

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6633081号
(P6633081)

(45) 発行日 令和2年1月22日 (2020.1.22)

(24) 登録日 令和1年12月20日 (2019.12.20)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62 Z N A Z

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 5/0783 (2010.01)

C 1 2 N 5/0783

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 15/63 Z

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

請求項の数 19 (全 53 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-533969 (P2017-533969)
 (86) (22) 出願日 平成27年12月23日 (2015.12.23)
 (65) 公表番号 特表2018-501794 (P2018-501794A)
 (43) 公表日 平成30年1月25日 (2018.1.25)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2015/054137
 (87) 国際公開番号 W02016/102965
 (87) 国際公開日 平成28年6月30日 (2016.6.30)
 審査請求日 平成30年10月23日 (2018.10.23)
 (31) 優先権主張番号 1423172.4
 (32) 優先日 平成26年12月24日 (2014.12.24)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 英国 (GB)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 507299817
 ユーシーエル ビジネス リミテッド
 イギリス国 ダブリュー 1 ティー 4 ティー
 ービー ロンドン, トットナム コート
 ロード 97, ザ ネットワーク ビ
 ルディング
 (73) 特許権者 517215973
 オートラス リミテッド
 イギリス国 ダブリュー 1 2 7 アールゼ
 ット ロンドン, ウッド レーン 58
 , フォレスト ハウス
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第 1 のキメラ抗原受容体 (C A R) および第 2 の C A R を別々の分子として細胞表面に共発現する細胞であって、各 C A R が、抗原結合ドメイン、スペーサーおよび膜貫通ドメインを含み、該第 1 の C A R の該抗原結合ドメインが、C D 1 9 に結合し、該第 2 の C A R の該抗原結合ドメインが、C D 2 2 に結合する、細胞。

【請求項 2】

前記第 1 の C A R のスペーサーは、前記第 2 の C A R のスペーサーとは異なる、請求項 1 に記載の細胞。

【請求項 3】

前記第 2 の C A R の前記抗原結合ドメインが、C D 2 2 の I g ドメイン 1、2、3 または 4 におけるエピトープに結合する、請求項 1 または 2 に記載の細胞。

【請求項 4】

第 1 のキメラ抗原受容体 (C A R) および第 2 のキメラ抗原受容体 (C A R) の両方をコードする核酸であって、該第 1 および第 2 の C A R は、それぞれ、抗原結合ドメイン、スペーサーおよび膜貫通ドメインを含み、該第 1 の C A R の該抗原結合ドメインが、C D 1 9 に結合し、該第 2 の C A R の該抗原結合ドメインが、C D 2 2 に結合する、核酸。

【請求項 5】

前記第 1 の C A R のスペーサーは、前記第 2 の C A R のスペーサーとは異なる、請求項 4 に記載の核酸。

10

20

【請求項 6】

前記第 2 の C A R の前記抗原結合ドメインが、C D 2 2 の I g ドメイン 1、2、3 または 4 におけるエピトープに結合する、請求項 4 または 5 に記載の核酸。

【請求項 7】

以下の構造：

A g B 1－スペーサー 1－T M 1－c o e x p r－A g B 2－スペーサー 2－T M 2

(ここで、

A g B 1 は、第 1 の C A R の抗原結合ドメインをコードする核酸であり；

スペーサー 1 は、該第 1 の C A R のスペーサーをコードする核酸であり

；

T M 1 は、該第 1 の C A R の膜貫通ドメインをコードする核酸であり；

c o e x p r は、自己切断性ペプチドをコードする核酸であり、

A g B 2 は、第 2 の C A R の抗原結合ドメインをコードする核酸であり；

スペーサー 2 は、該第 2 の C A R のスペーサーをコードする核酸であり；

T M 2 は、該第 2 の C A R の膜貫通ドメインをコードする核酸である)

を有し、その核酸は、T 細胞において発現されたとき、該第 1 の C A R および該第 2 の C A R が該 T 細胞表面に発現されるように、該自己切断性ペプチドで切断されるポリペプチドをコードする、

請求項 4 ～ 6 のいずれか一項に記載の核酸。

【請求項 8】

(i) 第 1 のキメラ抗原受容体 (C A R) をコードする第 1 の核酸であって、該核酸は、以下の構造：

A g B 1－スペーサー 1－T M 1

(ここで、

A g B 1 は、該第 1 の C A R の抗原結合ドメインをコードする核酸であり；

スペーサー 1 は、該第 1 の C A R のスペーサーをコードする核酸であり；

T M 1 は、該第 1 の C A R の膜貫通ドメインをコードする核酸である)

を有する、第 1 の核酸、および

(i i) 第 2 のキメラ抗原受容体 (C A R) をコードする第 2 の核酸であって、該核酸は、以下の構造：

A g B 2－スペーサー 2－T M 2

(A g B 2 は、該第 2 の C A R の抗原結合ドメインをコードする核酸であり；

スペーサー 2 は、該第 2 の C A R のスペーサーをコードする核酸であり；

T M 2 は、該第 2 の C A R の膜貫通ドメインをコードする核酸である)

を有する、第 2 の核酸

を含む、キットであって、該第 1 および第 2 の C A R は、それぞれ、抗原結合ドメイン、スペーサーおよび膜貫通ドメインを含み、該第 1 の C A R の該抗原結合ドメインが、C D 1 9 に結合し、該第 2 の C A R の該抗原結合ドメインが、C D 2 2 に結合する、キット。

【請求項 9】

前記第 1 の C A R のスペーサーは、前記第 2 の C A R のスペーサーとは異なる、請求項 8 に記載のキット。

【請求項 10】

前記第 2 の C A R の前記抗原結合ドメインが、C D 2 2 の I g ドメイン 1、2、3 または 4 におけるエピトープに結合する、請求項 8 または 9 に記載のキット。

【請求項 11】

請求項 8 ～ 10 のいずれか一項に記載のキットにおける前記第 1 の核酸を含む第 1 のベクター；および請求項 8 ～ 10 のいずれか一項に記載のキットにおける前記第 2 の核酸を含む第 2 のベクターを含む、キット。

【請求項 12】

請求項 4 ～ 7 のいずれか一項に記載の核酸を含む、ベクター。

【請求項 13】

請求項 1～3 のいずれかに記載の細胞を作製するための方法であって、請求項 4～7 のいずれか一項に記載の核酸；請求項 8～10 のいずれか一項に記載のキットにおける第 1 の核酸および第 2 の核酸；ならびに／あるいは請求項 11 に記載のキットにおける第 1 のベクターおよび第 2 のベクターまたは請求項 12 に記載のベクターを生体外で細胞に導入する工程を含む、方法。

【請求項 14】

前記細胞が、被験体から単離された試料に由来する、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

請求項 1～3 のいずれかに記載の複数の細胞を含む、医薬組成物。

10

【請求項 16】

疾患の処置および／または予防における使用のための請求項 15 に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

前記使用が、以下の工程：

(i) 被験体からの細胞含有試料の細胞の単離、

(i i) 請求項 4～7 のいずれか一項に記載の核酸；請求項 8～10 のいずれか一項に記載のキットにおける第 1 の核酸および第 2 の核酸；請求項 11 に記載のキットにおける第 1 のベクターおよび第 2 のベクターまたは請求項 12 に記載のベクターでの該細胞の形質導入またはトランスフェクト、および

(i i i) 該被験体に (i i) からの該細胞を投与すること
を含む、請求項 16 に記載の使用のための医薬組成物。

20

【請求項 18】

前記疾患が、がんである、請求項 16 または 17 に記載の使用のための医薬組成物。

【請求項 19】

前記がんが、B細胞悪性腫瘍である、請求項 18 に記載の使用のための医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、1つより多くのキメラ抗原受容体 (CAR) を含む細胞に関する。

30

【背景技術】

【0002】

発明の背景

若干の免疫治療剤が、治療用モノクローナル抗体 (mAb)、免疫コンジュゲート mAb、放射性コンジュゲート mAb および二重特異性 T 細胞エンゲージャーを含め、がん処置での使用について記載されている。

【0003】

典型的には、これらの免疫治療剤は、単一の抗原を標的とし、例えば、リツキシマブであれば CD20 を標的とし、ミエロタलगであれば CD33 を標的とし、そしてアレムツマブであれば CD52 を標的とする。

40

【0004】

ヒト CD19 抗原は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する 95 kD の膜貫通糖タンパク質である。CD19 は、B細胞分化の非常に初期から発現し、結局、形質細胞への B細胞分化の末期には消失する。結果的に、CD19 は、多発性骨髄腫以外のすべての B細胞悪性腫瘍上に発現する。正常な B細胞区画が失われることは、許容され得る毒性であるので、CD19 は、魅力的な CAR 標的であり、CAR で CD19 を標的化する臨床研究は、有望な結果を予見してきた。

【0005】

腫瘍学の分野における特有の問題は、ゴルディー-コールドマン仮説によって提供される：この仮説は、ほとんどのがん固有の高変異率に起因して、単一抗原を唯一標的化する

50

と、前記抗原の調節によって腫瘍エスケープがもたらされ得ることを説明している。この抗原発現の調節は、CD19を標的化する免疫治療薬を含む既知の免疫治療薬の有効性を低下させ得る。

【0006】

したがって、CD19を標的化する免疫治療薬に関する問題は、B細胞悪性腫瘍が変異してCD19陰性になり得ることである。これによって、CD19を標的とする治療に反応性でないCD19陰性がんが再発し得る。例えば、1つの小児科の研究において、Gruppらは、急性Bリンパ芽球性白血病（B-ALL）に対するCD19を標的とするキメラ抗原受容体治療の後の全再発の半数がCD19陰性疾患に起因したことを報告した（56th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition）。

10

【0007】

したがって、CD19陽性がんをはじめとした多くのがんに関連するマーカー発現の複雑なパターンを反映する1つより多くの細胞表面構造を標的化することができる免疫治療薬が必要とされている。

キメラ抗原受容体（CAR）

【0008】

キメラ抗原受容体は、例えば、モノクローナル抗体（mAb）の特異性をT細胞のエフェクター機能に結び付けるタンパク質である。キメラ抗原受容体の通常形態は、抗原認識性アミノ末端、スペーサー、T細胞生存および活性化シグナルを伝達する複合エンドドメインにすべて連結された膜貫通ドメインを有するI型膜貫通ドメインタンパク質の形態である（図1A参照）。

20

【0009】

これらの分子の最も一般的な形態は、シグナル伝達エンドドメインにスペーサーおよび膜貫通ドメインを介して融合された、標的抗原を認識するモノクローナル抗体から誘導された1本鎖可変フラグメント（scFv）の融合体である。上記分子は、その標的のscFvによる認識に応答してT細胞の活性化をもたらす。T細胞がかかるCARを発現すると、T細胞はその標的抗原を発現する標的細胞を認識し、殺す。いくつかのCARが腫瘍関連抗原に対して開発されており、かかるCAR発現T細胞を用いる養子移入手法は、現在様々ながんの処置についての臨床試験にかけられている。

30

【0010】

がん処置のためにCAR手法を用いると、腫瘍不均一性および免疫エディティングによって、CAR処置からのエスケープが引き起こされ得ることが認められた。例えば、Gruppらが記載した研究（2013；New Eng. J. Med 368：1509-1518，paper No 380，ASH 2014）では、CAR改変T細胞手法を急性Bリンパ性白血病の処置のために使用した。その臨床試験では、完全寛解の10人の患者が1ヶ月後に再発し、そのうちの5人が、CD19陰性疾患を再発したことが見出された。

【0011】

したがって、がんエスケープおよび腫瘍不均一性の問題に対処する代替のCAR処置手法が必要とされている。

40

2つのCAR結合特異性の発現

【0012】

タンデム型CARまたはTanCARとして知られる二重特異性CARは、複数のがん特異的マーカーを同時に標的化しようとして開発された。TanCARでは、細胞外ドメインは、リンカーにより連結された2つの抗原結合特異性をタンデムで含む。したがって、2つの結合特異性（scFv）は両方とも、単一の膜貫通部分に連結されている：一方のscFvは、膜に隣接し、他方は、遠位に存在する。

【0013】

Gradaら（2013，Mol Ther Nucleic Acids 2：e1

50

05)は、CD19特異的scFvに続いてGly-Serリンカー、そしてHER2特異的scFvを含むTanCARと記載している。そのHER2-scFvは、膜近傍の位置に存在し、CD19-scFvは、遠位に存在する。このTanCARは、2つの腫瘍制限抗原(tumour restricted antigens)の各々に対して異なるT細胞反応性を誘導すると示された。HER2(632aa/125Å)およびCD19(280aa, 65Å)のそれぞれの長さが、その特定の空間配置にふさわしいので、この配置が選択された。HER2-scFvは、HER2の最も遠位の4つのループに結合することも知られている。

【0014】

この手法に関する問題は、膜近傍のscFvが、遠位のscFvの存在、特に抗原に結合した遠位のscFvの存在のせいで到達できないことがあるということである。標的細胞上の抗原の空間配置を考慮して2つのscFvの相対位置を選択する必要があることに照らすと、すべてのscFv結合対に対してこの手法を用いることは不可能であり得る。さらに、このTanCAR手法が2つより多いscFvに対して使用され得る見込みはなく、3つまたはそれより多くのscFvを有するTanCARは、非常に大きな分子であり、それらのscFvは、互いに折り畳まれて抗原結合部位を覆い隠す可能性がある。また、2つまたはそれより多くのさらなるscFvによって膜貫通ドメインから離された最も遠位のscFvによる抗原結合が、T細胞活性化を引き起こすことができ得ることも疑わしい。

したがって、T細胞などの細胞の表面上に2つのCAR結合特異性を発現する代替の手法が必要とされている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0015】

【非特許文献1】56th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition

【非特許文献2】2013; New Eng. J. Med 368:1509-1518, paper No 380, ASH 2014

【非特許文献3】2013, Mol Ther Nucleic Acids 2:e105

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0016】

発明の要旨

本発明者らは、2つのCAR(1つはCD19に特異的であり、もう1つはCD22に特異的である)を細胞表面に発現するCAR-T細胞を開発した。

【0017】

したがって、第1の態様において、本発明は、第1のキメラ抗原受容体(CAR)および第2のCARを細胞表面に共発現する細胞を提供し、各CARは、抗原結合ドメインを含み、第1のCARの抗原結合ドメインは、CD19に結合し、第2のCARの抗原結合ドメインは、CD22に結合する。

【0018】

一方のCARがCD19に結合し、他方のCARがCD22に結合するという事実は、有益である。なぜなら、いくつかのリンパ腫および白血病は、CD19標的化後にCD19陰性になり(またはおそらくCD22標的化後にCD22陰性になり)、万一これが生じる場合は「バックアップ」抗原をもたらすからである。

【0019】

該細胞は、T細胞またはナチュラルキラー(NK)細胞などの免疫エフェクター細胞であり得る。T細胞に関して本明細書で挙げた特徴は、NK細胞などの他の免疫エフェクター細胞にも等しく当てはまる。

各CARは、

- (i) 抗原結合ドメイン；
- (ii) スペーサー；および
- (iii) 膜貫通ドメイン

を含み得る。各CARは、

- (i) 抗原結合ドメイン；
- (ii) スペーサー；
- (iii) 膜貫通ドメイン；
- (iv) エンドドメイン

を含み得る。

10

【0020】

第1のCARおよび第2のCARがヘテロダイマーを形成しないように、第1のCARのスペーサーは、第2のCARのスペーサーとは異なり得る。

【0021】

各CARが、それぞれの標的抗原を認識するように適応させるように、第1のCARのスペーサーは、第2のCARのスペーサーとは異なる長さおよび／または立体配置を有し得る。

【0022】

第2のCARの抗原結合ドメインは、CD22上の膜遠位(membrane-distal) エピトープに結合し得る。第2のCARの抗原結合ドメインは、CD22のIgドメイン1、2、3または4、例えば、CD22のIgドメイン3上のエピトープに結合し得る。

20

【0023】

第1のCARの抗原結合ドメインは、エキソン1、3または4によってコードされるCD19上のエピトープに結合し得る。

【0024】

一方のCARのエンドドメインは、共刺激ドメインおよびITAM含有ドメインを含み得；他方のCARのエンドドメインは、TNF受容体ファミリーのドメインおよびITAM含有ドメインを含み得る。

例えば、一方のCAR(CD19またはCD22特異的であり得る)は、以下の構造：

30

AgB1-スペーサー1-TM1-costim-ITAM

(ここで、

AgB1は、抗原結合ドメインであり；

スペーサー1は、スペーサーであり；

TM1は、膜貫通ドメインであり；

costimは、共刺激ドメインであり；そして

ITAMは、ITAM含有エンドドメインである)

を有し得、他方のCAR(CD22またはCD19特異的であり得る)は、以下の構造：

AgB2-スペーサー2-TM2-TNF-ITAM

(ここで、

40

AgB2は、抗原結合ドメインであり；

スペーサー2は、スペーサーであり；

TM2は、膜貫通ドメインであり；

TNFは、TNF受容体のエンドドメインであり；そして

ITAMは、ITAM含有エンドドメインである)

を有し得る。

【0025】

第2の態様において、本発明は、本発明の第1の態様において定義されたような第1のキメラ抗原受容体(CAR)と第2のキメラ抗原受容体(CAR)との両方をコードする核酸配列を提供する。

50

【0026】

その核酸配列は、以下の構造：

A g B 1ースペーサー 1ーT M 1ーc o e x p rーA b B 2ースペーサー 2ーT M 2

(ここで、

A g B 1は、第1のC A Rの抗原結合ドメインをコードする核酸配列であり；

スペーサー 1は、第1のC A Rのスペーサーをコードする核酸配列であり；

T M 1は、第1のC A Rの膜貫通ドメインをコードする核酸配列であり；

c o e x p rは、両C A Rの共発現を可能にする核酸配列であり、

A g B 2は、第2のC A Rの抗原結合ドメインをコードする核酸配列であり；

スペーサー 2は、第2のC A Rのスペーサーをコードする核酸配列であり；

T M 2は、第2のC A Rの膜貫通ドメインをコードする核酸配列であり；

その核酸配列は、T細胞において発現されるとき、第1のC A Rおよび第2のC A RがT細胞表面に共発現されるように切断部位で切断されるポリペプチドをコードする)

を有し得る。

【0027】

上記核酸配列は、以下の構造：

A g B 1ースペーサー 1ーT M 1ーエンド 1ーc o e x p rーA b B 2ースペーサー 2ー

T M 2ーエンド 2

(ここで、

A g B 1は、第1のC A Rの抗原結合ドメインをコードする核酸配列であり；

スペーサー 1は、第1のC A Rのスペーサーをコードする核酸配列であり；

T M 1は、第1のC A Rの膜貫通ドメインをコードする核酸配列であり；

エンド 1は、第1のC A Rのエンドドメインをコードする核酸配列であり；

c o e x p rは、両C A Rの共発現を可能にする核酸配列であり、

A g B 2は、第2のC A Rの抗原結合ドメインをコードする核酸配列であり；

スペーサー 2は、第2のC A Rのスペーサーをコードする核酸配列であり；

T M 2は、第2のC A Rの膜貫通ドメインをコードする核酸配列であり；

エンド 2は、第2のC A Rのエンドドメインをコードする核酸配列であり；

その核酸配列は、T細胞において発現されるとき、第1のC A Rおよび第2のC A RがT細胞表面に共発現されるように切断部位で切断されるポリペプチドをコードする)

を有し得る。

【0028】

2つのC A Rの共発現を可能にする核酸配列は、自己切断性ペプチドまたは2つのC A Rを共発現する代替的手段を可能にする配列、例えば内部リボソーム進入配列または第2プロモーターまたは当業者が同じベクターから2種のタンパク質を発現させることができるような他の手段を可能にする配列をコードし得る。

【0029】

代替的コドンは、相同組換えを回避するために、同一または類似のアミノ酸配列（例えば、膜貫通ドメインおよび／または細胞内T細胞シグナル伝達ドメイン（エンドドメイン））をコードする配列の領域で使用され得る。例えば、2つのC A Rが、スペーサー、膜貫通ドメイン、および／またはエンドドメインの全部もしくは一部に対して同一または類似のアミノ酸配列を有するが、異なる核酸配列によってコードされるように、代替的コドンがこのまたはこれらの部分をコードする配列の一部分において使用され得る。

【0030】

第3の態様において、本発明は、

(i) 第1のキメラ抗原受容体(C A R)をコードする第1の核酸配列(この核酸配列は、以下の構造：

A g B 1ースペーサー 1ーT M 1

(ここで、

A g B 1は、第1のC A Rの抗原結合ドメインをコードする核酸配列であり；

10

20

30

40

50

スペーサー 1 は、第 1 の C A R のスペーサーをコードする核酸配列であり；
T M 1 は、第 1 の C A R の膜貫通ドメインをコードする核酸配列である）
を有する）および

（ i i ）第 2 のキメラ抗原受容体をコードする第 2 の核酸配列（この核酸配列は、以下の構造：

A g B 2 – スペーサー 2 – T M 2

（ A g B 2 は、第 2 の C A R の抗原結合ドメインをコードする核酸配列であり；
スペーサー 2 は、第 2 の C A R のスペーサーをコードする核酸配列であり；
T M 2 は、第 2 の C A R の膜貫通ドメインをコードする核酸配列である）
を有する）

を含むキットを提供する。

【 0 0 3 1 】

そのキットは、以下を含み得る：

（ i ）第 1 のキメラ抗原受容体（ C A R ）をコードする第 1 の核酸配列（この核酸配列は、以下の構造を有する）

A g B 1 – スペーサー 1 – T M 1 – エンド 1

（ここで、

A g B 1 は、第 1 の C A R の抗原結合ドメインをコードする核酸配列であり；
スペーサー 1 は、第 1 の C A R のスペーサーをコードする核酸配列であり；
T M 1 は、第 1 の C A R の膜貫通ドメインをコードする核酸配列であり；
エンド 1 は、第 1 の C A R のエンドドメインをコードする核酸配列である）
を有する核酸配列；および

（ i i ）第 2 のキメラ抗原受容体（ C A R ）をコードする第 2 の核酸配列であって、以下の構造：

A g B 2 – スペーサー 2 – T M 2 – エンド 2

（ A g B 2 は、第 2 の C A R の抗原結合ドメインをコードする核酸配列であり；
スペーサー 2 は、第 2 の C A R のスペーサーをコードする核酸配列であり；
T M 2 は、第 2 の C A R の膜貫通ドメインをコードする核酸配列であり；
エンド 2 は、第 2 の C A R のエンドドメインをコードする核酸配列である）

【 0 0 3 2 】

第 4 の態様において、本発明は、第 1 の核酸配列を含む第 1 のベクターおよび第 2 の核酸配列を含む第 2 のベクターを含むキットを提供する。

【 0 0 3 3 】

それらのベクターは、プラスミドベクター、レトロウイルスベクターまたはトランスポゾンベクターであり得る。それらのベクターは、レンチウイルスベクターであり得る。

【 0 0 3 4 】

第 5 の態様において、本発明は、本発明の第 2 の態様に記載の核酸配列を含むベクターを提供する。そのベクターは、レンチウイルスベクターであり得る。

【 0 0 3 5 】

そのベクターは、プラスミドベクター、レトロウイルスベクターまたはトランスポゾンベクターであり得る。

【 0 0 3 6 】

第 6 の態様において、本発明は、本発明の第 1 の態様に記載の細胞を作製するための方法を提供し、その方法は、第 1 の C A R および第 2 の C A R をコードする 1 つもしくはそれより多くの核酸配列；または上で定義されたような 1 つもしくはそれより多くのベクターを T 細胞に導入する工程を含む。

【 0 0 3 7 】

その細胞は、患者、関連もしくは非関連造血系移植ドナー、完全に無関係のドナーから単離された試料に由来し得るか、臍帯血に由来し得るか、胚性細胞株から分化され得るか、誘導性前駆細胞株から分化され得るか、または形質転換細胞株から誘導され得る。

10

20

30

40

50

【0038】

第7の態様において、本発明は、本発明の第1の態様に記載の複数の細胞を含む医薬組成物を提供する。

【0039】

第8の態様において、本発明は、疾患を処置および／または予防するための方法を提供し、その方法は、本発明の第7の態様に記載の医薬組成物を被験体に投与する工程を含む。

【0040】

その方法は、以下の工程：

(i) 被験体からの細胞含有試料の単離

(i i) 第1のCARおよび第2のCARをコードする1つもしくはそれより多くの核酸配列またはそのような核酸配列を含む1つもしくはそれより多くのベクターでのその細胞の形質導入またはトランスフェクション；および

(i i i) その被験体に(i i)からの細胞を投与する工程を含み得る。

【0041】

上記疾患は、がんであり得る。そのがんは、B細胞悪性腫瘍であり得る。

【0042】

第9の態様において、本発明は、疾患の処置および／または予防において使用するための本発明の第7の態様に記載の医薬組成物を提供する。

【0043】

第10の態様において、本発明は、疾患を処置および／または予防するための医薬の製造における本発明の第1の態様に記載の細胞の使用を提供する。

本発明はまた、

a) 第1のキメラ抗原受容体(CAR)をコードする第1のヌクレオチド配列；

b) 第2のCARをコードする第2のヌクレオチド配列；

(ここで、一方のCARは、CD19に結合し、他方のCARは、CD22に結合する)および

c) 2つのCARが別々の実体として発現されるように、第1のヌクレオチド配列と第2のヌクレオチド配列との間に配置された自己切断性ペプチドをコードする配列を含む核酸配列も提供する。

【0044】

代替的コドンは、同一または類似アミノ酸配列をコードする領域における第1のヌクレオチド配列および第2のヌクレオチド配列の1つまたはそれより多くの部分で使用されてもよい。

【0045】

本発明はまた、そのような核酸を含むベクターおよび細胞も提供する。

【0046】

本発明者らはまた、特性が改善された新規の抗CD19 CARおよび抗CD22 CARも開発した。

【0047】

したがって、第11の態様において、本発明は、

a) 以下の配列を有する相補性決定領域(CDR)を有する重鎖可変領域(VH)：

CDR1-SYWMN(配列番号15)；

CDR2-QIWPGDGD TN YNGKFK(配列番号16)

CDR3-RETTTVGRYYYAMDY(配列番号17)；および

b) 以下の配列を有するCDRを有する軽鎖可変領域(VL)：

CDR1-KASQSV D Y D G D S Y L N(配列番号18)；

CDR2-DASN L V S(配列番号19)

CDR3-QQSTEDPWT(配列番号20)

を含むCD19結合ドメインを含むキメラ抗原受容体（CAR）を提供する。

【0048】

上記CD19結合ドメインは、配列番号23もしくは配列番号24として示されている配列を有するVHドメイン；または配列番号25、配列番号26もしくは配列番号40として示されている配列を有するVLドメイン、あるいはCD19に結合する能力を保持し、少なくとも90%の配列同一性を有するそれらの変異型を含み得る。

【0049】

上記CD19結合ドメインは、配列番号21、配列番号22もしくは配列番号39として示されている配列、またはCD19に結合する能力を保持し、少なくとも90%の配列同一性を有するそれらの変異型を含み得る。

10

【0050】

第12の態様において、本発明は、

a) 以下の配列を有する相補性決定領域（CDR）を有する重鎖可変領域（VH）：

CDR1-NYWLN（配列番号27）；

CDR2-NIYPSDSFTNYNQKFKD（配列番号28）

CDR3-DTQERSWYFDV（配列番号29）；および

b) 以下の配列を有するCDRを有する軽鎖可変領域（VL）：

CDR1-RSSQSLVHSNGNTYLH（配列番号30）；

CDR2-KVSNRFS（配列番号31）

CDR3-SQSTHVPWT（配列番号32）

20

を含むCD22結合ドメインを含むキメラ抗原受容体（CAR）を提供する。

【0051】

上記CD22結合ドメインは、配列番号35もしくは配列番号36として示されている配列を有するVHドメイン；または配列番号37もしくは配列番号38として示されている配列を有するVLドメイン、あるいはCD22に結合する能力を保持し、少なくとも90%の配列同一性を有するそれらの変異型を含み得る。

【0052】

上記CD22結合ドメインは、配列番号33もしくは配列番号34として示されている配列、またはCD22に結合する能力を保持し、少なくとも90%の配列同一性を有するそれらの変異型を含み得る。

30

【0053】

第13の態様において、本発明の第11の態様に記載のキメラ抗原受容体または本発明の第12の態様に記載のキメラ抗原受容体を細胞表面に発現する細胞が提供される。

【0054】

第14の態様において、本発明の第11の態様に記載のキメラ抗原受容体または本発明の第12の態様に記載のキメラ抗原受容体をコードする核酸配列が提供される。

【0055】

第15の態様において、本発明は、本発明の第14の態様に記載の核酸配列を含むベクターを提供する。そのベクターは、レンチウイルスベクターであり得る。

【0056】

40

このベクターは、プラスミドベクター、レトロウイルスベクターまたはトランスポゾンベクターであり得る。

【0057】

第16の態様において、本発明は、本発明の第13の態様による細胞を作製する方法であって、1つもしくはそれより多くの核酸配列（複数可）または上記で定義した1つもしくはそれより多くのベクター（複数可）を細胞に導入する工程を含む方法を提供する。

【0058】

その細胞は、T細胞またはナチュラルキラー（NK）細胞であり得る。細胞は、患者、関連もしくは非関連造血系移植ドナー、完全に無関係のドナーから単離された試料に由来

50

するか、臍帯血に由来するか、胚性細胞株から分化されるか、誘導性前駆細胞株から分化されるか、または形質転換細胞株から誘導され得る。

【0059】

第17の態様において、本発明は、本発明の第13の態様による複数の細胞を含む医薬組成物を提供する。

【0060】

第18の態様において、本発明は、疾患を処置および／または予防する方法であって、被験体に本発明の第17の態様による医薬組成物を投与する工程を含む方法を提供する。

【0061】

その方法は、以下の工程：

(i) 被験体からの細胞含有試料の単離；

(ii) CARをコードする核酸配列またはそのような核酸配列を含むベクターでのその細胞の形質導入またはトランスフェクション；および

(iii) その被験体に(ii)からの細胞を投与する工程を含み得る。

【0062】

上記疾患は、がんであり得る。そのがんは、B細胞悪性腫瘍であり得る。

【0063】

第19の態様において、本発明は、疾患の処置および／または予防で使用するための本発明の第17の態様による医薬組成物を提供する。

【0064】

第20の態様において、本発明は、疾患を処置および／または予防するための医薬の製造における本発明の第13の態様による細胞の使用を提供する。

【0065】

本発明の第11の態様において定義されたような第1のCARおよび本発明の第12の態様において定義されたような第2のCARを含む、本発明の第1の態様に記載の細胞も提供される。

【0066】

本発明の第11の態様において定義されたような第1のCARおよび本発明の第12の態様において定義されたような第2のCARをコードする、本発明の第2の態様に記載の核酸配列も提供される。

【0067】

本発明の第3の態様に記載のキットも提供され、ここで、第1の核酸配列は、本発明の第11の態様において定義されたような第1のCARをコードし、第2の核酸配列は、本発明の第12の態様において定義されたような第2のCARをコードする。

【0068】

本発明の第11の態様において定義されたような第1のCARおよび本発明の第12の態様において定義されたような第2のCARをコードする核酸配列を含む、本発明の第5の態様に記載のベクターも提供される。

【0069】

本発明者らはまた、共刺激ドメインと生存シグナルを生成するドメインとが、2つ（またはそれより多く）のCARの間に「分割」されている場合、ORゲートシステムにおいて性能が改善されることも見出した。

【0070】

したがって、第21の態様において、第1のキメラ抗原受容体(CAR)および第2のCARを細胞表面に共発現する細胞が提供され、各CARは、細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1のCARの細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激ドメインを含み；第2のCARの細胞内シグナル伝達ドメインは、TNF受容体ファミリーのエンドドメインを含む。

【0071】

共刺激ドメインは、CD28共刺激ドメインであり得る。

【0072】

TNF受容体ファミリーのエンドドメインは、例えば、OX-40または4-1BBエンドドメインであり得る。

【0073】

第1のCARおよび第2のCARの細胞内シグナル伝達ドメインはまた、CD3ゼータエンドドメインなどのITAM含有ドメインも含み得る。

【0074】

第1のCARは、以下の構造：

AgB1-スパーサー1-TM1-costim-ITAM

10

(ここで、

AgB1は、第1のCARの抗原結合ドメインであり；

スパーサー1は、第1のCARのスパーサーであり；

TM1は、第1のCARの膜貫通ドメインであり；

costimは、共刺激ドメインであり；そして

ITAMは、ITAM含有エンドドメインである)

を有し得る。

【0075】

第2のCARは、以下の構造：

AgB2-スパーサー2-TM2-TNF-ITAM

20

(ここで、

AgB2は、第2のCARの抗原結合ドメインであり；

スパーサー2は、第2のCARのスパーサーであり；

TM2は、第2のCARの膜貫通ドメインであり；

TNFは、TNF受容体のエンドドメインであり；そして

ITAMは、ITAM含有エンドドメインである)

を有し得る。

【0076】

第1のCARおよび第2のCARのうちの一方のCARが、CD19を標的化し得、他方のCARが、CD22を標的化し得る。

30

【0077】

第22の態様において、本発明の第21の態様において定義されたような第1のキメラ抗原受容体(CAR)と第2のキメラ抗原受容体(CAR)との両方をコードする核酸配列が提供される。

【0078】

その核酸配列は、以下の構造：

AgB1-スパーサー1-TM1-costim-ITAM1-coexpr-AgB2-スパーサー2-TM2-TNF-ITAM2

(ここで、

AgB1は、第1のCARの抗原結合ドメインをコードする核酸配列であり；

40

スパーサー1は、第1のCARのスパーサーをコードする核酸配列であり；

TM1は、第1のCARの膜貫通ドメインをコードする核酸配列であり；

costimは、共刺激ドメインをコードする核酸配列であり；

ITAM1は、第1のCARのITAM含有エンドドメインをコードする核酸配列であり；

coexprは、両CARの共発現を可能にする核酸配列であり、

AgB2は、第2のCARの抗原結合ドメインをコードする核酸配列であり；

スパーサー2は、第2のCARのスパーサーをコードする核酸配列であり；

TM2は、第2のCARの膜貫通ドメインをコードする核酸配列であり；

TNFは、TNF受容体のエンドドメインをコードする核酸配列であり；

50

I T A M 2は、第2のC A RのI T A M含有エンドドメインをコードする核酸配列である)
を有し得る。

【0079】

上記核酸配列は、細胞において発現されるとき、第1のC A Rおよび第2のC A Rが細胞表面に共発現されるように切断部位で切断されるポリペプチドをコードし得る。

【0080】

第23の態様において、

(i) 本発明の第21の態様において定義されたような第1のキメラ抗原受容体(C A R)をコードする第1の核酸配列(この核酸配列は、以下の構造： 10

A g B 1ーspacer 1ーT M 1ーc o s t i mーI T A M 1

(ここで、

A g B 1は、第1のC A Rの抗原結合ドメインをコードする核酸配列であり；

spacer 1は、第1のC A Rのspacerをコードする核酸配列であり；

T M 1は、第1のC A Rの膜貫通ドメインをコードする核酸配列であり；

c o s t i mは、共刺激ドメインをコードする核酸配列であり；

I T A M 1は、第1のC A RのI T A M含有エンドドメインをコードする核酸配列である)

を有する)および

(i i) 本発明の第21の態様において定義されたような第2のキメラ抗原受容体(C A R)をコードする第2の核酸配列(この核酸配列は、以下の構造： 20

A b B 2ーspacer 2ーT M 2ーT N FーI T A M 2

(A g B 2は、第2のC A Rの抗原結合ドメインをコードする核酸配列であり；

spacer 2は、第2のC A Rのspacerをコードする核酸配列であり；

T M 2は、第2のC A Rの膜貫通ドメインをコードする核酸配列であり；

T N Fは、T N F受容体のエンドドメインをコードする核酸配列であり；そして

I T A M 2は、第2のC A RのI T A M含有エンドドメインをコードする核酸配列である)

を有する)を含むキットが提供される。

【0081】 30

第24の態様において、本発明の第22の態様に記載の、または本発明の第23の態様において定義されたような、核酸配列を含むベクターが提供される。

【0082】

第25の態様において、本発明の第21の態様に記載の細胞を作製するための方法が提供され、その方法は、本発明の第22の態様に記載の核酸配列；本発明の第23の態様において定義されたような第1の核酸配列および第2の核酸配列；または本発明の第24の態様に記載のベクターを細胞に導入する工程を含む。

【0083】

第26の態様において、本発明は、本発明の第21の態様に記載の複数の細胞を含む医薬組成物を提供する。 40

【0084】

疾患を処置および／または予防するための方法も提供され、その方法は、本発明の第26の態様に記載の医薬組成物を被験体に投与する工程を含む。

【0085】

疾患の処置および／または予防において使用するための本発明の第26の態様に記載の医薬組成物も提供される。

【0086】

疾患を処置および／または予防するための医薬の製造における本発明の第21の態様に記載の細胞の使用も提供される。

【0087】 50

CD19を標的化する1つのCARおよびCD22を標的化するもう1つのCARを提供することによって、これらのマーカーの各々を標的化することが可能であり、それによって、がんエスケープの問題が低減される。

【0088】

それらのCARは、細胞の表面上に別々の分子として発現されるので、この手法は、T an CARに関連する空間的な問題および到達性の問題を克服する。細胞の活性化効率も改善される。各CARが、それ独自のスペーサーを有する場合、そのスペーサーを適応させることが可能であり、ゆえに、結合ドメインが細胞表面から突き出る距離およびその可撓性などを特定の標的抗原に対して適応させることが可能である。この選択は、T an CARに関連する考慮すべき設計事項、すなわち、1つのCARが、T細胞膜と隣接して

10

【0089】

切断部位によって分断された2つのCARをコードする単一の核酸を提供することによって、単純な単一の形質導入手順を用いて、2つのCARを共発現するように細胞を操作することが可能である。別々の構築物におけるCARエンコード配列を用いて二重トランスフェクション手順を使用することもできるが、これは、より複雑かつ高価であり得、それらの核酸に対してより多くの組込み部位を必要とし得る。二重トランスフェクション手順はまた、CARをコードする両方の核酸が効果的に形質導入および発現されたかに関する不確実性にも関連し得る。

20

【0090】

上記CARは、相同性の高い部分を有し得、例えば、膜貫通ドメインおよび／または細胞内シグナル伝達ドメインは、高度に相同である可能性がある。同一または類似のリンカーが、2つのCARに対して用いられる場合、それらのリンカーも高度に相同であり得る。このことから、それらの配列間での相同組換えの可能性があるので、両CARを単一の核酸配列に提供する手法は不適當であると示唆される。しかしながら、本発明者らは、相同性の高い領域をコードする配列の一部分を「コドンゆらぎ」にすることによって、単一の構築物から2つのCARを高効率で発現することが可能であることを見出した。コドンゆらぎは、同一または類似のアミノ酸配列をコードする配列の領域における代替的コドンの使用を含む。

30

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

第1のキメラ抗原受容体(CAR)および第2のCARを細胞表面に共発現する細胞であって、各CARが、抗原結合ドメインを含み、該第1のCARの該抗原結合ドメインが、CD19に結合し、該第2のCARの該抗原結合ドメインが、CD22に結合する、細胞。

(項目2)

各CARが、

(i) 抗原結合ドメイン；

(ii) スペーサー；および

(iii) 膜貫通ドメイン

を含み、前記第1のCARの該スペーサーは、前記第2のCARの該スペーサーとは異なる、項目1に記載の細胞。

40

(項目3)

前記第2のCARの前記抗原結合ドメインが、CD22のIgドメイン1、2、3または4におけるエピトープに結合する、項目2に記載の細胞。

(項目4)

項目1～3のいずれかにおいて定義されたような前記第1のキメラ抗原受容体(CAR)および前記第2のキメラ抗原受容体(CAR)の両方をコードする核酸配列。

(項目5)

50

以下の構造：

A g B 1－スペーサー 1－T M 1－c o e x p r－A b B 2－スペーサー 2－T M 2

（ここで、

A g B 1は、前記第 1 の C A R の抗原結合ドメインをコードする核酸配列であり；

スペーサー 1 は、前記第 1 の C A R のスペーサーをコードする核酸配列であり

；

T M 1 は、前記第 1 の C A R の膜貫通ドメインをコードする核酸配列であり；

c o e x p r は、両 C A R の共発現を可能にする核酸配列であり、

A g B 2 は、前記第 2 の C A R の抗原結合ドメインをコードする核酸配列であり；

スペーサー 2 は、前記第 2 の C A R のスペーサーをコードする核酸配列であり；

T M 2 は、前記第 2 の C A R の膜貫通ドメインをコードする核酸配列である）

を有し、その核酸配列は、T 細胞において発現されたとき、前記第 1 の C A R および前記第 2 の C A R が該 T 細胞表面に発現されるように、切断部位で切断されるポリペプチドをコードする、

項目 4 に記載の核酸配列。

（項目 6）

c o e x p r が、自己切断性ペプチドを含む配列をコードする、項目 5 に記載の核酸配列

。

（項目 7）

相同組換えを回避するために、代替的コドンが、同一または類似のアミノ酸配列をコードする配列の領域で使用される、項目 5 または 6 に記載の核酸配列。

（項目 8）

（i）項目 1 ～ 3 のいずれかにおいて定義されたような前記第 1 のキメラ抗原受容体（C A R）をコードする第 1 の核酸配列であって、該核酸配列は、以下の構造：

A g B 1－スペーサー 1－T M 1

（ここで、

A g B 1 は、前記第 1 の C A R の抗原結合ドメインをコードする核酸配列であり；

スペーサー 1 は、前記第 1 の C A R のスペーサーをコードする核酸配列であり；

T M 1 は、前記第 1 の C A R の膜貫通ドメインをコードする核酸配列である）

を有する、第 1 の核酸配列、および

（i i）項目 1 ～ 3 のいずれかにおいて定義されたような前記第 2 のキメラ抗原受容体（C A R）をコードする第 2 の核酸配列であって、該核酸配列は、以下の構造：

A g B 2－スペーサー 2－T M 2

（A g B 2 は、前記第 2 の C A R の抗原結合ドメインをコードする核酸配列であり；

スペーサー 2 は、前記第 2 の C A R のスペーサーをコードする核酸配列であり；

T M 2 は、前記第 2 の C A R の膜貫通ドメインをコードする核酸配列である）

を有する、第 2 の核酸配列

を含む、キット。

（項目 9）

項目 8 において定義されたような前記第 1 の核酸配列を含む第 1 のベクター；および項目 8 において定義されたような前記第 2 の核酸配列を含む第 2 のベクターを含む、キット。

（項目 1 0）

前記ベクターが、組込み型ウイルスベクターまたはトランスポゾンである、項目 9 に記載のキット。

（項目 1 1）

項目 4 ～ 7 のいずれかに記載の核酸配列を含む、ベクター。

（項目 1 2）

項目 1 1 に記載の、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またはトランスポゾン。

（項目 1 3）

10

20

30

40

50

項目 1 ～ 3 のいずれかに記載の細胞を作製するための方法であって、項目 4 ～ 7 のいずれかに記載の核酸配列；項目 8 において定義されたような第 1 の核酸配列および第 2 の核酸配列；ならびに／あるいは項目 9 において定義されたような第 1 のベクターおよび第 2 のベクターまたは項目 11 もしくは 12 に記載のベクターを細胞に導入する工程を含む、方法。

(項目 14)

前記細胞が、被験体から単離された試料に由来する、項目 13 に記載の方法。

(項目 15)

項目 1 ～ 3 のいずれかに記載の複数の細胞を含む、医薬組成物。

(項目 16)

項目 15 に記載の医薬組成物を被験体に投与する工程を含む、疾患を処置および／または予防するための方法。

(項目 17)

以下の工程：

(i) 被験体からの細胞含有試料の単離；

(i i) 項目 4 ～ 7 のいずれかに記載の核酸配列；項目 8 において定義されたような第 1 の核酸配列および第 2 の核酸配列；項目 9 もしくは 10 において定義されたような第 1 のベクターおよび第 2 のベクターまたは項目 11 もしくは 12 に記載のベクターでの該細胞の形質導入またはトランスフェクション；および

(i i i) 該被験体に (i i) からの該細胞を投与することを含む、項目 16 に記載の方法。

(項目 18)

前記疾患が、がんである、項目 16 または 17 に記載の方法。

(項目 19)

前記がんが、B 細胞悪性腫瘍である、項目 18 に記載の方法。

(項目 20)

疾患の処置および／または予防において使用するための項目 15 に記載の医薬組成物。

(項目 21)

疾患を処置および／または予防するための医薬の製造における項目 1 ～ 3 のいずれかに記載の細胞の使用。

(項目 22)

a) 以下の配列を有する相補性決定領域 (CDR) を有する重鎖可変領域 (VH)：

CDR1-SYWMN (配列番号 15)；

CDR2-QIWP GDGDTNYNGKFK (配列番号 16)；

CDR3-RETTTVGRYYAMDY (配列番号 17)；および

b) 以下の配列を有する CDR を有する軽鎖可変領域 (VL)：

CDR1-KASQSV DYGDSYLN (配列番号 18)；

CDR2-DASN LVS (配列番号 19)；

CDR3-QQSTEDPWT (配列番号 20)；

を含む CD19 結合ドメインを含む、キメラ抗原受容体 (CAR)。

(項目 23)

前記 CD19 結合ドメインが、配列番号 23 もしくは配列番号 24 として示されている配列を有する VH ドメイン；または配列番号 25、配列番号 26 もしくは配列番号 40 として示されている配列を有する VL ドメイン、CD19 に結合する能力を保持し、少なくとも 90% の配列同一性を有するそれらの変異型を含む、項目 22 に記載の CAR。

(項目 24)

前記 CD19 結合ドメインが、配列番号 21、配列番号 22 もしくは配列番号 39 として示されている配列、または CD19 に結合する能力を保持し、少なくとも 90% の配列同一性を有するそれらの変異型を含む、項目 22 に記載の CAR。

(項目 25)

10

20

30

40

50

a) 以下の配列を有する相補性決定領域 (CDR) を有する重鎖可変領域 (VH) :

CDR1-NYW I N (配列番号 27) ;

CDR2-N I Y P S D S F T N Y N Q K F K D (配列番号 28)

CDR3-D T Q E R S W Y F D V (配列番号 29) ; および

b) 以下の配列を有する CDR を有する軽鎖可変領域 (VL) :

CDR1-R S S Q S L V H S N G N T Y L H (配列番号 30) ;

CDR2-K V S N R F S (配列番号 31)

CDR3-S Q S T H V P W T (配列番号 32)

を含む CD22 結合ドメインを含む、キメラ抗原受容体 (CAR)。

(項目 26)

前記 CD22 結合ドメインが、配列番号 35 もしくは配列番号 36 として示されている配列を有する VH ドメイン；または配列番号 37 もしくは配列番号 38 として示されている配列を有する VL ドメイン、または CD22 に結合する能力を保持し、少なくとも 90 % の配列同一性を有するそれらの変異型を含む、項目 25 に記載の CAR。

(項目 27)

前記 CD22 結合ドメインが、配列番号 33 もしくは配列番号 34 として示されている配列、または CD22 に結合する能力を保持し、少なくとも 90 % の配列同一性を有するそれらの変異型を含む、項目 25 に記載の CAR。

(項目 28)

前記第 1 の CAR が、項目 22 ~ 24 のいずれかにおいて定義されたとおりであり、前記第 2 の CAR が、項目 25 ~ 27 のいずれかにおいて定義されたとおりである、項目 1 ~ 3 のいずれかに記載の細胞。

(項目 29)

項目 22 ~ 24 のいずれかにおいて定義されたような第 1 の CAR および項目 25 ~ 27 のいずれかにおいて定義されたような第 2 の CAR をコードする、項目 4 ~ 7 のいずれかに記載の核酸配列。

(項目 30)

前記第 1 の核酸配列が、項目 22 ~ 24 のいずれかにおいて定義されたような第 1 の CAR をコードし、前記第 2 の核酸配列が、項目 25 ~ 27 のいずれかにおいて定義されたような第 2 の CAR をコードする、項目 8 ~ 10 のいずれかに記載のキット。

(項目 31)

項目 29 に記載の核酸配列を含む、項目 11 または 12 に記載のベクター。

(項目 32)

第 1 のキメラ抗原受容体 (CAR) および第 2 の CAR を細胞表面に共発現する細胞であって、各 CAR は、細胞内シグナル伝達ドメインを含み、該第 1 の CAR の該細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激ドメインを含み；該第 2 の CAR の該細胞内シグナル伝達ドメインは、TNF 受容体ファミリーのエンドドメインを含む、細胞。

(項目 33)

前記共刺激ドメインが、CD28 共刺激ドメインである、項目 32 に記載の細胞。

(項目 34)

前記 TNF 受容体ファミリーのエンドドメインが、OX-40 または 4-1BB エンドドメインである、項目 32 または 33 に記載の細胞。

(項目 35)

前記第 1 の CAR および前記第 2 の CAR の前記細胞内シグナル伝達ドメインが、ITAM 含有ドメインも含む、項目 32 ~ 34 のいずれかに記載の細胞。

(項目 36)

前記第 1 の CAR が、以下の構造：

A g B 1 - スペーサー 1 - T M 1 - c o s t i m - I T A M

(ここで、

A g B 1 は、前記第 1 の CAR の抗原結合ドメインであり；

10

20

30

40

50

スパーサー 1 は、前記第 1 の C A R のスパーサーであり；
T M 1 は、前記第 1 の C A R の膜貫通ドメインであり；
c o s t i m は、共刺激ドメインであり；
I T A M は、I T A M 含有エンドドメインである）
を有し、前記第 2 の C A R が、以下の構造：

A g B 2 – スパーサー 2 – T M 2 – T N F – I T A M

（ここで、

A g B 2 は、前記第 2 の C A R の抗原結合ドメインであり；
スパーサー 2 は、前記第 2 の C A R のスパーサーであり；
T M 2 は、前記第 2 の C A R の膜貫通ドメインであり；
T N F は、T N F 受容体のエンドドメインであり；
I T A M は、I T A M 含有エンドドメインである）
を有する、項目 3 5 に記載の細胞。

（項目 3 7）

項目 3 2 ～ 3 6 のいずれかにおいて定義されたような前記第 1 のキメラ抗原受容体（C A R）および前記第 2 のキメラ抗原受容体（C A R）の両方をコードする核酸配列。

（項目 3 8）

以下の構造：

A g B 1 – スパーサー 1 – T M 1 – c o s t i m – I T A M 1 – c o e x p r – A b B 2
– スパーサー 2 – T M 2 – T N F – I T A M 2

（ここで、

A g B 1 は、前記第 1 の C A R の抗原結合ドメインをコードする核酸配列であり；
スパーサー 1 は、前記第 1 の C A R のスパーサーをコードする核酸配列であり；
T M 1 は、前記第 1 の C A R の膜貫通ドメインをコードする核酸配列であり；
c o s t i m は、共刺激ドメインをコードする核酸配列であり；
I T A M 1 は、前記第 1 の C A R の I T A M 含有エンドドメインをコードする核酸配列で
あり；

c o e x p r は、両 C A R の共発現を可能にする核酸配列であり、

A g B 2 は、前記第 2 の C A R の抗原結合ドメインをコードする核酸配列であり；
スパーサー 2 は、前記第 2 の C A R のスパーサーをコードする核酸配列であり；
T M 2 は、前記第 2 の C A R の膜貫通ドメインをコードする核酸配列であり；
T N F は、T N F 受容体のエンドドメインをコードする核酸配列であり；
I T A M 2 は、前記第 2 の C A R の I T A M 含有エンドドメインをコードする核酸配列で
あり、

その核酸配列は、細胞において発現されたとき、前記第 1 の C A R および前記第 2 の C A R が該細胞表面に発現されるように、切断部位で切断されるポリペプチドをコードする）
を有する、項目 3 7 に記載の核酸配列。

（項目 3 9）

（i）項目 3 2 ～ 3 6 のいずれかにおいて定義されたような前記第 1 のキメラ抗原受容体（C A R）をコードする第 1 の核酸配列であって、該核酸配列は、以下の構造：

A g B 1 – スパーサー 1 – T M 1 – c o s t i m – I T A M 1

（ここで、

A g B 1 は、前記第 1 の C A R の抗原結合ドメインをコードする核酸配列であり；
スパーサー 1 は、前記第 1 の C A R のスパーサーをコードする核酸配列であり；
T M 1 は、前記第 1 の C A R 膜貫通ドメインをコードする核酸配列であり；
c o s t i m は、共刺激ドメインをコードする核酸配列であり；
I T A M 1 は、前記第 1 の C A R の I T A M 含有エンドドメインをコードする核酸配列で
ある）

を有する、第 1 の核酸配列、および

（i i）項目 3 2 ～ 3 6 のいずれかにおいて定義されたような前記第 2 のキメラ抗原受容

10

20

30

40

50

体（CAR）をコードする第2の核酸配列であって、該核酸配列は、以下の構造：

AbB2-スパーサー2-TM2-TNF-ITAM2

（AgB2は、前記第2のCARの抗原結合ドメインをコードする核酸配列であり；

スパーサー2は、前記第2のCARのスパーサーをコードする核酸配列であり；

TM2は、前記第2のCARの膜貫通ドメインをコードする核酸配列であり；

TNFは、TNF受容体のエンドドメインをコードする核酸配列であり；

ITAM2は、前記第2のCARのITAM含有エンドドメインをコードする核酸配列である）

を有する、第2の核酸配列

を含む、キット。

（項目40）

項目37または38に記載の核酸配列を含む、ベクター。

（項目41）

項目37～38のいずれかに記載の細胞を作製するための方法であって、項目37もしくは38に記載の核酸配列；項目39において定義されたような第1の核酸配列および第2の核酸配列；または項目40に記載のベクターを細胞に導入する工程を含む、方法。

（項目42）

項目32～36のいずれかに記載の複数の細胞を含む、医薬組成物。

（項目43）

項目42に記載の医薬組成物を被験体に投与する工程を含む、疾患を処置および／または予防するための方法。

（項目44）

疾患の処置および／または予防において使用するための項目42に記載の医薬組成物。

（項目45）

疾患を処置および／または予防するための医薬の製造における項目32～36のいずれかに記載の細胞の使用。

【図面の簡単な説明】

【0091】

【図1】a）古典的CARを図示している模式図。（b）～（d）：種々の世代および並べ替えのCARエンドドメイン：（b）最初の設計は、FcεR1-γまたはCD3ζエンドドメインを介してITAMシグナルのみを伝達したが、後の設計は、同じ混成エンドドメインにおいてさらなる（c）1つまたは（d）2つの共刺激シグナルを伝達した。

【0092】

【図2】B細胞の成熟経路／B細胞の発生。DR=HLA-DR；cCD79=細胞質CD79；cCD22=細胞質CD22。CD19抗原とCD22抗原との両方が、B細胞成熟の初期において発現される。これらの細胞こそが、B細胞急性白血病に発展する。CD19ならびにCD22の両方を同時に標的化することが、B細胞急性白血病の標的化に最もふさわしい。

【0093】

【図3】抗CD19 OR CD22 CARカセットを設計するための戦略。CD19を認識するバインダーおよびCD22を認識するバインダーを選択する。最適なスパーサードメインおよびシグナル伝達ドメインを各CARに対して選択する。（a）FMD-2Aペプチドを用いて両CARが共発現されるように、ORゲートカセットを構築する。組換えを回避するために、任意の相同配列をコドンゆらぎにする。（c）2つのCARを別々のタンパク質としてT細胞表面上に共発現させる。

【0094】

【図4】同一のペプチド配列のレトロウイルスベクターにおける共発現を可能にするが相同組換えを回避するコドンゆらぎの例。ここでは、野生型HCH2CH3-CD28tmZetaが、コドンゆらぎのHCH2CH3-CD28tmZetaとアライメントしている。

10

20

30

40

50

【0095】

【図5】抗CD19 OR CD22 CARゲートの機能の実証。(a)構築物の略図：S1-シグナルペプチド1；HA-赤血球凝集素(haemagglutinin)タグ；HCH2CH3-IgG1野生型配列のヒンジ、CH2CH3；CD28tmZ-CD28膜貫通ドメインおよびCD3ゼータのゆらぎ配列；2A-口蹄疫2Aペプチド；S2-シグナルペプチド2；V5-v5エピトープタグ；aCD22-抗CD22 scFv；HCH2CH3'-IgG1のゆらぎ配列のヒンジ、CH2CH3；CD28tmZ-CD28膜貫通ドメインおよびCD3ゼータのゆらぎ配列；(b)単一ベクターからの2つの受容体の共発現。OKT3および抗CD28による刺激後に、末梢血T細胞にバイシストロニックベクターを形質導入した。形質導入の5日後に、抗V5-FITC(invivogen)および抗HA-PE(abcam)で染色することによって、細胞を解析した。2つのCARは、T細胞表面上で同時に検出され得る。(c)形質導入されていないT細胞、抗CD19 CARのみを発現しているT細胞、抗CD22 CARのみを発現しているT細胞、ならびに抗CD19 OR CD22 CARゲートを発現しているT細胞を、CD19もCD22も発現していない標的細胞、CD19もしくはCD22を単独で発現している標的細胞、または両方の抗原を発現している標的細胞でチャレンジした。抗CD19 OR CD22 CARゲートを発現しているT細胞は、一方の抗原が存在していなかったとしても、標的細胞を殺すことができた。

10

【0096】

【図6】マウスCD22ALAb scFv、ヒト化CD22ALAb scFvおよびM971 scFvのBiacore親和性測定。

20

【0097】

【図7】マウスCD19ALAb scFvおよびヒト化CD19ALAbのBiacore親和性測定。

【0098】

【図8】CD19ALAb scFvに対する可溶性scFv-CD19結合の結合カインेटィクスとfmc63 scFvに対する可溶性scFv-CD19結合の結合カインेटィクスとの比較。

【0099】

【図9】比較研究において使用されたCD19ALAb CAR、fmc63 CAR、CD22ALAb CARおよびM971 CARを図示している模式図。

30

【0100】

【図10】CD19ALAb抗原結合ドメインを有するCARとfmc63結合ドメインを有する等価なCARとを比較する、CD19陽性標的細胞の致死アッセイ。

【0101】

【図11】A)CD22ALAb抗原結合ドメインを有するCARとM971結合ドメインを有する等価なCARとを比較する、CD22陽性標的細胞の致死アッセイ。B)CD22陽性SupT1細胞と1:1で共培養した後のIFNγ放出を比較するアッセイ。

【0102】

【図12】CD19の構造およびエキソン。

40

【0103】

【図13A】実施例5において試験された4つの構築物を図示している模式図および構築物のマップ。構築物のマップにおいて、'でマークされた部分は、コドンゆらぎになっている。A:CD19 CARとCD22 CARとの両方が、41BB-CD3ゼータ複合エンドドメインを有し；B:CD19 CARとCD22 CARとの両方が、OX40-CD3ゼータ複合エンドドメインを有し；C:CD19 CARは、41BB-CD3ゼータ複合エンドドメインを有し、CD22 CARは、CD28-CD3ゼータ複合エンドドメインを有し；D:CD19 CARは、OX40-CD3ゼータ複合エンドドメインを有し、CD22 CARは、CD28-CD3ゼータ複合エンドドメインを有する。

50

【図13B】実施例5において試験された4つの構築物を図示している模式図および構築物のマップ。構築物のマップにおいて、'でマークされた部分は、コドンゆらぎになっている。A:CD19 CARとCD22 CARとの両方が、41BB-CD3ゼータ複合エンドドメインを有し; B:CD19 CARとCD22 CARとの両方が、OX40-CD3ゼータ複合エンドドメインを有し; C:CD19 CARは、41BB-CD3ゼータ複合エンドドメインを有し、CD22 CARは、CD28-CD3ゼータ複合エンドドメインを有し; D:CD19 CARは、OX40-CD3ゼータ複合エンドドメインを有し、CD22 CARは、CD28-CD3ゼータ複合エンドドメインを有する。

【図13C】実施例5において試験された4つの構築物を図示している模式図および構築物のマップ。構築物のマップにおいて、'でマークされた部分は、コドンゆらぎになっている。A:CD19 CARとCD22 CARとの両方が、41BB-CD3ゼータ複合エンドドメインを有し; B:CD19 CARとCD22 CARとの両方が、OX40-CD3ゼータ複合エンドドメインを有し; C:CD19 CARは、41BB-CD3ゼータ複合エンドドメインを有し、CD22 CARは、CD28-CD3ゼータ複合エンドドメインを有し; D:CD19 CARは、OX40-CD3ゼータ複合エンドドメインを有し、CD22 CARは、CD28-CD3ゼータ複合エンドドメインを有する。

【図13D】実施例5において試験された4つの構築物を図示している模式図および構築物のマップ。構築物のマップにおいて、'でマークされた部分は、コドンゆらぎになっている。A:CD19 CARとCD22 CARとの両方が、41BB-CD3ゼータ複合エンドドメインを有し; B:CD19 CARとCD22 CARとの両方が、OX40-CD3ゼータ複合エンドドメインを有し; C:CD19 CARは、41BB-CD3ゼータ複合エンドドメインを有し、CD22 CARは、CD28-CD3ゼータ複合エンドドメインを有し; D:CD19 CARは、OX40-CD3ゼータ複合エンドドメインを有し、CD22 CARは、CD28-CD3ゼータ複合エンドドメインを有する。

【0104】

【図14】図13に示された構築物を発現している細胞による標的細胞致死。

【発明を実施するための形態】

【0105】

詳細な説明

キメラ抗原受容体 (CAR)

図1で概略的に示されているCARは、細胞外抗原認識ドメイン (バインダー) を細胞内シグナル伝達ドメイン (エンドドメイン) に結び付けるキメラI型膜貫通タンパク質である。バインダーは、典型的にはモノクローナル抗体 (mAb) から誘導された1本鎖可変フラグメント (scFV) であるが、抗体様抗原結合部位を含む他のフォーマットに基づくことも可能である。スペーサードメインは、通常膜からバインダーを単離し、好適な配向をもたせるのに必要である。使用される一般的なスペーサードメインは、IgG1のFcである。より小型のスペーサー、例えば、抗原によっては、CD8αからのストーク、さらにはIgG1ヒンジ単独でも十分であり得る。膜貫通ドメインは、細胞膜にタンパク質をつなぎ止め、スペーサーをエンドドメインに結び付ける。

【0106】

初期のCAR設計は、FcεR1またはCD3ζのγ鎖のどちらかの細胞内部分から誘導されたエンドドメインを有していた。したがって、これらの第一世代受容体は、免疫学的シグナル1を伝達するもので、同種標的細胞のT細胞による致死を誘発するのに十分ではあったが、T細胞を十分に活性化して増殖および生存をもたらすことはなかった。この限界を克服するため、複合エンドドメインが構築された: T細胞共刺激分子の細胞内部分とCD3ζの細胞内部分の融合により、抗原認識後活性化シグナルおよび共刺激シグナルを同時に伝達することができる第二世代受容体をもたらされる。最も一般的に使用される

共刺激ドメインは、CD28の共刺激ドメインである。これは、T細胞増殖を誘発する最も強力な共刺激シグナル、すなわち免疫学的シグナル2を供給する。また、生存シグナルを伝達する密接に関連したOX40および41BBなど、TNF受容体ファミリーのエンドドメインを含む一部の受容体も記載されている。活性化シグナル、増殖シグナルおよび生存シグナルを伝達することができるエンドドメインを有するさらにいっそう強力な第三世代CARが現在記載されている。

【0107】

CARコード核酸は、例えば、レトロウイルスベクターを用いてT細胞に移入され得る。レンチウイルスベクターも使用され得る。こうして、多数のがん特異的T細胞が、養子細胞移入のために生成され得る。CARが標的抗原と結合したとき、これにより、活性化シグナルの、それが発現されるT細胞への伝達をもたらされる。すなわち、CARは、標的抗原を発現する腫瘍細胞に向けたT細胞の特異性および細胞傷害性を誘導する。 .

10

【0108】

本発明の第1の態様は、第1のCARおよび第2のCARを共発現する細胞に関し、ここで、T細胞が、CD19またはCD22のいずれかを発現している標的細胞を認識することができるように、一方のCARはCD19に結合し、他方のCARはCD22に結合する。

【0109】

したがって、本発明の第1のCARおよび第2のCARの抗原結合ドメインは、異なる抗原に結合し、両CARは、活性化エンドドメインを含み得る。それらの2つのCARは、同じであり得るスペーサドメイン、または2つの異なる受容体の交差対合を防止するのに十分に異なり得るスペーサドメインを含み得る。ゆえに、細胞は、CD19およびCD22のいずれかまたは両方を認識すると活性化するように操作され得る。このことは、ゴルディーコールドマン仮説（ほとんどのがんに固有の高変異率に起因して、単一抗原を唯一標的化すると、前記抗原の調節によって腫瘍エスケープがもたらされ得る）によって示唆されているように腫瘍学の分野において有用である。2つの抗原を同時に標的化することによって、そのようなエスケープの可能性（probably）が指数関数的に低下する。

20

【0110】

2つのCARがヘテロダイマーを形成しないことは重要である。

30

【0111】

本発明のT細胞の第1および第2のCARは、切断部位とともに両CARを含むポリペプチドとして生成され得る。

シグナルペプチド

【0112】

本発明の細胞のCARはシグナルペプチドを含み得、その結果、CARがT細胞などの細胞の内側で発現されるとき、新生タンパク質を小胞体、それに続いて細胞表面へと指向させ、そこで発現される。

【0113】

シグナルペプチドのコアは、単一アルファヘリックスを形成する傾向を有する疎水性アミノ酸の長いストレッチを含み得る。シグナルペプチドは、アミノ酸の短い正に荷電したストレッチから始まり得、これが転位中におけるポリペプチドの適切なトポロジーを強化する助けとなる。シグナルペプチドの末端に、典型的にはシグナルペプチダーゼにより認識され、切断されるアミノ酸のストレッチが存在する。シグナルペプチダーゼは、転位中または転位完了後に切断して、遊離シグナルペプチドおよび成熟タンパク質を生成させ得る。次いで、遊離シグナルペプチドは、特異的プロテアーゼにより消化される。

40

【0114】

シグナルペプチドは、分子のアミノ末端に位置し得る。

【0115】

シグナルペプチドは、配列番号1、2もしくは3、または5、4、3、2もしくは1個

50

のアミノ酸変異（挿入、置換または付加）を有するそれらの変異型を含み得るが、ただし、そのシグナルペプチドは、CARの細胞表面発現を引き起こすようになおも機能する。

【化1】

配列番号1: MGTSLLCWMALCLLGADHADG

【0116】

配列番号1のシグナルペプチドは、小型であり高効率である。末端グリシンの後で約95%の切断をもたらすことから、シグナルペプチダーゼによる効率的な除去をもたらすと予測される。

【化2】

配列番号2: MSLPVTALLPLALLHAARP

【0117】

配列番号2のシグナルペプチドは、IgG1に由来する。

【化3】

配列番号3: MAVPTQVLGLLLWLTDARC

【0118】

配列番号3のシグナルペプチドは、CD8に由来する。

【0119】

第1のCARに対するシグナルペプチドは、第2のCARのシグナルペプチドとは異なる配列を有し得る。

CD19

【0120】

ヒトCD19抗原は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する95kdの膜貫通糖タンパク質である。CD19は、単一の膜貫通ドメイン、細胞質のC末端および細胞外のN末端を有するI型膜貫通タンパク質として分類される。CD19の一般構造を図12に図示する。

【0121】

CD19は、正常なB細胞および腫瘍性B細胞ならびに濾胞樹状細胞のバイオマーカーである。実際に、CD19は、B細胞芽球への発生中に最も早く認識可能なB系列細胞由来のB細胞上に存在するが、形質細胞に成熟すると消失する。CD19は、主に、CD21およびCD81とともにB細胞共受容体として作用する。活性化されると、CD19の細胞質テイルは、リン酸化され、それによって、Srcファミリーキナーゼによる結合およびPI-3キナーゼのリクルートメントがもたらされる。CD19は、B細胞分化の非常に初期に発現するが、結局、形質細胞へのB細胞分化の末期には消失する。結果的に、CD19は、多発性骨髄腫以外のすべてのB細胞悪性腫瘍上に発現する。

以下の表に概要を述べるように、種々の設計のCARが種々の施設においてCD19に対して試験された：

【表1】

表1

施設	バインダー	エンドドメイン	コメント
University College London	Fmc63	CD3-ゼータ	低レベルの短期持続
Memorial Sloane Kettering	SJ25C1	CD28-ゼータ	短期間の持続
NCI/KITE	Fmc63	CD28-ゼータ	長期間の低レベル持続
Baylor, Centre for Cell and GeneTherapy	Fmc63	CD3-ゼータ /CD28-ゼータ	短期間の低レベル持続
UPENN/Novartis	Fmc63	41BB-ゼータ	長期間の高レベル持続

10

20

30

40

50

【0122】

上で示されたように、これまで行われた研究の大部分が、CD19を認識する結合ドメインの一部としてハイブリドーマfmc63に由来するscFvを使用した。

【0123】

図12に示されているように、CD19をコードする遺伝子は、10個のエキソンを含む：エキソン1～4は、細胞外ドメインをコードし；エキソン5は、膜貫通ドメインをコードし；エキソン6～10は、細胞質ドメインをコードする。

【0124】

本発明のCD19/CD22 ORゲートにおいて、抗CD19 CARの抗原結合ドメインは、CD19遺伝子のエキソン1によってコードされるCD19のエピトープに結合し得る。

10

【0125】

本発明のCD19/CD22 ORゲートにおいて、抗CD19 CARの抗原結合ドメインは、CD19遺伝子のエキソン3によってコードされるCD19のエピトープに結合し得る。

【0126】

本発明のCD19/CD22 ORゲートにおいて、抗CD19 CARの抗原結合ドメインは、CD19遺伝子のエキソン4によってコードされるCD19のエピトープに結合し得る。

CD19 ALAb

20

【0127】

本発明者らは、バインダーfmc63を含む公知の抗CD19 CARと比べて特性が改善された新規の抗CD19 CARを開発した（実施例2および3を参照のこと）。そのCARの抗原結合ドメインは、下記で特定されるCDRおよびVH/VL領域を有する、CD19バインダーであるCD19 ALAbに基づく。

【0128】

ゆえに、本発明はまた、a)以下の配列を有する相補性決定領域（CDR）を有する重鎖可変領域（VH）：

CDR1-SYWMN（配列番号15）；

CDR2-QIWPGDGD TN YNGKFK（配列番号16）

30

CDR3-RET TVGRYY YAMDY（配列番号17）；および

b)以下の配列を有するCDRを有する軽鎖可変領域（VL）：

CDR1-KASQSV DYD GDSYLN（配列番号18）；

CDR2-DASN LV S（配列番号19）

CDR3-QQSTEDPWT（配列番号20）

を含むCD19結合ドメインを含むCARも提供する。

【0129】

CD19結合活性に悪影響を及ぼさずに、1つまたはそれより多くの変異（置換、付加または欠失）をそのCDRまたは各CDRに導入することが可能であり得る。各CDRは、例えば、1つ、2つまたは3つのアミノ酸変異を有し得る。

40

本発明のCARは、以下のアミノ酸配列のうちの1つを含み得る。

配列番号21（マウスCD19 ALAb scFv配列）

【化4】

QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWWKQRPQGQGLEWIGQIWPGDGD
 NYNGKFKGKATLTADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQG
 TTVTVSSDIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSV DYD GDSYLNWYQQIPGQPPLLIYDA
 SNLVSGIPPRFSGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAAATYHCQQSTEDPWTFGGGKLEIK

配列番号22（ヒト化CD19 ALAb scFv配列－重鎖19，カッパー16）

50

【化 5】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYAFSSYWMNWRQAPGQSLEWIGQIWPGDGDT
 NYNGKFKGRATLTADESARTAYMELSSLRSGDTAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGKG
 TLVTVSSDIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDDYDGDSYLNWYQQKPGQPPKLLIYDA
 SNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAADVAVYHCQQSTEDPWTFGQGTKVEIKR

配列番号 39 (ヒト化 C D 1 9 A L A b s c F v 配列—重鎖 19, カッパー 7)

【化 6】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYAFSSYWMNWRQAPGQSLEWIGQIWPGDGDT
 NYNGKFKGRATLTADESARTAYMELSSLRSGDTAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGKG
 TLVTVSSDIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDDYDGDSYLNWYQQKPGQPPKLLIYD
 ASNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAADVAVYYCQQSTEDPWTFGQGTKVEIKR

10

【0130】

上記 s c F v は、V H—V L 配向 (配列番号 21、22 および 39 に示されているよう
 に) または V L—V H 配向であり得る。

本発明の C A R は、以下の V H 配列のうちの 1 つを含み得る。

配列番号 23 (マウス C D 1 9 A L A b V H 配列)

【化 7】

QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWWKQRPQGQLEWIGQIWPGDGDT
 NYNGKFKGKATLTADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQG
 TTVTVSS

20

配列番号 24 (ヒト化 C D 1 9 A L A b V H 配列)

【化 8】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYAFSSYWMNWRQAPGQSLEWIGQIWPGDGDT
 NYNGKFKGRATLTADESARTAYMELSSLRSGDTAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGKG
 TLVTVSS

本発明の C A R は、以下の V L 配列のうちの 1 つを含み得る。

30

配列番号 25 (マウス C D 1 9 A L A b V L 配列)

【化 9】

DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGDSYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVSGI
 PPRFSGSGSGTDFTLNHPVEKVDAAATYHCQQSTEDPWTFGGGKLEIK

配列番号 26 (ヒト化 C D 1 9 A L A b V L 配列, カッパー 16)

【化 10】

DIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDDYDGDSYLNWYQQKPGQPPKLLIYDASNLVSG
 VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAADVAVYHCQQSTEDPWTFGQGTKVEIKR

40

配列番号 40 (ヒト化 C D 1 9 A L A b V L 配列, カッパー 7)

【化 11】

DIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDDYDGDSYLNWYQQKPGQPPKLLIYDASNLVSG
 VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAADVAVYYCQQSTEDPWTFGQGTKVEIKR

【0131】

本発明の C A R は、少なくとも 80、85、90、95、98 または 99% の配列同一
 性を有する、配列番号 21、22、23、24、25、26、39 または 40 として示さ
 れている配列の変異型を含み得るが、ただし、この変異型の配列は、C D 19 に結合する
 能力を保持する (相補的な V L または V H ドメインと結合するとき、適切ならば)。

50

【0132】

2つのポリペプチド配列間のパーセンテージ同一性は、<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>において自由に入手可能なBLASTなどのプログラムによって容易に測定され得る。

CD22

【0133】

ヒトCD22抗原は、レクチンのSIGLECファミリーに属する分子である。ヒトCD22抗原は、成熟B細胞およびいくつかの未熟B細胞の表面上に見られる。一般的に言えば、CD22は、免疫系の過剰活性化および自己免疫疾患の発症を防止する制御性分子である。

10

【0134】

CD22は、N末端に位置する免疫グロブリン(Ig)ドメインによってシアル酸に特異的に結合する糖結合膜貫通タンパク質である。Igドメインが存在するために、CD22は、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーである。CD22は、B細胞受容体(BCR)シグナル伝達に対する阻害性受容体として機能する。

【0135】

CD22は、2つのアイソフォーム、1つは7つのドメインならびに3つのITIM(免疫受容体チロシンベース阻害性モチーフ)およびITAMを含む細胞質内テイルを有するもの；ならびにその代わりに、5つの細胞外ドメインおよび1つのITIMを有する細胞質内テイルを含むスプライシング変異型として存在し得るIgSFの分子である。CD22は、抗原に対するB細胞の応答の制御に関与する阻害性受容体であると考えられている。CD19と同様に、CD22は、pan-B抗原であると広く見なされているが、いくつかの非リンパ系組織上での発現が記載されている。治療用モノクローナル抗体および免疫コンジュゲートによるCD22の標的化は、臨床試験に入っている。

20

【0136】

抗CD22 CARの例は、Hasoら(Blood; 2013; 121(7))によって記載されている。具体的には、m971、HA22およびBL22 scFvに由来する抗原結合ドメインを有する抗CD22 CARが記載されている。

【0137】

抗CD22 CARの抗原結合ドメインは、30~50 nM、例えば、30~40 nMの範囲の K_D でCD22に結合し得る。その K_D は、約32 nMであり得る。

30

【0138】

CD22は、7つの細胞外IgG様ドメインを有し、これらのドメインは、通常、Igドメイン1~Igドメイン7として特定されており、Igドメイン7が、B細胞膜に最も近位であり、Igドメイン7が、Ig細胞膜から最も遠位である(上記のHasoら、2013、図2Bを参照のこと)。

CD22のアミノ酸配列に関するIgドメインの位置(<http://www.uniprot.org/uniprot/P20273>)を以下の表に要約する：

【表A】

Igドメイン	アミノ酸
1	20-138
2	143-235
3	242-326
4	331-416
5	419-500
6	505-582
7	593-676

40

【0139】

50

第2のCARの抗原結合ドメインは、CD22上の膜遠位のエピトープに結合し得る。
 第2のCARの抗原結合ドメインは、CD22のIgドメイン1、2、3または4上、例えば、CD22のIgドメイン3上のエピトープに結合し得る。第2のCARの抗原結合ドメインは、CD22のアミノ酸20～416の間、例えば、CD22のアミノ酸242～326の間に位置するエピトープに結合し得る。

【0140】

抗CD22抗体HA22およびBL22（上記のHassoら、2013）ならびに下記に記載されるCD22ALAbは、CD22のIgドメイン3上のエピトープに結合する。

【0141】

10

第2のCARの抗原結合ドメインは、CD22上の膜近位エピトープに結合しない可能性がある。第2のCARの抗原結合ドメインは、CD22のIgドメイン5、6または7上のエピトープに結合しない可能性がある。第2のCARの抗原結合ドメインは、CD22のアミノ酸419～676の間、例えば、CD22の505～676の間に位置するエピトープに結合しない可能性がある。

CD22ALAb

【0142】

本発明者らは、バインダーm971を含む公知の抗CD22 CARと比べて特性が改善された新規の抗CD22 CARを開発した（実施例2および3ならびに上記のHassoら（2013）を参照のこと）。そのCARの抗原結合ドメインは、下記で特定されるCDRおよびVH/VL領域を有するCD22バインダーであるCD22ALAbに基づく。

20

【0143】

ゆえに、本発明はまた、

a) 以下の配列を有する相補性決定領域（CDR）を有する重鎖可変領域（VH）：

CDR1-NYWLN（配列番号27）；

CDR2-NIYPSDSFTNYNQKFKD（配列番号28）

CDR3-DTQERSWYFDV（配列番号29）；および

b) 以下の配列を有するCDRを有する軽鎖可変領域（VL）：

CDR1-RSSQSLVHSNGNTYLH（配列番号30）；

30

CDR2-KVSNRFS（配列番号31）

CDR3-SQSTHVPWT（配列番号32）

を含むCD22結合ドメインを含むCARも提供する。

【0144】

CD22結合活性に悪影響を及ぼさずに、1つまたはそれより多くの変異（置換、付加または欠失）をそのCDRまたは各CDRに導入することが可能であり得る。各CDRは、例えば、1つ、2つまたは3つのアミノ酸変異を有し得る。

本発明のCARは、以下のアミノ酸配列のうちの1つを含み得る。

配列番号33（マウスCD22ALAb scFv配列）

【化12】

40

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTNYWINWVKQRPGQGLEWIGNIYPSDSFTNY
 NQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCTRTDQERSWYFDVWGAGTTTVTVSS
 DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLVKPGQSPKLLIYKVSNRFS
 GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIK

配列番号34（ヒト化CD22ALAb scFv配列）

【化 1 3】

EVQLVESGAIEVKKPGSSVKVSKASGYTFTNYWINWVRQAPGQGLEWIGNIYPSDSFTNY
 NQKFCDRATLTVDKSTSTAYLELRNLRSDDTAVYYCTRDTQERSWYFDVWGQGTLVTVSS
 DIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSQSLVHSNGNTYLVHWYQQKPGQAPRLLIYKVSNRFS
 GVPARFSGSGSGVEFTLTISLQSEDFAVYYCSQSTHVPWTFGQGTRLEIK

【0 1 4 5】

上記 s c F v は、V H－V L 配向（配列番号 3 3 および 3 4 に示されているように）または V L－V H 配向であり得る。

【0 1 4 6】

本発明の C A R は、以下の V H 配列のうちの 1 つを含み得る。
 配列番号 3 5（マウス C D 2 2 A L A b V H 配列）

【化 1 4】

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTNYWINWVKQRPQGQGLEWIGNIYPSDSFTNY
 NQKFCDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCTRDTQERSWYFDVWGAGTTVTVSS

配列番号 3 6（ヒト化 C D 2 2 A L A b V H 配列）

【化 1 5】

EVQLVESGAIEVKKPGSSVKVSKASGYTFTNYWINWVRQAPGQGLEWIGNIYPSDSFTNY
 NQKFCDRATLTVDKSTSTAYLELRNLRSDDTAVYYCTRDTQERSWYFDVWGQGTLVTVSS

本発明の C A R は、以下の V L 配列のうちの 1 つを含み得る。
 配列番号 3 7（マウス C D 2 2 A L A b V L 配列）

【化 1 6】

DVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLVHWYLVKPGQSPKLLIYKVSNRFS
 GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYFCSQSTHVPWTFGGGKLEIK

配列番号 3 8（ヒト化 C D 2 2 A L A b V L 配列）

【化 1 7】

DIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSSQSLVHSNGNTYLVHWYQQKPGQAPRLLIYKVSNRFS
 GVPARFSGSGSGVEFTLTISLQSEDFAVYYCSQSTHVPWTFGQGTRLEIK

【0 1 4 7】

本発明の C A R は、少なくとも 8 0、8 5、9 0、9 5、9 8 または 9 9 % の配列同一性を有する、配列番号 3 3、3 4、3 5、3 6、3 7 または 3 8 として示されている配列の変異型を含み得るが、ただし、この変異型の配列は、C D 2 2 に結合する能力を保持する（相補的な V L または V H ドメインと結合するとき、適切ならば）。

B 細胞発生およびその後の腫瘍における B 細胞抗原の発現

【0 1 4 8】

C D 1 9 は、p a n－B 抗原であると広く見なされているが、非常にまれに、いくつかの系統転換（l i n e a g e i n f i d e l i t y）を示すことがある。C D 1 9 分子は、より小さいドメインによって分断された 2 つの細胞外 I g S F ドメイン、および 1 つの I T A M を有する、この分子の細胞外の部分とほぼ同じ大きさの長い細胞質内テイルを含む。C D 1 9 は、B 細胞の発生および活性化において鍵となる分子である。C D 2 2 は、2 つのアイソフォーム（1 つは 7 つのドメインならびに 3 つの I T I M（免疫受容体チロシンベース阻害性モチーフ）および 1 つの I T A M を含む細胞質内テイルを含み；ならび、その代わりに 5 つの細胞外ドメインおよび 1 つの I T I M を有する細胞質内テイルを含むスプライシング変異型である）として存在し得る I g S F の分子である。C D 2 2 は、抗原に対する B 細胞の応答の制御に参与する阻害性受容体であると考えられている。C D 1 9 と同様に、C D 2 2 も、p a n－B 抗原であると広く見なされているが、いくつか

10

20

30

40

50

の非リンパ系組織上での発現が記載されている（Wenら（2012）J. Immunol. Baltim. Md 1950 188, 1075-1082）。治療用モノクローナル抗体および免疫コンジュゲートによるCD22の標的化は、臨床試験に入っている。CD22特異的CARの作製は、記載されている（Hasoら、2013, Blood: Volume 121; 7: 1165-74およびJamesら、2008, Journal of immunology, Volume 180; Issue 10; Pages 7028-38）。

【0149】

B細胞白血病の詳細な免疫フェノタイピング研究（immunophenotyping study）から、表面CD19は常に存在し、表面CD22はほぼ常に存在することが示されている。例えば、Raponiら（2011, 上記）は、B-ALLの427症例の表面抗原の表現型を調べたところ、調べた341症例においてCD22が存在することを見出した。

10

【0150】

上に記載されたCAR19を標的化した後のCD19ダウンレギュレーションの偶然性は、ゴルディーコールドマン仮説によって説明され得る。ゴルディーコールドマン仮説は、腫瘍細胞が、内在性の遺伝的不安定性に依存する率で抵抗性の表現型に変異すること、およびがんが耐性クローンを含む確率は変異率および腫瘍サイズに依存することを予測する。がん細胞が、細胞傷害性T細胞の直接的な致死に対して内在的に抵抗性になることは困難であり得るが、抗原の喪失はなおも起こり得る。実際に、この現象は、メラノーマ抗原およびEBV駆動性リンパ腫の標的化によってすでに報告されている。ゴルディーコールドマン仮説によると、最も治癒が見込めるのは、非交差耐性標的を同時に攻撃することであり得る。CD22が、B-ALLのほぼすべての症例において発現されることを考えると、CD22とともにCD19を同時にCARによって標的化すれば、抵抗性のCD19陰性クローンの出現が減少する可能性がある。

20

抗原結合ドメイン

【0151】

抗原結合ドメインは、抗原を認識するCARの部分である。抗体、抗体模倣物、およびT細胞受容体の抗原結合部位に基づくものを含め、多数の抗原結合ドメインが当技術分野では知られている。例えば、抗原結合ドメインは、モノクローナル抗体から誘導された1本鎖可変フラグメント（scFv）；標的抗原の天然リガンド；標的に対する十分な親和力をもつペプチド；単一ドメイン抗体；Darpin（設計されたアンキリン反復タンパク質）などの人工単一バインダー；またはT細胞受容体から誘導された単鎖を含み得る。

30

【0152】

CD19に結合するCARの抗原結合ドメインは、CD19に結合できる任意のドメインであってよい。例えば、抗原結合ドメインは、表1に記載されているようなCD19バインダーを含み得る。

【0153】

CD19に結合するCARの抗原結合ドメインは、表2に示されているCD19バインダーのうちの1つに由来する配列を含み得る。

40

【表 2】

表 2

バインダー	参考文献
HD63	Pezzutto (Pezzutto, A. et al. J. Immunol. Baltim. Md 1950 138, 2793–2799 (1987))
4g7	Meeker et al (Meeker, T. C. et al. Hybridoma 3 , 305–320 (1984))
Fmc63	Nicholson et al (Nicholson, I. C. et al. Mol. Immunol. 34, 1157–1165 (1997))
B43	Bejcek et al (Bejcek, B. E. et al. Cancer Res. 55 , 2346–2351 (1995))
SJ25C1	Bejcek et al (1995, 上記)
BLY3	Bejcek et al (1995, 上記)
B4または再表面化(re-surfaced)またはヒト化B4	Roguska et al (Roguska, M. A. et al. Protein Eng. 9, 895–904 (1996))
最適化およびヒト化HB12b	Kansas et al (Kansas, G. S. & Tedder, T. F. J. Immunol. Baltim. Md 1950 147, 4094–4102 (1991); Yazawa et al (Yazawa et al Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 15178–15183 (2005); Herbst et al (Herbst, R. et al. J. Pharmacol. Exp. Ther. 335, 213–222 (2010))

10

20

【0154】

C D 2 2 に結合する C A R の抗原結合ドメインは、C D 2 2 に結合できる任意のドメインであってよい。例えば、その抗原結合ドメインは、表 3 に記載されているような C D 2 2 バインダーを含み得る。

【表 3 - 1】

表 3

バインダー	参考文献
M5/44またはヒト化 M5/44	John et al (J. Immunol. Baltim. Md 1950 170, 3534-3543 (2003));およびDiJoseph et al (Cancer Immunol. Immunother. CII 54, 11-24 (2005))
M6/13	DiJoseph et al (上記)
HD39	Dorken et al (J. Immunol. Baltim. Md 1950 136, 4470-4479 (1986))
HD239	Dorken et al (上記)
HD6	Pezzutto et al (J. Immunol. Baltim. Md 1950 138, 98-103 (1987))
RFB-4,またはヒト化RFB-4,または親和性成熟されたもの	Campana et al (J. Immunol. Baltim. Md 1950 134, 1524-1530 (1985)); Krauss et al (Protein Eng. 16, 753-759 (2003)), Kreitman et al (J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 30, 1822-1828 (2012))
To15	Mason et al (Blood 69, 836-840 (1987))
4KB128	Mason et al (上記)
S-HCL1	Schwartz et al (Blood 65, 974-983 (1985))
mLL2 (EPB-2),またはヒト化 mLL2 - hLL2	Shih et al (Int. J. Cancer J. Int. Cancer 56, 538-545 (1994)), Leonard et al (J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 21, 3051-3059 (2003))
M971	Xiao et al (mAbs 1, 297-303 (2009))
BC-8	Engel et al (J. Exp. Med. 181, 1581-1586 (1995))
HB22-12	Engel et al (上記)

10

20

【0155】

スペーサードメイン

CARは、抗原結合ドメインを膜貫通ドメインと連結し、空間的に抗原結合ドメインをエンドドメインから分離させるためのスペーサー配列を含む。可撓性スペーサーは、抗原結合ドメインを異なる方向で配向させることにより、結合を促進し得る。

30

【0156】

本発明の細胞では、第1のCARおよび第2のCARは、異なるスペーサー分子を含む。例えば、スペーサー配列は、例えば、IgG1 Fc領域、IgG1ヒンジまたはヒトCD8ストークまたはマウスCD8ストークを含み得る。あるいは、スペーサーは、IgG1 Fc領域、IgG1ヒンジまたはCD8ストークと類似した長さおよび／またはドメインスペーシング特性を有する代替的リンカー配列を含み得る。ヒトIgG1スペーサーは、Fc結合性モチーフを除去するために改変され得る。

40

【0157】

抗CD19 CARに対するスペーサーは、CD8ストークスペーサー、またはCD8ストークスペーサーと等しい長さを有するスペーサーを含み得る。抗CD19 CARに対するスペーサーは、少なくとも30アミノ酸または少なくとも40アミノ酸を有し得る。抗CD19 CARに対するスペーサーは、35～55アミノ酸、例えば、40～50アミノ酸を有し得る。抗CD19 CARに対するスペーサーは、約46アミノ酸を有し得る。

【0158】

抗CD22 CARに対するスペーサーは、IgG1ヒンジスペーサー、またはIgG

50

1 ヒンジスパーサーに等しい長さを有するスパーサーを含み得る。抗CD22 CARに対するスパーサーは、30アミノ酸未満または25アミノ酸未満を有し得る。抗CD22 CARに対するスパーサーは、15～25アミノ酸、例えば、18～22アミノ酸を有し得る。抗CD22 CARに対するスパーサーは、約20アミノ酸を有し得る。

これらのスパーサーに対するアミノ酸配列の例を下記に示す：

配列番号4（ヒトIgG1のヒンジーCH2CH3）

【化18】

AEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKD

10

配列番号5（ヒトCD8ストーク）：

【化19】

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI

配列番号6（ヒトIgG1ヒンジ）：

【化20】

AEPKSPDKTHTCPPCPKDPK

20

配列番号7（CD2エクトドメイン）

【化21】

KEITNALETWGALGQDINLDIPSFQMSDDIDDIKWEKTSKKKIAQFRKEKETFKEDTYKLF
KNGTLKIKHLKTDQDIYKVSIDYDTKGKNVLEKIFDLKIQERVSKPKISWTCINTTLTCEVMNG
TDPELNLYQDGKHLKLSQRVITHKWTTSLSAFKCTAGNKVSKESSVEPVSCP
EKGLD

配列番号8（CD34エクトドメイン）

【化22】

SLDNNGTATPELPTQGTFNSVSTNVSQYETTTPTSLGSTSLHPVSQHGNEATTNITETTVKF
TSTSVITSVYGNTNSSVQSQTSVISTVFTTPANVSTPETTLKPSLSPGNVSDLSTTSTSLATS
PTKPYTSSSPILSDIAEKCSGIREVKLTQGICLEQNKTSSCAEFKKDRGEGLARVLCGEEQ
ADADAGAQCSCLLLAQSEVRPQCCLLLVLNRTEISSKLQLMKKHQSDLKKGILDFTEQDVA
SHQSYSQKT

30

【0159】

CARは典型的にはホモダイマーであるため（図1a参照）、交差対合がヘテロダイマー性キメラ抗原受容体を生じさせ得る。これは、例えば以下の様々な理由により望ましくない：（1）エピトープは、標的細胞上で同じ「レベル」にはないことがあり得、その結果、交差対合したCARは1つの抗原に結合できるのみであり得る；（2）2つの異なるscFvからのVHおよびVLは、取り換え可能であるが、標的を認識できないか、またはなお悪いことには予想外で予測外の抗原を認識することがあり得る。第1のCARのスパーサーは、交差対合を回避するため第2のCARのスパーサーとは十分に異なり得る。第1のスパーサーのアミノ酸配列は、第2のスパーサーとはアミノ酸レベルで50%、40%、30%または20%より低い同一性を共有し得る。

40

膜貫通ドメイン

【0160】

膜貫通ドメインは、膜にわたるCARの配列である。

50

【0161】

膜貫通ドメインは、膜において熱力学的に安定しているいかなるタンパク質構造であってもよい。これは、典型的には幾つかの疎水性残基で構成されるアルファ・ヘリックスである。いかなる膜貫通タンパク質の膜貫通ドメインでも、本発明の膜貫通部分を供給するのに使用され得る。タンパク質の膜貫通ドメインの存在および範囲は、TMHMMアルゴリズム (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) を用いて当業者により決定され得る。さらに、タンパク質の膜貫通ドメインが比較的単純な構造、すなわち膜にわたるのに十分な長さを有する疎水性アルファヘリックスを形成すると予測されるポリペプチド配列であるとすれば、人工的に設計されたTMドメインもまた使用され得る（米国特許第7052906B1号は、合成膜貫通成分について記載している）。

10

【0162】

膜貫通ドメインは、CD28から誘導され得、良好な受容体安定性を与える。

【0163】

上記膜貫通ドメインは、ヒトTy rp-1に由来し得る。ty rp-1の膜貫通配列を配列番号45として示す。

配列番号45

【化23】

IIAIAVVGALLLVALIFGTASYLI

20

活性化エンドドメイン

【0164】

エンドドメインは、CARのシグナル伝達部分である。抗原認識後、受容体がクラスター形成し、天然CD45およびCD148は、シナプスから排除され、シグナルは細胞へ伝達される。最も一般的に使用されるエンドドメイン成分は、3つのITAMを含むCD3-ゼータのエンドドメイン成分である。これは、抗原が結合された後、活性化シグナルをT細胞に伝達する。CD3-ゼータは、十分に適格な活性化シグナルを提供しない可能性があるため、追加の共刺激シグナル伝達が必要とされ得る。例えば、キメラCD28およびOX40は、CD3-ゼータと併用されて、増殖/生存シグナルを伝達し得るか、または3つ全部が一緒に使用され得る。

30

【0165】

本発明の細胞は、2つのCARを含み、各々がエンドドメインを有する。

第1のCARのエンドドメインおよび第2のCARのエンドドメインは、

(i) ITAM含有エンドドメイン、例えば、CD3ゼータ由来のエンドドメイン；および/または

(ii) 共刺激ドメイン、例えば、CD28由来のエンドドメイン；および/または

(iii) 生存シグナルを伝達するドメイン、例えば、OX-40または4-1BBなどのTNF受容体ファミリーのエンドドメインを含み得る。

40

【0166】

1つの配置において、共刺激ドメインおよび生存シグナル生成ドメインは、1つのORゲートにおける2つ（またはそれより多く）のCARの間で「共有」される。例えば、ORゲートが、2つのCAR、CAR AおよびCAR Bを有する場合、CAR Aは、共刺激ドメイン（例えば、CD28エンドドメイン）を含み得、CAR Bは、OX-40または4-1BBなどのTNF受容体ファミリーのエンドドメインを含み得る。

【0167】

ITAMモチーフを含むエンドドメインであれば、いずれも本発明における活性化エンドドメインとして作用し得る。幾つかのタンパク質が、1つまたはそれより多くのITAMモチーフを伴うエンドドメインを含むことが知られている。かかるタンパク質として少

50

し例を挙げれば、C D 3 イプシロン鎖、C D 3 ガンマ鎖およびC D 3 デルタ鎖が挙げられる。I T A Mモチーフは、サインY x x L / Iを与える、任意の2つの他のアミノ酸によりロイシンまたはイソロイシンから分離されたチロシンとして容易に認識され得る。常というわけではないが、典型的には、これらのモチーフの2つが、分子(Y x x L / I x (6 - 8) Y x x L / I)のテイルにおける6 ~ 8個の間のアミノ酸により分離される。このため、当業者であれば、活性化シグナルを伝達するための1つまたはそれより多くのI T A Mを含む既存のタンパク質を容易に見出すことができる。さらに、モチーフが単純であり、複合2次構造が要求されないと仮定すると、当業者であれば、活性化シグナルを伝達するための人工I T A Mを含むポリペプチドを設計できる(合成シグナル伝達分子に関する、国際公開第2 0 0 0 / 0 6 3 3 7 2号参照)。

10

【0168】

活性化エンドドメインを伴うC A Rの膜貫通および細胞内T細胞シグナル伝達ドメイン(エンドドメイン)は、配列番号9、10または11に示された配列または少なくとも80%の配列同一性を有するその変異型を含み得る。

配列番号9は、C D 2 8 膜貫通ドメインおよびC D 3 Zエンドドメインを含む。

【化24】

FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEY
DVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY
QGLSTATKDTYDALHMQALPPR

20

配列番号10は、C D 2 8 膜貫通ドメインならびにC D 2 8 およびC D 3 ゼータエンドドメインを含む。

【化25】

FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP
RDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRR
KNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP
PR

配列番号11は、C D 2 8 膜貫通ドメインならびにC D 2 8、O X 4 0 およびC D 3 ゼータエンドドメインを含む。

30

【化26】

FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPP
RDFAAYRSRDQRLPPDAHPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQG
QNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG
MKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

【0169】

変異型配列が、有効な膜貫通ドメインおよび有効な細胞内T細胞シグナル伝達ドメインを提供するものと仮定すれば、該配列は、配列番号9、10または11と少なくとも80%、85%、90%、95%、98%または99%の配列同一性を有し得る。

40

「分割」ORゲートエンドドメイン

【0170】

本発明は、共刺激ドメイン/生存シグナルドメインが2つのC A Rの間で「分割」されているORゲートを提供する。

【0171】

この点において、本発明は、第1のキメラ抗原受容体(C A R)および第2のC A Rを細胞表面に共発現する細胞を提供し、各C A Rは、細胞内シグナル伝達ドメインを含み、第1のC A Rの細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激ドメインを含み;第2のC A Rの細胞内シグナル伝達ドメインは、T N F受容体ファミリーのエンドドメインを含む。

【0172】

50

第1のCARおよび第2のCARは、異なる抗原に結合し得る。例えば、第1のCARは、CD19に結合し得、第2のCARは、CD22に結合し得るか；あるいは、第1のCARは、CD22に結合し得、第2のCARは、CD19に結合し得る。

【0173】

第1のCARの細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激ドメインを含み、生存シグナルを伝達するドメイン（例えば、TNF受容体ファミリーのエンドドメイン）を含まない。第2のCARの細胞内シグナル伝達ドメインは、TNF受容体ファミリーのエンドドメインを含み、共刺激ドメイン（例えば、CD28エンドドメイン）を含まない。

【0174】

共刺激ドメインは、CD28共刺激ドメインであり得る。CD28共刺激ドメインは、配列番号41として示される配列を有し得る。

配列番号41（CD28共刺激エンドドメイン）

【化27】

SKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS

【0175】

本発明のCARは、少なくとも80、85、90、95、98または99%の配列同一性を有する、配列番号41として示された配列の変異型を含み得るが、ただし、変異型の配列は、抗原認識の際にT細胞を共刺激する能力を保持し、すなわち、シグナル2をT細胞に提供する。

【0176】

TNF受容体ファミリーのエンドドメインは、OX40または4-1BBエンドドメインであり得る。OX40エンドドメインは、配列番号42として示される配列を有し得る。4-1BBエンドドメインは、配列番号43として示される配列を有し得る。

配列番号42（OX40エンドドメイン）

【化28】

RDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI

配列番号43（4-1BBエンドドメイン）

【化29】

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL

【0177】

本発明のCARは、少なくとも80、85、90、95、98または99%の配列同一性を有する、配列番号42または43として示された配列の変異型を含み得るが、ただし、その変異型の配列は、抗原認識の際に生存シグナルをT細胞に伝達する能力を保持する。

【0178】

第1および／または第2のCARの細胞内シグナル伝達ドメインはまた、ITAM含有ドメイン、例えば、CD3ゼータドメインも含み得る。CD3ゼータドメインは、配列番号44として示される配列を有し得る。

配列番号44（CD3ゼータエンドドメイン）

【化30】

**RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKPNQEGL
YNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR**

【0179】

本発明のCARは、少なくとも80、85、90、95、98または99%の配列同一性を有する、配列番号44として示された配列の変異型を含み得るが、ただし、その変異型の配列は、抗原認識の際にT細胞シグナル伝達を誘導する能力、すなわち、シグナル1

10

20

30

40

50

をT細胞に提供する能力を保持する。

第1のCARは、以下の構造：

AgB1-スパーサー1-TM1-costim-ITAM

(ここで、

AgB1は、第1のCARの抗原結合ドメインであり；

スパーサー1は、第1のCARのスパーサーであり；

TM1は、第1のCARの膜貫通ドメインであり；

costimは、共刺激ドメインであり；そして

ITAMは、ITAM含有エンドドメインである)

を有し得る。

10

【0180】

「Costim」は、CD28共刺激ドメインであり得る。

【0181】

「ITAM」は、CD3ゼータエンドドメインであり得る。

【0182】

第2のCARは、以下の構造：

AgB2-スパーサー2-TM2-TNF-ITAM

(ここで、

AgB2は、第2のCARの抗原結合ドメインであり；

スパーサー2は、第2のCARのスパーサーであり；

TM2は、第2のCARの膜貫通ドメインであり；

TNFは、TNF受容体のエンドドメインであり；そして

ITAMは、ITAM含有エンドドメインである)

を有し得る。

20

【0183】

「TNF」は、TNF受容体のエンドドメイン、例えば、OX40または4-1BBエンドドメインであり得る。

【0184】

「分割」エンドドメインを有する、第1のキメラ抗原受容体(CAR)と第2のキメラ抗原受容体(CAR)との両方をコードする核酸配列；ならびに上で定義されたような分割エンドドメインを含む2つの核酸(1つは、第1のCARをコードし、もう1つは、第2のCARをコードする)を含むキットも提供される。

30

共発現部位

【0185】

本発明の第2の態様は、第1のCARおよび第2のCARをコードする核酸に関する。

【0186】

核酸は、切断部位により連結された2つのCAR分子を含むポリペプチドを生成し得る。切断部位は、ポリペプチドが産生されるとき、外部の切断活性を一切必要とせず第1のCARおよび第2のCARへと直ちに切断されるように、自己切断性であり得る。

【0187】

40

様々な自己切断性部位が知られており、それらとしては、口蹄疫ウイルス(FMDV) 2Aペプチドおよび類似配列(Donnellyら、Journal of General Virology(2001), 82, 1027-1041)、例えば、配列番号12として示される配列を有するThoséa asignaウイルス由来の2A様配列のような配列が挙げられる：

配列番号12

【化31】

RAEGRGSLTTCGDVEENPGP.

共発現配列は、内部リボソーム進入部位(IRES)であり得る。共発現配列は、内部

50

プロモーターであり得る。

細胞

【0188】

本発明は、第1のCARおよび第2のCARを細胞表面に共発現する細胞に関し、ここで、一方のCARは、CD19に結合し、他方のCARは、CD22に結合する。

【0189】

該細胞は、免疫学的細胞など、細胞表面でCARを発現することができる任意の真核生物細胞であってよい。

【0190】

特に、細胞は、T細胞またはナチュラルキラー（NK）細胞などの免疫エフェクター細胞であり得る。

【0191】

T細胞またはTリンパ球は、細胞媒介性免疫において中心的役割を演じるリンパ球のタイプである。それらは、細胞表面におけるT細胞受容体（TCR）の存在により、B細胞およびナチュラルキラー細胞（NK細胞）など、他のリンパ球とは区別することができる。下記で概説する通り、様々なタイプのT細胞がある。

【0192】

ヘルパーTヘルパー細胞（TH細胞）は、形質細胞および記憶B細胞へのB細胞の成熟、ならびに細胞傷害性T細胞およびマクロファージの活性化を含む、免疫学的プロセスで他の白血球を補助する。TH細胞は、それらの表面でCD4を発現する。TH細胞は、抗原提示細胞（APC）の表面でMHCクラスII分子によりペプチド抗原と共に提示されたときに活性化される。これらの細胞は、種々のサイトカインを分泌することにより、種々のタイプの免疫応答を促進する、TH1、TH2、TH3、TH17、Th9、またはTFHを含む、幾つかのサブタイプのうちの1つに分化し得る。

【0193】

細胞傷害性T細胞（TC細胞またはCTL）は、ウイルス感染細胞および腫瘍細胞を破壊し、また移植拒絶でも関与する。CTLは、それらの表面でCD8を発現する。これらの細胞は、全有核細胞の表面に存在する、MHCクラスIに随伴する抗原に結合することにより標的を認識する。調節性T細胞により分泌されるIL-10、アデノシンおよび他の分子を通じて、CD8+細胞はアネルギー状態に不活化され得、実験的自己免疫脳脊髄炎などの自己免疫疾患を防止する。

【0194】

記憶T細胞は、感染の消散後長期にわたって持続する抗原特異的T細胞のサブセットである。それらは、それらの同種抗原に再曝露されると、迅速に多数のエフェクターT細胞に拡大し、過去の感染に対する「記憶」をもつ免疫系を提供する。記憶T細胞は、3つのサブタイプ：セントラル記憶T細胞（TCM細胞）および2タイプのエフェクター記憶T細胞（TEM細胞およびTEMRA細胞）を含む。記憶細胞は、CD4+またはCD8+のいずれかであり得る。記憶T細胞は、典型的には細胞表面タンパク質CD45ROを発現する。

【0195】

以前にはサプレッサーT細胞として知られていた、調節性T細胞（Treg細胞）は、免疫寛容の維持に非常に重要である。それらの主たる役割は、免疫反応の終末に向けてT細胞媒介性免疫を制止し、胸腺での負の選択のプロセスを逃れた自己反応性T細胞を抑制することである。

【0196】

CD4+Treg細胞の2つの主要クラスー天然に存在するTreg細胞および適応Treg細胞については記載されている。

【0197】

天然に存在するTreg細胞（CD4+CD25+FoxP3+Treg細胞としても知られている）は、胸腺で生じ、TSLPで活性化された骨髓性（CD11c+）樹状細胞

10

20

30

40

50

胞および形質細胞様（C D 1 2 3 +）樹状細胞の両方と発達中のT細胞との間の相互作用に関連付けられている。天然に存在するT r e g細胞は、F o x P 3と呼ばれる細胞内分子の存在により他のT細胞からは区別され得る。F O X P 3遺伝子の変異は、調節性T細胞の発達を防止し得るため、致命的な自己免疫疾患I P E Xが引き起こされ得る。

【0198】

適応T r e g細胞（T r 1細胞またはT h 3細胞としても知られている）は、正常な免疫応答中に生じ得る。

【0199】

本発明のT細胞は、上記で挙げたT細胞タイプのいずれでもよいが、特にC T Lであり得る。

10

【0200】

ナチュラルキラー（NK）細胞は、先天性免疫系の一部を形成する細胞溶解性細胞の1タイプである。NK細胞は、M H C非依存的にウイルス感染細胞からの内生シグナルに対して、迅速な応答を提供する。

【0201】

NK細胞（自然リンパ球の群に属する）は、大顆粒リンパ球（L G L）として定義され、Bリンパ球およびTリンパ球を生じる共通のリンパ性前駆細胞から分化した第3の種類の細胞を構成する。NK細胞は、骨髄、リンパ節、脾臓、扁桃および胸腺で分化および成熟し、次いでそこから循環系に入ることが知られている。

【0202】

本発明のC A R細胞は、上記で挙げた細胞タイプのいずれでもよい。

20

【0203】

C A R発現TまたはNK細胞などのC A R発現細胞は、患者自身の末梢血から（第1団）、またはドナー末梢血からの造血幹細胞移植の状況において（第2団）、または非関連ドナーからの末梢血（第3団）から生体外で作製され得る。

【0204】

本発明はまた、本発明によるC A R発現T細胞および／またはC A R発現NK細胞を含む細胞組成物を提供する。該細胞組成物は、本発明による核酸での血液試料の生体外形質導入により作製され得る。

【0205】

あるいは、C A R発現細胞は、T細胞などの関連する細胞タイプへの誘導性前駆細胞または胚性前駆細胞の生体外分化から誘導され得る。あるいは、溶解機能を保持し、治療薬として作用することができるT細胞系などの不死化細胞系も使用され得る。

30

【0206】

これらのすべての実施形態において、C A R細胞は、ウイルスベクターでの形質導入、DNAまたはRNAでのトランスフェクションを含む多くの手段のうちの1つによりC A RをコードするDNAまたはRNAを導入することにより生成される。

【0207】

本発明のC A R T細胞は、被験体由来の生体外T細胞であり得る。T細胞を、末梢血単核細胞（P B M C）試料から得てもよい。T細胞は、C A Rエンコード核酸で形質導入される前に、例えば抗C D 3モノクローナル抗体での処理により活性化および／または拡大され得る。

40

本発明のC A R T細胞は、

（i）被験体または上記で挙げた他の供給源からのT細胞含有試料の単離；および

（i i）第1のC A Rおよび第2のC A Rをコードする1つまたはそれより多くの核酸配列（複数可）によるT細胞の形質導入またはトランスフェクション

により作製され得る。

【0208】

次いで、T細胞は精製され得、例えば、第1のC A Rおよび第2のC A Rの共発現に基づいて選択され得る。

50

核酸配列

【0209】

本発明の第2の実施態様は、本発明の第1の実施態様で記載した第1のCARおよび第2のCARをコードする1つまたはそれより多くの核酸配列（複数も可）に関する。

【0210】

その核酸配列は、例えば、RNA、DNAまたはcDNA配列であり得る。

【0211】

その核酸配列は、CD19に結合する1つのキメラ抗原受容体（CAR）およびCD22に結合する別のCARをコードし得る。

【0212】

その核酸配列は、以下の構造：

AgB1ー Spacer 1ー TM1ー coexprー AgB2ー Spacer 2ー TM2

（ここで、

AgB1は、第1のCARの抗原結合ドメインをコードする核酸配列であり；

Spacer 1は、第1のCARのSpacerをコードする核酸配列であり；

TM1は、第1のCARの膜貫通ドメインをコードする核酸配列であり；

coexprは、両CARの共発現を可能にする核酸配列であり、

AgB2は、第2のCARの抗原結合ドメインをコードする核酸配列であり；

Spacer 2は、第2のCARのSpacerをコードする核酸配列であり；

TM2は、第2のCARの膜貫通ドメインをコードする核酸配列であり；

その核酸配列は、T細胞において発現されるとき、第1のCARおよび第2のCARが細胞表面に共発現されるように、切断部位において切断されるポリペプチドをコードする）を有し得る。

【0213】

第1のCARは、CD19に結合し得、第2のCARは、CD22に結合し得る。あるいは、第1のCARは、CD22に結合し得、第2のCARは、CD19に結合し得る。

【0214】

代替的コドンは、相同組換えを回避するために、同一または類似のアミノ酸配列をコードする配列の領域で使用され得る。

【0215】

遺伝暗号の縮重に起因して、同じアミノ酸配列をコードする代替的コドンを使用することが可能である。例えば、コドン「ccg」および「cca」の両方ともが、アミノ酸プロリンをコードするので、「ccg」の使用は、翻訳されるタンパク質の配列内のこの位置におけるアミノ酸に影響せずに「cca」と交換され得る。

【0216】

各アミノ酸をコードするために使用され得る代替的RNAコドンを表3に要約する。

表3

10

20

30

【表 3 - 2】

	U		C		A		G
U	UUU } Phe UUC } (F) UUA } Leu UUG } (L)	UCU } UCC } Ser UCA } (S) UCG }	UAU } Tyr UAC } (Y) UAA } オーカー UAG } アンバー	UGU } Cys UGC } (C) UGA } オパール UGG } Trp(W)			
C	CUU } CUC } Leu CUA } (L) CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } (P) CCG }	CAU } His CAC } (H) CAA } Gln CAG } (Q)	CGU } CGC } Arg CGA } (R) CGG }			
A	AUU } AUC } Ile AUA } (I) AUG } Met(M)	ACU } ACC } Thr ACG } (T) ACG }	AAU } Asn AAC } (N) AAA } Lys AAG } (K)	AGU } Ser AGC } (S) AGA } Arg AGG } (R)			
G	GUU } GUC } Val GUA } (V) GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } (A) GCG }	GAU } Asp GAU } (D) GAA } Glu GAG } (E)	GGU } GGC } Gly GGA } (G) GGG }			

【0217】

代替的コドンは、特に、第1のCARおよび第2のCARにおいて同一または類似のスペーサーが使用されている場合、第1のCARのスペーサーおよび第2のCARのスペーサーをコードする核酸配列の一部分において使用され得る。図4は、スペーサーHCH2CH3-ヒンジをコードする2つの配列を示しており、そのうちの1つにおいて、代替的コドンが使用されている。

【0218】

代替的コドンは、特に、第1のCARおよび第2のCARにおいて同一または類似の膜貫通ドメインが使用されている場合、第1のCARの膜貫通ドメインおよび第2のCARの膜貫通ドメインをコードする核酸配列の一部分において使用され得る。図4は、CD28膜貫通ドメインをコードする2つの配列を示しており、そのうちの1つにおいて、代替的コドンが使用されている。

【0219】

代替的コドンは、第1のCARのエンドドメインの全部または一部および第2のCARのエンドドメインの全部または一部をコードする核酸配列の一部分において使用され得る。代替的コドンは、CD3ゼータエンドドメインにおいて使用され得る。図4は、CD3ゼータエンドドメインをコードする2つの配列を示しており、そのうちの1つにおいて、代替的コドンが使用されている。

【0220】

代替的コドンは、1つまたはそれより多くの共刺激ドメイン、例えば、CD28エンドドメインにおいて使用され得る。

【0221】

代替的コドンは、生存シグナルを伝達する1つまたはそれより多くのドメイン、例えば

、OX40および41BBエンドドメインにおいて使用され得る。

【0222】

代替的コドンは、CD3ゼータエンドドメインをコードする核酸配列の一部分および／または1つもしくはそれより多くの共刺激ドメインをコードする核酸配列の一部分および／または生存シグナルを伝達する1つもしくはそれより多くのドメインをコードする核酸配列の一部分において使用され得る。

ベクター

【0223】

本発明はまた、1つまたはそれより多くのCARエンコード核酸配列（複数も可）を含むベクターまたはベクターのキットを提供する。かかるベクターは、宿主細胞へ核酸配列（複数も可）を導入するのに使用され得、それにより、その宿主細胞が第1のCARおよび第2のCARを発現する。

10

【0224】

ベクターは、例えば、プラスミドまたはウイルスベクター、例えば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、またはトランスポゾンに基づくベクターまたは合成mRNAであり得る。

【0225】

本ベクターは、T細胞に対しトランスフェクションまたは形質導入を行うことができるものであればよい。

医薬組成物

20

【0226】

本発明はまた、本発明の第1の実施態様によるT細胞またはNK細胞などの複数のCAR発現細胞を含む医薬組成物に関する。医薬組成物は、さらに薬学的に許容し得る担体、希釈剤または賦形剤を含んでもよい。医薬組成物は、所望により1種またはそれより多くのさらなる医薬活性ポリペプチドおよび／または化合物を含んでもよい。かかる製剤は、例えば、静脈内注入に好適な形態であり得る。

処置方法

【0227】

本発明の細胞は、B細胞リンパ腫細胞などのがん細胞を殺すことができる。T細胞などのCAR発現細胞は、患者本人の末梢血（第一者）から、またはドナー末梢血（第二者）由来の造血性幹細胞移植の環境において、または無関係のドナー（第三者）由来の末梢血からのいずれかで、生体外で創出され得る。あるいは、CAR T細胞は、誘導性前駆細胞または胚性前駆細胞からT細胞への生体外分化に由来し得る。これらの場合、CAR T細胞は、ウイルスベクターによる形質導入、DNAまたはRNAによるトランスフェクションをはじめとした多くの手段のうちの1つによって、CARをコードするDNAまたはRNAを導入することによって作製される。

30

【0228】

本発明の細胞は、がん細胞などの標的細胞を殺すことができてもよい。その標的細胞は、CD19またはCD22の発現によって認識可能である。

【表4】

40

表4ーリンパ系白血病におけるリンパ系抗原の発現

	CD19	CD22	CD10	CD7	CD5	CD3	cIgμ	sIgμ
初期プレB	100	>95	95	5	0	0	0	0
プレB	100	100	>95	0	0	0	100	0
移行性プレB	100	100	50	0	0	0	100	0
B	100	100	50	0	0	0	>95	>95
T	<5	0	0	100	95	100	0	0

【0229】

Campanaら (Immunophenotyping of leukemia.

50

J. Immunol. Methods 243, 59-75 (2000))より引用。c Igμ-細胞質(cytoplasmic)免疫グロブリン重鎖；s Igμ-表面免疫グロブリン重鎖。

【0230】

種々のタイプのB細胞白血病において一般に調べられたリンパ系抗原の発現は、B細胞の発生のそれをきっちりと反映している(図2を参照のこと)。

【0231】

本発明のT細胞は、がん、特にB細胞悪性腫瘍を処置するために使用され得る。

【0232】

CD19またはCD22を発現するがんの例は、ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫を含むB細胞リンパ腫；ならびにB細胞白血病である。

10

【0233】

例えば、B細胞リンパ腫は、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)、濾胞性リンパ腫、辺縁帯リンパ腫(MZL)または粘膜関連リンパ組織リンパ腫(MALT)、小細胞リンパ球性リンパ腫(慢性リンパ性白血病と重複)、マントル細胞リンパ腫(MCL)、バーキットリンパ腫、縦隔(胸腺)原発大細胞型B細胞リンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫(ワルデンシュトレームマクログロブリン血症として顕在化し得る)、結節性辺縁帯B細胞リンパ腫(NMZL)、脾臓辺縁帯リンパ腫(SMZL)、血管内大細胞型B細胞リンパ腫、原発性体腔性リンパ腫、リンパ腫様肉芽腫症、T細胞/組織球豊富型大細胞型B細胞リンパ腫または原発性中枢神経系リンパ腫であり得る。

20

【0234】

B細胞白血病は、急性リンパ芽球性白血病、B細胞慢性リンパ性白血病、B細胞前リンパ性白血病、前駆Bリンパ芽球性白血病またはヘアリーセル白血病であり得る。

【0235】

B細胞白血病は、急性リンパ芽球性白血病であり得る。

【0236】

本発明のT細胞による処置は、標準的手法で起こることが多い腫瘍細胞のエスケープまたは放出を防止するのを助け得る。

【0237】

以下、実施例により本発明をさらに記載するが、これは、本発明を実施する上で当業者を助ける役割を果たすことを意味するもので、本発明の範囲をいかなる意味にせよ限定する意図はない。

30

【実施例】

【0238】

実施例1-CD19/CD22論理的「OR」ゲートの実証実験

CD19「OR」CD22 CARゲートを、同じベクターにおけるCD19 CARおよびCD22 CARの共発現によって構築した。抗CD19バインダーは、再表面化(re-surfaced)B4抗体(Roguskaら(1996)Protein Eng. 9, 895-904)に由来するscFvであり、抗CD22バインダーは、ヒト化RFB4抗体に由来するscFvであった。ヒトIgG1ヒンジ-CH2-CH3スペーサーを両CARに対して使用し、そのスペーサーのコード配列をコドンゆらぎにして、組込み型ベクターによる相同組換えを回避した。両CARにおけるTMドメインは、CD28のTMドメインに由来し、両CARのエンドドメインは、CD3-ゼータを含んだ。また、これらの相同配列をコドンゆらぎにした。FMD-2Aペプチドによって分断されたインフレーションの2つのCARをクローニングすることによって、共発現を行った。CD19/CD22「OR」ゲート構築物の核酸配列およびアミノ酸配列をそれぞれ配列番号13および14として示す。

40

配列番号13

【化 3 2】

ATGAGCCTGCCCGTGACCGCCCTGCTGCTGCCCCCTGGCCCTGCTGCTGCACGCCGCCAGACCATAACCCCTACGAC
GTGCCCGACTACGCCAGCCTGAGCGGAGGCGCGGCAGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGTGAAG
AAGCCTGGCGCCAGCGTGAAGGTGTCTGTAAAGGCCAGCGCTACACCTTCACCAGCAACTGGATGCACTGGGTG
AGGCAGGCCCTTGACAGGGACTGGAGTGGATGGGCGAGATCGACCCAGCGACAGCTACACCAACTACAACCAG
AAGTTCAAGGGCCGGGTGACCATCACCGTGGATAAGAGCGCCAGCACCGCCTACATGGAGCTGTCCAGCCTGAGA
AGCGAGGATAACGCCGTGTACTACTGTGCCAGAGGCAGCAACCCCTACTACTACGCTATGGACTACTGGGGCCAG
GGCACCCCTGGTGACCGTGTCCAGCGGCGGAGGAGGAAGCGGAGGGGGCGGATCTGGCGGCGGAGGGAGCGAGATC
GTGCTGACCCAGAGCCCCGCCACCCCTGAGCCTGAGCCCTGGCGAGAGAGCCACCCCTGTCTGTAGCGCCAGCAGC
GGCGTGAATTACATGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCAGAGATGGATCTACGACACCAGCAAG
CTGGCCAGCGGCGTGCCCGCCAGATTACAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCAGCTACAGCCTGACCATCAGCAGCCTG
GAGCCTGAGGATTTGCGCGTGTATTATTGCCACCAGAGGGGCAGCTACACCTTTGGCGGCGGAACAAAGCTGGAG
ATCAAGCGCTCAGATCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCC
CTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGT
GATATCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATP
ATTTTCTGGGTGAGGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTC
TATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCCTGAGATG
GGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCC
TACAGTGAGATTGGGATGAAAGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACA
GCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCTCCTCGCAGAGCCGAGGGCAGGGGAAGTCTT
CTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAATCCCGGGCCCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTGTGGCTATT
TTAAAAGGTGTCCAGTGCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCAGGGGGTCCCTGCGC
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTGCTTTTCTAGTATCTATGACATGTCTTGGGTCCGCCAGGTTCCGGGGAAGGGG
CTGGAGTGGGTCTCATATATTAGTAGTGGTGGTGGTACCACCTATTACCCGGACACTGTGAAGGGCCGCTTCACC
ATCTCCCGTGACAATTCCCGCAACACTCTGGATCTTCAAATGAACAGTCTGCGCGTCGAGGACACGGCTGTCTAT
TATTGTGCGCGTCATAGTGGCTACGGTAGTAGCTACGGGGTTTTGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGAACCCCTGGTC
ACCGTCTCCTCAGGTGGAGGCGGTTGAGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGACATCCAGATGACTCAG
TCTCCGTCTCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGGTACCATCACCTGCCGTGCAAGTCAGGACATTAGCAAT
TATTTAACTGGCTTCAACAGAAACCGGGGAAAGCCCCGAAGCTCCTGATTTACTACACATCAATCTTACACTCA
GGAGTCCCGTACGCTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACCTCTACAATCAGCAGCCTGCAGCCGGAA
GATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGGGTAATACGCTTCCGTGGACGTTTGGCCAGGGGACCAAACTGGAAATC
AAACGTTGCGATCCAGCCGAACCAAGAGCCCCGATAAGACCCACACCTGTCCCCCTGCCAGCCCCAGAGCTG
CTGGGAGGCCCCAGCGTGTCTGTCTTCCACCCAAAGCCAAAGGATACCCCTGATGATTAGTAGAACACCCGAAGTG
ACCTGTGTGGTGGTGGATGTGTCTCAGGAGACCCCGAGGTGAAATTTAATTGGTATGTTGATGGTGTGGAAGTG
CACAAAGCCAAAACCAACCCAGAGAGGAGCAGTACAATTCTACCTATAGAGTCGTGTCTGTGCTGACAGTGCTG
CATCAGGATTGGCTGAACGGAAAAGATAACAATGTAAAGTGAGCAATAAGGCCCTGCCGCTCCAATTGAGAAG
ACAATTAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAAGGGAGCCCCAGGTGTATACACTGCCACCCAGTAGAGACGAACCTGACA
AAGAATCAGGTGTCTCTGACATGTCTGGTGAAGGGATTTTACCCATCTGATATCGCCGTGGAATGGGAATCTAAC
GGCCAGCCCCAGAATAACTATAAGACAACCCACCAAGTGTGGATAGCGATGGCAGCTTTTTTCTGTATTCTAAG
CTGACAGTGGATAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGAAATGTGTTAGCTGTAGTGTGATGCATGAGGCCCTGCACAAT

10

20

30

40

【化 3 3】

CACTATACCCAGAAATCTCTGAGTCTGAGCCCAGGCAAGAAGGACCCCAAGTTCTGGGTCTGGTGGTGGTGGGA
GGCGTGCTGGCCTGTTACTCTCTCCTGGTGACCGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGTGCGCTCCCGGGTGAAGTTT
TCTCGTCTGCCGATGCCCCAGCCTATCAGCAGGGCCAGAATCAGCTGTACAATGAACCTGGGCGAGGCGG
GAGGAGTACGACGTGCTGGATAAGCGGAGAGGCAGAGACCCCGAGATGGGCGGCAAACCACGGCGCAAAAATCCC
CAGGAGGGACTCTATAACGAGCTGCAGAAGGACAAAATGGCCGAGGCCTATTCCGAGATCGGCATGAAGGGAGAG
AGAAGACGCGGAAAGGGCCACGACGGCCTGTATCAGGGATTGTCCACCGCTACAAAAGATACATATGATGCCCTG
CACATGCAGGCCCTGCCACCCAGATGA

配列番号 1 4

10

【化 3 4】

MSLPVTALLLPLALLLHAARPYPYDVPDYASLSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT
SNWMHWVRQAPGQGLEWMGEIDPSDSYTNYNQKFKGRVTITVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
GSNPYYYAMDYWGQGTTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSGVNY
MHWYQQKPGQAPRRWIYDTSKILASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSELEPEDFAVYYCHQGRSYTFGGGT
KLEIKRSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIFWVLVVGGLVAC
YSLLVTVAFIIFWVRRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPGEMGGKPRRKN
PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRAEGRGSL
TCGDVEENPGPMEFGLSWLFLVAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVR
QVPGKGLEWVSYSISGGGTYYYPDTVKGRFTISRDNRSNTLDLQMNLSLRVEDTAVYYCARHSGYGSY
GVLFAYWGQGTTLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDISNYLNWL
QQKPGKAPKLLIYYTSLHSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKL
EIKRSDPAEPKSPDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
NWDGVEVHNATKPREEQYNSTYRVVSVLTIVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDKPKFWVLVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVR
SRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM
AEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPFR

20

【0 2 3 9】

両CARの共発現を実証するために、各CARのscFvをエピトープタグでタグ化した（それぞれHAまたはV5）。これに続いて単一のオープンリーディングフレームをS
FGレトロウイルスベクターにクローニングした。このベクターをT細胞に形質導入し、
抗HAおよび抗V5で染色し、フローサイトメトリーで発現を調べることによって、その
カセットを発現しているT細胞表面上に両CARを検出できた。

30

【0 2 4 0】

次に、CD19 OR CD22 CARゲートを発現しているT細胞を、CARを発
現していないコントロールT細胞または抗CD19 CARのみもしくは抗CD22 C
ARのみを発現しているコントロールT細胞とともに、いずれの抗原も発現していない標
的細胞または両方もしくは一方の抗原を発現している標的細胞でチャレンジした。本発明
者らは、ORゲートCAR T細胞が、いずれか一方または両方の標的抗原を発現してい
る標的細胞を殺すことができたことを見出した（図5）。

40

実施例2-CD19ALAbおよびCD22ALAbの特定および特徴づけ

【0 2 4 1】

CD19バインダー（CD19ALAb）を特定し、ヒト化し、マウスIgGおよびマ
ウスscFvの両方ならびにヒト化IgGおよびヒト化scFvの両方の結合親和性を特
定し、「ゴールドスタンダード」抗CD19バインダーであるfmc63と比較した。並
行して、CD22バインダー（CD22ALAb）を特定し、ヒト化し、マウスIgGお
よびマウスscFvの両方ならびにヒト化IgGおよびヒト化scFvの両方の結合親和
性を特定し、「ゴールドスタンダード」抗CD22バインダーであるM971と比較した
。

【0 2 4 2】

50

実験は、Biacore T200装置においてHBS-Pをランニング緩衝液および希釈緩衝液として使用して行った。BIAevaluationソフトウェアバージョン2.0をデータ処理に使用した。結合カイネティクスを調べるために、マウス抗ヒトIgGまたはヤギ抗マウスIgGをCM5センサーチップに共有結合させた。IgGまたはscFv-Fcタンパク質を捕捉し、様々な濃度の相互作用パートナータンパク質を30 μl/分の流速でフローセルに注入した。1:1ラングミュア結合モデルに従うカーブフィッティングによって、運動速度定数を得た。バルク屈折率の差を、捕捉抗体が活性表面と同じレベルに固定化されたブランクのコントロールフローセルを用いて減算した。緩衝液のみを用いて、二重参照減算(double reference subtraction)を行った。

10

【0243】

結果を図6～8に示す。

【0244】

データから、ヒト化CD22ALAbが、CD22に対してマウスCD22ALAbに匹敵する結合親和性(図6)および類似の結合カイネティクスを有することが示される。scFvフォーマットにおけるマウスCD22ALAbとヒト化CD22ALAbとの両方が、CD22に対して、ゴールドスタンダードのCD22結合抗体M971よりも有意に高い結合親和性を有する(図6)。

【0245】

IgGフォーマットにおけるマウスCD19ALAbおよびヒト化CD19ALAbの結合親和性は、類似していることを見出した(データ示さず)が、驚いたことに、scFvフォーマットでは、ヒト化CD19ALAbの結合親和性が、マウスCD19ALAbより高いことを見出した(図7)。CD19ALAbの結合親和性は、ゴールドスタンダードの抗CD19Ab fmc63の結合親和性に匹敵する(おそらくわずかに良好である)(図8)。

20

実施例3-CD19ALAb/fmc63 CARおよびCD22ALAb/M971 CARによる比較機能アッセイ

【0246】

CARの抗原結合ドメインは、その機能に影響し得る。この研究では、CD19ALAbおよびCD22ALAbを含むCARを創出し、fmc63またはM971に基づく抗原結合ドメインを有する等価なCARと機能を比較した。

30

【0247】

fmc63(抗CD19)およびM971(抗CD22)に基づくscFvを含むCARは、両方のCARが臨床開発中であるので、ゴールドスタンダード抗体と見なされ得る。

【0248】

CD19ALAb、fmc63、CD22ALAbおよびM971に基づいてCARを構築し、発現させた。それらの構造を図9に示す。それらのCARは、もっぱら抗原結合ドメインが異なる。すべての構築物において、結合ドメインをCD8ストークスパーサーとともに膜に連結させ、41BBおよびCD3-ゼータ由来の細胞内活性化モチーフを含んだ。

40

【0249】

CAR、gag/polおよびエンベロープタンパク質RD114をコードするプラスミドによる293T細胞の一過性のトランスフェクションによって、レトロウイルスを複製した。3日後、上清を回収し、それを用いて、レトロネクチンがコーティングされたプレート上で、PHA/IL2によって活性化されたPBMCに等力価のレトロウイルスを形質導入した。形質導入の6日後にCARの発現をフローサイトメトリーによって確認し、PBMCを、CD19+BFP SupT1細胞(fmc63およびCD19ALAb CAR)またはCD22+BFP SupT1細胞(M971およびCD22ALAb CAR)のいずれかと1:1の比で共培養した。1日後および3日後に、標的細胞致死

50

をアッセイした。また、1日後および3日後に、上清を取り出し、インターフェロン γ のレベルをELISAによってアッセイした。

【0250】

結果を図10および11に示す。

【0251】

図10に示されているように、CD19ALAb抗原結合ドメインを有するCARは、1日目と3日目との両方において、fmc63結合ドメインを有する等価なCARよりも多くのCD19+ve標的細胞の致死をもたらした(図10)。

【0252】

CD22に関しては、CD22ALAb抗原結合ドメインを有するCARは、3日後に、M971結合ドメインを有する等価なCARよりも多くのCD22+ve標的細胞の致死をもたらした(図11a)。CD22ALAb CARを用いたときのIFN γ の放出は、同じ時間が経過した後のM971 CARよりも有意に多かった。

【0253】

ゆえに、CD19ALAbおよびCD22ALAbに基づく抗原結合ドメインを有するCARは、fmc63およびM971に基づく等価なCARと比べて、標的細胞の致死に関して改善された特性を有する。

【0254】

上記のHasora(2013)で報告された知見を考えると、CD22ALAbの結果は、特に驚くべきものである。その研究では、抗CD22抗体HA22、BL22およびm971に基づく結合ドメインを有する種々の抗CD22 CARを作製して試験した。HA22およびBL22 scFvは、CD22のIgドメイン3に結合するのに対して、m971は、CD22のIgドメイン5~7内に結合する(Hasora(2013)図2Bを参照のこと)。m971由来のCARは、HA22由来のCARよりも優れた標的細胞致死活性を示すことが報告され、この知見は、そのCARによって標的化されたCD22エピトープの重要性に起因する(Hasora(2013)1168頁、最後のパラグラフ全体)。CD22の膜近位ドメインの標的化は、高度に活性な抗CD22 CARを開発する際の「鍵となるエレメント」であると結論づけられる(考察の最後のパラグラフ)。この知見に反して、本明細書中の図11に示されるデータは、CD22のIgドメイン3におけるエピトープを標的化するCD22ALAb(m971によって標的化されるIgドメイン5~7エピトープと比べて「膜遠位」エピトープ)が、m971に基づく抗CD22 CARよりも優れた標的細胞致死能を有することを実証している。

実施例4—種々のエンドドメインの組み合わせを有するORゲート構築物の調査

【0255】

4つのORゲート構築物を図13に示されているように開発した。それらのすべてが、同一の抗原結合ドメイン、スペーサドメインおよび膜貫通ドメインを有するCD19/CD22 ORゲートをコードした：構築物間の唯一の差異は、エンドドメインにあり、それらは、以下の表に示されているとおりであった：

【表B】

構築物	CD19 CARエンドドメイン	CD22 CARエンドドメイン
A	41BB-CD3 ζ	41BB-CD3 ζ
B	OX40-CD3 ζ	OX40-CD3 ζ
C	41BB-CD3 ζ	CD28-CD3 ζ
D	OX40-CD3 ζ	CD28-CD3 ζ

【0256】

各CD19/CD22 ORゲートを発現している細胞がインビトロでRaji細胞を殺す能力を、上に記載されたようにアッセイした。様々なORゲートの組み合わせを発現している形質導入されたPBMCを、CD19+/CD22+Raji標的細胞とともに

、1：1と1：10との両方のエフェクター：標的細胞比で72時間共培養した。

【0257】

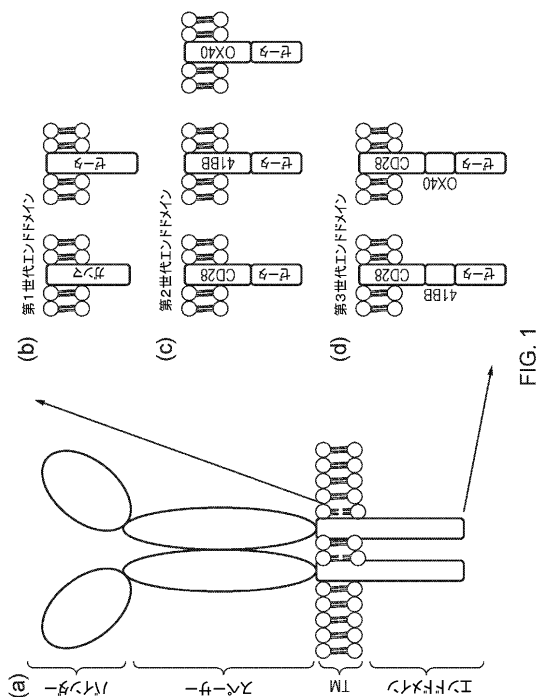
結果を図14に示す。4つすべてのORゲートが、fmc63およびM971 CARよりも有意に良好に標的細胞を殺すと見出された。1：10エフェクター：標的細胞比を用いたとき、一方のCARに4-1BBゼータ/OX40ゼータを有し、他方のCARにCD28ゼータを有する、「分割」エンドメインORゲートが、最善の致死活性を有したことが示された。

【0258】

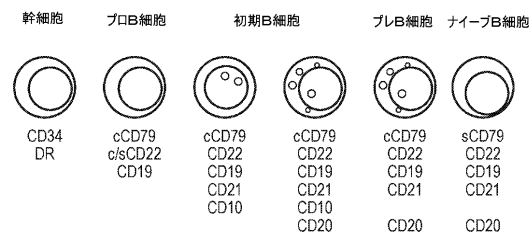
上記の明細書で挙げた出版物は全て、参照により本明細書に援用する。本発明の記載された方法および系の様々な修飾および変形は、本発明の範囲および趣旨から逸脱することなく当業者には明らかである。本発明を特定の好ましい実施形態と共に記載したが、請求されている本発明は、かかる特定の実施形態に過度に限定されるべきではないことを理解すべきである。事実、分子生物学、細胞生物学または関連分野における専門家にとって明白な、本発明を実施するために記載された方法の様々な修飾も以下の特許請求の範囲の範囲内に含まれるものとする。

10

【図1】



【図2】



【図 7】

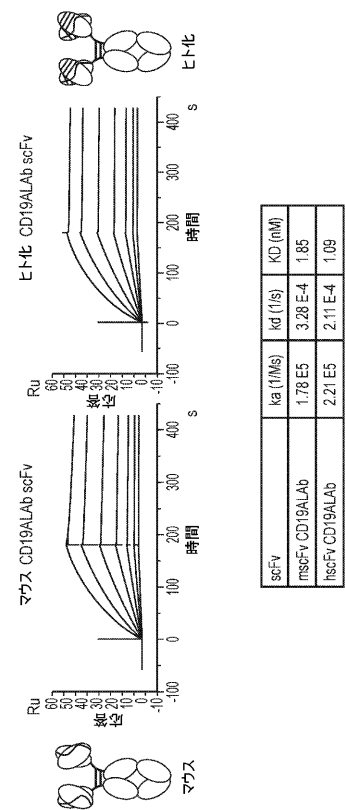


FIG. 7

【図 8】

scFv	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)	n
CD19ALAb	1.65 ± 0.143 × 10 ⁵	3.00 ± 2.198 × 10 ⁻⁴	1.1 ± 0.2	2
FMC63	3.2 ± 0.8 × 10 ⁵	3.9 ± 1.2 × 10 ⁻⁴	1.3 ± 0.7	2

FIG. 8

【図 9】

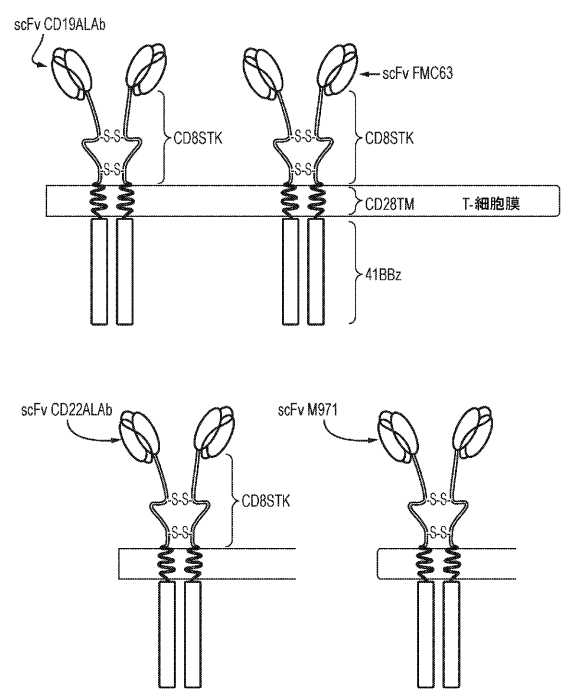


FIG. 9

【図 10】

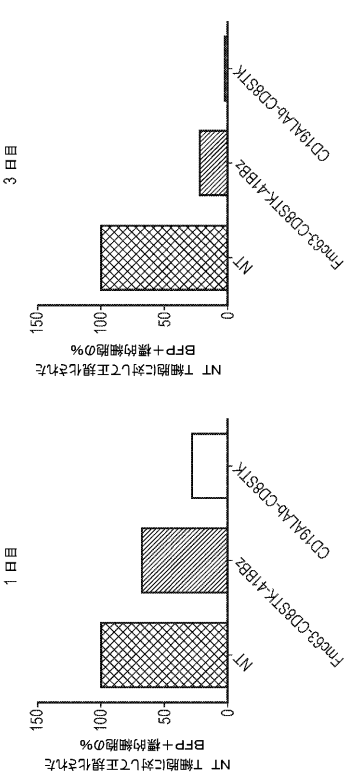


FIG. 10

【図 1 1】



FIG. 11

【図 1 2】

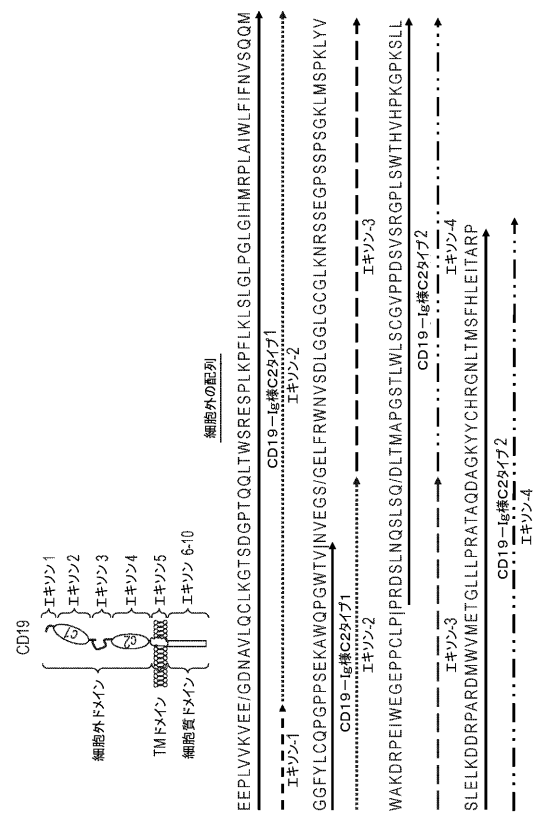


FIG. 12

【図 1 3 A】

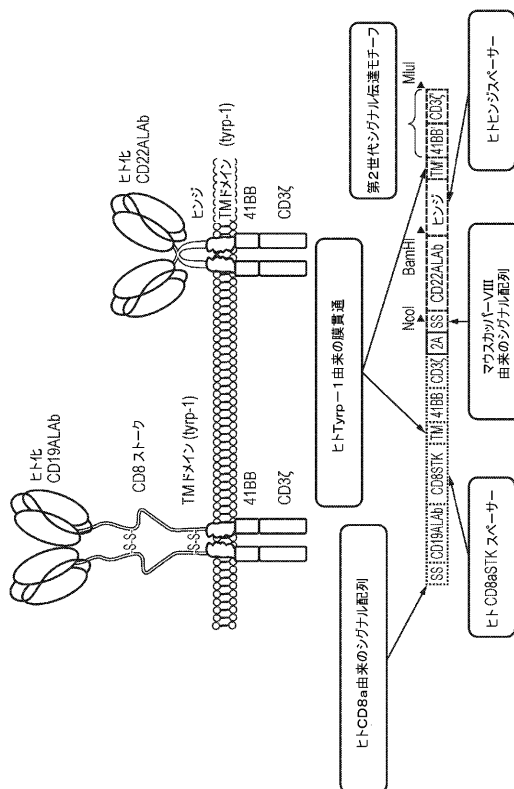


FIG. 13A

【図 1 3 B】

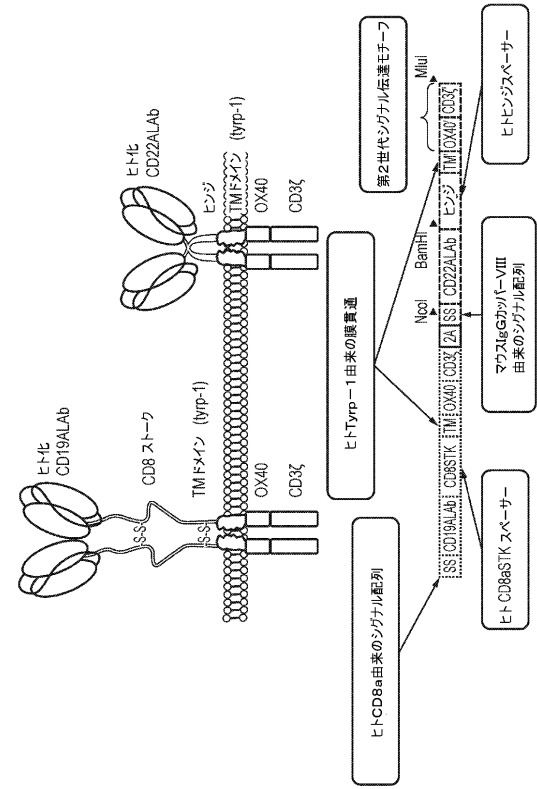
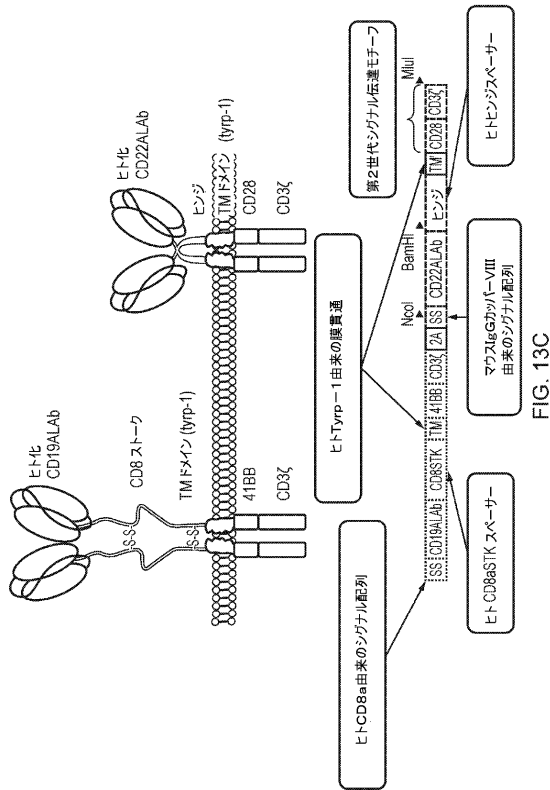
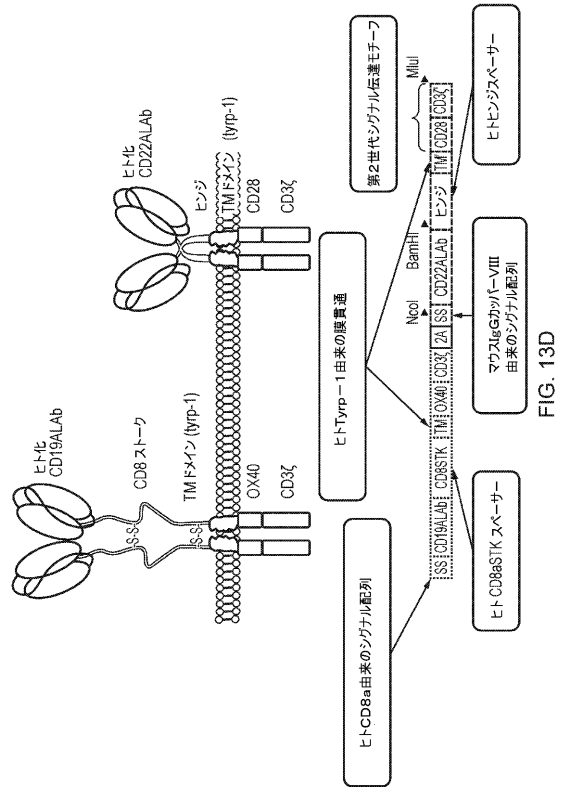


FIG. 13B

【図 13 C】



【図 13 D】



【図 14】

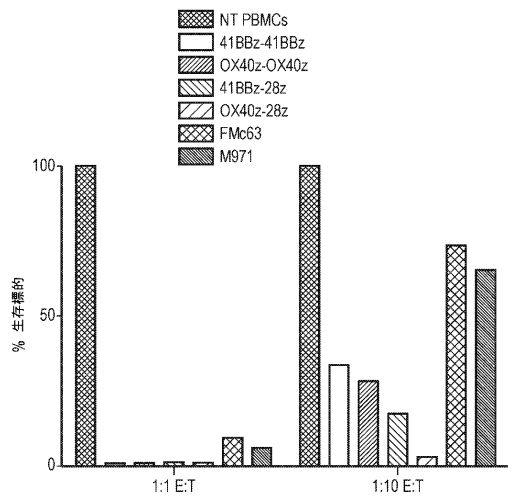


FIG. 14

【配列表】

0006633081000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 K 39/395 (2006.01)
A 6 1 K 35/76 (2015.01)
A 6 1 K 35/17 (2015.01)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)
C 0 7 K 14/705 (2006.01)
C 0 7 K 16/28 (2006.01)
C 0 7 K 19/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 T
A 6 1 K 39/395 E
A 6 1 K 35/76
A 6 1 K 35/17 Z
A 6 1 K 48/00
C 0 7 K 14/705
C 0 7 K 16/28
C 0 7 K 19/00

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 プーレ, マーティン

イギリス国 ダブリュー1ティー 4ティーピー ロンドン, トッテナム コート ロード 9
7, ザ ネットワーク ビルディング, ユーシーエル ビジネス ピーエルシー 気付

(72)発明者 コルドバ, ショーン

イギリス国 ダブリュー1ティー 4ティーピー ロンドン, トッテナム コート ロード 9
7, ザ ネットワーク ビルディング, ユーシーエル ビジネス ピーエルシー 気付

(72)発明者 オヌオハ, シモビ

イギリス国 ダブリュー1ティー 4ティーピー ロンドン, トッテナム コート ロード 9
7, ザ ネットワーク ビルディング, ユーシーエル ビジネス ピーエルシー 気付

(72)発明者 トーマス, サイモン

イギリス国 ダブリュー1ティー 4ティーピー ロンドン, トッテナム コート ロード 9
7, ザ ネットワーク ビルディング, ユーシーエル ビジネス ピーエルシー 気付

審査官 木原 啓一郎

(56)参考文献 国際公開第2013/123061 (WO, A1)

国際公開第2014/124143 (WO, A1)

CURRENT HEMATOLOGIC MALIGNANCY REPORTS, 2014年 2月 2日, Vol. 9, pp. 50-56

MOLECULAR THERAPY, 2013年11月, Vol. 21, No.11, pp. 2087-2101

RIET, Tobias, Erhöhung der Antigen-Selektivität von T-Zellen durch Koexpression chimarer Antigen-Rezeptoren unterschiedlicher Spezifität. PhD thesis, Universität zu Köln [online], 2010年, [retrieved on 2019.08.08], Retrieved from the Internet, URL, <http://kups.ub.uni-koeln.de/id/eprint/3261>

JOURNAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY, 2012年 4月17日, Vol. 32, pp. 1059-1070

IMMUNOTHERAPY, 2011年 1月, Vol. 3, No. 1, pp. 33-48

CANCER IMMUNOLOGY RESEARCH, 2013年 4月 7日, Vol. 1, No. 1, pp. 43-53

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00-7/08

C07K

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)