

(19)日本国特許庁(JP)

**(12)特許公報(B2)**

(11)特許番号  
**特許第7114490号**  
**(P7114490)**

(45)発行日 令和4年8月8日(2022.8.8)

(24)登録日 令和4年7月29日(2022.7.29)

(51)国際特許分類

C 1 2 N	15/62 (2006.01)	F I	C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	15/12 (2006.01)		C 1 2 N	15/12	Z N A
C 1 2 N	15/13 (2006.01)		C 1 2 N	15/13	
C 0 7 K	16/18 (2006.01)		C 0 7 K	16/18	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)		C 0 7 K	19/00	

請求項の数 17 (全131頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2018-567062(P2018-567062)
(86)(22)出願日	平成28年12月22日(2016.12.22)
(65)公表番号	特表2019-522973(P2019-522973)
	A)
(43)公表日	令和1年8月22日(2019.8.22)
(86)国際出願番号	PCT/US2016/068349
(87)国際公開番号	WO2017/222593
(87)国際公開日	平成29年12月28日(2017.12.28)
審査請求日	令和1年12月16日(2019.12.16)
(31)優先権主張番号	PCT/US2016/039306
(32)優先日	平成28年6月24日(2016.6.24)
(33)優先権主張国・地域又は機関	
	米国(US)
(31)優先権主張番号	62/369,004
(32)優先日	平成28年7月29日(2016.7.29)
	最終頁に続く

(73)特許権者	517299146 アイセル・ジーン・セラピューティクス ・エルエルシー
	アメリカ合衆国・ニューヨーク・1117 94・ストーニー・ブルック・ヘルス・
	サイエンス・ドライブ・25
(74)代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(74)代理人	100110364 弁理士 実広 信哉
(74)代理人	100133400 弁理士 阿部 達彦
(72)発明者	ユポ・マ アメリカ合衆国・ニューヨーク・1117 90・ストーニー・ブルック・ヘルス・
	最終頁に続く

(54)【発明の名称】 キメラ抗体受容体(CARs)の構成およびその使用方法

**(57)【特許請求の範囲】****【請求項1】**

単一のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドコンストラクトを含む操作された細胞であり、

単一のポリペプチドは、第1のキメラ抗原受容体ポリペプチド(CAR)、第2のキメラ抗原受容体ポリペプチド(CAR)、および第1のCARおよび第2のCARの間に配置された第1の切断部位を含み、ポリヌクレオチドは、第1および第2のCARの両方の発現をもたらす単一のポリペプチドの発現を駆動する単一のプロモーターを含み、ここで、

(i) 第1のCARは、第1の融合タンパク質を形成する、第1のシグナルペプチド、第1の抗原認識ドメイン、第1のヒンジ領域、第1の膜貫通ドメイン、第1の共刺激ドメイン、および第1のシグナル伝達ドメインを含み、そして

(ii) 第2のCARは、第2の融合タンパク質を形成する、第2のシグナルペプチド、第2の抗原認識ドメイン、第2のヒンジ領域、第2の膜貫通ドメイン、第2の共刺激ドメイン、および第2のシグナル伝達ドメインを含み、

そしてここで、第1の抗原認識ドメインおよび第2の抗原認識ドメインは異なり、それぞれが異なる標的に結合し、

ここで、第1および第2の抗原認識ドメインの標的は、それぞれ、CD19およびCD20、CD123およびCD33、BCMA(CD269)およびCD19、BCMA(CD269)およびCD38、BCMA(CD269)およびCS1から選択され、

ここで、第1および第2の共刺激ドメインは細胞内にあり、そして第1および第2の融合

タンパク質における前記ヒンジ領域と膜貫通領域との間の相互作用部位が排除または破壊されている、操作された細胞。

**【請求項 2】**

切断部位が、ブタ・テスコウイルス-1 2A (P2A)、ウマ鼻炎Aウイルス (ERAV) 2A (E2A)、およびFMDV 2A (F2A) からなる群から選択される、請求項1に記載の操作された細胞。

**【請求項 3】**

第1の共刺激ドメインおよび前記第2の共刺激ドメインが異なる、請求項1に記載の操作された細胞。

**【請求項 4】**

第1の共刺激ドメインはCD28を含み、第2の共刺激ドメインは4-1BBを含む、請求項1に記載の操作された細胞。

10

**【請求項 5】**

操作された細胞は、T細胞、CD4 T細胞、CD8 T細胞、ナチュラルキラー細胞、NKT細胞、またはNK-92細胞である、請求項1に記載の操作された細胞。

**【請求項 6】**

第1の抗原認識ドメインの標的はCD123を含み、第2の抗原認識ドメインの標的はCD33を含み、第1の共刺激ドメインはCD28を含み、第2の共刺激ドメインは4-1BBを含み、切断部位はP2Aを含み、操作された細胞はT細胞である、請求項1に記載の操作された細胞。

20

**【請求項 7】**

単一のポリペプチドが、IL-15/IL-15sushi、IL-15/IL-15sushiアンカー、PD-1、PD-L1、CSF1R、CTAL-4、TIM-3、TGFRベータ、IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-15RA、IL-21、それらの機能的断片、またはそれらの組み合わせを含むエンハンサーをさらに含み、

ここで、前記エンハンサーは、第2の切断部位によって第1のCARおよび第2のCARから分離されており、

ここで、前記エンハンサーは、前記の操作された細胞および免疫細胞の増殖を増強することにより、免疫細胞モジュレーターとして機能する、請求項1に記載の操作された細胞。

**【請求項 8】**

エンハンサーがIL-15/IL-15sushiを含む、請求項7に記載の操作された細胞。

30

**【請求項 9】**

エンハンサーがIL-15/IL-15sushiアンカーを含む、請求項7に記載の操作された細胞。

**【請求項 10】**

エンハンサーが、IL-15/IL-15sushiおよびIL-15/IL-15sushiアンカーを含む、請求項7に記載の操作された細胞。

**【請求項 11】**

第1の抗原認識ドメインの標的および第2の抗原認識ドメインの標的は、それぞれ、CD269およびCS1である、請求項1に記載の操作された細胞。

**【請求項 12】**

第1の抗原認識ドメインの標的および第2の抗原認識ドメインの標的は、それぞれ、CD269およびCD19である、請求項1に記載の操作された細胞。

40

**【請求項 13】**

第1の抗原認識ドメインの標的および第2の抗原認識ドメインの標的は、それぞれ、CD269およびCD20である、請求項1に記載の操作された細胞。

**【請求項 14】**

第1の抗原認識ドメインの標的および第2の抗原認識ドメインの標的は、それぞれ、CD19およびCD20である、請求項1に記載の操作された細胞。

**【請求項 15】**

第1の抗原認識ドメインの標的および第2の抗原認識ドメインの標的は、それぞれ、CD

50

19およびCD22である、請求項1に記載の操作された細胞。

【請求項16】

第1の抗原認識ドメインの標的および第2の抗原認識ドメインの標的は、それぞれ、CD19およびBAFF-Rである、請求項1に記載の操作された細胞。

【請求項17】

エンハンサーが以下、IL-7およびIL-15/IL-15sushiアンカーを含む、請求項7に記載の操作された細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

本発明は、キメラ抗体受容体(CARs)の構成およびその使用方法に関する。

関連出願との相互参照

この出願は、2016年6月24日に出願された国際PCT出願番号PCT / US16 / 39306および2016年6月29日に出願された米国特許出願第62 / 369,004号からの優先権を主張する国際PCT出願であり、その全体内容は参考により本明細書に組み込まれている。

【背景技術】

【0002】

20

リンパ球の一種であるT細胞は、細胞性免疫において中心的な役割を果たす。その他、リンパ球である、B細胞、ナチュラルキラー細胞（NK細胞）と比較し細胞の表面にT細胞受容体(TCR)が存在している。ヘルパーT細胞（CD4+TあるいはCD4T細胞と呼ばれる）には細胞表面上にCD4糖蛋白質が発現している。ヘルパーT細胞は、MHC（主要組織適合性複合体）クラスII分子によって提示されるペプチド抗原で活性化される。一旦活性化されると、これらの細胞は急速に増殖し、免疫応答を調節するサイトカインを分泌する。細胞傷害性T細胞（CD8 + T細胞またはCD8 T細胞としても知られている）は、CD8糖蛋白質を細胞表面上に発現している。CD8 + T細胞は、MHCクラスI分子によって提示される提示されるペプチド抗原で活性化される。T細胞のサブセットであるメモリーT細胞は、長期間生存し、それらの同種抗原に応答し、過去における感染および/あるいは腫瘍細胞に対する記憶に基づき、免疫反応を起こすことで身体を防御する。

【0003】

T細胞は、その表面上にキメラ抗原受容体（CARs）とよばれる特別な受容体を産生するように遺伝子操作することができる。CARsは、腫瘍細胞上の特異的タンパク質（抗原）を認識するT細胞上のタンパク質である。これらの設計されたCAR T細胞は、実験室において数十億に達するまで増殖させ、次いで、増殖させたCAR T細胞は患者に注入される。

30

【0004】

今日までのキメラ抗原受容体（CAR）T細胞を用いた臨床試験では、標準的化学療法に耐性をもつ血液悪性腫瘍に対する治療方として非常に見込みがある。最も注目すべきことに、CD19-特異的CAR（CD19CAR）T細胞療法は、B細胞悪性腫瘍における長期間の寛解を含め、著しく良好な結果をしめた。（参考文献：Kochenderfer、Wilsonら、2010、Kalos、Levine et al. 2011、Porter、Levine et al. 2011、Davila、Riviere et al. 2013、Grupp、Frey et al. 2013年、Grupp、Kalos al. 2013、Kalos、Nazimuddin et al. 2013、Kochenderfer、Dudley et al. 2013年、Kochenderfer、Dudley et al. 2013、Lee、Shah et al. 2013、Park、Riviere et al. 2013、Maude、Frey et al. 2014）。

40

【0005】

B細胞白血病およびリンパ腫におけるCAR療法の成功にもかかわらず、T細胞悪性腫瘍に対するCAR療法は、まだ十分には確立されていない。T細胞悪性腫瘍は、B細胞の悪性腫瘍と比較して予後不良である（Abramson、Feldman et al. 2014）、この点においてCAR療法は臨床における大きな可能性を秘めている。

【0006】

50

今まで、現行の努力は様々なB細胞悪性腫瘍に対するCAR T細胞の効果を実証することに集中している。CD19CARを用いたB-ALLでの治療は、初期寛解率は約90%であるが、これらのほとんどは1年以内に再発する。再発は、少なくとも部分的には抗原エスケープによるものである。したがって、再発を防止するためのより効果的なCAR T細胞療法が緊急に必要とされている。標的の発見と選別は最初のステップであり、その点における効果的なCAR設計への確実性あるいはガイド等の一般的な規則がない。

#### 【0007】

CAR治療でのより広範囲でのアプローチを取り入れるのを妨げるいくつかの障害がある。最も一般的な課題として、(1)抗原標的およびキメラ抗原受容体の選択。(2)CARのデザイン。(3)腫瘍の不均一性、特に腫瘍抗原の表面発現の変動。単一抗原を標的とすることは免疫エスケープの危険性を有し、これは複数の望ましい抗原を標的とすることによって克服することができる。(4)免疫抑制微小環境。CAR T細胞は、腫瘍部位への到達時に抑制され、非活性化され得るかもしれない。

10

#### 【0008】

ほとんどのCARキメラ抗原レセプターはモノクローナル抗体に由来するscFvであり、これらのモノクローナル抗体のいくつかは疾患の臨床試験または治療に使用されている。しかしながら、それらは有効性に限界があり、CARのような代替的かつより強力な標的に対するアプローチが必要であることを示唆されている。scFvは、CARに対して最も一般的に使用されるキメラ抗原受容体である。しかしながら、CAR親和性結合および抗原上の認識されたエピトープの位置は、その機能に影響し得る。さらに、T細胞またはNK細胞上の表面CAR発現のレベルは、適切なリーダー配列およびプロモーターの影響を受ける。さらに、過剰発現されたCARタンパク質は、細胞にとって有毒でもあり得る。

20

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0009】

したがって、T細胞関連悪性腫瘍へのより効果的で安全で効率的に働く、改善されたキメラ抗原レセプターに基づく治療の必要性が依然として存在する。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0010】

この実施例では、本開示は、第1の抗原認識ドメイン、第1のシグナルペプチド、第1のヒンジ領域、第1の膜貫通ドメイン、第1の共刺激ドメイン、および第1のヒンジ領域を含む第1のキメラ抗原レセプターポリペプチド、そして第2の抗原認識ドメイン、第2のシグナルペプチド、第2のヒンジ領域、第2の膜貫通ドメイン、第2の共刺激ドメイン、および第2のシグナル伝達ドメインを含む第2のキメラ抗原受容体ポリペプチドを有する改変細胞を提供する。ここにおいて第1の抗原認識ドメインは第2の抗原認識ドメインとは異なる。

30

#### 【0011】

別の実施例では、本開示は、キメラ抗原レセプターおよびエンハンサーを含む改変ポリペプチドを提供する。

#### 【0012】

別の実施例では、本開示は、キメラ抗原レセプターポリペプチドおよびエンハンサーを含む改変ポリペプチドを提供する。

40

#### 【0013】

別の実施例では、本開示は、シグナルペプチド、CD45抗原認識ドメイン、ヒンジ領域、膜貫通ドメイン、少なくとも1つの共刺激ドメイン、およびシグナル伝達ドメインを含むポリペプチド、操作されたキメラ抗原レセプターポリペプチドを提供する。別の実施例では、本開示は、上記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。

#### 【0014】

別の実施例において、本開示は、上記の操作されたポリペプチドまたはポリヌクレオチドを有する操作された細胞を提供する。

50

## 【0015】

別の実施例では、本開示は、標的細胞の数を減少させる方法を提供する、以下の方法等が含まれる、(i)少なくとも1つのキメラ抗原レセプターポリペプチドを有する操作された細胞の有効量と標的細胞とを接触させること、操作された細胞は様々なキメラ抗原レセプターポリペプチドをもち、各キメラ抗原レセプターポリペプチドは独立していること、また(ii)場合により、前記の標的細胞の数の減少を測定することを含む。標的細胞はインターロイキン6受容体、NY-ESO-1、アルファフェトプロテイン(AFP)、グリビカン3(GPC3)、BAFF-R、BCMA、TACI、LeY、CD5、CD13、CD14、CD15、CD19、CD20、CD22、CD33、CD41、CD45、CD61、CD64、CD68、CD117、CD123、CD138、CD267、CD269、CD38、Flt3受容体、およびCS1からなるグループより選択される少なくとも1つの細胞表面抗原を含む。

10

## 【0016】

別の実施例では、本開示は、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、多発性骨髓腫、慢性骨髓性白血病、B細胞急性リンパ芽球性白血病(B-ALL)、および細胞増殖性疾患を治療する方法であって、前記された如何なる操作された細胞を必要とする患者に投与することを含む。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0017】

【図1】図1. cCARの構成の概略図(以下、「multiple CARまたはcompound CAR」と呼ぶ)。Multipleまたはcompound CARは複数の抗原(例えば、cell type 1またはcell type 2または同じcell type)を標的にする。MultipleまたはcCAR T細胞による免疫療法は、異なる、あるいは同様の抗原認識ドメイン、ヒンジ(H)領域、膜貫通(TM)ドメイン、様々な共刺激ドメイン(co-stimulatory domain)および細胞内シグナル伝達ドメインを含む、それぞれ異なる構成要素のCARから構成されるものによる。

20

## 【0018】

【図2A】図2A. cCAR-Tの構成の概略図。構成は、P2Aペプチドによって連結された複数のモジュラーユニットによるCARであり、SFFVプロモーターにより発現が誘導される、リンカーが切断されると、cCARは分かれ、それぞれCD33および/またはCD123を発現する標的に関与する。新規cCAR構成として、構築物の活性化ドメインには、CD33 CARの区域に4-1BBが、そしてCD123 CAR上にCD28部位が含まれるが、これに限定されない。

30

【図2B】図2B. ウエスタンプロットによりT細胞に形質導入されたCD33CD123 cCARの発現を示す。この図は、2つの異なるCARタンパク質、すなわち、CD33 CARおよびCD123 CARの発現を示す。リンカーの切断時にCD33およびCD123 CARの両方を発現するcCAR-T細胞は、2つの明瞭かつ一貫して強いタンパク質バンドを示す。緑色蛍光タンパク質(GFP)は陰性対照として利用。

【図2C】図2C. フローサイトメトリー解析で形質導入の効率を表す。上パネルは、UCB(臍帯血)およびPB(末梢血)で使用する前に最大形質導入効率を測定するために、293FT HEK(ヒト胚性腎臓)細胞で試験したCD33CD123cCAR(またはCD33CD123-2G-CARとも呼ぶ)のレンチウイルス力値を示す。下部パネルは、CD33CD123cCAR構築物およびコントロールとしてのGFP形質導入細胞を含むレンチウイルスベクターで形質導入されたCD33CD123cCAR(CD33CD123-2G-CARとも呼ばれる)T細胞を示す。黄色の丸で示されたパーセンテージは、形質導入効率のプロキシである。

40

## 【0019】

【図3】図3. compound CAR(cCAR)を作製する方法を示す概略図。HEK-293-FT細胞をcompound CARプラスミドDNAおよびリポフェクタミン2000でトランスフェクトし、約36時間および約60時間でウイルス上清を回収、ろ過し、-80°で保存した。T細胞を抗マウスCD3抗体およびIL-2で少なくとも2日間活性化する。活性化T細胞は、レトロネクチンでコーティングされたプレート上で解凍されたレンチウイルスを用い、少なくとも1回形質導入され、 $0.3 \times 10^6$  T細胞数/mL細胞密度で約2日間の少なくとも1回の一晩の形質導入の後、形質導入効率を増加させるためにT細胞数を減少させた。形質導入後、細胞

50

を洗浄し、増殖させ、3日目にCARの発現効率を確認するために、F(Ab')2ラベリングによりフロー分析を行い、計5-7日細胞を増殖させる。cCAR T細胞をインビトロで標的細胞と共に培養し、癌細胞のcCAR T細胞による死滅効果をin vivo(マウス)で評価する。

【図4】図4. 前骨髄球性白血病細胞株HL60とCD33CD123-2G CAR-T細胞(cCAR)とのインキュベーションによる共培養アッセイ。cCAR-T細胞(下のパネル)の能力はコントロールGFP形質導入T細胞(上パネル)を用いて比較する。殺傷効力は、約24時間のインキュベーション後に残っているCD33+細胞の集団によって測定される(黄色の丸で囲まれている)。

【図5】図5. 約100%のCD33および約50-80%のCD123を発現する骨髄性白血病細胞株KG-1aとcCAR-T細胞のインキュベーションによる共培養アッセイ。cCAR-T細胞(下のパネル)をコントロールGFP形質導入T細胞(上パネル)と比較する。殺傷効力は、約24時間のインキュベーション後に残されたCD33+細胞の集団によって測定される。

【図6】図6. CD33CD123 cCAR-T細胞を、5:1でAML-9と共に培養する。共培養アッセイはcCAR-T細胞とAML患者サンプル(ここではAML-9と称する)とのインキュベーションを示している。患者細胞は、例えば、白血病細胞、単球および他のタイプの芽細胞のような、細胞の混合集団である。CD33およびCD34は白血病細胞の特異的マーカーとして、CAR-T作用の指標として作用する。CAR-Tパネル(右)をコントロールGFP形質導入T細胞(中央)と比較する。殺傷効力は、少なくとも24時間のインキュベーション後に残ったCD33+/CD34+細胞の集団によって測定される。

【図7】図7. CD33CD123 cCAR-T細胞を、5:1でSp-BM-B6と共に培養する。共培養アッセイはcCAR-T細胞とB-ALL患者サンプル(ここではSp-BM-B6と呼ぶ)とのインキュベーションを示している。患者の細胞は、例えば、白血病細胞、単球および他のタイプの芽細胞のような、細胞の混合集団である。CD34は、白血病細胞の特異的マーカーとして作用する。CAR-Tパネル(右)をコントロールGFP形質導入T細胞(中央)と比較する。殺傷効力は、少なくとも24時間のインキュベーション後に残ったCD34+細胞の集団によって計測される。

【図8】図8. NK-92細胞におけるCD33CD123 cCARの発現。CD33CD123 cCARの発現は、ヤギ抗マウスF(ab)2抗体を用い検出される。

【図9】図9. CD33CD123 cCAR NK-92細胞とHL-60とのインキュベーションによる共培養アッセイを示す。cCAR NK-92細胞の働きを、GFPにより形質導入されたNK-92細胞と比較する。殺傷効力は、約24時間のインキュベーション後に残ったCD33+細胞の集団によって測定される。

【図10】図10. cCAR NK-92細胞とKG1aとのインキュベーションによる共培養アッセイを示す。cCAR NK細胞パネルの結果を、GFPにより形質導入されたNK-92細胞の結果と比較する。殺傷効力は、約24時間のインキュベーション後に残ったCD33+細胞の集団によって計測される。

【図11】図11. CD33CD123 cCAR(CAR-CD33/123)NK-92細胞によるHL-60またはKG1aに対する用量依存的応答。殺傷効力は、約24時間のインキュベーション後に残ったCD33+細胞の集団によって測定される。

【図12】図12. CD33CD123 cCAR NK-92細胞によるKG11細胞の2つの集団における殺傷能力への対照との比較。アッセイは、CAR-CD33/123(CD33CD123 cCAR NK-92細胞)と標的細胞KG1aとの間での異なる細胞比率で実施した。殺傷効力は、約24時間のインキュベーション後に残ったCD33+CD123+あるいはCD33+CD123-細胞の集団によって計測される。

【0020】

【図13A】図13A. P2AおよびT2Aにより連結するこの図式は、单一のコンストラクトにcCAR-Tおよび4-1BBLの両方を含むことを示す。構成は2つのモジュラー単位のCARS Aペプチドおよびエンハンサーである、4-1BBLの発現を誘導させるSFFVプロモーターからなる。リンカーの切断により、cCARおよび4-1BBLが開裂し、CD33および/またはCD123および4-1BBLを発現に関与する。Compound CAR、CD33CD123 CAR T細胞は、

10

20

30

40

50

CD28のみならず4-1BBリガンド（4-1BBLまたはCD137L）を介した共刺激を受ける。CD3-zetaシグナル伝達ドメインは、このCAR-Tのアセンブリを完成させる。

【図13B】図13B. T細胞におけるCD33CD123-41BBL-2Gコンストラクトの発現。健康なドナーからの末梢血由来のT細胞に、CD33CD123-4-1BBL-2Gコンストラクトを、6ウェルプレートに2mlのウイルス上清液と共にインキュベートして形質導入した。CARの発現は、CARタンパク質の表面発現をF(ab)<sup>+</sup>ラベルを用いてアッセイされ、続いてFACS解析を受けた。形質導入された細胞は、対照T細胞と同時に標識することで比較した。形質導入期間の終了1日後に発現が定量され、形質導入された集団を囲んで示した。

#### 【0021】

【図14】図14. P2AおよびT2Aにより連結するこの図式は、単一のコンストラクトにcCAR-TおよびIL-15/IL-15sushiの両方を含むことを示す。構成は2つのモジュラー単位のCARsおよびエンハンサーである、IL-15/IL-15sushiの発現を誘導させるSFFVプロモーターからなる。リンカーの切断により、cCARおよびIL-15/IL-15sushiが開裂し、CD33および/またはCD123発現に関与する。CD3-zetaシグナル伝達ドメインは、このCAR-Tのアセンブリを完成させる。エンハンサーには、cCAR上のIL-15 / IL-15sushiが含まれるが、これに限定されない。

【図15】図15. cCARの略図。構成は、リンカーによって連結されたCARの複数のモジュール単位の発現を誘導するSFFVプロモーターを含む。リンカーの切断時に、cCARは開裂し、様々な標的抗原、CD19および/またはCD20、および/またはCD22および/またはCD138の組合せを発現する標的に関与する。Multiple cCARsは、同じまたは異なる共刺激ドメイン、4-1BB（4-BBとも呼ばれる）および/またはCD28を制限することなく、利用する。

【図16A】図16. 活性化されたT細胞は、CD19CD20-2G、CD19CD22-2G CAR T細胞を作製するために形質導入された（すべてL8である）。（16A）compound CARs.のデザイン。

【図16B】(16B) ウエスタンプロット。HEK-293T細胞に、コントロールベクター（レーン1）、CD19CD20-2G（レーン2）、およびCD19CD22-2G（レーン3）のレンチウイルスプラスミドをトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、上清を取り除き、細胞も回収した。細胞をウエスタンプロットのために溶解し、マウス抗ヒトCD3一次抗体およびヤギ抗マウスHRP二次抗体でプローブした。(16C) PMBCバフィコートT細胞を抗CD3抗体で3日間活性化した。コントロールベクター（左）、CD19CD20-2G（中）、またはCD19CD22-2G（右）のレンチウイルス上清のいずれかで細胞に形質導入した。3日後 細胞を回収し、ビオチンと結合したヤギ抗マウスFab2またはヤギIgG抗体と共に30分間インキュベートした。細胞を洗浄し、懸濁させ、ストレプトアビジン-PEおよびマウス抗ヒトCD3-PerCpで30分間染色した。細胞を洗浄し、2%ホルマリンに懸濁し、フローサイトメトリーで分析してCARの発現効率を測定した。（N=2）。

【図17】図17. 異なるリーダー配列を用いたcompound CD19CD22CAR T細胞の発現。コントロールベクター（左）、L8-CD19CD22-2GCAR（中央左）、L45-CD19CD22-2GCAR（中央右）またはCSF-CD19CD22-2GCAR（右）レンチウイルス上清のいずれかで細胞に形質導入した。上清はそれぞれ3倍濃縮した。3日間のインキュベーション後、細胞を採取し、ビオチンと結合したヤギ抗マウスFab2またはヤギIgG抗体と共に30分間インキュベートした。細胞を洗浄し、懸濁させ、ストレプトアビジン-PEおよびマウス抗ヒトCD3-PerCpで30分間染色した。細胞を洗浄し、2%ホルマリンに懸濁し、フローサイトメトリーで分析してCARの発現効率を測定した。（N=2）。

【図18】図18.濃縮されたL8-CD19CD22-2GまたはL8-CD19CD20-2Gレンチウイルス上清を用いた形質導入効率の比較。A. PMBCバフィコートT細胞を抗CD3抗体で3日間活性化した。対照ベクター（左）、非濃縮（中央）L8-CD19CD22-2GCARまたは3倍濃縮L8-CD19CD22-2GCAR（右）レンチウイルス上清のいずれかで細胞に形質導入した。3日間のインキュベーション後、細胞を採取し、ビオチンと結合したヤギ抗マウスFab2またはヤギIgG抗体と共に30分間インキュベートした。細胞を洗浄し、懸濁させ、ストレプトア

10

20

30

40

50

ビジン-PEおよびマウス抗ヒトCD3-PerCpで30分間染色した。細胞を洗浄し、2%ホルマリンに懸濁し、フローサイトメトリーで分析してCARの発現効率を測定した。(N=2)。B. 同じ実験を、L8-CD19CD20-2G非濃縮または2.5倍濃縮レンチウイルスベクターコンストラクトで行われた。

【図19】図19. L8-CD19CD22-2G CAR T細胞は、一晩の共培養においてSP53腫瘍細胞を溶解する。コントロール(上段)、L8-CD19CD22-2G(下段)のレンチウイルス上清のいずれかを形質導入した活性化PMBC T細胞を、1:1(左)2:1(中)および5:1(右)、エフェクター：標的細胞の割合でインキュベーションした。37℃で24時間インキュベートした後、サンプルを洗浄し、抗ヒトCD3-PerCpおよび抗ヒトCD19-APCで染色し、洗浄し、フローサイトメトリーで分析した。右上にSP53細胞のみを示し、各比率での溶解率の要約は右下にある。(N=2)。  
10

【図20】図20. L8-CD19CD22-2G CAR T細胞は、一晩の共培養においてJeKo-1腫瘍細胞を溶解する。対照(左)または3倍濃縮したL8-CD19CD22-2Gレンチウイルス上清(中)のいずれかで形質導入された活性化PMBC T細胞をJeCo-1細胞と2:1(上)および5:1(下)、エフェクター：標的細胞の割合でインキュベートした。37℃で24時間インキュベートした後、サンプルを洗浄し、抗ヒトCD3-PerCpおよび抗ヒトCD19-APCで染色し、洗浄し、フローサイトメトリーで分析した。JeKo-1細胞単独および細胞溶解の要約が右側に示されている。(N=2)。

【図21】図21. L8-CD19CD22-2G CAR T細胞は、一晩の共培養でAML患者細胞を溶解する。対照(左)または3倍濃縮したL8-CD19CD22-2Gレンチウイルス上清(中)のいずれかで形質導入した活性化PMBC T細胞を、AML(PT1)と診断された患者のCMTMRでの染色細胞と2:1(上)および5:1(下)、エフェクター：標的細胞の比でインキュベートした。37℃で24時間インキュベートした後、サンプルを洗浄し、抗ヒトCD3-PerCpおよび抗ヒトCD19-APCで染色し、洗浄し、フローサイトメトリーで分析した。患者細胞単独および細胞溶解の要約が右側に示されている。(N=2)。  
20

#### 【0022】

【図22A】図22A. L8-CD19CD22-2G CAR T細胞は、CD19 + B-ALL患者細胞を減少させる。対照(左)またはL8-CD19CD22-2G(中央)レンチウイルス上清のいずれかで形質導入した活性化PMBC T細胞を、1:1の比でCMTMR染色したB-ALL(PT2)を有する患者からの細胞と共に4日間、2.5%FBSおよびIL-2の存在下でインキュベートした。この37℃でのインキュベーション後、サンプルを洗浄し、抗ヒトCD3-PerCpおよび抗ヒトCD19-APCで染色し、洗浄し、フローサイトメトリーで分析した。単独で4日間培養した染色された患者の細胞を右側に示す。  
30

【図22B】図22B. L-8-CD19CD22-2G cCAR T細胞は、CD22 + K562細胞に対する効果を示す。野生型K562細胞への形質導入による人為的CD22発現K562細胞株(K562x p22)を作製した。続いて、K562細胞のマイナーなCD22+集団を標的とする、CD19CD22cCARの抗腫瘍作用を試験した。1:1の比(有効:標的)での共培養実験は、コントロールと比較してK562を発現するCD22集団に対して穏やかな有意な細胞毒性効果を示す。共培養物をCD3、CD19およびCD22で染色して、フローサイトメトリーによってエフェクターおよび標的集団を分離した。結果はグラフ化された。細胞傷害性の結果は、人工抗原提示細胞株に対する抗腫瘍活性に関して報告された他の数と一致している。  
40

#### 【0023】

【図23】図23. BC1cCARレンチウイルスの様々な形質導入スキーム。(A)方法1は毎回24時間の2回の形質導入からなり、ベースラインとなる形質導入スキームである。スキームは、図に従って進行する。(B)方法2は、方法1と同じ方法論を有するが、2回目の形質導入は、インキュベーションを継続することによって置き換えられる。(C)改訂された方法2は、細胞とウイルス上清を48時間直接インキュベートする。

#### 【0024】

【図24A】図24A-24C. CAR構成図および形質導入方法論の比較。(24A BC1cCARのモジュラーデザインは、抗CD269(BCMA)一本鎖可変断片(scFv)領域抗および自己切  
50

断P2Aペプチドに融合されたCD319 (CS1) scFv、CD8由来ヒンジ (H) および膜貫通 (TM) 領域、およびCD3 シグナル伝達ドメインに連結されたタンデムCD28および4-1BB共活性化ドメインから成る。T細胞表面上のCD3CAR分子の効率的な発現のために、強力な脾臓フォーカス形成ウイルスプロモーター (SFFV) およびCD8リーダー配列を使用した。

【図24B】(24B) BC1cCARの発現を、アイソタイプをコントロールし、フローサイトメトリーにより測定した。囲まれた集団は、形質導入されたCAR細胞を表す。

【図24C】(24C)方法の最適化により形質導入効率が向上する。

【図24D】図24D. HEK-293FT細胞におけるBC1cCARおよびBCMA-CS1-2Gのタンパク質発現。HEK-293FT細胞にGFP (レーン1)、BC1cCAR (レーン2) のレンチウイルスプラスミドをトランスフェクトし、48時間後に上清を除去し、細胞を回収した。細胞をウエスタンプロット用に溶解し、マウス抗ヒトCD3z抗体でプロープした。方法を最適化することで形質導入効率が改善される。

【0025】

【図25A】図25A-25C. 骨髄腫細胞株に対するBC1cCAR T細胞のインビトロ評価。(25A) BC1cCARおよびコントロールT細胞を、BCMA高陽性MM1SおよびRPMI-8226細胞と共に、2 : 1および5 : 1のE : T比で24時間培養した。標的MM1SおよびRPMI-8226細胞を、Cytotacker 色素 (CMTMR) によって染色して、これをエフェクターT細胞と区別した。CMTMR-PEとともに抗BCMA (CD269) および抗CS1 (CD319抗体) によって個体をゲートした。標的U266細胞をCytotacker (CMTMR) 色素で標識して、これをエフェクターT細胞と区別した。丸で囲まれた集団は腫瘍細胞を表す。

【図25B】(25B) U266標的の減少。BC1cCARおよびコントロールT細胞を、BCMAおよびCS1のサブセットを発現するU266細胞と共にインキュベートした。標的腫瘍細胞を上記で述べたように染色し、同様のゲーティング条件を適用した。腫瘍集団は囲った。

【図25C】(25C)ヒト骨髄腫細胞株に対するBC1cCAR T活性のインビトロ条件下の要約。2 : 1および5 : 1のE : T比での種々の骨髄腫細胞株に対するBC1cCAR T細胞でのin vitroにおける細胞毒性の図式的概要。

【0026】

【図26A】図26A-26D. 原発性骨髄腫腫瘍細胞に対するBC1cCAR T細胞の抗腫瘍活性の特性。(26A) MM7-G原発性二重表現型腫瘍に対する用量依存的効果。BC1cCARおよびコントロールT細胞を用いてBCMA + CS1 +原発性骨髄腫細胞MM7-Gに対して24時間培養した。標的細胞をCMTMRで予備染色し、培養を2 : 1、5 : 1および10 : 1のE : T比で行った。集団は、CMTMRとともにBCMAおよびCS1によってゲートされ、丸で囲まれた集団を示すフローサイトメトリープロットは、標的腫瘍集団を表す(左)。インビトロでの細胞傷害性の要約を明瞭化するため棒グラフが用いられている(右)。

【図26B】(26B) MM10-Gにおける母集団での特異的減少。MM10-G原発性腫瘍細胞との共培養を同様の条件で行った。抗CS1および抗BCMA抗体で染色した場合、MM10-Gは異なる個体群を明らかにする。BCMA + CS1 +二重陽性集団は紫色に着色され、CS1 +集団のみが濃紺色に着色される。BC1cCAR T細胞の各集団に対する細胞傷害性を以下の棒グラフに要約する。

【図26C】(26C) CS1dim BCMA<sup>-</sup>に対する用量依存的効果。MM11-G原発腫瘍。BCMA<sup>-</sup>CS1dim原発細胞 (MM11-G) を使用する第3の実験は、BC1cCAR細胞における傷害作用をE : T投薬量の範囲にわたって要約したものを示す。

【図26D】(26D) 様々なBCMAおよびCS1の混成を有する骨髄腫細胞株および原発性腫瘍細胞に対するBC1cCAR T細胞細胞での細胞毒性を示すパネルグラフの概要。

【0027】

【図27A】図27A-27D. BC1cCAR抗原特異性の機能的検証。(27A) 我々は、BCMAまたはCS1のいずれかをそれぞれ独立して発現させるために、CML細胞株K562を操作した。野生型K562は陰性ピークとして示す、一方、BCMAを発現するK562 (BCMAxpK562) およびCS1を発現するK562 (CS1xpK562) はそれぞれの抗原発現の割合に応じて集団

10

20

30

40

50

シフトを示す。

【図27B】(27B) BC1cCAR T細胞において、BCMAxpK562またはCS1xpK562のいずれかに対する短期(4時間~12時間)培養は、E:T用量の増加と相関する抗原特異的細胞傷害性を示す。野生型K562に対する実験をネガティブコントロールとして行った。CS1xpK562細胞に対するBC1cCARとの効力を比較するために、CS1特異的シングルCARを作製し、それぞれのプロットにおいて赤色バーで描写した。抗CS1への特異的活性は、培養24時間後のCS1<sup>dim</sup> NK-92細胞に対しても見られた。

【図27C】(27C) 混成細胞アッセイにおける単一抗原CARとBC1cCAR Tとの比較。長期培養は、BCMAxpK562細胞とCS1xpK562細胞との5:1割合での混合で48時間にわたって実施した。BC1cCAR、CS1-CAR、BCMA-CAR、およびコントロールT細胞を各ウェルに5:1、E:T比で加えられ、フローサイトメトリー分析により解析された。BCMAまたはCS1細胞の残留集団を示すヒストグラムプロットは、実験条件ごとに示され、赤色の線はT細胞または標的腫瘍集団の境界を画定する。ヒストグラムプロットにおける数値は、標的腫瘍細胞の残存集団の割合を表す。

【図27D】(27D) BC1cCAR Tの、原発性骨髓吸引液中のCS1サブセットに対する活性。さらなる共培養実験を、CS1発現少数サブセットとして骨髓吸引サンプルを用いて行った。BC1cCARまたはコントロールT細胞を2:1(左パネル)、5:1(中央パネル)、または10:1(右パネル)比で添加し、丸で囲んだ集団はCS1を発現する集団をする表す。結果をフローサイトメトリー(上部)で解析する。骨髓サブセットに対する抗CS1活性の要約グラフ(下記)。

#### 【0028】

【図28A】図28A-28C. 長期間での連続的殺傷アッセイおよび腫瘍の再負荷。(28A)長期間連続殺傷アッセイの構築のためのスキーム。最初の培養をCAR細胞またはコントロール細胞をMM1S腫瘍細胞と1:1、E:T比でセットアップし、外来性のサイトカインなしで168時間にわたってアッセイを行った。48時間後、少量の収集したサンプルについてフローサイトメトリー分析を行い、MM1S細胞を各処理ウェルに再び加えた。これを168時間の時点まで繰り返す。

【図28B】(28B) 48時間後のT細胞増殖および応答。フローサイトメトリー解析の日に画像撮影し、細胞を抗BCMA、抗CS1、および抗CD3抗体で染色した。MM1S細胞は、多数のCS1+割合で高度にBCMA+として発現している。青色に着色した円で囲まれた集団は、MM1S腫瘍の存在を表す。

【図28C】(28C) 108時間後のCAR細胞増殖および抗原の減少。同様の画像撮影およびフローサイトメトリー分析を108時間の時点で行った。

#### 【0029】

【図29A】図29A-29C. BC1cCAR T細胞はインビボで抗白血病効果を示す。(29A) MM1S Luc+を注入したマウスモデルのIVISでの画像化。NSGマウスに、致死量以下の照射を行い、ルシフェラーゼ発現MM1S多発性骨髓腫細胞を静脈注射して、測定可能な腫瘍形成を誘導した。3日後、マウスに $5 \times 10^6$ 数のBC1cCAR T細胞またはコントロールGFP T細胞を静脈注射した。3、6、8および11日目に、マウスにRediJect D-Luciferinを皮下注射し、IVISイメージングで解析した。

【図29B】(29B) BC1cCAR T細胞はMM1S腫瘍増殖を制御する。BC1cCAR T細胞注入マウスについて測定した平均光強度を、GFPコントロールT細胞注入マウスの平均光強度と比較した。

【図29C】(29C) BC1cCAR T細胞は、マウス生存率を改善する。マウスの生存率を測定し、2つのグループ間で比較し、ロングランクマントル・コックス検定の実施により、生存率が有意に改善された。

【図29D】図29D. BCMA-CARおよびBC1cCAR T細胞は、異種移植マウスモデルにおいてBCMAおよびCS1を発現するK562細胞の混和物に著しい抗白血病効果を示す。BCMAを発現するルシフェラーゼ陽性K562細胞をCS1を発現するルシフェラーゼ陽性K562細胞と4:1の比で混和する。その後、致死量以下の照射の24時間後に混合したK562細胞(

10

20

30

40

50

$0.5 \times 10^6$ 細胞)を静脈内(1日目)に注射した。3日後、BCMA CAR T細胞、BC1cCAR T細胞またはコントロールT細胞を各マウスに1コースで静脈注射した(各群についてn=5)。背側の腫瘍量は、3、7、10および12日目にIVISイメージングシステムを用いて測定した。7日目にBCMAマウス#3は大きな腫瘍を有する。10日目に背側をコントロール群と比較すると、BCMA = 47.7%少ない腫瘍量、cCAR = 53.8%少ない腫瘍量を示す。12日目の結果(腹側視野のみ)背側においてBCMA対コントロール= 43.8%少ない腫瘍量、cCAR対対照= 60.7%少ない腫瘍量をしめす。

【図29E】図29E. BCMAおよびBC1cCAR T細胞でのin vivoでの腫瘍量の有意な減少。コントロールに対するBCMA CAR T細胞またはcCAR(BC1cCAR)で処置したマウスにおける、コントロールと比較した経時的減少率。

10

#### 【0030】

【図30A】図30A-30B. NK-92細胞へのBC1cCAR形質導入。(30A) BC1cCARのモジュラー設計は、前述したように構成されています。

【図30B】(30B) NK-92細胞表面上のCAR発現。このコンストラクトをウイルス上清と共に48時間インキュベートすることでNK-92細胞に形質導入し、F(ab)'抗体検出で標識することによりCARタンパク質の表面発現を検出。形質導入された集団を囲み、コントロールNK-92細胞と比較する。

#### 【0031】

【図31A-C】図31A-31B. BC1cCAR NK-92抗腫瘍特性の特性評価。(31A) BC1cCAR NK細胞はミエローマ細胞株および原発性細胞を溶解する。BC1cCAR NK-92細胞を、原発性MM7-G腫瘍細胞に加えて、U266、RPMI-8226、およびMM1S骨髄腫細胞株に対してインキュベートした。共培養は、5:1のE:T比で2時間かけて実施し、集団を分離するために抗CS1および抗BCMA抗体で標識した。腫瘍集団は円で囲まれている。MM7-G原発腫瘍細胞をNK-92細胞と区別するために細胞サイトトラッカー色素(CMTMR)で染色し、囲んだ。視覚化の助けとしてBC1cCAR NK-92細胞傷害活性の要約が棒グラフで提示される。(31B) BC1cCAR NK-92細胞の抗原特異的活性についてBCMAを発現しているK562(BCMAXpK562)およびCS1を発現しているK562(CS1xpK562)細胞を用いて試験した。共培養は、5:1のE:T比で4時間かけて行った。K562集団はCMTMRで先に染色し、フローサイトメトリープロット上で円で囲んだ。棒グラフは抗腫瘍活性の要約を視覚化したものである。

20

#### 【0032】

【図32A】図32A-32C. 異なるBAFF-CARコンストラクトの作製および特性評価。(32A) T細胞表面上のL45-BAFF-28 CAR発現。L45-BAFF-28 CARをT細胞に形質導入し、F(ab)'抗体を用いて表面発現を評価した。ゲーティングはコントロールと比較した。

【図32B】(32B) CAR発現のリーダー配列に対する依存性。異なるリーダー配列を用いたBAFF-CARコンストラクトにおいて形質導入における効率を改善できるかどうかをテストした。F(ab)'抗体を用いて細胞表面上の検出を評価し、形質導入された集団を線で囲んだ。

【図32C】(32C) CAR発現の構造設計に対する依存性。さらなるBAFF-CARコンストラクト上に含まれる異なるリーダー配列および構造設計(さらなる単位)を検証し、CAR形質導入が改善され得るかどうかを決定するために使用した。形質導入された集団は、コントロールT細胞と比較して、線で囲まれ、ゲーティングされている。CSF-BAFF-28 41BBLは、CSFリーダー配列を有する4-1BBL(41BBL)を共発現するBAFF CARである。CSF-BAFF-28 IL-15RAは、CSFリーダー配列とIL-15 / IL-15SUS(IL-15RA)を共発現するBAFF CARである。

40

#### 【0033】

【図33】図33. L45-BAFF-28 CAR Tの抗腫瘍特性の特徴付け。L45-BAFF-28 CAR T細胞は、MM1S腫瘍細胞に対して抗腫瘍活性を有する。(33A) L45-BAFF-28 CAR T細胞を、MM1S骨髄腫細胞に対して3:1のE:T比で48時間培養した。繰り返しサンプルが表示されます。細胞傷害活性を棒グラフにて要約する。

50

## 【0034】

【図34A】図34A-34B. 異なるBAFF-CARコンストラクトおよび強化による抗腫瘍活性の特性評価。(34A) BAFF-CARはMM1S細胞に対して作成する。L8-BAFF-28IL-15 / IL-15sushiおよびL8-BAFF-28-41BBL CARをMM1S腫瘍細胞に対して5：1のE：T比で24時間培養した。腫瘍集団は線で囲まれている。

【図34B】(34B) SP53細胞に対するBAFF-CARコンストラクト。CARおよびL45-BAF F-28 CARの両方を、E：T比5：1でSp53腫瘍細胞(B系統)に対して24時間培養した。

## 【図34C】(34C) 細胞傷害活性の概要棒グラフ。

## 【0035】

【図35】図35. cCAR構成を示す略図。コンストラクトは、P2Aペプチドによって連結されたCARの2つのモジュール単位の発現をSFFVプロモーターにより誘導される。このP2Aペプチドが開裂すると、cCARはそれぞれ分かれ、BCMAおよび/またはCD19を発現する標的に関与する。2つのユニットCARは、異なるまたは同じ共刺激ドメインを使用する。共刺激ドメインは、4-1BBまたはCD28であり得るが、これに限定されない。

10

## 【0036】

【図36A】図36A-36B. BCMA CARユニットの特性評価。(36A) BCMA CARは、BC MA + MM1S細胞を効果的に減少させる。BCMA CARをT細胞に形質導入し、MM1S腫瘍細胞と共に培養した。CS1 CARも作製され、その強さのために使用されました。MM1S細胞は、BCMAおよびCS1の両方に対して有意に二重陽性である。共培養は、48時間にわたって実施し、BCMAおよびCS1抗体を用いて腫瘍の中心を同定した。線で囲まれた集団は、培養後の残留MM1S腫瘍細胞を表す。

20

【図36B】(36B) BCMA CARは、BCMA +原発腫瘍細胞を効果的に溶解する。(36B) BCMA CARおよびCS1 CARも、原発性MM7-G骨髄腫患者細胞に対するその抗腫瘍特性について評価された。MM7-G集団は、多数がBCMA + CS1 +集団であり、少数であるが有意なCS1 +集団も存在する。BCMA CARおよびCS1 CARの両方の細胞毒性を評価するためにBCMAおよび細胞トラッカー(CMTMR)により腫瘍集団をCAR細胞と区別した。

## 【0037】

【図37A-C】図37A-37C. CD19CARの特性評価。(37A) CD19CARユニットの設計。(37B) ウエスタンプロット。HEK-293T細胞を、コントロールベクター(レーン1)およびCD19-2G(レーン2)のレンチウイルスプラスミドでトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、上清を除去し、細胞も回収した。細胞をウエスタンプロットのために溶解し、マウス抗ヒトCD3z一次抗体およびヤギ抗マウスHRP二次抗体でプローブした。C. PMBCバフィコートT細胞を抗CD3抗体で3日間活性化した。細胞は、コントロールベクター(左)、2G(中央左)、L8-CD19CD20-2G(中央右)またはL8-CD19CD22-2GCAR(右)レンチウイルス上清のいずれかで形質導入した。3日間のインキュベーション後、細胞を採取し、ビオチンと結合したヤギ抗マウスFab2またはヤギIgG抗体と共に30分間インキュベートした。細胞を洗浄し、懸濁させ、ストレプトアビジン-PEおよびマウス抗ヒトCD3-PerCpで30分間染色した。細胞を洗浄し、2%ホルマリンに懸濁し、フローサイトメトリーで分析してCAR発現効率を測定した。(N=2)

30

## 【0038】

【図38A】図38A-38B. 異なるリーダー配列を用いたcompound CD19CAR T細胞の発現。(38A)異なるリーダー配列を有する融合タンパク質を発現するようにCARコンストラクトを設計した。

40

【図38B】(38B) PMBCバフィコートT細胞を抗CD3抗体で3日間活性化した。細胞に、コントロールベクター(左)、HA-CD19-2G(上の中央)、IL2-CD19-2G(右上)、L8-CD19-2G(下の中央左)、L45-CD19-2G(中右)またはCSF-CD19-2GCAR(右下)のいずれかのレンチウイルス上清を用いて形質導入した。3日間のインキュベーション後、細胞を採取し、ビオチンと結合したヤギ抗マウスFab2またはヤギIgG抗体と共に30分間インキュベートした。細胞を洗浄し、懸濁させ、ストレプトアビジン-PEおよびマウス抗ヒトCD3-PerCpで30分間染色した。細胞を洗浄し、2%ホルマリンに懸濁し、フローサイト

50

メトリーで分析してCAR効率を測定した。 (N=2)

【0039】

【図39A】図39A-39B. 異なるCD19 scFv配列を用いたT細胞上のCD19CARの発現。(39A) 異なるscFv配列を有する融合タンパク質を発現するようにCARコンストラクトを設計した。

【図39B】(39B) PMBCバフィコートT細胞を抗CD3抗体で3日間活性化した。コントロールベクター(左)、L8-CD19-2G(中央)、IL2-CD19-2G(右上)またはL8-CD19b-BB-2G(右)のレンチウイルス上清のいずれかを用いて細胞に形質導入した。3日間のインキュベーション後、細胞を採取し、ビオチンと結合したヤギ抗マウスFab2またはヤギIgG抗体と共に30分間インキュベートした。細胞を洗浄し、懸濁させ、ストレプトアビジン-PEおよびマウス抗ヒトCD3-PerCpで30分間染色した。細胞を洗浄し、2%ホルマリンに懸濁し、フローサイトメトリーで分析してCAR効率を測定した。(N=2)

【0040】

【図40】図40. L8-CD19-2GおよびCD19b-BB CAR T細胞は、一晩の共培養においてSP53腫瘍細胞を溶解する。コントロール(左)、L8-CD19-2G(中央)またはL8-CD19b-BB-2G(右)レンチウイルス上清のいずれかで形質導入された活性化PMBC T細胞をSP53細胞と2:1(上)および5:1(下)、でのエフェクター：標的細胞比でインキュベートした。37で24時間インキュベートした後、サンプルを洗浄し、抗ヒトCD3-PerCpおよび抗ヒトCD19-APCで染色し、洗浄し、フローサイトメトリーで分析した。SP53細胞のみと細胞溶解の要約が右端に示されている。(N=2)

【図41】図41. L8-CD19-2GおよびCD19b-BB CAR T細胞は、一晩の同時培養においてJeKo-1腫瘍細胞を溶解する。コントロール(左)、L8-CD19-2G(中央)またはL8-CD19b-BB-2G(右)レンチウイルス上清のいずれかで形質導入された活性化PMBC T細胞をJeCo-1細胞と2:1(top)および5:1(下部)、エフェクター：標的細胞の比でインキュベートした。37で24時間インキュベートした後、サンプルを洗浄し、抗ヒトCD3-PerCpおよび抗ヒトCD19-APCで染色し、洗浄し、フローサイトメトリーで分析した。右端にはJeKo-1細胞のみと細胞溶解の概要が示されている。(N=2)。

【図42】図42. L8-CD19-2GおよびL8-CD19b-BB-2G CAR T細胞は、一晩の共培養でAML患者細胞を溶解する。コントロール(左)、L8-CD19-2G(中央)またはL8-CD19b-BB-2G(右)レンチウイルス上清のいずれかで形質導入した活性化PMBC T細胞をCM-TMR染色したAMLを有する患者の細胞と、2:1(上)および5:1(下)、エフェクター：標的細胞での比率でインキュベートした。37で24時間インキュベートした後、サンプルを洗浄し、抗ヒトCD3-PerCpおよび抗ヒトCD19-APCで染色し、洗浄し、フローサイトメトリーで分析した。予備染色された患者細胞のみと細胞溶解の概要が右端に示されている。(N=2)。

【図43】図43. L8-CD19-2GおよびL8-CD19b-BB-2G CAR T細胞は、CD19+患者細胞を枯渇させる。コントロール(左)、L8-CD19-2G(中央)またはL8-CD19b-BB-2G(右)レンチウイルス上清のいずれかで形質導入した活性化PMBC T細胞を、CMTMR染色したB-ALLを有する患者由来の細胞と共にインキュベートした。L8-CD19b-BB-2G T細胞を患者細胞と1:1の比で一晩インキュベートし(上)、L8-CD19b-BB-2GT細胞を患者細胞と共に5:1の比で40時間インキュベートした(下)。この37でのインキュベーション後、サンプルを洗浄し、抗ヒトCD3-PerCpおよび抗ヒトCD19-APCで染色し、洗浄し、フローサイトメトリーで分析した。予備染色された患者細胞だけが右端に示されている。(N=2)。

【図44】図44. cCAR構造を示す略図。コンストラクトは、P2Aペプチドによって連結されたCARの2つのモジュール単位の発現を誘導するSFFVプロモーターからなる。このP2Aペプチドが開裂すると、cCARは別れ、BCMAおよび/またはCD19bを発現する標的に関与する。2つのユニットCARは、異なるまたは同じ共刺激ドメインを使用する。共刺激ドメインは、4-1BBまたはCD28であり得る。

【0041】

10

20

30

40

50

【図45A】図45A-45C. 異なるBAFF-CARコンストラクトの作製および特性評価。(45A) L45-BAFF-28 CARをT細胞に形質導入し、F(ab)'抗体を用いて表面発現を評価した。ゲーティングはコントロールと比較した。

【図45B】(45B)異なるリーダー配列を用いたBAFF-CARコンストラクトを試験し、形質導入における効率を改善できるかどうかを決定した。F(ab)'抗体を用いて表面検出で評価し、形質導入された集団を線で囲んだ。

【図45C】(45C)異なるリーダー配列およびコンストラクトの設計(追加の単位)を含む、さらなるBAFF-CARコンストラクトを検証し、CAR形質導入率が改善できるかどうかを決定するために使用した。形質導入された集団は、コントロールT細胞と比較して、線で囲まれ、ゲーティングされている。CSF-BAFF-28 41BBLは、CSFリーダー配列を有する4-1BBL(41BBL)を共発現するBAFF CARである。CSF-BAFF-28IL-15 / IL-15sushiは、CSFリーダー配列を有するとIL-15 / IL-15sushiを共発現するBAFF CARである。

#### 【0042】

【図46A】図46A-46B. L45-BAFF-28 CAR T細胞は、MM1S腫瘍細胞に対して抗腫瘍活性を有する。L45-BAFF-28 CAR Tの抗腫瘍特性の特性評価。(46A)(46B)から要約したインピトロでのBAFF CAR細胞傷害活性。

【図46B】(46B) L45-BAFF-28 CAR T細胞は、MM1S腫瘍細胞に対して抗腫瘍活性を有する。L45-BAFF-28 CAR T細胞を、MM1S骨髄腫細胞に対して3:1のE:T比で48時間培養した。重複したサンプルが表示されます。

#### 【0043】

【図47A】図47A-47B. 異なるBAFF-CAR構築物および増強を用いた抗腫瘍活性の特性評価。(47A) L8-BAFF-28IL-15 / IL-15sushiおよびL8-BAFF-28 4-1BBL CARを5:1のE:T比でMM1S腫瘍細胞に対して24時間培養した。腫瘍集団は線で囲まれている。

【図47B】(47B) 上述の両方のCARおよびL45-BAFF-28 CARをSp53腫瘍細胞(B系統)に対して5:1のE:T比で24時間培養した。

#### 【0044】

【図48】図48. CRISPR / Cas9干渉システム。sgRNAおよびCas9ピューロマイシンの発現は、それぞれU6プロモーターおよびSFFVプロモーターによって誘導される。Cas9は、E2A自己切断配列によってピューロマイシン耐性遺伝子に連結されている。

#### 【0045】

【図49A】図49A. 血液悪性腫瘍を標的とするCAR TまたはNK細胞の作製ステップ。

【図49B】図49B. CRISPR / Cas9レンチウイルスシステムを用いた安定したCD45ノックダウンNK-92細胞の作製および細胞の選別。フローサイトメトリー分析により、NK-92細胞の表面上のCD45発現レベルを示した(左パネル)。sgCD45B CRISPRをNK-92細胞に形質導入した後、形質導入細胞を、ピューロマイシンを含む培地の中で数週間培養した。CD45陰性NK-92細胞を、CD45抗体を用いて決定し、選別した。安定なNK45i-92(CD45ノックダウン)NK-92細胞の純度を、フローサイトメトリー分析(右パネル)により決定した。このデータは、NK45i-92細胞が首尾よく作製され、得られたことを示している。

#### 【0046】

【図50】図50. 野生型、GFP形質導入NK-92またはNK45i-92NK細胞の細胞増殖曲線。NK-92細胞におけるCD45ノックダウン(KD)に起因する細胞増殖の効果を評価するために、NK-92( )、GFP形質導入NK-92( )およびNK45i-92( )を24ウェルプレートに播種してから48時間および96時間後に細胞数を計数した。IL-2は48時間時点に添加した。(n=3回の独立した重複実験を行った)。データは平均±S.Dである。これらのデータは、NK-92上のCD45受容体をノックダウンしても、非形質導入NK-92細胞またはGFP形質導入NK-92細胞と比べ同様の細胞増殖曲線を示すことを示した。24ウェルプレート、n=3回の独立した重複実験、IL-2は48時間時点に添加した。

#### 【0047】

【図51A】図51A-51B. CCRF-CEM(標的:T)およびGFP NK-92細胞またはGFP NK

10

20

30

40

50

45i-92細胞（エフェクター：E）、5：1（E：T）比率による共培養アッセイ。16時間のインキュベーション。（51A）フローサイトメトリーによる分析、CCRF-CEMのみ培養（左パネルの青色のドット）、CCRF-CEMおよびコントロールGFP形質導入NK-92細胞（中央パネル）またはGFP NK45i-92細胞（右パネル）を共培養した。全パネル中の青色の点は、残存する標的CCRF-CEM細胞を示し、赤色のドットは共培養アッセイにおけるエフェクター細胞を示す。全てのインキュベーションタイムは16時間であり、エフェクターT細胞：標的細胞の比は5：1であった。全て重複実験で行った。

【図51B】（51B）棒グラフは、GFP形質導入NK45i-92細胞による細胞溶解のパーセントを、CCRF-CEMとの共培養アッセイにおいてコントロールGFP形質導入NK92細胞との結果を比較して示している。これらのデータは、NK-92細胞におけるCD45のノックダウンは、GFP-コントロールNK-92細胞と比較して、CCRF-CEM細胞に対する殺傷活性に有意差を示さないことを示唆する。青いドットは左上画分にあります。  
10

#### 【0048】

【図52A】図52A-52B. CCRF-CEM（標的：T）およびGFP NK-92、CD5CAR NK-92またはCD5CAR NK45i-92細胞（エフェクター：E）と5：1（E：T）の比および16時間のインキュベーションでの共培養アッセイ。（52A）右から左に向かって、CCRF-CEMのみ（左パネル）およびコントロールGFP NK-92細胞（左中央パネル）、CD5CAR NK-92細胞（右中央パネル）、CD5CAR NK45i。全てのパネル中の青色の点は、残存する標的CCRF-CEM細胞を示し、赤色のドットは共培養アッセイでのエフェクター細胞を示す。すべてインキュベーション時間は16時間であり、エフェクターT細胞：標的細胞の比は5：1であった。全て重複実験で行った。  
20

【図52B】（52B）棒グラフは、CCRF-CEMとの共培養アッセイにおけるコントロールGFP NK92細胞と比較した、CD5CAR NK-92細胞またはCD5CAR NK45i-92細胞による細胞溶解率を示す。データは平均±S.Dである。CD5CAR NK細胞およびCD5CAR NK45i-92細胞の両方は、コントロールGFP NK-92細胞と比較して、CD5陽性CCRF-CEMに対して100%近い細胞殺傷活性を示す。これらのデータは、CD5CAR NK細胞およびCD5CAR NK45i-92細胞が、GFPコントロールNK-92細胞と比較してCD5を発現するCCRF-CEM細胞をin vitro共培養アッセイで効果的に溶解することができ、CD45のノックダウンがNK-92細胞における殺傷活性への細胞機能に対し影響を及ぼさないことを示す。  
30

#### 【0049】

【図53A】図53A-53B. CD45CARの構造の構成およびその発現。（53A）CD45CARレンチウイルスベクターの模式図。CD45CAR構成は、リーダー配列、抗CD45scFv、ヒンジドメイン（H）、膜貫通ドメイン（TM）、2つの共刺激ドメイン（CD28および4-1BB）を含むモジュール化されたシグナル伝達ドメインであり、第3世代CARと定義され、細胞内シグナル伝達ドメインCD3ゼータを含む。  
30

【図53B】（53B）HEK-293FT細胞にGFP（レーン1）およびCD45CAR（レーン2）のレンチウイルスプラスミドをトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、上清を除去し、細胞を回収した。細胞をウエスタンプロット用に溶解し、マウス抗ヒトCD3z抗体で調べた。

#### 【0050】

【図54】図54. NK45i-92細胞へのCD45CARの形質導入およびCD45CAR形質導入細胞の選別。フローサイトメトリー分析によって、CD45CARレンチウイルスをNK45i-92細胞に形質導入した後、NK45i-92上のCD45CARの発現レベル（右パネルでの青丸で囲まれている領域）をNK45i-92細胞（左パネル）と比較検討した。CD45CAR発現NK45i-92細胞を選別し、細胞表面上のCD45発現レベルをフローサイトメトリー分析により測定した。細胞表面上に約87%のCD45CAR発現していることがフローサイトメトリー分析によつて検出された。  
40

#### 【0051】

【図55A】図55A-55B. CCRF-CEM（標的：T）およびGFP NK-92またはCD45CAR NK45i-92細胞（エフェクター：E）と5：1（E：T）比で、16時間のインキュベーション

10

20

30

40

50

の共培養アッセイ。(55A) CCRF-CEMおよびコントロールのGFP形質導入NK-92細胞(左パネル)またはCD45CAR NK45i-92細胞(右パネル)との共培養におけるフローサイトメトリー分析。全てのパネル中の青い点は、残存標的CCRF-CEM細胞を示し、赤色のドットは共培養アッセイにおけるエフェクターNK-92細胞を示す。すべてのインキュベーションタイムはすべて16時間であり、エフェクターT細胞：標的細胞の比率は5：1である。全て重複実験で行った。

【図55B】(55B) 棒グラフは、CCRF-CEMとの共培養アッセイにおけるCD45CAR NK45i-92細胞による細胞溶解率を、コントロールGFP NK92細胞との結果で比較して示している。データは平均±S.Dである。CD45CAR NK45i-92細胞は、コントロールGFP NK-92細胞と比較して、CCRF-CEM細胞に対して約70%の細胞溶解度を示す。これらのデータは、CD45CAR NK45i-92細胞がGFP-コントロールNK-92細胞と比較してCD45を発現するCCRF-CEM細胞をin vitro共培養アッセイで効果的に溶解することを示唆している。

#### 【0052】

【図56A】図56A-56C. Jurkat細胞(標的:T)およびGFP-コントロールまたはCD45CAR NK45i-92細胞(エフェクター:E)を5:1または2:1(E:T)比で6時間のインキュベーションした共培養アッセイ。(56A) Jurkat細胞をCMTMR細胞トラッカー色素で染色した後、フローサイトメトリー解析を行った。これらのデータは、Jurkat細胞がCD45陽性(左パネル)であり、かつ、ほぼCD56陰性細胞(右パネル)であることを示す。

【図56B】(56B) Jurkat細胞(標的:T)およびコントロールまたはCD45CAR NK45i-92細胞(エフェクター:E)を用いた共培養アッセイでのフローサイトメトリーによる解析。共培養アッセイの比率は、5:1または2:1(E:T)で行った。左パネルは、コントロールGFPまたはCD45CAR NK45i-92細胞と5:1(E:T)比の共培養において、右のパネルは、コントロールGFPまたはCD45CAR NK45i-92細胞との2:1(E:T)比率の結果である。パネル中の青い点は、共培養アッセイ後の、残りの標的Jurkat細胞を示し、赤色の点は、共培養アッセイでのエフェクター細胞を示す。すべてのインキュベーションタイムは6時間であった。全て重複実験で行った。

【図56C】(56C) 棒グラフは、5:1または2:1(E:T)比率におけるコントロールGFP NK92細胞と比較したCD45CAR NK45i-92細胞による細胞溶解率を示す。データは平均±S.Dである。CD45CAR NK45i-92細胞は、コントロールGFP NK-92細胞と比較して、Jurkat細胞に対して約60%の細胞溶解率を、両条件において示す。このデータは、CD45CAR NK45i-92細胞が、GFPコントロールNK-92細胞と比較して細胞表面上のCD45を発現するJurkat細胞をin vitro共培養アッセイで効果的に溶解することを示唆している。

#### 【0053】

【図57A】図57A-57C. GFP-NK-92細胞(標的:T)および非形質導入NK-92細胞またはCD45CAR NK45i-92細胞(エフェクター:E)と5:1または2:1(E:T)比率で6時間のインキュベーションでの共培養アッセイ。(57A) GFPコントロールNK-92細胞を用いたフローサイトメトリー解析。これらのデータは、GFPコントロールNK-92細胞の約99%がGFP陽性細胞(緑色の点)であることを証明している。

【図57B】(57B) GFPコントロールNK-92細胞(標的:T)および非形質導入の、あるいはCD45CAR NK45i-92細胞(エフェクター:E)を用いた共培養アッセイにおけるフローサイトメトリー解析。共培養アッセイの比は、5:1(57A)または2:1(E:T)(57C)で行った。左パネルは、非形質導入またはCD45CAR NK45i-92細胞と5:1(E:T)比率での共培養において、右パネルは非形質導入またはCD45CAR NK45i-92細胞との2:1(E:T)比率での共培養を示している。パネル中の緑色の点は、共培養アッセイによって残存した標的GFP NK-92細胞を示し、赤色のドットは共培養アッセイ後のエフェクター細胞を示す。すべてのインキュベーション時間は6時間であった。全て重複実験で行った。

【図57C】(57C) 棒グラフは、5:1または2:1(E:T)比率での非形質導入NK-92細胞と比較した、CD45CAR NK45i-92細胞によるGFP NK-92細胞の細胞溶解率を示す。データは平均±S.Dである。CD45CAR NK45i-92細胞は、非形質導入NK-92細胞と比較して、GFP NK-92細胞に対して2:1(E:T)比率で約20%の、5:1(E:T)比で約55

10

20

30

40

50

%のGFP 92細胞を溶解することを示した。このデータは、CD45CAR NK45i-92細胞が、非形質導入NK-92細胞と比較して細胞表面上のCD45を発現するGFP NK-92細胞をin vitro共培養アッセイで効果的に溶解することを示唆する。

【図57D】図57D. CD45b-BBまたはCD45b-28のNK45i-92細胞への形質導入およびCD45b-BBまたはCD45b-28 NK45i-92形質導入細胞の選別。CDB-BBの共刺激ドメインは4-1BBであり、CD45b-28の共刺激ドメインはCD28である。CD45b-BBまたはCD45b-28レンチウイルスをNK45i-92細胞に形質導入した後、NK45i-92上のCD45b-BB CARまたはCD45b-28 CARの発現レベル（中間パネルで、青で囲まれた領域）をNK45i-92細胞（左パネル）と比較してフローサイトメトリー分析で検討した。CD45b-BBまたはCD45b-28 CARを発現するNK45i-92細胞を選別し、CD45b-BBまたはCD45b-28の細胞上の発現レベルをフローサイトメトリー分析によって決定した。フローサイトメトリー解析により、細胞表面上に約74%のCD45b-BB CARまたは約82%のCD45b-28 CARが発現していることが検出された。  
10

【図57E】図57E. REH細胞（標的：T）およびGFP NK-92細胞、CD45CAR NK45i-92細胞、CD45b-BB NK45i-92細胞またはCD45b-28 NK45i-92細胞（エフェクター：E）と。5:1（E:T）比率で20時間のインキュベーションでの共培養アッセイ。上部はREH細胞のみ（左パネル）、REH細胞およびコントロールGFP形質導入NK-92細胞（第2左パネル）、CD45CAR NK45i-92細胞（中央パネル）、CD45b-BB NK45i-92細胞（左パネルから4番目）またはCD45b-28 NK45i-92細胞（右パネル）らの共培養でのフローサイトメトリーによる解析。全パネル中の青い点は、共培養アッセイ後の残存した標的REH細胞を示し、赤色のドットは、共培養アッセイ後のエフェクターGFPまたはCARs-NK-92細胞を示す。インキュベーションタイムはすべて20時間であり、エフェクターNK細胞：標的細胞の比率は5:1である。全て重複実験で行った。下の棒グラフは、REH細胞との共培養アッセイにおけるコントロールGFP NK92細胞と比較した、CD45CAR NK45i-92細胞、CD45b-BB NK45i-92細胞またはCD45b-28 NK45i-92細胞による細胞溶解率を示す。データは平均±S.Dである。コントロールGFP NK-92細胞と比較してCD45CAR NK45i-92細胞は約76%の細胞を溶解し、CD45b-BB NK45i-92細胞は約79%の細胞溶解度を示し、CD45b-28 NK45i-92細胞はREH細胞に対して100%細胞溶解を示す。これらのデータは、GFPコントロールNK92細胞と比較し3つの全てのCD45CARsがCD45を発現するB細胞とみなすREH細胞をインビトロ共培養アッセイにおいて効果的に溶解することを示唆している。  
20  
30

【図57FA】図57FA-57FI. U937細胞（標的：T）およびGFP NK-92細胞またはCD45b-28 NK45i-92細胞と2:1（E:T）比率、20時間での共培養アッセイ。FA、U937細胞（単球白血病細胞株）のみ（左パネル）、U937細胞およびコントロールGFP形質導入NK-92細胞（中央パネル）またはCD45b-28 NK45i-92細胞（右パネル）との共培養におけるフローサイトメトリー分析。全パネル中の青い点は、残存標的U937細胞を示し、赤色ドットは、共培養アッセイにおけるエフェクターであるGFPまたはCD45b-28 NK45i-92細胞を示す。インキュベーション時間はすべて6時間であり、エフェクターNK細胞：標的細胞の比率は2:1であった。

【図57FB】FB、棒グラフは、U937細胞との共培養アッセイにおけるCD45b-28 NK45i-92細胞による細胞溶解のパーセントを、コントロールGFP NK92細胞と比較して示す。CD45b-28 NK45i-92は、コントロールGFP NK-92細胞と比較して、U937細胞に対する約81%の細胞溶解を示す。  
40

【図57GA】図57GA-57GB. MOLM-13細胞（標的：T）およびGFP NK-92細胞またはCD45b-28 NK45i-92細胞を5:1（E:T）比で20時間での共培養アッセイ。GA、MOLM13細胞（単球白血病細胞株）のみ（左パネル）、Molm13細胞およびコントロールGFP形質導入NK-92細胞（中央パネル）またはCD45b-28 NK45i-92細胞（右パネル）との共培養におけるフローサイトメトリー分析。全てのパネル中の青い点は、残存標的MOLM13細胞を示し、赤色ドットは共培養アッセイによるエフェクターであるGFPまたはCD45b-28 NK45i-92細胞を示す。インキュベーション時間はすべて20時間であり、エフ  
50

エクターNK細胞：標的細胞の比率は5：1である。

【図57GB】GB、棒グラフは、MOLM13細胞との共培養アッセイにおけるCD45b-28 NK45i-92細胞による細胞溶解のパーセントを、コントロールGFP NK92細胞と比較して示す。 CD45b-28 NK45i-92は、コントロールGFP NK-92細胞と比較して、Molm13細胞に対する約91.6%の細胞溶解を示す。

【図57HA】図57HA-57HB. Jeko-1細胞（標的：T）およびGFP NK-92細胞またはCD45b-28 NK45i-92細胞を2：1（E：T）比で6時間での共培養アッセイ。 HA、Jeko-1細胞（T細胞急性リンパ球性細胞株）のみ（左パネル）、Jeko-1細胞およびコントロールGFP形質導入NK-92細胞（中央パネル）またはCD45b-28 NK45i-92細胞（右パネル）と共に培養したのフローサイトメトリー分析。全てのパネルの青い点は、残存標的Jeko-1細胞を示し、赤色の点は、共培養アッセイでのエフェクターであるGFPまたはCD45b-28 NK45i-92細胞を示す。インキュベーション時間は6時間であり、エフェクターNK細胞：標的細胞の比は2：1であった。

【図57HB】HB、棒グラフは、Jeko-1細胞との共培養アッセイにおけるCD45b-28 NK45i-92細胞による細胞溶解のパーセントを、コントロールGFP NK92細胞と比較して示す。 CD45b-28 NK45i-92は、コントロールGFP NK-92細胞と比較して、Jeko-1細胞に対する約44.6%の細胞溶解を示す。

【図57IA】図57IA-57IB. SP53細胞（標的：T）およびGFP NK-92細胞またはCD45b-28 NK45i-92細胞を2：1（E：T）比で6時間インキュベートする共培養アッセイ。 IA、SP53細胞（マントル細胞リンパ腫細胞株）のみ（左パネル）、Jeko-1細胞およびコントロールGFP形質導入NK-92細胞（中央パネル）またはCD45b-28 NK45i-92細胞と共に培養したフローサイトメトリー分析。全パネル中の青い点は、残存標的SP53細胞を示し、赤色のドットは、共培養アッセイによるエフェクターであるGFPまたはCD45b-28 NK45i-92細胞を示す。インキュベーション時間は6時間であり、エフェクターNK細胞：標的細胞の比は2：1であった。

【図57IB】IB、棒グラフは、SP53細胞との共培養アッセイにおいてCD45b-28 NK45i-92細胞による細胞溶解のパーセントを、コントロールGFP NK92細胞と比較して示す。 CD45b-28 NK45i-92は、コントロールGFP NK-92細胞と比較して、SP53細胞に対する約45%の細胞溶解を示す。

【図57J】図57J. 48時間の共培養におけるCD34(+) 脘帯血幹細胞の消失。ヒト臍帯血に由来するCD34(+) 幹細胞を、コントロールまたはCD45b-28 CAR NK細胞のいずれかと48時間、2：1の低比率（エフェクター：標的）で標識する前に共培養した。 CD34(+) 細胞の約96%がコントロールと比較して淘汰された。

#### 【0054】

【図58A】図58A. P2Aによって結びついている図はcCAR-Tおよび4-1BBLまたはIL-15 / IL-15sushiの両方が単一構造であることを示す。コンストラクトは、CARおよびエンハンサーである4-1BBLの発現を促進するSFFVプロモーターをもつ。リンカーが開裂されると、CD45 CAR（またはCD45b CAR）および4-1BBLまたはIL-15 / IL-15sushiが分裂し、CD45を発現する標的に関与する。 CD45 CAR T細胞は、CD28のみならず4-1BBリガンド（4-1BBLまたはCD137L）またはIL-15 / IL-15sushiを介した共刺激を受けた。 CD3-zetaシグナル伝達ドメインは、このCAR-Tのアセンブリを完了する。

【図58B】図58B. フローサイトメトリー分析による、CD45b-28-2G-4-1BBL CAR形質導入NK45i-92細胞上の表面CD45b CAR発現レベルの測定。左パネル（NK92細胞）および中央パネル（GFP-NK92）は、ネガティブコントロールであり、右パネルは、ScFv領域に対するヤギ抗マウスF（AB'）2-PEを用いて標識し、CD45b CARの細胞表面発現を示した（青色の曲線で囲まれている）。形質導入された細胞は、細胞表面上に86.99%のCD45b-CARを発現した。

【図58C】図58C. フローサイトメトリー分析による、CD45b-28-2G-IL15 / IL-15sushi CAR形質導入NK45i-92細胞上の表面CD45b CAR発現レベルを測定。左パネル（NK92細胞）および中央パネル（GFP-NK92）はネガティブコントロールを示し、右および

10

20

30

40

50

右パネルは、ScFv領域に対するヤギ抗マウスF(AB')2-PEを用いて標識したCD45b CARの表面発現を示した(青色の曲線で囲まれている)。CD45b-28-2G IL15RAウイルス形質導入細胞は、ネガティブコントロールと比較して細胞表面上にCD45b-CARの55.96%を発現した。

#### 【0055】

【図59A】図59A-59B. TまたはNK細胞におけるコンストラクトおよびその発現を説明するための模式図。(59A) CAR(第3世代)およびIL-15アルファ受容体であるIL-15/sushiドメインの組合せは、発現ベクター上にあり、それらの発現はSFFVプロモーターによって誘導される。IL-15/sushiを含むCARは、P2A自己切断配列と結びついている。IL-15/sushi部分は、IL-2シグナルペプチドがIL-15に融合された部位と構成され、26アミノ酸ポリ-プロリンリンカーを介してsushiドメインと連結されたる。

10

【図59B】(59B) CARおよびIL-15/sushiは、TまたはNK細胞上に存在する。

【図59C】図59C. フローサイトメトリー分析を用いて、CD45b-28-2G-IL-15 / IL-15sushi CAR形質導入NK45i-92細胞上の表面CD45b CAR発現レベルを測定した。左パネル(NK92細胞)および中央パネル(GFP-NK92)はネガティブコントロールであり、右および右パネルは、ScFv領域に対するヤギ抗マウスF(AB')2-PEを用いて標識したCD45b CARの表面発現を示した(青色の曲線で囲まれている)。CD45b-28-2G-IL-15 / IL-15sushiウイルス形質導入細胞は、ネガティブコントロール細胞と比較して、細胞表面上にCD45b-CARの55.96%を発現した。CD45b-28-2G-IL-15 / IL-15sushi NK細胞は強力な機能活性を示した。

20

#### 【0056】

【図60A】図60A-60B. CD4IL-15 / IL-15sushi発現。(60A) HEK-293FT細胞に、GFP(レーン1)およびCD4IL-15 / IL-15sushi CAR(レーン2)のレンチウイルスプラスミドをトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、上清を除去し、細胞をマウス抗ヒトCD3z抗体を用いたウェスタンプロットのために回収した。

【図60B】(60B)トランスフェクトされたHEK-293FT細胞由来のGFP(左)またはCD4IL-15 / IL-15sushi-CAR(右)ウイルス上清のいずれかでHEK-293細胞に形質導入した。3日間のインキュベーション後、細胞を採取し、ヤギ抗マウスF(AB')2で染色し、フローサイトメトリーで分析した。

30

#### 【0057】

【図61】図61. CD4IL-15 / IL-15sus CARのNK細胞への形質導入。トランスフェクトされたHEK-293FT細胞由来のGFP(左)またはCD4IL-15 / IL-15sushi CAR(右)ウイルス上清のいずれかでNK-92細胞に形質導入した。2回目の形質導入は、最初の形質導入の24時間後に行った。2回目の形質導入の24時間後、細胞を採取し、洗浄し、新鮮な培地およびIL-2を含む組織培養プレートに移した。3日間のインキュベーション後、細胞を採取し、ヤギ抗マウスF(AB')2抗体またはヤギIgG(コントロール)を用いて1:250希釈で30分間染色した。細胞を洗浄し、ストレプトアビジン-PEコンジュゲートで1:500で染色し、洗浄し、2%ホルマリンで懸濁し、フローサイトメトリーで分析した。

【図62】図62. CD4IL15RACARのT細胞への形質導入。左はウェスタンプロットの結果です。HEK-293FT細胞に、GFP(レーン1)およびCD4IL15RA-CAR(レーン2)のレンチウイルスプラスミドをトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、上清を除去し、マウス抗ヒトCD3ゼータ抗体を用いたウェスタンプロットのために細胞を回収した。右はCD4IL15RACARの発現を示している。臍帯血バフィーコート由来の活性化したT細胞に、トランスフェクトされたHEK-293FT細胞由来のGFP(左)または濃縮CD4IL15RACAR(右)ウイルス上清のいずれかで形質導入した。2回目の形質導入は、最初の形質導入24時間後に行った。2回目の形質導入の24時間後、細胞を回収し、洗浄し、新鮮な培地およびIL-2を含む組織培養プレートに移した。3日間のインキュベーション後、GFP(左)またはCD4IL15RA CAR(右)のいずれかを形質導入した細胞を回収し、ヤギ抗マウスF(AB')で染色した。細胞を洗浄し、ストレプトアビジン-PEコンジュゲートで1:500の希釈率で染色し、洗浄し、2%ホルマリンで懸濁し、フローサイトメトリーで分

40

50

析した。

**【 0 0 5 8 】**

【図 6 3 A】図63A-63B. CD4CAR NK-92細胞およびCD4IL-15 / IL-15sushi CAR NK-92細胞は、共培養においてKARPAS 299 T白血病細胞を殺傷する。(63A) GFPコントロール(右上)、CD4CAR(左下)、またはCD4IL-15 / IL-15sushi(右下)レンチウイルス上清のいずれかを形質導入したNK-92細胞を、5 : 1の比でKARPAS 299細胞と共にインキュベートした。4時間の共培養後、細胞をマウス抗ヒトCD4(APC)およびCD3(PerCp)抗体で染色し、フローサイトメトリーで分析した(N = 2)。

【図 6 3 B】左上のパネルは、ラベルされたKarpas 299細胞のみを示す。溶解した標的細胞のパーセンテージをグラフに示す(63B)。

**【 0 0 5 9 】**

【図 6 4】図64. CD4CAR NK-92細胞およびCD4IL-15 / IL-15sushi CAR NK-92細胞は、共培養においてMOLT4 T白血病細胞を殺傷する。GFPコントロール(左)、CD4CAR(中央)、またはCD4IL-15 / IL-15sushi(右から2番目)レンチウイルス上清のいずれかで形質導入されたNK-92細胞を、MOLT4細胞とエフェクター：標的を1 : 1または2 : 1の比率でインキュベートした。一晩の共培養後、細胞をマウス抗ヒトCD4(APC)およびCD56(PerCp)抗体で染色し、フローサイトメトリーで分析した(N = 2)。右上のパネルは、標識MOLT4細胞のみを示す。標的細胞の溶解率をグラフに示す。

**【 0 0 6 0 】**

【図 6 5 A】図65Aと65B. CD4CARおよびCD4IL-15 / IL-15sushi CAR T細胞は、インビボで抗白血病効果を示す。NSGマウスを致死量以下で照射し、測定可能な腫瘍形成を誘導する為、翌日に静脈内(尾静脈)にルシフェラーゼ発現MOLM13細胞を注射した(65A)。MOLM-13細胞はほぼ100% CD4+である。

【図 6 5 B】3日後、マウスに1コースの $8 \times 10^6$  CD4CAR、またはCD4IL-15 / IL-15sushi CAR T細胞またはベクターコントロールT細胞を静脈注射した。3、6、9、および11日目に、マウスにRediJect D-Luciferinを皮下注射し、IVISイメージングにより解析した(65B)。

【図 6 5 C】図65Cと65D. (65C) ベクターコントロールT細胞を注射したマウスとCD4CARおよびCD4IL-15/IL-15sushi T細胞を注射マウスについて測定した平均光強度と比較し、溶解率を決定するため、残りの腫瘍負荷と関連させた。

【図 6 5 D】(65D) マウスの生存率を測定し、3つのグループ間で比較した。

**【 0 0 6 1 】**

【図 6 6 A - D】図66Aと66B. CD4IL15 / IL-15sushi CAR NK細胞は、インビボでのストレス条件下において強力な抗白血病活性を示す。NSGマウスを致死量以下で照射し、測定可能な腫瘍形成を誘導する為に、翌日、ルシフェラーゼ発現Jurkat細胞をNSGマウスに静脈内(尾静脈)注射した(66A)。ジャーカット細胞のCD4+は60%未満である。3日後、マウスに、1コース、 $8 \times 10^6$  のCD4CAR、またはCD4IL-15 / IL-15sushi CAR NK細胞、あるいはベクターコントロールNK細胞を静脈注射した。3、7、10、および14日目に、マウスにRediJect D-Luciferinを皮下注射し、IVISイメージングにより解析した(66B)。図66C. ベクターコントロールNK注射マウスとCD4CARおよびCD4IL-15 / IL-15sushi NK注射マウスでの平均光強度と比較し、溶解率を決定するため、残りの腫瘍負荷と関連させた。

**【 0 0 6 2 】**

【図 6 7 A - B】図67. 図66に記載したものと同様の結果を示すCD4I-15 / IL-15sushi CAR NK細胞によるJurkat腫瘍細胞の強力な溶解を実証するin vivoでの繰り返実験。

**【 0 0 6 3 】**

【図 6 8 A】図68A-68B. 分泌されたIL-15 / IL-15sushiのCARおよび隣接する非形質導入細胞への影響。CD4CARまたはCD4IL15RAのいずれかを安定に発現するNK-92細胞を、GFPを安定に発現するNK-92細胞と50:50の比率で混合した。これらの細胞を、IL-2を添加したものまたはIL-2を添加しなかったものと共に培養した。(68A) IL-2を添加しない

10

20

30

40

50

で0日目（共培養の開始）および7日目に20倍率で蛍光顕微鏡で撮影した写真。

【図68B】(68B) IL-2の共存下または非存在下で共培養したNK-92細胞において、実験全体を通して計算した全細胞数（14日目まで）。

【0064】

【図69】図69. NK-92細胞増殖に対する分泌IL-15およびIL-15sushiの効果の比較。CD4IL-15 / IL-15sushi、CD4 IL-15、およびコントロール形質導入NK-92細胞を、通常のNK細胞培地内で250,000細胞からIL-2の非存在下で6日間培養した。形質導入された両方の細胞は表面CAR発現が10%であったが、CD4IL15-IL15sushi形質導入NK-92細胞は、6日目にCD4 IL-15で形質導入したNK-92細胞よりも約3倍高く増殖することができた。CD4 IL-15により形質導入されたNK-92細胞の増殖は、コントロールよりもわずかに高かったが、CD4 IL-15 / IL15sushiにより形質導入されたNK-92細胞より有意に低かった。この研究は、NK-92細胞増殖の促進におけるIL-15 / IL-15sushiの共発現機能複合体の重要性を暗示している。10

【図70】図70. Tregを標的とするTreg CAR Tコンストラクトを示す模式図。構成は、P2Aペプチドによって連結された2つのユニットのキメラ抗原レセプターの発現を誘導するSFFVプロモーターからなる。各ユニットは、CD45リーダーペプチド配列（シグナルペプチド）を含む。リンカーが開裂すると、2単位のペプチドが分けられ、CD4およびCD25を発現する標的に関与する。CD4キメラ抗原レセプターポリペプチド単位は、シグナルペプチド、CD4抗原認識ドメイン、ヒンジ領域、膜貫通ドメインおよびCD3ゼータ鎖を含む。CD25キメラ抗原レセプターポリペプチド単位は、シグナルペプチド、CD25抗原認識ドメイン、ヒンジ領域、膜貫通ドメイン、共刺激ドメイン（単数または複数）を含む。Treg CARは、CD4またはCD25抗原を有する細胞を最小限に抑えながら、CD4およびCD25を共発現する細胞の溶解活性を増強することができる。20

【0065】

【図71A】図71A-71B. CD4ゼータCD25 CARの特性評価。(71A) CD4ゼータCD25 CARは、48時間に及ぶウイルスインキュベーションを介してT細胞に形質導入され、F(ab)'抗体で染色されてCAR表面発現をアッセイした。線で囲まれた集団は、形質導入された細胞を表す。

【図71B】(71B) C4-25z CARは、構造機能を検証するためにCD4およびCD25抗体を用いて特性を評価した。最も関連性の高い2つの集団、すなわちCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>およびCD4<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>が囲まれている。二重陽性集団および他の表現型のグループの消失は、そばの棒グラフに要約される。30

【0066】

【図72】図72. CD4zetaCD25 CAR T細胞は、主にCD4およびCD25を同時発現する細胞を標的とする。PMBCバフィコートT細胞を活性化し3日後、コントロールベクター（左）、CD4CAR（中央）またはCD4ゼータCD25（右）レンチウイルス上清のいずれかを形質導入し、その後、T細胞を採取し、マウス抗ヒトCD25-PEおよびマウス抗ヒトCD4-APC 30分間インキュベートした。細胞を洗浄し、2%ホルマリン中に懸濁させ、フローサイトメトリーにより分析した。

【0067】

【図73A】図73A. CD5-52の構成を示す略図。コンストラクトは、CD5CARおよびCD52表面抗原の共発現を促進するSFFVプロモーターからなる。P2Aのリンカーの開裂による。CD5キメラ抗原レセプターポリペプチド単位は、シグナルペプチド、CD5抗原認識ドメイン、ヒンジ領域、膜貫通ドメイン、CD3ゼータ鎖の共刺激ドメインからなる。CD5ペプチドは、シグナルペプチド、CD52抗原認識ドメイン、ヒンジ領域、膜貫通ドメイン（CD28由来）からなる。40

【図73B】図73B. 血液中のCD5CAR-52T細胞の消失を判定するための実験計画。NSGマウスを致死量以下で照射し、CD5CAR-52T細胞（ $5 \times 10^6$ 細胞）を、各マウスに静脈内注射した。約24時間後、PBSまたは0.1mg / kgのCAMPATHをI.Pで投与（腹腔内注射）。N = 3である。6時間後および24時間後、末梢血を各マウスから収集し、CD3およびC

D45の抗体を用いて標識して、CAMPATH処置による急性期応答として、CAR-T細胞の消失を判定した。5日後、各マウスから全血を採取し、CAR-T細胞の持続性を判定するためにCD3およびCD45抗体を用いて標識した。フローサイトメトリー分析を用いてCAR-T細胞を測定した。

【図73C】図73C. CAMPATH処理の有無による、6時間後および24時間後の末梢血中のCD5CAR-52Tの消失。フローサイトメトリー分析は、CAMPATH処理の有無による、マウスの末梢血におけるCD5CAR-52T細胞（青色のドット）の持続性を示す。血液試料をCD3およびCD45の抗体で標識して、CD5CAR-52T細胞を検出した。CAR-T細胞の未注入（左パネル）での血液サンプルは、CD3およびCD45陽性細胞を示さなかった（ネガティブコントロール）。0.1mg / kgのCAMPATHを注射したマウスは、6時間（左から2番目のパネル）および24時間（右から2番目のパネル）後のCAMPATH未処置マウスと比較して、6時間（中央のパネル）および24時間（右のパネル）後で血液中からCD5CAR-52T細胞が消失した。N = 3である。これらの結果は、CAMPATH処置が短時間の間に血液からCAR-T細胞を除去できることを示唆している。10

【図73D】図73D. CAMPATH処理の有無による5日後の、全血におけるCD5CAR-52Tの消失。フローサイトメトリー分析は、CAMPATH処理の有無による、マウスの全血サンプルにおけるCD5CAR-52T細胞（青色のドット）の持続性を示す。血液試料をCD3およびCD45の抗体で標識して、CD5CAR-52T細胞の持続性を検出した。CAR-T細胞の未注入（左パネル）からの血液サンプルはCD3およびCD45陽性細胞を示さなかった（ネガティブコントロール）。0.1mg / kgのCAMPATH処理マウスは、5日後の全血試料中においてCAMPATH非注射マウス（中央パネル）と比較して、CD5CAR-52T細胞が消失した（右パネル）。これらの結果はまた、CAMPAT治療がCAR-T細胞を血液から除去できると仮定している。20

#### 【0068】

【図74】図74. それぞれ示された容量を用いて、HEK293細胞にEF1-GFPまたはSFFV-GFPウイルス上清のいずれかで、6ウェル組織培養プレートを用い、10%FBSを含むDME M中で形質導入した。培地は翌朝交換された。形質導入48時間後に細胞を10倍率でGFPによりEVOS蛍光顕微鏡で可視化した。

【図75】図75. 図74のデータに基づくEF1-GFPまたはSFFV-GFPウイルス上清のいずれかを形質導入したHEK293細胞をトリプシン処理し回収し、ホルマリン中に懸濁させ、FITCチャネルを用いたフローサイトメトリー分析によりGFP +細胞の割合を同定した。30

#### 【0069】

【図76A】図76A-76B. 低用量あるいは高容量のEF1-GFPまたはSFFV-GFPウイルス上清のいずれかを用い形質導入した活性化された臍帯血バフィーコートT細胞を培養、形質導入後7、14、21および28日後のGFP +細胞の割合を、細胞をホルマリン中に懸濁させ、FITCチャネルを用いてフローサイトメトリーにより解析した。（76A）低または高用量のウイルス上清のいずれかで形質導入された細胞についてのGFP + T細胞の割合。

【図76B】(76B) 高用量のEF1-GFP上清で形質導入されたGFP + T細胞の割合と少量のSFFV-GFP上清で形質導入されたT細胞におけるGFP +細胞のパーセントとの比較。（50 μLのSFFV-GFPおよび1mLのEF1-GFP上清を使用した）。（N=2）。40

#### 【0070】

【図77】図77.悪性形質細胞におけるリガンド受容体相互作用。APRILリガンドは、TA C1またはBCMAに結合する。BAFFリガンドは、TAC1、BCMA、またはBAFF-Rに結合する

【図78】図78. 分泌IL-15/IL-15sushiを共発現するCARによる腫瘍の殺傷のためのステップ。I、腫瘍およびその微小環境。腫瘍微小環境において、マクロファージ、T細胞、樹状細胞およびNK細胞は、腫瘍に対する免疫応答細胞であり、それらは可溶性細胞外ドメインのIL-15RAと複合体を形成する低レベルの不安定な内在性IL-15を分泌する。この複合体はより安定な分子を形成し、免疫細胞の生存および増殖を大きく促進する。腫瘍微小環境において、癌細胞は、癌を含む特定の事象中に免疫系を抑制するのに主要な役割を果50

たすと考えられている膜貫通タンパク質であるプログラム細胞死リガンド-1 (PD-L1) を発現する。PD-L1は、活性化T細胞、B細胞、および骨髄細胞上に見いだされるその受容体PD-1に結合し、これらの細胞免疫活性を抑制する。II、CAR TまたはNK細胞は、腫瘍微小環境にエンハンサーを運ぶための担体であり得る。CAR TまたはNK細胞は、分泌型融合タンパク質であるIL-15/IL-15sushi 融合体を同時発現するように設計される。III、操作されたCAR TまたはNK細胞は、標的腫瘍細胞（サブセットまたはすべての細胞のいずれか）に結合する。IV、腫瘍微小環境におけるCAR TまたはNK細胞の癌細胞への標的化、CAR標的抗原への結合、および腫瘍細胞の溶解および増殖したCAR TまたはNK細胞から可溶性IL-15/IL-15sushi 融合の大量分泌の誘発。可溶性IL-15/IL-15sushi 融合物は安定であり、CAR T / NK細胞およびそれらの隣接腫瘍免疫応答細胞への予期せぬ強力な免疫調節として機能する。分泌されたIL-15/IL-15sushi タンパク質は、他のT細胞、樹状細胞、マクロファージおよびNK細胞の腫瘍微小環境への輸送に関与し、これは、1) CAR TまたはNK細胞が非標的化癌細胞を排除できないという欠陥を補うことによって腫瘍細胞を溶解する。2) CAR T / NK細胞の持続性および抗腫瘍活性を増強する。IL-15/IL-15sushi の過剰発現は、免疫応答を抑制するPD-L1能力を圧倒する。好ましくは、このCAR療法は、PD-L1、CTLA-4阻害剤を含むがこれに限定されないチェックポイント阻害剤の投与と相乗的に使用して、より有効性を増すことができる。

【図79】図79. B細胞から形質細胞への成長時の表面マーカーが示されている。BAFFおよびAPRILの両方が受容体、BCMAおよびTACIに結合する。BAFFはBAFF-R受容体にも結合する。

【図80】図80. IL-2シグナルペプチドの異なる種間でのタンパク質配列アライメント。

【図81】図81. BAFF細胞外ドメインの異なる種間でのタンパク質配列アライメント。

【発明を実施するための形態】

【0071】

#### 詳細な説明

本開示は、キメラ抗原受容体(CAR)構成、その作製方法および使用方法を提供する。

【0072】

キメラ抗原レセプター(CAR)ポリペプチドは、シグナルペプチド、抗原認識ドメイン、ヒンジ領域、膜貫通ドメイン、少なくとも1つの共刺激ドメイン、およびシグナル伝達ドメインを含む。

【0073】

第1世代CARは、細胞内シグナル伝達ドメインとしてCD3zを含むが、第2世代CARは、様々なタンパク質由来の少なくとも1つの單一共刺激ドメインを含む。共刺激ドメインの例には、CD28、CD2、4-1BB(CD137、あるいは「4-BB」とも呼ばれる)、およびOX-40(CD124)が含まれるが、これらに限定されない。第3世代のCARには、CD28、4-1BB、CD134(OX-40)、CD2および/またはCD137(4-1BB)などの2つの共刺激ドメインが含まれるが、これらに限定されない。

【0074】

本明細書で使用される場合、用語「ペプチド」、「ポリペプチド」および「タンパク質」は交互に使用され、ペプチド結合によって共有結合したアミノ酸残基を有する化合物を指す。タンパク質またはペプチドは、少なくとも2つのアミノ酸を含有しなければならず、タンパク質またはペプチドの配列とすることができますアミノ酸の最大数に制限はない。ポリペプチドは、ペプチド結合によって互いに結合された2つ以上のアミノ酸を有する任意のペプチドまたはタンパク質を含む。本明細書中で使用される場合、短鎖、一般に当該技術分野では例えばペプチド、オリゴペプチド、およびオリゴマーとも言及されており、そして長鎖、一般に当該技術分野ではタンパク質と呼ばれ、それには多くの種類が存在する、これら両者について言及する。「ポリペプチド」には、例えば、とりわけ、生物学的に活性なフラグメント、実質的に相同なポリペプチド、オリゴペプチド、ホモダイマー、ヘテロダイマー、ポリペプチドの改変体、改変ポリペプチド、誘導体、類似体、融合

10

20

30

40

50

タンパク質が含まれる。ポリペプチドには、天然ペプチド、組換えペプチド、合成ペプチド、またはそれらの組み合わせが含まれる。

#### 【 0 0 7 5 】

「シグナルペプチド」は、輸送および局在化を指向するペプチド配列、そしてある細胞オルガネラ（小胞体など）および/または細胞表面に結合することができるいかなるペプチドを含むペプチド配列。本明細書において、「シグナルペプチド」および「リーダー配列」は互換的に使用される。

#### 【 0 0 7 6 】

シグナルペプチドは、本開示において、細胞膜および細胞表面への輸送を指示し、正確な局在を提供する、如何なる分泌タンパク質または膜貫通タンパク質のペプチド、ポリペプチドである。特に、本開示のシグナルペプチドは、本開示における細胞膜へ指示する本開示のポリペプチドであり、それらポリペプチドの細胞外部分が細胞表面に提示され、膜貫通部分が原形質膜に及んでおり、活性ドメインが細胞質部分、または細胞の内部に存在する。

10

#### 【 0 0 7 7 】

この実施例では、シグナルペプチドは、小胞体（ER）を通過した後に切断される、すなわち切断可能なシグナルペプチドである。この実施例では、シグナルペプチドは、I型、II型、III型またはIV型のヒトタンパク質である。この実施例では、シグナルペプチドは、免疫グロブリン重鎖シグナルペプチドを含む。

#### 【 0 0 7 8 】

この実施例では、シグナルペプチドは、ヒトCD45（UniProtKB / Swiss-Protアクセッショ番号P08575）由来のシグナルペプチドを含む。CD45シグナルペプチドは、23アミノ酸長（MYLWLKLLAFIGFAFLDTEVFVTG）である。いくつかの実施例では、シグナルペプチドは、CD45シグナルペプチドの機能的断片であり得るかもしれない。機能的断片は、添付のポリペプチドが細胞膜および細胞表面に向けるCD45シグナルペプチドの少なくとも10アミノ酸の断片を含む。ヒトCD45シグナルペプチドの断片の例には、MYLWLKLLAFIG、FAFLDTEVFVTG、およびLKLLAFIGFAFLDTEが含まれる。

20

#### 【 0 0 7 9 】

ヒトCD45シグナルペプチドの機能的等価物もまた考えられる。本明細書中で使用される場合、「機能的等価物」は、前述の配列位置の少なくとも1つにおいて、具体的に言及された以外のアミノ酸置換を示すが、依然として野生型CD45シグナルペプチドに関して同一または類似の性質を示す突然変異がもたらされる突然変異体として理解される。機能的等価物には、ヒトCD45シグナルペプチド、その機能的フラグメント、またはその機能的同等物と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%の同一性を有するポリペプチドが含まれる。

30

#### 【 0 0 8 0 】

機能的等価物には、他の種由来の相同タンパク質由来のCD45シグナルペプチドも含まれる。これらのシグナルペプチドの例には、マウスCD45由来のシグナルペプチド（MGLWLKLLAFIGFALLDTEVFVTG）、ラットCD45由来のシグナルペプチド（MYLWLKLLAFSLALLGPEVFVTG）、ヒツジCD45由来のシグナルペプチド（MTMYLWLKLLAFIGFAFLDTAVSVAG）、チンパンジーCD45由来のシグナルペプチド（MYLWLKLLAFIGFAFLDTEVFVTG）、およびサルCD45由来のシグナルペプチド（MTMYLWLKLLAFIGFAFLDTEVFVAG）が含まれる。

40

#### 【 0 0 8 1 】

別の実施例では、シグナルペプチドは以下の配列が含まれる、MX<sup>1</sup>LWLKLLAF X<sup>2</sup> X<sup>3</sup>A X<sup>4</sup>L X<sup>5</sup>X<sup>6</sup>X<sup>7</sup>VX<sup>8</sup> VX<sup>9</sup>G、それらはX<sup>1</sup>、X<sup>2</sup>、X<sup>3</sup>、X<sup>4</sup>、X<sup>5</sup>、X<sup>6</sup>、X<sup>7</sup>、X<sup>8</sup>、そしてX<sup>9</sup>がそれぞれ独立してY、G、S、F、L、D、P、T、E、またはAである。この実施例ではX<sup>1</sup>はYまたはG、X<sup>2</sup>はGまたはS、X<sup>3</sup>とX<sup>4</sup>は独立してFまたはL、X<sup>5</sup>はDあるいはG、X<sup>6</sup>はPまたはT、X<sup>7</sup>はEまたはA、X<sup>8</sup>はFまたはS、そしてX<sup>9</sup>はAまたはT.

#### 【 0 0 8 2 】

50

この実施例では、シグナルペプチドは、ヒトCD8a由来のシグナルペプチド（MALP VTALLLPLALLLHAARP）を含む。いくつかの実施例において、シグナルペプチドは、CD8aシグナルペプチドの機能的断片であり得るかもしれない。機能的断片は、添付のポリペプチドが細胞膜および細胞表面に向けるCD8aシグナルペプチドの少なくとも10アミノ酸の断片を含む。ヒトCD8aシグナルペプチドの断片の例としては、MALPV TALLLALAHAA、MALPV TALLLP、PVTALLLPLALL、およびLLLPL ALLLHAARPが挙げられる。

#### 【0083】

別の実施例では、シグナルペプチドは、ヒトCD8b由来のシグナルペプチド（MRP RLWLLA AQLTVLHGNSV）を含む。いくつかの実施例では、シグナルペプチドは、CD8bシグナルペプチドの機能的断片であってもよい。機能的断片は、添付のポリペプチドを細胞膜および細胞表面に向けるCD8bシグナルペプチドの少なくとも10アミノ酸の断片を含む。ヒトCD8bシグナルペプチドのフラグメントの例には、MRP RLWLLA AQ、RLWL LLA AQLTVLHG、およびLWLLA AQLTVLHGNSVが含まれる。

10

#### 【0084】

ヒトCD8aまたはCD8bシグナルペプチドの機能的等価物もまた考えられる。本明細書中で使用される場合、「機能的等価物」は、前述の配列位置の少なくとも1つにおいて、具体的に言及された以外のアミノ酸置換を示すが、依然として野生型CD8aまたはCD8bシグナルペプチドに関して同一または類似の性質を示す突然変異がもたらされる突然変異体として理解される。機能的等価物には、ヒトCD8シグナルペプチド、その機能的フラグメント、またはその機能的同等物と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%の同一性を有するポリペプチドが含まれる。

20

#### 【0085】

機能的等価物には、他の種由来の相同タンパク質由来のCD8aおよびCD8bシグナルペプチドも含まれる。

#### 【0086】

この実施例では、シグナルペプチドは、ヒトIL-2由来のシグナルペプチドを含む。IL-2シグナルペプチドは23アミノ酸長（MYRMQLLSCIALS LALVTNS）である。いくつかの実施例では、シグナルペプチドは、IL-2シグナルペプチドの機能的断片であるかもしれない。機能的断片は、添付のポリペプチドを細胞膜および細胞表面に導くIL-2シグナルペプチドの少なくとも10アミノ酸の断片を含む。ヒトIL-2シグナルペプチドのフラグメントの例には、MYRMQLLSCIAL、QLLSCIALS LALおよびSCIALS LALVTNSが含まれる。

30

#### 【0087】

ヒトIL-2シグナルペプチドの機能的等価物もまた考えられる。本明細書中で使用される場合、「機能的等価物」は、前述の配列位置の少なくとも1つにおいて、具体的に言及された以外のアミノ酸置換を示すが、依然として野生型IL-2シグナルペプチドに関して同一または類似の性質を示す突然変異がもたらされる突然変異体として理解される。機能的等価物には、ヒトIL-2シグナルペプチド、その機能的フラグメント、またはその機能的同等物と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%の同一性を有するポリペプチドが含まれる。

40

#### 【0088】

機能的等価物には、他の種由来の相同タンパク質由来のIL-2シグナルペプチドも含まれる。たとえば、図80を参照する。

#### 【0089】

別の実施例では、シグナルペプチドは以下の配列が含まれる、 $MYX^1X^2QLX^3SCX^4X^5LX^6LX^7LX^8X^9X^{10}X^{11}$ 、それらは $X^1$ 、 $X^2$ 、 $X^3$ 、 $X^4$ 、 $X^5$ 、 $X^6$ 、 $X^7$ 、 $X^8$ 、 $X^9$ 、 $X^{10}$ 、そして $X^{11}$ がそれぞれ独立してR、K、S、M、I、V、L、A、I、T、N、SまたはGである。この実施例では $X^1$ はR、KまたはS、 $X^2$ はM、IまたはV、 $X^3$ はLあるいはA、 $X^4$ と $X^5$ は独立してI、A、VまたはT、 $X^6$ はSあるいはT、 $X^7$ はAまたはV、 $X^8$ 、 $X^9$ 、 $X^{10}$ そして $X^{11}$ は独立してV、L、T、A、N、S、またはGである。

50

## 【0090】

「抗原認識ドメイン」には、標的の抗原、受容体、ペプチドリガンド、またはタンパク質リガンドに選択的であるかまたは標的とするポリペプチドに選択的なポリペプチドが含まれる。

## 【0091】

抗原認識ドメインは、リガンド結合および/またはシグナル伝達に関連する、如何なる多種多様な細胞外ドメインまたは分泌タンパク質のいずれかから得ることができる。抗原認識ドメインは、Ig軽鎖の一部と結合したIg重鎖の一部を含み、標的抗原に特異的に結合する一本鎖断片可変(scFv)として構成し得る。抗体は、モノクローナルまたはポリクローナル抗体であってもよく、または標的抗原に特異的に結合する任意のタイプであつてもよい。別の実施例において、抗原認識ドメインは、受容体またはリガンドでもあり得る。特定の実施例では、標的抗原は特定の疾患状態に特異的であり、疾患状態とは、compound CAR構造上の少なくとも1つのキメラ受容体構造によって認識され得るどんな種類の細胞表面抗原かもしれない。特定の実施例では、キメラ受容体は、特定のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体が存在するか、または作製することができる、如何なる癌に関するものであり得る。特に、神経芽腫、肺小細胞癌、メラノーマ、卵巣癌、腎細胞癌、結腸癌、ホジキンリンパ腫および小児急性リンパ芽球性白血病などの癌は、キメラ受容体に特異的な抗原を有する。

10

## 【0092】

いくつかの実施例では、抗原認識ドメインは、限定されるものではないが、高親和性で様々な特異的標的に結合するように操作できる非抗体タンパク質スカフォールド、例えばセンチリンのような、非抗体タンパク質スカフォールドであり得る。センチリンはヒトコンセンサステネイシンFN3ドメインに基づく足場タンパク質であり、通常はCAR分子のscFv分子よりも小さい。

20

## 【0093】

標的特異的抗原認識ドメインは、好ましくは、標的の抗原に対する抗体または標的の抗原に結合するペプチド、または標的の抗原に結合する抗体に結合するペプチドまたはタンパク質、または標的上の受容体に結合するペプチドまたはタンパク質リガンド(成長因子、サイトカイン、またはホルモンを含むが、これらに限定されない)、または標的上に結合するペプチドまたはタンパク質リガンドに結合する受容体に由来するドメイン(増殖因子受容体、サイトカイン受容体またはホルモンレセプターを含むが、これらに限定されない)を標的とすることができる抗原結合ドメインを含む。

30

## 【0094】

この実施例では、抗原認識ドメインは、標的に対して(選択的な)のモノクローナルまたはポリクローナル抗体の結合部分または可変領域を含む。

## 【0095】

別の実施例では、抗原認識ドメインは、ラクダ科の單一ドメイン抗体またはその一部を含む。この実施例では、ラクダ科单ドメイン抗体は、ラクダ科動物に見出される重鎖抗体、またはVHH抗体を含む。ラクダのVHH抗体(例えば、ラクダ、ヒトコブラクダ、ラマ、およびアルパカ)は、ラクダ科单鎖抗体の可変断片を指し(Nguyenら、2001; Muyldermans、2001参照)、また、ラクダの、ラクダ由来の組み換えVHH抗体、またはラクダのVHH合成抗体からの単離されたVHH抗体を含む。

40

## 【0096】

別の実施例では、抗原認識ドメインは、それらの同族受容体に関与するリガンドを含む。一例として、APRILは、TAC1受容体またはBCMA受容体に結合するリガンドである。本明細書中に開示される発明によれば、抗原認識ドメインは、APRILまたはそのフラグメントを含む。さらなる例として、BAFFは、BAFF-R受容体またはBCMA受容体に結合するリガンドである。本明細書中に開示される発明によれば、抗原認識ドメインは、BAFFまたはその断片を含む。別の実施例において、抗原認識ドメインはヒト化される。

## 【0097】

50

抗原認識ドメインは、その配列内にいくつかの可変性を含み、依然として本明細書に開示される標的に対して選択的であり得ることが理解される。したがって、抗原認識ドメインのポリペプチドは、本明細書中に開示される抗原認識ドメインポリペプチドと少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも80%、または少なくとも70%同一であり、依然として本明細書中に記載され、本開示の範囲内にあると考えられる。

#### 【0098】

標的にはインターロイキン6受容体、NY-ESO-1、アルファフェトプロテイン(AFP)、グリビカン-3(GPC3)、BCMA、BAFF-R、TACI、LeY、CD5、CD13、CD14、CD15、CD19、CD20、CD22、CD33、CD41、CD61、CD64、CD68、CD117、CD123、CD138、CD267、CD269、CD38、Flt3受容体、CS1、CD45、ROR1、PSMA、MAGE A3、糖脂質、グリビカン3、F77、GD-2、WT1、CEA、HER-2/neu、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、-フェトプロテイン、CA19-9、CA72-4、NY-ESO、FAP、ErbB、c-Met、MART-1、CD30、EGFRvIII、免疫グロブリン kappa and lambda、CD38、CD52、CD3、CD4、CD8、CD5、CD7、CD2そしてCD138らが含まれる。  
10

#### 【0099】

別の実施例では、標的には任意の部分のインターロイキン6受容体、NY-ESO-1、アルファフェトプロテイン(AFP)、グリビカン-3(GPC3)、BCMA、BAFF-R、TACI、LeY、CD5、CD13、CD14、CD15、CD19、CD20、CD22、CD33、CD41、CD61、CD64、CD68、CD117、CD123、CD138、CD267、CD269、CD38、Flt3受容体、CS1、CD45、TACI、ROR1、PSMA、MAGE A3、糖脂質、グリビカン3、F77、GD-2、WT1、CEA、HER-2 / neu、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、-フェトプロテイン、CA19-9、CA72-4、NY-ESO、FAP、ErbB、c-Met、MART-1、CD30、EGFRvIII、免疫グロブリン kappa and lambda、CD38、CD52、CD3、CD4、CD8、CD5、CD7、CD2およびCD138ら任意のタンパクを含む。  
20

#### 【0100】

この実施例では、標的にはインターロイキン6受容体、NY-ESO-1、アルファフェトプロテイン(AFP)、グリビカン-3(GPC3)、BCMA、BAFF-R、TACI、LeY、CD5、CD13、CD14、CD15、CD19、CD20、CD22、CD33、CD41、CD61、CD64、CD68、CD117、CD123、CD138、CD267、CD269、CD38、Flt3受容体、CS1、CD45、TACI、ROR1、PSMA、MAGE A3、糖脂質、グリビカン3、F77、GD-2、WT1、CEA、HER-2 / neu、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、-フェトプロテイン、CA19-9、CA72-4、NY-ESO、FAP、ErbB、c-Met、MART-1、CD30、EGFRvIII、免疫グロブリン kappa and lambda、CD38、CD52、CD3、CD4、CD8、CD5、CD7、CD2およびCD138ポリペプチドの露出表面部位を含む。  
30

#### 【0101】

例えば、図81に示すように、ターゲットはBAFFの表面露出領域を含む。ターゲットはBAFFの表面露出領域の一部を含むことができる。例えば、BAFFの一部には、ヒトBAFFの1~200、1~100、50~150、または100~200の残基が含まれる。

#### 【0102】

別の実施例では、標的抗原は、ヒトパピローマウイルス(HPV)またはEBV(エピスタインバーウイルス)抗原由来のE6およびE7などのその一部またはその表面露出領域等のウイルス性または真菌性の抗原含む。  
40

#### 【0103】

この実施例では、配列番号24を含むTACI抗原認識ドメイン。

この実施例では、配列番号25を含むBCMA抗原認識ドメイン。

この実施例では、配列番号26を含むCS1抗原認識ドメイン。

この実施例では、配列番号27を含むBAFF-R抗原認識ドメイン。

この実施例では、配列番号28を含むCD33抗原認識ドメイン。

この実施例では、配列番号29を含むCD123抗原認識ドメイン。

この実施例では、配列番号30を含むCD19抗原認識ドメイン。

10

20

30

40

50

この実施例では、配列番号31を含むCD20抗原認識ドメイン。

別の実施例では、配列番号32を含むCD20抗原認識ドメイン。

この実施例では、配列番号33を含むCD22抗原認識ドメイン。

この実施例では、配列番号34を含むCD45抗原認識ドメイン。

この実施例では、配列番号35を含むCD4抗原認識ドメイン。

この実施例では、配列番号36を含むCD25抗原認識ドメイン。

#### 【0104】

ヒンジ領域は、例えば、キメラ抗原受容体、および少なくとも1つの共刺激ドメインおよびシグナル伝達ドメインを含むが、これらに限定されない配列の間に位置する。ヒンジ配列は、例えば、ヒトまたはその一部を含む任意の属からの任意の適切な配列から得ることができる。そのようなヒンジ領域は当該技術分野において公知である。この実施例では、ヒンジ領域は、CD-8アルファ、CD28、4-1BB、OX40、CD3-ゼータ、T細胞レセプター または 鎖、CD3ゼータ鎖、CD28、CD3 、 CD45、CD4 、 CD5、 CD8、 CD8a、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、ICOS、CD154、それらの機能的誘導体、およびそれらの組み合わせを含むヒトタンパクのヒンジ領域を含む。

#### 【0105】

この実施例では、ヒンジ領域はCD8ヒンジ領域を含む。

#### 【0106】

いくつかの実施例では、ヒンジ領域は、免疫グロブリン（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、およびIgD）から選択されるものを含むが、これに限定されない。

#### 【0107】

膜貫通ドメインは、細胞膜に及ぶ疎水性ポリペプチドを含む。特に、膜貫通ドメインは、細胞膜の一方の側（細胞外）から細胞膜の向こう側（細胞内または細胞質）に及ぶ。

#### 【0108】

膜貫通ドメインは、アルファヘリックスまたはベータバレルの形状で、またはそれらの組み合わせであり得る。膜貫通ドメインは、多くの膜貫通セグメント、各アルファ-ヘリックス、ベータシート、またはそれらの組み合わせを有するポリトピックタンパク質を含む。

#### 【0109】

この実施例では、CARの構造のドメインの1つに もともと関連する膜貫通ドメインが使用される。別の実施例では、同一または異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインとそのような ドメインの結合を避けるため、あるいは、レセプター複合体の他のメンバーとの相互作用を最小限に抑えるために、膜貫通ドメインは選択またはアミノ酸置換によって修飾される。

#### 【0110】

例えば、膜貫通ドメインは、T細胞レセプター または 鎖の膜貫通ドメイン、CD3ゼータ鎖、CD28、CD3 、 CD45、CD4 、 CD5、 CD7、 CD8、 CD9、 CD16、 CD22 、 CD33、 CD37、 CD64、 CD80、 CD86、 CD68、 CD134、 CD137、 ICOS、 CD41、 CD154、それらの機能的誘導体、およびこれらの組み合わせが含まれる。

#### 【0111】

この実施例では、膜貫通ドメインは、ドメインのアミノ酸残基の25%超、50%超または75%超がロイシンおよびバリンなどの疎水性残基であるように人工的に設計される。この実施例では、フェニルアラニン、トリプトファンおよびバリンの三つ組が合成膜貫通ドメインの各末端に見出される。

#### 【0112】

この実施例では、膜貫通ドメインはCD8膜貫通ドメインである。別の実施例では、膜貫通ドメインはCD28膜貫通ドメインである。そのような膜貫通ドメインは当該分野で公知である。

10

20

30

40

50

**【 0 1 1 3 】**

シグナル伝達ドメインおよび共刺激ドメインは、免疫細胞を活性化する、あるいは少なくも少なくともいくつかの局面の免疫細胞シグナル伝達経路を活性化するためのポリペプチドを含む。

**【 0 1 1 4 】**

この実施例では、シグナル伝達ドメインは、CD3ゼータ、共通FcR（FCER1G）、FcRIIa、FcR（FcイプシロンRib）、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD79a、CD79b、DNAX活性化タンパク質10（DAP10）、DNAX活性化タンパク質12（DAP12）、それらの活性断片、それらの機能的誘導体、およびそれらの組み合わせを含む、それら機能的シグナル伝達ドメインのポリペプチドを含む。そのようなシグナル伝達ドメインは当該分野で公知である。10

**【 0 1 1 5 】**

この実施例では、CARポリペプチドは、1つ、あるいは1つ以上の共刺激ドメインを含む。この実施例では、共刺激ドメインは、OX40、CD27、CD28、CD30、CD40、PD-1、CD2、CD7、CD258、ナチュラルキラーグループ2メンバーC（NKG2C）、ナチュラルキラーグループ2メンバーD（NKG2D）、B7-H3 あるいはCD83、ICAM-1、LFA-1（CD11a / CD18）、ICOS、および4-1BB（CD137）の少なくとも1つに結合するリガンド、その活性断片、その機能的誘導体、およびそれらの組み合わせを含めたタンパク質由来の機能的シグナル伝達ドメインである。

**【 0 1 1 6 】**

本明細書中で使用される場合、少なくとも1つの共刺激ドメインおよびシグナル伝達ドメインは、細胞内ドメインとしてまとめて言及しているかもしれない。本明細書中で使用される場合、ヒンジ領域および抗原認識は、細胞外ドメインとしてまとめて言及しているかもしれない。20

**【 0 1 1 7 】**

本開示はさらに、上記のキメラ抗原レセプターポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。

**【 0 1 1 8 】**

本明細書で使用される「ポリヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチドの鎖として定義される。ポリヌクレオチドは、DNAおよびRNAが含まれる。さらに、核酸はヌクレオチドのポリマーである。したがって、本明細書中で使用される場合、核酸およびポリヌクレオチドは同様の意味もある。当業者であれば、核酸がポリヌクレオチドであり、これを加水分解してモノマー「ヌクレオチド」にすることができるという一般的な知識を有する。モノマーヌクレオチドを加水分解してヌクレオシドにすることができる。本明細書中で使用されるポリヌクレオチドは、すなわち例えば、組換えライブラリーまたは細胞からの通常のクローニング技術およびポリメラーゼ連鎖反応（PCR）などの合成手段によるクローニング、当技術分野で利用可能な任意の手段によって得られるすべての核酸配列が含まれるがこれに限定されない。30

**【 0 1 1 9 】**

CARをコードするポリヌクレオチドは、いかなる従来の方法によって、特定のCARのアミノ酸配列から容易に調製される。アミノ酸配列をコードする塩基配列は前述のNCBI RefSeq IDから、またはGenBankのアクセスション番号から各ドメインのアミノ酸配列を取得することができ、本発明の核酸は、標準的な分子生物学および/または化学的手順により調製することができる。例えば、塩基配列を元に、ポリヌクレオチドを合成することができ、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いてcDNAライブラリーから得られたDNA断片を組み合わせることで、本発明のポリヌクレオチドを調製することができる。40

**【 0 1 2 0 】**

この実施例では、本明細書に開示されるポリヌクレオチドは、遺伝子、発現力セットまたはクローニングカセットの一部である。

上記のポリヌクレオチドは、ベクターにクローニングすることができる。「ベク

10

20

30

40

50

ター」は、単離されたポリヌクレオチドを含み、単離されたポリヌクレオチドを細胞の内部に届けるために使用される構成物である。線状ポリヌクレオチド、イオン性または両親媒性化合物に関連するポリヌクレオチド、プラスミド、ファージミド、コスミドおよびウイルスを含むが、これらに限定されない多数のベクターが当該分野で公知である。ウイルスには、ファージ、ファージ誘導体が含まれる。したがって、用語「ベクター」は、自律的に複製するプラスミドまたはウイルスを含む。この用語はまた、例えばポリリジン化合物、リポソームなどの核酸の細胞への移動を容易にする非プラスミドおよび非ウイルス化合物を含むと解釈されるべきである。ウイルス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、レンチウイルスベクターなどが挙げられるが、これらに限定されない。この実施例では、ベクターには、クローニングベクター、発現ベクター、複製ベクター、プローブ生成ベクター、組み込みベクター、および配列決定ベクターが含まれる。

## 【0121】

この実施例では、ベクターはウイルスベクターである。この実施例では、ウイルスベクターは、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターである。一実施形態では、操作された細胞は、ポリヌクレオチド配列を発現するためにウイルスに形質導入される。

## 【0122】

哺乳動物細胞への遺伝子導入のための多く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のための便利なプラットフォームを提供する。選択された遺伝子は、ベクターに挿入され、当該分野で既知の技術を用いてレトロウイルス粒子にパッケージングされる。次いで、組換えウイルスを単離し、*in vivo*または*ex vivo*のいずれかの手段で患者の細胞に送達することができる。多くのレトロウイルス系が当該分野で公知である。いくつかの実施例では、アデノウイルスベクターが使用される。多くのアデノウイルスベクターが当該分野で既知である。この実施例では、レンチウイルスベクターが使用される。

## 【0123】

ウイルスベクター技術は当技術分野で周知であり、例えばSambrookら(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には、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含まれるが、これらに限定されない。一般に、適切なベクターは、少なくとも1つの生命体において機能する複製起点、プロモーター配列、好都合な制限エンドヌクレアーゼ部位、および1つ以上の選択マーカーを含む(例えば、WO 01/96584; WO 01/29058; および米国特許第6,326,193号)。

## 【0124】

レンチウイルスベクターは、高い効率でヒトT細胞に遺伝子を導入する能力に関してよく知られているが、ベクターにコードされた遺伝子の発現は、その発現を促進する内部プロモーターに依存する。強力なプロモーターは、追加の共刺激ドメインまたは増殖性サイトカインをコードする遺伝子を有する増加したCARの構成サイズが等量の発現を保証しないため、第3世代または第4世代のCARの作製に特に重要である。異なる強度および細胞型特異性を有する様々なプロモーターが存在する。CAR T細胞を用いる遺伝子治療は、T細胞が十分なCAR本体を発現し、長期間にわたり発現を維持する能力に依存している。EF1プロモーターはCAR発現のために一般的に選択されている。

## 【0125】

本開示は、T細胞またはNK細胞における高レベルの遺伝子発現のための強力なプロモーターを含む発現ベクターを提供する。さらなる実施例において、本発明者は、T細胞またはNK細胞におけるCARsの高レベル発現に有用な強力なプロモーターを開示する。特定の実施例では、SFFVプロモーターと関連した強力なプロモーターは、発現ベクターに選択的に導入されることで、T細胞またはNK細胞において高レベルの発現を獲得し、長

期間にわたって発現を維持することができる。CARs、T細胞共刺激因子およびサイトカインが発現されたものを免疫療法に使用する。

#### 【0126】

適切なプロモーターの一例は、前初期サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター配列である。このプロモーター配列は、それに連結された操作されうる任意のポリヌクレオチド配列で高レベルの発現を誘導することができる強力な構成的プロモーター配列である。適切なプロモーターの別の例は、伸長増殖因子-1a(EF-1a)である。しかしながら、シミアンウイルス40(SV40)初期プロモーター、マウス乳癌ウイルス(MMTV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)長末端反復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、エプスタイン・バーウイルス前初期プロモーター、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、クレアチンキナーゼプロモーターなどのヒト遺伝子プロモーターが挙げられるが、これらに限定されることなく、他の構成的プロモーター配列も使用される。さらに、本開示は構成性プロモーターの使用に限定されるべきではなく、誘導性プロモーターも本開示の一部として考慮される。誘導性プロモーターの使用することで、連結されたポリヌクレオチド配列の発現を望む場合、発現をオンにすることができる分子スイッチあるいは発現が望ましくない場合に発現をオフにすることができる分子スイッチを提供する。誘導性プロモーターの例には、メタロチオネインプロモーター、グルココルチコイドプロモーター、プログ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含まれるが、これらに限定されない。

10

#### 【0127】

キメラ抗原レセプターポリヌクレオチドの発現は、例えば、限定されるものではないが、SFFV(脾臓フォーカス形成ウイルス)(例えば、配列番号23)またはヒト伸長因子11(EF)プロモーター、CAG(CMVエンハンサーを有するニワトリ-アクチンプロモーター)プロモーター、ヒト伸長因子1(EF)プロモーターが利用される。低強度/低発現プロモーターの例としては、シミアンウイルス40(SV40)初期プロモーター、サイトメガロウイルス(CMV)前初期プロモーター、ユビキチンC(UBC)プロモーター、およびホスホグリセレートキナーゼ1(PGK)プロモーター、またはその一部を含め、限定されるものではないが、それらを含め利用される。キメラ抗原受容体の誘導性発現は、例えば、限定されるものではないがTRE3GV(全ての世代、好ましくは第3世代を含むTet応答エレメント)を含めたテトラサイクリン応答性プロモーター、誘導性プロモーター(Clontech Laboratories, Mountain View, CA)またはその一部またはそれらの組み合わせを含むこれらが使われることで、目的を達成するかもしれない。

20

30

#### 【0128】

好ましい実施例では、プロモーターは、SFFVプロモーターまたはその誘導体である。予想外にも、SFFVプロモーターは、本開示において、形質導入された細胞においてより強い発現およびより高い持続性を示すことが発見されている。

#### 【0129】

「発現ベクター」とは、発現されるヌクレオチド配列に作動可能に連結され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、発現のための十分なシス作用性エレメントを含む。発現のための他の要素は、宿主細胞によってまたはインビトロ発現系において供給され得る。発現ベクターには、組換えポリヌクレオチドを組み込むコスミド、プラスミド(例えば、裸であるかまたはリボソームに含まれる)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)など、当技術分野で公知のものすべてが含まれる。発現ベクターは、バイリストロニックまたはマルチリストロン発現ベクターであり得る。バイリストロニックまたはマルチリストロン発現ベクターは、(1)各オープンリーディングフレームに融合された複数のプロモーター、(2)遺伝子間のスプライシングシグナルの挿入、発現が単一のプロモーターによって誘導される遺伝子の融合、(3)遺伝子間でのタンパク質分解切断部位の挿入(自己切断ペプチド)、そして(iv)遺伝子間に内部リボソーム進

40

50

入部位（IRES）の挿入などが含まれる。

【0130】

この実施例では、本開示は、少なくとも1つのキメラ抗原レセプターポリペプチドまたはポリヌクレオチドを有する操作された細胞を提供する。

【0131】

「遺伝子操作された細胞」は、遺伝子、DNAまたはRNA配列、またはタンパク質もしくはポリペプチドの付加または修飾によって、修飾、形質転換、または操作される任意の生体の、如何なる細胞を意味する。本開示の単離された細胞、宿主細胞、および遺伝子操作された細胞は、キメラ抗原レセプターまたはキメラ抗原レセプター複合体をコードするDNAまたはRNA配列を含有すし、キメラ受容体を細胞表面に発現するNK細胞およびT細胞のような、単離された免疫細胞を含む。例えば、NK細胞を活性化またはTリンパ球活性した単離された宿主細胞および操作された細胞は、癌の治療および感染性疾患の治療のために使用され得る。

10

【0132】

この実施例では、操作された細胞は免疫調節細胞を含む。免疫調節細胞には、CD4 T細胞（ヘルパーT細胞）、CD8 T細胞（細胞傷害性T細胞、CTL）、および記憶T細胞またはT記憶幹細胞などのT細胞が含まれる。別の実施例において、T細胞には、ナチュラルキラーT細胞（NK T細胞）が含まれる。

【0133】

この実施例では、操作された細胞はナチュラルキラー細胞を含む。ナチュラルキラー細胞は当該分野でよく知られている。この実施例では、ナチュラルキラー細胞には、NK-92細胞などの細胞株が含まれる。NK細胞株のさらなる例には、NKG、YT、NK-YS、HANK-1、YTS細胞、およびNKL細胞などが含まれる。

20

【0134】

NK細胞は、GvHDのリスクなしに抗腫瘍効果をもたらし、T細胞と比較して短命である。したがって、NK細胞は、癌細胞を破壊した直後に枯渇されるため、改変された細胞を取り除くために、CARの構成上での誘導性自殺遺伝子導入の必要性を減らすであろう。

【0135】

本開示によれば、驚くべきことに、NK細胞は、本明細書中に開示されるキメラ抗原レセプターポリペプチドを含み、発現するように操作することで、その後、容易に利用可能な細胞であることが見出された。

30

【0136】

同種異系または自己NK細胞は、急速な免疫応答を誘導するが、その寿命が限られているため血液循環系から比較的急速に消失する。従って、驚くべきことに、出願人らはCAR細胞に基づく療法を使用した場合の、持続的な副作用の懸念が減少することを発見した。

【0137】

本発明の1つの側面によれば、本発明に従ってNK細胞は、増殖させ、CARポリヌクレオチドをトランスフェクトされることができる。NK細胞は、臍帯血、末梢血、iPS細胞および胚性幹細胞から得ることができる。本発明の1つの側面によれば、NK-92細胞は、増殖させ、CARをトランスフェクトさせ得るかもしれない。NK-92は、ナチュラルキラー（NK）細胞の特色および特徴を有する持続的に増殖する細胞株である（Arai、Meagherら、2008）。NK-92細胞株はIL-2依存性があり、安全であり（Arai、Meagher et al. 2008）、且つ実現可能であることが証明されている。CAR発現NK-92細胞は、フィーダー細胞との共培養の有無に関わらず、血清フリー培地中で増殖させることができる。目的のCARを保有するNK-92細胞の純粋な集団は、選別することで得ることができる。

40

【0138】

この実施例では、操作された細胞は、MHC認識に関するTCR（T細胞受容体）の構成要素を不活性化するために修飾された、ドナーから得られた同種異系T細胞を含む

50

。その結果として、TCR欠損T細胞は移植片対宿主病（GVHD）を引き起こさないであろう。  
。

#### 【0139】

いくつかの実施例において、操作された細胞は、細胞表面抗原の発現を妨げるように修飾されるのかもしれない。例えば、操作された細胞は、その発現および細胞表面上の存在を妨げるように、ネイティブCD45遺伝子を欠失させるように遺伝子改変されるかもしれない。

#### 【0140】

いくつかの実施例では、操作された細胞は、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクターまたはプラスミドなどのベクター上に組み込まれ得る誘導性自殺遺伝子（「安全スイッチ」）または安全スイッチの組み合わせをもつ。「安全スイッチ」の導入はcompound CARの安全性の側面を大幅に向上させ、標的腫瘍または標的外の腫瘍毒性を制限する。「安全スイッチ」は、カスパーゼ9遺伝子、チミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ（CD）またはシトクロムP450などの誘導性自殺遺伝子であり、しかしこれに限定されない。望ましくない改変T細胞を排除するための他の安全スイッチは、T細胞におけるCD20またはCD52またはCD19または切断型表皮成長因子受容体の発現を含む。すべての可能な安全スイッチが考えられており、本発明で盛り込まれている。

10

#### 【0141】

いくつかの実施例では、自殺遺伝子は、操作された細胞ゲノムに組み込まれる。

20

#### 【0142】

この実施例では、本開示は、CD45キメラ抗原レセプターポリヌクレオチドを有する操作細胞を提供する。この実施例では、CD45 CARポリペプチドは、配列番号13を含み、ポリヌクレオチド配列SEQ ID NO 14に対応する。別の実施例では、CD45 CARポリペプチドは配列番号15を含み、ポリヌクレオチド配列SEQ ID NO 16に対応する。別の実施例では、CD45 CARポリペプチドは、配列番号 17を含み、ポリヌクレオチド配列SEQ ID NO 18に対応する。

#### 【0143】

特定の実施例では、操作された細胞は、P2A切斷配列を介してIL15 / IL-15sushiに連結されたCD45 CARを含む。この実施例を提供するポリペプチドは、SEQ ID NO 43および対応するポリヌクレオチド配列SEQ ID NO 44を含む。

30

#### 【0144】

特定の実施例では、操作された細胞は、P2A切斷配列を介して4-1BBL (CD137L)に連結されたCD45 CARを含む。この実施例を提供するポリペプチドは、SEQ ID NO 43および対応するポリヌクレオチド配列SEQ ID NO 44を含む。

#### 【0145】

##### Multiple CARユニット

この実施例では、本開示は、少なくとも2つの異なる、または別個のCAR単位を有する操作された細胞を提供する。2つのCARユニットは、完全なCARユニットまたは不完全なCARユニットであってもよい。本明細書中で使用される場合、「異なるCARポリペプチド」および「異なるCARポリペプチド単位」は互換的に使用される。

40

#### 【0146】

本開示は、CARユニットまたは完全なCARユニットと定義するシグナルペプチド、抗原認識ドメイン、ヒンジ領域、膜貫通ドメイン、シグナル伝達ドメイン、および少なくとも1つの共刺激ドメインを有するキメラ抗原レセプターポリペプチドを提供する。本明細書で使用されるように、不完全CARユニットは、シグナルペプチド、抗原認識ドメイン、ヒンジ領域、膜貫通ドメイン、およびシグナル伝達ドメインまたは少なくとも1つの共刺激ドメインを有するポリペプチドを含む。不完全なCARユニットは、シグナル伝達ドメインおよび少なくとも1つの共刺激ドメインを含まないが、一方または他方を含まない。

#### 【0147】

50

この実施例では、本開示は、第1の抗原認識ドメインおよび共刺激ドメイン（第1の不完全CARユニット）を有する第1のキメラ抗原受容体ポリペプチドを、そして第2の抗原認識ドメインおよびシグナル伝達ドメイン（第2の不完全なCARユニット）を有する第2のキメラ抗原レセプターポリペプチドを有する操作細胞を提供する、その点で第1の抗原認識ドメインは第2の抗原認識ドメインとは異なる。

#### 【0148】

したがって、2つの不完全なCAR単位を有する操作された細胞は、両方の標的抗原が抗原認識ドメインに結合した場合にのみ完全に活性化される。この戦略は、標的が各不完全CARユニットの抗原認識ドメインに結合されるまで、操作された細胞が完全に活性化されないという点で、付加された特異性を提供する。

10

#### 【0149】

さらなら実施例において、操作された細胞は2つの不完全なCAR単位を有し、抗原認識ドメインの1つは、ビオチン、HIS、MYC、HA、アガロース、V5、マルトース、GST、GFP、CD52、CD20,4-1BB、またはCD28に特異的であり、結合することができるかもしだれない。

#### 【0150】

本明細書中で使用される場合、compound CAR (cCAR) またはmultiple CARは、少なくとも2つの異なるキメラ抗原レセプターポリペプチドを有する操作された細胞を指す。本明細書で用いられる「異なるキメラ抗原レセプターポリペプチド」は、ユニークな抗原認識ドメイン、シグナルペプチド、ヒンジ領域、膜貫通ドメイン、少なくとも1つの補助刺激ドメイン、およびシグナル伝達ドメインを有する。したがって、2つのユニークなキメラ抗原レセプターポリペプチドは、異なる抗原認識ドメインを有するであろう。シグナルペプチド、ヒンジ領域、膜貫通ドメイン、少なくとも1つの共刺激ドメイン、およびシグナル伝達ドメインは、2つの異なるキメラ抗原レセプターポリペプチド間で同じであっても異なっていてもよい。本明細書で使用されるように、キメラ抗原レセプター (CAR) 単位は、異なるキメラ抗原レセプターポリペプチド、またはそれを同様にコードするポリヌクレオチドを指す。

20

#### 【0151】

本明細書中で使用される場合、ユニークな抗原認識ドメインは、標的に特異的である、または単一の標的または標的の単一のエピトープを標的にするかの一つでもある。

30

#### 【0152】

いくつかの実施例では、compound CARは同じ抗原を標的とする。例えば、cCARは、単一の抗原の異なるエピトープまたは異なる部分を標的とする。いくつかの実施例では、compound CARに存在するそれぞれのCAR単位は、同様または異なる疾患状態における、異なる抗原を標的とする、あるいは、疾患状態によって引き起こされる副作用に特異的な異なる抗原を標的とする。

#### 【0153】

いくつかの実施例では、compound CARは2つの異なる抗原を標的とする。

様々なCAR単位を有するcompound CARsの作成は大変挑戦的である、(1) CAR-CAR相互作用が有害な影響を及ぼすかもしくは、適切なCAR設計がこの悪影響を相殺する鍵である、(2) 単一構成のcompound CARは発現力セットの長さを増加させる可能性がある、その結果、ウイルス力価およびタンパク質発現レベルの低下を引き起こすかもしくはない、(3) 単一のベクター内にmultiple CARsを発現させる為の、様々なCARボディ要素を含み、特に戦略を選択するため、適切な設計が必要である、(4) CARのさらなる単位を有するcompound CARに対して強力なプロモーターは特に重要である、(5) CARのヒンジ領域は、各CARユニット間のヒンジ領域の相互作用が好ましくは回避されるように設計する必要がある、(6) 細胞で発現する2つまたはそれ以上CARユニットが毒性作用を引き起こすかもしくない(CARとCARの相互作用)。出願人は、新規且つ驚くべきCARの構成並びに、これらのハードルを克服する方法を提供する。

40

#### 【0154】

50

この実施例では、本開示は、multiple CARユニットを有する操作された細胞を提供する。これにより、単一の操作された細胞が複数の抗原を標的とすることが可能になる。複数の表面マーカーまたは抗原を同時にmultiple CAR単位で標的とすることにより、耐性クローニングの選択が妨げられ、腫瘍の再発が減少する。様々なドメインおよび活性化部位を含む個々のCARの構成を持つMultiple CAR T細胞免疫療法はいずれの悪性腫瘍に対してもまだ展開されていない。

#### 【0155】

本発明のひとつの側面では、cCARは、multiple CAR単位を含む。いくつかの実施例では、cCARは、少なくとも2つのCAR単位を含む。別の実施例において、cCARは、少なくとも3つのCAR単位を含む。別の実施例において、cCARは、少なくとも4つのユニットを含む。

10

#### 【0156】

この実施例では、少なくとも2つの異なるキメラ抗原レセプターポリペプチドを有する操作細胞は、T細胞である。T細胞は、細胞表面抗原を発現しないように操作することができます。例えば、T細胞は、CD45細胞表面抗原を発現しないように操作することができる。

#### 【0157】

好みの実施例では、少なくとも2つの異なるキメラ抗原レセプターポリペプチドを有する操作細胞は、末梢血または臍帯血から単離された初代NK細胞であり、またNK-92細胞であり、疾患または癌を有する任意の哺乳類に「既製品」として投与される。

20

#### 【0158】

この実施例では、操作された細胞は、(i)第1の抗原認識ドメイン、第1のシグナルペプチド、第1のヒンジ領域、第1の膜貫通ドメイン、第1の共刺激ドメイン、および第1のシグナル伝達ドメインを含む第1のキメラ抗原レセプターポリペプチド、(ii)第2の抗原認識ドメイン、第2のシグナルペプチド、第2のヒンジ領域、第2の膜貫通ドメイン、第2の共刺激ドメイン、および第2のシグナル伝達ドメインを含む第2のキメラ抗原レセプターポリペプチド。第1の抗原認識ドメインは、第2の抗原認識ドメインとは異なる。

#### 【0159】

好みの実施例において、各操作されたCAR単位ポリヌクレオチドは、相同組換えを回避するために異なるヌクレオチド配列を有する。

30

#### 【0160】

この実施例において、第1の抗原認識ドメインの標的は、インターロイキン6受容体、NY-ESO-1、アルファフェトプロテイン(AFP)、グリビカン-3(GPC3)、BAFF-R、BCMA、TACI、LeY、CD5、CD13、CD14、CD15、CD19、CD20、CD22、CD33、CD41、CD61、CD64、CD68、CD117、CD123、CD138、CD267、CD269、CD38、Flt3受容体そしてCS1など、これらの組み合わせから選ばれ、第2の抗原認識ドメインの標的はインターロイキン6受容体、NY-ESO-1、アルファフェトプロテイン(AFP)、グリビカン-3(GPC3)、BAFF-R、BCMA、TACI、LeY、CD5、CD13、CD14、CD15、CD19、CD20、CD22、CD33、CD41、CD61、CD64、CD68、CD117、CD123、CD138、CD267、CD269、CD38、Flt3受容体そしてCS1これらの組み合わせからなるグループより選ばれる。

40

#### 【0161】

この実施例では、操作された細胞はCD19抗原認識ドメインを有する第1のキメラ抗原レセプターポリペプチドおよびCD20認識ドメインを有する第2のキメラ抗原レセプターポリペプチドを含む。この実施例では、この操作された細胞は、配列番号3のポリペプチドと配列番号4に対応するポリヌクレオチドとを含む。

#### 【0162】

この実施例では、操作された細胞は、CD19抗原認識ドメインを有する第1のキメラ抗原レセプターポリペプチドおよびCD22抗原認識ドメインを有する第2のキメラ抗原レセプターポリペプチドを含む。この実施例では、この操作された細胞は、配列番号5のポリ

50

ペプチドと配列番号6に対応するポリヌクレオチドとを含む。

**【0163】**

この実施例では、操作された細胞は、CD19抗原認識ドメインを有する第1のキメラ抗原レセプターポリペプチドおよびCD123抗原認識ドメインを有する第2のキメラ抗原レセプターポリペプチドを含む。この実施例では、この操作された細胞は、配列番号7のポリペプチドと配列番号8に対応するポリヌクレオチドとを含む。

**【0164】**

この実施例では、操作された細胞は、CD33抗原認識ドメインを有する第1のキメラ抗原レセプターポリペプチドおよびCD123抗原認識ドメインを有する第2のキメラ抗原レセプターポリペプチドを含む。この実施例では、この操作された細胞は、配列番号9のポリペプチドと配列番号10に対応するポリヌクレオチドとを含む。別の実施例では、この操作された細胞は、配列番号11のポリペプチドと配列番号12に対応するポリヌクレオチドとを含む。

10

**【0165】**

この実施例では、操作された細胞は、BAFF-R抗原認識ドメインを有する第1のキメラ抗原レセプターポリペプチドおよびCS1抗原認識ドメインを有する第2のキメラ抗原レセプターポリペプチドを含む。

**【0166】**

この実施例では、操作された細胞は、CD269抗原認識ドメインを有する第1のキメラ抗原レセプターポリペプチドおよびCS1抗原認識ドメインを有する第2のキメラ抗原レセプターポリペプチドを含む。この実施例では、この操作された細胞は、配列番号19のポリペプチドと配列番号20に対応するポリヌクレオチドとを含む。この実施例では、この操作された細胞は、配列番号21のポリペプチドと配列番号22に対応するポリヌクレオチドとを含む。

20

**【0167】**

この実施例では、操作された細胞は、CD33抗原認識ドメインを有する第1のキメラ抗原レセプターポリペプチドおよびCD123抗原認識ドメインを有する第2のキメラ抗原レセプターポリペプチドを含む。

**【0168】**

この実施例では、各CARユニットは、同一または異なるヒンジ領域を含む。別の実施例では、各CARユニットは、同一または異なる膜貫通領域を含む。別の実施例では、各CAR単位は、同一または異なる細胞内ドメインを含む。

30

**【0169】**

この実施例では、各CAR単位は、CD3ゼータ鎖シグナル伝達ドメインを含む。

**【0170】**

この実施例では、各別個のCARユニットは、相互作用を回避するために異なる共刺激ドメインを含む。例えば、第1のキメラ抗原レセプターポリペプチドは、4-BB共刺激ドメインを含み、そして第2のキメラ抗原レセプターポリペプチドは、CD28共刺激ドメインを含む。

40

**【0171】**

別の実施例では、ヒンジ領域は、望ましくない分子内または分子間相互作用を引き起こし得るアミノ酸を排除するように設計される。例えば、ヒンジ領域は、ジスルフィド結合の形成を防止するためにシステイン残基を排除または最小化するように設計される。別の実施例において、ヒンジ領域は、疎水性残基を排除または最小化して、望ましくない疎水性相互作用を防止するように設計される。

**【0172】**

Compound CARは、単独または組み合わせて標的を殺傷させることができる。Multipleまたはcompound CARは、同じまたは異なるヒンジ領域、同じまたは異なる膜貫通、同じまたは異なる共刺激性および同一または異なる細胞内ドメインを含む。好ましくは、ヒンジ領域は、相互作用部位を避けるように選択される。

50

**【 0 1 7 3 】**

本発明のcompound CARは、T細胞またはNK細胞中の同一または異なる腫瘍集団を標的とすることができます。例えば、第1のCARは、巨大な腫瘍集団を標的とし、次の、または第2のCARは、癌再発を避けるために、例えば、癌または白血病幹細胞を根絶するかもしれない。

**【 0 1 7 4 】**

本発明によれば、驚くべきことに、異なるまたは同じ腫瘍集団を標的とするTまたはNK細胞中のcompound CARが、CAR殺傷活性に耐性の癌細胞を引き起こし、それにより癌からの標的抗原のダウンレギュレーションを引き起こす、腫瘍因子と戦うことが見出した。驚くべきことに、これにより、「抗原逃避」および、異なる腫瘍細胞が異なる表面抗原発現プロファイルを示すことでの腫瘍の不均一性により癌細胞がCAR療法から「隠す」ことが可能になることも見出された。

10

**【 0 1 7 5 】**

CARポリペプチドおよびエンハンサーを有する操作された細胞

別の実施例において、本開示は、少なくとも1つのキメラ抗原レセプターポリペプチドおよびエンハンサーを有する操作された細胞を提供する。

**【 0 1 7 6 】**

この実施例では、本開示は、少なくとも2つの異なるキメラ抗原レセプターポリペプチドおよびエンハンサーを有する操作細胞を提供する。

20

**【 0 1 7 7 】**

本明細書中で使用される場合、エンハンサーは、キメラ抗原レセプターポリペプチドを有する操作された細胞の活性を促進または強化する生体分子を含む。エンハンサーにはサイトカインも含まれる。別の実施例において、エンハンサーは、IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21、PD-1、PD-L1、CSF1R、CTAL-4、TIM-3 そしてTGFR-beta、同受容体、および機能的な断片を含む。

**【 0 1 7 8 】**

エンハンサーは、本明細書に記載される操作された細胞によって発現され、操作された細胞の表面上に提示され得るか、またはエンハンサーは、操作された細胞によって周囲の細胞外空間に分泌され得る。サーフェスディスプレイおよび分泌の方法は、当技術分野において周知である。例えば、エンハンサーは、細胞外空間へのサーフェスディスプレイまたは分泌を提供するペプチドとの融合タンパク質であるかもしれない。

30

**【 0 1 7 9 】**

エンハンサーの効果は、エンハンサーレセプターおよびその機能的フラグメントなどのさらなる因子によって補完されるかもしれない。さらなる因子は、融合タンパク質としてエンハンサーと同時発現されてもよく、または別個のペプチドとして発現されて細胞外空間に分泌されてもよい。

**【 0 1 8 0 】**

エンハンサーは、操作されたCAR細胞から分泌されたサイトカインであり、CARポリペプチドと同時発現するように設計されている。同族の抗原とのCAR関与時に大量放出が起こる。腫瘍細胞を取り囲む炎症細胞は、癌細胞の進行および転移と有意な相関関係を有する。炎症細胞には、T細胞およびNK細胞、マクロファージ、樹状細胞などの自然免疫応答細胞が含まれ、それらの増殖および抗腫瘍活性はサイトカインによって調節される。CAR T細胞またはNK細胞などのCAR細胞は、標的癌細胞に結合し、CAR T / NK細胞の増殖からのエンハンサーの大量分泌を誘発する。分泌エンハンサーは、癌細胞に対する免疫応答細胞の生存、分化および活性化を効率的に促進する。エンハンサーとCARとの同時発現は、CAR TまたはNK細胞が非標的癌細胞を排除できないという欠点を補うことができる(図78)。

40

**【 0 1 8 1 】**

CAR細胞はサイトカインのキャリアであり、高用量の外因性サイトカインによる全身毒性を低下させるために、CAR細胞によって標的癌部位にサイトカインを送達すること

50

ができる(図78)。

【0182】

CAR細胞の持続的な生存または長期持続性を改善するために、CAR持続性を改善するため、膜結合エンハンサーをCARと同時発現させることができる。

【0183】

この実施例では、エンハンサーはIL-15である。この場合、上記のさらなる因子は、IL-15受容体およびその機能的断片である。機能的断片には、IL-15受容体、IL-15RA、およびIL-15RA(IL-15sushi)のsushiドメインが含まれる。可溶性IL-15RAまたはIL-15sushiは、IL-15分解を防止することで、IL-15機能活性を著しく増強する。可溶性IL-15 / IL-15RAまたはIL-15 / IL-15sushi複合体は、インビオでIL-15単独よりも安定ではるかに刺激性である。

【0184】

この実施例では、IL-15は、IL-15受容体、IL-15RA、およびIL-15RA(IL-15sushi)のsushiドメインの少なくとも1つとの融合タンパク質として同時発現される。この実施例では、IL-15受容体、IL-15RA、またはIL-15RAのsushiドメイン(IL-15sushi)は、IL-15のN末端にある。別の実施例では、IL-15受容体、IL-15RA、またはIL-15RAのsushiドメイン(IL-15sushi)は、IL-15のC末端にある。本明細書中で使用される場合、IL-15 / IL-15sushiは、融合タンパク質においてIL-15sushiがIL-15のC末端にあることを示し、IL-15sushi / il-15は、IL-15sushiが融合タンパク質中のIL-15のN末端にあることを示す。

【0185】

いくつかの実施例では、IL-15およびIL-15受容体またはその機能的断片ポリペプチドは、単一のポリペプチド分子上にあり、ペプチドリンカーによって離れており、ペプチドリンカーは、長さが1~25アミノ酸残基、長さが25~100アミノ酸残基の酸残基、または長さが50~200アミノ酸残基である。このリンカーは、本明細書に記載の高効率切断部位を含み得る。

【0186】

適切なsushiドメインの一例は、CARコンストラクトが含まれる、配列番号1。

本開示によれば、本明細書中に開示される任意のキメラ抗原レセプターポリペプチドは、ヒトインターロイキン2シグナルペプチドを有するヒトインターロイキン15、配列番号2を共発現する。

【0187】

インターロイキン(IL)-15およびその特異的受容体鎖であるIL-15R(IL-15-RA)は、NKおよびCD8T細胞を含む様々なエフェクター細胞において重要な機能的役割を果たす。CD8+T細胞は、IL-2、IL-7、IL21またはIL-15を含むが、これらに限定されない自己分泌成長因子を発現するように改変され、インビオへの移転後の生存を維持する。理論に縛られることを望むものではないが、IL-15は、CD4欠損を克服して、初代および記憶のCD8T細胞を誘導し得ると考えられている。CD8T細胞上のIL-15-RAまたはIL-15 IL-RA融合体の過剰発現は、インビトロおよびインビオでその生存および増殖を有意に増強する。いくつかの実施例では、CD4CARまたは任意のCARは、IL-15、IL15RAおよびIL-15 / IL-15RまたはIL15-RA / IL-15あるいはそれらの組み合わせの一部または半分以上の発現を行うことで、CAR TまたはNKの生存または増殖を増強し、記憶CAR CD8+T細胞の増殖を改善する。

【0188】

本開示は、本明細書に記載のCARポリペプチドおよび患者の癌を治療するためのCAR TまたはNKの生存または持続性または増殖を増強する、IL-15、IL-15RA、IL-15sushi、IL-15 / IL-15RA、IL15-RA / IL-15、IL-15 / IL-15sushi、IL15sushi / IL-15、それらの断片、それらの組み合わせの少なくとも1つを有する操作された細胞を提供する。

【0189】

別のある実施例では、本開示は、組換えIL-15、IL-15RA、IL-15sushi、IL-15 / IL-

10

20

30

40

50

15RA、IL15-RA / IL-15、IL-15 / IL-15sushi、IL15sushi / IL-15、その機能的フラグメント、およびそれらの組み合わせ、および少なくとも1つの別個のCARポリペプチドを含み、ここで抗原認識ドメインはNY-ESO-1、アルファフェトプロテイン(AFP)、グリビカン-3(GPC3)、BCMA、BAFF-R、BCMA、TACI、LeY、CD5、CD7、CD2、CD3、CD14、CD15、CD19、CD20、CD22、CD33、CD41、CD61、CD64、CD68、CD117、CD123、CD138、CD267、CD269、CD38、Flt3受容体、ROR1、PSMA、MAGE A3、糖脂質、F77、GD-2、WT1、CEA、HER-2/neu、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、CA19-9、CA72-4、NY-ESO、FAP、ErbB、c-Met、MART-1、CD30、EGFRvIII、免疫グロブリンカッパおよびラムダ、CD38およびCS1が挙げられる。標的抗原は、ヒトパピローマウイルス(HPV)またはEBV(エピスタインバーウイルス)抗原由来のE6およびE7などのウイルスまたは真菌抗原を含むこともできる。さらなる実施例では、抗原認識ポリペプチド(scFv)および対応するCD2、CD3、CD5、CD7、およびCD52のポリヌクレオチドは、より詳細に記載されているPCT出願のNo. PCT/US2016/39306にその内容は参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0190】

理論に拘泥するものではないが、IL-15 / IL-15sushiおよび他のタイプのIL-15またはIL-15RAタンパク質またはそのタンパク質フラグメントは、チェックポイントインヒビターまたはモジュレーター(例えば、抗PD-1)と組み合わせた場合にCARポリペプチドの相乗効果をもたらすと考えられる。

#### 【0191】

一実施例では、本開示は、IL-15 / IL-15sushi(配列番号1)および対応するポリヌクレオチド(配列番号2)を含むCD4 CAR操作細胞を提供する。一実施例では、本開示は、IL-15 / IL-15sushiを含むCD4 CAR操作細胞を、それを必要とする患者に投与することによって、癌患者における長期耐久性寛解を提供する方法を提供する。理論に拘泥するものではないが、IL-15 / IL-15sushiとCD4 CARポリペプチドとの同時発現は、標的癌細胞のCAR認識の感受性を増加させるか、または癌細胞に対する自然免疫細胞を漸加することによって、患者において長期耐性寛解をもたらすと考えられている。

#### 【0192】

この実施例では、本開示は、CD45キメラ抗原レセプターポリペプチドおよびIL-15 / IL-15sushi(配列番号44)および対応するヌクレオチド(配列番号43)を有する操作細胞を提供する。

#### 【0193】

この実施例では、本開示は、IL-15 / IL-15sushiを含むCD45 CAR操作細胞を、それを必要とする患者に投与することによって、癌患者における長期耐久性寛解を提供する方法を提供する。理論に拘泥するものではないが、IL-15 / IL-15sushiとCD45 CARポリペプチドとの同時発現は、標的癌細胞のCAR認識の感受性を増加させるか、または癌細胞に対する自然免疫細胞を漸加することによって、患者において長期耐性寛解をもたらすと考えられている。

#### 【0194】

この実施例では、操作された細胞は、CD45キメラ抗原レセプターポリペプチドおよび4-1BBL(配列番号74)および対応するヌクレオチド(配列番号73)を含む。

#### 【0195】

この実施例では、本開示は、それを必要とする患者に4-1BBLを同時発現するCD45 CAR操作細胞を投与することによって、癌に罹患している患者に長期耐久性寛解を提供する方法を提供する。理論に拘泥するものではないが、4-1BBLとCD45CARとの同時発現は、CAR操作細胞の持続性を増加させることによって患者において長期間の耐久性寛解をもたらすと考えられている。

#### 【0196】

この実施例では、操作された細胞は、CD19キメラ抗原レセプターポリペプチドおよびIL-15 / IL-15sushi(配列番号59)および対応するポリヌクレオチド(配列番号60

10

20

30

40

50

)を含む。この実施例では、本開示は、IL-15 / IL-15sushiを含むCD19 CAR操作細胞を、それを必要とする患者に投与することによって、癌患者における長期耐久性寛解を提供する方法を提供する。理論に拘泥するものではないが、IL-15 / IL-15sushiとCD19 CARとの同時発現は、標的癌細胞のCAR認識の感受性を増加させるか、または癌細胞に対する自然免疫細胞を漸加することによって、患者において長期耐久性寛解をもたらすと考えられている。

#### 【0197】

この実施例では、操作された細胞は、CD20キメラ抗原レセプターポリペプチドおよびIL-15 / IL-15sushi(配列番号58)および対応するポリヌクレオチド(配列番号57)を含む。この実施例では、本開示は、IL-15 / IL-15sushiを含むCD20 CAR操作細胞を、それを必要とする患者に投与することによって、癌患者における長期耐久性寛解を提供する方法を提供する。理論に拘泥するものではないが、IL-15 / IL-15sushiとCD20 CARとの同時発現は、標的癌細胞のCAR認識の感受性を高め、または癌細胞に対する自然免疫細胞を漸加することによって、患者において長期耐久性寛解をもたらすと考えられている。10

#### 【0198】

この実施例では、操作された細胞は、CD22キメラ抗原レセプターポリペプチドおよびIL-15 / IL-15sushi(配列番号62)および対応するポリヌクレオチド(配列番号61)を含む。この実施例では、本開示は、IL-15 / IL-15sushiを含むCD22 CAR操作細胞を、それを必要とする患者に投与することによって、癌患者における長期耐久性寛解を提供する方法を提供する。理論に拘泥するものではないが、IL-15 / IL-15sushiとCD22 CARとの同時発現は、標的癌細胞のCAR認識の感受性を増加させるか、または癌細胞に対する自然免疫細胞を漸加することによって、患者において長期耐久性寛解をもたらすと考えられている。20

#### 【0199】

この実施形態では、操作された細胞は、CD269キメラ抗原レセプターポリペプチドおよびIL-15 / IL-15sushi(配列番号44)および対応するポリヌクレオチド(配列番号45)を含む。この実施例では、本開示は、IL-15 / IL-15sushiを含むCD269 CAR操作細胞を、それを必要とする患者に投与することによって、癌患者における長期耐久性寛解を提供する方法を提供する。理論に拘泥するものではないが、IL-15 / IL-15sushiとCD269 CARとの同時発現は、標的癌細胞のCAR認識の感受性を高め、またはCD269(BCMA)dim陽性である血漿細胞または骨髄腫細胞としての癌細胞に対する自然免疫細胞を漸加することによって、患者において長期耐久性寛解をもたらすと考えられている。30

#### 【0200】

この実施例では、操作された細胞は、配列番号90のCD4ポリペプチドおよび配列番号89の対応するポリヌクレオチドを含む。

#### 【0201】

この実施例において、操作された細胞は、CD4キメラ抗原レセプターポリペプチドおよびIL-15 / IL-15sushi(配列番号96)および対応するポリヌクレオチド(配列番号95)を含む。この実施例では、本開示は、IL-15 / IL-15sushiを含むCD4 CAR操作細胞を、それを必要とする患者に投与することによって、癌患者における長期耐久性寛解を提供する方法を提供する。理論に拘泥するものではないが、IL-15 / IL-15sushiとCD4 CARとの同時発現は、標的癌細胞のCAR認識の感受性を増加させるか、または癌細胞に対する自然免疫細胞を漸加することによって、患者において長期耐久性寛解をもたらすと考えられている。40

#### 【0202】

この実施例では、操作された細胞は、CD4キメラ抗原レセプターポリペプチドおよびIL-15 / IL-15RA(膜結合型)(配列番号98)および対応するポリヌクレオチド(配列番号97)を含む。この実施例では、本開示は、IL-15 / IL-15RAを含むCD4 CAR操作細胞を、それを必要とする患者に投与することによって、癌患者における長期耐久性寛解を提供する方法を提供する。理論に拘泥するものではないが、IL-15 / IL-15RA(膜結合型

10

20

30

40

50

)とCD4 CARとの共発現は、CAR操作細胞の持続性を増加させることにより患者において長期間の耐久性寛解をもたらすと考えられる。

#### 【0203】

この実施例では、操作された細胞は、compound CAR、CD33CD123ポリペプチドおよびIL-15 / IL-15sushi(配列番号40)および対応するポリヌクレオチド(配列番号39)を含む。この実施例では、本開示は、IL-15 / IL-15sushiを含むCD33CD123 compound CAR操作細胞を、それを必要とする患者に投与することによって、癌患者における長期耐久性寛解を提供する方法を提供する。理論に拘泥するものではないが、IL-15 / IL-15sushiとCD33CD123 CARとの同時発現は、標的癌細胞のCAR認識の感受性を増加させるか、または癌細胞に対する自然免疫細胞を漸加することによって、患者において長期耐久性寛解をもたらすと考えられている。10

#### 【0204】

この実施例では、操作された細胞は、compound CAR、CD33CD123ポリペプチドおよび4-1BBL(配列番号38)および対応するポリヌクレオチド(配列番号37)を含む。この実施例では、本開示は、4-1BBLをそれを必要とする患者に同時発現するCD33CD123 compound CAR改変細胞を投与することによって、癌患者における長期耐久性寛解を提供する方法を提供する。理論に拘泥するつもりはないが、4-1BBLとCD33CD123cCARとの共発現は、cCAR操作細胞の持続性を増加させることにより、患者において長期間持続可能な寛解をもたらすと考えられている。

#### 【0205】

この実施例では、操作された細胞は、CD45リーダー配列(配列番号78)および対応するポリヌクレオチド配列(配列番号77)を有するBAFF CARポリペプチドを含む。20

#### 【0206】

この実施例では、操作された細胞は、CD8aリーダー配列(配列番号80を含む)および対応するポリヌクレオチド配列(配列番号79)を有するBAFF CARポリペプチドを含む。

#### 【0207】

この実施例では、操作された細胞は、BAFF CARポリペプチドおよびIL-15 / IL-15sushi(配列番号84)および対応するポリヌクレオチド(配列番号83)を含む。

#### 【0208】

この実施例では、本開示は、IL-15 / IL-15sushiを含むBAFF CAR操作細胞を、それを必要とする患者に投与することによって、癌患者における長期耐久性寛解を提供する方法を提供する。理論に拘泥するものではないが、IL-15 / IL-15sushiとBAFF CARとの同時発現は、標的癌細胞のCAR認識の感受性を増加させるか、またはBAFF受容体、CD269(BCMA)を弱く発現する血漿細胞または骨髄腫細胞としての癌細胞に対する自然免疫細胞を漸加することによって、患者において長期耐久性寛解をもたらすと考えられている。30

#### 【0209】

この実施例では、操作された細胞は、BAFF CARポリペプチドおよび4-1BBL(配列番号82)および対応するポリヌクレオチド(配列番号81)を含む。この実施例では、本開示は、BAFF CAR操作細胞を、それを必要とする患者に4-1BBLを同時発現させることによって投与することによって、癌患者において長期耐久性寛解を提供する方法を提供する。理論に拘泥するつもりはないが、4-1BBLとBAFF CARとの同時発現は、CAR操作細胞の持続性を増加させることにより、患者において長期間の耐久性寛解を提供することができると考えられている。40

#### 【0210】

この実施例では、操作された細胞は、配列番号86のcompound CAR、BAFF CD19bポリペプチドおよび配列番号85の対応するポリヌクレオチドを含む。

#### 【0211】

この実施例では、本開示は、BAFF CD19b compound CAR操作細胞を、それを必要とする患者に投与することによって、患者の自己免疫障害を治療する方法を提供する。50

理論に拘泥するつもりはないが、BAFF CD19b compound CAR操作細胞は、自己免疫疾患に関連するB細胞および形質細胞の枯渇のためのより良い治療結果を提供すると考えられている。

【0212】

この実施例では、操作された細胞は、配列番号88のAPRIL CD19b compound CARポリペプチドおよび配列番号77の対応するポリヌクレオチドを含む。

【0213】

この実施例では、本開示は、APRIL CD19b compound CAR操作細胞を、それを必要とする患者に投与することによって、それを必要とする患者のB細胞および形質細胞を枯渇させる方法を提供する。理論に拘泥するつもりはないが、APRIL CD19b compound CAR操作細胞は、自己免疫疾患に関連するB細胞および形質細胞の枯渇によるより良好な治療結果を提供することができると考えられている。10

【0214】

この実施例では、操作された細胞は、配列番号48のcompound CAR, CD269 CS1ポリペプチドおよび配列番号47の対応するポリヌクレオチドを含む。この実施例では、本開示は、CD269CS1 compound CAR操作細胞を、それを必要とする患者に投与することによって、患者の骨髄腫を治療する方法を提供する。

【0215】

理論に拘泥するつもりはないが、CD269 CS1 compound CAR改変細胞は、骨髄腫患者にとってより良好な治療結果を提供し、抗原逃避または疾患再発を予防すると考えられている。20

【0216】

この実施例では、操作された細胞は、配列番号50のcompound CAR, CD269 CD19bポリペプチドおよび配列番号49の対応するポリヌクレオチドを含む。

【0217】

この実施例では、本開示は、CD269 CD19b compound CAR操作細胞を、それを必要とする患者に投与することによって、患者のB細胞および形質細胞を枯渇させる方法を提供する。理論に拘泥するつもりはないが、CD269 CD19b compound CAR操作細胞は、B細胞および自己免疫疾患に関連する形質細胞の枯渇による自己免疫疾患に罹患している患者にとってより良好な治療結果をもたらすと考えられる。30

【0218】

この実施例では、操作された細胞は、配列番号52のcompound CAR, CD269 CS1ポリペプチドおよび配列番号51の対応するポリヌクレオチドを含む。この実施例では、本開示は、CD269 CD19 compound CAR操作細胞を、それを必要とする患者に投与することによって、患者のB細胞および形質細胞を枯渇させる方法を提供する。理論に拘泥するものではないが、CD269 CD19 compound CAR操作細胞は、B細胞および自己免疫疾患に関連する形質細胞の枯渇による自己免疫疾患に苦しむ患者においてより良好な治療結果をもたらすと考えられている。

【0219】

この実施例では、本開示は、CD19キメラ抗原レセプターポリヌクレオチドを有する操作細胞を提供する。この実施例では、CD19 CARポリペプチドは、配列番号54および配列番号53の対応するポリヌクレオチドを含む。別の実施例では、CD19 CARポリペプチドは、配列番号56および配列番号55の対応するポリヌクレオチドを含む。40

【0220】

この実施例では、操作された細胞は、CD30 CARポリペプチド、およびIL-15 / IL-15sushiポリペプチド（配列番号100）および対応するポリヌクレオチド（配列番号99）を含む。標的疾患は、CD30を発現する癌細胞を伴う悪性ホジキンリンパ腫である。

【0221】

この実施例では、本開示は、IL-15 / IL-15複合体を分泌するCD30CAR操作細胞をそれを必要とする患者にを投与することによって、腫瘍微小環境患者におけるT細胞お50

および自然免疫細胞を再活性化する方法を提供する。理論に拘泥するものではないが、操作された細胞から分泌されたIL-15 / IL-15sushi複合体（例えば、IL-15 / IL-15sushi複合体）は、腫瘍微小環境においてT細胞および自然免疫細胞を再活性化し、その後、ホジキンリンパ腫または未分化大細胞リンパ腫に対する抗腫瘍免疫応答を回復または増大させる。

#### 【0222】

この実施例では、本開示は、本明細書に開示されたCARポリペプチドとIL-15 / IL-15sushiの同時発現を含む、T細胞または自然免疫細胞の活性化または増殖を回復または増強する方法を提供する。

#### 【0223】

別の実施例では、本開示は、CD30抗原に特異的な抗原認識ドメインを有するキメラ抗原レセプターポリペプチドを提供する。

10

#### 【0224】

この実施例では、CD30CARは、少なくとも1つの共刺激ドメインを含む。別の実施形例では、CD30CARは、少なくとも2つの共刺激ドメインを含む。

#### 【0225】

いくつかの実施例では、本開示は、IL-15 / IL-15sushiをCD30CARと同時発現させる方法を含む。さらなる実施例では、安定な機能的IL-15 / IL-15sushi複合体の大量分泌が、CARの標的細胞への結合の際に生じる。

#### 【0226】

別の実施例では、本開示は、CD30 CAR操作細胞を、それを必要とする患者に投与することによって、ホジキンリンパ腫またはCD30抗原を発現する悪性細胞に関連する癌に罹患している患者を治療する方法を提供する。CD30を発現する悪性細胞の例は、未分化大細胞リンパ腫を含む。

20

#### 【0227】

悪性ホジキンリンパ腫は、CD30 + リード・ステルンベルグまたはリード・ステルンベルグのような細胞を持ち、それらは圧倒的多数のT細胞および自然免疫細胞に囲まれている。これらのTまたは自然免疫細胞は、癌細胞を排除することができないので免疫学的に寛容である。したがって、ホジキンリンパ腫を治療するための重要な側面の1つは、腫瘍微小環境下でT細胞および先天性免疫細胞を再活性化し、次いでそれらの抗腫瘍免疫応答を回復または増強することである。

30

#### 【0228】

いくつかの実施例において、本開示は、IL-15 / IL-15sushiとCD30CARとの同時発現の方法を含む。操作されたCD30CAR TまたはNK細胞が標的癌細胞に結合し、CD30 CAR TまたはNK細胞の増殖からのIL-15 / IL-15sushiの大量分泌を誘発し、それによりIL-15 / IL-15sushiを分泌することが免疫抑制腫瘍微小環境に打ち勝つため、癌細胞に対し、効率的にTまたは自然免疫細胞を回復または増強することである。

#### 【0229】

この実施例では、本開示は、それを必要とする患者にIL-15 / IL-15sushiを同時発現するCD30 CAR操作細胞を投与することによって、癌患者に長期間耐久性寛解を提供する方法を提供する。理論に拘泥するものではないが、CD30CARとのIL-15 / IL-15sushiの同時発現は、免疫抑制性腫瘍微小環境に打ち勝つため、標的癌細胞のCAR認識の感受性を増加させるか、または自然免疫細胞を漸加することによって、患者において長期間耐性寛解をもたらすと考えられている。

40

#### 【0230】

いくつかの実施例では、本開示は、IL-15 / IL-15sushiおよびCD30CARポリペプチドを同時発現する操作された細胞を提供する。理論に拘泥するものではないが、CD30CAR操作細胞とIL-15 / IL-15sushiの同時発現との組み合わせは、チェックポイントインヒビターまたはモジュレーター（例えば、抗PD-1）と組み合わせた場合に相乗効果をもたらすと考えられる。

#### 【0231】

50

いくつかの実施例では、本開示は、IL-15 / IL-15sushiをそれを必要とする患者に同時発現するCD30 CAR操作細胞を投与することによって、患者におけるホジキンリンパ腫を治療する方法を提供する。CD30CARポリペプチドとIL-15 / IL-15sushiの同時発現は、CD30がすべての癌細胞において発現されないため、CD30CAR単独よりもホジキンリンパ腫または未分化大細胞の治療のためにより良い結果をもたらす。

#### 【0232】

CAR共発現分泌型IL-15 / IL-15sushiによる腫瘍の除去のためのステップ（図78）

この実施例では、本開示は、IL-15 / IL-15sushiを同時発現するAPRIL CAR操作細胞を、それを必要とする患者に投与することによって、癌患者における長期耐久性寛解を提供する方法を提供する。理論に拘泥するものではないが、IL-15 / IL-15sushiとAPRIL CARポリペプチドとの同時発現は、標的癌細胞のCAR認識の感受性を増加させるか、または自然免疫細胞を漸加することによって、患者において長期耐久性寛解をもたらすと考えられている。APRIL受容体、CD269（BCMA）は、形質細胞および骨髄腫細胞において弱く発現される。

10

#### 【0233】

特定の実施例では、本開示は、前記腫瘍細胞を破壊するためにIL-2を同時発現するCAR操作細胞と前記腫瘍細胞を接触させることを含む、腫瘍細胞の排除方法を提供する。

#### 【0234】

IL-15は、もともとTおよびNK細胞のインターロイキン2（IL-2）様因子と考えられていた。IL-2とは異なり、IL-15は記憶T細胞の生存因子である。

20

#### 【0235】

特定の実施例において、腫瘍の排除は、以下の工程の少なくとも1つ以上の組み合わせによって達成され得る。

(1) CARまたはNK抗原を標的とすることによって腫瘍細胞の一部に本明細書に開示するCAR操作されたT細胞またはNK細胞の結合。

(2) この分子を共発現するCAR T / NK細胞の増殖からの延長された半減期を有するIL-15 / IL-15sushiまたはIL-2の大量分泌を誘発する。

(3) 腫瘍に対する様々な先天性および適応性の免疫細胞を動員し、刺激する。

(4) PD-L1およびCTLA-4阻害剤などのチェックポイント阻害の投与によって腫瘍に存在する腫瘍抑制を低減する。

30

#### 【0236】

理論に拘泥するものではないが、上記の工程の組合せは、協調した先天的および適応免疫応答を介して強力な抗腫瘍効果をもたらすと考えられる。

#### 【0237】

本明細書に記載の操作された細胞および方法は、特定のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体が存在するか、または当技術分野の現状に従って作成することができる任意の癌の治療に適している。特に、以下の癌が検討されており、本開示の範囲内であると考えられているが、神経芽細胞腫、肺癌、メラノーマ、卵巣癌、腎細胞癌、結腸癌、脳癌、ホジキンリンパ腫、B細胞リンパ腫/白血病およびT細胞リンパ腫/白血病。それらの全ては、本明細書に開示されるキメラ抗原レセプターポリペプチドおよび方法によって標的とされ得る細胞表面抗原を有する。

40

#### 【0238】

標的抗原の喪失、またはCAR TまたはNK枯渇のために、多くの腫瘍が特異的CAR T / NK殺傷から脱出する。本開示は、この脱出を克服する方法を提供する。理論に拘泥するものではないが、本開示は、本明細書に開示されるようなエンハンサーまたはサイトカイン、特にIL-15またはIL-2を有するCAR操作細胞を投与することによって、腫瘍部位でのCAR操作細胞により、腫瘍の逃避を妨げる。これは、自然免疫および適応免疫応答を直接的に刺激すると考えられている。さらに、CAR操作細胞からのIL-15および/またはIL-2分泌は、注入されたCAR T細胞またはCAR NK細胞の増殖および腫瘍部位への腫瘍破壊をもたらすと考えられる免疫細胞の浸潤を促進すると考えられている。

50

**【 0 2 3 9 】**

実施例では、半減期延長および延長された治療活性は、Fcドメイン、例えばIL-15FcまたはIL-2Fcの存在下で確立され得る。IL-15サイトカインの場合、IL-15 / IL-15sushiまたはIL-15 / IL-15sushi Fcが好ましい。Fcドメインは、様々なエフェクター分子（いわゆるFc融合タンパク質）に融合されたIgG Fcドメインと呼ばれる。

**【 0 2 4 0 】**

例えばCD19、CD20、CD22、CD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD33、CD30、CD123、CD45、BCMA、CS1、BAFF、TACI、およびAPRIL CARなどの単一抗原特異的CAR免疫療法標的抗原の完全な消失または標的抗原発現の変化に起因して、患者において寛解の危険性がある。これに基づいて、本開示は、本明細書中に開示されるCARポリペプチドを有する操作された細胞およびIL-15 / IL-15sushiの同時発現を投与することにより、標的癌細胞のCAR認識の感受性を増加させるか、または癌細胞への自然免疫細胞を漸加することによって、患者における長期耐久性寛解を提供する方法を提供する。

10

**【 0 2 4 1 】**

大量の 固形腫瘍またはリンパ腫は、CAR T細胞が全腫瘍を根絶するのが困難である。さらに、腫瘍に接触するとCAR T細胞が単に不活性化または抑制されるため、免疫抑制微小環境を克服する必要があります。

**【 0 2 4 2 】**

いくつかの実施例では、本開示は、操作された細胞において分泌性IL-15 / IL-15sushiおよびキメラ抗原レセプターポリペプチドを同時発現させる方法を提供する。

20

**【 0 2 4 3 】**

いくつかの実施例では、本開示は、前記操作された細胞において分泌IL-15 / IL-15sushiを同時発現させることによってCAR操作細胞のin vivoでの半減期を増加させる方法を提供する。理論に拘泥するものではないが、IL-15 / IL-15sushiの分泌複合体は機能的に安定であり、CAR含有操作細胞の生存を効率的に促進すると考えられている。

**【 0 2 4 4 】**

いくつかの実施例では、本開示は、癌細胞に対する自然免疫応答細胞の増殖を促進し、腫瘍の微小環境抑制を予防し、高用量の外因性サイトカインに伴う全身毒性を低下させるためのCARを担体として使用する方法を提供する。

**【 0 2 4 5 】**

30

いくつかの実施例では、本開示は、他のエフェクター免疫細胞をその部位に動員し、それらが癌細胞を殺傷するのを助けるためのキャリアとしてCARを使用し、標的とする癌部位にIL-15 / IL-15sushiを送達する方法を提供する。

**【 0 2 4 6 】**

いくつかの実施例では、本開示は、CAR T / NK細胞に対する抗原を失う癌細胞を根絶するためのバイスタンダー免疫を活性化するためのキャリアとしてCARを使用して、標的癌部位にIL-15 / IL-15sushiを送達する方法を提供する。

40

**【 0 2 4 7 】****操作された細胞を作製する方法**

本明細書に開示されるいかなるポリヌクレオチドのいずれかは、当技術分野で既知の任意の方法によって操作された細胞に導入され得る。

**【 0 2 4 8 】**

この実施例では、CARポリヌクレオチドは、本明細書に開示される任意のウイルスベクターによって操作された細胞に送達される。

**【 0 2 4 9 】**

この実施例では、安全性プロファイルまたは治療指數の向上を達成するために、本明細書中に開示される任意の操作細胞は、一過性RNA修飾「生分解性」バージョンまたは誘導体、またはそれらの組み合わせとして構築される。本発明のRNA修飾CARは、T細胞またはNK細胞に電気穿孔されるかもしれない。compound CARの発現は、数日にわたって徐々に減少し得るかもしれない。

50

**【 0 2 5 0 】**

本発明のいくつかの実施例では、本明細書中に開示される任意の操作された細胞は、ウイルスDNAなしで宿主ゲノムにCAR DNAを組み込むトランスポゾンシステム（「Sleeping Beauty」とも呼ばれる）で構築することができるかもしれない。

**【 0 2 5 1 】**

Multiple CARユニットを有する操作された細胞を作製する方法

別の実施例では、本開示は、少なくとも2つのCARユニットを有する操作された細胞を作製する方法を提供する。

**【 0 2 5 2 】**

いくつかの実施形態では、CARの複数の単位が、バイリストロンまたはマルチストロン発現ベクターを用いてT細胞またはNK細胞で発現される。バイリストロン性またはマルチリストロン性のベクターを構築するために用いることができるいくつかの戦略があり、限定されるものではないが、(1) CARのオープンリーディングフレームに融合した複数のプロモーター、(2) CARのユニット間のスプライシングシグナルの挿入、発現が単一のプロモーターによって誘導されるCARの融合、(3) CARのユニット間のタンパク質分解切断部位の挿入（自己切断ペプチド）、(iv) 内部リボソーム侵入部位（IRES）の挿入などがあげられる。

10

**【 0 2 5 3 】**

好ましい実施例では、複数のCAR単位が単一のオープンリーディングフレーム（ORF）で発現され、それによって複数のCAR単位を有する単一のポリペプチドが作製される。この実施例では、高効率切断部位を含むアミノ酸配列またはリンカーがそれぞれのCAR単位の間に配置される。

20

**【 0 2 5 4 】**

本明細書中で使用される場合、高い切断効率とは、翻訳されたタンパク質の50%以上、70%以上、80%以上または90%以上が切断されると定義される。切断効率は、Kim 2011によって記載されているように、ウェスタンプロット解析によって評価されるかもしれない。

**【 0 2 5 5 】**

さらに、好ましい実施例では、ウェスタンプロット分析で示されるように、等量の切断されたものが存在する。

30

**【 0 2 5 6 】**

高効率切断部位の例として、ブタ・テスコウイルス-1 2A (P2A)、FMDV 2A (本明細書ではF2Aと略記する)、ウマ鼻炎Aウイルス (ERAV) 2A (E2A)、Thosea asignaウイルス (T2A)、細胞質多角体病ウイルス2A (BmCPV2A) および軟化病ウイルス2A (BmIFV2A)、またはそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない。好ましい実施例では、高効率切断部位はP2Aである。高効率切断部位は、Kim JH, Lee S-R, Li L-H, Park H-J, Park J-H, Lee KY, et al. (2011) High Cleavage Efficiency of a 2A Peptide Derived from Porcine Teschovirus-1 in Human Cell Lines, Zebrafish and Mice. PLoS ONE 6(4): e18556の記載を参照により、本明細書に使用されている。

40

**【 0 2 5 7 】**

ここでの実施例において、複数のCAR単位が単一のオープンリーディングフレーム（ORF）下で発現され、発現は強力なプロモーターの制御下にある。強力なプロモーターの例として、SFFVプロモーターおよびその誘導体が含まれる。

**【 0 2 5 8 】**

CARポリペプチドおよびエンハンサーを有する操作された細胞

別の実施例では、本開示は、少なくとも1つのCARユニットおよびエンハンサーを発現する操作された細胞を作製する方法を提供する。

**【 0 2 5 9 】**

いくつかの実施例では、少なくとも1つのCARユニットおよびエンハンサーが、バイリストロンまたはマルチリストロン発現ベクターを用いてT細胞またはNK細胞で発現

50

される。バイシストロンまたはマルチシストロンのベクターを構築するために用いることができるいくつかの戦略があり、限定されるものではないが、(1) CARのオープンリーディングフレームに融合された複数のプロモーター、(2) CARのユニット間のスプライシングシグナルの挿入、および発現が単一のプロモーターによって誘導されるCARの融合、(3) CARのユニット間へのタンパク質分解切断部位(自己切断ペプチド)の挿入、(4) 内部リボソーム侵入部位(IRES)の挿入がある。

#### 【0260】

好ましい実施例では、複数のCAR単位が単一のオープンリーディングフレーム(ORF)で発現され、それによって少なくとも1つのCAR単位およびエンハンサーを有する単一のポリペプチドが作製される。この実施例では、高効率切断部位を含むアミノ酸配列またはリンカーが、各CAR単位間およびCAR単位とエンハンサーとの間に配置される。この実施例では、ORFは強力なプロモーターの制御下にある。強力なプロモーターの例には、SFFVプロモーターおよびその誘導体が含まれる。

10

#### 【0261】

さらに、好ましい実施例ではウェスタンプロット分析で示されるように、等量の切断されたものが存在する。

#### 【0262】

本明細書に開示される構成物を用いた治療方法

別の実施例では、本発明は、癌治療における同種異系移植の前におけるコンディショニングのため、CD45を標的化する方法を提供する。CD45は、白血球共通抗原(LCA)としても知られており、赤血球および血小板を除いて造血起源の事実上すべての細胞上で発現されるチロシンホスファターゼである。ほとんどの血液悪性腫瘍はCD45を発現する。例えば、85%～90%の急性リンパ性白血病および骨髄性白血病は、CD45を発現する。CD45は非造血起源には見出されない。さらに、CD45は、悪性細胞および白血球上の細胞当たり約200,000分子の平均コピー数の高密度で発現される。CD45は、様々な血液悪性腫瘍に対する理想的な標的である。しかしながら、CAR TおよびNK細胞もCD45を発現する。内因性CD45の不活性化がなければ、CD45を標的とすとした武装したCAR TまたはNK細胞は、結果、自己殺傷を引き起こし得るかもしれない。

20

#### 【0263】

CD45とTCR複合体の提携は、抗原に応答するT細胞活性化の調節において必須である。CD45欠損T細胞が抗原を提示することができないことは、TCR受容体(TCRs)を介したシグナル伝達の減少によるものである。TCRsは、抗原の提示に応答してT細胞の活性化に本質的な役割を果たす細胞表面受容体である。TCRは、一般に、細胞表面上に存在するT細胞受容体複合体を形成するために、形質導入サブユニット、CD3に関連する2つの鎖、およびから作製される。

30

#### 【0264】

驚くべきことに、本発明のmultiple CARs(Compound CARs, cCAR)は、癌細胞がCAR活性に抵抗する、すなわち癌細胞表面からの標的抗原のダウンレギュレーションまたは異種発現に抵抗する重要なメカニズムと戦うことが見出された。このメカニズムは癌細胞がCAR療法から「隠れる」ことを可能にし、これは「抗原逃避」とも呼ばれる現象である。本開示は、2つあるいはそれ以上の抗原の組み合わせを認識して腫瘍を迅速に排除することによって癌抗原逃避に対して先制するものである。

40

#### 【0265】

本開示は、cCARを用いたマルチ抗原の同時標的化方法であって、標的抗原の喪失またはダウンレギュレーションに基づく腫瘍選択の可能性を最小限に抑えることによって腫瘍制御を改善する方法を提供する。

#### 【0266】

開示される発明は、腫瘍細胞中に存在する異なるまたは同じ表面抗原を標的とするT細胞またはNK細胞でのcompound(multipleまたはcoumpound)cCARを含む。本発明のcompoundキメラ抗原レセプターは、リンカーによって連結され、同一または異な

50

る抗原を標的とする少なくとも複数のキメラレセプターでの構成物を含む。例えば、compound CAR (cCAR) 構成中に存在するそれぞれのCAR構成は、抗原認識ドメイン、細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび/または細胞質ドメインを含む。細胞外ドメインおよび膜貫通ドメインは、そのようないかなる求められるドメイン由来でありえる。Multiple CARの構成はリンカーでリンクされている。Compound CAR構成の発現はプロモーターによって誘導される。リンカーは、ペプチドまたはタンパク質の一部であってもよく、タンパク質またはペプチドが生成された後に自己切断される（自己切断ペプチドとも呼ばれる）。

#### 【0267】

この実施例では、本発明のcompound CARは、骨髓異形成症候群および急性骨髓性白血病（AML）を標的とする。骨髓異形成症候群（MDS）は、最も高齢者の中で頻繁に発生する難治性の造血幹細胞悪性腫瘍であり、毎年約14,000の新規症例が米国で発生しています。約30-40%のMDSの症例がAMLに進行する。人口の高齢化に伴い、MDSの発生率は増加し続けています。MDSおよびAMLは、かなり研究されているが、十分な治療法は開発されていない。

#### 【0268】

本発明の構成および方法は、癌の治療としての免疫療法における一次および共刺激シグナルの両方を送達するTリンパ球またはNK細胞の集団を作製するために使用され、とりわけ肺癌、黒色腫、乳癌、前立腺癌、結腸癌、腎細胞癌、卵巣癌、脳癌、肉腫、白血病およびリンパ腫などの治療が挙げられる。

#### 【0269】

免疫療法薬は、一般に、免疫エフェクター細胞および分子に依存し、癌細胞を標的化し、そして破壊することである。エフェクターは、直接的または間接的に腫瘍細胞標的と相互作用する表面分子を有するリンパ球であるかもしれない。様々なエフェクター細胞として、細胞傷害性T細胞、NK細胞およびNK-92細胞が含まれる。種々のエフェクター細胞には、細胞傷害性T細胞、NK細胞およびNK-92細胞が含まれる。本発明に記載の構成および方法は、化学療法、外科手術、放射線療法、遺伝子療法などの癌のための他のタイプの療法と併せて利用することができるかもしれない。本発明に記載の構成および方法は、炎症、免疫疾患および感染症などの免疫応答に依存する他の疾患でも利用されるかもしれない。

#### 【0270】

いくつかの実施例では、本開示のcompound CARは、微小残存病変を有し、もはや化学療法に応答しない患者に対して完全な寛解を達成することにより、骨髄移植に対する橋渡しとして機能し得るかもしれない。他の実施例では、compound CARは、白血病細胞を除去し、その後の骨髄幹細胞レスキュード白血球減少をサポートする。

#### 【0271】

いくつかの実施形態では、本開示のcompound CARは、癌細胞が標的抗原のダウンレギュレーションによってCAR活性に抵抗する重要なメカニズムに対して戦うことができる。別の実施例では、本発明のcompound CARはまた、癌細胞の不均一性と戦うことができ、これは、通常のCAR T / NK細胞療法において重大なる挑戦である。さらなる実施例では、開示されるcompound CARは、第1のCARが大きな腫瘍集団を標的とし、別のCARが癌再発を回避するために癌または白血病幹細胞を根絶するように設計される。

#### 【0272】

この実施形態では、本開示は、CD33抗原またはCD123抗原、あるいは両方有する細胞を、CD33抗原認識ドメインおよびCD123抗原認識ドメインを有するキメラ抗原レセプターポリペプチドの少なくとも1つを有する操作細胞と接触させることによって標的とする細胞を破壊する方法を提供する。操作された細胞は、T細胞またはNK細胞であり得る。

#### 【0273】

CD33抗原およびCD123抗原の少なくとも1つを有する細胞は、急性骨髓性白血

10

20

30

40

50

病、前駆急性リンパ芽球性白血病、慢性骨髄増殖性新生物、慢性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、芽球性形質細胞腫樹状腫瘍（BPDCN）、ホジキンリンパ腫、肥満細胞症およびヘアリーセル白血病細胞である。

#### 【0274】

別の実施形態では、本開示は、造血幹細胞移植のための骨髄破壊的移植前治療レジメンを提供する方法を提供する。この実施例では、CD33ユニットおよびCD123ユニットを有するTまたはNK操作細胞が、それを必要とする患者に投与される。

#### 【0275】

さらなる実施例では、本開示は、CD123またはCD33を発現する白血病幹細胞（LS C）またはバルク白血病細胞、またはその両方を根絶または死滅させる方法を提供する。  
この実施例では、CD33ユニットおよびCD123ユニットを有するTまたはNK操作細胞が、それを必要とする患者に投与される。

#### 【0276】

さらなる例では、TまたはNK細胞中のcompound CARは、CD34 + CD38-白血病幹細胞またはCD123またはCD33またはその両方を発現するバルク白血病細胞を根絶または死滅させるために使用され得るかもしれない。

#### 【0277】

いくつかの実施形態では、compound CARは、CD19またはCD20抗原またはその両方を発現する細胞を標的とする。別の実施例では、compound CARは、CD19またはCD22抗原またはその両方を発現する細胞を標的とする。標的細胞は、限定するものではないが、B細胞リンパ腫または白血病などの癌細胞であるかもしれない。さらなる実施例では、標的抗原は、ROR1、PSMA、MAGE A3、糖脂質、グリビカン3、F77、GD-2、WT1、CEA、HER-2 / neu、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、フェトプロテイン、CA19-9、CA72-4、NY-ESO、FAP、ErbB、c-Met、MART-1、CD30、EGFRvIII、免疫グロブリン kappaそしてlambda、CD38、CD52、CD3、CD4、CD8、CD5、CD7、CD2そしてCD138からなるグループより少なくとも1つは含まれるがこれに限定されない。標的抗原は、ヒトパピローマウイルス（HPV）またはEBV（エピスタンバーウィルス）抗原由來のE6およびE7などのウイルスまたは真菌抗原を含むことができる。

#### 【0278】

いくつかの実施例では、compound CAR操作細胞は、細胞表面CD19抗原または細胞表面CD123抗原またはその両方を有する細胞を標的とする。標的細胞は、限定するものではないが、B細胞リンパ腫または白血病などの癌細胞である。

#### 【0279】

CD19 CAR T細胞療法の臨床試験は、B-ALL患者の80～94%が完全寛解を達成するが、患者のかなりの部分が最終的に再発することを示している。B-ALLにおけるCD123発現の罹患率は高く、B-ALLのCAR標的として使用することができる。

#### 【0280】

いくつかの実施例では、compound CARは、CD19またはCD123抗原またはその両方を発現する細胞を標的とする。理論に拘泥するものではないが、CD19および/またはCD123 compound CAR操作細胞は、CD19またはCD123抗原の消失またはB-ALLまたは他のタイプのB細胞リンパ腫/白血病再発の防止により、腫瘍逃避を相殺すると考えられている。

#### 【0281】

さらなる実施例では、CD19および/またはCD20 compound CAR操作細胞は、細胞表面CD19抗原および/またはCD20細胞表面抗原を有する細胞を標的とする。別の実施例では、標的細胞は、限定するものではないが、B-ALL、高悪性度B細胞リンパ腫、低悪性度B細胞リンパ腫、びまん性大B細胞リンパ腫、バーケットリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、CLL、周辺ゾーンB細胞リンパ腫および濾胞性リンパ腫などの悪性B細胞リンパ腫/白血病である。

10

20

30

40

50

**【 0 2 8 2 】**

理論に拘泥するものではないが、CD19および/またはCD20 CAR操作細胞は、B細胞悪性腫瘍の養子T / NK細胞療法における抗原逃避に対する効果的な予防手段を提供し、疾患の再発を予防すると考えられている。

**【 0 2 8 3 】**

CAR標的細胞には、CD19、CD20、CD22およびCD123の少なくとも1つの抗原を有する先天性急性リンパ芽球性白血病、B細胞リンパ腫/白血病、慢性リンパ性白血病/リンパ腫、マントルリンパ腫、濾胞性リンパ腫、辺縁帯B細胞リンパ腫、びまん性大B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、芽球性形質細胞腫樹状新生物(BPDCN)、ホジキンリンパ腫および毛状細胞白血病細胞からなる群より選択される。

10

**【 0 2 8 4 】**

この実施例では、操作された細胞は、CD19抗原認識ドメインを有する第1のキメラ抗原レセプターポリペプチドおよびCD22抗原認識ドメインを有する第2のキメラ抗原レセプターポリペプチドを含む。この実施例では、この操作された細胞は、配列番号64のポリペプチドおよび、配列番号63の対応するポリヌクレオチドとを含む。

**【 0 2 8 5 】**

この実施例では、操作された細胞は、CD19抗原認識ドメインを有する第1のキメラ抗原レセプターポリペプチドおよびCD20抗原認識ドメインを有する第2のキメラ抗原レセプターポリペプチドを含む。この実施例では、この操作された細胞は、配列番号66のポリペプチドおよび、配列番号65の対応するポリヌクレオチドとを含む。

20

**【 0 2 8 6 】**

この実施例では、操作された細胞は、CD19抗原認識ドメインを有する第1のキメラ抗原レセプターポリペプチドおよびCD123抗原認識ドメインを有する第2のキメラ抗原レセプターポリペプチドを含む。この実施例では、この操作された細胞は、配列番号68のポリペプチドおよび、配列番号67の対応するポリヌクレオチドとを含む。

**【 0 2 8 7 】**

多発性骨髓腫は、骨髄における形質細胞の制御不能な増殖を示す不治の病です。CS1およびBCMAは骨髓腫細胞上に広く発現するが、造血幹/前駆細胞では発現しない。したがって、BCMAおよびCS1は、CAR T / NK細胞療法のための理想的な標的である。

30

**【 0 2 8 8 】**

さらなる実施例では、本開示は、CS1(SLAM7)抗原認識ドメインおよび/またはB細胞成熟抗原(BCMA)を標的とする抗原認識ドメインを有するcompound CAR操作細胞を提供する。別の実施例では、標的細胞は、限定されないが、多発性骨髓腫などの悪性形質細胞である。

**【 0 2 8 9 】**

理論に拘泥するものではないが、CS1およびBCMA抗原認識ドメインの少なくとも1つを有するcompound CAR操作細胞は、多発性骨髓腫および抗原逃避の相殺に対する機能性を増強すると考えられている。

**【 0 2 9 0 】**

いくつかの実施例では、CARは、限定されるものではないが、CS1、BCMA、CD267、BAFF-R、CD38、CD138、CD52、CD19、TACI、CD20、インターロイキン6レセプター、およびNY-ESO-1抗原を含む複数の抗原を発現している細胞を標的とする。別の実施例では、標的細胞は、限定されないが多発性骨髓腫などのような形質細胞、B細胞、悪性血漿細胞である。

40

**【 0 2 9 1 】**

いくつかの実施例において、compound CARは、限定されるものではないがCS1、BCMA、CD267、BAFF-R、CD38、CD138、CD52、CD19、TACI、CD20、インターロイキン6受容体、およびNY-ESO-1抗原を含む複数の抗原を発現している細胞を標的とする。別の実施形態では、標的細胞は、限定するものではないが、多発性骨髓腫などの悪性形質細胞である。

50

## 【0292】

いくつかの実施例では、compound CARは、アルファフェトプロテイン (AFP) およびグリピカン-3 (GPC3) を含むがこれに限定されない複数の抗原を発現する細胞を標的とする。別の実施例において、標的細胞は、肝細胞癌、線維芽細胞腫、肝芽細胞腫、未分化胚性肉腫および肝臓の間葉性腫瘍、肺扁平上皮細胞癌、精巣非分化胚細胞腫瘍、脂肪肉腫、卵巣および奇形卵黄嚢腫瘍、卵巣絨毛癌、卵巣明細胞癌、および胎盤部位栄養芽腫が挙げられる。

## 【0293】

理論に拘泥するものではないが、本開示は、異種または同じ抗原を標的とするcompound CAR操作T細胞またはNK細胞を提供し、腫瘍逃避を相殺し、腫瘍細胞の同時標的化を提供する。

10

## 【0294】

本明細書中に開示されるcompound CARを含むTまたはNK宿主細胞は、本開示において具体的に表現される。compound CARのヌクレオチドおよび構成、配列、宿主細胞、ベクターは、本開示の一部であると考えられ、本明細書において具体的に示される。

## 【0295】

いくつかの実施例では、compound CARは、現在開発中または市販されている任意の化学療法剤と組み合わせて投与される。いくつかの実施例では、compound CARは、血液悪性腫瘍、癌、非血液悪性腫瘍、炎症性疾患、HIVおよびHTLVなどの感染性疾患および他のものを含むが、これらに限定されない疾患の第一選択治療として投与される。この実施例において、compound CARを発現するT細胞は、適応免疫療法として同一または異なるcompound CARを発現するNK細胞と同時投与される。compound CAR NK細胞は、迅速で、生来の活性を標的細胞に提供するが、compound T細胞は相対的な持続性適応免疫活性を提供する。

20

## 【0296】

この実施例では、compound CARを発現する細胞は、哺乳動物、例えば、化学療法に耐性であり、骨髄幹細胞移植に適格でない患者への骨髄幹移植への橋渡しとして投与される。

## 【0297】

いくつかの実施例では、compound CARは、導入遺伝子を同時発現し、標的の腫瘍病変においてIL-12などの形質転換産物を放出し、さらに腫瘍微小環境を調節する。

30

## 【0298】

この実施例において、compound CARを発現する細胞は、疾患に対する治療の一部として、骨髄の骨髄アブレーションのために哺乳動物に投与される。

## 【0299】

特定の実施例では、compound CARを発現する細胞は、T細胞またはNK細胞であり得、哺乳動物、例えば、人間に投与される。提示される開示は、compound CARの投与によって、障害または疾患を有する哺乳動物を治療する方法を含む。標的細胞は、感染性疾患、炎症および自己免疫疾患のような他のいかなる疾患状態で影響される細胞や癌細胞なのかもしれない。

40

## 【0300】

本発明は、compound CARの断片、突然変異体または変異体（例えば、修飾形態）の使用及び、T / NK細胞の刺激および増殖を誘導する能力を保持する抗原の使用を含むことを意図する。「タンパク質の形態」は、少なくとも1つのCARまたは抗原と有意な相同性を共有し、T / NK細胞への刺激および増殖を達成することができるタンパク質を意味することが意図される。本明細書で使用する「生物学的に活性な」または「生物学的に活性な形態のタンパク質」という用語は、細胞の抗腫瘍活性をもたらすことができるタンパク質または変異体の形態を含むことを意味する。

## 【0301】

本発明の構成物および方法は、癌の治療としての免疫療法における一次および共

50

刺激シグナルの両方を送達するT細胞またはNK細胞の集団を作製するために使用され、特に肺癌、メラノーマ、乳癌、前立腺癌、結腸癌、腎細胞癌、卵巣癌、神経芽細胞腫、横紋筋肉腫、白血病およびリンパ腫が挙げられる。本発明に記載の構成物および方法は、化学療法、外科手術、放射線療法、遺伝子療法などの癌のための他のタイプの療法と併せて利用することができます。

1) いくつかの実施例では、本発明は、CARまたはcompound CAR T細胞あるいはNK細胞を患者に投与することによって、自己免疫疾患の患者のB細胞、未成熟B細胞、記憶B細胞、形質芽細胞、長期生存形質細胞、または形質細胞の減少方法を開示する。CARの標的細胞は、抗原であるBCMA、TACIおよびBAFF-Rの1つまたは2つ、または全てを発現するBまたは形質細胞である。自己免疫疾患には、全身性強皮症、多発性硬化症、乾癬、皮膚炎、炎症性腸疾患（クローン病および潰瘍性大腸炎など）、全身性エリテマトーデス、血管炎、関節リウマチ、シェーグレン症候群、多発性筋炎、肉芽腫症および血管炎、アジソン病、抗体複合体媒介性疾患および抗糸球体基底膜疾患が挙げられる。  
10

#### 【0302】

複数の細胞外細胞マーカーが、腫瘍関連抗原として有用性があり、したがってCAR T / NK細胞療法の潜在的標的として現在研究されている。しかし、健康な組織上でのこれらの抗原の発現は、有害事象（on-target, off-tumor）をもたらす、標的外への毒性は主要な安全性の懸念事項として残っている。さらに、CAR T / NK細胞療法の主要な制限は、腫瘍形成に必須ではない分子を標的とする場合、抗原エスケープの変異体を選択する可能性があることである。したがって、標的抗原の発現がほとんどまたは全くないまま存続する悪性細胞は、それらのCARの高親和性作用にもかかわらず、CAR T / NK細胞から回避し得る。  
20

#### 【0303】

本発明によれば、ナチュラルキラー（NK）細胞は、CARによる殺傷のための代替の細胞傷害性エフェクターである。T細胞とは異なり、NK細胞は前活性化を必要とせず、恒常的に細胞溶解性機能を示す。NK細胞においてcCARのさらなる発現は、NK細胞が癌、特にNK細胞治療に耐性の癌細胞を効果的に殺すことを可能にする。

#### 【0304】

さらに、NK細胞は、移植片対宿主病（GvHD）を誘発するリスクなしに、抗癌効果をもたらすことが知られている。  
30

#### 【0305】

研究により、CD34 + CD38-AML細胞上にCD123の異常な過剰発現が示されたが、正常骨髄対応CD34 + CD38-にはCD123を発現しなかった（Jordan、Upchurchら、2000）。CD123 +、CD34 + CD38-のこの集団は、これらの細胞が免疫不全マウスにおいて白血病プロセスを開始および維持することができるので、LSCs (Chronic Myeloid Leukemia Stem Cells)として考えられている。

#### 【0306】

CD34 + / CD38- / CD123 + LSCの数は、AML患者の臨床転帰を予測するために使用することができる。AML患者において15%を超えるCD34 + / CD38- / CD123 +細胞は、完全寛解の欠如および好ましくない細胞遺伝学的プロファイルと関連している。さらに、1%を超えるCD34 + / CD38- / CD123 +細胞の存在はまた、無病生存期間および全生存率に悪影響を及ぼし得る。  
40

#### 【0307】

現在、MDSおよびAMLの治療法は、白血病性芽細胞が非常に豊富であり、明らかに患者にとって最も当面の問題であるため、白血病芽細胞に焦点を当てている。重要なことに、白血病幹細胞（LSCs）は、他の白血病細胞（「プラスト」細胞）の大部分とはかなり異なり、それらはまれな亜集団を構成する。芽細胞を死滅させることで短期間の救済となるが、LSCsを破壊しなければ、常に再成長し、患者の病気は再発する。MDS疾患の恒久的な治癒を達成するためには、LSCsを破壊することが不可欠です。残念なことに、標準的な薬物レジメンは、MDSまたはAMLのLSCに対して有効ではない。したがって、白  
50

血病幹細胞集団および巨大な白血病集団の両方を特異的に標的とすることができる新しい治療法を開発することが重要である。本発明で開示されるcompound CARは、これらの集団の両方を標的とし、本明細書に具体的に記載している。

#### 【 0 3 0 8 】

本発明によれば、驚くべきことに、NK細胞は、治癒のための同種異系間の製品として使用され得る既製品を提供することが見出された。したがって、本発明によれば、cCAR細胞療法は、現在の技術水準によって要求されるような、患者特異的な基準で実施される必要がある。本発明の出願人は、患者のリンパ球または腫瘍浸潤したリンパ球を効果的なCAR細胞に基づく治療を行う為に単離する必要がない、新規の免疫療法を発見した。

#### 【 0 3 0 9 】

同種または自己NK細胞は、急速な免疫応答を誘導すると予想されるが、その寿命が限られているため血液循環系から比較的急速に消失する。したがって、本出願人らは、驚くべきことに、cCAR細胞に基づく療法を使用することで、持続的な副作用の懸念が減少することを発見した。

#### 【 0 3 1 0 】

本発明の1つの側面によれば、NK細胞を本発明に従ってcCARで増殖させ、トランسفェクトすることができる。NK細胞は、臍帯血、末梢血、iPS細胞および胚性幹細胞から得られる。本発明の1つの側面によれば、NK-92細胞は、増殖でき、cCARをトランسفェクトされ得る。NK-92は、ナチュラルキラー（NK）細胞の特色および特徴を有する持続的に増殖する細胞株である。NK-92細胞株はIL-2依存性であり、安全かつ適した細胞であることが証明されている。cCAR発現NK-92細胞は、フィーダー細胞との共培養の有無にかかわらず、無血清培地で増殖させることができる。興味のあるcCARを保有するNK-92の純粋な集団は、選別することで得ることができる。

#### 【 0 3 1 1 】

適切な表面標的抗原の同定は、適応免疫療法においてCAR T / NK細胞を開発するための前提条件である。

#### 【 0 3 1 2 】

本開示の1つの側面において、CD123抗原は、cCAR療法の標的の1つである。CD123（インターロイキン3受容体のアルファ鎖）が急性骨髄性白血病（AML）、B細胞急性リンパ芽球性白血病（B-ALL）、ヘアリーセル白血病および芽球性形質細胞様樹状腫瘍を含む様々な血液悪性腫瘍で過剰発現する。CD123は、正常な造血幹細胞上に存在しないか、または最小限に発現される。さらに重要なことに、CD123は、白血病幹細胞（LSC）に関連する白血病細胞のサブセットで発現され、そのアブレーションは難治性疾患および再発の予防に不可欠である。

#### 【 0 3 1 3 】

本開示の一側面において、CD33抗原は、cCAR治療の標的の1つである。CD33は、急性骨髄性白血病において悪性細胞の90%に発現する膜貫通受容体である。したがって、本開示によれば、CD123およびCD33の標的抗原は、安全性の観点から特に魅力的である。

#### 【 0 3 1 4 】

本開示によれば、compound CD33CD123CARsは、慢性骨髄性白血病（CML）集団の治療的処置に非常に有効であり得る。慢性骨髄性白血病（CML）では、CD34 + CD38-である細胞の稀なサブセットが存在する。この集団はLSCからなると考えられている。LSCの数の増加は、疾患の進行に関連する。低分子Bcr-Ab1チロシンキナーゼ阻害剤（TKI）は、CP-CML患者の全生存期間を有意に改善することが示されている。しかしながら、LSCは、TKI療法に対して耐性であると考えられている。CMLの治療にCML耐性LSCを標的とする新規療法が緊急に必要であり、新規治療は本開示で開示されるcompound CD33CD123 CARにおいて具体化される。CD123発現は、CD34 + CD38-集団において高い。本開示によれば、compound CD33CD123CARsは、この集団の治療的処置に非常に有効である。

10

20

30

40

50

## 【0315】

本発明のこの施形例では、cCARはCD123およびCD33の両方を発現する白血病細胞を治療処置として使用する。CD33は、骨髄系統、骨髄性白血病芽球および成熟単球の細胞上に発現するが、正常な多能性造血幹細胞では発現しない。CD33は、CML、骨髄増殖性新生物、およびMDSにおける白血病細胞において広く発現される。

## 【0316】

急性骨髓性白血病(AML)患者のかなりの数が標準的な化学療法レジメンに難治性であり、また治療後の疾患の再発を経験するため(Burnett 2012)、AMLに対するCAR T細胞免疫療法の開発は、求められるより良い医療としての可能性を秘めている。これらの患者の大部分において、白血病細胞は、CD123およびCD33の両方を発現し、本明細書に開示されるcompound CD33CD123 CARsは、広く臨床での適用性を与える。したがって、本発明は、複数の白血病関連抗原を標的とする複数のCARを含み、それによって、共刺激ドメイン活性化の相乗効果により白血病幹細胞を含む白血病細胞を標的とする抗原逃避メカニズムを相殺し、それにより、より強力で安全で効果的な治療法を提供する新規のmultiple cCAR T / NK細胞構造を開示する。

10

## 【0317】

本開示はさらに、標的抗原を同時発現する細胞に対するより強化された抗腫瘍活性を有し、さらに1つの抗原のみを発現する腫瘍細胞に対する感受性をも保持するcompound CAR構造を開示する。さらに、compound CARの各CARは、1つまたは2つの共刺激ドメインを持ち、そして特定の標的の存在下において強力な殺傷能力をもつ。

20

## 【0318】

乳癌および上皮卵巣癌を含む固形腫瘍を標的とするトランスシグナリング

CARsの二重特異性に関する前臨床研究において、CD3 細胞内シグナル伝達ドメインは、第二世代のCARからの共刺激ドメインから離れている。換言すれば、1つのCARは、共刺激ドメインのない第1世代のCARを含み、別のCARは、CD3ゼータ細胞内ドメインを欠いている。したがって、両方の標的抗原の存在が、T細胞の活性化および強力な殺傷のために必要とされる。したがって、それらは、標的特異性を増加させるが、感度を犠牲にして、2つの標的抗原のうちの1つの健康な組織での発現によって引き起こされる腫瘍外の毒性を減少させる方法として提案された。この実施例では、compound CARは、compound CD123CD19 CARである。B-ALLの集団のサブセットの90%以上がCD123を発現することが示されている。AMLやMDSとともに、B-ALLにはまれなLSC集団が存在すると考えられています。したがって、本発明に従って白血病性幹細胞および巨大な白血病集団の両方を標的とすることは、B-ALLsに適用することができる。本発明によれば、CD19がB細胞リンパ球集団の異なる段階で広く発現されるので、B-ALLにおいて発現されるCD123およびCD19表面抗原が標的であり得る。

30

## 【0319】

多発性骨髄腫(MM)は、米国で2番目に一般的な血液悪性腫瘍であり、骨髄または骨髄外腔部位に蓄積されたクローニング性形質細胞に由来する。MMは、約4.5年の生存期間中央値である治癒不可能な疾患である。前臨床開発における抗骨髄腫CARsが開発され、CAR標的にはCD38、CS1およびB細胞成熟抗原(BCMA)が含まれる。しかしながら、表面抗原発現の不均一性は、悪性形質細胞において一般的に起こり、CARsにとって困難な標的となる。悪性形質細胞も低レベルのCD19を発現する。これまで、骨髄腫幹細胞はCD19を含むいくつかのB細胞マーカーも発現することが示されている。この集団を標的にすることは、骨髄腫の治療において、標準的な治療と他の骨髄腫CAR療法と併用することで効果的であり得る。

40

## 【0320】

多発性骨髄腫(MM)は、形質細胞のクローニング性増殖を伴う血液学的悪性腫瘍である。治療の重要な進歩にもかかわらず、骨髄腫は治癒不可能な疾患のままである。したがって、新規の治療アプローチが緊急に必要とされている。

## 【0321】

50

CS1 (CD319またはSLAMF7とも呼ばれる)は、SLAMF7遺伝子によってコードされるタンパク質である。表面抗原CS1は、正常な形質細胞および骨髓腫細胞(悪性形質細胞)の堅牢なマーカーである。

#### 【0322】

B細胞成熟抗原(BCMA)またはCD269とも呼ばれる腫瘍壞死因子受容体スーパー・ファミリー、メンバー17(TNFRSF17)は、ほぼ専ら形質細胞および悪性形質細胞の末期段階で発現する。その発現は他の組織ではなく、CAR TまたはNK細胞の標的としての可能性を示している。

#### 【0323】

悪性形質細胞は、CD269およびCS1について様々な割合での抗原不均一性を示す。CD269またはCS1のいずれかを標的とする単一のCAR単位製品は、バルク腫瘍の細胞の大部分を標的とすることができます、その結果、最初の強い抗腫瘍応答がもたらされる。続いて、残存する稀な非標的細胞が増殖し、疾患の再発を引き起こす。多発性骨髓腫は特に不均一であるが、この現象は他の白血病または腫瘍にも確実に当てはまる可能性がある。BCMA CAR T細胞を用いたNIHの最近の臨床試験は、多発性骨髓腫を有する一部の患者において完全な応答を示す有望な結果を示した。しかしながら、これらの患者は17週間後に再発し、これは抗原エスケープによる可能性がある。抗原エスケープは、CD19 CARおよびNY-ESO1 CAR T細胞による治療においても見られる。従って、再発を防止するために、より有効なCAR T細胞による治療が緊急に必要とされている。

10

#### 【0324】

本発明の1つの側面において、BCMAおよびCS1は、BCMACS1 CAR療法の標的である。

20

#### 【0325】

いくつかの実施例では、compound CARは、BCMAまたはCS1抗原またはその両方を発現する細胞を標的とする。標的細胞は、限定するものではないが、リンパ腫、または白血病または形質細胞新生物のような癌細胞であるかもしれない。さらなる実施例では、形質細胞新生物は形質細胞白血病、多発性骨髓腫、形質細胞腫、重鎖疾患、アミロイドーシス、waldenstromのマクログロブリン腫、重鎖疾患、孤立性骨芽細胞腫、不確定性のモノクローナル性ガンマパシー(MGUS)およびくすぶり多発性骨髓腫から選択される。

#### 【0326】

いくつかの実施例では、本開示は、BCMAまたはCD19抗原またはその両方を発現する細胞を標的とするcompound CARポリペプチド操作細胞を提供する。標的細胞は、限定されないが、リンパ腫、または白血病または形質細胞新生物などの癌細胞であり得る。さらなる実施例では、形質細胞新生物は、形質細胞白血病、多発性骨髓腫、形質細胞腫、重鎖疾患、アミロイドーシス、ウォルデストロンのマクログロブリン腫、重鎖疾患、孤立性骨形質細胞腫、不確定性モノクローナル性ガンマパシー(MGUS)およびくすぶり多発性骨髓腫から選択される。

30

#### 【0327】

BAFF( B細胞活性化因子)およびAPRIL( 増殖誘導性リガンド)は、TACI( TNFRSF13BまたはCD267とも呼ばれる)およびBCMAに高親和性で特異的に結合する2つのTNF相同体である。BAFF(BLySとしても知られている)はBAFF-Rに結合し、機能的にB細胞の後期段階の生存および増殖の増強に関与する。BAFFはいくつかの自己免疫疾患を伴うことが示されている。APRILは、抗体クラススイッチの亢進において重要な役割を果たす。BAFFおよびAPRILの両方は、悪性形質細胞の増殖および残存因子として関与している。

40

#### 【0328】

悪性形質細胞または正常形質細胞におけるリガンド - 受容体相互作用は、図77および79に記載されている。

#### 【0329】

いくつかの実施例では、compound CARは、TACIまたはCS1抗原またはその両

50

方を発現する細胞を標的とする。別の実施例では、compound CARは、TACIまたはCS1抗原またはその両方を発現する細胞を標的とする。標的細胞は、限定するものではないが、リンパ腫、または白血病または形質細胞新生物のような癌細胞であってもよい。さらなる実施例では、形質細胞白血病は、形質細胞白血病、多発性骨髄腫、形質細胞腫、重鎖疾患、アミロイドーシス、waldenstromのマクログロブリン腫、重鎖疾患、孤立性骨芽細胞腫、不確定性のモノクローナル性ガンマパシー（MGUS）およびくすぶり多発性骨髄腫から選択される。標的細胞は、B細胞、未成熟B細胞、ナイーブB細胞、中心芽細胞、セントロサイト、記憶B細胞、形質芽細胞、長期生存形質細胞、形質細胞の1種または2種または複数の異なる細胞種であってもよい。これらの細胞は、全身性強皮症、多発性硬化症、乾癬、皮膚炎、炎症性腸疾患（クローン病および潰瘍性大腸炎など）、全身性エリテマトーデス、血管炎、関節リウマチ、シェーグレン症候群、多発性筋炎、肉芽腫症および血管炎、アジソン病、抗原 - 抗体複合体媒介疾患、および抗糸球体基底膜疾患が挙げられる。

#### 【0330】

いくつかの実施例では、本開示はBAFF-RまたはCS1抗原またはその両方を発現する細胞を標的とするcompound CAR操作細胞を提供する。別の実施例では、compound CARは、BAFF-RまたはCS1抗原またはその両方を発現する細胞を標的とする。標的細胞は、限定するものではないが、リンパ腫、または白血病または形質細胞新生物のような癌細胞であってもよい。さらなる実施では、形質細胞新生物は形質細胞白血病、多発性骨髄腫、形質細胞腫、重鎖疾患、アミロイドーシス、waldenstromのマクログロブリン腫、重鎖疾患、孤立性骨芽細胞腫、不確定性のモノクローナル性ガンマパシー（MGUS）およびくすぶり多発性骨髄腫から選択される。

#### 【0331】

エリテマトーデス（SLE）、尋常性天疱瘡および多発性硬化症（MS）のような自己免疫疾患は、著しい罹患率および障害を引き起こす。これらの疾患は現在の治療法にはほとんど反応せず、疾患経過中の頻繁な再発が認められる。Bおよび形質細胞は、自己抗体産生の源である自己免疫疾患の病因において重要な役割を果たす。Bおよび形質細胞は、抗原提示、サイトカイン分泌、または抗体産生による疾患の進行および再発に寄与し得る。CAR T / NK細胞アプローチを用いたB細胞または形質細胞の削除またはその両方は有益な治療法となりうる。

#### 【0332】

臓器移植は人の新しい命を象徴し、移植可能な臓器には腎臓、心臓、肺、脾臓、腸が含まれる。しかし、多くの患者は、ヒト白血球抗原（HLA）のようなドナー抗原に対する既存または発生中のドナー特異的抗体のために、潜在的に人命を救う器官を受け取ることができない。したがって、患者は寄贈された器官を失うことがあります。現在、抗体介在拒絶に利用可能な治療選択肢はほとんどなく、抗体媒介拒絶反応の有効な治療のための分野において非常に多くの未だに対処されていないことに必要性が存在する。CAR T / NK細胞を用いたB細胞または形質細胞またはその両方の欠損での抗体介在拒絶の治療法を提供する。

#### 【0333】

開示された開示は、CD19またはCD20を発現する細胞を標的とするCAR操作細胞に関する構成および方法を提供し、B細胞の欠損をもたらすが、限定されるものではないが、全身性エリテマトーデス（SLE）、慢性関節リウマチ（RA）、および尋常性天疱瘡および多発性硬化症（MS）などを含む抗体媒介性臓器拒絶または自己免疫疾患有する患者において、長寿命の血漿細胞を温存する。CARによるB細胞の欠失は、疾患の活動の減少に有益である。

#### 【0334】

本開示はまた、BCMAまたはBAFF-R、TACIを発現する細胞を標的とするCAR操作細胞に関する構成および方法を提供し、限定されるものではないが、全身性エリテマトーデス（SLE）、慢性関節リウマチ（RA）、および尋常性天疱瘡および多発性硬化症（MS）などを含む抗体媒介性臓器拒絶または自己免疫疾患有する患者において、形質細胞の

10

20

30

40

50

欠損をもたらす。形質細胞の欠失は、疾患の活動の低下に寄与し得る。

#### 【0335】

いくつかの実施例では、本開示は、自己免疫疾患および臓器抗体媒介臓器拒絶の治療のための、成熟B細胞、記憶B細胞、および短命、長寿の形質細胞を枯渇させるCARのためのCAR操作細胞に関する構成および方法を提供する。この実施例では、本開示は、以下の戦略のうちの1つあるいはそれ以上を使用して、成熟、記憶B細胞、および短命、長寿の形質細胞を枯渇させる方法を提供する：

1) CD19またはCD20またはCD22に対するscFvを有するCAR操作細胞と前記細胞を接触させることにより、成熟、記憶B細胞および短命、長寿の形質細胞の枯渇

2) BCMAまたはTACIまたはBAFF-Rに対するscFvを有するCAR操作細胞と前記細胞とを接触させることによる、短命および長寿の形質細胞の枯渇、または

3) BCMAまたはTACIまたはBAFF-R結合ドメイン（BAFFまたはAPRIL）を含む抗原認識ドメインを有するCAR操作細胞と前記細胞とを接触させることによる、短命および長寿の形質細胞の枯渇。

4) 抗体媒介臓器拒絶または自己免疫障害を有する患者の疾患の活動の低下を提供するために、1つ以上の異なる抗原を標的とするcompound CAR操作細胞と前記細胞とを接触させることでの、成熟、記憶B細胞および短命、長寿の形質細胞の欠失。

5) CD19、CD20、CD22、BCMA、TACI、APRILおよびBAFFから選択する1つ以上の異なる抗原を標的とするCAR操作細胞を接触させることによる、成熟、記憶B細胞および短命、長寿の形質細胞の欠失。

#### 【0336】

いくつかの実施例では、compound CAR（cCAR）は、BAFF-R、BCMA、TACIおよびCS1抗原の1つまたは2つまたはすべてを発現する細胞を標的とする。

#### 【0337】

いくつかの実施例では、cCARにおけるCARの単位は、1) BAFF-R、BCMA、TACIおよびCS1のいずれかに対するscFv、2) ヒンジ領域、3) 共刺激ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含むことができる。

#### 【0338】

いくつかの実施例では、BAFF CARはcCARにおけるCARのユニットになることができ、1) BCMAまたはTACIまたはBAFF-R結合ドメイン、2) ヒンジ領域、3) 共刺激ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

#### 【0339】

いくつかの実施例では、APRIL CARはcCARにおけるCARのユニットになることができ、1) BCMAまたはTACI結合ドメイン、2) ヒンジ領域、3) 共刺激ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

#### 【0340】

さらなる実施例では、BCMAまたはTACIまたはBAFF-R結合ドメインは、APRILおよびBAFF分子の一部または全部であり得る。

#### 【0341】

いくつかの実施例では、cCARにおけるCARのユニットは、1) BCMAまたはCS1に対するscFv;、2) ヒンジ領域、3) 共刺激ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含むことができる。

#### 【0342】

いくつかの実施例では、cCARにおけるCARのユニットは、1) BCMAまたはCD19に対するscFv;、2) ヒンジ領域、3) 共刺激ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含むことができる。

#### 【0343】

いくつかの実施例では、cCARにおけるCARのユニットは、1) BCMAまたはCD20に対するscFv;、2) ヒンジ領域、3) 共刺激ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含むことができる。

10

20

30

40

50

**【 0 3 4 4 】**

いくつかの実施例では、cCARにおけるCARのユニットは、1) BAFF-R 結合ドメインまたはBCMAに対するscFv;、2) ヒンジ領域、3) 共刺激ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含むことができる。

**【 0 3 4 5 】**

いくつかの実施例では、cCARにおけるCARのユニットは、1) BAFF-R 結合ドメインまたはCD19に対するscFv;、2) ヒンジ領域、3) 共刺激ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含むことができる。

**【 0 3 4 6 】**

いくつかの実施例では、cCARにおけるCARのユニットは、1) BAFF-R 結合ドメインまたはCD20に対するscFv;、2) ヒンジ領域、3) 共刺激ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含むことができる。 10

**【 0 3 4 7 】**

いくつかの骨髄腫細胞がBCMAについてはdim(弱い)または陰性であることは予想外である。骨髄腫細胞におけるCAR抗原認識の感受性を高めるためには、この疾患を治癒するために複数の抗原を標的とすることが重要である。

**【 0 3 4 8 】**

TACI、BCMAおよびBAFF-RはBAFFの受容体である。いくつかの骨髄腫細胞がBCMAよりもTACIまたはBAFF-Rを発現することも予想外である。

**【 0 3 4 9 】**

いくつかの実施例では、本開示は、治療有効性を改善し、抗原疾患の逃避のリスクを低減するために、受容体、BAFF-R、TACIおよびBCMAの少なくとも1つを発現する細胞を標的とするBAFF CARを含む方法を提供する。 20

**【 0 3 5 0 】**

BCMAへのBAFF結合に対する親和性は、ナノモル範囲内のBAFF-RまたはTACIのそれよりはるかに弱いマイクロモル範囲内である。

**【 0 3 5 1 】**

いくつかの実施例において、本開示は、BAFF CARによって排除できない骨髄腫細胞のいくつかを補うために、BAFFおよびBCMA CARを含むcompound cCARを作製する方法を提供する。 30

**【 0 3 5 2 】**

さらなる実施例では、cCARは、1つまたは2つまたは複数のCARを含むことができる。各ユニットCARは、同じかまたは異なるヒンジ領域および共刺激ドメインをもつことができる。

**【 0 3 5 3 】**

さらなる実施例では、cCARは、1つまたは2つまたは複数のCARポリヌクレオチドユニットを含むことができる。各ユニットCARは相同組換えを避けるために異なるポリヌクレオチド配列を有することができた。

**【 0 3 5 4 】**

いくつかの実施例において、2つ以上の異なる抗原を標的とすることは、少なくとも2つの別個のCAR TまたはNK細胞によって產生される、プールされたCAR操作細胞によって達成され得る。本明細書中で使用されるプールされたCAR操作細胞には、1つ以上の異なるCARポリペプチド単位を有する操作細胞の集団が含まれる。一例として、プールされた操作された細胞は、異なるCARポリペプチドを有する操作された細胞の集団および異なるおよび別個のCARポリペプチドを有する操作された細胞の集団を含む。さらに、プールされたCAR操作細胞には、cCARポリペプチドを有する操作細胞が含まれる。 40

**【 0 3 5 5 】**

プールされたCAR TまたはNK細胞は、以下のステップで完了させることができる。

- 1) 異なる抗原を標的とするCARの少なくとも2つの別々のコンストラクトを作製する。

2) 個々のコンストラクトをTまたはNK細胞に形質導入し、それらを標準培地中のex vivoで増殖させる。

3) 適切な比率で異なる増殖させたT細胞またはNK細胞をプールする。そして

4) プールされたCAR TまたはNK細胞を被験体に投与する。

あるいは、異なる操作された細胞を個々に増殖させ、独立してまたは連続的に投与することができる。

#### 【0356】

さらなる実施例では、標的抗原は、ROR1、PSMA、MAGE A3、糖脂質、グリピカン3、F77、GD-2、WT1、CEA、HER-2 / neu、MAGE-3、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、フェトプロテイン、CA19-9、CA72-4、NY-ESO、FAP、ErbB、c-Met、MART-1、CD30、EGFRvIII、免疫グロブリン kappaそしてlambda、CD38、CD52、CD3、CD4、CD8、CD5、CD7、CD2そしてCD138からなるグループより少なくとも1つは含まれるがこれに限定されない。標的抗原は、ヒトパピローマウイルス(HPV)またはEBV(エブスタインバーウイルス)抗原由来のE6およびE7などのウイルスまたは真菌抗原を含むこともできる。

10

#### 【0357】

いくつかの実施例では、cCARは、CD19またはCD20抗原またはその両方を発現する細胞を標的とする。別の実施例では、cCARは、CD19またはCD22抗原またはその両方を発現する細胞を標的とする。標的細胞は、B細胞リンパ腫または白血病などの自己免疫疾患または癌細胞に関連する正常B細胞である。

20

#### 【0358】

急性移植片対宿主病(GVHD)は、同種造血幹細胞移植後の罹患率および死亡率の最も重要な原因のままである。GVHDのエフェクター期では、鎖と鎖のヘテロ二量体であるT細胞受容体(TCR)がT細胞の表面上に発現し、TCRは宿主細胞上のHLA分子上のいくつかの抗原を認識し、T細胞増殖を増強し、細胞毒を放出することで宿主細胞に損傷を引き起こす。TCR遺伝子の不活性化は潜在的な移植片対宿主反応を予防するのに有效である。TCRの不活性化は、同種抗原、したがってGVHDでのTCR認識の防止をもたらし得る。NK細胞におけるCD45の役割は、T細胞のそれとはかなり異なる。CD45欠損マウス由来のNK細胞は、プロトタイプ腫瘍細胞株Yac-1に対して正常な細胞傷害活性を有する。さらに、CD45欠損NK細胞は正常に増殖し、IL15およびIL-21に応答する。したがって、CD45の破壊または消失は、NK細胞での殺傷性および増殖に影響しないであろう。本開示は、T細胞またはNK細胞におけるCD45の永久的消失方法に続き、続いてCD45特異的CARの安定した導入の方法を含む。その結果、操作されたT細胞は、抗原の提示に対する自己殺傷および応答を引き起こすことなく、CD45特異的にリダイレクトされた求められた特性を示す。さらなる実施例では、操作されたT細胞は、悪性疾患または他の疾患を治療するための既成治療としての有効性を有し得るかもしれない。本開示は、内因性CD45の不活性化または消失によりTCRシグナル伝達が減少または失われたときに増殖を可能にするようなT細胞の操作に関する方法に提示する。TCRシグナル伝達の低下または消失は、GVHDの予防をもたらす可能性がある。

30

#### 【0359】

さらなる実施例では、CD45の不活性化によるTCRシグナル伝達を低下させるかまたは失うT細胞は、「既成の」治療用製品として使用することができる。

40

#### 【0360】

本開示は、改変T細胞またはNK細胞の方法、(a) CD45を不活性化することによってT細胞またはNK細胞を修飾すること、(b)これらの改変された細胞を増殖させる、(c) CD45を発現しない修飾T細胞またはNK細胞を選別する、(d) CD45CARを導入することを含む。

#### 【0361】

実施例において、CD45CAR遺伝子をエンコードしたキメラ抗原レセプター(CAR)は、抗原認識ドメイン、ヒンジ領域、膜貫通ドメイン、およびT細胞活性化ドメインの

50

少なくとも1つを含み、抗原認識ドメインは、細胞上に存在するCD45表面抗原にリダイレクトされたものからなる。抗原認識ドメインは、CD45抗原に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を含む。抗原認識ドメインは、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体の結合部位または可変領域を含む。

#### 【0362】

本開示は、分泌IL-15 / IL-15sushi複合体を同時発現することによって、CD45CAR T / NK細胞の増殖、持続性および抗腫瘍活性を改善する方法を含む。さらなる実施例では、操作されたCD45CAR T / NK細胞は、特異的CAR T / NK細胞の増殖を促進し、自然免疫細胞の腫瘍部位への浸潤を促進して腫瘍破壊をもたらす分泌IL-15 / IL-15sushi複合体を含む。

10

#### 【0363】

本開示は、操作されたCD45 CAR T細胞が、CD28経路を介した共刺激を受けるだけでなく、高い治療効果を提供する4-1BBリガンド（CD137L）を同時発現する代替方法も提供する。

#### 【0364】

いくつかの実施形態において、改変T細胞は、同種ドナーから得られ、「既製品」として使用される。

#### 【0365】

CAR TまたはNK細胞を用いたCD45の標的化は、TおよびNK細胞がこの表面抗原を発現するので、自己殺傷を引き起こし得るかもしれない。この欠点を克服するために、本開示は、CD45が欠損した操作された細胞を提供する。本明細書中で使用される場合、遺伝子の発現が減少または排除される場合、遺伝子操作された細胞は特定の遺伝子を欠いている。発現の減少または排除は、当技術分野で既知の任意の遺伝的方法によって達成され得る。一つの例として、CD45遺伝子は操作されたCRISP / Cas9システム、ジンクフインガーヌクレアーゼ（ZFNs）およびTALEヌクレアーゼ（TALENs）およびメガヌクレアーゼを用いてCD45遺伝子を不活性化されるかもしれない。CD45の欠失されたTまたはNK細胞は、CD45を発現する腫瘍を標的とするCARsをその後、形質導入される。

20

#### 【0366】

本開示は、骨髄、血液および器官における異常細胞または悪性細胞を排除または減少させるための方法を含む。Bおよびいくつかの実施例において、CD45を発現する悪性細胞は、急性白血病、慢性白血病、BおよびT細胞リンパ腫、骨髄性白血病、急性リンパ芽球性リンパ腫または白血病、原発性滲出液リンパ腫、網内組織球腫、ダウン症候群の一過性骨髄増殖性疾患、リンパ球優性ホジキンリンパ腫、骨髄性白血病または肉腫、樹状細胞腫、組織球性肉腫、腱鞘の巨細胞腫、指状嵌入樹状細胞肉腫、移植後リンパ増殖性疾患などが挙げられる。

30

#### 【0367】

造血幹細胞移植（HSCT）は、血液悪性腫瘍または非血液疾患の治療に広く使用されている。非血液疾患には、遺伝的障害および免疫不全および自己免疫疾患が含まれる。遺伝的障害としては、鎌状赤血球症、サラセミアおよびリソゾーム蓄積症が挙げられるが、これらに限定されない。幹細胞移植の前に、患者は、ドナー幹細胞の生着および増殖を促進するために、造血幹/前駆細胞を骨髄ニッチで枯渇させる条件的治療を受ける必要がある。高用量の化学療法および全身照射は条件治療に使用されるが、特に重篤な腸粘膜炎などの非造血器官において重度の毒性および長期の合併症を引き起こす。さらに、従来の条件療法は造血細胞の回復をもたらす骨髄のニッチを破壊する可能性がある。安全性の懸念は、HSCTを様々な非血液疾患に拡大する努力の大きな障害となっている。CD45は、造血細胞上でのみ発現され、CD45を標的とすることは、非造血器官に対する毒性を最小限に抑えるべきである。

40

#### 【0368】

いくつかの実施形態では、CD45CAR細胞を用いて、骨髄幹細胞移植のための造血細胞を除去すると同時に、白血病/リンパ腫細胞または移植片拒絶反応が可能な免疫細胞

50

を除去することによって骨髓内に空間を作ることができる。

**【 0 3 6 9 】**

いくつかの実施例では、これらの組織に対する全身照射の破壊的効果とは対照的に、造血幹/前駆細胞を枯渇させるためにCD45CAR操作細胞を使用することは、骨髓の構造および脈管構造を保存する。骨髓の構造および脈管構造の保存により、一過性CD45CAR処置後の造血回復がより速くなる。

**【 0 3 7 0 】**

さらなる実施例において、CD45CAR細胞は、それらが幹細胞を受ける骨髓移植を受ける前に、患者の前治療のために使用され得るかも知れない。さらなる実施例では、CD45CARは、造血幹細胞移植のための骨髓芽球調節レジメンとして使用され得る。

10

**【 0 3 7 1 】**

好みの実施例では、CD45CAR操作細胞療法は一時的であり、骨髓細胞および末梢造血細胞のより迅速な回復を可能にする。一過性の療法は、短命の操作された細胞を使用することによって、または本明細書に記載の自殺システムを有する操作された細胞を提供することによって達成され得る。

**【 0 3 7 2 】**

いくつかの実施例では、本開示は、CD45を発現する造血幹/前駆細胞を特異的に標的とするCD45CAR操作細胞と該当細胞を接触させることにより、CD45を発現する内因性造血幹/前駆細胞を選択的に枯渇させるか、アブレーションさせる方法を含む。

**【 0 3 7 3 】**

いくつかの実施例において、CD45CAR細胞は、幹細胞移植および/または化学療法後の残存疾患を治療または予防するために利用される。

20

**【 0 3 7 4 】**

いくつかの実施例において、CD45CARは、発現している遺伝子またはカセットの一部である。好みの実施例では、発現遺伝子またはカセットは、CD45CARに加えて、アクセサリー遺伝子またはタグまたはその一部を含み得るかも知れない。アクセサリー遺伝子は、カスパー<sup>®</sup>9遺伝子、チミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ(CD)またはシトクロムP450を含むが、これらに限定されない誘導性自殺遺伝子またはその一部であり得るかも知れない。「自殺遺伝子」でのアブレーション方は、遺伝子治療の安全性を向上させ、特定の化合物または分子によって活性化された場合にのみ細胞を死滅させる。いくつかの実施例では、自殺遺伝子は誘導性であり、二量体化(CID)の特定の化学誘導体を使用して活性化される。

30

**【 0 3 7 5 】**

いくつかの実施例では、安全スイッチは、c-mycタグ、CD20、CD52(Campath)、トランケートされたEGFR遺伝子(EGFR<sup>t</sup>)またはその一部またはそれらの組み合わせであるアクセサリータグなどを含むことができる。アクセサリータグは、非免疫原性の選択ツールとして、または追跡マーカーとして使用され得るかも知れない。いくつかの実施例では、安全スイッチは、RSV F糖タンパク質A2株(NSELLSLINDMPITNDQKKLMSNN)の254~277残基に対応する24残基ペプチドを含むことができる。

40

**【 0 3 7 6 】**

いくつかの実施例において、安全スイッチは、モノクローナル抗TNF薬剤によって結合されたTNFのアミノ酸配列を含み得る。

**【 0 3 7 7 】**

CAR TおよびNK細胞機能を増強するIL-15およびその受容体

最近の研究により、T細胞の持続性がCAR T細胞の治療効果と良好に相關することが実証されている。最近の試験は、注入された産物の量よりも品質が抗腫瘍活性に寄与する上でより重要であることを示す、注入された少量のCAR T細胞によって強力で持続性の抗腫瘍活性が生じ得ることを実証している。インターロイキン(IL)-15は、リンパ球の発生および止血を促進するサイトカインである。IL-15レベルの増加は、T細胞増殖を促進し、T細胞エフェクター応答を増強する。最近の研究からのデータは、IL-15が、抗

50

腫瘍活性に関連する重要な因子の1つである記憶CD8 T細胞の産生および維持にとって重要なことを示している。IL-15は、T細胞の生存、増殖および記憶T細胞の産生などのIL-15媒介作用に寄与するIL-15受容体アルファ鎖（IL-15RAまたはRAとも呼ばれる）に結合する。

#### 【0378】

IL-15RAは、T細胞および他のタイプの細胞の細胞表面上のこのIL-15RA / 複合体との結合により、T細胞およびIL-15シグナルの表面の複合体に結合する

IL-15単独のトランスフェクションはT細胞機能に有意な影響を与えないが、IL-15 / IL-15RAのトランスフェクションはT細胞が生存し、自律的に増殖することを可能にする。

10

#### 【0379】

投与されたIL-15単独の効力は、遊離IL-15RAの有効性およびその短い半減期によって制限され得る。可溶性IL-15 / RA複合体の投与は、インビボでのIL-15半減期および生体利用率を大幅に増強した。したがって、IL-15のみではなく、この複合体によるマウスでの治療は、記憶CD8 T細胞およびNK細胞の強力な増殖および維持をもたらす。IL-15の結合には、Sushiドメイン（IL-15sushi）と呼ばれるIL-15RAの細胞外領域の一部が必要である（WEI et al., J. Immunol., vol. 167(1), p:277-282, 2001）。IL-15 / sushi融合タンパク質はIL-15 / IL-15とも呼ばれ、IL-15および可溶性IL-15RA（IL-15sushi）単独よりリンカーがより強力である。IL-15 / RA（膜結合型）またはIL-15 / sushi（可溶性型）の組み合わせは、IL-15活性を最大にすることができる。膜結合形態のIL-15 / RAは、形質導入細胞の表面上のIL-15RAに結合したIL-15を維持することによって遊離IL-15を放出しないであろう。

20

#### 【0380】

本開示において、形質導入された細胞から放出された可溶性IL-15 / IL-15sushiは、形質導入された細胞およびそれらの隣接細胞の増殖を促進し、さらにそれらを腫瘍に対して刺激することができるが予期せぬ発見である。

#### 【0381】

本開示は、CARおよびIL-15 / IL-15sushiまたはIL-15 / RAの両方を单一のコンストラクトに有する操作された細胞を提供する。いくつかの実施例では、本開示は、より高いウイルス力価を產生し、CARおよびIL-15 / RAまたはIL-15 / IL-15sushiの両方を誘導するためのより強力なプロモーターを使用する方法を含む。

30

#### 【0382】

いくつかの実施例では、本開示は、(1)CD4、CD2、CD3、CD7、CD5、CD45、CD20、CD19、CD33、CD123、CS1、およびB細胞成熟抗原（BCMA）など、限定されるものではないがCARの標的となる抗原を含む、そして(2)IL-15、(3)IL15RA（膜結合型）またはsushi(IL-15/IL-15sushiなどのことを有する操作された細胞を提供する。さらなる実施例において、CARは、キメラ抗原レセプター、限定されるものではないがCD28、CD2、4-1BB、4-1BBL（CD137L）、B7-2/CD86、CTLA-4、B7-H1/PD-L1、ICOS、B7-H2、PD-1、B7-H3、PD-L2、B7-H4、CD40 Ligand/TNFSF5、DPP4/CD26、DAP12およびOX40、そして細胞内ドメインのCD3ゼータ鎖をなどのよう一つまたはそれ以上の共刺激性の内在ドメインを含む。さらなる実施例では、これに限定されないが強力なプロモーターは、SFFVであり得る。CARs、IL-15 / RAまたはsushiおよび誘導性自殺遺伝子（「安全スイッチ」）、またそれらの組み合わせを、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またはプラスミドなどのベクター上に組み立てることができる。「安全スイッチ」の導入は、安全性プロフィールを大幅に向上させ、CARの標的または腫瘍外への毒性を制限する可能性がある。

40

#### 【0383】

この実施例では、操作された細胞は、CD2キメラ抗原レセプターポリペプチドおよびIL-15 / IL-15sushi（配列番号102）および対応するポリヌクレオチド（配列番号101）を含む。理論に拘泥するものではないが、IL-15 / IL-15sushiとCD2 CARとの同時発

50

現は、標的癌細胞のCAR認識の感受性を増加させるか、または癌細胞に対する自然免疫細胞を漸加することによって、患者において長期耐性寛解をもたらすと考えられている。

#### 【0384】

この実施例では、操作された細胞は、CD3キメラ抗原レセプターポリペプチドおよびIL-15 / IL-15sushi（配列番号104）および対応するポリヌクレオチド（配列番号103）を含む。理論に拘泥するものではないが、IL-15 / IL-15sushiとCD3 CARとの同時発現は、標的癌細胞のCAR認識の感受性を増加させるか、または癌細胞に対する自然免疫細胞を漸加することによって、患者において長期耐性寛解をもたらすと考えられている。

#### 【0385】

この実施例では、操作された細胞は、CD7キメラ抗原レセプターポリペプチドおよびIL-15 / IL-15sushi（配列番号106）および対応するポリヌクレオチド（配列番号105）を含む。いくつかの実施例では、本開示は、IL-15 / IL-15sushiをそれを必要とする患者に同時発現するCD7 CAR操作細胞を投与することによって、癌患者における長期耐久性寛解を提供する方法を提供する。理論に拘泥するものではないが、IL-15 / IL-15sushiとCD7 CARとの同時発現は、標的癌細胞のCAR認識の感受性を増加させるか、または癌細胞に対する自然免疫細胞を漸加することによって、患者において長期耐性寛解をもたらすと考えられている。

10

#### 【0386】

この実施例では、操作された細胞は、CD5キメラ抗原レセプターポリペプチドおよびIL-15 / IL-15sushi（配列番号107）および対応するポリヌクレオチド（配列番号108）を含む。いくつかの実施例では、本開示は、IL-15 / IL-15sushiをそれを必要とする患者に同時発現するCD5 CAR操作細胞を投与することによって、癌患者における長期耐久性寛解を提供する方法を提供する。理論に拘泥するものではないが、IL-15 / IL-15sushiとCD5 CARとの同時発現は、標的癌細胞のCAR認識の感受性を増加させるか、または癌細胞に対する自然免疫細胞を漸加することによって、患者において長期耐性寛解をもたらすと考えられている。

20

#### 【0387】

##### CD4 + CD25 +制御性T細胞を標的とするCAR

サプレッサーT細胞とも呼ばれる制御性T細胞（Tregs）は、免疫系を調節し、自己抗原の耐性を維持するT細胞の亜集団である。Tregsは、移植、アレルギー、喘息、感染症、移植片対宿主病（GVHD）、および自己免疫における多様な臨床応用を伴い、血液中の全CD4 + T細胞の約1-5%を構成する。Tregのバイオマーカーは、CD4、Foxp3およびCD25である。Tregは、ナイーブCD4細胞に由来すると考えられている。

30

#### 【0388】

癌では、Tregsは腫瘍免疫を抑制し、癌細胞の増殖を制御する体の本来の能力を妨げる上で重要な役割を果たす。

#### 【0389】

Tregsはがん患者で拡大し、しばしば腫瘍の微小環境に富んでいます。Tregsは腫瘍に浸潤し、抗腫瘍免疫を制限する。Tregが枯渇すると、正常に徐々に増殖する腫瘍を拒絶することができる。

40

#### 【0390】

CD25を標的とする抗体を用いたTregの枯渇は、Tregの部分的な減少をもたらすが、抗腫瘍活性は限られる。著名な抗腫瘍効果のためには、高レベルのTreg枯渇が必要である。さらに、Tregsは活性化されたCD4 + およびCD8 + リンパ球ならびに活性化されたNK細胞とCD25発現を共有するので、特異性に関して重要な問題がある。一般に、Tregsは、エフェクターT細胞およびNK細胞から効果的に識別することが非常に困難であり、研究を困難にさせる。

#### 【0391】

この実施例では、操作された細胞は、CD4抗原認識ドメインを有する第1のキメラ抗原レセプターポリペプチドおよびCD23抗原認識ドメインを有する第2のキメラ抗原レセ

50

プターポリペプチドを含む。この実施例では、この操作された細胞は、CD45のリーダー配列を伴う配列番号92のポリペプチドおよび、配列番号91の対応するポリヌクレオチドとを含む。

#### 【0392】

この実施例では、操作された細胞は、CD4抗原認識ドメインを有する第1のキメラ抗原レセプターポリペプチドおよびCD25抗原認識ドメインを有する第2のキメラ抗原レセプターポリペプチドを含む。この実施例では、この操作された細胞は、CD8aのリーダー配列を伴う配列番号94のポリペプチドおよび、配列番号93の対応するポリヌクレオチドとを含む。

#### 【0393】

##### 制御性T細胞の特定の実施形態

Tリンパ球（T細胞）は、細胞性免疫において重要な役割を果たす白血球のサブタイプである。T細胞はCD4およびCD8細胞に分けられる。ナチュラルキラー細胞（NK細胞）は、自然免疫に重要なタイプの細胞傷害性細胞である。

#### 【0394】

制御性T細胞（Tregs）は、免疫寛容および抑制を媒介するCD4<sup>+</sup>細胞の一種であり、ヘルパーT細胞とは区別される。Tregsは、CD4、CD25およびFoxp3（CD4CD25<sup>+</sup>制御性T細胞）を発現する。

#### 【0395】

Tregは腫瘍微小環境で豊富であり、抗腫瘍免疫応答を妨げ、癌細胞耐性を促進するために重要であると考えられている。腫瘍における浸潤性Tregの増加は、血液悪性腫瘍および固形腫瘍を含む様々な癌における生存率の低下を伴っている。

#### 【0396】

Tregは、腫瘍微小環境に優先的に往来し、免疫抑制の重要な役割を果たすようである（Ethan M. Shevach et al, Annual Review of Immunology, Vol. 18: 423-449, 2000）。

#### 【0397】

Tregsの部分的な減少をもたらすCD25を標的とすることによって、癌治療のためのTregを削除するために多数の異なる方法が用いられる。しかしながら、これは次のように問題となる可能性がある、（1）CD25は、活性化されたCD4、CD8およびNK細胞においても発現される。CD25発現は、活性化B細胞、マクロファージ、骨芽細胞、いくつかの胸腺細胞、いくつかの骨髄前駆体およびいくつかの乏突起膠細胞に見られる。（2）効能には非常に高レベルのTregの枯渇が必要である（Xingrui Li et al, Eur. J. Immunol. 2010, 40: 3325 ~ 3335）。

#### 【0398】

CARの設計は、主要組織適合性複合体（MHC）に依存しない方法で、患者またはドナー免疫細胞を特定の「標的」抗原に対してリダイレクトすることである。CARタンパク質構造コントラクトは、通常、機能するのに不可欠な多数のモジュール構成要素または領域を含む。「標的」認識のためのモジュールは、細胞外一本鎖可変断片（scFv）である。この構成は、慎重に選択された標的抗原に対する特異的な方向を有するモノクローナル抗体に由来する。scFvに適切な長さのタンデムのヒンジ領域は、標的タンパク質への最適な結合を可能にするscFv領域の機動性を伝達する。膜貫通ドメイン領域は、CD28および/または4-1BBのような細胞外結合領域と共に活性化ドメインとの間の導管として機能する。最終モジュールは、CD3ゼータ細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

#### 【0399】

本開示は、CD4およびCD25を共発現する細胞を標的とする新規なTreg CAR（CD4zetaCD25CARまたはC4-25z CARとも呼ばれる）構造コントラクトのための方法を提供する。Treg CARは、CD4およびCD25を同時発現しない細胞の大部分を保存しながら、Tregを特異的に枯渇させる。

#### 【0400】

10

20

30

40

50

いくつかの実施例では、Treg CARにおけるCD4およびCD25に対する2つのscFv分子の同時係合の際に、T細胞活性化を達成することができる。さらなる実施例では、T細胞活性化シグナルおよび共刺激シグナルの両方が、2つの異なる/別個のキメラ抗原レセプター-ポリペプチドを使用して提供される。

#### 【0401】

この実施例では、Treg CARは、(1)第1の抗原認識ドメイン、第1のシグナルペプチド、第1のヒンジ領域、第1の膜貫通ドメイン、第1の共刺激ドメイン、および第1のシグナル伝達ドメインを含む第1のキメラ抗原レセプター-ポリペプチド、そして(2)第2の抗原認識ドメイン、第2のシグナルペプチド、第2のヒンジ領域、第2の膜貫通ドメイン、第2の共刺激ドメイン、および第2のシグナル伝達ドメインを含む第2のキメラ抗原レセプター-ポリペプチド。第1のキメラ抗原レセプター-ポリペプチドユニットおよび第2のキメラエンジニアリングポリペプチドユニットの両方が単一のポリペプチド分子上に発現され、高効率切断部位を含むアミノ酸配列が第1のキメラ抗原レセプター-ポリペプチドユニットと第2のキメラ抗原受容体ポリペプチド単位を含む。

#### 【0402】

いくつかの実施例において、Treg CARは、CD4またはCD25抗原のみを有する細胞を最小限に抑えながら、CD4およびCD25を共発現する細胞の溶解活性を増強する。

#### 【0403】

いくつかの実施例において、第1のキメラ抗原レセプター-ポリペプチドユニットのヌクレオチド配列は、相同組換えを回避するために、第2のキメラ操作ポリペプチドユニットとは異なる。

#### 【0404】

いくつかの実施例において、Treg CARにおける高効率切断部位はP2Aである。

#### 【0405】

いくつかの実施例では、第1の抗原認識ドメインの標的はCD4またはCD25のいずれかであり、第2の抗原認識ドメインの標的はCD4またはCD25のいずれかであり、第1の抗原認識ドメインは第2の抗原認識ドメインとは異なる。

#### 【0406】

この実施例では、抗原認識ドメインは、標的に対して向けられる(選択的な)モノクローナルまたはポリクローナル抗体の結合部分または可変領域を含む。さらなる実施形

30 例では、標的抗原はCD4またはCD25である。

いくつかの実施例では、TまたはNK細胞は、異なるまたは同じ抗原を標的とするTreg CARを含む。

#### 【0407】

いくつかの実施例において、T細胞またはNK細胞は、CD4およびCD25を発現するTregを標的とするTreg CARを含み、CD4およびCD25を同時発現しない大部分の細胞は含まない。

#### 【0408】

いくつかの実施例では、T細胞またはNK細胞は、Tregを欠損するTreg CARを含む。

#### 【0409】

いくつかの実施例では、本開示は、被験体におけるCD4 + CD25 + Foxp3 + T調節細胞(Treg)関連疾患を治療または予防するのに有用なTreg CARの作製方法を提供する。さらなる実施例において、Treg CARで治療される疾患は、限定はされないが、癌を含む。

#### 【0410】

いくつかの実施例では、本開示は、CD4 + CD25 + Foxp3 + T調節細胞(Treg)に関連する癌を治療または予防するのに有用なTreg CARの作製方法を提供し、それらは肝細胞癌、線維芽細胞腫、肝芽細胞腫、未分化胚肉腫および肝臓の間葉性過誤腫、肺扁平上皮細胞癌、精巣非分化生殖細胞腫瘍、脂肪肉腫、卵巣および性腺外卵黄腫瘍、卵巣絨毛

10

20

30

40

50

癌、奇形腫、卵巣明細胞癌、胎盤栄養芽腫、リンパ腫および白血病が含まれるが、これらに限定されない。

**【0411】**

いくつかの実施例において、本開示は、被験体における腫瘍の増殖を阻害するため有用なTreg CARの作製方法を提供する。

**【0412】**

いくつかの実施例では、Treg CARは、現在開発中または市販されている任意の化学療法剤と組み合わせて投与される。いくつかの実施例では、Treg CARは、限定されないが、血液悪性腫瘍および癌を含む疾患の第1選択治療として投与される。

**【0413】**

いくつかの実施例では、Treg CARを発現する細胞は、より良い治療成果を得るために、限定されないが、CTLA-4およびPD-1 / PD-L1遮断薬、またはIL-2、IL-15またはIL-15 / IL-15sushiまたはIL-15 / RAおよびIL-12の阻害剤、またはコロニー刺激因子-1受容体(CSF1R)の阻害剤を含む免疫調節薬と同時投与される。

**【0414】**

いくつかの実施例において、Treg CARを発現する細胞は、他の免疫調節薬またはCAR発現細胞と同時に投与され、被験体において相乗効果を提供する。

**【0415】**

特定の実施例において、Treg CARを発現する細胞は、T細胞またはNK細胞でありえ、哺乳動物、例えば、人間に投与される。

**【0416】**

いくつかの実施例において、Treg CARは、癌の治療における免疫療法において使用される。癌は、肺癌、黒色腫、乳癌、前立腺癌、結腸癌、腎細胞癌、卵巣癌、子宮頸癌、頭頸部癌、胃癌、肝臓癌、神経芽細胞腫、横紋筋肉腫、白血病およびリンパ腫から選択されるかもしれない。本開示に記載される構成および方法は、化学療法、外科手術、放射線療法、遺伝子療法などの癌のための他のタイプの療法と併せて利用されてもよい。

**【0417】**

安全性プロファイルまたは治療指標の向上を達成するために、本開示のTreg CARは、一過性RNA修飾「生分解性」バージョンまたは誘導体、またはそれらの組み合わせとして構築することができる。本開示のRNA修飾CARは、T細胞またはNK細胞にエレクトロポレーションされるかもしれない。Treg CARの発現は、数日にわたって徐々に減少し得る。

**【0418】**

被験体においてTreg CARを用いて癌を治療する方法は、本開示において具体化される。この方法は 以下を

- (1) 被験者またはドナーからT / NK細胞を得る。
- (2) リンパ球 / T細胞またはNK細胞を培養する。
- (3) 培養したT細胞またはNK細胞にTreg CARコンストラクトを導入する。
- (4) Treg CAR T細胞またはNK細胞を増殖させる。
- (5) 対象に治療上有効な量を投与することによって対象を治療する。

腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)のエクスピボでの増殖は、現在の養子細胞療法でうまく使用されている。この実施例では、TILを採取し、エクスピボで首尾よく増殖させる。

**【0419】**

いくつかの実施例において、TILsは、腫瘍組織サンプルから得られ、TILsの数を増殖することができる。Treg CAR TまたはNK細胞をTILsと共に培養してTreg集団を枯渇させ、癌に対するTIL応答を増強し、これは疾患治療に有用であった。

**【0420】**

いくつかの実施例では、CD4CARは、抗原認識ドメイン、ヒンジ領域、共刺激ドメインおよび細胞内ドメイン(CD3ゼータ鎖)を含む一組のCAR本体を有する。さらなる実施例では、CD4CARはTregを枯渇させ、次いで癌細胞に対するT細胞応答を増強し、抗腫

10

20

30

40

50

癌活性の治療結果を改善する。

**【 0 4 2 1 】**

いくつかの実施例では、CD25CARは、抗原認識ドメイン、ヒンジ領域、共刺激ドメインおよび細胞内ドメイン（CD3ゼータ鎖）を含む一組のCAR本体を有する。さらなる実施例では、CD25CARはTregを枯渇させ、次いで癌細胞に対するT細胞応答を増強し、抗腫瘍活性の治療結果を改善する。

**【 0 4 2 2 】**

本開示は、以下に示す実例を参照してよりよく理解されかもしれない。以下の実施例は、本明細書で請求される化合物、組成物、物品、デバイスおよび/または方法がどのように作られ、評価されるかについての完全な開示および記載を当業者に提供するために提示され、純粋に模範の例示であり、本開示を限定するものではない。

10

**【 0 4 2 3 】**

本明細書に記載の操作された細胞のいずれかの投与では、CAR増強剤の同時投与を追加することができるかもしれない。より良好な治療結果のために、CAR増強剤の例としては、CAR活性を増強する、しかしながらこれに限定されない、免疫チェックポイント経路を標的とする薬剤、コロニー刺激因子-1受容体（CSF1R）の阻害剤などの免疫調節薬が挙げられる。免疫チェックポイント経路を標的とする薬剤には、阻害性免疫受容体CTLA-4、PD-1、およびPD-L1に結合し、CTLA-4およびPD-1 / PD-L1遮断をもたらす小分子、タンパク質または抗体が含まれる。本明細書で使用されるように、増強剤は、上記で述べられたエンハンサーをも含む。

20

**【 0 4 2 4 】**

本明細書で使用する「患者」には、哺乳動物が含まれる。本明細書で言及される哺乳動物は、任意の哺乳動物であり得る。本明細書で使用される「哺乳動物」という用語は、マウスおよびハムスターのようななげっ歯類の哺乳動物、およびウサギのようなLagomorphaの哺乳動物を含むが、これらに限定されない任意の哺乳動物を意味する。哺乳動物は、Felines（ネコ）およびCanines（イヌ）を含む、order Carnivoraからのものであってもよいかもしれない。哺乳類は、Bovines（ウシ）およびSwines（ブタ）またはEquines（ウマ）を含むorder Artiodactylaからのものであってもよいかもしれない。好ましくは、哺乳動物はヒトである。患者には被験者が含まれる。

30

**【 0 4 2 5 】**

特定の実施例では、患者は、0～6ヶ月齢、6～12ヶ月齢、1～5歳齢、5～10歳齢、5～12歳齢、10～15歳、15～20歳のヒトである、13～19歳、20～25歳、25～30歳、20～65歳、30～35歳、35～40歳、40～45歳、45～50歳、50歳、55～60歳、60～65歳、65～70歳、70～75歳、75～80歳、80～85歳、85～90歳、90～95歳年齢は95歳から100歳である。

**【 0 4 2 6 】**

本明細書で述べられるように、操作された細胞の「有効量」および「治療有効量」という用語は、所望の治療または生理学的または効果または治療効果を提供するのに十分な量の操作細胞を意味する。そのような効果または治療効果には、細胞性疾患の症状の軽減または改善が含まれる。望ましくない効果、例えば、副作用は、時に所望の治療効果と共に現れる。それゆえ、従事者は潜在的な効果と潜在的なリスクとのバランスを取って、適宜な「有効量」が何であるかを判断する。必要とされる正確な量は、対象の種、年齢および患者の一般的な状態、投与様式、その他などに依存して、患者によって異なるであろう。したがって、正確な「有効量」を指定することは不可能かもしれません。しかしながら、いかなる個人の場合でも、適切な「効果的な量」という用語は、唯一の日常的な実験による該当業界による通常の技術を用いて決定される。一般的に、特定の操作された細胞または操作された細胞群は、標的細胞の増殖を減少させるのに十分な量および条件下で与えられる。

40

**【 0 4 2 7 】**

癌の治療、阻害または予防のためのデリバリーシステムでの投与後、熟練した

50

専門家に周知の様々な技術を用いることで治療用の操作細胞の有効性を評価することができる。

#### 【 0 4 2 8 】

例えば、化学療法アジュvantと共に送達される治療用に操作された細胞が、癌細胞の負荷を軽減するか、またはさらなる増殖を予防することを観察することによって、対象の癌の治療または阻害するのに有効であることを当業者は理解するであろう。癌細胞の負荷は、例えば、特定の癌細胞の核酸の存在を検出するためのポリメラーゼ連鎖反応アッセイを用いて、または血液中の特定の癌細胞マーカーの同定、たとえば抗体を用いての被験体または患者からのサンプル（例えば、血液に限定されないが）の測定、または、患者の循環する癌細胞抗体レベルの量を測定することによる、当該分野で既知の方法によって測定することができる。

10

#### 【 0 4 2 9 】

本明細書を通して、量は範囲および下限および上限の境界によって定義される。各下限の境界は、各上限の境界と組み合わせ範囲を定義することができます。下部境界と上部境界はそれぞれ別の要素として考慮すべきです。

#### 【 0 4 3 0 】

本明細書を通して、“one embodiment,” “an embodiment,” “one example,” または“an example”という言及は、その実施形態または実施例に関連して説明した特定の特徴、構造または特性が、本実施形態の少なくとも1つの実施形態に含まれることを意味する。したがって、本明細書を通して様々な箇所での“in one embodiment,” “in an embodiment,” “one example,” または“an example”という句の出現は、必ずしもすべて同じ実施形態または例を指すものではない。さらに、特定の特徴、構造または特性は、1つまたは複数の実施形態または実施例において、任意の適切な組み合わせおよび／またはサブコンビネーションで組み合わせることができる。

20

#### 【 0 4 3 1 】

本明細書で使用されるとき、用語“comprises,” “comprising,” “includes,” “including,” “has,” “having,” またはそれらの任意の他の変形は、非排他的包含を包含することを意図している。例えば、要素のリストを含むプロセス、物品、または装置は必ずしもそれらの要素のみに限定されず、明示的に列挙されていない、またはそのようなプロセス、物品、または装置に固有の他の要素を含んでもよい。

30

#### 【 0 4 3 2 】

さらに、そうでないと明示的に述べられていない限り、“or”は包括的な“or”を指し、排他的な“or”を指すのではない。たとえば、条件AまたはBは、次のいずれかによって満たされる。Aが真（または存在）でBが偽（または存在しない）、Aが偽（または存在しない）、Bが真（または存在） AとBの両方が真（または存在）である。

#### 【 0 4 3 3 】

さらに、本明細書に示されるいかなる例または説明図も、それらが利用される用語の限定に対する制限、制限、またはそれらの表現の定義として決して見なされるべきではない。代わりに、これらの例または例示は、1つの特定の実施形態に関して説明されないと見なされるべきであり、単に例示として見なされるべきである。当業者は、これらの実施例または例示が利用される用語は、それと共にまたは明細書の他の場所に与えられても与えられなくてもよい他の実施形態を包含し、すべてのそのような実施形態は特許請求の範囲内に含まれることを意図する その用語の範囲 そのような非限定的な例および図解を指定する言語は、“for example,” “for instance,” “e.g.,”、および“in one embodiment”を含むがこれらに限定されない。

40

#### 【 0 4 3 4 】

本明細書では、複数のメンバを含むさまざまなパラメータのグループについて説明している。一群のパラメータ内で、各メンバは、追加のサブグループを作るために他のメンバのうちの任意の1つまたは複数と組み合わされてもよい。例えば、グループのメンバーがa、b、c、d、およびeである場合、特に企図される追加のサブグループには、メンバ

50

ーのうちの任意の1、2、3、または4つ、例えばaおよびc、a、d、およびe、b、c、d、およびe等が含まれる。

#### 【0435】

本明細書中で使用される場合、XXXX抗原認識ドメインは、XXXXに対して選択的なポリペプチドである。したがって、XXXXがターゲットです。例えば、CD38抗原認識ドメインは、CD38に特異的なポリペプチドである。

#### 【0436】

本明細書中で使用される場合、CDXCARは、CDX抗原認識ドメインを有するキメラ抗原受容体を指す。

#### 【0437】

本明細書中で使用される場合、CAR操作細胞は、キメラ抗原レセプターポリペプチドを含む、本明細書に記載の操作された細胞である。例として、CD45操作細胞は、本明細書に開示されるCD45キメラ抗原受容体ポリペプチドを有する操作細胞である。

#### 【0438】

本明細書で使用される場合、compound CAR (cCAR) 操作細胞は、少なくとも2つの異なるキメラ抗原レセプターポリペプチドを含む、本明細書に記載の操作された細胞である。例として、CD19CD22 compound CAR操作細胞は、CD19抗原認識ドメインを有する第1のキメラ抗原レセプターポリペプチドおよびCD22抗原認識ドメインを有する第2のキメラ抗原レセプターポリペプチドを含む、本明細書に記載の操作された細胞である。

#### 【0439】

本開示は、以下に示す実例を参照してよりよく理解されかもしれない。以下の実施例は、本明細書で請求される化合物、組成物、物品、デバイスおよび/または方法がどのように作られ、評価されるかについての完全な開示および記載を当業者に提供するために提示され、純粹に模範の例示であり、本開示を限定するものではない。

#### 【実施例】

#### 【0440】

##### 使用例

操作されたcCARは、CD33またはCD123または両方を発現する細胞を標的とする compound CAR (cCAR) の作成

CD33CD123 cCARの構造は、図1および図2Aの概略図に従う。それは、2つの異なるCARのユニットを有する機能的なcompound CAR (cCAR) の発現を誘導するSFF V（脾臓フォーカス形成ウイルス）プロモーターを含む。抗原受容体は、抗CD33および抗CD123のscFv（一本鎖可変断片）スクレオチド配列を頭部につける。ピコルナウイルス由来のP2Aペプチドは、バイシストロン性遺伝子構造の自己切断ダイナミクスの非常に効率的な機構のために利用される。自己切断P2Aペプチドは、発現中における2つの独立したCARユニット、CD33CAR、およびCD123CARと一緒に連結するのに役立つ。文献中で一般的に使用されている内部リボソーム進入部位 (IRES) に対するこのアプローチの利点は、小さいサイズおよび高い切断効率もつP2Aペプチドを上流および下流の2つの単位タンパク質間にはさめることである。さらに、自己切断P2Aペプチドの使用は、IRESが適用された場合に、IRESの前後の遺伝子間の発現レベルの差の問題を回避することができる。

#### 【0441】

モジュラーユニットであるCD33CARは、CD33 scFvドメイン、CD8aヒンジ領域、CD8a膜貫通ドメイン、4-BB共刺激ドメインおよびCD3ゼータ鎖の細胞内ドメインを含む。第2のモジュラーCAR、CD123CARは、CD33CARと同じヒンジ、膜貫通および細胞内シグナル伝達ドメインを有するが、異なるscFvおよび共刺激ドメインを有する。CD33 CARはそれに対応する抗原を認識し、CD123 CARはそれに対応する抗原に結合する。ヒンジ領域は、ジスルフィド相互作用が回避されるように設計された。異なる共刺激ドメイン、4-BBおよびCD28を使用した。CD33CD123 compound CARをレンチウイルスプラスミドにサブクローニングした。

#### 【0442】

10

20

30

40

50

### 高効率compound CAR (cCAR)の作製

Compound CARレンチウイルスは、図2に示すように大きなサイズのインサートを含むベクターのため、力値を増加させるために2倍量のベクターDNAを使用した以外は、Lipofectamine 2000の製造業者の指示に従った方法を用いてHEK-293FT細胞へトランスフェクションさせることで作製した。12から16時間のインキュベーション後、Lipofectamineを含む培地を除去し、10%FBS、20mM HEPES、1mMピルビン酸ナトリウムおよび1mM酪酸ナトリウムを含むDMEM培地と交換した。約24時間後、上清を採取し、冷蔵し、新鮮な培地と交換した。さらに約24時間後、これを回収し、前の上清と合わせ、0.45μMフィルターディスクで濾過した。上清を一定分量に分割し、液体窒素で急速凍結し、-80°で保存した。HEK-293 FT細胞を回収し、凍結保存し、その後の電気泳動およびウェスタンプロットティングのために溶解した(図2)。

#### 【0443】

PB(末梢血)またはCB(ヒト臍帯血)バフィーコート細胞を、抗CD3抗体およびIL-2で2日間活性化した。cCARレンチウイルス上清を、レトロネクチンでコートしたマルチウェルプレート上にスピノクレーションした。活性化T細胞を、形質導入効率を高めるために約 $0.3 \times 10^6$ 細胞/mLの低濃度でレンチウイルス上清を含む複数のウェル上にて形質導入した(図3)。

#### 【0444】

最初のオーバーナイトでの形質導入の後、細胞が異常に見えない限り、細胞を洗浄せずに2回目の形質導入のために、次のウイルスをコートしたプレートに直接添加した。2回目のオーバーナイトでの形質導入の後、細胞を洗浄し、合わせて、組織培養処理プレートでインキュベートした。CAR T細胞を、共培養殺傷アッセイの前に約5日間まで増殖させた。インキュベーションの約3日後、ビオチンと結合したヤギ抗マウスF(Ab')2またはヤギIgG(アイソタイプ)抗体と共に細胞をインキュベートし、洗浄し、続いてストレプトアビジン-PEおよび抗ヒトCD3抗体とともにインキュベートした。洗浄し、2%ホルマリン中に懸濁させた後、細胞をフローサイトメトリーで分析して、形質導入効率を決定した。

#### 【0445】

### CD33CD123 cCAR特性評価

Compound CARの構築を確認するため、トランスフェクトされたCD33CD123 cCAR HEK293T細胞をウェスタンプロットで解析を行った。抗CD3ゼータモノクローナル抗体を用いたイムノプロットは、compound CAR CD3ゼータ融合タンパク質の予測されるサイズのバンドを示した(図2B)。重要なことに、同レベルの強度の2つの異なるバンドシグナルがプロット上で観察され、P2Aペプチドによる高い切断作用が成功したと予期された。期待されるように、GFPコントロールベクターについては予期されたように、CD3ゼータの発現は見られなかった。scFvの表面発現を、HEK293細胞(図2C)および初代T細胞(図2C)についてもテストした。

#### 【0446】

compound CD33CD23CARレンチウイルスの、HEK293細胞株における形質導入効率についての検査のため、フローサイトメトリー(Beckman Coulter)により分析した(図2C)。フローサイトメトリーは、HEK細胞の約67%がCD33CD123 CARを発現することを示した。ヒト末梢血(PB)は、自己T細胞療法にしばしば用いられる。ヒトPBバフィーコート細胞を抗CD3抗体およびIL-2で活性化し、CD4CARまたはコントロール(GFP)レンチウイルスのいずれかで形質導入した。形質導入後、フローサイトメトリー分析は、T細胞の約22%がCD33CD123CARを発現することを示した(図2C)。

#### 【0447】

臍帯血(UCB)および末梢血(PB)由来のCD33CD123cCAR T細胞は、CD33発現腫瘍細胞を特異的に殺す

CD33CD123 cCAR T細胞またはGFP T細胞(コントロール)を、0.5:1から50:1から、好ましくは約2:1、5:1、10:1、20:1、50:1、約100,000、200,000

10

20

30

40

50

0、500,000、約100万、または200万個のエフェクター細胞と約50,000、100,000、200,000個の標的細胞、それぞれ)の範囲の比率で標的細胞とともにIL-2を含まない約1-2mLのT細胞培養培地中で約24時間インキュベートした。標的細胞は、白血病細胞株および白血病患者由来の白血病細胞であった。共培養の約24時間後、細胞をマウス抗ヒトCD33、CD123、CD34およびCD3抗体で染色した。

#### 【0448】

CD33CARおよびCD123 CARを発現するCD33CD123 cCAR T細胞を作製し、HL60およびKG-1a細胞系を用いて抗白血病機能を試験した。HL60細胞株は、CD33を高度に発現する前骨髄球性白血病細胞株である。その細胞集団の約100%がCD33+であり、そのわずかなサブセット(10%)がdim CD123+である。培養において、この細胞系を用いてCD33発現白血病細胞を標的とすることに重点を置いてCD33CD123 CARの有効性を決定するためにテストした。さらに、HL60におけるCD33の強力な発現のために、CD33CD123cCARの作用はかなり強い可能性がある。実際に、エフェクター対標的細胞の様々な比率の24時間の共培養条件下で、CD33CD123cCARは有意な白血病細胞への殺傷作用を示した(図4)。CB由来のCD33CD123 CAR T細胞を、HL60細胞を死滅させる能力について最初に試験した。約0.5:1から50:1、好ましくは1:1から約5:1、より好ましくは約2:1から4:1の範囲の低エフェクター:標的(E:T)比で約24時間のインキュベーションにより、CD33CD123 CAR細胞はGFPコントロールと比較してCD33発現HL60細胞の約55%の細胞を除去した。約5:1の比率では、殺傷能は約82%に上昇した。

10

#### 【0449】

末梢血単核細胞(PBMC)に由来するCD33CD123 CARは、HL60と比較し、約100%のCD33並び50-80%のCD123を発現する骨髄性白血病細胞株KG1aと共に培養した。従って、KG1aは、CD33CD123 CARが標的とする抗原に対して二重陽性である、比較的二重の標的細胞集団である。約24時間のインキュベーションにて、約0.5:1~50:1の範囲の低エフェクター:標的(E:T)比で検討した。約2:1の低いE:T比ではCD33CD123 CARは、約26%の中適度な抗白血病活性を示し、E:T比が10:1に増加すると、KG1aへの殺傷はGFPコントロールと比較し約62%となり(図5)、CD33マーカーの強度は、強く提示されるHL60に対する殺傷の効率の指標であり、KG1aよりも多くのCAR作用を利用する。これらの実験は、関連する抗原提示細胞集団に対する全CD33CD123 CARの機能についての証拠を提供する。

20

#### 【0450】

さらなるcompound CAR、CD33CD123-BB cCARが作製された(データは示さず)。このcompound CARは、2つの独立したCAR単位である、CD33およびCD123を含む。第1のCARは、CD33へ結合するscFvを含み、第2のCARは、CD123を認識する異なるscFvを有する。両方のCARは、同じヒンジ領域、膜貫通型、共刺激性および細胞内ドメインを含む。CD33CD123-BB cCARレンチウイルスを産生させ、それらのKG-1a細胞における殺傷能を試験した。図5に示すように、約10:1の比率で実質的に死滅したが、CD33CD123 cCARよりも効力が低くかった。

30

#### 【0451】

CD33CD123 cCARは、CD33および/またはCD123を発現する患者サンプルに対しての活性を有する

40

細胞株での実験に加えて、個々のCARユニットの機能を試験するために、患者の試料についての研究も実施した。侵攻性の急性骨髄性白血病(AML)であるAML-9は、CD33CD123 cCARの有効性を試験するために用いられた。AML-9サンプル中の複数の細胞型を含む患者細胞集団の不均一性のために、白血病芽球は、2つの陽性マーカーであったCD34およびCD33でゲートされた。白血病細胞のこのCD33+CD34+集団の枯渇は、GFPコントロールと比較してCAR T細胞では48%であることが観察された(図6)。

#### 【0452】

CD123陽性およびCD33陰性であった白血病細胞もまた試験した。この目的のた

50

めに、ヒトB細胞急性リンパ芽球性白血病（B-ALL）サンプルであるSp-BM-B6を選択した。この試料中の全ての白血病性芽球はCD34+ CD33-であり、CD123に対して約50%以上陽性であった。CD33CD123 cCAR T細胞によるCD34+白血病細胞集団の減少は、GFPコントロールと比較して約86%であった（図7）。細胞株およびヒトの試料研究に基づいて、本発明者らのデータは、compound CD33CD123 CARがCD33またはCD123またはその両方を発現する白血病細胞を標的とすることができる強く示唆するものである。

#### 【0453】

CD33またはCD23またはその両方を発現する白血病細胞を標的とするCD33CD123 cCAR NK細胞

10

ナチュラルキラー（NK）細胞はCD56+ CD3-であり、CD8+ T細胞のような感染細胞および腫瘍細胞を効率的に殺すことができる。CD8+ T細胞とは異なり、NK細胞は、細胞を殺すために活性化を必要とせずに腫瘍に対して細胞傷害性を発揮する。NK細胞は、サイトカインストームによる潜在的に致命的な合併症を回避できるので、より安全なエフェクター細胞である。しかしながら、CD33またはCD123または両方のCAR NK細胞を用いて、白血病を死滅させることに関しては完全に未開発である。

#### 【0454】

CD33CD123 cCAR NK 細胞の作製

NK-92細胞に、CD33CD123 CARレンチウイルス上清を、2度にわたる連続したオーバーナイトでの形質導入方で形質導入を行い、方法としてはレトロネクチンおよびウイルスをコーティングしたプレートをそれぞれの形質導入時に交換した。形質導入した細胞を3または4日間増殖させ、次いでCARの発現をフローサイトメトリーによって分析した。細胞を採取し、ヤギ抗マウスF（Ab'）2と約1：250の割合で約30分間インキュベートした。細胞を洗浄し、懸濁させ、ストレプトアビジン-PEで約30分間染色した。細胞を洗浄し、2%ホルマリン中に懸濁させ、フローサイトメトリーにより分析した。次いで、CD33CD123cCARを発現するNK-92細胞を上記のように標識し、FACSAria上で選別し、F（Ab'）2でラベルされた細胞の上部0.2%を収集し、培養した。選別して培養した細胞のその後の標識では、抗マウスF（Ab'）2についてNK-92細胞は約89%の陽性を示した（図8）。

20

#### 【0455】

CD33CD123 cCAR NK細胞は、白血病細胞を効率的に溶解または殺傷する

30

最初に、我々は、共培養においてHL-60癌細胞株を死滅させる能力を測定することにより、CD33CD123 cCAR NK-92細胞の機能を試験した。実質的にすべてのHL-60細胞はCD33を高発現するが、この細胞株でのCD123発現は10%（弱）未満である。したがって、CD33CD123cCARの殺傷能力は、cCARがCD33を適切に標的化している能力に依存する可能性が高い。

#### 【0456】

CD33CD123 cCAR NK-92細胞を、IL-2を含まないNK細胞培地中で約24時間、HL-60細胞とともに共培養した。インキュベーション後、CD33CD123cCAR NK-92細胞を標識し、非CARであるGFP NK-92細胞をコントロールとして比較した。コントロールのGFP NK-92細胞と比較して、CD33CD123 cCAR NK-92細胞によるHL-60細胞の劇的な殺傷が観察された。さらに、CD33CD123 cCAR NK-92細胞の殺傷能力は、用量依存性であり、コントロールと比較して約10対1の細胞比率ではほぼ100%であった（図9および11）。

40

#### 【0457】

骨髓性白血病細胞株を用いた続いての共培養実験は、HL-60と比較して中程度の強さのレベルであるが、すべての細胞においてCD33を発現するKG1aを用いて実施された。CD123抗原はKG1a細胞の約50~80%に発現する。実験デザインは、上記で述べられている、最初のHL-60殺傷アッセイの実験と同様に、同じインキュベーション時間、同じ、エフェクター：癌細胞比および、同じくGFP NK-92細胞をコントロールに用いた。結果

50

は、GFP NK-92細胞コントロールと比較し、CD33CD123 cCAR NK-92細胞によるKG1a細胞の顕著な殺傷力が用量依存的に示された。エフェクター：標的の比が10：1である場合、CD33CD123cCAR NK-92細胞によるKG1a細胞の殺傷力は、GFPコントロールのものと比較して約85%であった（図10および11）。

#### 【0458】

KG1a細胞の解析により、KG1a細胞は2つの異なる集団、CD33 + CD123-およびCD33 + CD123+を示した。図11は、両方の集団で見られる細胞の殺傷が用量依存的に増加することを示した。驚くべきことに、二重陽性集団は、エフェクター細胞比の増加に伴いついてより高い効率的死滅を示し、CD33およびCD123の2つのモジュラーCARによる相乗効果の可能性を示唆した（図12）。

10

#### 【0459】

我々はまた、CD28を介した共刺激入手しただけでなく、4-1BBリガンド（4-1BBLまたはCD137L）を単一の構築物に同時発現させて、より良い治療効果を提供する、操作されたCD33CD123 CAR T細胞を作製した（図13A）。健康なドナーからの末梢血に由来するT細胞に、CD33CD123-4-1BBL-2Gコンストラクトを、6ウェルプレートに2mlのウイルス上清と共にインキュベートして形質導入した。CAR発現は、CARタンパク質の表面発現によるF(ab)’標識を用いてアッセイされ、続いてFACS分析を行った。形質導入された細胞を、同時に標識したコントロールT細胞と比較した。発現を決定し、形質導入された集団を、形質導入期間の終了後の1日目にプロットした。T細胞上の表面CD33CD123-41BBL-2G CAR発現は約60%であった（図13B）。

20

#### 【0460】

CD33CD123 CARは、4-1BBLがコンストラクト中に含まれる場合、機能的活性化を改善する。

エンハンサーであるIL-15 / IL-15sushiもCD33CD123 CARコンストラクトに含まれていた。compound CAR、CD33CD123およびIL-15 / IL-15sushiの両方が単一コンストラクトであった（図14）。IL-15 / IL-15sushiは、CAR T / NK細胞の増殖を促進し、自然免疫細胞の腫瘍部位への浸潤をもたらし、腫瘍破壊をより良好に行うことができる。

#### 【0461】

操作されたcCARは、1) CD19またはCD20またはその両方、2) CD19またはCD20またはその両方、3) CD19またはCD138またはその両方を標的とする。

30

#### CD19CD20、CD19CD22およびCD19CD138 cCARの作製

3つのcCARは、上記のCD33CD123cCARと同様の手順を用いて作製された（図15）。

#### 【0462】

#### 第2世代compound CAR (CD19CD20およびCD19CD22) の作製

compound CAR (cCAR) のコンストラクトは、図16Aの模式図に従う。これは、CARの2つの異なるユニットを有する機能性cCARの発現を誘導するSFFV（脾臓フォーカス形成ウイルス）プロモーターを含む。最初のCARは、ピコルナウイルス由来である高効率のP2A自己切断ペプチドによって完全な第2のCAR (CD20-2GまたはCD22-2Gのいずれか) に連結された、完全なL8-CD19-2G CAR (ヒトCD8aリーダー配列を使用し、L-8と呼ばれる) である。全配列はフレーム内にあり、結果として最初に細胞表面発現の半分前に切断される1つの大きな融合タンパク質である。この方法は両方のCARの発現レベルが等しいことを保証する。続いてcCAR DNA分子を上記と同じレンチウイルスプラスミドにサブクローニングした。

40

#### 【0463】

形質導入されたT細胞はcCARを効率的に発現する

レンチウイルスベクター上清は、CD19CD20-2GまたはCD19CD22-2GベクターコンストラクトまたはコントロールベクターのいずれかでトランスフェクトしたHEK293T細胞から作製した。レンチウイルス上清の回収を集めた後、細胞を回収し、溶解し、ウェ

50

スタンプロット転写の為に電気泳動した。プロット膜を抗ヒトCD3ゼータ抗体とインキュベーションすることで、切断後の各CAR単位を表す2つの異なるバンドが得られた。CD19CARはCD20またはCD22 CARユニットよりもわずかに大きい(図18B)。次に、末梢血単核バフィーコート細胞を3日間活性化し、濃縮CD19CD20-2G、CD19CD22-2Gまたはコントロールベクターレンチウイルス上清をレトロネクチンでコーティングした非組織培養プレート上で形質導入した。形質導入処置を、最初の形質導入の24時間後に繰り返した。T細胞表面上のCAR発現は、形質導入の3日後に示されたヤギ抗マウスF(Ab')2抗体およびマウス抗ヒトCD3で形質導入されたT細胞を染色することで示した。

#### 【0464】

図16は、濃縮L8-CD19CD20-2Gレンチウイルス上清で形質導入された細胞の26.9%が、濃縮CD19CD22-2Gレンチウイルス上清で形質導入されたT細胞の35.6%が、コントロール形質導入と比較した場合に、フローサイトメトリーによってF(Ab')2およびCD3の両方に対して陽性であると判定された。

#### 【0465】

形質導入されたT細胞は、リーダー配列に基づいて異なるレベルでCD19CD22-2Gを発現する

次に、cCARの最高レベルの細胞表面発現をもたらすリーダー配列を決定し、ヒトCD8a(L8)、CD45(L45)、およびコロニー刺激因子(CSF)のリーダー配列を組み込んだ3つのコンストラクトを作製した(図17)。ヒト末梢血T細胞をこれらのベクターのそれぞれから作製したレンチウイルス上清で形質導入した後、T細胞の形質導入効率を上記のようなF(Ab')2抗体を用いて測定した。L8リーダー配列は再び最高の形質導入効率(43.8%)をもたらし、その後L45(9.8%)およびCSF(1.3%)が続いた。(図17)。これは、単一CARのように、compound CARの最適な設計が、表面CAR発現のためのリーダー配列に部分的に依存することを示す。

#### 【0466】

レンチウイルス上清の濃度は、cCARの形質導入効率を高めることができる。

形質導入されたT細胞のCAR効率を改善するために、CD19CD20-2GおよびCD19CD22-2Gのレンチウイルス上清を $3,880 \times g$ で24時間遠心分離した。得られたウイルスペレットを、元の容量の3分の1で培地に懸濁し、3倍に濃縮した。この濃縮物を用いて、非濃縮ウイルスと同じ用量を用い活性化T細胞に形質導入した。図10aは、3倍濃縮CD19CD22-2Gレンチウイルス上清で形質導入したT細胞のCAR効率はほぼ3倍増加し、2.5×濃縮CD19CD20-2Gレンチウイルス上清で形質導入されたT細胞のCAR効率は約10倍増加した(図18)。これは、より長いcCARコンストラクトのためにレンチウイルスベクターの濃縮の重要性を示している。

#### 【0467】

cCAR CAR T細胞は、CD19発現腫瘍細胞株を特異的に標的とする。

CD19+細胞系、SP53およびJeKo-1(両方のマントル細胞リンパ腫系)を効果的に溶解するL8-CD19CD22-2GおよびL8-CD19CD20-2G CAR T細胞の能力を決定するために、T細胞共培養殺傷アッセイを実施した。簡潔言えば、各標的細胞株をCMTMR膜色素で予め染色し、次いでベクターコントロール、L8-CD19CD22-2GまたはL8-CD19CD20-2G CAR T細胞のいずれかと2:1および5:1エフェクター:標的細胞の比で共培養した(血清またはIL-2を含まない1mLのT細胞培地中に200,000または500,000エフェクターヒト細胞に対し100,000の標的細胞)。一晩インキュベートした後、細胞を抗ヒトCD3-PerCPおよびCD19-APCで30分間標識し、洗浄し、フローサイトメトリーによる分析のために2%ホルマリンに懸濁した。L8-CD19CD22-2G CAR T細胞は、腫瘍細胞に対し強力な溶解を示し(図19)、それぞれ2:1および5:1の比でSP53細胞の53.4%および93%を溶解した。同じ比率で、L8-CD19CD22-2G CAR T細胞は、JeKo-1細胞の69%および97.3%を溶解することができた(図20)。

#### 【0468】

cCAR CAR T細胞は、AMLおよびB-ALL患者サンプルからCD19+細胞を排除する。

10

20

30

40

50

患者サンプルを用いて再度研究を行った。これらの初代細胞のバフィコート画分をCMTMRで予め標識し、腫瘍細胞株と同じ様式で、ベクターコントロールまたはL8-CD19 CD22-2G CAR T細胞と共に培養した。L8-CD19 CD22-2G CAR T細胞は、一晩の共培養において、それぞれ2:1および5:1の比でCD19の異常発現を伴うAML患者細胞の54.3%および77%を溶解し、2.5% FBSおよびIL-2が加えられた培地において4日間の共培養、1:1の比でB-ALL腫瘍細胞の84.3%を溶解した(図21,22A)。これらのAML患者細胞は65%の芽細胞しか含まず、その75%がCD19を発現したので、L8-CD19 CD22-2G CAR T細胞はCD19陽性芽細胞集団全体を排除することができた可能性が高い。

#### 【0469】

cCAR CAR T細胞は、CD22を発現するK562細胞を溶解する。

10

野生型K562細胞への形質導入による人工的CD22発現K562細胞株(K562xp22)を作製した。続いて、K562細胞のマイナーカーCD22+集団を標的とするために、CD19 CD22 cCARの抗腫瘍特性を試験した。1:1の比(有効:標的)での共培養実験は、対照と比較してK562を発現するCD22集団に対して穏やかな有意な細胞毒性効果を示す。細胞傷害性の結果は、人工抗原提示細胞株に対する抗腫瘍活性に関して他に報告された数と一致している(図22B)。

#### 【0470】

設計されたcCARは、BCMAおよびCS1を発現する細胞を標的とする  
多発性骨髄腫または自己免疫疾患の治療のためのBCMA CS1 cCARおよびBCMA CD19 cCARを含むcCARの作製

20

CD38、CS1、CD138、B細胞成熟抗原(BCMA)およびCD38を含む標的抗原に対するcCARsの前臨床研究が展開されている。CD19 CARはまた、第I相臨床試験において多発性骨髄腫の治療に対していくつかの有効性を示した。しかし、表面抗原発現の不均一性が悪性形質細胞で一般的に生じることから、単一の標的がこの疾患を治療するのに十分であるとは考えにくい。BCMA CS1 cCAR、BCMA CD19 cCAR、BCMA CD38 cCARおよびBCMA CD138 cCARが作製され、実験デザインは上記のCD33 CD123 cCARのものと同様であった。

#### 【0471】

多発性骨髄腫治療あるいは自己免疫疾患のためのBCMA CS1 cCAR(BC1cCAR)を含むcCARの作製

30

BCMA-CS1 cCAR(BC1cCAR)コンストラクトの作製と特性評価

本発明者らは、compound CARコンストラクトの形質導入は、一般に、単一抗原CARと比較して高い効率の遺伝子導入率を欠いていることが認められた。コンストラクトのサイズまたはエフェクター細胞への代謝ストレスまたは他の要因に起因しようが、compound CARの形質導入スキームの最適化は依然として必要である。我々は、形質導入に3つの異なるプロトコールを比較、またインキュベーションがウイルス上清内で起こるかどうか、形質導入手順の頻度、および処理当たりの最終細胞密度数を含む主要な差異を含め比較した。方法1は毎回24時間2回形質導入においてレトロネクチン被覆プレートで最初にウイルスとともにインキュベートし、吸引し、次いで $0.5 \times 10^6$ 細胞/mlの最終濃度までT細胞と共にインキュベートした。方法2は同じウイルスおよびレトロネクチンの手法を使用したが、最終細胞密度を $0.3 \times 10^6$ 細胞/mlで、第2の形質導入期間を合計48時間までの継続的なインキュベーションに変えた。方法2は、 $0.3 \times 10^6$ 細胞/mlの細胞密度でレトロネクチン被覆プレート上でウイルス上清を細胞と48時間直接インキュベートするインキュベーションスキームを使用する(図23)。

40

#### 【0472】

形質導入プロトコルの最適化は、改善されたBC1cCAR表面発現と相關する

BC1cCARのモジュールデザインは、自己切断P2Aペプチドを挟んで、抗CD269(BCMA、B細胞成熟抗原)一本鎖可変断片(scFv)領域と抗CD319(CS1)scFvと融合した、CD8由来のヒンジ(H)および膜貫通(TM)領域、そしてタンデム4-1BB共活性化ドメイン、ならびにCD3シグナル伝達ドメインに連結した形を含むように設計される(

50

図24A）。強力な脾臓フォーカス形成ウイルスプロモーター（SFFV）およびCD8リーダー配列を、BC1cCARのCAR分子のT細胞表面上での効率的な発現のために使用した。ヒト末梢血軟膜から単離したT細胞を、2日活性化させた後にBC1cCARレンチウイルスで形質導入した。上記の異なる形質導入スキームによれば、各技術について様々な形質導入効率が報告されている（図24B）。我々は、一般に、減少した細胞密度（ $0.3 \times 10^6$ 細胞 / ml）で48時間ウイルス上清と共にインキュベートした細胞が最も高い遺伝子移入効率を支持することを見出した（図24B）。したがって、我々の形質導入スキームを改善するにつれて、対応してより高い遺伝子導入率が観察される（図24C）。

#### 【0473】

トランスフェクトされたBC1cCAR HEK293T細胞を、compound構造の確認のために、ウエスタンプロット分析を行った。抗CD3モノクローナル抗体を用いたイムノプロットにおいて、compound CAR CD3融合タンパク質での予測される大きさのバンドを示した（図24D）。重要なことに、P2Aペプチドの高切斷作用の成功により同様の強度の2つの別個のバンドのシグナルが観察された。期待されたように、GFPコントロールベクターについてはCD3の発現は見られなかった。

10

#### 【0474】

BC1cCAR T細胞は、BCMA + およびCS1 + 骨髄腫細胞株を特異的に溶解する。

BC1cCAR T-cellsによる細胞障害活性を評価するため、MM1S (BCMA + CS1+)、RPMI-8226 (BCMA + CS1-) およびU266 (BCMA + CS1dim) らの骨髄腫細胞株と共に培養アッセイを行った。標的細胞を溶解するBC1cCAR T細胞の能力は、フローサイトメトリー解析によって定量化し、標的細胞をCytototracker色素 (CMTMR) で染色した。24時間の共培養において、BC1cCARはMM1S細胞の実質的に完全な溶解を示し、2 : 1のE : T比で標的細胞の90%以上が減少し、および5 : 1のE : Tでの95%以上の減少を示した（図24Aおよび図25C）。RPMI-8226細胞において、BC1cCARはE : T比2 : 1で70%以上のBCMA + 標的細胞を溶解し、5 : 1のE : Tで75%以上を溶解した（図25Aおよび図25C）。U266標的細胞との24時間の共培養において、BC1cCARはBCMA+U266細胞の80%を2 : 1のE : T比で溶解し、飽和状態に達した（図25Bおよび図25C）。骨髄腫細胞株はすべてほぼBCMA + であるので、これらの結果はBC1cCAR T細胞によるBCMAターゲティングの大部分が有効な細胞溶解を促進することを示唆している。

20

#### 【0475】

BC1cCAR T細胞は、一次患者の骨髄腫サンプルにおけるBCMA + およびCS1 + 集団を特異的に標的とする。

30

原発性腫瘍細胞に対するBC1cCAR T細胞を用いて共培養を行い、多様な原発性骨髄腫細胞を殺傷させる能力を評価した。MM10-G患者サンプルのフローサイトメトリー分析で、明瞭かつ一貫したBCMA + およびCS1 + 集団サブセットを明らかにする。MM7-Gサンプルは完全なBCMA + CS1 + 表現型を示し、一方、MM11-Gは骨髄吸引物であるという性質に起因すると思われるノイズの多いBCMAdim CS1dimの表現型を示す。BC1cCAR T細胞は、E : T比5 : 1で75%以上の溶解を示し、10 : 1で85%以上に増加し、MM7-Gの一次患者試料の強い用量依存的アブレーションを示す（図26A）。

40

#### 【0476】

BC1cCARは、24時間にわたってMM10-G共培養物中のBCMA + CS1 + およびBCMA-CS1 + のサブセット集団を有意にアブレートすることによって、標的化されかつ特異的な溶解能力を示す。2 : 1のE : T比で、BC1cCAR T細胞はBCMA + CS1 + 集団の60%および70%のCS1 + のみの集団をアブレートする（図26B）。5 : 1のE : T比では、CS1 + のみの集団のアブレーションは80%に増加する（図26B）。MM11-G（図26C）に対して、BC1cCAR T細胞も用量依存的に細胞傷害活性を示すことができた（図26C）。まとめると、BC1cCAR T細胞は、骨髄腫細胞株およびBCMAおよびCS1の異なる組み合わせを提示する原発腫瘍細胞の両方に対して強力な抗腫瘍活性を示す（図26D）。

#### 【0477】

BC1cCAR抗原特異的活性の機能的評価

50

その抗原標的化に関してBC1cCARの生物学的特性を評価し特徴付けるために、本発明者らは、BC1cCAR scFv機能性を独立して試験することができるモデルを確立した。骨髓腫マーカー（K562）に陰性のCML細胞株を使用することで、K562細胞にCS1 cDNAを導入し、続いてピューロマイシン選択（図27A）により安定した発現を促進することにより、安定したCS1発現K562細胞株（CS1xpK562）を樹立した。BCMA scFv機能性を試験するために、NIH (Kochenderfer Lab) からBCMA発現K562細胞株（BCMAxpK562）を得た。本発明者らは、各抗原発現細胞株（図27A）に対する各抗原の独立した発現を確認した後、BC1cCAR T標的機能性を決定するための共培養実験においてそれらを使用した。

## 【0478】

10

短期培養（24時間）では、BC1cCAR T細胞はBCMAxpK562細胞に対して細胞傷害活性を示したが、野生型K562細胞に対しては効果を示さなかった（図27B）。次に、CS1xpK562細胞に対する短期培養物は、CS1発現標的細胞に対する同様の応答を示す。さらに、BC1cCAR T細胞は、CS1xpK562細胞に対するCS1特異的CARよりも強い細胞傷害効果を有するようであった（図27B）。CS1<sup>dim</sup>発現NK-92細胞において、細胞傷害性が用量依存的効果として示されたので、抗CS1活性のさらなる検証を行った（図27B）。

## 【0479】

潜在的な臨床シナリオにおいて抗原エスケープをモデル化するために、我々は複合共培養実験を行った。BCMAxpK562とCS1xpK562を1:1の比率で混合し、現実世界のシナリオで再発する可能性のある抗原残存集団の証拠を探した。抗原の枯渇を確実にするために48時間にわたって共培養を行った。次に、T細胞および標的腫瘍細胞の集団を表すヒストグラムを作成した。各ヒストグラムプロットの数字は、ゲートされた標的腫瘍の残存数を表す。本発明者らは、コントロールT細胞と比較して、BCMA特異的CARおよびCS1特異的CARは、それぞれの集団に対して枯渇するか、または著しい細胞毒性効果を有することができることを見出した。しかし、CS1特異的CARは有意な残留BCMA+集団を残したが、BCMA特異的CARは高度の細胞傷害性を達成したが、依然として小さいが明確なCS1+集団を残した（図27C）。対照的に、BC1cCAR T細胞は、両方の標的集団を効果的に枯渇させた（図27C）。我々は、抗原1個を有する残留腫瘍集団が、単一の抗原特異的CARのみを用いて治療を受けた患者において再発を引き起こす可能性があると推測している。

## 【0480】

20

正常な骨髓は、CS1を発現することができる形質細胞の小さなサブセットを発現するので、CS1を誘導するCARが細胞毒性を有する可能性があるという懸念がある。骨髓中のCS1集団は実際にBC1cCARによって用量依存的に影響を受けるが（図27D）、CS1サブセット自体は小さい。

## 【0481】

30

BC1cCAR T細胞は、腫瘍の再負荷をしても持続性および連続殺傷能力を示す

次に、BC1cCAR T細胞が、細胞溶解、破片および腫瘍の再負荷によって引き起こされる好ましくない微環境下で腫瘍細胞を連続的に殺傷する能力を調べた。図28Aのスキームを使用して、MM1S細胞を骨髓腫腫瘍のモデルとして用いて長期共培養を行い、新鮮なMM1Sを有するBC1cCAR T細胞および他のCARコンストラクトを腫瘍増殖または再発をシミュレートするために定期的に再負荷した。最初の共培養条件は、1:1のE:T比で行った。外因性サイトカインが存在しない場合、標的抗原の枯渇は、48時間後の全てのCAR細胞によって達成され、有意なクラスター化およびT細胞増殖が見られる（図28B）。対照的に、コントロールT細胞は応答せず、腫瘍個体群を生じる増殖は現在はその最初の数の2倍に増殖している。新鮮なMM1S細胞を用いてすべての処理中のウェルに再負荷した後、我々は外因性サイトカインなしでも強い細胞傷害性を保持していることがわかった。108時間までに、新たに入力されたMM1S細胞は、CS1-CARから依然として観察される有意な細胞傷害性を伴って、BCMA-CARおよびBC1cCARの両方によって実質的に枯渇した。しかし、この段階では、フローサイトメトリーはCS1-CAR集団の減少および腫瘍抗原集団の相対的増殖が約17%を示し（図28C）、これはCS1-CAR T細胞が虚脱している

40

50

可能性があることを示唆している。この時点で、コントロールT細胞は腫瘍細胞によって完全に増殖している。しかし、CAR腫瘍溶解および細胞毒性はすべて168時間後に停止したが、BCMA-CARおよびBC1cCARは検出可能な少数のT細胞集団を示し、コントロールT細胞およびCS1-CAR T細胞はすべて実質的に消失した（データは示さず）。

#### 【0482】

BC1cCAR T細胞は、インビボで腫瘍の有意な制御および減少を示す。

BC1cCAR T細胞のインビボでの抗腫瘍活性を評価するために、我々は、多発性骨髓腫細胞株であるルシフェラーゼ発現MM.1S細胞を致死量以下で照射したNSGマウスに静脈注射し、測定可能な白血病形成を誘発することができる、異種マウスマodelを開発した。腫瘍細胞の注射3日後に、マウスに、 $5 \times 10^6$ 個のBC1cCAR T細胞またはコントロールGFPT細胞を単回用量で静脈注射した。3日目、6日目、8日および11日目に、マウスにRediJect D-Luciferin (Perkin Elmer) を皮下注射し、腫瘍負荷をIVISイメージングにより測定した（図21）。BC1cCAR処置による腫瘍増殖のコントロールを決定するために、BC1cCAR T細胞注射マウスについて測定した平均光強度を、GFPコントロールマウスのそれと比較した（図29B）。Unpaired T検定は、コントロールグループと比較して、BC1cCAR T細胞の注射グループでは、6日目までに、光強度が小さく、したがって腫瘍の負荷がより少なく、2つの群の間に非常に有意な差（P = 0.01）を示した（図29B）。全てのBC1cCAR T細胞注射マウスは過去50日に生存し、1/4以上は65日を超えたままであった。コントロールマウスと処置マウスとの間のP値は、Long Rank Mantel-Cox試験に基づいて0.0011である。コントロールT細胞注射マウスの生存率は、早ければ50日目までに短期間で減少し始め、55日目までに死亡した。要約すると、これらのインビボデータは、BC1cCAR T細胞が、MM1S注射NSGマウスにおける腫瘍負荷を有意に減少させ、生存を延長することを示している。

#### 【0483】

BC1cCAR T細胞は、混合抗原異種マウスマodelにおいて改善された細胞毒性効果を示す。

本発明者らは、安定して形質導入されたBCMAまたはCS1のいずれかを発現するルシフェラーゼ発現K562細胞を致死量以下に照射し静脈注射したNSGマウスを用いて、異種マウスマodelを計画した。BCMAおよびCS1発現K562細胞を、ピューロマイシンセレクション後に、さらに選別し、安定な均一な单一抗原集団として樹立した。BCMAおよびCS1を発現するK562細胞を、潜在的な抗原逃避のモデルとして、注射の前にそれぞれ4:1の比率で混合した。腫瘍細胞注射の3日後、マウスに、1コース $15 \times 10^6$ のコントロールT細胞、BCMA特異的CAR、またはBC1cCAR T細胞を静脈注射した。2匹のコントロールマウスは、T細胞注入および細胞凝集などの技術的問題の結果として、注射処置の結果として死亡した。3,7,10および12日目に、マウスにRediJect D-Luciferin (Perkin Elmer) を皮下注射し、腫瘍負荷を視覚化するためにIVISイメージングで解析した（図19D）。BC1cCAR T細胞注射マウスについて測定された平均光強度（腫瘍負荷を示す）は、治療による腫瘍増殖の制御を測定するために、BCMA特異的CARおよびGFP対照注射マウスのそれと比較された（図29D）。10日目までに、BCMA特異的CARおよびBC1cCAR T細胞の両方がコントロールと比較して47%を超える腫瘍の減少を示した。しかし、BC1cCARに有利な腫瘍負荷の減少には、マウスの背側に10日早くに6%の差があった。12日目までに、背側のBC1cCAR（図19DおよびE）のために腫瘍減少に17%の差があった。この数は、BCMA-K562 (80%) に対して注入されたCS1-K562細胞の割合 (20%) に近く。おそらく、CS1発現K562細胞が抗原逃避のモデルとして生存および増殖した結果であろう。要約すると、これらのインビボデータは、BC1cCAR T細胞が、複数の抗原集団について改善された腫瘍負荷制御を示すようであることを示している。

#### 【0484】

NK細胞におけるBC1cCAR形質導入および抗腫瘍特性の検証

異なる状況におけるBC1cCARの強さをさらに評価するために、本発明者らはBC1cCARコンストラクトをNK細胞株モデルのNK-92に形質導入した。NK-92細胞への48時間

10

20

30

40

50

に及ぶレンチウイルスインキュベーションによって、このコンストラクトは、形質導入することで成功し、遺伝子導入後の62.1%の表面発現特性をもたらした（図30Aおよび30B）。 $0.3 \sim 0.5 \times 10^6$ 細胞 / mlの密度でのNK-92細胞のメンテナンスは、安定した集団をもたらした。インビトロでBC1cCAR抗腫瘍活性をテストするために、本発明者らは、骨髓腫細胞株および一次患者サンプルとの共培養を行った。BC1cCARは、MM1S、U266およびRPMI-8226細胞株に対して、E : T比が5 : 1の培養液で80%溶解に近づいた。それは、さらに主要なMM7-G腫瘍の60%以上を溶解した（図31Aおよび31B）。これらの結果は、BC1cCAR T細胞との比較可能性の点において同様である。次に、我々はBC1cCARがBCMA +またはCS1 +細胞を単独で溶解する能力におけるBC1cCARの抗原特異性を測定した。BC1cCAR T細胞についても同様のアッセイを行った（図27）。BCMAを発現するK562（BCMAXpK562）またはCS1を発現するK562（CS1xpK562細胞）のいずれかを用いた4時間の培養において、BC1cCAR NK細胞はいずれの集団に対しても細胞傷害性効果を有することができることを見出した（図31C）。

#### 【0485】

形質細胞性骨髓腫または自己免疫疾患の治療のためのBCMA CD19またはBCMA CD19bを含むcCARの作製

BCCMA-CD19 cCARまたはBCMA-CD19b cCARコンストラクトの作製および特性評価

BC1cCARのモジュールデザインは、自己切断P2Aペプチドを挟んで、抗CD269（BCMA、B細胞成熟抗原）一本鎖可変断片（scFv）領域と抗CD319（CS1）scFvと融合した、CD8由来のヒンジ（H）および膜貫通（TM）領域、そしてタンデム4-1BB共活性化ドメイン、ならびにCD3 シグナル伝達ドメインに連結した形を含むように設計される（図35）。強力な脾臓フォーカス形成ウイルスプロモーター（SFFV）およびCD8リーダー配列を、BC1cCAR分子のT細胞表面上での効率的な発現のため、および上記の同様のアプローチを用いたin vitroおよびin vivoでの抗腫瘍活性のために使用した。

#### 【0486】

BCMA CD19 CAR中のCARの各ユニットは、抗血漿細胞または抗B細胞活性について試験される。我々は、BCMA CARユニットが任意のBCMA +集団を強力に溶解できることを見出した。本発明者らは、二重BCMA CS1陽性形質細胞系MM1Sとの共培養を最初に行い、強さの測定の第二の手段としてCS1 CARを使用した。我々は、BCMAおよびCS1特異的CARの両方が高効率でMM1S標的を溶解できることを観察した（図36A）。次に、大多数がBCMA +原発性骨髓腫サンプルMM7-Gに対して、BCMA CARおよびCS1 CARを培養した。我々は、BCMA発現に関しては、BCMA CARはすべてのBCMA +細胞を実質的に枯渇させることができることを見出した。対照的に、CS1 CARは残留BCMA +集団を残した（図36B）。これらの結果は、BCMA CARがその細胞毒性効果において高い効力および特異性を果たすことを示唆している。

#### 【0487】

次に、抗B細胞活性についてCD19 CARユニットをテストした。抗CD19分子の一本鎖可変断片（scFv）スクレオチド配列を、2つの異なるコンストラクト、CD19-2GおよびCD19b-BB CARに使用した。シグナル伝達を改善するために、CD19CARは、CD3 シグナル伝達ドメインに融合した4-1BB共活性化ドメインを用いて設計され、第2世代のCARとした（図37A）。CD19を標的とする第2世代CAR T細胞は、これまでに臨床試験に用いられてきた。T細胞表面上のCD19CAR分子の効率的な発現のために、強力な脾臓フォーカス形成ウイルスプロモーター（SFFV）を使用し、CD8aのリーダー配列をコンストラクトに組み込んだ。比較のために、CD45、CSF、ヒトアルブミン（HA）またはIL-2のリーダー配列を用いたCD19CARコンストラクトも作製した。CD-8由来のヒンジ（H）および膜貫通（TM）領域によって、抗CD19 scFvを細胞内シグナル伝達ドメインから分かれている（図37）。異なるリーダー配列または異なるscFv配列を有するCD19CAR DNA分子もまた、レンチウイルスプラスミドにサブクローニングされた。

#### 【0488】

形質導入されたT細胞はCD19CARを効率的に発現する - レンチウイルスベクター上清は、

10

20

30

40

50

CD19-2GベクターコンストラクトおよびコントロールベクターでトランスフェクトされたHEK293T細胞から產生された。レンチウイルス上清の回収を集めた後、細胞を回収し、溶解し、ウェスタンプロット転写の前に電気泳動した。プロット膜と抗ヒトCD3ゼータ抗体とのインキュベーションは、CD19-2Gでトランスフェクトされた細胞から溶解物を含むレーンにおいて予測される発現される融合タンパク質サイズである、約56kDaのバンドを生じた（図37B）。次に、末梢血単核バフィーコート細胞を3日間活性化し、レトロネクチンでコーティングした非組織培養プレート上でL8-CD19-2Gまたはコントロールベクターレンチウイルス上清で形質導入した。形質導入手順を、最初の形質導入の24時間後に繰り返した。T細胞表面上のCAR発現は、形質導入の3日後に、ヤギ抗マウスFab抗体およびマウス抗ヒトCD3を用いて形質導入されたT細胞を染色することで行われる。図37Cは、対照形質導入と比較した場合、L8-CD19-2Gウイルスで形質導入した細胞の19.8%がF(10 Ab')2およびCD3の両方に対して陽性であったことをフローサイトメトリーによって決定された示す。

#### 【0489】

形質導入されたT細胞は、リーダー配列に基づいて異なるレベルでCD19-2Gを発現する。CD19-2G CARの最高レベルの細胞表面発現をもたらすリーダー配列を決定するために、ヒトCD8a(L8)、CD45(L45)、コロニー刺激因子(CSF)、ヒトアルブミン(HA)、およびIL2リーダー配列を取り込んだ幾つかのコンストラクトが作製された（図38A）。ヒト末梢血T細胞をこれらのベクターのそれから作製したレンチウイルス上清で形質導入した後、T細胞の形質導入効率を上記のようなF(10 Ab')2抗体を用いて測定した。L8リーダー配列が組み込まれたCD19-2Gコンストラクトのみが、CARの顯著な細胞表面発現をもたらした（32.5%）一方で、L45リーダー配列はわずか3.3%の形質導入効率をもたらし、CSF、HAおよびIL2は1%未満であった（図38B）。これは、CD19-2G CARの最適のデザインが、部分的に使用されるリーダー配列に依存することを示す。

形質導入されたT細胞は、scFv配列に基づいて異なるレベルでCD19-2Gを発現する。CD19-2G CARの最高レベルの細胞表面発現をもたらすであろうCD19のscFv配列を決定するために、CD19-2G CAR（図39A）のデザインにおいて、CD19およびCD19bの2つの異なる配列を使用した。両方ともL8リーダー配列を使用した。ヒト末梢血T細胞と同じ条件下でこれらのベクターのそれから作製したレンチウイルス上清で形質導入した後、上記のようにF(10 Ab')2抗体を用いてT細胞の形質導入効率を測定した。CD19-2Gコンストラクトは18.2%CAR細胞を生じたが、CD19b-BB-2G構築物は54.7%CAR効率をもたらした（図39B）。これは、CD19-2G CARの最適な設計もまた、使用されるscFvの配列に部分的に依存することを示す。

#### 【0490】

CD19-2GおよびCD19b-BB-2G CAR T細胞は、CD19発現細胞株を特異的に標的とする。

CD19+細胞系、SP53およびJeKo-1（両方ともマントル細胞リンパ腫系）を効果的に溶解するCD19-2GおよびCD19b-BB-2G CAR T細胞の能力を決定するために、T細胞共培養死滅アッセイを実施した。簡潔には、各標的細胞株をCMTMR膜色素で予め標識し、次いでベクターコントロール、L8-CD19-2GまたはL8-CD19b-BB-2G CAR T細胞のいずれかと2:1および5:1エフェクター：標的細胞の比で共培養した（血清またはIL-2を含まない1mLのT細胞培地中に200,000または500,000エフェクター細胞に対し100,000の標的細胞）。一晩インキュベートした後、細胞を抗ヒトCD3-PerCpおよびCD19-APCで30分間標識し、洗浄し、フローサイトメトリーによる分析のために2%ホルマリンに懸濁した。CD19-2GおよびCD19b-BB-2G CAR T細胞の両方が、B細胞株SP53およびJeKo-1の強力な溶解を示した（図41）。

#### 【0491】

CD19-2GおよびCD19b-BB-2G CAR T細胞は、AMLおよびB-ALL患者サンプルからCD19+細胞を排除する

患者サンプルを用いて研究を行った。CD19+細胞を有する2人の患者、すなわち、AML（CD19の異常発現）と診断された患者、およびB-ALLを有する患者がこの研究で

10

20

30

40

50

使用された。患者の血液は、それぞれ26.4%および90%のCD19+細胞を含んでいた（図41A、42A）。これらの初代細胞のバフィコート画分をCMTMRで予め標識し、ベクターコントロール、L8-CD19-2GまたはL8-CD19b-BB-2G T細胞のいずれかと、腫瘍細胞株と同じ方法および比率で共培養した。L-8-CD19-2G CARおよびL-8-CD19b-2G細胞の両方は、CD19を発現する標的細胞を完全に除去することができた（図42および43）。ウイルス力価は一般に、インサートのサイズが増加するにつれて減少し、CD19b scFvの配列はCD19b CARに対してより高い力価を提供した（図39）。したがって、CD19b scFvを用いてcompound BCMA CD19b CARを作製した（図44）。BCMA CD19b CAR。

#### 【0492】

##### 骨髄腫細胞と形質細胞への代替CARデザイン

我々は、様々なB細胞活性化因子受容体に結合するリガンドを発現するCARを設計した。腫瘍集団に結合する可能性のある潜在的な抗原またはリガンド因子についてCARを設計することは論理的な飛躍のように思われるが、CAR技術における技術的トラブルシューティングは依然として高くて永続的な障壁である。すべてのCARコンストラクトが、未定義の分子相互作用または設計上の問題の結果として、一定のあるまたは十分な表面発現を達成することはできない。我々は、CD28細胞内シグナル伝達ドメインを有するCD45リーダー配列BAFF-CARが約21%の表面発現を達成することができた（図45A）。しかし、CD8またはCSF由来の代替リーダー配列を有するBAFF-CARは、有意な発現を達成しなかった（図45B）。CAR設計を考慮した場合、さらに別の要因が観察された。我々は、1つのケースにおいて、刺激経路として支持する4-1BBLリガンド結合ドメインを用いてBAFF-CARコンストラクトを設計した。別の方では、コンストラクトにアームを発現するIL-15 / IL-15sushiアーマーを加えた。両方の場合において、4-1BBLまたはIL-15 / IL-15sushiと対になったCD8リーダー配列は、両方ともCSFリーダー配列よりも高い表面発現を達成した（図45C）。

#### 【0493】

##### BAFF-CARの抗形質細胞特性

我々は、BAFFがリガンド結合複合体である血漿細胞マーカーCD138の構成成分を発現している形質細胞骨髄腫細胞（MM1S）またはマントル（MCL）細胞（SP53）のいずれかを用いてそれらを培養することにより、様々なBAFF-CARの生物学的特性を特徴付けた。L45-BAFF-28 CARは48時間後にE:T比が3:1で60%に近づくとMM1S腫瘍細胞を溶解することができた（図46）。さらに、L8-BAFF-28 IL-15 / IL-15sushiおよびL8-BAFF-28 4-1BBL CARも同等の程度の細胞傷害性を達成することができた（図47A、47C）。B細胞マントル細胞株SP53との共培養は、約25%の細胞傷害性を有する限定された効果をL8-BAFF-28 IL-15 / IL-15 CARのみについて見られた（図47）。

#### 【0494】

##### CD45 CAR治療

目的の遺伝子を標的とするために、3対のsgRNAをCHOPCHOPで設計する。次いで、遺伝子特異的sgRNAを、ヒトCas9およびE2A自己切断リンカーと連結したピューロマイシン耐性遺伝子を発現するレンチウイルスベクター（Lenti U6-sgRNA-SFFV-Cas9-puro-wpre）にクローニングする。U6-sgRNAカセットはCas9エレメントの前にある。sgRNAおよびCas9puroの発現は、それぞれU6プロモーターおよびSFFVプロモーターによって誘導される（図48）。

#### 【0495】

以下の遺伝子特異的sgRNA配列を使用し、構築した。

本発明の非限定的な実施例において、見本的な遺伝子特異的sgRNAは、以下に示すように設計および構築されている：

CD45 sgRNA構造：

Lenti-U6-sgCD45a-SFFV-Cas9-puro GTGGTGTGAGTAGGTAA

Lenti-U6-sgCD45b-SFFV-Cas9-puro GAGTTTGCAATTGGCGG

Lenti-U6-sgCD45c-SFFV-Cas9-puro GAGGGTGGTTGTCAATG

10

20

30

40

50

図49は、血液悪性腫瘍を標的とするCD45 CAR TまたはNK細胞の作製の段階を示す。

#### 【0496】

##### NK細胞上のCD45を標的とするCRISPR / Casヌクレアーゼ

レンチウイルスに保有された遺伝子特異的sgRNAを用いてNK-92細胞を形質導入した。NK-92細胞におけるCD45発現の消失は、フローサイトメトリー解析によって判定した。NK-92細胞のCD45陰性集団を選別し、増殖させた（図49B）。選別後に増殖させたCD45陰性NK-92細胞を用いてCD45CAR NK細胞を作製した。得られたCD45CAR NK細胞を用いて、CD45<sup>+</sup>細胞を殺傷させる能力においてテストした。

#### 【0497】

CRISPR / Casヌクレアーゼ標的後のCD45不活性化NK-92細胞（NK45i-92）における機能的特性解析 10

我々は、CD45のCRISPR / Casヌクレアーゼによる不活性化後、NK45i-92細胞の細胞増殖が野生型NK-92細胞の増殖と同様であることを実証した（図26）。CD45の不活性化は、NK-92の細胞増殖に全く有意に影響しなかった。さらに、NK45i-92細胞の溶解能は、細胞を白血病細胞であるCCRFと共に培養した場合、野生型NK-92の溶解能と一致していることを示した（図51）。

#### 【0498】

CD45-不活性化NK-92がCAR溶解と互換性があることを実証するために、NK45i-92細胞および野生型NK-92にCD5CARまたはGFPを発現するレンチウイルスをそれぞれ形質導入した。得られたCD5CAR NK45i-92細胞およびGFP NK45i-92をFACSで選別し、標的細胞を殺傷させる能力を比較するために使用した。CD5CAR NK45i-92細胞は、CD5が標的である白血病細胞、CCRF-CEM細胞と共に培養した場合、比（E:T）、2:1および5:1の割合で強い殺傷能力を示した。我々は、インビトロでの実験においてCD5CAR NK45i-92とCD5 CAR NK-92細胞とでCCRF-CEM細胞に対し、同様の殺傷効力があることを示した（図52）。これは、CD45発現の喪失がCAR NK細胞の抗腫瘍活性を低下させないことを示唆している。 20

#### 【0499】

##### CD45CARコンストラクトの作製

我々は次に、NK45i-92細胞中のCD45CARが白血病細胞中のCD45抗原に応答することを調べる。我々はCD45CARを作製した。CD45CARは、CD3シグナル伝達ドメインが連結された抗CD45一本鎖可変断片（scFv）領域、CD8由来ヒンジ（H）および膜貫通（TM）領域およびタンデムCD28および4-1BB共活性化ドメインからなる29A）。強力な脾臓フォーカス形成ウイルスプロモーター（SFFV）およびCD8リーダー配列を使用した。CD45CARタンパク質は、CD45CARレンチウイルスプラスミドでトランスフェクトされたHEK293-FT細胞を用いたウエスタンプロットで適切なベクターコントロールと比較によって明らかにされた。さらに、抗CD3ゼータモノクローナル抗体を用いたイムノプロットにより、ベクターコントロールはバンドが見られなかったが、CD45CARタンパク質の予測されるサイズのバンドが目的のサンプルからみられた（図53B）。 30

#### 【0500】

##### CD45CAR NK45i-92 NK細胞

蛍光活性化細胞選別（FACS）によるCD45NK45i-92細胞が多く含まれる領域を回収後、ソーティング後におけるCD45CAR NK-92導入効率は87%であるとフローサイトメトリー（図54）によって測定された。CD45NK45i-92細胞のFACS収集後、CD45CAR発現レベルは、少なくとも10継代にわたって一貫して安定したままであった。 40

#### 【0501】

CD45CAR NK45i-92細胞は、CD45<sup>+</sup>白血病細胞を特異的に溶解する。

CD45CAR NK45i-92抗白血病活性を評価するために、T-ALL細胞株である、CCRF-CEMおよびJurkat、ならびにNK細胞株およびNK-92細胞を用いた共培養アッセイを実施した、何故ならばこれら細胞はCD45を発現しているからである（図55、56そして57）。本発明者らは、我々はCD45CAR NK45i-92細胞が一貫して白血病細胞の強力な溶解

10

20

30

40

50

を示したことを実証した。CD45CAR NK45i-92細胞は、標的細胞に対する低有効性 (E : T 比 5 : 1) で6時間インキュベートした後、60%を超えるCCRF-CEM細胞を効果的に溶解した(図55)。6時間の共培養後、CD45CAR NK45i-92細胞はまた、E : T、2 : 1または5 : 1の比で約60%のJurkat細胞を殺傷することができた(図56)。6時間の共培養の後、CD45CAR NK45i-92細胞は、E : T 比 2 : 1 で 20% CD45陽性NK-92細胞を効率的に溶解し、E : T = 5 : 1 で 60% に近い溶解度を示した(図57A ~ 57C)。

#### 【0502】

CD45標的の血液悪性腫瘍のさらなる分析のために、さらに2つのCARをCD45-28またはCD45-BB CARを発現するレンチウイルスを用いてNK45i-92細胞を形質導入することでCD45-28およびCD45-BB CARを作製した。CD45-28およびCD45-BB CARは、前述のCD45CARとは異なる新しい抗CD45 scFvを含む。CD45-28 CARはCD28共刺激ドメインを使用し、CD45-BBは4-BB共刺激ドメインを有する。両方のCARとともに、CD 8由来のヒンジ(H)、膜貫通(TM)領域およびCD3 シグナル伝達ドメインを使用する。CD45CARは、B急性リンパ芽球性細胞株REHへの強力な溶解を示した。CD45CAR NK45i-92細胞は、約76%のREH細胞を溶解した。CD45b-BB CAR NK45i-92細胞およびCD45b-28 CAR NK45i-92細胞は、コントロールGFP NK-92細胞と比較して、それぞれREH細胞の約79%および100%の溶解能を示した(図57D ~ 57E)。CD45b-28 CAR NK45i-92細胞は、REH細胞(B-ALL細胞)の溶解力に対し最高値を示した。

10

#### 【0503】

我々はまた、CD45b-28CAR CD45b-28 CAR NK45i-92細胞が他のタイプの白血病細胞を溶解できるかどうかを調べた。図57Fに示すように、U937細胞(標的 : T)およびGFP NK-92細胞またはCD45b-28 NK45i-92細胞(エフェクター : E)を2 : 1(E : T)比で20時間共培養アッセイを行った、CD45b-28 NK45i-92細胞は、コントロールGFP NK-92細胞と比較して、U937細胞に対して約81%の細胞溶解で頑強な抗白血病活性を示した。U937は急性骨髄性白血病細胞株である。MOLM-13細胞(標的 : T)およびGFP NK-92細胞またはCD45b-28 NK45i-92細胞(エフェクター : E)を用いて、5 : 1(E : T)比率で20時間共培養アッセイを行った場合、同様な結果が見られた(図57G)。MOLM-13細胞は、積極的な急性単球性白血病を有する患者に由来する。抗白血病活性も、2つのマントル細胞系SP53およびJeko(図57HおよびI)において調べた。で2 : 1の低い比(E : T)の6時間での比較的短い共培養でCD45b-28 NK45i-92は、対照のGFP NK-92細胞と比較してSP53細胞またはJeko白血病細胞の40%を越す溶解をすることができた。これらの研究は、CD45b-28 NK45i-92が様々なタイプの悪性白血病に対して顕著な抗白血病性を有することを実証した。

20

#### 【0504】

我々はさらに、CD45b-28 NK45i-92細胞がCD34+造血幹/前駆細胞を溶解できるかどうかを調べた。ヒト臍帯血に由来するCD34(+)幹細胞を、コントロールまたはCD45b-28 CAR NK細胞と48時間、2 : 1の低比(有効 : 標的)で共培養した。CD45b-28 NK45i-92細胞は、コントロールと比較してCD34+造血前駆細胞をほぼ排除する(図57J)。

30

#### 【0505】

##### CD45 CAR活性を増強する代替CARの設計

40

我々はまた、CD28を介した共刺激を受けるだけでなく、4-1BBリガンド(4-1BBLまたはCD137L)を単一のコンストラクトに共発現させて、より良い治療効果を提供する改変CD45 CAR細胞を作製した(図58A)。以下で説明する。

#### 【0506】

実施例 : CD45b-28-2G-4-1BBLが作製され、作製したCD45b CAR細胞は共刺激経路CD28および4-1BBの両方の刺激を受けることができた。CD45b-28-2G-4-1BBLウイルスを4倍濃縮し、NK45i-92細胞を形質導入するために使用した。そのCAR表面発現は約87%であった(図58B)。CD45b-28-2G-4-1BBLウイルスを4倍濃縮し、形質導入に使用した。4-1BBLがコンストラクトに含まれている場合、CD45b-2G CAR細胞の抗腫

50

癌活性は有意に改善された。

#### 【 0 5 0 7 】

エンハンサーであるIL-15 / IL-15sushiも、CD45 CAR抗腫瘍活性を増強するための代替アプローチとしてCD45 CARコンストラクトに含まれていた。 CD45 CARおよびIL-15 / IL-15sushiの両方が単一のコンストラクトに存在した（図58）。 IL-15 / IL-15sushiが構造中に含まれる場合、CD45b-2G CAR細胞の抗腫瘍活性は有意に改善される。

#### 【 0 5 0 8 】

実施例：CD45b-28-2G-IL-15 / IL-15sushi NK細胞を作製した。表面CD45b CAR発現は約60%であった。（図58C）。 IL-15 / IL-15sushiがコンストラクト中に含まれた場合、CD45b-2G CAR細胞の抗腫瘍活性は有意に改善された。10

#### 【 0 5 0 9 】

CD4IL-15 / IL-15sushi CARのキャラクタリゼーション

CD4IL-15 / IL-15sushi -CARが作製され、それはIL-15 / IL-15sushiに連結した第3世代のCD4CARを含む（図59）。 CAR、（第3世代）、sushi / IL-15の組み合わせを発現ベクター上に組み立て、それらの発現はSFFVプロモーターにより誘導される（図59）。 IL-15 / IL-15sushiを有するCARは、P2A切断配列と連動している。 IL-15 / IL-15sushi部分は、26アミノ酸のポリ - プロリンリンカーを介してIL-15sushiに連結されたIL-15に融合されたIL-2シグナルペプチドからなる（図59）。 IL-2シグナルペプチドは、より良い分泌シグナルを提供する。 IL-15 / IL-15sushiの安定な機能的複合体は、形質導入された細胞から分泌され、分泌はIL-2シグナルペプチドによって命令される。20

#### 【 0 5 1 0 】

CD4IL-15 / IL-15sushiコンストラクトを確認するために、GFP（コントロール）またはCD4IL-15/IL-15sushi のいずれかのレンチウイルスプラスミドでHEK293FT細胞にトランスフェクションした。 CD4IL-15 / IL-15sushi。トランスフェクションから約60時間後、HEK-293FT細胞および上清の両方を回収した。細胞をプロテアーゼ阻害剤カクテルを含有するRIPA緩衝液中で溶解し、電気泳動した。ゲルをImmobilon FLプロックティング膜に移し、ブロックし、マウス抗ヒトCD3z抗体を1 : 500でプローブした。洗浄後、膜をヤギ抗マウスHRPコンジュゲートでプローブし、洗浄し、HyGlo HRP基質での処理後にフィルムに曝露した。 CD4IL-15 / IL-15sushiは、HEK293細胞で首尾よく発現した（レーン2、図60a）。新鮮なHEK-293細胞への形質導入により、CD4IL-15 / IL-15sushiレンチウイルス上清をさらに調べた（図60A）。 HEK-293細胞に、トランスフェクトされたHEK-293FT細胞由来のGFPまたはCD4IL-15 / IL-15sushi CARウイルス上清のいずれかを形質導入した。ポリブレンを4 μL / mLまで添加した。 16時間後に培地を交換し、ウイルス上清またはポリブレンを含まない培地と交換した。形質導入の3日後、細胞を採取し、ヤギ抗マウスF (Ab') 2抗体で1 : 250で30分間染色した。細胞を洗浄し、ストレプトアビジン-PEコンジュゲートで1 : 500で染色し、洗浄し、2 % ホルマリンで懸濁し、フローサイトメトリーで分析した。図60bは、CD4IL-15 / IL-15sus CARレンチウイルスで形質導入されたHEK-293細胞が、F (Ab) 2-PEについて80%陽性であったことを示している（丸で囲まれた領域、図60B）、GFPコントローエウレンチウイルスによる形質導入は、F (Ab) 2-PEに対し極小であった（図60）。30

#### 【 0 5 1 1 】

CD4IL-15 / IL-15sushi - CAR NK細胞の作製

NK-92細胞に、濃縮したCD4IL-15 / IL-15sushi-CARレンチウイルス上清を形質導入した。 5日間のインキュベーション後、細胞を採取し、ヤギ抗マウスF (Ab') 2と1 : 250で30分間インキュベートした。細胞を洗浄し、懸濁させ、ストレプトアビジン-PEで30分間染色した。細胞を洗浄し、2 % ホルマリン中に懸濁させ、フローサイトメトリーで分析し、その結果、形質導入細胞のほぼ70 % 近くがCD4IL-15 / IL-15sushi-CARを発現するを生じた（丸で囲まれた領域、図61。 CD4IL-15 / IL-15sushi-CARのさらなる実験的試験には、インピトロおよびインピボでの白血病/リンパ腫殺傷アッセイ、ならびにC40

D4CARで形質導入された細胞とでの標的殺傷および増殖速度の比較検討が含まれる。CD4 IL-15 / IL本発明者はまた、CD19IL-15 / IL-15sush CAR、CD20IL-15/IL-15sush CAR そして CD22IL-15/IL-15sush CARを作製するために上記の同じ方法を使用した。

#### 【 0 5 1 2 】

CD4IL-15 / IL-15sushi -CAR T細胞の作製

ヒト臍帯バフィーコート細胞にCD4IL-15/IL-15sushi -CARレンチウイルス上清を形質導入した。5日間のインキュベーション後、細胞を採取し、ヤギ抗マウスF (Ab') 2と1：250の比率で30分間インキュベートした。細胞を洗浄し、懸濁させ、ストレプトアビジン-PE抗体で30分間染色した。細胞を洗浄し、2% ホルマリン中に懸濁させ、フローサイトメトリーで分析し、その結果、形質導入細胞の63%がCD4IL-15/IL-15sushi -CARを発現することがわかった(図62の丸で囲んだ領域)。CD4IL-15/IL-15sushi -CARのさらなる実験的試験には、インビトロおよびインビボでの白血病/リンパ腫殺傷アッセイ、ならびにCD4CARで形質導入された細胞とでの標的殺傷能力および細胞増殖速度の比較検討が含まれる。

10

#### 【 0 5 1 3 】

CD4IL-15/IL-15sushi CAR NK細胞を、以下のCD4陽性細胞株、Karpas 299およびMOLT4と共に培養することにより、インビトロでCD4CAR NK細胞と比較して抗白血病活性について試験した。

Karpas 299細胞株は、患者由来の未分化大型T細胞リンパ腫である。CD4を発現するMOLT4細胞株は、19歳の患者の末梢血から樹立された急性リンパ芽球性白血病(T-ALL)である。4時間の共培養実験の間に、エフェクター：標的の5：1比率において、CD4IL-15/IL-15sushi CAR NK NK細胞は、CD4CAR NK細胞の殺傷能力(82%、図63)よりもさらに高い割合で、Karpas 299細胞への著しい殺傷能力(95%)を示した。同様に、MOLT4細胞と1：1で共培養した場合、CD4IL-15/IL-15sushi CAR NK細胞は、オーバーナイトアッセイ(図64)においてCD4CAR NK細胞よりも高い速度(84%～65%)で標的細胞を溶解した。これらの結果は、CD4IL-15/IL-15sushi NK細胞が、CD4CAR NK細胞同様に腫瘍細胞をアブレートすることができるることを示す。

20

#### 【 0 5 1 4 】

CD4CAR およびCD4IL-15/IL-15sushi CAR T細胞は、in vivoでより強力な抗腫瘍活性を示す。

30

CD4CAR およびCD4IL-15/IL-15sushi CAR T細胞のインビボでの抗腫瘍活性を評価し、CD4IL-15/IL-15sushi CAR T細胞がCD4CAR T細胞に対して、より持続性が増加する可能性を検討するため、本発明者らは、致死以下に照射したNSGマウスに100% CD4である急性骨髓性白血病細胞株(M5)であるルシフェラーゼ発現MOLM13細胞を静脈注射することで測定可能な腫瘍形成を可能とする異種マウスモデルを開発した(図65)。腫瘍細胞注射の3日後、6匹のマウスに、 $8 \times 10^6$ 個のCD4CAR、CD4IL-15/IL-15sushi CAR T細胞またはベクターコントロールT細胞を1コースで静脈注射した。3、6、9および11日目に、マウスにRediJect D-Luciferin(Perkin Elmer)を皮下注射し、腫瘍量をIVISイメージングにて測定した(図65B)。処置マウスとコントロールマウスを比較した時における腫瘍細胞のパーセンテージを決定するために、CD4CAR およびCD4IL-15/IL-15sushi CAR T細胞注入マウスについて測定した平均光強度を、ベクターコントロールT細胞注入マウスと比較した(図65C)。6日目において、CD4CAR T細胞での治療マウスは、コントロールと比較して腫瘍量が52%低かったが、一方、CD4IL-15/IL-15sushi CAR T細胞での治療マウスは腫瘍負荷量が74%低かった。11日目に、ほとんどすべての腫瘍細胞がこれらのグループの両方において溶解された。Unpaired T検定では、コントロールと比較して、CD4CAR およびCD4IL-15/IL-15sushi CAR T細胞での治療グループは、9日目まで光強度が弱く、より少ない腫瘍量であり、非常に有意な統計差( $P = 0.045$ )を示した。要約すると、これらのインビボデータは、CD4CAR およびCD4IL-15/IL-15sushi CAR T細胞が、ベクターコントロールT細胞と比較して、腫瘍負荷およびMOLM13を注入したNSGマウスを有意に減少させることを示している。

40

50

## 【 0 5 1 5 】

次に、2つのグループにわたってマウスの生存率を比較した（図65D）。CD4IL-15 / IL-15sushi CAR T細胞を注射した全ての白血病マウスは、CD4CAR T細胞よりも長く生存した。要約すると、これらのインビポデータは、CD4IL-15 / IL-15sushi CAR T細胞が、コントロール細胞と比較して、CD4IL-15 / IL-15sushi CAR T-注入NSGマウスにおける腫瘍負荷を有意に減少させ、生存期間を延長することを示した。

## 【 0 5 1 6 】

CD4IL-15 / IL-15sushi CAR NK細胞は、生体内で強力で持続的な抗腫瘍活性を示す。

CD4IL-15 / IL-15sushiCARの機能をさらに評価するために、我々は、NK CAR細胞およびJurkat腫瘍細胞を利用してストレス状態を作り出した。NK細胞は短い半減期特性を有し、白血病Jurkat細胞は60%未満のCD4+表現型を示す（図66A）。このような条件下で、分泌性可溶IL-15sushiがその持続性および殺傷能力に関してどのようにCAR機能に影響を及ぼすかを調べることができる。次に、致死量以下に照射したNSGマウスにルシフェラーゼ発現Jurkat細胞を静脈注射して、測定可能な腫瘍形成を誘導する、異種NSGマウスモデルを使用した。MOLM-13細胞とは対照的に、Jurkat細胞は60%未満のCD4+表現型を示す（図66A5）。Jurkat細胞注射の3日後に、マウスに、CD4CAR、CD4IL-15 / IL-15sushi、またはベクターコントロールNK細胞のいずれか $10 \times 10^6$ の1コースで静脈注射した。3日目（処置前日）、7、10および14日目に、腫瘍負荷を測定するためにマウスにIVISイメージングを行った（図66B）。CD4CARおよびCD4IL-15 / IL-15sushi NK注射マウスについて測定された平均光強度を、ベクターコントロールNK注射マウスのそれと比較して、Jurkat細胞の溶解率を決定した（図66C）。両方の症状は、7日目までに有意な腫瘍細胞溶解を示したが、CD4CAR NK細胞の溶解率は、14日目と同じままであったが、CD4IL-15 / IL-15sushi NK細胞は97%以上に増加した。（図66D）。Unpaired T検定は、14日目までに2つのグループ間に非常に有意な差（P < 0.0001）を示した。これらの結果は、Jurkat腫瘍細胞のCD4CAR NKでの細胞溶解がCD4- Jurkat細胞の増殖に追いつくことができなかったことを示し、IL-15 / IL-15sushiを分泌するNK CAR細胞の継続的な増殖が効果的に溶解した。分泌型IL-15 / IL-15sushiとCARとの同時発現は、CAR TまたはNK細胞がdim発現癌細胞または非標的癌細胞を排除できないという欠点を補うことができる。実験の繰り返し（図67）は、図66に記載したものと同様の結果を示した。

## 【 0 5 1 7 】

分泌されたIL-15 / IL-15sushiは、NK細胞の生存および増殖に関わるIL-2の代わりとなる。

IL-15 / IL-15sushi分泌NK細胞の細胞生存への効果を測定した。CD4CARまたはCD4IL-15 / IL-15sushiのいずれかで安定に形質導入されたNK-92細胞をIL-2の存在下または非存在下で培養し、IL-15 / IL-15sushi分泌のみが生存および増殖につながるかどうかを調べた。IL-2なしで培養したCD4CAR発現NK細胞は7日目までに死滅したが、IL-2を添加しないで培養したCD4IL-15 / IL-15sushi発現NK細胞は、IL-2を添加し培養したCD4CARまたはCD4IL-15 / IL-15sushi細胞のいずれかとほぼ同じ速度で増殖した（図68B）、これは分泌されたIL-15 / IL-15sushiがIL-2に代わることを示す。さらに、我々は、IL-15 / IL-15sushiを分泌するNK細胞が、共培養中の非形質導入NK-92細胞の生存および増殖を助けることができるることを実証することができた。この実験では、等しい割合のNK GFP発現細胞を、IL-2の存在下または非存在下で、CD4CARまたはCD4IL-15 / IL-15を発現するNK細胞のいずれかとともに培養した。細胞を2~3日ごとに数えた（図68A）。7日目までに、IL-2を与えられていないCD4CAR NK細胞は死滅したが、IL-2を含まないCD4IL-15 / IL-15sushi NK細胞はIL-2と培養したCD4CARまたはCD4IL-15 / IL-15sushi細胞とほぼ同じ速度で生存し、増殖した。GFP発現細胞の数がCD4IL-15 / IL-15sushi NK細胞と伴い増殖した（図68B）、このことは分泌されたIL-15 / IL-15sushiがGFP NK細胞の生存にポジティブな影響を及ぼしたこと示す。GFP陽性細胞のパーセンテージは、実験の過程にわたって50%から70%を超えて上昇した（デー

10

20

30

40

50

タは示さず）。第2の実験（図69）では、GFP NKおよび対照ベクターNKまたはCD4IL-15/IL-15sushi NK細胞のいずれかを10対1の比率で、IL-2を用いずに混合した。6日目までに、対照細胞と共に培養した細胞はすべて死滅したが、IL-15/IL-15sushiを分泌するNK細胞で培養した細胞の生存は10日まで生存した。

#### 【0518】

この効果が分泌タンパク質単独または共培養細胞間の相互作用によるものかどうかをさらに調べるために、GFP NK細胞をCD4CARまたはCD4IL-15 / IL-15sushi NKまたはNK細胞より上のチャンバーで培養する実験を考案した。この条件では、2つの培養間を隔てる膜の間にタンパク質のみが通過でき、細胞は通過し得ない。細胞をIL-2なしでインキュベートし、1日おきにカウントし、1：1に分割した。6日までにNK細胞上のGFP NK細胞は死滅し、CD4IL-15 / IL-15sushi NK細胞より上の、GFP NK細胞は12日目まで生存、増殖しており（図70）、それにより細胞間の直接の接触ではなく、CD4IL-15 / IL-15sushi NK細胞から分泌されたIL-15 / IL-15sushiタンパク質が生かすことを示している。このモデルでは、上室は、CD4IL-15 / IL-15sushi NK細胞からのIL-15 / IL-15sushiの分泌によってT細胞またはNK細胞の生存が改善される腫瘍微小環境を示している。

10

#### 【0519】

分泌されたIL-15 / IL-15sushiのCAR Tおよび非形質導入隣接細胞への影響

我々はまた、IL-2の存在下または非存在下で、CD4CARおよびCD4IL-15 / IL-15sushi形質導入T細胞の細胞増殖を比較した。IL-2の存在下または非存在下で、形質導入された細胞を実験を通して総細胞数が計算された（17日目まで）。CD4IL-15 / IL-15sushi形質導入T細胞は、CD4CAR形質導入T細胞よりもIL-2の不存在に対してより耐性であるようであった。

20

#### 【0520】

使用例

Treg CAR標的Treg細胞の作製

Treg CAR（CD4zetaCD25CARまたはC4-25zとも呼ばれる）は、図70の模式図に従った。これは、P2A切断ペプチドによって連結された2つの異なる不完全CARの発現を誘導するするSFFV（脾臓フォーカス形成ウイルス）プロモーターを含む。CD4キメラ抗原レセプターポリペプチド単位は、CD45シグナルペプチド、CD4抗原認識ドメイン、ヒンジ領域（誘導CD8a）、膜貫通ドメイン（CD8a）およびCD3ゼータ鎖を含み、CD25キメラ抗原レセプターポリペプチド単位は、CD45シグナルペプチド、CD25抗原認識ドメイン、ヒンジ領域（CD8a）、膜貫通ドメイン（CD8a）、共刺激ドメイン、CD28を含む。Treg CARは、CD4またはCD25抗原のみを有する細胞を最小限に抑えながら、CD4およびCD25を同時発現する細胞を溶解する活性を増強することができる。

30

#### 【0521】

CD4ゼータCD25CAR（C4-25z）（Treg CAR）をアッセイで形質導入した。コントロールT細胞と比較して、CD4zetaCD25CAR細胞は約15%の表面発現を示し、これは構造上の機能の以下の表現型の検証を観察するのに十分であった（図70A）。CD4zetaCD25 CAR細胞およびコントロールT細胞の両方を、フローサイトメトリー分析上の論理ゲート作用を探すために、CD4およびCD25抗体で解析した。構造上のデザインのために、CD4zetaCD25CAR細胞は、CD4およびCD25抗原の両方を同時発現する細胞を溶解させる活性を増強するであろう。ここでは、他の表現型の症例でのオフロジック事象の影響がほとんどないCD4 + CD25 +二重陽性集団の枯渇（～95%）を示した。棒グラフの要約は、ロジックゲートされたCARコンストラクトのデザインが二重陽性集団のみ有意に影響することを示している（図70B）。

40

#### 【0522】

我々は、CD4zetaCD25 CARをCD4 CARと比較することによって、それをさらに特徴づけた。予想通り、CD4CAR T細胞は、CD4だけを発現する細胞に対し顕著な溶解能力を持ち、一方CD4zetaCD25CAR T細胞がこの集団に対して制限された殺傷能力しかなかった（図71）。CD4zetaCD25CAR T細胞はまた、CD4およびCD25抗原の両方を発

50

現する細胞の事実上完全な枯渇を示した(図71)。これらの研究は、CD4およびCD25の両方を同時に発現する細胞を標的とする堅牢なCD4zetaCD25CARが確立されていることを実証している。コンストラクト中のヒト特異的CD4またはCD25scFvの為、CD4zetaCD25CARの機能的特性を動物において試験することは困難である。

#### 【0523】

いくつかの実施例では、開示される開示はまた、CD4 CD25CAR治療活性を改善する方法を含む。この例を以下に説明する。

#### 【0524】

##### 使用例

操作されたCD4ゼータCD25CAR細胞は、本開示に従って調製された。細胞殺傷アッセイを行われる。4-1BBLまたはIL-15 / IL-15sushiまたはIL-15 / IL-15RAと共に発現すると、CD4zetaCD25CARによる標的細胞殺傷が改善される。

10

#### 【0525】

##### 安全スイッチ

「安全スイッチ」の導入は安全性の側面を大幅に向上させ、「安全スイッチ」は、限定するものではないが、カスパーぜ9遺伝子、チミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ(CD)またはシトクロムP450のような誘導性自殺遺伝子であり得る。

#### 【0526】

実例：T細胞悪性腫瘍を標的とするCD5CARを用いたCARとCD52の共発現。

T細胞悪性腫瘍に対するCAR T細胞を用いた臨床治療では、腫瘍枯渇後またはCAR療法による予期せぬ副作用のために、緊急的にCAR T細胞を患者から排除する安全方法を確立する必要がある。T細胞およびB細胞は、細胞表面上でCD52を発現し、CD52特異的抗体であるCAMPATH(アレムツズマブ)は、CD52+細胞を循環系から排除することができる。したがって我々は、CD5CARベクターコンストラクトにヒトCD52配列を組み込んだ(図72A)。この追加のCD52コンストラクトは、ネイティブのCD52からのシグナル伝達と機械的に隔てている。その目的は、CAMPATH処置後にCAR T細胞表面上のネイティブのCD52抗原逃避の可能性を先取りすることである。CD5CAR-CD52レンチウイルスタンパク質および発現を、形質導入されたHEK293細胞上のCD52抗体を用いたウエスタンプロットおよびフローサイトメトリー分析によって確認した。我々はまた、CD52を共発現することがCAR T細胞機能に影響しないことも見出した。

20

#### 【0527】

##### CAMPATH処置による、注入されたCD5CAR-CD52 T細胞のインビボでの枯渇

CAMPATH(アレムツズマブ)処置によるCAR除去の効果を評価するために、我々は、記載されているインビボ処置を行った(図72Bと72C)。 $5 \times 10^6$ 個のCD5CAR-52T細胞を照射マウスに静脈注射した。翌日、各グループ、3匹のマウスに対して、0.1mg/kgのCAMPATHまたはPBSをIP注射により注入した。CAMPATH処理の6時間後および24時間後、我々はマウス尾から末梢血を採取し、FACS分析によりCD5CAR-52T細胞の存在を判定した。CAMPATH注入は、6時間および24時間の両方で、血液中のCD5CAR-CD52 T細胞を実質的に完全に枯渇させる(図72C)。CAMPATH投与の5日後、CD5CAR-CD52細胞は、骨髄および脾臓の両方においても完全に枯渇させた(図72D)。これらの知見は、循環およびリンパ器官からCAR-T細胞を枯渇させる安全トリガーとして作用する有用な戦略としてのCAMPATHの使用を支持する。

30

#### 【0528】

この実施例では、操作された細胞は、CD5キメラ抗原レセプターポリペプチドおよびアンカーCD52(配列番号70)および対応するポリヌクレオチド(配列番号69)を含む。いくつかの実施例において、CD52は、CD5 CAR操作細胞または任意のCAR操作細胞に組み込まれ、CAR治療のための「安全スイッチ」として使用することができる。

40

#### 【0529】

##### GFPレポーターを用いたプロモーターテスト

HEK293FT細胞に、SFFV、EF1またはCAGプロモーターの下でGFPを発現する

50

レンチウイルスプラスミドでトランスフェクトした。トランスフェクションの約60時間後、上清をそれぞれから回収した。相対的ウイルス力価は、最初に、3つのプロモーターのそれぞれからの上清をHEK293細胞に導入することによって決定した。HEK-293FT細胞から得られた、それぞれ3つのGFPウイルス上清を用いてHEK-293細胞に形質導入した。ポリブレンを4 μL/ mLまで添加した。16時間後に培地を交換し、ウイルス上清またはポリブレンを含まない培地と交換した。形質導入の3日後、細胞を回収、洗浄し、2%ホルマリン中に懸濁し、GFP発現(FITC)の状態をフローサイトメトリーにより分析した。GFP発現は各試料で見られたが、SFFVプロモーターを用いて作製したウイルスで形質導入した細胞で最も高かった。

## 【0530】

10

活性化されたヒト臍帯バフィーコート細胞に、各プロモーターからのGFPレンチウイルス上清(HEK293導入効率の結果に基づく量)を用いて形質導入した。5日間のインキュベーション後、細胞を採取し、洗浄し、2%ホルマリンで懸濁させ、フローサイトメトリーによりGFP発現について分析した。高レベル(10<sup>3</sup>)で細胞の43%がGFPを発現したが、プロモーターEF1(15%)およびCAG(3%)を用いたウイルスを形質導入した細胞のGFP発現はかなり低かった。5日後、同じ方法で分析した細胞は、それっぽく同じパーセンテージを示した(それぞれ、46%、15%および3%)。これらの結果は、SFFVプロモーターがEF1またはCAGプロモーターよりも強い発現をもたらし、発現が形質導入後少なくとも10日間は高いままであることを示す。さらなる実験的試験には、形質導入された細胞の10日間の期間を超えるより長いインキュベーション時間が含まれる。

## 【0531】

20

上清中のウイルスペクター粒子の機能力価(フローサイトメトリーによって決定されたGFP細胞の百分率(%))は、より高い力価のウイルスがより多くの細胞に浸潤し、よりGFP発現の高い割合の細胞集団をもたらすので、代理のウイルス力価調整として可能にする)。

各上清中のウイルスペクター粒子の機能的力価を決定するために、HEK293細胞に、12ウェル組織培養処理プレートの1ウェルあたり30 μL(低)、125 μL(中)または500 μL(高)のいずれかの量で、EF1-GFPまたはSFFV-GFPウイルス上清のいずれかで形質導入した。翌朝、培地を10%FBSを含むDMEMに変更した(図73)。

## 【0532】

30

次いで、形質導入された細胞をトリプシン処理し、洗浄し、そしてホルマリン中に懸濁させ、フローサイトメトリーで解析した。各条件におけるGFP+細胞の割合を、FITCチャネルを用いたフローサイトメトリーによって測定した(図74)。いずれの場合においても、SFFV-GFPで形質導入された細胞は、それに相応する容量のEF1-GFPウイルス上清で形質導入した場合よりも高い割合のGFP+細胞を保有していた(低容量ウイルス使用時では50%と18%、中容量では80%と40%、高容量のウイルス使用時では82%と70%の割合のGFP+細胞が見られた)。このことから、我々は最大量のEF1プロモーターウィルスを使用することは、力価に関して言えばSFFVプロモーターウィルスの最低容量を使用することに匹敵し、以下の形質導入実験の結果より、相対的なプロモーター強度の比較を可能であると判断した。

## 【0533】

40

形質導入された細胞はまた、各ウェルについて20倍の倍率で、同じ露光条件で、GFPを用いてEVOS蛍光顕微鏡で視覚化された(図73)。SFFV-GFPウイルス上清で形質導入された細胞は、EF1-GFPウイルスで形質導入された細胞よりも劇的に明るかった。さらに、高いウイルス量の使用下でのEF1プロモーターの画像と、低いウイルス量を使用してでのSFFVプロモーターの画像とを比較することは、同様の蛍光強度を示す。これは、SFFVプロモーターが遺伝子発現のより強力な駆動体であることを指示している。

## 【0534】

50

初代T細胞における異なるプロモーターでの表面発現と持続性の比較(フローサイトメトリーによって決定されたT細胞への形質導入によるGFP細胞の割合は、HEK293細胞での先の実験から予想されるようなGFP細胞集団での予期される差異を示す。)

初代T細胞におけるプロモーター形質導入効率および表面発現の持続性を決定するために、活性化された臍帯血バフィーコートT細胞を、レトロネクチン（Clontech）でプレコートした12ウェルの組織培養プレート中で50 µLのSFFV-GFPまたは1mLのEF1-GFP EF1-GFPウイルス上清のいずれかを用い形質導入した。2度にわたるオーバーナイトでの形質導入の後、細胞を300 IU / mLのIL-2（Peprotech）を含むT細胞培養培地で培養し、1.0 ~ 4.0 × 10<sup>6</sup> / mLの細胞密度を維持した。細胞を洗浄し、ホルマリン中に懸濁させ、形質導入後7、14、21および28日におけるGFP +細胞の割合をFITCチャンネルを用いてフローサイトメトリー分析を行うことで決定した。GFP +細胞のパーセンテージは、SFFV-GFPで形質導入されたT細胞の方がEF1-GFP形質導入されたT細胞（図75A）と比較して一貫して高かった。さらなる比較により、より多い量（1mL）のEF1-GFP上清で形質導入されたT細胞が、より少ない量（50 µLまたは20倍少ない）のSFFV-GFP上清で形質導入された細胞よりも、7日目と28日目の間で、GFP+の細胞の割合が60%超から40%未満まで減少した（図75B）。このことは、SFFVプロモーターを用いた形質導入が、形質導入された細胞の形質発現のより良い持続性を維持することを示唆している。

#### 【0535】

T抗原認識部分（CD4、CD8、CD3、CD5、CD7、およびCD2の少なくとも1つ、またはその一部またはその組合せ）、ヒンジ領域およびT細胞の活性化ドメインの少なくとも1つを含むCAR遺伝子を作製する方法が提供される。

#### 【0536】

CD33、CD123、CD19、CD20、CD22、CD269、CS1、CD38、CD52、RO R1、PSMA、BAFF、TACI、CD138、およびGPC3の少なくとも一つを含むCAR（cCAR）標的抗原、あるいは、ヒンジ領域とT細胞活性化ドメインの一部あるいは組み合わせを含む、複数のユニットの作製方法が提供される。

#### 【0537】

提供される方法は、1) CD45を発現する白血病およびリンパ腫を標的とし、自己殺傷を回避するCAR TまたはNK細胞の作製、2) 阻害性腫瘍微小環境を克服し、増強された抗腫瘍活性および長期持続性を示すように設計された「armored」CAR TまたはNK細胞の作製。

#### 【0538】

本開示は、上に記載され例示された実施形態に限定されず、本開示および特許請求の範囲の範囲内で変更および修正が可能である。

#### 【0539】

本開示の好ましい実施例であると現在考えられるものが記載されているが、当業者であれば、本開示の精神から逸脱することなく他の更なる変更及び修正を行うことができ、本開示の真の範囲内に入るようなすべてのそのような修正および変更を請求することができる。

#### 【0540】

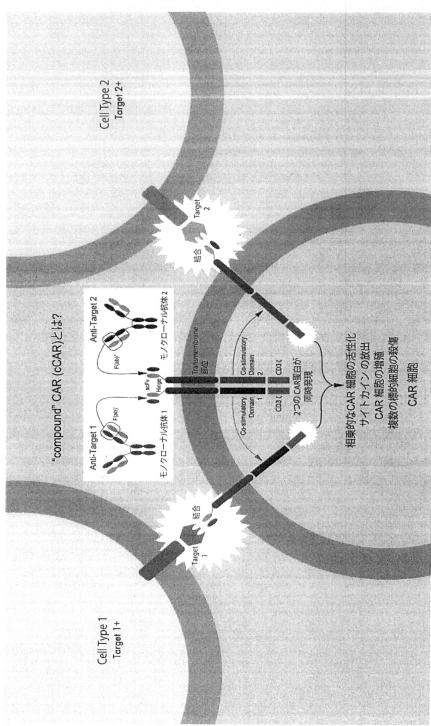
本発明の態様に関する様々な用語が、明細書および特許請求の範囲全体にわたって使用される。そのような用語は、他に指示がない限り、当該分野において通常の意味を有するものとする。他の特別に定義された用語は、本明細書で提供される定義と一致するように解釈されるべきである。

#### 【0541】

##### 配列表の登録

参照によりその全体が本明細書に組み込まれ、その出願のための配列表がある。シーケンスリストは、2016年12月22日に作成された "sequence\_listing.txt" という名前のコンピュータ可読ASCIIテキストファイルに開示されています。このsequence-listing.txtファイルのサイズは508KBです。

【図面】  
【図 1】



【図 2 A】

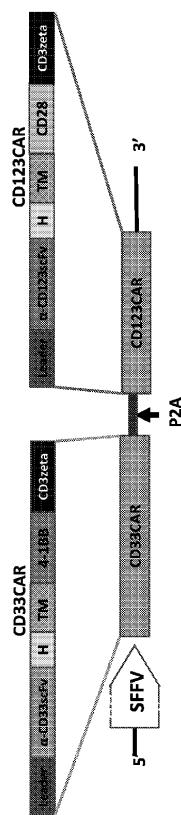


FIGURE 2A

10

20

【図 2 B】

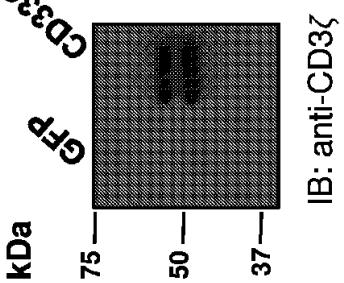
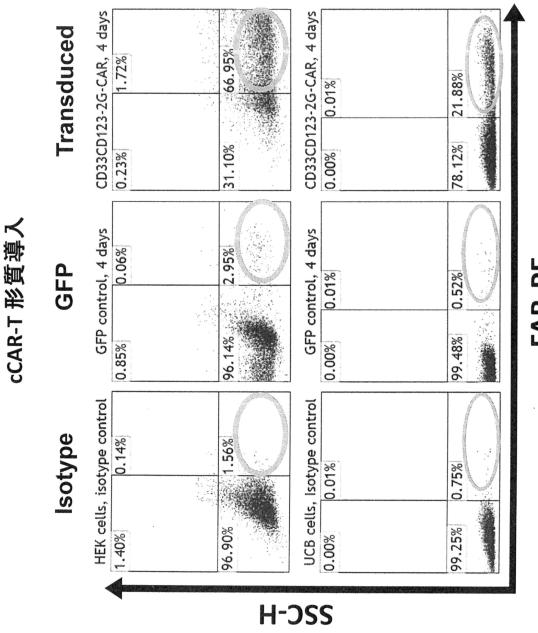


FIGURE 2B

30

40

【図 2 C】



50

【図3】

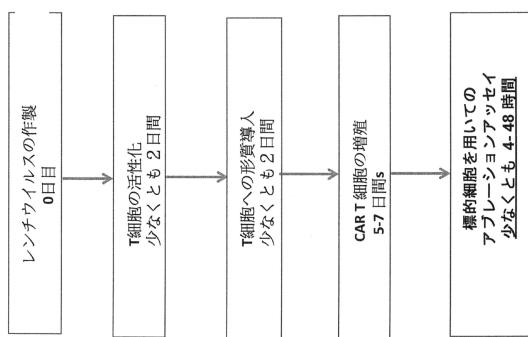
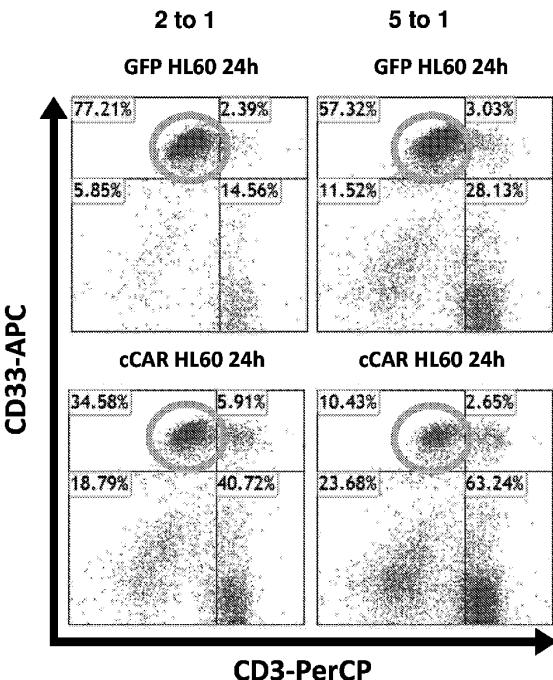


図3

【図4】



10

20

FIGURE 4

30

【図5】

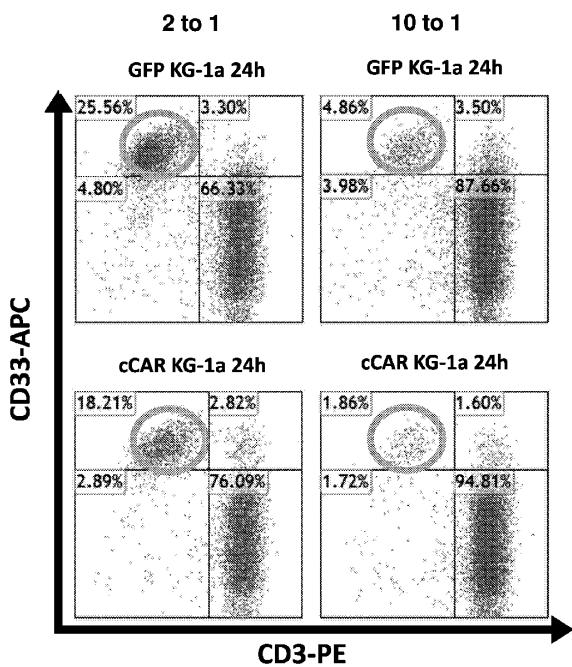
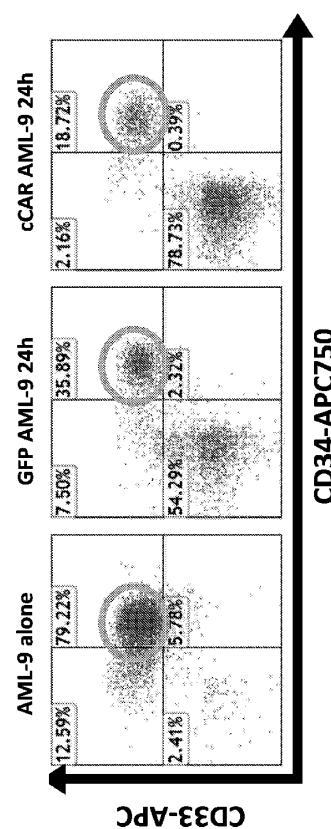


FIGURE 5

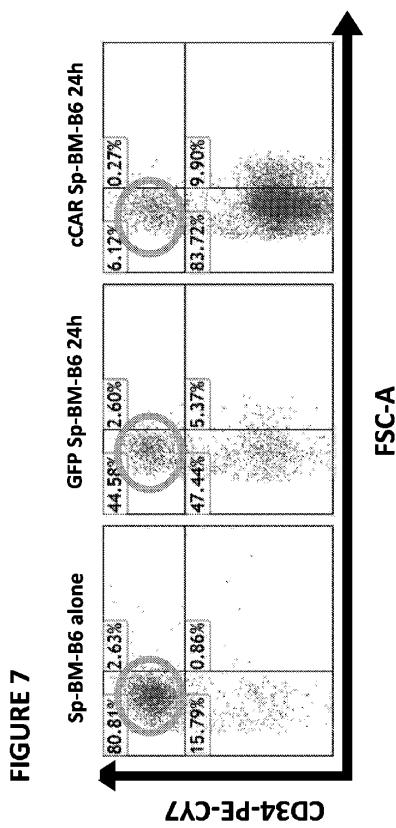
【図6】



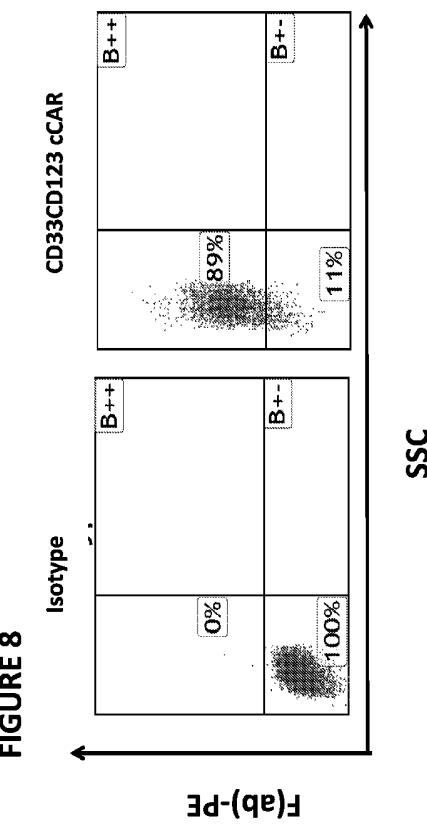
40

50

【図 7】



【図 8】



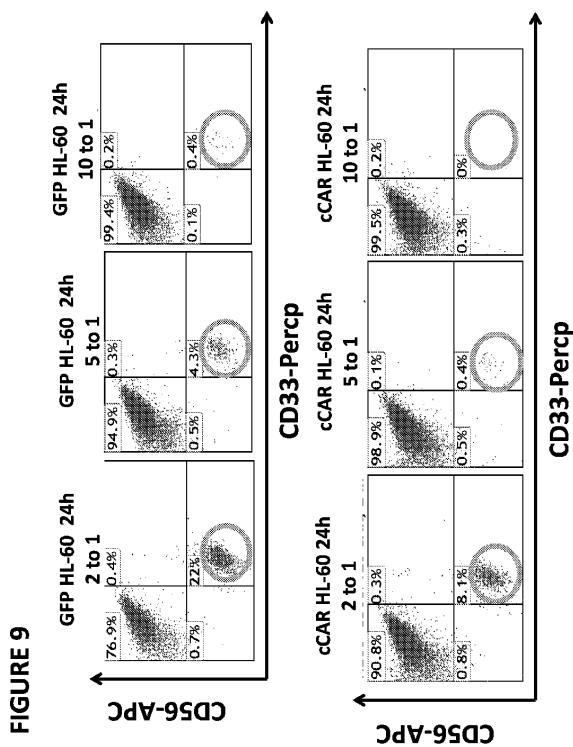
10

20

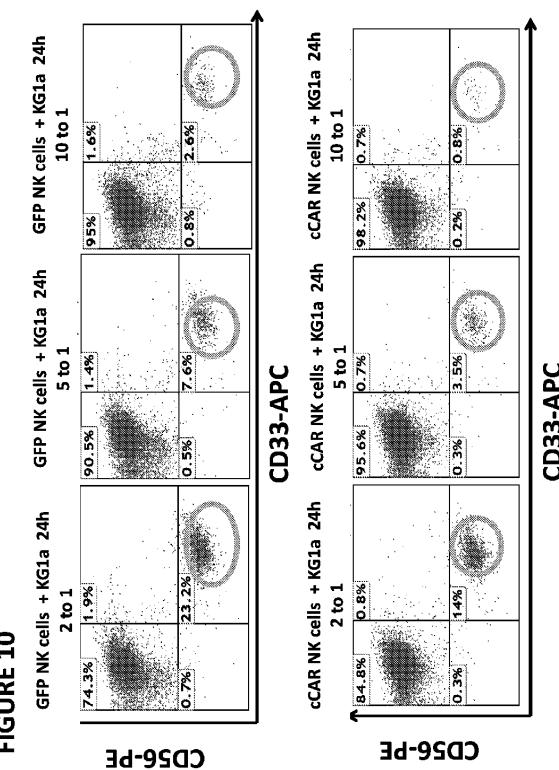
30

40

【図 9】

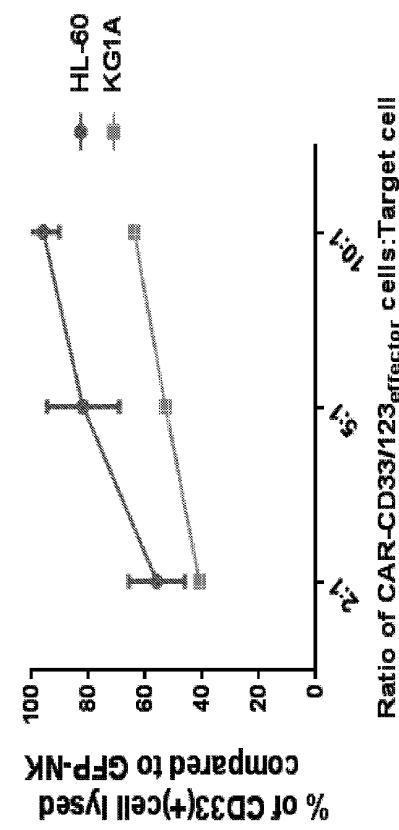


【図 10】

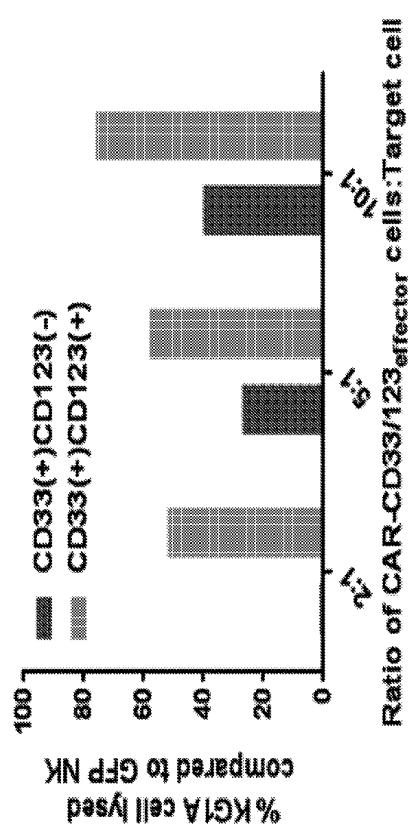


50

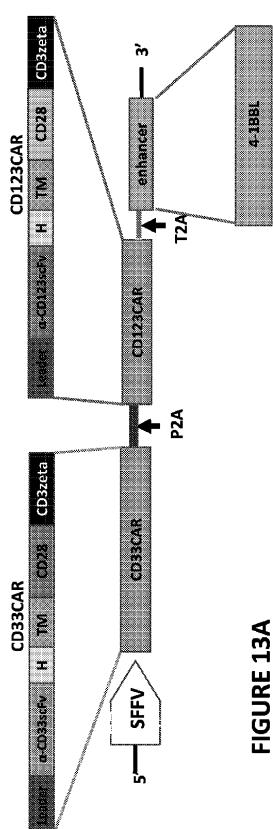
【図 1 1】



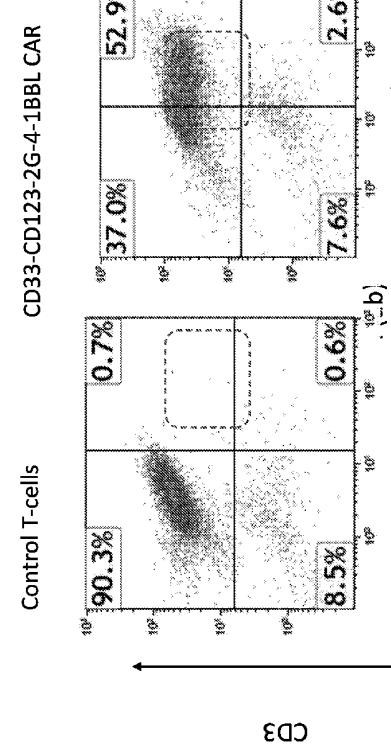
【図 1 2】



【図 1 3 A】



【図 1 3 B】



10

20

30

40

50

【図 14】

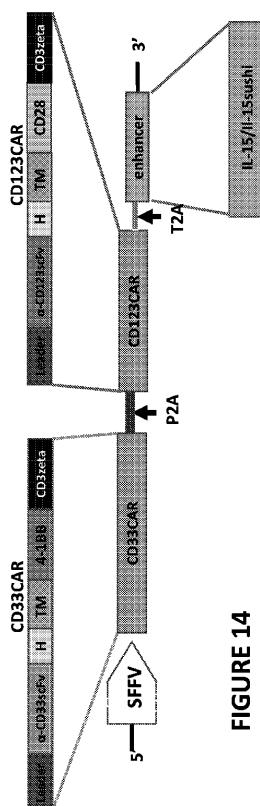


FIGURE 14

【図 15】

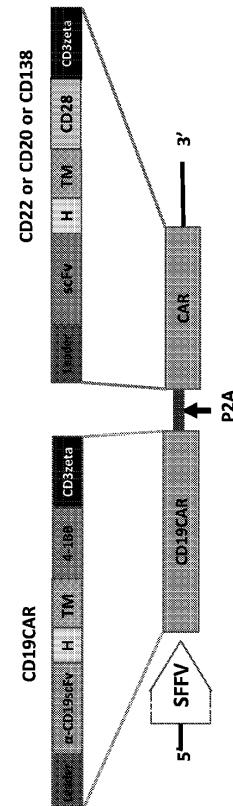


FIGURE 15

【図 16A】

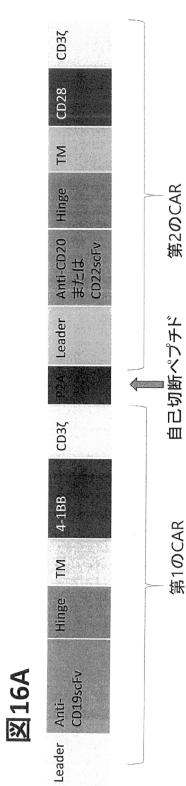


FIGURE 16A

【図 16B】

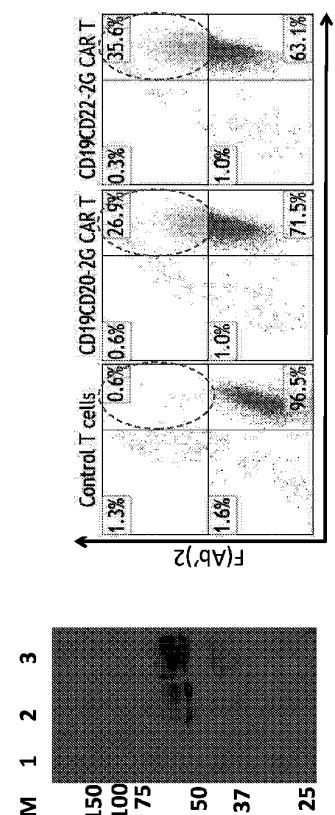


FIGURE 16B

10

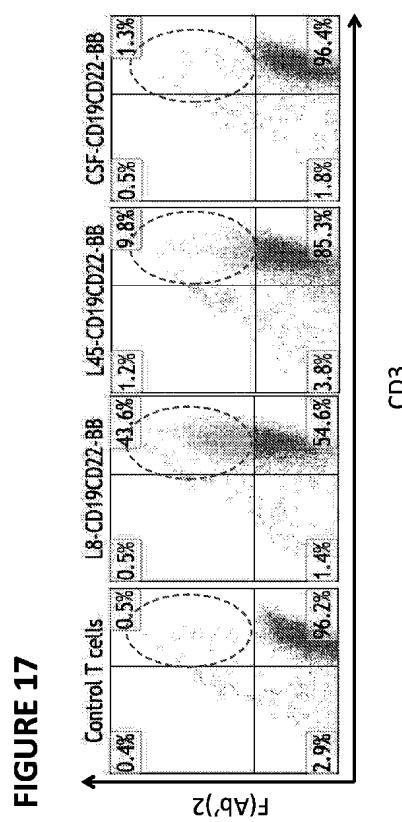
20

30

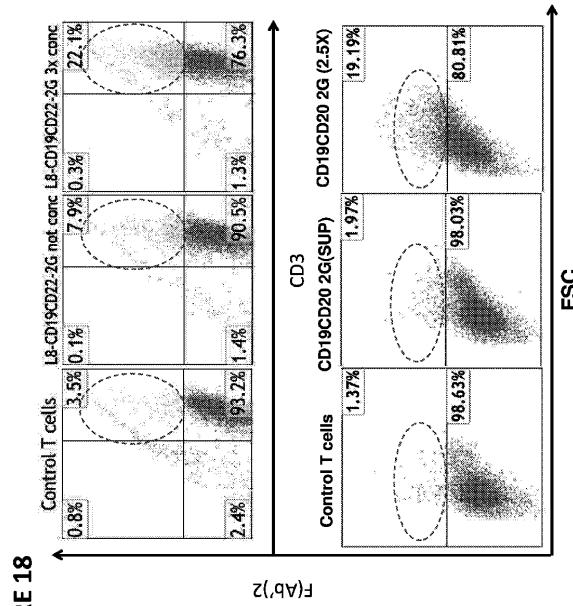
40

50

【図 17】



【図 18】



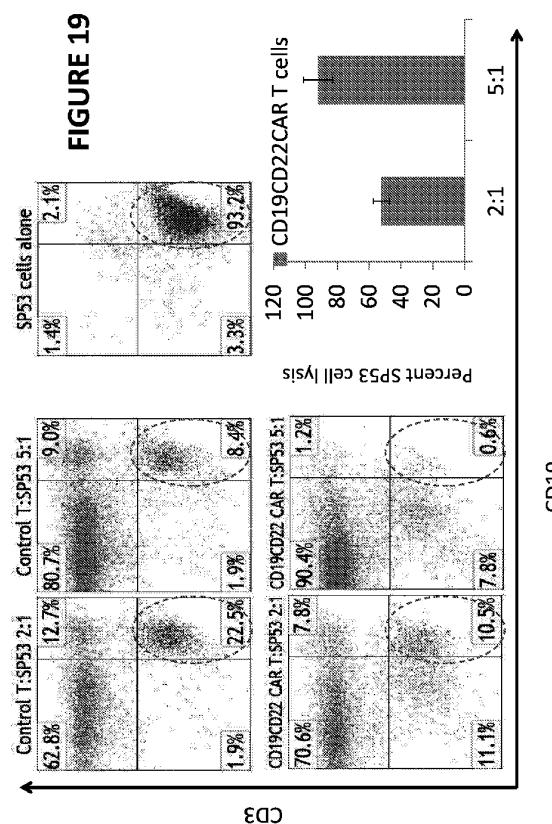
10

20

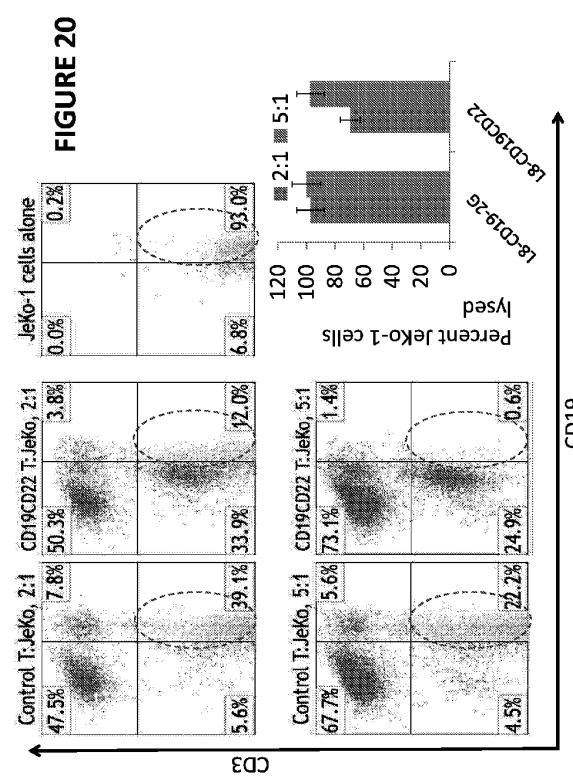
30

40

【図 19】

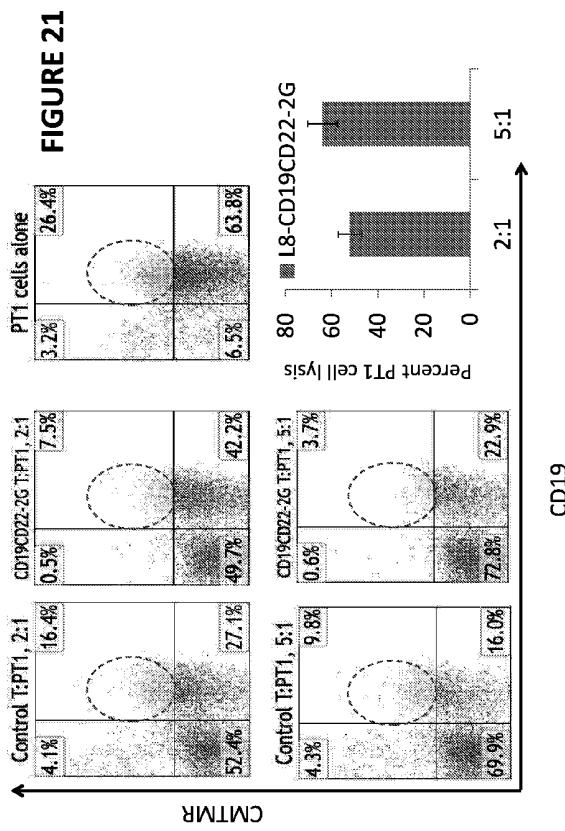


【図 20】



50

【図 2 1】



【図 2 2 A】

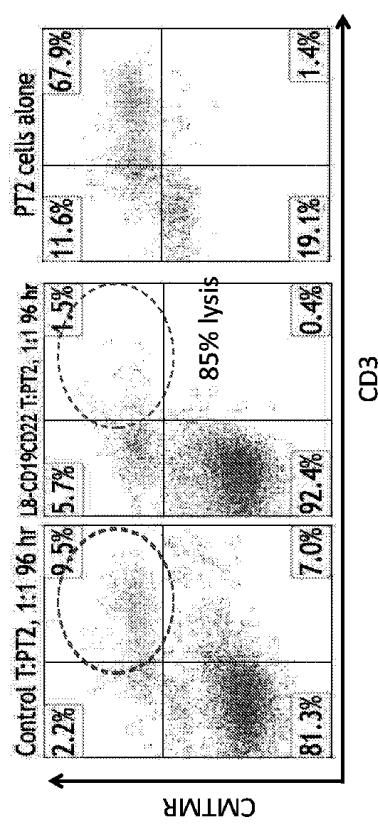
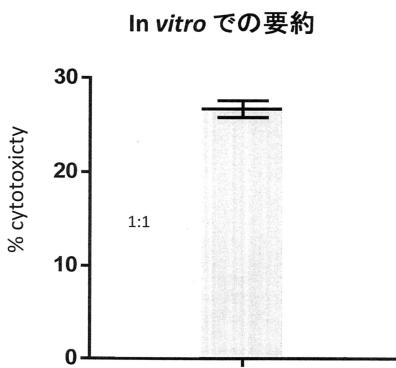


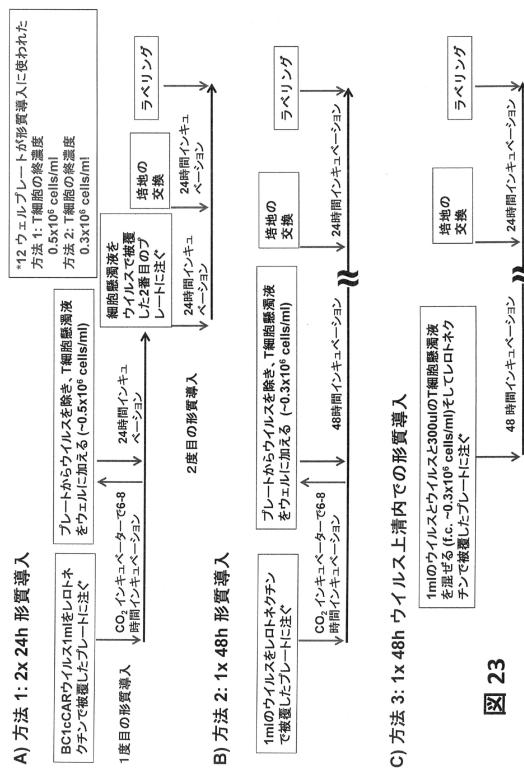
FIGURE 22A

【図 2 2 B】

図22B



【図 2 3】



【図 2 4 A】



【図 2 4 C】

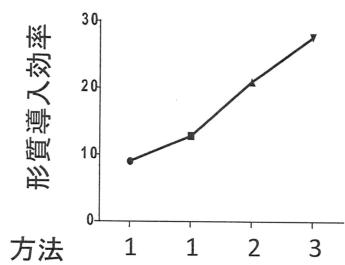
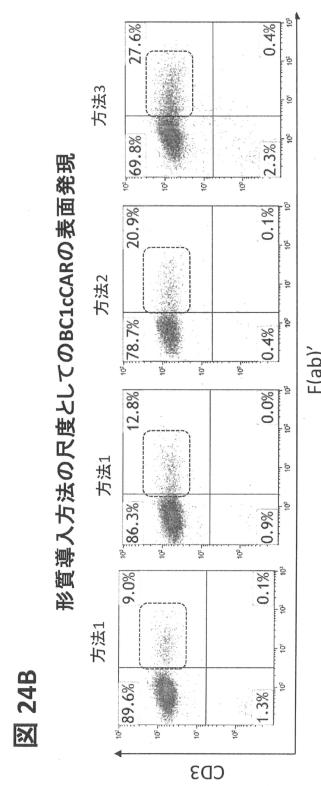


図 24C

【図 2 4 B】



【図 2 4 D】

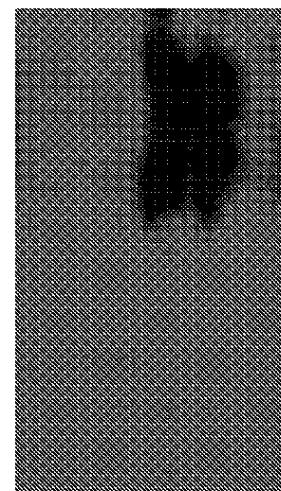


FIGURE 24D

10

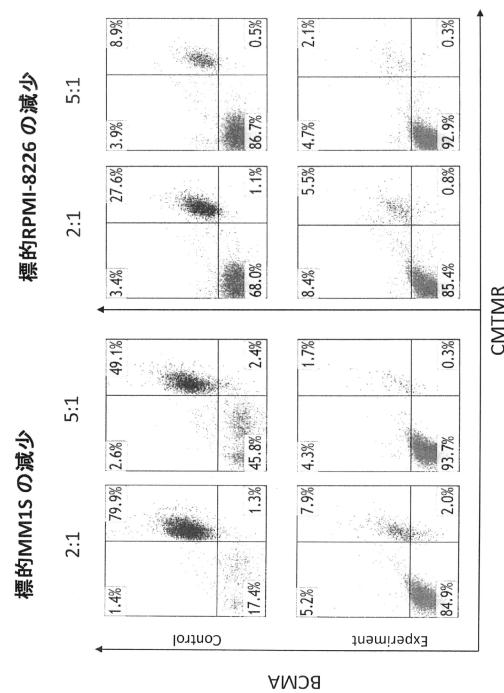
20

30

40

50

【図 25 A】



【図 25 B】

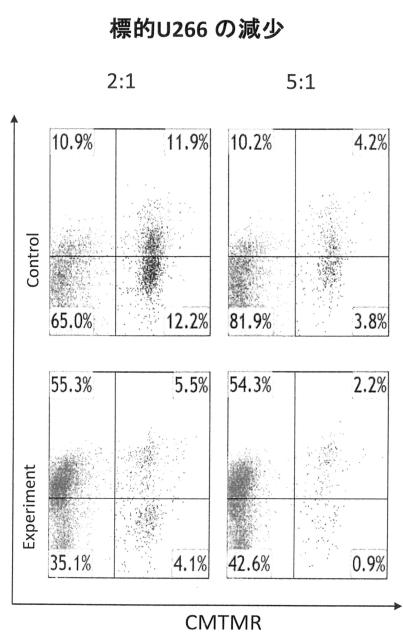


図25A

図 25B

【図 25 C】

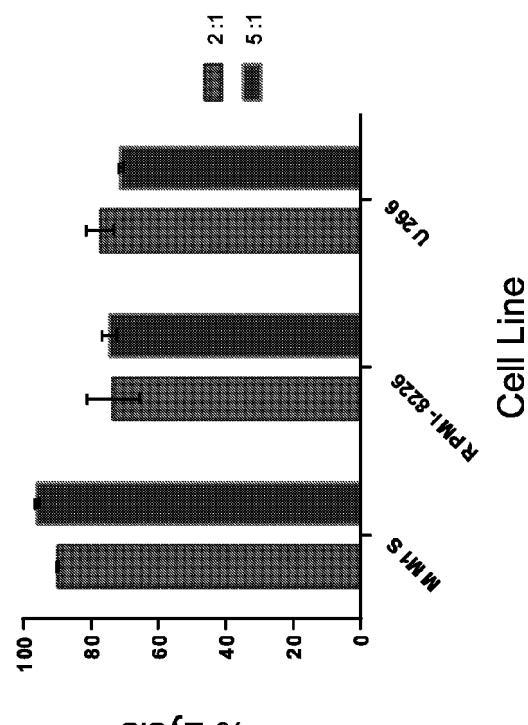


FIGURE 25C

【図 26 A】

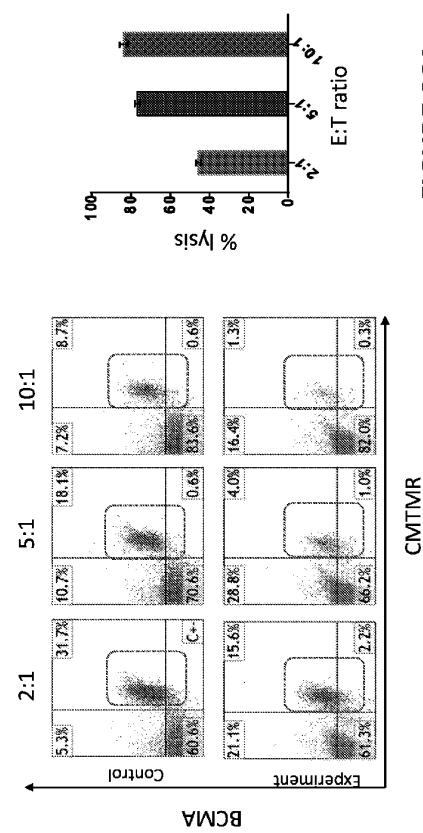


FIGURE 26A

10

20

30

40

50

FIGURE 26A

【図 2 6 B】

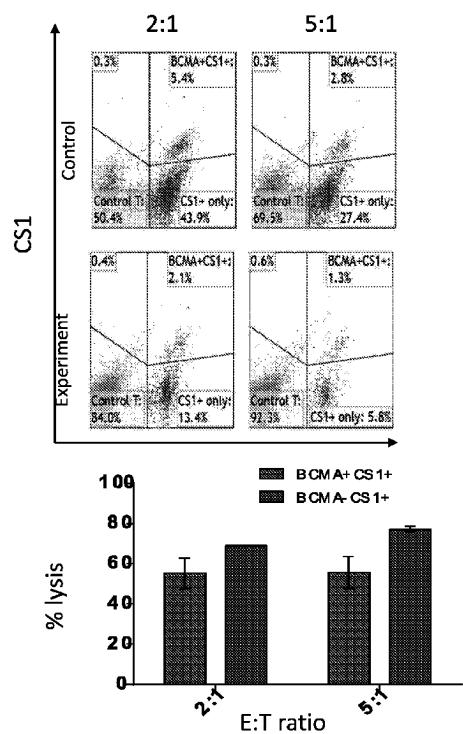


FIGURE 26B

【図 2 6 C】

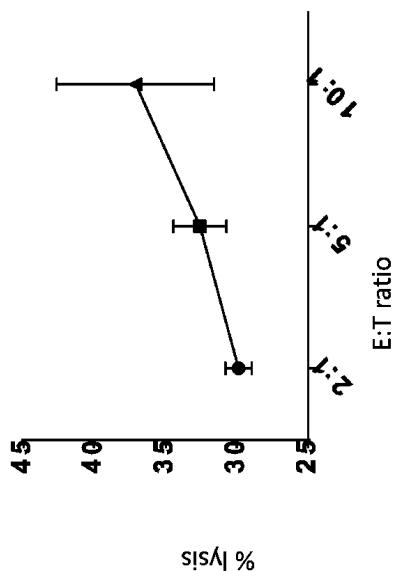


FIGURE 26C

10

20

30

40

【図 2 6 D】

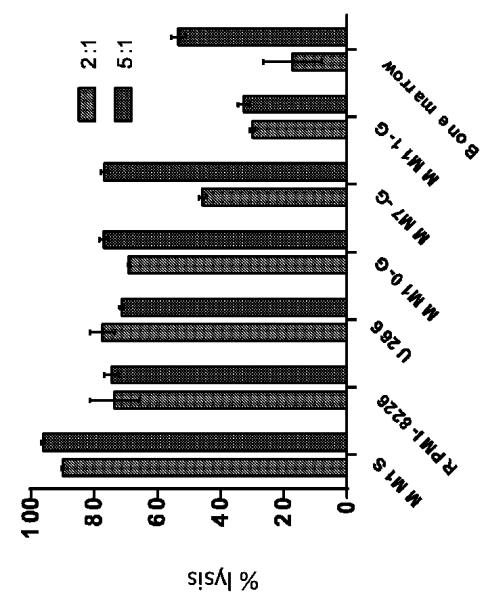


FIGURE 26D

【図 2 7 A】

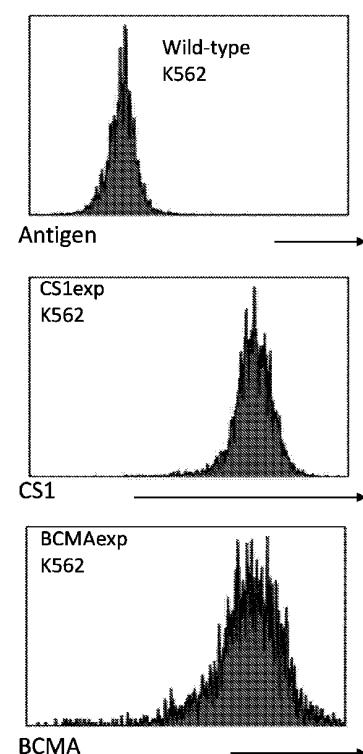
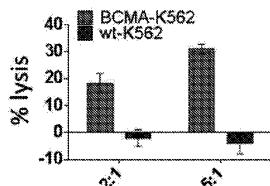
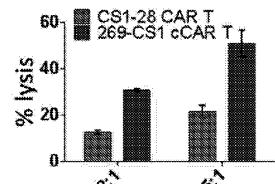
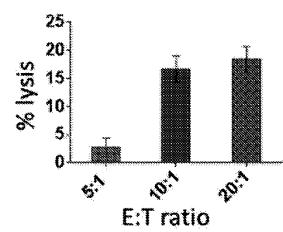


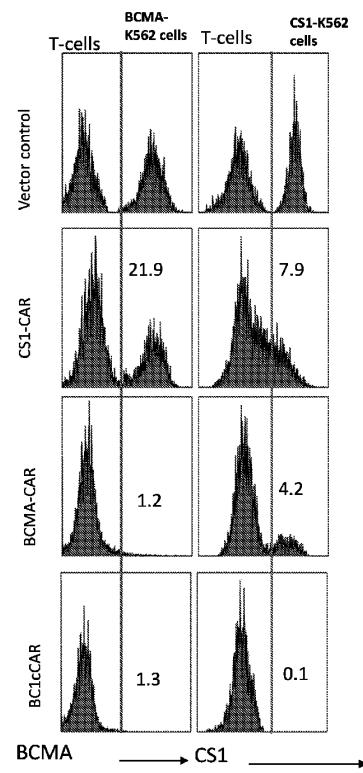
FIGURE 27A

50

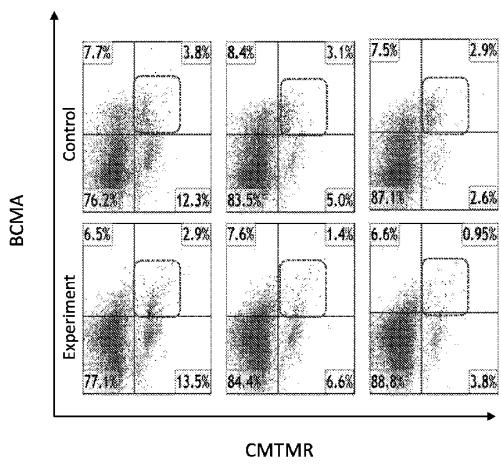
【図 27B】

**Short-term BCMA depletion by BC1cCAR T-cells****Short-term CS1 depletion by BC1cCAR T vs. CS1 CAR T****Anti-CS1 activity of BC1cCAR T against CS1<sup>dim</sup> NK-92 cells****FIGURE 27B**

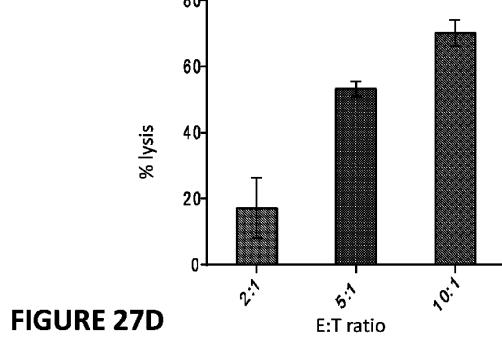
【図 27C】

**FIGURE 27C**

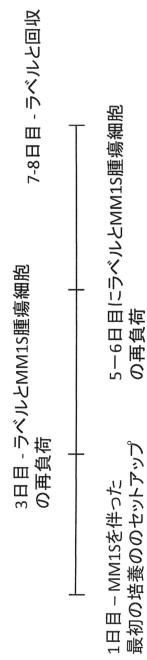
【図 27D】



CMTMR

**FIGURE 27D**

【図 28A】

**図28A**

【図 28B】

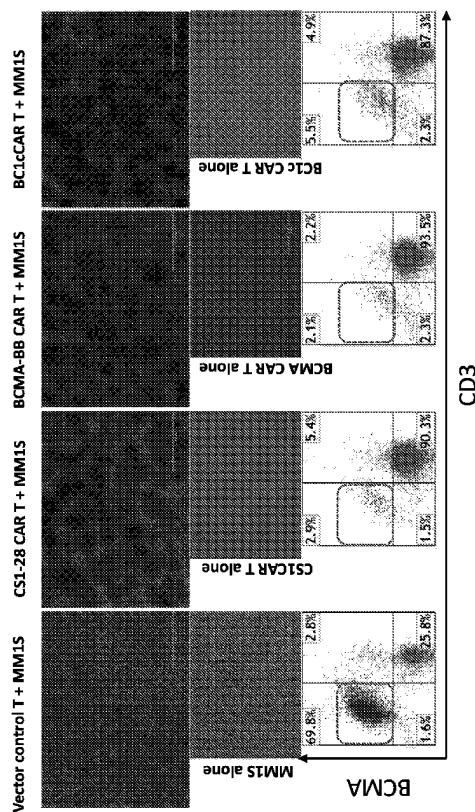


FIGURE 28B

【図 28C】

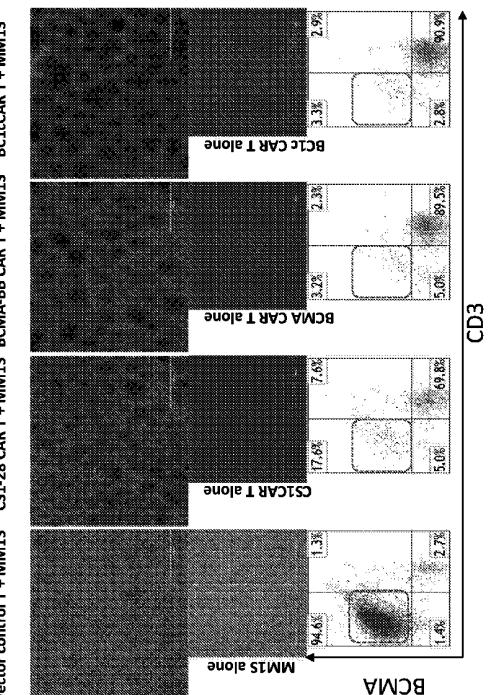


FIGURE 28C

10

20

30

40

【図 29A】

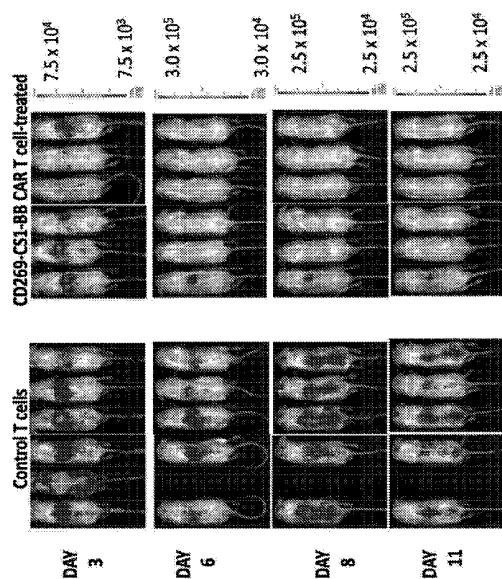
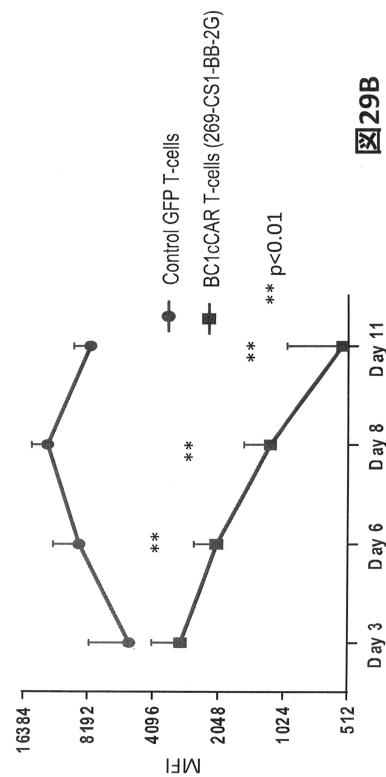


FIGURE 29A

【図 29B】

BC1cCAR T細胞がMM1S腫瘍細胞の増殖をコントロールする



50

【図 29C】

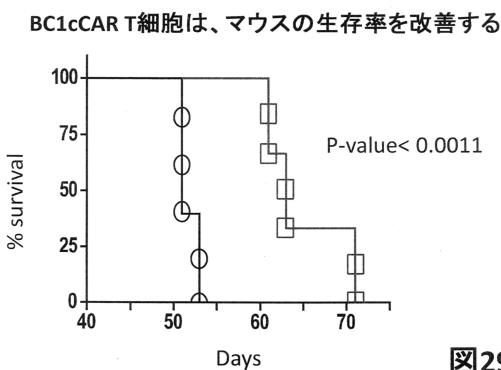


図 29C

【図 29D】

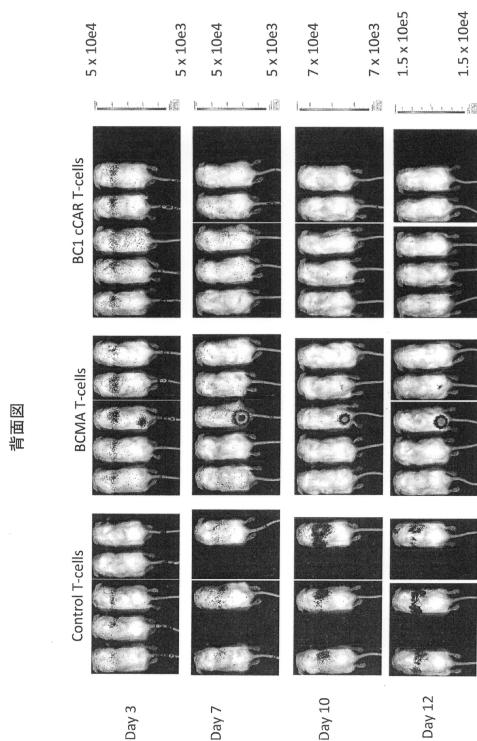


図 29D

【図 29E】

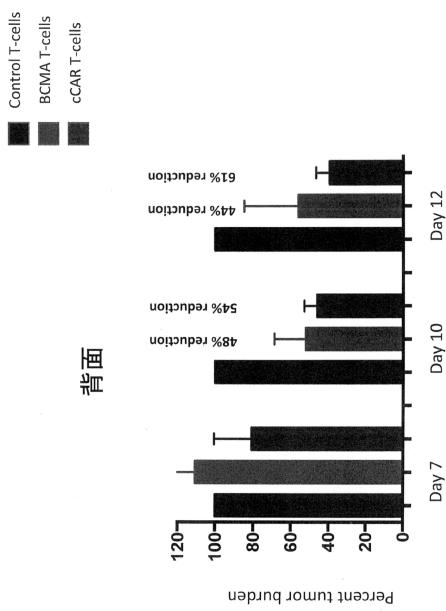


図 29E

【図 30A】

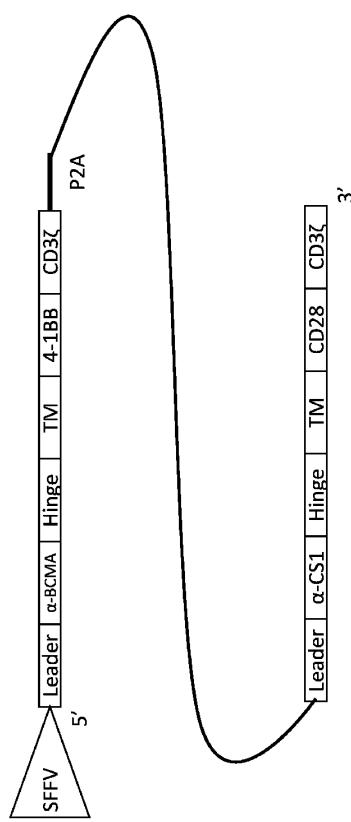


FIGURE 30A

10

20

30

40

50

【図 30B】

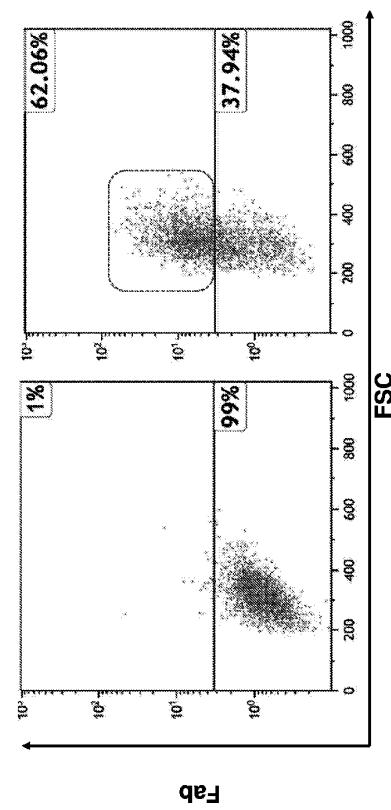


FIGURE 30B

【図 31A】

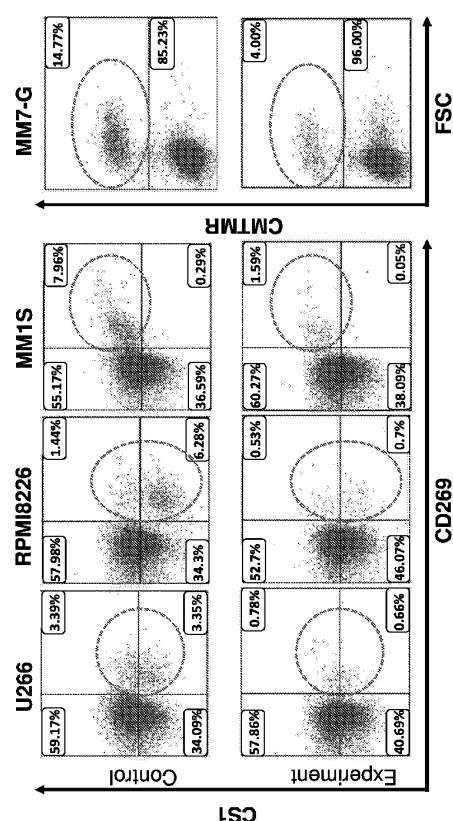


FIGURE 31A

【図 31B】

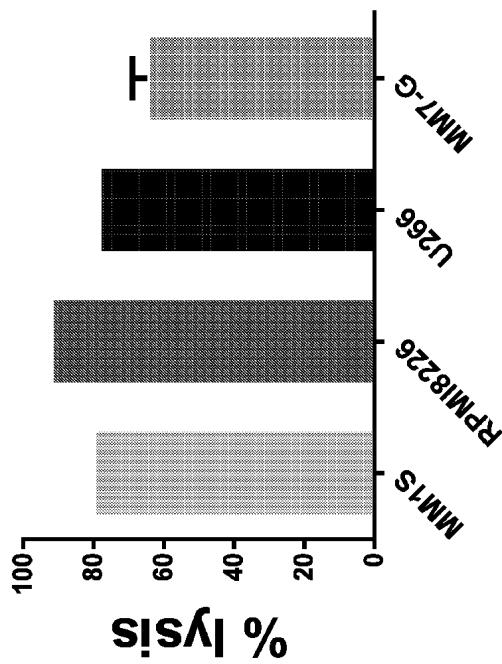


FIGURE 31B

【図 31C】

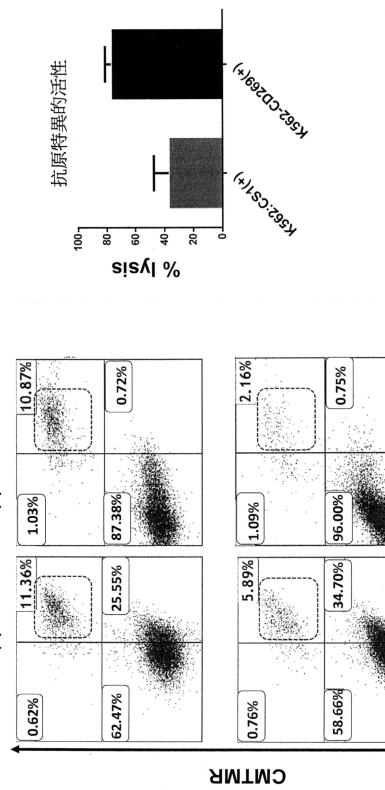


FIGURE 31C

10

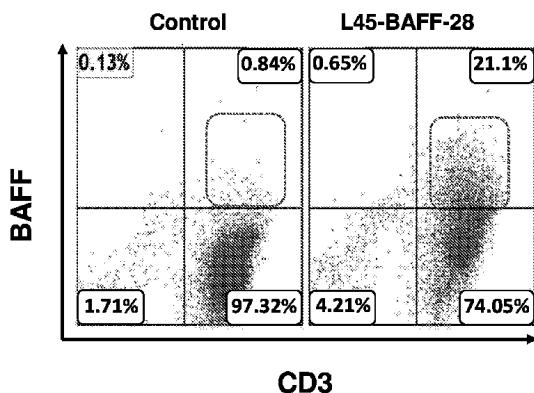
20

30

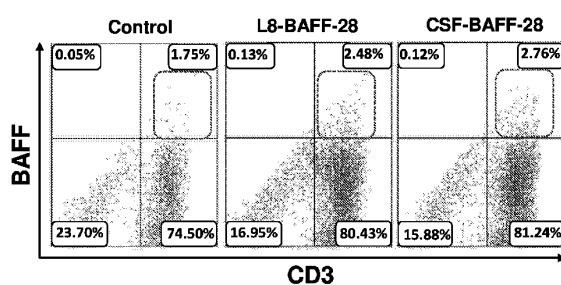
40

50

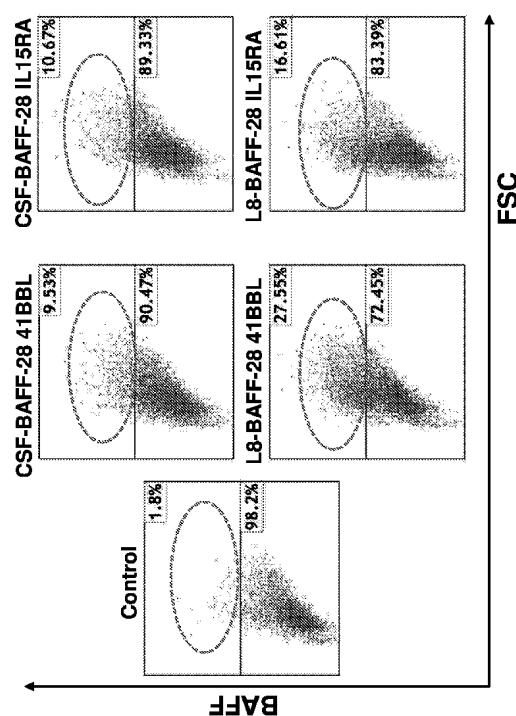
【図 3 2 A】

**FIGURE 32A**

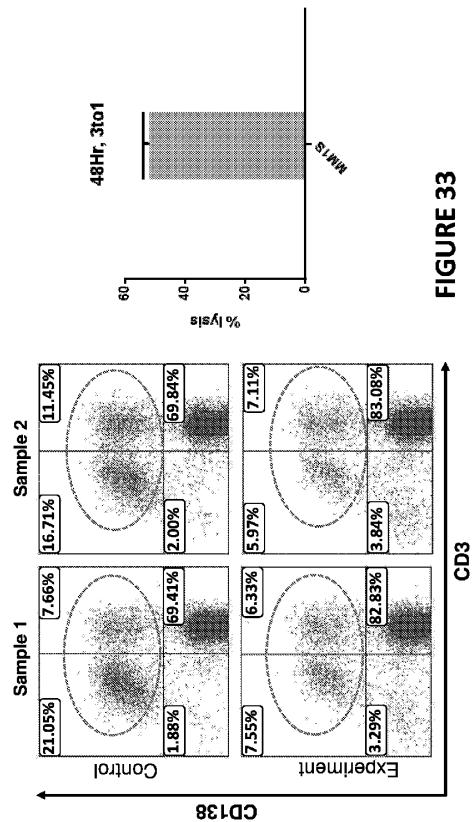
【図 3 2 B】

**FIGURE 32B**

【図 3 2 C】

**FIGURE 32C**

【図 3 3】

**FIGURE 33**

10

20

30

40

50

【図 3 4 A】

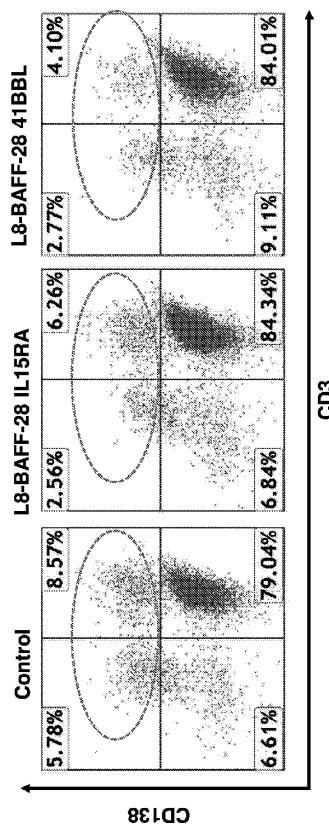
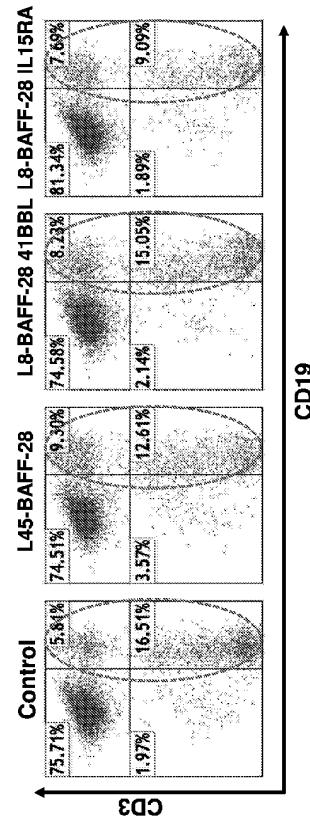


FIGURE 34A

【図 3 4 B】



CD19

10

20

【図 3 4 C】

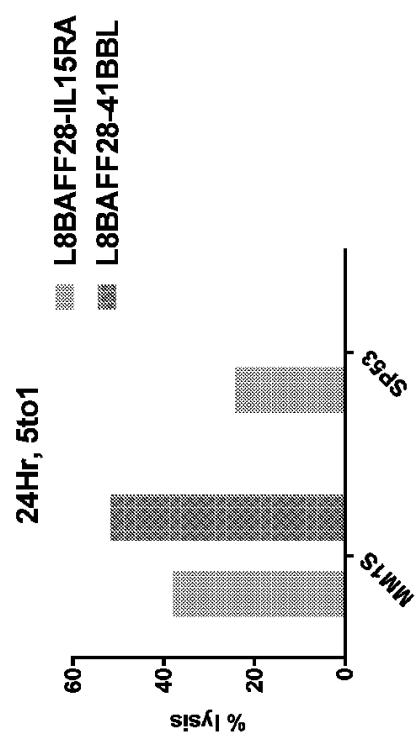
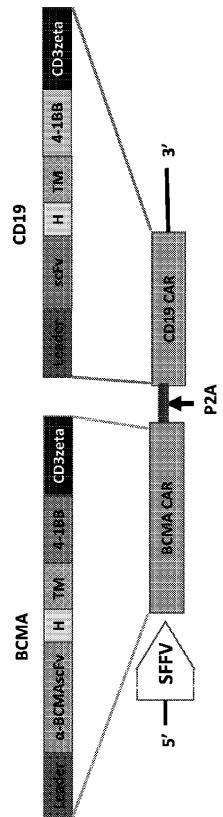


FIGURE 34C

【図 3 5】



30

40

50

【図 3 6 A】

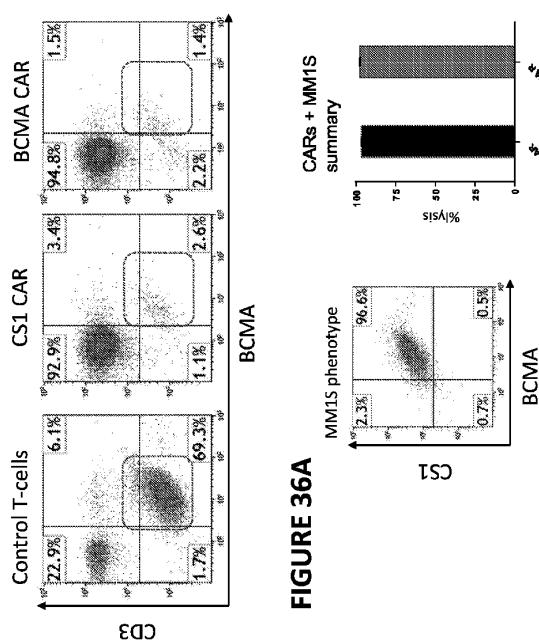


FIGURE 36A

【図 3 6 B】

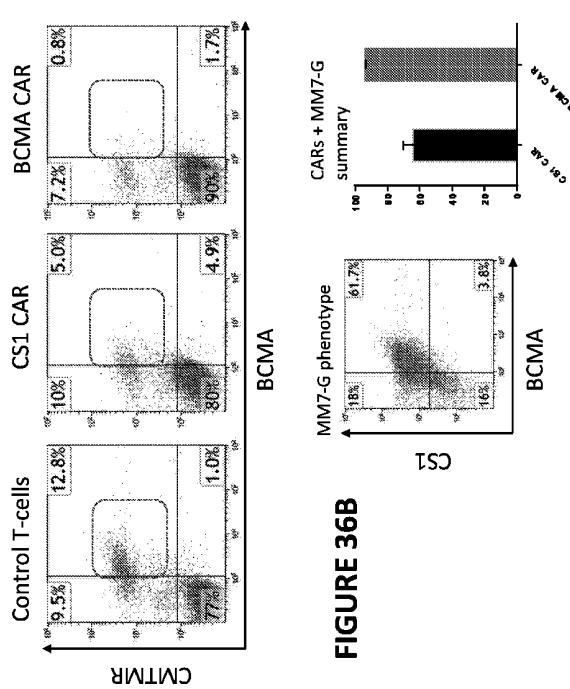


FIGURE 36B

10

20

【図 3 7 A】

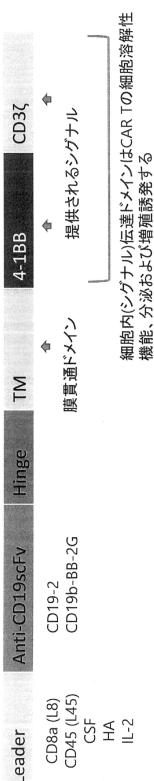
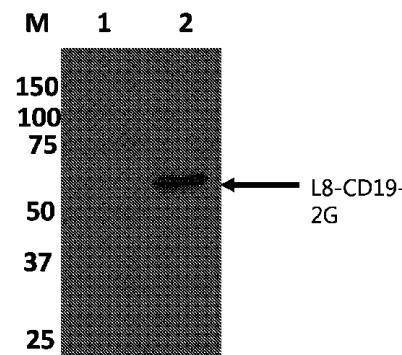


図37A

30

【図 3 7 B】

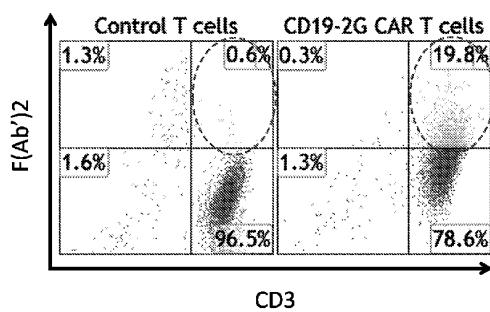
FIGURE 37B



40

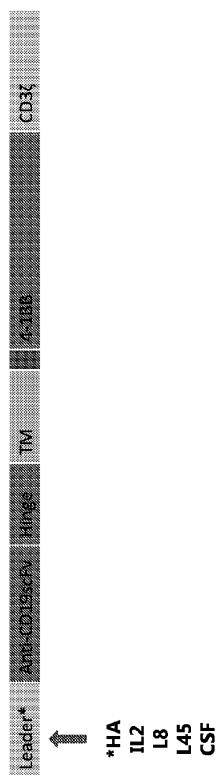
50

【図 3 7 C】

**FIGURE 37C**

10

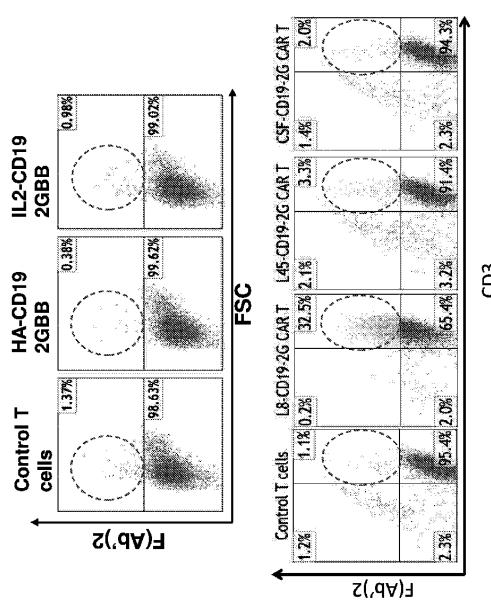
【図 3 8 A】



20

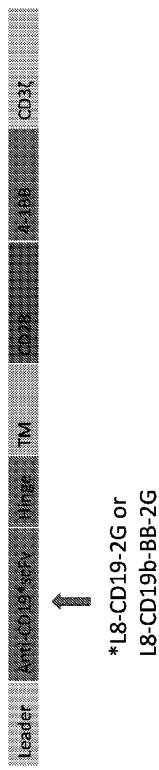
**FIGURE 38A**

【図 3 8 B】

**FIGURE 38B**

30

【図 3 9 A】

**FIGURE 39A**

40

50

【図 39B】

FIGURE 39B

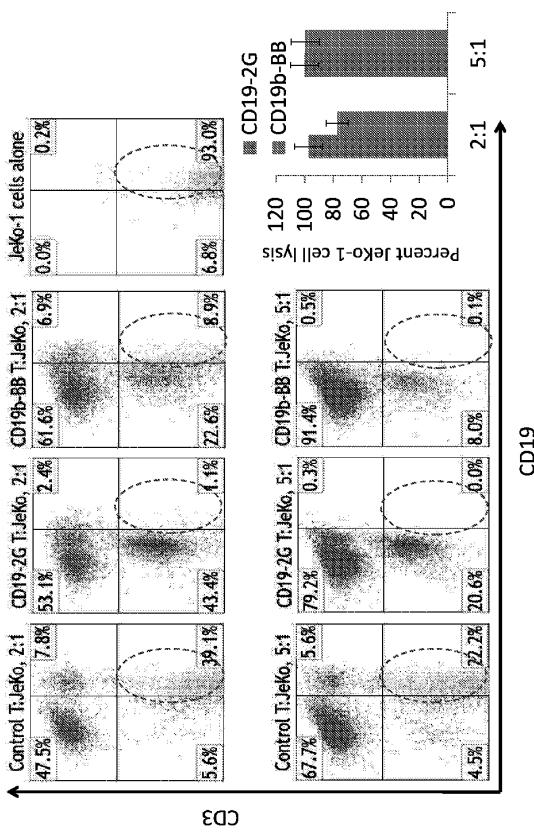
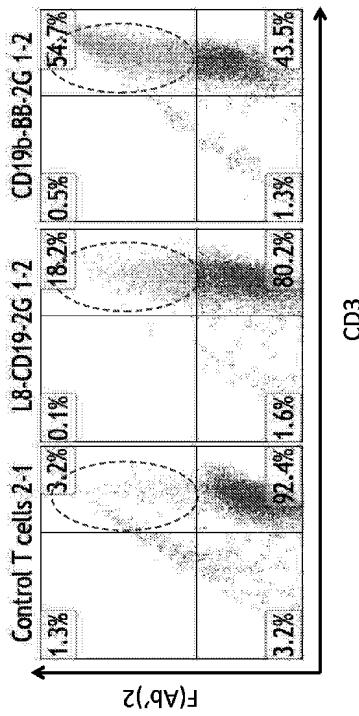


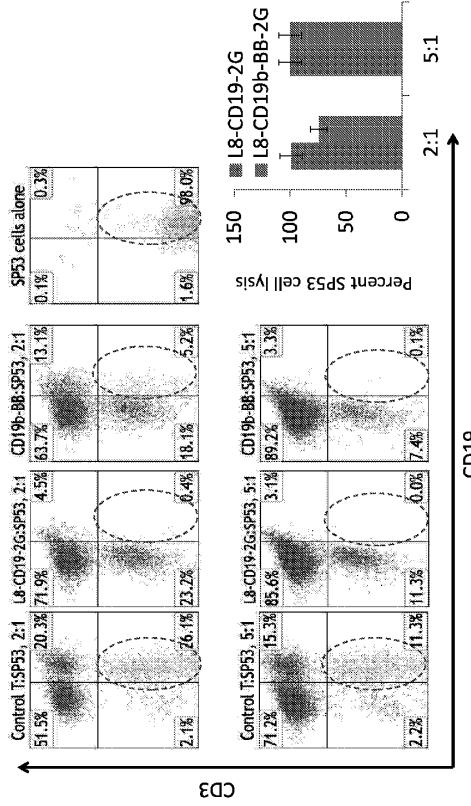
FIGURE 41



【図 41】

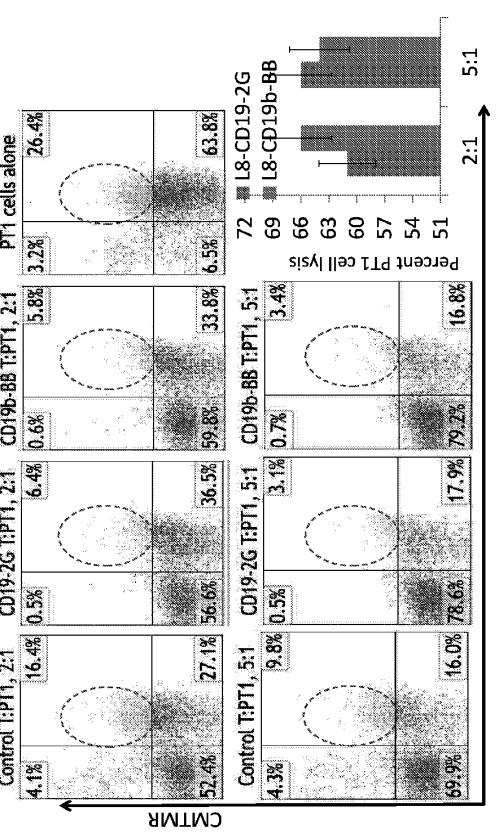
【図 40】

FIGURE 40

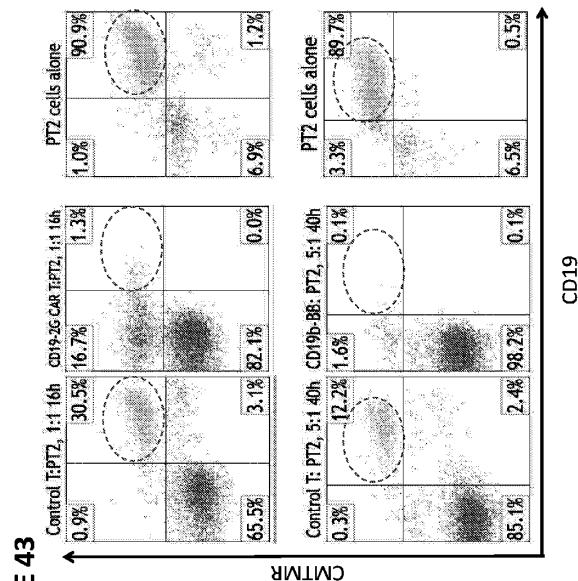


【図 42】

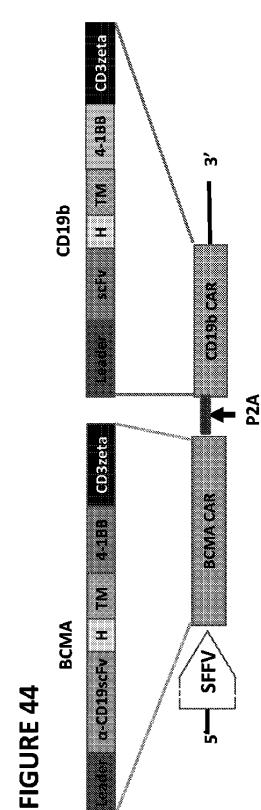
FIGURE 42



【図 4 3】



【図 4 4】

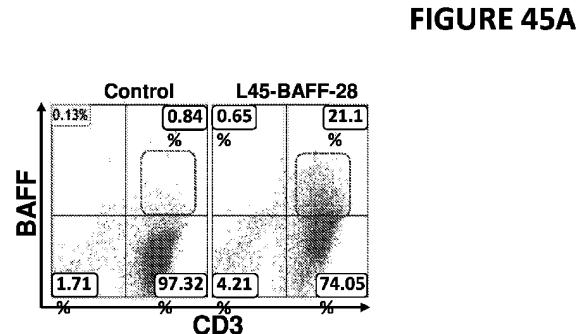


10

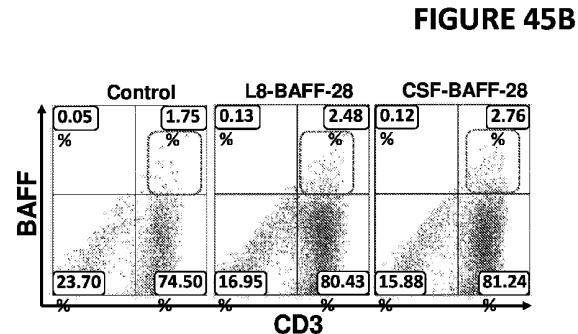
20

30

【図 4 5 A】



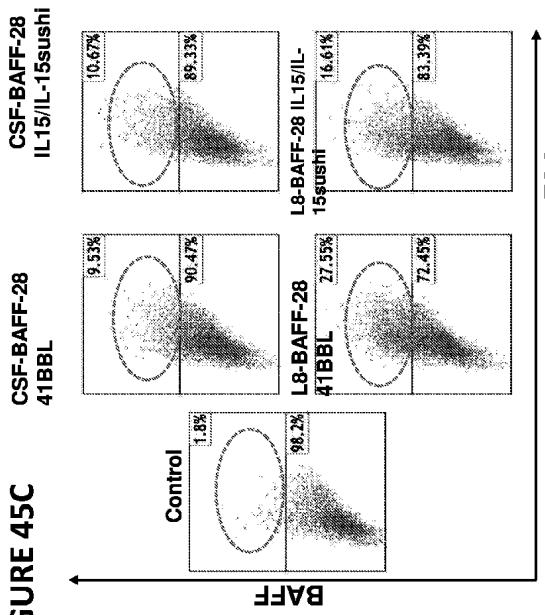
【図 4 5 B】



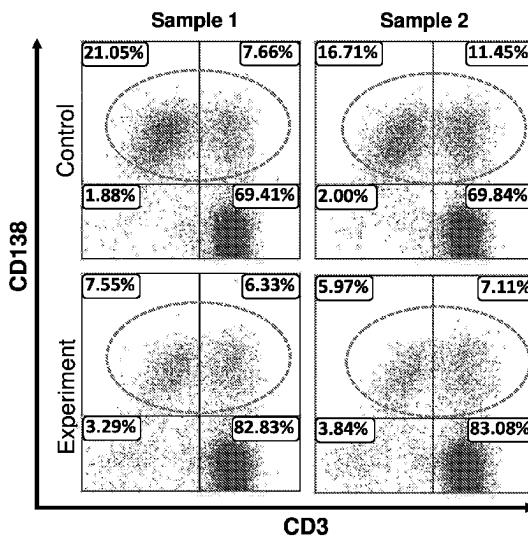
40

50

【図 4 5 C】



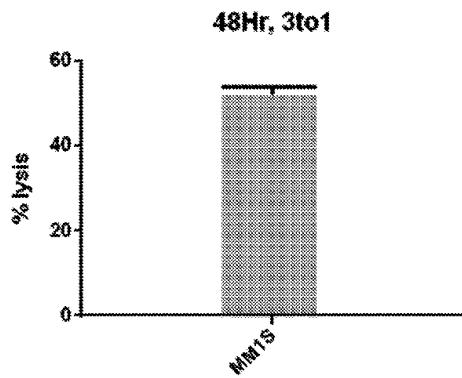
【図 4 6 A】

**FIGURE 46A**

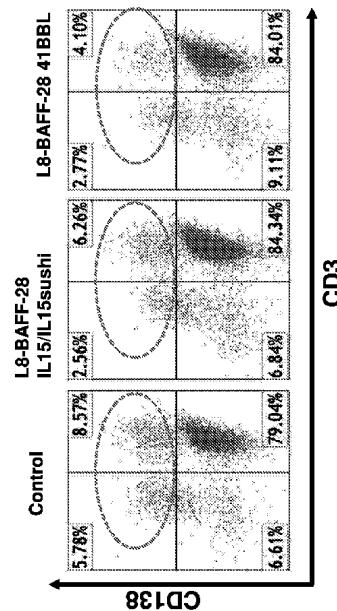
10

20

【図 4 6 B】

**FIGURE 46B**

【図 4 7 A】

**FIGURE 47A**

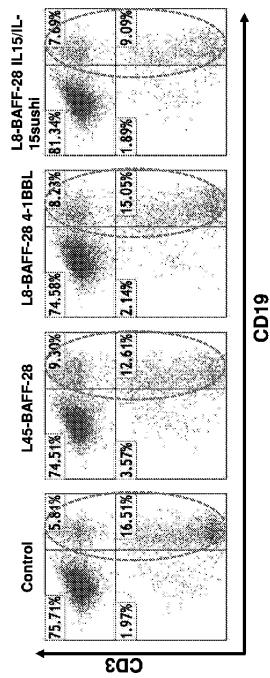
30

40

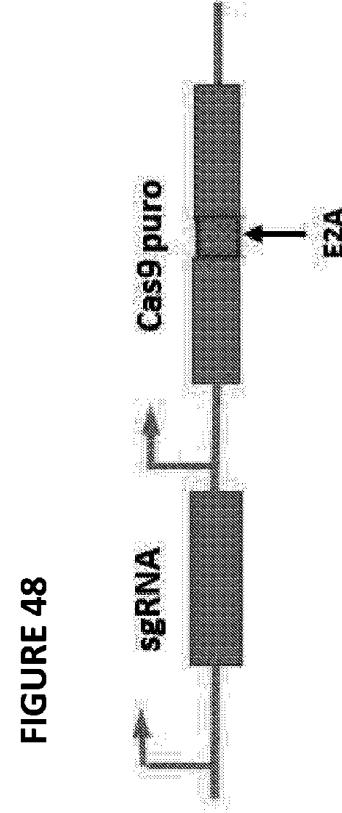
50

【図47B】

FIGURE 47B



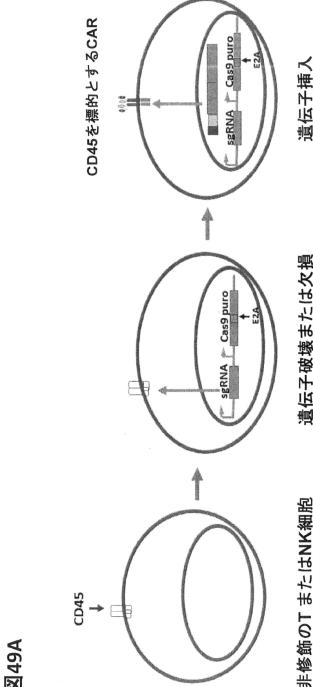
【図48】



10

20

【図49A】

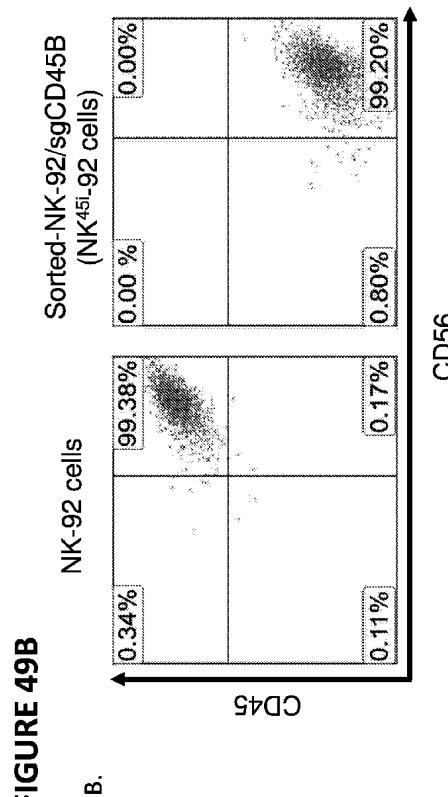


**ステップ:**  
CARで武装されたTまたはNK細胞は血液悪性腫瘍を標的にしている。  
1. ドナーからのT細胞あるいはNK細胞  
2. CD45の遺伝子破壊あるいは欠損を行う  
3. CD45をターゲットとするscFv CARの挿入

30

40

【図49B】



50

【図 5 0】

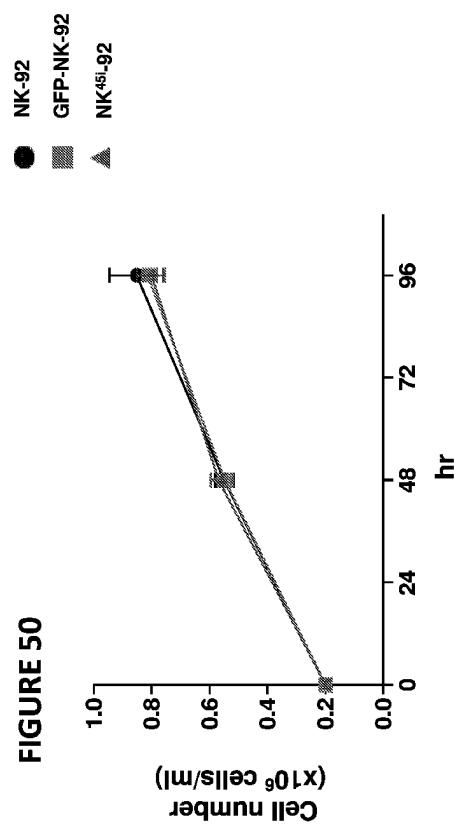


FIGURE 50

【図 5 1 A】

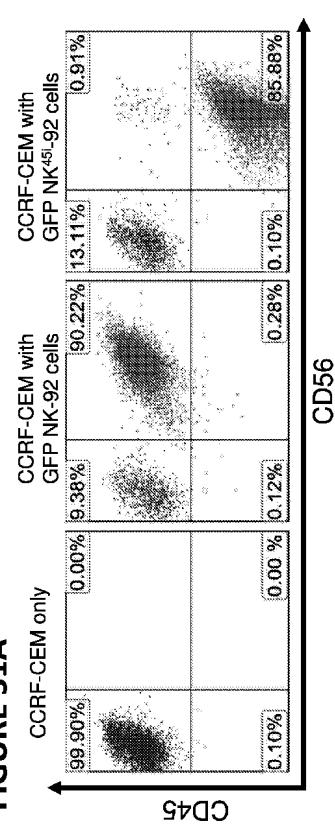


FIGURE 51A

【図 5 1 B】

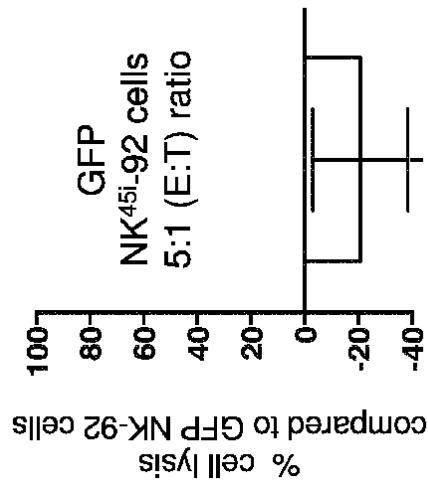


FIGURE 51B

【図 5 2 A】

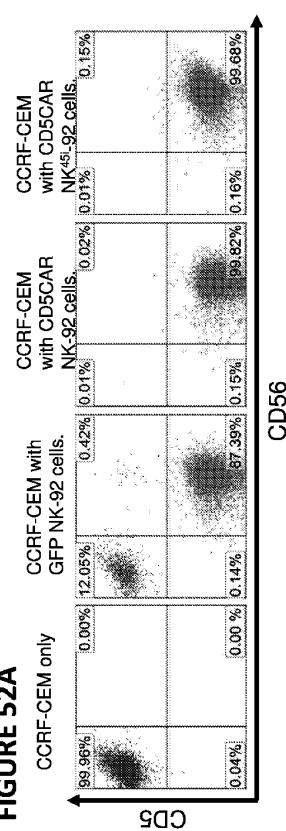


FIGURE 52A

10

20

30

40

50

【図 5 2 B】

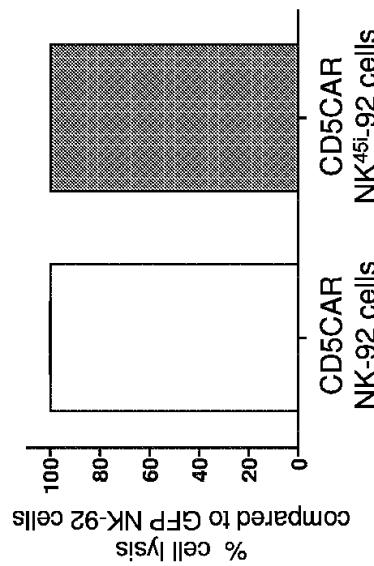
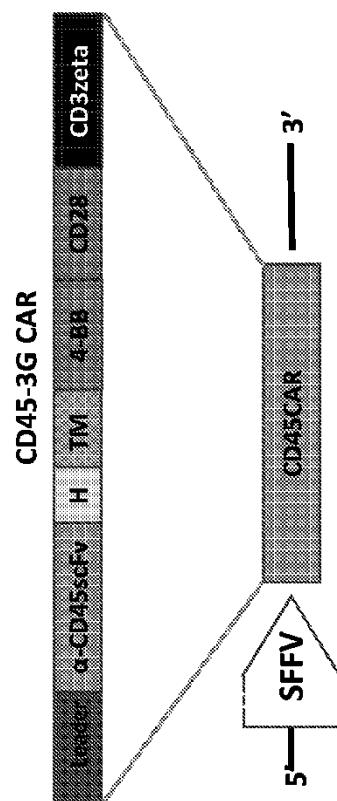


FIGURE 52B

【図 5 3 A】



10

【図 5 3 B】

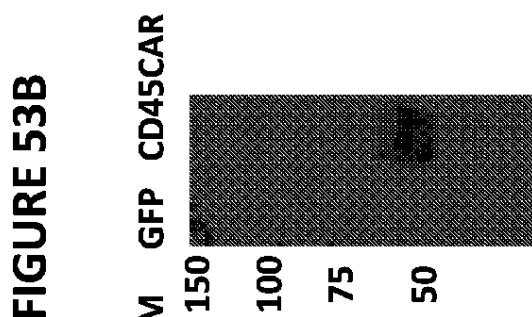
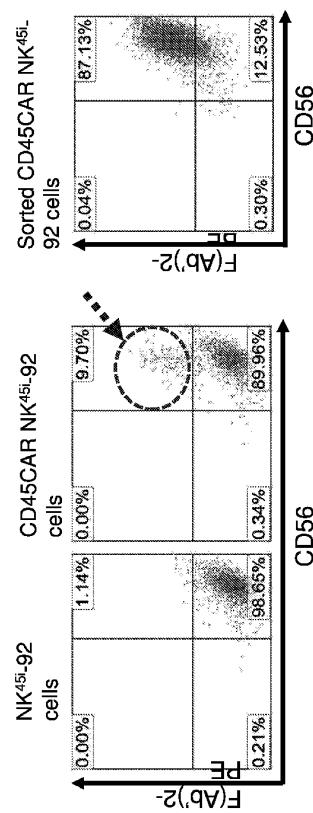


FIGURE 53B

FIGURE 53A

20

【図 5 4】



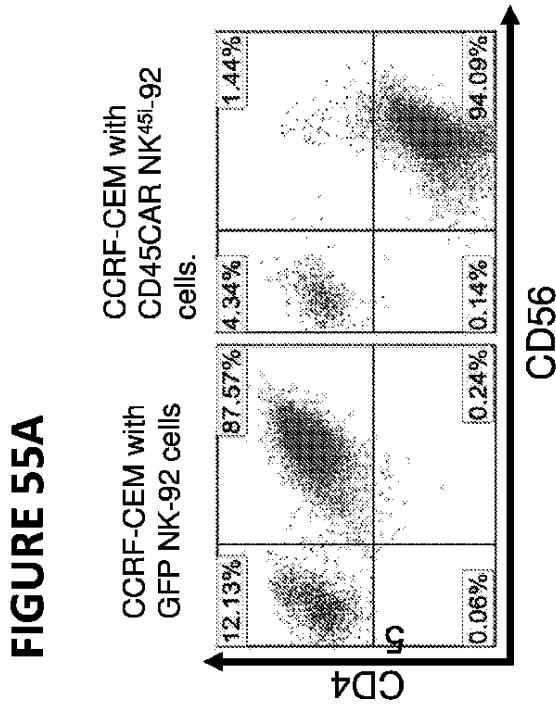
30

FIGURE 54

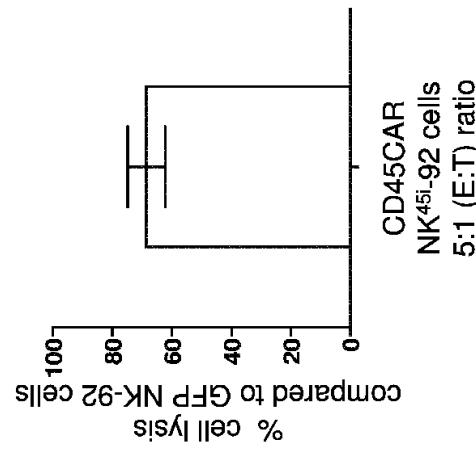
40

50

【図 5 5 A】



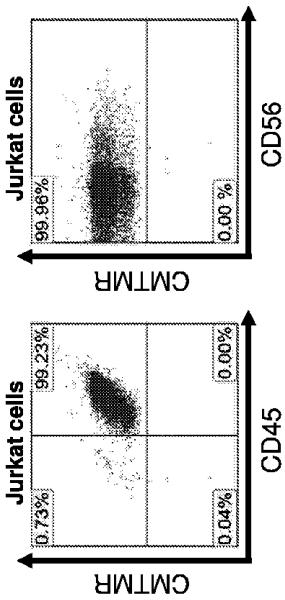
【図 5 5 B】



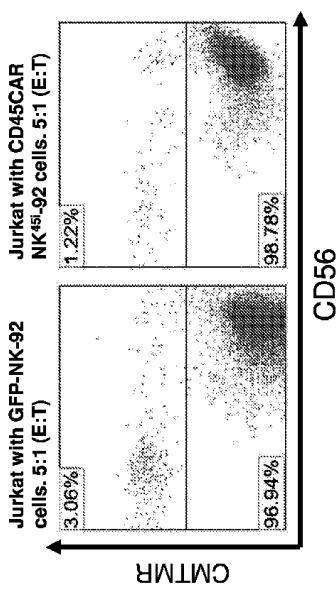
10

20

【図 5 6 A】



【図 5 6 B】

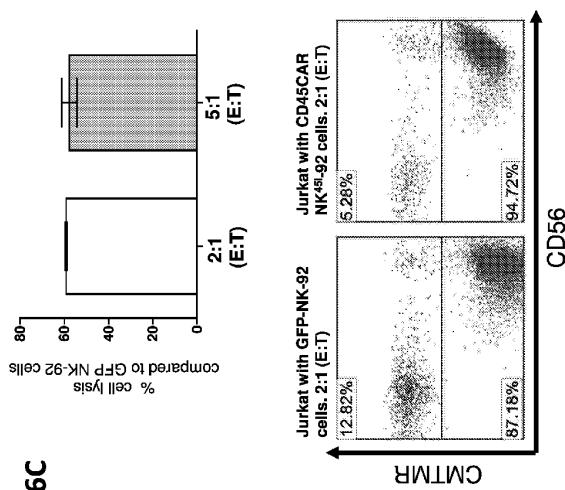


30

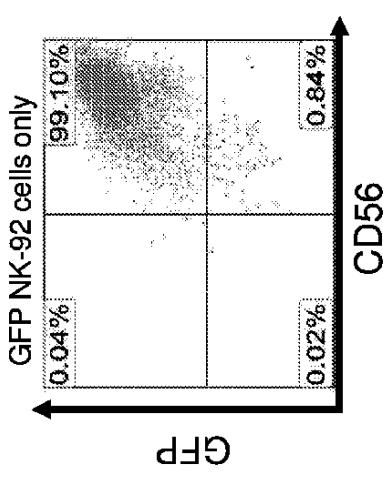
40

50

【図 5 6 C】



【図 5 7 A】



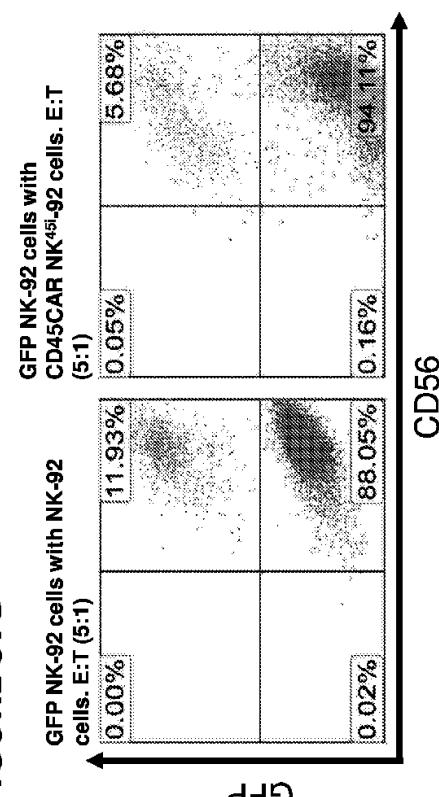
10

20

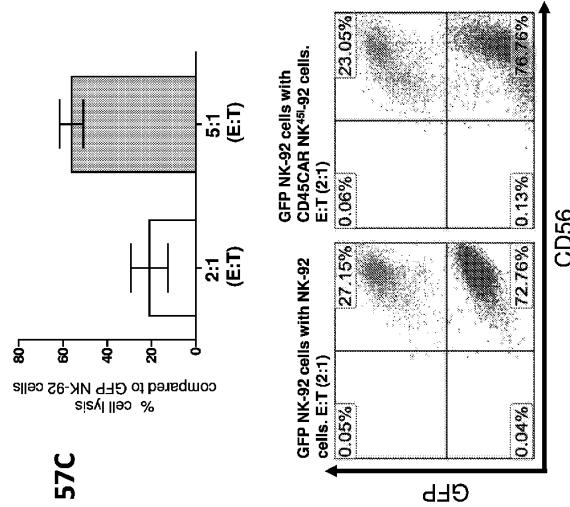
30

40

【図 5 7 B】

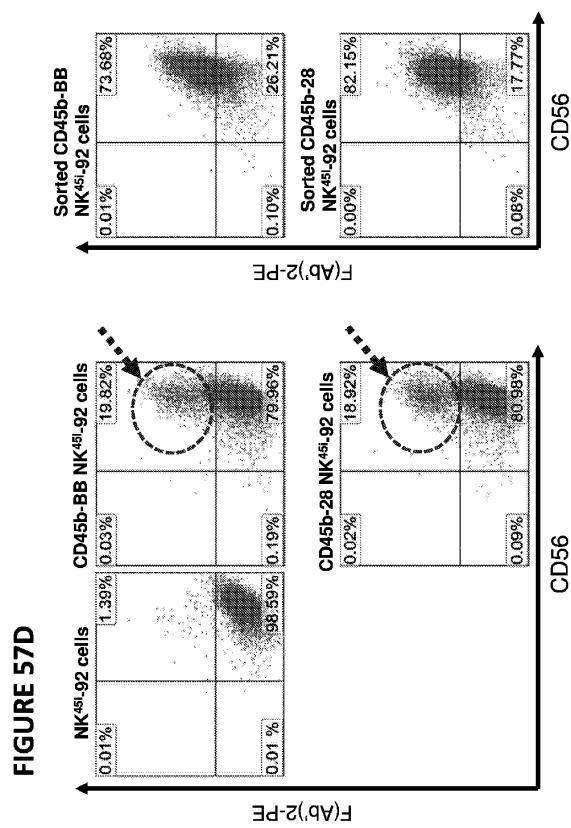


【図 5 7 C】

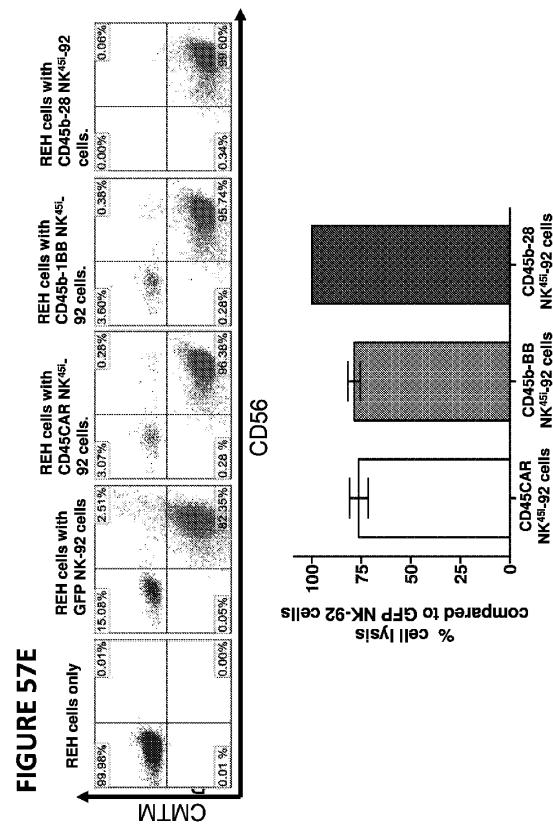


50

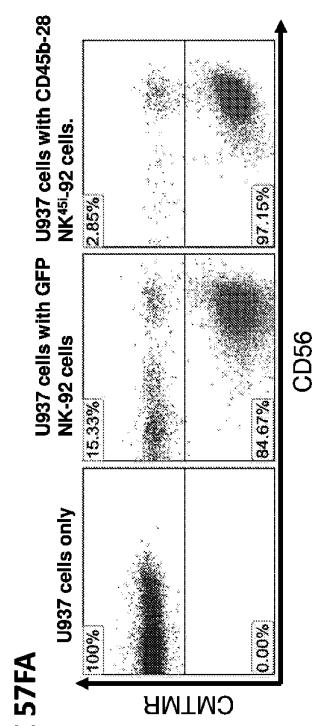
【図 5 7 D】



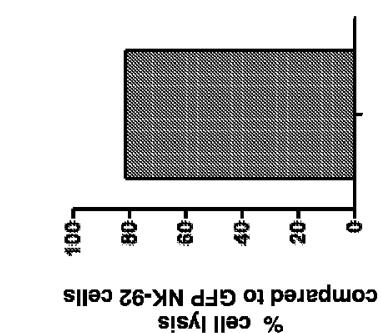
【図 5 7 E】



【図 5 7 F A】



【図 5 7 F B】



10

20

30

40

50

【図 5 7 G A】

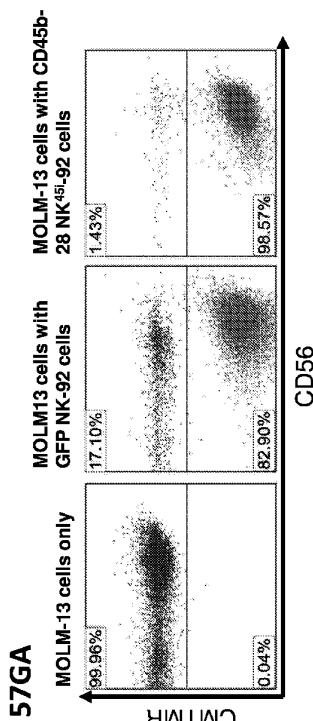
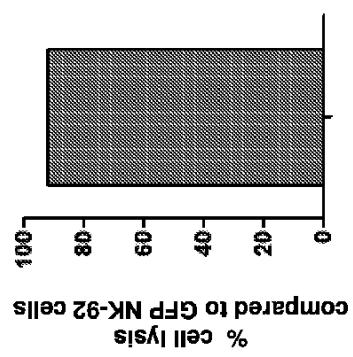


FIGURE 57GA

【図 5 7 G B】



10

【図 5 7 H A】

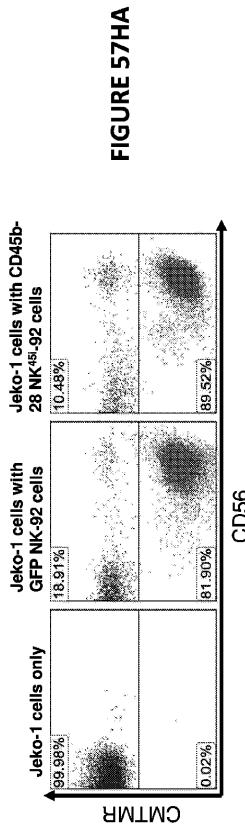
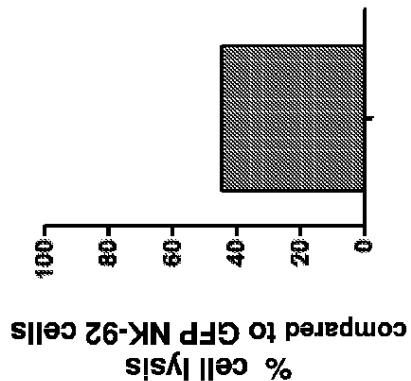


FIGURE 57HA

【図 5 7 H B】



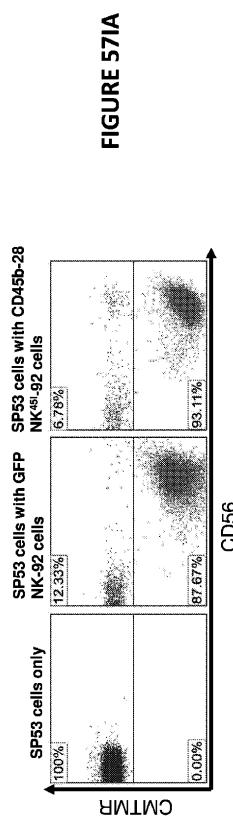
30

FIGURE 57HB

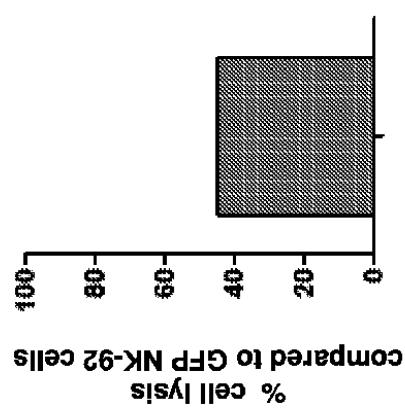
40

50

【図 5 7 I A】



【図 5 7 I B】



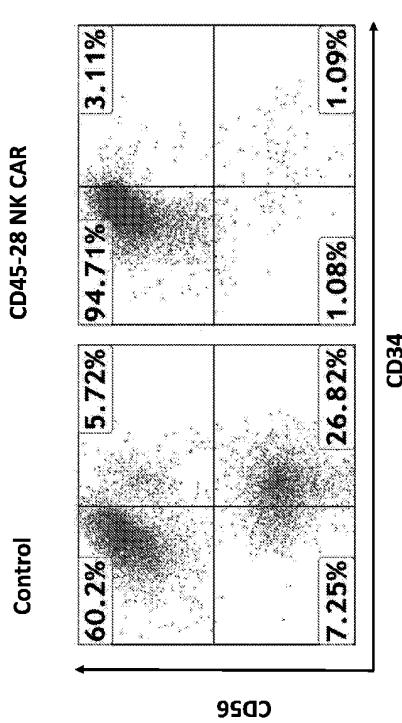
10

20

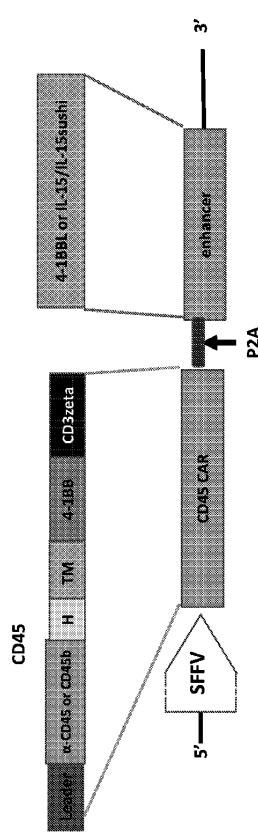
30

40

【図 5 7 J】



【図 5 8 A】



50

【図 5 8 B】

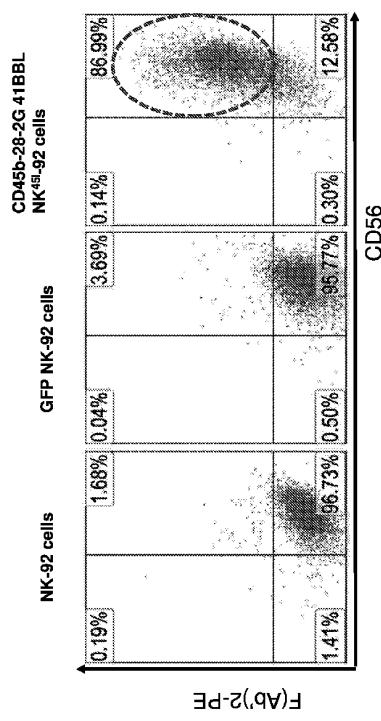


FIGURE 58B

【図 5 8 C】

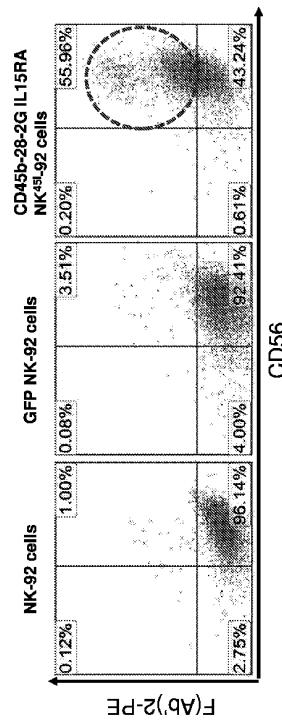


FIGURE 58C

10

20

30

40

【図 5 9 A】

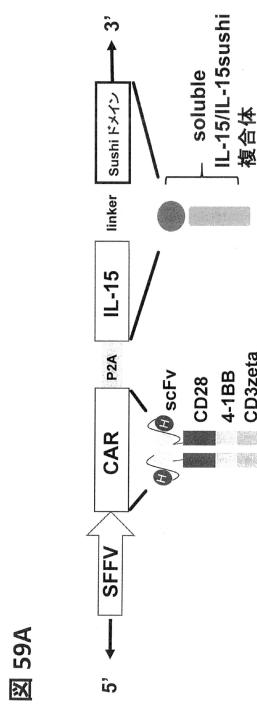


図 59A

【図 5 9 B】

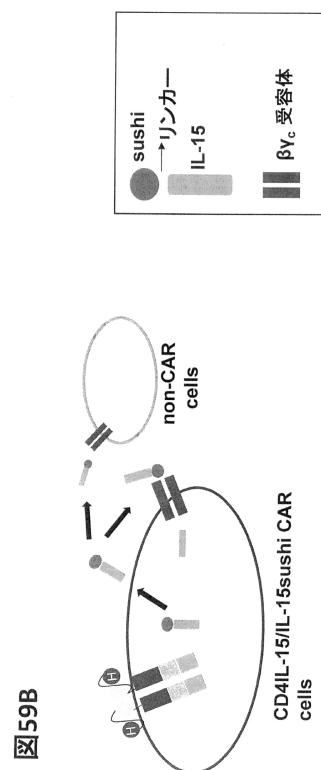
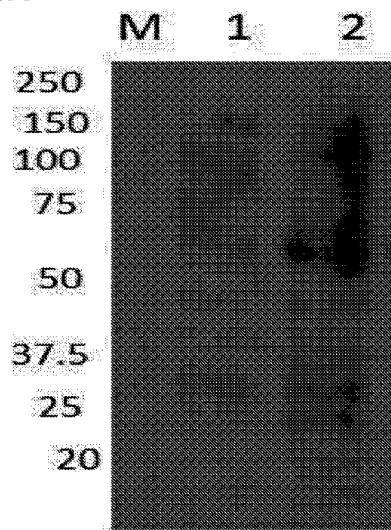


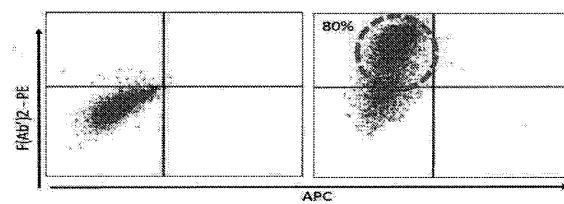
図 59B

50

【図 60 A】

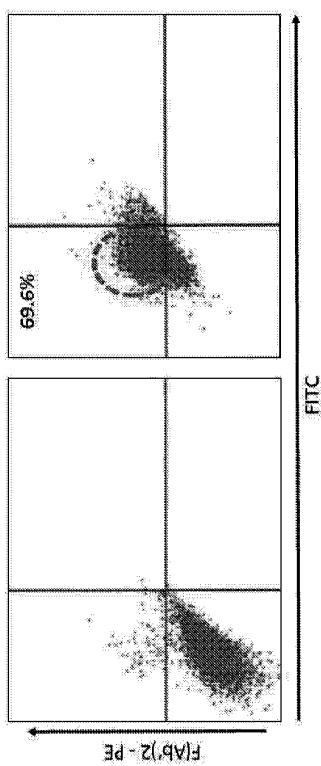
**FIGURE 60A**

【図 60 B】

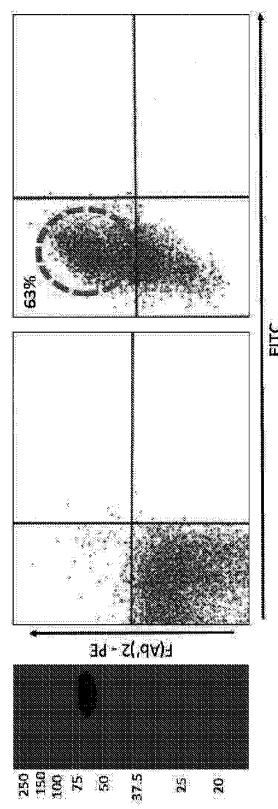
**FIGURE 60B**

10

【図 61】

**FIGURE 61**

【図 62】



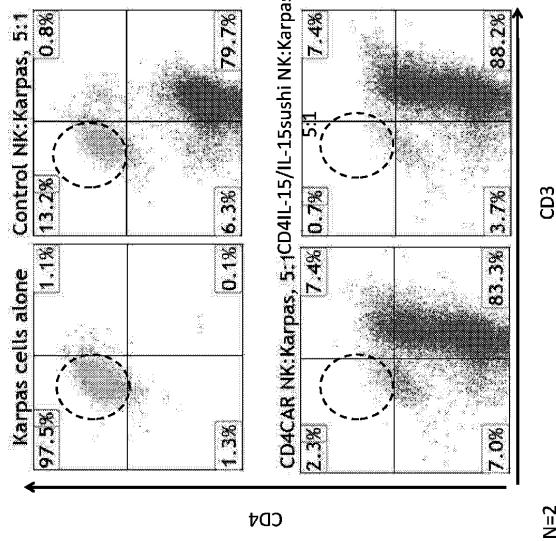
20

30

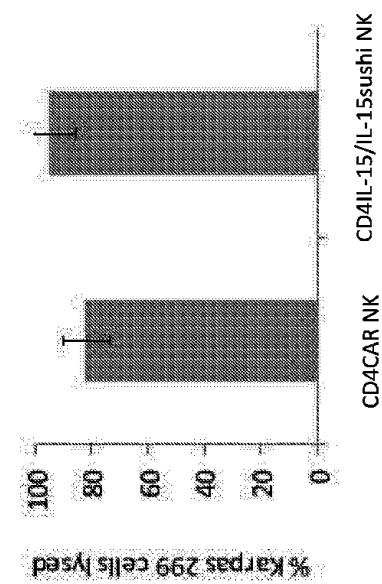
40

50

【図 6 3 A】



【図 6 3 B】

**FIGURE 63B**

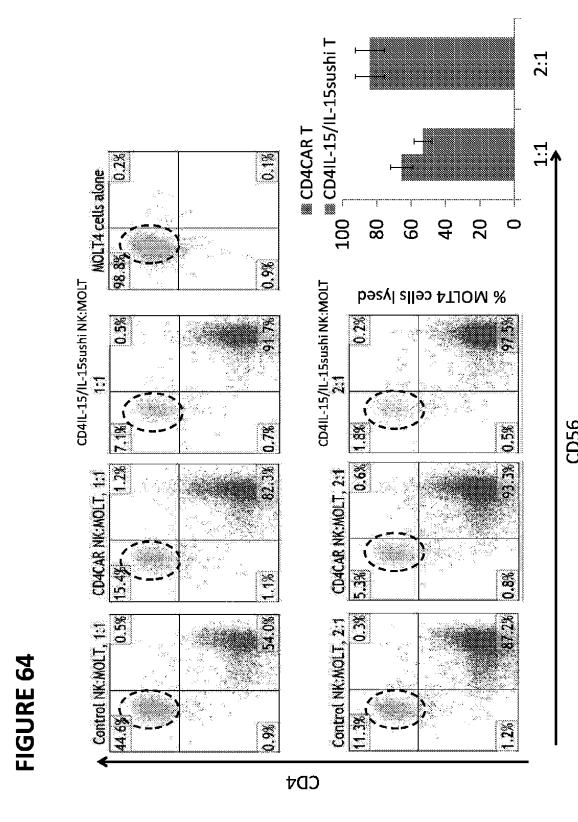
10

20

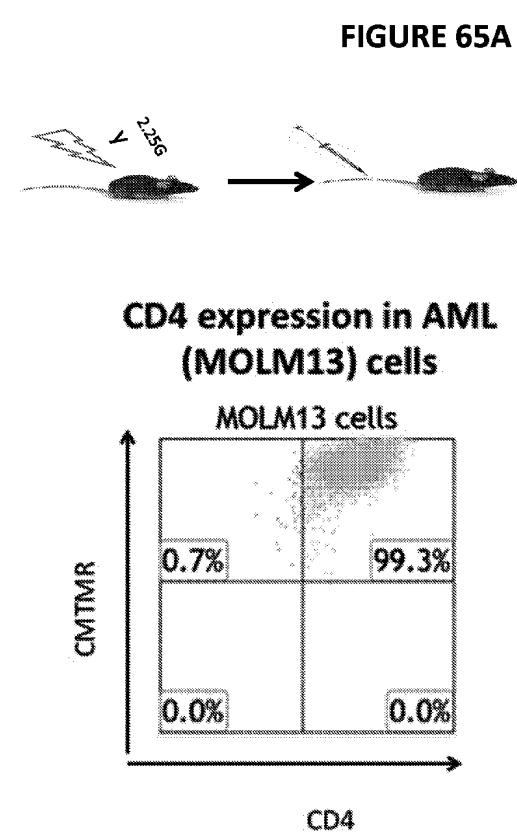
30

40

【図 6 4】



【図 6 5 A】

**FIGURE 65A**

10

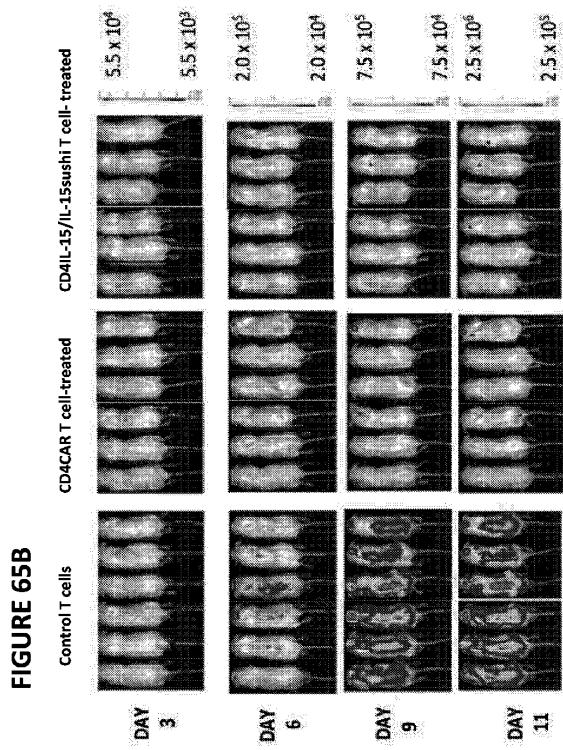
20

30

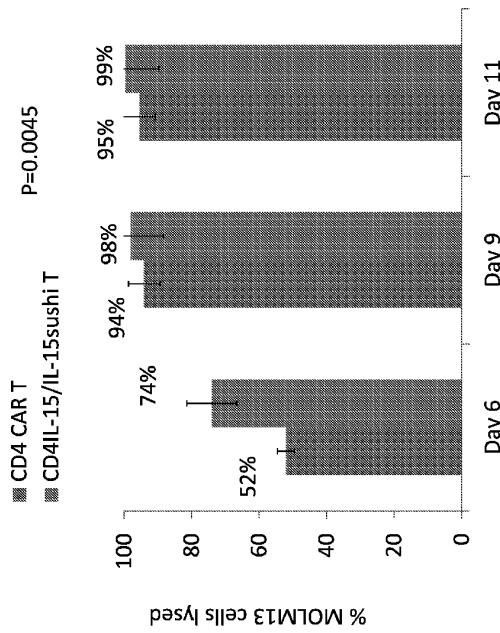
40

50

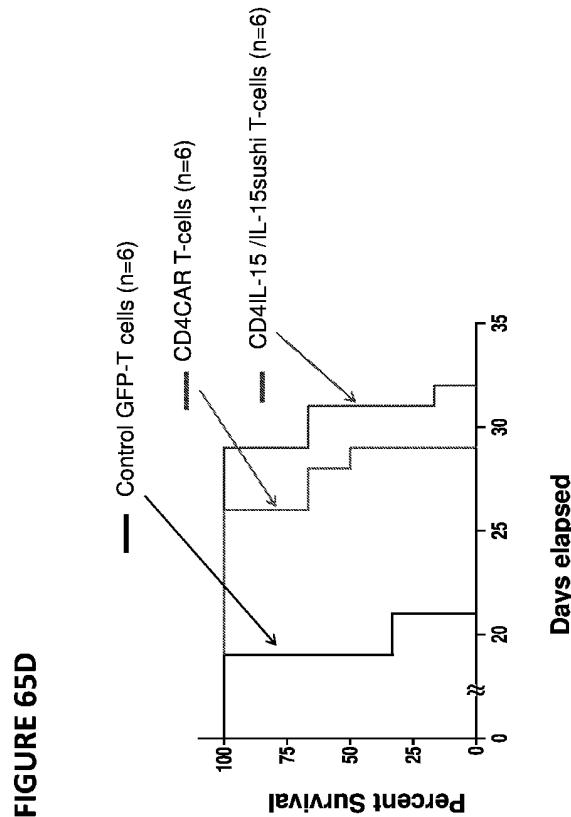
【図 6 5 B】



【図 6 5 C】



【図 6 5 D】



【図 6 6 A】

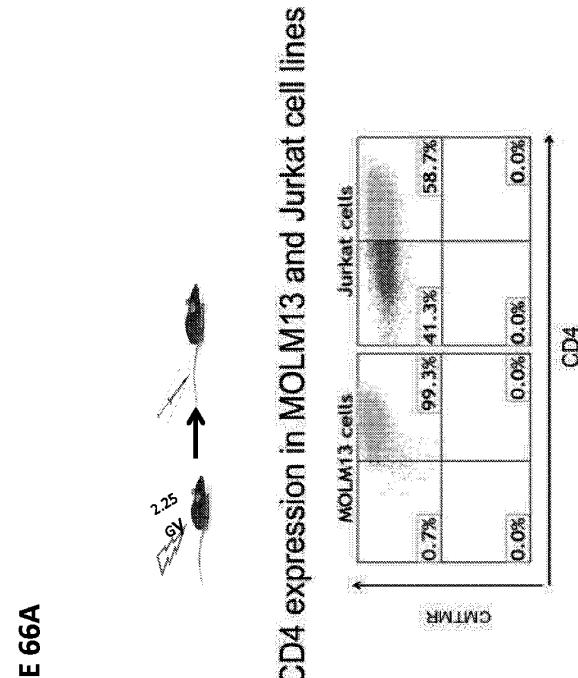
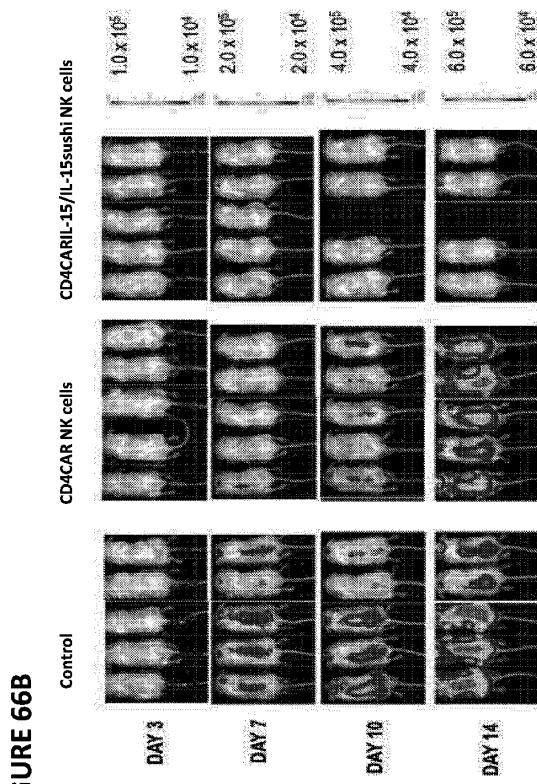


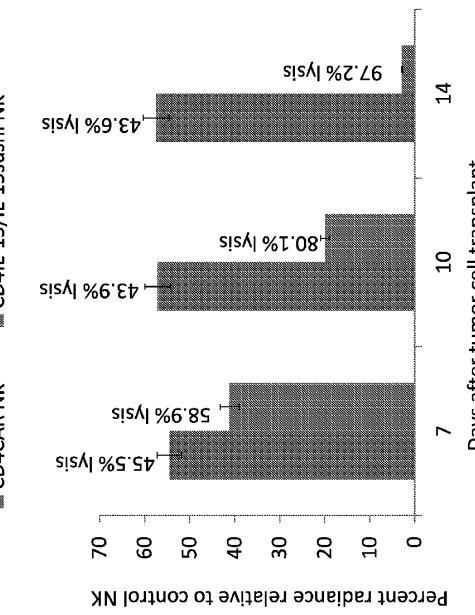
FIGURE 66B

10  
20  
30  
40  
50

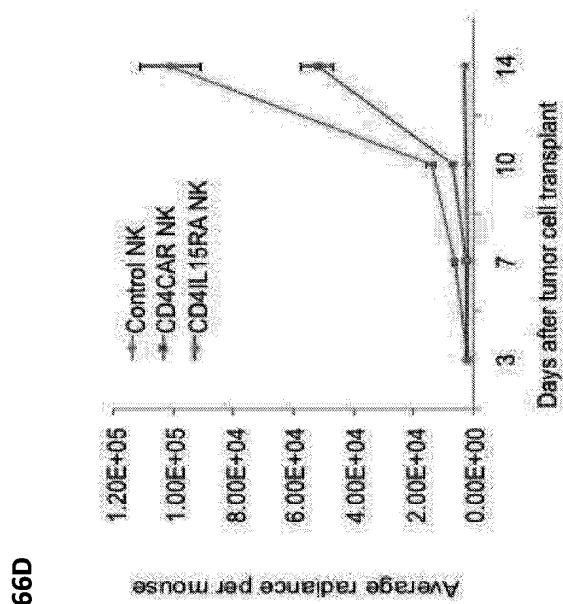
【図 6 6 B】



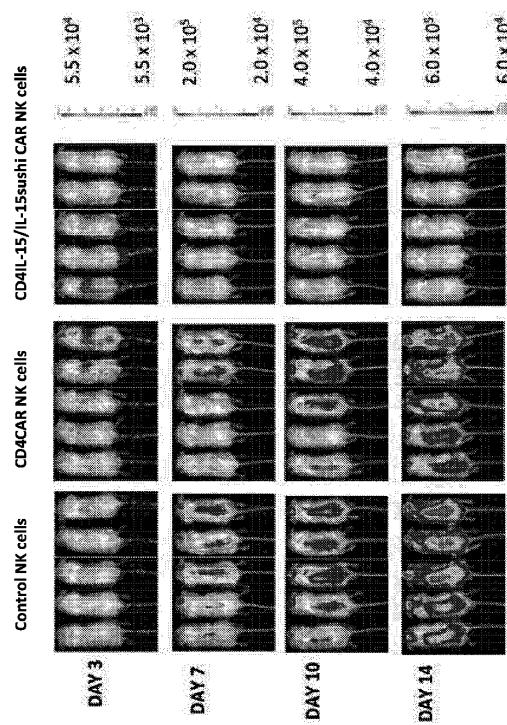
【図 6 6 C】



【図 6 6 D】



【図 6 7 A】



10

20

30

40

50

【図 6 7 B】

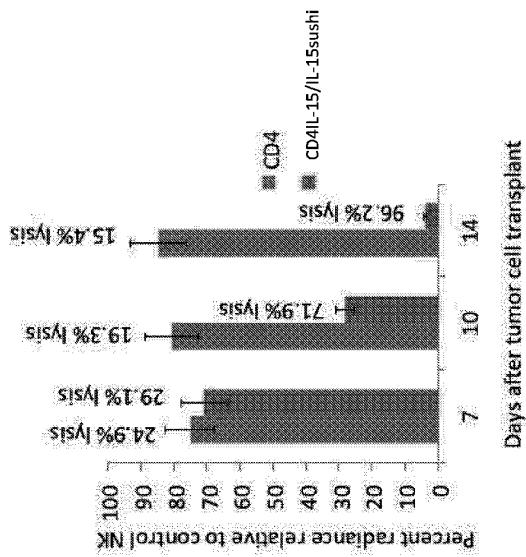
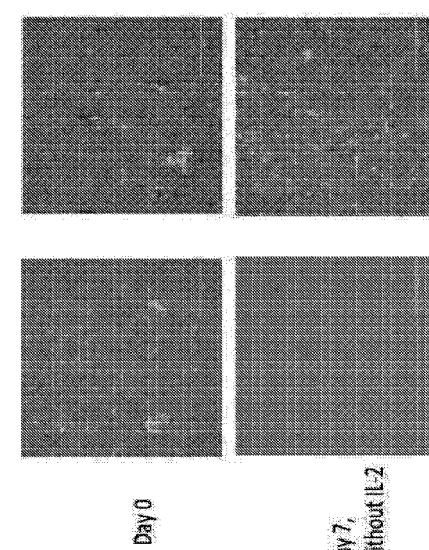


FIGURE 67B

【図 6 8 A】



10

20

30

40

【図 6 8 B】

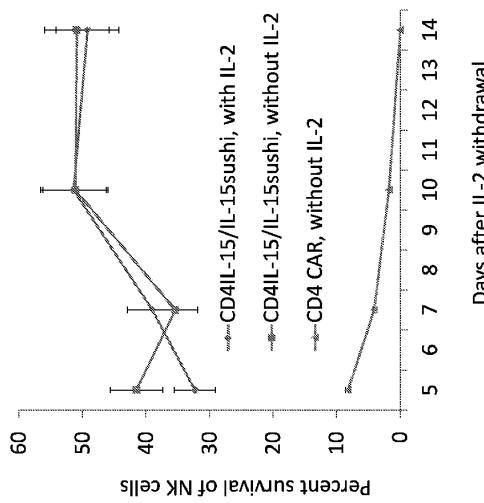
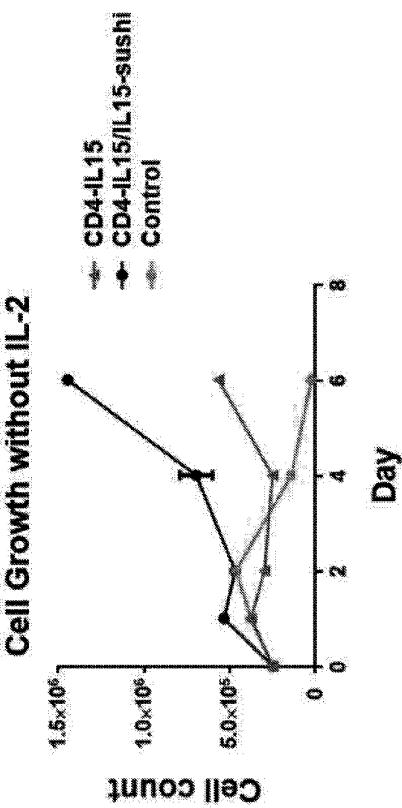


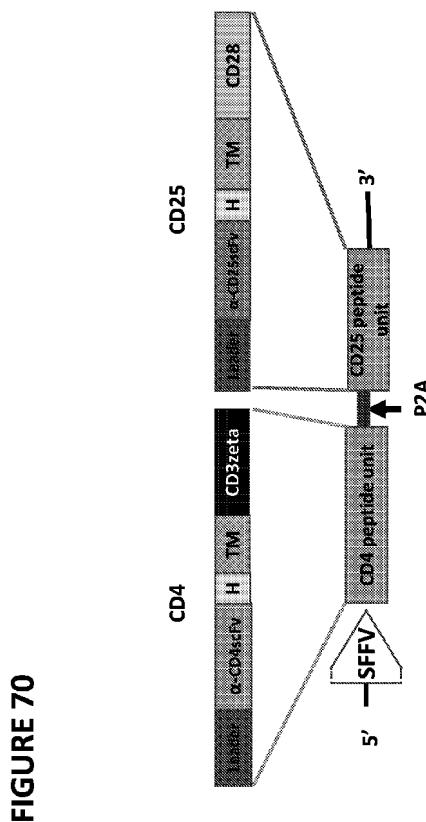
FIGURE 68B

【図 6 9】

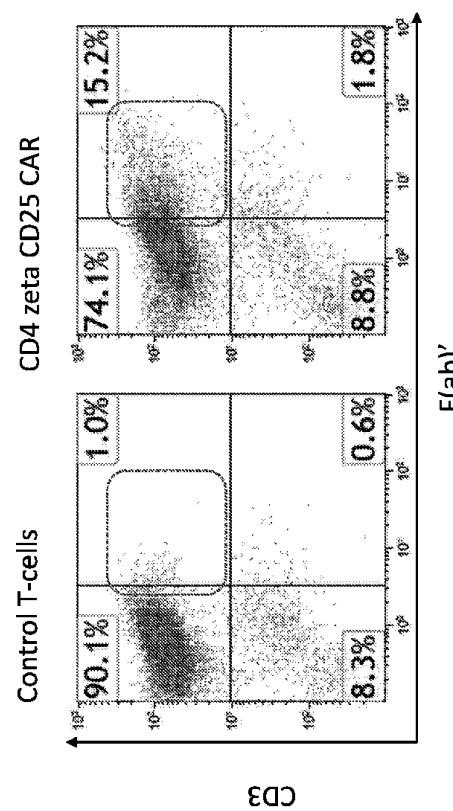


50

【図 7 0】

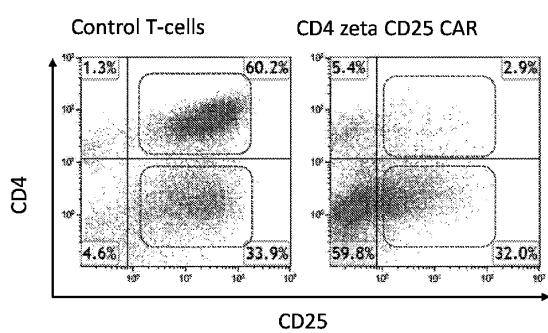


【図 7 1 A】

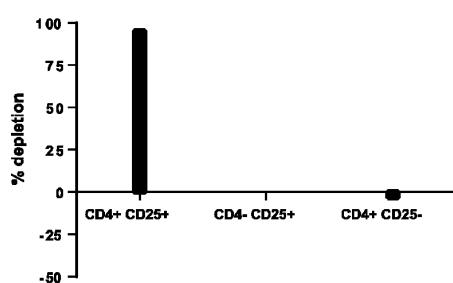
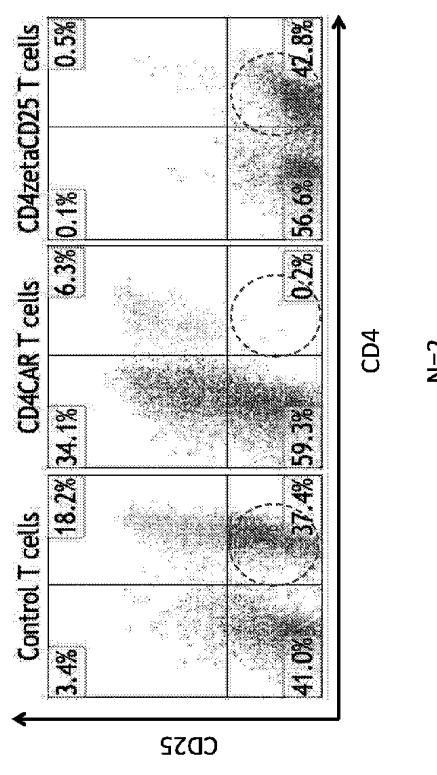


【図 7 1 B】

FIGURE 71B



【図 7 2】



10

20

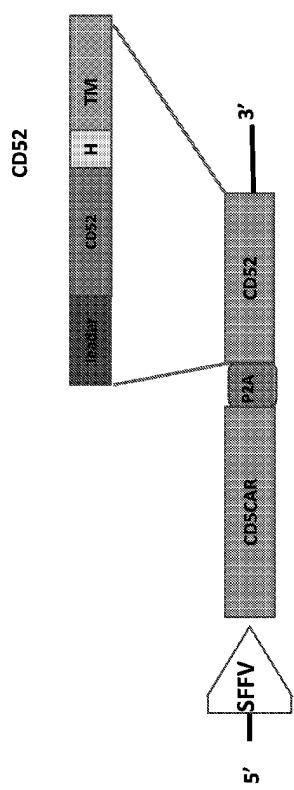
30

40

50

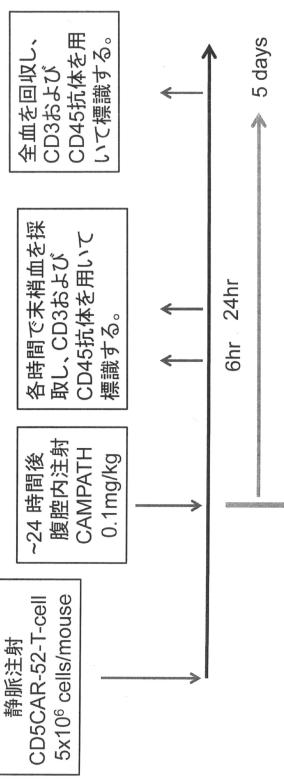
【図 7 3 A】

FIGURE 73A

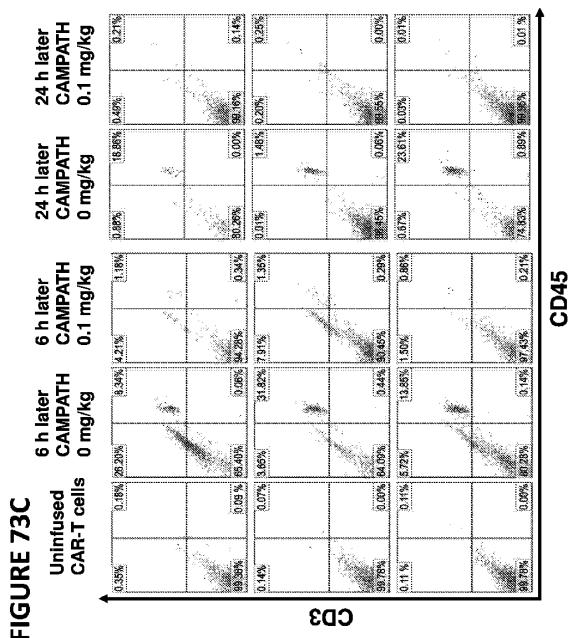


【図 7 3 B】

FIGURE 73B

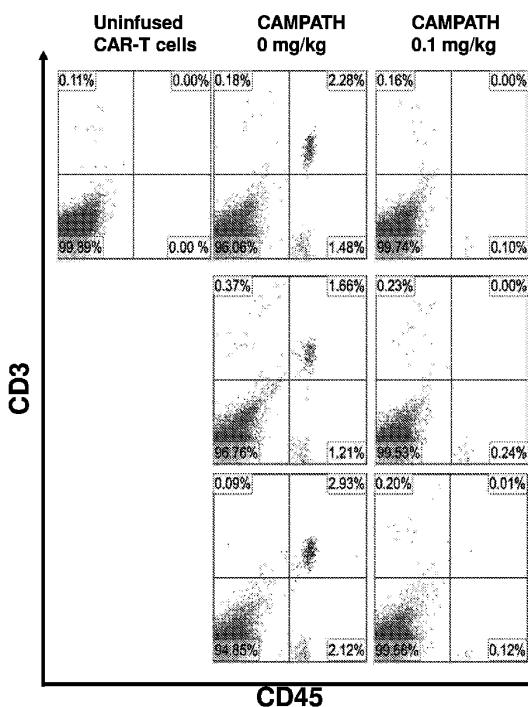


【図 7 3 C】



【図 7 3 D】

FIGURE 73D



10

20

30

40

50

【図 7 4】

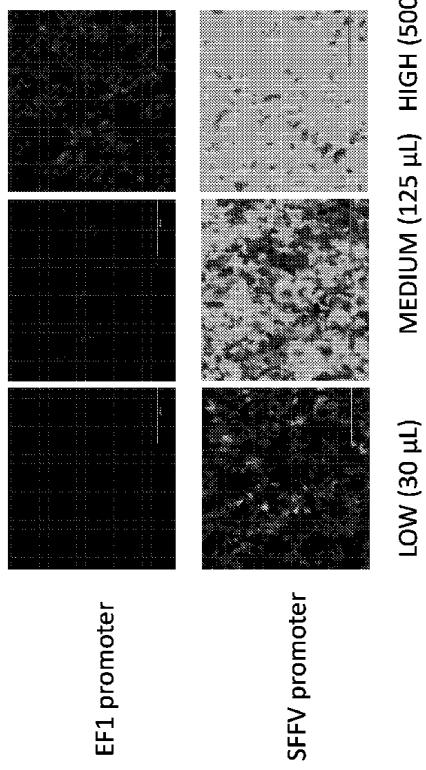


FIGURE 74

【図 7 5】

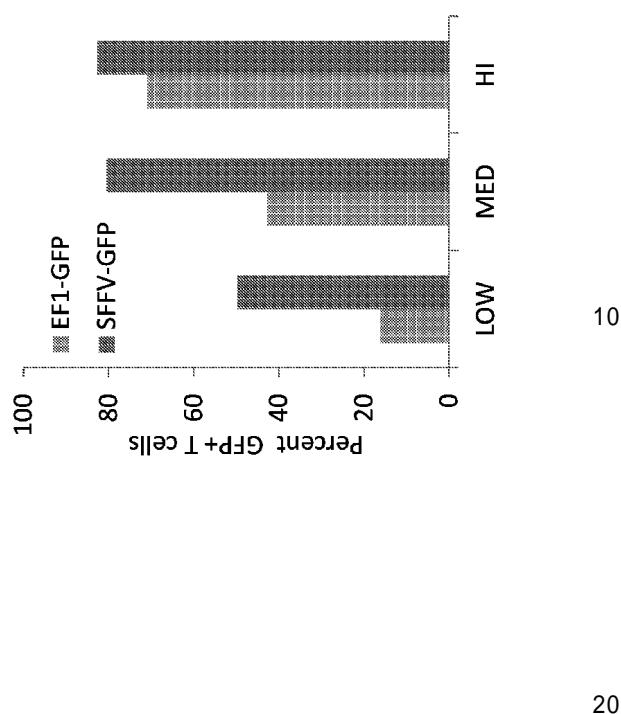


FIGURE 75

【図 7 6 A】

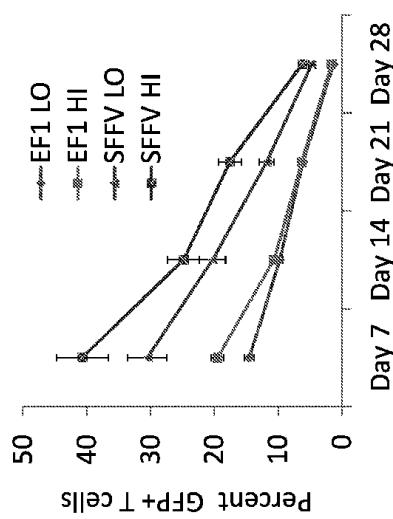


FIGURE 76A

【図 7 6 B】

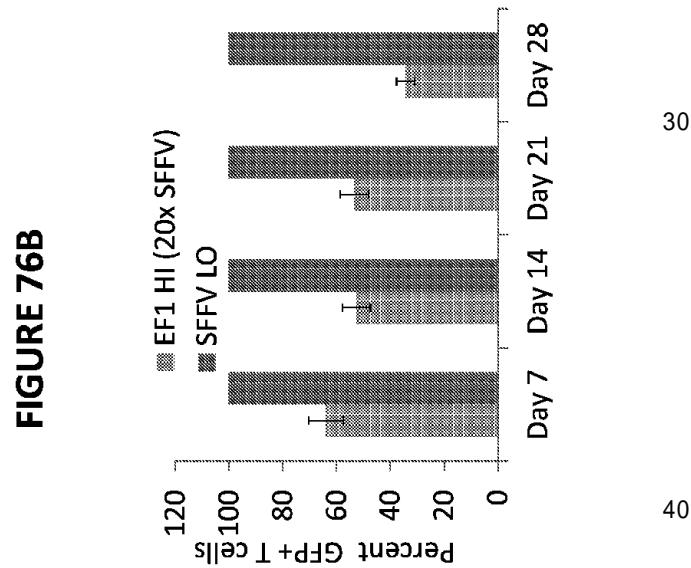


FIGURE 76B

【図 7 7】

FIGURE 77



FIGURE 79

【図 7 8】

Receptor

Ligand

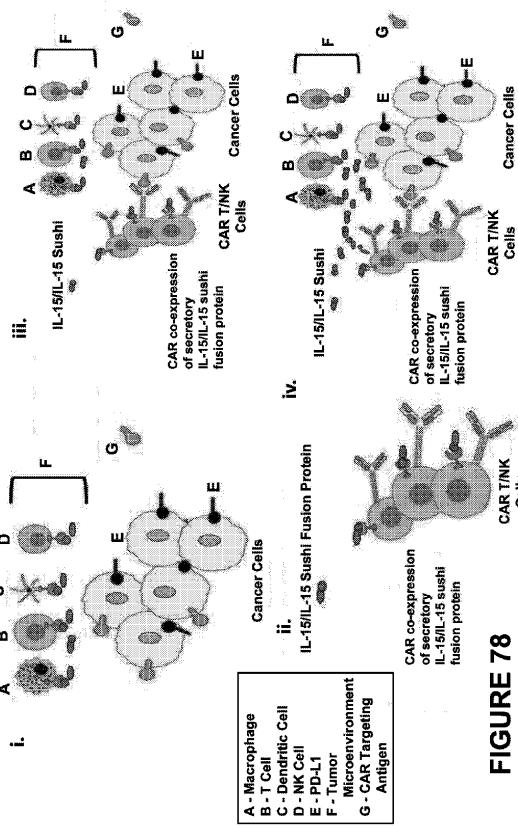
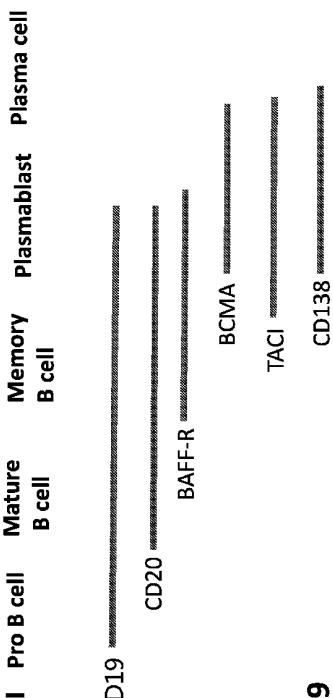


FIGURE 78

【図 7 9】



【図 8 0】

H. sapiens (human)	M Y R M Q L I S C T I A L S A L V T N S
M. mulatta (rhesus)	M Y R M Q L I S C T I A L S A L V T N S
B. taurus (bovine)	M Y K I Q I L I S C T I A L T L A I V A N G
O. cuniculus (rabbit)	M Y K V Q I L I S C T I A L T L A I L T S S
M. musculus (mouse)	M Y S M Q L I A S C V T I L T L V I L L V N S

H. sapiens (human)  
M. mulatta (rhesus)  
B. taurus (bovine)  
O. cuniculus (rabbit)  
M. musculus (mouse)

FIGURE 80

## 【図 8 1】

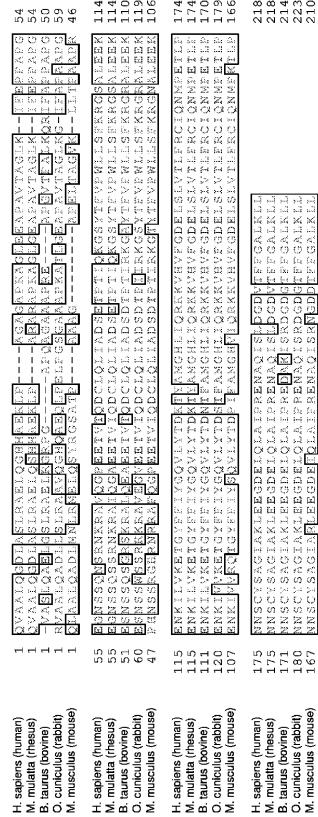


FIGURE 81

## 【配列表】

0007114490000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

	F I		
C 0 7 K	14/725 (2006.01)	C 0 7 K	14/725
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 N	5/0783(2010.01)	C 1 2 N	5/0783
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/06
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
		C 1 2 N	15/63
			Z

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

サイエンシズ・ドライブ・25・アイセル・ジーン・セラピューティクス・エルエルシー

## (72)発明者 ケヴィン・ピンズ

アメリカ合衆国・ニューヨーク・11790・ストーニー・ブルック・ヘルス・サイエンシズ・ドライブ・25・アイセル・ジーン・セラピューティクス・エルエルシー

## (72)発明者 シュン・ジャン

アメリカ合衆国・ニューヨーク・11790・ストーニー・ブルック・ヘルス・サイエンシズ・ドライブ・25・アイセル・ジーン・セラピューティクス・エルエルシー

## (72)発明者 マサユキ・ワダ

アメリカ合衆国・ニューヨーク・11790・ストーニー・ブルック・ヘルス・サイエンシズ・ドライブ・25・アイセル・ジーン・セラピューティクス・エルエルシー

## (72)発明者 ケヴィン・チェン

アメリカ合衆国・ニューヨーク・11790・ストーニー・ブルック・ヘルス・サイエンシズ・ドライブ・25・アイセル・ジーン・セラピューティクス・エルエルシー

審査官 山本 匠子

## (56)参考文献 特許第6961497(JP, B2)

特表2015-513394(JP, A)

米国特許出願公開第2015/0307623(US, A1)

米国特許出願公開第2003/0147865(US, A1)

国際公開第2015/168613(WO, A2)

国際公開第2015/120180(WO, A1)

国際公開第2016/073755(WO, A2)

国際公開第2016/044605(WO, A1)

特表2018-518974(JP, A)

## (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

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

C 0 7 K

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

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)