

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

キメラ抗原受容体(CAR)をコードする単離核酸分子であって、該CARが抗EGFRvIII結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび、刺激ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含み、該抗EGFRvIII結合ドメインが表2または配列番号11に示す任意の抗EGFRvIII軽鎖結合ドメインアミノ酸配列の軽鎖相補決定領域1 (LC CDR1)、軽鎖相補決定領域2 (LC CDR2)および軽鎖相補決定領域3 (LC CDR3)の1つ以上、ならびに表2または配列番号11に示す任意の抗EGFRvIII重鎖結合ドメインアミノ酸配列の重鎖相補決定領域1 (HC CDR1)、重鎖相補決定領域2 (HC CDR2)および重鎖相補決定領域3 (HC CDR3)の1つ以上を含む、単離核酸分子。

10

【請求項 2】

表2または配列番号11に示す任意の抗EGFRvIII軽鎖結合ドメインアミノ酸配列のLC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3を含む、請求項 1 記載の単離核酸分子。

【請求項 3】

表2または配列番号11に示す任意の抗EGFRvIII重鎖結合ドメインアミノ酸配列のHC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3を含む、請求項 1 記載の単離核酸分子。

【請求項 4】

表2または配列番号11に示す任意の抗EGFRvIII軽鎖結合ドメインアミノ酸配列のLC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3ならびに、表2または配列番号11に示す任意の抗EGFRvIII重鎖結合ドメインアミノ酸配列のHC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3を含む、請求項 1 記載の単離核酸分子。

20

【請求項 5】

表2または配列番号11に示す任意の軽鎖可変領域を含む、請求項 1 記載の単離核酸分子。

【請求項 6】

表2または配列番号11に記載の任意の重鎖可変領域を含む請求項 1 記載の単離核酸分子。

【請求項 7】

表2または配列番号11に記載の任意の軽鎖可変領域および表2または配列番号11に記載の任意の重鎖可変領域を含む、請求項 1 記載の単離核酸分子。

30

【請求項 8】

EGFRvIII結合ドメインがscFvである、請求項 1～7 のいずれか記載の単離核酸分子。

【請求項 9】

軽鎖可変領域が、表2または配列番号11に記載の軽鎖可変領域のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個または3個の変更を有するが、30個以下、20個以下または10個以下の変更を有するアミノ酸配列か、または表2または配列番号11に示すアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列を含む、請求項 1～8 のいずれか記載の単離核酸分子。

【請求項 10】

重鎖可変領域が、表2または配列番号11に示す重鎖可変領域のアミノ酸配列に少なくとも1つ、2つまたは3つの変更を有するが、変更が30以下、20以下または10以下であるアミノ酸配列、または表2または配列番号11に示すアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列を含む、請求項 1～9 のいずれか記載の単離核酸分子。

40

【請求項 11】

該抗EGFRvIII結合ドメインが、配列番号38、配列番号44、配列番号50、配列番号56、配列番号62、配列番号68、配列番号74、配列番号80および配列番号86からなる群から選択される配列または、それと95～99%の同一性を有する配列を含む、請求項 1～10 のいずれか記載の単離核酸分子。

【請求項 12】

該抗EGFRvIII結合ドメインをコードする核酸配列が、配列番号39、配列番号45、配列番号51、配列番号57、配列番号63、配列番号69、配列番号75、配列番号81 および配列番号9

50

8からなる群から選択される配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む、請求項1～11のいずれか記載の単離核酸分子。

【請求項13】

コードされたCARが、T細胞受容体の α 鎖、 β 鎖または ζ 鎖、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137およびCD154からなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメインを含む、請求項1～12のいずれか記載の単離核酸分子。

【請求項14】

コードされた膜貫通ドメインが配列番号15の配列を含む、請求項1～13のいずれか記載の単離核酸分子。

【請求項15】

コードされた膜貫通ドメインが、配列番号15のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個または3個の変更を有するが、20個以下、10個以下または5個以下の変更を有するアミノ酸配列か、または配列番号15のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列を含む、請求項1～14のいずれか記載の単離核酸分子。

【請求項16】

膜貫通ドメインをコードする核酸配列が、配列番号8の配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む、請求項1～15のいずれか記載の単離核酸分子。

【請求項17】

コードされた抗EGFRvIII結合ドメインが、ヒンジ領域によって膜貫通ドメインに結合している、請求項1～16のいずれか記載の単離核酸分子。

【請求項18】

コードされたヒンジ領域が、配列番号14またはそれと95～99%の同一性を有する、請求項17記載の単離核酸分子。

【請求項19】

ヒンジ領域をコードする核酸配列が、配列番号7の配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む、請求項17記載の単離核酸分子。

【請求項20】

同時刺激ドメインをコードする配列をさらに含む、請求項1～19のいずれか記載の単離核酸分子。

【請求項21】

コードされた同時刺激ドメインが、OX40、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)および4-1BB (CD137)からなる群から選択されるタンパク質の機能性シグナル伝達ドメインを含む、請求項20記載の単離核酸分子。

【請求項22】

コードされた同時刺激ドメインが配列番号16の配列を含む、請求項20または21記載の該単離核酸分子。

【請求項23】

コードされた同時刺激ドメインが、配列番号16のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個または3個変更（例えば置換）を有するが、20個以下、10個以下または5個以下の変更（例えば置換）を有するアミノ酸配列または配列番号16のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列を含む、請求項20または21記載の単離核酸分子。

【請求項24】

同時刺激ドメインをコードする核酸配列が、配列番号9の配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む、請求項20または21記載の単離核酸分子。

【請求項25】

細胞内シグナル伝達ドメインをコードする配列をさらに含む、請求項1～24のいずれか記載の単離核酸分子。

【請求項26】

コードされた細胞内シグナル伝達ドメインが4-1BBの機能性シグナル伝達ドメインおよ

10

20

30

40

50

び/またはCD3ζの機能性シグナル伝達ドメインを含む、請求項1～25のいずれか記載の単離核酸分子。

【請求項27】

コードされた細胞内シグナル伝達ドメインが配列番号16の配列および/または配列番号17または配列番号99の配列を含む、請求項1～26のいずれか記載の単離核酸分子。

【請求項28】

該細胞内シグナル伝達ドメインが、配列番号16のアミノ酸配列および/または配列番号17または配列番号99のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個または3個の変更を有するが、20個以下、10個以下または5個以下の変更を有するアミノ酸配列か、または配列番号16のアミノ酸配列および/または配列番号17または配列番号99のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列を含む、請求項1～27のいずれか記載の単離核酸分子。

10

【請求項29】

該コードされた細胞内シグナル伝達ドメインが、配列番号16の配列および、配列番号17または配列番号99の配列を含む、該細胞内シグナル伝達ドメインを含む配列が同一フレーム内で、単一のポリペプチド鎖として発現する、請求項1～28のいずれか記載の単離核酸分子。

【請求項30】

該細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列が、配列番号9の配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列および/または配列番号10または配列番号100の配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む、請求項1～29のいずれか記載の単離核酸分子。

20

【請求項31】

リーダー配列をさらに含む、請求項1～30のいずれか記載の単離核酸分子。

【請求項32】

リーダー配列が、配列番号13を含む、請求項31記載の単離核酸分子。

【請求項33】

請求項1～32のいずれか記載の核酸分子によりコードされている単離ポリペプチド分子。

【請求項34】

配列番号43、配列番号49、配列番号55、配列番号61、配列番号67、配列番号73、配列番号79、配列番号85および配列番号90からなる群から選択される配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む、請求項33記載の単離ポリペプチド分子。

30

【請求項35】

配列番号73の配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む、請求項34記載の単離ポリペプチド分子。

【請求項36】

配列番号79の配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む、請求項34記載の単離ポリペプチド分子。

【請求項37】

抗EGFRvIII結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含む、単離キメラ抗原受容体(CAR)分子。

40

【請求項38】

該細胞内シグナル伝達ドメインが同時刺激ドメインおよび/または一次シグナル伝達ドメインを含む、請求項37記載の単離CAR分子。

【請求項39】

該抗EGFRvIII結合ドメインが抗EGFRvIII結合ドメインを含む抗体または抗体断片を含む、請求項37または38記載の単離CAR分子。

【請求項40】

該抗EGFRvIII結合ドメインが、表2または配列番号11に示す任意の抗EGFRvIII結合ドメインの軽鎖相補決定領域1 (LC CDR1)、軽鎖相補決定領域2 (LC CDR2)および軽鎖相補決定

50

領域3 (LC CDR3)の1つ以上ならびに、表2または配列番号11に示す任意の抗EGFRvIII結合ドメインの重鎖相補決定領域 1 (HC CDR1)、重鎖相補決定領域2 (HC CDR2)および重鎖相補決定領域3 (HC CDR3)の1つ以上を含む、請求項 37～39のいずれか記載の単離CAR分子。

【請求項 41】

表2または配列番号11に示す任意の抗EGFRvIII軽鎖結合ドメインアミノ酸配列のLC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3を含む、請求項 37～40のいずれか記載の単離CAR分子。

【請求項 42】

表2または配列番号11に示す任意の抗EGFRvIII重鎖結合ドメインアミノ酸配列のHC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3を含む、請求項 37～41のいずれか記載の単離CAR分子。

10

【請求項 43】

表2または配列番号11に示す任意の抗EGFRvIII軽鎖結合ドメインアミノ酸配列のLC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3ならびに、表2または配列番号11に示す任意の抗EGFRvIII重鎖結合ドメインアミノ酸配列のHC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3を含む、請求項 37～42のいずれか記載の単離CAR分子。

【請求項 44】

該抗EGFRvIII結合ドメインがscFvである、請求項 37～43のいずれか記載の単離CAR分子。

【請求項 45】

該抗EGFRvIII結合ドメインが表2または配列番号11に記載のアミノ酸配列の軽鎖および重鎖を含む、請求項 37～44のいずれか記載の単離CAR分子。

20

【請求項 46】

該抗EGFRvIII結合ドメインが、表2または配列番号11に記載の軽鎖可変領域のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個または3個の変更を有するが、30個以下、20個以下または10個以下の変更を有するアミノ酸配列か、または表2または配列番号11に記載の軽鎖可変領域のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 37～45のいずれか記載の単離CAR分子。

【請求項 47】

該抗EGFRvIII結合ドメインが、表2または配列番号11に示す重鎖可変領域のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個または3個の変更を有するが、変更が30個以下、20個以下または10個以下であるアミノ酸配列または表2または配列番号11に示すアミノ酸配列に95～99%の同一性を有する配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項 37～46のいずれか記載の単離CAR分子。

30

【請求項 48】

該抗EGFRvIII結合ドメインが配列番号38、配列番号44、配列番号50、配列番号56、配列番号62、配列番号68、配列番号74、配列番号80および配列番号86からなる群から選択される配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む、請求項 37～47のいずれか記載の単離CAR分子。

【請求項 49】

T細胞受容体の α 鎖、 β 鎖もしくは γ 鎖、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137およびCD154からなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインをさらに含む、請求項 37～48のいずれか記載の単離CAR分子。

40

【請求項 50】

膜貫通ドメインが配列番号15の配列を含む、請求項 49記載の単離CAR分子。

【請求項 51】

膜貫通ドメインが、配列番号15のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個または3個の変更を有するが、20個以下、10個以下または5個以下の変更を有するアミノ酸配列か、または配列番号15のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列を含む、請求項 49または50記載の単離CAR分子。

50

【請求項 5 2】

該抗EGFRvIII結合ドメインがヒンジ領域によって膜貫通ドメインに結合している、請求項 3 7～5 1 のいずれか記載の単離CAR分子。

【請求項 5 3】

コードされたヒンジ領域が、配列番号14またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む、請求項 5 2 記載の単離CAR分子。

【請求項 5 4】

同時刺激ドメインをコードする配列をさらに含む、請求項 3 7～5 3 のいずれか記載の単離CAR分子。

【請求項 5 5】

同時刺激ドメインが、OX40、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)および4-1BB (CD137)からなる群から選択されるタンパク質の機能性シグナル伝達ドメインを含む、請求項 5 4 記載の単離CAR分子。

【請求項 5 6】

同時刺激ドメインが、配列番号16の配列を含む、請求項 5 4 または 5 5 記載の単離CAR分子。

【請求項 5 7】

同時刺激ドメインが、配列番号16のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個または3個の変更を有するが、20個以下、10個以下または5個以下の変更を有するアミノ酸配列または配列番号16のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列を含む、請求項 5 4 または 5 5 記載の単離CAR分子。

【請求項 5 8】

細胞内シグナル伝達ドメインをコードする配列をさらに含む、請求項 3 7～5 7 のいずれか記載の単離CAR分子。

【請求項 5 9】

該細胞内シグナル伝達ドメインが4-1BBの機能性シグナル伝達ドメインおよび/またはCD3ζの機能性シグナル伝達ドメインを含む、請求項 5 8 記載の単離CAR分子。

【請求項 6 0】

該細胞内シグナル伝達ドメインが配列番号16の配列および/または配列番号17の配列を含む、請求項 5 8 または 5 9 記載の単離CAR分子。

【請求項 6 1】

細胞内シグナル伝達ドメインが、配列番号16の配列および/または配列番号99の配列を含む、請求項 5 8 または 5 9 記載の単離CAR分子。

【請求項 6 2】

細胞内シグナル伝達ドメインが、配列番号16のアミノ酸配列および/または配列番号17または配列番号99のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個または3個の変更を有するが、20個以下、10個以下または5個以下の変更を有するアミノ酸配列または配列番号16のアミノ酸配列および/または配列番号17または配列番号99のアミノ酸配列に95～99%の同一性を有する配列を含む、請求項 5 8～6 1 のいずれか記載の単離CAR分子。

【請求項 6 3】

該細胞内シグナル伝達が、ドメイン配列番号16の配列および配列番号17または配列番号99の配列を含み、該細胞内シグナル伝達ドメインを含む配列が同一フレーム中で、単一のポリペプチド鎖として発現される、請求項 5 8～6 1 のいずれか記載の単離CAR分子。

【請求項 6 4】

リーダー配列をさらに含む、請求項 3 7～6 3 のいずれか記載の単離CAR分子。

【請求項 6 5】

リーダー配列が配列番号13のアミノ酸配列または配列番号13のアミノ酸配列に95～99%の同一性を有する配列を含む、請求項 6 4 記載の単離CAR分子。

【請求項 6 6】

配列番号38、44、50、56、62、68、74または80に示す抗EGFRvIII結合ドメインの軽鎖相

10

20

30

40

50

補決定領域1 (LC CDR1)、軽鎖相補決定領域2 (LC CDR2)および軽鎖相補決定領域3 (LC CDR3)の1つ以上ならびに、配列番号38、44、50、56、62、68、74または80に示す抗EGFRvIII結合ドメインの重鎖相補決定領域1 (HC CDR1)、重鎖相補決定領域2 (HC CDR2)および重鎖相補決定領域3 (HC CDR3)の1つ以上を含む、抗EGFRvIII結合ドメイン。

【請求項 6 7】

配列番号38、44、50、56、62、68、74または80の抗EGFRvIII軽鎖結合ドメインアミノ酸配列のLC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3を含む、請求項 6 6 記載の抗EGFRvIII結合ドメイン。

【請求項 6 8】

配列番号38、44、50、56、62、68、74または80の抗EGFRvIII重鎖結合ドメインアミノ酸配列のHC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3を含む、請求項 6 6 または 6 7 記載の抗EGFRvIII結合ドメイン。

10

【請求項 6 9】

配列番号38、44、50、56、62、68、74または80の抗EGFRvIII軽鎖結合ドメインアミノ酸配列のLC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3、ならびに配列番号38、44、50、56、62、68、74または80の抗EGFRvIII重鎖結合ドメインアミノ酸配列のHC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3を含む、請求項 6 6 ～ 6 8 のいずれか記載の抗EGFRvIII結合ドメイン。

【請求項 7 0】

表2の軽鎖可変領域および配列番号38、44、50、56、62、68、74または80の重鎖可変領域を含む、請求項 6 6 ～ 6 9 のいずれか記載の抗EGFRvIII結合ドメイン。

20

【請求項 7 1】

配列番号38、44、50、56、62、68、74または80に示す軽鎖可変領域のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個または3個の変更を有するが、30個以下、20個以下または10個以下の変更を有するアミノ酸配列または、配列番号38、44、50、56、62、68、74または80中のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列;および/または、配列番号38、44、50、56、62、68、74または80に示す重鎖可変領域のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個または3個の変更を有するが、30個以下、20個以下または10個以下の変更を有するアミノ酸配列または配列番号38、44、50、56、62、68、74または80中のアミノ酸配列に95～99%の同一性を有する配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項 6 6 ～ 7 0 のいずれか記載の抗EGFRvIII結合ドメイン。

30

【請求項 7 2】

配列番号38、配列番号44、配列番号50、配列番号56、配列番号62、配列番号68、配列番号74、配列番号80および配列番号86からなる群から選択される配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む、請求項 6 7 ～ 7 1 のいずれか記載の抗EGFRvIII結合ドメイン。

【請求項 7 3】

CARをコードする核酸分子を含む、請求項 1 ～ 7 2 のいずれか記載のベクター。

【請求項 7 4】

DNA、RNA、プラスミド、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクターおよびレトロウイルスベクターからなる群から選択される、請求項 7 3 記載のベクター。

40

【請求項 7 5】

プロモーターをさらに含む、請求項 7 3 または 7 4 記載のベクター。

【請求項 7 6】

該プロモーターがEF-1プロモーターである、請求項75記載のベクター。

【請求項 7 7】

該EF-1プロモーターが配列番号97の配列を含む、請求項 7 6 記載のベクター。

【請求項 7 8】

該ベクターが試験管内で転写されたベクターである、請求項 7 3 ～ 7 7 のいずれか記載のベクター。

【請求項 7 9】

50

ベクター中の核酸配列がさらにポリ(A)テールを含む、請求項 7 3～7 8 のいずれか記載のベクター。

【請求項 8 0】

ベクター中の核酸配列がさらに3' UTRを含む、請求項 7 3～7 9 のいずれか記載のベクター。

【請求項 8 1】

請求項 7 3～8 0 のいずれか記載のベクターを含む細胞。

【請求項 8 2】

T細胞である、請求項 8 1 記載の細胞。

【請求項 8 3】

該T細胞がCD8+ T細胞である、請求項 8 2 記載の細胞。

【請求項 8 4】

ヒト細胞である、請求項 8 1 または 8 2 記載の細胞。

【請求項 8 5】

請求項 7 3～8 0 のいずれか記載のベクターでT細胞に形質導入することを含む、細胞の作製方法。

【請求項 8 6】

試験管内で転写されたRNAまたは合成RNAを細胞に導入することを含む、RNA操作細胞集団の作製方法であって、該RNAが本明細書に記載のCAR分子をコードする核酸を含む、方法。

【請求項 8 7】

請求項 3 7～6 5 のいずれかに記載のCAR分子を発現する細胞を有効量で哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物に抗腫瘍免疫を提供する方法。

【請求項 8 8】

該細胞が自家T細胞である、請求項 8 7 記載の方法。

【請求項 8 9】

該細胞が同種間T細胞である、請求項 8 7 または 8 8 記載の方法。

【請求項 9 0】

該哺乳動物がヒトである、請求項 8 7～8 9 のいずれか記載の方法。

【請求項 9 1】

EGFRvIIIの発現に関連する疾患に罹患している哺乳動物の処置方法であって、該哺乳動物に、請求項 3 7～6 5 のいずれか記載のCAR分子を発現する細胞を有効量で投与することを含む、方法。

【請求項 9 2】

EGFRvIIIに関連する疾患が神経膠芽腫である、請求項 9 1 記載の方法。

【請求項 9 3】

EGFRvIIIに関連する疾患が、多形神経膠芽腫 (GBM)、未分化星状細胞腫、巨細胞神経膠芽腫、膠肉腫、未分化乏突起神経膠腫、未分化上衣腫、脈絡叢がん、未分化神経節膠腫、松果体芽腫、髄上皮腫、上衣芽腫、髄芽腫、テント上原始神経外胚葉性腫瘍、AT/RT(非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍)、肺がん(例えば非小細胞肺がん)、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、結腸直腸がんおよび膀胱がんからなる群から選択されるがんまたはその任意の組合せ、または任意のがんの転移である、請求項 9 1 または 9 2 記載の方法。

【請求項 9 4】

CAR分子を発現する細胞が、CAR分子を発現する細胞の有効性を上昇させる薬剤と組み合わせて投与される、請求項 9 1～9 3 のいずれか記載の方法。

【請求項 9 5】

CAR分子を発現する細胞が、CAR分子発現細胞の投与に伴う副作用の1つ以上を改善させる薬剤と組み合わせて投与される、請求項 9 1～9 4 のいずれか記載の方法。

【請求項 9 6】

CAR分子を発現する細胞が、EGFRvIIIに関連する疾患を処置する薬剤と組み合わせて投

10

20

30

40

50

与される、請求項 9 1～9 5 のいずれか記載の方法。

【請求項 9 7】

医薬として用いるための、請求項 1～3 2 のいずれか記載の単離核酸分子、請求項 3 3～3 6 のいずれか記載の単離ポリペプチド分子、請求項 3 7～6 5 のいずれか記載の単離 CAR、請求項 6 6～7 2 のいずれか記載の抗EGFRvIII結合ドメイン、請求項 7 3～8 0 のいずれか記載のベクターまたは請求項 8 1～8 4 のいずれか記載の細胞。

【請求項 9 8】

EGFRvIII発現疾患の処置に用いるための、請求項 1～3 2 のいずれか記載の単離核酸分子、請求項 3 3～3 6 のいずれか記載の単離ポリペプチド分子、請求項 3 7～6 5 のいずれか記載の単離CAR、請求項 6 6～7 2 のいずれか記載の抗EGFRvIII結合ドメイン、請求項 7 3～8 0 のいずれか記載のベクターまたは請求項 8 1～8 4 のいずれか記載の細胞。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

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

【0 0 0 2】

連邦政府資金による研究開発の記載

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

20

【0 0 0 3】

配列表

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

【0 0 0 4】

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

【背景技術】

30

【0 0 0 5】

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

40

【0 0 0 6】

上皮増殖因子受容体(EGFR)の発現上昇は、種々のがん、例えば乳がん、肺がん、頭頸部がんならびに神経膠芽腫において頻繁に検出される。EGFR遺伝子中の自然発生的な再配列は、最初に、原発性ヒト神経膠芽腫において同定され、該変異は、EGFRの増幅を伴う腫瘍の殆ど全ての症例において報告されている。これらの再配列からは、3種類の異なる変異体が生じる。これらのうちの最も一般的なものは、EGFR mRNAのエキソン2～7が欠失していることにより特徴付けられるIII型EGF欠失変異受容体(EGFRvIII)である。これらの欠失は、cDNAヌクレオチド第275番～第1075番に相当し、これらは、おそらく、選択的スプラ

50

EGFRvIII結合ドメインの重鎖相補決定領域1 (HC CDR1)、重鎖相補決定領域2 (HC CDR2)および重鎖相補決定領域3 (HC CDR3) の1つ以上 (例えば3つ全て) を含み、例えば、1つ以上、例えば3つ全てのLC CDRおよび1つ以上、例えば3つ全てのHC CDRを含むヒト化抗EGFRvIII結合ドメインである。態様の一において、コードされた抗EGFRvIII結合ドメインは、本明細書 (例えば表2または配列番号11) に記載の軽鎖可変領域および/または本明細書 (例えば表2または配列番号11) に記載の重鎖可変領域を含む。態様の一において、コードされた抗EGFRvIII結合ドメインは、表2または配列番号11のアミノ酸配列の軽鎖および長鎖を含むscFvである。態様の一において、抗EGFRvIII結合ドメイン (例えばscFv) は、表2または配列番号11に記載の軽鎖可変領域のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個または3個の変更 (例えば置換) を有するが、30個以下、20個以下、10個以下の変更 (例えば置換) を有するアミノ酸配列または、表2もしくは配列番号11のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域; および/または表2または配列番号11の重鎖可変領域のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個または3個の変更 (例えば置換) を有するが、30個以下、20個以下、または10個以下の変更 (例えば置換) を有するアミノ酸配列または、表2もしくは配列番号11のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列を含む重鎖可変領域を含む。態様の一において、該抗EGFRvIII結合ドメインは、配列番号38、配列番号44、配列番号50、配列番号56、配列番号62、配列番号68、配列番号74、配列番号80および配列番号86からなる群から選択される配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。態様の一において、該抗EGFRvIII結合ドメインをコードする核酸配列は、配列番号68の配列を含む。態様の一において、該抗EGFRvIII結合ドメインをコードする核酸配列は、配列番号39、配列番号45、配列番号51、配列番号57、配列番号63、配列番号69、配列番号75、配列番号81および配列番号98からなる群から選択される配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。態様の一において、コードされた抗EGFRvIII結合ドメインは、scFvであり、本明細書中、例えば表2または配列番号11に示すアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域が、本明細書、例えば表2または配列番号11に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に、リンカー、例えば本明細書に記載のリンカーを介して結合している。態様の一において、コードされた抗EGFRvIII結合ドメインは、 $(\text{Gly}_4\text{-Ser})_n$ リンカーを含み、ここで、 n は1、2、3、4、5または6であり、好ましくは4である (配列番号110)。scFvの軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、例えば次のいずれかの方向性を有してよい: 軽鎖可変領域ーリンカーー重鎖可変領域または重鎖可変領域ーリンカーー軽鎖可変領域。

【0011】

態様の一において、コードされたCARは、T細胞受容体の α 鎖、 β 鎖または ζ 鎖、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137およびCD154からなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む、膜貫通ドメインを含む。態様の一において、コードされた膜貫通ドメインは、配列番号15の配列を含む。態様の一において、コードされた膜貫通ドメインは、配列番号15のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個または3個の変更 (例えば置換) を有するが、20個以下、10個以下または5個以下の変更 (例えば置換) を有するアミノ酸配列または配列番号15のアミノ酸配列と95～99%の同一性を示す配列を含む。態様の一において、該膜貫通ドメインをコードする核酸配列は、配列番号8の配列または該配列と95～99%の同一性を有する配列を含む。

【0012】

態様の一において、コードされた抗EGFRvIII結合ドメインは、ヒンジ領域、例えば本明細書に記載のヒンジ領域によって膜貫通ドメインに連結している。態様の一において、コードされたヒンジ領域は、配列番号14または配列番号104または配列番号106または配列番号108またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。態様の一において、該ヒンジ領域をコードする核酸配列は、配列番号7または配列番号105または配列番号107または配列番号109の配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。

【0013】

態様の一において、単離核酸分子は、同時刺激ドメイン、例えば本明細書に記載の同時

刺激ドメインをコードする配列をさらに含む。態様の一において、コードされた同時刺激ドメインは、OX40、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278) および4-1BB (CD137)からなる群から選択されるタンパク質の機能性シグナル伝達ドメインを含む。態様の一において、コードされた同時刺激ドメインは、配列番号16の配列を含む。態様の一において、コードされた同時刺激ドメインは、配列番号102の配列を含む。態様の一において、コードされた同時刺激ドメインは、配列番号16または配列番号102のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個もしくは3個の変更（例えば置換）を有するが、20個以下、10個以下、または5個以下の変更（例えば置換）を有するアミノ酸配列または、配列番号16または配列番号102のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列を含む。態様の一において、同時刺激ドメインをコードする核酸配列は、配列番号9またはそれと95～99%の同一性を示す配列を含む。

10

【0014】

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

20

30

【0015】

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

40

50

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

【0016】

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

【0017】

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

【0018】

局面の一において、本発明は、抗EGFRvIII結合ドメインをコードする単離核酸分子に関し、ここで、該抗EGFRvIII結合ドメインは、本明細書に記載の抗EGFRvIII結合ドメインの軽鎖相補決定領域1 (LC CDR1)、軽鎖相補決定領域2 (LC CDR2)および軽鎖相補決定領域3

(LC CDR3) の1つ以上（例えば3つ全て）、ならびに本明細書に記載の抗EGFRvIII結合ドメインの重鎖相補決定領域1 (HC CDR1)、重鎖相補決定領域2 (HC CDR2)および重鎖相補決定領域3 (HC CDR3)の1つ以上（例えば3つ全て）を含み、例えば1つ以上、例えば3つ全てのLC CDRおよび1つ以上、例えば3つ全てのHC CDRを含むヒト化抗EGFRbIII結合ドメインである。態様の一において、コードされた抗EGFRvIII結合ドメインは、本明細書に記載の（例えば配列番号38、44、50、56、62、68、74または80の）軽鎖可変領域および/または本明細書に記載の（例えば配列番号38、44、50、56、62、68、74または80の）重鎖可変領域を含む。態様の一において、コードされた抗EGFRvIII結合ドメインは、配列番号38、44、50、56、62、68、74または80のアミノ酸配列の軽鎖および重鎖を含むscFvである。態様の一において、該抗EGFRvIII結合ドメイン(例えば、scFv)は、配列番号38、44、50、56、62、68、74または80に示される軽鎖可変領域のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個または3個の変更（例えば置換）を有するが、30個以下、20個以下または10個以下の変更（例えば置換）を有するアミノ酸配列または配列番号38、44、50、56、62、68、74または80のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域；および/または配列番号38、44、50、56、62、68、74または80に示す重鎖可変領域のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個または3個の変更（例えば置換）を有するが、30個以下、20個以下または10個以下の変更（例えば置換）を有するアミノ酸配列または配列番号38、44、50、56、62、68、74または80のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列を含む重鎖可変領域を含む。態様の一において、該抗EGFRvIII結合ドメインは、配列番号38、配列番号44、配列番号50、配列番号56、配列番号62、配列番号68、配列番号74、配列番号80および配列番号86からなる群から選択される配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。態様の一において、該抗EGFRvIII結合ドメインをコードする核酸配列は、配列番号39、配列番号45、配列番号51、配列番号57、配列番号63、配列番号69、配列番号75、配列番号81および配列番号98からなる群から選択される配列または、それと95～99%の同一性を有する配列を含む。態様の一において、コードされた抗EGFRvIII結合ドメインはscFvであり、本明細書、例えば表2に記載のアミノ酸を含む軽鎖可変領域が、本明細書、例えば表2に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に、リンカー、例えば本明細書に記載のリンカーを介して結合している。態様の一において、コードされた抗EGFRvIII結合ドメインは、(Gly₄-Ser)_nリンカーを含み、ここで、nは1、2、3、4、5または6であり、好ましくは4である（配列番号110）。scFvの軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、例えば：軽鎖可変領域-リンカー-重鎖可変領域または重鎖可変領域-リンカー-軽鎖可変領域のいずれの方向を示していてもよい。

【0019】

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

【0020】

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

【0021】

態様の一において、抗EGFRvIII結合ドメインは、本明細書に記載の抗EGFRvIII結合ドメインの軽鎖相補決定領域1 (LC CDR1)、軽鎖相補決定領域2 (LC CDR2)および軽鎖相補決定領域3 (LC CDR 3)の1つ以上（例えば3つ全て）および、本明細書に記載する抗EGFRvIII結合ドメインの重鎖相補決定領域1 (HC CDR1)、重鎖相補決定領域2 (HC CDR2)および重鎖相補決定領域3 (HC CDR3)の1つ以上（例えば3つ全て）を含み、例えば、1つ以上、例えば3つ全てのLC CDRおよび1つ以上、例えば3つ全てのHC CDRを含むヒト化抗EGFRvIII結合ドメインである。態様の一において、該抗EGFRvIII結合ドメインは、本明細書（例えば表2または配列番号11）に記載の軽鎖可変領域および/または本明細書（例えば表2または配列番号11）に記載の重鎖可変領域を含む。態様の一において、該抗EGFRvIII結合ドメインは、表2または配列番号11に記載のアミノ酸配列の軽鎖および重鎖を含むscFvである。態様の一において、抗EGFRvIII結合ドメイン（例えばscFv）は、表2または配列番号11に記載の軽鎖可変領域のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個または3個の変更（例えば置換）を有するが、30個以下、20個以下または10個以下の変更（例えば置換）を有するアミノ酸配列または表2または配列番号11に記載の軽鎖可変領域のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域；および/または表2または配列番号11に記載の重鎖可変領域のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個または3個の変更（例えば置換）を有するが、30個以下、20個以下または10個以下の変更（例えば置換）を有するアミノ酸配列または表2または配列番号11に記載のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列を含む重鎖可変領域を含む。態様の一において、該抗EGFRvIII結合ドメインは、配列番号38、配列番号44、配列番号50、配列番号56、配列番号62、配列番号68、配列番号74、配列番号80、および配列番号86からなる群から選択される配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。態様の一において、該抗EGFRvIII結合ドメインはscFvであり、本明細書に記載の、例えば表2または配列番号11に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域は、本明細書、例えば表2または配列番号11に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に、リンカー、例えば本明細書に記載のリンカーを介して結合している。態様の一において、該抗EGFRvIII結合ドメインは、(Gly₄-Ser)_nリンカーを含み、ここで、nは1、2、3、4、5または6、好ましくは4（配列番号110）である。scFvの軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、軽鎖可変領域-リンカー-重鎖可変領域または重鎖可変領域-リンカー-軽鎖可変領域、のいずれの方向性を示していてもよい。

【0022】

態様の一において、該単離CAR分子は、T細胞受容体のα鎖、β鎖もしくはγ鎖、CD28、CD3ε、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137およびCD154からなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む。態様の一において、該膜貫通ドメインは、配列番号15の配列を含む。態様の一において、該膜貫通ドメインは、配列番号15のアミノ酸配列に、少なくとも1個、2個または3個の変更（例えば置換）を有するが、20個以下、10個以下または5個以下の変更（例えば置換）を有するアミノ酸配列か、または配列番号15のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列を含む。

【0023】

態様の一において、該抗EGFRvIII結合ドメインは、ヒンジ領域、例えば本明細書に記載のヒンジ領域によって膜貫通ドメインに連結している。態様の一において、コードされたヒンジ領域は、配列番号14または配列番号104または配列番号106または配列番号108またはそれと95～99%の同一性を示す配列を含む。

【0024】

態様の一において、該単離CAR分子はさらに、同時刺激ドメイン、例えば本明細書に記載の同時刺激ドメインをコードする配列を含む。態様の一において、該同時刺激ドメインは、OX40、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18) および 4-1BB (CD137) からなる群から選択されるタンパク質の機能性シグナル伝達ドメインを含む。態様の一において、該同時刺激ドメインは、配列番号16または配列番号102の配列を含む。態様の一において、該同時刺激ドメインは、配列番号16または配列番号102のアミノ酸配列に少な

くとも1個、2個または3個の変更（例えば置換）を有するが、20個以下、10個以下または5個以下の変更（例えば置換）を有するアミノ酸配列または配列番号16または配列番号102のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列を含む。態様の一において、単離CAR分子は、細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメインをさらに含む。態様の一において、細胞内シグナル伝達ドメインは、4-1BBまたはCD27の機能性シグナル伝達ドメインおよび/またはCD3ζの機能性シグナル伝達ドメインを含む。態様の一において、細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号16または配列番号102の配列および/または配列番号17の配列を含む。態様の一において、該細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号16または配列番号102の配列および/または配列番号99の配列を含む。態様の一において、該細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号16または配列番号102のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個または3個の変更（例えば置換）を有するが、20個以下、10個以下または5個以下の変更を有するアミノ酸配列および/または配列番号17または配列番号99のアミノ酸配列を含むか、または配列番号16または配列番号102のアミノ酸配列に95～99%同一性を有する配列および/または配列番号17または配列番号99のアミノ酸配列を含む。態様の一において、該細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号16または配列番号102の配列および配列番号17または配列番号99の配列を含み、ここで該細胞内シグナル伝達ドメインを含む配列は、同一フレーム中で、単一ポリペプチド鎖として発現する。

10

【0025】

態様の一において、該単離CAR分子は、さらにリーダー配列、例えば本明細書に記載のリーダー配列を含む。態様の一において、該リーダー配列は、配列番号13のアミノ酸配列または配列番号13のアミノ酸配列と95～99%の同一性を有する配列を含む。

20

【0026】

他の局面において、本発明は、リーダー配列、例えば本明細書に記載のリーダー配列、例えば配列番号13またはそれと95～99%の同一性を有するリーダー配列、本明細書に記載の抗EGFRvIII結合ドメイン、例えば本明細書に記載の、LC CDR1、LC CDR2、LC CDR3、HC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3を含む抗EGFRvIII結合ドメイン、例えば表2または配列番号11に記載の抗EGFRvIII結合ドメインまたはそれと95～99%の同一性を有する配列、ヒンジ領域、例えば本明細書に記載のヒンジ領域、例えば配列番号14または配列番号104または配列番号106または配列番号108のヒンジ領域、またはそれと95～99%の同一性を有するヒンジ領域、膜貫通ドメイン、例えば本明細書に記載の膜貫通ドメイン、例えば配列番号15の配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を有する膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメイン（例えば同時刺激ドメインおよび/または一次シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメイン）を含む、単離CARに関する。態様の一において、該細胞内シグナル伝達ドメインは、同時刺激ドメイン、例えば本明細書に記載の同時刺激ドメイン、例えば配列番号16の配列を有する4-1BB同時刺激ドメインまたは配列番号102の配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を有するCD27 同時刺激ドメイン、および/または一次シグナル伝達ドメイン、例えば本明細書に記載の一次シグナル伝達ドメイン、例えば配列番号17または配列番号99の配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を有するCD3ζ刺激ドメインを含む。態様の一において、該細胞内シグナル伝達ドメインは同時刺激ドメイン、例えば本明細書に記載の同時刺激ドメイン、例えば配列番号16の配列を有する4-1BB同時刺激ドメインまたは配列番号102の配列を有するCD27同時刺激ドメイン、および/または一次シグナル伝達ドメイン、例えば本明細書に記載の一次シグナル伝達ドメイン、例えば配列番号17または配列番号99の配列を有するCD3ζ刺激ドメインを含む。

30

40

【0027】

態様の一において、単離CAR分子は、配列番号43、配列番号49、配列番号55、配列番号61、配列番号67、配列番号73、配列番号79、配列番号85または配列番号90のアミノ酸配列、または配列番号43、配列番号49、配列番号55、配列番号61、配列番号67、配列番号73、配列番号79、配列番号85または配列番号90のアミノ酸配列に少なくとも1個、2個、3個、4個、5個、10個、15個、20個または30個の変更（例えば置換）を有するが、60個以下、50

50

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

【0028】

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

【0029】

他の局面において、本発明は、本明細書に記載の核酸分子、例えば本明細書に記載のCARをコードする核酸分子を含むベクターに関する。態様の一において、該ベクターは、DNA、RNA、プラスミド、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクターまたはレトロウイルスベクターからなる群から選択される。

【0030】

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

【0031】

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

【0032】

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

【0033】

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

【0034】

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

【0035】

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

【0036】

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

【0037】

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

【0038】

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

【0039】

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

【0040】

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

10

【0041】

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

【0042】

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

【0043】

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

20

【0044】

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

【図面の簡単な説明】

【0045】

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

30

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

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

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

40

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

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

50

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

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

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

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

【0046】

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

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

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

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

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

【0047】

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

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

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

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

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

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

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

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

【図 18】図18は、腫瘍サイズの増大（ cm^3 、左上）および腫瘍発光の平均値の進行（ $\text{p/s/cm}^2/\text{sr}$ 、右上）ならびにヒト化EGFRvIII CARコンストラクト(CAR6)で形質転換したCAR+ T細胞で処置したマウスにおける生体のカプラン・マイヤー生存曲線（下図）を示すグラフである。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0048】

定義

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

【0049】

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

【0050】

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

【0051】

「キメラ抗原受容体」あるいは「CAR」という語は、少なくとも、細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび、以下に記載する刺激分子由来の機能性シグナル伝達ドメインを含む細胞質シグナル伝達ドメイン（「細胞内シグナルドメイン」とも称する）を含む、組換えポリペプチドコンストラクトを指す。局面の一において、該刺激分子は、T細胞受容体複合体に結合する鎖である。局面の一において、細胞質シグナル伝達ドメインはさらに、後述する少なくとも1つの同時刺激分子由来の機能性シグナル伝達ドメインを1つ以上含む。局面の一において、同時刺激分子は、4-1BB（すなわちCD137）および/またはCD28から選択される。局面の一において、CARは、細胞外抗原認識ドメイン、膜貫通ドメインおよび刺激分子由来の機能性シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含むキメラ融合タンパク質を含む。局面の一において、該CARは、細胞外抗原認識ドメイン、膜貫通ドメインならびに、同時刺激分子由来の機能性シグナル伝達ドメインおよび刺激分子由来の機能性シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含むキメラ融合タンパク質を含む。局面の一において、CARは、細胞外抗原認識ドメイン、膜貫通ドメイン、ならびに1つ以上の同時刺激分子に由来する2つの機能性シグナル伝達ドメインおよび刺激分子由来の機能性シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含むキメラ融合タンパク質を含む。局面の一において、CARは、CAR融合タンパク質のアミノ末端(N-末端)に付加的なリーダー配列を含む。局面の一において、CARはさらに、細胞外抗原認識ドメインのN-末端にリーダー配列を含み、ここで、該リーダー配列は、細胞プロセッシングおよびCARの細胞膜への局在化の間に該抗原認識ドメイン（例えばscFV）から切断されていてもよい。

【0052】

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

【0053】

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

【0054】

「EGFRvIII」という語は、上皮成長因子受容体のバリエーションIIIを指す。EGFRvIIIは、ヒトの腫瘍で最も一般的に観察されるEGFRのバリエーションであるが、正常な組織では滅多に

10

20

30

40

50

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

【0055】

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

【0056】

「抗体断片」という語は、インタクトな抗体の少なくとも1つの部分、またはその組換えバリエーションを指し、抗体断片の認識および標的、例えば抗原への特異的な結合をもたらすのに十分な、抗原結合ドメイン、例えばインタクトな抗体の抗原決定可変領域を指す。抗体断片の例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂およびFv断片、scFv抗体断片、直鎖抗体、単一ドメイン抗体、例えばsdAb (VLまたはVH)、ラクダVHHドメインおよび、抗体断片から形成された多特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されるものではない。「scFv」という語は、軽鎖の可変領域を含む少なくとも1つの抗体断片および重鎖の可変領域を含む抗体断片を少なくとも1つ含む融合タンパク質を指し、ここで、該軽鎖および重鎖可変領域は、短い、柔軟性のあるポリペプチドリンカーを介して近接して連結しており、一本鎖のポリペプチドとして発現でき、該scFvは、それが由来するインタクトな抗体の特異性を維持している。特にことわらない限り、本明細書中では、scFvは、VLおよびVH可変領域を任意の順序で、例えば、該ポリペプチドのN-末端およびC-末端について任意の順序で有してよく、scFvはVL-リンカー-VHまたはVH-リンカー-VLを含んでいてよい。

【0057】

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

【0058】

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

【0059】

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

【0060】

「組換え抗体」という語は、組換えDNA技術を用いて産生した抗体、例えばバクテリオファージまたは酵母発現システムによって発現される抗体を指す。該用語は、抗体をコー

10

20

30

40

50

ドし、抗体タンパク質または該抗体を特定するアミノ酸配列を発現するDNA分子を合成することにより産生される抗体であって、ここで、該DNAまたはアミノ酸配列が、当該分野で利用可能なよく知られているDNAまたはアミノ酸配列組換え技術を用いて得られたものである、抗体を指す。

【0061】

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

【0062】

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

【0063】

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

【0064】

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

【0065】

「異種間」という語は、異なる種由来の移植物を指す。

【0066】

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

【0067】

本明細書に記載の「EGFRvIII発現に関連する疾患」としては、EGFRvIIIの発現に関連する疾患またはEGFRvIIIを発現する細胞、例えば種々のがん、例えば神経膠芽腫（神経膠芽腫幹細胞を含む）；乳がん、卵巣がんおよび非小細胞肺がん；頭頸部扁平上皮がん；髄芽

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

【0068】

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

【0069】

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

【0070】

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

【0071】

「抗原提示細胞」または「APC」という語は、主要組織適合複合体(MHC)と複合体を形成

した外来の抗原をその表面に提示する免疫系細胞、例えば補助細胞（例えば、B細胞および樹状細胞等）を指す。T細胞は、T細胞受容体(TCR)を用いてこれらの複合体を認識し得る。APCは抗原をプロセッシングし、T細胞に提示する。

【0072】

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

【0073】

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

【0074】

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

【0075】

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

【0076】

「同時刺激分子」という語は、同時刺激リガンドとともに特異的に結合し、それによって、T細胞による同時刺激応答、例えば非限定的な例としては増殖を媒介する、T細胞上の同族結合パートナーを指す。同時刺激分子は、効率的な免疫応答に必要な、抗原受容体またはそのリガンド以外の細胞表面分子である。同時刺激分子としては、例えば、MHC クラスI分子、BTLAおよびTollリガンド受容体ならびにOX40、CD2、CD27、CD28、CD5、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)および4-1BB (CD137)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0077】

同時刺激細胞内シグナル伝達ドメインは、同時刺激分子の細胞内部分由来であってよい。同時刺激分子は、次のタンパク質ファミリー：TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、SLAM (signaling lymphocytic activation molecules)タンパク質および活性化NK細胞受容体であってよい。該分子の例としては、CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、GITR、CD30、CD40、ICOS、BAFFR、HVEM、リン

10

20

30

40

50

パ球機能関連抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、SLAMF7、NKp80、CD160、B7-H3 および、CD83に特異的に結合するリガンド等が挙げられる。

【0078】

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

【0079】

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

10

【0080】

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

20

【0081】

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

30

【0082】

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

【0083】

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

【0084】

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

40

【0085】

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

【0086】

「導入ベクター」という語は、単離核酸を含み、該単離核酸を細胞の内部に送達するのに用い得る物質の組成物を指す。当該分野では多数のベクターが公知であり、例えば、直鎖ポリヌクレオチド、イオン性または両親媒性化合物と共役したポリヌクレオチド、プラスミドおよびウイルスが挙げられるが、これらに限定されるものではない。したがって、「導入ベクター」という語は、自己複製プラスミドまたはウイルスを含む。概用語はまた、核酸の細胞内への導入を促進する非プラスミドおよび非ウイルス化合物、例えばポリリ

50

ジン化合物およびリポソーム等をさらに含むと解釈される。ウイルス導入ベクターの例としては、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクター等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0087】

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

10

【0088】

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

【0089】

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

20

【0090】

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

30

【0091】

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

40

50

c)、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含んでいてよい。さらなる詳細については、Jones et al., Nature, 321: 522-525, 1986; Reichmann et al., Nature, 332: 323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596, 1992を参照のこと。

【0092】

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

10

【0093】

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

【0094】

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

20

【0095】

「作動可能に連結」または「転写制御」という語は、調節配列および異種性の核酸配列との機能性連結であって、後者の配列の発現を引き起こす連結を指す。例えば、第一核酸配列が第二核酸配列と機能的な関係にある配置である場合、該第一核酸配列は第二核酸配列と作動可能に連結している。例えば、プロモーターが、コード配列の転写または発現に影響を及ぼす場合、該プロモーターは該コード配列に作動可能に連結している。作動可能に連結したDNA配列は、互いに近接していてよく、例えば2つのタンパク質コード領域が結合する必要がある場合には、同一のリーディングフレーム内にある。

【0096】

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

30

【0097】

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

40

【0098】

「ペプチド」、「ポリペプチド」および「タンパク質」という語は、互換可能に用いられ、これらは、ペプチド結合により共有結合したアミノ酸残基を含む化合物を指す。タンパク質またはペプチドは、少なくとも2つのアミノ酸を含んでいなければならない。タンパク質またはペプチドの配列を含んでいてよいアミノ酸の最大数は限定されない。ポリペプチドはペプチド結合により互いに連結している2つ以上のアミノ酸を含む任意のペプチドまたはタンパク質を含む。本明細書では、該用語は、当該分野で一般的に、例えばペプチ

50

ド、オリゴペプチドおよびオリゴマーと称される短鎖および当該分野で一般的にタンパク質と称される、多くの種類が存在する長鎖の両方を指す。「ポリペプチド」は特に、例えば、生物学的に活性な断片、実質的に相同性のポリペプチド、オリゴペプチド、ホモダイマー、ヘテロダイマー、ポリペプチドのバリエーション、修飾ポリペプチド、誘導体、類似体、融合タンパク質を含む。ポリペプチドは天然のペプチド、組換えペプチドまたはその組合せを含む。

【0099】

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

【0100】

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

【0101】

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

【0102】

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

【0103】

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

【0104】

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

【0105】

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

10

20

30

40

50

の生化学反応として進行する。該キャッピング部位は、mRNAの機能性、例えば安定性および翻訳効率を調節するために、修飾されていてもよい。

【0106】

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

【0107】

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

【0108】

本明細書において、「ポリアデニル化」という語は、ポリアデニル部またはその修飾バリエーションのメッセンジャーRNA分子との共有結合を指す。真核生物では、メッセンジャーRNA (mRNA) 分子は殆どが3'末端でポリアデニル化されている。該3'ポリ(A)テールは、プレ-mRNAに、酵素、すなわちポリアデニル酸ポリメラーゼの作用により付加された、長い（しばしば700塩基の）アデニンヌクレオチド配列である。高等真核生物では、ポリ(A)テールは、特定の配列、すなわちポリアデニル化シグナルを含む転写物に付加される。ポリ(A)テールおよびそこに結合するタンパク質は、mRNAのエキソヌクレアーゼによる分解からの保護に寄与する。ポリアデニル化は、また、転写終結、核からのmRNAの輸送および翻訳にも重要である。ポリアデニル化は、DNAがRNAに転写された直後に核内で起こるが、それよりも後に細胞質でさらに起こる場合もある。転写が終結すると、該mRNA鎖はRNAポリメラーゼと共役したエンドヌクレアーゼ複合体によって切断される。該切断部位は、通常、切断部位の近くの塩基配列AAUAAAの存在によって特徴付けられる。mRNAの切断後、アデノシン残基が結合部位のフリーの3'末端に付加される。

【0109】

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

【0110】

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

【0111】

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

【0112】

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

【0113】

本明細書において「治療」という語は処置を指す。治療効果は、病態の減弱、抑制、寛

解または根絶により得られる。

【0114】

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

【0115】

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

10

【0116】

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

【0117】

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

20

【0118】

範囲：本明細書を通じて、本発明の種々の局面を範囲の形態で表示してよい。範囲の形態の記載は、都合良さと簡潔さのためのものであり、本発明の範囲を限定するものではないことは理解されるべきである。したがって、範囲についての記載は、あり得る全ての部分的な範囲ならびにその範囲内の個々の数値を具体的に開示していると解釈するべきである。例えば、1~6という範囲は、1~3、1~4、1~5、2~4、2~6、3~6などの部分的な範囲ならびに、該範囲内の個々の値、例えば1、2、2.7、3、4、5、5.3および6といった数値を具体的に開示ししていると見なすべきである。他の例として、95~99%の同一性のような範囲は、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するものを含み、96~99%、96~98%、96~97%、97~99%、97~98%および98~99%の同一性のような部分的な範囲を含む。このことは、範囲の広さに関わらず適用される。

30

【0119】

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

【0120】

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

40

【0121】

局面の一において、CARのEGFRvIIIタンパク質結合部位は、scFv抗体断片である。局面の一において、該抗体断片は、同等の結合親和性を維持している、例えばそれが由来する

50

IgG抗体に匹敵する有効性で、同じ抗原と結合するという点において機能性を示す。局面の一において、該抗体断片は、例えば非限定的な例として、当業者が理解するような、免疫応答の活性化、標的抗原からのシグナル伝達発生の阻害、キナーゼ活性の阻害等を含んでいてよい生物学的な応答をもたらすという点において機能性を示す。

【0122】

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

【0123】

局面の一において、CARの抗EGFRvIII結合ドメイン部分は、哺乳類細胞での発現用にコドンが最適化された配列の導入遺伝子によりコードされている。局面の一において、本発明のCARコンストラクト全体は、その全体の配列が哺乳類細胞での発現用にコドンが最適化されている導入遺伝子によりコードされている。コドン最適化は、コードDNA中の同義コドン（すなわち同じアミノ酸をコードするコドン）の出現頻度が、種によって偏っているという知見に関する。該コドン同義性により、同一のポリペプチドが種々のヌクレオチド配列によりコードされることが可能となっている。コドン最適化方法としては種々の方法が当該分野で知られており、例えば、少なくとも米国特許第5,786,464号および第6,114,148号明細書に記載の方法が挙げられる。

【0124】

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

【0125】

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

【0126】

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

10

20

30

40

50

【0127】

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

【0128】

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

10

【0129】

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

【0130】

キメラ抗原受容体 (CAR)

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

20

【0131】

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

30

40

【0132】

50

リーダー配列の例を配列番号13に示す。ヒンジ/スパーサー配列の例は配列番号14または配列番号104または配列番号106または配列番号108に示す。膜貫通ドメイン配列の例は、配列番号15に示す。4-1BBタンパク質の同時刺激ドメイン配列の例は、配列番号16に示す。CD27タンパク質の同時刺激ドメインの配列の例を、配列番号102に示す。CD3ζドメイン配列の一次シグナル伝達ドメインの例を、配列番号17に示す。CD3ζドメインの一次シグナル伝達ドメインの配列の例を配列番号99に示す。

【0133】

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

【0134】

局面の一において、本発明は、CARをコードする核酸分子を含む組換え核酸コンストラクトを含み、ここで、該核酸分子は、配列番号42、配列番号48、配列番号54、配列番号60、配列番号66、配列番号72、配列番号78、配列番号84および配列番号90からなる群から選択される抗EGFRvIII結合ドメインをコードする核酸配列を含み、該配列は、細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列に近接しており、同一リーディングフレーム中にある。CARに用いてよい細胞内シグナル伝達ドメインとしては、例えば、CD3ζ、CD28および4-1BB等の細胞内シグナル伝達ドメインの1つ以上が挙げられるが、これらに限定されるものではない。いくつかの例において、CARはCD3ζ、CD28、4-1BBの細胞内シグナル伝達ドメインの任意の組合せを含んでよい。局面の一において、該核酸コンストラクトは配列番号42を含む。局面の一において、CARコンストラクトの核酸配列は、配列番号48を含む。局面の一において、該核酸コンストラクトは、配列番号54を含む。局面の一において、該核酸コンストラクトは配列番号60を含む。局面の一において、該核酸コンストラクトは配列番号66を含む。局面の一において、該核酸コンストラクトは配列番号72を含む。局面の一において、該核酸コンストラクトは配列番号78を含む。局面の一において、該核酸コンストラクトは配列番号84を含む。

【0135】

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

【0136】

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

【0137】

本発明はまた、細胞に直接導入し得るRNAコンストラクトを含む。導入に用いるためのm

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

【0138】

抗原結合ドメイン

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

10

【0139】

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

【0140】

局面の一において、抗原結合ドメインを含むCARの一部は、EGFRvIIIを標的とする抗原結合ドメインを含む。局面の一において、該抗原結合ドメインはヒトEGFRvIIIを標的とする。例えば、マウスモノクローナル抗体(IgG2b) 3C10は、EGFRvIII特異的な融合部を含む14アミノ酸ペプチド(LEEKKGNYVVDHC; 配列番号101)を用いたマウスの免疫化によりEGFRvIIIに対して作製され、野生型のEGFRへの結合が認識されることなく、EGFRvIIIに対して特異性の高い認識を示すことが確認されている(Okamoto et al, British J. Cancer 1996, 73:1366-1372)。したがって、いくつかの態様において、抗原結合ドメインは、EGFRvIII連結ドメイン中のアミノ酸、例えば付加されたグリシン残基を含むアミノ酸配列を標的とする。いくつかの態様において、該抗原結合ドメインは、配列番号101のアミノ酸配列中の1つ以上のアミノ酸配列を標的とする。

20

30

【0141】

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

40

【0142】

したがって、局面の一において、該抗原結合ドメインは、ヒト抗体または抗体断片を含む。他の局面において、該抗原結合ドメインはヒト化抗体または抗体断片を含む。態様の一において、該抗EGFRvIII結合ドメインは、本明細書に記載の抗EGFRvIII結合ドメインの軽鎖相補決定領域1(LC CDR1)、軽鎖相補決定領域2(LC CDR2)および軽鎖相補決定領域3(LC CDR3)の1つ以上(例えば、1つ、2つまたは3つ全て)および、本明細書に記載の抗EGFRvIII結合ドメインの重鎖相補決定領域1(HC CDR1)、重鎖相補決定領域2(HC CDR2)および重鎖相補決定領域3(HC CDR3)の1つ以上(例えば、1つ、2つまたは3つ全て)を含む。態様の一において、抗EGFRvIII結合ドメインは、本明細書に記載の軽鎖可変領域および/

50

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

10

【0143】

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

20

【0144】

ヒト化抗体は、当該分野で公知の種々の技術、例えば非限定的な例としては、CDRグラフィティング（例えば欧州特許第239,400号；国際公開第91/09967号；ならびに米国特許第5,225,539号、第5,530,101号および第5,585,089号明細書参照、これらの文献はそれぞれ参照によりその全体が本明細書に包含される）、ベニヤリングまたはリサーフェシング（例えば欧州特許第592,106号および第519,596号明細書；Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28(4/5):489-498；Studnicka et al., 1994, *Protein Engineering*, 7(6):805-814；およびRoguska et al., 1994, *PNAS*, 91:969-973参照、これらの文献はそれぞれ参照によりその全体が本明細書に包含される）、鎖シャッフリング（例えば米国特許第5,565,332号明細書参照、当該文献は参照によりその全体が本明細書に包含される）、および、例えば米国特許出願公開第2005/0042664号、第2005/0048617号、米国特許第6,407,213号、第5,766,886号明細書、国際公開第9317105号、Tan et al., 2002, *J. Immunol.*, 169:1119-25；Caldas et al., 2000, *Protein Eng.*, 13(5):353-60；Morea et al., 2000, *Methods*, 20:267-79；Baca et al., 1997, *J. Biol. Chem.*, 272:10678-84；Roguska et al., 1996, *Protein Eng.*, 9(10):895-904；Couto et al., 1995, *Cancer Res.*, 55:5973s-5977；Couto et al., 1995, *Cancer Res.*, 55(8):1717-22；Sandhu 1994 *Gene*, 150(2):409-10；およびPedersen et al., 1994, *J. Mol. Biol.*, 235(3):959-73（これらの文献はそれぞれ参照により本明細書に包含される）に記載の技術を用いて作製してよい。フレームワーク領域中のフレームワーク残基が、CDRドナー抗体由来の相当する残基により置換されて、例えば抗原結合が変化、例えば改善することがしばしばある。これらのフレームワーク置換は、当該分野でよく知られた方法、例えばCDRとフレームワーク残基の相互作用をモデリングして、抗原結合に重要なフレームワーク残基を特定することおよび、特定の位置にある通常でないフレームワーク残基を特定するために配列比較することにより特定される（例えばQueen et al., 米国特許第5,585,089号明細書；およびRiechmann et al., 1988, *Nature*, 332:323参照、これらの文献は参照によりその全体が本明細書に包含される）。

30

40

【0145】

ヒト化抗体または抗体断片はヒトでないその供給源由来のアミノ酸配列を1つ以上維持している。これらの非ヒトアミノ酸残基は、「移入」残基と称され、これらは、典型的に、「移入」可変ドメインから取り入れられたものである。本明細書において、ヒト化抗体または抗体断片は、非ヒト免疫グロブリン分子由来の1つ以上のCDRとフレームワーク領域

50

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

【0146】

ヒト化抗体作製に用いるヒト可変ドメイン、軽鎖および重鎖両方の可変ドメインの選択を、抗原性を低下させるために行う。所謂「最良適合」方法によれば、齧歯類抗体の可変ドメイン配列は、公知のヒト可変ドメイン配列のライブラリー全体に対してスクリーニングされる。齧歯類に最も近いヒト配列をヒト化抗体のヒトフレームワーク (FR) として認める (Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)、当該文献の内容は参照により本明細書に包含される)。他の方法では、特定の軽鎖または重鎖のサブグループの全てのヒト抗体のコンセンサス配列由来の特定のフレームワークを用いる。いくつかの異なるヒト化抗体に対して同じフレームワークを用いてよい (例えば、Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)を参照のこと; 該文献の内容は、その全体が参照により本明細書に包含される)。

【0147】

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

【0148】

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

【0149】

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

【0150】

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

【0151】

安定性および変異

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

【0152】

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

【0153】

scFvの変異(可溶性scFvのヒト化および直接変異導入により生じる変異)は、scFvの安定性を変化させ、scFvおよびEGFRvIII CARコンストラクトの安定性を全体的に改善する。ヒト化scFvの安定性は、例えば、T_m、変性温度および凝集温度を測定することによって、

マウスscFvと比較する。変異scFvの結合能は、実施例に記載のアッセイを用いて決定し得る。

【0154】

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

【0155】

タンパク質の安定性の評価方法

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

【0156】

a) 熱安定性

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

【0157】

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

【0158】

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

【0159】

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

【0160】

組成物の熱安定性は、生化学的に測定し得る。熱安定性を評価する生化学的方法の一例は、熱負荷アッセイ(thermal challenge assay) である。「熱負荷アッセイ」では、組成物を一定範囲の高温に一定時間暴露する。例えば、態様の一において、試験scFv分子またはscFv分子を含む分子を一定範囲の温度上昇に、例えば1~1.5時間暴露する。その後、該

タンパク質の活性を、関連する生化学アッセイにより評価する。例えば、該タンパク質が結合タンパク質(例えばscFvまたはscFv含有ポリペプチド)である場合、該結合タンパク質の結合活性を、機能性または定量性ELISAにより決定し得る。

【0161】

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

10

【0162】

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

20

30

【0163】

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

40

【0164】

加えて、該抗EGFRvIII結合ドメイン、例えばscFvに対する変異は、該抗EGFRvIII結合ドメイン、例えばscFvの熱安定性を、変異していない抗EGFRvIII結合ドメイン、例えばscFvと比較して変化させる。ヒト化抗EGFRvIII結合ドメイン、例えばscFvが抗EGFRvIII CARコンストラクトに組み込まれているとき、該抗EGFRvIII結合ドメイン、例えばヒト化scFvは、抗EGFRvIII CARコンストラクト全体に熱安定性をもたらす。態様の一において、該抗EGFRvIII結合ドメイン、例えばscFvは、該抗EGFRvIII結合ドメイン、例えばscFvに熱安定性

50

を与える単一の変異を含む。他の態様において、該抗EGFRvIII結合ドメイン、例えばscFvは、該抗EGFRvIII結合ドメイン、例えばscFvに熱安定性を与える複数の変異を含む。態様の一において、該抗EGFRvIII結合ドメイン例えばscFvにおける複数の変異は、該抗EGFRvIII結合ドメイン、例えばscFvの熱安定性に相加的な効果を及ぼす。

【0165】

b) 凝集%

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

【0166】

c) 結合親和性

組成物の安定性は、その標的結合親和性を決定することにより評価し得る。結合親和性を決定する方法として、多種多様な方法が当該分野で知られている。結合親和性の決定方法の一例は、表面プラズモン共鳴法を使用する。表面プラズモン共鳴は、例えば、BIAcore system (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.)を用いることによって、バイオセンサーマトリクス中のタンパク質の濃度を検出することで、生体特異的な相互作用をリアルタイムで解析することを可能にする、光学的な現象である。さらなる記載については、Jonsson, U., et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26; Jonsson, U., et al. (1991) Biotechniques 11:620-627; Johnsson, B., et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131;およびJohnsson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198:268-277を参照のこと。

【0167】

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

【0168】

種々の局面において、CARの抗原結合ドメインは、可変領域の1つまたは両方(例えばVHおよび/またはVL)、例えば1つ以上のCDR領域および/または1つ以上のフレームワーク領域中の1つ以上のアミノ酸を変更することにより操作される。特異的な一の局面において、本発明のCAR組成物は抗体断片を含む。さらなる局面において該抗体断片はscFvを含む。

【0169】

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

てよい。

【0170】

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

【0171】

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

【0172】

配列比較のためには、典型的に、1つの配列が参照配列となり、試験配列は参照配列に対して比較される。配列比較アルゴリズムを用いる場合は、試験配列および参照配列をコンピューターに打ち込み、必要であれば、サブシーケンス座標（subsequence coordinates）を指定し、さらに配列アルゴリズムプログラムパラメーターを指定する。初期設定のプログラムパラメーターを用いても、または他のパラメーターを指定してもよい。その後、配列比較アルゴリズムによって、プログラムパラメーターに基づいて、参照配列に対する試験配列の%配列同一性が算出される。比較のための配列アラインメントの方法は、当該分野でよく知られている。比較のための最適な配列アラインメントは、例えば、Smith and Waterman, (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c記載の局所的相同性(local homology)アルゴリズム、Needleman and Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48:443記載の相同性アラインメントアルゴリズム、Pearson and Lipman, (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444記載の類似性探索方法、これらのアルゴリズムのコンピューターによる実行（Wisconsin Genetics Software Package中のGAP, BESTFIT, FASTAおよびTFasta (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI))または手動アラインメントおよび視覚的な検査（例えば、Brent et al., (2003) Current Protocols in Molecular Biology参照）により行い得る。

【0173】

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

【0174】

また、2つのアミノ酸配列間の%同一性は、ALIGN program (version 2.0)に組み込まれているE. Meyers and W. Miller, (1988) Comput. Appl. Biosci. 4:11-17に記載のアルゴリズムを用いて、PAM120 weight residue table、gap length penalty 12およびgap penalty 4を用いて決定してもよい。さらに、2つのアミノ酸配列間の%同一性を、GCG softw

are package (www.gcg.comより入手可能)のGAPプログラムに組み込まれているNeedleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:444-453) アルゴリズムを用いて、Blossom 62 matrixまたはPAM250 matrixのいずれか、およびgap weight: 16、14、12、10、8、6または4 およびlength weight: 1、2、3、4、5または6を用いて決定してもよい。

【0175】

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

【0176】

膜貫通ドメイン

膜貫通ドメインに関して、種々の態様において、CARは、CARの細胞外ドメインに結合する膜貫通ドメインを含むように設計されていてよい。膜貫通ドメインは、該膜貫通ドメインに隣接する1個以上の付加的なアミノ酸、例えば該膜貫通領域が由来するタンパク質の細胞外領域に結合する1個以上のアミノ酸（例えば細胞外領域の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10～15個のアミノ酸）および/または該膜貫通タンパク質が由来するタンパク質の細胞内領域に結合する1個以上の付加的なアミノ酸（例えば細胞内領域の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10～15個のアミノ酸）を含んでいてよい。局面の一において、該膜貫通ドメインは、使用するCARの他のドメインの1つに結合するものである。いくつかの態様において、膜貫通ドメインは、該ドメインが、同じまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインに結合するのを避けるため、例えば受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小化するために、選択またはアミノ酸置換による変更を受けていてよい。局面の一において、膜貫通ドメインは、CART細胞表面の他のCARとホモ二量体を形成することができる。他の局面において、膜貫通ドメインのアミノ酸配列は、同一CART中に存在する天然の結合パートナーの結合ドメインとの相互作用を最小化するために、変更または置換を受けていてよい。

【0177】

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

【0178】

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

【0179】

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

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

GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCGAGTTCCTGGGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCC
CAAGCCCAAGGACACCCCTGATGATCAGCCGACCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCCG
AGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGGGAGGAGCAGTTCAATAGC
ACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGACCCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGTAAGGTGTCCAA
CAAGGGCCTGCCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGGTGTACACCCCTGC
CCCCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCC
GTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTT
CCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCC
TGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG (配列番号105)。

【0180】

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

AGGTGGCCCGAAAAGTCCCAAGGCCAGGCATCTAGTGTTCCTACTGCACAGCCCCAGGCAGAAGGCAGCCTAGCCAAAGC
TACTACTGCACCTGCCACTACGCGCAATACTGGCCGTGGCGGGGAGGAGAAGAAAAAGGAGAAAGAGAAAGAAGAACAGG
AAGAGAGGGAGACCAAGACCCCTGAATGTCCATCCCATACCCAGCCGCTGGGCGTCTATCTCTTGACTCCCGCAGTACAG
GACTTGTGGCTTAGAGATAAGGCCACCTTTACATGTTTCGTCGTGGGCTCTGACCTGAAGGATGCCCATTTGACTTGGGA
GGTTGCCGAAAGGTACCCACAGGGGGGTTGAGGAAGGGTTGCTGGAGCGCCATTCCAATGGCTCTCAGAGCCAGCACT
CAAGACTCACCCCTTCGAGATCCCTGTGGAACGCCGGGACCTCTGTACATGTACTCTAAATCATCTAGCCTGCCCCCA
CAGCGTCTGATGGCCCTTAGAGAGCCAGCCGCCAGGCACCAAGCTTAAGCTTAGCCTGAATCTGCTCGCCAGTAGTGATCC
CCCAGAGGCCGCCAGCTGGCTCTTATGCGAAGTGTCCGGCTTTAGCCCGCCCAACATCTTGCTCATGTGGCTGGAGGACC
AGCGAGAAGTGAACACCAGCGGCTTCGCTCCAGCCCGGCCCCACCCAGCCGGGTTCTACCACATTCTGGGCCTGGAGT
GTCTTAAGGTCCCAGCACCACTAGCCCCCAGCCAGCCACATACACCTGTGTTGTGTTCCCATGAAGATAGCAGGACCT
GCTAAATGCTTCTAGGAGTCTGGAGGTTTCCTACGTGACTGACCATT (配列番号107)。

【0181】

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

【0182】

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

【0183】

細胞質ドメイン

CARの細胞質ドメインまたは領域は、細胞内シグナル伝達ドメインを含む。細胞内シグ
ナル伝達ドメインは一般的に、該CARが導入される免疫細胞の正常なエフェクター機能の

10

20

30

40

50

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

10

【0184】

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

【0185】

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

20

【0186】

一次シグナル伝達ドメインは、TCR複合体の一次活性化を刺激または阻害のいずれかによって制御する。刺激作用を有する一次細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫受容体活性化チロシンモチーフまたはITAMとして知られているシグナル伝達モチーフを含んでいてよい。

【0187】

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

30

【0188】

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

40

50

細胞持続および抗腫瘍活性を増強することが示されている(Song et al. Blood. 2012; 119(3):696-706)。

【0189】

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

【0190】

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

【0191】

局面の一において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ζのシグナル伝達ドメインおよびCD28のシグナル伝達ドメインを含むように設計される。局面の一において、該細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3ζのシグナル伝達ドメインおよび4-1BBのシグナル伝達ドメインを含むように設計される。局面の一において、4-1BBのシグナル伝達ドメインは、配列番号16のシグナル伝達ドメインである。局面の一において、CD3ζのシグナル伝達ドメインは、配列番号17のシグナル伝達ドメインである。

【0192】

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

【0193】

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

【0194】

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

【0195】

他の局面において、本発明は、集団中の少なくとも1つの細胞が、本明細書に記載の抗E

10

20

30

40

50

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

【0196】

RNA遺伝子導入

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

【0197】

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

【0198】

態様の一において、一過性遺伝子導入の一形態として、試験管内転写されたRNA CARを細胞に導入してよい。該RNAは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により作製されたテンプレートを用いた試験管内転写により作製される。任意の入手源由来の所望のDNAを、PCRによって、適当なプライマーおよびRNAポリメラーゼを用いた試験管内mRNA合成用のテンプレートに直接変換し得る。DNAの入手源は、例えば、ゲノムDNA、プラスミドDNA、ファージDNA、cDNA、合成DNA配列または他の適当な任意のDNA源であってよい。試験管内転写用の望ましいテンプレートは、本発明のCARである。例えば、RNA CARのテンプレートは、抗腫瘍抗体の一本鎖可変領域を含む細胞外領域；ヒンジ領域、膜貫通ドメイン(例えばCD8aの膜貫通ドメイン)；および細胞内シグナル伝達ドメイン、例えばCD3 ζ のシグナル伝達ドメインおよび4-1BBのシグナル伝達ドメインを含む細胞質領域を含む。

【0199】

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

【0200】

PCRは、遺伝子導入に用いるmRNAの試験管内転写用テンプレートを作製するのに用いられる。PCRを行う方法は当該分野でよく知られている。PCRに用いるプライマーは、PCRのテンプレートとして用いるDNAの領域に実質的に相補である領域を有するように設計される。本明細書において、「実質的に相補」とあるとは、プライマー配列の塩基の大部分または全てが相補的であるか、または1以上の塩基が非相補的であるかまたはミスマッチであるヌクレオチド配列を指す。実質的に相補的な配列は、意図するDNA標的と、PCRで用いるアニーリング条件下で、アニーリングまたはハイブリダイズすることができる。該プライマーは、DNAテンプレートのどの部分と実質的に相補的になるように設計してもよい。

例えば、該プライマーは、5'および3' UTRを含む、通常細胞中で転写される核酸（オープンリーディングフレーム）の一部を増幅するように設計してよい。該プライマーは、また、所望の特定のドメインをコードする核酸部分を増幅するように設計してもよい。態様の一において、該プライマーは、ヒトcDNA、例えば5'および3' UTRの全てまたは一部を含むヒトcDNAのコード領域を増幅するように設計される。PCRに有用なプライマーは、当該分野でよく知られている合成方法により作製し得る。「フォワードプライマー」は、増幅するDNA配列の上流のDNAテンプレート上のヌクレオチドに実質的に相補的であるヌクレオチド領域を含むプライマーである。本明細書において、「上流」は、コーディング鎖に対して増幅するDNA配列の5'側の部位を指す。「リバーズプライマー」は、増幅するDNA配列の下流にある二本鎖DNAテンプレートに実質的に相補的なヌクレオチド領域を含むプライマーである。本明細書において、「下流」という語は、コーディング鎖に対して、増幅するDNA配列の3'側部位を指すのに用いる。

10

【0201】

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

【0202】

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

20

【0203】

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

30

【0204】

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

40

【0205】

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

50

これらに限定されない。T7、T3およびSP6プロモーターのコンセンサスヌクレオチド配列は、当該分野で公知である。

【0206】

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

【0207】

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

【0208】

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

【0209】

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

【0210】

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

【0211】

5'キャップもまた、RNA分子に安定性を与え得るものである。好ましい態様において、本明細書に記載の方法により作製されたRNAは5'キャップを含む。該5'キャップは、当該分野で公知の方法であり、本明細書に記載されている技術によって得られる(Cougot, et al., *Trends in Biochem. Sci.*, 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., *RNA*, 7:1468-95 (2001); Elango, et al., *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 330:958-966 (2005))。

【0212】

本明細書に記載の方法により作製したRNAは、配列内リボソーム進入部位(IRES)配列を含んでいてもよい。該IRES配列は、キャップ非依存性のmRNAへのリボソーム結合を開始させ、転写開始を促進する、任意のウイルス性、染色体性または人工的に設計した配列であ

10

20

30

40

50

ってよい。細胞のエレクトロポレーションに適した任意の溶質もまた含まれてよく、これらは、細胞透過性および生存性を促進する因子、例えば糖、ペプチド、脂質、タンパク質、抗酸化剤および界面活性剤を含んでいてよい。

【0213】

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

【0214】

CARをコードする核酸コンストラクト

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

【0215】

したがって、局面の一において、本発明は、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする単離核酸分子に関し、ここで、該CARは、抗EGFRvIII結合ドメイン(例えばヒト化抗EGFRvIII結合ドメイン)、膜貫通ドメインおよび、同時刺激ドメイン、例えば同時刺激シグナル伝達ドメインおよび/または一次シグナル伝達ドメイン、例えば ζ 鎖を含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む。態様の一において、該抗EGFRvIII結合ドメインは、本明細書に記載の抗EGFRvIII結合ドメイン、例えば配列番号38、配列番号44、配列番号50、配列番号56、配列番号62、配列番号68、配列番号74および配列番号80からなる群から選択される配列またはそれと95~99%の同一性を有する配列を含む抗EGFRvIII結合ドメインである。態様の一において、該単離核酸分子はさらに、同時刺激ドメインをコードする配列を含む。態様の一において、該同時刺激ドメインは、OX40、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)および4-1BB (CD137)からなる群から選択されるタンパク質の機能性シグナル伝達ドメインである。態様の一において、該同時刺激ドメインは、配列番号16の配列またはそれと95~99%の同一性を有する配列を含む。態様の一において、膜貫通ドメインは、T鎖受容体の α 鎖、 β 鎖または ζ 鎖、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137およびCD154からなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインである。態様の一において、該膜貫通ドメインは、配列番号15の配列またはそれと95~99%の同一性を有する配列を含む。態様の一において、該細胞内シグナル伝達ドメインは、4-1BBの機能性シグナル伝達ドメインおよびCD3 ζ の機能性シグナル伝達ドメインを含む。態様の一において、該細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号16または配列番号102の配列またはそれと95~99%の同一性を有する配列、ならびに配列番号17または配列番号99の配列、またはそれと95~99%の同一性を有する配列を含み、ここで、該細胞内シグナル伝達ドメインを含む配列は、同一フレーム中で、単一ポリペプチド鎖として発現する。態様の一において、該抗EGFRvIII結合ドメインは、ヒンジ領域、例えば本明細書に記載のヒンジを介して、膜貫通ドメインに結合している。態様の一において、該ヒンジ領域は、配列番号14または配列番号104または配列番号106または配列番号108の配列またはそれと95~99%の同一性を有する配列を含む。

【0216】

他の局面において、本発明は、配列番号13のリーダー配列、配列番号38、配列番号44、配列番号50、配列番号56、配列番号62、配列番号68、配列番号74、配列番号80および配列番号86からなる群から選択される配列(またはそれと95~99%の同一性を有する配列)を有するscFvドメイン、配列番号14または配列番号104または配列番号106または配列番号108(またはそれと95~99%の同一性を有する配列)のヒンジ領域、配列番号15の配列(または

それと95～99%の同一性を有する配列)を有する膜貫通ドメイン、配列番号16の配列を有する4-1BB同時刺激ドメインまたは配列番号102の配列(またはそれと95～99%の同一性を有する配列)を有するCD27同時刺激ドメインおよび配列番号17または配列番号99(またはそれと95～99%の同一性を有する配列)を有するCD3 ζ 同時刺激ドメインを含むCARコンストラクトをコードする単離核酸分子に関する。

【0217】

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

10

【0218】

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

20

【0219】

態様の一において、コードされたCAR分子はさらに、同時刺激ドメインをコードする配列を含む。態様の一において、該同時刺激ドメインは、OX40、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)および4-1BB (CD137)からなる群から選択されるタンパク質の機能性シグナル伝達ドメインである。態様の一において、同時刺激ドメインは、配列番号16の配列を含む。態様の一において、膜貫通ドメインは、T細胞受容体の α 鎖、 β 鎖または ζ 鎖、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137およびCD154からなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインである。態様の一において、膜貫通ドメインは、配列番号15の配列を含む。態様の一において、細胞内シグナル伝達ドメインは、4-1BBの機能性シグナル伝達ドメインおよび ζ の機能性シグナル伝達ドメインを含む。態様の一において、該細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号16の配列および配列番号17の配列を含み、ここで、該細胞内シグナル伝達ドメインを含む配列は、同一フレーム中で、単一ポリペプチド鎖として発現する。態様の一において、抗EGFRvIII結合ドメインは、ヒンジ領域によって膜貫通ドメインに連結している。態様の一において、該ヒンジ領域は、配列番号14を含む。態様の一において、該ヒンジ領域は、配列番号104または配列番号106または配列番号108の配列を含む。

30

【0220】

他の局面において、本発明は、配列番号13のリーダー配列、配列番号38、配列番号44、配列番号50、配列番号56、配列番号62、配列番号68、配列番号74、配列番号80および配列番号86からなる群から選択される配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を有するscFvドメイン、配列番号14または配列番号104または配列番号106または配列番号108のヒンジ領域、配列番号15の配列を有する膜貫通ドメイン、配列番号16の配列を有する4-1BB同時刺激ドメインまたは配列番号102の配列を有するCD27同時刺激ドメインならびに配列番号17または配列番号99を有するCD3 ζ 刺激ドメインを含む、コードされたCAR分子に関する。態様の一において、コードされたCAR分子は、配列番号43、配列番号49、配列番号55、配列番号61、配列番号67、配列番号73、配列番号79、配列番号85および配列番号90からなる群から選択される配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。態様の一において、コードされたCAR分子は、配列番号73の配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。態様の一において、単離CAR分子は、配列番号79の配列またはそれと95～99%の同一性を有する配列を含む。

40

50

【0221】

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

【0222】

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

10

【0223】

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

20

【0224】

本発明の発現コンストラクトはまた、標準的な遺伝子送達プロトコルを用いた核酸免疫化および遺伝子治療に使用し得る。遺伝子送達方法は、当該分野で公知である。例えば、米国特許第5,399,346号、第5,580,859号、第5,589,466号明細書を参照のこと（これらの文献は参照によりその全体が本明細書に包含される）。他の態様において、本発明は、遺伝子治療ベクターを提供する。

【0225】

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

30

【0226】

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

40

【0227】

哺乳類細胞に遺伝子を導入するために、多数のウイルスベースのシステムが開発されている。例えば、レトロウイルスは、遺伝子送達システムに都合の良いプラットフォームを提供する。選択された遺伝子を、当該分野で公知の技術を用いてベクターに挿入し、レトロウイルス粒子中に封入し得る。次いで、該組換えウイルスを単離し、対象の細胞に、生体内または生体外で送達してよい。多数のレトロウイルスシステムが当該分野で公知である。いくつかの態様において、アデノウイルスベクターが用いられる。当該分野では多数のアデノウイルスベクターが公知である。態様の一において、レンチウイルスベクターが用

50

いられている。

【0228】

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

10

【0229】

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

20

【0230】

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

30

【0231】

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

40

50

価するのに用いてよい。

【0232】

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

【0233】

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

【0234】

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

【0235】

ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入する化学的な方法としては、コロイド分散系、例えば巨大分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズおよび脂質ベースの系、例えば水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセルおよびリポソームが挙げられる。試験管内および生体内で送達ビヒクルとして用いるコロイド系の例はリポソーム（例えば人工膜小胞）である。

【0236】

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

【0237】

使用するのに適当な脂質は、市販品から入手できる。例えばジミリスチルホスファチジルコリン（「DMPC」）は、Sigma, St. Louis, MOより；リン酸ジセチル（「DCP」）は、K & K Laboratories (Plainview, NY)より；コレステロール（「Choi」）は、Calbiochem-Behringより；ジミリスチルホスファチジルグリセロール（「DMPG」）および他の脂質はAvanti

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

10

【0238】

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

20

【0239】

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

30

【0240】

T細胞の供給源

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

40

50

指示にしたがって用いることによって達成し得る。洗浄後、該細胞は、種々の生体適合性バッファー、例えばCa-不含有、Mg-不含有PBS、PlasmaLyte Aまたはバッファーを含むか、または含まない他の生理食塩水溶液に再懸濁してよい。あるいは、アフエレーシス試料の望ましくない成分を除いて、細胞を培養培地に直接再懸濁してもよい。

【0241】

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

【0242】

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

【0243】

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

【0244】

所望の細胞集団をポジティブ選択またはネガティブ選択によって単離するために、細胞および表面 (例えばビーズのような粒子) の濃度を変化させてよい。特定の局面において、細胞とビーズが確実に最大限接触するように、ビーズと細胞を混合する体積を有意に減

少させる（例えば細胞の濃度を上昇させる）ことが望ましい場合もある。例えば、局面の一において、 2×10^9 個/mlの細胞濃度を用いる。局面の一において、 1×10^9 個/mlの細胞濃度を用いる。さらなる局面において、 1×10^8 個/mlを超える細胞濃度を用いる。さらなる局面において、10、15、20、25、30、35、40、45または 50×10^6 個/mlの細胞濃度を用いる。さらに他の局面において、75、80、85、90、95または 100×10^6 個/mlの細胞濃度を用いる。さらなる局面において、125または 150×10^6 個/mlの細胞濃度を用いてよい。高い濃度を用いることによって、細胞収率、細胞活性および細胞増殖が上昇し得る。さらに、高い細胞濃度を用いることによって、所望の標的抗原の発現が弱い可能性のある細胞、例えばCD28ネガティブT細胞のより効率的な捕捉または多くの腫瘍細胞が存在する試料（例えば白血病血、腫瘍組織等）からのより効率的な捕捉が可能になる。該細胞集団が、治療上の価値を有しており、得るのが望ましい場合もある。例えば高い細胞濃度を用いることで、通常CD28の発現が弱いCD8+ T細胞をより効率的に選択することが可能になる。

【0245】

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

【0246】

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

【0247】

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

【0248】

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

【0249】

本発明において、本明細書に記載するように増殖させた細胞が必要になり得るよりも前の期間に、対象から血液試料またはアフエーシス産物を回収することも考慮されている。そのようなものとして、細胞の増殖源を任意の必要なタイムポイントにおいて回収してよく、T細胞療法が有益であり得る任意の疾患または症状、例えば本明細書に記載するような疾患または症状のT細胞療法に後で用いるために、所望の細胞、例えばT細胞を単離して凍結してよい。局面の一において、血液試料またはアフエーシスを、全体的に健康な対象より採取する。特定の局面において、血液試料またはアフエーシスを、疾患を発症する危険性があるが、未だ発症していない全体的に健康な対象より採取し、所望の細胞を単離して、後で使用するために凍結する。特定の局面において、T細胞を増殖させて、凍結し、後で使用してよい。特定の局面において、試料を本明細書に記載の特定の疾患と診

断された直後であり、何の処置も受けていない対象から回収する。さらなる局面において、関連する任意の処置様式、非限定的な例としては、薬剤、例えばナタリズマブ、エファリズマブ、抗ウイルス剤、化学療法、放射線照射、免疫抑制剤、例えばシクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノレートおよびFK506、抗体または他の免疫除去剤、例えばCAMPATH、抗CD3抗体、シトキサン、フルダラビン、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、FR901228および照射による処置を受ける前に、対象から採取した血液試料またはアフエレーシスから細胞を単離する。

【0250】

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

【0251】

T細胞の活性化および増殖

T細胞は一般的に、例えば、米国特許第6,352,694号；第6,534,055号；第6,905,680号；第6,692,964号；第5,858,358号；第6,887,466号；第6,905,681号；第7,144,575号；第7,067,318号；第7,172,869号；第7,232,566号；第7,175,843号；第5,883,223号；第6,905,874号；第6,797,514号；第6,867,041号；および米国特許出願公開第20060121005号に記載の方法を用いて活性化および増殖させ得る。

【0252】

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

【0253】

特定の局面において、T細胞についての一次刺激シグナルおよび同時刺激シグナルは、異なるプロトコルによって得られてよい。例えば、各シグナルをもたらす物質は、溶液中にあっても、表面に結合していてもよい。表面に結合している場合、該物質は、同一の表面に結合していても（すなわち「cis」形態）、または別の表面に結合していてもよい（すなわち「trans」形態）。あるいは、1つの物質が表面上に結合しており、もう一方が溶液中にあってもよい。局面の一において、同時刺激シグナルをもたらす物質は、細胞表面に結合しており、一次活性化シグナルをもたらす物質は、溶液中にあるかまたは表面に結合している。特定の局面において、両方の物質が溶液中にあってもよい。局面の一において

、該物質は可溶性の形態であって、次いで表面、例えばFc受容体または該物質に結合する抗体もしくは他の結合性物質を発現する細胞に架橋されてもよい。この点に関しては、例えば、本発明のT細胞の活性化および増殖への使用が考えられる、人工抗原提示細胞(aAPC)に関する、米国特許出願公開第20040101519号および第20060034810号明細書を参照のこと。

【0254】

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

【0255】

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

動する。局面の一において、最も典型的な1日目の使用比率は、約1:1、2:1および3:1である。

【0256】

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

【0257】

例えば、細胞表面タンパク質を、抗CD-3および抗CD-8が結合した常磁性のビーズ（3x28ビーズ）をT細胞に接触させることによって連結してよい。局面の一において、細胞（例えば、 $10^4 \sim 10^9$ 個のT細胞）およびビーズ（例えば、1:1の比率の、DYNABEADS（登録商標）M-450 CD3/CD28 T常磁性体ビーズ）をバッファー、例えばPBS（二価カチオン、例えばカルシウムおよびマグネシウムを含まない）中で結合させる。任意の細胞濃度を用いてよいことは、当業者には容易に理解し得ることである。例えば、標的細胞が試料中で非常に希少であって、該試料の約0.01%のみが所望の標的細胞を含んでいてもよく、または試料全体（すなわち100%）が標的細胞を含んでいてもよい。したがって、細胞数がどのような場合であっても、本発明の範囲内に含まれる。特定の局面において、細胞と粒子が確実に最大限接触するために、粒子と細胞を混合する体積を有意に低下させる（すなわち、細胞の濃度を上昇させる）ことが望ましい場合もある。例えば、局面の一において、約 2×10^9 個/mlの細胞濃度を用いる。局面の一において、 1×10^8 個/mlを超える細胞濃度を用いる。さらなる局面において、10、15、20、25、30、35、40、45または 50×10^6 個/mlの細胞濃度を用いる。さらに他の局面において、75、80、85、90、95または 100×10^6 個/mlの細胞濃度を用いる。さらなる局面において、125または 150×10^6 個/mlの細胞濃度を用いてよい。高い濃度を用いることによって、細胞収率、細胞活性および細胞増殖が上昇し得る。さらに、高い細胞濃度を用いることによって、所望の標的抗原の発現が弱い可能性のある細胞、例えばCD28ネガティブT細胞のより効率的な捕捉が可能になる。特定の局面において、該細胞集団が、治療上の価値を有しており、得るのが望ましい場合もある。例えば高い細胞濃度を用いることで、通常CD28の発現が弱いCD8+ T細胞をより効率的に選択することが可能になる。

【0258】

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

10

20

30

40

50

【0259】

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

10

【0260】

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

【0261】

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

【0262】

20

初代培養T細胞中のCAR発現のウェスタンブロット解析は、単量体および二量体の存在を検出するのに使用し得る。例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)を参照のこと。非常に端的には、CARを発現するT細胞(CD4⁺およびCD8⁺ T細胞の1:1の混合物)を試験管内で、10日より長く増殖させた後、溶解および還元的な条件下でSDS-PAGEを行った。全長のTCR ζ細胞質ドメインおよび内在性のTCR ζ鎖を含むCARは、TCR ζ鎖に対する抗体を用いたウェスタンブロットにより検出される。同じT細胞のサブセットを、共有結合二量体形成の評価を可能にするために、非還元条件下でのSDS-PAGE解析に用いる。

【0263】

30

抗原刺激後のCAR⁺ T細胞の試験管内の増殖は、フローサイトメトリーにより測定し得る。例えば、CD4⁺およびCD8⁺ T細胞の混合物を、αCD3/αCD28 aAPCを用いて刺激した後、解析するプロモーターの制御下でGFPを発現するレンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行う。プロモーターの例としては、CMV IE遺伝子、EF-1α、ユビキチンCまたはホスフォグリセロールキナーゼ(PGK) プロモーターが挙げられる。GFPの蛍光は、培養6日目に、CD4⁺および/またはCD8⁺ T細胞サブセット中でフローサイトメトリーにより評価する。例えばMilone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)を参照のこと。あるいは、CD4⁺およびCD8⁺ T細胞の混合物を、αCD3/αCD28でコートした磁気ビーズで0日目に刺激し、1日目に、CARをeGFPとともに発現する2シストロン性のレンチウイルスベクターを用いて、2Aリボソームスキップ配列(ribosomal skipping sequence)を用いて、CARを形質導入する。培養物を洗浄した後、抗CD3および抗CD28抗体の存在下で、EGFRvIII⁺ U-87細胞(U-87-EGFRvIII)、野生型U-87細胞(U-87野生型)またはhCD32および4-1BBLを発現するK562細胞(K562-BBL-3/28)のいずれかで再刺激する。外来性のIL-2を100 IU/mlで隔日に培養物に添加する。ビーズベースカウントを用いて、フローサイトメトリーによりGFP⁺ T細胞を計数する。例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)を参照のこと。

40

【0264】

再刺激の非存在下でのCAR⁺ T細胞増殖維持を測定してもよい。例えば、Milone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)を参照のこと。端的に言えば、0日目にαCD3/αCD28コーティング磁気ビーズを用いて刺激し、1日目の指定のCARを形質導入した後、培養8日目に、Coulter Multisizer III particle counterを用いて平均T細胞体積 (fl)

50

を測定する。

【0265】

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

【0266】

細胞傷害性は、標準的な⁵¹Cr放出アッセイにより評価し得る。例えばMilone et al., Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009)を参照のこと。端的には、標的細胞 (EGFRvIIIまたは野生型EGFR (wt))を発現するU87MG、BHKまたはCHO細胞)に⁵¹Crを(NaCrO₄ (New England Nuclear, Boston, MA)として)37℃で2時間、頻りに攪拌しながら負荷し、完全RPMI培地で2回洗浄し、マイクロタイタープレートに加える。ウェル中で、エフェクターT細胞を完全RPMI培地中で、種々のエフェクター細胞:標的細胞 (E:T)の比率を用いて標的細胞と混合する。培地のみ(自発的放出、SR)または界面活性剤triton-X 100 (総放出、TR)の1%溶液を含んでいるウェルをさらに準備する。37℃で4時間インキュベーションした後、各ウェルから上清を回収する。その後、放出された⁵¹Crをgamma particle counter (Packard Instrument Co., Waltham, MA)を用いて計測する。各条件について、少なくとも3回重複して試験を行い、溶解%を次の式: $\text{溶解\%} = (\text{ER} - \text{SR}) / (\text{TR} - \text{SR})$ (式中、ERは各条件で放出される⁵¹Crを表す)に基づいて計算する。あるいは、他の細胞傷害性アッセイ、例えば実施例8に記載するようなフローベース細胞障害性アッセイを用いてもよい。

【0267】

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

【0268】

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

【0269】

EGFRvIII発現疾患および障害への治療的適用

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

【0270】

神経膠腫は、膠細胞(例えば神経細胞の周囲にあり、神経細胞を支持する細胞であり、乏突起膠細胞、星状細胞、ミクログリアおよび上皮細胞が挙げられる)で発症する中枢神経系のがんを指す。神経膠腫は発症率および悪性度の両方の点から特に深刻であり、その

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

10

【0271】

神経膠芽腫は成人において最も一般的な原発性脳腫瘍である。米国で悪性の原発性脳腫瘍と診断された18,000人の患者のうち、半分を超える患者が多形神経膠芽腫に罹患している。多形神経膠芽腫は、増殖指数が高く、微小血管の増殖および局所的な壊死を示す、未分化な細胞性の高い腫瘍である。徴候および症状は、いくつかの要因（サイズ、成長速度、脳内の腫瘍の局在）に依存し、主に頭痛、けいれん、神経障害、精神状態の変化として表れる。多形神経膠芽腫の予後は悲惨なものである。患者の大多数において、生存時間は2年未満である。カルノフスキー・パフォーマンス・ステータス (KPS)は、最も重要な予後因子の1つである：KPS>70の患者は、18ヶ月の時点でそれよりKPSスコアが低い患者の生存率が13%であるのに対し、症例の約18%が生存している。原発性の多形神経膠芽腫は、膠細胞から新規に発症し、典型的には6ヶ月よりも短い病歴を示し、高齢患者により多く、小細胞の組織像を示す。続発性の多形神経膠芽腫は、既に存在していた低グレードの星状細胞腫から数ヶ月または数年をかけて発症し、主に若年層の人々に罹患し、巨細胞組織像を示す。

20

【0272】

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

30

【0273】

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

40

【0274】

星状細胞腫には生物学的なサブセットがあり、これはこの腫瘍で見られる臨床的な不均一性を反映し得る。これらのサブセットには、小児期の散在性線維性星状細胞腫の一形態であり、しばしば悪化をたどる脳幹神経膠腫が含まれる。脳幹GBMは、若い患者に罹患する成人GBMと、遺伝的な特徴が共通している。多形黄色星細胞腫(PXA)は、若年層の成人に主に罹患する、表層性の低グレード星状細胞腫瘍である。これらの腫瘍は奇妙な組織的外観を有するが、典型的には、遅い成長を示す腫瘍であるため、外科的な治療を受け入れ得る。しかし、PXAは、GBMとして再発する場合がある。毛様細胞性星状細胞腫は小児期の最も一般的な星状腫瘍であり、成人に罹患する散在性線維性の星状細胞腫とは臨床的および

50

組織学的に異なる。上衣下巨細胞星状細胞種 (SEGA) は通常結節性硬化症(TS)と関連があり、TS患者の脳室を裏打ちする、所謂「蠟燭溝形成(candle guttering)」と組織学的に同じである、脳室周囲低グレード星状細胞腫瘍である。TS中の他の腫瘍病変と同様に、これらは成長が遅く、真性腫瘍よりも過誤腫に近い場合もある。小児期の線維形成性大脳星状細胞種 (DCAI) および線維形成性乳児星細胞腫(DIGG) は生後1年または2年の間に子供が罹患する、大きな、表在性の、通常嚢胞性の、良性星状細胞種である。

【0275】

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

【0276】

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

【0277】

髄芽腫は主に小児において、後頭蓋窩に発症する悪性の原始腫瘍である。これらの腫瘍は若年層の成人でも発症する。髄芽腫は、しばしば外科的に切除された後、化学療法および/または放射線照射により処置される。髄芽腫は、局所的または時によっては後頭蓋窩から脊椎への滴下転移として再発し得る。髄膜腫は、髄膜で発症し、その下にある脳を圧迫する、一般的な頭蓋内腫瘍である。典型的には良性であり、明らかに悪性となることはごく稀であると考えられるが、これらの腫瘍を制御することは、しばしば臨床的な課題を提起するものである。髄膜腫の組織学的グレードは、大多数である良性、WHOグレード I/IV (82%); 割合は多くない非定型、WHO II/IV (15%); および低い頻度で、未分化または悪性、WHOグレード III/IV (3%)と変動する。

【0278】

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

【0279】

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

に、視床下部の腫瘍は、小児の成長および栄養に影響を与え得る。小脳という例外はあるが、脳の片側にある腫瘍は体の反対側に症候および障害を引き起こす。

【0280】

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

10

【0281】

本発明は、EGFRvIII発現細胞集団の増殖を阻害するかまたは該細胞を減少させる方法であって、EGFRvIII発現細胞を含む細胞集団を、本明細書に記載の、EGFRvIII発現細胞に結合するCAR発現細胞、例えば、T細胞に接触させることを含む、方法を提供する。特定の態様において、本発明は、EGFRvIIIを発現するがん細胞集団の増殖を阻害するかまたは、該集団を減少させる方法であって、EGFRvIII発現がん細胞集団を、本発明の、EGFRvIII発現細胞に結合するCAR発現細胞、例えばT細胞に接触させることを含む、方法を提供する。他の態様において、本発明は、EGFRvIII発現がん細胞集団の増殖を阻害または該細胞集団を減少させる方法であって、該EGFRvIII発現がん細胞集団を、EGFRvIII発現細胞に結合する本発明のEGFRvIII CART細胞集団に接触させることを含む、方法を提供する。特定の態様において、本発明のEGFRvIII CART細胞は、陰性対象に対し、神経膠腫またはEGFRvIII発現細胞に関連する他のがんに関連する対象またはモデル動物において、細胞および/またはがん細胞の含量(quantity)、数、量(amount)またはパーセンテージを、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも65%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも95%または少なくとも99%低下させる。局面の一において、対象はヒトである。

20

【0282】

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

30

【0283】

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

【0284】

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

40

【0285】

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

50

【0286】

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

【0287】

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

【0288】

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

【0289】

局面の一において、本明細書に記載のCAR修飾T細胞は、哺乳動物の生体外免疫化および/または生体内治療用のワクチンの一種であり得る。局面の一において、該哺乳動物はヒトである。

【0290】

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

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

【0291】

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

【0292】

造血細胞および前駆細胞の生体外増殖の手法は、米国特許第5,199,942号明細書に記載されており（当該文献は参照により本明細書に包含される）、本発明の細胞に適用してよい。他の適当な方法も、当該分野では知られている。したがって、本発明は、特定の該細胞の生体外増殖方法に限定されるものではない。端的には、T細胞の生体外培養および増殖は：(1) 哺乳動物の末梢血回収物または骨髓移植片からCD34+ 造血幹細胞および前駆細胞を回収すること；および(2) 該細胞を生体外で増殖させることを含む。米国特許第5,199,942号明細書に記載の細胞増殖因子に加え、他の因子、例えばflt3-L、IL-1、IL-3およびc-kitリガンドを、該細胞の培養および増殖に用いてよい。

【0293】

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

【0294】

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

【0295】

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

【0296】

本発明はまた、EGFRvIII発現細胞集団の増殖を阻害するか、または該細胞を減少させる方法であって、EGFRvIII発現細胞を含む細胞集団を、本明細書に記載の、EGFRvIII発現細胞に結合するEGFRvIII CART細胞に接触させることを含む、方法を提供する。特定の局面において、本発明は、EGFRvIIIを発現するがん細胞集団の増殖を阻害するか、または該集団を減少させる方法であって、EGFRvIII発現がん細胞集団を、EGFRvIII発現細胞に結合する本明細書に記載のEGFRvIII CART細胞に接触させることを含む、方法を提供する。局面の一において、本発明は、EGFRvIIIを発現するがん細胞集団の増殖を阻害するかまたは該集団を減少させる方法であって、EGFRvIII発現がん細胞集団を、本明細書に記載のEGFRvIII CART細胞に結合するEGFRvIII CART細胞に接触させることを含む、方法を提供する。特定の局面において、本発明のEGFRvIII CART細胞は、神経膠腫またはEGFRvIII発現細胞に関連する他のがん罹患している対象またはモデル動物において、陰性対照と比較して、細胞および/またはがん細胞の含量、数、量またはパーセンテージを、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも65%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも95%または少なくとも99%減少させる。局面の一において、該対象はヒトである。

【0297】

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

【0298】

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

【0299】

組み合わせ療法

本明細書に記載の、CAR発現細胞は、他の公知の薬剤および療法と組み合わせて用いてよい。本明細書において、「組み合わせて」投与するとは、2つの(またはそれより多くの)異なる処置が、対象の障害に関する苦痛の経過において該対象に送達されること、例えば該2つ以上の処置が、対象が障害についての診断を受けた後であるが、該障害が治療されるかもしくは除去されるか、または処置が他の理由で終了するよりも前に該対象に送達されることを指す。いくつかの態様において、第2の処置の送達を開始したときに第1の処置の送達は未だ進行中であるため、投与期間に重なりが見られる。このことを、本明細書中において、「同時」または「同時的な送達」と称する場合もある。他の態様において、1つの処置の送達はもう1つの処置を開始する前に終了する。いずれの場合においても、い

いくつかの態様において、該処置は、組合せ投与であるためにより有効である。例えば、第2の処置は、第1の処置なしに投与する場合よりもより効果的である、例えば、第2の処置が少なくとも同等の効果がみられるか、または第2の処置が症候をより大幅に減少させる。または、同等の状況が第1の処置についてみられる。いくつかの態様において、送達は、症候または該障害に関連する他のパラメーターの低下が、一方の処置がない場合のもう一方の処置について観察されるよりも大きくなるように行われる。かかる2つの処置の効果は部分的に相加的であっても、全体的に相加的であっても、または相加よりも優れたものであってもよい。該送達は、第2の処置が送達されるときに、第1の処置の効果が未だ検出できるように行ってもよい。

【0300】

10

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

【0301】

さらなる局面において、本明細書に記載のCAR発現細胞は、外科手術、化学療法、放射線療法、免疫抑制剤、例えばシクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノレートおよびFK506、抗体または他の免疫除去剤、例えばCAMPATH、抗CD3抗体または他の抗体療法、サイトキシン(cytotoxin)、フルダラビン、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、FR901228、サイトカインおよび放射線照射と組み合わせた処置レジメンに用いてよい。悪性神経腫瘍用の免疫療法アプローチの例が、Johnson et al. 2010 Curr Neurol Neurosci Rep 10:259-266に記載されている。いくつかの態様において、本明細書に記載のCAR発現細胞は、細胞外マトリクスタンパク質、例えばテネイシン(tenascin)を標的とする薬剤、例えば抗テネイシン抗体、例えば²¹¹At-標識抗テネイシン抗体と組み合わせた処置レジメンで用いてよい。いくつかの態様において、本明細書に記載のCAR発現細胞は、免疫調節剤、例えばインターフェロンα、インターフェロンβ、TGF-β2ペプチド阻害剤またはポリICLCと組み合わせた処置レジメンで用いてよい。いくつかの態様において、本明細書に記載のCAR発現細胞は、WT1転写因子ペプチドワクチン、例えばIzumoto et al. 2008 J Neurosurg 108:963-971に記載のものと組み合わせた処置レジメンで用いてよい。

20

30

【0302】

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

【0303】

組み合わせ療法への使用が考えられる一般的な化学療法剤としては次のものが挙げられる：アナストロゾール(Arimidex(登録商標))、ビカルタミド(Casodex(登録商標))、硫酸ブレオマイシン(Blenoxane(登録商標))、ブスルファン(Myleran(登録商標))、ブスルファン注射薬(Busulfex(登録商標))、カペシタビン(Xeloda(登録商標))、N4-ペントキシカルボニル-5-デオキシ-5-フルオロシチジン、カルボプラチン(Paraplatin(登録商標))、カルムスチン(BicNU(登録商標))、クロラムブシル(Leukeran(登録商標))、シスプラチン(Platinol(登録商標))、クラドリビン(Leustatin(登録商標))、シクロホスファミド(Cytosar-U(登録商標))またはNeosar(登録商標))、シタラビン、シトシンアラビノシド(Cytosar-U(登録商標))、シタラビンリポソーム注射薬(DepoCyt(登録商標))、ダカルバジン(DTIC-Dome(登録商標))、ダクチノマイシン(アクチノマイシンD、Cosmegen)、塩酸ダウノルビシン(Cerubidine(登録商標))、クエン酸ダウノルビシンリポソーム注射薬(Daunoxome(登録商標))、デキサメタゾン、ドセタキセル(Taxotere(登録商標))、塩酸ドキソルビシン(Adriamycin(登録商標))、Rubex(登録商標))、エトポシド(Vepesid(登録商標))、リン酸フルダラビン(Fludara(登録商標))、5-フルオロウラシル(Adrucil(登録商標))、Efudex(登録商

40

50

標))、フルタミド(Eulexin(登録商標))、テザシチビン(tezacitibine)、ゲムシタビン(ジフルオロデオキシシチジン)、ヒドロキシウレア(Hydrea(登録商標))、イダルビシン(Idamycin(登録商標))、イホスファミド(IFEX(登録商標))、イリノテカン(Camptosar(登録商標))、L-アスパラギナーゼ(ELSPAR(登録商標))、ロイコボリンカルシウム、メルファラン(Alkeran(登録商標))、6-メルカトプリン(Purinethol(登録商標))、メトトレキサート(Metotrexate(登録商標))、ミトキサントロン(Novantrone(登録商標))、マイロターグ、パクリタキセル(Taxol(登録商標))、フェニックス(イットリウム90/MX-DTPA)、ペントスタチン、ポリフェプロザン20カルムスチンインプラント(Gliadel(登録商標))、クエン酸タモキシフェン(Nolvadex(登録商標))、テニポシド(Vumon(登録商標))、6-チオグアニン、チオテパ、チラパザミン(Tirazone(登録商標))、塩酸トポテカン注射薬(Hycamptin(登録商標))、ビンブラスチン(Velban(登録商標))、ピンクリスチン(Oncovin(登録商標))およびビンレルビン(Navelbine(登録商標))。

10

【0304】

アルキル化剤の例としては次のものが挙げられるが、これらに限定されない： ナイトロジェンマスタード、エチレンイミン誘導体、スルホン酸アルキル、ニトロソウレアおよびトリアゼン： ウラシルマスタード(Aminouracil Mustard(登録商標)、Chlorethaminacil(登録商標)、Demethyldopan(登録商標)、Desmethyldopan(登録商標)、Haemanthamine(登録商標)、Nordopan(登録商標)、Uracil nitrogen mustard(登録商標)、Uracillost(登録商標)、Uracilmostaza(登録商標)、Uramustin(登録商標)、Uramustine(登録商標))、クロルメチン(Mustargen(登録商標))、シクロホスファミド(Cytosan(登録商標)、Neosar(登録商標)、Clafen(登録商標)、Endoxan(登録商標)、Procytox(登録商標)、RevimmuneTM)、イホスファミド(Mitoxana(登録商標))、メルファラン(Alkeran(登録商標))、クロラムブシル(Leukeran(登録商標))、ピポプロマン(Amedel(登録商標)、Vercyte(登録商標))、トリエチレンメラミン(Hemel(登録商標)、Hexalen(登録商標)、Hexastat(登録商標))、トリエチレンチオホスフォラミン、テモゾロミド(Temodar(登録商標))、チオテパ(Thioplex(登録商標))、ブスルファン(Busilvex(登録商標)、Myleran(登録商標))、カルムスチン(BiCNU(登録商標))、ロムスチン(CeeNU(登録商標))、ストレプトゾシン(Zanosar(登録商標))およびダカルバジン(DTIC-Dome(登録商標))。さらなるアルキル化剤の例としては、以下のものが挙げられるが、これらに限定されない： オキサリプラチン(Eloxatin(登録商標))； テモゾロミド(Temodar(登録商標)) および Temodal(登録商標))； ダクチノマイシン(Aktychomycin(登録商標))として知られる、Cosmegen(登録商標))； メルファラン(L-PAM、L-サルコリシンおよびフェニルアラニンマスタードとしても知られる、Alkeran(登録商標))； アルトレタミン(ヘキサメチルメラミン(HMM)としても知られる、Hexalen(登録商標))； カルムスチン(BiCNU(登録商標))； ベンダムスチン(Treanda(登録商標))； ブスルファン(Busulfex(登録商標))およびMyleran(登録商標))； カルボプラチン(Paraplatin(登録商標))； ロムスチン(CCNUとしても知られる、CeeNU(登録商標))； シスプラチン(CDDPとしても知られる、Platinol(登録商標))およびPlatinol(登録商標)-AQ)； クロラムブシル(Leukeran(登録商標))； シクロホスファミド(Cytosan(登録商標)) および Neosar(登録商標))； ダカルバジン(DTIC、DICおよびイミダゾールカルボキサミドとしても知られる、DTIC-Dome(登録商標))； アルトレタミン(ヘキサメチルメラミン(HMM)としても知られる、Hexalen(登録商標))； イホスファミド(Ifex(登録商標))； プレドニムスチン(Prednumustine)； プロカルバジン(Matulane(登録商標))； メクロレタミン(ナイトロジェンマスタード、ムスチンおよび塩酸メクロレタミンとしても知られる、Mustargen(登録商標))； Streptozocin(Zanosar(登録商標))； チオテパ(チオホスファミド、TESPAおよびTSPAとしても知られる、Thioplex(登録商標))； シクロホスファミド(Endoxan(登録商標)、Cytosan(登録商標)、Neosar(登録商標)、Procytox(登録商標)、Revimmune(登録商標))； およびベンダムスチンHCl(Treanda(登録商標))。

20

30

40

【0305】

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

50

【 0 3 0 6 】

血管新生阻害剤の例としては、次のものが挙げられるが、これらに限定されるものではない：A6 (Angstrom Pharmaceuticals)、ABT-510 (Abbott Laboratories)、ABT-627 (アトラセンタン) (Abbott Laboratories/Xinlay)、ABT-869 (Abbott Laboratories)、アクチミド (CC4047、Pomalidomide) (Celgene Corporation)、AdGVPEDF.11D (GenVec)、ADH-1 (エクスヘリン) (Adherex Technologies)、AEE788 (Novartis)、AG-013736 (アキシチニブ) (Pfizer)、AG3340 (プリノマスタット) (Agouron Pharmaceuticals)、AGX1053 (AngioGenex)、AGX51 (AngioGenex)、ALN-VSP (ALN-VSP 02) (Alnylam Pharmaceuticals)、AMG 386 (Amgen)、AMG706 (Amgen)、アパチニブ (YN968D1) (Jiangsu Hengrui Medicine)、AP23573 (リダフォロリムス/MK8669) (Ariad Pharmaceuticals)、AQ4N (Novavea)、ARQ 1 97 (ArQule)、ASA404 (Novartis/Antisoma)、アチプリモド (Callisto Pharmaceuticals)、ATN-161 (Attenuon)、AV-412 (Aveo Pharmaceuticals)、AV-951 (Aveo Pharmaceuticals)、アバスチン (ベバシズマブ) (Genentech)、AZD2171 (セジラニブ/レセンチン) (AstraZeneca)、BAY 57-9352 (テタチニブ) (Bayer)、BEZ235 (Novartis)、BIBF1120 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals)、BIBW 2992 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals)、BMS-275291 (Bristol-Myers Squibb)、BMS-582664 (Brivanib) (Bristol-Myers Squibb)、BMS-690514 (Bristol-Myers Squibb)、カルシトリオール、CCI-779 (トーリセル) (Wyeth)、CDP-791 (ImClone Systems)、セフラトニン (Ceflatonin) (ホモハリントニン/HHT) (ChemGenex Therapeutics)、セレブレックス (セレコキシブ) (Pfizer)、CEP-7055 (セファロン/Sanofi)、CHIR-265 (Chiron Corporation)、NGR-TNF、COL-3 (メタスタット) (Collagenex Pharmaceuticals)、コンプレタスタチン (Oxigene)、CP-751,871 (フィギツムマブ) (Pfizer)、CP-547,632 (Pfizer)、CS-7017 (Daiichi Sankyo Pharma)、CT-322 (アンジオセプト) (Adnexus)、クルクミン、ダルテパリン (フラグミン) (Pfizer)、ジスルフィラム (アンタピュース)、E7820 (Eisai Limited)、E7080 (Eisai Limited)、EMD 121974 (シレンジタイド) (EMD Pharmaceuticals)、ENMD-1198 (EntreMed)、ENMD-2076 (EntreMed)、エンドスター (Endostar) (Simcere)、アービタックス (ImClone/Bristol-Myers Squibb)、EZN-2208 (Enzon Pharmaceuticals)、EZN-2968 (Enzon Pharmaceuticals)、GC1008 (Genzyme)、ゲニステイン、GSK1363089 (フォレチニブ) (GlaxoSmithKline)、GW786034 (パゾパニブ) (GlaxoSmithKline)、GT-111 (Vascular Biogenics Ltd.)、IMC-1121B (ラムシルマブ) (ImClone Systems)、IMC-18F1 (ImClone Systems)、IMC-3G3 (ImClone LLC)、INCB007839 (Incyte Corporation)、INGN 241 (Introgen Therapeutics)、イレッサ (ZD1839/ゲフィチニブ)、LBH589 (ファリーダック/パノビノスタット) (Novartis)、ルセンティス (ランビズマブ) (Genentech/Novartis)、LY317615 (エンザスタウリン) (Eli Lilly and Company)、マクジェン (ペガブタニブ) (Pfizer)、MEDI522 (アベグリン (Abeigrin)) (MedImmune)、MLN518 (タンデュチニブ) (Millennium)、ネオバスタット (Neovastat) (AE941/ベネフィン) (Aeterna Zentaris)、ネクサバール (Bayer/Onyx)、NM-3 (Genzyme Corporation)、ノスカピン (Cougar Biotechnology)、NPI-2358 (Nereus Pharmaceuticals)、OSI-930 (OSI)、Palomid 529 (Paloma Pharmaceuticals, Inc.)、Panzem Capsules (2ME2) (EntreMed)、Panzem NCD (2ME2) (EntreMed)、PF-02341066 (Pfizer)、PF-04554878 (Pfizer)、PI-88 (Progen Industries/Medigen Biotechnology)、PKC412 (Novartis)、Polyphenon E (緑茶抽出物) (Polyphenon E International, Inc)、PPI-2458 (Praecis Pharmaceuticals)、PTC299 (PTC Therapeutics)、PTK787 (バタラニブ) (Novartis)、PXD101 (ベリノスタット) (CuraGen Corporation)、RAD001 (エベロリムス) (Novartis)、RAF265 (Novartis)、レゴラフェニブ (BAY73-4506) (Bayer)、レブリミド (Celgene)、レターン (Retaane) (Alcon Research)、SN38 (リボソーム) (Neopharm)、SNS-032 (BMS-387032) (Sunesis)、SOM230 (パシレオチド) (Novartis)、スクアラミン (Genaera)、スラミン、ステント (Pfizer)、タルセバ (Genentech)、TB-403 (Thrombogenics)、テンポスタチン (Tempostatin) (Collard Biopharmaceuticals)、テトラチオモリブデート (Sigma-Aldrich)、TG100801 (TargeGen)、サリドマイド (Celgene Corporation)、チンザパリンナトリウム、TKI258 (Novartis)、TRC093 (Tracon Pharmaceuticals Inc.)、VEGF Trap (アフリベルセプト) (Regen

eron Pharmaceuticals)、VEGF Trap-Eye (Regeneron Pharmaceuticals)、ベグリニ(Veglin) (VasGene Therapeutics)、ボルテゾミブ(Millennium)、XL184 (Exelixis)、XL647 (Exelixis)、XL784 (Exelixis)、XL820 (Exelixis)、XL999 (Exelixis)、ZD6474 (AstraZeneca)、ポリノスタット(Merck)およびZSTK474。

【0307】

血管内皮増殖因子(VEGF)受容体阻害剤の例としては以下が挙げられるが、これらに限定されるものではない：ベバシズマブ (Avastin(登録商標))、アキシチニブ(Inlyta(登録商標))；ブリバニブアラニネート(BMS-582664、(S)-((R)-1-(4-(4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イルオキシ)-5-メチルピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-6-イルオキシ)プロパン-2-イル)2-アミノプロパノエート)；ソラフェニブ (Nexavar(登録商標))；パゾパニブ(Votrient(登録商標))；リング酸スニチニブ(Sutent(登録商標))；セジラニブ(AZD2171、CAS 288383-20-1)；バラガテフ(BIBF1120、CAS 928326-83-4)；フォレチニブ(GSK1363089)；テラチニブ (BAY57-9352、CAS 332012-40-5)；アパチニブ(YN968D1、CAS 811803-05-1)；イマチニブ(Gleevec(登録商標))；ボナチニブ(AP24534、CAS 943319-70-8)；チボザニブ(AV951、CAS 475108-18-0)；レゴラフェニブ(BAY73-4506、CAS 755037-03-7)；二塩酸バタラニブ (PTK787、CAS 212141-51-0)；ブリバニブ(BMS-540215、CAS 649735-46-6)；バンデタニブ(Caprelsa(登録商標)またはAZD6474)；ニリン酸モテサニブ (AMG706、CAS 857876-30-3、N-(2,3-ジヒドロ-3,3-ジメチル-1H-インドール-6-イル)-2-[(4-ピリジニルメチル)アミノ]-3-ピリジニカルボキサミド、国際公開第02/066470号に記載)；二乳酸ドビチニブ(TKI258、CAS 852433-84-2)；リンファニブ(ABT869、CAS 796967-16-3)；カボザンチニブ(XL184、CAS 849217-68-1)；レスタウルチニブ(CAS 111358-88-4)；N-[5-[[[5-(1,1-ジメチルエチル)-2-オキサゾリル]メチル]チオ]-2-チアゾリル]-4-ピペリジニカルボキサミド(BMS38703、CAS 345627-80-7)；(3R,4R)-4-アミノ-1-((4-((3-メトキシフェニル)アミノ)ピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-5-イル)メチル)ピペリジン-3-オール(BMS690514)；N-(3,4-ジクロロ-2-フルオロフェニル)-6-メトキシ-7-[[[(3 α ,5 β ,6 α)-オクタヒドロ-2-メチルシクロペンタ[c]ピロール-5-イル]メトキシ]-4-キナゾリンアミン (XL647、CAS 781613-23-8)；4-メチル-3-[[1-メチル-6-(3-ピリジニル)-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-イル]アミノ]-N-[3-(トリフルオロメチル)フェニル]-ベンズアミド(BHG712、CAS 940310-85-0)；およびアフリベルセプト(Eylea(登録商標))。

【0308】

EGF経路阻害剤の例としては、tyrphostin 46、EKB-569、エルロチニブ(Tarceva(登録商標))、ゲフィチニブ (Iressa(登録商標))、アービタックス、ニモツズマブ、ラパチニブ(Tykerb(登録商標))、セツキシマブ(抗EGFR mAb)、¹⁸⁸Re-標識ニモツズマブ(抗EGFR mAb)ならびに国際公開第97/02266号、欧州特許出願公開第0 564 409号、国際公開第99/03854号、欧州特許出願公開第0 520 722号、欧州特許出願公開第0 566 226号、欧州特許出願公開第0 787 722号、欧州特許出願公開第0 837 063号、米国特許第5,747,498号、国際公開第98/10767号、国際公開第97/30034号、国際公開第97/49688号、国際公開第97/38983号および国際公開第96/33980号に一般的小および具体的に開示されている化合物が挙げられるが、これらに限定されるものではない。EGFR抗体の例としては、セツキシマブ (Erbix(登録商標))；パニツムマブ (Vectibix(登録商標))；マツズマブ (EMD-72000)；トラスツズマブ (Herceptin(登録商標))；ニモツズマブ (hR3)；ザルツムマブ；TheraCIM h-R3；MDX0447 (CAS 339151-96-1)；およびch806 (mAb-806、CAS 946414-09-1) が挙げられるが、これらに限定されるものではない。上皮成長因子受容体(EGFR)阻害剤の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されるものではない：塩酸エルロチニブ (Tarceva(登録商標))、ゲフィチニブ(Iressa(登録商標))；N-[4-[(3-クロロ-4-フルオロフェニル)アミノ]-7-[[[(3"S)-テトラヒドロ-3-フラニル]オキシ]-6-キナゾリニル]-4-(ジメチルアミノ)-2-ブテンアミド、Tovok(登録商標))；バンデタニブ(Caprelsa(登録商標))；ラパチニブ(Tykerb(登録商標))；(3R,4R)-4-アミノ-1-((4-((3-メトキシフェニル)アミノ)ピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-5-イル)メチル)ピペリジン-3-オール(BMS690514)；二塩酸カネルチニブ (CI-1033)；6-[4-[(4-エチル-1-ピペラジニル)メチル]フェニル]-N-[(1R)-1-フェニ

ルエチル]-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-4-アミン(AEE788、CAS 497839-62-0); ムブリチニブ (TAK165); ペリチニブ(EKB569); アファチニブ(BIBW2992); ネラチニブ(HKI-272); N-[4-[[1-[(3-フルオロフェニル)メチル]-1H-インダゾール-5-イル]アミノ]-5-メチルピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-6-イル]-カルバミン酸、(3S)-3-モルホリニルメチルエステル (BMS599626); N-(3,4-ジクロロ-2-フルオロフェニル)-6-メトキシ-7-[[[(3 α , 5 β , 6 α)-オクタヒドロ-2-メチルシクロペンタ[c]ピロール-5-イル]メトキシ]-4-キナゾリンアミン(XL647、CAS781613-23-8); および4-[4-[[[(1R)-1-フェニルエチル]アミノ]-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-6-イル]-フェノール(PKI166、CAS 187724-61-4)。

【0309】

mTor阻害剤の例としては、ラパマイシン (Rapamune(登録商標))およびその類似体および誘導体; SDZ-RAD; テムシロリムス(Torisel(登録商標); CCI-779としても知られる); リダフォロリムス(以前はデフェロリムスとして知られていた、(1R,2R,4S)-4-[(2R)-2-[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-ジヒドロキシ-19,30-ジメトキシ-15,17,21,23,29,35-ヘキサメチル-2,3,10,14,20-ペンタオキソ-11,36-ジオキサ-4-アザトリシクロ[30.3.1.0^{4,9}]ヘキサトリアコンタ-16,24,26,28-テトラエン-12-イル]プロピル]-2-メトキシシクロヘキシルジメチルホスフィネート(AP23573およびMK8669としても知られ、国際公開第03/064383号に記載されている); エベロリムス(Afinitor(登録商標)またはRAD001); ラパマイシン(AY22989、Sirolimus(登録商標)); セマピモド(Simapimod) (CAS 164301-51-3); (5-{2,4-ビス[(3S)-3-メチルモルホリン-4-イル]ピリド[2,3-d]ピリミジン-7-イル}-2-メトキシフェニル)メタノール(AZD8055); 2-アミノ-8-[trans-4-(2-ヒドロキシエトキシ)シクロヘキシル]-6-(6-メトキシ-3-ピリジニル)-4-メチル-ピリド[2,3-d]ピリミジン-7(8H)-オン(PF04691502、CAS 1013101-36-4); およびN²-[1,4-ジオキソ-4-[[4-(4-オキソ-8-フェニル-4H-1-ベンゾピラン-2-イル)モルホリニウム-4-イル]メトキシ]ブチル]-L-アルギニルグリシル-L- α -アスパラチル-L-セリン-内部塩(SF1126、CAS 936487-67-1)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0310】

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

10

20

30

40

50

ル]オキシ]メチル]-ベンゼンエタンアミン(A674563、CAS 552325-73-2); 4-[(4-クロロフェニル)メチル]-1-(7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-4-イル)-4-ピペリジニアミン(CCT128930、CAS 885499-61-6); 4-(4-クロロフェニル)-4-[4-(1Hピラゾール-4-イル)フェニル]-ピペリジン(AT7867、CAS 857531-00-1); およびアルチェキシン(Archexin) (RX-0201、CAS 663232-27-7)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0311】

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

10

【0312】

態様の一において、対象は、CAR発現細胞の投与に伴う副作用を減少させるか、または緩和させる薬剤の投与を受けてよい。CAR発現細胞の投与に伴う副作用としては、CRSおよびマクロファージ活性化症候群(MAS)とも称される血球貪食性リンパ組織球症(HLH)が挙げられるが、これらに限定されるものではない。CRSの症候としては、高熱、悪心、一過性の低血圧および低酸素症等が挙げられる。したがって、本明細書に記載の方法は、本明細書に記載のCAR発現細胞を対象に投与し、CAR発現細胞による処置より生じる可溶性因子のレベルの上昇を制御する薬剤を投与することを含んでいてよい。態様の一において、対象において上昇する可溶性因子は、IFN- γ 、TNF α 、IL-2およびIL-6の1つ以上である。したがって、この副作用を処置するために投与される薬剤は、これらの可溶性因子の1つ以上を中和する薬剤であってよい。該薬剤としては、例えば、ステロイド、TNF α 阻害剤およびIL-6阻害剤が挙げられるが、これらに限定されるものではない。TNF α 阻害剤の例は、エンタネルセプト(entanercept)である。IL-6阻害剤の例はトシリズマブ(toc)である。

20

30

【0313】

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

40

【0314】

50

PD1は、CD28、CTLA-4、ICOSおよびBTLAをも含むCD28ファミリーの受容体の阻害性の一員である。PD-1は、活性化B細胞、T細胞および骨髄細胞に発現される (Agata et al. 1996 Int. Immunol 8:765-75)。PD1、PD-L1およびPD-L2に対して2つのリガンドが、PD1への結合時にT細胞活性を低下させることが示されている (Freeman et al. 2000 J Exp Med 192:1027-34; Latchman et al. 2001 Nat Immunol 2:261-8; Carter et al. 2002 Eur J Immunol 32:634-43)。PD-L1は、ヒトのがんに豊富である (Dong et al. 2003 J Mol Med 81:281-7; Blank et al. 2005 Cancer Immunol. Immunother 54:307-314; Konishi et al. 2004 Clin Cancer Res 10:5094)。免疫抑制は、PD1とPD-L1の局所的な相互作用を阻害することによって逆行し得る。PD1、PD-L1およびPD-L2の抗体、抗体断片および他の阻害剤は当該分野で利用可能であり、本明細書に記載のCD123 CARと組み合わせて用いてよい。例えば、ニボルマブ(BMS-936558またはMDX1106とも称される; Bristol-Myers Squibb) は、PD-1を特異的に遮断する完全ヒトIgG4モノクローナル抗体である。ニボルマブ(クローン5C4)およびPD-1に特異的に結合する他のヒトモノクローナル抗体は、米国特許第8,008,449号明細書および国際公開第2006/121168号に記載されている。ピジリズマブ(CT-011; Cure Tech)は、PD-1に結合するヒト化IgG1kモノクローナル抗体である。ピジリズマブおよび他のヒト化抗PD1モノクローナル抗体は、国際公開第2009/101611号に記載されている。ランプロリズマブ(MK03475とも称される; Merck)は、PD1に結合するヒト化IgG4モノクローナル抗体である。ランプロリズマブおよび他のヒト化抗PD1抗体は米国特許第8,354,509号および国際公開第2009/114335号に記載されている。MDPL3280A (Genentech / Roche)は、PD-L1に結合するヒトFc最適化IgG1モノクローナル抗体である。MDPL3280AおよびPD-L1に対する他のヒトモノクローナル抗体は、米国特許第7,943,743号および米国特許出願公開第20120039906号明細書に記載されている。他の抗PD-L1結合剤としては、YW243.55.S70 (重鎖および軽鎖可変領域は、国際公開第2010/077634号の配列番号20および21に記載) およびMDX-1 105 (BMS-936559とも称される、例えば国際公開第2007/005874号に記載の抗PD-L1結合剤)が挙げられる。AMP-224 (B7-DCIg; Amplimmune; 例えば、国際公開第2010/027827号および国際公開第2011/066342号に記載)は、PD1とB7-H1の間の相互作用を遮断するPD-L2 Fc融合可溶性受容体である。他の抗PD1抗体としては、AMP 514 (Amplimmune)とりわけ、米国特許第8,609,089号、米国特許出願公開第2010028330号および/または米国特許出願公開第20120114649号明細書に記載の抗PD1抗体が挙げられる。CAR発現細胞の活性を上昇させる物質は、例えば、第一ドメインが阻害分子またはその断片であり、第二ドメインが、ポジティブシグナルと結合するポリペプチドである、第一ドメインおよび第二ドメインを含む融合タンパク質であってよく、ここで、ポジティブシグナルと結合するポリペプチドは、例えば、CD28、ICOSおよびその断片、例えばCD28および/またはICOSの細胞内シグナル伝達ドメインである。態様の一において、該融合タンパク質は、CARを発現する細胞と同じ細胞に発現される。他の局面において、該融合タンパク質は、抗EGFRvIII CARを発現しない細胞、例えばT細胞により発現される。

【0315】

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

【0316】

医薬組成物および処置

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

【0317】

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

【0318】

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

【0319】

「免疫学的有効量」、「抗腫瘍有効量」、「腫瘍阻害性有効量」または「治療量」と記載する場合、投与する本発明の組成物の正確な量は、患者（対象）の年齢、体重、腫瘍サイズ、感染または転移の程度および症状の個々の違いを考慮して医師が決定してよい。一般的に、本明細書に記載のT細胞を含む医薬組成物を、細胞数 $10^4 \sim 10^9$ 個/kg（体重）、いくつかの場合には $10^5 \sim 10^6$ 個/kg、その範囲内の全ての値を含む投与量で投与してよいといえる。T細胞組成物はまた、これらの投与量で複数回投与してもよい。該細胞は、免疫療法において一般的に知られている注入技術により投与してよい（例えばRosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988を参照のこと）。

【0320】

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

【0321】

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

【0322】

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

【0323】

上述の処置の患者に投与する用量は、処置する症状および処置のレシピエントの正確な

性質により変化する。ヒト投与用の用量の調整は、当該分野で用いられている方法にしたがって行ってよい。

【実施例】

【0324】

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

【0325】

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

【0326】

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

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

【0327】

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

【0328】

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

【0329】

この実施例で用いる材料および方法をここに示す。

【0330】

材料および方法

NSGマウスモデル

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

【0331】

生物学的系の構造および特徴

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

【0332】

マウス注入用の細胞の準備

マウスに注入する細胞はヒトT細胞である。ヒト単核細胞濃縮アフエレーシス産物は、University of Pennsylvania Human Immunology Coreの健康なボランティアドナーの白血球除去により得られる。全ての検体は、University Institutional Review Boardの承認したプロトコルにしたがって回収し、各ドナーから同意書を得ている。T細胞をRosetteSep human T cell enrichment cocktail (Stemcell Technologies, Vancouver, Canada)を用いてネガティブ選択する。T細胞をTRP研究室に移し、ここで研究用グレードのCD3/28ビーズを用いて活性化し、グルタミン、10% FBS、20mM Hepes、100U/ml ペニシリンおよび100ug/ml ストレプトマイシンを含むRPMI中で増殖させる。パッケージレンチウイルスベクターを直接活性化培養物に添加してから24時間後にベクターの形質導入が起こる。細胞を5日目にビーズから離し、増殖をCoulter Multisizer 3(Beckman Coulter, Fullerton, CA)を用いて、サイズ (fl) 変化および総細胞数の変化について、濃度を $0.7E6 \sim 2E6$ 個/mlに維持しながら経過観察を行う。CAR導入T細胞についての形質導入効率を、ヤギ抗マウス抗体 (GAM、3C10-ベースCARに対する) またはヤギ抗ヒト抗体 (GAH、139ベースCARに対する) のいずれかで染色することによりフローサイトメトリーにより試験する。マウス1個体あたり 1×10^6 個のCAR+ T細胞を、試験の0日目に尾静脈注射して注入する。

【0333】

テモゾロミド (TMZ) 処理

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

【0334】

臨床グレードのCART

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

【0335】

脳室内のEGFRvIII発現神経膠芽腫のCAR-T細胞による根絶

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

10

【0336】

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

【0337】

GBMに有効なCAR治療を開発するために、3つの新規のEGFRvIIIを標的とするレンチウイルスCARコンストラクトを作製した。これらのベクターはそれぞれ、EGFRvIII特異的マウスモノクローナル抗体 (mAb) 3C10または「139」として設計されたEGFRvIII特異的ヒト化モノクローナル抗体 (mAbs) 由来の一本鎖可変断片(scFv)をコードする(図6)。該3C10 scFvは、CD8aヒンジ、4-1BBおよびCD3ζドメインと連結しており、CD28膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインと連結しているか、またはしていない (それぞれ3C10BBz28-CARおよび3C10BBz-CAR)。139 scFvは、CD8aヒンジ、4-1BBおよびCD3ζドメインと連結している (139BBz-CAR)。これらのCARのそれぞれを導入したヒトT細胞は、EGFRvIII発現U87ヒトGBM細胞(U87-EGFRvIII)に対して特異的および強力な細胞溶解を示した; 図7を参照のこと。7日目のU87-EGFRvIII腫瘍を脳内に有する免疫不全NOD/scid/γc(-/-) (NSG) マウスは: 1) 139BBz-CAR; 2) 3C10BBz-CAR; 3) 3C10BBz28-CAR; 4) ヒトCD19を標的化する対照CD19BBz-CARを用いて生体外で形質導入したヒトT細胞1 x 10⁶ 個の静脈内注入を受けた。これらのマウスはまた、テモゾロミド (330 mcg/投与) の腹腔内注射を7~11日目に受けた。U87-EGFRvIII発現細胞は、ルシフェラーゼも発現するため、生物発光イメージング(BLI) で腫瘍増殖をモニターした。生理食塩水のみで処置したマウスは全てが腫瘍の急速な成長により、21日目までに死亡し、ACTを行わないテモゾロミド処置は、U87-EGFRvIII腫瘍を阻害はしたが根絶はしなかった。CD19BBz-CAR-T細胞およびテモゾロミドの投与を受けたマウスは、U87-EGFRvIIIに対して何らかの同種間応答を示したものの、腫瘍はこれらのマウスで成長を続けた。その一方で、139BBz-CAR-、3C10BBz-CAR-または3C10BBz28-CAR-導入T細胞の投与を受けた全てのマウスで、BLIシグナルが21日目までにベースラインレベルまでに減弱した。このことは、腫瘍が全体的に根絶されたことを示す (図8)。重要なことに、3C10BBz-CART細胞の投与を受けたマウスは、3C10BBz28または139BBz CART細胞のいずれよりも、腫瘍が速く除去された。このことは、3C10とBBzの組合せが患者においてよりよい応答をもたらすものであることを示す。腫瘍成長および末梢免疫応答をモニターし、3種類のEGFRvIII-CARベクターのうちのいずれが他の2つよりも長期抗腫瘍効果において優れているかを決定した。

20

30

40

【0338】

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

【0339】

臨床デザイン

50

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

【0340】

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

【0341】

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

【0342】

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

【0343】

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

miR-17-92発現は、1型の表現型およびT細胞の生存亢進をもたらす。神経膠芽腫(GBM)患者由来のT細胞では、miR-17-92が発現低下していることが報告されている。キメラ抗原受容体を形質導入したT細胞(CAR-T細胞)を用いた養子移入療法の有効性を改善するために、miR-17-92および、タンデムのT細胞受容体CD3ζ鎖シグナル伝達モジュールおよびCD137(4-1BB)およびCD28の同時刺激モチーフに結合した上皮増殖因子受容体バリエーションIII (EGFRvIII)-特異的な一本鎖可変断片 (scFv) からなるCARのための新規レンチウイルスベクター(pELNS-3C10-CAR)を構築した。EGFRvIIIを安定して発現するU87 GBM細胞 (U87-EGFRvIII) に対する抗原特異的な強い細胞障害性活性に加え、miR-17-92を共形質導入したCAR-T細胞は、miR-17-92の共形質導入を伴わないCAR-T細胞と比較して、トランスフォーミング増殖因子 (TGF)-βおよびテモゾロミドのT細胞抑制効果に対する耐性が改善された。脳室内にU87-EGFRvIII異種移植片を有するマウスでは、導入遺伝子由来のmiR-17-92発現がある場合でもない場合でも、CAR-T細胞は、同レベルの強い治療効果を示し、CAR-T細胞の制御できない増殖は見られなかった。しかしながら、これらのマウスの脳内に、U87-EGFRvIII細胞を再負荷したときは、共形質導入したCAR-T細胞の投与を受けたマウスでは、miR-17-92の共形質導入のないCAR-T細胞の処置を受けたマウスと比較して、保護が改善することが示された。これらのデータは、GBMの患者における有効性を高めるために、miR-17-92をCARに組み込み得ることを支持するものである。

【0344】

試験の結果を次に記載する。

【0345】

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

ヒトEGFRvIII特異的なモノクローナル抗体(mAb) 3C10由来の一本鎖可変断片(scFv)を介してEGFRvIIIを認識するレンチウイルスベクター (pELNS-3C10-CAR) を作製した(図1A参照)。このコンストラクトでは、EF-1 α プロモーターにより、3C10-由来scFv、CD28膜貫通ドメイン(TM)ならびに4-1BBおよび細胞内ドメイン (ICD)およびCD3 ζ ドメインを組み込んだCAR融合タンパク質の発現を制御する。FG12-ベースの SIN(self-inactivating) ベクターを用いたレンチウイルスmiR-17-92コンストラクト (FG12-EF1 α -miR-17/92 も作製した(図1B)。このベクターでは、EF-1 α プロモーターがmiR-17-92を制御し、ヒトUbiCプロモーターが、形質導入細胞の追跡用の高感度緑色蛍光タンパク質(EGFP)マーカー遺伝子を制御する。このスキームで用いる用語は: RSV/HIV-1 5' LTR; ハイブリッドRSVプロモーター-R/U5末端反復配列、EF-1 α ; ヒト伸張因子1 α -サブユニットプロモーター、VH; 3C10免疫グロブリンの重鎖の可変領域、VL; 3C10免疫グロブリンの軽鎖の可変領域、HIV-1 Δ -3' LTR; U3領域に欠損を有するSIN型3' 末端反復配列、CMV/HIV-1 5' LTR; ハイブリッドCMVプロモーター-R/U5末端反復配列、UbiC; ユビキチンCプロモーター、である。

【0346】

CARおよびmiR-17-92を形質導入したヒトT細胞の試験管内特徴付け

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

【0347】

CARおよび導入遺伝子由来のmiR-17-92の両方を発現するヒトT細胞を得るために、CD3⁺ T細胞に、2つのレンチウイルスベクターを連続して感染させることにより、pELNS-3C10-CARおよびFG12-EF1 α -miR-17/92によって共形質導入した。pELNS-3C10-CARを用いた最初の形質導入の24時間後に、該T細胞にFG12- EF1 α -miR-17-92を形質導入した。全体のT細胞の約4分の1 (23.6%)が、CARおよびEGFPの両方を発現している様子が観察された (図2A、右)。その後の試験管内試験のために、CAR-形質導入T細胞(CAR-T細胞)をビオチン化抗マウスF(ab')₂ Abおよび抗ビオチンMACSを用いて濃縮した。共形質導入の効率 (図2A、右)に基づけば、少なくとも50%のCAR-T細胞がEGFR (すなわち、導入遺伝子由来のmiR-17-92)をとともに発現していた。リアルタイムPCRにより、F(ab')₂ Ab-濃縮した、miR-17-92-共形質導入CAR-T細胞では、CAR単独で形質導入したT細胞と比較して、3~4倍高いmiR-17-92の発現が検出された(図2B)。図2Bは、qRT-PCRにより測定した、形質導入されたT細胞中のmiR-17-92クラスターメンバーである、miR-17-3p、miR-17-5pおよびmiR-92a-1の発現レベルを示す。同様の結果を示す3つの実験のうちの1つの、3回繰り返した測定値の平均 $\pm$ SD値を表す。* は、スチューデントt検定を用いた2群間でp<0.05であることを示す。図2Cは、種々のE:T比率で、⁵¹Cr-標識したU87-EGFRvIIIまたは対照のU87細胞に対する12時間の⁵¹Cr-放出アッセイにより評価した、形質導入T細胞のEGFRvIII特異的な細胞傷害活性を表す。対照細胞は、モック(EGFP)-形質導入T細胞である。値は、3つのウェルの平均値 $\pm$ SDを表す。

【0348】

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

【0349】

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

過去の試験 (Sasaki et al., 2010, J. Transl Med 8:17)において、miR-17-92遺伝子

導入マウス由来のCD4⁺ T細胞は、野生型マウス由来の対応物と比較すると、IFN- γ 産生の増加を示し; ヒト Jurkat T細胞のmiR-17-92による遺伝子導入は、活性化誘導細胞死 (AICD) を引き起こした。

【0350】

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

【0351】

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

【0352】

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

【0353】

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

【0354】

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

脳室内に確立された(7日目) U87-EGFRvIII腫瘍を有する免疫不全NOD/scid/ γ c(-/-) (NSG) マウスにおけるCAR-T細胞の有効性を評価するための試験を行った。マウスは、miR-17-92共形質導入CAR-T細胞、miR-17-92の共形質導入のないCAR-T細胞またはモック形質導入T細胞の、尾静脈を介した単回静脈内(i.v.)注入を受けた(2×10^6 個/マウス)。新しくGBMと診断された患者が日常的にTMZ療法を受けるのと同様に、TMZを、T細胞注入の日から開始して5日間毎日腹腔内(i.p.) 投与することを計画した (図4A)。図4Bは、 Kaplan-Meier解析を示す。CAR-T細胞で処理したマウス(miR-17-92の共形質導入を伴うかまたは伴わない)の生存中間値は、モック形質導入T細胞と比較して有意に上昇していた ($p<0.05$)。TMZおよびモック形質導入T細胞の投与を受けた対照マウスが全てT細胞注入の3週間

(21日)以内に死亡したように、TMZ処置そのものは、効果がなかった(図4B)。CAR-T細胞を注入した5匹のマウスのうちの1匹および、miR-17-92共形質導入CAR-T細胞を注入した5匹のマウスのうちの2匹が腫瘍の進行により22日までに死亡したが、これらの群の他のマウスは全て、40日より長く生存した。類似の結果を示す2回の独立した実験のうちの1回の結果を示す。miR-17-92-共形質導入CAR-T細胞とmiR-17-92を共形質導入していないCAR-T細胞を投与したマウス間では、生存に統計学的に有意な差は見られなかった(ログランク検定: $p=0.5485$)。

【0355】

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

10

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

20

【0356】

miR-17-92は、有効性を改善するために、CARに組み込んでよい

本明細書に示す結果は、3C10 scFvをCD3 ζ 鎖、CD137 (4-1BB)およびCD28とともに組み込んだ新規抗EGFRvIII-CAR (3C10-CAR)を導入したT細胞中のmiR-17-92の共発現の効果を示す。この結果は、miR-17-92の共発現は、TGF- β およびテモゾロミドのT細胞増殖抑制効果に対する耐性を改善させることを示す。生体内では、3C10-CARおよびmiR-17-92の両方を共導入したT細胞は、3C10-CAR単独を導入したT細胞と比較して、治療効果をよく持続させることが示された。

【0357】

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

30

40

【0358】

miR-17-92は発がん性miRと記載されているが(van Haaften and Agami, 2010, Genes & Development 24:1-4)、miR-17-92の過剰発現自体は、リンパ球において発がん性ではないことが知られている(Xiao et al., 2008, Nat Immunol 9:405-414)。実際、現在まで

50

の研究において、miR-17-92導入T細胞の制御できない増殖は観察されていない。それにもかかわらず、より安全性を確保するための他の方法として、レンチウイルスを用いて安定的に導入を行うのではなく、miR-17-92それ自体で一過性に形質導入を行い、該T細胞を多数注入することは、ウイルスベクターの導入に伴う、安全性についての懸念のない、合理的な方法であり得る(Zhao et al., 2010, Cancer Research 70:9053-9061)。

【0359】

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

【0360】

EGFRvIIIがGBM患者の一部の集団にのみ発現にしており、「EGFRvIII陽性」の症例の場合であってもGBM細胞の一部にのみ発現しているものであることを認識することは重要なことである(Heimberger et al., 2005, Clin.Cancer Res. 11:1462-1466)。単一の標的としてEGFRvIIIを標的とする免疫療法は、免疫療法が標的とする抗原が低下しているGBM細胞の増殖をもたらしやすい(Sampson et al., 2010, J Clin Oncol 28:4722-4729)。多数のこれまでの研究により、神経膠芽腫の免疫療法に用いるための、GBM-関連抗原、例えばIL-13R α 2 (Kong et al., 2012, Clin Cancer Res 18:5949-5960; Kahlon et al., 2004, Cancer Res. 64:9160-9166)、HER-2 (Ahmed et al., 2010, Clinical Cancer Research 16:474-485)およびEphA2 (Chow, K.K. et al)に対するCARならびにEphA2に対するように改変されたT細胞が開発されている(Mol Ther (2012))。いずれの特定の理論にも束縛されるものではないが、有効なCAR療法は、最終的には、GBM-誘導性の抑制メカニズムに対する耐性を示し、複数の抗原を標的とすることのできるT細胞を用いているため、注入されたT細胞は、不均一な抗原発現プロファイルを示すGBMに対して有効かつ維持された治療効果を示すと考えられている。

【0361】

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

【0362】

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

【0363】

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

【0364】

実施例3: CAR配列

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

10

【0365】

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

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

MALPVTALLLPLALLLHAARPGSEIQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIEDY YIHWVKQRTEQGLEWIGRIDPEND
ETKYGPFIQGRATITADTSSNTVYLQLSSLTS EDTAVYYCAFRGGVYWGPGTTLTSSGGGGSGGGSGGGGSHMDVVM
TQSPL TLSVAIGQSASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLISLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLRISRV
EAEDLGIYYCWQGFTHFGTGGGKLEIKASTTTPAPR PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWV
LVVVGGLVACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSKR GRKKLLYIFKQ
PFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQ GQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPPEMGGKPR
RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

20

【0366】

3C10scFv-BBz CAR (アミノ酸) (配列番号2)

MALPVTALLLPLALLLHAARPGSEIQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIE
DYYIHWVKQRTEQGLEWIGRIDPENDETKYGPFIQGRATITADTSSNTVYLQLSSLTSEDYAVYYCAFRGGVYWGPGTTLT
TVSSGGGGSGGGSGGGGSHMDVVMTQSPL TLSVAIGQSASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLISLVSK
LDSGVPD RFTGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCWQGFTHFGTGGGKLEIKASTTTPAPR PPTPAPTIASQPLSL
RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAFLAGTCGVLLLSL VITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF
PEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA
YSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

30

【0367】

3C10scFv-CD28BB ζ CAR (核酸) (配列番号18)

atggccttaccagtgaaccgccttgctcctgccgctggccttgctgctccacgccgccaggccgggatccgagattcagct
gcag caatctggggcagaacttgtagaagccaggggcctcagtcagctgctcctgcacaggttctggcttcaacattgaa
gactactatat tcactgggtgaagcagaggactgaacagggcctggaattggaattgatcctgagaatgatg
aaactaaatatggccc aatattccagggcagggccactataacacgcagacacatcctccaacacagctctacctgcaact
cagcagcctgacatctgagga cactgccgtctattactgtgccttttcgcggtggagtctactggggccaggaaccact
ctcacagctctcctcaggaggtgggtgggtccgggtgggtgggtccggaggtgggtgggtcacatatggatgttgtgatgac
ccagctctccactcactctatcggttgccattggac aatcagcctccatctcttgcaagtcaagtcagagcctcttagat
agtgatggaaagacatatattgaattgggtgttacagaggccagggcagctctccaaagcgccctaattctctctggtgtctaa
actggactctggagtcctgacaggttactggcagtggtgacaggag agatttcacactgagaatcagcagagtgaggag
gctgaggatttgggaatttattattgtgtggcaaggtacacattttcctgggacgtt cgggtggaggggaccaagctggaga
taaaagctagcaccacgacgccagcgccgaccaccaacaccggcgccaccatcg cgtcgcagccccctgtccctgcg
cccagaggcgtgccggccagcgggcgggggcgagtgacacagagggggctggacttcgcctgtgatttttgggtgctgg
tggtgggtgggtggagtcctggcttgctatagcttgctagtaacagtgccctttattattttctgggtg aggagtaagag
gagcaggctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgcgccccggggccaccgcaagcattacc agccctat
gccccaccacgagcgttcgcagcctatcgctccaaacggggcgagaaagaactcctgtatatattcaaacaccatt ta
tgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaagaaggaggatgtgaactg

40

50

a gagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtacaagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctag
gacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccggggaccctgagatggggggaaagccgagaaggaagaac
cct caggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagc
gccgg agggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacat
gcaggccc tgccccctcgc

【0368】

3C10scFv-BBz CAR (核酸) (配列番号19)

Atggccttaccagtaccgccttgcctcctgccgctggccttgcctgctccacgccgccaggccgggatccgagattcagct
gca gcaatctggggcagaacttgtgaagccaggggcctcagtcgaagctgtcctgcacagggttctggcttcaacattgaa
gactactat attcactgggtgaagcagaggactgaacaggcctggatggattggaaggattgatcctgagaatgatg
aaactaaatatggc ccaatatccaggggcaggccactataacagcagacacatcctccaacacagtctacctgcaact
cagcagcctgacatctgaggacactgccgtctattactgtgcctttcgcggtggagtctactggggggccaggaaccactc
tcacagtctcctcaggagggtgggtg gtccgggtgggtgggttccggagggtgggttcacatatggatgttgtgatgac
ccagtctccactcactctatcggttgccattg gacaatcagcctccatctcttgcaagtcaagtcagagcctcttagat
agtgtatgaaaagacatatattgaattgggtgttacagaggc caggccagtctccaaagcgcctaattctctctgggtgtcta
aactggactctggagtccttgacagggttactggcagtggtatcagg gacagatttcacactgagaatcagcagagtggga
ggctgaggatttgggaatttattattgtctggcaaggtacacattttcctgggacgttcgggtggaggggaccaagctggaga
taaaagctagcaccacgacgccagcgccgcgaccaccaacaccggcgccccacc atcgcgctcgagccccctgtccctgcg
cccagaggcgtgccggccagcgcgggggggcgagtcacacgaggggggctgg acttcgcctgtgatattctacatctgg
gcgccccctggccgggacttgtggggctcttctcctgtcactgggttatcaccctttactgcaa acggggcagaaagaaac
tcctgtatatattcaacaacatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagc tgccgatttcc
agaagaagaagaaggaggatgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccgctacaagcaggggccaga
accagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccggg accctga
gatgggggggaaagccgagaaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcct
acagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggagggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccacc
aaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgc

【0369】

「139」と称されるscFv断片は、EGFRvIIIに対するヒト抗体である (Morgan et al., 2012 Hum Gene Ther 23(10): 1043-53)。139 scFvを含むEGFRvIII CARは、最初に139 scFvを合成することにより作製した。139 scFvの配列は、リーダー配列、CD8ヒンジ、膜貫通 (TM) ドメインおよび所望のシグナル伝達ドメインを用いてクローニングした。例えば、139 scFvについての配列を4-1BBおよびCD3ζのシグナル伝達ドメインを用いてクローニングした。該CARコンストラクト(139scFv-BBz)は、レンチウイルス作製のpELNSベクターから発現される。

【0370】

139scFv-BBz CAR (アミノ酸) (配列番号3)

MALPVTALLPLALLLHAARPGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGIRNNL AWYQQKPGKAPKRLIYAASNLQS
GVPSRFTGSGSGTEFTLIVSSLPEDFATYYC LQHHSYPLTSGGGTKVEIKRTGSTSGSGKPGSGEGSEVQVLES GGGL
VQPGSLR LSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTNYADSVKGRFTISRDKSKNTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCAGSSGWSEYWGQGLTVTVSSASTTTPAPRP PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA
PLAGTCGVLLLSLV ITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQN
QLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKHDGLYQGLSTATK
DTYDALHMQALPPR

【0371】

139scFv-BBz CAR (核酸) (配列番号20)

Atggccttaccagtaccgccttgcctcctgccgctggccttgcctgctccacgccgccaggccgggatccgacatccagat
gaccagagccctagcagcctgagcgccagcgtggggcgacagagtaccatcacctgtcgggccagccaggggcatcagaa
aca acctggcctgggtatcagcagaagccccggcaaggcccccaagagactgatctacgtgccagcaatctgcagagcgg
cgtgcc cagcagattcaccggaagcggctccggcaccgagttaccctgatcgtgtccagcctgcagccccaggagcttc
gccacctact actgcctgcagcaccacagctaccctctgaccagcgcgaggaccaccaagggtggagatcaagcggaccg

gcagcaccagc ggccagcggaagcctggcagcgggcaggggaagcaggtccaggtgctggaatctggcggcgactggt
gcagcctggcggcagcctgagactgagctgtgccgcccagcggcttcaccttcagcagctacgccatgtcttgggtccggc
aggtccttggaag ggccctggaatgggtgtccgccatcagcggctctggcggctccaccaactacgccgacagcgtgaa
gggcccgttcacatcagccgggacaacagcaagaacacctgtatctgcagatgaacagcctgagagccgaggacaccg
ccgtgtactactgtgccgg cagcagcgggtggagcagtagtctggggccagggcacactgggtcacagtgtctagcgtag
caccacgacgccagcggcgc gaccaccaacaccggcgccccaccatcgcgctcgagccccctgtccctgcgcccagaggcg
tgccggccagcggcggggggg cgcagtgcacacgagggggctggacttcgcctgtgatatctacatctgggcgccccttgg
ccgggacttgtggggctcttctcctgtcactggttatcaccctttactgcaaacggggcagaaagaaactcctgtatata
ttcaaacaacatttatgagaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttccagaagaagaaga
aggaggtatgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgcccccggtacaagcaggggccagaaccagctctata
acgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttggacaagagacgtggccgggaccctgagatgggggggaaag
ccgagaaggaagaacctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgg
gatgaaaggcgagcgccggagggggaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtagacgccaccaaggacacctacg
acgccccttcacatgcaggccctgccccctcgct

【0372】

CAR構成要素

核酸配列:

・ 3C10 scFvヌクレオチド配列(マウス); (配列番号4)

GAGATTTCAGCTGCAGCAATCTGGGGCAGAACTTGTGAAGCCAGGGCCTCAGTCAAGCTGTCTTGCACAGGTTCTGGCTT
CAACATTGAAGACTACTATATTCAGTGGGTGAAGCAGAGGACTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGAAGGATTGATCCTG
AGAATGATGAACTAAATATGGCCCAATATTCAGGGCAGGGCCACTATAACAGCAGACACATCCTCCAACACAGTCTAC
CTGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCCTTTTCGCGGTGGAGTCTACTGGGGGCCAGG
AACCACTCTCAGAGTCTCCTCAGGAGGTGGTGGTTCCGGTGGTGGTGGTTCCGGAGGTGGTGGTTACATATGGATGTTG
TGATGACCCAGTCTCCACTCACTCTATCGGTTGCCATTGGACAATCAGCCTCCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTC
TTAGATAGTGATGAAAAGACATATTTGAATTTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTCTCTGGT
GTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTGAGAATCAGCAGAG
TGGAGGCTGAGGATTTGGAATTTATTTATTTGCTGGCAAGGTACACATTTTCTGGGACGTTCCGGTGGAGGGACCAAGCTG
GAGATAAAA

【0373】

・ 139 scFvヌクレオチド配列(ヒト化); (配列番号5)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCCGGCCAGCCA
GGGCATCAGAAAACACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAAGCCCGCAAGGCCCCCAAGAGACTGATCTACGCTGCCAGCAATC
TGCAGAGCGGCGTGCCAGCAGATTCACCGGAAGCGGCTCCGGCACCGAGTTACCCCTGATCGTGTCCAGCCTGCAGCCC
GAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGCACCACAGCTACCCCTCTGACCAGCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAGATCAA
GCGGACCGGCAGCACCAGCGGCAGCGGCAAGCCTGGCAGCGGCGAGGGAAGCGAGGTCCAGGTGCTGGAATCTGGCGGCG
GACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTACCTTCAGCAGCTACGCCATGTCTTGG
GTCCGGCAGGCTCCTGGAAGGGCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCAGCGGCTCTGGCGGCTCCACCAACTACGCCGACAG
CGTGAAGGGCCGTTTACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG
ACACCGCGGTGTACTACTGTGCCGGCAGCAGCGGGTGGAGCGAGTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTAGC

【0374】

・ リーダー (核酸配列); (配列番号6)

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGC CGCCAGGCCG

【0375】

・ ヒンジ(核酸配列); (配列番号7)

ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGC
AGCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGT GCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTG
TGAT

【0376】

・ 膜貫通ドメイン(核酸配列); (配列番号8)

ATCTACATCTGGGCGCCCTTGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACT

10

20

30

40

50

GGTTATCACCCCTTTACTGC

【0377】

- ・ 4-1BB細胞内ドメイン(核酸配列); (配列番号9)

AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGAC CAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATG
GCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG

【0378】

- ・ CD3 ζ (核酸配列); (配列番号10)

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACAAGCAGGGCCAG AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAG
GACGAAGAGAGGAGTACGATGTTT

TGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGA AGAACCCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGA 10
ACTGCAGAAAGATAAGATGGCGG AGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGGCAAGGGGC

ACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGC

CCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

【0379】

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

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAG

AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTT

TGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGA

AGAACCCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGG

AGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGGCAAGGGGC 20

ACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGC

CCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

【0380】

アミノ酸配列:

- ・ 3C10 scFvアミノ酸配列(マウス); (配列番号11)

EIQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIEDYYIHVVKQRTEQGLEWIGRIDPEN DETKYGPIFQGRATITADTSSNTV
YLQLSSLTSEDYVYYCAFRGGVYWGPGTTL TVSSGGGGSGGGSGGGGSHMDVVMQSPPLTSLVAIGQSASISCKSSQ

SLLDSG KTYLNWLLQRPQGSPKRLISLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGI

YYCWQGTHTFPGTFGGGKLEIK

【0381】

- ・ 139 scFv アミノ酸配列(ヒト); (配列番号12)

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGIIRNLAQYQQKPGKAPKRLIYAASNLQ SGVPSRFTGSGSGTEFTLIVSSLQ
PEDFATYYCLQHHSYPLTSGGGTKVEIKRTGS

TSGSGKPGSGEGSEVQVLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGSTNYADSVKG

RFTISRDNSTNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAGSSGWSEYWGQGLVTVSS

【0382】

- ・ リーダー(アミノ酸配列) (配列番号13)

MALPVTALLPLALLHAARP

【0383】

- ・ ヒンジ(アミノ酸配列) (配列番号14)

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

【0384】

- ・ 膜貫通(アミノ酸配列) (配列番号15)

IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC

【0385】

- ・ 4-1BB細胞内ドメイン(アミノ酸配列) (配列番号16)

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

【0386】

- ・ CD3 ζ ドメイン(アミノ酸配列) (配列番号17)

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER 50

RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

【0387】

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

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER
RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

【0388】

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

【0389】

実施例4: EGFRvIIIICARについての予測CDRの指定

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

【化1】

EIQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIEDYYIHVVKQRT EQGLEWIGRIDPEN DETKYGPIFQGR

ATITADTSSNTVYLQLSSLTSED TAVYYCAFRGGVYWPGTT LTVSS; (配列番号21);

ここで、CDR1は

【化2】

DYYIH (配列番号22)

CDR2は

【化3】

RIDPENDETKYGPIFQG (配列番号23)

であり、

CDR3は

【化4】

RGGVY (配列番号24)

である。

【化5】

・ VL: **DVVM TQSPLT LSV AIGQSASISCKSSQSLLDS DGKTYL N WLLQ R PGQSPKRLISL VSKLDSGV**

PDRFTGSGSGTDFTLRISRVEAEDLG IYYC WQGT HFP GTFGGGTKLEIK; (配列番号25);

ここで、CDR1は

【化6】

KSSQSLLDS DGKTYL N (配列番号26)

CDR2は

【化7】

LVSKLDS (配列番号27)

であり、CDR3は
【化 8】

WQGTHFPGT (配列番号28)

である。
【0 3 9 0】

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

【化 9】

・ VH: EIQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIEDYYIHVVKQRT**EQGLEWIGRIDPEN DETKYGPI**
FQGRATITADTSSNTVYLQLSSLTSEDTAVYYCA**FRGGVYWPGTT** LTVSS; (配列番号29);

10

ここで、CDR1は
【化 1 0】

GFNIEDY (配列番号30)

CDR2は
【化 1 1】

DPENDE (配列番号31)

であり、

20

CDR3は
【化 1 2】

RGGVY (配列番号32)

である。
【化 1 3】

・ VL: DVVMTQSPLT**LSVAIGQSASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQ**RP**GGQSPKRLISL VSKLDSGV**
PDRFTGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCWQGTHFPGT**FGGGTKLEIK**; (配列番号33);

30

ここで、CDR1は
【化 1 4】

SQSLLSDGKTY (配列番号34)

CDR2は
【化 1 5】

LVS (配列番号35)

であり、

40

CDR3は
【化 1 6】

GTHFPG (配列番号36)

である。
【0 3 9 1】

実施例5：マウス抗EGFRvIII抗体のヒト化

臨床の現場では、マウスEGFRvIII抗体のヒト化が望ましく、ここで、マウス特異的残基は、該マウスCARコンストラクトを導入したT細胞を用いた処置を受けた患者において、ヒト抗マウス抗原 (HAMA) 応答を誘発し得る。ハイブリドーマ由来のマウスEGFRvIII抗体のVHおよびVL配列を文献から抽出した(Morgan et al. (2012) Human Gene Therapy, 23: 104

50

3-1953、上記)。マウスEGFRvIII抗体由来のCDR領域をヒト生殖系列受容体フレームワーク VH1_1-fまたはVH5_5aならびにVK2_A17またはVK4_B3 (vBASE database)に移植することにより、ヒト化を行った。CDR領域に加えて、CDR領域の構造的な統合性を支持すると考えられるいくつかのフレームワーク残基、すなわちVK2 #36、#49、VK4 #2、#36、#46、#49、VH1 #2、#24、#76、#94およびVH5 #2、#24、#73、#76、#94がマウス配列から維持されていた。さらに、図9に示すように、ヒトJエレメントJH6およびJK4を、長鎖および軽鎖にそれぞれ用いた。得られたヒト化抗体のアミノ酸配列を、軽鎖については、VK2_A17/Hz1およびVK4_B3/Hz1とし、重鎖についてはVH1_1-f/Hz1、VH5_5-a/Hz1とした。残基の番号付けは、Kabat (上記Kabat E.A. et al, 1991)にしたがう。CDRの定義については、上記KabatおよびChothia et al, 1987を用いた。マウスEGFRvIIIから維持されているフレームワーク残基は枠囲いの太字/イタリックで示し、CDR残基には下線を付している。

10

【0392】

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

【0393】

クローニング：

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

20

【0394】

VLおよびVHドメインをコードする配列を哺乳類細胞における分泌に適当な発現ベクター中にサブクローニングした。発現ベクターのエレメントには、プロモーター(サイトメガロウイルス (CMV) エンハンサー-プロモーター)、分泌を促進するシグナル配列、ポリアダニル化シグナルおよび転写終結配列 (ウシ成長ホルモン(BGH)遺伝子)、エピソームの複製および原核生物での複製を可能にするエレメント(例えばSV40起点およびColE1または当該分野で公知の他のエレメント)および選択を可能にするエレメント (アンピシリン耐性遺伝子およびゼオシンマーカー)が含まれる。

30

【0395】

実施例6: ヒト化抗EGFRvIII可溶性scFv断片の特徴付け

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

【0396】

scFv発現および精製

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

40

【0397】

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

【0398】

50

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

【0399】

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

【0400】

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

【0401】

実施例7: ヒト化EGFRvIII CARコンストラクト

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

【0402】

【表1】

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

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

【0403】

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

クトを作製した。

【0404】

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

【表2-1】

表2: ヒト化 EGFRvIII CAR コンストラクト

名称	配列 番号:	配列
CAR 1		
CAR1 scFv ドメイン	38	eiqlvqsgaevkkgpatvkisckgsgfniedyyihwvqqapkgglewmgridpendet kygpifqgrvtitadtstntvymelsslrsedtavyycafrggvwywqggtvtvssgggsg gggsgggsgggsgsdvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqqkpg qppkrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdfilitisslqaedvavyycwqgthfpgtfgggtkv eik
CAR1 scFv ドメイン nt	39	gaaatccagctggccaatcgggagctgaggtcaagaagccgggagccaccgtcaagatct catgcaaggggctgggattcaacatcgaggactactacattcactgggtgcagcaagctccg ggaaaaggcctggaatggatgggcagaatcgaccagaaaacgacgaaactaagtacgga ccgattttccaaggaagagtactatcaccccgatactcaaccaataaccgtctacatggaac tgagctcgctccggctccgaagatactgcagtgattactgtgcctttcgggaggggtgactg gggccaaggaaactactgtcactgtctcgtcaggaggcggagggtcgggaggaggcgggag cggaggcgggtggctcgggtggcggagggaagcgacgtggtgatgaccagtccccggactc cctcgccgtgagcctcgagagagggcgactatcaattgcaagtcgtcccagtcacttctgga ttccgatggtaaacgtacctcaactggctgcagcaaaagccagggcagccacccaaacggt tgatctccctgtgtccaaactggatagcggagtgcctgaccgcttctcgggttcggtagcgg gaccgactcacccgtacgatcagctcactgcaggcggaggacgtggcagtggtactactgct ggaggggaaccacttccctggcacctttggagggtggcaccaagggtggagatcaag

10

20

30

40

【表 2 - 2】

CAR1 可溶性 scFv-nt	40	atggccctccctgtcaccgccctgctgttccgctggctcttctgtctccacgccgctcgcccg aaatccagctggtccaatcgggagctgaggtcaagaagccgggagccacgtcaagatctc atgcaaggggtcgggattcaacatcgaggactactacattcactgggtgcagcaagctccgg gaaaaggcctggaatggatgggcagaatcgaccagaaaacgacgaaactaagtacggac cgattttccaaggaagagtgactatcaccgccgatacttcaaccaataccgtctacatggaact gagctcgtccggtccgaagatactgcagtgtattactgtgcctttcgggaggggtgtactgg ggccaaggaaactactgtcactgtctcgtcaggaggcggagggtcgggaggaggcgggagc ggaggcgggtggctcgggtggcggagggaagcgacgtgggtgatgaccagtcctccggactcc ctcgcctgagcctcggagagagggcgactatcaattgcaagtcgtccagtcacttctggatt ccgatggtaaaacgtacctcaactggctgcagcaaaagccagggcagccacccaaacggtt gatctcccttgtgtccaaactggatagcggagtgctgaccgcttctcgggttccggtagcggg accgacttcacctgacgatcagctcactgcaggcggaggacgtggcagtgactactgtctg gcagggaacccacttccctggcaccttggaggtggcaccaagggtggagatcaagggatcg caccaccatcaccatcatcatcac
CAR1 可溶性scFv -aa	41	<u>Malpvtalllplalllhaarpeiqlvqsgaevkkpgatvkisckgsgfniedyyihwvqqap</u> gkglewmgridpendetkygpifqgrvtitadtstntvymelsslrscdtavyycfrggvy wgqgtvtvssgggsgggsgggsgggsgggsgdvvmtqspdslavslgeratinckssqsl ldsdgktylnwlqkpgqppkrlislvskldsgvpdrfsrgsgsgtdfiltisslqaedvavyy cwqgthfpgtfgggtkveikgshhhhhhhh

10

20

30

【表 2 - 3】

CAR 1- 全長-nt レンチ ウイルス	42	atggccctccctgtcaccgccctgtgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgaga tccagctgggtgcagtcgggagctgaagtcaaaaagcctggcgcaaccgtcaagatctcgtgcaaa ggatcagggttcaacatcgaggactactacatccattgggtgcaacaggcaccggaaaaggcct ggagtggatggggaggattgaccagaaaatgacgaaaccaagtacggaccgatcttccaagga cgggtgaccatcacggctgacacttccactaacaccgtctacatggaactctcgagccttcgctcgg aagataccgcgggtgtactactgcgccttagagggtggagtctactggggacaagggactaccgtca ccgtgtcgtcaggtggcggaggatcaggcggaggcggctccggtggaggaggaagcggagga gggtggctccgacgtgggtgatgacgcagtcaccggactccttggcgggtgagcctgggtgaacgcgc cactatcaactgcaagagctcccagagcttctggactccgatgaaagacttatctcaattggctg caacagaagcctggccagccgccaaagagactcatctactgggtgagcaagctggatagcggag tgccagatcggtttccggatcgggctcaggcaccgacttaccctgactatttctccctccaagcc gaggatgtggcgtctactactgttggcaggggactcacttcccggggaccttcggtggaggcact aagggtggagatcaaaaccactaccccagcaccgaggccacccaccccggtcctaccatcgctt cccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctgggtggggccgtgcatacccg ggcttctgacttcgctgcgatatctacattgggccctctggctgggtacttgcggggctcgtgctt cactcgtgatcacttctactgtaagcgcggctcggagaagctgctgtacatcttaagcaaccctca tgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttccagaggaggagga aggcggctgcgaactgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgtccagcctacaagcagggg cagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcg gagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagagggcctgt acaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacg cagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacaccta tgacgctctcacatgcaggccctgccgcctcgg

10

20

30

40

【表 2 - 4】

CAR 1-全長-aa	43	malpvtalllplalllhaarpciqlvqsgaevkkpgatvkisckgsgfniedyyihwvqqap gkglewmgridpendetkygpifqgrvtitadtstntvymelsslrse dtavyycafrgg vywgqgttvtvssggggsgggsgggsgggsgggsgdvvm tqspdslavslgeratinckss qslldsdgktylnwlqqkpgqppkrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdfiltisslqaedva vyycwqgthfpgtfgggtkveikttpparpptpaptiasqpls rpeacrpaaggavhtgr ldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkklyifkqpfmrpvqttqeedgcscr fpe eeeggccelrvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgrrceydvldkrrgrdpemggkprrk npqeglynclqkdkmaeayseigmkgemrrgkghdglyqglstatkdydalhm qalpp r
CAR 2		
CAR2 scFv ドメイン	44	dvvm tqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqqkpgqppkrlislvskldsg vpdrfsgsgsgtdfiltisslqaedvavyycwqgthfpgtfgggtkveikggggsgggsg ggsgggggsciq lvqsgaevkkpgatvkisckgsgfniedyyihwvqqapgkglewm gridpendetkygpifqgrvtitadtstntvymelsslrse dtavyycafrggvywgqgttvt vss

10

20

30

【表 2 - 5】

CAR2 scFv ドメイン- nt	45	gatgtcgtgatgaccagtcgccagactccctcgagtgctcctgggagaacggggccaccatc aactgcaaatcgagccagtcactgctggactcagacggaaagacctacctcaactggctgca gcagaagcctggccagccaccgaagcgcctgatctccctgggtgccaaagctggactcgggc gtcccgacaggttagcggttagcggctcgggaaccgacttcactctgaccattagctcgtc caagctgaagatgtggcggtctactactgctggcaggggaccacttccccgggaccttggc ggaggaactaaagtcgaaatcaaaggaggaggcgatcaggtggaggaggcagcggagg aggaggaggcggcggtggcggtccgaaattcaacttgtcaatccggtgccgaggtgaag aaacctgggtgccactgtcaagatctcgtgaaggatcgggattcaatcaggactactaca tccactgggtgcaacaggcgccaggaaaggattggagtggatgggtcgatcgaccggga aaacgatgagactaagtacggaccgatcttcaaggccgggtcacgatcactcggatacct ccactaataccgtgtatatggagctctcgtcactgagaagcgaagatcggccgtgtactactg cgcatcagaggagggtgtgtactggggccagggaactactgtgaccgtgtcgtcg

10

20

【表 2 - 6】

CAR2 - 可溶性 scFv - nt	46	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcgcccg atgtcgtgatgacctcagctcccagactccctcgcagtgtccttgggagaacgggcccaccatca actgcaaatcgagccagtcactgctggactcagacggaaagacctacctcaactggctgcag cagaagcctggccagccaccgaagcgctgatctccctgggtccaagctggactcgggcgt cccgacaggtttagcggtagcggctcgggaaccgacttactctgaccattagctcgtcca agctgaagatgtggcggtctactactgctggcaggggacccacttccccgggacctttggcg gaggaaactaaagtcgaaatcaaaggaggaggcggtcaggtggaggaggcagcggaggga ggaggggagcggcggtggcggtccgaaattcaacttgcaatccggtgccgaggtgaaga aacctgggtgccactgtcaagatctcgtgtaagggtcgggattcaatatcaggactactacat ccactgggtgcaacaggcgccaggaaagggttggagtggtgggtcgcatcgaccggga aaacgatgagactaagtacggaccgatcttccaaggccgggtcacgatcactcgggatacct ccactaataccgtgtatatggagctctcgtcactgagaagcgaagatacggccgtgtactactg cgattcagaggaggtgtgtactggggccagggaactactgtgaccgtgtcgtcggggtcac atcaccaccatcatcatcaccac
CAR2- 可溶性 scFv - aa	47	<u>malpvtalllplalllhaar</u>pdvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqq kpgqppkrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdfiltisslqacdvaavyycwqgthfpgtfggg tkveikggggsgggsgggsgggsgggsciqlvqsgaevkkpgatvkisckgsgfniedyyi hwwqqapgkglewmgridpendetkygpifqgrvtitadtstntvymelsslrsedtavy <u>ycafrggvywgqgtvtvssgshhhhhhhh</u>

10

20

30

【表 2 - 7】

CAR 2-全長- nt	48	atggccctccctgtcaccgccctgctgttccgctggctcttctgtctccacgccgctcgcccg acgtggatcatgactcaaagcccagattccttggctgtctcccttggagaaagagcaacgatcaa ttgcaaaagctcgcagtccttggactccgatggaaaaacctacctaacttggctgcagca gaagccgggacaaccaccaaagcggctgatttccctcgtgtccaagctggacagcggcgtg ccggatcgttctcgggcagcggctcgggaaccgattttactctactatttctcacttgaagc ggaggacgtggcgggtgtattactgtggcagggcactcacttccgggtacttttggaggagg taccaaagtcgaatcaagggtggaggcgggagcggagggcgggtcgggaggagga ggatcgggtggcggaggctcagaatccagctgggtcagtcagggtccgaagtgaagaag cctggggccacgggtgaagatctcgtgcaaggggagcggattcaacatcgaggattactacat ccattgggtgcaacaggccctggcaaagggtggaatggatgggaaggatcgaccccg gaatgacgagactaagtacggcccgatcttccaaggacgggtgaccatcactgcagacactt caaccaacaccgtctacatggaactctcctcgtcgtcctcaggacaccgccgtgtactact gtgtttcagaggaggagtctactggggacagggaacgaccgtgaccgtcagctcaaccact accccgacccgaggccacccaccccggtcctaccatcgctccagcctctgtccctcgcg tccggaggcatgtagaccgcagctgggtggggccgtgcataccgggggtcttgacttgcct gcgatatctacatttgggccctctggctgggtacttgcgggtcctgctgttctactcgtgatca ctcttactgtaagcgcgggtcggagaagctgctgtacatctttaagcaaccttcatgaggcct gtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttccagaggaggaggaaggcg gctgcgaactgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgtccagcctacaagcaggggca gaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgtggacaagc ggagaggacgggaccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatcccaagagggg cctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaag gggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccaggggactcagcaccgccacc aaggacacctatgacgtcttccatgacaggccctgccgcctcgg

10

20

30

40

【表 2 - 8】

CAR 2-全長- aa	49	malpvtalllplalllhaarpdvvm tqspdslavslgeratinck <u>kssqslldsdgktylnwlq</u> qkpgqppkrlis <u>lvskldsgvpdrfsgsgsgtdfiltisslqaedvavyycwqgthfpgtfg</u> ggtkvcikgggsgggsgggsgggsgggsciqlvqsgaevkkpgatvkisckgsgfnied <u>yyihwvqqapgkglewmgridpendetkygpifqgrvtitadtstntvymelsslrse</u> tavyyca <u>frggvywgqgtvtvssttpaprpptpaptiasqplsrpeacrpaaggavhtg</u> ldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfe ceeggcclrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrrceydvldkrrgrdpemggkprrk npqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrgkghdglyqglstatkdydalhm qalpp r
CAR 3		
CAR3 scFv ドメイン	50	eiqlvqsgaevkkpgeslriskgsgfniedyyihwvrqmpgkglewmgridpendetk ygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycafrggvywgqgtvtvs sgggsgg ggsgggsgggsgsdvmtqspslpvtlgqpasisckssqslldsdgktylnwlqqrpg qsprrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdflkisrveacdvgvyycwqgthfpgtfgggtkv eik

10

20

30

【表 2 - 9】

CAR3 scFv ドメイン nt	51	gagattcagctgggtccaaagcggcgagaagtgaaaaagccaggggaatcgttgcgcacatca gctgtaaagggttccggcttcaacatcgaggactattacatccattgggtgcggcagatgccag gaaaggggctggaatggatgggacggattgacccggagaacgacgaaaccaagtacggac cgatcttcaaggacacgtgactatctccggacaccagcatcaatacgggtgtacctccaatg gtcctcactcaaggcctcggataccgcgatgtactactgcgcgttcagaggaggcgtctactg gggacaagggactactgtgactgtctcatcaggagggtggaggaagcggaggagggtggctcg ggcggagggtggatcgggaggaggagggtccgatgtggtgatgaccagtcctccactgtcgc tcccgggtgacccctggacagcctgctagcatctcgtgcaaaccctcgcaatccctgctggactc ggacggaaaaacgtacctcaattggctgcagcagcgcctggccagagcccgagaaggctt atctcgtggtgtcaaagctggatagcgggtgtcccgaccgggttcagcggctcagggtcagg aaccgatttcaccttgaagatctccgcgtggaagccgaagatgtcggagtctactactgtctgg cagggtactcacttcccggggaccttgggtggcggcactaagggtcgagattaag

10

20

【表 2 - 1 0】

CAR 3- 可溶性 scFv - nt	52	atggccctccctgtcaccgccctgctgttccgctggctcttctgtccacgccgctcgcccg agattcagctggtccaaagcggcgagaaagtgtgaaagccaggggaatcgttgcgcacag ctgtaaagggtccggcttcaacatcgaggactattacatccattgggtgcggcagatgccagga aaggggctggaatggatgggacggattgaccgggagaacgacgaaaccaagtacggaccg atcttcaaggacacgtgactatctccgccgacaccagcatcaatacgggtgtacctccaatggt cctcactcaaggcctcggataccgcgatgtactactgcgcgttcagaggaggcgttactggg gacaagggactactgtgactgtctcatcaggaggtggaggaagcggaggaggtggtcggg cggaggtggatcgggaggaggagggtccgatgtggtgatgaccagtccccactgtcgtc ccggtgaccctcggacagcctgtagcatctcgtgcaatcctcgcaatccctgctggactcg gacggaaaaacgtacctcaattggctgcagcagcggcctggccagagcccagagaaggetta tctcgtggtgtcaaagctggatagcgggtgtgcccagaccggttcagcgggtcagggtcagga accgattcaccttgaagatctccgcgtggaagccgaagatgtcggagtctactactgtggc agggtactcacttccggggacccttgggtggcggcactaagggtcgagattaagggtcacacc atcatcaccatcaccaccac
CAR 3- 可溶性 scFv - aa	53	<u>malpvtalllplalllhaar</u>peiqlvqsgaevkkgeslrisccksgsfniedyihwvrqmp gkglewmgripndetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycfrgg vywgqgtvtvssgggsgggsgggsgggsgggsgdvmtqspslpvtlgqpasisckss qslldsdgktylnwlqrrpgqsprrlislvskldsgvpdrfsghsgsgtdftlkisrveadvgv yycwqgthfpgtfgggtkveikgshhhhhhhh

10

20

30

【表 2 - 1 1】

CAR 3-全長- nt	54	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg aaatccagctgggtgcaaagcggagccgaggtgaagaagcccggagaatccctgcgcactc gtgtaagggttccggctttaacatcgaggattactacatccactgggtgagacagatgccggg caaaggcttggaatggatgggcccgcacgcacccggagaacgacgaaaccaatacggacc aatcttccaaggacatgtgactatttccgcggatacctccatcaaacactgtctacttcagtgga gctcgtcaaggcgtcggataccgccatgtactactgcgcattcagaggaggtgtgtactggg gccaggggactacgggtcacctgtcctcgggaggtggagggtcaggaggcggaggctcgg gggtggaggatcaggcggaggaggaaagcgaatgtggtcatgactcaatccccactgtcact gcctgtcactctggggcaaccggcttccatctcatgaagtcaagccaatcgtctcactcc gacggaaaaacctacatcaattggcttcagcagcgcacccaggccagtcgcctcggaggctgat ctcactcgtgtcgaagcttgactcgggggtgccggatcgggttagcgggaagcggatcgggga ccgacttcacgttgaagattagccgggtggaagccgaggacgtgggagtcattactgtggc aggggacccacttccggggacttccggaggaggcaccaaagtcgagattaagaccactac cccagcaccgaggccaccaccccggtcctaccatgcctcccagcctctgtccctgcgtc cggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcataccggggcttgaacttcgctgc gatatctacatttggccctctggctggacttcgggggtcctgctgcttactcgtgatcact cttactgtaaagcgggtcggaagaagctgctgtacatcttaagcaaccctcatgaggcctgt gcagactactcaagaggaggacggctgttcacgctccagaggaggaggaaagcgg ctgcgaactgcgcgtgaaatcagccgcagcgcagatgtccagccacaagcaggggag aaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcg gagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcagaaagaatcccaagagggc ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg ggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca aggacacctatgacgtcttcacatgcaggccctgccgcctcgg

10

20

30

40

【表 2 - 1 2】

CAR 3-全長- aa	55	malpvtalllplalllhaarpciqlvqsgaevkkpgeslrisccksgsfni <u>edyyih</u> wvrqmp gkglewm <u>g</u> <u>ridpendetkygpifqgh</u> vtisadtsintvylqwsslkasdtamyycafr <u>g</u> <u>gvyw</u> gqgttvvssgggsgggsgggsgggsgggsgdvvm ¹⁰ tsplslpvtlgqpasis <u>cks</u> <u>sqslldsdgktyln</u> wlqqrpgqsprrlis <u>lvskldsg</u> vpdfsgsgsgtdfilkisrveadv gvyy <u>cwqgthfpgt</u> fgggtkveiktttpprpptpaptiasqplsrpeacrpaaggavhtr gldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqtqeedgcscrfp eeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynclnlgrrceydvlkrrgrdpemggkpr knpqeglynclqkdmacayscigmkgerrgkghdglyqglstatkdydalhmqalp pr
CAR 4		
CAR4 scFv ドメイン	56	dvvm ²⁰ tsplslpvtlgqpasisckssqslldsdgktylnwlqqrpgqsprrlislvskldsgv pdfsgsgsgtdfilkisrveadvgvyy <u>cwqgthfpgt</u> fgggtkveikgggsgggsg ggsggggsciqlvqsgaevkkpgeslrisccksgsfni <u>edyyih</u> wvrqmpgkglewm g ridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycafrggvywqgttv tvss

10

20

30

【表 2 - 1 3】

CAR4 scFv ドメイン nt	57	gacgtcgtcatgaccagagcccgcgtcactgcctgtgacctgggccagccggcgtccat tagctgcaaatcctcgcaatccctgctcgactcagacggaaaaacgtacttgaactggctccaa cagcgccctgggcaatccccaaggcggcttatctcactcgtcagcaagctcgatagcgggtgc ccagacagattttcgggctcgggatcgggcactgattcactctgaagatcgcgggtggaa gccgaggatgtgggagtgtactattgtctggcagggcactcacttccccgggacgtttggcgg aggaactaaggctcgagatcaaaggaggagggtggatcaggcggagggtgggagcggaggag gaggaagcggtggtggagggttcgaaatccagctggtgcaatcaggagccgaggtgaaga agccgggagaatccctgcgcactcgtgcaagggtcgggcttcaacatcgaggattactac atccactgggtgcggcagatgccgggaaaggggttggaatggatgggacgcattgacccgg aaaatgatgaaaccaaatacgggccaatctccaaggccacgtgaccattagcgtgacactt ccatcaacaccgtgtaccttcagtggctcctcactgaaggcgtcggacactgccatgtactactg tgcattcagaggaggggtctactggggacagggcaccaccgtgaccgtgagctcc

10

20

【表 2 - 1 4】

CAR4- 可溶性 scFv - nt	58	atggccctccctgtcaccgccctgctgttccgctggctcttctgtctccacgccgctcgcccg acgtgctcatgaccagagcccgctgtcactgcctgtgacctgggcccagccggcgtccatta gctgcaaatcctcgcaatccctgctcgactcagacggaaaaacgtacttgaactggctccaac agcgccctgggcaatccccaaggcggttatctcactcgtcagcaagctcgatagcggtgtcc cagacagatttccgggctcgggatcgggcactgatttcactctgaagatctcgccgggtggaag ccgaggatgtgggagtgtactattgtctggcagggcactcacttccccgggacgtttggcgga ggaactaaggctgagatcaaaggaggagggtggatcaggcggagggtgggagcggaggagg aggaagcgggtggtggagggtccgaaatccagctgggtgcaatcaggagccgaggtgaagaa gccggggagaatccctgcgcatctcgtgcaagggtcgggcttcaacatcaggattactacat ccactgggtgcggcagatgccgggaaagggttggaatggatgggacgcattgacccgga aatgatgaaacaaatagggccaatctccaaggccacgtgaccattagcgctgacacttc catcaacaccgtgtaccttcagtggctcctcactgaaggcgtcggacactgcatgtactactgt gcattcagaggaggggtctactggggacagggcaccaccgtgaccgtgagctccggctcgc atcaccatcatcaccaccatcac
CAR4- 可溶性 scFv -aa	59	<u>malpvtalllplalllhaar</u>pdvmtqsplslpvtlgqpasisckssqslldsdgktylnwlqq rpgqsprrlislvskldsgvpdrfsgsgtdfllkisrveadvgyycwqgthfpgtfggg tkveikggggsgggsgggsgggsgggsciqlvqsgaevkkpgeslrisckgsgfniedyyi hwvrqmpgkglewmgridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtam yycafrggywgqgttvssgshhhhhhhh

10

20

30

【表 2 - 1 5】

CAR 4-全長- nt	60	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcgcccg acgtcgtcatgacccaatccccctctccccgccggtcaccctgggtcagccggcgctgatctc atgcaaaagctcacagtcctgctggattcggacggaaaaacctacttgaactggctccaaca gaggccgggtcagtcacctcgcagactgatctcgtggtagcaagctcgactcgggtgtgc cggatcgggttctccgggtcaggatcgggcaccgactttacgctcaagatttcgagagtggagg ccgaggatgtgggagtgtactattgctggcagggcacgcatttccccgggacctttggaggc gggactaagggtggaaatcaaggagggtggcggatcaggcggaggaggcagcggcggag gtggatcaggaggcggagggtcagagatccagctgggtccaaagcggagcagagggtgaaga agccaggcggagtcccttcgcatttcgtgcaaaggagcggctcaacattgaagattactacat ccactgggtgcggcaaatccaggaaagggtctggaatggatgggacggatcgaccaga aaatgatgaaactaagtacggaccgatcttccaaggacacgtcactatctccgcggacattc gatcaacaccgtgtacctccagtggagcagcttgaaagcctccgacaccgctatgtactactgt gccttccgcggaggagtctactggggacaggggactactgtgaccgtgtcgtccaccactac cccagcaccgaggccaccaccccggtcctaccatcgctcccagcctctgtccctgcgtc cggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcataccggggcttgacttcgctgc gatatctacatttggccctctggctggacttcggggctcctgctgcttactcgtgatcact cttactgtaagcgggtcggagaagctgctgtacatcttaagcaaccttcatgaggcctgt gcagactactcaagaggaggacggctgttcattgcccgttccagaggaggaggaaaggcgg ctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcagggggcag aaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcg gagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaagagggc ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg ggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca aggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgctcgg

10

20

30

40

【表 2 - 1 6】

CAR 4-全長- aa	61	malpvtalllplalllhaarpdvmtqspslpvtlgqpasisc <u>kssqslldsdgktylnwlq</u> qrrgqsprrlis <u>lvskldsgvpdrfs</u> gsgsgtdflkisirveacdvgvyycw <u>qgthfpgtfg</u> ggtkvcikgggsgggsgggsgggsgggsciqlvqsgaevkkpgeslriscgsgfniedy <u>yihwvrqmpgkglewmgridpendetkygpifqgh</u> vtisadtsintvylqwsslkasd tamyycafr <u>ggvyw</u> gqgttvtssttpaprrpptaptiasqplsirpeacrpaaggavhtr gldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfp eeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynclnlgrreedydldkrrrdpemggkpr knpqeglynclqkdmacayscigmkgerrgkghdglyqglstatkdydalhmqalp pr
CAR 5		
CAR5 scFv ドメイン	62	eiqlvqsgaevkkpgatvkiscgsgfniedyyihwvqqapgkglewmgridpendet kygpifqgrvtitadtsintvymelsslrse dtavyycafrggvywqgttvtssgggsg ggsgggsgggsgsdvmtqspslpvtlgqpasisc <u>kssqslldsdgktylnwlq</u> qrrg qsprrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdflkisirveacdvgvyycw <u>qgthfpgtfg</u> ggtkv eik

10

20

30

【表 2 - 1 7】

CAR5 scFv ドメイン nt	63	gaaatccagctcgtgcagagcggagccgaggtcaagaaaccgggtgctaccgtgaagattt catgcaagggatcgggcttcaacatcgaggattactacatccactgggtgcagcaggcacca ggaaaaggacttgaatggatgggccggatcgacccggaaaatgacgagactaagtacggcc ctatcttccaaggacgggtgacgatcacgcagacactagcaccaacaccgtctatatggaac tctcgtccctgagggtccgaagatactgccgtgtactactgtgcgtttcgcggagggtgtactgg ggacagggtaccaccgtcacctgtcatcgggcgggtggaggctccgggtggaggagggtca ggaggcgggtggaagcggaggaggcggcagcgacgtggtcatgactcaatcgccgtgtcg ctgcccgtcactctgggacaacccgcgtccatcagctgcaaactctgcagtcactgttact ccgatggaaagacctacctcaactggctgcagcaacgccaggccaatcccaagacgcct gatctcgttggtgtcaaagctggactcaggggtgccggaccgggttctccggagcgggtcgg gcacggatttcactctcaagatctccagagtgggaagccgaggatgtgggagtctactactgt ggcagggaacccatttccctggaacttttggcggaggaactaaggtcgagattaaa

10

20

【表 2 - 1 8】

CAR5 - 可溶性 scFv - nt	64	atggccctccctgtcaccgccctgctgttccgctggctcttctgtctccacgccgctcgcccg aaatccagctcgtgcagagcggagccgaggtcaagaaaccgggtgctaccgtgaagatttca tgcaagggatcgggcttcaacatcgaggattactacatccactgggtgcagcaggcaccagg aaaaggacttgaatggatggggccggatcgacccggaaaatgacgagactaagtacggccct atcttccaaggacgggtgacgatcaccgcagacactagcaccaacaccgtctatatggaactc tcgtccctgaggtccgaagatactgccgtgtactactgtgcgttccgagggtgtgtactggg gacagggtaccaccgtcaccgtgtcatcgggcgggtggaggctccgggtggaggagggtcag gaggcgggtggaagcggaggaggcggcagcgacgtggtcatgactcaatgccgctgtcgc tgcccgctactctgggacaaccgcgtccatcagctgcaaatcctcgagtcactgcttgactc cgatggaaagacctacctaactggctgcagcaacgccaggccaatccccaagacgcctg atctcgttggtgtcaaagctggactcaggggtgccggaccgggttctccgggagcgggtcggg cacggatttcactctcaagatctccagagtgaagccgaggatgtgggagtctactactgtg gcagggaacccatttccctggaacttttggcggagggaactaaggctcgagattaaaggagcc accatcatcatcaccaccaccac
CAR5 - 可溶性 scFv -aa	65	<u>malpvtalllplalllhaar</u>ceiqlvqsgaevkkpgatvkiscksgfniedyyihwvqqap gkglewmgridpendetkygpifqgrvtitadtstntvymelsslrscdtavyycfrggvy wgqgtvtvssgggsgggsgggsgggsgdvvmtqspislptlgqpasisckssqsl ldsdgktylnwlqrrpgqsprrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdflkisirveacdvgvyy cwqgthfpgtfgggtkveikgshhhhhhhh

10

20

30

【表 2 - 1 9】

CAR 5-全長- nt	66	atggccctccctgtcaccgccctgctgttccgctggctcttctgtccacgccgctcgcccg aaatccagctcgtgcagagcggagccgaggtcaagaaaccgggtgtaccgtgaagattca tgcaagggatcgggcttcaacatcgaggattactacatccactgggtgcagcaggcaccagg aaaaggacttgaatggatgggcccggatcgacccggaaaatgacgagactaagtacggccct atcttccaaggacgggtgacgatcaccgcagacactagcaccaacacccgtctatatggaactc tcgtccctgaggtccgaagatactgccgtgtactactgtgcgttccgagggtgtgtactggg gacagggtaccacgctaccgtgtcatcgggcgggtggaggctccggtggaggagggtcag gaggcgggtggaagcggaggaggcggcagcgacgtggtcatgactcaatcggcgtgtcgc tgcccgctactctgggacaaccgcgtccatcagctgcaaatcctcgagtcactgttgactc cgatggaaagacctacctcaactggctgcagcaacgccaggccaatccccaagacgcctg atctcgttgggtcaaaagctggactcaggggtgcccggaccgggttctccggagcgggtcggg cacggatttactctcaagatctccagagtgaagccgaggatgtgggagtctactactgtg gcagggaaccatttccctggaacttttggcggagggaactaagggtcgagattaaaaccactac cccagcaccgaggccaccacccggctcctaccatcgccctccagcctctgtccctgcgtc cggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcataccggggcttgaacttcgctgc gatatctacatttgggcccctctggctgggtacttgcggggtcctgtctgttactactgtgatcact ctttactgtaagcgggtcgggaagaagctgctgtacatcttgaagcaacccttcatgaggcctgt gcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttccagaggaggaggaagggcg ctgcgaactgcgctgaaatcagccgcagcgagatgtccagcctacaagcagggggcag aaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgtggacaagcg gagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcagaaagaatcccaagaggggc ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg ggaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca aggacacctatgacgtcttccatgcaggccctgcccctcgg

10

20

30

40

【表 2 - 2 0】

CAR 5-全長- aa	67	malpvtalllplalllhaarpciqlvqsgaevkkpgatvkisckgsgfniedyyihwvqqap gkglewmg gridpendetkygpifqgr vtitadtstntvymelsslrsedtavyycfr ggg vyw gqgttvsvssgggsgggsgggsgggsgggsgdvvmqspslpvtlgqpasisck ss qslldsdgktylnw lqrrpgqsprrlis lvskldsg vpdrfsgsgsgtdftlkisrveacdvg vyy cwqgthfpgt fgggtkveikttpparpptpaptiasqplsrpeacrpaaggavhtrg ldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkklyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfe eeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrk npqeglynclqkdkmacayseigmkgemrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalpp r
CAR 6		
CAR6 scFv ドメイン	68	eiqlvqsgaevkkpgeslriskgsgfniedyyihwvrqmpgkglewmg gridpendetk ygpifqghv tisadtsintvylqwsslkasdtamyycafrggywqgttvsvssgggsg gggsgggsgggsgdvvmqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqqkg qppkrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdftlisslqacdva vyycwqgthfpgt fgggtkv eik

10

20

30

【表 2 - 2 1】

CAR6 scFv ドメイン nt	69	gaaatccagctggtgcagtcaggcgccgaggtcaagaagccgggagagtcgctgagaatct cgtgcaagggctcgggggttcaacatcgaggactactacattcactgggtcaggcagatgccg ggaaagggactggaatggatgggcccgatcgaccagaaaatgacgaaaccaatacggg ccgattttcaaggccaagtgactatcagcgcagacacgagcatcaacactgtctacctccagt ggtcctcgcttaaggccagcgataccgctatgtactactcgccattcagaggcggggtgtact ggggacaagggaaccactgtgaccgtgagcagcggaggtggcggctcgggaggaggtggg agcggaggaggaggttcggcgggtggaggatcagatgtcgtgatgaccagtcgccggact ccctcgctgtctcactgggcgagcgcgcgacatcaactgcaaatcgagccagtcgctgttg gactccgatggaaagacttatctgaattggctgcaacagaaaccaggacaacctccaagcg gctcatctcgcttgttcaaaactcattcgggagtgccagaccgcttcgggggtccgggag cggaactgactttactttgaccatttcctcactgcaagcggaggatgtggccgtgtattactgttg gcagggcacgcattccctggaaccttcgggtggcgggaactaagggtggaaatcaag

10

20

【表 2 - 2 2】

CAR6- 可溶性 scFv - nt	70	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcgcccg aaatccagctggtgcagtcaggcgccgaggtcaagaagccgggagagtcgtgagaatctc gtgcaagggctcggggttcaacatcgaggactactacattcactgggtcaggcagatgccgg gaaagggactggaatggatgggcccggatcgaccagaaaatgacgaaaccaatacgggc cgattttcaaggccacgtgactatcagcgcagacacgagcatcaacactgtctacctcagtg gtcctcgcttaaggccagcgataccgctatgtactactgcgcattcagaggcggtgtactg gggacaaggaaccactgtgaccgtgagcagcggaggtggcggtcgggaggaggtggga gcccaggaggaggttccggcggtggaggatcagatgtcgtgatgaccagtcgccggactc cctcgctgtctcactgggcgagcgcgcgaccatcaactgcaaatcgagccagtcgctgttg actccgatggaaagacttatctgaattggtgcaacagaaaccaggacaacctccaagcgg ctcatctcgctgtgtcaaaactcgattcgggagtgccagaccgcttctcgggggtccgggagc gggaactgactttactttgaccatttcctcactgcaagcggaggatgtggccgtgtattactgttg cagggcacgcatttccctggaaccttcgggtggcggaactaagggtggaaatcaagggatcaca ccaccatcatcaccatcaccacat
CAR6 - 可溶性 scFv-aa	71	<u>malpvtalllplalllhaar</u>peiqlvqsgaevkkgeslrisccksgsfniedyihwvrqmp gkglewmgripndetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycfrgg vywgqgtvtvssgggsgggsgggsgggsgggsgdvvm tqspdslavslgeratinckss qslldsdgktylnwlqqkpgppkrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdfiltisslqaedvav yycwqgthfpgtfgggtkveikgshhhhhhhh

10

20

30

【表 2 - 2 3】

CAR6-全長- nt	72	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcgcccg agattcagctcgtgcaatcgggagcgggaagtcaagaagccaggagagtccttgcggatctca tgcaagggtagcggccttaacatcagggaattactacatccactgggtgaggcagatgccggg gaagggaactcgaatggatgggacggatcgaccagaaaacgacgaaactaagtacgggtcc gatcttccaaggccatgtgactattagcggcgatacttcaatcaataccgtgtatctgcaatggtc ctcatlgaaagcctcagataccgcgatgtactactgtgctttcagaggaggggtctactgggga cagggaactaccgtgactgtctcgtccggcgaggcgggtcaggaggtaggggcagcggga ggaggaggggtccggcgagggtgggtccgacgtcgtgatgaccagagccctgacagcctg gcagtgagcctgggcgaaagagctaccattaaactgcaaactgtcgagagcctgtctggactc ggacggaaaaacgtacctcaattggctgcagcaaaagcctggccagccaccgaagcgctt atctacttggtgtcgaagctggattcgggagtgcccgatcgcttctccggctcgggatcgggt actgacttcacctcactatctcctcgcttcaagcagaggacgtggccgtctactactgttgca gggaaccactttccgggaaccttcggcgaggagcgaagtgagatcaagaccactacc ccagcaccgaggccacccaccccggtcctaccatcgctccagcctctgtccctgcgtcc ggaggcatgtagaccgcagctgggtggggcgtgcataccgggggtcttgacttcgctgcg atatctacatttggccctctggctgggtacttgcggggctcctgtctgttactcgtgatcactct ttactgtaagcgggtcggagaagctgctgtacatctttaagcaaccttcatgaggcctgtg cagactactcaagaggaggacggctgttcatgccgggtccagaggaggaggaaggcggct gcgaactgcgctgaaatcagccgcagcgcagatgtccagcctacaagcaggggcaga accagctctacaacgaactcaatcttgggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcgg agaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaagaggcct gtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggg gaacgcagaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggaactcagcaccgccacca ggacacctatgacgtcttcacatgcaggccctgccgcctcgg

10

20

30

40

【表 2 - 2 4】

CAR6-全長-aa	73	malpvtalllplalllhaarpciqlvqsgaevkkpgeslriscksgsfni <u>edyyih</u> wvrqmp gkglewmg <u>ridpendetkygpifqgh</u> vtisadtsintvylqwsslkasdtamyycafrg <u>gvywgqgttv</u> tvssggsgsgsgsgsgsgsgsgsdvmtqspdslavslgeratin <u>cks</u> <u>sqslldsdgktyln</u> wlqqkpgqppkrlis <u>lvskldsg</u> vpdrfsgsgsgtdfiltisslqaedv avyy <u>cwqgthfpgt</u> fgggtkveikttppaprpptpaptiasqplsrlpeacrpaaggavhtr gldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkklllyifkqpfmrpvqtqeedgcscrfp eeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynclnlgrreedydldkrrgrdpemggkpr knpqeglynclqkdmacayscigmkgerrgkghdglyqglstatkdydalhmqalp pr
CAR 7		
CAR7 scFv ドメイン	74	dvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqqkpgqppkrlislvskldsg vpdrfsgsgsgtdfiltisslqaedvavyy <u>cwqgthfpgt</u> fgggtkveikggsgsgsgsg ggsgsgsgsciqlvqsgaevkkpgeslriscksgsfni <u>edyyih</u> wvrqmpgkglewmg ridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycafrggvywgqgttv tvss

10

20

30

【表 2 - 2 5】

CAR7 scFv ドメ イン nt	75	gacgtggtgatgacccaatgccagattccctggcagtgctccctgggcgaacgcgccactattaactgca aatcgtcacagtccttgcttgattccgacggaaagacctacctcaattggctccagcagaagccaggaca accgccaaagagactgatcctcctgggtgcaaaagctggactcgggagtgctgatcgggttcgggtag cgggagcggcaccgacttcactctgaccatctcgtcactccaggctgaggacgtggccgtgtattactgt tggcagggtactcactttccgggcactttcggaggcggcaccaagggtggagattaaaggaggaggcgg aagcggagggtggaggatcgggagggtggaggcggcggaggaggaggagcgagatccagctcgtcc aatcgggagcgggaagtgaagaagcccggagagtcacttagaatctcatgcaaggggtcgggcttcaac atcgaggattactacatccattgggtccgccagatgcctggtaaaggactggaaatggatggggaggattg acccggaaaacgacgaaactaagtacggaccgatcttcaagggcacgtgactatctccgtgatactc aatcaatactgtctacctccagtggctcctcgtgaaagcaagcgacaccgcgatgtactactgcgccttcc ggggaggagtgtactggggccaaggcaccacgggtcacgggtcagctcc
CAR7- 可溶性 scFv - nt	76	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgacgtggt gatgacccaatgccagattccctggcagtgctccctgggcgaacgcgccactattaactgcaaatcgtca cagtccttgcttgattccgacggaaagacctacctcaattggctccagcagaagccaggacaaccgcca aagagactgatcctcctgggtgcaaaagctggactcgggagtgctgatcgggttcgggtagcgggagc ggcaccgacttcactctgaccatctcgtcactccaggctgaggacgtggccgtgtattactgttggcagg gtactcactttccgggcactttcggaggcggcaccaagggtggagattaaaggaggaggcgggaagcgg agggtggaggatcgggagggtggaggcggcggaggaggaggagcgagatccagctcgtccaatcgg gagcgggaagtgaagaagcccggagagtcacttagaatctcatgcaaggggtcgggcttcaacatcgag gattactacatccattgggtccgccagatgcctggtaaaggactggaaatggatggggaggattgacccg gaaaacgacgaaactaagtacggaccgatcttcaagggcacgtgactatctccgtgatactcaatca atactgtctacctccagtggctcctcgtgaaagcaagcgacaccgcgatgtactactgcgccttccgggg aggagtgtactggggccaaggcaccacgggtcacgggtcagctccgggtcccatcaccaccaccatcacc atcatcac

10

20

30

40

【表 2 - 2 6】

CAR7- 可溶性 scFv - aa	77	<u>malpvtallplallhaarpdvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqqkpgqp</u> pkrlislvskldsgvpdrfsqsgsgtdflttisslqaedvavyycwqgthfpgtfgggtkveikggggs ggggsggggsggggsqqlvqsgaevkkpgeslrisckgsgfniedyyihwvrqmpgkglewmg ridpendctkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamycafrggvywgqgtvtvssgsh <u>hhhhhhh</u>

【表 2 - 2 7】

CAR 7 全長- nt	78	atggccctccctgtcaccgccctgctgtctccgctggctcttctgtctccacgccgctcggcccgacgtggt gatgactcagtcgcctgactcgttggtgtgtcccttggagagcggggccactatcaattgcaagtcacccc agtcgctgttggtattccgacgggaaaacctacctcaattggctgcagcaaaaaccgggacagcctcaa agcggctcatcagcctggtgtccaagtggacagcggcggtccagaccgcttctcgggttcgggaagc ggtactgatttcacgctgaccatctcatccctccaagcggaggatgtggcagctactactgttggcaggg cacgcattttcgggcacttttggaggaggaccgaaggtcgaatcaaggaggagggtggtcggggcg gaggaggctcgggaggaggaggatcaggaggcgggtggaagcgagattcaactggtccagagcggc gcagaagtcaagaagccgggtgaatcgctcagaatctcgtgcaaaggatcgggattcaacatcgagga ctactacattcacttgggtcagacaaatgccgggcaaagggtggaatggatggggaggatcgaccccg aaaacgatgaaaccaagtacggaccaatctccaagggcacgtgaccatttcggcggacacctcaatca acactgtgtacctccagtggagctcacttaaggccagcgataccgcatgtactattgcgtttccgcgga gggggtgtactggggacagggcactactgtgaccgtgtcatccaccactaccccagcaccgaggccacc caccccggtcctaccatcgctccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctgg tggggccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttgggccccctctggctggtacttg cggggctctgtgtttcactcgtgatcactctttactgtaagcgcggctcggaagaagctgctgtacatctt aagcaaccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttccagag gaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagc aggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaag cggagaggacgggacccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaagagggcctgta caacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcaga agaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctc ttacatgcaggccctgccgcctcgg

10

20

30

40

【表 2 - 2 8】

CAR 7 全長-aa	79	malpvtallplallhaarpdvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqqkpgq ppkrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdftltisslqaedvavyycwqgthfpgtfgggtkveikggg sgsgsgsgsgsgsgsgsgscqlvqsgaevkkpgeslrisckgsgfniedyyihwvrqmpgkglew mgridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycfrggvywgqgtvtv ssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckr grkkllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrpfceceggcelrvkfsrsadapaykqggnqlynclnigr reedydldkrrgrdpemggkprknpcglynclqkdmacayseigmkgerrrgkghdglyqg lstatkdydalhm qalppr
CAR 8		
CAR8 scFv ドメ イン	80	dvmtqspslpvtlgqpasisckssqslldsdgktylnwlqqrpgqsprrlislvskldsgvpdrfsgs sgsgtdftlkisrveadvgvyycwqgthfpgtfgggtkveikggsgsgsgsgsgsgscql vqsgaevkkpgatvkiskkgsgfniedyyihwvqqapgkglewmgridpendetkygpifqgrvt itadtstntvymelssrsedtavyycfrggvywgqgtvtvss
CAR8 scFv ドメ イン nt	81	gatgtggtcatgacgcagtcaccactgtccctccccgtgacccttgacagccagcgtcgattagctgca agtcacccaatccctgctcgattcgatggaaagacctatctcaactggctgcagcaaagacccgggtca gagccctaggagactcatctcggttggtgtcaaagctggacagcggagtgccggaccgggtttccgggtcg ggatcggggacggacttcactctgaagattcacgggtggaagctgaggatgtgggagtgtactactgct ggcaggggaacccattccctggcacttttggcggagggaactaaggctgaaatcaaggaggagggtggc tcgggaggaggcggtatcggcgaggcgggagcggcgaggagggtccgaaatccaacttgcca gtcaggagccgaagtgaagaaacgggagccaccgtcaaatcagctgtaaggatcgggattcaata tcgaggactactacatccactgggtgcagcaagctccgggcaaaggactggagtggtatggggcgcatc gaccagagaacgacgaaacaaatacggcccgatcttccaaggcggggtgaccatcaccgaggaca cctcaactaacactgtgtacatggagctgagctccctgcgtccgaagatactgcagtctactactgcgcc ttccgcggtgggtgtgtactggggacagggcaccactgtgactgtcagctcg

10

20

30

40

【表 2 - 2 9】

CAR8- 可溶性 scFv - nt	82	atggccctccctgtcaccgccctgctgttccgctggctcttctgtccacgccgctcggccccgatgtggt catgacgcagtcaccactgtccctccccgtgaccttggacagccagcgtcgattagctgcaagtcaccc caatccctgctcgattcggatggaaagacctatctcaactggctgcagcaaagaccgggtcagagcccta ggagactcatctcgttgggtgtcaaagctggacagcggagtgccggaccgggttttcgggtcgggatcgg ggacgggacttcactctgaagatttcacgggtggaagctgaggatgtgggagtgtaactactgctggcagg gaacccatttccctggcacttttggcggaggaaactaaggctcgaatatcaaggaggagggtggctcggga ggaggcggatcgggcggaggcgggagcggcggaggagggtccgaaatccaactgtccagtcagg agccgaagtgaagaaaccgggagccaccgtcaaaatcagctgtaagggatcgggattcaatatcaggg actactacatccactgggtgcagcaagctccgggcaaaggactggagtgatggggcgcatcgacca gagaacgacgaaaccaatacggcccgatctccaaggcgggtgaccatcacgcggacacctcaa ctaacactgtgtacatggagctgagctccctgcgctccgaagatactgcagtctactactgcgccttcgc ggtgggtgtgtactggggacagggcaccactgtgactgtcagctcgggggtccaccatcatcaccaccac catcac
CAR8- 可溶性 scFv - aa	83	<u>malpvtallplallhaarpdvmtqspislptlgqpasisckssqslldsdgktylnwlqqrpgqsp</u> rrlislvsklsgvpdrfsgsgsgtdfilkisrveadvgyycwqgthfpgtfgggtkveikggggsg gggsgggsgggsgsciqlvqsgaevkkpgatvkisckgsgfniedyyihwvqqapgkglewmgr idpendetkygpifqgrvtitadtstntvymelsslrstedavyycafrggvwywggtttvssgshhh <u>hhhhh</u>

10

20

30

【表 2 - 3 0】

CAR 8-全 長- nt	84	atggccctccctgtcaccgccctgctgttccgctggctcttctgtctccacgccgctcggcccgatgtggt catgacgcagtcaccactgtccctccccgtgaccttggacagccagcgtcgattagctgcaagtcaccc caatccctgctcgattcggatggaaagacctatctcaactggctgcagcaaagaccgggtcagagcccta ggagactcatctcgttgggtgcaaagctggacagcggagtgccggaccgggtttccgggtcgggatcgg ggacgggacttactctgaagattcacgggtggaagctgaggatgtgggagtgtactactgctggcagg gaacccatttccctggcacttttggcggaggaaactaaggctcgaatatcaaggaggagggtggctcggga ggaggcggatcggcggaggcgggagcggcggaggagggtccgaaatccaactgtccagtcagg agccgaagtgaagaaccgggagccaccgtcaaatcagctgtaagggtcgggattcaatatcaggg actactacatccactgggtgcagcaagctccgggcaaaggactggagtggatggggcgcatcgacca gagaacgacgaaaccaaatacggcccgatctccaaggcgggtgaccatcacgcggacacctcaa ctaactgtgtacatggagctgagctccctgcgctccgaagatactgcagtctactactgcgccttcgc gggtggtgtgtactggggacagggcaccactgtgactgtcagctcgaccactacccagcaccgaggcc accaccccggtcctaccatcgctccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagc tgggtggggccgtgcataccgggggtcttgacttcgctgcgatactacatttggggccctctggctggta cttgcggggctcgtgcttctactcgtgatactctttactgtaagcgcggctcggagaagctgctgtaca tctttaagcaaccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccgttccca gaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgtccagcctaca agcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggac aagcggagaggacgggaccagaaatggcggggaagccgcgagaaagaatcccaagagggcct gtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaggggaacgca gaagaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcacccaccaaggacacctatgacg ctcttcacatgcaggccctgcccgcctcgg

10

20

30

40

【表 2 - 3 1】

CAR 8-全 長- aa	85	malpvtalllplalllhaarpdvmtqspslpvtlgqpasisck <u>ssqslldsdgktylnwl</u> qrpqgs prrlis <u>lvskldsgvpdrfsgsgsgtdftl</u> kisrveadvgyy <u>cwqgthfpgtfggg</u> tkveikgggg sgggsgggsgggsgggsciqlvqsgaevkpgatvkiskgsgfniedy <u>yihwv</u> qqapgkglew <u>mgridpendetkygpifqgrv</u> titadtstntvymelsslrseadvyycafr <u>ggvyw</u> gqgttvtvsst tpprptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgr kklyifkqpfmrvpqtteedgcscrpfceecggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlyncnlgrre cydvldkrrgrdpemggkprknpqeglyncelqkdkmacayseigmkgerrrgkghdglyqglst atkdtydalhmqalppr
CAR 9 マウス抗 EGFRvIII クローン 3C10		
CAR9 scFv ドメ イン	86	eiqlqqsgaelvkpgasvklscgsgfniedyihwvkqrteqglewigridentetkygpifqgra titadtssntvylqlssltseadvyycafrggvywpgtltvssggsgsgggsgggshmdvmt qspltsvaigqsasisckssqslldsdgktylnwllqrpqgspkrlislvskldsgvpdrftgsgsgtdft lrisrveacdliyycwqgthfpgtfgggtkleik
CAR9 scFv ドメ イン nt	98	gagatccagctccaacagagcggagccgaactggcacaaccgggagcgtcggtgaagtgtcatgcac tggatcgggcttcaacatcgaggattactacatccactgggtcaagcaacgcaccgagcaggggctgga atggatcggacggatcgaccccgaaaacgatgaaaccaagtacgggcctatctccaaggacgggcca ccattacggctgacacgtcaagcaataccgtctacctccagcttccagcctgacctccaggacactgc cgtgtactactgcgccttcagaggaggcgtgtactggggaccaggaaccactttgacctgtccagcgg aggcgggtggatcaggaggaggaggctcaggcgggtggcggctcgacatggacgtggtcatgactcag tccccgtgacctgtcggtggcaattggacagagcgcatccatctgtgcaagagctcacagtcgtgc tggattccgacggaaagacttatctgaactggctgctccaaagaccaggggcaatcaccgaaacgccttat ctccctgggtgtcgaaactcgactcgggtgtgccggatcggtttaccggtagcgggtccggcacggacttc actctccgacttgcagggtggaagcggaggatctcgggatctactactgttggcagggaacccacttcc ctgggacttttggaggcgggaactaagctggaaatcaag

10

20

30

40

【表 2 - 3 2】

CAR9- 可溶性 scFv - nt	87	atggccctccctgtcaccgccctgctgttccgctggctcttctgtccacgccgctcggccccgagatcca gctccaacagagcgggagccgaactgggtcaaaccgggagcgtcgggtgaagtgtcatgcactggatcgg gcttcaacatcgaggattactacatccactgggtcaagcaacgcaccgagcaggggctggaatggatcg gacggatcgaccccgaaaacgatgaaaccaagtacgggcctatcttccaaggacgggccaccattacg gctgacacgtcaagcaataccgtctacctccagctttccagcctgacctccgaggacactgccgtgtacta ctgcgccttcagaggaggcgtgtactggggaccaggaaccactttgacggtgtccagcggaggcggtg gatcaggaggaggaggctcaggcggtggcggtcgcacatggacgtggatgactcagtcctccgct gaccctgtcgggtggcaattggacagagcgcacatcctcgtgcaagagctcacagtcgctgtgattcc gacggaaagacttatctgaactggctgtcctaaagaccagggaatcaccgaaacgccttatctccctgg tgtcgaaactcgactcgggtgtgccggatcgggttaccggtagcgggtccggcacggacttcactctccg catttcgagggtggaagcggaggatctcgggatctactactgttggcagggaaccacttcctgggact ttggaggcggaactaagctggaaatcaagggtagccatcaccatcaccaccaccatcat
CAR9- 可溶性 scFv - aa	88	<u>malpvtalllplalllhaarpeiqlqqsgaelvkpgasvklscetgsfniedyyihwvkqrteqglewi</u> gridpendetkygpifqgratitadtssntvylqlssltse dtavyycafrggvywpggtltvssggggs gggsggggshmdvvm tqspltsvaigqsasisckssqslldsdgktylnwllqrpqspkrlislv skldsgvpdrftgsgsgtdflrisrveadlgiyycwqgthfpgtfgggtkleikgshhhhhhhh

10

20

30

【表 2 - 3 3】

CAR 9-全 長 - nt	89	atggccctccctgtcaccgccctgctgttccgctggctcttctgtctccacgccgctcgcccgagatcca gctccaacagagcggagccgaactgggtcaaaccgggagcgtcgggtgaagttgtcatgcactggatcgg gcttcaacatcgaggattactacatccactgggtcaagcaacgcaccgagcaggggctggaatggatcg gacggatcgacccgaaaacgatgaaaccaagtacgggcctatcttccaaggacgggccaccattacg gctgacacgtcaagcaataccgtctacctccagctttccagcctgacctccgaggacactgccgtgtacta ctgcgccttcagaggaggcgtgtactggggaccaggaaccactttgacgtgtccagcggaggcggtg gatcaggaggaggaggctcaggcgggtggcggctcgacatggacgtggatgactcagtcgccgct gacctgtcgggtggcaattggacagagcgcacccatctcgtgcaagagctcacagtcgctgtgattcc gacggaaagacttatctgaactggctgtctcaaagaccagggaatcaccgaaacgccttatctccctgg tgtcgaactcgactcgggtgtccggatcggttaccggtagcgggtccggcacggacttcactctccg catttcgagggtggaagcggaggatctcgggatctactactgttggcagggaaccacttccctgggact tttggaggcggaactaagctggaaatcaagaccactacccagcaccgaggccacccaccccggtcc taccatcgctccagcctctgtccctgcgtcggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgca taccgggggtcttgacttcgctgcgatatctacatttggggccctctggctggtacttgcggggctctgt gcttactcgtgatcactctttactgtaagcgcgggtcggagaagctgctgtacatcttaagcaacccttc atgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgtcatgccgggtcccagaggaggaggaag gcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgtccagcctacaagcaggggcagaa ccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgtggacaagcggagaggac gggacccagaaatgggcggggaagccgcgcagaaagaatcccaagagggcctgtacaacgagctcc aaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaagg ccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgtcttcacatgcagg ccctgccgcctcgg

10

20

30

40

【表 2 - 3 4】

CAR 9- 全長 - aa	90	malpvtalllplalllhaarpeiqqqsgaelvkpgasvklscetgsgfnied <u>dyvih</u> wvkqrteqglewi <u>gridpendetkygpifqgr</u> atitadtssntvylqlssltseavyyca <u>frggvy</u> wgpgtltvssggg gsgggsggggshmdvmtqspiltlsvaigqsasisc <u>kssqslldsdgktyln</u> willqrpqgspkrli <u>slvskldsg</u> vpdrftgsgsgtdflrisrveacdigiyc <u>wqgthfpgt</u> fgggtkleikttppaprpptpa ptiasqplsirpeacrpaaggavhtrglfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckgrgklllyifkqpf mrpvqttceedgcscrfeceeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreedyvldkrrgr dpemggkprknppqeglynelqkdmacayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalh mqalppr
CAR10		抗 EGFRvIII クローン 139
CAR10 scFv ドメ イン	91	diqmtqspsslsasvgdrvtitcrasqgirnlnlawyqqkpgkapkrliyaasnlsqgvsrftgsgsgt eflivsslpqpedfatyyclqhhsypltsggggtkveikrtgstsgsgkpgsggeevqvlesggglvqp ggslrlscaasgftfssyamswwrqapgkglewvsaisgggstnyadsvkgrflisrdnsknltlylq mnsiraedtavyycagssgwscywgqgtltvtvss
CAR9 scFv ドメ イン nt	92	gatatccaaatgactcagagcccttcacccctgagcgccagcgctggagacagggtgaccatcacgtgc cgggcatccaaggcattagaaataacttggcggtggtatcagcaaaaaccaggaaaggccccgaagcg cctgatctacggcgccctccaaccttcagtcaggagtgccctcgcgcttcaccgggagcggtagcggaac tgagtttacccttategtgtctccctgcagccagaggacttcgcgacctactactgcctccagcatcactc gtacccgttgacttcgggaggcggaaccaaggctgaaatcaaacgcactggctcgacgtcagggtccg gtaaaccgggatcgggagaaggatcggaagtccaagtgtggagagcgaggcgactcgtgcaac ctggcggtcgctcgcgctcagctgtgcgcgctgggttttacttcagctcgacgtatgtcatgggtg cggcaggctccgggaaagggtggaatgggtgtccgctatttcgggtcggtggaagcaccacaa cgccgactccgtgaaggagcgcttcaccatctcacgggataactccaagaatactctgtacctccagatg aactcgtgagagcgaggacaccgcagtgactactgcgcagggtcaagcggtggtccgaatactg gggacagggcaccctcgtcactgtcagctcc

10

20

30

40

【表 2 - 3 5】

CAR10- 可溶性 scFv - nt	93	atggccctccctgtcaccgccctgctgttccgctggctcttctgtccacgccgctcggcccgatatcca aatgactcagagcccttcacccctgagcgccagcgtcggagacagggtagccatcacgtgccgggcat cccaaggcattagaaataacttggcgtggtatcagcaaaaaccaggaaaggccccgaagcgctgatct acggcgctccaaccttcagtcaggagtgccctcgcgcttcacggggagcggtagcggaaactgagtta cccttatcgtgtcgtccctgcagccagaggacttcgacactactactgcctccagcatcactcgtaccg ttgacttcgggaggcggaaccaaggctgaaatcaaacgcactggctcgacgtcagggtccggtaaacc gggatcgggagaaggatcggagtcgaagtccaagtctggagagcggaggcggactcgtgcaacctggcgg gtcgtcgcggctcagctgtgccgctcgggttttactttcagctcgtacgtatgtcatgggtgcggcagg ctccgggaaaggggctggaatgggtgtccgctatttcgggctcgggtggaagcaccaattacgccgact ccgtgaaggagcgttcacatctcacgggataactccaagaatactctgtacctccagatgaactcgt gagagccgaggacaccgcagtgtactactgcgcagggtcaagcggctggtccgaatactggggacag ggcaccctcgtcactgtcagctcccatcaccatcaccaccaccatcac
CAR10- 可溶性 scFv - aa	94	<u>malpvtallplalllhaar</u> pd iqm tqspsslsasvgdrv titcrasqgirn lawyqqkpgkapkrl iy aasn lqsgvpsrftgsgsgteflivsslqpedfatyy clqhhsypltsgggtkveikrtgstsgskpgs gcvse vqlcs ggg lvqp ggs lrlscaas gftfssyams wvrqapgkglewvsaisgsggstnyads vkgrftisrdnskntlylqmns lraedtavyy cagssgwseywgqgtlvtvss <u>hhhhhhhh</u>

10

20

30

【表 2 - 3 6】

CAR 10	95	atggccctccctgtcaccgccctgctgttccgctggctcttctgtccacgccgctcggcccgatatcca
全長 - nt		aatgactcagagcccttcacccctgagcggcagcgtcggagacagggtagaccatcacgtgccgggcat
		cccaaggcattagaaataacttggcgtgggtatcagcaaaaaccaggaaaggccccgaagcgctgatct
		acggcgctccaaccttcagtcaggagtgccctcgcgcttcacggggagcggtagcggaaactgagtta
		cccttatcgtgtcgtccctgcagccagaggacttcgcgacctactactgcctccagcatcactcgtaccg
		ttgacttcgggaggcggaaccaaggtcgaaatcaaacgcactggctcgacgtcagggtcgggtaaacc
		gggatcgggagaaggatcggagtcgaagtctggagagcggaggcggactcgtgcaacctggcgg
		gtcgtcgcggctcagctgtgccggtcgggttttactttcagctcgtacgctatgtcatgggtgcggcagg
		ctccgggaaaggggctggaatgggtgtccgctatttcggctcgggtggaagcaccaattacgccgact
		ccgtgaaggagcgttcacatctcacgggataactccaagaatactctgtacctccagatgaactcgt
		gagagccgaggacaccgcagtgtactactgcgcagggtcaagcggctgggtccgaatactggggacag
		ggcaccctcgtcactgtcagctccaccactacccagcaccgaggccaccaccccggtcctaccatc
		gcctccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctgggtggggcgtgcataccg
		gggtcttgacttcgcctgcgatatctacattggggccctctggctgggtacttgcggggtcctgtgtcttca
		ctcgtgatcactctttactgtaagcgggtcggagaagctgtgtacatcttaagcaaccttcagtagg
		cctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttatgcgggttcccagaggaggaggaaggcggct
		gcgaactgcgctgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagct
		ctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgtggacaagcggagaggacgggac
		ccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaagagggcctgtacaacgagctccaaaag
		gataagatggcagaagcctatagcgagattgggtatgaaaggggaacgcagaagaggcaaaggccacg
		acggactgtaccagggactcagcacgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctg
		ccgcctcgg

10

20

30

40

【表 2 - 3 7】

CAR 10 全長 - aa	96	malpvtallplallhaarpdiqmtqspsslsasvgdrv titcrasqgirnlnlawyqqkpgkapkrlly aasnlgsgvpsrftgsgsgteftlivsslqpedfatyyclqhhsypltsgggkveikrtgstsgsgkpgs gegsevvqlcsggglvqpggsrlscaasgftfssyamswwrqapgkglewvsaisgsggstnyads vkgrftisrdnsntlylqmnsiraedtavyycagssgwscywgqgtlvtssttpaprpptpaptia sqplsrlpeacrpaaggavhtrglfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckgrkkllyifkqpfmrp vqttqeedgcscrfpceecggcelrvkfsrsadapaykqggnqlynelnlgrrceydvldkrrgrdpe m ggkprknpqeglynelqkdkmacayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdtydalhm qal ppr

10

【0405】

次いで、CAR scFv断片をレンチウイルスベクター中にクローニングし、単一のコーディングフレーム中に全長のCARコンストラクトを作製し、発現用にEF1αプロモーターを用いた(配列番号97)：

20

EF1αプロモーター

GTGAGGCTCCGGTGGCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTTCGGCAATT
GAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTAAGTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGT
GGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAG
TGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGC
AGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCCTTCG
CCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGC
TGCTTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTA
ATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTTGGGGCCGCCGGCGGCGACGGGGCCCCGTGCGTCCCAGCGCACA
TGTTTCGGCGAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGT
GCCTGGCCTCGCGCCCGCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCCGTGCGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAA
GATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCAACC
ACACAAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCT
CGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTG
AGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGATCT
TGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGA (配列番号97)。

30

【0406】

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

40

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

【0407】

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

50

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

【0408】

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

【0409】

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

【0410】

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

【0411】

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

【0412】

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

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

【0413】

材料および方法

CAR機能の初期特性化用のJurkatレポーター細胞株の作製

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

10

【0414】

EGFRvIII-特異的CAR JNL細胞のT細胞活性化の評価

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

20

【0415】

ヒト化EGFRvIII-特異的になるように改変したCAR T細胞の作製

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

30

【0416】

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

40

【0417】

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

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

50

T細胞とする。適当な数のT細胞を、一定数の標的細胞と混合することによりアッセイを開始した。4または16時間後に、各混合物の全体積をとり、各ウェルを洗浄した。T細胞をCD3について染色し、全ての細胞を生/死マーカーである7AADで染色した。最後の洗浄の後、沈殿している細胞を、予め決定した数のカウントビーズとともに、特定の体積で懸濁した。細胞染色データをLSRIIフローサイトメトリーにより得、ビーズを用いてFlowJo softwareを用いて解析し、結果を定量化した。

【0418】

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

【0419】

結果

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

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

【0420】

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

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

【0421】

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

)は、形質導入細胞の%によく相関する。

【0422】

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

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

【0423】

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

【0424】

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

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

【0425】

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

【0426】

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

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

を培養から除き、Cytometric Bead Assay (CBA)を用いてサイトカインを解析した。結果は、1) CAR6およびCAR9 T細胞がEGFRvIII-発現細胞に応答して同等のレベルのIFN γ を誘発したことおよび、2) いずれのCAR T細胞集団も野生型EGFR発現細胞に対してIFN γ の発現を誘発しなかったことを明らかに示すものである。重要なことに、これらのデータは、死滅アッセイ (killing assay)のデータおよび増殖データとともに、CAR6およびCAR9がEGFRvIIIに対して機能的な特異性を示し、抗腫瘍免疫応答促進能を有することを示すものである。

【0427】

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

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

【0428】

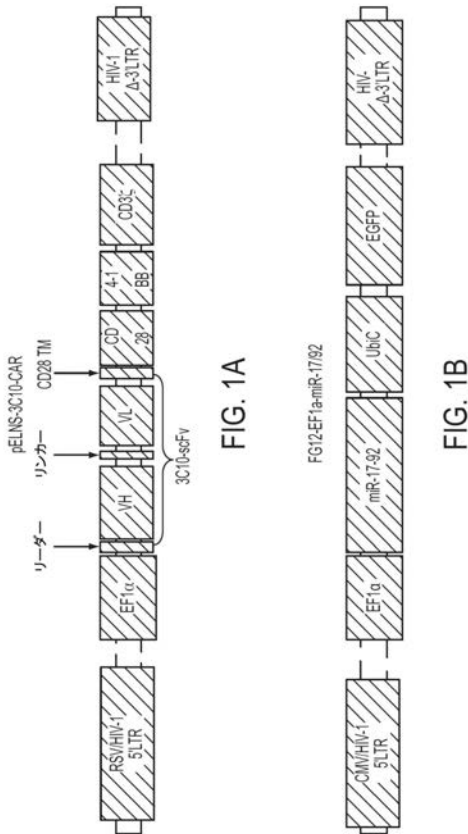
この実施例において、EGFRvIII、GFP+Luc+ を発現するU87vIIIヒト神経膠腫 1×10^6 個を洗浄し、続けて、100 μ L生理食塩水中で、30個体のNSG 免疫不全マウス(N = 10/群)の側腹部に注射した。ヒトT細胞を抗CD3/28コートしたビーズで刺激し、レンチウイルスによるヒト化EGFRvIII CAR scFv #2173 (CAR6)形質導入を行った。形質導入、生体外増殖およびビーズ除去の後、CAR形質導入T細胞(フローサイトメトリーによれば約50%がCAR+)を洗浄し、100 μ L生理食塩水中で、尾静脈を介して、腫瘍移植後5日目に注射した。腫瘍増殖をキャリパ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

【0429】

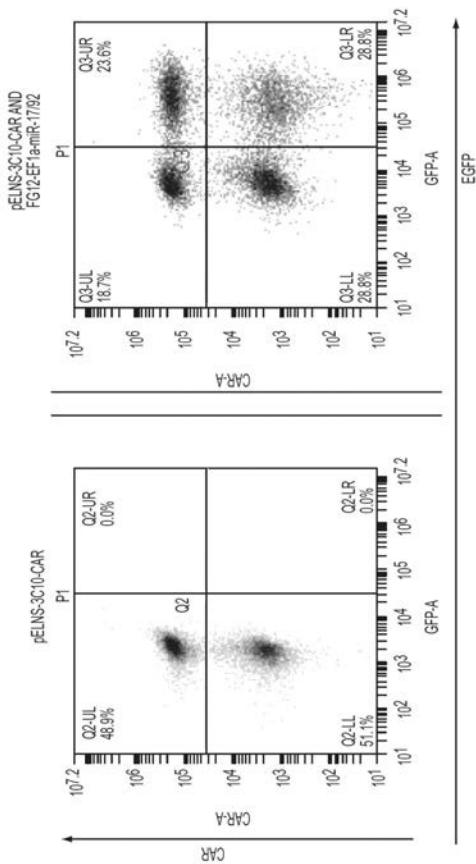
等価物

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

【 図 1 】



【 図 2 A 】



【 図 2 B 】

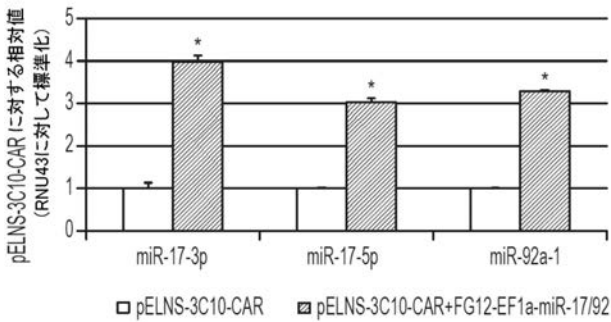


FIG. 2B

【 図 2 C 】

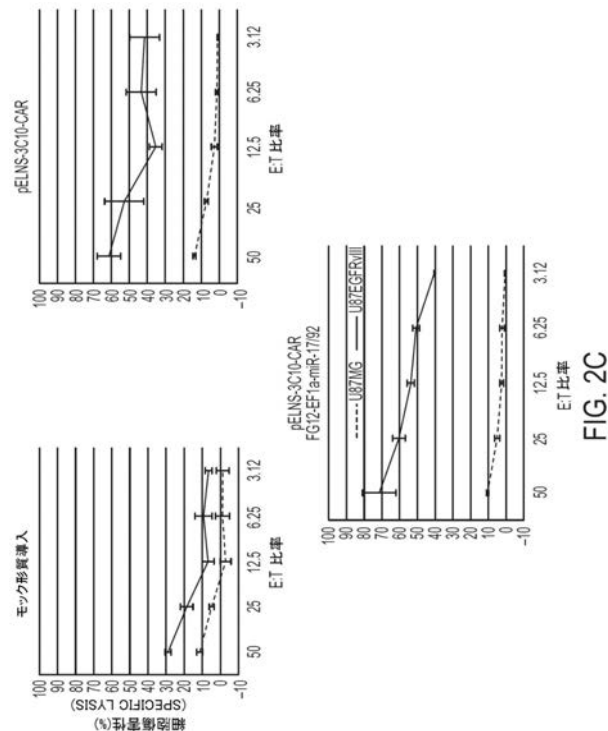


FIG. 2C

【図 3 A】

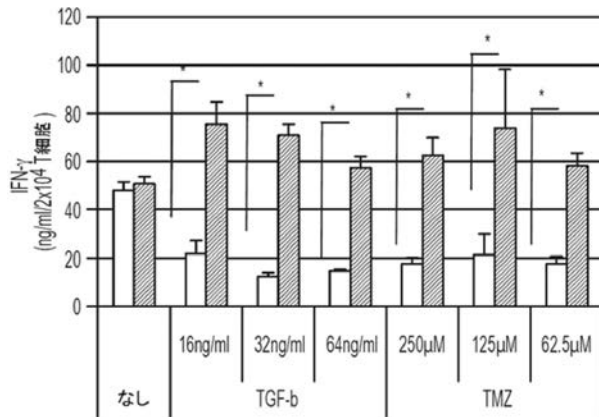


FIG. 3A

【図 3 B】

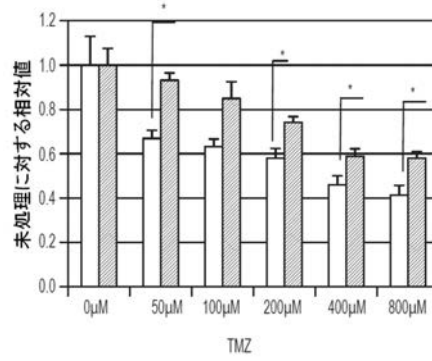


FIG. 3B

【図 3 C】

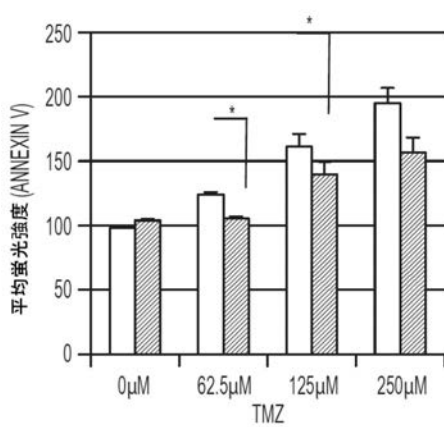


FIG. 3C

【図 3 D】

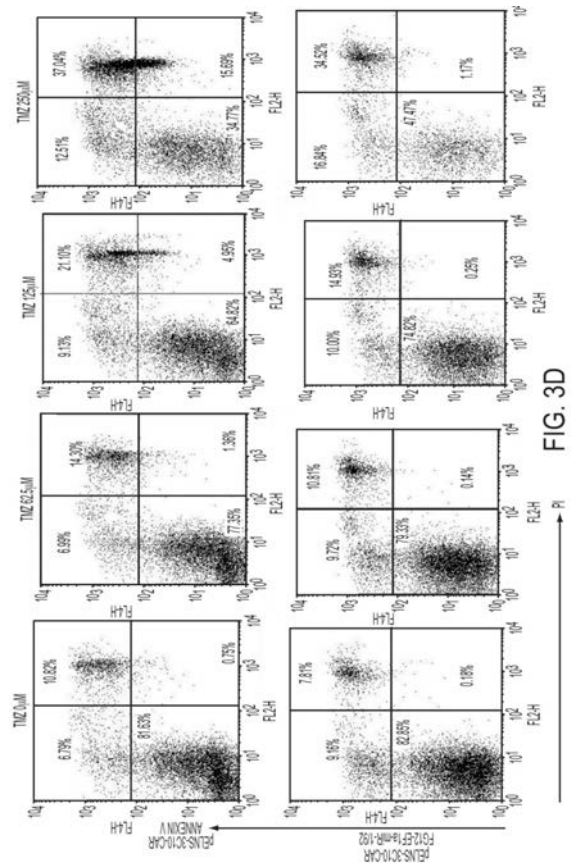


FIG. 3D

【図 4】

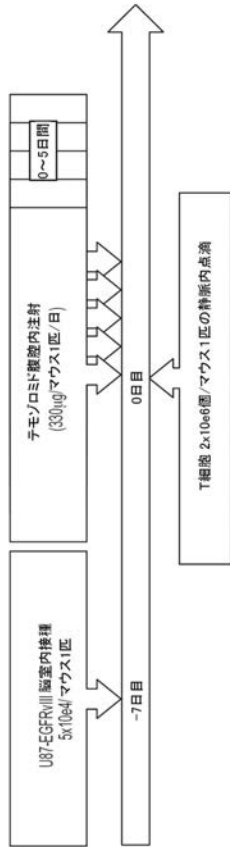


FIG. 4A

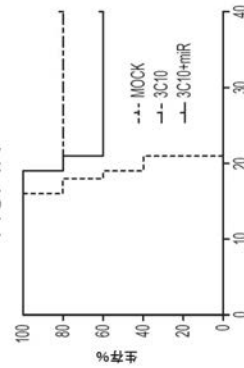


FIG. 4B

【図 5】

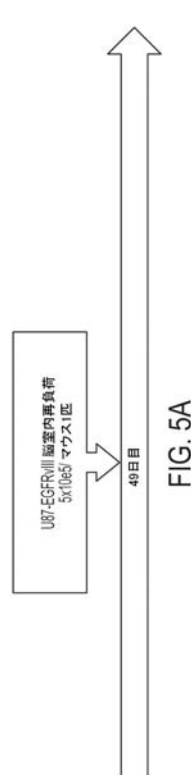


FIG. 5A

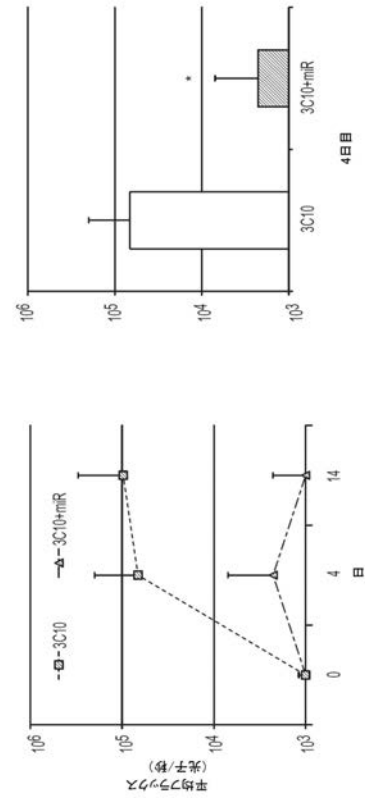


FIG. 5C

FIG. 5B

【図 6】

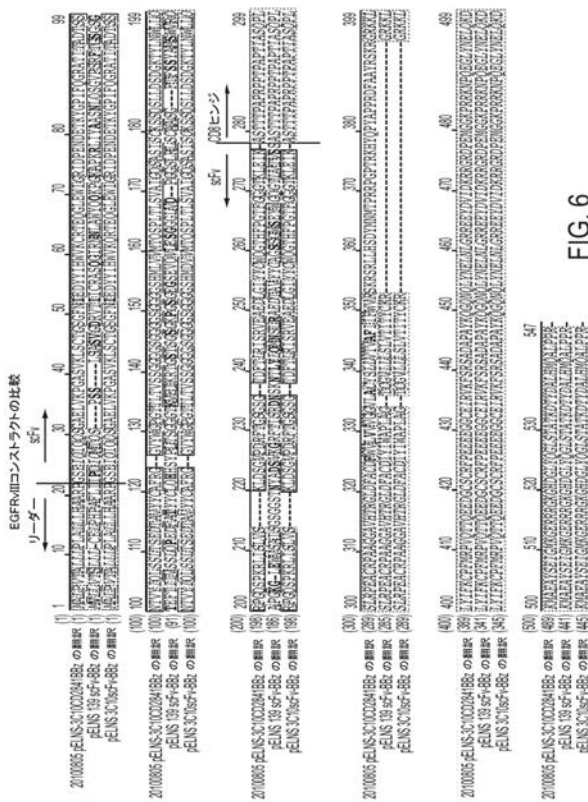


FIG. 6

【図 7】

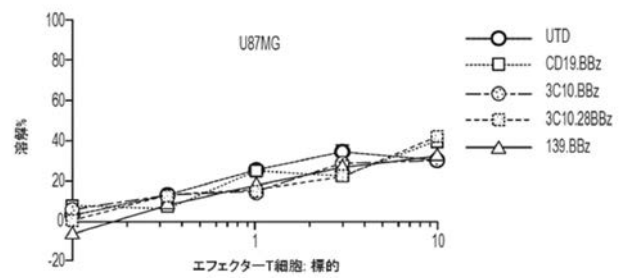


FIG. 7A

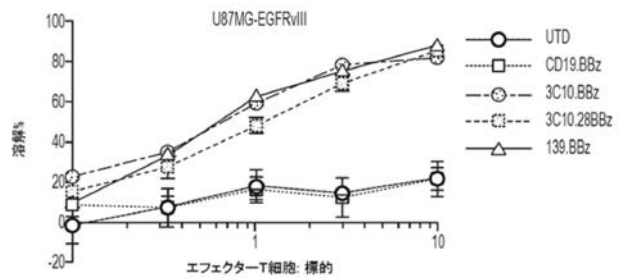
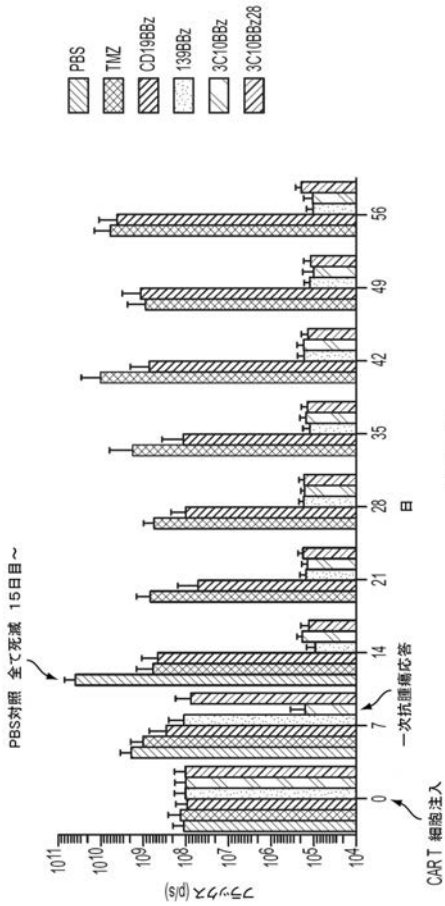
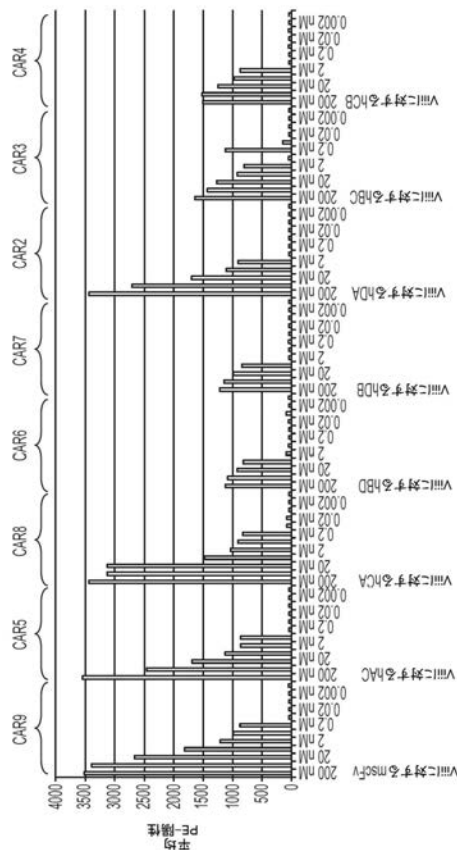


FIG. 7B

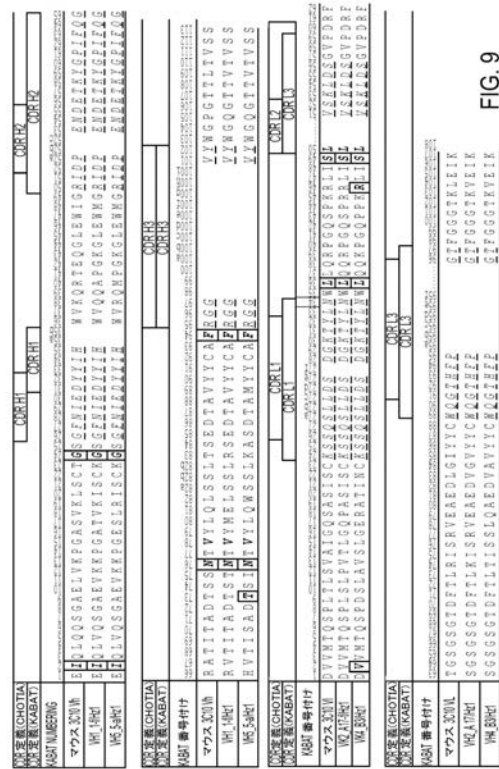
【図 8】



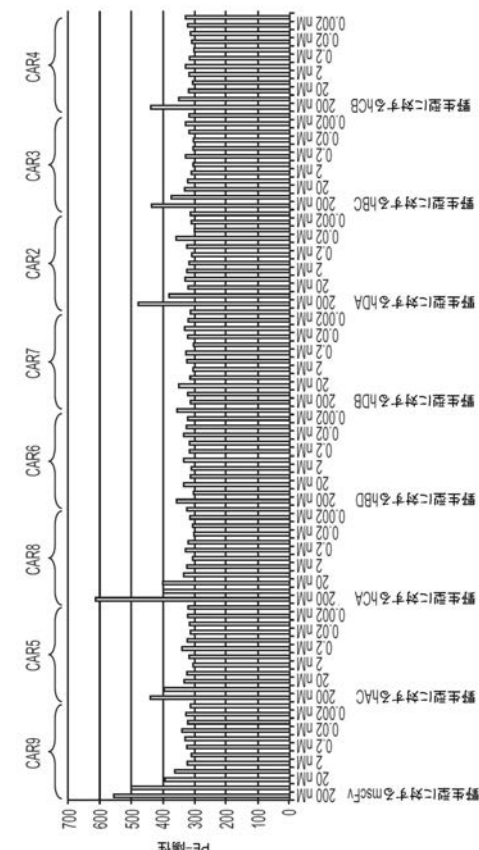
【図 10】



【図 9】



【図 11】



【図 12 A】

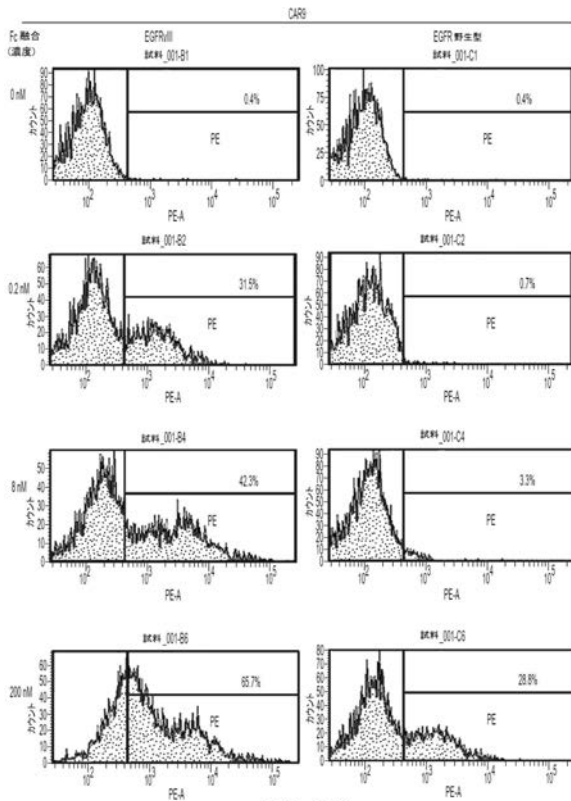


FIG. 12A

【図 12 B】

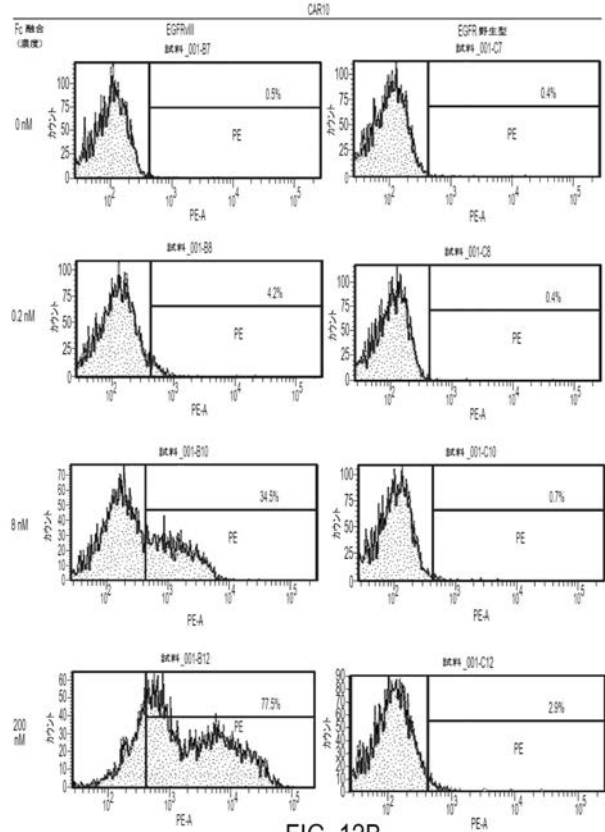


FIG. 12B

【図 13】

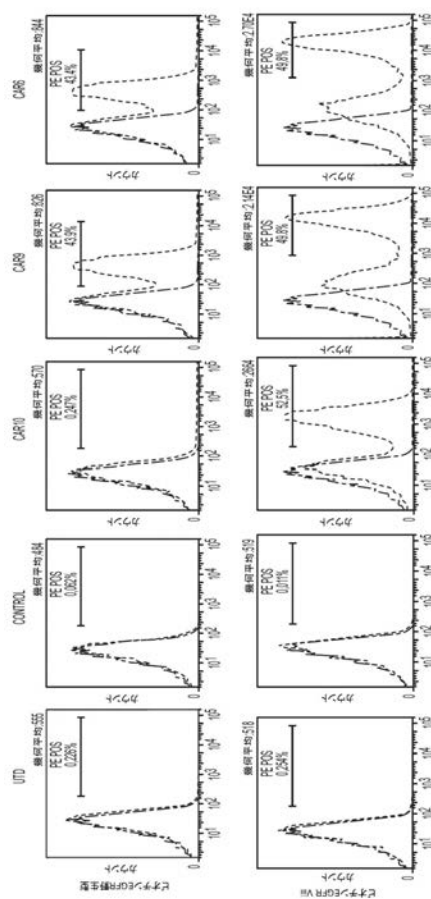


FIG. 13

【図 14】

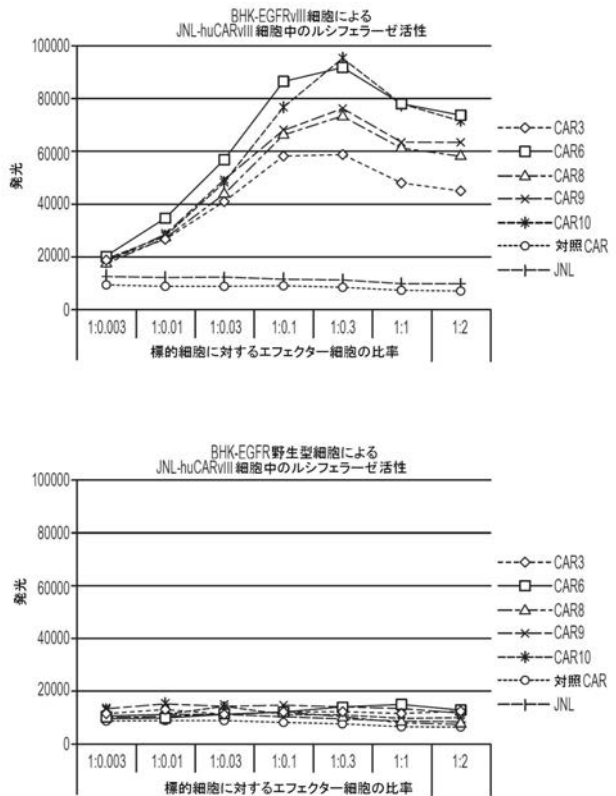


FIG. 14

【図 15】

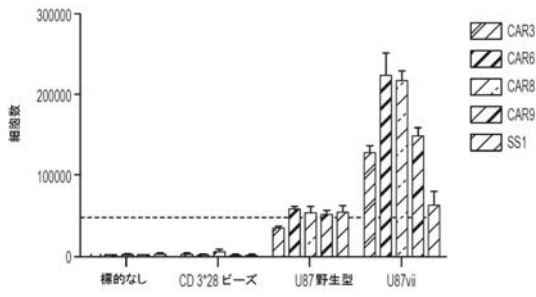


FIG. 15

【図 16】

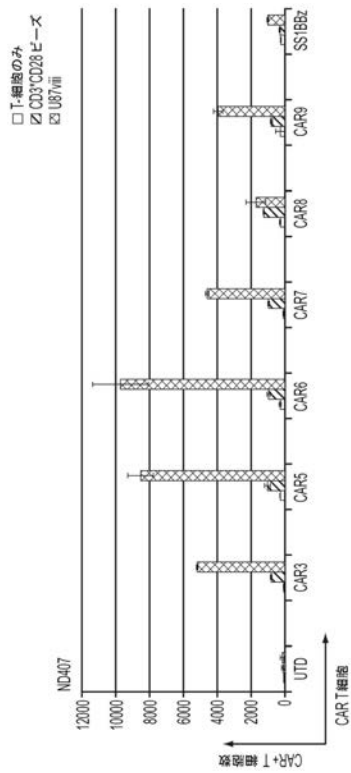


FIG. 16

【図 17】

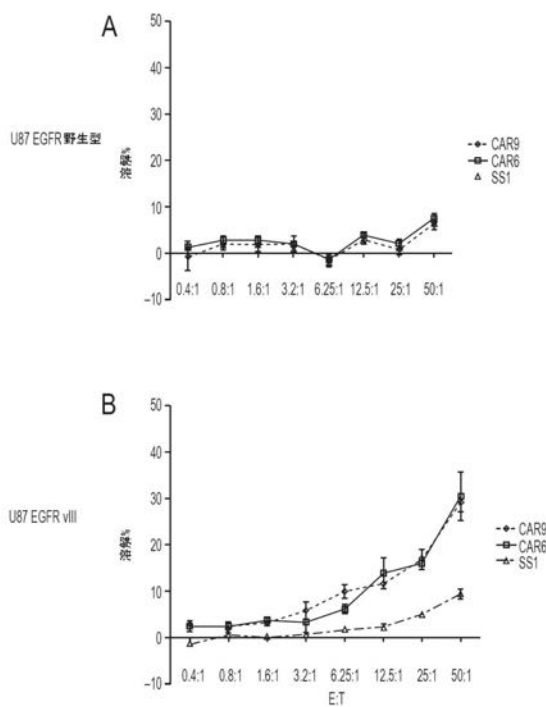


FIG. 17

【図 18】

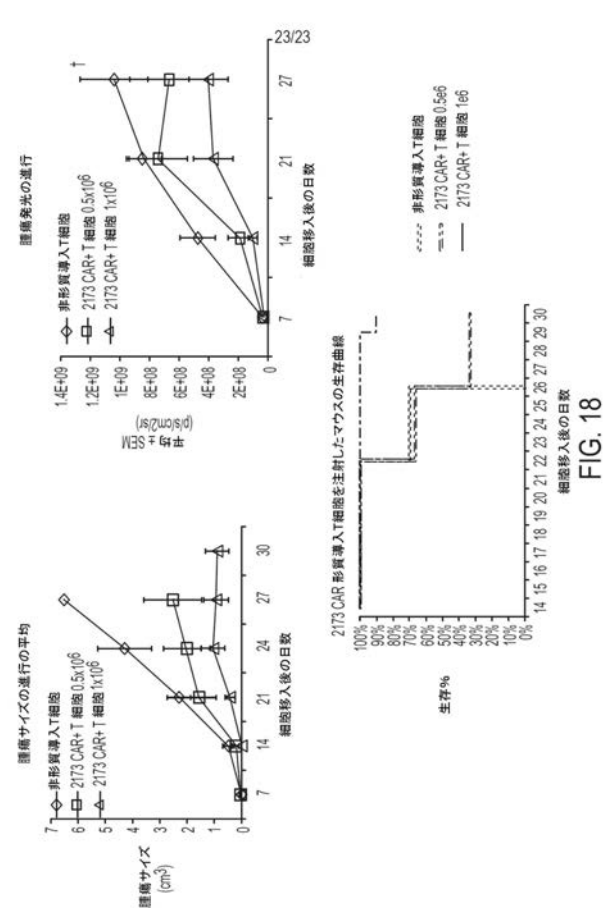


FIG. 18

【配列表】

2020062017000001.app

【手続補正書】

【提出日】令和1年12月25日(2019.12.25)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

キメラ抗原受容体（CAR）をコードする単離核酸分子であって、コードされたCARが、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗EGFRvIII結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および、一次シグナル伝達ドメイン、同時刺激ドメインまたは一次シグナル伝達ドメインおよび同時刺激ドメインの両方を含む細胞内シグナル伝達ドメインを含み；

（a）重鎖可変領域が；

（i）配列DYYIH（配列番号22）を含むCDR1；

（ii）配列RIDPENDETKYGP I F Q G（配列番号23）を含むCDR2；および

（iii）配列RGGVY（配列番号24）を含むCDR3を含み；

（b）軽鎖可変領域が；

（i）配列KSSQSLLDSDGKTYLN（配列番号26）を含むCDR1；

（ii）配列LVSKLDS（配列番号27）を含むCDR2；および

（iii）配列WQGTHFP GT（配列番号28）を含むCDR3を含み；

（c）抗EGFRvIII結合ドメインが；

（i）配列番号68の軽鎖可変領域および／または重鎖可変領域と少なくとも95％配列同一性を有する；

（ii）配列番号68の軽鎖可変領域および／または重鎖可変領域の20個以下の変更を有する；

（iii）配列番号50の軽鎖可変領域および／または重鎖可変領域と少なくとも95％配列同一性を有する；または

（iv）配列番号80の軽鎖可変領域および／または重鎖可変領域と少なくとも95％配列同一性を有する、

アミノ酸配列を含む、単離核酸分子。

【請求項2】

（a）軽鎖可変領域が、表2に記載の軽鎖可変領域または表2に記載の軽鎖可変領域と95％～99％配列同一性を有するアミノ酸配列を含み；および

（b）重鎖可変領域が、表2に記載の重鎖可変領域または表2に記載の重鎖可変領域と95％～99％配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、

請求項1に記載の単離核酸分子。

【請求項3】

（a）抗EGFRvIII結合ドメインの軽鎖可変領域が、配列番号68の軽鎖可変領域のアミノ酸配列と95％～99％配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、抗EGFRvIII結合ドメインの重鎖可変領域が、配列番号68の重鎖可変領域のアミノ酸配列と95％～99％配列同一性を有するアミノ酸配列を含む；

（b）抗EGFRvIII結合ドメインの軽鎖可変領域が、配列番号50の軽鎖可変領域のアミノ酸配列と95％～99％配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、抗EGFRvIII結合ドメインの重鎖可変領域が、配列番号50の重鎖可変領域のアミノ酸配列と95％～99％配列同一性を有するアミノ酸配列を含む；

（c）抗EGFRvIII結合ドメインの軽鎖可変領域が、配列番号80の軽鎖可変領域

のアミノ酸配列と95%～99%配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、抗EGFRv I I I結合ドメインの重鎖可変領域が、配列番号80の重鎖可変領域のアミノ酸配列と95%～99%配列同一性を有するアミノ酸配列を含む；

(d) 抗EGFRv I I I結合ドメインの軽鎖可変領域が、配列番号68の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含み、抗EGFRv I I I結合ドメインの重鎖可変領域が、配列番号68の重鎖可変領域のアミノ酸配列を含む；

(e) 抗EGFRv I I I結合ドメインの軽鎖可変領域が、配列番号50の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含み、抗EGFRv I I I結合ドメインの重鎖可変領域が、配列番号50の重鎖可変領域のアミノ酸配列を含む；または

(f) 抗EGFRv I I I結合ドメインの軽鎖可変領域が、配列番号80の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含み、抗EGFRv I I I結合ドメインの重鎖可変領域が、配列番号80の重鎖可変領域のアミノ酸配列を含む、

請求項1または2に記載の単離核酸分子。

【請求項4】

抗EGFRv I I I結合ドメインが、配列番号68、配列番号50または配列番号80のアミノ酸配列を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の単離核酸分子。

【請求項5】

(i) 抗EGFRv I I I結合ドメインをコードする核酸分子が、配列番号69、配列番号51または配列番号81のヌクレオチド配列と少なくとも95%配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む；

(i i) 抗EGFRv I I I結合ドメインをコードする核酸分子が、配列番号69、配列番号51または配列番号81のヌクレオチド配列を含む；

(i i i) コードされたCARが、配列番号73、配列番号55または配列番号85のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列を含む；および／または

(i v) CARをコードする核酸分子が、配列番号72、配列番号54または配列番号84のヌクレオチド配列、またはそれと少なくとも95%同一性を有するヌクレオチド配列を含む、

請求項1～4のいずれか一項に記載の単離核酸分子。

【請求項6】

抗EGFRv I I I結合ドメインがヒトまたはヒト化抗体または抗体断片を含み、所望により抗体断片がscFvである、請求項1～5のいずれか一項に記載の単離核酸分子。

【請求項7】

(i) コードされたCARが、T細胞受容体のα鎖、β鎖またはζ鎖、CD28、CD3ε、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137およびCD154からなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメインを含む；

(i i) 膜貫通ドメインが、配列番号15のアミノ酸配列；配列番号15のアミノ酸配列に少なくとも1個の変更を有するが、20個以下の変更を有するアミノ酸配列；または配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも95%配列同一性を有するアミノ酸配列を含む；および／または

(i i i) 膜貫通ドメインをコードする核酸分子が、配列番号8のヌクレオチド配列またはそれと少なくとも95%配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、

請求項1～6のいずれか一項に記載の単離核酸分子。

【請求項8】

抗EGFRv I I I結合ドメインが、ヒンジ領域によって膜貫通ドメインに結合しており、所望により；

(i) ヒンジ領域が、配列番号14のアミノ酸配列またはそれと少なくとも95%配列同一性を有するアミノ酸配列を含む；または

(i i) ヒンジ領域をコードする核酸分子が、配列番号7のヌクレオチド配列またはそれ

と少なくとも 95% 配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、
請求項 1～7 のいずれか一項に記載の単離核酸分子。

【請求項 9】

細胞内シグナル伝達ドメインが、一次シグナル伝達ドメインおよび同時刺激ドメイン、
例えば、OX40、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278) および 4-1BB (CD137) からなる群から選択されるタンパク質の機能性シグナル伝達ドメインを含み、所望により：

(i) 同時刺激ドメインが、配列番号 16 のアミノ酸配列；配列番号 16 のアミノ酸配列に少なくとも 1 個の変更を有するが、20 個以下の変更を有するアミノ酸配列；または配列番号 16 のアミノ酸配列と少なくとも 95% 配列同一性を有するアミノ酸配列を含む；または

(ii) 同時刺激ドメインをコードする核酸配列が、配列番号 9 のヌクレオチド配列またはそれと少なくとも 95% 配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、

請求項 1～8 のいずれか一項に記載の単離核酸分子。

【請求項 10】

(i) 細胞内シグナル伝達ドメインが、一次シグナル伝達ドメインを含む；

(ii) 細胞内シグナル伝達ドメインが、同時刺激シグナル伝達ドメインを含む；

(iii) 細胞内シグナル伝達ドメインが、4-1BB の機能性シグナル伝達ドメインおよび CD3ζ の機能性シグナル伝達ドメインを含む；

(iv) 同時刺激ドメインが、配列番号 16 のアミノ酸配列；配列番号 16 のアミノ酸配列に少なくとも 1 個の変更を有するが、20 個以下の変更を有するアミノ酸配列；または配列番号 16 のアミノ酸配列と少なくとも 95% 配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、一次シグナル伝達ドメインが、配列番号 17 または配列番号 99 のアミノ酸配列；配列番号 17 または配列番号 99 のアミノ酸配列に少なくとも 1 個の変更を有するが、20 個以下の変更を有するアミノ酸配列、または配列番号 17 または配列番号 99 のアミノ酸配列と少なくとも 95% 配列同一性を有するアミノ酸配列を含む；

(v) 細胞内シグナル伝達ドメインが、配列番号 16 のアミノ酸配列および配列番号 17 または配列番号 99 のアミノ酸配列を含み、細胞内シグナル伝達ドメインを含むアミノ酸配列が、同一フレーム内で、単一のポリペプチド鎖として発現する；および／または

(vi) 細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸分子が、配列番号 9 のヌクレオチド配列、またはそれと少なくとも 95% 配列同一性を有するヌクレオチド配列、および／または配列番号 10 または配列番号 100 のヌクレオチド配列、またはそれと少なくとも 95% 配列同一性を有するヌクレオチド配列を含む、

請求項 1～9 のいずれか一項に記載の単離核酸分子。

【請求項 11】

CAR が、リーダー配列を含み、所望によりリーダー配列が、配列番号 13 のアミノ酸配列を含む、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の単離核酸分子。

【請求項 12】

請求項 1～11 のいずれか一項に記載の核酸分子によりコードされている単離 CAR 分子であって、所望により単離 CAR 分子が、配列番号 73、配列番号 55 または配列番号 85 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 95% 配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、単離 CAR 分子。

【請求項 13】

重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗 EGF RvIII 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および、一次シグナル伝達ドメイン、同時刺激ドメインまたは一次シグナル伝達ドメインおよび同時刺激ドメインの両方を含む細胞内シグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体 (CAR) 分子であって：

(a) 重鎖可変領域が：

(i) 配列 DYYIH (配列番号 22) を含む CDR1；

(ii) 配列 RIDPENDETKYGP I FQG (配列番号 23) を含む CDR2；お

よび

(i i i) 配列 R G G V Y (配列番号 2 4) を含む C D R 3 を含み ;

(b) 軽鎖可変領域が :

(i) 配列 K S S Q S L L D S D G K T Y L N (配列番号 2 6) を含む C D R 1 ;

(i i) 配列 L V S K L D S (配列番号 2 7) を含む C D R 2 ; および

(i i i) 配列 W Q G T H F P G T (配列番号 2 8) を含む C D R 3 を含み、

(c) コードされた抗 E G F R v I I I 結合ドメインが :

(i) 配列番号 6 8 の軽鎖可変領域および / または重鎖可変領域と少なくとも 9 5 % 配列同一性を有する ;

(i i) 配列番号 6 8 の軽鎖可変領域および / または重鎖可変領域の 2 0 個以下の変更を有する ;

(i i i) 配列番号 5 0 の軽鎖可変領域および / または重鎖可変領域と少なくとも 9 5 % 配列同一性を有する ; または

(i v) 配列番号 8 0 の軽鎖可変領域および / または重鎖可変領域と少なくとも 9 5 % 配列同一性を有する、

アミノ酸配列を含む、キメラ抗原受容体 (C A R) 分子。

【請求項 1 4】

C A R 分子が請求項 2 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の C A R である、請求項 1 3 に記載の単離 C A R 分子。

【請求項 1 5】

重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗 E G F R v I I I 結合ドメインであって :

(a) 重鎖可変領域が :

(i) 配列 D Y Y I H (配列番号 2 2) を含む C D R 1 ;

(i i) 配列 R I D P E N D E T K Y G P I F Q G (配列番号 2 3) を含む C D R 2 ; および

(i i i) 配列 R G G V Y (配列番号 2 4) を含む C D R 3 を含み ;

(b) 軽鎖可変領域が :

(i) 配列 K S S Q S L L D S D G K T Y L N (配列番号 2 6) を含む C D R 1 ;

(i i) 配列 L V S K L D S (配列番号 2 7) を含む C D R 2 ; および

(i i i) 配列 W Q G T H F P G T (配列番号 2 8) を含む C D R 3 を含み、

(c) 抗 E G F R v I I I 結合ドメインが :

(i) 配列番号 6 8 の軽鎖可変領域および / または重鎖可変領域と少なくとも 9 5 % 配列同一性を有する ;

(i i) 配列番号 6 8 の軽鎖可変領域および / または重鎖可変領域の 2 0 個以下の変更を有する ;

(i i i) 配列番号 5 0 の軽鎖可変領域および / または重鎖可変領域と少なくとも 9 5 % 配列同一性を有する ; または

(i v) 配列番号 8 0 の軽鎖可変領域および / または重鎖可変領域と少なくとも 9 5 % 配列同一性を有する、

アミノ酸配列を含む、抗 E G F R v I I I 結合ドメイン。

【請求項 1 6】

請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の核酸分子を含むベクターであって、所望により :

(i) ベクターが、DNA、RNA、プラスミド、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクターおよびレトロウイルスベクターからなる群から選択される ;

(i i) ベクターが、プロモーター、例えば、E F - 1 プロモーター、例えば、配列番号 9 7 のヌクレオチド配列を含む E F - 1 プロモーターをさらに含む ;

(i i i) ベクターが、試験管内で転写されたベクターである ;

(i v) ベクターが、ポリ (A) テールを含むヌクレオチド配列をさらに含む ; および / または

(v) ベクターが、3' UTRを含むヌクレオチド配列をさらに含む、ベクター。

【請求項 17】

請求項 1～11 のいずれか一項に記載の核酸分子、請求項 12 に記載の単離 C A R 分子、請求項 13 または 14 のいずれか一項に記載の C A R 分子、または請求項 16 に記載のベクターを含む単離細胞であって、所望により：

(i) 細胞が T 細胞、例えば、C D 8 + T 細胞である；および／または

(i i) 細胞がヒト細胞である、
単離細胞。

【請求項 18】

(i) 請求項 1～11 のいずれか一項に記載の核酸分子または請求項 16 に記載のベクターで T 細胞に形質導入することを含む、細胞を作製する；または

(i i) 試験管内で転写された R N A または合成 R N A を細胞に導入することを含む R N A 操作細胞集団を作製する、ここで、R N A が請求項 1～11 のいずれか一項に記載の核酸分子を含む、
試験管内または生体外での方法。

【請求項 19】

哺乳動物において抗腫瘍免疫を提供する方法において使用するための請求項 17 に記載の細胞であって、方法は有効量の細胞を哺乳動物に投与することを含む、細胞。

【請求項 20】

E G F R v I I I の発現に関連する疾患に罹患している哺乳動物を処置する方法において使用するための請求項 17 に記載の細胞であって、方法は有効量の細胞を哺乳動物に投与することを含み、所望により、E G F R v I I I の発現に関連する疾患は、多形神経膠芽腫 (G B M)、未分化星状細胞腫、巨細胞神経膠芽腫、膠肉腫、未分化乏突起神経膠腫、未分化上衣腫、脈絡叢がん、未分化神経節膠腫、松果体芽腫、髓上皮腫、上衣芽腫、髓芽腫、テント上原始神経外胚葉性腫瘍、A T / R T (非定型奇形腫様／ラブドイド腫瘍)、肺がん (例えば非小細胞肺がん)、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、結腸直腸がんおよび膀胱がんからなる群から選択されるがんまたはその任意の組合せ、または任意のがんの転移である、細胞。

【請求項 21】

医薬として使用するための、請求項 1～11 のいずれか一項に記載の単離核酸分子、請求項 12 に記載の単離 C A R 分子、請求項 13 または 14 に記載の C A R 分子、請求項 16 に記載のベクター、または請求項 17 に記載の細胞。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76		
A 6 1 K 35/761 (2015.01)	A 6 1 K	35/761		
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17	Z	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28		

1. TRITON

- (71)出願人 501111751
 ユニバーシティ・オブ・ピッツバーグ・オブ・ザ・コモンウェルス・システム・オブ・ハイヤー・エデュケーション
 UNIVERSITY OF PITTSBURGH-OF THE COMMONWEALTH
 SYSTEM OF HIGHER EDUCATION
 アメリカ合衆国15260ペンシルベニア州ピッツバーグ、サッカレー・アンド・オハラ・ストリート、ガードナー・スティー爾・コンフェレンス・センター200番
- (74)代理人 100106518
 弁理士 松谷 道子
- (74)代理人 100122301
 弁理士 富田 憲史
- (72)発明者 ジェニファー・ブログドン
 アメリカ合衆国02139マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー250番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイテッド
- (72)発明者 ローラ・アレクサンドラ・ジョンソン
 アメリカ合衆国19003ペンシルベニア州アードモア、アーマット・アベニュー111番
- (72)発明者 カール・エイチ・ジューン
 アメリカ合衆国19066ペンシルベニア州メリオン・ステーション、ベアード・ロード409番
- (72)発明者 アンドレアス・レーヴ
 アメリカ合衆国02143マサチューセッツ州サマービル、ボウ・ストリート50番、アパートメント・ナンバー9
- (72)発明者 マルチェラ・モーズ
 アメリカ合衆国19010ペンシルベニア州ブリン・モア、ハビランド・ドライブ705番
- (72)発明者 ジョン・ショラー
 アメリカ合衆国19072ペンシルベニア州ナーバース、ギルピン・ロード410番
- (72)発明者 岡田 秀穂
 アメリカ合衆国15206ペンシルベニア州ピッツバーグ、ビーチウッド・ブルーバード3008番

Fターム(参考) 4B065 AA94X AB01 AC14 BA02 BA03 BB25 BC03 BC07 BC11 BD14
 CA25 CA44
 4C084 AA13 NA14 ZB261 ZB262
 4C085 AA14 DD62 EE01
 4C087 AA01 AA02 BC83 CA04 CA12 DA18 NA14 ZB26
 4H045 DA76 EA20 FA74 GA20

【外国語明細書】

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

TREATMENT OF CANCER USING HUMANIZED ANTI-EGFRvIII CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR

This application claims priority to U.S. Serial No.: 61/888,255 filed October 8, 2013 and U.S. Serial No.: 61/767,071, filed February 20, 2013, the entire contents of each of these applications is incorporated herein by reference.

STATEMENT REGARDING FEDERALLY SPONSORED RESEARCH OR DEVELOPMENT

This invention was made with government support under 2R01 NS055140 and 1P01 CA1322714 awarded by the National Institute of Health (NIH). The government has certain rights in the invention.

SEQUENCE LISTING

The instant application contains a Sequence Listing which has been submitted electronically in ASCII format and is hereby incorporated by reference in its entirety. Said ASCII copy, created on February 20, 2014, is named N2067-7000WO_SL.txt and is 228,605 bytes in size.

FIELD OF THE INVENTION

[001] The present invention relates generally to the use of T cells engineered to express a Chimeric Antigen Receptor (CAR) to treat a disease associated with expression of Epidermal Growth Factor Receptor III.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[002] Although the central nervous system (CNS) is often considered to be immunologically privileged (Okada *et al.*, 2009, Crit Rev Immunol 29:1-42), recent vaccine studies in patients with malignant glioma demonstrated positive results (Aguilar *et al.*, 2012, Curr Treat Options Oncol 13:437-450; Ruzevick, *et al.*, 2012, Neurosurg Clin N Am 23:459-470;15; and Okada *et al.*, 2011, J Clin Oncol 29:330-336). However, vaccine efficacy, which relies on intact host-immune activity, can suffer from systemic suppression of immunity due to

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

tumor expression of immunosuppressive cytokines as well as chemo- and radiotherapy. On the other hand, adoptive cell transfer (ACT) therapy with autologous T-cells, especially with T-cells transduced with Chimeric Antigen Receptors (CARs), has shown promise in pilot hematologic cancer trials (Kalos *et al.*, 2011, *Sci Transl Med* 3(95):95ra73; and Porter *et al.*, 2011, *New England Journal of Medicine* 365:725-733).

[003] Enhanced expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) is frequently detected in a variety of carcinomas, including breast, lung, head and neck, as well as glioblastoma. Spontaneous rearrangements within the EGF receptor gene were first identified in primary human glioblastoma tumors, and in nearly all cases the alterations have been reported in tumors with EGFR amplification. Three different types of mutants result from these rearrangements. The most common of these is the Type III EGF deletion-mutant receptor (EGFRvIII), which is characterized by the deletion of exons 2-7 in the EGFR mRNA. These deletions correspond to cDNA nucleotides 275-1075, which encode amino acids 6-276, presumably through alternative splicing or rearrangements. Deletion of 801 bp within the extracellular domain of the EGFR gene causes an in-frame truncation of the normal EGFR protein, resulting in a 145-kDa receptor, thereby creating a tumor specific and immunogenic epitope (reviewed in Hatanpaa *et al.*, 2010, *Neoplasia* 12:675- 684; Mukasa *et al.*, 2010, *Proc Natl Acad Sci USA* 107:2616-2621). EGFRvIII expression has been seen in many tumor types, including glioblastoma multiforme (GBM), but is rarely observed in normal tissue. EGFRvIII is expressed in 24% to 67% of GBM cases, and in patients surviving ≥ 1 year, the expression of EGFRvIII is an independent negative prognostic indicator (Heimberger *et al.*, 2005, *Clin.Cancer Res.* 11:1462-1466; Heimberger *et al.*, 2005, *J Transl. Med* 3:38).

SUMMARY OF THE INVENTION

[004] The invention provides, among other things, compositions and methods for controlling an immune response in patients by providing optimized and/or humanized antibodies or antibody fragments (e.g., scFv) that bind Epidermal Growth Factor Receptor III (EGFRvIII) integrated into a Chimeric Antigen Receptor (CAR) construct. In some embodiments, the invention pertains to the use of T cells engineered to express an antibody or antibody fragment that bind EGFRvIII, e.g., a humanized antibody or antibody fragment that

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

binds EGFRvIII, integrated into a CAR to treat a cancer associated with expression of EGFRvIII. In some aspects, the invention pertains to adoptive cell transfer that may be particularly suitable for patients with glioma because the specificity, number, and functional phenotype of cells prepared *ex vivo* can be manipulated and controlled far better than native T-cells induced by *in vivo* immunization.

[005] Accordingly, in one aspect, the invention pertains to an isolated nucleic acid molecule encoding a chimeric antigen receptor (CAR), wherein the CAR comprises an antibody or antibody fragment which includes an anti-EGFRvIII binding domain (e.g., a humanized antibody or antibody fragment that specifically binds to EGFRvIII), a transmembrane domain, and an intracellular signaling domain (e.g., an intracellular signaling domain comprising a costimulatory domain and/or a primary signaling domain). In one embodiment, the CAR comprises an antibody or antibody fragment which includes an anti-EGFRvIII binding domain described herein (e.g., a humanized antibody or antibody fragment that specifically binds to EGFRvIII as described herein), a transmembrane domain described herein, and an intracellular signaling domain described herein (e.g., an intracellular signaling domain comprising a costimulatory domain and/or a primary signaling domain).

[006] In one embodiment, the encoded anti-EGFRvIII binding domain comprises one or more (e.g., all three) light chain complementary determining region 1 (LC CDR1), light chain complementary determining region 2 (LC CDR2), and light chain complementary determining region 3 (LC CDR3) of an anti-EGFRvIII binding domain described herein, and one or more (e.g., all three) heavy chain complementary determining region 1 (HC CDR1), heavy chain complementary determining region 2 (HC CDR2), and heavy chain complementary determining region 3 (HC CDR3) of an anti-EGFRvIII binding domain described herein, e.g., a humanized anti-EGFRvIII binding domain comprising one or more, e.g., all three, LC CDRs and one or more, e.g., all three, HC CDRs. In one embodiment, the encoded anti-EGFRvIII binding domain comprises a light chain variable region described herein (e.g., in Table 2 or SEQ ID NO:11) and/or a heavy chain variable region described herein (e.g., in Table 2 or SEQ ID NO:11). In one embodiment, the encoded anti-EGFRvIII binding domain is a scFv comprising a light chain and a heavy chain of an amino acid sequence of Table 2 or SEQ ID NO:11. In an embodiment, the anti-EGFRvIII binding domain (e.g., an scFv) comprises: a light chain variable region comprising an amino acid sequence having at least one, two or three

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

modifications (e.g., substitutions) but not more than 30, 20 or 10 modifications (e.g., substitutions) of an amino acid sequence of a light chain variable region provided in Table 2 or SEQ ID NO:11, or a sequence with 95-99% identity with an amino acid sequence of Table 2 or SEQ ID NO:11; and/or a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence having at least one, two or three modifications (e.g., substitutions) but not more than 30, 20 or 10 modifications (e.g., substitutions) of an amino acid sequence of a heavy chain variable region provided in Table 2 or SEQ ID NO:11, or a sequence with 95-99% identity to an amino acid sequence of Table 2 or SEQ ID NO:11. In one embodiment, the anti-EGFRvIII binding domain comprises a sequence selected from a group consisting of SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:80, and SEQ ID NO:86, or a sequence with 95-99% identity thereof. In one embodiment, the nucleic acid sequence encoding the anti-EGFRvIII binding domain comprises a sequence of SEQ ID NO:68. In one embodiment, the nucleic acid sequence encoding the anti-EGFRvIII binding domain comprises a sequence selected from a group consisting of SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:81, and SEQ ID NO:98, or a sequence with 95-99% identity thereof. In one embodiment, the encoded anti-EGFRvIII binding domain is a scFv, and a light chain variable region comprising an amino acid sequence described herein, e.g., in Table 2 or SEQ ID NO:11, is attached to a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence described herein, e.g., in Table 2 or SEQ ID NO:11, via a linker, e.g., a linker described herein. In one embodiment, the encoded anti-EGFRvIII binding domain includes a (Gly₄-Ser)_n linker, wherein n is 1, 2, 3, 4, 5, or 6, preferably 4 (SEQ ID NO: 110). The light chain variable region and heavy chain variable region of a scFv can be, e.g., in any of the following orientations: light chain variable region-linker-heavy chain variable region or heavy chain variable region-linker-light chain variable region.

[007] In one embodiment, the encoded CAR includes a transmembrane domain that comprises a transmembrane domain of a protein selected from the group consisting of the alpha, beta or zeta chain of the T-cell receptor, CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 and CD154. In one embodiment, the encoded transmembrane domain comprises a sequence of SEQ ID NO: 15. In one embodiment, the encoded transmembrane domain comprises an amino acid sequence

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

having at least one, two or three modifications (e.g., substitutions) but not more than 20, 10 or 5 modifications (e.g., substitutions) of an amino acid sequence of SEQ ID NO:15, or a sequence with 95-99% identity to an amino acid sequence of SEQ ID NO:15. In one embodiment, the nucleic acid sequence encoding the transmembrane domain comprises a sequence of SEQ ID NO:8, or a sequence with 95-99% identity thereof.

[008] In one embodiment, the encoded anti-EGFRvIII binding domain is connected to the transmembrane domain by a hinge region, e.g., a hinge region described herein. In one embodiment, the encoded hinge region comprises SEQ ID NO:14 or SEQ ID NO:104 or SEQ ID NO:106 or SEQ ID NO:108, or a sequence with 95-99% identity thereof. In one embodiment, the nucleic acid sequence encoding the hinge region comprises a sequence of SEQ ID NO:7, or SEQ ID NO:105 or SEQ ID NO:107 or SEQ ID NO:109 or a sequence with 95-99% identity thereof.

[009] In one embodiment, the isolated nucleic acid molecule further comprises a sequence encoding a costimulatory domain, e.g., a costimulatory domain described herein. In one embodiment, the encoded costimulatory domain comprises a functional signaling domain of a protein selected from the group consisting of OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), and 4-1BB (CD137). In one embodiment, the encoded costimulatory domain comprises a sequence of SEQ ID NO:16. In one embodiment, the encoded costimulatory domain comprises a sequence of SEQ ID NO:102. In one embodiment, the encoded costimulatory domain comprises an amino acid sequence having at least one, two or three modifications (e.g., substitutions) but not more than 20, 10 or 5 modifications (e.g., substitutions) of an amino acid sequence of SEQ ID NO:16 or SEQ ID NO:102, or a sequence with 95-99% identity to an amino acid sequence of SEQ ID NO:16 or SEQ ID NO:102. In one embodiment, the nucleic acid sequence encoding the costimulatory domain comprises a sequence of SEQ ID NO:9, or a sequence with 95-99% identity thereof.

[0010] In one embodiment, the isolated nucleic acid molecule further comprises a sequence encoding an intracellular signaling domain, e.g., an intracellular signaling domain described herein. In one embodiment, the encoded intracellular signaling domain comprises a functional signaling domain of 4-1BB and/or a functional signaling domain of CD3 zeta. In one embodiment, the encoded intracellular signaling domain comprises a functional signaling

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

domain of CD27 and/or a functional signaling domain of CD3 zeta. In one embodiment, the encoded intracellular signaling domain comprises the sequence of SEQ ID NO: 16 or SEQ ID NO: 102 and/or the sequence of SEQ ID NO: 17 or SEQ ID NO:99. In one embodiment, the intracellular signaling domain comprises an amino acid sequence having at least one, two or three modifications (e.g., substitutions) but not more than 20, 10 or 5 modifications (e.g., substitutions) of an amino acid sequence of SEQ ID NO:16 and/or an amino acid sequence of SEQ ID NO:17 or SEQ ID NO:99, or a sequence with 95-99% identity to an amino acid sequence of SEQ ID NO:16 or SEQ ID NO:102 and/or an amino acid sequence of SEQ ID NO:17 or SEQ ID NO:99. In one embodiment, the encoded intracellular signaling domain comprises the sequence of SEQ ID NO: 16 or SEQ ID NO:102 and the sequence of SEQ ID NO: 17 or SEQ ID NO:99, wherein the sequences comprising the intracellular signaling domain are expressed in the same frame and as a single polypeptide chain. In one embodiment, the nucleic acid sequence encoding the intracellular signaling domain comprises a sequence of SEQ ID NO:9 or SEQ ID NO:103, or a sequence with 95-99% identity thereof, and/or a sequence of SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:100, or a sequence with 95-99% identity thereof.

[0011] In another aspect, the invention pertains to an isolated nucleic acid molecule encoding a CAR construct comprising a leader sequence, e.g., a leader sequence described herein, e.g., of SEQ ID NO: 13, an anti-EGFRvIII binding domain described herein, e.g., an anti-EGFRvIII binding domain comprising a LC CDR1, a LC CDR2, a LC CDR3, a HC CDR1, a HC CDR2 and a HC CDR3 described herein, e.g., an anti-EGFRvIII binding domain described in Table 2 or SEQ ID NO:11, or a sequence with 95-99% identity thereof, a hinge region described herein, e.g., of SEQ ID NO:14 or SEQ ID NO:104 or SEQ ID NO:106 or SEQ ID NO:108, a transmembrane domain described herein, e.g., having a sequence of SEQ ID NO: 15, and an intracellular signaling domain, e.g., an intracellular signaling domain described herein. In one embodiment, the encoded intracellular signaling domain comprises a costimulatory domain, e.g., a costimulatory domain described herein, e.g., a 4-1BB costimulatory domain having a sequence of SEQ ID NO:16, and/or a primary signaling domain, e.g., a primary signaling domain described herein, e.g., a CD3 zeta stimulatory domain having a sequence of SEQ ID NO:17 or SEQ ID NO:99. In one embodiment, the encoded intracellular signaling domain comprises a costimulatory domain, e.g., a costimulatory domain described herein, e.g., a CD27 costimulatory domain having a sequence of SEQ ID NO:102,

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

and/or a primary signaling domain, e.g., a primary signaling domain described herein, e.g., a CD3 zeta stimulatory domain having a sequence of SEQ ID NO:17 or SEQ ID NO:99. In one embodiment, the encoded intracellular signaling domain comprises a costimulatory domain, e.g., a costimulatory domain described herein, e.g., a 4-1BB costimulatory domain having a sequence of SEQ ID NO:16, and a primary signaling domain, e.g., a primary signaling domain described herein, e.g., a CD3 zeta stimulatory domain having a sequence of SEQ ID NO:17 or SEQ ID NO:99. In one embodiment, the encoded intracellular signaling domain comprises a costimulatory domain, e.g., a costimulatory domain described herein, e.g., a CD27 costimulatory domain having a sequence of SEQ ID NO:102, and a primary signaling domain, e.g., a primary signaling domain described herein, e.g., a CD3 zeta stimulatory domain having a sequence of SEQ ID NO:17 or SEQ ID NO:99. In one embodiment, the isolated nucleic acid molecule encoding the CAR construct includes a leader sequence encoded by the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:6, or a sequence with 95-99% identity thereto. In one embodiment, the isolated nucleic acid molecule encoding the CAR construct includes an anti-EGFR binding domain sequence encoded by the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:81, or SEQ ID NO:98, or a sequence with 95-99% identity thereto. In one embodiment, the isolated nucleic acid molecule encoding the CAR construct includes an anti-EGFR binding domain sequence encoded by the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:69, or a sequence with 95-99% identity thereto. In one embodiment, the isolated nucleic acid molecule encoding the CAR construct includes an anti-EGFR binding domain sequence encoded by the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:4, or a sequence with 95-99% identity thereto. In one embodiment, the isolated nucleic acid molecule encoding the CAR construct includes a transmembrane sequence encoded by the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:8, or a sequence with 95-99% identity thereto. In one embodiment, the isolated nucleic acid molecule encoding the CAR construct includes an intracellular signaling domain sequence encoded by the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:9, or a sequence with 95-99% identity thereto and/or a nucleic acid sequence of SEQ ID NO:10, or a sequence with 95-99% identity thereto.

[0012] In one embodiment, the isolated nucleic acid molecule comprises (e.g., consists of) a nucleic acid encoding a CAR amino acid sequence of SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:85,

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

or SEQ ID NO:90, or an amino acid sequence having at least one, two, three, four, five, 10, 15, 20 or 30 modifications (e.g., substitutions) but not more than 60, 50 or 40 modifications (e.g., substitutions) of an amino acid sequence of SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:85, or SEQ ID NO:90, or an amino acid sequence having 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identity to an amino acid sequence of SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:85, or SEQ ID NO:90. In one embodiment, the isolated nucleic acid molecule comprises (e.g., consists of) a nucleic acid encoding a CAR amino acid sequence of SEQ ID NO:1, or SEQ ID NO:2, or an amino acid sequence having at least one, two, three, four, five, 10, 15, 20 or 30 modifications (e.g., substitutions) but not more than 60, 50 or 40 modifications (e.g., substitutions) of an amino acid sequence of SEQ ID NO:1, or SEQ ID NO:2, or an amino acid sequence having 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identity to an amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2.

[0013] In one embodiment, the isolated nucleic acid molecule comprises (e.g., consists of) a nucleic acid sequence of SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:84, or SEQ ID NO:89 or a nucleic acid sequence having 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identity to a nucleic acid sequence of SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:84, or SEQ ID NO:89. In one embodiment, the isolated nucleic acid molecule comprises (e.g., consists of) a nucleic acid sequence of SEQ ID NO:18, or SEQ ID NO:19, or a nucleic acid sequence having 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identity to a nucleic acid sequence of SEQ ID NO:18 or SEQ ID NO:19.

[0014] In one aspect, the invention pertains to an isolated nucleic acid molecule encoding an anti-EGFRvIII binding domain, wherein the anti-EGFRvIII binding domain comprises one or more (e.g., all three) light chain complementary determining region 1 (LC CDR1), light chain complementary determining region 2 (LC CDR2), and light chain complementary determining region 3 (LC CDR3) of an anti-EGFRvIII binding domain described herein, and one or more (e.g., all three) heavy chain complementary determining region 1 (HC CDR1), heavy chain complementary determining region 2 (HC CDR2), and heavy chain

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

complementary determining region 3 (HC CDR3) of an anti-EGFRvIII binding domain described herein, e.g., a humanized anti-EGFRvIII binding domain comprising one or more, e.g., all three, LC CDRs and one or more, e.g., all three, HC CDRs. In one embodiment, the encoded anti-EGFRvIII binding domain comprises a light chain variable region described herein (e.g., in SEQ ID NO:38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 or 80) and/or a heavy chain variable region described herein (e.g., in SEQ ID NO:38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 or 80). In one embodiment, the encoded anti-EGFRvIII binding domain is a scFv comprising a light chain and a heavy chain of an amino acid sequence of in SEQ ID NO:38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 or 80. In an embodiment, the anti-EGFRvIII binding domain (e.g., an scFv) comprises: a light chain variable region comprising an amino acid sequence having at least one, two or three modifications (e.g., substitutions) but not more than 30, 20 or 10 modifications (e.g., substitutions) of an amino acid sequence of a light chain variable region provided in SEQ ID NO:38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 or 80, or a sequence with 95-99% identity with an amino acid sequence of SEQ ID NO:38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 or 80; and/or a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence having at least one, two or three modifications (e.g., substitutions) but not more than 30, 20 or 10 modifications (e.g., substitutions) of an amino acid sequence of a heavy chain variable region provided in SEQ ID NO:38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 or 80, or a sequence with 95-99% identity to an amino acid sequence in SEQ ID NO:38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 or 80. In one embodiment, the anti-EGFRvIII binding domain comprises a sequence selected from a group consisting of SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:80, and SEQ ID NO:86, or a sequence with 95-99% identity thereof. In one embodiment, the nucleic acid sequence encoding the anti-EGFRvIII binding domain comprises a sequence selected from a group consisting of SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:81, and SEQ ID NO:98, or a sequence with 95-99% identity thereof. In one embodiment, the encoded anti-EGFRvIII binding domain is a scFv, and a light chain variable region comprising an amino acid sequence described herein, e.g., in Table 2, is attached to a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence described herein, e.g., in Table 2, via a linker, e.g., a linker described herein. In one embodiment, the encoded anti-EGFRvIII binding domain includes a (Gly₄-Ser)_n linker, wherein n is 1, 2, 3, 4, 5, or 6, preferably 4 (SEQ ID NO: 110). The light chain variable region

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

and heavy chain variable region of a scFv can be, e.g., in any of the following orientations: light chain variable region-linker-heavy chain variable region or heavy chain variable region-linker-light chain variable region.

[0015] In another aspect, the invention pertains to an isolated polypeptide molecule encoded by the nucleic acid molecule. In one embodiment, the isolated polypeptide molecule comprises a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:85 and SEQ ID NO:90, or a sequence with 95-99% identity thereof. In one embodiment, the isolated polypeptide comprises a sequence of SEQ ID NO:73, or a sequence with 95-99% identity thereof. In one embodiment, the isolated polypeptide comprises a sequence of SEQ ID NO:79, or a sequence with 95-99% identity thereof.

[0016] In another aspect, the invention pertains to an isolated chimeric antigen receptor (CAR) molecule comprising an anti-EGFRvIII binding domain (e.g., a humanized antibody or antibody fragment that specifically binds to EGFRvIII), a transmembrane domain, and an intracellular signaling domain (e.g., an intracellular signaling domain comprising a costimulatory domain and/or a primary signaling domain). In one embodiment, the CAR comprises an antibody or antibody fragment which includes an anti-EGFRvIII binding domain described herein (e.g., a humanized antibody or antibody fragment that specifically binds to EGFRvIII as described herein), a transmembrane domain described herein, and an intracellular signaling domain described herein (e.g., an intracellular signaling domain comprising a costimulatory domain and/or a primary signaling domain described herein).

[0017] In one embodiment, the anti-EGFRvIII binding domain comprises one or more (e.g., all three) light chain complementary determining region 1 (LC CDR1), light chain complementary determining region 2 (LC CDR2), and light chain complementary determining region 3 (LC CDR3) of an anti-EGFRvIII binding domain described herein, and one or more (e.g., all three) heavy chain complementary determining region 1 (HC CDR1), heavy chain complementary determining region 2 (HC CDR2), and heavy chain complementary determining region 3 (HC CDR3) of an anti-EGFRvIII binding domain described herein, e.g., a humanized anti-EGFRvIII binding domain comprising one or more, e.g., all three, LC CDRs and one or more, e.g., all three, HC CDRs. In one embodiment, the anti-EGFRvIII binding

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

domain comprises a light chain variable region described herein (e.g., in Table 2 or SEQ ID NO:11) and/or a heavy chain variable region described herein (e.g., in Table 2 or SEQ ID NO:11). In one embodiment, the anti-EGFRvIII binding domain is a scFv comprising a light chain and a heavy chain of an amino acid sequence listed in Table 2 or SEQ ID NO:11. In an embodiment, the anti-EGFRvIII binding domain (e.g., an scFv) comprises: a light chain variable region comprising an amino acid sequence having at least one, two or three modifications (e.g., substitutions) but not more than 30, 20 or 10 modifications (e.g., substitutions) of an amino acid sequence of a light chain variable region provided in Table 2 or SEQ ID NO:11, or a sequence with 95-99% identity with an amino acid sequence provided in Table 2 or SEQ ID NO:11; and/or a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence having at least one, two or three modifications (e.g., substitutions) but not more than 30, 20 or 10 modifications (e.g., substitutions) of an amino acid sequence of a heavy chain variable region provided in Table 2 or SEQ ID NO:11, or a sequence with 95-99% identity to an amino acid sequence provided in Table 2 or SEQ ID NO:11. In one embodiment, the anti-EGFRvIII binding domain comprises a sequence selected from a group consisting of SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:80, and SEQ ID NO:86, or a sequence with 95-99% identity thereof. In one embodiment, the anti-EGFRvIII binding domain is a scFv, and a light chain variable region comprising an amino acid sequence described herein, e.g., in Table 2 or SEQ ID NO:11, is attached to a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence described herein, e.g., in Table 2 or SEQ ID NO:11, via a linker, e.g., a linker described herein. In one embodiment, the anti-EGFRvIII binding domain includes a (Gly₄-Ser)_n linker, wherein n is 1, 2, 3, 4, 5, or 6, preferably 4 (SEQ ID NO: 110). The light chain variable region and heavy chain variable region of a scFv can be, e.g., in any of the following orientations: light chain variable region-linker-heavy chain variable region or heavy chain variable region-linker-light chain variable region.

[0018] In one embodiment, the isolated CAR molecule comprises a transmembrane domain of a protein selected from the group consisting of the alpha, beta or zeta chain of the T-cell receptor, CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 and CD154. In one embodiment, the transmembrane

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

domain comprises a sequence of SEQ ID NO:15. In one embodiment, the transmembrane domain comprises an amino acid sequence having at least one, two or three modifications (e.g., substitutions) but not more than 20, 10 or 5 modifications (e.g., substitutions) of an amino acid sequence of SEQ ID NO:15, or a sequence with 95-99% identity to an amino acid sequence of SEQ ID NO:15.

[0019] In one embodiment, the anti-EGFRvIII binding domain is connected to the transmembrane domain by a hinge region, e.g., a hinge region described herein. In one embodiment, the encoded hinge region comprises SEQ ID NO:14 or SEQ ID NO:104 or SEQ ID NO:106 or SEQ ID NO:108, or a sequence with 95-99% identity thereof.

[0020] In one embodiment, the isolated CAR molecule further comprises a sequence encoding a costimulatory domain, e.g., a costimulatory domain described herein. In one embodiment, the costimulatory domain comprises a functional signaling domain of a protein selected from the group consisting of OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) and 4-1BB (CD137). In one embodiment, the costimulatory domain comprises a sequence of SEQ ID NO:16 or SEQ ID NO:102. In one embodiment, the costimulatory domain comprises an amino acid sequence having at least one, two or three modifications (e.g., substitutions) but not more than 20, 10 or 5 modifications (e.g., substitutions) of an amino acid sequence of SEQ ID NO:16 or SEQ ID NO:102, or a sequence with 95-99% identity to an amino acid sequence of SEQ ID NO:16 or SEQ ID NO:102. In one embodiment, the isolated CAR molecule further comprises a sequence encoding an intracellular signaling domain, e.g., an intracellular signaling domain described herein. In one embodiment, the intracellular signaling domain comprises a functional signaling domain of 4-1BB or CD27 and/or a functional signaling domain of CD3 zeta. In one embodiment, the intracellular signaling domain comprises the sequence of SEQ ID NO: 16 or SEQ ID NO:102 and/or the sequence of SEQ ID NO:17. In one embodiment, the intracellular signaling domain comprises the sequence of SEQ ID NO: 16 or SEQ ID NO:102 and/or the sequence of SEQ ID NO:99. In one embodiment, the intracellular signaling domain comprises an amino acid sequence having at least one, two or three modifications (e.g., substitutions) but not more than 20, 10 or 5 modifications (e.g., substitutions) of an amino acid sequence of SEQ ID NO:16 or SEQ ID NO:102 and/or an amino acid sequence of SEQ ID NO:17 or SEQ ID NO:99, or a sequence with 95-99% identity to an amino acid sequence of SEQ ID NO:16 or SEQ ID NO:102 and/or

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

an amino acid sequence of SEQ ID NO:17 or SEQ ID NO:99. In one embodiment, the intracellular signaling domain comprises the sequence of SEQ ID NO: 16 or SEQ ID NO:102 and the sequence of SEQ ID NO: 17 or SEQ ID NO:99, wherein the sequences comprising the intracellular signaling domain are expressed in the same frame and as a single polypeptide chain.

[0021] In one embodiment, the isolated CAR molecule further comprises a leader sequence, e.g., a leader sequence described herein. In one embodiment, the leader sequence comprises an amino acid sequence of SEQ ID NO: 13, or a sequence with 95-99% identity to an amino acid sequence of SEQ ID NO:13.

[0022] In another aspect, the invention pertains to an isolated CAR molecule comprising a leader sequence, e.g., a leader sequence described herein, e.g., a leader sequence of SEQ ID NO: 13, or having 95-99% identity thereof, an anti-EGFRvIII binding domain described herein, e.g., an anti-EGFRvIII binding domain comprising a LC CDR1, a LC CDR2, a LC CDR3, a HC CDR1, a HC CDR2 and a HC CDR3 described herein, e.g., an anti-EGFRvIII binding domain described in Table 2 or SEQ ID NO:11, or a sequence with 95-99% identity thereof, a hinge region, e.g., a hinge region described herein, e.g., a hinge region of SEQ ID NO:14 or SEQ ID NO:104 or SEQ ID NO:106 or SEQ ID NO:108, or having 95-99% identity thereof, a transmembrane domain, e.g., a transmembrane domain described herein, e.g., a transmembrane domain having a sequence of SEQ ID NO: 15 or a sequence having 95-99% identity thereof, an intracellular signaling domain, e.g., an intracellular signaling domain described herein (e.g., an intracellular signaling domain comprising a costimulatory domain and/or a primary signaling domain). In one embodiment, the intracellular signaling domain comprises a costimulatory domain, e.g., a costimulatory domain described herein, e.g., a 4-1BB costimulatory domain having a sequence of SEQ ID NO:16 or a CD27 costimulatory domain having a sequence of SEQ ID NO:102, or having 95-99% identity thereof, and/or a primary signaling domain, e.g., a primary signaling domain described herein, e.g., a CD3 zeta stimulatory domain having a sequence of SEQ ID NO:17 or SEQ ID NO:99, or having 95-99% identity thereof. In one embodiment, the intracellular signaling domain comprises a costimulatory domain, e.g., a costimulatory domain described herein, e.g., a 4-1BB costimulatory domain having a sequence

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

of SEQ ID NO:16 or a CD27 costimulatory domain having a sequence of SEQ ID NO:102, and/ a primary signaling domain, e.g., a primary signaling domain described herein, e.g., a CD3 zeta stimulatory domain having a sequence of SEQ ID NO:17 or SEQ ID NO:99.

[0023] In one embodiment, the isolated CAR molecule comprises (e.g., consists of) an amino acid sequence of SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:85, or SEQ ID NO:90, or an amino acid sequence having at least one, two, three, four, five, 10, 15, 20 or 30 modifications (e.g., substitutions) but not more than 60, 50 or 40 modifications (e.g., substitutions) of an amino acid sequence of SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:85, or SEQ ID NO:90, or an amino acid sequence having 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identity to an amino acid sequence of SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:85, or SEQ ID NO:90. In one embodiment, the isolated CAR molecule comprises (e.g., consists of) an amino acid sequence of SEQ ID NO:1, or SEQ ID NO:2, or an amino acid sequence having at least one, two, three, four, five, 10, 15, 20 or 30 modifications (e.g., substitutions) but not more than 60, 50 or 40 modifications (e.g., substitutions) of an amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2, or an amino acid sequence having 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identity to an amino acid sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2. In one embodiment, the isolated CAR molecule comprises (e.g., consists of) an amino acid sequence of SEQ ID NO:73, or an amino acid sequence having at least one, two, three, four, five, 10, 15, 20 or 30 modifications (e.g., substitutions) but not more than 60, 50 or 40 modifications (e.g., substitutions) of an amino acid sequence of SEQ ID NO:73, or an amino acid sequence having 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identity to an amino acid sequence of SEQ ID NO:73. In one embodiment, the isolated CAR molecule comprises (e.g., consists of) an amino acid sequence of SEQ ID NO:79, or an amino acid sequence having at least one, two, three, four, five, 10, 15, 20 or 30 modifications (e.g., substitutions) but not more than 60, 50 or 40 modifications (e.g., substitutions) of an amino acid sequence of SEQ ID NO:79, or an amino acid sequence having 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identity to an amino acid sequence of SEQ ID NO:79.

[0024] In one aspect, the invention pertains to an anti-EGFRvIII binding domain comprising one or more (e.g., all three) light chain complementary determining region 1 (LC

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

CDR1), light chain complementary determining region 2 (LC CDR2), and light chain complementary determining region 3 (LC CDR3) of an anti-EGFRvIII binding domain described herein, and one or more (e.g., all three) heavy chain complementary determining region 1 (HC CDR1), heavy chain complementary determining region 2 (HC CDR2), and heavy chain complementary determining region 3 (HC CDR3) of an anti-EGFRvIII binding domain described herein, e.g., a humanized anti-EGFRvIII binding domain comprising one or more, e.g., all three, LC CDRs and one or more, e.g., all three, HC CDRs. In one embodiment, the anti-EGFRvIII binding domain comprises a light chain variable region described herein (e.g., in SEQ ID NO:38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 or 80) and/or a heavy chain variable region described herein (e.g. in SEQ ID NO:38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 or 80). In one embodiment, the anti-EGFRvIII binding domain is a scFv comprising a light chain and a heavy chain of an amino acid sequence of in SEQ ID NO:38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 or 80. In an embodiment, the anti-EGFRvIII binding domain (e.g., an scFv) comprises: a light chain variable region comprising an amino acid sequence having at least one, two or three modifications (e.g., substitutions) but not more than 30, 20 or 10 modifications (e.g., substitutions) of an amino acid sequence of a light chain variable region provided, in SEQ ID NO:38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 or 80 or a sequence with 95-99% identity with an amino acid sequence in SEQ ID NO:38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 or 80; and/or a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence having at least one, two or three modifications (e.g., substitutions) but not more than 30, 20 or 10 modifications (e.g., substitutions) of an amino acid sequence of a heavy chain variable region provided in SEQ ID NO:38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 or 80, or a sequence with 95-99% identity to an amino acid sequence in SEQ ID NO:38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 or 80. In one embodiment, the anti-EGFRvIII binding domain comprises a sequence selected from a group consisting of SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:80, and SEQ ID NO:86, or a sequence with 95-99% identity thereof. In one embodiment, the anti-EGFRvIII binding domain is a scFv, and a light chain variable region comprising an amino acid sequence described herein, e.g., in Table 2, is attached to a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence described herein, e.g., in Table 2, via a linker, e.g., a linker described herein. In one embodiment, the anti-EGFRvIII binding domain includes a (Gly₄-Ser)_n linker, wherein n is 1, 2, 3, 4, 5, or 6, preferably 4 (SEQ ID NO: 110). The light chain variable region and heavy

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

chain variable region of a scFv can be, e.g., in any of the following orientations: light chain variable region-linker-heavy chain variable region or heavy chain variable region-linker-light chain variable region.

[0025] In another aspect, the invention pertains to a vector comprising a nucleic acid molecule described herein, e.g., a nucleic acid molecule encoding a CAR described herein. In one embodiment, the vector is selected from the group consisting of a DNA, a RNA, a plasmid, a lentivirus vector, adenoviral vector, or a retrovirus vector.

[0026] In one embodiment, the vector is a lentivirus vector. In one embodiment, the vector further comprises a promoter. In one embodiment, the promoter is an EF-1 promoter. In one embodiment, the EF-1 promoter comprises a sequence of SEQ ID NO: 97.

[0027] In one embodiment, the vector is an in vitro transcribed vector, e.g., a vector that transcribes RNA of a nucleic acid molecule described herein. In one embodiment, the nucleic acid sequence in the vector further comprises a poly(A) tail, e.g., a poly A tail described herein, e.g., comprising about 150 adenosine bases (SEQ ID NO: 111). In one embodiment, the nucleic acid sequence in the vector further comprises a 3'UTR, e.g., a 3' UTR described herein, e.g., comprising at least one repeat of a 3'UTR derived from human beta-globulin.

[0028] In another aspect, the invention pertains to a cell comprising a vector described herein. In one embodiment, the cell is a cell described herein, e.g., a human T cell, e.g., a human T cell described herein. In one embodiment, the human T cell is a CD8+ T cell.

[0029] In another aspect, the invention pertains to a method of making a cell comprising transducing a cell described herein, e.g., a T cell described herein, with a vector of comprising a nucleic acid encoding a CAR, e.g., a CAR described herein.

[0030] The present invention also provides a method of generating a population of RNA-engineered cells, e.g., cells described herein, e.g., T cells, transiently expressing exogenous RNA. The method comprises introducing an in vitro transcribed RNA or synthetic RNA into a cell, where the RNA comprises a nucleic acid encoding a CAR molecule described herein.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

[0031] In another aspect, the invention pertains to a method of providing an anti-tumor immunity in a mammal comprising administering to the mammal an effective amount of a cell expressing a CAR molecule, e.g., a cell expressing a CAR molecule described herein. In one embodiment, the cell is an autologous T cell. In one embodiment, the cell is an allogeneic T cell. In one embodiment, the mammal is a human.

[0032] In another aspect, the invention pertains to a method of treating a mammal having a disease associated with expression of EGFRvIII (*e.g.*, a proliferative disease, a precancerous condition, and a noncancer related indication associated with the expression of EGFRvIII) comprising administering to the mammal an effective amount of the cells expressing a CAR molecule, e.g., a CAR molecule described herein.

[0033] In one embodiment, the disease is a disease described herein. In one embodiment, the disease associated with EGFRvIII is a glioblastoma. In one embodiment, the disease associated with EGFRvIII is a cancer, e.g., a cancer selected from the group consisting of glioblastoma multiforme (GBM), anaplastic astrocytoma, giant cell glioblastoma, gliosarcoma, anaplastic oligodendroglioma, anaplastic ependymoma, choroid plexus carcinoma, anaplastic ganglioglioma, pineoblastoma, medulloepithelioma, ependymoblastoma, medulloblastoma, supratentorial primitive neuroectodermal tumor, atypical teratoid/rhabdoid tumor, lung cancer (*e.g.*, non-small cell lung carcinomas) breast, prostate, ovarian, colorectal and bladder carcinoma and any combination thereof, and metastases of any of the cancers.

[0034] In one embodiment, the cells expressing a CAR molecule, e.g., a CAR molecule described herein, are administered in combination with an agent that increases the efficacy of a cell expressing a CAR molecule, e.g., an agent described herein.

[0035] In one embodiment, the cells expressing a CAR molecule, e.g., a CAR molecule described herein, are administered in combination with an agent that ameliorates one or more side effect associated with administration of a cell expressing a CAR molecule, e.g., an agent described herein.

[0036] In one embodiment, the cells expressing a CAR molecule, e.g., a CAR molecule described herein, are administered in combination with an agent that treats the disease associated with EGFRvIII, e.g., an agent described herein.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

[0037] In one embodiment, the cells expressing a CAR molecule, e.g., a CAR molecule described herein, are administered at a dose and/or dosing schedule described herein.

[0038] In one embodiment, the cells expressing a CAR molecule, e.g., a CAR molecule described herein, are administered as a first line treatment for the disease, e.g., the cancer, e.g., the cancer described herein. In another embodiment, the cells expressing a CAR molecule, e.g., a CAR molecule described herein, are administered as a second, third, fourth line treatment for the disease, e.g., the cancer, e.g., the cancer described herein.

[0039] In another aspect, the invention pertains to the isolated nucleic acid molecule encoding a CAR of the invention, the isolated polypeptide molecule of a CAR of the invention, the vector comprising a CAR of the invention, and the cell comprising a CAR of the invention for use as a medicament, e.g., as described herein.

[0040] In another aspect, the invention pertains to a the isolated nucleic acid molecule encoding a CAR of the invention, the isolated polypeptide molecule of a CAR of the invention, the vector comprising a CAR of the invention, and the cell comprising a CAR of the invention for use in the treatment of a disease expressing EGFRvIII, e.g., a disease expressing EGFRvIII as described herein.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0041] Figures 1A and 1B are a series of schematic diagrams of lentiviral vectors for 3C10-CAR and miR-17-92. Figure 1A depicts the 3C10-CAR expressing vector pELNS-3C10-CAR; and Figure 1B depicts the miR-17-92-expressing lentiviral vector;

[0042] Figures 2A through 2C are a series of images showing the functional expression of lentivirally transduced 3C10-CAR and miR-17-92 in human T cells. CD3+ T cells that were transduced with pELNS-3C10-CAR alone or both pELNS-3C10-CAR and FG12-EF1a-miR-17/92;

[0043] Figures 3A through 3D are a series of images demonstrating that co-expression of miR17-92 in CAR-T-cells confers resistance to suppressive effects of TGF- β and TMZ. CAR-T-cells (open bars) and those co-transduced with miR-17-92 (closed bars) were co-cultured

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

with an APCs expressing EGFRvIII in the presence of indicated concentrations of TGF- β and TMZ;

[0044] Figures 4A and 4B are images depicting robust therapeutic effects of CAR-T-cells in mice bearing U87-EGFRvIII tumors;

[0045] Figures 5A through 5C are a series of images demonstrating that co-transduced miR-17-92 in CAR-T cells confers improved protection against re-challenged glioma cells;

[0046] Figure 6 is an image showing the comparison of the representative EGFRvIII CARs (SEQ ID NOS 1, 121, and 2, respectively, in order of appearance);

[0047] Figure 7 is an image showing that human T-cells transduced with EGFRvIII CARs exhibited specific and potent lysis of EGFRvIII-expressing U87 human GBM cells (U87-EGFRvIII);

[0048] Figure 8 is a graph showing that all anti-EGFRvIII CARTs clear tumor cells, but construct 3C10.BBz CART clears tumors most rapidly by day 7;

[0049] Figure 9 is a table showing the VH and VL sequences of humanized EGFRvIII (SEQ ID NOS 122-127, respectively, in order of appearance);

[0050] Figure 10 is a graph showing in vitro binding of soluble humanized scFv constructs binding to EGFRvIII + cell line;

[0051] Figure 11 is a graph showing in vitro binding of soluble humanized scFv constructs binding to EGFR wild type cell line, with clone 73 (also referred to as CAR6) and clone 74 (also referred to as CAR7) showing a safer profile;

[0052] Figure 12 is a graph of comparing the specificity of murine CAR9 and human CAR10 for EGFRvIII and wild type EGFR in transient transfection of Jurkat cells and detection with Fc fusion proteins;

[0053] Figure 13 is a graph showing primary T cell transduction of donor T cells with the humanized EGFRvIII CAR constructs mCAR19 (control), CAR10, CAR9, and CAR6, stained with saturating amounts of EGFRvIII;

[0054] Figure 14 is a graph showing the luciferase activity of humanized EGFRvIII CAR constructs by BHK-EGFRvIII but not wild type cells;

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

[0055] Figure 15 is a graph showing that the humanized EGFRvIII CAR constructs proliferate in response to U87vIII challenge with no background proliferation to wild type EGFR;

[0056] Figure 16 is a graph showing that the humanized EGFRvIII CAR constructs proliferate in vitro in the presence of U87vIII challenge;

[0057] Figure 17 is a graph showing a 4 hour⁵¹-Chromium release tumor killing assay in which the humanized EGFRvIII CAR construct, 2173 (CAR6) and CAR9 specifically kills EGFRvIII expressing but not wild type EGFR cells; and

[0058] Figure 18 is a graph showing progression of tumor size (cm³, upper left panel) and progression of tumor radiance average (p/s/cm²/sr, upper right panel), and Kaplan-meier survival curve (lower) in vivo in mice treated with CAR+ T cells transduced with the humanized EGFRvIII CAR construct (CAR6).

DETAILED DESCRIPTION

Definitions

[0059] Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which the invention pertains.

[0060] The term “a” and “an” refers to one or to more than one (i.e., to at least one) of the grammatical object of the article. By way of example, “an element” means one element or more than one element.

[0061] The term “about” when referring to a measurable value such as an amount, a temporal duration, and the like, is meant to encompass variations of $\pm 20\%$ or in some instances $\pm 10\%$, or in some instances $\pm 5\%$, or in some instances $\pm 1\%$, or in some instances $\pm 0.1\%$ from the specified value, as such variations are appropriate to perform the disclosed methods.

[0062] The term “Chimeric Antigen Receptor” or alternatively a “CAR” refers to a recombinant polypeptide construct comprising at least an extracellular antigen binding domain, a transmembrane domain and a cytoplasmic signaling domain (also referred to herein as “an

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

intracellular signaling domain”) comprising a functional signaling domain derived from a stimulatory molecule as defined below. In one aspect, the stimulatory molecule is the zeta chain associated with the T cell receptor complex. In one aspect, the cytoplasmic signaling domain further comprises one or more functional signaling domains derived from at least one costimulatory molecule as defined below. In one aspect, the costimulatory molecule is chosen from 4-1BB (i.e., CD137) and/or CD28. In one aspect, the CAR comprises a chimeric fusion protein comprising an extracellular antigen recognition domain, a transmembrane domain and an intracellular signaling domain comprising a functional signaling domain derived from a stimulatory molecule. In one aspect, the CAR comprises a chimeric fusion protein comprising an extracellular antigen recognition domain, a transmembrane domain and an intracellular signaling domain comprising a functional signaling domain derived from a co-stimulatory molecule and a functional signaling domain derived from a stimulatory molecule. In one aspect, the CAR comprises a chimeric fusion protein comprising an extracellular antigen recognition domain, a transmembrane domain and an intracellular signaling domain comprising two functional signaling domains derived from one or more co-stimulatory molecule(s) and a functional signaling domain derived from a stimulatory molecule. In one aspect, the CAR comprises a chimeric fusion protein comprising an extracellular antigen recognition domain, a transmembrane domain and an intracellular signaling domain comprising at least two functional signaling domains derived from one or more co-stimulatory molecule(s) and a functional signaling domain derived from a stimulatory molecule. In one aspect the CAR comprises an optional leader sequence at the amino-terminus (N-ter) of the CAR fusion protein. In one aspect, the CAR further comprises a leader sequence at the N-terminus of the extracellular antigen recognition domain, wherein the leader sequence is optionally cleaved from the antigen recognition domain (e.g., a scFv) during cellular processing and localization of the CAR to the cellular membrane.

[0063] The term “signaling domain” refers to the functional portion of a protein which acts by transmitting information within the cell to regulate cellular activity via defined signaling pathways by generating second messengers or functioning as effectors by responding to such messengers.

[0064] The term “EGFR” refers to any mammalian mature full-length epidermal growth factor receptor, including human and non-human forms. The 1186 amino acid human EGFR is

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

described in Ullrich *et al.*, Nature 309:418-425 (1984)) and GenBank Accession No. AF125253 and SwissProt Acc No P00533-2.

[0065] The term “EGFRvIII” refers to Epidermal growth factor receptor variant III. EGFRvIII is the most common variant of EGFR observed in human tumors but is rarely observed in normal tissue. This protein results from the in-frame deletion of exons 2-7 and the generation of a novel glycine residue at the junction of exons 1 and 8 within the extra-cellular domain of the EGFR, thereby creating a tumor specific epitope. EGFRvIII is expressed in 24% to 67% of GBM, but not in normal tissues. EGFRvIII is also known as type III mutant, delta-EGFR, EGFRde2-7, and ΔEGFR and is described in U.S. Pat. Nos. 6,455,498, 6,127,126, 5,981,725, 5,814,317, 5,710,010, 5,401,828, and 5,212,290. Expression of EGFRvIII may result from a chromosomal deletion, and may also result from aberrant alternative splicing. See Sugawa *et al.*, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. 87:8602-8606.

[0066] The term “antibody,” as used herein, refers to a protein, or polypeptide sequence derived from an immunoglobulin molecule which specifically binds with an antigen. Antibodies can be polyclonal or monoclonal, multiple or single chain, or intact immunoglobulins, and may be derived from natural sources or from recombinant sources. Antibodies can be tetramers of immunoglobulin molecules.

[0067] The term “antibody fragment” refers to at least one portion of an intact antibody, or recombinant variants thereof, and refers to the antigen binding domain, e.g., an antigenic determining variable region of an intact antibody, that is sufficient to confer recognition and specific binding of the antibody fragment to a target, such as an antigen. Examples of antibody fragments include, but are not limited to, Fab, Fab', F(ab')₂, and Fv fragments, scFv antibody fragments, linear antibodies, single domain antibodies such as sdAb (either VL or VH), camelid VHH domains, and multi-specific antibodies formed from antibody fragments. The term “scFv” refers to a fusion protein comprising at least one antibody fragment comprising a variable region of a light chain and at least one antibody fragment comprising a variable region of a heavy chain, wherein the light and heavy chain variable regions are contiguously linked via a short flexible polypeptide linker, and capable of being expressed as a single chain polypeptide, and wherein the scFv retains the specificity of the intact antibody from which it is derived. Unless specified, as used herein an scFv may have the VL and VH variable regions in

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

either order, e.g., with respect to the N-terminal and C-terminal ends of the polypeptide, the scFv may comprise VL-linker-VH or may comprise VH-linker-VL.

[0068] The portion of the CAR composition of the invention comprising an antibody or antibody fragment thereof may exist in a variety of forms where the antigen binding domain is expressed as part of a contiguous polypeptide chain including, for example, a single domain antibody fragment (sdAb), a single chain antibody (scFv) and a humanized antibody (Harlow *et al.*, 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow *et al.*, 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird *et al.*, 1988, Science 242:423-426). In one aspect, the antigen binding domain of a CAR composition of the invention comprises an antibody fragment. In a further aspect, the CAR comprises an antibody fragment that comprises a scFv.

[0069] The term “antibody heavy chain,” refers to the larger of the two types of polypeptide chains present in antibody molecules in their naturally occurring conformations, and which normally determines the class to which the antibody belongs.

[0070] The term “antibody light chain,” refers to the smaller of the two types of polypeptide chains present in antibody molecules in their naturally occurring conformations. Kappa (κ) and lambda (λ) light chains refer to the two major antibody light chain isotypes.

[0071] The term “recombinant antibody” refers to an antibody which is generated using recombinant DNA technology, such as, for example, an antibody expressed by a bacteriophage or yeast expression system. The term should also be construed to mean an antibody which has been generated by the synthesis of a DNA molecule encoding the antibody and which DNA molecule expresses an antibody protein, or an amino acid sequence specifying the antibody, wherein the DNA or amino acid sequence has been obtained using recombinant DNA or amino acid sequence technology which is available and well known in the art.

[0072] The term “antigen” or “Ag” as used herein is defined as a molecule that provokes an immune response. This immune response may involve either antibody production, or the activation of specific immunologically-competent cells, or both. The skilled artisan will understand that any macromolecule, including virtually all proteins or peptides, can serve as an antigen. Furthermore, antigens can be derived from recombinant or genomic DNA. A skilled

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

artisan will understand that any DNA, which comprises a nucleotide sequences or a partial nucleotide sequence encoding a protein that elicits an immune response therefore encodes an “antigen” as that term is used herein. Furthermore, one skilled in the art will understand that an antigen need not be encoded solely by a full length nucleotide sequence of a gene. It is readily apparent that the present invention includes, but is not limited to, the use of partial nucleotide sequences of more than one gene and that these nucleotide sequences are arranged in various combinations to encode polypeptides that elicit the desired immune response. Moreover, a skilled artisan will understand that an antigen need not be encoded by a “gene” at all. It is readily apparent that an antigen can be generated synthesized or can be derived from a biological sample, or might be macromolecule besides a polypeptide. Such a biological sample can include, but is not limited to a tissue sample, a tumor sample, a cell or a fluid with other biological components.

[0073] The term “anti-tumor effect” refers to a biological effect which can be manifested by various means, including but not limited to, e.g., a decrease in tumor volume, a decrease in the number of tumor cells, a decrease in the number of metastases, an increase in life expectancy, decrease in tumor cell proliferation, decrease in tumor cell survival, or amelioration of various physiological symptoms associated with the cancerous condition. An “anti-tumor effect” can also be manifested by the ability of the peptides, polynucleotides, cells and antibodies of the invention in prevention of the occurrence of tumor in the first place.

[0074] The term “autologous” refer to any material derived from the same individual to whom it is later to be re-introduced into the individual.

[0075] The term “allogeneic” refers to any material derived from a different animal of the same species as the individual to whom the material is introduced. Two or more individuals are said to be allogeneic to one another when the genes at one or more loci are not identical. In some aspects, allogeneic material from individuals of the same species may be sufficiently unlike genetically to interact antigenically

[0076] The term “xenogeneic” refers to a graft derived from an animal of a different species.

[0077] The term “cancer” refers to a disease characterized by the rapid and uncontrolled growth of aberrant cells. Cancer cells can spread locally or through the bloodstream and

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

lymphatic system to other parts of the body. Examples of various cancers are described herein and, include but are not limited to, glioblastoma, breast cancer, prostate cancer, ovarian cancer, cervical cancer, skin cancer, pancreatic cancer, colorectal cancer, renal cancer, liver cancer, brain cancer, lymphoma, leukemia, lung cancer and the like.

[0078] The term “disease associated with expression of EGFRvIII” as used herein includes, but is not limited to, a disease associated with expression of EGFRvIII or condition associated with cells which express EGFRvIII including, tumor cells of various cancers such as, e.g., glioblastoma (including glioblastoma stem cells); breast, ovarian, and non-small cell lung carcinomas; head and neck squamous cell carcinoma; medulloblastoma, colorectal cancer, prostate cancer, and bladder carcinoma. Without being bound to a particular theory or mechanism, it is believed that by eliciting an antigen-specific response against EGFRvIII, the CARs disclosed herein provide for one or more of the following: targeting and destroying EGFRvIII-expressing tumor cells, reducing or eliminating tumors, facilitating infiltration of immune cells to the tumor site, and enhancing/extending anti-tumor responses. Because EGFRvIII is not expressed at detectable levels in normal (i.e., non-cancerous) tissue, it is contemplated that the inventive CARs advantageously substantially avoid targeting/destroying normal tissues and cells.

[0079] The term “conservative sequence modifications” is intended to refer to amino acid modifications that do not significantly affect or alter the binding characteristics of the antibody or antibody fragment containing the amino acid sequence. Such conservative modifications include amino acid substitutions, additions and deletions. Modifications can be introduced into an antibody or antibody fragment of the invention by standard techniques known in the art, such as site-directed mutagenesis and PCR-mediated mutagenesis. Conservative amino acid substitutions are ones in which the amino acid residue is replaced with an amino acid residue having a similar side chain. Families of amino acid residues having similar side chains have been defined in the art. These families include amino acids with basic side chains (e.g., lysine, arginine, histidine), acidic side chains (e.g., aspartic acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (e.g., glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine, tryptophan), nonpolar side chains (e.g., alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine), beta-branched side chains (e.g., threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (e.g., tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine). Thus, one or more amino acid

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

residues within a CAR of the invention can be replaced with other amino acid residues from the same side chain family and the altered CAR can be tested using the functional assays described herein.

[0080] The term “stimulation,” refers to a primary response induced by binding of a stimulatory molecule (e.g., a TCR/CD3 complex) with its cognate ligand thereby mediating a signal transduction event, such as, but not limited to, signal transduction via the TCR/CD3 complex. Stimulation can mediate altered expression of certain molecules, such as downregulation of TGF- β , and/or reorganization of cytoskeletal structures, and the like.

[0081] The term “stimulatory molecule,” refers to a molecule expressed by a T cell that provides the primary cytoplasmic signaling sequence(s) that regulate primary activation of the TCR complex in a stimulatory way for at least some aspect of the T cell signaling pathway. In one aspect, the primary signal is initiated by, for instance, binding of a TCR/CD3 complex with an MHC molecule loaded with peptide, and which leads to mediation of a T cell response, including, but not limited to, proliferation, activation, differentiation, and the like. A primary cytoplasmic signaling sequence (also referred to as a “primary signaling domain”) that acts in a stimulatory manner may contain a signaling motif which is known as immunoreceptor tyrosine-based activation motif or ITAM. Examples of an ITAM containing primary cytoplasmic signaling sequence that is of particular use in the invention includes, but is not limited to, those derived from TCR zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (also known as “ICOS”) and CD66d. In a specific CAR of the invention, the intracellular signaling domain in any one or more CARS of the invention comprises an intracellular signaling sequence, e.g., a primary signaling sequence of CD3-zeta. In a specific CAR of the invention, the primary signaling sequence of CD3-zeta is the sequence provided as SEQ ID NO:17 or the equivalent residues from a non-human species, e.g., mouse, rodent, monkey, ape and the like. In a specific CAR of the invention, the primary signaling sequence of CD3-zeta is the sequence provided as SEQ ID NO:99 or the equivalent residues from a non-human species, e.g., mouse, rodent, monkey, ape and the like.

[0082] The term “antigen presenting cell” or “APC” refers to an immune system cell such as an accessory cell (e.g., a B-cell, a dendritic cell, and the like) that displays a foreign antigen complexed with major histocompatibility complexes (MHC's) on its surface. T-cells may

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

recognize these complexes using their T-cell receptors (TCRs). APCs process antigens and present them to T-cells.

[0083] An “intracellular signaling domain,” as the term is used herein, refers to an intracellular portion of a molecule. The intracellular signaling domain generates a signal that promotes an immune effector function of the CAR containing cell, e.g., a CART cell. Examples of immune effector function, e.g., in a CART cell, include cytolytic activity and helper activity, including the secretion of cytokines.

[0084] In an embodiment, the intracellular signaling domain can comprise a primary intracellular signaling domain. Exemplary primary intracellular signaling domains include those derived from the molecules responsible for primary stimulation, or antigen dependent stimulation. In an embodiment, the intracellular signaling domain can comprise a costimulatory intracellular domain. Exemplary costimulatory intracellular signaling domains include those derived from molecules responsible for costimulatory signals, or antigen independent stimulation. For example, in the case of a CART, a primary intracellular signaling domain can comprise a cytoplasmic sequence of a T cell receptor, and a costimulatory intracellular signaling domain can comprise cytoplasmic sequence from co-receptor or costimulatory molecule.

[0085] A primary intracellular signaling domain can comprise a signaling motif which is known as an immunoreceptor tyrosine-based activation motif or ITAM. Examples of ITAM containing primary cytoplasmic signaling sequences include, but are not limited to, those derived from CD3 zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b, and CD66d DAP10 and DAP12.

[0086] The term “zeta” or alternatively “zeta chain”, “CD3-zeta” or “TCR-zeta” is defined as the protein provided as GenBan Acc. No. BAG36664.1, or the equivalent residues from a non-human species, e.g., mouse, rodent, monkey, ape and the like, and a “zeta stimulatory domain” or alternatively a “CD3-zeta stimulatory domain” or a “TCR-zeta stimulatory domain” is defined as the amino acid residues from the cytoplasmic domain of the zeta chain that are sufficient to functionally transmit an initial signal necessary for T cell activation. In one aspect the cytoplasmic domain of zeta comprises residues 52 through 164 of GenBank Acc. No. BAG36664.1 or the equivalent residues from a non-human species, e.g., mouse, rodent,

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

monkey, ape and the like, that are functional orthologs thereof. In one aspect, the “zeta stimulatory domain” or a “CD3-zeta stimulatory domain” is the sequence provided as SEQ ID NO:17. In one aspect, the “zeta stimulatory domain” or a “CD3-zeta stimulatory domain” is the sequence provided as SEQ ID NO:99.

[0087] The term “costimulatory molecule” refers to the cognate binding partner on a T cell that specifically binds with a costimulatory ligand, thereby mediating a costimulatory response by the T cell, such as, but not limited to, proliferation. Costimulatory molecules are cell surface molecules other than antigen receptors or their ligands that are required for an efficient immune response. Costimulatory molecules include, but are not limited to, an MHC class I molecule, BTLA and a Toll ligand receptor, as well as OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) and 4-1BB (CD137).

[0088] A costimulatory intracellular signaling domain can be derived from the intracellular portion of a costimulatory molecule. A costimulatory molecule can be represented in the following protein families: TNF receptor proteins, Immunoglobulin-like proteins, cytokine receptors, integrins, signaling lymphocytic activation molecules (SLAM proteins), and activating NK cell receptors. Examples of such molecules include CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, GITR, CD30, CD40, ICOS, BAFR, HVEM, lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3, and a ligand that specifically binds with CD83, and the like.

[0089] The intracellular signaling domain can comprise the entire intracellular portion, or the entire native intracellular signaling domain, of the molecule from which it is derived, or a functional fragment thereof.

[0090] The term “4-1BB” refers to member of the TNFR superfamily with an amino acid sequence provided as GenBank Acc. No. AAA62478.2, or the equivalent residues from a non-human species, e.g., mouse, rodent, monkey, ape and the like; and a “4-1BB costimulatory domain” is defined as amino acid residues 214-255 of GenBank Acc. No. AAA62478.2, or the equivalent residues from a non-human species, e.g., mouse, rodent, monkey, ape and the like. In one aspect, the “4-1BB costimulatory domain” is the sequence provided as SEQ ID NO:16 or the equivalent residues from a non-human species, e.g., mouse, rodent, monkey, ape and the like.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

[0091] The term “encoding” refers to the inherent property of specific sequences of nucleotides in a polynucleotide, such as a gene, a cDNA, or an mRNA, to serve as templates for synthesis of other polymers and macromolecules in biological processes having either a defined sequence of nucleotides (e.g., rRNA, tRNA and mRNA) or a defined sequence of amino acids and the biological properties resulting therefrom. Thus, a gene, cDNA, or RNA, encodes a protein if transcription and translation of mRNA corresponding to that gene produces the protein in a cell or other biological system. Both the coding strand, the nucleotide sequence of which is identical to the mRNA sequence and is usually provided in sequence listings, and the non-coding strand, used as the template for transcription of a gene or cDNA, can be referred to as encoding the protein or other product of that gene or cDNA.

[0092] Unless otherwise specified, a “nucleotide sequence encoding an amino acid sequence” includes all nucleotide sequences that are degenerate versions of each other and that encode the same amino acid sequence. The phrase nucleotide sequence that encodes a protein or a RNA may also include introns to the extent that the nucleotide sequence encoding the protein may in some version contain an intron(s).

[0093] The term “effective amount” or “therapeutically effective amount” are used interchangeably herein, and refer to an amount of a compound, formulation, material, or composition, as described herein effective to achieve a particular biological result.

[0094] The term “endogenous” refers to any material from or produced inside an organism, cell, tissue or system.

[0095] The term “exogenous” refers to any material introduced from or produced outside an organism, cell, tissue or system.

[0096] The term “expression” refers to the transcription and/or translation of a particular nucleotide sequence driven by a promoter.

[0097] The term “transfer vector” refers to a composition of matter which comprises an isolated nucleic acid and which can be used to deliver the isolated nucleic acid to the interior of a cell. Numerous vectors are known in the art including, but not limited to, linear polynucleotides, polynucleotides associated with ionic or amphiphilic compounds, plasmids, and viruses. Thus, the term “transfer vector” includes an autonomously replicating plasmid or a

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

virus. The term should also be construed to further include non-plasmid and non-viral compounds which facilitate transfer of nucleic acid into cells, such as, for example, a polylysine compound, liposome, and the like. Examples of viral transfer vectors include, but are not limited to, adenoviral vectors, adeno-associated virus vectors, retroviral vectors, lentiviral vectors, and the like.

[0098] The term “expression vector” refers to a vector comprising a recombinant polynucleotide comprising expression control sequences operatively linked to a nucleotide sequence to be expressed. An expression vector comprises sufficient cis-acting elements for expression; other elements for expression can be supplied by the host cell or in an in vitro expression system. Expression vectors include all those known in the art, including cosmids, plasmids (e.g., naked or contained in liposomes) and viruses (e.g., lentiviruses, retroviruses, adenoviruses, and adeno-associated viruses) that incorporate the recombinant polynucleotide.

[0099] The term “lentivirus” refers to a genus of the Retroviridae family. Lentiviruses are unique among the retroviruses in being able to infect non-dividing cells; they can deliver a significant amount of genetic information into the DNA of the host cell, so they are one of the most efficient methods of a gene delivery vector. HIV, SIV, and FIV are all examples of lentiviruses.

[00100] The term “lentiviral vector” refers to a vector derived from at least a portion of a lentivirus genome, including especially a self-inactivating lentiviral vector as provided in Milone *et al.*, Mol. Ther. 17(8): 1453–1464 (2009). Other examples of lentivirus vectors that may be used in the clinic, include but are not limited to, e.g., the LENTIVECTOR® gene delivery technology from Oxford BioMedica, the LENTIMAX™ vector system from Lentigen and the like. Nonclinical types of lentiviral vectors are also available and would be known to one skilled in the art.

[00101] The term “homologous” or “identity” as used herein refers to the subunit sequence identity between two polymeric molecules, e.g., between two nucleic acid molecules, such as, two DNA molecules or two RNA molecules, or between two polypeptide molecules. When a subunit position in both of the two molecules is occupied by the same monomeric subunit; e.g., if a position in each of two DNA molecules is occupied by adenine, then they are homologous or identical at that position. The homology between two sequences is a direct function of the

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

number of matching or homologous positions; e.g., if half (e.g., five positions in a polymer ten subunits in length) of the positions in two sequences are homologous, the two sequences are 50% homologous; if 90% of the positions (e.g., 9 of 10), are matched or homologous, the two sequences are 90% homologous.

[00102] “Humanized” forms of non-human (e.g., murine) antibodies are chimeric immunoglobulins, immunoglobulin chains or fragments thereof (such as Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ or other antigen-binding subsequences of antibodies) which contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. For the most part, humanized antibodies and antibody fragments thereof are human immunoglobulins (recipient antibody or antibody fragment) in which residues from a complementary-determining region (CDR) of the recipient are replaced by residues from a CDR of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat or rabbit having the desired specificity, affinity, and capacity. In some instances, Fv framework region (FR) residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Furthermore, a humanized antibodies/antibody fragment can comprise residues which are found neither in the recipient antibody nor in the imported CDR or framework sequences. These modifications can further refine and optimize antibody or antibody fragment performance. In general, the humanized antibody or antibody fragment thereof will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the CDR regions correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or a significant portion of the FR regions are those of a human immunoglobulin sequence. The humanized antibody or antibody fragment can also comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin. For further details, see Jones *et al.*, Nature, 321: 522-525, 1986; Reichmann *et al.*, Nature, 332: 323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596, 1992.

[00103] The term “human” antibody refers to fully human antibodies as well as effectively human antibodies. “Fully human” refers to an immunoglobulin, such as an antibody or antibody fragment, where the whole molecule is of human origin or consists of an amino acid sequence identical to a human form of the antibody or immunoglobulin. An “effectively human” antibody is an antibody that includes a sufficient number of human amino acid positions such that the antibody does not elicit an immunogenic response in a normal human.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

[00104] The term “isolated” means altered or removed from the natural state. For example, a nucleic acid or a peptide naturally present in a living animal is not “isolated,” but the same nucleic acid or peptide partially or completely separated from the coexisting materials of its natural state is “isolated.” An isolated nucleic acid or protein can exist in substantially purified form, or can exist in a non-native environment such as, for example, a host cell.

[00105] In the context of the present invention, the following abbreviations for the commonly occurring nucleic acid bases are used. “A” refers to adenosine, “C” refers to cytosine, “G” refers to guanosine, “T” refers to thymidine, and “U” refers to uridine.

[00106] The term “operably linked” or “transcriptional control” refers to functional linkage between a regulatory sequence and a heterologous nucleic acid sequence resulting in expression of the latter. For example, a first nucleic acid sequence is operably linked with a second nucleic acid sequence when the first nucleic acid sequence is placed in a functional relationship with the second nucleic acid sequence. For instance, a promoter is operably linked to a coding sequence if the promoter affects the transcription or expression of the coding sequence. Operably linked DNA sequences can be contiguous with each other and, e.g., where necessary to join two protein coding regions, are in the same reading frame.

[00107] The term “parenteral” administration of an immunogenic composition includes, e.g., subcutaneous (s.c.), intravenous (i.v.), intramuscular (i.m.), or intrasternal injection, intratumoral, or infusion techniques.

[00108] The term “nucleic acid” or “polynucleotide” refers to deoxyribonucleic acids (DNA) or ribonucleic acids (RNA) and polymers thereof in either single- or double-stranded form. Unless specifically limited, the term encompasses nucleic acids containing known analogues of natural nucleotides that have similar binding properties as the reference nucleic acid and are metabolized in a manner similar to naturally occurring nucleotides. Unless otherwise indicated, a particular nucleic acid sequence also implicitly encompasses conservatively modified variants thereof (e.g., degenerate codon substitutions), alleles, orthologs, SNPs, and complementary sequences as well as the sequence explicitly indicated. Specifically, degenerate codon substitutions may be achieved by generating sequences in which the third position of one or more selected (or all) codons is substituted with mixed-base and/or deoxyinosine residues

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

(Batzner *et al.*, Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); and Rossolini *et al.*, Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)).

[00109] The terms “peptide,” “polypeptide,” and “protein” are used interchangeably, and refer to a compound comprised of amino acid residues covalently linked by peptide bonds. A protein or peptide must contain at least two amino acids, and no limitation is placed on the maximum number of amino acids that can comprise a protein’s or peptide’s sequence. Polypeptides include any peptide or protein comprising two or more amino acids joined to each other by peptide bonds. As used herein, the term refers to both short chains, which also commonly are referred to in the art as peptides, oligopeptides and oligomers, for example, and to longer chains, which generally are referred to in the art as proteins, of which there are many types. “Polypeptides” include, for example, biologically active fragments, substantially homologous polypeptides, oligopeptides, homodimers, heterodimers, variants of polypeptides, modified polypeptides, derivatives, analogs, fusion proteins, among others. A polypeptide includes a natural peptide, a recombinant peptide, or a combination thereof.

[00110] The term “promoter” refers to a DNA sequence recognized by the synthetic machinery of the cell, or introduced synthetic machinery, required to initiate the specific transcription of a polynucleotide sequence.

[00111] The term “promoter/regulatory sequence” refers to a nucleic acid sequence which is required for expression of a gene product operably linked to the promoter/regulatory sequence. In some instances, this sequence may be the core promoter sequence and in other instances, this sequence may also include an enhancer sequence and other regulatory elements which are required for expression of the gene product. The promoter/regulatory sequence may, for example, be one which expresses the gene product in a tissue specific manner.

[00112] The term “constitutive promoter” refers to a nucleotide sequence which, when operably linked with a polynucleotide which encodes or specifies a gene product, causes the gene product to be produced in a cell under most or all physiological conditions of the cell.

[00113] The term “inducible promoter” refers to a nucleotide sequence which, when operably linked with a polynucleotide which encodes or specifies a gene product, causes the gene product to be produced in a cell substantially only when an inducer which corresponds to the promoter is present in the cell.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

[00114] The term “tissue-specific promoter” refers to a nucleotide sequence which, when operably linked with a polynucleotide encodes or specified by a gene, causes the gene product to be produced in a cell substantially only if the cell is a cell of the tissue type corresponding to the promoter.

[00115] The term “flexible polypeptide linker” or “linker” as used in the context of a scFv refers to a peptide linker that consists of amino acids such as glycine and/or serine residues used alone or in combination, to link variable heavy and variable light chain regions together. In one embodiment, the flexible polypeptide linker is a Gly/Ser linker and comprises the amino acid sequence (Gly-Gly-Gly-Ser)_n (SEQ ID NO: 112), where *n* is a positive integer equal to or greater than 1. For example, *n*=1, *n*=2, *n*=3, *n*=4, *n*=5 and *n*=6, *n*=7, *n*=8, *n*=9 and *n*=10. In one embodiment, the flexible polypeptide linkers include, but are not limited to, (Gly₄ Ser)₄ (SEQ ID NO: 113) or (Gly₄ Ser)₃ (SEQ ID NO: 114). In another embodiment, the linkers include multiple repeats of (Gly₂Ser), (GlySer) or (Gly₃Ser) (SEQ ID NO: 112). Also included within the scope of the invention are linkers described in WO2012/138475, incorporated herein by reference).

[00116] As used herein, a 5' cap (also termed an RNA cap, an RNA 7-methylguanosine cap or an RNA m⁷G cap) is a modified guanine nucleotide that has been added to the “front” or 5' end of a eukaryotic messenger RNA shortly after the start of transcription. The 5' cap consists of a terminal group which is linked to the first transcribed nucleotide. Its presence is critical for recognition by the ribosome and protection from RNases. Cap addition is coupled to transcription, and occurs co-transcriptionally, such that each influences the other. Shortly after the start of transcription, the 5' end of the mRNA being synthesized is bound by a cap-synthesizing complex associated with RNA polymerase. This enzymatic complex catalyzes the chemical reactions that are required for mRNA capping. Synthesis proceeds as a multi-step biochemical reaction. The capping moiety can be modified to modulate functionality of mRNA such as its stability or efficiency of translation.

[00117] As used herein, “in vitro transcribed RNA” refers to RNA, preferably mRNA, that has been synthesized in vitro. Generally, the in vitro transcribed RNA is generated from an in vitro transcription vector. The in vitro transcription vector comprises a template that is used to generate the in vitro transcribed RNA.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

[00118] As used herein, a “poly(A)” is a series of adenosines attached by polyadenylation to the mRNA. In the preferred embodiment of a construct for transient expression, the polyA is between 50 and 5000 (SEQ ID NO: 115), preferably greater than 64, more preferably greater than 100, most preferably greater than 300 or 400. poly(A) sequences can be modified chemically or enzymatically to modulate mRNA functionality such as localization, stability or efficiency of translation.

[00119] As used herein, “polyadenylation” refers to the covalent linkage of a polyadenylyl moiety, or its modified variant, to a messenger RNA molecule. In eukaryotic organisms, most messenger RNA (mRNA) molecules are polyadenylated at the 3' end. The 3' poly(A) tail is a long sequence of adenine nucleotides (often several hundred) added to the pre-mRNA through the action of an enzyme, polyadenylate polymerase. In higher eukaryotes, the poly(A) tail is added onto transcripts that contain a specific sequence, the polyadenylation signal. The poly(A) tail and the protein bound to it aid in protecting mRNA from degradation by exonucleases. Polyadenylation is also important for transcription termination, export of the mRNA from the nucleus, and translation. Polyadenylation occurs in the nucleus immediately after transcription of DNA into RNA, but additionally can also occur later in the cytoplasm. After transcription has been terminated, the mRNA chain is cleaved through the action of an endonuclease complex associated with RNA polymerase. The cleavage site is usually characterized by the presence of the base sequence AAUAAA near the cleavage site. After the mRNA has been cleaved, adenosine residues are added to the free 3' end at the cleavage site.

[00120] As used herein, “transient” refers to expression of a non-integrated transgene for a period of hours, days or weeks, wherein the period of time of expression is less than the period of time for expression of the gene if integrated into the genome or contained within a stable plasmid replicon in the host cell.

[00121] The term “signal transduction pathway” refers to the biochemical relationship between a variety of signal transduction molecules that play a role in the transmission of a signal from one portion of a cell to another portion of a cell. The phrase “cell surface receptor” includes molecules and complexes of molecules capable of receiving a signal and transmitting signal across the membrane of a cell.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

[00122] The term “subject” is intended to include living organisms in which an immune response can be elicited (e.g., mammals, human).

[00123] The term “substantially purified” cell refers to a cell that is essentially free of other cell types. A substantially purified cell also refers to a cell which has been separated from other cell types with which it is normally associated in its naturally occurring state. In some instances, a population of substantially purified cells refers to a homogenous population of cells. In other instances, this term refers simply to cell that have been separated from the cells with which they are naturally associated in their natural state. In some aspects, the cells are cultured in vitro. In other aspects, the cells are not cultured in vitro.

[00124] The term “therapeutic” as used herein means a treatment. A therapeutic effect is obtained by reduction, suppression, remission, or eradication of a disease state.

[00125] The term “prophylaxis” as used herein means the prevention of or protective treatment for a disease or disease state.

[00126] In the context of the present invention, “tumor antigen” or “hyperproliferative disorder antigen” or “antigen associated with a hyperproliferative disorder” refers to antigens that are common to specific hyperproliferative disorders. In certain aspects, the hyperproliferative disorder antigens of the present invention are derived from, cancers including but not limited to primary or metastatic melanoma, thymoma, lymphoma, sarcoma, lung cancer, liver cancer, non-Hodgkin's lymphoma, non-Hodgkins lymphoma, leukemias, uterine cancer, cervical cancer, bladder cancer, kidney cancer and adenocarcinomas such as breast cancer, prostate cancer, ovarian cancer, pancreatic cancer, and the like.

[00127] The term “transfected” or “transformed” or “transduced” refers to a process by which exogenous nucleic acid is transferred or introduced into the host cell. A “transfected” or “transformed” or “transduced” cell is one which has been transfected, transformed or transduced with exogenous nucleic acid. The cell includes the primary subject cell and its progeny.

[00128] The term “specifically binds,” refers to an antibody, or a ligand, which recognizes and binds with a cognate binding partner (e.g., a stimulatory and/or costimulatory molecule

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

present on a T cell) protein present in a sample, but which antibody or ligand does not substantially recognize or bind other molecules in the sample.

[00129] Ranges: throughout this disclosure, various aspects of the invention can be presented in a range format. It should be understood that the description in range format is merely for convenience and brevity and should not be construed as an inflexible limitation on the scope of the invention. Accordingly, the description of a range should be considered to have specifically disclosed all the possible subranges as well as individual numerical values within that range. For example, description of a range such as from 1 to 6 should be considered to have specifically disclosed subranges such as from 1 to 3, from 1 to 4, from 1 to 5, from 2 to 4, from 2 to 6, from 3 to 6 etc., as well as individual numbers within that range, for example, 1, 2, 2.7, 3, 4, 5, 5.3, and 6. As another example, a range such as 95-99% identity, includes something with 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identity, and includes subranges such as 96-99%, 96-98%, 96-97%, 97-99%, 97-98% and 98-99% identity. This applies regardless of the breadth of the range.

Description

[00130] Provided herein are compositions of matter and methods of use for the treatment of a disease such as cancer using an anti-EGFRvIII chimeric antigen receptors (CAR).

[00131] In one aspect, the invention provides a number of chimeric antigen receptors comprising an antibody or antibody fragment engineered to specifically bind to an EGFRvIII protein. In one aspect, the invention provides a cell (e.g., T cell) engineered to express a CAR, wherein the CAR T cell ("CART") exhibits an antitumor property. In one aspect a cell is transformed with the CAR and the CAR is expressed on the cell surface. In some embodiments, the cell (e.g., T cell) is transduced with a viral vector encoding a CAR. In some embodiments, the viral vector is a retroviral vector. In some embodiments, the viral vector is a lentiviral vector. In some such embodiments, the cell may stably express the CAR. In another embodiment, the cell (e.g., T cell) is transfected with a nucleic acid, e.g., mRNA, cDNA, DNA, encoding a CAR. In some such embodiments, the cell may transiently express the CAR.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

[00132] In one aspect, the EGFRvIII protein binding portion of the CAR is a scFv antibody fragment. In one aspect such antibody fragments are functional in that they retain the equivalent binding affinity, e.g., they bind the same antigen with comparable efficacy, as the IgG antibody from which it is derived. In one aspect such antibody fragments are functional in that they provide a biological response that can include, but is not limited to, activation of an immune response, inhibition of signal-transduction origination from its target antigen, inhibition of kinase activity, and the like, as will be understood by a skilled artisan.

[00133] In one aspect, the EGFRvIII antigen binding domain of the CAR is a murine scFv antibody fragment. In another aspect, the EGFRvIII antigen binding domain of the CAR is a scFv antibody fragment that is humanized compared to the murine sequence of the scFv from which it is derived. Generation of an exemplary parental murine monoclonal antibody against EGFRvIII (3C10) is disclosed in Okamoto et al. (British J. Cancer 1996, 73:1366-1372). An exemplary fully human antibody against EGFRvIII (139) is disclosed in Morgan *et al.* (2012) Human Gene Therapy, 23: 1043-1953, incorporated herein by reference. In one aspect, the scFv for the murine sequence comprises SEQ ID NO: 11. Humanization of this mouse scFv may be desired for the clinical setting, where the mouse-specific residues may induce a human-anti-mouse antigen (HAMA) response in patients who receive EGFRvIII treatment, e.g., treatment with T cells transduced with the EGFRvIII construct.

[00134] In one aspect, the anti-EGFRvIII binding domain portion of a CAR is encoded by a transgene whose sequence has been codon optimized for expression in a mammalian cell. In one aspect, entire CAR construct of the invention is encoded by a transgene whose entire sequence has been codon optimized for expression in a mammalian cell. Codon optimization refers to the discovery that the frequency of occurrence of synonymous codons (i.e., codons that code for the same amino acid) in coding DNA is biased in different species. Such codon degeneracy allows an identical polypeptide to be encoded by a variety of nucleotide sequences. A variety of codon optimization methods is known in the art, and include, e.g., methods disclosed in at least US Patent Numbers 5,786,464 and 6,114,148.

[00135] In one aspect, the anti-EGFRvIII binding domain of a CAR is a humanized anti-EGFRvIII binding domain. For example, in one embodiment, the anti-EGFRvIII binding domain comprises the scFv portion provided in SEQ ID NO:38. In one aspect, the humanized

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

anti-EGFRvIII binding domain comprises the scFv portion provided in SEQ ID NO:44. In one aspect, the humanized anti-EGFRvIII binding domain comprises the scFv portion provided in SEQ ID NO:50. In one aspect, the humanized anti-EGFRvIII binding domain comprises the scFv portion provided in SEQ ID NO:56. In one aspect, the humanized anti-EGFRvIII binding domain comprises the scFv portion provided in SEQ ID NO:62. In one aspect, the humanized anti-EGFRvIII binding domain comprises the scFv portion provided in SEQ ID NO:68. In one aspect, the humanized anti-EGFRvIII binding domain comprises the scFv portion provided in SEQ ID NO:74. In one aspect, the humanized anti-EGFRvIII binding domain comprises the scFv portion provided in SEQ ID NO:80. In one aspect, the humanized anti-EGFRvIII binding domain comprises the scFv portion provided in SEQ ID NO:86.

[00136] In one aspect, a CAR disclosed herein includes an antigen binding domain of a specific antibody with an intracellular signaling domain. For example, in some aspects, the intracellular signaling domain includes, but is not limited to, CD3-zeta chain, 4-1BB and CD28 signaling modules and combinations thereof.

[00137] In one aspect, the antigen binding domain binds to EGFRvIII. In one aspect, the CAR comprises the sequence provided in SEQ ID NO:43. In one aspect, the CAR comprises the sequence provided in SEQ ID NO:49. In one aspect, the CAR comprises the sequence provided in SEQ ID NO:55. In one aspect, the CAR comprises the sequence provided in SEQ ID NO:61. In one aspect, the CAR comprises the sequence provided in SEQ ID NO:67. In one aspect, the CAR comprises the sequence provided in SEQ ID NO:73. In one aspect, the CAR comprises the sequence provided in SEQ ID NO:79. In one aspect, the CAR comprises the sequence provided in SEQ ID NO:85.

[00138] In one aspect, CAR comprises at least one intracellular signaling domain selected from the group consisting of a CD137 (4-1BB) signaling domain, a CD28 signaling domain, a CD3zeta signal domain, and any combination thereof. In one aspect, the CAR comprises at least one intracellular signaling domain of one or more costimulatory molecule(s) other than a CD137 (4-1BB) or CD28, a CD3zeta signal domain, and any combination thereof.

[00139] Furthermore, the present invention provides CAR compositions and their use in medicaments or methods for treating, among other diseases, cancer or any malignancy or autoimmune diseases involving cells or tissues which express EGFRvIII.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

[00140] The present invention also provides compositions and methods for overexpression of miR-17-92, e.g., in a CAR-expressing cell, e.g., a T cell. In one aspect, transgene-derived overexpression of miR-17-92 provides a CAR-transduced T-cell with improved resistance against tumor-induced immunosuppression and chemotherapy, thereby promoting long-lasting therapeutic effects.

Chimeric Antigen Receptor (CAR)

[00141] The present invention encompasses a recombinant DNA construct comprising sequences encoding a CAR, wherein the CAR comprises an antibody fragment that binds specifically to EGFRvIII, e.g., a human antibody fragment that specifically binds to EGFRvIII. In one aspect, the EGFRvIII is human EGFRvIII, and the nucleic acid sequence encoding the antibody fragment is contiguous with, and in the same reading frame as a nucleic acid sequence encoding an intracellular signaling domain. The intracellular signaling domain can comprise a costimulatory signaling domain and/or a primary signaling domain, e.g., a zeta chain. The costimulatory signaling domain refers to a portion of the CAR comprising at least a portion of the intracellular domain of a costimulatory molecule.

[00142] In specific aspects, a CAR construct of the invention comprises a scFv domain selected from the group consisting of SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:80, and SEQ ID NO:86, wherein the scFv may be preceded by an optional leader sequence such as provided in SEQ ID NO: 13, and followed by an optional hinge sequence such as provided in SEQ ID NO:14 or SEQ ID NO:104 or SEQ ID NO:106 or SEQ ID NO:108, a transmembrane region such as provided in SEQ ID NO:15, an intracellular signalling domain that includes SEQ ID NO:16 or SEQ ID NO:102 and a CD3 zeta sequence that includes SEQ ID NO:17 or SEQ ID NO:99, wherein the domains are contiguous with and in the same reading frame to form a single fusion protein. Also included in the invention is a nucleotide sequence that encodes the polypeptide of each of the scFv fragments selected from the group consisting of SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:80, and SEQ ID NO: 86, and each of the domains of SEQ ID NOS: 13-17. Also included in the invention is a nucleotide sequence that encodes the polypeptide of each of the

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

scFv fragments selected from the group consisting of SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:80, and SEQ ID NO: 86, , and each of the domains of SEQ ID NOS: 13-16 and SEQ ID NO:99. In one aspect, the EGFRvIII CAR construct comprises an optional leader sequence, an extracellular antigen binding domain that specifically binds EGFRvIII, a hinge, a transmembrane domain, and an intracellular stimulatory domain. In one aspect, the EGFRvIII CAR construct comprises an optional leader sequence, an extracellular antigen binding domain that specifically binds EGFRvIII, a hinge, a transmembrane domain, an intracellular signaling domain that includes a costimulatory domain and a primary stimulatory domain. Specific EGFRvIII CAR constructs containing a humanized scFv domain are provided in SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:85, and SEQ ID NO:90. Specific EGFRvIII CAR constructs containing a murine scFv domain is provided in SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2.

[00143] An exemplary leader sequence is provided as SEQ ID NO: 13. An exemplary hinge/spacer sequence is provided as SEQ ID NO: 14 or SEQ ID NO:104 or SEQ ID NO:106 or SEQ ID NO:108. An exemplary transmembrane domain sequence is provided as SEQ ID NO:15. An exemplary sequence of a costimulatory domain of the 4-1BB protein is provided as SEQ ID NO: 16. An exemplary sequence of a costimulatory domain of the CD27 protein is provided as SEQ ID NO:102. An exemplary primary signaling domain of a CD3zeta domain sequence is provided as SEQ ID NO: 17. Another exemplary primary signaling domain of a CD3zeta domain sequence is provided as SEQ ID NO:99.

[00144] In one aspect, the present invention encompasses a recombinant nucleic acid construct comprising a nucleic acid molecule encoding a CAR, wherein the nucleic acid molecule comprises the nucleic acid sequence encoding an anti-EGFRvIII binding domain, e.g., described herein, that is contiguous with, and in the same reading frame as a nucleic acid sequence encoding an intracellular signaling domain. In one aspect, the anti-EGFRvIII binding domain is selected from one or more of SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:80, and SEQ ID NO:86. In one aspect, the anti-EGFRvIII binding domain is encoded by a nucleotide sequence provided in a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 75, SEQ ID

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

NO: 81, and SEQ ID NO:98. In one aspect, the anti-EGFRvIII binding domain is encoded by SEQ ID NO: 39. In one aspect, the anti-EGFRvIII binding domain is encoded by SEQ ID NO: 45. In one aspect, the anti-EGFRvIII binding domain is encoded by SEQ ID NO: 51. In one aspect, the anti-EGFRvIII binding domain is encoded by SEQ ID NO: 57. In one aspect, the anti-EGFRvIII binding domain is encoded by SEQ ID NO: 63. In one aspect, the anti-EGFRvIII binding domain is encoded by SEQ ID NO: 69. In one aspect, the anti-EGFRvIII binding domain is encoded by SEQ ID NO: 75. In one aspect, the anti-EGFRvIII binding domain is encoded by SEQ ID NO: 81.

[00145] In one aspect, the present invention encompasses a recombinant nucleic acid construct comprising a nucleic acid molecule encoding a CAR, wherein the nucleic acid molecule comprises a nucleic acid sequence encoding an anti-EGFRvIII binding domain selected from the group consisting of SEQ ID NO:42, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:66, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:84, and SEQ ID NO:90 wherein the sequence is contiguous with and in the same reading frame as the nucleic acid sequence encoding an intracellular signaling domain. An exemplary intracellular signaling domain that can be used in the CAR includes, but is not limited to, one or more intracellular signaling domains of, e.g., CD3-zeta, CD28, 4-1BB, and the like. In some instances, the CAR can comprise any combination of intracellular signaling domains of CD3-zeta, CD28, 4-1BB, and the like. In one aspect the nucleic acid construct comprises SEQ ID NO: 42. In one aspect the nucleic acid sequence of a CAR construct is SEQ ID NO:48. In one aspect the nucleic acid construct comprises SEQ ID NO:54. In one aspect the nucleic acid construct comprises SEQ ID NO:60. In one aspect the nucleic acid construct comprises SEQ ID NO:66. In one aspect the nucleic acid construct comprises SEQ ID NO:72. In one aspect the nucleic acid construct comprises SEQ ID NO:78. In one aspect the nucleic acid construct comprises SEQ ID NO:84.

[00146] The nucleic acid sequences coding for the desired molecules can be obtained using recombinant methods known in the art, such as, for example by screening libraries from cells expressing the gene, by deriving the gene from a vector known to include the same, or by isolating directly from cells and tissues containing the same, using standard techniques. Alternatively, the nucleic acid of interest can be produced synthetically, rather than cloned.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

[00147] The present invention includes retroviral and lentiviral vector constructs expressing a CAR that can be directly transduced into a cell.

[00148] The present invention also includes an RNA construct that can be directly transfected into a cell. A method for generating mRNA for use in transfection involves in vitro transcription (IVT) of a template with specially designed primers, followed by polyA addition, to produce a construct containing 3' and 5' untranslated sequence ("UTR"), a 5' cap and/or Internal Ribosome Entry Site (IRES), the nucleic acid to be expressed, and a polyA tail, typically 50-2000 bases in length. RNA so produced can efficiently transfect different kinds of cells. In one embodiment, the template includes sequences for the CAR. In an embodiment, an RNA CAR vector is transduced into a T cell by electroporation.

Antigen binding domain

[00149] In one aspect, the CAR of the invention comprises a target-specific binding element otherwise referred to as an antigen binding domain. The choice of moiety depends upon the type and number of ligands that define the surface of a target cell. For example, the antigen binding domain may be chosen to recognize a ligand that acts as a cell surface marker on target cells associated with a particular disease state. Thus examples of cell surface markers that may act as ligands for the antigen binding domain in a CAR of the invention include those associated with viral, bacterial and parasitic infections, autoimmune disease and cancer cells.

[00150] In one aspect, the CAR-mediated T-cell response can be directed to an antigen of interest by way of engineering an antigen binding domain that specifically binds a desired antigen into the CAR.

[00151] In one aspect, the portion of the CAR comprising the antigen binding domain comprises an antigen binding domain that targets EGFRvIII. In one aspect, the antigen binding domain targets human EGFRvIII. For example, a mouse monoclonal antibody (IgG2b) 3C10 was produced against EGFRvIII by immunization of mice with a 14 amino acid peptide (LEEKKGNYVVT DHC; SEQ ID NO:101) including the EGFRvIII- specific fusion junction and demonstrated highly specific recognition of EGFRvIII without any detectable binding to wild-type EGFR (Okamoto *et al*, British J. Cancer 1996, 73:1366-1372). Accordingly, in some

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

embodiments, the antigen binding domain targets an amino acid sequence, e.g., an amino acid sequence comprising an added glycine residue, within the EGFvIII fusion junction domain. In some embodiments, the antigen binding domain targets an one or more amino acid sequence in the amino acid sequence of SEQ ID NO:101.

[00152] The antigen binding domain can be any domain that binds to the antigen including, but not limited to, a monoclonal antibody, a polyclonal antibody, a recombinant antibody, a human antibody, a humanized antibody, and a functional fragment thereof, including but not limited to a single-domain antibody such as a heavy chain variable domain (VH), a light chain variable domain (VL) and a variable domain (VHH) of camelid derived nanobody, and to an alternative scaffold known in the art to function as antigen binding domain, such as a recombinant fibronectin domain, and the like. In some instances, it is beneficial for the antigen binding domain to be derived from the same species in which the CAR will ultimately be used in. For example, for use in humans, it may be beneficial for the antigen binding domain of the CAR to comprise human or humanized residues for the antigen binding domain of an antibody or antibody fragment.

[00153] Thus, in one aspect, the antigen binding domain comprises a human antibody or an antibody fragment. In another aspect, the antigen binding domain comprises a humanized antibody or antibody fragment. In one embodiment, the anti-EGFRvIII binding domain comprises one or more (e.g., one, two, or all three) light chain complementary determining region 1 (LC CDR1), light chain complementary determining region 2 (LC CDR2), and light chain complementary determining region 3 (LC CDR3) of an anti-EGFRvIII binding domain described herein, and one or more (e.g., one, two, or all three) heavy chain complementary determining region 1 (HC CDR1), heavy chain complementary determining region 2 (HC CDR2), and heavy chain complementary determining region 3 (HC CDR3) of an anti-EGFRvIII binding domain described herein. In one embodiment, the anti-EGFRvIII binding domain comprises a light chain variable region described herein and/or a heavy chain variable region described herein. In one embodiment, the anti-EGFRvIII binding domain is a scFv comprising a light chain variable region and a heavy chain variable region of an amino acid sequence, e.g., a light chain variable region and heavy chain variable region described herein. In an embodiment, the anti-EGFRvIII binding domain (e.g., an scFv) comprises: a light chain variable region comprising an amino acid sequence having at least one, two or three

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

modifications (e.g., substitutions) but not more than 30, 20 or 10 modifications (e.g., substitutions) of an amino acid sequence of a light chain variable region provided herein, or a sequence with 85-99% (e.g., 90-99%, or 95-99%) identity to an amino acid sequence provided herein; and/or a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence having at least one, two or three modifications (e.g., substitutions) but not more than 30, 20 or 10 modifications (e.g., substitutions) of an amino acid sequence of a heavy chain variable region provided herein, or a sequence with 85-99% (e.g., 90-99%, or 95-99%) identity to an amino acid sequence provided herein. In one aspect, the antigen binding domain comprises one or more sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:80, and SEQ ID NO:86. In one aspect the humanized CAR is selected from one or more sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:85, and SEQ ID NO:90.

[00154] In some aspects, a non-human antibody is humanized, where specific sequences or regions of the antibody are modified to increase similarity to an antibody naturally produced in a human or fragment thereof. In one aspect, the antigen binding domain is humanized.

[00155] A humanized antibody can be produced using a variety of techniques known in the art, including but not limited to, CDR-grafting (see, e.g., European Patent No. EP 239,400; International Publication No. WO 91/09967; and U.S. Pat. Nos. 5,225,539, 5,530,101, and 5,585,089, each of which is incorporated herein in its entirety by reference), veneering or resurfacing (see, e.g., European Patent Nos. EP 592,106 and EP 519,596; Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28(4/5):489-498; Studnicka *et al.*, 1994, *Protein Engineering*, 7(6):805-814; and Roguska *et al.*, 1994, *PNAS*, 91:969-973, each of which is incorporated herein by its entirety by reference), chain shuffling (see, e.g., U.S. Pat. No. 5,565,332, which is incorporated herein in its entirety by reference), and techniques disclosed in, e.g., U.S. Patent Application Publication No. US2005/0042664, U.S. Patent Application Publication No. US2005/0048617, U.S. Pat. No. 6,407,213, U.S. Pat. No. 5,766,886, International Publication No. WO 9317105, Tan *et al.*, 2002, *J. Immunol.*, 169:1119-25; Caldas *et al.*, 2000, *Protein Eng.*, 13(5):353-60; Morea *et al.*, 2000, *Methods*, 20:267-79; Baca *et al.*, 1997, *J. Biol. Chem.*, 272:10678-84; Roguska *et al.*, 1996, *Protein Eng.*, 9(10):895-904; Couto *et al.*, 1995, *Cancer Res.*, 55 :5973s-5977; Couto *et al.*, 1995, *Cancer Res.*, 55(8):1717-22; Sandhu 1994 *Gene*,

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

150(2);409-10; and Pedersen *et al.*, 1994, J. Mol. Biol., 235(3):959-73, each of which is incorporated herein in its entirety by reference. Often, framework residues in the framework regions will be substituted with the corresponding residue from the CDR donor antibody to alter, for example improve, antigen binding. These framework substitutions are identified by methods well-known in the art, e.g., by modeling of the interactions of the CDR and framework residues to identify framework residues important for antigen binding and sequence comparison to identify unusual framework residues at particular positions. (See, e.g., Queen *et al.*, U.S. Pat. No. 5,585,089; and Riechmann *et al.*, 1988, Nature, 332:323, which are incorporated herein by reference in their entireties.)

[00156] A humanized antibody or antibody fragment has one or more amino acid residues remaining in it from a source which is nonhuman. These nonhuman amino acid residues are often referred to as “import” residues, which are typically taken from an “import” variable domain. As provided herein, humanized antibodies or antibody fragments comprise one or more CDRs from nonhuman immunoglobulin molecules and framework regions wherein the amino acid residues comprising the framework are derived completely or mostly from human germline. Multiple techniques for humanization of antibodies or antibody fragments are well-known in the art and can essentially be performed following the method of Winter and co-workers (Jones *et al.*, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, Science, 239:1534-1536 (1988)), by substituting rodent CDRs or CDR sequences for the corresponding sequences of a human antibody, i.e., CDR-grafting (EP 239,400; PCT Publication No. WO 91/09967; and U.S. Pat. Nos. 4,816,567; 6,331,415; 5,225,539; 5,530,101; 5,585,089; 6,548,640, the contents of which are incorporated herein by reference herein in their entirety). In such humanized antibodies and antibody fragments, substantially less than an intact human variable domain has been substituted by the corresponding sequence from a nonhuman species. Humanized antibodies are often human antibodies in which some CDR residues and possibly some framework (FR) residues are substituted by residues from analogous sites in rodent antibodies. Humanization of antibodies and antibody fragments can also be achieved by veneering or resurfacing (EP 592,106; EP 519,596; Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498; Studnicka *et al.*, Protein Engineering, 7(6):805-814 (1994); and Roguska *et al.*, PNAS, 91:969-973 (1994)) or chain

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

shuffling (U.S. Pat. No. 5,565,332), the contents of which are incorporated herein by reference herein in their entirety.

[00157] The choice of human variable domains, both light and heavy, to be used in making the humanized antibodies is to reduce antigenicity. According to the so-called “best-fit” method, the sequence of the variable domain of a rodent antibody is screened against the entire library of known human variable-domain sequences. The human sequence which is closest to that of the rodent is then accepted as the human framework (FR) for the humanized antibody (Sims *et al.*, J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 196:901 (1987), the contents of which are incorporated herein by reference herein in their entirety). Another method uses a particular framework derived from the consensus sequence of all human antibodies of a particular subgroup of light or heavy chains. The same framework may be used for several different humanized antibodies (see, e.g., Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol., 151:2623 (1993), the contents of which are incorporated herein by reference herein in their entirety).

[00158] In some aspects, the portion of a CAR composition of the invention that comprises an antibody fragment is humanized with retention of high affinity for the target antigen and other favorable biological properties. According to one aspect of the invention, humanized antibodies and antibody fragments are prepared by a process of analysis of the parental sequences and various conceptual humanized products using three-dimensional models of the parental and humanized sequences. Three-dimensional immunoglobulin models are commonly available and are familiar to those skilled in the art. Computer programs are available which illustrate and display probable three-dimensional conformational structures of selected candidate immunoglobulin sequences. Inspection of these displays permits analysis of the likely role of the residues in the functioning of the candidate immunoglobulin sequence, e.g., the analysis of residues that influence the ability of the candidate immunoglobulin to bind the target antigen. In this way, FR residues can be selected and combined from the recipient and import sequences so that the desired antibody or antibody fragment characteristic, such as increased affinity for the target antigen, is achieved. In general, the CDR residues are directly and most substantially involved in influencing antigen binding.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

[00159] In one aspect, the anti-EGFRvIII binding domain is, for example, a Fv, a Fab, or a (Fab')₂, or a bi-functional (e.g. bi-specific) hybrid antibody (e.g., Lanzavecchia *et al.*, Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)). In one aspect, an antibody fragment provided herein is a scFv. In one aspect, the scFv binds an EGFRvIII protein but not wild type EGFR. In some instances, a human scFv may also be derived from a yeast display library.

[00160] In some instances, scFvs can be prepared according to method known in the art (see, for example, Bird *et al.*, (1988) Science 242:423-426 and Huston *et al.*, (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). ScFv molecules can be produced by linking VH and VL regions together using flexible polypeptide linkers. The scFv molecules comprise a linker (e.g., a Ser-Gly linker) with an optimized length and/or amino acid composition. The linker length can greatly affect how the variable regions of an scFv fold and interact. In fact, if a short polypeptide linker is employed (e.g., between 5-10 amino acids, intrachain folding is prevented. Interchain folding is also required to bring the two variable regions together to form a functional epitope binding site. For examples of linker orientation and size see, e.g., Hollinger *et al.* 1993 Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448, U.S. Patent Application Publication Nos. 2005/0100543, 2005/0175606, 2007/0014794, and PCT publication Nos. WO2006/020258 and WO2007/024715, is incorporated herein by reference.

[00161] An scFv can comprise a linker of at least 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, or more amino acid residues between its VL and VH regions. The linker sequence may comprise any naturally occurring amino acid. In some embodiments, the linker sequence comprises amino acids glycine and serine. In another embodiment, the linker sequence comprises sets of glycine and serine repeats such as (Gly₄Ser)_n (SEQ ID NO: 37), where n is a positive integer equal to or greater than 1. In one embodiment, the linker can be (Gly₄Ser)₄ (SEQ ID NO: 113) or (Gly₄Ser)₃ (SEQ ID NO: 114). Variation in the linker length may retain or enhance activity, giving rise to superior efficacy in activity studies.

Stability and Mutations

[00162] The stability of an anti-EGFRvIII binding domain, e.g., scFv molecules (e.g., soluble scFv), can be evaluated in reference to the biophysical properties (e.g., thermal

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

stability) of a conventional control scFv molecule or a full length antibody. In one embodiment, the humanized scFv has a thermal stability that is greater than about 0.1, about 0.25, about 0.5, about 0.75, about 1, about 1.25, about 1.5, about 1.75, about 2, about 2.5, about 3, about 3.5, about 4, about 4.5, about 5, about 5.5, about 6, about 6.5, about 7, about 7.5, about 8, about 8.5, about 9, about 9.5, about 10 degrees, about 11 degrees, about 12 degrees, about 13 degrees, about 14 degrees, or about 15 degrees Celsius than a control binding molecule (e.g. a conventional scFv molecule) in the described assays.

[00163] The improved thermal stability of the anti-EGFRvIII binding domain, e.g., scFv, is subsequently conferred to the entire EGFRvIII CAR construct, leading to improved therapeutic properties of the EGFRvIII CAR construct. The thermal stability of the anti-EGFRvIII binding domain, e.g., scFv, can be improved by at least about 2°C or 3°C as compared to a conventional antibody. In one embodiment, the anti-EGFRvIII binding domain, e.g., scFv, has a 1°C improved thermal stability as compared to a conventional antibody. In another embodiment, the anti-EGFRvIII binding domain, e.g., scFv, has a 2°C improved thermal stability as compared to a conventional antibody. In another embodiment, the anti-EGFRvIII binding domain, e.g., scFv, has a 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15°C improved thermal stability as compared to a conventional antibody. Comparisons can be made, for example, between the scFv molecules disclosed herein and scFv molecules or Fab fragments of an antibody from which the scFv VH and VL were derived. Thermal stability can be measured using methods known in the art. For example, in one embodiment, T_m can be measured. Methods for measuring T_m and other methods of determining protein stability are described in more detail below.

[00164] Mutations in scFv (arising through humanization or direct mutagenesis of the soluble scFv) alter the stability of the scFv and improve the overall stability of the scFv and the EGFRvIII CAR construct. Stability of the humanized scFv is compared against the murine scFv using measurements such as T_m, temperature denaturation and temperature aggregation. The binding capacity of the mutant scFvs can be determined using assays described in the Examples.

[00165] In one embodiment, the anti-EGFRvIII binding domain, e.g., scFv, comprises at least one mutation arising from the humanization process such that the mutated scFv confers

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

improved stability to the EGFRvIII construct. In another embodiment, the anti-EGFRvIII binding domain, e.g., scFv, comprises at least 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mutations arising from the humanization process such that the mutated scFv confers improved stability to the EGFRvIII construct.

Methods of Evaluating Protein Stability

[00166] The stability of an antigen binding domain may be assessed using, e.g., the methods described below. Such methods allow for the determination of multiple thermal unfolding transitions where the least stable domain either unfolds first or limits the overall stability threshold of a multidomain unit that unfolds cooperatively (e.g. a multidomain protein which exhibits a single unfolding transition). The least stable domain can be identified in a number of additional ways. Mutagenesis can be performed to probe which domain limits the overall stability. Additionally, protease resistance of a multidomain protein can be performed under conditions where the least stable domain is known to be intrinsically unfolded via DSC or other spectroscopic methods (Fontana, *et al.*, (1997) Fold. Des., 2: R17-26; Dimasi *et al.* (2009) J. Mol. Biol. 393: 672-692). Once the least stable domain is identified, the sequence encoding this domain (or a portion thereof) may be employed as a test sequence in the methods.

a) Thermal Stability

[00167] The thermal stability of the compositions may be analyzed using a number of non-limiting biophysical or biochemical techniques known in the art. In certain embodiments, thermal stability is evaluated by analytical spectroscopy.

[00168] An exemplary analytical spectroscopy method is Differential Scanning Calorimetry (DSC). DSC employs a calorimeter which is sensitive to the heat absorbances that accompany the unfolding of most proteins or protein domains (see, e.g. Sanchez-Ruiz, *et al.*, Biochemistry, 27: 1648-52, 1988). To determine the thermal stability of a protein, a sample of the protein is inserted into the calorimeter and the temperature is raised until the Fab or scFv unfolds. The temperature at which the protein unfolds is indicative of overall protein stability.

[00169] Another exemplary analytical spectroscopy method is Circular Dichroism (CD) spectroscopy. CD spectrometry measures the optical activity of a composition as a function of

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

increasing temperature. Circular dichroism (CD) spectroscopy measures differences in the absorption of left-handed polarized light versus right-handed polarized light which arise due to structural asymmetry. A disordered or unfolded structure results in a CD spectrum very different from that of an ordered or folded structure. The CD spectrum reflects the sensitivity of the proteins to the denaturing effects of increasing temperature and is therefore indicative of a protein's thermal stability (see van Mierlo and Steemsma, J. Biotechnol., 79(3):281-98, 2000).

[00170] Another exemplary analytical spectroscopy method for measuring thermal stability is Fluorescence Emission Spectroscopy (see van Mierlo and Steemsma, supra). Yet another exemplary analytical spectroscopy method for measuring thermal stability is Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy (see, e.g. van Mierlo and Steemsma, supra).

[00171] The thermal stability of a composition can be measured biochemically. An exemplary biochemical method for assessing thermal stability is a thermal challenge assay. In a "thermal challenge assay", a composition is subjected to a range of elevated temperatures for a set period of time. For example, in one embodiment, test scFv molecules or molecules comprising scFv molecules are subject to a range of increasing temperatures, e.g., for 1-1.5 hours. The activity of the protein is then assayed by a relevant biochemical assay. For example, if the protein is a binding protein (e.g. an scFv or scFv-containing polypeptide) the binding activity of the binding protein may be determined by a functional or quantitative ELISA.

[00172] Such an assay may be done in a high-throughput format and those disclosed in the Examples using *E. coli* and high throughput screening. A library of anti-EGFRvIII binding domain, e.g., scFv, variants may be created using methods known in the art. Anti-EGFRvIII binding domain, e.g., scFv, expression may be induced and the anti-EGFRvIII binding domain, e.g., scFv, may be subjected to thermal challenge. The challenged test samples may be assayed for binding and those anti-EGFRvIII binding domains, e.g., scFvs, which are stable may be scaled up and further characterized.

[00173] Thermal stability is evaluated by measuring the melting temperature (T_m) of a composition using any of the above techniques (e.g. analytical spectroscopy techniques). The melting temperature is the temperature at the midpoint of a thermal transition curve wherein 50% of molecules of a composition are in a folded state (See e.g., Dimasi *et al.* (2009) J. Mol Biol. 393: 672-692). In one embodiment, T_m values for an anti-EGFRvIII binding domain, e.g.,

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

scFv, are about 40°C, 41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C, 46°C, 47°C, 48°C, 49°C, 50°C, 51°C, 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C, 66°C, 67°C, 68°C, 69°C, 70°C, 71°C, 72°C, 73°C, 74°C, 75°C, 76°C, 77°C, 78°C, 79°C, 80°C, 81°C, 82°C, 83°C, 84°C, 85°C, 86°C, 87°C, 88°C, 89°C, 90°C, 91°C, 92°C, 93°C, 94°C, 95°C, 96°C, 97°C, 98°C, 99°C, 100°C. In one embodiment, T_m values for an IgG is about 40°C, 41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C, 46°C, 47°C, 48°C, 49°C, 50°C, 51°C, 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C, 66°C, 67°C, 68°C, 69°C, 70°C, 71°C, 72°C, 73°C, 74°C, 75°C, 76°C, 77°C, 78°C, 79°C, 80°C, 81°C, 82°C, 83°C, 84°C, 85°C, 86°C, 87°C, 88°C, 89°C, 90°C, 91°C, 92°C, 93°C, 94°C, 95°C, 96°C, 97°C, 98°C, 99°C, 100°C. In one embodiment, T_m values for an multivalent antibody is about 40°C, 41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C, 46°C, 47°C, 48°C, 49°C, 50°C, 51°C, 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C, 66°C, 67°C, 68°C, 69°C, 70°C, 71°C, 72°C, 73°C, 74°C, 75°C, 76°C, 77°C, 78°C, 79°C, 80°C, 81°C, 82°C, 83°C, 84°C, 85°C, 86°C, 87°C, 88°C, 89°C, 90°C, 91°C, 92°C, 93°C, 94°C, 95°C, 96°C, 97°C, 98°C, 99°C, 100°C.

[00174] Thermal stability is also evaluated by measuring the specific heat or heat capacity (C_p) of a composition using an analytical calorimetric technique (e.g. DSC). The specific heat of a composition is the energy (e.g. in kcal/mol) is required to rise by 1°C, the temperature of 1 mol of water. As large C_p is a hallmark of a denatured or inactive protein composition. The change in heat capacity (ΔC_p) of a composition is measured by determining the specific heat of a composition before and after its thermal transition. Thermal stability may also be evaluated by measuring or determining other parameters of thermodynamic stability including Gibbs free energy of unfolding (ΔG), enthalpy of unfolding (ΔH), or entropy of unfolding (ΔS). One or more of the above biochemical assays (e.g. a thermal challenge assay) are used to determine the temperature (i.e. the T_c value) at which 50% of the composition retains its activity (e.g. binding activity).

[00175] In addition, mutations to the anti-EGFRvIII binding domain, e.g., scFv, alter the thermal stability of the anti-EGFRvIII binding domain, e.g., scFv, compared with the unmutated anti-EGFRvIII binding domain, e.g., scFv. When the humanized anti-EGFRvIII binding domain, e.g., scFv, is incorporated into an anti-EGFRvIII CAR construct, the anti-EGFRvIII binding domain, e.g., humanized scFv confers thermal stability to the overall anti-

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

EGFRvIII CAR construct. In one embodiment, the anti-EGFRvIII binding domain, e.g., scFv, comprises a single mutation that confers thermal stability to the anti-EGFRvIII binding domain, e.g., scFv. In another embodiment, the anti-EGFRvIII binding domain, e.g., scFv, comprises multiple mutations that confer thermal stability to the anti-EGFRvIII binding domain, e.g., scFv. In one embodiment, the multiple mutations in the anti-EGFRvIII binding domain, e.g., scFv, have an additive effect on thermal stability of the anti-EGFRvIII binding domain, e.g., scFv.

b) % Aggregation

[00176] The stability of a composition can be determined by measuring its propensity to aggregate. Aggregation can be measured by a number of non-limiting biochemical or biophysical techniques. For example, the aggregation of a composition may be evaluated using chromatography, e.g. Size-Exclusion Chromatography (SEC). SEC separates molecules on the basis of size. A column is filled with semi-solid beads of a polymeric gel that will admit ions and small molecules into their interior but not large ones. When a protein composition is applied to the top of the column, the compact folded proteins (i.e. non-aggregated proteins) are distributed through a larger volume of solvent than is available to the large protein aggregates. Consequently, the large aggregates move more rapidly through the column, and in this way the mixture can be separated or fractionated into its components. Each fraction can be separately quantified (e.g. by light scattering) as it elutes from the gel. Accordingly, the % aggregation of a composition can be determined by comparing the concentration of a fraction with the total concentration of protein applied to the gel. Stable compositions elute from the column as essentially a single fraction and appear as essentially a single peak in the elution profile or chromatogram.

c) Binding Affinity

[00177] The stability of a composition can be assessed by determining its target binding affinity. A wide variety of methods for determining binding affinity are known in the art. An exemplary method for determining binding affinity employs surface plasmon resonance. Surface plasmon resonance is an optical phenomenon that allows for the analysis of real-time biospecific interactions by detection of alterations in protein concentrations within a biosensor matrix, for example using the BIAcore system (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

Piscataway, N.J.). For further descriptions, see Jonsson, U., *et al.* (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jonsson, U., *i* (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Jonsson, B., *et al.* (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131; and Johnson, B., *et al.* (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277.

[00178] In one aspect, the antigen binding domain of the CAR comprises an amino acid sequence that is homologous to an antigen binding domain amino acid sequence described herein, and the antigen binding domain retains the desired functional properties of the anti-EGFRvIII antibody fragments described herein. In one specific aspect, the CAR composition of the invention comprises an antibody fragment. In a further aspect, that antibody fragment comprises an scFv.

[00179] In various aspects, the antigen binding domain of the CAR is engineered by modifying one or more amino acids within one or both variable regions (e.g., VH and/or VL), for example within one or more CDR regions and/or within one or more framework regions. In one specific aspect, the CAR composition of the invention comprises an antibody fragment. In a further aspect, that antibody fragment comprises an scFv.

[00180] It will be understood by one of ordinary skill in the art that the antibody or antibody fragment of the invention may further be modified such that they vary in amino acid sequence (e.g., from wild-type), but not in desired activity. For example, additional nucleotide substitutions leading to amino acid substitutions at "non-essential" amino acid residues may be made to the protein. For example, a nonessential amino acid residue in a molecule may be replaced with another amino acid residue from the same side chain family. In another embodiment, a string of amino acids can be replaced with a structurally similar string that differs in order and/or composition of side chain family members, e.g., a conservative substitution, in which an amino acid residue is replaced with an amino acid residue having a similar side chain, may be made.

[00181] Families of amino acid residues having similar side chains have been defined in the art, including basic side chains (e.g., lysine, arginine, histidine), acidic side chains (e.g., aspartic acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (e.g., glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine), nonpolar side chains (e.g., alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan), beta-branched side chains (e.g.,

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (e.g., tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine).

[00182] Percent identity in the context of two or more nucleic acids or polypeptide sequences, refers to two or more sequences that are the same. Two sequences are "substantially identical" if two sequences have a specified percentage of amino acid residues or nucleotides that are the same (e.g., 60% identity, optionally 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% identity over a specified region, or, when not specified, over the entire sequence), when compared and aligned for maximum correspondence over a comparison window, or designated region as measured using one of the following sequence comparison algorithms or by manual alignment and visual inspection. Optionally, the identity exists over a region that is at least about 50 nucleotides (or 10 amino acids) in length, or more preferably over a region that is 100 to 500 or 1000 or more nucleotides (or 20, 50, 200 or more amino acids) in length.

[00183] For sequence comparison, typically one sequence acts as a reference sequence, to which test sequences are compared. When using a sequence comparison algorithm, test and reference sequences are entered into a computer, subsequence coordinates are designated, if necessary, and sequence algorithm program parameters are designated. Default program parameters can be used, or alternative parameters can be designated. The sequence comparison algorithm then calculates the percent sequence identities for the test sequences relative to the reference sequence, based on the program parameters. Methods of alignment of sequences for comparison are well known in the art. Optimal alignment of sequences for comparison can be conducted, e.g., by the local homology algorithm of Smith and Waterman, (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c, by the homology alignment algorithm of Needleman and Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48:443, by the search for similarity method of Pearson and Lipman, (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444, by computerized implementations of these algorithms (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), or by manual alignment and visual inspection (see, e.g., Brent et al., (2003) Current Protocols in Molecular Biology).

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

[00184] Two examples of algorithms that are suitable for determining percent sequence identity and sequence similarity are the BLAST and BLAST 2.0 algorithms, which are described in Altschul et al., (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402; and Altschul et al., (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410, respectively. Software for performing BLAST analyses is publicly available through the National Center for Biotechnology Information.

[00185] The percent identity between two amino acid sequences can also be determined using the algorithm of E. Meyers and W. Miller, (1988) *Comput. Appl. Biosci.* 4:11-17) which has been incorporated into the ALIGN program (version 2.0), using a PAM120 weight residue table, a gap length penalty of 12 and a gap penalty of 4. In addition, the percent identity between two amino acid sequences can be determined using the Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:444-453) algorithm which has been incorporated into the GAP program in the GCG software package (available at www.gcg.com), using either a Blossom 62 matrix or a PAM250 matrix, and a gap weight of 16, 14, 12, 10, 8, 6, or 4 and a length weight of 1, 2, 3, 4, 5, or 6.

[00186] In one aspect, the present invention contemplates modifications of the starting antibody or fragment (e.g., scFv) amino acid sequence that generate functionally equivalent molecules. For example, the VH or VL of an anti-EGFRvIII binding domain, e.g., scFv, comprised in the CAR can be modified to retain at least about 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% identity of the starting VH or VL framework region of the anti-EGFRvIII binding domain, e.g., scFv. The present invention contemplates modifications of the entire CAR construct, e.g., modifications in one or more amino acid sequences of the various domains of the CAR construct in order to generate functionally equivalent molecules. The CAR construct can be modified to retain at least about 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% identity of the starting CAR construct.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

Transmembrane domain

[00187] With respect to the transmembrane domain, in various embodiments, a CAR can be designed to comprise a transmembrane domain that is attached to the extracellular domain of the CAR. A transmembrane domain can include one or more additional amino acids adjacent to the transmembrane region, e.g., one or more amino acid associated with the extracellular region of the protein from which the transmembrane was derived (e.g., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 up to 15 amino acids of the extracellular region) and/or one or more additional amino acids associated with the intracellular region of the protein from which the transmembrane protein is derived (e.g., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 up to 15 amino acids of the intracellular region). In one aspect, the transmembrane domain is one that is associated with one of the other domains of the CAR is used. In some instances, the transmembrane domain can be selected or modified by amino acid substitution to avoid binding of such domains to the transmembrane domains of the same or different surface membrane proteins, e.g., to minimize interactions with other members of the receptor complex. In one aspect, the transmembrane domain is capable of homodimerization with another CAR on the CART cell surface. In a different aspect, the amino acid sequence of the transmembrane domain may be modified or substituted so as to minimize interactions with the binding domains of the native binding partner present in the same CART.

[00188] The transmembrane domain may be derived either from a natural or from a recombinant source. Where the source is natural, the domain may be derived from any membrane-bound or transmembrane protein. In one aspect the transmembrane domain is capable of signaling to the intracellular domain(s) whenever the CAR has bound to a target. A transmembrane domain of particular use in this invention may include at least the transmembrane region(s) of e.g., the alpha, beta or zeta chain of the T-cell receptor, CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154.

[00189] In some instances, the transmembrane domain can be attached to the extracellular region of the CAR, e.g., the antigen binding domain of the CAR, via a hinge, e.g., a hinge from a human protein. For example, in one embodiment, the hinge can be a human Ig (immunoglobulin) hinge, e.g., an IgG4 hinge, or a CD8a hinge. In one embodiment, the hinge

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

or spacer comprises (e.g., consists of) the amino acid sequence of SEQ ID NO:14. In one aspect, the transmembrane domain comprises (e.g., consists of) a transmembrane domain of SEQ ID NO: 15.

[00190] In one aspect, the hinge or spacer comprises an IgG4 hinge. For example, in one embodiment, the hinge or spacer comprises a hinge of the amino acid sequence

ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKGM

(SEQ ID NO:104). In some embodiments, the hinge or spacer comprises a hinge encoded by a nucleotide sequence of

GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCCGAGTTCCTGGGCGG
ACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGA
CCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAGGAGGACCCCGAGGTCCA
GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGG
GAGGAGCAGTTCAATAGCACCTACCGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCA
GGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCC
AGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGG
TGTACACCCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAC
CTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAC
GGCCAGCCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCA
GCTTCTTCCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAA
CGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGA
GCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG (SEQ ID NO:105).

[00191] In one aspect, the hinge or spacer comprises an IgD hinge. For example, in one embodiment, the hinge or spacer comprises a hinge of the amino acid sequence

RWPESPKAQASSVPTAQPPAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERET
KTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTG
GVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAQA
PVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPG
STTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLNLNASRSLEVSYVTDH (SEQ ID

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

NO:106). In some embodiments, the hinge or spacer comprises a hinge encoded by a nucleotide sequence of

AGGTGGCCCGAAAGTCCCAAGGCCAGGCATCTAGTGTTCCTACTGCACAGCCCCA
GGCAGAAGGCAGCCTAGCCAAAGCTACTACTGCACCTGCCACTACGCGCAATACT
GGCCGTGGCGGGGAGGAGAAGAAAAAGGAGAAAGAGAAAGAAGAACAGGAAGA
GAGGGAGACCAAGACCCCTGAATGTCCATCCCATACCCAGCCGCTGGGCGTCTATC
TCTTGACTCCCGCAGTACAGGACTTGTGGCTTAGAGATAAGGCCACCTTTACATGT
TTCGTCGTGGGCTCTGACCTGAAGGATGCCCATTTGACTTGGGAGGTTGCCGAAA
GGTACCCACAGGGGGGGTTGAGGAAGGGTTGCTGGAGCGCCATTCCAATGGCTCT
CAGAGCCAGCACTCAAGACTCACCTTCCGAGATCCCTGTGGAACGCCGGGACCTC
TGTCACATGTACTCTAAATCATCCTAGCCTGCCCCACAGCGTCTGATGGCCCTTAG
AGAGCCAGCCGCCAGGCACCAAGTTAAGCTTAGCCTGAATCTGCTCGCCAGTAGTG
ATCCCCCAGAGGCCGCCAGCTGGCTCTTATGCGAAGTGTCCGGCTTTAGCCCCGCC
AACATCTTGCTCATGTGGCTGGAGGACCAGCGAGAAGTGAACACCAGCGGCTTCG
CTCCAGCCCCGGCCCCACCCAGCCGGGTTCTACCACATTCTGGGCCTGGAGTGTC
TTAAGGGTCCCAGCACCACTAGCCCCAGCCAGCCACATACACCTGTGTTGTGTC
CCATGAAGATAGCAGGACCCTGCTAAATGCTTCTAGGAGTCTGGAGGTTTCCTACG
TGACTGACCATT (SEQ ID NO:107).

[00192] In one aspect, the transmembrane domain may be recombinant, in which case it will comprise predominantly hydrophobic residues such as leucine and valine. In one aspect, a triplet of phenylalanine, tryptophan and valine can be found at each end of a recombinant transmembrane domain.

[00193] Optionally, a short oligo- or polypeptide linker, e.g., between 2 and 10 amino acids in length, may form the linkage between the transmembrane domain and the cytoplasmic region of the CAR. A glycine-serine doublet is an example of a suitable linker. For example, in one aspect, the linker comprises the amino acid sequence of GGGSGGGGS (SEQ ID NO:108).

In some embodiments, the linker is encoded by a nucleotide sequence of
GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC (SEQ ID NO:109).

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

Cytoplasmic domain

[00194] The cytoplasmic domain or region of the CAR includes an intracellular signaling domain. An intracellular signaling domain is generally responsible for activation of at least one of the normal effector functions of the immune cell in which the CAR has been introduced. The term “effector function” refers to a specialized function of a cell. Effector function of a T cell, for example, may be cytolytic activity or helper activity including the secretion of cytokines. Thus the term “intracellular signaling domain” refers to the portion of a protein which transduces the effector function signal and directs the cell to perform a specialized function. While usually the entire intracellular signaling domain can be employed, in many cases it is not necessary to use the entire chain. To the extent that a truncated portion of the intracellular signaling domain is used, such truncated portion may be used in place of the intact chain as long as it transduces the effector function signal. The term intracellular signaling domain is thus meant to include any truncated portion of the intracellular signaling domain sufficient to transduce the effector function signal.

[00195] Examples of intracellular signaling domains for use in the CAR of the invention include the cytoplasmic sequences of the T cell receptor (TCR) and co-receptors that act in concert to initiate signal transduction following antigen receptor engagement, as well as any derivative or variant of these sequences and any recombinant sequence that has the same functional capability.

[00196] It is known that signals generated through the TCR alone are insufficient for full activation of the T cell and that a secondary and/or costimulatory signal is also required. Thus, T cell activation can be said to be mediated by two distinct classes of cytoplasmic signaling sequences: those that initiate antigen-dependent primary activation through the TCR (primary intracellular signaling domains) and those that act in an antigen-independent manner to provide a secondary or costimulatory signal (secondary cytoplasmic signaling domain, e.g., a costimulatory domain).

[00197] A primary signaling domain regulates primary activation of the TCR complex either in a stimulatory way, or in an inhibitory way. Primary intracellular signaling domains that act in a stimulatory manner may contain signaling motifs which are known as immunoreceptor tyrosine-based activation motifs or ITAMs.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

[00198] Examples of ITAM containing primary intracellular signaling domains that are of particular use in the invention include those of TCR zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 epsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b, and CD66d. In one embodiment, a CAR of the invention, e.g., a CAR selected from the group consisting of SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:79, and SEQ ID NO:85, comprises a intracellular signaling domain, e.g., a primary signaling domain, of CD3-zeta. In one embodiment, a primary signaling domain comprises a modified ITAM domain, e.g., a mutated ITAM domain which has altered (e.g., increased or decreased) activity as compared to the native ITAM domain. In one embodiment, a primary signaling domain comprises a modified ITAM-containing primary intracellular signaling domain, e.g., an optimized and/or truncated ITAM-containing primary intracellular signaling domain. In an embodiment, a primary signaling domain comprises one, two, three, four or more ITAM motifs.

[00199] The intracellular signaling domain of the CAR can comprise the CD3-zeta signaling domain by itself or it can be combined with any other desired intracellular signaling domain(s) useful in the context of a CAR of the invention. For example, the intracellular signaling domain of the CAR can comprise a CD3 zeta chain portion and a costimulatory signaling domain. The costimulatory signaling domain refers to a portion of the CAR comprising the intracellular domain of a costimulatory molecule. A costimulatory molecule is a cell surface molecule other than an antigen receptor or its ligands that is required for an efficient response of lymphocytes to an antigen. Examples of such molecules include CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, and a ligand that specifically binds with CD83, and the like. For example, CD27 costimulation has been demonstrated to enhance expansion, effector function, and survival of human CART cells in vitro and augments human T cell persistence and antitumor activity in vivo (Song et al. Blood. 2012; 119(3):696-706).

[00200] The intracellular signaling sequences within the cytoplasmic portion of a CAR of the invention may be linked to each other in a random or specified order. Optionally, a short oligo- or polypeptide linker, for example, between 2 and 10 amino acids (e.g., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10 amino acids) in length may form the linkage between intracellular signaling sequence.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

In one embodiment, a glycine-serine doublet can be used as a suitable linker. In one embodiment, a single amino acid, e.g., an alanine, a glycine, can be used as a suitable linker.

[00201] In one aspect, the intracellular signaling domain is designed to comprise two or more, e.g., 2, 3, 4, 5, or more, costimulatory signaling domains. In an embodiment, the two or more, e.g., 2, 3, 4, 5, or more, costimulatory signaling domains, are separated by a linker molecule, e.g., a linker molecule described herein. In one embodiment, the intracellular signaling domain comprises two costimulatory signaling domains. In some embodiments, the linker molecule is a glycine residue. In some embodiments, the linker is an alanine residue.

[00202] In one aspect, the intracellular signaling domain is designed to comprise the signaling domain of CD3-zeta and the signaling domain of CD28. In one aspect, the intracellular signalling domain is designed to comprise the signaling domain of CD3-zeta and the signaling domain of 4-1BB. In one aspect, the signaling domain of 4-1BB is a signaling domain of SEQ ID NO: 16. In one aspect, the signaling domain of CD3-zeta is a signaling domain of SEQ ID NO: 17.

[00203] In one aspect, the intracellular signaling domain is designed to comprise the signaling domain of CD3-zeta and the signaling domain of CD27. In one aspect, the signaling domain of CD27 comprises an amino acid sequence of QRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP (SEQ ID NO:102). In one aspect, the signalling domain of CD27 is encoded by a nucleic acid sequence of AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAACATGACTCCCCGCC GCCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCGCGACTTCGCA GCCTATCGCTCC (SEQ ID NO:103).

[00204] In one aspect, the CAR-expressing cell described herein can further comprise a second CAR, e.g., a second CAR that includes a different antigen binding domain, e.g., to the same target (EGFRvIII) or a different target.

[00205] In another aspect, the present invention provides a population of CAR-expressing cells, e.g., CART cells. In some embodiments, the population of CAR-expressing cells comprises a mixture of cells expressing different CARs. For example, in one embodiment, the population of CART cells can include a first cell expressing a CAR having an anti-EGFRvIII binding domain described herein, and a second cell expressing a CAR having a different anti-

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

EGFRvIII binding domain, e.g., an anti-EGFRvIII binding domain described herein that differs from the anti-EGFRvIII binding domain in the CAR expressed by the first cell. As another example, the population of CAR-expressing cells can include a first cell expressing a CAR that includes an anti-EGFRvIII binding domain, e.g., as described herein, and a second cell expressing a CAR that includes an antigen binding domain to a target other than EGFRvIII. In one embodiment, the population of CAR-expressing cells includes, e.g., a first cell expressing a CAR that includes a primary intracellular signaling domain, and a second cell expressing a CAR that includes a secondary signaling domain.

[00206] In another aspect, the present invention provides a population of cells wherein at least one cell in the population expresses a CAR having an anti-EGFRvIII domain described herein, and a second cell expressing another agent, e.g., an agent which enhances the activity of a CAR-expressing cell. For example, in one embodiment, the agent can be an agent which inhibits an inhibitory molecule. Inhibitory molecules, e.g., PD1, can, in some embodiments, decrease the ability of a CAR-expressing cell to mount an immune effector response. Examples of inhibitory molecules include PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 and TGFR beta.

RNA Transfection

[00207] Disclosed herein are methods for producing an in vitro transcribed RNA CAR. The present invention also includes a CAR encoding RNA construct that can be directly transfected into a cell. A method for generating mRNA for use in transfection can involve in vitro transcription (IVT) of a template with specially designed primers, followed by polyA addition, to produce a construct containing 3' and 5' untranslated sequence ("UTR"), a 5' cap and/or Internal Ribosome Entry Site (IRES), the nucleic acid to be expressed, and a polyA tail, typically 50-2000 bases in length (SEQ ID NO: 116). RNA so produced can efficiently transfect different kinds of cells. In one aspect, the template includes sequences for the CAR.

[00208] In one aspect the EGFRvIII CAR is encoded by a messenger RNA (mRNA). In one aspect the mRNA encoding the EGFRvIII CAR is introduced into a T cell for production of a CART cell.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

[00209] In one embodiment, the in vitro transcribed RNA CAR can be introduced to a cell as a form of transient transfection. The RNA is produced by in vitro transcription using a polymerase chain reaction (PCR)-generated template. DNA of interest from any source can be directly converted by PCR into a template for in vitro mRNA synthesis using appropriate primers and RNA polymerase. The source of the DNA can be, for example, genomic DNA, plasmid DNA, phage DNA, cDNA, synthetic DNA sequence or any other appropriate source of DNA. The desired template for in vitro transcription is a CAR of the present invention. For example, the template for the RNA CAR comprises an extracellular region comprising a single chain variable domain of an anti-tumor antibody; a hinge region, a transmembrane domain (e.g., a transmembrane domain of CD8a); and a cytoplasmic region that includes an intracellular signaling domain, e.g., comprising the signaling domain of CD3-zeta and the signaling domain of 4-1BB.

[00210] In one embodiment, the DNA to be used for PCR contains an open reading frame. The DNA can be from a naturally occurring DNA sequence from the genome of an organism. In one embodiment, the nucleic acid can include some or all of the 5' and/or 3' untranslated regions (UTRs). The nucleic acid can include exons and introns. In one embodiment, the DNA to be used for PCR is a human nucleic acid sequence. In another embodiment, the DNA to be used for PCR is a human nucleic acid sequence including the 5' and 3' UTRs. The DNA can alternatively be an artificial DNA sequence that is not normally expressed in a naturally occurring organism. An exemplary artificial DNA sequence is one that contains portions of genes that are ligated together to form an open reading frame that encodes a fusion protein. The portions of DNA that are ligated together can be from a single organism or from more than one organism.

[00211] PCR is used to generate a template for in vitro transcription of mRNA which is used for transfection. Methods for performing PCR are well known in the art. Primers for use in PCR are designed to have regions that are substantially complementary to regions of the DNA to be used as a template for the PCR. "Substantially complementary," as used herein, refers to sequences of nucleotides where a majority or all of the bases in the primer sequence are complementary, or one or more bases are non-complementary, or mismatched. Substantially complementary sequences are able to anneal or hybridize with the intended DNA target under annealing conditions used for PCR. The primers can be designed to be substantially

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

complementary to any portion of the DNA template. For example, the primers can be designed to amplify the portion of a nucleic acid that is normally transcribed in cells (the open reading frame), including 5' and 3' UTRs. The primers can also be designed to amplify a portion of a nucleic acid that encodes a particular domain of interest. In one embodiment, the primers are designed to amplify the coding region of a human cDNA, including all or portions of the 5' and 3' UTRs. Primers useful for PCR can be generated by synthetic methods that are well known in the art. "Forward primers" are primers that contain a region of nucleotides that are substantially complementary to nucleotides on the DNA template that are upstream of the DNA sequence that is to be amplified. "Upstream" is used herein to refer to a location 5' to the DNA sequence to be amplified relative to the coding strand. "Reverse primers" are primers that contain a region of nucleotides that are substantially complementary to a double-stranded DNA template that are downstream of the DNA sequence that is to be amplified. "Downstream" is used herein to refer to a location 3' to the DNA sequence to be amplified relative to the coding strand.

[00212] Any DNA polymerase useful for PCR can be used in the methods disclosed herein. The reagents and polymerase are commercially available from a number of sources.

[00213] Chemical structures with the ability to promote stability and/or translation efficiency may also be used. The RNA preferably has 5' and 3' UTRs. In one embodiment, the 5' UTR is between one and 3000 nucleotides in length. The length of 5' and 3' UTR sequences to be added to the coding region can be altered by different methods, including, but not limited to, designing primers for PCR that anneal to different regions of the UTRs. Using this approach, one of ordinary skill in the art can modify the 5' and 3' UTR lengths required to achieve optimal translation efficiency following transfection of the transcribed RNA.

[00214] The 5' and 3' UTRs can be the naturally occurring, endogenous 5' and 3' UTRs for the nucleic acid of interest. Alternatively, UTR sequences that are not endogenous to the nucleic acid of interest can be added by incorporating the UTR sequences into the forward and reverse primers or by any other modifications of the template. The use of UTR sequences that are not endogenous to the nucleic acid of interest can be useful for modifying the stability and/or translation efficiency of the RNA. For example, it is known that AU-rich elements in 3' UTR sequences can decrease the stability of mRNA. Therefore, 3' UTRs can be selected or

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

designed to increase the stability of the transcribed RNA based on properties of UTRs that are well known in the art.

[00215] In one embodiment, the 5' UTR can contain the Kozak sequence of the endogenous nucleic acid. Alternatively, when a 5' UTR that is not endogenous to the nucleic acid of interest is being added by PCR as described above, a consensus Kozak sequence can be redesigned by adding the 5' UTR sequence. Kozak sequences can increase the efficiency of translation of some RNA transcripts, but does not appear to be required for all RNAs to enable efficient translation. The requirement for Kozak sequences for many mRNAs is known in the art. In other embodiments the 5' UTR can be 5'UTR of an RNA virus whose RNA genome is stable in cells. In other embodiments various nucleotide analogues can be used in the 3' or 5' UTR to impede exonuclease degradation of the mRNA.

[00216] To enable synthesis of RNA from a DNA template without the need for gene cloning, a promoter of transcription should be attached to the DNA template upstream of the sequence to be transcribed. When a sequence that functions as a promoter for an RNA polymerase is added to the 5' end of the forward primer, the RNA polymerase promoter becomes incorporated into the PCR product upstream of the open reading frame that is to be transcribed. In one preferred embodiment, the promoter is a T7 polymerase promoter, as described elsewhere herein. Other useful promoters include, but are not limited to, T3 and SP6 RNA polymerase promoters. Consensus nucleotide sequences for T7, T3 and SP6 promoters are known in the art.

[00217] In a preferred embodiment, the mRNA has both a cap on the 5' end and a 3' poly(A) tail which determine ribosome binding, initiation of translation and stability mRNA in the cell. On a circular DNA template, for instance, plasmid DNA, RNA polymerase produces a long concatameric product which is not suitable for expression in eukaryotic cells. The transcription of plasmid DNA linearized at the end of the 3' UTR results in normal sized mRNA which is not effective in eukaryotic transfection even if it is polyadenylated after transcription.

[00218] On a linear DNA template, phage T7 RNA polymerase can extend the 3' end of the transcript beyond the last base of the template (Schenborn and Mierendorf, *Nuc Acids Res.*, 13:6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, *Eur. J. Biochem.*, 270:1485-65 (2003).

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

[00219] The conventional method of integration of polyA/T stretches into a DNA template is molecular cloning. However polyA/T sequence integrated into plasmid DNA can cause plasmid instability, which is why plasmid DNA templates obtained from bacterial cells are often highly contaminated with deletions and other aberrations. This makes cloning procedures not only laborious and time consuming but often not reliable. That is why a method which allows construction of DNA templates with polyA/T 3' stretch without cloning highly desirable.

[00220] The polyA/T segment of the transcriptional DNA template can be produced during PCR by using a reverse primer containing a polyT tail, such as 100T tail (SEQ ID NO: 117) (size can be 50-5000 T (SEQ ID NO: 118)), or after PCR by any other method, including, but not limited to, DNA ligation or in vitro recombination. Poly(A) tails also provide stability to RNAs and reduce their degradation. Generally, the length of a poly(A) tail positively correlates with the stability of the transcribed RNA. In one embodiment, the poly(A) tail is between 100 and 5000 adenosines (SEQ ID NO: 119).

[00221] Poly(A) tails of RNAs can be further extended following in vitro transcription with the use of a poly(A) polymerase, such as E. coli polyA polymerase (E-PAP). In one embodiment, increasing the length of a poly(A) tail from 100 nucleotides to between 300 and 400 nucleotides (SEQ ID NO: 120) results in about a two-fold increase in the translation efficiency of the RNA. Additionally, the attachment of different chemical groups to the 3' end can increase mRNA stability. Such attachment can contain modified/artificial nucleotides, aptamers and other compounds. For example, ATP analogs can be incorporated into the poly(A) tail using poly(A) polymerase. ATP analogs can further increase the stability of the RNA.

[00222] 5' caps on also provide stability to RNA molecules. In a preferred embodiment, RNAs produced by the methods disclosed herein include a 5' cap. The 5' cap is provided using techniques known in the art and described herein (Cougot, et al., Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., RNA, 7:1468-95 (2001); Elango, et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005)).

[00223] The RNAs produced by the methods disclosed herein can also contain an internal ribosome entry site (IRES) sequence. The IRES sequence may be any viral, chromosomal or artificially designed sequence which initiates cap-independent ribosome binding to mRNA and

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

facilitates the initiation of translation. Any solutes suitable for cell electroporation, which can contain factors facilitating cellular permeability and viability such as sugars, peptides, lipids, proteins, antioxidants, and surfactants can be included.

[00224] RNA can be introduced into target cells using any of a number of different methods, for instance, commercially available methods which include, but are not limited to, electroporation (Amaza Nucleofector-II (Amaza Biosystems, Cologne, Germany)), (ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.) or the Gene Pulser II (BioRad, Denver, Colo.), Multiporator (Eppendorf, Hamburg Germany), cationic liposome mediated transfection using lipofection, polymer encapsulation, peptide mediated transfection, or biolistic particle delivery systems such as “gene guns” (see, for example, Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12(8):861-70 (2001).

Nucleic Acid Constructs Encoding a CAR

[00225] The present invention provides nucleic acid molecules encoding one or more CAR constructs described herein. In one aspect, the nucleic acid molecule is provided as a messenger RNA transcript. In one aspect, the nucleic acid molecule is provided as a DNA construct.

[00226] Accordingly, in one aspect, the invention pertains to an isolated nucleic acid molecule encoding a chimeric antigen receptor (CAR), wherein the CAR comprises a anti-EGFRvIII binding domain (e.g., a humanized anti-EGFRvIII binding domain), a transmembrane domain, and an intracellular signaling domain comprising a stimulatory domain, e.g., a costimulatory signaling domain and/or a primary signaling domain, e.g., zeta chain. In one embodiment, the anti-EGFRvIII binding domain is an anti-EGFRvIII binding domain described herein, e.g., an anti-EGFRvIII binding domain which comprises a sequence selected from a group consisting of SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:74, and SEQ ID NO:80, or a sequence with 95-99% identity thereof. In one embodiment, the isolated nucleic acid molecule further comprises a sequence encoding a costimulatory domain. In one embodiment, the costimulatory domain is a functional signaling domain of a protein selected from the group consisting of OX40, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), and 4-1BB

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

(CD137). In one embodiment, the costimulatory domain comprises a sequence of SEQ ID NO:16, or a sequence with 95-99% identity thereof. In one embodiment, the transmembrane domain is transmembrane domain of a protein selected from the group consisting of the alpha, beta or zeta chain of the T-cell receptor, CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 and CD154. In one embodiment, the transmembrane domain comprises a sequence of SEQ ID NO: 15, or a sequence with 95-99% identity thereof. In one embodiment, the intracellular signaling domain comprises a functional signaling domain of 4-1BB and a functional signaling domain of CD3 zeta. In one embodiment, the intracellular signaling domain comprises the sequence of SEQ ID NO: 16 or SEQ ID NO:102, or a sequence with 95-99% identity thereof, and the sequence of SEQ ID NO: 17 or SEQ ID NO:99, or a sequence with 95-99% identity thereof, wherein the sequences comprising the intracellular signaling domain are expressed in the same frame and as a single polypeptide chain. In one embodiment, the anti-EGFRvIII binding domain is connected to the transmembrane domain by a hinge region, e.g., a hinge described herein. In one embodiment, the hinge region comprises SEQ ID NO:14 or SEQ ID NO:104 or SEQ ID NO:106 or SEQ ID NO:108, or a sequence with 95-99% identity thereof.

[00227] In another aspect, the invention pertains to an isolated nucleic acid molecule encoding a CAR construct comprising a leader sequence of SEQ ID NO: 13, a scFv domain having a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:80, and SEQ ID NO:86 (or a sequence with 95-99% identity thereof), a hinge region of SEQ ID NO:14 or SEQ ID NO:104 or SEQ ID NO:106 or SEQ ID NO:108 (or a sequence with 95-99% identity thereof), a transmembrane domain having a sequence of SEQ ID NO: 15 (or a sequence with 95-99% identity thereof), a 4-1BB costimulatory domain having a sequence of SEQ ID NO:16 or a CD27 costimulatory domain having a sequence of SEQ ID NO:102 (or a sequence with 95-99% identity thereof), and a CD3 zeta stimulatory domain having a sequence of SEQ ID NO:17 or SEQ ID NO:99 (or a sequence with 95-99% identity thereof).

[00228] In another aspect, the invention pertains to an isolated polypeptide molecule encoded by the nucleic acid molecule. In one embodiment, the isolated polypeptide molecule comprises a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:79, SEQ ID

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

NO:85, and SEQ ID NO:90 or a sequence with 95-99% identity thereof. In one embodiment, the isolated polypeptide comprises a sequence of SEQ ID NO:73, or a sequence with 95-99% identity thereof. In one embodiment, the isolated polypeptide comprises a sequence of SEQ ID NO:79, or a sequence with 95-99% identity thereof.

[00229] In another aspect, the invention pertains to a nucleic acid molecule encoding a chimeric antigen receptor (CAR) molecule that comprises an anti-EGFRvIII binding domain, a transmembrane domain, and an intracellular signaling domain comprising a stimulatory domain, and wherein said anti-EGFRvIII binding domain comprises a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:80, and SEQ ID NO:86, or a sequence with 95-99% identity thereof.

[00230] In one embodiment, the encoded CAR molecule further comprises a sequence encoding a costimulatory domain. In one embodiment, the costimulatory domain is a functional signaling domain of a protein selected from the group consisting of OX40, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) and 4-1BB (CD137). In one embodiment, the costimulatory domain comprises a sequence of SEQ ID NO:16. In one embodiment, the transmembrane domain is a transmembrane domain of a protein selected from the group consisting of the alpha, beta or zeta chain of the T-cell receptor, CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 and CD154. In one embodiment, the transmembrane domain comprises a sequence of SEQ ID NO:15. In one embodiment, the intracellular signaling domain comprises a functional signaling domain of 4-1BB and a functional signaling domain of zeta. In one embodiment, the intracellular signaling domain comprises the sequence of SEQ ID NO: 16 and the sequence of SEQ ID NO: 17, wherein the sequences comprising the intracellular signaling domain are expressed in the same frame and as a single polypeptide chain. In one embodiment, the anti-EGFRvIII binding domain is connected to the transmembrane domain by a hinge region. In one embodiment, the hinge region comprises SEQ ID NO:14. In one embodiment, the hinge region comprises SEQ ID NO:104 or SEQ ID NO:106 or SEQ ID NO:108

[00231] In another aspect, the invention pertains to an encoded CAR molecule comprising a leader sequence of SEQ ID NO: 13, a scFv domain having a sequence selected from the group

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

consisting of SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:80, and SEQ ID NO:86, or a sequence with 95-99% identity thereof, a hinge region of SEQ ID NO:14 or SEQ ID NO:104 or SEQ ID NO:106 or SEQ ID NO:108, a transmembrane domain having a sequence of SEQ ID NO: 15, a 4-1BB costimulatory domain having a sequence of SEQ ID NO:16 or a CD27 costimulatory domain having a sequence of SEQ ID NO:102, and a CD3 zeta stimulatory domain having a sequence of SEQ ID NO:17 or SEQ ID NO:99. In one embodiment, the encoded CAR molecule comprises a sequence selected from a group consisting of SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:85, and SEQ ID NO:90, or a sequence with 95-99% identity thereof. In one embodiment, the encoded CAR molecule comprises a sequence of SEQ ID NO:73, or a sequence with 95-99% identity thereof. In one embodiment, the isolated CAR molecule comprises a sequence of SEQ ID NO:79, or a sequence with 95-99% identity thereof.

[00232] The nucleic acid sequences coding for the desired molecules can be obtained using recombinant methods known in the art, such as, for example by screening libraries from cells expressing the gene, by deriving the gene from a vector known to include the same, or by isolating directly from cells and tissues containing the same, using standard techniques. Alternatively, the gene of interest can be produced synthetically, rather than cloned.

[00233] The present invention also provides vectors in which a DNA of the present invention is inserted. Vectors derived from retroviruses such as the lentivirus are suitable tools to achieve long-term gene transfer since they allow long-term, stable integration of a transgene and its propagation in daughter cells. Lentiviral vectors have the added advantage over vectors derived from onco-retroviruses such as murine leukemia viruses in that they can transduce non-proliferating cells, such as hepatocytes. They also have the added advantage of low immunogenicity.

[00234] In brief summary, the expression of natural or synthetic nucleic acids encoding CARs is typically achieved by operably linking a nucleic acid encoding the CAR polypeptide or portions thereof to a promoter, and incorporating the construct into an expression vector. The vectors can be suitable for replication and integration eukaryotes. Typical cloning vectors

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

contain transcription and translation terminators, initiation sequences, and promoters useful for regulation of the expression of the desired nucleic acid sequence.

[00235] The expression constructs of the present invention may also be used for nucleic acid immunization and gene therapy, using standard gene delivery protocols. Methods for gene delivery are known in the art. See, e.g., U.S. Pat. Nos. 5,399,346, 5,580,859, 5,589,466, incorporated by reference herein in their entireties. In another embodiment, the invention provides a gene therapy vector.

[00236] The nucleic acid can be cloned into a number of types of vectors. For example, the nucleic acid can be cloned into a vector including, but not limited to a plasmid, a phagemid, a phage derivative, an animal virus, and a cosmid. Vectors of particular interest include expression vectors, replication vectors, probe generation vectors, and sequencing vectors.

[00237] Further, the expression vector may be provided to a cell in the form of a viral vector. Viral vector technology is well known in the art and is described, for example, in Sambrook et al. (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York), and in other virology and molecular biology manuals. Viruses, which are useful as vectors include, but are not limited to, retroviruses, adenoviruses, adeno-associated viruses, herpes viruses, and lentiviruses. In general, a suitable vector contains an origin of replication functional in at least one organism, a promoter sequence, convenient restriction endonuclease sites, and one or more selectable markers, (e.g., WO 01/96584; WO 01/29058; and U.S. Pat. No. 6,326,193).

[00238] A number of viral based systems have been developed for gene transfer into mammalian cells. For example, retroviruses provide a convenient platform for gene delivery systems. A selected gene can be inserted into a vector and packaged in retroviral particles using techniques known in the art. The recombinant virus can then be isolated and delivered to cells of the subject either in vivo or ex vivo. A number of retroviral systems are known in the art. In some embodiments, adenovirus vectors are used. A number of adenovirus vectors are known in the art. In one embodiment, lentivirus vectors are used.

[00239] Additional promoter elements, e.g., enhancers, regulate the frequency of transcriptional initiation. Typically, these are located in the region 30-110 bp upstream of the start site, although a number of promoters have recently been shown to contain functional

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

elements downstream of the start site as well. The spacing between promoter elements frequently is flexible, so that promoter function is preserved when elements are inverted or moved relative to one another. In the thymidine kinase (tk) promoter, the spacing between promoter elements can be increased to 50 bp apart before activity begins to decline. Depending on the promoter, it appears that individual elements can function either cooperatively or independently to activate transcription.

[00240] One example of a suitable promoter is the immediate early cytomegalovirus (CMV) promoter sequence. This promoter sequence is a strong constitutive promoter sequence capable of driving high levels of expression of any polynucleotide sequence operatively linked thereto. Another example of a suitable promoter is Elongation Growth Factor -1 α (EF-1 α). However, other constitutive promoter sequences may also be used, including, but not limited to the simian virus 40 (SV40) early promoter, mouse mammary tumor virus (MMTV), human immunodeficiency virus (HIV) long terminal repeat (LTR) promoter, MoMuLV promoter, an avian leukemia virus promoter, an Epstein-Barr virus immediate early promoter, a Rous sarcoma virus promoter, as well as human gene promoters such as, but not limited to, the actin promoter, the myosin promoter, the hemoglobin promoter, and the creatine kinase promoter. Further, the invention should not be limited to the use of constitutive promoters. Inducible promoters are also contemplated as part of the invention. The use of an inducible promoter provides a molecular switch capable of turning on expression of the polynucleotide sequence which it is operatively linked when such expression is desired, or turning off the expression when expression is not desired. Examples of inducible promoters include, but are not limited to a metallothionine promoter, a glucocorticoid promoter, a progesterone promoter, and a tetracycline promoter.

[00241] In order to assess the expression of a CAR polypeptide or portions thereof, the expression vector to be introduced into a cell can also contain either a selectable marker gene or a reporter gene or both to facilitate identification and selection of expressing cells from the population of cells sought to be transfected or infected through viral vectors. In other aspects, the selectable marker may be carried on a separate piece of DNA and used in a co-transfection procedure. Both selectable markers and reporter genes may be flanked with appropriate regulatory sequences to enable expression in the host cells. Useful selectable markers include, for example, antibiotic-resistance genes, such as neo and the like.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

[00242] Reporter genes are used for identifying potentially transfected cells and for evaluating the functionality of regulatory sequences. In general, a reporter gene is a gene that is not present in or expressed by the recipient organism or tissue and that encodes a polypeptide whose expression is manifested by some easily detectable property, e.g., enzymatic activity. Expression of the reporter gene is assayed at a suitable time after the DNA has been introduced into the recipient cells. Suitable reporter genes may include genes encoding luciferase, beta-galactosidase, chloramphenicol acetyl transferase, secreted alkaline phosphatase, or the green fluorescent protein gene (e.g., Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479: 79-82). Suitable expression systems are well known and may be prepared using known techniques or obtained commercially. In general, the construct with the minimal 5' flanking region showing the highest level of expression of reporter gene is identified as the promoter. Such promoter regions may be linked to a reporter gene and used to evaluate agents for the ability to modulate promoter-driven transcription.

[00243] Methods of introducing and expressing genes into a cell are known in the art. In the context of an expression vector, the vector can be readily introduced into a host cell, e.g., mammalian, bacterial, yeast, or insect cell by any method in the art. For example, the expression vector can be transferred into a host cell by physical, chemical, or biological means.

[00244] Physical methods for introducing a polynucleotide into a host cell include calcium phosphate precipitation, lipofection, particle bombardment, microinjection, electroporation, and the like. Methods for producing cells comprising vectors and/or exogenous nucleic acids are well-known in the art. See, for example, Sambrook et al. (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York). A preferred method for the introduction of a polynucleotide into a host cell is calcium phosphate transfection.

[00245] Biological methods for introducing a polynucleotide of interest into a host cell include the use of DNA and RNA vectors. Viral vectors, and especially retroviral vectors, have become the most widely used method for inserting genes into mammalian, e.g., human cells. Other viral vectors can be derived from lentivirus, poxviruses, herpes simplex virus I, adenoviruses and adeno-associated viruses, and the like. See, for example, U.S. Pat. Nos. 5,350,674 and 5,585,362.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

[00246] Chemical means for introducing a polynucleotide into a host cell include colloidal dispersion systems, such as macromolecule complexes, nanocapsules, microspheres, beads, and lipid-based systems including oil-in-water emulsions, micelles, mixed micelles, and liposomes. An exemplary colloidal system for use as a delivery vehicle in vitro and in vivo is a liposome (e.g., an artificial membrane vesicle).

[00247] In the case where a non-viral delivery system is utilized, an exemplary delivery vehicle is a nanoparticle, e.g., a liposome or other suitable sub-micron sized delivery system. The use of lipid formulations is contemplated for the introduction of the nucleic acids into a host cell (in vitro, ex vivo or in vivo). In another aspect, the nucleic acid may be associated with a lipid. The nucleic acid associated with a lipid may be encapsulated in the aqueous interior of a liposome, interspersed within the lipid bilayer of a liposome, attached to a liposome via a linking molecule that is associated with both the liposome and the oligonucleotide, entrapped in a liposome, complexed with a liposome, dispersed in a solution containing a lipid, mixed with a lipid, combined with a lipid, contained as a suspension in a lipid, contained or complexed with a micelle, or otherwise associated with a lipid. Lipid, lipid/DNA or lipid/expression vector associated compositions are not limited to any particular structure in solution. For example, they may be present in a bilayer structure, as micelles, or with a "collapsed" structure. They may also simply be interspersed in a solution, possibly forming aggregates that are not uniform in size or shape. Lipids are fatty substances which may be naturally occurring or synthetic lipids. For example, lipids include the fatty droplets that naturally occur in the cytoplasm as well as the class of compounds which contain long-chain aliphatic hydrocarbons and their derivatives, such as fatty acids, alcohols, amines, amino alcohols, and aldehydes.

[00248] Lipids suitable for use can be obtained from commercial sources. For example, dimyristyl phosphatidylcholine ("DMPC") can be obtained from Sigma, St. Louis, MO; dicetyl phosphate ("DCP") can be obtained from K & K Laboratories (Plainview, NY); cholesterol ("Choi") can be obtained from Calbiochem-Behring; dimyristyl phosphatidylglycerol ("DMPG") and other lipids may be obtained from Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, AL). Stock solutions of lipids in chloroform or chloroform/methanol can be stored at about -20°C. Chloroform is used as the only solvent since it is more readily evaporated than methanol.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

“Liposome” is a generic term encompassing a variety of single and multilamellar lipid vehicles formed by the generation of enclosed lipid bilayers or aggregates. Liposomes can be characterized as having vesicular structures with a phospholipid bilayer membrane and an inner aqueous medium. Multilamellar liposomes have multiple lipid layers separated by aqueous medium. They form spontaneously when phospholipids are suspended in an excess of aqueous solution. The lipid components undergo self-rearrangement before the formation of closed structures and entrap water and dissolved solutes between the lipid bilayers (Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5: 505-10). However, compositions that have different structures in solution than the normal vesicular structure are also encompassed. For example, the lipids may assume a micellar structure or merely exist as nonuniform aggregates of lipid molecules. Also contemplated are lipofectamine-nucleic acid complexes.

[00249] Regardless of the method used to introduce exogenous nucleic acids into a host cell or otherwise expose a cell to the inhibitor of the present invention, in order to confirm the presence of the recombinant DNA sequence in the host cell, a variety of assays may be performed. Such assays include, for example, “molecular biological” assays well known to those of skill in the art, such as Southern and Northern blotting, RT-PCR and PCR; “biochemical” assays, such as detecting the presence or absence of a particular peptide, e.g., by immunological means (ELISAs and Western blots) or by assays described herein to identify agents falling within the scope of the invention.

[00250] The present invention further provides a vector comprising a CAR encoding nucleic acid molecule. In one aspect, a CAR vector can be directly transduced into a cell, e.g., a T cell. In one aspect, the vector is a cloning or expression vector, e.g., a vector including, but not limited to, one or more plasmids (e.g., expression plasmids, cloning vectors, minicircles, minivectors, double minute chromosomes), retroviral and lentiviral vector constructs. In one aspect, the vector is capable of expressing the CAR construct in mammalian T cells. In one aspect, the mammalian T cell is a human T cell.

Sources of T cells

[00251] Prior to expansion and genetic modification, a source of T cells is obtained from a subject. The term “subject” is intended to include living organisms in which an immune

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

response can be elicited (e.g., mammals). Examples of subjects include humans, dogs, cats, mice, rats, and transgenic species thereof. T cells can be obtained from a number of sources, including peripheral blood mononuclear cells, bone marrow, lymph node tissue, cord blood, thymus tissue, tissue from a site of infection, ascites, pleural effusion, spleen tissue, and tumors. In certain aspects of the present invention, any number of T cell lines available in the art, may be used. In certain aspects of the present invention, T cells can be obtained from a unit of blood collected from a subject using any number of techniques known to the skilled artisan, such as Ficoll™ separation. In one preferred aspect, cells from the circulating blood of an individual are obtained by apheresis. The apheresis product typically contains lymphocytes, including T cells, monocytes, granulocytes, B cells, other nucleated white blood cells, red blood cells, and platelets. In one aspect, the cells collected by apheresis may be washed to remove the plasma fraction and to place the cells in an appropriate buffer or media for subsequent processing steps. In one aspect of the invention, the cells are washed with phosphate buffered saline (PBS). In an alternative aspect, the wash solution lacks calcium and may lack magnesium or may lack many if not all divalent cations. Initial activation steps in the absence of calcium can lead to magnified activation. As those of ordinary skill in the art would readily appreciate a washing step may be accomplished by methods known to those in the art, such as by using a semi-automated “flow-through” centrifuge (for example, the Cobe 2991 cell processor, the Baxter CytoMate, or the Haemonetics Cell Saver 5) according to the manufacturer’s instructions. After washing, the cells may be resuspended in a variety of biocompatible buffers, such as, for example, Ca-free, Mg-free PBS, PlasmaLyte A, or other saline solution with or without buffer. Alternatively, the undesirable components of the apheresis sample may be removed and the cells directly resuspended in culture media.

[00252] In one aspect, T cells are isolated from peripheral blood lymphocytes by lysing the red blood cells and depleting the monocytes, for example, by centrifugation through a PERCOLL™ gradient or by counterflow centrifugal elutriation. A specific subpopulation of T cells, such as CD3+, CD28+, CD4+, CD8+, CD45RA+, and CD45RO+T cells, can be further isolated by positive or negative selection techniques. For example, in one aspect, T cells are isolated by incubation with anti-CD3/anti-CD28 (e.g., 3x28)-conjugated beads, such as DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T, for a time period sufficient for positive selection of the desired T cells. In one aspect, the time period is about 30 minutes. In a further aspect, the time

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

period ranges from 30 minutes to 36 hours or longer and all integer values there between. In a further aspect, the time period is at least 1, 2, 3, 4, 5, or 6 hours. In yet another preferred aspect, the time period is 10 to 24 hours. In one aspect, the incubation time period is 24 hours. Longer incubation times may be used to isolate T cells in any situation where there are few T cells as compared to other cell types, such in isolating tumor infiltrating lymphocytes (TIL) from tumor tissue or from immunocompromised individuals. Further, use of longer incubation times can increase the efficiency of capture of CD8+ T cells. Thus, by simply shortening or lengthening the time T cells are allowed to bind to the CD3/CD28 beads and/or by increasing or decreasing the ratio of beads to T cells (as described further herein), subpopulations of T cells can be preferentially selected for or against at culture initiation or at other time points during the process. Additionally, by increasing or decreasing the ratio of anti-CD3 and/or anti-CD28 antibodies on the beads or other surface, subpopulations of T cells can be preferentially selected for or against at culture initiation or at other desired time points. The skilled artisan would recognize that multiple rounds of selection can also be used in the context of this invention. In certain aspects, it may be desirable to perform the selection procedure and use the “unselected” cells in the activation and expansion process. “Unselected” cells can also be subjected to further rounds of selection.

[00253] Enrichment of a T cell population by negative selection can be accomplished with a combination of antibodies directed to surface markers unique to the negatively selected cells. One method is cell sorting and/or selection via negative magnetic immunoadherence or flow cytometry that uses a cocktail of monoclonal antibodies directed to cell surface markers present on the cells negatively selected. For example, to enrich for CD4+ cells by negative selection, a monoclonal antibody cocktail typically includes antibodies to CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR, and CD8. In certain aspects, it may be desirable to enrich for or positively select for regulatory T cells which typically express CD4+, CD25+, CD62Lhi, GITR+, and FoxP3+. Alternatively, in certain aspects, T regulatory cells are depleted by anti-CD25 conjugated beads or other similar method of selection.

[00254] In one embodiment, a T cell population can be selected that expresses one or more of IFN- γ , TNF α , IL-17A, IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, IL-10, IL-13, granzyme B, and perforin, or other appropriate molecules, e.g., other cytokines. Methods for screening for cell expression can be determined, e.g., by the methods described in PCT Publication No.: WO 2013/126712.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

[00255] For isolation of a desired population of cells by positive or negative selection, the concentration of cells and surface (e.g., particles such as beads) can be varied. In certain aspects, it may be desirable to significantly decrease the volume in which beads and cells are mixed together (e.g., increase the concentration of cells), to ensure maximum contact of cells and beads. For example, in one aspect, a concentration of 2 billion cells/ml is used. In one aspect, a concentration of 1 billion cells/ml is used. In a further aspect, greater than 100 million cells/ml is used. In a further aspect, a concentration of cells of 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, or 50 million cells/ml is used. In yet one aspect, a concentration of cells from 75, 80, 85, 90, 95, or 100 million cells/ml is used. In further aspects, concentrations of 125 or 150 million cells/ml can be used. Using high concentrations can result in increased cell yield, cell activation, and cell expansion. Further, use of high cell concentrations allows more efficient capture of cells that may weakly express target antigens of interest, such as CD28-negative T cells, or from samples where there are many tumor cells present (e.g., leukemic blood, tumor tissue, etc.). Such populations of cells may have therapeutic value and would be desirable to obtain. For example, using high concentration of cells allows more efficient selection of CD8+ T cells that normally have weaker CD28 expression.

[00256] In a related aspect, it may be desirable to use lower concentrations of cells. By significantly diluting the mixture of T cells and surface (e.g., particles such as beads), interactions between the particles and cells is minimized. This selects for cells that express high amounts of desired antigens to be bound to the particles. For example, CD4+ T cells express higher levels of CD28 and are more efficiently captured than CD8+ T cells in dilute concentrations. In one aspect, the concentration of cells used is 5×10^6 /ml. In other aspects, the concentration used can be from about 1×10^5 /ml to 1×10^6 /ml, and any integer value in between.

[00257] In other aspects, the cells may be incubated on a rotator for varying lengths of time at varying speeds at either 2-10°C or at room temperature.

[00258] T cells for stimulation can also be frozen after a washing step. Wishing not to be bound by theory, the freeze and subsequent thaw step provides a more uniform product by removing granulocytes and to some extent monocytes in the cell population. After the washing step that removes plasma and platelets, the cells may be suspended in a freezing solution.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

While many freezing solutions and parameters are known in the art and will be useful in this context, one method involves using PBS containing 20% DMSO and 8% human serum albumin, or culture media containing 10% Dextran 40 and 5% Dextrose, 20% Human Serum Albumin and 7.5% DMSO, or 31.25% Plasmalyte-A, 31.25% Dextrose 5%, 0.45% NaCl, 10% Dextran 40 and 5% Dextrose, 20% Human Serum Albumin, and 7.5% DMSO or other suitable cell freezing media containing for example, Hespan and PlasmaLyte A, the cells then are frozen to -80°C at a rate of 1° per minute and stored in the vapor phase of a liquid nitrogen storage tank. Other methods of controlled freezing may be used as well as uncontrolled freezing immediately at -20° C or in liquid nitrogen.

[00259] In certain aspects, cryopreserved cells are thawed and washed as described herein and allowed to rest for one hour at room temperature prior to activation using the methods of the present invention.

[00260] Also contemplated in the context of the invention is the collection of blood samples or apheresis product from a subject at a time period prior to when the expanded cells as described herein might be needed. As such, the source of the cells to be expanded can be collected at any time point necessary, and desired cells, such as T cells, isolated and frozen for later use in T cell therapy for any number of diseases or conditions that would benefit from T cell therapy, such as those described herein. In one aspect a blood sample or an apheresis is taken from a generally healthy subject. In certain aspects, a blood sample or an apheresis is taken from a generally healthy subject who is at risk of developing a disease, but who has not yet developed a disease, and the cells of interest are isolated and frozen for later use. In certain aspects, the T cells may be expanded, frozen, and used at a later time. In certain aspects, samples are collected from a patient shortly after diagnosis of a particular disease as described herein but prior to any treatments. In a further aspect, the cells are isolated from a blood sample or an apheresis from a subject prior to any number of relevant treatment modalities, including but not limited to treatment with agents such as natalizumab, efalizumab, antiviral agents, chemotherapy, radiation, immunosuppressive agents, such as cyclosporin, azathioprine, methotrexate, mycophenolate, and FK506, antibodies, or other immunoablative agents such as CAMPATH, anti-CD3 antibodies, cytoxan, fludarabine, cyclosporin, FK506, rapamycin, mycophenolic acid, steroids, FR901228, and irradiation.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

[00261] In a further aspect of the present invention, T cells are obtained from a patient directly following treatment that leaves the subject with functional T cells. In this regard, it has been observed that following certain cancer treatments, in particular treatments with drugs that damage the immune system, shortly after treatment during the period when patients would normally be recovering from the treatment, the quality of T cells obtained may be optimal or improved for their ability to expand ex vivo. Likewise, following ex vivo manipulation using the methods described herein, these cells may be in a preferred state for enhanced engraftment and in vivo expansion. Thus, it is contemplated within the context of the present invention to collect blood cells, including T cells, dendritic cells, or other cells of the hematopoietic lineage, during this recovery phase. Further, in certain aspects, mobilization (for example, mobilization with GM-CSF) and conditioning regimens can be used to create a condition in a subject wherein repopulation, recirculation, regeneration, and/or expansion of particular cell types is favored, especially during a defined window of time following therapy. Illustrative cell types include T cells, B cells, dendritic cells, and other cells of the immune system.

Activation and Expansion of T Cells

[00262] T cells may be activated and expanded generally using methods as described, for example, in U.S. Patents 6,352,694; 6,534,055; 6,905,680; 6,692,964; 5,858,358; 6,887,466; 6,905,681; 7,144,575; 7,067,318; 7,172,869; 7,232,566; 7,175,843; 5,883,223; 6,905,874; 6,797,514; 6,867,041; and U.S. Patent Application Publication No. 20060121005.

[00263] Generally, the T cells of the invention may be expanded by contact with a surface having attached thereto an agent that stimulates a CD3/TCR complex associated signal and a ligand that stimulates a costimulatory molecule on the surface of the T cells. In particular, T cell populations may be stimulated as described herein, such as by contact with an anti-CD3 antibody, or antigen-binding fragment thereof, or an anti-CD2 antibody immobilized on a surface, or by contact with a protein kinase C activator (e.g., bryostatin) in conjunction with a calcium ionophore. For co-stimulation of an accessory molecule on the surface of the T cells, a ligand that binds the accessory molecule is used. For example, a population of T cells can be contacted with an anti-CD3 antibody and an anti-CD28 antibody, under conditions appropriate for stimulating proliferation of the T cells. To stimulate proliferation of either CD4⁺ T cells or

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

CD8+ T cells, an anti-CD3 antibody and an anti-CD28 antibody. Examples of an anti-CD28 antibody include 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diaclone, Besançon, France) can be used as can other methods commonly known in the art (Berg *et al.*, Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen *et al.*, J. Exp. Med. 190(9):1319-1328, 1999; Garland *et al.*, J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, 1999).

[00264] In certain aspects, the primary stimulatory signal and the costimulatory signal for the T cell may be provided by different protocols. For example, the agents providing each signal may be in solution or coupled to a surface. When coupled to a surface, the agents may be coupled to the same surface (i.e., in “cis” formation) or to separate surfaces (i.e., in “trans” formation). Alternatively, one agent may be coupled to a surface and the other agent in solution. In one aspect, the agent providing the costimulatory signal is bound to a cell surface and the agent providing the primary activation signal is in solution or coupled to a surface. In certain aspects, both agents can be in solution. In one aspect, the agents may be in soluble form, and then cross-linked to a surface, such as a cell expressing Fc receptors or an antibody or other binding agent which will bind to the agents. In this regard, see for example, U.S. Patent Application Publication Nos. 20040101519 and 20060034810 for artificial antigen presenting cells (aAPCs) that are contemplated for use in activating and expanding T cells in the present invention.

[00265] In one aspect, the two agents are immobilized on beads, either on the same bead, i.e., “cis,” or to separate beads, i.e., “trans.” By way of example, the agent providing the primary activation signal is an anti-CD3 antibody or an antigen-binding fragment thereof and the agent providing the costimulatory signal is an anti-CD28 antibody or antigen-binding fragment thereof; and both agents are co-immobilized to the same bead in equivalent molecular amounts. In one aspect, a 1:1 ratio of each antibody bound to the beads for CD4+ T cell expansion and T cell growth is used. In certain aspects of the present invention, a ratio of anti CD3:CD28 antibodies bound to the beads is used such that an increase in T cell expansion is observed as compared to the expansion observed using a ratio of 1:1. In one particular aspect an increase of from about 1 to about 3 fold is observed as compared to the expansion observed using a ratio of 1:1. In one aspect, the ratio of CD3:CD28 antibody bound to the beads ranges from 100:1 to 1:100 and all integer values there between. In one aspect of the present invention, more anti-CD28 antibody is bound to the particles than anti-CD3 antibody, i.e., the ratio of

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

CD3:CD28 is less than one. In certain aspects of the invention, the ratio of anti CD28 antibody to anti CD3 antibody bound to the beads is greater than 2:1. In one particular aspect, a 1:100 CD3:CD28 ratio of antibody bound to beads is used. In one aspect, a 1:75 CD3:CD28 ratio of antibody bound to beads is used. In a further aspect, a 1:50 CD3:CD28 ratio of antibody bound to beads is used. In one aspect, a 1:30 CD3:CD28 ratio of antibody bound to beads is used. In one preferred aspect, a 1:10 CD3:CD28 ratio of antibody bound to beads is used. In one aspect, a 1:3 CD3:CD28 ratio of antibody bound to the beads is used. In yet one aspect, a 3:1 CD3:CD28 ratio of antibody bound to the beads is used.

[00266] Ratios of particles to cells from 1:500 to 500:1 and any integer values in between may be used to stimulate T cells or other target cells. As those of ordinary skill in the art can readily appreciate, the ratio of particles to cells may depend on particle size relative to the target cell. For example, small sized beads could only bind a few cells, while larger beads could bind many. In certain aspects the ratio of cells to particles ranges from 1:100 to 100:1 and any integer values in-between and in further aspects the ratio comprises 1:9 to 9:1 and any integer values in between, can also be used to stimulate T cells. The ratio of anti-CD3- and anti-CD28-coupled particles to T cells that result in T cell stimulation can vary as noted above, however certain preferred values include 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, and 15:1 with one preferred ratio being at least 1:1 particles per T cell. In one aspect, a ratio of particles to cells of 1:1 or less is used. In one particular aspect, a preferred particle: cell ratio is 1:5. In further aspects, the ratio of particles to cells can be varied depending on the day of stimulation. For example, in one aspect, the ratio of particles to cells is from 1:1 to 10:1 on the first day and additional particles are added to the cells every day or every other day thereafter for up to 10 days, at final ratios of from 1:1 to 1:10 (based on cell counts on the day of addition). In one particular aspect, the ratio of particles to cells is 1:1 on the first day of stimulation and adjusted to 1:5 on the third and fifth days of stimulation. In one aspect, particles are added on a daily or every other day basis to a final ratio of 1:1 on the first day, and 1:5 on the third and fifth days of stimulation. In one aspect, the ratio of particles to cells is 2:1 on the first day of stimulation and adjusted to 1:10 on the third and fifth days of stimulation. In one aspect, particles are added on a daily or every other day basis to a final ratio of 1:1 on the first day, and 1:10 on the third and fifth days of stimulation. One of skill in the art will appreciate that a variety of other ratios may be suitable

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

for use in the present invention. In particular, ratios will vary depending on particle size and on cell size and type. In one aspect, the most typical ratios for use are in the neighborhood of 1:1, 2:1 and 3:1 on the first day.

[00267] In further aspects of the present invention, the cells, such as T cells, are combined with agent-coated beads, the beads and the cells are subsequently separated, and then the cells are cultured. In an alternative aspect, prior to culture, the agent-coated beads and cells are not separated but are cultured together. In a further aspect, the beads and cells are first concentrated by application of a force, such as a magnetic force, resulting in increased ligation of cell surface markers, thereby inducing cell stimulation.

[00268] By way of example, cell surface proteins may be ligated by allowing paramagnetic beads to which anti-CD3 and anti-CD28 are attached (3x28 beads) to contact the T cells. In one aspect the cells (for example, 10^4 to 10^9 T cells) and beads (for example, DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T paramagnetic beads at a ratio of 1:1) are combined in a buffer, for example PBS (without divalent cations such as, calcium and magnesium). Again, those of ordinary skill in the art can readily appreciate any cell concentration may be used. For example, the target cell may be very rare in the sample and comprise only 0.01% of the sample or the entire sample (i.e., 100%) may comprise the target cell of interest. Accordingly, any cell number is within the context of the present invention. In certain aspects, it may be desirable to significantly decrease the volume in which particles and cells are mixed together (i.e., increase the concentration of cells), to ensure maximum contact of cells and particles. For example, in one aspect, a concentration of about 2 billion cells/ml is used. In one aspect, greater than 100 million cells/ml is used. In a further aspect, a concentration of cells of 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, or 50 million cells/ml is used. In yet one aspect, a concentration of cells from 75, 80, 85, 90, 95, or 100 million cells/ml is used. In further aspects, concentrations of 125 or 150 million cells/ml can be used. Using high concentrations can result in increased cell yield, cell activation, and cell expansion. Further, use of high cell concentrations allows more efficient capture of cells that may weakly express target antigens of interest, such as CD28-negative T cells. Such populations of cells may have therapeutic value and would be desirable to obtain in certain aspects. For example, using high concentration of cells allows more efficient selection of CD8+ T cells that normally have weaker CD28 expression.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

[00269] In one aspect of the present invention, the mixture may be cultured for several hours (about 3 hours) to about 14 days or any hourly integer value in between. In one aspect, the mixture may be cultured for 21 days. In one aspect of the invention the beads and the T cells are cultured together for about eight days. In one aspect, the beads and T cells are cultured together for 2-3 days. Several cycles of stimulation may also be desired such that culture time of T cells can be 60 days or more. Conditions appropriate for T cell culture include an appropriate media (e.g., Minimal Essential Media or RPMI Media 1640 or, X-vivo 15, (Lonza)) that may contain factors necessary for proliferation and viability, including serum (e.g., fetal bovine or human serum), interleukin-2 (IL-2), insulin, IFN- γ , IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF β , and TNF- α or any other additives for the growth of cells known to the skilled artisan. Other additives for the growth of cells include, but are not limited to, surfactant, plasmanate, and reducing agents such as N-acetyl-cysteine and 2-mercaptoethanol. Media can include RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15, and X-Vivo 20, Optimizer, with added amino acids, sodium pyruvate, and vitamins, either serum-free or supplemented with an appropriate amount of serum (or plasma) or a defined set of hormones, and/or an amount of cytokine(s) sufficient for the growth and expansion of T cells. Antibiotics, e.g., penicillin and streptomycin, are included only in experimental cultures, not in cultures of cells that are to be infused into a subject. The target cells are maintained under conditions necessary to support growth, for example, an appropriate temperature (e.g., 37° C) and atmosphere (e.g., air plus 5% CO₂).

[00270] T cells that have been exposed to varied stimulation times may exhibit different characteristics. For example, typical blood or apheresed peripheral blood mononuclear cell products have a helper T cell population (TH, CD4+) that is greater than the cytotoxic or suppressor T cell population (TC, CD8+). Ex vivo expansion of T cells by stimulating CD3 and CD28 receptors produces a population of T cells that prior to about days 8-9 consists predominately of TH cells, while after about days 8-9, the population of T cells comprises an increasingly greater population of TC cells. Accordingly, depending on the purpose of treatment, infusing a subject with a T cell population comprising predominately of TH cells may be advantageous. Similarly, if an antigen-specific subset of TC cells has been isolated it may be beneficial to expand this subset to a greater degree.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

[00271] Further, in addition to CD4 and CD8 markers, other phenotypic markers vary significantly, but in large part, reproducibly during the course of the cell expansion process. Thus, such reproducibility enables the ability to tailor an activated T cell product for specific purposes.

[00272] Once a EGFRvIII CAR is constructed, various assays can be used to evaluate the activity of the molecule, such as but not limited to, the ability to expand T cells following antigen stimulation, sustain T cell expansion in the absence of re-stimulation, and anti-cancer activities in appropriate *in vitro* and animal models. Assays to evaluate the effects of a EGFRvIII CAR are described in further detail below

[00273] Western blot analysis of CAR expression in primary T cells can be used to detect the presence of monomers and dimers. See, *e.g.*, Milone *et al.*, Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009). Very briefly, T cells (1:1 mixture of CD4⁺ and CD8⁺ T cells) expressing the CARs are expanded *in vitro* for more than 10 days followed by lysis and SDS-PAGE under reducing conditions. CARs containing the full length TCR- ζ cytoplasmic domain and the endogenous TCR- ζ chain are detected by western blotting using an antibody to the TCR- ζ chain. The same T cell subsets are used for SDS-PAGE analysis under non-reducing conditions to permit evaluation of covalent dimer formation.

[00274] *In vitro* expansion of CAR⁺ T cells following antigen stimulation can be measured by flow cytometry. For example, a mixture of CD4⁺ and CD8⁺ T cells are stimulated with α CD3/ α CD28 aAPCs followed by transduction with lentiviral vectors expressing GFP under the control of the promoters to be analyzed. Exemplary promoters include the CMV IE gene, EF-1 α , ubiquitin C, or phosphoglycerokinase (PGK) promoters. GFP fluorescence is evaluated on day 6 of culture in the CD4⁺ and/or CD8⁺ T cell subsets by flow cytometry. See, *e.g.*, Milone *et al.*, Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009). Alternatively, a mixture of CD4⁺ and CD8⁺ T cells are stimulated with α CD3/ α CD28 coated magnetic beads on day 0, and transduced with CAR on day 1 using a bicistronic lentiviral vector expressing CAR along with eGFP using a 2A ribosomal skipping sequence. Cultures are re-stimulated with either EGFRvIII⁺ U-87 cells (U-87-EGFRvIII), wild-type U-87 cells (U-87 wild type) or K562 cells expressing hCD32 and 4-1BBL in the presence of antiCD3 and anti-CD28 antibody (K562-BBL-3/28) following washing. Exogenous IL-2 is added to the cultures every other day at 100

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

IU/ml. GFP⁺ T cells are enumerated by flow cytometry using bead-based counting. See, *e.g.*, Milone *et al.*, Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009).

[00275] Sustained CAR⁺ T cell expansion in the absence of re-stimulation can also be measured. See, *e.g.*, Milone *et al.*, Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009). Briefly, mean T cell volume (fl) is measured on day 8 of culture using a Coulter Multisizer III particle counter following stimulation with α CD3/ α CD28 coated magnetic beads on day 0, and transduction with the indicated CAR on day 1.

[00276] Assessment of cell proliferation and cytokine production has been previously described, *e.g.*, at Milone *et al.*, Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009). Briefly, assessment of CAR-mediated proliferation is performed in microtiter plates by mixing washed T cells with target cells, such as U87MG, BHK or CHO cells expressing EGFRvIII or EGFR wildtype (wt) or CD32 and CD137 (KT32-BBL) for a final T-cell:target cell ratio of 1:1. Anti-CD3 (clone OKT3) and anti-CD28 (clone 9.3) monoclonal antibodies are added to cultures with KT32-BBL cells to serve as a positive control for stimulating T-cell proliferation since these signals support long-term CD8⁺ T cell expansion *ex vivo*. T cells are enumerated in cultures using CountBright™ fluorescent beads (Invitrogen, Carlsbad, CA) and flow cytometry as described by the manufacturer. CAR⁺ T cells are identified by GFP expression using T cells that are engineered with eGFP-2A linked CAR-expressing lentiviral vectors. For CAR⁺ T cells not expressing GFP, the CAR⁺ T cells are detected with biotinylated recombinant EGFRvIII protein and a secondary avidin-PE conjugate. CD4⁺ and CD8⁺ expression on T cells are also simultaneously detected with specific monoclonal antibodies (BD Biosciences). Cytokine measurements are performed on supernatants collected 24 hours following re-stimulation using the human TH1/TH2 cytokine cytometric bead array kit (BD Biosciences, San Diego, CA) according the manufacturer's instructions. Fluorescence is assessed using a FACScalibur flow cytometer, and data is analyzed according to the manufacturer's instructions.

[00277] Cytotoxicity can be assessed by a standard ⁵¹Cr-release assay. See, *e.g.*, Milone *et al.*, Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009). Briefly, target cells (U87MG, BHK or CHO cells expressing EGFRvIII or EGFR wildtype (wt) are loaded with ⁵¹Cr (as NaCrO₄, New England Nuclear, Boston, MA) at 37°C for 2 hours with frequent agitation, washed twice in complete RPMI and plated into microtiter plates. Effector T cells are mixed with target cells in

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

the wells in complete RPMI at varying ratios of effector cell:target cell (E:T). Additional wells containing media only (spontaneous release, SR) or a 1% solution of triton-X 100 detergent (total release, TR) are also prepared. After 4 hours of incubation at 37°C, supernatant from each well is harvested. Released ⁵¹Cr is then measured using a gamma particle counter (Packard Instrument Co., Waltham, MA). Each condition is performed in at least triplicate, and the percentage of lysis is calculated using the formula: % Lysis = (ER – SR) / (TR – SR), where ER represents the average ⁵¹Cr released for each experimental condition. Alternative cytotoxicity assays may also be used, such as flow based cytotoxicity assays, as described in Example 8.

[00278] Click beetle red and click beetle green luciferase can be used to simultaneously follow tumor progression and T cell trafficking, as each use the same luciferin substrate but emit light at the opposite ends of the visible light spectrum.

[00279] Other assays, including those described in the Example section herein as well as those that are known in the art can also be used to evaluate the EGFRvIII CAR constructs of the invention.

Therapeutic Application for EGFRvIII Expressing Diseases and Disorders

[00280] EGFRvIII is a tumor specific, ligand-independent, constitutively active variant of the epidermal growth factor receptor. The present invention provides compositions and methods for treating diseases and disorders associated with EGFRvIII. An example of a disease or disorder associated with EGFRvIII is glioma.

[00281] Glioma refers to a cancer of the central nervous system that begins in glial cells (e.g., cells that surround and support nerve cells and includes oligodendrocytes, astrocytes, microglia, and ependymal cells). Gliomas are particularly serious in terms of both incidence and malignancy, and are classified into seven or more types such as glioblastoma and anaplastic astrocytoma according to their detailed pathological tissue type. Disease stage (tumor size, presence of distal metastasis) and histological malignancy are used when determining the degree of malignancy of primary brain tumors. Histological malignancy is classified into four levels, i.e., G1 to G4 according to the Guidelines for the Treatment of Brain Tumors ((2002) Kanehara & Co., Ltd.), and these correspond to WHO1 to WHO4,

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

respectively. The larger the number, the higher the degree of malignancy. For example, the malignancy of glioblastoma is G4 (WHO4), while the malignancy of anaplastic astrocytoma is G3 (WHO3), and both G3 and G4 are classified as malignant. Thus, according to some embodiments, the methods of this invention target malignant gliomas. In other aspects the invention targets glioblastoma multiforme (GBM). In further embodiments, the compositions and methods of the present invention may be used in the treatment of other gliomas including, but not limited to, anaplastic astrocytoma, giant cell glioblastoma, gliosarcoma, anaplastic oligodendroglioma, anaplastic ependymoma, choroid plexus carcinoma, anaplastic ganglioglioma, pineoblastoma, medulloepithelioma, ependymoblastoma, medulloblastoma, supratentorial primitive neuroectodermal tumor, and atypical teratoid/rhabdoid tumor.

[00282] Glioblastoma is the most common primary brain tumor in adults. More than half of the 18,000 patients diagnosed with malignant primary brain tumors in US each year have glioblastoma multiforme. Glioblastoma multiforme is an anaplastic, highly cellular tumor, with high proliferation indices, microvascular proliferation and focal necrosis. Signs and symptoms depend on several factors (size, rate of growth, localization of the tumor within the brain) and are mainly represented by headache, seizures, neurological deficits, changes in mental status. Glioblastoma multiforme prognosis remains dismal. Survival time is less than 2 years for the majority of patients. Karnofsky performance status (KPS) is one of the most important prognostic factors: patients with KPS>70 are alive at 18 months in approx 18% of cases, compared with 13% of patients with lower KPS scores. Primary glioblastoma multiforme develops de novo from glial cells, typically has a clinical history of less than six months, is more common in older patients and presents small-cell histology. Secondary glioblastoma multiforme develops over months or years from pre-existing low-grade astrocytomas, predominantly affects younger people and presents giant-cell histology.

[00283] Malignant gliomas are also known as high grade gliomas. They can affect the brain and the spinal cord. In some aspects, compositions and methods of the present invention may be used to treat subjects carrying a brain malignant glioma, for example, one that is chosen among anaplastic astrocytoma (AA), glioblastoma multiform (GBM), anaplastic oligodendroglioma (AO) and anaplastic oligoastrocytoma (AOA). In some aspects, compositions and methods of the present invention may be used to treat subjects carrying a glioblastoma multiforme (GBM).

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

[00284] Glioblastoma multiforme is the most malignant stage of astrocytoma, with survival times of less than 2 years for most patients. Histologically, these tumors are characterized by high proliferation indices, endothelial proliferation and focal necrosis. The highly proliferative nature of these lesions likely results from multiple mitogenic effects. One of the hallmarks of GBM is endothelial proliferation. A host of angiogenic growth factors and their receptors are found in GBMs.

[00285] There are biologic subsets of astrocytomas, which may reflect the clinical heterogeneity observed in these tumors. These subsets include brain stem gliomas, which are a form of pediatric diffuse, fibrillary astrocytoma that often follow a malignant course. Brain stem GBMs share genetic features with those adult GBMs that affect younger patients. Pleiomorphic xanthoastrocytoma (PXA) is a superficial, low-grade astrocytic tumor that predominantly affects young adults. While these tumors have a bizarre histological appearance, they are typically slow-growing tumors that may be amenable to surgical cure. Some PXAs, however, may recur as GBM. Pilocytic astrocytoma is the most common astrocytic tumor of childhood and differs clinically and histopathologically from the diffuse, fibrillary astrocytoma that affects adults. Pilocytic astrocytomas do not have the same genomic alterations as diffuse, fibrillary astrocytomas. Subependymal giant cell astrocytomas (SEGA) are periventricular, low-grade astrocytic tumors that are usually associated with tuberous sclerosis (TS), and are histologically identical to the so-called “candle-gutterings” that line the ventricles of TS patients. Similar to the other tumorous lesions in TS, these are slowly-growing and may be more akin to hamartomas than true neoplasms. Desmoplastic cerebral astrocytoma of infancy (DCAI) and desmoplastic infantile ganglioglioma (DIGG) are large, superficial, usually cystic, benign astrocytomas that affect children in the first year or two of life.

[00286] Oligodendrogliomas and oligoastrocytomas (mixed gliomas) are diffuse, primarily CNS glial tumors that are clinically and biologically most closely related to the diffuse, fibrillary astrocytomas. The tumors, however, are far less common than astrocytomas and have generally better prognoses than the diffuse astrocytomas. Oligodendrogliomas and oligoastrocytomas may progress, either to WHO grade III anaplastic oligodendroglioma or anaplastic oligoastrocytoma, or to WHO grade IV GBM. Thus, the genetic changes that lead to oligodendroglial tumors constitute yet another pathway to GBM.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

[00287] Ependymomas are a clinically diverse group of gliomas that vary from aggressive intraventricular tumors of children to benign spinal cord tumors in adults. Transitions of ependymoma to GBM are rare. Choroid plexus tumors are also a varied group of tumors that preferentially occur in the ventricular system, ranging from aggressive supratentorial intraventricular tumors of children to benign cerebellopontine angle tumors of adults. Choroid plexus tumors have been reported occasionally in patients with Li-Fraumeni syndrome and von Hippel-Lindau (VHL) disease.

[00288] Medulloblastomas are malignant, primitive tumors that arise in the posterior fossa, primarily in children. These tumors also occur in young adults. Medulloblastomas often are surgically resected with subsequent treatment with chemotherapy and/or radiation. They may recur locally or occasionally as drop metastasis from the posterior fossa to the spine.

Meningiomas are common intracranial tumors that arise in the meninges and compress the underlying brain. Although typically considered benign and only rarely frankly malignant, management of these tumors often poses clinical challenges. Histological grades of meningiomas vary with the majority benign, WHO grade I/IV (82%); less commonly atypical, WHO II/IV (15%); and infrequently they occur as anaplastic or malignant, WHO grade III/IV (3%).

[00289] Schwannomas are benign tumors that arise on peripheral nerves. Schwannomas may arise on cranial nerves, particularly the vestibular portion of the eighth cranial nerve (vestibular schwannomas, acoustic neuromas) where they present as cerebellopontine angle masses.

Hemangioblastomas are tumors of uncertain origin that are composed of endothelial cells, pericytes and so-called stromal cells. These benign tumors most frequently occur in the cerebellum and spinal cord of young adults. Multiple hemangioblastomas are characteristic of von Hippel-Lindau disease (VHL). Hemangiopericytomas (HPCs) are dural tumors which may display locally aggressive behavior and may metastasize. The histogenesis of dural-based hemangiopericytoma (HPC) has long been debated, with some authors classifying it as a distinct entity and others classifying it as a subtype of meningioma.

[00290] The symptoms of both primary and metastatic brain tumors often depend on the location in the brain and the size of the tumor. Since various regions of the brain are responsible for specific functions, clinical symptoms will vary a great deal. Tumors in the frontal lobe of the

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

brain may cause weakness and paralysis, mood disturbances, difficulty thinking, confusion and disorientation, and wide emotional mood swings. Parietal lobe tumors may cause seizures, numbness or paralysis, difficulty with handwriting, inability to perform simple mathematical problems, difficulty with certain movements, and loss of the sense of touch. Tumors in the occipital lobe can cause loss of vision in half of each visual field, visual hallucinations, and seizures. Temporal lobe tumors can cause seizures, perceptual and spatial disturbances, and receptive aphasia. If a tumor occurs in the cerebellum, the person may have ataxia, loss of coordination, headaches, and vomiting. Tumors in the hypothalamus may cause emotional changes, and changes in the perception of hot and cold. In addition, hypothalamic tumors may affect growth and nutrition in children. With the exception of the cerebellum, a tumor on one side of the brain causes symptoms and impairment on the opposite side of the body.

[00291] Compositions and methods of the present invention may be used to treat a subject who has been characterized as having cells or tissues expressing EGFRvIII, or is suspected of having cells or tissues expressing EGFRvIII. For example, subjects benefiting from treatment according to the invention include subjects with a glioma, or subjects suspected of having a glioma, for example, as evidenced by the presence of one or more of headaches, nausea and vomiting, seizures, loss of vision, pain, weakness, numbness in the extremities, and/or cranial nerve disorders as a result of increased intracranial pressure. In particular embodiments, the glioma being treated is glioblastoma multiforme. In accordance with this embodiment, the glioblastoma multiforme can be in the brain or spinal cord.

[00292] The present invention provides methods for inhibiting the proliferation or reducing an EGFRvIII-expressing cell population, the methods comprising contacting a population of cells comprising an EGFRvIII-expressing cell with a CAR-expressing cell described herein, e.g., a T cell, that binds to the EGFRvIII-expressing cell. In a specific embodiment, the present invention provides methods for inhibiting the proliferation or reducing the population of cancer cells expressing EGFRvIII, the methods comprising contacting the EGFRvIII-expressing cancer cell population with invention CAR-expressing cell described herein, e.g., a T cell, that binds to the EGFRvIII-expressing cell. In another embodiment, the present invention provides methods for inhibiting the proliferation or reducing the population of cancer cells expressing EGFRvIII, the methods comprising contacting the EGFRvIII-expressing cancer cell population with an EGFRvIII CART cell of the invention that binds to the EGFRvIII-expressing cell. In certain

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

embodiments, the EGFRvIII CART cell of the invention reduces the quantity, number, amount or percentage of cells and/or cancer cells by at least 25%, at least 30%, at least 40%, at least 50%, at least 65%, at least 75%, at least 85%, at least 95%, or at least 99% in a subject with or animal model glioma or another cancer associated with EGFRvIII-expressing cells relative to a negative control. In one aspect, the subject is a human.

[00293] The present invention also provides methods for preventing, treating and/or managing a disorder associated with EGFRvIII-expressing cells (e.g., a glioblastoma), the methods comprising administering to a subject in need an EGFRvIII CART cell described herein that binds to the EGFRvIII-expressing cell. In one aspect, the subject is a human.

[00294] The present invention provides methods for preventing relapse of cancer associated with EGFRvIII-expressing cells, the methods comprising administering to a subject in need thereof an EGFRvIII CART cell described herein that binds to the EGFRvIII-expressing cell. In another embodiment, the methods comprise administering to the subject in need thereof an effective amount of an EGFRvIII CART cell described herein that binds to the EGFRvIII-expressing cell in combination with an effective amount of another therapy.

[00295] In one aspect, the invention pertains to a vector comprising an EGFRvIII CAR operably linked to promoter for expression in mammalian T cells. In one aspect, the invention provides a recombinant T cell expressing the EGFRvIII CAR for use in treating EGFRvIII-expressing tumors. The recombinant T cell expressing the anti-EGFRvIII CAR is termed an EGFRvIII CART. In one aspect, the EGFRvIII CART of the invention is capable of contacting a tumor cell with at least one EGFRvIII CAR of the invention expressed on its surface such that the EGFRvIII CART is activated in response to the antigen and the CART targets the tumor cell and growth of the tumor is inhibited.

[00296] In one aspect, the invention pertains to a method of inhibiting growth of a EGFRvIII-expressing tumor cell, comprising contacting the tumor cell with an EGFRvIII CAR T cell described herein such that the CART is activated in response to the antigen and targets the cancer cell, wherein the growth of the tumor is inhibited. In one aspect, the activated CART targets and kills the cancer cell.

[00297] In one aspect, the invention pertains to a method of treating cancer in a subject. The method comprises administering to the subject an EGFRvIII CAR T cell described herein

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

such that the cancer is treated in the subject. An example of a cancer that is treatable by the EGFRvIII CAR T cell of the invention is a cancer associated with expression of EGFRvIII. In one aspect, the cancer associated with expression of EGFRvIII is a glioblastoma.

[00298] In one aspect, cancer associated with EGFRvIII is selected from the group consisting of glioblastoma multiforme (GBM), anaplastic astrocytoma, giant cell glioblastoma, gliosarcoma, anaplastic oligodendroglioma, anaplastic ependymoma, choroid plexus carcinoma, anaplastic ganglioglioma, pineoblastoma, medulloepithelioma, ependymoblastoma, medulloblastoma, supratentorial primitive neuroectodermal tumor, and atypical teratoid/rhabdoid tumor, non-small cell lung carcinomas, lung, breast, prostate, ovarian, colorectal and bladder carcinoma and any combination thereof.

[00299] The invention includes a type of cellular therapy where T cells are genetically modified to express a chimeric antigen receptor (CAR) and the CAR T cell is infused to a recipient in need thereof. The infused cell is able to kill tumor cells in the recipient. In some embodiments, the CAR-modified T cells are able to replicate in vivo resulting in long-term persistence that can lead to sustained tumor control. In various aspects, the T cells administered to the patient, or their progeny, persist in the patient for at least four months, five months, six months, seven months, eight months, nine months, ten months, eleven months, twelve months, thirteen months, fourteen month, fifteen months, sixteen months, seventeen months, eighteen months, nineteen months, twenty months, twenty-one months, twenty-two months, twenty-three months, two years, three years, four years, or five years after administration of the T cell to the patient.

[00300] In one aspect, the CAR-modified T cells described herein may be a type of vaccine for ex vivo immunization and/or in vivo therapy in a mammal. In one aspect, the mammal is a human.

[00301] With respect to ex vivo immunization, at least one of the following occurs in vitro prior to administering the cell into a mammal: i) expansion of the cells, ii) introducing a nucleic acid encoding a CAR to the cells or iii) cryopreservation of the cells.

[00302] Ex vivo procedures are well known in the art and are discussed more fully below. Briefly, cells are isolated from a mammal (e.g., a human) and genetically modified (e.g., transduced or transfected in vitro) with a vector expressing a CAR disclosed herein. The CAR-

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

modified cell can be administered to a mammalian recipient to provide a therapeutic benefit. The mammalian recipient may be a human and the CAR-modified cell can be autologous with respect to the recipient. Alternatively, the cells can be allogeneic, syngeneic or xenogeneic with respect to the recipient.

[00303] The procedure for ex vivo expansion of hematopoietic stem and progenitor cells is described in U.S. Pat. No. 5,199,942, incorporated herein by reference, can be applied to the cells of the present invention. Other suitable methods are known in the art therefore the present invention is not limited to any particular method of ex vivo expansion of the cells. Briefly, ex vivo culture and expansion of T cells comprises: (1) collecting CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells from a mammal from peripheral blood harvest or bone marrow explants; and (2) expanding such cells ex vivo. In addition to the cellular growth factors described in U.S. Pat. No. 5,199,942, other factors such as flt3-L, IL-1, IL-3 and c-kit ligand, can be used for culturing and expansion of the cells.

[00304] In addition to using a cell-based vaccine in terms of ex vivo immunization, the present invention also provides compositions and methods for in vivo immunization to elicit an immune response directed against an antigen in a patient.

[00305] Generally, the cells activated and expanded as described herein may be utilized in the treatment and prevention of diseases that arise in individuals who are immunocompromised. In particular, the CAR-modified T cells of the invention are used in the treatment of diseases, disorders and conditions associated with expression of EGFRvIII. In certain aspects, the cells of the invention are used in the treatment of patients at risk for developing diseases, disorders and conditions associated with expression of EGFRvIII. Thus, the present invention provides methods for the treatment or prevention of diseases, disorders and conditions associated with expression of EGFRvIII comprising administering to a subject in need thereof, a therapeutically effective amount of the CAR-modified T cells of the invention.

[00306] The CAR-modified T cells of the present invention may be administered either alone, or as a pharmaceutical composition in combination with diluents and/or with other components such as IL-2 or other cytokines or cell populations or other drug treatments, e.g., described herein.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

[00307] The present invention also provides methods for inhibiting the proliferation or reducing an EGFRvIII-expressing cell population, the methods comprising contacting a population of cells comprising an EGFRvIII-expressing cell with an EGFRvIII CART cell described herein that binds to the EGFRvIII-expressing cell. In a specific aspect, the present invention provides methods for inhibiting the proliferation or reducing the population of cancer cells expressing EGFRvIII, the methods comprising contacting the EGFRvIII-expressing cancer cell population with an EGFRvIII CART cell described herein that binds to the EGFRvIII-expressing cell. In one aspect, the present invention provides methods for inhibiting the proliferation or reducing the population of cancer cells expressing EGFRvIII, the methods comprising contacting the EGFRvIII-expressing cancer cell population with an EGFRvIII CART cell described herein that binds to the EGFRvIII-expressing cell. In certain aspects, the EGFRvIII CART cell of the invention reduces the quantity, number, amount or percentage of cells and/or cancer cells by at least 25%, at least 30%, at least 40%, at least 50%, at least 65%, at least 75%, at least 85%, at least 95%, or at least 99% in a subject with or animal model for glioma or another cancer associated with EGFRvIII-expressing cells relative to a negative control. In one aspect, the subject is a human.

[00308] The present invention also provides methods for preventing, treating and/or managing a disease associated with EGFRvIII-expressing cells (e.g., glioblastoma), the methods comprising administering to a subject in need an EGFRvIII CART cell described herein that binds to the EGFRvIII-expressing cell. In one aspect, the subject is a human.

[00309] The present invention provides methods for preventing relapse of cancer associated with EGFRvIII-expressing cells, the methods comprising administering to a subject in need thereof an EGFRvIII CART cell described herein that binds to the EGFRvIII-expressing cell. In one aspect, the methods comprise administering to the subject in need thereof an effective amount of an EGFRvIII CART cell described herein that binds to the EGFRvIII-expressing cell in combination with an effective amount of another therapy.

[00310] Combination Therapies

[00311] A CAR-expressing cell described herein may be used in combination with other known agents and therapies. Administered “in combination”, as used herein, means that two

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

(or more) different treatments are delivered to the subject during the course of the subject's affliction with the disorder, e.g., the two or more treatments are delivered after the subject has been diagnosed with the disorder and before the disorder has been cured or eliminated or treatment has ceased for other reasons. In some embodiments, the delivery of one treatment is still occurring when the delivery of the second begins, so that there is overlap in terms of administration. This is sometimes referred to herein as "simultaneous" or "concurrent delivery". In other embodiments, the delivery of one treatment ends before the delivery of the other treatment begins. In some embodiments of either case, the treatment is more effective because of combined administration. For example, the second treatment is more effective, e.g., an equivalent effect is seen with less of the second treatment, or the second treatment reduces symptoms to a greater extent, than would be seen if the second treatment were administered in the absence of the first treatment, or the analogous situation is seen with the first treatment. In some embodiments, delivery is such that the reduction in a symptom, or other parameter related to the disorder is greater than what would be observed with one treatment delivered in the absence of the other. The effect of the two treatments can be partially additive, wholly additive, or greater than additive. The delivery can be such that an effect of the first treatment delivered is still detectable when the second is delivered.

[00312] A CAR-expressing cell described herein and the at least one additional therapeutic agent can be administered simultaneously, in the same or in separate compositions, or sequentially. For sequential administration, the CAR-expressing cell described herein can be administered first, and the additional agent can be administered second, or the order of administration can be reversed.

[00313] In further aspects, a CAR-expressing cell described herein may be used in a treatment regimen in combination with surgery, chemotherapy, radiation, immunosuppressive agents, such as cyclosporin, azathioprine, methotrexate, mycophenolate, and FK506, antibodies, or other immunoablative agents such as CAMPATH, anti-CD3 antibodies or other antibody therapies, cytoxin, fludarabine, cyclosporin, FK506, rapamycin, mycophenolic acid, steroids, FR901228, cytokines, and irradiation. Exemplary immunotherapy approaches for malignant glioma are disclosed in Johnson et al. 2010 Curr Neurol Neurosci Rep 10:259-266. In some embodiments, a CAR-expressing cell described herein may be used in a treatment regimen in combination an agent targets extracellular matrix proteins, such as tensin, e.g., an

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

anti-tenascin antibody, e.g., a ^{211}At -labeled anti-tenascin antibody. In some embodiments, a CAR-expressing cell described herein may be used in a treatment regimen in combination with an immunomodulatory agent, such as interferon alpha, interferon beta, TGF- β 2 peptide inhibitor, or poly-ICLC. In some embodiments, a CAR-expressing cell described herein may be used in a treatment regimen in combination with a WT1 transcription factor peptide vaccine, such as that described in Izumoto et al. 2008 J Neurosurg 108:963-971.

[00314] In one embodiment, a CAR-expressing cell described herein can be used in combination with a chemotherapeutic agent. Exemplary chemotherapeutic agents include an alkylating agent, a platinum based agent, an angiogenesis inhibitor (e.g., a VEGF pathway inhibitor, a tyrosine kinase inhibitor (e.g., an EGF pathway inhibitor), an mTOR inhibitor.

[00315] General Chemotherapeutic agents considered for use in combination therapies include anastrozole (Arimidex®), bicalutamide (Casodex®), bleomycin sulfate (Blenoxane®), busulfan (Myleran®), busulfan injection (Busulfex®), capecitabine (Xeloda®), N4-pentoxycarbonyl-5-deoxy-5-fluorocytidine, carboplatin (Paraplatin®), carmustine (BiCNU®), chlorambucil (Leukeran®), cisplatin (Platinol®), cladribine (Leustatin®), cyclophosphamide (Cytosan® or Neosar®), cytarabine, cytosine arabinoside (Cytosar-U®), cytarabine liposome injection (DepoCyt®), dacarbazine (DTIC-Dome®), dactinomycin (Actinomycin D, Cosmegen), daunorubicin hydrochloride (Cerubidine®), daunorubicin citrate liposome injection (DaunoXome®), dexamethasone, docetaxel (Taxotere®), doxorubicin hydrochloride (Adriamycin®, Rubex®), etoposide (Vepesid®), fludarabine phosphate (Fludara®), 5-fluorouracil (Adrucil®, Efudex®), flutamide (Eulexin®), tezacitibine, Gemcitabine (difluorodeoxycytidine), hydroxyurea (Hydrea®), Idarubicin (Idamycin®), ifosfamide (IFEX®), irinotecan (Camptosar®), L-asparaginase (ELSPAR®), leucovorin calcium, melphalan (Alkeran®), 6-mercaptopurine (Purinethol®), methotrexate (Folex®), mitoxantrone (Novantrone®), mylotarg, paclitaxel (Taxol®), phoenix (Yttrium90/MX-DTPA), pentostatin, polifeprosan 20 with carmustine implant (Gliadel®), tamoxifen citrate (Nolvadex®), teniposide (Vumon®), 6-thioguanine, thiotepa, tirapazamine (Tirazone®), topotecan hydrochloride for injection (Hycamptin®), vinblastine (Velban®), vincristine (Oncovin®), and vinorelbine (Navelbine®).

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

[00316] Exemplary alkylating agents include, without limitation, nitrogen mustards, ethylenimine derivatives, alkyl sulfonates, nitrosoureas and triazenes): uracil mustard (Aminouracil Mustard®, Chlorethaminacil®, Demethyldopan®, Desmethyldopan®, Haemanthamine®, Nordopan®, Uracil nitrogen mustard®, Uracillost®, Uracilmostaza®, Uramustin®, Uramustine®), chlormethine (Mustargen®), cyclophosphamide (Cytosan®, Neosar®, Clafen®, Endoxan®, Procytox®, RevimmuneTM), ifosfamide (Mitoxana®), melphalan (Alkeran®), Chlorambucil (Leukeran®), pipobroman (Amedel®, Vercyte®), triethylenemelamine (Hemel®, Hexalen®, Hexastat®), triethylenethiophosphoramine, Temozolomide (Temodar®), thiotepa (Thioplex®), busulfan (Busilvex®, Myleran®), carmustine (BiCNU®), lomustine (CeeNU®), streptozocin (Zanosar®), and Dacarbazine (DTIC-Dome®). Additional exemplary alkylating agents include, without limitation, Oxaliplatin (Eloxatin®); Temozolomide (Temodar® and Temodal®); Dactinomycin (also known as actinomycin-D, Cosmegen®); Melphalan (also known as L-PAM, L-sarcolysin, and phenylalanine mustard, Alkeran®); Altretamine (also known as hexamethylmelamine (HMM), Hexalen®); Carmustine (BiCNU®); Bendamustine (Treanda®); Busulfan (Busulfex® and Myleran®); Carboplatin (Paraplatin®); Lomustine (also known as CCNU, CeeNU®); Cisplatin (also known as CDDP, Platinol® and Platinol®-AQ); Chlorambucil (Leukeran®); Cyclophosphamide (Cytosan® and Neosar®); Dacarbazine (also known as DTIC, DIC and imidazole carboxamide, DTIC-Dome®); Altretamine (also known as hexamethylmelamine (HMM), Hexalen®); Ifosfamide (Ifex®); Prednumustine; Procarbazine (Matulane®); Mechlorethamine (also known as nitrogen mustard, mustine and mechloroethamine hydrochloride, Mustargen®); Streptozocin (Zanosar®); Thiotepa (also known as thiophosphoamide, TESP and TSPA, Thioplex®); Cyclophosphamide (Endoxan®, Cytosan®, Neosar®, Procytox®, Revimmune®); and Bendamustine HCl (Treanda®).

[00317] Exemplary platinum based agents include, without limitation, carboplatin, cisplatin, and oxaliplatin.

[00318] Exemplary angiogenesis inhibitors include, without limitation A6 (Angstrom Pharmaceuticals), ABT-510 (Abbott Laboratories), ABT-627 (Atrasentan) (Abbott Laboratories/Xinlay), ABT-869 (Abbott Laboratories), Actimid (CC4047, Pomalidomide) (Celgene Corporation), AdGVPEDF.11D (GenVec), ADH-1 (Exherin) (Adherex Technologies), AEE788 (Novartis), AG-013736 (Axitinib) (Pfizer), AG3340 (Prinomastat)

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

(Agouron Pharmaceuticals), AGX1053 (AngioGenex), AGX51 (AngioGenex), ALN-VSP (ALN-VSP O2) (Alnylam Pharmaceuticals), AMG 386 (Amgen), AMG706 (Amgen), Apatinib (YN968D1) (Jiangsu Hengrui Medicine), AP23573 (Ridaforolimus/MK8669) (Ariad Pharmaceuticals), AQ4N (Novavea), ARQ 197 (ArQule), ASA404 (Novartis/Antisoma), Atiprimod (Callisto Pharmaceuticals), ATN-161 (Attenuon), AV-412 (Aveo Pharmaceuticals), AV-951 (Aveo Pharmaceuticals), Avastin (Bevacizumab) (Genentech), AZD2171 (Cediranib/Recentin) (AstraZeneca), BAY 57-9352 (Telatinib) (Bayer), BEZ235 (Novartis), BIBF1120 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals), BIBW 2992 (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals), BMS-275291 (Bristol-Myers Squibb), BMS-582664 (Brivanib) (Bristol-Myers Squibb), BMS-690514 (Bristol-Myers Squibb), Calcitriol, CCI-779 (Torisel) (Wyeth), CDP-791 (ImClone Systems), Ceflatonin (Homoharringtonine/HHT) (ChemGenex Therapeutics), Celebrex (Celecoxib) (Pfizer), CEP-7055 (Cephalon/Sanofi), CHIR-265 (Chiron Corporation), NGR-TNF, COL-3 (Metastat) (Collagenex Pharmaceuticals), Combretastatin (Oxigene), CP-751,871 (Figitumumab) (Pfizer), CP-547,632 (Pfizer), CS-7017 (Daiichi Sankyo Pharma), CT-322 (Angiocept) (Adnexus), Curcumin, Dalteparin (Fragmin) (Pfizer), Disulfiram (Antabuse), E7820 (Eisai Limited), E7080 (Eisai Limited), EMD 121974 (Cilengitide) (EMD Pharmaceuticals), ENMD-1198 (EntreMed), ENMD-2076 (EntreMed), Endostar (Simcere), Erbitux (ImClone/Bristol-Myers Squibb), EZN-2208 (Enzon Pharmaceuticals), EZN-2968 (Enzon Pharmaceuticals), GC1008 (Genzyme), Genistein, GSK1363089 (Foretinib) (GlaxoSmithKline), GW786034 (Pazopanib) (GlaxoSmithKline), GT-111 (Vascular Biogenics Ltd.), IMC--1121B (Ramucirumab) (ImClone Systems), IMC-18F1 (ImClone Systems), IMC-3G3 (ImClone LLC), INCB007839 (Incyte Corporation), INGN 241 (Introgen Therapeutics), Iressa (ZD1839/Gefitinib), LBH589 (Faridak/Panobinostat) (Novartis), Lucentis (Ranibizumab) (Genentech/Novartis), LY317615 (Enzastaurin) (Eli Lilly and Company), Macugen (Pegaptanib) (Pfizer), MEDI522 (Abegrin) (MedImmune), MLN518 (Tandutinib) (Millennium), Neovastat (AE941/Benefin) (Aeterna Zentaris), Nexavar (Bayer/Onyx), NM-3 (Genzyme Corporation), Noscipine (Cougar Biotechnology), NPI-2358 (Nereus Pharmaceuticals), OSI-930 (OSI), Palomid 529 (Paloma Pharmaceuticals, Inc.), Panzem Capsules (2ME2) (EntreMed), Panzem NCD (2ME2) (EntreMed), PF-02341066 (Pfizer), PF-04554878 (Pfizer), PI-88 (Progen Industries/Medigen Biotechnology), PKC412 (Novartis), Polyphenon E (Green Tea Extract) (Polypheno E International, Inc), PPI-2458 (Praecis

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

Pharmaceuticals), PTC299 (PTC Therapeutics), PTK787 (Vatalanib) (Novartis), PXD101 (Belinostat) (CuraGen Corporation), RAD001 (Everolimus) (Novartis), RAF265 (Novartis), Regorafenib (BAY73-4506) (Bayer), Revlimid (Celgene), Retaane (Alcon Research), SN38 (Liposomal) (Neopharm), SNS-032 (BMS-387032) (Sunesis), SOM230(Pasireotide) (Novartis), Squalamine (Genaera), Suramin, Sutent (Pfizer), Tarceva (Genentech), TB-403 (Thrombogenics), Tempostatin (Collard Biopharmaceuticals), Tetrathiomolybdate (Sigma-Aldrich), TG100801 (TargeGen), Thalidomide (Celgene Corporation), Tinzaparin Sodium, TKI258 (Novartis), TRC093 (Tracon Pharmaceuticals Inc.), VEGF Trap (Aflibercept) (Regeneron Pharmaceuticals), VEGF Trap-Eye (Regeneron Pharmaceuticals), Veglin (VasGene Therapeutics), Bortezomib (Millennium), XL184 (Exelixis), XL647 (Exelixis), XL784 (Exelixis), XL820 (Exelixis), XL999 (Exelixis), ZD6474 (AstraZeneca), Vorinostat (Merck), and ZSTK474.

[00319] Exemplary Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) receptor inhibitors include, but are not limited to, Bevacizumab (Avastin®), axitinib (Inlyta®); Brivanib alaninate (BMS-582664, (S)-((R)-1-(4-(4-Fluoro-2-methyl-1H-indol-5-yloxy)-5-methylpyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-6-yloxy)propan-2-yl)2-aminopropanoate); Sorafenib (Nexavar®); Pazopanib (Votrient®); Sunitinib malate (Sutent®); Cediranib (AZD2171, CAS 288383-20-1); Vargatef (BIBF1120, CAS 928326-83-4); Foretinib (GSK1363089); Telatinib (BAY57-9352, CAS 332012-40-5); Apatinib (YN968D1, CAS 811803-05-1); Imatinib (Gleevec®); Ponatinib (AP24534, CAS 943319-70-8); Tivozanib (AV951, CAS 475108-18-0); Regorafenib (BAY73-4506, CAS 755037-03-7); Vatalanib dihydrochloride (PTK787, CAS 212141-51-0); Brivanib (BMS-540215, CAS 649735-46-6); Vandetanib (Caprelsa® or AZD6474); Motesanib diphosphate (AMG706, CAS 857876-30-3, N-(2,3-dihydro-3,3-dimethyl-1H-indol-6-yl)-2-[(4-pyridinylmethyl)amino]-3-pyridinecarboxamide, described in PCT Publication No. WO 02/066470); Dovitinib dilactic acid (TKI258, CAS 852433-84-2); Linfanib (ABT869, CAS 796967-16-3); Cabozantinib (XL184, CAS 849217-68-1); Lestaurtinib (CAS 111358-88-4); N-[5-[[[5-(1,1-Dimethylethyl)-2-oxazolyl]methyl]thio]-2-thiazolyl]-4-piperidinecarboxamide (BMS38703, CAS 345627-80-7); (3R,4R)-4-Amino-1-((4-(3-methoxyphenyl)amino)pyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-5-yl)methyl)piperidin-3-ol (BMS690514); N-(3,4-Dichloro-2-fluorophenyl)-6-methoxy-7-[(3α,5β,6α)-octahydro-2-methylcyclopenta[c]pyrrol-5-yl]methoxy]-4-quinazolinamine (XL647, CAS 781613-23-8); 4-

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

Methyl-3-[[1-methyl-6-(3-pyridinyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4-yl]amino]-*N*-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-benzamide (BHG712, CAS 940310-85-0); . and Aflibercept (Eylea®).

[00320]

[00321] Exemplary EGF pathway inhibitors include, without limitation tyrphostin 46, EKB-569, erlotinib (Tarceva®), gefitinib (Iressa®), erbitux, nimotuzumab, lapatinib (Tykerb®), cetuximab (anti-EGFR mAb), ¹⁸⁸Re-labeled nimotuzumab (anti-EGFR mAb), and those compounds that are generically and specifically disclosed in WO 97/02266, EP 0 564 409, WO 99/03854, EP 0 520 722, EP 0 566 226, EP 0 787 722, EP 0 837 063, US 5,747,498, WO 98/10767, WO 97/30034, WO 97/49688, WO 97/38983 and WO 96/33980. Exemplary EGFR antibodies include, but are not limited to, Cetuximab (Erbix®); Panitumumab (Vectibix®); Matuzumab (EMD-72000); Trastuzumab (Herceptin®); Nimotuzumab (hR3); Zalutumumab; TheraCIM h-R3; MDX0447 (CAS 339151-96-1); and ch806 (mAb-806, CAS 946414-09-1). Exemplary Epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors include, but not limited to, Erlotinib hydrochloride (Tarceva®), Gefitinib (Iressa®); N-[4-[(3-Chloro-4-fluorophenyl)amino]-7-[[[3-¹⁸S]-tetrahydro-3-furanyl]oxy]-6-quinazolinyl]-4(dimethylamino)-2-butenamide, Tovok®; Vandetanib (Caprelsa®); Lapatinib (Tykerb®); (3*R*,4*R*)-4-Amino-1-((4-((3-methoxyphenyl)amino)pyrrolo[2,1-*f*][1,2,4]triazin-5-yl)methyl)piperidin-3-ol (BMS690514); Canertinib dihydrochloride (CI-1033); 6-[4-[(4-Ethyl-1-piperazinyl)methyl]phenyl]-*N*-[(1*R*)-1-phenylethyl]-7*H*-Pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-amine (AEE788, CAS 497839-62-0); Mubritinib (TAK165); Pelitinib (EKB569); Afatinib (BIBW2992); Neratinib (HKI-272); *N*-[4-[[1-[(3-Fluorophenyl)methyl]-1*H*-indazol-5-yl]amino]-5-methylpyrrolo[2,1-*f*][1,2,4]triazin-6-yl]-carbamic acid, (3*S*)-3-morpholinylmethyl ester (BMS599626); *N*-(3,4-Dichloro-2-fluorophenyl)-6-methoxy-7-[[[3α,5β,6α]-octahydro-2-methylcyclopenta[*c*]pyrrol-5-yl]methoxy]-4-quinazolinamine (XL647, CAS 781613-23-8); and 4-[4-[(1*R*)-1-Phenylethyl]amino]-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-6-yl]-phenol (PKI166, CAS 187724-61-4).

[00322] Exemplary mTor inhibitors include, without limitation, rapamycin (Rapamune®), and analogs and derivatives thereof; SDZ-RAD; Temsirolimus (Torisel®; also known as CCI-779); Ridaforolimus (formally known as deferolimus, (1*R*,2*R*,4*S*)-4-[(2*R*)-2-[(1*R*,9*S*,12*S*,15*R*,16*E*,18*R*,19*R*,21*R*, 23*S*,24*E*,26*E*,28*Z*,30*S*,32*S*,35*R*)-1,18-dihydroxy-19,30-

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

dimethoxy-15,17,21,23, 29,35-hexamethyl-2,3,10,14,20-pentaoxo-11,36-dioxo-4-azatricyclo[30.3.1.0^{4,9}] hexatriaconta-16,24,26,28-tetraen-12-yl]propyl]-2-methoxycyclohexyl dimethylphosphinate, also known as AP23573 and MK8669, and described in PCT Publication No. WO 03/064383); Everolimus (Afinitor® or RAD001); Rapamycin (AY22989, Sirolimus®); Simapimod (CAS 164301-51-3); (5-{2,4-Bis[(3*S*)-3-methylmorpholin-4-yl]pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7-yl}-2-methoxyphenyl)methanol (AZD8055); 2-Amino-8-[*trans*-4-(2-hydroxyethoxy)cyclohexyl]-6-(6-methoxy-3-pyridinyl)-4-methyl-pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-one (PF04691502, CAS 1013101-36-4); and *N*²-[1,4-dioxo-4-[[4-(4-oxo-8-phenyl-4*H*-1-benzopyran-2-yl)morpholinium-4-yl]methoxy]butyl]-L-arginylglycyl-L- α -aspartyl-L-serine-, inner salt (SF1126, CAS 936487-67-1).

[00323] Exemplary Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) inhibitors include, but are not limited to, 4-[2-(1*H*-Indazol-4-yl)-6-[[4-(methylsulfonyl)piperazin-1-yl]methyl]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4-yl]morpholine (also known as GDC 0941 and described in PCT Publication Nos. WO 09/036082 and WO 09/055730); 2-Methyl-2-[4-[3-methyl-2-oxo-8-(quinolin-3-yl)-2,3-dihydroimidazo[4,5-*c*]quinolin-1-yl]phenyl]propionitrile (also known as BEZ 235 or NVP-BEZ 235, and described in PCT Publication No. WO 06/122806); 4-(trifluoromethyl)-5-(2,6-dimorpholinopyrimidin-4-yl)pyridin-2-amine (also known as BKM120 or NVP-BKM120, and described in PCT Publication No. WO2007/084786); Tozasertib (VX680 or MK-0457, CAS 639089-54-6); (5*Z*)-5-[[4-(4-Pyridinyl)-6-quinolinyl]methylene]-2,4-thiazolidinedione (GSK1059615, CAS 958852-01-2); (1*E*,4*S*,4*aR*,5*R*,6*aS*,9*aR*)-5-(Acetyloxy)-1-[(di-2-propenylamino)methylene]-4,4*a*,5,6,6*a*,8,9,9*a*-octahydro-1*H*-hydroxy-4-(methoxymethyl)-4*a*,6*a*-dimethyl-cyclopenta[5,6]naphtho[1,2-*c*]pyran-2,7,10(1*H*)-trione (PX866, CAS 502632-66-8); and 8-Phenyl-2-(morpholin-4-yl)-chromen-4-one (LY294002, CAS 154447-36-6). Exemplary Protein Kinase B (PKB) or AKT inhibitors include, but are not limited to, 8-[4-(1-Aminocyclobutyl)phenyl]-9-phenyl-1,2,4-triazolo[3,4-*f*][1,6]naphthyridin-3(2*H*)-one (MK-2206, CAS 1032349-93-1); Perifosine (KRX0401); 4-Dodecyl-N-1,3,4-thiadiazol-2-yl-benzenesulfonamide (PHT-427, CAS 1191951-57-1); 4-[2-(4-Amino-1,2,5-oxadiazol-3-yl)-1-ethyl-7-[(3*S*)-3-piperidinylmethoxy]-1*H*-imidazo[4,5-*c*]pyridin-4-yl]-2-methyl-3-butyn-2-ol (GSK690693, CAS 937174-76-0); 8-(1-Hydroxyethyl)-2-methoxy-3-[(4-methoxyphenyl)methoxy]-6*H*-dibenzo[*b,d*]pyran-6-one (palomid 529, P529, or SG-00529); Tricirbine (6-Amino-4-methyl-8-(β -D-ribofuranosyl)-4*H*,8*H*-pyrrolo[4,3,2-*de*]pyrimido[4,5-

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

c]pyridazine); (α S)- α -[[[5-(3-Methyl-1H-indazol-5-yl)-3-pyridinyl]oxy]methyl]-benzeneethanamine (A674563, CAS 552325-73-2); 4-[(4-Chlorophenyl)methyl]-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)-4-piperidinamine (CCT128930, CAS 885499-61-6); 4-(4-Chlorophenyl)-4-[4-(1H-pyrazol-4-yl)phenyl]-piperidine (AT7867, CAS 857531-00-1); and Archexin (RX-0201, CAS 663232-27-7).

[00324] Drugs that inhibit either the calcium dependent phosphatase calcineurin (cyclosporine and FK506) or inhibit the p70S6 kinase that is important for growth factor induced signaling (rapamycin). (Liu *et al.*, Cell 66:807-815, 1991; Henderson *et al.*, Immun. 73:316-321, 1991; Bierer *et al.*, Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993) can also be used. In a further aspect, the cell compositions of the present invention may be administered to a patient in conjunction with (e.g., before, simultaneously or following) bone marrow transplantation, T cell ablative therapy using chemotherapy agents such as, fludarabine, external-beam radiation therapy (XRT), cyclophosphamide, and/or antibodies such as OKT3 or CAMPATH. In one aspect, the cell compositions of the present invention are administered following B-cell ablative therapy such as agents that react with CD20, e.g., Rituxan. For example, in one embodiment, subjects may undergo standard treatment with high dose chemotherapy followed by peripheral blood stem cell transplantation. In certain embodiments, following the transplant, subjects receive an infusion of the expanded immune cells of the present invention. In an additional embodiment, expanded cells are administered before or following surgery.

[00325] In one embodiment, the subject can be administered an agent which reduces or ameliorates a side effect associated with the administration of a CAR-expressing cell. Side effects associated with the administration of a CAR-expressing cell include, but are not limited to CRS, and hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH), also termed Macrophage Activation Syndrome (MAS). Symptoms of CRS include high fevers, nausea, transient hypotension, hypoxia, and the like. Accordingly, the methods described herein can comprise administering a CAR-expressing cell described herein to a subject and further administering an agent to manage elevated levels of a soluble factor resulting from treatment with a CAR-expressing cell. In one embodiment, the soluble factor elevated in the subject is one or more of IFN- γ , TNF α , IL-2 and IL-6. Therefore, an agent administered to treat this side effect can be an agent that neutralizes one or more of these soluble factors. Such agents include, but are not limited to a

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

steroid, an inhibitor of TNF α , and an inhibitor of IL-6. An example of a TNF α inhibitor is etanercept. An example of an IL-6 inhibitor is Tocilizumab (toc).

[00326] In one embodiment, the subject can be administered an agent which enhances the activity of a CAR-expressing cell. For example, in one embodiment, the agent can be an agent which inhibits an inhibitory molecule. Inhibitory molecules, e.g., Programmed Death 1 (PD1), can, in some embodiments, decrease the ability of a CAR-expressing cell to mount an immune effector response. Examples of inhibitory molecules include PD1, PD-L1, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 and TIGR beta. Inhibition of an inhibitory molecule, e.g., by inhibition at the DNA, RNA or protein level, can optimize a CAR-expressing cell performance. In embodiments, an inhibitory nucleic acid, e.g., an inhibitory nucleic acid, e.g., a dsRNA, e.g., an siRNA or shRNA, can be used to inhibit expression of an inhibitory molecule in the CAR-expressing cell. In an embodiment the inhibitor is an shRNA. In an embodiment, the inhibitory molecule is inhibited within a CAR-expressing cell. In these embodiments, a dsRNA molecule that inhibits expression of the inhibitory molecule is linked to the nucleic acid that encodes a component, e.g., all of the components, of the CAR. In one embodiment, the inhibitor of an inhibitory signal can be, e.g., an antibody or antibody fragment that binds to an inhibitory molecule. For example, the agent can be an antibody or antibody fragment that binds to PD1, PD-L1, PD-L2 or CTLA4 (e.g., ipilimumab (also referred to as MDX-010 and MDX-101, and marketed as Yervoy®; Bristol-Myers Squibb; Tremelimumab (IgG2 monoclonal antibody available from Pfizer, formerly known as ticilimumab, CP-675,206)).

[00327] PD1 is an inhibitory member of the CD28 family of receptors that also includes CD28, CTLA-4, ICOS, and BTLA. PD-1 is expressed on activated B cells, T cells and myeloid cells (Agata et al. 1996 Int. Immunol 8:765-75). Two ligands for PD1, PD-L1 and PD-L2 have been shown to downregulate T cell activation upon binding to PD1 (Freeman et al. 2000 J Exp Med 192:1027-34; Latchman et al. 2001 Nat Immunol 2:261-8; Carter et al. 2002 Eur J Immunol 32:634-43). PD-L1 is abundant in human cancers (Dong et al. 2003 J Mol Med 81:281-7; Blank et al. 2005 Cancer Immunol. Immunother 54:307-314; Konishi et al. 2004 Clin Cancer Res 10:5094). Immune suppression can be reversed by inhibiting the local interaction of PD1 with PD-L1. Antibodies, antibody fragments, and other inhibitors of PD1, PD-L1 and PD-L2 are available in the art and may be used combination with a CD123 CAR described

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

herein. For example, nivolumab (also referred to as BMS-936558 or MDX1106; Bristol-Myers Squibb) is a fully human IgG4 monoclonal antibody which specifically blocks PD-1. Nivolumab (clone 5C4) and other human monoclonal antibodies that specifically bind to PD-1 are disclosed in US 8,008,449 and WO2006/121168. Pidilizumab (CT-011; Cure Tech) is a humanized IgG1k monoclonal antibody that binds to PD-1. Pidilizumab and other humanized anti-PD1 monoclonal antibodies are disclosed in WO2009/101611. Lambrolizumab (also referred to as MK03475; Merck) is a humanized IgG4 monoclonal antibody that binds to PD1. Lambrolizumab and other humanized anti-PD1 antibodies are disclosed in US 8,354,509 and WO2009/114335. MDPL3280A (Genentech / Roche) is a human Fc optimized IgG1 monoclonal antibody that binds to PD-L1. MDPL3280A and other human monoclonal antibodies to PD-L1 are disclosed in U.S. Patent No.: 7,943,743 and U.S Publication No.: 20120039906. Other anti-PD-L1 binding agents include YW243.55.S70 (heavy and light chain variable regions are shown in SEQ ID NOs 20 and 21 in WO2010/077634) and MDX-1 105 (also referred to as BMS-936559, and, e.g., anti-PD-L1 binding agents disclosed in WO2007/005874). AMP-224 (B7-DCIg; Amplimmune; e.g., disclosed in WO2010/027827 and WO2011/066342), is a PD-L2 Fc fusion soluble receptor that blocks the interaction between PD1 and B7-H1. Other anti-PD1 antibodies include AMP 514 (Amplimmune), among others, e.g., anti-PD1 antibodies disclosed in US 8,609,089, US 2010028330, and/or US 20120114649. The agent which enhances the activity of a CAR-expressing cell can be, e.g., a fusion protein comprising a first domain and a second domain, wherein the first domain is an inhibitory molecule, or fragment thereof, and the second domain is a polypeptide that is associated with a positive signal, e.g., the polypeptide that is associated with a positive signal is CD28, ICOS, and fragments thereof, e.g., an intracellular signaling domain of CD28 and/or ICOS. In one embodiment, the fusion protein is expressed by the same cell that expressed the CAR. In another embodiment, the fusion protein is expressed by a cell, e.g., a T cell that does not express an anti-EGFRvIII CAR.

[00328] In one embodiment, the agent which enhances activity of a CAR-expressing cell described herein is miR-17-92.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

Pharmaceutical compositions and treatments

[00329] Pharmaceutical compositions of the present invention may comprise a CAR-expressing cell, e.g., a plurality of CAR-expressing cells, as described herein, in combination with one or more pharmaceutically or physiologically acceptable carriers, diluents or excipients. Such compositions may comprise buffers such as neutral buffered saline, phosphate buffered saline and the like; carbohydrates such as glucose, mannose, sucrose or dextrans, mannitol; proteins; polypeptides or amino acids such as glycine; antioxidants; chelating agents such as EDTA or glutathione; adjuvants (e.g., aluminum hydroxide); and preservatives. Compositions of the present invention are in one aspect formulated for intravenous administration.

[00330] Pharmaceutical compositions of the present invention may be administered in a manner appropriate to the disease to be treated (or prevented). The quantity and frequency of administration will be determined by such factors as the condition of the patient, and the type and severity of the patient's disease, although appropriate dosages may be determined by clinical trials.

[00331] In one embodiment, the pharmaceutical composition is substantially free of, e.g., there are no detectable levels of a contaminant, e.g., selected from the group consisting of endotoxin, mycoplasma, replication competent lentivirus (RCL), p24, VSV-G nucleic acid, HIV gag, residual anti-CD3/anti-CD28 coated beads, mouse antibodies, pooled human serum, bovine serum albumin, bovine serum, culture media components, vector packaging cell or plasmid components, a bacterium and a fungus. In one embodiment, the bacterium is at least one selected from the group consisting of *Alcaligenes faecalis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenza*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Streptococcus pyogenes* group A.

[00332] When "an immunologically effective amount," "an anti-tumor effective amount," "a tumor-inhibiting effective amount," or "therapeutic amount" is indicated, the precise amount of the compositions of the present invention to be administered can be determined by a physician with consideration of individual differences in age, weight, tumor size, extent of infection or metastasis, and condition of the patient (subject). It can generally be stated that a

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

pharmaceutical composition comprising the T cells described herein may be administered at a dosage of 10^4 to 10^9 cells/kg body weight, in some instances 10^5 to 10^6 cells/kg body weight, including all integer values within those ranges. T cell compositions may also be administered multiple times at these dosages. The cells can be administered by using infusion techniques that are commonly known in immunotherapy (see, e.g., Rosenberg *et al.*, New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988).

[00333] In certain aspects, it may be desired to administer activated T cells to a subject and then subsequently redraw blood (or have an apheresis performed), activate T cells therefrom according to the present invention, and reinfuse the patient with these activated and expanded T cells. This process can be carried out multiple times every few weeks. In certain aspects, T cells can be activated from blood draws of from 10cc to 400cc. In certain aspects, T cells are activated from blood draws of 20cc, 30cc, 40cc, 50cc, 60cc, 70cc, 80cc, 90cc, or 100cc.

[00334] The administration of the subject compositions may be carried out in any convenient manner, including by aerosol inhalation, injection, ingestion, transfusion, implantation or transplantation. The compositions described herein may be administered to a patient trans arterially, subcutaneously, intradermally, intratumorally, intranodally, intramedullary, intramuscularly, by intravenous (i.v.) injection, or intraperitoneally. In one aspect, the T cell compositions of the present invention are administered to a patient by intradermal or subcutaneous injection. In one aspect, the T cell compositions of the present invention are administered by i.v. injection. The compositions of T cells may be injected directly into a tumor, lymph node, or site of infection.

[00335] In a particular exemplary aspect, subjects may undergo leukapheresis, wherein leukocytes are collected, enriched, or depleted ex vivo to select and/or isolate the cells of interest, e.g., T cells. These T cell isolates may be expanded by methods known in the art and treated such that one or more CAR constructs of the invention may be introduced, thereby creating a CAR T cell of the invention. Subjects in need thereof may subsequently undergo standard treatment with high dose chemotherapy followed by peripheral blood stem cell transplantation. In certain aspects, following or concurrent with the transplant, subjects receive an infusion of the expanded CAR T cells of the present invention. In an additional aspect, expanded cells are administered before or following surgery.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

[00336] The dosage of the above treatments to be administered to a patient will vary with the precise nature of the condition being treated and the recipient of the treatment. The scaling of dosages for human administration can be performed according to art-accepted practices.

EXAMPLES

[00337] The invention is further described in detail by reference to the following experimental examples. These examples are provided for purposes of illustration only, and are not intended to be limiting unless otherwise specified. Thus, the invention should in no way be construed as being limited to the following examples, but rather, should be construed to encompass any and all variations which become evident as a result of the teaching provided herein.

[00338] Without further description, it is believed that one of ordinary skill in the art can, using the preceding description and the following illustrative examples, make and utilize the compounds of the present invention and practice the claimed methods. The following working examples specifically point out various aspects of the present invention, and are not to be construed as limiting in any way the remainder of the disclosure.

Example 1: Redirected autologous T cells engineered to express EGFRvIII-targeted chimeric antigen receptor in patients diagnosed with EGFRvIII+ glioblastoma

[00339] The following experiments were designed to address whether human T cells re-directed to the surface protein EGFRvIII with an antibody-based chimeric antigen receptor (CAR) would be effective in eliminating an EGFRvIII+ model of glioblastoma multiforme in NSG mice. In addition, experiments were designed to evaluate engraftment and persistence of these cells. Three different forms of CARs are tested, encompassing two different single-chain variable fragments (the portion of the CAR binding to the EGFRvIII antigen), and the intracellular signaling domains (4-1BB and CD3 zeta with and without CD28).

[00340] The immunodeficient NOD/scid/γnull (NSG) mouse is an excellent xenotransplantation model to engraft human tumor cell lines (the brain tumor line U87, which are EGFR+ and has versions engineered to be EGFRvIII+) and human T cells. Following

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

engraftment, the human T cells can be maintained in NSG mice for approximately 2 months, or until fatal xenogeneic GVHD (xGVHD) develops, which depends on the dose and donor of human T cells infused.

[00341] Briefly, a novel CAR (3C10 CAR) using the lentiviral platform was created incorporating a scFv derived from anti-EGFRvIII monoclonal antibody 3C10. This CAR has been tested *in vitro* and in xenogeneic mouse models. NOD/scid/ γ c(-/-) (NSG) mouse models have been widely used for pre-clinical assessments of CAR therapy, including evaluation of long-term persistence of infused human T-cells. NSG mice bearing Day 7 U87-EGFRvIII tumors in the brain received i.p. injections of temozolomide (1 mg/dose) daily on Days 7-11 and i.v. infusions of: 2×10^6 human T- cells *ex vivo* transduced with 3C10 CAR or mock enhance green fluorescence protein (EGFP)-vector on Days 7 and 17. On Day 21, BLI signals were undetectable in all mice that received CAR-transduced T-cells, while mice treated with the mock-transduced T- cells show regrowth of the tumor in 4 of 5 mice following the transient anti-tumor effect by temozolomide. In a separate experiment, mice treated with CAR-T-cells were sacrificed on Day 21, and the infiltration of CAR-transduced T-cells was evaluated by immunohistochemistry using biotin-conjugated anti-F(ab')₂ mAb (specific for the 3C10CAR) and streptavidin- Phycoerythrin (PE). i.v. infused CAR-T-cells appeared to heavily infiltrate the tumor based on the intense PE signals while the control tissue stained with streptavidin-PE but without the anti-F(ab')₂ mAb showed background signals only.

[00342] The materials and methods employed in these experiments are now.

Materials and Methods

NSG Mouse Model

[00343] A colony of immunodeficient NOD/scid/ γ cnull (NSG) mice was recently established. NSG mice lack T and B cells, natural killer cells, and also have impaired dendritic cell function. It has been confirmed that engraftment of activated T cells was superior in NSG mice over the previous NOD/scid/ β 2Mnull mouse model. Therefore the NSG model was used for the human xenotransplantation experiments.

Structure and Characteristics of the Biological System

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

[00344] Although many of the monoclonal and polyclonal Abs directed against EGFRvIII have cross reactivity to wild type EGFR or other non-specific proteins, a monoclonal antibody (mAb) 3C10, which was originally developed by immunization of mice with a 14 amino acid peptide including the EGFRvIII-specific fusion junction, demonstrated highly specific recognition of EGFRvIII with negligible detectable binding to wild-type EGFR (Okamoto *et al.*, 1996 *Br J Cancer* 73:1366-1372). A research-grade lentiviral vector was used for the transduction of the T cells.

Cell Preparation for Mouse Infusion

[00345] The cells for infusion into mice are human T cells. Human mononuclear cell enriched apheresis products are obtained by leukapheresis of healthy volunteer donors by the University of Pennsylvania Human Immunology Core. All specimens are collected under a University Institutional Review Board-approved protocol, and informed written consent is obtained from each donor. T cells are negatively selected using a RosetteSep human T cell enrichment cocktail (Stemcell Technologies, Vancouver, Canada). T cells are transferred to TRP laboratory where they are activated with research grade CD3/28 beads and expanded in RPMI with Glutamine, 10% FBS, 20mM Hepes, 100U/ml Penicillin and 100ug/ml Streptomycin. Vector transduction occurs 24 hours later with packaged lentivectors added directly to activated cultures. Cells are debeaded on day 5 and expansion is monitored with a Coulter Multisizer 3(Beckman Coulter, Fullerton, CA) for changes in size (fl) and total cell counts, maintaining concentration between 0.7E6 to 2E6 cells/ml. Transduction efficiency for CAR- transduced T cells is tested by flow cytometry by staining with either goat anti-mouse antibody (GAM, for 3C10-based CARs) or goat-anti-human (GAH, for 139-based CAR). Mice are infused with 1 million CAR+ T cells per mouse by tail vein injection on day 0 of the study.

Temozolomide (TMZ) Treatment

[00346] Mice bearing i.c. U87-EGFRvIII tumor and receiving CAR+ T cells on day 0 subsequently receive intraperitoneal (i.p.) injections of TMZ on days 0-4 (daily for 5 days): TMZ is resolved in DMEM at 6.67mg/ml. Each mouse receives 50uL TMZ solution (333 microgram/dose; approximately 17 mg/kg/dose) by i.p. injections.

Clinical grade CART

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

[00347] The CART-EGFRvIII T cells are prepared in the clinical cell and vaccine production facility (CVPF), and the cell product is autologous T lymphocytes. CD3+ T- cells are enriched from a leukapheresis product by depletion of monocytes via counterflow centrifugal elutriation . On day 0, the manufacturing process is initiated with activation of the enriched T-cells using anti-CD3/CD28 mAb coated magnetic beads. The T cell culture is exposed to the EGFRvIII CAR lentivirus vector and expanded. The T-cell manufacturing process initiates in a static tissue culture (day 0 to day 5), followed by transfer to a Wave bioreactor if needed for additional expansion under perfusion conditions. At the end of the culture, cells are depleted of magnetic beads, washed, concentrated, and cryopreserved. The modified T cell product is cryopreserved in cryobags in a volume dependent on the cell number (at a final concentration of maximum 10^8 /ml) using a controlled-rate freezer. Cryopreserved EGFRvIII CAR T-cell products are stored in a monitored freezer at $\leq -130^\circ \text{C}$. The results of the experiments are now described.

Eradication of intracranial EGFRvIII-expressing glioblastoma by CAR-T-cells

[00348] Glioblastoma (GBM) is the most common and the most malignant primary brain tumors, and responsible for approximately 12,000 cancer-related deaths in the US each year. Patients with GBM have a median survival of sorter than 15 months following treatment with a combination of chemotherapy (temozolomide) with radiotherapy (RT). Adoptive cell transfer (ACT) therapy with autologous T-cells, especially with T-cells transduced with chimeric antigen receptors (CARs), has shown promise in recent hematologic cancer trials. ACT with CART cells may be particularly suitable for patients with GBM because the specificity, number, and functional phenotype of cells prepared *ex vivo* can be manipulated and controlled better than native T-cells induced by *in vivo* immunization.

[00349] Epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII) is the most common variant of the EGFR observed in human tumors but is rarely observed in normal tissue. This protein results from the in-frame deletion of exons 2-7 and the generation of a novel glycine residue at the junction of exons 1 and 8 within the extra-cellular domain of the EGFR, thereby creating a tumor-specific epitope. EGFRvIII is expressed in 24% to 67% of GBM, but not in normal tissues.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

[00350] To develop effective CAR therapy for GBM, three novel lentiviral CAR constructs targeting EGFRvIII were generated. Each of these vectors encode a single-chain variable fragment (scFv) derived from EGFRvIII-specific murine monoclonal antibodies (mAbs) 3C10 or EGFRvIII-specific humanized monoclonal antibodies (mAbs) designated "139" (Figure 6). The 3C10 scFv was coupled with CD8a hinge, 4-1BB and CD3 ζ domains with or without CD28 trans-membrane and intracellular domains (3C10BBz28-CAR and 3C10BBz-CAR, respectively). The 139 scFv was coupled with CD8a hinge, 4-1BB and CD3 ζ domains (139BBz-CAR). Human T-cells transduced with each of these CARs demonstrated specific and potent lysis of EGFRvIII-expressing U87 human GBM cells (U87-EGFRvIII); see Figure 7. Immunocompromised NOD/scid/ γ c(-/-) (NSG) mice bearing Day 7 U87-EGFRvIII tumors in the brain received intravenous infusions of 1×10^6 human T-cells transduced *ex vivo* with: 1) 139BBz-CAR; 2) 3C10BBz-CAR; 3) 3C10BBz28-CAR; 4) control CD19BBz-CAR targeting human CD19. These mice also received intraperitoneal injections of temozolomide (330 mcg/dose) daily on Days 7-11. The tumor growth was monitored by bioluminescence imaging (BLI) as the U87-EGFRvIII cells also express luciferase. All mice treated with only saline died by Day 21 due to rapid tumor growth, and temozolomide treatment without ACT inhibited but did not eradicate the U87-EGFRvIII tumors. Mice receiving CD19BBz-CAR-T-cells and temozolomide demonstrated some allogeneic responses against U87-EGFRvIII, but the tumors continued to grow in these mice. On the other hand, in all mice receiving 139BBz-CAR-, 3C10BBz-CAR-, or 3C10BBz28-CAR-transduced T-cells, the BLI signals diminished to under baseline levels by Day 21, suggesting total tumor eradication (Figure 8). Importantly, mice receiving 3C10BBz-CART cells cleared the tumor faster than either the 3C10BBz28 or 139BBz CART cells, suggesting the combination of 3C10 with BBz might afford a better response in patients. The tumor growth and peripheral immune responses were monitored to determine whether any of the three EGFRvIII-CAR vectors are superior to the others for long-term anti-tumor effects.

[00351] The results presented herein strongly support development of a Phase I clinical trial of ACT with EGFRvIII-targeting CAR-T-cells in GBM patients who concurrently receive standard of care chemotherapy with temozolomide.

Clinical Design

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

[00352] A single-arm open-label pilot study was designed to determine the safety, tolerability and engraftment potential of CART-EGFRvIII T cells in patients with EGFRvIII+ newly diagnosed GBMs. Generally, all subjects are dosed with autologous CART- EGFRvIII T cells. Eligible subjects are leukapheresed to obtain large numbers of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) for CART-EGFRvIII manufacturing. The T cells are purified from the PBMC, transduced with the humanized 3C10-CAR lentiviral vector, expanded *in vitro* and cryopreserved in appropriate dose aliquots. Cells to be infused are thawed at the bedside immediately prior to infusion on day 0.

[00353] Subjects are subjected to blood tests to assess safety, and engraftment and persistence of the CART EGFRvIII cells at regular intervals through week 4 (day 28). The subsets of circulating T-cells that contain the 3C10-CAR vector are assessed at various times after infusion and compared to the baseline sample. After day 28, subjects are evaluated monthly until 6 months with a medical history, a physical examination, brain MRI and blood tests or as per standard of care.

[00354] Research blood tests are conducted concurrent with these visits. After the six months, patients are followed every 2 months for two years. After the two-year timepoint, subjects enter a roll-over study for annual follow-up by phone and questionnaire for an additional thirteen years to assess for the diagnosis of long-term health problems, such as development of new malignancy, as required by FDA regulations pertaining to gene transfer studies.

[00355] Without wishing to be bound by any particular theory, it is believed that because of the highly restricted expression of the EGFRvIII protein, there is no anticipation of any kind of off-tumor on-target activation of T cells. Preferably, only one infusion of the CART-EGFRvIII is administered, and therefore do not anticipate allergic- type responses either. However, one toxicity that may be encountered is bystander inflammation from T cell activation at the site of tumor. Symptoms and signs of brain edema will be closely monitored and managed. In some embodiments, bystander inflammation from T cell activation can be treated by administration of an anti-inflammatory agent, such as a steroid agent.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

Example 2: Co-transduction of miR-17-92 enhances anti-tumor activity of T-cells transduced with the anti-EGFRvIII chimeric antigen receptor in mice bearing human glioblastoma xenografts

[00356] miR-17-92 expression confers type-1 phenotype and enhanced survival of T-cells. It has been reported that that miR-17-92 is down-regulated in T-cells derived from glioblastoma (GBM) patients. To improve the efficacy of adoptive transfer therapy against GBM using T-cells transduced with Chimeric Antigen Receptors (CAR-T-cells), a novel lentiviral vectors for miR-17-92 and a CAR consisting of epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII)-specific single-chain variable fragment (scFv) coupled to the T-cell receptor CD3 ζ chain signaling module and co-stimulatory motifs of CD137 (4-1BB) and CD28 in tandem (pELNS-3C10-CAR) was constructed. In addition to antigen- specific and potent cytotoxic activities against U87 GBM cells stably expressing EGFRvIII (U87-EGFRvIII), CAR-T-cells co-transduced with miR-17-92 exhibited improved resistance to T-cell suppressing effects of transforming growth factor (TGF)- β and temozolomide compared with CAR-T-cells without miR-17-92 co-transduction. In mice bearing intracranial U87-EGFRvIII xenografts, CAR-T-cells with or without transgene-derived miR-17-92 expression demonstrated similar levels of potent therapeutic effects without demonstrating any uncontrolled growth of CAR-T-cells. However, when these mice were re-challenged with U87-EGFRvIII cells in the brains, mice receiving co-transduced CAR-T-cells exhibited improved protection compared with mice treated with CAR-T-cells without miR-17-92 co-transduction. These data support miR-17-92 can be integrated in the CAR to improve the efficacy in patients with GBM.

The results of the experiments are now described.

Construction of lentiviral vectors for EGFRvIII-specific CAR and miR-17-92

[00357] A lentiviral vector for a CAR that recognizes the EGFRvIII through a single-chain variable fragment (scFv) derived from human EGFRvIII-specific monoclonal antibody (mAb) 3C10 (pELNS-3C10-CAR was generated (See Figure 1A). In this construct, the EF-1 α promoter drives the CAR fusion protein integrating the 3C10-derived scFv, CD28 trans-membrane (TM) as well as 4-1BB and intracellular domains (ICD) and CD3 ζ domains. A lentiviral miR-17-92 construct using the FG12-based self-inactivating (SIN) vector (FG12-

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

EF1a-miR-17/92 was also created (See Figure 1B). In this vector, the EF-1 α promoter drives miR-17-92 and the human UbiC promoter drives enhanced green fluorescence protein (EGFP) marker gene for tracking of transduced cells. Abbreviations used in the schema: RSV/HIV-1 5'LTR; Hybrid RSV promoter-R/U5 long terminal repeat, EF-1 α ; Human elongation factor 1 α -subunit promoter, VH; Variable region in the heavy chain of the 3C10 immunoglobulin, VL; Variable region in the light chain of the 3C10 immunoglobulin, HIV-1 Δ -3'LTR; Self-inactivating 3' long terminal repeat with deletion in U3 region, CMV/HIV-1 5'LTR Hybrid CMV promoter-R/U5 long terminal repeat, UbiC; Ubiquitin C promoter.

In vitro characterization of human T-cells transduced with the CAR and miR-17-92

[00358] Healthy donor-derived CD3⁺ T-cells were transduced with pELNS-3C10- CAR, and the cells were evaluated for expression levels of the transgene by flow cytometry for expression of 3C10-CAR and miR-17-92 by anti-mouse (Fab')₂ antibody and EGFP, respectively (Figure 2A, Left). Using anti-mouse F(ab')₂ Ab, which is specific for the 3C10-derived scFv on human T-cells, nearly half (48.9%) of the T-cells expressing the 3C10-derived scFv on their surface were detected.

[00359] To obtain human T-cells expressing both the CAR and transgene-derived miR-17-92, CD3⁺ T-cells were co-transduced with pELNS-3C10-CAR and FG12-EF1a-miR-17/92 by sequential infection of the two lentiviral vectors. At 24 hours after the initial transduction with pELNS-3C10-CAR, the T-cells were transduced with FG12- EF1a-miR-17-92. It was observed that approximately a quarter (23.6%) of the total T- cells expressed both CAR and EGFP (Figure 2A, Right). For subsequent *in vitro* studies, CAR-transduced T-cells (CAR-T-cells) were enriched using biotinylated anti-mouse F(ab')₂ Ab and anti-biotin MACS. Based on the efficiency of co-transduction (Figure 2A, Right), at least 50% of the CAR-T-cells also expressed EGFR (hence the transgene- derived miR-17-92). By real-time PCR, 3-4 fold higher expression of miR-17-92 was detected in the F(ab')₂ Ab-enriched, miR-17-92-co-transduced CAR-T-cells compared with T-cells transduced with the CAR alone (Figure 2B). Figure 2B demonstrates the expression levels of the miR-17-92 cluster members, miR-17-3p, miR-17-5p and miR-92a-1 in transduced T cells measured by qRT-PCR. Mean $\pm$ SD values of 3 replicate measurements from one of three experiments with similar results are depicted. * indicates $p < 0.05$ between the two groups using student t test. Figure 2C depicts EGFRvIII specific

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

cytotoxic activities of transduced T cells evaluated by a 12-h ^{51}Cr -release assay at various E:T ratios against ^{51}Cr -labeled U87-EGFRvIII or control U87 cells. Control cells were Mock (EGFP)-transduced T-cells. Values indicate mean $\pm$ SD in triplicated wells.

[00360] While the mock-transduced T-cells showed only background levels of lysis against both parental U87 (EGFRvIII-negative) and U87-EGFRvIII cells, T-cells transduced with the CAR demonstrated potent and specific lysis of EGFRvIII-expressing U87 human GBM cells (U87-EGFRvIII) with only background levels of cytotoxic effects against parental U87 cells (Figure 2C). In these 12h ^{51}Cr -release assays, co-transduction of CAR-T-cells with miR-17-92 did not significantly enhance their specific cytotoxic activity against U87-EGFRvIII target cells.

miR-17-92 co-transduction confers enhanced IFN- γ release and resistance to suppressive effects by TGF- β and temozolomide (TMZ – standard of care therapy)

[00361] In a previous study (Sasaki *et al.*, 2010, J. Transl Med 8:17), CD4⁺ T cells derived from miR-17-92 transgenic mice demonstrated increased IFN- γ production when compared with counterparts derived from wild type mice; and transfection of human Jurkat T cells with miR-17-92 lead to enhanced resistance to activation-induced cell death (AICD).

[00362] Experiments were conducted to evaluate whether co-transduction of CAR-T-cells with miR-17-92 confers improved IFN- γ production, cell proliferation and lesser degrees of apoptotic death when they are exposed to a chemotherapy agent TMZ or an immuno-suppressive cytokine TGF- β .

[00363] When CAR-T-cells were stimulated with EGFRvIII-transduced artificial Antigen-Presenting Cells (aAPCs) without TGF- β or TMZ, the cells expressed similar levels of IFN- γ with or without co-transduction. However, when the cells were exposed to escalating doses of TGF- β or TMZ, CAR-T-cells without miR-17-92 co-transduction produced significantly reduced levels of IFN- γ , while the co-transduced CAR-T-cells maintained high level production of IFN- γ (Figure 3A). Open bars and closed bars represent results from CAR-T-cells (without miR-17-92) and miR-17-92 co-transduced CAR-T cells, respectively. Figure 3A shows IFN- γ produced by the transduced T cells during the 25 last 24h of 96h co-culture. Figure 3B shows relative proliferation levels between the groups were evaluated by WST1 assay following the 3-

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

day co-culture course. Figures 3C and 3D show apoptotic death of CAR-T-cells evaluated by Annexin-V and PI. Figure 3C show mean fluorescent intensity for Annexin-V on CAR-T-cells exposed to TMZ. Values indicate mean $\pm$ SD in triplicate wells. (* indicates $P < 0.05$) Figure 3D show flow cytometric histograms for Annexin-V+ and/or PI+ in one of the three experiments with similar results.

[00364] Experiments were conducted to evaluate the effects of miR-17-92 co-transduction on proliferation of CAR-T-cells in the presence of TMZ in culture. Experiments were designed to induce the proliferation of CAR-T-cells with EGFRvIII- expressing aAPC and the proliferation was evaluated by WST-1 assay (Figure 3B). Without TMZ, miR-17-92-co-transduced CAR-T-cells demonstrated a trend toward a faster proliferation rate compared with control CAR-T-cells, but the difference was not significant. To specifically evaluate the impact of TMZ on the CAR-T-cell proliferation, in Figure 3B, the proliferation rate of the cells in each group was depicted relative to the proliferation of the same cells without TMZ. When increasing concentrations of TMZ are added in the culture, the degrees of growth suppression was significantly less in the miR-17-92 co-transduced CAR-T-cells compared with the control CAR-T-cells.

[00365] Experiments were conducted to evaluate whether miR-17-92-co-transduction would render CAR-T-cells more resistant to TMZ-induced apoptosis. To this end, flow-cytometric assessments of Annexin V⁺ and propidium iodide (PI)⁺ CAR-T- cells were conducted in increasing concentrations of TMZ (Figure 3C and 3D). It was observed that a dose-dependent increase of both early apoptotic (Annexin V⁺PI⁻), apoptotic/necrotic (Annexin V⁺PI⁺) and necrotic (Annexin V⁻PI⁺) cells, and miR-17-92-co-transduced CAR-T-cells demonstrated lesser degrees of the apoptotic changes compared with control CAR-T-cells.

Intravenous injection of CAR-T-cells in combination with TMZ leads to complete remission of established U87-EGFRvIII tumors in NSG mice

[00366] Experiments were conducted to evaluate the efficacy of CAR-T-cells in immunocompromised NOD/scid/ $\gamma c^{-/-}$ (NSG) mice bearing established (Day 7) intracranial U87-EGFRvIII tumors. Mice received a single intravenous (i.v.) infusion of miR-17-92 co-transduced CAR-T-cells, CAR-T-cells without co-transduction of miR-17-92, or mock-

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

transduced T-cells (2×10^6 /mouse) via the tail vein. As newly diagnosed GBM patients routinely receive TMZ therapy, experiments were designed to administer intraperitoneal (i.p.) daily injections of TMZ for 5 days starting on the day of T-cell infusion (Figure 4A). Figure 4B shows a Kaplan- Meier analysis. Median survival of the mice treated with CAR-T cells (with or without co-transduction of miR-17-92) was significantly greater compared the mice with mock transduced T cells ($p < 0.05$). TMZ treatment itself was ineffective as all the control mice receiving TMZ and mock-transduced T-cells died within 3 weeks (day 21) after the T-cell infusion (Figure 4B). Although one of five mice with CAR-T-cells and two of five mice with miR-17-92 co-transduced CAR-T-cells died for the tumor progression by day 22, all the other mice in these groups survived longer than 40 days. Results are from one of two independent experiments with similar results. There was not a statistically significant difference in survival of the mice receiving miR-17-92-co-transduced CAR-T-cells vs. CAR-T-cells without miR-17-92 co-transduction (log-rank test: $p=0.5485$).

miR-17-92 co-transduced CAR-T-cells confers a persistent protection against U87- EGFRvIII tumors in mice

[00367] To determine whether CAR-T-cells infused in the mice in the experiment presented in Figure 4 can provide long-term protection of the hosts against the U87- EGFRvIII tumors, the survivors were re-challenged with inoculation of U87-EGFRvIII cells in the contra-lateral hemisphere of the brain on Day 49 (Figure 5). While the re- challenged tumor cells grew in all three mice treated with CAR-T-cells, none of the mice treated with miR-17-92-co-transduced CAR-T-cells demonstrated BLI signals beyond the background levels. These results strongly suggest that co-transduction of miR-17-92 cluster confers long-term persistence of the CAR-T-cells, thereby providing prolonged protection of the host against the tumor growth. Longitudinal measurements of tumor-derived mean photon flux $\pm$ SD from the 2 groups of mice. The background luminescence level (up to 10^3 p/s) was defined based on the levels observed in non-tumor-bearing mice imaged in parallel with tumor-bearing mice in treatment groups

miR-17-92 can be integrated in the CAR to improve efficacy

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

[00368] The results presented herein demonstrate the effects of miR-17-92 co-expression in T-cells transduced with the novel anti-EGFRvIII-CAR (3C10-CAR) integrating 3C10 scFv with CD3 ζ chain, CD137 (4-1BB) and CD28. The present results show that co-expression of miR-17-92 confers improved resistance to T-cell growth-suppressing effects of TGF- β and temozolomide. *In vivo*, T-cells co-transduced with both 3C10-CAR and miR-17-92 demonstrated more persistent therapeutic effects compared with T-cells transduced with 3C10-CAR alone.

[00369] Lentiviral transduction of miR-17-92 in the present study confers ectopic over-expression of the miR-cluster in transduced T-cells. In physiological conditions, however, expression levels of endogenous miR-17-92 in T-cells appear to be tightly regulated. In human CD8⁺ T cells, miR-17-92 expression is detected high levels in naïve cells but diminishes as the cells differentiate (Salaun *et al.*, 2011, J Transl Med 9:44). In a mouse model of lymphocytic choriomeningitis virus infection, miR-17-92 is strongly up-regulated following T-cell activation, however down-regulated after clonal expansion, and further silenced during memory development (Wu *et al.*, 2012, Proc Natl Acad Sci USA 109:9965-9970). In this referenced study, miR-17-92 is necessary for the rapid T-cell expansion and their IFN- γ expression. However, overexpression of miR-17-92 skews the differentiation toward short-lived terminal effector cells. Failure to down-regulate miR-17-92 leads to a gradual loss of memory cells and defective central memory cell development (Wu *et al.*, 2012, Proc Natl Acad Sci USA 109:9965-9970). These observations are not necessarily consistent with the results presented herein as persistence of miR-17-92-co-transduced CAR-T-cells and their efficient ability to protect the hosts from the re-challenged U87-EGFRvIII cells was observed. Without wishing to be bound by any particular theory, it is believed that this observation is attributable to the combinatory effects of the co-stimulatory molecules provided in the CAR and the miR-17-92.

[00370] Although miR-17-92 has been described as an oncogenic miR (van Haaften and Agami, 2010, Genes & Development 24:1-4), miR-17-92 overexpression itself is known not to be oncogenic in lymphocytes (Xiao *et al.*, 2008, Nat Immunol 9:405-414). Indeed, uncontrolled proliferation of miR-17-92-transduced T-cells in the current study was not observed. Nonetheless, as an alternative approach for better safety assurance, transient transduction of T-cells with miR-17-92 itself, instead of lentiviral stable transfer, and multiple injection of those

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

T-cells may represent a reasonable approach without the associated safety concerns of integrating viral vectors (Zhao *et al.*, 2010, Cancer Research 70:9053-9061).

[00371] In regard to the EGFRvIII-targeting CARs for therapy of GBM, recently, Morgan *et al.* evaluated scFv sequences derived from seven different anti-EGFRvIII mAbs, including 3C10 and human 139, in γ -retroviral CARs (Morgan *et al.*, 2012, Hum Gene Ther 23:1043-1053). The *in vitro* characterization of those CARs revealed the 3C10 and the 139 as two of the three clones that yielded specific IFN- γ production in response to EGFRvIII-expressing target cells, but not cells expressing the wild-type EGFR gene.

[00372] It is also important to recognize that EGFRvIII is expressed only in a population of GBM patients and fractions of the GBM cells even in “EGFRvIII-positive” cases (Heimberger *et al.*, 2005, Clin.Cancer Res. 11:1462-1466). Immunotherapy targeting EGFRvIII as the single target will likely result in the outgrowth of GBM cells that have down-regulated the immunotherapy-targeted antigen (Sampson *et al.*, 2010, J Clin Oncol 28:4722-4729). A number of previous studies have developed CARs against GBM-associated antigens, such as IL-13R α 2 (Kong *et al.*, 2012, Clin Cancer Res 18:5949-5960; Kahlon *et al.*, 2004, Cancer Res. 64:9160-9166), HER-2 (Ahmed *et al.*, 2010, Clinical Cancer Research 16:474-485) and EphA2 (Chow, K.K. *et al.* T Cells Redirected to EphA2 for the Immunotherapy of Glioblastoma. Mol Ther (2012). Without wishing to be bound by any particular theory, it is believed that effective CAR therapy should ultimately employ T-cells that are able to resist GBM-induced suppression mechanisms and target multiple antigens, so that the infused T-cells will exhibit effective and sustained therapeutic effects against GBM with heterogenous antigen-expression profiles.

[00373] The results presented herein demonstrate the benefits of using T-cells co- transduced with pELNS-3C10-CAR and FG12-EF1a-miR-17/92. As an alternative approach to achieve co-expression of the CAR and miR-17-92 transgene, a pELNS-based lentiviral vector that expresses both 3C10-CAR gene and miR-17-92 gene as a single transcript was constructed. Use of this single “tandem” vector may have an advantage in terms of relatively simple transduction procedures and straightforward regulatory processes compared with the two vector-based approach. Furthermore, all T-cells that express the CAR should also express miR-17-92. However, it was found that the transduction efficiency of the “tandem” vector is lower than that by the two vector approach likely because the titer of lentivirus decreases as the size of insert

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

increases. As discussed elsewhere herein, lentiviral transduction of 3C10-CAR gene and electroporation of miR-17-92 in combination may be a feasible strategy.

[00374] In the present study, it was also found that 40% to 60% of CD3⁺ CAR-T-cells were CD4⁺, and that CD4⁺ CAR-T-cells effectively lysed U87-EGFRvIII cells in an EGFRvIII-specific manner. It has been reported that Perforin⁺ CD4⁺ T-cells mediate cytotoxic activities via the perforin/granzyme B pathway, but not the Fas/FasL pathway (Porakishvili *et al.*, 2004, *Haematologica* 89:435-443). Hence, it is believed that the CD4⁺ CAR-T-cells in the current study expressed perforin and granzyme B to mediate the observed lytic activities against U87-EGFRvIII cells.

[00375] In summary, the current study provides a strong foundation for evaluation of CAR therapy integrating miR-17-92.

Example 3: CAR Sequences

[00376] Murine monoclonal antibody (mAb) 3C10 was originally developed by immunization of mice with a 14 amino acid peptide (PEP3) including the EGFRvIII-specific fusion junction and demonstrated highly specific recognition of EGFRvIII without any detectable binding to wild-type EGFR (Okamoto *et al.*, *British J. Cancer* 1996, 73:1366-1372). Subsequently, a single-chain variable fragment (scFv) of mAb 3C10 was produced and cDNA for the 3C10 scFv was obtained. While avidity and/or antigen-specificity of the original mAbs can be often lost in scFv forms, the 3C10 scFv retained its selective reactivity with the EGFRvIII-specific epitope (Nakayashiki *et al.*, *Jpn. J. Cancer Res.* 2000, 91:1035-1043).

[00377] An EGFRvIII CAR was constructed by cloning the 3C10scFv (mouse) with CD28, 4-1BB, and CD3 zeta into the pELNS lentiviral backbone plasmid (EF1 promoter). Another EGFRvIII CAR was generated by cloning the 3C10scFv into a CD8ahinge/CD8TM/4-1BB/CD3zeta pELNS lentiviral backbone, which is expressed by EF1a promoter.

3C10scFv-CD28BBzeta CAR (Amino Acid) (SEQ ID NO: 1)

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

MALPVTALLLPLALLLHAARPGSEIQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIEDY
 YIHWVKQRTEQGLEWIGRIDPENDETKYGPFIQGRATITADTSSNTVYLQLSSLTS
 EDTAVYYCAFRGGVYWGP GTTLTVSSGGGSGGGGSGGGGSHMDVVMQTQSPL
 TLSVAIGQSASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLISLVSKLDSGVPDRFTG
 SSGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCWQGFTHPGTFGGGTKLEIKASTTTPAPR
 PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDFWVLVVVGVLACYSL
 LVTVAFIHFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSKR
 GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQ
 GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA
 YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

3C10scFv-BBz CAR (Amino Acid) (SEQ ID NO: 2)

MALPVTALLLPLALLLHAARPGSEIQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIE
 DYYIHWVKQRTEQGLEWIGRIDPENDETKYGPFIQGRATITADTSSNTVYLQLSSLTSE
 DTA VYYCAFRGGVYWGP GTTLTVSSGGGSGGGGSGGGGSHMDVVMQTQSPL
 TLSVAIGQSASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLISLVSKLDSGVPD
 RFTGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCWQGFTHPGTFGGGTKLEIKASTTTPAPR
 PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSL
 VITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCELRVKFSRSADAP
 AYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK
 MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

3C10scFv-CD28BBzeta CAR (Nucleic Acid) (SEQ ID NO: 18)

atggccttaccagtgtaccgccttgcctcctgccgtggccttgcctcctccacgccgccaggccgggatccgagattcagctgcag
 caatctggggcagaactgtgaagccaggggcctcagtcagctgtcctgcacagggtcctgctcaacattgaagactactatat
 tctactgggtgaagcagaggactgaacaggcctggaatggattggaaggattgatcctgagaatgatgaactaaatagcccc
 aatattccaggggcaggccactataacagcagacacatcctccaacacagtctacctgcaactcagcagcctgacatctgagga
 cactgccgtctattactgtgccttcgcgtggagtctactggggccagggaaccactctcacagtctcctcaggaggtgggtggtccggt
 ggtgggtgggtccggagggtgggtggttcacatatggatgttgatgaccaggtctccactcactctatcggtgccattggac

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

aatcagcctccatctcttgcagtgcaagtcagagcctcttagatagtgatggaaagacatatattgaattggtgttacagaggccaggccagt
ctccaaagcgcctaattctctctggtgtctaaactggactctggagtcctgacaggttcactggcagtggtatcaggggac
agatttcacactgagaatcagcagagtgaggctgaggatttgggaatttatttattgctggcaaggtacacattttcctgggacgtt
cgggtggaggaccagctggagataaaagctagcaccacgacgccagcggcgcgaccaccaacaccggcggccaccatcg
cgtcgcagccccgtccctgcgccagaggcgtgccggccagcggcggggggcgcagtgacacagagggggctggacttcgcctgt
gatttttgggtgctggtggtggtggtggagtcctgcttgcctatagcttgcctagtaacagtgccctttatttttctgggtg
aggagtaagaggagcaggctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgcggccccggggccaccgcgaagcattacc
agccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgtccaaacggggcagaaagaactcctgtatatattcaacaaccatt
tatgagaccagtacaaactactcaagaggagatgctgtagctgccgatttcagaagaagaaggaggatgtgaactga
gagtgaaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtacaagcaggggccagaaccagctctataacgactcaatctaggacgaagag
aggagtacgatgttttgacaagagacgtggcgggaccctgagatggggggaaagccgagaagggaagaacccct
cagggaaggcctgfacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgcagcgccgg
agggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtcagaccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggcccc
tgccccctcgc

3C10scFv-BBz CAR (Nucleic Acid) (SEQ ID NO: 19)

Atggccttaccagtgaccgcttgcctctgccgctggccttgcctccacgccgccaggccgggatccgagattcagctgca
gcaatctggggcagaacttgtgaagccaggggcctcagtcgaagctgtcctgcacaggttctggttcaacattgaagactactat
attcactgggtgaagcagaggactgaacagggcctgggaatggattggaaggattgacctgagaatgatgaactaaatatggc
ccaatatccaggggcagggccactataacagcagacacatcctccaacacagtcctacactcagcagcctgacatctgaggacact
gccgtctattactgtcccttcgcgggtggagtctactgggggccagggaaccactctcacagtcctcaggagggtgtg
gttccgggtggtggtgttccggagggtggtgttcacatatggatgttgatgacccagtcctcactactctatcggttgcattg
gacaatcagcctccatctcttgcagtgcaagtcagagcctcttagatagtgatggaaagacatatattgaattggtgttacagaggc
caggccagctccaaagcgcctaattctctctggtgtctaaactggactctggagtcctgacaggttcactggcagtggtatcagg
gacagatttcacactgagaatcagcagagtgaggctgaggatttgggaatttatttattgctggcaaggtacacattttcctgggacgttcg
gtggaggggaccaagctggagataaaagctagcaccacgacgccagcggcgcgaccaccaacaccggcggccacc
atcgcgctgcagccccgtccctgcgccagaggcgtgccggccagcggcggggggcgcagtgacacagagggggctgg
acttcgcctgtgatatctacatctgggcgcccttggccgggacttgggggtccttctcctgtcactggttatccctttactgcaa
acggggcagaaagaactcctgtatatattcaacaaccattttatgagaccagtacaaactactcaagagggaagatggctgtagc
tgccgatttcagaagaagaagaaggaggtgtgaactgagagtgaaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtacaagcagg

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

ccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttgacaagagacgtggccggg
 accctgagatgggggaaagccgagaaggaagaaccctcagggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcc
 tacagtgagattgggatgaaaggcgagcgccggaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtacagccaccaagga
 cacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgc

[00378] The scFv fragment termed "139" is a human antibody to EGFRvIII (Morgan *et al.*, 2012 Hum Gene Ther 23(10): 1043-53). An EGFRvIII CAR comprising the 139 scFv was generated by initially synthesizing the 139 scFv. The sequence for the 139 scFv was cloned with a leader sequence, CD8 hinge, transmembrane (TM) domain, and the desired signaling domains. For example, the sequence for the 139 scFv was cloned with the signaling domains for 4-1BB and CD3 zeta. The CAR construct (139scFv-BBZ) is expressed from the pELNS vector for lentivirus production.

139scFv-BBz CAR (Amino Acid) (SEQ ID NO: 3)

MALPVTALLLPLALLLHAARPGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGIRNNL
 AWYQQKPGKAPKRLIYAASNLSQGVPSRFTGSGSGTEFTLIVSSLQPEDFATYYC
 LQHHSYPLTSGGGTKVEIKRTGSTSGSGKPGSGEGSEVQVLESGGGLVQPGGSLR
 LSAAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVSAISGSGSTNYADSVKGRFTISR
 NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGSSGWSEYWGQGLTVTVSSASTTTPAPRP
 PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLV
 ITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPA
 YKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKM
 AEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

139scFv-BBz CAR (Nucleic Acid) (SEQ ID NO: 20)

Atggccttaccagtaccgccttgctctgccgctggccttgctgctccacgcccgccaggccgggatccgacatccagatgaccaga
 gccctagcagcctgagcggcagcgtggcgacagagtgaccatcacctgtcgggccagccaggcagcagcagaaca
 acctggcctggtatcagcagaagcccggaaggccccaagagactgatctacgctgccagcaatctgcagagcggcggtgcc
 cagcagattcaccggaagcggtccggcaccgagttcacctgatcgtgtccagcctgcagcccgaggacttcgccacctact

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

actgcctgcagcaccacagctaccctctgaccagcggcggaggcaccagggtggagatcaagcggaccggcagcaccagc
 ggcagcggcgaagcctggcagcggcgagggaagcgagggtccagggtgctggaaatctggcggcggactggtgcagcctggcggcagc
 ctgagactgagctgtgccgccagcggccttcaccttcagcagctacgccatgtcttgggtccggcaggtcctctggaaag
 ggccctggaaatgggtgtccgccatcagcggctctggcggtccaccaactacgccgacagcgtgaaggccgggttcaccatcagccgg
 gacaacagcaagaacacctgtatctgcagatgaacagcctgagagccgaggacaccgccgtgtactactgtgccgg
 cagcagcgggtggagcagtagtactggggccaggcagcactgtcacagtgtctagcgctagcaccacgacgccagcggcgc
 gaccaccaacaccggcgcccaccatcgctgcagccccgtgctccgcgccagaggcgtgccggccagcggcgggggg
 cgcagtgcacacgagggggctggacttcgctgtgatatctacatctggcgcccctggccgggacttgtgggctcttctctgtcactg
 gttatcacctttactgcaaagggggcagaagaagaactcctgtatatattcaacaacatttatgagaccagtacaactactcaagga
 agatggctgtagctgccatttcagaagaagaaggaggtgtgaactgagagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgc
 gtacaagcagggccagaaccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgttttgacaagagacgtggccgg
 gacctgagatggggggaagccgagaagggaagaaacctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggagg
 cctacagtgagattgggatgaaaggcgagcggcgaggggcaaggggcacgatggcctttaccagggtctcagtagcaccacaag
 gacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgccccctcgt

CAR COMPONENTS

NUCLEIC ACID SEQUENCES:

- 3C10 scFv Nucleotide Sequence (Mouse); (SEQ ID NO: 4)

GAGATTTCAGCTGCAGCAATCTGGGGCAGAACTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCA
 AGCTGTCCTGCACAGGTTCTGGCTTCAACATTGAAGACTACTATATTCAGTGGGTG
 AAGCAGAGGACTGAACAGGGCCTGGAATGGATTGGAAGGATTGATCCTGAGAATG
 ATGAAACTAAATATGGCCCAATATTCCAGGGCAGGGCCACTATAACAGCAGACAC
 ATCCTCCAACACAGTCTACCTGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCG
 TCTATTACTGTGCCTTTTCGCGGTGGAGTCTACTGGGGGCCAGGAACCACTCTCACA
 GTCTCCTCAGGAGGTGGTGGTTCCGGTGGTGGTTCCGGAGGTGGTGGTTTCA
 TATGGATGTTGTGATGACCCAGTCTCCACTCACTCTATCGGTTGCCATTGGACAATC
 AGCCTCCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACAT
 ATTTGAATTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTCTCTG
 GTGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGAC

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

AGATTTCACACTGAGAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAATTTATTATT
GCTGGCAAGGTACACATTTTCCTGGGACGTTTCGGTGGAGGGACCAAGCTGGAGAT
AAAA

- 139 scFv Nucleotide Sequence (Humanized); (SEQ ID NO: 5)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAG
TGACCATCACCTGTCGGGCCAGCCAGGGCATCAGAAACAACCTGGCCTGGTATCA
GCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCAAGAGACTGATCTACGCTGCCAGCAATCTGCAG
AGCGGCGTGCCAGCAGATTACCGGAAGCGGCTCCGGCACCGAGTTACCCCTGA
TCGTGTCCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCTGCAGCACCAC
AGCTACCCTCTGACCAGCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGACCGGCA
GCACCAGCGGCAGCGGCAAGCCTGGCAGCGGCGAGGGAAGCGAGGTCCAGGTGCT
GGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGTGCC
GCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACGCCATGTCTTGGGTCCGGCAGGCTCCTGG
AAAGGGCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCAGCGGCTCTGGCGGCTCCACCAACTAC
GCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCC
TGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCC
GGCAGCAGCGGGTGGAGCGAGTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTA
GC

- leader (nucleic acid sequence); (SEQ ID NO: 6)

ATGGCCTTACCAAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGC
CGCCAGGCCG

- hinge (nucleic acid sequence); (SEQ ID NO: 7)

ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGC
AGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGT
GCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT

- transmembrane (nucleic acid sequence); (SEQ ID NO: 8)

ATCTACATCTGGGCGCCCTTGCCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACT
GGTTATCACCCCTTACTGC

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

- 4-1BB Intracellular domain (nucleic acid sequence); (SEQ ID NO: 9)
AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGAC
CAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCAGAAGAAGA
AGAAGGAGGATGTGAACTG
- CD3 zeta (nucleic acid sequence); (SEQ ID NO: 10)
AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAGGGCCAG
AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTT
TGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGA
AGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGG
AGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGC
ACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGC
CCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC
- CD3 zeta (nucleic acid sequence; NCBI Reference Sequence NM_000734.3); (SEQ ID NO:100)
AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAG
AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTT
TGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGA
AGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGG
AGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGC
ACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGC
CCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

AMINO ACID SEQUENCES:

- 3C10 scFv Amino Sequence (Mouse); (SEQ ID NO: 11)
EIQLQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIEDYYIHVKQRTEQGLEWIGRIDPEN
DETKYGPIFQGRATITADTSSNTVYLQLSSLTSEDVAVYYCAFRGGVYWPGTTL
TVSSGGGSGGGGSGGGGSHMDVVMQSPPLTSLVAIGQSASISCKSSQSLDSDG
KTYLNLWLLQRPQGSPKRLISLVSKLDGVPDRFTGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGI

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

YYCWQGTHFPGTFGGGTKLEIK

- 139 scFv Amino Sequence (Human); (SEQ ID NO: 12)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNNLAWYQQKPGKAPKRLIYAASNLQ
SGVPSRFTGSGSGTEFTLIVSSLQPEDFATYYCLQHHSYPLTSGGGTKVEIKRTGS
TSGSGKPGSGEGSEVQVLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP
GKGLEWVSAISGSGGSTNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY
CAGSSGWSEYWGQGLTVTVSS

- leader (amino acid sequence) (SEQ ID NO: 13)

MALPVTALLPLALLHAARP

- hinge (amino acid sequence) (SEQ ID NO: 14)

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

- transmembrane (amino acid sequence) (SEQ ID NO: 15)

IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC

- 4-1BB Intracellular domain (amino acid sequence) (SEQ ID NO: 16)

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

- CD3 zeta domain (amino acid sequence) (SEQ ID NO: 17)

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE
GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

- CD3 zeta domain (amino acid sequence; NCBI Reference Sequence NM_000734.3)
(SEQ ID NO:99)

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE
GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[00379] The nucleotide encoding the polypeptide of SEQ ID NO:11 is provided as SEQ ID NO:4. The nucleotide encoding the polypeptide of SEQ ID NO:12 is provided as SEQ ID NO:5.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

The nucleotide encoding the polypeptide of SEQ ID NO:13 is provided as SEQ ID NO:6. The nucleotide encoding the polypeptide of SEQ ID NO:14 is provided as SEQ ID NO:7. The nucleotide encoding the polypeptide of SEQ ID NO:15 is provided as SEQ ID NO:8. The nucleotide encoding the polypeptide of SEQ ID NO:16 is provided as SEQ ID NO:9. The nucleotide encoding the polypeptide of SEQ ID NO:17 is provided as SEQ ID NO:10. The nucleotide encoding the polypeptide of SEQ ID NO:1 is provided as SEQ ID NO:18. The nucleotide encoding the polypeptide of SEQ ID NO:2 is provided as SEQ ID NO:19. The nucleotide encoding the polypeptide of SEQ ID NO:3 is provided as SEQ ID NO:20. The nucleotide encoding the polypeptide of SEQ ID NO:99 is provided as SEQ ID NO:100.

Example 4: Predicted CDR designations for the EGFRvIII CAR

[00380] The predicted CDR designations for the EGFRvIII CAR under Kabat are as follows:

- VH:

EIQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIED**DYYIH**WVKQRTEQGLEWIGRIDPEN
DETKYGPIFQGRATITADTSSNTVYLQLSLTSEDTAVYYCAFR**GGVY**WGPGTT
 LTVSS; (SEQ ID NO: 21);

wherein CDR1 is **DYYIH** (SEQ ID NO: 22), CDR2 is **RIDPENDETKYGPIFQ**
 (SEQ ID NO: 23), and CDR3 is **GGVY** (SEQ ID NO: 24).

- VL:

DVVMTQSPLTSLVAIGQSASIS**KSSQSLLDS**DGKTYLNWLLQRPQGSPKRLISL
VSKLDSGVDPDRFTGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGIYYC**WQGT**HFPGTFGGGTKLEIK;
 (SEQ ID NO: 25);

wherein CDR1 is **KSSQSLLDSDGKTYLN** (SEQ ID NO: 26), CDR2 is
LVSKLDS (SEQ ID NO: 27), and CDR3 is **WQGT**HFPGT (SEQ ID NO: 28).

[00381] The predicted CDR designations for the EGFRvIII CAR under Chothia are as follows:

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

- VH:

EIQLQQSGAELVKPGASVKLSCTGSGFNIEDYYIHVVKQRTEQGLEWIGRIDPEN
DETKYGPIFQGRATITADTSSNTVYQLSSLTSEDVAVYYCAFRGGVYWGPGTT
LTVSS; (SEQ ID NO: 29);

wherein CDR1 is **GFNIEDY** (SEQ ID NO: 30), CDR2 is **DPENDE** (SEQ ID NO: 31), and CDR3 is **RGGVY** (SEQ ID NO: 32).

- VL:

DVVMQTQSPLTSLVAIGQSASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLISL
VSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGIYYCWQGTHTFPGTFGGGKLEIK;
(SEQ ID NO: 33);

wherein CDR1 is **SQSLLDSDGKTY** (SEQ ID NO: 34), CDR2 is **LVS** (SEQ ID NO: 35), and CDR3 is **GTHFPG** (SEQ ID NO: 36).

Example 5: Humanization of Murine Anti-EGFRvIII Antibody

[00382] Humanization of murine EGFRvIII antibody is desired for the clinical setting, where the mouse-specific residues may induce a human-anti-mouse antigen (HAMA) response in patients who receive treatment with T cells transduced with the murine CAR construct. VH and VL sequences of hybridoma derived murine EGFRvIII antibody were extracted from published literature (Morgan *et al.* (2012) Human Gene Therapy, 23: 1043-1953, *Supra*). Humanization was accomplished by grafting CDR regions from murine EGFRvIII antibody onto human germline acceptor frameworks VH1_1-f or VH5_5a as well as VK2_A17 or VK4_B3 (vBASE database). In addition to the CDR regions, several framework residues, i.e. VK2 #36, #49, VK4 #2, #36, #46, #49, VH1 #2, #24, #76, #94 and VH5 #2, #24, #73, #76, #94, thought to support the structural integrity of the CDR regions were retained from the murine sequence. Further, the human J elements JH6 and JK4 were used for the heavy and light chain, respectively. The resulting amino acid sequences of the humanized antibody were designated VK2_A17/Hz1 and VK4_B3/Hz1 for the light-chains and VH1_1-f/Hz1, VH5_5-a/Hz1 for the heavy chains shown in Figure 9. The residue numbering follows Kabat (Kabat E.A. *et al.*, 1991, *supra*). For CDR definitions, both Kabat as well as Chothia *et al.*, 1987 *supra*) were used.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

Frame work residues retained from mouse EGFRvIII are shown boxed bold /italic, CDR residues are underlined.

[00383] Based on the humanized light and heavy chain sequences as shown in Figure 9, a total of 8 framework combinations were used to generate soluble scFv's for further validation. The order in which the VL and VH domains appear in the scFv was varied (i.e., VL-VH, or VH-VL orientation), and four copies of the "G₄S" subunit (SEQ ID NO: 37), in which each subunit comprises the sequence GGGGS (SEQ ID NO:37) was used to connect the frameworks. Figure 9 discloses the CDR's in the VH and VL sequences calculated by Kabat *et al* and Chothia *et al.* (Supra).

Cloning:

[00384] DNA sequences coding for mouse and humanized VL and VH domains were obtained, and the codons for the constructs were optimized for expression in cells from Homo sapiens.

[00385] Sequences coding for VL and VH domain were subcloned into expression vectors suitable for secretion in mammalian cells. Elements of the expression vector include a promoter (Cytomegalovirus (CMV) enhancer-promoter), a signal sequence to facilitate secretion, a polyadenylation signal and transcription terminator (Bovine Growth Hormone (BGH) gene), an element allowing episomal replication and replication in prokaryotes (e.g. SV40 origin and ColE1 or others known in the art) and elements to allow selection (ampicillin resistance gene and zeocin marker).

Example 6: Characterization of humanized anti-EGFRvIII soluble scFv fragments

[00386] Soluble scFv fragments were generated described above using standard molecule biology techniques. These soluble scFvs were used in characterization studies to examine the stability, cell surface expression, and binding properties of the scFvs.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

scFv expression and purification

[00387] For transfection of each scFv construct, approximately 3e8 293F cells were transfected with 100 µg of plasmid using PEI as the transfection reagent at the ratio of 3:1 (PEI:DNA). The cells were grown in 100ml EXPi293 Expression media (Invitrogen) in a shaker flask at 37°C, 125 rpm, 8% CO₂. The culture was harvested after six days and used for protein purification.

[00388] 293F cells were harvested by spinning down at 3500g for 20 minutes. The supernatant was collected and filtered through VacuCap90 PF Filter Unit (w/0.8/0.2µm Super Membrane, PALL). Around 400ul of Ni-NTA agarose beads (Qiagen) were added to the supernatant. The mixture was rotated and incubated for 4 hrs at 4°C. It was loaded onto a purification column and washed with washing buffer with 20mM Histidine. The protein was eluted with 500µl elution buffer with 300mM Histidine. The samples were dialyzed against PBS buffer at 4°C overnight. Protein samples were quantified using nanodrop 2000c.

EC₅₀ by FACS binding of purified scFv's to cells expressing either human EGFR wild type or EGFRvIII

[00389] The following experiments were conducted to demonstrate that all the humanized EGFRvIII scFv variants have comparable binding to EGFRvIII, but no binding to wild type EGFR.

[00390] HEK293F suspension cells were transiently transfected with either wild type hEGFR or hEGFRvIII and were harvested 2 days after transfection. Approximately 5e5 cells /per well were transferred to a BD Falcon 96 well plate. The cells were spun down at 900 rpm (Sorval Legend XT centrifuge) for 3 minutes. The supernatant was removed. Anti-EGFRvIII scFv protein samples were diluted in DPBS with 5% FBS. The samples were added into the wells, mixed and incubated for 1 hour. The cells were washed twice in the DPBS with 5% FBS. The cells were incubated with anti-poly His PE (R&D) for 1 hour, washed twice before FACS analysis (LSRII from BD Biosciences).

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

[00391] The EC₅₀ of mouse scFv (m3C10) for hEGFRvIII was determined to be ~5 nM as shown in Figure 10. All the humanized EGFRvIII scFv variants showed EC₅₀ values in the single digit to low double digit nM EC₅₀s range (5-50 nM). Moreover, no appreciable binding of constructs 2173 and 2174 to wild type EGFR expressing cell lines was detected indicating an improved safety profile compared to murine 3C10, as shown in Figure 11. Based on these studies, clone 2173 was selected for further clinical characterization, as shown in Example 8

Example 7: Humanized EGFRvIII CAR Constructs

[00392] ScFv to be used in the final CAR constructs were derived from the humanized framework sequences described in Example 1. The order in which the VL and VH domains appear in the scFv was varied (i.e., VL-VH, or VH-VL orientation). A (G4S)₄ (SEQ ID NO: 113), linker was used to connect the variable domains to create the scFvs shown in Table 1.

[00393] Table 1. Humanized EGFRvIII scFv constructs showing VH and VL orientation and linker length (Table discloses "G4S" as SEQ ID NO: 37)

construct ID	Length aa	annotation
108358	277	VH1-VK4, 4G4S
108359	277	VK4-VH1, 4G4S
108360	277	VH5-VK2, 4G4S
108361	277	VK2-VH5, 4G4S
107276	277	VH1-VK2, 4G4S
111046	278	VH5-VK4, 4G4S
111048	278	VK4-VH5, 4G4S
107277	277	VK2-VH1, 4G4S
107275		
mEGFRvIII 3C10	274	VH-VL, 3G4S+HM
EGFRvIII 139	269	VL-VH,

[00394] The sequences of the humanized scFv fragments are provided below in Table 2 (SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:74, and SEQ ID NO:80). These scFv fragments were used with additional

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

sequences, SEQ ID NOs: 13-17, to generate full CAR constructs with SEQ ID NOs: SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:79, and SEQ ID NO:85.

[00395] These clones all contained a Q/K residue change in the signal domain of the co-stimulatory domain derived from CD3zeta chain.

Table 2: Humanized EGFRvIII CAR Constructs

Name	SEQ ID NO:	Sequence
CAR 1		
CAR1 scFv domain	38	eiqlvqsgaevkpgatvkiscksgfniedyyihwvqqapgkglewmgridpendet kygpifqgrvitadtstntvymelsslrstedavyycafrggywgqgtttvssgggsg ggsgggsgggsgsdvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqkpg qppkrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdftltisslqaedvayycwqgthfpgtfgggtkv eik
CAR1 scFv domain nt	39	gaaatccagctggtccaatcgggagctgaggtaagaagccgggagccaccgtcaagatct catgcaaggggtcgggattcaacatcaggactactacattcactgggtgcagcaagctccg ggaaaaaggcctggaatggatggcgagaatcgaccagaaaacgacgaaactaagtacgga ccgattttcaaggaagagtactatcaccgccgatacttaaccaataaccgtctacatggaac tgagctcgtccgggtccgaagatactgcagtgattactgtgcctttcgcggagggtgtactg gggccaaggaaactactgtcactgtctcgtcaggagggcggagggtcgggaggagggcgggag cggaggcgggtggtcgggtggcgagggaagcgacgtggtgatgaccagtgccccggactc cctcgccgtgagcctcgagagagggcgactatcaattgcaagtcgtcccagtcacttctgga ttccgatggtaaaacgtacctcaactggctgcagcaaaagccaggcgccacccaaacggt tgatctccctgtgtccaaactggatagcggagtgctgaccgcttctcgggtccggtagcgg gaccgacttcaccctgacgatcagctcactgcaggcggaggagcgtggcagtggtactactgct ggcagggaacccacttccctggcacctttggagggtggcaccgaaggtggagatcaag
CAR1 Soluble scFv - nt	40	atggccctccctgtcaccgcccgtgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccc aatccagctggtccaatcgggagctgaggtaagaagccgggagccaccgtcaagatctc atgcaagggggtcgggattcaacatcaggactactacattcactgggtgcagcaagctccgg

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

		gaaaaagcctggaatggatgggcagaatcgaccagaaaacgacgaaactaagtacggac cgattttccaagggaagagtgactatcaccgccgatacttcaaccaataccgtctacatggaact gagctcgcctccggccgaagatactgcagtgattactgtcccttcgcggagggtgtactgg ggccaagggaactactgtcactgtctcgtcaggaggcggagggtcggaggaggcgggagc ggaggcgggtgctcgggtggcggaggaaagcgacgtggtgatgccagtcgccggactcc ctcgccgtgagcctcggagagaggcgcactatcaattgcaagtcgtcccagtcacttctgatt ccgatggtaaaacgtacctcaactggctgcagcaaaagccagggcagccaccaaacggtt gatctccctgtgtccaaactggatagcggagtgccctgaccgctctcgggtccgtagcggg accgacttcacctgacgatcagctcactgcaggcggaggacgtggcagtgactactgtctg gcagggaaccacttccttgcaccttggaggtggcacaagggtggagatcaagggtacg caccaccatcaccatcatcatc
CAR1 Soluble scFv - aa	41	<u>Malpvtalllplalllhaarpeiqlvqsgaevkpgatvkiskcsgfniedyyihwvqqap</u> gkglewmgridpendetkygpifqgrvitadtstntvymelsslsredtavyycafrgvy wgqgtvtvssggsgsgsgsgsgsgsdvmtqspdslavslgeratincssqsl ldsdgktylnwlqqkpgppkrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdftlisslqaedvavyy cwqgthfpgtfgggtkveikgshhhhhhhh
CAR 1 – Full – nt lentivirus	42	atggccctcctgtcaccgccctgctgcttcgctgctcttctgtccacgccgctcggcccg agatccagctgggtgcagtcgggagctgaagtcaaaagcctggcgcaaccgtcaagatctcg tgcaaaagatcagggttcaacatcgaggactactacatccattgggtgcaacaggcaccggg aaaaggcctggagtgatgggaggattgaccagaaaatgacgaaaccaagtacggacc gatcttcaaggacgggtgaccatcacggctgacacttccactaacaccgtctacatggaact ctcgagccttcgctcggagataccgcgggtgactactgcgccttagagggtgagtgactactgg ggacaagggactaccgtcaccgtgtcgtcagggtggcggaggatcaggcggaggcggctcc gggtggaggaggaaaggaggagggtgctccgacgtggtgatgacgagtcaccggactcc ttggcgggtgagcctgggtgaacgcgccactatcaactgcaagagctcccagagcttctgga ctccgatggaagacttatctcaattggctgcaacagaagcctggccaagccccaagagac tcatctcactgtgtgagcaagctggatagcggagtgccagatcggtttcgggatcgggctcag gcaccgacttcacctgactatttctcctccaagccgaggatgtgcccgtctactactgttgg caggggactcactcccgggaccttcgggtggaggcactaagggtggagatcaaaacctac cccagcaccgaggccaccacccggctcctaccatcgctcccagcctctgctcctgcgtc cggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcataccgggggtcttacttcgcctgc

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

		gatatctacatttggccctctggctgtacttgcgggtcctgctgctttcactcgtgactact ctttactgtaagcgcggctcgggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgaggcctgt gcagactactcaagaggaggacggctgttcattgccgggtcccagaggaggaggaaaggcgg ctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcag aaccagctctacaacgaactcaatcttgctcggagagaggagtacgacgtgctgacaagcg gagaggacgggacccagaaatggcggggaagccgcgcagaaagaatcccaagagggc ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg ggaacgcagaagaggcaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca aggacacctatgacgtcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR 1 – Full - aa	43	malpvtalllplalllhaarpeiqvlvqsgaevkkpgatvkiscksgsfnie <u>dyvih</u> wvqqap gkglewm <u>gridpendetkygpifqgr</u> vtitadtstntvymelssrsedtavyyc <u>afrgg</u> <u>vyw</u> gqgtvtvssgggsgggsgggsgggsgggsgdvvmtqspdslavslgeratinck <u>ss</u> <u>qslldsdgktyln</u> wlqkpgqppkrlis <u>lvsklds</u> gvpdfsgsgsgtdftltisslqaedva vyy <u>cwgthfpgt</u> fgggtkveiktttpprptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrg ldfacdiyiwaplagtegvllslvitlyckrgrklliyfkqpfmrvpqtteedgcsrfpe eeeggcelrvkfsrsadapaykqgnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemgkprrk npqeglynelqkdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalpp r
CAR 2		
CAR2 scFv domain	44	dvvmqtspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqkpgqppkrlislvskldsg vpdrfsgsgsgtdftltisslqaedvavyycwgthfpgtfgggtkveikgggsgggsgg ggsggggseiqlvqsgaevkkpgatvkiscksgsfnieyyihwvqqapgkglewm gridpendetkygpifqgrvtitadtstntvymelssrsedtavyyc <u>afrgg</u> vyw <u>gqgtvt</u> vss
CAR2 scFv domain - nt	45	gatgtcgtgatgaccagtcctccagactccctgcagtgctcttgggagaacgggccaccatc aactgcaaactgagccagtcactgctggactcagacgaaagacctacctaactggctgca gcagaagcctggccagccaccgaagcgctgatccctgggtccaagctggactcgggc gtcccgacaggtttagcggtagcggctcgggaaccgacttactctgaccattagctcgtc caagctgaagatgtgctggtctactactgctgacaggggaccacttccccgggacctttggc ggaggaaactaaagtcgaaatcaaaggaggagggcgatcaggtggaggaggcagcggagg aggaggaggagcggcggtggcgctccgaaattcaactgtgcaatccgggtgccgaggtgaag

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

		aaacctgggcccactgtcaagatctcgtgtaaggatcgggattcaatcaggactactaca tccactgggtgcaacaggcggcaggaaaggattggagtgaggatgggtcgcacgaccggga aaacgatgagactaagtacggaccgatctccaaggccgggtcacgactactgcggatacct ccactaataccgtgtatatggagctctcgtcactgagaagcgaagatacggccgtgtactactg cgattcagaggaggtgtgtactggggccagggaactactgtgaccgtgtcgtcgtg
CAR2 - Soluble scFv - nt	46	atggccctccctgtcaccgcccgtgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg atgtcgtgatgaccagtcctccagactccctcgcagtgtccttgggagaacgggccaccatca actgcaaatcagccagtcactgctggactcagacggaaagacctacccaactggctgcag cagaagcctggccagccaccgaagcgcctgatctccctggtgtccaagctggactcgggctgt cccgacaggtttagcggtagcggctcgggaaccgacttactctgaccattagctcgtccca agctgaagatgtggcggcttactactgctggcaggggaccacttccccgggacctttggcg gagggaactaaagtcgaaatcaaggaggaggcggatcagggtggaggaggcagcggaggga ggaggggagcggcgggtggcggctccgaaattcaactgtgcaatccgggtccgagggtgaaga aacctgggtcccactgtcaagatctcgtgtaaggatcgggattcaatcagaggactactacat ccactgggtgcaacagcggccaggaaaggattggagtgatgggtcgcacgaccggga aaacgatgagactaagtacggaccgatctccaaggccgggtcacgactactgcggatacct ccactaataccgtgtatatggagctctcgtcactgagaagcgaagatacggccgtgtactactg cgattcagaggaggtgtgtactggggccagggaactactgtgaccgtgtcgtcgggggtcac atcaccaccatcatcatcaccac
CAR2 - Soluble scFv - aa	47	<u>malpvtalllplalllhaar</u> pdvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqq kpgqppkrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdftltisslqaedvavyycwqgthfpgtfggg tkveikgggsgggsgggsgggsgggseiqlvqsgaevkkpgatvkisksgsfniedyyi hwvqqapgkglewmgridpendetkygpifqgrvtitadtstntvymelsslrstavy ycafrggyvwgqgttvsvssgshhhhhhhh
CAR 2 - Full - nt	48	atggccctccctgtcaccgcccgtgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccg acgtggatcatgactcaagcccagattccttggctgtctcccttgagaaagagcaacgatcaa ttgcaaaagctcgcagtcctgttggactccgatggaaaaacctacccaactggctgcagca gaagccgggacaaccaccaaaagcggctgattccctcgtgtccaagctggacagcggcgtg ccggatcgtctcgggcagcggctcgggaaccgattttactctcactatttctcactgcaagc ggaggacgtggcgggtgtattactgctggcagggcactcacttccgggtacttttggaggagg taccaaaagtcgaaatcaagggtggaggcgggagcggaggaggcgggtcgggaggaggga

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

		ggatcgggtggcggaggtcagaatccagctgggtgcagtcaggtgccgaagtgaagaag cctggggccacgggtgaagatctcgtgcaaggggagcggattcaacatcaggattactacat ccattgggtgcaacaggccctggcaagggtggaatggatgggaaggatcgacccga gaatgacgagactaagtagggccgafcttccaaggacgggtgaccatcactgcagacact caaccaacaccgtctacatggaactctctcgtcgtcgcaggacaccgccgtgactact gtgcttcagaggaggagtctactggggacagggaacgaccgtgaccgtcagctcaaccact accccgaccaggcccccacccggctcctaccatcgctcccgacctctgtccctgcg tccggaggcatgtagaccgcagctgggtggggccgtgcataccgggggtcttgacttcgct gcgatatctacattgggccctctggctggtacttgcgggtcctgctgcttctactcgtgatca ctctttactgtaagcgcggctggaagaagctgctgtacatctttaagaacccctcatgaggcct gtgcagactactcaaggaggagcggctgttcatgccggtcccagaggaggaggaaggcg gctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggca gaaccagctctacaacgaactcaatctgtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagc ggagaggacgggacccagaaatggcgagggaagccgcgcagaaagaatccccagaggg cctgtacaacgagctccaaaagataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaag gggaacgcagaaggcgaagggccacgacggactgtaccagggactcagaccgccacc aaggacacctatgacgctcttcatatgcaggccctgccgctcgg
CAR 2 - Full - aa	49	malpvtalllplallhaarpdvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlq qkpgqppkrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdftltisslqaedvavyycwqgthfpgtfg ggtkveikgggsgggsgggsgggsgggseiqlvqsgaevkkgpavtkiscksgsgfnied yyihwvqqapgkglewmgridpendetkvgpifggrvtitadtstntvymelsslrse tavyycafrggvyywgqgtvtvssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaggavhtrg ldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfe eeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrk npqeglynelqkdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalpp r
CAR 3		
CAR3 scFv domain	50	eiqlvqsgaevkkgpesslriscksgsgfniedyyihwvrqmpgkglewmgridpendetk ygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycafrggvywgqgtvtvssgggsg ggsgggsgggsgsdvmtqspslpvtlqqpasickssqslldsdgktylnwlqqrpg qsprrlislvsldsgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveadvgyywcwqgthfpgtfgggtkv

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

		eik
CAR3 scFv domain nt	51	gagattcagctgggtccaaagcggcgagaaagtgaagccagggaatcgtgcgcacatca gctgtaaaaggtccggcttcaacatcgaggactattacatccattgggtgcggcagatgccag gaaaggggctggaatggatgggacggattgacccggagaacgacgaaaccaagtacggac cgatctttcaaggacacgtgactatctccgccgacaccagcatcaatacgggtgtacctccaatg gtcctcactcaaggcctcgataccgcgatgtactactgcgcgttcagaggaggcgtctactg gggacaagggactactgtgactgtctcatcaggagggtggaggaaaggaggagggtgctcg ggcggagggtgacggaggaggagggtccgatgtggtgatgaccagtcctccactgtcgc tcccggtgacctcgacagcctgtagcatctcgtgcaaatcctcgcaatccctgctggactc ggacggaaaaacgtacctcaattggctgcagcagcgcctggccagagcccagaaaggctt atctcgtggtgtcaaaagctggatagcgggtgtgccgaccggttcagcggctcagggtcagg aaccgatttcacctgaagatctcccgcgtggaagccgaagatgtcggagtctactactgtggtg cagggtactcacttccggggaccttgggtggcggcactaagggtcgagattaag
CAR 3 - Soluble scFv - nt	52	atggccctcctgtcaccgcccgtgcttccgctggtcttctgtctccacgccgctcggcccg agattcagctgggtccaaagcggcgagaaagtgaagccagggaatcgtgcgcacatcag ctgtaaaaggtccggcttcaacatcgaggactattacatccattgggtgcggcagatgccagga aaggggctggaatggatgggacggattgacccggagaacgacgaaaccaagtacggaccg atctttcaaggacacgtgactatctccgccgacaccagcatcaatacgggtgtacctccaatggt cctcactcaaggcctcgataccgcgatgtactactgcgcgttcagaggaggcgtctactggg gacaaaggactactgtgactgtctcatcaggagggtggaggaaaggaggagggtgctcggg cggagggtgacggaggaggaggagggtccgatgtggtgatgaccagtcctccactgtcgtc ccggtgacctcgacagcctgtagcatctcgtgcaaatcctcgcaatccctgctggactcg gacggaaaaacgtacctcaattggctgcagcagcgcctggccagagcccagaaaggctta tctcgtcgtgtcaaaagctggatagcgggtgtgccgaccggttcagcggctcagggtcagga accgatttcacctgaagatctcccgcgtggaagccgaagatgtcggagtctactactgtggtc agggtactcacttccggggaccttgggtggcggcactaagggtcgagattaagggtcacacc atcatcaccatcaccaccac
CAR 3 - Soluble scFv - aa	53	malpvtalllplallhaarpeiqlvqsgaevkkpgeslriskgsgfniedyyihwvrqmp gkglewmgridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycafrgg vywgqgtvtvssgggsgggsgggsgggsgggsvmtqspislptlqgpasisckss qslldsdgktylnwlqqrpgqsprrlislvsklsgvpdrfsqsgsgtdftlkisrveadvgv

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

		yycwqgthfpgtfgggtkveikgshhhhhhhh
CAR 3 – Full - nt	54	atggccctccctgtcaccgcccgtgcttccgctggtcttctgtccacgccgctcggcccg aatccagctggtgcaaacggagccgaggtgaagaagcccggagaatccctgcgcattc gtgtaagggttccggctttaacatcgaggattactacatccactgggtgagacagatgccggg caaaggctctggaatggaaggcccatcgacccggagaacgacgaaacaaatacggacc aatctccaaggacatgtgactatttccgggatacctccatcaaacactgtctactgcagtga gctcgtcaaggcgtcgataccgccatgtactactgcgcattcagaggaggtgtgtactggg gccaggggcactacgggtcaccgtgtcctcgggaggtggagggtcaggaggcggaggtcgg gcgggtggaggtacaggcggagggaggagcgtgtgtcatgactcaatccccactgtcact gcctgtcactctggggcaaccggcttccatctcatgaagtcaagccaatcgtctcgtactcc gacggaaaaacctacctcaattggcttcagcagcggccaggccagtcgcctcggaggtgat ctcactgtgtcgaagcttgactccgggtgccggatcggttagcggagcggatcgggga ccgacttcacgttgaagattagccgggtggaagccgaggacgtgggagctattactgtgac aggggaccacttcccgggacttccggagggagggcaccaaaagtcgagattaagaccactac cccagcaccgaggccaccacccggctcctaccatcgctcccagcctctgtccctcgtc cggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcataccggggtcttgacttcgctgc gatatctacatttggcccctctggtggtacttgcggggtcctgctgcttactcgtgactact ctttactgtaagcgcgggtcggagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgaggcctgt gcagactactcaaggaggagggacggctgttcatgccgggttccagaggaggaggagggcgg ctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgagcgcagatgtccagcctacaagcaggggcag aaccagctctacaacgaactcaatttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcg gagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaagagggc ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg ggaacgcagaaggcgaagggccacgacggactgtaccagggactcagcaccggccacca aggacacctatgacgtcttcatatgcaggccctgccgcctcgg
CAR 3 – Full - aa	55	malpvtalllplalllhaarpeiqlvqsgaevkkpgeslrisksgsfnie <u>dvvih</u> wvrqmp gkglewm <u>gridpendetkvgpifqgh</u> vtisadtsintvylqwsllkasdtamyycafr <u>g</u> <u>gvvw</u> gqgtvtvssgggsgggsgggsgggsgggsgdvmtqspslpvtlgqpasis <u>ks</u> <u>sqsllds</u> <u>dgktvln</u> wlqqrpgqsprrlis <u>lvsklds</u> gvprdfsgsgsgtdftlkisrveadv gvyye <u>wqgthfpgt</u> fgggtkveikttpprptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtr gldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkillyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfp

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

		eeeeggccelrvkfsrsadapaykqggnqlynelnlgrrceydvlkrrgrdpemggkpr knpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalp pr
CAR 4		
CAR4 scFv domain	56	dvvmqtspislpvtlqgpasisckssqslldsdgktylnwlqrrpgqsprlislvsklsgv pdrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycwqgthfpgtfgggtkveikggsgsgsgsg ggsgsgsgseiqlvqsgeavkpkpgeslrisksgsfniedyihwvrqmpgkglewmg ridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycafrggvywgqgttv tvss
CAR4 scFv domain nt	57	gacgtgcatgacccagagcccgtgctactgcctgtgaccctgggccagccggcgtccat tagctgcaaatcctcgcaatccctgctcgactcagacggaaaaacgtactgaactggctcaa cagcggcctgggcaatcccaaggcggcttatctactcgtcagcaagctcgatagcgggtgc ccagacagattttcgggctcgggacgaggcactgattcactctgaagatctcgcgggtgga gccgaggatgtgggagtgactattgctggcagggcactcacttccccgggacgtttggcgg aggaaactaaggctgagatcaaaaggaggaggtggatcaggcggagggtggagcggaggag gaggaaagggtggtggaggtccgaaatccagctggtgcaatcaggagccgagggtgaaga agccgggagaatccctgcgcattctcgtcaagggtcgggcttcaacatcgaggattactac atccactgggtgcggcagatgccgggaaagggttggaatggatgggacgcattgacccgg aaaatgatgaaccataacaggccaatctccaaggccacgtgaccattagcgtgacactt ccatcaacaccgtgtacctcagtggtcctcactgaaggcgtcggacactgcatgtactactg tgcaatcagaggaggggtctactggggacagggcaccaccgtgaccgtgagctcc
CAR4 – Soluble scFv - nt	58	atggccctccctgtcaccgcccgtgctgttccgctggtcttctgctccacggcgtcggccc acgtcgtcatgacccagagcccgtgctactgcctgtgaccctgggccagccggcgtcatta gctgcaaatcctcgcaatccctgctcgactcagacggaaaaacgtactgaactggctccaac agcggcctgggcaatcccaaggcggcttatctactcgtcagcaagctcgatagcgggtgctc cagacagattttcgggctcgggacgaggcactgattcactctgaagatctcgcgggtgga ccgaggatgtgggagtgactattgctggcagggcactcacttccccgggacgtttggcggga ggaaactaaggctgagatcaaaaggaggaggtggatcaggcggagggtggagcggaggagg aggaaagggtggtggaggtccgaaatccagctggtgcaatcaggagccgagggtgaagaa gccgggagaatccctgcgcattctcgtcaagggtcgggcttcaacatcgaggattactacat ccactgggtgcggcagatgccgggaaagggttggaatggatgggacgcattgacccgga

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

		aaatgatgaaacaaatagggccaatctccaaggccacgtgaccattagcgctgacacttc catcaacaccgtgtaccttcagtggtcctcactgaaggcgtcgacactgccatgtactactgt gcattcagaggagggtctactggggacagggcaccaccgtgaccgtgagctccggctcgc atcaccatcatcaccaccatcac
CAR4 – Soluble scFv -aa	59	<u>malpvtalllplalllhaar</u> pdvmtqspislpvtlgqpasisckssqslldsdgktylnwlqq rpgqsprrlislvsldsgvpdrfsghsgsgtdftlkisrveaedvgvyycwqgthfpgtfggg tkveikggggsgggsgggsgggsgggseiqlvqsgaevkkpgeslrisksgsgfniedyyi hwvrmpgkglewmgridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtam yycafrggvywgqgtvtvssgshhhhhhhh
CAR 4 – Full - nt	60	atggccctccctgtcaccgcccgtgctgtccgctggctcttctgctccacgccgctcggcccgc acgtcgtcatgacccaatcccctctctccctgcccgtcaccctgggtcagccggcgtcgtatctc atgcaaaagctcacagtcctctgctgattcggacggaaaaacctaattgaactggctccaaca gagggccgggtcagtcctcctgcagactgatctcgtggtgagcaagctcgaactcgggtgtgc cggatcgggtctccgggtcaggatcgggcaccgactttacgctcaagatttcagagtgaggagg ccgaggatgtgggagtgactattgctggcagggcacgcatttccccgggaccttggaggc gggaactaagggtgaaatcaaggagggtggcggatcaggcggaggaggcagcggcgagg gtggatcaggaggcggagggtcagagatccagctggtccaaagcggagcagagggtgaaga agccaggcgaagtccttcgcatttcgtgcaaaggaggcgggttcaacattgaagattactacat ccactgggtgcggcaaatgccaggaaagggtctggaatggatgggacggatcgaccacaga aatgatgaaactaagtacggaccgatcttccaaggacacgtcactatctccgggacacttc gatcaacaccgtgtacctccagtggagcagcttgaagcctccgacaccgctatgtactactgt gccttccggcggaggagtacttggggacaggggactactgtgaccgtgtcgtccaccactac cccagcaccgaggccaccacccggctcctaccatcgctccagcctctgtccctcgtc cggaggcatgtagaccgcagctgggtgggcccgtgcataccgggggtcttgacttcgctgc gatattctacatttggccctctggtggtacttgcgggtcctgctgcttctactcgtgatcact ctttactgtaagcgcggtcggaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgaggcctgt gcagactactcaagaggaggacggctgttcatgccggttccagaggaggaggagggcgg ctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcag aaccagctctacaacgaactcaatcttggcggagagaggagtacacgtgctggacaagcg gagaggacgggaccacagaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatccccaaaggggc ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

		ggaacgcagaagaggcaagggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca aggacacacatgacgctcttcacatgcagggccctgccgcctcgg
CAR 4 – Full - aa	61	malpvtalllplalllhaarpdvmtqspislplvtlqgpasisc <u>kssqslldsdktyln</u> wlq qrpqsprrlsl <u>svsklds</u> gvpdrrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyyc <u>wqgthfpgtfg</u> ggtkveikggggsgggsgggsgggsgggseiqlvqsgaevkkpgeslrisksgsfniedy <u>yihwv</u> rqmpgkglewm <u>gridpendetkvgpifqg</u> hvtisadtsintvylqwsslkasd tamyycafr <u>ggvvy</u> wgqgtvtvssttpaprrptpaptiasqplslrpeacrpaaagavhtr gldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckgrkkllyifkqpfmrpvtqteedgcscrfp eeeeggcelrvkfsrsadapaykqggnqlynelnlgreeydvldkrrgrdpemggkpr knpqeglynelqkdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatktdtydalhmqalp pr
CAR 5		
CAR5 scFv domain	62	eiqlvqsgaevkkpgatvkisksgsfniedyihwvqqapgkglewmgridpendet kygpifqgrvitadstntvymelssrsedtavyycfrggvvywgqgtvtvssggsgsg ggsgsgsgsgsgsdvmtqspislplvtlqgpasisc <u>kssqslldsdktyln</u> wlqqrpq qsprrlslsvskldsgvpdrrfsgsgsgtdftlkisrveaedvgvyycwqgthfpgtfgggtkv eik
CAR5 scFv domain nt	63	gaaatccagctcgtgcagagcggagccgaggtcaagaaaccgggtgctaccgtgaagattt catgcaaggatcgggcttcaacatcgaggattactacatccactgggtgcagcaggcacca ggaaaaggacttgaatggatggccggatcgaccggaaaatgacgagactaagtacggcc ctatctccaaggacgggtgacgatcaccgcagactagcaccaacaccgtctatatggaac tctcgtccctgaggtccgaagatactgccgtgtactactgtgcgttcgcggaggtgtgtactgg ggacaggggtaccaccgtcaccgtgtcgcggcggtggaggtccgggtggagggaggtca ggagggcggtggaagcggaggagggcgagcgacgtgtcatgactcaatgccgctgtcg ctgcccgtactctgggacaaccgcgtccatcagctgcaaatcctgcagtcactgcttgact ccgatggaaaacctaactgaactgctgcagcaaccccaggccaatcccaagacgcct gatctcgttggtgtcaaaagctggactcaggggtgccggaccggttccgggagcgggtcgg gcacgggatttactctcaagatctccagagtggagccgaggtgtggaggtctactactgct ggcaggggaacccatttccctggaacttttggcggagggaactaaggtcgagattaaa
CAR5 - Soluble	64	atgccctccctgtcaccgccctgctgctccgctggtcttctgtccacgccgctcggcccg aaatccagctcgtgcagagcggagccgaggtcaagaaaccgggtgctaccgtgaagatttca

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

scFv - nt		tgcaaggatcgggcttcaacatcgaggattactacatccactgggtgcagcaggcaccagg aaaaggacttgaatggatgggcccggatcgacccggaaaatgacgagactaagtacggccct atcttccaaggacgggtgacgatcaccgcagacactagcaccaacaccgtctatatggaactc tcgtccctgagggtccgaagatactgccgtgtactactgtgcgtttcgcggagggtgtactggg gacagggtaccaccgtcaccgtgtcatcggcggtggaggctccggaggaggagggtcag gaggcgggtggaagcggaggaggcggcagcgacgtggtcatgactcaatgccgctgtcgc tgcccgctactctgggacaacccgcgtccatcagctgcaaatcctcgagtcactgcttgactc cgatggaaagacctacctaactggctgcagcaacgccaggccaatcccaagacgcctg atctcgttggtgtcaaaactggactcagggtgcccggaccggttctccggagcgggtcggg cacggatttactctcaagatctccagagtggagccgaggatgtggagtgctactactgctg gcagggaacccatttcctggaacttttggcggagggaactaaggctcgagattaaaggagcc accatcatcatcaccaccaccac
CAR5 - Soluble scFv -aa	65	<u>malpvtalllplalllhaarpeiqlvqsgaevkkgatvskiscksgfniedyyihwvqqap</u> gkglewmgripndetkygpfqgrvtitadtstntvymelsslrstedtavyycfrgvy wgqgtvtvssggsgsgsgsgsgsgsdvmtqspslpvtlqgpasickssqsl ldsdgktylnwlqrrpgqsprrlislvsldsgvpdrfsgsgsgtdftlkisrveadvgvyy cwqgthfpgtfgggtkveikgshhhhhhhh
CAR 5 – Full - nt	66	atggccctccctgtcaccgacctgctgcttccgctgctcttctgctccacgccgctcgcccg aatccagctcgtgcagagcggagccgagggtcaagaaccgggtgctaccgtgaagatttca tgcaaggatcgggcttcaacatcgaggattactacatccactgggtgcagcaggcaccagg aaaaggacttgaatggatgggcccggatcgacccggaaaatgacgagactaagtacggccct atcttccaaggacgggtgacgatcaccgcagacactagcaccaacaccgtctatatggaactc tcgtccctgagggtccgaagatactgccgtgtactactgtgcgtttcgcggagggtgtactggg gacagggtaccaccgtcaccgtgtcatcggcggtggaggctccggaggaggagggtcag gaggcgggtggaagcggaggaggcggcagcgacgtggtcatgactcaatgccgctgtcgc tgcccgctactctgggacaacccgcgtccatcagctgcaaatcctcgagtcactgcttgactc cgatggaaagacctacctaactggctgcagcaacgccaggccaatcccaagacgcctg atctcgttggtgtcaaaactggactcagggtgcccggaccggttctccggagcgggtcggg cacggatttactctcaagatctccagagtggagccgaggatgtggagtgctactactgctg gcagggaacccatttcctggaacttttggcggagggaactaaggctcgagattaaaccactac cccagcaccgaggccaccaccgggctcctaccatgcctccagcctctgtccctgcgtc

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

		cggaggcatgtagaccgcagctgggtggggccgtgcataccgggggtcttgacttcgcctgc gatatctacattggccctctggctgtacttcggggctcctgctgctttcactcgtgactact ctttactgtaagcgcggctcggaagaagctgctgtacatcttaagcaaccctcatgaggcctgt gcagactactcaagaggaggacggctgttcagccgggtccagaggaggaggaggaagcggg ctgcgaactcgcgtgaaattcagccgagcgcagatgctccagcctacaagcaggggag aaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcg gagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaagagggc ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg ggaacgcagaagaggcaagggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca aggacacctatgacgtcttcacatgcagggcctgccgcctcgg
CAR 5 – Full - aa	67	malpvtalllplallhaarpeiqlvqsgaevkkgatvkisksgsfnie<u>dyvih</u>wvqqap gkglewm<u>gridpendetkypifqgr</u>vtitadtstntvymelssrsedavyycafr<u>gg</u> <u>yyw</u>gqgtvtvssgggsgggsgggsgggsgsdvmtqspslpvtlqgpasisc<u>kss</u> <u>qslldsdgktyln</u>wlqqrpqsprrlis<u>lvsklds</u>gvpdrfsrgsgtdftlkisrveadv vyyw<u>qgthfpgt</u>fgggtkveikttpprptpaptiasqplsrpeacrpaagavhtrg ldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfe eeeggcelrvkfsrsadapaykqgnqlynelnlgrreeydvldkrrrdpemmkgprrk npqeglynelqkdmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalpp r
CAR 6		
CAR6 scFv domain	68	eiqlvqsgaevkkgpesslrisksgsfnieyyihwvrqmpgkglewmgridpendetk ygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycafrggvywqgtvtvssgggsg gggsgggsgggsgsdvmtqspdsavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqqkpg qppkrlislvskldsgvpdrfsrgsgtdftlisslqaedvavyycwqgthfpgtfgggtkv eik
CAR6 scFv domain nt	69	gaaatccagctggtgcagtcaggcggcagggtcaagaagccgggagagtcgctgagaatct cgtgcaagggtcgggggttaacatcgaggactactacattcagggtcaggcagatgccg ggaaaggactggaatgatggcggcggatcgaccagaaaatgacgaaaccaatacggg ccgattttcaaggccacgtgactatcagcgacacagcatcaactgtctacctcagct ggctctcgcttaaggccagcgataccgctatgtactactgcgattcagaggcggggtgtact ggggacaaggaaccactgtgaccgtgagcagcggaggtggcgctcgggaggaggtggg

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

		agcggaggaggaggttccggcgggtggaggatcagatgtcgtgatgaccagtcctccggact ccctcgtgtctcactggcgagcgcgcgaccatcaactgcaaatcagccagtcgctgttg gactccgatggaaagacttatctgaattggctgcaacagaaaccaggacaacctccaagcg gtcatctcgttgtgtcaaaactcattcgggagtgccagaccgttctcgggggtccgggag cggaaactgactttactttgaccatttctcactgcaagcggaggatgtggcgtgtattactgttg gcagggcacgcatttccctggaaccttcggtggcgggaactaagggtgaaatcaag
CAR6 - Soluble scFv - nt	70	atggccctccctgtcaccgacctgctgcttccgctggctcttctgtccacgccgctcggcccg aatccagctggtgcagtcaggcggcggaggtcaagaagccgggagagtcgctgagaatctc gtgcaagggtcgggggtcaacatcagaggactactacattcactgggtcaggcagatgccgg gaaaggactggaatggatggccggatcgaccagaaaatgacgaaaccaatacgggc cgattttcaaggccacgtgactatcagcgcagacacagagcatcaacactgtctacctccagt gtcctcgttaaggccagcgataccgctatgtactactgcgcattcagagcgggggtgtactg gggacaagggaacctgtgaccgtgagcagcggaggtggcggctcgggagaggtggga gcggaggaggaggttccggcgggtggaggatcagatgtcgtgatgaccagtcctccggactc cctcgtgtctcactggcgagcgcgcgaccatcaactgcaaatcagccagtcgctgttg actccgatggaaagacttatctgaattggctgcaacagaaaccaggacaacctccaagcgg ctcatctcgttgtgtcaaaactcattcgggagtgccagaccgttctcgggggtccgggagc ggaactgactttactttgaccatttctcactgcaagcggaggatgtggcgtgtattactgttg cagggcacgcatttccctggaaccttcggtggcgggaactaagggtgaaatcaaggatcaca ccaccatcaccatcaccacat
CAR6 - Soluble scFv - aa	71	<u>malpvtalllplallhaar</u>peiqlvqsgaevkkpgeslriskgsgfniedyyihwvrqmp gkglewmgridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycafrgg vywgqgttvsvsgggsgggsgggsgggsgsdvmtqspdslavslgeratinckss qslldsdgktylnwlqqkpgppkrlislvskldsgvpdrfsqsgsgtdftltisslqaedvav yycwqgthfpgtfgggtkveikgshhhhhhhhhh
CAR6 - Full - nt	72	atggccctccctgtcaccgacctgctgcttccgctggctcttctgtccacgccgctcggcccg agattcagctcgtgcaatcgggagcgggaagtcagaagccaggagagtccttgcggatctca tgcaagggtagcggctttaacatcagaggattactacatccactgggtgaggcagatgccggg gaagggactcgaatggatgggacggatcgaccagaaaacgacgaaactaagtacggtcc gatctccaaggccatgtgactattagcggcgatactcaatcaataccgtgtatctgcaatggtc ctcattgaaagcctcagataccgcgatgtactactgtgctttcagaggaggggtctactgggga

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

		cagggaactaccgtgactgtctgtccggcggaggcgggtcaggagggtggcggcagcggaggaggagggtccggcggagggtgggtccgacgtcgtgatgaccagagccctgacagcctggcagtgagcctgggcgaaagagctaccattaactgcaaatcgtcgcagagcctgctggactcggacggaaaaacgtacctcaattggctgcagcaaaagcctggccagccaccgaagcgcttatctactgggtgtcgaagctggattcggagtgcccgtcgttctccggctcgggacgggtactgactcaccctactatctctcgttcaagcagaggacgtggcgtctactactgctggcagggaacccacttccgggaaccttcggcggaggggacgaaagtggagatcaagaccactaccagcaccgaggccaccaccccggtcctaccatcgctccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccgcagctgggtgggcccgtgcataccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacattggccccctctgctgtgacttgcgggtcctgctgttctactcgtgatcactcttactgtaagcgcggtcggagaagctgctgtacatcttaagcaaccttcatgaggcctgtgcagactactcaagaggaggacggctgttcctgccgtccagaggaggaggaaagcggctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaactcaatcttggctggagagaggagtagacgtgctgtgacaagcggagaggacgggaccagaatgggcgggaagccgcgcagaaagaatcccaagaggcctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagggaacgcagaagaggcaaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR6 – Full – aa	73	malpvtallplallhaarpeiqlvqsgaevkkpgeslrisksgsfni<u>dyvih</u>wvrqmpgkglewm<u>ridpendetkvgpifqgh</u>vtisadtsintvylqwsslkasdtamyycafr<u>ggyvw</u>gqgttvsvsgggsgggsgggsgggsggsvmtqspdslavslgeratin<u>ksqsllsdsgktvln</u>wlqqkpgqppkrlis<u>lvs</u>kldsgvpdrfsghsgsgtdftltisslqaedvavyyc<u>wqgthfpgt</u>fgggtkveikttppaprpptpaptiasqplsrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrfeeeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgreeydvldkrrgrdpemggkprknppqeglynelqkdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalp
CAR 7		
CAR7 scFv domain	74	dvmtqspdslavslgeratinckssqsllsdsgktylnwlqqkpgqppkrlislvsldsgvpdrfsghsgsgtdftltisslqaedvavyycwqgthfpgtfgggtkveikgggsgggsgggsgggsggseiqlvqsgaevkkpgeslrisksgsfni<u>dyvih</u>wvrqmpgkglewm

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

		ridpendetkygpifqghvtisadtsintvylqwsslkasdtamyycfrggvywgggttv tvss
CAR7 scFv domain nt	75	gacgtggtgatgaccaatcgccagattccctggcagtgccctggcggaacgcgccactatt aactgcaaatcgtcacagtccttgcttgattccgacggaaagacctacccaattggctccagc agaagccaggacaaccgcaaaagagactgatccctgggtgcaaaagctggactcgggagt gcctgatcgggttcgggtagcgggagcggcaccgacttactctgacctctcgtactcca ggctgaggacgtggccgtgtattactgttggcaggggtactcactttccgggcactttcggaggc ggcaccaagggtgagattaaaggaggaggcggaaagcggaggtggaggtcgggaggtgg tgggagcggcggaggaggagcggatccagctcgtccaatcgggagcggaaagtgaaga agcccgagagtcacttagaatctcatgcaaggggtcgggcttcaacatcgaggattactaca tccattgggtccgccagatgcctggtaaaggactggaatggatggggaggattgaccggaa aacgacgaaactaagtacggaccgatcttcaagggcacgtgactatctccgctgatactca atcaatactgtctacctccagtggtcctcgtgaaagcaagcgacaccgcgatgtactactgcg ccttcggggaggagtgtactggggccaaggcaccacggtcacgggtcagctcc
CAR7 - Soluble scFv - nt	76	atggccctccctgtaccgcccgtgcttccgctggctcttctgtccacgccgctcggcccg acgtggtgatgaccaatcgccagattccctggcagtgccctggcggaacgcgccactatta actgcaaatcgtcacagtccttgcttgattccgacggaaagacctacccaattggctccagca gaagccaggacaaccgcaaaagagactgatccctgggtgcaaaagctggactcgggagt cctgatcgggttcgggtagcgggagcggcaccgacttactctgacctctcgtactccag gctgaggacgtggccgtgtattactgttggcaggggtactcactttccgggcactttcggaggcg gcaccaagggtgagattaaaggaggaggcggaaagcggaggtggaggtcgggaggtggt gggagcggcggaggaggagcggatccagctcgtccaatcgggagcggaaagtgaagaa gcccggagagtcacttagaatctcatgcaaggggtcgggcttcaacatcgaggattactacat ccattgggtccgccagatgcctggtaaaggactggaatggatggggaggattgaccggaa aacgacgaaactaagtacggaccgatcttcaagggcacgtgactatctccgctgatactca atcaatactgtctacctccagtggtcctcgtgaaagcaagcgacaccgcgatgtactactgcg ccttcggggaggagtgtactggggccaaggcaccacggtcacgggtcagctccggctccca tcaccaccaccatcacatcac
CAR7 - Soluble	77	<u>malpvtalllplalllhaar</u> pdvmtqspdslavslgeratinckssqslldsdgktylnwlqq kpgqppkrlislvskldsgvpdrfsgsgsgtdftltisslqaedvavyycwqgthfpgtfggg

PCT/US2014/017364

150

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

		<u>yihwvrqmpgkglewmgridpendetkypifqgh</u>hvtisadtsintvylqwsslkasd tamyyc<u>afrggv</u>wgqgtvtvssttpaprpptpaptiasqplsrpeacrpaaaggavhtr gldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrkillyifkqpfmrpvqttqeedgcserfp eeeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgreeydvldkrgrdpemggkpr knpqeglynelqkdkmaeyseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalp pr
CAR 8		
CAR8 scFv domain	80	dvvmqtqslslpvtlqgpasickssqslldsdgktylnwlqqrpgqsprtlslvskldsgv pdrfsgsgsgtdftlkisrveadvgyycwqgthfpgtfggggtkveikggsgsgsgsg ggsgsgsgseiqlvqsgaevkpgatvkiscksgsfniedyihwvqqapgkglewm gridpendetkypifqgrvtitadtstntvymelssrsedavyycafrggyvwgqgtvt vss
CAR8 scFv domain nt	81	gatgtggtcatgacgcagtcaccactgtccctccccgtgaccttgacagccagcgtcgatt agctgcaagtcacccaatccctgctcgattcgatggaaagacctatctcaactggctgcagc aaagaccgggtcagagccctaggagactcatctcgttggtgtaaaagctggacagcggagtgc ccggaccgggtttccgggttcgggacgggacggacttactctgaagatttcacgggtggaa gctgaggatgtgggagtgtactactgctggcagggaacccatttcctggcacttttggcggga ggaaactaaggtcgaaatcaaggaggaggtggctcgggaggaggcgatcggcgaggagg cgggagcggcgaggagggtccgaaatccaactgtccagtcaggagccgaagtgaagaa accgggagccaccgtcaaatcagctgtaaggatcgggattcaatcagaggactactacat ccactgggtgcagcaagctccgggcaaggactggagtggatggcgcatcgacccaga gaacgacgaaacaaatacggcccgatctccaaggcggtgacctaccggcgacac ctcaactaacactgtgtacatggagctgagctccctgcgctccgaagatactgcagctactact gcgccttccgggtggtgtgtactggggacagggcaccactgtgactgtcagctcg
CAR8 - Soluble scFv - nt	82	atggccctccctgtcaccgcccgtgctgtccgctggctcttctgctccacggcgtcggcccg atgtggtcatgacgcagtcaccactgtccctccccgtgaccttgacagccagcgtcgatta gctgcaagtcacccaatccctgctcgattcgatggaaagacctatctcaactggctgcagca aagaccgggtcagagccctaggagactcatctcgttggtgtaaaagctggacagcggagtgc cggaccgggtttccgggttcgggacgggacggacttactctgaagatttcacgggtggaa ctgaggatgtgggagtgtactactgctggcagggaacccatttcctggcacttttggcgag gaactaaggtcgaaatcaaggaggaggtggctcgggaggaggcgatcggcgaggaggc

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

		gggagcggcggaggagggtccgaaatccaactgtccagtcaggagccgaagtgaagaaa ccgggagccaccgtcaaatcagctgtaaggatcgggattcaatatcaggactactacatc cactgggtgcagcaagctccgggcaaaaggactggagtggatggggcgcatcgacccagag aacgacgaaaccaatacggcccgatctccaaggcggggtgacctaccgcggacacct caactaacactgtgtacatggagctgagctccctgcgctccgaagatactgcagtctactactg cgcttccgcgggtgtgtgtactggggacagggcaccactgtgactgtcagctcggggtccc accatcatcaccaccaccatcac
CAR8 - Soluble scFv - aa	83	<u>malpvtalllplalllhaar</u>pdvmtqspislpvtlgqpasickssqslidsdgtkylnwlq rpgqsprrlislvsldsgvpdrfsqsgsgtdflkisirveadvgyvycwqgthfpgtfggg tkveikgggsgggsgggsgggsgggseiqlvqsgaevkkpgatvkisksgsfniedyyi hwvqqapgkglewmgridpendetkygpifqgrvtitadtstntvymelsslsredtavy ycafrggvywqggtvtvssgshhhhhhhh
CAR 8 – Full - nt	84	atggccctccctgtcaccgccctgctgcttccgctggctcttctgctccacgccgctcggccc atgtgtcatgacgcagtcaccactgtccctccccgtgaccttgacagccagcgtcgatta gctgcaagtcacccaatccctgctcgattcggatggaagacctatctcaactggctgcagca aagacccggtcagagccctaggagactcatctgttggtgtcaaaagctggacagcggagtgc cggaccgggtttccgggttcgggatcggggacggacttactctgaagattcacgggtggaag ctgaggtatgtgggagtgtactactgctggcagggaaccatttccctggcattttggcggag gaactaaggtcgaaatcaaggaggaggtggctcgggaggaggcggatcggcgggaggc gggagcggcggaggagggtccgaaatccaactgtccagtcaggagccgaagtgaagaaa ccgggagccaccgtcaaatcagctgtaaggatcgggattcaatatcaggactactacatc cactgggtgcagcaagctccgggcaaaaggactggagtggatggggcgcatcgacccagag aacgacgaaaccaatacggcccgatctccaaggcggggtgacctaccgcggacacct caactaacactgtgtacatggagctgagctccctgcgctccgaagatactgcagtctactactg cgcttccgcgggtgtgtgtactggggacagggcaccactgtgactgtcagctcgaccactac cccagcaccgaggccaccaccccggtcctaccatcgcctcccagcctctgtccctcgcgtc cggaggcatgtagaccgcagctggtggggccgtgcataccgggggttctgacttcgcctgc gatatctacatttggccctctgctggtgacttcgggggtcctgctgcttctactcgtgatca cttactgtaaagcgcggtcggaaagagctgctgtacatcttaagcaaccctcatgaggcctgt gcagactactcaagaggaggacggctgtcatgccggttccagaggaggagggaagcgg

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

		ctgcgaactgcgcgtgaaattcagccgcagcgcagatgctccagcctacaagcaggggcag aaccagctctacaacgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaagcg gagaggacgggaccagaaatgggcgggaagccgcgcagaaaagaatcccaagagggc ctgtacaacgagctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagg ggaacgcagaagaggcaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccacca aggacacctatgacgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR 8 – Full - aa	85	malpvtalllplalllhaarpdvmtqspislpvtlqqpasisc <u>kssqslldsdgktyln</u> wlq qrpqgsprrlis <u>lvs</u> <u>skldsg</u> vprdfsgsgsgtdftlkisrveadvgyyyc <u>wqgthfpgtfg</u> ggtkveikgggsgggsgggsgggsgggseiqlvqsgaevkkgpatvkisksgsfni <u>ed</u> <u>vyih</u> wvqqapgkglewmg <u>ridpendetkvgpifggr</u> vtitadtstntvymelsslrse tavyycafr <u>rggyv</u> wgqgtvtvssttpaprpptpaptiasqplsrpeacrpaaggavhtrg ldfacdiyiwaplagtcgvllslvitlyckrgrklllyifkqpfmrpvqttqeedgcscrpe eeeggcelrvkfsrsadapaykqgqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprrk npqeglynelqkdmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatktdtydalhmqaalpp r
CAR 9		Mouse anti-EGFRvIII clone 3C10
CAR9 scFv domain	86	eiqlqqsgaelvkpgasvklscetgsgfniedyyihwvkqrteqglewigridentetkyg pifqgratitadtssntvylqlssltstetavyycafrggyvwgpgtltvssggsgggsgsg gggshmdvmtqspitlsvaigqsasiscssqslldsdgktylnwllqrpqgsprkrlislv skldsgvprdfsgsgtdftlrisrveadlgiyycwqgthfpgtfgggtkleik
CAR9 scFv domain nt	98	gagatccagctccaacagagcggagccgaactggtcaaaccgggagcgtcgtggaagtgt catgcactggatcgggttcaacatcgaggattactacatccactgggtcaagcaacgcaccg agcaggggctggaatggatcgacggatcgaccccgaaaacgatgaaaccaagtacgggc ctatctccaaggacgggccaccattacggctgacacgtcaagcaataccgtctacctccagct ttccagcctgacctccgaggacactgccgtgtactactgcgccttcagaggaggcgtgtactg gggaccagggaaccactttgaccgtgtccagcggaggcgggtggtcagggaggaggaggtc aggcgggtggcggctgcacatggacgtggtcatgactcagtcctccgctgacctgtcggtgg caattggacagagcgcacatctctgtgcaagagctcacagtcgctgctgattccgacggaa agacttatctgaactggctgtccaaagaccagggaatcaccgaaacgccttatctccctggt gtcgaaactcgactcgggtgtgcccggatcggtttaccggtagcgggtccggcacggacttca ctctccgcatttcagggtggaagcggaggatctcgggatctactactgttggcagggaaccc

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

		acttccctgggacttttggaggcggaactaagctggaaatcaag
CAR9 - Soluble scFv - nt	87	atggccctccctgtcaccgcccgtgcttccgctggtcttctgtctccacgccgctcggcccg agatccagctccaacagagcggagccgaactggtcaaacgggagcgtcggtaagttgtc atgcactggatcgggcttaacatcaggattactacatccactgggtcaagcaacgcaccga gcaggggctggaatggatcggacggatcgaacccgaaaacgatgaaaccaagtacgggcc tatcttccaaggacgggccaccattacggctgacacgtcaagcaataccgtctacctccagctt tccagcctgacctccgaggacactgccgtgtactactgcgccttcagaggaggcgtgtactgg ggaccagggaaccactttgaccgtgtccagcggagcgggtggatcaggaggaggaggctca ggcgggtggcggctgcacatggacgtggtcatgactcagtcctccgctgacctgtcgggtggc aattggacagagcgcacccatctcgtgcaagagctcacagtcgctgctgattccgacggaaa gacttatctgaactggctgtccaaagaccaggggcaatcaccgaaacgccttatctccctgtg tcgaaactcgactcgggtgtgcccgtcgggttaccggtagcgggtccggcacggacttact ctccgcatttcgagggtggaagcggaggtatcgggtactactgttggcagggaacca cttccctgggacttttggaggcggaactaagctggaaatcaagggtagccatcacatcacca ccaccatcat
CAR9 - Soluble scFv - aa	88	<u>malpvtalllplalllhaarpeiqlqqsgaelvkpgasvklsetgsfniedyyihwvkqrte</u> qglewigridpendetkygpifqgratitadtssntvylqlssltsetavyycafrgvywg pgtltlvssggggsgggsggggshmdvmtqspiltlsvaigqsasisckssqslsdsdgtk ylnwllqrpqspkrlislvskldsgvpdrftgsgsgtdftlrisrveaedlgiiycwqgthfp gtfgggtkleikgshhhhhhhh
CAR 9 – Full - nt	89	atggccctccctgtcaccgcccgtgcttccgctggtcttctgtctccacgccgctcggcccg agatccagctccaacagagcggagccgaactggtcaaacgggagcgtcggtaagttgtc atgcactggatcgggcttaacatcaggattactacatccactgggtcaagcaacgcaccga gcaggggctggaatggatcggacggatcgaacccgaaaacgatgaaaccaagtacgggcc tatcttccaaggacgggccaccattacggctgacacgtcaagcaataccgtctacctccagctt tccagcctgacctccgaggacactgccgtgtactactgcgccttcagaggaggcgtgtactgg ggaccagggaaccactttgaccgtgtccagcggagcgggtggatcaggaggaggaggctca ggcgggtggcggctgcacatggacgtggtcatgactcagtcctccgctgacctgtcgggtggc aattggacagagcgcacccatctcgtgcaagagctcacagtcgctgctgattccgacggaaa gacttatctgaactggctgtccaaagaccaggggcaatcaccgaaacgccttatctccctgtg tcgaaactcgactcgggtgtgcccgtcgggttaccggtagcgggtccggcacggacttact

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

		ctccgcatttcgaggggtggaagcggaggatctcgggatctactactgttggcaggggaacca cttccctgggacttttgaggcgggaactaagctggaaatcaagaccactacccagaccga ggccacccaccccggtctctaccatcgctccagcctctgtccctgcgtccggaggcatgta gaccgcagctgggtgggcccgtgcatacccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacattg ggccctctggtggtacttgcgggctctgctgttctactcgtgatcacttttactgtaagcg cggtcggaagaagctgctgtacatcttaagcaacccttcagaggcctgtgcagactactcaa gaggaggacggctgttcagccgggtccagaggaggaggaaaggcggctgcgaactgcgc gtgaaattcagccgcagcgagatgctccagcctacaagcaggggcagaaccagctctaca acgaactcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaaggcgagaggacggg accagaaatggcggggaagccgcgagaagaatcccaagaggcctgtacaacgag ctccaaaaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagggaacgcagaa gaggcaaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacctatg acgctcttcacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR 9 – Full - aa	90	malpvtalllplalllhaarpeiqlqqsgaelvkpgasvklscetgsfniedvvihwvkqrte qglewigridpendetkvgpifqgratitadtssntvylqlssltedavyycafrggvww gpgttltvssgggsgggsgggsgggshmdvmtqspitlsvaigqsasisckssqslldsdg ktvlnwllqrpqgspkrlislvskldsgvpdrftgsgsgtdflrisrveadlgiyycwqgt hfpgtfgggkdeikttpprptpaptiasqplsrpeacrpaaggavhtrglfdiacdiyw aplagtegvllslvitlyckrgrklliyfkqpfmrpvqtteedgcsrfpeeeeggcelrv kfsrsadapaykqgnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkprkrnpqeglynel qkdmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqualppr
CAR10		Anti-EGFRvIII clone 139
CAR10 scFv domain	91	dqmtqspsslsasvgdrvtiterasqgirnnlawyqqkpgkapkrliyaasnlqsgvpsrft gsgsgteftlivsslqpedfatyyclqhhsypltsgggkveikrtgstsgskpgsggegsev qvlesggglvqpggslrlscaasgftssyamswvrqapgkglewvsaisgsggstnyads vkgrftisrdnsntlylqmnsraedavyyacgssgwseywgqgtltvtvss
CAR9 scFv domain nt	92	gatatccaaatgactcagagcccttcacccctgagcggcagcgtcggagacagggtgacat cacgtgccgggcatcccaaggcattagaataacttggcgtggtatcagcaaaaaccaggaa aggccccgaagcgctgatctacgcggcctccaaccttcagtcaggagtgccttcgcgcttc accgggagcggtagcgggaactgagttacccttattcgtgtcgtccctgcagccagaggacttc gcgacctactactgcctccagcatcactcgtacccgttacttcgggaggcgggaaccaaggtc

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

		gaaatcaaacgcactggctcgacgtcaggggtccggtaaaccgggacgggagaaggatcg gaagtccaagtgtctggagagcggagggcggactcgtgcaacctggcgggtcgctcggctc agctgtccgcgtcgggtttactttcagctcgtacgtatgtcatgggtgcggcaggctccgg gaaaggggctggaatgggtgtccgctatttccggctcgggtggaagcaccataattaccggac tccgtgaaggacgcttcacatctcacgggataactccaagaatactctgtacctccagatga actcgtgagagccgaggacaccgcagtgtactactgcgcagggtcaagcggctgtccga atactggggacagggcaccctcgtactgtcagctcc
CAR10 - Soluble scFv - nt	93	atggccctccctgtcaccgcccgtgtgttccgctggctcttctgtccacgccgctcggcccg atatccaaatgactcagagcccttcatccctgagcggcagcgtcggagacagggtgaccatc acgtgccgggcatcccaaggcattagaataaacttggcgtggtatcagcaaaaaccaggaaa ggccccgaagcgctgatctacgcggcctccaaccttcagtcaggagtgcctcgcgcttca ccgggagcggtagcggaaactgagttacccttatcgtgtcgtccctgcagccagaggacttcg cgacctactactgcctccagcatcactcgtacccgttgacttcgggagggcggaaaccaaggctc aatcaaacgcactggctcgcagtcagggtccggtaaaccgggacgggagaaggatcgga agtccaagtgtcggagagcggagggcggactcgtgcaacctggcgggtcgtcgggctcag ctgtgccgcgtcgggtttactttcagctcgtacgtatgtcatgggtgcggcaggctccggga aaggggctggaatgggtgtccgctatttccggctcgggtggaagcaccataattaccggactc cgtgaagggacgcttcacatctcacgggataactccaagaatactctgtacctccagatgaa ctcgtgagagccgaggacaccgcagtgtactactgcgcagggtcaagcggctgtccgaa tactggggacagggcaccctcgtactgtcagctccatcaccatcaccaccatcac
CAR10 - Soluble scFv - aa	94	<u>malpvtalllplalllhaarp</u>diqmtqspsslsasvgrvtitcrasqgirnlnlawyqqkpgk apkrliyaasnlqsgvpsrftsgsgsteftlivsslpqdfatyyclqhhshypltsgggkveik rtgstsgsgkpgsggsevqvlesggglvqpggslrlscaasgftfssyamswvrqapgkg lewvsaisgsggstnyadsvkgrftisrdnskntlylqmnsraedavyyagssgwsey wgqgtlvtvsshhhhhhhh
CAR 10 Full - nt	95	atggccctccctgtcaccgcccgtgtgttccgctggctcttctgtccacgccgctcggcccg atatccaaatgactcagagcccttcatccctgagcggcagcgtcggagacagggtgaccatc acgtgccgggcatcccaaggcattagaataaacttggcgtggtatcagcaaaaaccaggaaa ggccccgaagcgctgatctacgcggcctccaaccttcagtcaggagtgcctcgcgcttca ccgggagcggtagcggaaactgagttacccttatcgtgtcgtccctgcagccagaggacttcg cgacctactactgcctccagcatcactcgtacccgttgacttcgggagggcggaaaccaaggctc

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

		aaatcaaacgcactggctcgacgtcagggtccggtaaacgggacgggagaaggatcgga agtccaagtgcaggagcggaggcggactcgtgcaacctggcgggtcgtcggtcag ctgtgccgcgtcgggttttactttcagctcgtacgtatgtcatgggtgcggcaggctccggga aaggggctggaatgggtgtccgctatttccggctcgggtggaagcaccaattacgccgactc cgtgaaggacgcttcaccatctcacgggataactccaagaatactctgtacctccagatgaa ctcgctgagagccgaggacaccgcagtggtactactgcgcagggtcaagcggctggtccgaa tactggggacaggcaccctcgtcactgtcagctccaccactaccacgacccaggccac ccaccccggtcctaccatcgctcccaagcctctgtccctgcgtccggaggcatgtagaccg cagctggtggggccgtgcataccggggtcttgacttcgcctgcgatatctacatttggggccc tctgctgtacttgcggggtcctgctgttctactcgtgatcactcttactgtaagcgcggtcg gaagaagctgctgtacatctttaagcaaccctcatgagcctgtgcagactactcaagagga ggacggctgttcatgccggtccagaggaggaggaaggcggctgcgaactgcgcgtgaa attcagccgcagcgcagatgtccagcctacaagcaggggcagaaccagctctacaacgaa ctcaatcttggtcggagagaggagtacgacgtgctggacaaggcggagaggacgggaccca gaaatgggcgggaagccgcgcaaaagaatcccaaggggcctgtacaacgagctccaa aaggataagatggcagaagcctatagcgagattggtatgaaagggaacgcagaagaggc aaaggccacgacggactgtaccagggactcagcaccgccaccaaggacacatgtacgctc ttacatgcaggccctgccgcctcgg
CAR 10 Full - aa	96	malpvtallplallhaarpdiqmtqspsslsasvgdrvtitcrasqgirnlnawyqqkpgk apkrliyaasnlsqsvpsrftgsgsgteftlivsslqpedfatyyclqhhsypltsgggtkveik rtgstsgskpgsggegsevvlesggglvqpggslrlscaasgftfssyamswvrqapkgk lewvsaisgsggstnyadsvkgrftisrdnskntlylqmnsiraedavyyagssgwsey wgqgtlvtvssttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrgldfacdiyiwapla gtcgvllslvitlyckrgrkillyifkqpfmrpvqttqeedgcscrpfceeeeggcelrvkfsrs adapaykqggnqlynelnlgrreedyvldkrrgrdpemggkprnrnpqeglynelqkdk maeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr

[00396] The CAR scFv fragments were then cloned into lentiviral vectors to create a full length CAR construct in a single coding frame, and using the EF1 alpha promoter for expression (SEQ ID NO: 97).

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

EF1 alpha promoter

GTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAG
 AAGTTGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGG
 TAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGA
 GAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGC
 CGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGG
 GTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTG
 ATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGG
 AGCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCG
 TGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCA
 TTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTA
 ATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGAC
 GGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGC
 CACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGC
 CTCGCGCCCGCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTTCGGCACC
 AGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAA
 TGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAA
 AGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGTTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCC
 GTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCTCTTAGGTTGGGG
 GGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTA
 GGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGAT
 CTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTCAGG
 TGTCGTGA (SEQ ID NO: 97).

Surface expression of CAR9, CAR10 and select humanized EGFRvIII CAR constructs and staining by FACS

[00397] The following experiments showed that there appears to be an affinity difference for EGFRvIII based *in vitro* binding studies in both Jurkat cells and primary T cells.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

[00398] Jurkat E6 cells were electroporated with either CAR9 vector or CAR10 vector using Amaxa Cell Line Nucleofector Kit V (Lonza, Colgne AG, Germany) and program X-001. One day after the transfection, 0.5×10^6 cells were placed into each well of a V-shape 96 well plate (Greiner Bio-One, Germany) in 0.2 ml FACS buffer (DPBS buffer containing 5% FBS) and incubated for 10 minutes at room temperature. Cells were then spun down and resuspended in 0.2 ml of the FACS buffer with different concentrations of EGFRvIII-Fc or EGFRwt-Fc and incubated at 4°C for 30 minutes. Cells were then washed with FACS buffer three times, and incubated with 0.2 ml of the FACS buffer with 2 µl of PE anti-human IgG Fc (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) for 30 minutes at 4°C in the dark. After washing with 0.2 ml of FACS buffer three times, cells were analyzed on a LSRII (BD Biosciences, San Jose, CA) machine using the FACSDiva software (BD Biosciences, San Jose, CA). Immunofluorescence staining was analyzed as the relative log fluorescence of live cells, and the percentage of the PE positive cells were measured.

[00399] As shown in Figure 12, binding of the CAR9 expressed in Jurkat cells to EGFRvIII-Fc fusion protein is approximately 1000 fold stronger than to wild type EGFR-Fc. Furthermore, the CART construct expressing CAR10 exhibits a significantly lower (~40 fold) binding to EGFRvIII compared to CAR9. This suggests that although murine CAR9 binds to EGFRvIII, it still retains some binding to wild type EGFR. Moreover, it strongly indicates that CAR9 has a higher binding affinity for EGFRvIII than the CAR10 construct.

[00400] Further experiments in primary T cells yielded similar results. Briefly, primary human CD3+ T cells were stimulated with anti-CD3/CD28 beads for 24 hrs and then transduced with lentiviral vectors encoding either CAR9, CAR10, CAR6 or a control CAR at a MOI of 3:1. Included in the experiment was also a mock transduced T cell population. These cells were expanded for about 8-9 days in culture until they started to rest down. At this point, 0.5×10^6 cells were placed into each well of a V-shape 96 well plate. The cells were washed one time with PBS and stained with Live/Dead reagent (1:1000 in PBS) for 30 min on ice. Cells were then washed twice with FACS buffer and incubated with 1 µg/ml biotinylated EGFRvIII or EGFR wt protein for 30 min on ice. Cells were then washed two times and incubated with 0.2 ml of FACS buffer with 1:1000 dilution of streptavidin-PE for 15 min on ice. After washing twice with FACS buffer, cells were analyzed on a LSRII.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

Immunofluorescence staining was analyzed as the relative log fluorescence of live cells and the percentage of the PE positive cells were measured in conjunction with the geometric mean of the positive population.

[00401] As shown in Figure 13, the CAR9 and CAR6 CARs show a 10-fold higher geometric mean (21K for CAR9, 27K for CAR6) for EGFRvIII binding than the CAR10 (only 2K) when saturating amounts of EGFRvIII protein are used for detection, even though all constructs transduce equivalently (~50% transduction efficiency for all). Similarly, the specificity for EGFR wt protein is about 10-fold lower, as depicted by the log shift downwards for the staining with EGFR wt protein. This provides additional support to the findings in the Jurkat cells above that indicate CAR9 and CAR6 have a stronger affinity for EGFRvIII protein compared to CAR10 when expressed in primary T cells and suggest they will be more efficacious in the clinic.

Functional analysis of the panel of humanized CAR constructs was conducted as described in Example 8.

Example 8: Analysis of humanized EGFRvIII-specific CAR Constructs in T cells

[00402] To evaluate the feasibility of targeting EGFRvIII via a CAR technology, the humanized EGFRvIII scFv fragments were cloned into a lentiviral CAR expression vector with the CD3zeta chain and the 4-1BB costimulatory molecule in two different configurations. The optimal construct is selected based on the quantity and quality of the effector T cell response of EGFRvIII CAR transduced T cells in response to EGFRvIII+ and EGFR wt targets. Effector T cell responses include, but are not limited to, cellular expansion, proliferation, doubling, cytokine production and target cell killing or cytolytic activity (degranulation).

Materials and Methods

Generation of Jurkat reporter cell line for initial characterization of CAR function

[00403] As an alternative to primary T cell transduction and activation, a Jurkat-NFAT reporter cell line can be used to evaluate the functional activity of CAR constructs. The Jurkat T cell line (E6-1) was transfected with a NFAT-luciferase reporter construct and a stable,

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

clonal cell line (JNL) was selected for further characterization based on strong induction of the NFAT reporter following PMA and ionomycin stimulation. The JNL cells are transduced with lentiviral vectors at a MOI of 5:1 and then expanded for 5-7 days. Before using in an assay, the percentage of cells transduced (expressing the EGFRvIII CAR on the cell surface) and their relative fluorescence intensity of that expression are determined by flow cytometric analysis on an LSRII. From the histogram plots, the relative expression levels of the CARs can be examined by comparing percentage transduced with their relative fluorescent intensity.

Evaluating T cell activation of humanized EGFRvIII-specific CAR JNL cells

[00404] To evaluate T cell activation in the JNL reporter cell line, JNL or CAR-transduced JNL cells are plated at 50,000 cells per well in a 96 well black plate with a clear bottom. Target cells (BHK parental cells or BHK cells engineered to express either EGFRvIII or EGFR wt) are added to the wells to create effector to target (E:T) ratios of 1:2, 1:1, 1:0.3, 1:0.1, 1:0.03, 1:0.01, and 1:0.003. PMA and ionomycin are used as a positive control for activation. Cells are incubated at 37 C for 16-24 hrs. At the end of the incubation, an equal volume of Bright-Glo Luciferase assay reagent is added to each well. The plate is incubated at room temperature for 10 minutes and then luminescence is measured using a luminometer.

Generation of redirected humanized EGFRvIII-specific CAR T cells

[00405] The humanized EGFRvIII-specific CAR lentiviral transfer vectors are used to produce the genomic material packaged into the VSVg pseudotyped lentiviral particles. Lentiviral transfer vector DNA is mixed with the three packaging components of VSVg, gag/pol and rev in combination with lipofectamine reagent to transfect them together in to 293T cells. After 24 and 48hr, the media is collected, filtered and concentrated by ultracentrifugation or chromatography. The resulting viral preparation is stored at -80C. The number of transducing units is determined by titration on SupT1 cells.

[00406] Redirected EGFRvIII-specific CART cells are produced by activating fresh T cells by engaging with CD3x28 beads for 24hrs and then adding the appropriate number of transducing units to obtain the desired percentage of transduced T cells. These modified T cells are allowed to expand until they become rested and come down in size (~300 fl) at which point

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

they are cryopreserved for later analysis. The cell numbers and sizes are measured using a Coulter multisizer III. Before cryopreserving, percentage of cells transduced (expressing the EGFRvIII-specific CAR on the cell surface) and their relative fluorescence intensity of that expression are determined by flow cytometric analysis on an LSRII. From the histogram plots, the relative expression levels of the CARs can be examined by comparing percentage transduced with their relative fluorescent intensity.

Evaluating cytolytic activity, proliferation capabilities and cytokine secretion of humanized EGFRvIII redirected CAR T cells.

[00407] To evaluate the functional abilities of humanized EGFRvIII-specific CAR T cells to kill, proliferate and secrete cytokines, the cells are thawed and allowed to recover overnight. In addition to the humanized constructs, the murine CAR9 was used for comparative purposes while SS1-BBz was used as non-targeting expressed CAR for background CAR/T cell effect. For this flow based cytotoxicity assay, the target cells are stained with CFSE to quantitate their presence. The target cells were also stained for EGFRvIII expression to confirm similar target antigens levels. The cytolytic activities of EGFRvIII CAR T cells are measured at a titration of effector:target cell ratios of 10:1, 3:1, 1:1, 0.3:1 and 0:1 where effectors were defined as T cells expressing the anti-EGFRvIII CAR. Assays were initiated by mixing an appropriate number of T cells with a constant number of targets cells. After 4 or 16hrs, total volume of each mixture was removed and each well washed. The T cells were stained for CD3 and all cells stained with live/dead marker 7AAD. After the final wash, the pelleted cells were re-suspended in a specific volume with a predetermined number of counting beads. Cell staining data was collected by LSRII flow cytometry and analyzed with FlowJo software using beads to quantitate results.

[00408] For measuring cell proliferation and cytokine production of humanized CAR-EGFRvIII T cells, cells were thawed and allowed to recover overnight. In addition to the humanized CAR-EGFRvIII, the murine CAR9 was used for comparative purposes while SS1-BBz was used as a non-targeting expressed CAR for background CAR/T cell effect. The T cells were directed towards U87, an astrocytoma-derived glioblastoma cell line expressing or not expressing EGFRvIII. In addition, CD3x28 beads were used to evaluate the potential of T cells to respond to the second round of endogenous immunological signals. To analyze proliferation, T cells were stained with CFSE. The proliferation was the dilution of the CFSE

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

stain reflecting the separation of the parental markings now into two daughter cells. The assay tested only an effector:target ratios of 1:1 and 1:0 where effectors were defined as total T cells (CD4 and 8) normalized to express the anti-EGFRvIII chimeric receptor at a common percentage. The assay was done in duplicate and 24hrs after mixing of the cells. Supernatant was removed for cytokine production. After 5 days, T cells were stained for live/dead with Live/Dead Violet (Invitrogen), then stained for CAR expression and phenotyped as either CD4 or CD8 cells. After the final wash, the pelleted cells were re-suspended in a specific volume with a predetermined number of BD counting beads. Cell staining data was collected by LSRII flow cytometry and analyzed with FlowJo software using beads to quantitate results. Total cell counts were determined by number of cells counted relative to a specific number of beads multiplied by the fraction of beads yet to be counted.

Results

Jurkat reporter assay to test the ability of the humanized CART-EGFRvIII cells to recognize EGFRvIII target cells.

[00409] The ability of CART constructs to induce activation following target engagement was measured with the JNL reporter cell line. The JNL cell line is engineered with a NFAT-Luciferase reporter construct which is induced following target engagement of the CAR. JNL cells were transduced with the various CAR-EGFRvIII constructs (CAR9, CAR3, CAR6, CAR8 and CAR10). Transduction efficiency was assessed by flow cytometry and was shown to be about 45-52% for all the constructs. The JNL-CAR-EGFRvIII cells were then stimulated with seven different E:T ratios using three different target cells (BHK parental, BHK-EGFRvIII or BHK-EGFR wt). JNL parental cells and JNL cells expressing a control CAR were included as additional controls. The results in Figure 14 show significant target induced activation can occur at ratios as low as 1:0.01 for all constructs tested and CAR6 and CAR10 induce the most activation at the higher E:T ratios. No significant activation was observed with the EGFR wt expressing cells or by the control CAR expressing JNL cells. These data demonstrate specificity of the CAR constructs for EGFRvIII target and lack of cross-reactivity to EGFR wt target.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

Transduction and expansion of primary human T cells with the humanized EGFRvIII CAR constructs

[00410] CD3+ T cells were obtained from apheresis products or whole blood from healthy donors. As described above, T cells were stimulated with CD3xCD28 beads for 24 hrs and then transduced with concentrated lentiviral supernatants at a MOI of 3. Cells were expanded in culture for 8-10 days.

[00411] Cell surface expressions of humanized EGFRvIII CARs are comparable and their expression level very similar to murine CAR9. The overlay of histograms plotting the cell surface expression staining pattern of each humanized EGFRvIII-specific CAR transduced T cells and the mean fluorescent intensity (MFI) calculated from these profiles correlates well with the percentage of cells transduced.

Proliferation Assay to Test the Ability of EGFRvIII Target Cells to stimulate Humanized EGFRvIII CART Cells

[00412] The ability of EGFRvIII specific CAR T cells to proliferate in response to target engagement was evaluated in a proliferation assay. Subpopulations were enumerated by flow cytometry. Donor T cells were transduced with either humanized CARs, murine CAR9 or SS1 (mesothelin targeting). CARs were mixed 1:1 or 1:0 with target cells and cocultured for 5 days. Figure 15 shows the ability of ND407 EGFRvIII CAR T cells to proliferate in an antigen specific manner. The dash bar indicates the number of T cells seeded and comparatively, no increase in T cell numbers were detected targeting U87 while engagement with U87-EGFRvIII induced proliferation which was specific to EGFRvIII CAR T cell populations. The relative response for ND407 indicated that CAR6 and CAR8 are more robust than CAR9 or CAR3. The result of CD3x28 beads indicates their stimulation was not enough to drive proliferation on a second round of activation, similar to no stimulation at all.

[00413] ND407 T cells were used to screen different huEGFRvIII CARs for their ability to preferentially expand CAR+ T cells. Figure 16 shows CAR5 and CAR6 consistently having the strongest CAR+ expansion in each donor. CAR+ increase is a result of a successful

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

engagement with target, proliferation and survival of activation induced cell death of antigen recognition.

Killing Assay to Test the Ability of the Humanized EGFRvIII CART Cells to Kill EGFRvIII Target Cells

[00414] The ability of EGFRvIII specific CAR T cells to kill targets was tested in a Chromium release assay. The human glioblastoma cell line, U-87MG, was engineered to express either EGFR wild type receptor or the EGFRvIII mutant. These engineered cell lines served as the targets for the killing assay. Three effector CAR T cells were used to determine the specificity of killing target cells; 1) human T cells transduced to express murine 3C10 (CAR9), 2) human T cells transduced to express a humanized version of the murine 3C10, referred to as CAR6 and 3) human T cells transduced with a CAR specific for mesothelin, SS1. All effector cells were normalized to express 30% CAR+ transduction. Target cells were labeled with chromium-51 and washed immediately prior to coculture. The effectors and targets were mixed together at the indicated ratios (E:T) and allowed to incubate for 4 hours.

[00415] The results in Figure 17 (A) shows that CAR T cells mixed with U-87 cells expressing the wild type EGFR receptor showed no cell killing above background up to E:T of 50:1. However, the results in Figure 17 (B) show that in contrast, EGFRvIII specific CAR T cells, CAR9 or CAR6, mixed with U-87 cells expressing EGFRvIII showed specific killing at E:T ratios of 6.25:1 up to 50:1. No significant killing was observed when the mesothelin specific CAR T cells were used as effectors. These data demonstrate the specific on target killing of target cells expressing EGFRvIII by CAR9 and CAR6 T cells, but no killing of cells expressing wild type EGFR or by a non-specific CAR T cell, SS1.

Cytokine assay to test the ability of the Humanized EGFRvIII CART cells to promote an anti-tumor response and demonstrate specificity

[00416] The ability of EGFRvIII specific CAR T cells to induce cytokine in response to target engagement was evaluated in a co-culture assay. CAR T cells were co-cultured with target expressing cells for 18-24 hrs at various target:effector ratios (0.3:1, 1:1, 3:1 and 10:1).

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

Target cells included U87 cells expressing the EGFR wt endogenous protein (U87 wt), U87 cells overexpressing EGFRvIII (U87-vIII), BHK (baby hamster kidney cells) parental cells, BHK cells overexpressing human EGFR wt protein (BHK wt), or BHK cells overexpressing human EGFRvIII protein (BHK-vIII). After 18-24 hrs, supernatants were removed from the cultures and cytokines analyzed using a Cytometric Bead Assay (CBA). The results clearly demonstrated that 1) CAR6 and CAR9 T cells induced similar levels of IFN γ in response to EGFRvIII-expressing cells and 2) that neither CAR T cell population induced IFN γ in response to EGFR wt expressing cells. Importantly, these data together with the killing and proliferation data indicate CAR6 and CAR9 show functional specificity for EGFRvIII and have the capability to promote an anti-tumor immune response.

Example 9: Humanized anti-EGFRvIII CART cells reduce tumor burden in mice

[00417] Humanized anti-EGFRvIII CAR T cells were shown to reduce tumor burden in vivo in mice. For example, #2173 (CAR6) humanized anti-EGFRvIII chimeric antigen receptor (CAR) lentivirally-transduced human T lymphocytes were delivered intravenously in xenogeneic immune-compromised NOD/SCID/common-gamma chain $^{-/-}$ mice treated established U87vIII glioma tumors in vivo. Control mice with 5 day established U87vIII subcutaneous flank tumors receiving donor-matched non-CAR transduced T cells' tumors grew rapidly, both by direct subcutaneous tumor measurement using calipers (max length x max width), and by photon emission measured by Spectrum in vivo imaging system (IVIS). In treated mice receiving even low numbers (0.5×10^6) of CAR6 transduced cells, tumor growth was markedly reduced in mice in a dose-dependent manner.

[00418] In this example, 1×10^6 U87vIII human gliomas expressing EGFRvIII, GFP+Luc+ were washed and injected subcutaneously in 100 μ L saline in the flanks of 30 NSG immune-compromised mice (N = 10/group). Human T cells were stimulated with anti-CD3/28 coated beads and lentivirally transduced with humanized EGFRvIII CAR scFv #2173 (CAR6). Following transduction, ex vivo expansion and bead removal, CAR transduced T cells (~ 50% CAR+ by flow cytometry) were washed and injected in 100 μ L saline via tail vein 5 days after tumor implantation. Tumor growth was evaluated by caliper measurement (upper left), and luciferin-induced photon emission (upper right). Measurements were started 7 days after T cell

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

transfer and 12 days after tumor injection. SEM is shown in Figure 18 (N = 10 mice/group). Survival of each group is plotted by Kaplan Meier curves in Figure 18 (lower). All mice receiving control T cells died by day 26, with group receiving 0.5×10^6 and 1.0×10^6 CAR6 T-cells at 30% and 90% survival, respectively as of experimental day 30.

EQUIVALENTS

[00419] The disclosures of each and every patent, patent application, and publication cited herein are hereby incorporated herein by reference in their entirety. While this invention has been disclosed with reference to specific aspects, it is apparent that other aspects and variations of this invention may be devised by others skilled in the art without departing from the true spirit and scope of the invention. The appended claims are intended to be construed to include all such aspects and equivalent variations.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

What is claimed is:

1. An isolated nucleic acid molecule encoding a chimeric antigen receptor (CAR), wherein said CAR comprises an anti-EGFRvIII binding domain, a transmembrane domain, and an intracellular signaling domain comprising a stimulatory domain, and wherein said anti-EGFRvIII binding domain comprises one or more of light chain complementary determining region 1 (LC CDR1), light chain complementary determining region 2 (LC CDR2), and light chain complementary determining region 3 (LC CDR3) of any anti-EGFRvIII light chain binding domain amino acid sequence listed in Table 2 or SEQ ID NO:11, and one or more of heavy chain complementary determining region 1 (HC CDR1), heavy chain complementary determining region 2 (HC CDR2), and heavy chain complementary determining region 3 (HC CDR3) of any anti-EGFRvIII heavy chain binding domain amino acid sequence listed in Table 2 or SEQ ID NO:11.
2. The isolated nucleic acid molecule of claim 1, comprising LC CDR1, LC CDR2 and LC CDR3 of any anti-EGFRvIII light chain binding domain amino acid sequence listed in Table 2 or SEQ ID NO:11.
3. The isolated nucleic acid molecule of claim 1, comprising HC CDR1, HC CDR2, and HC CDR3 of any anti-EGFRvIII heavy chain binding domain amino acid sequence listed in Table 2 or SEQ ID NO:11.
4. The isolated nucleic acid molecule of claim 1, comprising LC CDR1, LC CDR2 and LC CDR3 of any anti-EGFRvIII light chain binding domain amino acid sequence listed in Table 2 or SEQ ID NO:11, and HC CDR1, HC CDR2, and HC CDR3 of any anti-EGFRvIII heavy chain binding domain amino acid sequence listed in Table 2 or SEQ ID NO:11.
5. The isolated nucleic acid molecule of claim 1, comprising any light chain variable region listed in Table 2 or SEQ ID NO:11.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

6. The isolated nucleic acid molecule of claim 1, comprising any heavy chain variable region listed in Table 2 or SEQ ID NO:11.
7. The isolated nucleic acid molecule of claim 1, comprising any light chain variable region listed in Table 2 or SEQ ID NO:11 and any heavy chain variable region listed Table 2 or SEQ ID NO.:11.
8. The isolated nucleic acid molecule of any of the preceding claims, wherein the EGFRvIII binding domain is a scFv.
9. The isolated nucleic acid molecule of any of the preceding claims, wherein the light chain variable region comprises an amino acid sequence having at least one, two or three modifications but not more than 30, 20 or 10 modifications of an amino acid sequence of a light chain variable region provided in Table 2 or SEQ ID NO:11, or a sequence with 95-99% identity to an amino acid sequence provided in Table 2 or SEQ ID NO:11.
10. The isolated nucleic acid molecule of any of the preceding claims, wherein the heavy chain variable region comprises an amino acid sequence having at least one, two or three modifications but not more than 30, 20 or 10 modifications of an amino acid sequence of a heavy chain variable region provided in Table 2 or SEQ ID NO:11, or a sequence with 95-99% identity to an amino acid sequence provided in Table 2 or SEQ ID NO:11.
11. The isolated nucleic acid molecule of any of the preceding claims, wherein the anti-EGFRvIII binding domain comprises a sequence selected from a group consisting of SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:80, and SEQ ID NO:86, or a sequence with 95-99% identify thereof.
12. The isolated nucleic acid molecule of any of the preceding claims, wherein the nucleic acid sequence encoding the anti-EGFRvIII binding domain comprises a sequence selected from a group consisting of SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:51, SEQ ID NO:57, SEQ

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

ID NO:63, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:81 and SEQ ID NO:98, or a sequence with 95-99% identity thereof.

13. The isolated nucleic acid molecule of any of the preceding claims, wherein the encoded CAR includes a transmembrane domain that comprises a transmembrane domain of a protein selected from the group consisting of the alpha, beta or zeta chain of the T-cell receptor, CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 and CD154.

14. The isolated nucleic acid molecule of any of the preceding claims, wherein the encoded transmembrane domain comprises a sequence of SEQ ID NO: 15.

15. The isolated nucleic acid molecule of any of the preceding claims, wherein the encoded transmembrane domain comprises an amino acid sequence comprises at least one, two or three modifications but not more than 20, 10 or 5 modifications of an amino acid sequence of SEQ ID NO:15, or a sequence with 95-99% identity to an amino acid sequence of SEQ ID NO:15.

16. The isolated nucleic acid molecule of any of the preceding claims, wherein the nucleic acid sequence encoding the transmembrane domain comprises a sequence of SEQ ID NO:8, or a sequence with 95-99% identity thereof.

17. The isolated nucleic acid molecule of any of the preceding claims, wherein the encoded anti-EGFRvIII binding domain is connected to the transmembrane domain by a hinge region.

18. The isolated nucleic acid molecule of claim 17, wherein the encoded hinge region comprises SEQ ID NO:14, or a sequence with 95-99% identity thereof.

19. The isolated nucleic acid molecule of claim 17, wherein the nucleic acid sequence encoding the hinge region comprises a sequence of SEQ ID NO:7, or a sequence with 95-99% identity thereof.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

20. The isolated nucleic acid molecule of any of the preceding claims, further comprising a sequence encoding a costimulatory domain.

21. The isolated nucleic acid molecule of claim 20, wherein the encoded costimulatory domain comprises a functional signaling domain of a protein selected from the group consisting of OX40, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), and 4-1BB (CD137).

22. The isolated nucleic acid molecule of claim 20 or 21, wherein the encoded costimulatory domain comprises a sequence of SEQ ID NO:16.

23. The isolated nucleic acid molecule of claim 20 or 21, wherein the encoded costimulatory domain comprises an amino acid sequence comprises at least one, two or three modifications (e.g., substitutions) but not more than 20, 10 or 5 modifications (e.g., substitutions) of an amino acid sequence of SEQ ID NO:16, or a sequence with 95-99% identity to an amino acid sequence of SEQ ID NO:16.

24. The isolated nucleic acid molecule of claim 20 or 21, wherein the nucleic acid sequence encoding the costimulatory domain comprises a sequence of SEQ ID NO:9, or a sequence with 95-99% identify thereof.

25. The isolated nucleic acid molecule of any of the preceding claims, further comprising a sequence encoding an intracellular signaling domain.

26. The isolated nucleic acid molecule of any of the preceding claims, wherein the encoded intracellular signaling domain comprises a functional signaling domain of 4-1BB and/or a functional signaling domain of CD3 zeta.

27. The isolated nucleic acid molecule of any of the preceding claims, wherein the encoded intracellular signaling domain comprises the sequence of SEQ ID NO: 16 and/or the sequence of SEQ ID NO: 17 or SEQ ID NO:99.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

28. The isolated nucleic acid molecule of any of the preceding claims, wherein the intracellular signaling domain comprises an amino acid sequence having at least one, two or three modifications but not more than 20, 10 or 5 modifications of an amino acid sequence of SEQ ID NO:16 and/or an amino acid sequence of SEQ ID NO:17 or SEQ ID NO:99, or a sequence with 95-99% identity to an amino acid sequence of SEQ ID NO:16 and/or an amino acid sequence of SEQ ID NO:17 or SEQ ID NO:99.
29. The isolated nucleic acid molecule of any of the preceding claims, wherein the encoded intracellular signaling domain comprises the sequence of SEQ ID NO: 16 and the sequence of SEQ ID NO: 17 or SEQ ID NO:99, wherein the sequences comprising the intracellular signaling domain are expressed in the same frame and as a single polypeptide chain.
30. The isolated nucleic acid molecule of any of the preceding claims, wherein the nucleic acid sequence encoding the intracellular signaling domain comprises a sequence of SEQ ID NO:9, or a sequence with 95-99% identity thereof, and/or a sequence of SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:100, or a sequence with 95-99% identity thereof.
31. The isolated nucleic acid molecule of any of the preceding claims, further comprising a leader sequence.
32. The isolated nucleic acid molecule of claim 31, wherein the leader sequence comprises SEQ ID NO: 13.
33. An isolated polypeptide molecule encoded by the nucleic acid molecule of any one of claims 1-32.
34. The isolated polypeptide molecule of claim 33 comprising a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:55, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:85 and SEQ ID NO:90, or a sequence with 95-99% identity thereof.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

35. The isolated polypeptide molecule of claim 34 comprising a sequence of SEQ ID NO:73, or a sequence with 95-99% identity thereof.
36. The isolated polypeptide molecule of claim 34 comprising a sequence of SEQ ID NO:79, or a sequence with 95-99% identity thereof.
37. An isolated chimeric antigen receptor (CAR) molecule comprising an anti-EGFRvIII binding domain, a transmembrane domain, and an intracellular signaling domain.
38. The isolated CAR molecule of claim 37, wherein the intracellular signaling domain comprises a costimulatory domain and/or a primary signaling domain.
39. The isolated CAR molecule of claim 37 or 38, wherein the anti-EGFRvIII binding domain comprises an antibody or antibody fragment which includes an anti-EGFRvIII binding domain.
40. The isolated CAR molecule of any of claims 37-39, wherein the anti-EGFRvIII binding domain comprises one or more light chain complementary determining region 1 (LC CDR1), light chain complementary determining region 2 (LC CDR2), and light chain complementary determining region 3 (LC CDR3) of any anti-EGFRvIII binding domain listed in Table 2 or SEQ ID NO:11, and one or more heavy chain complementary determining region 1 (HC CDR1), heavy chain complementary determining region 2 (HC CDR2), and heavy chain complementary determining region 3 (HC CDR3) of any anti-EGFRvIII binding domain listed in Table 2 or SEQ ID NO:11.
41. The isolated CAR molecule of any of claims 37-40, comprising LC CDR1, LC CDR2 and LC CDR3 of any anti-EGFRvIII light chain binding domain amino acid sequence listed in Table 2 or SEQ ID NO:11.
42. The isolated CAR molecule of any of claims 37-41, comprising HC CDR1, HC CDR2, and HC CDR3 of any anti-EGFRvIII heavy chain binding domain amino acid sequence listed in Table 2 or SEQ ID NO:11.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

43. The isolated CAR molecule of any of claims 37-42, comprising LC CDR1, LC CDR2 and LC CDR3 of any anti-EGFRvIII light chain binding domain amino acid sequence listed in Table 2 or SEQ ID NO:11, and HC CDR1, HC CDR2, and HC CDR3 of any anti-EGFRvIII heavy chain binding domain amino acid sequence listed in Table 2 or SEQ ID NO:11.

44. The isolated CAR molecule of any of claims 37-43, wherein the anti-EGFRvIII binding domain is a scFv.

45. The isolated CAR molecule of any of claims 37-44, wherein the anti-EGFRvIII binding domain comprises a light chain and a heavy chain of an amino acid sequence listed in Table 2 or SEQ ID NO:11.

46. The isolated CAR molecule of any of claims 37-45, wherein the anti-EGFRvIII binding domain comprises: a light chain variable region comprising an amino acid sequence having at least one, two or three modifications but not more than 30, 20 or 10 modifications of an amino acid sequence of a light chain variable region provided in Table 2 or SEQ ID NO:11, or a sequence with 95-99% identity with an amino acid sequence provided in Table 2 or SEQ ID NO:11.

47. The isolated CAR molecule of any of claims 37-46, wherein the anti-EGFRvIII binding domain comprises a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence having at least one, two or three modifications but not more than 30, 20 or 10 modifications of an amino acid sequence of a heavy chain variable region provided in Table 2 or SEQ ID NO:11, or a sequence with 95-99% identity to an amino acid sequence provided in Table 2 or SEQ ID NO:11.

48. The isolated CAR molecule of any of claims 37-47, wherein the anti-EGFRvIII binding domain comprises a sequence selected from a group consisting of SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:80, and SEQ ID NO:86, or a sequence with 95-99% identify thereof.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

49. The isolated CAR molecule of any of claims 37-48, further comprising a transmembrane domain of a protein selected from the group consisting of the alpha, beta or zeta chain of the T-cell receptor, CD28, CD3 epsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 and CD154.
50. The isolated CAR molecule of claim 49, wherein the transmembrane domain comprises a sequence of SEQ ID NO:15.
51. The isolated CAR molecule of claim 49 or 50, wherein the transmembrane domain comprises an amino acid sequence having at least one, two or three modifications but not more than 20, 10 or 5 modifications of an amino acid sequence of SEQ ID NO:15, or a sequence with 95-99% identity to an amino acid sequence of SEQ ID NO:15.
52. The isolated CAR molecule of any of claims 37-51, wherein the anti-EGFRvIII binding domain is connected to the transmembrane domain by a hinge region.
53. The isolated CAR molecule of claim 52, wherein the encoded hinge region comprises SEQ ID NO:14, or a sequence with 95-99% identity thereof.
54. The isolated CAR molecule of any of claims 37-53 further comprising a sequence encoding a costimulatory domain.
55. The isolated CAR molecule of claim 54, wherein the costimulatory domain comprises a functional signaling domain of a protein selected from the group consisting of OX40, CD27, CD28, CD30, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) and 4-1BB (CD137).
56. The isolated CAR molecule of claim 54 or 55, wherein the costimulatory domain comprises a sequence of SEQ ID NO:16.
57. The isolated CAR molecule of claim 54 or 55, wherein the costimulatory domain comprises an amino acid sequence having at least one, two or three modifications but not more

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

than 20, 10 or 5 modifications of an amino acid sequence of SEQ ID NO:16, or a sequence with 95-99% identity to an amino acid sequence of SEQ ID NO:16.

58. The isolated CAR molecule of any of claims 37-57, further comprising a a sequence encoding an intracellular signaling domain.

59. The isolated CAR molecule of claim 58, wherein the intracellular signaling domain comprises a functional signaling domain of 4-1BB and/or a functional signaling domain of CD3 zeta.

60. The isolated CAR molecule of claims 58 or 59, wherein the intracellular signaling domain comprises the sequence of SEQ ID NO: 16 and/or the sequence of SEQ ID NO:17.

61. The isolated CAR molecule of claims 58 or 59, wherein intracellular signaling domain comprises the sequence of SEQ ID NO: 16 and/or the sequence of SEQ ID NO:99.

62. The isolated CAR molecule of any of claims 58-61, wherein the intracellular signaling domain comprises an amino acid sequence having at least one, two or three modifications but not more than 20, 10 or 5 modifications of an amino acid sequence of SEQ ID NO:16 and/or an amino acid sequence of SEQ ID NO:17 or SEQ ID NO:99, or a sequence with 95-99% identity to an amino acid sequence of SEQ ID NO:16 and/or an amino acid sequence of SEQ ID NO:17 or SEQ ID NO:99.

63. The isolated CAR molecule of any of claims 58-61, wherein the intracellular signaling domain comprises the sequence of SEQ ID NO: 16 and the sequence of SEQ ID NO: 17 or SEQ ID NO:99, wherein the sequences comprising the intracellular signaling domain are expressed in the same frame and as a single polypeptide chain.

64. The isolated CAR molecule of any of claims 37-63, further comprising a leader sequence.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

65. The isolated CAR molecule of claim 64, wherein the leader sequence comprises an amino acid sequence of SEQ ID NO: 13, or a sequence with 95-99% identity to an amino acid sequence of SEQ ID NO:13.

66. An anti-EGFRvIII binding domain comprising one or more light chain complementary determining region 1 (LC CDR1), light chain complementary determining region 2 (LC CDR2), and light chain complementary determining region 3 (LC CDR3) of an anti-EGFRvIII binding domain in SEQ ID NO:38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 or 80, and one or more heavy chain complementary determining region 1 (HC CDR1), heavy chain complementary determining region 2 (HC CDR2), and heavy chain complementary determining region 3 (HC CDR3) of an anti-EGFRvIII binding domain in SEQ ID NO:38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 or 80.

67. The anti-EGFRvIII binding domain of claim 66, comprising LC CDR1, LC CDR2 and LC CDR3 of an anti-EGFRvIII light chain binding domain amino acid sequence in SEQ ID NO:38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 or 80.

68. The anti-EGFRvIII binding domain of claim 66 or 67, comprising HC CDR1, HC CDR2, and HC CDR3 of an anti-EGFRvIII heavy chain binding domain amino acid sequence in SEQ ID NO:38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 or 80.

69. The anti-EGFRvIII binding domain of any of claims 66-68, comprising LC CDR1, LC CDR2 and LC CDR3 of an anti-EGFRvIII light chain binding domain amino acid sequence, in SEQ ID NO:38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 or 80 and HC CDR1, HC CDR2, and HC CDR3 of an anti-EGFRvIII heavy chain binding domain amino acid sequence in SEQ ID NO:38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 or 80.

70. The anti-EGFRvIII binding domain of any of claims 66-69, comprising a light chain variable region in Table 2 and a heavy chain variable region in SEQ ID NO:38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 or 80.

71. The anti-EGFRvIII binding domain of any of claims 66-70, comprising an amino acid sequence having at least one, two or three modifications but not more than 30, 20 or 10

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

modifications of an amino acid sequence of a light chain variable region provided in SEQ ID NO:38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 or 80, or a sequence with 95-99% identity with an amino acid sequence in SEQ ID NO:38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 or 80; and/or a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence having at least one, two or three modifications but not more than 30, 20 or 10 modifications of an amino acid sequence of a heavy chain variable region provided in SEQ ID NO:38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 or 80, or a sequence with 95-99% identity to an amino acid sequence in SEQ ID NO:38, 44, 50, 56, 62, 68, 74 or 80.

72. The anti-EGFRvIII binding domain of any of claims 66-71, comprising a sequence selected from a group consisting of SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:80, and SEQ ID NO:86, or a sequence with 95-99% identity thereof.

73. A vector comprising a nucleic acid molecule encoding a CAR of any of the preceding claims.

74. The vector of claim 73, where in the vector is selected from the group consisting of a DNA, a RNA, a plasmid, a lentivirus vector, adenoviral vector, or a retrovirus vector.

75. The vector of claim 73 or 74, further comprising a promoter.

76. The vector of claim 75, wherein the promoter is an EF-1 promoter.

77. The vector of claim 76, wherein the EF-1 promoter comprises a sequence of SEQ ID NO: 97.

78. The vector of any of claims 73-77, wherein the vector is an in vitro transcribed vector.

79. The vector of any of claims 73-78, wherein the nucleic acid sequence in the vector further comprises a poly(A) tail.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

80. The vector of any of claims 73-79, wherein the nucleic acid sequence in the vector further comprises a 3'UTR..
81. A cell comprising the vector of any of claims 73-80.
82. The cell of claim 81, wherein the cell is a T cell.
83. The cell of claim 82, wherein the T cell is a CD8+ T cell.
84. The cell of claim 81 or 82, wherein the cell is a human cell.
85. A method of making a cell comprising transducing a T cell with a vector of claims 73-80.
86. A method of generating a population of RNA-engineered cells comprising introducing an in vitro transcribed RNA or synthetic RNA into a cell, where the RNA comprises a nucleic acid encoding a CAR molecule described herein.
87. A method of providing an anti-tumor immunity in a mammal comprising administering to the mammal an effective amount of a cell expressing a CAR molecule of claim 37-65.
88. The method of claim 87, wherein the cell is an autologous T cell.
89. The method of claim 87 or 88, wherein the cell is an allogeneic T cell.
90. The method of any of claims 87-89, wherein the mammal is a human.
91. A method of treating a mammal having a disease associated with expression of EGFRvIII comprising administering to the mammal an effective amount of cells expressing a CAR molecule of any of claims 37-65.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

92. The method of claim 91, wherein the disease associated with EGFRvIII is a glioblastoma.
93. The method of claim 91 or 92, wherein the disease associated with EGFRvIII is a cancer selected from the group consisting of glioblastoma multiforme (GBM), anaplastic astrocytoma, giant cell glioblastoma, gliosarcoma, anaplastic oligodendroglioma, anaplastic ependymoma, choroid plexus carcinoma, anaplastic ganglioglioma, pineoblastoma, medulloepithelioma, ependymblastoma, medulloblastoma, supratentorial primitive neuroectodermal tumor, atypical teratoid/rhabdoid tumor, lung cancer (e.g., non-small cell lung carcinomas) breast, prostate, ovarian, colorectal and bladder carcinoma and any combination thereof, and metastases of any of the cancers.
94. The method of any of claims 91-93, wherein the cells expressing a CAR molecule are administered in combination with an agent that increases the efficacy of a cell expressing a CAR molecule.
95. The method of any of claims 91-94, wherein the cells expressing a CAR molecule are administered in combination with an agent that ameliorates one or more side effects associated with administration of a cell expressing a CAR molecule.
96. The method of any of claims 91-95, wherein the cells expressing a CAR molecule are administered in combination with an agent that treats the disease associated with EGFRvIII.
97. The isolated nucleic acid molecule of any of claims 1-32, the isolated polypeptide molecule of any of claims 33-36, the isolated CAR of any of claims 37-65, the anti-EGFRvIII binding domain of any of claims 66-72, the vector of any of claims 73-80 or the cell of any of claims 81-84 for use as a medicament.
98. The isolated nucleic acid molecule of any of claims 1-32, the isolated polypeptide molecule of any of claims 33-36, the isolated CAR of any of claims 37-65, the anti-EGFRvIII binding domain of any of claims 66-72, the vector of any of claims 73-80 or the cell of any of claims 81-84 for use in the treatment of a disease expressing EGFRvIII.

(57) **Abstract:** The invention provides compositions and methods for treating diseases associated with expression of EGFRvIII. The invention also relates to chimeric antigen receptor (CAR) specific to EGFRvIII, vectors encoding the same, and recombinant T cells comprising the anti- EGFRvIII CAR. The invention also includes methods of administering a genetically modified T cell expressing a CAR that comprises an anti-EGFRvIII binding domain.

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

1/23

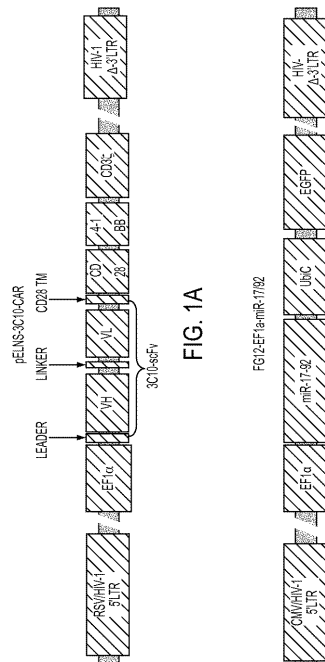


FIG. 1A

FIG. 1B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

2/23

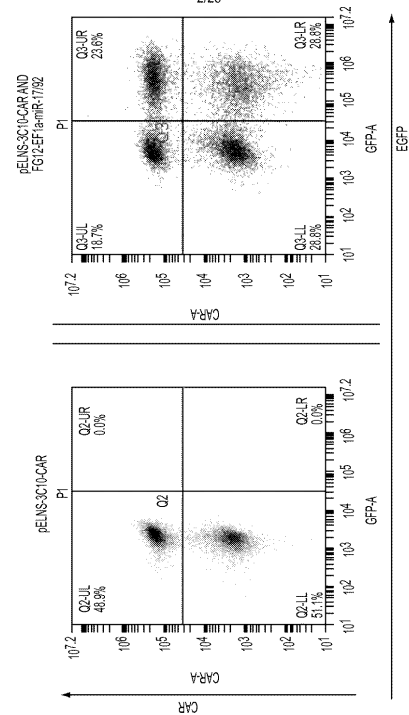


FIG. 2A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2014/130657 PCT/US2014/017364

3/23

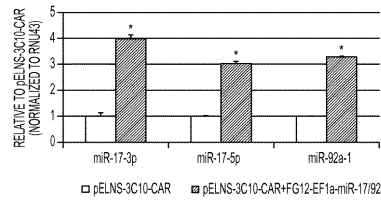


FIG. 2B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2014/130657 PCT/US2014/017364

4/23

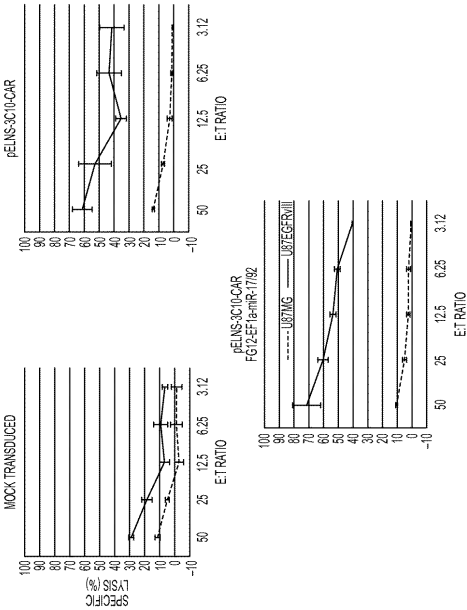


FIG. 2C

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2014/130657 PCT/US2014/017364

5/23

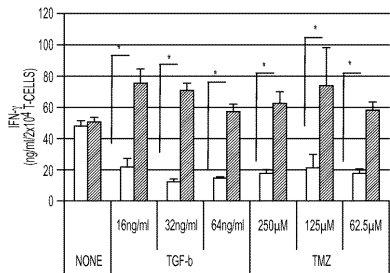


FIG. 3A

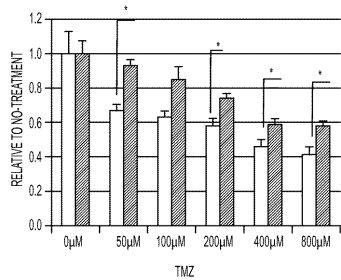


FIG. 3B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2014/130657 PCT/US2014/017364

6/23

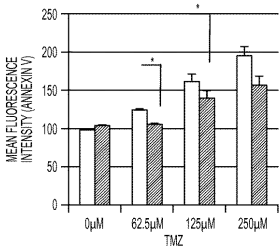
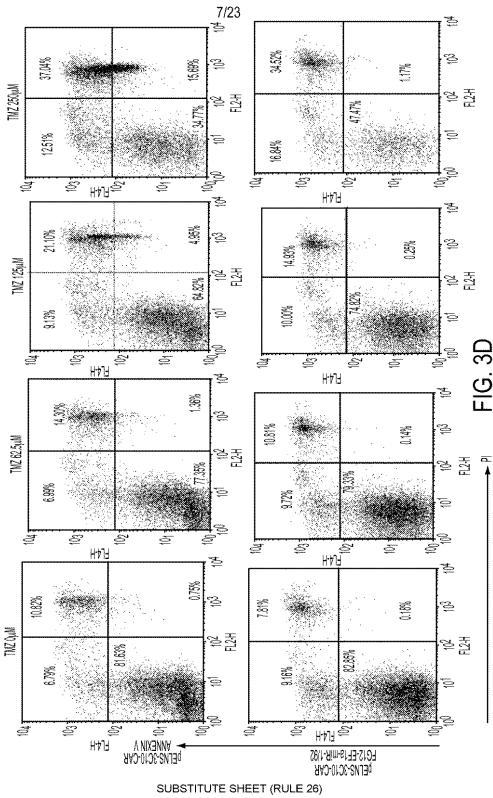


FIG. 3C

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

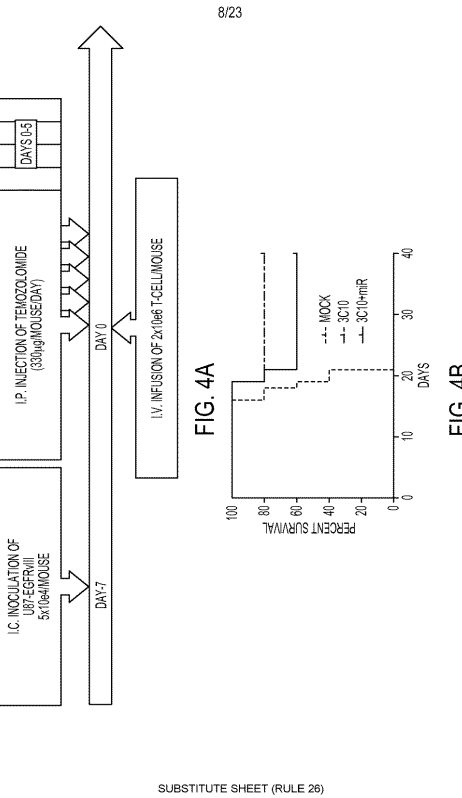
WO 2014/130657

PCT/US2014/017364



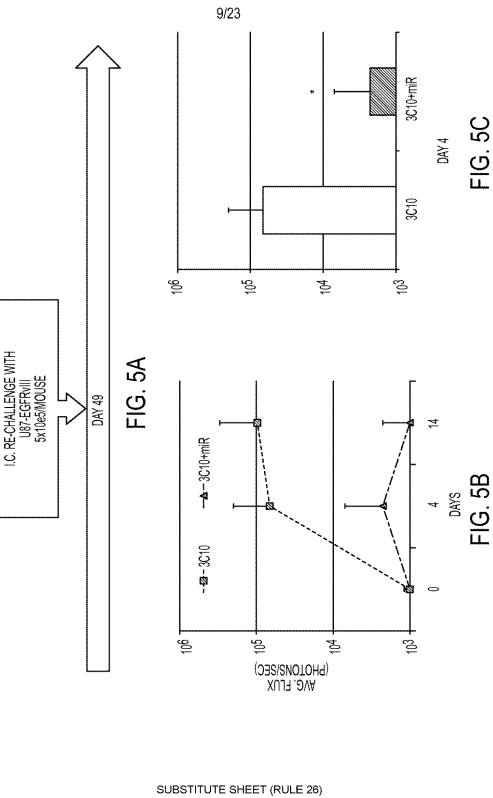
WO 2014/130657

PCT/US2014/017364



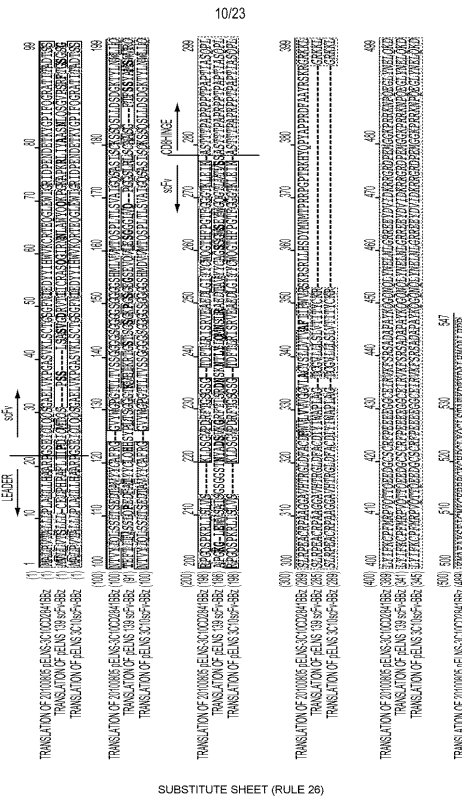
WO 2014/130657

PCT/US2014/017364



WO 2014/130657

PCT/US2014/017364



WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

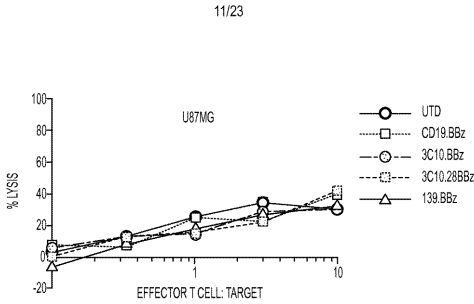


FIG. 7A

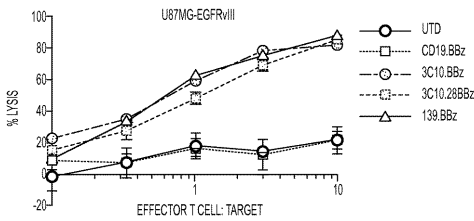


FIG. 7B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

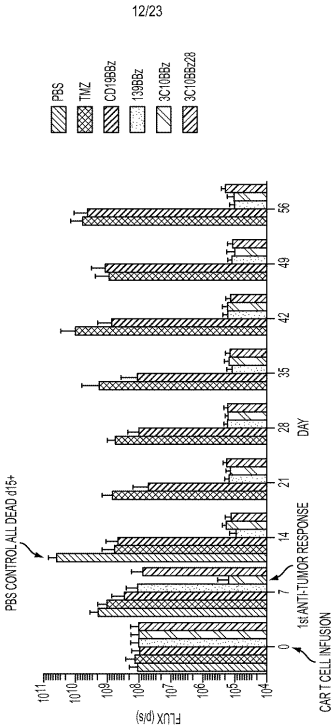


FIG. 8

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

PROTEIN/CDNA	COR H1	COR H2
ASBT NUMBER		
MURNE CD19	ENGGTTVYVPIIAC	
MHT 19H1	WVKAETGCTGTCGIDP	
MHT 54H1	WVKAETGCTGTCGIDP	
PROTEIN/CDNA	COR H1	COR H2
ASBT NUMBER		
MURNE CD19	YVMPGGTLLTVSS	
MHT 19H1	YVMPGGTLLTVSS	
MHT 54H1	YVMPGGTLLTVSS	
PROTEIN/CDNA	COR H1	COR H2
ASBT NUMBER		
MURNE CD19	YVMPGGTLLTVSS	
MHT 19H1	YVMPGGTLLTVSS	
MHT 54H1	YVMPGGTLLTVSS	

FIG. 9

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

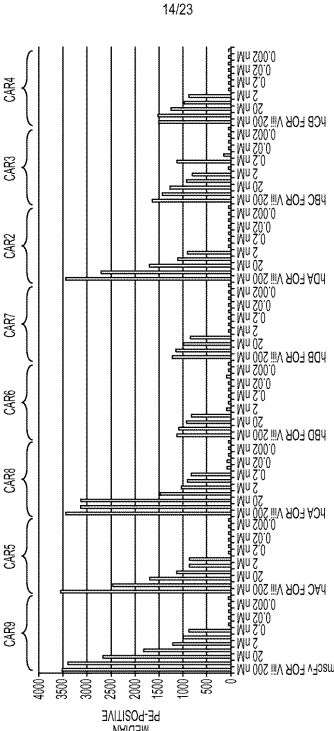
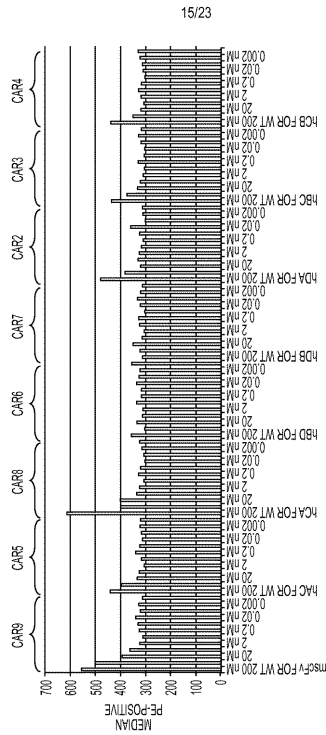


FIG. 10

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2014/130657

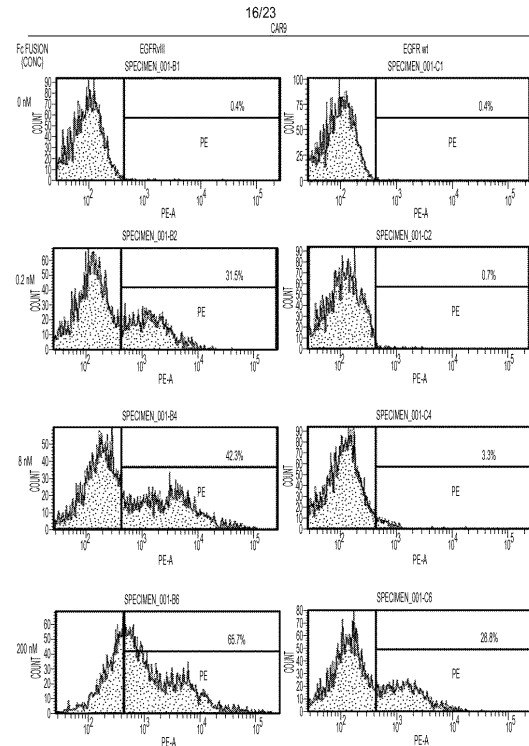
PCT/US2014/017364



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2014/130657

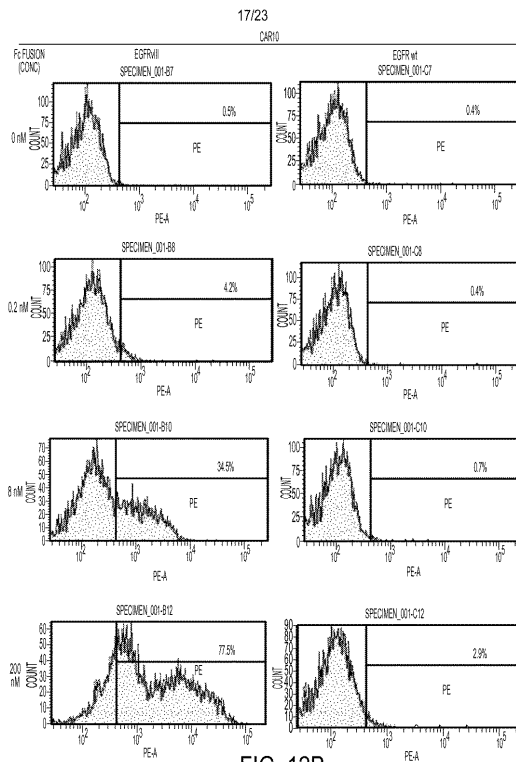
PCT/US2014/017364



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2014/130657

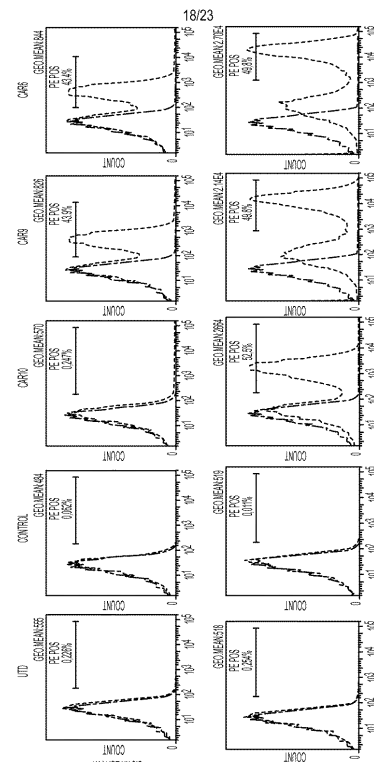
PCT/US2014/017364



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

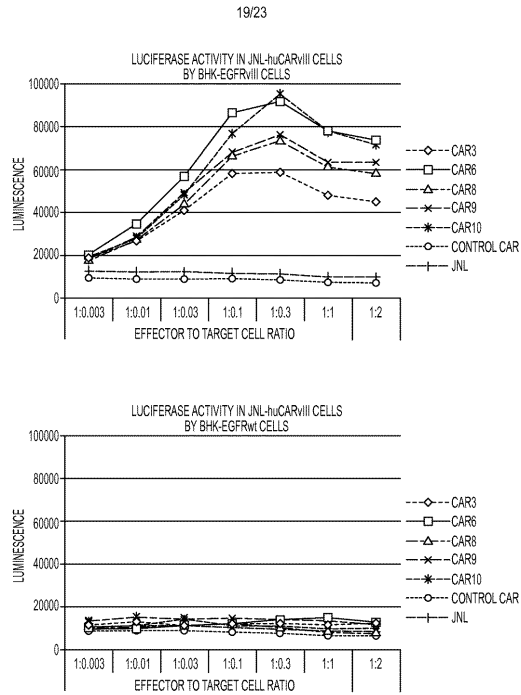


FIG. 14

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

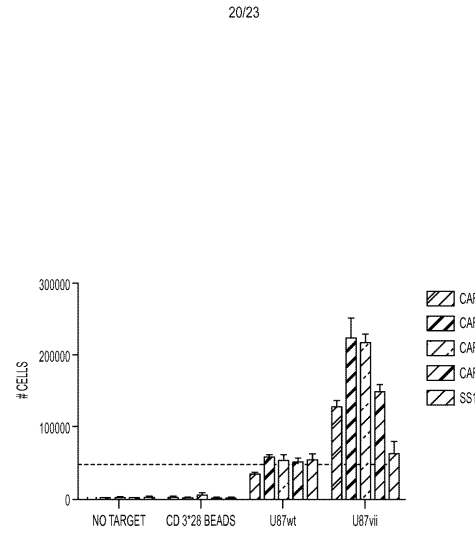


FIG. 15

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

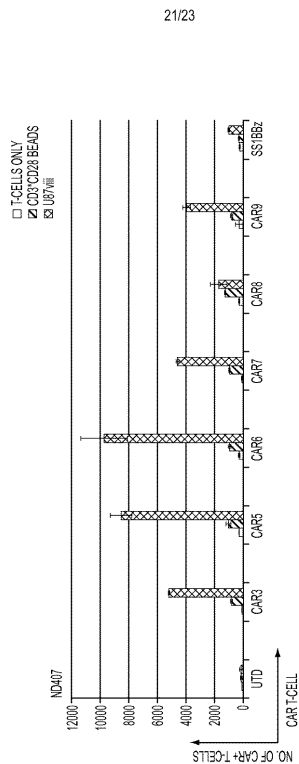


FIG. 16

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

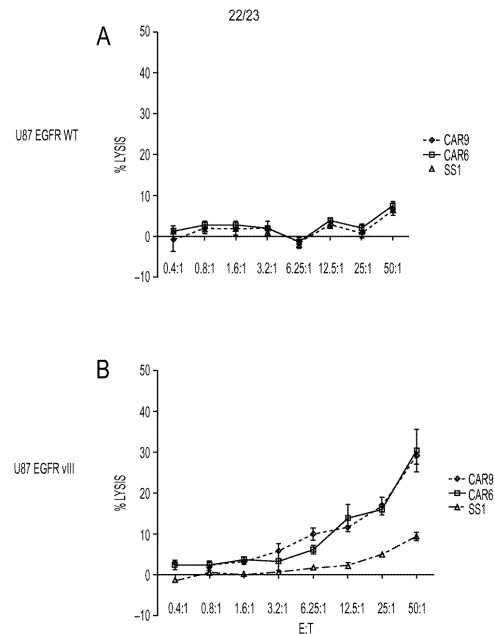


FIG. 17

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

【配列表】

2020062017000002.app

WO 2014/130657

PCT/US2014/017364

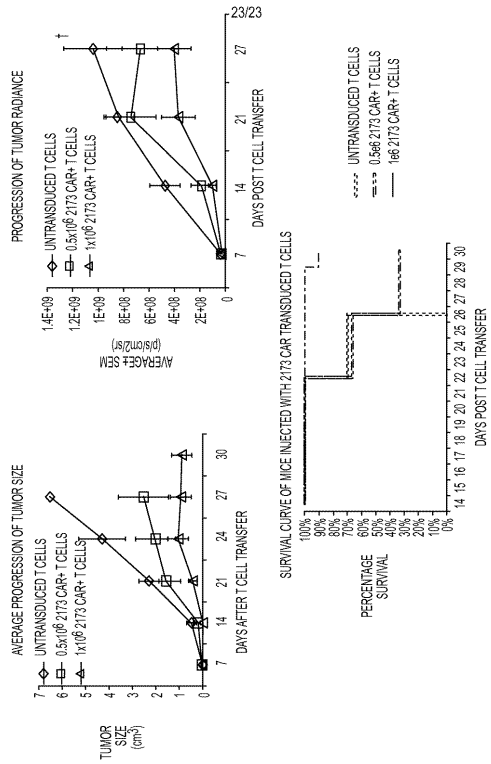


FIG. 18

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)