

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6850528号
(P6850528)

(45) 発行日 令和3年3月31日(2021.3.31)

(24) 登録日 令和3年3月10日(2021.3.10)

(51) Int.Cl.	F 1
A 6 1 K 35/12	(2015.01)
A 6 1 K 39/395	(2006.01)
A 6 1 K 45/00	(2006.01)
A 6 1 K 48/00	(2006.01)
A 6 1 P 35/00	(2006.01)
	A 6 1 K 35/12
	A 6 1 K 39/395
	A 6 1 K 45/00
	A 6 1 K 48/00
	A 6 1 P 35/00

請求項の数 22 (全 57 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-556818 (P2014-556818)
(86) (22) 出願日	平成25年2月13日 (2013.2.13)
(65) 公表番号	特表2015-513394 (P2015-513394A)
(43) 公表日	平成27年5月14日 (2015.5.14)
(86) 國際出願番号	PCT/US2013/025953
(87) 國際公開番号	W02013/123061
(87) 國際公開日	平成25年8月22日 (2013.8.22)
審査請求日	平成28年1月29日 (2016.1.29)
審判番号	不服2019-2577 (P2019-2577/J1)
審判請求日	平成31年2月26日 (2019.2.26)
(31) 優先権主張番号	61/598,216
(32) 優先日	平成24年2月13日 (2012.2.13)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

(73) 特許権者	514204772 シアトル チルドレンズ ホスピタル ド ゥーイング ビジネス アズ シアトル チルドレンズ リサーチ インスティテュ ート アメリカ合衆国 ワシントン州 シアトル ナインス アベニュー 1900
(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】二重特異性キメラ抗原受容体およびその治療的使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

遺伝子を導入することにより、二重特異性キメラ抗原受容体 (CAR) およびトランケート型上皮成長因子受容体 (EGFRt) を発現している、遺伝子改変T細胞であって、該二重特異性CARが、

- a . 少なくとも 2 つの抗原特異的標的指向領域、
- b . 細胞外スペーサードメイン、
- c . 膜貫通ドメイン、
- d . 少なくとも 1 つの共刺激ドメイン、および
- e . 細胞内シグナル伝達ドメイン

を含み、

各抗原特異的標的指向領域が抗原特異的単鎖 Fv (scFv) フラグメントを含み、少なくとも 2 つの抗原特異的標的指向領域が、単一のB細胞上で発現されるCD19 および CD20 に結合する、

前記T細胞。

【請求項 2】

- a . (i) 少なくとも 2 つの抗原特異的標的指向領域、
(ii) 細胞外スペーサードメイン、
(iii) 膜貫通ドメイン、
(iv) 少なくとも 1 つの共刺激ドメイン、および

10

20

(v) 細胞内シグナル伝達ドメイン

を含む、二重特異性キメラ抗原受容体 (CAR) であって、各抗原特異的標的指向領域が抗原特異的単鎖Fv (scFv) フラグメントを含み、かつ少なくとも2つの抗原特異的標的指向領域が、単一のB細胞上で発現されるCD19およびCD20に結合する、二重特異性CAR；ならびに

b. トランケート型上皮成長因子受容体 (EGFRt)

をコードする、ポリヌクレオチド、または、

前記二重特異性CARをコードするポリヌクレオチドと前記EGFRtをコードするポリヌクレオチドを組み合わせたセットのポリヌクレオチド。

【請求項3】

10

前記二重特異性CARおよび前記EGFRtが、切断可能なリンカーを介して連結され、任意で該切断可能なリンカーが、自己切斷型の切断可能なリンカーであり、任意で2Aリンカー、2A様リンカー、またはその機能的等価物のうちのいずれか1つまたは複数である、請求項1に記載の遺伝子改変T細胞。

【請求項4】

前記二重特異性CARおよび前記EGFRtが、切断可能なリンカーを介して連結され、任意で該切断可能なリンカーが、自己切斷型の切断可能なリンカーであり、任意で2Aリンカー、2A様リンカー、またはその機能的等価物のうちのいずれか1つまたは複数である、請求項2に記載のポリヌクレオチド。

【請求項5】

20

配列番号：1または10に記載される配列を含む、請求項2に記載のポリヌクレオチド。

【請求項6】

請求項2, 4または5に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項7】

プラスミドトランスポゾン、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、泡状ウイルスベクター、アデノウイルスベクター、RNAウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、またはアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターである、請求項6に記載のベクター。

【請求項8】

30

前記細胞外スペーサードメインが、(i)抗体のFcフラグメント、またはその機能的等価物、フラグメント、もしくは誘導体、(ii)抗体のヒンジ領域、またはその機能的等価物、フラグメント、もしくは誘導体、(iii)抗体のCH2領域、(iv)抗体のCH3領域、(v)人工スペーサー配列、(vi)IgG4のヒンジ、CH2、およびCH3領域、(vii)IgG4のヒンジ領域、(viii)IgG4のヒンジおよびCH2領域、(ix)CD8のヒンジ領域、(x)IgG1のヒンジ、CH2、およびCH3領域、(xi)IgG1のヒンジ領域、(xii)IgG1のヒンジおよびCH2領域、ならびに(xiii)それらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含み；

前記膜貫通ドメインが、I型膜貫通タンパク質の膜貫通領域、人工疎水性配列、T細胞受容体複合体の鎖の膜貫通ドメイン、CD28の膜貫通ドメイン、CD8の膜貫通ドメイン、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含み；

前記少なくとも1つの共刺激ドメインが、CD28、CD137(4-1BB)、CD134(OX40)、Dap10、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数に由来するシグナル伝達ドメインを含み；ならびに/または

前記細胞内シグナル伝達ドメインが、ヒトCD3鎖、FcRIII、FcRI、Fc受容体の細胞質側末端、免疫受容体チロシン活性化モチーフ(ITAM)を有する細胞質受容体、およびそれらの組み合わせのうちの1つまたは複数のシグナル伝達ドメインを含む、

50

請求項 1 または 3 に記載の遺伝子改変T細胞。

【請求項 9】

前記細胞外スペーサードメインが、(i)抗体のFcフラグメント、またはその機能的等価物、フラグメント、もしくは誘導体、(ii)抗体のヒンジ領域、またはその機能的等価物、フラグメント、もしくは誘導体、(iii)抗体のCH2領域、(iv)抗体のCH3領域、(v)人工スペーサー配列、(vi)IgG4のヒンジ、CH2、およびCH3領域、(vii)IgG4のヒンジ領域、(viii)IgG4のヒンジおよびCH2領域、(ix)CD8のヒンジ領域、(x)IgG1のヒンジ、CH2、およびCH3領域、(xi)IgG1のヒンジ領域、(xii)IgG1のヒンジおよびCH2領域、ならびに(xiii)それらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含み；

10

前記膜貫通ドメインが、I型膜貫通タンパク質の膜貫通領域、人工疎水性配列、T細胞受容体複合体の鎖の膜貫通ドメイン、CD28の膜貫通ドメイン、CD8の膜貫通ドメイン、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含み；

前記少なくとも1つの共刺激ドメインが、CD28、CD137(4-1BB)、CD134(OX40)、Dap10、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数に由来するシグナル伝達ドメインを含み；ならびに/または

20

前記細胞内シグナル伝達ドメインが、ヒトCD3鎖、FcR_{IIA}、FcRI、Fc受容体の細胞質側末端、免疫受容体チロシン活性化モチーフ(ITAM)を有する細胞質受容体、およびそれらの組み合わせのうちの1つまたは複数のシグナル伝達ドメインを含む。

請求項 2, 4 または 5 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 10】

前記細胞外スペーサードメインが、(i)抗体のFcフラグメント、またはその機能的等価物、フラグメント、もしくは誘導体、(ii)抗体のヒンジ領域、またはその機能的等価物、フラグメント、もしくは誘導体、(iii)抗体のCH2領域、(iv)抗体のCH3領域、(v)人工スペーサー配列、(vi)IgG4のヒンジ、CH2、およびCH3領域、(vii)IgG4のヒンジ領域、(viii)IgG4のヒンジおよびCH2領域、(ix)CD8のヒンジ領域、(x)IgG1のヒンジ、CH2、およびCH3領域、(xi)IgG1のヒンジ領域、(xii)IgG1のヒンジおよびCH2領域、ならびに(xiii)それらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含み；

30

前記膜貫通ドメインが、I型膜貫通タンパク質の膜貫通領域、人工疎水性配列、T細胞受容体複合体の鎖の膜貫通ドメイン、CD28の膜貫通ドメイン、CD8の膜貫通ドメイン、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含み；

前記少なくとも1つの共刺激ドメインが、CD28、CD137(4-1BB)、CD134(OX40)、Dap10、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数に由来するシグナル伝達ドメインを含み；ならびに/または

40

前記細胞内シグナル伝達ドメインが、ヒトCD3鎖、FcR_{IIA}、FcRI、Fc受容体の細胞質側末端、免疫受容体チロシン活性化モチーフ(ITAM)を有する細胞質受容体、およびそれらの組み合わせのうちの1つまたは複数のシグナル伝達ドメインを含む。

請求項 6 または 7 に記載のベクター。

【請求項 11】

前記細胞外スペーサードメインがCD8ヒンジを含み、前記膜貫通ドメインがCD8膜貫通ドメインを含み、前記少なくとも1つの共刺激ドメインが4-1BB共刺激ドメインを含み、および前記細胞内シグナル伝達ドメインがCD3鎖のシグナル伝達ドメインを含むか；

50

前記細胞外スペーサードメインが Ig G 4 のヒンジ領域を含み、前記膜貫通ドメインが CD 28 膜貫通ドメインを含み、前記共刺激ドメインが 4 - 1 B B 共刺激ドメインを含み、および前記細胞内シグナル伝達ドメインが CD 3 鎖のシグナル伝達ドメインを含むか；または

前記細胞外スペーサードメインが Ig G 4 のヒンジ領域を含み、前記膜貫通ドメインが CD 28 膜貫通ドメインを含み、前記少なくとも 1 つの共刺激ドメインが CD 28 共刺激ドメインを含み、および前記細胞内シグナル伝達ドメインが CD 3 鎖のシグナル伝達ドメインを含む、

請求項 1, 3 または 8 に記載の遺伝子改変 T 細胞。

【請求項 12】

10

前記細胞外スペーサードメインが CD 8 ヒンジを含み、前記膜貫通ドメインが CD 8 膜貫通ドメインを含み、前記少なくとも 1 つの共刺激ドメインが 4 - 1 B B 共刺激ドメインを含み、および前記細胞内シグナル伝達ドメインが CD 3 鎖のシグナル伝達ドメインを含むか；

前記細胞外スペーサードメインが Ig G 4 のヒンジ領域を含み、前記膜貫通ドメインが CD 28 膜貫通ドメインを含み、前記共刺激ドメインが 4 - 1 B B 共刺激ドメインを含み、および前記細胞内シグナル伝達ドメインが CD 3 鎖のシグナル伝達ドメインを含むか；または

前記細胞外スペーサードメインが Ig G 4 のヒンジ領域を含み、前記膜貫通ドメインが CD 28 膜貫通ドメインを含み、前記少なくとも 1 つの共刺激ドメインが CD 28 共刺激ドメインを含み、および前記細胞内シグナル伝達ドメインが CD 3 鎖のシグナル伝達ドメインを含む、

請求項 2, 4, 5 または 9 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 13】

20

前記細胞外スペーサードメインが CD 8 ヒンジを含み、前記膜貫通ドメインが CD 8 膜貫通ドメインを含み、前記少なくとも 1 つの共刺激ドメインが 4 - 1 B B 共刺激ドメインを含み、および前記細胞内シグナル伝達ドメインが CD 3 鎖のシグナル伝達ドメインを含むか；

前記細胞外スペーサードメインが Ig G 4 のヒンジ領域を含み、前記膜貫通ドメインが CD 28 膜貫通ドメインを含み、前記共刺激ドメインが 4 - 1 B B 共刺激ドメインを含み、および前記細胞内シグナル伝達ドメインが CD 3 鎖のシグナル伝達ドメインを含むか；または

前記細胞外スペーサードメインが Ig G 4 のヒンジ領域を含み、前記膜貫通ドメインが CD 28 膜貫通ドメインを含み、前記少なくとも 1 つの共刺激ドメインが CD 28 共刺激ドメインを含み、および前記細胞内シグナル伝達ドメインが CD 3 鎖のシグナル伝達ドメインを含む、

請求項 6, 7 または 10 に記載のベクター。

【請求項 14】

30

前記二重特異性 CAR が単一のポリペプチド鎖として発現され；および / または前記少なくとも 2 つの抗原特異的標的指向領域が、直列に配置され、かつリンクカーによって分離されている、

請求項 1, 3, 8 または 11 に記載の遺伝子改変 T 細胞。

【請求項 15】

40

請求項 2, 4, 5, 9 または 12 に記載のポリヌクレオチドを含む、遺伝子改変 T 細胞。

。

【請求項 16】

請求項 6, 7, 10 または 13 に記載のベクターを含む、遺伝子改変 T 細胞。

【請求項 17】

ナイーブ T 細胞、セントラルメモリー T 細胞、またはエフェクターメモリー T 細胞である、請求項 1, 3, 8, 11, 14, 15 または 16 に記載の遺伝子改変 T 細胞。

50

【請求項 18】

a . 請求項 1 , 3 , 8 , 11 , 14 , 15 , 16 または 17 に記載の遺伝子改変 T 細胞と、

b . 薬学的に許容される担体と
を含む、薬学的組成物。

【請求項 19】

a . 請求項 2 , 4 , 5 , 9 または 12 に記載のポリヌクレオチドと、

b . 薬学的に許容される担体と
を含む、薬学的組成物。

【請求項 20】

a . 請求項 6 , 7 , 10 または 13 に記載のベクターと、

b . 薬学的に許容される担体と
を含む、薬学的組成物。

【請求項 21】

医薬に使用するための請求項 18 , 19 または 20 に記載の薬学的組成物。

【請求項 22】

以下の工程を含む、二重特異性 CAR を発現する一定量の遺伝子改変 T 細胞を生成する方法：

請求項 6 , 7 , 10 または 13 に記載のベクターを、1 個または複数個の T 細胞にトランسفクトする工程、および

少なくとも 2 つの抗原特異的標的指向領域によって標的とされる抗原を発現する細胞、少なくとも 2 つの抗原特異的標的指向領域によって標的とされる組換え抗原を発現する細胞、またはキメラ抗原受容体に対する抗体を発現する細胞で、該 1 個または複数個の T 細胞を刺激する工程であって、それによって該 T 細胞が、一定量の遺伝子改変 T 細胞を生成するように増殖する、工程。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、キメラ抗原受容体およびそれを使用する遺伝子改変細胞に関する。

【背景技術】

【0002】

現在の免疫療法は、癌細胞上の単一抗原を標的とするように設計されている。しかしながら、例えば、癌細胞は不安定であり、一部の細胞はもはや標的抗原を有していない場合がある。抗原消失エスケープ変異体 (antigen loss escape variant) と称されるこれらの細胞は、療法による破壊を回避し、成長し続け、野放しに蔓延し得る。ゆえに、当該技術分野において、癌および他の疾患における治療の失敗を防ぐか、または最小化する療法の必要性が存在する。

【発明の概要】

【0003】

一実施形態において、本発明は、(a) 少なくとも 2 つの抗原特異的標的指向領域、(b) 細胞外スペーサードメイン、(c) 膜貫通ドメイン、(d) 少なくとも 1 つの共刺激ドメイン、および (e) 細胞内シグナル伝達ドメインを含む、二重特異性キメラ抗原受容体を提供し、ここで、各抗原特異的標的指向領域は、抗原特異的単鎖 Fv (scFv) フラグメントを含み、かつ異なる抗原に結合し、かつここで、その二重特異性キメラ抗原受容体は、治療用制御物質と共に発現される。

【0004】

一実施形態において、本発明は、二重特異性キメラ抗原受容体および治療用制御物質の組み合わせをさらに提供し、ここで、その二重特異性キメラ抗原受容体は、(a) 少なくとも 2 つの抗原特異的標的指向領域、(b) 細胞外スペーサードメイン、(c) 膜貫通ドメイン、(d) 少なくとも 1 つの共刺激ドメイン、および (e) 細胞内シグナル伝達ドメ

10

20

30

40

50

インを含み、ここで、各抗原特異的標的指向領域は、抗原特異的単鎖 F v (s c F v) フラグメントを含み、かつ異なる抗原に結合する。

【 0 0 0 5 】

一実施形態において、本発明は、(a) 少なくとも 2 つの抗原特異的標的指向領域、(b) 細胞外スペーサードメイン、(c) 膜貫通ドメイン、(d) 少なくとも 1 つの共刺激ドメイン、および(e) 細胞内シグナル伝達ドメインを含む、二重特異性キメラ抗原受容体をさらに提供し、ここで、各抗原特異的標的指向領域は、抗原特異的単鎖 F v (s c F v) フラグメントを含み、かつ異なる抗原に結合し、かつここで、その二重特異性キメラ抗原受容体は、トランケート型上皮成長因子受容体(E G F R t)と共に発現される。

【 0 0 0 6 】

一実施形態において、本発明は、(a) 少なくとも 2 つの抗原特異的標的指向領域、(b) C D 8 ヒンジ細胞外スペーサードメイン、(c) C D 8 膜貫通ドメイン、(d) 4 - 1 B B 共刺激ドメイン、および(v i) C D 3 細胞内シグナル伝達ドメインを含む、二重特異性キメラ抗原受容体をさらに提供し、ここで、各抗原特異的標的指向領域は、抗原特異的単鎖 F v (s c F v) フラグメントを含み、かつ異なる抗原に結合し、ここで、その二重特異性キメラ抗原受容体は E G F R t と共に発現され、かつここで、その二重特異性キメラ抗原受容体および E G F R t は、T 2 A リンカーを介して連結されている。

【 0 0 0 7 】

一実施形態において、上述の二重特異性キメラ抗原受容体、二重特異性キメラ抗原受容体および治療用制御物質の組み合わせ、二重特異性キメラ抗原受容体をコードするポリペプチド、二重特異性キメラ抗原受容体を含むベクター、ウイルス、および遺伝子改変細胞、二重特異性キメラ抗原受容体および治療用制御物質の組み合わせを含むベクター、ウイルス、および遺伝子改変細胞、またはそれらの組み合わせと、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物がまた提供される。

[本発明1001]

- a . 少なくとも2つの抗原特異的標的指向領域、
- b . 細胞外スペーサードメイン、
- c . 膜貫通ドメイン、
- d . 少なくとも1つの共刺激ドメイン、および
- e . 細胞内シグナル伝達ドメイン

を含み、治療用制御物質と共に発現される、二重特異性キメラ抗原受容体であって、

各抗原特異的標的指向領域が、抗原特異的単鎖 F v (s c F v) フラグメントを含み、
かつ異なる抗原に結合する、
二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1002]

前記治療用制御物質が、トランケート型上皮成長因子受容体(E G F R t)、チミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、ニトロレダクターゼ、キサンチン - グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、ヒトカスパーゼ8、ヒトカスパーゼ9、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、リナマラーゼ / リナマリン / グルコースオキシダーゼ、デオキシリボヌクレオシドキナーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ(H R P) / インドール - 3 - 酢酸(I A A)、グルタミルシテインシンテターゼ、C D 20 / C D 20、C D 34 / チミジンキナーゼキメラ、d o x 依存カスパーゼ - 2、変異チミジンキナーゼ(H S V - T K S R 39)、A P 1903 / F a s 系、キメラサイトカイン受容体(C C R)、選択マーカー、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む、本発明1001の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1003]

前記 E G F R t が、E G F R 特異的 s i R N A 、小分子、抗 E G F R 抗体もしくはそのフラグメント、またはそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数に結合する、
本発明1002の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1004]

10

20

30

40

50

前記選択マーカーが、ジヒドロキシ葉酸受容体 (dihydroxy folate receptor) (DHFR)、変異DHFR、メチル化-DNA-タンパク質-システムメチルトランスフェラーゼ、イノシンーリン酸デヒドログナーゼII (IMDHGP2)、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む、本発明1002の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1005]

前記CCRが、(i) IL-7サイトカイン-リンカー-IL7R、(ii) IL-7サイトカイン-リンカー-IL-7Rの細胞外ドメイン-IL-7Rの膜貫通ドメイン-IL-2Rの細胞質ドメイン、(iii) IL-7サイトカイン-リンカー-IL2R、および(iv) それらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む、本発明1002の二重特異性キメラ抗原受容体。

10

[本発明1006]

前記二重特異性キメラ抗原受容体および前記治療用制御物質が、切断可能なリンカーを介して連結されている、本発明1001の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1007]

前記切断可能なリンカーが、自己切斷型の切断可能なリンカーである、本発明1006の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1008]

前記切断可能なリンカーが、2Aリンカー、2A様リンカー、またはその機能的等価物のうちのいずれか1つまたは複数である、本発明1007の二重特異性キメラ抗原受容体。

20

[本発明1009]

前記細胞外スペーサードメインが、抗体のFcフラグメント、またはその機能的等価物、フラグメント、もしくは誘導体、抗体のヒンジ領域、またはその機能的等価物、フラグメント、もしくは誘導体、抗体のCH2領域、抗体のCH3領域、人工スペーサー配列、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む、本発明1001の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1010]

前記細胞外スペーサードメインが、(i) IgG4のヒンジ、CH2、およびCH3領域、(ii) IgG4のヒンジ領域、(iii) IgG4のヒンジおよびCH2領域、(iv) CD8のヒンジ領域、(v) IgG1のヒンジ、CH2、およびCH3領域、(vi) IgG1のヒンジ領域、(vii) IgG1のヒンジおよびCH2領域、または(viii) それらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む、本発明1009の二重特異性キメラ抗原受容体。

30

[本発明1011]

前記膜貫通ドメインが、I型膜貫通タンパク質の膜貫通領域、人工疎水性配列、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む、本発明1001の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1012]

前記膜貫通ドメインが、T細胞受容体複合体の鎖の膜貫通ドメイン、CD28、CD8、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む、本発明1011の二重特異性キメラ抗原受容体。

40

[本発明1013]

前記共刺激ドメインが、CD28、CD137(4-1BB)、CD134(OX40)、Dap10、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数に由来するシグナル伝達ドメインを含む、本発明1001の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1014]

前記細胞内シグナル伝達ドメインが、ヒトCD3鎖、FcR_{IIA}、Fc_{RI}、Fc受容体の細胞質側末端、免疫受容体チロシン活性化モチーフ(ITAM)を有する細

50

胞質受容体、およびそれらの組み合わせのうちの1つまたは複数のシグナル伝達ドメインを含む、本発明1001の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1015]

前記少なくとも2つの抗原特異的標的指向ドメインのそれぞれが、癌、炎症性疾患、神経障害、糖尿病、心血管系疾患、感染性疾患、自己免疫性疾患、およびそれらの組み合わせに対して特異的な抗原から成る群から独立して選択される抗原を標的とする、本発明1001の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1016]

癌に特異的な前記抗原が、4-1BB、5T4、腺癌抗原、-フェトプロテイン、BAFF、B-リンパ腫細胞、C242抗原、CA-125、炭酸脱水酵素9(CA-IX)、C-MET、CCR4、CD152、CD19、CD20、CD200、CD22、CD221、CD23(IgE受容体)、CD28、CD30(TNFRSF8)、CD33、CD4、CD40、CD44v6、CD51、CD52、CD56、CD74、CD80、CEA、CNTO888、CTLA-4、DR5、EGFR、EpCAM、CD3、FAP、フィプロネクチンのエクストラドメイン-B、葉酸受容体1、GD2、GD3ガングリオシド、糖タンパク質75、GPNMB、HER2/neu、HGF、ヒト細胞分散因子(scatter factor)受容体キナーゼ、IGF-1受容体、IGF-I、IGG1、L1-CAM、IL-13、IL-6、インスリン様成長因子I受容体、インテグリン51、インテグリンv3、MORAb-009、MS4A1、MUC1、ムチンCanAg、N-グリコリルノイラミン酸、NPC-1C、PDGF-R、PDL192、ホスファチジルセリン、前立腺癌細胞、RANKL、RON、ROK1、SCH900105、SDC1、SLAMF7、TAG-72、テネイシンC、TGF2、TGF-、TRAIL-R1、TRAIL-R2、腫瘍抗原CTAA16.88、VEGFA、VEGFR-1、VEGFR2、ビメンチン、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む、本発明1015の二重特異性キメラ抗原受容体。

10

[本発明1017]

前記少なくとも2つの抗原特異的標的指向領域が、(i)CD19およびCD20、(ii)CD20およびL1-CAM、(iii)L1-CAMおよびGD2、(iv)EGFRおよびL1-CAM、(v)CD19およびCD22、(vi)EGFRおよびC-MET、(vii)EGFRおよびHER2、(viii)C-METおよびHER2、または(ix)EGFRおよびROK1に結合する、本発明1001の二重特異性キメラ抗原受容体。

30

[本発明1018]

前記少なくとも2つの抗原特異的標的指向領域が、CD19およびCD20に結合する、本発明1001の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1019]

炎症性疾患に特異的な前記抗原が、AOC3(VAP-1)、CAM-3001、CCL11(エオタキシン-1)、CD125、CD147(ベイシジン)、CD154(CD40L)、CD2、CD20、CD23(IgE受容体)、CD25(IL-2受容体の鎖)、CD3、CD4、CD5、IFN-、IFN-、IgE、IgEFc領域、IL-1、IL-12、IL-23、IL-13、IL-17、IL-17A、IL-22、IL-4、IL-5、IL-5、IL-6、IL-6受容体、インテグリン4、インテグリン47、リヤマ(Lamaglam)、LFA-1(CD11a)、MEDI-528、ミオスタチン、OX-40、rhUMAb7、スクレロスシン(scleroscins)、SOST、TGF1、TNF-、VEGFA、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む、本発明1015の二重特異性キメラ抗原受容体。

40

[本発明1020]

神経障害に特異的な前記抗原が、アミロイド、MABT5102A、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む、本発明1015の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1021]

糖尿病に特異的な前記抗原が、L-1、CD3、およびそれらの組み合わせのうちのい

50

すれか1つまたは複数を含む、本発明1015の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1022]

心血管系疾患に特異的な前記抗原が、C5、心筋ミオシン、CD41(インテグリン-
IIb)、フィブリンII、鎖、ITGB2(CD18)、スフィンゴシン-1-ホスファ-
ート、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む、本発明1015の
二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1023]

感染性疾患に特異的な前記抗原が、炭疽毒素、CCR5、CD4、クランピング因子A、
サイトメガロウイルス、サイトメガロウイルス糖タンパク質B、内毒素、大腸菌(Esc-
herichia coli)、B型肝炎表面抗原、B型肝炎ウイルス、HIV-1、H-
sp90、A型インフルエンザ血球凝集素、リポテイコ酸、緑膿菌(Pseudomonas
aeruginosa)、狂犬病ウイルス糖タンパク質、呼吸器合胞体ウイルス、TNF-
、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む、本発明1015の二重特異性キメラ抗原受容体。

10

[本発明1024]

本発明1001の二重特異性キメラ抗原受容体と、治療用制御物質との組み合わせ。

[本発明1025]

前記治療用制御物質が、トランケート型上皮成長因子受容体(EGFr)、チミジン
キナーゼ、シトシンデアミナーゼ、ニトロレダクターゼ、キサンチン-グアニンホスホリ-
ボシルトランスフェラーゼ、ヒトカスパーぜ8、ヒトカスパーぜ9、プリンヌクレオシドホ-
スホリラーゼ、リナマラーゼ/リナマリン/グルコースオキシダーゼ、デオキシリボヌク-
レオシドキナーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)/インドール-3-酢酸(IAA)、
グルタミルシステインシンテターゼ、CD20/CD20、CD34/チミジンキ-
ナーゼキメラ、d₀x依存カスパーぜ-2、変異チミジンキナーゼ(HSV-TKSR39)
、AP1903/Fas系、キメラサイトカイン受容体(CCR)、選択マーカー、および
それらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む、本発明1024の組み合わせ。

20

[本発明1026]

前記EGFrが、EGFr特異的siRNA、小分子、抗EGFr抗体もしくはその
フラグメント、またはそれらの組み合わせのうちのいずれかのうちの1つまたは複数に結-
合する、本発明1025の組み合わせ。

30

[本発明1027]

前記選択マーカーが、ジヒドロキシ葉酸受容体(DHFR)、変異DHFR、メチル化-
DNA-タンパク質-システインメチルトランスフェラーゼ、イノシン-リン酸デヒド-
ロゲナーゼII(IMDH2)、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは
複数を含む、本発明1025の組み合わせ。

[本発明1028]

前記CCRが、(i)IL-7サイトカイン-リンカー-IL7R、(ii)IL-7
サイトカイン-リンカー-IL-7Rの細胞外ドメイン-IL-7Rの膜貫通ドメイン-
IL-2Rの細胞質ドメイン、(iii)IL-7サイトカイン-リンカー-IL2R
、および(iv)それらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む、本発明1025の組み合わせ。

40

[本発明1029]

前記二重特異性キメラ抗原受容体および前記治療用制御物質が、切断可能なリンカーを
介して連結されている、本発明1024の組み合わせ。

[本発明1030]

前記切断可能なリンカーが、自己切斷型の切断可能なリンカーである、本発明1029の組
み合わせ。

[本発明1031]

前記切断可能なリンカーが、2Aリンカー、2A様リンカー、またはその機能的等価物の
うちのいずれか1つまたは複数である、本発明1029の組み合わせ。

50

[本発明1032]

本発明1001の二重特異性キメラ抗原受容体または本発明1024の組み合わせをコードする、ポリヌクレオチド。

[本発明1033]

本発明1032のポリヌクレオチドによってコードされる、ポリペプチド。

[本発明1034]

本発明1032のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

[本発明1035]

本発明1032のポリヌクレオチドを含む、ウイルス。

[本発明1036]

R N A ウイルスである、本発明1035のウイルス。

10

[本発明1037]

レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ隨伴ウイルス、レンチウイルス、ポックスウイルス、またはヘルペスウイルスである、本発明1035のウイルス。

[本発明1038]

本発明1032のポリヌクレオチド、本発明1001のキメラ抗原受容体、または本発明1024の組み合わせを含む、遺伝子改変細胞。

[本発明1039]

T - リンパ球 (T 細胞) である、本発明1038の遺伝子改変細胞。

[本発明1040]

ナイーブ T 細胞、セントラルメモリー T 細胞、エフェクターメモリー T 細胞、またはそれらの組み合わせである、本発明1039の遺伝子改変細胞。

20

[本発明1041]

ナチュラルキラー (N K) 細胞、造血幹細胞 (H S C) 、胚性幹細胞、または多能性幹細胞である、本発明1038の遺伝子改変細胞。

[本発明1042]

a . 本発明1001の二重特異性キメラ抗原受容体、本発明1024の組み合わせ、本発明1032のポリペプチド、本発明1034のベクター、本発明1035のウイルス、本発明1038の遺伝子改変細胞、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数と、

b . 薬学的に許容される担体と

30

を含む、薬学的組成物。

[本発明1043]

本発明1042の薬学的組成物と、

治療用制御物質を発現する細胞の増殖を阻害するための、該治療用制御物質と生化学的に相互作用するように適合された組成物との組み合わせ。

[本発明1044]

前記治療用制御物質と生化学的に相互作用するように適合された前記組成物が、ハーセブチン、メトトレキサート、セツキシマブ、チミジン類似体 (例えばガンシクロビル) 、 (E) - 5 - (2 - ブロモビニル) - 2' - デオキシウリジン (B V D U) 、 5 - フルロシトシン (f l u r o c y t o s i n e) (5 - F C) 、 5 - (アザリジン (a z a r i d i n) - 1 - イル) - 2 , 4 - ジニトロベンズアミド (C B 1954) 、 6 - チオグアニン、合成二量体化薬 (d i m e r i z i n g d r u g) (例えば、 A P 1903) 、 リン酸フルダラビン、リナマリン (l i n) 、ヌクレオシド類似体 (例えば、 B V D U 、ジフルオロデオキシチジン (d F d C) 、 1 - - D - アラビノフラノシリチミン (A l a - T)) 、 インドール - 3 - 酢酸 (I A A) 、 1 - ブチオニン - S , R - スルホキシイミン (B S O) 、 リツキシマブ (R T X) 、 ドキシサイクリン、チロシンキナーゼ阻害剤、またはそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数である、本発明1043の組み合わせ。

40

[本発明1045]

以下の工程を含む、キメラ抗原受容体を発現する一定量の T 細胞を生成する方法 :

50

(i) 本発明1034のベクターを、1個または複数個のT細胞にトランスフェクトする工程、および

(ii) 少なくとも2つの抗原特異的標的指向領域によって標的とされる抗原を発現する細胞、少なくとも2つの抗原特異的標的指向領域によって標的とされる組換え抗原を発現する細胞、またはキメラ抗原受容体に対する抗体を発現する細胞で、該1個または複数個のT細胞を刺激する工程であって、それによって該T細胞が、一定量のT細胞を生成するように増殖する、工程。

[本発明1046]

疾患の治療を必要とする対象における疾患を治療するための方法であって、該方法が、

10

(i) 本発明1042の組成物を提供する工程、および

(ii) 治療的有効量の該組成物を、該疾患を治療するように該対象に投与する工程を含み、

少なくとも2つの抗原特異的標的指向領域がそれぞれ、抗原を標的とし、かつ少なくとも1つのそのような抗原が、該疾患と関連している、該方法。

[本発明1047]

a. 少なくとも2つの抗原特異的標的指向領域、

b. 細胞外スペーサードメイン、

c. 膜貫通ドメイン、

20

d. 少なくとも1つの共刺激ドメイン、および

e. 細胞内シグナル伝達ドメイン

を含み、トランケート型上皮成長因子受容体(EGFRt)と共に発現される、二重特異性キメラ抗原受容体であって、

各抗原特異的標的指向領域が、抗原特異的単鎖Fv(sCFv)フラグメントを含み、かつ異なる抗原に結合する、二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1048]

チミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、ニトロレダクターゼ、キサンチン-グアニンホリボシルトランスフェラーゼ、ヒトカスパーーゼ8、ヒトカスパーーゼ9、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、リナマラーゼ/リナマリン/グルコースオキシダーゼ、デオキシリボヌクレオシドキナーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)/インドール-3-酢酸(IAA)、グルタミルシスティンシンテターゼ、CD20/CD20、CD34/チミジンキナーゼキメラ、d_{ox}依存カスパーーゼ-2、変異チミジンキナーゼ(HSV-TKSR39)、AP1903/Fas系、キメラサイトカイン受容体(CCR)、選択マーカー、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む治療用制御物質と共に発現される、本発明1047の二重特異性キメラ抗原受容体。

30

[本発明1049]

前記EGFRtが、EGFR特異的siRNA、小分子、抗EGFR抗体もしくはそのフラグメント、またはそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数に結合する、本発明1047の二重特異性キメラ抗原受容体。

40

[本発明1050]

前記選択マーカーが、ジヒドロキシ葉酸受容体(DHFR)、変異DHFR、メチル化-DNA-タンパク質-システィンメチルトランスフェラーゼ、イノシン-リン酸デヒドロゲナーゼII(IMDH2)、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む、本発明1048の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1051]

前記CCRが、(i)IL-7サイトカイン-リンカー-IL7R、(ii)IL-7サイトカイン-リンカー-IL-7Rの細胞外ドメイン-IL-7Rの膜貫通ドメイン-IL-2Rの細胞質ドメイン、(iii)IL-7サイトカイン-リンカー-IL2R

50

、および(i v)それらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む、本発明1048の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1052]

前記二重特異性キメラ抗原受容体および前記治療用制御物質が、切断可能なリンカーを介して連結されている、本発明1047の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1053]

前記切断可能なリンカーが、自己切斷型の切断可能なリンカーである、本発明1052の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1054]

前記切断可能なリンカーが、2Aリンカー、2A様リンカー、またはその機能的等価物のうちのいずれか1つまたは複数である、本発明1052の二重特異性キメラ抗原受容体。

10

[本発明1055]

前記細胞外スペーサードメインが、抗体のFcフラグメント、またはその機能的等価物、フラグメント、もしくは誘導体、抗体のヒンジ領域、またはその機能的等価物、フラグメント、もしくは誘導体、抗体のCH2領域、抗体のCH3領域、人工スペーサー配列、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む、本発明1047の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1056]

前記細胞外スペーサードメインが、(i) IgG4のヒンジ、CH2、およびCH3領域、(ii) IgG4のヒンジ領域、(iii) IgG4のヒンジおよびCH2領域、(iv) CD8のヒンジ領域、(v) IgG1のヒンジ、CH2、およびCH3領域、(vi) IgG1のヒンジおよびCH2領域、ならびに(vii) これらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む、本発明1055の二重特異性キメラ抗原受容体。

20

[本発明1057]

前記膜貫通ドメインが、I型膜貫通タンパク質の膜貫通領域、人工疎水性配列、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む、本発明1047の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1058]

前記膜貫通ドメインが、T細胞受容体複合体の鎖の膜貫通ドメイン、CD28、CD8、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む、本発明1057の二重特異性キメラ抗原受容体。

30

[本発明1059]

前記共刺激ドメインが、CD28、CD137(4-1BB)、CD134(OX40)、Dap10、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数に由来するシグナル伝達ドメインを含む、本発明1047の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1060]

前記細胞内シグナル伝達ドメインが、ヒトCD3鎖、FcR_{IIA}、Fc_{RI}、Fc受容体の細胞質側末端、免疫受容体チロシン活性化モチーフ(ITAM)を有する細胞質受容体、およびそれらの組み合わせのうちの1つまたは複数のシグナル伝達ドメインを含む、本発明1047の二重特異性キメラ抗原受容体。

40

[本発明1061]

前記少なくとも2つの抗原特異的標的指向ドメインのそれぞれが、癌、炎症性疾患、神経障害、糖尿病、心血管系疾患、感染性疾患、自己免疫性疾患、およびそれらの組み合わせに対して特異的な抗原から成る群から独立して選択される抗原を標的とする、本発明1047の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1062]

癌に特異的な前記抗原が、4-1BB、5T4、腺癌抗原、-フェトプロテイン、BAF

50

F、B-リンパ腫細胞、C242抗原、CA-125、炭酸脱水酵素9(CA-IX)、C-MET、CCR4、CD152、CD19、CD20、CD200、CD22、CD221、CD23(IgE受容体)、CD28、CD30(TNFRSF8)、CD33、CD4、CD40、CD44v6、CD51、CD52、CD56、CD74、CD80、CEA、CNTO888、CTL A-4、DR5、EGFR、EpCAM、CD3、FAP、フィブロネクチンのエクストラドメイン-B、葉酸受容体1、GD2、GD3ガングリオシド、糖タンパク質75、GPNMB、HER2/neu、HGF、ヒト細胞分散因子受容体キナーゼ、IGF-1受容体、IGF-I、IGG1、L1-CAM、IL-13、IL-6、インスリン様成長因子I受容体、インテグリン51、インテグリンv3、MORAb-009、MS4A1、MUC1、ムチンCanna g、N-グリコリルノイラミン酸、NPC-1C、PDGF-R、PDL192、ホスファチジルセリン、前立腺癌細胞、RANKL、RON、ROR1、SCH 900105、SDC1、SLAMF7、TAG-72、テネイシンC、TGF 2、TGF-、TRAIL-R1、TRAIL-R2、腫瘍抗原CTAA16.88、VEGFA、VEGFR-1、VEGFR2、ビメンチン、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む、本発明1061の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1063]

前記少なくとも2つの抗原特異的標的指向領域が、(i) CD19およびCD20、(ii) CD20およびL1-CAM、(iii) L1-CAMおよびGD2、(iv) EGFRおよびL1-CAM、(v) CD19およびCD22、(vi) EGFRおよびC-MET、(vii) EGFRおよびHER2、(viii) C-METおよびHER2、または(ix) EGFRおよびROR1に結合する、本発明1047の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1064]

前記少なくとも2つの抗原特異的標的指向領域が、CD19およびCD20に結合する、本発明1047の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1065]

炎症性疾患に特異的な前記抗原が、AOC3(VAP-1)、CAM-3001、CCL11(エオタキシン-1)、CD125、CD147(ペイシジン)、CD154(CD40L)、CD2、CD20、CD23(IgE受容体)、CD25(IL-2受容体の鎖)、CD3、CD4、CD5、IFN-、IFN-、IgE、IgE Fc領域、IL-1、IL-12、IL-23、IL-13、IL-17、IL-17A、IL-22、IL-4、IL-5、IL-5、IL-6、IL-6受容体、インテグリン4、インテグリン47、リヤマ、LFA-1(CD11a)、MED1-528、ミオスタチン、OX-40、rhuma b7、スクレロスシン、SOST、TGF 1、TNF-、VEGFA、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む、本発明1061の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1066]

神経障害に特異的な前記抗原が、アミロイド、MAB T5102A、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む、本発明1061の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1067]

糖尿病に特異的な前記抗原が、L-1、CD3、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む、本発明1061の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1068]

心血管系疾患に特異的な前記抗原が、C5、心筋ミオシン、CD41(インテグリン-1Ib)、フィブリンII、鎖、ITGB2(CD18)、スフィンゴシン-1-ホスファート、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む、本発明1061の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1069]

感染性疾患に特異的な前記抗原が、炭疽毒素、CCR5、CD4、クランピング因子A、サイトメガロウイルス、サイトメガロウイルス糖タンパク質B、内毒素、大腸菌、B型肝炎表面抗原、B型肝炎ウイルス、HIV-1、Hsp90、A型インフルエンザ血球凝集素

10

20

30

40

50

、リポティコ酸、緑膿菌、狂犬病ウイルス糖タンパク質、呼吸器合胞体ウイルス、T N F - 、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む、本発明1061の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1070]

本発明1047の二重特異性キメラ抗原受容体と、EGFRtとの組み合わせ。

[本発明1071]

前記EGFRtが、EGFR特異的siRNA、小分子、抗EGFR抗体もしくはそのフラグメント、またはそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数に結合する、本発明1070の組み合わせ。

[本発明1072]

10

前記二重特異性キメラ抗原受容体および前記EGFRtが、切断可能なリンカーを介して連結されている、本発明1070の組み合わせ。

[本発明1073]

前記切断可能なリンカーが、自己切斷型の切断可能なリンカーである、本発明1072の組み合わせ。

[本発明1074]

前記切断可能なリンカーが、2Aリンカー、2A様リンカー、またはその機能的等価物のうちのいずれか1つまたは複数である、本発明1072の組み合わせ。

[本発明1075]

20

本発明1047の二重特異性キメラ抗原受容体または本発明1070の組み合わせをコードする、ポリヌクレオチド。

[本発明1076]

本発明1075のポリヌクレオチドによってコードされる、ポリペプチド。

[本発明1077]

本発明1075のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

[本発明1078]

本発明1075のポリヌクレオチドを含む、ウイルス。

[本発明1079]

RNAウイルスである、本発明1078のウイルス。

[本発明1080]

30

レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ隨伴ウイルス、レンチウイルス、ポックスウイルス、またはヘルペスウイルスである、本発明1078のウイルス。

[本発明1081]

本発明1075のポリヌクレオチド、本発明1047のキメラ抗原受容体、または本発明1070の組み合わせを含む、遺伝子改変細胞。

[本発明1082]

T-リンパ球（T細胞）である、本発明1081の遺伝子改変細胞。

[本発明1083]

ナイーブT細胞、セントラルメモリーT細胞、エフェクターメモリーT細胞、またはそれらの組み合わせである、本発明1082の遺伝子改変細胞。

40

[本発明1084]

ナチュラルキラー（NK）細胞、造血幹細胞（HSC）、胚性幹細胞、または多能性幹細胞である、本発明1081の遺伝子改変細胞。

[本発明1085]

a. 本発明1047の二重特異性キメラ抗原受容体、本発明1070の組み合わせ、本発明1076のポリペプチド、本発明1077のベクター、本発明1078のウイルス、本発明1081の遺伝子改変細胞、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数と、

b. 薬学的に許容される担体と

を含む、薬学的組成物。

[本発明1086]

50

本発明1085の薬学的組成物と、
E G F R t を発現する細胞の増殖を阻害するための、治療用制御物質と生化学的に相互作用するように適合された組成物と
の組み合わせ。

[本発明1087]

前記治療用制御物質と生化学的に相互作用するように適合された前記組成物が、ハーセプチン、メトトレキサート、セツキシマブ、チミジン類似体（例えばガンシクロビル）、(E)-5-(2-プロモビニル)-2'-デオキシウリジン(BVDU)、5-フルロシトシン(5-Fc)、5-(アザリジン-1-イル)-2',4-ジニトロベンズアミド(CB1954)、6-チオグアニン、合成二量体化薬（例えば、AP1903）、リン酸フルダラビン、リナマリン(lyn)、ヌクレオシド類似体（例えば、BVDU、ジフルオロロデオキシシチジン(dFdC)）、1-D-アラビノフランシルチミン(アラ-T)）、インドール-3-酢酸(IAA)、1-ブチオニン-S,R-スルホキシイミン(BSO)、リツキシマブ(RTX)、ドキシサイクリン、チロシンキナーゼ阻害剤、またはそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数である、本発明1086の組み合わせ。

10

[本発明1088]

以下の工程を含む、キメラ抗原受容体を発現する一定量のT細胞を生成する方法：
(i) 本発明1077のベクターを、1個または複数個のT細胞にトランスフェクトする工程、および
(ii) 少なくとも2つの抗原特異的標的指向領域によって標的とされる抗原を発現する細胞、少なくとも2つの抗原特異的標的指向領域によって標的とされる組換え抗原を発現する細胞、またはキメラ抗原受容体に対する抗体を発現する細胞で、該1個または複数個のT細胞を刺激する工程であって、それによって該T細胞が、一定量のT細胞を生成するように増殖する、工程。

20

[本発明1089]

疾患の治療を必要とする対象における疾患を治療するための方法であって、
該方法が、
(i) 本発明1085の組成物を提供する工程、および
(ii) 治療的有効量の該組成物を、該疾患を治療するように該対象に投与する工程
を含み、
少なくとも2つの抗原特異的標的指向領域がそれぞれ、抗原を標的とし、かつ少なくとも1つのそのような抗原が、該疾患と関連している、
該方法。

30

[本発明1090]

図4、9、または11に記載される配列を含む、二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1091]

a. 少なくとも2つの抗原特異的標的指向領域、
b. CD8 ヒンジ細胞外スペーサードメイン、
c. CD8 膜貫通ドメイン、
d. 4-1BB共刺激ドメイン、および
e. CD3 細胞内シグナル伝達ドメイン

40

を含み、トランケート型上皮成長因子受容体(EGFRt)と共に発現される、二重特異性キメラ抗原受容体であって、

各抗原特異的標的指向領域が、抗原特異的単鎖Fv(scfv)フラグメントを含み、かつ異なる抗原に結合し、

二重特異性キメラ抗原受容体およびEGFRtが、T2Aリンカーを介して連結されている、

二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1092]

チミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、ニトロレダクターゼ、キサンチン-グアニ

50

ンホスホリボシリトランスフェラーゼ、ヒトカスパーーゼ8、ヒトカスパーーゼ9、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、リナマラーゼ/リナマリン/グルコースオキシダーゼ、デオキシリボヌクレオシドキナーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)/インドール-3-酢酸(IAA)、グルタミルシスティンシンテターゼ、CD20/CD20、CD34/チミジンキナーゼキメラ、d₀x依存カスパーーゼ-2、変異チミジンキナーゼ(HSV-TK S R 39)、AP1903/Fas系、キメラサイトカイン受容体(CCR)、選択マーカー、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む治療用制御物質と共に発現される、本発明1091の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1093]

前記EGFRtが、EGFR特異的siRNA、小分子、抗EGFR抗体もしくはそのフラグメント、またはそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数に結合する、本発明1091の二重特異性キメラ抗原受容体。 10

[本発明1094]

前記選択マーカーが、ジヒドロキシ葉酸受容体(DHFR)、変異DHFR、メチル化-DNA-タンパク質-システィンメチルトランスフェラーゼ、イノシン-リン酸デヒドロゲナーゼII(IMDH P2)、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む、本発明1092の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1095]

前記CCRが、(i)IL-7サイトカイン-リンカー-IL7R、(ii)IL-7サイトカイン-リンカー-IL-7Rの細胞外ドメイン-IL-7Rの膜貫通ドメイン-IL-2Rの細胞質ドメイン、(iii)IL-7サイトカイン-リンカー-IL2R、および(iv)それらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む、本発明1092の二重特異性キメラ抗原受容体。 20

[本発明1096]

前記少なくとも2つの抗原特異的標的指向ドメインのそれぞれが、癌、炎症性疾患、神経障害、糖尿病、心血管系疾患、感染性疾患、自己免疫性疾患、およびそれらの組み合わせに対して特異的な抗原から成る群から独立して選択される抗原を標的とする、本発明1091の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1097]

癌に特異的な前記抗原が、4-1BB、5T4、腺癌抗原、-フェトプロテイン、BAFF、B-リンパ腫細胞、C242抗原、CA-125、炭酸脱水酵素9(CA-IX)、C-MET、CCR4、CD152、CD19、CD20、CD200、CD22、CD221、CD23(IgE受容体)、CD28、CD30(TNFRSF8)、CD33、CD4、CD40、CD44v6、CD51、CD52、CD56、CD74、CD80、CEA、CNTO888、CTLA-4、DR5、EGFR、EpCAM、CD3、FAP、フィプロネクチンのエクストラドメイン-B、葉酸受容体1、GD2、GD3ガングリオシド、糖タンパク質75、GP NMB、HER2/neu、HGF、ヒト細胞分散因子受容体キナーゼ、IGF-1受容体、IGF-I、IGG1、L1-CAM、IL-13、IL-6、インスリン様成長因子I受容体、インテグリン51、インテグリンv3、MORAb-009、MS4A1、MUC1、ムチンCanaag、N-グリコリルノイラミン酸、NPC-1C、PDGF-R、PDL192、ホスファチジルセリン、前立腺癌細胞、RANKL、RON、ROR1、SCH 900105、SDC1、SLAMF7、TAG-72、テネイシンC、TGF-2、TGF-、TRAIL-R1、TRAIL-R2、腫瘍抗原CTAA16.88、VEGFA、VEGFR-1、VEGFR2、ビメンチン、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む、本発明1096の二重特異性キメラ抗原受容体。 30

[本発明1098]

前記少なくとも2つの抗原特異的標的指向領域が、(i)CD19およびCD20、(ii)CD20およびL1-CAM、(iii)L1-CAMおよびGD2、(iv)EGFRおよびL1-CAM、(v)CD19およびCD22、(vi)EGFRおよびC-MET、(vii)EGFRおよびHER2、(viii)C-METおよびHER2、または(ix)

10

20

30

40

50

) E G F R および R O R 1 に結合する、本発明1096の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1099]

前記少なくとも2つの抗原特異的標的指向領域が、 C D 19 および C D 20 に結合する、本発明1096の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1100]

炎症性疾患に特異的な前記抗原が、 A O C 3 (V A P - 1) 、 C A M - 3001 、 C C L 11 (エオタキシン - 1) 、 C D 125 、 C D 147 (ベイシジン) 、 C D 154 (C D 40 L) 、 C D 2 、 C D 20 、 C D 23 (I g E 受容体) 、 C D 25 (I L - 2 受容体の 鎖) 、 C D 3 、 C D 4 、 C D 5 、 I F N - 、 I F N - 、 I g E 、 I g E F c 領域、 I L - 1 、 I L - 12 、 I L - 23 、 I L - 13 、 I L - 17 、 I L - 17 A 、 I L - 22 、 I L - 4 、 I L - 5 、 I L - 5 、 I L - 6 、 I L - 6 受容体、インテグリン 4 、インテグリン 4 7 、リヤマ、 L F A - 1 (C D 11 a) 、 M E D I - 528 、ミオスタチン、 O X - 40 、 r h u M A b 7 、スクレロスシン、 S O S T 、 T G F 1 、 T N F - 、 V E G F - A 、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む、本発明1096の二重特異性キメラ抗原受容体。

10

[本発明1101]

神経障害に特異的な前記抗原が、 アミロイド、 M A B T 5102 A 、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む、本発明1096の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1102]

糖尿病に特異的な前記抗原が、 L - 1 、 C D 3 、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む、本発明1096の二重特異性キメラ抗原受容体。

20

[本発明1103]

心血管系疾患に特異的な前記抗原が、 C 5 、心筋ミオシン、 C D 41 (インテグリン - I I b) 、フィブリン I I 、 鎖、 I T G B 2 (C D 18) 、スフィンゴシン - 1 - ホスファート、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む、本発明1096の二重特異性キメラ抗原受容体。

[本発明1104]

感染性疾患に特異的な前記抗原が、炭疽毒素、 C C R 5 、 C D 4 、クランピング因子 A 、サイトメガロウイルス、サイトメガロウイルス糖タンパク質 B 、内毒素、大腸菌、 B 型肝炎表面抗原、 B 型肝炎ウイルス、 H I V - 1 、 H s p 90 、 A 型インフルエンザ血球凝集素、リポテイコ酸、緑膿菌、狂犬病ウイルス糖タンパク質、呼吸器合胞体ウイルス、 T N F - 、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数を含む、本発明1096の二重特異性キメラ抗原受容体。

30

【図面の簡単な説明】

【 0 0 0 8 】

例となる実施形態が、参考図面中に例示されている。本明細書に開示される実施形態および図面は、限定ではなく例示であると考えられることが意図される。

【 0 0 0 9 】

【図1】本発明の一実施形態に従う、本発明のキメラ抗原受容体の略図を示す。 A S T R は抗原特異的標的指向領域であり、 L はリンカーであり、 E S D は細胞外スペーサードメインであり、 T M は膜貫通ドメインであり、 C S D は共刺激ドメインであり、 I S D は細胞内シグナル伝達ドメインである。

40

【図2】本発明の一実施形態に従う、(a) 抗 C D 19 × C D 20 C A R の成分、および(b) e p H I V - 7 レンチウイルスベクタートランスファープラスミドにパッケージ化された完全 c D N A を示す。

【図3】本発明の一実施形態に従う、二重特異性 C A R C D 19 s c F v - G 1 y 4 S e r 1 リンカー - C D 20 s c F v - I g G 4 ヒンジ - C D 28 t m - 4 1 B B - C D 3 - T 2 A - E G F R t _ e p H I V 7 の核酸配列を示す。

【図4】本発明の一実施形態に従う、二重特異性 C A R C D 19 s c F v - G 1 y 4 S e r 1 リンカー - C D 20 s c F v - I g G 4 ヒンジ - C D 28 t m - 4 1 B B - C D 3

50

- T 2 A - E G F R t _ e p H I V 7 の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

【図 5】本発明の一実施形態に従う、CD19scFv - G1y4Ser1リンカー - CD20scFv - IgG4ヒンジ - CD28tm - CD28gg - CD3 導入遺伝子構築物を示す。

【図 6】本発明の一実施形態に従う、外因性 c 非依存性成長を支持するための C CR プラットフォームの発生を示す。(a) 野生型対キメラサイトカイン受容体の概略図。IL - 7R 構成的サイトカイン受容体 (C CR7) は、(G₄S)₂ リンカーを介して完全長ヒト IL - 7R 鎖につながれたヒト IL - 7 サイトカインから成る。IL - 2R 構成的サイトカイン受容体 (C CR2) は、IL - 7R 細胞内シグナル伝達ドメインがヒト IL - 2 / IL - 15R 細胞質ドメインで置換されていることを除いて、C CR7 と同一である。(b) 発現構築物 C CR - T 2 A - CD19t の図。

【図 7】本発明の一実施形態に従う、本発明の一実施形態、すなわち、IgG4 のヒンジ領域、CD28 の膜貫通ドメイン、4 - 1BB の共刺激ドメイン、および CD3 の細胞質ドメインを含む主鎖 CAR の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

【図 8】本発明の一実施形態に従う、本発明の一実施形態、すなわち、GMCSFRss - CD19scFv - G1y4Ser リンカー - CD20scFv - huIgG ヒンジ / CH2 / CH3 - CD28tm / CD28cyto - 41BB - CD3 の核酸配列を示す。GMCSFRss は、GMCSFR 由来のシグナル配列である。

【図 9】本発明の一実施形態に従う、本発明の一実施形態、すなわち、GMCSFRss - CD19scFv - G1y4Ser リンカー - CD20scFv - huIgG ヒンジ / CH2 / CH3 - CD28tm / CD28cyto - 41BB - CD3 の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。GMCSFRss は、GMCSFR 由来のシグナル配列である。

【図 10】本発明の一実施形態に従う、本発明の一実施形態、すなわち、GMCSFRss - CD19scFv - G1y4Ser リンカー - CD20scFv - CD8 ヒンジ - CD8 tm - 41BB - CD3 - T 2 A - E G F R t の核酸配列を示す。GMCSFRss は、GMCSFR 由来のシグナル配列である。

【図 11】本発明の一実施形態に従う、本発明の一実施形態、すなわち、GMCSFRss - CD19scFv - G1y4Ser リンカー - CD20scFv - CD8 ヒンジ - CD8 tm - 41BB - CD3 - T 2 A - E G F R t の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。GMCSFRss は、GMCSFR 由来のシグナル配列である。

【図 12】本発明の一実施形態に従う、本発明の一実施形態、すなわち、T 2 A - E G F R t の核酸配列を示す。

【図 13】本発明の一実施形態に従う、本発明の一実施形態、すなわち、T 2 A - E G F R t の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

【発明を実施するための形態】

【0010】

本明細書に引用されるすべての参照物は、完全に明記されるかのように、参照することによりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。別途定義されない限り、本明細書で使用される技術および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3rd ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2001)、March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 5th ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2001)、およびSambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2001) は、当業者に本出願において使用される用語の多くの一般的な指針を提供する。

【0011】

10

20

30

40

50

当業者は、本発明の実践において使用され得る、明細書に記載されるものと類似または同等の多くの方法および材料を理解するであろう。実際に、本発明は、記載の方法および材料には全く限定されない。本発明の目的に対して、以下の用語が下記に定義される。

【0012】

本明細書に記載の発明は、キメラ抗原受容体を提供する。キメラ抗原受容体は、免疫特異性を遺伝子改変細胞に移植する改変受容体である。単一のキメラ抗原受容体（CAR）が多重抗原に対する特異性を持つことによって、様々な利益を達成することができ、とりわけ、1患者あたり多数種のT細胞生成物を作製することと比べて労力が著しく減少することが挙げられる。

【0013】

定義

キメラ抗原受容体の成分

本明細書で使用される場合、「抗原特異的標的指向領域」（ASTR）は、特定の抗原を標的とするCARの領域を指す。本発明のCARは、少なくとも2つの異なる抗原を標的とする少なくとも2つの標的指向領域を含む。一実施形態において、CARは、少なくとも3つ以上の異なる抗原を標的とする3つ以上の標的指向領域を含む。CAR上の標的指向領域は、細胞外である。いくつかの実施形態において、抗原特異的標的指向領域は、抗体またはその機能的等価物またはそのフラグメントまたはその誘導体を含み、標的指向領域のそれぞれは、異なる抗原を標的とする。標的指向領域は、そのそれぞれが標的抗原に特異的である、完全長重鎖、Fabフラグメント、単鎖Fv（scFv）フラグメント、二価单鎖抗体、またはダイアボディを含み得る。しかしながら、そのそれぞれが本発明の様々な実施形態において使用され得る、結合サイトカイン（サイトカイン受容体を有する細胞の認識をもたらす）、アフィボディ、天然型受容体由来のリガンド結合ドメイン、（例えば、腫瘍細胞上の）受容体の溶解性タンパク質/ペプチドリガンド、ペプチド、および免疫応答を促すためのワクチン等の多数の代替物が存在する。実際に、当業者に理解されるように、高い親和性で所与の抗原に結合するほぼすべての分子が、抗原特異的標的指向領域として使用され得る。

【0014】

本明細書で使用される場合、「キメラ抗原受容体」または「CAR」または「CARs」は、抗原特異性を細胞（例えば、ナイーブT細胞、セントラルメモリーT細胞、エフェクターメモリーT細胞、またはそれらの組み合わせ等のT細胞）に移植する改変受容体を指す。CARはまた、人工T細胞受容体、キメラT細胞受容体、またはキメラ免疫受容体としても知られる。本発明のCARは、少なくとも2つの抗原特異的標的指向領域、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、1つまたは複数の共刺激ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。2つ以上の抗原特異的標的指向領域は、少なくとも2つの異なる抗原を標的とし、直列に配列され、リンカー配列によって分離され得る。一実施形態において、細胞外スペーサードメインは任意である。別の実施形態において、CARは、二重特異性CARである。二重特異性CARは、2つの異なる抗原に特異的である。

【0015】

本明細書で使用される場合、「共刺激ドメイン」（CSD）は、メモリー細胞の増殖、生存、および/または発生を増強するCARの部分を指す。本発明のCARは、1つまたは複数の共刺激ドメインを含み得る。各共刺激ドメインは、例えば、TNFRスーパーファミリーのメンバー、CD28、CD137（4-1BB）、CD134（OX40）、Dap10、CD27、CD2、CD5、ICAM-1、LFA-1（CD11a/CD18）、Lck、TNFR-I、TNFR-II、Fas、CD30、CD40、またはそれらの組み合わせのいずれか1つまたは複数の共刺激ドメインを含む。（例えば、他のタンパク質由来の）他の共刺激ドメインが、当業者に明白であり、本発明の代替の実施形態に関連して使用され得る。

【0016】

本明細書で使用される場合、「細胞外スペーサードメイン」（ESD）は、抗原特異的

10

20

30

40

50

標的指向領域と膜貫通ドメインとの間の親水性領域を指す。いくつかの実施形態において、本発明のCARは、細胞外スペーサードメインを含む。他の実施形態において、本発明のCARは、細胞外スペーサードメインを含まない。その細胞外スペーサードメインは、抗体のFcフラグメント、またはそのフラグメントもしくは誘導体、抗体のヒンジ領域、またはそのフラグメントもしくは誘導体、抗体のCH2領域、抗体のCH3領域、人工スペーサー配列、またはそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない。細胞外スペーサードメインの例には、CD8ヒンジ、ならびに、例えばG1y3程小さくてもよい、ポリペプチドから作製される人工スペーサー、またはIgG(ヒトIgG4等)のCH1およびCH3ドメインが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、細胞外スペーサードメインは、(i) IgG4のヒンジ、CH2、およびCH3領域、(ii) IgG4のヒンジ領域、(iii) IgG4のヒンジおよびCH2、(iv) CD8のヒンジ領域、(v) IgG1のヒンジ、CH2、およびCH3領域、(vi) IgG1のヒンジ領域、または(vi) IgG1のヒンジおよびCH2領域のいずれか1つまたは複数である。他の細胞外スペーサードメインが当業者に明白であり、本発明の代替の実施形態に関連して使用され得る。

【0017】

本明細書で使用される場合、「細胞内シグナル伝達ドメイン」(ISD)または「細胞質ドメイン」は、エフェクター機能シグナルを伝達し、細胞にその特殊化された機能を実施するように指示する、CARの部分を指す。エフェクター機能シグナルを伝達するドメインの例には、T細胞受容体複合体の鎖またはそのホモログのいずれか(例えば、鎖FcR1および鎖、MB1(Ig)鎖、B29(Ig)鎖等)、ヒトCD3鎖、CD3ポリペプチド(、および)、sykファミリーチロシンキナーゼ(Syk、ZAP70等)、srcファミリーチロシンキナーゼ(Lck、Fyn、Lyn等)、ならびにCD2、CD5、およびCD28等のT細胞伝達に関与する他の分子が挙げられるが、これらに限定されない。他の細胞内シグナル伝達ドメインが当業者に明白であり、本発明の代替の実施形態に関連して使用され得る。

【0018】

本明細書で使用される場合、「リンカー」(L)または「リンカードメイン」または「リンカー領域」は、本発明のCARのドメイン/領域のいずれかを一緒に連結する、約1~100アミノ酸の長さのオリゴまたはポリペプチド領域を指す。リンカーは、隣接するタンパク質ドメインが互いに自由に動くように、グリシンおよびセリンのようなフレキシブル残基で構成され得る。2つの隣接するドメインが互いに立体的に干渉しないことを確実にすることが望ましい場合、より長いリンカーが使用され得る。リンカーは、切断可能であってもよく、または切断可能でなくてもよい。切断可能なリンカーの例には、2Aリンカー(例えば、T2A)、2A様リンカー、またはそれらの機能的等価物、およびそれらの組み合わせが挙げられる。いくつかの実施形態において、リンカーには、ピコルナウイルス2A様リンカー、ブタテッショウウイルス(P2A)のCHYSEL配列、ゾセア・アシグナ(Thosea asigna)ウイルス(T2A)、またはそれらの組み合わせ、変異体、および機能的等価物が挙げられる。他の実施形態において、リンカー配列は、2Aグリシンと2Bプロリンとの間に切断をもたらす、Asp-Val/Ile-Glu-X-Asn-Pro-Gly(2A)-Pro(2B)モチーフを含んでもよい。他のリンカーが当業者に明白であり、本発明の代替の実施形態に関連して使用され得る。

【0019】

本明細書で使用される場合、「膜貫通ドメイン」(TMD)は、細胞膜を横断するCARの領域を指す。本発明のCARの膜貫通ドメインは、膜貫通タンパク質(例えば、I型膜貫通タンパク質)、人工疎水性配列、またはそれらの組み合わせの膜貫通領域である。他の膜貫通ドメインが当業者に明白であり、本発明の代替の実施形態に関連して使用され得る。

【0020】

その他

本明細書で使用される場合、「抗原消失エスケープ変異体」は、標的抗原の発現の低減または消失を示す細胞を指し、それらの抗原は、本発明のCARによって標的とされる。

【0021】

本明細書で使用される場合、「B細胞関連疾患」は、B細胞免疫不全、自己免疫性疾患、ならびに／またはB細胞と関連している過剰／無制御細胞増殖（リンパ腫および／もしくは白血病を含む）を含む。本発明の二重特異性CARが治療手段として使用され得る、そのような疾患の例には、全身性エリテマトーデス（SLE）、糖尿病、関節リウマチ（RA）、反応性関節炎、多発性硬化症（MS）、尋常性天疱瘡、セリアック病、クローン病、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、自己免疫性甲状腺疾患、X連鎖無ガンマグロブリン血症、プレB急性リンパ芽球性白血病、全身性エリテマトーデス、分類不能型免疫不全、慢性リンパ性白血病、選択的IgA欠乏および／またはIgGサブクラス欠乏と関連している疾患、B細胞系リンパ腫（ホジキンリンパ腫および／または非ホジキンリンパ腫）、胸腺腫を伴う免疫不全、一過性低ガンマグロブリン血症および／または高IgM症候群、ならびにEBV媒介性リンパ増殖性疾患等のウイルス媒介性B細胞疾患、およびB細胞が病態生理に関与する慢性感染症が挙げられるが、これらに限定されない。

【0022】

「有益な結果」には、疾患状態の重症度を緩和するか、もしくは軽減する、疾患状態が悪化するのを防ぐ、疾患状態を治癒する、疾患状態を発症するのを防ぐ、患者が疾患状態を発症する機会を低減する、および患者の寿命もしくは寿命の予想値を伸ばすことが含まれるが、これらには全く限定されない。

【0023】

「癌」および「癌性」とは、典型的には、制御されていない細胞成長によって特徴付けられる、哺乳動物における生理的状態を指すか、または述べる。癌の例には、B細胞リンパ腫（ホジキンリンパ腫および／または非ホジキンリンパ腫）、脳腫瘍、乳癌、結腸癌、肺癌、肝細胞癌、胃癌、膵臓癌、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、尿路の癌、甲状腺癌、腎癌、癌腫、黒色腫、頭頸部癌、脳癌、ならびにアンドロゲン依存性前立腺癌およびアンドロゲン非依存性前立腺癌を含むがこれらに限定されない前立腺癌が挙げられるが、これらに限定されない。

【0024】

本明細書で使用される場合、「共発現」は、2つ以上の遺伝子の同時の発現を指す。遺伝子は、例えば、単一のタンパク質または単一のポリペプチド鎖としてのキメラタンパク質をコードする核酸であり得る。例えば、本発明のCARは、治療用制御物質（例えば、トランケート型上皮成長因子（EGFRt））と共に発現され得、CARは、第1のポリヌクレオチド鎖でコードされ、治療用制御物質は、第2のポリヌクレオチド鎖でコードされる。一実施形態において、第1および第2のポリヌクレオチド鎖は、切断可能なリンカーをコードする核酸配列によって連結される。CARおよび治療用制御物質系をコードするポリヌクレオチドは、IRES配列によって連結される。代替的に、CARおよび治療用制御物質は、リンカーを介して連結されていないが、代わりに例えば、2つの異なるベクターによってコードされている、2つの異なるポリヌクレオチドによってコードされる。さらに、本発明のCARは、治療用制御物質およびCCR、治療用制御物質およびDHF R（例えば、変異DHF R）、または治療用制御物質およびCCRおよびDHF R（例えば、変異DHF R）と共に発現され得る。CAR、治療用制御物質、およびCCRは、共発現され、それぞれ、第1、第2、および第3のポリヌクレオチド配列によってコードされ得、その第1、第2、および第3のポリヌクレオチド配列はIRES配列または切断可能なリンカーコードする配列を介して連結される。代替的に、これらの配列は、リンカーを介して連結されないが、代わりに例えば、別々のベクターによってコードされる。CAR、治療用制御物質、およびDHF R（例えば、変異DHF R）は、共発現され、第1、第2、および第4のポリヌクレオチド配列によってコードされ得、それぞれ、その第1、第2、および第4のポリヌクレオチド配列はIRES配列を介して、または切断可能なリンカーコードする配列を介して連結される。代替的に、これらの配列は、リンカーを介して連結されないが、代わりに例えば、別々のベクターによってコードされる。

10

20

30

40

50

連結されないが、代わりに例えば、別々のベクターによってコードされる。CAR、治療用制御物質、CCR、およびDHF (例えば、変異DHF) は、共発現され、それぞれ、第1、第2、第3、および第4のポリヌクレオチド配列によってコードされ得、その第1、第2、第3、および第4のポリヌクレオチド配列はIRES配列または切断可能なリンカーコードする配列を介して連結される。代替的に、これらの配列は、リンカーを介して連結されないが、代わりに例えば、別々のベクターによってコードされる。前述の配列が別々のベクターによってコードされる場合、これらのベクターは、同時に、または連続してトランスフェクトされ得る。

【0025】

本明細書で使用される場合、「状態」、「疾患状態 (disease conditions)」、「疾患」、および「疾患状態 (disease state)」は、患部細胞が、例えば、患部細胞上の特異抗原に対する抗体を発現する本発明のCARによって標的とされ得る、生理学的状態を含む。標的とされ得る抗原の例には、B細胞 (CD19 およびCD20) 上で発現される抗原、癌腫、肉腫、リンパ腫、白血病、胚細胞性腫瘍、芽細胞腫上で発現される抗原、種々の免疫細胞上で発現される抗原、ならびに種々の血液疾患、自己免疫性疾患、および/または炎症性疾患と関連している細胞上で発現される抗原が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0026】

本明細書で使用される場合、「遺伝子修飾細胞によって標的とされる疾患」は、治療的に有益な結果を実現するように遺伝子修飾細胞が患部細胞または健常な細胞を標的とするかどうかに関係なく、本発明の遺伝子修飾細胞によって、任意の疾患における任意の手段に関与する任意の細胞が標的とされることを包含する。遺伝子修飾細胞には、遺伝子修飾T細胞、NK細胞、造血幹細胞、多能性胚性幹細胞、または胚性幹細胞が含まれるが、これらに限定されない。遺伝子修飾細胞は、本発明のCARを発現し、そのCARは、標的細胞の表面上で発現される抗原のいずれかを標的とし得る。標的とされ得る抗原の例には、B細胞上で発現される抗原、癌腫、肉腫、リンパ腫、白血病、胚細胞性腫瘍、および芽細胞腫上で発現される抗原、種々の免疫細胞上で発現される抗原、ならびに種々の血液疾患、自己免疫性疾患、および/または炎症性疾患と関連している細胞上で発現される抗原が挙げられるが、これらに限定されない。標的とされ得る他の抗原が当業者に明白であり、それらの代替の実施形態に関連して本発明のCARによって標的とされ得る。

20

【0027】

「エフェクター機能」は、分化した細胞の特殊化された機能を指す。T細胞のエフェクター機能は、例えば、サイトカインの分泌を含む、細胞溶解活性またはヘルパー活性であり得る。

【0028】

本明細書で使用される場合、「遺伝子修飾細胞」、「再配向細胞 (redirection cell)」、「遺伝子改変細胞」、または「修飾細胞」は、本発明のCARを発現する細胞を指す。

【0029】

本明細書で使用される場合、「免疫細胞」は、抗原提示細胞、B細胞、好塩基球、細胞傷害性T細胞、樹状細胞、好酸球、顆粒球、ヘルパーT細胞、白血球、リンパ球、マクロファージ、マスト細胞、メモリー細胞、単球、ナチュラルキラー細胞、好中球、貪食細胞、形質細胞、およびT細胞を含むが、これらに限定されない、哺乳類免疫系の細胞を指す。

40

【0030】

本明細書で使用される場合、「免疫応答」は、先天免疫、体液性免疫、細胞性免疫、免疫、炎症反応、後天(適応)免疫、自己免疫、および/または過活動免疫 (overactive immunity) を含むが、これらに限定されない、免疫を指す。

【0031】

本明細書で使用される場合、「哺乳類」は、限定されることなく、ヒトおよび非ヒト靈

50

長動物、例えばチンパンジーおよび他の類人猿ならびにサル種；ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、およびウマ等の家畜動物；イヌおよびネコ等の飼育哺乳動物；マウス、ラット、モルモット等の齧歯動物を含む実験動物を含む、哺乳綱の任意のメンバーを指す。この用語は、特定の年齢または性別を示さない。このため、成体および新生児の対象、ならびに胎児は、雄性または雌性にかかわらず、本用語の範囲内に含まれることが意図される。

【0032】

本明細書で使用される場合、「ポリヌクレオチド」には、DNA、RNA、cDNA(相補DNA)、mRNA(メッセンジャーRNA)、rRNA(リボソームRNA)、s_hRNA(小ヘアピンRNA)、s_nRNA(核内低分子RNA)、s_noRNA(核小体低分子RNA)、miRNA(マイクロRNA)、ゲノムDNA、合成DNA、合成RNA、および/またはtRNAが含まれるが、これらに限定されない。

10

【0033】

本明細書で使用される場合、「裸のDNA」は、発現に適切な配向で好適な発現ベクター内にクローニングされたCARをコードするDNAを指す。使用され得るウイルスベクターには、SINレンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、泡沫状ウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、ハイブリッドベクター、および/またはプラスミドトランスポゾン(例えば、sleeping beautyトランスポゾンシステム)もしくはインテグラーゼ系のベクターシステムが含まれるが、これらに限定されない。本発明の代替の実施形態に関連して使用され得る他のベクターが、当業者に明白である。

20

【0034】

本明細書で使用される場合、「単鎖可変フラグメント」、「単鎖抗体可変フラグメント」、または「scFv」抗体は、リンカーペプチドで結合された重鎖および軽鎖のみの可変領域を含む、抗体の形態を指す。

【0035】

本明細書で使用される場合、「標的細胞」は、一疾患に関与し、本発明の遺伝子修飾細胞(遺伝子修飾T細胞、NK細胞、造血幹細胞、多能性幹細胞、および胚性幹細胞が挙げられるが、これらに限定されない)によって標的とされ得る細胞を指す。他の標的細胞が当業者に明白であり、本発明の代替の実施形態に関連して使用され得る。

【0036】

30

「T細胞」および「Tリンパ球」という用語は、互いに交換可能であり、本明細書において同義的に使用される。例には、ナイーブT細胞、セントラルメモリーT細胞、エフェクターメモリーT細胞、またはそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【0037】

本明細書で使用される場合、「治療剤」は、例えば、疾患を、治療する、阻害する、防ぐ、その影響を軽減する、その重症度を低減する、発症の可能性を低減する、その進行を緩徐にする、および/またはそれを治癒するために使用される薬剤を指す。治療剤によって標的とされる疾患には、限定されないが、癌腫、肉腫、リンパ腫、白血病、胚細胞性腫瘍、芽細胞腫が含まれ、種々の免疫細胞上で発現される抗原、ならびに種々の血液疾患、自己免疫性疾患、および/または炎症性疾患と関連している細胞上で発現される抗原が含まれる。

40

【0038】

本明細書で使用される場合、「治療用制御物質」は、細胞増殖を制御する、細胞選択(例えば、本発明のキメラ抗原受容体を発現する細胞を選択する)を促進する、細胞トラッキングを促進する、またはそれらの組み合わせを行う作用物質を指す。1つの実施形態において、細胞増殖を制御することとは、細胞増殖を促進するように細胞増殖を上方制御することを含む。別の実施形態において、細胞増殖を制御することとは、細胞増殖を減少させるか、または阻害するように細胞増殖を下方制御することを含む。いくつかの実施形態において、治療用制御物質として役立つ作用物質は、治療的利点をもたらし得る二重特異

50

性キメラ抗原受容体を発現する細胞の濃縮を促進し得る。

【0039】

本明細書で使用される場合、「形質導入」は、ウイルスベクターを使用した、外来核酸の細胞内への導入を指す。

【0040】

本明細書で使用される場合、「トランスフェクション」は、組換えDNA技術を使用した、外来核酸の細胞内への導入を指す。「形質転換」という用語は、「外来」（すなわち、外因性または細胞外）遺伝子、DNA、またはRNA配列の、宿主細胞への導入を意味し、その導入遺伝子または配列によってコードされるタンパク質または酵素等の望ましい物質を産生させるように、宿主細胞にその導入遺伝子または配列を発現させるようにする。導入遺伝子または配列はまた、「クローン化された」または「外来」遺伝子または配列と呼ばれてもよく、細胞の遺伝子機構によって使用される、開始、停止、プロモーター、シグナル、分泌、または他の配列等の制御性または調節配列を含み得る。遺伝子または配列は、非機能性配列または機能不明の配列を含み得る。導入DNAまたはRNAを受容しきつ発現する宿主細胞は、「形質転換され」てあり、「形質転換体」または「クローン」である。宿主細胞に導入されるDNAまたはRNAは、その宿主細胞と同じ属もしくは種の細胞、または異なる属もしくは種の細胞を含む、任意の源に由来し得る。

【0041】

本明細書で使用される場合、「治療」および「治療する」は、そこで対象が、たとえその治療が最終的に不成功であったとしても、標的とされる病態を防ぐか、もしくは鈍化（緩和）させる、病態を防ぐ、有益な結果を探究するか、もしくは得る、あるいは個体のその状態を発症する可能性を低下させることを目的とした、治療的処置および予防的もしくは予防手段の両方を指す。治療を必要とする者には、既にその状態を有している者、ならびにその状態を有し易い者、またはその状態が防がれるべき者が含まれる。

【0042】

本明細書で使用される場合、「腫瘍」は、悪性または良性にかかわらず、すべての腫瘍細胞の成長および増殖、ならびにすべての前癌性および癌性細胞および組織を指す。

【0043】

本明細書で使用される場合、「ベクター」、「クローニングベクター」、および「発現ベクター」は、媒介物であって、これにより、宿主を形質転換しきつ導入配列の発現（例えば、転写および翻訳）を促進するように、ポリヌクレオチド配列（例えば、外来遺伝子）が宿主細胞に導入され得る、媒介物を指す。ベクターには、プラスミド、ファージ、ウイルス等が含まれる。

【0044】

本発明の説明

キメラ抗原受容体

いかなる前提によっても限定されることは望まないが、本発明のキメラ抗原受容体（例えば、二重特異性CAR）は、例えば、単一の抗原が標的とされる場合、種々の療法の経過中に生じ得る抗原消失エスケープ変異体の成長による従来の治療的失敗を克服し得ると考えられる。したがって、本発明は、とりわけ、CARをコードする核酸配列およびアミノ酸配列、CARを含むベクター、CARを含むウイルス、CARを含む遺伝子修飾細胞（再配向細胞）、ならびにそれらを作製し使用する方法を対象とする。いくつかの実施形態において、CARは二重特異性CARである。他の実施形態において、CARは、3つ以上の異なる抗原を標的とし、結合する。

【0045】

一般的な実施形態において、本発明は、CAR（例えば、二重特異性CAR）、CAR（例えば、二重特異性CAR）をコードする核酸配列、CAR（例えば、二重特異性CAR）をコードする核酸を含むベクター、CAR（例えば、二重特異性CAR）をコードする核酸配列を含むウイルス、CAR（例えば、二重特異性CAR）を発現する宿主細胞（遺伝子修飾細胞等）、CAR（例えば、二重特異性CAR）および治療用制御物質の組み

合わせ、ならびに C A R (例えば、二重特異性 C A R) を治療剤として作製し、使用する方法に関する。

【 0 0 4 6 】

本発明の C A R は、少なくとも 2 つの異なる抗原を標的とする。 C A R (二重特異性 C A R 等) は、治療用制御物質、例えば、トランケート型上皮成長因子受容体 (E G F R t) 、キメラサイトカイン受容体 (C C R) 、および / またはジヒドロキシ葉酸受容体 (d i h y d r o x y f o l a t e r e c e p t o r) (D H F R) (例えば、変異 D H F R) と共に発現される。 C A R および治療用制御物質をコードするポリヌクレオチドは、 I R E S 配列を介して、または切断可能なリンカーをコードするポリヌクレオチド配列を介して、連結され得る。本発明の C A R は、それらが細胞内で発現され、次にその細胞が、少なくとも 1 つの抗原特異的標的指向領域と相互作用する少なくとも 1 つの分子の存在、例えば抗原の存在に応じて増殖し得るように、構築される。

【 0 0 4 7 】

いくつかの実施形態において、本発明の C A R とともに使用するための治療用制御物質は、トランケート型上皮成長因子受容体 (E G F R t) 、チミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、ニトロレダクターゼ、キサンチン - グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、ヒトカスパーーゼ 8 、ヒトカスパーーゼ 9 、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、リナマラーゼ / リナマリン / グルコースオキシダーゼ、デオキシリボヌクレオシドキナーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P) / インドール - 3 - 酢酸 (I A A) 、グルタミルシスティンシンテターゼ、 C D 2 0 / C D 2 0 、 C D 3 4 / チミジンキナーゼキメラ、 d o x 依存カスパーーゼ - 2 、変異チミジンキナーゼ (H S V - T K S R 3 9) 、または A P 1 9 0 3 / F a s 系のうちのいずれか 1 つまたは複数を含む。一実施形態において、本発明の C A R は、切断可能なリンカーまたは I R E S 配列を介して E G F R t に連結される。別の実施形態において、二重特異性 C A R は、切断可能なリンカーまたは I R E S 配列を介して E G F R t に連結される。

【 0 0 4 8 】

本明細書に記載の C A R は、単一のポリペプチド鎖として合成され得、少なくとも 2 つの抗原特異的標的指向領域、細胞外スペーサードメイン、膜貫通ドメイン、 1 つまたは複数の共刺激ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含み得る。この実施形態において、抗原特異的標的指向領域は N 末端にあり、直列に配列され、リンカーペプチドによって分離されている。抗原特異的標的指向領域は、膜貫通ドメインに連結される細胞外スペーサードメインに連結される。膜貫通ドメインは、共刺激ドメインに連結される。共刺激ドメインは、 C 末端の細胞内シグナル伝達ドメインに連結される。 1 つを超える共刺激ドメインが使用される場合、複数の共刺激ドメインは、その N 末端で膜貫通ドメインと、およびその C 末端で細胞内シグナル伝達ドメインと直列に配列され得る。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、 I 型膜貫通タンパク質として C A R を細胞表面に方向付ける N 末端シグナル配列をさらに含み得る。抗原特異的標的指向領域は、細胞外に面していてよく、細胞内シグナル伝達ドメインは細胞質内であってよい。

【 0 0 4 9 】

図 1 は、本発明のキメラ抗原受容体の略図を示す。

【 0 0 5 0 】

一実施形態において、 C A R 中の細胞外スペーサードメインは任意である。そのような C A R において、抗原特異的標的指向領域は N 末端にあり、直列に配列され、リンカーペプチドによって分離されている。抗原特異的標的指向領域は、膜貫通ドメインに連結され得る。膜貫通ドメインは、共刺激ドメインに連結され得る。共刺激ドメインは、 C 末端の細胞内シグナル伝達ドメインに連結され得る。 1 つを超える共刺激ドメインが使用される場合、複数の共刺激ドメインは、直列に配列され得、その N 末端に膜貫通ドメイン、およびその C 末端に細胞内シグナル伝達ドメインがある。これらのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、 I 型膜貫通タンパク質として C A R を細胞表面に方向付ける N 末端シグナル配列をさらに含み得る。抗原特異的標的指向領域は、細胞外に面していてよく、

10

20

30

40

50

細胞内シグナル伝達ドメインは細胞質内であってよい。

【0051】

キメラ抗原受容体の抗原特異的標的指向領域

本発明のCARは、いくつかの（2つ以上、3つ以上等）異なる抗原を標的とし得る。一実施形態において、CARは二重特異性CARであり、2つの異なる抗原を標的とする。上述のように、CARの抗原特異的標的指向領域は、直列に配列され得、リンカーベプチドによって分離され得る。CARによって標的とされる抗原は、単一の患部細胞（癌性B細胞等）上の抗原、またはそれが疾患に寄与する別々の細胞上で発現される抗原であり得る。CARによって標的とされる抗原は、疾患に直接的または間接的のいずれかで関与する抗原である。

10

【0052】

二重特異性CARにおいて、少なくとも2つの異なる抗原特異的抗体またはそのフラグメントもしくはその誘導体は、抗原特異的標的指向領域内にクローニングされ得る。抗体は、任意の、しかし少なくとも2つの別個の最適な抗原に特異的であり得る。抗原に特異的な抗体は、抗体のFabフラグメントまたは抗体の単鎖可変フラグメント（scFv）であり得る。

【0053】

例えば、図2は、CD19およびCD20に特異的なCARを描写する本発明の一実施形態を示す。当業者によく知られている方法を使用して、複数の、少なくとも2つの異なる抗原に特異的なscFvは、以下に記載される遺伝子修飾細胞によって標的とされ得る細胞上で標的抗原が発現される限り、IgG₄-CD28-ドメインの上流に（すなわち、N末端に）クローニングされる。そのような技術が文献において完全に説明される。（Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989)、Current Protocols in Molecular Biology. Volumes I-III [Ausubel, R. M., ed. (1994)]、Cell Biology: A Laboratory Handbook. Volumes I-III [J. E. Celis, ed. (1994)]、Current Protocols in Immunology. Volumes I-III [Coligan, J. E., ed. (1994)]、Oligonucleotide Synthesis. (M. J. Gait ed. 1984)、Nucleic Acid Hybridization [B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1985)]、Transcription And Translation [B. D. Hames & S. J. Higgins, eds. (1984)]、Animal Cell Culture [R. I. Freshney, ed. (1986)]、Immobilized Cells And Enzymes [IRL Press, (1986)]、Practical Guide To Molecular Cloning B. Perbal (1984)、Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober, eds., 1991)、Annual Review of Immunology、ならびにAdvances in Immunology等の学術誌における研究書）。

20

【0054】

1つの実施形態において、各抗原特異的標的指向領域は、抗原特異性を与えるのにV_Hドメイン単独で十分である場合（「單一ドメイン抗体」）、V_H、CH1、ヒンジ、ならびにCH2およびCH3（Fc）Igドメインを有する完全長IgG重鎖（標的抗原に特異的）を含む。完全長IgG重鎖は、適切な膜貫通ドメインを介して、共刺激ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインに連結され得る。完全に活性である抗原特異的標的指向領域を生成するためにV_HおよびV_Lドメインの両方が必要な場合、V_H含有CARおよび完全長ラムダ軽鎖（IgL）の両方が、活性の抗原特異的標的指向領域を生成するため

30

40

50

に細胞に導入される。一実施形態において、細胞外スペーサードメインは、抗原特異的結合ドメインと膜貫通ドメインとの間に連結され得る。細胞には、治療に関連した成果をもたらすことができる、T-リンパ球（T細胞）、ナチュラルキラー細胞、造血幹細胞、および/または多能性胚性/誘導性幹細胞が含まれるが、これらに限定されない。

【0055】

別の実施形態において、CARの各抗原特異的標的指向領域は、それが異なる標的抗原に特異的である、少なくとも2つの単鎖抗体可変フラグメント（scFv）を含む。scFvは、その中で1つの可変ドメイン（V_HまたはV_L）のC末端がポリペプチドリンカーを介して、他方（それぞれ、V_LまたはV_H）のN末端につながれており、scFvは、抗原の結合または結合の特異性を著しく破壊することなく発達してきた。（Chaudhary et al., A recombinant single-chain immunotoxin composed of anti-Tac variable regions and a truncated diphtheria toxin. 1990 Proc. Natl. Acad. Sci., 87: 9491、Bedzyk et al. Immunological and structural characterization of a high affinity anti-fluorescein single-chain antibody. 1990 J. Biol. Chem., 265: 18615）。リンカーは、V_HのN末端をV_LのC末端に、またはV_HのC末端をV_LのN末端に結合する。これらのscFvは、自然抗体の重鎖および軽鎖中にある定常領域（Fc）を欠く。少なくとも2つの異なる抗原に特異的なscFvは、直列に配列され、膜貫通ドメインを介して共刺激ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインに連結される。一実施形態において、細胞外スペーサードメインは、抗原特異的結合領域と膜貫通ドメインとの間に連結され得る。

【0056】

別の態様において、各scFvフラグメントは、重鎖の定常ドメインのすべて、または一部に融合され得る。少なくとも2つの異なる抗原に特異的な、結果として生じる抗原特異的標的指向領域は、膜貫通ドメインを介して共刺激ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインに結合される。一実施形態において、細胞外スペーサードメインは、抗原特異的結合ドメインと膜貫通ドメインとの間に連結され得る。

【0057】

さらなる実施形態において、CARの各抗原特異的標的指向領域は、二価（divalent）（または二価（bivalent））単鎖可変フラグメント（di-scFv、bi-scFv）を含む。di-scFvを含むCARにおいて、各抗原に特異的な2つのscFvは、直列scFvをもたらす2つのV_Hおよび2つのV_L領域をもつ単一ペプチド鎖を生成することによって、一緒に連結される。（Xiong, Cheng-Yi; Natarajan, A; Shi, X B; Denardo, G L; Denardo, S J (2006). "Development of tumor targeting anti-MUC-1 multimer: effects of di-scFv unpaired cysteine location on PEGylation and tumor binding". Protein Engineering Design and Selection 19(8): 359-367、Kufer, Peter; Lutterbuse, Ralf; Baeuerle, Patrick A. (2004). "A revival of bispecific antibodies". Trends in Biotechnology 22(5): 238-244）。少なくとも2つの抗原特異的標的指向領域を含むCARは、2つの抗原のそれぞれに特異的な2つのscFvを発現することになる。少なくとも2つの異なる抗原に特異的な、結果として生じる抗原特異的標的指向領域は、膜貫通ドメインを介して共刺激ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインに結合される。一実施形態において、細胞外スペーサードメインは、抗原特異的結合ドメインと膜貫通ドメインとの間に連結され得る。

【0058】

10

20

30

40

50

さらなる実施形態において、CARの各抗原特異的標的指向領域は、ダイアボディを含む。ダイアボディにおいて、scFvは、2つの可変領域が一緒に折り重なるには短すぎるリンカーペプチドを用いて作製され、scFvを二量体化させる。さらにより短いリンカー（1つまたは2つのアミノ酸）は、三量体、いわゆるトリアボディ（triabody）またはトリボディ（tribody）の形成をもたらす。テトラボディ（tetrabody）もまた使用され得る。

【0059】

本発明のCARを作製するために、2つ以上の個々の抗原特異的標的指向領域は、単一のタンパク質分子上で共有結合的または非共有結合的のいずれかで互いに結合される。オリゴまたはポリペプチドリンカー、Fcヒンジまたは膜ヒンジ領域は、これらのドメインを互いに結合するために使用され得る。本発明のCARは、異なる組み合わせでともに結合される異なる抗原特異的標的指向領域のうちの2つ以上を含み得る。例えば、免疫グロブリン配列（例えば、scFvおよび/または単一ドメイン抗体）を含む2つ以上の抗原特異的標的指向領域は、互いに連結され得る。

【0060】

キメラ抗原受容体の抗原特異的標的指向領域の標的

いくつかの実施形態において、CAR（例えば、二重特異性CAR）の抗原特異的標的指向領域は、癌、炎症性疾患、神経障害、糖尿病、心血管系疾患、感染性疾患、またはそれらの組み合わせに特異的な抗原を標的とする。本発明のCAR（例えば、二重特異性CAR）によって標的とされ得る抗原の例には、B細胞上で発現される抗原、癌腫、肉腫、リンパ腫、白血病、胚細胞性腫瘍、芽細胞腫上で発現される抗原、種々の免疫細胞上で発現される抗原、ならびに種々の血液疾患、自己免疫性疾患、および/または炎症性疾患と関連している細胞上で発現される抗原が挙げられるが、これらに限定されない。少なくとも2つの異なる標的抗原に特異的な本発明のCARは、発現細胞のエフェクター機能を両標的抗原のいずれかに向け直すことが可能であり得る。構築物のこの特徴は、例えば、遺伝的に不安定なB細胞系悪性腫瘍を、単一の抗原特異性を使用して標的とする際の、抗原消失エスケープ変異体の問題を克服し得る。

【0061】

本発明のCAR（例えば、二重特異性CAR）によって標的とされ得る癌に特異的な抗原には、4-1BB、5T4、腺癌抗原、-フェトプロテイン、BAFF、B-リンパ腫細胞、C242抗原、CA-125、炭酸脱水酵素9（CA-IX）、C-MET、CCR4、CD152、CD19、CD20、CD200、CD22、CD221、CD23（IgE受容体）、CD28、CD30（TNFRSF8）、CD33、CD4、CD40、CD44v6、CD51、CD52、CD56、CD74、CD80、CEA、CNTO888、CTLA-4、DR5、EGFR、EpCAM、CD3、FAP、フィブロネクチンのエクストラドメイン-B、葉酸受容体1、GD2、GD3ガングリオシド、糖タンパク質75、GPNMB、HER2/neu、HGF、ヒト細胞分散因子（scat ter factor）受容体キナーゼ、IGF-1受容体、IGF-I、IGG1、L1-CAM、IL-13、IL-6、インスリン様成長因子I受容体、インテグリン5-1、インテグリンv3、MORAb-009、MS4A1、MUC1、ムチンCαnAg、N-グリコリルノイラミン酸、NPC-1C、PDGF-R、PDL192、ホスファチジルセリン、前立腺癌細胞、RANKL、RON、ROR1、SCH900105、SDC1、SLAMF7、TAG-72、テネイシンC、TGF-2、TGF-、TRAIL-R1、TRAIL-R2、腫瘍抗原CTAA16.88、VEGFA、VEGFR-1、VEGFR2、またはビメンチンのうちのいずれか1つまたは複数が含まれるが、これらに限定されない。癌に特異的な他の抗原が当業者に明白であり、本発明の代替の実施形態に関連して使用され得る。上記抗原を標的とするCARの例には、二重特異性CAR、EGFRtと共に発現される二重特異性CAR、EGFRtおよびCCRと共に発現される二重特異性CAR、EGFRtおよびDHF（例えば、変異DHF）と共に発現される二重特異性CAR、またはEGFRtおよびCDRおよびDHF（例

10

20

30

40

50

えば変異D H F R)と共に発現される二重特異性C A Rが挙げられるが、これらに限定されない。

【0062】

いくつかの実施形態において、二重特異性キメラ抗原受容体は、少なくとも2つの異なる抗原を標的とし、結合する。本発明の二重特異性C A Rによって結合される少なくとも2つの抗原の対の例には、C D 1 9およびC D 2 0、C D 1 9およびC D 2 2、C D 2 0およびL 1 - C A M、L 1 - C A MおよびG D 2、E G F RおよびL 1 - C A M、E G F RおよびC - M E T、E G F RおよびH E R 2、C - M E TおよびH E R 2、ならびにE G F RおよびR O R 1が挙げられるが、これらに限定されない。癌に特異的な抗原の他の対が当業者に明白であり、本発明の代替の実施形態に関連して使用され得る。さらに他の実施形態において、二重特異性キメラ抗原受容体は、C D 1 9およびC D 2 0を標的とする。上記抗原を標的とするC A Rの例には、二重特異性C A R、E G F R tと共に発現される二重特異性C A R、E G F R tおよびC C Rと共に発現される二重特異性C A R、E G F R tおよびD H F R (例えば、変異D H F R)と共に発現される二重特異性C A R、またはE G F R tおよびC D RおよびD H F R (例えば変異D H F R)と共に発現される二重特異性C A Rが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0063】

本発明のC A Rによって標的とされ得る炎症性疾患に特異的な抗原には、A O C 3 (V A P - 1)、C A M - 3 0 0 1、C C L 1 1 (エオタキシン - 1)、C D 1 2 5、C D 1 4 7 (ベイシジン)、C D 1 5 4 (C D 4 0 L)、C D 2、C D 2 0、C D 2 3 (I g E受容体)、C D 2 5 (I L - 2受容体の鎖)、C D 3、C D 4、C D 5、I F N - 、I F N - 、I g E、I g E F c領域、I L - 1、I L - 1 2、I L - 2 3、I L - 1 3、I L - 1 7、I L - 1 7 A、I L - 2 2、I L - 4、I L - 5、I L - 5、I L - 6、I L - 6受容体、インテグリン 4、インテグリン 4 7、リヤマ (L a m a g l a m a)、L F A - 1 (C D 1 1 a)、M E D I - 5 2 8、ミオスタチン、O X - 4 0、r h u M A b 7、スクレロスシン (s c l e r o s c i n)、S O S T、T G F 1、T N F - 、またはV E G F - Aのうちのいずれか1つまたは複数が含まれるが、これらに限定されない。炎症性疾患に特異的な他の抗原が当業者に明白であり、本発明の代替の実施形態に関連して使用され得る。上記抗原を標的とするC A Rの例には、二重特異性C A R、E G F R tと共に発現される二重特異性C A R、E G F R tおよびC C Rと共に発現される二重特異性C A R、E G F R tおよびD H F R (例えば、変異D H F R)と共に発現される二重特異性C A R、またはE G F R tおよびC D RおよびD H F R (例えば変異D H F R)と共に発現される二重特異性C A Rが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0064】

本発明のC A Rによって標的とされ得る神経障害に特異的な抗原には、アミロイドまたはM A B T 5 1 0 2 Aのうちのいずれか1つまたは複数が含まれるが、これらに限定されない。神経障害に特異的な他の抗原が当業者に明白であり、本発明の代替の実施形態に関連して使用され得る。上記抗原を標的とするC A Rの例には、二重特異性C A R、E G F R tと共に発現される二重特異性C A R、E G F R tおよびC C Rと共に発現される二重特異性C A R、E G F R tおよびD H F R (例えば、変異D H F R)と共に発現される二重特異性C A R、またはE G F R tおよびC D RおよびD H F R (例えば変異D H F R)と共に発現される二重特異性C A Rが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0065】

本発明のC A Rによって標的とされ得る糖尿病に特異的な抗原には、L - 1 またはC D 3のうちのいずれか1つまたは複数が含まれるが、これらに限定されない。糖尿病または他の代謝障害に特異的な他の抗原が当業者に明白であり、本発明の代替の実施形態に関連して使用され得る。上記抗原を標的とするC A Rの例には、二重特異性C A R、E G F R tと共に発現される二重特異性C A R、E G F R tおよびC C Rと共に発現される二重特異性C A R、E G F R tおよびD H F R (例えば、変異D H F R)と共に発現される二重特異性C A R、またはE G F R tおよびC D RおよびD H F R (例えば変異D H F R)と共に発現され

40

50

る二重特異性 CAR が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 6 6 】

本発明の CAR によって標的とされ得る心血管系疾患に特異的な抗原には、 C 5 、心筋ミオシン、 C D 4 1 (インテグリン - I I b) 、フィブリン I I 、鎖、 I T G B 2 (C D 1 8) 、およびスフィンゴシン - 1 - ホスファートのうちのいずれか 1 つまたは複数が含まれるが、これらに限定されない。心血管系疾患に特異的な他の抗原が当業者に明白であり、本発明の代替の実施形態に関連して使用され得る。上記抗原を標的とする CAR の例には、二重特異性 CAR 、 E G F R t と共に発現される二重特異性 CAR 、 E G F R t および C C R と共に発現される二重特異性 CAR 、 E G F R t および D H F R (例えば、変異 D H F R) と共に発現される二重特異性 CAR 、または E G F R t および C D R および D H F R (例えば変異 D H F R) と共に発現される二重特異性 CAR が挙げられるが、これらに限定されない。 10

【 0 0 6 7 】

本発明の CAR によって標的とされ得る感染性疾患に特異的な抗原には、炭疽毒素、 C C R 5 、 C D 4 、クランピング因子 A 、サイトメガロウイルス、サイトメガロウイルス糖タンパク質 B 、内毒素、大腸菌 (E s c h e r i c h i a c o l i) 、 B 型肝炎表面抗原、 B 型肝炎ウイルス、 H I V - 1 、 H s p 9 0 、 A 型インフルエンザ血球凝集素、リポテイコ酸、緑膿菌 (P s e u d o m o n a s a e r u g i n o s a) 、狂犬病ウイルス糖タンパク質、呼吸器合胞体ウイルス、および T N F - のうちのいずれか 1 つまたは複数が含まれるが、これらに限定されない。感染性疾患に特異的な他の抗原が当業者に明白であり、本発明の代替の実施形態に関連して使用され得る。上記抗原を標的とする CAR の例には、二重特異性 CAR 、 E G F R t と共に発現される二重特異性 CAR 、 E G F R t および C C R と共に発現される二重特異性 CAR 、 E G F R t および D H F R (例えば、変異 D H F R) と共に発現される二重特異性 CAR 、または E G F R t および C D R および D H F R (例えば変異 D H F R) と共に発現される二重特異性 CAR が挙げられるが、これらに限定されない。 20

【 0 0 6 8 】

標的抗原のさらなる例には、特異的なまたは増幅された様式で癌細胞上に見出される表面タンパク質 (例えば、 B 細胞リンパ腫における I L - 1 4 受容体、 C D 1 9 、 C D 2 0 、および C D 4 0 、様々な癌腫におけるルイス Y および C E A 抗原、乳癌および結腸直腸癌における T a g 7 2 抗原、肺癌における E G F - R 、ヒト乳癌および卵巣癌においてしばしば増幅されている葉酸結合タンパク質および H E R - 2 タンパク質) 、またはウイルスタンパク質 (例えば、 H I V の g p 1 2 0 および g p 4 1 エンベロープタンパク質、 B 型および C 型肝炎ウイルス由来のエンベロープタンパク質、ヒトサイトメガロウイルスの糖タンパク質 B および他のエンベロープ糖タンパク質、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス等のオンコウイルス由来のエンベロープタンパク質) が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の CAR の他の潜在的標的は、リガンドが H I V g p 1 2 0 エンベロープ糖タンパク質である場合、 C D 4 、ならびに他のウイルス受容体、例えばヒトライノウイルスの受容体である I C A M 、およびポリオウイルスの関連受容体分子を含む。 30

【 0 0 6 9 】

本発明の CAR のさらなる標的は、 B 細胞関連疾患に関与する抗原を含む。本発明の CAR のなおさらなる標的が当業者に明白であり、本発明の代替の実施形態に関連して使用され得る。 40

【 0 0 7 0 】

キメラ抗原受容体の共刺激ドメイン

本発明の CAR はまた、共刺激ドメインを含む。このドメインは、細胞増殖、細胞生存、およびメモリー細胞の発生を増強し得る。本発明の CAR は、 1 つまたは複数の共刺激ドメインを含み得る。各共刺激ドメインは、例えば、 T N F R スーパーファミリーのメンバー、 C D 2 8 、 C D 1 3 7 (4 - 1 B B) 、 C D 1 3 4 (O X 4 0) 、 D a p 1 0 、 C D 2 7 、 C D 2 、 C D 5 、 I C A M - 1 、 L F A - 1 、 L c k 、 T N F R - 1 、 T N F R 50

- I I 、 F a s 、 C D 3 0 、 C D 4 0 、またはそれらの組み合わせのうちのいずれか 1 つまたは複数の共刺激ドメインを含む。他のタンパク質由来の共刺激ドメインがまた、本発明の C A R とともに使用され得る。さらなる共刺激ドメインが当業者に明白であり、本発明の代替の実施形態に関連して使用され得る。 C A R が 1 つを超える共刺激ドメインを含む場合、これらのドメインは直列に配列され、任意にリンカーによって分離され得る。

【 0 0 7 1 】

キメラ抗原受容体の細胞外スペーサードメイン

本発明の C A R は、細胞外スペーサードメインをさらに含み得る。いくつかの実施形態において、このドメインは、適切なタンパク質フォールディングを促進する。細胞外スペーサードメインは、抗原特異的標的指向領域および膜貫通ドメインに付着される親水性領域を含む。細胞外スペーサードメインには、抗体の F c フラグメント、またはそのフラグメントもしくは誘導体、抗体のヒンジ領域、またはそのフラグメントもしくは誘導体、抗体の C H 2 領域、抗体の C H 3 領域、人工スペーサー配列、またはそれらの組み合わせが含まれ得るが、これらに限定されない。細胞外スペーサードメインの例には、 C D 8 ヒンジ、 G 1 y 3 等のポリペプチドから作製される人工スペーサー、または I g G (ヒト I g G 4 等) の C H 1 、 C H 3 ドメインが挙げられるが、これらに限定されない。具体的に、細胞外スペーサードメインは、 (i) I g G 4 のヒンジ、 C H 2 、および C H 3 領域、 (i i) I g G 4 のヒンジ領域、 (i i i) I g G 4 のヒンジおよび C H 2 、 (i v) C D 8 のヒンジ領域、 (v) I g G 1 のヒンジ、 C H 2 、および C H 3 領域、 (v i) I g G 1 のヒンジ領域、もしくは (v i) I g G 1 のヒンジおよび C H 2 、またはそれらの組み合わせであり得る。さらなる細胞外スペーサードメインが当業者に明白であり、本発明の代替の実施形態に関連して使用され得る。

10

20

30

【 0 0 7 2 】

キメラ抗原受容体の膜貫通ドメイン

本発明の C A R はまた、膜貫通ドメインを含み得る。膜貫通ドメインは、 I 型、 I I 型、または I I I 型膜貫通タンパク質のいずれかを含む、膜貫通ドメインを有する任意のタンパク質に由来する膜貫通配列を含み得る。本発明の C A R の膜貫通ドメインはまた、人工疎水性配列を含み得る。本発明の C A R の膜貫通ドメインは、二量体化しないように選択され得る。さらなる膜貫通ドメインが当業者に明白であり、本発明の代替の実施形態に関連して使用され得る。

30

【 0 0 7 3 】

キメラ抗原受容体の細胞内シグナル伝達ドメイン

本発明の C A R はまた、細胞内シグナル伝達ドメインを含み得る。このドメインは、細胞質内であってもよく、エフェクター機能シグナルを伝達し、細胞にその特殊化された機能を実施するように指示し得る。細胞内シグナル伝達ドメインの例には、 T 細胞受容体の鎖またはそのホモログのいずれか (例えは、 鎖、 F c R 1 および 鎖、 M B 1 (I g) 鎖、 B 2 9 (I g) 鎖等) 、 C D 3 ポリペプチド (、 、 および) 、 s y k ファミリーチロシンキナーゼ (S y k 、 Z A P 7 0 等) 、 s r c ファミリーチロシンキナーゼ (L c k 、 F y n 、 L y n 等) 、ならびに C D 2 、 C D 5 、および C D 2 8 等の T 細胞伝達に関与する他の分子が挙げられるが、これらに限定されない。具体的に、細胞内シグナル伝達ドメインは、ヒト C D 3 鎖、 F c R I I I 、 F c R I 、 F c 受容体の細胞質側末端、免疫受容体チロシン活性化モチーフ (I T A M) を有する細胞質受容体、またはそれらの組み合わせであり得る。さらなる細胞内シグナル伝達ドメインが当業者に明白であり、本発明の代替の実施形態に関連して使用され得る。

40

【 0 0 7 4 】

キメラ抗原受容体におけるリンカー

いくつかの実施形態において、本発明の C A R の 2 つ以上の成分は、 1 つまたは複数のリンカーによって分離される。例えは、少なくとも 2 つの抗原特異的標的指向領域を含む C A R において、 C A R 上の第 1 の標的指向領域は、 C A R 上の第 2 の標的指向領域からリンカーを介して分離され得る。さらに、 C A R は、リンカーを介して治療用制御物質に

50

連結され得る。リンカーは、本発明のCARのドメイン/領域のいずれかを一緒に連結する、約1~100アミノ酸の長さのオリゴまたはポリペプチド領域である。いくつかの実施形態において、リンカーは、例えば、5~12アミノ酸の長さ、5~15アミノ酸の長さ、または5~20アミノ酸の長さであり得る。リンカーは、隣接するタンパク質ドメインが互いに自由に動くように、グリシンおよびセリンのようなフレキシブル残基で構成され得る。例えば、100アミノ酸よりも長い、より長いリンカーが、本発明の代替の実施形態に関連して使用されてもよく、例えば、2つの隣接するドメインが互いに立体的に干渉しないことを確実にするために選択され得る。本発明において使用され得るリンカーの例には、2Aリンカー（例えば、T2A）、2A様リンカー、またはその機能的等価物が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0075】

治療用制御物質

治療用制御物質は、細胞増殖を制御するか、細胞選択（例えば、本発明のキメラ抗原受容体を発現する細胞を選択する）を促進するか、またはそれらの組み合わせを行う。1つの実施形態において、細胞増殖を制御することとは、細胞増殖を促進するように細胞増殖を上方制御することを含む。別の実施形態において、細胞増殖を制御することとは、細胞増殖を減少させるか、または阻害するように細胞増殖を下方制御することを含む。いくつかの実施形態において、治療用制御物質として役立つ作用物質は、治療的利点をもたらし得る二重特異性キメラ抗原受容体を発現する細胞の濃縮を促進し得る。いくつかの実施形態において、治療用制御物質として役立つ作用物質は、追加の組成物と生化学的に相互作用することができ、その治療用制御物質の機能が制御されるようになる。例えば、EGFRt（治療用制御物質）は、セツキシマブと生化学的に相互作用することができ、選択、トラッキング、細胞アブレーション、またはそれらの組み合わせにおけるEGFRtの機能が制御されるようになる。

20

【0076】

治療用制御物質の例には、トランケート型上皮成長因子受容体（EGFRt）、チミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、ニトロレダクターゼ、キサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、ヒトカスパーーゼ8、ヒトカスパーーゼ9、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、リナマラーゼ/リナマリン/グルコースオキシダーゼ、デオキシリボヌクレオシドキナーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）/インドール-3-酢酸（IAA）、グルタミルシスティンシンテターゼ、CD20/CD20、CD34/チミジンキナーゼキメラ、dox依存カスパーーゼ-2、変異チミジンキナーゼ（HSV-TKSR39）、AP1903/Fas系、キメラサイトカイン受容体（CCR）、選択マーカー、およびそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、治療用制御物質は、二重特異性キメラ抗原受容体と共に発現される。

30

【0077】

治療用制御物質の機能を制御する薬剤の例には、ハーセプチン、メトトレキサート、セツキシマブ、チミジン類似体（例えばガンシクロビル）、（E）-5-(2-プロモビニル)-2'-デオキシリジン（BVDU）、5-フルロシトシン（fluorocytosine）(5-Fc)、5-(アザリジン(azaridin)-1-イル)-2,4-ジニトロベンズアミド(CB1954)、6-チオグアニン、合成二量体化薬(dimerring drug)（例えば、AP1903）、リン酸フルダラビン、リナマリン(lin)、ヌクレオシド類似体（例えば、BVDU、ジフルオロデオキシチジン(dFdC)）、1-D-アラビノフラノシルチミン（アラ-T）、インドール-3-酢酸（IAA）、1-ブチオニン-S, R-スルホキシミン(BSO)、リツキシマブ(RTX)、ドキシサイクリン、チロシンキナーゼ阻害剤、またはそれらの組み合わせのうちのいずれか1つまたは複数が挙げられるが、これらに限定されない。これらの薬剤は、治療用制御物質の使用前、使用中、または使用後に投与され得る。

40

【0078】

50

上述のように、本発明のCARは、単一ポリペプチド鎖として合成され得る。CARが二重特異性CARの場合、そのCARをコードするポリヌクレオチド配列は、例えば、N末端からC末端方向で以下の配置であり得る：N末端シグナル配列-抗原特異的標的指向領域1-リンカー-抗原特異的標的指向領域2-細胞外スペーサードメイン-膜貫通ドメイン-共刺激ドメイン-細胞内シグナル伝達ドメイン。一実施形態において、そのようなCARは、2つ以上の共刺激ドメインを含み得る。

【0079】

代替的に、CARをコードするポリヌクレオチド配列は、N末端からC末端方向で以下の配置であり得る：N末端シグナル配列-抗原特異的標的指向領域1-リンカー-抗原特異的標的指向領域2-膜貫通ドメイン-共刺激ドメイン-細胞内シグナル伝達ドメイン。一実施形態において、そのようなCARは、2つ以上の共刺激ドメインを含み得る。

10

【0080】

CARが2つを超える抗原特異的標的指向領域を含む場合、CARをコードするポリヌクレオチド配列は、N末端からC末端方向で以下の配置であり得る：N末端シグナル配列-抗原特異的標的指向領域1-リンカー-抗原特異的標的指向領域2-リンカー-(抗原特異的標的指向領域)_n-膜貫通ドメイン-共刺激ドメイン-細胞内シグナル伝達ドメイン。そのようなCARは、細胞外スペーサードメインをさらに含み得る。各抗原特異的標的指向領域は、リンカーによって分離され得る。一実施形態において、そのようなCARは、2つ以上の共刺激ドメインを含み得る。

【0081】

20

本発明は、細胞外スペーサードメイン、膜貫通ドメイン、共刺激ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む、本発明の例となるCARの主鎖の核酸配列を提供する。具体的には、CARの例となる主鎖は、N末端からC末端の方向で、IgG4ヒンジ-CD28tm-41BB-CD3を含み得、細胞外スペーサードメインはIgG4ヒンジ領域であり、膜貫通ドメインはCD28由来の膜貫通領域であり、共刺激ドメインは4-1BB由来であり、細胞内シグナル伝達ドメインはCD3鎖由来である(図7)。少なくとも2つ以上の抗原特異的標的指向領域は、IgG4ヒンジに対してN末端に挿入され得る。

【0082】

30

本発明は、CARがCD19およびCD20に特異的である、本発明の例となる実施形態の核酸配列を提供する。1つの実施形態において、二重特異性抗CD19×CD20 CARをコードする配列が、図3、8、または10に示される。別の実施形態において、二重特異性抗CD19×CD20 CARをコードする配列が、図4、9、または11に示される。この例となる実施形態において、二重特異性CARはCD19およびCD20に特異的なscFvを含み、各scFvは、リンカーによって分離されており、膜貫通ドメインを介して共刺激ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインへと結合される細胞外スペーサードメインに結合されている。例となるCARは1組のscFv配列を示したが、CD19およびCD20に特異的な任意のscFvが使用され得る。特定の実施形態において、CD19およびCD20に特異的な二重特異性CARは、CD19scFv-G1y4Serリンカー-CD20scFv-IgG4-ヒンジ-CD28tm-41BB(cytoto)-(cytoto)であり、図3および4に示される配列によってコードされる。この二重特異性CARは、G1y4Serリンカーによって連結されたCD19およびCD20に特異的な単鎖Fvフラグメント、IgG4ヒンジ細胞外スペーサードメイン、CD28膜貫通ドメイン、41BB共刺激ドメイン、およびCD3鎖由来の細胞質ドメインを含む。

40

【0083】

別の実施形態において、CD19およびCD20に特異的な二重特異性CARは、CD19scFv-G1y4serリンカー-CD20scFv-hulgG4-ヒンジCH2CH3-CD28tm/cytoto-41BB-を含む(図9～10)。この二重特異性CARは、G1y4Serリンカーによって連結されたCD19およびCD20に特異

50

的な単鎖 Fv フラグメント、ヒト IgG4 ヒンジ、CH2 および CH3 細胞外スペーサードメイン、CD28 膜貫通ドメイン、4-1BB 共刺激ドメイン、ならびに CD3 鎌由来の細胞質ドメインを含む。

【 0084 】

さらなる実施形態において、CD19 および CD20 に特異的な二重特異性 CAR は、CD19-Gly4Ser リンカー - CD20scFv - CD8 ヒンジ - CD8 TM - 41BB 共刺激 - cyto (図 11 ~ 12) である。この二重特異性 CAR は、Gly4Ser リンカーによって連結された CD19 および CD20 に特異的な単鎖 Fv フラグメント、CD8 ヒンジ細胞外スペーサードメイン、CD8 膜貫通ドメイン、41BB 共刺激ドメイン、および CD3 鎌由来の細胞質ドメインを含む。

10

【 0085 】

トランケート型上皮成長因子受容体 (EGFRt)

ヒト上皮成長因子受容体 (h u E G F R) (ヒトにおける EGFR; Erbb-1、HER1) は、造血およびリンパ球新生系の細胞によって発現されることはなく、成長因子受容体の Erbb ファミリーの受容体チロシンキナーゼである。リガンド (EGF、TGF- α) 結合は、受容体チロシンキナーゼ不活性単量体の活性ホモ二量体への移行の結果として、EGFR の N 末端細胞外ドメイン I および II 内で生じる。

【 0086 】

EGFR の細胞外ドメイン III は、抗体 (例えば、セツキシマブ (Erbitux)、IgG1 キメラ抗体) の結合部位を含む。ヒト EGFR は、例えば、細胞外ドメイン I II、IV、またはそれらの組み合わせ内に無傷の抗体結合部位 (例えば、セツキシマブ結合部位) を保持する一方、ドメイン I および II の除去、ならびにその細胞質側末端の欠失によるシグナル伝達活性が欠けていることによって、リガンド (EGF、TGF- α) に結合できなくなり得ると考えられる (Wang et al., A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells Blood 118 (5) 1255 - 1263)。

20

【 0087 】

本明細書に記載のトランケート型 EGFRt ポリペプチドは、細胞ベースの療法の遺伝子改変のために少なくとも 3 つの使用法を有する: エクスピボ細胞精製、インビボ細胞トラッキング、および細胞アブレーション。一実施形態において、治療用制御物質として本発明の CAR と使用するための EGFRt は、EGFR 特異的 siRNA、EGFR を標的とする小分子、抗 EGFR 抗体、またはそれらの組み合わせのうちのいずれか 1 つまたは複数に結合する。別の実施形態において、EGFRt は、図 12 もしくは 13 に示される配列、または図 12 もしくは 13 に示される配列と約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、もしくは約 95% 相同である配列を含む。

30

【 0088 】

本発明の一実施形態において、h u E G F R t は、CAR を発現する細胞を精製するか (例えば、エクスピボ細胞精製)、CAR を発現する細胞をトラッキングするか (例えば、インビトロもしくはインビボ細胞トラッキング)、または必要に応じて細胞アブレーションを誘起することによって、CAR を発現する細胞を制御する (例えば、インビボもしくはインビトロもしくはエクスピボ) ように、本発明の CAR と共に発現され得る。1 つの実施形態において、CAR は、二重特異性 CAR である。

40

【 0089 】

キメラサイトカイン受容体 (CCR)

養子免疫療法における外因性 c サイトカインの使用の限界に基づき、本発明は、内因性 c サイトカインシグナル伝達機構を持つ T 細胞を提供する。強制構成的キメラサイトカイン受容体 IL-2 / IL-15R (CCR2) および IL-7R (CCR7) 受容体シグナルの有用性を比較した。以下に記載されるように、キメラサイトカイン受

50

容体は、細胞傷害性T細胞（C T L）の生存、残存、およびインビボ生着を改善する能力を有する。

【0090】

したがって、本発明の一実施形態において、本発明のCARは、CCRと共に発現され得る。例えば、二重特異性CARは、EGFRtおよびCCRと共に発現され得る。代替的に、二重特異性CARは、CCRと共に発現され得る。キメラサイトカイン受容体の例には、IL-7サイトカイン-リンカー-IL7R、IL-7サイトカイン-リンカー-IL-7Rの細胞外ドメイン-IL-7Rの膜貫通ドメイン-IL-2Rの細胞質ドメイン、IL-7サイトカイン-リンカー-IL2Rが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0091】

IL-7サイトカイン-リンカー-IL7Rを含むCCRは、IL-7サイトカインのN末端に結合されたN末端シグナル配列を含み、IL-7サイトカインはリンカーを介してIL-7R（IL-7受容体の鎖）の細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞質ドメインに連結されている。

【0092】

IL-7サイトカイン-リンカー-IL-7Rの細胞外ドメイン-IL-7Rの膜貫通ドメイン-IL-2Rの細胞質ドメインを含むCCRは、IL-7サイトカインのN末端に結合されたN末端シグナル配列を含み、IL-7サイトカインはリンカーを介してIL-7Rの細胞外ドメインおよび膜貫通ドメイン、ならびにIL-2R（IL-2受容体の鎖）の細胞質ドメインに連結されている。

20

【0093】

IL-7サイトカイン-リンカー-IL2Rを含むCCRは、IL-7サイトカインのN末端に結合されたN末端シグナル配列を含み、IL-7サイトカインはリンカーを介してIL-2Rの細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞質ドメインに連結されている。

【0094】

ジヒドロキシ葉酸受容体（DHFR）

治療用導入遺伝子と、リンパ球毒性（lymphotoxic）薬物に対する抵抗性を与える薬物抵抗性導入遺伝子とを共発現するためのT細胞の遺伝子修飾は、インビボおよびエクスピボの両方で治療用細胞を選択する機会を提供する。変異したヒト酵素導入遺伝子である、ジヒドロ葉酸レダクターゼ二重変異体（DHFR^{F5}; L22F、F31S）は、変異したT細胞にメトトレキサート（MTX）に対する抵抗性を与え、B細胞系腫瘍細胞を特異的に標的とするCD19特異性キメラ抗原受容体（CD19CAR）を共発現する細胞の選択を可能にする。

30

【0095】

一実施形態において、本発明のCAR（例えば二重特異性CAR）は、DHFR（例えば、変異DHFR）と共に発現され得る。さらなる実施形態において、二重特異性CARは、EGFRt、CCR、およびDHFR（変異DHFRを含む）と共に発現され得る。代替的に、二重特異性CARは、EGFRtおよびDHFR（変異DHFRを含む）と共に発現され得る。

40

【0096】

本発明のCARとともに使用され得る他の選択マーカーには、メチル化-DNA-タンパク質-システインメチルトランスフェラーゼ（MDMT）、イノシン-リン酸デヒドロゲナーゼII（IMDHP2）、またはそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。MDMTは、細胞を化学療法に対して抵抗性にし、ゆえに化学療法とT細胞療法との相乗作用が望ましい場合に使用され得る。

【0097】

本発明のCARをコードするベクターがまた本明細書に提供される。CARをコードするベクターはまたEGFRtもコードする。いくつかの実施形態において、CARおよび

50

E G F R t をコードするベクターはまた、 C C R または D H F R (例えば、変異 D H F R) もコードする。他の実施形態において、 C A R および E G F R t をコードするベクターはまた、 C C D および D H F R (例えば、変異 D H F R) もコードする。いくつかの特定の実施形態において、ベクターは、二重特異性 C A R および E G F R t 、二重特異性 C A R および E G F R t および C C R 、二重特異性 C A R および E G F R t および C C R および D H F R (例えば、変異 D H F R) 、または二重特異性 C A R および E G F R t および C C R および D H F R (例えば、変異 D H F R) をコードし得る。本発明の C A R を発現するために使用され得るベクターには、レンチウイルスベクター、 レトロウイルスベクター、 泡沫状ウイルスベクター、 A A V ベクター、 アデノウイルスベクター、 改変ハイブリッドウイルス、 裸の D N A (S l e e p i n g B e a u t y 、 P i g g y b a k 等のトランスポゾン媒介ベクター、 P h i 3 1 等のインテグラーゼが含まれるが、これらに限定されない) が含まれるが、これらに限定されない。 10

【 0 0 9 8 】

本発明の一例となる実施形態において、本明細書に開示される C D 1 9 および C D 2 0 に特異的な二重特異性 C A R は、図 5 に例示されるように、レンチウイルスベクターによって発現される。

【 0 0 9 9 】

本発明の遺伝子改变細胞

本発明はまた、本発明の C A R を含みかつ安定して発現する遺伝子改变細胞を提供する。遺伝子改变細胞によって発現される C A R は、少なくとも 2 つの抗原特異的標的指向領域、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、 1 つまたは複数の共刺激ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含み得る。 C A R をコードするポリヌクレオチド配列はまた、 N 末端シグナル配列も含み得る。一実施形態において、 C A R は二重特異性 C A R である。少なくとも 2 つの抗原特異的標的指向領域、細胞外スペーサードメイン、膜貫通ドメイン、 1 つまたは複数の共刺激ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインのそれぞれは上述されている。抗原特異的標的指向ドメインは、 M H C 非拘束的な様式で、その様式では T 細胞受容体によって通常は結合されない抗原に特異的に結合することが可能である。 20

【 0 1 0 0 】

一実施形態において、本発明の C A R (例えば、二重特異性 C A R) を発現する遺伝子改变細胞は、 E G F R t を共発現する。さらなる実施形態において、 C A R (例えば、二重特異性 C A R) を発現する遺伝子改变細胞は、 E G F R t および C C R を共発現する。さらなる実施形態において、 C A R (例えば、二重特異性 C A R) を発現する遺伝子改变細胞は、 E G F R t および D H F R (例えば、変異 D H F R) を共発現する。別の実施形態において、 C A R (例えば、二重特異性 C A R) を発現する遺伝子改变細胞は、 E G F R t 、 C C R 、および D H F R (例えば、変異 D H F R) を共発現する。 30

【 0 1 0 1 】

遺伝子改变細胞は、少なくとも 2 つの異なる標的抗原に特異的な、少なくとも 2 つの抗原特異的標的指向領域を有する C A R を発現する。 1 つの実施形態において、抗原特異的標的指向領域は、標的特異的抗体またはそれらの機能的等価物もしくはフラグメントもしくは誘導体を含む。抗原特異的抗体は、抗体の F a b フラグメントまたは抗体の単鎖可変フラグメント (s c F v) であり得る。 40

【 0 1 0 2 】

本発明の C A R を含みかつ発現し得る遺伝子改变細胞には、治療に関連した成果をもたらすことができる、 T - リンパ球 (T 細胞) 、ナイーブ T 細胞 (T N) 、メモリー T 細胞 (例えば、セントラルメモリー T 細胞 (T c M) 、エフェクターメモリー細胞 (T e M)) 、ナチュラルキラー細胞、造血幹細胞および / または多能性胚性 / 誘導性幹細胞が含まれるが、これらに限定されない。一実施形態において、遺伝子改变細胞は自家細胞である。例として、本発明の個々の T 細胞は、 C D 4 + / C D 8 - 、 C D 4 - / C D 8 + 、 C D 4 - / C D 8 - 、または C D 4 + / C D 8 + であり得る。 T 細胞は、 C D 4 + / C D 8 - および C D 4 - / C D 8 + 細胞の混合群、または単一クローニングの一群であり得る。本発明 50

の C D 4 + T 細胞は、標的抗原を発現する細胞（例えば、C D 2 0 + および / または C D 1 9 + 腫瘍細胞）とインビトロで共培養された場合、I L - 2 、I F N 、T N F 、および他のT細胞エフェクターサイトカインを産生し得る。本発明の C D 8 + T 細胞は、抗原特異的標的細胞とインビトロで共培養された場合、その標的細胞を溶解し得る。いくつかの実施形態において、T細胞は、C D 4 5 R A + C D 6 2 L + ナイープ細胞、C D 4 5 R O + C D 6 2 L + セントラルメモリー細胞、C D 6 2 L - エフェクターメモリー細胞、またはそれらの組み合わせうちのいずれか1つまたは複数であり得る。（Berger et al. , Adoptive transfer of virus-specific and tumor-specific T cell immunity. Current Opinion Immunol 2009 21 (2) 224 - 232）。 10

【0103】

遺伝子修飾細胞は、本発明の C A R をコードする D N A を細胞に安定してトランスフェクトすることによって産生され得る。本発明の C A R （例えば、二重特異性 C A R ）をコードする D N A はまた、E G F R t 、C C R 、および / または D H F R （例えば、変異 D H F R ）もコードし得る。1つの実施形態において、第1のポリヌクレオチドは C A R （例えば、二重特異性 C A R ）をコードし、I R E S 配列または切断可能なリンカーをコードするポリヌクレオチドを介して、E G F R t をコードする第2のポリヌクレオチドに連結される。別の実施形態において、第1のポリヌクレオチドは C A R （例えば、二重特異性 C A R ）をコードし、I R E S 配列または切断可能なリンカーをコードするポリヌクレオチドを介して、E G F R t をコードする第2のポリヌクレオチドに連結され、第1もしくは第2のポリヌクレオチドは、同様に I R E S 配列または切断可能なリンカーをコードするポリヌクレオチドを介して、C C R または D H F R （例えば、変異 D H F R ）をコードする第3のポリヌクレオチドに連結される。さらなる実施形態において、第1のポリヌクレオチドは C A R （例えば、二重特異性 C A R ）をコードし、I R E S 配列または切断可能なリンカーをコードするポリヌクレオチドを介して、E G F R t をコードする第2のポリヌクレオチドに連結され、第1および第2のポリヌクレオチドは、I R E S 配列または切断可能なリンカーをコードするポリヌクレオチドを介して、C C R をコードする第3のポリヌクレオチドおよび D H F R （例えば、変異 D H F R ）をコードする第4のポリヌクレオチドに連結される。ウイルスベクターは一般的に異種遺伝子を細胞（例えば、T細胞）に運ぶために使用される。遺伝子修飾細胞を生成するために使用され得るウイルスベクターの例には、S I N レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、泡沫状ウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（A A V ）ベクター、および / またはプラスミドトランスポゾン（例えば、s l e e p i n g b e a u t y リンクスベクター）が挙げられるが、これらに限定されない。 20

【0104】

種々の方法は、本発明の C A R を発現する安定したトランスフェクタントを生成する。1つの実施形態において、細胞に安定してトランスフェクトしかつ細胞を向け直す方法は、裸の D N A を使用するエレクトロポレーションによるものである。裸の D N A を使用することによって、再配向細胞を生成するために必要とされる時間は、著しく減少され得る。本発明の C A R をコードする裸の D N A を使用して細胞を遺伝子改変するためのさらなる方法には、（例えば、リン酸カルシウム、デンドリマー、リポソーム、および / もしくは陽イオンポリマーを使用する）化学形質転換法、非化学形質転換法（例えば、エレクトロポレーション、光学形質転換、遺伝子エレクトロトランスファー、および / もしくはハイドロダイナミックデリバリー）、ならびに / または粒子ベースの方法（例えば、遺伝子銃を使用するインペールフェクション（i m p a l e f e c t i o n ）および / もしくはマグネットフェクション（m a g n e t o f e c t i o n ））が含まれるが、これらに限定されない。単一の統合された非再配列ベクターおよび C A R の発現の存在を示すトランスフェクトされた細胞は、エクスピボで拡大され得る。1つの実施形態において、エクスピボでの拡大のために選択された細胞は C D 8 + であり、抗原特異的標的細胞を特異的に認識しかつ溶解する能力を示す。 30

【0105】

ウイルス形質導入法もまた、本発明のCARを発現する再配向細胞を生成するために使用され得る。本発明の二重特異性CARを発現する遺伝子修飾細胞を生成するために使用され得る細胞型には、治療に関連した成果をもたらすことができるTリンパ球（T細胞）、ナチュラルキラー細胞、造血幹細胞、および/または多能性胚性/誘導性幹細胞が含まれるが、これらに限定されない。

【0106】

適切な条件下での抗原によるT細胞の刺激は、細胞の増殖（拡大）および/またはIL-2の産生をもたらす。本発明のCARを含む細胞は、1つまたは複数の抗原の、CARの抗原特異的標的指向領域への結合に応答して、数を拡大する。本発明はまた、CARを発現する細胞を作製しかつ拡大させる方法を提供する。その方法は、CARを発現するベクターを細胞にトランスフェクトするか、または形質導入することと、該細胞を、受容体に対する標的抗原、組換え標的抗原、または抗体を発現する細胞で刺激することとを含み、前記細胞は、T細胞を作製しかつ拡大させるように増殖する。一実施形態において、細胞は、治療に関連した成果をもたらすことができる、Tリンパ球（T細胞）、ナチュラルキラー（NK）細胞、造血幹細胞（HSC）、または多能性胚性/誘導性幹細胞のうちのいずれか1つまたは複数であり得る。

【0107】

一例となる実施形態において、本発明の遺伝子改変細胞は、CD19およびCD20抗原に特異的な二重特異性CARを発現する。さらなる実施形態において、遺伝子改変T細胞は、二重特異性CAR CD19scFv-G1y4ser-リンカー-CD20scFv-hulgG4-ヒンジ-CD28-41BB(cyt0)-(cyt0)、またはCD19scFv-G1y4ser-リンカー-CD20scFv-hulgG4-ヒンジCH2CH3-CD28tm/cyt0-、またはCD19-G1y4serリンカー-CD20scFv-CD8ヒンジ-CD8TM-41BB共刺激-cyt0を発現する。

【0108】

一例となる実施形態において、本発明は、CD19特異的およびCD20特異的CARを発現するT細胞を作製しかつ拡大させる方法を提供する。その方法は、レンチウイルスを使用して、CD19およびCD20二重特異性CARを発現するベクターを、CD3×CD28ビーズ刺激精製セントラルメモリーT細胞（末梢血由来のT細胞等）に形質導入することと、rhUIL-2および/またはIL-15の存在下でT細胞を成長させることと、T細胞を、CD19⁺およびCD20⁺細胞、組換えCD19およびCD20、または受容体に対する抗体で再度刺激することとを含み、T細胞は、CD19特異的およびCD20特異的T細胞を作製しかつ拡大させるように増殖する。

【0109】

本発明の治療方法

本発明のCARを使用して、抗原消失エスケープ変異体から生じる治療の失敗を克服し、既存の療法に対する抵抗性を低減し、および/または本CARによって標的とされる抗原と関連している疾患を治療することができる。

【0110】

したがって、本発明はまた、本発明のCARによって標的とされる抗原と関連している疾患の治療を必要とする対象における、該疾患を治療するための方法も提供する。その方法は、本発明のCARを含む組成物を提供すること、ならびに有効量のその組成物を、対象における抗原と関連している疾患を治療するように投与することを含む。

【0111】

本発明はまた、抗原消失エスケープ変異体から生じる治療の失敗を克服することを必要とする対象における疾患状態（例えば、B細胞疾患）において、該治療の失敗を克服するための方法も提供する。その方法は、本発明のCARを含む組成物を提供すること、ならびに有効量のその組成物を、対象における抗原と関連している疾患を治療するように投与

10

20

30

40

50

することを含む。

【0112】

いくつかの実施形態において、その組成物は、CARをコードするポリヌクレオチド、CARを含むタンパク質、またはCARを含む遺伝子修飾細胞を含む。別の実施形態において、組成物の遺伝子修飾細胞は、治療に関連した成果をもたらすことができるTリンパ球(T細胞)、ナイーブT細胞(T_N)、メモリーT細胞(例えば、セントラルメモリーT細胞(T_{CM})、エフェクターメモリー細胞(T_{EM}))、ナチュラルキラー(NK)細胞、造血幹細胞(HSC)、または多能性胚性/誘導性幹細胞であり、それらは本発明のCARを発現する。本発明の組成物は、単独で、または既存の療法と併せて投与され得る。他の療法が併せて使用される場合、本発明の組成物は、他の既存の療法と同時に、または連続して投与され得る。10

【0113】

薬学的組成物

種々の実施形態において、本発明は、薬学的に許容される賦形剤および治療的有効量の本発明のCAR(例えば、二重特異性CAR)を含む、薬学的組成物を提供する。組成物中の本発明のCARは、CARをコードするポリヌクレオチド、CARを含むタンパク質、またはCARを含む遺伝子修飾細胞のいずれか1つまたは複数であり得る。本組成物は、EGFRt、CCR、および/もしくはDHF_R(例えば、変異DHF_R)をコードするポリヌクレオチド、EGFRt、CCR、および/もしくはDHF_Rを含みCARと共に発現されるタンパク質、またはCARを発現しかつEGFRt、CCRおよび/もしくはDHF_Rを共発現する遺伝子修飾細胞をさらに含み得る。「薬学的に許容される賦形剤」は、概して安全、非毒性、および望ましい薬学的組成物の調製において有用である賦形剤を意味し、獣医学的使用、ならびにヒトへの薬学的使用に許容される賦形剤を含む。そのような賦形剤は、固体、液体、半固体、またはエアロゾル組成物の場合には気体であり得る。20

【0114】

種々の実施形態において、本発明に従う薬学的組成物は、任意の投与経路を介する送達用に製剤化され得る。「投与経路」とは、エアロゾル、経鼻、経口、静脈内、筋肉内、腹腔内、吸入、経粘膜、経皮、非経口、埋め込み型ポンプ、連続注入、局所適用、カプセル、および/または注射を含むが、これらに限定されない、当該技術分野で既知の任意の投与経路を指し得る。30

【0115】

本発明に従う薬学的組成物はまた、任意の薬学的に許容される担体を含有してもよい。本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」は、ある組織、臓器、または身体の部分から、別の組織、臓器、または身体の部分へと関心対象の化合物を運ぶか、または輸送することに関与する、薬学的に許容される材料、組成物、または媒介物を指す。例えば、担体は、液体もしくは固体フィラー、希釈剤、賦形剤、溶媒、もしくはカプセル封入材料、またはそれらの組み合わせであり得る。担体の各成分は、それが製剤の他の成分と適合性がなければならないという点で、「薬学的に許容され」なければならない。それはまた、その治療的利益を過度に上回る、毒性、過敏、アレルギー反応、免疫原性、または任意の他の合併症の危険性を有してはならないという意味で、それが接触し得る任意の組織または臓器と接触する使用に適していなければならない。40

【0116】

本発明に従う薬学的組成物はまた、経口投与用にカプセルに封入されるか、錠剤化されるか、または乳剤もしくはシロップに調製されてもよい。薬学的に許容される固形もしくは液体担体が、組成物を増強するか、もしくは安定させるために、または組成物の調製を促進するために添加され得る。液体担体には、シロップ、落花生油、オリーブ油、グリセリン、生理食塩水、アルコール、および水が含まれる。固形担体には、デンブン、ラクトース、硫酸カルシウム、二水和物、白土、ステアリン酸マグネシウムもしくはステアリン酸、タルク、ペクチン、アカシア、寒天、またはゼラチンが含まれる。担体にはまた、单50

独で、または蛻とともに、モノステアリン酸グリセリンもしくはジステアリン酸グリセリン等の持続放出材料も含まれる。

【0117】

薬学的調製物は、必要に応じて、錠剤形成のための製粉、混合、造粒、および加圧、または硬性ゼラチンカプセル形成のための製粉、混合、および充填に関する薬学の従来の技術に従って作製される。液体担体を使用する場合、調製物は、シロップ、エリキシル剤、乳剤、または水性もしくは非水性懸濁液の形態である。そのような液体製剤は、直接経口投与または軟性ゼラチンカプセル内に充填されて投与されてもよい。

【0118】

本発明に従う薬学的組成物は、治療的有効量で送達され得る。正確な治療的有効量は、所与の対象における治療の有効性の観点において最も効果的な結果をもたらす組成物の量である。この量は、治療化合物の特性（活性度、薬物動態、薬力学、および生物学的利用能を含む）、対象の生理的状態（年齢、性別、疾患タイプおよび段階、全身健康状態、所与の投薬量に対する応答性、および薬物療法のタイプを含む）、製剤物中の薬学的に許容される担体の性質、ならびに投与経路を含むが、これらに限定されない、様々な要因に応じて異なる。臨床および薬理学分野の技術者は、通例の実験方法を通して、例えば、化合物の投与に対する対象の反応を監視し、それに応じて投薬量を調整することによって治療的有効量を決定することができる。さらなるガイダンスは、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro ed. 20th edition, Williams & Wilkins PA, USA) (2000) を参照されたい。

【実施例】

【0119】

特許請求される発明をより良く例示するために以下の実施例が提供され、本発明の範囲を限定するとは解釈されない。特定の材料が言及される範囲に関して、それは単に例示の目的であり、本発明を限定するとは意図されない。当業者は、独創的な能力を行使されることなく、かつ本発明の範囲から逸脱することなく、同等の手段または反応物を開発し得る。

【0120】

実施例 1

図1は、本発明の二重特異性キメラ抗原受容体の略図である。本発明の一例となる実施形態において、図2は、二重特異性抗CD19 × 抗CD20二重特異性CARの成分を示す。図2はまた、e pHIV-7レンチウイルスベクタートランスファープラスミドにパッケージ化された完全cDNAの概略図も示す。図3および4は、一例となる二重特異性CAR、すなわち、GMCSFss-CD19scFv-Gly4Ser1リンカーネCD20scFv-IgG4ヒンジ-CD28tm-41BB-T2A-EGFRt_e pHIV7の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

【0121】

実施例 2

図5は、本発明の例となるCARのベクター構築物、すなわち、CD19scFv-CD20scFv-IgG4-CD28tm-CD28共刺激-CD3導入遺伝子構築物を示す概略図である。過去にGibsonらによって記述されたワンステップ等温DNAアセンブリ法を使用して、CD19scFv-CD20scFv-IgG4-CD28tm-CD28共刺激-CD3導入遺伝子を構築した(Enzymatic assembly of DNA molecules upto several hundred kilobases. Nature Methods. 2009; 6: 343-345)。CD19scFv構築物のV_LおよびV_Hドメインを、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって、以前に記述されたCD19CAR-CD28-導入遺伝子から配列決定した。Schmitz N, Dregger P, Glass B, Sureda A. Allogeneic transplantation in lymphoma: c

10

20

30

40

50

urrent status. Haematologica. 2007; 92(11): 1533-1548)。以前に記述されたCD20R-CD28-導入遺伝子を使用して、スプライス重複(sPLICED-overlap)ポリメラーゼ連鎖反応によって、CD20 scFvのV_HおよびV_Lドメインを構築した(Michael Jensen et al., CD20 is a molecular target for scFvFc:zeta receptor redirected T-cells: implications for cellular immunotherapy of CD20⁺ malignancy. Biology of Blood and Marrow Transplant. 1998; 4: 75-83)。CD19 scFvおよびCD20 scFvのV_HおよびV_Lドメインを以前に記述されたように18残基リンカーペプチドに連結した。PCRによってCD19R-CD28-CD3導入遺伝子を使用して、IgG4-CD28tm-CD28共刺激ドメインを配列決定した。以前に記述されたCD19R-CD28--T2A-EGFRt₁epHIV7プラスミド(Seitaro Terakura et al., Generation of CD19-CAR modified CD8+ T-cells derived from virus-specific central memory T-cells. Blood. Oct. 26, 2011)からのCD19R-CD28部分のNH₂およびRSR1の制限消化によって、CD3-T2A-EGFRt₁epHIV7レンチウイルスデスティネーションベクターを調製した。制限消化された-epHIV7デスティネーションベクター、ならびに5'末端に30bp重複を含むそれぞれに対するプライマーを有する、CD19scFv、CD20scFv、およびIgG4-CD28tm-CD28共刺激-DNAフラグメントを使用して、ワンステップ等温ギブソンDNAアセンブリ法によって、最終CD19scFv-CD20scFv-IgG4-CD28tm-CD28共刺激-CD3構築物を構築した。

【0122】

(表1)二重特異性CAR epHIV-7トランスファープラスミド中の調節エレメント

調節エレメント	機能	
U5	5' ユニーク配列	
Psi	パッケージングシグナル	
RRE	Rev応答エレメント	
フランプ	組込み前複合体の核内移行を促進するための ポリプリントラック配列およびセントラルターミネーション 配列 (central termination sequence) を含む	10
EF1p プロモーター	CD19xCD20 CARの発現を駆動する EF1- α 真核生物プロモーター配列	
WPRE	ウイルスRNA輸送を増強するための ウッドチャック肝炎ウイルス由来調節エレメント	
delU3	SINベクターを生成するための、欠失を有する3'U3	
R	LTR内の反復配列	
U5	LTRの3'U5配列	20
Amp ^R	アンピシリン耐性遺伝子	
CoEl ori	プラスミドの複製開始点	
SV40 ori	SV40の複製開始点	
CMV プロモーター	ウイルスゲノムRNAを生成するためのCMVプロモーター	
R	LTR内の反復配列	

【 0 1 2 3 】

実施例 3

H E K 2 9 3 T 細胞に抗 C D 1 9 x C D 2 0 C A R - T 2 A - E G F R t e p H I V - 7 トランスファープラスミドまたは抗 C D 2 0 x C D 1 9 C A R - T 2 A - E G F R t e p H I V - 7 トランスファープラスミドをトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞をビオチン化抗 F c 抗体およびストレプトアビジン P E (S A - P E) で染色し、次いで上記 2 つの C A R の発現の検出のために、フローサイトメトリー解析に供した。抗 C D 1 9 x C D 2 0 C A R および抗 C D 2 0 x C D 1 9 C A R の両方が、トランスフェクトされた H E K 2 9 3 T 細胞上で発現された。

【 0 1 2 4 】

e p H I V - 7 トランスファープラスミドは、上記 2 つの二重特異性 C A R と E G F R t を共発現した。ビオチン化抗 E G F R 抗体 / S A - P E 染色およびフローサイトメトリー解析の組み合わせを使用して、同じくトランスフェクトされた細胞上で E G F R t 共発現を検出した。

【 0 1 2 5 】

実施例 4

初代ヒト末梢血由来 T 細胞を O K T 3 で活性化し、次いで、单一特異性抗 C D 1 9 C A R 、单一特異性抗 C D 2 0 C A R 、または二重特異性抗 C D 1 9 x C D 2 0 C A R - T 2 A - E G F R t e p H I V 7 レンチウイルスベクターを用いて、レンチウイルスによる (l e n t i v i r a l l y) 形質導入を行った。e p H I V 7 レンチウイルスベクターもまた、单一特異性抗 C D 1 9 C A R 、单一特異性抗 C D 2 0 C A R 、または二重特異性抗 C D 1 9 x C D 2 0 とともに、 E G F R t をコードした。このようにして、

10

20

30

40

50

C A R を発現する細胞は E G F R t を共発現した。トランスフェクトされた細胞をビオチン化抗 E G F R 抗体および S A - P E で染色し、次いで、 E G F R t 発現および単一特異性または二重特異性 C A R の共発現の検出のために、フローサイトメトリー解析に供した。単一特異性抗 C D 1 9 C A R をトランスフェクトされた細胞のうち 5 1 % が E G F R t を発現し、単一特異性抗 C D 2 0 C A R をトランスフェクトされた細胞のうち 3 8 . 5 % が E G F R t を発現し、二重特異性抗 C D 1 9 x C D 2 0 C A R をトランスフェクトされた細胞のうち 6 3 . 8 % が E G F R t を発現した。

【 0 1 2 6 】

トランスフェクトされた細胞における T 細胞受容体 (T C R) 複合体もまた、 F I T C 結合抗 T C R および抗 T C R 抗体染色ならびにフローサイトメトリー解析を使用して 10 、同じくトランスフェクトされた細胞内で検出された。

【 0 1 2 7 】

実施例 5

C D 1 9 、もしくは C D 2 0 、または C D 1 9 および C D 2 0 の両方を発現するように H 9 細胞を遺伝子修飾した。細胞を抗 C D 1 9 および抗 C D 2 0 抗体で染色し、次いで C D 1 9 および C D 2 0 の発現を検出するために、フローサイトメトリー解析に供した。サイトメトリー解析は、 C D 1 9 + C D 2 0 - 、 C D 1 9 - C D 2 0 + 、および C D 1 9 + C D 2 0 + H 9 細胞の所望の発現プロファイルを確認した、すなわち、遺伝子改変された H 9 細胞は、 C D 1 9 もしくは C D 2 0 、または C D 1 9 および C D 2 0 の両方を発現し、それによって、抗原陰性抗原消失エスケープ変異体を含む癌標的細胞を刺激した。後に記述されるように、これらの細胞株はその後、 C A R 発現 T 細胞株を刺激するために標的細胞として使用され、標的細胞を死滅させるエフェクター細胞として作用した。 20

【 0 1 2 8 】

同様に、 S U P - B 1 5 および D H L - 6 細胞株中の C D 1 9 および C D 2 0 発現の内在レベルを抗 C D 1 9 A P C および抗 C D 2 0 P E 染色ならびにフローサイトメトリー解析を使用して分析した。 S U P - B 1 5 細胞株は、高レベルの C D 1 9 および低レベルの C D 2 0 (ゆえに、 C D 1 9 + C D 2 0 -) を発現し、かつ D H L - 1 6 細胞株は、高レベルの C D 2 0 および低レベルの C D 1 9 (ゆえに、 C D 1 9 - C D 2 0 +) を発現した。

【 0 1 2 9 】

実施例 6

4 時間のクロム放出アッセイを使用してエフェクター細胞による標的細胞の溶解を測定した。エフェクター細胞は、単一特異性抗 C D 1 9 C A R 、単一特異性抗 C D 2 0 C A R 、または二重特異性抗 C D 1 9 x C D 2 0 C A R を発現するために、レンチウイルスによって形質導入された初代ヒト T 細胞である。二重特異性抗 C D 1 9 x C D 2 0 C A R エフェクター T 細胞は、 C D 1 9 + C D 2 0 - H 9 細胞、 C D 1 9 - C D 2 0 + H 9 細胞、 C D 1 9 + C D 2 0 + H 9 細胞、および S U P - B 1 5 細胞を含む、 C D 1 9 + C D 2 0 - 、 C D 1 9 - C D 2 0 + 、および C D 1 9 + C D 2 0 + 標的細胞のすべてを効果的に溶解した。 1 : 1 、 3 : 1 、 1 0 : 1 、および 3 0 : 1 の比率のエフェクター対標的に 40 おいて、それぞれ約 2 5 % 、 4 5 % 、 5 0 % 、および 6 0 % の標的細胞が溶解された。

【 0 1 3 0 】

対照的に、単一特異性 C A R 発現 T 細胞株は、単一特異性 C A R エフェクター細胞から逃れる抗原陰性抗原消失エスケープ変異体を溶解することができない。抗 C D 1 9 C A R エフェクター T 細胞は、 C D 1 9 - C D 2 0 + 標的を溶解することができず、抗 C D 2 0 C A R エフェクター T 細胞は、 C D 1 9 + C D 2 0 - 標的を溶解することができなかつた。

【 0 1 3 1 】

実施例 7

二重特異性 C A R 発現 C D 4 濃縮 T 細胞は、 C D 1 9 + C D 2 0 - H 9 細胞、 C D 1 9 - C D 2 0 + H 9 細胞、 C D 1 9 + C D 2 0 + H 9 細胞、および S U P - B 1 5 細胞を含 50

む、CD19⁺CD20⁻、CD19⁻CD20⁺、およびCD19⁺CD20⁺標的細胞による刺激に応じたサイトカイン分泌（インターフェロン（IFN-g、IFN-））に対して活性化された。IFN-量を、共培養の24時間後にT細胞および標的細胞の培養上清のサイトカインビーズアレイによって測定した。活性化された二重特異性CAR発現CD4濃縮T細胞は、全タイプの標的細胞による刺激に応じて少なくとも2500 pg/ml INF-gを分泌した。対照的に、単一特異性CAR発現T細胞株は、単一特異性CARエフェクター細胞から逃れる抗原陰性抗原消失エスケープ変異体による刺激に応じて、サイトカインINF-g分泌に対して活性化されなかった。CD19CAR-T細胞は、CD19⁻CD20⁺標的細胞との共培養の際にIGN-を分泌することができず、CD20CAR-T細胞は、CD19⁺CD20⁻標的細胞との共培養の際にIGN-を分泌することができなかった。
10

インビトロでの刺激アッセイ

- 刺激物(3×10⁵):

– TM-LCL	— H9 親
– OKT3-TM-LCL	— H9 CD19R
– SUP-B15	— H9 CD20R
– DHL-6	— H9 CD19/20R

- 応答物(SR2D₁₇上の1×10⁶):

– CD4 濃縮 モック	— CD8 濃縮 モック
– CD4 濃縮 CD19R	— CD8 濃縮 CD19R
– CD4 濃縮 CD20R	— CD8 濃縮 CD20R
– CD4 濃縮 CD19/20R	— CD8 濃縮 CD19/20R

- 細胞を24時間インキュベートし、無細胞上清をBioPlexアッセイのために当日採取する

【0132】

実施例8

以下の実施例は、T2A配列を介してトランケート型上皮成長因子受容体（EGFRt）に連結されたCD19特異性キメラ抗原受容体を説明する。EGFRtは、他のキメラ抗原受容体、例えば、二重特異性キメラ抗原受容体に連結され、それと共に発現され得る。
30

【0133】

出願人は、ビオチン化セツキシマブを使用する免疫磁気精製、フローサイトメトリーおよび免疫組織化学による細胞トラッキング、ならびに全身性セツキシマブ投与後のインビトロでの細胞アブレーションのための、形質導入T細胞によって発現されたそのようなトランケート型EGFR（hUEGFRt）の有用性を示した。この例となる実施形態において、EGFRtのドメインIおよびIIは除去されたが、ドメインIIIおよびIVは保持された。

【0134】

CD19CAR-T2A-EGFRt-epHIV7レンチウイルス構築物は、示されるように(1)CD19特異的FMC63モノクローナル抗体(mAb)のV_HおよびV_L遺伝子断片、IgG4ヒンジ-C_H2-C_H3、共刺激分子CD28の膜貫通および細胞質シグナル伝達ドメイン、ならびにCD3鎖の細胞質ドメインから成るキメラ抗原受容体(CAR)配列(Kowollik C.K. et al., CD28 costimulation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor enhances in vivo persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells. Cancer Res. 2006, 66(22): 10995-11004);(2)自己切断型のT2A配列(Szymczak A.L. et al., Correction of multi-gene deficiency in vivo using a "self-c
40
50

leaving" 2 A peptide-based retroviral vector. *Nat Biotechnol* 2004; 22 (5) 589 - 594); ならびに(3)トランケート型EGFR配列を含む。

【0135】

レンチウイルス形質導入後のhuEGFR⁺ヒトT細胞の免疫磁気濃縮

huEGFR⁺細胞の免疫磁気選択またはFACS選別のいずれかに対してビオチン化セツキシマブを使用した。出願人らは、CD19CARおよびhuEGFR⁺の共発現を指示する、自己不活性化レンチウイルスによって形質導入されたヒトT細胞の免疫磁気選択のために、市販の抗ビオチンマイクロビーズと併せてビオチン化セツキシマブを使用した。

10

【0136】

PBMCまたは精製セントラルメモリー(CD45RO⁺CD62L⁺T_{CM})またはエフェクターメモリー(CD45RO⁺CD62L⁺T_{EM})T細胞サブセットを抗CD3/抗CD28ビーズで刺激し、次いで、レンチウイルスペクターによって形質導入して初代ヒトT細胞株のパネルを生成した；その2.6%～40%はhuEGFR⁺およびCARを発現した。選択されていない細胞をビオチン化セツキシマブおよび抗ビオチンマイクロビーズで標識し、次いで、その90%がhuEGFR⁺およびCARを発現する選択された細胞集団を一貫して得るように分離した。

【0137】

選択されていないT細胞および選択された画分をビオチン化-セツキシマブおよびPE結合ストレプトアビジンまたはPE結合抗ビオチンAbのいずれかで染色し、次いで、フローサイトメトリー解析に供した。CD19CAR⁺EGFR⁺細胞の選択を、OKT3芽細胞の形質導入の3日後(38%から98%に濃縮された)、または形質導入エフェクターメモリーCD62L CD45RO⁺由来細胞の急速拡大の1サイクル後(20%から96%に濃縮された)、形質導入CMVpp65特異的TCM由来細胞の急速拡大の3サイクル後(12%から91%に濃縮された)、もしくは形質導入CD8⁺TCM由来細胞の急速拡大の2サイクル後(3%から97%に濃縮された)のいずれかで実施した。CD19CAR⁺EGFR⁺IMPDH2dm⁺細胞の選択を、形質導入TCM由来細胞の急速拡大の1サイクル後(25から92%に濃縮された)に実施した。

20

【0138】

レンチウイルスペクターに含まれるCD19CAR-T2A-EGFR⁺-IMPDH2dm構築物は、CD19特異的CD28共刺激CAR(CD19CAR)のコドン最適化配列部分、続いて自己切断可能T2A、ならびに選択マーカーhuEGFR⁺およびIMPDH2dm(ミコフェノラート27の添加に応じて細胞生存を可能にさせるイノシンーリン酸デヒドロゲナーゼ2遺伝子の二重変異体)を、伸長因子1プロモーター配列(EF-1p)、GM-CSF受容体鎖シグナル配列(GMCSFRss)、および3ヌクレオチド停止コドンとともに含む。

30

【0139】

OKT3媒介性の拡大に供される、選択されていない形質導入T細胞の培養物において、免疫磁気選択の前にhuEGFR⁻細胞のhuEGFR⁺細胞を上回る増殖優位性を観察した。しかしながら、免疫磁気選択後、huEGFR⁺発現のレベルおよび発現細胞の頻度は、OKT3ベースの拡大^{1/4}の14日間サイクルの3回連続した期間にわたって、安定したままであった。免疫磁気選択後のEGFR⁺細胞の拡大倍率は、選択されていない培養物におけるhuEGFR⁺細胞のものよりも有意に増強された。

40

【0140】

これらのデータは、huEGFR⁺が形質導入ヒトT細胞に独特である細胞表面マーカーとして役立つことができ、その後の、CARも発現する安定したhuEGFR⁺発現細胞集団の、セツキシマブベースの免疫磁気精製を可能にすることを示す。

【0141】

フローサイトメトリーおよび免疫組織化学を使用する養子移入huEGFR⁺T細胞の

50

トラッキング

養子移入 T 細胞の生着をトラッキングするための huEGFr⁺ の有用性を試験するために、出願人らは、 CD19 CAR⁺ EGFr⁺ ヒト T 細胞を移植された NOD / scid IL-2R⁺ マウスから血液および骨髄標本を収集した。

【0142】

まず、固定していない末梢血および骨髄単核細胞試料をビオチン化セツキシマブおよび PE 結合ストレプトアビシンで染色した後、フローサイトメトリー解析に供した。ヒト CD45⁺ T 細胞生着のレベル (20% ~ 25%) は、 EGFr 陰性もしくは陽性 T 細胞のいずれかを投与された動物において同様であったが、ヒト CD45 および EGFr についての二重染色は、 huEGFr⁺ (すなわち、導入遺伝子を発現する) ヒト T 細胞を 10 、それらの huEGFr⁺ 陰性カウンターパートから分離することを可能にした。

【0143】

次に、出願人らは、 EGFr 特異的診断キットを使用して、標準パラフィン包埋の固定組織標本が、 huEGFr⁺ T 細胞浸潤の検出に適しているかどうかを特定しようと試みた。出願人らは、移植マウスからのパラフィン包埋した大腿骨の免疫組織化学的分析を実施し、骨髄中の huEGFr⁺ 細胞を検出した。これらのデータは、養子移入 T 細胞の頻度および組織分布の数量化のためのトラッキングマーカーとして役立つ huEGFr⁺ の有用性を支持する。

【0144】

huEGFr⁺ に結合するセツキシマブは、ヒト T 細胞を ADC_C に対して感作する

20

細胞表面選択 / トラッキングマーカーの有用な特徴は、インビボでの細胞アブレーションのための標的として役立つその能力である。出願人らは、 T 細胞上で huEGFr⁺ に結合されたセツキシマブがインビトロで huEGFr⁺ T 細胞の ADC_C を活性化する度合い、ならびにセツキシマブ投与が NOD / scid マウス中の養子移入 huEGFr⁺ T 細胞の生着を減弱し得るかどうかを評価した。

【0145】

標的細胞として ⁵¹Cr 標識化 huEGFr⁺ T 細胞、およびエフェクターとしてヒト GM-CSF 活性化新鮮 PBMC を共培養した。次いで、セツキシマブの添加は、 huEGFr⁺ T 細胞をエフェクターによる ADC_C 細胞溶解に対して特異的に感作した。 huEGFr⁺ T 細胞の溶解を 4 時間のクロム放出アッセイによって測定し、結果は、セツキシマブ添加が溶解を、 50:1 、 25:1 、 5:1 、および 1:1 のエフェクター 30 対標的 (エフェクター : 標的) 比率で、それぞれ、 5% 未満から約 50% 、 45% 、 40% 、および 15% 著しく増大させたことを示した。

【0146】

対照的に、このアッセイにおいて、 CD20 特異的 mAb リツキサンの添加は、 huEGFr⁺ T 細胞の ADC_C の誘起に対して効果を有さなかった。

【0147】

出願人らは次に、オートクリン IL-2 を分泌しあつホタルルシフェラーゼバイオフォトニック (biophotonic) レポーターを発現するように、さらに修飾された huEGFr⁺ CTL_{L-2} マウスの T 細胞を誘導し、これらの ffluc⁺ huEGFr⁺ CTL_{L-2} 細胞を、静脈内注射を介して NOD / scid マウスに養子移入し、それらにその後セツキシマブまたはリツキサンを与えた。移入された CTL_{L-2} のインビボでの生着は、インビボバイオフォトニックイメージングによって測定されたように、 Erbitux (毎日腹腔内に 1mg) を与えたマウスにおいて有意に阻害された (97% 、 P < 0.05) 。 ffluc⁺ huEGFr⁺ CTL_{L-2} 細胞のセツキシマブ媒介性の消失は、 4 ~ 6 日間の間に生じた。これらのデータは、 huEGFr⁺ T 細胞を受けた患者に対する治療用制御物質としてのセツキシマブ投与の使用を支持する。

40

【0148】

実施例 9

本実施例は、内因性 c サイトカインシグナル伝達機構を持つ T 細胞を説明し、キメラ

50

サイトカイン受容体 (CCR) である IL-2 / IL-15R (CCR2) および IL-7R (CCR7) が、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の生存、残存、およびインビテーションを改善する能力を有することを示す。トランケート型 CD19 抗原 (CD19t) を、細胞表面上の CCR の発現を示すように、T2A リンカーを介して CCR に連結した。本明細書に記載のキメラサイトカイン受容体は、本明細書に記載の二重特異性 CAR 等の、本発明のキメラ抗原受容体に連結され得る。

【0149】

細胞内因性でリガンド非依存性の c サイトカインプラットフォームを生じるために、出願人らは、10 個のアミノ酸によって IL-7R の細胞外ドメインにつながれた IL-7 サイトカインから成るキメラ c サイトカイン受容体 (CCR) を作製した。IL-7R シグナルを与える CCR を作製するために、IL-7 サイトカインを完全長 IL-7R 鎖につないだ (CCR7)。IL-2 / IL-15R シグナルを提供する CCR は、IL-7 サイトカインを、IL-2 / IL-15R の細胞質ドメインと融合された IL-7R の細胞外および膜貫通ドメインにつなぐことによって作製した (CCR2)。これらの単鎖キメラ受容体は、シグナル伝達のために内因性 c 鎖を必要とすることが予想される。

【0150】

構築物を次いで、CCR 導入遺伝子の後に、自己切断可能な T2A 配列、および細胞質トランケート型 CD19 抗原 (CD19t) が続くように生成した。CCR および CD19t は、単一転写物として発現され、翻訳後に、2 つの別々の 1 型膜タンパク質 CCR (T2A) および CD19t をもたらすように T2A 自己切断型ペプチドの C 末端で切断される。単一転写物からの 2 つのタンパク質の発現に基づく、CCR (T2A) 対 CD19t 発現の比率は 1 : 1 であり、したがって、細胞表面 CD19t は、CCR 細胞表面発現のしるしである。レンチウイルス形質導入およびこれら構築物の発現は次いで、ジャーカット細胞株および NK-92 細胞株の両方において見られるように、表面 CD19t 発現によって測定され得る。

【0151】

IL-7R の細胞外ドメインから 1 ~ 126 個のアミノ酸を欠失しているトランケート型 IL-7R につながれた IL-7 サイトカインを有する第 3 の CCR もまた作製した (CCR7t)。内因性 c 鎖との CCR7t 二量体形成の分子モデルが、シグナル伝達に必須である。IL-7R の細胞外ドメインの 1 ~ 126 個のアミノ酸の欠失は、CCR7t を非機能性にする。

【0152】

トランケート型 CCR7 発現は、サイトカイン非依存性細胞成長について機能的にシグナル伝達または支持しない。フローサイトメトリーは、レンチ形質導入ジャーカット (95% CD19t⁺ CCR7t⁺) およびテフ細胞株 (97% CD19t⁺ CCR7t⁺) 上の細胞表面 CD19t を検出した。CCR7t 発現ジャーカット細胞株での STAT5 リン酸化のウエスタンプロット分析は、非形質導入対照ジャーカット細胞株と比較して、リン酸化 STAT5 の明らかな増加を検出しなかった。陽性対照 OKT3 刺激 PBMC を 50 U / ml IL-2 および 10 ng / ml IL-15 中で培養し、K562 は、増加したリン酸化 STAT5 の活性化を示した。したがって、20 日間培養された CCR7t 形質導入 CTL の拡大および生存能はなお、サイトカインに左右された。

【0153】

CCR2 および CCR7 等の機能的 CCR が、外因性サイトカインの不在下で CD8⁺ ヒト初代 T 細胞の成長を支持し得るかを判定するために、本発明者らは各 CCR を発現する CTL の拡大を測定した。CCR7t を発現するヒト初代 T 細胞は、外因性サイトカインの不在下では拡大できなかった。CCR2 および CCR7 の両方が、それぞれ 5 U / ml および 0.5 U / ml IL-2 中で培養された親の細胞のものと同様の手法において、生存能の維持によって CD8⁺ T 細胞の生存および増殖を支持すること

が可能であった。C C R 2⁺対C C R 7⁺ C T Lについて測定された全細胞拡大の増加は、細胞周期のG1、S、G2、およびM相に存在する核抗原タンパク質であるKi67の発現の増加と相関する（すなわち、C C R 7に対する26のMFI対C C R 2に対する52のMFI）。IL-2およびIL-7シグナル伝達に応答して誘発される主要な抗アポトーシス性タンパク質である、より高度なBcl-2の発現が、C C R 7⁺対C C R 2⁺ C T Lにおいて観察され、ヒト初代T細胞の生存を維持するC C R 7の能力を支持した。このデータを合わせると、両方のC C R がサイトカイン非依存性T細胞生存能および拡大を支持するが、C C R 7がエフェクターCD8⁺ C T Lの生存を維持する間、C C R 2は増殖優位性を提供することが示唆される。

【0154】

10

C C Rを発現するCD8⁺ T細胞は、インビボでのサイトカイン非依存性生着を示す。本発明者の研究所およびその他による研究は、NOD/Scid IL-2R^{−/−}マウスにおけるヒトC T Lの生着が、ヒトIL-15またはIL-2の外因性投与に依存することを示す。この依存性を克服すべくC T LにおけるC C R発現の可能性を試験するために、親のエフェクターT細胞、C C R 7⁺ C T L、およびC C R 2⁺ C T Lを外因性サイトカイン投与の不存在下で免疫不全NOD/Scid IL-2R^{−/−}マウスの尾静脈に注入した。8日目、17日目、24日目、および48日目に1群あたり少なくとも4匹のマウスを収集し、血液および骨髄中のT細胞レベルを分析することによって全生着を比較した。

【0155】

20

血液中では、C C R 2⁺ C T Lは、C C R 7⁺ C T Lおよび親の細胞と比較して、非常に著しい（P < 0.007）外因性サイトカイン非依存性生着を有した。骨髄中では、C C R 7⁺ C T L（P < 0.03）およびC C R 2⁺ C T L（P < 0.0005）の両方が、親の細胞と比較して著しい外因性サイトカイン非依存性生着を有した。C C R 2⁺ C T Lは、C C R 7⁺ C T Lと比較してより高い生着を有した。これは、C C R 7⁺ C T LおよびC C R 2⁺ C T Lの両方が外因性サイトカイン非依存性生着を支持することができるが、細胞の全割合が異なったことを示す。血液は、骨髄と比較して、C C R 2⁺ C T Lのより高い割合の生着を支持した。骨髄は、長期間にわたるC C R 7⁺ C T Lの生着を支持した。重要なことには、細胞がいずれの群においても48日目には血液および骨髄中にもはや存在しなかったように、生着は無限ではなかった。

30

【0156】

細胞内因性cサイトカインシグナルは、養子移入C T Lの支持のための外因性サイトカイン投与の必要性に取って代わることができる。細胞内因性サイトカイン受容体を提供することで、養子免疫療法（養子移入C T Lの長期残存）の主要な限界を克服することができる。これは、外因性サイトカインの投与の必要性を排除することができ、内因性細胞型に対する毒性およびバイスタンダー効果を低減することができる。

【0157】

40

実施例10

本実施例は、EGFR^tおよびD H F Rに連結されたC D 19キメラ抗原受容体が、メトトレキサートによって制御され得ることを示す。本明細書に記載の方法を使用して、本明細書に記載のジヒドロキシ葉酸受容体は、本発明の二重特異性キメラ抗原受容体に連結され得る。

【0158】

出願人らは、より低い毒性の薬学的利用可能な薬物メトレキサート（M T X）によってT細胞の選択を可能にし得るヒトジヒドロ葉酸レダクターゼ（h D H F R）変異体を使用する、ヒト選択性（s e l e c t a b l e）導入遺伝子を開発した。M T Xは、チミジル酸スクレオチドの新規合成に必須の主要な酵素であるD H F Rの競合的阻害を通して、その抗増殖性効果を発揮する。

【0159】

本実施例において、出願人らは、C D 19特異性キメラ抗原受容体（C D 19発現腫瘍

50

を標的とするための C D 1 9 C A R) を共発現する初代ヒト T 細胞の、 D H F R ^F _S (h D H F R L 2 2 F / F 3 1 S 変異体) 媒介性インビトロ選択の可能性を評価した。このストラテジーにおいて、本発明者らは、形質導入された T 細胞の混合群の、リンパ球毒性薬物 M T X への曝露は、非形質導入 T 細胞の排除および D H F R ^F _S / C D 1 9 C A R T 細胞の選択的拡大をもたらすはずであり、総じて、共発現 T 細胞は T 細胞群の抗腫瘍効果を増大すると仮定した。ここで、出願人らは、遺伝子修飾 T 細胞の D H F R ^F _S 媒介性選択が、 C D 1 9 C A R 治療的導入遺伝子発現を強制し、かつ臨床的に達成可能な濃度の M T X (例えば、 0 . 1 μ M M T X) の存在下で C A R ⁺ 安定組込み体の誘導を可能にしたことを見た。

【 0 1 6 0 】

10

潜在的治療有用性のための h D H F R ^F _S 選択アプローチをもたらすために、出願人らは、リボソームスキップ T 2 A 配列によってそれが分離されている C D 1 9 特異性キメラ抗原受容体 (C D 1 9 C A R) およびトラッキングマーカー (h u E G F R t) としてのトランケート型ヒト E G F R ポリペプチドと併せて、 h D H F R ^F _S を共発現するレンチウイルスベクターを設計した。

【 0 1 6 1 】

C T L L 2 T 細胞に、まずこの C D 1 9 C A R - h u E G F R t - h D H F R ^F _S レンチウイルスベクターを形質導入し、その M T X に対する抵抗性を評価した。レンチ形質導入の 10 日後、細胞の 7 ~ 8 % が C D 1 9 C A R および h u E G F R t 発現に対して陽性であった。

20

【 0 1 6 2 】

M T X の不在下において、非形質導入および形質導入 C T L L 2 細胞が、等しい割合で拡大した (それぞれ、 2 1 および 2 7 倍) 。 M T X (0 ~ 0 . 1 μ M) で 8 日間のインキュベーション後、 8 0 % の生存を有する 7 倍拡大が、形質導入細胞において観察され、一方、非形質導入 C T L L 2 細胞の 0 . 0 5 μ M 以上の M T X への曝露は、非形質導入 C T L L 2 細胞の拡大および生存能に対して強い阻害をもたらした。

【 0 1 6 3 】

異なる濃度の M T X での培養物における 8 日後の形質導入 C T L L 2 紡錘の h u E G F R t 発現レベルの評価は、導入遺伝子発現 h u E G F R t ⁺ 細胞の著しい M T X 媒介性濃縮をさらに明らかにした (0 . 0 1 、 0 . 0 2 5 、 0 . 0 5 、および 0 . 1 μ M の M T X で、それぞれ 4 9 % 、 9 3 % 、 9 8 . 5 % 、 9 9 %) 。

30

【 0 1 6 4 】

選択された C T L L 2 紡錘にとって耐性であり得る M T X の最高用量をさらに特徴付けるために、 0 . 1 μ M M T X で 8 日間培養された形質導入 C T L L 2 紡錘を広範囲の M T X 濃度 (最大 0 . 7 5 μ M) で置き換えた。これらの、形質導入されかつ事前に M T X 選択された細胞は、最大 0 . 2 5 μ M の M T X 濃度で 9 0 ~ 1 0 0 倍拡大することが可能であり、それは M T X の不在下での非形質導入対照 C T L L 2 の拡大と等しかった。

【 0 1 6 5 】

出願人らは、初代ヒト T 紡錘に、同じ C D 1 9 C A R - h u E G F R t - h D H F R ^F _S レンチウイルスベクターを形質導入した。精製 C D 6 2 L ⁺ C D 4 5 R O ⁺ T 紡錘を、それらの養子移入後の残存の可能性に基づいて開始群として使用した。形質導入の 10 日後、これらの T 紡錘を異なる濃度の M T X で培養し、経時的な細胞数および生存能を評価した。 10 日後、形質導入および非形質導入 T 紡錘は、 M T X の不在下では同等に (8 0 倍) 拡大した。さらに、たとえ 0 . 1 μ M の M T X であっても、形質導入 T 紡錘は 6 3 % の生存能を維持し、一方、非形質導入初代ヒト T 紡錘は、 0 . 0 2 5 μ M ほどの低い M T X 濃度で開始したが、生存能および拡大倍率の両方の強い阻害を示した。

40

【 0 1 6 6 】

異なる濃度の M T X での培養物における 10 日後の形質導入 T 紡錘のフローサイトメトリー評価は、導入遺伝子発現細胞の著しい M T X 媒介性濃縮を明らかにした (例えば、 0 . 0 2 5 μ M M T X は、約 5 4 % C D 1 9 C A R ⁺ および 7 9 % E G F R t ⁺ に濃

50

縮した；0.05 μM MTXは、約76% CD19CAR⁺および89% EGFRt⁺に濃縮した)。

【0167】

培養物の6日目対10日目におけるCD19CARおよびEGFRt発現の比較は、経時的な、このMTX/DHFR^{F5}媒介性選択の安定した進行を明らかにした(0日目：18% CD19CAR⁺、28% EGFRt⁺；6日目：48% CD19CAR⁺、71% EGFRt⁺；10日目：70% CD19CAR⁺、88% EGFRt⁺)。

【0168】

本明細書に引用されるすべての参照物は、完全に明記されるかのように参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。別途定義されない限り、本明細書で使用される技術および科学用語は、本発明がそこに属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3rd ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2001)、March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 5th ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2001)、およびSambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2001)は、当業者に本出願において使用される用語の多くの一般的な指針を提供する。

10

【0169】

当業者は、本明細書に記載されるものと類似または同等の本発明の実践において使用され得る多くの方法および材料を理解するであろう。実際に、本発明は、記載の方法および材料には全く限定されない。本発明の目的に対して、以下の用語が下記に定義される。

【0170】

これらの記述は、上記の実施形態を直接説明するが、当業者は、本明細書に示され、説明される特定の実施形態の修正および/または変形を考えてよいことを理解されたい。本記述の範囲内である任意のそのような修正または変形は、同様にその中に含まれることが意図される。具体的に言及されない限り、本明細書および特許請求の範囲の単語および語句は、通常の、および当出願分野における当業者に慣用的な意味において使用されることが、発明者の意図である。

30

【0171】

特許申請書提出時において、出願人に既知である本発明の種々の実施形態の前述の説明は、提案されており、例示および説明の目的を意図している。本説明は、包括的であるか、または本発明を開示される正確な形式に限定することを意図せず、多くの修正および変形が、上記の教示の観点から可能である。記載の本実施形態は、本発明の原理およびその実用的な用途の説明、ならびに他の当業者が種々の実施形態において、および企図される特定の使用に適した種々の修正を伴って本発明を利用できるようにするのに役立つ。したがって、本発明は、本発明を実行するために開示される特定の実施形態に限定されないことが意図される。

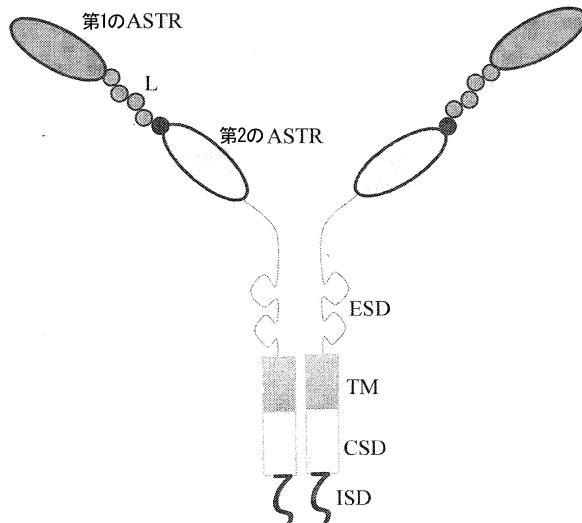
40

【0172】

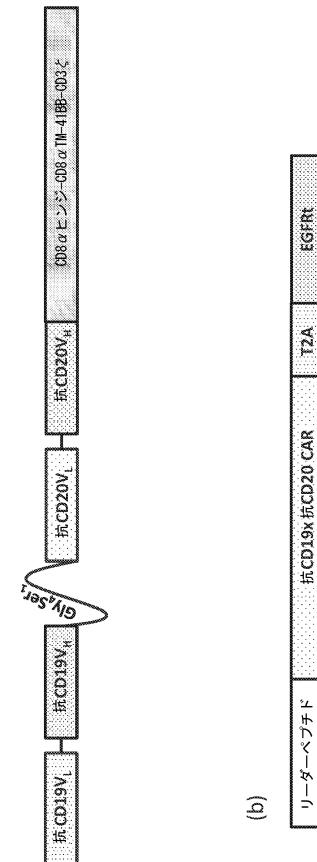
本発明の特定の実施形態が示され説明されたが、本明細書の教示に基づいて、本発明およびそのより広範な態様から逸脱することなく変更および修正がなされることが可能であることが当業者にとって明白である。概して、本明細書で使用される用語は、概して「限定されない」用語(例えば、用語「含んでいる」は、「含んでいるがこれに限定されない」として解釈されるべきであり、用語「有する」は、「少なくとも有する」として解釈されるべきであり、用語「含む」は「含むがこれに限定されない」として解釈されるべきである等)として意図されることが当業者には理解されるであろう。

50

〔 図 1 〕



【 四 2 】



【 図 3 】

GMCSFRs.s CD19scFv-Gly4Ser1リンカー-CD20scFv-IgG4ヒンジ-CD28tm-41BB-CD3-
T2A-EGFR₊epHIV7

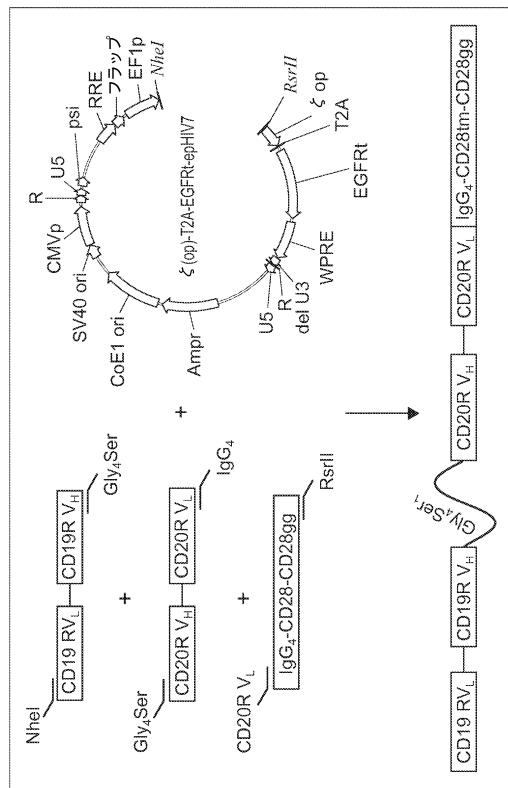
【図4-2】

DNA: TGTTTACAGAGAAGCCAGGRTCTCCCCAACCTGGATTATGCCACA
 AA: W Y Q K K P G S S F K P W I Y A T
 DNA: TCCAACTTGGCTCTGGAGTCCCCTGCTGGCTTCAGTGGAGTGGCTCGG
 AA: S N L A S G V P A R S G S G
 DNA: ACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGAGTGAGGCTGAAAGTGTCTCCACT
 AA: T S Y S L T I S R V E A E D A T
 DNA: TATTCTAGTCCAGCAGTGAGSTTTAACTCAGCCCAAGTTCGGAGGGGGGACCC
 AA: Y Y C Q Q S S P N P P T P G G S T
 DNA: AAGCTGGAAATAAAGAGAGCAAGTACGGACCCGCCCTGGCCCCCTGGCCCT
 AA: K L E I K S E S X Y Q P P C P C P
 DNA: ATGTCCTGGTGTCTGGTGTCTGGAGGGCTGCTGGCTCTACAGCTG
 AA: M F N V L V V G G V L A C Y S L
 DNA: CTGGCTACCTGCGCTTCATCATCTTGGTGAACAGGGGGCAAGAAA
 AA: L V T V A F I F W V K R R K K
 DNA: CTCTCTGATATACTAAACACCAATTAGTGGACCCAGTACAACAACTACCAA
 AA: P L R P Q P F M R P V Q T T Q
 DNA: GAGGACAGATGCTGTAGCTGGCAATTTCAGAGAGAGAGAGAGAGAGATG
 AA: E E D G C S C R C F F E E G G C
 DNA: GAATCTGGGGTAAAGTTCAAGCAGAACGGCCGAGCCTCTGGCTTACAGAG
 AA: E L R V K P S R S A D A P A Y Q Q
 DNA: GGCAGAGATCAAGCTGTACACAGAGCTGAACCTGGCGAGAAGGAGTAC
 AA: G Q N Q L Y N E L N L G R R E E Y
 DNA: GACGTCCTGGATAAGCGAGAGGCCGGACCTTGAGATGGCGCAGCGCT
 AA: D V L D K R R G R D P E M G K P
 DNA: CGCGCGAGAACCCCAAGGAGCTGTAAACGAACTCGAGAAAGAGAACAG
 AA: R R E N P Q E G L Y N E L Q K D K
 DNA: ATGCGCGAGGCTTACAGCGAGATCGCGCATGAAGGGCGAGCGGGAGGGCG
 AA: M A E A Y S E I G M K G E R R G
 DNA: AA929CCACAGCGGCTGTATCAAGGCTCTGCTCCACCGGACCAAGGATACC
 AA: K G H D G L Y N Q G L I S T T A T K D T
 DNA: TAGGACGCCCCCTGCGCATCGAGGCGCTGCGAGGGAGGGCG
 AA: Y D A L H M Q A L F P R L E G G G
 DNA: GAC929CCACAGCGAGACTCTTCATCATCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAG
 AA: E G R G S E T C G D V E E N B G
 DNA: CCTAGGATGCTTCTCTGGTGAACAGGCTCTGCTGTGAGTTACCAACAC
 AA: P R M P L L V T S L L C E L F H
 DNA: CCAGGAACTTCCCTGATCCACAGCAGAAAGTTGTAACGGAATAGGTATTG
 AA: P A F L L I P R K V C N G I G I G
 DNA: GAAATTAAAGACTCTCCATATACTGAGATAATTAAACACTTAA
 AA: E D F D S L S I S I A T E N K H P K
 DNA: AACTGCACTTCACTAGTGGCATCTCCACATCTCTGGCGGTGGATTAG
 AA: N C T S I S S G D L H I L P V A P R
 DNA: GGTGACTCTTCACACATACTCTCTCTGGATCCACAGGAACTGGATATT
 AA: G D S F T H T P P L D Q E L D I
 DNA: CTGAAAACCCTGAAAGGAAATCACAGGGTTTGGCTGATTCAAGCTGGCT
 AA: L K T V K E I T G F L I Q A W P
 DNA: GAAAACAGGACGGACCTCCATGGCCTTGGAGAACCTAGAAATCATAGCGGC
 AA: E N R T D L H A F E N L E I I R G
 DNA: AGGACCAAGCAACATGGTCAGTTTCTGCAAGTCAGCTGAGACATA
 AA: R T E Q H G Q F S L A V V S L N I
 DNA: ACATCCTTGGGATTCAGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGATGAGATGTGATA
 AA: T S L G L R S L K E I S A D G D V I
 DNA: ATTTCAGGAAACAAAATTTGCTGTCAAAATCAATRAACTGAAAAA
 AA: I S G N K N L C Y A N T I N W K K
 DNA: CTGTTTGGGACCTTCGGTCAAGMAACCAAAATTATAGCMACAGAGGTGAA
 AA: L F G T S G Q K T K I I S N R G E

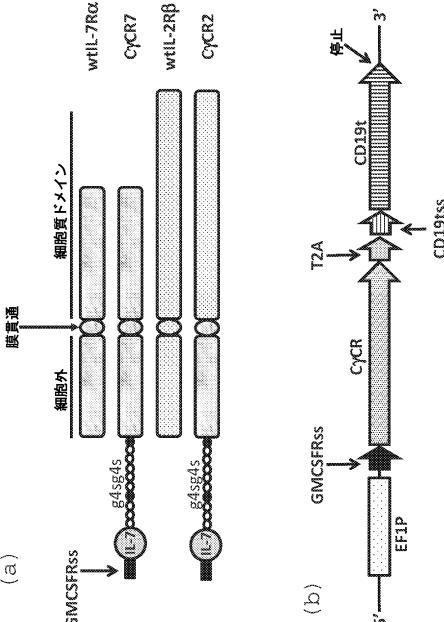
【図4-3】

DNA: AACAGCTGCAAGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCCTGGCTCCCCCGAG
 AA: N S C K A T G Q V C H A L C S P E
 DNA: GGCCTGCTGGGGCCCGAGGCCAGGGAGCTGCGTCTCTGGCGGAATGTCAGC
 AA: G C W G P E P R D C V S C R N V S
 DNA: CGAGGCAAGGAAATGGCGTGAACAGTGGCAACCTTCTGAGGGGTGAGCCAAAGG
 AA: R G R E C V D Z K C N L L E G E P R E
 DNA: GAGTTTGTGAGAACTCTGAGTGCATACAGTGGCCACCCAGAGTGGCTGCT
 AA: E F V E N S E C I Q C H P E C L P
 DNA: CAGGCCATGAACTACCCCTGCAAGGAGGGAGCAACTGTATTCAG
 AA: Q A M N I T C T G R G P D N C I O
 DNA: TGTGCCCTACATTCAGCGCCCTACTGCGTCAAGACTGCGCCAGGA
 AA: C A H Y I D G F H C V K T C P A G
 DNA: GTCATGGAGAAAACACCCCTGCTGAGACTACGAGACCCCGCCCAT
 AA: V M G E N N T L V W K Y A D A G H
 DNA: GTGTCGCACCTGTCGATCCAACTGACCTACGGATGCACTGGCCAGGT
 AA: V C H L C H P N C T Y G C T G P G
 DNA: CTTGANGCTGTCACAGAATGGCCTANGATCCCCTCATCGCCACTGG
 AA: L E G C P T N G P K I P S I A T G
 DNA: ATGGTGGGGCCCTCTCTGGTGTGGTGGCCCTGGGATCGGGCTC
 AA: M V G A L L L L L V V A L G I G L
 DNA: TTCTATGTGA
 AA: F M *

【図5】



【図6】



【 図 7 】

IgG4ヒンジ-CD28tm-41BB-CD3ζ

【 図 8 】

GMCSFRss-CD19scFv-Gly4serリンカー-CD20scFv-huIgG4ヒンジ/CH2/CH3-CD28tm/CD28cyto-41BB-CD3ζ

【 図 9 - 1 】

GMCSFRss-CD19scFv-Gly4serリンカー-CD20scFv-hulgG4ヒンジ/CH2/CH3-CD28tm/CD28cyto-41BB-CD3ζ

DNA: ATAGCTGCTGCTGGTGGACCGACCTGCTGCTGTCGAGCTGCCACCCCCGCC
AA: M L L L V T S S L L C E L P H F P A

DNA: TTTCTGCTGATCCCCGACATCCGAGTGGACCCAGACCCATCTGAGGC
AA: F F L L I F D I Q M T Q T T S S L S

DNA: GCGAGCCTGGGGGACCCGGGGTGGACCATCGCTGCCGGGAGCAGGACATC
AA: A A S L G G D R V T T I S C R A S Q O D I

DNA: AGCAAGTACTGAACTGGTATCAGCAGAAAGGCCGACGCTCAAGCTG
AA: S K Y L N W Y Q Q K P D P G T V K L

DNA: CTGATCTACACACCCGGCGCTGACAGCAGCGGCTGCCCCAGCGGTTTGGC
AA: L I Y H T S R L H S G V P S R F S

DNA: GGCAGCGGTCCGGCAGCCSACTACAGCCTGACATCTCCACCTGGAGCG
AA: G S G S G T D Y S L T I S N L E Q

DNA: GAAAGTATCGCCACCTTTGGCAGGGGCCAACACTGGCTTACACC
AA: E D I A T A Y F C Q Q G N T L P Y T

DNA: TTTGGCGGGAAACAAGCTGGAAATCACCGGAGCACCTCCGGAGCGG
AA: F G G G K T K L E I T G S T S G S G

DNA: AACGCTGGCAGCGGGCAGGGCAGCCAAAGGGCGAGGTGGAGCTGGAGAA
AA: K P G S S G E G S T T K G E V K L Q E

DNA: AGCGGCCCTGGCTGGTGGCCCCAGCGGAGCGCTGAGCGTGGCTGACCTGCC
AA: S G P G L V A P S Q S L S V T C T

DNA: GTGAGCCGGCTGGAGCTTGGCCAGCTAACGGCGTAGGGCTGGATGGCTGGCC
AA: S V G S P L P D Y G V S W I R Q P

DNA: CCCAGGRRAGGGCTGGAAATGGCTGGGGCTGATCTGGGCGAGCAGACCC
AA: P R K G K L E W L G V I W G S E T T

DNA: TACTACACAGCGGCCAGGAAGAGCCGCTGGACATCATCATCAAGGACACCG
AA: Y Y N S N A L K S R L T I I K D N S

DNA: AAAGAGCCGGCTGGTGGAGATGGACAGCGCCGAGACAGCAGACCCG
AA: K S Q V W F L K M N S L Q T D D T A

DNA: ATCTACTACTGGGCCAACGCACTACTACTACGGCGGCGAGCTACCGCCATGGAC
AA: I Y Y C A K H Y Y Y G G S Y A M D

DNA: TACTGGGGCAAGGCCAACCGAGCTGGCTGAGCGGGAGGTGGGAGTTC
AA: E V Q Q G T S V T Y P T S S G G G T G G

DNA: GAGGTGGCAGCTGGAGCTGGAGCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGGCTTGGGGCTCA
AA: E V L L Q Q S Q S G A E L V K P G A S

DNA: GTGAAAGATGTCCTGGCAAGGGCTGGCTGGAGCTGGTCAACATTTGAGCTGGAT
AA: V K M S S C K A G S Y T F T S Y N M

(图 9 - 2)

DNA: CACTGGGTAAAGCAGACACCTGGACAGGGCCTGGAATGGATTGGAGCTATT
AA: H W V K Q T P G Q G L E W I G A I

DNA: TATCCAGGAATGGTGTAACTTCTACAAATCAGAAAGTTCAAAGGCAAGGCC
AA: Y P G N G D T S Y N Q K F K G K A

AA: T L T A D K S S S S T A Y M Q L S S
 DNA: CTGACATCTGAGGACTCTGCGGACTATTACTGTCAAGATCTAATTATTAC

AA: L T S E D S A D Y Y C A R S N Y Y
 DNA: GGTAGTAGCTACTGGTTCTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACACGGTCACC
 M S C S M H E P D V W C Y G T T T N T

```
DNA: GTCTCCTCAGGGCACTACTAGCGGTGGCTCCGGGGGGCGGTTCCGGTGGG
  AA: V S S G S T S G G G S G G G S G G
```

DNA: GGCGGGAGCAGCGACATTGTGCTGACCCAACTCTCCAGCTATCCTGTCTGCA

```

AA: G G S S D T V L T Q S P A T E S A
DNA: TCTCCAGGGGAGAAGGTCAACATGACTTGCAAGGGCCAGCTCAAGTGTAAAT
AA: S P G E K V T M T C R A S S S V N

```

DNAT: TACATGGACCTGGTACCAAGAAGAAGCCAGGTTCTCCCCCAAAACCCCGGGAT
 AA: Y M D W Y Q K K P G S S P K P W T

DNAA: TATGCCGACAGTCGAAACGCGCGCTCTCGCACTCGCTCTCGCGCTCTCGCGCT

AA: Y A T S N L A S G V P A R F S G S
DNA: GGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGAT

AA: A A T Y Y C Q Q W S F N P P T F G

DNA: G G G G G G C C A A G C T G G A A A T A A A G A G A G C B G T A C G G A C C G C C T G C C C C

AA: G G T K L E I K E S K Y G P P C P

DNA: CCTTGCCCTGCCCGAGTTCCTGGGCUUACCCAGCGTGTCTCTGTGCCCC
 AA: P C P A P E F L G G P S V F L F R

DNA: CCCAAGCCCCAAGGACACCCCTGATGATCAGCCGGACCCCCCGAGGTGACCTGC

AAA: E R K F R K D I L P I T S R I F E E V K C

AA: V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y

DNA: GTGGACGGCGTGGAAAGTGCACAAAGCCAAAGACCAAGGCCAGAGAGGAAACAG
AA: V D G V E V H N A K T K P R E F Q

DNA: -TTCGAACTGCAACCTTACCGGCGATGGTGTCTGCTCTGACCGTGCTGACCCAGGC-

AA: F N S T Y R V V S V L T V L H Q D

DNA: TGGCTGAACGGCAAAAGAATACAAAGTCAAGGTGTCACAAAGGGCCCTGCC
 AA: W L N G K E Y K C K V S N K G L P

【図 9 - 3】

【図 1.1 - 1】

DNA: ATGCTGCTGCTGGTGGACCGCTGCTGCTGCGAGCTGCCACCCGCC
AA: M L L L V T S L L C E L P P A

DNA: TTTCTGCTGATCCCCGACATCCAGATGCCAGGCCAGCCTCCAGCTGAGC
AA: F F L L I P D I Q M T Q T T S S L S

DNA: GCGAGCTGCGGCCGACCGGTGACCATCAGCTGCCGGGCCGACAGCATC
AA: A S L S L G D R V T I S C R A S Q D I

DNA: AGCAAGTCTGAACTGGTATCAGCAGAGGCCGCCGACCGTCAAGCTG
AA: S K Y L L N W Y Q Q K P D G T V K L

DNA: CTGATCTTACACACCGCCGGCTGCACAGCGCCGTTGGCCAGCGTTTAA
AA: L I Y H T S R L H S G V P S R F S

DNA: GGCAGCGGCTCCGGCACGGACTACAGCGTGGACCATCTCCAACCTGGAAACAG
AA: G S G S G T D Y S L T I S L E B

DNA: GAGATATGCCAACCTACTTTGGCAGGAGGCGACAGCTGGCTACACCC
AA: E D I A T A Y F C Q Q G N T L P Y T

DNA: TTTGGCGGGGAAACAAAGCTGGAAATCACCGGCAGCCCTCGGCG
AA: F G G G T K T L E I T G S T S G S G

DNA: AACCGCTGGCAGGGCGAGGGCGACCCAAGGGCGAGGTGAAGCTGGAGGA
AA: K P G S G E G S T K G E V K L Q E

DNA: AGCGGCCCTGGCTGGTGGCCCGAGCCAGGGCTGAGCTGGCTGACCTGGACCC
AA: S G P G L V A P S Q S L S V T C T

DNA: GTGAGCGGGCTGAGCTGGCCGACTACGGGTGAGCTGGATTCGGCAGGCC
AA: V S G V P L P D Y G V S W I R Q P

DNA: CCAAGGAAGGGCTGGATGGCTGGGGCTGATCTGGGCGAGGGGAGACCC
AA: F R K G L E W L G V I W G S E T T

DNA: TACTAACACGGCCCTGAAGAGCCGCTGACCATCATCAAGGAAACAGC
AA: Y Y N S A L K S R L T I F K D N S

DNA: AAAGAGCCGGTGGTCTGAAGATGAAACAGCTGCGAGGCCGACCCGCC
AA: K S Q V F L K M N S L Q T D D T A

DNA: ATCTCTACTGGCCTGAAAGCTACTACAGCGCCGAGCTACGCCATGGAC
AA: I Y Y Y C A K H Y Y Y G G S Y A M D

DNA: TACTGGGGCCAGGGCACCGCGTGGCTGAGCCAGGGTGGTGGATTC
AA: Y W G Q G T S V T V S S G G G S

DNA: GAGGTGCGAGCTGCGAGCTGGGGCTGAGCTGGTGAACGCCCTGGGGCTCA
AA: E V Q P L Q Q S G A E L V K P G A S

DNA: GTGAAGATGCTGCGAACGGCTCTGGCTACACATTTGGCTGAGCTAC
AA: V K M S C K C A S G Y T E T S Y V N M

【 図 9 - 4 】

DNA: ACCGCCACCAAGGATACCTCTCGACGCCCTGACATGCAAGGCCCTGGCCCCCA
AA: T A T K D T Y D A L H M Q A L P P

DNA: AGG
AA: T C

【図 10】

GMCSFRss-CD19scFv-Gly4serリンカー-CD20scFv-CD8αヒンジ-CD8αTM-41BB-CD3ξ-T2A-EGFRt

【図11-2】

DNA: CACTGGGTAAGCAGACACCTGGACAGGGCCTGGAATGGATTGGAGCTATT
AA: H W V K Q T P G Q G L E W I G A I

DNA: TATCCAGGAATGTTGATACTTCCTACAAATCAGAAGTTCAAAGGCAAGGCC
AA: Y P G N G D T S Y N Q K F K G K A

DNA: ACATGTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCTCATGCAAGCTCAGCAGC
AA: T L T A D K S S S T A Y M Q L S S

DNA: CTGACATCTGAGGACTCTGCGGACTATTACTGTGCAAGATCTAAATTAC

```

AA: L T S E D S A D Y Y C A R S N Y Y
DNA: GGTAGTAGCTACTGGTCTTCGNTGCTGGGCGCAGGGACCACTGGTCACC
AA: G S S Y W F E D V W G A G T T V T

```

DNA: GTCTCTCTAGGGCAGTACTAGCGGTGGTGGCTCGGGGGCGGTTCCGGTGG
AA: V S S G S T S G G G S G G G S G G

DNA: GCGGGCAGCAGCGACATTGTGCTGACCCAAATCTCCAGCTATCCTGTCTGCA
AA: G G S S D I V L T Q S P A I L S A

```

DNA: TCTCCAGGGGAGAAGGTACAAATGACTTGCAGGGCCAGCTCAAGTGTAAAT
AA: S P G E K V T M T C R A S S S V N

```

DNA: TACATGGACTGGTACCAAGAGAAGGCCAGGATCCTCCCCCAAACCTGGATT
AA: Y M D W Y Q K K P G S S P K P W I

DNA: TATGCCACATCCAACCTGGCTTCGAGTCGCCTGCTCGCTTCACTGGCAGT
AA: Y A T S N L A S G V P A R F S G S

DNA: GGGCTGGGACCTCTTACTCTCTACAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGAT
AA: G S G T S Y S L T I S R V E A E D

```

DNA: GCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTTTAATCCACCCACGTTGGAA
AA: A A T Y Y C Q Q W S F N P P T F G

```

DNA: GGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAAGAGAGCAAGTACGGACCGCCCTGGCCCC
AA: G G T K L E I K E S K Y G P P C P

DNA: CCTTGCCCTAACGCTTACCAACCAACCCCTGCCCCTAGACCTCCAAACACCCGCC
AA: P C P K P T T T P A P R P P T P A

DNA: CCAACAAATCGCCAGCCAGCCCTCTGTCTCTGAGGGCCGAGGCTTGTAGACCCA
AA: P T I A S Q P L S L R P E A C R P

DNA: GCTGCTGGCGGAGCCGTGACACCCAGAGGACTGGATTCGCTGCGACATC
AA: A A G G A V H T R G L D F A C D I

DNA: TACATCTGGGCCCTCTGGCCGGCACATGTGGCTGCTGCTGCTGAGGCTC
AA: Y I W A P L A G T C G V L L L S L

DNA: GTGATCACCAAGCGGGGCAGAAAAGAACTGCTGTACATCTTAAAGCAGGCC
AA: V I T K R G R K K L L Y I P K Q P

DNA: TTCAATGCGGCCCGTGCAGACCAACCCAGGAGAGGAGCGGCTGCTCTGCAGA
AA: F M R P V Q T T Q E E D G C S C R

【 図 1 1 - 3 】

DNA: TTCCCCGAGGAAAGAAAGGCGCCTCGAGCTGAGACTGAGAATGTTTACAGCAGA
AA: F P E E E G G C E L R V K F S R

DNA: TCGCGGAGGCCCTGCCTACAGCAGGGACAGAACGCTGTACAAACGG
AA: S A D A P A Y Q Q R Q G N Q N L Y N E

DNA: CTGAACCTGGGAGACAGCGGAAGAGGTACGACGCTGCTGGACAAGCGCAGAGGC
AA: L N L G R R E E Y D V L D K R R G

DNA: CGGGACCTCTGAGATGGGGGAGAACGCCAGAAGAAAAGACCCGAGG
AA: R D P M G G K P R R K R N P Q G E A G

DNA: CTGTRTAACTGAGAAGCTGAGAAAAGRCAGAATGGCCGAGGCTCATCGCAGAGTC
AA: L Y N E L Q K D K M A E A Y S E I

DNA: GGAATGAGGG
AA: G M K G E R R R G K G H D G L Y Q

DNA: GGCCTGAGACGGCCACCAAGGGACACTATGACGCCCTGCACATGCGAGGCC
AA: G L S T A T K D T Y D A L H M Q A

DNA: CTGGCTTCAAGACTCGAGGGGCGCGGGAGAGGCGAGACAGAGAAGTCTTCTAAACA
AA: L P P R L E G G G E G R G G S E L L T

DNA: TCGGGTGAAGCTGGGGGGAAATCCGGGGCTTAGGTGCTCTCTGGTGACA
AA: C G D V D E N P G G P R N L L L V T

DNA: AGGCTCTGCTCTGTGAGTTACCAACACCCAGCATTCTCTCTGATCCCAAGCC
AA: S L L L C E L P H F P A F L L I P R

DNA: AAATGTTGTAACGGAAATAGTGTTGGTGAATTAAAGACTCTTCCTCCATA
AA: K V C N G I G I G I P F K D S L S I

DNA: AATGCTCTGAAATTAAACACTTCAAAACTGGCACCTCCATCAGTGGCGAT
AA: N A T N I K H F K N C T S I S G D

DNA: CTGCCACATCTCCGGTGGCAATTAGGGTGACTCTCTCACACATCTCT
AA: L H I L P V V A F R G D G S F T H T P

DNA: CCTCTGGATCACAGGAACCTGGTATTTCTGAAAAACCGTAAGGGAAATCACA
AA: P L D P Q E L D D I L K T V K E I T

DNA: GGGTTTTGCTGATTAGGGCTGGGCTGAAACAGGAGCGGACCTCCATGCC
AA: G F L L I L I Q A W P E N R T D L H A

DNA: TTGAGGAACTGAGGAAATCATACCGGGGAGACCCAGAACATGGTCACTTT
AA: L N L E I I T A C R G R T K T Q H G Q F E

DNA: TCTCTTGAGCTGGTCAGGCCATGAGTATTCCTGAAAAACCGTAAGGGAAATCACA
AA: S L A V V S L N I T S L G L R S L

DNA: AAGGAGTAAGTGATCAGGAGATGTGATAATTTCAGGAAACACCAATTGTC
AA: K E I I S D G D V V I I T S G N K N L I C

DNA: TATGCAATACATAAAACTGGGAAAAAAACTGTTGGGACCTCCGGTCAGAAA
AA: Y A A N T I R W W K L F F G T S S Q G K

【図 1.1 - 4】

【図 1.3 - 1】

DNA: CTCGAGGGGGCGGGAGGGAGGGGCGAGGGAGTCCTTCATACATCGGGTGACGTG
 AA: L E G G G E G R G S L L T C G D V

DNA: GAGGAGGAATCCTGGCCCTAGGATGCGTCTCTCTGGTGCACAGGGCTTCGTC
 AA: E B N P G F P M L L B L V T S L L L

DNA: TGTGAGTTTACACCCACGGATTCCTCTGGTGCACAGGGCTTCGTC
 AA: C E B L P H P A F F L L I P R K V C V

DNA: GGAATAGGTATTGGTGAATTAAAGACTCACTCTCCATAAATGCTACGAAAT
 AA: G I G I G E F K D S L S I N A T N

DNA: ATTAACTACCTCAAAACTCGACCTTCATACAGTGCGATCTCCACATCTCG
 AA: I K H F K N C T S I S G D L H I L

DNA: CCGGTGGCATTTAGGGGTGACTCTTCACACATACAGTCCTCTGGATCCA
 AA: P V A F R G D S F T H T P P L D P

DNA: CAGGAACCTGGATATTCTGAAAACAGCTAAAGGAATCACAGGGTTTCTCG
 AA: Q E L D I L K T V K E I T G C A C

DNA: ATTCCGGCTTGGCTGAAAACAGGGACGGACCTTCATCGCTTGGAGAACCTA
 AA: I Q A A W P E N R T D L H A F E N L

DNA: GAAATCATACGCGGAGGACCAAGCAACATGGTCAGTTCTCTGTCAGTC
 AA: E I I R G R T K M H G Q S S L A V

DNA: GTCGGCTTGAACATACATCTTGGGATTACCGCTCCCTGAGGAGATAAGT
 AA: V S L N I T S L G L R S L K B I S

DNA: GATGGAGATGTGTAATTTCAGGAAAACAAAAATTGTTGGCTATGCAAAATACA
 AA: D G D V I I S G N K N L C Y A N T

DNA: ATAAACATGGAAAAAAACTGTGGGACCTCCGGTCAGAAAACAAAAATTATA
 AA: I N W K R F G T S G Q G K T K I I

DNA: AGCCARCAAGGTGAAAACAGCTCGAACGGCCACAGGGCAGGTCTGGCATGCC
 AA: S N R G E R S C K A T G Q V C H A

DNA: TTGTGCTCCCCGGGGCTGCTGGGGCCCGAGGCGGGACTGGCTCTCT
 AA: L C S P E G C W G G P E P R D C V S

DNA: TGCGGAAATGTCAGGGAGGGATGCGTGGACAAAGTCACCTTCTG
 AA: C R N V S R G R E C V D K C N L L

DNA: GAGGGTGAGGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGGTGATACAGTGCCAC
 AA: E G E P R F V E N S E C I Q C H

DNA: CCAGAGATGGCTCCTGAGGGCAATGACATCACCTGGACAGGGACGGGGACCA
 AA: P E C C L P Q A M N I T C T G R G P

DNA: GACAACTGTTACCGCCATACAGGGCTTCAGGCGGGCCACATTCAGGCGCC
 AA: T G C A G T G C A G T T C A G T T C A G T T C A G T T C A G T T C A G

【図1.3-2】

```

DNA: ACCCTGCCCGCAGCTCATGGAGAAAACACACCCCTGGCTGGAAAGTAC
AA: T C P A G V M G E N N T L W V K Y

DNA: CGAGACGCCGCCATGTGTGCACCCCTGTGCATCCAACCTGCACCTACGGA
AA: A D A G V C H L C P N C T V T Y G

DNA: TGCACTGGCCAGGTCTTGAAGCTGTGCAACGAAATGGCCCTAAGATCCG
AA: C T G F G L E G C P T N G H F K I P

DNA: TCCATCGCCACTGGATGGTGGGGGGGGCCCTCTTGTGCTGCTGGTGCGCC
AA: S I A T G M V G A L L L L L V V A

DNA: CTGGGAGTCGGCTCTCATGTGA

```

【配列表】

0006850528000001.app

フロントページの続き

(51) Int.CI.		F I		
C 0 7 K	14/705	(2006.01)	C 0 7 K	14/705 Z N A
C 0 7 K	14/715	(2006.01)	C 0 7 K	14/715
C 0 7 K	14/725	(2006.01)	C 0 7 K	14/725
C 0 7 K	14/735	(2006.01)	C 0 7 K	14/735
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	19/00
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 N	15/00	(2006.01)	C 1 2 N	15/00

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 イエンセン マイケル

アメリカ合衆国 ワシントン州 ベーンブリッジ アイルランド プレザント ビーチ ドライブ

3 4 9 4

合議体

審判長 井上 典之

審判官 藤原 浩子

審判官 松本 直子

(56)参考文献 国際公開第2011/056894 (WO, A1)

国際公開第2011/041093 (WO, A1)

Mol. Ther., 2011年5月, Vol. 19, Suppl. 1, P. S11

NEURO-ONCOLOGY, 2011年11月, Vol. 13, Suppl. 3, P. ii
i 115

(58)調査した分野(Int.CI., DB名)

A61K

C12N

JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDream III)

Caplus / BIOSIS / EMBASE / MEDLINE (STN)