

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6647868号
(P6647868)

(45) 発行日 令和2年2月14日 (2020.2.14)

(24) 登録日 令和2年1月17日 (2020.1.17)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13 Z N A

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62 Z

C O 7 K 16/28 (2006.01)

C O 7 K 16/28

C O 7 K 16/46 (2006.01)

C O 7 K 16/46

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 P 21/08

請求項の数 41 (全 138 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-558946 (P2015-558946)
 (86) (22) 出願日 平成26年2月20日 (2014.2.20)
 (65) 公表番号 特表2016-508725 (P2016-508725A)
 (43) 公表日 平成28年3月24日 (2016.3.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/017364
 (87) 国際公開番号 W02014/130657
 (87) 国際公開日 平成26年8月28日 (2014.8.28)
 審査請求日 平成29年2月20日 (2017.2.20)
 (31) 優先権主張番号 61/888,255
 (32) 優先日 平成25年10月8日 (2013.10.8)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/767,071
 (32) 優先日 平成25年2月20日 (2013.2.20)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 504389991
 ノバルティス アーゲー
 スイス国 バーゼル リヒトシュトラッセ
 35
 (73) 特許権者 500429103
 ザ トラスティーズ オブ ザ ユニバー
 シティ オブ ペンシルバニア
 アメリカ合衆国 19104 ペンシルベ
 ニア州 フィラデルフィア シビック セ
 ンター ブールバード 3600 ナイン
 ス フロア

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト化抗EGFRvIIIキメラ抗原受容体を用いたがんの処置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

キメラ抗原受容体 (CAR) をコードする単離核酸分子であって、
 該CARが抗EGFRvIII結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および、一次シグナル伝
 達ドメイン、同時刺激ドメインまたは一次シグナル伝達ドメインおよび同時刺激ドメイン
 の両方を含む細胞内シグナル伝達ドメインを含み、

該コードされた抗EGFRvIII結合ドメインが、

(i) (a) 配列番号26の配列からなる軽鎖相補決定領域1 (LC CDR1) ;

(b) 配列番号27の配列からなる軽鎖相補決定領域2 (LC CDR2) ; および

(c) 配列番号28の配列からなる軽鎖相補決定領域3 (LC CDR3)

を含む軽鎖可変領域、および

(ii) (a) 配列番号22の配列からなる重鎖相補決定領域1 (HC CDR1) ;

(b) 配列番号23の配列からなる重鎖相補決定領域2 (HC CDR2) ; および

(c) 配列番号24の配列からなる重鎖相補決定領域3 (HC CDR3)

を含む重鎖可変領域

を含み、配列番号68のアミノ酸配列と少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸
 配列を含む、単離核酸分子。

【請求項2】

抗EGFRvIII結合ドメインがscFvである、請求項1に記載の単離核酸分子。

【請求項3】

10

20

コードされた抗EGFRvIII結合ドメインが、配列番号68のアミノ酸配列を含む、請求項1または2に記載の単離核酸分子。

【請求項4】

該抗EGFRvIII結合ドメインをコードする核酸配列が、配列番号69の配列または、それと95～99%の同一性を有する配列を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の単離核酸分子。

【請求項5】

コードされたCARが、T細胞受容体の鎖、鎖または鎖、CD28、CD3、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137およびCD154からなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメインを含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の単離核酸分子。

10

【請求項6】

コードされた膜貫通ドメインが、配列番号15の配列、あるいは配列番号15のアミノ酸配列に少なくとも1個の変更を有するが、20個以下の変更を有するアミノ酸配列か、または配列番号15のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列を含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の単離核酸分子。

【請求項7】

膜貫通ドメインをコードする核酸配列が、配列番号8の配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の単離核酸分子。

20

【請求項8】

コードされた抗EGFRvIII結合ドメインが、ヒンジ領域によって膜貫通ドメインに結合している、請求項1～7のいずれか一項に記載の単離核酸分子。

【請求項9】

コードされたヒンジ領域が、配列番号14の配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む、請求項8に記載の単離核酸分子。

【請求項10】

ヒンジ領域をコードする核酸配列が、配列番号7の配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む、請求項9に記載の単離核酸分子。

【請求項11】

30

同時刺激ドメインをコードする配列をさらに含む、請求項1～10のいずれか一項に記載の単離核酸分子。

【請求項12】

コードされた同時刺激ドメインが、OX40、CD27、CD28、CD5、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、ICOS(CD278)および4-1BB(CD137)からなる群から選択されるタンパク質の機能性シグナル伝達ドメインを含む、請求項11に記載の単離核酸分子。

【請求項13】

i) コードされた同時刺激ドメインが、配列番号16の配列、あるいは配列番号16のアミノ酸配列に少なくとも1個の変更を有するが、20個以下の変更を有するアミノ酸配列か、または配列番号16のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列を含むか、または

40

ii) 同時刺激ドメインをコードする核酸配列が、配列番号9の配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む、請求項11または12に記載の単離核酸分子。

【請求項14】

コードされた細胞内シグナル伝達ドメインが、

i) 4-1BBの機能性シグナル伝達ドメインおよびCD3の機能性シグナル伝達ドメイン；

ii) 配列番号16の配列および/または配列番号17または配列番号99の配列、ある

50

いは配列番号 16 のアミノ酸配列および / または配列番号 17 または配列番号 99 のアミノ酸配列に少なくとも 1 個の変更を有するが、20 個以下の変更を有するアミノ酸配列か、または配列番号 16 のアミノ酸配列および / または配列番号 17 または配列番号 99 のアミノ酸配列と 95 ~ 99 % の同一性を有する配列 ; または

i i i) 配列番号 16 の配列および、配列番号 17 または配列番号 99 の配列であって、該細胞内シグナル伝達ドメインを含む配列が同一フレーム内で、単一のポリペプチド鎖として発現する、配列

を含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の単離核酸分子。

【請求項 15】

該細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列が、配列番号 9 の配列またはそれと 95 ~ 99 % の同一性を有する配列および / または配列番号 10 または配列番号 100 の配列またはそれと 95 ~ 99 % の同一性を有する配列を含む、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の単離核酸分子。

10

【請求項 16】

リーダー配列をさらに含む、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の単離核酸分子。

【請求項 17】

リーダー配列が、配列番号 13 の配列を含む、請求項 16 に記載の単離核酸分子。

【請求項 18】

請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の核酸分子によりコードされている単離ポリペプチド分子。

20

【請求項 19】

配列番号 73 のアミノ酸配列またはそれと 95 ~ 99 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 18 に記載の単離ポリペプチド分子。

【請求項 20】

抗 E G F R v I I I 結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含む、単離キメラ抗原受容体 (C A R) 分子であって、抗 E G F R v I I I 結合ドメインが、

(i) (a) 配列番号 26 の配列からなる軽鎖相補決定領域 1 (L C C D R 1) ;

(b) 配列番号 27 の配列からなる軽鎖相補決定領域 2 (L C C D R 2) ; および

(c) 配列番号 28 の配列からなる軽鎖相補決定領域 3 (L C C D R 3)

30

を含む軽鎖可変領域、および

(i i) (a) 配列番号 22 の配列からなる重鎖相補決定領域 1 (H C C D R 1) ;

(b) 配列番号 23 の配列からなる重鎖相補決定領域 2 (H C C D R 2) ; および

(c) 配列番号 24 の配列からなる重鎖相補決定領域 3 (H C C D R 3)

を含む重鎖可変領域

を含み、配列番号 68 のアミノ酸配列と少なくとも 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、

単離 C A R 分子。

【請求項 21】

該細胞内シグナル伝達ドメインが同時刺激ドメインおよび一次シグナル伝達ドメインを含む、請求項 20 に記載の単離 C A R 分子。

40

【請求項 22】

該抗 E G F R v I I I 結合ドメインが、配列番号 68 のアミノ酸配列を含む、請求項 20 または 21 に記載の単離 C A R 分子。

【請求項 23】

該抗 E G F R v I I I 結合ドメインがヒンジ領域によって膜貫通ドメインに結合している、請求項 20 ~ 22 のいずれか一項に記載の単離 C A R 分子。

【請求項 24】

リーダー配列をさらに含む、請求項 20 ~ 23 のいずれか一項に記載の単離 C A R 分子

。

50

【請求項 25】

(i)(a) 配列番号 26 の配列からなる軽鎖相補決定領域 1 (LC CDR1) ;
(b) 配列番号 27 の配列からなる軽鎖相補決定領域 2 (LC CDR2) ; および
(c) 配列番号 28 の配列からなる軽鎖相補決定領域 3 (LC CDR3)
を含む軽鎖可変領域、および
(ii)(a) 配列番号 22 の配列からなる重鎖相補決定領域 1 (HC CDR1) ;
(b) 配列番号 23 の配列からなる重鎖相補決定領域 2 (HC CDR2) ; および
(c) 配列番号 24 の配列からなる重鎖相補決定領域 3 (HC CDR3)
を含む重鎖可変領域
を含み、配列番号 68 のアミノ酸配列と少なくとも 99% の配列同一性を有するアミノ酸
配列を含む、抗 EGF R v I I I 結合ドメイン。

10

【請求項 26】

配列番号 68 のアミノ酸配列を含む、請求項 25 に記載の抗 EGF R v I I I 結合ドメイン。

【請求項 27】

請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 28】

DNA、RNA、プラスミド、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクターおよびレトロウイルスベクターからなる群から選択される、請求項 27 に記載のベクター。

20

【請求項 29】

プロモーターをさらに含む、請求項 27 または 28 に記載のベクター。

【請求項 30】

該プロモーターが EF - 1 プロモーターであり、該 EF - 1 プロモーターが配列番号 97 の配列を含む、請求項 29 に記載のベクター。

【請求項 31】

該ベクターが試験管内で転写されたベクターである、請求項 27 ~ 30 のいずれかに記載のベクター。

【請求項 32】

ベクター中の核酸配列がさらにポリ (A) テールまたは 3' UTR を含む、請求項 27 ~ 31 のいずれかに記載のベクター。

30

【請求項 33】

請求項 27 ~ 32 のいずれかに記載のベクターを含む細胞。

【請求項 34】

T 細胞または CD8 + T 細胞である、請求項 33 に記載の細胞。

【請求項 35】

ヒト細胞である、請求項 33 または 34 に記載の細胞。

【請求項 36】

請求項 27 ~ 32 のいずれか一項に記載のベクターで T 細胞に形質導入することを含む、細胞の作製方法。

40

【請求項 37】

試験管内で転写された RNA または合成 RNA を細胞に導入することを含む、RNA 操作細胞集団の作製方法であって、該 RNA が請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の核酸分子を含む、方法。

【請求項 38】

請求項 33 ~ 35 のいずれか一項に記載の細胞の有効量を含む、抗腫瘍免疫を提供するための組成物。

【請求項 39】

EGFR v I I I の発現に関連する疾患を処置するための組成物であって、請求項 33 ~ 35 のいずれか一項に記載の細胞の有効量を含む、組成物。

【請求項 40】

50

EGFRvIIIの発現に関連する疾患が、多形神経膠芽腫（GBM）、未分化星状細胞腫、巨細胞神経膠芽腫、膠肉腫、未分化乏突起神経膠腫、未分化上衣腫、脈絡叢がん、未分化神経節膠腫、松果体芽腫、髄上皮腫、上衣芽腫、髄芽腫、テント上原始神経外胚葉性腫瘍、AT/RT（非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍）、肺がん、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、結腸直腸がんおよび膀胱がんからなる群から選択されるがんまたはその任意の組合せ、またはその任意のがんの転移である、請求項39に記載の組成物。

【請求項41】

肺がんが非小細胞肺がんである、請求項40に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本出願は、米国特許出願第61/888,255号（2013年10月8日出願）および米国特許出願第61/767,071号（2013年2月20日出願）に対して優先権を主張し、これらの出願の全体は、それぞれ、引用により本明細書中に包含される。

【0002】

連邦政府資金による研究開発の記載

本発明は、米国国立衛生研究所(NIH)の第2R01 NS055140号および第1P01 CA1322714号の助成により行われた。政府は本発明において特定の権利を有する。

【0003】

配列表

20

本願は、電子データによりASCIIフォーマットで提出した配列表を含み、該配列表は、言及によりその全体が本明細書に包含される。該ASCIIコピー（2014年2月20日作成）は、N2067-7000WO_SL.txtという名称であり、サイズは228,605バイトである。

【0004】

本発明は、全体的に、上皮成長因子受容体(EGFR)IIIの発現に関連する疾患を処置するための、キメラ抗原受容体(CAR)を発現するように操作したT細胞の使用に関する。

【背景技術】

【0005】

中枢神経系(CNS)は、しばしば免疫学的特権を有していると考えられているが(Okada et al., 2009, Crit Rev Immunol 29:1-42)、悪性神経膠腫の患者における近年のワクチン研究は、陽性の結果を示している(Aguilar et al., 2012, Curr Treat Options Oncol 13:437-450; Ruzevick, et al., 2012, Neurosurg Clin N Am 23:459-470;15; およびOkada et al., 2011, J Clin Oncol 29:330-336)。しかしながら、ワクチンの有効性は、インタクトな宿主-免疫活性に依存するものであるため、化学療法および放射性療法と同様に、腫瘍が免疫抑制性サイトカインを発現することによる全身性の免疫抑制に苦しむ可能性がある。一方、自家T細胞、特にキメラ抗原受容体(CAR)で形質導入したT細胞を用いた養子細胞移入(ACT)療法は見込みがあるものであることが、血液がんの予備試験で示されている(Kalos et al., 2011, Sci Transl Med 3(95):95ra73; およびPorter et al., 2011, New England Journal of Medicine 365:725-733)。

30

【0006】

40

上皮増殖因子受容体(EGFR)の発現上昇は、種々のがん、例えば乳がん、肺がん、頭頸部がんならびに神経膠芽腫において頻繁に検出される。EGFR遺伝子中の自然発生的な再配列は、最初に、原発性ヒト神経膠芽腫において同定され、該変異は、EGFRの増幅を伴う腫瘍の殆ど全ての症例において報告されている。これらの再配列からは、3種類の異なる変異体が生じる。これらのうちの最も一般的なものは、EGFR mRNAのエキソン2~7が欠失していることにより特徴付けられるIII型EGF欠失変異受容体(EGFRvIII)である。これらの欠失は、cDNAヌクレオチド第275番~第1075番に相当し、これらは、おそらく、選択的スプライシングまたは再配列を介して、アミノ酸第6番~第276番をコードしている。EGFR遺伝子の細胞外ドメイン中の801bpの欠失は、正常なEGFRタンパク質のインフレームトランケーションを引き起こし、145kDaの受容体が生じ、それにより、腫瘍特異的な免疫原性のエピ

50

トープが生じる (Hatanpaa et al., 2010, Neoplasia 12:675- 684; Mukasa et al., 2010, Proc Natl Acad Sci USA 107:2616-2621に概説されている)。EGFRvIIIの発現は、多数の種類の腫瘍、例えば多形神経膠芽腫(GBM)で見られているが、正常な組織では滅多に見られない。EGFRvIIIは、GBMの症例の24%~67%に発現しており、1年以上生存している患者では、EGFRvIIIの発現は、独立したネガティブな予後の指標である (Heimberger et al., 2005, Clin.Cancer Res. 11:1462-1466; Heimberger et al., 2005, J Transl. Med 3:38)。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Okada et al., 2009, Crit Rev Immunol 29:1-42

【非特許文献2】Aguilar et al., 2012, Curr Treat Options Oncol 13:437-450

【非特許文献3】Ruzevick, et al., 2012, Neurosurg Clin N Am 23:459-470;15

【非特許文献4】Okada et al., 2011, J Clin Oncol 29:330-336

【非特許文献5】Kalos et al.,2011, Sci Transl Med 3(95):95ra73

【非特許文献6】Porter et al., 2011, New England Journal of Medicine 365:725-733

【非特許文献7】Hatanpaa et al., 2010, Neoplasia 12:675- 684

【非特許文献8】Mukasa et al., 2010, Proc Natl Acad Sci USA 107:2616-2621

【非特許文献9】Heimberger et al., 2005, Clin.Cancer Res. 11:1462-1466

【非特許文献10】Heimberger et al.,2005, J Transl. Med 3:38

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、とりわけ、キメラ抗原受容体(CAR)コンストラクトに導入した上皮増殖因子受容体III(EGFRvIII)に結合する、最適化および/またはヒト化抗体または抗体断片(例えばscFv)を提供することによって、患者における免疫応答を制御するための組成物および方法を提供する。いくつかの態様において、本発明は、EGFRvIIIの発現に関連するがんを処置するための、CARに組み込まれたEGFRvIIIに結合する抗体または抗体断片、例えばEGFRvIIIに結合するヒト化抗体または抗体断片を発現するように操作したT細胞の使用に関する。いくつかの局面において、本発明は、生体内免疫化により誘導されるナイーブT細胞よりも、生体外で調製する細胞は、特異性、数および機能性の表現型をはるかによく操作および制御できるため、神経膠腫の患者に特に適当であり得る細胞移入に関する。

【0009】

したがって、局面の一において、本発明は、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする単離核酸分子に関し、ここで、該CARは、抗EGFRvIII結合ドメイン(例えば、EGFRvIIIに特異的に結合するヒト化抗体または抗体断片)、膜結合ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、同時刺激ドメインおよび/または一次シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメイン)を含む、抗体または抗体断片を含む。態様の一において、該CARは、本明細書に記載の抗EGFRvIII 結合ドメインを含む抗体または抗体断片(例えば、本明細書に記載のEGFRvIIIに特異的に結合するヒト化抗体または抗体断片)、本明細書に記載の膜貫通ドメインおよび本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、同時刺激ドメインおよび/または一次シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメイン)を含む。

【0010】

態様の一において、コードされた抗EGFRvIII結合ドメインは、本明細書に記載の抗EGFRvIII結合ドメインの軽鎖相補決定領域1(LC CDR1)、軽鎖相補決定領域2(LC CDR2)および軽鎖相補決定領域3(LC CDR3)の1つ以上(例えば3つ全て)、ならびに本明細書に記載の抗EGFRvIII結合ドメインの重鎖相補決定領域1(HC CDR1)、重鎖相補決定領域2(HC CDR2)および重鎖相補決定領域3(HC CDR3)の1つ以上(例えば3つ全て)を含み、例えば、1つ以上、例えば3つ全てのLC CDRおよび1つ以上、例えば3つ全てのHC CDRを含むヒト化抗EGFRv

10

20

30

40

50

III結合ドメインである。態様のーにおいて、コードされた抗EGFRvIII結合ドメインは、本明細書(例えば表2または配列番号11)に記載の軽鎖可変領域および/または本明細書(例えば表2または配列番号11)に記載の重鎖可変領域を含む。態様のーにおいて、コードされた抗EGFRvIII結合ドメインは、表2または配列番号11のアミノ酸配列の軽鎖および長鎖を含むscFvである。態様のーにおいて、抗EGFRvIII結合ドメイン(例えばscFv)は、表2または配列番号11に記載の軽鎖可変領域のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個または3個の変更(例えば置換)を有するが、30個以下、20個以下、10個以下の変更(例えば置換)を有するアミノ酸配列または、表2もしくは配列番号11のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域; および/または表2または配列番号11の重鎖可変領域のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個または3個の変更(例えば置換)を有するが、30個以下、20個以下、または10個以下の変更(例えば置換)を有するアミノ酸配列または、表2もしくは配列番号11のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列を含む重鎖可変領域を含む。態様のーにおいて、該抗EGFRvIII結合ドメインは、配列番号38、配列番号44、配列番号50、配列番号56、配列番号62、配列番号68、配列番号74、配列番号80および配列番号86からなる群から選択される配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。態様のーにおいて、該抗EGFRvIII結合ドメインをコードする核酸配列は、配列番号68の配列を含む。態様のーにおいて、該抗EGFRvIII結合ドメインをコードする核酸配列は、配列番号39、配列番号45、配列番号51、配列番号57、配列番号63、配列番号69、配列番号75、配列番号81および配列番号98からなる群から選択される配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。態様のーにおいて、コードされた抗EGFRvIII結合ドメインは、scFvであり、本明細書中、例えば表2または配列番号11に示すアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域が、本明細書、例えば表2または配列番号11に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に、リンカー、例えば本明細書に記載のリンカーを介して結合している。態様のーにおいて、コードされた抗EGFRvIII結合ドメインは、(Gly₄-Ser)_nリンカーを含み、ここで、nは1、2、3、4、5または6であり、好ましくは4である(配列番号110)。scFvの軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、例えば次のいずれかの方向性を有してよい: 軽鎖可変領域 - リンカー - 重鎖可変領域または重鎖可変領域 - リンカー - 軽鎖可変領域。

【0011】

態様のーにおいて、コードされたCARは、T細胞受容体の鎖、鎖または鎖、CD28、CD3、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137およびCD154からなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む、膜貫通ドメインを含む。態様のーにおいて、コードされた膜貫通ドメインは、配列番号15の配列を含む。態様のーにおいて、コードされた膜貫通ドメインは、配列番号15のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個または3個の変更(例えば置換)を有するが、20個以下、10個以下または5個以下の変更(例えば置換)を有するアミノ酸配列または配列番号15のアミノ酸配列と95～99%の同一性を示す配列を含む。態様のーにおいて、該膜貫通ドメインをコードする核酸配列は、配列番号8の配列または該配列と95～99%の同一性を有する配列を含む。

【0012】

態様のーにおいて、コードされた抗EGFRvIII結合ドメインは、ヒンジ領域、例えば本明細書に記載のヒンジ領域によって膜貫通ドメインに連結している。態様のーにおいて、コードされたヒンジ領域は、配列番号14または配列番号104または配列番号106または配列番号108またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。態様のーにおいて、該ヒンジ領域をコードする核酸配列は、配列番号7または配列番号105または配列番号107または配列番号109の配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。

【0013】

態様のーにおいて、単離核酸分子は、同時刺激ドメイン、例えば本明細書に記載の同時刺激ドメインをコードする配列をさらに含む。態様のーにおいて、コードされた同時刺激ドメインは、OX40、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278) および4-1BB (CD137) からなる群から選択されるタンパク質の機能性シグナル伝達ドメ

10

20

30

40

50

ンを含む。態様の一において、コードされた同時刺激ドメインは、配列番号16の配列を含む。態様の一において、コードされた同時刺激ドメインは、配列番号102の配列を含む。態様の一において、コードされた同時刺激ドメインは、配列番号16または配列番号102のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個もしくは3個の変更（例えば置換）を有するが、20個以下、10個以下、または5個以下の変更（例えば置換）を有するアミノ酸配列または、配列番号16または配列番号102のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列を含む。態様の一において、同時刺激ドメインをコードする核酸配列は、配列番号9またはそれと95～99%の同一性を示す配列を含む。

【0014】

態様の一において、該単離核酸分子は、細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメインをコードする配列をさらに含む。態様の一において、コードされた細胞内シグナル伝達ドメインは、4-1BBの機能性シグナル伝達ドメインおよび/またはCD3 の機能性シグナル伝達ドメインを含む。態様の一において、コードされたシグナル伝達ドメインは、CD27の機能性シグナル伝達ドメインおよび/またはCD3 の機能性シグナル伝達ドメインを含む。態様の一において、コードされた細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号16または配列番号102および/または配列番号17または配列番号99の配列を含む。態様の一において、該細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号16のアミノ酸配列および/または配列番号17または配列番号99のアミノ酸配列の少なくとも1個、2個または3個の変更（例えば置換）を有するが、20個以下、10個以下または5個以下の変更（例えば置換）を有するアミノ酸配列または配列番号16または配列番号102のアミノ酸配列および/または配列番号17または配列番号99と95～99%の同一性を有する配列を含む。態様の一において、コードされた細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号16または配列番号102の配列および配列番号17または配列番号99の配列を含み、ここで、該細胞内シグナル伝達ドメインを含む配列は、同一フレーム中で、単一のポリペプチド鎖として発現する。態様の一において、細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列は、配列番号9または配列番号103の配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列および/または配列番号10または配列番号100またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。

【0015】

他の局面において、本発明は、リーダー配列、例えば、本明細書中に記載のリーダー配列、例えば配列番号13の配列、本明細書に記載の抗EGFRvIII結合ドメイン、例えば、LC CDR1、LC CDR2、LC CDR3、HC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3を含む抗EGFRvIII結合ドメイン、例えば表2または配列番号11に記載の抗EGFRvIII結合ドメインもしくはそれと95～99%同一である配列、本明細書に記載のヒンジ領域、例えば配列番号14、配列番号104、配列番号106または配列番号108のヒンジ領域、本明細書に記載の膜貫通ドメイン、例えば配列番号15の配列を有する膜貫通ドメインならびに細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメインを含む。態様の一において、コードされた細胞内シグナル伝達ドメインは、同時刺激ドメイン、例えば本明細書に記載の同時刺激ドメイン、例えば、配列番号16の配列を有する4-1BB同時刺激ドメイン、および/または一次シグナル伝達ドメイン、例えば本明細書に記載の一次シグナル伝達ドメイン、例えば配列番号17または配列番号99を有するCD3 刺激ドメインを含むCARコンストラクトをコードする単離核酸分子に関する。態様の一において、コードされる細胞内シグナル伝達ドメインは、同時刺激ドメイン、例えば本明細書に記載の同時刺激ドメイン、例えば配列番号102の配列を有するCD27同時刺激ドメイン、および/または一次シグナル伝達ドメイン、例えば本明細書に記載の一次シグナル伝達ドメイン、例えば配列番号17または配列番号99の配列を有するCD3 刺激ドメインを含む。態様の一において、コードされている細胞内シグナル伝達ドメインは、同時刺激ドメイン、例えば、本明細書に記載の同時刺激ドメイン、例えば配列番号16の配列を有する4-1BB同時刺激ドメイン、ならびに一次シグナル伝達ドメイン、例えば本明細書に記載の一次シグナル伝達ドメイン、例えば配列番号17または配列番号99の配列を有するCD3 刺激ドメインを含む。態様の一において、コードされた細胞内シグナル伝達ドメインは、同時刺激ドメイン、例えば本明細書に記載の同時刺激ドメイン

10

20

30

40

50

、例えば配列番号102の配列を有するCD27同時刺激ドメイン、ならびに一次シグナル伝達ドメイン、例えば本明細書に記載の一次シグナル伝達ドメイン、例えば配列番号17または配列番号99の配列を有するCD3 刺激ドメインを含む。態様の一において、該CARコンストラクトをコードする単離核酸分子は、配列番号6の核酸配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列にコードされるリーダー配列を含む。態様の一において、該CARコンストラクトをコードする単離核酸分子は、配列番号39、配列番号45、配列番号51、配列番号57、配列番号63、配列番号69、配列番号75、配列番号81もしくは配列番号98またはそれと95～99%の同一性を有する配列にコードされる、抗EGFR結合ドメイン配列を含む。態様の一において、該CARコンストラクトをコードする単離核酸分子は、配列番号69の核酸配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列にコードされる抗EGFR結合ドメイン配列を含む。態様の一において、該CARコンストラクトをコードする単離核酸分子は、配列番号4の核酸配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列にコードされる抗EGFR結合ドメイン配列を含む。態様の一において、該CARコンストラクトをコードする単離核酸分子は、配列番号8またはそれと95～99%の同一性を有する配列の核酸配列によりコードされる膜貫通配列を含む。態様の一において、該CARコンストラクトをコードする単離核酸分子は、配列番号9の核酸配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列および/または配列番号10の核酸配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列によってコードされる細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0016】

態様の一において、単離核酸分子は、配列番号43、配列番号49、配列番号55、配列番号61、配列番号67、配列番号73、配列番号79、配列番号85もしくは配列番号90のCARアミノ酸配列または、配列番号43、配列番号49、配列番号55、配列番号61、配列番号67、配列番号73、配列番号79、配列番号85もしくは配列番号90のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、10個、15個、20個または30個の変更（例えば置換）を有するが、60個以下、50個以下または40個以下の変更（例えば置換）を有するアミノ酸配列、または配列番号43、配列番号49、配列番号55、配列番号61、配列番号67、配列番号73、配列番号79、配列番号85もしくは配列番号90のアミノ酸配列と85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む（例えば該配列からなる）。態様の一において、該単離核酸分子は、配列番号1もしくは配列番号2のCARアミノ酸配列、または配列番号1もしくは配列番号2のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、10個、15個、20個または30個の変更（例えば置換）を有するが、60個以下、50個以下または40個以下の変更（例えば置換）を有するアミノ酸配列、または配列番号1または配列番号2のアミノ酸配列と85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するアミノ酸配列をコードする核酸を含む（例えば、該核酸からなる）。

【0017】

態様の一において、該単離核酸分子は、配列番号42、配列番号48、配列番号54、配列番号60、配列番号66、配列番号72、配列番号78、配列番号84もしくは配列番号89の核酸配列、または配列番号42、配列番号48、配列番号54、配列番号60、配列番号66、配列番号72、配列番号78、配列番号84もしくは配列番号89の核酸配列と85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有する核酸配列を含む（例えば該配列からなる）。態様の一において、該単離核酸分子は、配列番号18もしくは配列番号19の核酸配列または、配列番号18もしくは配列番号19の核酸配列と85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有する核酸配列を含む（例えば、該核酸配列からなる）。

【0018】

局面の一において、本発明は、抗EGFRvIII結合ドメインをコードする単離核酸分子に関し、ここで、該抗EGFRvIII結合ドメインは、本明細書に記載の抗EGFRvIII結合ドメインの軽鎖相補決定領域1 (LC CDR1)、軽鎖相補決定領域2 (LC CDR2)および軽鎖相補決定領域3 (LC CDR3) の1つ以上（例えば3つ全て）、ならびに本明細書に記載の抗EGFRvIII結合ドメインの重鎖相補決定領域1 (HC CDR1)、重鎖相補決定領域2 (HC CDR2)および重鎖相補決定領域3 (HC CDR3)の1つ以上（例えば3つ全て）を含み、例えば1つ以上、例えば3つ全てのL

10

20

30

40

50

C CDRおよび1つ以上、例えば3つ全てのHC CDRを含むヒト化抗EGFRvIII結合ドメインである。態様の一において、コードされた抗EGFRvIII結合ドメインは、本明細書に記載の（例えば配列番号38、44、50、56、62、68、74または80の）軽鎖可変領域および/または本明細書に記載の（例えば配列番号38、44、50、56、62、68、74または80の）重鎖可変領域を含む。態様の一において、コードされた抗EGFRvIII結合ドメインは、配列番号38、44、50、56、62、68、74または80のアミノ酸配列の軽鎖および重鎖を含むscFvである。態様の一において、該抗EGFRvIII結合ドメイン（例えば、scFv）は、配列番号38、44、50、56、62、68、74または80に示される軽鎖可変領域のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個または3個の変更（例えば置換）を有するが、30個以下、20個以下または10個以下の変更（例えば置換）を有するアミノ酸配列または配列番号38、44、50、56、62、68、74または80のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域；および/または配列番号38、44、50、56、62、68、74または80に示す重鎖可変領域のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個または3個の変更（例えば置換）を有するが、30個以下、20個以下または10個以下の変更（例えば置換）を有するアミノ酸配列または配列番号38、44、50、56、62、68、74または80のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列を含む重鎖可変領域を含む。態様の一において、該抗EGFRvIII結合ドメインは、配列番号38、配列番号44、配列番号50、配列番号56、配列番号62、配列番号68、配列番号74、配列番号80および配列番号86からなる群から選択される配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。態様の一において、該抗EGFRvIII結合ドメインをコードする核酸配列は、配列番号39、配列番号45、配列番号51、配列番号57、配列番号63、配列番号69、配列番号75、配列番号81および配列番号98からなる群から選択される配列または、それと95～99%の同一性を有する配列を含む。態様の一において、コードされた抗EGFRvIII結合ドメインはscFvであり、本明細書、例えば表2に記載のアミノ酸を含む軽鎖可変領域が、本明細書、例えば表2に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に、リンカー、例えば本明細書に記載のリンカーを介して結合している。態様の一において、コードされた抗EGFRvIII結合ドメインは、(Gly₄-Ser)_nリンカーを含み、ここで、nは1、2、3、4、5または6であり、好ましくは4である（配列番号110）。scFvの軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、例えば：軽鎖可変領域-リンカー-重鎖可変領域または重鎖可変領域-リンカー-軽鎖可変領域のいずれの方向を示していてもよい。

【0019】

他の局面において、本発明は、該核酸分子にコードされる単離ポリペプチド分子に関する。態様の一において、該単離ポリペプチド分子は、配列番号43、配列番号49、配列番号55、配列番号61、配列番号67、配列番号73、配列番号79、配列番号85および配列番号90からなる群から選択される配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。態様の一において、該単離ポリペプチドは、配列番号73の配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。態様の一において、該単離ポリペプチドは、配列番号79の配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。

【0020】

他の局面において、本発明は、抗EGFRvIII結合ドメイン（例えば、EGFRvIIIに特異的に結合するヒト化抗体または抗体断片）、膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメイン（例えば同時刺激ドメインおよび/または一次シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナルドメイン）を含む、単離キメラ抗原受容体（CAR）分子に関する。態様の一において、該CARは、本明細書に記載の抗EGFRvIII結合ドメイン（例えば、本明細書に記載する、EGFRvIIIに特異的に結合するヒト化抗体または抗体断片）、本明細書に記載の膜貫通ドメイン、および本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメイン（例えば、本明細書に記載の同時刺激ドメインおよび/または一次シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメイン）を含む抗体または抗体断片を含む。

【0021】

態様の一において、抗EGFRvIII結合ドメインは、本明細書に記載の抗EGFRvIII結合ドメインの軽鎖相補決定領域1（LC CDR1）、軽鎖相補決定領域2（LC CDR2）および軽鎖相補決定領域3（LC CDR 3）の1つ以上（例えば3つ全て）および、本明細書に記載する抗EGFRvIII結

10

20

30

40

50

合ドメインの重鎖相補決定領域1 (HC CDR1)、重鎖相補決定領域2 (HC CDR2)および重鎖相補決定領域3 (HC CDR3) の1つ以上 (例えば3つ全て) を含み、例えば、1つ以上、例えば3つ全てのLC CDRおよび1つ以上、例えば3つ全てのHC CDRを含むヒト化抗EGFRvIII結合ドメインである。態様のーにおいて、該抗EGFRvIII結合ドメインは、本明細書 (例えば表2または配列番号11) に記載の軽鎖可変領域および/または本明細書 (例えば表2または配列番号11) に記載の重鎖可変領域を含む。態様のーにおいて、該抗EGFRvIII結合ドメインは、表2または配列番号11に記載のアミノ酸配列の軽鎖および重鎖を含むscFvである。態様のーにおいて、抗EGFRvIII結合ドメイン (例えばscFv) は、表2または配列番号11に記載の軽鎖可変領域のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個または3個の変更 (例えば置換) を有するが、30個以下、20個以下または10個以下の変更 (例えば置換) を有するアミノ酸配列または表2または配列番号11に記載の軽鎖可変領域のアミノ酸配列と95~99%の同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域; および/または表2または配列番号11に記載の重鎖可変領域のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個または3個の変更 (例えば置換) を有するが、30個以下、20個以下または10個以下の変更 (例えば置換) を有するアミノ酸配列または表2または配列番号11に記載のアミノ酸配列と95~99%の同一性を有する配列を含む重鎖可変領域を含む。態様のーにおいて、該抗EGFRvIII結合ドメインは、配列番号38、配列番号44、配列番号50、配列番号56、配列番号62、配列番号68、配列番号74、配列番号80、および配列番号86からなる群から選択される配列またはそれと95~99%の同一性を有する配列を含む。態様のーにおいて、該抗EGFRvIII結合ドメインはscFvであり、本明細書に記載の、例えば表2または配列番号11に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域は、本明細書、例えば表2または配列番号11に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に、リンカー、例えば本明細書に記載のリンカーを介して結合している。態様のーにおいて、該抗EGFRvIII結合ドメインは、(Gly₄-Ser)_nリンカーを含み、ここで、nは1、2、3、4、5または6、好ましくは4 (配列番号110) である。scFvの軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、軽鎖可変領域-リンカー-重鎖可変領域または重鎖可変領域-リンカー-軽鎖可変領域、のいずれの方向性を示していてもよい。

【0022】

態様のーにおいて、該単離CAR分子は、T細胞受容体の 鎖、 鎖もしくは 鎖、CD28、CD3、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137およびCD154からなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む。態様のーにおいて、該膜貫通ドメインは、配列番号15の配列を含む。態様のーにおいて、該膜貫通ドメインは、配列番号15のアミノ酸配列に、少なくとも1個、2個または3個の変更 (例えば置換) を有するが、20個以下、10個以下または5個以下の変更 (例えば置換) を有するアミノ酸配列か、または配列番号15のアミノ酸配列と95~99%の同一性を有する配列を含む。

【0023】

態様のーにおいて、該抗EGFRvIII結合ドメインは、ヒンジ領域、例えば本明細書に記載のヒンジ領域によって膜貫通ドメインに連結している。態様のーにおいて、コードされたヒンジ領域は、配列番号14または配列番号104または配列番号106または配列番号108またはそれと95~99%の同一性を示す配列を含む。

【0024】

態様のーにおいて、該単離CAR分子はさらに、同時刺激ドメイン、例えば本明細書に記載の同時刺激ドメインをコードする配列を含む。態様のーにおいて、該同時刺激ドメインは、OX40、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18) および 4-1BB (CD137) からなる群から選択されるタンパク質の機能性シグナル伝達ドメインを含む。態様のーにおいて、該同時刺激ドメインは、配列番号16または配列番号102の配列を含む。態様のーにおいて、該同時刺激ドメインは、配列番号16または配列番号102のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個または3個の変更 (例えば置換) を有するが、20個以下、10個以下または5個以下の変更 (例えば置換) を有するアミノ酸配列または配列番号16または配列番号102のアミノ酸配列と95~99%の同一性を有する配列を含む。態様のーにおいて、単離CAR分子

10

20

30

40

50

は、細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメインをさらに含む。態様のーにおいて、細胞内シグナル伝達ドメインは、4-1BBまたはCD27の機能性シグナル伝達ドメインおよび/またはCD3 の機能性シグナル伝達ドメインを含む。態様のーにおいて、細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号16または配列番号102の配列および/または配列番号17の配列を含む。態様のーにおいて、該細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号16または配列番号102の配列および/または配列番号99の配列を含む。態様のーにおいて、該細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号16または配列番号102のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個または3個の変更（例えば置換）を有するが、20個以下、10個以下または5個以下の変更を有するアミノ酸配列および/または配列番号17または配列番号99のアミノ酸配列を含むか、または配列番号16または配列番号102のアミノ酸配列に95～99%同一性を有する配列および/または配列番号17または配列番号99のアミノ酸配列を含む。態様のーにおいて、該細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号16または配列番号102の配列および配列番号17または配列番号99の配列を含み、ここで該細胞内シグナル伝達ドメインを含む配列は、同一フレーム中で、単一ポリペプチド鎖として発現する。

【0025】

態様のーにおいて、該単離CAR分子は、さらにリーダー配列、例えば本明細書に記載のリーダー配列を含む。態様のーにおいて、該リーダー配列は、配列番号13のアミノ酸配列または配列番号13のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列を含む。

【0026】

他の局面において、本発明は、リーダー配列、例えば本明細書に記載のリーダー配列、例えば配列番号13またはそれと95～99%の同一性を有するリーダー配列、本明細書に記載の抗EGFRvIII結合ドメイン、例えば本明細書に記載の、LC CDR1、LC CDR2、LC CDR3、HC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3を含む抗EGFRvIII結合ドメイン、例えば表2または配列番号11に記載の抗EGFRvIII結合ドメインまたはそれと95～99%の同一性を有する配列、ヒンジ領域、例えば本明細書に記載のヒンジ領域、例えば配列番号14または配列番号104または配列番号106または配列番号108のヒンジ領域、またはそれと95～99%の同一性を有するヒンジ領域、膜貫通ドメイン、例えば本明細書に記載の膜貫通ドメイン、例えば配列番号15の配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を有する膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメイン（例えば同時刺激ドメインおよび/または一次シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメイン）を含む、単離CARに関する。態様のーにおいて、該細胞内シグナル伝達ドメインは、同時刺激ドメイン、例えば本明細書に記載の同時刺激ドメイン、例えば配列番号16の配列を有する4-1BB同時刺激ドメインまたは配列番号102の配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を有するCD27 同時刺激ドメイン、および/または一次シグナル伝達ドメイン、例えば本明細書に記載の一次シグナル伝達ドメイン、例えば配列番号17または配列番号99の配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を有するCD3 刺激ドメインを含む。態様のーにおいて、該細胞内シグナル伝達ドメインは同時刺激ドメイン、例えば本明細書に記載の同時刺激ドメイン、例えば配列番号16の配列を有する4-1BB同時刺激ドメインまたは配列番号102の配列を有するCD27同時刺激ドメイン、および/または一次シグナル伝達ドメイン、例えば本明細書に記載の一次シグナル伝達ドメイン、例えば配列番号17または配列番号99の配列を有するCD3 刺激ドメインを含む。

【0027】

態様のーにおいて、単離CAR分子は、配列番号43、配列番号49、配列番号55、配列番号61、配列番号67、配列番号73、配列番号79、配列番号85または配列番号90のアミノ酸配列、または配列番号43、配列番号49、配列番号55、配列番号61、配列番号67、配列番号73、配列番号79、配列番号85または配列番号90のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、10個、15個、20個または30個の変更（例えば置換）を有するが、60個以下、50個以下または40個以下の変更（例えば置換）を有するアミノ酸配列、または配列番号43、配列番号49、配列番号55、配列番号61、配列番号67、配列番号73、配列番号79、配列番号85もしくは配列番号90のアミノ酸配列と85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の同一

10

20

30

40

50

性を有する配列を含む（例えば、該配列からなる）。態様の一において、単離されたCAR分子は、配列番号1または配列番号2のアミノ酸配列、または配列番号1または配列番号2のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、10個、15個、20個または30個の変更（例えば置換）を有するが、60個以下、50個以下または40個以下の変更（例えば置換）を有するアミノ酸配列、または配列番号1または配列番号2のアミノ酸配列と85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有する配列を含む（例えば、該配列からなる）。態様の一において、単離されたCAR分子は、配列番号73のアミノ酸配列、または配列番号73のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、10個、15個、20個または30個の変更（例えば置換）を有するが、60個以下、50個以下または40個以下の変更（例えば置換）を有するアミノ酸配列もしくは配列番号73のアミノ酸配列と85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有する配列を含む（例えば該配列からなる）。態様の一において、単離されたCAR分子は、配列番号79のアミノ酸配列または配列番号79のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、10個、15個、20個または30個の変更（例えば置換）を有するが、60個以下、50個以下または40個以下の変更（例えば置換）を有するアミノ酸配列または配列番号79のアミノ酸配列と85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む（例えば該配列からなる）。

【0028】

局面の一において、本発明は、本明細書に記載の抗EGFRvIII結合ドメインの軽鎖相補決定領域1（LC CDR1）、軽鎖相補決定領域2（LC CDR2）および軽鎖相補決定領域3（LC CDR3）の1つ以上（例えば3つ全て）ならびに、本明細書に記載の抗EGFRvIII結合ドメインの重鎖相補決定領域1（HC CDR1）、重鎖相補決定領域2（HC CDR2）および重鎖相補決定領域3（HC CDR3）の1つ以上を含む抗EGFRvIII結合ドメイン、例えば1つ以上、例えば3つ全てのLC CDRおよび1つ以上、例えば3つ全てのHC CDRを含むヒト化抗EGFRvIII結合ドメインに関する。態様の一において、該抗EGFRvIII結合ドメインは、本明細書（例えば配列番号38、44、50、56、62、68、74または80）に記載の軽鎖可変領域および/または本明細書（例えば配列番号38、44、50、56、62、68、74または80）に記載の重鎖可変領域を含む。態様の一において、該抗EGFRvIII結合ドメインは、配列番号38、44、50、56、62、68、74または80のアミノ酸配列の軽鎖および重鎖を含むscFvである。態様の一において、該抗EGFRvIII結合ドメイン（例えばscFv）は、配列番号38、44、50、56、62、68、74または80に示す軽鎖可変領域のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個または3個の変更（例えば置換）を有するが、30個以下、20個以下、10個以下の変更（例えば置換）を有するアミノ酸配列または配列番号38、44、50、56、62、68、74または80に示すアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域；および/または配列番号38、44、50、56、62、68、74または80に示す重鎖可変領域のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個または3個の変更（例えば置換）を有するが、30個以下、20個以下、10個以下の変更（例えば置換）を有するアミノ酸配列または配列番号38、44、50、56、62、68、74または80に示すアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列を含む重鎖可変領域を含む。態様の一において、該抗EGFRvIII結合ドメインは、配列番号38、配列番号44、配列番号50、配列番号56、配列番号62、配列番号68、配列番号74、配列番号80および配列番号86からなる群から選択される配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。態様の一において、該抗EGFRvIII結合ドメインはscFvであり、本明細書、例えば表2に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域が本明細書、例えば表2に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に、リンカー、例えば本明細書に記載のリンカーを介して結合している。態様の一において、該抗EGFRvIII結合ドメインは(Gly₄-Ser)_nリンカーを含み、ここで、nは1、2、3、4、5または6であり、好ましくは4（配列番号110）である。scFvの軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、例えば、次のいずれかの方向性であってよい：軽鎖可変領域-リンカー-重鎖可変領域または、重鎖可変領域-リンカー-軽鎖可変領域。

【0029】

他の局面において、本発明は、本明細書に記載の核酸分子、例えば本明細書に記載のCARをコードする核酸分子を含むベクターに関する。態様の一において、該ベクターは、DNA

10

20

30

40

50

、RNA、プラスミド、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクターまたはレトロウイルスベクターからなる群から選択される。

【0030】

態様の一において、該ベクターはレンチウイルスベクターである。態様の一において、該ベクターはさらにプロモーターを含む。態様の一において、該プロモーターはEF-1プロモーターである。態様の一において、該EF-1プロモーターは、配列番号97の配列を含む。

【0031】

態様の一において、該ベクターは、試験管内で転写されるベクター、例えば本明細書に記載の核酸分子のRNAを転写するベクターである。態様の一において、該ベクター中の核酸配列は、ポリ(A)テール、例えば本明細書に記載のポリAテール、例えば約150のアデノシン塩基(配列番号111)をさらに含む。態様の一において、該ベクター中の核酸配列はさらに、3' UTR、例えば本明細書に記載の3' UTR、例えば少なくとも1リピートのヒトγグロブリン由来の3' UTRをさらに含む。

10

【0032】

他の局面において、本発明は、本明細書に記載のベクターを含む細胞に関する。態様の一において、該細胞は、本明細書に記載の細胞、例えばヒトT細胞、例えば本明細書に記載のヒトT細胞である。態様の一において、該ヒトT細胞はCD8+ T細胞である。

【0033】

他の局面において、本発明は、細胞の作製方法であって、本明細書に記載の細胞、例えば本明細書に記載のT細胞を、CAR、例えば本明細書に記載のCARをコードする核酸を含むベクターを用いて形質導入することを含む方法に関する。

20

【0034】

本発明はまた、RNA-操作した細胞、例えば本明細書に記載の細胞、例えば外来RNAを一過的に発現するT細胞を作製する方法を提供する。該方法は、試験管内で転写されたRNAまたは合成RNAを細胞に導入することを含み、ここで、該RNAは、本明細書に記載のCAR分子をコードする核酸を含む。

【0035】

他の局面において、本発明は、哺乳動物における抗腫瘍免疫を提供する方法であって、該哺乳動物に、CAR分子を発現する細胞、例えば、本明細書に記載の、CAR分子を発現する細胞を有効量投与することを含む方法を提供する。態様の一において、該細胞は、自家T細胞である。態様の一において、該細胞は、同種異系T細胞である。態様の一において、該哺乳動物はヒトである。

30

【0036】

他の局面において、本発明は、EGFRvIIIの発現に関連する疾患(例えば、増殖性疾患、前がん状態およびEGFRvIIIの発現に関連するがんに関連しない適応症)に罹患する哺乳動物の処置方法であって、該哺乳動物に、CAR分子、例えば本明細書に記載のCAR分子を発現する細胞を有効量投与することを含む、方法に関する。

【0037】

態様の一において、疾患は、本明細書に記載の疾患である。態様の一において、EGFRvIIIに関連する疾患は神経膠芽腫である。態様の一において、EGFRvIIIに関連する疾患は、がん、例えば、多形神経膠芽腫(GBM)、未分化星状細胞腫、巨細胞神経膠芽腫、膠肉腫、未分化乏突起神経膠腫、未分化上衣腫、脈絡叢がん、未分化神経節膠腫、松果体芽腫、髄上皮腫、上衣芽腫、髄芽腫、テント上原始神経外胚葉性腫瘍、AT/RT(非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍)、肺がん(例えば非小細胞肺がん)、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、結腸直腸がんおよび膀胱がんおよびその任意の組合せからなる群ならびに該がんの任意の転移から選択されるがんである。

40

【0038】

態様の一において、CAR分子、例えば本明細書に記載のCAR分子を発現する細胞を、CAR分子を発現する細胞の有効性を上昇させる薬剤、例えば本明細書に記載の薬剤と組み合わせて投与する。

50

【0039】

態様の一において、CAR分子、例えば本明細書に記載のCAR分子を発現する細胞は、CAR分子、例えば本明細書に記載のCAR分子を発現する細胞を発現する細胞の投与に関連する1つ以上の副作用を改善させる薬剤と組み合わせて投与する。

【0040】

態様の一において、CAR分子、例えば本明細書に記載のCAR分子を発現する細胞を、EGFRvIIIに関連する疾患を処置する薬剤、例えば本明細書に記載の薬剤と組み合わせて投与する。

【0041】

態様の一において、CAR分子、例えば本明細書に記載のCAR分子を発現する細胞は、本明細書に記載の投与量および/または計画で投与する。

10

【0042】

態様の一において、CAR分子、例えば本明細書に記載のCAR分子を発現する細胞を、疾患、例えばがん、例えば本明細書に記載のがんの第一選択処置として投与する。他の態様において、CAR分子、例えば本明細書に記載のCAR分子を発現する細胞は、疾患、例えばがん、例えば本明細書に記載のがんの、処置の第二、第三、第四の選択肢として投与される。

【0043】

他の局面において、本発明は、医薬、例えば本明細書に記載するような医薬として用いるための、本発明のCARをコードする単離核酸分子、本発明のCARの単離ポリペプチド分子、本発明のCARを含むベクターおよび本発明のCARを含む細胞に関する。

20

【0044】

他の局面において、本発明は、EGFRvIIIを発現する疾患、例えば本明細書に記載のEGFRvIIIを発現する疾患の処置に用いるための、本発明のCARをコードする該単離核酸分子、本発明のCARの単離ポリペプチド分子、本発明のCARを含むベクターおよび本発明のCARを含む細胞に関する。

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図1】図1Aおよび1Bは、3C10-CARおよびmiR-17-92のレンチウイルスベクターの模式図である。図1Aは、3C10-CARの発現ベクターであるpELNS-3C10-CARを表し；図1Bは、miR-17-92発現レンチウイルスベクターを表す。

30

【図2】図2A～2Cは、ヒトT細胞にレンチウイルスによって導入した3C10-CARおよびmiR-17-92の機能性の発現を示す一連の図である。pELNS-3C10-CAR単独または、pELNS-3C10-CARおよびFG12-EF1a-miR-17/92の両方を導入したCD3+ T細胞を用いた；

【図3】図3A～3Dは、CAR-T細胞におけるmiR17-92の共発現が、TGF- α およびTMZの抑制効果に対する耐性をもたらすものであることを示す図である。CAR-T細胞（中抜き棒グラフ）およびmiR-17-92を共導入したCAR-T細胞（黒色棒グラフ）を、記載の濃度のTGF- α およびTMZの存在下で、EGFRvIIIを発現するAPCとともに培養した。

【図4】図4Aおよび4Bは、U87-EGFRvIII腫瘍を有するマウスにおけるCAR-T細胞の強い治療効果を示す図である。

【図5】図5A～5Cは、CAR-T細胞に共形質導入したmiR-17-92が再負荷した神経膠腫細胞に対する保護を改善させることを示す一連の図である。

40

【0046】

【図6】図6は、代表的なEGFRvIII CARの比較を示す図である（それぞれ順番に配列番号1、121および122）；

【図7】図7は、EGFRvIII CARを導入したヒトT細胞がEGFRvIII発現U87ヒトGBM細胞(U87-EGFRvIII)を特異的かつ強力に溶解したことを示す。

【図8】図8は、全ての抗EGFRvIII CARTが腫瘍細胞を排除するが、コンストラクト3C10.Bz CARTが7日目までに最も急速に腫瘍を除去することを示すグラフである。

【図9】図9は、ヒト化EGFRvIIIのVHおよびVL配列を示す表である（それぞれ順番に配列番号122～127）。

50

【図 1 0】図10は、EGFRvIII+細胞株に結合する可溶性ヒト化scFVコンストラクトの試験管内結合を示すグラフである。

【 0 0 4 7 】

【図 1 1】図11は、EGFR野生型細胞株に結合する可溶性ヒト化scFvコンストラクトの試験管内での結合を示し、クローン73 (CAR6とも称される) およびクローン74 (CAR7とも称される)がより安全なプロファイルを示すことを示すグラフである；

【図 1 2】図12は、Jurkat細胞の一過性遺伝子導入におけるマウスCAR9およびヒトCAR10のEGFRvIIIおよび野生型EGFRへの特異性の比較、およびFc融合タンパク質を用いた検出を示すグラフである。

【図 1 3】図13は、飽和量のEGFRvIIIを染色した、ヒト化EGFRvIII CARコンストラクトmCAR19 (対照)、CAR10、CAR9およびCAR6によるドナーT細胞の原発性T細胞形質導入を示すグラフである。

【図 1 4】図14は、ヒト化EGFRvIII CARコンストラクトがBHK-EGFRvIIIによってルシフェラーゼ活性を示すが野生型の細胞では示さないことを示すグラフである。

【図 1 5】図15は、U87vIII負荷に対して、ヒト化EGFRvIII CARコンストラクトは増殖を示し、野生型EGFRに対するバックグラウンドの増殖は見られないことを示すグラフである。

【図 1 6】図16は、ヒト化EGFRvIII CARコンストラクトが試験管内で、U87vIII負荷の存在下で増殖することを示すグラフである。

【図 1 7】図17は、ヒト化EGFRvIII CARコンストラクト、2173 (CAR6)およびCAR9がEGFRvIII発現細胞を特異的に殺すが、野生型EGFR発現細胞は殺さないことを示す、4時間にわたる51-クロム放出腫瘍死滅アッセイの結果を表すグラフである。

【図 1 8】図18は、腫瘍サイズの増大 (cm³、左上) および腫瘍発光の平均値の進行 (p/s/cm²/sr、右上)ならびにヒト化EGFRvIII CARコンストラクト(CAR6)で形質転換したCAR+ T細胞で処置したマウスにおける生体のカプラン・マイヤー生存曲線 (下図) を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 4 8 】

定義

とくにことわらない限り、本明細書で用いる全ての技術的用語は、本発明が属する分野の当業者が通常理解するのと同じ意味を有する。

【 0 0 4 9 】

単数表現は、該物質が文法的に1つ以上 (すなわち、少なくとも1つ) であることを指す。例えば、「要素 (単数表現)」という表現は、1つの要素または1より多くの要素を指す。

【 0 0 5 0 】

測定可能な値、例えば、量および持続時間等についての言及における「約」という語は、特定の値の、±20%、場合によっては±10%または場合によっては±5%または場合によっては±1%または場合によっては±0.1%の変動を、記載の方法を行うのに適当であるように含むことを意味する。

【 0 0 5 1 】

「キメラ抗原受容体」あるいは「CAR」という語は、少なくとも、細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび、以下に記載する刺激分子由来の機能性シグナル伝達ドメインを含む細胞質シグナル伝達ドメイン (「細胞内シグナルドメイン」とも称する) を含む、組換えポリペプチドコンストラクトを指す。局面の一において、該刺激分子は、T細胞受容体複合体に結合する 鎖である。局面の一において、細胞質シグナル伝達ドメインはさらに、後述する少なくとも1つの同時刺激分子由来の機能性シグナル伝達ドメインを1つ以上含む。局面の一において、同時刺激分子は、4-1BB (すなわちCD137) および/またはCD28から選択される。局面の一において、CARは、細胞外抗原認識ドメイン、膜貫通ドメインおよび刺激分子由来の機能性シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメイ

10

20

30

40

50

ンを含むキメラ融合タンパク質を含む。局面の一において、該CARは、細胞外抗原認識ドメイン、膜貫通ドメインならびに、同時刺激分子由来の機能性シグナル伝達ドメインおよび刺激分子由来の機能性シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含むキメラ融合タンパク質を含む。局面の一において、CARは、細胞外抗原認識ドメイン、膜貫通ドメイン、ならびに1つ以上の同時刺激分子に由来する2つの機能性シグナル伝達ドメインおよび刺激分子由来の機能性シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含むキメラ融合タンパク質を含む。局面の一において、CARは、細胞外抗原認識ドメイン、膜貫通ドメイン、ならびに1つ以上の同時刺激ドメイン由来の少なくとも2つの機能性シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインおよび刺激分子由来の機能性シグナル伝達ドメインを含むキメラ融合タンパク質を含む。局面の一において、CARは、CAR融合タンパク質のアミノ末端(N-末端)に付加的なリーダー配列を含む。局面の一において、CARはさらに、細胞外抗原認識ドメインのN-末端にリーダー配列を含み、ここで、該リーダー配列は、細胞プロセッシングおよびCARの細胞膜への局在化の間に該抗原認識ドメイン(例えばscFV)から切断されていてもよい。

【0052】

「シグナル伝達ドメイン」という語は、二次メッセンジャーを産生するか、または該メッセンジャーに応答してエフェクターとして機能することによって、細胞内で細胞活性を調節する情報を伝達することにより作用する、タンパク質の機能性部分を指す。

【0053】

「EGFR」という語は、任意の哺乳動物、例えばヒト型および非ヒト型の、成熟全長上皮成長因子受容体を指す。1186アミノ酸長のヒトEGFRは、Ullrich et al., Nature 309:418-425 (1984))ならびにGenBank Accession No. AF125253およびSwissProt Acc No P00533-2に記載されている。

【0054】

「EGFRvIII」という語は、上皮成長因子受容体のバリエーションIIIを指す。EGFRvIIIは、ヒトの腫瘍で最も一般的に観察されるEGFRのバリエーションであるが、正常な組織では滅多に見られない。このタンパク質は、EGFRの細胞外ドメイン中のエキソン2~7がインフレーム欠失し、さらに、エキソン1と8の連結部に新規のグリシン残基が生成したことによるものであり、これにより、腫瘍特異的なエピトープが生じる。EGFRvIIIは、GBMの24%~67%において発現するが、正常な組織には発現しない。EGFRvIIIはまた、タイプIII変異体、デルタEGFR、EGFRde2-7およびEGFRとも称され、米国特許第6,455,498号、第6,127,126号、第5,981,725号、第5,814,317号、第5,710,010号、第5,401,828号および第5,212,290号明細書に記載されている。EGFRvIIIの発現は、クロモソーム欠損によって生じる場合もあり、また、異常な代替スプライシングによって生じる場合もある。Sugawa et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. 87:8602-8606を参照のこと。

【0055】

本明細書において、「抗体」という語は、抗原に特異的に結合する免疫グロブリン分子由来のタンパク質またはポリペプチド配列を指す。抗体はポリクローナルであってもまたはモノクローナルであってもよく、複数鎖であっても一本鎖であってもよく、またはインタクトな免疫グロブリンであってもよく、さらに、天然由来であってもまたは組換え由来であってもよい。抗体は、四量体免疫グロブリン分子であってもよい。

【0056】

「抗体断片」という語は、インタクトな抗体の少なくとも1つの部分、またはその組換えバリエーションを指し、抗体断片の認識および標的、例えば抗原への特異的な結合をもたらすのに十分な、抗原結合ドメイン、例えばインタクトな抗体の抗原決定可変領域を指す。抗体断片の例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂およびFv断片、scFv抗体断片、直鎖抗体、単ドメイン抗体、例えばsdAb (VLまたはVH)、ラクダVHHドメインおよび、抗体断片から形成された多特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されるものではない。「scFv」という語は、軽鎖の可変領域を含む少なくとも1つの抗体断片および重鎖の可変領域を含む抗体断片を少なくとも1つ含む融合タンパク質を指し、ここで、該軽鎖および重鎖可変領

10

20

30

40

50

域は、短い、柔軟性のあるポリペプチドリンカーを介して近接して連結しており、一本鎖のポリペプチドとして発現でき、該scFvは、それが由来するインタクトな抗体の特異性を維持している。特にことわらない限り、本明細書中では、scFvは、VLおよびVH可変領域を任意の順序で、例えば、該ポリペプチドのN-末端およびC-末端について任意の順序で有していてもよく、scFvはVL-リンカー-VHまたはVH-リンカー-VLを含んでいてもよい。

【0057】

抗体または抗体断片を含む、本発明のCAR組成物の一部は、抗原結合ドメインが、近接ポリペプチド鎖の一部として発現する、種々の形態、例えば単一ドメイン抗体断片(sdAb)、一本鎖抗体(scFv)およびヒト化抗体の形態で存在していてもよい(Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426)。局面の一において、本発明のCAR組成物の抗原結合ドメインは、抗体断片を含む。さらなる局面において、CARは、scFvを含む抗体断片を含む。

10

【0058】

「抗体重鎖」という語は、天然起源の立体配置の抗体分子中に存在する2種類のポリペプチド鎖の大きい方のポリペプチド鎖であって、通常、該抗体が属するクラスを決定する鎖を指す。

【0059】

「抗体軽鎖」という語は、天然起源の立体配置の抗体分子中に存在する2種のポリペプチド鎖の小さい方の鎖をさす。カッパ()およびラムダ()軽鎖は、2種の主要な抗体軽鎖のアイソタイプを指す。

20

【0060】

「組換え抗体」という語は、組換えDNA技術を用いて産生した抗体、例えばバクテリオファージまたは酵母発現システムによって発現される抗体を指す。該用語は、抗体をコードし、抗体タンパク質または該抗体を特定するアミノ酸配列を発現するDNA分子を合成することにより産生される抗体であって、ここで、該DNAまたはアミノ酸配列が、当該分野で利用可能なよく知られているDNAまたはアミノ酸配列組換え技術を用いて得られたものである、抗体を指す。

30

【0061】

本明細書中で用いる「抗原」または「Ag」という語は、免疫応答を引き起こす分子と定義する。この免疫応答は、抗体産生または特異的な免疫適格細胞の活性化またはその両方を伴うことがある。任意の巨大分子、例えば実質的に全てのタンパク質またはペプチドは、抗原として作用し得ることは当業者には理解できることである。さらに、抗原は、組換えまたはゲノムDNA由来であってもよい。したがって、当業者は、免疫応答を誘発するタンパク質をコードするヌクレオチド配列またはヌクレオチド配列の一部を含む任意のDNAは、「抗原」をコードしていることは、当業者には理解できることである。さらに、抗原は、1遺伝子の全長のヌクレオチド配列によってのみコードされる必要があるわけではないことも当業者が理解することである。本発明は、2以上の遺伝子の部分的なヌクレオチド配列の使用を含むが、これに限定されないこと、ならびに、これらのヌクレオチド配列が、所望の免疫応答を誘発するポリペプチドをコードするように種々の組み合わせで並べられることは、容易に理解できることである。さらに、当業者は、抗原が「遺伝子」によってコードされている必要は全くないことも理解するであろう。抗原は、合成により産生されていても、または生物学的試料由来であっても、またはポリペプチド以外の巨大分子であってもよいことは明らかなことである。該生物学的試料としては、組織試料、腫瘍試料、細胞または他の生物学的成分を含む液体であってもよいが、これらに限定されるものではない。

40

【0062】

「抗腫瘍効果」という語は、種々の方法によって顕在化し得る生物学的効果を指し、そ

50

の例としては、腫瘍体積の減少、腫瘍細胞の減少、転移数の減少、平均余命の延長、腫瘍細胞増殖の低下、腫瘍細胞生存の低下またはがんの症状に関連する種々の生理学的症状の改善が挙げられるがこれらに限定されるものではない。「抗腫瘍効果」は、本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、細胞および抗体が、最初に腫瘍の出現を予防し得ることにより表され得る。

【0063】

「自家」という語は、同一個体由来であり、後に該個体に再導入される任意の物質を指す。

【0064】

「同種異系」という語は、物質を導入する個体と同じ種の異なる個体由来の任意の物質を指す。遺伝子が1個以上の部位で同一でない場合、2以上の個体は、互いに同種異系であるといわれる。局面によっては、同一種の個体由来の同種異系物質が、抗原性に相互作用する程に遺伝的に異なっている場合もある。

【0065】

「異種間」という語は、異なる種由来の移植物を指す。

【0066】

「がん」という語は、異常な細胞の急速かつ制御できない増殖により特徴付けられる疾患を指す。がん細胞は、局所的にまたは血流およびリンパ系を介して体の他の部分に広がることできる。種々のがんの例、例えば神経膠芽腫、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、子宮頸がん、皮膚がん、膵臓がん、結腸直腸がん、腎臓がん、肝臓がん、脳のがん、リンパ腫、白血病および肺がん等を本明細書中に記載するが、これらに限定されるものではない。

【0067】

本明細書に記載の「EGFRvIII発現に関連する疾患」としては、EGFRvIIIの発現に関連する疾患またはEGFRvIIIを発現する細胞、例えば種々のがん、例えば神経膠芽腫（神経膠芽腫幹細胞を含む）；乳がん、卵巣がんおよび非小細胞肺がん；頭頸部扁平上皮がん；髄芽腫、結腸直腸がん、前立腺がんおよび膀胱がんの腫瘍細胞に関連する症状が挙げられるが、これらに限定されるものではない。特定の理論または機構に左右されるものではないが、EGFRvIIIに対する抗原特異的な応答を誘発することによって、本明細書に記載のCARはEGFRvIII-発現腫瘍細胞の標的化および破壊、腫瘍の減少または除去、免疫細胞の腫瘍部位への浸透の促進、および抗腫瘍応答の促進/拡張のうちの1つ以上をもたらすと考えられている。EGFRvIIIは、正常な（すなわち非がん性）組織では、検出できるレベルで発現しないため、本発明のCARは有利なことに、正常組織および細胞の標的化/破壊を実質的に避けることができると考えられている。

【0068】

「保存的配列変更」という語は、該アミノ酸配列を含む抗体または抗体断片の結合特性に有意に影響を与えないまたは変動させない、アミノ酸変更を指すことを意図する。かかる保存的変更としては、アミノ酸置換、付加および欠失が挙げられる。変更は、当該分野で公知の標準的な技術、例えば部位特異的変異誘発およびPCR介在変異誘発により抗体または抗体断片に導入し得る。保存されたアミノ酸置換は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基に置換されるものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基ファミリーは当該分野で定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖（例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、無電荷極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、分枝側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸を含む。したがって、本発明のCAR中の1つ以上のアミノ酸残基は、同一側鎖ファミリーの他のアミノ酸残基で置換されていてよく、該変異CARを、本明細書に記載の機能アッセイを用いて試験してよい。

【0069】

「刺激」という語は、刺激分子（例えばTCR/CD3複合体）とその同族リガンドの結合により誘発され、それによりシグナル伝達イベントが介在される最初の応答を指し、例としては、TCR/CD3 複合体を介したシグナル伝達が挙げられるが、これらに限定されるものではない。刺激は、特定の分子の発現の変化、例えばTGF- β の下方制御および/または細胞骨格構造の再構成などを媒介し得る。

【0070】

「刺激分子」という語は、T細胞シグナル伝達経路の少なくともいくつかの局面において、刺激におけるTCR複合体の最初の活性化を制御する最初の一連の細胞質シグナル伝達をもたらすT細胞により発現される分子を指す。局面の一において、最初のシグナル伝達は、例えば、TCR/CD3複合体と、ペプチドを負荷したMHC分子の結合により開始し、これは、T細胞応答、例えば、非限定的な例としては、増殖、活性化および分化等の媒介をもたらす。刺激作用を示す、最初の細胞質シグナル伝達配列（「一次シグナル伝達ドメイン」とも称する）は、免疫受容活性化チロシンモチーフすなわちITAMとして知られるシグナル伝達モチーフを含んでいてよい。本発明で特に用いるITAMを含む一次細胞質シグナル伝達配列の例としては、TCR 、FcR 、FcR 、CD3 、CD3 、CD3 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278（「ICOS」としても知られる）およびCD66d由来のものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。本発明の特定のCARにおいて、本発明の1つ以上のCAR中の細胞内シグナル伝達ドメインは、細胞内シグナル伝達配列、例えばCD3 の一次シグナル伝達配列を含む。本発明の特定のCARにおいて、CD3 の一次シグナル伝達配列は、配列番号17に表される配列または、非ヒト種、例えばマウス、齧歯類、サルおよび類人猿等由来の相当する残基である。本発明の特定のCARにおいて、CD3 の一次シグナル伝達配列は、配列番号99として表される配列または非ヒト種、例えばマウス、齧歯類、サルおよび類人猿等由来の相当する残基である。

【0071】

「抗原提示細胞」または「APC」という語は、主要組織適合複合体(MHC)と複合体を形成した外来の抗原をその表面に提示する免疫系細胞、例えば補助細胞（例えば、B細胞および樹状細胞等）を指す。T細胞は、T細胞受容体(TCR)を用いてこれらの複合体を認識し得る。APCは抗原をプロセッシングし、T細胞に提示する。

【0072】

本明細書において、「細胞内シグナル伝達ドメイン」という語は、分子の細胞内部分を指す。該細胞内シグナル伝達ドメインは、CAR含有細胞、例えばCART細胞の免疫エフェクター機能を促進するシグナルを生成する。例えばCART細胞における免疫エフェクター機能の例としては、細胞溶解活性およびヘルパー活性、例えばサイトカインの分泌が挙げられる。

【0073】

態様の一において、該細胞内シグナル伝達ドメインは、一次細胞内シグナル伝達ドメインを含んでいてよい。一次細胞内シグナル伝達ドメインの例としては、一次刺激、または抗原依存性刺激に重要な分子由来のものが挙げられる。態様の一において、該細胞内シグナル伝達ドメインは、同時刺激細胞内ドメインを含んでいてよい。同時刺激細胞内シグナル伝達ドメインの例としては、同時刺激シグナルまたは抗原依存性刺激に重要な分子由来のものが挙げられる。例えば、CARTの場合には、一次細胞内シグナル伝達ドメインは、T細胞受容体の細胞質配列を含んでいてよく、同時刺激細胞内シグナル伝達ドメインは、共受容体または同時刺激分子由来の細胞質性配列を含んでいてよい。

【0074】

一次細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫受容活性化チロシンモチーフまたはITAMとして知られるシグナルモチーフを含んでいてよい。ITAM含有一次細胞質シグナル配列の例としては、CD3 、FcR 、FcR 、CD3 、CD3 、CD3 、CD5、CD22、CD79a、CD79bならびにCD66d DAP10およびDAP12由来のものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0075】

「 」または「鎖」、「CD3- 」または「TCR- 」という語は、GenBank Acc. No. B AG36664.1として表されるタンパク質または非ヒト種、例えばマウス、齧歯類、サルおよび類人猿等由来の相当する残基として定義され、「刺激ドメイン」あるいは「CD3- 刺激ドメイン」または「TCR- 刺激ドメイン」はT細胞活性化に必要な最初のシグナルを機能的に伝達するのに十分な、鎖の細胞質ドメイン由来のアミノ酸残基と定義される。局面の一において、細胞質ドメインは、GenBank Acc. No. BAG36664.1の第52～164番目の残基または、その機能的オルソログである、非ヒト種、例えばマウス、齧歯類、サルおよび類人猿等由来の相当する残基を含む。局面の一において、「刺激ドメイン」または「CD3 刺激ドメイン」は、配列番号17として示される配列である。局面の一において、「刺激ドメイン」または「CD3- 刺激ドメイン」は配列番号99として示される配列である。

10

【0076】

「同時刺激分子」という語は、同時刺激リガンドとともに特異的に結合し、それによって、T細胞による同時刺激応答、例えば非限定的な例としては増殖を媒介する、T細胞上の同族結合パートナーを指す。同時刺激分子は、効率的な免疫応答に必要な、抗原受容体またはそのリガンド以外の細胞表面分子である。同時刺激分子としては、例えば、MHC クラスI分子、BTLAおよびToIIリガンド受容体ならびにOX40、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)および4-1BB (CD137)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

20

【0077】

同時刺激細胞内シグナル伝達ドメインは、同時刺激分子の細胞内部分由来であってよい。同時刺激分子は、次のタンパク質ファミリー：TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、SLAM (signaling lymphocytic activation molecules)タンパク質および活性化NK細胞受容体であってよい。該分子の例としては、CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、GITR、CD30、CD40、ICOS、BAFFR、HVEM、リンパ球機能関連抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、SLAMF7、Nkp80、CD160、B7-H3および、CD83に特異的に結合するリガンド等が挙げられる。

【0078】

該細胞内シグナル伝達ドメインは、それが由来する細胞内部分全体、または天然の細胞内シグナル伝達ドメイン全体またはその機能性断片を含んでいてよい。

30

【0079】

「4-1BB」という語は、GenBank Acc. No. AAA62478.2として提供されるアミノ酸配列または非ヒト種、例えばマウス、齧歯類、サルおよび類人猿由来の相当の残基を有するTNFRスーパーファミリーのメンバーを指し；「4-1BB同時刺激ドメイン」は、GenBank Acc. No. AAA62478.2の第214～第255番のアミノ酸残基または非ヒト種、例えばマウス、齧歯類、サルおよび類人猿等由来の相当する残基を指す。局面の一において、「4-1BB同時刺激ドメイン」は、配列番号16として表される配列または非ヒト種、例えばマウス、齧歯類、サルおよび類人猿等由来の相当する残基を指す。

【0080】

「コードする」という語は、ポリヌクレオチド、例えば遺伝子、cDNAまたはmRNA中のヌクレオチドの特定の配列の、生物学的プロセスにおいて、特定のヌクレオチド配列（例えばrRNA、tRNAおよびmRNA）か、または特定のアミノ酸配列を有する他のポリマーおよび巨大分子の合成のテンプレートとして作用する固有の性質およびそこから生じる生物学的な性質を指す。したがって、遺伝子、cDNAまたはRNAは、該遺伝子に相当するmRNAの転写および翻訳が、細胞または他の生物学系でタンパク質を産生する場合、該タンパク質を「コード」している。mRNA配列と同一のヌクレオチド配列であり、配列表に通常記載される、コーディング鎖および、遺伝子またはcDNAの転写のテンプレートとして用いられる非コーディング鎖は、ともに、タンパク質または該遺伝子もしくはcDNAの他の産物をコードしているとしてよい。

40

50

【0081】

特にことわらない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」は、互いに縮重しており、同じアミノ酸配列をコードする全てのヌクレオチド配列を含む。タンパク質をコードするヌクレオチド配列、またはRNAは、該タンパク質をコードするヌクレオチド配列がいくつかのバージョンにおいて含んでいてよい程度にイントロンを含んでいてよい。

【0082】

「有効量」または「治療上有効量」という語は、本明細書中で互換可能に用いられ、本明細書に記載の特定の生物学的な結果を達成するのに有効な、化合物、製剤、物質または組成物の量を指す。

10

【0083】

「内在性」という語は、生物体、細胞、組織またはシステム由来であるか、またはその中で産生される任意の物質を指す。

【0084】

「外来性」という語は、生物体、細胞、組織またはシステムに導入されたか、またはその外で産生される任意の物質を指す。

【0085】

「発現」という語は、特定のヌクレオチド配列の、プロモーターによる転写および/または翻訳を指す。

【0086】

20

「導入ベクター」という語は、単離核酸を含み、該単離核酸を細胞の内部に送達するのに用い得る物質の組成物を指す。当該分野では多数のベクターが公知であり、例えば、直鎖ポリヌクレオチド、イオン性または両親媒性化合物と共役したポリヌクレオチド、プラスミドおよびウイルスが挙げられるが、これらに限定されるものではない。したがって、「導入ベクター」という語は、自己複製プラスミドまたはウイルスを含む。概用語はまた、核酸の細胞内への導入を促進する非プラスミドおよび非ウイルス化合物、例えばポリリジン化合物およびリポソーム等をさらに含むと解釈される。ウイルス導入ベクターの例としては、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクター等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0087】

30

「発現ベクター」という語は、発現するヌクレオチド配列に作動可能に連結した発現制御配列を含む組換えポリヌクレオチドを含むベクターを指す。発現ベクターは、発現に十分なシスエレメントを含み；発現用の他のエレメントは、ホスト細胞または試験管内発現システム中で供給してよい。発現ベクターは、当該分野で公知の全ての発現ベクター、例えば組換えポリペプチドを組み入れる、コスミド、プラスミド（例えば、プラスミド単独またはリポソームに含まれたプラスミド）およびウイルス（例えばレンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）を含む。

【0088】

「レンチウイルス」という語は、レトロウイルス科の1つの属を指す。レンチウイルスは、非分裂細胞に感染することができるという点でレトロウイルスの中で特有であり；ホスト細胞のDNAに有意な量の遺伝情報を送達することができ、そのため、遺伝子送達ベクターの中で最も効率的な方法の1つである。HIV、SIVおよびFIVは全て、レンチウイルスの例である。

40

【0089】

「レンチウイルスベクター」という語は、レンチウイルスゲノムの少なくとも一部に由来するベクターを指し、例としては、特に、Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009)に記載のSIN (self-inactivating) レンチウイルスベクターが挙げられる。臨床で用い得るレンチウイルスベクターの他の例としては、例えば、LENTIVECTOR（登録商標）gene delivery technology (Oxford BioMedica)およびLENTIMAX™ vector system (Lentigen)等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。非臨床タイプのレンチウ

50

イルスペクターもまた利用可能であり、これらは当業者には知られている。

【0090】

本明細書で用いる「相同」または「同一」という語は、2つのポリマー分子、例えば2つの核酸分子、例えば2つのDA分子または2つのRNA分子または2つのポリペプチド分子間のサブユニット配列同一性を指す。2つの分子の間のサブユニット部位が同じ単量体サブユニットで占められている、例えば2つのDNA分子のそれぞれの特定部位がアデニンで占められている場合、それらはその位置において相同または同一である。2つの配列間の相同性は、マッチするまたは相同な位置の数の直接的な指標であり；例えば、2つの配列の半分の位置（例えば10のサブユニットの長さのポリマー中の5つの位置）が相同である場合、この2つの配列は50%相同であり；90%の位置（例えば、10個のうちの9個）がマッチしているかまたは相同である場合、この2つの配列は90%相同である。

10

【0091】

非ヒト（例えばマウス）抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小配列を含むキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはその断片（例えばFv、Fab、Fab'、F(ab')₂または抗体の他の抗原結合配列）である。殆どの場合、ヒト化抗体およびその断片は、レシピエントの相補決定領域(CDR)由来の残基が、所望の特異性、親和性および容量を有する、非ヒト種（ドナー抗体）、例えばマウス、ラットまたはウサギのCDR由来の残基で置換されているヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体または抗体断片）である。いくつかの場合において、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域(FR)の残基が、相当する非ヒト種の残基により置換されている。さらに、ヒト化抗体/抗体断片は、レシピエント抗体にも移入したCDRもしくはフレームワーク配列のいずれにも見られない残基を含んでいてよい。これらの変更はさらに、抗体または抗体断片の性能を改良および最適化し得る。一般的に、ヒト化抗体またはその抗体断片は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変領域を実質的に全て含み、ここで、全てまたは実質的に全てのCDR領域は、非ヒト免疫グロブリンのそれに相当し、FR領域の全てまたは相当の部分は、ヒト免疫グロブリン配列のそれである。該ヒト化抗体または抗体断片はまた、免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含んでいてよい。さらなる詳細については、Jones et al., Nature, 321: 522-525, 1986; Reichmann et al., Nature, 332: 323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596, 1992を参照のこと。

20

30

【0092】

「ヒト」抗体という語は、完全ヒト抗体ならびに有効ヒト抗体を指す。「完全ヒト」抗体という語は、分子全体がヒト起源であるか、ヒト形態の抗体または免疫グロブリンと同一のアミノ酸配列からなる、免疫グロブリン、例えば抗体または抗体断片を指す。「有効ヒト」抗体は、抗体が正常なヒトにおいて免疫原性応答を引き起こさない程度に十分な数のヒトアミノ酸部位を含む抗体である。

【0093】

「単離された」という語は、天然の状態から変化したかまたは除かれたことを指す。例えば、生体内に天然に存在する核酸またはペプチドは「単離された」ものではないが、天然の状態で共存する物質から部分的または完全に分離された該核酸またはペプチドは、「単離された」ものである。単離された核酸またはタンパク質は、実質的に精製された形態で存在しても、または非天然環境下、例えば宿主細胞中に存在してもよい。

40

【0094】

本発明において、共通する核酸塩基について次の略語を用いる。「A」はアデノシン、「C」はシトシン、「G」はグアノシン、「T」はチミジン、および「U」はウリジンを指す。

【0095】

「作動可能に連結」または「転写制御」という語は、調節配列および異種性の核酸配列との機能性連結であって、後者の配列の発現を引き起こす連結を指す。例えば、第一核酸配列が第二核酸配列と機能的な関係にある配置である場合、該第一核酸配列は第二核酸配

50

列と作動可能に連結している。例えば、プロモーターが、コード配列の転写または発現に影響を及ぼす場合、該プロモーターは該コード配列に作動可能に連結している。作動可能に連結したDNA配列は、互いに近接していてもよく、例えば2つのタンパク質コード領域が結合する必要がある場合には、同一のリーディングフレーム内にある。

【0096】

免疫原性組成物の「非経腸」投与という語は、例えば、皮下(s.c.)、静脈内(i.v.)、筋肉内(i.m.)または胸骨内注射、腫瘍内投与または点滴技術を指す。

【0097】

「核酸」または「ポリヌクレオチド」という語は、デオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)およびその一本鎖または二本鎖形態のポリマーを指す。とくに限定しない限り、該用語は、参照の核酸配列と同様の結合性を有し、天然起源のヌクレオチドと同様に代謝される、天然起源のヌクレオチドの類似体を含む核酸を含む。特にことわらない限り、特定の核酸配列はまた、その保存された修飾バリエーション(例えば、変性コドン置換)、アレル、オルソログ、SNPおよび相補配列を、明確に記載されている配列と同じように含む。具体的には、変性コドン置換は、選択した1つ以上(または全て)のコドンの3番目の部位が混合塩基またはデオキシイノシン残基によって置換された配列を作製することにより達成し得る(Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); and Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994))。

【0098】

「ペプチド」、「ポリペプチド」および「タンパク質」という語は、互換可能に用いられ、これらは、ペプチド結合により共有結合したアミノ酸残基を含む化合物を指す。タンパク質またはペプチドは、少なくとも2つのアミノ酸を含んでいなければならない。ポリペプチドはペプチド結合により互いに連結している2つ以上のアミノ酸を含む任意のペプチドまたはタンパク質を含む。本明細書では、該用語は、当該分野で一般的に、例えばペプチド、オリゴペプチドおよびオリゴマーと称される短鎖および当該分野で一般的にタンパク質と称される、多くの種類が存在する長鎖の両方を指す。「ポリペプチド」は特に、例えば、生物学的に活性な断片、実質的に相同性のポリペプチド、オリゴペプチド、ホモダイマー、ヘテロダイマー、ポリペプチドのバリエーション、修飾ポリペプチド、誘導体、類似体、融合タンパク質を含む。ポリペプチドは天然のペプチド、組換えペプチドまたはその組合せを含む。

【0099】

「プロモーター」という語は、細胞の合成機構または導入した合成機構により認識される、ポリヌクレオチドの特異的な転写に必要なDNA配列を指す。

【0100】

「プロモーター/調節配列」という語は、プロモーター/調節配列に作動可能に連結した遺伝子産物の発現に必要な核酸配列を指す。この配列はコアプロモーター配列であり得る場合もあり、この配列がエンハンサー配列および該遺伝子産物の発現に必要な他の調節エレメントを含んでいてもよい場合もある。該プロモーター/調節配列は、例えば、該遺伝子産物を組織特異的に発現させるものであってよい。

【0101】

「構成的プロモーター」という語は、遺伝子産物をコードするかまたは特定するポリヌクレオチドに作動可能に連結している場合に、細胞の生理学的条件の殆どのまたは全てにおいて、該遺伝子産物の産生を細胞内で引き起こすヌクレオチド配列を指す。

【0102】

「誘導性プロモーター」という語は、遺伝子産物をコードするかまたは特定するポリヌクレオチドに作動可能に連結している場合に、実質的に細胞中に該プロモーターに相当する誘導物質が存在するときのみ、該遺伝子産物の産生を細胞内で引き起こすヌクレオチド配列を指す。

【0103】

「組織特異的プロモーター」という語は、遺伝子をコードするか、または遺伝子に特定されたポリヌクレオチドに作動可能に連結した場合に、該細胞がプロモーターに相当する種類の組織の細胞であるときにのみ、該遺伝子産物の産生を細胞内で引き起こすヌクレオチド配列を指す。

【0104】

scFVに関する記載で用いる、「フレキシブルポリペプチドリンカー」または「リンカー」という語は、アミノ酸、例えばグリシンおよび/またはセリン残基からなり、単独でまたは組み合わせて用いられ、可変重鎖領域および可変軽鎖領域を連結するペプチドリンカーを指す。態様の一において、該フレキシブルポリペプチドリンカーは、Gly/Serリンカーであり、アミノ酸配列(Gly-Gly-Gly-Ser)_n (配列番号112)を含み、ここで、_nは1以上の正の整数である。例えば、_n=1、_n=2、_n=3、_n=4、_n=5、_n=6、_n=7、_n=8、_n=9および_n=10である。態様の一において、該フレキシブルポリペプチドリンカーは、(Gly₄ Ser)₄ (配列番号113)または(Gly₄ Ser)₃ (配列番号114)を含むが、これらに限定されるものではない。他の態様において、該リンカーは、(Gly₂Ser)、(GlySer)または(Gly₃Ser) (配列番号112)の多数の繰り返しを含む。国際公開第2012/138475号(引用により本明細書中に包含される)に記載のリンカーもまた、本発明の範囲内に含まれる。

【0105】

本明細書において、5' キャップ(RNAキャップ、RNA 7-メチルグアノシンキャップまたはRNA m⁷Gキャップとも称される)は、転写の開始直後に真核細胞のメッセンジャーRNAの「前面」または5' 末端に添加された修飾グアニンヌクレオチドである。該5' キャップは、最初に転写されたヌクレオチドに連結した末端の基からなる。5' キャップの存在は、リボソームによる認識およびRNaseからの保護に重要である。キャップ付加は、転写と対になっており、お互いに影響するように転写と同時に起こる。転写開始の直後に、合成されているmRNAの5' 末端にRNAポリメラーゼと共役しているキャップ合成複合体が結合する。この酵素複合体は、mRNAキャッピングに必要な化学反応を触媒する。合成は、複数工程の生化学反応として進行する。該キャッピング部位は、mRNAの機能性、例えば安定性および翻訳効率を調節するために、修飾されていてもよい。

【0106】

本明細書において、「試験管内で転写されたRNA」は、試験管内で合成されたRNA、好ましくはmRNAを指す。一般的に、試験管内で転写されたRNAは、試験管内転写ベクターから作製される。試験管内ベクターは、試験管内で転写されたRNAを作製するのに用いられるテンプレートを含む。

【0107】

本明細書において、「ポリ(A)」は、ポリアデニル化によりmRNAに結合した一連のアデノシンである。一過性発現用のコンストラクトの好ましい態様において、ポリAは、50~5000塩基(配列番号115)好ましくは64塩基を超える、より好ましくは100塩基を超え、最も好ましくは300または400塩基を超える。ポリ(A)配列は、mRNAの機能性、例えば局在性、安定性または翻訳効率を調節するために、化学的にまたは酵素により修飾されていてもよい。

【0108】

本明細書において、「ポリアデニル化」という語は、ポリアデニル部またはその修飾バリエーションのメッセンジャーRNA分子との共有結合を指す。真核生物では、メッセンジャーRNA(mRNA)分子は殆どが3' 末端でポリアデニル化されている。該3' ポリ(A)テールは、プレ-mRNAに、酵素、すなわちポリアデニル酸ポリメラーゼの作用により付加された、長い(しばしば700塩基の)アデニンヌクレオチド配列である。高等真核生物では、ポリ(A)テールは、特定の配列、すなわちポリアデニル化シグナルを含む転写物に付加される。ポリ(A)テールおよびそこに結合するタンパク質は、mRNAのエキソヌクレアーゼによる分解からの保護に寄与する。ポリアデニル化は、また、転写終結、核からのmRNAの輸送および翻訳にも重要である。ポリアデニル化は、DNAがRNAに転写された直後に核内で起こるが、

10

20

30

40

50

それよりも後に細胞質でさらに起こる場合もある。転写が終結すると、該mRNA鎖はRNAポリメラーゼと共役したエンドヌクレアーゼ複合体によって切断される。該切断部位は、通常、切断部位の近くの塩基配列AAUAAAの存在によって特徴付けられる。mRNAの切断後、アデノシン残基が結合部位のフリーの3'末端に付加される。

【0109】

本明細書において、「一過性」という語は、組み込まれていない導入遺伝子の、数時間、数日または数週間の間の発現を指し、ここで、発現期間は、該遺伝子が宿主細胞中でゲノムに組み込まれた場合または安定なプラスミドレプリコンに含まれている場合の発現期間よりも短い。

【0110】

「シグナル伝達経路」という語は、細胞の一部分から他の部分へのシグナル伝達で役割を果たす種々のシグナル伝達分子間の生化学的な関係を指す。「細胞表面受容体」という語は、細胞膜を通るシグナルおよび伝達シグナルを受容することのできる分子および複合値を含む。

【0111】

「対象」という語は、免疫応答を誘発し得る生体（例えば哺乳動物、ヒト）を含むことを意図する。

【0112】

「実質的に精製された」細胞という語は、他の種類の細胞を基本的に含まない細胞を指す。実質的に精製された細胞はまた、天然の状態では、通常関連する他の細胞種から分離された細胞を指す。場合によって、実質的に精製された細胞集団は、均一な細胞の集団を指す。他の場合において、この用語は、単に、天然の状態では関連している細胞から分離された細胞を指す。いくつかの局面において、該細胞は試験管内で培養される。他の局面において、細胞は試験管内では培養されない。

【0113】

本明細書において「治療」という語は処置を指す。治療効果は、病態の減弱、抑制、寛解または根絶により得られる。

【0114】

本明細書で用いる「予防」という語は、疾患または病態の防止または保護的処置を指す。

【0115】

本発明において、「腫瘍抗原」または「過増殖性障害抗原」または「過増殖性障害に関連する抗原」という語は、特定の過増殖性障害に共通の抗原を指す。特定の局面において、本発明の過増殖障害抗原は、がん、例えば非限定的な例としては、原発性または転移性の黒色腫、胸腺腫、リンパ腫、骨肉腫、肺がん、肝臓がん、非ホジキンリンパ腫、白血病、子宮がん、子宮頸がん、膀胱がん、腎臓がんおよび腺がん、例えば乳がん、前立腺がん、卵巣がんおよび膵臓がん等由来である。

【0116】

「遺伝子導入した」または「形質転換した」または「形質導入した」という語は、外来性の核酸が宿主細胞に移される、または導入される過程を指す。「遺伝子導入された」または「形質転換された」または「形質導入された」細胞は、外来性の核酸で遺伝子導入、形質転換または形質導入された細胞である。該細胞は初代の対象細胞およびその子孫を含む。

【0117】

「特異的に結合する」という語は、試料中に存在する同族結合パートナータンパク質（例えばT細胞上に存在する刺激分子および/または同時刺激分子）を認識して結合するが、該試料中の他の分子を実質的に認識または結合しない抗体またはリガンドを指す。

【0118】

範囲：本明細書を通じて、本発明の種々の局面を範囲の形態で表示してよい。範囲の形態の記載は、都合良さと簡潔さのためのものであり、本発明の範囲を限定するものではない

10

20

30

40

50

ことは理解されるべきである。したがって、範囲についての記載は、あり得る全ての部分的な範囲ならびにその範囲内の個々の数値を具体的に開示していると解釈するべきである。例えば、1~6という範囲は、1~3、1~4、1~5、2~4、2~6、3~6などの部分的な範囲ならびに、該範囲内の個々の値、例えば1、2、2.7、3、4、5、5.3および6といった数値を具体的に開示していると見なすべきである。他の例として、95~99%の同一性のような範囲は、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するものを含み、96~99%、96~98%、96~97%、97~99%、97~98%および98~99%の同一性のような部分的な範囲を含む。このことは、範囲の広さに関わらず適用される。

【0119】

本発明は、抗EGFRvIIIキメラ抗原受容体(CAR)を用いた、疾患、例えばがんの処置のための組成物および使用方法を提供する。

10

【0120】

局面の一において、本発明は、EGFRvIIIタンパク質に特異的に結合するように操作した抗体または抗体断片を含む多数のキメラ抗原受容体を提供する。局面の一において、本発明は、CARを発現するように操作した細胞(例えばT細胞)を提供し、ここで該CAR T細胞(「CART」)は、抗腫瘍性を示す。局面の一において、細胞は、CARを用いて形質転換され、CARが細胞表面に発現する。いくつかの態様において、該細胞(例えばT細胞)は、CARをコードするウイルスベクターを用いて形質導入される。いくつかの態様において、該ウイルスベクターはレトロウイルスベクターである。いくつかの態様において、該ウイルスベクターはレンチウイルスベクターである。いくつかのかかる態様において、該細胞はCARを安定して発現してよい。他の態様において、該細胞(例えばT細胞)は、CARをコードする核酸、例えばmRNA、cDNA、DNAによって遺伝子導入される。いくつかのかかる態様において、該細胞は一過的にCARを発現してよい。

20

【0121】

局面の一において、CARのEGFRvIIIタンパク質結合部位は、scFv抗体断片である。局面の一において、該抗体断片は、同等の結合親和性を維持している、例えばそれが由来するIgG抗体に匹敵する有効性で、同じ抗原と結合するという点において機能性を示す。局面の一において、該抗体断片は、例えば非限定的な例として、当業者が理解するような、免疫応答の活性化、標的抗原からのシグナル伝達発生の阻害、キナーゼ活性の阻害等を含んでいてよい生物学的な応答をもたらすという点において機能性を示す。

30

【0122】

局面の一において、CARのEGFRvIII抗原結合ドメインは、マウスscFv抗体断片である。他の局面において、CARのEGFRvIII抗原結合ドメインは、由来するscFvマウス配列と比較してヒト化されているscFv断片である。EGFRvIII(3C10)に対する親マウスモノクローナル抗体の作製は、例えばOkamoto et al. (British J. Cancer 1996, 73:1366-1372)に記載されている。EGFRvIIIに対する完全ヒト抗体の例(139)は、Morgan et al. (2012) Human Gene Therapy, 23: 1043-1953に記載されており、当該文献は引用により本明細書中に包含される。局面の一において、マウス配列のscFvは配列番号11を含む。このマウスscFvのヒト化は、臨床状況において望ましい場合があり、この場合、マウス特異的な残基が、EGFRvIII処置、例えばEGFRvIIIコンストラクトで形質導入されたT細胞を用いた処置を受ける患者においてヒト抗マウス抗原(HAMA)応答を引き起こし得る。

40

【0123】

局面の一において、CARの抗EGFRvIII結合ドメイン部分は、哺乳類細胞での発現用にコドンが最適化された配列の導入遺伝子によりコードされている。局面の一において、本発明のCARコンストラクト全体は、その全体の配列が哺乳類細胞での発現用にコドンが最適化されている導入遺伝子によりコードされている。コドン最適化は、コードDNA中の同義コドン(すなわち同じアミノ酸をコードするコドン)の出現頻度が、種によって偏っているという知見に関する。該コドン同義性により、同一のポリペプチドが種々のヌクレオチド配列によりコードされることが可能となっている。コドン最適化方法としては種々の方法が当該分野で知られており、例えば、少なくとも米国特許第5,786,464号および第6,114

50

,148号明細書に記載の方法が挙げられる。

【0124】

局面の一において、CARの抗EGFRvIII結合ドメインは、ヒト化抗EGFRvIII結合ドメインである。例えば、態様の一において、該抗EGFRvIII結合ドメインは、配列番号38に記載のscFv部位を含む。局面の一において、該ヒト化抗EGFRvIII結合ドメインは、配列番号44に記載のscFv部位を含む。局面の一において、該ヒト化抗EGFRvIII結合ドメインは、配列番号50に記載のscFv部位を含む。局面の一において、該ヒト化抗EGFRvIII結合ドメインは、配列番号56に記載のscFv部位を含む。局面の一において、該ヒト化抗EGFRvIII結合ドメインは、配列番号62に記載のscFv部位を含む。局面の一において、ヒト化抗EGFRvIII結合ドメインは、配列番号68に記載のscFv部位を含む。局面の一において、ヒト化抗EGFRvIII結合ドメインは、配列番号74に記載のscFv部位を含む。局面の一において、ヒト化抗EGFRvIII結合ドメインは、配列番号80に記載のscFv部位を含む。局面の一において、該ヒト化抗EGFRvIII結合ドメインは、配列番号86に記載のscFv部位を含む。

10

【0125】

局面の一において、本明細書に記載のCARは、特異的な抗体の抗原結合ドメインを、細胞内シグナル伝達ドメインとともに含む。例えば、いくつかの局面において、細胞内シグナル伝達ドメインとしては、CD3- 鎖、4-1BBおよびCD28シグナル伝達モジュールおよびその組合せが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0126】

局面の一において、該抗原結合ドメインはEGFRvIIIに結合する。局面の一において、CARは、配列番号43に記載の配列を含む。局面の一において、CARは、配列番号49に記載の配列を含む。局面の一において、CARは配列番号55に記載の配列を含む。局面の一において、CARは配列番号61に記載の配列を含む。局面の一において、CARは配列番号67に記載の配列を含む。局面の一において、CARは配列番号73に記載の配列を含む。局面の一において、CARは、配列番号79に記載の配列を含む。局面の一において、CARは、配列番号85に記載の配列を含む。

20

【0127】

局面の一において、CARは、CD137 (4-1BB)シグナル伝達ドメイン、CD28シグナル伝達ドメイン、CD3 シグナル伝達ドメイン、およびその任意の組合せからなる群から選択される少なくとも1つの細胞内シグナル伝達ドメインを含む。局面の一において、CARは、CD137 (4-1BB)またはCD28、CD3 シグナル伝達ドメインおよびその任意の組合せ以外の1つ以上の同時刺激分子の少なくとも1つのシグナル伝達ドメインを含む。

30

【0128】

さらに、本発明は、CAR組成物および疾患、特にEGFRvIII発現細胞または組織に関連するがんまたは何らかの悪性疾患または自己免疫疾患の処置用の医薬および処置方法におけるその使用を提供する。

【0129】

本発明はまた、CAR-発現細胞、例えばT細胞におけるmiR-17-92の過剰発現用組成物および方法を提供する。局面の一において、導入遺伝子由来のmiR-17-92の過剰発現は、腫瘍誘発性の免疫抑制および化学療法に対する耐性の改善をもたらす、それにより長期持続性の治療効果の促進を伴う、CAR導入T細胞をもたらす。

40

【0130】

キメラ抗原受容体 (CAR)

本発明は、CARをコードする配列を含む組換えDNAコンストラクトを含み、ここで、該CARは、EGFRvIIIに特異的に結合する抗体断片、例えばEGFRvIIIに特異的に結合するヒト抗体断片を含む。局面の一において、該EGFRvIIIはヒトEGFRvIIIであり、該抗体断片をコードする核酸配列は、細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列と隣接しており、同一リーディングフレーム中に存在する。該細胞内シグナル伝達ドメインは、同時刺激シグナル伝達ドメインおよび/または一次シグナル伝達ドメイン、例えば 鎖を含んでいてよい。同時刺激ドメインは、同時刺激分子の細胞内ドメインの少なくとも一部を含む、CA

50

Rの一部を指す。

【0131】

特定の局面において、本発明のCARコンストラクトは、配列番号38、配列番号44、配列番号50、配列番号56、配列番号62、配列番号68、配列番号74、配列番号80、および配列番号86からなる群から選択されるscFvドメインであって、該scFvの前には、配列番号13で表されるような付加的なリーダー配列があつてよいscFvドメイン、後には、例えば配列番号14または配列番号104または配列番号106または配列番号108で表されるような付加的なヒンジ配列、例えば配列番号15で表されるような膜貫通領域、配列番号16または配列番号102を含む細胞内シグナル伝達ドメインおよび配列番号17または配列番号99を含むCD3 配列を含み、ここで、該ドメインは近接しており、同一のリーディングフレーム中に存在し、単一の融合タンパク質を形成する。配列番号38、配列番号44、配列番号50、配列番号56、配列番号62、配列番号68、配列番号74、配列番号80および配列番号86からなる群から選択される各scFv断片および配列番号13～17の各ドメインのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列も本発明に含まれる。配列番号38、配列番号44、配列番号50、配列番号56、配列番号62、配列番号68、配列番号74、配列番号80および配列番号86からなる群から選択される各scFv断片ならびに、配列番号13～16および配列番号99の各ドメインのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列も本発明に含まれる。局面の一において、該EGFRvIII CARコンストラクトは、付加的なリーダー配列、EGFRvIIIに特異的に結合する細胞外結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメインおよび細胞内刺激ドメインを含む。局面の一において、該EGFRvIII CARコンストラクトは、付加的なリーダー配列、EGFRvIIIに特異的に結合する細胞外抗原結合領域、ヒンジ、膜貫通ドメイン、同時刺激ドメインおよび一次刺激ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む。ヒト化scFvドメインを含む特定のEGFRvIII CARコンストラクトは、配列番号43、配列番号49、配列番号55、配列番号61、配列番号67、配列番号73、配列番号79、配列番号85および配列番号90に示す。マウスscFvドメインを含む特定のEGFRvIII CARコンストラクトを、配列番号1および配列番号2に示す。

【0132】

リーダー配列の例を配列番号13に示す。ヒンジ/スペーサー配列の例は配列番号14または配列番号104または配列番号106または配列番号108に示す。膜貫通ドメイン配列の例は、配列番号15に示す。4-1BBタンパク質の同時刺激ドメイン配列の例は、配列番号16に示す。CD27タンパク質の同時刺激ドメインの配列の例を、配列番号102に示す。CD3 ドメイン配列の一次シグナル伝達ドメインの例を、配列番号17に示す。CD3 ドメインの一次シグナル伝達ドメインの配列の例を配列番号99に示す。

【0133】

局面の一において、本発明は、CARをコードする核酸分子を含む組換え核酸コンストラクトを含み、ここで、該核酸分子は、細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列と近接し、同一フレーム中にある抗EGFRvIII結合ドメイン、例えば本明細書に記載の抗EGFRvIII結合ドメインをコードする核酸を含む。局面の一において、該抗EGFRvIII結合ドメインは、配列番号38、配列番号44、配列番号50、配列番号56、配列番号62、配列番号68、配列番号74、配列番号80および配列番号86の1つ以上から選択される。局面の一において、該抗EGFRvIII結合ドメインは、配列番号39、配列番号45、配列番号51、配列番号57、配列番号63、配列番号69、配列番号75、配列番号81および配列番号98からなる群から選択される配列に記載のヌクレオチド配列にコードされる。局面の一において、該抗EGFRvIII結合ドメインは配列番号39にコードされる。局面の一において、該抗EGFRvIII結合ドメインは配列番号45にコードされる。局面の一において、該抗EGFRvIII結合ドメインは配列番号51にコードされる。局面の一において、該抗EGFRvIII結合ドメインは配列番号57にコードされる。局面の一において、該抗EGFRvIII結合ドメインは配列番号63にコードされる。局面の一において、該抗EGFRvIII結合ドメインは配列番号69にコードされる。局面の一において、該抗EGFRvIII結合ドメインは配列番号75にコードされる。局面の一において、該抗EGFRvIII結合ドメインは配列番号81にコードされる。

【0134】

局面の一において、本発明は、CARをコードする核酸分子を含む組換え核酸コンストラクトを含み、ここで、該核酸分子は、配列番号42、配列番号48、配列番号54、配列番号60、配列番号66、配列番号72、配列番号78、配列番号84および配列番号90からなる群から選択される抗EGFRvIII結合ドメインをコードする核酸配列を含み、該配列は、細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列に近接しており、同一リーディングフレーム中にある。CARに用いてよい細胞内シグナル伝達ドメインとしては、例えば、CD3、CD28および4-1BB等の細胞内シグナル伝達ドメインの1つ以上が挙げられるが、これらに限定されるものではない。いくつかの例において、CARはCD3、CD28、4-1BBの細胞内シグナル伝達ドメインの任意の組合せを含んでよい。局面の一において、該核酸コンストラクトは配列番号42を含む。局面の一において、CARコンストラクトの核酸配列は、配列番号48を含む。局面の一において、該核酸コンストラクトは、配列番号54を含む。局面の一において、該核酸コンストラクトは配列番号60を含む。局面の一において、該核酸コンストラクトは配列番号66を含む。局面の一において、該核酸コンストラクトは配列番号72を含む。局面の一において、該核酸コンストラクトは配列番号78を含む。局面の一において、該核酸コンストラクトは配列番号84を含む。

【0135】

所望の分子をコードする核酸配列は、当該分野で公知の組換え方法、例えば該遺伝子を発現する細胞由来のライブラリーのスクリーニング、該遺伝子を含むことが知られているベクターからの遺伝子の抽出、または該遺伝子を含む細胞および組織からの直接の単離によって、標準的な技術を用いて調製してよい。あるいは、所望の核酸をクローニングではなく、合成により作製してもよい。

【0136】

本発明は、細胞に直接導入し得るCARを発現するレトロウイルスおよびレンチウイルスベクターコンストラクトを含む。

【0137】

本発明はまた、細胞に直接導入し得るRNAコンストラクトを含む。導入に用いるためのmRNA作製方法は、特別に設計したプライマーを用いたテンプレートの試験管内転写 (IVT)、それに次ぐポリA付加を行い、3'および5'非翻訳配列(「UTR」)、5'キャップおよび/または配列内リボソーム進入部位(IRES)、発現させる核酸およびポリAテールを含む、典型的に50~2000塩基の長さのコンストラクトを作製することを含む。このように作製したRNAは、種々の細胞に効率的に導入することができる。態様の一において、該テンプレートはCARの配列を含む。態様の一において、RNA CAR vベクターはエレクトロポレーションによりT細胞内に導入される。

【0138】

抗原結合ドメイン

局面の一において、本発明のCARは、抗原結合ドメインとも称される、標的特定の結合エレメントを含む。部位の選択は、標的細胞の表面を決定するリガンドの種類および数に依存する。例えば、抗原結合ドメインは、特定の病態と関連する標的細胞の細胞表面マーカーとして作用するリガンドを認識するように選択してよい。本発明のCARの抗原結合ドメインのリガンドとして作用し得る細胞表面マーカーの例としては、ウイルス性、細菌性および寄生性の感染症、自己免疫疾患およびがん細胞に関連するものが挙げられる。

【0139】

局面の一において、CARを介したT細胞応答を、所望の抗原に特異的に結合する抗原結合ドメインをCARに組み込むことによって所望の抗原に向けることができる。

【0140】

局面の一において、抗原結合ドメインを含むCARの一部は、EGFRvIIIを標的とする抗原結合ドメインを含む。局面の一において、該抗原結合ドメインはヒトEGFRvIIIを標的とする。例えば、マウスモノクローナル抗体(IgG2b) 3C10は、EGFRvIII特異的な融合部を含む14アミノ酸ペプチド(LEEKKGNYVVDHC; 配列番号101)を用いたマウスの免疫化によりEGFR

vIIIに対して作製され、野生型のEGFRへの結合が認識されることなく、EGFRvIIIに対して特異性の高い認識を示すことが確認されている (Okamoto et al, British J. Cancer 1996, 73:1366-1372)。したがって、いくつかの態様において、抗原結合ドメインは、EGFRvIII連結ドメイン中のアミノ酸、例えば付加されたグリシン残基を含むアミノ酸配列を標的とする。いくつかの態様において、該抗原結合ドメインは、配列番号101のアミノ酸配列中の1つ以上のアミノ酸配列を標的とする。

【0141】

抗原結合ドメインは、抗原に結合する任意のドメインであってよく、非限定的な例としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組換え抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、およびその機能性断片、例えば非限定的な例としては、単一ドメイン抗体、例えば重鎖可変ドメイン (VH)、軽鎖可変ドメイン (VL) およびラクダ由来のナノボディの可変ドメイン (VHH)、抗原結合ドメインとして機能することが当該分野で公知である他のスキャフォールド、例えば組換えフィブロネクチンドメイン等が挙げられる。いくつかの場合において、抗原結合ドメインは、CARが最終的に用いられる種と同一の種由来であることが有益である。例えば、ヒトに用いる場合は、CARの抗原結合ドメインは、抗体または抗体断片の抗原結合ドメインとして、ヒトまたはヒト化された残基を含んでいることが有益であり得る。

【0142】

したがって、局面の一において、該抗原結合ドメインは、ヒト抗体または抗体断片を含む。他の局面において、該抗原結合ドメインはヒト化抗体または抗体断片を含む。態様の一において、該抗EGFRvIII結合ドメインは、本明細書に記載の抗EGFRvIII結合ドメインの軽鎖相補決定領域1 (LC CDR1)、軽鎖相補決定領域2 (LC CDR2) および軽鎖相補決定領域3 (LC CDR3) の1つ以上 (例えば、1つ、2つまたは3つ全て) および、本明細書に記載の抗EGFRvIII結合ドメインの重鎖相補決定領域1 (HC CDR1)、重鎖相補決定領域2 (HC CDR2) および重鎖相補決定領域3 (HC CDR3) の1つ以上 (例えば、1つ、2つまたは3つ全て) を含む。態様の一において、抗EGFRvIII結合ドメインは、本明細書に記載の軽鎖可変領域および/または本明細書に記載の重鎖可変領域を含む。態様の一において、抗EGFRvIII結合ドメインは、軽鎖可変領域および重鎖可変領域のアミノ酸配列、例えば、本明細書に記載の軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含む、scFvである。態様の一において、抗EGFRvIII結合ドメイン (例えばscFv) は、本明細書に記載の軽鎖可変領域のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個または3個の変更 (例えば置換) を有するが、30個以下、20個以下または10個以下の変更 (例えば置換) を有するアミノ酸配列か、または本明細書に記載のアミノ酸配列と85 ~ 99% (例えば90 ~ 99% または95 ~ 99%) の同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域; および/または本明細書に記載の重鎖可変領域のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個または3個の変更 (例えば置換) を有するが、30個以下、20個以下または10個以下の変更 (例えば置換) を有するアミノ酸配列または本明細書に記載のアミノ酸配列と85 ~ 99% (例えば、90 ~ 99% または95 ~ 99%) の同一性を有する配列を含む、重鎖可変領域を含む。局面の一において、抗原結合ドメインは、配列番号38、配列番号44、配列番号50、配列番号56、配列番号62、配列番号68、配列番号74、配列番号80 および配列番号86 からなる群から選択される1つ以上の配列を含む。局面の一において、ヒト化CARは、配列番号43、配列番号49、配列番号55、配列番号61、配列番号67、配列番号73、配列番号79、配列番号85 および配列番号90 からなる群の1つ以上の配列から選択される。

【0143】

いくつかの局面において、非ヒト抗体はヒト化され、ここで、該抗体の特定の配列または領域が、ヒトで天然に産生される抗体またはその断片との類似性を上昇させるために変更される。局面の一において、抗原結合部位がヒト化される。

【0144】

ヒト化抗体は、当該分野で公知の種々の技術、例えば非限定的な例としては、CDR グラフティング (例えば欧州特許第239,400号; 国際公開第91/09967号; ならびに米国特許第5,225,539号、第5,530,101号および第5,585,089号明細書参照、これらの文献はそれぞれ参

10

20

30

40

50

照によりその全体が本明細書に包含される)、ベニヤリングまたはリサーフェシング(例えば欧州特許第592,106号および第519,596号明細書; Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering*, 7(6):805-814; および Roguska et al., 1994, *PNAS*, 91:969-973参照、これらの文献はそれぞれ参照によりその全体が本明細書に包含される)、鎖シャッフリング(例えば米国特許第5,565,332号明細書参照、当該文献は参照によりその全体が本明細書に包含される)、および、例えば米国特許出願公開第2005/0042664号、第2005/0048617号、米国特許第6,407,213号、第5,766,886号明細書、国際公開第9317105号、Tan et al., 2002, *J. Immunol.*, 169:1119-25; Caldas et al., 2000, *Protein Eng.*, 13(5):353-60; Morea et al., 2000, *Methods*, 20:267-79; Baca et al., 1997, *J. Biol. Chem.*, 272:10678-84; Roguska et al., 1996, *Protein Eng.*, 9(10):895-904; Couto et al., 1995, *Cancer Res.*, 55:5973s-5977; Couto et al., 1995, *Cancer Res.*, 55(8):1717-22; Sandhu 1994 *Gene*, 150(2):409-10; および Pedersen et al., 1994, *J. Mol. Biol.*, 235(3):959-73 (これらの文献はそれぞれ参照により本明細書に包含される)に記載の技術を用いて作製してよい。フレームワーク領域中のフレームワーク残基が、CDRドナー抗体由来の相当する残基により置換されて、例えば抗原結合が変化、例えば改善することがしばしばある。これらのフレームワーク置換は、当該分野でよく知られた方法、例えばCDRとフレームワーク残基の相互作用をモデリングして、抗原結合に重要なフレームワーク残基を特定することおよび、特定の位置にある通常でないフレームワーク残基を特定するために配列比較することにより特定される(例えば Queen et al., 米国特許第5,585,089号明細書; および Riechmann et al., 1988, *Nature*, 332:323参照、これらの文献は参照によりその全体が本明細書に包含される)。

【0145】

ヒト化抗体または抗体断片はヒトでないその供給源由来のアミノ酸配列を1つ以上維持している。これらの非ヒトアミノ酸残基は、「移入」残基と称され、これらは、典型的に、「移入」可変ドメインから取り入れられたものである。本明細書において、ヒト化抗体または抗体断片は、非ヒト免疫グロブリン分子由来の1つ以上のCDRとフレームワーク領域を含み、ここで、該フレームワークを含むアミノ酸残基は、完全にまたは殆どが、ヒト生殖系列由来である。抗体または抗体断片のヒト化のための多数の方法が当該分野でよく知られており、基本的に、Winter ら(Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988))の方法にしたがって、齧歯類のCDRまたはCDR配列を、ヒト抗体の相当する配列に置換すること、すなわちCDRグラフィティングによって行い得る(欧州特許出願公開第239,400号; 国際公開第91/09967号; および米国特許出願公開第4,816,567号; 第6,331,415号; 第5,225,539号; 第5,530,101号; 第5,585,089号; 第6,548,640号明細書、これらの文献の内容はその全体が参照により本明細書に包含される)。該ヒト化抗体および抗体断片では、非ヒト種由来の相当する配列で置換されている部分が、インタクトなヒト可変ドメインよりも実質的に少ない。ヒト化抗体は、しばしば、いくつかのCDR残基および場合によってはいくつかのフレームワーク (FR) 残基が、齧歯類の抗体の相当する部位の残基によって置換されているヒト抗体である。抗体および抗体断片のヒト化は、ベニヤリングまたはリサーフェシング(欧州特許出願公開第592,106号; 第519,596号; Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28(4/5):489-498; Studnicka et al., *Protein Engineering*, 7(6):805-814 (1994); および Roguska et al., *PNAS*, 91:969-973 (1994))または鎖シャッフリング(chain shuffling)(米国特許第5,565,332号)によって達成でき、これらの文献の内容は、その全体が参照により本明細書中に包含される。

【0146】

ヒト化抗体作製に用いるヒト可変ドメイン、軽鎖および重鎖両方の可変ドメインの選択を、抗原性を低下させるために行う。所謂「最良適合」方法によれば、齧歯類抗体の可変ドメイン配列は、公知のヒト可変ドメイン配列のライブラリー全体に対してスクリーニングされる。齧歯類に最も近いヒト配列をヒト化抗体のヒトフレームワーク (FR) として認める (Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 19

6:901 (1987)、当該文献の内容は参照により本明細書に包含される)。他の方法では、特定の軽鎖または重鎖のサブグループの全てのヒト抗体のコンセンサス配列由来の特定のフレームワークを用いる。いくつかの異なるヒト化抗体に対して同じフレームワークを用いてよい (例えば、Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)を参照のこと; 該文献の内容は、その全体が参照により本明細書に包含される)。

【0147】

いくつかの局面において、抗体断片を含む本発明のCAR組成物の一部は、標的抗原に対する高い親和性および他の好ましい生物学的な性質を維持したままヒト化されている。本発明の局面の一によれば、ヒト化抗体および抗体断片は、親配列および種々の概念的なヒト化産物の、親配列およびヒト化配列の3次元モデルを用いた解析を経て作製される。3次元免疫グロブリンモデルは、一般的に利用可能であり、当該分野でよく知られている。選択した免疫グロブリン候補配列の3次元立体構造を模式化して表すコンピュータープログラムが利用可能である。これらを表示させて調べることによって、免疫グロブリン候補配列の機能における、残基の役割の推定解析、例えば、該候補免疫グロブリンの標的抗原への結合能に影響を及ぼす残基の解析が可能になる。この方法により、所望の抗体または抗体断片の特徴、例えば標的抗原に対する親和性の上昇を達成するように、FR残基をレシピエントから選択して組合せて配列を取り込むことができる。一般的に、CDR残基は、直接および殆ど実質的に、抗原結合に影響を与えるのに関連している。

【0148】

局面の一において、該抗EGFRVIII結合ドメインは例えば、Fv、Fabまたは(Fab')₂または二機能性 (例えば二特異性) ハイブリッド抗体 (例えばLanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987))である。局面の一において、本明細書に記載の抗体断片は、scFvである。局面の一において、scFvはEGFRVIIIタンパク質には結合するが、野生型のEGFRには結合しない。場合によっては、ヒトscFvは、酵母ディスプレイライブラリーより得てもよい。

【0149】

場合によっては、scFvは、当該分野で公知の方法にしたがって作製してもよい (例えばBird et al., (1988) Science 242:423-426およびHuston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883参照)。ScFv分子は、VHおよびVL領域を、柔軟性のあるポリペプチドリンカーを用いて連結することにより作製してよい。該scFv分子は、最適な長さおよび/またはアミノ酸組成のリンカー (例えばSer-Glyリンカー)を含む。リンカー長は、scFvの可変領域のフォールディングおよび相互作用に大きな影響を与える場合がある。実際、短いポリペプチドリンカー (例えば、5~10アミノ酸)を用いた場合、鎖内フォールディングが妨げられる。鎖内フォールディングはまた、2つの可変領域がともに、機能性のエピトープ結合部位を形成するのに必要である。リンカーの配向およびサイズについては、例えばHollinger et al. 1993 Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448、米国特許出願公開第2005/0100543号、第2005/0175606号、第2007/0014794号明細書ならびに国際公開第2006/020258号および第2007/024715号を参照 (これらの文献はそれぞれ参照により本明細書に包含される)。

【0150】

scFvは、VL領域とVH領域の間に、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50個またはそれ以上のアミノ酸残基のリンカーを含み得る。該リンカー配列は、天然起源のアミノ酸を含んでよい。いくつかの態様において、該リンカー配列は、アミノ酸である、グリシンおよびセリンを含む。他の態様において、該リンカー配列は、グリシンとセリンの繰り返しのセット、例えば(Gly₄Ser)_n (配列番号37) (式中、nは1以上の正の整数である)を含む。態様の一において、該リンカーは、(Gly₄Ser)₄ (配列番号113)または(Gly₄Ser)₃ (配列番号114)であってよい。リンカー長の変動は、活性を維持するかまたは上昇させ、活性試験において優れた有効性をもたらす場合がある。

【0151】

安定性および変異

抗EGFRvIII結合ドメイン、例えばscFv分子(例えば可溶性scFv)の安定性は、慣用の対照scFv分子または全長の抗体の生物物理学的な性質(例えば熱安定性)との相対により評価し得る。態様の一において、ヒト化scFvは、本明細書に記載のアッセイにおいて、対照結合分子(例えば慣用のscFv分子)よりも、約0.1、約0.25、約0.5、約0.75、約1、約1.25、約1.5、約1.75、約2、約2.5、約3、約3.5、約4、約4.5、約5、約5.5、約6、約6.5、約7、約7.5、約8、約8.5、約9、約9.5、約10、約11、約12、約13、約14 または約15 高い熱安定性を示す。

【0152】

該抗EGFRvIII結合ドメイン、例えば、scFvの熱安定性の改善は、次いで、EGFRvIII CARコンストラクト全体に及び、EGFRvIII CARコンストラクトの治療特性の改善を引き起こす。該抗EGFRvIII結合ドメイン、例えばscFvの熱安定性は、慣用的な抗体と比較して、少なくとも約2 または3 改善され得る。態様の一において、該抗EGFRvIII結合ドメイン、例えばscFvは、慣用的な抗体と比較して、1 改善した熱安定性を示す。他の態様において、該抗EGFRvIII結合ドメイン、例えばscFvは、慣用的な抗体と比較して2 改善された熱安定性を示す。他の態様において、該抗EGFRvIII結合ドメイン、例えばscFvは、慣用的な抗体と比較して、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 改善された熱安定性を示す。比較は、例えば、本明細書に記載のscFv分子と、scFv VHおよびVLが由来する抗体のscFv分子またはFab断片との間で行ってよい。熱安定性は、当該分野で公知の方法を用いて測定してよい。例えば、態様の一において、T_mを測定し得る。T_mの測定方法およびタンパク質安定性を決定する他の方法は以下に詳述する。

【0153】

scFvの変異(可溶性scFvのヒト化および直接変異導入により生じる変異)は、scFvの安定性を変化させ、scFvおよびEGFRvIII CARコンストラクトの安定性を全体的に改善する。ヒト化scFvの安定性は、例えば、T_m、変性温度および凝集温度を測定することによって、マウスscFvと比較する。変異scFvの結合能は、実施例に記載のアッセイを用いて決定し得る。

【0154】

態様の一において、該抗EGFRvIII結合ドメイン、例えばscFvは、変異scFvがEGFRvIIIコンストラクトに安定性の改善をもたらすような、ヒト化工程で生じた少なくとも1つの変異を含む。他の態様において、抗EGFRvIII結合ドメイン、例えばscFvは、変異scFvがEGFRvIIIコンストラクトに安定性の改善をもたらすためのヒト化工程で生じた、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の変異を含む。

【0155】

タンパク質の安定性の評価方法

抗原結合ドメインの安定性は、例えば、後述する方法を用いて評価し得る。該方法により、最も安定性の低いドメインが最初にアンフォールディングするかまたは協調してアンフォールディングするマルチドメインユニット(例えば単一のアンフォールディング転移を示すマルチドメインタンパク質)の安定性の閾値が全体的に限定される、複数の熱アンフォールディング転移を検出することが可能になる。最も安定性の低いドメインは、複数の付加的な方法により特定し得る。どのドメインが全体の安定性を限定しているかを探索するために、変異を導入してよい。さらに、マルチドメインタンパク質のプロテアーゼ耐性を、最も安定性の低いドメインが天然でアンフォールディングを起こすことがDSCまたは他の分光測定法により知られている条件下で調べてよい(Fontana, et al., (1997) Fold. Des., 2: R17-26; Dimasi et al. (2009) J. Mol. Biol. 393: 672-692)。最も安定性の低いドメインが特定されると、このドメイン(またはその一部)をコードする配列を当該方法の試験配列として使用し得る。

【0156】

a) 熱安定性

該組成物の熱安定性は、多数の非限定的な生物物理または生化学技術により解析し得る。特定の態様において、熱安定性は、解析分光測定により評価される。

【0157】

分析分光測定法の一例は、示差走査熱量測定(DSC)である。DSCは、殆どのタンパク質またはタンパク質ドメインのアンフォールディングに伴う熱吸収を感受する熱量計を用いる(例えば、Sanchez-Ruiz, et al., Biochemistry, 27: 1648-52, 1988参照)。タンパク質の熱安定性を決定するために、該タンパク質の試料を該熱量計に挿入し、Fab またはscFvがアンフォールディングするまで温度を上昇させる。タンパク質がアンフォールディングする温度がタンパク質全体の安定性の指標となる。

【0158】

分析分光測定法の他の例は、円二色性(CD) 分光測定法である。CD分光測定法は、温度上昇の指標として、組成物の光学活性を測定する。円二色性(CD) 分光測定法は、構造の非対称性から生じる、左回りの偏光と右回りの偏光の吸収性の差異を測定する。変性した、またはアンフォールディングした構造は、変性していないまたは折りたたまれた構造とは大きく異なるCDスペクトルを示す。CDスペクトルは、該タンパク質の、温度上昇の変性効果に対する感受性を反映するものであり、そのため、タンパク質の熱安定性の指標となる(van Mierlo and Steemsma, J. Biotechnol., 79(3):281-98, 2000参照)。

【0159】

熱安定性を測定する分析分光測定法の他の例は、蛍光放射分光測定法である(上記van Mierlo and Steemsmaを参照)。熱安定性を測定する分析分光測定法の他の例は、核磁気共鳴(NMR) 分光測定法である(例えば上記van Mierlo and Steemsmaを参照のこと)。

【0160】

組成物の熱安定性は、生化学的に測定し得る。熱安定性を評価する生化学的方法の一例は、熱負荷アッセイ(thermal challenge assay) である。「熱負荷アッセイ」では、組成物を一定範囲の高温に一定時間暴露する。例えば、態様の一において、試験scFv分子またはscFv分子を含む分子を一定範囲の温度上昇に、例えば1~1.5時間暴露する。その後、該タンパク質の活性を、関連する生化学アッセイにより評価する。例えば、該タンパク質が結合タンパク質(例えばscFvまたはscFv含有ポリペプチド)である場合、該結合タンパク質の結合活性を、機能性または定量性ELISAにより決定し得る。

【0161】

該アッセイは、ハイスループット形態で、大腸菌(E. coli)を用いてハイスループットスクリーニングを行った実施例に記載するように行ってよい。抗EGFRvIII結合ドメイン、例えばscFvのバリエーションのライブラリーを、当該分野で公知の方法を用いて作製し得る。抗EGFRvIII結合ドメイン、例えばscFvの発現を誘導し、該抗EGFRvIII結合ドメイン、例えばscFvを熱負荷に付してよい。該負荷試験試料を、結合性について評価し、安定性を示す抗EGFRvIII結合ドメイン、例えばscFvをスケールアップしてさらに特徴付けを行ってよい。

【0162】

熱安定性は、組成物の融解温度(T_m) を上述の技術(例えば分析分光測定技術)を用いて測定することによって評価する。融解温度は、組成物の分子の50%が折りたたまれた状態である、温度遷移曲線の間接点の温度である(例えば、Dimasi et al. (2009) J. Mol Biol. 393: 672-692を参照)。態様の一において、抗EGFRvIII結合ドメイン、例えばscFvについてのT_m値は、約40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100である。態様の一において、IgGについてのT_m値は約40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74

10

20

30

40

50

、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100である。態様の一において、多価抗体についてのT_m値は約40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100である。

【0163】

熱安定性は、分析熱量測定技術(例えばDSC)を用いて組成物の比熱または熱容量(C_p)を測定することによっても評価される。組成物の比熱は、水1molの温度を1℃上昇させるのに必要なエネルギー(例えばkcal/mol表示)である。C_pが大きいことは、変性または不活性なタンパク質組成物の指標である。組成物の熱容量の変化(ΔC_p)は、熱転移の前後の組成物の比熱を決定することにより測定される。熱安定性を、熱安定性の他のパラメーター、例えばアンフォールディングのギブス自由エネルギー(ΔG)、アンフォールディングのエンタルピー(ΔH)またはアンフォールディングのエントロピー(ΔS)を測定または決定することにより評価してもよい。上述の生化学アッセイの1つ以上(例えば熱負荷アッセイ)は、組成物の50%がその活性(例えば結合活性)を維持する温度(すなわちT_c値)を決定するのに用いられる。

【0164】

加えて、該抗EGFRvIII結合ドメイン、例えばscFvに対する変異は、該抗EGFRvIII結合ドメイン、例えばscFvの熱安定性を、変異していない抗EGFRvIII結合ドメイン、例えばscFvと比較して変化させる。ヒト化抗EGFRvIII結合ドメイン、例えばscFvが抗EGFRvIII CARコンストラクトに組み込まれているとき、該抗EGFRvIII結合ドメイン、例えばヒト化scFvは、抗EGFRvIII CARコンストラクト全体に熱安定性をもたらす。態様の一において、該抗EGFRvIII結合ドメイン、例えばscFvは、該抗EGFRvIII結合ドメイン、例えばscFvに熱安定性を与える単一の変異を含む。他の態様において、該抗EGFRvIII結合ドメイン、例えばscFvは、該抗EGFRvIII結合ドメイン、例えばscFvに熱安定性を与える複数の変異を含む。態様の一において、該抗EGFRvIII結合ドメイン例えばscFvにおける複数の変異は、該抗EGFRvIII結合ドメイン、例えばscFvの熱安定性に相加的な効果を及ぼす。

【0165】

b) 凝集%

組成物の安定性は、その凝集性を測定することによって決定し得る。凝集は、多数の非限定的な生化学または生物物理学的な技術により測定し得る。例えば、組成物の凝集は、クロマトグラフィー、例えばサイズ交換クロマトグラフィー(SEC)により評価し得る。SECは、サイズに基づいて分子を分離する。イオンおよび小さい分子は内側に入れるが、大きい分子は入ることのできないポリマーゲルの半固体ビーズでカラムを充填する。タンパク質組成物をカラムの一番上にアプライすると、コンパクトな折りたたまれたタンパク質(すなわち非凝集タンパク質)は、大きなタンパク質凝集体にとって利用可能なものよりも体積の大きい溶媒に分散する。結果的に、大きな凝集体の方がカラム内を速く移動し、この方法によって混合物を分離し、その成分に分画することができる。各画分は(例えば光散乱)によって、ゲルからの溶出時に別に定量化し得る。したがって、組成物の凝集%は、画分の濃度をゲルにアプライしたタンパク質の全体濃度と比較することによって決定し得る。安定な組成物は、本質的に単一画分としてカラムから溶出し、ならびに溶出プロファイルまたはクロマトグラムにおいて本質的に単一のピークを示す。

【0166】

c) 結合親和性

組成物の安定性は、その標的結合親和性を決定することにより評価し得る。結合親和性を決定する方法として、多種多様な方法が当該分野で知られている。結合親和性の決定方法の一例は、表面プラズモン共鳴法を使用する。表面プラズモン共鳴は、例えば、BIAcore

system (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.)を用いることによって、バイオセンサーマトリクス中のタンパク質の濃度を検出することで、生体特異的な相互作用をリアルタイムで解析することを可能にする、光学的な現象である。さらなる記載については、Jonsson, U., et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26; Jonsson, U., et al. (1991) Biotechniques 11:620-627; Johnsson, B., et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131; および Johnsson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198:268-277を参照のこと。

【0167】

局面の一において、CARの抗原結合ドメインは、本明細書に記載の抗原結合ドメインアミノ酸配列と相同なアミノ酸配列を含み、該抗原結合ドメインは、本明細書に記載の抗EGFRvIII抗体断片の所望の機能性を維持している。特異的な局面の一において、本発明のCAR組成物は抗体断片を含む。さらなる局面において、該抗体断片はscFvを含む。

10

【0168】

種々の局面において、CARの抗原結合ドメインは、可変領域の1つまたは両方(例えばVHおよび/またはVL)、例えば1つ以上のCDR領域および/または1つ以上のフレームワーク領域中の1つ以上のアミノ酸を変更することにより操作される。特異的な一局面において、本発明のCAR組成物は抗体断片を含む。さらなる局面において該抗体断片はscFvを含む。

【0169】

本発明の抗体または抗体断片が、アミノ酸配列において(例えば野生型から)変わっているが、所望の活性については変わらないようにさらに変更されていてよいことは、当業者には理解されることである。例えば、「非必須」のアミノ酸残基の置換を引き起こす付加的なヌクレオチド置換が該タンパク質で起こっていてよい。例えば、分子中の非必須アミノ酸残基は、同一側鎖ファミリーの他のアミノ酸残基で置換されていてよい。他の態様において、一連のアミノ酸は、例えば保存性置換のように、側鎖ファミリーメンバーの順番および/または組成が異なる、構造が類似した一連のアミノ酸によって置換されていてよく、ここで、アミノ酸残基は、類似の側鎖を有するアミノ酸残基によって置換されていてよい。

20

【0170】

同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当該分野で定義されている。例えば、塩基性側鎖(例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖(例えばアスパラギン酸、グルタミン酸)、非電荷極性側鎖(例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖(例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、分枝側鎖(例えばスレオニン、バリン、イソロイシン)および芳香族性側鎖(例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)である。

30

【0171】

2つ以上の核酸またはポリペプチド配列間の%同一は、同一である2つ以上の配列について言われる。比較ウィンドウで、一致する部分が最大になるように比較および配列させるか、または以下に示す配列比較アルゴリズムの1つを用いてもしくは手動で配列させて視覚的に検査することにより領域を指定したときに、2つの配列が、同じアミノ酸残基またはヌクレオチドを特定の%で有する場合(例えば、特定の領域について、またはとくにことわらない限りは配列全体について60%同一、または70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一であってもよい)、該配列は「実質的に同一」である。該同一性は、少なくとも約50ヌクレオチド(または10アミノ酸)の長さの領域についてのものであってよく、より好ましくは100~500または1000以上のヌクレオチド(または20、50または200以上のアミノ酸)の長さの領域についてのものである。

40

【0172】

配列比較のためには、典型的に、1つの配列が参照配列となり、試験配列は参照配列に対して比較される。配列比較アルゴリズムを用いる場合は、試験配列および参照配列をコ

50

ンピューターに打ち込み、必要であれば、サブシーケンス座標 (subsequence coordinates) を指定し、さらに配列アルゴリズムプログラムパラメーターを指定する。初期設定のプログラムパラメーターを用いても、または他のパラメーターを指定してもよい。その後、配列比較アルゴリズムによって、プログラムパラメーターに基づいて、参照配列に対する試験配列の%配列同一性が算出される。比較のための配列アラインメントの方法は、当該分野でよく知られている。比較のための最適な配列アラインメントは、例えば、Smith and Waterman, (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c記載の局所的相同性(local homology) アルゴリズム、Needleman and Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48:443記載の相同性アラインメントアルゴリズム、Pearson and Lipman, (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444記載の類似性探索方法、これらのアルゴリズムのコンピューターによる実行 (Wisconsin Genetics Software Package中のGAP, BESTFIT, FASTAおよびTFasta (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI))または手動アラインメントおよび視覚的な検査(例えば、Brent et al., (2003) Current Protocols in Molecular Biology参照)により行い得る。

10

【 0 1 7 3 】

%配列同一性および配列類似性を決定するのに適当なアルゴリズムの2つの例は、BLASTおよびBLAST 2.0アルゴリズムであり、これらはAltschul et al., (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402;およびAltschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410にそれぞれ記載されている。BLAST解析を行うためのソフトウェアは、国立生物工学情報センター(National Center for Biotechnology Information)により利用可能なように公開されている。

20

【 0 1 7 4 】

また、2つのアミノ酸配列間の%同一性は、ALIGN program (version 2.0)に組み込まれているE. Meyers and W. Miller, (1988) Comput. Appl. Biosci. 4:11-17に記載のアルゴリズムを用いて、PAM120 weight residue table、gap length penalty 12およびgap penalty 4を用いて決定してもよい。さらに、2つのアミノ酸配列間の%同一性を、GCG software package (www.gcg.comより入手可能)のGAPプログラムに組み込まれているNeedleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:444-453) アルゴリズムを用いて、Blossom 62 matrixまたはPAM250 matrixのいずれか、およびgap weight : 16、14、12、10、8、6または4およびlength weight : 1、2、3、4、5または6を用いて決定してもよい。

30

【 0 1 7 5 】

局面の一において、本発明は、機能的に等価な分子を生成させる、開始抗体または断片(例えばscFv)の変更を考慮する。例えば、CARに含まれる抗EGFRvIII結合ドメイン、例えばscFvのVHまたはVLは、該抗EGFRvIII結合ドメイン、例えばscFvの開始VHまたはVLフレームワーク領域と少なくとも約70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の同一性が維持されるように変更されていてよい。本発明は、機能的に等価な分子を生成するためのCARコンストラクト全体の変更、例えばCARコンストラクトの種々のドメインにおける1つ以上のアミノ酸配列の変更を考慮している。該CARコンストラクトは、開始CARコンストラクトの少なくとも約70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の同一性が維持されるように変更されていてよい。

40

【 0 1 7 6 】

膜貫通ドメイン

膜貫通ドメインに関して、種々の態様において、CARは、CARの細胞外ドメインに結合する膜貫通ドメインを含むように設計されていてよい。膜貫通ドメインは、該膜貫通ドメインに隣接する1個以上の付加的なアミノ酸、例えば該膜貫通領域が由来するタンパク質の細胞外領域に結合する1個以上のアミノ酸(例えば細胞外領域の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10~15個のアミノ酸) および/または該膜貫通タンパク質が由来するタンパク質の細胞内領域に結合する1個以上の付加的なアミノ酸(例えば細胞内領域の1、2、3、4、5、6、7

50

、8、9、10～15個のアミノ酸)を含んでいてよい。局面の一において、該膜貫通ドメインは、使用するCARの他のドメインの1つに結合するものである。いくつかの態様において、膜貫通ドメインは、該ドメインが、同じまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインに結合するのを避けるため、例えば受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小化するために、選択またはアミノ酸置換による変更を受けていてよい。局面の一において、膜貫通ドメインは、CART細胞表面の他のCARとホモ二量体を形成することができる。他の局面において、膜貫通ドメインのアミノ酸配列は、同一CART中に存在する天然の結合パートナーの結合ドメインとの相互作用を最小化するために、変更または置換を受けていてよい。

【0177】

膜貫通ドメインは、天然由来であっても組換え由来であってもよい。入手源が天然のものである場合、該ドメインは、任意の膜結合または膜貫通タンパク質由来であってもよい。局面の一において、該膜貫通ドメインは、CARが標的に結合さえすれば、細胞内ドメインにシグナルを伝えることができる。本発明の特定の用途の膜貫通ドメインは、少なくとも、膜貫通領域、例えば、T細胞受容体の鎖、鎖または鎖、CD28、CD3、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154の膜貫通領域を含んでいてよい。

【0178】

いくつかの態様において、膜貫通ドメインは、CARの細胞外領域、例えばCARの抗原結合ドメインに、ヒンジ、例えばヒトタンパク質由来のヒンジを介して結合していてよい。例えば、態様の一において、該ヒンジはヒトIg（免疫グロブリン）ヒンジ、例えばIgG4ヒンジまたはCD8ヒンジであってもよい。態様の一において、該ヒンジまたはスペーサーは、配列番号14のアミノ酸配列を含む（例えば、該配列からなる）。局面の一において、膜貫通ドメインは、配列番号15の膜貫通ドメインを含む（例えば、該膜貫通ドメインからなる）。

【0179】

局面の一において、ヒンジまたはスペーサーは、IgG4ヒンジを含む。例えば、態様の一において、該ヒンジまたはスペーサーは次のアミノ酸配列のヒンジを含む：

ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKM（配列番号104）。いくつかの態様において、該ヒンジまたはスペーサーは次のヌクレオチド配列にコードされるヒンジを含む：

GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCCGAGTTCCTGGGCGGACCCAGCGTGTTCTGTTCCCCC
CAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCCG
AGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGGGAGGAGCAGTTCAATAGC
ACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGTAAGGTGTCCAA
CAAGGGCTGCCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGC
CCCCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCC
GTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTT
CCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCC
TGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG（配列番号105）。

【0180】

局面の一において、該ヒンジまたはスペーサーはIgDヒンジを含む。例えば、態様の一において、該ヒンジまたはスペーサーは次のアミノ酸配列のヒンジを含む： RWPEPKAQASVPTAQPAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLDKAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVCTLNHPSLPQRLMALREPAAQAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPPQGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSIVTDH（配列番号106）。いくつかの態様において、該ヒンジまたはスペーサーは、次のヌクレオチド配列にコードされるヒンジを含む：

AGGTGGCCCGAAAGTCCCAAGGCCAGGCATCTAGTGTTCCTACTGCACAGCCCCAGGCAGAAGGCAGCCTAGCCAAAGC
TACTACTGCACCTGCCACTACGCGCAATACTGGCCGTGGCGGGGAGGAGAAGAAAAAGGAGAAAGAGAAAGAAGAACAGG
AAGAGAGGGAGACCAAGACCCCTGAATGTCCATCCCATACCCAGCCGCTGGGCGTCTATCTCTTGACTCCCGCAGTACAG
GACTTGTGGCTTAGAGATAAGGCCACCTTTACATGTTTCGTGCTGGGCTCTGACCTGAAGGATGCCCATTTGACTTGGGA
GGTTGCCGAAAGGTACCCACAGGGGGGTTGAGGAAGGGTTGCTGGAGCGCCATTCCAATGGCTCTCAGAGCCAGCACT
CAAGACTCACCTTCCGAGATCCCTGTGGAACGCCGGGACCTCTGTACATGTACTCTAAATCATCCTAGCCTGCCCCCA
CAGCGTCTGATGGCCCTTAGAGAGCCAGCCGCCAGGCACCAAGCTTAGCCTGAATCTGCTCGCCAGTAGTGATCC
CCCAGAGGCCGCCAGCTGGCTCTTATGCGAAGTGTCGGCTTTAGCCCGCCCAACATCTTGCTCATGTGGCTGGAGGACC
AGCGAGAAGTGAACACCAGCGGCTTCGCTCCAGCCCGGGCCCCACCCAGCCGGGTTCTACCACATTCTGGGCCTGGAGT
GTCTTAAGGGTCCCAGCACCACTAGCCCCAGCCAGCCACATACACCTGTGTTGTGTCCCATGAAGATAGCAGGACCCT
GCTAAATGCTTCTAGGAGTCTGGAGGTTTCCTACGTGACTGACCATT (配列番号107)。

10

【0181】

局面の一において、該膜貫通ドメインは、組み換えられたものであってもよく、この場合、該ドメインは、疎水性残基、例えばロイシンおよびバリンを主に含む。局面の一において、フェニルアラニン、トリプトファンおよびバリンのトリプレットが、組換え膜貫通ドメインの両端に見られることもある。

【0182】

また、短いオリゴまたはポリペプチドリinker、例えば2~10アミノ酸の長さのリンカーは、CARの膜貫通ドメインおよび細胞質領域間に結合を形成し得る。グリシン - セリンダブレットが、適当なリンカーの例である。例えば、局面の一において、該リンカーは、アミノ酸配列GGGSGGGGS (配列番号108)を含む。いくつかの態様において、該リンカーは、核酸配列GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC (配列番号109)にコードされる。

20

【0183】

細胞質ドメイン

CARの細胞質ドメインまたは領域は、細胞内シグナル伝達ドメインを含む。細胞内シグナル伝達ドメインは一般的に、該CARが導入される免疫細胞の正常なエフェクター機能の少なくとも1つの活性化に重要である。「エフェクター機能」という語は、細胞の特有の機能を指す。T細胞のエフェクター機能は、例えば、細胞溶解活性またはヘルパー活性、例えばサイトカインの分泌であり得る。したがって、「細胞内シグナル伝達ドメイン」という語は、エフェクター機能シグナルを伝達し、該細胞に特有の機能を果たさせるタンパク質の一部を指す。細胞内シグナル伝達ドメインは通常は全体を使用し得るが、鎖の全体を用いる必要はない場合も多い。該細胞内シグナル伝達ドメインの切断部分が用いられる程度において、該切断型部分は、エフェクター機能シグナルを伝達できる限り、インタクトなドメインの代わりに使用してよい。したがって、細胞内シグナル伝達ドメインという語は、エフェクター機能シグナルを伝達するのに十分な該細胞内シグナル伝達ドメインの任意の切断部分を含むことを意図する。

30

【0184】

本発明のCARに用いるための細胞内シグナル伝達ドメインの例としては、T細胞受容体(TCR)、および協調して作用し、抗原受容体の結合後のシグナル伝達を開始させる共受容体の細胞質配列、ならびにこれらの配列の誘導体またはバリエーションおよび同じ機能性を有する任意の組換え配列が挙げられる。

40

【0185】

TCRを介して生成されたシグナルだけでは、T細胞の完全な活性化には不十分であり、二次および/または同時刺激シグナルが必要であることが知られている。したがって、T細胞活性化は、2つの異なるクラスの連続した細胞質シグナル伝達、すなわちTCRを介した抗原依存性の一次活性化を開始させるシグナル伝達(一次細胞内シグナル伝達ドメイン)および抗原に依存せずに作用し、二次または同時刺激シグナルを供給するシグナル伝達(二次細胞質シグナル伝達ドメイン、例えば同時刺激ドメイン)を介しているといえる。

【0186】

一次シグナル伝達ドメインは、TCR複合体の一次活性化を刺激または阻害のいずれかに

50

よって制御する。刺激作用を有する一次細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫受容活性化チロシンモチーフまたはITAMとして知られているシグナル伝達モチーフを含んでいてよい。

【0187】

本発明で特に用いる、ITAM含有一次細胞内シグナル伝達ドメインの例としては、TCR、FcR、FcR、CD3、CD3、CD3、CD5、CD22、CD79a、CD79bおよびCD66dの該ドメインが挙げられる。態様の一において、本発明のCAR、例えば配列番号43、配列番号49、配列番号55、配列番号61、配列番号67、配列番号73、配列番号79および配列番号85からなる群から選択されるCARは、細胞内シグナル伝達ドメイン、例えばCD3の一次シグナル伝達ドメインを含む。態様の一において、一次シグナル伝達ドメインは、修飾ITAMドメイン、例えば、天然のITAMドメインと比較して活性が変化した（例えば上昇したかまたは低下した）変異ITAMドメインを含む。態様の一において、一次シグナル伝達ドメインは、修飾ITAM含有一次細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば最適化および/または切断型ITAM含有一次細胞内シグナル伝達ドメインを含む。態様の一において、一次シグナル伝達ドメインは、1つ以上、2つ以上、3つ以上または4つ以上のITAMモチーフを含む。

10

【0188】

CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3シグナル伝達ドメインを単独で含んでいても、または本発明のCARに有用な他の所望の細胞内シグナル伝達ドメインと結合していてもよい。例えば、CARの該細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3鎖部分と同時刺激シグナル伝達ドメインとを含んでいてよい。同時刺激シグナル伝達ドメインは、同時刺激分子の細胞内ドメインを含む、CARの一部を指す。同時刺激分子は、抗原受容体またはそのリガンド以外の、リンパ球の抗原に対する効率的な応答に必要な細胞表面分子である。該分子の例としては、CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3および、CD83に特異的に結合するリガンド等が挙げられる。例えば、CD27の同時刺激は、ヒトCART細胞の試験管内での増殖、エフェクター機能および生存を上昇させることが示されており、生体内でのヒトT細胞持続および抗腫瘍活性を増強することが示されている (Song et al. Blood. 2012; 119(3):696-706)。

20

【0189】

本発明のCARの細胞質部分中の細胞内シグナル伝達配列を、ランダムにまたは特定の順番で互いに連結させてもよい。場合によっては、短いオリゴもしくはペプチドリンカー、例えば長さ2~10アミノ酸（例えば2、3、4、5、6、7、8、9または10アミノ酸）のリンカーが、細胞内シグナル伝達配列間の連結を形成していてもよい。態様の一において、グリシン-セリンダブレットを適当なリンカーとして用いてよい。態様の一において、単一のアミノ酸、例えばアラニン、グリシンを適当なリンカーとして用いてよい。

30

【0190】

局面の一において、細胞内シグナル伝達ドメインは、2つ以上、例えば2つ、3つ、4つ、5つまたはそれ以上の同時刺激シグナル伝達ドメインを含むように設計される。態様の一において、該2つ以上、例えば2、3、4、5つまたはそれ以上の同時刺激ドメインは、リンカー分子、例えば本明細書に記載のリンカー分子により分離されていてもよい。態様の一において、該細胞内シグナル伝達ドメインは、2つの同時刺激シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの態様において、該リンカー分子はグリシン残基である。いくつかの態様において、該リンカーはアラニン残基である。

40

【0191】

局面の一において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3のシグナル伝達ドメインおよびCD28のシグナル伝達ドメインを含むように設計される。局面の一において、該細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3のシグナル伝達ドメインおよび4-1BBのシグナル伝達ドメインを含むように設計される。局面の一において、4-1BBのシグナル伝達ドメインは、配列番号16のシグナル伝達ドメインである。局面の一において、CD3のシグナル伝達ドメインは、配列番号17のシグナル伝達ドメインである。

50

【0192】

局面の一において、該細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3- のシグナル伝達ドメインおよびCD27のシグナル伝達ドメインを含む様に設計される。局面の一において、CD27のシグナル伝達ドメインは、次のアミノ酸配列：QRRKYRSNKGESPVPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP（配列番号102）を含む。局面の一において、CD27のシグナル伝達ドメインは、次の核酸配列：AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC（配列番号103）によってコードされる。

【0193】

局面の一において、本明細書に記載のCAR-発現細胞は、第二のCAR、例えば同じ標的(EGFRvIII)または異なる標的に対する異なる抗原結合ドメインを含む、第二CARをさらに含んでいてよい。

10

【0194】

他の局面において、本発明は、CAR発現細胞、例えばCART細胞の集団を提供する。いくつかの態様において、CAR発現細胞集団は、異なるCARを発現する細胞の混合物を含む。例えば、態様の一において、CART細胞の集団は、本明細書に記載の抗EGFRvIII結合ドメインを有するCARを発現する第一細胞および異なる抗EGFRvIII結合ドメイン、例えば、第一細胞が発現するCARの抗EGFRvIII結合ドメインとは異なる本明細書に記載の抗EGFRvIII結合ドメインを有するCARを発現する第二細胞を含んでいてよい。他の例として、CAR発現細胞の集団は、抗EGFRvIII結合ドメイン、例えば本明細書に記載の抗EGFRvIII結合ドメインを含むCARを発現する第一細胞およびEGFRvIIIとは異なる標的に対する抗原結合ドメインを含むCARを発現する第二細胞を含んでいてよい。態様の一において、CAR発現細胞の集団は、例えば、一次細胞内シグナル伝達ドメインを含むCARを発現する第一細胞および二次シグナル伝達ドメインを含むCARを発現する第二細胞を含む。

20

【0195】

他の局面において、本発明は、集団中の少なくとも1つの細胞が、本明細書に記載の抗EGFRvIIIドメインを有するCARを発現する細胞集団であって、他の物質、例えばCAR発現細胞の活性を上昇させる物質を発現する第二細胞を含む、細胞集団を提供する。例えば、態様の一において、該物質は、阻害分子を阻害する物質であってよい。阻害分子、例えばPD1は、いくつかの態様において、CAR-発現細胞の免疫エフェクター応答の開始能を低下させ得る。阻害分子の例としては、PD1、PD-L1、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4およびTGFR が挙げられる。

30

【0196】

RNA遺伝子導入

試験管内で転写されるRNA CARの作製方法を本明細書に記載する。本発明はまた、細胞に直接導入できる、CARをコードするRNAコンストラクトを提供する。導入に用いるmRNAの作製方法は、特別に設計したプライマーを用いたテンプレートの試験管内転写(IVT)の後にポリA付加を行い、3'および5'非翻訳配列(「UTR」)、5'キャップおよび/または配列内リボソーム進入部位(IRES)、発現する核酸配列、およびポリAテールを含む、典型的に50-2000塩基の長さのコンストラクトを作製する(配列番号116)ことを含んでいてよい。このように作製したRNAは、種々の細胞に効率的に導入することができる。局面の一において、該テンプレートは、CARのための配列を含む。

40

【0197】

局面の一において、該EGFRvIII CARは、メッセンジャーRNA(mRNA)にコードされている。局面の一において、EGFRvIII CARをコードするmRNAが、CART細胞作製のためにT細胞に導入される。

【0198】

態様の一において、一過性遺伝子導入の一形態として、試験管内転写されたRNA CARを細胞に導入してよい。該RNAは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により作製されたテンプレートを用いた試験管内転写により作製される。任意の入手源由来の所望のDNAを、PCRによ

50

て、適当なプライマーおよびRNAポリメラーゼを用いた試験管内mRNA合成用のテンプレートに直接変換し得る。DNAの入手源は、例えば、ゲノムDNA、プラスミドDNA、ファージDNA、cDNA、合成DNA配列または他の適当な任意のDNA源であってよい。試験管内転写用の望ましいテンプレートは、本発明のCARである。例えば、RNA CARのテンプレートは、抗腫瘍抗体の一本鎖可変領域を含む細胞外領域；ヒンジ領域、膜貫通ドメイン（例えばCD8aの膜貫通ドメイン）；および細胞内シグナル伝達ドメイン、例えばCD3 のシグナル伝達ドメインおよび4-1BBのシグナル伝達ドメインを含む細胞質領域を含む。

【0199】

態様の一において、PCRに用いるDNAは、オープンリーディングフレームを含む。該DNAは生物のゲノム由来の天然起源のDNA由来であってよい。態様の一において、該核酸は、5' および/または3' 非翻訳領域(UTR)をいくつかまたは全て含んでいてよい。該核酸は、エキソンおよびイントロンを含んでいてよい。態様の一において、PCRに用いるDNAはヒト核酸配列である。他の態様において、PCRに用いるDNAは、5' および3' UTRを含むヒト核酸配列である。該DNAはあるいは、天然の生物体では通常発現しない、人工DNA配列であってもよい。人工DNA配列の例は、遺伝子の一部がつながり合わされ、融合タンパク質をコードするオープンリーディングフレームを形成するDNAである。つながり合わされたDNAの部分は、単一の生物または2以上の生物由来であってよい。

【0200】

PCRは、遺伝子導入に用いるmRNAの試験管内転写用テンプレートを作製するのに用いられる。PCRを行う方法は当該分野でよく知られている。PCRに用いるプライマーは、PCRのテンプレートとして用いるDNAの領域に実質的に相補である領域を有するように設計される。本明細書において、「実質的に相補」であるとは、プライマー配列の塩基の大部分または全てが相補的であるか、または1以上の塩基が非相補的であるかまたはミスマッチであるヌクレオチド配列を指す。実質的に相補的な配列は、意図するDNA標的と、PCRで用いるアニーリング条件下で、アニーリングまたはハイブリダイズすることができる。該プライマーは、DNAテンプレートのどの部分と実質的に相補的になるように設計してもよい。例えば、該プライマーは、5' および3' UTRを含む、通常細胞中で転写される核酸（オープンリーディングフレーム）の一部を増幅するように設計してよい。該プライマーは、また、所望の特定のドメインをコードする核酸部分を増幅するように設計してもよい。態様の一において、該プライマーは、ヒトcDNA、例えば5' および3' UTRの全てまたは一部を含むヒトcDNAのコード領域を増幅するように設計される。PCRに有用なプライマーは、当該分野でよく知られている合成方法により作製し得る。「フォワードプライマー」は、増幅するDNA配列の上流のDNAテンプレート上のヌクレオチドに実質的に相補的であるヌクレオチド領域を含むプライマーである。本明細書において、「上流」は、コーディング鎖に対して増幅するDNA配列の5' 側の部位を指す。「リバースプライマー」は、増幅するDNA配列の下流にある二本鎖DNAテンプレートに実質的に相補的なヌクレオチド領域を含むプライマーである。本明細書において、「下流」という語は、コーディング鎖に対して、増幅するDNA配列の3' 側部位を指すのに用いる。

【0201】

PCRに有用な任意のDNAポリメラーゼは、本明細書中に記載する方法で用いてよい。反応薬およびポリメラーゼは、多数の供給源から市販されている。

【0202】

安定性および/または翻訳効率を促進することのできる化学構造を用いてもよい。該RNAは、5' および3' UTRを有するのが好ましい。態様の一において、5' UTRは、1~3000 ヌクレオチドの長さである。コード領域に付加する5' および3' UTR配列の長さは、異なる方法、例えば非限定的な例としては、UTRの異なる領域にアニーリングするPCR用プライマーを設計することによって変化し得る。この方法を用いることで、当業者は、転写されたRNAの遺伝子導入後に、最適な翻訳効率を達成するのに必要な5' および3' UTRの長さを変更し得る。

【0203】

5' および3' UTRは、天然起源の、所望の核酸の内在性5' および3' UTRであってよい。あるいは、所望の核酸に内在するものではないUTR配列を、フォワードおよびリバースプライマーへの挿入またはテンプレートへの他の任意の修飾によって付加してよい。所望の核酸に対して内在性ではないUTR配列を用いることは、RNAの安定性および/または翻訳効率を変化させるのに有用であり得る。例えば、3' UTR配列中のAUに富んだエレメントは、mRNAの安定性を低下させ得ることが知られている。したがって、3' UTRは、当業者によく知られたUTRの性質に基づいて、転写されたRNAの安定性を上昇させるように選択または設計してよい。

【0204】

態様の一において、5' UTRは、内在性核酸のコザック配列を含んでいてよい。あるいは、所望の核酸に内在しない5' UTRを上述のようにPCRによって付加した場合、5' UTR配列を付加することによりコンセンサスコザック配列を再設計してもよい。コザック配列は、RNA転写物の翻訳効率を上昇させ得るが、全てのRNAにおいて効率的な翻訳が可能になるのに必要であるとは考えられていない。多くのmRNA配列について、コザック配列が必要であることが当該分野で知られている。他の態様において、5' UTRは、RNAゲノムが細胞中で安定であるRNAウイルスの5' UTRであってよい。他の態様において、mRNAのエキソヌクレアーゼによる分解を阻害するために、種々のヌクレオチド類似体を3' または5' UTRにおいて用いてよい。

【0205】

遺伝子クローニングの必要のない、DNAテンプレートからのRNAの合成を可能にするためには、転写プロモーターを、転写する配列の上流のDNAテンプレートに結合させなければならない。RNAポリメラーゼに対してプロモーターとして機能する配列をフォワードプライマーの5' 末端に付加すると、該RNAポリメラーゼプロモーターは、転写されるオープンリーディングフレームのPCR産物の上流に取り込まれる。好ましい態様の一において、該プロモーターは、本明細書中に記載する、T7ポリメラーゼプロモーターである。他の有用なプロモーターとしては、T3およびSP6 RNAポリメラーゼプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。T7、T3およびSP6プロモーターのコンセンサスヌクレオチド配列は、当該分野で公知である。

【0206】

好ましい態様において、mRNAは、細胞中でリボソーム結合、翻訳開始およびmRNAの安定性を決定づける5' 末端のキャップおよび3' ポリ(A) テールの両方を有する。環状DNAテンプレート例えば、プラスミドDNA上では、RNAポリメラーゼは真核細胞での発現には適当ではない長いコンカテマー産物を産生する。3' UTRの末端で直鎖化したプラスミドDNAの転写により、転写後にポリアデニル化しても真核細胞の遺伝子導入に有効ではない通常の大きさのmRNAが得られる。

【0207】

直鎖DNAテンプレート上で、ファージT7 RNAポリメラーゼは、該テンプレートの最後の塩基よりさらに転写物の3' 末端を延長させることができる(Schenborn and Mierendorf, Nuc Acids Res., 13:6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, Eur. J. Biochem., 270:1485-65 (2003))。

【0208】

ポリA/T伸張をDNAテンプレートに組み込む慣用的な方法は、分子クローニングである。しかし、プラスミドDNAに組み込まれたポリA/T配列は、プラスミドの不安定化を引き起こす可能性があり、バクテリア細胞から得たプラスミドDNAのテンプレートが、しばしば欠失および他の異常で非常に汚染されているのは、このためである。このため、クローニング手法は手間と時間がかかるだけでなく、信頼性がないことがしばしばである。ポリA/T 3' 伸張を含むDNAテンプレートをクローニングせずに構築することのできる方法に対する要望が高いのはこのためである。

【0209】

転写DNAテンプレートのポリA/Tセグメントは、ポリTテール、例えば100Tテール(配列番

10

20

30

40

50

号117) (サイズが50~5000のTであってよい (配列番号118))を含むリバースプライマーを用いたPCRにより作製するか、または他の任意の方法、例えば非限定的な例としてはDNA連結または試験管内の組換えにより、PCR後に作製してよい。ポリ(A)テールはまた、RNAに安定性を与え、分解を低下させる。一般的に、ポリ(A) テールの長さは転写されたRNAの安定性と正に相関する。態様の一において、ポリ(A)テールは、100~5000個のアデノシンである(配列番号119)。

【0210】

RNAのポリ(A) テールは、ポリ(A) ポリメラーゼ、例えば大腸菌(*E. coli*) ポリAポリメラーゼ(E-PAP)を用いた試験管内転写によりさらに伸張し得る。態様の一において、ポリ(A) テールの長さを100ヌクレオチドから約300~400ヌクレオチド (配列番号120) に上げる
10
ことにより、該RNAの翻訳効率が約2倍上昇する。さらに、3'末端に異なる化学基を結合することによって、mRNA安定性が上昇し得る。該結合物は、修飾/人工ヌクレオチド、アパタマーおよび他の化合物を含んでいてよい。例えば、ATP類似体をポリ(A)ポリメラーゼを用いてポリ(A) テールに組み込んでよい。ATP類似体はさらに、RNAの安定性を上昇させ得る。

【0211】

5'キャップもまた、RNA分子に安定性を与え得るものである。好ましい態様において、本明細書に記載の方法により作製されたRNAは5'キャップを含む。該5'キャップは、当該分野で公知の方法であり、本明細書に記載されている技術によって得られる(Cougot, et al., Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., RNA, 7:146
20
8-95 (2001); Elango, et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005))。

【0212】

本明細書に記載の方法により作製したRNAは、配列内リボソーム進入部位(IRES)配列を含んでいてもよい。該IRES配列は、キャップ非依存性のmRNAへのリボソーム結合を開始させ、転写開始を促進する、任意のウイルス性、染色体性または人工的に設計した配列であってよい。細胞のエレクトロポレーションに適した任意の溶質もまた含まれてよく、これらは、細胞透過性および生存性を促進する因子、例えば糖、ペプチド、脂質、タンパク質、抗酸化剤および界面活性剤を含んでいてよい。

【0213】

RNAは、多数の異なる方法のうち任意の方法、例えば、市販されている方法、例えば非限定的な例としてはエレクトロポレーション(Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems, Cologne, Germany))、(ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.)またはGene Pulser II (BioRad, Denver, Colo.)、Multiporator (Eppendorf, Hamburg Germany)、リポフェクションを用いたカチオン性リボソーム介在性遺伝子導入、ポリマーカプセル封入、ペプチド介在性遺伝子導入または微粒子銃粒子送達系、例えば「遺伝子銃(gene gun)」(例えば、Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12(8):861-70 (2001)参照)によって
30
標的細胞に導入し得る。

【0214】

CARをコードする核酸コンストラクト

本発明は、本発明に記載の、1つ以上のCARコンストラクトをコードする核酸分子を提供する。局面の一において、該核酸分子はメッセンジャーRNA転写物として提供される。局面の一において、該核酸分子はDNAコンストラクトとして提供される。

【0215】

したがって、局面の一において、本発明は、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする単離核酸分子に関し、ここで、該CARは、抗EGFRvIII結合ドメイン (例えばヒト化抗EGFRvIII結合ドメイン)、膜貫通ドメインおよび、同時刺激ドメイン、例えば同時刺激シグナル伝達ドメインおよび/または一次シグナル伝達ドメイン、例えば 鎖を含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む。態様の一において、該抗EGFRvIII結合ドメインは、本明細書に記載の抗EGFRvIII結合ドメイン、例えば配列番号38、配列番号44、配列番号50、配列番号56、
50

配列番号62、配列番号68、配列番号74および配列番号80からなる群から選択される配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む抗EGFRvIII結合ドメインである。態様の一において、該単離核酸分子はさらに、同時刺激ドメインをコードする配列を含む。態様の一において、該同時刺激ドメインは、OX40、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)および4-1BB (CD137)からなる群から選択されるタンパク質の機能性シグナル伝達ドメインである。態様の一において、該同時刺激ドメインは、配列番号16の配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。態様の一において、膜貫通ドメインは、T鎖受容体の鎖、鎖または鎖、CD28、CD3、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137およびCD154からなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインである。態様の一において、該膜貫通ドメインは、配列番号15の配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。態様の一において、該細胞内シグナル伝達ドメインは、4-1BBの機能性シグナル伝達ドメインおよびCD3の機能性シグナル伝達ドメインを含む。態様の一において、該細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号16または配列番号102の配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列、ならびに配列番号17または配列番号99の配列、またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含み、ここで、該細胞内シグナル伝達ドメインを含む配列は、同一フレーム中で、単一ポリペプチド鎖として発現する。態様の一において、該抗EGFRvIII結合ドメインは、ヒンジ領域、例えば本明細書に記載のヒンジを介して、膜貫通ドメインに結合している。態様の一において、該ヒンジ領域は、配列番号14または配列番号104または配列番号106または配列番号108の配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。

【0216】

他の局面において、本発明は、配列番号13のリーダー配列、配列番号38、配列番号44、配列番号50、配列番号56、配列番号62、配列番号68、配列番号74、配列番号80および配列番号86からなる群から選択される配列（またはそれと95～99%の同一性を有する配列）を有するscFvドメイン、配列番号14または配列番号104または配列番号106または配列番号108（またはそれと95～99%の同一性を有する配列）のヒンジ領域、配列番号15の配列（またはそれと95～99%の同一性を有する配列）を有する膜貫通ドメイン、配列番号16の配列を有する4-1BB同時刺激ドメインまたは配列番号102の配列（またはそれと95～99%の同一性を有する配列）を有するCD27同時刺激ドメインおよび配列番号17または配列番号99（またはそれと95～99%の同一性を有する配列）を有するCD3 同時刺激ドメインを含むCARコンストラクトをコードする単離核酸分子に関する。

【0217】

他の局面において、本発明は、該核酸分枝にコードされる単離ポリペプチド分子に関する。態様の一において、該単離ポリペプチド分子は、配列番号43、配列番号49、配列番号55、配列番号61、配列番号67、配列番号73、配列番号79、配列番号85および配列番号90からなる群から選択される配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。態様の一において、単離ポリペプチドは、配列番号73の配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。態様の一において、単離ポリペプチドは、配列番号79の配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。

【0218】

他の局面において、本発明は、抗EGFRvIII結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび、刺激ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体(CAR)分子をコードする核酸分子に関し、ここで、該抗EGFRvIII結合ドメインは、配列番号38、配列番号44、配列番号50、配列番号56、配列番号62、配列番号68、配列番号74、配列番号80および配列番号86からなる群から選択されるか、またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。

【0219】

態様の一において、コードされたCAR分子はさらに、同時刺激ドメインをコードする配列を含む。態様の一において、該同時刺激ドメインは、OX40、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)および4-1BB (CD137)からなる群から選択されるタンパク質の機能

性シグナル伝達ドメインである。態様のーにおいて、同時刺激ドメインは、配列番号16の配列を含む。態様のーにおいて、膜貫通ドメインは、T細胞受容体の鎖、鎖または鎖、CD28、CD3、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137およびCD154からなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインである。態様のーにおいて、膜貫通ドメインは、配列番号15の配列を含む。態様のーにおいて、細胞内シグナル伝達ドメインは、4-1BBの機能性シグナル伝達ドメインおよびの機能性シグナル伝達ドメインを含む。態様のーにおいて、該細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号16の配列および配列番号17の配列を含み、ここで、該細胞内シグナル伝達ドメインを含む配列は、同一フレーム中で、単一ポリペプチド鎖として発現する。態様のーにおいて、抗EGFRvIII結合ドメインは、ヒンジ領域によって膜貫通ドメインに連結している。態様のーにおいて、該ヒンジ領域は、配列番号14を含む。態様のーにおいて、該ヒンジ領域は、配列番号104または配列番号106または配列番号108の配列を含む。

10

【0220】

他の局面において、本発明は、配列番号13のリーダー配列、配列番号38、配列番号44、配列番号50、配列番号56、配列番号62、配列番号68、配列番号74、配列番号80および配列番号86からなる群から選択される配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を有するscFvドメイン、配列番号14または配列番号104または配列番号106または配列番号108のヒンジ領域、配列番号15の配列を有する膜貫通ドメイン、配列番号16の配列を有する4-1BB同時刺激ドメインまたは配列番号102の配列を有するCD27同時刺激ドメインならびに配列番号17または配列番号99を有するCD3刺激ドメインを含む、コードされたCAR分子に関する。態様のーにおいて、コードされたCAR分子は、配列番号43、配列番号49、配列番号55、配列番号61、配列番号67、配列番号73、配列番号79、配列番号85および配列番号90からなる群から選択される配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。態様のーにおいて、コードされたCAR分子は、配列番号73の配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。態様のーにおいて、単離CAR分子は、配列番号79の配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。

20

【0221】

所望の分子をコードする核酸配列は、当該分野で知られている組換え方法、例えば、標準的な技術を用いた、該遺伝子を発現する細胞由来のライブラリーのスクリーニング、該遺伝子を含むことが知られているベクターから該遺伝子を得るか、または該遺伝子を含むことが知られている細胞および組織から直接単離することにより得られる。あるいは、所望の遺伝子を、クローニングではなく合成により作製してもよい。

30

【0222】

本発明はまた、本発明のDNAが挿入されているベクターを提供する。レトロウイルス、例えばレンチウイルス由来のベクターは、導入遺伝子の長期間の安定した組み込みおよび娘細胞における増殖を可能にするものであるため、長期間の遺伝子導入を達成するのに適切な手段である。レンチウイルスベクターは、非増殖細胞、例えば肝細胞に形質導入できるという点において、オンコレトロウイルス、例えばマウス白血病ウイルス由来のベクターよりもさらに有益である。

【0223】

端的にまとめると、CARをコードする天然または合成核酸の発現は、典型的に、CARポリペプチドまたはその一部をコードする核酸をプロモーターに作動可能に連結し、該コンストラクトを発現ベクターに組み込むことにより達成される。該ベクターは、真核生物における複製および組み込みに適当であってよい。典型的なクローニングベクターは、転写および翻訳のターミネーター、開始配列および所望の核酸配列の発現調節に有用なプロモーターを含む。

40

【0224】

本発明の発現コンストラクトはまた、標準的な遺伝子送達プロトコルを用いた核酸免疫化および遺伝子治療に使用し得る。遺伝子送達方法は、当該分野で公知である。例えば、米国特許第5,399,346号、第5,580,859号、第5,589,466号明細書を参照のこと（これらの

50

文献は参照によりその全体が本明細書に包含される)。他の態様において、本発明は、遺伝子治療ベクターを提供する。

【0225】

核酸は、多くの種類のベクターに導入し得る。例えば、核酸は、プラスミド、ファージミド、ファージ誘導体、動物ウイルスおよびコスミド中にクローニングし得るが、これらに限定されない。特に好ましいベクターとしては、発現ベクター、複製ベクター、プロンプト産生ベクターおよびシーケンシングベクターが挙げられる。

【0226】

さらに、該発現ベクターは、ウイルスベクターの形態で細胞に供給されてよい。ウイルスベクター技術は、当該分野でよく知られており、例えば、Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) および他のウイルス学および分子生物学のマニュアルに記載されている。ベクターとして有用なウイルスとしては、例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルスおよびレンチウイルスが挙げられるが、これらに限定されるものではない。一般的に、適当なベクターは、少なくとも1種の生物で機能性を示す複製起点、プロモーター配列、都合の良い制限エンドヌクレアーゼ部位および1つ以上の選択可能なマーカー(例えば国際公開第01/96584号; 国際公開第01/29058号; および米国特許第6,326,193号明細書)を含む。

【0227】

哺乳類細胞に遺伝子を導入するために、多数のウイルスベースのシステムが開発されている。例えば、レトロウイルスは、遺伝子送達システムに都合の良いプラットフォームを提供する。選択された遺伝子を、当該分野で公知の技術を用いてベクターに挿入し、レトロウイルス粒子中に封入し得る。次いで、該組換えウイルスを単離し、対象の細胞に、生体内または生体外で送達してよい。多数のレトロウイルスシステムが当該分野で公知である。いくつかの態様において、アデノウイルスベクターが用いられる。当該分野では多数のアデノウイルスベクターが公知である。態様の一例において、レンチウイルスベクターが用いられている。

【0228】

さらなるプロモーターエレメント、例えばエンハンサーは、転写開始の頻度を制御する。典型的には、これらは開始部位から30~110bp上流の領域に存在するが、近年、多数のプロモーターが、開始部位の下流にも機能性エレメントを同様に含むことが示されている。プロモーターエレメント間の間隔は柔軟性があることがしばしばであるため、プロモーターの機能は、エレメントが互いに対して反転または移動しても保存される。チミジンキナーゼ(tk) プロモーターでは、プロモーターエレメント間の間隔を50bpまで広げても、活性の低下は見られない。プロモーターに依存するが、個々のエレメントは、転写を活性化させるために、強調してまたは独立して機能し得る。

【0229】

適当なプロモーターの例としては、最初期サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター配列が挙げられる。このプロモーター配列は、そこに作動可能に連結した任意のポリヌクレオチド配列を高いレベルで発現させることのできる強力な構成的プロモーター配列である。他の適当なプロモーターの例としては、伸長因子1 (EF-1) が挙げられる。しかし、他の構成的プロモーター配列、例えば非限定的な例としては、SV40(simian virus 40)初期プロモーター、マウス乳がんウイルス(MMTV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)末端反復配列(LTR)プロモーター、MoMuLVプロモーター、トリ白血病ウイルスプロモーター、Epstein-Barrウイルス最初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーターならびにヒト遺伝子プロモーター、例えば非限定的な例としては、アクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、ヘモグロビンプロモーターおよびクレアチンキナーゼプロモーターを用いてもよい。さらに、本発明は、構成的なプロモーターの使用に限定されるべきではない。誘導性のプロモーターもまた、本発明の一部として考慮される。誘導性プロモーターを用いることによって、作動可能に連結しているポリヌクレオチド配列の発現を、所望するときに

onにし、または発現が望ましくないときにはoffにする分子スイッチが提供される。誘導性プロモーターの例としては、メタロチオネイン(metallothionein)プロモーター、糖質コルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモーターおよびテトラサイクリンプロモーターが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0230】

CARポリペプチドまたはその一部の発現を評価するために、細胞に導入する発現ベクターは、ウイルスベクターにより導入または感染しようとする細胞集団から発現細胞の特定および選択を促進するための選択可能なマーカー遺伝子またはレポーター遺伝子のいずれかまたは両方を含んでよい。他の局面において、選択可能なマーカーは、別のDNA断片上に存在し、共形質転換手法において用いてもよい。選択可能なマーカーおよびレポーター遺伝子は、宿主細胞における発現を可能にする適当な調節配列に隣接してよい。有用な選択可能なマーカーとしては、例えば抗生物質耐性遺伝子、例えばneo等が挙げられる。

10

【0231】

レポーター遺伝子は、遺伝子導入されている可能性のある細胞を特定し、かつ調節配列の機能を評価するために用いられる。一般的に、レポーター遺伝子は、レシピエントの生物体または組織には存在または発現せず、その発現が容易に認識可能な性質、例えば酵素活性により顕在化するポリペプチドをコードする遺伝子である。レポーター遺伝子の発現は、DNAがレシピエント細胞に導入されてから適当な時間が経過した後に評価される。適当なレポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、分泌アルカリホスファターゼまたは緑色蛍光タンパク質遺伝子をコードする配列が挙げられる(例えばUi-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82)。適当な発現系がよく知られており、公知の技術を用いて調製または市販のものを入手してよい。一般的に、レポーター遺伝子の最も高い発現を示す、最小5'隣接領域を有するコンストラクトが、プロモーターとして特定される。該プロモーター領域は、レポーター遺伝子に連結し、プロモーターに制御される転写の調節能について薬剤を評価するのに用いてよい。

20

【0232】

細胞に遺伝子を導入して発現させる方法は、当該分野で知られている。発現ベクターの場合には、該ベクターは当該分野の任意の方法で容易に宿主細胞、例えば哺乳動物、バクテリア、酵母または昆虫細胞に容易に導入し得る。例えば、発現ベクターは、物理学的、化学的または生物学的方法により宿主細胞に導入し得る。

30

【0233】

ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入する物理学的な方法としては、リン酸カルシウム沈殿法、リポフェクション法、パーティクルガン、マイクロインジェクションおよびエレクトロポレーション等が挙げられる。ベクターおよび/または外来核酸を含む細胞の作製方法は当該分野でよく知られている。例えばSambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)を参照のこと。ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入する好ましい方法は、リン酸カルシウム法による遺伝子導入である。

40

【0234】

所望のポリヌクレオチドを宿主細胞に導入する生物学的な方法としては、DNAおよびRNAベクターの使用が挙げられる。ウイルスベクター、とくにレトロウイルスベクターは、遺伝子を哺乳動物、例えばヒト細胞に挿入するのに最も広く用いられている方法である。他のウイルスベクターはレンチウイルス、ポックスウイルス、単純ヘルペスI型ウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス等由来であってよい。例えば米国特許第5,350,674号および第5,585,362号明細書を参照のこと。

【0235】

ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入する化学的な方法としては、コロイド分散系、例えば巨大分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズおよび脂質ベースの系、

50

例えば水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセルおよびリポソームが挙げられる。試験管内および生体内で送達ビヒクルとして用いるコロイド系の例はリポソーム（例えば人工膜小胞）である。

【0236】

非ウイルス性送達系を用いる場合、送達ビヒクルの例は、ナノ粒子、例えばリポソームまたは他の適当なサブミクロンサイズの送達系である。脂質製剤の使用は、（試験管内、生体外または生体内の）宿主細胞への核酸の導入について考えられている。他の局面において、核酸は、脂質と結合してよい。脂質と結合している核酸は、リポソームの水性の内側に封入しても、リポソームの脂質二重層内に分散させても、リポソームとオリゴヌクレオチドの両方と結合している連結分子を介してリポソームに結合していても、リポソーム中に捕捉されていても、リポソームと複合体を形成していても、脂質を含む溶液中に分散していても、脂質と混合していても、脂質と結合していても、脂質中に懸濁剤として含まれていても、ミセルとともに含まれていても、もしくはともに複合体を形成していても、または他の方法で脂質と結合していてもよい。脂質、脂質/DNAまたは脂質/発現ベクターと結合している組成物は、溶液中の特定の構造に限定されない。例えば、それらは、二重膜構造、例えばミセル構造で存在していても、または「崩壊した」構造で存在していてもよい。それらはまた単に溶液中に分散して、サイズまたは形態が均一でない凝集体を形成していてもよい。脂質および脂肪物質は、天然起源の脂質であっても、合成脂質であってもよい。例えば脂質は、細胞質内に天然で発生する脂肪性の液滴ならびに長鎖の脂肪族炭化水素およびその誘導体、例えば脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコールおよびアルデヒドを含むクラスの化合物を含む。

【0237】

使用するのに適当な脂質は、市販品から入手できる。例えばジミリスチルホスファチジルコリン（「DMPC」）は、Sigma, St. Louis, MOより；リン酸ジセチル（「DCP」）は、K & K Laboratories (Plainview, NY)より；コレステロール（「Choi」）は、Calbiochem-Behringより；ジミリスチルホスファチジルグリセロール（「DMPG」）および他の脂質はAvanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL)より入手し得る。脂質のクロロホルムまたはクロロホルム/メタノール中のストック溶液は、約-20℃で保存してよい。クロロホルムは、メタノールよりも蒸発しやすいので、単一の溶媒として用いられる。「リポソーム」は、封入された脂質二重層または凝集体の作製により形成された、種々の単層および多層膜の脂質ビヒクルを含む一般的な用語である。リポソームは、リン脂質二重膜および内部の水性媒体を有する小胞構造により特徴付けられる。多重膜リポソームは、水性媒体により分離される複数の脂質層を有する。リン脂質が過剰の水性溶液中に懸濁されている場合、多重膜リポソームは自発的に形成される。脂質成分が自己再配列を起こした後、閉じた構造が形成され、水および溶解した溶質が脂質二重層間に捕捉される(Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5: 505-10)。しかし、通常の小胞構造とは異なる構造を溶液中に有する組成物もまた含まれる。例えば、脂質は、ミセル構造であることを想定してもよく、または単に脂質分子の不均一な凝集体として存在してもよい。リポフェクタミン-核酸複合体もまた考慮される。

【0238】

外来性の核酸を宿主細胞に導入するか、または細胞を本発明の阻害剤に暴露するのに用いる方法にかかわらず、該宿主細胞中に組換えDNAが存在することを確認するために種々のアッセイを行ってよい。該アッセイとしては、例えば、当該分野でよく知られた「分子生物学的」アッセイ、例えばサザンブロットおよびノザンブロット、RT-PCRおよびPCR；「生化学的」アッセイ、例えば免疫学的方法(ELISAおよびウェスタンブロット)で、または本発明の範囲内の物質を特定するための、本発明に記載のアッセイによって特定のペプチドの存在の有無を検出することが挙げられる。

【0239】

本発明はさらに、CARをコードする核酸分子を含むベクターを提供する。局面の一において、CARベクターは、細胞、例えばT細胞に直接導入してよい。局面の一において、該ベ

10

20

30

40

50

クターは、クローニングベクターまたは発現ベクターであり、例えば1つ以上のプラスミド（例えば発現プラスミド、クローニングベクター、ミニサークル、ミニベクター、二重微小染色体）、レトロウイルスおよびレンチウイルスベクターコンストラクトを含むベクターであるが、これらに限定されるものではない。局面の一において、該ベクターはCARコンストラクトを哺乳類T細胞において発現させることができる。局面の一において、該哺乳類T細胞はヒトT細胞である。

【0240】

T細胞の供給源

増殖および遺伝的修飾に先だって、T細胞源を対象より得る。「対象」という語は、免疫応答を誘発し得る生体（例えば哺乳類）を指すことを意図する。対象の例としては、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラットおよびそれらのトランスジェニック種が挙げられる。T細胞は多数の供給源、例えば末梢血単核細胞、骨髓、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位由来の組織、腹水、胸水貯留、脾臓組織および腫瘍から得てよい。本発明の特定の局面において、当該分野で利用可能な任意のT細胞株を用いてよい。本発明の特定の局面において、T細胞は、当該分野で公知の任意の技術、例えばFicoll™分離を用いて、対象から回収した血液のユニットから得てよい。好ましい局面の一において、個人の循環血由来の細胞をアフエーシスにより得る。該アフエーシス産物は典型的に、リンパ球、例えばT細胞、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球、赤血球および血小板を含む。局面の一において、アフエーシスにより回収される細胞は、洗浄して血漿画分を除き、その後の処理工程のために細胞を適当なバッファーまたは媒体中に入れてよい。本発明の局面の一において、細胞をリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）で洗浄する。他の局面において、洗浄液は、カルシウムを含まず、また、マグネシウムを含まないか、または全てではなくても多くの二価性カチオンを含まなくてよい。カルシウム非存在下では、最初の活性化工程が、活性の増強を引き起こし得る。当業者には容易に理解し得ることであるが、洗浄工程は、当業者に公知の方法、例えば半自動化「フロースルー」遠心分離（例えば、Cobe 2991 cell processor, the Baxter CytoMateまたはHaemonetics Cell Saver 5）を製造者の指示にしたがって用いることによって達成し得る。洗浄後、該細胞は、種々の生体適合性バッファー、例えばCa-不含有、Mg-不含有PBS、PlasmaLyte Aまたはバッファーを含むか、または含まない他の生理食塩水溶液に再懸濁してよい。あるいは、アフエーシス試料の望ましくない成分を除いて、細胞を培養培地に直接再懸濁してもよい。

【0241】

局面の一において、赤血球を溶解し、単球を例えばPERCOLL™勾配による遠心分離または対向流遠心溶出法（counterflow centrifugal elutriation）によって枯渇させることにより、T細胞を末梢血リンパ球から単離する。T細胞の特定の分集団、例えばCD3+、CD28+、CD4+、CD8+、CD45RA+かつCD45RO+のT細胞を、ポジティブ選択またはネガティブ選択技術によりさらに単離してよい。例えば、局面の一において、T細胞は、抗CD3/抗CD28（例えば3x28）結合ビーズ、例えばDYNABEADS（登録商標）M-450 CD3/CD28 Tとともに、所望のT細胞をポジティブ選択するのに十分な期間インキュベーションすることにより単離する。局面の一において、該期間は約30分である。さらなる局面において、該期間は30分～36時間以上、ならびにその範囲内の全ての整数値である。さらなる局面において、該期間は、少なくとも1、2、3、4、5または6時間である。なおさらなる他の好ましい局面において、該期間は10～24時間である。局面の一において、インキュベーション時間は24時間である。他の細胞種に比べてT細胞が少ない条件下におけるT細胞の単離、例えば腫瘍組織または免疫不全個体から腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を単離する場合は、インキュベーション時間を長くしてもよい。さらに、インキュベーション時間を長くすることによって、CD8+ T細胞の捕捉効率が上昇し得る。したがって、単純に時間を短くしたり長くしたりすることによって、T細胞はCD3/CD28ビーズに結合することが可能になり、かつ/または、（後述するように）ビーズのT細胞に対する比率を上昇させるかまたは減少させることによりT細胞の分集団を、培養開始時または該プロセスの他のタイムポイントにおいて、好ましくようにポジティブまたはネガティブに選択することができる。さらに、ビーズまたは他の表面

上の抗CD3および/または抗CD28抗体の比率を上昇および/または低下させることにより、T細胞の分集団を、培養開始時または所望の他のタイムポイントにおいて好ましようにポジティブまたはネガティブに選択し得る。本発明においては、選択を複数回行ってよいことは、当業者には理解できることである。特定の局面において、選択手法を行い、「非選択」細胞を活性および増殖工程に用いることが望ましい場合もある。「非選択」細胞に対してさらに選択をおこなってもよい。

【0242】

T細胞集団のネガティブ選択による濃縮は、ネガティブ選択される細胞に特有の表面マーカーに対する抗体を組み合わせることにより達成し得る。方法の1つは、ネガティブ磁気免疫付着またはネガティブ選択される細胞上に存在する細胞表面マーカーに対するモノクローナル抗体の混合液を用いたフローサイトメトリーを介した細胞選別および/または選択である。例えば、CD4+細胞をネガティブ選択により濃縮するためには、モノクローナル抗体混合液は、典型的には、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DRおよびCD8に対する抗体を含む。特定の局面において、CD4+、CD25+、CD62Lhi、GITR+およびFoxP3+を典型的に発現する調節T細胞を濃縮するか、またはポジティブ選択するのが望ましい場合もある。あるいは、特定の局面において、調節T細胞は、抗CD25結合ビーズまたは他の同様の選択方法によって枯渇させられる。

【0243】

態様の一において、IFN- γ 、TNF α 、IL-17A、IL-2、IL-3、IL-4、GM-CSF、IL-10、IL-13、グランザイムBおよびパーフォリンの1以上または他の適当な分子、例えば他のサイトカインを発現するT細胞集団を選択し得る。細胞発現をスクリーニングする方法は、例えば、国際公開第2013/126712号に記載の方法により決定し得る。

【0244】

所望の細胞集団をポジティブ選択またはネガティブ選択によって単離するために、細胞および表面（例えばビーズのような粒子）の濃度を変化させてよい。特定の局面において、細胞とビーズが確実に最大限接触するように、ビーズと細胞を混合する体積を有意に減少させる（例えば細胞の濃度を上昇させる）ことが望ましい場合もある。例えば、局面の一において、 2×10^9 個/mlの細胞濃度を用いる。局面の一において、 1×10^9 個/mlの細胞濃度を用いる。さらなる局面において、 1×10^8 個/mlを超える細胞濃度を用いる。さらなる局面において、10、15、20、25、30、35、40、45または 50×10^6 個/mlの細胞濃度を用いる。さらに他の局面において、75、80、85、90、95または 100×10^6 個/mlの細胞濃度を用いる。さらなる局面において、125または 150×10^6 個/mlの細胞濃度を用いてよい。高い濃度を用いることによって、細胞収率、細胞活性および細胞増殖が上昇し得る。さらに、高い細胞濃度を用いることによって、所望の標的抗原の発現が弱い可能性のある細胞、例えばCD28ネガティブT細胞のより効率的な捕捉または多くの腫瘍細胞が存在する試料（例えば白血球、腫瘍組織等）からのより効率的な捕捉が可能になる。該細胞集団が、治療上の価値を有しており、得るのが望ましい場合もある。例えば高い細胞濃度を用いることで、通常CD28の発現が弱いCD8+ T細胞をより効率的に選択することが可能になる。

【0245】

関連する局面において、細胞の濃度をより低くすることが望ましい場合もある。T細胞および表面（例えばビーズのような粒子）の混合物を有意に希釈することによって、粒子と細胞の間の相互作用が最小化される。これにより、粒子に結合する所望の抗原を多量に発現する細胞が選択される。例えば、CD4+ T細胞は、CD28をCD8+ T細胞よりも高いレベルで発現し、希釈濃度を用いた場合はCD8+ Tよりも効率的に捕捉される。局面の一において、用いる細胞の濃度は 5×10^6 個/mlである。他の局面において、用いる細胞濃度は、約 1×10^5 個/ml ~ 1×10^6 個/mlおよびその間の任意の整数値であってよい。

【0246】

他の局面において、細胞をローテータ - 上で、2~10 または室温で、種々の速度で、種々の期間インキュベーションしてよい。

【0247】

刺激用T細胞を洗浄工程の後に凍結させてもよい。理論に束縛されるものではないが、凍結工程およびそれに続く融解工程により、該細胞集団中の顆粒球およびある程度の単球が除去されることにより、より均一な産物が得られる。血漿および血小板を除去する洗浄工程の後、細胞を凍結溶液に懸濁してよい。当該分野では多くの凍結溶液およびパラメーターが公知であり、本発明で有用であるが、1つの方法として20% DMSOおよび8% ヒト血清アルブミンを含むPBS、または10% デキストラン40および5% デキストロース、20% ヒト血清アルブミンおよび7.5% DMSOを含むか、または31.25% Plasmalyte-A、31.25% デキストロース5%、0.45% NaCl、10% デキストラン40および5%デキストロース、20%ヒト血清アルブミンおよび7.5% DMSOを含む培養培地または、例えばHespanおよびPlasmaLyte Aを含む他の適当な細胞凍結培地の使用が挙げられ、次いで、細胞は-80 に、1分あたり1 の速度で凍結され、液体窒素タンク中の気相に保存される。制御凍結の他の方法ならびに、制御されない-20 または液体窒素への急冷を用いてもよい。

10

【0248】

特定の局面において、凍結保存された細胞を本明細書に記載するように融解させて洗浄し、本発明の方法を用いて活性化させる前に1時間室温で休息させる。

【0249】

本発明において、本明細書に記載するように増殖させた細胞が必要になり得るよりも前の期間に、対象から血液試料またはアフエーシス産物を回収することも考慮されている。そのようなものとして、細胞の増殖源を任意の必要なタイムポイントにおいて回収してよく、T細胞療法が有益であり得る任意の疾患または症状、例えば本明細書に記載するよう
な疾患または症状のT細胞療法に後で用いるために、所望の細胞、例えばT細胞を単離して凍結してよい。局面の一において、血液試料またはアフエーシスを、全体的に健康な対象より採取する。特定の局面において、血液試料またはアフエーシスを、疾患を発症する危険性があるが、未だ発症していない全体的に健康な対象より採取し、所望の細胞を単離して、後で使用するために凍結する。特定の局面において、T細胞を増殖させて、凍結し、後で使用してよい。特定の局面において、試料を本明細書に記載の特定の疾患と診断された直後であり、何の処置も受けていない対象から回収する。さらなる局面において、関連する任意の処置様式、非限定的な例としては、薬剤、例えばナタリズマブ、エファリズマブ、抗ウイルス剤、化学療法、放射線照射、免疫抑制剤、例えばシクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノレートおよびFK506、抗体または他の免
疫除去剤、例えばCAMPATH、抗CD3抗体、シトキサン、フルダラビン、シクロスポリン、FK
506、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、FR901228および照射による処置を
受ける前に、対象から採取した血液試料またはアフエーシスから細胞を単離する。

20

30

【0250】

さらなる本発明の局面において、機能性のT細胞を有する対象を残す処置の直後に、T細胞を患者から直接得る。この点については、特定のがん処置、特に免疫系に損傷を与える薬剤を用いた処置の後では、患者が該処置から通常回復する期間の直後に、得られるT細胞の品質が、生体外での増殖能について最適であるか、または改善している場合があることが観察されている。同様に、本明細書に記載の方法を用いた生体外操作の後、これらの細胞は、生着性の上昇および生体内の増殖に関して好ましい状態であり得る。したがって、血液細胞、例えばT細胞、樹状細胞または造血系列の他の細胞をこの回復期に回収すること、本発明の範囲に含まれると考えられる。さらに、特定の局面において、特に治療後の規定の猶予期間の間に、対象において特定の細胞種の再増殖、再循環、再生および/または増殖が好ましい状況を作り出すために、動態化（例えば、GM-CSFを用いた動態化）および移植前処置を用いてもよい。代表的な細胞種としては、T細胞、B細胞、樹状細胞および免疫系の他の細胞が挙げられる。

40

【0251】

T細胞の活性化および増殖

T細胞は一般的に、例えば、米国特許第6,352,694号；第6,534,055号；第6,905,680号；第6,692,964号；第5,858,358号；第6,887,466号；第6,905,681号；第7,144,575号；第7,0

50

67,318号；第7,172,869号；第7,232,566号；第7,175,843号；第5,883,223号；第6,905,874号；第6,797,514号；第6,867,041号；および米国特許出願公開第20060121005号に記載の方法を用いて活性化および増殖させ得る。

【0252】

一般的に、本発明のT細胞は、CD3/TCR複合体関連シグナルを刺激する物質およびT細胞表面の同時刺激分子を刺激するリガンドが結合した表面と接触させることによって増殖させ得る。具体的には、T細胞集団は、本明細書に記載するように、例えば表面上に固定した抗CD3抗体またはその抗原結合断片、または抗CD2抗体と接触、またはカルシウムイオンフォアと組み合わせてタンパク質キナーゼCアクティベーター（例えばプリオスタチン）と接触させることにより刺激し得る。T細胞の表面上のアクセサリー分子の同時刺激のために、該アクセサリー分子に結合するリガンドを用いる。例えば、T細胞集団を、T細胞の増殖を刺激するのに適当な条件下で、抗CD3抗体および抗CD28抗体と接触させてよい。CD4+ T細胞またはCD8+ T細胞のいずれかの増殖を刺激するために、抗CD3抗体および抗CD28抗体を使用し得る。抗CD28抗体の例としては、9.3、B-T3、XR-CD28 (Diacclone, Besancon, France)を用いてよく、当該分野で広く知られている他のの方法を用いてもよい (Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9):1319-1328, 1999; Garland et al., J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, 1999)。

【0253】

特定の局面において、T細胞についての一次刺激シグナルおよび同時刺激シグナルは、異なるプロトコルによって得られてよい。例えば、各シグナルをもたらす物質は、溶液中にあっても、表面に結合していてもよい。表面に結合している場合、該物質は、同一の表面に結合していても（すなわち「cis」形態）、または別の表面に結合していてもよい（すなわち「trans」形態）。あるいは、1つの物質が表面上に結合しており、もう一方が溶液中にあってもよい。局面の一において、同時刺激シグナルをもたらす物質は、細胞表面に結合しており、一次活性化シグナルをもたらす物質は、溶液中にあるかまたは表面に結合している。特定の局面において、両方の物質が溶液中にあってもよい。局面の一において、該物質は可溶性の形態であって、次いで表面、例えばFc受容体または該物質に結合する抗体もしくは他の結合性物質を発現する細胞に架橋されてもよい。この点に関しては、例えば、本発明のT細胞の活性化および増殖への使用が考えられる、人工抗原提示細胞(aAPC)に関する、米国特許出願公開第20040101519号および第20060034810号明細書を参照のこと。

【0254】

局面の一において、2つの物質を、ビーズに、同じビーズに、すなわち「cis」にまたは別のビーズに、すなわち「trans」に固定する。例えば、一次活性シグナルをもたらす物質は抗CD3抗体またはその抗原結合断片であり、同時刺激シグナルをもたらす物質は、抗CD28抗体またはその抗原結合断片であり；その両方が同等の分子量で同じビーズ上に共固定されている。局面の一において、CD4+ T細胞増殖およびT細胞成長に、ビーズに結合した各抗体は、1:1の比率で用いられる。本発明の特定の局面において、ビーズに結合した抗CD3:抗CD28抗体を、1:1の比率で用いた場合に観察されるT細胞増殖と比較して増殖が上昇するような比率で用いる。特定の局面の一において、1:1の比率を用いた場合と比較して、細胞増殖の、約1倍～約3倍の上昇が観察される。局面の一において、ビーズに結合するCD3:CD28抗体の比率は、100:1～1:100の範囲およびこの範囲内の全ての整数値である。本発明の局面の一において、粒子に、抗CD3抗体よりも多くの抗CD28抗体が結合している、すなわち、CD28に対するCD3の比率が1未満である。本発明の特定の局面において、ビーズに結合している抗CD28抗体の、抗CD3抗体に対する比率は、2:1よりも大きい。特定の局面の一において、1:100の、ビーズに結合するCD3:CD28抗体の比率が用いられる。局面の一において、1:75のビーズに結合するCD3:CD28抗体比率が用いられる。さらなる局面において、1:50のビーズに結合するCD3:CD28抗体の比率が用いられる。局面の一において、1:30のビーズに結合するCD3:CD28抗体の比率が用いられる。好ましい局面の一において、1:10のビーズに結合するCD3:CD28抗体の比率が用いられる。局面の一において、1:3のビー

ズに結合するCD3:CD28抗体の比率が用いられる。さらなる局面の一において、3:1のビーズに結合するCD3:CD28抗体の比率が用いられる。

【0255】

T細胞または他の標的細胞の刺激に、粒子：細胞の比率1:500~500:1およびその間の任意の整数値の比率を用いてよい。当業者には容易に理解できることであるが、粒子：細胞の比率は、標的細胞に対する粒子のサイズに依存し得る。例えば、サイズの小さいビーズは少数の細胞しか結合できないが、大きいビーズは多数の細胞を結合できる。特定の局面において、細胞：表面の比は1:100~100:1の範囲およびその間の全ての整数値であり、さらなる局面において、該比率は、1:9~9:1およびその間の全ての整数値を含み、これらの比率を、T細胞を刺激するのに用い得る。T細胞刺激を引き起こす抗CD3および抗CD28に結合した粒子とT細胞の比率は、上述のように変動し得るが、特定の好ましい値としては、1:100、1:50、1:40、1:30、1:20、1:10、1:9、1:8、1:7、1:6、1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1および15:1が挙げられ、粒子:T細胞の比率が少なくとも1:1であることが好ましい。局面の一において、1:1以下の粒子：細胞の比率が用いられる。好ましい局面の一において、好ましい粒子：細胞の比率は1:5である。さらなる局面において、粒子：細胞の比率は、刺激する日に依存して変動し得る。例えば、局面の一において、粒子：細胞の比率は1日目には1:1~10:1であり、その後、10日目まで、毎日または隔日に粒子をさらに細胞に添加し、最終的な比率を(添加する日の細胞数に基づいて)1:1~1:10とする。特定の局面の一において、粒子：細胞の比率は、刺激の1日目に1:1であり、刺激の3日目および5日目に1:5に調整する。局面の一において、1日目の最終比率1:1に基づいて、粒子を毎日または隔日に追加し、刺激の3日目および5日目には1:5になるようにする。局面の一において、粒子：細胞の比率が刺激1日目には2:1であり、刺激後3日目および5日目に1:10に調整する。局面の一において、1日目の1:1の最終比率に基づいて、粒子を毎日または隔日に追加し、刺激の3日目および5日目に1:10になるように調整する。他の種々の比率が本発明で用いるのに適当であり得ることは当業者に理解できることである。特に、比率は粒子サイズならびに細胞サイズおよび種類によって変動する。局面の一において、最も典型的な1日目の使用比率は、約1:1、2:1および3:1である。

【0256】

本発明のさらなる局面において、細胞、例えばT細胞を薬剤コートしたビーズと組合せ、次いで該ビーズと細胞を分離した後、細胞を培養する。他の局面において、培養を行う前に、薬剤コートしたビーズと細胞を分離せず、ともに培養を行う。さらなる局面において、ビーズと細胞を最初に力、例えば磁力によって濃縮し、細胞表面のマーカーの連結を増強させ、それにより細胞刺激を誘導する。

【0257】

例えば、細胞表面タンパク質を、抗CD-3および抗CD-8が結合した常磁性のビーズ(3x28ビーズ)をT細胞に接触させることによって連結してよい。局面の一において、細胞(例えば、 $10^4 \sim 10^9$ 個のT細胞)およびビーズ(例えば、1:1の比率の、DYNABEADS(登録商標)M-450 CD3/CD28 T常磁性体ビーズ)をバッファー、例えばPBS(二価カチオン、例えばカルシウムおよびマグネシウムを含まない)中で結合させる。任意の細胞濃度を用いてよいことは、当業者には容易に理解し得ることである。例えば、標的細胞が試料中で非常に希少であって、該試料の約0.01%のみが所望の標的細胞を含んでいてもよく、または試料全体(すなわち100%)が標的細胞を含んでいてもよい。したがって、細胞数がどのような場合であっても、本発明の範囲内に含まれる。特定の局面において、細胞と粒子が確実に最大限接触するために、粒子と細胞を混合する体積を有意に低下させる(すなわち、細胞の濃度を上昇させる)ことが望ましい場合もある。例えば、局面の一において、約 2×10^9 個/mlの細胞濃度を用いる。局面の一において、 1×10^8 個/mlを超える細胞濃度を用いる。さらなる局面において、10、15、20、25、30、35、40、45または 50×10^6 個/mlの細胞濃度を用いる。さらに他の局面において、75、80、85、90、95または 100×10^6 個/mlの細胞濃度を用いる。さらなる局面において、125または 150×10^6 個/mlの細胞濃度を用いてよい。高い濃

度を用いることによって、細胞収率、細胞活性および細胞増殖が上昇し得る。さらに、高い細胞濃度を用いることによって、所望の標的抗原の発現が弱い可能性のある細胞、例えばCD28ネガティブT細胞のより効率的な捕捉が可能になる。特定の局面において、該細胞集団が、治療上の価値を有しており、得るのが望ましい場合もある。例えば高い細胞濃度を用いることで、通常CD28の発現が弱いCD8⁺ T細胞をより効率的に選択することが可能になる。

【0258】

本発明の局面の一において、該混合物は、数時間（約3時間）～約14日間またはその間の任意の時間単位の期間、培養してよい。局面の一において、該混合物は、21日間培養してよい。本発明の局面の一において、ピーズおよびT細胞を約8日間共培養する。局面の一において、ピーズおよびT細胞を2～3日間共培養する。T細胞の培養時間が60日以上になるように、刺激を数サイクル繰り返すことが望ましい場合もある。T細胞の培養に適当な条件としては、増殖および生存に必要な因子、例えば血清（例えばウシ胎仔血清またはヒト血清）、インターロイキン2(IL-2)、インスリン、IFN- γ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF β およびTNF- α または、当業者に公知の細胞増殖用の他の任意の添加剤を含んでいてよい、適当な培地（例えば基礎培地またはRPMI Media 1640またはX-vivo 15 (Lonza)）が挙げられる。細胞増殖用の他の添加剤としては、界面活性剤、プラスマネートおよび還元剤、例えばN-アセチル-システインおよび2-メルカプトエタノールが挙げられるが、これらに限定されるものではない。培地としては、アミノ酸、ピルビン酸ナトリウムおよびビタミンを添加した、血清不含の、または適当な量の血清（または血漿）もしくは規定量のホルモンおよび/またはT細胞の成長および増殖に十分な量のサイトカインを添加した、RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo 15およびX-Vivo 20、Optimizerが挙げられる。抗生物質、例えばペニシリンおよびストレプトマイシンは、実験用の培養時にのみ添加し、対象に注入する細胞の培養には添加しない。標的細胞は、増殖を支持するのに必要な条件下、例えば適当な温度（例えば37 $^{\circ}$ C）および雰囲気（例えば大気+5% CO₂）下で維持する。

【0259】

数回の刺激に暴露されたT細胞は、種々の特徴を示し得る。例えば典型的な血液またはアフエーシスされた末梢血単核細胞産物は、細胞傷害性またはサブレッサーT細胞集団（TC、CD8⁺）よりも大きいヘルパーT細胞集団（TH、CD4⁺）を有する。CD3およびCD28受容体を刺激することによるT細胞の生体外増殖により、約8～9日経つ前には、主にTH細胞からなるT細胞集団が得られる。それに対し、約8～9日経過後には、該T細胞集団に含まれる、TC細胞の集団が次第に大きくなる。したがって、処置の目的に応じて、主にTH細胞を含むT細胞集団を対象に注入することが有益であり得る。同様に、TC細胞の抗原特異的サブセットを単離した場合、このサブセットの割合が大きくなるように増殖させることが有益であり得る。

【0260】

さらに、CD4およびCD8マーカーに加えて、他の表現型のマーカーも有意に変動するが、大部分において、細胞増殖プロセス間の変動は再現性良く行われる。該再現性により、特定の目的に合わせて活性化T細胞産物を調製することが可能になる。

【0261】

EGFRvIII CARを構築すると、該分子の活性、例えば非限定的な例としては、抗原刺激後のT細胞を増殖させる性質、再刺激の非存在下でのT細胞増殖の維持能および抗がん活性を評価するのに、適当な試験管内でもおよび動物でもにおいて種々のアッセイを使用し得る。EGFRvIII CARの効果を評価するアッセイは以下に詳述する。

【0262】

初代培養T細胞中のCAR発現のウェスタンブロット解析は、単量体および二量体の存在を検出するのに使用し得る。例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)を参照のこと。非常に端的には、CARを発現するT細胞（CD4⁺およびCD8⁺ T細胞の1:1の混合物）を試験管内で、10日より長く増殖させた後、溶解および還元的な条件下でSDS

10

20

30

40

50

-PAGEを行った。全長のTCR 細胞質ドメインおよび内在性のTCR 鎖を含むCARは、TCR 鎖に対する抗体を用いたウェスタンブロットにより検出される。同じT細胞のサブセットを、共有結合二量体形成の評価を可能にするために、非還元条件下でのSDS-PAGE解析に用いる。

【0263】

抗原刺激後のCAR⁺ T細胞の試験管内の増殖は、フローサイトメトリーにより測定し得る。例えば、CD4⁺およびCD8⁺ T細胞の混合物を、CD3/ CD28 aAPCを用いて刺激した後、解析するプロモーターの制御下でGFPを発現するレンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行う。プロモーターの例としては、CMV IE遺伝子、EF-1、ユビキチンCまたはホスフォグリセロールキナーゼ(PGK) プロモーターが挙げられる。GFPの蛍光は、培養6日目に、CD4⁺および/またはCD8⁺ T細胞サブセット中でフローサイトメトリーにより評価する。例えばMilone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)を参照のこと。あるいは、CD4⁺およびCD8⁺ T細胞の混合物を、CD3/ CD28でコートした磁気ビーズで0日目に刺激し、1日目に、CARをeGFPとともに発現する2シストロン性のレンチウイルスベクターを用いて、2Aリボソームスキップ配列(ribosomal skipping sequence)を用いて、CARを形質導入する。培養物を洗浄した後、抗CD3および抗CD28抗体の存在下で、EGFRvIII⁺ U-87細胞(U-87-EGFRvIII)、野生型U-87細胞(U-87野生型)またはhCD32および4-1BBLを発現するK562細胞(K562-BBL-3/28)のいずれかで再刺激する。外来性のIL-2を100 IU/mlで隔日に培養物に添加する。ビーズベースカウントを用いて、フローサイトメトリーによりGFP⁺ T細胞を計数する。例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)を参照のこと。

【0264】

再刺激の非存在下でのCAR⁺ T細胞増殖維持を測定してもよい。例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)を参照のこと。端的に言えば、0日目に CD3/ CD28コーティング磁気ビーズを用いて刺激し、1日目の指定のCARを形質導入した後、培養8日目に、Coulter Multisizer III particle counterを用いて平均T細胞体積(fl)を測定する。

【0265】

細胞増殖およびサイトカイン産生の評価は、例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)に記載されている。端的には、CARを介する増殖の評価は、洗浄したT細胞を標的細胞、例えば、EGFRvIIIまたは野生型EGFR (wt)またはCD32およびCD137を発現するU87MG、BHKまたはCHO細胞(KT32-BBL)と、最終のT細胞:標的細胞の比率が1:1になるように混合することによって、マイクロタイタープレート中で行う。抗CD3モノクローナル抗体(クローンOKT3)および抗CD28モノクローナル抗体(クローン9.3)をKT32-BBL細胞とともに培養物に添加し、T細胞増殖の陽性対照とする。これは、これらのシグナルが生体外において長期のCD8⁺ T細胞の増殖を支持するためである。CountBright™ fluorescent bead (Invitrogen, Carlsbad, CA)およびフローサイトメトリーを製造者の指示にしたがって用いて培養物中のT細胞数を計測する。CAR⁺ T細胞は、eGFP-2Aを連結したCAR-発現レンチウイルスベクターを用いて操作したT細胞を用いて、GFPの発現により特定する。GFPを発現しないCAR⁺ T細胞については、該CAR⁺ T細胞は、ビオチン化組換えEGFRvIIIタンパク質および二次アビジン-PE 結合体を用いて検出する。T細胞上のCD4⁺およびCD8⁺発現は、特異的なモノクローナル抗体(BD Biosciences)によって同時に検出される。サイトカイン測定は、TH1/TH2 cytokine cytometric bead array kit (BD Biosciences, San Diego, CA)を用いて、製造者の指示にしたがって、再刺激後の24時間後に回収した上清に対して行う。蛍光は、FACScaliburフローサイトメトリーを用いて評価し、データを製造者の指示にしたがって解析する。

【0266】

細胞傷害性は、標準的な⁵¹Cr放出アッセイにより評価し得る。例えばMilone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)を参照のこと。端的には、標的細胞(EGFRvIIIまたは野生型EGFR (wt))を発現するU87MG、BHKまたはCHO細胞)に⁵¹Crを(NaCrO₄ (New

England Nuclear, Boston, MA) として)37 で2時間、頻繁に攪拌しながら負荷し、完全RPMI培地で2回洗浄し、マイクロタイタープレートに加える。ウェル中で、エフェクターT細胞を完全RPMI培地中で、種々のエフェクター細胞:標的細胞 (E:T)の比率を用いて標的細胞と混合する。培地のみ(自発的放出、SR)または界面活性剤triton-X 100 (総放出、TR)の1%溶液を含んでいるウェルをさらに準備する。37 で4時間インキュベーションした後、各ウェルから上清を回収する。その後、放出された⁵¹Crをgamma particle counter (Packard Instrument Co., Waltham, MA)を用いて計測する。各条件について、少なくとも3回重複して試験を行い、溶解%を次の式: 溶解% = (ER - SR) / (TR - SR) (式中、ERは各条件で放出される⁵¹Crを表す)に基づいて計算する。あるいは、他の細胞傷害性アッセイ、例えば実施例8に記載するようなフローベース細胞障害性アッセイを用いてもよい。

10

【0267】

クリックビートルレッドおよびクリックビードルグリーンルシフェラーゼを、腫瘍の進行およびT細胞の輸送を同時に経過観察するために用いてよく、これらはそれぞれ同じルシフェリン基質を用いるが、可視光スペクトルの反対側に発光する。

【0268】

他のアッセイ、例えば本明細書に記載の実施例に記載のアッセイならびに当該分野で公知のアッセイを、本発明のEGFRvIII CARコンストラクトの評価に用いてよい。

【0269】

EGFRvIII発現疾患および障害への治療的適用

EGFRvIIIは内皮増殖因子受容体の腫瘍特異的、リガンド非依存性、構成的活性化バリエーションである。本発明は、EGFRvIIIと関連する疾患および障害の処置用組成物および方法を提供する。EGFRvIIIと関連する疾患または障害の例は神経膠腫である。

20

【0270】

神経膠腫は、膠細胞(例えば神経細胞の周囲にあり、神経細胞を支持する細胞であり、乏突起膠細胞、星状細胞、ミクログリアおよび上皮細胞が挙げられる)で発症する中枢神経系のがんを指す。神経膠腫は発症率および悪性度の両方の点から特に深刻であり、その詳細な病理組織の種類によって、神経膠芽腫および未分化星状細胞腫などの7つ以上の種類に分類される。原発性の脳腫瘍の悪性度の決定には、疾患ステージ(腫瘍サイズ、遠位転移の有無)および組織学的な悪性度を用いる。組織学的悪性度は、ガイドラインであるGuidelines for the Treatment of Brain Tumors ((2002) Kanehara & Co., Ltd.)にしたがって、4つのレベル、すなわちG1~G4およびそれにそれぞれ対応するWHO1~WHO4に分類される。この数字は大きくなるほど、悪性度は高くなる。例えば、神経膠芽腫の悪性度はG4 (WHO4)、未分化星状細胞腫の悪性度はG3 (WHO3)であり、G3およびG4はともに悪性に分類される。したがって、本発明のいくつかの態様によれば、本発明の方法は、悪性神経膠腫を標的とする。他の局面において、本発明は、多形神経膠芽腫を標的とする。さらなる態様において、本発明の組成物および方法は、他の神経膠腫、例えば非限定的な例としては、未分化星状細胞腫、巨細胞神経膠芽腫、膠肉腫、未分化乏突起神経膠腫、未分化上皮腫、脈絡叢がん、未分化神経節膠腫、松果体芽腫、髄上皮腫、上皮芽腫、髄芽腫、テント上原始神経外胚葉性腫瘍およびAT/RT(非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍)の処置に用いてもよい。

30

40

【0271】

神経膠芽腫は成人において最も一般的な原発性脳腫瘍である。米国で悪性の原発性脳腫瘍と診断された18,000人の患者のうち、半分以上の患者が多形神経膠芽腫に罹患している。多形神経膠芽腫は、増殖指数が高く、微小血管の増殖および局所的な壊死を示す、未分化な細胞性の高い腫瘍である。徴候および症状は、いくつかの要因(サイズ、成長速度、脳内の腫瘍の局在)に依存し、主に頭痛、けいれん、神経障害、精神状態の変化として表れる。多形神経膠芽腫の予後は悲惨なものである。患者の大多数において、生存時間は2年未満である。カルノフスキー・パフォーマンス・ステータス (KPS)は、最も重要な予後因子の1つである: KPS>70の患者は、18ヶ月の時点でそれよりKPSスコアが低い患者の生存率が13%であるのに対し、症例の約18%が生存している。原発性の多形神経膠芽腫は、膠

50

細胞から新規に発症し、典型的には6ヶ月よりも短い病歴を示し、高齢患者により多く、小細胞の組織像を示す。続発性の多形神経膠芽腫は、既に存在していた低グレードの星状細胞腫から数ヶ月または数年をかけて発症し、主に若年層の人々に罹患し、巨細胞組織像を示す。

【0272】

悪性神経膠腫は、グレードの高い神経膠腫としても知られている。悪性神経膠腫は脳および脊髄に発症する。いくつかの局面において、本発明の組成物および方法は、脳悪性神経膠腫、例えば未分化星状細胞腫(AA)、多形神経膠芽腫(GBM)、未分化乏突起神経膠腫(AO)および未分化乏突起星状細胞腫(AOA)から選択されるものに罹患している対象の処置に用いてよい。いくつかの局面において、本発明の組成物および方法は、多形神経膠芽腫(GBM)に罹患している対象の処置に用いてよい。

10

【0273】

多形神経膠芽腫は、星状細胞腫の最も悪性のステージであり、殆どの患者において、生存時間は2年未満である。組織学的には、これらの腫瘍は、高い増殖指数、内皮増殖および局所的な壊死によって特徴付けられる。この病変の高い増殖性は、複数の分裂促進作用により生じたものであると考えられる。GBMの指標の1つは内皮増殖である。多数の血管新生増殖因子およびその受容体がGBMに見られる。

【0274】

星状細胞腫には生物学的なサブセットがあり、これはこの腫瘍で見られる臨床的な不均一性を反映し得る。これらのサブセットには、小児期の散在性線維性星状細胞腫の一形態であり、しばしば悪化をたどる脳幹神経膠腫が含まれる。脳幹GBMは、若い患者に罹患する成人GBMと、遺伝的な特徴が共通している。多形黄色星細胞腫(PXA)は、若年層の成人に主に罹患する、表層性の低グレード星状細胞腫瘍である。これらの腫瘍は奇妙な組織的外観を有するが、典型的には、遅い成長を示す腫瘍であるため、外科的な治療を受け入れ得る。しかし、PXAは、GBMとして再発する場合がある。毛様細胞性星状細胞腫は小児期の最も一般的な星状腫瘍であり、成人に罹患する散在性線維性の星状細胞腫とは臨床的および組織学的に異なる。上衣下巨細胞星状細胞腫(SEGA)は通常結節性硬化症(TS)と関連があり、TS患者の脳室を裏打ちする、所謂「蠟燭溝形成(candle guttering)」と組織学的に同じである、脳室周囲低グレード星状細胞腫瘍である。TS中の他の腫瘍病変と同様に、これらは成長が遅く、真性腫瘍よりも過誤腫に近い場合もある。小児期の線維形成性大脳星状細胞腫(DCAI)および線維形成性乳児星細胞腫(DIGG)は生後1年または2年の間に子供が罹患する、大きな、表在性の、通常嚢胞性の、良性星状細胞腫である。

20

30

【0275】

乏突起神経膠腫および乏突起星状細胞腫(混合神経膠腫)は、散在性、線維性の星状細胞腫に、臨床的および生物学的に最も近縁な、散在性の、主にCNS性の膠細胞腫瘍である。しかし、当該腫瘍は、星状細胞腫よりはるかに一般的でなく、散在性星状細胞腫よりも一般的により生命予後を示す。乏突起神経膠腫および乏突起星細胞腫は、WHOグレードIII未分化乏突起神経膠腫または未分化乏突起星細胞腫まで進行し得るか、またはWHOグレードIVのGBMまで進行し得る。したがって、乏突起膠細胞腫瘍を引き起こす遺伝子変化は、さらに他のGBMへの経路を構成する。

40

【0276】

上衣腫は、小児の侵襲性の脳室内腫瘍から、成人の良性脊髄腫瘍まで変わる、臨床的に多様な神経膠腫の群である。上衣腫からGBMへの移行は珍しい。脈絡叢腫瘍もまた、脳室系で優先的に発症する種々の腫瘍の群であり、小児の侵襲性のテント上脳室内腫瘍から、成人の良性の小脳橋角部腫瘍にまで渡る。脈絡叢腫瘍は、リー・フラウメニ症候群およびフォンヒッペル・リンダウ病(VHL)の患者でしばしば報告されている。

【0277】

髓芽腫は主に小児において、後頭蓋窩に発症する悪性の原始腫瘍である。これらの腫瘍は若年層の成人でも発症する。髓芽腫は、しばしば外科的に切除された後、化学療法および/または放射線照射により処置される。髓芽腫は、局所的または時によっては後頭蓋窩

50

から脊椎への滴下転移として再発し得る。髄膜腫は、髄膜で発症し、その下にある脳を圧迫する、一般的な頭蓋内腫瘍である。典型的には良性であり、明らかに悪性となることはごく稀であると考えられるが、これらの腫瘍を制御することは、しばしば臨床的な課題を提起するものである。髄膜腫の組織学的グレードは、大多数である良性、WHOグレード I/IV (82%); 割合は多くない非定型、WHO II/IV (15%); および低い頻度で、未分化または悪性、WHOグレード III/IV (3%)と変動する。

【0278】

シュワン細胞腫は、末梢神経系で発症する良性腫瘍である。シュワン細胞腫は、脳神経、特に第VIII脳神経の前提部分に発症し得（前庭性シュワン細胞腫、聴神経腫瘍）、ここでシュワン細胞腫は小脳・橋角部腫瘍として存在する。血管芽腫は、不特定起源の、内皮細胞、周皮細胞および所謂間質細胞からなる腫瘍である。これらの良性腫瘍は、若年の成人の小脳および脊髄に最も頻繁に発症する。複数の血管芽腫は、フォンヒッペル・リンダウ病 (VHL) を特徴とする。血管外皮腫(HPC)は、局所的に侵襲性の挙動を示し、転移し得る硬膜腫瘍である。硬膜ベースの血管外皮腫(HPC)の組織形成は長く議論されており、全く別のものと分類されている場合もあれば、髄膜腫のサブタイプと分類されている場合もある。

【0279】

原発性および転移性脳腫瘍の症候は、しばしば該腫瘍の脳内の位置およびサイズに依存する。脳の種々の領域がその特定の機能に重要であるため、臨床的な症候は大きく異なる。脳の前頭葉の腫瘍は、脱力感および麻痺、気分障害、思考困難、錯乱および失見当識ならびに広い感情の揺れ動きを引き起こし得る。頭頂葉腫瘍は、てんかん、痺れまたは麻痺、筆記困難、単純な数学的問題が解けなくなる、特定の動きに困難を伴うならびに触覚の損失を引き起こし得る。後頭葉の腫瘍は、各視界の半分の喪失、幻覚およびてんかんを引き起こし得る。側頭葉の腫瘍はてんかん、知覚および空間障害および受容性失語症を引き起こし得る。腫瘍が小脳内にある場合、その人は、運動失調、協調運動障害、頭痛および嘔吐を示し得る。視床下部の腫瘍は、感情変化、温冷知覚の変化を引き起こし得る。さらに、視床下部の腫瘍は、小児の成長および栄養に影響を与え得る。小脳という例外はあるが、脳の片側にある腫瘍は体の反対側に症候および障害を引き起こす。

【0280】

本発明の組成物および方法は、EGFRvIIIを発現する細胞または組織を有することによって特徴付けられているか、またはEGFRvIIIを発現する組織を有する疑いのある対象の処置に使用し得る。例えば、本発明の処置により利益を得る対象としては、神経膠腫の対象または、例えば頭痛、悪心および嘔吐、てんかん、視覚喪失、疼痛、脱力感、四肢の痺れおよび/または脳室内の圧力の上昇による脳神経障害の1つ以上の存在により、神経膠腫に罹患している疑いのある対象が挙げられる。特定の態様において、処置される神経膠腫は多形神経膠芽腫である。この態様によれば、多形神経膠芽腫は脳または脊髄にあり得る。

【0281】

本発明は、EGFRvIII発現細胞集団の増殖を阻害するかまたは該細胞を減少させる方法であって、EGFRvIII発現細胞を含む細胞集団を、本明細書に記載の、EGFRvIII発現細胞に結合するCAR発現細胞、例えば、T細胞に接触させることを含む、方法を提供する。特定の態様において、本発明は、EGFRvIIIを発現するがん細胞集団の増殖を阻害するかまたは、該集団を減少させる方法であって、EGFRvIII発現がん細胞集団を、本発明の、EGFRvIII発現細胞に結合するCAR発現細胞、例えばT細胞に接触させることを含む、方法を提供する。他の態様において、本発明は、EGFRvIII発現がん細胞集団の増殖を阻害または該細胞集団を減少させる方法であって、該EGFRvIII発現がん細胞集団を、EGFRvIII発現細胞に結合する本発明のEGFRvIII CART細胞集団に接触させることを含む、方法を提供する。特定の態様において、本発明のEGFRvIII CART細胞は、陰性対象に対し、神経膠腫またはEGFRvIII発現細胞に関連する他のがんに関連する対象またはモデル動物において、細胞および/またはがん細胞の含量(quantity)、数、量(amount)またはパーセンテージを、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも65%、少なくとも75%、少

なくとも85%、少なくとも95%または少なくとも99%低下させる。局面の一において、対象はヒトである。

【0282】

本発明はまた、EGFRvIII発現細胞に関連する障害（例えば、神経膠芽腫）を予防、処置および/または制御する方法であって、必要とする対象に、EGFRvIII発現細胞に結合する、本明細書記載のEGFRvIII CART細胞を投与することを含む、方法を提供する。局面の一において、対象はヒトである。

【0283】

本発明は、EGFRvIII発現細胞に関連するがんの再発を予防する方法であって、それを必要とする対象に、本明細書に記載の、EGFRvIII発現細胞に結合するEGFRvIII CART細胞を投与することを含む、方法を提供する。他の態様において、該方法は、それを必要とする対象に、有効量の、本明細書に記載する、EGFRvIII発現細胞に結合するEGFRvIII CART細胞を、有効量の他の療法と組み合わせて投与することを含む。

10

【0284】

局面の一において、本発明は、哺乳動物のT細胞での発現用プロモーターに作動可能に連結したEGFRvIII CARを含むベクターに関する。局面の一において、本発明は、EGFRvIII発現腫瘍を処置するのに用いるための、EGFRvIII CARを発現する組換えT細胞を提供する。抗EGFRvIII CARを発現する該組換えT細胞は、EGFRvIII CARTと称される。局面の一において、本発明のEGFRvIII CARTは、EGFRvIII CARTが抗原に応答して活性化し、該CARTが腫瘍細胞を標的とし、腫瘍の成長が阻害されるように、その表面に発現する本発明のEGFRvIII CARの少なくとも1つに腫瘍細胞を接触させることができる。

20

【0285】

局面の一において、本発明は、EGFRvIII発現腫瘍細胞の増殖を阻害する方法であって、CARTが抗原に応答して活性化し、がん細胞を標的化するように、該腫瘍細胞を本明細書に記載のEGFRvIII CAR T細胞と接触させることを含む、腫瘍の成長が阻害される方法に関する。局面の一において、該活性化CARTはがん細胞を標的として死滅させる。

【0286】

局面の一において、本発明は、対象におけるがんを処置する方法に関する。該方法は、がんが該対象中で処置されるように、本明細書中に記載のEGFRvIII CAR T細胞を対象に投与することを含む。本発明のEGFRvIII CAR T細胞で処置し得るがんの例は、EGFRvIII発現と関連するがんである。局面の一において、EGFRvIIIの発現と関連するがんは神経膠芽腫である。

30

【0287】

局面の一において、EGFRvIIIと関連するがんは、多形神経膠芽腫(GBM)、未分化星状細胞腫、巨細胞神経膠芽腫、膠肉腫、未分化乏突起神経膠腫、未分化上衣腫、脈絡叢がん、未分化神経節膠腫、松果体芽腫、髄上皮腫、上衣芽腫、髄芽腫、テント上原始神経外胚葉性腫瘍およびAT/RT(非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍)、非小細胞肺癌、肺癌、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、結腸直腸がんおよび腎臓がんならびにその任意の組合せからなる群から選択される。

【0288】

本発明は、T細胞がキメラ抗原受容体(CAR)を発現するように遺伝的に修飾されており、該CAR T細胞がそれを必要とするレシピエントに注入される、一種の細胞療法を含む。注入された細胞はレシピエント中の腫瘍細胞を死滅させることができる。いくつかの態様において、CAR修飾T細胞は、生体内で複製できるため、長期間維持され、持続性の腫瘍制御をもたらし得る。種々の局面において、患者に投与されたT細胞またはその後代細胞は、患者へのT細胞の投与後少なくとも4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、12ヶ月、13ヶ月、14ヶ月、15ヶ月、16ヶ月、17ヶ月、18ヶ月、19ヶ月、20ヶ月、21ヶ月、22ヶ月、23ヶ月、2年、3年、4年または5年の間、該患者中で維持される。

40

【0289】

局面の一において、本明細書に記載のCAR修飾T細胞は、哺乳動物の生体外免疫化および

50

/または生体内治療用のワクチンの一種であり得る。局面の一において、該哺乳動物はヒトである。

【0290】

生体外免疫化については、細胞を哺乳動物に投与する前に、次のうちの少なくとも1つを試験管内で行う：

i) 細胞の増殖、ii) CARをコードする核酸の細胞への導入またはiii) 該細胞の凍結保存。

【0291】

生体外手法は当該分野でよく知られており、後でより詳細に記載する。端的には、細胞を哺乳動物（例えばヒト）から単離し、本明細書に記載のCAR発現ベクターを用いて、遺伝的に修飾（例えば、試験管内形質導入または遺伝子導入）する。該CAR修飾細胞は、哺乳類レシピエントに投与して、治療効果を得ることができる。該哺乳類レシピエントはヒトであってよく、該CAR修飾細胞は、レシピエントと自家性であってよい。あるいは、該細胞は、レシピエントと同種異系、同系または異種関係であってよい。

【0292】

造血細胞および前駆細胞の生体外増殖の手法は、米国特許第5,199,942号明細書に記載されており（当該文献は参照により本明細書に包含される）、本発明の細胞に適用してよい。他の適当な方法も、当該分野では知られている。したがって、本発明は、特定の該細胞の生体外増殖方法に限定されるものではない。端的には、T細胞の生体外培養および増殖は：(1) 哺乳動物の末梢血回収物または骨髓移植片からCD34+ 造血幹細胞および前駆細胞を回収すること；および(2) 該細胞を生体外で増殖させることを含む。米国特許第5,199,942号明細書に記載の細胞増殖因子に加え、他の因子、例えばflit3-L、IL-1、IL-3およびc-kitリガンドを、該細胞の培養および増殖に用いてよい。

【0293】

生体外免疫化に関する細胞ベースワクチンの使用に加えて、本発明はまた、患者中の抗原に対する免疫応答を誘発する生体内免疫化のための組成物および方法を提供する。

【0294】

一般的に、本明細書に記載するように活性化および増殖させた細胞は、免疫不全の個人において発症する疾患の処置および予防に用いてよい。具体的には、本発明のCAR修飾T細胞は、EGFRvIIIの発現に関連する疾患、障害および症状の処置に用いられる。特定の局面において、本発明の細胞は、EGFRvIIIの発現に関連する疾患、障害および症状を発症する危険性のある患者の処置に用いられる。したがって、本発明は、EGFRvIIIの発現に関連する疾患、障害および症状の処置または予防方法であって、それを必要とする対象に、治療上有効量の、本発明のCAR修飾T細胞を投与することを含む方法を提供する。

【0295】

本発明のCAR修飾T細胞は、単独で投与しても、または希釈剤および/または他の成分、例えばIL-2または他のサイトカインまたは細胞集団または薬剤処理、例えば本明細書に記載のものと組み合わせて、医薬組成物として投与してもよい。

【0296】

本発明はまた、EGFRvIII発現細胞集団の増殖を阻害するか、または該細胞を減少させる方法であって、EGFRvIII発現細胞を含む細胞集団を、本明細書に記載の、EGFRvIII発現細胞に結合するEGFRvIII CART細胞に接触させることを含む、方法を提供する。特定の局面において、本発明は、EGFRvIIIを発現するがん細胞集団の増殖を阻害するか、または該集団を減少させる方法であって、EGFRvIII発現がん細胞集団を、EGFRvIII発現細胞に結合する本明細書に記載のEGFRvIII CART細胞に接触させることを含む、方法を提供する。局面の一において、本発明は、EGFRvIIIを発現するがん細胞集団の増殖を阻害するかまたは該集団を減少させる方法であって、EGFRvIII発現がん細胞集団を、本明細書に記載のEGFRvIII発現細胞に結合するEGFRvIII CART細胞に接触させることを含む、方法を提供する。特定の局面において、本発明のEGFRvIII CART細胞は、神経膠腫またはEGFRvIII発現細胞に関連する他のがん罹患している対象またはモデル動物において、陰性対照と比較して、

細胞および/またはがん細胞の含量、数、量またはパーセンテージを、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも65%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも95%または少なくとも99%減少させる。局面の一において、該対象はヒトである。

【0297】

本発明はまた、EGFRvIII発現細胞に関連する疾患(例えば神経膠芽腫)を予防、処置および/または制御する方法であって、必要とする対象に、本明細書に記載の、EGFRvIII発現細胞に結合するEGFRvIII CART細胞を投与することを含む、方法を提供する。局面の一において、該対象はヒトである。

【0298】

本発明は、EGFRvIII発現細胞と関連するがんの再発を予防する方法であって、それを必要とする対象に、本明細書に記載の、EGFRvIII発現細胞に結合するEGFRvIII CART細胞を投与することを含む、方法を提供する。局面の一において、該方法は、必要とする対象に、有効量の、本明細書に記載の、EGFRvIII発現細胞に結合するEGFRvIII CART細胞を、有効量の他の療法と組み合わせて投与することを含む。

【0299】

組み合わせ療法

本明細書に記載の、CAR発現細胞は、他の公知の薬剤および療法と組み合わせて用いてよい。本明細書において、「組み合わせて」投与するとは、2つの(またはそれより多くの)異なる処置が、対象の障害に関する苦痛の経過において該対象に送達されること、例えば該2つ以上の処置が、対象が障害についての診断を受けた後であるが、該障害が治療されるかもしくは除去されるか、または処置が他の理由で終了するよりも前に該対象に送達されることを指す。いくつかの態様において、第2の処置の送達を開始したときに第1の処置の送達は未だ進行中であるため、投与期間に重なりが見られる。このことを、本明細書中において、「同時」または「同時的な送達」と称する場合もある。他の態様において、1つの処置の送達はもう1つの処置を開始する前に終了する。いずれの場合においても、いくつかの態様において、該処置は、組合せ投与であるためにより有効である。例えば、第2の処置は、第1の処置なしに投与する場合よりもより効果的である、例えば、第2の処置が少なくとも同等の効果がみられるか、または第2の処置が症候をより大幅に減少させる。または、同等の状況が第1の処置についてみられる。いくつかの態様において、送達は、症候または該障害に関連する他のパラメーターの低下が、一方の処置がない場合のもう一方の処置について観察されるよりも大きくなるように行われる。かかる2つの処置の効果は部分的に相加的であっても、全体的に相加的であっても、または相加よりも優れたものであってもよい。該送達は、第2の処置が送達されるときに、第1の処置の効果が未だ検出できるように行ってもよい。

【0300】

本明細書に記載のCAR発現細胞および少なくとも1つの付加的な治療剤を、同時に、同じもしくは別の組成物中で投与しても、または連続して投与してもよい。連続投与については、本明細書に記載のCAR発現細胞を先に投与し、付加的な薬剤を後に投与しても、または投与の順番を逆にしてもよい。

【0301】

さらなる局面において、本明細書に記載のCAR発現細胞は、外科手術、化学療法、放射線療法、免疫抑制剤、例えばシクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノレートおよびFK506、抗体または他の免疫除去剤、例えばCAMPATH、抗CD3抗体または他の抗体療法、サイトキシン(cytotoxin)、フルダラビン、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、FR901228、サイトカインおよび放射線照射と組み合わせた処置レジメンに用いてよい。悪性神経膠腫用の免疫療法アプローチの例が、Johnson et al. 2010 Curr Neurol Neurosci Rep 10:259-266に記載されている。いくつかの態様において、本明細書に記載のCAR発現細胞は、細胞外マトリクスタンパク質、例えばテネイシン(tenascin)を標的とする薬剤、例えば抗テネイシン抗体、例えば²¹¹At-

10

20

30

40

50

標識抗テネイシン抗体と組み合わせた処置レジメンで用いてよい。いくつかの態様において、本明細書に記載のCAR発現細胞は、免疫調節剤、例えばインターフェロン、インターフェロン、TGF- β 2ペプチド阻害剤またはポリICLCと組み合わせた処置レジメンで用いてよい。いくつかの態様において、本明細書に記載のCAR発現細胞は、WT1転写因子ペプチドワクチン、例えばIzumoto et al. 2008 J Neurosurg 108:963-971に記載のものと組み合わせた処置レジメンで用いてよい。

【0302】

態様の一において、本明細書に記載のCAR発現細胞は、化学療法剤と組み合わせて用いてよい。化学療法剤の例としては、アルキル化剤、プラチナベースの薬剤、血管新生阻害剤(例えば、VEGF経路阻害剤)、チロシンキナーゼ阻害剤(例えば、EGF経路阻害剤)、mTOR阻害剤が挙げられる。

【0303】

組み合わせ療法への使用が考えられる一般的な化学療法剤としては次のものが挙げられる：アナストロゾール(Arimidex(登録商標))、ピカルタミド(Casodex(登録商標))、硫酸ブレオマイシン(Blenoxane(登録商標))、ブスルファン(Myleran(登録商標))、ブスルファン注射薬(Busulfex(登録商標))、カペシタピン(Xeloda(登録商標))、N4-ペントキシカルボニル-5-デオキシ-5-フルオロシチジン、カルボプラチン(Paraplatin(登録商標))、カルムスチン(BicNU(登録商標))、クロラムブシル(Leukeran(登録商標))、シスプラチン(Platinol(登録商標))、クラドリピン(Leustatin(登録商標))、シクロホスファミド(Cytoxan(登録商標)またはNeosar(登録商標))、シタラビン、シトシンアラビノシド(Cytosar-U(登録商標))、シタラビンリポソーム注射薬(DepoCyt(登録商標))、ダカルバジン(DTIC-Dome(登録商標))、ダクチノマイシン(アクチノマイシンD、Cosmegan)、塩酸ダウノルビシン(Cerubidine(登録商標))、クエン酸ダウノルビシンリポソーム注射薬(Daunoxome(登録商標))、デキサメタゾン、ドセタキセル(Taxotere(登録商標))、塩酸ドキソルビシン(Adriamycin(登録商標)、Rubex(登録商標))、エトポシド(Vepesid(登録商標))、リン酸フルダラビン(Fludara(登録商標))、5-フルオロウラシル(Adrucil(登録商標)、Efudex(登録商標))、フルタミド(Eulixin(登録商標))、テザシチビン(tezacitibine)、ゲムシタピン(ジフルオロデオキシシチジン)、ヒドロキシウレア(Hydrea(登録商標))、イダルビシン(Idamycin(登録商標))、イホスファミド(IFEX(登録商標))、イリノテカン(Camptosar(登録商標))、L-アスパラギナーゼ(ELSPAR(登録商標))、ロイコボリンカルシウム、メルファラン(Alkeran(登録商標))、6-メルカトプリン(Purinethol(登録商標))、メトトレキサート(Metotrexate(登録商標))、ミトキサントロン(Novantrone(登録商標))、マイロターグ、パクリタキセル(Taxol(登録商標))、フェニックス(イットリウム90/MX-DTPA)、ペントスタチン、ポリフェプロザン20カルムスチンインプラント(Gliadel(登録商標))、クエン酸タモキシフェン(Nolvadex(登録商標))、テニポシド(Vumon(登録商標))、6-チオグアニン、チオテパ、チラバザミン(Tirazone(登録商標))、塩酸トボテカン注射薬(Hycamptin(登録商標))、ビンブラスチン(Velban(登録商標))、ピンクリスチン(Oncovin(登録商標))およびビノレルビン(Navelbine(登録商標))。

【0304】

アルキル化剤の例としては次のものが挙げられるが、これらに限定されない：ナイトロジェンマスタード、エチレンイミン誘導体、スルホン酸アルキル、ニトロソウレアおよびトリアゼン)：ウラシルマスタード(Aminouracil Mustard(登録商標)、Chlorethaminacil(登録商標)、Demethylidopan(登録商標)、Desmethylidopan(登録商標)、Haemanthamine(登録商標)、Nordopan(登録商標)、Uracil nitrogen mustard(登録商標)、Uracillost(登録商標)、Uracilmostaza(登録商標)、Uramustin(登録商標)、Uramustine(登録商標))、クロルメチン(Mustargen(登録商標))、シクロホスファミド(Cytoxan(登録商標)、Neosar(登録商標)、Clafen(登録商標)、Endoxan(登録商標)、Procytox(登録商標)、RevimmuneTM)、イホスファミド(Mitoxana(登録商標))、メルファラン(Alkeran(登録商標))、クロラムブシル(Leukeran(登録商標))、ピポプロマン(Amedel(登録商標)、Vercyte(登録商標))、トリエチレンメラミン(Hemel(登録商標)、Hexalen(登録商標)、Hexastat(登録商標))、

トリエチレンチオホスホラミン、テモゾロミド(Temodar(登録商標))、チオテパ(Thioplex(登録商標))、ブスルファン(Busilvex(登録商標))、Myleran(登録商標))、カルムスチン(BiCNU(登録商標))、ロムスチン(CeeNU(登録商標))、ストレプトゾシン(Zanosar(登録商標))およびダカルバジン(DTIC-Dome(登録商標))。さらなるアルキル化剤の例としては、以下のものが挙げられるが、これらに限定されない：オキサリプラチン(Eloxatin(登録商標))；テモゾロミド(Temodar(登録商標)) および Temodal(登録商標))；ダクチノマイシン(アクチノマイシン-Dとしても知られる、Cosmegen(登録商標))；メルファラン(L-PAM、L-サルコリシンおよびフェニルアラニンマスタードとしても知られる、Alkeran(登録商標))；アルトレタミン(ヘキサメチルメラミン (HMM)としても知られる、Hexalen(登録商標))；カルムスチン (BiCNU(登録商標))；ベンダムスチン (Treanda(登録商標))；ブスルファン (Busulfex(登録商標))およびMyleran(登録商標))；カルボプラチン (Paraplatin(登録商標))；ロムスチン(CCNUとしても知られる、CeeNU(登録商標))；シスプラチン(CDDPとしても知られる、Platinol(登録商標))およびPlatinol(登録商標)-AQ)；クロラムブシル(Leukeran(登録商標))；シクロホスファミド (Cytoxan(登録商標)) およびNeosar(登録商標))；ダカルバジン(DTIC、DICおよびイミダゾールカルボキサミドとしても知られる、DTIC-Dome(登録商標))；アルトレタミン(ヘキサメチルメラミン(HMM)としても知られる、Hexalen(登録商標))；イホスファミド (Ifex(登録商標))；プレドニムスチン(Prednumustine)；プロカルバジン (Matulane(登録商標))；メクロレタミン (ナイトロジェンマスタード、ムスチンおよび塩酸メクロレタミンとしても知られる、Mustargen(登録商標))；Streptozocin (Zanosar(登録商標))；チオテパ (チオホスファミド、TESPAおよびTSPAとしても知られる、Thioplex(登録商標))；シクロホスファミド (Endoxan(登録商標)、Cytoxan(登録商標)、Neosar(登録商標)、Procytox(登録商標)、Revimmune(登録商標))；およびベンダムスチンHCl (Treanda(登録商標))。

【 0 3 0 5 】

プラチナベースの剤の例としては、カルボプラチン、シスプラチンおよびオキサリプラチンが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【 0 3 0 6 】

血管新生阻害剤の例としては、次のものが挙げられるが、これらに限定されるものではない：A6 (Angstrom Pharmaceuticals)、ABT-510 (Abbott Laboratories)、ABT-627 (アトラセンタン) (Abbott Laboratories/Xinlay)、ABT-869 (Abbott Laboratories)、アクチミド (CC4047、Pomalidomide) (Celgene Corporation)、AdGVPEDF.11D (GenVec)、ADH-1 (エクスヘリン) (Adherex Technologies)、AEE788 (Novartis)、AG-013736 (アキシチニブ) (Pfizer)、AG3340 (プリノマスタット) (Agouron Pharmaceuticals)、AGX1053 (AngioGenex)、AGX51 (AngioGenex)、ALN-VSP (ALN-VSP 02) (Alnylam Pharmaceuticals)、AMG 386 (Amgen)、AMG706 (Amgen)、アパチニブ(YN968D1) (Jiangsu Hengrui Medicine)、AP23573 (リダフォロリムス/MK8669) (Ariad Pharmaceuticals)、AQ4N (Novavea)、ARQ 197 (ArQule)、ASA404 (Novartis/Antisoma)、アチプリモド(Callisto Pharmaceuticals)、ATN-161 (Attenuon)、AV-412 (Aveo Pharmaceuticals)、AV-951 (Aveo Pharmaceuticals)、アバスチン (ベバシズマブ) (Genentech)、AZD2171 (セジラニブ/レセンチン) (AstraZeneca)、BAY 57-9352 (テタチニブ) (Bayer)、BEZ235 (Novartis)、BIBF1120 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals)、BIBW 2992 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals)、BMS-275291 (Bristol-Myers Squibb)、BMS-582664 (Brivanib) (Bristol-Myers Squibb)、BMS-690514 (Bristol-Myers Squibb)、カルシトリオール、CCI-779 (トーリセル) (Wyeth)、CDP-791 (ImClone Systems)、セフラトニン(Ceflatonin) (ホモハリントニン/HHT) (ChemGenex Therapeutics)、セレブレックス(セレコキシブ) (Pfizer)、CEP-7055 (セファロン/Sanofi)、CHIR-265 (Chiron Corporation)、NGR-TNF、COL-3 (メタスタット) (Collagenex Pharmaceuticals)、コンプレタスタチン(Oxigene)、CP-751,871(フィギツムマブ) (Pfizer)、CP-547,632 (Pfizer)、CS-7017 (Daiichi Sankyo Pharma)、CT-322 (アンジオセプト) (Adnexus)、クルクミン、ダルテパリン(フラグミン) (Pfizer)、ジスルフィラム(アンタピュース)、E7820 (Eisai Limited)、E7080 (Eisai Limited)、EMD 121974(シ

10

20

30

40

50

レンジタイド) (EMD Pharmaceuticals)、ENMD-1198 (EntreMed)、ENMD-2076 (EntreMed)、エンドスター (Endostar) (Simcere)、アービタックス (ImClone/Bristol-Myers Squibb)、EZN-2208 (Enzon Pharmaceuticals)、EZN-2968 (Enzon Pharmaceuticals)、GC1008 (Genzyme)、ゲニステイン、GSK1363089 (フォレチニブ) (GlaxoSmithKline)、GW786034 (パゾパニブ) (GlaxoSmithKline)、GT-111 (Vascular Biogenics Ltd.)、IMC--1121B (ラムシルマブ) (ImClone Systems)、IMC-18F1 (ImClone Systems)、IMC-3G3 (ImClone LLC)、INCB007839 (Incyte Corporation)、INGN 241 (Introgen Therapeutics)、イレッサ (ZD1839/ゲフィチニブ)、LBH589 (ファリーダック/パノビノスタット) (Novartis)、ルセンティス (ランビズマブ) (Genentech/Novartis)、LY317615 (エンザスタウリン) (Eli Lilly and Company)、マクジェン (ペガブタニブ) (Pfizer)、MEDI522 (アベグリン (Abegrin)) (MedImmune)、MLN518 (タンデュチニブ) (Millennium)、ネオバスタット (Neovastat) (AE941/ベネフィン) (Aeterna Zentaris)、ネクサパール (Bayer/Onyx)、NM-3 (Genzyme Corporation)、ノスカピン (Cougar Biotechnology)、NPI-2358 (Nereus Pharmaceuticals)、OSI-930 (OSI)、Palomid 529 (Paloma Pharmaceuticals, Inc.)、Panzem Capsules (2ME2) (EntreMed)、Panzem NCD (2ME2) (EntreMed)、PF-02341066 (Pfizer)、PF-04554878 (Pfizer)、PI-88 (Progen Industries/Medigen Biotechnology)、PKC412 (Novartis)、Polypheno E (緑茶抽出物) (Polypheno E International, Inc.)、PPI-2458 (Praecis Pharmaceuticals)、PTC299 (PTC Therapeutics)、PTK787 (パタラニブ) (Novartis)、PXD101 (ベリノスタット) (CuraGen Corporation)、RAD001 (エベロリムス) (Novartis)、RAF265 (Novartis)、レゴラフェニブ (BAY73-4506) (Bayer)、レプリミド (Celgene)、レターン (Retaane) (Alcon Research)、SN38 (リボソーム) (Neopharm)、SNS-032 (BMS-387032) (Sunesis)、SOM230 (パシレオチド) (Novartis)、スクアラミン (Genaera)、スラミン、ステント (Pfizer)、タルセバ (Genentech)、TB-403 (Thrombogenics)、テンポスタチン (Tempostat) (Collard Biopharmaceuticals)、テトラチオモリブデート (Sigma-Aldrich)、TG100801 (TargeGen)、サリドマイド (Celgene Corporation)、チンザパリンナトリウム、TKI258 (Novartis)、TRC093 (Tacon Pharmaceuticals Inc.)、VEGF Trap (アフリベルセプト) (Regeneron Pharmaceuticals)、VEGF Trap-Eye (Regeneron Pharmaceuticals)、ベグリン (Veglin) (VasGene Therapeutics)、ボルテゾミブ (Millennium)、XL184 (Exelixis)、XL647 (Exelixis)、XL784 (Exelixis)、XL820 (Exelixis)、XL999 (Exelixis)、ZD6474 (AstraZeneca)、ボリノスタット (Merck) および ZSTK474。

【 0 3 0 7 】

血管内皮増殖因子 (VEGF) 受容体阻害剤の例としては以下が挙げられるが、これらに限定されるものではない：ベパシズマブ (Avastin (登録商標))、アキシチニブ (Inlyta (登録商標))；ブリバニブアラニネート (BMS-582664、(S)-((R)-1-(4-(4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イルオキシ)-5-メチルピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-6-イルオキシ)プロパン-2-イル)2-アミノプロパノエート)；ソラフェニブ (Nexavar (登録商標))；パゾパニブ (Votrient (登録商標))；リンゴ酸スニチニブ (Sutent (登録商標))；セジラニブ (AZD2171、CAS 288383-20-1)；パラガテフ (BIBF1120、CAS 928326-83-4)；フォレチニブ (GSK1363089)；テラチニブ (BAY57-9352、CAS 332012-40-5)；アパチニブ (YN968D1、CAS 811803-05-1)；イマチニブ (Gleevec (登録商標))；ボナチニブ (AP24534、CAS 943319-70-8)；チボザニブ (AV951、CAS 475108-18-0)；レゴラフェニブ (BAY73-4506、CAS 755037-03-7)；二塩酸パタラニブ (PTK787、CAS 212141-51-0)；ブリバニブ (BMS-540215、CAS 649735-46-6)；バンデタニブ (Caprelsa (登録商標) または AZD6474)；ニリン酸モテサニブ (AMG706、CAS 857876-30-3、N-(2,3-ジヒドロ-3,3-ジメチル-1H-インドール-6-イル)-2-[(4-ピリジニルメチル)アミノ]-3-ピリジニカルボキサミド、国際公開第02/066470号に記載)；二乳酸ドピチニブ (TKI258、CAS 852433-84-2)；リンファニブ (ABT869、CAS 796967-16-3)；カボザンチニブ (XL184、CAS 849217-68-1)；レスタウルチニブ (CAS 111358-88-4)；N-[5-[[[5-(1,1-ジメチルエチル)-2-オキサゾリル]メチル]チオ]-2-チアゾリル]-4-ピペリジニカルボキサミド (BMS38703、CAS 345627-80-7)；(3R,4R)-4-アミノ-1-((4-((3-メトキシフェニル)アミノ)ピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-5-イル)メチル)ピペリジン-3-オール (BMS69

0514); N-(3,4-ジクロロ-2-フルオロフェニル)-6-メトキシ-7-[[(3a, 5, 6a)-オクタヒドロ-2-メチルシクロペンタ[c]ピロール-5-イル]メトキシ]-4-キナゾリンアミン (XL647, CAS 781613-23-8); 4-メチル-3-[[1-メチル-6-(3-ピリジニル)-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-イル]アミノ]-N-[3-(トリフルオロメチル)フェニル]-ベンズアミド (BHG712, CAS 940310-85-0); およびアフリベルセプト (Eylea(登録商標))。

【 0 3 0 8 】

EGF経路阻害剤の例としては、tyrphostin 46、EKB-569、エルロチニブ (Tarceva(登録商標))、ゲフィチニブ (Iressa(登録商標))、アービタックス、ニモツズマブ、ラパチニブ (Tykerb(登録商標))、セツキシマブ (抗EGFR mAb)、¹⁸⁸Re- 標識ニモツズマブ (抗EGFR mAb) ならびに国際公開第97/02266号、欧州特許出願公開第0 564 409号、国際公開第99/03854号、欧州特許出願公開第0 520 722号、欧州特許出願公開第0 566 226号、欧州特許出願公開第0 787 722号、欧州特許出願公開第0 837 063号、米国特許第5,747,498号、国際公開第98/10767号、国際公開第97/30034号、国際公開第97/49688号、国際公開第97/38983号および国際公開第96/33980号に一般のおよび具体的に開示されている化合物が挙げられるが、これらに限定されるものではない。EGFR抗体の例としては、セツキシマブ (Erbix(登録商標)); パニツムマブ (Vectibix(登録商標)); マツズマブ (EMD-72000); トラスツズマブ (Herceptin(登録商標)); ニモツズマブ (hR3); ザルツムマブ; TheraCIM h-R3; MDX 0447 (CAS 339151-96-1); およびch806 (mAb-806, CAS 946414-09-1) が挙げられるが、これらに限定されるものではない。上皮成長因子受容体(EGFR)阻害剤の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されるものではない: 塩酸エルロチニブ (Tarceva(登録商標))、ゲフィチニブ (Iressa(登録商標)); N-[4-[(3-クロロ-4-フルオロフェニル)アミノ]-7-[[(3 " S ")-テトラヒドロ-3-フラニル]オキシ]-6-キナゾリニル]-4-(ジメチルアミノ)-2-プテンアミド、Tovok(登録商標)); パンデタニブ (Caprelsa(登録商標)); ラパチニブ (Tykerb(登録商標)); (3R,4R)-4-アミノ-1-((4-((3-メトキシフェニル)アミノ)ピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-5-イル)メチル)ピペリジン-3-オール (BMS690514); 二塩酸カネルチニブ (CI-1033); 6-[4-[(4-エチル-1-ピペラジニル)メチル]フェニル]-N-[(1R)-1-フェニルエチル]-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-4-アミン (AEE788, CAS 497839-62-0); ムブリチニブ (TAK165); ペリチニブ (EKB569); アファチニブ (BIBW2992); ネラチニブ (HKI-272); N-[4-[[1-[(3-フルオロフェニル)メチル]-1H-インダゾール-5-イル]アミノ]-5-メチルピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-6-イル]-カルバミン酸、(3S)-3-モルホリニルメチルエステル (BMS599626); N-(3,4-ジクロロ-2-フルオロフェニル)-6-メトキシ-7-[[(3a, 5, 6a)-オクタヒドロ-2-メチルシクロペンタ[c]ピロール-5-イル]メトキシ]-4-キナゾリンアミン (XL647, CAS 781613-23-8); および4-[4-[(1R)-1-フェニルエチル]アミノ]-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-6-イル]-フェノール (PKI166, CAS 187724-61-4)。

【 0 3 0 9 】

mTor阻害剤の例としては、ラパマイシン (Rapamune(登録商標)) およびその類似体および誘導体; SDZ-RAD; テムシロリムス (Torisel(登録商標)); CCI-779としても知られる); リダフォロリムス (以前はデフェロリムスとして知られていた、(1R,2R,4S)-4-[(2R)-2-[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-ジヒドロキシ-19,30-ジメトキシ-15,17,21,23,29,35-ヘキサメチル-2,3,10,14,20-ペンタオキソ-11,36-ジオキサ-4-アザトリシクロ[30.3.1.0^{4,9}]ヘキサトリアコンタ-16,24,26,28-テトラエン-12-イル]プロピル]-2-メトキシシクロヘキシルジメチルホスフィネート (AP23573およびMK8 669としても知られ、国際公開第03/064383号に記載されている); エベロリムス (Afinitor(登録商標) またはRAD001); ラパマイシン (AY22989, Sirolimus(登録商標)); セマピモド (Simapimod) (CAS 164301-51-3); (5-{2,4-ビス[(3S)-3-メチルモルホリン-4-イル]ピリド[2,3-d]ピリミジン-7-イル}-2-メトキシフェニル)メタノール (AZD8055); 2-アミノ-8-[trans-4-(2-ヒドロキシエトキシ)シクロヘキシル]-6-(6-メトキシ-3-ピリジニル)-4-メチル-ピリド[2,3-d]ピリミジン-7(8H)-オン (PF04691502, CAS 1013101-36-4); およびN²-[1,4-ジオキソ-4-[[4-(4-オキソ-8-フェニル-4H-1-ベンゾピラン-2-イル)モルホリニウム-4-イル]メトキシ]ブチル]-L-アルギニルグリシル-L- -アスパラチル-L-セリン- 内部塩 (SF

10

20

30

40

50

1126、CAS 936487-67-1)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0310】

ホスホイノシチド3キナーゼ (PI3K) 阻害剤の例としては、4-[2-(1H-インダゾール-4-イル)-6-[[4-(メチルスルホニル)ピペラジン-1-イル]メチル]チエノ[3,2-d]ピリミジン-4-イル]モルホリン (GDC 0941としても知られ、国際公開第09/036082号および第09/055730号に記載されている); 2-メチル-2-[4-[3-メチル-2-オキソ-8-(キノリン-3-イル)-2,3-ジヒドロイミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル]フェニル]プロピオニトリル (BEZ 235またはNVP-BEZ 235としても知られ、国際公開第06/122806号に記載されている); 4-(トリフルオロメチル)-5-(2,6-ジモルホリノピリミジン-4-イル)ピリジン-2-アミン (BKM120またはNVP-BKM120としても知られ、国際公開第2007/084786号に記載); トザセルチブ (VX680またはMK-0457、CAS 639089-54-6); (5Z)-5-[[4-(4-ピリジニル)-6-キノリニル]メチレン]-2,4-チアゾリジンジオン (GSK1059615、CAS 958852-01-2); (1E,4S,4aR,5R,6aS,9aR)-5-(アセチルオキシ)-1-[(ジ-2-プロベニルアミノ)メチレン]-4,4a,5,6,6a,8,9,9a-オクタヒドロ-11-ヒドロキシ-4-(メトキシメチル)-4a,6a-ジメチル-シクロペンタ[5,6]ナフト[1,2-c]ピラン-2,7,10(1H)-トリオン (PX866、CAS 502632-66-8); および8-フェニル-2-(モルホリン-4-イル)-クロメン-4-オン (LY294002、CAS 154447-36-6)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。プロテインキナーゼB (PKB)またはAKT阻害剤の例としては、8-[4-(1-アミノシクロブチル)フェニル]-9-フェニル-1,2,4-トリアゾロ[3,4-f][1,6]ナフチリジン-3(2H)-オン (MK-2206、CAS 1032349-93-1); ペリフォシン (KRX0401); 4-ドデシル-N-1,3,4-チアジアゾール-2-イル-ベンゼンスルホンアミド (PHT-427、CAS 1191951-57-1); 4-[2-(4-アミノ-1,2,5-オキサジアゾール-3-イル)-1-エチル-7-[(3S)-3-ピペリジニルメトキシ]-1H-イミダゾ[4,5-c]ピリジン-4-イル]-2-メチル-3-ブチン-2-オール (GSK690693、CAS 937174-76-0); 8-(1-ヒドロキシエチル)-2-メトキシ-3-[(4-メトキシフェニル)メトキシ]-6H-ジベンゾ[b,d]ピラン-6-オン (palomid 529、P529またはSG-00529); トリシリピン (Tricirbine) (6-アミノ-4-メチル-8-(D-リボフラノシル)-4H,8H-ピロロ[4,3,2-de]ピリミド[4,5-c]ピリダジン); (S)-[[[5-(3-メチル-1H-インダゾール-5-イル)-3-ピリジニル]オキシ]メチル]-ベンゼンエタンアミン (A674563、CAS 552325-73-2); 4-[(4-クロロフェニル)メチル]-1-(7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-4-イル)-4-ピペリジンアミン (CCT128930、CAS 885499-61-6); 4-(4-クロロフェニル)-4-[4-(1H-ピラゾール-4-イル)フェニル]-ピペリジン (AT7867、CAS 857531-00-1); およびアルチェキシ (Archexin) (RX-0201、CAS 663232-27-7)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0311】

カルシウム依存性ホスファターゼであるカルシニューリンを阻害する薬剤(シクロスポリンおよびFK506)または、増殖因子誘発性のシグナル伝達に重要なp70S6キナーゼを阻害する薬剤(ラパマイシン)を用いてもよい(Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993)。さらなる局面において、本発明の細胞組成物は、骨髄移植、化学療法剤、例えば、フルダラビン、体外照射療法(XRT)、シクロホスファミドおよび/または抗体、例えばOKT3またはCAMPATHを用いたT細胞除去療法と組み合わせて(例えばその前、同時または後に)投与してよい。局面の一において、本発明の細胞組成物は、例えば、CD20と反応する薬剤、例えばリツキシマンを用いたB細胞除去療法の後に投与される。例えば、態様の一において、対象は、高用量の化学療法による標準的な処置の後に、末梢血幹細胞移植を受けてよい。特定の態様において、該移植の後に、対象は、本発明の増殖した免疫細胞の注入投与を受ける。さらなる態様において、増殖した細胞を、外科手術の前または後に投与する。

【0312】

態様の一において、対象は、CAR発現細胞の投与に伴う副作用を減少させるか、または緩和させる薬剤の投与を受けてよい。CAR発現細胞の投与に伴う副作用としては、CRSおよびマクロファージ活性化症候群(MAS)とも称される血球貪食性リンパ組織球症(HLH)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。CRSの症候としては、高熱、悪心、一過性

10

20

30

40

50

の低血圧および低酸素症等が挙げられる。したがって、本明細書に記載の方法は、本明細書に記載のCAR発現細胞を対象に投与し、CAR発現細胞による処置より生じる可溶性因子のレベルの上昇を制御する薬剤を投与することを含んでいてよい。態様の一において、対象において上昇する可溶性因子は、IFN-、TNF、IL-2およびIL-6の1つ以上である。したがって、この副作用を処置するために投与される薬剤は、これらの可溶性因子の1つ以上を中和する薬剤であってよい。該薬剤としては、例えば、ステロイド、TNF阻害剤およびIL-6阻害剤が挙げられるが、これらに限定されるものではない。TNF阻害剤の例は、エンタネルセプト(entanercept)である。IL-6阻害剤の例はトシリズマブ(toc)である。

【0313】

態様の一において、対象は、CAR発現細胞の活性を上昇させる薬剤の投与を受けてよい。例えば、態様の一において、該薬剤は、阻害分子を阻害する薬剤であってよい。阻害分子、例えばPD1 (Programmed Death 1)は、いくつかの態様では、CAR発現細胞の、免疫エフェクター応答の開始能を低下させ得る。阻害分子の例としては、PD1、PD-L1、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4およびTGFRが挙げられる。阻害分子の、DNA、RNAまたはタンパク質レベルでの阻害による阻害は、CAR発現細胞の挙動を最適化し得る。複数の態様において、阻害性核酸、例えばdsRNA、例えばsiRNAまたはshRNAのような阻害性核酸は、CAR発現細胞中の阻害分子の発現を阻害するのに使用し得る。態様の一において、該阻害剤は、shRNAである。態様の一において、該阻害分子は、CAR発現細胞中で阻害される。これらの態様において、阻害分子の発現を阻害するdsRNA分子は、CARの成分、例えば全ての成分をコードする核酸に連結している。態様の一において、阻害シグナルの阻害剤は、例えば、阻害分子に結合する抗体または抗体断片であってよい。例えば、該物質は、PD1、PD-L1、PD-L2またはCTLA4に結合する抗体または抗体断片であってよい(例えば、イピリムマブ(MDX-010およびMDX-101とも称され、Yervoy(登録商標)として販売; Bristol-Myers Squibb; トレメリムマブ(Tremelimumab) (Pfizerより市販のIgG2モノクローナル抗体、以前はチシリムマブ、CP-675,206として知られる))。 10 20

【0314】

PD1は、CD28、CTLA-4、ICOSおよびBTLAをも含むCD28ファミリーの受容体の阻害性の一員である。PD-1は、活性化B細胞、T細胞および骨髄細胞に発現される (Agata et al. 1996 Int. Immunol 8:765-75)。PD1、PD-L1およびPD-L2に対して2つのリガンドが、PD1への結合時にT細胞活性を低下させることが示されている (Freeman et al. 2000 J Exp Med 192:1027-34; Latchman et al. 2001 Nat Immunol 2:261-8; Carter et al. 2002 Eur J Immunol 32:634-43)。PD-L1は、ヒトのがんに豊富である (Dong et al. 2003 J Mol Med 81:281-7; Blank et al. 2005 Cancer Immunol. Immunother 54:307-314; Konishi et al. 2004 Clin Cancer Res 10:5094)。免疫抑制は、PD1とPD-L1の局所的な相互作用を阻害することによって逆行し得る。PD1、PD-L1およびPD-L2の抗体、抗体断片および他の阻害剤は当該分野で利用可能であり、本明細書に記載のCD123 CARと組み合わせて用いてよい。例えば、ニボルマブ(BMS-936558またはMDX1106とも称される; Bristol-Myers Squibb)は、PD-1を特異的に遮断する完全ヒトIgG4モノクローナル抗体である。ニボルマブ(クローン5C4)およびPD-1に特異的に結合する他のヒトモノクローナル抗体は、米国特許第8,008,449号明細書および国際公開第2006/121168号に記載されている。ピジリズマブ(CT-011; Cure Tech)は、PD-1に結合するヒト化IgG1kモノクローナル抗体である。ピジリズマブおよび他のヒト化抗PD1モノクローナル抗体は、国際公開第2009/101611号に記載されている。ランプロリズマブ(MK03475とも称される; Merck)は、PD1に結合するヒト化IgG4モノクローナル抗体である。ランプロリズマブおよび他のヒト化抗PD1抗体は米国特許第8,354,509号および国際公開第2009/114335号に記載されている。MDPL3280A (Genentech / Roche)は、PD-L1に結合するヒトFc最適化IgG1モノクローナル抗体である。MDPL3280AおよびPD-L1に対する他のヒトモノクローナル抗体は、米国特許第7,943,743号および米国特許出願公開第20120039906号明細書に記載されている。他の抗PD-L1結合剤としては、YW243.55.S70 (重鎖および軽鎖可変領域は、国際公開第2010/077634号の配列番号20および21に記載) およびMDX-1105 (BMS-936559とも称される、例えば国際公開第2007/005874号に記載の抗PD 30 40 50

-L1結合剤)が挙げられる。AMP-224 (B7-DCIlg; Amplimmune; 例えば、国際公開第2010/027827号および国際公開第2011/066342号に記載)は、PD1とB7-H1の間の相互作用を遮断するPD-L2 Fc融合可溶性受容体である。他の抗PD1抗体としては、AMP 514 (Amplimmune)とりわけ、米国特許第8,609,089号、米国特許出願公開第2010028330号および/または米国特許出願公開第20120114649号明細書に記載の抗PD1抗体が挙げられる。CAR発現細胞の活性を上昇させる物質は、例えば、第一ドメインが阻害分子またはその断片であり、第二ドメインが、ポジティブシグナルと結合するポリペプチドである、第一ドメインおよび第二ドメインを含む融合タンパク質であってよく、ここで、ポジティブシグナルと結合するポリペプチドは、例えば、CD28、ICOSおよびその断片、例えばCD28および/またはICOSの細胞内シグナル伝達ドメインである。態様の一において、該融合タンパク質は、CARを発現する細胞と同じ細胞に発現される。他の局面において、該融合タンパク質は、抗EGFRvIII CARを発現しない細胞、例えばT細胞により発現される。

10

【0315】

態様の一において、本明細書に記載のCAR発現細胞の活性を上昇させる物質は、miR-17-92である。

【0316】

医薬組成物および処置

本発明の医薬組成物は、CAR発現細胞、例えば、本明細書に記載する、複数のCAR発現細胞を、1つ以上の薬学的または生理学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤と組合せて、含んでいてよい。該組成物は、緩衝液、例えば中性の緩衝化食塩水およびリン酸緩衝化食塩水等；炭水化物、例えばグルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン、マンニトール；タンパク質；ポリペプチドまたはアミノ酸、例えばグリシン；抗酸化剤；キレート剤、例えばEDTAまたはグルタチオン；アジュバント（例えば水酸化アルミニウム）；および保存料を含んでいてよい。本発明の組成物は、局面の一において、静脈内投与用に製剤される。

20

【0317】

本発明の医薬組成物は、処置する（または予防する）疾患に適当な方法で投与してよい。適当な投与量は臨床試験により決定し得るが、投与の量および頻度は、患者の症状、および患者の疾患の種類および重症度等の因子により決定される。

【0318】

30

態様の一において、該医薬組成物は、混入物、例えばエンドトキシン、マイコプラズマ、RCL (replication competent lentivirus)、p24、VSV-G核酸、HIV gag、残存抗CD3/抗CD28コートピース、マウス抗体、プールヒト血清、ウシ血清アルブミン、ウシ血清、培養培地成分、ベクターパッケージング細胞またはプラスミド成分、バクテリアおよび真菌からなる群から選択される混合物を実質的に含まない、例えば検出できるレベルでは含まない。態様の一において、該バクテリアはアルガリゲネス・フェカリス (*Alcaligenes faecalis*)、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、インフルエンザ桿菌 (*Haemophilus influenza*)、ナイセリア・メニンギティディス (*Neisseria meningitidis*)、シュードモナス・エルギノーサ (*Pseudomonas aeruginosa*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、肺炎球菌 (*Streptococcus pneumonia*)およびA群溶連菌 (*Streptococcus pyogenes* group A)からなる群から選択される少なくとも1種である。

40

【0319】

「免疫学的有効量」、「抗腫瘍有効量」、「腫瘍阻害性有効量」または「治療量」と記載する場合、投与する本発明の組成物の正確な量は、患者（対象）の年齢、体重、腫瘍サイズ、感染または転移の程度および症状の個々の違いを考慮して医師が決定してよい。一般的に、本明細書に記載のT細胞を含む医薬組成物を、細胞数 $10^4 \sim 10^9$ 個/kg（体重）、いくつかの場合には $10^5 \sim 10^6$ 個/kg、その範囲内の全ての値を含む投与量で投与してよいといえる。T細胞組成物はまた、これらの投与量で複数回投与してもよい。該細胞は、免疫療法において一般的に知られている注入技術により投与してよい（例えばRosenberg et al

50

I., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988を参照のこと)。

【0320】

特定の局面において、活性化T細胞を対象に投与した後、再び採血を行い(またはアフエーシスを行い)、本発明にしたがってそこから得たT細胞を活性化させ、該患者にこれらの活性化させ、増殖させたT細胞を再び注入するのが望ましい場合もある。この操作は、2~3週間毎に複数回行ってよい。特定の局面において、T細胞は、10cc~400ccの採血から活性化し得る。特定の局面において、T細胞は、20cc、30cc、40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90ccまたは100ccの採血から活性化し得る。

【0321】

対象組成物の投与は任意の都合の良い方法、例えばエアロゾル吸入、注射、経口摂取、注入、インプラントまたは移植によって行ってよい。本明細書に記載の組成物は、動脈内、皮下、皮内、腫瘍内、結節内、髄質内、筋肉内、静脈内(i.v.)注射または腹腔内投与してよい。局面の一において、本発明のT細胞組成物は、皮内または皮下注射により投与される。局面の一において、本発明のT細胞組成物は、静脈内注射により投与される。T細胞組成物は、腫瘍、リンパ節または感染部位に直接注射してよい。

【0322】

特定の例示的な局面において、対象は、白血球除去を行ってよく、ここでは、白血球を回収して生体外で濃縮するか、または枯渇させ、所望の細胞、例えばT細胞を選択および/または単離する。これらのT細胞の単離物を当該分野で公知の方法によって増殖させ、1つ以上の本発明のCARコンストラクトが導入され、本発明のCAR T細胞が作製されるように処理してよい。それらを必要とする対象は、次いで高用量の化学療法による標準的な処理を行った後、末梢血幹細胞の移植を行ってよい。特定の局面において、移植の後または移植と同時に、対象は増殖させた本発明のCAR T細胞の注入を受ける。さらなる局面において、増殖させた細胞を外科手術の前または後で投与する。

【0323】

上述の処置の患者に投与する用量は、処置する症状および処置のレシピエントの正確な性質により変化する。ヒト投与用の用量の調整は、当該分野で用いられている方法にしたがって行ってよい。

【実施例】

【0324】

本発明は、以下の実施例でさらに詳細に表される。これらの実施例は、例示のみを目的とするものであって、とくにことわらない限り限定的なものではない。したがって、本発明は、以下の実施例に限定されるのではなく、本明細書の記載から明らかな任意の変更を全て包含すると解釈するべきである。

【0325】

さらに記載がなければ、当業者は、前述の記載および後述の実施例を用いて、本発明の化合物を製造および使用し、本発明の特許請求の範囲に記載の方法を実施し得ると考えられる。次の実施例は、本発明の種々の局面を具体的に示すものであって、本明細書の開示の残りの部分を限定するものと解釈するべきではない。

【0326】

実施例1: EGFRvIII+ 神経膠芽腫と診断された患者におけるEGFRvIII標的化キメラ抗原受容体を発現するよう操作した遺伝子改変自家T細胞

次の実験は、抗体ベースのキメラ抗原受容体(CAR)によって表面タンパク質EGFRvIIIに対するように改変されたヒトT細胞が、NSGマウスにおいてEGFRvIII+モデルの多形神経膠芽腫を除去するのに有効であるかどうかを確かめるために計画した。さらに、これらの細胞の生着性および持続性を評価するための実験を計画した。3つの異なる形態のCARを試験し、これらは、2つの異なる一本鎖可変断片(EGFRvIII抗原に結合するCARの部位)および細胞内シグナル伝達ドメイン(4-1BBおよびCD3を含み、CD28を含むものと含まないものがある)を含む。

【0327】

免疫欠損NOD/scid/ cヌル(NSG) マウスは、ヒト腫瘍細胞株(EGFR+であり、EGFRvIII+であるように操作されたバージョンが存在する脳腫瘍細胞株U87) およびヒトT細胞を移植するのに優れた異種移植モデルである。移植後、該ヒトT細胞をNSGマウス中で約2ヶ月、または致死的な異種GVHD (xGVHD)が発症するまで維持してよく、これは注入したヒトT細胞の量およびドナーに依存する。

【0328】

端的には、レンチウイルスブラットホームを用いて、抗EGFRvIIIモノクローナル抗体3C10が由来するscFvを取り込むことによって新規のCAR (3C10 CAR)を作製した。このCARを試験管内および異種移植マウスモデルで試験した。NOD/scid/ c(-/-) (NSG)マウスモデルは、CAR療法の前臨床評価、例えば注入したヒトT細胞の長期間の持続の評価に広く用いられている。7日目のU87-EGFRvIII腫瘍を脳に有するNSGマウスが、7~11日目の間毎日テモゾロミドの腹腔内注射(1 mg/投与量)を受け、かつ、7日目および17日目に、3C10 CARまたはモック高感度緑色蛍光タンパク質(EGFP)-ベクターで生体外形質導入したヒトT細胞 2×10^6 個の静脈内注入投与を受けた。21日目には、BLIシグナルは、CAR形質導入T細胞の投与を受けたマウスでは全ての個体において検出できなかったが、モック形質導入T細胞で処理したマウスは、5個体中の4個体が、テモゾロミドによる一過的な抗腫瘍効果の後、腫瘍の再増殖を示した。別の試験において、CAR-T細胞で処理したマウスを21日目に屠殺し、CAR導入T細胞の浸潤を、ビオチン結合抗F(ab')₂ mAb (3C10CAR特異的) およびストレプトアビジン-フィコエリトリン(PE)を用いた免疫組織化学により評価した。ストレプトアビジン-PEを用いて、抗F(ab')₂ mAbを用いずに染色した対照組織は、バックグラウンドシグナルのみを示し、一方、静脈注射したCAR-T細胞は、強いPEシグナルに基づいて、腫瘍に強く浸潤していると考えられる。

【0329】

この実施例で用いる材料および方法をここに示す。

【0330】

材料および方法

NSGマウスモデル

免疫欠損NOD/scid/ cヌル(NSG) マウスのコロニーが近年確立された。NSGマウスは、T細胞およびB細胞、ナチュラルキラー細胞を欠損し、樹状細胞の機能が損傷している。活性化T細胞の移植は、NSGマウスにおいて、従来のNOD/scid/ 2Mヌル マウスモデルよりも優れた結果を示したことが確認されている。したがって、該NSGモデルをヒト異種間移植試験に用いた。

【0331】

生物学的系の構造および特徴

EGFRvIIIに対するモノクローナルおよびポリクローナルAbの多くは、野生型のEGFRまたは他の非特異的なタンパク質に対する交差反応性を示すが、モノクローナル抗体(mAb) 3C10は、本来EGFRvIII特異的な融合部を含む14アミノ酸によって免疫化されたマウスから開発されたものであり、EGFRvIIIを高い特異性で認識し、野生型のEGFRに対する結合が無視できる程度にしか検出されないことが示されている (Okamoto et al., 1996 Br J Cancer 73:1366-1372)。T細胞の導入には研究グレードのレンチウイルスベクターを用いた。

【0332】

マウス注入用の細胞の準備

マウスに注入する細胞はヒトT細胞である。ヒト単核細胞濃縮アフェレーシス産物は、University of Pennsylvania Human Immunology Coreの健康なボランティアドナーの白血球除去により得られる。全ての検体は、University Institutional Review Boardの承認したプロトコルにしたがって回収し、各ドナーから同意書を得ている。T細胞をRosetteSep human T cell enrichment cocktail (Stemcell Technologies, Vancouver, Canada)を用いてネガティブ選択する。T細胞をTRP研究室に移し、ここで研究用グレードのCD3/28ビーズを用いて活性化し、グルタミン、10% FBS、20mM Hepes、100U/ml ペニシリンおよび100ug/ml ストレプトマイシンを含むRPMI中で増殖させる。パッケージレンチベクターを直

接活性化培養物に添加してから24時間後にベクターの形質導入が起こる。細胞を5日目にビーズから離し、増殖をCoulter Multisizer 3(Beckman Coulter, Fullerton, CA)を用いて、サイズ (fl)変化および総細胞数の変化について、濃度を $0.7 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 個/mlに維持しながら経過観察を行う。CAR導入T細胞についての形質導入効率を、ヤギ抗マウス抗体 (GAM、3C10-ベースCARに対する) またはヤギ抗ヒト抗体 (GAH、139ベースCARに対する)のいずれかで染色することによりフローサイトメトリーにより試験する。マウス1個体あたり 1×10^6 個のCAR+ T細胞を、試験の0日目に尾静脈注射して注入する。

【0333】

テモゾロミド (TMZ) 処理

脳室内にU87-EGFRvIII腫瘍を有し、0日目にCAR+ T細胞の投与を受けたマウスに、続けてTMZを0~4日目に腹腔内注射(i.p.)する (1日1回、5日間): TMZは、DMEMに6.67mg/mlで溶解させる。各マウスは、腹腔内注射により50 μ LのTMZ溶液(333 μ g/投与; 約17 mg/kg/投与)の投与を受ける。

【0334】

臨床グレードのCART

CART-EGFRvIII T細胞をCVPF(clinical cell and vaccine production facility)で調製し、該細胞産物は自家Tリンパ球である。CD3+ T細胞は、白血球除去産物から、向流遠心分離により単球を枯渇させることにより濃縮させる。0日目に、抗CD3/CD28 mAbコーティングした磁気ビーズを用いて、該濃縮T細胞を活性化させることにより、製造プロセスを開始する。T細胞培養物はEGFRvIII CARレンチウイルスベクターに暴露し、増殖させる。該T細胞調製工程は、静的な組織培養で開始し(0日目~5日目)、その後、必要であれば、灌流条件下でさらに増殖させるために、Waveバイオリアクターに移される。培養の終了時に、細胞から磁気ビーズを除き、洗浄して濃縮し、凍結保存する。修飾T細胞産物は、細胞数に合わせた体積で、凍結用の袋に入れ、冷凍速度制限冷凍庫を用いて凍結保存する (最終濃度は最大で 10^8 /ml)。凍結保存したEGFRvIII CAR T細胞産物を、 -130°C で、監視されたフリーザー中で保存する。該試験の結果は次に記載する。

【0335】

脳室内のEGFRvIII発現神経膠芽腫のCAR-T細胞による根絶

神経膠芽腫 (GBM)は最も一般的で最も悪性度の高い原発性の脳腫瘍であり、毎年米国で約12,000人のがん関連の死亡の原因となっている。GBMの患者は、化学療法 (テモゾロミド) と放射線(RT)両方の組合せ処置の後において、生存期間の中央値が15ヶ月より短い。自家T細胞、特にキメラ抗原受容体(CAR)を導入したT細胞を用いた養子細胞移入(ACT)療法は、近年の血液がんの試験において見込みがあることが示された。CART細胞を用いたACTは、GBMの患者に特に適当であり得る。これは、生体内の免疫化により誘導されるナイーブT細胞よりも生体外で調製される細胞の特異性、数および機能性の表現型ははるかに操作および制御がしやすいためである。

【0336】

上皮成長因子受容体バリエーションIII (EGFRvIII) は、ヒトの腫瘍で見られるEGFRの最も一般的なバリエーションであるが、正常な組織では殆ど見られない。このタンパク質は、EGFRの細胞外ドメインにおいて、エキソン2~7がインフレーム欠損し、エキソン1および8の結合部位に新規のグリシン残基が生成したことにより生じたものであり、それにより腫瘍特異的なエピトープが生成された。EGFRvIIIは、GBMの24%~67%に発現するが、正常な組織には発現しない。

【0337】

GBMに有効なCAR治療を開発するために、3つの新規のEGFRvIIIを標的とするレンチウイルスCARコンストラクトを作製した。これらのベクターはそれぞれ、EGFRvIII特異的マウスモノクローナル抗体 (mAb) 3C10または「139」として設計されたEGFRvIII特異的ヒト化モノクローナル抗体 (mAbs) 由来の一本鎖可変断片(scFv)をコードする(図6)。該3C10 scFvは、CD8aヒンジ、4-1BBおよびCD3 ドメインと連結しており、CD28膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインと連結しているか、またはしていない (それぞれ3C10BBz28-CARおよび3

C10BBz-CAR)。139 scFvは、CD8aヒンジ、4-1BBおよびCD3 ドメインと連結している (139 BBz-CAR)。これらのCARのそれぞれを導入したヒトT細胞は、EGFRvIII発現U87ヒトGBM細胞 (U87-EGFRvIII) に対して特異的および強力な細胞溶解を示した；図7を参照のこと。7日目のU87-EGFRvIII腫瘍を脳内に有する免疫不全NOD/scid/ c(-/-) (NSG) マウスは：1) 139 BBz-CAR；2) 3C10BBz-CAR；3) 3C10BBz28-CAR；4) ヒトCD19を標的化する対照CD19BBz-CARを用いて生体外で形質導入したヒトT細胞 1×10^6 個の静脈内注入を受けた。これらのマウスはまた、テモゾロミド (330 mcg/投与) の腹腔内注射を7～11日目に受けた。U87-EGFRvIII発現細胞は、ルシフェラーゼも発現するため、生物発光イメージング (BLI) で腫瘍増殖をモニターした。生理食塩水のみで処置したマウスは全てが腫瘍の急速な成長により、21日目までに死亡し、ACTを行わないテモゾロミド処置は、U87-EGFRvIII腫瘍を阻害はしたが根絶はしなかった。CD19BBz-CAR-T細胞およびテモゾロミドの投与を受けたマウスは、U87-EGFRvIIIに対して何らかの同種間応答を示したものの、腫瘍はこれらのマウスで成長を続けた。その一方で、139BBz-CAR-、3C10BBz-CAR-または3C10BBz28-CAR-導入T細胞の投与を受けた全てのマウスで、BLIシグナルが21日目までにベースラインレベルまでに減弱した。このことは、腫瘍が全体的に根絶されたことを示す (図8)。重要なことに、3C10BBz-CAR細胞の投与を受けたマウスは、3C10BBz28または139BBz CART細胞のいずれよりも、腫瘍が速く除去された。このことは、3C10とBBzの組合せが患者においてよりよい応答をもたらし得るものであることを示す。腫瘍成長および末梢免疫応答をモニターし、3種類のEGFRvIII-CARベクターのうちのいずれが他の2つよりも長期抗腫瘍効果において優れているかを決定した。

【0338】

本明細書に示す結果は、EGFRvIII標的CAR-T細胞を用いたACTが、テモゾロミドにより標準的な化学療法を同時に受けているGBM患者におけるフェーズI臨床試験の結果の発展を強く支持するものである。

【0339】

臨床デザイン

新しくGBMと診断されたEGFRvIII+を有する患者における、CART-EGFRvIII T細胞の安全性、耐用性および生着能を決定するために、単一群 (single-arm) 非盲検予備試験を行った。全体的に、全ての対象に自家CART-EGFRvIII T細胞を投与する。好適な対象は白血球除去を行い、CART-EGFRvIII作製用に多数の末梢血単核球 (PBMC) を得る。T細胞をPBMCより精製し、ヒト化3C10-CARレンチウイルスベクターを用いて形質導入し、試験管内で増殖させ、適当なアリコートで凍結保存する。注入する細胞は、0日目の注入の直前に、ベッドサイドで融解する。

【0340】

CART EGFRvIII細胞の安全性、生着性および耐用性を評価するための血液試験に、対象を規則的な間隔で4週間 (28日目) まで付す。3C10-CARベクターを含む循環T細胞のサブセットを、注入後、複数回評価し、ベースラインの試料と比較する。28日後、対象の病歴、身体検査、脳MRIおよび血液試験を用いてまたは、標準治療として、1ヶ月に1回、6ヶ月目まで評価する。

【0341】

血液試験は、これらの来診時に同時に行う。6ヶ月経過後、患者は、2ヶ月おきに、2年間経過観察される。2年間のタイムポイントの後、遺伝子転移試験に関するFDAの規制により必要とされる、長期間の健康問題、例えば新規悪性腫瘍の発症を診断評価するために、対象は1年に1回の電話およびアンケートにより、さらに13年間経過観察される。

【0342】

特定の理論に束縛されるものではないが、T細胞の「off-tumor on-target」活性化が全く予測されないのは、EGFRvIIIタンパク質の発現がきわめて限定されているためであると考えられる。CART-EGFRvIIIを1回のみ注入投与し、そのために、アレルギー性の応答が预期されないことが好ましい。しかしながら、起こり得る毒性の1つは、腫瘍部位からのT細胞活性化によるバースタンダー炎症である。脳浮腫に近い症状および徴候がモニターされ

、処置される。いくつかの態様において、T細胞活性化によるバイスタンダー炎症は、抗炎症剤、例えばステロイド剤を投与することにより処置し得る。

【0343】

実施例2: miR-17-92の共形質導入は、ヒト神経膠芽腫異種移植片を有するマウスにおける抗EGFRvIIIキメラ抗原受容体を形質導入したT細胞の抗腫瘍活性を増強する

miR-17-92発現は、1型の表現型およびT細胞の生存亢進をもたらす。神経膠芽腫(GBM)患者由来のT細胞では、miR-17-92が発現低下していることが報告されている。キメラ抗原受容体を形質導入したT細胞(CAR-T細胞)を用いた養子移入療法の有効性を改善するために、miR-17-92および、タンデムのT細胞受容体CD3 鎖シグナル伝達モジュールおよびCD137 (4-1BB)およびCD28の同時刺激モチーフに結合した上皮増殖因子受容体バリエーションIII (EGFRvIII)-特異的一本鎖可変断片(scFv)からなるCARのための新規レンチウイルスベクター(pELNS-3C10-CAR)を構築した。EGFRvIIIを安定して発現するU87 GBM細胞(U87-EGFRvIII)に対する抗原特異的な強い細胞障害性活性に加え、miR-17-92を共形質導入したCAR-T細胞は、miR-17-92の共形質導入を伴わないCAR-T細胞と比較して、トランスフォーミング増殖因子(TGF)- およびテモゾロミドのT細胞抑制効果に対する耐性が改善された。脳室内にU87-EGFRvIII異種移植片を有するマウスでは、導入遺伝子由来のmiR-17-92発現がある場合でもない場合でも、CAR-T細胞は、同レベルの強い治療効果を示し、CAR-T細胞の制御できない増殖は見られなかった。しかしながら、これらのマウスの脳内に、U87-EGFRvIII細胞を再負荷したときは、共形質導入したCAR-T細胞の投与を受けたマウスでは、miR-17-92の共形質導入のないCAR-T細胞の処置を受けたマウスと比較して、保護が改善することが示された。これらのデータは、GBMの患者における有効性を高めるために、miR-17-92をCARに組み込み得ることを支持するものである。

【0344】

試験の結果を次に記載する。

【0345】

EGFRvIII-特異的なCARおよびmiR-17-92のレンチウイルスベクターの構築

ヒトEGFRvIII特異的なモノクローナル抗体(mAb) 3C10由来の一本鎖可変断片(scFv)を介してEGFRvIIIを認識するレンチウイルスベクター(pELNS-3C10-CAR)を作製した(図1A参照)。このコンストラクトでは、EF-1 プロモーターにより、3C10-由来scFv、CD28膜貫通ドメイン(TM)ならびに4-1BBおよび細胞内ドメイン(ICD)およびCD3 ドメインを組み込んだCAR融合タンパク質の発現を制御する。FG12-ベースの SIN(self-inactivating) ベクターを用いたレンチウイルスmiR-17-92コンストラクト(FG12-EF1a-miR-17/92 も作製した(図1B)。このベクターでは、EF-1 プロモーターがmiR-17-92を制御し、ヒトUbiCプロモーターが、形質導入細胞の追跡用の高感度緑色蛍光タンパク質(EGFP)マーカー遺伝子を制御する。このスキームで用いる用語は: RSV/HIV-1 5' LTR; ハイブリッドRSVプロモーター-R/U5末端反復配列、EF-1 ; ヒト伸張因子1 -サブユニットプロモーター、VH; 3C10免疫グロブリンの重鎖の可変領域、VL; 3C10免疫グロブリンの軽鎖の可変領域、HIV-1 -3' LTR; U3領域に欠損を有するSIN型3' 末端反復配列、CMV/HIV-1 5' LTR; ハイブリッドCMVプロモーター-R/U5末端反復配列、UbiC; ユビキチンCプロモーター、である。

【0346】

CARおよびmiR-17-92を形質導入したヒトT細胞の試験管内特徴付け

健康なドナー由来のCD3+ T細胞を、pELNS-3C10- CARを用いて形質導入し、それぞれ抗マウス(Fab')₂抗体およびEGFPを用いた3C10-CARおよびmiR-17-92の発現についてのフローサイトメトリーにより、該細胞の導入遺伝子の発現レベルを評価した(図2A、左)。ヒトT細胞上の3C10由来のscFvに特異的な抗マウスF(ab')₂ Abを用いることで、約半分(48.9%)のT細胞がその表面に3C10-由来のscFvを発現していることが検出された。

【0347】

CARおよび導入遺伝子由来のmiR-17-92の両方を発現するヒトT細胞を得るために、CD3+ T細胞に、2つのレンチウイルスベクターを連続して感染させることにより、pELNS-3C10-CARおよびFG12-EF1a-miR-17/92によって共形質導入した。pELNS-3C10-CARを用いた最初の

形質導入の24時間後に、該T細胞にFG12- EF1a-miR-17-92を形質導入した。全体のT細胞の約4分の1 (23.6%)が、CARおよびEGFPの両方を発現している様子が観察された (図2A、右)。その後の試験管内試験のために、CAR-形質導入T細胞 (CAR-T細胞) をビオチン化抗マウス F(ab')₂ Abおよび抗ビオチンMACSを用いて濃縮した。共形質導入の効率 (図2A、右) に基づけば、少なくとも50%のCAR-T細胞がEGFR (すなわち、導入遺伝子由来のmiR-17-92) をともに発現していた。リアルタイムPCRにより、F(ab')₂ Ab-濃縮した、miR-17-92-共形質導入CAR-T細胞では、CAR単独で形質導入したT細胞と比較して、3~4倍高いmiR-17-92の発現が検出された (図2B)。図2Bは、qRT-PCRにより測定した、形質導入されたT細胞中のmiR-17-92クラスターメンバーである、miR-17-3p、miR-17-5pおよびmiR-92a-1の発現レベルを示す。同様の結果を示す3つの実験のうちの1つの、3回繰り返した測定値の平均±SD値を表す。* は、スチューデントt検定を用いた2群間でp<0.05であることを示す。図2Cは、種々のE:T比率で、⁵¹Cr-標識したU87-EGFRvIIIまたは対照のU87細胞に対する12時間の⁵¹Cr-放出アッセイにより評価した、形質導入T細胞のEGFRvIII特異的な細胞傷害活性を表す。対照細胞は、モック (EGFP)-形質導入T細胞である。値は、3つのウェルの平均値±SDを表す。

10

【0348】

モック形質導入したT細胞が親U87 (EGFRvIII陰性) およびU87-EGFRvIII細胞に対してバックグラウンドレベルの溶解しか示さないのに対し、CARを形質導入したT細胞は、強力かつ特異的にEGFRvIII-発現U87ヒトGBM細胞 (U87-EGFRvIII) を溶解するが、親U87細胞に対してはバックグラウンドレベルの細胞毒性効果しか示さなかった (図2C)。この12時間の⁵¹Cr-放出アッセイにおいて、miR-17-92を用いたCAR-T細胞の共形質導入は、U87-EGFRvIII標的細胞に対する特異的な細胞毒性活性を有意に増強させることはなかった。

20

【0349】

miR-17-92共形質導入は、IFN- γ 放出を増強させ、TGF- β およびテモゾロミド (TMZ - 標準治療) による抑制効果に対する耐性をもたらす

過去の試験 (Sasaki et al., 2010, J. Transl Med 8:17) において、miR-17-92遺伝子導入マウス由来のCD4+ T細胞は、野生型マウス由来の対応物と比較すると、IFN- γ 産生の増加を示し; ヒトJurkat T細胞のmiR-17-92による遺伝子導入は、活性化誘導細胞死 (AICD) を引き起こした。

【0350】

30

CAR-T細胞の、miR-17-92による共形質導入が、細胞が化学療法剤TMZまたは免疫抑制性サイトカインTGF- β に暴露されたときのIFN- γ 産生、細胞増殖を改善させ、アポトーシスによる細胞死の程度を低下させるか否かを評価するための試験を行った。

【0351】

CAR-T細胞が、EGFRvIIIを形質導入した人工抗原提示細胞 (aAPC) で刺激されており、TGF- β またはTMZの刺激を受けていないとき、該細胞は、共形質導入の有無にかかわらず同レベルのIFN- γ を発現した。しかしながら、細胞を、量を次第に上昇させたTGF- β またはTMZに暴露したとき、miR-17-92が共形質導入されていないCAR-T細胞は、IFN- γ のレベルが著しく低下したのに対し、共形質導入CAR-T細胞は、高いレベルのIFN- γ 産生を維持していた (図3A)。白抜きのバーおよび黒色のバーは、それぞれ、CAR-T細胞 (miR-17-92なし) およびmiR-17-92共形質導入CAR-T細胞の結果を示す。図3Aは、96時間の共培養の最後の24時間の間の形質導入T細胞により産生されたIFN- γ を示す。図3Bは、3日間共培養した後に、WST1アッセイにより評価した群間の相対的な増殖レベルを示す。図3Cおよび3Dは、Annexin-VおよびPIによって評価したCAR-T細胞のアポトーシスを示す。図3Cは、TMZに暴露されたCAR-T細胞上のAnnexin-Vの平均蛍光強度を示す。値は、重複した3ウェルの平均±SDを示す (* はP<0.05を表す)。図3Dは、類似の結果を示す3回の実験のうちの1回のAnnexin-V+および/またはPI+のフローサイトメリーのヒストグラムを示す。

40

【0352】

培養中のTMZの存在下におけるCAR-T細胞の増殖に対するmiR-17-92共形質導入の影響を評価するための試験を行った。EGFRvIII-発現aAPCによるCAR-T細胞の増殖を誘導する試験

50

を計画し、該増殖をWST-1アッセイによって評価した(図3B)。TMZの非存在下では、miR-17-92-共形質導入CAR-T細胞は、対照CAR-T細胞と比較してより速い増殖速度を示す傾向があったが、有意な差はなかった。TMZのCAR-T細胞増殖に対する影響を具体的に評価するために、図3Bに、TMZの非存在下での同じ細胞の増殖に対する、各群の細胞の増殖速度を示す。培養に添加するTMZの濃度を上昇させると、増殖抑制の程度は、対照CAR-T細胞と比較して、miR-17-92共形質導入CAR-T細胞では有意に低下していた。

【0353】

miR-17-92-共形質導入がCAR-T細胞のTMZ-誘発性のアポトーシスに対する耐性を強めるかどうかを評価するための試験を行った。この目的のために、Annexin V⁺ およびヨウ化プロピジウム(PI)+ CAR-T細胞のフローサイトメトリー評価を、TMZの濃度を上昇させて行った(図3Cおよび3D)。初期アポトーシス細胞(Annexin V⁺PI⁻)、アポトーシス/ネクローシス細胞(Annexin V⁺PI⁺) およびネクローシス細胞(Annexin V⁻PI⁺) が全て濃度依存的に増加することならびに、miR-17-92-共形質導入CAR-T細胞が、対照CAR-T細胞と比較してアポトーシス性の変化の程度を低下させた様子が観察された。

【0354】

CAR-T細胞をTMZと組合せて静脈内注射することにより、NSGマウスにおいて確立U87-EGFRvIII腫瘍の完全な寛解が引き起こされる

脳室内に確立された(7日目) U87-EGFRvIII腫瘍を有する免疫不全NOD/scid/ c(-/-) (NSG) マウスにおけるCAR-T細胞の有効性を評価するための試験を行った。マウスは、miR-17-92共形質導入CAR-T細胞、miR-17-92の共形質導入のないCAR-T細胞またはモック形質導入T細胞の、尾静脈を介した単回静脈内(i.v.)注入を受けた(2×10^6 個/マウス)。新しくGBMと診断された患者が日常的にTMZ療法を受けるのと同様に、TMZを、T細胞注入の日から開始して5日間毎日腹腔内(i.p.)投与することを計画した(図4A)。図4Bは、 Kaplan-Meier解析を示す。CAR-T細胞で処理したマウス(miR-17-92の共形質導入を伴うかまたは伴わない)の生存中間値は、モック形質導入T細胞と比較して有意に上昇していた($p < 0.05$)。TMZおよびモック形質導入T細胞の投与を受けた対照マウスが全てT細胞注入の3週間(21日)以内に死亡したように、TMZ処置そのものは、効果がなかった(図4B)。CAR-T細胞を注入した5匹のマウスのうちの1匹および、miR-17-92共形質導入CAR-T細胞を注入した5匹のマウスのうちの2匹が腫瘍の進行により22日までに死亡したが、これらの群の他のマウスは全て、40日より長く生存した。類似の結果を示す2回の独立した実験のうちの1回の結果を示す。miR-17-92-共形質導入CAR-T細胞とmiR-17-92を共形質導入していないCAR-T細胞を投与したマウス間では、生存に統計学的に有意な差は見られなかった(ログランク検定: $p=0.5485$)。

【0355】

miR-17-92を共導入したCAR-T細胞は、マウス中のU87-EGFRvIII腫瘍に対する保護を持続させる

図4に示す試験において、マウスに注入したCAR-T細胞がU87-EGFRvIII腫瘍に対するホストの長期間の保護を提供し得るかどうかを決定するために、49日目に脳の反対側の半球にU87-EGFRvIII細胞を接種することにより生き残り個体を再負荷した(図5)。CAR-T細胞で処置した3個体全てにおいて、再負荷した腫瘍細胞が増殖したのに対し、miR-17-92-共形質導入CAR-T細胞で処置したマウスでは、バックグラウンドレベルを超えるBLIシグナルを示す個体がなかった。これらの結果は、miR-17-92クラスターの共形質導入が、CAR-T細胞の長期間の持続性をもたらし、それにより、腫瘍成長に対するホストの保護を延長することを強く示唆している。腫瘍の長期的測定は、2群のマウスの光子束 \pm SDを示す。バックグラウンドの発光レベル(最大 10^3 p/s)は、処置群の腫瘍を有するマウスと平行して、腫瘍を持たないマウスで観察されたレベルに基づいて決定した。

【0356】

miR-17-92は、有効性を改善するために、CARに組み込んでよい

本明細書に示す結果は、3C10 scFvをCD3 鎖、CD137 (4-1BB)およびCD28とともに組み込んだ新規抗EGFRvIII-CAR (3C10-CAR)を導入したT細胞中のmiR-17-92の共発現の効果を

10

20

30

40

50

示す。この結果は、miR-17-92の共発現は、TGF- β およびテモゾロミドのT細胞増殖抑制効果に対する耐性を改善させることを示す。生体内では、3C10-CARおよびmiR-17-92の両方を共導入したT細胞は、3C10-CAR単独を導入したT細胞と比較して、治療効果をよく持続させることが示された。

【0357】

本試験におけるmiR-17-92のレンチウイルスによる形質導入により、形質導入したT細胞においてmiR-クラスターを異所的に過剰発現させる。しかし、生理学的な条件下において、T細胞中の内在性miR-17-92の発現レベルは厳密に制御されている。ヒトCD8+ T細胞において、miR-17-92の発現は、ナイーブな細胞では高いレベルで検出されるが、細胞が分化するにつれて減弱する(Salaun et al., 2011, J Transl Med 9:44)。リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス感染のマウスモデルにおいて、T細胞の活性化後、miR-17-92発現は大きく上昇しているが、クローン増殖の後では発現が低下し、さらに、記憶の発達の間はサイレンシングしている(Wu et al., 2012, Proc Natl Acad Sci USA 109:9965-9970)。この参照している試験において、急速なT細胞の増殖およびそれらによるIFN- γ の発現にはmiR-17-92が必要である。しかし、miR-17-92の過剰発現は、分化を寿命の短いターミナルエフェクター細胞へと向かわせる。miR-17-92の発現を低下させることができれば、記憶細胞が次第に失われ、セントラルメモリー細胞の発達に欠損が見られるようになる(Wu et al., 2012, Proc Natl Acad Sci USA 109:9965-9970)。この観察は、miR-17-92を共遺伝子導入したCAR-T細胞の持続性と、U87-EGFRvIII細胞の再負荷からのホスト保護能が観察された、本明細書に記載の結果と必ずしも一致するものではない。特定の理論に縛られるものではないが、この観察結果は、CARとmiR-17-92によりもたらされる同時刺激分子の組合せ効果によるものであると考えられる。

【0358】

miR-17-92は発がん性miRと記載されているが(van Haaften and Agami, 2010, Genes & Development 24:1-4)、miR-17-92の過剰発現自体は、リンパ球において発がん性ではないことが知られている(Xiao et al., 2008, Nat Immunol 9:405-414)。実際、現在までの研究において、miR-17-92導入T細胞の制御できない増殖は観察されていない。それにもかかわらず、より安全性を確保するための他の方法として、レンチウイルスを用いて安定的に導入を行うのではなく、miR-17-92それ自体で一過性に形質導入を行い、該T細胞を多数注入することは、ウイルスベクターの導入に伴う、安全性についての懸念のない、合理的な方法であり得る(Zhao et al., 2010, Cancer Research 70:9053-9061)。

【0359】

GBMの治療用のEGFRvIII-標的化CARについては、近年、Morganらが、 γ -レトロウイルスCARの中で、7つの異なる抗EGFRvIII mAb、例えば3C10およびヒト139由来のscFv配列を評価した(Morgan et al., 2012, Hum Gene Ther 23:1043-1053)。CARの試験管内特徴付けにより、3C10および139が、EGFRvIII-発現標的細胞に应答して特異的にIFN- γ を産生するが、野生型EGFR遺伝子を発現している細胞に対しては産生しない3クローンの中の2つであることが明らかになった。

【0360】

EGFRvIIIがGBM患者の一部の集団にのみ発現にしており、「EGFRvIII陽性」の症例の場合であってもGBM細胞の一部にのみ発現しているものであることを認識することは重要なことである(Heimberger et al., 2005, Clin.Cancer Res. 11:1462-1466)。単一の標的としてEGFRvIIIを標的とする免疫療法は、免疫療法が標的とする抗原が低下しているGBM細胞の増殖をもたらしやすい(Sampson et al, 2010, J Clin Oncol 28:4722-4729)。多数のこれまでの研究により、神経膠芽腫の免疫療法に用いるための、GBM-関連抗原、例えばIL-13R $\alpha 2$ (Kong et al., 2012, Clin Cancer Res 18:5949-5960; Kahlon et al., 2004, Cancer Res. 64:9160-9166)、HER-2 (Ahmed et al., 2010, Clinical Cancer Research 16:474-485)およびEphA2 (Chow, K.K. et al)に対するCARならびにEphA2に対するように改変されたT細胞が開発されている(Mol Ther (2012))。いずれの特定の理論にも束縛されるものではないが、有効なCAR療法は、最終的には、GBM-誘導性の抑制メカニズムに対す

る耐性を示し、複数の抗原を標的とすることのできるT細胞を用いているため、注入されたT細胞は、不均一な抗原発現プロファイルを示すGBMに対して有効かつ維持された治療効果を示すと考えられている。

【0361】

本明細書に記載する結果は、pELNS-3C10-CARおよびFG12-EF1a-miR-17/92を共導入したT細胞を用いた利点を示す。CARおよびmiR-17-92導入遺伝子の共発現を達成するための他の方法として、3C10-CAR遺伝子およびmiR-17-92遺伝子の両方を単一の転写物として発現するpELNS-ベースレンチウイルスベクターを構築した。この単一の「タンデム」ベクターの使用は、2つのベクターをベースとするアプローチに比べ、導入手法が比較的単純になること、および、調節手法が容易であるという点から有利なものであり得る。さらに、CARを発現しているT細胞が全てmiR-17-92をも発現していることになる。しかし、該「タンデム」ベクターの導入効率は、2つのベクターを用いたアプローチよりも低い。これは、インサートの大きさが大きくなるにつれて、レンチウイルスの力価が低くなるためと考えられる。本明細書中に記載するように、3C10-CAR遺伝子をレンチウイルスにより導入し、それと組み合わせて、miR-17-92をエレクトロポレーションにより導入するのが、実行可能な戦略であり得る。

【0362】

本研究により、CD3+ CAR-T細胞の40%~60%がCD4+であり、CD4+ CAR-T細胞は、EGFRvIII特異的に、U87-EGFRvIII細胞を有効に溶解することが見出された。パーフォリン+ CD4+ T細胞は、パーフォリン/グランザイムB経路を介して細胞毒性活性を仲介するが、Fas/FasL経路は介さない(Porakishvili et al., 2004, Haematologica 89:435-443)。このことから、現在の研究において、CD4+ CAR-T細胞は、パーフォリンおよびグランザイムBを発現し、観察されるU87-EGFRvIII細胞に対する溶解活性に介在すると考えられている。

【0363】

まとめれば、本実施例により、miR-17-92を取り込んだCAR療法の評価についての強力な基礎がもたらされる。

【0364】

実施例3: CAR配列

マウスモノクローナル抗体(mAb) 3C10は、本来EGFRvIII特異的な融合部を含む14アミノ酸ペプチド(PEP3)を用いたマウスの免疫化により開発され、EGFRvIIIは高い特異性で認識したが、野生型のEGFRに対しては検出できる結合が見られなかった(Okamoto et al, British J. Cancer 1996, 73:1366-1372)。次に、mAb 3C10の一本鎖可変断片(scFv)が作製され、3C10 scFvのcDNAが得られた。本来のmAbの結合活性および/または抗原特異性が、scFv形態では失われていることがしばしばであったが、該3C10 scFvはそのEGFRvIII特異的エピトープに対する選択的反応性を維持していた(Nakayashiki et al., Jpn. J.Cancer Res. 2000, 91:1035-1043)。

【0365】

EGFRvIII CARを、3C10scFv (マウス)をCD28、4-1BBおよびCD3 とともにpELNSレンチウイルス骨格プラスミド(EF1プロモーター)中にクローニングして構築した。他のEGFRvIII CARを、3C10scFvをCD8aヒンジ/CD8TM/4-1BB/CD3 pELNSレンチウイルス骨格にクローニングすることにより作製し、これはEF-1aプロモーターにより発現制御される。

3C10scFv-CD28BBzeta CAR (アミノ酸) (配列番号1)

MALPVTALLLLPLALLLHAARPGSEIQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIEDY YIHWVKQRTEQGLEWIGRIDPEND
ETKYGPIFQGRATITADTSSNTVYLQLSSLTS EDTAVYYCAFRGGVYWGPGTTLTVSSGGGGSGGGSGGGGSHMDVVM
TQSPL TLSVAIGQSASISCKSSQSLLDSGKTYLNWLLQRPQGSPKRLISLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLRISRV
EAEDLGIYYCWQGTHTFGTGGGKLEIKASTTTPAPR PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWV
LVVVGGVLCYSL LVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSKR GRKKLLYIFKQ
PFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQ GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR
RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

【0366】

3C10scFv-BBz CAR (アミノ酸) (配列番号2)

MALPVTALLLLPLALLLHAARPGSEIQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIE
 DYYIHWVKQRTEQGLEWIGRIDPENDETKYGPFIQGRATITADTSSNTVYLQLSSLTSEDTAVYYCAFRGGVYWGPGTTL
 TVSSGGGSGGGGSGGGGSHMDVVMQSPSL TLSVAIGQSASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLISLVSK
 LDGVPD RFTGSGSGTDFTLRISRVEADLGIIYCWQGFHFGTGGGKLEIKASTTTPAPR PPTPAPTIASQPLSL
 RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL VITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF
 PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA
 YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

【 0 3 6 7 】

3C10scFv-CD28BB CAR (核酸) (配列番号18)

atggccttaccagtaccgccttgcctgccgctggccttgcctgctccacgccgccaggccgggatccgagattcagct
 gcag caatctggggcagaacttgaagccaggggcctcagtcgaagctgtcctgcacaggttctggcttcaacattgaa
 gactactatat tcactgggtgaagcagaggactgaacaggcctggaatggattggaaggattgatcctgagaatgatg
 aaactaaatatggccc aatattccagggcagggccactataacagcagacacatcctccaacacagctctacctgcaact
 cagcagcctgacatctgagga cactgccgtctattactgtgcctttcgcggtggagtctactgggggccaggaaccact
 ctacagctcctcaggaggtgggtgggtccgggtgggtgggtccggaggtgggtgggtcacatatggatgttgtgatgac
 ccagctcctcactcactctatcggttgccattggac aatcagcctccatctcttgcaagtcagtcagagcctcttagat
 agtgaatgaaagacataat tgaattgggtgttacagaggccaggccagctctccaaagcgctaatctctctgggtgctaa
 actggactctggagtccttgacaggttactggcagtggaatcaggagac agatttcacactgagaatcagcagagtgga
 gctgaggatttgggaatttattattgctggcaaggtacacatttctgggacgtt cggtggagggaccaagctggaga
 taaaagctagcaccacgacgccagcgccgaccaccaacaccggcgccaccatcg cgtcgcagccctgtccttgcg
 ccagaggcgtgccggccagcgccggggggcgagtgacacagagggggctggacttcgcctgtgatttttgggtgctgg
 tgggtggttgggtggagtcttggcttgcctatagcttgcctagtaacagtgccctttattatttctgggtg aggagtaagag
 gagcaggtcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgccggcccgccaccgcaagcattacc agccctat
 gccccaccacgagcttgcgagcctatcgctccaaacggggcagaaagaaactcctgtatataattcaacaaccatt ta
 tgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaaggaggatgtgaactg
 agagtgaaagtcagcaggagcgagacgccccgcgtacaagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctag
 gacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggacctgagatggggggaaagccgagaaggagaac
 cct caggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagc
 gccgg agggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacat
 gcaggccc tgccccctcgc

【 0 3 6 8 】

3C10scFv-BBz CAR (核酸) (配列番号19)

Atggccttaccagtaccgccttgcctgccgctggccttgcctgctccacgccgccaggccgggatccgagattcagct
 gca gcaatctggggcagaacttgaagccaggggcctcagtcgaagctgtcctgcacaggttctggcttcaacattgaa
 gactactat attcactgggtgaagcagaggactgaacaggcctggaatggattggaaggattgatcctgagaatgatg
 aaactaaatatggc ccaatattccagggcagggccactataacagcagacacatcctccaacacagctctacctgcaact
 cagcagcctgacatctgaggacactgccgtctattactgtgcctttcgcggtggagtctactgggggccaggaaccactc
 tcacagctcctcaggaggtgggtg gtccgggtgggtgggttccggaggtgggtgggtcacatatggatgttgtgatgac
 ccagctcctcactcactctatcggttgccattg gacaatcagcctccatctcttgcaagtcagtcagagcctcttagat
 agtgaatgaaagacataat tgaattgggtgttacagaggc caggccagctctccaaagcgctaatctctctgggtgctta
 aactggactctggagtccttgacaggttactggcagtggaatcagg gacagatttcacactgagaatcagcagagtgga
 ggctgaggatttgggaatttattattgctggcaaggtacacatttctgggacgttcggtggagggaccaagctggaga
 taaaagctagcaccacgacgccagcgccgaccaccaacaccggcgccacc atcgctgcgagccctgtccttgcg
 ccagaggcgtgccggccagcgccggggggcgagtgacacagagggggctgg acttcgcctgtgatatctacatctgg
 gcgccccttggccgggacttgtgggttcttctctgtcactgggttatcaccctttactgcaa acggggcagaaagaaac
 tcctgtatataattcaacaaccatttatagagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagc tgccgatttcc
 agaagaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgagacgccccgcgtacaagcagggccaga
 accagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccggg accctga
 gatggggggaaagccgagaaggagaacccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcct

acagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccaggggtctcagtacagccacc
aaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgc

【 0 3 6 9 】

「139」と称されるscFv断片は、EGFRvIIIに対するヒト抗体である (Morgan et al., 2012 Hum Gene Ther 23(10): 1043-53)。139 scFvを含むEGFRvIII CARは、最初に139 scFvを合成することにより作製した。139 scFvの配列は、リーダー配列、CD8ヒンジ、膜貫通(TM)ドメインおよび所望のシグナル伝達ドメインを用いてクローニングした。例えば、139 scFvについての配列を4-1BBおよびCD3 のシグナル伝達ドメインを用いてクローニングした。該CARコンストラクト(139scFv-BBZ)は、レンチウイルス作製のpELNSベクターから発現される。

10

【 0 3 7 0 】

139scFv-BBZ CAR (アミノ酸) (配列番号3)

MALPVTALLLPLALLLHAARPGSDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGI RNNL AWYQQKPGKAPKRLIYAASNLSQSGVPSRFTGSGSGTEFTLIVSSLQPEDFATYYC LQHHSYPLTSGGGTKVEIKRTGSTSGSGKPGSGEGSEVQVLESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSTNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGSSGWSEYWGQGLTVSSASTTTPAPRP PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLLSLV ITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

20

【 0 3 7 1 】

139scFv-BBZ CAR (核酸) (配列番号20)

Atggccttaccagtgaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgccaggccgggattccgacatccagatgacccagagccctagcagcctgagcgccagcgctggcgacagagtgacattcacctgtcgggccagccaggggcatcagaaacaacctggcctgggtatcagcagaagcccggaaggcccccaagagactgatctacgctgccagcaatctgcagagcggcgtgcc cagcagattcacgggaagcggctccggcacaggagttcacctgatcggtgccagcctgcagcccgaggacttcgccacctact actgcctgcagcaccacagctacctctgaccagcggcgaggaccacaaaggtggagatcaagcggaccggcagcaccagc ggcagcgggaagcctggcagcggcgaggggaagcggaggtccagggtgctggaatctggcggcgggactgggtgcagcctggcggcagcctgagactgagctgtgccgccagcggcttcaccttcagcagctacgccatgtcttgggtccggcaggctcctggaag ggcctggaatgggtgtccgccatcagcggctctggcggctccaccaactacgccgacagcgtgaaaggccgggttcacatcagccgggacaacagcaagaacacctgtatctgcagatgaacagcctgagagccgaggacaccg ccgtgtactactgtgccgg cagcagcgggtggagcgagtactggggccaggggcacactgggtcacagtgtctagcgctagcaccagcagccagcggcgc gaccaccaacaccggcgccaccatcgcgctgcagccctgtccctgcgcccagaggcgtgccggccagcggcgggggg cgcagtgcacacgagggggctggacttcgcctgtgatctacatctgggcgccttggccgggacttgtggggtccttctcctgtcactgggtatcacctttactgcaaacggggcagaaagaaactcctgtatata ttcaaacaaccatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaaggaggtgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtacaagcaggggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgtttggacaagagacgtggccgggacccctgagatggggggaaagccgagaaggaagaacctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccaggggtctcagtacagccaccaaggacacctacgaccccttcacatgcaggccctgccccctcgc

30

40

【 0 3 7 2 】

CAR構成要素

核酸配列:

3C10 scFvヌクレオチド配列(マウス); (配列番号4)

GAGATTCAGCTGCAGCAATCTGGGGCAGAACTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCAAGCTGTCCTGCACAGTTCTGGCTTCAACATTGAAGACTACTATATTTCACTGGGTGAAGCAGAGGACTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGAAGGATTGATCCTGAGAATGATGAAACTAAATATGGCCCAATATTCAGGGCAGGGCCACTATAACAGCAGACACATCCTCCAACACAGTCTACCTGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCCTTTCGCGGTGGAGTCTACTGGGGGCCAGGAACCACTCTCAGAGTCTCCTCAGGAGGTGGTGGTTCCGGTGGTGGTTCCGGAGGTGGTGGTTCACATATGGATGTTGTGATGACCCAGTCTCCACTCACTCTATCGGTTGCCATTGGACAATCAGCCTCCATCTCTTGAAGTCAAGTCAGAGCCTC

50

TTAGATAGTGATGGAAAGACATATTTGAATTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTCTCTGGT
GTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTGAGAATCAGCAGAG
TGGAGGCTGAGGATTTGGGAATTTATTATTGCTGGCAAGGTACACATTTTCTGGGACGTTCCGGTGGAGGGACCAAGCTG
GAGATAAAA

【 0 3 7 3 】

139 scFvヌクレオチド配列(ヒト化); (配列番号5)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCTGGGCCAGCCA
GGGCATCAGAAACAACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGAGACTGATCTACGCTGCCAGCAATC
TGCAGAGCGGCGTGCCAGCAGATTACCGGAAGCGGCTCCGGCACCGAGTTACCCCTGATCGTGTCCAGCCTGCAGCCC
GAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGCACCACAGCTACCCTCTGACCAGCGGCGAGGCACCAAGGTGGAGATCAA
GCGGACCGGCAGCACCAGCGGCAGCGGCAAGCCTGGCAGCGGCAGGGAAGCGAGGTCCAGGTGCTGGAATCTGGCGGCG
GACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTACCTTCAGCAGCTACGCCATGTCTTGG
GTCCGGCAGGCTCCTGGAAGGGCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCAGCGGCTCTGGCGGCTCCACCAACTACGCCGACAG
CGTGAAGGGCCGGTTACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG
ACACCGCGTGTAATACTGTGCCGCAGCAGCGGGTGGAGCGAGTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTAGC

10

【 0 3 7 4 】

リーダー (核酸配列); (配列番号6)

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGC CGCCAGGCCG

【 0 3 7 5 】

ヒンジ(核酸配列); (配列番号7)

ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGC
AGCCCTGTCCCTGCGCCAGAGCGTGCCGGCCAGCGCGGGGGGCGCAGT GCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTG
TGAT

20

【 0 3 7 6 】

膜貫通ドメイン(核酸配列); (配列番号8)

ATCTACATCTGGGCGCCCTTGCCGGGACTTGTTGGGGTCCTTCTCCTGTCACT
GGTTATCACCTTTACTGC

【 0 3 7 7 】

4-1BB細胞内ドメイン(核酸配列); (配列番号9)

AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGAC CAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATG
GCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAGGAGGATGTGAACTG

30

【 0 3 7 8 】

CD3 (核酸配列); (配列番号10)

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACAAGCAGGGCCAG AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAG
GACGAAGAGAGGAGTACGATGTTT
TGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGA AGAACCTCAGGAAGGCCTGTACAATGA
ACTGCAGAAAGATAAGATGGCGG AGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGC
ACGATGGCCTTTACCAGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGC
CCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

40

【 0 3 7 9 】

CD3 (核酸配列; NCBI参照配列NM_000734.3); (配列番号100)

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAG
AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTT
TGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGA
AGAACCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGG
AGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGC
ACGATGGCCTTTACCAGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGC
CCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

【 0 3 8 0 】

アミノ酸配列:

50

3C10 scFvアミノ酸配列(マウス); (配列番号11)

EIQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIEDYYIHWVKQRTEQGLEWIGRIDPEN DETKYGPFIQGRATITADTSSNTV
YLQLSSLTSEDYAVYYCAFRGGVYWGPGTTL TVSSGGGGSGGGGGSGGGGSHMDVVMQSPPLTSLVAIGQSASISCKSSQ
SLLDSDG KTYLNWLLQRPQGSPKRLISLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGI
YYCWQGTHTFPGTFGGGKLEIK

【0381】

139 scFv アミノ酸配列(ヒト); (配列番号12)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGI RNNLA WYQQKPGKAPKRLIYAASNLQ SGVPSRFTGSGSGTEFTLIVSSLQ
PEDFATYYCLQHHSYPLTSGGGTKVEIKRTGS
TSGSGKPGSGEGSEVQVLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGSTNYADSVKG
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAGSSGWSEYWGQGT LVTVSS

10

【0382】

リーダー(アミノ酸配列) (配列番号13)

MALPVTALLPLALLLHAARP

【0383】

ヒンジ(アミノ酸配列) (配列番号14)

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

【0384】

膜貫通(アミノ酸配列) (配列番号15)

IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC

20

【0385】

4-1BB細胞内ドメイン(アミノ酸配列) (配列番号16)

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL

【0386】

CD3 ドメイン(アミノ酸配列) (配列番号17)

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER
RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

【0387】

CD3 ドメイン(アミノ酸配列; NCBI参照配列NM_000734.3) (配列番号99)

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER
RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

30

【0388】

配列番号11のポリペプチドをコードするヌクレオチドは配列番号4として表す。配列番号12のポリペプチドをコードするヌクレオチドを配列番号5として表す。配列番号13のポリペプチドをコードするヌクレオチドを配列番号6として表す。配列番号14のポリペプチドをコードするヌクレオチドを配列番号7として表す。配列番号15のポリペプチドをコードするヌクレオチドを配列番号8として表す。配列番号16のポリペプチドをコードするヌクレオチドを配列番号9として表す。配列番号17のポリペプチドをコードするヌクレオチドを配列番号10として表す。配列番号1のポリペプチドをコードするヌクレオチドを配列番号18として表す。配列番号2のポリペプチドをコードするヌクレオチドを配列番号19として表す。配列番号3のポリペプチドをコードするヌクレオチドを配列番号20として表す。配列番号99のポリペプチドをコードするヌクレオチドを配列番号100として表す。

40

【0389】

実施例4: EGFRvIIIICARについての予測CDRの指定

Kabatによって指定されるEGFRvIIIICARについての予測CDRは以下の通りである:

【化1】

EIQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIEDYYIHWVKQRTEQGLEWIGRIDPEN DETKYGPFIQGR
ATITADTSSNTVYLQLSSLTSEDYAVYYCAFRGGVYWGPGTT LTVSS; (配列番号21);

ここで、CDR1は

50

【化 2】

DYYIH (配列番号22)

CDR2は

【化 3】

RIDPENDETKYGPIFQG (配列番号23)

であり、

CDR3は

【化 4】

RGGVY (配列番号24)

である。

【化 5】

・ VL: DVVMTQSPLTSLVAIGQSASISCKSSQSLSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLISL VSKLDSGV
PDRFTGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCWQGTHTFPGTFGGGKLEIK; (配列番号25);

ここで、CDR1は

【化 6】

KSSQSLSDGKTYLN (配列番号26)

CDR2は

【化 7】

LVSKLDS (配列番号27)

であり、CDR3は

【化 8】

WQGTHTFPGT (配列番号28)

である。

【0 3 9 0】

Chothiaによって指定されるEGFRcIIICARについての予測CDRは以下の通りである:

【化 9】

・ VH: EIQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIEDYYIHVVKQRTQGLEWIGRIDPEN DETKYGPI
FQGRATITADTSSNTVYVLQSSLTSED TAVYYCAFRGGVYWGPGTT LTVSS; (配列番号29);

ここで、CDR1は

【化 10】

GFNIEDY (配列番号30)

CDR2は

【化 11】

DPENDE (配列番号31)

であり、

CDR3は

【化 12】

RGGVY (配列番号32)

10

20

30

40

50

である。

【化 1 3】

・ VL: DVVMTQSPLTSLVAIGQASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLISL VSKLDSGV
PDRFTGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGIIYCWQGTHFPQTFGGGKLEIK; (配列番号33);

ここで、CDR1は

【化 1 4】

SQSLDSDGKTY (配列番号34)

10

CDR2は

【化 1 5】

LVS (配列番号35)

であり、

CDR3は

【化 1 6】

GTHFPQ (配列番号36)

である。

20

【0391】

実施例5: マウス抗EGFRvIII抗体のヒト化

臨床の現場では、マウスEGFRvIII抗体のヒト化が望ましく、ここで、マウス特異的残基は、該マウスCARコンストラクトを導入したT細胞を用いた処置を受けた患者において、ヒト抗マウス抗原 (HAMA) 応答を誘発し得る。ハイブリドーマ由来のマウスEGFRvIII抗体のVHおよびVL配列を文献から抽出した(Morgan et al. (2012) Human Gene Therapy, 23: 1043-1953、上記)。マウスEGFRvIII抗体由来のCDR領域をヒト生殖系列受容体フレームワークVH1_1-fまたはVH5_5aならびにVK2_A17またはVK4_B3 (vBASE database) に移植することにより、ヒト化を行った。CDR領域に加えて、CDR領域の構造的な統合性を支持すると考えられるいくつかのフレームワーク残基、すなわちVK2 #36、#49、VK4 #2、#36、#46、#49、VH1 #2、#24、#76、#94およびVH5 #2、#24、#73、#76、#94がマウス配列から維持されていた。さらに、図9に示すように、ヒトJエレメントJH6およびJK4を、長鎖および軽鎖にそれぞれ用いた。得られたヒト化抗体のアミノ酸配列を、軽鎖については、VK2_A17/Hz1およびVK4_B3/Hz1とし、重鎖についてはVH1_1-f/Hz1、VH5_5-a/Hz1とした。残基の番号付けは、Kabat (上記Kabat E.A. et al, 1991) にしたがう。CDRの定義については、上記KabatおよびChothia et al, 1987を用いた。マウスEGFRvIIIから維持されているフレームワーク残基は枠囲いの太字/イタリックで示し、CDR残基には下線を付している。

30

【0392】

図9に示すように、ヒト化軽鎖および重鎖配列に基づいて、全部で8つのフレームワークの組合せを用いて、さらなる検証のために可溶性scFvを作製した。該scFV中のVLドメインおよびVHドメインの順番は変動しており(すなわち、VL-VHまたはVH-VLの方向)、各サブユニットがGGGGS (配列番号37) 配列を含む、「G₄S」サブユニット(配列番号37)を4コピー用いて、フレームワークを連結した。図9は、上記Kabat et alおよびChothia et al.によって算出されたVHおよび配列中のCDRを表す。

40

【0393】

クローニング:

マウスおよびヒト化VLおよびVHドメインをコードするDNA配列を得、該コンストラクトのコドンヒト(Homo sapiens)由来の細胞での発現用に最適化した。

【0394】

VLおよびVHドメインをコードする配列を哺乳類細胞における分泌に適当な発現ベクター

50

中にサブクロニングした。発現ベクターのエLEMENTには、プロモーター(サイトメガロウイルス (CMV) エンハンサー-プロモーター)、分泌を促進するシグナル配列、ポリアダニル化シグナルおよび転写終結配列 (ウシ成長ホルモン(BGH)遺伝子)、エピソームの複製および原核生物での複製を可能にするELEMENT(例えばSV40起点およびColE1または当該分野で公知の他のELEMENT)および選択を可能にするELEMENT (アンピシリン耐性遺伝子およびゼオシンマーカー)が含まれる。

【0395】

実施例6: ヒト化抗EGFRvIII可溶性scFv断片の特徴付け

可溶性scFv断片を上述の標準的な分生物学技術を用いて作製した。これらの可溶性scFvを、その安定性、細胞表面発現および結合特性を検討するための特徴付け試験に用いた。

10

【0396】

scFv発現および精製

各scFvコンストラクトの遺伝子導入のために、約3e8個の293F細胞を、PEIを遺伝子導入用試薬として、3:1 (PEI:DNA)の比で用いて、プラスミド100 µgで遺伝子導入した。該細胞をEXPi293 Expression media (Invitrogen) 100ml中で、シェーカーフラスコ内で、37、125 rpm、8% CO₂で増殖させた。培養物を6日後に回収し、タンパク質精製に用いた。

【0397】

293F細胞を、3500gで20分間遠心分離して回収した。上清を回収し、VacuCap90 PF Filter Unit (w/0.8/0.2 µm Super Membrane, PALL)に通して濾過した。約400 µlのNi-NTA agarose beads (Qiagen)を上清に添加した。該混合物を回転させ、4 で4時間インキュベーションした。該混合物を精製カラムに充填し、20mM ヒスチジンを含む洗浄バッファーで洗浄した。タンパク質を、300mM ヒスチジンを含む溶出バッファー500 µlで溶出した。試料をPBSバッファーに対して、4 で一晩透析した。タンパク質試料をnanodrop 2000cを用いて定量した。

20

【0398】

ヒト野生型EGFRまたはEGFRvIIIを発現する細胞への精製scFvの結合のFACSによるEC₅₀次の試験を、全てのヒト化EGFRvIII scFvパリアントがEGFRvIIIに対して匹敵する結合を示すが、野生型のEGFRには結合しないことを示すために行った。

【0399】

30

HEK293F浮遊細胞を、野生型hEGFRまたはhEGFRvIIIのいずれかで一過的に遺伝子導入し、遺伝子導入の2日後に回収した。約5e5個/ウェルの細胞をBD Falcon 96 well plateに移した。該細胞を900 rpmで3分間遠心分離した (Sorval Legend XT centrifuge)。上清を除いた。抗EGFRvIII scFvタンパク質試料を5% FBSを含有するDPBSで希釈した。該試料をウェルに添加し、混合して1時間インキュベーションした。該細胞を5% FBSを含むDPBSで2回洗浄した。該細胞をanti-poly His PE (R&D) とともに1時間インキュベーションし、2回洗浄した後、FACS解析を行った (LSRII (BD Biosciences))。

【0400】

hEGFRvIIIについてのマウスscFv (m3C10)のEC₅₀は、図10に示すように、約5nMと定量された。全てのヒト化EGFRvIII scFvパリアントは、一桁のEC₅₀値から2桁の低い値までの範囲のnM単位のEC₅₀ (5 ~ 50 nM)を示した。さらに、図11に示すように、コンストラクト2173および2174の、野生型EGFR発現細胞株に対するはっきりと認識できる結合が検出できなかったことから、マウス3C10と比較して、安全性プロファイルが改善していることが示唆される。これらの試験に基づいて、実施例8に示すようなさらなる臨床症状について、クローン2173を選択した。

40

【0401】

実施例7: ヒト化EGFRvIII CARコンストラクト

最終CARコンストラクトに用いるScFvは、実施例1に記載のヒト化フレームワーク配列より得た。VLおよびVHドメインの順番は変動した (すなわちVL-VHまたはVH-VL方向)。可変ドメインを連結して表1のscFvを作製するのに (G4S)₄ (配列番号113) リンカーを用いた。

50

【 0 4 0 2 】

【 表 1 】

表1. ヒト化 EGFRvIII scFv コンストラクトの VH および VL の方向性ならびにリンカー長を示す (表中、「G4S」は配列番号 37 を示す)

コンストラクト ID	アミノ酸長	アノテーション
108358	277	VH1-VK4, 4G4S
108359	277	VK4-VH1, 4G4S
108360	277	VH5-VK2, 4G4S
108361	277	VK2-VH5, 4G4S
107276	277	VH1-VK2, 4G4S
111046	278	VH5-VK4, 4G4S
111048	278	VK4-VH5, 4G4S
107277	277	VK2-VH1, 4G4S
107275		
mEGFRvIII 3C10	274	VH-VL, 3G4S+HM
EGFRvIII 139	269	VL-VH,

10

20

【 0 4 0 3 】

ヒト化scFv断片の配列を次の表2に示す(配列番号38、配列番号44、配列番号50、配列番号56、配列番号62、配列番号68、配列番号74および配列番号80)。これらのscFv断片をさらなる配列番号13～17とともに用いて、配列番号43、配列番号49、配列番号55、配列番号61、配列番号67、配列番号73、配列番号79および配列番号85を含む全長のCARコンストラクトを作製した。

【 0 4 0 4 】

これらのクローンは全て、CD3 鎖由来の同時刺激ドメインのシグナルドメインにQ/K残基変化を含んでいた。

30

【表 2 - 1】

表 2: ヒト化 EGFRvIII CAR コンストラクト

名称	配列 番号:	配列
CAR 1		
CAR1 scFv ドメイン	38	eiqlvqsgaevkkpgatvkiscksgfniedyyihwvqqapgkglewmgridpendet kygpifqgrvtitadtstntvymelsslrsedtavyycfrggvywgqgtvtvssggggsg gggsgggsgggsgsdvmtqspdslavslgeratinckssqllsdgktylnwlqqkpg qppkrlislvsklsgvpdrfsgsgsgtdflitisslqaedvavyycwqgthfpgtfgggtkv cik
CAR1 scFv ドメイン nt	39	gaaatccagctggccaatcgggagctgaggtaagaagccgggagccaccgtcaagatct catgcaaggggtcgggattcaacatcgaggactactacattcactgggtgcagcaagctccg ggaaaaggcctggaaatggatgggcagaatcgaccagaaaacgacgaaactaagtacgga ccgattttccaaggagagtactatcacccgcccatactcaaccaataccgtctacatggaac tgagctcgctccggtcgaagatactgcagtgtattactgtgccttcgaggagggtgactg gggccaaggaaactactgtcactgtctcgtcaggaggcggagggtcgggaggaggcgggag cggaggcgggtggctcgggtggcggagggaagcgacgtggtgatgaccagtcgccggactc cctcgccgtgagcctcggagagaggcgactatcaattgcaagtcgtcccagtcacttctgga ttccgatggtaaaacgtacctcaactggctgcagcaaaagccagggcagccacccaaacggt tgatctcccttggtccaaactggatagcggagtgccctgaccgcttctcgggttcgggtagcgg gaccgactcacctgacgatcagctcactgcaggcggaggacgtggcagtgactactgct ggaggggaaccacttccctggcaccttggagggtggcaccaagggtggagatcaag

10

20

30

【表 2 - 2】

<p>CAR1</p> <p>可溶性 scFv-nt</p>	<p>40</p>	<p>atggccctccctgtcaccgccctgctgttccgctggctcttctgtccacgccgctcggcccg aaatccagctgggtccaatcgggagctgaggtcaagaagccgggagccaccgtcaagatctc atgcaaggggtcgggattcaacatcaggactactacattcactgggtgcagcaagctccgg gaaaaggcctggaatggatgggcagaatcgaaccagaaaacgacgaaactaagtacggac cgattttcaagggaagagtactatcaccgccgatactcaaccaataccgtctacatggaact gagctcgtccgggtccgaagatactgcagtgtattactgtgcctttcgcggaggggtgtactgg ggccaaggaaactactgtcactgtctcgtcaggaggcggagggtcgggaggaggcgggagc ggaggcgggtggctcgggtggcggagggaagcgacgtggtgatgaccagtcctccggactcc ctgccgtgagcctcggagagaggcgactatcaattgcaagtcgtccagtcacttctggatt ccgatggtaaaacgtacctcaactggctgcagcaaaagccagggcagccacccaaacggtt gatctcccttgtgtccaaactggatagcggagtgctgaccgcttctcgggttccggtagcggg accgacttcacctgacgatcagctcactgcaggcggaggacgtggcagtgactactgtctg gcagggaacccacttccctggcaccttggagggtggcaccaaggtggagatcaagggatcg caccacatcaccatcatcatcac</p>
<p>CAR1</p> <p>可溶性scFv -aa</p>	<p>41</p>	<p><u>Malpvtalllplalllhaarpeiqlvqsgaevkkpgatvkiscksgfniedyyihwvqqap</u> gkglewmgridpendetkygpifqgrvtitadtstntvymelsslrsedtavyycafirggvy wgqgttvsvssgggsggggsgggsgggsgggsgdvmtqspdslavslgeratinckssqsl ldsdgktylnwlqqkpgppkrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdflltisslqaedvavyy cwqgthfpgtfgggtkveikgshhhhhhhh</p>

10

20

30

CAR 1-
全長-nt
レンチ
ウイルス

CAR 1- 全長-nt レンチ ウイルス	42	atggccctccctgtcaccgccctgtgtctccgctggctcttctgtccacgccgctcggcccgaga	10
		tccagctgggtgcagtcgggagctgaagtcaaaaagcctggcgcaaccgtcaagatctcgtgcaa	
		ggatcaggggttcaacatcgaggactactacatccattgggtgcaacaggcacccggaaaaggcct	
		ggagtggatggggaggattgacctcagaaaatgacgaaaccaagtacggaccgatcttccaagga	
		cgggtgaccatcacggctgacacttccactaacaccgtctacatggaactctcgagccttcgctcgg	
		aagataccgcgggtgtactactgcgccttagagggtggagtctactggggacaagggactaccgtca	
		ccgtgtcgtcaggtggcggaggatcaggcggaggcggctccgggtggaggagggaagcggaggga	
		gggtggctccgacgtgggtgatgacgcagtcaccggactccttggcgggtgagcctgggtgaacgcgc	
		cactatcaactgcaagagctcccagagcttgcctggactccgatgaaagacttatctcaattggctg	
		caacagaagcctggccagccgccaaagagactcatctactgggtgagcaagctggatagcggag	
		tgcagatcgggttttcgggacgggctcaggcacccgacttaccctgactatttctccctccaagcc	20
		gaggatgtggccttactactgttggcaggggactcacttccggggaccttcggtggaggcact	
		aaggtggagatcaaaaccactaccccagcaccgaggccaccaccccggtccttaccatcgctt	
		cccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctgtggggccgtgcatacccg	
		ggcttgcacttcgcctgcgatatctacatttgggccctctggctgggtacttgcggggctcgtgcttt	
		cactcgtgatcactcttactgttaagcgcggtcgggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctca	
		tgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccgggttccagaggaggagga	
		aggcggctgcgaactgcgcgtgaaatcagccgcagcgcagatgtccagcctacaagcagggg	
		cagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcg	
		gagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaagagggcctgt	
		acaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggatgaaaggggaacg	40
		cagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacaccta	
		tgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg	

【表 2 - 4】

CAR 1-全長-aa	43	malpvtallplallhaarpeiqlvqsgaevkkpgatvkiscksgfniedyyihwvqqap gkglewmgridpendetkygpifqgrvitadtstntvymelsslrsedtavyycafrgg vywgqgtvtvssggsgsgsgsgsgsgsgsgsdvmtqspdslavslgeratinckss qsllsdgktylnwlqqkpgppkrlislvsklsgvpdrfsgsgsgtdfltisslqaedva vyycwqgthfpgtfgggtkveikttpparpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrg ldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfe ceeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrrcydvldkrrgdpemggkprrk npqeglynelqkdkmacayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalpp r
CAR 2		
CAR2 scFv ドメイン	44	dvvmtqspdslavslgeratinckssqsllsdgktylnwlqqkpgppkrlislvsklsg vpdrfsgsgsgtdfltisslqaedvavyycwqgthfpgtfgggtkveikggsgsgsgsg ggsgsgsgsciqlvqsgaevkkpgatvkiscksgfniedyyihwvqqapgkglewm gridpendetkygpifqgrvitadtstntvymelsslrsedtavyycafrggvywgqgtvt vss

10

20

【表 2 - 5】

CAR2 scFv ドメイン- nt	45	gatgtcgtgatgaccagtcctccagactccctcgagtgctccttgggagaacgggccaccatc aactgcaaatcgagccagtcactgctggactcagacggaaagacctacctaactggctgca gcagaagcctggccagccaccgaagcgctgactccttgggtccaagctggactcgggc gtcccgacaggttttagcggtagcggctcgggaaccgacttcactctgaccattagctcgctc caagctgaagatgtggcggcttactactgctggcaggggacccacttccccgggaccttggc ggagggaactaaagtcgaaatcaaaggaggaggcggatcagggtggaggaggcagcggagg aggaggaggcggcgggtggcggctccgaaatcaacttgtcaatccgggtccgagggtgaag aaacctgggtccactgtcaagatctcgtgtaagggatcgggattcaatatcaggactactaca tcactgggtgcaacaggcgccaggaaaggattggagtggatgggtcgcatcgaccggga aaacgatgagactaagtacggaccgatcttcaaggccgggtcacgatcactgcggatacct ccactaataccgtgtatatggagctctcgtcactgagaagcgaagatacggcgtgtactactg cgcattcagaggagggtgtgtactggggccagggaactactgtgaccgtgtcgtcg
--------------------------	----	---

10

20

【表 2 - 6】

CAR2 - 可溶性 scFv - nt	46	atggccctccctgtcaccgcccgtctgcttccgctggctcttctgtctccacgcccgtcggccccg atgtcgtgatgacctcagctcccagactccctcgcagtgctccttgggagaacgggcccaccatca actgcaaatcgagccagtcactgtggactcagacggaaagacctacctaactggctgcag cagaagcctggccagccaccgaagcgccctgatctccctgggtgtccaagctggactcgggcgt cccggacagggttagcggtagcggctcgggaaccgacttcactctgaccattagctcgtcca agctgaagatgtggcggctactactgtggcaggggacccacttccccgggaccttggcg gaggaactaaagtcgaaatcaaaggaggaggcggatcagggtggaggaggcagcggagga ggaggaggcggcgggtggcggctccgaaatcaacttgtcaatccgggtccgaggtgaaga aacctgggtccactgtcaagatctcgtgtaagggatcgggattcaatatcaggactactacat ccactgggtgcaacaggcggccaggaaagggttgagtggtggatgggtcgcacgcaccgga aaacgatgagactaagtacggaccgatctccaaggccgggtcacgatcactgcggatacct ccactaataccgtgtatatggagctctcgtcactgagaagcgaagatacggccgtgtactactg cgcattcagaggaggtgtgtactggggccagggaactactgtgaccgtgtcgtcggggtcac atcaccaccatcatcatcaccac
CAR2- 可溶性 scFv - aa	47	<u>malpvtallplallhaarpdvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqq</u> kpgqppkrlislvsldsgvpdrfsgsgsgtdftlisslqaedvavyycwqgthfpgtfggg tkveikggggsgggsgggsgggsgggscqlvqsgaevkkgpatvkiscksgfniedyyi hwwqqapgkglewmgridpendetkygpifqgrvtitadtstntvymelsslrsedtavy <u>ycafrggvywggtttvssgshhhhhhhh</u>

10

20

30

【表 2 - 7】

CAR 2-全長- nt	48	<p>atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgtccacgccgctcggcccg acgtggatcatgactcaaagcccagattccttggctgtctcccttggagaaagagcaacgatcaa ttgcaaaagctcgagtcctgttggactccgatggaaaaacctacctaactggctgcagca gaagccgggacaaccaccaaagcggctgattccctcgtgtccaagctggacagcggcgtg ccggatcgtctcgggcagcggctcgggaaccgattttactctcactatttcgtcactgcaagc ggaggacgtggcgggtgtattactgtgtggcagggcactcacttcccggtacttttgggtggagg taccaaagtcgaatcaagggtggaggcgggagcggaggaggcgggtcgggaggaggga ggatcgggtggcggaggctcagaaatccagctgggtcagtcagggtccgaagtgaagaag cctggggccacgggtgaagatctcgtgcaaggggagcggattcaacatcgaggattactacat ccattgggtgcaacaggcccttggcaaagggtggaatggatgggaaggatcgacccga gaatgacgagactaagtacggcccgatcttccaaggacgggtgaccatcactgcagacactt caaccaacaccgtctacatggaactctcctcgtcgtcgcgcaggacaccgccgtgtactact gtgcttcagaggaggagtctactggggacagggaacgaccgtgaccgtcagctcaaccact accccagcaccgaggccaccaccccggtcctaccatcgccctccagcctctgtccctgcg tcggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcataccgggggtcttgacttcgcct gcgatatctacatttgggcccctctggctgtgtacttgcggggctcgtgcttctcactcgtgatca ctcttactgtgaagcgggtcgggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccttcatgaggcct gtgcagactactcaaggaggaggacggctgttcatgccggttccagaggaggagggaaggcg gctgcgaactgcgcgtgaaatcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcagggggca gaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagc ggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagaggg cctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaag gggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggaactcagcaccgccacc aaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgcgcctcgg</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
--------------	----	--	---

【表 2 - 8】

CAR 2-全長- aa	49	malpvtallplalllhaarpdvmtqspdslavslgeratinck <u>ssqsllds</u> dgktylnwlq qkpgqppkrlis <u>lvskldsg</u> vpdfsgsgsgtdfiltisslqaedvavyyc <u>wqgthfpgtfg</u> ggtkveikggggsgggsgggsgggsgggsgciqlvqsgaevkpgatvkisckgsgfnied <u>yyih</u> wvqqapgkglewm <u>gridpendetkygpifq</u> grvtitadtstntvymelsslrsed tavyyca <u>frggvyw</u> qggtvtvssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrg ldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfe ceeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlyncnlgrreedyvldkrrgrdpemggkprrk npqeglyncqlkdkmacayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalpp r
CAR 3		
CAR3 scFv ドメイン	50	ciqlvqsgaevkpgeslriscckgsgfniedyyihwvrqmpgkglewmgridpendetk ygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycfrggvywqggtvtvssggggsg ggsgggsgggsgsdvmtqspslpvtlgqpasisckssqslldsdgktylnwlqqrpg qsprrlislvskldsgvpdfsgsgsgtdftlkisrveacdvgvyycwqgthfpgtfgggtkv eik

10

20

【表 2 - 9】

CAR3 scFv ドメイン nt	51	gagattcagctgggtccaaagcggcgagaaagtgtgaaaagccaggggaatcgttcgcgcacatca gctgtaaaggttccgggttcaacatcgaggactattacatccattgggtgcggcagatgccag gaaaggggctggaatggatgggacgggattgacccggagaacgacgaaaccaagtacggac cgatctttcaaggacacgtgactatctccgccgacaccagcatcaatacgggtgtacctccaatg gtcctcactcaaggcctcggataccgcatgtactactgcgcgttcagaggaggcgtctactg gggacaagggaactactgtgactgtctcatcaggagggtggaggaagcggaggagggtggctcg ggcggagggtggatcgggaggaggagggtccgatgtggtgatgaccagtcctccactgtcgc tcccggtgacctcggacagcctgctagcatctcgtgcaaactctcgcaatccctgctggactc ggacggaaaaacgtacctcaattggctgcagcagcgcctggccagagcccgaagaaggctt atctcgtcgtgtgtcaaagctggatagcgggtgtgcccgaccgggttcagcggctcagggtcagg aaccgattcaccttgaagatctcccgctggaagccgaagatgtcggagtctactactgtgg cagggtactcacttcccggggaccttgggtggcggcactaaggctcgagattaag
-------------------------	----	--

10

20

【表 2 - 1 0】

CAR 3- 可溶性 scFv - nt	52	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccc agattcagctggtccaaagcggcgagaaagtgaaaaagccaggggaatcgttgcgcacacag ctgtaaagggtccggcttcaacatcgaggactattacatccattgggtgcggcagatgccagga aaggggctgggaatggatgggacggattgacccggagaacgacgaaaccaagtacggaccg atcttcaaggacacgtgactatctccgccgacaccagcatcaatcgggtgtacctccaatggt cctcactcaaggcctcggataccgcgatgtactactgcgcgttcagaggaggcgtctactggg gacaagggaactactgtactgtctcatcaggagggtggaggaagcggaggagggtggctcggg cggagggtggatcgggaggaggagggtccgatgtggtgatgaccagtccccactgtcgtc ccggtgacctcggacagcctgtagcatctcgtgcaaatcctcgcaatccctgctggactcg gacggaaaaacgtacctcaattggctgcagcagcgccctggccagagcccagagaaggctta tctcgtggtgtcaaagctggatagcgggtgtgccgaccggttcagcggctcagggtcagga accgattcacctgaagatctccgcgtggaagccgaagatgtcggagtctactactgtggc agggactactcctccggggaccttgggtggcggcactaaggctcagattaagggtcacacc atcatcaccatcaccaccac
CAR 3- 可溶性 scFv - aa	53	<u>malpvtallplallhaarpeiqlvqsgacvkkp</u> geslriscgsgfniedyyihwvrqmp gkglewmgridpendetkygpifqhvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycfrgg vywgqgtvtvssgggsgggsgggsgggsgggsgdvmtqspslpvtlgqpasisckss qslldsdgktylnwlqrrpgqsprrlislvsldsgvpdrfsgsgsgtdflkisirveacdvgv yycwqgthfpgtfgggtkveikgshhhhhhhh

10

20

30

【表 2 - 1 1】

CAR 3-全長- nt	54	<p>atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg aaatccagctgggtgcaaagcggagccgagggtgaagaagcccgagaaatccctgcgcattc gtgtaagggttccggctttaacatcgaggattactacatccatgggtgagacagatgccggg caaaggctgggaatggatgggccgcacgcacccggagaaacgacgaaccaaatacggacc aatcttccaaggacatgtgactatttccgcggtacatccatcaacactgtctacttgcagtga gctcgtcaaggcgtcggtaccccatgtactactgcgcattcagaggagggtgtgtactggg gccagggcactacggtcaccgtgtcctcgggagggtggagggtcaggaggcggaggctcgg gcgggtggaggatcaggcggaggaggaaagcgatgtggtcatgactcaatccccactgtact gcctgtcactctggggcaaccggcttccatctcatgcaagtcaagccaatcgctgctcgcactcc gacggaaaaacctacctaattggcttcagcagcgccaggccagtcgcctcggaggctgat ctcactcgtgtcgaagcttgactccgggtgcccgatcggtttagcgggaagcggatcgggga ccgacttcacgttgaagattagccgggtggaagccgaggacgtgggagtctattactgtggc aggggacccacttccggggacttccggaggaggcacaaagtcgagattaagaccactac cccagcaccgaggccacccacccggctcctaccatcgctccagcctctgtccctgcgtc cggaggcatgtagaccgcagctgggtggggccgtgcataccgggggtcttgacttcgcctgc gatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggtcctgctgttctactcgtgatcact cttactgtaagcggtcggaagaagctgtgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgt gcagactactcaagaggaggacggctgtcatgccgttccagaggaggaggaaagcgg ctgcgaactgcgcgtgaaatcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcag aaccagctctacaacgaactcaatcttggctggagagaggagtacgacgtgtctggacaagcg gagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcagaaagaatcccaagagggc ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg ggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca aggacacctaagcgtcttcacatgcaggccctgccgcctcgg</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
--------------	----	--	---

【表 2 - 1 2】

CAR 3-全長- aa	55	malpvtalllplalllhaarpeiqlvqsgaevkkpgeslrisccksgfniedyyihwvrqmp gkglewmg <u>ridpendetkygpifqgh</u> vtisadtsintvylqwsslkasdtamyycafrg <u>gvywgqgttv</u> tvssggsgsgsgsgsgsgsgsgsgsdvmtqspslpvtlgqpasisck <u>s</u> <u>qsllsdsgktylnw</u> lqqrpgqsprrlis <u>lvskldsgv</u> pdfsgsgsgtdflkisrveadv gvyycw <u>qgthfpgtf</u> gggkveikttppaprpptpaptiasqplsrpeacrpaaggavhtr gldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgkkllyifkqpfmrpvqtqeedgcscrfp ccccggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynecnlgrceydvlckrrgrdpemggkpr knpqeglynelqkdkmacayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalp pr
CAR 4		
CAR4 scFv ドメイン	56	dvmtqspslpvtlgqpasisckssqsllsdsgktylnwqqrpgqsprrlislvskldsgv pdfsgsgsgtdflkisrveadvgvyycwqgthfpgtfgggkveikggsgsgsgsg ggsgsgsgsciqlvqsgaevkkpgeslrisccksgfniedyyihwvrqmpgkglewmg ridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycafrggvywgqgttv tvss

10

20

【表 2 - 1 3】

CAR4 scFv ドメイン nt	57	gacgtcgtcatgacccagagcccgctgtcactgcctgtgacctgggccagccggcgctccat tagctgcaaactctcgcaatccctgctcgactcagacggaaaaacgtacttgaactggctcaa cagcgccctgggcaatcccaaggcggcttatctcactcgtcagcaagctcgatagcgggtgc ccagacagatttctgggctcgggatcgggcactgattcactctgaagatctcgcggtggaa gccgaggatgtgggagtgctactattgctggcagggcactcacttccccgggacgttggcgg aggaaactaaggctgagatcaaaggaggaggtggatcaggcggaggtgggagcggaggag gagggaagcgggtgggaggttcgaaatccagctggtgcaatcaggagccgaggtgaaga agccggggagaatccctgcgcactcgtgcaagggtcgggcttcaacatcgaggattactac atccactgggtgcggcagatgccgggaaaggggttggaatggatgggacgcattgacccgg aaaatgatgaaaccaaatacgggccaatctccaaggccacgtgaccattagcgtgacactt ccatcaacaccgtgtaccttcagtggctcctactgaaggcgtcggacactgccatgtactactg tgcatcagaggaggggtctactggggacagggcaccaccgtgaccgtgagctcc
-------------------------	----	--

10

20

【表 2 - 1 4】

CAR4- 可溶性 scFv - nt	58	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg acgtcgtcatgaccagagcccgcgtgctactgcctgtgacctgggccagccggcgctcatta gctgcaaatcctcgcaatccctgctcgactcagacggaaaaacgtactgaactggctccaac agcgccctgggcaatccccaaggcggcttatctcactcgtcagcaagctcgatagcgggtgcc cagacagatttccgggctcgggatcgggcactgattcactctgaagatctcgggggtggaag ccgaggatgtgggagtgactattgctggcagggcactcacttccccgggacgtttggcgga ggaactaaggctgagatcaaaggaggagggtggatcaggcggagggtgggagcggaggagg aggaagcggtggtggaggtccgaaatccagctggtgcaatcaggagccgaggtgaagaa gccgggagaatccctgcgcactcgtgcaagggtcgggcttcaacatcaggattactacat ccactgggtgcggcagatgccgggaaagggttgaatggatgggacgcattgaccgga aatgatgaaccaatacgggccaatcttcaaggccacgtgaccattagcgtgacacttc catcaacaccgtgtaccttcagtggctcctcactgaaggcgtcggacactgccatgtactactgt gcattcagaggaggggtctactggggacagggcaccaccgtgaccgtgagctccggctcgc atcaccatcatcaccaccatcac
CAR4- 可溶性 scFv -aa	59	<u>malpvtallplallhaarpdvmtqsplslpvtlgqpasisckssqslldsdgktylnwlqq</u> rpgqsprrlislvsklsgvpdrfsgsgsgtdflkisirveadvgvyycwqgthfpgtfggg tkveikggggsgggsgggsgggsgggsciqlvqsgaevkkpgeslrisksgsfniedyyi hwvrrmpgkglewmgridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtam <u>yycfrggvywgqgtvtvssgshhhhhhhh</u>

10

20

30

【表 2 - 1 5】

CAR 4-全長- nt	60	<p>atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgtccacgccgctcggcccg acgtcgtcatgaccaatccctctctccctgcccgtcaccctgggtcagccggcgatctc atgcaaaagctcacagtccctgctggattcggacggaaaaacctacttgaactggctccaaca gaggccgggtcagtcacctcgcagactgatctcgtggtgagcaagctcgaactcgggtgtgc cggatcgggttctccgggtcaggatcgggcaccgactttacgctcaagatttcgagagtggagg ccgaggatgtgggagtgtactattgtggcagggcacgcatttccccgggacatttggaggc gggactaagggtggaatcaaggagggtggcgatcaggcggaggaggcagcggcggag gtggatcaggaggcggagggtcagagatccagctggtccaaagcggagcagaggtaaga agccaggcagagtccttcgcatcttgcaaaggaggcggcttcaacattgaagattactacat ccactgggtgcggcaaatgccaggaaagggtctggaatggatgggacggatcgaccaga aaatgatgaaactaagtacggaccgatcttccaaggacacgtcactatctccgggacacttc gatcaacaccgtgtacctccagtggagcagcttgaagcctccgacaccgctatgtactactgt gccttccggcggaggagtctactggggacaggggactactgtgacctgtctgccaccactac cccagcaccgaggccacccaccccggtcctaccatcgctccagcctctgtccctgcgtc cggaggcatgtagaccgcagctgggtggggccgtgcataccgggggtcttgacttcgctgc gatctctacatttgggcccctctggctggttacttgcggggtcctgctgttctactcgtgatcact ctttactgtaagcggctcggagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcagaggcctgt gcagactactcaagaggaggacggctgtcatgccgttcccagaggaggagggaaggcgg ctgcgaactgcgcgtgaaatcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcag aaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgtctggacaagcg gagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaagagggc ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg ggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca aggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgctcgg</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
--------------	----	--	---

【表 2 - 1 6】

CAR 4-全長- aa	61	malpvtalllplalllhaarpdvmtqsplslpvtlgqpasisck <u>ssqsllds</u> dgktylnwlq qrpqqsprrlis <u>lvskldsgvpdrfs</u> gsgsgtdfllkisirveacdvgvyycw <u>qgthfpgtfg</u> ggtkveikggggsgggsgggsgggsgggsgciqlvqsgaevkkpgeslriskgsgfniedy yihwvrqmpgkglewm <u>gridpendetkygpifqgh</u> vtisadtsintvylqwsslkasd tamyycafr <u>ggvyw</u> gqgtvtvssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtr gldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfp ccccggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlyncnlgrceydvldkrrgrdpemggkpr knpqeglyncelqkdkmacayscigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalp pr
CAR 5		
CAR5 scFv ドメイン	62	ciqlvqsgaevkkpgatvkiskgsgfniedyyihwvqqapgkglewmgridpendet kygpifqgrvtitadtstntvymelsslrsedtavyycufrggvywqgtvtvssggggsg ggsgggsgggsgsdvmtqsplslpvtlgqpasisckssqslldsdgktylnwlqrpq qsprrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdfllkisirveacdvgvyycwqgthfpgtfgggtkv eik

10

20

【表 2 - 17】

<p>CAR5</p> <p>scFv ドメイン</p> <p>nt</p>	<p>63</p>	<p>gaaatccagctcgtgcagagcggagccgaggtcaagaaaccgggtgctaccgtgaagattt</p> <p>catgcaagggatcgggcttcaacatcgaggattactacatccactgggtgcagcaggcacca</p> <p>ggaaaaggacttgaatggatgggcccgatcgaccggaaaaatgacgagactaagtacggcc</p> <p>ctatcttccaaggacgggtgacgatcacgcagacactagcaccaacaccgtctatatggaac</p> <p>tcctgtccctgaggtccgaagatactgccgtgtactactgtgcgtttcgcggaggtgtgtactgg</p> <p>ggacaggggtaccaccgtcaccgtgtcatcgggcgggtggaggctccggtggaggagggtca</p> <p>ggaggcgggtggaagcggaggaggcggcagcgacgtggtcatgactcaatcggcgtgtcg</p> <p>ctgcccgtcactctgggacaaccgcgtccatcagctgcaaactctcgagtcactgcttgact</p> <p>ccgatggaaagacctacctaactggctgcagcaacgccaggccaatcccaagacgcct</p> <p>gatctcgttgggtgtcaaagctggactcaggggtgccggaccgggttctccgggagcgggtcgg</p> <p>gcacggatttcactctcaagatctccagagtgaagccgaggatgtgggagtcactactgct</p> <p>ggcaggggaaccatttccctggaacttttggcggagggaactaaggtcgagattaaa</p>
--	-----------	--

10

20

【表 2 - 1 8】

CAR5 - 可溶性 scFv - nt	64	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgtccacgccgctcggcccg aaatccagctcgtgcagagcggagccgaggtcaagaaaccgggtgctaccgtgaagattica tgcaagggatcgggcttcaacatcgaggattactacatccactgggtgcagcaggcaccagg aaaaggacttgaatggatgggccgggatcgaccggaaaaatgacgagactaagtacggccct atctccaaggacgggtgacgatcaccgcagacactagcaccaacaccgtctatatggaactc tcgtccctgaggtccgaagatactgccgtgtactactgtgcgttccgagggtgtgtactggg gacagggtaccaccgtcaccgtgtcatcgggcgggtggaggctccggtggaggagggtcag gaggcggtggaagcggaggaggcggcagcgacgtggtcatgactcaatgccgctgtcgc tgcccgtcactctgggacaaccgcgtccatcagctgcaaattccgcagtcactgcttgactc cgatggaaagacctacctcaactggctgcagcaacgccaggccaatccccaagacgcctg atctcgttgggtgcaaagctggactcaggggtgccggaccgggtctccgggagcgggtcggg cacggatttactctcaagatctccagagtgggaagccgaggatgtgggagtctactactgtg gcagggaacccatttccctggaacttttggcggagggaactaaggctcgagattaaaggagcc accatcatcatcaccaccaccac
CAR5 - 可溶性 scFv -aa	65	<u>malpvtallplallhaarpeiqlvqsgacvkkpgatvkiscksgsfniedyyihwvqqap</u> gkglewmgridpendetkygpifqgrvtitadtstntvymelsslrsedtavyycfrggvy wqggttvtvssgggsgggsgggsgggsgggsgdvmtqspslpvtlgqpasisckssqsl ldsdgktylnwlqrrpgqsprrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveacdvgvyy <u>cwqgthfpgtfgggtkveikgshhhhhhhh</u>

10

20

30

【表 2 - 1 9】

CAR 5-全長- nt	66	<p>atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg aaatccagctcgtgcagagcggagccgaggtaagaaacccgggtgctaccgtgaagattica tgcaagggatcgggcttcaacatcgaggattactacatccactgggtgcagcaggcaccagg aaaaggacttgaatggatgggccggatcgaccggaaaaatgacgagactaagtacggccct atcttccaaggacgggtgacgatcaccgcagacactagcaccaacaccgtctatatggaactc tcgtccctgagggtccgaagatactgcccgtgtactactgtgcgttccggagggtgtgtactggg gacagggtaccaccgtcaccgtgtcatcgggcgggtggaggctccggtggaggagggtcag gaggcgggtggaagcggaggaggcggcagcgacgtggtcatgactcaatcgccgtgtcgc tgcccgtcactctgggacaaccgcgtccatcagctgcaaatccctgcagtcactgcttgactc cgatggaaagacctaccctcaactggctgcagcaacgccaggccaatcccaagacgcctg atctcgttggtgtcaaagctggactcaggggtgccggaccgggttctccgggagcgggtcggg cacggatttactctcaagatctccagagtggaaagccgaggatgtgggagtctactactgtg gcagggaacccatttccctggaaacttttggcggagggaactaaggctcgagattaaaaccactac cccagcaccgaggccaccaccccggtcctaccatcgctccagcctctgtccctgcgtc cggaggcatgtagaccgcagctgggtggggccgtgcataccgggggtcttgacttcgcctgc gatctacatttgggcccctctggctggtacttgcggggctcgtgctttactcgtgatcact ctttactgtaagcgggtcggagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcatgaggcctgt gcagactactcaagaggaggacggctgtcatgccgttcccagaggaggagggaaggcgg ctgcgaactgcgcgtgaaatcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggagcag aaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgtctggacaagcg gagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaagagggc ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg ggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca aggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
--------------	----	--	---

【表 2 - 2 0】

CAR 5-全長- aa	67	malpvtallplallhaarpeiqlvqsgaevkkpgatvkiscksgsfni <u>edyyihwvqqap</u> gkglewmgr <u>ridpendetkygpifqgrv</u> titadtstntvymelsslrsedtavyyc <u>afrgg</u> <u>vywgqgtvtvssggsgsgsgsgsgsgsgsgsgsdvmtqsp</u> slpvtlgqpasis <u>ckss</u> <u>qsllsdgktylnwlqqrpgqsprrlis</u> <u>lvsklds</u> gvpdrrfs ^{gsgsgtdftlkisr} veacdvg vyycw <u>qgthfpgt</u> fgggtkveikttppaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaaggavhtrg ldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfe ceeggcclrvkfsrsadapaykqgqnqlynclnlgrreedyvldkrrgrdpemggkprrk npqeglynclqkdmacayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhmqalpp r
CAR 6		
CAR6 scFv ドメイン	68	ciqlvqsgaevkkpgeslrisccksgsfni <u>edyyihwvrqmpgkglewmgridpendetk</u> <u>ypgifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyyc</u> afrggvywgqgtvtvssggsgsg ggsgggsgsgsgsdvmtqspdslavslgeratinckss <u>qsllsdgktylnwlqqkp</u> <u>qppkrlislvsklds</u> gvpdrrfs ^{gsgsgtdftl} tisslqacdva <u>vyycwqgthfpgt</u> fgggtkv eik

10

20

【表 2 - 2 1】

<p>CAR6</p> <p>scFv ドメイン</p> <p>nt</p>	<p>69</p>	<p>gaaatccagctgggtgcagtcaggcgcgaggtcaagaagccgggagagtcgctgagaatct</p> <p>cgtgcaagggtcgggggtcaacatcgaggactactacattcactgggtcaggcagatgccg</p> <p>ggaaagggtactggaatggatggcgcgatcgaccagaaaatgacgaaaccaatacggg</p> <p>ccgattttcaaggccacgtgactatcagcgagacacgagcatcaacactgtctacctccagt</p> <p>ggtcctcgcttaaggccagcgataccgctatgtactactgcgcattcagaggcggggtgtact</p> <p>ggggacaaggaaccactgtgaccgtgagcagcggaggtggcggtcgggaggaggtggg</p> <p>agcggaggaggaggttccggcgggtggaggatcagatgtcgtgatgaccagtccccggact</p> <p>ccctcgctgtctcactgggcgagcgcgcgaccatcaactgcaaatcgagccagtcgctgttg</p> <p>gactccgatggaaagacttatctgaattggctgcaacagaaaccaggacaacctcccaagcg</p> <p>gctcatctcgcttgtgtcaaaactcgattcgggagtgccagaccgcttctcggggtccgggag</p> <p>cggaaactgactttactttgaccatttcctcactgcaagcggaggatgtggccgtgtattactgttg</p> <p>gcagggcacgcatttccctggaaccttcgggtggcggaactaagggtggaaatcaag</p>
--	-----------	--

10

20

【表 2 - 2 2】

CAR6- 可溶性 scFv - nt	70	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg aatccagctgggtgcagtcaggcgccgaggtcaagaagccgggagagtcgctgagaatctc gtgcaagggctcgggggttcaacatcgaggactactacattcactgggtcaggcagatgccgg gaaagggactggaatggatgggcccgcgaccagaaaatgacgaaaccaatacgggc cgattttcaaggccacgtgactatcagcgcagacacgagcatcaacactgtctacctcagtg gtcctcgcttaaggccagcgataccgctatgtactactgcgcattcagaggcggggtgtactg gggacaaggaaccactgtgaccgtgagcagcggaggtggcggctcgggaggaggtggga gggaggaggaggttcggcggtggaggatcagatgtcgtgatgaccagtccccggactc cctcgctgtctcactgggcgagcgcgcgaccatcaactgcaaatcgagccagtcgctgttg actccgatggaaagacttatctgaattggctgcaacagaaccaggacaacctccaagcgg ctcatctcgttgtgcaaaactcgattcgggagtgccagaccgcttctcggggtccgggagc ggaaactgactttactttgaccatttcctcactgcaagcggaggatgtggccgtgtattactgttg cagggcacgcatttccctggaaccttcgggtggcgggaactaagggtggaaatcaagggatcaca ccaccatcatcaccatcaccacat
CAR6 - 可溶性 scFv-aa	71	<u>malpvtalllplalllhaarpeiqlvqsgacvkkp</u> geslriscgsgfniedyyihwvrqmp gkglewmgridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycfrgg vywgqgttvsvssgggsgggsgggsgggsgggsgdvmtqspdslavslgeratinckss qslldsdgktylnwlqqkpgppkrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdftlisslqaedvav yycwqgthfpgtfgggtkveikgshhhhhhhh

10

20

30

【表 2 - 2 3】

CAR6-全長- nt	72	<p>atggccctccctgtcaccgccctgctgttccgctggctcttctgtccacgccgctcggcccg agattcagctcgtgcaatcgggagcgggaagtcaagaagccaggagagtccttgcggatcga tgcaagggtagcggctttaacatcgaggattactacatccactgggtgaggcagatgccggg gaagggactcgaatggatgggacggatcgaccagaaaacgacgaaactaagtacgggtcc gatcttccaaggccatgtgactattagcggcgatacttcaatcaataccgtgtatctgcaatggtc ctcattgaaagcctcagataccgcgatgtactactgtgtttcagaggaggggtctactgggga cagggaactaccgtgactgtctcgtccggcggaggcgggtcaggaggtggcggcagcggga ggaggaggggtccggcggagggtgggtccgacgtcgtgatgaccagagccctgacagcctg gcagtgagcctgggcgaaagagctaccattaaactgcaaactcgtcgagagcctgctggactc ggacggaaaaacgtacctcaattggctgcagcaaaagcctggccagccaccgaagcgctt atctcactgggtgtcgaagctggattcgggagtgcccgatcgcttctccggctcgggatcgggt actgacttcaccctcactatctcctcgttcaagcagaggacgtggccgtctactactgtcggca gggaaccacattccgggaaccttcggcggaggagcgaagtgagatcaagaccactacc ccagcaccgaggccaccaccccggtcctaccatcgctccagcctctgtccctgcgtcc ggaggcatgtagaccgcagctgggtggggccgtgcataccgggggtcttgacttcgcctgcg atatctacatttggggccctctggctgggtacttgcggggtcctgtcgtttcactcgtgatcactt ttactgtaagcgggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttcagaggcctgtg cagactactcaagaggaggacggctgttcatgccgttccagaggaggagggaaggcggt gcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgtccagcctacaagcaggggcaga accagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcgg agaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaagagggcct gtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggg gaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagaccgccacca ggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
-------------	----	---	---

【表 2 - 2 4】

CAR6-全長-aa	73	malpvtalllplallhaarpeiqlvqsgaevkkpgeslrisccksgfniedyyihwvrqmp gkglewmg <u>ridpendetkygpifqgh</u> vtisadtsintvylqwsslkasdtamyycfrg <u>gvywgqgttv</u> tvssggsgsgsgsgsgsgsgsgsdvmtqspdslavslgeratinck <u>s</u> <u>qsll</u> dsdgktylnwlqqkpgqppkrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdfltisslqaedv avyycw <u>qgthfpgt</u> fgggtkveikttppaprpptpaptiasqplsrpeacrpaaggavhtr gldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfp ccccggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynecnlgrceydvlckrrgrdpemggkpr knpqeglynclqkdkmacayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalp pr
CAR 7		
CAR7 scFv ドメイン	74	dvmtqspdslavslgeratinckssqsllsdgktylnwlqqkpgqppkrlislvskldsg vpdrfsgsgsgtdfltisslqaedvavyycwqgthfpgtfgggtkveikggsgsgsgsg ggsgsgsgsciqlvqsgaevkkpgeslrisccksgfniedyyihwvrqmpgkglewmg ridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycfrggvywgqgttv tvss

10

20

【表 2 - 2 5】

<p>CAR7</p> <p>scFv ドメイン nt</p>	<p>75</p>	<p>gacgtggtgatgacccaatcgccagattccctggcagtgccctgggcgaacgcgccactattaactgca aatcgtcacagtcttgcctgattccgacggaaagacctacctaattggctccagcagaagccaggaca accgccaaagagactgatctccctgggtgcaaaagctggactcgggagtgccctgatcgggttcctcgggtag cgggagcggcaccgacttcactctgaccatctcgtcactccaggctgaggacgtggccgtgtattactgt tggcaggggtactcactttccgggcactttcggaggcggcaccaaggtggagattaaaggaggaggcgg aagcggagggtggaggatcgggaggtggtgggagcggcggaggaggaggagcgagatccagctcgtcc aatcgggagcgggaagtgaagaagcccggagagtcacttagaatctcatgcaaggggtcgggcttcaac atcgaggattactacatccattgggtccgccagatgcctggtaaaggactggaatggatggggaggattg accgggaaaacgacgaaactaagtacggaccgatctttcaagggcacgtgactatctccgtgatacctc aatcaatactgtctacctccagtggctcctcgtgaaagcaagcgacaccgcgatgtactactgcgccttcc ggggaggagtgtagtggggccaaggcaccacgggtcacggtcagctcc</p>	<p>10</p> <p>20</p>
<p>CAR7- 可溶性 scFv - nt</p>	<p>76</p>	<p>atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgtccacgcgcctcggcccgacgtggt gatgaccaatcgccagattccctggcagtgccctgggcgaacgcgccactattaactgcaaatcgtca cagtcttgcctgattccgacggaaagacctacctaattggctccagcagaagccaggacaaccgcc aagagactgatctccctgggtgcaaaagctggactcgggagtgccctgatcgggttcctcgggtagcgggagc ggcaccgacttcactctgaccatctcgtcactccaggctgaggacgtggccgtgtattactgttggcagg gtactcactttccgggcactttcggaggcggcaccaaggtggagattaaaggaggaggcgggaagcgg agggtggaggatcgggagggtggtgggagcggcggaggaggaggagcgagatccagctcgtccaatcgg gagcgggaagtgaagaagcccggagagtcacttagaatctcatgcaaggggtcgggcttcaacatcgag gattactacatccattgggtccgccagatgcctggtaaaggactggaatggatggggaggattgacccg gaaaacgacgaaactaagtacggaccgatctttcaagggcacgtgactatctccgtgatacctcaatca atactgtctacctccagtggctcctcgtgaaagcaagcgacaccgcgatgtactactgcgccttccgggg aggagtgtagtggggccaaggcaccacgggtcacggtcagctccgggtcccatcaccaccaccatcacc atcatcac</p>	<p>30</p> <p>40</p>

【表 2 - 2 6】

CAR7- 可溶性 scFv - aa	77	<u>malpvtalllplalllhaar</u> pdvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqqkpgqp pkrlislvs kldsgvpdrfsgsgsgtdftltisslqaedvavyycwqgthfpgtfgggkvcikggggs ggggsgggsggggsciqlvsgaevkkpgeslrisckgsgfniedyyihwvrqmpgkglewmg ridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycfrggvywgqgttvvssgsh <u>hhhhhhhh</u>
---------------------------	----	--

【表 2 - 2 7】

<p>CAR 7</p> <p>全長- nt</p>	<p>78</p>	<p>atggccctccctgtcaccgccctgtcttccgctggctcttctgtctccacgccctcggcccgacgtggt</p> <p>gatgactcagtcgcctgactcgtggctgttcccttggagagcgggccactatcaattgcaagtcatccc</p> <p>agtcgctgttgattccgacgggaaaacctacctaattggctgcagcaaaaaccgggacagcctcaa</p> <p>agcggctcatcagcctgggtgtccaagtggacagcggcggtgccagaccgttctcgggtcgggaagc</p> <p>ggtactgattcacgctgaccatctcatccctccaagcggaggatgtggcagctactactgttggcaggg</p> <p>cacgcatttccgggcacttttggaggaggggaccaaggtcgaaatcaaggaggagggtggctcgggcg</p> <p>gaggaggctcgggaggaggaggatcaggaggcgggtggaagcgagattcaactggtcagagcggc</p> <p>gcagaagtcaagaagccgggtgaatcgctcagaatctcgtgcaaaggatcgggattcaacatcgagga</p> <p>ctactacattcactgggtcagacaaatgccgggcaaagggtggaatggatggggaggatcgaccccg</p> <p>aaaacgatgaaaccaagtacggaccaatctccaagggcacgtgaccatttcggcggacacctcaatca</p> <p>acactgtgtacctccagtggagctcacttaaggccagcgataccgccatgtactattgcgtttccggga</p> <p>gggggtgtactggggacagggcactactgtgaccgtgtcatccaccactaccaccagcaccgaggccacc</p> <p>caccccggtcctaccatcgccctccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctgg</p> <p>tggggccgtgcataccgggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttggggccctctggctggtacttg</p> <p>cggggctcctgtctgttactcgtgatcacctttactgtaagcgggtcggagaagctgtgtacatcttt</p> <p>aagcaaccttcagaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcattgcgggttcccagag</p> <p>gaggagggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgtccagcctacaagc</p> <p>aggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgtctggacaag</p> <p>cgggaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaagagggcctgta</p> <p>caacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaagggggaacgcaga</p> <p>agaggcaaaaggccacgacggactgtaccagggaactcagcacccaccaaggacacctatgacgctc</p> <p>ttcacatgcaggccctgccgcctcgg</p>
----------------------------	-----------	---

10

20

30

40

【表 2 - 2 8】

CAR 7 全長-aa	79	malpvtalllplalllhaarpdvmtqspds lavslgeratinc <u>kssqslldsdgktylnwl</u> qqkpgq ppkrlis <u>lvsklds</u> gvpdfrfsgsgsgtdflitisslqaedvavyycw <u>qgthfpgtfgggtkveikggg</u> gsgggsgsgggsgsggseiqlvqsgaevkkgpge slrisksgsfni <u>edyih</u> wvrqmpgkglew m <u>gridpendetkygpifqgh</u> vtisadtsintvylqwsslkasdtamyycfr <u>ggvyw</u> gqgttv ssttpaprpptpaptiasqpls lrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckr grkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcs crfpeceeggeclrvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgr reeydvldkrrrdpemggkprkrnpqeglynclqdkmacayseigmkgerrrgkghdglyqg lstatkdydalhmqalppr
CAR 8		
CAR8 scFv ドメ イン	80	dvmtqspslspvtlgqpasiscssqslldsdgktylnwlqqrpgqsprrlislvskldsgvpdrfsgs sgtdflkisirveadvgyyycwqgthfpgtfgggtkveikgggsgsgggsgsgggsgsgggseiql vqsgaevkkgpatvkisksgsfni <u>edyih</u> wvqqapgkglewmgridpendetkygpifqgrvt itadtstntvymelsslrsedtavyycfrggvywgqgtvtvss
CAR8 scFv ドメ イン nt	81	gatgtggcatgacgcagtcaccactgtccctccccgtgaccttgacagccagcgtcgattagctgca agtcatcccaatccctgctcgattcgatggaaagacctatctcaactggctgcagcaaagacccggta gagccctaggagactcatctcggttggtgtcaaagctggacagcggagtgccggaccggtttccgggtcg ggatcggggacggacttcactctgaagattcacgggtggaagctgaggatgtgggagtgtactactgct ggcaggggaacccatttccctggcacttttggcggagggaactaaggtcgaaatcaaggaggagggtggc tcgggaggaggcggatcgggcggaggcggggagcggcggaggagggtccgaaatccaactgtcca gtcaggagccgaagtgaagaacccgggagccaccgtcaaaatcagctgtaagggatcgggattcaata tcgaggactactacatccactgggtgcagcaagctccgggcaaaggactggagtggatggggcgcatc gaccagagaacgacgaaacaaatacggcccgatcttccaagggcgggtgaccatcacgcggaca cctcaactaacactgtgtacatggagctgagctccctgcgcgccgaagatactgcagtctactactgcgcc ttccgcggtggtgtgtactggggacagggcaccactgtgactgtcagctcg

20

30

40

【表 2 - 2 9】

CAR8- 可溶性 scFv - nt	82	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgatgtggt catgacgcagtcaccactgtccctccccgtgaccttggacagccagcgtcgattagctgcaagtcaccc caatccctgctcgaattcggatggaaagacctatctcaactggctgcagcaaagacccggtcagagcccta ggagactcatctcgttgggtgtaaagctggacagcggagtgccggaccgggtttccgggtcgggatcgg ggacggacttcactctgaagatttcacgggtggaaagctgaggatgtgggagtgtactactgctggcagg gaacccatttccctggcacttttggcggagggaactaaggtcgaaatcaaggaggagggtggctcggga ggaggcggatcgggcggaggcgggagcggcggaggagggtccgaaatccaactgtccagtcagg agccgaagtgaagaaaccgggagccaccgtcaaaatcagctgtaagggatcgggattcaatatcagg actactacatccactgggtgcagcaagctccgggcaaaggactggagtggatggggcgcatcgacca gagaacgacgaaacaaatacggcccgatctccaaggcggggtgaccatcacgcggacacctcaa ctaactgtgtacatggagctgagctccctgcgctcgaagatactgcagtctactactgcgccttccgc ggtggtgtgtactggggacagggcaccactgtgactgtcagctcgggggtccaccatcatcaccaccac catcac
CAR8- 可溶性 scFv - aa	83	<u>malpvtalllplalllhaar</u> pdvmtqsplslpvtlgqpasisckssqslldsdgktylnwlqqrpgqsp rrlislvsklsgvpdrfsgsgsgtdflkisirveacdvgvyycwqgthfpgtfgggtkveikgggsg ggsgggsgggsgseiqlvqsgaevkkpgatvkiscksgfniedyyihwvqqapgkglewmgr idpendetkygpifqgrvtitadtsntvymelssrsedtavyycfrggvywgqgtvtvssgshhh <u>hhhhh</u>

10

20

30

【表 2 - 3 0】

CAR 8-全 長- nt	84	<p>atggccctccctgtcaccgccctgtcttccgctggctcttctgtccacgccgctcggcccgatgtggt catgacgcagtcaccactgtccctccccgtgaccttggacagccagcgtcgattagctgaagtcaccc caatccctgtctcgattcggatggaaagacctatctcaactggctgcagcaaagaccgggtcagagcccta ggagactcatctcgttgggtgtcaagctggacagcggagtgccggaccgggttttccgggtcgggatcgg ggacggacttcactctgaagatttcacgggtggaaagctgaggatgtgggagtgtactactgtggcagg gaacccatttccctggcacttttggcggagggaactaaggctgaaatcaaggaggagggtggctcggga ggaggcggatcggcggaggcggaggcggaggagggtccgaaatccaactgtccagtcagg agccgaagtgaagaaaccgggagccaccgtcaaaatcagctgtaaggatcgggattcaatatcagg actactacatccactgggtgcagcaagctccgggcaaaggactggagtggatggggcgcatcgacca gagaacgacgaaacaaataccgcccgatcttccaaggcggggtgaccatcacgcggacacctcaa ctaactgtgtacatggagctgagctccctgcgtccgaagatactgcagtctactactgcgccttccgc gggtgggtgtactggggacagggcaccacigtgactgtcagctcgaccactacccagcacggaggcc accacccccggctcctaccatcgctccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagc tgggtggggccgtgcatacccggggtcttgaacttcgcctgcgatatctacattggggccctctggctggt cttgcggggtcctgtctgttctactcgtgatcactcttactgttaagcgcggctcggagaagctgtgtaca tctttaagcaaccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttccca gaggaggagggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgtccagcctaca agcaggggcagaaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgtggac aagcggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaagagggcct gtacaacgagctcaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattgggtatgaaaggggaacgca gaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggaactcagaccgccaccaaggacacctatgacg ctcttcatgcaggccctgcgcctcgg</p>
------------------	----	---

10

20

30

40

CAR 8-全
長- aa

40

【表 2 - 3 2】

CAR9- 可溶性 scFv - nt	87	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccagatcca gctccaacagagcggagccgaactgggtcaaaccgggagcgtcgggaagtgtcatgactggatcgg gcttcaacatcgaggattactacatccactgggtcaagcaacgcaccgagcaggggctggaatggatcg gacggatcgaccccgaaaacgatgaaaccaagtacgggcctatcttccaaggacgggccaccattacg gctgacacgtcaagcaataccgtctacctccagctttccagcctgacctccgaggacactgccgtgtacta ctgcgccttcagaggaggcgtgtactggggaccagggaaccactttgaccgtgtccagcggaggcgggtg gatcaggaggaggaggctcaggcgggtggcggctcgcacatggacgtggatcatgactcagtcctccgct gacctgtcgggtggcaattggacagagcgcatccatctcgtgcaagagctcacagtcgctgctggattcc gacggaaagacttatctgaactggctgctcaaagaccagggaatcaccgaaacgccttatctccctgg tgtcgaaactcgactcgggtgtgcccggatcgggttaccggtagcgggtccggcacggacttcactctccg catttcgagggtggaagcggaggatctcgggatctactactgttggcagggaaccacttcctgggact tttgaggcggaactaagctggaaatcaagggtagccatcacatcaccaccacatcat
CAR9- 可溶性 scFv - aa	88	<u>malpvtalllplalllhaar</u> pciqqlqsgaelvkpgasvklscetgsgfniedyyihwvkqrteqglewi gridpendetkygpifqgratitadtssntvylqlssltsedtavyycafrggvywpgtltlvssggggs ggggsggggshmdvmtqspltlsvaigqsasisckssqslldsdgktylnwllqrpqspkrlislv skldsgvpdrftgsgsgtdflrisrveacdligiycwqgthfpgtfgggtkleikgshhhhhhhh

10

20

30

【表 2 - 3 3】

CAR 9-全 長 - nt	89	<p>atggccctccctgtcaccgccctgtctgttccgtggctcttctgtctccacgccgtcggcccagatcca gctccaacagagcggagccgaactgggtcaaacggggagcgtcgggaagtgtcatgactggatcgg gcttcaacatcgaggattactacatccactgggtcaagcaacgcaccgagcaggggctggaatggatcg gacggatcgaccccgaaaacgatgaaaccaagtacgggcctatcttccaaggacgggcccaccattacg gctgacacgtcaagcaataccgtctacctccagctttccagcctgacctccgaggacactgccgtgtacta ctgcgccttcagaggaggcgtgtactggggaccagggaaccactttgaccgtgtccagcggaggcgggtg gatcaggaggaggaggctcaggcgggtggcggctcgacatggacgtggatcatgactcagtcctccgct gacctgtcgggtggcaattggacagagcgcacatccatctcgtgcaagagctcacagtgcgtgctggattcc gacggaaagacttactgaactggctgtctccaaagaccagggaatcacgaaacgccttactcctctgg tgtcgaaactcgactcgggtgtgcccgatcgggttacgggtagcgggtccggcacggacttcactctccg catttcgagggtggaagcggaggatctcgggatctactactgttggcagggaacccacttcctgggact tttggaggcggaaactaagctggaaatcaagaccactacccagcaccgaggccaccaccccggtcc taccatcgccctccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctgggtggggccgtgca taccgggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttggggccctctggctgggtacttgcggggctcgtct gctttcactcgtgatcactcttactgttaagcgcgggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaacccttc atgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttccagaggaggagggaag gcccgtgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgtccagcctacaagcaggggcagaa ccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggac gggaccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaagagggcctgtacaacgagctcc aaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaagg ccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgtcttcacatgcagg ccctgccgcctcgg</p>
-------------------	----	---

10

20

30

40

【表 2 - 3 4】

CAR 9- 全長 - aa	90	malpvtalllplalllhaarpeiqllqsgaelvkpgasvklstcgsgfniedyyihwvkqrteqglewi gridpendetkygpifqgratitadtssntvylqlssltsedtavyycafrggvywpggtltlvssggg gsgggsggggshmdvmtqspiltlsvaigqsasisc <u>kssqslldsdgktyln</u> willqrpqspkrli s <u>lvskldsg</u> vprdfitgsgsgtdflirsrveacdligiyycw <u>qgthfpgt</u> fgggtkleiktttpprptpa ptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkkllyifkqpf mrpvqttqeedgcscrfeceeggcclrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreedyvldkrgr dpemggkprknpqeglynelqkdkmacayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalh mqalppr
CAR10		抗 EGFRvIII クローン 139
CAR10 scFv ドメ イン	91	diqmtqspsslsasvgdrvtiterasqgirnlnlawyqqkpgkapkriyaasnlsqsgvpsrftgsgsgt eftlivsslqpedfatyyclqhhsypltsgggtkveikrtgstsgskpgsggegsevqvlesggglvqp ggslrlscaasgftfssyamswwrqpqkglewvsaisgsggstnyadsvkgrftisrdnsntlylq mnsbraedtavyyacgssgwseywgqgtltvtss
CAR9 scFv ドメ イン nt	92	gatatccaatgactcagagcccttcatccctgagcgccagcgctggagacagggtagcatcacgtgc cgggcatccaaggcattagaaataacttggcgtgggtatcagcaaaaaccaggaaagggcccggaagcg cctgatctacgcggcctccaaccttcagtcaggagtgccctcgcgcttcaccgggagcggtagcgggaac tgagtttacccttatcgtgtcgtccctgcagccagaggacttcgcgacctactactgcctccagcatcactc gtaccggttgacttcgggaggcggaaccaaggctcgaaatcaaacgcactggctcgacgtcagggtccg gtaaaccgggatcgggagaaggatcggaagtccaagtgtggagagcgaggcggaactcgtgcaac ctggcgggctcgtcgggtcagctgtgccgcgtcgggttttacttccagctcgtacgctatgtcatgggtg cggcagggtccgggaaaggggctggaatgggtgtccgctatttccggctcgggtggaagcaccaatta cgccgactccgtgaagggacgcttcaccatctcacgggataactccaagaatactctgtacctccagatg aactcgtgagagccgaggacaccgcagtgactactgcgcagggtcaagcggtcgggtccgaatactg gggacagggcaccctcgtcactgtcagctcc

【表 2 - 3 5】

CAR10- 可溶性 scFv - nt	93	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgatatcca aatgactcagagcccttcatccctgagcgcagcgtcggagacaggggtaccatcacgtgccgggcat cccaaggcattagaaataacttggcgtggatcagcaaaaaccaggaaaggccccgaagcgcctgatct acggggcctccaaccttcagtcaggagtgccctcgcgcttcaccgggagcggtagcgggaactgagtta cccttatcgtgtcgtccctgcagccagaggacttcgcgacctactactgacctccagcatcactcgtacccg ttgacttcgggaggcgggaaccaaggctcgaatcaaacgcactggctcgacgtcaggggtccggtaaacc gggatcgggagaaggatcgggaagtcgaagtgcggagagcggaggcggactcgtgcaacctggcgg gtcgtcgcggctcagctgtgccgcgtcgggttttactttcagctcgtacgctatgcatgggtgcggcagg ctccgggaaaggggtggaatgggtgtccgctatttccggctcgggtggaagcaccattacgccgact ccgtgaagggacgcttcacatctcacgggataactccaagaatactctgtacctccagatgaactcgt gagagccgaggacaccgagtgactactgcgcagggtcaagcggctggccgaatactggggacag ggcaccctcgtcactgtcagctcccatcaccatcaccaccacatcac
CAR10- 可溶性 scFv - aa	94	<u>malpvtalllplalllhaar</u> pdiqmtqspsslsasvgdrvtitcrasqgirnnlawyqqkpgkapkrlly aasnlqsgvpsrftgsgsgteflivsslqpedfatyyclqhhsypltsgggtkveikrtgstsgskpgs gegsevqvlesggglvqppgslrlscaasgftssyamswvrqapgkglewvsaisgsggstnyads vkgrftisrdnskntlylqmnsiraedtavyycagssgwscywgqgtlvtvss <u>hhhhhhhh</u>

10

20

30

【表 2 - 3 6】

<p>CAR 10</p> <p>全長 - nt</p>	<p>95</p>	<p>atggccctccctgtcaccgccctgtcttccgctggctcttctgtccacgccgctcggcccgatatcca</p> <p>aatgactcagagcccttcatccctgagcgccagcgctcggagacaggggtgaccatcacgtgccgggcat</p> <p>cccaaggcattagaaataacttggcgtggatcagcaaaaaccaggaaaggccccgaagcgctgatct</p> <p>acggggcctccaaccttcagtcaggagtgccctcgcgcttcaccgggagcggtagcggaaactgagtta</p> <p>cccttatcgtgtcgtccctgcagccagaggacttcgcgacctactactgacctccagcatcactcgtaccgg</p> <p>ttgacttcgggaggcggaaaccaaggctcgaatcaaacgcactggctcgacgtcagggctcggtaaacc</p> <p>gggatcgggagaaggatcggaaagtcgaagtgtggagagcggaggcggactcgtcaacctggcgg</p> <p>gtcgtcgggtcagctgtccgcgtcgggttttactttcagctcgtacgtatgcatgggtgcggcagg</p> <p>ctcggggaaggggctggaatgggtgtccgtatttccggctcgggtggaagcaccaattacgcgcgact</p> <p>ccgtgaagggacgcttcacatctcacgggataactccaagaatactctgtacctccagatgaactcgt</p> <p>gagagccgaggacaccgagtgactactgcgcagggtcaagcggctggctcgaatactggggacag</p> <p>ggcaccctcgtcactgtcagctccaccactacccagcaccgaggccaccaccccggtcctaccatc</p> <p>gcctccagcctctgtccctgcgtcggaggcatgtagaccgcagctgggtggggcgtgcatacccg</p> <p>gggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttggggccctctggctgggtacttgcggggctcgtgctttca</p> <p>ctcgtgatcactcttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccttcatgagg</p> <p>cctgtgcagactactcaagaggaggacggctgtcatgccggtcccagaggaggaggaaggcggct</p> <p>gcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagct</p> <p>ctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcggagaggacgggac</p> <p>ccagaaatgggcgggaagccgcgagaagaatccccaagagggcctgtacaacgagctccaaaag</p> <p>gataagatggcagaagcctatagcgagattggatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaaggccacg</p> <p>acggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctg</p> <p>ccgcctcgg</p>
------------------------------	-----------	---

10

20

30

40

【表 2 - 3 7】

CAR 10 全長 - aa	96	malpvtalllplalllhaarpdiaqmtqspsslsasvdrvttitcrasqgirnlnlawyqqkpgkapkrlly aasnlqsgvpsrftgsgsgteflivsslqpedfatyyclqhhsypltsgggtkveikrtgstsgsgkpgs gegsevvqlsgggglvqpggsrlscaasgftssyamswwrqapgkglewvsaisgsggstnyads vkgrftisrdnsntlylqmnsiraedtavyycagssgwseywgqglvtvsslttpprppptpaptia sqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrp vqttqeedgcscrfececeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlyneclnlgrrceydvldkrrgrdpe mggkprknppqeglynelqkdmacayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqal ppr
-------------------	----	---

10

【 0 4 0 5】

次いで、CAR scFv断片をレンチウイルスベクター中にクローニングし、単一のコーディングフレーム中に全長のCARコンストラクトを作製し、発現用にEF1 プロモーターを用いた(配列番号97)：

20

EF1 プロモーター

GTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCGGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATT
GAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCTTTTTCCCGAGGGT
GGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAG
TGCCGTGTGTGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCCTGACCTGAATTACTTCCACCTGGCTGC
AGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTTCGAGGCCTTGCCTTAAGGAGCCCTTCG
CCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGC
TGCTTTGATAAGTCTCTAGCCATTTAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTA
ATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACA
TGTTCCGGCAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGT
GCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGCAAGGCTGGCCCGGTGCGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAA
GATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTACCC
ACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCT
CGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTGCTCTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGAGTTTCCCCACACTG
AGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCT
TGGTTCACTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGA (配列番号97)。

30

【 0 4 0 6】

CAR9、CAR10の表面発現およびヒト化EGFRvIII CARコンストラクトの選択ならびにFACSによる染色

40

以下の実験は、Jurkat細胞と初代T細胞の両方において試験管内の結合についての試験に基づいて、EGFRvIIIに対する親和性に違いがあると考えられることを示したものである。

【 0 4 0 7】

Jurkat E6細胞に、Amara Cell Line Nucleofector Kit V (Lonza, Cologne AG, Germany) およびprogram X-001を用いて、CAR9ベクターまたはCAR10ベクターのいずれかを用いてエレクトロポレーションにより遺伝子導入した。遺伝子導入の1日後、 0.5×10^6 個の細胞をV-shape 96 well plate (Greiner Bio-One, Germany)の各ウェルに、0.2 ml FACSバッファ(5% FBS含有DPBSバッファ)中で加え、10分間室温でインキュベーションした。次いで、細胞をスピンドウンし、種々の濃度のEGFRvIII-Fcまたは野生型EGFR-Fcを含むFACSバッファ0.2 mlに再懸濁し、4℃で30分間インキュベーションした。その後、細胞をFACS

50

バッファで3回洗浄し、PE抗ヒトIgG Fc (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) 2 μ lを含むFACSバッファ0.2mlを加えて30分間、4℃、暗所でインキュベーションした。FACSバッファ0.2mlで3回洗浄した後、細胞をFACSDiva software (BD Biosciences, San Jose, CA)を用いて、LSRII (BD Biosciences, San Jose, CA) 機器で解析した。免疫蛍光を、生細胞の相対対数蛍光として解析し、PE陽性細胞のパーセンテージを計測した。

【0408】

図12に示すように、Jurkat細胞に発現するCAR9のEGFRvIII-Fc融合タンパク質への結合は、野生型のEGFR-Fcの約1000倍強力である。さらに、CAR10を発現するCARTコンストラクトは、CAR9と比較して、EGFRvIIIに対する結合が有意に低い(約40分の1)。このことは、マウスCAR9はEGFRvIIIに結合するものの、野生型EGFRに対する結合がいづらか維持されたままであることを示唆するものである。さらに、このことは、CAR9がCAR10コンストラクトよりもEGFRvIIIに対して高い親和性を示すことを強く示すものである。

【0409】

初代T細胞におけるさらなる実験から同様の結果が得られた。端的に言えば、初代ヒトCD3+ T細胞を抗CD3/CD28ビーズを用いて24時間刺激し、次いで、CAR9、CAR10、CAR6または対照CARをコードするレンチウイルスベクターを、MOI 3:1で用いて形質導入を行った。該実験はまた、モック導入T細胞集団を含んでいた。これらの細胞は、細胞増殖が静止するようになるまで約8~9日間増殖させた。この時点で、 0.5×10^6 個の細胞を、V字型96ウェルプレートの各ウェルに加えた。細胞をPBSで1回洗浄し、生/死試薬(PBS中、1:1000)で30分間、氷上で染色した。次いで、細胞をFACSバッファで2回洗浄し、ビオチン化したEGFRvIIIもしくは野生型EGFRのタンパク質(1 μ g/ml)を添加して、30分間氷上でインキュベーションした。次いで細胞を2回洗浄し、ストレプトアビジン-PEを1:1000の希釈率で含むFACSバッファ0.2mlを加えて、15分間、氷上でインキュベーションした。FACSバッファで2回洗浄した後、細胞をLSRIIで解析した。免疫蛍光染色を、生細胞の相対対数蛍光として解析し、PE陽性細胞のパーセンテージを、陽性細胞の幾何平均と合わせて測定した。

【0410】

図13に示すように、全てのコンストラクトにおいて形質導入が同程度で起こっていても(全てについて形質導入効率は約50%)、CAR9およびCAR6のCARは、飽和量のEGFRvIIIタンパク質を検出に用いた場合、EGFRvIII結合について、CAR10 (2Kのみ)と比較して、10倍高い幾何平均を示す(CAR9については21K、CAR6については27K)。同様に、EGFR野生型タンパク質に対する特異性は、野生型EGFRタンパク質についての染色について下向きのログシフトに示すように、約10/1の低さである。このことは、CAR9およびCAR6が、初代T細胞に発現させたときに、CAR10と比較してEGFRvIIIタンパク質に対して強い親和性を持つことを示唆し、臨床においてさらに有効であることを示唆する、Jurkat細胞における上述の知見をさらに支持するものである。

【0411】

ヒト化CARコンストラクトのパネルの機能解析を実施例8に記載するように行った。

【0412】

実施例8: T細胞中のヒト化EGFRvIII-特異的CARコンストラクトの解析

CAR技術によってEGFRvIIIを標的化することの可能性を評価するために、ヒト化EGFRvIII scFv断片を、2つの異なる立体配置でCD3 鎖および4-1BB同時刺激分子を有するレンチウイルスCAR発現ベクター中にクローニングした。最適なコンストラクトをEGFRvIII+および野生型EGFR標的に対するEGFRvIII CAR導入T細胞のエフェクターT細胞応答の量および質に基づいて選択する。エフェクターT細胞応答としては、細胞増殖、増殖、倍加、サイトカイン産生および標的細胞死滅および細胞溶解活性(脱顆粒)が挙げられるがこれらに限定されるものではない。

【0413】

材料および方法

CAR機能の初期特性化用のJurkatレポーター細胞株の作製

初代T細胞形質導入および活性化の代替として、Jurkat-NFAT レポーター細胞株をCARコンストラクトの機能活性の評価に用いてよい。Jurkat細胞株 (E6-1)に、NFAT-ルシフェラーゼレポーターコンストラクトを用いて遺伝子導入し、安定クローン細胞株 (JNL) をPMAおよびイオノマイシン刺激後のNFATの強力な誘導に基づくさらなる特性化のために選択した。該JNL細胞に、レンチウイルスベクターをMOI 5:1で用いて形質導入し、5~7日間増殖させた。アッセイで用いる前に、形質導入細胞 (EGFRvIII CARを細胞表面に発現する細胞) のパーセンテージおよび該発現の相対蛍光強度を、LSRIIを用いたフローサイトメトリー解析により決定する。ヒストグラムプロットから、CARの相対発現レベルを、その相対蛍光強度を用いて、形質導入されたパーセンテージを比較することにより検討し得る。

【0414】

10

EGFRvIII-特異的CAR JNL細胞のT細胞活性化の評価

JNLレポーター細胞株においてT細胞活性化を評価するために、JNLまたはCAR形質導入JNL細胞を、底部が透明の96ウェル黒色プレートに、1ウェルあたり50,000個加えた。標的細胞(BHK親細胞またはEGFRvIIIまたは野生型EGFRのいずれかを発現するように操作されたBHK細胞)を該ウェルに添加してエフェクター細胞：標的細胞(E:T)の比率を1:2、1:1、1:0.3、1:0.1、1:0.03、1:0.01および1:0.003とした。PMAおよびイオノマイシンを活性化の陽性対照として用いる。細胞を37℃で16~24時間インキュベーションする。インキュベーションの終了時に、等しい体積のBright-Glo Luciferase assay reagentを各ウェルに添加する。該プレートを室温で10分間インキュベーションした後、ルミノメーターを用いて測定する。

20

【0415】

ヒト化EGFRvIII-特異的になるように改変したCAR T細胞の作製

ヒト化EGFRvIII-特異的CARレンチウイルス導入ベクターは、VSVg偽型レンチウイルス粒子にパッケージされるゲノム物質の作製に用いられる。レンチウイルス導入ベクターDNAは、VSVg、gag/polおよびrevの3つのパッケージング成分と混合され、それらを293T細胞とともに遺伝子導入するためのリポフェクタミン試薬と組み合わせられる。24時間および48時間後に、培地を回収し、濾過して超遠心分離またはクロマトグラフィーにより濃縮する。得られたウイルス調製液を-80℃で保存する。形質導入ユニット数を、SupT1細胞における滴定により決定する。

【0416】

30

EGFRvIII-特異的になるように改変したCAR T細胞を、新鮮なT細胞をCD3x28ビーズに24時間結合させることにより活性化させた後、適当な数の形質導入ユニットを添加して所望のパーセンテージの形質導入T細胞を得ることにより作製する。これらの改変T細胞を、休止しサイズが小さくなるまで増殖させ(薬300 fl)、そのポイントで後の解析のために凍結保存する。細胞数およびサイズをCoulter multisizer IIIを用いて測定する。凍結保存前に、形質導入した細胞 (EGFRvIII-特異的CARを細胞表面に発現する細胞)の%および該発現の相対蛍光強度をLSRIIを用いたフローサイトメトリー解析により決定する。ヒストグラムプロットから、CARの相対発現レベルを、形質導入%と相対蛍光強度を比較することにより検討し得る。

【0417】

40

ヒト化EGFRvIII改変CAR T細胞の細胞溶解活性、増殖能およびサイトカイン分泌の評価

ヒト化EGFRvIII-特異的CAR T細胞の機能的な死滅能、増殖能およびサイトカイン分泌能を評価するために、細胞を融解して一晚回復させる。ヒト化コンストラクトに加えて、マウスCAR9を比較目的で用いた。一方で、SS1-BBzはバックグラウンドCAR/T細胞効果のための、非標的化発現CARとして用いた。このフローベースの細胞毒性アッセイのために、標的細胞をCSFEで染色し、その存在を定量した。また、標的抗原レベルが同程度であることを確かめるために、標的細胞をEGFRvIII発現について染色した。EGFRvIII CAR T細胞の細胞溶解活性を、エフェクター細胞：標的細胞の比率を10:1、3:1、1:1、0.3:1および0:1のタイトレーションで測定し、ここでエフェクター細胞は、抗EGFRvIII CARを発現しているT細胞とする。適当な数のT細胞を、一定数の標的細胞と混合することによりアッセイを開

50

始した。4または16時間後に、各混合物の全体積をとり、各ウェルを洗浄した。T細胞をCD3について染色し、全ての細胞を生/死マーカーである7AADで染色した。最後の洗浄の後、沈殿している細胞を、予め決定した数のカウントビーズとともに、特定の体積で懸濁した。細胞染色データをLSRIIフローサイトメトリーにより得、ビーズを用いてFlowJo softwareを用いて解析し、結果を定量化した。

【0418】

ヒトCAR-EGFRvIII T細胞の細胞増殖およびサイトカイン産生を測定するために、細胞を融解し、一晚回復させた。ヒト化CAR-EGFRvIIIに加えて、マウスCAR9を比較目的のために用い、CAR/T細胞のバックグラウンド効果のために、SS1-BBzを非標的化発現CARとして用いた。該T細胞はEGFRvIIIを発現しているか、または発現していない星細胞腫由来の神経膠芽腫細胞株であるU87を標的としている。さらに、CD3x28 ビーズを用いて、2回目の内在性の免疫シグナルへの応答能を評価した。増殖を解析するために、T細胞をCFSEで染色した。増殖は、親細胞の標識が2つの娘細胞に分離したことを反映する、CFSE染色の希釈に表された。該アッセイは、1:1および1:0のエフェクター：標的比率のみを試験し、ここで、エフェクターは、抗EGFRvIIIキメラ受容体を共通のパーセンテージで発現するように標準化したT細胞(CD4および8)全体とした。該アッセイは、2つ組みで、細胞の混合から24時間後に行った。サイトカイン産生のために上清を除いた。5日後、T細胞をLive/Dead Violet (Invitrogen)で生/死判定のために染色した後、CAR発現を調べるために染色を行い、表現型がCD4またはCD8細胞であるかを決定した。最後の洗浄の後、沈殿細胞を予め決定した数のBDカウントビーズとともに、特定の体積に再懸濁した。細胞染色データをLSRIIフローサイトメトリーにより得、FlowJoソフトウェアで解析し、ビーズを用いて結果を定量化した。全細胞数を、特定の数のビーズに対する細胞数を、未だカウントされていないビーズのフラクションを掛けることによって決定した。

【0419】

結果

ヒト化CART-EGFRvIII細胞のEGFRvIII標的細胞に対する認識能を試験するためのJurkatレポーターアッセイ

CARTコンストラクトの、標的結合後の活性化誘発能を、JNLレポーター細胞株を用いて測定した。JNL細胞株は、CARへの標的結合後に誘導されるNFAT-ルシフェラーゼレポーターコンストラクトを導入されている。JNL細胞を種々のCAR-EGFRvIIIコンストラクト(CAR9、CAR3、CAR6、CAR8およびCAR10)を用いて形質導入した。形質導入効率は、フローサイトメトリーにより評価し、全てのコンストラクトについて、約45~52%であることが示された。その後、JNL-CAR-EGFRvIII細胞を7つの異なるE:T比率で、3つの異なる標的細胞(親BHK、BHK-EGFRvIIIまたはBHK-野生型EGFR)を用いて刺激した。JNL親細胞および対照CARを発現するJNL細胞を、さらなる対照として用いた。図14の結果は、試験した全てのコンストラクトについて、有意な標的化誘発性の活性化が1:0.01という低い比率で起こり得ること、ならびに、E:T比率が高い場合に、CAR6およびCAR10が最も強く活性化を誘発することを示すものである。野生型EGFR発現細胞または対照CAR発現JNL細胞では、有意な活性化は観察されなかった。これらのデータは、該CARコンストラクトが、EGFRvIII標的に対して特異性を示し、野生型EGFR標的に対する交差反応を示さないことを示すものである。

【0420】

初代ヒトT細胞のヒト化EGFRvIII CARコンストラクトを用いた形質導入および増殖

CD3+ T細胞は、健康なドナー由来のアフェレーシス産物または全血より得た。上述するように、T細胞をCD3xCD28ビーズで24時間刺激した後、濃縮レンチウイルス上清を用いて、MOI 3で形質導入を行った。細胞を培養により8~10日間増殖させた。

【0421】

ヒト化EGFRvIII CARの細胞表面発現は、マウスCAR9に匹敵しその発現レベルも非常に近い。各ヒト化EGFRvIII-特異的CAR形質導入T細胞の細胞表面発現染色パターンのヒストグラムプロットの重ね合わせおよびこれらのプロファイルから算出された平均蛍光強度(MFI)は、形質導入細胞の%によく相関する。

【0422】

EGFRvIII標的細胞の、ヒト化EGFRvIIICART細胞に対する刺激能を試験するための増殖アッセイ

EGFRvIII特異的CAR T細胞の、標的結合への応答時の増殖能を増殖アッセイで評価した。分集団の細胞数をフローサイトメトリーにより計測した。ドナーT細胞を、ヒト化CAR、マウスCAR9またはSS1 (メソテリン標的化)のいずれかをを用いて形質導入した。CARを標的細胞とともに、1:1または1:0で混合し、5日間共培養した。図15は、ND407 EGFRvIII CAR T細胞の抗原特異的な増殖能を示す。破線は播種したT細胞の数を示し、比較の結果、U87-EGFRvIIIとの結合は、増殖を誘発するが、これはEGFRvIII CAR T細胞集団に特異的であったのに対し、U87を標的とした場合、T細胞数の増殖は全く検出されなかった。ND407に対する相対的な応答は、CAR6およびCAR8が、CAR9またはCAR3よりも強いことを示す。CD3x28ビーズを用いた結果は、それらの刺激が2回目の活性化では増殖を誘導するのに十分ではなく、全く刺激を与えていない場合に近いことを示している。

10

【0423】

そのCAR+ T細胞を好ましく増殖させる性質について、ND407 T細胞を、異なるhuEGFRvIII CARをスクリーニングするのに用いた。図16は、CAR5およびCAR6が、一貫して各ドナーにおいて最も強いCAR+増殖を示すことを示す。CAR+増殖は、標的との結合、増殖および抗原認識によるAICD(活性化誘導細胞死)を生き延びたことによる結果である。

【0424】

ヒト化EGFRvIII CART細胞のEGFRvIII標的細胞死滅能を試験するための死滅アッセイ(Killing Assay)

20

EGFRvIII特異的CAR T細胞の標的細胞死滅能をクロム放出アッセイで試験した。ヒト神経膠芽腫細胞株U-87MGを、野生型EGFRまたはEGFRvIII変異体のいずれかを発現するように操作した。これらの操作細胞株を、死滅アッセイ(killing assay)の標的とした。次の3つのエフェクターCAR T細胞を用いて、標的細胞を死滅させる際の特異性を決定した; 1)マウス3C10 (CAR9)を発現するように形質導入したヒトT細胞、2)マウス3C10のヒト化バージョン (CAR6とも称される)を発現するように形質導入したヒトT細胞および、3) メソテリン、SS1に特異的なCARを形質導入したヒトT細胞。エフェクター細胞は全て、30%がCAR+導入形質を発現するように基準化した。標的細胞をクロム-51で標識し、共培養の直前に洗浄した。エフェクターおよび標的を指定の比率(E:T)で混合し、4時間インキュベーションした。

30

【0425】

図17 (A) の結果は、野生型EGFRを発現するU-87細胞と混合したCAR T細胞が、50:1のE:T比率まで、バックグラウンドを超える細胞消滅を示さなかったことを示す。しかし、図17 (B)の結果は、対照的に、EGFRvIII特異的CAR T細胞、CAR9またはCAR6は、EGFRvIIIを発現するU-87細胞と混合されると、6.25:1~50:1のE:T比率で特異的に細胞を死滅させたことを示す。メソテリン特異的なCAR T細胞をエフェクターとして用いた場合、有意な殺傷は全く観察されなかった。これらのデータは、EGFRvIII発現標的細胞が、CAR9およびCAR6 T細胞によって特異的に死滅するが、野生型EGFRを発現する細胞は死滅せず、または、非特異的CAR T細胞、SS1によっては死滅させられないことを示す。

40

【0426】

ヒト化EGFRvIII CART細胞の抗腫瘍応答を促進能および特異性を試験するためのサイトカインアッセイ

EGFRvIII特異的CAR T細胞の標的結合に応答したサイトカイン誘導能を、共培養アッセイで評価した。CAR T細胞を、標的結合細胞と、種々の標的:エフェクター比率 (0.3:1、1:1、3:1および10:1)で、18~24時間共培養した。標的細胞としては、野生型EGFR内在性タンパク質発現U87細胞(U87 wt)、EGFRvIII過剰発現U87細胞(U87-vIII)、BHK (ペビーハムスター腎臓細胞) 親細胞、ヒト野生型EGFRタンパク質過剰発現BHK細胞(BHK wt)またはヒトEGFRvIIIタンパク質過剰発現BHK細胞 (BHK-vIII)が挙げられる。18~24時間後、上清を培養から除き、Cytometric Bead Assay (CBA)を用いてサイトカインを解析した。結果

50

は、1) CAR6およびCAR9 T細胞がEGFRvIII-発現細胞にตอบสนองして同等のレベルのIFN を誘発したことおよび、2)いずれのCAR T細胞集団も野生型EGFR発現細胞に対してIFN の発現を誘発しなかったことを明らかに示すものである。重要なことに、これらのデータは、死滅アッセイ (killing assay)のデータおよび増殖データとともに、CAR6およびCAR9がEGFRvIIIに対して機能的な特異性を示し、抗腫瘍免疫応答促進能を有することを示すものである。

【0427】

実施例9: ヒト化抗EGFRvIII CART細胞はマウスにおいて腫瘍量を低下させる

ヒト化抗EGFRvIII CAR T細胞は、マウス生体内で腫瘍量を低下させることが示された。例えば、#2173 (CAR6) ヒト化抗EGFRvIIIキメラ抗原受容体(CAR) レンチウイルス形質導入ヒトTリンパ球を確立U87vIII神経膠腫腫瘍で生体内処理した異種移植免疫不全NOD/SCID/c (-/-) マウスに静脈内送達した。5日目の確立したU87vIII皮下側腹部に腫瘍を有する対照マウスは、ドナーマッチさせた非CAR形質導入T細胞の投与を受け、該マウスの腫瘍は、キャリパーを用いた直接的な皮下腫瘍測定(長さの最大値x幅の最大値)および生体内イメージングシステム(IVIS)によって測定した光子放射の両方において急速に成長を示した。少ない数であっても($0.5-1 \times 10^6$)、CAR6形質導入細胞投与処置を受けたマウスでは、腫瘍成長は、用量依存的に低下した。

【0428】

この実施例において、EGFRvIII、GFP+Luc+ を発現するU87vIIIヒト神経膠腫 1×10^6 個を洗浄し、続けて、100 μ L生理食塩水中で、30個体のNSG 免疫不全マウス(N = 10/群)の側腹部に注射した。ヒトT細胞を抗CD3/28コートしたビーズで刺激し、レンチウイルスによるヒト化EGFRvIII CAR scFv #2173 (CAR6)形質導入を行った。形質導入、生体外増殖およびビーズ除去の後、CAR形質導入T細胞(フローサイトメトリーによれば約50%がCAR+)を洗浄し、100 μ L生理食塩水中で、尾静脈を介して、腫瘍移植後5日目に注射した。腫瘍増殖をキャリパー測定(左上)およびルシフェリン誘導性光子放射(右上)により評価した。測定を、T細胞導入の7日後および腫瘍注入の12日後に開始した。SEMは図18 (N = 10匹/群)に示す。各群の生存を、カプラン・マイヤー曲線により、プロットしたものを図18 (下図)に示す。対照T細胞を投与されたマウスは全て26日目までに死亡し、 0.5×10^6 および 1.0×10^6 個のCAR6 T細胞を投与された個体は、それぞれ試験30日目において30% および90%が生存していた。

【0429】

等価物

本明細書で引用するそれぞれ、および全ての特許明細書、特許出願および出版物は、参照によりその全体が本明細書に包含される。本発明は特定の局面について記載されているが、本発明の精神および範囲から離れなければ、他の局面およびバリエーションが当業者によって考慮され得るものであることは明らかである。末尾の特許請求の範囲は、かかる局面および相当するバリエーションを全て含むことを意図する。

【 図 1 】

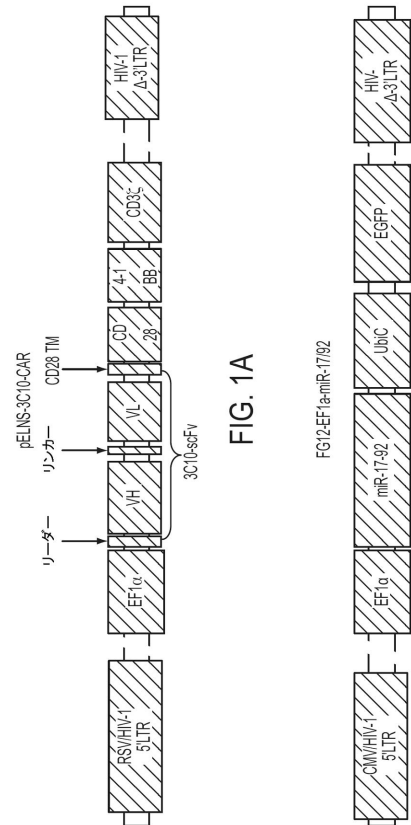
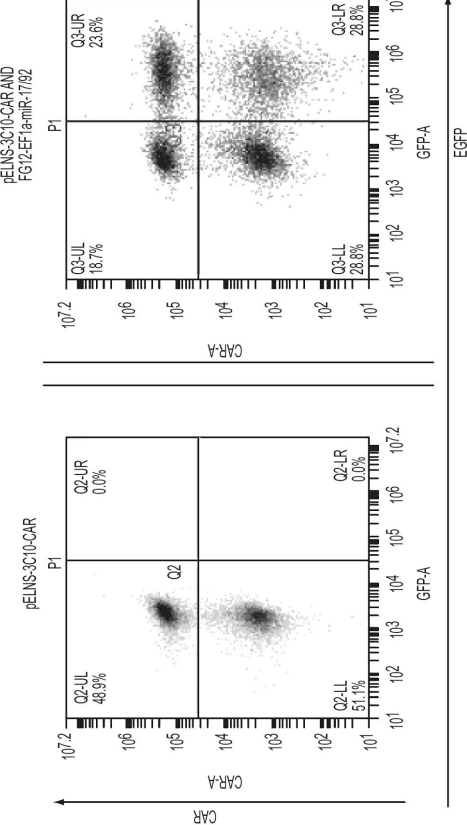


FIG. 1A

FIG. 1B

【 図 2 A 】



【 図 2 B 】

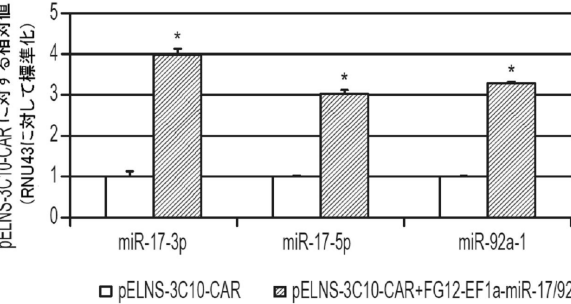


FIG. 2B

【 図 2 C 】

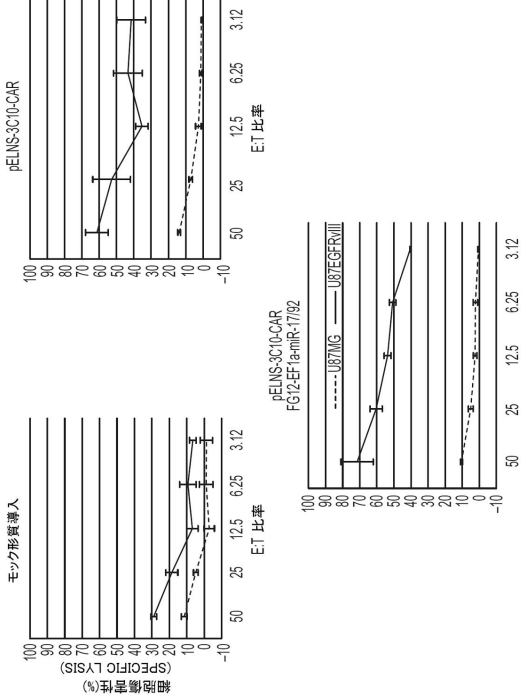


FIG. 2C

【図 3 A】

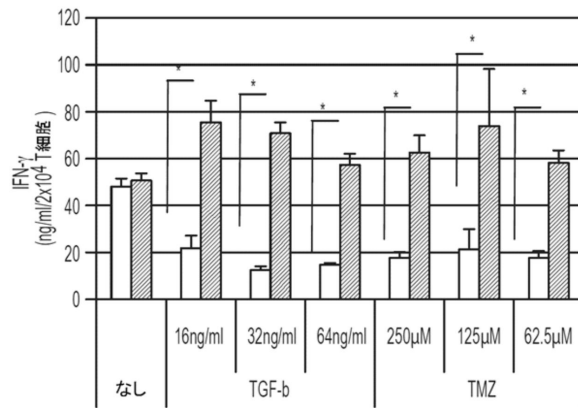


FIG. 3A

【図 3 B】

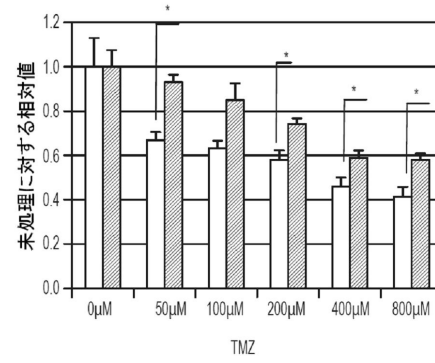


FIG. 3B

【図 3 C】

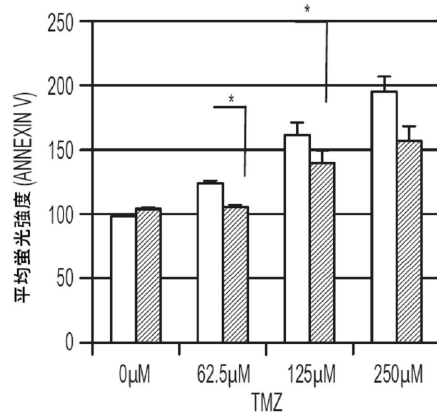


FIG. 3C

【図 3 D】

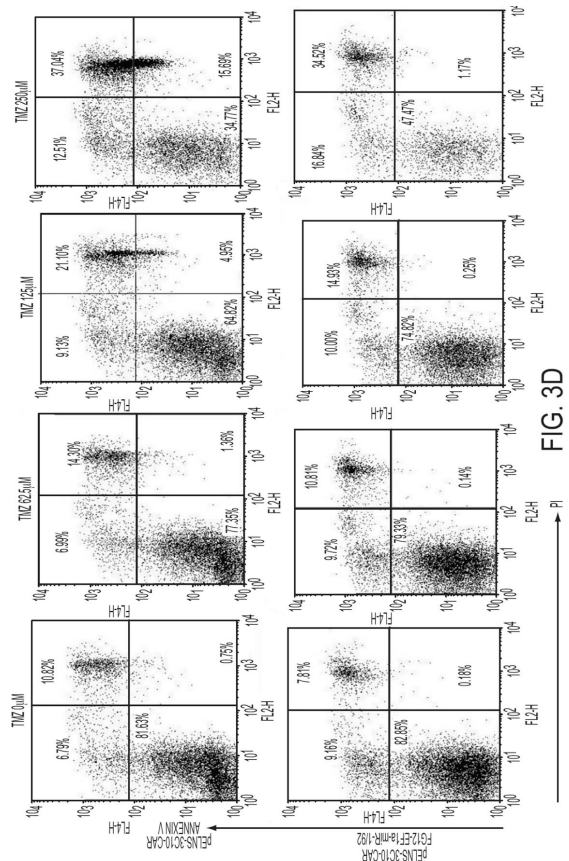


FIG. 3D

【 図 4 】

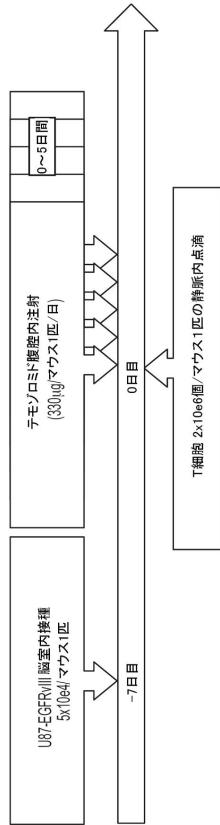


FIG. 4A

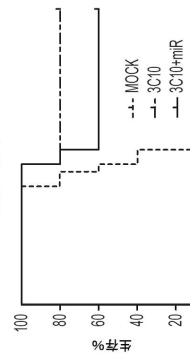
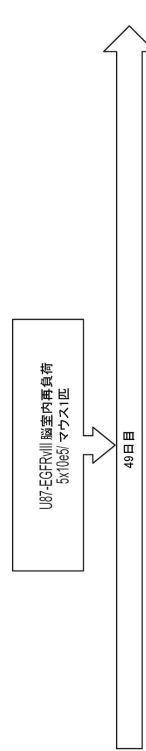


FIG. 4B



【 図 5 】

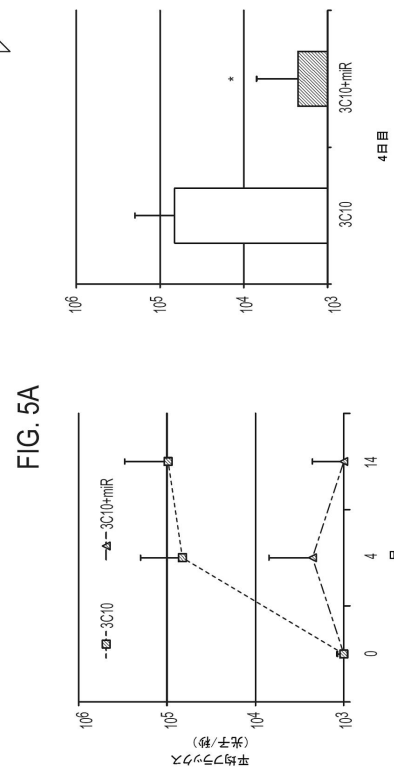


FIG. 5C

FIG. 5B

【 図 6 】

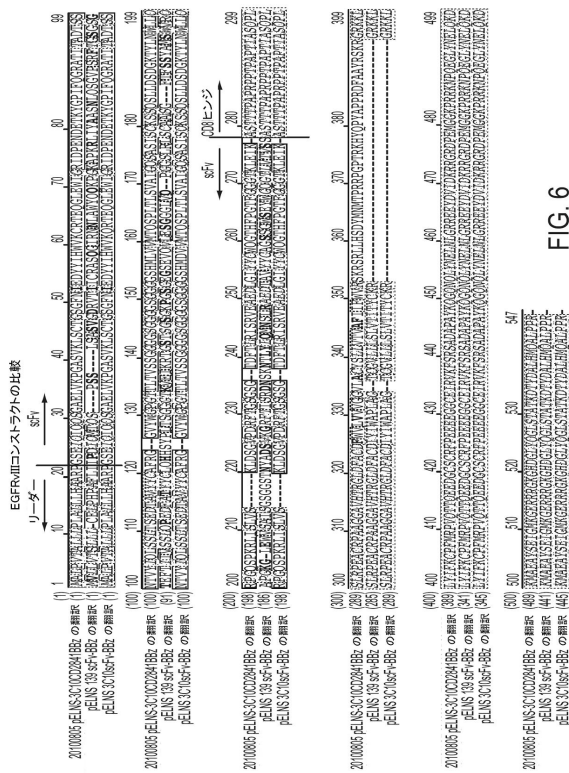


FIG. 6

【 図 7 】

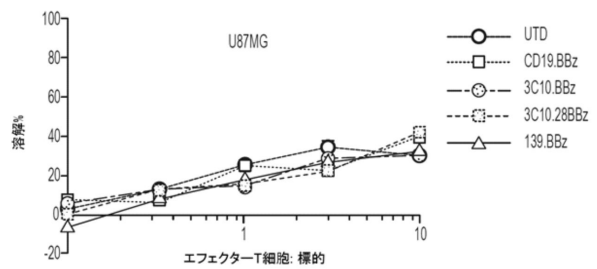


FIG. 7A

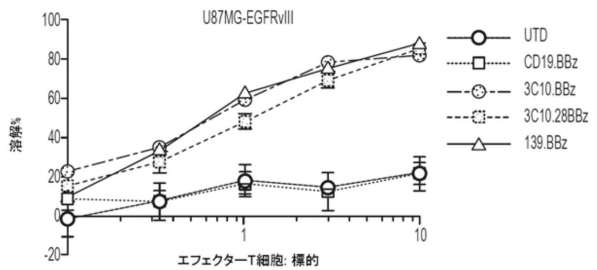
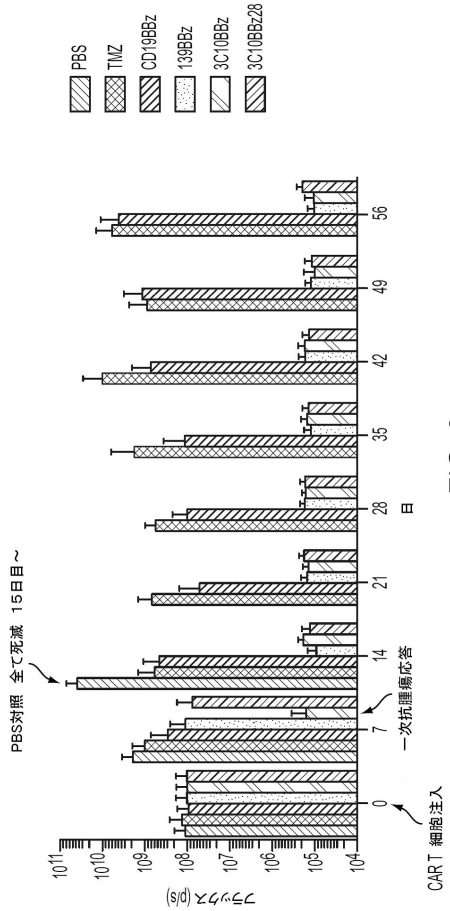


FIG. 7B

【圖 8】



【 図 9 】

[illegible]

FIG. 9

【 図 1 0 】

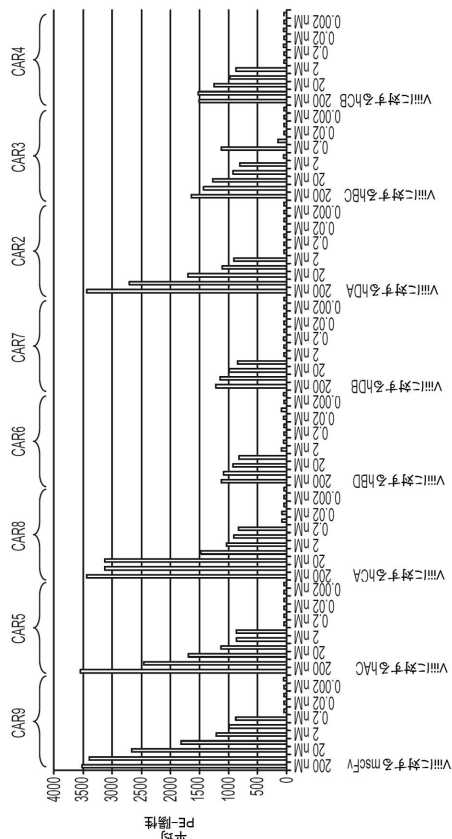


FIG. 10

【 図 1 1 】

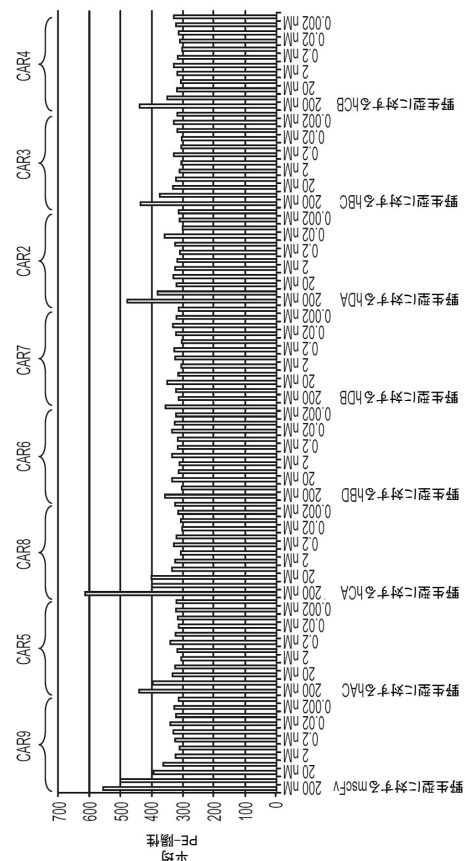
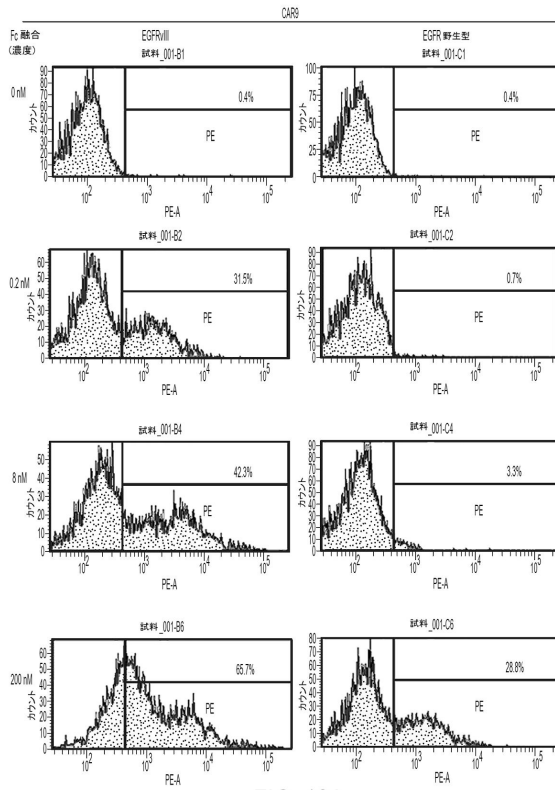
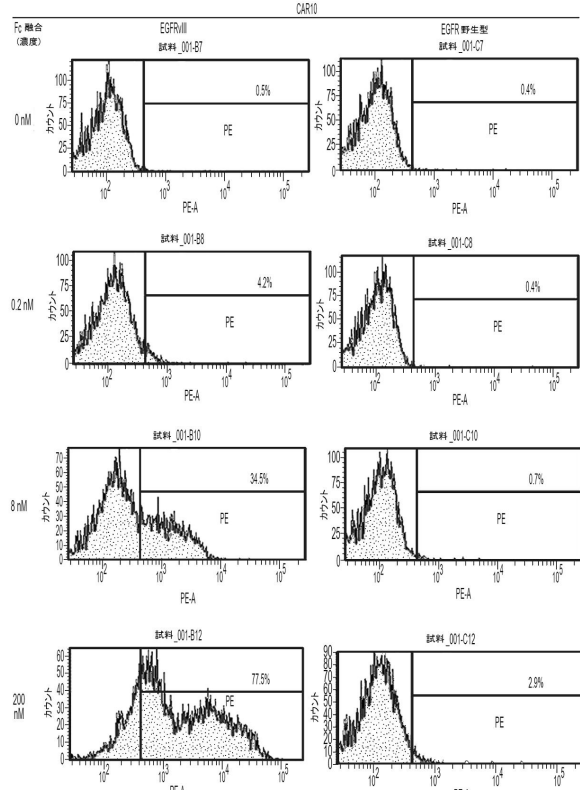


FIG. 11

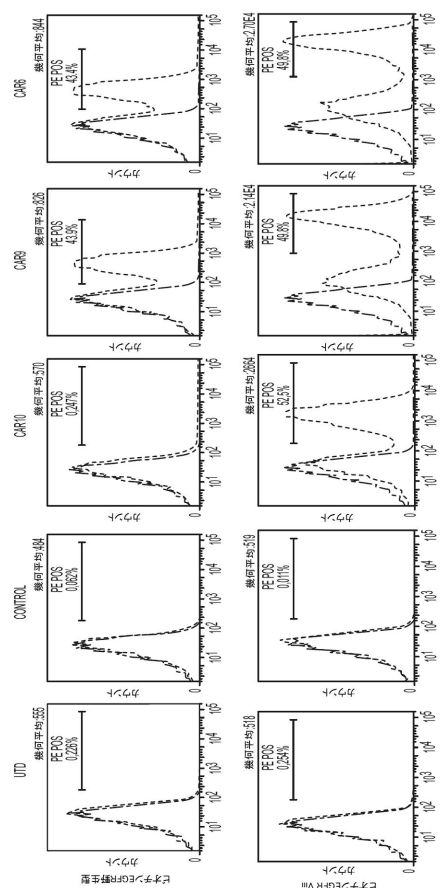
【図 12 A】



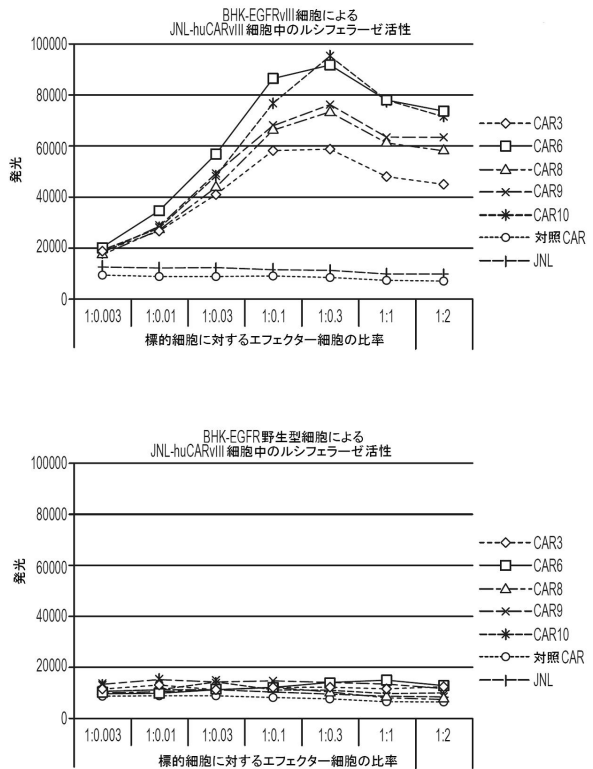
【図 12 B】



【図 13】



【図 14】



【図 15】

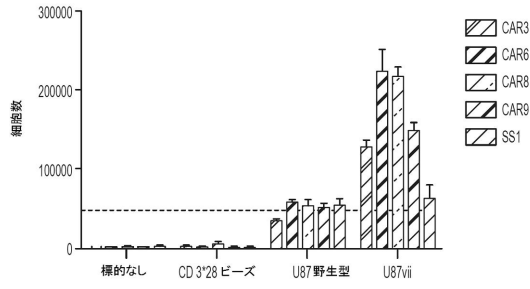


FIG. 15

【図 16】

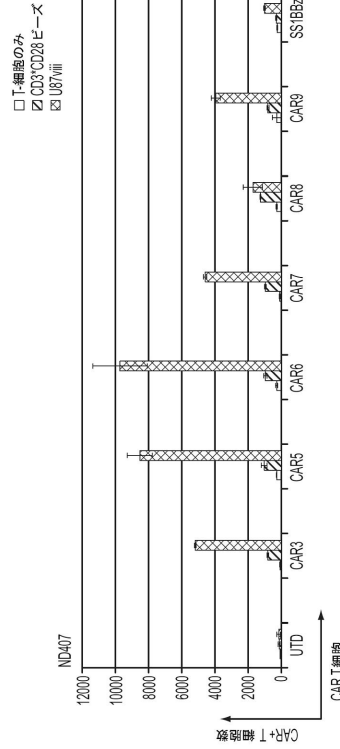


FIG. 16

【図 17】

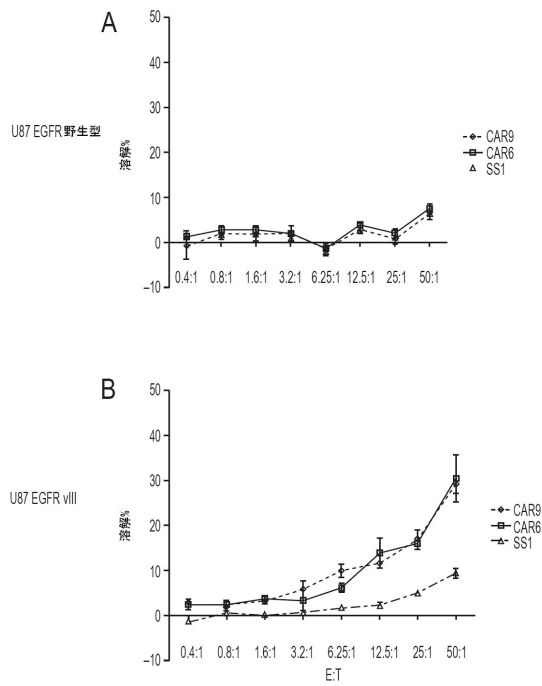


FIG. 17

【図 18】

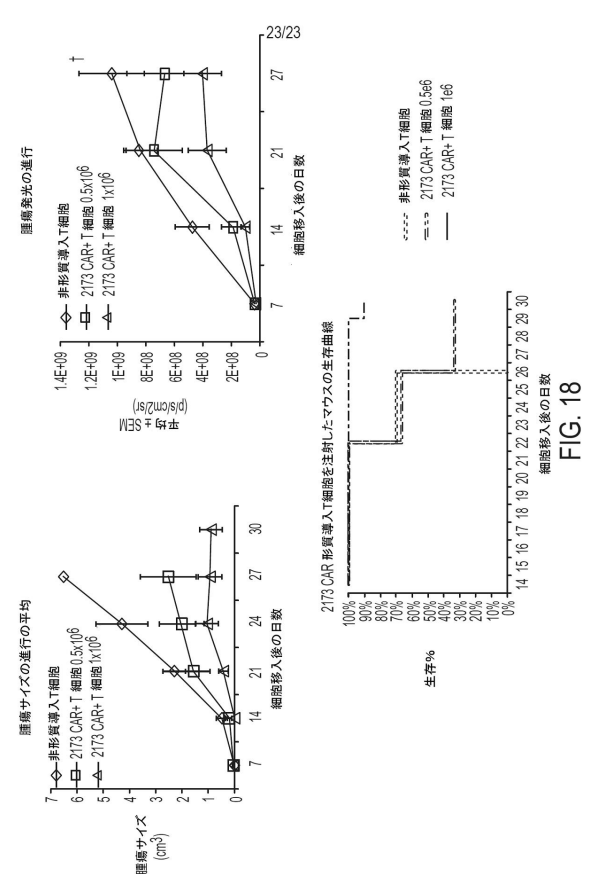


FIG. 18

【配列表】

0006647868000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17 Z
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00

(73)特許権者 501111751

ユニバーシティ・オブ・ピッツバーグ - オブ・ザ・COMMONWEALTH
エデュケーション

UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH
SYSTEM OF HIGHER EDUCATION

アメリカ合衆国15260ペンシルベニア州ピッツバーグ、サッカレー・アンド・オハラ・ストリ
ーツ、ガードナー・スティール・コンフェレンス・センター200番

(74)代理人 100081422

弁理士 田中 光雄

(74)代理人 100084146

弁理士 山崎 宏

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(72)発明者 ジェニファー・ブログドン

アメリカ合衆国02139マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー25
0番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレ
イテッド

(72)発明者 ローラ・アレクサンドラ・ジョンソン

アメリカ合衆国19003ペンシルベニア州アードモア、アーマット・アベニュー111番

(72)発明者 カール・エイチ・ジューン

アメリカ合衆国19066ペンシルベニア州メリオン・ステーション、ベアード・ロード409番

(72)発明者 アンドレアス・レーヴ

アメリカ合衆国02143マサチューセッツ州サマービル、ボウ・ストリート50番、アパートメ
ント・ナンバー9

(72)発明者 マルチェラ・モーズ

アメリカ合衆国19010ペンシルベニア州布林・モア、ハビランド・ドライブ705番

(72)発明者 ジョン・ショラー

アメリカ合衆国19072ペンシルベニア州ナーバース、ギルピン・ロード410番

(72)発明者 岡田 秀穂

アメリカ合衆国15206ペンシルベニア州ピッツバーグ、ビーチウッド・ブルバード3008
番

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 国際公開第2012/138475(WO, A1)

Cancer Sci., 2010年, vol.101, no.12, pp.2518-2524

Jpn. J. Cancer Res., 2000年, vol.91, no.10, pp.1035-1043

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 4 / 0 0 - 1 6 / 4 6

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

UniProt/GeneSeq

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/

WPIDS (STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

PubMed