

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7282521号

(P7282521)

(45)発行日 令和5年5月29日(2023.5.29)

(24)登録日 令和5年5月19日(2023.5.19)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 35/17 (2015.01)

A 6 1 K 35/17

Z N A

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 35/02 (2006.01)

A 6 1 P 35/02

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00

1 2 1

請求項の数 17 (全56頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-553142(P2018-553142)

(86)(22)出願日 平成29年4月7日(2017.4.7)

(65)公表番号 特表2019-513764(P2019-513764 A)

(43)公表日 令和1年5月30日(2019.5.30)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/026618

(87)国際公開番号 WO2017/177149

(87)国際公開日 平成29年10月12日(2017.10.12)

審査請求日 令和2年4月6日(2020.4.6)

(31)優先権主張番号 62/320,183

(32)優先日 平成28年4月8日(2016.4.8)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/323,971

(32)優先日 平成28年4月18日(2016.4.18)

最終頁に続く

(73)特許権者 505194066

パーデュー・リサーチ・ファウンデーション

PURDUE RESEARCH FOUNDATION

アメリカ合衆国47906インディアナ州ウェスト・ラファイエット、ニューマン・ロード1801番、パーデュー・テクノロジー・センター・エアロスペース、オフィス・オブ・テクノロジー・コマニゼーション

(73)特許権者 508347801

エンドサイト・インコーポレイテッド

ENDOCYTE, INC.

アメリカ合衆国47906インディアナ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 CAR T細胞療法のための方法および組成物

(57)【特許請求の範囲】

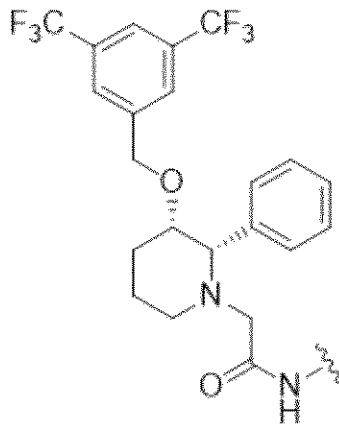
【請求項1】

NK-1受容体発現がんを治療するためのキメラ抗原受容体(CAR)T細胞組成物であって、

該CAR T細胞は、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)に対するCARを含み、投与にあたって、

第1の複合体またはその薬学的に許容される塩と共に投与され、その第1の複合体はリンカーによってFITCに連結しているNK-1受容体結合リガンド(NK1RL)を含み、NK1RLは式：

【化 1】



10

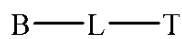
を含むことを特徴とする、CAR T細胞組成物。

【請求項 2】

NK-1受容体発現がんを治療するためのキメラ抗原受容体 (CAR) T細胞組成物であって、
 該CAR T細胞は、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) に対するCARを含み、
 投与にあたって、

第 1 の複合体またはその薬学的に許容される塩と共に投与され、その第 1 の複合体は式：

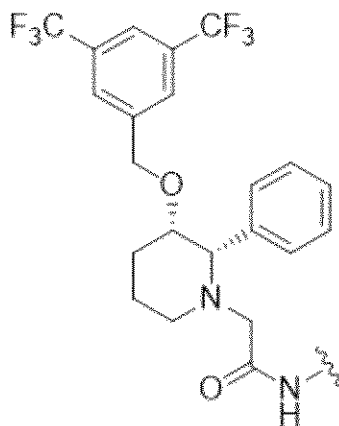
【化 2】



20

[式中、B は式：

【化 3】

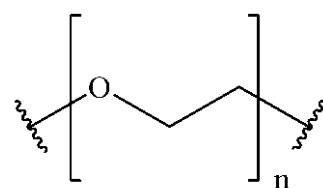


30

を含み、

L は式：

【化 4】



40

(式中、 n は 0 ~ 200 の整数である) であり、

T は FITC である]

を有することを特徴とする、CAR T細胞組成物。

【請求項 3】

n が 0 ~ 150、0 ~ 110、0 ~ 20、15 ~ 20、または 15 ~ 110 の整数である

50

請求項 2 の CAR T 細胞組成物。

【請求項 4】

請求項 1 ～ 3 のいずれかの CAR T 細胞組成物であって、

第 2 の複合体またはその薬学的に許容される塩と共に投与され、その第 2 の複合体は葉酸および FITC を含むことを特徴とする、CAR T 細胞組成物。

【請求項 5】

CAR T 細胞が配列番号：1 または配列番号：3 に対して少なくとも約 90 %、約 95 %、約 98 %、または約 100 % の同一性を有する核酸を含む、請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の CAR T 細胞組成物。

【請求項 6】

CAR T 細胞が配列番号：2 に対して少なくとも約 90 %、約 95 %、約 98 %、または約 100 % の同一性を有するポリペプチドを含む、請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の CAR T 細胞組成物。

【請求項 7】

CAR T 細胞が配列番号：2 に対して少なくとも約 90 %、約 95 %、約 98 %、または約 100 % の同一性を有するキメラ抗原受容体ポリペプチドを含む、請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の CAR T 細胞組成物。

【請求項 8】

CAR T 細胞が配列番号：1 に対して少なくとも約 90 %、約 95 %、約 98 %、または約 100 % の同一性を有する核酸を含むベクターを含む、請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載の CAR T 細胞組成物。

【請求項 9】

ベクターが、レンチウイルスベクターである、請求項 8 に記載の CAR T 細胞組成物。

【請求項 10】

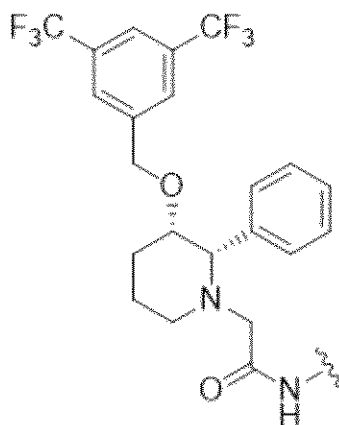
請求項 1 ～ 9 のいずれかに記載の CAR T 細胞組成物を含む、がんを治療するための医薬組成物。

【請求項 11】

CAR T 細胞組成物と少なくとも 2 つの異なるタイプのブリッジを含む組み合わせ医薬であって、

該ブリッジが標的部分に連結している低分子リガンドを含み、ブリッジの少なくとも 1 つにあるリガンドが式：

【化 5】



を含む NK-1R リガンドであり、別のブリッジにあるリガンドが葉酸、DUPA、および CAIX リガンドから選択され、ブリッジ分子中の標的部分が同じである、組み合わせ医薬。

【請求項 12】

標的化部分が FITC である、請求項 11 に記載の組み合わせ医薬。

【請求項 13】

がんを治療するための CAR T 細胞を含む医薬組成物であって、請求項 11 に記載の組み

10

20

30

40

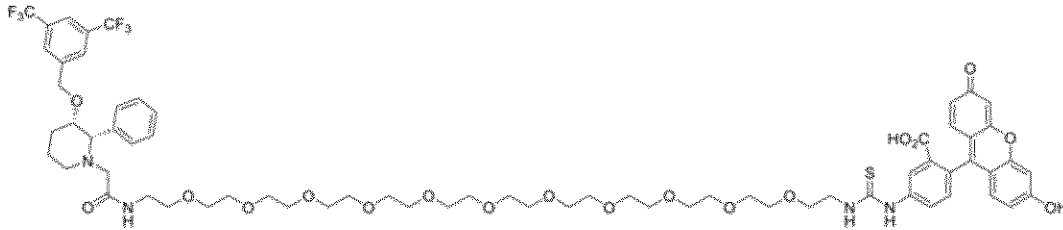
50

合わせ医薬と共に投与されることを特徴とし、そこでの一方のブリッジにあるリガンドがNK-1Rリガンドであり、別のブリッジにあるリガンドが葉酸であり、標的部位がFITCであることを特徴とする、医薬組成物。

【請求項 1 4】

第 1 の複合体が

【化 6】



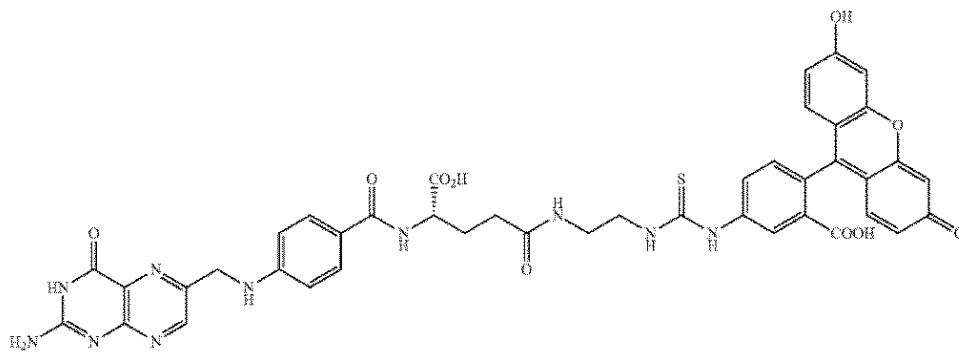
10

である、請求項 1 ~ 9 のいずれかの CAR T 細胞組成物。

【請求項 1 5】

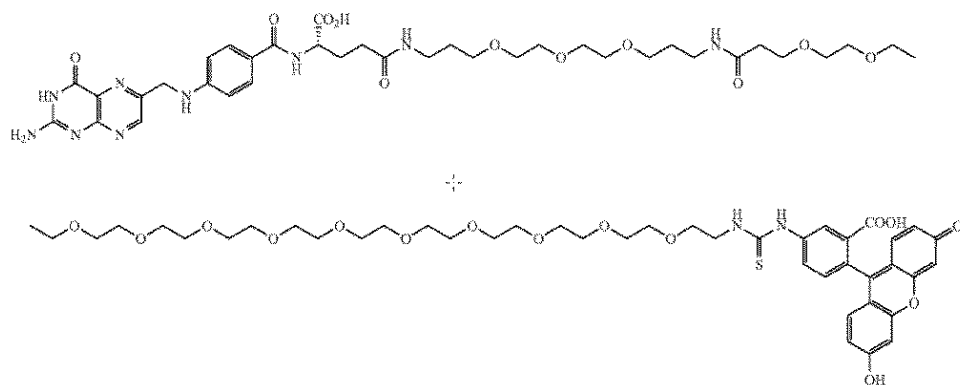
第 2 の複合体が

【化 7】



20

【化 8】

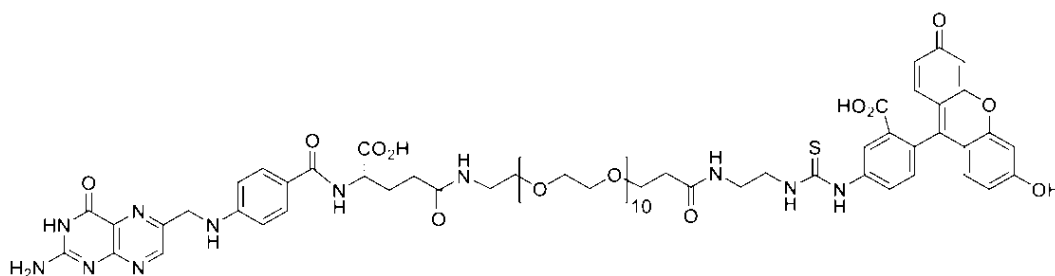


30

40

50

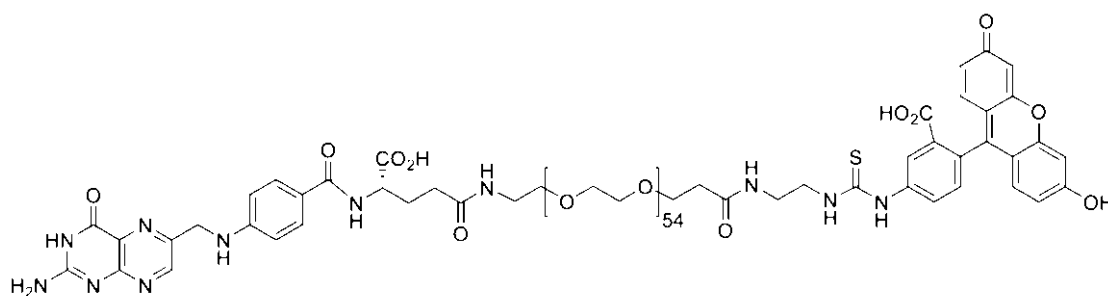
【化 9】



10

または

【化 10】



20

である請求項 4 ～ 9、および 14 のいずれかの CAR T 細胞組成物。

【請求項 16】

リンカーが、ポリエチレングリコール (PEG)、ポリプロリン、親水性アミノ酸、糖、非天然型ペプチドグリカン、ポリビニルピロリドン、および/またはプルロニック (登録商標) F-127 を含む、請求項 1 ～ 9、および 15 のいずれかの CAR T 細胞組成物。

【請求項 17】

リンカーが PEG を含む、請求項 16 の CAR T 細胞組成物。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、米国特許法 119 条 (e) の下に、2016 年 4 月 8 日出願の米国仮出願第 62/320,183 号および 2016 年 4 月 18 日出願の米国仮出願第 62/323,971 号に対する優先権を主張する。両出願の開示の全体は、参照することにより本出願に包含される。

技術分野

本開示は、CAR T 細胞を患者に投与すること、およびリンカーによって標的化部分に連結された小分子を含む組成物を患者に投与することによって、がんを有する患者を治療する方法に関する。本開示はまた、このような方法において使用するための組成物に関する。

40

【背景技術】

【0002】

リンパ球 (たとえば、T 細胞) の患者への養子移入に基づく免疫療法は、がんおよび他の疾患の治療における価値ある治療法である。リンパ球の養子移入に基づく免疫療法の開発において、多くの重要な進歩がなされてきた。多くの異なるタイプの免疫療法剤の中で、開発されている免疫治療剤のうち最も有望なもの 1 つは、T 細胞発現キメラ抗原受容体 (CAR T 細胞) である。キメラ抗原受容体 (CAR) は、特定の抗原、たとえば、腫瘍抗原を標的とするように設計された遺伝子操作された受容体である。この標的化は、たとえば、CAR を発現する CAR T 細胞が特定の腫瘍抗原を介して腫瘍を標的化し、殺すことができるように、

50

腫瘍に対する細胞傷害性をもたらす。

【 0 0 0 3 】

第一世代のCARは、認識領域、たとえば、腫瘍によって発現された抗原への認識および結合のための抗体由来の一本可変領域フラグメント(scFv)、および活性化シグナル伝達ドメインから構成され、たとえば、T細胞のCD3 鎖は、CARにおいてT細胞活性化シグナルとして働くことができる。CAR T細胞はインビトロで陽性結果を示したが、臨床試験において疾患(たとえば、がん)を排除することには限界があった。1つの問題は、インビボで活性化を延長し、CAR T細胞集団を拡大することができないことであった。

【 0 0 0 4 】

この問題に対処するために、インビボでのT細胞の長期活性化を達成するために、第二世代のCARに共刺激ドメイン(たとえば、CD137、CD28またはCD134)が包含されている。共刺激ドメインの付加は、CARを含むT細胞のインビボ増殖および生存を増強し、初期臨床データは、そのような構築物が、がんのような疾患の治療において有望な治療剤であることを示した。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 5 】

CAR T細胞療法において改善がなされているが、いくつかの問題が残っている。第1に、CAR T細胞によって標的化された抗原(たとえば、腫瘍関連抗原)を発現する正常細胞に起因する「オフターゲット」毒性が生じうる。第2に、調節されていないCAR T細胞活性化は、CAR T細胞による疾患細胞(たとえば、がん細胞)の迅速かつ制御されない排除が、腫瘍が治療されている場合は腫瘍溶解症候群、またはサイトカイン放出症候群(CRS)と呼ばれる代謝障害の集合を誘導する場合に見出される可能性があり、これは患者にとって致命的でありうる。腫瘍溶解症候群およびCRSは、容易に調節することができず、制御不能に活性化される、CAR T細胞の投与に起因しうる。したがって、CAR T細胞は、がんのような疾患の治療における道具として大いに有望であるが、オフターゲット毒性の減少を提供し、CAR T細胞活性化のより正確な制御を提供する追加のCAR T細胞療法が必要とされる。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 6 】

発明の概略

本発明者らは、オフターゲット毒性を減少させ、CAR T細胞活性化をより正確に制御する、CAR T細胞治療における重要な進歩を提供する方法を発見した。本明細書に記載されるさまざまな実施態様において、リンカーによって標的化部分に連結された小分子リガンドは、がんとCAR T細胞との間のブリッジとして使用され、がんの改善のためにCAR T細胞をがんに誘導する。1つの実施態様では、「小分子リガンド」は、たとえば、葉酸、DUPA、NK-1Rリガンド、CAIXリガンド、ガンマグルタミルトランスぺプチダーゼのリガンド、またはCCK2Rリガンドであり得、その各々は、がん細胞に特異的に結合する小分子リガンドである(すなわち、これらのリガンドの受容体は、正常組織と比較して過剰発現する)。

【 0 0 0 7 】

1つの実施態様では、「小分子リガンド」は、CAR T細胞によって発現されるCARに結合する「標的化部分」に連結される。さまざまな実施態様では、「標的化部分」は、たとえば、2,4-ジニトロフェノール(DNP)、2,4,6-トリニトロフェノール(TNP)、ピオチン、ジゴキシゲニン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、NHS-フルオレセイン、ペンタフルオロフェニルエステル(PFP)、テトラフルオロフェニルエステル(TFP)、ノッティン、センチリン、およびDARPinから選択されうる。

【 0 0 0 8 】

「標的化部分」は、CAR T細胞によって発現される遺伝子操作されたCARの認識領域に結合する。したがって、CARの認識領域(たとえば、抗体の一本可変領域フラグメント(scF

10

20

30

40

50

v))は、「標的化部分」に向けられる。したがって、リンカーによって標的化部分に連結された小分子リガンドは、がんとCAR T細胞との間の「ブリッジ」として作用し、がんの改善のためにCAR T細胞をがんに向かわせる。

【 0 0 0 9 】

例示的な1つの実施態様では、本発明者らは、リンカー(すなわち、ブリッジ)によって標的化部分に連結された小分子リガンドの用量を変化させることが、インビボでCRSを制御する能力をもたらしうることを発見した。もう1つの実施態様では、本発明者らは、リンカー(すなわち、ブリッジ)によって標的化部分に連結された小分子リガンドの用量を変化させることが、CAR T細胞活性化時にインビボでCRSを制御する能力をもたらしうることを発見した。さらにもう1つの実施態様では、これらの方法の組み合わせは、インビボでのCAR T細胞活性化およびサイトカイン放出の正確な制御に使用することができる。もう1つの実施態様では、小分子リガンドのその受容体に対する親和性は、CAR T細胞活性化を制御するため、または正常組織に対する毒性を回避するための特異性を達成するために変更することができる。

10

【 0 0 1 0 】

1つの実施態様では、がんの治療方法が提供される。この方法は、i)化合物またはその薬学的に許容される塩の第1の用量を患者に投与すること(ここで、化合物はリンカーによって標的化部分に連結された小分子リガンドを含む)；ii)CAR T細胞組成物を患者に投与すること(ここで、CAR T細胞は、標的化部分に向けられたCARを含む)；iii)化合物またはその薬学的に許容される塩の第2の用量を患者に投与すること(ここで、第2の用量は第1の用量とは異なる)；がんを改善するために患者を治療すること；を含む。

20

【 0 0 1 1 】

もう1つの実施態様では、がんの治療方法が提供される。この方法は、i)第1の複合体またはその薬学的に許容される塩を患者に投与すること；ii)CAR T細胞組成物を患者に投与すること(ここで、CAR T細胞は、標的化部分に向けられたCARを含む)；iii)第2の複合体またはその薬学的に許容される塩を患者に投与すること(ここで第1および第2の複合体は、それぞれ、リンカーによって標的化部分に連結された小分子リガンドを含み、第1の複合体および第2の複合体は異なる)；およびiv)がんを改善するために患者を治療すること；を含む。

【 0 0 1 2 】

30

さらにもう1つの実施態様では、がんの治療方法が提供される。この方法は、i)第1の複合体またはその薬学的に許容される塩の第1の用量を患者に投与すること；ii)CAR T細胞組成物を患者に投与すること(ここで、CAR T細胞は、標的化部分に向けられたCARを含む)；iii)第2の複合体またはその薬学的に許容される塩の第2の用量を患者に投与すること(ここで第1の複合体および第2の複合体は、それぞれ、標的化部分に連結された小分子リガンドを含み、第1の複合体および第2の複合体は異なり、第1の用量および第2の用量は異なる)；およびiv)がんを改善するために患者を治療すること；を含む。

【 0 0 1 3 】

さらにもう1つの例示的实施態様では、配列番号：1を含む核酸を含むCAR T細胞が提供される。もう1つの態様では、配列番号：2を含むポリペプチドを含むCAR T細胞が提供される。もう1つの実施態様では、配列番号：1を含み、キメラ抗原受容体をコードする単離された核酸が提供される。さらにもう1つの実施態様では、配列番号：2を含むキメラ抗原受容体ポリペプチドが提供される。もう1つの態様では、配列番号：1を含むベクターが提供される。もう1つの例示的实施態様では、レンチウイルスベクターである、配列番号：1を含むベクターが提供される。

40

【 0 0 1 4 】

いくつかの実施態様は、以下の列举された項目によっても記述される：

1. がんの治療方法であって、

i)化合物またはその薬学的に許容される塩の第1の用量を患者に投与すること(ここで、化合物はリンカーによって標的化部分に連結された小分子リガンドを含む)；

50

ii) CAR T細胞組成物を患者に投与すること(ここで、CAR T細胞は、標的化部分に向けられたCARを含む)；

ii) 化合物またはその薬学的に許容される塩の第2の用量を患者に投与すること(ここで、第2の用量は第1の用量とは異なる)；および

iv) がんを改善するために患者を治療すること；を含む方法。

2. がんの治療方法であって、

i) 第1の複合体またはその薬学的に許容される塩を患者に投与すること；

ii) CAR T細胞組成物を患者に投与すること(ここで、CAR T細胞は、標的化部分に向けられたCARを含む)；

iii) 第2の複合体またはその薬学的に許容される塩を患者に投与すること(ここで第1および第2の複合体は、それぞれ、リンカーによって標的化部分に連結された小分子リガンドを含み、第1の複合体および第2の複合体は異なる)；および

iv) がんを改善するために患者を治療すること；を含む方法。

3. がんの治療方法であって、

i) 第1の複合体またはその薬学的に許容される塩の第1の用量を患者に投与すること；

ii) CAR T細胞組成物を患者に投与すること(ここで、CAR T細胞は、標的化部分に向けられたCARを含む)；

iii) 第2の複合体またはその薬学的に許容される塩の第2の用量を患者に投与すること(ここで第1の複合体および第2の複合体は、それぞれ、リンカーによって標的化部分に連結された小分子リガンドを含み、第1の複合体および第2の複合体は異なり、第1の用量および第2の用量は異なる)；および

iv) がんを改善するために患者を治療すること；を含む方法。

4. 第1の複合体またはその薬学的に許容される塩中のリンカー、および第2の複合体またはその薬学的に許容される塩中のリンカーが異なる、項目2または3に記載の方法。

5. 第1の複合体またはその薬学的に許容される塩中のリンカー、および第2の複合体またはその薬学的に許容される塩中のリンカーが同じである、項目2または3に記載の方法。

6. 第1の複合体またはその薬学的に許容される塩中のリガンド、および第2の複合体またはその薬学的に許容される塩中のリガンドが異なる、項目2～5のいずれか1つに記載の方法。

7. 第1の複合体またはその薬学的に許容される塩中のリガンド、および第2の複合体またはその薬学的に許容される塩中のリガンドが同じである、項目2～5のいずれか1つに記載の方法。

8. 第1の複合体またはその薬学的に許容される塩中の標的化部分、および第2の複合体またはその薬学的に許容される塩中の標的化部分が異なる、項目2～7のいずれか1つに記載の方法。

9. 第1の複合体またはその薬学的に許容される塩中の標的化部分、および第2の複合体またはその薬学的に許容される塩中の標的化部分が同じである、項目2～7のいずれか1つに記載の方法。

10. リガンドが、葉酸、DUPA、NK-1Rリガンド、CAIXリガンド、ガンマグルタミルトランスペプチダーゼのリガンド、およびCCK2Rリガンドから選択される、項目1～9のいずれか1つに記載の方法。

11. リガンドが葉酸である、項目10に記載の方法。

12. リガンドがNK-1Rリガンドである、項目10に記載の方法。

13. リガンドがDUPAである、項目10に記載の方法。

14. リガンドがCCK2Rリガンドである、項目10に記載の方法。

15. リガンドがガンマグルタミルトランスペプチダーゼのリガンドである、項目10に記載の方法。

16. 標的化部分が、2,4-ジニトロフェノール(DNP)、2,4,6-トリニトロフェノール(TNP)、ピオチン、ジゴキシゲニン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、NHS-フルオレセイン、ペンタフルオロフェニルエステル(PFP)、テトラフルオロフ

10

20

30

40

50

エニルエステル(TFP)、ノッティン、センチリン、およびDARPinから選択される、項目1～15のいずれか1つに記載の方法。

17. 標的化部分がFITCである、項目16に記載の方法。

18. 標的化部分がDNPである、項目16に記載の方法。

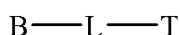
19. 標的化部分がTNPである、項目16に記載の方法。

20. リンカーが、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロリン、親水性アミノ酸、糖、非天然ペプチドグリカン、ポリビニルピロリドン、および/またはプルロニックF-127を含む、項目1～19のいずれか1つに記載の方法。

21. リンカーがPEGを含む、項目20に記載の方法。

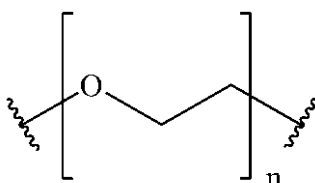
22. 化合物またはその薬学的に許容される塩、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、または第2の複合体またはその薬学的に許容される塩が、式：

【化1】



[式中、Bは小分子リガンドを表し、Lはリンカーを表し、およびTは標的化部分を表し、ここで、Lは、式：

【化2】



(式中、nは、0～200の整数である)

で示される構造を含む]

で示される構造を有する、項目1～21のいずれか1つに記載の方法。

23. nが、0～150の整数である、項目22に記載の方法。

24. nが、0～110の整数である、項目22に記載の方法。

25. nが、0～20の整数である、項目22に記載の方法。

26. nが、15～20の整数である、項目22に記載の方法。

27. nが、15～110の整数である、項目22に記載の方法。

28. リンカーがPEGを含み、標的化部分がFITCまたはその薬学的に許容される塩である、項目1～27のいずれか1つに記載の方法。

29. 化合物またはその薬学的に許容される塩、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、または第2の複合体またはその薬学的に許容される塩の用量が、患者の体重について約10nmol/kg～約3000nmol/kgである、項目1～28のいずれか1つに記載の方法。

30. 化合物またはその薬学的に許容される塩、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、または第2の複合体またはその薬学的に許容される塩の用量が、患者の体重について約50nmol/kg～約2000nmol/kgである、項目1～29のいずれか1つに記載の方法。

31. 化合物またはその薬学的に許容される塩、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、または第2の複合体またはその薬学的に許容される塩の用量が、患者の体重について約100nmol/kg～約1000nmol/kgである、項目1～30のいずれか1つに記載の方法。

32. 化合物またはその薬学的に許容される塩、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、または第2の複合体またはその薬学的に許容される塩の用量が、患者の体重について約100nmol/kg～約600nmol/kgである、項目1～31のいずれか1つに記載の方法。

33. 化合物またはその薬学的に許容される塩、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、または第2の複合体またはその薬学的に許容される塩の用量が、患者の体重について約200nmol/kg～約500nmol/kgである、項目1～32のいずれか1つに記載の方法。

34. 化合物またはその薬学的に許容される塩、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、または第2の複合体またはその薬学的に許容される塩の用量が、患者の体重につ

いて約250nmol/kg～約500nmol/kgである、項目1～33のいずれか1つに記載の方法。

35．がんが、肺がん(cancer)、骨がん、膵がん、皮膚がん、頭部がん、頸部がん、皮膚黒色腫、眼内黒色腫、子宮がん、卵巣がん、子宮内膜がん、直腸がん、胃がん、結腸がん、乳がん、トリプルネガティブ乳がん、子宮頸管の癌(carcinoma)、子宮内膜の癌、子宮頸部の癌、膣の癌、外陰部の癌、ホジキン病、食道のがん、小腸のがん、内分泌系のがん、甲状腺のがん、副甲状腺のがん、非小細胞肺がん、副腎のがん、軟部組織の肉腫、尿道のがん、前立腺がん、慢性白血病、急性白血病、リンパ球性リンパ腫、胸膜中皮腫、膀胱のがん、バーキットリンパ腫、尿管のがん、腎臓のがん、腎細胞癌、腎盂の癌、中枢神経系(CNS)新生物、原発性CNSリンパ腫、脊髄軸腫瘍、脳幹グリオーマ、下垂体腺腫、胃食道接合部の腺癌から選択される、項目1～34のいずれか1つに記載の方法。

10

36．がんが、葉酸受容体を発現しているがんである、項目1～11または16～35のいずれか1つに記載の方法。

37．がんが、子宮内膜癌である、項目35に記載の方法。

38．がんが、非小細胞肺がんである、項目35に記載の方法。

39．がんが、卵巣がんである、項目35に記載の方法。

40．がんが、トリプルネガティブ乳がんである、項目35に記載の方法。

41．CARが認識領域を有し、認識領域が抗体の一本可変領域フラグメント(scFv)である、項目1～40のいずれか1つに記載の方法。

42．CARが認識領域を有し、CARの認識領域が、抗FITC抗体の一本可変領域フラグメント(scFv)である、項目1～11、16～17、または20～41のいずれか1つに記載の方法。

20

43．CARが共刺激ドメインを有し、共刺激ドメインが、CD28、CD137(4-1BB)、CD134(OX40)、およびCD278(ICOS)から選択される、項目1～42のいずれか1つに記載の方法。

44．CARが活性化シグナル伝達ドメインを有し、活性化シグナル伝達ドメインが、T細胞CD3 鎖またはFc受容体 である、項目1～43のいずれか1つに記載の方法。

45．CARが認識領域を有し、認識領域が抗FITC抗体の一本可変領域フラグメント(scFv)であり；CARが共刺激ドメインを有し、共刺激ドメインがCD137 (4-1BB)であり；およびCARが活性化シグナル伝達ドメインを有し、活性化シグナル伝達ドメインがT細胞CD3 鎖である、項目1～11、16～17、または20～41のいずれか1つに記載の方法。

46．化合物またはその薬学的に許容される塩、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、または第2の複合体またはその薬学的に許容される塩、およびCAR T細胞組成物の複数回用量が投与される、項目1～45のいずれか1つに記載の方法。

30

47．化合物またはその薬学的に許容される塩、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、または第2の複合体またはその薬学的に許容される塩の投与の前、あるいはCAR T細胞組成物の投与の前に、患者がイメージングされる、項目1～46のいずれか1つに記載の方法。

48．化合物またはその薬学的に許容される塩、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、または第2の複合体またはその薬学的に許容される塩が、抗体ではなく、抗体のフラグメントを含まない、項目1～47のいずれか1つに記載の方法。

49．標的化部分が、ペプチドエピトープでない、項目1～48のいずれか1つに記載の方法。

40

50．患者に「オフターゲット」毒性をもたらすサイトカイン放出が、起こらず、がんに対するCAR T細胞傷害性が生じる、項目1～49のいずれか1つに記載の方法。

51．患者に「オフターゲット」組織毒性が生じず、がんに対するCAR T細胞傷害性が生じる、項目1～50のいずれか1つに記載の方法。

52．がんが腫瘍を含み、患者の腫瘍サイズが減少し、「オフターゲット」組織毒性が生じない、項目1～51のいずれか1つに記載の方法。

53．配列番号：1を含む核酸を含むCAR T細胞。

54．配列番号：2を含むポリペプチドを含むCAR T細胞。

55．配列番号：1を含み、キメラ抗原受容体をコードする単離核酸。

50

56．配列番号：2を含むキメラ抗原受容体ポリペプチド。

57．配列番号：1を含むベクター。

58．ベクターが、レンチウイルスベクターである、項目57に記載のベクター。

59．CARがヒトアミノ酸配列を含む、項目1～56のいずれか1つに記載の方法、CAR T細胞、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする単離核酸、またはキメラ抗原受容体ポリペプチド。

60．CARがヒトアミノ酸配列からなる、項目1～56のいずれか1つに記載の方法、CAR T細胞、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする単離核酸、またはキメラ抗原受容体ポリペプチド。

61．少なくとも2つの異なるタイプのブリッジを含むキットであって、ブリッジが標的化部分に連結された小分子リガンドを含み、少なくとも2つの異なるタイプのブリッジ中のリガンドが異なり、およびリガンドが、葉酸、DUPA、CAIXリガンド、NK-1Rリガンド、ガンマグルタミルトランスペプチダーゼのリガンド、およびCCK2Rリガンドから選択される、キット。

10

62．少なくとも1つのブリッジ中のリガンドが、NK-1Rリガンドである、項目61に記載のキット。

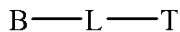
63．少なくとも1つのブリッジ中のリガンドが、ガンマグルタミルトランスペプチダーゼのリガンドである、項目61に記載のキット。

64．少なくとも1つのブリッジ中のリガンドが、葉酸である、項目61に記載のキット。

65．ブリッジが、式：

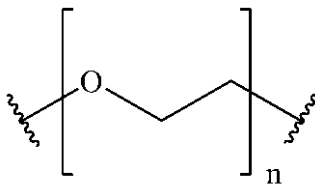
20

【化3】



[式中、Bは小分子リガンドを表し、Lはリンカーを表し、およびTは標的化部分を表し、ここで、Lは、式：

【化4】



30

(式中、nは、0～200の整数である)

で示される構造を含む]

を有する構造を有する、項目61～64のいずれか1つに記載のキット。

66．nが、0～150の整数である、項目65に記載のキット。

67．nが、0～110の整数である、項目65に記載のキット。

68．nが、0～20の整数である、項目65に記載のキット。

69．nが、15～20の整数である、項目65に記載のキット。

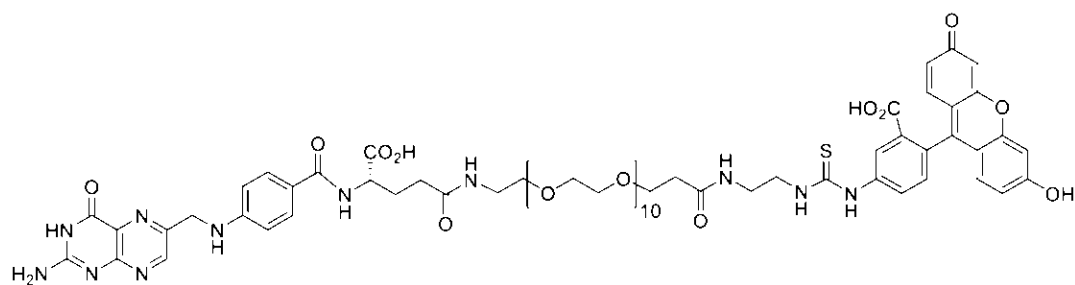
70．nが、15～110の整数である、項目65に記載のキット。

40

71．リガンドがC、AIXリガンドである、項目1～10、16～52、または59～60のいずれか1つに記載の方法、または項目61から70のいずれか1つに記載のキット。

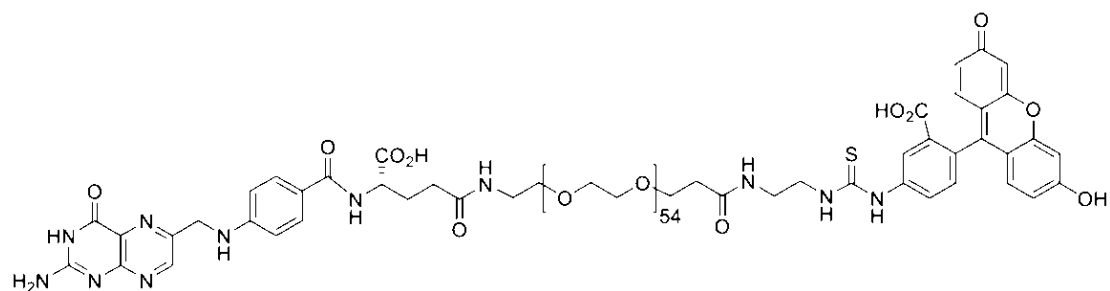
72．式：

【化 5】



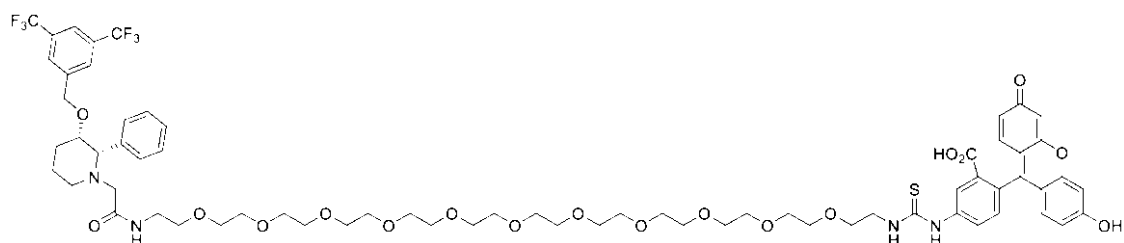
10

【化 6】



20

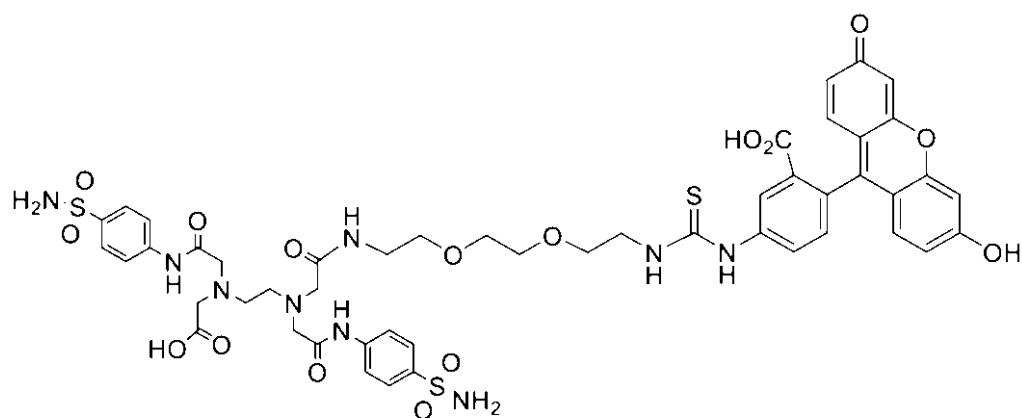
【化 7】



30

、または

【化 8】



40

50

で示される複合体。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1A - 1B】(CAR T細胞)：標的細胞(がん細胞)比が5：1での異なる細胞型における、FITC-小分子複合体を用いたCAR T細胞増殖を示す。図1Aは、KB(FR+)細胞におけるCAR T細胞増殖を示す。図1Bは、HEK293(NK1R+)細胞におけるCAR T細胞増殖を示す。

【図2A - 2F】異なる細胞型においてFITC-小分子複合体を用いた、CAR T細胞による炎症性サイトカインIFN- γ 産生を示す。図2Aは、KB(FR+)細胞における炎症性サイトカインIFN- γ 産生を示す。図2Bは、LNCaP(PSMA+)細胞における炎症性サイトカインIFN- γ 産生を示す。図2Cは、HEK293(NK1R+)細胞における炎症性サイトカインIFN- γ 産生を示す。図2Dは、異なる濃度のFITC-葉酸を用いた、KB(FR+)細胞における炎症性サイトカインIFN- γ 産生を示す。図2Eは、異なる複合体を用いた、KB(FR+)細胞における炎症性サイトカインIFN- γ 産生を示す。図2Fは、異なる複合体を用いた、KB(FR+)細胞における炎症性サイトカインIFN- γ 産生を示す。

10

【図3A - 3F】異なる細胞型においてFITC-小分子複合体で処置した腫瘍細胞のインビトロ毒性を示す。図3Aは、KB(FR+)細胞におけるインビトロ毒性を示す。図3Bは、LNCaP(PSMA+)細胞におけるインビトロ毒性を示す。図3Cは、HEK293(NK1R+)細胞におけるインビトロ毒性を示す。図3Dは、異なるE：T(エフェクター細胞：標的細胞)比の関数としての、KB(FR+)細胞におけるインビトロ毒性を示す。図3Eは、FITC-葉酸濃度の関数としての、KB(FR+)細胞におけるインビトロ毒性を示す。図3Fは、異なる複合体を用いた、KB(FR+)細胞におけるインビトロ毒性を示す。

20

【図4A - 4B】CAR T細胞の活性化が、がん細胞上の腫瘍抗原の発現レベルと関連することを示す。図4Aは、腫瘍抗原FR α レベルを示す。最も高いピークはKB(FR+)細胞のピークである。図4Bは、MDA-MB-231およびKB細胞におけるIFN- γ 産生によって測定されたFITC-小分子複合体を用いたCAR T細胞の活性化を示す。

【図5A - 5C】CAR T細胞をFITC-PEG11-NK1複合体とともに、または複合体なしで処置することを含む、HEK293(NK1R+)腫瘍異種移植片およびCAR T細胞療法を示す。図5Aは、24日間にわたって測定された腫瘍体積を示す。図5Bは、22日間の療法にわたって測定された体重を示す。図5Cは、FITC-PEG11-NK1とともにCAR T細胞を注射した後のCD3+ヒトT細胞におけるCAR T細胞のパーセンテージを示す。

30

【図6A - 6B】図5A - 図5Cにおいて使用されるモデルの例示的なマウスから採取された臓器を示す。図6Aは、非処置グループから採取された臓器を示す。図6Bは、CAR T細胞療法の2週間後に採取された臓器を示す。

【図7A - 7C】FITC-PEG12-葉酸複合体、FITC-葉酸複合体、または複合体なしのいずれかでCAR T細胞を用いて細胞を処置することを含む、CAR T細胞療法下でのMDA-MB-231(FR+)異種移植片を示す。図7Aは、23日間にわたって測定された腫瘍体積を示す。図7Bは、21日間の療法にわたって測定された体重を示す。図7Cは、CAR T細胞を注射した後のCD3+ヒトT細胞におけるCAR T細胞のパーセンテージを示す。

【図8A - 8B】図7A - 図7Cに示されるモデルの例示的なマウスから採取された器官を示す。図8Aは、非処置グループから採取された臓器を示す。図8Bは、CAR T細胞および500nmole/体重kgのFITC-PEG12-葉酸複合体を含むCAR T細胞療法の3週間後に採取された臓器を示す。

40

【図9】図9は、図5 - 図6のHEK293(NK1R+)異種移植モデルおよび図7 - 図8のMDA-MB-231(FR+)異種移植モデルの血液指標を示す。

【図10】使用されるFITC-小分子複合体に依存する、CAR T細胞で処置されたKB(FR+)腫瘍細胞に対する細胞傷害性の差異を示す。

【図11】異なる濃度のFITC-PEG-12-葉酸複合体とCAR T細胞を用いたKB腫瘍異種移植モデルにおける体重パーセント変化を示す。

【図12A - 12C】図12A - 12Cは、図11に示されるKB異種移植モデルの例示的なマウスから採取された臓器を示す。図12Aは、非処置グループから採取された臓器を示す。

50

図12Bは、250nmol/kgのFITC-PEG-12-葉酸で処置したCAR T細胞療法グループから採取された臓器を示す。図12Cは、CAR T細胞および500nmol/kgのFITC-PEG-12-葉酸で処置したCAR T細胞療法グループから採取された臓器を示す。

【図13】図11 - 図12のKB異種移植モデルからのマウスの血液指標を示す。

【図14A - 14B】CAR T形質導入に使用された構築物を示す。図14Aは、CAR4-1BB Z構築物を示す。図14Bは、レンチウイルスベクターを示す。

【図15A - 15B】形質導入されたT細胞のフローサイトメトリー分析を示す。図15Aは、非形質導入細胞を示す。図15Bは、形質導入細胞を示す。

【図16A - 16B】形質導入されたCAR T細胞の蛍光顕微鏡使用を示す。図16Aは、形質導入を示すGFPイメージングを示す。図16Bは、陽性に形質導入された細胞(positively transduced cells)に局在するFITC葉酸を示す。

10

【図17】使用された複合体の関数としてのCD69の相対的発現によって測定されたCAR T細胞の活性化を示す。

【図18】使用された複合体の関数としてのKB、LNCaP、およびCAR T細胞の腫瘍不均一性を示す。

【図19A - 19C】別の脇腹に2つの異なる細胞株(すなわち、MDA-MB-231(FR+)およびHEK(NK1R+))から生じる2つの異なる腫瘍を有するマウスに同じ抗FITC CAR T細胞(10^7 細胞)が導入され、その後、PBSのみ(図19A)、FITC-PEG11-NK1R (500nmole/kg)(図19B)、またはFITC-PEG11-NK1R (500nmole/kg) + FITC-PEG12-葉酸 (500nmole/kg)(図19C)のいずれかが、1日おきに注射された場合の抗腫瘍効力を示す。図19A：(黒丸)FR+ (MDA-MB-231)：CAR T細胞+ PBS、(黒四角)NK1R+(HEK)：CAR T細胞+ PBS；図19B：(黒丸)FR+ (MDA-MB-231)：CAR T細胞+ PBS、(黒四角)NK1R+(HEK)：CAR T細胞+ FITC-PEG11-NK1R (500nmole/kg)；図19C：(黒丸)FR+ (MDA-MB-231)：CAR T細胞+ FITC-PEG12-FA (500nmole/kg)、(黒四角)NK1R+(HEK)：CAR T細胞+ PBS。

20

【発明を実施するための形態】

【0016】

定義

本明細書で用いる「a」または「an」は、1つまたは複数を意味することができる。たとえば、整数、分数、およびパーセントなどの数値に関して、本明細書で用いる「約」は、一般的に、当業者であれば、列挙された値と同等であるとみなす(たとえば、同じ機能または結果を有する)数値の範囲(たとえば、列挙された値の $\pm 5\% \sim 10\%$)を示す。

30

本明細書で用いる用語「治療する」、「治療している」、「治療された」または「治療」は、治療的処置および予防的(prophylactic)または予防的(preventative)処置の両方を意味する。

【0017】

本明細書で用いる用語、がんに関して「改善する」、「改善している」、「改善」または「改善された」は、がんの症状を軽減すること、腫瘍のサイズを縮小させること、腫瘍を完全にまたは部分的に除去すること(たとえば、完全寛解または部分寛解)、疾患を安定させること、がんの進行を防げること(たとえば、無進行生存)、病気の発生を予防し、病気の進行を予防すること(例えば、無増悪生存)、または病気の治療的または予防的処置であると医師が考える、がんに対する他の効果を意味する。

40

【0018】

本明細書で用いる用語「投与する」、「投与している」または「投与された」は、限定的ではないが、経口(po)、静脈内(iv)、筋肉内(im)、皮下(sc)および経皮などの、本明細書で記載される化合物またはその薬学的に許容される塩、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、または第2の複合体またはその薬学的に許容される塩、またはCAR T細胞組成物を患者に導入するためのすべての手段を意味する。

【0019】

本明細書で用いる用語「オフターゲット毒性」は、患者を治療している医師にとって容

50

認できない臓器損傷または患者の体重の減少、またはB細胞非形成などの患者を治療している医師にとって受け入れがたい何らかの他の効果を意味する。

【0020】

本明細書で用いる用語「形質導入」および「トランスフェクション」は、同等に使用され、これらの用語は、ウイルス的および非ウイルス的方法などの任意の人工的方法によって核酸を細胞に導入することを意味する。

【0021】

例示的な実施態様の詳細な説明

本明細書中に記載されるさまざまな実施態様において、リンカーによって標的化部分に連結された小分子リガンドは、がんとCAR T細胞(すなわち、キメラ抗原受容体を発現する細胞傷害性T細胞)との間のブリッジとして使用される。ブリッジは、がんの改善のためにCAR T細胞をがんに向かわせる。1つの実施態様では、「小分子リガンド」は、葉酸、CAIXリガンド、DUPA、NK-1Rリガンド、ガンマグルタミミルトランスぺプチダーゼのリガンド、またはCCK2Rリガンドであり得、それぞれが、がん細胞のタイプに特異的に結合する小分子リガンドである(すなわち、これらのリガンドのそれぞれの受容体が、正常組織と比較してがん細胞上で過剰発現する)。

【0022】

小分子リガンドに連結された「標的化部分」は、CAR T細胞によって発現される遺伝子操作されたCARの認識領域に結合する。したがって、CARの認識領域(たとえば、抗体の一本フラグメント可変領域(scFv))が、「標的化部分」に向けられる。このように、リンカーによって標的化部分に連結された小分子リガンドは、がんとCAR T細胞との間のブリッジとして作用し、がんの改善のためにCAR T細胞をがんに向かわせる。さまざまな実施態様では、がんとCAR T細胞との間のブリッジは、実施例5～12に示したいずれの複合体であってもよい。

【0023】

ブリッジは、小さい有機分子であり、血流からのクリアランスは、迅速に達成されうる(たとえば、約20分以下)。1つの態様では、CAR T細胞応答は、「ブリッジ」の小分子リガンド部分のための受容体を発現するがん細胞のみを標的とすることができ、それによって正常組織へのオフターゲット毒性が低減される。もう1つの態様では、CAR T細胞の活性化は、血流からのブリッジの急速なクリアランスにより、およびCAR T細胞の活性化を制御するブリッジの用量および構造を変える能力により、制御されうる。さらに、CAR T細胞構築物の1つのタイプがさまざまながんを標的化するために使用されうるので、このシステムは、「普遍的」でありうる。例示的に、CAR T細胞によって認識される標的化部分は、CAR T細胞構築物の1つの型が使用されうるように一定のままでありうるが、がんに結合する小分子リガンドは、多種多様ながんの標的化を可能にするように変更される。

【0024】

1つの実施態様では、本発明者らは、リンカーによって標的化部分に連結された小分子リガンド(すなわち、ブリッジ)の用量を変えることが、CAR T細胞活性化においてインビボでCRSを制御する能力をもたらしうることを発見した。もう1つの実施態様では、本発明者らは、標的化部分に連結された小分子リガンド(ブリッジ)中のリンカーを変化させることが、CAR T細胞活性化においてインビボでCRSを制御することができることを発見した。さらにもう1つの実施態様では、これらの方法の組み合わせが、インビボでのCAR T細胞活性化およびサイトカイン放出を正確に制御するために使用されうる。

【0025】

以下の項目リストおよび特許請求の範囲に記載されたさまざまな実施態様において、リンカーによって標的化部分に連結された小分子リガンドは、「化合物」、「第1の複合体」または「第2の複合体」と呼ばれる。用語「化合物」は、インビボでのサイトカイン放出を制御するために、リンカーによって標的化部分に連結された小分子リガンドの用量を変化させる実施態様において使用される。用語「第1の複合体」および「第2の複合体」は、2つの異なる複合体が患者に投与される実施態様において使用される。たとえば、標的

10

20

30

40

50

化部分に連結された小分子リガンドのリンカーは、インビボでのサイトカイン放出を制御するために変化させることができ、または複合体を異なる小分子リガンドまたは異なる標的化部分を含むように変更することができる。

【 0 0 2 6 】

いくつかの実施態様は、以下の列挙された項目によって記述される：

1. がんの治療方法であって、
 - i) 化合物またはその薬学的に許容される塩の第1の用量を患者に投与すること(ここで、化合物はリンカーによって標的化部分に連結された小分子リガンドを含む)；
 - ii) CAR T細胞組成物を患者に投与すること(ここで、CAR T細胞は、標的化部分に向けられたCARを含む)；
 - iii) 化合物またはその薬学的に許容される塩の第2の用量を患者に投与すること(ここで、第2の用量は第1の用量とは異なる)；および
 - iv) がんを改善するために患者を治療すること；を含む方法。
2. がんの治療方法であって、
 - i) 第1の複合体またはその薬学的に許容される塩を患者に投与すること；
 - ii) CAR T細胞組成物を患者に投与すること(ここで、CAR T細胞は、標的化部分に向けられたCARを含む)；
 - iii) 第2の複合体またはその薬学的に許容される塩を患者に投与すること(ここで第1および第2の複合体は、それぞれ、リンカーによって標的化部分に連結された小分子リガンドを含み、第1の複合体および第2の複合体は異なる)；および
 - iv) がんを改善するために患者を治療すること；を含む方法。
3. がんの治療方法であって、
 - i) 第1の複合体またはその薬学的に許容される塩の第1の用量を患者に投与すること；
 - ii) CAR T細胞組成物を患者に投与すること(ここで、CAR T細胞は、標的化部分に向けられたCARを含む)；
 - iii) 第2の複合体またはその薬学的に許容される塩の第2の用量を患者に投与すること(ここで第1の複合体および第2の複合体は、それぞれ、リンカーによって標的化部分に連結された小分子リガンドを含み、第1の複合体および第2の複合体は異なり、第1の用量および第2の用量は異なる)；および
 - iv) がんを改善するために患者を治療すること；を含む方法。
4. 第1の複合体またはその薬学的に許容される塩中のリンカー、および第2の複合体またはその薬学的に許容される塩中のリンカーが異なる、項目2または3に記載の方法。
5. 第1の複合体またはその薬学的に許容される塩中のリンカー、および第2の複合体またはその薬学的に許容される塩中のリンカーが同じである、項目2または3に記載の方法。
6. 第1の複合体またはその薬学的に許容される塩中のリガンド、および第2の複合体またはその薬学的に許容される塩中のリガンドが異なる、項目2～5のいずれか1つに記載の方法。
7. 第1の複合体またはその薬学的に許容される塩中のリガンド、および第2の複合体またはその薬学的に許容される塩中のリガンドが同じである、項目2～5のいずれか1つに記載の方法。
8. 第1の複合体またはその薬学的に許容される塩中の標的化部分、および第2の複合体またはその薬学的に許容される塩中の標的化部分が異なる、項目2～7のいずれか1つに記載の方法。
9. 第1の複合体またはその薬学的に許容される塩中の標的化部分、および第2の複合体またはその薬学的に許容される塩中の標的化部分が同じである、項目2～7のいずれか1つに記載の方法。
10. リガンドが、葉酸、DUPA、NK-1Rリガンド、CAIXリガンド、ガンマグルタミルトランスペプチダーゼのリガンド、およびCCK2Rリガンドから選択される、項目1～9のいずれか1つに記載の方法。
11. リガンドが葉酸である、項目10に記載の方法。

10

20

30

40

50

12. リガンドがNK-1Rリガンドである、項目10に記載の方法。
 13. リガンドがDUPAである、項目10に記載の方法。
 14. リガンドがCCK2Rリガンドである、項目10に記載の方法。
 15. リガンドがガンマグルタミルトランスペプチダーゼのリガンドである、項目10に記載の方法。

16. 標的化部分が、2,4-ジニトロフェノール(DNP)、2,4,6-トリニトロフェノール(TNP)、ビオチン、ジゴキシゲニン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、NHS-フルオレセイン、ペンタフルオロフェニルエステル(PFP)、テトラフルオロフェニルエステル(TFP)、ノッティン、センチリン、およびDARPinから選択される、項目1～15のいずれか1つに記載の方法。

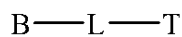
10

17. 標的化部分がFITCである、項目16に記載の方法。
 18. 標的化部分がDNPである、項目16に記載の方法。
 19. 標的化部分がTNPである、項目16に記載の方法。
 20. リンカーが、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロリン、親水性アミノ酸、糖、非天然ペプチドグリカン、ポリビニルピロリドン、および/またはブルロニックF-127を含む、項目1～19のいずれか1つに記載の方法。

21. リンカーがPEGを含む、項目20に記載の方法。
 22. 化合物またはその薬学的に許容される塩、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、または第2の複合体またはその薬学的に許容される塩が、式：

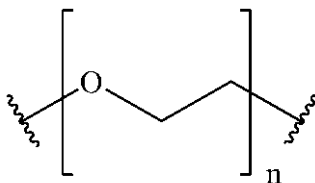
【化9】

20



[式中、Bは小分子リガンドを表し、Lはリンカーを表し、およびTは標的化部分を表し、ここで、Lは、式：

【化10】



30

(式中、nは、0～200の整数である)

で示される構造を含む]

で示される構造を有する、項目1～21のいずれか1つに記載の方法。

23. nが、0～150の整数である、項目22に記載の方法。
 24. nが、0～110の整数である、項目22に記載の方法。
 25. nが、0～20の整数である、項目22に記載の方法。
 26. nが、15～20の整数である、項目22に記載の方法。
 27. nが、15～110の整数である、項目22に記載の方法。
 28. リンカーがPEGを含み、標的化部分がFITCまたはその薬学的に許容される塩である、項目1～27のいずれか1つに記載の方法。

40

29. 化合物またはその薬学的に許容される塩、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、または第2の複合体またはその薬学的に許容される塩の用量が、患者の体重について約10nmol/kg～約3000nmol/kgである、項目1～28のいずれか1つに記載の方法。

30. 化合物またはその薬学的に許容される塩、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、または第2の複合体またはその薬学的に許容される塩の用量が、患者の体重について約50nmol/kg～約2000nmol/kgである、項目1～29のいずれか1つに記載の方法。

31. 化合物またはその薬学的に許容される塩、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、または第2の複合体またはその薬学的に許容される塩の用量が、患者の体重について約100nmol/kg～約1000nmol/kgである、項目1～30のいずれか1つに記載の方法。

50

32．化合物またはその薬学的に許容される塩、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、または第2の複合体またはその薬学的に許容される塩の用量が、患者の体重について約100nmol/kg～約600nmol/kgである、項目1～31のいずれか1つに記載の方法。

33．化合物またはその薬学的に許容される塩、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、または第2の複合体またはその薬学的に許容される塩の用量が、患者の体重について約200nmol/kg～約500nmol/kgである、項目1～32のいずれか1つに記載の方法。

34．化合物またはその薬学的に許容される塩、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、または第2の複合体またはその薬学的に許容される塩の用量が、患者の体重について約250nmol/kg～約500nmol/kgである、項目1～33のいずれか1つに記載の方法。

35．がんが、肺がん(cancer)、骨がん、膵がん、皮膚がん、頭部がん、頸部がん、皮膚黒色腫、眼内黒色腫、子宮がん、卵巣がん、子宮内膜がん、直腸がん、胃がん、結腸がん、乳がん、トリプルネガティブ乳がん、子宮頸管の癌(carcinoma)、子宮内膜の癌、子宮頸部の癌、膣の癌、外陰部の癌、ホジキン病、食道のがん、小腸のがん、内分泌系のがん、甲状腺のがん、副甲状腺のがん、非小細胞肺がん、副腎のがん、軟部組織の肉腫、尿道のがん、前立腺がん、慢性白血病、急性白血病、リンパ球性リンパ腫、胸膜中皮腫、膀胱のがん、バーキットリンパ腫、尿管のがん、腎臓のがん、腎細胞癌、腎盂の癌、中枢神経系(CNS)新生物、原発性CNSリンパ腫、脊髄軸腫瘍、脳幹グリオーマ、下垂体腺腫、胃食道接合部の腺癌から選択される、項目1～34のいずれか1つに記載の方法。

36．がんが、葉酸受容体を発現しているがんである、項目1～11または16～35のいずれか1つに記載の方法。

37．がんが、子宮内膜癌である、項目35に記載の方法。

38．がんが、非小細胞肺がんである、項目35に記載の方法。

39．がんが、卵巣がんである、項目35に記載の方法。

40．がんが、トリプルネガティブ乳がんである、項目35に記載の方法。

41．CARが認識領域を有し、認識領域が抗体の一本可変領域フラグメント(scFv)である、項目1～40のいずれか1つに記載の方法。

42．CARが認識領域を有し、CARの認識領域が、抗FITC抗体の一本可変領域フラグメント(scFv)である、項目1～11、16～17、または20～41のいずれか1つに記載の方法。

43．CARが共刺激ドメインを有し、共刺激ドメインが、CD28、CD137(4-1BB)、CD134(OX40)、およびCD278(ICOS)から選択される、項目1～42のいずれか1つに記載の方法。

44．CARが活性化シグナル伝達ドメインを有し、活性化シグナル伝達ドメインが、T細胞CD3 鎖またはFc受容体 である、項目1～43のいずれか1つに記載の方法。

45．CARが認識領域を有し、認識領域が抗FITC抗体の一本可変領域フラグメント(scFv)であり；CARが共刺激ドメインを有し、共刺激ドメインがCD137(4-1BB)であり；およびCARが活性化シグナル伝達ドメインを有し、活性化シグナル伝達ドメインがT細胞CD3 鎖である、項目1～11、16～17、または20～41のいずれか1つに記載の方法。

46．化合物またはその薬学的に許容される塩、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、または第2の複合体またはその薬学的に許容される塩、およびCAR T細胞組成物の複数回用量が投与される、項目1～45のいずれか1つに記載の方法。

47．化合物またはその薬学的に許容される塩、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、または第2の複合体またはその薬学的に許容される塩の投与の前、あるいはCAR T細胞組成物の投与の前に、患者がイメージングされる、項目1～46のいずれか1つに記載の方法。

48．化合物またはその薬学的に許容される塩、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、または第2の複合体またはその薬学的に許容される塩が、抗体ではなく、抗体のフラグメントを含まない、項目1～47のいずれか1つに記載の方法。

49．標的化部分が、ペプチドエピトープでない、項目1～48のいずれか1つに記載の方法。

50．患者に「オフターゲット」毒性をもたらすサイトカイン放出が、起こらず、がん

10

20

30

40

50

対するCAR T細胞傷害性が生じる、項目1～49のいずれか1つに記載の方法。

51．患者に「オフターゲット」組織毒性が生じず、がんに対するCAR T細胞傷害性が生じる、項目1～50のいずれか1つに記載の方法。

52．がんが腫瘍を含み、患者の腫瘍サイズが減少し、「オフターゲット」組織毒性が生じない、項目1～51のいずれか1つに記載の方法。

53．配列番号：1を含む核酸を含むCAR T細胞。

54．配列番号：2を含むポリペプチドを含むCAR T細胞。

55．配列番号：1を含み、キメラ抗原受容体をコードする単離核酸。

56．配列番号：2を含むキメラ抗原受容体ポリペプチド。

57．配列番号：1を含むベクター。

58．ベクターが、レンチウイルスベクターである、項目57に記載のベクター。

59．CARがヒトアミノ酸配列を含む、項目1～56のいずれか1つに記載の方法、CAR T細胞、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする単離核酸、またはキメラ抗原受容体ポリペプチド。

60．CARがヒトアミノ酸配列からなる、項目1～56のいずれか1つに記載の方法、CAR T細胞、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする単離核酸、またはキメラ抗原受容体ポリペプチド。

61．少なくとも2つの異なるタイプのブリッジを含むキットであって、ブリッジが標的化部分に連結された小分子リガンドを含み、少なくとも2つの異なるタイプのブリッジ中のリガンドが異なり、およびリガンドが、葉酸、DUPA、CAIXリガンド、NK-1Rリガンド、ガンマグルタミルトランスぺプチダーゼのリガンド、およびCCK2Rリガンドから選択される、キット。

62．少なくとも1つのブリッジ中のリガンドが、NK-1Rリガンドである、項目61に記載のキット。

63．少なくとも1つのブリッジ中のリガンドが、ガンマグルタミルトランスぺプチダーゼのリガンドである、項目61に記載のキット。

64．少なくとも1つのブリッジ中のリガンドが、葉酸である、項目61に記載のキット。

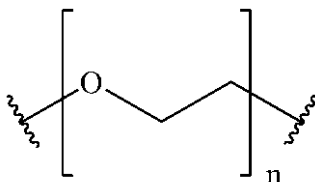
65．ブリッジが、式：

【化11】



[式中、Bは小分子リガンドを表し、Lはリンカーを表し、およびTは標的化部分を表し、ここで、Lは、式：

【化12】



(式中、nは、0～200の整数である)

で示される構造を含む]

を有する構造を有する、項目61～64のいずれか1つに記載のキット。

66．nが、0～150の整数である、項目65に記載のキット。

67．nが、0～110の整数である、項目65に記載のキット。

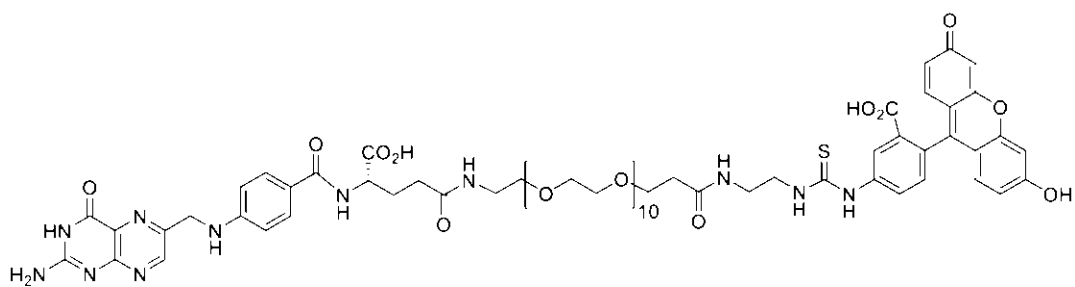
68．nが、0～20の整数である、項目65に記載のキット。

69．nが、15～20の整数である、項目65に記載のキット。

70．nが、15～110の整数である、項目65に記載のキット。

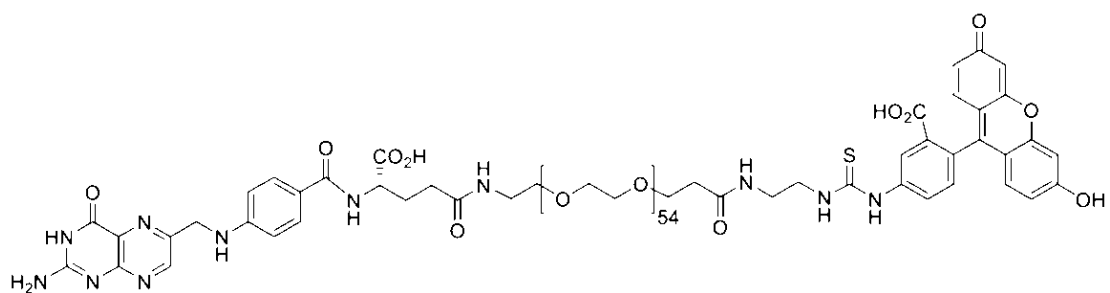
71．リガンドがC、AIXリガンドである、項目1～10、16～52、または59～60のいずれか1つに記載の方法、または項目61から70のいずれか1つに記載のキット。

72. 式：
【化 1 3】



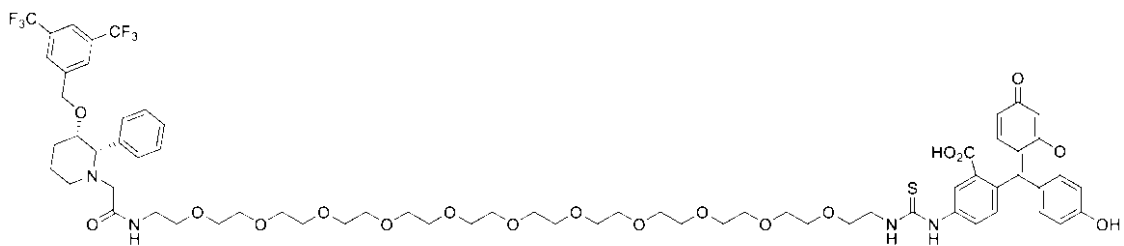
10

、
【化 1 4】



20

、
【化 1 5】



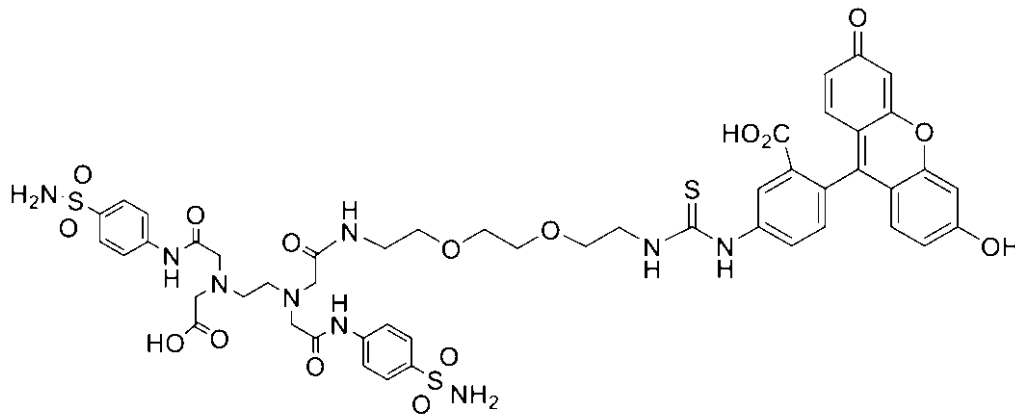
30

、または

40

50

【化 16】



10

で示される複合体。

【0027】

本明細書に記載されるように、「患者」はヒトであってもよく、または獣医学の用途の場合、患者は実験動物、農業動物、家畜、または野生動物であってもよい。1つの態様では、患者は、げっ歯類(たとえば、マウス、ラット、ハムスターなど)、ウサギ、サル、チンパンジーなどの実験動物；イヌ、ネコ、もしくはウサギなどの愛玩動物；ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギなどの農業動物；またはクマ、パンダ、ライオン、トラ、ヒョウ、ゾウ、シマウマ、キリン、ゴリラ、イルカ、またはクジラなどの飼育下での野生動物でありうる。本明細書に記載の方法では、「がんを改善するために患者を治療する」工程は、本方法における投与工程を含みうるか、またはそれからなりうる。

20

【0028】

例示的な1つの実施態様では、

リンカーによって標的化部分に連結された小分子リガンド(ブリッジ)は、小分子リガンドに連結されたフルオレセインイソチオシアネート(FITC)を含む。がんは、小分子リガンドのための受容体を過剰発現する。第二成分として、たとえば、細胞傷害性T細胞は、抗FITC scFvを含むCARを発現するように形質転換される。この態様では、CARは、がん小分子リガンドが結合した結果として、FITC分子でがんを飾るFITCを標的とする。したがって、正常な非標的細胞に対する毒性が回避されうる。抗FITC CAR発現T細胞がFITCに結合すると、CAR T細胞が活性化され、がんが改善される(たとえば、がん細胞を殺すことによる)。

30

【0029】

1つの実施態様では、「小分子リガンド」は、葉酸、DUPA(PSMA陽性ヒト前立腺がん細胞および他のがん細胞によって結合されるリガンド)、NK-1Rリガンド(たとえば、結腸および膵臓のがん上に見出されるNK-1Rの受容体のためのリガンド)、CAIXリガンド(CAIXリガンドのための受容体は、たとえば、腎臓がん、卵巣がん、外陰部がん、および乳がん上に見出される)、ガンマグルタミルトランスぺプチダーゼのリガンド(トランスぺプチダーゼは、たとえば、卵巣がん、結腸がん、肝がん、星状細胞性神経膠腫、黒色腫および白血病において過剰発現する)、またはCCK2Rリガンド(CCK2Rリガンドの受容体は、甲状腺、肺、膵臓、卵巣、脳、胃、消化管間質および結腸のガン上に見出される)であり得、それぞれが、がん細胞のタイプに特異的に結合する小分子リガンドである(すなわち、これらのリガンドのそれぞれの受容体が、正常組織と比較してがん細胞上で過剰発現する)。1つの実施態様では、DUPA誘導体は、標的化部分に連結された小分子リガンドであるリガンドであり得、DUPA誘導体は、参照により本明細書に組み込まれるWO 2015/057852に記載されている。

40

【0030】

50

1つの実施態様では、小分子リガンドは、葉酸である。葉酸は、葉酸、葉酸類似体、または別の葉酸受容体結合分子でありうる。さまざまな実施態様では、使用されうる葉酸類似体として、フォリン酸、プテロポリグルタミン酸、およびテトラヒドロプテリンなどの葉酸受容体結合プテリジン、ジヒドロ葉酸、テトラヒドロ葉酸、およびそれらのデアザおよびジデアザ類似体が挙げられる。用語「デアザ(deaza)」および「ジデアザ(dideaza)」類似体は、天然に存在する葉酸構造中の1個または2個の窒素原子に置換された炭素原子を有する、当技術分野で認められている類似体を示す。たとえば、デアザ類似体として、1-デアザ、3-デアザ、5-デアザ、8-デアザ、および10-デアザ類似体が挙げられる。ジデアザ類似体として、たとえば、1,5-ジデアザ、5,10-ジデアザ、8,10-ジデアザおよび5,8-ジデアザ類似体が挙げられる。前述の葉酸類似体は、葉酸受容体に結合する能力を反映して、従来、「葉酸」と呼ばれている。ほかの葉酸受容体結合類似体として、アミノプテリン、アメトプテリン(メトトレキサート)、N10-メチル葉酸、2-デアミノ-ヒドロキシ酪酸、デアザメトプテリンまたは3-デアザメトプテリンなどのデアザ類似体、および3',5'-ジクロロ-4-アミノ-4-デオキシ-N10-メチルプテロイルグルタミン酸(ジクロロメトトレキサート)が挙げられる。

10

【0031】

1つの実施態様では、小分子リガンドは、約10,000ダルトン未満、約9000ダルトン未満、約8,000ダルトン未満、約7000ダルトン未満、約6000ダルトン未満、約5000ダルトン未満、約4500ダルトン未満、約4000ダルトン未満、約3500ダルトン未満、約3000ダルトン未満、約2500ダルトン未満、約2000ダルトン未満、約1500ダルトン未満、約1000ダルトン未満、または約500ダルトン未満の質量を有してもよい。もう1つの実施態様では、小分子リガンド may have a mass of 約1~約10,000ダルトン、約1~約9000ダルトン、約1~約8,000ダルトン、約1~約7000ダルトン、約1~約6000ダルトン、約1~約5000ダルトン、約1~約4500ダルトン、約1~約4000ダルトン、約1~約3500ダルトン、約1~約3000ダルトン、約1~約2500ダルトン、約1~約2000ダルトン、約1~約1500ダルトン、約1~約1000ダルトン、または約1~約500ダルトンの質量を有してもよい。

20

【0032】

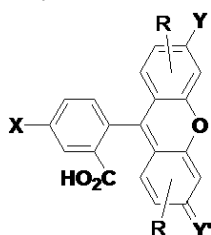
1つの態様では、CAR T細胞によって発現されたCARに結合する「標的化部分」は、たとえば、2,4-ジニトロフェノール(DNP)、2,4,6-トリニトロフェノール(TNP)、ビオチン、ジゴキシゲニン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、NHS-フルオレセイン、ペンタフルオロフェニルエステル(PFP)、テトラフルオロフェニルエステル(TFP)、ノッティン、センチリン、およびDARPinから選択されうる。標的化部分の同一性は、好ましくは特異性をもってCARによって認識され、結合されるべきであり、かつ比較的低い分子量を有する点でのみ限定される。さまざまな態様では、例示的な標的化部分は、低分子量の有機分子などのハプテンである。

30

【0033】

標的化部分は、以下の例示的な構造を有しうる：

【化17】



40

[式中、Xは酸素、窒素またはイオウであり、Xはリンカー-Lに結合し；YはOR^a、NR^a₂またはNR^a₃であり；およびY'は、O、NRまたはNR^a₂であり；各Rは、独立して、どの場合も、H、フルオロ、スルホン酸、スルホネート、およびそれらの塩などから選択され；およびR^aは、水素またはアルキルである]。

50

【 0 0 3 4 】

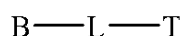
1つの例示的態様では、本明細書に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、または第2の複合体またはその薬学的に許容される塩中のリンカーは、直接結合(たとえば、FITCのイソチオシアネート基と小分子リガンドの遊離アミン基との間の反応)でありうるか、または該結合が、中間リンカー(intermediary linker)を介するものでありうる。1つの実施態様では、存在するならば、中間リンカーは、二価リンカーなどの当技術分野で公知の生体適合性リンカーでありうる。例示的な1つの実施態様では、二価リンカーは約1～約30個の炭素原子を含むことができる。もう1つの例示的実施態様では、二価リンカーは約2～約20個の炭素原子を含むことができる。他の実施態様では、低分子量二価リンカー(すなわち、約30～約300のおよその分子量を有するもの)が用いられる。もう1つの実施態様では、適切な長さのリンカーとして、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39または40個の原子を有するリンカーが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【 0 0 3 5 】

さまざまな実施態様では、標的化部分に連結された小分子リガンドは、式：

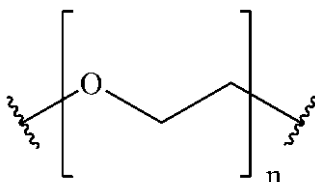
【化 1 8】



[式中、Bは小分子リガンドを表し、Lはリンカーを表し、およびTは標的化部分を表し、ここで、Lは、式：

20

【化 1 9】



(式中、nは、0～200の整数である)

で示される構造を含む]

30

で示されうる。もう1つの実施態様では、nは、0～150、0～110、0～100、0～90、0～80、0～70、0～60、0～50、0～40、0～30、0～20、0～15、0～14、0～13、0～12、0～11、0～10、0～9、0～8、0～7、0～6、0～5、0～4、0～3、0～2、0～1、15～16、15～17、15～18、15～19、15～20、15～21、15～22、15～23、15～24、15～25、15～26、15～27、15～28、15～29、15～30、15～31、15～32、15～33、15～34、15～35、15～36、15～37、15～38、15～39、15～40、15～50、15～60、15～70、15～80、15～90、15～100、15～110、15～120、15～130、15～140、15～150の整数でありうるか、またはnは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、50、60、70、80、90、100、108、110、120、130、140、または150でありうる。

40

【 0 0 3 6 】

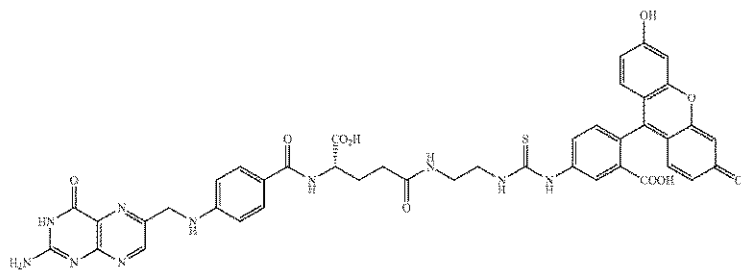
もう1つの実施態様では、リンカーは、1つ以上のスペーサーを含み得る二価リンカーであってもよい。例示的なスペーサーを以下の表に示す。

以下の非限定的な例示的スペーサーが記載され、ここで、*は小分子リガンドまたは標的化部分への結合点を示す。

【 0 0 3 7 】

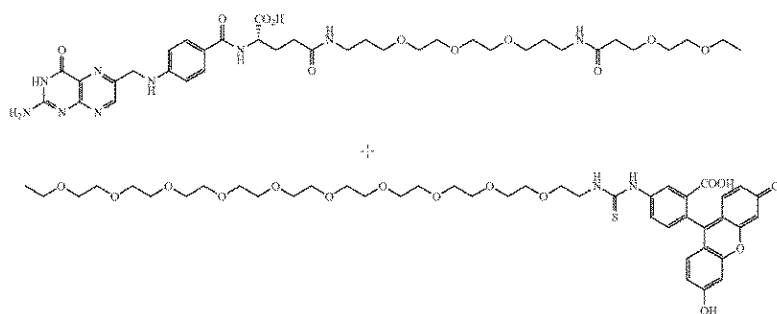
【表 1】

【化 2 0】



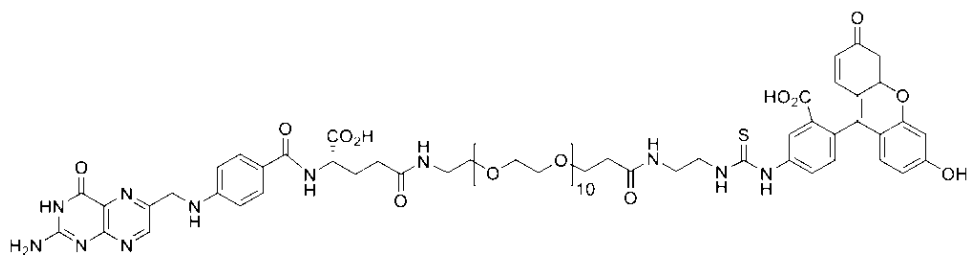
【化 2 1】

10



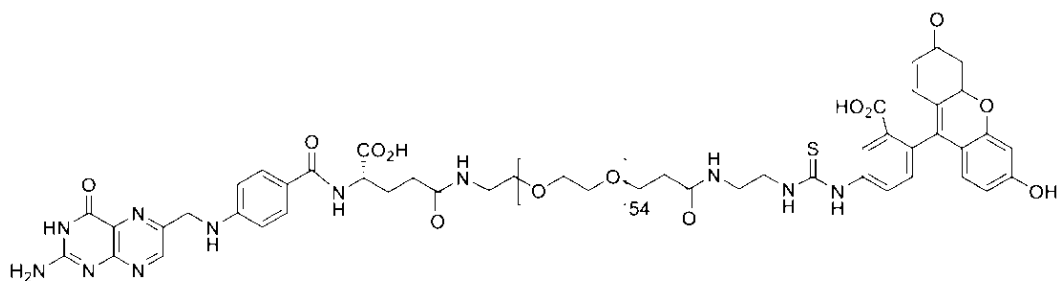
20

【化 2 2】



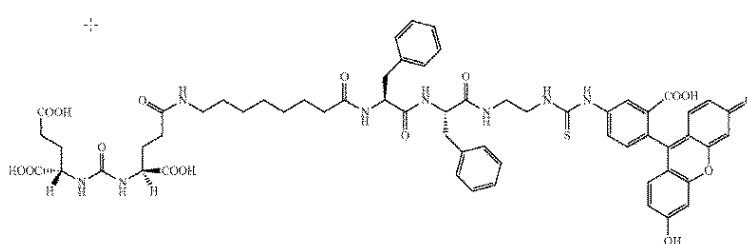
30

【化 2 3】



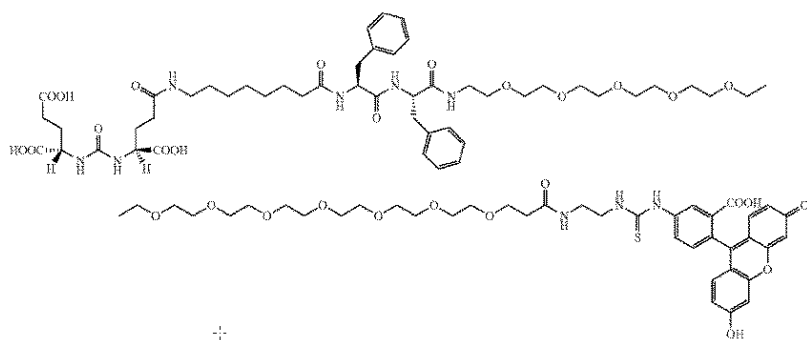
40

【化 2 4】



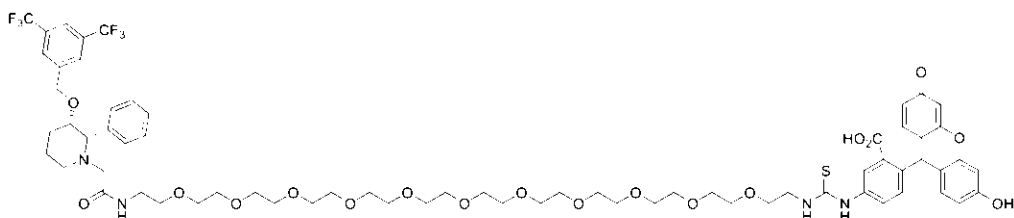
50

【化 2 5】



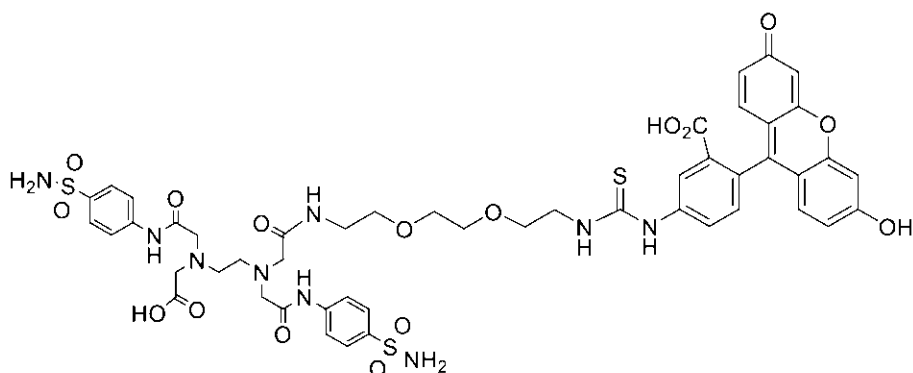
10

【化 2 6】



20

【化 2 7】



30

【0039】

他の実施態様では、化合物またはその薬学的に許容される塩、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、または第2の複合体またはその薬学的に許容される塩は、抗体ではなく、抗体のフラグメントを含まない。さらにもう1つの実施態様では、標的化部分は、ペプチドエピトープではない。

40

【0040】

1つの例示的態様では、異なるタイプの複合体(たとえば、第1の複合体および第2の複合体)を患者に投与することができる。たとえば、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩中のリンカー、および第2の複合体またはその薬学的に許容される塩中のリンカーは、同一であるか、または異なりうる。もう1つの態様では、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩中のリガンド、および第2の複合体またはその薬学的に許容される塩中のリガンドは、同一であるか、または異なりうる。もう1つの例示的実施態様では、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩中の標的化部分、および第2の複合体またはその薬学的に許容される塩中の標的化部分は、同一であるか、または異なりうる。これらの実施態様の任意の組み合わせもまた、以下に記載される用量の任意の組み合わせと共に企図さ

50

れる。

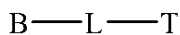
【0041】

さらにもう1つの実施態様では、少なくとも2つの異なるタイプのブリッジを含むキットが提供され、ここで、ブリッジは、標的化部分に連結された小分子リガンドを含み、ここで、少なくとも2つの異なるタイプのブリッジ中のリガンドは異なり、ここで、リガンドは、葉酸、DUPA、CAIXリガンド、NK-1Rリガンド、ガンマグルタミルトランスペプチダーゼのリガンド、およびCCK2Rリガンドから選択される。この実施態様では、少なくとも1つのブリッジ中のリガンドは、NK-1Rリガンド、ガンマグルタミルトランスペプチダーゼのリガンド、葉酸、CAIXリガンド、CCK2Rリガンド、またはDUPAでありうる。

【0042】

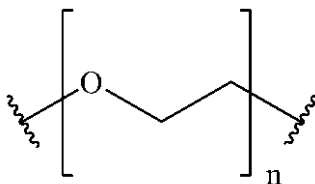
もう1つの態様では、キット中のブリッジは、式：

【化28】



[式中、Bは小分子リガンドを表し、Lはリンカーを表し、およびTは標的化部分を表し、ここで、Lは、式：

【化29】



(式中、nは、0～200の整数である)

で示される構造を含む]

を有しうる。他の実施態様では、nは、0～150の整数、0～110の整数、0～20の整数、15～20の整数、15～110、またはnについて本明細書に記載された任意の他の整数の値または範囲でありうる。

【0043】

リンカーによって標的化部分に連結された小分子リガンドの「薬学的に許容される塩」が、意図される。本明細書で用いる用語「薬学的に許容される塩」は、その対イオンが医薬において使用されうる塩を示す。このような塩として、1)親化合物の遊離塩基と、塩酸、臭化水素酸、硝酸、リン酸、硫酸、および過塩素酸等などの無機酸、あるいは酢酸、シュウ酸、(D)または(L)リンゴ酸、マレイン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、サリチル酸、酒石酸、クエン酸、コハク酸またはマロン酸等などの有機酸との反応によって得ることができる酸付加塩；または2)親化合物中に存在する酸性プロトンが、たとえば、アルカリ金属イオン、アルカリ土類イオン、またはアルミニウムイオンなどの金属イオンによって置換されるか、またはエタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、トリメタミン、N-メチルグルカミン等などの有機塩基と配位する場合に形成される塩が挙げられる。薬学的に許容される塩は、当業者に周知であり、そのような薬学的に許容される塩は、本明細書に記載の実施態様に関連して企図されうる。

【0044】

さまざまな実施態様では、適切な酸付加塩は、非毒性塩が形成される酸から形成される。例示的な例として、酢酸塩、アスパラギン酸塩、安息香酸塩、ベシル酸塩、重炭酸塩/炭酸塩、重硫酸塩/硫酸塩、ホウ酸塩、カンシル酸塩、クエン酸塩、エジシル酸塩、エシル酸塩、ギ酸塩、フマル酸塩、グルセプト酸塩、グルコン酸塩、グルクロン酸塩、ヘキサフルオロリン酸塩、ヒベンズ酸塩、塩酸塩/塩化物、臭化水素酸塩/臭化物、ヨウ化水素/ヨウ化物、イセチオン酸塩、乳酸塩、リンゴ酸塩、マレイン酸塩、マロン酸塩、メシル酸塩、メチル硫酸塩、ナフチル酸塩、2-ナプシル酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、オロチン酸塩、シ

10

20

30

40

50

ユウ酸塩、パルミチン酸塩、パモ酸塩、リン酸塩/リン酸水素塩/リン酸二水素塩、サッカ
ラート、ステアリン酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、トシル酸塩およびトリフルオロ酢酸塩
が挙げられる。

【0045】

さまざまな実施態様では、適切な塩基塩(base salts)は、非毒性塩が形成される塩基か
ら形成される。例示的な例として、アルギニン、ベンザチン、カルシウム、コリン、ジエ
チルアミン、ジオールアミン、グリシン、リジン、マグネシウム、メグルミン、オラミン
、カリウム、ナトリウム、トロメタミンおよび亜鉛塩が挙げられる。酸および塩基のヘミ
塩、たとえば、ヘミ硫酸塩および半カルシウム塩も形成されうる。

【0046】

1つの例示的態様では、本明細書に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩、第1
の複合体またはその薬学的に許容される塩、または第2の複合体またはその薬学的に許容
される塩は、1つ以上のキラル中心を含むことができるか、またはそうでなければ、複数
の立体異性体として存在することができる。したがって、さまざまな実施態様は、純粋な
立体異性体、ならびにエナンチオマー、ジアステレオマー、およびエナンチオマー的また
はジアステレオマー的に富んだ混合物などの立体異性体の混合物を含みうる。1つの態様
では、本明細書に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩、第1の複合体またはそ
の薬学的に許容される塩、または第2の複合体またはその薬学的に許容される塩は、幾何
異性体として存在することができる。したがって、さまざまな実施態様は、純粋な幾何異
性体または幾何異性体の混合物を含みうる。

【0047】

いくつかの態様では、本明細書に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩、第1
の複合体またはその薬学的に許容される塩、または第2の複合体またはその薬学的に許容
される塩は、非溶媒和形態および水和形態などの溶媒和形態で存在しうる。一般に、溶媒
和形態は、非溶媒和形態と等価であり、本発明の範囲に包含される。

【0048】

本明細書に記載の方法はまた、ブリッジの標的化部分(たとえば、FITC、DNP、またはT
NP)を認識して結合するキメラ抗原受容体(CAR)を発現するように操作された細胞傷害性T
リンパ球を利用する。1つの実施態様では、本明細書に記載のCARは、1)特異性を有する
標的化部分を認識してこれに結合する認識領域(たとえば、抗体の一本フラグメント可変(s
cFv)領域); 2)Tリンパ球の増殖および生存を促進する共刺激ドメイン; および3)細胞傷害
性Tリンパ球活性化シグナルを生成する活性化シグナル伝達ドメイン; などの3つのドメイ
ンを含む。

【0049】

さまざまな態様では、葉酸、DUPA、CAIXリガンド、NK-1Rリガンド、ガンマグルタミ
ルトランスペプチダーゼのリガンド、またはCCK2Rリガンドを結合する抗体のscFv領域
を使用することができる。例示的な実施態様では、scFv領域は、(i)標的化部分に結合する当
該分野で公知の抗体、(ii)ハプテンなどの選択された標的部分を用いて新たに調製された抗
体、および(iii)そのような抗体のscFv領域に由来する配列変異体から製造することができ
、たとえば、それらが由来するscFv領域のアミノ酸配列に対して、少なくとも約80%、少
なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも
約99%、または少なくとも約99.5%の配列同一性を有するscFv領域である。

【0050】

本明細書に記載の任意の実施態様では、CARの結合部分は、たとえば、抗体、Fab、Fv
、Fc、または(Fab')2フラグメントなどの一本鎖フラグメント可変領域(scFv)でありうる。

【0051】

1つの態様では、共刺激ドメインは、標的化部分へのCARの結合の際の細胞傷害性Tリン
パ球の増殖および生存を増強する働きをする。適切な同時刺激ドメインとして: 1)CD28
、2)腫瘍壊死因子(TNF)受容体ファミリーのメンバーであるCD137(4-1BB)、3)受容体の
TNFRスーパーファミリーのメンバーであるCD134(OX40)、および4)CD278(ICOS)、活

10

20

30

40

50

性化T細胞上に発現されるCD28スーパーファミリー共刺激分子、またはそれらの組み合わせ、が挙げられる。適切な同時刺激ドメインにはまた、CD27、CD30、CD150、DAP10、およびNKG2D、またはそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。当業者であれば、これらの共刺激ドメインの配列変異体が、本発明に悪影響を及ぼすことなく使用でき、それらがモデル化されるドメインと同じか、または類似の活性を有することを理解するであろう。さまざまな実施態様では、このような変異体は、それらが由来するドメインのアミノ酸配列に対して、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または少なくとも約99.5%の配列同一性を有する。

【0052】

例示的实施態様では、活性化シグナル伝達ドメインは、標的化部分にCARが結合すると細胞傷害性Tリンパ球を活性化するように働く。適切な活性化シグナル伝達ドメインとして、T細胞CD3 鎖およびFc受容体 が挙げられる。当業者であれば、変異体がモデル化されるドメインと同じかまたは同様の活性を有する場合、これらの注目される活性化シグナル伝達ドメインの配列変異体を用いることができることを理解するであろう。さまざまな実施態様では、変異体は、それらが由来するドメインのアミノ酸配列に対して、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または少なくとも約99.5%の配列同一性を有する。

【0053】

1つの態様では、CARをコードする構築物は、遺伝子工学技術を用いて製造される。このような技術は、参照により本明細書に組み込まれる、Sambrookら、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)に詳細に記載されている。一例として、フレーム内に認識領域、1つ以上の共刺激ドメイン、および活性化シグナル伝達ドメインを含み、5' から3' 方向に連結した融合タンパク質をコードするプラスミドまたはウイルス発現ベクター(たとえば、レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクター、スリーピング・ビューティ、およびピギーバック(非ウイルス媒介CAR遺伝子デリバリーシステムを含むトランスポゾン/トランスポゼースシステム))

を製造することができる。他の実施態様では、他の構成が許容可能であり、認識領域、活性化シグナル伝達ドメイン、および1つ以上の共刺激ドメインを含む。融合タンパク質における認識領域の配置は、一般に、細胞の外側に領域の表示が達成されるように行われる。1つの実施態様では、CARは、融合タンパク質の細胞表面への適切な輸送を確実にするシグナルペプチド、融合タンパク質が完全な膜タンパク質として維持されることを確実にする膜貫通ドメイン、および認識領域に柔軟性を与え、標的化部分との強い結合を可能にするヒンジドメイン

などの追加の要素が含まれてもよい。

【0054】

例示的CARの図形が、図14AおよびBに示されており、そこでは、融合タンパク質配列がレンチウイルス発現ベクターに組み込まれており、「SP」がシグナルペプチドであり、CARが抗FITC CAR、CD3 ヒンジおよび膜貫通(TM)領域が存在し、共刺激ドメインは4-1BBであり、活性化シグナル伝達ドメインはCD3 である。1つの態様では、CARインサートの核酸配列は配列番号：1として提供され、インサートのアミノ酸配列は配列番号：2として提供される。

【0055】

1つの実施態様では、CARは認識領域を有し、認識領域は、抗FITC抗体の一本鎖フラグメント可変(scFv)領域であり、共刺激ドメインであり、共刺激ドメインは、CD137(4-1BB)であり、活性化シグナル伝達ドメインおよび活性化シグナル伝達ドメインはT細胞CD3 鎖である。抗FITC scFvおよび抗フルオレセインscFvが等価な用語であることは、当業者に周知である。

【0056】

10

20

30

40

50

1つの実施態様では、細胞傷害性Tリンパ球の集団を、CAR構築物をコードする発現ベクターでトランスフェクションすることにより、細胞傷害性Tリンパ球を遺伝子操作してCAR構築物を発現させることができる。選択されたCAR構築物を発現するTリンパ球の形質導入された集団を調製するための適切な方法は、当業者に周知であり、参照により本明細書に組み込まれる、Sambrookら、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、(2001)に記載されている。

【0057】

さまざまな実施態様では、配列番号：1または3の核酸を含むCAR T細胞が提供される。もう1つの実施態様では、配列番号：2のポリペプチドを含むCAR T細胞が提供される。もう1つの例示的態様では、配列番号：1または3を含み、キメラ抗原受容体をコードする単離された核酸が提供される。さらにもう1つの実施態様では、配列番号：2を含むキメラ抗原受容体ポリペプチドが提供される。もう1つの実施態様では、配列番号：1または3を含むベクターが提供される。もう1つの態様では、配列番号：1または3を含むレンチウイルスベクターが提供される。もう1つの実施態様では、配列番号：2は、ヒトまたはヒト化アミノ酸配列を含みうるか、またはそれらからなりうる。

【0058】

これらの実施態様のそれぞれでは、配列番号：1、配列番号：2、または配列番号：3に対して、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または少なくとも約99.5%の配列同一性を有する変異体核酸配列またはアミノ酸配列が企図される。もう1つの実施態様では、核酸配列は、配列番号：1または3に対して、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または少なくとも約99.5%の配列同一性を有する変異体核酸配列でありえ、ならびに該変異体配列は、配列番号：2のポリペプチドをコードする。もう1つの実施態様では、変異体核酸またはアミノ酸配列は、列番号：1または配列番号：2または配列番号：3の200核酸または200アミノ酸のストレッチに沿って、配列番号：1または配列番号：2または配列番号：3に対して、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または少なくとも約99.5%の配列同一性を有する変異体核酸またはアミノ酸配列でありうる。配列間の同一性または類似性パーセントの決定は、たとえば、GAPプログラム(Genetics Computer Group、ソフトウェア; Accelrys on <http://www.accelrys.com>で入手可能)を用いて行うことができ、アラインメントは、たとえば、ClustalWアルゴリズム(VNTIソフトウェア、InforMax Inc.)を用いて行うことができる。目的の核酸またはアミノ酸配列を用いて配列データベースを検索することができる。データベース検索のためのアルゴリズムは、通常、BLASTソフトウェアに基づいている(Altschulら、1990)。いくつかの実施態様では、同一性パーセントは、核酸またはアミノ酸配列の全長に沿って決定することができる。

【0059】

また、本発明の範囲内には、配列番号：1または3で表される核酸に相補的な核酸、および配列番号：1または3で表される核酸にハイブリダイズする核酸、または高緊縮条件下でその相補体にハイブリダイズする核酸が含まれる。本発明において、「高度緊縮条件」とは、5×SSPEおよび50%ホルムアミド中での65℃でのハイブリダイゼーションおよび0.5×SSPE中での65℃での洗浄を意味する。高緊縮、低緊縮および適度な縮性ハイブリダイゼーション条件は、参照により本明細書に組み込まれる、Sambrookら、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、(2001)に記載されている。いくつかの例示的な態様において、ハイブリダイゼーションは、核酸の全長に沿って起こる。

【0060】

1つの実施態様では、治療される患者が患者の免疫系を破壊するために高用量の化学療法または放射線治療を受けた場合など、異種細胞も使用することができるが、本明細書に記載の方法で使用する、CAR T細胞を調製するために使用される細胞傷害性Tリンパ球

10

20

30

40

50

は、自己細胞でありうる。1つの実施態様では、同種細胞を用いることができる。

【0061】

1つの態様では、細胞傷害性リンパ球Tは、当技術分野で周知の手段によって患者から得ることができる。たとえば、細胞傷害性T細胞は、患者から末梢血を採取し、血液をFicoll密度勾配遠心分離にかけ、次いで、ネガティブT細胞単離キット(EasySep(商標)T細胞単離キットなど)を用いて、末梢血から細胞傷害性T細胞の集団を単離することによって得ることができる。例示的な1つの実施態様では、細胞傷害性Tリンパ球の集団は純粋である必要はなく、他のT細胞、単球、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞、およびB細胞などの他の細胞を含むことができる。1つの態様では、採取された集団は、選択された細胞型の少なくとも約90%、選択された細胞型の少なくとも約91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%を含むことができる。

10

【0062】

1つの実施態様では、細胞傷害性Tリンパ球が得られた後、細胞の活性化を促進する条件下で細胞は培養される。この実施態様では、培養条件は、培養培地の成分に対する反応性を考慮することなく細胞を患者に投与することができるようなものであってもよい。たとえば、培養条件は、ウシ血清アルブミンなどのウシ血清産物を含まなくてもよい。1つの例示的態様では、細胞傷害性T細胞の場合には、抗CD3抗体など公知の活性化剤を培地に導入することによって活性化を達成することができる。他の適切な活性化剤として、抗CD28抗体が挙げられる。1つの態様では、リンパ球の集団は、約1~約4日間、活性化を促進する条件下で培養することができる。1つの実施態様では、適切なレベルの活性化は、細胞サイズ、増殖速度、またはフローサイトメトリーによって決定される活性化マーカーによって決定することができる。

20

【0063】

例示的な1つの実施態様では、活性化を促進する条件下で細胞傷害性Tリンパ球の集団を培養した後、CARをコードする発現ベクターで細胞をトランスフェクションすることができる。適切なベクターおよびトランスフェクション方法は上記に記載されている。1つの態様では、トランスフェクション後、細胞を患者に直ちに投与することができるか、または、たとえば、細胞がトランスフェクションから回復する時間を可能にするために、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18日間以上、あるいは約5~約12日間、約6~約13日間、約7~約14日間、または約8~約15日間、細胞を培養することができる。

30

。適切な培養条件は、細胞が、活性化を促進するために使用された薬剤を用いるか、または用いないかのいずれかで、活性化のために培養された条件と同様でありうる。

【0064】

したがって、上述したように、1つの例示的態様では、本明細書に記載の治療方法は、さらに、1)自己または異種の細胞傷害性Tリンパ球の集団を得ること、2)Tリンパ球を細胞の活性化を促進する条件下で培養すること、および3)CARをコードする発現ベクターでリンパ球をトランスフェクションしてCAR T細胞を形成すること、を含みうる。

【0065】

例示的な1つの実施態様では、細胞がトランスフェクトされ、活性化された際に、CAR T細胞を含む組成物を調製し、患者に投与することができる。1つの実施態様では、ウシ血清のような動物性産物を欠く培養培地を使用することができる。もう1つの実施態様では、細菌、真菌およびマイコプラズマによる汚染を避けるために当業者が典型的に用いる組織培養条件を使用することができる。例示的実施態様では、患者に投与する前に、細胞をペレット化し、洗浄し、そして薬学的に許容される担体または希釈剤中に再懸濁させる。CARを発現する細胞傷害性Tリンパ球を含む例示的な組成物は、滅菌290mOsm生理食塩水中、注入可能な低温用媒体(Plasma-Lyte A、デキストロース、塩化ナトリウム注射液、ヒト血清アルブミンおよびDMSOを含む)中、2%ヒト血清アルブミンを含む0.9%NaCl中、または任意の他の滅菌290mOsm注入材料中の細胞を含む組成物を含む。あるいは、培養培地の固有性に応じて、CAR T細胞は、組成物として培養培地中に投与されうるか、

40

50

または濃縮され、投与前に培地に再懸濁されうる。CAR T細胞組成物は、非経口投与(たとえば、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内、静脈内、またはくも膜下腔内)などの任意の適切な手段を介して患者に投与することができる。

【0066】

1つの態様では、患者に投与される組成物中のCAR T細胞の総数および細胞の濃度は、使用される細胞傷害性Tリンパ球のタイプ、CARの結合特異性、標的化部分と小分子リガンドの固有性、がんの固有性、患者におけるがんの位置、組成物を患者に投与するために使用される手段、および治療される患者の健康、年齢および体重などの多くの因子に依存して変化する。しかしながら、形質導入されたCAR T細胞を含む適切な組成物は、約 1×10^5 ~ 約 1×10^{15} 個の形質導入されたCAR T細胞を含む、約5ml ~ 約200mlの容量を有する組成物を含む。典型的な組成物は、約 1×10^7 ~ 約 1×10^{10} 個のCAR T細胞を含む、約10ml ~ 約125mlの容量を含む。例示的な組成物は、約100mlの容量中に、約 1×10^9 個のCAR T細胞を含む。1つの態様では、CAR T細胞の単回用量または複数回用量を患者に投与することができる。

10

【0067】

さまざまな実施態様では、治療されるがんは、癌腫、肉腫、リンパ腫、メラノーマ、中皮腫、鼻咽頭癌、白血病、腺癌、または骨髄腫である。他の実施態様では、がんは、肺がん、骨がん、膵がん、皮膚がん、頭部がん、頸部がん、皮膚黒色腫、眼内黒色腫、子宮がん、卵巣がん、子宮内膜がん、直腸がん、胃がん、結腸がん、乳がん、トリプルネガティブ乳がん、子宮頸管の癌、子宮内膜の癌、子宮頸部の癌、膣の癌、外陰部の癌、ホジキン病、食道のがん、小腸のがん、内分泌系のがん、甲状腺のがん、副甲状腺のがん、非小細胞肺がん、副腎のがん、軟部組織の肉腫、尿道のがん、前立腺がん、慢性白血病、急性白血病、リンパ球性リンパ腫、胸膜中皮腫、膀胱のがん、バーキットリンパ腫、尿管のがん、腎臓のがん、腎細胞癌、腎盂の癌、中枢神経系(CNS)新生物、原発性CNSリンパ腫、脊髄軸腫瘍、脳幹グリオーマ、下垂体腺腫または胃食道接合部の腺癌であってもよい。

20

【0068】

これらの実施態様のいくつかの態様では、がんは、葉酸受容体を発現しているがんである。これらの実施態様のいくつかの態様では、がんは、子宮内膜がん、非小細胞肺がん、卵巣がん、またはトリプルネガティブ乳がんである。もう1つの実施態様では、イメージングされるがんは、腫瘍である。もう1つの実施態様では、がんは、悪性である。

30

【0069】

本明細書に記載される化合物またはその薬学的に許容される塩、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、第2の複合体またはその薬学的に許容される塩、またはCAR T細胞組成物は、当技術分野で公知の任意の適切な方法を用いて患者に投与されうる。本明細書に記載されるように、用語「投与する」または「投与された」は、限定的ではないが、経口(po)、静脈内(iv)、筋肉内(im)、皮下(sc)および経皮などの、化合物またはその薬学的に許容される塩、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、第2の複合体またはその薬学的に許容される塩、またはCAR T細胞組成物を患者に導入するすべての手段を包含する。本明細書に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、または第2の複合体またはその薬学的に許容される塩は、従来の無毒性の薬学的に許容される担体、アジュバントおよびビヒクルを含有する単位投与剤形および/または製剤で投与されうる。

40

【0070】

1つの態様では、本明細書に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、第2の複合体またはその薬学的に許容される塩、またはCAR T細胞組成物は、血流、筋肉、または内部臓器に直接投与することができる。このような非経口投与に適した経路として、静脈内、動脈内、腹腔内、髄腔内、硬膜外、脳室内、尿道内、胸骨内、頭蓋内、腫瘍内、筋肉内および皮下送達が挙げられる。1つの実施態様では、非経口投与のための手段として、針(マイクロニードルを含む)注射器、無針注射器および注入技術が挙げられる。

50

10

20

30

50

ol/kg、約50nmol/kg～約500nmol/kg、約50nmol/kg～約400nmol/kg、約50nmol/kg～約300nmol/kg、約50nmol/kg～約200nmol/kg、約50nmol/kg～約100nmol/kg、約100nmol/kg～約300nmol/kg、約100nmol/kg～約500nmol/kg、約100nmol/kg～約1000nmol/kg、約100nmol/kg～約2000nmol/kgの範囲でありうる。他の実施態様では、用量は、患者の体重当たり、約100nmol/kg、約150nmol/kg、約200nmol/kg、約250nmol/kg、約300nmol/kg、約350nmol/kg、約400nmol/kg、約450nmol/kg、約500nmol/kg、約600nmol/kg、約700nmol/kg、約800nmol/kg、約900nmol/kg、約1000nmol/kg、約2000nmol/kg、または約3000nmol/kgであってもよい。これらの実施態様では、「kg」は、患者の体重のキログラムである。1つの態様では、化合物またはその薬学的に許容される塩、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、第2の複合体またはその薬学的に許容される塩の単回または複数回用量が、患者に投与されてもよい。

10

【0075】

もう1つの実施態様では、約20 ug/患者の体重kg～約3 mg/患者の体重kgの化合物またはその薬学的に許容される塩、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、第2の複合体またはその薬学的に許容される塩が、患者に投与される。もう1つの態様では、量は、約0.2 mg/患者の体重kg～約0.4 mg/患者の体重kgでありうるか、または約50 ug/患者の体重kgでありうる。1つの態様では、化合物またはその薬学的に許容される塩、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、第2の複合体またはその薬学的に許容される塩の単回または複数回用量が、患者に投与されてもよい。

20

【0076】

1つの実施態様では、標的化部分に連結された小分子リガンドは、CAR T細胞組成物の前に患者に投与されうる。もう1つの実施態様では、標的化部分に連結された小分子リガンドは、CAR T細胞組成物と同時であるが異なる製剤中で、患者に投与される。さらにもう1つの実施態様では、標的化部分に連結された小分子リガンドは、CAR T細胞組成物の後に患者に投与されうる。

【0077】

1つの例示的態様では、CAR T細胞の投与と標的化部分に連結された小分子の投与との間のタイミングは、使用されるCAR T細胞のタイプ、CARの結合特異性、標的化部分と小分子リガンドの固有性、がんの固有性、患者におけるがんの位置、CAR T細胞および標的化部分に連結された小分子リガンドを患者に投与するために使用される手段、および治療される患者の健康、年齢および体重などの因子に依存して大きく変化する。1つの態様では、標的化部分に連結された小分子リガンドは、約3、6、9、12、15、18、21、または24時間以内、または約0.5、1、1.5、2、2.5、3、4、5、6、7、8、9、10日以内もしくはそれ以上などで、CAR T細胞の前後に投与されうる。

30

【0078】

いくつかの実施態様では、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、第2の複合体またはその薬学的に許容される塩、または第1および第2の複合体またはその薬学的に許容される塩の両方の投与速度を調節することによって、腫瘍溶解の速度を制御することができる。したがって、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、第2の複合体またはその薬学的に許容される塩、または第1および第2の複合体またはその薬学的に許容される塩の両方の投与速度を変化させることによって、CAR T細胞組成物の細胞傷害性を制御することができる。いくつかの実施態様では、本明細書に記載するように、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、第2の複合体またはその薬学的に許容される塩、または第1および第2の複合体またはその薬学的に許容される塩の両方の投与速度を調節することによって、CAR T細胞組成物の細胞傷害性を、腫瘍溶解症候群またはサイトカイン放出症候群(CRS)のリスクと釣り合わせることができる。第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、第2の複合体またはその薬学的に許容される塩、または第1および第2の複合体またはその薬学的に許容される塩の両方の投与速度が、当技術分野で周知の任意の投与スケジュールの関数でありうると理解される。たとえば、投与速度は、連続投与、1日1回の投与

40

50

(別称qd)、1日2回の投与(別称bid)、1日3回の投与(別称tid)、1週間に2回(別称BIW)、1週間に3回の投与(別称TIW)、毎週1回、およびそれに類するものに基づく投与スケジュールの関数でありうる。第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、第2の複合体またはその薬学的に許容される塩、または第1および第2の複合体またはその薬学的に許容される塩の両方のために選択された投与スケジュールは、濃度とともに適用されて、CAR T細胞組成物の細胞傷害性を制御しうると理解される。いくつかの実施態様では、本明細書に記載のように、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、第2の複合体またはその薬学的に許容される塩、または第1および第2の複合体またはその薬学的に許容される塩の両方の濃度とともに投与スケジュールを調節することによって、CAR T細胞組成物の細胞傷害性を、腫瘍溶解症候群またはサイトカイン放出症候群(CRS)のリスクと釣り合わせることを
10

【0079】

本明細書に記載の方法の1つの実施態様では、患者への化合物またはその薬学的に許容される塩、第1の複合体またはその薬学的に許容される塩、第2の複合体またはその薬学的に許容される塩の投与の前、または患者へのCAR T細胞組成物投与の前に、がんは、イメージングされる。例示的な1つの実施態様では、イメージングは、PETイメージングによって生じる。他の例示的な実施態様では、イメージングは、MRIイメージングまたはSPECT/CTイメージングによって生じる。イメージング法が、当技術分野で周知のいずれかの適切なイメージング法でありうるということが理解される。

【0080】

本明細書に記載の実施態様のいずれかでは、がんはCAR T細胞の傷害性が生じるにもかかわらず、患者の「オフターゲット」傷害性をもたらすサイトカイン放出は起こらない可能性がある。本明細書に記載の任意の実施態様では、がんはCAR T細胞の傷害性が生じるにもかかわらず、患者に「オフターゲット」組織傷害性が生じない可能性がある。本明細書に記載の任意の実施態様では、がんは、腫瘍を含んでいてもよく、「オフターゲット」傷害性は生じないが、患者の腫瘍の大きさが減少する可能性がある。

【実施例1】

【0081】

CAR遺伝子をコードするレンチウイルスベクターの作製

オーバーラップPCR法を用いて、フルオレセインに対するscFvを含むCAR構築物を作製した。フルオレセインに対するscFV、抗フルオレセイン(4-4-20)抗体由来の4M5.3(Kd=270fM、762bp)を合成した。図14Aに示すように、ヒトCD8 シグナルペプチド(SP、63bp)、ヒンジおよび膜貫通領域(249bp)、4-1BB(CD137、141bp)およびCD3 鎖(336bp)の細胞質ドメインをコードする配列を、オーバーラッピングPCRによって、抗フルオレセインscFVと融合させた。得られたCAR構築物(1551bp)をEcoRI/NotI切断レンチウイルス発現ベクターpCDH-EF1-MCS-(PGK-GFP)に挿入した(図14B、System Biosciences)。レンチウイルスベクター中のCAR構築物の配列をDNA配列決定により確認した。

【0082】

例示的なCAR核酸コード配列は、以下を含んでもよい：

【0083】

ATGGCCTTACCAAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAG
GCCGGATGTCGTGATGACCCAGACCCCTCAGCCTCCAGTGTCCTCGGTGACCAGG
CTTCTATTAGTTGCAGATCCAGCCAGTCCCTCGTGCACTCTAACGGTAATACCTACCTG
AGATGGTATCTCCAGAAGCCCGGACAGAGCCCTAAGGTGCTGATCTACAAAGTCTCCAA
CCGGGTGTCTGGAGTCCCTGACCGCTTCTCAGGGAGCGGTTCCGGCACCGACTTCACCC
TGAAGATCAACCGGGTGGAGGCCGAAGACCTCGGCGTCTATTTCTGCTCTCAGAGTACA
CATGTGCCCTGGACCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGGAGATCAAAAGCTCCGCAGACGA
TGCCAAGAAAGATGCCGCTAAGAAAGACGATGCTAAGAAAGACGATGCAAAGAAAGAC
GGTGGCGTGAAGCTGGATGAAACCGGAGGAGGTCTCGTCCAGCCAGGAGGAGCCATGAA
GCTGAGTTGCGTGACCAGCGGATTACCTTTGGGCACTACTGGATGAACTGGGTGCGAC
50

AGTCCCCAGAGAAGGGGCTCGAATGGGTCGCTCAGTTCAGGAACAAACCCTACAATTAT
GAGACATACTATTTCAGACAGCGTGAAGGGCAGGTTTACTATCAGTA

【 0 0 8 4 】

GAGACGATTCCAAATCTAGCGTGTACCTGCAGATGAACAATCTCAGGGTCTGAAGATACA
GGCATCTACTATTGCACAGGGGCATCCTATGGTATGGAGTATCTCGGTCAGGGGACAAG
CGTCACAGTCAGTTTTCGTGCCGGTCTTCCTGCCAGCGAAGCCCACCACGACGCCAGCGC
CGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAG
GCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGACACAGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGA
TATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTA
TCACCCTTTACTGCAACCACAGGAACCGTTTCTCTGTTGTTAAACGGGGCAGAAAGAAA
CTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGA
TGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGT
TCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAG
CTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCC
TGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGC
AGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAG
GGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACG
ACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA (配列番号：1)。

10

【 0 0 8 5 】

上記の例示的な核酸配列において、第1のATGが開始コドンである。例示的なCARアミノ酸配列は、以下を含んでもよい：

20

【 0 0 8 6 】

MALPVTALLPLALLLHAARPDVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLR
WYLQKPGQSPKVLIIYKVSNRVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKINRVEAEDLGVIYFCSQSTHV
PWTFGGGTKLEIKSSADDAKKDAKKDDAKKDDAKKDDGGVKLDETGGGLVQPGGAMKL
SCVTSGFTFGHYWMNWVRQSPEKGLEWVAQFRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDDSKS
SVYLMNNLRVEDTGIYYCTGASYGMEYLGQGSVTVSFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPA
PTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN
RFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFPFFFFFFEGGCELRVKFSRSADAPAY
QQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY
SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号：2)

30

【 0 0 8 7 】

例示的インサートは、以下を含んでもよい：

【 0 0 8 8 】

GCCACCATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGC
CGCCAGGCCGGATGTGCTGATGACCCAGACCCCCCTCAGCCTCCAGTGTCCTCGGTG
ACCAGGCTTCTATTAGTTGCAGATCCAGCCAGTCCCTCGTGCACTCTAACGGTAATACC
TACCTGAGATGGTATCTCCAGAAGCCCGGACAGAGCCCTAAGGTGCTGATCTACAAAGT
CTCCAACCGGGTGTCTGGAGTCCCTGACCGCTTCTCAGGGAGCGGTTCCGGCACCGACT
TCACCCTGAAGATCAACCGGGTGGAGGCCGAAGACCTCGGCGTCTATTTCTGCTCTCAG
AGTACACATGTGCCCTGGACCTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGGAGATCAAAAGCTCCGC
AGACGATGCCAAGAAAGATGCCGCTAAGAAAGACGATGCTAAGAAAGACGATGCAAAG
AAAGACGGTGGCGTGAAGCTGGATGAAACCGGAGGAGGTCTCGTCCAGCCAGGAGGAGC
CATGAAGCTGAGTTGCGTGACCAGCGGATTCACCTTTGGGCACTACTGGATGAACTGGG
TGCGACAGTCCCAGAGAAGGGGCTCGAATGGGTCGCTCAGTTCAGGAACAAACCCTAC
AATTATGAGACATACTATTTCAGACAGCGTGAAGGGCAGGTTTACTATCAGTA

40

【 0 0 8 9 】

GAGACGATTCCAAATCTAGCGTGTACCTGCAGATGAACAATCTCAGGGTCTGAAGATACA
GGCATCTACTATTGCACAGGGGCATCCTATGGTATGGAGTATCTCGGTCAGGGGACAAG
CGTCACAGTCAGTTTTCGTGCCGGTCTTCCTGCCAGCGAAGCCCACCACGACGCCAGCGC

50

CGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAG
 GCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGA
 TATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCTTCTCCTGTCACTGGTTA
 TCACCCTTTACTGCAACCACAGGAACCGTTTCTCTGTTGTTAAACGGGGCAGAAAGAAA
 CTCCTGTATATATTCAAACAACCATTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGA
 TGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGT
 TCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAG
 CTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCC
 TGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGC
 AGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAG
 GGGCAAGGGGCGACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACG
 ACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA (配列番号：3)

10

【0090】

上記の例示的なインサートにおいて、第1のGCCACC配列は、ATG開始コドンが続く、制限酵素切断部位であってもよい。例示的インサートアミノ酸配列は、以下を含んでもよい：

【0091】

ATMALPVTALLPLALLHAARPDVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTY
 LRWYLQKPGQSPKVLIIKVSNRVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKINRVEAEDLGVYFCSQST
 HVPWTFGGGTGLEIKSSADDAKDDAAKKDDAKKDDAKKDDGKVLDLDETGGGLVQPGGAM
 KLSCVTSGFTFGHYWMNWVRQSPEKGLEWVAQFRNKPYNYETIYSDSVKGRFTISRDDS
 KSSVYLQMNNLRVEDTGIYYCTGASYGMEYLGQGTSTVTSFVPVFLPAKPTTTPAPRPPT
 PAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNH
 RNRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAP
 AYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE
 AYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号：4)

20

【実施例2】

【0092】

ヒトT細胞形質導入のためのCAR遺伝子を含むレンチウイルスの産生

抗フルオレセイン一本鎖可変(scFv)CARを含むレンチウイルスウイルスを調製するために、293TNパッケージング細胞株を、抗フルオレセインscFv CARをコードするレンチウイルスベクターおよびパッケージングプラスミドの混合物の第2世代(Cellecta)で同時トランスフェクトした。トランスフェクションの24および48時間後、CAR遺伝子を有するレンチウイルスを含有する上清を採取し、ヒトT細胞での将来の形質導入のために、標準的なポリエチレングリコールウイルス濃縮法(Clontech)によってウイルス粒子を濃縮した。

30

【実施例3】

【0093】

ヒトPBMCからのヒトT細胞の単離

T細胞をフィコール密度勾配遠心分離(GE Healthcare Lifesciences)によりヒト末梢血単核細胞(PBMC)から単離した。残りのフィコール溶液を洗い流した後、EasySep™ヒトT細胞単離キット(STEM CELL technologies)を用いてT細胞を単離した。精製T細胞を、ヒトIL-2(100IU/mL、Miltenyi Biotech Inc)の存在下、1%ペニシリンおよび硫酸ストレプトマイシンを含むTexMACS培地(Miltenyi Biotech Inc)で培養した。T細胞をマルチウェルプレート中で 1×10^6 細胞/mLの密度で培養した。T細胞を分けて2~3日ごとに再供給した。

40

【実施例4】

【0094】

ヒトT細胞の形質導入

単離したT細胞を、ヒトIL-2(100IU/mL)の存在下で12~24時間、抗CD3/CD28抗体(

50

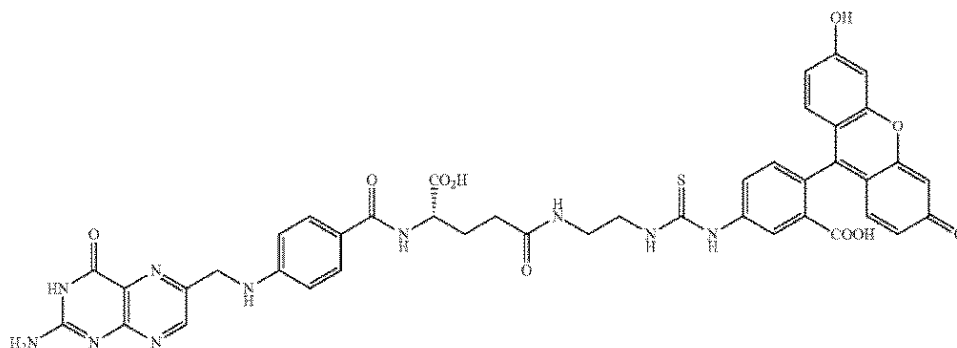
Life Technologies)とカップリングしたDynabeadsで活性化し、次いで、抗フルオレセインCAR遺伝子をコードするレンチウイルスで形質導入した。72時間後に細胞を収穫し、形質導入されたT細胞上のCARの発現を、フローサイトメトリーを用いてGFP蛍光細胞を測定することによって同定した。図15Aに示すように、非形質導入T細胞はGFP発現を示さない。図15Bに示すように、形質導入されたT細胞はGFPを発現する。

【実施例 5】

【0095】

FITC-葉酸の合成

【化30】



【0096】

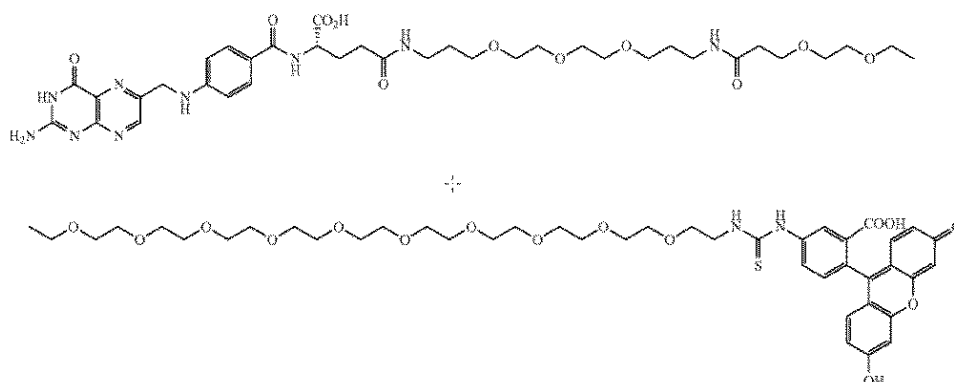
テトラメチルグアニジンおよびジイソプロピルアミンの存在下、葉酸- γ -エチレンジアミンを、無水ジメチルスルホキシド(DMF)中のフルオレセインイソチオシアネート(FITC)異性体I(Sigma-Aldrich)に結合させた。粗生成物をXterra RP18分取HPLCカラム(Waters)にロードし、99%5mMリン酸ナトリウム(移動相A、pH7.4)および1%アセトニトリル(移動相B)で開始し、20mL/分の流速で、10分間で90%Aおよび10%Bに達する勾配条件で溶出した。これらの条件下で、FITC-葉酸の主ピークは典型的に27~50分で溶出した。FITC-葉酸画分の質を、UV検出器を用いた分析用逆相HPLCによってモニターした。純度98.0%超の画分(LCMS)を凍結乾燥して最終的なFITC-葉酸生成物を得た。

【実施例 6】

【0097】

FITC-PEG12-葉酸の合成

【化31】



【0098】

ユニバーサルポリエチレングリコール(PEG)Nova Tag(商標)樹脂(0.2g)をペプチド合成容器に入れ、イソプロピルアルコール(i-PrOH)(3×10mL)およびジメチルホルムアミド(DMF、3×10mL)で洗浄した。DMF中の20%ピペリジン(3×10mL)を用いて9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)脱保護を行った。反応の進行を評価するためにカイザー試験を行った。次いで、容器に、DMF中のFmoc-L-グルタミン酸5-tert-ブチルエステル(Fmoc-Glu-(Ot-Bu)-OH)(23.5mg)の溶液、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(i-Pr₂NEt)

(4当量)およびベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(PyBOP)(2当量)を加えた。DMF中の20%ピペリジン(3×10mL)を用いてFmoc脱保護を行った。次いで、容器に、N¹⁰-TFA-Pte-OH(22.5mg)、DMF、i-Pr₂NEt(4当量)およびPyBOP(2当量)の溶液を入れた。アルゴンを2時間バブリングし、樹脂をDMF(3×3mL)およびi-PrOH(3×3mL)で洗浄した。ジクロロメタン(DCM)中で樹脂を膨潤させた後、DCM/トリフルオロエタン(TFE)(1:1)(2×3mL)中の1Mヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)の溶液を加えた。アルゴンを1時間バブリングし、溶媒を除去し、樹脂をDMF(3×3mL)およびi-PrOH(3×3mL)で洗浄した。樹脂をDMF中で膨潤させた後、DMF中のFmoc-NH-(PEG)₁₂-COOH(46.3mg)の溶液、i-Pr₂NEt(4当量)およびPyBOP(2当量)を加えた。アルゴンを2時間バブリングし、樹脂をDMF(3×3mL)およびi-PrOH(3×3mL)で洗浄した。DMF中の20%ピペリジン(3×10mL)を用いてFmoc脱保護を行った。反応の進行を評価するためにカイザー試験を行った。次いで、容器にDMFおよびi-Pr₂NEt(4当量)中のFITC(Life Technologies 21.4mg)の溶液を入れ、次いで、アルゴンを2時間バブリングし、樹脂をDMF(3×3mL)およびi-PrOH(3×3mL)で洗浄した。次いで、容器にDMF(2×2mL)中の2%NH₂NH₂を加えた。最終化合物を、TFA:H₂O:トリイソプロピルシラン(TIS)(95:2.5:2.5)(開裂溶液)を用いて樹脂から切断し、真空下で濃縮した。濃縮生成物をEt₂O中で沈殿させ、真空下で乾燥させた。粗生成物を分取RP-HPLC(移動相:A=10mM酢酸アンモニウム、pH=7、=ACN;方法:13mL/分にて30分で0%B~30%B)を用いて精製した。純粋な画分をプールし、凍結乾燥させて、FITC-PEG₁₂-葉酸を得た。

10

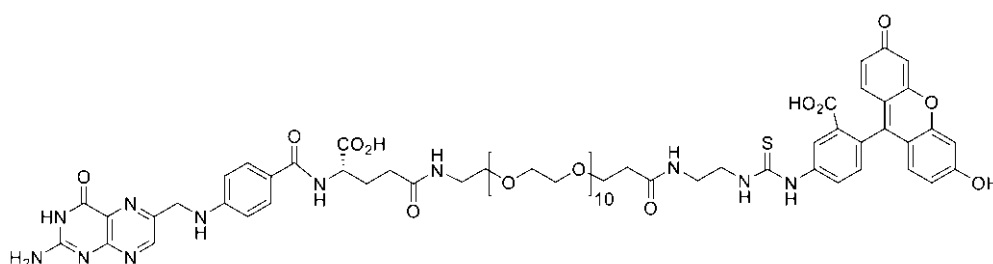
20

【実施例7】

【0099】

FITC-PEG20-葉酸の合成

【化32】



30

【0100】

エチレンジアミン、ポリマー結合(200-400メッシュ)-樹脂(50mg)をペプチド合成容器に入れ、DCM(3mL)、続いてDMF(3mL)で膨潤させた。次いで、容器にDMF中のFmoc-PEG₂₀-COOH溶液(131mg、1.0当量)、i-Pr₂NEt(6.0当量)およびPyBOP(4.0当量)を入れた。アルゴンを6時間バブリングし、カップリング溶液を排水し、樹脂をDMF(3×10mL)およびi-PrOH(3×10mL)で洗浄した。反応の進行を評価するためにカイザー試験を行った。各アミノ酸カップリングの前に、DMF(3×10mL)中の20%ピペリジンを用いてFmoc脱保護を行った。上記の手順を繰り返して、Fmoc-Glu-OtBu(72mg、2.0当量)およびTfa. プテロイン酸(41mg、1.2当量)のカップリング工程との反応を完了させた。樹脂をDMF 3×10mL中の2%ヒドラジンで洗浄(5分)して、プテロイン酸のトリフルオロ-アセチル保護基を切断し、i-PrOH(3×10mL)、続いてDMF(3×10mL)で洗浄した。樹脂をアルゴン下で30分間乾燥させた。切断溶液を用いて樹脂から葉酸-ペプチドを切断した。10mLの開裂混合物を入れ、アルゴンを1.5時間バブリングした。開裂混合物を清浄なフラスコに排出した。樹脂をさらなる切断混合物で3回洗浄した。合わせた混合物を減圧下でより少量(~5mL)に濃縮し、エチルエーテル中で沈殿させた。

40

【0101】

50

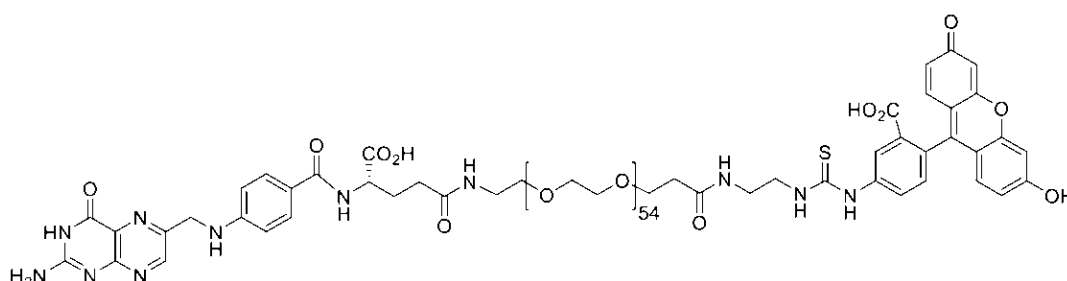
沈殿物を遠心分離によって集め、エチルエーテルで洗浄し(3回)、高真空下で乾燥させた。乾燥した葉酸-PEG₂₀-EDA(1.0当量)を、室温にて、DMSOおよびDIPEA中のFITC(50 mg、1.5当量)で処理した。反応の進行をLCMSによってモニターした。8時間後、出発物質を消費して生成物を得た。粗反応混合物を分取HPLC(移動相A=10mM酢酸アンモニウム、pH=7; 有機相B=アセトニトリル; 方法: 0%B~30%B、13mL/分にて35分)で精製し、FITC-PEG₂₀-葉酸を収率60%で得た。

【実施例 8】

【0102】

FITC-PEG₁₀₈-葉酸の合成

【化 3 3】



10

【0103】

エチレンジアミン、ポリマー結合(200-400メッシュ)-樹脂(50mg)をペプチド合成容器に入れ、DCM(3mL)、続いてDMF(3mL)で膨潤させた。次いで、容器にDMF中のFmoc-PEG₃₆-COOH溶液(161mg、1.0当量)、i-Pr₂NEt(6.0当量)およびPyBOP(4.0当量)を入れた。アルゴンを6時間バブリングし、カップリング溶液を排水し、樹脂をDMF(3×10mL)およびi-PrOH(3×10mL)で洗浄した。反応の進行を評価するためにカイザー試験を行った。各アミノ酸カップリングの前に、DMF(3×10mL)中の20%ピペリジンを用いてFmoc脱保護を行った。上記の手順を繰り返して、2X Fmoc-PEG₃₆-COOH(161 mg、1.0当量)、Fmoc-Glu-OtBu (72 mg、2.0当量)およびTfa. プテロイン酸(41.0 mg、1.2当量)のカップリング工程との反応を完了させた。樹脂をDMF 3×10mL中の2%ヒドラジンで洗浄(5分)して、プテロイン酸のトリフルオロアセチル保護基を切断し、i-PrOH(3×10mL)、続いてDMF(3×10mL)で洗浄した。最後に、樹脂をDMF 3×10mL中の2%ヒドラジンで洗浄して(5分)、プテロイン酸上のトリフルオロアセチル保護基を切断し、i-PrOH(3×10mL)、続いてDMF(3×10mL)で洗浄した。樹脂をアルゴン下で30分間乾燥させた。切断溶液を用いて樹脂から葉酸-ペプチドを切断した。10mLの開裂混合物を入れ、アルゴンを1.5時間バブリングした。開裂混合物を清浄なフラスコに排出した。樹脂をさらなる切断混合物で3回洗浄した。合わせた混合物を減圧下でより少量(~5mL)に濃縮し、エチルエーテル中で沈殿させた。

【0104】

沈殿物を遠心分離によって集め、エチルエーテルで洗浄し(3回)、高真空下で乾燥させた。乾燥した葉酸-PEG₁₀₈-EDA(1.0当量)を、室温にて、DMSOおよびDIPEA中のFITC(50 mg、1.5当量)で処理した。反応の進行をLCMSによってモニターした。10時間後、出発物質を消費して生成物を得た。粗反応混合物を分取HPLC(移動相A=10mM酢酸アンモニウム、pH=7; 有機相B=アセトニトリル; 方法: 0%B~30%B、13mL/分にて35分)で精製し、FITC-PEG₁₀₈-葉酸を収率64%で得た。

【実施例 9】

【0105】

FITC-DUPAの合成

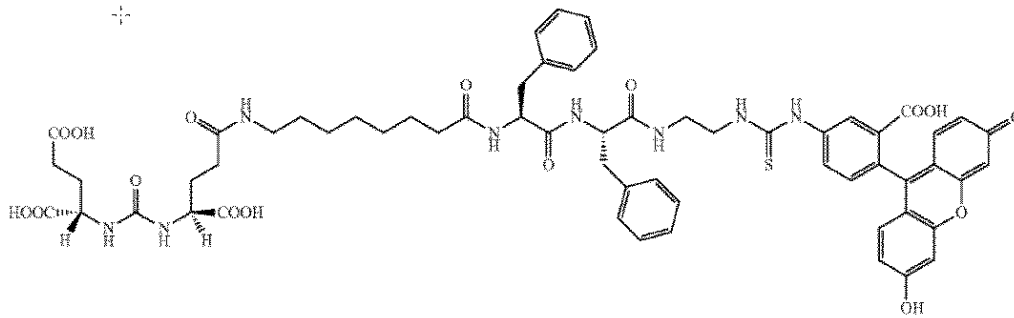
20

30

40

50

【化 3 4】



10

【 0 1 0 6】

DUPA-FITCは、以下のように固相方法によって合成した。Universal Nova Tag (商標)樹脂(50mg、0.53mM)をDCM(3mL)、続いてDMF 3mLで膨潤させた。20%ピペリジンのDMF溶液(3×3mL)を樹脂に加え、アルゴンを5分間バブリングした。樹脂をDMF(3×3mL)およびイソプロピルアルコール(i-PrOH、3×3mL)で洗浄した。アルゴンを2時間バブリングし、樹脂をDMF(3×3mL)およびi-PrOH(3×3mL)で洗浄した。樹脂をDCM中で膨潤させた後、DCM/TFE(1:1)(2×3mL)中の1M HOBtの溶液を加えた。アルゴンを1時間バブリングし、溶媒を除去し、樹脂をDMF(3×3mL)およびi-PrOH(3×3mL)で洗浄した。樹脂をDMF中で膨潤させた後、DMF中のFmoc-Phe-OH(2.5当量)、HATU(2.5当量)およびDIPEA(4.0当量)の溶液を加えた。アルゴンを2時間バブリングし、樹脂をDMF(3×3mL)およびi-PrOH(3×3mL)で洗浄した。8-アミノオクタン酸およびフルオレセインイソチオシアネートまたはロードミンイソチオシアネートの添加のためのさらなる2つのカップリング工程について、上記の手順を繰り返した。開裂溶液を用いて最終化合物を樹脂から切断し、真空下で濃縮した。濃縮生成物をジエチルエーテル中で沈殿させ、真空下で乾燥させた。分取RP-HPLC[$\lambda = 488\text{nm}$; 溶媒勾配: 25分で1% B ~ 80% B、80% B 洗浄30分; A=10mM NH_4OAc 、pH=7; B=アセトニトリル(ACN)]を用いて、粗生成物を精製した。ACNを真空下で除去し、精製画分を凍結乾燥してFITC-DUPAを茶色がかったオレンジ色の固体として得た。RP-HPLC: $t_R=8.0\text{分}$ (A=10 mM NH_4OAc 、pH=7.0; B=ACN、溶媒勾配: 10分で1% B ~ 50% B、80% Bで洗浄、15分ラン)。 $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6/\text{D}_2\text{O}$): 0.98-1.27 (ms, 9H); 1.45 (b, 3H); 1.68-1.85 (ms, 11H); 2.03 (m, 8H); 2.6-3.44 (ms, 12H); 3.82 (b, 2H); 4.35 (m, 1H); 6.53 (d, $J=8.1\text{ Hz}$, 2H); 6.61 (dd, $J=5.3, 3.5\text{ Hz}$, 2H); 6.64 (s, 2H); 7.05 (d, $J=8.2\text{ Hz}$, 2H); 7.19 (m, 5H); 7.76 (d, $J=8.0\text{ Hz}$, 1H); 8.38 (s, 1H)。HRMS (ESI)(m/z): ($M+H$) $^+$ $\text{C}_{51}\text{H}_{59}\text{N}_7\text{O}_{15}\text{S}$ について計算値、1040.3712、実測値、1040.3702。UV/vis: max=491 nm。

20

30

【実施例 10】

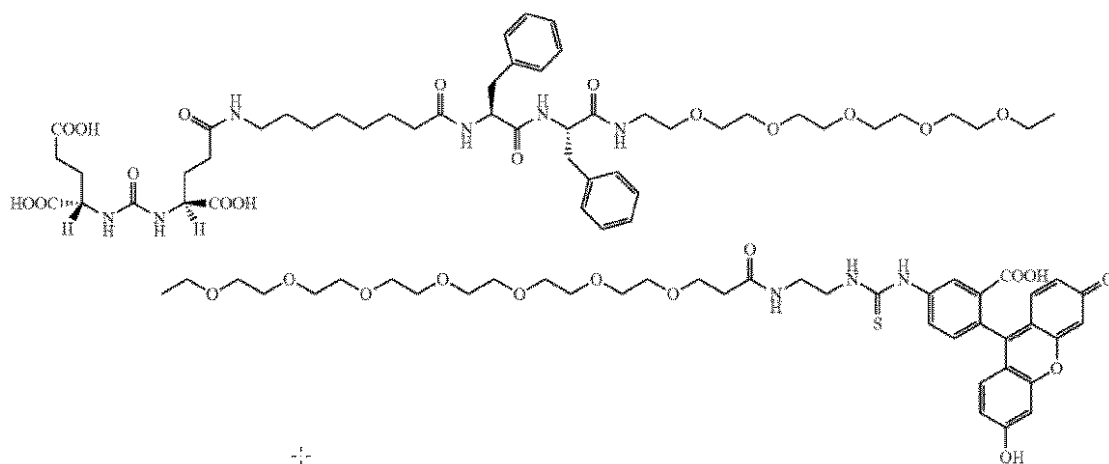
【 0 1 0 7】

FITC-PEG12-DUPAの合成

40

50

【化 3 5】



10

【 0 1 0 8 】

1,2-ジアミノエタントリチル樹脂(0.025g)をペプチド合成容器に入れ、i-PrOH(3×10 mL)、続いてDMF(3×10mL)で洗浄した。次いで、DMF中のFmoc-NH-(PEG)₁₂-COOH(42.8mg)、i-Pr₂NEt(2.5当量)およびPyBOP(2.5当量)の溶液を容器に導入した。得られた溶液をArで1時間バブリングし、カップリング溶液を排出し、樹脂をDMF(3×10mL)およびi-PrOH(3×10mL)で洗浄した。反応の進行を評価するためにカイザー試験を行った。DMF中の20%ピペリジン(3×10mL)を用いてFmoc脱保護を行った。この手順を繰り返して、すべてのカップリング工程を完了させた(2×1.5当量のFmoc-Phe-OHおよび1.5当量の8-アミノオクタン酸および1.2当量のDUPAを、それらの各カップリング工程のそれぞれで使用した)。DUPAカップリング後、樹脂をDMF(3×10mL)およびi-PrOH(3×10mL)で洗浄し、減圧下で乾燥させた。ペプチドは、切断溶液を用いてペプチド合成容器中の樹脂から切断された。15mLの切断溶液をペプチド合成容器に加え、反応物をAr下で15分間バブリングした。樹脂をさらに2回、10mL量の切断溶液でそれぞれ5分間処理した。切断混合物を約5mLに濃縮し、エチルエーテルで沈殿させた。沈殿物を遠心分離によって集め、エチルエーテル(3×)で洗浄し、高真空下で乾燥して、粗物質を回収した。ジメチルスルホキシド(DMSO、1mL)中の粗DUPA-(PEG)₁₂-EDA(10mg)およびFITC(5.6mg)の攪拌溶液に、室温にて、i-Pr₂NEt(5当量)を加え、アルゴン下で6時間攪拌した。LCMSにより反応をモニターし、分取HPLC(移動相：A=10mM酢酸アンモニウム、pH=7、B=ACN；方法：13mL/分で30分において0%B~50%B)で精製した。精製された画分をプールし、凍結乾燥してFITC-PEG₁₂-DUPAを得た。精製された画分をプールし、凍結乾燥してFITC-PEG₁₂-DUPAを得た。

20

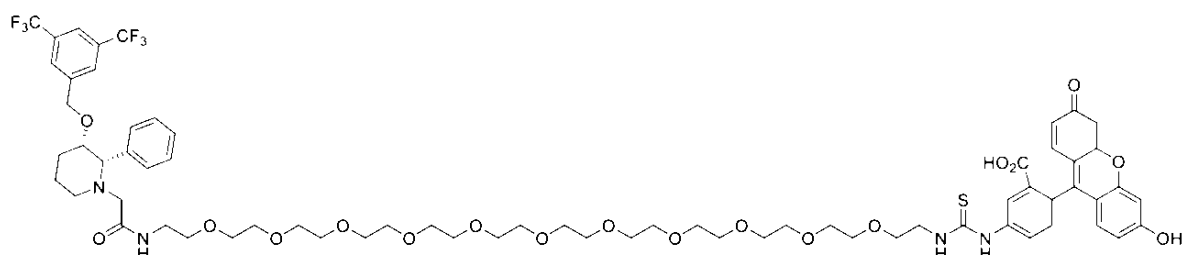
30

【実施例 1 1】

【 0 1 0 9 】

FITC-PEG11-NK1の合成

【化 3 6】



40

【 0 1 1 0 】

50

無水CH₂Cl₂中のO-(2-アミノエチル)-O'-[2-(Boc-アミノ)エチル]デカエチレングリコール(BocNH-PEG₁₁-NH₂)のNK-1(0.02g、0.0433mmol、1.0当量)(Sigma、0.0336g、0.0521mmol、1.2当量)、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(PyBOP)(0.027g、0.0521mmol、1.2当量)の溶液に、アルゴン下、室温にて、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(DIPEA)(0.076mL、0.4338mmol、10当量)を加えた。反応の進行をLCMSによってモニターし、分取RP-HPLC(Waters、XBridge(商標) PrepC18, 5μm; 19×100mmカラム、移動相A=20mM酢酸アンモニウム緩衝液、pH7、B=アセトニトリル、30分で10-100%B、13mL/分、λ=220nm、254nm)により精製した。純粋な画分を集め、すべての有機溶媒を蒸発させ、サンプルを48時間凍結乾燥してNK1-PEG₁₁-NHBocを得た。収量：40.13mg(97%)。無水DCM中のNK1-PEG₁₁-NHBoc(0.0165g、0.015mmol)にトリフルオロ酢酸(TFA、20当量)を加え、反応混合物を室温で4時間撹拌した。過剰のTFAを除去し、残りの溶液を水で希釈し、CH₂Cl₂(3×5mL)を用いて抽出した。合わせた有機層をブラインで洗浄し、乾燥させ(Na₂SO₄)、濃縮した。得られた残渣を真空下で乾燥し、さらに精製することなく次の工程に使用した。無水ジメチルスルホキシド(DMSO、0.3mL)中のNK1-PEG₁₁-NH₂(0.008g、0.0081mmol、1.0当量)、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)(Sigma、0.0037g、0.0097mmol、1.2当量)の溶液を、アルゴン下、室温にて、ジイソプロピルエチルアミン(0.0028mL、0.0162mmol、2.0当量)に加えた。反応の進行をLCMSでモニターし、生成物を分取RP-HPLC(Waters、XBridge(商標) PrepC18、5μm; 19×100mmカラム、移動相A=20mM酢酸アンモニウム緩衝液、pH7、B=アセトニトリル、30分で10-100%B、13mL/分、λ=280nm)によって精製した。純粋な画分を集め、すべての有機溶媒を蒸発させ、サンプルを48時間凍結乾燥してFITC-PEG₁₁-NK1を収量8.54mg(77%)で得た。

【0111】

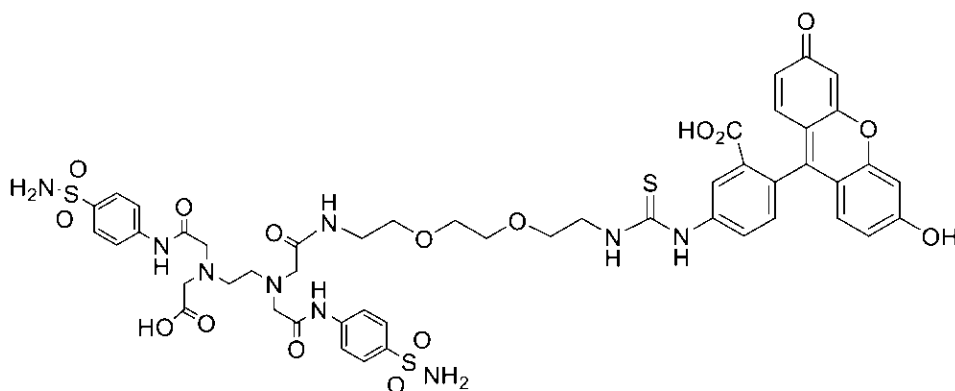
*注：NK-1化合物は、文献(Ref：DESIGN AND DEVELOPMENT OF NEUROKININ-1 RECEPTOR-BINDING AGENT DELIVERY 複合体、出願番号：PCT/US2015/44229；参照することにより本願に組み込まれる)中の手順を用いて調製した塩基性リガンドから出発する2段階手順によって合成した。

【実施例12】

【0112】

FITC-PEG2-CA9の合成

【化37】



【0113】

テフロン(Teflon)磁気撹拌棒を用いて、50mLの丸底フラスコ中で、CA9リガンド(53.6mg)をDMF(2~3mL)に溶解した。周囲の空気を、真空を用いて除去し、窒素ガスで置換し、これを3サイクル行った。丸底フラスコを一定の窒素ガス下に保持した。このフラス

コに、28.9mgのN-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド塩酸塩(EDC)、続いて21.6mgの1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物(HOBt)および18.9 μ LのBoc-PEG2-NH₂(Sigma Aldrich)を加えた。5.4 μ Lのトリエチルアミン(TEA)を加え、反応物を一晩攪拌した。HPLCを用いて反応混合物を精製し、UHPLC-MS(831の標的m/z)で確認した。高真空回転蒸発を用いてアセトニトリルを除去し、生成物を凍結乾燥した。化合物を1:1のTFA:DCMとともに30分間混合した。高真空回転蒸発を用い、続いて高真空下で30分間かけてTFA/DCMを除去した。次いで、化合物をDMFに溶解し、5モル当量のi-Pr₂NEt、16mgのフルオレセインイソチオシアネート(Life Technologies)と混合し、1時間攪拌した。反応混合物をHPLCで精製し、UHPLC-MS(標的m/z=1120)で標的化合物を確認した。サンプルを凍結乾燥し、-20℃で保存した。

10

【実施例 13】

【0114】

形質導入されたCAR-T細胞における抗FITC scFv発現の評価

機能性抗FITC scFvが形質導入されたCAR T細胞の細胞表面上に発現するかどうかを確認するために、CAR T細胞をFITC-葉酸複合体とともに氷上で30分間インキュベートした。細胞を洗浄した後、抗葉酸抗体(Santa Cruz)を添加し、氷上で30分間インキュベートした。最後に、Alexa Fluor 647標識二次抗体(Jackson ImmunoResearch)を用いて、CAR T細胞発現機能性抗FITC scFvを視覚化した。図16Aに示すように、形質導入されたCAR T細胞はGFP発現を示す。図16Bに示すように、これらの形質導入されたCAR-T細胞は、免疫蛍光標識によって視覚化されたFITC-葉酸複合体に結合することができる。

20

【実施例 14】

【0115】

インビトロでのCAR T細胞の細胞傷害性アッセイ

所望のFITC-リガンドでCAR T細胞の細胞傷害性を試験するために、標準的な乳酸脱水素酵素(LDH)放出アッセイを、ThermoFisher ScientificのPierce(商標) LDH細胞傷害性アッセイキットを用いて実施した。LDHアッセイのためのサンプルを調製するために、10⁴細胞/100 μ Lの密度で96穴プレートの各ウェルに播種し、一晩増殖させた。翌日、異なるエフェクター(CAR T細胞): 標的細胞(がん細胞)比(たとえば、E:T=20:1、10:1、5:1および1:1)を有するようにさまざまな数でCAR T細胞を調製した。さまざまな濃度のFITC-リガンドを各ウェルに入れ、6~24時間共培養した。共インキュベーション後、CAR T細胞およびがん細胞を含むプレートを室温にて10分間350 \times gで遠心分離して、細胞破片または残存する細胞を除去した。次に、各サンプルの上清50 μ Lを新しい96ウェルプレートに移した。移した50 μ Lの各サンプルに、50 μ Lの調製したLDH反応混合物を添加し、室温にて30分間インキュベートした。50 μ Lの停止溶液を添加し、各サンプルの吸光度を490nmおよび680nmで測定した。以下の式を用いて各サンプルについて細胞傷害性のパーセントを計算した:

30

細胞傷害性% = (実験値 - エフェクター細胞(自発的) - 標的細胞(自発的)) / (標的細胞(最大対照) - 標的細胞(自発的対照)) \times 100

【0116】

図3A - Cに示すように、CAR T細胞は、腫瘍抗原に対して適合する複合体との組み合わせでのみ活性化される。図3Aは、100nMの各複合体を用いたE:Tが10:1のKB(FR+)モデルにおけるCAR T細胞の細胞傷害性を示す。FITC-葉酸、FITC-PEG20-葉酸、およびFITC-PEG108-葉酸活性化は、FITC-DUPAを伴うか、または複合体の不在下での活性化よりも大きい。図3Bは、100nMのFITC-DUPAまたはFITC-PEG12-DUPAを用いた10:1のE:Tを有するLNCaP(PSMA+)モデルにおけるCAR T細胞の細胞傷害性を示す。FITC-DUPA複合体は、FITC-葉酸を用いるか、または複合体の不在下よりも大きい活性化を示す。図3Cは、100nMのFITC-PEG11-NK1を用いた10:1のE:Tを有するHEK293 (NK1R+)モデルにおけるCAR T細胞の細胞傷害性を示す。FITC-PEG11-NK1は、FITC-葉酸を用いるか、または複合体の不在下よりも大きい活性化を示す。

40

【0117】

50

図3Dに示すように、KB(FR+)モデルにおける腫瘍細胞に対するCAR T細胞の細胞傷害性は、100nMのFITC-葉酸およびFITC-DUPAを用いたアッセイ中に使用されるE:T比の関数である。図3Eに示すように、KB(FR+)モデルにおける腫瘍細胞に対するCAR T細胞の細胞傷害性は、共インキュベーション(E:T比10:1)中に使用されるFITC-葉酸の濃度の関数である。

【0118】

図10に示すように、KB(FR+)モデルにおけるCAR T細胞傷害性は、複合体ブリッジの濃度を調節することによって、または10:1のE:Tを有する異なる長さのPEGを有するリンカーを用いることによって、制御することができる。

【実施例15】

【0119】

CAR T細胞増殖およびCAR T細胞活性化の同定

CAR T細胞の増殖は、主にフローサイトメトリーによって測定された。まず、96穴プレートの各ウェルに 10^4 細胞/100 μ Lの密度で、がん細胞(KB(FR+)またはHEK(NK1R+))を播種し、一晚培養した。翌日、所望のFITC-リガンドの存在下または不在下でCAR T細胞を各ウェルに入れ、細胞を5日間(120時間)共培養した。共インキュベーション後、CAR T細胞を、標準的な免疫染色手順によって抗ヒトCD3 APC抗体(Biolegend)で染色した(氷上で20分間)。抗ヒトCD3染色およびGFPの両方に対して陽性の細胞をCAR T細胞増殖について計数した。

【0120】

図1A - Bに示すように、CAR(T細胞)細胞は、KB(FR+)細胞およびHEK293(NK1R+)細胞を用いてFITC-小分子複合体(100nM)で腫瘍細胞を標的化した(E:T=5:1)結果として増殖した。図1Aは、異なる複合体によるKB(FR+)細胞の存在下でのCAR T細胞増殖を示す。図1Bは、異なる複合体によるHEK (NK1R+)細胞の存在下でのCAR T細胞増殖を示す。図1にさらに見られるように、PEGの異なる長さを有するリンカーの存在は、CAR-T細胞増殖のレベルに影響を及ぼす。

【0121】

CAR T細胞の活性化を測定するために、上記の同じ手順で、がん細胞を調製した。がん細胞およびCAR T細胞を100nM FITC-リガンドの存在下または不在下で10:1のE:T比で24時間共培養し、採取した。洗浄後、各サンプルからの細胞を抗ヒトCD69 Alexa Fluor 647(Biolegend)で染色した。CAR T細胞の活性化を定量するために、GFP陽性T細胞のゲートでデータを分析した。図17に示すように、CD69発現は共培養複合体に関連する。

【実施例16】

【0122】

IFN- γ 産生アッセイ

CAR T細胞によるIFN- γ の産生を試験するために、BiolegendからのヒトIFN- γ 検出ELISAキットを用いて、標準的なELISAアッセイを行った。簡単に述べると、がん細胞を96穴プレートの各ウェルに 10^4 細胞/培地100 μ Lの密度で播種し、一晚増殖させた。CAR T細胞を所望のFITC-リガンドを含む各がんサンプルに導入し、24時間共培養した。共インキュベーション後、各サンプルの上清を採取し、1000 \times gおよび4 $^{\circ}$ Cで10分間遠心分離して細胞破片を除去した。次いで、各サンプルからの透明な上清を、ELISAによってIFN- γ を検出するために使用するか、または将来の使用のために-80 $^{\circ}$ Cで保存した。各サンプルの調製が完了した後、製造者の指示に基づいて標準的ELISAを実施した。

【0123】

図2A-2Cに示すように、KB細胞(FR+)(図2A)、LNCaP(PSMA+)(図2B)、またはHEK(NK1R+)(図2C)における5:1のE:T比により、CAR T細胞は、100nM FITC-小分子複合体の存在下で有意な量の炎症性サイトカインを産生する。さらに示されるように、サイトカインの量は、使用される複合体に依存する。図2Dに示すように、炎症性サイトカインの量は、KB(FR+)細胞で使用されるFITC-葉酸の濃度に関連する。図2Eおよび2Fに示すよう

10

20

30

40

50

に、異なる複合体(100nM)は、KB(FR+)細胞において異なるIFN- 応答を生み出す。

【0124】

図4A - 4Bに示すように、CAR T細胞の活性化は、KB(FR+)細胞およびMDA-MB-231細胞における腫瘍抗原レベルと相関する。同じ複合体用量で細胞をインキュベートすることからIFN- 産生を測定すると、抗FITC CAR T細胞の活性化が、ガン細胞上の腫瘍抗原の発現レベルと相関することが示される。

【実施例17】

【0125】

腫瘍抗原レベルとCAR-T活性化との相関の評価

KB(FR+)細胞およびMDA-MB-231細胞を100nMのFITC-葉酸とともに氷上で30分間インキュベートした。洗浄後、細胞上のFR 腫瘍抗原に結合するFITC-葉酸をフローサイトメトリーで測定した。図4Aに示すように、KB(FR+)細胞は、MDA-MB-231細胞よりも高いレベルのFR発現および対応するFITC結合を有する。

【0126】

これらの2つの細胞株を、100nMのFITC-葉酸、FITC-PEG20-葉酸およびFITC-PEG108-葉酸の存在下、E:T比が10:1で、24時間、CAR T細胞と共培養した。INF- 産生を測定することにより、CAR T細胞活性化を検出した。培養細胞の上清を採取し、ELISAキットを用いてIFN- 産生を測定した。図4Bに示すように、より高いFR レベルで、KB細胞(FR+)細胞は、CAR T細胞をMDA-MB-231細胞よりもはるかに良好に活性化した。

【実施例18】

【0127】

インビボでのCAR T細胞の抗腫瘍効果

インビボでのCAR T細胞抗腫瘍活性の有効性を同定するために、免疫不全NSGマウス(Jackson Laboratory)を用いた。各腫瘍特異的抗原を発現するガン細胞株を、NSGマウスの肩に皮下注射して、固形腫瘍異種移植片を確立した。約50~100mm³の腫瘍体積に達したとき、腫瘍を有するマウスにCAR T細胞を導入し、所望のFITC-リガンドを1日おきに導入した(i.v.)。対照マウスにはFITC-リガンドの代わりにPBSを投与した。血液中の腫瘍体積およびサイトカインレベル(IL2、IL6、IL10、IFN- 、およびTNF-)を測定した。体重減少を測定することによって、治療の一般的な毒性をモニターした。各処置の終わりに、マウス血液を採取して貧血、白血球数およびCAR T細胞増殖を試験した。マウスの臓器も評価した。

【0128】

HEK293(NK1R+)細胞を用いた異種移植モデルを図5A - 5Cおよび図6A - 6Bに示す。図5Aに示すように、FITC-PEG11-NK1(500nmol/kg)で処置したマウスでは腫瘍サイズは減少したが、対照マウスでは増殖し続けた。図5Bに示すように、FITC-PEG11-NK1で処置したマウスの体重は対照マウスに対して変化しなかった。図5Cに示すように、ヒトT細胞におけるCAR T細胞の割合は、CAR T細胞注入後に増加した。図6A - 図6Bに示すように、処置群(6B)由来の採取された臓器は、対照群(6A)から採取されたマウス臓器と比較して、2週間の治療後にサイトカイン放出症候群の徴候を示さずに正常サイズで現れた。

【0129】

MDA-MB-231(FR+)細胞を用いた異種移植モデルを図7A - 7Cおよび8A - 8Bに示す。図7Aに示すように、FITC-PEG12-葉酸(500nmol/kg)またはFITC-葉酸(500nmoles/kg)で処置したマウスでは腫瘍のサイズは減少したが、対照マウスでは腫瘍は増殖し続けた。図7Bに示すように、FITC-PEG11-NK1で処置したマウスの体重は、処置中変化しなかった。図7Cに示すように、CAR T細胞および複合体治療後、ヒトT細胞におけるCAR T細胞の割合は増加した。図8A-Bに示すように、FITC-PEG12-葉酸で処置したマウスから採取した臓器(8B)は、正常なサイズで現れ、そして、対照群から採取したマウス臓器(8A)と比較して、3週間の治療後にサイトカイン放出症候群の兆候は観察されなかった。この特許出願の実施態様のいずれかで使用されるように、「nmol/kg」と「nmoles/kg」とは等価である。

10

20

30

40

50

【0130】

図9に示すように、FITC-PEG11-NK1(500nmol/kg)HEK-NK1RモデルおよびFITC-PEG12-葉酸(500nmol/kg)を用いたMDA-MB-231モデルの血液指標もまた、サイトカインストームが治療の過程で発生していなかったことを示した。

【0131】

図11、12A - 12Cおよび13に示されるように、KB(FR+)腫瘍異種移植片を、2つの異なる濃度のFITC-PEG12-葉酸で処理した。図11に示すように、より低い用量(250nmol/kg)で処置したマウスは、より高い用量(500nmol/kg)で処置したマウスと比較して、より軽度の体重減少を示した。図12A - 12Cに示すように、非処置マウス(図12A)およびより低い用量を処置されたマウス(図12B)から採取された臓器は、より高い用量(図12C)と比較して、より軽度のサイトカイン放出症候群を示した。図13に示すように、より低い投薬を受けたKB異種移植マウスは、より軽度のサイトカイン放出を示す良好な血液指標を示した。

10

【実施例19】

【0132】

インビボでのCAR T細胞の抗腫瘍効果

同じ抗FITC CAR T細胞が、異種性のがん細胞とFITC-リガンドのカクテルとの混合を根絶することができるかどうかを調べるために、免疫不全NSGマウス(Jackson laboratory)をインビボ研究に利用した。2つの異なるガン細胞株(たとえば、MDA-MB-231(FR+)およびHEK(NK1R+))を同じマウスの別々の脇腹に移植した。次いで、抗FITC CAR T細胞(10^7 細胞)を、腫瘍体積が約50~100mm³に達したときに静脈内注射によって導入した。さらに、FITC-リガンドの混合物(すなわち、FITC-PEG12-葉酸(500nmol/kg)およびFITC-PEG11-NK1R(500nmol/kg))、単一のFITC-PEG11-NK1R(500nmol/kg)またはPBSを、静脈内注射によって1日おきに投与した。FITC-リガンドによるCAR T細胞の抗腫瘍効果を、1日おきに腫瘍体積を測定することによって分析した。

20

【0133】

図19A - 19Cに示されるように、FITC-PEG11-NK1RおよびFITC-PEG12-葉酸の両方が導入された場合、同じ抗FITC CAR T細胞によって、両方の腫瘍(すなわち、MDA-MB-231(MDA)およびHEK(NK1R))が排除された。FITC-PEG11-NK1Rのみで処置されたマウスでは、HEK(NK1R)腫瘍のみが根絶された。理論に拘束されるものではないが、FITC-PEG12-葉酸が投与されなかったため、MDA-MB-231は、FITC-PEG11-NK1Rのみが投与された同じマウスで成長を続けたと考えられる。予想通り、両方の腫瘍は、PBSが導入された場合は何の反応も示さなかった。これらのデータは、同じ抗FITC CAR T細胞が、FITC-リガンドのカクテルを介して、異種腫瘍混合物を抗原的に根絶することができることを示唆している。

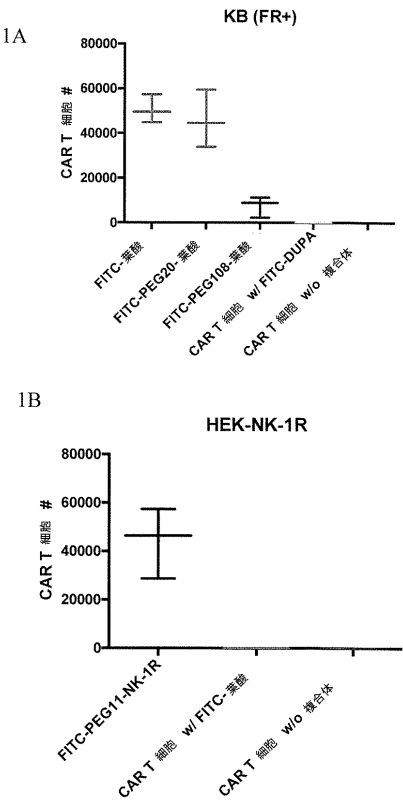
30

40

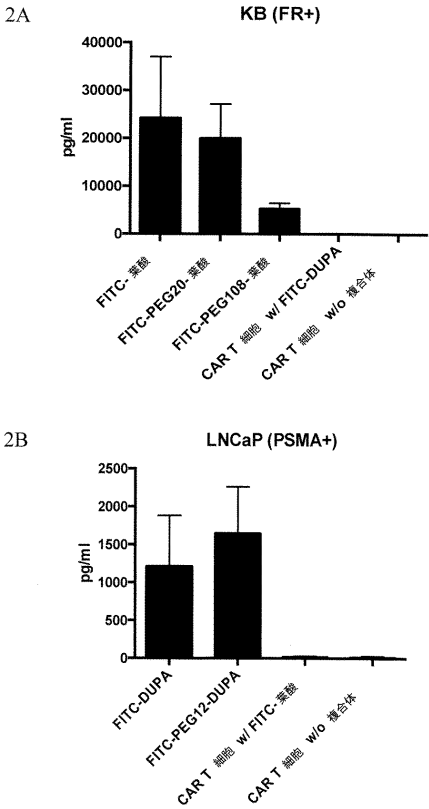
50

【図面】

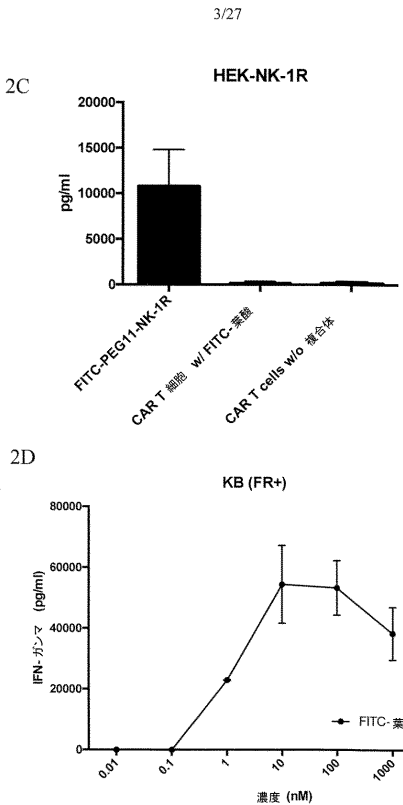
【図 1 A - 1 B】



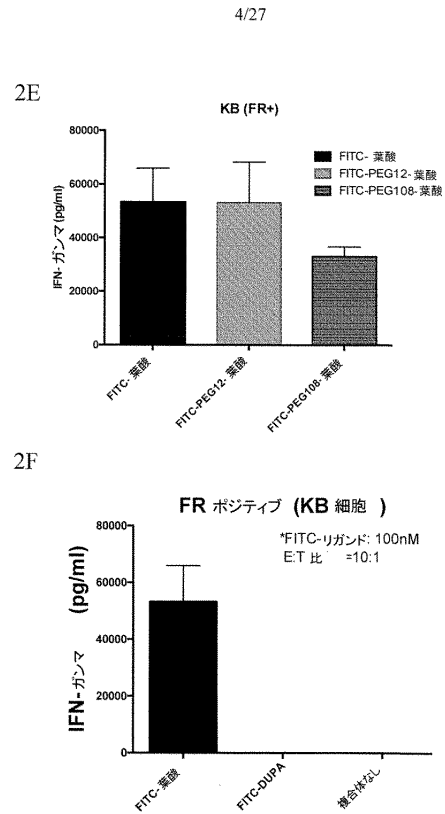
【図 2 A - 2 B】



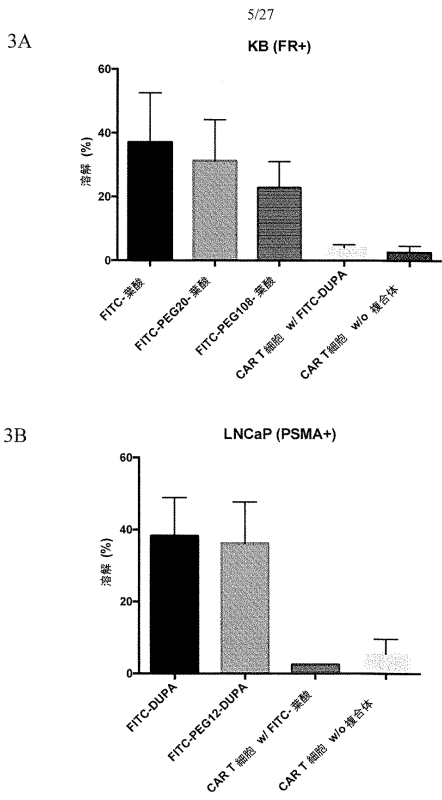
【図 2 C - 2 D】



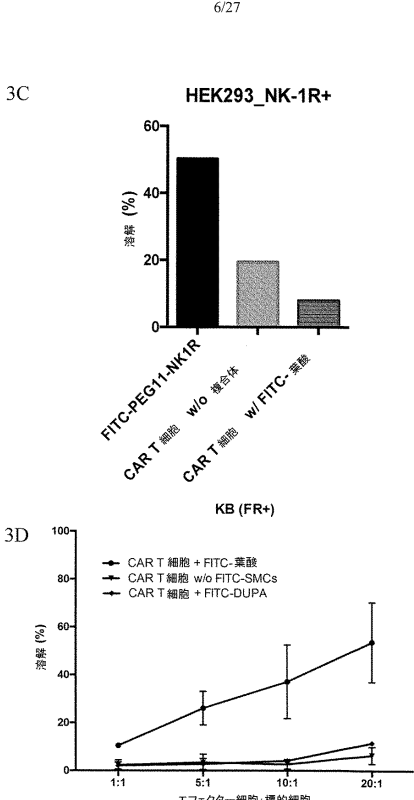
【図 2 E - 2 F】



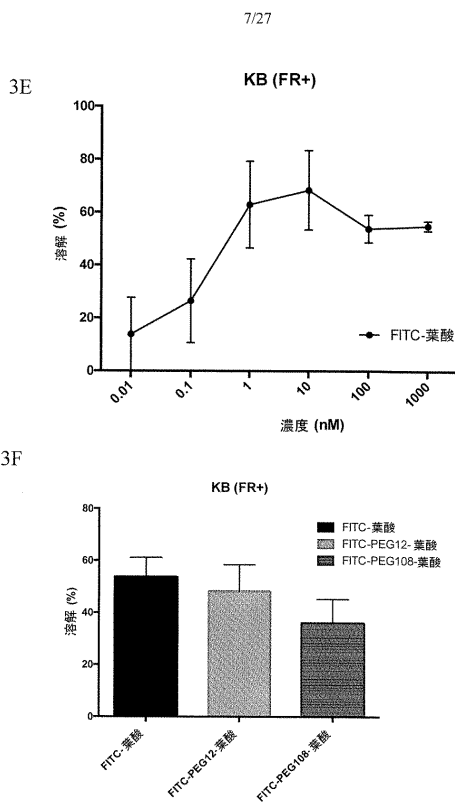
【図 3 A - 3 B】



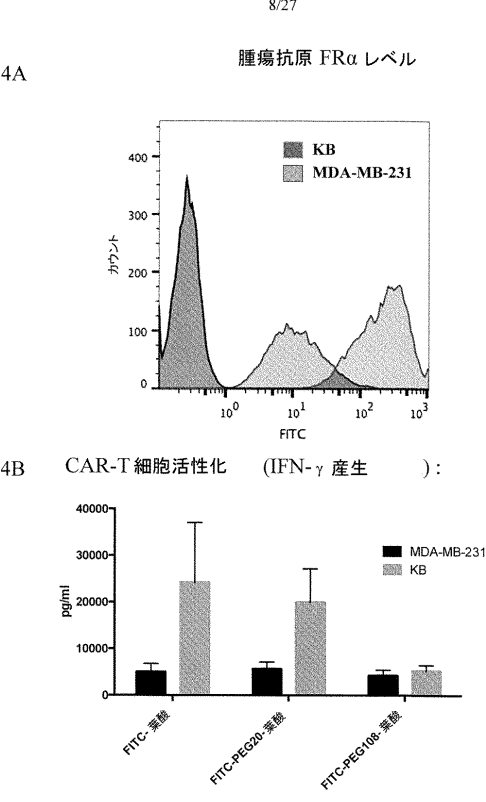
【図 3 C - 3 D】



【図 3 E - 3 F】



【図 4 A - 4 B】



10

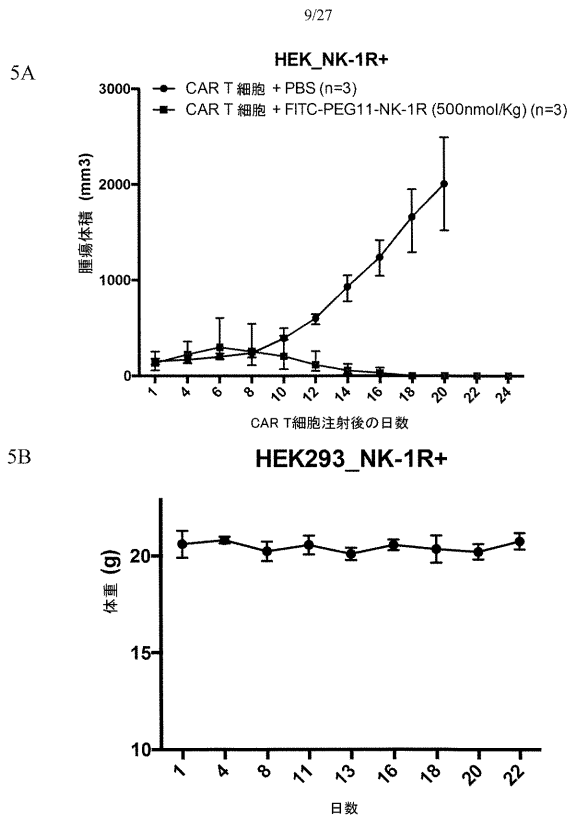
20

30

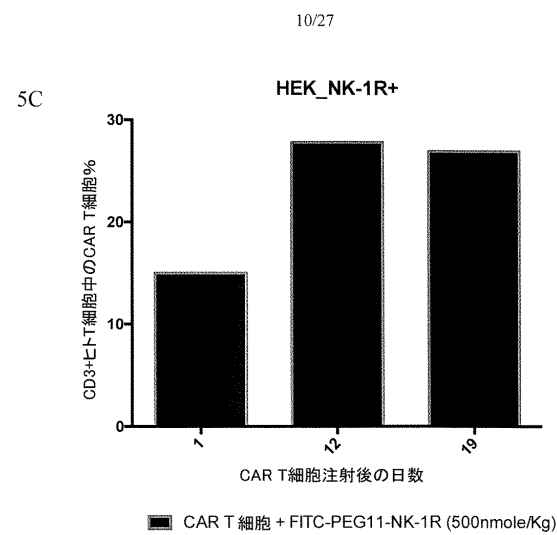
40

50

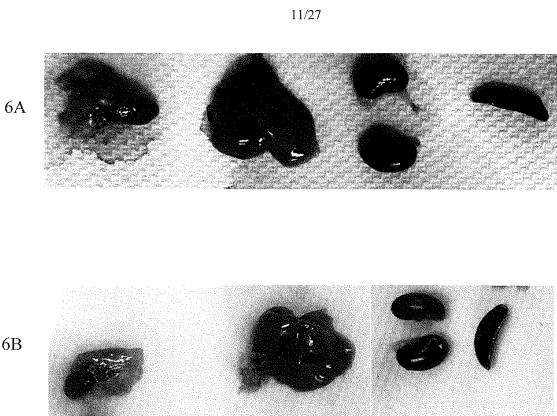
【 図 5 A - 5 B 】



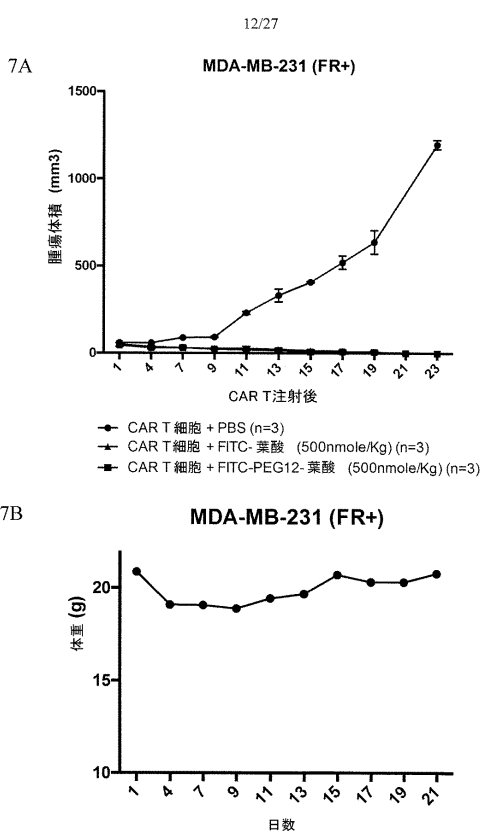
【 図 5 C 】



【 図 6 A - 6 B 】



【 図 7 A - 7 B 】



10

20

30

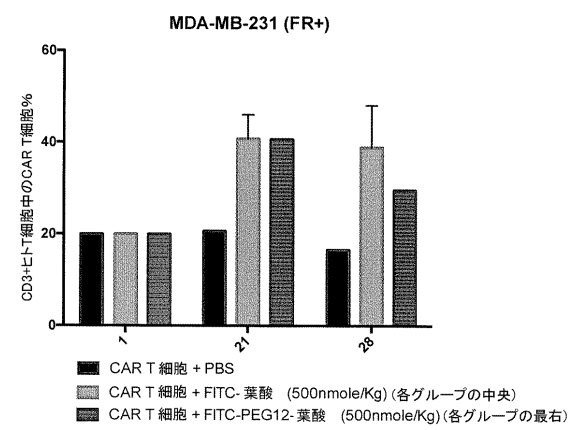
40

50

【図 7 C】

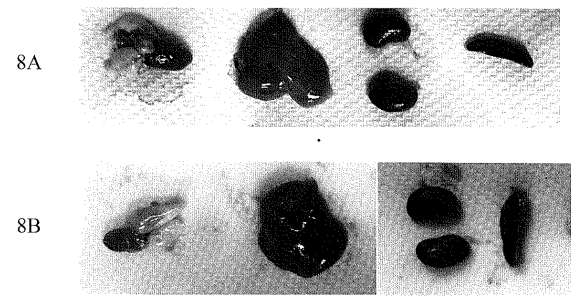
7C

13/27



【図 8 A - 8 B】

14/27



10

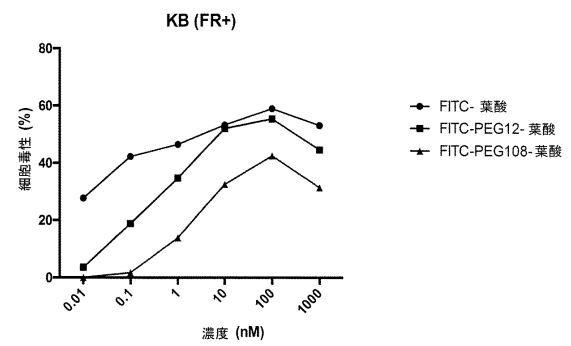
【図 9】

15/27

	非処置	HEK-NK1R (NK1R+) (CR)	MDA-MB-231 (FR+) (CR)
WBC (10 ⁹ /L)	10.36	7.38	3.25
リンパ球 (10 ⁹ /L)	0.50	1.23	0.27
単球 (10 ⁹ /L)	1.06	0.92	0.18
好中球 (10 ⁹ /L)	8.80	5.23	2.80
リンパ球 (%)	4.8	16.7	8.3
単球 (%)	10.2	12.5	5.6
好中球 (%)	85.0	70.8	86.1

【図 10】

16/27

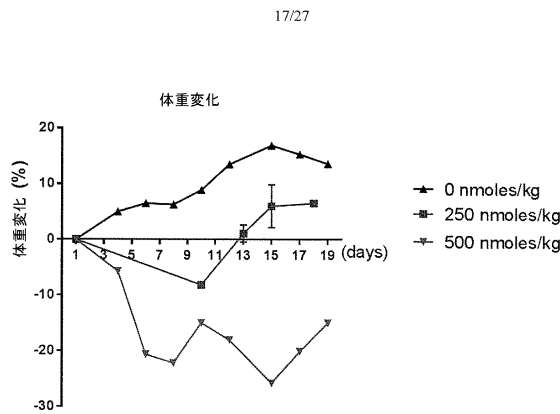


30

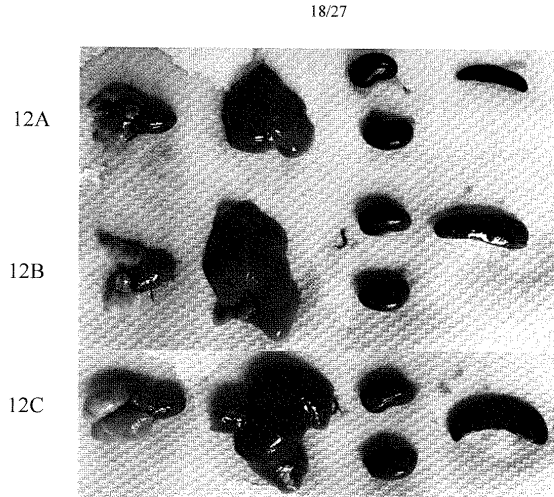
40

50

【図 1 1】



【図 1 2 A - 1 2 C】



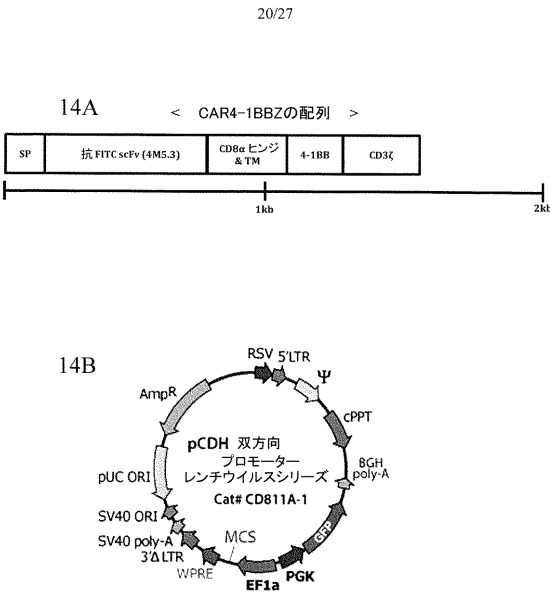
10

【図 1 3】

19/27

FITC-PEG12- 葉酸 投与	投与なし 対照	250 ナノモル/体重kg	500 ナノモル/体重kg
WBC (10 ⁹ /L)	10.36	21.07	74.17
リンパ球 (10 ⁹ /L)	0.50	0.77	4.73
単球 (10 ⁹ /L)	1.06	1.19	8.96
好中球 (10 ⁹ /L)	8.80	19.11	60.48

【図 1 4 A - 1 4 B】



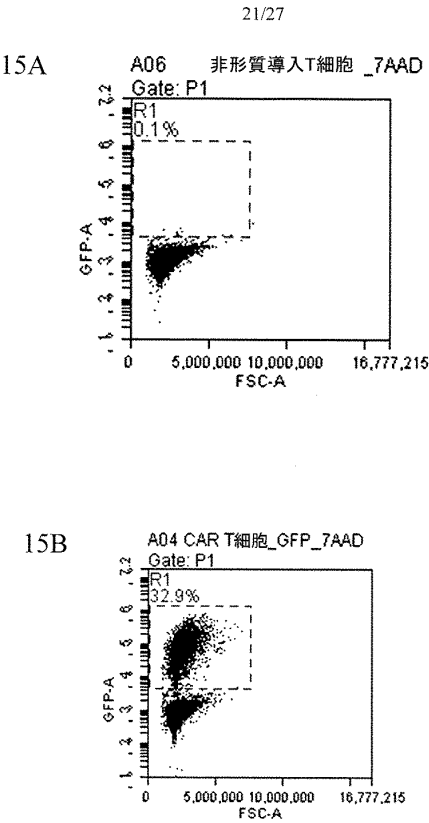
20

30

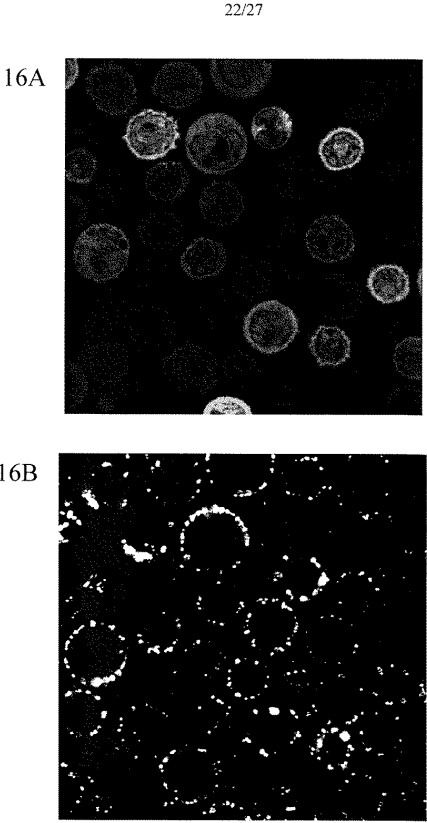
40

50

【図 15 A - 15 B】



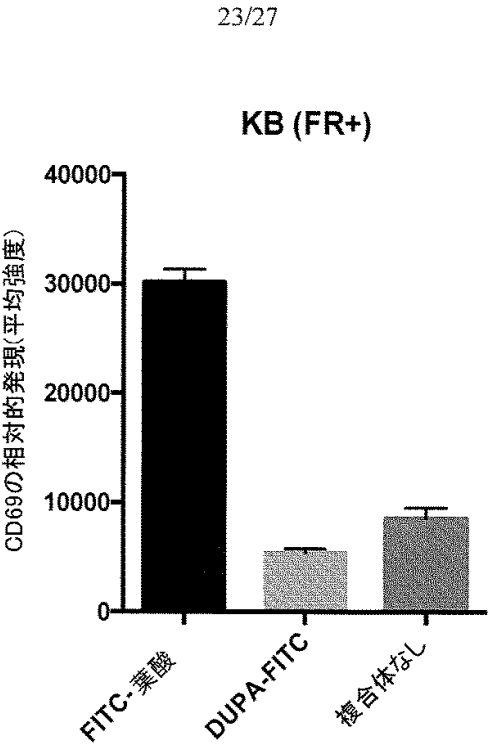
【図 16 A - 16 B】



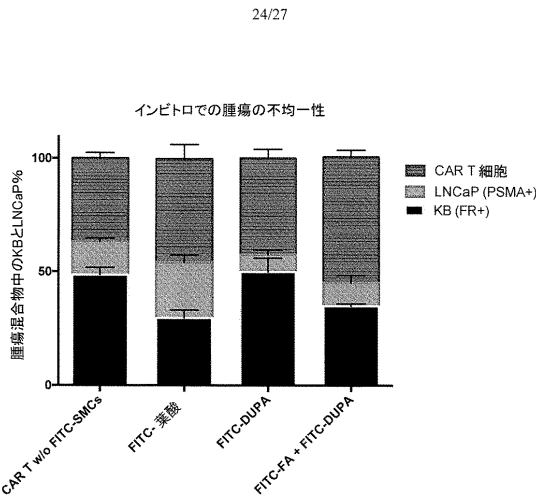
10

20

【図 17】



【図 18】



30

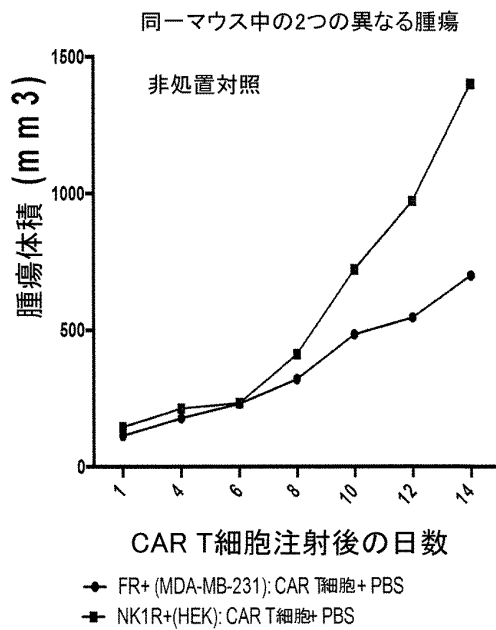
40

50

【図 19 A】

25/27

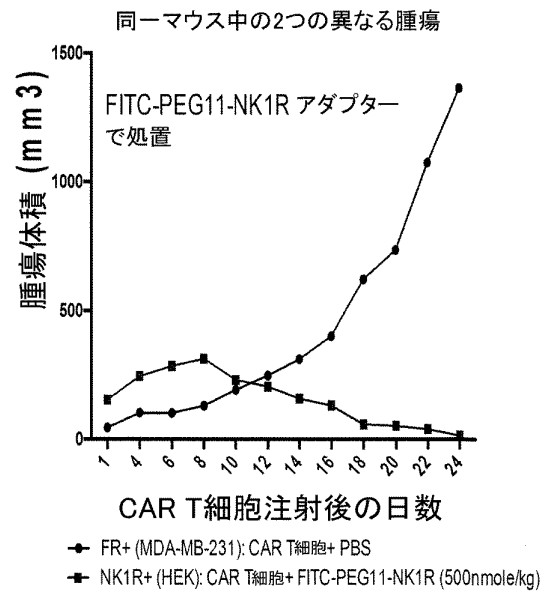
19A



【図 19 B】

26/27

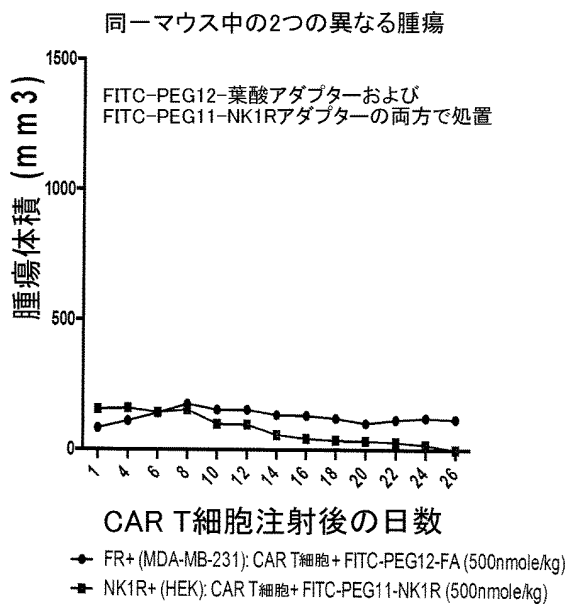
19B



【図 19 C】

27/27

19C



10

20

30

40

50

【配列表】

0007282521000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	31/352 (2006.01)	A 6 1 K	31/352	
A 6 1 K	47/65 (2017.01)	A 6 1 K	47/65	
A 6 1 K	47/54 (2017.01)	A 6 1 K	47/54	
A 6 1 K	47/58 (2017.01)	A 6 1 K	47/58	
A 6 1 K	47/60 (2017.01)	A 6 1 K	47/60	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	
C 0 7 K	14/705 (2006.01)	C 0 7 K	14/705	
C 1 2 N	15/867 (2006.01)	C 1 2 N	15/867	
C 0 7 K	5/065 (2006.01)	C 0 7 K	5/065	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

州ウエスト・ラファイエット、ケント・アベニュー 3 0 0 0 番

(74)代理人 100145403

弁理士 山尾 憲人

(74)代理人 100126778

弁理士 品川 永敏

(74)代理人 100162684

弁理士 呉 英燦

(74)代理人 100162695

弁理士 釜平 双美

(74)代理人 100156155

弁理士 水原 正弘

(72)発明者 フィリップ・ステュワート・ロウ

アメリカ合衆国 4 7 9 0 6 インディアナ州ウエスト・ラファイエット、ファーム・リッジ・ロード
5 8 5 0 番

(72)発明者 ハイヤン・チュー

アメリカ合衆国 4 7 9 0 6 インディアナ州ウエスト・ラファイエット、オニキス・ストリート 9 8
9 番

(72)発明者 ヨング・リー

アメリカ合衆国 4 7 9 0 6 インディアナ州ウエスト・ラファイエット、チェスウィック・コート 3
4 1 8 番、アパートメント・ナンバー 1

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 3 2 0 7 9 9 (U S , A 1)

国際公開第 2 0 1 6 / 0 2 5 3 2 2 (W O , A 1)

特表 2 0 1 4 - 5 0 4 2 9 4 (J P , A)

Mol. Pharmaceutics , 2016年04月04日 , Vol. 13 , p. 1618-1625 , DOI: 10.1021/acs.molp
harmaceut.6b00065PNAS , 2016年01月12日 , Vol. 113, No. 4 , E450-E458 , <https://doi.org/10.1073/pnas.1524193113>

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 3 5 / 1 7

A 6 1 P 3 5 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

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