

明 細 書

発明の名称：血液がんに対する抗体

技術分野

[0001] 本発明は、血液がんに対する抗体に関する。より詳しくは、H L A－D R を認識する抗体又はその機能的断片に関する。本発明はまた、前記抗体若しくはその機能的断片を保持するキメラ抗原受容体、又は、当該キメラ抗原受容体を発現する免疫細胞に関する。さらに、本発明は、前記抗体又はその機能的断片と免疫細胞に対する抗原認識部位とを含む、多重特異性抗体に関する。また、本発明は、これら抗体等を含む医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] 急性骨髄性白血病（A M L）は、代表的な血液がんの一つである。化学療法で治癒しない場合、同種造血幹細胞移植の適応となり、それにより多くの人が治癒するが、それでも治せない人は数多く存在する。そのような患者の治癒を目指した一つの有望なアプローチに、キメラ抗原受容体 T（C A R－T）細胞を用いた免疫療法がある。

[0003] C D 1 9 C A R－T細胞は、再発／難治性のB細胞性白血病、悪性リンパ腫に対して著明な効果を上げている（非特許文献1、2）。しかし、A M Lに対して有効性なC A R－T細胞はまだ存在しない。これまでに、C D 3 3、C D 1 2 3等を標的としてA M Lに対するC A R－T細胞が開発されているが、いずれも正常血液細胞の一部において発現が見られるために血液毒性が強いこと等が問題となっている（非特許文献3、4）。

[0004] そのため、C A R－T療法に有用なA M L特異的細胞表面抗原を探索する試みが、世界中で数多くなされている。しかしながら、トランスクリプトーム解析、あるいはプロテオーム解析といった網羅的方法を用いて精力的になされたにもかかわらず、良い標的は見つかっていない（非特許文献5）。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1: Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, Waller EK, Borchmann P, McGuirk JP, et al. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2019; 380 (1) : 45–56.

非特許文献2: Park JH, Riviere I, Gonen M, Wang X, Senchal B, Curran KJ, et al. Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2018; 378 (5) : 449–59.

非特許文献3: Wang, Q. S., Y. Wang, H. Y. Lv, Q. W. Han, H. Fan, B. Guo, L. L. Wang, and W. D. Han. 2015. Treatment of CD33-directed chimeric antigen receptor-modified T cells in one patient with relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Mol Ther* 23: 184–191.

非特許文献4: Loff, S., J. Dietrich, J. E. Meyer, J. Riewaldt, J. Spehr, M. von Bonin, C. Grunder, M. Swayampakula, K. Franke, A. Feldmann, M. Bachmann, G. Ehninger, A. Ehninger, and M. Cartellieri. 2020. Rapidly Switchable Universal CAR-T Cells for Treatment of CD123-Positive Leuk

emia. Mol Ther Oncolytics 17:408–420.

非特許文献5: Perna F, Berman SH, Soni RK, Mansilla-Soto J, Eyquem J, Hamieh M, et al. Integrating Proteomics and Transcriptomics for Systematic Combinatorial Chimeric Antigen Receptor Therapy of AML. Cancer Cell. 2017; 32(4):506–19 e5.

非特許文献6: Hasegawa K, Ikeda S, Yaga M, Watanabe K, Urakawa R, Iehara A, et al. Selective targeting of multiple myeloma cells with a monoclonal antibody recognizing the ubiquitous protein CD98 heavy chain. Sci Transl Med. 2022; 14(632):eaax7706.

非特許文献7: Hosen N, Matsunaga Y, Hasegawa K, Matsuno H, Nakamura Y, Makita M, et al. The activated conformation of integrin beta7 is a novel multiple myeloma-specific target for CAR T cell therapy. Nat Med. 2017; 23(12):1436–43.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、前記従来技術の有する課題に鑑みてなされたものであり、AML等の血液がんの特異的な細胞表面抗原を同定し、当該抗原を認識する抗体又はその機能的断片、及び当該抗体等を用いた血液がんの免疫療法に有効な

手段を、提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0007] 本発明者らは従前、タンパク質自体はがん特異的でなくても、その翻訳後の変化によって形成されるがん特異のエピトープが免疫療法の標的となり得ることを見出している（非特許文献6、7）。
- [0008] そこで、前記目的を達成すべく、AML細胞に結合する抗体を数多く作製し、それらの中からAML特異的な抗体を同定し、その認識抗原を同定するというアプローチにより、AML特異的な抗体の単離とそれを元にしたCAR-T細胞の開発等を、本発明者らは目指した。
- [0009] 具体的には先ず、AML患者の骨髓（BM）細胞あるいは様々なAML細胞株に結合するモノクローナル抗体（mAb）を分泌する約14,000のハイブリドーマを確立した。次に、これらmAbから、健常ドナーからの末梢血単核細胞（PBMC）中のB細胞以外の細胞には結合しない1,078個のmAbを選択した。さらに、AML患者のBM細胞をこれら候補mAbで染色し、最終的にAMLに特異的に結合するmAbを32クローン同定した。
- [0010] そして、そのうちの1クローンKG2032に関し、CRISPR-Cas9系によって網羅的な遺伝子ノックアウトを行ったリンパ腫細胞（Daudi細胞）に対する結合性の喪失を指標として、前記抗体が認識する抗原の同定を試みた。その結果、KG2032が認識する抗原はHLA-DRであることが明らかになった。また、前記32クローンのうち、KG2032とは異なる8クローンの認識する抗原も、HLA-DRであることが明らかになった。
- [0011] さらに、HLA-DRは多型性の高い分子であるため、KG2032は、HLA-DRのどのアレルを認識できるのかを調べた。その結果、HLA-DRB1*0405、0410、0701、0803、0901、1201又は1454を発現させた慢性骨髓性白血病細胞株（K562細胞）にKG2032は結合する一方で、HLA-DRB1*0101、0301、04

03、0404、0802、1101、1301、1302、1403、1405、1406、1501又は1502を発現させたK562細胞にはKG2032は結合しないことが明らかになった。

[0012] また、HLA-DRが発現している単球やT細胞の一部に対しては、KG2032は結合しないことも明らかになった。

[0013] また、KG2032の可変領域のアミノ酸配列を特定し、当該領域にCD28及びCD3ζ、又は、CD8α、4-1BB及びCD3ζとを融合させたキメラ抗原受容体を設計した。そして、当該キメラ抗原受容体を発現するT細胞(CAR-T細胞)を調製し、ヒト急性骨髄性白血病由来の細胞株(KG1a細胞)と共培養させた。その結果、前記CAR-T細胞は、IFN-γ及びIL-2といったサイトカインを産生し、また細胞傷害活性を示すことが明らかになった。さらに、KG1a細胞を移入したマウスに、前記CAR-T細胞を投与した結果、顕著な抗腫瘍効果が奏されることを見出した。

[0014] さらに、KG2032の可変領域にCD28及びCD3ζを融合させたキメラ抗原受容体とIL-15を共発現させるためのベクターを作製した。そして、当該キメラ抗原受容体を発現するNK細胞(CAR-NK細胞)を調製し、ヒト急性骨髄性白血病由来の細胞株(KG1a細胞)と共培養させた。その結果、前記CAR-NK細胞は、細胞傷害活性を示すことが明らかになった。さらに、KG1a細胞を移入したマウスに、前記CAR-NK細胞を投与した結果、顕著な抗腫瘍効果が奏されることも見出した。

[0015] これらの結果から、血液がん治療において、KG2032のようなHLA-DRを認識する抗体を用いることで、以下のような利用態様(1)及び(2)が可能になり得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0016] (1) 抗HLA-DR抗体を用いることで、HLA-DR不一致同種移植後再発のAML患者でレシピエント(白血病患者)のHLA-DRが該抗HLA-DR抗体陽性型で、ドナーのHLA-DR型が該抗HLA-DR抗体陰性型である場合には、移植を受けた患者自身あるいはドナー由来T細胞が

ら作った該抗HLA-D R抗体由来CAR-T細胞はレシピエントの白血病を特異的に攻撃すると考えられる。

[0017] (2) 正常血液細胞においてはB細胞など一部の細胞にしか結合せず、また全ての血液細胞の源となる造血幹細胞においてはその一部にしか結合しない抗HLA-D R抗体を用いることで、該抗HLA-D R抗体陽性のHLA-D R型を有するAML患者における通常の自家CAR-T細胞を治療に用いたとしても、白血病細胞は排除され、正常造血は該抗HLA-D R抗体陰性細胞で保たれると考えられるので、治療として成立すると考えられる。

[0018] すなわち、本発明は以下の態様を提供する。

[0019] [1] HLA-D Rを認識する抗体又はその機能的断片を含む、血液がんを治療するための組成物。

[0020] [2] 造血幹細胞が移植された血液がん患者に投与される組成物であって、

HLA-D Rを認識する抗体又はその機能的断片を含み、

前記造血幹細胞の提供者と前記患者とはHLA-D Rのアレル型が異なり、

、

前記抗体又はその機能的断片が、前記患者のHLA-D Rに結合し、かつ、前記提供者のHLA-D Rに結合しない、組成物。

[0021] [3] 前記抗体又はその機能的断片が、HLA-DRBを認識する、[1] 又は [2] に記載の組成物。

[0022] [4] 前記抗体又はその機能的断片が、HLA-DRB1を認識する、[1] 又は [2] に記載の組成物。

[0023] [5] 前記抗体又はその機能的断片が、HLA-DRB1*0405、HLA-DRB1*0410、HLA-DRB1*0701、HLA-DRB1*0803、HLA-DRB1*0901、HLA-DRB1*1201、HLA-DRB1*1454、HLA-DRB1*0101、HLA-DRB1*0301、HLA-DRB1*0403、HLA-DRB1*0404、HLA-DRB1*0802、HLA-DRB1*1101、HL

A-DRB1*1301、HLA-DRB1*1302、HLA-DRB1*1403、HLA-DRB1*1405、HLA-DRB1*1406、HLA-DRB1*1501及びHLA-DRB1*1502からなる群から選択される少なくとも1のHLA-DRB1のアレル型に結合する、[1]又は[2]に記載の組成物。

[0024] [6] 前記抗体又はその機能的断片が、86位がアスパラギン酸以外のアミノ酸であるHLA-DRB1のアレル型に結合し、かつ、86位がアスパラギン酸であるHLA-DRB1のアレル型には結合しない、[1]又は[2]に記載の組成物。

[0025] [7] 前記抗体又はその機能的断片が、HLA-DRB1*0405、HLA-DRB1*0410、HLA-DRB1*0701、HLA-DRB1*0803、HLA-DRB1*0901、HLA-DRB1*1201及びHLA-DRB1*1454からなる群から選択される少なくとも1のHLA-DRB1のアレル型に結合し、かつ、HLA-DRB1*0101、HLA-DRB1*0301、HLA-DRB1*0403、HLA-DRB1*0404、HLA-DRB1*0802、HLA-DRB1*1101、HLA-DRB1*1301、HLA-DRB1*1302、HLA-DRB1*1403、HLA-DRB1*1405、HLA-DRB1*1406、HLA-DRB1*1501及びHLA-DRB1*1502からなる群から選択される少なくとも1つのHLA-DRB1のアレル型には結合しない、[1]又は[2]に記載の組成物。

[0026] [8] 前記抗体又はその機能的断片を保持するキメラ抗原受容体を、発現する免疫細胞を含む、[1]～[7]のうちのいずれか1項に記載の組成物。

[0027] [9] 前記免疫細胞は、前記造血幹細胞の提供者由来の細胞から調製される、[8]に記載の組成物。

[0028] [10] 前記造血幹細胞の提供者由来の細胞は、多能性幹細胞である、[9]に記載の組成物。

- [0029] [11] 前記抗体又はその機能的断片と免疫細胞に対する抗原認識部位とを保持する、多重特異性抗体を含む、[1]～[7]のうちのいずれか1項に記載の組成物。
- [0030] [12] 前記抗体又はその機能的断片が一部の正常血液細胞に結合しない、[1]～[7]のうちのいずれか1項に記載の組成物。
- [0031] [13] 前記抗体又はその機能的断片が単球に結合しない、[1]～[7]のうちのいずれか1項に記載の組成物。
- [0032] [14] 前記抗体又はその機能的断片を保持するキメラ抗原受容体を、発現する免疫細胞を含む、[13]に記載の組成物。
- [0033] [15] 前記抗体又はその機能的断片と免疫細胞に対する抗原認識部位とを含む、多重特異性抗体を含む、[13]に記載の組成物。
- [0034] [16] 86位のアミノ酸がアスパラギン酸以外のアミノ酸であるHLA-DRB1の74～89位のアミノ酸配列を含む領域に結合し、かつ86位のアミノ酸がアスパラギン酸であるHLA-DRB1の74～89位のアミノ酸配列を含む領域には結合しない、HLA-DRを認識する抗体又はその機能的断片。
- [0035] [17] 下記(a)～(i)のうちのいずれかの特徴を有する、HLA-DRを認識する、抗体又はその機能的断片
- (a) 配列番号：1～3に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域1～3を含む重鎖可変領域と、配列番号：5～7に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域1～3を含む軽鎖可変領域とを有する
 - (b) 配列番号：34～36に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域1～3を含む重鎖可変領域と、配列番号：38～40に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域1～3を含む軽鎖可変領域とを有する
 - (c) 配列番号：42～44に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域1～3を含む重鎖可変領域と、配列番号：46～48に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域1～3を含む軽鎖可変領域とを有する
 - (d) 配列番号：50～52に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域

域 1 ～ 3 を含む重鎖可変領域と、配列番号： 5 4 ～ 5 6 に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域 1 ～ 3 を含む軽鎖可変領域とを有する

(e) 配列番号： 5 8 ～ 6 0 に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域 1 ～ 3 を含む重鎖可変領域と、配列番号： 6 2 ～ 6 4 に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域 1 ～ 3 を含む軽鎖可変領域とを有する

(f) 配列番号： 6 6 ～ 6 8 に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域 1 ～ 3 を含む重鎖可変領域と、配列番号： 6 2 ～ 6 4 に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域 1 ～ 3 を含む軽鎖可変領域とを有する

(g) 配列番号： 7 0 ～ 7 2 に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域 1 ～ 3 を含む重鎖可変領域と、配列番号： 6 2 ～ 6 4 に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域 1 ～ 3 を含む軽鎖可変領域とを有する

(h) 配列番号： 7 4 ～ 7 6 に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域 1 ～ 3 を含む重鎖可変領域と、配列番号： 6 2 ～ 6 4 に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域 1 ～ 3 を含む軽鎖可変領域とを有する

(i) 配列番号： 6 6 ～ 6 8 に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域 1 ～ 3 を含む重鎖可変領域と、配列番号： 6 2、7 8 及び 6 4 に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域 1 ～ 3 を含む軽鎖可変領域とを有する

。

[0036] [18] [16] 又は [17] に記載の抗体又はその機能的断片を保持するキメラ抗原受容体。

[0037] [19] [16] 又は [17] に記載の抗体又はその機能的断片を保持するキメラ抗原受容体を発現する、免疫細胞。

[0038] [20] [16] 又は [17] に記載の抗体又はその機能的断片が結合しない、[19] に記載の免疫細胞。

[0039] [21] T細胞、NK細胞及びNK T細胞からなる群から選択される少なくとも1つの細胞である、[19] 又は [20] に記載の免疫細胞。

[0040] [22] [16] 又は [17] に記載の抗体若しくはその機能的断片、又は、[19] ～ [21] のうちのいずれか1項に記載の免疫細胞を含む、

医薬組成物。

- [0041] [23] 血液がんを治療するための、[22]に記載の医薬組成物。
- [0042] [24] 前記免疫細胞は、治療対象である血液がん患者とは異なるヒトに由来する細胞から調製される、[23]に記載の医薬組成物。
- [0043] [25] 前記免疫細胞は、治療対象である血液がん患者から採取された細胞から調製される、[23]に記載の医薬組成物。
- [0044] [26] [23]に記載の医薬組成物を製造する方法であって、[16]又は[17]に記載の抗体又はその機能的断片が結合しない免疫細胞を、[18]に記載のキメラ抗原受容体を発現させるように改変する工程を含む、方法。
- [0045] [27] 前記免疫細胞は、治療対象である血液がん患者とは異なるヒトに由来する細胞である、[26]に記載の方法。
- [0046] [28] 前記免疫細胞は、治療対象である血液がん患者から採取された細胞である、[26]に記載の方法。
- [0047] [29] 前記免疫細胞は、T細胞、NK細胞及びNK T細胞からなる群から選択される少なくとも1つの細胞である、[26]～[28]のうちのいずれか1項に記載の方法。

発明の効果

- [0048] 本発明によれば、血液がん特異的な細胞表面抗原となるHLA-D Rを標的とすることにより、当該抗原を認識する抗体若しくはその機能的断片、又はそれを保持するキメラ抗原受容体等を用いることにより、前記疾患の治療等が可能となる。
- [0049] 特に、かかる抗体は、HLA-D Rに対してアレル特異性を示し得るので、HLA-D R不一致同種移植後再発の血液がん患者で、レシピエント（血液がん患者）のHLA-D Rが本発明の抗体が結合する陽性型で、ドナーのHLA-D Rが本発明の抗体が結合しない陰性型である場合には、多能性幹細胞を含むドナー由来細胞から作った本発明の抗体由来のCAR-T細胞等はレシピエントの血液がんを特異的に攻撃することが可能となる。

[0050] また、本発明の抗体が結合する陽性のHLA-DRを有する血液がん患者における通常の自家CAR-T細胞等による治療に、本発明の抗体を用いたとしても、血液がん細胞は排除され、正常造血は本発明の抗体が結合しない陰性細胞で保たれ、治療することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0051] [図1A]健常人末梢血に対するKG2032の結合性を、フローサイトメトリーによって解析した結果を示す図である。図中、TはT細胞、BはB細胞、Moは単球、Neuは好中球を各々示す。

[図1B]AML検体に対するKG2032の結合性を、フローサイトメトリーによって解析した結果を示す図である。症例番号(unique patient number:UPN)1~14は、各AML患者由来の白血病細胞を示す。

[図2A]CRISPRガイドRNA(gRNA)ライブラリーを用いた、KG2032が認識する抗原を同定するための工程の概要を示す図である。

[図2B]図2Aに示すCas9発現Dauid細胞に対するKG2032の結合性を、フローサイトメトリーによって解析した結果を示す図である。より具体的には、図2Aに示すgRNAライブラリー導入後、KG2032の結合が低下した細胞分画をソーティングした。そのソート前、ソート後の細胞のKG2032の結合を解析した結果を示す。

[図2C]前記ソート後、ソート前の細胞に導入されているgRNAの頻度をプロットした図である。

[図2D]HLA-DR分子がノックアウトされたDauid細胞に対する、KG2032又は既存の抗HLA-DR抗体(L243)の結合性を、フローサイトメトリーによって解析した結果を示す図である。

[図2E]HLA-DR分子がノックアウトされたDauid細胞に対する、KG2053、KG1982、KG19122、KG19130、KG19214、KG19833、aAML191870又はaAML191872の結合性を、フローサイトメトリーによって解析した結果を示す図である。

[図3]各種HLA-DRB1分子を発現させたK562細胞に対する、KG2032又はL243の結合性を、フローサイトメトリーによって解析した結果を示す図である。

[図4A]KG2032陰性HLA-DRB1（0403／0802）を有する健常人（ドナー1）の末梢血各分画、又は、KG2032陽性HLA-DRB1（0403／0901）を有する健常人（ドナー2）の末梢血各分画に対する、KG2032又はL243の結合性を、フローサイトメトリーによって解析した結果を示す図である。

[図4B]KG2032陽性HLA-DRB1を有するAML患者骨髓細胞に対する、KG2032の結合性を、フローサイトメトリーによって解析した結果を示す図である。

[図4C]KG2032陽性HLA-DRB1を有する健常人骨髓細胞の各分画に対する、KG2032の結合性を、フローサイトメトリーによって解析した結果を示す図である。

[図5A]KG2032のAML治療における利用態様の概要を示す図である。

[図5B]KG2032のAML治療における別の利用態様の概要を示す図である。

[図6]DRB1*1454（KG2032陽性）とDRB1*1502（KG2032陰性）のアミノ酸配列を比較した結果を示す図である。図中、Region1～5は、アミノ酸配列において違いの多い領域を各々示す。

[図7A]HLA-DRB1*1454（KG2032陽性）とHLA-DRB1*1502（KG2032陰性）とを部分的に融合させたキメラタンパク質の概要を示す図である。

[図7B]前記各種キメラタンパク質を各々発現させたK562細胞に対する、KG2032又はL243の結合性を、フローサイトメトリーによって解析した結果を示す図である。

[図7C]各種HLA-DRB1分子をK562細胞に発現させた際に、KG2032が結合するものとししないものについて、Region3のアミノ酸配

列を比較した結果を示す図である。

[図7D]DRB1*0405 (KG2032陽性)の86位のアミノ酸セリン (S)をアスパラギン酸 (D)に置換した変異体をK562細胞に発現させ、KG2032あるいはL243の結合を比較した結果を示す図である。

[図8A]KG2032の可変領域を含むキメラ抗原受容体 (KG2032-CAR)の概要を示す図である。

[図8B]KG2032-CARの導入率を解析した結果を示す図である。

[図8C]KG2032-CARを発現させたT細胞 (KG2032-CAR-T細胞)の増殖率を示す、グラフである。図中「Control」は遺伝子導入されていないT細胞を示す。

[図8D]KG2032-CAR-T細胞と白血病細胞株 KG1a (KG2032陽性)又はTHP-1 (KG2032陰性)とを24時間共培養した後、サイトカイン産生を解析した結果を示すグラフである。

[図8E]KG2032-CAR-T細胞と白血病細胞株KG1a又はTHP-1とを4時間共培養した後、細胞傷害活性を解析した結果を示すグラフである。

[図8F]ダサチニブ添加時、非添加時のKG2032-CAR-T細胞の増殖性を解析した結果を示すグラフである。なお、図8F以降の図面においては、KG2032-CAR-Tとして、図8Aに示す「BBζ」を用いた結果を示す。

[図8G]ダサチニブ添加時、非添加時のKG2032-CAR-T細胞におけるT細胞疲弊マーカー (PD-1, LAG-3, TIM-3)の発現を、フローサイトメトリーによって解析した結果を示す図である。

[図8H]ダサチニブ添加時、非添加時の、KG2032-CAR-T細胞とKG1a細胞との共培養における、IL-2産生を解析した結果を示すグラフである。

[図8I]ルシフェラーゼ発現KG1a細胞をNOGマウスに移植した異種移植モデルにおける、KG2032-CAR-T細胞投与の効果を、in vi

voイメーシングシステム（IVIS）によって生物発光を検出して解析した結果を示す図である。

[図8J]ルシフェラーゼ発現KG1a細胞をNOGマウスに移植した異種移植モデルにおける、KG2032-CAR-T細胞投与の効果を解析した結果を示すグラフである。当該グラフにおいて、IVISによって検出された発光強度の推移を示す。

[図9A]KG2032-CAR-T2A-IL-15、及び、当該CARを導入したNK細胞の製造工程の概要を示す図である。

[図9B]KG2032-CAR-T2A-IL-15を導入したNK細胞（KG2032-CAR-NK）又はコントロール（非導入（NT））NK細胞の*in vitro*培養中の増殖性を解析した結果を示すグラフである。

[図9C]KG2032-CAR-NKにおけるCD56、CD3、KG2032-CARの発現についてフローサイトメトリーによって解析した結果を示す図である。

[図9D]KG2032-CAR-NK又はコントロールNK細胞を標的細胞と共培養した際のCD107a脱顆粒についてフローサイトメトリーによって測定した結果を示すグラフである。

[図9E]KG2032-CAR-NK又はコントロールNK細胞を標的細胞と共培養した際の細胞傷害活性を、⁵¹Cr放出アッセイによって測定した結果を示すグラフである。

[図9F]免疫不全マウスへの、KG1a AML細胞（KG1a-luc）の移植及びKG2032-CAR-NKの投与のタイミングを示す図である。

[図9G]KG2032-CAR-NKを投与したKG1a移植マウスの生存率を示すグラフである。

[図9H]KG2032-CAR-NK又はコントロールNK細胞を注入したマウスの生物発光を検出して解析した結果を示す図である（各群n=4）。

[図10A]免疫不全マウスへの、AML患者由来の骨髓細胞の移植及び改変KG2032-CAR-T細胞の投与のタイミングを示す図である。

[図10B]改変KG2032 CAR-T細胞又はコントロールT細胞を注入したマウスの骨髓細胞をフローサイトメトリーによって解析した結果を示す図である。マウスCD45陰性細胞として予めゲートされた細胞集団の解析を示す。

[図10C]AML細胞移植31日後の骨髓細胞中、マウスCD45陰性細胞中のヒトCD45⁺ヒトCD3⁻ヒトCD34⁺AML細胞の割合を示すドット図である。

発明を実施するための形態

[0052] <抗HLA-DR抗体>

本発明は、クラスIIの主要組織適合性複合体(MHC)のひとつであるHLA-DRを、認識する抗体又はその機能的断片に関する。本発明において「HLA-DRを認識する」とは、HLA-DRにおける少なくとも1のアレル型に結合することを意味し、また、HLA-DRにおける少なくとも1のアレル型に結合し、かつ少なくとも1の他のアレル型に結合しないことも含む。

[0053] HLA-DRのアレル型として、例えば、HLA-DR1、HLA-DR2、HLA-DR3、HLA-DR4、HLA-DR5、HLA-DR6、HLA-DR7、HLA-DR8、HLA-DR9、HLA-DR10、HLA-DR11、HLA-DR12、HLA-DR13、HLA-DR14、HLA-DR15、HLA-DR52、HLA-DR53が挙げられる。また、HLA-DRは、例えば、 α 鎖及び β 鎖の複合体であり、より具体的には、 α 鎖として、HLA-DRA1等のHLA-DRAが挙げられる。 β 鎖として、HLA-DRB1、HLA-DRB3、HLA-DRB4、HLA-DRB5等のHLA-DRBが挙げられる。さらに、HLA-DRB1としては、例えば、HLA-DRB1*0405(配列番号:11)、HLA-DRB1*0410(配列番号:12)、HLA-DRB1*0701(配列番号:13)、HLA-DRB1*0803(配列番号:14)、HLA-DRB1*0901(配列番号:15)、HLA-DRB1*120

1（配列番号：16）、HLA-DRB1*1454（配列番号：17）、HLA-DRB1*0101（配列番号：18）、HLA-DRB1*0301（配列番号：19）、HLA-DRB1*0403（配列番号：20）、HLA-DRB1*0404（配列番号：21）、HLA-DRB1*0802（配列番号：22）、HLA-DRB1*1101（配列番号：23）、HLA-DRB1*1301（配列番号：24）、HLA-DRB1*1302（配列番号：25）、HLA-DRB1*1403（配列番号：26）、HLA-DRB1*1405（配列番号：27）、HLA-DRB1*1406（配列番号：28）、HLA-DRB1*1501（配列番号：29）、HLA-DRB1*1502（配列番号：30）が挙げられる。

[0054] 本発明の抗体として、例えば、86位がアスパラギン酸以外のアミノ酸であるHLA-DRB1のアレル型に結合する抗体が挙げられる。さらに、当該抗体は、86位がアスパラギン酸であるHLA-DRB1のアレル型には結合しない抗体であっても良い。なお、86位における「アスパラギン酸以外のアミノ酸」は、好ましくは、セリン、バリン又はアラニンである。

[0055] より具体的な例として、HLA-DRB1*0405（配列番号：11）、HLA-DRB1*0410（配列番号：12）、HLA-DRB1*0701（配列番号：13）、HLA-DRB1*0803（配列番号：14）、HLA-DRB1*0901（配列番号：15）、HLA-DRB1*1201（配列番号：16）及びHLA-DRB1*1454（配列番号：17）からなる群から選択される少なくとも1（例えば、1、2、3、4、5、6又は7）のHLA-DRに結合する抗体が挙げられる。また、その一方で、HLA-DRB1*0101（配列番号：18）、HLA-DRB1*0301（配列番号：19）、HLA-DRB1*0403（配列番号：20）、HLA-DRB1*0404（配列番号：21）、HLA-DRB1*0802（配列番号：22）、HLA-DRB1*1101（配列番号：23）、HLA-DRB1*1301（配列番号：24）、HLA-DRB1*1302（配列番号：25）、HLA-DRB1*1403（配列番号：26）、HLA-DRB1*1405（配列番号：27）、HLA-DRB1*1406（配列番号：28）、HLA-DRB1*1501（配列番号：29）、HLA-DRB1*1502（配列番号：30）が挙げられる。

号：26）、HLA-DRB1*1405（配列番号：27）、HLA-DRB1*1406（配列番号：28）、HLA-DRB1*1501（配列番号：29）及びHLA-DRB1*1502（配列番号：30）からなる群から選択される少なくとも1（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12又は13）のHLA-DRには結合しない抗体であっても良い。さらに、後述の実施例に示すように、本発明の抗体はHLA-DRB1の74～89位のアミノ酸配列を含む領域を認識し得る。また、本発明の抗体は、単球、T細胞の一部に結合しないものであってもよい。

[0056] なお、抗体のかかる結合性の有無については、当業者であれば免疫学的手法を用いることにより解析することができる。例えば、後述の実施例に示すとおり、フローサイトメトリーによる抗原分析において、被検抗体に由来するピークが、そのアイソタイプコントロール抗体に由来するピークと比較して、蛍光強度が強い側にシフトしている場合は、被検抗体は抗原に（実質的に）結合すると判断することができる。一方、かかるシフトが認められない場合は、被検抗体は抗原に（実質的に）結合しないと判断することができる。

[0057] また、本発明の抗体の結合性は、 K_D （解離定数）として 10^{-7} 以下であることが好ましく、 10^{-8} 以下であることがより好ましい。 K_D は、 k_a （結合速度定数）及び k_d （解離速度定数）から算出される（ $K_D = k_d / k_a$ ）。 k_a 及び k_d は、2分子間の結合解離反応における速度定数であり、例えば、表面プラズモン共鳴法（SPR）による測定によって決定することができる。抗体と抗原間の結合のSPR測定は周知であり、当業者であればかかる周知技術に基づいて抗体の k_a 及び k_d を求めることができ、更には K_D を算出することができる。

[0058] 本発明における「抗体」は、免疫グロブリンの全てのクラス及びサブクラスを含む。「抗体」には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体が含まれる。「ポリクローナル抗体」は、異なるエпитープに対する異なる抗体を含む抗体調製物である。また「モノクローナル抗体」とは、実質的に均一な

抗体の集団から得られる抗体を意味する。ポリクローナル抗体とは対照的に、モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基を認識するものである。本発明の抗体は、好ましくはモノクローナル抗体である。本発明の抗体は、自然環境の成分から分離され、及び／又は回収された（すなわち、単離された）抗体である。

[0059] 本発明の抗体は、ADCC活性及びCDC活性から選択される少なくとも1つの細胞傷害活性を有していてもよく、ADCC活性及びCDC活性の双方を有していてもよい。

[0060] 本発明において「ADCC活性（抗体依存性細胞傷害活性）」とは、標的細胞の細胞表面抗原に抗体が結合した際、その抗体のFc領域にエフェクター細胞（NK細胞、単球等の免疫細胞）がさらに結合することにより、当該細胞が活性化され、それに伴い、因子を放出して標的細胞を殺傷する活性を意味する。他方、「CDC活性（補体依存性細胞傷害活性）」とは、抗体が標的細胞に結合すると補体系が活性化し、その結果、標的細胞を溶解する活性を意味する。

[0061] 本発明の抗体はまた、抗腫瘍活性を有していてもよい。本発明において「抗腫瘍活性」とは、がん細胞の増殖を抑制する活性、がん細胞の死を誘導する活性及びがん細胞の転移を抑制する活性のうちの少なくともいずれか一つの活性を意味する。抗腫瘍活性は、例えば、後述の実施例に示すような担がんモデルを用いた分析により評価することができる。また、かかるインビボの系でなくとも、被検抗体の存在下又は非存在下にて腫瘍細胞を培養し、前者における腫瘍細胞数が、後者におけるそれと比較して低減した場合、当該抗体は抗腫瘍活性を有すると判断することが出来る。

[0062] 本発明の抗体は、HLA-DRを認識できればよく、その由来、種類、形状等は特に限定されない。具体的には、非ヒト動物由来の抗体（例えば、マウス抗体、ウサギ抗体、ラット抗体、ラクダ抗体）、ヒト由来の抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体が含まれる。

[0063] 本発明において「非ヒト動物由来の抗体」としては、例えば、後述の実施

例に示す、KG2032、KG2053、KG1982、KG19130、KG19214、KG19833、aAML191870、aAML191872、KG19122を挙げることができ、より具体的には、以下のアミノ酸アミノ酸配列を含む可変領域を保持する抗体が挙げられる。

(a) 配列番号：4に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号：8に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを保持する抗体。

(b) 配列番号：37に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号：41に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを保持する抗体。

(c) 配列番号：45に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号：49に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを保持する抗体。

(d) 配列番号：53に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号：57に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを保持する抗体。

(e) 配列番号：61に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号：65に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを保持する抗体。

(f) 配列番号：69に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号：65に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを保持する抗体。

(g) 配列番号：73に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号：65に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを保持する抗体。

(h) 配列番号：77に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号：65に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを保持する抗体

(i) 配列番号：69に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号：79に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを保持する抗体。

[0064] さらに、以下のような相補性決定領域(CDR)を保持するHLA-D Rを認識する抗体も、例として挙げることができる。

(a) 配列番号：4に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域から決定される重鎖CDR1～3と、配列番号：8に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域から決定される軽鎖CDR1～3とを保持する抗体。

(b) 配列番号：37に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域から決定さ

れる重鎖CDR1～3と、配列番号：41に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域から決定される軽鎖CDR1～3とを保持する抗体。

(c) 配列番号：45に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域から決定される重鎖CDR1～3と、配列番号：49に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域から決定される軽鎖CDR1～3とを保持する抗体。

(d) 配列番号：53に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域から決定される重鎖CDR1～3と、配列番号：57に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域から決定される軽鎖CDR1～3とを保持する抗体。

(e) 配列番号：61に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域から決定される重鎖CDR1～3と、配列番号：65に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域から決定される軽鎖CDR1～3とを保持する抗体。

(f) 配列番号：69に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域から決定される重鎖CDR1～3と、配列番号：65に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域から決定される軽鎖CDR1～3とを保持する抗体。

(g) 配列番号：73に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域から決定される重鎖CDR1～3と、配列番号：65に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域から決定される軽鎖CDR1～3とを保持する抗体。

(h) 配列番号：77に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域から決定される重鎖CDR1～3と、配列番号：65に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域から決定される軽鎖CDR1～3とを保持する抗体

(i) 配列番号：69に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域から決定される重鎖CDR1～3と、配列番号：79に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域から決定される軽鎖CDR1～3とを保持する抗体。

[0065] なお、かかる抗体に関し、可変領域のアミノ酸配列に基づきCDRを決定する方法としては特に制限はないが、例えば、Kabat、Chothia、IMGT、Aho等の公知のナンバリングスキームが挙げられ、より具体的に、Kabatによって決定された例として、以下のようなCDRを保持するHLA-D Rを認識する抗体を挙げることができる。

(a) 配列番号：1～3に記載のアミノ酸配列を各々重鎖CDR1～3として保持し、かつ、配列番号：5～7に記載のアミノ酸配列を各々軽鎖CDR1～3として保持する抗体。

(b) 配列番号：34～36に記載のアミノ酸配列を各々重鎖CDR1～3として保持し、かつ、配列番号：38～40に記載のアミノ酸配列を各々軽鎖CDR1～3として保持する抗体。

(c) 配列番号：42～44に記載のアミノ酸配列を各々重鎖CDR1～3として保持し、かつ、配列番号：46～48に記載のアミノ酸配列を各々軽鎖CDR1～3として保持する抗体。

(d) 配列番号：50～52に記載のアミノ酸配列を各々重鎖CDR1～3として保持し、かつ、配列番号：54～56に記載のアミノ酸配列を各々軽鎖CDR1～3として保持する抗体。

(e) 配列番号：58～60に記載のアミノ酸配列を各々重鎖CDR1～3として保持し、かつ、配列番号：62～64に記載のアミノ酸配列を各々軽鎖CDR1～3として保持する抗体。

(f) 配列番号：66～68に記載のアミノ酸配列を各々重鎖CDR1～3として保持し、かつ、配列番号：62～64に記載のアミノ酸配列を各々軽鎖CDR1～3として保持する抗体。

(g) 配列番号：70～72に記載のアミノ酸配列を各々重鎖CDR1～3として保持し、かつ、配列番号：62～64に記載のアミノ酸配列を各々軽鎖CDR1～3として保持する抗体。

(h) 配列番号：74～76に記載のアミノ酸配列を各々重鎖CDR1～3として保持し、かつ、配列番号：62～64に記載のアミノ酸配列を各々軽鎖CDR1～3として保持する抗体

(i) 配列番号：66～68に記載のアミノ酸配列を重鎖CDR1～3として保持し、かつ、配列番号：62、78及び64に記載のアミノ酸配列を各々軽鎖CDR1～3として保持する抗体。

[0066] また、本発明においては、このような特定のアミノ酸配列からなる可変領

域及び／又はCDRを保持する抗体のみならず、望ましい活性（抗原に対する反応性等）を減少させることなく、そのアミノ酸配列が修飾された抗体が含まれる。このようなアミノ酸配列変異体は、例えば、上述の可変領域等をコードするDNAへの変異導入によって、またはペプチド合成によって作製することができる。そのような修飾には、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基の置換、欠失、付加及び／又は挿入を含む。抗体のアミノ酸配列が改変される部位は、改変される前の抗体と同等の活性を有する限り、抗体の重鎖又は軽鎖の定常領域であってもよく、また、可変領域（フレームワーク領域（FR）及びCDR）であってもよい。CDR以外のアミノ酸の改変は、抗原との反応性への影響が相対的に少ないと考えられるため、通常改変はFRに施される。しかしながら、現在では、CDRのアミノ酸を改変して、抗原へのアフィニティーが高められた抗体をスクリーニングする手法が公知である（PNAS, 102:8466-8471 (2005)、Protein Engineering, Design&Selection, 21:485-493 (2008)、国際公開第2002/051870号、J. Biol. Chem., 280:24880-24887 (2005)、Protein Engineering, Design&Selection, 21:345-351 (2008)、MAbs, Mar-Apr; 6 (2):437-45 (2014)）。また、現在では、統合計算化学システム等（例えば、Molecular Operating Environment、カナダCCG社製）を利用することにより、抗原へのアフィニティーが高められた抗体をモデリングすることもできる（例えば、<http://www.rsi.co.jp/kagaku/cs/ccg/products/application/protein.html> 参照）。さらに、Protein Eng Des Sel, 2010 Aug; 23 (8):643-51に記載のとおり、抗原へのアフィニティーにおいて、重鎖可変領域のCDR1及び軽鎖可変領域のCDR3は関与していない例が知られている。また同様に、Molecular Immunology 4

4 : 1 0 7 5 - 1 0 8 4 (2 0 0 7) には、大抵の抗体においては、軽鎖可変領域の C D R 2 は抗原へのアフィニティーに関与していないということが報告されている。このように、抗体の抗原へのアフィニティーにおいては、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域各々の C D R 1 ~ 3 の全てを要せずとも、同等の活性を発揮し得る。実際に、B i o c h e m B i o p h y s R e s C o m m u n . 2 0 0 3 J u l 1 8 ; 3 0 7 (1) : 1 9 8 - 2 0 5 、 J M o l B i o l . 2 0 0 4 J u l 9 ; 3 4 0 (3) : 5 2 5 - 4 2 、 J M o l B i o l . 2 0 0 3 A u g 2 9 ; 3 3 1 (5) : 1 1 0 9 - 2 0 においては、元の抗体の少なくとも 1 の C D R を保持することによって、抗原へのアフィニティーが維持された例が報告されている。

[0067] また、本発明の抗体に関し、可変領域において改変されるアミノ酸数は、好ましくは、10 アミノ酸以内、より好ましくは 5 アミノ酸以内、さらに好ましくは 3 アミノ酸以内（例えば、2 アミノ酸以内、1 アミノ酸）である。さらに、かかる改変は全て、抗原との結合性への影響が少ないという観点から、C D R 以外、すなわち F R に施されていることが好ましい。また、C D R において改変されるアミノ酸数は、好ましくは 5 アミノ酸以内、より好ましくは 3 アミノ酸以内（例えば、2 アミノ酸以内、1 アミノ酸）である。

[0068] アミノ酸の改変は、好ましくは、保存的な置換である。本発明において「保存的な置換」とは、類似する（化学的に同様な側鎖を有する）他のアミノ酸残基で置換することを意味する。化学的に同様なアミノ酸側鎖を有するアミノ酸残基のグループは、本発明の属する技術分野でよく知られている。例えば、酸性アミノ酸（アスパラギン酸及びグルタミン酸）、塩基性アミノ酸（リジン・アルギニン・ヒスチジン）、中性アミノ酸においては、炭化水素鎖を持つアミノ酸（グリシン・アラニン・バリン・ロイシン・イソロイシン・プロリン）、ヒドロキシ基を持つアミノ酸（セリン・トレオニン）、硫黄を含むアミノ酸（システイン・メチオニン）、アミド基を持つアミノ酸（アスパラギン・グルタミン）、イミノ基を持つアミノ酸（プロリン）、芳香族基を持つアミノ酸（フェニルアラニン・チロシン・トリプトファン）で分類

することができる。

[0069] また、改変後のアミノ酸配列が、上述の特定のアミノ酸配列からなる可変領域とアミノ酸配列レベルで80%以上の相同性又は同一性を有するアミノ酸配列を含む可変領域を保持する抗体も、改変される前の抗体と同等の活性を有する限り、本発明の抗体に含まれる。かかる相同性又は同一性としては、少なくとも80%であればよいが、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上（例えば、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上）である。なお、かかる抗体の可変領域における改変は、抗原との結合性への影響が少ないという観点から、CDR以外、すなわちFRに施されていることが好ましい。また、「同一性」は、比較するアミノ酸配列間においてアミノ酸の種類が同一な部位の割合を意味し、「相同性」は、さらに類似するアミノ酸が同一な部位の割合を加えた割合を意味する。配列の相同性又は同一性は、BLASTP（アミノ酸レベル）のプログラム（Altschul et al. J. Mol. Biol., 215:403-410, 1990）を利用して決定することができる。該プログラムは、KarlinおよびAltschulによるアルゴリズムBLAST（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:2264-2268, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-5877, 1993）に基づいている。BLASTPによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターは、例えばscore=50、wordlength=3とする。また、Gapped BLASTプログラムを用いて、アミノ酸配列を解析する場合は、Altschulら（Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997）に記載されているように行うことができる。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である。

[0070] また、「同等の活性を有する」とは、例えば、抗原への結合性が、対象抗体（例えば、KG2032、KG2053、KG1982、KG19130

、KG19214、KG19833、a AML 191870、a AML 191872、KG19122)と同等(例えば、70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上)であることを意味する。

[0071] また、本発明の抗体の改変は、例えば、グリコシル化部位の数又は位置を変化させる等の抗体の翻訳後プロセスの改変であってもよい。これにより、例えば、抗体のADCC活性を向上させることができる。抗体のグリコシル化とは、典型的には、N-結合又はO-結合である。抗体のグリコシル化は、抗体を発現するために用いる宿主細胞に大きく依存する。グリコシル化パターンの改変は、糖生産に関わる特定の酵素の導入又は欠失等の公知の方法で行うことができる(特開2008-113663号公報、米国特許第5047335号、米国特許第5510261号、米国特許第5278299号、国際公開第99/54342号)。さらに、本発明においては、抗体の安定性を増加させる等の目的で脱アミド化されるアミノ酸若しくは脱アミド化されるアミノ酸に隣接するアミノ酸を他のアミノ酸に置換することにより脱アミド化を抑制してもよい。また、グルタミン酸を他のアミノ酸へ置換して、抗体の安定性を増加させることもできる。本発明は、こうして安定化された抗体をも提供するものである。

[0072] 本発明において「キメラ抗体」とは、ある種の抗体の可変領域とそれとは異種の抗体の定常領域とを連結した抗体である。キメラ抗体は、例えば、抗原をマウスに免疫し、そのマウスモノクローナル抗体の遺伝子から抗原と結合する抗体可変部(可変領域)を切り出して、ヒト骨髓由来の抗体定常部(定常領域)遺伝子と結合し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入して産生させることにより取得することができる(例えば、特開平8-280387号公報、米国特許第4816397号公報、米国特許第4816567号公報、米国特許第5807715号公報)。

[0073] キメラ抗体の定常領域には、通常、ヒト由来の抗体のものが使用される。例えば重鎖においては、C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4、C μ 、C δ 、C α 1、C α 2、及びC ϵ を定常領域として利用することができる。また軽鎖

においてはC κ やC λ を定常領域として使用できる。これらの定常領域のアミノ酸配列、並びにそれをコードする塩基配列は公知である。また、抗体自体の安定性、又は抗体の産生の安定性を改善するために、ヒト由来の抗体定常領域中の1又は数個のアミノ酸を置換、欠失、付加及び／又は挿入をすることができる。

[0074] 本発明において「ヒト化抗体」とは、非ヒト動物由来の抗体のCDRの遺伝子配列をヒト由来の抗体遺伝子に移植（CDRグラフトニング）した抗体であり、その作製方法は、オーバーラップ伸長PCR法（overlap extension PCR）等、公知である（例えば、欧州特許出願公開第239400号明細書、欧州特許出願公開第125023号明細書、国際公開第90/07861号、国際公開第96/02576号）。抗体の変領域は、通常、4つのFRにはさまれた3つのCDRで構成されている。CDRは、実質的に、抗体の結合特異性を決定している領域である。CDRのアミノ酸配列は多様性に富む一方、FRを構成するアミノ酸配列は、異なる結合特異性を有する抗体の間でも、高い相溶性又は同一性を示すことが多い。そのため、一般に、CDRの移植によって、ある抗体の結合特異性を、他の抗体に移植することができるといわれている。また、CDRの機能の維持の観点から、非ヒト由来CDRのヒトFRへの移植においては、その非ヒト動物由来のFRと相溶性又は同一性の高いヒトFRが選択される。すなわち、CDR内のアミノ酸は、抗原を認識するばかりでなく、CDRの近傍にあるFRのアミノ酸と配位し、CDRのループ構造の維持にも関与しているため、移植すべきCDRに隣接しているFRのアミノ酸配列と相溶性又は同一性の高いアミノ酸配列からなるヒトFRを利用することが好ましい。

[0075] 非ヒト動物由来のFRと相溶性又は同一性の高い公知のヒトFRの検索を、例えば、インターネットで利用可能な抗体に特化した検索システム（<http://www.bioinf.org.uk/abysis/>）を利用して行うことができる。このようにして得られたヒトFRの配列と一致するように、非ヒト由来の抗体のCDR以外の配列に変異を導入することができ

る。あるいは、検索によって得られたヒトFRのアミノ酸配列をコードする遺伝子（cDNA）が入手可能な場合は、その配列中に非ヒト由来CDRを導入してもよい。変異の導入等は核酸合成、部位特異的変異誘発などの当該分野で公知の技術を用いて行うことができる。

[0076] このようにして作製されたヒト化抗体の抗原への結合活性を定性的又は定量的に測定し、評価することによって、CDRを介して連結されたときに該CDRが良好な抗原結合部位を形成するようなヒト由来の抗体のFRが好適に選択できる。また必要に応じ、Sato, K. et al., Cancer Res, 1993, 53, 851-856等に記載の方法に沿って、ヒト化抗体のCDRが適切な抗原結合部位を形成するようにFRのアミノ酸残基を置換することもでき、さらに当該アミノ酸を置換した変異型抗体の抗原への結合活性を測定して評価することによって、所望の性質を有する変異FR配列を選択することができる。

[0077] さらに、本発明の抗体としては、上述の特定のアミノ酸配列又はその改変体を含む、可変領域又はCDRを保持する抗体に対し、HLA-DRへの結合において競合する抗体の態様もとり得る。言い換えれば、上述の特定のアミノ酸配列又はその改変体を含む、可変領域又はCDRを保持する抗体が結合性を示すエピトープに結合する抗体の態様もとり得る。

[0078] 本発明において「エピトープ」とは、抗原中に存在する抗原決定基、すなわち抗体中の抗原結合ドメインが結合する抗原上の部位を意味する。したがって、本発明におけるエピトープは、アミノ酸の一次配列中において連続する複数のアミノ酸からなるポリペプチド（線状エピトープ）であってもよく、アミノ酸の一次配列中において隣接していないアミノ酸が、ペプチド又はタンパク質の折り畳み等の三次元構造によって近傍にくることにより形成されるポリペプチド（不連続エピトープ、構造的エピトープ）であってもよい。また、かかるエピトープとしては、典型的には、少なくとも3つ（例えば4つ）、最も普通には少なくとも5つ（例えば、6～20個、7～15個、8～10個）のアミノ酸からなる。

- [0079] また、抗体が得られた場合、当業者であれば、その抗体が反応性を示す抗原上のペプチド領域（エピトープ）を特定して、そのペプチド領域に結合する種々の抗体を作製し得る。さらに、二つの抗体が同一又は立体的に重なり合ったエピトープと結合するかどうかは、競合アッセイ法により決定することができる。
- [0080] 本発明において抗体の「機能的断片」とは、抗体の一部分（部分断片）であって、HLA-DRを認識するものを意味する。具体的には、Fab、Fab'、F(ab')₂、可変領域断片（Fv）、ジスルフィド結合Fv、単鎖可変領域断片（一本鎖Fv、scFv）、sc(Fv)₂、及びこれらの重合体等が挙げられる。
- [0081] ここで「Fab」とは、1つの軽鎖及び重鎖の一部からなる免疫グロブリンの一価の抗原結合断片を意味する。抗体のパパイン消化によって、また、組換え方法によって得ることができる。「Fab'」は、抗体のヒンジ領域の1つ又はそれより多いシステインを含めて、重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端でのわずかの残基の付加によって、Fabとは異なる。「F(ab')₂」とは、両方の軽鎖と両方の重鎖の部分からなる免疫グロブリンの二価の抗原結合断片を意味する。
- [0082] 「可変領域断片（Fv）」は、完全な抗原認識及び結合部位を有する最少の抗体断片である。Fvは、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域が非共有結合により強く連結されたダイマーである。「単鎖可変領域断片（一本鎖Fv、scFv）」は、抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、これらの領域は、単一のポリペプチド鎖に存在する。「sc(Fv)₂」は、2つの重鎖可変領域及び2つの軽鎖可変領域をリンカー等で結合して一本鎖にしたものである。
- [0083] 本発明の抗体は、ハイブリドーマ法によって作製することができ、また組換えDNA法によって作製することができる。ハイブリドーマ法としては、代表的には、コーラー及びミルスタインの方法（Kohler & Milstein, Nature, 256:495（1975））が挙げられる。この

方法における細胞融合工程に使用される抗体産生細胞は、抗原（HLA-D R、その部分ペプチド、それらにFcタンパク質等が融合してあるタンパク質、またはこれらを発現する細胞等）で免疫された動物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、サル、ヤギ）の脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血白血球等である。免疫されていない動物から予め単離された上記の細胞又はリンパ球等に対して、抗原を培地中で作用させることによって得られた抗体産生細胞も使用することが可能である。ミエローマ細胞としては公知の種々の細胞株を使用することが可能である。抗体産生細胞及びミエローマ細胞は、それらが融合可能であれば、異なる動物種起源のものでもよいが、好ましくは、同一の動物種起源のものである。ハイブリドーマは、例えば、抗原で免疫されたマウスから得られた脾臓細胞と、マウスミエローマ細胞との間の細胞融合により産生され、その後のスクリーニングにより、HLA-D Rを認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得ることができる。HLA-D Rを認識するモノクローナル抗体は、ハイブリドーマを培養することにより、また、ハイブリドーマを投与した哺乳動物の腹水から、取得することができる。

[0084] 組換えDNA法は、上記本発明の抗体をコードするDNAをハイブリドーマやB細胞等からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主細胞（例えば、HEK細胞等の哺乳類細胞株、大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞等）に導入し、本発明の抗体を組換え抗体として産生させる手法である（例えば、P. J. Delves, *Antibody Production: Essential Techniques*, 1997 WILEY、P. Shepherd and C. Dean *Monoclonal Antibodies*, 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS、Vandamme A. M. et al., *Eur. J. Biochem.* 192: 767-775 (1990)）。本発明の抗体をコードするDNAの発現においては、重鎖又は軽鎖をコードするDNAを別々に発現ベクターに組み込んで宿主細胞を形質転換してもよく、重鎖及び

軽鎖をコードするDNAを単一の発現ベクターに組み込んで宿主細胞を形質転換してもよい（国際公開第94／11523号 参照）。本発明の抗体は、上記宿主細胞を培養し、宿主細胞内又は培養液から分離・精製し、実質的に純粋で均一な形態で取得することができる。抗体の分離・精製は、通常のポリペプチドの精製で使用されている方法を使用することができる。トランスジェニック動物作製技術を用いて、抗体遺伝子が組み込まれたトランスジェニック動物（ウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ等）を作製すれば、そのトランスジェニック動物のミルクから、抗体遺伝子に由来するモノクローナル抗体を大量に取得することも可能である。

[0085] 本発明は、上記本発明の抗体をコードするDNA、該DNAを含むベクター、該DNAを保持する宿主細胞、及び該宿主細胞を培養し、抗体を回収することを含む抗体の生産方法をも提供することができる。

[0086] <キメラ抗原受容体>

後述の実施例に示すとおり、本発明の抗体の標的であるHLA-DRは、血液がん特異的な細胞表面抗原となる。また、本発明の抗体の可変領域は、キメラ抗原受容体（CAR）及びそれを発現するT細胞（所謂CAR-T）において有用である。よって、本発明は、HLA-DRに結合する抗体又はその可変領域と、膜貫通領域と、細胞内シグナル領域とを含む、CARの態様もとりに得る。

[0087] 本発明において、「キメラ抗原受容体（Chimeric Antigen Receptor: CAR）」は、細胞外領域となるHLA-DRに結合する領域と、膜貫通領域と、細胞内シグナル領域とが、その順にてN末端側から配置され、直接又は間接的に連結されてなる、キメラタンパク質を意味する。

[0088] 本発明において、「HLA-DRに結合する領域（抗原結合性領域）」は、例えば、上述の抗体又はその機能的断片を用いることができるが、通常CARには、scFvが用いられる。

[0089] 「scFv」は、上述のとおり、モノクローナル抗体（免疫グロブリン）

の軽鎖可変領域と重鎖可変領域がリンカーを介して連結された構造体であり、抗原との結合能を保持している。s c F vにおけるN末端側の順としては、軽鎖可変領域、リンカー、重鎖可変領域であってもよく、また重鎖可変領域、リンカー、軽鎖可変領域であってもよい。

[0090] s c F vにおける「リンカー」としては、例えばペプチドリンカーを用いることができる。リンカーの長さは特に限定されない。例えば、アミノ酸数が5～25個のリンカーを用いることができる。リンカーの長さは好ましくは8～25アミノ酸、さらに好ましくは15～20アミノ酸である。ペプチドリンカーの好適な例として、グリシン又はグリシン及びセリンを含むペプチドリンカー（G G S リンカー、G S リンカー、G G G リンカー、W h i t l o w / 2 1 8 リンカー等）が挙げられる。これらリンカーを構成するアミノ酸であるグリシンとセリンは、それ自体のサイズが小さく、リンカー内で高次構造が形成されにくいという利点を有する。

[0091] s c F vの基となるモノクローナル抗体としては、特に制限はないが、例えば、上述の非ヒト動物由来の抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体が挙げられる。また、好適な例としても上述のとおりである。

[0092] 本発明において「膜貫通領域」は、細胞膜を貫通する機能を有し、C A R を細胞膜に繫留し得るポリペプチドであれば特に制限はない。膜貫通領域を担うポリペプチドの由来となるタンパク質としては、例えば、C D 2 8、C D 3 ζ、C D 3 ε、4-1 B B、C D 4 5、C D 4、C D 5、C D 8 α、C D 8 β、C D 9、C D 1 6、C D 2 2、C D 3 3、C D 3 7、C D 6 4、C D 8 0、C D 8 6、C D 1 3 4、C D 1 3 7、I C O S、C D 1 5 4、G I T R、T細胞受容体のα鎖及びβ鎖が挙げられる。

[0093] 本発明において「細胞内シグナル領域」は、C A R が細胞膜上に配置された際に細胞内に配置される領域であり、免疫細胞のエフェクター機能の発揮に必要なシグナルを伝達すること、すなわち、抗原結合性領域が抗原（H L A - D R）と結合した際、免疫細胞の活性化に必要なシグナル（所謂一次シグナル）を伝達することが可能な領域である。このような細胞内シグナル領

域としては、一般的に、T細胞受容体（TCR）及びCD3複合体といった活性化シグナル伝達ドメインのみを有するもの（第1世代CAR）、活性化シグナル伝達ドメインに加えて共刺激分子由来の共刺激シグナル伝達ドメイン（例えば、CD28又は4-1BBの細胞内ドメイン）を有するもの（第2世代CAR）、活性化シグナル伝達ドメインに加えて複数の共刺激シグナル伝達ドメイン（例えば、CD28及び4-1BBの細胞内ドメイン）を有するもの（第3世代CAR）がある。また、CD79A細胞内領域及びCD40細胞内領域を含むものも挙げられる（Mol Ther 2021 Sep 1; 29(9): 2677-2690. 参照）。

[0094] 「細胞内シグナル領域」は、前記のように、一次シグナルを伝達することが出来ればよく、当該シグナルに關与するタンパク質の活性化シグナル伝達ドメインを用いることができる。一次シグナル伝達には、免疫受容体活性化チロシンモチーフ（immunoreceptor tyrosine-based activation motif: ITAM）が關与することが知られている。ITAMを有するタンパク質としては、例えば、CD3 ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、DAP10、DAP12が挙げられる。

[0095] 本発明においてCARが含む細胞内シグナル領域の数は、1つに限定されず、複数の細胞内シグナル領域を含むこともできる（例えば、1～5個、1～3個、又は1個若しくは2個のシグナル伝達因子を含むこともできる）。この場合、含む複数の細胞内シグナル領域は、同じものであってもよいし、異なるものであってもよい。

[0096] 本発明のCARは、上述の抗原結合領域、膜貫通領域及び細胞内シグナル領域に加えて、他のドメインを含むこともできる。他のドメインの例としては、共刺激伝達領域、スペーサー配列、シグナルペプチド等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0097] T細胞上に発現する共刺激分子は、抗原提示細胞上に発現する各共刺激分

子に特異的なリガンドとの結合により、細胞内に共刺激シグナルを伝達し、T細胞の活性化を補助することが知られている（二次シグナル伝達）。本発明において「共刺激伝達領域」とは、前記のような共刺激分子の共刺激シグナル伝達に関与する細胞内ドメインを意味する。共刺激分子の例としては、CD28、4-1BB（CD137）、OX40（CD134）、ICOS、CD2、CD4、CD5、CD8 α 、CD8 β 、CD154等が挙げられる。本発明のCARは、これら共刺激分子の共刺激伝達領域を含むことができる。

[0098] 本発明のCARが含み得る共刺激伝達領域の数は、1つに限定されず、複数であってもよい。本発明のCARは、共刺激伝達領域を、例えば、1～5個、1～3個、又は1個若しくは2個含むことができる。本発明のCARが、複数の共刺激シグナル伝達域を含む場合、当該域は、同じものであってもよく、また異なるものであってもよい。

[0099] 本発明において「スペーサー」は、各領域等の間を連結する配列を意味し、各領域の機能を抑制しない限り特に制限はなく、またそのアミノ酸数も特に制限されるものではないが、通常1～500アミノ酸、好ましくは5～300アミノ酸であり、さらに好ましくは10～100アミノ酸である。

[0100] スペーサーの配列は特に限定されないが、例えば、IgG、好ましくはヒトIgG（例えばサブタイプIgG1やIgG4）のヒンジ部又はその一部、ヒンジ部とCH2の一部、或いは膜貫通ドメインに利用する因子（例えばCD28）の一部等の配列をスペーサーに用いることができる。なお、ヒンジ部又はその一部の配列を利用することにより、柔軟性に富むスペーサーが構成されることを期待できる。

[0101] 本発明において「シグナルペプチド」は、CARの分泌を促すため、または細胞膜への局在化を指示するためのペプチドを意味し、リーダー配列とも称される。シグナルペプチドは、通常、抗原結合領域のN末端に直接又は間接的に結合され得る。また任意で、細胞プロセッシング及び細胞膜へのCARの局在化中に抗原結合領域から、シグナルペプチドは切断されてもよい。か

かるシグナルペプチドの例としては、免疫グロブリン（IgK等）、ヒトGM-CSF受容体、T細胞受容体の α 鎖及び β 鎖、CD8 α 、CD8 β 、CD3 ζ 、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、ICOS、CD154、GITR等のシグナルペプチドが挙げられる。

[0102] 以上、本発明のCARにおける各領域等の例について説明したが、これら領域等に関する具体的なアミノ酸配列は、当業者であれば、公知の文献やNCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>) 等のデータベースを検索して適宜入手することができる。さらに、本願の配列表において具体的な配列も開示してある。また、このような典型的なアミノ酸配列（例えば、NCBI レファレンスシーケンス）に限らず、本発明に係る領域等は、当該領域が担う機能を維持している限り、それら典型的なアミノ酸配列に対する改変体、相同体も含み得る。また、かかる改変体、相同体は、典型的なアミノ酸配列に対し、通常高い相溶性又は同一性を有する。高い相溶性又は同一性は、通常60%以上であり、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上（例えば、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上）である。

[0103] また、本発明のCARは、1種のポリペプチドからなる分子であってもよいし、2種以上のポリペプチドの複合体からなる分子であってもよい。また、本発明のCARは、ポリペプチド又はその複合体からなる分子であってもよいし、ポリペプチド又はその複合体に、他の物質（例えば、蛍光物質、放射性物質、無機粒子等）が連結してなるものであってもよい。

[0104] 本発明のCARは、化学修飾されたものであってもよい。本発明のCARを構成するポリペプチドは、C末端がカルボキシル基（-COOH）、カルボキシレート（-COO⁻）、アミド（-CONH₂）、エステル（-COOR）のいずれであってもよい。ここでエステルにおけるRとしては、例えば

、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル等のC 1-6アルキル基；例えば、シクロペンチル、シクロヘキシル等のC 3-8シクロアルキル基；例えば、フェニル、 α -ナフチル等のC 6-12アリール基；例えば、ベンジル、フェネチル等のフェニル-C 1-2アルキル基； α -ナフチルメチル等の α -ナフチル-C 1-2アルキル基等のC 7-14アラルキル基；ピバロイルオキシメチル基等が用いられる。本発明のCARを構成するポリペプチドは、C末端以外のカルボキシル基（又はカルボキシレート）が、アミド化又はエステル化されていてもよい。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステル等が用いられる。さらに、本発明のCARを構成するポリペプチドには、N末端のアミノ酸残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基等のC 1-6アルカノイル等のC 1-6アシル基等）で保護されているもの、生体内で切断されて生成し得るN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基等）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基等のC 1-6アルカノイル基などのC 1-6アシル基等）で保護されているものも包含される。

[0105] また、本発明のCARは、他の機能性タンパク質を有していてもよい。他の機能性タンパク質としては特に制限はなく、本発明のCARに付与したい機能に応じて適宜選択される。例えば、CARの精製及び検出を容易にする目的で用いる機能性タンパク質としては、Mycタグ、Hisタグ、HAタグ、FLAGタグ（登録商標、Sigma-Aldrich社）、蛍光タンパク質タグ（GFP等）等が挙げられる。

[0106] 本発明のキメラ抗原受容体は、酸又は塩基との薬学的に許容される塩の形態であってもよい。塩は、薬学的に許容される塩である限り特に限定されず、酸性塩、塩基性塩のいずれも採用することができる。例えば、酸性塩の例としては、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩等の無機酸塩；酢酸塩、プロピオン酸塩、酒石酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、リンゴ

酸塩、クエン酸塩、メタンスルホン酸塩、パラトルエンスルホン酸塩等の有機酸塩；アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩等のアミノ酸塩等が挙げられる。また、塩基性塩の例として、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩等が挙げられる。本発明のキメラ抗原受容体は、溶媒和物の形態であってもよい。溶媒は、薬学的に許容されるものであれば特に限定されず、例えば水、エタノール、グリセロール、酢酸等が挙げられる。

[0107] なお、これまでにCARを利用した実験、臨床研究等の報告がいくつかあり（例えば、Rossig C, et al. Mol Ther 10:5-18, 2004; Dotti G, et al. Hum Gene Ther 20:1229-1239, 2009; Ngo MC, et al. Hum Mol Genet 20 (R1):R93-99, 2011; Ahmed N, et al. Mol Ther 17:1779-1787, 2009; Pule MA, et al. Nat Med 14:1264-1270, 2008; Louis CU, et al. Blood 118:6050-6056, 2011; Kochenderfer JN, et al. Blood 116:4099-4102, 2010; Kochenderfer JN, et al. Blood 119:2709-2720, 2012; Porter DL, et al. N Engl J Med 365:725-733, 2011; Kalos M, et al. Sci Transl Med 3:95ra73, 2011; Brentjens RJ, et al. Blood 118:4817-4828, 2011; Brentjens RJ, et al. Sci Transl Med 5:177ra38, 2013）、これらの報告を参考にして、本発明のCARを構築することができる。また、後述の実施例において、具体的な配列等も示しているため、これらを参考にして本発明のCARを構築することもできる。

[0108] <キメラ抗原受容体をコードするヌクレオチド>

本発明は、本発明のCARをコードするポリヌクレオチドを提供する。scFv等の抗原結合領域をコードするヌクレオチド配列の情報については、例えば、その基となるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマのヌクレオチド配列を解析することによって入手することができる。

[0109] また、抗原結合性領域以外の、本発明のCARにおける各領域等をコードする具体的なヌクレオチド配列は、当業者であれば、公知の文献やNCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>) 等のデータベースを検索しても適宜入手することができる。さらに、上記領域等をコードするヌクレオチド配列は、公知のものに限定されず、上記各領域等をコードするヌクレオチド配列であれば用いることができる。遺伝子コードの縮重により、1つのアミノ酸に対応するコドンは複数存在する。したがって、同一のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は多数存在する。本発明のポリヌクレオチドのヌクレオチド配列は、本発明のCARをコードする限り、遺伝子コードの縮重によって生じる複数のヌクレオチド配列のいずれであってもよい。さらにまた、CARを発現する細胞における発現を最適化するために、本発明のCARにおける各領域等をコードするヌクレオチド配列において、アミノ酸をコードするために選択されるコドンは改変されてもよい。

[0110] そして、当業者であれば、このようなヌクレオチド配列情報に基づき、化学合成する方法（ホスホロアミダイト法等）や、PCRによって増幅する方法等の公知の技術を用い、各領域等をコードするポリヌクレオチドを作製することができる。さらに、このようにして得られた各領域等をコードするポリヌクレオチドを、直接又はスペーサーを介して連結することにより、本発明のCARをコードするポリヌクレオチドを得ることができる。なお、各領域等をコードするポリヌクレオチドの連結は、後述の実施例において示すように、例えば、オーバーラップ伸長PCR法等の公知の方法を用いて行うことができる。

[0111] <キメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチドを含むベクター>

本発明は、上述のポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。本発明のベクターとしては直鎖状でも環状でもよく、例えば、ウイルスベクター、プラスミドベクター、エピソーマルベクター、人工染色体ベクター、トランスポゾンベクターが挙げられる。

[0112] ウイルスベクターとしては、例えば、レンチウイルス等のレトロウイルスベクター、センダイウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、ポリオウイルスベクター、シンドビスウイルスベクター、ラブドウイルスベクター、パラミクソウイルスベクター、オルソミクソウイルスベクターが挙げられる。

[0113] プラスミドベクターとしては、例えば、p c D N A 3. 1、p A 1-11、p X T 1、p R c / C M V、p R c / R S V、p c D N A 1 / N e o等の、動物細胞発現用プラスミドベクターが挙げられる。

[0114] エピソーマルベクターは、染色体外で自律複製可能なベクターである。エピソーマルベクターを用いる具体的手段は、公知である（Y u ら、S c i e n c e、2009年、324, 797-801ページ 参照）。エピソーマルベクターとしては、例えば、EBV、SV40等に由来する自律複製に必要な配列をベクター要素として含むベクターが挙げられる。自律複製に必要なベクター要素としては、具体的には、複製開始点と、複製開始点に結合して複製を制御するタンパク質をコードする遺伝子であり、例えば、EBVにあっては複製開始点oriPとEBNA-1遺伝子、SV40にあっては複製開始点oriとSV40LT遺伝子が挙げられる。

[0115] 人工染色体ベクターとしては、例えば、YAC（Yeast artificial chromosome）ベクター、BAC（Bacterial artificial chromosome）ベクター、PAC（P1-derived artificial chromosome）ベクターが挙げられる。

[0116] これらベクターにおいて、増殖が緩やかな細胞であっても高効率に遺伝子

を導入し易く、また安定発現株の樹立が容易であるという観点から、レトロウイルスベクターが好ましい。

[0117] 本発明のベクターには、上述のCARをコードするポリヌクレオチドの他に、プロモーター、エンハンサー、ポリA付加シグナル、ターミネーター等の発現制御配列、複製開始点や複製開始点に結合して複製を制御するタンパク質をコードするヌクレオチド配列、他のタンパク質をコードするヌクレオチド等を含んでいてもよい。

[0118] 上述のCARをコードするポリヌクレオチドや後述の他のタンパク質をコードするヌクレオチドは、プロモーターの下流に作動可能に配置することで、各ポリヌクレオチドを効率よく転写することが可能となる。かかる「プロモーター」としては、例えば、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、SR α プロモーター、SV40初期プロモーター、レトロウイルスのLTR、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、HSV-TK（単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ）プロモーター、EF1 α プロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター等が挙げられる。

[0119] 「他のタンパク質をコードするヌクレオチド」としては、例えば、蛍光タンパク質遺伝子、レポーター遺伝子、薬剤耐性遺伝子等のマーカー遺伝子、サイトカイン等のT細胞活性化に関与する分子をコードする遺伝子等を挙げることができる。さらに、後述の実施例に示す、細胞内ドメインを持たないEGFR (truncated EGFR, tEGFR) も挙げられる。また、例えば、IRES、2Aペプチド配列（例えば、Thosea signa由来の2Aペプチド(T2A)）をコードするDNA等を用いることにより、前記他のタンパク質は上述のCARと共にポリシストロニックに発現させることが可能となる。

[0120] さらに、CARを発現する細胞を投与した対象（血液がん患者等）の体内で、投与したCAR発現細胞のアポトーシスを適宜誘導するため、自殺遺伝子を「他のタンパク質をコードするヌクレオチド」として、本発明のベクタ

ーは含み得る。自殺遺伝子としては、例えば、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ（HSV-TK）、誘導性カスパーゼ9（inducible caspase 9: iCasp9）が挙げられる。また、かかる遺伝子の機能を活性化する薬剤としては、HSV-TKに対してはガンシクロビル、iCasp9に対しては二量体誘導化合物（chemical induction of dimerization: CID）であるAP1903等を挙げることができる（Cooper L.J. ら、Cytotherapy, 2006; 8 (2) : 105-17ページ、Jensen M. C. ら、Biol Blood Marrow Transplant, 2010 Sep; 16 (9) : 1245-56ページ、Jones BS.、Front Pharmacol, 2014 Nov 27; 5 : 254.、Minagawa K., Pharmaceuticals (Basel), 2015 May 8; 8 (2) : 230-49ページ、Bole-Richard E., Front Pharmacol, 2015 Aug 25; 6 : 174 参照）。

[0121] <キメラ抗原受容体を発現する細胞>

本発明は、本発明のCARを発現する細胞を提供する。本発明の細胞は、上述の本発明のCARをコードするポリヌクレオチド又はベクターを、細胞に導入することにより得ることができる。

[0122] 本発明のポリヌクレオチド又はベクターが導入される「細胞」は、哺乳動物由来の細胞であることが好ましく、例えば、ヒト由来の細胞、又は齧歯類（マウス、ラット等）、ウシ、ヒツジ、ウマ、イヌ、ブタ、サル等の非ヒト哺乳動物由来の細胞を用いることができる。細胞の種類は、特に限定されず、血液、骨髓液等の体液や、脾臓、胸腺、リンパ節等の組織、腫瘍やがん性腹水等から採取された細胞等を使用することができる。好ましい例としては、CAR発現用細胞として、免疫細胞を挙げることができる。

[0123] 「免疫細胞」としては、CD4陽性CD8陰性T細胞、CD4陰性CD8陽性T細胞、T細胞、 $\alpha\beta$ -T細胞、 $\gamma\delta$ -T細胞、NK細胞、NKT細胞

等を挙げることができる。かかる免疫細胞は、i P S細胞といった多能性幹細胞から調製されたものを含む。また、上記の如きリンパ球又は前駆細胞を含むものであれば、様々な細胞集団を用いることができる。すなわち、末梢血から採取されるP B M C（末梢血単核細胞）も免疫細胞の例として挙げられる。

[0124] 本発明のポリヌクレオチドの導入の前にC A R発現用細胞を活性化させてもよい。例えば、抗C D 3抗体及び抗C D 2 8抗体で刺激し、C A R発現用細胞を活性化させることができる。より具体的には、抗C D 3抗体と抗C D 2 8抗体で培養面をコートした培養容器（例えば培養皿）で培養することによって、抗C D 3抗体及び抗C D 2 8抗体による刺激を加えることができる。抗C D 3抗体と抗C D 2 8抗体がコートされた磁気ビーズ（例えば、V E R I T A S社が提供するD y n a b e a d s T - A c t i v a t o r C D 3 / C D 2 8）を利用して当該刺激を行うことも可能である。

[0125] また、後述の実施例に示すように、本発明の細胞の疲弊を防止するために、当該細胞の製造中に、チロシンキナーゼ阻害剤を培地に添加してもよい。かかるチロシンキナーゼ阻害剤としては、例えば、ダサチニブが挙げられる。

[0126] 細胞の生存率／増殖率を高めるために、活性化処理の際、T細胞増殖因子が添加された培養液を使用してもよい。T細胞増殖因子としてはI L - 2、I L - 1 5、I L - 7等を用いることができる。I L - 2、I L - 1 5、I L - 7等のT細胞増殖因子は常法に従って調製することができる。また、市販品を利用することもできる。ヒト以外の動物種のT細胞増殖因子の使用を排除するものではないが、通常、T細胞増殖因子はヒト由来のもの（組換え体であってもよい）を用いる。

[0127] 典型的には、その適用（対象への投与）のため、本発明のポリヌクレオチド導入後の細胞を増殖させる。例えば、T細胞増殖因子が添加された培養液を用いて本発明のポリヌクレオチド導入細胞を培養する（必要に応じて継代培養する）。この培養に加え、C A R発現用細胞の活性化の場合と同様の処

理（再活性化）を行うことにしてもよい。

[0128] なお、本発明の細胞の培養には、血清（ヒト血清、ウシ胎仔血清等）を添加した培地を用いてもよいが、無血清培地を採用することにより、臨床応用する際の安全性が高く、かつ血清ロット間の差による培養効率の違いが出にくいという利点を有する細胞を調製することが可能になる。血清を用いる場合には、自己血清、すなわち、本発明の細胞の投与を受ける対象から採取した血清を用いることが好ましい。

[0129] また、本発明の細胞は、過剰な免疫反応等を抑えるタンパク質（免疫チェックポイント物質等）の機能が抑制されている細胞であってもよい。かかるタンパク質としては、例えば、P r o g r a m m e d D e a t h 1（PD-1）、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、TIM-3、CEACAM（CEACAM-1、CEACAM-3、CEACAM-5等）、LAG-3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3（CD276）、B7-H4（VTEN1）、HVEM（TNFRSF14又はCD270）、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9が挙げられる。

[0130] また、本発明の細胞は、他家移植をし易くするために、内在性のTCR、HLA等のタンパク質の機能が抑制されている細胞であってもよい。

[0131] タンパク質の機能を抑制する方法としては、前記タンパク質をコードする遺伝子を標的とするノックアウト法、前記遺伝子の転写産物と相補的なdsRNA（二重鎖RNA、例えばsiRNA）を用いる方法、当該転写産物と相補的なアンチセンスRNAを用いる方法、前記転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有するRNAを用いる方法が挙げられる。また、部位特異的なヌクレアーゼ（例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）、CRISPR-Cas9等のDNA二本鎖切断酵素）を利用して、標的遺伝子を改変する方法であるゲノム編集法も、前記物質の機能を抑制するために好適に用いられる。

[0132] 本発明のポリヌクレオチド又はベクターを細胞に導入する方法としては、リポフェクション法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法等を挙げることができる。また、本発明のベクターがレトロウイルスベクターである場合、ベクターが有しているLTR配列及びパッケージングシグナル配列に基づいて適切なパッケージング細胞を選択し、これを使用してレトロウイルス粒子を調製してもよい。パッケージング細胞としては、例えば、PG13、PA317、GP+E-86、GP+envAm-12、Psi-Cripが挙げられる。また、トランスフェクション効率の高い293細胞や293T細胞をパッケージング細胞として用いることもできる。

[0133] また、本発明のポリヌクレオチド又はベクターを細胞に導入した後、当該細胞のCARの発現は、フローサイトメトリー、RT-PCR、ノーザンブロットティング、ウエスタンブロットティング、ELISA、蛍光免疫染色等の公知の方法により確認することができる。

[0134] <多重特異性抗体>

後述の実施例に示すとおり、本発明の抗体の標的であるHLA-DRは、血液がん特異的な細胞表面抗原となる。よって、当該抗原を目印として血液がん細胞に免疫細胞を誘導し、細胞傷害等を奏することが出来れば、当該疾患の治療等に資する。かかる免疫療法を可能とする態様として、多重特異性抗体が挙げられる。

[0135] 「多重特異性抗体」は、少なくとも2つの異なる抗原に対して結合特異性を有する、複数の抗原認識部位を保持するモノクローナル抗体を意味する。

[0136] 本発明において、多重特異性抗体は、上述の本発明の抗体又はその機能的断片と免疫細胞に対する抗原認識部位とを保持する。かかる免疫細胞としては、特に制限はなく、上記<キメラ抗原受容体を発現する細胞>における例示のとおりであるが、血液がん細胞等の標的細胞に細胞傷害等を奏し得るという観点から、エフェクター細胞であることが好ましい。エフェクター細胞としては、例えば、NK（ナチュラルキラー）細胞、単球、マクロファージ

、好酸球等が挙げられる、また、かかる細胞において、本発明の多重特異性抗体が認識し得る抗原としては、前記細胞の表面上に存在する刺激又は阻害受容体が挙げられる。より具体的には、CD3、CD16、B7-H4、BTLA、CD4、CD8、CD25、CD27、CD28、CD32、CD56、CD137、CTLA-4、GITR、HVEM、ICOS、LAG-3、NKG2D、OX40、PD-1、TIGIT、TIM-3、VISTA、4-1BB、NK-発現KIR、B7-1、B7-2、B7H3、PD-L1、PD-L2、TNFSF9等が例示される。

[0137] 本発明の多重特異性抗体の好ましい態様としては、二重特異性抗体（バイスペシフィック抗体）が挙げられ、より具体的には、BsDb（二重特異性ダイアボディ）、scBsDb（単鎖二重特異性ダイアボディ）、scBsTaFv（単鎖二重特異性タンデム可変ドメイン）、DNL-（Fab）3（ドック&ロック三価Fab）、sdAb（単ドメイン抗体）、Bs sdAb（二重単鎖複合体抗体）、Knobs-into-holes BsAb IgG、Ig-scFv融合型、Diabody-Fc融合型、二重可変領域抗体（DVD-IgG）が挙げられる。

[0138] また、かかる二重特異性抗体は、当業者であれば適宜公知の手法を用いることによって作製することが出来る。かかる公知の手法としては、例えば、HLA-DRを認識する抗体等を産生するハイブリドーマと免疫細胞を認識する抗体等を産生するハイブリドーマとの更なる融合細胞から産生させる方法（クワドローマ法）が挙げられる。また、これら異なる抗体の機能的断片（例えば、Fab）を化学的に架橋させる方法が挙げられる。さらに、これら異なる抗体の機能的断片をコードするDNAをリンカーを介して融合させ、得られたDNA構築物を宿主細胞に導入し、当該細胞から産生させる方法が挙げられる。さらにまた、Knob-into-Hole（Genentech）、Triomab/Quadroma（Trion Pharma/Fresenius Biotech）、CrossMAb（Roche）、electrostatic-matched（Amgen）、LUZ

—Y (Genentech)、Strand Exchange Engineered Domain body (SEEDbody) (EMD Serono)、Biclonic (Merus) Duo Body (Genmab A/S) 等の、異なる抗体又はその機能的断片のヘテロ二量体化を促進させる方法、国際公開第2008/119353号、国際公開第2011/131746号等に記載の、制御されたFab-ARM交換法 (CFAF法)、Chengbin Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-IgTM) Molecule、Springer Nature Experiments、2010に記載の方法が、挙げられる。

[0139] <抗体薬物複合体>

後述の実施例に示すとおり、本発明の抗体の標的であるHLA-DRは、血液がん特異的な細胞表面抗原となる。よって、本発明は、本発明の抗体（特にヒト化抗体）又はその機能的断片と、薬物とを結合させてなる、抗体薬物複合体 (ADC) の態様もとり得る。

[0140] 本発明のADCにおいて、抗体と結合させることができる「薬物」は、特に制限されるものではないが、例えば、当技術分野で公知の細胞傷害性物質が挙げられる。「細胞傷害性物質」としては、抗がん剤、例えば、イリノテカン (CPT-11)、イリノテカンの代謝産物SN-38 (10-ヒドロキシ-7-エチルカンプトテシン)、アドリアマイシン、タキソール、5-フルオロウラシル、ニムスチン、ラミニスチン、テモゾロミド等のアルキル化剤、ゲムシタビン、ヒドロキシカルバミド等の代謝拮抗剤、エトポシド、ビンクリスチン等の植物アルカロイド、マイトマイシン、ブレオマイシン等の抗がん性抗生物質、シスプラチン等の白金製剤、ソラフェニブ、エルロチニブ等の分子標的剤、メトトレキセート、シトシンアラビノシド、6-チオグアニン、6-メルカプトプリン、シクロフォスファミド、イフォスファミド、ブスルファン、MMAE (モノメチルアウリスタチンE)、DM1 (メ

ルタンシン)、カリキアマイシンが挙げられる。細胞傷害性物質としては、放射性同位体、例えば、 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{131}I 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{10}B 、 ^{111}In 、 ^{90}Y も挙げられる。細胞傷害性物質としては、細胞傷害活性を機能させる光感受性物質、より具体的には、光照射により活性化されることにより、それ自体が細胞傷害性(細胞毒性)を示す形態に変化する物質であってもよく、また細胞傷害性物質(細胞毒性物質)を生じさせる物質であってもよい。例えば、クロリン(chlorins)、クロリンe6、ポルフィマーナトリウム、タラポルフィンナトリウム、ベルテポルフィン、及びこれらの前駆体及び誘導体が挙げられる。また、細胞傷害性物質としては、毒性ペプチド、例えば、サボリン、リシン、志賀毒等のリボソーム不活化タンパク質(RIP)が挙げられる。

[0141] また、抗体と細胞傷害性物質との結合も、当該技術分野で公知の方法により行うことができ、直接的結合及び間接的結合のいずれでもよい。例えば、直接的な結合として、共有結合を利用することができる。間接的な結合としては、リンカーを介した結合を利用することができる。リンカーについての一般的な技術は、例えば、Hermanson, G. T. Bioconjugate Techniques, Academic Press, 1996; Harris, J. M. and Zalipsky, S. 編, Poly(ethylene glycol), Chemistry and Biological Applications, ACS Symposium Series, 1997; Veronese, F. and Harris, J. M. 編, Peptide and protein PEGylation. Advanced Drug Delivery Review 54 (4), 2002に記載されている。また、リンカーは、直鎖状のリンカー(2価のリンカー)であってもよく、分枝状のリンカー(3価以上のリンカー)であってもよい。

[0142] <医薬組成物>

本発明は、本発明の抗体若しくはその可変領域、又は、それを保持する抗

体構築物（上述の、キメラ抗原受容体を発現する細胞、多重特異性抗体、抗体薬物複合体（ADC）等。以下、単に「本発明の抗体等」とも称する）を有効成分とする医薬組成物（例えば、抗がん剤）、並びに本発明の抗体等の治療上の有効量を、対象に投与する工程を含んでなる、疾患（例えば、急性骨髄性白血病等の血液がん）の治療の方法をも提供するものである。

[0143] 本発明が対象とする「疾患」としては、HLA-DRを特異的な表面抗原として保持する細胞に関連する疾患であれば特に制限はないが、例えば、血液がんが挙げられ、より具体的には、急性骨髄性白血病、その類縁疾患（骨髄異形成症候群（MDS）、急性リンパ性白血病（ALL）、B細胞性悪性リンパ腫、多発性骨髄腫等）が挙げられる。「血液がん」は、原発性のがんであってもよく、再発性のがんであってもよく、続発性のがんであってもよく、転移性のがんであってもよい。「急性骨髄性白血病（acute myeloid leukemia: AML）」は、分化・成熟能が障害された幼若骨髄系細胞のクローナルな自律性増殖を特徴とする多様性に富む血液腫瘍を意味する。また、骨髄における異常な白血病細胞の急速な増殖、及びそれに伴い、正常な造血機能は著しく阻害されることを特徴とする血球の骨髄性系統のがんでもあり、白血球減少、貧血、血小板減少に伴う症状等を呈する。

[0144] 本発明の「医薬組成物」は、本発明の抗体等の他、薬理学上許容される他の成分を含むことができる。このような他の成分としては、例えば、担体、乳化剤、湿潤剤、pH緩衝化剤、培地、賦形剤、崩壊剤、緩衝剤、等張化剤、懸濁剤、可溶化剤、無痛化剤、安定剤、保存剤、防腐剤が挙げられる。より具体的に、薬理学上許容される他の成分としては、注射剤等の液状製剤の場合には、水溶液（生理食塩水、注射用水、リン酸塩緩衝液、葡萄糖水溶液、グリセロール水溶液等）、水酸化アルミニウム等を例として挙げることができる。また、凍結乾燥した製剤の場合、糖（マンニトール、ラクトース、サッカロース等）、アルブミン等を例として挙げることができるが、これらに限定されるものではない。さらに、本発明の医薬組成物は、上記成分が投

与前に混合され得るような、キットの態様であってもよい。また、注射剤として用いる場合には、シリンジに導入された形態であり得る。

[0145] 本発明の医薬組成物は、有効成分として、本発明の抗体等のみを含むものであってもよいし、当該抗体等及び少なくとも一つの他の抗がん剤を含むものであってもよい。また、本発明の抗体等は、他の抗がん剤と共に投与することもでき、これによって抗腫瘍効果を増強させることができる。このような目的で使用される他の抗がん剤は、本発明の抗体等と同時に、別々に、あるいは連続して対象に投与されてもよいし、それぞれの投与間隔を変えて投与してもよい。このような「抗がん剤」として、例えば、ベネトクラックス、アザシチジン、ダサチニブ、シタラビン（Ara-C、Cytosar-U）、エノシタビン、キザルチニブ（AC220）、ソラフェニブ（BAY 43-906）、レスタウルチニブ（CEP-701）、ミドスタウリン（PKC412）、カルボプラチン、カルムスチン、クロランブシル、ダカルバジン、イフォスファミド、ロムスチン、メクロレタミン、プロカルバジン、ペントスタチン、（2'-デオキシコホルマイシン）、エトポシド、テニポシド、トボテカン、ビンブラスチン、ピンクリスチン、パクリタキセル、デキサメタゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニソン、オールトランスレチノイン酸、三酸化ヒ素、インターフェロン α 、リツキシマブ（リツキサン（登録商標））、ゲムツズマブオゾガマイシン、メシル酸イマチニブ、シトサール-U、メルファラン、ブスルファン（ミレラン（登録商標））、チオテパ、ブレオマイシン、プラチナ（シスプラチン）、シクロホスファミド、サイトキサン（登録商標）、ダウノルビシン、ドキソルビシン、イダルビシン、ミトキサントロン、5-アザシチジン、クラドリビン、フルダラビン、ヒドロキシ尿素、6-メルカプトプリン、メトトレキサート、6-チオグアニン、免疫チェックポイント阻害薬（抗PD-1抗体等）、又は、それらの任意の組み合わせを挙げることができるが、抗腫瘍活性を有する薬剤であれば限定されることはない。また、本発明の医薬組成物、本発明の抗体等は、前述の抗がん剤を用いる化学療法に限らず、放射性療法、がん免疫療法等

の他のがん治療方法と併用してもよい。

- [0146] さらに、本発明の細胞を含む医薬組成物の場合には、他の成分として、細胞の保護を目的としてジメチルスルホキシド（DMSO）や血清アルブミン等、細菌の混入を阻止する目的で抗生物質等を含んでもよい。さらにまた、細胞の活性化、増殖又は分化誘導等を目的として、サイトカイン、成長因子、ステロイド等のT細胞活性化因子、ビタミン類、免疫賦活剤、免疫チェックポイント阻害剤を含んでもよく、また、本発明の細胞とこれら他の成分を併用してもよい。
- [0147] 医薬組成物の投与方法は、投与する物質の種類、組成物の態様、対象の年齢、体重、性別、健康状態等により異なるが、非経口投与（例えば、静脈投与、動脈投与、局所投与）、経口投与のいずれかの投与経路で投与することができる。好ましい投与方法は、非経口投与であり、より好ましくは静脈投与である。また、全身投与によらず、局所投与を行ってもよい。局所投与として、標的とする組織（骨髄等）への直接注入を例示することができる。
- [0148] 医薬組成物の投与量は、対象の年齢、体重、性別、健康状態、症状の進行の程度及び投与する医薬組成物の成分により変動しうる。また、投与スケジュールも、これら条件によって適宜調整され、単回投与の他、連続的又は定期的に複数回投与してもよいが、一般的に、抗体を静脈内投与の場合、成人には体重1 kg当たり1日0.1～1000 mg、好ましくは1～100 mgである。また、ADCを投与する場合には、含有する薬物量換算にて、成人には体重1 kg当たり1日0.001～1000 mg、好ましくは0.01～100 mgである。これら抗体又はADCの投与回数としては、例えば、1回、又は1日～1年間に1回の間隔（例えば、1週毎、10～30日毎、1月毎、3～6月毎、半年毎、1年毎）で複数回投与してもよい。
- [0149] また、本発明の治療方法における細胞（例えば、キメラ抗原受容体を発現する細胞）の投与量としては、例えば、1回の投与において、成人には体重1 kg当たり投与細胞の個数として、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^{10}$ 個（好ましくは $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^9$ 個、より好ましくは $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ 個）とする

ことができる。投与間隔としては、例えば、1週毎、10～30日毎、1月毎、3～6月毎、1年毎等とすることができる。また、本発明の細胞は、投与対象の体内で自律的に増殖できるため、1回きりの投与とすることもできる。また、投与後に体内の本発明の細胞数をモニタリングし、その結果に応じて投与時期を決定するようにしてもよい。

[0150] 本発明において、本発明の抗体等を投与される「対象」としては、例えば、血液がん等に罹患しているヒト、血液がん等が再発するおそれがあるヒト、血液がん等が再発したヒトが挙げられる。また本発明において、「治療」とは、血液がん等に特徴的な症状又は随伴症状を緩和すること（軽症化）、症状の悪化を阻止ないし遅延すること、血液がん細胞増多等の臨床検査値異常を改善すること等が含まれる。さらに、血液がんの再発の防止、遅延又は危険性の低下も含まれる。

[0151] 特に、本発明の抗体等体は、HLA-D Rに対してアレル特異性を示し得るので、HLA-D R不一致同種移植後再発の血液がん患者等で、レシピエント（血液がん患者等）のHLA-D R型が本発明の抗体等が結合する陽性型で、ドナーのHLA-D R型が本発明の抗体等が結合しない陰性型である場合には、移植を受けた患者本人あるいはドナー由来の細胞から作ったCAR-T細胞等はレシピエントの血液がんを特異的に攻撃することが可能となる。

[0152] また、本発明の抗体は、正常血液細胞の中では、B細胞など一部の細胞にしか結合せず、単球等には結合しないうえ、全ての血液細胞の源となる造血幹細胞の一部にしか結合しないので、本発明の抗体等が結合する陽性型のHLA-D Rを有する血液がん患者等における通常の自家CAR-T細胞等を治療に用いたとしても、血液がん細胞は排除され、正常造血は本発明の抗体等が結合しない陰性型の細胞で保たれ、治療することが可能となる。

実施例

[0153] 以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。本実施例は、以下に示す材料及び方法

を用いて行った。

[0154] (患者検体)

急性骨髄性白血病 (AML) 患者由来の骨髄は同意を取った後、腸骨から採取した。単核球細胞は F i c o l l P a q u e (G E H e a l t h c a r e) を用いて分離し、解析に用いた。

[0155] (抗AMLモノクローナル抗体の作製)

6週齢のBALB/cマウス (C L E A J a p a n) の足底にAML細胞株 (K G 1 a、T H P - 1、U 9 3 7、H L 6 0、M O L M - 1 3) を注入して免疫した。4回の免疫後に膝窩リンパ節から採取したリンパ球と S P 2 / 0 マウスミエローマ細胞を P E G 1 5 0 0 (R o c h e A p p l i e d S c i e n c e) を用いて細胞融合した後、HAT培地で 9 6 w e l l p l a t e に播種し、ハイブリドーマを選択した。AML細胞に結合し、正常血液細胞に結合しないモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを同定するために、まず、AML細胞株を各ハイブリドーマ上清中のモノクローナル抗体と反応させ、その後、PE標識抗マウスIgG抗体 (B i o L e g e n d 4 0 5 3 0 7) と反応させフローサイトメトリーで解析した。次に、健常人由来末梢血単核球 (P B M C) を同様に染色し、正常血液細胞に結合しないモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択した後、細胞と上清を保存し、その後の解析に用いた。

[0156] (フローサイトメトリー解析)

単細胞浮遊液を蛍光標識抗体で染色した。染色には、a n t i - C D 3 4 - A P C (8 G 1 2, B D B i o s c i e n c e s), a n t i - C D 3 8 - F I T C (H I T 2, B i o l e g e n d), a n t i - C D 3 - C y 7 P E (U C H T 1, B i o L e g e n d), a n t i - C D 1 9 - C y 7 A P C (H I B 1 9, B i o L e g e n d), a n t i - C D 1 4 - B V 5 1 0 (M 5 E 2, B i o l e g e n d), a n t i - H L A - D R - A P C (L 2 4 3, B i o l e g e n d), a n t i - C D 1 1 c - F I T C (B u 1 5, B i o l e g e n d), a n t i - C D 1 9 - P E (H I B 1 9

, Biolegend), anti-CD279-BV510 (EH12.2H7, Biolegend), anti-CD223-FITC (11C3C65, Biolegend), anti-CD366-PE (F38-2E2, Biolegend), goat anti-mouse IgG-PE (405307, BioLegend), goat anti-mouse F(ab')₂-Alexa Fluor 647 (115-605-072, Jackson ImmunoResearch), Biotin-conjugated anti-EGFR antibody (Erbitux), Streptavidin-PE (405204, Biolegend) を用いた。KG2032 (mouse IgG2a) は Protein G Sepharose4 Fast Flow (GE Healthcare) を用いて精製し、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で染色に用いた。解析と細胞の sorting は FACS Canto II あるいは FACS Aria II (BD Bioscience) を用いて行った。データは FlowJo software を用いて解析した。活性化 T 細胞を用いた解析のためには、健常人由来 PBMC を $1 \times 10^6/\text{ml}$ で $3\mu\text{g}/\text{ml}$ の PHA 存在下で 3 日間刺激した。

[0157] (CRISPR gRNA library を用いた KG2032 の抗原の同定)

始めに、Cas9 タンパクを発現する Daudi 細胞のクローンの取得を行った。具体的にはまず、Daudi 細胞に Cas9 発現レンチウイルスベクター感染させ、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の Blasticidin を 4 日間加えてベクターが導入された細胞を選択した後、96well プレートにて single-cell sorting を行った。それらを増幅した後、Cas9 reporter (Tzelepis K et al., Cell Rep. 2016; 17(4): 1193-205, 参照) を導入することによりノックアウト効率の良いクローンを選択した。

[0158] 次に、このようにして得られた、Cas9 タンパクを発現する Daudi

細胞のクローンに、Human Genome-wide Knockout CRISPR Library (京都大学 遊佐研究室から供与) を約 30% の導入効率になるように感染させた後、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ の puromycin を 3 日間加え CRISPR library が導入された細胞の選択を行った。その細胞をさらに増やし、 2×10^8 個の細胞を KG2032 で染色し、KG2032 の結合が弱い (KG2032 low) 5% の分画から 5×10^6 個 sorting した。Sort 後の細胞から DNeasy Blood & Tissue Kits (QIAGEN) で DNA 抽出を行い、NGS 解析を行った。Sort 前の 5×10^7 細胞からも、Blood & Cell Culture DNA Maxi Kit (QIAGEN) を用い DNA 抽出を行い、コントロールとした。

[0159] (ノックアウト細胞の作製)

HLA-DR のノックアウトを行うための guide RNA (gRNA) の合成を、GeneArt Precision gRNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。gRNA は以下の 2 種類を作製した：

gRNA 配列 (1) : GTGCGCTTCGACAGCGACGT (配列番号 : 31) ,

gRNA 配列 (2) : GACGGAGCGGGTGCGGTTCC (配列番号 : 32) 。

[0160] 2×10^5 個の Daudi 細胞に TrueCut Cas9 Protein v2 (Thermo Fisher Scientific) $1 \mu\text{g}$ と作製した gRNA 200ng を、NEON Transfection System (invitrogen) により遺伝子導入した。9 日後に anti-HLA-DR-APC で染色し、HLA-DR がノックアウトされた細胞を sorting し、解析に用いた。

[0161] (KG2032 のエピトープの同定)

HLA-DRB1*1454 (KG2032 陽性) と HLA-DRB1*

1502 (KG2032陰性)の5種類のキメラをoverlapping PCRにより作製した。作製したキメラをレトロウイルスベクターによりKG2032に遺伝子導入し、2日後にKG2032とL243で染色し、結合の有無をフローサイトメトリーで解析した。

[0162] (キメラ抗原受容体 (CAR) の構築と作製 1)

KG2032の可変部をコードするcDNAをSMARTer RACE 5' / 3' Kit (Takara) を用い、5' RACE法により取得し、配列を同定した。そして、図8Aに示すとおり、軽鎖 (VL) と重鎖 (VH) とを、リンカー配列を介して、overlapping PCR法を用い、融合した。さらに、それと、CD28及びCD3ζ、又は、CD8α、4-1BB及びCD3ζとを、overlapping PCR法により融合したもの (図8Aに示す「28ζ」、「BBζ」) をレトロウイルスベクターに挿入し、KG2032-CAR発現ベクターを作製した (なお、各々「KG2032-CD28-CD3ζ-CAR」、「KG2032-BBζ-CAR」とも称する)。抗EGFR抗体で導入効率を測定できるようにするため、細胞内領域を欠損させたEGFRの配列を、KG2032-CAR発現ベクターのCD3ζの後にT2A配列に引き続く形で付加した。

[0163] (CAR-T細胞の作製)

各KG2032 CAR発現ベクターを、Gag-polベクター、VSV-Gベクターと一緒にLipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて293T細胞に導入した後、48時間及び72時間後の上清を回収し、ウイルスベクターを作製した。健常人由来PBMCを抗CD3抗体 (OKT3, eBioscience) 及び抗CD28抗体 (CD28.2, eBioscience) で刺激し、活性化したT細胞を作製しておき、ウイルスが含まれる上清を感染させた。その後、CARが導入されたT細胞を100 IU/mlのIL-2を添加したmediumで6日間培養した。Dasatinibを加える場合は、4-6日目に1 μMの濃度で添加した。6日目に、goat anti-mouse F(ab')₂

- Alexa Fluor 647 (115-605-072, Jackson ImmunoResearch) あるいは biotin-conjugated anti-EGFR antibody を用いて CAR の導入効率を解析した。

[0164] (サイトカイン産生の測定 1)

KG2032 CAR-T 細胞あるいはコントロール T 細胞のサイトカイン産生を Human IFN- γ Quantikine ELISA Kit / Human IL-2 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems) で測定した。具体的には、エフェクター細胞とターゲット細胞をそれぞれ 1×10^5 個ずつ 96 well plate で共培養し、16~24 時間後の上清を標準曲線の範囲に収まるように希釈して測定した。

[0165] (細胞傷害活性の測定 1)

T 細胞の腫瘍細胞傷害能は ^{51}Cr release assay により測定した。 5×10^5 の target 細胞に $25 \mu\text{Ci}$ の ^{51}Cr クロム酸ナトリウム溶液 (PerkinElmer) を加え、 37°C で 1.5 h インキュベートし、ラベルされた target 細胞 1×10^4 個と effector 細胞を、様々な Effector / Target 比で共培養した。4 時間後に上清に放出された ^{51}Cr を gamma counter でカウントした。Total あるいは spontaneous に放出される ^{51}Cr はラベルされた 1×10^4 個の細胞を 1% Triton X-100 あるいはメEDIUM で培養して測定した。細胞傷害活性は、 $\left[(\text{specific } ^{51}\text{Cr release} - \text{spontaneous } ^{51}\text{Cr release}) / (\text{total } ^{51}\text{Cr release} - \text{spontaneous } ^{51}\text{Cr release}) \right] \times 100$ で計算した。

[0166] (異種移植マウスモデル 1)

KG1a-luc / venus は、KG1a 細胞にルシフェラーゼ遺伝子をレンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入して作製した。6-8 週齢の

メスのNOD/SCID/IL-2Rγcnull (NOG) マウス（日本クレア）に1.2 Gyの放射線を照射した後、 4×10^6 個のルシフェラーゼを発現させたKG1a細胞（KG1a-luc/venus）を尾静脈から注入した。5日後にVivoGlo Luciferin（Promega, 150 mg/kg体重）を腹腔内に投与し、in vivoイメージングシステム（IVIS）により撮影し、Living Image software（PerkinElmer）で解析した。翌日、CAR-T細胞あるいはコントロールT細胞を $1 - 2 \times 10^6$ 個静脈内投与し、その後毎週IVISによる撮影を行った。

[0167] （キメラ抗原受容体（CAR）の構築と作製 2）

KG2032の軽鎖及び重鎖の可変領域のcDNAを、オーバーラップPCRによってCD28及びCD3ζのcDNAと融合させた。さらに、T2A-IL-15 cDNAもオーバーラップPCRによってKG2032 CARと融合させた。

[0168] （CAR NK細胞の作製）

KG2032非反応性のHLAを有する臍帯血（CB）を、フローサイトメトリーでCD19+ B細胞に対するKG2032反応性を測定することにより同定した。T細胞はCD3 MicroBeads（Miltenyi Biotec）を用いて除去した。T細胞を除去したCB単核球を100 Gy照射したK562-mb15-41 BBL細胞で刺激し、20 IU/mLのIL-2存在下で培養した。1週間後、KG2032 CAR-T2A-IL-15 cDNAを発現するレトロウイルスを、RetroNectinを用いてCB由来NK細胞に導入した。その後、100 Gy照射したK562-mb15-41 BBL細胞で細胞を再刺激し、さらに1週間培養し、さらなる実験に使用した。

[0169] （細胞傷害活性の測定 2）

NK細胞の腫瘍細胞傷害能は ^{51}Cr release assayにより測定した。 6×10^5 個の標的細胞を37℃で1.5時間、25 μCiの 51

Cr] クロム酸ナトリウム (PerkinElmer) で標識した。標識された標的細胞 (1×10^4 個) をエフェクター細胞と 4 時間インキュベートし、採取した上清中の ^{51}Cr 放出をガンマカウンターでカウントした。全 ^{51}Cr 放出及び自発的 ^{51}Cr 放出は、 1×10^4 標識標的を 1% Triton X-100 又は培養液中でインキュベートすることにより測定した。細胞傷害活性は、 $[(\text{specific } ^{51}\text{Cr release} - \text{spontaneous } ^{51}\text{Cr release}) / (\text{total } ^{51}\text{Cr release} - \text{spontaneous } ^{51}\text{Cr release})] \times 100$ として計算した。

[0170] (CD107a 脱顆粒アッセイ)

KG2032 CAR NK 細胞又はコントロール NK 細胞 (2.5×10^5 細胞) を、KG1a AML 細胞又は AML 患者の骨髓細胞 (5×10^4 細胞) と、エフェクター：ターゲット比が 5：1 になるように 96 ウェルプレートで共培養した。培養開始時に抗 CD107a Alexa Fluor 647 (1：50) とモネンシン (BD Biosciences、1：1500) を添加した。5 時間培養後、細胞を抗 CD56-PE で染色し、フローサイトメトリーで解析した。なお、前記 AML 患者の HLA-DR のアレル型は DRB1*08：02／12：01 である。

[0171] (異種移植マウスモデル 2)

KG1a AML 細胞を NOD／SCID／IL-2R γ null (NOG) マウス (In Vivo Science 社) に静脈内移植することにより、播種性 AML モデルを樹立した。6～8 週齢の雌性 NOG マウス (移植の 4～24 時間前に 1.0～2.4 Gy の放射線を照射) に 1×10^6 個のルシフェラーゼ発現 KG1a 細胞を尾静脈から静脈内注射した。KG2032 CAR NK 細胞を用いた実験では、1.0～1.4 $\times 10^6$ 個の KG2032 CAR NK 細胞またはコントロール NK 細胞を、AML 細胞移植後 1 日目と 3 日目に注入した。マウスにおける腫瘍の増殖は IVIS によりルシフェリン投与時の蛍光発光を測定することにより測定された。

[0172] (改変KG2032 CAR-T細胞の作製)

KG2032のlight chainとheavy chainの可変領域cDNAを、オーバーラップPCRによってCD8 α , 4-1BB, CD3 ζ cDNAと融合することによりKG2032 CARのcDNAを構築した。KG2032 CAR 配列中CD3 ζ ITAMモチーフ内のチロシンをフェニルアラニンに置換するための変異は、PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (Takara) を用いて導入した。

[0173] (腸管粘膜上皮細胞の単細胞懸濁液の調製)

腸管粘膜上皮細胞の単細胞懸濁液を調製するために、粘膜を3mmの厚さに切り、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)(ナカライテスク)で3回洗浄し、10mM EDTAを含むHBSS(ナカライテスク)で37℃、30分間インキュベートした。その後、上皮細胞を振盪して剥がし、回収した。400gで5分間遠心した後、細胞を500U/mL DNase Iを含むTrypLE Express(Thermo Fisher Scientific)に懸濁し、37℃で30分間インキュベートすることにより、単細胞懸濁液を得た。腸管上皮細胞のDNAはDNeasy Blood & Tissue Kit(QIAGEN)を用いて抽出した。HLA-DRB1のタイピングは、HLA研究所(日本、京都)で行った。

[0174] (サイトカイン産生の測定 2)

改変KG2032 CAR-T細胞又はコントロールT細胞を、腸管上皮細胞あるいは白血病細胞 各 1×10^5 個と16時間共培養した。その培養上清に分泌されたサイトカインをELISAキット(IFN- γ 及びIL-2; R&D Systems)を用いて測定した。

[0175] (細胞傷害活性の測定 3)

改変KG2032 CAR-T細胞の細胞傷害活性は、 ^{51}Cr 放出アッセイで測定した。 6×10^5 個の標的細胞を37℃で1.5時間、25 μCi の ^{51}Cr クロム酸ナトリウム(PerkinElmer)で標識した。標

識された標的細胞 (1×10^4) をエフェクター細胞と4時間インキュベートし、採取した上清中の ^{51}Cr 放出をガンマカウンターでカウントした。全 ^{51}Cr 放出及び自発的 ^{51}Cr 放出は、 1×10^4 標識標的を1% Triton X-100又は培養液中でインキュベートすることにより測定した。細胞傷害活性は、 $([\text{特異的}^{51}\text{Cr} \text{ 放出} - \text{自発的}^{51}\text{Cr} \text{ 放出}] / [\text{全}^{51}\text{Cr} \text{ 放出} - \text{自発的}^{51}\text{Cr} \text{ 放出}]) \times 100$ として計算した。

[0176] (異種移植マウスモデル 3)

KG1a AML細胞をNOD/SCID/IL-2R γ null (NOG) マウス (In Vivo Science) に静脈内移植することにより、播種性AMLモデルを樹立した。6~8週齢の雌性NOGマウス(移植の4~24時間前に1.0~2.4 Gyの放射線を照射)に $1 \sim 4 \times 10^6$ 個のルシフェラーゼ発現KG1a細胞を尾静脈から静脈内注射した。5日目に、マウスにVivoGlo Luciferin (Promega、150 mg/kg体重)を腹腔内注入し、Living Imageソフトウェア (PerkinElmer)を備えたin vivoイメージングシステム (IVIS)を用いて腫瘍が放つ蛍光を観察することにより、腫瘍の増殖を測定した。その後、マウスに $1.1 \sim 2.2 \times 10^6$ 個の改変KG2032 CAR-T細胞又はコントロールT細胞を静脈内注射した。

[0177] (異種移植マウスモデル 4)

AML細胞のDNAはDNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)を用いて細胞から抽出した。HLA-DRB1のタイピングは、HLA研究所(日本、京都)で行い、KG2032反応性のHLA-DRB1を有するAML細胞を実験に用いた。AML患者からのBM細胞をNOGマウスの骨髓内に移植した。6~8週齢の雌性NOGマウスに、移植の4~24時間前に1.2 Gyの放射線を照射した後、CD3陽性T細胞を除いたAML細胞を 4×10^5 個左脛骨に注射した。その6日後、マウスに 2×10^6 個の改変KG2032 CAR-T細胞又はコントロールT細胞を静脈内注射した。注入1ヵ月後、BM細胞を抗ヒトCD45-Cy7A

PC (2D1, BioLegend)、抗ヒトCD34-APC (8G12, BD Biosciences)、抗ヒトCD3-PE (HIT3a, BioLegend)、抗マウスTer119-PerCP-Cy5.5 (Ter-119, BioLegend)、抗マウスCD45-Cy7-PE (30-F11, BioLegend) で染色し、フローサイトメトリーで解析した。

[0178] 上記材料及び方法を用いて行った実験の結果を、以下に示す。

[0179] (AML 特異的モノクローナル抗体 KG2032 の同定)

AML 特異的モノクローナル抗体 (mAb) の取得を目的として、まず、AML 患者の骨髓 (BM) 細胞から、様々な AML 細胞株及び AML 細胞に結合するモノクローナル抗体 (mAb) を分泌する約 14,000 のハイブリドーマを確立した。

[0180] 次に、これら mAb から、健常ドナーからの末梢血単核細胞 (PBMC) 中の B 細胞以外の細胞には結合しない 1,078 個の mAb を選択した。さらに、AML 患者の BM 細胞をこれら候補 mAb で染色し、最終的に AML に特異的に結合する mAb として KG2032 というクローンを同定した。

[0181] KG2032 は、図 1A に示すとおり、スクリーニングに用いたある健常ドナー由来 PBMC 中においては結合性が認められなかった。一方、図 1B に示すとおり、KG2032 は、AML 患者 14 人中 7 人において、ほぼすべての白血病細胞に結合した。

[0182] (KG2032 が認識する抗原の同定)

図 2A に示す工程にて、KG2032 が認識する抗原の同定を試みた。まず、Cas9 タンパクを発現する Daudi 細胞に Human Genome-wide Knockout CRISPR Library を導入し、puromycin により当該ライブラリーが導入された細胞を濃縮した。それら細胞をさらに増やし、 2×10^8 個の細胞を KG2032 で染色し、KG2032 low 5% の分画を 5×10^6 個ソーティングした (図 2B)。

[0183] 次に、ソーティング前の細胞とソーティング後のKG2032low細胞に導入されているgRNAの配列を次世代シーケンス（NGS）によって解析した結果、KG2032low細胞において有意に濃縮されていたインサートgRNAが標的とする分子として、HLA-DRA, HLA-DRB1, C11TA, CD74が同定された（図2C）。後者2つはHLA-DRが細胞表面に発現するために必要な分子であることを考えると、KG2032はHLA-DRを認識しているということが示唆された。そこで、HLA-DRを欠損させたDauid細胞に対するKG2032の結合性を解析したところ、図2Dに示すとおり、当該結合性は認められず、KG2032が認識する抗原はHLA-DRであることが明らかになった。さらに、図2Eに示すとおり、前記32クローンのうち、KG2032とは異なる8クローンの認識する抗原も、HLA-DRであることが明らかになった。

[0184] これら本発明の抗HLA-DR抗体の可変領域のアミノ酸配列を、下記表1及び2に示す。さらに、これら可変領域からKabattによって決定されたCDRsのアミノ酸配列を表3及び4に示す。

[0185]

[表1]

clone No.	変異可変領域 (VH)	
KG2032	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKGSGYTFTD YAIHWFRQSHAKSLEWIGSISTYSGNPVYNQ NFKGKATMTVOKSSSTAYMELARLTSEDSA IYYCARYSELVFDYWGGGTTLTVSS	(SEQ ID: 4)
KG19833	EVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSFTG YYMHWVKQSHGKSLEWIGRVNPDNGGTSY NQKFKGKAILTVDKSSSTAYMDLRLTSEDS AVYYCARNHYGYSDYGMDDYWGQGTSTVTV SS	(SEQ ID: 37)
KG1982	QVQLQQSGAVLARPGASVKLSCKASGYTFTS YWMQWVKQRPGGLEWIGAIYPGDGDTTRYT QKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDS AVYYCAREGAYYVFDYWGGGTTLTVSS	(SEQ ID: 45)
aAML191872	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCRASGYTFTD YNIHWVKQSHGKSLEWIGIYIPYNGGTGYN QKFKSKATLTVNNSSSTAYMDLRLTSEDS AVSYCAREARYPYGMDYWGQGTSTVTVSS	(SEQ ID: 53)
KG19130	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKD TYMHWVKQRPEQGLYWVGWIDPANGNTKH DPRFQDTATITADTTSTAYLQLSSLTSEDT ALYYCARSLRYWCFDVGAGTTTVTVSS	(SEQ ID: 61)
KG19122	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTN HWMQWIKQRPGGLEWIGAIYPGDGDTTRY QKFKGKATVTTDKSSSTAYMQLSSLASEDS AVYYCARRGFYYDVMDYWGQGTSTVTVSS	(SEQ ID: 69)
aAML191870	QVTLKESQPGILQSSQTLSTLCSPSGFSLSTS GIGVGWIRQPSGKOLEWLAHIWWDNYYYYN TALRSRLTISKDTSNNQVFLKIASVDAADTAT YYCARSSYFGNHLYYFDYWGGGTTLTVSS	(SEQ ID: 73)
KG2053	EVHLLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFIFSS YAMSWVRQTPEKRLEWVATISGGGTYYIYPO SVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRSEDTA MYTCARGENWFAYWGQGTLLTVSA	(SEQ ID: 77)
KG19214	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTN HWMQWIKQRPGGLEWIGAIYPGDGDTTRY QKFKGKATVTTDKSSSTAYMQLSSLASEDS AVYYCARRGFYYDVMDYWGQGTSTVTVSS	(SEQ ID: 69)

[0186]

[表2]

clone No.	軽鎖可変領域 (VL)	
KG2032	DIKMTQSPSSMYASLGERTITCKASQDIYS YLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRF SGSGSGQDYSLTISSLEYEDLGIIYYCLHNDE FPWTFGGGTKVEIK	(SEQ ID: 8)
KG19833	DIVMTQSPSSLVSAGEKVTMSCKSSQSLLN SGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRES GVFDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYY CQNDHSYPYTFGGGTKLEIK	(SEQ ID: 41)
KG1982	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTS GYNYMHWWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGV PARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQ HSRELPTWTFGGGTKLEIK	(SEQ ID: 49)
aAML191872	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHN YLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLPGVPSR FSGSGSGTQYSLKIYSLQTEDFGSYQCQHF WTFPYTFGGGTKLEIK	(SEQ ID: 57)
KG19130	DIVMTQSHKFMSTLVGDRVSITCKASQDVS TTVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDR FTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQGHY STPPTFGGGTKLEIK	(SEQ ID: 65)
KG19122	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVS TTVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDR FTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQGHY STPPTFGGGTKLEIK	(SEQ ID: 65)
aAML191870	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVS TTVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDR FTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQGHY STPPTFGGGTKLEIK	(SEQ ID: 65)
KG2053	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVS TTVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDR FTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQGHY STPPTFGGGTKLEIK	(SEQ ID: 65)
KG19214	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVS TTVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDR FTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQGHY STPPTFGGGTKLEIK	(SEQ ID: 79)

[0187]

[表3]

clone No.	重組可變領域 (VH)					
	CDR1		CDR2		CDR3	
KG2823	DYAH	(SEQ ID: 1)	GISYSGNPYNQNFKG	(SEQ ID: 2)	YSELVFDY	(SEQ ID: 3)
KG19839	GYTMH	(SEQ ID: 34)	RVPDNGGTSYNQKFKG	(SEQ ID: 35)	NHYTGYSIDYGMQY	(SEQ ID: 36)
KG1987	SYWMQ	(SEQ ID: 43)	ATPGDGDTRYTKFKG	(SEQ ID: 43)	EGATYYLFDY	(SEQ ID: 44)
aAML191872	DYNH	(SEQ ID: 50)	VIYPNCGTCYNQKFKG	(SEQ ID: 51)	EARYPYGMQY	(SEQ ID: 52)
KG19130	DTYMH	(SEQ ID: 58)	WIDPANGTKHIDPRFQD	(SEQ ID: 59)	SLRYWCFDY	(SEQ ID: 60)
KG19122	NHWMO	(SEQ ID: 66)	ATPGDGDTRYSQKFKG	(SEQ ID: 67)	RGFGYYDWMQY	(SEQ ID: 68)
aAML191870	TSCIGVC	(SEQ ID: 70)	NHWNDQNYNTALRG	(SEQ ID: 71)	SSYFCNHLHYFDY	(SEQ ID: 72)
KG2853	SYAMS	(SEQ ID: 74)	TSGGGTYYTPDSVRG	(SEQ ID: 75)	GENWFAY	(SEQ ID: 76)
KG19714	NHWMO	(SEQ ID: 86)	ATPGDGDTRYSQKFKG	(SEQ ID: 87)	RGFGYYDWMQY	(SEQ ID: 88)

[表4]

clone No.	軽鎖可変領域 (VL)					
	CDR1		CDR2		CDR3	
KG2032	KASQDIYSYLS	(SEQ ID: 5)	RANRLVD	(SEQ ID: 6)	LHNDEFPWT	(SEQ ID: 7)
KG19833	KSSQGLNSGNQKNYLA	(SEQ ID: 38)	QASTRES	(SEQ ID: 39)	QNCHSYPT	(SEQ ID: 40)
KG19882	RASKSVSTSGYNYMH	(SEQ ID: 46)	IASNLES	(SEQ ID: 47)	QHRRLPWT	(SEQ ID: 48)
#AML191872	RASGNHNYLA	(SEQ ID: 54)	NAKTLPD	(SEQ ID: 55)	QHFWTTPYT	(SEQ ID: 56)
KG19136	KASQDYSITVA	(SEQ ID: 60)	SASYRYT	(SEQ ID: 61)	QQHYSTPPT	(SEQ ID: 64)
KG19122	KASQDYSITVA	(SEQ ID: 62)	SASYRYT	(SEQ ID: 63)	QQHYSTPPT	(SEQ ID: 64)
#AML191870	KASQDYSITVA	(SEQ ID: 62)	SASYRYT	(SEQ ID: 63)	QQHYSTPPT	(SEQ ID: 64)
KG2053	KASQDYSITVA	(SEQ ID: 62)	SASYRYT	(SEQ ID: 63)	QQHYSTPPT	(SEQ ID: 64)
KG19214	KASQDYSITVA	(SEQ ID: 62)	SVSYRYT	(SEQ ID: 78)	QQHYSTPPT	(SEQ ID: 84)

[0189] (KG2032が認識するHLA-DRB1のアレル特異性)

HLA-DRB1は多型性の高い分子であるため、HLA-DRB1のどのアレルが認識されるかを調べた。その結果、図3に示すとおり、HLA-

DRB1*0404、0405、0410、0803、0901又は1454を発現させたK562細胞にはKG2032が結合した。一方、HLA-DRB1*0101、0403、0802、1101又は1502を発現させたK562細胞にはKG2032は結合しなかった。

[0190] さらに、図4Aに示すとおり、KG2032陰性HLA-DRB1遺伝子(0403/0802)を有するドナーからのPBMCの細胞のいずれにもKG2032は結合しなかった。また、KG2032陽性HLA-DRB1遺伝子である0901を有するドナーの末梢血を染色したところ、B細胞及び活性化T細胞への結合は見られたものの、既存の抗HLA-DR抗体L243と比較して極めて弱い結合であった。

[0191] さらに、図4Aに示すとおり、L243が結合する、すなわちHLA-DRが発現している単球やT細胞の一部に対し、KG2032は結合しなかった。また、図4Bに示すとおり、KG2032陽性HLA-DRB1遺伝子を有するAML患者において、白血病細胞へのKG2032の結合が観察された。

[0192] KG2032陽性HLA-DRB1遺伝子である0410及び0803を有するドナーの骨髓細胞を染色したところ、造血幹細胞(CD34+CD38-)及び造血前駆細胞(CD34+CD38+)への結合は見られたものの、既存の抗HLA-DR抗体L243と比較して極めて弱い結合であった。さらに、図4Cに示すとおり、L243が結合する、すなわちHLA-DRが発現している造血幹細胞のうちごく一部の細胞にしか、KG2032は結合しなかった。

[0193] これらの結果から、AML治療において、以下のようなKG2032の利用例(1)及び(2)が考えられる。

[0194] (1) HLA-DR不一致同種移植後再発のAML患者でレシピエント(白血病患者)のHLA-DRがKG2032陽性型で、ドナーのHLA-DR型がKG2032陰性型である場合には、移植を受けた患者自身あるいはドナー由来T細胞から作ったKG2032由来CAR-T細胞はレシピエン

トの白血病を特異的に攻撃すると考えられる（図5 A）。

[0195] （2）正常血液細胞においては、KG2032は、B細胞など一部の細胞にしか結合せず、また全ての血液細胞の源となる造血幹細胞においてはその一部にしか結合しないので、KG2032陽性のHLA-DRB1型を有するAML患者における通常の自家CAR-T細胞を治療に用いたとしても、白血病細胞は排除され、正常造血はKG2032陰性細胞で保たれると考えられるので、治療として成立すると考えられる（図5 B）。

[0196] （KG2032が認識するエピトープの同定）

KG2032が認識するエピトープを同定すべく、HLA-DRB1*1454（KG2032陽性）とHLA-DRB1*1502（KG2032陰性）のアミノ酸配列を比較した（図6）。さらに、図7 Aに示すようなHLA-DRB1*1454とHLA-DRB1*1502のキメラタンパク質を発現する発現ベクターをoverlapping PCRにより作製した。そして、それらをレトロウイルスによりK562細胞に遺伝子導入し、2日後にKG2032とL243で染色し、結合の有無をフローサイトメトリーで解析した。その結果、図7 Bに示すとおり、図6に示すRegion 3（A, A, 74-89）がKG2032の結合に必須であることが示された。

[0197] さらに、KG2032が結合するHLA-DRB1と結合しないHLA-DRB1とのRegion 3のアミノ酸配列を比較したところ、図7 Cに示すように、86位のアミノ酸がKG2032が結合しないHLA-DRでは常にアスパラギン酸（D）なのに対して、結合するHLA-DRでは、セリン（S）、バリン（V）又はアラニン（A）であることが分かった。

[0198] そこで、KG2032が結合するHLA-DRB1*0405の86位のセリン（S）をアスパラギン酸（D）に置換したものを、K562細胞に発現させた。その結果、図7 Dに示すように、L243の結合は保たれるが、KG2032の結合は失われることが明らかになった。

[0199] これらのことからKG2032が結合するためには、Region 3のう

ち86位のアミノ酸はアスパラギン酸以外のアミノ酸（セリン、バリン、アラニン等）であることが必須であることが示された。

[0200] (KG2032非反応性DRドナーに由来するCAR-T細胞の開発)

KG2032の可変領域を含むキメラ抗原受容体(KG2032-CAR)を作製した。まず、KG2032の可変部のcDNAをSMARTer RACE 5' / 3' Kit (Takara)を用いた5' RACE法により取得し、配列を同定した。次に、図8Aに示すとおり、軽鎖(VL)及び重鎖(VH)を、リンカー配列を介し、overlapping PCR法を用いて融合させた後、それと、CD28及びCD3 ζ 、又は、CD8 α 、4-1BB及びCD3 ζ とを、overlapping PCR法により融合し、2種類のKG2032-CAR(KG2032-CD28-CD3 ζ -CAR、KG2032-BBz-CAR)を作製した。なお、これらCARの構成は、下記表5に示す。

[0201]

[表5]

KG2032- CD28-CD32-CAR (配列番号: 9)	ドナー (1-22位)	抗原認識能 (94%)		細胞毒性	細胞内シグナル伝達	
		KG2032 細胞毒性試験 (23-28位)	WH119w/218 シグナル (131-145位)	KG2032 細胞毒性試験 (146-262位)	CD28 (365-381位)	CD32 (373-484位)
KG2032- CD28-CAR (配列番号: 10)	ドナー (1-22位)	KG2032 細胞毒性試験 (23-28位)	WH119w/218 シグナル (131-145位)	KG2032 細胞毒性試験 (146-262位)	CD28 (365-381位)	CD32 (373-484位)
KG2032- CD28-CAR (配列番号: 11)	ドナー (1-22位)	KG2032 細胞毒性試験 (23-28位)	WH119w/218 シグナル (131-145位)	KG2032 細胞毒性試験 (146-262位)	CD28 (365-381位)	CD32 (373-484位)
KG2032- CD28-CAR (配列番号: 12)	ドナー (1-22位)	KG2032 細胞毒性試験 (23-28位)	WH119w/218 シグナル (131-145位)	KG2032 細胞毒性試験 (146-262位)	CD28 (365-381位)	CD32 (373-484位)

[0202] 次に、KG2032陰性HLA-DRB1 (0403/0802) ドナー

由来のＴリンパ球に、ＫＧ２０３２ ＣＡＲをレトロウイルスベクターを用いて導入し、ＫＧ２０３２－ＣＡＲ－Ｔ細胞を作製した（図８Ｂ及び８Ｃ）

。

[0203] このようにして作製されたＣＡＲ－Ｔ細胞は、図８Ｄ及び８Ｅに示すとおり、ＫＧ２０３２が結合するＫＧ１α細胞と共培養することにより、ＩＦＮ－γ及びＩＬ－２を産生し、細胞傷害活性を示した。一方、ＫＧ２０３２が結合しないＴＨＰ－１細胞との共培養では、サイトカイン産生及び細胞傷害活性ともに見られなかった。

[0204] なお、これらの結果は、共刺激分子がＣＤ２８であっても４－１ＢＢであっても見られたので、以降の実験では４－１ＢＢが共刺激分子であるＫＧ２０３２－ＣＡＲ（ＫＧ２０３２－ＢＢζ－ＣＡＲ）についてのみ評価した。

[0205] 次に、ＣＡＲ－Ｔ細胞の疲弊を防止するために、ＣＡＲ－Ｔ細胞の製造中にチロシンキナーゼ阻害剤であるダサチニブを加えることを試みた。その結果、図８Ｆ～Ｈに示すとおり、１μＭのダサチニブで処理により、ＫＧ２０３２－ＢＢζ－ＣＡＲ－Ｔ細胞の増殖は促進する一方で、疲弊マーカー分子（ＰＤ－１，ＴＩＭ－３，ＬＡＧ－３）の発現は減少した。また、ＫＧ１αとの共培養時のＩＬ－２サイトカイン産生も増加した。

[0206] 次に、ＮＯＧマウスにルシフェラーゼを発現するＫＧ１α細胞を移入した後、ＫＧ２０３２－ＢＢζ ＣＡＲ－Ｔ細胞を投与し、その抗白血病効果を評価した。その結果、図８Ｉ及びＪに示すとおり、著明な抗白血病効果が見られた。

[0207] （ＫＧ２０３２非反応性ＤＲドナーに由来するＣＡＲ－ＮＫ細胞の開発）

ＫＧ２０３２の可変領域にＣＤ２８及びＣＤ３ζを融合させたキメラ抗原受容体とＩＬ－１５を共発現させるためのベクターを作製した。そして、当該キメラ抗原受容体を発現するＮＫ細胞（ＣＡＲ－ＮＫ細胞）を調製し、ヒト急性骨髄性白血病由来の細胞株（ＫＧ１α細胞）と共培養させた。その結果、図には示していないが、前記ＣＡＲ－ＮＫ細胞も、細胞傷害活性を示すことが明らかになった。さらに、ＫＧ１α細胞を移入したマウスに、前記Ｃ

AR-NK細胞を投与した結果、顕著な抗腫瘍効果が奏されることも明らかになった。

[0208] 具体的に説明すると、KG2032の可変領域、CD28、CD3ζを融合して、CAR-NK細胞用のKG2032 CARコンストラクトを作製した。さらに、CAR-NK細胞の増殖と生存を高めるために、IL-15をKG2032 CARとともに共発現させるレトロウイルスベクターを設計した。KG2032-非反応性HLA-DRB1を持つヒト臍帯血(CB)細胞からT細胞を除き、4-1BBリガンドと膜結合IL-15を発現するK562細胞(放射線照射した)で刺激してNK細胞を増殖させた。培養開始から14日後、KG2032 CAR/IL-15をレトロウイルス導入したCB由来NK細胞を分析した(図9A~9C)。

[0209] KG1a細胞又は患者由来の初代AML細胞と共培養すると、コントロール(CARを導入していない)NK細胞と比較して、KG2032 CAR-NK細胞でCD107a脱顆粒が有意に増加したが、HLA-DR欠損KG1a細胞との共培養では増加しなかった(図9D)。

[0210] KG2032 CAR-NK細胞は、KG1a細胞及び患者由来の初代AML細胞に対して有意な細胞傷害性を示したが、HLA-DR欠損KG1a細胞に対しては示さなかった(図9E)。

[0211] さらに、KG2032 CAR-NK細胞を、KG1a AML細胞を移植した免疫不全マウスに投与すると、白血病細胞を有意に減少し、マウスの生存期間は延長された(図9F~9H)。

[0212] (改変KG2032 CAR-T細胞の開発)

重篤なサイトカイン放出症候群(CRS)は非血液系組織においてHLA-DRの発現を亢進させる可能性があるため、KG2032 CAR-T細胞の安全性を最大限に高めるためには、重症CRSを避けるべきである。CARコンストラクトを改変することにより、CAR-T細胞の有効性を失うことなく、重篤なCRSを防ぐことができると報告されている(Ying, Z. et al. A safe and potent anti-CD

19 CAR T cell therapy. Nat Med 25, 947-953 (2019). <https://doi.org:10.1038/s41591-019-0421-7>). そこで、AML細胞との共培養時にCAR-T細胞によるサイトカイン産生を減少させるため、抗原認識ドメインにおける重鎖(VH)と軽鎖(VL)の順序を変更し、CD8 α ヒンジ/膜貫通ドメインの長さを延長することにより、KG2032 CARコンストラクトを改変した。さらに、CARの活性化シグナルを弱めるために、CD3 ζ 配列の3つの免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ(ITAM)ドメインのうち2つに変異を導入した(Feucht, J. et al. Calibration of CAR activation potential directs alternative T cell fates and therapeutic potency. Nat Med 25, 82-88 (2019))。なお、この改変KG2032 CARの構成は、前記表5に示される。

[0213] 先ず、KG1a AML細胞との共培養後の、オリジナル又は改変KG2032 CAR-T細胞によるIFN- γ の分泌を分析した。その結果、改変KG2032 CAR-T細胞によるIFN- γ の分泌は、オリジナルによるそれと比較して低減しており、前記変異によって、CARの活性化シグナルが弱められたことが、確認された。

[0214] 次に、大腸がん患者切除標本から得た正常小腸から精製した正常腸管上皮細胞又はKG1a細胞と共培養した後の、改変KG2032 CAR-T細胞によるIFN- γ 及びIL-2の分泌量を分析した。その結果、改変KG2032 CAR-T細胞は、KG2032反応性HLA-DRB1を持つ正常腸管上皮細胞との共培養では活性化されなかった。一方、改変KG2032 CAR-T細胞は、KG1a AML細胞及び患者由来の初代AML細胞に対する細胞傷害活性を保持していた。

[0215] また、改変KG2032 CAR-T細胞を、KG1a AML細胞を移植したマウスに投与した。その結果、改変KG2032 CAR-T細胞の

投与により、マウスに生着した K G 1 a A M L 細胞は有意に減少し、生存期間が延長した。なお、改変 K G 2 0 3 2 C A R - T 細胞で治療したマウスでは明らかな毒性は観察されなかった。

[0216] さらに、改変 K G 2 0 3 2 C A R - T 細胞を、患者由来 A M L 細胞を移植した免疫不全マウスに投与した（図 1 0 A）。その結果、改変 K G 2 0 3 2 C A R - T 細胞は、免疫不全マウスに移植された患者由来 A M L 細胞を根絶した（図 1 0 B 及び 1 0 C）。なお、改変 K G 2 0 3 2 C A R - T 細胞を投与したマウスに明らかな毒性は観察されなかった。

産業上の利用可能性

[0217] 以上説明したように、本発明によれば、急性骨髄性白血病等の血液がんの特異的な細胞表面抗原となる H L A - D R を標的とすることにより、当該抗原を認識する抗体若しくはその機能的断片、又はそれを保持するキメラ抗原受容体等を用いることにより、前記疾患の治療等が可能となる。

[0218] 特に、かかる抗体は、H L A - D R に対してアレル特異性を示し得るので、H L A - D R 不一致同種移植後再発の血液がん患者で、レシピエント（血液がん患者）の H L A - D R が本発明の抗体が結合する陽性型で、ドナーの H L A - D R が本発明の抗体が結合しない陰性型である場合には、ドナー由来細胞から作った本発明の抗体由来の C A R - T 細胞等はレシピエントの血液がん細胞を特異的に攻撃することが可能となる。

[0219] また、本発明の抗体が、正常血液細胞においては、B 細胞など一部の細胞にしか結合せず、単球等には結合しない場合、本発明の抗体が結合する陽性の H L A - D R を有する血液がん患者における通常の自家 C A R - T 細胞等を治療に用いたとしても、血液がん細胞は排除され、正常造血は本発明の抗体が結合しない陰性細胞で保たれ、治療が可能となる。

[0220] よって、本発明は、血液がんに対する治療薬及びその開発等において、有用である。

請求の範囲

- [請求項1] H L A－D Rを認識する抗体又はその機能的断片を含む、血液がんを治療するための組成物。
- [請求項2] 前記抗体又はその機能的断片を保持するキメラ抗原受容体を、発現する免疫細胞を含む、請求項1に記載の組成物。
- [請求項3] 前記抗体又はその機能的断片と免疫細胞に対する抗原認識部位とを保持する、多重特異性抗体を含む、請求項1に記載の組成物。
- [請求項4] 前記抗体又はその機能的断片が単球に結合しない、請求項1に記載の組成物。
- [請求項5] 前記抗体又はその機能的断片を保持するキメラ抗原受容体を、発現する免疫細胞を含む、請求項4に記載の組成物。
- [請求項6] 前記抗体又はその機能的断片と免疫細胞に対する抗原認識部位とを保持する、多重特異性抗体を含む、請求項4に記載の組成物。
- [請求項7] 前記抗体又はその機能的断片が、86位がアスパラギン酸以外のアミノ酸であるH L A－D R B 1のアレル型に結合し、かつ、86位がアスパラギン酸であるH L A－D R B 1のアレル型には結合しない、請求項1に記載の組成物。
- [請求項8] 前記抗体又はその機能的断片が、86位のアミノ酸がアスパラギン酸以外のアミノ酸であるH L A－D R B 1の74～89位のアミノ酸配列を含む領域に結合し、かつ
- 86位のアミノ酸がアスパラギン酸であるH L A－D R B 1の74～89位のアミノ酸配列を含む領域には結合しない、請求項1に記載の組成物。
- [請求項9] 下記（a）～（i）のうちのいずれかの特徴を有する、H L A－D Rを認識する、抗体又はその機能的断片
- （a）配列番号：1～3に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域1～3を含む重鎖可変領域と、配列番号：5～7に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域1～3を含む軽鎖可変領域とを有す

る

(b) 配列番号：34～36に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域1～3を含む重鎖可変領域と、配列番号：38～40に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域1～3を含む軽鎖可変領域とを有する

(c) 配列番号：42～44に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域1～3を含む重鎖可変領域と、配列番号：46～48に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域1～3を含む軽鎖可変領域とを有する

(d) 配列番号：50～52に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域1～3を含む重鎖可変領域と、配列番号：54～56に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域1～3を含む軽鎖可変領域とを有する

(e) 配列番号：58～60に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域1～3を含む重鎖可変領域と、配列番号：62～64に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域1～3を含む軽鎖可変領域とを有する

(f) 配列番号：66～68に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域1～3を含む重鎖可変領域と、配列番号：62～64に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域1～3を含む軽鎖可変領域とを有する

(g) 配列番号：70～72に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域1～3を含む重鎖可変領域と、配列番号：62～64に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域1～3を含む軽鎖可変領域とを有する

(h) 配列番号：74～76に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域1～3を含む重鎖可変領域と、配列番号：62～64に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域1～3を含む軽鎖可変領域

とを有する

(i) 配列番号：66～68に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域1～3を含む重鎖可変領域と、配列番号：62、78及び64に記載のアミノ酸配列を各々含む相補性決定領域1～3を含む軽鎖可変領域とを有する。

[請求項10] 請求項8又は9に記載の抗体又はその機能的断片を保持するキメラ抗原受容体を発現する、免疫細胞。

[請求項11] 請求項8若しくは9に記載の抗体若しくはその機能的断片、又は、前記抗体若しくはその機能的断片を含むキメラ抗原受容体を発現する免疫細胞を含む、医薬組成物。

[請求項12] 造血幹細胞が移植された血液がん患者に投与される組成物であって、
H L A－D Rを認識する抗体又はその機能的断片を含み、
前記造血幹細胞の提供者と前記患者とはH L A－D Rのアレル型が異なり、
前記抗体又はその機能的断片が、前記患者のH L A－D Rに結合し、かつ、前記提供者のH L A－D Rに結合しない、組成物。