを示す。少なくとも5回の独立した実験の平均±SEM。UT：非形質導入T細胞。統計的有意性を二元配置ANOVA検定（UTに対する多重比較）で決定した：*** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

50

【図25】図25. エフェクター：標的（E：T）細胞比4：1、2：1、1：1および0.5：1で、インキュベーション期間24時間および48時間の後の、U937 GFPffLuc細胞に対する種々のCD84標的化CAR T細胞の細胞傷害性アッセイ。非処理細胞（標的細胞単独）に対する標的生存細胞のパーセンテージを示す。少なくとも3回の独立した実験の平均±SEM。UT：非形質導入T細胞。統計的有意性を二元配置ANOVA検定（UTに対する多重比較）で決定した：*** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

【図26】図26. エフェクター：標的（E：T）細胞比4：1、2：1、1：1および0.5：1で、インキュベーション期間24時間および48時間の後の、MOLT-4 GFPffLuc細胞に対する種々のCD84標的化CAR T細胞の細胞傷害性アッセイ。非処理細胞（標的細胞単独）に対する標的生存細胞のパーセンテージを示す。少なくとも5回の独立した実験の平均±SEM。UT：非形質導入T細胞。統計的有意性を二元配置ANOVA検定（UTに対する多重比較）で決定した：*** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

【図27】図27. エフェクター：標的（E：T）細胞比4：1、2：1、1：1および0.5：1で、インキュベーション期間24時間および48時間の後の、CFSEで染色した初代AML細胞に対する種々のCD84標的化CAR T細胞の細胞傷害性アッセイ。非処理細胞（標的細胞単独）に対する標的生存細胞のパーセンテージを示す。UT：非形質導入T細胞。統計的有意性を二元配置ANOVA検定（UTに対する多重比較）で決定した：*** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

【図28】図28. エフェクター：標的（E：T）細胞比4：1、2：1、1：1および0.5：1で、インキュベーション期間24時間および48時間の後の、CFSEで染色した初代T-ALL細胞に対する種々のCD84標的化CAR T細胞の細胞傷害性アッセイ。非処理細胞（標的細胞単独）に対する標的生存細胞のパーセンテージを示す。UT：非形質導入T細胞。統計的有意性を二元配置ANOVA検定（UTに対する多重比較）で決定した：*** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

【図29】図29. エフェクター：標的比2：1で、24時間のインキュベーション後の、示されるようにRamos、MOLM-13またはMOLT-4細胞と共培養したCD84標的化CAR T細胞によるIFN- γ 分泌。UT：非形質導入T細胞。統計分析は、球面性を仮定する二元配置ANOVA混合効果分析および多重比較（UTに対する）のためのダネット事後検定で決定した。少なくとも3回の実験の平均±SDを示す。*** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

【図30】図30. エフェクター：標的比2：1で、24時間のインキュベーション後の、示されるようにRamos、MOLM-13またはMOLT-4細胞と共培養したCD84標的化CAR T細胞によるグランザイムB分泌。UT：非形質導入T細胞。統計分析は、球面性を仮定する二元配置ANOVA混合効果分析および多重比較（UTに対する）のためのダネット事後検定で決定した。少なくとも3回の実験の平均±SDを示す。*** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

【図31】図31. エフェクター：標的比2：1で、24時間のインキュベーション後の、示されるようにRamos、MOLM-13またはMOLT-4細胞と共培養したCD84標的化CAR T細胞によるTNF- γ 分泌。UT：非形質導入T細胞。統計分析は、球面性を仮定する二元配置ANOVA混合効果分析および多重比較（UTに対する）のためのダネット事後検定で決定した。少なくとも3回の実験の平均±SDを示す。*** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

【図32】図32. 4日の時点で、CFSEアッセイによりin vitroで測定されたCAR T細胞の増殖（フローサイトメトリー画像）。0日目と、培地のみ（対照）、IL-2で刺激した場合またはMOLM-13 AML細胞の存在下で4日後の増殖。UT：非形質導入T細胞。

【図33】図33. 同種幹細胞移植のために健常ドナーのアフェレーシス産物から単離されたCD34⁺HSPCに対するフローサイトメトリーにより評価したCD84、CD3

10

20

30

40

50

3 および CD 1 2 3 発現。薄いグレーのヒストグラムは、アイソタイプ適合対照抗体による染色を表し、濃いグレーのものは、特異的抗体による染色を表す。

【図 3 4】図 3 4. エフェクター：標的 (E : T) 細胞比 4 : 1 および 2 : 1 で、インキュベーション期間 2 4 時間の後の、5 つの異なる臍帯血ユニットから単離された CD 3 4⁺ H P S C に対する種々の CD 8 4 標的化 C A R T 細胞の細胞傷害性アッセイ。非処理細胞 (標的細胞単独) に対する標的生存細胞のパーセンテージを示す。5 回の独立した実験の平均 ± S E M。U T : 非形質導入 T 細胞。統計的有意性を二元配置 A N O V A (U T に対する多重比較) で決定した : *** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

【図 3 5】図 3 5. エフェクター：標的 (E : T) 細胞比 4 : 1、2 : 1、1 : 1 および 0.5 : 1 で、インキュベーション期間 2 4 時間の後の、同種幹細胞移植のために健常ドナーのアフェレーシス産物から単離された CD 3 4⁺ H P S C に対する種々の CD 8 4 標的化 C A R T 細胞の細胞傷害性アッセイ。非処理細胞 (標的細胞単独) に対する標的生存細胞のパーセンテージを示す。3 回の独立した実験の平均 ± S E M。U T : 非形質導入 T 細胞。統計的有意性を二元配置 A N O V A (U T に対する多重比較) で決定した : *** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

【図 3 6】図 3 6. エフェクター：標的 (E : T) 細胞比 4 : 1、2 : 1、1 : 1 および 0.5 : 1 で、インキュベーション期間 2 4 時間の後の、同じドナーから単離された CD 3⁺ T 細胞に対する種々の CD 8 4 標的化 C A R T 細胞の細胞傷害性アッセイ。非処理細胞 (標的 T 細胞単独) に対する標的生存 T 細胞のパーセンテージを示す。5 回の独立した実験の平均 ± S E M。U T : 非形質導入 T 細胞。統計的有意性を二元配置 A N O V A (U T に対する多重比較) で決定した : *** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ 。

【図 3 7】図 3 7. 種々の C A R T 8 4 と共培養する前の標的 T 細胞および共培養した後の生存標的 T 細胞に関する種々の T 細胞サブセットのフローサイトメトリーによる分析。以下の T 細胞サブセットを検討した : CD 4 5 R A + / CD 6 2 L + ナイーブ (白)、CD 4 5 R A - / CD 6 2 L + セントラルメモリー (濃いグレー)、CD 4 5 R A - / CD 6 2 L - エフェクターメモリー (黒)、および CD 4 5 R A + / CD 6 2 L - エフェクター T 細胞 (薄いグレー)。

【図 3 8】図 3 8. *in vivo* における M O L M - 1 3 細胞に対する C A R T 8 4 細胞の有効性。O L M - 1 3 の病勢進行を毎週、生物発光によりモニタリングした。生物発光定量 (A) および動物生存率 (B)。生物発光定量の統計分析は、U T 処置マウスと比較したダネットの多重比較を用いる二元配置 A N O V A モデルで行った。生存率の統計的有意性は、3 比較に関して p 値を補正したロジランク検定で決定した。

【図 3 9】図 3 9. *in vivo* における M O L M - 1 3 細胞に対する C A R T 8 4 細胞の有効性。M O L M - 1 3 の病勢進行を毎週、生物発光によりモニタリングした。生物発光定量 (A) および動物生存率 (B)。実験の終了時にマウスの骨髄 (上) および脾臓 (下) でフローサイトメトリーにより評価された M O L M - 1 3 G F P - f f L u c 細胞 (C)、CD 3⁺ T 細胞 (D) および C A R T 細胞 (E) の総数。生物発光定量の統計分析は、U T 処置マウスと比較したダネットの多重比較を用いる二元配置 A N O V A モデルで行った。生存率の統計的有意性は、3 比較に関して p 値を補正したロジランク検定で決定した。M O L M - 1 3 および CD 3⁺ T 細胞定量の統計分析は、U T 処置マウスと比較したダネットの多重比較を用いる一元配置 A N O V A モデルで行い、C A R T 細胞定量の分析は、テューキーの多重比較を用いる一元配置 A N O V A モデルで行った。

【図 4 0】図 4 0. *in vivo* における M O L M - 1 3 細胞に対する CD 8 4 C A R T 細胞の有効性。M O L M - 1 3 の病勢進行を、毎週、生物発光により追跡した。生物発光定量 (A) および動物生存率 (B)。実験の終了時にマウスの骨髄 (上) および脾臓 (下) でフローサイトメトリーにより評価された M O L M - 1 3 G F P - f f L u c 細胞 (C)、CD 3⁺ T 細胞 (D) および C A R T 細胞 (E) の総数。生物発光定量の統計分析は、U T 処置マウスと比較したダネットの多重比較を用いる二元配置 A N O V A モデ

10

20

30

40

50

ルで行った。生存率の統計的有意性は、3比較に関してp値を補正したログランク検定で決定した。MOLM-13およびCD3⁺細胞定量の統計分析は、UT処置マウスと比較したダネットの多重比較を用いる一元配置ANOVAモデルで行い、CART細胞定量の分析は、テューキーの多重比較を用いる一元配置ANOVAモデルで行った。

【図41】図41. *in vivo*におけるMOLT-4細胞に対するCD84 CART細胞の有効性。MOLT-4の病勢進行を、毎週、生物発光によりモニタリングした。生物発光定量(A)および動物生存率(B)。生物発光定量の統計分析は、UT処置マウスと比較したダネットの多重比較を用いる二元配置ANOVAモデルで行った。生存率の統計的有意性は、3比較に関してp値を補正したログランク検定で決定した。

【図42】図42. *in vivo*におけるMOLT-4細胞に対するCD84 CART細胞の有効性。MOLT-4の病勢進行を、毎週、生物発光によりモニタリングした。生物発光定量(A)および動物生存率(B)。実験の終了時にマウスの骨髄(上)および脾臓(下)でフローサイトメトリーにより検出されたMOLT-4 GFP-ffLuc細胞(C)、CD3⁺T細胞(D)およびCART細胞(E)の総数。生物発光定量の統計分析は、UT処置マウスと比較したダネットの多重比較を用いる二元配置ANOVAモデルで行った。生存率の統計的有意性は、3比較に関してp値を補正したログランク検定で決定した。MOLT-4およびCD3⁺細胞定量の統計分析は、UT処置マウスと比較したダネットの多重比較を用いる一元配置ANOVAモデルで行い、CART細胞定量の分析は、テューキーの多重比較を用いる一元配置ANOVAモデルで行った。

【図43】図43. フローサイトメトリーにより評価したヒト初代細胞上のCD84発現。薄いグレーのヒストグラムは、アイソタイプ適合対照抗体による染色を表し、濃いグレーのヒストグラムは、特異的CD84抗体による染色を表す。

【図44】図44. XCELLigence装置を用い、細胞培養にCART/UTを添加(矢印)した後72時間に測定された、ヒト初代細胞に対するCART84細胞152.3、153.5およびUTの細胞傷害性アッセイ。UT:非形質導入T細胞。

【図45】図45. *in vivo*におけるRamos細胞に対するCD84 CART細胞の有効性。(A)Ramosの病勢進行を、毎週、生物発光によりモニタリングした。生物発光定量の統計分析は、UT処置マウスと比較したダネットの多重比較を用いる二元配置ANOVAモデルで行った。(B)終了時にマウスの骨髄のフローサイトメトリーにより評価されたRamos GFP-ffLuc細胞の総数。統計分析は、UT処置マウスと比較したダネットの多重比較を用いる一元配置ANOVAモデルで行った。UT:非形質導入T細胞。* $p < 0.05$ 。

【発明を実施するための形態】

【0062】

発明の詳細な説明

「を含む(comprising)」、「を含む(comprises)」および「から構成される(compri sed of)」という用語は、本明細書で使用される場合、「包含する(including)」もしくは「包含する(includes)」または「含有する(containing)」もしくは「含有する(contains)」と同義であり、包含またはオープンエンドを示し、列挙されていない付加的メンバー、要素または工程を除外しない。「を含む(comprising)」、「を含む(comprises)」および「から構成される(compri sed of)」という用語にはまた、「からなる(consisting of)」という用語も含まれる。

【0063】

CD84

CD84(LY9BおよびSLAMF5としても知られる)は、シグナル伝達リンパ球活性化分子(signalling lymphocyte activation molecule)(SLAM)ファミリーのメンバーである膜糖タンパク質であり、それ自体は、Igスーパーファミリーのより大きなCD2細胞表面受容体サブグループのサブセットである。

【0064】

CD84受容体の細胞外部分は、非カノニカルなIgV遠位ドメインとIgC2g近位

ドメインを含み、これはS L A Mファミリーの全メンバーに共通する構造である。C D 8 4はホモフィリック結合分子として機能し、多くの免疫細胞種で発現される。受容体：リガンド相互作用にはI g Vドメインが関与し、細胞質ドメインとは独立している。ホモフィリック界面にはC D 8 4とS L A Mファミリーの他の分子との結合を妨げる特異的な違いがある。

【0065】

本発明者らは、C D 8 4が、パーキットリンパ腫、急性骨髄性白血病（A M L）、慢性骨髄性白血病（C M L）、B細胞急性リンパ芽球性白血病（B－A L L）、T細胞急性リンパ芽球性白血病（T－A L L）および組織球性リンパ腫を包含する悪性血液疾患に由来する様々な細胞株で過剰発現されていることを決定付けた。

10

【0066】

研究によれば、C D 8 4は慢性リンパ球性白血病（C L L）で過剰発現されることが示唆されている。

【0067】

C D 8 4のアミノ酸配列例は以下の通りである。

```
MAQHHLWILLLLCLQTWPEAAGKDSEIFTVNGILGESVTFFVNIQEPQVKIIAWTSKTSVAYVTPGDSE  
TAPVVTVTTHRNYERIHALGPNYNLVISDLRMEDAGDYKADINTQADPYTTTKRYNLQIYRRLGKPKIT  
QSLMASVNSTCNVTLTCSVEKEEKNVTYNWSPLGEEGNVLQIFQTPEDQELTYTCTAQNPVSNNSDSIS  
ARQLCADIAMGFRTHHTGLLSVLAMFFLLVLILSSVFLFRLFKRRQGRIFFEGSCLNTFTKNPYAASKK  
TIITYIMASRNTQPAESRIYDEILQSKVLPSKEEPVNTVYSEVQFADKMGKASTQDSKPPGTSSYEIVI
```

20

(配列番号 126)

【0068】

抗原結合ドメイン

抗原結合ドメインは、抗原を認識してそれと結合する能力を有するタンパク質またはペプチドであり得る。抗原結合ドメインとしては、目的の抗原に対する天然、合成、半合成のまたは組換え産生された結合相手が含まれる。

【0069】

例示的抗原結合ドメインとしては、抗体もしくは抗体フラグメントもしくは誘導体、受容体（例えば、T C R）の細胞外ドメイン、細胞表面分子／受容体のリガンド、またはその受容体結合ドメインが含まれる。

30

【0070】

好ましい実施形態では、抗原結合ドメインは、抗体であるか、または抗体に由来する。抗体由来ドメインは、抗体のフラグメント、または抗体の1以上のフラグメントの遺伝子操作された産物であり得、そのフラグメントは、抗原との結合に関与する。例としては、可変領域（F v）、相補性決定領域（C D R）、F a b、一本鎖可変フラグメント（s c F v）、重鎖可変領域（V H）、軽鎖可変領域（V L）およびラクダ科動物抗体（V H H）が挙げられる。

【0071】

抗原結合ドメインは、非ヒト（例えば、マウス）、キメラ、ヒト化または完全ヒト型であり得る。

40

【0072】

好ましい実施形態では、抗原結合ドメインは、一本鎖可変フラグメント（s c F v）である。s c F vは、例えば、マウス、ヒトまたはヒト化s c F vであり得る。

【0073】

抗体またはその抗原結合フラグメントに関して「相補性決定領域」（C D R）という用語は、抗体の重鎖または軽鎖の可変領域中の変動の大きいループを指す。C D Rは、抗原のコンフォメーションと相互作用し、抗原との結合をほぼ決定することができる（ただし、いくつかのフレームワーク領域が結合に関与することが知られている）。重鎖可変領域

50

と軽鎖可変領域はそれぞれ3つのCDRを含んでいる。

【0074】

「重鎖可変領域」(VH)とは、抗体の重鎖の可変フラグメントを指し、フレームワーク領域として知られる隣接するストレッチ間に挿入された3つのCDRを含み、フレームワーク領域は、CDRよりも高度に保存され、CDRを支持する足場を形成している。

【0075】

「軽鎖可変領域」(VL)とは、抗体の軽鎖の可変フラグメントを指し、フレームワーク領域間に挿入された3つのCDRを含んでいる。

【0076】

「Fv」とは、完全な抗原結合部位を保持する抗体の最小フラグメントを指す。Fvは、1本の軽鎖の可変領域と1本の重鎖の可変領域が結合したものからなる。

10

【0077】

「一本鎖可変フラグメント」(scFv)とは、軽鎖可変領域(VL)と重鎖可変領域(VH)が互いに直接またはペプチドリンカー配列を介して連結したものからなる操作抗体を指す。

【0078】

抗原結合ドメインは、抗原と特異的に結合することができ、例えば、その抗原には結合するが、他のペプチドには結合しないか、または他のペプチドにはより低い親和性でしか結合しない。

【0079】

2つの分子(例えば、抗原結合ドメインと抗原)の間の結合親和性は、例えば、解離定数(K_D)の決定により定量することができる。 K_D は、例えば、表面プラズモン共鳴(SPR)などの技術を用いて、抗原結合ドメインと抗原の間の複合体形成および解離の速度を測定することで決定することができる。複合体の会合および解離に対応する速度定数は、それぞれ会合速度定数 k_a (または k_{on})および解離速度定数 k_d (または k_{off})として表される。式 $K_D = k_d / k_a$ から、 K_D は、 k_a および k_d と関係がある。

20

【0080】

適切には、抗原結合ドメインは、CD84結合ドメインである。

【0081】

30

40

50

配列番号	説明	配列
1	152-1D5 CDR-H1	NYWIN
2	152-1D5 CDR-H2	DIYPVSGTTNYNEKFKR
3	152-1D5 CDR-H3	GTGRFAY
4	152-1D5 CDR-L1	RASQSVSTSSYSYMH
5	152-1D5 CDR-L2	FASNLES
6	152-1D5 CDR-L3	QHSWEIPYT
7	153-4D9 CDR-H1	NYWLG
8	153-4D9 CDR-H2	DIYPGGGYTNYIEKFKG
9	153-4D9 CDR-H3	YEGGYGNYDAMDY
10	153-4D9 CDR-L1	RASESVDNYGISFMN
11	153-4D9 CDR-L2	AASNQGS
12	153-4D9 CDR-L3	QQSKAVPRT
13	R3-B3 CDR-H1	GFTFSSYA
14	R3-B3 CDR-H2	ISGSGGST
15	R3-B3 CDR-H3	AKWDCSDGRCYWAY
16	R3-B3 CDR-L1	NIESKD
17	R3-B3 CDR-L2	DDA
18	R3-B3 CDR-L3	QVWDSSSDHVV
19	R3-G7 CDR-H1	GFTFSSYP
20	R3-G7 CDR-H2	ISYHGRNK
21	R3-G7 CDR-H3	ARDRDATPGGTGVGNHGMV
22	R3-G7 CDR-L1	QSLHSSGYNY
23	R3-G7 CDR-L2	MGS
24	R3-G7 CDR-L3	MQGLQTPPT
25	R3-H3	GFTFSDNA

10

20

30

40

50

	CDR-H1	
26	R3-H3 CDR-H2	ISGTGRTT
27	R3-H3 CDR-H3	AKWDCSDGRCYWAY
28	R3-H3 CDR-L1	QSLVYSDGDTY
29	R3-H3 CDR-L2	KVS
30	R3-H3 CDR-L3	MQGTHWPPNT
31	GYCD84.1-7 CDR-H1	TSGMGVG
32	GYCD84.1-7 CDR-H2	HIWDDVKRYNPALKS
33	GYCD84.1-7 CDR-H3	MRTSYFYDY
34	GYCD84.1-7 CDR-L1	RASENIFSSLA
35	GYCD84.1-7 CDR-L2	NAKTLAE
36	GYCD84.1-7 CDR-L3	QHHYATPFT
37	GYCD84.1-97 CDR-H1	SYWIN
38	GYCD84.1-97 CDR-H2	DIYLGSGSTNYNEFKS
39	GYCD84.1-97 CDR-H3	SGGYLGY
40	GYCD84.1-97 CDR-L1	RASQSVSTSSYSYMH
41	GYCD84.1-97 CDR-L2	FASNLES
42	GYCD84.1-97 CDR-L3	QHSWEIPYT
43	GYCD84.1- 108 CDR-H1	NYWIG
44	GYCD84.1- 108 CDR-H2	DIYPGGGYTNYNENFKG
45	GYCD84.1- 108 CDR-H3	STTYSSYWCVDV
46	GYCD84.1- 108 CDR-L1	KSSQSLNNGNQANYLA
47	GYCD84.1- 108 CDR-L2	GASTRES
48	GYCD84.1- 108 CDR-L3	QNDHSYPFT
49	GYCD84.1- 207 CDR-H1	RYWMS
50	GYCD84.1- 207 CDR-H2	EINPDSSTINYTPSLKD

10

20

30

40

50

51	GYCD84.1- 207 CDR-H3	PGPTVVATYWFYFDV
52	GYCD84.1- 207 CDR-L1	RSSQSIVHSNGNTYLE
53	GYCD84.1- 207 CDR-L2	KVSSRFS
54	GYCD84.1- 207 CDR-L3	FQGSHPRT
55	GYCD84.1- 226 CDR-H1	RYWIN
56	GYCD84.1- 226 CDR-H2	DIYPGSGSTNYNEKFKS
57	GYCD84.1- 226 CDR-H3	DTTIAY
58	GYCD84.1- 226 CDR-L1	RASQSVTTSRYSYM
59	GYCD84.1- 226 CDR-L2	FASNLES
60	GYCD84.1- 226 CDR-L3	QHSWEIPYT
61	152-1D5 VH	QVQLQQPGAEEVVPQTSVKLSCKASGYNFTNYWINWVKLRPGQGLEWIGD IYPVSGTTNYNEKFKRKATLTVDTSSTGNMQLSSLASEDSALYYCASGT GRFAYWGQGLVTVSA
62	152-1D5 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSSYSYMHWYQQKPGPPKL LIKAFASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDTATYYCQHSWEIPY TFGGGTKLEIK
63	153-4D9 VH	QVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYFTFTNYWLGWVKQRPBGHLEWIGD IYPGGGYTNYIEKFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARYE GGYYGNYDAMDYWGQGSTVTVSS
64	153-4D9 VL	DIVLTQSPGSLAVSLGQRATISCRASESDNYGISFMNWFQQKPGPPKL LIYAASNQSGVPARFSGSGSGTDFTLNHPMEEDDTAMYFCQQSKAVPR TFGGGTKLEIK
65	R3-B3 VH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSA ISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWD CSDGRCYWAYWGQGLVTVSS
66	R3-B3 VL	QPVLTQPPSVSVAPGQTARISCGGDNIESKDVHWYQRKSGQAPVLVHDD ADRPTGIPDRFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFG GGTQLTVL
67	R3-B3 リンカー	GGGGSGGGSGGGSGGGGAS
68	R3-G7 VH	QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCTASGFTFSSYPMHWVRQAPGKLEWVAA ISYHGRNKFYADSVKGRFTISRDDLSTLYLQMNNLKADDTAVYSCARDR DATPGGTGVGNHGMVAVWGQGTITVTVSS
69	R3-G7 VL	EIVLTQSPSLPLPVTPEGPASISCKSSQSLHSSGYNLDWYLGKPGQSPQ LLIHMGSNRASGVPARFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCMQGLQTP PTFGGGTKLEIK
70	R3-G7 リンカー	GGGGSGGGSGGGSGGGGAS

10

20

30

40

50

71	R3-H3 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNAMSWVRQAPGKGLEWVSA ISGTGRTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWD CSDGRCYWAYWGQGTLLTVSS
72	R3-H3 VL	EIVLTQSPPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGDTYLNWFQQRPQGSPR RLIYKVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTTHWP PNTFGQGTRLEIK
73	R3-H3 リンカー	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGAS
74	GYCD84.1-7 VH	QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVGVIRQPSGKGLEWL AHIWDDVKRYNPALKSRLTISKDTSSSQVFLKIASVDTADTATYYCARM RTSYFDYWGQGTLLTVSS
75	GYCD84.1-7 VL	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIFSSSLAWYQQRQKSPQLLVYN AKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQCQHHYATPFTFGS GTKLEIK
76	GYCD84.1-97 VH	QVQLQQPGAELVKPGTSVKLSCKASGYNFTSYWINWVKLRPGQGLEWIGD IYLGSGSTNYNEKFKSKATLTVDTSSSSAYMQLSSLVSEDSALYYCATSG GYLGWYGQGTLLTVSS
77	GYCD84.1-97 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKL LIKFAFNLESQVPAERFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDTATYYCQHSWEIPY TFGGGTLEIK
78	GYCD84.1- 108 VH	QVQLQQSGAELVLRPGTSVKMSCKAAGYFTNYWIGWVRQRPGHGLEWIGD IYPGGGYTNYNENFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSALYYCARST TYSSSYWCFDVGPGTTTVSS
79	GYCD84.1- 108 VL	DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQANYLAWYQQKPGQPP KLLINGASTRESQVDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNDHSY PFTFGSGTKLEIK
80	GYCD84.1- 207 VH	EVKLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSRYWMSWVRQAPGKGLEWIGE INPDSSSTINYTPSLKDKFIISRDNKNTLYLQMSKVRSEDTALYYCARPG PTVVATYWFYDVGAGTTTVSS
81	GYCD84.1- 207 VL	DVLMQTPTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIHVSNGNTYLEWYLQKPGQSPK LLIYKVSSRFSGVPDRFSGSASGTDFTLKISRVEAEDLVGYFCFQGSHPV RTFGGTLEIK
82	GYCD84.1- 226 VH	QVQLQQPGAELVKPGTSVKLSCKASGYNFTRYWINWVKLRPGQGLEWIGD IYPSGSGSTNYNEKFKSKATLTVDTSSTAYMQLSRLASEDSALYYCARDT TIAYWGQGTLLTVSA
83	GYCD84.1- 226 VL	DIVLTQSPPTSLAVSLGQRATISCRASQSVTSRYSYMHWYQQKPGQPPKL LIKFAFNLESQVPAERFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDTATYYCQHSWEIPY TFGGGTLEIK
131	GYCD84.2.32 CDR-H1	GYNMN
132	GYCD84.2.32 CDR-H2	NIDPYYGGTNYNQKFKG
133	GYCD84.2.32 CDR-H3	GLLSGSFPY
134	GYCD84.2.32 CDR-L1	RASENIYSYLA
135	GYCD84.2.32 CDR-L2	NAKTLAE
136	GYCD84.2.32 CDR-L3	QHHYGSPLT
137	GYCD84.3.89 CDR-H1	RSWMS
138	GYCD84.3.89 CDR-H2	EINPDSSSTINYTPSLKD
139	GYCD84.3.89 CDR-H3	FYDGYSIYWFYDV
140	GYCD84.3.89 CDR-L1	RSSQSIHVSNGDYLE

10

20

30

40

50

141	GYCD84.3.89 CDR-L2	KVSNRFS
142	GYCD84.3.89 CDR-L3	FQGSHPVPT
143	GYCD84.3.29 8 CDR-H1	TSGMGVG
144	GYCD84.3.29 8 CDR-H2	HIWDDVKRYNPALRS
145	GYCD84.3.29 8 CDR-H3	IATYFFDF
146	GYCD84.3.29 8 CDR-L1	RASENIFSSFA
147	GYCD84.3.29 8 CDR-L2	NARTLAE
148	GYCD84.3.29 8 CDR-L3	QHHYASPFT
149	GYCD84.2.27 CDR-H1	TSGMGVG
150	GYCD84.2.27 CDR-H2	HIWDDVKRYNPALKS
151	GYCD84.2.27 CDR-H3	MSTSYFDY
152	GYCD84.2.27 CDR-L1	KASQSLTSA
153	GYCD84.2.27 CDR-L2	SASYRYT
154	GYCD84.2.27 CDR-L3	QQHYSSPFT
155	GYCD84.5.17 1 CDR-H1	IYAMN
156	GYCD84.5.17 1 CDR-H2	RIRSKSNRYARFYADSVKD
157	GYCD84.5.17 1 CDR-H3	PLRSYFSMDY
158	GYCD84.5.17 1 CDR-L1	KASENVDYVS
159	GYCD84.5.17 1 CDR-L2	GASNRYT
160	GYCD84.5.17 1 CDR-L3	GQTYSPWT
161	GYCD84.2.32 VH	EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSTGYNMNWVKQSNKGKLEWIGN IDPYYGGTNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARGL LSGSFPYWGQGLVTVSA
162	GYCD84.2.32 VL	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQKQKSPQLLVYN AKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLHPEDFGSYFCQHHYGSPLTFGA GTKLEVK
163	GYCD84.3.89 VH	EVKLLSGGGLVQPGGSLKLSCAASGFGFSRSWMSWVRQAPGKGLEWIGE INPDSTINYTPSLKDKFIISRDNAKNTLFLQMSKVRSEDTALYYCATFY DGYSIYWYFDVWGAGTTTVSS
164	GYCD84.3.89 VL	DVLTMTQTPSLPVS LGDQASISCRSSQSIVHSGDYLEWYLQKPGQSPK LLIYKVSNRFSGVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPV RTFGGGTKLEIK
165	GYCD84.3.29 8 VH	QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVGWIRQPSGKGLEWL AHIWDDVKRYNPALRSRLTISKDTSSSQVFLNIASVDTADTATYYCTRI AVTYFFDFWGQGLTVSS
166	GYCD84.3.29 8 VL	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIFSSFAWYQQKGRSPQLLVYN ARTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGTYFCQHHYASPFTFGS GTELGVK

10

20

30

40

50

167	GYCD84.2.27 VH	QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLTTSGMGVGWIRQPSGKGLEWL AHIWDDVKRYNPALKSRLTISKDTSSSQVFLKIASVDTADTASYCARM STSYFQDYWGQGTTLTVSS
168	GYCD84.2.27 VL	DIVMTQSHKFMSTSLGDRVSI SCKASQSLFTSVAWYQQKPGQSPKLLIYS ASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSSPFTFGS GTKLGIK
169	GYCD84.5.17 1 VH	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLAACAASGFTFNIIYAMNWVRQAPGKGLEWVAR IRSKSNNYARFYADSVKDRFTISRDDSQSMLYLQMNLLKTEDTAMYYCVR PLRSYFMSMDYWGQGTSTVTVSS
170	GYCD84.5.17 1 VL	SIVMTQSPKSMMSVGERVTLSCKASENVDITYVSWYQQKPEQSPKLLIYG ASNRYTGVPDRFTGSGSATDFTLTISSVKAEDLADYHCGQTYSPWTFGG GTKLEIK

10

【0082】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、配列：CDR1-NYWIN（配列番号1）；CDR2-DIYPVSGTTNYNEKFKR（配列番号2）；およびCDR3-GTGRFAY（配列番号3）；またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域（CDR）を有する重鎖可変領域（VH）；ならびに配列：CDR1-RASQSVSTSSYSYMH（配列番号4）；CDR2-FASNLES（配列番号5）；およびCDR3-QHSWEIPYT（配列番号6）；またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域（VL）を含む。

20

【0083】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、配列：CDR1-NYWLG（配列番号7）；CDR2-DIYPGGGYTNYIEKFKG（配列番号8）；およびCDR3-YEGGYYGNYDAMDY（配列番号9）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域（CDR）を有する重鎖可変領域（VH）；ならびに配列：CDR1-RASESVDNYGISFMN（配列番号10）；CDR2-AASNQGS（配列番号11）；およびCDR3-QQSKAVPRT（配列番号12）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域（VL）を含む。

30

【0084】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、配列：CDR1-GFTFSSYA（配列番号13）；CDR2-ISGSGGST（配列番号14）；およびCDR3-AKWDCSDGR CYWAY（配列番号15）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域（CDR）を有する重鎖可変領域（VH）；ならびに配列：CDR1-NIESKD（配列番号16）；CDR2-DDA（配列番号17）；およびCDR3-QVWDS S SDHV V（配列番号18）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域（VL）を含む。

【0085】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、配列：CDR1-GFTFSSYP（配列番号19）；CDR2-ISYHGRNK（配列番号20）；およびCDR3-ARDRDATPGGTGVGNHGMAY（配列番号21）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域（CDR）を有する重鎖可変領域（VH）；ならびに配列：CDR1-QSLLHSSGYNY（配列番号22）；CDR2-MGS（配列番号23）；およびCDR3-MQGLQTPPT（配列番号24）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域（VL）を含む。

40

【0086】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、配列：CDR1-GFTFSDNA（

50

配列番号 25) ; CDR2-ISGTGRTT (配列番号 26) ; および CDR3-AKWDCSDGR CYWAY (配列番号 27) 、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域 (CDR) を有する重鎖可変領域 (VH) ; ならびに配列 : CDR1-QSLVYS DGD TY (配列番号 28) ; CDR2-KVS (配列番号 29) ; および CDR3-MQGTHWPPNT (配列番号 30) 、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する CDR を有する軽鎖可変領域 (VL) を含む。

【0087】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、配列 : CDR1-TSGMGVG (配列番号 31) ; CDR2-HIWWDDVKRYNPALKS (配列番号 32) ; および CDR3-MRTSY YFDY (配列番号 33) 、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域 (CDR) を有する重鎖可変領域 (VH) ; ならびに配列 : CDR1-RA SENIFSSLA (配列番号 34) ; CDR2-NAKT LAE (配列番号 35) ; および CDR3-QHHYATPFT (配列番号 36) 、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する CDR を有する軽鎖可変領域 (VL) を含む。

【0088】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、配列 : CDR1-SYWIN (配列番号 37) ; CDR2-DIYLGS GSTNYNEKFKS (配列番号 38) ; および CDR3-SGGYLG Y (配列番号 39) 、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域 (CDR) を有する重鎖可変領域 (VH) ; ならびに配列 : CDR1-RASQSVSTSSYSYMH (配列番号 40) ; CDR2-FASNLES (配列番号 41) ; および CDR3-QHSWEIPYT (配列番号 42) 、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する CDR を有する軽鎖可変領域 (VL) を含む。

【0089】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、配列 : CDR1-NYWIG (配列番号 43) ; CDR2-DIYPGGGYTNYNENFKG (配列番号 44) ; および CDR3-STTYYS S YWC F DV (配列番号 45) 、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域 (CDR) を有する重鎖可変領域 (VH) ; ならびに配列 : CDR1-KSSQSLLNSGNQANYLA (配列番号 46) ; CDR2-GASTRES (配列番号 47) ; および CDR3-QNDHSYPFT (配列番号 48) 、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する CDR を有する軽鎖可変領域 (VL) を含む。

【0090】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、配列 : CDR1-RYWMS (配列番号 49) ; CDR2-EINPDSSTINYTPSLKD (配列番号 50) ; および CDR3-PGPTVVATYWF DV (配列番号 51) 、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域 (CDR) を有する重鎖可変領域 (VH) ; ならびに配列 : CDR1-RSSQSIVHSNGNTYLE (配列番号 52) ; CDR2-KVSSRF S (配列番号 53) ; および CDR3-FQGSHVPR T (配列番号 54) 、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する CDR を有する軽鎖可変領域 (VL) を含む。

【0091】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、配列 : CDR1-RYWIN (配列番号 55) ; CDR2-DIYPGS GSTNYNEKFKS (配列番号 56) ; および CDR3-DTTIAY (配列番号 57) 、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域 (CDR) を有する重鎖可変領域 (VH) ; ならびに配列 : CDR1-RASQSVTTSTRYSYMH (配列番号 58) ; CDR2-FASNLES (配列番号 59) ; および CDR3-QHSWEIPYT

10

20

30

40

50

(配列番号 60)、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する CDR を有する軽鎖可変領域 (VL) を含む。

【0092】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、配列：CDR1-GYNMN (配列番号 131)；CDR2-NIDPYYG GTNYNQKFKG (配列番号 132)；および CDR3-GLLSGSFPY (配列番号 133)、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域 (CDR) を有する重鎖可変領域 (VH)；ならびに配列：CDR1-RASENIYSYLA (配列番号 134)；CDR2-NAKT LAE (配列番号 135)；および CDR3-QHHYGSPLT (配列番号 136)、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する CDR を有する軽鎖可変領域 (VL) を含む。

10

【0093】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、配列：CDR1-RSWMS (配列番号 137)；CDR2-EINPDSSTINYTPSLKD (配列番号 138)；および CDR3-FYDGYSIYWYFDV (配列番号 139)、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域 (CDR) を有する重鎖可変領域 (VH)；ならびに配列：CDR1-RSSQSIVHSNGDTYLE (配列番号 140)；CDR2-KVSNRFS (配列番号 141)；および CDR3-FQGSHVPR T (配列番号 142)、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する CDR を有する軽鎖可変領域 (VL) を含む。

20

【0094】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、配列：CDR1-TSGMGVG (配列番号 143)；CDR2-HIWWDDVKRYNPALRS (配列番号 144)；および CDR3-IAVTYFFDF (配列番号 145)、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域 (CDR) を有する重鎖可変領域 (VH)；ならびに配列：CDR1-RASENIFSSFA (配列番号 146)；CDR2-NART LAE (配列番号 147)；および CDR3-QHHYAS PFT (配列番号 148)、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する CDR を有する軽鎖可変領域 (VL) を含む。

30

【0095】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、配列：CDR1-TSGMGVG (配列番号 149)；CDR2-HIWWDDVKRYNPALKS (配列番号 150)；および CDR3-MSTSY YFDY (配列番号 151)、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域 (CDR) を有する重鎖可変領域 (VH)；ならびに配列：CDR1-KASQSLFTSVA (配列番号 152)；CDR2-SASYRYT (配列番号 153)；および CDR3-QQHYSS PFT (配列番号 154)、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する CDR を有する軽鎖可変領域 (VL) を含む。

40

【0096】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、配列：CDR1-IYAMN (配列番号 155)；CDR2-RIRSKSN NYARFYADSVKD (配列番号 156)；および CDR3-PLRSYFSMDY (配列番号 157)、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域 (CDR) を有する重鎖可変領域 (VH)；ならびに配列：CDR1-KASENVDTYVS (配列番号 158)；CDR2-GASNRYT (配列番号 159)；および CDR3-GQTYSPWT (配列番号 160)、またはそれぞれ 3 個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する CDR を有する軽鎖可変領域 (VL) を含む。

【0097】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、配列番号 61 の配列を有する VH ドメ

50

10

20

30

40

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、配列番号 80 の配列を有する V H ドメイン；および配列番号 81 の配列を有する V L ドメイン、またはそれぞれそれぞれと少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %

、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%もしくは少なくとも 99%、好ましくは少なくとも 90%の配列同一性を有するその変異体を含む。

【0106】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、配列番号 82 の配列を有する V H ドメイン；および配列番号 83 の配列を有する V L ドメイン、またはそれぞれそれぞれと少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%もしくは少なくとも 99%、好ましくは少なくとも 90%の配列同一性を有するその変異体を含む。

【0107】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、配列番号 161 の配列を有する V H ドメイン；および配列番号 162 の配列を有する V L ドメイン、またはそれぞれそれぞれと少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%もしくは少なくとも 99%、好ましくは少なくとも 90%の配列同一性を有するその変異体を含む。

【0108】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、配列番号 163 の配列を有する V H ドメイン；および配列番号 164 の配列を有する V L ドメイン、またはそれぞれそれぞれと少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%もしくは少なくとも 99%、好ましくは少なくとも 90%の配列同一性を有するその変異体を含む。

【0109】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、配列番号 165 の配列を有する V H ドメイン；および配列番号 166 の配列を有する V L ドメイン、またはそれぞれそれぞれと少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%もしくは少なくとも 99%、好ましくは少なくとも 90%の配列同一性を有するその変異体を含む。

【0110】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、配列番号 167 の配列を有する V H ドメイン；および配列番号 168 の配列を有する V L ドメイン、またはそれぞれそれぞれと少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%もしくは少なくとも 99%、好ましくは少なくとも 90%の配列同一性を有するその変異体を含む。

【0111】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、配列番号 169 の配列を有する V H ドメイン；および配列番号 170 の配列を有する V L ドメイン、またはそれぞれそれぞれと少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%もしくは少なくとも 99%、好ましくは少なくとも 90%の配列同一性を有するその変異体を含む。

【0112】

C D 8 4 結合ドメインは s c F v であり得る。s c F v は、例えば約 10～25 アミノ酸の短いリンカーペプチドで連結された抗体の重鎖可変領域 (V H) と軽鎖可変領域 (V L) を含み得る。s c F v は、配向 (N 末端から C 末端へ) V H-V L または V L-V H であり得る。いくつかの実施形態では、s c F v は、配向 (N 末端から C 末端へ) V H-V L である。いくつかの実施形態では、s c F v は、配向 (N 末端から C 末端へ) V L-V H である。

【0113】

V H ドメインと V L ドメインを連結するためのリンカー配列の例としては、以下が挙げられる：

10

20

30

40

50

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGAS (配列番号 67)

GGGGSGGGGSGGGGS (配列番号 110)

GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (配列番号 111)

【0114】

抗原結合ドメインは、配列番号61、63、112～125もしくは181～184のいずれか1つの配列、またはそれと少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%、好ましくは少なくとも90%の配列同一性を有するその変異体を含み得る、またはからなり得る。

【0115】

適切には、変異体は、少なくともCD84、ならびに配列番号61、63、112～125または181～184として示される対応する抗原結合ドメインに結合し得る。例えば、変異体は、配列番号61、63、112～125または181～184として示される対応する抗原結合ドメインとCD84の間の結合親和性と少なくとも同等の親和性でCD84と特異的に結合し得る。

【0116】

抗原結合ドメイン	配列
152.1 (VH)	QVQLQQPGAIEVVQPGTSVKLSCKASGYNFTNYWINWVKLRPGQGL EWIGDIYPVSGTTNYNEKFKRKATLTVDTSSTGNMQLSSLASED SALYYCASGTGRFAYWGQGLTVTVSA (配列番号 61)
152.2 (VLS3VH)	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSSYSYMHYQQKPG QPPKLLIKFASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDTATY YCQHSWEIPTYFGGGTKLEIKRAGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQQP GAIEVVQPGTSVKLSCKASGYNFTNYWINWVKLRPGQGLEWIGDIY PVSGTTNYNEKFKRKATLTVDTSSTGNMQLSSLASEDSALYYCA SGTGRFAYWGQGLTVTVSA (配列番号 112)
152.3 (VLS4VH)	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSSYSYMHYQQKPG QPPKLLIKFASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDTATY YCQHSWEIPTYFGGGTKLEIKRAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQV QLQQPGAIEVVQPGTSVKLSCKASGYNFTNYWINWVKLRPGQGLEW

10

20

30

40

50

抗原結合ドメイン	配列
	IGDIYPVSGTTNYNEKFKRKATLTVDTSSTGNMQLSSLASEDSA LYYCASGTGRFAYWGQGLTVTVSA (配列番号 113)
152.4 (VHS3VL)	QVQLQQPGAEEVVPGETSVKLSCKASGYNFTNYWINWVKLRPGQGL EWIGDIYPVSGTTNYNEKFKRKATLTVDTSSTGNMQLSSLASED SALYYCASGTGRFAYWGQGLTVTVSAGGGGSGGGGSGGGSDIVL TQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPK LLIKFASNLESQVGFARFSGSGSDFTLNHPVEEEDTATYYCQH SWEIPYTFGGGKLEIKRA (配列番号 114)
152.5 (VHS4VL)	QVQLQQPGAEEVVPGETSVKLSCKASGYNFTNYWINWVKLRPGQGL EWIGDIYPVSGTTNYNEKFKRKATLTVDTSSTGNMQLSSLASED SALYYCASGTGRFAYWGQGLTVTVSAGGGGSGGGGSGGGSGGGG SDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSSYSYMHWYQQKPG QPPKLLIKFASNLESQVGFARFSGSGSDFTLNHPVEEEDTAT YYCQHSWEIPYTFGGGKLEIKRA (配列番号 115)
153.1 (VH)	QVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKRPGHGL EWIGDIYPGGGYTNYIEKFKGKATLTADTSSTAYMQLSSLTSED SAVYFCARYEGGYGNYDAMDYWGQTSVTVSS (配列番号 63)
153.2 (VLS3VH)	DIVLTQSPGSLAVSLGQRATISCRASESDNYGISFMNWFQQKPG QPPKLLIYAASNQSGSGVPARFSGSGSDFTSLNIHPMEEDDTAMY FCQQSKAVPRTFGGGKLEIKRAGGGGSGGGGSGGGGSGVQLQQS GAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKRPGHGLEWIGDIY PGGGYTNYIEKFKGKATLTADTSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCA RYEGGYGNYDAMDYWGQTSVTVSS (配列番号 116)
153.3 (VLS4VH)	DIVLTQSPGSLAVSLGQRATISCRASESDNYGISFMNWFQQKPG QPPKLLIYAASNQSGSGVPARFSGSGSDFTSLNIHPMEEDDTAMY FCQQSKAVPRTFGGGKLEIKRAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGV QLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKRPGHGLEW IGDIYPGGGYTNYIEKFKGKATLTADTSSTAYMQLSSLTSEDSA VYFCARYEGGYGNYDAMDYWGQTSVTVSS (配列番号 117)
153.4 (VHS3VL)	QVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKRPGHGL EWIGDIYPGGGYTNYIEKFKGKATLTADTSSTAYMQLSSLTSED SAVYFCARYEGGYGNYDAMDYWGQTSVTVSSGGGGSGGGSGG GGSDIVLTQSPGSLAVSLGQRATISCRASESDNYGISFMNWFQQ KPGQPPKLLIYAASNQSGSGVPARFSGSGSDFTSLNIHPMEEDDT AMYFCQQSKAVPRTFGGGKLEIKRA (配列番号 118)
153.5 (VHS4VL)	QVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKRPGHGL EWIGDIYPGGGYTNYIEKFKGKATLTADTSSTAYMQLSSLTSED SAVYFCARYEGGYGNYDAMDYWGQTSVTVSSGGGGSGGGSGG GGSGGGSDIVLTQSPGSLAVSLGQRATISCRASESDNYGISFM NWFQQKPGQPPKLLIYAASNQSGSGVPARFSGSGSDFTSLNIHP MEEDDTAMYFCQQSKAVPRTFGGGKLEIKRA (配列番号 119)
B3.4 (VHS3VL)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVSAISGGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKWDGSDGRCYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGG SQPVLTPPPSVVAPGQTARISCGGDNIESKDVHWYQRKSGQAPV LVVHDDADRPTGIPDRFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQV WDSSSDHVVFGGGTQLTVL (配列番号 120)
B3.5 (VHS4VL)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVSAISGGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKWDGSDGRCYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGG

10

20

30

40

50

抗原結合ドメイン	配列
	SGGGGSQPVLTQPPSVSVAPGQTARISCGGDNIESKDVHWYQRKS GQAPVLVVDHADRPTGIPDRFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDSSSDHVVFGGGTQLTVL (配列番号 121)
G7.4 (VHS3VL)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFTFSSYPMHVVRQAPGKGL EWVAAISYHGRNKFYADSVKGRFTISRDDLRLSTLYLQMNNLKADD TAVYSCARDRDATPGGTGVGNHGMVAVWGQTTVTVSSGGGGSGGG SGGGGGSEIVLTQSPLSLPVTGPGEPAISCKSSQSLHSSGYNLYL DWYLQKPGQSPQLLIHMGSNRASGVPARFSGSGSGTDFTLRISRV EAEDVGYYCMQGLQTPPTFGGGTKLEIK (配列番号 122)
G7.5 (VHS4VL)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFTFSSYPMHVVRQAPGKGL EWVAAISYHGRNKFYADSVKGRFTISRDDLRLSTLYLQMNNLKADD TAVYSCARDRDATPGGTGVGNHGMVAVWGQTTVTVSSGGGGSGGG SGGGGGSGGGGGSEIVLTQSPLSLPVTGPGEPAISCKSSQSLHSS GYNLYLDWYLQKPGQSPQLLIHMGSNRASGVPARFSGSGSGTDFTLRISRV EAEDVGYYCMQGLQTPPTFGGGTKLEIK (配列番号 123)
H3.4 (VHS3VL)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSDNAMSWSVRQAPGKGL EWVSAISGTGRTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKWDGSDGRCYWAYWGQTLTVTVSSGGGGSGGGSGGGG SEIVLTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGDTYLNWQQRR PGQSPRRLIYKVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV GYYCMQGTHTWPPNTFGQGTTRLEIK (配列番号 124)
H3.5 (VHS4VL)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSDNAMSWSVRQAPGKGL EWVSAISGTGRTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKWDGSDGRCYWAYWGQTLTVTVSSGGGGSGGGSGGGG SGGGGSEIVLTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGDTYLN WFQQRRPGQSPRRLIYKVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGYYCMQGTHTWPPNTFGQGTTRLEIK (配列番号 125)
1.7.3 (VLS4VH)	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIFSSLAWYQQRQKSPQ LLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQC HYATPFTFGSGTKLEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGVTLKESG PGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVGVIRQPSGKGLEWLAHI WWDDVKRYNPALKSRLTISKDTSSSQVFLKIASVDTADTATYYCA RMRTSYFDYWGQGTTLTVSS (配列番号 181)
1.7.5 (VHS4VL)	QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVGVIRQPSGK GLEWLAHIWWDDVKRYNPALKSRLTISKDTSSSQVFLKIASVDTA DTATYYCARMRTSYFDYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGSGG GGSDIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIFSSLAWYQQRQ KSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSY YQCQHHYATPFTFGSGTKLEIK (配列番号 182)
1.226.5 (VHS4VL)	QVQLQQPGAELVKPGTSVKLSCKASGYNFTRYWINWVKLRPGQGL EWIGDIYPGSGSTNYNEKFKSKATLTVDTSSTAYMQLSRLASED SALYYCARDTTIAYWGQTLTVTVSAGGGSGGGSGGGSGGGSGG DIVLTQSPTSLAVSLGQRATISCRASQSVTTSRYSYMHWYQQKPG QPPKLLIKFASNLESQVAPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDTATY YCQHSWEIPYTFGGGTLEIK (配列番号 183)
3.89.5 (VHS4VL)	EVKLESGGGLVQPGGSLKLSCTASGFTFSDNAMSWSVRQAPGKGL EWIGEINPDSSTINYTPSLKDKFIISRDNKNTLYLQMSKVRSED TALYYCATFYDGYSIYWFYDVGAGTTVTVSSGGGGSGGGSGGG SGGGGGSDVLTQTPLSLPVSGLDQASISCRSSQSIHVSNGDLYL EWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR EAEDLGYYCFQGSHPRTFGGGTKLEIK (配列番号 184)

10

20

30

40

【0117】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、配列番号61の配列、またはそれと少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%、好ましくは少なくとも90%の配列同一性を有し、好ましくはCD84との結合能を保持するその変異体を含む、またはそれからなる。

【0118】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、配列番号63の配列、またはそれと少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも

50

【 0 1 1 9 】

【 0 1 2 0 】

【 0 1 2 1 】

【 0 1 2 2 】

【 0 1 2 3 】

【 0 1 2 4 】

【 0 1 2 5 】

【 0 1 2 6 】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、配列番号 119 の配列、またはそれと少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 % もしくは少なくとも 99 %、好ましくは少なくとも 90 % の配列同一性を有し、好ましくは、CD84 との結

【 0 1 2 7 】

【 0 1 2 8 】

10

【 0 1 2 9 】

20

【 0 1 3 0 】

30

【 0 1 3 1 】

【 0 1 3 2 】

40

【 0 1 3 3 】

【 0 1 3 4 】

50

【 0 1 3 5 】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、配列番号 183 の配列、またはそれと少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 % もしくは少なくとも 99 %、好ましくは少なくとも 90 % の配列同一性を有し、好ましくは、CD84 との結合能を保持するその変異体を含む、またはそれからなる。

【0136】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、配列番号 184 の配列、またはそれと少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 % もしくは少なくとも 99 %、好ましくは少なくとも 90 % の配列同一性を有し、好ましくは、CD84 との結合能を保持するその変異体を含む、またはそれからなる。

10

【0137】

抗原結合ドメインは、キメラ抗原受容体 (CAR) に含まれてよい。

【0138】

キメラ抗原受容体 (CAR)

「キメラ抗原受容体」(CAR または CARs) は、本明細書で使用される場合、細胞 (例えば、ナイーブ T 細胞、セントラルメモリー T 細胞、エフェクターメモリー T 細胞またはそれらの組合せなどの T 細胞) に抗原特異性を付与することができる操作された受容体を指す。CAR は、人工 T 細胞受容体、キメラ T 細胞受容体またはキメラ免疫受容体としても知られる。CAR はまた、NK 細胞 (例えば、臍帯血 (CB)、誘導多能性幹細胞 (iPSC)、骨髄 (BM)、ヒト胚性幹細胞 (hESC)、細胞株 (例えば、NK92 もしくは YT)、または末梢血 (PB) 由来) などの他の免疫細胞にも抗原特異性を付与することができる (Mehta et al. (2018) Front. Immunol. 9: 283; Liu et al. (2020) N. Engl. J. Med. 382: 545-553)。NK 細胞で使用する CAR は、他の膜貫通ドメイン (NKGD2D または DAP12 など) および他の共刺激ドメイン (NKGD2D または 2B4 など) を有してもよく、CAR-NK 細胞にサイトカインのサポートを常に提供するために、それらに CAR 構築物内に IL-2 または IL-15 の遺伝子を組み込んでもよい。

20

【0139】

CAR は、例えば、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 (エンドドメイン) を含んでもよい。

30

【0140】

いくつかの実施形態では、CAR は、CD84 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を含んでなる。CAR は、1 以上の共刺激ドメインを含み得る。

【0141】

CAR の抗原結合ドメイン (例えば、CD84 結合ドメイン) は、本明細書に開示されるような抗原結合ドメインであり得る。

【0142】

別の態様において、本発明は、配列番号 172 ~ 180 のいずれか 1 つの配列、またはそれと少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 % もしくは少なくとも 99 %、好ましくは少なくとも 90 % の配列同一性を有するその変異体を含む、またはそれからなるキメラ抗原受容体 (CAR) を提供する。

40

【0143】

適切には、変異体は、配列番号 172 ~ 180 として示される対応する CAR と少なくとも同様に機能し得る。例えば、変異体は、配列番号 172 ~ 180 として示される対応する CAR と CD84 の間の結合親和性と少なくとも同等の結合親和性で CD84 と特異的に結合し得る。

【0144】

50

【 0 1 4 5 】

10

【 0 1 4 7 】

20

【 0 1 4 9 】

30

40

【 0 1 5 2 】

50

とも96%、少なくとも97%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%、好ましくは少なくとも90%の配列同一性を有するその変異体を含む、またはそれからなるキメラ抗原受容体(CAR)を提供する。

【0153】

膜貫通ドメイン

CARは、膜貫通ドメインを含み得る。

【0154】

膜貫通ドメインは、I型、II型またはIII型膜貫通タンパク質のいずれかを含む膜貫通ドメインを有する任意のタンパク質に由来する膜貫通配列を含み得る。CARの膜貫通ドメインはまた、人工疎水性配列も含み得る。CARの膜貫通ドメインは、二量体化しないように選択され得る。

10

【0155】

CAR構築物で使用される膜貫通(TM)領域の例としては、a) CD28 TM領域(Pule et al., Mol Ther, 2005, Nov;12(5):933-41; Brentjens et al., CCR, 2007, Sep 15;13(18 Pt 1):5426-35; Casucci et al., Blood, 2013, Nov 14;122(20):3461-72); b) OX40 TM領域(Pule et al., Mol Ther, 2005, Nov;12(5):933-41); c) 4-1BB TM領域(Brentjens et al., CCR, 2007, Sep 15;13(18 Pt 1):5426-35); d) CD3-ζ TM領域(Pule et al., Mol Ther, 2005, Nov;12(5):933-41; Di Stasi et al. Blood, 2009, Jun 18;113(25):6392-402); e) CD8a TM領域(Maher et al., Nat Biotechnol, 2002, Jan;20(1):70-5; Imai C et al., Leukemia, 2004, Apr;18(4):676-84; Brentjens et al., CCR, 2007, Sep 15;13(18 Pt 1):5426-35; Milone et al., Mol Ther, 2009, Aug;17(8):1453-64); f) DAP12 TM領域(Mueller, N. et al. J. Immunother. 2015, June 01; 38, 197)); g) 2B4 TM領域(Altwater, B. et al. Clin. Cancer Res, 2009, July 22; (15) 4857-4866)およびh) NKG2D TM領域(Li, Y et al, Cell Stem Cell, 2018, Aug 2; (23):181-192)がある。

20

【0156】

さらなる膜貫通ドメインは、当業者に自明である。

【0157】

CD8a膜貫通ドメインのアミノ酸配列例は、

30

IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC

(配列番号 127)

である。

【0158】

CD28膜貫通ドメインのアミノ酸配列例は、

FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV

40

(配列番号 128)

である。

【0159】

いくつかの実施形態では、膜貫通ドメインは、配列番号127もしくは128の配列、またはそれと少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%、好ましくは少なくとも90%の配列同一性を有するその変異体を含

50

む、またはそれからなる。

【0160】

シグナルペプチド

CARは、CARが細胞内で発現された際に、そのタンパク質が小胞体に、その後、細胞表面に向けられるようなシグナルペプチドを含み得る。

【0161】

シグナルペプチドは、トランスロケーション中またはトランスロケーション後にシグナルペプチダーゼにより認識され、切断されて成熟タンパク質を生成し得る。

【0162】

いくつかの実施形態では、シグナルペプチドは、CD8aシグナルペプチドである。

【0163】

スペーサー

CARは、抗原結合ドメインを膜貫通ドメインに連結するスペーサーを含み得る。

【0164】

スペーサー配列は、例えば、IgG1Fc領域、IgG1ヒンジまたはヒトもしくはマウスCD8スタークを含み得る。

【0165】

いくつかの実施形態では、CARは、CD8aスタークを含んでなる。

【0166】

細胞内シグナル伝達ドメイン

細胞内ドメインは、CARにおけるシグナル伝達を提供することができる。

【0167】

細胞内シグナル伝達ドメインは、1以上の免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based activation motif)(ITAM)を含んでなってもよく、ITAMは、免疫系の特定の細胞表面タンパク質の細胞質テールで2回繰り返される4つのアミノ酸の、保存された配列である。このモチーフは、ロイシンまたはイソロイシンから任意の2つの他のアミノ酸によって隔てられてチロシンを含む(YxxL/I)。これらのモチーフのチロシン残基は、受容体分子とそれらのリガンドとの相互作用後にリン酸化され、シグナル伝達経路に関与する他のタンパク質との結合部位を形成し得る。

【0168】

細胞内シグナル伝達ドメインは、3つのITAMを含むCD3-ζエンドドメインを含み得る、またはからなり得る。CD3-ζエンドドメインは、抗原が結合した後、T細胞に活性化シグナルを伝達し得る。

【0169】

CARは、1以上の共刺激ドメインを含み得る。例えば、4-1BB(CD137としても知られる)は、CD3-ζとともに使用することができ、またはCD28、OX40および/もしくはICOSは、増殖/生存シグナルを伝達するためにCD3-ζとともに使用することができる。また、NKG2D、2B4(CD244としても知られる)、DAP12および/またはDAP10も、増殖/生存シグナルを伝達するためにCD3-ζとともに使用することができる。

【0170】

いくつかの実施形態では、CARは、CD3-ζシグナル伝達ドメインを含み、共刺激ドメインを欠く。いくつかの実施形態では、CARは、CD3-ζシグナル伝達ドメインと1以上の共刺激ドメインを含んでなる。

【0171】

いくつかの実施形態では、CARは、4-1BB共刺激ドメイン、CD28共刺激ドメインおよびOX40共刺激ドメインからなる群から選択される1以上の共刺激ドメインを含んでなる。

【0172】

10

20

30

40

50

好ましい実施形態では、CARは、4-1BB共刺激ドメインを含んでなる。いくつかの実施形態では、CARは、CD28共刺激ドメインを含んでなる。いくつかの実施形態では、CARは、OX40共刺激ドメインを含んでなる。

【0173】

好ましい実施形態では、CARは、4-1BB共刺激ドメインとCD3-ζシグナル伝達ドメインを含んでなる。

【0174】

CD3-ζシグナル伝達ドメインのアミノ酸配列例は、

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNE
LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

(配列番号 129)

である。

【0175】

いくつかの実施形態では、シグナル伝達ドメインは、配列番号129の配列、またはそれと少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%、好ましくは少なくとも90%の配列同一性を有するその変異体を含む、またはそれからなる。

20

【0176】

4-1BB共刺激ドメインのアミノ酸配列例は、

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

(配列番号 130)

である。

30

【0177】

CD28共刺激ドメインのアミノ酸配列例は、

RSKRSRLHLHSDYMNMTPRRPGPTRKHQYPYAPPRDFAAYRS

(配列番号 171)

である。

【0178】

いくつかの実施形態では、共刺激ドメインは、配列番号130もしくは171の配列、またはそれと少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%、好ましくは少なくとも90%の配列同一性を有するその変異体を含む、またはそれからなる。

40

【0179】

ポリヌクレオチド

本発明のポリヌクレオチドは、DNAまたはRNA、好ましくはDNAを含み得る。それらは一本鎖または二本鎖であり得る。好ましくは、ポリヌクレオチドは、単離されたポリヌクレオチドである。当業者ならば、遺伝コードの縮重の結果として多くの異なるポリヌクレオチドが同じポリペプチドをコードし得ることを理解するであろう。さらに、当業

50

者ならば、通常の技術を用いて、本発明のポリペプチドを発現させる任意の特定の宿主生物のコドン使用頻度を反映させるために、本発明のポリヌクレオチドによりコードされているポリペプチド配列に影響を及ぼさないヌクレオチド置換を行えることも理解されるであろう。

【0180】

ポリヌクレオチドは、当技術分野で利用可能ないずれの方法によって修飾されてもよい。このような修飾は、本発明のポリヌクレオチド *in vivo* 活性を高めるため、または寿命を延ばすために行うことができる。

【0181】

DNA ポリヌクレオチドなどのポリヌクレオチドは、組換え、合成的に、または当業者に利用可能ないずれの手段によって生産してもよい。それらはまた標準的な技術によってクローニングしてもよい。

【0182】

より長いポリヌクレオチドは一般に、組換え手段を用いて、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) クローニング技術を用いて生産される。これは、クローニングが望まれる標的配列に隣接するプライマー対 (例えば、約 15 ~ 30 ヌクレオチド) を作製すること、それらのプライマーを動物またはヒト細胞から得られた mRNA または cDNA と接触させること、所望の領域の増幅が起こる条件下で PCR を実行すること、増幅されたフラグメントを単離すること (例えば、反応混合物をアガロースゲルで精製することによる) および増幅された DNA を回収することを含む。これらのプライマーは、増幅された DNA が適したベクターにクローニングできるように適切な制限酵素認識部位を含むように設計することができる。

【0183】

ポリヌクレオチドは、本発明の抗原結合ドメイン、抗体または CAR をコードする 1 以上のヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターおよび／またはエンハンサーを含み得る。「作動可能に連結された」という用語は、本明細書で使用される場合、2 つの構成要素が、両方が実質的に障害なくそれらの機能を遂行できる様式で相互に連結されていることを意味し得る。例えば、プロモーターおよび／またはエンハンサーは、抗原結合ドメイン、抗体または CAR の発現を促進および／または増強し得る。

【0184】

いくつかの実施形態では、プロモーターは、EF1 α プロモーターである。

【0185】

ベクター

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、ベクターである。

【0186】

好ましくは、ベクターは、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターまたはアデノウイルスベクターなどのウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、ウイルスゲノムである。

【0187】

別の態様において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含んでなるウイルスベクターを提供する。

【0188】

いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、ウイルスベクター粒子の形態である。

【0189】

ベクターは、ある環境から別の環境へと実体の移動を可能にするか、または容易にするツールである。本発明によれば、一例として、組換え核酸技術で使用されるいくつかのベクターは、核酸のセグメント (例えば、異種 cDNA セグメントなどの異種 DNA セグメント) のような実体を標的細胞に移入することを可能にする。ベクターは、異種核酸 (DNA または RNA) を細胞内に維持し、核酸セグメントを含んでなるベクターの複製を促進し、および／または核酸セグメントによってコードされるタンパク質の発現を促進する

10

20

30

40

50

という目的を果たすことができる。

【0190】

本発明で使用されるポリヌクレオチドを含んでなるベクターは、トランスフェクション、形質導入および形質転換などの当技術分野で公知の様々な技術を用いて細胞に導入することができる。

【0191】

トランスフェクションは、核酸を細胞に組み込む一般的プロセスを指し、非ウイルスベクターを用いて細胞にポリヌクレオチドを送達するプロセスを含む。形質導入は、ウイルスベクターを用いて細胞に核酸を組み込むプロセスを指し得る。

【0192】

レトロウイルスおよびレンチウイルスベクター

レトロウイルスベクターは、いずれの適切なレトロウイルスから誘導されてもよく、または誘導可能である。多数の異なるレトロウイルスが特定されている。例としては、マウス白血病ウイルス (MLV)、ヒトT細胞白血病ウイルス (HTLV)、マウス乳腺腫瘍ウイルス (MMTV)、ラウス肉腫ウイルス (RSV)、藤浪肉腫ウイルス (FuSV)、モロニーマウス白血病ウイルス (Mo-MLV)、FBRマウス骨肉腫ウイルス (FBRMSV)、モロニーマウス肉腫ウイルス (Mo-MSV)、エイブルソンマウス白血病ウイルス (A-MLV)、鳥類骨髄細胞腫瘍ウイルス-29 (MC29) および鳥類赤芽球症ウイルス (AEV) が挙げられる。レトロウイルスの詳細なリストは、Coffin, J. M. et al. (1997) *Retroviruses*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 758-63に乱すことができる。

【0193】

レトロウイルスは、「単純型」と「複雑型」の2つのカテゴリーに大別される。レトロウイルスはさらに7つのグループに分けられる。このうち5つのグループは発癌性を持つレトロウイルスである。残りの2つのグループはレンチウイルスとスプーマウイルスである。

【0194】

レトロウイルスゲノムとレンチウイルスゲノムの基本構造には、5' LTRおよび3' LTRなどの多くの共通の特徴がある。これらの間またはこれらの中には、ゲノムのパッケージングを可能にするパッケージングシグナル、プライマー結合部位、宿主細胞ゲノムへの組み込みを可能にする組み込み部位、ならびにパッケージング構成要素をコードする gag、pol、および env 遺伝子（これらはウイルス粒子の組み立てに必要なポリペプチドである）が配置されている。レンチウイルスには、HIVの rev および RRE 配列などの付加的な特徴があり、組み込まれたプロウイルスのRNA転写物を核から感染標的細胞の細胞質へ効率的に輸送することができる。

【0195】

プロウイルスでは、これらの遺伝子の両末端に長い末端反復配列 (long terminal repeats) (LTR) と呼ばれる領域が隣接している。これらのLTRは、プロウイルスの組み込みおよび転写を担う。LTRはまた、エンハンサー-プロモーター配列としても働き、ウイルス遺伝子の発現を制御することができる。

【0196】

LTR自体は同一の配列で、U3、R、およびU5の3つの要素に分けられる。U3はRNAの3'末端に特有の配列に由来する。Rは、RNAの両端の繰り返し配列に由来する。U5は、RNAの5'末端に特有の配列に由来する。これらの3つの要素の大きさはレトロウイルスによってかなり異なる。

【0197】

欠陥レトロウイルスベクターゲノムでは、gag、pol および env は存在しないか、または機能しないかであり得る。

【0198】

典型的なレトロウイルスベクターでは、複製に必須の1以上のタンパク質コード領域の

10

20

30

40

50

少なくとも一部がウイルスから除去されてよい。これによりウイルスベクターは複製欠陥型となる。

【0199】

レンチウイルスベクターは、より大きなレトロウイルスベクター群の一部である。レンチウイルス詳細なリストは、Coffin, J.M. et al. (1997) *Retroviruses*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 758-63に見出すことができる。要するに、レンチウイルスは、霊長類群と非霊長類群に分けることができる。霊長類レンチウイルスの例としては、限定されるものではないが、ヒト後天性免疫不全症候群（AIDS）の病原体であるヒト免疫不全ウイルス（HIV）；およびサル免疫不全ウイルス（SIV）が挙げられる。非霊長類レンチウイルスの例としては、プロトタイプの「スローウイルス」であるビスナ／メディウイルス（VSV）、ならびに関連のヤギ関節炎脳炎ウイルス（CAEV）、ウマ伝染性貧血ウイルス（EIAV）、および最近報告されたネコ免疫不全ウイルス（FIV）およびウシ免疫不全ウイルス（BIV）が挙げられる。

10

【0200】

レンチウイルス科は、レンチウイルスが分裂細胞と非分裂細胞の両方に感染能がある（Lewis, P et al. (1992) *EMBO J.* 11: 3053-8; Lewis, P.F. et al. (1994) *J. Virol.* 68: 510-6）という点でレトロウイルスとは異なる。対照的に、MLVなどの他のレトロウイルスは、非分裂細胞または分裂の遅い細胞、例えば、例えば、筋肉、脳、肺および肝臓組織を構成している細胞に感染能がない。

20

【0201】

レンチウイルスベクターは、本明細書で使用される場合、レンチウイルスから誘導可能な少なくとも1つの構成要素部分を含んでなるベクターである。好ましくは、その構成要素部分は、ベクターが細胞に感染するか、遺伝子を発現するか、または複製される生物学的機序に関与する。

【0202】

レンチウイルスベクターは、「霊長類」ベクターであり得る。レンチウイルスベクターは、「非霊長類」ベクターであってもよい（すなわち、霊長類、特にヒトに基本的に感染しないウイルスに由来する）。非霊長類レンチウイルスの例は、霊長類には本来感染しないレンチウイルス科の任意のメンバーであり得る。

30

【0203】

レンチウイルス系ベクターの例として、HIV-1系およびHIV-2系ベクターを以下に記載する。

【0204】

HIV-1ベクターは、単純レトロウイルスにも見られるシス作用エレメントを含む。gagオープンリーディングフレームにわたる配列がHIV-1のパッケージングに重要であることが示されている。従って、HIV-1ベクターは多くの場合、翻訳開始コドンが変異したgagの関連部分を含む。さらに、ほとんどのHIV-1ベクターはRREを含むenv遺伝子の一部も含む。RevはRREに結合し、核から細胞質への全長または単スプライシングmRNAの輸送を可能にする。Revおよび／またはRREが存在しないと、全長HIV-1 RNAは核内に蓄積する。あるいは、メイソンファイザーサルウイルスなどのある種の単純レトロウイルスからの構成的輸送エレメントを用いて、RevとRREの必要性を緩和することもできる。HIV-1 LTRプロモーターからの効率的な転写には、ウイルスタンパク質Tatが必要である。

40

【0205】

ほとんどのHIV-2系ベクターは、HIV-1ベクターに構造上よく似ている。HIV-1系ベクターと同様に、HIV-2ベクターも、全長または単スプライシングウイルスRNAの効率的な輸送にRREを必要とする。

【0206】

好ましくは、本発明で使用するウイルスベクターは、最少量のウイルスゲノムを含む。

50

【0207】

「最少量のウイルスゲノム」とは、目的のヌクレオチド配列を標的宿主細胞に感染、導入、および送達するために必要な機能を提供するために、ウイルスベクターが非必須要素を除去し、必須要素を保持するように操作されていると理解されるべきである。この戦略についてのさらなる詳細は、WO 1998/017815に見出すことができる。

【0208】

好ましくは、宿主細胞／パッケージング細胞内でウイルスゲノムを生産するために使用されるプラスミドベクターは、パッケージング構成要素の存在下で、RNAゲノムのウイルス粒子へのパッケージングを可能とするのに十分なレンチウイルス遺伝情報を有し、これらのウイルス粒子は、標的細胞に感染することはできるが、最終標的細胞内で独自に複製して感染力のあるウイルス粒子を生産することはできない。好ましくは、ベクターは、機能的な *gag-pol* 遺伝子および／または *env* 遺伝子および／または複製に必須な他の遺伝子を欠く。

【0209】

しかしながら、宿主細胞／パッケージング細胞内でウイルスゲノムを生産するために使用されるプラスミドベクターは、宿主細胞／パッケージング細胞内でゲノムの転写を命令するためにレンチウイルスゲノムに作動可能に連結された転写調節制御配列も含む。これらの調節配列は、転写されるウイルス配列（すなわち、5' U3領域）に会合した天然配列であってもよいし、または別のプロモーター（例えば、CMVプロモーター）などの異種プロモーターであってもよい。

【0210】

ベクターは、ウイルスのエンハンサーおよびプロモーター配列が欠失した自己不活性化（SIN）ベクターであってもよい。SINベクターは、*in vivo*において野生型ベクターと同程度の有効性で生成され、非分裂細胞に形質導入することができる。SINプロウイルスの長い末端反復配列（LTR）の転写不活性化は、複製コンピテントウイルスによる動員を防ぐはずである。これはまた、LTRのシス作用効果を排除することにより、内部プロモーターからの遺伝子の調節された発現を可能にするはずである。

【0211】

ベクターは、組込み欠陥型であってもよい。組込み欠陥型レンチウイルスベクター（IDLV）は、例えば、ベクターに触媒的に不活性なインテグラーゼ（触媒部位にD64V変異を有するHIVインテグラーゼなど；Naldini, L. et al. (1996) Science 272: 263-7; Naldini, L. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 11382-8; Leavitt, A.D. et al. (1996) J. Virol. 70: 721-8）をパッケージングすること、またはベクターLTRの必須の *att* 配列を修飾するか、もしくはベクターLTRから必須の *att* 配列を削除すること（Nightingale, S.J. et al. (2006) Mol. Ther. 13: 1121-32）、または上記の組合せによって生産することができる。

【0212】

細胞

別の態様において、本発明は、本発明のポリヌクレオチド、ベクター、抗原結合ドメインまたはCARを含んでなる細胞を提供する。

【0213】

いくつかの実施形態では、細胞は、T細胞、リンパ球または幹細胞、例えば、造血幹細胞、臍帯血幹細胞（CB）または誘導多能性幹細胞（iPSC）である。

【0214】

例えば、細胞は、CD4細胞、CD8細胞、Th0細胞、Tc0細胞、Th1細胞、Tc1細胞、Th2細胞、Tc2細胞、Th17細胞、Th22細胞、 γ/δ T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、ナチュラルキラーT（NKT）細胞、ダブルネガティブT細胞、ナイーブT細胞、メモリー幹T細胞、セントラルメモリーT細胞、エフェクターメモリーT細胞、エフェクターT細胞、サイトカイン誘導性キラー（CIK）細胞、造血幹細胞および誘導多能性幹細胞（iPSC）からなる群から選択され得る。

【0215】

いくつかの実施形態では、細胞は、T細胞またはNK細胞、好ましくは、T細胞である。いくつかの実施形態では、T細胞は、自己または同種T細胞である。

【0216】

細胞は、対象から単離されたものであってよい。

【0217】

本発明の細胞は、養子細胞移入に使用するために提供され得る。本明細書で使用される場合、「養子細胞移入」という用語は、患者への細胞集団の投与を指す。一般に、細胞は、対象から単離された後に遺伝的に修飾され、患者に投与される前に *in vitro* で培養されたT細胞である。

【0218】

養子細胞移入は、同種異型または自己であり得る。

【0219】

「自己細胞移入」とは、出発細胞集団（その後本発明によるポリヌクレオチドまたはベクターで形質導入される）が、形質導入された細胞集団が投与される対象と同じ対象から得られることと理解される。自己移入は、免疫学的不適合に関連する問題を回避し、遺伝的に一致したドナーが利用可能かどうかに関係なく対象に利用可能であるので有利である。

【0220】

「同種細胞移入」とは、出発細胞集団（その後本発明によるポリヌクレオチドまたはベクターで形質導入される）が、形質導入された細胞集団が投与される対象とは異なる対象から得られることと理解される。好ましくは、免疫学的不適合のリスクを最小化するために、ドナーは細胞が投与される対象と遺伝的に一致している。あるいは、ドナーは不一致で患者とは無関係でもよい。

【0221】

治療方法

別の態様において、本発明は、療法において使用するための本発明の抗原結合ドメイン、抗体、CAR、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞または医薬組成物を提供する。

【0222】

いくつかの実施形態では、療法は、癌の治療である。

【0223】

好ましい実施形態では、癌は、血液悪性腫瘍である。

【0224】

好ましい実施形態では、癌細胞は、CD84を発現し、例えば、血液悪性腫瘍は、CD84を発現する血液悪性腫瘍であり得る。

【0225】

いくつかの実施形態では、癌は、慢性リンパ球性白血病（CLL）、B細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）、バーキットリンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、B細胞急性リンパ芽球性白血病（B-ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、骨髄異形成症候群、T細胞急性リンパ芽球性白血病／リンパ腫（T-ALL）、慢性骨髄増殖性症候群、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性骨髄単球性白血病、樹状細胞新生物および組織球性肉腫からなる群から選択される。

【0226】

いくつかの実施形態では、癌は、慢性リンパ球性白血病（CLL）、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）、バーキットリンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、B細胞急性リンパ芽球性白血病（B-ALL）、T細胞急性リンパ芽球性白血病／リンパ腫（T-ALL）、急性骨髄性白血病（AML）および組織球性肉腫からなる群から選択される。

【0227】

好ましい実施形態では、癌は、CLL、B細胞リンパ腫、B-ALL、T-ALLおよ

10

20

30

40

50

び A M L からなる群から選択される。

【0228】

好ましい実施形態では、癌は、B細胞リンパ腫、B-A L L、T-A L LおよびA M L からなる群から選択される。

【0229】

別の態様において、本発明は、A M Lの治療において使用するための、本発明の抗原結合ドメイン、抗体、C A R、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞または医薬組成物を提供する。

【0230】

別の態様において、本発明は、T-A L Lの治療において使用するための、本発明の抗原結合ドメイン、抗体、C A R、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞または医薬組成物を提供する。

【0231】

別の態様において、本発明は、B細胞リンパ腫の治療において使用するための、本発明の抗原結合ドメイン、抗体、C A R、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞または医薬組成物を提供する。

【0232】

別の態様において、本発明は、パーキットリンパ腫の治療において使用するための、本発明の抗原結合ドメイン、抗体、C A R、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞または医薬組成物を提供する。

【0233】

いくつかの実施形態では、癌は、T細胞リンパ腫でない。いくつかの実施形態では、癌は、成熟T細胞リンパ腫でない。いくつかの実施形態では、癌はC L Lでない。いくつかの実施形態では、癌は、固形腫瘍でない。

【0234】

哺乳動物、特にヒトの治療が好ましい。ヒトの治療および獣医学的治療の両方が本発明の範囲内にある。

【0235】

医薬組成物および注射溶液

本発明で使用するための薬剤は単独で投与することができるが、特にヒトの療法では、一般に、医薬担体、賦形剤または希釈剤と混合して投与される。

【0236】

本発明の薬剤、例えば、細胞またはベクター粒子は、医薬組成物として製剤してよい。これらの組成物は、薬剤に加えて、薬学上許容される担体、希釈剤、賦形剤、バッファー、保存剤または当技術分野で周知のその他の材料を含んでなっておりよい。このような材料は、非毒性であるべきで、有効成分の有効性に干渉してはならない。担体またはその他の材料の厳密な性質は、投与経路、例えば、静脈内であるか動脈内であるかによって当業者に決定可能である。

【0237】

医薬組成物は一般に、液体の形態である。液体医薬組成物は一般に、水、石油、動物もしくは植物油、鉱油または合成油などの液体担体を含む。生理食塩水溶液、塩化マグネシウム、デキストロースもしくはその他の糖類溶液、またはエチレングリコール、プロピレングリコールもしくはポリエチレングリコールなどのグリコールも含み得る。いくつかの場合、プルロニック(登録商標)アシッド(P F 6 8) 0.001%などの界面活性剤が使用可能である。いくつかの場合、血清アルブミンが組成物に使用可能である。

【0238】

注射のためには、有効成分は、発熱物質を含まず、適切なp H、等張性および安定性を有する水溶液の形態であり得る。当業者ならば、例えば、塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液または乳酸加リンゲル注射液などの等張性ビヒクルを用いて適切な溶液を調製することが十分可能である。必要に応じて、保存剤、保存剤、バッファー、抗酸化剤および

10

20

30

40

50

／またはその他の添加剤を含めてもよい。

【0239】

遅延放出のためには、薬剤は、当技術分野で公知の方法によって、生体適合性ポリマーから形成されたマイクロカプセル、またはリポソーム担体系など、緩徐放出のために調剤された医薬組成物中に含まれてよい。

【0240】

細胞療法製剤の取り扱いは、細胞療法に関するFACT-JACE国際基準に準拠して行うことが好ましい。

【0241】

投与

いくつかの実施形態では、本発明の抗原結合ドメイン、抗体、CAR、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞または医薬組成物は、対象に全身投与される。

【0242】

いくつかの実施形態では、本発明の抗原結合ドメイン、抗体、CAR、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞または医薬組成物は、対象に局所投与される。

【0243】

「全身送達」または「全身投与」という用語は、本明細書で使用される場合、例えば、薬剤の広域分布を達成するために、本発明の薬剤が循環系に投与されることを意味する。対照的に、局所または局所投与は、薬剤の送達を限局された領域に制限する。

【0244】

いくつかの実施形態では、本発明の抗原結合ドメイン、抗体、CAR、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞または医薬組成物は、血管内、静脈内または動脈内に投与される。

【0245】

好ましい実施形態では、本発明の抗原結合ドメイン、抗体、CAR、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞または医薬組成物は、静脈内に投与される。

【0246】

用量

当業者ならば、対象に投与する本発明の薬剤の適切な用量を容易に決定することができる。一般に、医師が個々の患者に最も適した実際の用量を決定し、それは、採用される特定の化合物の活性、その化合物の代謝安定性および作用時間、年齢、体重、健康状態、性別、食事、投与の様式および時間、排泄速度、薬剤の組合せ、特定の病態の重症度、および治療を受ける個人を包含する様々な要因に依存する。当然のことながら、より高用量または低用量範囲が妥当な個々の例もあり得、そのような場合も本発明の範囲内にある。

【0247】

対象

「対象」という用語は、本明細書で使用される場合、ヒトまたは非ヒト動物を指す。

【0248】

非ヒト動物の例としては、脊椎動物、例えば、哺乳動物、例えば、非ヒト霊長類（特に高等霊長類）、イヌ、齧歯類（例えば、マウス、ラットまたはモルモット）、ブタおよびウシが挙げられる。非ヒト動物は、伴侶動物であり得る。

【0249】

好ましくは、対象はヒトである。

【0250】

変異体、誘導体、類似体、ホモログおよびフラグメント

本明細書で述べられる特定のタンパク質およびヌクレオチドに加え、本発明はまた、それらの変異体、誘導体、類似体、ホモログおよびフラグメントも包含する。

【0251】

本発明の文脈で、所与の配列の「変異体」は、残基の特定の配列（アミノ酸残基であれ核酸残基であれ）が、対象とするポリペプチドまたはポリヌクレオチドがその内因性機能のうち少なくとも1つを保持するように修飾されている配列である。変異体配列は、天然

10

20

30

40

50

ポリペプチドまたはポリヌクレオチド中に存在する少なくとも１つの残基の付加、欠失、置換、修飾、置き換えおよび／または変動によって得ることができる。

【０２５２】

「誘導体」という用語は、本明細書で本発明のタンパク質またはポリペプチドに関して使用される場合、結果として生じるタンパク質またはポリペプチドがその内因性の機能のうち少なくとも１つを保持する限り、配列からのまたは配列への１（または複数の）アミノ酸残基のいずれの置換、変動、修飾、置き換え、欠失および／または付加も包含する。

【０２５３】

「類似体」という用語は、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドに関して本明細書で使用される場合、任意の模倣剤、すなわち、それが模倣するポリペプチドまたはポリヌクレオチドの内因性の機能のうち少なくとも１つを有する化学化合物を包含する。

【０２５４】

一般に、アミノ酸置換は、修飾された配列が必要とされる活性または能力を保持する限り、例えば、１、２または３から１０または２０の置換を行うことができる。アミノ酸置換は、非天然類似体の使用を含み得る。

【０２５５】

本発明で使用されるタンパク質はまた、サイレント変異を生じ、機能的に同等のタンパク質をもたらすアミノ酸残基の欠失、挿入または置換を有し得る。意図的なアミノ酸置換は、内因性機能が保持される限り、残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性および／または両親媒性の類似性に基づいて行うことができる。例えば、負電荷を有するアミノ酸としては、アスパラギン酸およびグルタミン酸が挙げられ；正電荷を有するアミノ酸としては、リシンおよびアルギニンが挙げられ；類似の親水性値を有する非電荷極性頭基を有するアミノ酸としては、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニンおよびチロシンが挙げられる。

【０２５６】

保存的置換は、例えば、下表に従って行うことができる。第２列の同じブロック、好ましくは第３列の同じ行のアミノ酸は、互いに置換することができる。

【０２５７】

脂肪族	非極性	GAP
		ILV
	極性-非電荷	CSTM
		NQ
	極性-電荷	DE
		KRH
芳香族		FWY

【０２５８】

「ホモログ」という用語は、本明細書で使用される場合、野生型アミノ酸配列または野生型ヌクレオチド配列と特定の相同性を有する実体を意味する。「相同性」という用語は、「同一性」と同等と見なすことができる。

【０２５９】

本文脈において、相同配列とは、対象配列と少なくとも５０％、５５％、６５％、７５％、８５％または９０％同一、好ましくは少なくとも９５％、９６％または９７％または９８％または９９％同一であり得るアミノ酸配列を包含するものとする。一般に、ホモログは、対象のアミノ酸配列と同じ活性部位などを含んでなる。相同性は類似性（すなわち、類似の化学的特性／機能を有するアミノ酸残基）という観点で考えることもできるが、本発明の文脈では、配列同一性という観点で相同性を表すことが好ましい。

【0260】

本文脈において、相同配列は、対象配列と少なくとも50%、55%、65%、75%、85%または90%同一、好ましくは少なくとも95%、96%または97%または98%または99%同一であり得るヌクレオチド配列を包含すると見なされる。相同性は類似性の観点から考えることもできるが、本発明の文脈では、配列同一性の観点から相同性を表現することが好ましい。

【0261】

好ましくは、本明細書において詳述される配列番号のいずれか1つに対する同一性パーセントを有する配列という場合には、言及される配列番号の全長にわたって記載の同一性パーセントを有する配列を指す。

【0262】

相同性比較は目視により、またはより通常には、容易に入手可能な配列比較プログラムの助けで行うことができる。これらの市販のコンピュータプログラムは、2つ以上の配列間の相同性または同一性のパーセントを計算することができる。

【0263】

相同性パーセントは、連続する配列にわたって計算することができ、すなわち、一方の配列を他方の配列とアラインし、一方の配列の各アミノ酸またはヌクレオチドを、他方の配列の対応するアミノ酸またはヌクレオチドと、1残基ずつ直接比較する。これは「ギャップなし」アラインメントと呼ばれる。通常、このようなギャップなしアラインメントは、比較的短い残基数の場合にのみ行われる。

【0264】

これは非常に簡単で一貫性のある方法であるが、例えば、それ以外は同一の配列ペアにおいて、アミノ酸またはヌクレオチド配列に1つの挿入または欠失があると、それに続く残基またはコドンがアラインメントから外れてしまうことがあり、その結果、グローバルアラインメントを実行した際に、相同性パーセントが大きく減少する可能性があることを考慮することができない。結果として、ほとんどの配列比較法は、全体の相同性スコアに過度のペナルティを与えることなく、可能性のある挿入および欠失を考慮した最適なアラインメントを生成するように設計されている。これは、配列アラインメントに「ギャップ」を挿入し、局所的な相同性を最大化しようとすることで達成される。

【0265】

しかしながら、これらのより複雑な方法は、同じ数の同一アミノ酸またはヌクレオチドに対して、比較する2配列間のより高い関連性を反映して、できるだけギャップの少ない配列アラインメントは、ギャップの多いものよりも高いスコアとなるように、アラインメントで発生する各ギャップに「ギャップペナルティ」を割り当てる。ギャップの存在に対して比較的高いコストを課し、ギャップ内のそれに続く各残基に対してより小さなペナルティを課す「アフィンギャップコスト」が一般に使用される。これは最も一般的に使用されるギャップスコアリングシステムである。高いギャップペナルティは、当然のことながらギャップの少ない最適化されたアラインメントを生成する。ほとんどのアラインメントプログラムでは、ギャップペナルティを変更することができる。しかし、そのようなソフトウェアを配列比較に使用する場合は、デフォルト値を使用することが好ましい。例えば、GCG Wisconsin Bestfitパッケージを使用する場合、アミノ酸配列のデフォルトのギャップペナルティは、ギャップが-12、各エクステンションが-4である。

【0266】

従って、最大相同パーセントの計算には、まずギャップペナルティを考慮した最適なアラインメントの生成が必要である。このようなアラインメントを行うのに適したコンピュータプログラムは、GCG Wisconsin Bestfitパッケージ（ウィスコンシン大学，USA；Devereux et al. (1984) Nucleic Acids Research 12: 387）である。配列比較を行うことができる他のソフトウェアの例としては、限定されるものではないが、BLASTパッケージ（Ausubel et al. (1999) ibid - Ch. 18参

10

20

30

40

50

照)、FASTA(Atschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 403-410)および比較ツールのGENEWORKSスーツが挙げられる。BLASTもFASTAも、オフラインおよびオンライン検索に利用可能である(Ausubel et al. (1999) ibid, pages 7-58 ~7-60参照)。しかしながら、用途によっては、GCG Bestfitプログラムを使用するのが好ましい。別のツール、BLAST 2 Sequencesもタンパク質およびヌクレオチド配列を比較するために利用可能である(FEMS Microbiol. Lett. (1999) 174: 247-50; FEMS Microbiol. Lett. (1999) 177: 187-8)。

【0267】

最終的な相同性パーセントは同一性の観点から評価することもできるが、アラインメントプロセス自体は通常、オール・オア・ナッシングのペア比較に基づいていない。その代わりに、化学的類似性または進化的距離に基づいて各対の比較にスコアを割り当てる、スケール化された類似性スコアマトリックスが一般に使用される。一般に使用されるこのようなマトリックスの例としては、BLOSUM62マトリックス(BLASTプログラムスーツのデフォルトマトリックス)がある。GCG Wisconsinプログラムでは一般に、公開デフォルト値または提供されている場合にはカスタムシンボル比較テーブルのいずれかを使用する(さらなる詳細はユーザーマニュアルを参照)。アプリケーションによっては、GCGパッケージの公開デフォルト値、または他のソフトウェアの場合にはBLOSUM62などのデフォルトマトリックスを使用することが好ましい。

【0268】

ソフトウェアが最適なアラインメントを作成したら、相同性パーセント、好ましくは配列同一性パーセントを計算することができる。ソフトウェアは通常、配列比較の一部としてこれを行い、数値結果を生成する。

【0269】

「フラグメント」もまた変異体であり、この用語は通常、機能性または例えばアッセイにおいて注目するポリペプチドまたはポリヌクレオチドの選択された領域を指す。従って、「フラグメント」とは、全長ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの一部であるアミノ酸または核酸配列を指す。

【0270】

このような変異体は、部位特異的突然変異誘発などの標準的な組換えDNA技術を用いて作製することができる。挿入が行われる場合、挿入部位の両側の天然に存在する配列に対応する5'および3'隣接領域とともに挿入配列をコードする合成DNAを作製すればよい。隣接領域には、天然に存在する配列の部位に対応する便利な制限部位が含まれているので、適切な酵素で配列を切断し、その切断部位に合成DNAを連結すればよい。その後、DNAは本発明に従って発現され、コードされたタンパク質が作られる。これらの方法は、DNA配列の操作に関して当技術分野で知られている多くの標準的技術を例示したに過ぎず、他の既知の技術を使用してもよい。

【0271】

コドンの最適化

本発明で使用されるポリヌクレオチドはコドンの最適化を行ってもよい。コドンの最適化は、これまでにWO1999/41397およびWO2001/79518に記載されている。細胞が異なれば、特定のコドンの使用が異なる。このコドンの偏りは、細胞種における特定のtRNAの相対存在量の偏りに対応する。対応するtRNAの相対存在量に合うように配列中のコドンを変更することで、発現を増加させることができる。同様に、特定の細胞種では対応するtRNAが稀であることが知られているコドンを用意的に選択することで、発現を減少させることもできる。このように、さらに高度な翻訳制御が可能になる。コドン使用頻度表は、哺乳動物細胞だけでなく、他の様々な生物についても当分野で知られている。

【0272】

当業者は、開示された本発明の範囲から逸脱することなく、本明細書に開示された本発明の全ての特徴を組み合わせることができることを理解するであろう。

【0273】

以下、本発明の好ましい特徴および実施形態を限定されない例として説明する。

【0274】

本発明の実施には、特に断りのない限り、化学、生化学、分子生物学、微生物学および免疫学の従来技術を用いるが、これらは当業者の能力の範囲内にある。このような技術は文献で説明されている。例えば、Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F.M. et al. (1995 and periodic supplements) *Current Protocols in Molecular Biology*, Ch. 9, 13 and 16, John Wiley & Sons; Roe, B., Crabtree, J. and Kahn, A. (1996) *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; Polak, J.M. and McGee, J.O' D. (1990) *In Situ Hybridization: Principles and Practice*, Oxford University Press; Gait, M.J. (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; and Lilley, D.M. and Dahlberg, J.E. (1992) *Methods in Enzymology: DNA Structures Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA*, Academic Pressを参照のこと。これらの一般的なテキストのそれぞれは参照により本明細書の一部とされる。

【実施例】

【0275】

実施例1：血液悪性腫瘍におけるCD84の発現

本発明者らは、CD84が様々な悪性血液疾患で過剰発現していることを認めた。TCGAおよびGTExプロジェクトからの9,736の腫瘍および8,587の正常サンプルのRNAシーケンシング発現データを解析するための対話型ウェブサーバーであるGEPIAを使用して(<http://gepia.cancer-pku.cn/index.html>; Tang et al. *GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses*. *Nucleic Acids Res.* 2017; 10.1093/nar/gkx247)、以下のことを見出した。

- ・CD84発現は、47のリンパ系新生物びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（図1では、DLBCとして表す）では、337の血液サンプルの4.2倍。
- ・CD84発現は、173の急性骨髄性白血病（図1では、LAMLLとして表す）では、70の骨髄サンプルの10.1倍。

【0276】

本発明者らはまた、様々なタイプの固形および血液腫瘍に由来する1,100を超える細胞株パネルのmRNA発現データを含むCancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) データセットも調査した(<https://portals.broadinstitute.org/ccle>)。mRNA発現のRNAseqとAffymetrix解析の両方から、CD84はバーキットリンパ腫、急性骨髄性白血病(AML)、B細胞リンパ腫、慢性骨髄性白血病(CML)、B細胞性急性リンパ芽球性白血病(B-ALL)、およびT細胞性急性リンパ芽球性白血病(T-ALL)由来の細胞株では高レベルで発現しているが、T細胞性リンパ腫または固形腫瘍でそうではないことが示された（図2）。

【0277】

本発明者らは、次に、異なる血液悪性腫瘍に由来する細胞株の表面におけるCD84発現を評価した。表1に、使用した細胞株、それが由来する血液悪性腫瘍、および図3に示したサイトメトリック解析に基づくCD84発現の定性的評価を示す。

【0278】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1. 表面 CD84 発現を評価するために使用した血液悪性腫瘍に由来する細胞株および CD84 発現の定性的評価の一覧(本明細書で MOLM-13 と記載した実験における急性骨髄芽球性白血病細胞株は、従前に急性骨髄芽球性白血病細胞株 Kasumi-1 であることが示された; Kasumi-1 に対する言及は、相応に更新されている)。

細胞株	血液悪性腫瘍	CD84 発現
Ramos	バーキットリンパ腫	高
Raji	バーキットリンパ腫	高
Daudi	バーキットリンパ腫	高
NALM6	B-細胞急性リンパ芽球性白血病	高
MOLT-4	T-細胞急性リンパ芽球性白血病	高
U937	組織球性リンパ腫	低
MOLM-13	急性骨髄芽球性白血病	中
K562	慢性骨髄性白血病(急性転化)	低
THP-1	急性単球性白血病	低

10

20

【0279】

本発明者らは、CLL 患者からの 9 サンプルにおける CD84 の発現をフローサイトメトリーで解析した。表 2 に、図 4 に示したサイトメトリー解析に基づく CD84 発現の定性的評価を示す。白血病細胞における CD84 の発現を、リンパ球 (CD84 moderate) および単球 (CD84 high) における CD84 の発現と比較した。薄いグレーのヒストグラムはアイソタイプ適合対照抗体による染色を表し、濃いグレーのヒストグラムは特異的 CD84 抗体による染色を表す。

【0280】

【表 2】

30

表 2. フローサイトメトリーにより評価した 9 名の慢性リンパ球性白血病(CLL)患者からの白血病細胞における CD84 の発現

患者番号	CD84 発現
P01	中
P02	高
P03	高
P04	高
P05	高
P06	高
P07	高
P08	高
P09	高

40

【0281】

ある種のゲノムデータベースは、AML において CD84 が mRNA レベルで過剰発現していることを示唆しているが、本発明者らは、AML と診断された患者 (n = 10) の悪性細胞の表面に CD84 が発現しているかどうかを確認しようとした (表 3)。

50

【 0 2 8 2 】

【 表 3 】

表 3. フローサイトメトリーにより評価された 10 名の急性骨髄性白血病(AML)患者の白血病細胞における CD84 の発現

患者番号	CD84 発現
P01	中
P02	中
P03	高
P04	中
P05	中
P06	中
P07	中
P08	中
P09	中
P10	高

10

20

【 0 2 8 3 】

フローサイトメトリーデータの 2 つの代表例を図 5 に示す：患者 0 4 と患者 1 0 のサンプルは、それぞれ CD 8 4 の発現が中と高を示す。

【 0 2 8 4 】

実施例 2：CD 8 4 抗体

マウスモノクローナル抗体

本発明者らは、2 つの抗 CD 8 4 マウスモノクローナル抗体 (1 5 2 - 1 D 5 と 1 5 3 - 4 D 9; Engel et al. B-cell antigens section report, in Schlossman S (ed): Leucocyte Typing V. Oxford, UK, Oxford University Press, 1995, page 483; Palou et al. Genomic characterization of CD84 reveals the existence of five isoforms differing in their cytoplasmic domains. Tissue Antigens. 2000; 55(2):118-27) の配列を研究および決定した。

30

【 0 2 8 5 】

さらに、本発明者らは、ヒト CD 8 4 タンパク質で BALB / c マウスを免疫することにより、方法に記載されているように、多数の新しい抗 CD 8 4 マウスモノクローナル抗体を作製した。表 3 に、方法に記載されたように特性評価を行ったこれらの抗体の特徴をまとめる。3 0 0 . 1 9 - CD 8 4 ⁺、R a j i および R a m o s 細胞、リンパ球および単球への結合は、等量 / 等濃度の抗 CD 8 4 抗体を添加したハイブリドーマ上清を用いて行った。

【 0 2 8 6 】

40

50

【表 4】

表 4. 抗 CD84 マウスモノクローナル抗体の特徴のまとめ

抗体	クラス	ドメイン	300.19-CD84 結合	Raji 結合	Ramos 結合	リンパ球 結合	単球 結合
152-1D5	IgG1, κ	hD1	92.5%	97.6%	73.4%	24.4%	72.0%
153-4D9	IgG1, κ	hD1	88.0%	65.8%	34.3%	15.9%	47.7%
GYCD84.1 108	IgG2a, κ	hD1	93.9%	30.3%	31.2%	13.6%	41.3%
GYCD84.1 226	IgG1, κ	hD1	98.1%	99.9%	80.2%	28.7%	76.1%
GYCD84.2 32	IgG1, κ	hD1	99.0%	99.5%	78.6%	28.7%	78.2%
GYCD84.3 89	IgG1, κ	hD1	83.0%	99.1%	91.3%	24.9%	72.7%
GYCD84.1 97	IgG2a, κ	hD1	97.7%	na	na	na	na
GYCD84.1 207	IgG1, κ	hD1	94.2%	na	na	na	na
GYCD84.1 7	IgG1, κ	hD2	92.6%	91.4%	59.0%	19.0%	64.4%
GYCD84.3 298	IgG1, κ	hD2	93.5%	45.9%	28.3%	16.6%	53.9%
GYCD84.2 27	IgG1, κ	hD2	96.3%	97.5%	66.3%	25.4%	77.5%
GYCD84.5 171	IgG1, κ	hD2	93.2%	73.9%	35.1%	26.8%	64.8%

na:該当なし

【0287】

軽鎖の可変領域（VL）に相当する配列と重鎖の可変領域（VH）に相当する配列は、**Mouse Ig-Primer Set (Novagen)** を用いて異なるハイブリドーマから決定した。この領域のサンガーシーケンシングは、**Absolute Antibody**（英国）により行われた。相補性決定領域（CDR）およびフレームワーク領域（FR）は、**Abyssis**（配列は **Kabat** ナンバリングスキームで定義）、**IMGT** および **IgBLAST** データベースを用いて同定した。

【0288】

表 5 は、これらの抗体の VH 配列および VL 配列を示す。各配列の 3 つの CDR が太字および下線で強調されている。

【0289】

10

20

30

40

50

【表 5】

表5. 抗CD84マウスモノクローナル抗体のVH配列およびVL配列 列番号

抗体	VH	VL
152-1D5	QVQLQQPGAELVQPGTSVKLSCKASGYNF <u>TNYWIN</u> WVKLRPGQGLEWIG <u>DIYPVSGTT</u> <u>NYNEKFKR</u> KATLTVDTSSTGNMQLSSLA SEDSALYYCAS <u>GTGRFAY</u> WGQGTTLTVSA (配列番号 61)	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCR <u>RASQSV</u> <u>STSSYSYMH</u> WYQQKPGQPPKLLIK <u>FASNL</u> <u>ES</u> GVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDT ATYYC <u>QHSWEIPYT</u> FGGGTKLEIK (配列番号 62)
153-4D9	QVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYTF <u>TNYWL</u> GWVKQRPGHGLEWIG <u>DIYPGGGYT</u> <u>NYIEKFKG</u> KATLTADTSSTAYMQLSSLT SEDSAVYFCAR <u>YEGGYGYNDAMDY</u> WGQG TSVTVSS (配列番号 63)	DIVLTQSPGSLAVSLGQRATISCR <u>RASESV</u> <u>DNYGISFMN</u> WFQQKPGQPPKLLIY <u>AASNQ</u> <u>GS</u> GVPARFSGSGSGTDFTSLNIHPMEEDDT AMYFC <u>QOSKAVPRT</u> FGGGTKLEIK (配列番号 64)
GYCD84.1-7	QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSL <u>STSGMGV</u> GWIRQPSGKGLEWLA <u>HIWDDV</u> <u>KRYNPALKS</u> RLTISKDTSSSQVFLKIASV DTADTATYYCARM <u>MRTSYFYDY</u> WGQGTTLT VSS (配列番号 74)	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCR <u>RASENI</u> <u>FSSLA</u> WYQQRQKGSPQLLVY <u>NAKTLAE</u> GV PSRFSGSGSGTQFSLKINSLPEDFGSY <u>COHHYATPFT</u> FGSGTKLEIK (配列番号 75)
GYCD84.1-97	QVQLQQPGAELVKPGTSVKLSCKASGYNF <u>TSYWIN</u> WVKLRPGQGLEWIG <u>DIYLGSGST</u> <u>NYNEKFKS</u> KATLTVDTSSSAYMQLSSLV SEDSALYYCAT <u>SGGYLGY</u> WGQGTTLTVSS (配列番号 76)	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCR <u>RASQSV</u> <u>STSSYSYMH</u> WYQQKPGQPPKLLIK <u>FASNL</u> <u>ES</u> GVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDT ATYYC <u>QHSWEIPYT</u> FGGGTKLEIK (配列番号 77)
GYCD84.1-108	QVQLQQSGAELVRPGTSVKMSCKAAGYTF <u>TNYWIG</u> WVRQRPBGHGLEWIG <u>DIYPGGGYT</u> <u>NYNENFKG</u> KATLTADTSSTAYMQLSSLT SEDSALYYCAR <u>STTYYSYWC</u> FDVWGP TVTSS (配列番号 78)	DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSC <u>KSSQSL</u> <u>LNSGNQANYLA</u> WYQQKPGQPPKLLIY <u>GAS</u> <u>TRES</u> GVDPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAE DLAVYYC <u>QNDHSYPFT</u> FGSGTKLEIK (配列番号 79)
GYCD84.1-207	EVKLLESGGGLVQPGGSLKLSAASGFDF <u>SRYWMS</u> WVRQAPGKGLEWIG <u>EINPDSSTI</u> <u>NYTPSLKD</u> KFIIISRDNAKNTLYLQMSKVR SEDTALYYCAR <u>PGPTVATYWF</u> FDVWGAG TTVTSS (配列番号 80)	DVLTMTQTPSLPVS LGDQASISCR <u>RSSQSI</u> <u>VHSNGNTYLE</u> WYLQKPGQSPKLLIY <u>KVSS</u> <u>RFS</u> GVDPDRFSGSASGTDFTLKISRVEAED LGVYYC <u>FQGSHPRT</u> FGGGTKLEIK (配列番号 81)
GYCD84.1-226	QVQLQQPGAELVKPGTSVKLSCKASGYNF <u>TRYWIN</u> WVKLRPGQGLEWIG <u>DIYPGSGST</u> <u>NYNEKFKS</u> KATLTVDTSSTAYMQLSRLA SEDSALYYCARD <u>TTIAY</u> WGQGTTLTVSA (配列番号 82)	DIVLTQSPSTSLAVSLGQRATISCR <u>RASQSV</u> <u>TTSRYSYMH</u> WYQQKPGQPPKLLIK <u>FASNL</u> <u>ES</u> GVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDT ATYYC <u>QHSWEIPYT</u> FGGGTKLEIK (配列番号 83)
GYCD84.2.32	EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSF <u>TGYNMN</u> WVKQSNKSLWIG <u>NIDPYYGGT</u> <u>NYNQKFKG</u> KATLTVDKSSSTAYMQLKSLT SEDSAVYYCAR <u>GLLSGSFPY</u> WGQGTTLTV SA (配列番号 161)	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCR <u>RASENI</u> <u>YSYLA</u> WYQQKQKSPQLLVY <u>NAKTLAE</u> GV PSRFSGSGSGTQFSLKINSLPEDFGSYF <u>COHHYGSPLT</u> FGAGTKLEVK (配列番号 162)
GYCD84.3.89	EVKLLESGGGLVQPGGSLKLSAASGFDF <u>SRWMS</u> WVRQAPGKGLEWIG <u>EINPDSSTI</u>	DVLTMTQTPSLPVS LGDQASISCR <u>RSSQSI</u> <u>VHSNGDYLE</u> WYLQKPGQSPKLLIY <u>KVSN</u>

10

20

30

40

50

	<u>NYTPSLKD</u> KFIIISRDNAKNTLFLQMSKVR SEDTALYYCAT <u>FYDGYSIYWYFDV</u> WGAGT TVTVSS (配列番号 163)	<u>RFS</u> GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED LGVYYC <u>FQGSHPRT</u> FGGGTKLEIK (配列番号 164)
GYCD84.3.298	QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSL S <u>TSGMGV</u> GWIRQPSGKGLEWLAHIWDDV <u>KRYNPALRS</u> RLTISKDTSSSQVFLNIASV DTADTATYYCTR <u>IAVTYFFDF</u> WGQGTTLT VSS (配列番号 165)	DIQMTQSPASLSASVGETVTITC <u>RASENI</u> <u>FSSFAW</u> YQQKRGSPQLLVY <u>NARTLAE</u> GV PSRFSGSGSGTQFSLKINSIQPEDFGTYF <u>CQHHYAS</u> PFTFGSGTELGVK (配列番号 166)
GYCD84.2.27	QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSL T <u>TSGMGV</u> GWIRQPSGKGLEWLAHIWDDV <u>KRYNPALKS</u> RLTISKDTSSSQVFLKIASV DTADTASYCARM <u>STSYFFDY</u> WGQGTTLT VSS (配列番号 167)	DIVMTQSHKFMSTSLGDRVSI <u>SKASQSL</u> <u>FTSVAW</u> YQQKPGQSPKLLIY <u>SASRYT</u> GV PDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYY <u>CQHHYSS</u> PFTFGSGTKLGK (配列番号 168)
GYCD84.5.171	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLAASGFTF NIYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKSNNY <u>ARFYADSVKDR</u> FTISRDDSQSMYLYQMNN LKTEDTAMYYCVR <u>PLRSYFSMDY</u> WGQGTS VTVSS (配列番号 169)	SIVMTQSPKSMMSVGERVTLSC <u>KASENV</u> <u>DTYVSW</u> YQQKPEQSPKLLIY <u>GASNRYT</u> GV PDRFTGSGSATDFTLTISSVKAEDLADYH <u>CGQTYSPWT</u> FGGGTKLEIK (配列番号 170)

10

20

【0290】

ヒトscFv

ファージディスプレイスクリーニングを用いて、CD84に結合する新規なヒトscFvを同定した。3つの異なるscFvが同定され（R3-B3、R3-G7およびR3-H3）；重鎖（VH）および軽鎖（VL）の可変ドメインのCDRおよびFRの配列を表6に示す。

【0291】

【表6】

表6. 抗CD84ヒトscFvのVL配列およびVH配列

	R3-B3	R3-G7	R3-H3
VH FR1	QVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAAS (配列番号 84)	QVQLVESGGGVVQPGRSRL SCTAS (配列番号 92)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAAS (配列番号 100)
VH CDR1	GFTFSSYA (配列番号 13)	GFTFSSYP (配列番号 19)	GFTFSDNA (配列番号 25)
VH FR2	MSWVRQAPGKGLEWVSA (配列番号 85)	MHWVRQAPGKGLEWVAA (配列番号 93)	MSWVRQAPGKGLEWVSA (配列番号 101)
VH CDR2	ISGSGGST (配列番号 14)	ISYHGRNK (配列番号 20)	ISGTGRIT (配列番号 26)
VH FR3	YYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYC (配列番号 86)	FYADSVKGRFTISRDDLST LYLQMNNLKADDTAVYSC (配列番号 94)	YYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYC (配列番号 102)
VH CDR3	AKWDCSDGRCYWAY (配列番号 15)	ARDRDATPGGTGVGNHGMV (配列番号 21)	AKWDCSDGRCYWAY (配列番号 27)
VH FR4	WGQGTLLTVSS (配列番号 87)	WGQGTTLTVSS (配列番号 95)	WGQGTLLTVSS (配列番号 103)
VH	配列番号 65	配列番号 68	配列番号 71
リンカー	GGGGSGGGSGGGSGGGGA S (配列番号 67)	GGGGSGGGSGGGSGGGGA S (配列番号 70)	GGGGSGGGSGGGSGGGGA S (配列番号 73)
VL FR1	QPVLTPPPSVSVAPGQTARI SCGGD (配列番号 88)	EIVLTQSPSLPVTTPGEPAS ISCKSS (配列番号 96)	EIVLTQSPSLPVTTLGQPAS ISCRSS (配列番号 104)

30

40

50

VL CDR1	NIESKD (配列番号 16)	QSLHSSGYNY (配列番号 22)	QSLVYSDGDTY (配列番号 28)
VL FR2	VHWYQRKSGQAPVLVVH (配列番号 89)	LDWYLQKPGQSPQLLIH (配列番号 97)	LNWFQQRPGQSPRRLIY (配列番号 105)
VL CDR2	DDA (配列番号 17)	MGS (配列番号 23)	KVS (配列番号 29)
VL FR3	DRPTGIPDRFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYC (配列番号 90)	NRASGVPARFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYC (配列番号 98)	NRDSGVPRDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC (配列番号 106)
VL CDR3	QVWDSSSDHV (配列番号 18)	MQGLQTPPT (配列番号 24)	MQGTHWPPNT (配列番号 30)
VL FR4	EGGGTQLTVL (配列番号 91)	EGGGTKLEIK (配列番号 99)	FGQGTTRLEIK (配列番号 107)
VL	配列番号 66	配列番号 69	配列番号 72

10

【0292】

実施例3：CD84 CARの作製

本発明者らは、いくつかの抗CD84 CAR構築物(CAR84)を作製した。完全なCAR84配列を、EF1 α プロモーターの制御下にシグナルペプチド、CD84に特異的なscFv、CD8aのヒンジ領域と膜貫通領域、共刺激ドメイン4-1BB、およびシグナル伝達ドメインCD3- ζ を包含する第三世代レンチウイルスベクターpCCL (Dull et al. A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. J. Virol. 1998;72:8463-8471)にクローニングした(図6)。

20

【0293】

scFvドメインの様々な変種が、上述の抗体に基づいて設計された。これらのscFvは、VH配列とVL配列の順序(VH鎖のみを有する変種もある)、およびVHとVLの間に使用されるリンカーが異なり、3つ(S3)または4つ(S4)のモチーフ(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)が使用されている。各CAR変種に付けられた名称は、scFvの設計を反映している。合成され、pCCLベクターにクローニングされた種々のscFvドメインの配列を表7に示す。

【0294】

30

【表7】

表7. 設計された各CD84 CARに使用されたscFvドメインの配列および構造

CAR名	抗体/scFv	第1ドメイン	リンカー	第2ドメイン
152.1 (VH)	152-1D5	VH: QVQLQQPGAEEVVPQTSTVKLS CKASGYNFTNYWINWVKLRPG QGLEWIGDIYPVSGTTNYNEK FKRKATLTVDTSSTGNMQLS SLASEDSALYYCASGTGRFAY WGQGTLLVTVSA (配列番号 61)		
152.2 (VLS3VH)	152-1D5	VL: DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSSYSYMHYQQKPGQPPKLLIKFASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEE	GGGGS GGGGS GGGGS (配列番号)	VH: QVQLQQPGAEEVVPQTSTVKLS CKASGYNFTNYWINWVKLRPG QGLEWIGDIYPVSGTTNYNEK FKRKATLTVDTSSTGNMQLS

40

50

CAR 名	抗体/ scFv	第1ドメイン	リンカー	第2ドメイン
		EDTATYYCQHSWEIPYTFGGG TKLEIKRA (配列番号 108)	110)	SLASEDSALYYCASGTGRFAY WGQGTTLVTVSA (配列番号 61)
152.3 (VLS4VH)	152-1D5	<u>VL:</u> DIVLTQSPASLAVSLGQRATI SCRASQSVSTSSYSYMHWYQQ KPGQPPKLLIKFASNLESGVP ARFSGSGSGTDFTLNIHPVEE EDTATYYCQHSWEIPYTFGGG TKLEIKRA (配列番号 108)	GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS (配列 番号 111)	<u>VH:</u> QVQLQQPGAQEVVQPGTSVKLS CKASGYNFTNYWINWVKLRPG QGLEWIGDIYPVSGTTNYNEK FKRKATLTVDTSSTGNMQLS SLASEDSALYYCASGTGRFAY WGQGTTLVTVSA (配列番号 61)
152.4 (VHS3VL)	152-1D5	<u>VH:</u> QVQLQQPGAQEVVQPGTSVKLS CKASGYNFTNYWINWVKLRPG QGLEWIGDIYPVSGTTNYNEK FKRKATLTVDTSSTGNMQLS SLASEDSALYYCASGTGRFAY WGQGTTLVTVSA (配列番号 61)	GGGGS GGGGS GGGGS (配列 番号 110)	<u>VL:</u> DIVLTQSPASLAVSLGQRATI SCRASQSVSTSSYSYMHWYQQ KPGQPPKLLIKFASNLESGVP ARFSGSGSGTDFTLNIHPVEE EDTATYYCQHSWEIPYTFGGG TKLEIKRA (配列番号 108)
152.5 (VHS4VL)	152-1D5	<u>VH:</u> QVQLQQPGAQEVVQPGTSVKLS CKASGYNFTNYWINWVKLRPG QGLEWIGDIYPVSGTTNYNEK FKRKATLTVDTSSTGNMQLS SLASEDSALYYCASGTGRFAY WGQGTTLVTVSA (配列番号 61)	GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS (配列 番号 111)	<u>VL:</u> DIVLTQSPASLAVSLGQRATI SCRASQSVSTSSYSYMHWYQQ KPGQPPKLLIKFASNLESGVP ARFSGSGSGTDFTLNIHPVEE EDTATYYCQHSWEIPYTFGGG TKLEIKRA (配列番号 108)
153.1 (VH)	153-4D9	<u>VH:</u> QVQLQQSGAELVRPGTSVKIS CKASGYTFTNYWLGWVKQRPG HGLEWIGDIYPGGGYTNYIEK FKGKATLTADTSSTAYMQLS SLTSEDSAVYFCARYEGGYG NYDAMDYWGQTSVTVSS (配列番号 63)		
153.2 (VLS3VH)	153-4D9	<u>VL:</u> DIVLTQSPGSLAVSLGQRATI SCRASESDNYGISFMNWFQQ KPGQPPKLLIYAASNQGSQV ARFSGSGSGTDFSLNIHPMEE DDTAMYFCQQSKAVPRTFGGG TKLEIKRA (配列番号 109)	GGGGS GGGGS GGGGS (配列 番号 110)	<u>VH:</u> QVQLQQSGAELVRPGTSVKIS CKASGYTFTNYWLGWVKQRPG HGLEWIGDIYPGGGYTNYIEK FKGKATLTADTSSTAYMQLS SLTSEDSAVYFCARYEGGYG NYDAMDYWGQTSVTVSS (配列番号 63)
153.3 (VLS4VH)	153-4D9	<u>VL:</u> DIVLTQSPGSLAVSLGQRATI SCRASESDNYGISFMNWFQQ KPGQPPKLLIYAASNQGSQV ARFSGSGSGTDFSLNIHPMEE DDTAMYFCQQSKAVPRTFGGG TKLEIKRA (配列番号 109)	GGGGS GGGGS GGGGS (配列 番号 111)	<u>VH:</u> QVQLQQSGAELVRPGTSVKIS CKASGYTFTNYWLGWVKQRPG HGLEWIGDIYPGGGYTNYIEK FKGKATLTADTSSTAYMQLS SLTSEDSAVYFCARYEGGYG NYDAMDYWGQTSVTVSS (配列番号 63)
153.4 (VHS3VL)	153-4D9	<u>VH:</u> QVQLQQSGAELVRPGTSVKIS CKASGYTFTNYWLGWVKQRPG HGLEWIGDIYPGGGYTNYIEK	GGGGS GGGGS GGGGS (配列	<u>VL:</u> DIVLTQSPGSLAVSLGQRATI SCRASESDNYGISFMNWFQQ KPGQPPKLLIYAASNQGSQV

10

20

30

40

50

CAR 名	抗体/ scFv	第1ドメイン	リンカー	第2ドメイン
		FKGKATLTADTSSSTAYMQLS SLTSEDSAVYFCARYEGGYYG NYDAMDYWGQGTSTVTVSS (配列番号 63)	番号 110)	ARFSGSGSGTDFSLNIHPMEE DDTAMYFCQQSKAVPRTFGGG TKLEIKRA (配列番号 109)
153.5 (VHS4VL)	153-4D9	VH: QVQLQQSGAELVRPGTSVKIS CKASGYTFTNYWLGWVKQRP HGLEWIGDIYPGGGYTNYIEK FKGKATLTADTSSSTAYMQLS SLTSEDSAVYFCARYEGGYYG NYDAMDYWGQGTSTVTVSS (配列番号 63)	GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS (配列 番号 111)	VL: DIVLTQSPGSLAVSLGQRATI SCRASESVDNYGISFMNWFQQ KPGQPPKLLIYAASNQSGSVP ARFSGSGSGTDFSLNIHPMEE DDTAMYFCQQSKAVPRTFGGG TKLEIKRA (配列番号 109)
B3.4 (VHS3VL)	R3-B3	VH: QVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGSGSTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKWDCSDGR CYWAYWGQGTSTVTVSS (配列番号 65)	GGGGS GGGGS GGGGS (配列 番号 110)	VL: QPVLTPPPSVSVAPGQTARIS CGGDNIESKDVHWYQRKSGQA PVLVHDDADRPTGIPDRFSG SNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDSSSDHVVFGGGTQL TVL (配列番号 66)
B3.5 (VHS4VL)	R3-B3	VH: QVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGSGSTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKWDCSDGR CYWAYWGQGTSTVTVSS (配列番号 65)	GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS (配列 番号 111)	VL: QPVLTPPPSVSVAPGQTARIS CGGDNIESKDVHWYQRKSGQA PVLVHDDADRPTGIPDRFSG SNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDSSSDHVVFGGGTQL TVL (配列番号 66)
G7.4 (VHS3VL)	R3-G7	VH: QVQLVESGGGVVQPGRSRLRS CTASGFTFSSYPMHWVRQAPG KGLEWVAISYHGRNKFYADS VKGRFTISRDDLRLSTLYLQMN NLKADDTAVYSCARDRDATPG GTGVGNHGMVWGQGTSTVTVS S (配列番号 68)	GGGGS GGGGS GGGGS (配列 番号 110)	VL: EIVLTQSPPLSLPVTGPGEPA SCKSSQSLHSSGYNLDWYL QKPGQSPQLLIHMGSNRASGV PARFSGSGSGTDFTLRISRVE AEDVGYYCMQGLQTPPTFGG GTKLEIK (配列番号 69)
G7.5 (VHS4VL)	R3-G7	VH: QVQLVESGGGVVQPGRSRLRS CTASGFTFSSYPMHWVRQAPG KGLEWVAISYHGRNKFYADS VKGRFTISRDDLRLSTLYLQMN NLKADDTAVYSCARDRDATPG GTGVGNHGMVWGQGTSTVTVS S (配列番号 68)	GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS (配列 番号 111)	VL: EIVLTQSPPLSLPVTGPGEPA SCKSSQSLHSSGYNLDWYL QKPGQSPQLLIHMGSNRASGV PARFSGSGSGTDFTLRISRVE AEDVGYYCMQGLQTPPTFGG GTKLEIK (配列番号 69)
H3.4 (VHS3VL)	R3-H3	VH: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSDNAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGTGRTTYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKWDCSDGR CYWAYWGQGTSTVTVSS (配列番号 71)	GGGGS GGGGS GGGGS (配列 番号 110)	VL: EIVLTQSPPLSLPVTLGQPASI SCRSSQSLVYSDGDTYLNWFQ QRPQGSPRRLIYKVSNRDSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGYYCMQGTHWPPNTFG QGTRLEIK (配列番号 72)
H3.5 (VHS4VL)	R3-H3	VH: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSDNAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGTGRTTYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKWDCSDGR	GGGGS GGGGS GGGGS (配列 番号 111)	VL: EIVLTQSPPLSLPVTLGQPASI SCRSSQSLVYSDGDTYLNWFQ QRPQGSPRRLIYKVSNRDSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGYYCMQGTHWPPNTFG

10

20

30

40

CAR 名	抗体/ scFv	第1ドメイン	リンカー	第2ドメイン
		CYWAYWGQGTSTVTVSS (配列番号 71)	111)	QGTRLEIK (配列番号 72)

【0295】

完全なCAR配列を表8に示す。

【0296】

50

【表 8】

表8. 完全なCAR配列

CAR 名	抗体/ scFv	CAR 配列
152.3 (VLS4VH)	152-1D5	MALPVTGLLLSLGLLLHAARPTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSV STSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKFASNLESQVPAFSGSGSGTDFTLNIHP VEEEDTATYYCQHSWEIPTYTGGGKLEIKRAGGGSGGGSGGGSGGGSG QVQLQQPGAQEVVQPGTSVKLSCKASGYNFTNYWINVVKLRPGQGLEWIGDIY PVSGTTNYNEKFKRKATLTVDTSSTGNMQLSSLASEDSALYYCASGTGRFA YWGQGTSLVTVSATTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQ EEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号 172)
153.4 (VHS3VL)	153-4D9	MALPVTGLLLSLGLLLHAARPTGQVQLQSGAELVRPGTSVKISCKASGYTF TNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIYPGGGYTNIEKFKGKATLTADTSSSTAYM QLSSLTSEDSAVYFCARYEGGYGNYDAMDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSDIVLTQSPGSLAVSLGQRATISCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGQP PKLLIYAASNQSGVPAFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSKAVP RTFGGKLEIKRATTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTR GLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT TQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREE YDVLDKRRGRDPPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR GKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号 173)
153.5 (VHS4VL)	153-4D9	MALPVTGLLLSLGLLLHAARPTGQVQLQSGAELVRPGTSVKISCKASGYTF TNYWLGWVKQRPGHGLEWIGDIYPGGGYTNIEKFKGKATLTADTSSSTAYM QLSSLTSEDSAVYFCARYEGGYGNYDAMDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSGGGSDIVLTQSPGSLAVSLGQRATISCRASESVDNYGISFMNWFQQ KPGQPPKLLIYAASNQSGVPAFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQ SKAVPRTFGGKLEIKRATTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGG AVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK GERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号 174)
G7.5 (VHS4VL)	R3-G7	MALPVTGLLLSLGLLLHAARPTGQVQLVESGGGVVQPGRSRLSCTASGFTF SSYPMHVVRQAPGKLEWVAASISYHGRNKFYADSVKGRFTISRDDLSTLYL QMNNLKADDTAVYSCARDRDATPGGTGVGNHGMVAVWGQGTSTVTVSSGGGGSG GGGGSGGGSGGGSEIVLTQSPLSLPVTGPGEPAISCKSSQSLHSSGYNYL DWYLQKPGQSPQLLIHMGSNRASGVPAFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDVGV YYCMQGLQTPPTFGGKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQ PFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号 175)
H3.5 (VHS4VL)	R3-H3	MALPVTGLLLSLGLLLHAARPTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SDNAMSWVRQAPGKLEWVSAISGTGRTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKWDCSDGRCYWAYWGQGTSLVTVSSGGGGSGGGSGG GGSEIVLTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGDTYLNWFQQRPQGSP RRLIYKVSNRDSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTWPP NTFGQGTREIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL

10

20

30

40

CAR 名	抗体/ scFv	CAR 配列
		DFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQ EEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号 176)
1.7.3 (VLS4VH)	GYCD84. 1-7	MALPVTGLLLSLGLLLHAARPTGDIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENI FSSLAWYQQRQGKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPE DFGSYYCQHHYATPFTFGSGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVTLKE SGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVGVIRQPSGKGLEWLAHIWDDV KRYNPALKSRLTISKDTSSSQVFLKIASVDTADTATYYCARMRTSYFFDYWG QGTTTLTVSSTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA CDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD KRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号 177)
1.7.5 (VHS4VL)	GYCD84. 1-7	MALPVTGLLLSLGLLLHAARPTGQVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSL STSGMGVGVIRQPSGKGLEWLAHIWDDVKRYNPALKSRLTISKDTSSSQVF LKIASVDTADTATYYCARMRTSYFFDYWGQGTTTLTVSSGGGSGGGGSGGGG SGGGGSDIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIFSSLAWYQQRQGKSPQL LVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYYCQHHYATPFTF GSGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA CDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD KRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号 178)
1.226.5 (VHS4VL)	GYCD84. 1-226	MALPVTGLLLSLGLLLHAARPTGQVQLQPGAEVLKPGTSVKLSCKASGYNF TRYWINWVKLRPGQGLEWIGDIYPGSGSTNYNEKFKSKATLTVDTSSTAYM QLSRLASEDSALYYCARDTTIAYWGQGLVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSDIVLTQSPTSLAVSLGQRATISCRASQSVTTSRYSYMHWYQQKPGQPPL LIKFSNLESQVPSRFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDTATYYCQHSWEIPYTF GGGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFA CDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLD KRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHD GLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号 179)
3.89.5 (VHS4VL)	GYCD84. 3-89	MALPVTGLLLSLGLLLHAARPTGEVKLLSEGGGLVQPGGSLKLSCAASGFGF SRSWMSWVRQAPGKGLEWIGEINPDSSTINYTPSLKDKFIISRDNANTLFL QMSKVRSEDTALYYCATFYDGYSIYWFVDVWAGTTVTVSSGGGSGGGGSG GGGSGGGGSDVLMQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSI VHSNGDTYLEWYLQ KPGQSPKLLIYKVS NRFSQVDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQ GSHVPRTFGGGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAV HTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRP VQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGE RRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号 180)

10

20

30

40

50

【0297】

CD84 CARTの生産

pCCL-EF1 α -CD84ベクターの種々の変種を含むレンチウイルス(LV)をHEK293-T細胞で産生し、限界希釈法によって導入ユニット数を決定した。次に、これらのレンチウイルスを用いて全血から単離したT細胞に形質導入した。その後、これらのCAR-T細胞を6～8日間、拡大培養した。

【0298】

下表(表9～11)は、種々のCARTに関して3回の独立した形質導入の後に得られたT細胞の数、ならびにこれらのT細胞のうち表面にCD84 CARを発現したもののパーセンテージをまとめたものである。

【0299】

【表 9】

表 9. 152-1D5 抗体に基づく CD84 CA. 発現レンチウイルスを独立に 3 回形質導入した後に得られた CAR 陽性 T 細胞の数およびパーセンテージ

	形質導入#1		形質導入#2		形質導入#3	
	細胞数	% CAR	細胞数	% CAR	細胞数	% CAR
UT	19.2 x10 ⁶	0%	8.7 x10 ⁶	0.0%	7.8 x10 ⁶	0.0%
152.1	4.6 x10 ⁶	2.5%	5.5 x10 ⁶	2.1%	6.2 x10 ⁶	2.3%
152.2	0.9 x10 ⁶	66.0%	1.0 x10 ⁶	87.8%	1.0 x10 ⁶	86.3%
152.3	2.1 x10 ⁶	66.3%	0.5 x10 ⁶	83.9%	0.7 x10 ⁶	89.1%
152.4	1.6 x10 ⁶	38.2%	2.0 x10 ⁶	60.7%	1.5 x10 ⁶	69.5%
152.5	1.1 x10 ⁶	47.7%	2.6 x10 ⁶	75.4%	2.4 x10 ⁶	73.8%

10

【0300】

【表 10】

表 10. 153-4D9 抗体に基づく CD84 CAR 発現レンチウイルスを独立に 3 回形質導入した後に得られた CAR 陽性 T 細胞の数およびパーセンテージ

	形質導入#1		形質導入#2		形質導入#3	
	細胞数	% CAR	細胞数	% CAR	細胞数	% CAR
UT	5.7 x10 ⁶	0%	18.4 x10 ⁶	0%	12.3 x10 ⁶	0%
153.1	0.2 x10 ⁶	0%	13.9 x10 ⁶	1.4%	11.6 x10 ⁶	0.5%
153.2	5.2 x10 ⁶	1.3%	13.0 x10 ⁶	4.5%	8.3 x10 ⁶	0.5%
153.3	6.5 x10 ⁶	19.4%	11.3 x10 ⁶	43.4%	7.3 x10 ⁶	60.5%
153.4	5.7 x10 ⁶	39.2%	7.6 x10 ⁶	39.8%	5.5 x10 ⁶	34.7%
153.5	4.3 x10 ⁶	52.1%	12.6 x10 ⁶	51.7%	4.5 x10 ⁶	58.7%

20

30

【0301】

【表 11】

表 11. R3-B3、R3-G7 および R3-H3 scFv に基づく CD84 CAR 発現レンチウイルスを独立に 3 回形質導入した後に得られた CAR 陽性 T 細胞の数およびパーセンテージ

	形質導入#1		形質導入#2		形質導入#3	
	細胞数	% CAR	細胞数	% CAR	細胞数	% CAR
UT	41.8 x10 ⁶	0%	79.4 x10 ⁶	0%	27.3 x10 ⁶	0%
B3.4	55.4 x10 ⁶	20.4%	49.1 x10 ⁶	6.5%	22.3 x10 ⁶	7.8%
B3.5	47.5 x10 ⁶	11.6%	38.9 x10 ⁶	3.8%	16.6 x10 ⁶	5.3%
G7.4	49.9 x10 ⁶	56.3%	43.4 x10 ⁶	30.7%	32.6 x10 ⁶	39.1%
G7.5	42 x10 ⁶	64.3%	48.8 x10 ⁶	34%	10.3 x10 ⁶	47.4%
H3.4	18.7 x10 ⁶	51.9%	59.9 x10 ⁶	54%	19.4 x10 ⁶	33.7%
H3.5	10.3 x10 ⁶	55.6%	52.5 x10 ⁶	62.7%	34.6 x10 ⁶	40.2%

40

【0302】

以下の CAR LV は、CAR 陽性 T 細胞：152.1、153.1、153.2、B

50

3. 4およびB3. 5の効率的な拡大増殖をもたらさなかった。152. 1および153. 1 CARはさらなる実験に使用しなかった。

【0303】

実施例4：in vitro サイトカイン生産におけるCD84 CART

各CART細胞のサイトカイン放出能を評価するために、エフェクター-標的細胞の共培養の上清を採取した。CD84^{high}細胞株Ramosを標的細胞として、2：1のエフェクター：標的細胞比で使用した。上清中のIFN- γ （図7）、IL-2（図8）、グランザイム-B（図9）およびTNF- α （図10）のレベルを、24時間の共培養後に酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）によって決定した。非形質導入T細胞（UT）を陰性対照として使用した（標的細胞と共培養）。4回の独立した実験を行った。

10

【0304】

これらの結果は、R3-B3 scFv CAR結合ドメインを有するCART細胞がサイトカイン放出活性を欠くことを示し、従って、次の実験には使用しなかった。他方、R3-H3 scFv CAR結合ドメインを有するCART細胞は、多量のサイトカインを放出し、これら2つのCART細胞（H3. 4およびH3. 5）は、最大の炎症性プロファイルを示す。152-1D5 CART細胞は、scFvの設計（VH-VLの順およびリンカー長）とは関わらず類似のプロファイルを示した。153-4D9およびR3-G7抗体に基づくCART細胞は類似のプロファイルを示し、サイトカインをほとんど分泌しない153. 3 CART細胞を除き、R3-H3および152-1D5 CART細胞に比べて低いサイトカイン放出を示した。

20

【0305】

実施例5：抗CD84 CARTのin vitro細胞傷害性

in vitroにおけるCART84細胞の有効性を評価するために、本発明者らは、CD84発現レベルが異なり、リンパ起源（Ramos、NALM6およびMOLT-4細胞株）と骨髓起源（K562およびMOLM-13細胞株）の両方のいくつかのGFP発現標的細胞株に対して、各CART細胞の細胞傷害性アッセイを行った。CART細胞傷害性は、24時間の共培養の後に、サイトメトリーにより生GFP陽性細胞のパーセンテージを決定することで評価した。エフェクター：標的細胞比 4：1、2：1、1：1および0. 5：1を試験した。

30

【0306】

まず、本発明者らは、CD84^{high} Ramos細胞株に対して全てのCARを試験した（図11）。エフェクター：標的比 2：1の結果を示す。R3-H3および152-1D5 CART細胞は、この細胞株に対して最も高い細胞傷害活性を示したが、153-4D9およびR3-G7 CART細胞は、それより低い細胞傷害活性を示した。153. 3 CART細胞は、153-4D9構築物に基づく全てのCARで最も低い細胞傷害活性を示した。

【0307】

次に、本発明者らは、CD84発現の低い骨髓細胞株であるK562に対して全てのCARを試験した（図12）。エフェクター：標的比 2：1の結果を示す。152-1D5および153-4D9抗体に基づくCARは、UT細胞に比べて統計的に有意な細胞傷害活性を示した。

40

【0308】

RamosおよびK562に対する細胞傷害性に基づいて、本発明者らは、さらなる特性評価のために以下のCART細胞：152. 3、153. 4、153. 5、G7. 5およびH3. 5を選択した。本発明者らは、いくつかの細胞株に対して、24および48時間の共培養の後に、4種類のエフェクター：標的比（4：1、2：1、1：1および0. 5：1）で、これらのCART細胞の細胞傷害性を評価した。Ramosは、急速進行性B細胞リンパ腫細胞株であり（図13）、K562は、CD84発現の低い急性骨髓性白

50

血病細胞株であり（図14）、一方、MOLM-13は、CD84発現が中程度の急性骨髄性白血病細胞株である（図15）。NALM-6は、B細胞急性リンパ芽球性白血病細胞株であり（図16）、MOLT-4は、T細胞急性リンパ芽球性白血病細胞株である（図17）。

【0309】

2:1比に関して示されるように（図11）、選択されたCARは、各エフェクター：標的比について、UT細胞に比べ、Ramos細胞に対して統計的に有意な細胞傷害活性を示した（図13）。K562の場合、図12で示されたものと同じパターンが見られ、152-1D5および153-4D9抗体に基づくCARは、UT細胞に比べて統計的に有意な細胞傷害活性を示した（図14）。

10

【0310】

選択された全てのCARが、MOLM-13に対して細胞傷害活性を示し、152-1D5および153-4D9抗体に基づくCARが、R3-G7およびR3-H3抗体に基づくものよりも高い細胞傷害効果を示した（図15）。

【0311】

152-1D5および153-4D9抗体に基づくCARは、R3-G7およびR3-H3 scFvに基づくCARよりも、NALM-6細胞株に対して高い細胞傷害活性を示した（図16）。MOLT-4細胞株では、152-1D5抗体に基づくCARがUT細胞に比べて最も高い統計的に有意な細胞傷害活性を示し、次いで153-4D9およびR3-G7抗体に基づくCARであった（図17）。

20

【0312】

実施例6：末梢血単核細胞（PBMC）におけるCD84発現

本発明者らは、種々のPBMC細胞集団におけるCD84発現をフローサイトメトリーにより評価し、得られた結果はこれまでに記載されたものと同様であった。単球は、Ramos細胞株で見られたものと同様の高いCD84発現を示す。B細胞は、中程度のCD84発現を示す。CD4およびCD8の両T細胞には、CD84発現に関して明瞭に異なる亜集団（陽性および陰性）があり、陽性集団では中程度のCD84発現レベルであった（図18）。

【0313】

実施例7：PBMCに対するCD84 CARTの*in vitro*細胞傷害性

30

本発明者らは、PBMCに対するCD84 CARTの細胞傷害活性を評価した。各実験で、エフェクター細胞（すなわち、CART84細胞）と標的細胞（PBMC）の両方を同じドナーから得た。3名の異なるドナーの3回の独立した実験の平均を示す。CART細胞は、それら固有のPBMCに対して統計的に有意な細胞傷害活性を示さなかった。しかしながら、これらのCART細胞は、並行実験でRamos細胞に対しては統計的に有意な細胞傷害活性を示した（図19）。

【0314】

実施例8：実施例1～20の方法

マウスモノクローナル抗CD84抗体の作製

BALB/cマウスを3週間隔で3～4回、CD84全長DNAで安定にトランスフェクトされた300.19細胞で免疫した(de la Fuente MA et al. CD84 leukocyte antigen is a new member of the Ig superfamily. Blood. 1997; 15;90(6):2398-405)。1回目の腹腔内(i.p.)注射は、300μlのPBS中、 2.0×10^6 細胞からなり、2回目は、300μlのPBS中、 2.0×10^6 細胞からなり、最後の注射は、300μlのPBS中、 3.0×10^6 細胞からなった。最後の追加免疫後3日目にマウスを安楽死させ、脾細胞を採取して細胞融合を行った。

40

【0315】

NS1骨髓腫細胞(European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK)と脾臓細胞を、4:1(脾臓細胞:NS1)の比で37℃にてインキュベートし、室温で10分間遠心分離し、絶えず攪拌しながら

50

細胞ペレットに1 mLの温PEG溶液を加えることによって融合させた。細胞をRPMI培養培地にゆっくり再懸濁させ、遠心分離し、加湿インキュベーター内、37℃、5%CO₂でインキュベートした。

【0316】

融合10日後に、50 µlのハイブリドーマ上清を、非トランスフェクト300.19細胞を陰性対照として用い、300.19-CD84細胞とフローサイトメトリーで分析することによりスクリーニングを行った。300.19-CD84細胞に陽性、300.19細胞に陰性と判定されたハイブリドーマを24ウェルプレートに移し、コンフルエントになるまで増殖させた後、T75フラスコに移した。次に、目的の抗体を産生する単一のハイブリドーマクローンを限界希釈により単離した。各ハイブリドーマについて、10個の単一クローンを300.19-CD84細胞を用いてフローサイトメトリーで再検査した。このクローニングプロトコルを陽性クローンの1つで繰り返した。

10

【0317】

各抗体について、アイソタイプ（クラスおよびサブクラス）は、抗IgGコートプレートに抗体を加えた後、抗マウスHRP抗体とともにプレートをインキュベートするELISA法により決定した。2つのCD84細胞外ドメインのどちらが抗体によって認識されるかを決定するために、ドメイン1（D1）と2（D2）の配列がヒトまたはマウスであるキメラCD84細胞外ドメインを発現するCOS細胞を用いてフローサイトメトリー解析を行った。

20

【0318】

完全ヒト抗CD84 scFvの同定

哺乳動物細胞によって産生されたヒトCD84（SDS-PAGEにより確認；図20）を抗原として使用し、 5.37×10^{10} scFv変異体という高い多様性を有するヒトナイフファージディスプレイLib S F M a xライブラリー（Proteogenix、フランス）のパニングを行った。

【0319】

バイオパニングラウンドでは、チューブを抗原でコーティングし、ブロッキングし、洗浄し、およびファージライブラリーとともにインキュベートした。洗浄後、グリシンHCでファージ結合剤の溶出を行い、次いで中和した。

30

【0320】

溶出したファージの濃度を決定するために、これら大腸菌(E. coli) T G 1細胞に加え、次いでプレートに注ぎ、逆さまにして培養した。PFU（プラーク形成単位）の計算は、プレート上のプラーク（すなわち、死滅したT G 1）の数に基づいた。

【0321】

溶出したファージを増幅するために、これら大腸菌T G 1細胞に加え、次いでヘルパーファージを感染させ、培養した。PEG / NaClでファージを沈降させた後、再懸濁させ、増幅したファージをELISA分析の次のバイオパニングラウンドに使用した。

【0322】

この分析では、ラウンドを重ねるごとに有意な濃縮が示され（表12）、ラウンド3の産出量がすでに優れた濃縮を示していたため、ファージの多様性の低下を防ぐためにさらなるバイオパニングラウンドは行わなかった。

40

【0323】

50

【表 1 2】

表 12. 溶出したファージの濃度

ラウンド	抗原濃度	洗浄回数	ファージ量 (pfu)	
			投入量	産出量
1	50 µg/mL	5	2×10^{12}	2.5×10^5
2	50 µg/mL	5	2×10^{12}	4.5×10^6
3	50 µg/mL	5	2×10^{12}	9×10^7

10

【0 3 2 4】

ラウンド 3 のファージをモノクローナル E L I S A 分析のために選択した。単一の大腸菌 T G 1 クローンを採取し、ヘルパーファージとともに培養した。遠心分離の後、ファージを含む上清を回収した。

【0 3 2 5】

プレートに抗原またはバッファのいずれかでコーティングし、洗浄し、ブロッキングし、再び洗浄した。次に、ファージをプレートに加え、インキュベートした。プレートを洗浄し、次いで、抗ファージセイヨウワサビペルオキシダーゼ (H R P) 抗体を加えた後、洗浄し、T M B、次いで H C L でインキュベートした。プレートを 4 5 0 n m で読み取った。

20

【0 3 2 6】

陽性クローンのシーケンシングの後、3 つの異なるユニークな配列が同定された。同定された 3 つのユニークなクローンを次に、クローンの特異性を保証するために E L I S A により再検定した。全てのファージを同じ濃度で検定した。プレートを抗原 (A g) またはバッファ (N C) のいずれかでカバーした。これらの結果から、3 つのクローンが C D 8 4 抗原と特異的に結合することが明らかになった (表 1 3)。

【0 3 2 7】

【表 1 3】

表 13. 陽性クローンの ELISA

クローン ID	Ag ¹	NC ²
R3-B3	0.5060	0.0240
R3-G7	2.397	0.0220
R3-H3	0.696	0.0170

30

【0 3 2 8】

ドナー、細胞株

健康なドナーの血液バフィーコートは、基準血液バンク B a n c d e S a n g i T e i x i t s、バルセロナ (スペイン) から入手した。

40

【0 3 2 9】

R a m o s、R a j i、N A L M 6、K 5 6 2、M O L M - 1 3、K a s u m i - 6、T H P - 1、および U 9 3 7 は、A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n (A T C C) から購入した。R a m o s、R a j i、N A L M 6、K 5 6 2、N S 1 および T H P - 1 細胞株は、1 0 % ウシ胎仔血清 (F B S、M e r c k) およびペニシリン-ストレプトマイシン (L a b c l i n i c s) を添加した R P M I 培地 (T h e r m o F i s h e r) で培養し、3 0 0 . 1 9 細胞には、1 % L - グルタミン (G i b c o) および 0 . 1 % 2 - β - メルカプトエタノール (S i g m a) も添加した。H E K 2 9 3 T および C O S 細胞株は、1 0 % F B S (M e r c k) およびペニシリン-ストレプトマイシン (L a b c l i n i c s) を 1 % L - グルタミン (G i b c o) ととも

50

に添加したDMEM培地（Gibco）で培養した。全ての細胞株を37℃および5%CO₂で増殖させた。

【0330】

レンチウイルスの生産

直鎖ポリエチレンイミン（PEI、分子量25000、Polysciences Inc 23966-1）を用い、HEK293-T細胞を、パッケージングプラスミドpRSV-Rev（Addgene、12253）、pMDLg/Prre（Addgene、12251）、およびエンベローププラスミドpCMV-VSV-G（Addgene、12259）とともに本発明者らのトランスファベクターpCCL-EF1α-CD84でトランスフェクトした。48時間後にレンチウイルス上清を回収し、LentiX-Concentrator（Clontech、Takara）を用い、製造舎のプ
10

【0331】

レンチウイルスの力価測定

形質導入単位の数（TU/mL）は、限界希釈法で決定した。

【0332】

HEK293T細胞を形質導入の24時間前に播種し、1:10希釈のウイルス上清を調製し、8mg/mLでポリブレン（Sigma-Aldrich）を添加したDMEM培地（Gibco）に加えた。48時間後に細胞をトリプシンで処理し、AffiniPure F(ab')₂フラグメントヤギ抗マウス免疫グロブリンG（IgG）アロフィ
20

【0333】

T細胞形質導入およびCART拡大培養

T細胞は、Ficoll-Paque（商標）での密度勾配遠心分離中の全血から、RosetteSep（商標）（StemCellからのRosetteSep Human T cell Enrichmentカクテル）により単離した。T細胞は、5%ABヒト血清（Sigma H4522）、ペニシリン-ストレプトマイシン（ThermoFisher、100mg/mL）、および50IU/mLのIL-2（Milteny
30

【0334】

フローサイトメトリー

CAR84を、組換えCD84-Hisタンパク質（R&D、1855-CD）および二次His Tag APC結合抗体（R&D、IC050A）およびビオチンSP結合
40

AffiniPure F(ab')₂-フラグメントヤギ抗マウスIgG（Jackson ImmunoResearch Laboratories、115-065-072）またはビオチンSP結合AffiniPure F(ab')₂-フラグメントヤギ抗ヒトIgG（Jackson ImmunoResearch Laboratories、109-065-006）とBV421結合ストレプトアビジン（BD Horizon、563259）で検出した。ヒトタンパク質に対する以下のmAbを使用した：CD3-APC、CD4-PE-Cy7、CD4-Alexa Fluor-488、CD19-PE、CD8-APC-H7、PD-1-PE-Cy7、TIM-3-BB515、CD69-PerCP-Cy（商標）5.5、LAG-3-BV-605、CD62L-FITC、CCR7-PerCP-Cy（商標）5.5、CD84-PE、CD4
50

ー P E - C y (商標) 7、C D 4 5 R A - A P C (B e c t o n D i c k i n s o n)、C D 8 4 - A P C および C D 8 4 - P E (B i o L e g e n d)。サンプルをフローサイトメーター B D F A C S C a n t o I I (B D B i o s c i e n c e s)、L S R I I F o r t e s s a 4 L w i t h H T S (B D)、および A t t u n e N x T 4 L サイトメーター (T h e r m o F i s h e r) にかけた。E L I S A には、以下の m A b を使用した：抗マウス I g G - H R P (ヤギで作製した抗マウス I g G - ペルオキシダーゼ抗体、S i g m a、カタログ：A 3 6 7 3 - 1 M L) およびヤギで作製した抗マウス I g G コーティング (抗マウス I g G 抗体 (s i g m a、カタログ：M 2 6 5 0 - 1 M L)。データは、F l o w J o ソフトウェア 10.7.1 を用いて解析した。

【0335】

10

i n v i t r o 細胞傷害性アッセイ

C A R T 細胞の細胞傷害性を、種々のエフェクター：標的比を用い、種々の時点で評価した。これらのアッセイに使用した標的細胞は、従前に記載されているように (Shah et al. Antigen Presenting Cell-Mediated Expansion of Human Umbilical Cord Blood Yields Log-Scale Expansion of Natural Killer Cells with Anti-Myeloma Activity. PLoS One. 2013; 8(10))、G F P - ホタルルシフェラーゼ (G F P - f f l u c) を過剰発現させるためにレンチウイルスベクターで改変した。

【0336】

生存 G F P + 腫瘍細胞の残存率をフローサイトメトリーにより分析し、下式：生細胞の % = 100 × (x 時点の T 細胞とともにある G F P + 細胞の数 / x 時点の G F P + 細胞単独の数) を用いて計算した。

20

【0337】

i n v i t r o 増殖アッセイ

C D 8 4 抗原に応答した C A R T 8 4 細胞の増殖を、C F S E アッセイ (Castella, M. et al. (2019) Mol. Ther. - Methods Clin. Dev. 12: 134-144) を用いて測定した。C A R T 細胞を C e l l T r a c e C F S E (I n v i t r o g e n、T h e r m o F i s h e r、15598431) で染色した後、刺激有りまたは無しで 96 時間共培養した。増殖をフローサイトメトリーにより分析し、増殖指数 (P I) を計算した (P I = 異なる世代の細胞数の合計 / 細胞の数)。

【0338】

30

i n v i t r o サイトカイン産生

I F N - γ、T N F - α、I L - 6、I L - 1 β サイトカインを酵素結合免疫吸着アッセイ (D u o S e t E L I S A、R & D s y s t e m s) により、製造者のプロトコールに従って定量した。

【0339】

上記明細書に記載されている全ての刊行物は、参照により本明細書の一部とされる。開示されている本発明の抗原結合ドメイン、抗体、キメラ抗原受容体、使用および方法の種々の改変および変形は、本発明の範囲および趣旨から逸脱することなく当業者には自明であろう。本発明を特定の好ましい実施形態に関して開示してきたが、特許請求される本発明はそのような特定の実施形態に不当に限定されるべきではないと理解されるべきである。実際、当業者には自明である、本発明を実施するための開示された態様の様々な改変は、以下の特許請求の範囲に含まれることが意図される。

40

【0340】

実施例 9：C D 8 4 C A R の操作

本発明者らは、抗体 G Y C D 8 4 . 1 - 7、G Y C D 8 4 . 1 - 226 および G Y C D 8 4 . 3 - 89 に基づくいくつかの抗 C D 8 4 C A R 構築物を作製した。完全な C A R 8 4 配列を、E F 1 α プロモーターの制御下にシグナルペプチド、C D 8 4 に特異的な s c F v、C D 8 α ヒンジおよび膜貫通領域、共刺激ドメイン 4 - 1 B B およびシグナル伝達ドメイン C D 3 - ζ を包含する第三世代レンチウイルスベクター p C C L (Dull et al. A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging Syst

50

em. J. Virol. 1998;72:8463-8471)にクローニングした (図6)。

【0341】

抗体GYCD84.1-7に基づき、VH配列とVL配列の順序が異なる2つの異なるscFvを設計した。これらのCARは全て、4(S4)モチーフ(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)のリンカーを含む。各CAR変種に付けられた名称は、scFvの設計を反映している。合成され、pCCLベクターにクローニングされた種々のscFvドメインの配列を表14に示す。

【0342】

【表14】

表14. 設計した各CD84 CAR に使用したscFvドメインの配列および構造

CAR 名	抗体/ scFv	第1ドメイン	リンカー	第2ドメイン
1.7.3 (VLS4VH)	GYCD84.1-7	VL: DIQMTQSPASLSA SVGETVTITCRAS ENIFSSLAWYQQR QGKSPQLLVYNAK TLAEGVPSRFSGS GSGTQFSLKINSL QPEDFGSYQCQHH YATPFTFGSGTKL EIK (配列番号 75)	GGGSGGGG SGGGSGGG GS (配列 番号 111)	VH: QVTLKESGPGILQPSQTLTSLT CSFSGFSLSTSGMGVWIRQP SGKGLEWLAHIWWDDVKRYNP ALKSRLTISKDTSSSQVFLKI ASVDTADTATYYCARMRTSY FDYWGQGTTLTVSS (配列番号 74)
1.7.5 (VHS4VL)	GYCD84.1-7	VH: QVTLKESGPGILQ PSQTLTSLTCSFSG FSLSTSGMGVWIR RQPSGKLEWLAH IWWDDVKRYNPAL KSRLTISKDTSSS QVFLKIASVDTAD TATYYCARMRTSY YFDYWGQGTTLTV SS (配列番号 74)	GGGSGGGG SGGGSGGG GS (配列 番号 111)	VL: DIQMTQSPASLSASVGETVTI TCRAENIFSSLAWYQQRQK SPQLLVYNAKTLAEGVPSRFS GSGSGTQFSLKINSLQPEDFG SYQCQHHYATPFTFGSGTKLE IK (配列番号 75)
1.226.5 (VHS4VL)	GYCD84.1-226	VH: QVQLQQPGAELVK PGTSVKLSCKASG YNFTRYWINWVKL RPGQGLEWIGDIY PGSGSTNYNEKFK SKATLTVDTSSST AYMQLSRLASEDS ALYYCARDTTIAY WGQGTTLVTVSA (配列番号 82)	GGGSGGGG SGGGSGGG GS (配列 番号 111)	VL: DIVLTQSPTSLAVSLGQRATI SCRASQSVTTSRYSYMHWYQQ KPGQPPKLLIKFASNLESGVP ARFSGSGSGTDFTLNHPVEE EDTATYYCQHSWEIPYTFGGG TKLEIK (配列番号 83)
3.89.5 (VHS4VL)	GYCD84.3-89	VH: EVKLLSGGGLVQ	GGGSGGGG SGGGSGGG	VL:

10

20

30

40

50

		PGGSLKLSCAASG FGFSRSWMSWVRQ APGKGLEWIGEIN PDSSTINYTPSLK DKFIISRDNANT LFLQMSKVRSED ALYYCATFYDGYS IYWYFDVWGAGTT VTVSS (配列番号 163)	GS (配列 番号 111)	DVLMQTPLSLPVSLGDQASI SCRSSQSIVHSNGDTYLEWYL QKPGQSPKLLIYKVSNRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDLGVYYCFQGSHVPRTEFGG GTKLEIK (配列番号 164)
--	--	---	-----------------------	---

10

【 0 3 4 3 】

実施例 10：血液悪性腫瘍における C D 8 4 の発現

本発明者らは、A M L または T − A L L と診断された患者の白血病細胞の C D 8 4 発現をフローサイトメトリーにより分析した。表 1 5 および 1 6 に、それぞれ A M L 細胞および T − A L L 細胞上での C D 8 4 発現の定性評価をまとめる。A M L サンプルの初代白血病細胞のフローサイトメトリー分析の 2 つの代表例を図 5 に示す。T − A L L サンプル（患者 0 1 および患者 0 2 ）の分析を図 2 1 に示す。

【 0 3 4 4 】

【表 1 5 】

20

表 15. フローサイトメトリーにより評価した 16 名の AML 患者の白血病細胞上の CD84 発現

患者番号	CD84 発現
P11	中
P12	高
P13	中
P14	高
P15	中
P16	中
P17	高
P18	中
P19	低
P20	中
P21	中
P22	低
P23	高
P24	高
P25	高
P26	高

30

40

【 0 3 4 5 】

50

【表 16】

表 16. フローサイトメトリーにより評価した 2 名の T-ALL 患者の白血病細胞上の CD84 発現

患者番号	CD84 発現
P01	高
P02	高

【0346】

実施例 11：CD84 CART の生産

CART84 1.7.3、1.226.5 および 3.89.5 pCCL-EF1 α -CD84 ベクターを含むレンチウイルス (LV) を HEK293-T 細胞で生産し、1 mL 当たりの形質導入単位の数に限界希釈法で決定した。レンチウイルスを用いて全血から単離した T 細胞に形質導入し、次に、これらの CAR-T 細胞を 6～8 日間拡大培養した。

【0347】

表 17 に、3 回の独立した形質導入の後に得られた T 細胞の数、ならびに表面に CD84 CAR を発現した T 細胞のパーセンテージをまとめる。

【0348】

【表 17】

表 17. CD84 CAR を発現するレンチウイルスでの形質導入の 6～7 日後に得られた CAR 陽性 T 細胞の数およびパーセンテージ。3 回の独立した形質導入からのデータを示す。

	形質導入#1		形質導入#2		形質導入#3	
	細胞数	% CAR	細胞数	% CAR	細胞数	% CAR
UT	20.7 x10 ⁶	0%	20.9 x10 ⁶	0%	7.1 x10 ⁶	0%
1.7.3	12.2 x10 ⁶	61.9%	13.6 x10 ⁶	75.7%	8.2 x10 ⁶	98.5%
1.226.5	14.6 x10 ⁶	74.9%	7.2 x10 ⁶	85.7%	8.2 x10 ⁶	94.8%
3.89.5	13.1 x10 ⁶	58%	10.3 x10 ⁶	64.1%	23.6 x10 ⁶	80.8%

【0349】

形質導入 6～7 日後の CART84 1.7.3、1.226.5 および 3.89.5 の拡大培養、ならびに 152.3、153.5 および H3.5 の拡大培養のさらなる分析を図 22 に示し、0 日目の T 細胞数に対する増加倍率として表される。

【0350】

実施例 12：CD84 CART in vitro 細胞傷害性

細胞傷害性に基づき、Ramos、K562、MOLM-13、NALM6 および MOLT-4 細胞、CART84 152.3、153.5 および H3.5 に対して得られた結果を、さらなる特性評価のために選択し、1.7.3 および 1.226.5 および 3.89.5 と比較した。本発明者らは、エフェクター：標的細胞比 4：1、2：1、1：1 および 0.5：1 で、24 時間または 48 時間の共培養の後の、Ramos、MOLM-13、U937 および MOLT-4 細胞に対するそれらの細胞傷害性を、サイトメトリーにより生 GFP 陽性細胞のパーセンテージを決定することにより評価した。これらの細胞上の CD84 発現を図 3 に示す。

【0351】

全ての CART84 が Ramos 細胞 (CD84^{high}) に対して高い細胞傷害効果を示し、これは UT と比較して統計的に有意であった (図 23)。細胞傷害効果は、全ての CART 細胞で経時的に増加したが、この効果は、H3.5 および 1.226.5 の場合、特に低比率 (1：1 および 0.5：1) では低かった。

【0352】

MOLM-13 (CD84 moderate) および U937 (CD84 low) AML 細胞に対して、CART84 152.3、153.5、1.7.3、1.226.5 および 3.89.5 は高い細胞傷害効果を示し、これは UT と比較して統計的に有意であった（それぞれ図 24 および 25）。CART84 H3.5 は、両細胞株の白血病細胞に対して、他の CART 細胞よりも低い細胞傷害活性を示した。細胞傷害効果は、全ての CART で経時的に増加した。H3.5 を除く全ての CART 細胞が、それらの低い CD84 発現にもかかわらず U937 細胞に対して高い細胞傷害性を示した。

【0353】

最後に、本発明者らは、MOLT-4 細胞 (CD84 high) に対する CART84 152.3、153.5、1.7.5、1.226.5 および 3.89.5 の細胞傷害性を評価したところ、U937 細胞で見られたものと同じパターンが見られ、すなわち、H3.5 を除く全ての CART 細胞が高い細胞傷害効果を示し、これは経時的に増加し、UT と比較して統計的に有意であった（図 26）。

【0354】

実施例 13：AML および T-ALL 由来初代白血病芽細胞に対する CD84 CART の in vitro 細胞傷害性

本発明者らは、Haematology Department of Hospital Clinic de Barcelona (HCB) から得た患者サンプル由来の初代 AML 細胞に対する CART84 細胞 152.3、153.5、G7.5 および H3.5 の細胞傷害性を評価した。CD84 発現を初代芽細胞で評価し、次にこれを CFSE で染色し、エフェクター細胞 (CART/UT) とエフェクター：標的細胞比 4:1、2:1、1:1 および 0.5:1 で 24 時間および 48 時間共培養した。この期間の後、細胞を LIVE/Dead (商標) Fixable Aqua で染色して生/死細胞を区別した。CART 細胞 152.3 および 153.5 は、AML 芽細胞に対して最も高い細胞傷害活性を示し、これは UT の効果と比較して統計的に有意であった。CART H3.5 および G7.5 は、低い細胞傷害効果を示した。細胞傷害効果は、全ての CART により誘導され、経時的に増加した（図 27）。

【0355】

本発明者らはまた、Haematology Department of Hospital Clinic de Barcelona (HCB) から得た初代 T-ALL 患者サンプルに対する CART84 細胞 152.3、153.5、1.7.3、1.226.5 および 3.89.5 の細胞傷害性も評価した。実験は AML サンプルに関して上記したように行った。CART 152.3、153.5 および 1.7.3 の細胞傷害性は、CART 1.226.5 および 3.89.5 より高かった（図 28）。

【0356】

実施例 14：CD84 CART の in vitro サイトカイン産生

各 CART 細胞のサイトカイン放出能を評価するために、エフェクター-標的細胞共培養の上清を回収した。Ramos、MOLM-13 および MOLT-4 を標的細胞として、2:1 のエフェクター：標的細胞比で使用した。上清中の IFN- γ （図 29）、グランザイム-B（図 30）および TNF- α （図 31）のレベルを、24 時間の共培養の後に酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) で決定した。非形質導入 T 細胞 (UT) を陰性対照として使用した（標的細胞と共培養）。4 回の独立した実験を行った。IFN- γ および グランザイム B は、細胞傷害性サイトカインであり、TNF- α は炎症性サイトカインである。CART84 H3.5 は、Ramos と共培養した場合、全ての供試 CART84 のサイトカイン産生に最高値を示した。MOLM-13 および MOLT-4 細胞と共培養した後の CART84 1.7.3 のサイトカインプロファイルは、H3.5 と同様であった。他の全ての供試 CART 細胞は、同様のレベルのサイトカインを産生した。これらの結果からは、H3.5 と 1.7.3 の両 CART 細胞は、持続性のシグナル伝達、すなわちリガンド不在下で構成的または慢性的に活性化を示す可能性が示唆される。

【0357】

実施例15：CD84 CARTの*in vitro*増殖

各CART84細胞の、抗原CD84の結合実施例に特異的に増殖する能力を評価するために、CFSE増殖アッセイを行った。簡単に述べれば、0日目にCART細胞をCellTrace（商標）CFSEで染色した。0日目の細胞（UTまたはCART細胞）；培地で単独培養した4日目の細胞；IL-2（50UI/mL）の非特異的刺激で刺激した4日目の細胞；および特異的抗原、すなわち、MOLM-13細胞で、エフェクター：標的比 0.5：1で刺激した4日目の細胞、の4つの条件を試験した。本発明者らは、CD84抗原に曝露した場合、培地のみまたはIL-2とともにインキュベートした場合よりも、CART84 152.3、153.5および1.226.5がより増殖することを証明できた（図32）。一方、CART H3.5、1.7.3および3.89.5は、MOLM-13またはIL-2で刺激した際に同様に増殖したことから、これらのCART84は持続的シグナル伝達を示す可能性が示唆された。

10

【0358】

実施例16：造血始原幹細胞に対するCD84 CARTの*in vitro*細胞傷害性

CD84は、数種の血液悪性腫瘍由来の悪性細胞上で発現する。これらにはAMLがあり、CD84の発現は、骨髄性白血病芽細胞間で、程度は低いが造血前駆幹細胞（HPSC）間で共有されている。CD33とCD123も同様で、どちらもAML治療用に開発中のCART製剤の標的である。図33はアフエーシス産物からのHPSCにおけるCD84、CD33およびCD123の発現を示している。

20

【0359】

CART84の潜在的な骨髄毒性を評価するために、HPSCに対するそれらの細胞毒性を、2つの異なる供給源：臍帯血ユニット（CBU、BST製）および同種幹細胞移植のためにG-CSFで動員された健康なドナーからのアフエーシス産物（同じくBST製）から得られたCD34⁺HPSCで検討した。アフエーシス産物からのCD34⁺細胞は、骨髄毒性を研究する理想的なモデルであるが、この種のオンターゲット／オフ腫瘍毒性を研究するためには、CBUからのCD34⁺細胞を用いるのがより一般的である。

【0360】

CBUからの精製CD34⁺細胞を、エフェクター：標的細胞比 4：1および2：1で、CART84 152.3、153.5、1.7.3、1.229および3.89.5と24時間共培養した。CART84 152.3、153.5、1.7.3および1.226.5は、CBUからのCD34⁺細胞に対して低～中の細胞傷害活性を示し、CART84 3.89.5が最も高かった。図34は、5回の独立した実験からの結果をまとめたものである。

30

【0361】

アフエーシス産物由来のCD34⁺HPSCに対する細胞傷害性アッセイでは、CART84を作製するために3つの異なるドナーのバフィーコートを使用した。意外にも、これらの細胞に対するCART84の細胞傷害性は比較的低かった。48時間後、CARTの細胞傷害性は増加したが、非特異的なUTの細胞傷害性も増加した（図35）。

40

【0362】

実施例17：CD84 CARTの*in vitro* T細胞毒性

CD84はT細胞で発現することから、本発明者らはCART84のT細胞に対する潜在的毒性を調べた。T細胞はドナーの全血から直接単離し、その半分は活性化し、形質導入を行ってCART細胞を生成し、残りの半分はCART細胞が利用可能になるまで（すなわち6～7日間）凍結保存した。T細胞をCFSEで染色した後、CART84と共培養した。図36は、5回の独立した実験の結果を示す。CART84 152.3、153.5、1.7.3および3.89.5は、自身のT細胞に対して中程度の細胞傷害効果を示した。一方、1.226.5によって誘導された細胞傷害活性は低く、UTと比較して統計的に有意ではなかった。

50

【0363】

どの特定のT細胞画分がCART84の標的とされているかをさらに理解するために、以下のT細胞サブセットタイプ、セントラルメモリー、エフェクターメモリー、およびエフェクターCD4/CD8 T細胞：に対する効果を分析した。異なるT細胞亜集団をフローサイトメトリーにより調べた：1) アッセイ前の標的T細胞、および2) 図37に示すように、異なるCART84と共培養した後の生存T細胞。CD84はメモリーT細胞に多く発現していることから予想されるように、セントラルメモリーT細胞画分がCART84、特に152.3、153.5および1.7.3によって最も影響を受けることが観察された。さらに、全てのT細胞サブセットがCART84との共培養後も存在した。

10

【0364】

実施例18：AMLモデルにおける抗CD84 CARTのin vivo有効性

GFP-ホタルルシフェラーゼ (GFP-ffLuc) を発現するように改変したMOLM-13 AML細胞を用いて、NOD-scid-gamma (NSG) 免疫不全マウスでの3回の独立した実験で、数種のCART84細胞の有効性を試験した。in vitroでの有効性と安全性プロファイルが最も優れていたCART84が、in vivoでの試験用に選択された：152.3、153.5、H3.5、1.7.3および1.226.5。

【0365】

1回目と2回目の実験で、0日目に 1×10^6 または 0.25×10^6 のMOLM-13 GFP-ffLuc細胞をそれぞれNSGマウスの静脈内 (i.v.) に注射した (図38および39)。6日後、 $4 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ のUT、CART84細胞152.3、153.5、H3.5または1.7.3をマウスにi.v.注射した。CART152.3、153.5および1.7.3で処置したマウスは、UTで処置したマウスと比較して生存率に統計的に有意な増大を示した。

20

【0366】

図40で示した実験において、0日目に 1×10^5 のMOLM-13 GFP-ffLuc細胞をi.v.注射し、2日後と11日後にUT、CART152.3、153.5および1.226.5をそれぞれ 5×10^6 および 3×10^6 細胞の用量で注射した。CART152.3および153.5は、生物発光によりモニタリングされる腫瘍進行を抑制し、これはUTで処置したマウスと比較して統計的に有意であった。さらに、CART152.3および153.5で処置したマウスは、UTで処置したマウスと比較して生存率に統計的に有意な増大を示した。

30

【0367】

実験の終了時に安楽死させたマウスの骨髄および脾臓を回収し、腫瘍細胞 (MOLM-13-GFP-ffLuc)、ヒトCD3⁺T細胞またはCART細胞の存在を定量するためにフローサイトメトリーにより分析した。両実験で、CART84処置マウスは、UT処置マウスと比較して骨髄および脾臓の両方で腫瘍細胞数が有意に少なかった (図39Cおよび40C)。ヒトT細胞は、UTで処置したマウスの骨髄と脾臓の両方で増殖したが、これはおそらく異種移植片対宿主病 (xeno-GvHD) のためであろう (図39Dおよび40D)。CART84細胞は骨髄と脾臓の両方に見られ、CART84152.3の場合に最も顕著であった (図39Eと40E)。

40

【0368】

要約すると、152.3および153.5はAMLの病勢進行を一貫して抑制することができ、処置した動物の生存率を増加させた。

【0369】

実施例19：T-ALLモデルにおけるCART84のin vivo有効性

GFP-ffLucを発現するように改変したMOLT-4 T-ALL細胞を用い、NOD-scid-gamma (NSG) マウスでの2回の独立した実験でCART84細胞の有効性を調べた。以下のCART84を試験した：152.3、153.5、1.

50

7. 3 および 1. 2 2 6. 5。

【0370】

図41に示した実験では、0日目にNSGマウスに 0.75×10^6 のMOLT-4 GFP-ffLuc細胞を注射し、5日後に 3×10^6 のCARTまたはUTをi.v.注射した。CART 84 152.3は、生物発光によりモニタリングされる腫瘍進行を、UTで処置したマウスと比較して統計的に有意に抑制した。さらに、CART 152.3および153.5で処置したマウスは、UTで処置したマウスと比較して生存に率統計的に有意な増大を示した。

【0371】

図42に示す実験では、0日目に 4×10^5 のMOLT-4 GFP-ffLuc細胞をi.v.注射し、2日後に 5×10^6 のCARTまたはUTを注射した。CART 84 152.3および153.5による処置は、生物発光によりモニタリングされる腫瘍進行の抑制と生存率の増大の両方にUTと比較して統計的に有意な有効性を惹起した。

【0372】

実験の終了時に安楽死させたマウスの骨髄および脾臓を、腫瘍細胞(MOLT-4)、ヒトCD3⁺T細胞およびCART細胞の存在を定量するためにフローサイトメトリーにより分析した。この場合、異なる群の動物の骨髄および脾臓に見られる腫瘍細胞の数に統計的に有意な違いは無かった(図42C)。ヒトT細胞は、UTで処置したマウスの骨髄と脾臓の両方で増殖したが、これはおそらくxeno-GvHDのためであろう(図42D)。CART細胞は、特に152.3細胞の場合、骨髄と脾臓の両方に見られた(図42E)。

【0373】

CART 84 152.3および153.5は、両T-ALL実験でT-ALL疾患の抑制および生存の延長に最も有効であった。

【0374】

実施例20：ヒト初代細胞に対するCD84 CARTのin vitro傷害性

潜在的オンターゲット／オフ腫瘍傷害性を評価するため、ヒト初代細胞のCD84発現を調べ、その後CART 84によって誘導される潜在的な細胞傷害性効果を調べた。以下のヒト細胞：ヒト冠動脈内皮細胞(HCAEC)、ヒト小気道上皮細胞(HsAEPc)、ヒト心筋細胞(HCM)、ヒト腎上皮細胞(HREpC)およびヒト子宮線維芽細胞(HUF)を検討した。フローサイトメトリーを用いて、これらの細胞の表面にはCD84が発現していないことを証明することができた(図43)。

【0375】

XCELLigenceアッセイで、本発明者らは、CART 84 152.3および153.5がHsAEPc、HCM、HREpCまたはHUFに対して細胞傷害性を示さなかったことを見出した。しかしながら、HCAECに対しては、CD84発現がないにもかかわらずいくらかの細胞傷害性効果が見られ、この効果は抗原特異的でないことが示唆された。このことを確認するために、本発明者らは、CART 84の細胞傷害活性を、CD123(この抗原が内皮細胞の表面で発現されるため)を標的とするCARTの細胞傷害活性と比較した。CD123に対するCART細胞により誘導された細胞傷害性は、CART 84 152.3または153.5により誘導されたものより有意に高かった(図44)。

【0376】

実施例21：実施例9～20の方法

CD123 CARの作製

本発明者らは、US2014/0271582からのIL3scfv-IgG4(L235E)-CD28gg-ζ(26292)CARに基づいて抗CD123 CAR構築物を作製した。CAR配列を、EF1αプロモーターの制御下にシグナルペプチド(GMCSFRα)、26292 scFv(VH-リンカー-VL)、IgG4-FcヒンジおよびCD28膜貫通領域、共刺激ドメインCD28およびシグナル伝達ドメインCD3

ーζを包含する第三世代レンチウイルスベクターpCCL(Dull et al. A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. J. Virol. 1998; 72:8463-8471)にクローニングした。

【0377】

フローサイトメトリー

T細胞の陽性CAR画分をビオチン-SP (ロングスパーサー) AffiniPure ヤギ抗マウスIgG、F(ab')₂フラグメントヤギ抗マウスIgG (Jackson ImmunoResearch) またはビオチンSP結合AffiniPure F(ab')₂-フラグメントヤギ抗ヒトIgG (Jackson ImmunoResearch) で検出し、洗浄した後、BV421/PE結合ストレプトアビジン (eBioscience) および以下に記載するような各タンパク質パネルを調べるために必要な抗体とともにインキュベートした。

10

【0378】

ヒトタンパク質に対する以下のmAbを用いてCAR T細胞表現型を調べた：CD197-BV510 (CCR7)、CD62L-FITC、CD4-Pecy7、CD8-APCH7、CD45RA-APC (Becton Dickinson)。

【0379】

ヒトタンパク質に対する以下のmAbを用いて、AML/T-ALLサンプル中に存在する種々の集団細胞を調べた：CD11-APC、CD19-Fitc、HLA-DR-A450、CD45-PerCPCy5.5、CD34-PerCPCy5.5、CD3-APC、CD3-APCH7、CD33-Fitc、CD14-Fitc、CD14-APCH7、CD13-PE、CD13-BV421 (Becton Dickinson)、CD84-APC、CD84-PE (BioLegend)、CD45-A750、CD117-Pecy7 (Beckman Coulter)、CD123-PECy7 (eBiosciences)。

20

【0380】

ヒトタンパク質に対する以下のmAbを用いて、末梢血中に存在する種々の単核細胞集団を調べた：CD3-BV421、CD14-APCH7、CD19-FITC、CD33-APC、CD34-PerCPCy5.5、CD38-APC、CD84-PE (BioLegend)、CD123-PECy7 (eBiosciences) およびHLA-DR-BV450 (Becton Dickinson)。

30

【0381】

タンパク質に対する以下のmAbをMOLM-13モデルで行うin vivo実験に使用した：抗ヒトCD3-APCH7、抗ヒトCD33-APC、抗ヒトCD45-PerCP-Cy5.5、抗マウスCD45-PECy7、ストレプトアビジン-BV421 (Becton Dickinson)。タンパク質に対する以下のmAbをMOLT-4モデルで行うin vivo実験に使用した：抗ヒトCD3-APC、抗ヒトCD45-PerCP-Cy5.5、抗マウスCD45-Pe-Cy7、ストレプトアビジン-BV421 (Becton Dickinson)。

【0382】

全てのサンプルをBD FACSCanto (商標) II、LSRFortessa (商標) 4L (DB Biosciences) またはAttune (商標) NxT (Invitrogen) フローサイトメーターに流し、FlowJo v10.8.0ソフトウェア (BD Biosciences) で解析した。

40

【0383】

AMLおよびT-ALL患者からの初代白血病芽細胞に対するin vitro細胞傷害性アッセイ

初代芽細胞をCFSE (ThermoFisher) で染色し、エフェクター細胞 (CAR T/UT) と、エフェクター：標的細胞比 4:1、2:1、1:1および0.5:1で24時間および48時間、共培養した。この期間の後、共培養細胞をLIVE/De

50

ad (商標) Fixable Aqua (ThermoFisher) で染色して生／死細胞を区別した。残留している生芽細胞のパーセンテージをフローサイトメトリーにより決定し、下式：生細胞% = $100 \times (\text{x 時点の CART 細胞とともにあるネガティブ LIVE / Dead 陽性 CFSE 細胞の数} / \text{x 時点のネガティブ LIVE / Dead 陽性 CFSE 細胞単独の数})$ を用いて計算した。

【0384】

CD34⁺細胞の単離

造血始原幹細胞 (CD34⁺) は、臍帯血ユニット (CBU、血液バンク Banc d e Sang i Teixits de Barcelona、BST) および同種幹細胞移植のために G-CSF で改変した健常ドナーからのアフレーシス産物 (これも BST から入手) から入手した。

【0385】

CD34⁺細胞は、まず、Ficoll-Paque 密度勾配遠心分離、次に、ヒト CD34 マイクロビーズキットを用いた磁気分離 (Miltenyi Biotec、陽性選択) による CD34⁺造血始原幹細胞の精製によって、CBU から単離した。アフレーシス産物から CD34⁺細胞を単離するために、細胞をそのまま CD34 磁性ビーズで精製した。

【0386】

CD34⁺細胞に対する in vitro 細胞傷害性アッセイ

CD34⁺細胞に対する CD84 CART 細胞傷害性を評価するために、CD34⁺細胞をエフェクター細胞 (CART / UT) と、エフェクター：標的細胞比 4：1、2：1 で、24 時間および 48 時間、共培養した。この期間の後、共培養細胞を APC 結合 CD3 および PE 結合 CD34 抗体で染色してエフェクターを標的細胞から区別し、LIVE / Dead Fixable Aqua で標識して生／死細胞を区別した。

【0387】

精製 T 細胞に対する in vitro 細胞傷害性アッセイ

T 細胞は、ドナーバフィーコートからの Ficoll-Paque 密度勾配遠心分離中に、Rosette Sep (商標) からの免疫細胞単離試薬を用いて単離した。このプロセスで得られた T 細胞の半分を活性化し、形質導入を行って CART 細胞を生成し、残りの半分は、標的細胞として使用するために、CART 細胞が利用可能になるまで (すなわち 8 日間) 凍結保存した。細胞傷害性アッセイを行うために、T 細胞を解凍し、CFSE で染色した後、CART 細胞と、種々のエフェクター：標的比で共培養した。24 時間後、エフェクターと標的細胞をどちらも固定し、LIVE / Dead Fixable Aqua 細胞染色キットで染色した。

【0388】

残留している生 T 細胞のパーセンテージをフローサイトメトリーで決定し、下式：生細胞の% = $100 \times (\text{x 時点の CART 細胞とともにあるネガティブ LIVE / Dead 陽性 CFSE 細胞の数} / \text{x 時点のネガティブ LIVE / Dead 陽性 CFSE 細胞単独の数})$ を用いて計算した。

【0389】

残留する生 T 細胞サブセットを調べるために、フローサイトメトリーの節に説明したように、これらを表現型パネルからのヒト mAb でも染色した。

【0390】

in vivo 有効性アッセイ

8～12 週齢の非糖尿病-Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl / SzJ (NSG) マウス (Charles River) を飼育し、バルセロナ大学医学健康科学部の動物施設で病原体のない条件下で収容した。0.1～1×10⁶ 個の GFPffLuc 発現 MOLM-13 または GFPffLuc-MOLT-4 細胞を生理食塩水に再懸濁し、0 日目に各 NSG マウスの静脈内 (IV) に注入した投与した。腫瘍細胞注入から 2～9 日後に、3～5×10⁶ の UT または CD84 CART を静脈内 (i.v.)

10

20

30

40

50

注入した。腫瘍の進行は、Xenogen IVIS 50 Imaging System (PerkinElmer) を用いて生物発光によりモニタリングした。生物発光を測定するために、XenoLight D-Luciferin (Perkin Elmer Ref. 122799) 100 μ L を各マウスの腹腔内に投与し、腫瘍量を毎週モニタリングした。Living Image ソフトウェア (PerkinElmer) を用いて可視化し、全発光束を算出した。マウスは、人道的エンドポイント基準の徴候を表した時点で安楽死させた。骨髄と脾臓を取り出し、フローサイトメトリーで腫瘍細胞、T 細胞および CART 細胞の存在を定量した。

【0391】

全ての手順は、バルセロナ大学医学・健康科学部の所内動物飼育委員会に従って行われた。

【0392】

初代ヒト細胞

以下の初代ヒト細胞：ヒト冠動脈内皮細胞 (HCAEC)、ヒト小気道上皮細胞 (HSAEPc)、ヒト子宮線維芽細胞 (HUF)、ヒト心筋細胞 (HCM) およびヒト腎臓上皮細胞 (HREpC) を PromoCell から取得した。細胞は、データシートに示されるように、特定の培地および添加剤 (これも PromoCell から) とともに 37°C、5% CO₂ で培養した。

【0393】

接着細胞を用いた *in vitro* 細胞傷害性アッセイ

接着細胞に対する CART 細胞の傷害性を評価するために、インピーダンスにより細胞増殖のリアルタイム測定を可能にする xCELLigence 装置を使用した。xCELLigence 用の RTCA エープレート (16 ウェル) に標的細胞を播種し、xCELLigence RTCA マルチプルプレートモニタリングシステムを用いて 24 時間、細胞指数をモニタリングした。この時点で、100 mL の増殖培地または T 細胞 (非形質導入 T 細胞または CART 細胞を 4:1 のエフェクター: 標的比で) を各ウェルに加えた。各ウェルから取得したデータ (細胞指数) を 1 に対して正規化し、72 時間、細胞増殖をモニタリングした。データは、xCELLigence RTCA Software Lite 2.0.0.1301 を用いて解析した。

【0394】

実施例 22: B 細胞リンパ腫モデルにおける CART 84 の *in vivo* 有効性

いくつかの CART 84 細胞の有効性を、NOD scid gamma (NSG) マウスでの *in vivo* 実験において、GFP-ffLuc を発現するように改変した Ramos (バーキットリンパ腫) 細胞を用いて調べた。以下の CART 84 を調べた: 152.3、153.5 および H3.5。

【0395】

図 45 に示される実験では、 4×10^5 個の Ramos GFP-ffLuc 細胞を 0 日目に NSG マウスに *i.v.* 注射した。2 日後に、 5×10^6 個の CART または UT 細胞を *i.v.* 注射した。CART 152.3、153.5 および H3.5 で処置したマウスは、より遅い増殖傾向を示した (図 45 A)。実験の終了時に安楽死させたマウスの骨髄を回収し、腫瘍細胞の存在を定量するためにフローサイトメトリーにより解析した。CART 84 処置マウスは、UT 処置マウスと比較した場合に、骨髄中の Ramos GFP-ffLuc 細胞の数が統計的に有意に低かった (図 45 B)。

【0396】

実施形態

以下、本発明の様々な特徴および実施形態を、以下の番号を付けた段落を参照して説明する。

【0397】

1. a) 配列: CDR1-NYWIN (配列番号 1); CDR2-DIYPVSGTT NYNEKFKR (配列番号 2); および CDR3-GTGRFAY (配列番号 3); ま

たはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域(CDR)を有する重鎖可変領域(VH)；ならびに

配列：CDR1-RASQSVSTSSYSYMH(配列番号4)；CDR2-FASNLES(配列番号5)；およびCDR3-QHSWEIPYT(配列番号6)；またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域(VL)；

b) 配列：CDR1-NYWLG(配列番号7)；CDR2-DIYPGGGYTNYIEKFKG(配列番号8)；およびCDR3-YEGGYYGNYDAMDY(配列番号9)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域(CDR)を有する重鎖可変領域(VH)；ならびに

配列：CDR1-RASESVDNYGISFMN(配列番号10)；CDR2-ASNSNGS(配列番号11)；およびCDR3-QQSKAVPRT(配列番号12)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域(VL)；

c) 配列：CDR1-GFTTFSSYA(配列番号13)；CDR2-ISGSGGST(配列番号14)；およびCDR3-AKWDCSDGRCYWAY(配列番号15)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域(CDR)を有する重鎖可変領域(VH)；ならびに

配列：CDR1-NIESKD(配列番号16)；CDR2-DDA(配列番号17)；およびCDR3-QVWDSSSDHVV(配列番号18)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域(VL)；

d) 配列：CDR1-GFTTFSSYP(配列番号19)；CDR2-ISYHGRNK(配列番号20)；およびCDR3-ARDRDATPGGTGVGNHGMAY(配列番号21)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域(CDR)を有する重鎖可変領域(VH)；および

配列：CDR1-QSL LHSSGYNY(配列番号22)；CDR2-MGS(配列番号23)；およびCDR3-MQGLQTPPT(配列番号24)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域(VL)；

e) 配列：CDR1-GFTTFSDNA(配列番号25)；CDR2-ISGTGRTT(配列番号26)；およびCDR3-AKWDCSDGRCYWAY(配列番号27)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域(CDR)を有する重鎖可変領域(VH)；および

配列：CDR1-QSLVYSDGDTY(配列番号28)；CDR2-KVS(配列番号29)；およびCDR3-MQGTHWPPNT(配列番号30)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域(VL)；

f) 配列：CDR1-TSGMGVG(配列番号31)；CDR2-HIWWDDVKRYNPALKS(配列番号32)；およびCDR3-MRTSY YFDY(配列番号33)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域(CDR)を有する重鎖可変領域(VH)；および

配列：CDR1-RASENIFSSLA(配列番号34)；CDR2-NAKTLE(配列番号35)；およびCDR3-QHHYATPFT(配列番号36)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域(VL)；

g) 配列：CDR1-SYWIN(配列番号37)；CDR2-DIYLGSGSTNYNEKFKS(配列番号38)；およびCDR3-SGGYLG Y(配列番号39)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域(CDR)を有する重鎖可変領域(VH)；および

10

20

30

40

50

配列：CDR1-RASQSVSTSSYSYMH（配列番号40）；CDR2-FASNLES（配列番号41）；およびCDR3-QHSWEIPYT（配列番号42）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域（VL）；

h）配列：CDR1-NYWIG（配列番号43）；CDR2-DIYPGGGYTNNENFKG（配列番号44）；およびCDR3-STTYYSYWCFDV（配列番号45）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域（CDR）を有する重鎖可変領域（VH）；および

配列：CDR1-KSSQSLLNSGNQANYLA（配列番号46）；CDR2-GASTRES（配列番号47）；およびCDR3-QNDHSYPFT（配列番号48）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域（VL）；

10

i）配列：CDR1-RYWMS（配列番号49）；CDR2-EINPDSSSTINYTPSLKD（配列番号50）；およびCDR3-PGPTVVATYWYFDV（配列番号51）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域（CDR）を有する重鎖可変領域（VH）；および

配列：CDR1-RSSQSIVHSNGNTYLE（配列番号52）；CDR2-KVSSRFS（配列番号53）；およびCDR3-FQGSHVPRT（配列番号54）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域（VL）；または

20

j）配列：CDR1-RYWIN（配列番号55）；CDR2-DIYPGSGSTINYNEKFKS（配列番号56）；およびCDR3-DTTIAY（配列番号57）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域（CDR）を有する重鎖可変領域（VH）；および

配列：CDR1-RASQSVTTSRYSYMH（配列番号58）；CDR2-FASNLES（配列番号59）；およびCDR3-QHSWEIPYT（配列番号60）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域（VL）；

k）配列：CDR1-GYNMN（配列番号131）；CDR2-NIDPYYGGTNYNQKFKG（配列番号132）；およびCDR3-GLLSGSFPY（配列番号133）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域（CDR）を有する重鎖可変領域（VH）；および

30

配列：CDR1-RASENIYSYLA（配列番号134）；CDR2-NAKTLE（配列番号135）；およびCDR3-QHHYGSPLT（配列番号136）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域（VL）；

l）配列：CDR1-RSWMS（配列番号137）；CDR2-EINPDSSSTINYTPSLKD（配列番号138）；およびCDR3-FYDGYSIYWYFDV（配列番号139）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域（CDR）を有する重鎖可変領域（VH）；および

40

配列：CDR1-RSSQSIVHSNGDNTYLE（配列番号140）；CDR2-KVSNRFS（配列番号141）；およびCDR3-FQGSHVPRT（配列番号142）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域（VL）；

m）配列：CDR1-TSGMGVG（配列番号143）；CDR2-HIWWDDVKRYNPALRS（配列番号144）；およびCDR3-IAVTYFFDF（配列番号145）、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域（CDR）を有する重鎖可変領域（VH）；および

配列：CDR1-RASENIIFSSFA（配列番号146）；CDR2-NARTLE（配列番号147）；およびCDR3-QHHYASPT（配列番号148）、ま

50

たはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域(VL)；

n) 配列：CDR1-TSGMGVVG (配列番号149)；CDR2-HIWWDDVKRYNPALKS (配列番号150)；およびCDR3-MSTSY YFDY (配列番号151)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域(CDR)を有する重鎖可変領域(VH)；および

配列：CDR1-KASQSLFTSVA (配列番号152)；CDR2-SASRY Y T (配列番号153)；およびCDR3-QQHYS SPFT (配列番号154)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域(VL)；または

o) 配列：CDR1-IYAMN (配列番号155)；CDR2-RIRSKSNNYARFYADSVKD (配列番号156)；およびCDR3-PLRSYFSMDY (配列番号157)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有する相補性決定領域(CDR)を有する重鎖可変領域(VH)；および

配列：CDR1-KASENVDTYVS (配列番号158)；CDR2-GASNR Y T (配列番号159)；およびCDR3-GQTYSPWT (配列番号160)、またはそれぞれ3個までのアミノ酸置換、付加もしくは欠失を有するその変異体を有するCDRを有する軽鎖可変領域(VL)

を含んでなる抗原結合ドメイン。

【0398】

2. a) 配列番号61の配列を有するVHドメイン；および配列番号62または108の配列を有するVLドメイン；

b) 配列番号63の配列を有するVHドメイン；および配列番号64または109の配列を有するVLドメイン；

c) 配列番号65の配列を有するVHドメイン；および配列番号66の配列を有するVLドメイン；

d) 配列番号68の配列を有するVHドメイン；および配列番号69の配列を有するVLドメイン；

e) 配列番号71の配列を有するVHドメイン；および配列番号72の配列を有するVLドメイン；

f) 配列番号74の配列を有するVHドメイン；および配列番号75の配列を有するVLドメイン；

g) 配列番号76の配列を有するVHドメイン；および配列番号77の配列を有するVLドメイン；

h) 配列番号78の配列を有するVHドメイン；および配列番号79の配列を有するVLドメイン；

i) 配列番号80の配列を有するVHドメイン；および配列番号81の配列を有するVLドメイン；または

j) 配列番号82の配列を有するVHドメイン；および配列番号83の配列を有するVLドメイン；

k) 配列番号161の配列を有するVHドメイン；および配列番号162の配列を有するVLドメイン；

l) 配列番号163の配列を有するVHドメイン；および配列番号164の配列を有するVLドメイン；

m) 配列番号165の配列を有するVHドメイン；および配列番号166の配列を有するVLドメイン；

n) 配列番号167の配列を有するVHドメイン；および配列番号168の配列を有するVLドメイン；または

o) 配列番号169の配列を有するVHドメイン；および配列番号170の配列を有するVLドメイン；

またはそれぞれそれと少なくとも 90% の配列同一性を有するその変異体を含んでなる、段落 1 の抗原結合ドメイン。

【0399】

3. 段落 1 または 2 の抗原結合ドメインを含んでなる抗体。

【0400】

4. 場合により、

a) CAR が s c F v CAR であり；

b) CAR が CD 8 a 膜貫通ドメインを含み；

c) CAR が 4-1 BB または CD 28 共刺激ドメインを含み；かつ／または

d) CAR が CD 3- ζ シグナル伝達ドメインを含んでなる、

10

段落 1 または 2 の抗原結合ドメインを含んでなるキメラ抗原受容体 (CAR)。

【0401】

5. 段落 1 もしくは 2 の抗原結合ドメイン、段落 3 の抗体、または段落 4 の CAR をコードする 1 以上のヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチド。

【0402】

6. 段落 5 のポリヌクレオチドを含んでなるベクター。

【0403】

7. 段落 5 のポリヌクレオチドまたは段落 6 のベクターを含んでなる細胞。

【0404】

8. 段落 1 もしくは 2 の抗原結合ドメイン、または段落 4 の CAR を含んでなる細胞。

20

【0405】

9. 第 1 の CAR および第 2 の CAR を含み、第 1 の CAR が段落 4 の CAR であり、場合により、第 2 の CAR が抗 CD 19 CAR、抗 CD 20 CAR、抗 CD 22 CAR、抗 CD 33 CAR、抗 CD 123 CAR；または抗 CD 7 CAR である、細胞。

【0406】

10. T 細胞または NK 細胞であり、場合により、自己または同種細胞である、段落 7～9 のいずれか一項に記載の細胞。

【0407】

11. 段落 1 もしくは 2 の抗原結合ドメイン、段落 3 の抗体、段落 4 の CAR、段落 5 のポリヌクレオチド、段落 6 のベクター、または段落 7～10 のいずれか 1 つの細胞を含んでなる医薬組成物。

30

【0408】

12. 療法、場合により癌の治療である療法において使用するための、段落 1 もしくは 2 の抗原結合ドメイン、段落 3 の抗体、段落 4 の CAR、段落 5 のポリヌクレオチド、段落 6 のベクター、段落 7～10 のいずれか 1 つの細胞、または段落 11 の医薬組成物。

【0409】

13. 癌が血液悪性腫瘍、場合により、CD 8 4 を発現する血液悪性腫瘍であり、および／または癌が慢性リンパ球性白血病 (CLL)、B 細胞リンパ腫、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL)、バーキットリンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、B 細胞急性リンパ芽球性白血病 (B-ALL)、急性骨髄性白血病 (AML)、骨髄異形成症候群、T 細胞急性リンパ芽球性白血病／リンパ腫 (T-ALL)、慢性骨髄増殖性症候群、慢性骨髄性白血病 (CML)、慢性骨髄単球性白血病、樹状細胞新生物および組織球性肉腫からなる群から選択される、段落 12 に記載の使用のための抗原結合ドメイン、抗体、CAR、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または医薬組成物。

40

【0410】

14. サンプルの CD 8 4 発現レベルを決定するため、場合により、対象由来のサンプルの CD 8 4 発現レベルを分析するための、段落 1 もしくは 2 の抗原結合ドメイン、または段落 3 の抗体の使用。

【0411】

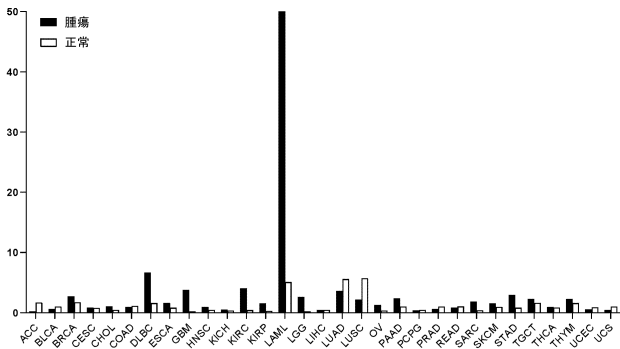
15. 抗 CD 8 4 CAR または抗体による治療に適した対象を特定するための方法で

50

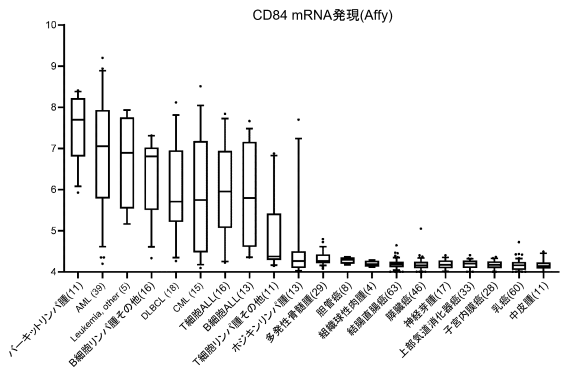
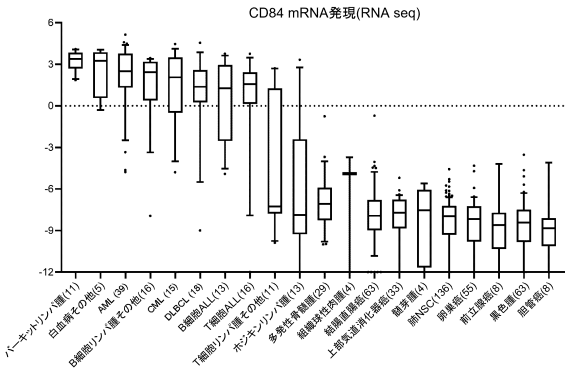
あって、対象から単離されたサンプルのCD84発現レベルを決定することを含み、CD84発現レベルが段落1もしくは2の抗原結合ドメイン、または段落3の抗体を用いて決定される、方法。

【図面】

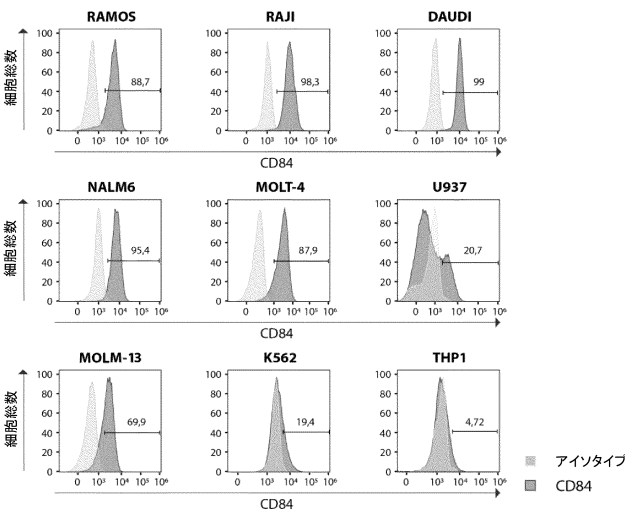
【図1】



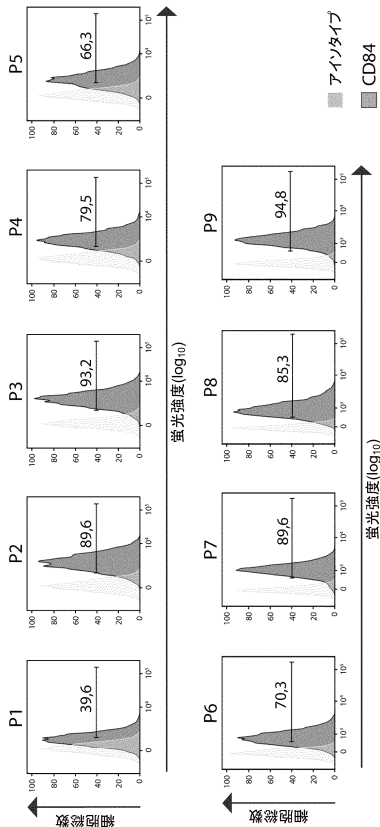
【図2】



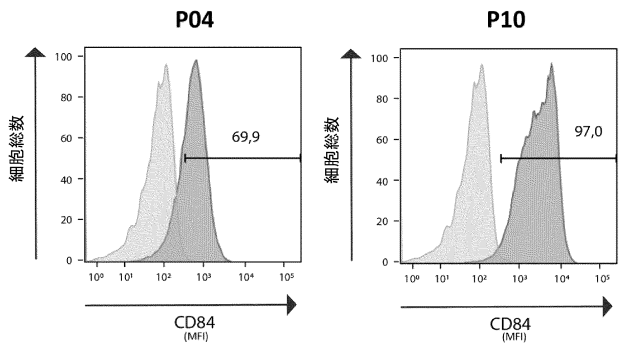
【図 3】



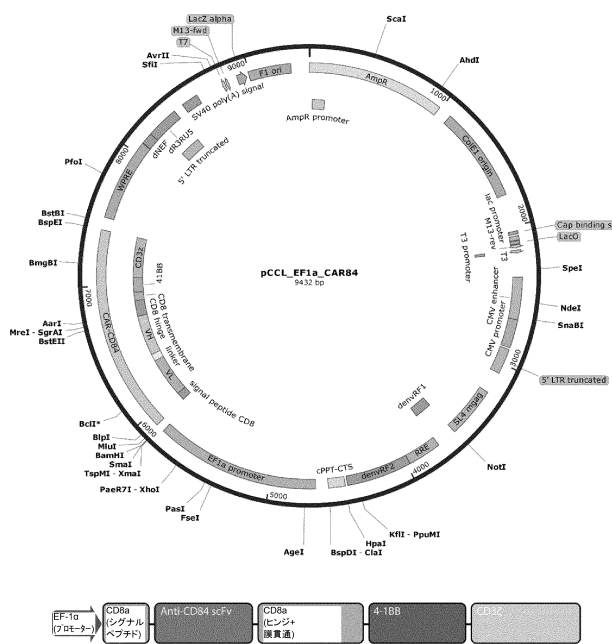
【図 4】



【図 5】



【図 6】



10

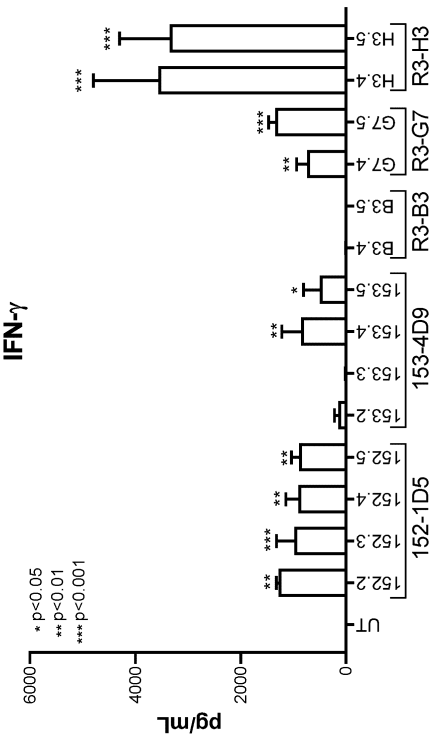
20

30

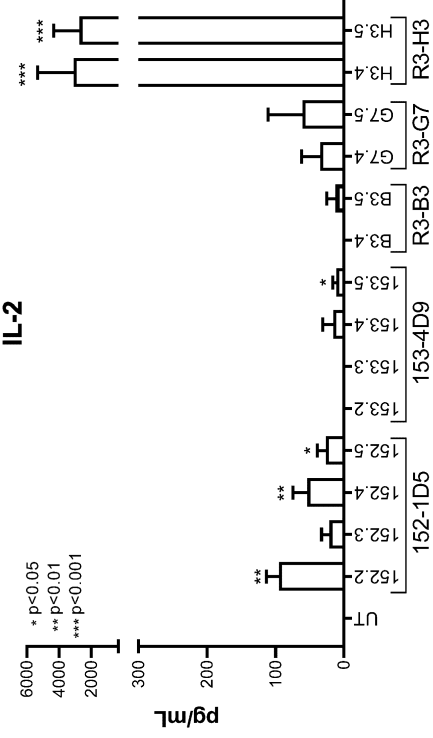
40

50

【図 7】



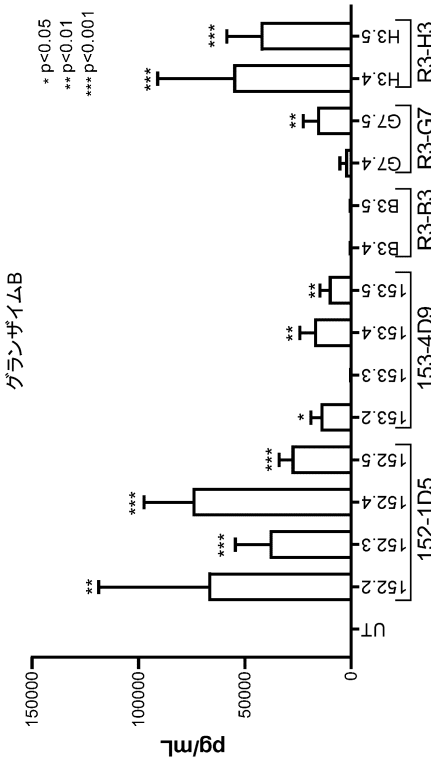
【図 8】



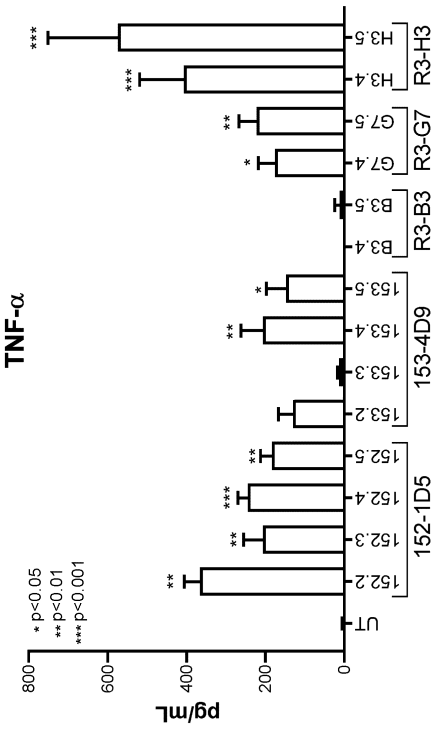
10

20

【図 9】



【図 10】

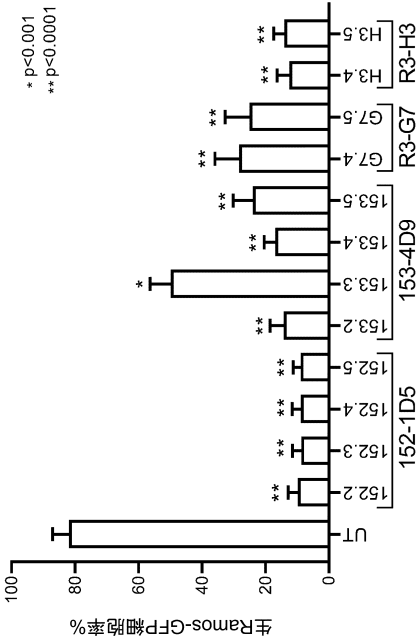


30

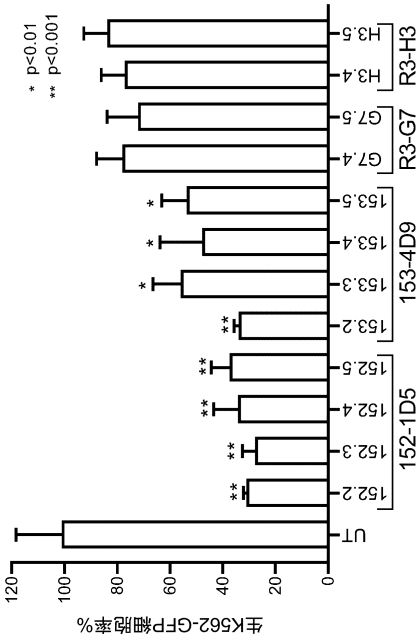
40

50

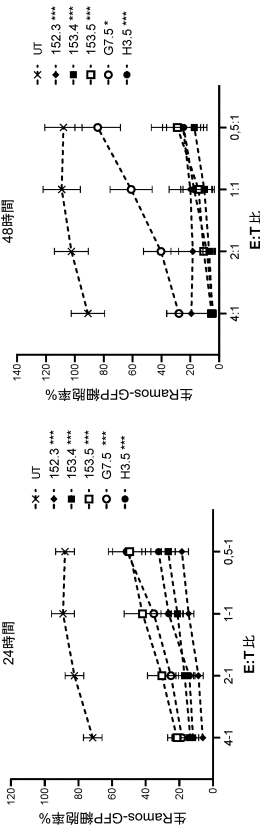
【図 1 1】



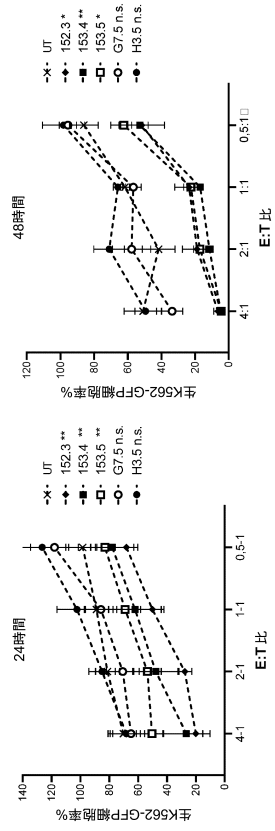
【図 1 2】



【図 1 3】



【図 1 4】



10

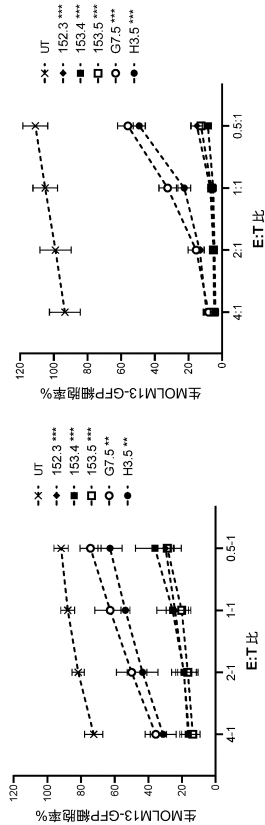
20

30

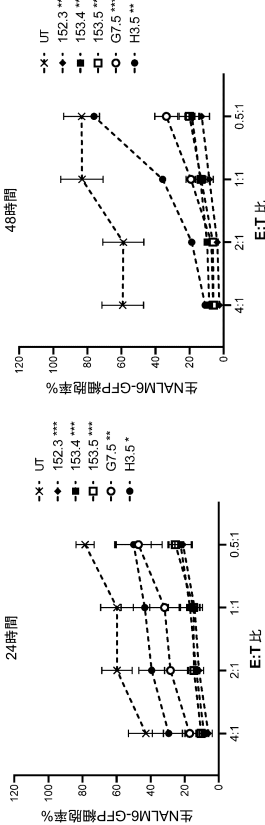
40

50

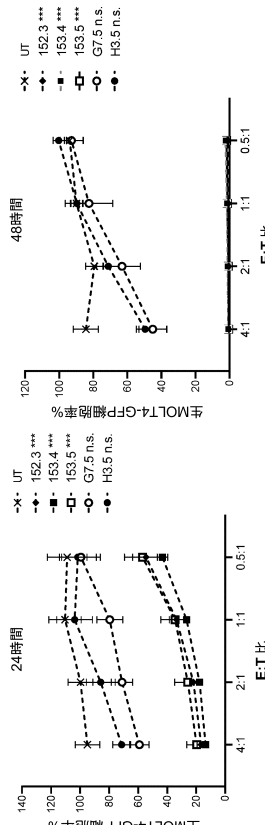
【図 1 5】



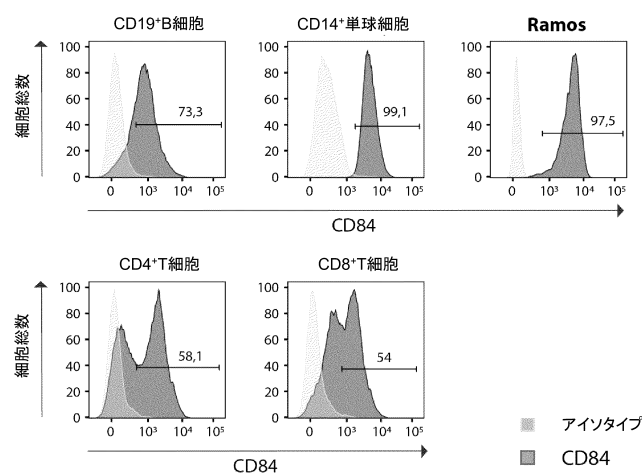
【図 1 6】



【図 1 7】



【図 1 8】



10

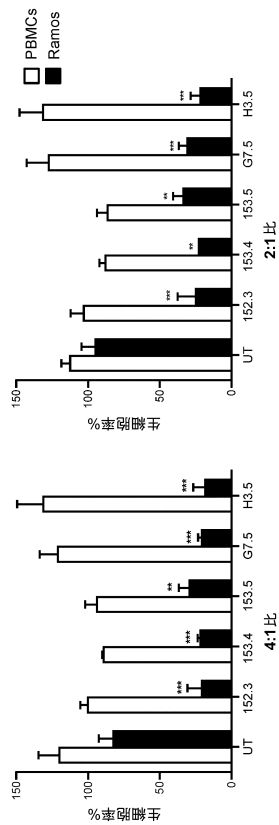
20

30

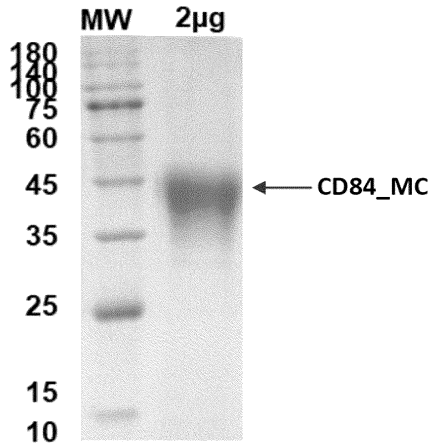
40

50

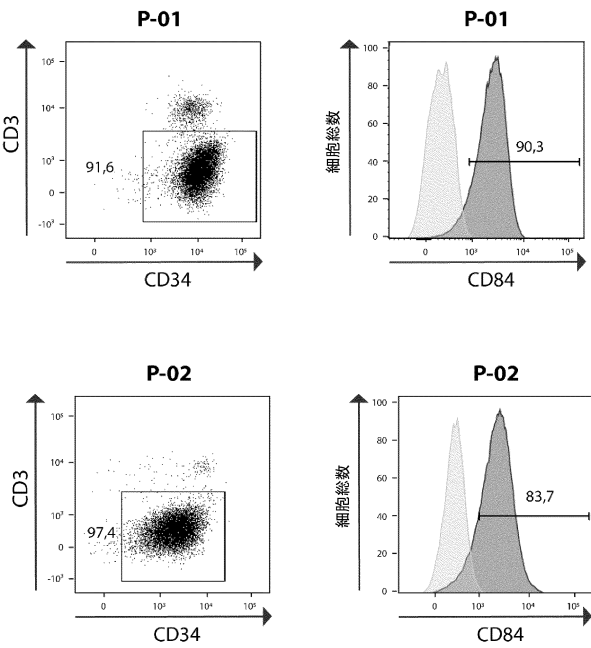
【図 19】



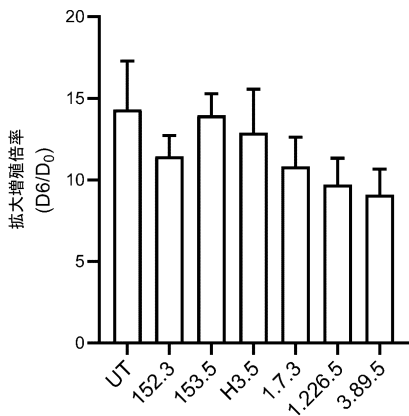
【図 20】



【図 21】



【図 22】



10

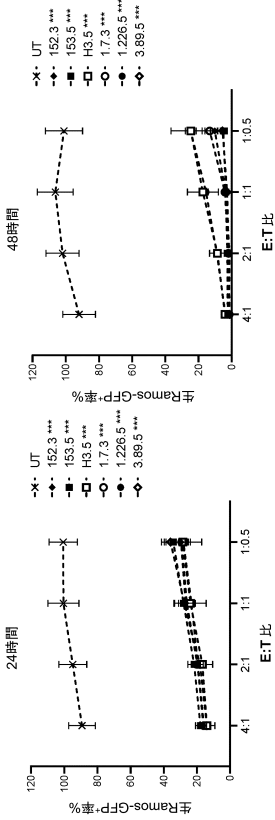
20

30

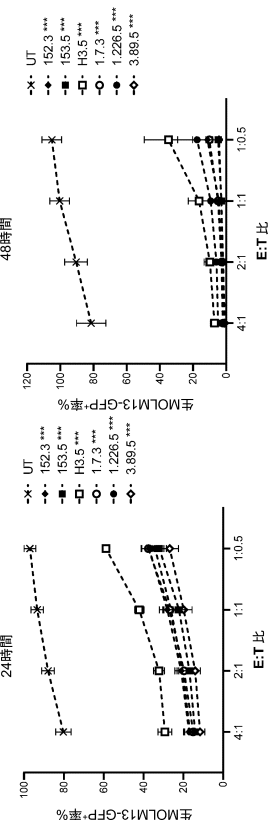
40

50

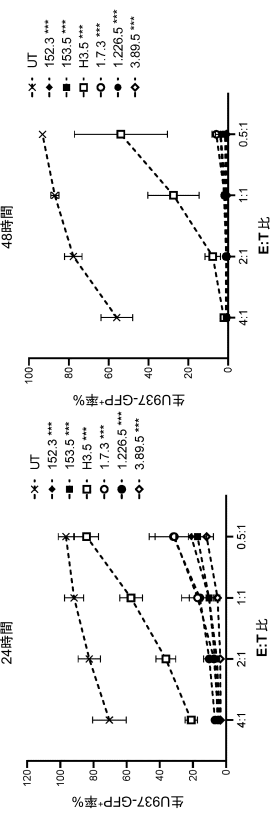
【図 2 3】



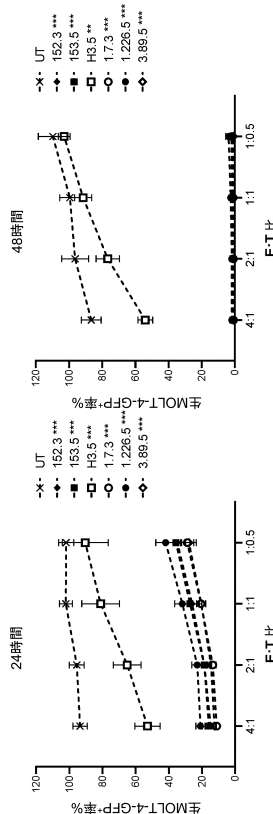
【図 2 4】



【図 2 5】



【図 2 6】



10

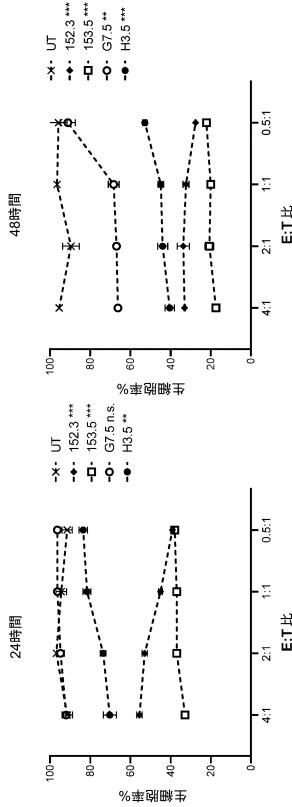
20

30

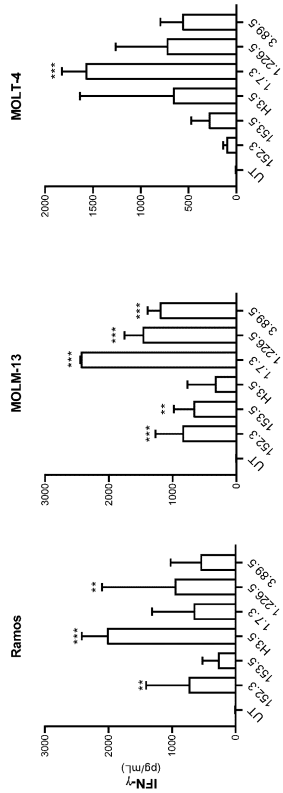
40

50

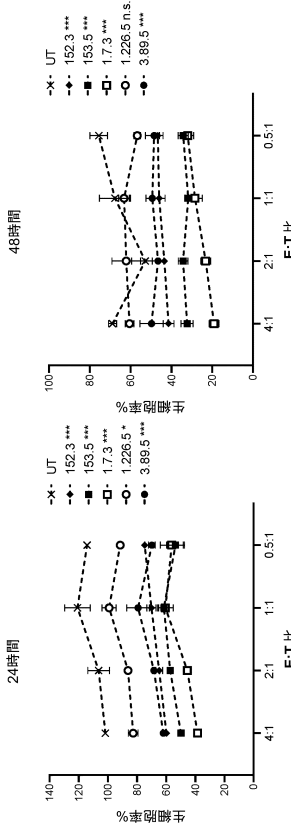
【図 2 7】



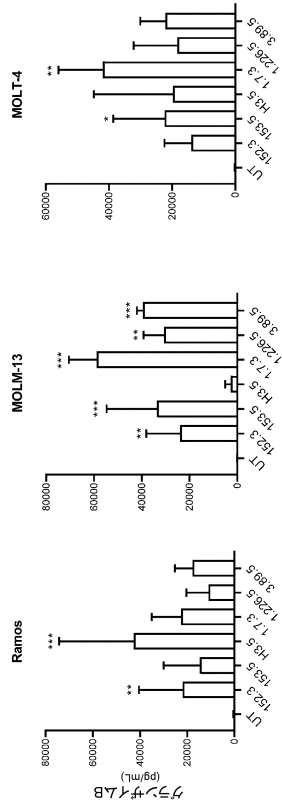
【図 2 9】



【図 2 8】



【図 3 0】



10

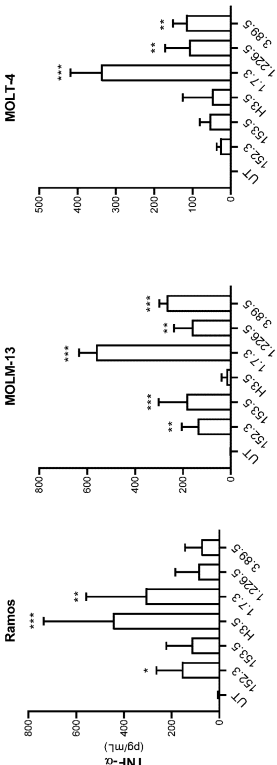
20

30

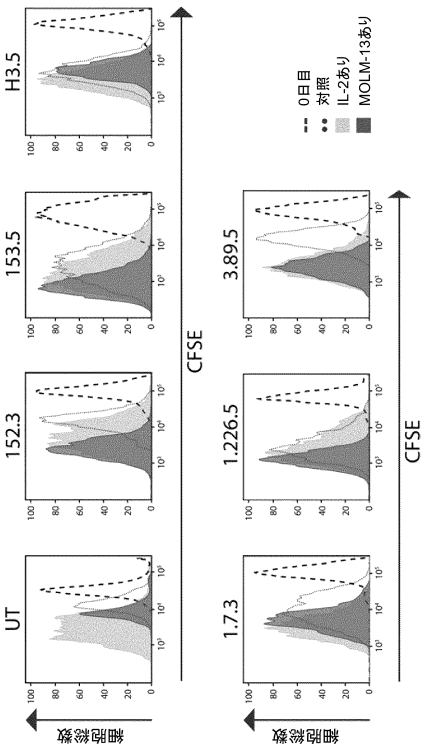
40

50

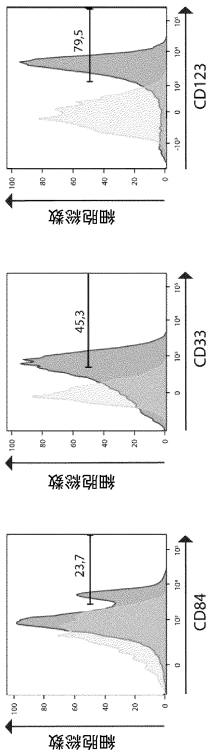
【図 3 1】



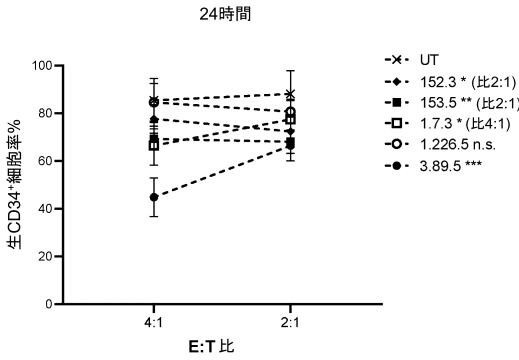
【図 3 2】



【図 3 3】



【図 3 4】



10

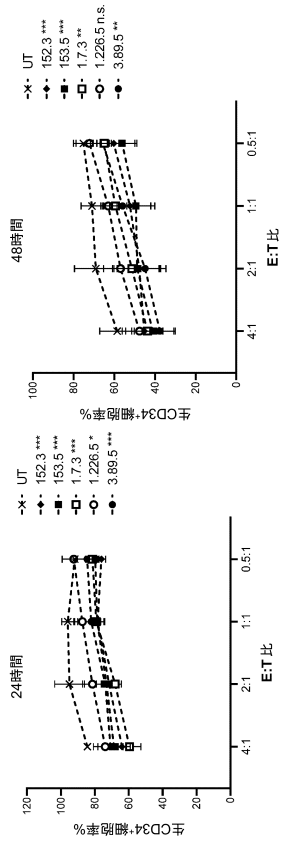
20

30

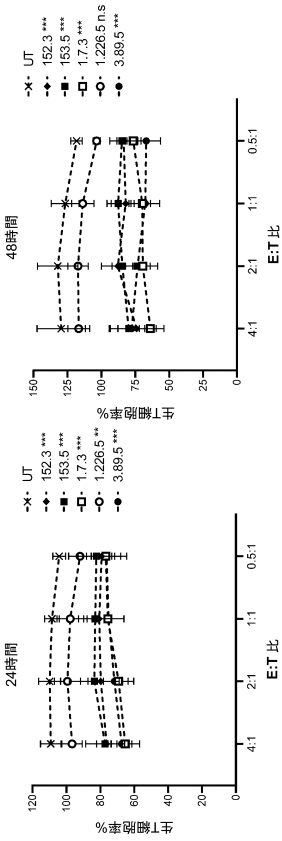
40

50

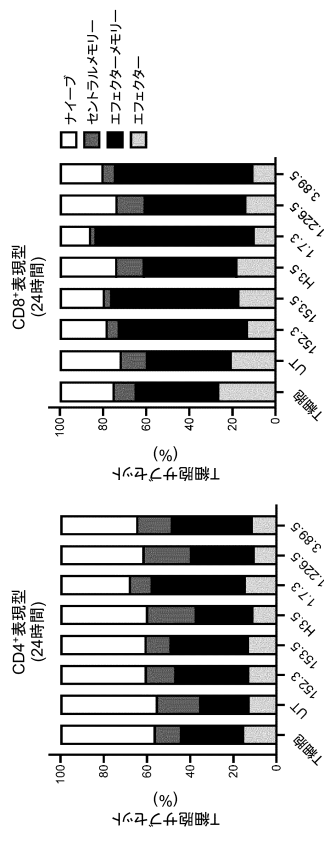
【図 3 5】



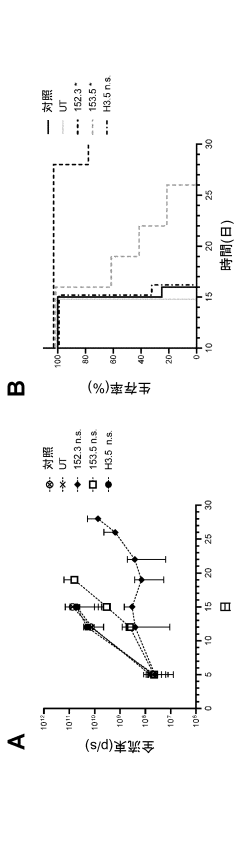
【図 3 6】



【図 3 7】



【図 3 8】



10

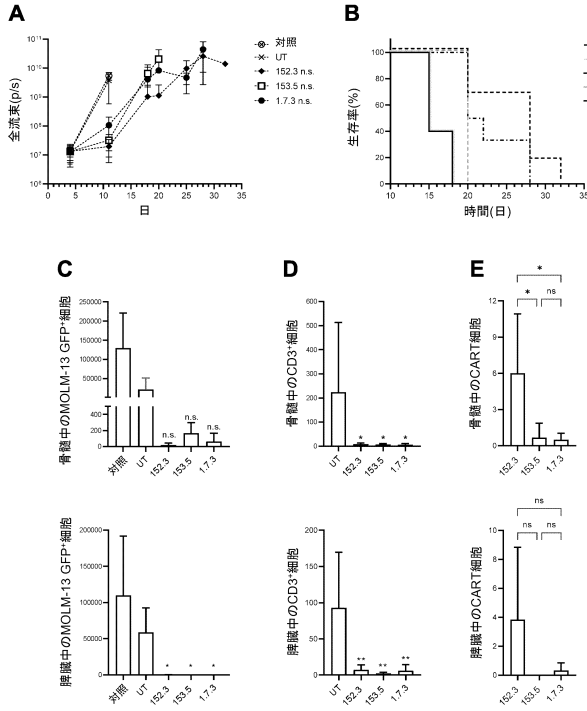
20

30

40

50

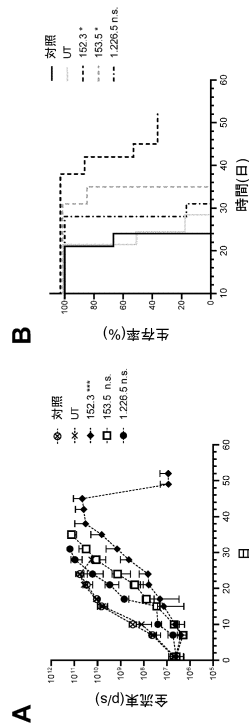
【図 3 9】



10

20

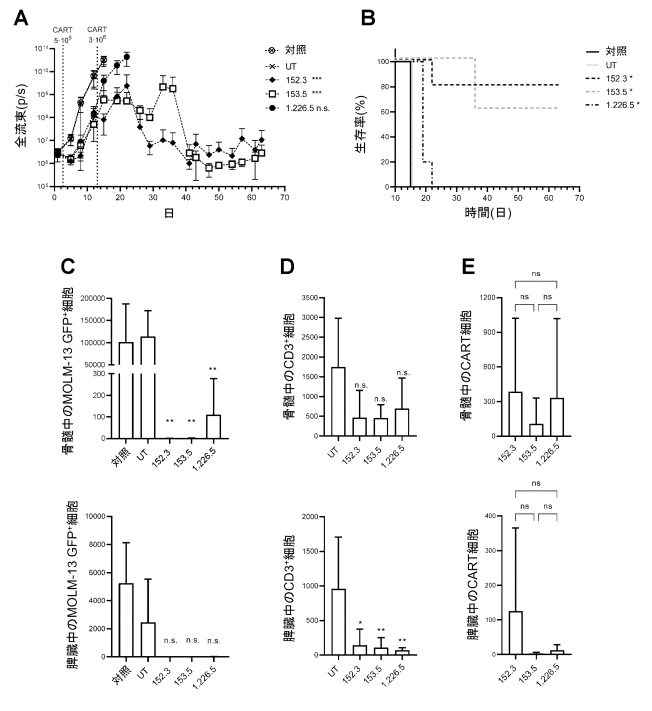
【図 4 1】



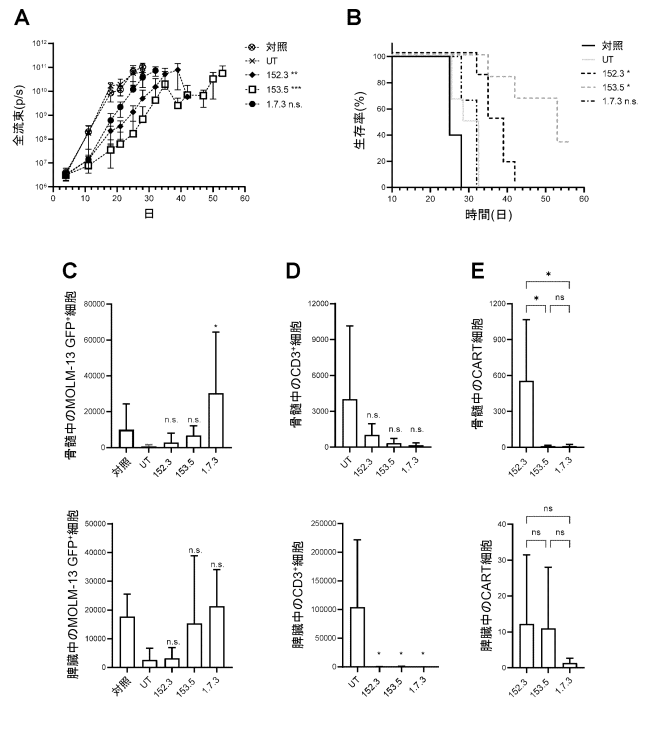
30

40

【図 4 0】

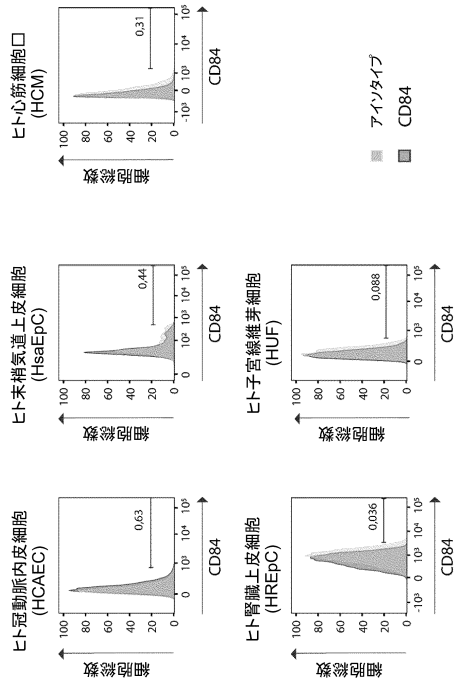


【図 4 2】

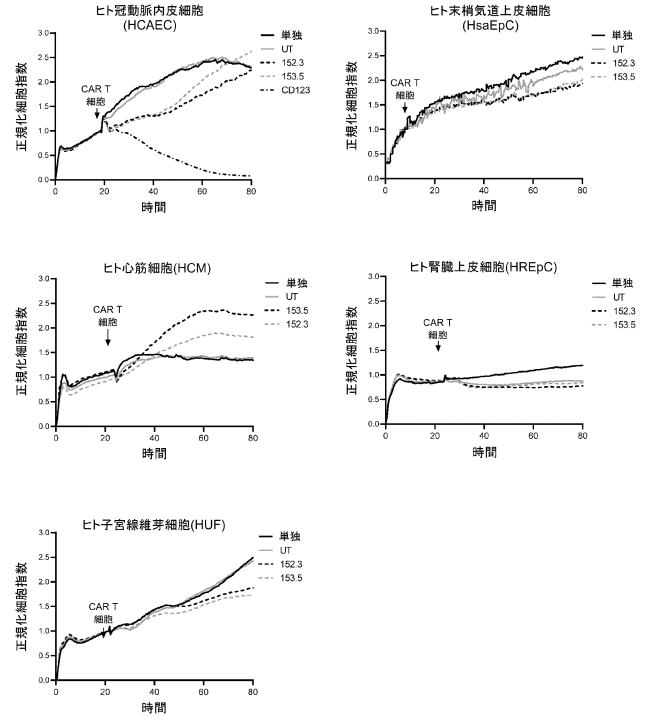


50

【図 4 3】



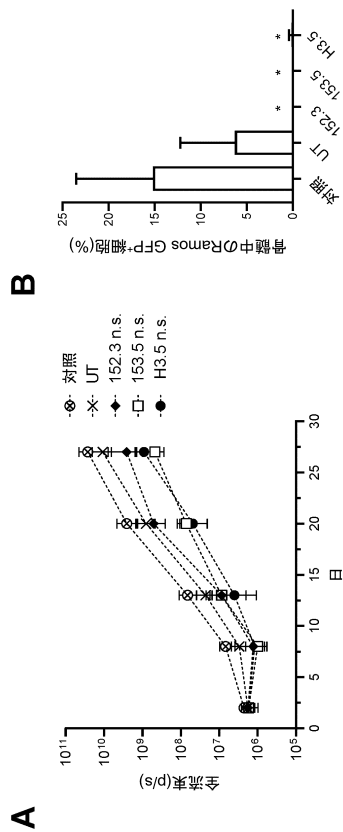
【図 4 4】



10

20

【図 4 5】



30

40

【配列表】

2025500618000001.xml

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP2023/050194
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. b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)). ☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed. 2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing. 3. Additional comments:		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/050194

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28 C07K14/725 A61K39/00
ADD.

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 A61K

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)
EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015/118538 A1 (YEDA RES & DEV [IL]) 13 August 2015 (2015-08-13) claims 1-27; examples 2,5 -----	1-16
X	WO 2021/001404 A1 (UNIV WUERZBURG J MAXIMILIANS [DE]) 7 January 2021 (2021-01-07) examples 7-9 ----- -/-	1-16

☒ 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

"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

13 March 2023

Date of mailing of the international search report

21/03/2023

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Siaterli, Maria

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/050194

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CUENCA MARTA ET AL: "CD84 cell surface signaling molecule: An emerging biomarker and target for cancer and autoimmune disorders", CLINICAL IMMUNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 204, 26 October 2018 (2018-10-26), pages 43-49, XP085800151, ISSN: 1521-6616, DOI: 10.1016/J.CLIM.2018.10.017 [retrieved on 2018-10-26] paragraph [02.5] page 47, left-hand column, paragraph 3 -----	1-16
X	DE LA FUENTE M A ET AL: "CD84 leukocyte antigen is a new member of the Ig superfamily", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 90, no. 6, 15 September 1997 (1997-09-15), pages 2398-2405, XP002124601, ISSN: 0006-4971 page 2399, right-hand column, paragraph 3 -----	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2023/050194

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015118538 A1	13-08-2015	CN 106573976 A EP 3102607 A1 ES 2696348 T3 US 2017260270 A1 US 2018327493 A1 WO 2015118538 A1	19-04-2017 14-12-2016 15-01-2019 14-09-2017 15-11-2018 13-08-2015
WO 2021001404 A1	07-01-2021	EP 3994170 A1 US 2022372159 A1 WO 2021001404 A1	11-05-2022 24-11-2022 07-01-2021

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 1 2 N 1/19 (2006.01)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)
A 6 1 P 35/02 (2006.01)
A 6 1 K 35/17 (2025.01)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)
A 6 1 K 35/76 (2015.01)
G 0 1 N 33/574 (2006.01)
C 0 7 K 14/705 (2006.01)
C 1 2 N 15/12 (2006.01)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)
C 1 2 P 21/08 (2006.01)
C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 5/10
A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 35/02
A 6 1 K 35/17
A 6 1 K 39/395 E
A 6 1 K 39/395 T
A 6 1 K 48/00
A 6 1 K 35/76
G 0 1 N 33/574 A
C 0 7 K 14/705
C 1 2 N 15/12
C 1 2 N 15/13
C 1 2 N 5/0783
C 1 2 P 21/08
C 1 2 P 21/02 C

,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,D
 E,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,S
 M,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,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,
 ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,L
 A,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,V
 N,WS,ZA,ZM,ZW

スペイン国 0 8 0 3 6 バルセロナ, ビジャロエル, 1 7 0

(74)代理人

110002572

弁理士法人平木国際特許事務所

(72)発明者

クレイン, ゴンザレス, ネラ

スペイン国 イー-0 8 0 1 7 バルセロナ, 2 エヌ-2 エー, 1 0, カジェ モント デ オルサ

(72)発明者

ファン オテロ, マヌエル

スペイン国 イー-0 8 9 4 0 コルネラ デル リヨブレガット, 1 1, カジェ ドクトル バレイ
ンティ カルリャ イ メルゲナト

(72)発明者

ヴィレラ プイグ, ラモン

スペイン国 イー-0 8 0 0 4 バルセロナ, アティック 2 エー, 7, カジェ メタ

(72)発明者

ペレス アミル, ロレーナ

スペイン国 イー-0 8 2 3 8 サン キルツェ デル バジェス, 2 0, アベニーダ ラ プラーナ

(72)発明者

リベイロ ドス サントス, クラウディオ ジョアオ

スペイン国 イー-3 7 0 0 1 サラマンカ, 3 オー イー, 4, プラザ バシリオス

F ターム (参考)

4B064 AG20 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01
 4B065 AA93X AA94X AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44
 4C084 AA13 NA05 NA14 ZB26 ZB27
 4C085 AA13 AA14 CC22 EE01 EE03 GG01
 4C087 AA01 AA02 BB37 BB65 BC83 NA05 NA14 ZB26 ZB27
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA41 DA50 DA76 EA22 EA28 FA72 FA74