

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7438123号  
(P7438123)

(45)発行日 令和6年2月26日(2024.2.26)

(24)登録日 令和6年2月15日(2024.2.15)

|                        |                               |          |                          |
|------------------------|-------------------------------|----------|--------------------------|
| (51)国際特許分類             |                               | F I      |                          |
| C 1 2 N                | 15/62 (2006.01)               | C 1 2 N  | 15/62 Z Z N A            |
| C 1 2 N                | 15/12 (2006.01)               | C 1 2 N  | 15/12                    |
| C 1 2 N                | 15/13 (2006.01)               | C 1 2 N  | 15/13                    |
| C 1 2 N                | 15/63 (2006.01)               | C 1 2 N  | 15/63 Z                  |
| C 1 2 N                | 15/53 (2006.01)               | C 1 2 N  | 15/53                    |
| 請求項の数 49 (全54頁) 最終頁に続く |                               |          |                          |
| (21)出願番号               | 特願2020-548920(P2020-548920)   | (73)特許権者 | 515045617                |
| (86)(22)出願日            | 平成31年3月12日(2019.3.12)         |          | シアトル チルドレンズ ホスピタル (      |
| (65)公表番号               | 特表2021-518108(P2021-518108 A) |          | ディービーエイ シアトル チルドレンズ      |
| (43)公表日                | 令和3年8月2日(2021.8.2)            |          | リサーチ インスティテュート)          |
| (86)国際出願番号             | PCT/US2019/021823             |          | アメリカ合衆国 9 8 1 0 1 ワシントン  |
| (87)国際公開番号             | WO2019/178078                 |          | 州, シアトル, ナインス アベニュー      |
| (87)国際公開日              | 令和1年9月19日(2019.9.19)          |          | 1 9 0 0                  |
| 審査請求日                  | 令和4年3月10日(2022.3.10)          |          | 1 9 0 0 Ninth Ave. Sea   |
| (31)優先権主張番号            | 62/643,055                    |          | ttle, WA 9 8 1 0 1 U. S. |
| (32)優先日                | 平成30年3月14日(2018.3.14)         | (74)代理人  | A.                       |
| (33)優先権主張国・地域又は機関      | 米国(US)                        |          | 100077012                |
| 前置審査                   |                               | (72)発明者  | 弁理士 岩谷 龍                 |
|                        |                               |          | テンペラ, ジャコモ               |
|                        |                               |          | アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 0 1  |
|                        |                               |          | , シアトル, 9 ティーエイチ アベニュー   |
|                        |                               |          | 最終頁に続く                   |

(54)【発明の名称】 腫瘍特異的 T 細胞免疫療法用の I L - 1 3 受容体 α 2 ( I L 1 3 R α 2 ) 標的キメラ抗原受容体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

キメラ抗原受容体をコードする核酸であって、  
該キメラ抗原受容体が、  
IL-13 受容体 α 2 ( I L 1 3 R α 2 ) と結合するリガンド結合ドメイン；  
前記リガンド結合ドメインと膜貫通ドメインの間に位置し、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列または配列番号 9 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列からなるポリペプチドスパーサー；  
膜貫通ドメイン；および  
細胞内シグナル伝達領域  
を含み、  
前記リガンド結合ドメインが、  
配列番号 2 0 に示されるアミノ酸配列を有する相補性決定領域 ( C D R ) 1 ；  
配列番号 2 1 に示されるアミノ酸配列を有する C D R 2 ；および  
配列番号 2 2 に示されるアミノ酸配列を有する C D R 3 を含む、重鎖可変 ( V H ) ドメイン  
ならびに  
配列番号 2 3 に示されるアミノ酸配列を有する C D R 1 ；  
配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列を有する C D R 2 ；および  
配列番号 2 5 に示されるアミノ酸配列を有する C D R 3 を含む、軽鎖可変 ( V L ) ドメイン  
を含み、

前記膜貫通ドメインが、前記ポリペプチドスパーサーおよび前記細胞内シグナル伝達領域を連結している核酸。

【請求項 2】

前記VHドメインのアミノ酸配列が、配列番号 18 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 90% の同一性を有し、前記VLドメインのアミノ酸配列が、配列番号 19 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 90% の同一性を有する、請求項 1 に記載の核酸。

【請求項 3】

前記VHドメインのアミノ酸配列が、配列番号 18 に示されるアミノ酸配列を有し、前記VLドメインのアミノ酸配列が、配列番号 19 に示されるアミノ酸配列を有する、請求項 1 または 2 に記載の核酸。

【請求項 4】

前記リガンド結合ドメインが、抗体の抗原結合断片である、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の核酸。

【請求項 5】

前記リガンド結合ドメインが、一本鎖可変領域断片 (scFv) である、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の核酸。

【請求項 6】

前記scFvが、VL-VHの順で連結されたVLドメインおよびVHドメインを含む、請求項 5 に記載の核酸。

【請求項 7】

前記scFvが、配列番号 61 に示されるヌクレオチド配列と少なくとも 95% の同一性を有する配列を含む、請求項 5 または 6 に記載の核酸。

【請求項 8】

前記scFvが、配列番号 61 に示されるヌクレオチド配列を含む、請求項 5 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の核酸。

【請求項 9】

前記細胞内シグナル伝達領域が、第 1 シグナル伝達ドメインと共刺激シグナル伝達ドメインを含み、前記第 1 シグナル伝達ドメインが、CD3ζのシグナル伝達ドメインの全体またはその一部を含み、前記共刺激シグナル伝達ドメインが、CD27、CD28、4-1BB、OX-40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、LFA-1、CD2、CD7、NKG2C、B7-H3およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の核酸。

【請求項 10】

前記第 1 シグナル伝達ドメインが、CD3ζのシグナル伝達ドメインの一部であり、前記共刺激シグナル伝達ドメインが、4-1BBのシグナル伝達ドメインの一部である、請求項 9 に記載の核酸。

【請求項 11】

前記膜貫通ドメインが、CD28膜貫通ドメインを含む、請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の核酸。

【請求項 12】

マーカータンパク質をコードする配列をさらに含む、請求項 1 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の核酸。

【請求項 13】

前記マーカータンパク質が、末端切断型の上皮成長因子受容体、末端切断型のヒト上皮成長因子受容体 2、末端切断型の分化抗原群 (Cluster of Differentiation) 19 またはジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) である、請求項 12 に記載の核酸。

【請求項 14】

前記DHFRが、DHFRの二重変異体 (DHFRdm) である、請求項 13 に記載の核酸。

【請求項 15】

前記DHFRdmが、L22Fアミノ酸変異およびF31Sアミノ酸変異を含む、請求項 14 に記載の核酸。

10

20

30

40

50

## 【請求項 16】

請求項 1 ～ 15 のいずれか 1 項に記載の核酸を含む発現ベクター。

## 【請求項 17】

ウイルスベクターである、請求項 16 に記載の発現ベクター。

## 【請求項 18】

レンチウイルスベクターまたはアデノウイルスベクターである、請求項 16 または 17 に記載の発現ベクター。

## 【請求項 19】

請求項 1 ～ 15 のいずれか 1 項に記載の核酸によってコードされるキメラ抗原受容体 (CAR) ポリペプチド。

## 【請求項 20】

請求項 1 ～ 15 のいずれか 1 項に記載の核酸を含む細胞。

## 【請求項 21】

リンパ球である、請求項 20 に記載の細胞。

## 【請求項 22】

前記リンパ球が、CD45RA<sup>-</sup>、CD45RO<sup>+</sup>およびCD62L<sup>+</sup>の表現型を有する、請求項 21 に記載の細胞。

## 【請求項 23】

ナイーブCD8<sup>+</sup>T細胞、セントラルメモリーCD8<sup>+</sup>T細胞、エフェクターメモリーCD8<sup>+</sup>T細胞またはCD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞である、請求項 20 ～ 22 のいずれか一項に記載の細胞。

## 【請求項 24】

ナイーブCD4<sup>+</sup>T細胞、セントラルメモリーCD4<sup>+</sup>T細胞、エフェクターメモリーCD4<sup>+</sup>T細胞またはCD45RA<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>T細胞である、請求項 20 ～ 22 のいずれか一項に記載の細胞。

## 【請求項 25】

前駆T細胞である、請求項 20 に記載の細胞。

## 【請求項 26】

前記前駆T細胞が、造血幹細胞である、請求項 25 に記載の細胞。

## 【請求項 27】

請求項 20 ～ 26 のいずれか 1 項に記載の細胞と薬学的に許容されるキャリアを含む医薬組成物。

## 【請求項 28】

請求項 1 ～ 15 のいずれか 1 項に記載の核酸を含む遺伝子操作された細胞を作製する方法であって、

遺伝子操作された細胞を産生するために請求項 1 ～ 15 のいずれか 1 項に記載の核酸を細胞に導入する工程；

前記遺伝子操作された細胞を増殖させるのに十分な条件下において、抗CD3抗体および／または抗CD28抗体ならびに少なくとも 1 種の恒常性サイトカインの存在下で前記遺伝子操作された細胞を培養する工程；ならびに

増殖後の前記遺伝子操作された細胞を濃縮する工程を含む方法。

## 【請求項 29】

前記細胞がリンパ球である、請求項 28 に記載の方法。

## 【請求項 30】

前記リンパ球が、CD45RA<sup>-</sup>、CD45RO<sup>+</sup>およびCD62L<sup>+</sup>の表現型を有する、請求項 29 に記載の方法。

## 【請求項 31】

前記細胞が、ナイーブCD8<sup>+</sup>T細胞、セントラルメモリーCD8<sup>+</sup>T細胞、エフェクターメモリーCD8<sup>+</sup>T細胞またはCD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞である、

10

20

30

40

50

請求項 28～30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

前記細胞が、ナイーブ CD4+T 細胞、セントラルメモリー CD4+T 細胞、エフェクターメモリー CD4+T 細胞または CD45RA+CD62L+CD4+CD45RO-T 細胞である、請求項 28～30 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 33】

前記細胞が前駆 T 細胞である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 34】

前記前駆 T 細胞が、造血幹細胞である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記核酸が、マーカータンパク質をコードする配列をさらに含み、前記濃縮する工程が、マーカータンパク質の発現を選択する試薬と増殖後の前記遺伝子操作された細胞を培養する工程を含む、請求項 28～34 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

前記少なくとも 1 種の恒常性サイトカインが、IL-15、IL-7、IL-21 またはこれらの組み合わせである、請求項 28～35 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 37】

前記マーカータンパク質が、末端切断型の上皮成長因子受容体である、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 38】

IL-13 受容体  $\alpha 2$  を発現するがんの治療または抑制用の医薬品の製造における、請求項 20～26 のいずれか一項に記載の細胞の使用。

【請求項 39】

前記がんが脳がんを含む、請求項 38 に記載の使用。

【請求項 40】

前記脳がんが神経膠腫、神経膠芽腫または多形膠芽腫である、請求項 39 に記載の使用。

【請求項 41】

がんの治療用である、請求項 27 に記載の医薬組成物。

【請求項 42】

前記がんが IL13R $\alpha$  陽性の悪性腫瘍である、請求項 41 に記載の医薬組成物。

【請求項 43】

前記がんが脳がんである、請求項 41 または 42 に記載の医薬組成物。

【請求項 44】

前記脳がんが神経膠腫、神経膠芽腫または多形膠芽腫である、請求項 43 に記載の医薬組成物。

【請求項 45】

化学療法および放射線療法から選択される療法を受けている対象への投与用である、請求項 41～44 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 46】

前記化学療法が、電気化学療法、アルキル化剤、抗腫瘍抗生物質、トポイソメラーゼ阻害薬、分裂阻害薬、コルチコステロイド、DNA インターカレーター、チェックポイント阻害薬またはこれらの組み合わせを含む、請求項 45 に記載の医薬組成物。

【請求項 47】

前記化学療法が、5-フルオロウラシル (5-FU)、6-メルカプトプリン (6-MP)、カペシタビン、クラドリビン、クロファラビン、シタラビン、フロクスウリジン、フルダラビン、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、メトトレキサート、ペメトレキセド、ペントスタチン、チオグアニンまたはこれらの組み合わせを含む、請求項 45 に記載の医薬組成物。

【請求項 48】

哺乳動物への投与用である、請求項 41～47 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

10

20

30

40

50

## 【請求項 49】

ヒトへの投与用である、請求項 41～48 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

## 関連出願の相互参照

本出願は、2018年3月14日に出願された「腫瘍特異的 T 細胞免疫療法用の IL-13 受容体  $\alpha 2$  (IL13R $\alpha 2$ ) 標的キメラ抗原受容体」という名称の米国仮出願第 62/643055 号の優先権の利益を主張するものであり、この出願は引用によりその全体が本明細書に明示的に援用される。

10

## 【0002】

## 配列表の参照

本願は電子形式の配列表とともに出願されたものである。この配列表は、SCRI169WO SEQLIST のファイル名で 2019 年 3 月 12 日に作成された約 62kb のファイルとして提供されたものである。この電子形式の配列表に記載の情報は、参照によりその全体が本明細書に明示的に援用される。

## 【0003】

本明細書で提供する方法および組成物の実施形態のいくつかは、ヒト IL-13 受容体  $\alpha 2$  (IL13Ra2) の細胞外ドメインに特異的に結合するキメラ抗原受容体 (CAR)、この CAR を含む細胞、およびがん細胞 (固形腫瘍の細胞など) を標的とした細胞ベースの免疫療法に関する。

20

## 【背景技術】

## 【0004】

脳がんについての理解が一層深まってきているにもかかわらず、過去十年間において、死亡率は一定の水準のままであり、革新的な新規治療法が早急に必要とされている。CD19 を標的とした CAR 発現 T 細胞を B 細胞悪性腫瘍の患者に投与したところ、完全寛解が認められたという注目すべき臨床データの裏付けを元に、現在、T 細胞免疫療法は、がん療法として有望視されている。しかしながら、改善されたさらなる T 細胞免疫療法が依然として必要とされている。

## 【発明の概要】

30

## 【課題を解決するための手段】

## 【0005】

本明細書で提供する方法および組成物の実施形態のいくつかは、キメラ抗原受容体をコードする核酸であって、該キメラ抗原受容体が、

IL-13 受容体  $\alpha 2$  (IL13R $\alpha 2$ ) と結合および／または相互作用するリガンド結合ドメイン；

前記リガンド結合ドメインと膜貫通ドメインの間に位置するポリペプチドスパーサー；  
膜貫通ドメイン；および  
細胞内シグナル伝達領域  
を含むことを特徴とする核酸を含む。

40

## 【0006】

いくつかの実施形態において、前記リガンド結合ドメインは、  
配列番号 20 のアミノ酸配列もしくはその保存的変異配列を有する重鎖相補性決定領域 1 (CDR1)；

配列番号 21 のアミノ酸配列もしくはその保存的変異配列を有する重鎖相補性決定領域 2 (CDR2)；および／または

配列番号 22 のアミノ酸配列もしくはその保存的変異配列を有する重鎖相補性決定領域 3 (CDR3)  
を含む。

## 【0007】

50

いくつかの実施形態において、前記リガンド結合ドメインは、  
配列番号 23 のアミノ酸配列もしくはその保存的変異配列を有する軽鎖相補性決定領域  
1 (CDR1) ;

配列番号 24 のアミノ酸配列もしくはその保存的変異配列を有する軽鎖相補性決定領域  
2 (CDR2) ; および／または

配列番号 25 のアミノ酸配列もしくはその保存的変異配列を有する軽鎖相補性決定領域  
3 (CDR3)  
を含む。

【0008】

いくつかの実施形態において、前記リガンド結合ドメインは、配列番号 18 のアミノ酸  
配列と少なくとも 90 % の同一性を有するポリペプチドを含む重鎖可変 (VH) ドメインを  
含む。

10

【0009】

いくつかの実施形態において、前記リガンド結合ドメインは、配列番号 19 のアミノ酸  
配列と少なくとも 90 % の同一性を有するポリペプチドを含む軽鎖可変 (VL) ドメインを  
含む。

【0010】

いくつかの実施形態において、前記リガンド結合ドメインは、

配列番号 20 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR1 ;

配列番号 21 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR2 ; および／または

配列番号 22 のアミノ酸配列を有する重鎖 CDR3

を含む。

20

【0011】

いくつかの実施形態において、前記リガンド結合ドメインは、

配列番号 23 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR1 ;

配列番号 24 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR2 ; および／または

配列番号 25 のアミノ酸配列を有する軽鎖 CDR3

を含む。

【0012】

いくつかの実施形態において、前記リガンド結合ドメインは、配列番号 18 のアミノ酸  
配列を有するポリペプチドを含む VH ドメインを含む。

30

【0013】

いくつかの実施形態において、前記リガンド結合ドメインは、配列番号 19 のアミノ酸  
配列を有する VL ドメインを含む。

【0014】

いくつかの実施形態において、前記リガンド結合ドメインは、抗原結合断片などの抗体  
断片である。

【0015】

いくつかの実施形態において、前記リガンド結合ドメインは、一本鎖可変領域断片 (sc  
Fv) である。いくつかの実施形態において、前記 scFv は、VL-VH の順で連結された VL  
ドメインおよび VH ドメインを含む。いくつかの実施形態において、前記一本鎖可変領域断  
片 (scFv) は、配列番号 61 のヌクレオチド配列と少なくとも 95 % の同一性を有する配  
列を含む。いくつかの実施形態において、前記一本鎖可変領域断片 (scFv) は、配列番号  
61 のヌクレオチド配列を含む。

40

【0016】

いくつかの実施形態において、前記スペーサーは、アミノ酸配列 X<sub>1</sub> P P X<sub>2</sub> P を含む。

【0017】

いくつかの実施形態において、前記スペーサー領域は、ヒト抗体のヒンジ領域の一部ま  
たはその改変バリエーションを含む。

【0018】

50

いくつかの実施形態において、前記スペーサーは、15アミノ酸長以下であり、かつ1アミノ酸長以上または2アミノ酸長以上である。

【0019】

いくつかの実施形態において、前記スペーサーは、配列番号9のアミノ酸配列と少なくとも95%の同一性を有する配列を含むか、この配列からなるか、実質的にこの配列からなる。いくつかの実施形態において、前記スペーサーは、配列番号9のアミノ酸配列またはその保存的置換配列を含むか、これらの配列のいずれかからなるか、実質的にこれらの配列のいずれかからなる。

【0020】

いくつかの実施形態において、前記スペーサーは、IgG4ヒンジスペーサー（短いスペーサー）を含むか、このスペーサーからなるか、実質的にこのスペーサーからなる。

【0021】

いくつかの実施形態において、前記スペーサーは、IgG4ヒンジ-CH3スペーサー（中程度の長さのスペーサー）を含むか、このスペーサーからなるか、実質的にこのスペーサーからなる。

【0022】

いくつかの実施形態において、前記スペーサーは、IgG4ヒンジ-CH2（L234D、N297A）-CHEスペーサー（長いスペーサー）を含むか、このスペーサーからなるか、実質的にこのスペーサーからなる。

【0023】

いくつかの実施形態において、前記細胞内シグナル伝達領域は、第1シグナル伝達ドメインと共刺激シグナル伝達ドメインを含み、該細胞内シグナル伝達領域は、CD3ζの全体またはその一部と、CD27、CD28、4-1BB、OX-40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、LFA-1、CD2、CD7、NKG2CおよびB7-H3のそれぞれのシグナル伝達ドメインならびにこれらの組み合わせからなる群から選択される共刺激シグナル伝達ドメインとの組み合わせを含んでいてもよい。

【0024】

いくつかの実施形態において、前記細胞内シグナル伝達領域は、CD3ζのシグナル伝達部分と4-1BBのシグナル伝達部分を含む。

【0025】

いくつかの実施形態において、前記膜貫通ドメインは、CD28膜貫通ドメイン（CD28tm）を含む。

【0026】

いくつかの実施形態は、マーカー配列をコードする核酸を含む。いくつかの実施形態において、前記マーカー配列は、末端切断型受容体であり、EGFRt、HER2tまたはCD19tであってもよい。

【0027】

いくつかの実施形態は、メトトレキサートにより選択できるように構成されたジヒドロ葉酸還元酵素をコードする導入遺伝子をさらに含む。いくつかの実施形態において、前記ジヒドロ葉酸還元酵素をコードする導入遺伝子は、ジヒドロ葉酸還元酵素の二重変異体（DHFRdm）である。いくつかの実施形態において、ジヒドロ葉酸還元酵素の二重変異体は、L22Fアミノ酸変異およびF31Sアミノ酸変異を含む。

【0028】

本明細書で提供する方法および組成物の実施形態のいくつかは、本明細書で提供する実施形態のいずれかによる核酸を含む発現ベクターを含む。いくつかの実施形態において、前記ベクターはウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、前記ベクターは、レンチウイルスベクターまたはアデノウイルスベクターである。

【0029】

本明細書で提供する方法および組成物の実施形態のいくつかは、本明細書で提供する実施形態のいずれかによる核酸によってコードされるキメラ抗原受容体（CAR）ポリペプチ

10

20

30

40

50

ドを含む。

【0030】

本明細書で提供する方法および組成物の実施形態のいくつかは、本明細書で提供する実施形態のいずれかによる核酸を含む宿主細胞を含む。

【0031】

いくつかの実施形態において、前記宿主細胞は、ナイーブCD8+T細胞、セントラルメモリーCD8+T細胞、エフェクターメモリーCD8+T細胞およびバルクCD8+T細胞からなる群から選択されるCD8+細胞傷害性Tリンパ球である。いくつかの実施形態において、前記CD8+細胞傷害性Tリンパ球は、セントラルメモリーT細胞であり、該セントラルメモリーT細胞は、CD45RO+、CD62L+およびCD8+である。

10

【0032】

いくつかの実施形態において、前記宿主細胞は、ナイーブCD4+T細胞、セントラルメモリーCD4+T細胞、エフェクターメモリーCD4+T細胞およびバルクCD4+T細胞からなる群から選択されるCD4+ヘルパーTリンパ球である。いくつかの実施形態において、前記CD4+ヘルパーリンパ球は、ナイーブCD4+T細胞であり、該ナイーブCD4+T細胞は、CD45RA+、CD62L+およびCD4+であり、かつCD45RO-である。

【0033】

いくつかの実施形態において、前記宿主細胞は前駆T細胞である。

【0034】

20

いくつかの実施形態において、前記宿主細胞は造血幹細胞である。

【0035】

本明細書で提供する方法および組成物の実施形態のいくつかは、本明細書で提供する実施形態のいずれかによる宿主細胞と薬学的に許容される添加剤を含む医薬組成物を含む。

【0036】

本明細書で提供する方法および組成物の実施形態のいくつかは、本明細書で提供する実施形態のいずれかによる宿主細胞を作製する方法であって、

本明細書で提供する実施形態のいずれかによる核酸を細胞に導入する工程；

前記細胞を増殖させるのに十分な条件下において、抗CD3抗体および／または抗CD28抗体ならびに少なくとも1種の恒常性サイトカインの存在下で前記細胞を培養する工程；

30

ならびに  
前記核酸または該核酸を含むベクターで形質導入した細胞を選択的に濃縮できるように構成された選択試薬で前記細胞を選択する工程  
を含む方法を含む。

【0037】

いくつかの実施形態において、前記細胞はリンパ球である。いくつかの実施形態において、前記リンパ球は、CD45RA-、CD45RO+およびCD62L+の表現型を有する。いくつかの実施形態において、前記リンパ球はCD8+またはCD4+である。

【0038】

いくつかの実施形態において、前記選択試薬はメトトレキサートである。

40

【0039】

いくつかの実施形態において、前記サイトカインは、IL-15、IL-7および／またはIL-21である。

【0040】

いくつかの実施形態は、マーカータンパク質をコードする第2の核酸を前記宿主細胞に導入する工程をさらに含む。いくつかの実施形態において、前記マーカータンパク質はEGFRである。

【0041】

本明細書で提供する方法および組成物の実施形態のいくつかは、医薬品において使用するため、またはIL-13受容体α2を発現するがんもしくは固形腫瘍の治療もしくは抑制に

50

において使用するための、本明細書で提供する実施形態のいずれかによる宿主細胞を含む。いくつかの実施形態において、前記がんは脳がんを含む。いくつかの実施形態において、前記がんは神経膠腫または神経膠芽腫である。いくつかの実施形態において、前記がんは多形膠芽腫（GBM）である。いくつかの実施形態において、前記がんは神経膠腫である。

#### 【0042】

本明細書で提供する方法および組成物の実施形態のいくつかは、対象においてがんを治療、抑制または緩和する方法であって、がんの治療、抑制または緩和が必要な対象に、本明細書で提供する実施形態のいずれかによる宿主細胞を投与する工程を含む方法を含む。いくつかの実施形態において、前記がんはIL13R $\alpha$ 陽性の悪性腫瘍である。いくつかの実施形態において、前記がんは脳がんである。いくつかの実施形態において、前記がんは神経膠腫または神経膠芽腫である。いくつかの実施形態において、前記がんは神経膠腫である。いくつかの実施形態において、前記がんは多形膠芽腫（GBM）である。いくつかの実施形態において、前記対象は哺乳動物である。いくつかの実施形態において、前記対象はヒトである。

#### 【0043】

いくつかの実施形態は、化学療法および放射線療法から選択される付加療法を投与する工程をさらに含む。いくつかの実施形態において、前記化学療法薬は、電気化学療法、アルキル化剤、代謝拮抗薬（たとえば、5-フルオロウラシル（5-FU）、6-メルカプトプリン（6-MP）、カペシタビン（ゼローダ（登録商標））、クラドリビン、クロファラビン、シタラビン（Ara-C（登録商標））、フロクスウリジン、フルダラビン、ゲムシタビン（ジェムザール（登録商標））、ヒドロキシウレア、メトトレキサート、ペメトレキセド（アリムタ（登録商標））、ペントスタチンおよびチオグアニン）、抗腫瘍抗生物質、トポイソメラーゼ阻害薬、分裂阻害薬、コルチコステロイド、DNAインターカレーターまたはチェックポイント阻害薬（チェックポイントキナーゼCHK1、CHK2）を含む。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0044】

【図1】IL-13R $\alpha$ 2標的CARの特定の実施形態の概略図と、これらのIL-13R $\alpha$ 2標的CARの実施形態の構築に使用した構成成分を示す。これらのIL-13R $\alpha$ 2特異的CARは、2種の抗体（「hu08」（Ab01）および「hu07」（Ab02））のいずれかに由来するVHドメインとVLドメインをリンカーで連結した、IL-13受容体 $\alpha$ 2（IL-13R $\alpha$ 2）の細胞外エピソードを特異的に認識する様々な一本鎖可変領域断片（scFv）のうちのいずれか1つ；様々なスペーサドメインのうちのいずれか1つ（「S」、「M」または「L」で示す）；ヒトCD28に由来する膜貫通ドメイン（CD28tm）；ヒト4-1BBに由来する共刺激ドメイン；CD3 $\zeta$ に由来するシグナル伝達ドメイン；T2Aリボソームスキップ配列；および末端切断型EGFR（EGFRt）形質導入マーカーを含み、任意でさらなるT2Aリボソームスキップ配列と、メトトレキサートにより選択できるように構成されたジヒドロ葉酸還元酵素の二重変異体（DHFRdm）をコードする導入遺伝子を含んでいた。

#### 【0045】

【図2A】図1に示した様々なCARを形質導入したCD8<sup>+</sup>T細胞（上パネル）またはCD4<sup>+</sup>T細胞（下パネル）におけるEGFRtの発現のフローサイトメトリー分析を示す。各パネルとも、上段から下段の順に、mock T細胞；スペーサーSを含むIL-13Ra2 Ab01 VL-VH CARを導入したT細胞；スペーサーSを含むIL-13Ra2 Ab01 VH-VL CARを導入したT細胞；スペーサーSを含むIL-13Ra2 Ab02 VL-VH CARを導入したT細胞；およびスペーサーSを含むIL-13Ra2 Ab02 VH-VL CARを導入したT細胞を示す。

#### 【0046】

【図2B】グラフに示した様々な標的細胞とともにインキュベートした場合の、様々なCARを形質導入したCD8<sup>+</sup>T細胞からのサイトカインの産生（IL-2、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ ）を分析したグラフを示す。各凡例は、mock T細胞；スペーサーSを含むIL-13Ra2 Ab01 VL-VH CARを導入したT細胞；スペーサーSを含むIL-13Ra2 Ab01 VH-VL CARを導入したT細胞；スペーサーSを含むIL-13Ra2 Ab02 VL-VH CARを導入したT細胞；および

スペーサー S を含む IL-13R $\alpha$ 2 Ab02 VH-VL CAR を導入した T 細胞を示す。

【0047】

【図2C】グラフに示した様々な標的細胞とともにインキュベートした場合の、様々なCARを形質導入したCD4+T細胞からのサイトカインの産生（IL-2、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ ）を分析したグラフを示す。各凡例は、mock T細胞；スペーサー S を含む IL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VL-VH CAR を導入した T細胞；スペーサー S を含む IL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VH-VL CAR を導入した T細胞；スペーサー S を含む IL-13R $\alpha$ 2 Ab02 VL-VH CAR を導入した T細胞；およびスペーサー S を含む IL-13R $\alpha$ 2 Ab02 VH-VL CAR を導入した T細胞を示す。

【0048】

【図3A】IL-13R $\alpha$ 2 hu08 CAR を健常ドナー由来の T細胞に形質導入し、マルチパラメータフローサイトメトリーで分析した結果を示す。ヒストグラムの4分割線はコントロール染色に基づいて設定した（上パネルおよび中央パネル）。さらに、CAR を形質導入した CD8+T細胞における EGFRt の発現をフローサイトメトリーで分析した結果を示す（下パネル）。グラフに示した CAR は、mock；スペーサー S を含む IL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VL-VH CAR；スペーサー M を含む IL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VL-VH CAR；スペーサー L を含む IL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VL-VH CAR；スペーサー S を含む IL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VH-VL CAR；スペーサー M を含む IL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VH-VL CAR；およびスペーサー L を含む IL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VH-VL CAR であった。

【0049】

【図3B】グラフに示した特定の標的細胞と共培養した CAR 含有 CD8+T細胞によるサイトカインの産生と細胞溶解活性を分析した結果を示す。グラフに示した CAR は、mock；スペーサー S を含む IL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VL-VH CAR；スペーサー M を含む IL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VL-VH CAR；スペーサー L を含む IL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VL-VH CAR；スペーサー S を含む IL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VH-VL CAR；スペーサー M を含む IL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VH-VL CAR；およびスペーサー L を含む IL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VH-VL CAR であった。

【0050】

【図4A】溶媒、mock細胞、抗 IL-13R $\alpha$ 2 CAR を含む  $2 \times 10^6$  個の T細胞；抗 IL-13R $\alpha$ 2 CAR を含む  $1 \times 10^6$  個の T細胞；または抗 IL-13R $\alpha$ 2 CAR を含む  $0.5 \times 10^6$  個の T細胞で治療したマウスにおいて、腫瘍負荷を示す尺度としての全流束（光子／秒）（y軸）の経時変化（腫瘍接種後の経過日数、x軸）を分析したグラフを示す。抗 IL-13R $\alpha$ 2 CAR として、スペーサー S を含む IL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VL-VH CAR を使用した。

【0051】

【図4B】抗 IL-13R $\alpha$ 2 CAR（スペーサー S を含む IL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VL-VH CAR）を発現する T細胞の投与量を徐々に増加して治療したマウスのカプランマイヤー生存曲線を示す。

【0052】

【図5A】mock細胞；短いスペーサーを含む抗 IL-13R $\alpha$ 2 CAR を含む  $2 \times 10^6$  個の T細胞；中程度の長さのスペーサーを含む抗 IL-13R $\alpha$ 2 CAR を含む  $2 \times 10^6$  個の T細胞；または長いスペーサーを含む抗 IL-13R $\alpha$ 2 CAR を含む  $2 \times 10^6$  個の T細胞で治療したマウスにおいて、腫瘍負荷を示す尺度としての全流束（光子／秒）（y軸）の経時変化（腫瘍接種後の経過日数、x軸）を分析したグラフを示す。

【0053】

【図5B】長いスペーサー、中程度の長さのスペーサーまたは短いスペーサーを含む抗 IL-13R $\alpha$ 2 CAR を発現する T細胞で治療したマウスのカプランマイヤー生存曲線を示す。

【0054】

【図5C】長いスペーサー、中程度の長さのスペーサーまたは短いスペーサーを含む抗 IL-13R $\alpha$ 2 CAR を発現する T細胞で治療したマウスの生物発光データの曲線下面積（AUC）の分析を示す。様々な長さのスペーサーバリエントを含む IL13R $\alpha$ 2 Ab01 CAR T細胞と Mock T細胞の間で AUC の平均値を比較した。\*、 $P < 0.05$ ；\*\*、 $P < 0.01$ ；\*\*\*\*、 $P < 0.0001$ 。

10

20

30

40

50

## 【発明を実施するための形態】

## 【0055】

本明細書で提供する方法および組成物の実施形態のいくつかは、IL13Ra2標的キメラ抗原受容体（CAR）（たとえばIL-13R $\alpha$ 2に特異的な第2世代CARなど）、該CARを含む細胞、該CARをコードする核酸、該CARを使用した関連する治療方法および該CARの使用を含む。本明細書で提供するCARとして、様々な構成成分またはドメインの特定の組み合わせを有するCARが挙げられ、たとえば、CARの機能が最適化されたものが挙げられる。いくつかの態様において、IL13Ra2 CARで標的化したT細胞療法は、現在実施されているIL-13R $\alpha$ 2特異的ながん療法および非特異的ながん療法の代替療法または補助療法（併用療法など）として使用することもできる。

## 【0056】

IL-13R $\alpha$ 2は、転移性または後期のBasal-like乳がん（BLBC）において過剰発現されることが過去に報告されている（Papageorgis et al. Breast Cancer Research, 2015; 17 (1); この文献は引用によりその全体が本明細書に明示的に援用される）。また、公的に利用可能なデータに基づいて、無増悪生存期間の予測とIL-13R $\alpha$ 2の高発現の間での相関関係が見出されている。また、肺に急速に拡散する傾向のあるBLBCのサブタイプでは、IL-13R $\alpha$ 2が高発現することが観察されている。さらに、IL-13R $\alpha$ 2は、ヒト神経膠腫細胞の増殖を刺激し、Src/PI3K/Akt/mTORシグナル伝達経路を介した転移も刺激することが判明している（Tu et al. Tumour Biol. 2016 Nov; 37(11):14701-14709; この文献は引用によりその全体が本明細書に明示的に援用される）。たとえばキメラ受容体を使用した治療法などの、IL13Ra2を標的とした治療法が過去に報告されている（たとえば、Brown et al Clin Cancer Res 2015; Brown et al N Engl J Med 2016; Brown et al Mol Ther 2017; WO2014072888(A1)を参照されたい; これらの文献では、がん治療用の抗IL-13受容体 $\alpha$ 2（IL-13-Ra2）抗体および抗体-薬物複合体が報告されている; これらの文献は引用によりその全体が本明細書に明示的に援用される）。このような治療法として、IL13変異体（たとえばE13Y）に基づく結合ドメインまたは抗原認識ドメイン（たとえばzetakineなど）を使用した治療法やこれらのドメインを含む治療法がある。

## 【0057】

いくつかの実施形態において、本発明により提供されるCARならびに該CARを使用した方法および該CARの使用は、特定の結合ドメインとその他の特定の成分を含むCAR（たとえば特定のスペーサドメインを含む治療剤など）が、神経膠芽腫またはそのモデルにおいて特に有利な活性および／またはインビボ抗がん作用を示したという本明細書で述べる観察結果に部分的に基づくものである。いくつかの態様において、本発明により提供される組成物、方法および使用は、神経膠芽腫および／またはその他のIL-13R $\alpha$ 2陽性悪性腫瘍の治療、抑制または予防に使用される。いくつかの態様において、本明細書で提供するCARは、様々な点においてその他のCARとは異なるものであり、たとえば、分子構造の1つ以上の特徴が異なり、たとえば、本発明により提供されるCARの結合ドメインによって特異的に認識され、該CARの標的となるIL-13R $\alpha$ 2のエピトープが異なる。

## 【0058】

本明細書で提供する実施形態は、本発明のCAR-T細胞が、インビトロにおいて神経膠芽腫細胞株に対し抗腫瘍活性を示すとともに、異種移植片モデルの腫瘍の増殖に対しても抑制能を示し、いくつかの点において、分子構造が異なるその他の様々なCARよりも強力な作用を示したという本明細書に記載の観察結果（たとえば本明細書に記載の前臨床試験における観察結果など）に部分的に基づくものである。これらの知見に基づき、脳腫瘍およびその他のIL-13R $\alpha$ 2陽性がんのための免疫療法において、このようなCARを含む組成物を商用利用することも想定される。

## 【0059】

用語の定義

本明細書において「核酸」または「核酸分子」という用語は、本明細書に照らせば、一

10

20

30

40

50

一般的な通常の意味を有し、たとえば、ポリヌクレオチドが挙げられ、たとえば、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）、オリゴヌクレオチド、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により得られる断片、およびライゲーション、切断、エンドヌクレアーゼ作用またはエキソヌクレアーゼ作用により得られる断片などが挙げられるが、これらに限定されない。核酸分子は、天然のヌクレオチドモノマー（DNA、RNAなど）、または天然のヌクレオチドの類似体（たとえば、天然のヌクレオチドのエナンチオマー）からなるモノマー、またはこれらの組み合わせから構成されていてもよい。修飾ヌクレオチドは、糖部分および／またはピリミジン塩基部分もしくはプリン塩基部分に修飾を有していてもよい。糖部分の修飾としては、たとえば、ハロゲン、アルキル基、アミンまたはアジド基による1つ以上のヒドロキシル基の置換が挙げられ、糖部分はエーテル化またはエステル化されていてもよい。さらに、糖部分全体が、立体構造的に類似の構造や電子的に類似の構造と置換されていてもよく、このような構造として、たとえば、アザ糖および炭素環式糖類似体が挙げられる。修飾塩基部分としては、アルキル化プリン、アルキル化ピリミジン、アシル化プリン、アシル化ピリミジン、およびその他の公知の複素環置換基が挙げられる。核酸モノマーは、ホスホジエステル結合またはこれと似た結合により連結することができる。ホスホジエステル結合と似た結合としては、ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合、ホスホロセレノエート結合、ホスホロジセレノエート結合、ホスホロアニロチオエート（phosphoroanilothioate）結合、ホスホロアニリデート（phosphoranilidate）結合、ホスホロアミデート結合などが挙げられる。「核酸分子」は、いわゆる「ペプチド核酸」も包含し、これは、ポリアミド主鎖に付加された天然の核酸塩基または修飾核酸塩基を含む。核酸は、一本鎖であってもよく、二本鎖であってもよい。いくつかの実施形態において、タンパク質をコードする核酸配列を提供する。いくつかの実施形態において、前記核酸はRNAまたはDNAである。

#### 【0060】

本明細書において「キメラ抗原受容体」という用語は、本明細書に照らせば、一般的な通常の意味を有し、たとえば、前記疾患または障害に関連する分子と結合する抗体配列またはその他のタンパク質配列のリガンド結合ドメインが、スペーサードメインを介して、特定の細胞（T細胞など）またはその他の受容体の1つ以上の細胞内シグナル伝達ドメイン（たとえば共刺激ドメイン）に連結された合成設計受容体が挙げられるが、これに限定されない。キメラ受容体は、人工細胞受容体、人工T細胞受容体、キメラ細胞受容体、キメラT細胞受容体、キメラ免疫受容体、および／またはキメラ抗原受容体（CAR）とも呼ぶことができる。レトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターなどのベクターを使用してキメラ受容体のコード配列を細胞（好ましくはT細胞）に移入することによって、モノクローナル抗体またはその結合断片の特異性を細胞（好ましくはT細胞）に移植することができる。いくつかの例において、CARは、特定の細胞表面抗原を発現する標的細胞へT細胞を指向させるために設計された遺伝子組換えT細胞受容体であってもよい。養子細胞移入と呼ばれる方法によって、まず対象からT細胞を得た後、抗原に対して特異性を発揮することができる受容体を発現できるようにT細胞を遺伝子操作する。次いで、このT細胞を患者に再導入する。再導入されたT細胞は抗原を認識し標的とすることができる。CARは、免疫受容体を発現する細胞に任意の特異性を移植することができる遺伝子組換え受容体でもある。研究者によっては、キメラ抗原受容体すなわち「CAR」は、抗体または抗体断片（好ましくは抗体の抗原結合断片）、スペーサー、シグナル伝達ドメインおよび膜貫通領域を含むものであると理解されている。本明細書に記載のCARは、様々な構成成分またはドメイン（たとえばエピトープ結合領域（たとえば抗体断片、scFvまたはそれらの一部）、スペーサー、膜貫通ドメインおよび／またはシグナル伝達ドメインなど）が遺伝子組換えされており、これによって驚くべき効果が得られたことから、本明細書の開示全体においてCARの構成成分をそれぞれ別個のものとして区別できることが多い。CARに含まれる様々な構成要素は様々なバリエーションを有することから、たとえば、このようなバリエーションによって、特定のエピトープまたは抗原に対する結合親和性が増強される。

10

20

30

40

50

## 【0061】

ベクターを使用してCARのコード配列をT細胞に移入することによって、モノクローナル抗体またはその結合断片もしくはscFvの特異性をT細胞に移植することができる。治療が必要な対象を治療するためにCARを使用する場合、養子細胞移入と呼ばれる技術が使用される。この技術では、治療対象からT細胞を採取し、得られたT細胞を遺伝子操作して、抗原に特異的なCARを発現させる。CARの発現により抗原の認識とその標的化が可能になったT細胞を患者に再導入する。

## 【0062】

いくつかの実施形態において「膜貫通ドメイン」は、細胞膜の二重層を貫通する疎水性タンパク質領域であり、生体膜に埋め込まれるタンパク質を繋ぎ止める役割を果たす。膜貫通ドメインのトポロジーは、膜貫通型の $\alpha$ ヘリックスであってもよいが、これに限定されない。キメラ抗原受容体の実施形態のいくつかにおいて、該キメラ抗原受容体は、膜貫通ドメインをコードする配列を含む。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメインは、CD28膜貫通配列またはその断片を含み、このCD28膜貫通配列またはその断片は、10アミノ酸長、11アミノ酸長、12アミノ酸長、13アミノ酸長、14アミノ酸長、15アミノ酸長、16アミノ酸長、17アミノ酸長、18アミノ酸長、19アミノ酸長、20アミノ酸長、21アミノ酸長、22アミノ酸長、23アミノ酸長、24アミノ酸長、25アミノ酸長、26アミノ酸長、27アミノ酸長もしくは28アミノ酸長、またはこれらの長さのいずれか2つによって定義される範囲内の長さである。いくつかの実施形態において、CD28膜貫通配列またはその断片は、28アミノ酸長である。

## 【0063】

いくつかの実施形態において、第1シグナル伝達ドメインや共刺激シグナル伝達ドメインなどのシグナル伝達ドメインとして、細胞内の成分と相互作用するタンパク質または受容体タンパク質の細胞内ドメインまたは細胞質内ドメインが挙げられ、これらの細胞内ドメインは、シグナルを中継するか、シグナルの中継に関与することができる。いくつかの態様において、このような相互作用は、エフェクター分子またはエフェクタータンパク質との特異的なタンパク質-タンパク質相互作用またはタンパク質-リガンド相互作用を介した細胞内ドメインによる情報伝達によって起こり、次いでシグナル伝達の連鎖反応が起こることによって、その目的地へとシグナルを送ることができる。いくつかの実施形態において、シグナル伝達ドメインとして、共刺激ドメインが挙げられる。いくつかの態様において、共刺激ドメインとしては、T細胞にシグナルを提供するシグナル伝達部分が挙げられ、このシグナル伝達部分は、たとえばTCR/CD3複合体のCD3 $\zeta$ 鎖などによって提供される第1シグナルに加えて、たとえば、免疫応答、活性化、増殖、分化、サイトカイン分泌、細胞溶解活性、パーフォリン活性および／またはグランザイム活性などのT細胞エフェクター応答などの応答を増強するシグナルをT細胞に提供する。いくつかの実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインおよび／または共刺激ドメインとして、CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2Cおよび／もしくはB7-H3の全体もしくはその一部、ならびに／またはCD83に特異的に結合するリガンドの全体もしくはその一部を挙げることができる。

## 【0064】

本明細書において「抗体」という用語は、本明細書に照らせば、一般的な通常の意味を有し、たとえば、形質細胞によって産生されるY字型の大きなタンパク質であって、免疫系において細菌やウイルスなどの異物を特定し、それらを中和する機能を有するタンパク質が挙げられるが、これに限定されない。いくつかの文脈において「抗体」は、抗体の抗原結合断片を指す。抗体タンパク質は4つのポリペプチド鎖、すなわち、ジスルフィド結合により連結された同一の重鎖2本と同一の軽鎖2本を含んでいてもよい。それぞれの重鎖および軽鎖は、免疫グロブリンドメインと呼ばれる構造ドメインから構成される。これらのドメインは70～110個のアミノ酸を含むことができ、そのサイズおよび機能により様々なカテゴリーに分類される。キメラ抗原受容体は、抗体断片（好ましくは抗原結合

断片)を含むリガンド結合ドメインを含むことができる。

いくつかの実施形態において、キメラ抗原受容体 (CAR) をコードする核酸であって、  
a) IL-13受容体  $\alpha 2$  (IL13R $\alpha 2$ ) と結合および／または相互作用するリガンド結合ドメインをコードする第1のポリヌクレオチド、  
b) 前記リガンド結合ドメインがIL-13受容体  $\alpha 2$  (IL13R $\alpha 2$ ) と相互作用するのに十分な長さのポリペプチドスパーサーをコードする第2のポリヌクレオチド、  
c) 膜貫通ドメインをコードする第3のポリヌクレオチド、ならびに  
d) 細胞内シグナル伝達ドメインをコードする第4のポリヌクレオチド  
を含む核酸を提供する。

いくつかの実施形態において、前記リガンド結合ドメインは抗体断片である。

【0065】

本明細書において「一本鎖可変領域断片」または「scFv」という用語は、本明細書に照らせば、一般的な通常の意味を有し、たとえば、短いリンカーペプチドで連結された免疫グロブリンの重鎖可変領域 (VH) と軽鎖可変領域 (VL) を含む融合タンパク質が挙げられるが、これに限定されない。本発明を何ら限定するものではないが、このリンカーは、柔軟性を得るためにグリシンを含んでいてもよく、溶解性を得るために親水性アミノ酸 (たとえばセリンまたはトレオニン) を含んでいてもよい。前記リンカーは、VHのN末端とVLのC末端を連結することができ、あるいはVHのC末端とVLのN末端を連結することもできる。いくつかの実施形態において、CAR上に存在するリガンド結合ドメインは、一本鎖可変領域断片 (scFv) である。いくつかの実施形態において、CAR上に存在するscFvドメインは、腫瘍細胞上に存在するIL-13受容体  $\alpha 2$  (IL13R $\alpha 2$ ) に特異的である。

【0066】

いくつかの実施形態において、本発明の組成物、細胞およびベクターは、マーカー配列または該マーカー配列をコードする核酸を含み、マーカー配列として、たとえば、細胞の標識となるタンパク質を挙げることができる。本発明の細胞の実施形態のいくつかにおいて、本発明の細胞は、この細胞上に発現される特定のキメラ抗原タンパク質のマーカータンパク質を共発現する。本明細書で提供する細胞の実施形態のいくつかにおいて、キメラ抗原受容体は、特定のマーカータンパク質と共発現される。本明細書で提供する細胞の実施形態のいくつかにおいて、該細胞は、キメラ抗原受容体をコードする核酸を含む。マーカーとして選択マーカー配列を挙げることができ、たとえば、人為的な選択を可能とする特性を付与するために、ベクターまたは細胞に導入される遺伝子が挙げられる。選択マーカー配列またはマーカー配列は、スクリーニング可能なマーカーであってもよく、このようなマーカー配列を使用することによって、研究者が所望とする細胞と所望としない細胞を区別すること、または特定の種類の細胞を濃縮することが可能となる。いくつかの実施形態において、細胞表面選択マーカーをコードするマーカー配列を含むキメラ抗原受容体をコードするベクターを提供する。本明細書に記載の実施形態において、フローサイトメトリーなどの実験において選択可能なマーカー配列を含んでいてもよい融合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態において、マーカーは、Her2tGタンパク質またはEGFRtタンパク質である。

【0067】

メトトレキサート (MTX) として、たとえば、代謝拮抗薬および葉酸代謝拮抗薬が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの態様において、メトトレキサート (MTX) は、葉酸の代謝を抑制することによって作用する。いくつかの実施形態において、養子T細胞免疫療法用の遺伝子組換えマルチプレックスT細胞を作製する方法を提供する。最も広い範囲において、本発明の方法は、本明細書に記載の実施形態のいずれかによる遺伝子送達ポリヌクレオチドを提供する工程、および選択試薬を加えることによって、前記遺伝子送達ポリヌクレオチドを含む細胞の選択する工程を含んでいてもよい。本明細書に記載の実施形態のいくつかにおいて、前記選択試薬は選択剤を含む。いくつかの実施形態において、前記選択試薬はMTXである。

【0068】

本明細書において「ジヒドロ葉酸還元酵素」または「DHFR」という用語は、本明細書に照らせば、一般的な通常の意味を有し、たとえば、NADPHを電子ドナーとして使用してジヒドロ葉酸をテトラヒドロ葉酸に還元する酵素が挙げられるが、これに限定されず、このテトラヒドロ葉酸は、C1転移反応に使用されるテトラヒドロ葉酸由来の補因子に変換されうる。本明細書の実施形態のいくつかにおいて、遺伝子送達ポリヌクレオチドを提供する。いくつかの実施形態において、前記遺伝子送達ポリヌクレオチドは、ジヒドロ葉酸還元酵素の二重変異体（DHFRdm）をコードする少なくとも1つの選択マーカーカセットを含む。

#### 【0069】

いくつかの実施形態において、コドンの最適化などによって改変または最適化された構築物および配列を提供し、コドンの最適化として、たとえば、所望の細胞（好ましくはヒト細胞）におけるタンパク質の発現効率を最大限まで高めることができることが知られているコドンへと特定のコドンを変更する設計プロセスが挙げられるが、これに限定されない。いくつかの実施形態において、コドンの最適化が述べられており、当業者に公知のアルゴリズムを使用してコドンを最適化することによって、タンパク質の収率が上昇するように最適化された合成遺伝子転写産物を作製することができる。コドン最適化のためのアルゴリズムを含むプログラムは当業者に公知である。このようなプログラムとしては、たとえば、OptimumGene™アルゴリズム、GeneGPS（登録商標）アルゴリズムが挙げられる。さらに、コドンが最適化された合成配列は、たとえば、Integrated DNA Technologies社および他のDNAシーケンシングサービスから市販品として入手できる。いくつかの実施形態において、ヒトにおける発現のためにコドンが最適化された、完全長の遺伝子転写産物をコードする遺伝子の核酸配列について述べる。いくつかの実施形態において、前記遺伝子は、特にヒト細胞におけるタンパク質の発現が最大限まで上昇するように選択されたコドンを有するように最適化されており、このように選択されたコドンによって、T細胞におけるタンパク質またはCARの濃度を上昇させることができる。

#### 【0070】

コドンを最適化することによって、ポリヌクレオチドの二次構造の形成を減少させることもできる。いくつかの実施形態において、コドンを最適化することによって、全体のGC/AT比を低下させることもできる。コドンの最適化を厳密に行うと、望ましくない二次構造が形成されたり、あるいは望ましくないGC含量となって二次構造が形成されたりする場合がある。このような二次構造は、転写効率に影響を与える。コドン使用頻度の最適化を行った後にGeneOptimizerなどのプログラムを使用することによって、二次構造の形成を回避したり、GC含量を最適化したりすることができる。このようなさらなるプログラムは、最初のコドン最適化を行った後にさらに最適化を実施したり、トラブルシューティングを行うために使用することができ、それによって、1回目の最適化の後で起こりうる二次構造の形成を制限することができる。最適化用のその他のプログラムは当業者に公知である。いくつかの実施形態において、前記核酸は、ヒトにおける発現および／または二次構造の除去および／または全体のGC/AT比の低下を目的としてコドン最適化された配列を含む。いくつかの実施形態において、前記配列は、二次構造の形成を回避するために最適化されている。いくつかの実施形態において、前記配列は、全体のGC/AT比が低下するように最適化されている。

#### 【0071】

本明細書において「ベクター」、「発現ベクター」または「構築物」は、本明細書に照らせば、一般的な通常の意味を有し、たとえば、細胞に異種核酸を導入するために使用される核酸であって、様々な制御因子を含むことから、細胞において異種核酸を発現させることができる核酸が挙げられるが、これに限定されない。ベクターとしては、プラスミド、ミニサークル、酵母、およびウイルスゲノムが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、前記ベクターは、プラスミド、ミニサークルまたはウイルスゲノムである。いくつかの実施形態において、前記ベクターはウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、前記ウイルスベクターは、レンチウイルスである。いく

つかの実施形態において、前記ベクターは、レンチウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、前記ベクターは、フォーミーウイルスベクター、アデノウイルスベクター、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。

【0072】

いくつかの実施形態において「T細胞」すなわち「Tリンパ球」は、どのような哺乳動物種から得られたT細胞であってもよく、サル、イヌ、ヒトなどから得られたT細胞であってもよいが、霊長類から得られたT細胞であることが好ましい。いくつかの実施形態において、T細胞は、たとえば治療用組成物の形態などの該T細胞が投与される予定のレシピエント対象または該T細胞が投与されたレシピエント対象と同種（同種であるが別のドナーに由来するもの）である。いくつかの実施形態において、T細胞は自己由来である（ドナーとレシピエントは同じである）。いくつかの実施形態において、T細胞は同系である（ドナーとレシピエントは異なるが、一卵性双生児である）。

【0073】

本明細書において「リボソームスキップ配列」は、翻訳中のリボソームにリボソームスキップ配列を「スキップ」させてペプチド結合の形成を妨げ、リボソームスキップ配列の直後の領域から翻訳させるという機能を有する配列を指す。たとえば、いくつかのウイルスはリボソームスキップ配列を有することから、単一の核酸から複数のタンパク質を連続して翻訳することができ、翻訳されたタンパク質はペプチド結合によって連結されずに個別のタンパク質として得られる。本明細書において、リボソームスキップ配列は「リンカー」配列として使用される。本明細書で提供する核酸の実施形態のいくつかにおいて、本発明の核酸は、キメラ抗原受容体をコードする配列とマーカータンパク質をコードする配列との間にリボソームスキップ配列を含むことから、キメラ抗原受容体とマーカータンパク質は、ペプチド結合によって連結されずに共発現される。いくつかの実施形態において、前記リボソームスキップ配列はP2A配列、T2A配列、E2A配列またはF2A配列である。いくつかの実施形態において、前記リボソームスキップ配列はT2A配列である。

【0074】

成熟T細胞は、表面タンパク質としてCD4を発現し、CD4+T細胞と呼ばれる。CD4+T細胞は、一般に、免疫系においてヘルパーT細胞として機能することが運命づけられているものとして扱われる。たとえば、抗原提示細胞がクラスII MHC上で抗原を発現する場合、CD4+細胞は細胞間相互作用（たとえばCD40とCD40L）の組み合わせおよびサイトカインを介して抗原提示細胞を補助する。しかしながら、稀に例外があり、たとえば、制御性T細胞、ナチュラルキラー細胞、および細胞傷害性T細胞のサブグループもCD4を発現する。これらのCD4+発現T細胞群は、いずれもヘルパーT細胞とは見なされない。

【0075】

本明細書において「セントラルメモリー」T細胞（または「T<sub>CM</sub>」）という用語は、本明細書に照らせば、一般的な通常の意味を有し、たとえば、抗原を経験した細胞傷害性Tリンパ球（CTL）であり、ナイーブ細胞と比較して、その表面上にCD62LまたはCCR7とCD45ROを発現するが、CD45RAは発現していないか、CD45RAの発現が低下している細胞傷害性Tリンパ球（CTL）が挙げられるが、これに限定されない。いくつかの実施形態において、セントラルメモリー細胞は、ナイーブ細胞と比較して、CD62L、CCR7、CD28、CD127、CD45RO、および／またはCD95の発現が陽性であり、CD54RAの発現が低下している。

【0076】

本明細書において「エフェクター」T細胞または「T<sub>E</sub>」という用語は、本明細書に照らせば、一般的な通常の意味を有し、たとえば、抗原を経験した細胞傷害性Tリンパ球であり、セントラルメモリー細胞またはナイーブ細胞と比較して、CD62L、CCR7またはCD28を発現していないか、CD62L、CCR7またはCD28の発現が低下しているか、グランザイムBおよび／またはパーフォリンが陽性である細胞傷害性Tリンパ球が挙げられるが、これに限定されない。

【0077】

本明細書において「医薬添加剤」または「医薬担体」という用語は、本明細書に照らせば、一般的な通常の意味を有し、たとえば、処置または治療を目的とした薬学的に活性な薬剤またはT細胞を処方および／または投与するための溶媒として使用される担体または不活性媒体が挙げられるが、これに限定されない。担体としては、高分子ミセル、リポソーム、リポタンパク質ベースのキャリア、ナノ粒子キャリア、デンドリマーおよび／または当業者に公知のT細胞用のその他の担体が挙げられる。理想的な担体または添加剤としては、毒性がなく、生体適合性、非免疫原性および生分解性を有し、宿主の防御機構によって認識されないものが挙げられる。

#### 【0078】

本明細書において「前駆T細胞」という用語は、本明細書に照らせば、一般的な通常の意味を有し、たとえば、胸腺へと遊走して、前駆T細胞になることができ、T細胞受容体を発現していないリンパ球系前駆細胞が挙げられるが、これに限定されない。あらゆるT細胞は、骨髄中の造血幹細胞に由来する。造血幹細胞由来の造血前駆細胞（リンパ球系前駆細胞）は胸腺に定着し、細胞分裂により増殖し、未熟な胸腺細胞の大集団を作り出す。最も初期の胸腺細胞はCD4もCD8も発現せず、したがって、ダブルネガティブ（CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>）細胞に分類される。これらは発達が進むにつれて、ダブルポジティブ胸腺細胞（CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>）となり、最終的にシングルポジティブ（CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>またはCD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>）胸腺細胞に成熟して、その後、胸腺から末梢組織に放出される。

#### 【0079】

多形膠芽腫（GBM）は、通常、脳に発生する最もアグレッシブながんと考えられている。神経膠芽腫の初期の徴候および症状は、通常、非特異的である。神経膠芽腫の症状として、頭痛、人格変化、悪心、および脳卒中とよく似た症状が挙げられる。

#### 【0080】

本明細書において「5'非翻訳領域（5'UTR）」としても知られている「リーダー配列」は、開始コドンの上流に位置するmRNA領域であり、mRNA転写産物の翻訳制御に重要である。キメラ抗原受容体（CAR）を有する遺伝子組換えT細胞の製造方法の実施形態のいくつかにおいて、前記キメラ抗原受容体をコードするベクターは、リーダー配列をコードする配列を含む。

#### 【0081】

本発明の実施形態において、リガンドについて述べる。「リガンド」という用語は、本明細書に照らせば、一般的な通常の意味を有し、たとえば、生体分子と複合体を形成することができる物質が挙げられるが、これに限定されない。リガンドとしては、たとえば、基質、タンパク質、小分子、阻害因子、活性化因子、核酸および神経伝達物質が挙げられるが、これらに限定されない。リガンドは分子間力によって結合し、たとえばイオン結合、水素結合、またはファンデルワールス相互作用によって結合する。リガンドが受容体タンパク質に結合すると、三次元構造が変化し、それによってリガンドの機能が発揮される。リガンドの結合強度は、結合親和性とも呼ばれ、直接的な相互作用および解離作用によって決まる。リガンドは、「リガンド結合ドメイン」によって結合されてもよい。「リガンド結合ドメイン」は、たとえば、タンパク質上の特定のリガンドまたは特定のエピトープと結合可能な構造に見られる保存配列を指してもよい。リガンド結合ドメインまたはリガンド結合部分は、抗体またはその結合断片もしくはscFv、受容体のリガンドもしくはその変異体、ペプチド、および／またはポリペプチド性親和性分子もしくはポリペプチド性結合パートナーを含んでいてもよい。リガンド結合ドメインは、1つまたは複数のリガンドに特異的な特定のタンパク質ドメインやタンパク質上のエピトープであってもよいが、これらに限定されない。

#### 【0082】

本発明の実施形態において、インターロイキン13受容体α2サブユニット（IL-13Rα2）について述べる。CD213A2（分化抗原群（cluster of differentiation）213A2）としても知られている「インターロイキン13受容体α2サブユニット（IL-13Rα2）」という用語は、本明細書に照らせば、一般的な通常の意味を有し、たとえば、ヒトではIL-

10

20

30

40

50

13RA2遺伝子によってコードされる細胞膜結合タンパク質が挙げられるが、これに限定されない。IL-13R $\alpha$ 2は、インターロイキン13受容体複合体のサブユニットの1つである。IL-13R $\alpha$ 1と密接に関係している。IL-13R $\alpha$ 2は、通常、IL-13と高い親和性で結合するが、機能性を持つ細胞質内ドメインを持たず、シグナル伝達のメディエーターとしては機能しないと見られる。一方、IL-13R $\alpha$ 2は、IL-4には直接結合することができないにもかかわらず、IL-13とIL-4の作用を制御することができる。さらに、IL-13R $\alpha$ 2は、IL-13の細胞内移行に一定の役割を果たしていることが報告されている。

【0083】

いくつかの実施形態において、前記ペプチドスペーサーは、15アミノ酸長以下であり、かつ1アミノ酸長以上または2アミノ酸長以上である。いくつかの実施形態において、前記スペーサーはポリペプチド鎖である。いくつかの実施形態において、前記スペーサーはポリペプチド鎖である。いくつかの態様において、前記ポリペプチド鎖の長さは、たとえば、10アミノ酸長、11アミノ酸長、12アミノ酸長、13アミノ酸長、14アミノ酸長、15アミノ酸長、16アミノ酸長、17アミノ酸長、18アミノ酸長、19アミノ酸長、20アミノ酸長、21アミノ酸長、22アミノ酸長、23アミノ酸長、24アミノ酸長、25アミノ酸長、26アミノ酸長、27アミノ酸長、28アミノ酸長、29アミノ酸長、30アミノ酸長、31アミノ酸長、32アミノ酸長、33アミノ酸長、34アミノ酸長、35アミノ酸長、36アミノ酸長、37アミノ酸長、38アミノ酸長、39アミノ酸長、40アミノ酸長、41アミノ酸長、42アミノ酸長、43アミノ酸長、44アミノ酸長、45アミノ酸長、46アミノ酸長、47アミノ酸長、48アミノ酸長、49アミノ酸長、50アミノ酸長、51アミノ酸長、52アミノ酸長、53アミノ酸長、54アミノ酸長、55アミノ酸長、56アミノ酸長、57アミノ酸長、58アミノ酸長、59アミノ酸長、60アミノ酸長、61アミノ酸長、62アミノ酸長、63アミノ酸長、64アミノ酸長、65アミノ酸長、66アミノ酸長、67アミノ酸長、68アミノ酸長、69アミノ酸長、70アミノ酸長、71アミノ酸長、72アミノ酸長、73アミノ酸長、74アミノ酸長、75アミノ酸長、76アミノ酸長、77アミノ酸長、78アミノ酸長、79アミノ酸長、80アミノ酸長、81アミノ酸長、82アミノ酸長、83アミノ酸長、84アミノ酸長、85アミノ酸長、86アミノ酸長、87アミノ酸長、88アミノ酸長、89アミノ酸長、90アミノ酸長、91アミノ酸長、92アミノ酸長、93アミノ酸長、94アミノ酸長、95アミノ酸長、96アミノ酸長、97アミノ酸長、98アミノ酸長、99アミノ酸長、100アミノ酸長、101アミノ酸長、102アミノ酸長、103アミノ酸長、104アミノ酸長、105アミノ酸長、106アミノ酸長、107アミノ酸長、108アミノ酸長、109アミノ酸長、110アミノ酸長、111アミノ酸長、112アミノ酸長、113アミノ酸長、114アミノ酸長、115アミノ酸長、116アミノ酸長、117アミノ酸長、118アミノ酸長、119アミノ酸長、120アミノ酸長、121アミノ酸長、122アミノ酸長、123アミノ酸長、124アミノ酸長、125アミノ酸長、126アミノ酸長、127アミノ酸長、128アミノ酸長、129アミノ酸長、130アミノ酸長、131アミノ酸長、132アミノ酸長、133アミノ酸長、134アミノ酸長、135アミノ酸長、136アミノ酸長、137アミノ酸長、138アミノ酸長、139アミノ酸長、140アミノ酸長、141アミノ酸長、142アミノ酸長、143アミノ酸長、144アミノ酸長、145アミノ酸長、146アミノ酸長、147アミノ酸長、148アミノ酸長、149アミノ酸長、150アミノ酸長、151アミノ酸長、152アミノ酸長、153アミノ酸長、154アミノ酸長、155アミノ酸長、156アミノ酸長、157アミノ酸長、158アミノ酸長、159アミノ酸長、160アミノ酸長、161アミノ酸長、162アミノ酸長、163アミノ酸長、164アミノ酸長、165アミノ酸長、166アミノ酸長、167アミノ酸長、168アミノ酸長、169アミノ酸長、170アミノ酸長、171アミノ酸長、172アミノ酸長、173アミノ酸長、174アミノ酸長、175アミノ酸長、176アミノ酸長、177アミノ酸長、178アミノ酸長、179アミノ酸長、180アミノ酸長、181アミノ酸長、182アミノ酸長、183アミノ酸長、184アミノ酸長、185アミノ酸長、186アミノ酸長、187アミノ酸長、188アミノ酸長、189アミノ酸長、190アミノ酸長、191アミノ酸長、192アミノ酸長、193アミノ酸長、194アミノ酸長、195アミノ酸長、196アミノ酸長、197アミノ酸長、198アミノ酸長、199アミノ酸長、200アミノ酸長、201アミノ酸長、202アミノ酸長、203アミノ酸長、204アミノ酸長、205アミノ酸長、206アミノ酸長、207アミノ酸

10

20

30

40

50

長、208アミノ酸長、209アミノ酸長、210アミノ酸長、211アミノ酸長、212アミノ酸長、213アミノ酸長、214アミノ酸長、215アミノ酸長、216アミノ酸長、217アミノ酸長、218アミノ酸長、219アミノ酸長、220アミノ酸長、221アミノ酸長、222アミノ酸長、223アミノ酸長、224アミノ酸長、225アミノ酸長、226アミノ酸長、227アミノ酸長、228アミノ酸長、229アミノ酸長、230アミノ酸長、231アミノ酸長、232アミノ酸長、233アミノ酸長、234アミノ酸長、235アミノ酸長、236アミノ酸長、237アミノ酸長、238アミノ酸長、239アミノ酸長もしくは240アミノ酸長、またはこれらの長さのいずれか2つによって定義される範囲内の長さであってもよい。

キメラ抗原受容体において、スペーサーは、たとえば、20種のアミノ酸のうち任意のものを任意の順序で含むことによって、所望の長さのポリペプチド鎖を構成していてもよく、前記20種のアミノ酸としては、アルギニン、ヒスチジン、リシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン、システイン、グリシン、プロリン、アラニン、バリン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、および／またはトリプトファンが挙げられる。

スペーサー配列は、キメラ抗原受容体においてscFV（またはリガンド結合ドメイン）と膜貫通ドメインの間に位置するリンカーであってもよい。キメラ抗原受容体の実施形態のいくつかにおいて、該キメラ抗原受容体は、スペーサーをコードする配列をさらに含む。いくつかの実施形態において、前記スペーサーは、10アミノ酸長、11アミノ酸長、12アミノ酸長、13アミノ酸長、14アミノ酸長、15アミノ酸長、16アミノ酸長、17アミノ酸長、18アミノ酸長、19アミノ酸長、20アミノ酸長、21アミノ酸長、22アミノ酸長、23アミノ酸長、24アミノ酸長、25アミノ酸長、26アミノ酸長、27アミノ酸長、28アミノ酸長、29アミノ酸長、30アミノ酸長、31アミノ酸長、32アミノ酸長、33アミノ酸長、34アミノ酸長、35アミノ酸長、36アミノ酸長、37アミノ酸長、38アミノ酸長、39アミノ酸長、40アミノ酸長、41アミノ酸長、42アミノ酸長、43アミノ酸長、44アミノ酸長、45アミノ酸長、46アミノ酸長、47アミノ酸長、48アミノ酸長、49アミノ酸長、50アミノ酸長、51アミノ酸長、52アミノ酸長、53アミノ酸長、54アミノ酸長、55アミノ酸長、56アミノ酸長、57アミノ酸長、58アミノ酸長、59アミノ酸長、60アミノ酸長、61アミノ酸長、62アミノ酸長、63アミノ酸長、64アミノ酸長、65アミノ酸長、66アミノ酸長、67アミノ酸長、68アミノ酸長、69アミノ酸長、70アミノ酸長、71アミノ酸長、72アミノ酸長、73アミノ酸長、74アミノ酸長、75アミノ酸長、76アミノ酸長、77アミノ酸長、78アミノ酸長、79アミノ酸長、80アミノ酸長、81アミノ酸長、82アミノ酸長、83アミノ酸長、84アミノ酸長、85アミノ酸長、86アミノ酸長、87アミノ酸長、88アミノ酸長、89アミノ酸長、90アミノ酸長、91アミノ酸長、92アミノ酸長、93アミノ酸長、94アミノ酸長、95アミノ酸長、96アミノ酸長、97アミノ酸長、98アミノ酸長、99アミノ酸長、100アミノ酸長、101アミノ酸長、102アミノ酸長、103アミノ酸長、104アミノ酸長、105アミノ酸長、106アミノ酸長、107アミノ酸長、108アミノ酸長、109アミノ酸長、110アミノ酸長、111アミノ酸長、112アミノ酸長、113アミノ酸長、114アミノ酸長、115アミノ酸長、116アミノ酸長、117アミノ酸長、118アミノ酸長、119アミノ酸長、120アミノ酸長、121アミノ酸長、122アミノ酸長、123アミノ酸長、124アミノ酸長、125アミノ酸長、126アミノ酸長、127アミノ酸長、128アミノ酸長、129アミノ酸長、130アミノ酸長、131アミノ酸長、132アミノ酸長、133アミノ酸長、134アミノ酸長、135アミノ酸長、136アミノ酸長、137アミノ酸長、138アミノ酸長、139アミノ酸長、140アミノ酸長、141アミノ酸長、142アミノ酸長、143アミノ酸長、144アミノ酸長、145アミノ酸長、146アミノ酸長、147アミノ酸長、148アミノ酸長、149アミノ酸長、150アミノ酸長、151アミノ酸長、152アミノ酸長、153アミノ酸長、154アミノ酸長、155アミノ酸長、156アミノ酸長、157アミノ酸長、158アミノ酸長、159アミノ酸長、160アミノ酸長、161アミノ酸長、162アミノ酸長、163アミノ酸長、164アミノ酸長、165アミノ酸長、166アミノ酸長、167アミノ酸長、168アミノ酸長、169アミノ酸長、170アミノ酸長、171アミノ酸長、172アミノ酸長、173アミノ酸長、174アミノ酸長、175アミノ酸長、176アミノ酸長、177アミノ酸長、178アミノ酸長、179アミノ酸長、1

10

20

30

40

50

80アミノ酸長、181アミノ酸長、182アミノ酸長、183アミノ酸長、184アミノ酸長、185アミノ酸長、186アミノ酸長、187アミノ酸長、188アミノ酸長、189アミノ酸長、190アミノ酸長、191アミノ酸長、192アミノ酸長、193アミノ酸長、194アミノ酸長、195アミノ酸長、196アミノ酸長、197アミノ酸長、198アミノ酸長、199アミノ酸長、200アミノ酸長、201アミノ酸長、202アミノ酸長、203アミノ酸長、204アミノ酸長、205アミノ酸長、206アミノ酸長、207アミノ酸長、208アミノ酸長、209アミノ酸長、210アミノ酸長、211アミノ酸長、212アミノ酸長、213アミノ酸長、214アミノ酸長、215アミノ酸長、216アミノ酸長、217アミノ酸長、218アミノ酸長、219アミノ酸長、220アミノ酸長、221アミノ酸長、222アミノ酸長、223アミノ酸長、224アミノ酸長、225アミノ酸長、226アミノ酸長、227アミノ酸長、228アミノ酸長、229アミノ酸長、230アミノ酸長、231アミノ酸長、232アミノ酸長、233アミノ酸長、234アミノ酸長、235アミノ酸長、236アミノ酸長、237アミノ酸長、238アミノ酸長、239アミノ酸長もしくは240アミノ酸長の配列を含むか、またはこれらの長さのいずれか2つによって定義される範囲内の長さの配列を含む。いくつかの実施形態において、前記スペーサーは、キメラ抗原受容体においてscFvと膜貫通領域の間に位置する。いくつかの実施形態において、前記スペーサーは、キメラ抗原受容体においてリガンド結合ドメインと膜貫通領域の間に位置する。

#### 【0084】

所望の長さとなるようにスペーサーをカスタマイズ、選択または最適化することによって、標的細胞に対するscFvドメインの結合性を向上させて、それにより細胞傷害性を高めてもよい。いくつかの実施形態において、scFvドメインまたはリガンド結合ドメインと膜貫通ドメインの間に位置するリンカーまたはスペーサーは、25～55アミノ酸長であってもよい（たとえば、少なくとも25アミノ酸長、少なくとも26アミノ酸長、少なくとも27アミノ酸長、少なくとも28アミノ酸長、少なくとも29アミノ酸長、少なくとも30アミノ酸長、少なくとも31アミノ酸長、少なくとも32アミノ酸長、少なくとも33アミノ酸長、少なくとも34アミノ酸長、少なくとも35アミノ酸長、少なくとも36アミノ酸長、少なくとも37アミノ酸長、少なくとも38アミノ酸長、少なくとも39アミノ酸長、少なくとも40アミノ酸長、少なくとも41アミノ酸長、少なくとも42アミノ酸長、少なくとも43アミノ酸長、少なくとも44アミノ酸長、少なくとも45アミノ酸長、少なくとも46アミノ酸長、少なくとも47アミノ酸長、少なくとも48アミノ酸長、少なくとも49アミノ酸長、少なくとも50アミノ酸長、少なくとも51アミノ酸長、少なくとも52アミノ酸長、少なくとも53アミノ酸長、少なくとも54アミノ酸長もしくは少なくとも55アミノ酸長、またはこれらの長さのいずれか2つによって定義される範囲内のアミノ酸長であってもよい）。

#### 【0085】

いくつかの実施形態は、ポリペプチド配列またはその保存的変異配列（たとえばポリペプチド配列が保存的置換された配列）を含む。いくつかの実施形態において、「保存的アミノ酸置換」は、機能的に同等のアミノ酸同士が置換されるアミノ酸置換を指す。保存的アミノ酸変化によって、得られるペプチドのアミノ酸配列において同義変化が起こる。たとえば、同等の極性を有する1つ以上のアミノ酸は同等の機能を有し、得られるペプチドのアミノ酸配列において同義変化が起こる。特定の非極性残基をより小さい非極性残基と置換する場合も、たとえこれらの残基が別々のグループに属していたとしても、「保存的置換」であると考えてもよい（たとえば、フェニルアラニンからより小さいイソロイシンへの置換）。類似した側鎖を有するアミノ酸残基ファミリーは当技術分野において定義されている。保存的アミノ酸置換に含まれるいくつかのファミリーを表1に示す。

10

20

30

40

50

【表 1】

| ファミリー             | アミノ酸                                   |
|-------------------|----------------------------------------|
| 非極性               | Trp, Phe, Met, Leu, Ile, Val, Ala, Pro |
| 極性無電荷             | Gly, Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr, Cys      |
| 酸性／負電荷            | Asp, Glu                               |
| 塩基性／正電荷           | Arg, Lys, His                          |
| $\beta$ 位に側鎖      | Thr, Val, Ile                          |
| ペプチド鎖の方向に影響を与える残基 | Gly, Pro                               |
| 芳香性               | Trp, Tyr, Phe, His                     |

10

## 【0086】

膵臓がん、乳がん、卵巣がん、悪性神経膠腫（たとえば神経膠芽腫）などの様々ながん細胞において、インターロイキン13受容体 $\alpha 2$ （IL-13R $\alpha 2$ ）が高発現することが判明している。また、高悪性度の星状細胞腫を有するヒト患者の大部分においても、IL-13R $\alpha 2$ が過剰発現することが示されている（PLoS One. 2013 Oct 16; 8(10):e77719参照；この文献は引用によりその全体が本明細書に明示的に援用される）。さらに、様々なモデルのがん細胞においてIL13RA2の発現量を抑制すると、腫瘍の増殖が顕著に遅延することが過去の研究で示されている（Breast Cancer Research, 2015; 17 (1)；この文献は引用によりその全体が本明細書に明示的に援用される）。ほとんどの正常組織はIL-13RA2を発現せず、IL-13RA2を発現してもその発現量は低いと想定される。

20

## 【0087】

多形膠芽腫（GBM）の場合、IL13R $\alpha 2$ の高発現は、腫瘍が進行していることおよび患者の生存率が低いことを示す予後マーカーとなることがある。本発明では、IL13R $\alpha 2$ を選択的な標的とするキメラ抗原受容体（CAR）、ならびに該CARを含有または使用した細胞および治療法を提供する。本発明で提供されるCARは、通常、膜貫通領域および細胞内シグナル伝達領域に連結された細胞外ドメインを含み、前記細胞内シグナル伝達領域は、通常、第1シグナル伝達ドメインおよび共刺激シグナル伝達ドメインを含む1つ以上のシグナル伝達ドメインを含む。

30

## 【0088】

細胞外ドメインは抗原結合モチーフを含み、いくつかの態様において、この抗原結合モチーフは、（scFvなどの）抗原結合抗体断片であるか、抗原結合抗体断片を含む。いくつかの態様において、この抗原結合ドメイン（scFv）は、ヒトインターロイキン13R $\alpha 2$ 特異的抗体に由来するものである。いくつかの実施形態において、本発明のCARは、膜貫通ドメインに細胞外結合ドメインを連結するスペーサー領域を含む。いくつかの態様において、スペーサーの1つ以上の特性は、CARの特徴（CARの機能など）が最適化されるように設計され、たとえば、エピトープと結合領域と細胞膜の間の接触が適切な距離で起こるように、かつ／または柔軟性を付与できるように設計される。いくつかの態様において、スペーサーの長さは、20アミノ酸長未満または20アミノ酸長以下であり、たとえば、15アミノ酸長未満もしくは15アミノ酸長以下、14アミノ酸長未満もしくは14アミノ酸長以下、13アミノ酸長未満もしくは13アミノ酸長以下、または12アミノ酸長未満もしくは12アミノ酸長以下である。いくつかの態様において、スペーサーの長さは、12アミノ酸長もしくは約12アミノ酸長、または15アミノ酸長もしくは約15アミノ酸長である。いくつかの態様において、スペーサーは、免疫グロブリンのヒンジ領域（たとえばヒトIgGのヒンジ領域、たとえばヒトIgG4のヒンジ領域など）の全体もしくはその一部、またはそれらの改変体を含む。

40

## 【0089】

いくつかの実施形態において、前記スペーサーはヒト抗体のヒンジ領域を含む。前記方

50

法の実施形態のいくつかにおいて、前記スペーサーはIgG4のヒンジを含む。いくつかの実施形態において、前記IgG4ヒンジ領域は改変されたIgG4ヒンジである。本明細書で述べる「改変されたIgG4ヒンジ」は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7または配列番号8で示されるヒンジ領域のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%もしくは100%の配列同一性、またはこれらのパーセンテージのいずれか2つによって定義される範囲内の配列同一性を有するヒンジ領域を指してもよい。

【0090】

いくつかの実施形態において、本発明のCARは、短い(S)スペーサー、中程度の長さ(M)のスペーサーまたは長い(L)スペーサーを含む。短い(S)スペーサーは、配列番号9に示される配列を含む。中程度の長さ(M)のスペーサーは、配列番号10に示される配列を含む。長い(L)スペーサーは、配列番号11に示される配列を含む。

【0091】

いくつかの実施形態において、膜貫通部分は、ヒトCD28膜貫通ドメインなどのCD28膜貫通ドメイン(CD28tm)を含むか、CD28膜貫通ドメイン(CD28tm)である。CD28tmは、配列番号12に示される配列によってコードされる。CD28tmは、配列番号13に示されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、膜貫通ドメインは、1つ以上の共刺激ドメインを含む細胞内シグナル伝達領域に連結されており、この共刺激ドメインは、たとえば、ヒト4-1BB(CD137)の細胞内セグメントに由来する共刺激ドメイン、およびヒトCD3 $\zeta$ などのCD3 $\zeta$ のシグナル伝達ドメインである。いくつかの実施形態において、本発明のCARの設計は、IL13R $\alpha$ 2の様々な細胞外エピトープを標的とし、scFvを形成する2つの分子(VHおよびVL)の様々な組み合わせに基づき、この2つの分子はVH-VLの順またはVL-VHの順で連結され、CARのスペーサーとして3種の長さのものを使用することができる。CARの骨格の残りの部分は、膜貫通ドメインと共刺激ドメインが占める。別の実施形態では、上皮成長因子受容体(EGFRt)の末端切断型もCARに含まれ、T細胞の表面上でCARとともに共発現される。さらなる実施形態では、ジヒドロ葉酸還元酵素の二重変異体(DHFRdm)をコードする導入遺伝子が含まれ、これによって、メトトレキサートによるT細胞製剤の選択が可能となる。本明細書で述べるように、IL13R $\alpha$ 2標的CARを発現するCD8 T細胞およびCD4 T細胞はいずれも、インビトロにおいて強力な腫瘍細胞傷害性を示すとともに、インビボにおいて神経膠芽腫モデルに対し強力な特異的有効性を示す。

【0092】

いくつかの実施形態は、IL13R $\alpha$ 2 Ab01と呼ばれる抗体に由来するVLドメインおよびVHドメインを含むscFvがVL-リンカー-VHの順で連結されたCARを含む。いくつかの態様において、このようなCARは、スペーサー、膜貫通ドメインおよび／またはシグナル伝達ドメインの特定の組み合わせをさらに含む。たとえば、いくつかの態様において、このようなCARは、15個以下のアミノ酸もしくは12個以下のアミノ酸からなるスペーサー、もしくは実質的に15個以下のアミノ酸もしくは12個以下のアミノ酸からなるスペーサーを含み、かつ／またはこのスペーサーは、免疫グロブリンのヒンジ領域もしくはその改変バリエーション(たとえばIgG4のヒンジ領域もしくはその改変バリエーションなど)を含むか、これらのいずれかからなるか、実質的にこれらのいずれかからなる。いくつかの態様において、CARDメインは、たとえば4-1BBシグナル伝達ドメインおよびCD3 $\zeta$ シグナル伝達ドメインなどの、共刺激シグナル伝達ドメインおよび第1シグナル伝達ドメインをさらに含む。いくつかの態様において、本発明とは異なる別のCARと比べて、たとえば、本発明とは異なる別の結合ドメインを含むCAR(たとえば、別のVH領域および／もしくはVL領域を含み、かつ／もしくはVH領域およびVL領域の方向が異なるCAR)、および／または同じ結合ドメインを含んでいるが、その他の1つ以上の領域が異なるCAR(たとえば別のスペーサー(たとえばさらに長いスペーサー)などを含むCAR)などと比べて、本発明の好ましい実施形態は、インビトロにおいて細胞傷害性およびサイトカインの分泌を増強させ、かつ／または(たとえばヒト神経膠芽腫などにおいて)インビボにおける機能を向

10

20

30

40

50

上させたりすることによって、T細胞のエフェクター機能を増強することができるという点で有利であってもよい。いくつかの態様において、本明細書で提供する実施形態は、ヒト多形膠芽腫（GBM）の頭蓋内移植後にIL13R $\alpha$ 2標的CAR T細胞の単回注射で治療したマウスを含むマウスモデルなどのIL-13Ra2発現腫瘍を有する対象において、腫瘍の増殖を抑制し、かつ／または生存率の中央値を上昇させることができたという本明細書での観察結果に基づくものである。

【0093】

#### 特定の核酸

本明細書で提供する方法および組成物の実施形態のいくつかは、キメラ抗原受容体をコードする核酸であって、該キメラ抗原受容体が、

- a) 配列番号18のVH領域のCDR3（ならびに任意でCDR1およびCDR2）と、配列番号19のVL領域のCDR3（ならびに任意でCDR1およびCDR2）を含み、かつ／またはIL-13受容体 $\alpha$ 2（IL13R $\alpha$ 2）と結合および／もしくは相互作用するリガンド結合ドメイン；
  - b) 前記リガンド結合ドメインと膜貫通ドメインの間に位置するポリペプチドスペーサー；
  - c) 膜貫通ドメイン；ならびに
  - d) 細胞内シグナル伝達領域
- を含むことを特徴とする核酸を含む。

いくつかの実施形態において、前記リガンド結合ドメインは、抗原結合断片などの抗体断片である。いくつかの実施形態において、前記リガンド結合ドメインは、一本鎖可変領域断片（scFv）である。いくつかの実施形態において、前記スペーサーは、15アミノ酸長以下であり、かつ1アミノ酸長以上または2アミノ酸長以上である。いくつかの実施形態において、前記スペーサーは、アミノ酸配列X<sub>1</sub>PPX<sub>2</sub>Pを含む。いくつかの実施形態において、前記スペーサー領域は、ヒト抗体のヒンジ領域の一部またはその改変バリエーションを含む。いくつかの実施形態において、前記細胞内シグナル伝達領域は、第1シグナル伝達ドメインと共刺激シグナル伝達ドメインを含み、該細胞内シグナル伝達領域は、CD3 $\zeta$ の全体またはその一部と、CD27、CD28、4-1BB、OX-40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、LFA-1、CD2、CD7、NKG2CおよびB7-H3のそれぞれのシグナル伝達ドメインならびにこれらの組み合わせからなる群から選択される共刺激シグナル伝達ドメインとの組み合わせを含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、前記細胞内シグナル伝達領域は、CD3 $\zeta$ のシグナル伝達部分および4-1BBのシグナル伝達部分を含む。いくつかの実施形態において、前記膜貫通ドメインは、CD28膜貫通ドメイン（CD28tm）を含む。いくつかの実施形態において、前記スペーサーは、IgG4ヒンジスペーサー（短いスペーサー）を含むか、このスペーサーからなるか、実質的にこのスペーサーからなる。いくつかの実施形態において、前記スペーサーは、IgG4ヒンジ-CH3スペーサー（中程度の長さのスペーサー）を含むか、このスペーサーからなるか、実質的にこのスペーサーからなる。いくつかの実施形態において、前記スペーサーは、IgG4ヒンジ-CH2（L234D、N297A）-CHEスペーサー（長いスペーサー）を含むか、このスペーサーからなるか、実質的にこのスペーサーからなる。いくつかの実施形態において、前記scFvは、VL-VHの順で連結されたVLドメインおよびVHドメインを含み、前記CARは短いスペーサーを含む。いくつかの実施形態において、前記scFvは、VH-VLの順で連結されたVHドメインおよびVLドメインを含み、前記CARは、中程度の長さのスペーサーまたは長いスペーサーを含む。いくつかの実施形態において、前記一本鎖可変領域断片（scFv）は、配列番号61または配列番号62に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記一本鎖可変領域断片（scFv）は、配列番号63または配列番号64に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、前記核酸は、マーカー配列をコードする核酸をさらに含む。いくつかの実施形態において、前記マーカー配列は、末端切断型受容体であり、EGFRt、HER2tまたはCD19tであってもよい。いくつかの実施形態において、前記核酸は、メトトレキサートにより選択できるように構成されたジヒドロ葉酸還元酵素をコードする導入遺伝子をさらに含む。いくつかの実施形態において、前記ジヒドロ葉酸還元酵素をコードする導入遺伝子は、ジヒドロ葉酸還元酵素の二重変異体（DHFRdm）である。いくつかの実施形態におい

10

20

30

40

50

て、第1のポリヌクレオチド、第2のポリヌクレオチド、第3のポリヌクレオチドおよび／または第4のポリヌクレオチドは、前記核酸全体のGC/AT比が低下するようにコドン最適化されている。いくつかの実施形態において、第1のポリヌクレオチド、第2のポリヌクレオチド、第3のポリヌクレオチドおよび／または第4のポリヌクレオチドは、ヒトにおける発現のためにコドン最適化されている。いくつかの実施形態において、ジヒドロ葉酸還元酵素の二重変異体は、L22Fアミノ酸変異およびF31Sアミノ酸変異を含む。

【0094】

本明細書で提供する方法および組成物の実施形態のいくつかは、本発明の実施形態のいずれかによる核酸を含む発現ベクターを含む。いくつかの実施形態において、前記ベクターはウイルスベクターである。いくつかの実施形態において、前記ベクターは、レンチウイルスベクターまたはアデノウイルスベクターである。

【0095】

#### 特定のキメラ受容体

本明細書で提供する方法および組成物の実施形態のいくつかは、本発明の実施形態のいずれかによる核酸または本発明の実施形態のいずれかによるベクターによってコードされるキメラ受容体ポリペプチドを含む。

【0096】

#### 特定の宿主細胞

本明細書で提供する方法および組成物の実施形態のいくつかは、本発明の実施形態のいずれかによる核酸もしくは本発明の実施形態のいずれかによる発現ベクターを含む宿主細胞、または本発明の実施形態のいずれかによるキメラ受容体を発現する宿主細胞を含む。いくつかの実施形態において、前記宿主細胞は、遺伝子組換え細胞を含む。いくつかの実施形態において、前記キメラ抗原受容体は、本発明の実施形態のいずれかによる核酸または本発明の実施形態のいずれかによるベクターによってコードされる。いくつかの実施形態において、前記発現ベクターは、本発明の実施形態のいずれかによる核酸を含む。いくつかの実施形態において、前記宿主細胞は、ナイーブCD8+T細胞、セントラルメモリーCD8+T細胞、エフェクターメモリーCD8+T細胞およびバルクCD8+T細胞からなる群から選択されるCD8+細胞傷害性Tリンパ球である。いくつかの実施形態において、前記CD8+細胞傷害性Tリンパ球は、セントラルメモリーT細胞であり、該セントラルメモリーT細胞は、CD45RO+、CD62L+およびCD8+である。いくつかの実施形態において、前記宿主細胞は、ナイーブCD4+T細胞、セントラルメモリーCD4+T細胞、エフェクターメモリーCD4+T細胞およびバルクCD4+T細胞からなる群から選択されるCD4+ヘルパーTリンパ球である。いくつかの実施形態において、前記CD4+ヘルパーリンパ球は、ナイーブCD4+T細胞であり、該ナイーブCD4+T細胞は、CD45RA+、CD62L+およびCD4+であり、かつCD45RO-である。いくつかの実施形態において、前記宿主細胞は前駆T細胞である。いくつかの実施形態において、前記宿主細胞は造血幹細胞である。

【0097】

本明細書で提供する方法および組成物の実施形態のいくつかは、IL-13受容体 $\alpha 2$ を発現するがんまたは固形腫瘍の治療または抑制において使用するための、本発明の実施形態のいずれかによる宿主細胞または本発明の実施形態のいずれかによる組成物を提供する。前記組成物は、本発明の実施形態のいずれかによる宿主細胞と医薬品添加剤を含む。いくつかの実施形態において、前記がんは神経膠芽腫である。いくつかの実施形態において、前記がんは多形膠芽腫（GBM）である。いくつかの実施形態において、前記がんはIL13R $\alpha$ 陽性の悪性腫瘍である。いくつかの実施形態において、前記がんは脳がんまたは脳腫瘍である。

【0098】

#### 特定の組成物

本明細書で提供する方法および組成物の実施形態のいくつかは、本発明の実施形態のいずれかによる宿主細胞と薬学的に許容される添加剤を含む組成物を含む。

## 【0099】

宿主細胞を作製する特定の方法

本明細書で提供する方法および組成物の実施形態のいくつかは、本発明の実施形態のいずれかによる宿主細胞を作製する方法であって、

- a) 本発明の実施形態のいずれかによる核酸または本発明の実施形態のいずれかによる発現ベクターをリンパ球に導入する工程；
- b) 抗CD3抗体および／または抗CD28抗体ならびに少なくとも1種の恒常性サイトカインの存在下で、前記リンパ球を培養して増殖させる工程；ならびに
- c) 前記核酸または前記ベクターで形質導入した細胞を選択的に濃縮できるように構成された選択試薬で前記リンパ球を選択する工程を含む方法を提供する。

10

いくつかの実施形態において、前記選択試薬はメトトレキサートである。いくつかの実施形態において、前記リンパ球は、CD45RA<sup>+</sup>、CD45RO<sup>+</sup>およびCD62L<sup>+</sup>の表現型を有する。いくつかの実施形態において、前記リンパ球は、CD8<sup>+</sup>またはCD4<sup>+</sup>である。いくつかの実施形態において、前記サイトカインは、IL-15、IL-7および／またはIL-21である。いくつかの実施形態において、前記方法は、マーカータンパク質をコードする第2の核酸を前記宿主細胞に導入する工程をさらに含む。いくつかの実施形態において、前記マーカータンパク質はEGFR<sup>t</sup>である。

## 【0100】

特定の治療方法

本明細書で提供する方法および組成物の実施形態のいくつかは、がんまたは腫瘍を有する対象において細胞免疫療法を行う方法であって、本発明の実施形態のいずれかによる宿主細胞または本発明の実施形態による組成物を前記対象に投与する工程を含む方法を提供する。前記組成物は、本発明の実施形態のいずれかによる宿主細胞と薬学的に許容される添加剤を含む。いくつかの実施形態において、前記がんは神経膠芽腫である。いくつかの実施形態において、前記がんは多形膠芽腫（GBM）である。いくつかの実施形態において、前記がんはIL13R $\alpha$ 陽性の悪性腫瘍である。いくつかの実施形態において、前記がんは脳がんである。いくつかの実施形態において、前記対象は、併用療法の投与を行うために選択された対象である。いくつかの実施形態において、前記併用療法は、化学療法薬の投与を含む。いくつかの実施形態において、前記併用療法は、放射線療法の投与を含む。いくつかの実施形態において、前記化学療法薬は、電気化学療法、アルキル化剤、代謝拮抗薬（たとえば、5-フルオロウラシル（5-FU）、6-メルカプトプリン（6-MP）、カペシタビン（ゼローダ（登録商標））、クラドリビン、クロファラビン、シタラビン（Ara-C（登録商標））、フロクスウリジン、フルダラビン、ゲムシタビン（ジェムザール（登録商標））、ヒドロキシウレア、メトトレキサート、ペメトレキセド（アリムタ（登録商標））、ペントスタチンおよびチオグアニン）、抗腫瘍抗生物質、トポイソメラーゼ阻害薬、分裂阻害薬、コルチコステロイド、DNAインターカレーターまたはチェックポイント阻害薬（チェックポイントキナーゼCHK1、CHK2）を含む。いくつかの実施形態において、前記がんは神経膠腫である。

20

30

## 【0101】

特定のIL13Ra2標的CARの構築

図1は、本発明において作製したIL-13R $\alpha$ 2標的CAR構造をコードするいくつかの核酸の概略図を示し、各IL-13R $\alpha$ 2標的CAR構造は、様々な結合ドメインのうちのいずれか1つ、様々なスペーサー領域のうちのいずれか1つ、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを有する。これらの典型的なIL-13R $\alpha$ 2標的CARの各核酸配列は、リーダー配列を含み、このリーダー配列を使用して、たとえば、CARをコードするmRNA転写産物の翻訳などを可能としてもよい。これらの典型的なCARはいずれもIL-13R $\alpha$ 2標的scFvを含み、より具体的には、配列番号14に示されるVHドメインと配列番号16に示されるVLドメインを有する抗IL13R $\alpha$ 2 scFv、または配列番号15に示されるVHドメインと配列番号17に示されるVLドメインを有する抗IL13R $\alpha$ 2 scFvを含む。4種のscFv

40

50

のいずれかを結合ドメインとして含むCARを作製し、試験した。これら4種の結合ドメインは、各抗IL13R $\alpha$ 2抗体のVHドメインとVLドメインのペアを、VL-VHの順またはVH-VLの順で含んでいた。

#### 【0102】

前述した典型的な各CARにおいて、3種のスペーサーのうちのいずれかがscFvと膜貫通ドメインの間に配置されている。これらの3種のスペーサーを図1に示す。試験したこれらのスペーサーは、長さが異なり、いずれも免疫グロブリンの定常領域に由来するものであった。アミノ酸配列の長さが最も短いスペーサーは、改変ヒトIgG4ヒンジ領域であり；中間（中程度）の長さのスペーサーは、改変ヒトヒンジ領域とCH3ドメインを含んでおり（IgG4-CH3）；試験したもののうち最も長いスペーサーは、改変IgG4ヒンジ領域と改変CH2領域と改変CH3領域を含んでいた（IgG4-CH2（L235D、N297Q）-CH3（L））。また、本発明において作製した典型的な各CARは、ヒトCD28に由来する膜貫通ドメイン（CD28tmドメイン）、ならびにヒト4-1BBのシグナル伝達ドメインおよびヒトCD3 $\zeta$ のシグナル伝達ドメイン（4-1BBドメイン、CD3 $\zeta$ ドメイン）をさらに含んでいた。

10

#### 【0103】

各CARをコードし、これを発現させるために使用された核酸は、T2Aスキップ配列をコードする配列と、CAR発現のマーカーとしての末端切断型サロゲートマーカーをコードする核酸をさらに含んでいた。

#### 【0104】

いくつかの実施形態において、本発明の実施形態において提供されるCARのリガンド結合ドメインは、配列番号18のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、配列番号18のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、配列番号18と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有する配列を有する重鎖可変領域、配列番号18と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有する配列からなる重鎖可変領域、または配列番号18の配列を有するVH領域のCDR1、CDR2および／もしくはCDR3（通常少なくともCDR3）を含む重鎖可変領域を含む。

20

#### 【0105】

いくつかの実施形態において、本発明の実施形態において提供されるCARのリガンド結合ドメインは、配列番号19のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、配列番号19のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域、配列番号19と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有する配列を有する軽鎖可変領域、配列番号19と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有する配列からなる軽鎖可変領域、または配列番号19の配列を有するVL領域のCDR1、CDR2およびCDR3を含む軽鎖可変領域を含む。このような配列はW02014072888に記載されている（この文献は引用によりその全体が本明細書に援用される）。

30

#### 【0106】

いくつかの実施形態において、ヒトIL-13R $\alpha$ 2に特異的に結合するリガンド結合領域は、  
(a) 配列番号20を含む重鎖CDR1；  
(b) 配列番号21を含む重鎖CDR2；および／もしくは  
(c) 配列番号22を含む重鎖CDR3を含み、かつ／または  
(d) 配列番号23を含む軽鎖CDR1；  
(e) 配列番号24を含む軽鎖CDR2；および／もしくは  
(f) 配列番号25を含む軽鎖CDR3  
を含む。

40

#### 【0107】

いくつかの実施形態において、前記リガンド結合領域は、配列番号18に示される重鎖可変領域のアミノ酸配列と、配列番号19に示される軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含む。

#### 【0108】

50

いくつかの実施形態において、前記リガンド結合ドメインは、  
配列番号 28 を含む重鎖 CDR2 (CDRH2) ;  
(c) 配列番号 29 を含む重鎖 CDR3 (CDRH3) ;  
(d) 配列番号 30 を含む軽鎖 CDR1 ;  
(e) 配列番号 31 を含む軽鎖 CDR2 ; および / または  
(f) 配列番号 32 を含む軽鎖 CDR3  
を含む。

#### 【0109】

いくつかの実施形態において、前記リガンド結合ドメインは、配列番号 33、配列番号 34、配列番号 35 または配列番号 36 に示される配列を含む重鎖 CDR1 (CDR-H1) を含む。いくつかの実施形態において、CDR-H2 は、配列番号 37、配列番号 38、配列番号 39 または配列番号 40 に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、CDRH3 は、配列番号 41 に示される配列を含む。

#### 【0110】

いくつかの実施形態において、前記 CAR は、前記結合ドメインと前記膜貫通ドメインの間に配置されたスペーサーを含む。いくつかの実施形態において、前記スペーサーは、免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含むか、免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部からなるか、実質的に免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部からなり、この免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部としては、たとえば、免疫グロブリンのヒンジ領域の全体もしくはその一部、たとえば、IgG4 のヒンジ領域またはその機能性バリエーションが挙げられる。いくつかの実施形態において、前記免疫グロブリンの定常領域および / またはヒンジ領域は、IgG4 や IgG1 などのヒト IgG の定常領域および / もしくはヒンジ領域またはそれらのバリエーションである。スペーサーの長さは、抗原に結合した際の細胞の応答性が、スペーサーの非存在下よりも増強するような長さであってもよい。代表的なスペーサーとして、国際特許出願 W02014031687 に記載されているものが挙げられる (この文献は引用によりその全体が本明細書に明示的に援用される)。いくつかの例において、前記スペーサーは、12 アミノ酸長、約 12 アミノ酸長もしくは 12 アミノ酸長以下、または 15 アミノ酸長、約 15 アミノ酸長、15 アミノ酸長以下もしくは約 15 アミノ酸長以下である。

#### 【0111】

前記スペーサーとして、少なくとも 10 ~ 229 個のアミノ酸を有するスペーサー、少なくとも 10 ~ 200 個のアミノ酸を有するスペーサー、少なくとも 10 ~ 175 個のアミノ酸を有するスペーサー、少なくとも 10 ~ 150 個のアミノ酸を有するスペーサー、少なくとも 10 ~ 125 個のアミノ酸を有するスペーサー、少なくとも 10 ~ 100 個のアミノ酸を有するスペーサー、少なくとも 10 ~ 75 個のアミノ酸を有するスペーサー、少なくとも 10 ~ 50 個のアミノ酸を有するスペーサー、少なくとも 10 ~ 40 個のアミノ酸を有するスペーサー、少なくとも 10 ~ 30 個のアミノ酸を有するスペーサー、少なくとも 10 ~ 20 個のアミノ酸を有するスペーサーもしくは少なくとも 10 ~ 15 個のアミノ酸を有するスペーサー、およびこれらの範囲の両端の間にある任意の整数で表される個数のアミノ酸を有するスペーサーが挙げられる。いくつかの実施形態において、スペーサー領域は、1 ~ 12 個のアミノ酸、1 ~ 119 個のアミノ酸、または 1 ~ 229 個のアミノ酸を有する。いくつかの実施形態において、前記スペーサーは、1 アミノ酸長以上かつ 250 アミノ酸長未満、1 アミノ酸長以上かつ 200 アミノ酸長未満、1 アミノ酸長以上かつ 150 アミノ酸長未満、1 アミノ酸長以上かつ 100 アミノ酸長未満、1 アミノ酸長以上かつ 75 アミノ酸長未満、1 アミノ酸長以上かつ 50 アミノ酸長未満、1 アミノ酸長以上かつ 25 アミノ酸長未満、1 アミノ酸長以上かつ 20 アミノ酸長未満、1 アミノ酸長以上かつ 15 アミノ酸長未満、1 アミノ酸長以上かつ 12 アミノ酸長未満、または 1 アミノ酸長以上かつ 10 アミノ酸長未満である。いくつかの実施形態において、前記スペーサーは、10 ~ 250 アミノ酸長、10 ~ 150 アミノ酸長、10 ~ 100 アミノ酸長、10 ~ 50 アミノ酸長、10 ~ 25 アミノ酸長、10 ~ 15 アミノ酸長、15 ~ 250 ア

10

20

30

40

50

ミノ酸長、15～150アミノ酸長、15～100アミノ酸長、15～50アミノ酸長、15～25アミノ酸長、25～250アミノ酸長、25～100アミノ酸長、25～50アミノ酸長、50～250アミノ酸長、50～150アミノ酸長、50～100アミノ酸長、100～250アミノ酸長、100～150アミノ酸長、または150～250アミノ酸長である。代表的なスペーサーとして、IgG4ヒンジのみからなるスペーサー、CH2ドメインおよびCH3ドメインに連結されたIgG4ヒンジからなるスペーサー、またはCH3ドメインに連結されたIgG4ヒンジからなるスペーサーが挙げられる。また、代表的なスペーサーとして、Hudecek et al. Clin. Cancer Res., 19:3153 (2013)、国際特許出願WO 2014031687、米国特許第8,822,647号、米国公開出願第2014/0271635号（これらの文献は引用によりその全体が本明細書に明示的に援用される）に記載されているスペーサーが挙げられるが、これらに限定されない。

10

#### 【0112】

いくつかの態様において、前記CARのスペーサーは、IgG4ヒンジ、IgG4ヒンジ-CH3またはIgG4ヒンジ-CH2（L235D、N297Q）-CH3からなるか、これらのいずれかを含む。

#### 【0113】

いくつかの実施形態において、前記リガンド結合ドメインは、（a）配列番号18に示されるVH配列のCDR1、CDR2およびCDR3を含む重鎖可変領域；ならびに（b）配列番号19に示されるVL配列のCDR1、CDR2およびCDR3を含む軽鎖可変領域を含む。これらの配列は、WO2014/072888に記載されている（この文献は引用によりその全体が本明細書に明示的に援用される）。

20

#### 【0114】

いくつかの実施形態において、前記重鎖および前記軽鎖の方向は、VL-リンカー-VHの順である。いくつかの態様では、VH-リンカー-VLの順である。

#### 【0115】

いくつかの実施形態において、前記リガンド結合領域は、配列番号18に示されるVH配列のCDR1、CDR2およびCDR3を含む重鎖可変領域と、配列番号19に示されるVL配列のCDR1、CDR2およびCDR3を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態において、免疫グロブリンの定常領域を含むスペーサーを提供する。たとえば、このようなスペーサーとして、配列番号42のアミノ酸配列および配列番号43のアミノ酸配列からなる群から選択され、少なくとも1対のアミノ酸置換を含むFc領域の全体またはその一部を含むスペーサー；またはL443C（配列番号44）、Q347C（配列番号45）、kK183C（配列番号46）、配列番号47、L443C/kK183C（配列番号44および配列番号46）、Q347C/kA111C（配列番号45および配列番号47）、ならびにQ347C/kK183C（配列番号45および配列番号46）からなる群から選択される組換えFc領域と少なくとも1つの組換え軽鎖定常領域を含むスペーサーが挙げられる。

30

#### 【0116】

いくつかの実施形態において、前記定常領域またはその一部は、配列番号48に示される配列を含む。

#### 【0117】

いくつかの実施形態において、Ab02由来scFvは、配列番号49（LCDR1）、配列番号50（LCDR2）および／または配列番号51（LCDR3）に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、Ab02抗体は、配列番号55（HCDR1）、配列番号56（HCDR2）および／または配列番号57（HCDR3）に示される配列を含む。

40

#### 【0118】

いくつかの実施形態において、Ab01抗体は、配列番号52（LCDR1）、配列番号53（LCDR2）および／または配列番号54（LCDR3）に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、Ab01抗体は、配列番号58（HCDR1）、配列番号59（HCDR2）および／または配列番号60（HCDR3）に示される配列を含む。

#### 【0119】

50

いくつかの実施形態において、前記CARは、VL—リンカー—VHの順で連結されたVHドメインおよびVLドメインを含むscFvである抗原結合領域、またはこのscFvを含む抗原結合領域を含む。いくつかの実施形態において、たとえば、このような実施形態のいくつかの態様において、VHドメインは、配列番号18のアミノ酸配列を含むか、配列番号18に示されるVH配列のCDR3（ならびに任意でCDR1およびCDR2）を含むか、かつ／または配列番号18と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、このアミノ酸配列からなるか、または配列番号18の配列を有するVH領域のCDR1、CDR2および／もしくはCDR3（通常少なくともCDR3）を含む。いくつかの態様、たとえば、このような実施形態の態様において、前記VHは、Ab01に由来するVHである。このような実施形態の態様のいくつかにおいて、VLドメインは、配列番号19のアミノ酸配列を含むか、配列番号19に示されるVL配列のCDR3（ならびに任意でCDR1およびCDR2）を含むか、かつ／または配列番号19と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、このアミノ酸配列からなるか、または配列番号19の配列を有するVL領域のCDR1、CDR2および／もしくはCDR3（通常少なくともCDR3）を含む。いくつかの態様、たとえば、このような実施形態の態様において、VHは、Ab01に由来するVHである。このような実施形態のいずれかの態様のいくつかにおいて、たとえば、前述の結合ドメインを有するCARの態様において、前記CARは、前記結合ドメインと前記膜貫通ドメインの間にスペーサー領域を含み、このスペーサー領域は、50アミノ酸長以下、40アミノ酸長以下、30アミノ酸長以下もしくは20アミノ酸長以下、または約50アミノ酸長以下、約40アミノ酸長以下、約30アミノ酸長以下もしくは約20アミノ酸長以下であり、たとえば15アミノ酸長以下もしくは約15アミノ酸長以下、または12アミノ酸長以下もしくは約12アミノ酸長以下であり、かつ／または免疫グロブリンのヒンジ領域またはそのバリエーション、たとえばIgG4のヒンジまたはそのバリエーションを含むか、これらのいずれかであるか、実質的にこれらのいずれかからなる。

#### 【0120】

いくつかの態様において、前記CARおよび／または該CARを発現する細胞は、参照CARと比較して1種以上の機能活性が増強または向上している。いくつかの態様において、参照CARとは、同様（あるいは同一）の結合ドメインを有するが、スペーサーの長さおよび／または組成が異なるCARを指す。たとえば、参照CARは、50アミノ酸長よりも長いスペーサー、40アミノ酸長よりも長いスペーサー、30アミノ酸長よりも長いスペーサー、20アミノ酸長よりも長いスペーサー、15アミノ酸長よりも長いスペーサーもしくは12アミノ酸長よりも長いスペーサー、約50アミノ酸長よりも長いスペーサー、約40アミノ酸長よりも長いスペーサー、約30アミノ酸長よりも長いスペーサー、約20アミノ酸長よりも長いスペーサー、約15アミノ酸長よりも長いスペーサーもしくは約12アミノ酸長よりも長いスペーサーを有し、かつ／または同一あるいは同様の可変領域を含む結合ドメインを有するが、これらの可変領域の方向が異なる。いくつかの実施形態において、前記CARおよび／または該CARを発現する細胞の機能は、IL-13Ra2発現細胞との共培養アッセイ（たとえば、サイトカインの産生もしくは細胞溶解活性を測定するアッセイ）などのインビトロアッセイで観察され、またはIL-13Ra2陽性腫瘍を有する動物モデルを使用したインビボアッセイ（たとえば、CAR発現細胞（CAR発現T細胞など）の投与後に腫瘍負荷の減少もしくは生存率を評価するアッセイなど）で観察される。

#### 【0121】

本発明の実施形態では、抗原結合ドメインおよびその他のドメインを様々な組み合わせた図1に示す8種のCARを様々なアッセイにおいて試験した。

#### 【0122】

##### 特定の配列

いくつかの実施形態において、Ab01 VHは、配列番号14に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、Ab01 VLは、配列番号16に示される配列を含む。いくつかの

実施形態において、IL13Ra2 Ab01 VLVH scFvは、配列番号 6 1 に示される配列によってコードされる。いくつかの実施形態において、IL13Ra2 Ab01 VHVL scFvは、配列番号 6 2 に示される配列によってコードされ、この配列は、Ab01-VL配列、Ab01-VH配列、開始コドン (ATG)、5'末端NheI制限部位 (GCTAGC) および 3'末端RsrII制限部位 (CGGACCG) を含む。いくつかの実施形態において、Ab01-VHタンパク質配列は、配列番号 6 5 を含む。いくつかの実施形態において、Ab01 HCDR1は、配列番号 6 6 に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、Ab01 HCDR2は、配列番号 6 7 に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、Ab01 HCDR3は、配列番号 6 8 に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、Ab01-VLは、配列番号 6 9 に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、Ab01 LCDR1は、配列番号 7 0 に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、Ab01 LCDR2は、配列番号 7 1 に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、Ab01 LCDR3は、配列番号 7 2 に示される配列を含む。

#### 【0123】

いくつかの実施形態において、Ab02 VHは、配列番号 1 5 に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、Ab02 VLは、配列番号 1 7 に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、IL13Ra2 Ab02 VLVH scFvは、配列番号 6 3 に示される配列によってコードされる。いくつかの実施形態において、IL13Ra2 Ab02 VHVL scFvは、配列番号 6 4 に示される配列によってコードされ、この配列は、Ab02-VL配列、Ab02-VH配列、開始コドン (ATG)、5'末端NheI制限部位 (GCTAGC) および 3'末端RsrII制限部位 (CGGACCG) を含む。いくつかの実施形態において、Ab02-VHタンパク質配列は、配列番号 7 3 に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、Ab02 HCDR1は、配列番号 7 4 に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、Ab02 HCDR2は、配列番号 7 5 に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、Ab02 HCDR3は、配列番号 7 6 に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、Ab02-VLタンパク質配列は、配列番号 7 7 に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、Ab02 LCDR1は、配列番号 7 8 に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、Ab02 LCDR2は、配列番号 7 9 に示される配列を含む。いくつかの実施形態において、Ab02 LCDR3は、配列番号 8 0 に示される配列を含む。

#### 【実施例】

#### 【0124】

#### 実施例 1—IL-13R $\alpha$ 2 標的 CAR の構築

様々な IL-13R $\alpha$ 2 標的 CAR を構築した。図 1 に示すように、これらの IL-13R $\alpha$ 2 特異的 CAR は、IL-13 受容体  $\alpha$ 2 (IL-13R $\alpha$ 2) の細胞外エピトープを特異的に認識する様々な一本鎖可変領域断片 (scFv) のうちのいずれか 1 つ；様々なスペーサードメインのうちのいずれか 1 つ (「S」、「M」または「L」で示す)；ヒト CD28 に由来する膜貫通ドメイン (CD28tm)；ヒト 4-1BB に由来する共刺激ドメイン；CD3 $\zeta$  に由来するシグナル伝達ドメイン；T2A リボソームスキップ配列；および末端切断型 EGFR (EGFRt) 形質導入マーカを含み、任意でさらなる T2A リボソームスキップ配列と、メトトレキサートにより選択できるように構成されたジヒドロ葉酸還元酵素の二重変異体 (DHFRdm) をコードする導入遺伝子を含んでいた。

#### 【0125】

一本鎖可変領域断片 (scFv) を得ることができる抗体またはエピトープ結合断片の例としては、ヒト化抗 IL-13Ra2 IgG1 抗体 hu08 (Creative Biolabs、ニューヨーク)、および抗 IL-13RA2 治療抗体 (hu07 v1.1) (Creative Biolabs、ニューヨーク) が挙げられる。

#### 【0126】

各 CAR において、スペーサードメインは scFv と連結されており、このスペーサードメインによって細胞外結合部分が膜貫通ドメインに連結されている。各 CAR は、アミノ酸配列の長さが異なる 3 種のスペーサー (S、M または L) のうちのいずれか 1 つを含むように構築した (スペーサー S (配列番号 9)；スペーサー M (配列番号 10)；またはスペー

10

20

30

40

50

サー L（配列番号 11））。2種の抗IL-13Ra2抗体（「Hu08」（Ab01）；および「Hu07」（Ab02））のいずれかに由来するVHドメインおよびVLドメインを使用することにより、様々なIL-13R $\alpha$ 2標的CARにおいてscFvの構成を様々に変えた。各CARのscFv部分は、配列番号14または配列番号15に示される配列を有するVH領域と、配列番号16または配列番号17に示される配列を有するVL領域とを含み、柔軟なペプチドリンカーを介してVL-VHの順またはVH-VLの順で連結した。

【0127】

#### 実施例2—様々な抗体に由来するCARの機能比較

様々な抗体に由来する結合ドメインscFvを異なる方向で含むCARの機能比較を行った。この比較は、EGFRtの細胞表面発現分析およびサイトカイン放出アッセイを使用して行った。この試験で利用した各CARは、「S」スパーサー（配列番号9のアミノ酸配列を有する改変された免疫グロブリンのヒンジ領域）と、図1に示した前述の膜貫通ドメイン、共刺激シグナル伝達ドメインおよび第1シグナル伝達ドメインと、図1に示した様々な結合領域scFv（VH-VLの順またはVL-VHの順で連結されたVHドメインとVLドメインを含む）のうちのいずれか1つとを含んでいた。利用したCARは、スパーサーSを含むIL-13Ra2 Ab01 VLVH CAR；スパーサーSを含むIL-13Ra2 Ab01 VHVL CAR；スパーサーSを含むIL-13Ra2 Ab02 VLVH CAR；およびスパーサーSを含むIL-13Ra2 Ab02 VHVL CARであった。

【0128】

CD8+T細胞およびCD4+T細胞におけるEGFRtマーカーの発現をフローサイトメトリーで測定することによって、各細胞におけるCARの発現を試験した（図2A）。

【0129】

DAOY細胞（ヒト脳／小脳細胞株）、U251T細胞（ヒト神経膠芽腫細胞株）およびIL13R $\alpha$ 2を発現するように組換えたK562細胞（ヒト慢性骨髄性白血病細胞）をそれぞれCAR T細胞と共培養した。24時間後、サイトカインアッセイを使用して、上清中のIL-2濃度、IFN- $\gamma$ 濃度およびTNF- $\alpha$ 濃度を測定した。Ab01抗体から得たVHドメインとVLドメインをVH-VLの順またはVL-VHの順で連結した結合ドメインを含むCARを発現するCD8+T細胞およびCD4+T細胞と標的細胞をインキュベートした場合に、サイトカインの産生の増加が観察された（図2Bおよび図2C）。

【0130】

#### 実施例3—様々なスパーサーを含むCARの機能比較

同じ抗体に由来する（異なる方向の）scFvと長さの異なる様々なスパーサーを含むCARの機能比較を行った。マーカー配列EGFRtをゲーティングして、CD8+細胞における図1に示した4種のCARの細胞表面発現を試験した（図3A）。さらに、各CARを有するCD8+細胞の特異的溶解能およびサイトカイン放出能を試験した。この試験において、典型的な各CARは、2種の結合ドメインのいずれか1つ（Ab01から得たVLドメインとVHドメインをVL-VHの順で連結したscFv、またはこれらのドメインをVH-VLの順で連結したscFv）、様々なスパーサーのうちのいずれか1つ（（配列番号9のアミノ酸配列を有する）「S」、（配列番号10のアミノ酸配列を有する）「M」、または（配列番号11のアミノ酸配列を有する）「L」）、ならびに図1に示した前述の膜貫通ドメイン、共刺激シグナル伝達ドメインおよび第1シグナル伝達ドメインをそれぞれ含んでいた。

【0131】

グラフに示した各CARを含むレンチウイルスを健常ドナー由来のT細胞に形質導入し、マルチパラメータフローサイトメトリーで分析した代表的な結果を図3A（上パネルおよび中央パネル）に示す。ヒストグラムの4分割線はコントロール染色に基づいて設定した。さらに、IL-13R $\alpha$ 2標的CARを導入したCD8+T細胞におけるサロゲートマーカー（EGFRt）の表面発現をフローサイトメトリーで分析した（図3A、下パネル）。

【0132】

グラフに示すように、エフェクター細胞と標的細胞の比率を様々に変えて、IL-13R $\alpha$ 2標的CARを発現するCD8 T細胞と、様々なIL-13Ra2発現標的細胞株を共培養した（図3

10

20

30

40

50

B)。クロム放出アッセイを行って細胞溶解活性を評価するとともに、上清中のサイトカインの産生を評価した。クロム放出アッセイは、4時間にわたる共培養により実施し、サイトカインの放出は、24時間の共培養より評価した（エフェクター：標的＝2：1）。図3Cに示すように、様々なCAR発現T細胞との共培養によって特異的溶解とサイトカインの分泌が誘導され、標的細胞に対するエフェクター細胞の比率を増加させると特異的溶解が増加した。VL-VHの順で連結したscFvと「S」スパーサーを含むCARを発現させた細胞では、評価したその他のCAR発現細胞と比べて、細胞溶解活性の増強が観察された。VL-VHの順で連結した結合ドメインを有する様々なCARを評価したところ、いずれも標的に特異的な細胞溶解活性とサイトカインの産生が観察された。さらに、VL-VHの順で連結したCARでは、「S」スパーサーを有している場合、試験したその他のスパーサーよりも優れた作用が観察された。これに対して、「S」スパーサーを有し、VH-VLの順で連結したCARでは、このアッセイにおいて細胞溶解活性は観察されなかった（一方、「M」スパーサーまたは「L」スパーサーを有し、VH-VLの順で連結したCARでは、いずれも活性が観察された）。

#### 【0133】

サイトカインの産生に関しては、図3Bに示すように、スパーサーSを含むIL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VLVH CARを導入したT細胞、スパーサーMを含むIL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VLVH CARを導入したT細胞、およびスパーサーLを含むIL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VLVH CARを導入したT細胞においてIFN- $\gamma$ の高発現が誘導された。また、スパーサーMを含むIL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VHVH CARを導入したT細胞、およびスパーサーLを含むIL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VHVH CARを導入したT細胞でもIFN- $\gamma$ の発現が示された。さらに、スパーサーSを含むIL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VLVH CARを導入したT細胞、スパーサーMを含むIL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VLVH CARを導入したT細胞、およびスパーサーLを含むIL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VLVH CARを導入したT細胞では、特異的溶解の増加が見られた。

#### 【0134】

特異的溶解に関しては、図3Bに示すように、短いスパーサー（S）を含むIL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VLVH CARを有するCD8+細胞、中程度の長さのスパーサー（M）を含むIL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VLVH CARを有するCD8+細胞、および長いスパーサー（L）を含むIL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VLVH CARを有するCD8+細胞は、各CD8+細胞の濃度を高くすると、顕著な量の特異的溶解が観察された。さらに、これらの細胞では、IFN- $\gamma$ サイトカインの産生も多かった。

#### 【0135】

これに対して、短いスパーサー（S）を含むIL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VLVH CAR、中程度の長さのスパーサー（M）を含むIL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VLVH CARおよび長いスパーサー（L）を含むIL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VLVH CARと比較した場合、短いスパーサー（S）を含むIL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VHVH CARを発現する細胞、中程度の長さのスパーサー（M）を含むIL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VHVH CARを発現する細胞および長いスパーサー（L）を含むIL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VHVH CARを発現する細胞では特異的溶解が減少した。スパーサーSを含むIL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VHVH CARでは、特異的溶解は見られなかった。さらに、スパーサーSを含むIL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VHVH CARを発現させた場合、IFN- $\gamma$ は発現されなかったが、中程度の長さのスパーサー（M）を含むIL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VHVH CARおよび長いスパーサー（L）を含むIL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VHVH CARを発現させた場合は、IFN- $\gamma$ の発現が見られた。

#### 【0136】

#### 実施例4—インビボにおける抗IL13R $\alpha$ 2 CARの抗腫瘍活性

Ab01抗体に由来するVLドメインとVHドメインをVL-VHの順で連結した結合ドメインとスパーサー「S」を含むIL13R $\alpha$ 2特異的CARを発現する細胞を神経膠芽腫マウスモデルに投与し、治療帰結を評価した。CD8+細胞においてこのCARを発現させ、実験に使用した。実験に際し、0日目に、ffLuc+U87膠芽腫細胞（ $0.2 \times 10^6$ 個）をNSGマウスの前脳に頭蓋内注射した。7日目に、IL-13R $\alpha$ 2 Ab01 VLVH CARを形質導入したCD8+T細胞

胞を様々な投与量（ $2 \times 10^6$ 個、 $1 \times 10^6$ 個または $0.5 \times 10^6$ 個）で使用してマウス群（1群あたり  $n = 3$ ）を治療するか、マウス群（1群あたり  $n = 3$ ）に治療を行わなかった（溶媒コントロールまたはmock）。

【0137】

図1に示した膜貫通ドメインおよびシグナル伝達ドメインならびに「S」スペーサーを含み、Ab01に由来するVHドメインとVLドメインをVL-VHの順で連結したIL13R $\alpha$ 2特異的CARのインビボにおける抗腫瘍活性を分析した試験の結果を図4Aおよび図4Bに示す。0日目に、ホタルルシフェラーゼを発現するヒト神経膠芽腫細胞（ffLuc<sup>+</sup>U87膠芽腫細胞）（ $0.2 \times 10^6$ 個）をNSGマウスの前脳に頭蓋内注射した。7日目に、マウス群（1群あたり  $n = 3$ ）に溶媒コントロールを投与するか、Mock投与を行うか、IL-13R $\alpha$ 2特異的CAR（Ab01 VL-VH）を発現するCD8<sup>+</sup>細胞を様々な投与量（ $2 \times 10^6$ 個、 $1 \times 10^6$ 個または $0.5 \times 10^6$ 個）で投与して治療した。図4Aは、腫瘍負荷を示す尺度としての全光束（光子／秒）（y軸）を時間（腫瘍接種後の経過日数、x軸）に対してプロットしたグラフであり、溶媒による治療またはMock治療（左側のグラフ）をマウスに行った場合の結果と、グラフに示すように細胞数を徐々に減らしてCAR<sup>+</sup>細胞を投与した場合の結果を示しており（右側のグラフ；右側から左側にかけて示す）、CAR発現細胞の投与により腫瘍が退縮したことが示されている。カプランマイヤー生存曲線では、抗IL-13R $\alpha$ 2 CARを発現するT細胞の投与量を増加するほど、マウスの生存率が改善することが示された（図4B）。溶媒コントロールにおける25日後の生存率は0%であった。一方、IL13R $\alpha$ 2 Ab01 VLVHを発現するCD8<sup>+</sup>T細胞を $2 \times 10^6$ 個投与したマウスでは、90日後の生存率が約50%になった。

【0138】

#### 実施例5—インビボにおける抗IL13R $\alpha$ 2 CARの抗腫瘍活性

U251T腫瘍担持マウスを神経膠芽腫モデルとして使用し、実施例3と実質的に同様にして実験を行い、様々な長さのスペーサーを含むIL13Ra2 Ab01 VLVH CARの効果を評価した。0日目に、U251T GFP:ffluc腫瘍細胞を頭蓋内注射し、7日目に、CD8<sup>+</sup>CAR T細胞またはCD8<sup>+</sup>Mock T細胞を腫瘍内注射した。Mock T細胞を注射したマウスは、コントロールとして使用した。

【0139】

短いスペーサーを含む第2世代IL13R $\alpha$ 2 Ab01 VLVH CAR T細胞で治療したマウスでは、いずれも腫瘍が完全に退縮した。中程度の長さのスペーサーを含むCARを注射したマウス群では、そのうちの1匹のみにおいて腫瘍の再発が見られ、腫瘍を注射してから58日目に安楽死する必要があった。長いスペーサーを含むIL13R $\alpha$ 2 CAR T細胞の腫瘍内投与で治療したU251T腫瘍担持マウスでは、そのうちの3匹において低い治療活性しか示されず、腫瘍が再発した。

【0140】

以上のデータをすべて考え合わせると、インビボにおいて最適な抗腫瘍作用を付与するには、短い細胞外スペーサーを使用してIL13R $\alpha$ 2 Ab01 VLVHを構成することが最適であることが示唆され、その臨床開発が可能であることが裏付けられた。

【0141】

本明細書で提供する方法および組成物の実施形態のいくつかにおける特定のアミノ酸配列およびヌクレオチド配列の一覧を表2に示す。

10

20

30

40

50

【表 2】

| 配列番号    | 特徴               | 配列                                                                                                                                                                                                                                                      |
|---------|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 配列番号 1  | ヒト IgG1          | EPKSCDKTHTCPPCP                                                                                                                                                                                                                                         |
| 配列番号 2  | ヒト IgG2          | ERKCCVECP                                                                                                                                                                                                                                               |
| 配列番号 3  | ヒト IgG3          | ELKTPLGDTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP<br>EPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP                                                                                                                                                                                       |
| 配列番号 4  | ヒト IgG4          | ESKYGPPCPSCP                                                                                                                                                                                                                                            |
| 配列番号 5  | 改変ヒト IgG4        | ESKYGPPCPPCP                                                                                                                                                                                                                                            |
| 配列番号 6  | 改変ヒト IgG4        | YGPPCPPCP                                                                                                                                                                                                                                               |
| 配列番号 7  | 改変ヒト IgG4        | KYGPPCPPCP                                                                                                                                                                                                                                              |
| 配列番号 8  | 改変ヒト IgG4        | EVVKYGPPCPPCP                                                                                                                                                                                                                                           |
| 配列番号 9  | 短いスペーサー          | ESKYGPPCPPCP                                                                                                                                                                                                                                            |
| 配列番号 10 | 中程度の長さの<br>スペーサー | ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG<br>FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS<br>RWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK                                                                                                                            |
| 配列番号 11 | 長いスペーサー          | ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV<br>VVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV<br>YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY<br>KTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHN<br>HYTQKSLSLGLK |
| 配列番号 12 | CD28tm           | ATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTCGGAGGC<br>GTGCTGGCCTGCTACAGCCTGCTGGTCACCGTGGCCTTCAT<br>CATCTTTTGGGTG                                                                                                                                                            |
| 配列番号 13 | CD28tm           | MFWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV                                                                                                                                                                                                                             |
| 配列番号 14 | Ab01-VH          | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRNGMSWVRQAPG<br>KGLEWVATVSSGGSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSL<br>RAEDTAVYYCARQGTTALATRFFDVWGQGTLVTVSS                                                                                                                       |
| 配列番号 15 | Ab02-VH          | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTKYGVHWVRQAPG<br>KGLEWVAVKWAGGSTDYNALMSRFTISRDNKNSLYLQMNSL<br>RAEDTAVYYCARDHRDAMDYWGQGTLVTVSS                                                                                                                              |

10

20

30

40

50

| 配列番号    | 特徴      | 配列                                                                                                                                            |
|---------|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 配列番号 16 | Ab01-VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCKASQDVGTA<br>VAWYQQKPGKA<br>PKLLIYSASYRSTGVPSRFSGSGSGTDFTL<br>TISSL<br>QPEDFATYYCQHHYSAPWTFGGGTKVEIK                    |
| 配列番号 17 | Ab02-VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCTASLSVSST<br>YLHWYQQKPGKA<br>PKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTL<br>TISSL<br>QPEDFATYYCHQYHRSPLTFGGGTKVEIK                   |
| 配列番号 18 | VH 領域   | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS<br>RNGMSWVRQAPG<br>KGLEWVATVSSGGSYIYYADSVKGRFTISR<br>DNAKNSLYLQMNSL<br>RAEDTAVYYCARQGTTALATRFFDVWGQGT<br>LTVSS |
| 配列番号 19 | VL 領域   | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCKASQDVGTA<br>VAWYQQKPGKA<br>PKLLIYSASYRSTGVPS<br>RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHH<br>YSAPWTFGGGTK<br>VEIK                |
| 配列番号 20 | 重鎖 CDR1 | SRNGMS                                                                                                                                        |
| 配列番号 21 | 重鎖 CDR2 | TVSSGGSYIYYADSVKG                                                                                                                             |
| 配列番号 22 | 重鎖 CDR3 | QGTTALATRFFDV                                                                                                                                 |
| 配列番号 23 | 軽鎖 CDR1 | KASQDVGTA                                                                                                                                     |
| 配列番号 24 | 軽鎖 CDR2 | SASYRST                                                                                                                                       |
| 配列番号 25 | 軽鎖 CDR3 | QHHYSAPWT                                                                                                                                     |
| 配列番号 26 | 空き      |                                                                                                                                               |
| 配列番号 27 | 空き      |                                                                                                                                               |
| 配列番号 28 | 重鎖 CDR2 | TVSSGGSYIYYADSVKG                                                                                                                             |
| 配列番号 29 | 重鎖 CDR3 | QGTTALATRFFDV                                                                                                                                 |
| 配列番号 30 | 軽鎖 CDR1 | KASQDVGTA                                                                                                                                     |
| 配列番号 31 | 軽鎖 CDR2 | SASYRST                                                                                                                                       |
| 配列番号 32 | 軽鎖 CDR3 | QHHYSAPWT                                                                                                                                     |
| 配列番号 33 | 重鎖 CDR1 | GFTFSRN                                                                                                                                       |
| 配列番号 34 | 重鎖 CDR1 | GFTFSRNGMS                                                                                                                                    |

10

20

30

40

50

| 配列番号    | 特徴      | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|---------|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 配列番号 35 | 重鎖 CDR1 | RNGMS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 配列番号 36 | 重鎖 CDR1 | SRNGMS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 配列番号 37 | 重鎖 CDR2 | SSGGSY                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 配列番号 38 | 重鎖 CDR2 | TVSSGGSYIY                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 配列番号 39 | 重鎖 CDR2 | TVSSGGSYIY                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 配列番号 40 | 重鎖 CDR2 | TVSSGGSYIYYADSVKG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 配列番号 41 | 重鎖 CDR3 | ARQGTTALATRFFDV                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 配列番号 42 | Fc 領域   | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRNGMSWVRQAPG<br>KGLEWVATVSSGGSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSL<br>RAEDTAVYYCARQGTTALATRFFDVWGQGLTVTVSSASTKGPS<br>VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV<br>HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV<br>DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR<br>TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS<br>TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ<br>PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYCTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM<br>HEALHNHYTQKSLSCSPGK  |
| 配列番号 43 | Fc 領域   | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRNGMSWVRQAPG<br>KGLEWVATVSSGGSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSL<br>RAEDTAVYYCARQGTTALATRFFDVWGQGLTVTVSSASTKGPS<br>VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV<br>HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV<br>DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR<br>TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS<br>TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ<br>PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNCFSCFSVM<br>HEALHNHYTQKSLSCSPGK |

10

20

30

40

50

| 配列番号    | 特徴    | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|---------|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 配列番号 44 | Fc 領域 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRNGMSWVRQAPG<br>KGLEWVATVSSGGSYIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSL<br>RAEDTAVYYCARQGTALATRFDDVWGQGTLLTVSSASTKGPS<br>VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV<br>HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV<br>DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR<br>TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS<br>TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ<br>PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM<br>HEALHNHYTQKSLSCSPGK |
| 配列番号 45 | Fc 領域 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRNGMSWVRQAPG<br>KGLEWVATVSSGGSYIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSL<br>RAEDTAVYYCARQGTALATRFDDVWGQGTLLTVSSASTKGPS<br>VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV<br>HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV<br>DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR<br>TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS<br>TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ<br>PREPCVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG<br>QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM<br>HEALHNHYTQKSLSL     |
| 配列番号 46 | Fc 領域 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVAWYQQKPGKA<br>PKLLIYSASYRSTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC<br>QHHYSAPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV<br>VCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTSL<br>SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 配列番号 47 | Fc 領域 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVAWYQQKPGKA<br>PKLLIYSASYRSTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC<br>QHHYSAPWTFGGGTKVEIKRTVACPSVFIFPPSDEQLKSGTASV<br>VCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTSL<br>SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 配列番号 48 | Fc 領域 | TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRKAKVQWKVDN<br>ALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKAAYEKHKVYACEV<br>THQGLSSPVTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 配列番号 49 | LCDR1 | TASLSVSSTYLH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |

10

20

30

40

50

| 配列番号    | 特徴                        | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|---------|---------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 配列番号 50 | LCDR2                     | STSNLAS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 配列番号 51 | LCDR3                     | HQYHRSPLT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 配列番号 52 | LCDR1                     | KASQDVGTAVA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 配列番号 53 | LCDR2                     | SASYRST                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 配列番号 54 | LCDR3                     | QHHYSAPWT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 配列番号 55 | HCDR1                     | TKYGVH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 配列番号 56 | HCDR2                     | VKWAGGSTDYNSALMS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 配列番号 57 | HCDR3                     | DHRDAMDY                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 配列番号 58 | HCDR1                     | SRNGMS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 配列番号 59 | HCDR2                     | TVSSGGSYIYYADSVKG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 配列番号 60 | HCDR3                     | QGTTALATRFFDV                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 配列番号 61 | IL13Ra2 Ab01<br>VLVH scFv | GCTAGCCCCGCCACCATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGC<br>TCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCTCCTGATCCCAGACA<br>TCCAGATGACCCAGTCCCCCTCTTCTCTGTCTGCCTCTGTGG<br>GCGACAGAGTGACCATCACCTGTAAGGCCAGTCAGGATGTA<br>GGTACTGCTGTAGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGC<br>TCCAAGCTGCTGATCTACTCGGCATCCTACCGGTCCACTGG<br>CGTGCCTTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGATTT<br>CACCTGACCATCTCCTCCCTCCAGCCTGAGGATTTTCGCCAC<br>CTACTACTGCCAGCACCATTATAGTGCTCCGTGGACGTTTGG<br>CGGCGGAACAAAGGTGGAGATCAAGGGTGGTGGTGGTTCTG<br>GCGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTGGTTCTGAGGTGCAGCT<br>GGTGGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCT<br>CTGAGACTGTCTTGCCGCCTCCGGCTTCACCTTCAGTAGG<br>AATGGCATGTCTTGGGTGAGGCAGGCCCTGGCAAGGGCCT<br>GGAGTGGGTGGCCACCGTTAGTAGTGGTGGTAGTTACATCTA<br>CTATGCAGACAGTGTGAAGGGGCGGTTACCATCTCCAGGG<br>ACAACGCCAAGAACTCCCTGTACCTCCAGATGAACTCCCTGA<br>GGGCCGAGGATACCGCGTGTACTACTGTGCCAGACAAGGG<br>ACTACGGCACTAGCTACGAGGTTCTTCGATGTCTGGGGCCAG<br>GGCACCTGGTGACCGTGTCTCTGAATCTAAGTACGGACC<br>G |

10

20

30

40

50

| 配列番号    | 特徴                                                                                                                              | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 配列番号 62 | IL13Ra2 Ab01<br>VHVL scFv:<br><br>Ab01-VL;<br>Ab01-VH;<br>ATG 開始コドン;<br>5' NheI 制限部位<br>(GCTAGC);<br>3' RsrII 制限部位<br>(CGGACCG) | GCTAGCCCGCCACCATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGC<br>TCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCTCCTGATCCCAGAGG<br>TGCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGG<br>CGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCTCCGGCTTCACCTT<br>CAGTAGGAATGGCATGTCTTGGGTGAGGCAGGCCCTGGCA<br>AGGGCCTGGAGTGGGTGGCCACCGTTAGTAGTGGTGGTAGT<br>TACATCTACTATGCAGACAGTGTGAAGGGGCGGTTACCATC<br>TCCAGGGACAACGCCAAGAACTCCCTGTACCTCCAGATGAAC<br>TCCCTGAGGGCCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGTGCCAG<br>ACAAGGGACTACGGCACTAGCTACGAGGTTCTTCGATGTCTG<br>GGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGTCTCTGGTGGTGGTG<br>GTTCTGGCGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTGGTTCTGACATC<br>CAGATGACCCAGTCCCCCTCTTCTGTCTGCCTCTGTGGGC<br>GACAGAGTGACCATCACCTGTAAGGCCAGTCAGGATGTAGGT<br>ACTGCTGTAGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCTCC<br>CAAGCTGCTGATCTACTCGGCATCCTACCGGTCCACTGGCGT<br>GCCTTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGATTTAC<br>CCTGACCATCTCCTCCCTCCAGCCTGAGGATTTGCCACCTA<br>CTACTGCCAGCACCATTAAGTGCTCCGTGGACGTTTGGCGG<br>CGGAACAAAGGTGGAGATCAAGGAATCTAAGTACGGACCG |

10

20

30

40

50

| 配列番号    | 特徴                        | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|---------|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 配列番号 63 | IL13Ra2 Ab02<br>VLVH scFv | GCTAGCCCGCCACCATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGC<br>TCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCTCCTGATCCCAGATAT<br>TCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCGAGCGTGG<br>GCGATCGCGTGACCATTACCTGCACCGCGAGCCTGAGCGTG<br>AGCAGCACCTATCTGCATTGGTATCAGCAGAAACCGGGCAAA<br>GCGCCGAAACTGCTGATTTATAGCACCAGCAACCTGGCGAG<br>CGGCGTGCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACC<br>GATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAAGATTTT<br>GCGACCTATTATTGCCATCAGTATCATCGCAGCCCGCTGACC<br>TTTGGCGGGCGGCACCAAAGTGGAAATTAAAGGTGGTGGTGG<br>TTCTGGCGGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTGGTTCTGAAGTGC<br>AGCTGGTGGAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCGGGCGG<br>CAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGCGAGCGGCTTTACCTTTA<br>CCAAATATGGCGTGCAATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCAAA<br>GGCCTGGAATGGGTGGCGGTGAAATGGGCGGGCGGCAGCA<br>CCGATTATAACAGCGCGCTGATGAGCCGCTTTACCATTAGCC<br>GCGATAACGCGAAAAACAGCCTGTATCTGCAGATGAACAGCC<br>TGCGCGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGAT<br>CATCGCGATGCGATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGT<br>GACCGTGAGCAGCGAATCTAAGTACGGACCG |

10

20

30

40

50

| 配列番号    | 特徴                                                                                                                              | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 配列番号 64 | IL13Ra2 Ab02<br>VHVL scFv:<br><br>Ab02-VL;<br>Ab02-VH;<br>ATG 開始コドン;<br>5' NheI 制限部位<br>(GCTAGC);<br>3' RsrII 制限部位<br>(CGGACCG) | GCTAGCCCGCCACCATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGC<br>TCTGTGAGTTACCACACCCAGCATTCTCCTGATCCCAGAAG<br>TGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCGGG<br>CGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGCGAGCGGCTTTACCT<br>TTACCAAATATGGCGTGCATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGC<br>AAAGGCCTGGAATGGGTGGCGGTGAAATGGGCGGGCGGCA<br>GCACCGATTATAACAGCGCGCTGATGAGCCGCTTTACCATTA<br>GCCGCGATAACGCGAAAAACAGCCTGTATCTGCAGATGAACA<br>GCCTGCGCGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGCGC<br>GATCATCGCGATGCGATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCT<br>GGTGACCGTGAGCAGCGGTGGTGGTGGTTCTGGCGGCGGC<br>GGCTCCGGTGGTGGTGGTTCTGATATTCAGATGACCCAGAG<br>CCCGAGCAGCCTGAGCGCGAGCGTGGGCGATCGCGTGACC<br>ATTACCTGCACCGCGAGCCTGAGCGTGAGCAGCACCTATCT<br>GCATTGGTATCAGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAACTGC<br>TGATTTATAGCACCAGCAACCTGGCGAGCGGCGTGCCGAGC<br>CGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAC<br>CATTAGCAGCCTGCAGCCGGAAGATTTTGCACCTATTATTG<br>CCATCAGTATCATCGCAGCCCGCTGACCTTTGGCGGCGGCA<br>CCAAAGTGGAATTAAGAATCTAAGTACGGACCG |
| 配列番号 65 | Ab01-VH                                                                                                                         | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRNGMSWVRQAPG<br>KGLEWVATVSSGGSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSL<br>RAEDTAVYYCARQGTTALATRFFDVWGQGTLVTVSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 配列番号 66 | Ab01 HCDR1                                                                                                                      | SRNGMS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 配列番号 67 | Ab01 HCDR2                                                                                                                      | TVSSGGSYIYYADSVKG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 配列番号 68 | Ab01 HCDR3                                                                                                                      | QGTTALATRFFDV                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 配列番号 69 | Ab01-VL                                                                                                                         | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTAFAVWYQQKPGKA<br>PKLLIYSASYSRSTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC<br>QHHYSAPWTFGGGTKVEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 配列番号 70 | Ab01 LCDR1                                                                                                                      | KASQDVGTAFA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 配列番号 71 | Ab01 LCDR2                                                                                                                      | SASYSRST                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 配列番号 72 | Ab01 LCDR3                                                                                                                      | QHHYSAPWT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

10

20

30

40

50

| 配列番号    | 特徴              | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|---------|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 配列番号 73 | Ab02-VH         | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTKYGVHWVRQAPG<br>KGLEWVAVKWAGGSTDYNALMSRFTISRDNAKNSLYLQMNSL<br>RAEDTAVYYCARDHRDAMDYWGQGTLVTVSS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 配列番号 74 | Ab02 HCDR1      | TKYGVH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 配列番号 75 | Ab02 HCDR2      | VKWAGGSTDYNALMS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 配列番号 76 | Ab02 HCDR3      | DHRDAMDY                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 配列番号 77 | Ab02-VL         | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCTASLSVSSTYLHWYQQKPGKA<br>PKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL<br>QPEDFATYYCHQYHRSPLTFGGGTKVEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 配列番号 78 | Ab02 LCDR1      | TASLSVSSTYLH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 配列番号 79 | Ab02 LCDR2      | STSNLAS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 配列番号 80 | Ab02 LCDR3      | HQYHRSPLT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 配列番号 81 | DHFRdm          | MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDFWPPLRNESRYFQRM TTTSS<br>VEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGA<br>HFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMWVIVGGSSVYKEAMNHPG<br>HLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGI<br>KYKFEVYEKND                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 配列番号 82 | DHFRdm          | ATGGTTGGTTCGCTAAACTGCATCGTCGCTGTGTCCCAGAAC<br>ATGGGCATCGCAAGAACGGGGACTTCCCCTGGCCACCGCT<br>CAGGAATGAATCCAGATATTTCCAGAGAATGACCACAACCTC<br>TTCAGTAGAAGGTAAACAGAATCTGGTGATTATGGGTAAGAA<br>GACCTGGTTCTCCATTCTGAGAAGAATCGACCTTTAAAGGG<br>TAGAATTAATTTAGTTCTCAGCAGAGAACTCAAGGAACCTCCA<br>CAAGGAGCTCATTTTCTTTCCAGAAGTCTAGATGATGCCTTAA<br>AACTTACTGAACAACCAGAATTAGCAAATAAAGTAGACATGGT<br>CTGGATAGTTGGTGGCAGTTCTGTTTATAAGGAAGCCATGAA<br>TCACCCAGGCCATCTTAACTATTTGTGACAAGGATCATGCAA<br>GACTTTGAAAGTGACACGTTTTTCCAGAAATTGATTTGGAGA<br>AATATAAACTTCTGCCAGAATACCCAGGTGTTCTCTCTGATGT<br>CCAGGAGGAGAAAGGCATTAAGTACAAATTTGAAGTATATGA<br>GAAGAATGATTAA |
| 配列番号 83 | GMCSFss<br>リーダー | ATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCTTCTGCTCTGTGAGTTACCA<br>CACCCAGCATTCTCCTGATCCCA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |

10

20

30

40

50

| 配列番号    | 特徴                           | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|---------|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 配列番号 84 | Ab01-VL                      | GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCTTCTCTGTCTGCCTCT<br>GTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAAGGCCAGTCAGGA<br>TG TAGGTACTGCTGTAGCCTGGTATCAGCAGAAAGCCTGGCAA<br>GGCTCCCAAGCTGCTGATCTACTCGGCATCCTACCGGTCCAC<br>TGGCGTGCCTTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCG<br>ATTTACCCCTGACCATCTCCTCCCTCCAGCCTGAGGATTTCTG<br>CCACCTACTACTGCCAGCACCATTATAGTGCTCCGTGGACGT<br>TTGGCGGCGGAACAAAGGTGGAGATCAAG                                           |
| 配列番号 85 | Ab01-VH                      | GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGC<br>CTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCTCCGGCTTCA<br>CCTTCAGTAGGAATGGCATGTCTTGGGTGAGGCAGGCCCT<br>GGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCCACCGTTAGTAGTGGTGG<br>TAGTTACATCTACTATGCAGACAGTGTGAAGGGGCGTTTAC<br>CATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACTCCCTGTACCTCCAGAT<br>GAACTCCCTGAGGGCCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGTG<br>CCAGACAAGGGACTACGGCACTAGCTACGAGGTTCTTCGATG<br>TCTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGTCTCT |
| 配列番号 86 | Ab02-VL                      | GATATTGAGATGACCCAGAGCCCCGAGCAGCCTGAGCGCGAG<br>CGTGGGCGATCGCGTGACCATACCTGCACCGCGAGCCTGA<br>GCGTGAGCAGCACCTATCTGCATTGGTATCAGCAGAAACCGG<br>GCAAAGCGCCGAACTGCTGATTTATAGCACCAGCAACCTGG<br>CGAGCGGCGTGCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGG<br>CACCGATTTTACCCTGACCATAGCAGCCTGCAGCCGGAAGA<br>TTTTGCGACCTATTATTGCCATCAGTATCATCGCAGCCCGCTG<br>ACCTTTGGCGGCGGCACCAAAGTGGAATTTAA                                              |
| 配列番号 87 | Ab02-VH                      | GAAGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGC<br>CGGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGCGAGCGGCTT<br>TACCTTTACCAAATATGGCGTGCAATTGGGTGCGCCAGGCGCC<br>GGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGGCGGTGAAATGGGCGGGC<br>GGCAGCACCGATTATAACAGCGCGCTGATGAGCCGCTTTACC<br>ATTAGCCGCGATAACGCGAAAAACAGCCTGTATCTGCAGATG<br>AACAGCCTGCGCGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGC<br>GCGCGATCATCGCGATGCGATGGATTATTGGGGCCAGGGCA<br>CCCTGGTGACCGTGAGCAGC              |
| 配列番号 88 | (Gly-Gly-Gly-Ser)<br>x3 リンカー | GGTGGTGGTGGTTCTGGCGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTG<br>GTTCT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |

10

20

30

40

50

| 配列番号    | 特徴                | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|---------|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 配列番号 89 | Ab01 scFv<br>VLVH | GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCTTCTCTGTCTGCCTCT<br>GTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAAGGCCAGTCAGGA<br>TGTAGGTACTGCTGTAGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAA<br>GGCTCCCAAGCTGCTGATCTACTCGGCATCCTACCGGTCCAC<br>TGGCGTGCCCTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCG<br>ATTCACCCTGACCATCTCCTCCCTCCAGCCTGAGGATTCG<br>CCACCTACTACTGCCAGCACCATTATAGTGCTCCGTGGACGT<br>TTGGCGGCGGAACAAAGGTGGAGATCAAGGGTGGTGGTGGT<br>TCTGGCGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTGGTCTGAGGTGCA<br>GCTGGTGGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGC<br>TCTCTGAGACTGTCTTGCGCCCTCCGGCTTCACCTTCAGT<br>AGGAATGGCATGTCTTGGGTGAGGCAGGCCCTGGCAAGGG<br>CCTGGAGTGGGTGGCCACCGTTAGTAGTGGTGGTAGTTACAT<br>CTACTATGCAGACAGTGTGAAGGGGCGGTTCCACCATCTCCAG<br>GGACAACGCCAAGAACTCCCTGTACCTCCAGATGAACTCCCT<br>GAGGGCCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGTGCCAGACAAG<br>GGACTACGGCACTAGCTACGAGGTTCTTCGATGTCTGGGGC<br>CAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCTCT |
| 配列番号 90 | Ab01 scFv<br>VHVL | GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGC<br>CTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGCGCCCTCCGGCTTCA<br>CCTTCAGTAGGAATGGCATGTCTTGGGTGAGGCAGGCCCT<br>GGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCCACCGTTAGTAGTGGTGG<br>TAGTTACATCTACTATGCAGACAGTGTGAAGGGGCGGTTAC<br>CATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACTCCCTGTACCTCCAGAT<br>GAACTCCCTGAGGGCCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGTG<br>CCAGACAAGGGACTACGGCACTAGCTACGAGGTTCTTCGATG<br>TCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCTCTGGTGGT<br>GGTGGTTCTGGCGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTGGTTCTGA<br>CATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCTTCTCTGTCTGCCTCTGT<br>GGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTAAGGCCAGTCAGGATG<br>TAGGTACTGCTGTAGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAG<br>GCTCCCAAGCTGCTGATCTACTCGGCATCCTACCGGTCCACT<br>GGCGTGCCTTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGA<br>TTTACCCTGACCATCTCCTCCCTCCAGCCTGAGGATTCGC<br>CACCTACTACTGCCAGCACCATTATAGTGCTCCGTGGACGTT<br>TGGCGGCGGAACAAAGGTGGAGATCAAG  |

10

20

30

40

50

| 配列番号    | 特徴                | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|---------|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 配列番号 91 | Ab02 scFv<br>VLVH | GATATTCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCGAG<br>CGTGGGCGATCGCGTGACCATTACCTGCACCGCGAGCCTGA<br>GCGTGAGCAGCACCTATCTGCATTGGTATCAGCAGAAACCGG<br>GCAAAGCGCCGAAACTGCTGATTTATAGCACCAGCAACCTGG<br>CGAGCGGCGTGCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGG<br>CACCGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAAGA<br>TTTTGCGACCTATTATTGCCATCAGTATCATCGCAGCCCGCTG<br>ACCTTTGGCGGCGGCACCAAAGTGGAATTAAGGTGGTGG<br>TGGTTCTGGCGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTGGTTCTGAAG<br>TGCAGCTGGTGGAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCGGG<br>CGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGCGAGCGGCTTTACCT<br>TTACCAAATATGGCGTGCAATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGC<br>AAAGGCCTGGAATGGGTGGCGGTGAAATGGGCGGCGGCA<br>GCACCGATTATAACAGCGCGCTGATGAGCCGCTTTACCATTA<br>GCCGCGATAACGCGAAAAACAGCCTGTATCTGCAGATGAACA<br>GCCTGCGCGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGCGC<br>GATCATCGCGATGCGATGGATTATTGGGGCCAGGGCACCT<br>GGTGACCGTGAGCAGC     |
| 配列番号 92 | Ab02 scFv<br>VHVL | GAAGTGCAGCTGGTGGAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGC<br>CGGGCGGCAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCGGCGAGCGGCTT<br>TACCTTTACCAAATATGGCGTGCAATTGGGTGCGCCAGGCGCC<br>GGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGGCGGTGAAATGGGCGGGC<br>GGCAGCACCGATTATAACAGCGCGCTGATGAGCCGCTTTACC<br>ATTAGCCGCGATAACGCGAAAAACAGCCTGTATCTGCAGATG<br>AACAGCCTGCGCGCGGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGC<br>GCGCGATCATCGCGATGCGATGGATTATTGGGGCCAGGGCA<br>CCCTGGTGACCGTGAGCAGCGGTGGTGGTGGTTCTGGCGGC<br>GGCGGCTCCGGTGGTGGTGGTTCTGATATTCAGATGACCCA<br>GAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCGAGCGTGGGCGATCGCGTG<br>ACCATTACCTGCACCGCGAGCCTGAGCGTGAGCAGCACCTA<br>TCTGCATTGGTATCAGCAGAAACCGGGCAAAGCGCCGAAACT<br>GCTGATTTATAGCACCAGCAACCTGGCGAGCGGCGTGCCGA<br>GCCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTG<br>ACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAAGATTTTTCGACCTATTAT<br>TGCCATCAGTATCATCGCAGCCCGCTGACCTTTGGCGGCGG<br>CACCAAAGTGGAATTAATA |
| 配列番号 93 | 短いスペーサー           | GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |

10

20

30

40

50

| 配列番号    | 特徴     | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|---------|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 配列番号 94 | CD28tm | ATGTTCTGGGTGCTGGTGGTGGTCGGAGGCGTGCTGGCCTG<br>CTACAGCCTGCTGGTCACCGTGGCCTTCATCATCTTTTGGGT<br>G                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 配列番号 95 | 41-BB  | AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCAT<br>TTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTA<br>GCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG                                                                                                                                                                                                                                             |
| 配列番号 96 | CD3ζ   | CGGGTGAAGTTCAGCAGAAGCGCCGACGCCCCTGCCTACCA<br>GCAGGGCCAGAATCAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGCA<br>GAAGGGAAGAGTACGACGTCCTGGATAAGCGGAGAGGCCGG<br>GACCCTGAGATGGGCGGCAAGCCTCGGCGGAAGAACCCCCA<br>GGAAGGCCTGTATAACGAACTGCAGAAAGACAAGATGGCCG<br>AGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGAGGCG<br>GGGCAAGGGCCACGACGGCCTGTATCAGGGCCTGTCCACCG<br>CCACCAAGGATACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTG<br>CCCCCAAGG |
| 配列番号 97 | T2A    | CTCGAGGGCGGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATG<br>CGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGG                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

10

20

30

40

50

| 配列番号    | 特徴    | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|---------|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 配列番号 98 | EGFRt | CGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATTGGTGAATTTAAAGAC<br>TCACTCTCCATAAATGCTACGAATATTAACACTTCAAAAACT<br>GCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCAT<br>TTAGGGGTGACTCCTTCACACATACTCCTCCTCTGGATCCAC<br>AGGAACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGT<br>TTTTGCTGATTCAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCC<br>ATGCCTTTGAGAACCTAGAAATCATACGCGGCAGGACCAAGC<br>AACATGGTCAGTTTTCTCTTGACAGTCGTCAGCCTGAACATAAC<br>ATCCTTGGGATTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGATGGAGA<br>TGTGATAATTTCAGGAAACAAAAATTTGTGCTATGCAAATACA<br>ATAAACTGGAAAAAACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACC<br>AAAATTATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAAGGCCACA<br>GGCCAGGTCTGCCATGCCTTGTGCTCCCCGAGGGCTGCTG<br>GGGCCCCGAGCCCAGGGAAGTGCCTCTTGGCCGAATGTCA<br>GCCGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGTGCAACCTTCTGGAG<br>GGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGAACTCTGAGTGCATACA<br>GTGCCACCCAGAGTGCCTGCCTCAGGCCATGAACATCACCT<br>GCACAGGACGGGGACCAGACAACCTGTATCCAGTGTGCCCAC<br>TACATTGACGGCCCCCACTGCGTCAAGACCTGCCCCGGCAGG<br>AGTCATGGGAGAAAACAACACCCTGGTCTGGAAGTACGCAGA<br>CGCCGGCCATGTGTGCCACCTGTGCCATCCAACTGCACCTA<br>CGGATGCACTGGGCCAGGTCTTGAAGGCTGTCCAACGAATG<br>GGCCTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGGGGGCC<br>CTCCTCTTGCTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCCTCTT<br>CATG |

10

20

30

40

50

| 配列番号     | 特徴               | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|----------|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 配列番号 99  | DHFRdm           | ATGGTTGGTTCGCTAAACTGCATCGTCGCTGTGTCCCAGAAC<br>ATGGGCATCGGCAAGAACGGGGACTTCCCCTGGCCACCGCT<br>CAGGAATGAATCCAGATATTTCCAGAGAATGACCACAACCTC<br>TTCAGTAGAAGGTAAACAGAATCTGGTGATTATGGGTAAGAA<br>GACCTGGTTCTCCATTCTGAGAAGAATCGACCTTTAAAGGG<br>TAGAATTAATTTAGTTCTCAGCAGAGAACTCAAGGAACCTCCA<br>CAAGGAGCTCATTTTCTTTCCAGAAGTCTAGATGATGCCTTAA<br>AACTTACTGAACAACCAGAATTAGCAAATAAAGTAGACATGGT<br>CTGGATAGTTGGTGGCAGTTCTGTTTATAAGGAAGCCATGAA<br>TCACCCAGGCCATCTTAAACTATTTGTGACAAGGATCATGCAA<br>GACTTTGAAAGTGACACGTTTTTTCCAGAAATTGATTTGGAGA<br>AATATAAACTTCTGCCAGAATACCCAGGTGTTCTCTCTGATGT<br>CCAGGAGGAGAAAGGCATTAAGTACAAATTTGAAGTATATGA<br>GAAGAATGATTAA |
| 配列番号 100 | 中程度の長さの<br>スペーサー | GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCTGGCCA<br>GCCTAGAGAACCCCAGGTGTACACCCTGCCTCCCAGCCAGG<br>AAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCA<br>AAGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGC<br>AACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGT<br>GCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCCGGCTGA<br>CCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTCAGC<br>TGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCA<br>GAAGTCCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAG                                                                                                                                                                                                                                   |

10

20

30

40

50

| 配列番号     | 特徴      | 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|----------|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 配列番号 101 | 長いスペーサー | ATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCCG<br>AGTTTCGACGGCGGACCCAGCGTGTTCTGTTCCCCCCCAAG<br>CCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCGAGGTGAC<br>CTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGATCCCGAGGTCC<br>AGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCC<br>AAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCCAGAGCACCTACCG<br>GGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGA<br>ACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTG<br>CCCAGCAGCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCA<br>GCCTCGCGAGCCCCAGGTGTACACCTGCCTCCCTCCCAGG<br>AAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTG<br>AAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG<br>CAACGGCCAGCCTGAGAACAACACTACAAGACCACCCCTCCCG<br>TGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCCGGCTG<br>ACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTTAG<br>CTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCC<br>AGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAG |

10

20

## 【0142】

本明細書で使用されている複数形および／または単数形の用語は、当業者であれば、本明細書の記載および／または用途に適するように、複数形用語を単数のものとして、かつ／または単数形用語を複数ものものとして解釈することができる。本発明を明確なものとするために、様々な単数形／複数形用語が意図的に使い分けられている。

## 【0143】

当業者であれば、本明細書に記載の用語、特に添付の請求項（たとえば添付の請求項の本体部）に記載の用語は、通常、「オープンエンドな」用語であることを理解できるであろう（たとえば、「含んでいる（including）」という用語は、「含んでいるが、これらに限定されない」と解釈されるべきであり、「有する（having）」という用語は、「少なくとも有する」と解釈されるべきであり、「含む（include）」という用語は「含むが、これらに限定されない」と解釈されるべきである）。さらに、特定の数が請求項に記載されている場合、前述のような意図も請求項に明確に記載されており、特定の数が記載されていない場合はそのような意図も存在しないことも、当業者であれば理解できるであろう。具体的に説明をすれば、たとえば、後述の特許請求の範囲では、請求項を定義するために、「少なくとも1つ」や「1つ以上」といった前置きが記載されている場合がある。しかしながら、このような前置きが記載されているからといって、不定冠詞「1つ（aまたはan）」を使用して構成要素が記載された請求項を、1つのみの構成要素を含む実施形態に限定すべきではなく、たとえ同じ請求項内に「1つ以上」または「少なくとも1つ」といった前置きと「1つ（aまたはan）」といった不定冠詞とが含まれていたとしても、1つのみの構成要素を含む実施形態に限定すべきではない（たとえば、「1つ（aおよび／またはan）」は、「少なくとも1つ」または「1つ以上」を意味すると解釈すべきである）。これは、定冠詞を使用して記載された請求項でも同じである。また、請求項に特定の数が明確に記載されていたとしても、「少なくとも」記載されたその数であるということを当業者であれば理解するであろう（たとえば、修飾語を伴わない「2つ」という記載は、「少なくとも2つ」または「2つ以上」を意味する）。さらに、「A、BおよびCのうちの少なくとも1つ」といった慣用語句が使用されている場合、通常、そのような語句は、当業者がその語句を通常理解する意味で記載されている（たとえば「A、BおよびCのうち

30

40

50

の少なくとも1つを有するシステム」は、Aのみを有するシステム、Bのみを有するシステム、Cのみを有するシステム、AとBを有するシステム、AとCを有するシステム、BとCを有するシステム、ならびに／またはA、BおよびCを有するシステムなどを包含するが、これらに限定されない)。また、「A、BまたはCのうちの少なくとも1つ」といった慣用語句が使用されている場合、通常、そのような語句は、当業者がその語句を通常理解する意味で記載されている(たとえば「A、BまたはCのうちの少なくとも1つを有するシステム」は、Aのみを有するシステム、Bのみを有するシステム、Cのみを有するシステム、AとBを有するシステム、AとCを有するシステム、BとCを有するシステム、ならびに／またはA、BおよびCを有するシステムなどを包含するが、これらに限定されない)。さらに、2つ以上の選択肢を表すための選言的用語および／または選言的語句は、明細書、特許請求の範囲または図面のいずれにおいても、記載された用語のうちの1つ、記載された用語のいずれか、または記載された用語の両方を含む場合があると当業者であれば理解するであろう。たとえば「AまたはB」という表現は、「AまたはB」または「AおよびB」を含む場合がある。

10

【0144】

さらに、本開示の特徴または態様がマーカッシュ形式で記載されている場合、当業者であれば、マーカッシュ形式で記載された各メンバーまたはそれらからなるサブグループについても記載されていると理解できるであろう。

【0145】

第1の態様から第8の態様で述べた実施形態の特徴はいずれも、本明細書に記載のあらゆる態様および実施形態に適用可能である。さらに、第1の態様から第8の態様において述べた実施形態の特徴はいずれも、その一部または全体がそれぞれ独立して、本明細書に記載のその他の実施形態とどのようにでも組み合わせることができ、たとえば、1つ、2つ、3つまたはそれ以上の実施形態の全体またはその一部を組み合わせてもよい。さらに、第1の態様から第8の態様において述べた実施形態の特徴はいずれも、その他の態様または実施形態において任意の特徴として採用してもよい。

20

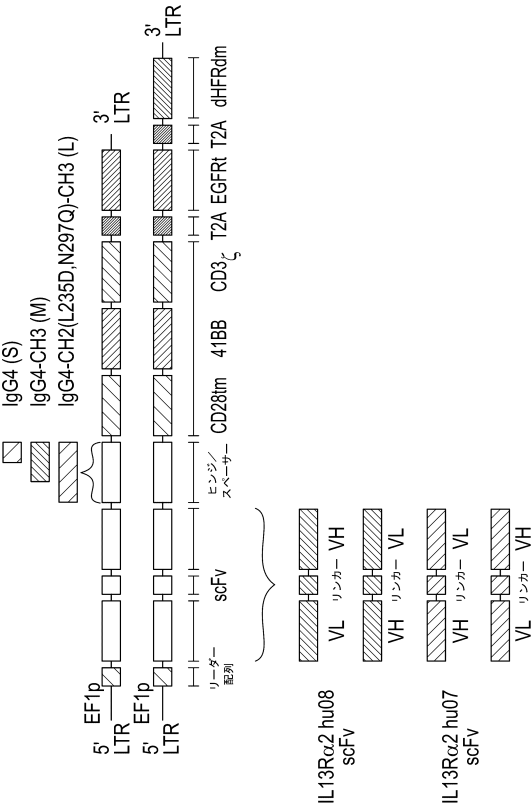
30

40

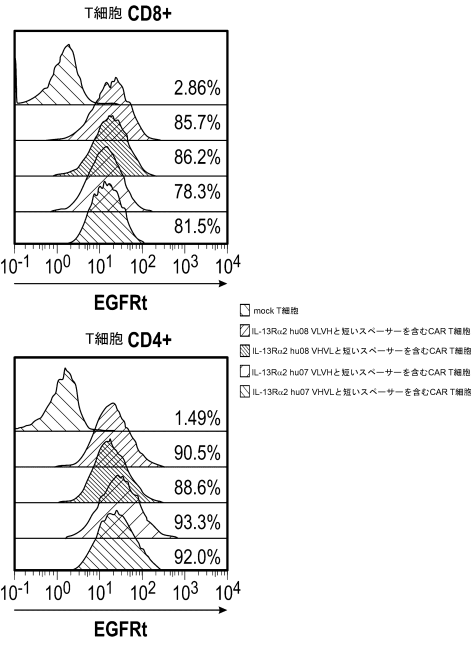
50

【図面】

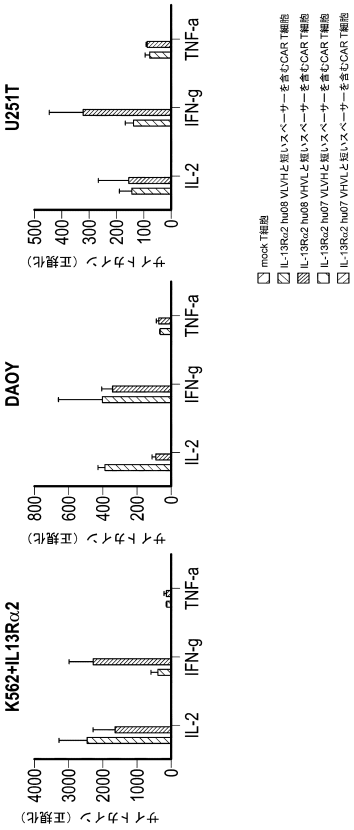
【図 1】



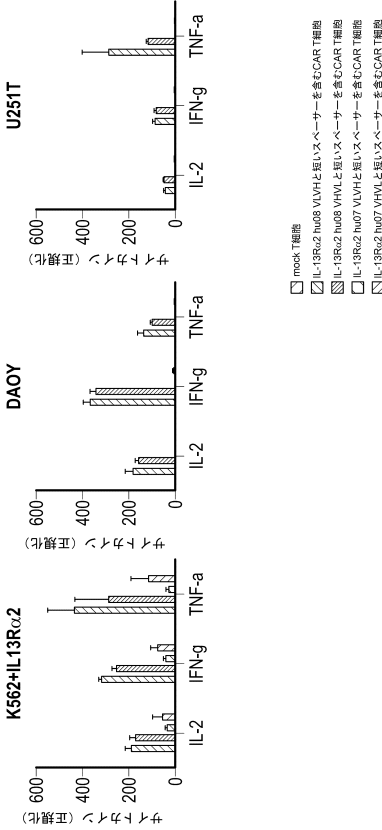
【図 2 A】



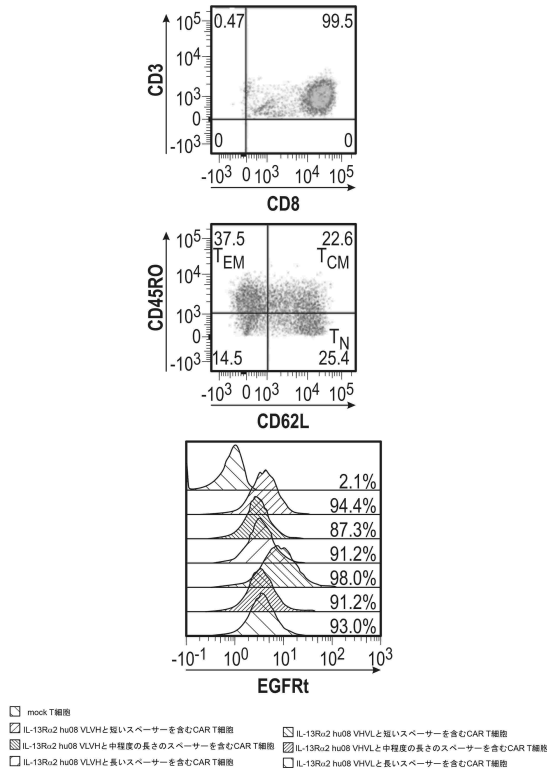
【図 2 B】



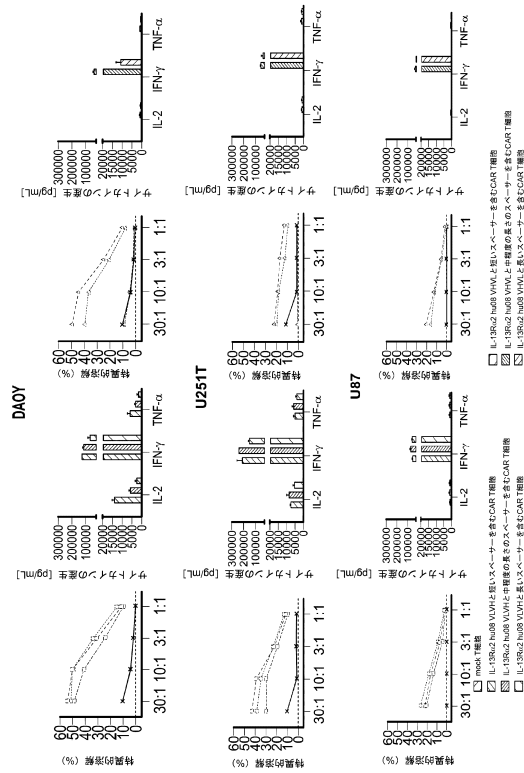
【図 2 C】



【図 3 A】



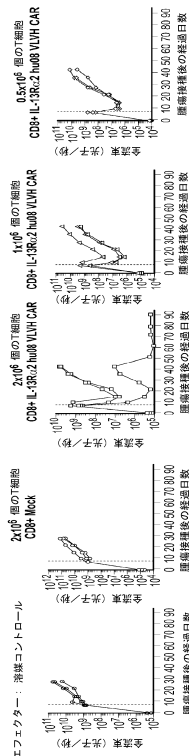
【図 3 B】



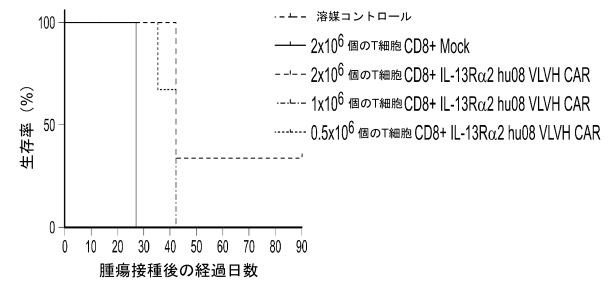
10

20

【図 4 A】



【図 4 B】

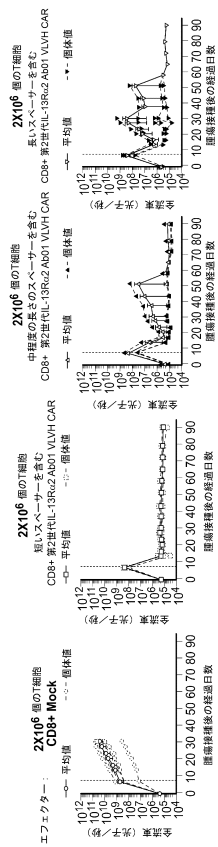


30

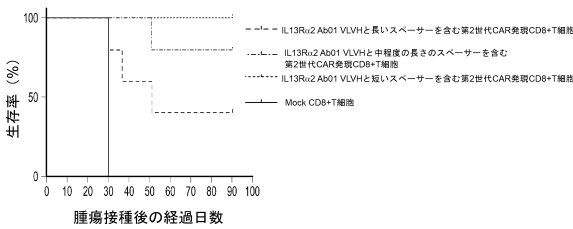
40

50

【図 5 A】



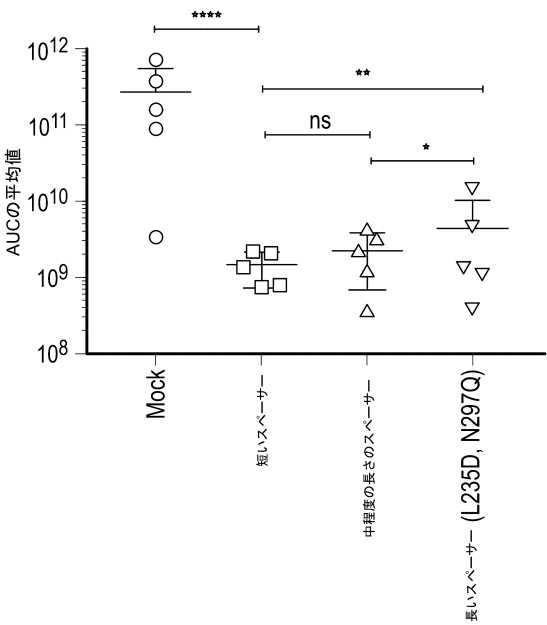
【図 5 B】



10

20

【図 5 C】



30

40

【配列表】

0007438123000001.app

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

## F I

|         |                  |         |        |   |
|---------|------------------|---------|--------|---|
| C 1 2 N | 15/861 (2006.01) | C 1 2 N | 15/861 | Z |
| C 1 2 N | 15/867 (2006.01) | C 1 2 N | 15/867 | Z |
| C 0 7 K | 19/00 (2006.01)  | C 0 7 K | 19/00  |   |
| C 1 2 N | 5/10 (2006.01)   | C 1 2 N | 5/10   |   |
| A 6 1 K | 35/15 (2015.01)  | A 6 1 K | 35/15  |   |
| 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  |   |
| C 1 2 N | 5/0783(2010.01)  | C 1 2 N | 5/0783 |   |
| C 1 2 N | 5/0789(2010.01)  | C 1 2 N | 5/0789 |   |

1 9 0 0 シアトル チルドレンズ ホスピタル, ディービーエー シアトル チルドレンズ リサーチ  
インスティテュート内

## (72)発明者 ジェンセン, マイケル シー.

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 0 1, シアトル, 9 ティーエイチ アベニュー 1 9 0 0 シア  
トル チルドレンズ ホスピタル, ディービーエー シアトル チルドレンズ リサーチ インスティ  
テュート内

審査官 小田 浩代

## (56)参考文献

特表 2 0 1 6 - 5 0 3 2 9 5 ( J P , A )

特表 2 0 1 7 - 5 3 4 2 6 2 ( J P , A )

特表 2 0 1 6 - 5 2 5 8 8 1 ( J P , A )

特表 2 0 1 7 - 5 2 9 0 8 1 ( J P , A )

Krenciute G. et al., Characterization and Functional Analysis of scFv-based Chimeric Antige  
n Receptors to Redirect T Cells to IL13R $\alpha$ 2-positive Glioma, Mol Ther, 2016年, Vol. 24(  
2), pp. 354-363

Jonnalagadda M. et al., Efficient selection of genetically modified human T cells using met  
hotrexate- resistant human dihydrofolate reductase, Gene Ther, 2013年, Vol. 20, pp. 8  
53-860

橋本 直哉, 脳腫瘍に対する免疫療法, 京府医大誌 , 2017年, Vol. 126, pp. 405-415

## (58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

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

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

U n i P r o t / G e n e S e q

P u b M e d