

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6588004号  
(P6588004)

(45) 発行日 令和1年10月9日(2019.10.9)

(24) 登録日 令和1年9月20日(2019.9.20)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/62	(2006.01)
C 12 N 15/85	(2006.01)
C 12 N 15/86	(2006.01)
C 07 K 19/00	(2006.01)
C 12 N 5/10	(2006.01)
C 12 N	15/62
C 12 N	15/85
C 12 N	15/86
C 07 K	19/00
C 12 N	5/10

請求項の数 18 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-502984 (P2016-502984)
(86) (22) 出願日	平成26年3月14日 (2014.3.14)
(65) 公表番号	特表2016-514457 (P2016-514457A)
(43) 公表日	平成28年5月23日 (2016.5.23)
(86) 國際出願番号	PCT/US2014/029109
(87) 國際公開番号	W02014/144622
(87) 國際公開日	平成26年9月18日 (2014.9.18)
審査請求日	平成29年3月14日 (2017.3.14)
(31) 優先権主張番号	13/844,048
(32) 優先日	平成25年3月15日 (2013.3.15)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

(73) 特許権者	598004424 シティ・オブ・ホープ City of Hope アメリカ合衆国カリフォルニア州91010 0-0269, デュアーテ, イースト・デ ュアーテ・ロード 1500 1500 East, Duarte Road, Duarte, California 91010-0269, United States of America
(74) 代理人	100140109 弁理士 小野 新次郎
(74) 代理人	100075270 弁理士 小林 泰

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CD123特異的キメラ抗原受容体でリダイレクトしたT細胞およびそれらの使用方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

抗CD123scFv領域と、

79位におけるNからQへのアミノ酸置換および17位におけるLからEへのアミノ酸置換を有しており、かつ10位におけるSからPへのアミノ酸置換を有していてもよい、配列番号13を含むIgG4ヒンジ領域と、

T細胞受容体ゼータ鎖のシグナル伝達ドメインとを含む、キメラ抗原受容体をコードする核酸分子。

## 【請求項2】

配列番号13を含むIgG4ヒンジ領域が、10位においてSからPへのアミノ酸置換を有する、請求項1に記載の核酸分子。

## 【請求項3】

キメラ受容体が、CD27共刺激シグナル伝達ドメイン、CD28共刺激シグナル伝達ドメイン、4-1BB共刺激シグナル伝達ドメイン、およびOX40共刺激シグナル伝達ドメインからなる群から選択される共刺激シグナル伝達ドメインをさらに含む、請求項1に記載の核酸分子。

## 【請求項4】

抗CD123scFv領域が、組換え免疫毒素26292のVHドメインおよびVLドメインまたは組換え免疫毒素32716のVHドメインおよびVLドメインを含む、請求項1に記載の核酸分子。

10

20

## 【請求項 5】

キメラ抗原受容体が、配列番号 11 および配列番号 12 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

## 【請求項 6】

配列番号 1 、配列番号 2 、配列番号 3 、および配列番号 4 からなる群から選択される又クレオチド配列を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

## 【請求項 7】

キメラ抗原受容体が、CD28 膜貫通ドメインを含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

## 【請求項 8】

請求項 1 に記載の核酸分子を含む、発現ベクター。

10

## 【請求項 9】

ウイルスベクターである、請求項 8 に記載の発現ベクター。

## 【請求項 10】

抗 CD123scFv 領域が、ヒト化抗 CD123scFv 領域である、請求項 1 に記載の核酸分子。

## 【請求項 11】

抗 CD123scFv 領域が、配列番号 9 の 23 ~ 266 位のアミノ酸を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

## 【請求項 12】

抗 CD123scFv 領域が、配列番号 10 の 23 ~ 259 位のアミノ酸を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

20

## 【請求項 13】

IGG4 ヒンジ領域が、配列番号 9 の 267 ~ 495 位のアミノ酸を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

## 【請求項 14】

キメラ抗原受容体が、CD28 膜貫通ドメインをさらに含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

30

## 【請求項 15】

キメラ抗原受容体が、CD28 共刺激ドメインをさらに含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

## 【請求項 16】

CD28 共刺激ドメインが、配列番号 9 の 498 ~ 564 位のアミノ酸を含む、請求項 15 に記載の核酸分子。

## 【請求項 17】

CD28 共刺激ドメインが、配列番号 10 の 489 ~ 557 位のアミノ酸を含む、請求項 15 に記載の核酸分子。

## 【請求項 18】

T 細胞受容体ゼータ鎖のシグナル伝達ドメインが、配列番号 9 の 568 ~ 679 位のアミノ酸を含む、請求項 15 に記載の核酸分子。

## 【発明の詳細な説明】

40

## 【技術分野】

## 【0001】

優先権の主張

[0001] 本出願は、参照により図面を含めてその全体が本明細書に組み込まれる、2013年3月15日に出願された米国特許第13/844,048号に基づく優先権を主張する。

政府の利益

[0002] 本発明は、N I H による助成金番号 P50 CA107399 号、P01 CA030206 号、および M01 RR0004 における政府支援によりなされた。政府は、本発明において、一定の権利を有する。

50

**【背景技術】****【0002】**

[0003]急性骨髓性白血病(AML)とは、骨髓中の未成熟の骨髓系細胞の急速な増殖を特徴とし、結果として造血機能不全に至る疾患である[1]。急性骨髓性白血病(AML)のための第一選択処置は、50年近くにわたりほとんど変わらないままであり、AMLは、依然として予後の悪い疾患である。標準的な誘導化学療法は、完全寛解を誘導することもあるが、多くの患者は、最終的には再発して疾患に負ける[2]。したがって、AMLのための新規の治療剤の開発は、極めて重要である。

**【0003】**

[0004]同種造血細胞移植は、選択された患者における疾患の治癒を達成することが可能であり、AMLのドナー由来の免疫療法に対する感受性を強調する。加えて、インターロイキン3受容体アルファ鎖(CD123)も、正常な造血幹細胞と比較して、AML上で過剰発現するので、潜在的な免疫療法の標的として同定されている。

**【0004】**

[0005]AML細胞についての免疫表現型検査における近年の進歩は、将来の治療のための標的として作用する可能性がある複数のAML関連細胞表面抗原を明らかにしている[3]。実際、AMLを処置するための、CD44、CD47、T細胞免疫グロブリンムチン3(TIM-3)、およびインターロイキン3受容体アルファ鎖(IL-3R；CD123)を標的化する抗体を使用する前臨床試験が記載されており、マウスモデルにおける有望な抗白血病活性を裏付けている[3、4]。CD123は、急性骨髓性白血病および慢性骨髓性白血病、有毛細胞白血病、B細胞系統急性リンパ芽球性白血病、および芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍を含む、多様な悪性腫瘍上で発現する。加えて、CD123は、正常な造血幹細胞上では発現しないことが典型的であり、このため、CD123は、理想的な免疫療法の標的となっている。加えて、CD123特異的治療剤についての2つの第I相試験も終了しており、いずれの薬物も、良好な安全性プロファイルを表している(ClinicalTrials.gov ID:NCT00401739およびNCT00397579)。残念ながら、これらのCD123標的化薬の有効性が限定されていることから、抗白血病活性を観察するには、CD123を標的化する、代替的、かつ、より強力な治療が要請されうることが示唆される。

**【0005】**

[0006]AMLを処置するための、より強力な可能性がある、代替的な治療は、MHC非依存的な形で、細胞表面腫瘍関連抗原(TAA)へと、T細胞の特異性をリダイレクトするキメラ抗原受容体(CAR)を発現させるT細胞の使用である[5]。大半の場合において、CARは、CD3のシグナル伝達ドメインに融合させたモノクローナル抗体に由来する一本鎖可変領域断片(scFv)を含み、共刺激エンドドメインを含有しうる[5]。複数の研究グループが、B細胞悪性腫瘍を処置するための、多様な抗原を標的化するCARを開発しており[6～10]、多くの研究グループが、第I相臨床試験において、CARを発現させるT細胞の査定へと進んでいる[11～15]。これに対し、AMLを処置するための、CARを操作されたT細胞は、依然として希少である[16、17]。

**【発明の概要】****【発明が解決しようとする課題】****【0006】**

[0007]AMLのための現行の処置レジメン(regimens)は、選択された患者では完全寛解を達成することもあるが、多くの患者は、最終的に再発することから、より永続的な寛解をもたらしうる新規の治療剤に対する必要が強調される。抗原特異的細胞傷害性Tリンパ球ワクチン、アロ反応性ナチュラルキラー細胞ワクチン、および樹状細胞ワクチンを含む、多様なAML標的化免疫療法が現在開発されつつある。例えば、Okalasは、ウィルムス腫瘍1ペプチドによるワクチン接種は、AML患者における臨床的応答および免疫学的応答をもたらしうることを裏付けた[33]。しかし、これらの標的化治療は、HLA依存性である。この目的では、T細胞の特異性をリダイレクトして、AML細胞を

10

20

30

40

50

、 H L A 非依存的な形で、選択的に標的化しうる C A R などの、標的化治療剤をデザインすることが望ましいと予想される。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 7 】

[0008] C D 1 2 3 特異的 s c F v を含有する、キメラ抗原受容体 ( C A R ) のファミリーであって、C D 1 2 3 上の異なるエピトープを標的化する C A R のファミリーを開発した。いくつかの実施形態では、このような C D 1 2 3 キメラ抗原受容体 ( C D 1 2 3 C A R ) 遺伝子は、F c 受容体への結合を消失させる、I g G 4 スペーサー領域の変化を含む修飾 I g G 4 ヒンジ領域にインフレームで融合した抗 C D 1 2 3 s c F v 領域を含む。一実施形態では、修飾 I g G 4 ヒンジ領域は、S 2 2 8 P 置換、L 2 3 5 E 置換を含み、任意選択で、N 2 9 7 Q 置換を含む。C D 1 2 3 C A R 遺伝子はまた、少なくとも 1 つの共刺激シグナル伝達ドメイン、および T 細胞受容体 ( T C R ) ゼータ鎖のシグナル伝達ドメインも含む。いくつかの実施形態では、C D 1 2 3 C A R 遺伝子は、配列番号 1 、配列番号 2 、配列番号 3 、または配列番号 4 から選択されるヌクレオチド配列を含む。他の実施形態では、C D 1 2 3 C A R 遺伝子は、配列番号 9 、配列番号 1 0 、配列番号 1 1 、または配列番号 1 2 を含むアミノ酸配列をコードする。

【 0 0 0 8 】

[0009] 下記で記載される実施形態に従い、C D 1 2 3 C A R 遺伝子は、ベクター ( 例えば、ウイルスベクター ) 内に挿入された発現カセットの一部でありうる。ヒト T 細胞集団自体に、ベクターを介して形質導入する結果として、T 細胞に、C D 1 2 3 C A R 遺伝子を発現させることができる。健常ドナーの T 細胞 ( C D 4 / C D 8 ) 内で発現させたところ、C D 1 2 3 C A R は、T 細胞の特異性をリダイレクトして、C D 1 2 3 + 細胞株に対する強力なエフェクター活性のほか、初代 A M L 患者試料に対する強力なエフェクター活性も媒介した。C D 1 2 3 C A R T 細胞は、in vitro における顆粒球 / マクロファージおよび赤血球系のコロニー形成を、それほど変化させなかつたことから、A M L 細胞に対する、免疫細胞と対比した示差的な効果が示唆される。

【 0 0 0 9 】

[0010] さらに、活動性 A M L を有する患者から得られた T 細胞は、C D 1 2 3 C A R 遺伝子が発現されるように改変することができ、in vitro において、自己 A M L 芽球を溶解させることができる。これらの結果は、C D 1 2 3 C A R が形質導入された T 細胞が、高リスクの A M L を処置するための免疫療法として使用しうることを示唆する。こうして、いくつかの実施形態によれば、対象における A M L を処置する方法であって、第 1 の C D 1 2 3 C A R 遺伝子が形質導入された第 1 の T 細胞集団を対象に投与するステップを含む方法が提供される。方法はさらに、第 1 の C D 1 2 3 C A R 遺伝子をトランسفェクトされた第 1 の T 細胞集団を、第 2 の C D 1 2 3 C A R 遺伝子が形質導入された第 2 の T 細胞集団と組み合わせて、対象に投与するさらなるステップも含みうる。いくつかの実施形態では、第 1 の C D 1 2 3 C A R 遺伝子は、配列番号 3 または配列番号 4 から選択されるヌクレオチド配列を含む。第 2 の C D 1 2 3 C A R 遺伝子はまた、配列番号 3 または配列番号 4 から選択されるヌクレオチド配列も含みうるが、第 2 の C D 1 2 3 C A R 遺伝子のヌクレオチド配列は、第 1 の C D 1 2 3 C A R 遺伝子について選択されたヌクレオチド配列と同じではない場合がある。この結果として、2 つ以上の異なる C D 1 2 3 C A R が形質導入された T 細胞集団を使用する、A M L の組合せ処置であって、単一の C D 1 2 3 C A R が形質導入された T 細胞集団の使用と比較した場合に相乗的効果をもたらしうる、組合せ処置がもたらされる。

【 図面の簡単な説明】

【 0 0 1 0 】

【 図 1 】 [0011] 図 1 は、C D 1 2 3 特異的 C A R を、健常ドナーのヒト T 細胞内で発現させうることを示す図である。 ( A ) 修飾 I g G 4 ヒンジドメイン、C D 2 8 の修飾膜貫通細胞内シグナル伝達ドメイン、および C D 3 シグナル伝達ドメインを含有する C A R についての概略図である。また、T 2 A リボソームスキップ配列および切断型 E G F R ( E

G F R t ) 形質導入マーカーも、指し示される。( B ) 単一の健常ドナーに由来する、m o c k 形質導入 T 細胞およびレンチウイルスで形質導入された T 細胞の代表的な表現型を示す図である。免疫磁気選択および 1 サイクルの増殖の後、C A R で改変された T 細胞を、ビオチニル化抗 F c またはビオチニル化抗 E G F R 、続いて P E コンジュゲートストレプトアビジンおよび抗 T C R / 、抗 C D 4 、または抗 C D 8 で染色し、フローサイトメトリーで解析した。象限配置は、アイソタイプ対照による染色に基づき、各象限に収まる細胞の百分率が指し示される。( C ) 免疫磁気選択および 1 サイクルの増殖の後における、3 つの異なる健常ドナー T 細胞株からの、表示の細胞表面マーカーの発現を示す図である。データは、平均値 ± S E M を表す。

【図 2 】[0012] 図 2 は、C D 1 2 3 特異的 C A R を発現させる T 細胞が、C D 1 2 3 を発現させる腫瘍細胞株を溶解させることを示す図である。( A ) C D 1 2 3 ( 上、黒線 ) または C D 1 9 ( 下、黒線 ) を発現させるように一過性にトランスフェクトされた 2 9 3 T 細胞についてのフローサイトメトリー解析を示す図である。m o c k 形質導入親 2 9 3 T 細胞を、抗 C D 1 2 3 抗体または抗 C D 1 9 抗体 ( グレーの塗りつぶし、上および下 ) で染色して、バックグラウンドの発現レベルを決定した。( B ) クロム放出アッセイによる、C D 1 2 3 - C A R を発現させる T 細胞 ( 2 6 2 9 2 および 3 2 7 1 6 ) の、C D 1 2 3 ( 2 9 3 T - C D 1 2 3 ) または C D 1 9 ( 2 9 3 T - C D 1 9 ) を発現させる 2 9 3 T 細胞に対する特異的細胞傷害作用を示す図である。データは、3 連のウェルの平均値 + S . D . を表す。( C ) A M L 細胞株である K G 1 a 上、E B V で形質転換された L C L 細胞株上、および C M L 細胞株である K 5 6 2 上の C D 1 2 3 についてのフローサイトメトリー解析を示す図である。各ヒストグラムには、アイソタイプ対照 ( グレーの塗りつぶし ) に照らした、C D 1 2 3 染色について陽性の細胞の百分率 ( 黒線 ) が指し示される。( D ) クロム放出アッセイによる、C D 1 2 3 - C A R T 細胞 ( 2 6 2 9 2 および 3 2 7 1 6 ) の、C D 1 9 + C D 1 2 3 + L C L 細胞株および C D 1 9 - C D 1 2 3 + 細胞株である K G 1 a に対する特異的細胞傷害作用を示す図である。O K T 3 を発現させる L C L ( L C L - O K T 3 ) 細胞株および C D 1 9 - C D 1 2 3 - K 5 6 2 細胞株を、それぞれ、陽性対照細胞株および陰性対照細胞株として使用した。データは、3 連のウェルの平均値 + S . D . を表す。

【図 3 - 1 】[0013] 図 3 は、C D 1 2 3 特異的 T 細胞が、I N F - および T N F - を放出し、C D 1 2 3 を発現させる標的細胞に応答して増殖することを示す図である。C D 1 2 3 C A R T 細胞、または 3 例の健常ドナーに由来する、対応する ( p a i r m a t c h e d ) 対照の T 細胞を、表示の細胞株と共に、E : T を 1 0 : 1 として、2 4 時間にわたり共培養し、I F N - および T N F - の放出を、L u m i n e x マルチプレックスビーズ技術により定量化したことを示す図である。

【図 3 - 2 】図 3 は、C D 1 2 3 特異的 T 細胞が、I N F - および T N F - を放出し、C D 1 2 3 を発現させる標的細胞に応答して増殖することを示す図である。( B ) 対応する、C F S E で標識された C D 1 9 特異的 T 細胞または C D 1 2 3 特異的 T 細胞を、表示の刺激細胞株と共に、E : T を 2 : 1 として、9 6 時間にわたり共培養し、C F S E の希釈について、フローサイトメトリーで解析したことを示す図である。非刺激 T 細胞 ( 塗りつぶされたヒストグラム ) を、ベースラインの T 細胞増殖対照として使用した。

【図 4 】[0014] 図 4 は、初代 A M L 試料との共培養後における、C D 1 2 3 特異的 C A R による、複数の C D 4 エフェクター機能および C D 8 エフェクター機能の活性化を示す図である。対応する、C A R を操作された T 細胞を、6 時間にわたり、3 つの異なる初代 A M L 患者試料 ( A M L 1 7 9 、 3 7 3 、および 6 0 5 ) と共に共培養し、表面 C D 1 0 7 a の発現および細胞内 I F N - または細胞内 T N F - の産生について解析した。( A 、棒グラフ ) C D 1 0 7 a を発現させる、D A P I - C D 3 + C D 8 + E G F R t + 細胞の百分率を示す図である。データは、平均値 + S . D . を表す ( A 、円グラフ ) 。脱顆粒を経、I F N - および / または T N F - を産生する、C D 3 + C D 8 + E G F R t + 細胞の画分を、円グラフにプロットする。( B ) A および B において記載される同じ実験に由来する、D A P I - C D 3 + C D 4 + E G F R t + 集団についてのデータを示す図で

ある。(C)対応する、CFSEで標識されたCD19特異的T細胞またはCD123特異的T細胞を、表示の刺激細胞と共に、E:Tを2:1として、72時間にわたり共培養し、DAPI CD3+EGFR<sup>t</sup>+集団内のCFSEの希釈について、フローサイトメトリーで解析した。LCL細胞株およびK562細胞株、それぞれ、27種類の陽性対照および陰性対照として用いられる。プレB-ALL802は、CD19およびCD123について二重に陽性の原発性患者試料である。象限配置は、非刺激T細胞に基づく。

【図5】[0015]図5は、初代AML細胞が、CD123特異的T細胞により特異的に標的化されることを示す図である。(A)対応するCD19特異的T細胞またはCD123特異的T細胞を、51Crで標識されたCD34+初代AML試料と共に、E:Tを25:1として、4時間にわたり共培養した。LCL細胞株およびK562細胞株は、それぞれ、陽性対照および陰性対照として用いられる。プレB-ALL802は、CD19およびCD123について二重に陽性の原発性患者試料である。データは、3連のウェルの平均値±S.D.を表す。(B)(A)における3例の初代AML患者試料に由来するAML芽球の特異的溶解を示す図である。データは、平均値±SEMを表す。26292および32716をCD19Rと比較する、対応のないスチューデントのt検定を使用して、\*: p < 0.05および\*\*: p < 0.0005とする。

【図6】[0016]図6は、in vitroにおける、CD123CARを発現させるT細胞の、正常前駆細胞および白血病性前駆細胞に対する効果を示す図である。(A)および(B)CD34+臍帯血(CB)細胞(n=3)を、CD34で免疫磁気選択し、対応するCD19特異的T細胞もしくはCD123特異的T細胞または培地単独(未処置)と共に、E:Tを25:1として、4時間にわたり共培養した。次いで、細胞を、半固体のメチルセルロースによる前駆細胞培養物中に、14~18日間にわたり播種し、顆粒球マクロファージコロニー形成単位(CFU-GM、A)コロニーおよび赤芽球バースト形成単位(BFU-E、B)コロニーの存在について評定した。百分率は、CD19特異的T細胞対照に対して正規化する。データは、3つの異なるCB試料についての平均値±SEMを表す。(C)CD34+初代AML患者試料(AML493、AML519、またはAML545)を免疫磁気選択し、対応するCD19特異的T細胞もしくはCD123特異的T細胞または培地単独(未処置)と共に、E:Tを25:1として、4時間にわたり共培養した。次いで、細胞を、半固体のメチルセルロースによる前駆細胞培養物中に、14~18日間にわたり播種し、白血病コロニー形成単位(CFU-L)の存在について評定した。百分率は、CD19特異的T細胞対照に対して正規化する。データは、3つの異なる初代AML患者試料についての平均値±SEMを表す。26292および32716をCD19Rと比較する、対応のないスチューデントのt検定を使用して、\*: p < 0.05とする。(D)CD19Rに対して正規化された、CD123標的化CAR構築物(26292または32716)で処置された、(A)に由来するCBまたは(C)に由来するAML細胞の組合せによるコロニー形成を示す図である。対応のないスチューデントのt検定を使用して、\*: p < 0.05とする。

【図7】[0017]図7は、CD123CARでリダイレクトした、AML患者に由来するT細胞は、in vitroにおいて、自己芽球を特異的に溶解することを示す図である。(A)3例のAML患者に由来するT細胞に、レンチウイルスで形質導入して、CD19R、26292 CAR、または32716 CARを発現させたことを示す図である。形質導入の19日後における、AML722に由来するT細胞株が示される。(B)51Cr放出アッセイにおいて使用される標的細胞上のCD123の発現を示す図である。CD123+細胞の百分率および各試料の相対蛍光指数(RFI)を指し示す。(C)3例のAML患者試料から操作されたT細胞をエフェクターとして使用し、51Crで標識された、自己CD34に富む芽球を標的細胞として使用する、4時間にわたる自己殺滅アッセイについての結果を示す図である。データは、3連のウェルの平均値±S.D.を表す。

【図8】[0018]図8は、ホタルルシフェラーゼを発現させるように改変された、AML細胞株であるKG1aを注射した5日後(5日目)において、S228P+L235E突然

10

20

30

40

50

変異またはS 2 2 8 P + L 2 3 5 E + N 2 9 7 Q 突然変異を含有する、C D 1 2 3 C A R が形質導入されたT細胞(2 6 2 9 2)で処置されたN S Gマウスについての生物発光イメージングにより示される、腫瘍サイズの変化を示す図である。

【図9】[0019]図9は、いくつかの実施形態に係る、抗原特異的一本鎖F v、ヒンジ領域、共刺激シグナル伝達ドメイン、およびT細胞受容体ゼータ鎖シグナル伝達ドメインを有するキメラ抗原受容体(C A R)の概略図(U r b a W JおよびL o n g o D L、N E n g l J M e d、2 0 1 1、3 6 5 : 7 5 4 ~ 7 5 7による画像)である。

【図10-1】[0020]図10は、いくつかの実施形態に係る、3 2 7 1 6 C A R (S 2 2 8 P + L 2 3 5 E)構築物(配列番号1:アンチセンス鎖(上:番号付けされた鎖)、配列番号5:センス鎖(下:番号付けされていない鎖))のヌクレオチド配列、および3 2 7 1 6 C A R (S 2 2 8 P + L 2 3 5 E)構築物(配列番号9)のアミノ酸配列を含む、L 2 3 5 E突然変異およびS 2 2 8 P突然変異(「3 2 7 1 6 C A R (S 2 2 8 P + L 2 3 5 E)」)を有する3 2 7 1 6 C A R構築物についての概略図である。突然変異は、太字で示す。

【図10-2】[0020]図10は、いくつかの実施形態に係る、3 2 7 1 6 C A R (S 2 2 8 P + L 2 3 5 E)構築物(配列番号1:アンチセンス鎖(上:番号付けされた鎖)、配列番号5:センス鎖(下:番号付けされていない鎖))のヌクレオチド配列、および3 2 7 1 6 C A R (S 2 2 8 P + L 2 3 5 E)構築物(配列番号9)のアミノ酸配列を含む、L 2 3 5 E突然変異およびS 2 2 8 P突然変異(「3 2 7 1 6 C A R (S 2 2 8 P + L 2 3 5 E)」)を有する3 2 7 1 6 C A R構築物についての概略図である。

【図10-3】[0020]図10は、いくつかの実施形態に係る、3 2 7 1 6 C A R (S 2 2 8 P + L 2 3 5 E)構築物(配列番号1:アンチセンス鎖(上:番号付けされた鎖)、配列番号5:センス鎖(下:番号付けされていない鎖))のヌクレオチド配列、および3 2 7 1 6 C A R (S 2 2 8 P + L 2 3 5 E)構築物(配列番号9)のアミノ酸配列を含む、L 2 3 5 E突然変異およびS 2 2 8 P突然変異(「3 2 7 1 6 C A R (S 2 2 8 P + L 2 3 5 E)」)を有する3 2 7 1 6 C A R構築物についての概略図である。

【図11-1】[0021]図11は、いくつかの実施形態に係る、2 6 2 9 2 C A R (S 2 2 8 P + L 2 3 5 E)構築物(配列番号2:アンチセンス鎖(上:番号付けされた鎖)、配列番号6:センス鎖(下:番号付けされていない鎖))のヌクレオチド配列、および2 6 2 9 2 C A R (S 2 2 8 P + L 2 3 5 E)構築物(配列番号10)のアミノ酸配列を含む、L 2 3 5 E突然変異およびS 2 2 8 P突然変異(「2 6 2 9 2 C A R (S 2 2 8 P + L 2 3 5 E)」)を有する2 6 2 9 2 C A R構築物についての概略図である。突然変異は、太字で示す。

【図11-2】[0021]図11は、いくつかの実施形態に係る、2 6 2 9 2 C A R (S 2 2 8 P + L 2 3 5 E)構築物(配列番号2:アンチセンス鎖(上:番号付けされた鎖)、配列番号6:センス鎖(下:番号付けされていない鎖))のヌクレオチド配列、および2 6 2 9 2 C A R (S 2 2 8 P + L 2 3 5 E)構築物(配列番号10)のアミノ酸配列を含む、L 2 3 5 E突然変異およびS 2 2 8 P突然変異(「2 6 2 9 2 C A R (S 2 2 8 P + L 2 3 5 E)」)を有する2 6 2 9 2 C A R構築物についての概略図である。

【図11-3】[0021]図11は、いくつかの実施形態に係る、2 6 2 9 2 C A R (S 2 2 8 P + L 2 3 5 E)構築物(配列番号2:アンチセンス鎖(上:番号付けされた鎖)、配列番号6:センス鎖(下:番号付けされていない鎖))のヌクレオチド配列、および2 6 2 9 2 C A R (S 2 2 8 P + L 2 3 5 E)構築物(配列番号10)のアミノ酸配列を含む、L 2 3 5 E突然変異およびS 2 2 8 P突然変異(「2 6 2 9 2 C A R (S 2 2 8 P + L 2 3 5 E)」)を有する2 6 2 9 2 C A R構築物についての概略図である。

【図12-1】[0022]図12は、いくつかの実施形態に係る、3 2 7 1 6 C A R (S 2 2 8 P + L 2 3 5 E + N 2 9 7 Q)構築物(配列番号3:アンチセンス鎖(上:番号付けされた鎖)のヌクレオチド配列、配列番号7:センス鎖(下:番号付けされていない鎖))、および3 2 7 1 6 C A R (S 2 2 8 P + L 2 3 5 E + N 2 9 7 Q)構築物(配列番号11)のアミノ酸配列を含む、L 2 3 5 E突然変異、S 2 2 8 P突然変異、およびN 2 9 7

10

20

30

40

50

Q突然変異（「3 2 7 1 6 C A R ( S 2 2 8 P + L 2 3 5 E + N 2 9 7 Q )」）を有する3 2 7 1 6 C A R 構築物についての概略図である。突然変異は、太字と下線で強調して示す。I U P A C による塩基 コードのRは、AまたはGに対応し、I U P A C による塩基コードのYは、TまたはCに対応する。

【図12-2】[0022]図12は、いくつかの実施形態に係る、3 2 7 1 6 C A R ( S 2 2 8 P + L 2 3 5 E + N 2 9 7 Q )構築物（配列番号3：アンチセンス鎖（上：番号付けされた鎖）のヌクレオチド配列、配列番号7：センス鎖（下：番号付けされていない鎖））  
、および3 2 7 1 6 C A R ( S 2 2 8 P + L 2 3 5 E + N 2 9 7 Q )構築物（配列番号11）のアミノ酸配列を含む、L 2 3 5 E 突然変異、S 2 2 8 P 突然変異、およびN 2 9 7 Q 突然変異（「3 2 7 1 6 C A R ( S 2 2 8 P + L 2 3 5 E + N 2 9 7 Q )」）を有する3 2 7 1 6 C A R 構築物についての概略図である。  
10

【図12-3】[0022]図12は、いくつかの実施形態に係る、3 2 7 1 6 C A R ( S 2 2 8 P + L 2 3 5 E + N 2 9 7 Q )構築物（配列番号3：アンチセンス鎖（上：番号付けされた鎖）のヌクレオチド配列、配列番号7：センス鎖（下：番号付けされていない鎖））  
、および3 2 7 1 6 C A R ( S 2 2 8 P + L 2 3 5 E + N 2 9 7 Q )構築物（配列番号11）のアミノ酸配列を含む、L 2 3 5 E 突然変異、S 2 2 8 P 突然変異、およびN 2 9 7 Q 突然変異（「3 2 7 1 6 C A R ( S 2 2 8 P + L 2 3 5 E + N 2 9 7 Q )」）を有する3 2 7 1 6 C A R 構築物についての概略図である。

【図13-1】[0023]図13は、いくつかの実施形態に係る、2 6 2 9 2 C A R ( S 2 2 8 P + L 2 3 5 E + N 2 9 7 Q )構築物（配列番号4：アンチセンス鎖（上：番号付けされた鎖）のヌクレオチド配列、配列番号8：センス鎖（下：番号付けされていない鎖））  
、および2 6 2 9 2 C A R ( S 2 2 8 P + L 2 3 5 E + N 2 9 7 Q )構築物（配列番号12）のアミノ酸配列を含む、L 2 3 5 E 突然変異、S 2 2 8 P 突然変異、およびN 2 9 7 Q 突然変異（「2 6 2 9 2 C A R ( S 2 2 8 P + L 2 3 5 E + N 2 9 7 Q )」）を有する2 6 2 9 2 C A R 構築物についての概略図である。突然変異は、太字で示す。I U P A C による塩基 コードのRは、AまたはGに対応し、I U P A C による塩基 コードのYは、TまたはCに対応する。  
20

【図13-2】[0023]図13は、いくつかの実施形態に係る、2 6 2 9 2 C A R ( S 2 2 8 P + L 2 3 5 E + N 2 9 7 Q )構築物（配列番号4：アンチセンス鎖（上：番号付けされた鎖）のヌクレオチド配列、配列番号8：センス鎖（下：番号付けされていない鎖））  
、および2 6 2 9 2 C A R ( S 2 2 8 P + L 2 3 5 E + N 2 9 7 Q )構築物（配列番号12）のアミノ酸配列を含む、L 2 3 5 E 突然変異、S 2 2 8 P 突然変異、およびN 2 9 7 Q 突然変異（「2 6 2 9 2 C A R ( S 2 2 8 P + L 2 3 5 E + N 2 9 7 Q )」）を有する2 6 2 9 2 C A R 構築物についての概略図である。  
30

【図13-3】[0023]図13は、いくつかの実施形態に係る、2 6 2 9 2 C A R ( S 2 2 8 P + L 2 3 5 E + N 2 9 7 Q )構築物（配列番号4：アンチセンス鎖（上：番号付けされた鎖）のヌクレオチド配列、配列番号8：センス鎖（下：番号付けされていない鎖））  
、および2 6 2 9 2 C A R ( S 2 2 8 P + L 2 3 5 E + N 2 9 7 Q )構築物（配列番号12）のアミノ酸配列を含む、L 2 3 5 E 突然変異、S 2 2 8 P 突然変異、およびN 2 9 7 Q 突然変異（「2 6 2 9 2 C A R ( S 2 2 8 P + L 2 3 5 E + N 2 9 7 Q )」）を有する2 6 2 9 2 C A R 構築物についての概略図である。  
40

【図14】[0024]図14は、初代A M L 試料および臍帯血におけるC D 1 2 3 の発現を示す図である。（A）初代A M L 細胞上のC D 1 2 3 の発現についての代表例を示す図である。細胞に、D A P I <sup>-</sup> 系統 <sup>-</sup> C D 3 4 <sup>+</sup> 集団についてゲートをかけ、C D 1 2 3 の発現（黒色：アイソタイプ対照、赤色：抗C D 1 2 3 ）について評価した。（B）D A P I <sup>-</sup> 系統 <sup>-</sup> C D 3 4 <sup>+</sup> 集団内で発現させたC D 1 2 3 陽性細胞の百分率を示す図である。各点は、個々の試料を表す。（C）D A P I <sup>-</sup> 系統 <sup>-</sup> C D 3 4 <sup>+</sup> 集団内の、C D 1 2 3 についての相対蛍光指数（R F I ）を示す図である。R F I は、抗C D 1 2 3 細胞の中央値を、アイソタイプ対照で染色された細胞の中央値で除することにより計算する。（D）A M L 6 0 5 試料上（赤色）、A M L 7 2 2 試料上（青色）、および臍帯血試料上（グレー）の  
50

CD123の発現についてのヒストグラムの重合せを示す図である。アイソタイプ対照は、黒色で示す。

【図15】[0025]図15は、初代AML患者試料とのインキュベーションに応答する、CD123特異的T細胞による複数のエフェクター機能の活性化を探索するのに使用される、ゲーティング戦略について例示する図である。T細胞のエフェクター機能を同定する多色フローサイトメトリーのためのゲーティング戦略を、AML373との共培養後におけるCD123CAR(26292ベースの)T細胞について示す。(A)初期ゲートを、CD3<sup>+</sup>細胞にかけることを示す図である。(B)蛍光陰性のものである(fluorescence minus one)対照を使用して確立される二次ゲートを、EGFr<sup>+</sup>細胞にかけることを示す図である。(C)三次ゲートを、CD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>集団にかけることを示す図である。(D)最終ゲートを、CD107a<sup>+</sup>細胞にかけることを示す図である。(E)CD107a<sup>+</sup>集団内のIFN- $\gamma$ およびTNF- $\gamma$ の産生を示す図である。象限は、アイソタイプ対照で染色された試料を使用して確立した。各象限内に百分率を注記する。

【図16-1】[0026]図16は、CFSEが、CARを発現させるT細胞のCD4集団内およびCD8集団内のいずれにおいても希釈されたことを示す図である。この図には、図5Cで示した細胞のCD4亜集団(A)を示す。DAPI<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>EGFr<sup>+</sup>細胞についての初期ゲートの後で、CD4細胞およびCD8細胞を、初代AML患者試料との共培養後における、CFSEの希釈について解析した。象限配置は、非刺激T細胞に基づく。

10

【図16-2】図16は、CFSEが、CARを発現させるT細胞のCD4集団内およびCD8集団内のいずれにおいても希釈されたことを示す図である。この図には、図5Cで示した細胞のCD8亜集団(B)を示す。DAPI<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>EGFr<sup>+</sup>細胞についての初期ゲートの後で、CD4細胞およびCD8細胞を、初代AML患者試料との共培養後における、CFSEの希釈について解析した。象限配置は、非刺激T細胞に基づく。

20

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0011】

[0027]本発明のある特定の実施形態について、具体例、配列、および図面を使用して詳細に記載する。本発明は、特許請求の範囲により規定される、本発明の範囲内に含まれうる、全ての代替物、改変、および同等物にわたることを意図するので、列挙される実施形態は、本発明を、それらの実施形態を限定することを意図するものではない。当業者は、本明細書で記載される方法および材料と類似するかまたは同等な、多くの方法および材料を、本発明を実施するのに使用しうることを認識すると予想される。

30

##### 【0012】

[0028]いくつかの実施形態では、腫瘍を標的化するキメラ抗原受容体(CAR)をコードする遺伝子が提供される。ある特定の実施形態に従い、遺伝子は、CD123特異的CAR(CD123CAR)をコードする。CD123CAR遺伝子は、抗CD123一本鎖Fv(scFv)領域、および以下のドメイン:ヒンジ領域、共刺激シグナル伝達ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメイン、またはこれらの組合せのうちの1または複数を含む。

40

##### 【0013】

[0029]いくつかの実施形態では、CD123CAR遺伝子は、抗CD123一本鎖Fv(scFv)領域、ヒンジ領域を含むことが可能であり、任意選択で、少なくとも1つの共刺激シグナル伝達ドメインを含むことが可能であり、任意選択で、細胞内シグナル伝達ドメインを含みうるがこれらに限定されない。

##### 【0014】

[0030]ある特定の実施形態では、CD123CAR遺伝子は、抗CD123一本鎖Fv(scFv)領域、ヒンジ領域、少なくとも1つの共刺激シグナル伝達ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメイン(図9)を含みうるがこれらに限定されない。

##### 【0015】

50

[0031]抗 C D 1 2 3 s c F v 領域は、発現すると、C D 1 2 3 のエピトープに結合しうるヌクレオチド配列を含みうる。いくつかの実施形態では、s c F v 抗 C D 1 2 3 s c F v 領域は、組換え免疫毒素 (R I T) である 2 6 2 9 2 および 3 2 7 1 6 [18] の V H ドメインおよび V L ドメインをコードするヌクレオチドを含む。本明細書ではまた、2 6 2 9 2 を標的化する C D 1 2 3 C A R 遺伝子および 3 2 7 1 6 を標的化する C D 1 2 3 C A R 遺伝子を、それぞれ、2 6 2 9 2 C A R および 3 2 7 1 6 C A R とも称する。ある特定の実施形態では、抗 C D 1 2 3 s c F v 領域は、以下：

3 2 7 1 6 C A R のための、配列番号 1 または配列番号 3 のヌクレオチド 8 2 ~ 8 1 4 、または

2 6 2 9 2 C A R のための、配列番号 2 または配列番号 4 のヌクレオチド 8 2 ~ 7 9 2 10 から選択されるヌクレオチド配列を含みうる。

#### 【0016】

[0032]前記ヌクレオチド配列は、以下：

3 2 7 1 6 C A R 内で使用される場合の、配列番号 9 または配列番号 1 1 の残基 2 3 ~ 2 6 6 、または

2 6 2 9 2 C A R 内で使用される場合の、配列番号 1 0 または配列番号 1 2 の残基 2 3 ~ 2 5 9

から選択されるアミノ酸配列をコードする。

#### 【0017】

[0033]ある特定の実施形態では、抗 C D 1 2 3 s c F v 領域を改変して、結合を増強することができ、免疫原性を低減することもできる。例えば、一態様では、抗 C D 1 2 3 s c F v 領域は、ヒト化抗 C D 1 2 3 s c F v 領域でありうる。 20

#### 【0018】

[0034]ヒンジ領域は、C H 2 ドメイン - C H 3 ドメイン間に収まる、免疫グロブリン(例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4)の少なくとも一部を含みうる。いくつかの実施形態では、ヒンジ領域は、修飾ヒンジである。修飾ヒンジは、C D 1 2 3 C A R のオフターゲット効果の低減に寄与し、これにより、その特異性および有効性を増大させる、1カ所または複数カ所のアミノ酸置換またはアミノ酸修飾を有しうる。本明細書で使用される「アミノ酸修飾」または「アミノ酸置換」または「置換」とは、タンパク質配列内またはペプチド配列内のアミノ酸の置換、挿入、および / または欠失を意味する。本明細書で使用される「アミノ酸置換」または「置換」とは、親ペプチド配列内または親タンパク質配列内の特定の位置におけるアミノ酸の、別のアミノ酸による置きかえを意味する。例えば、置換 S 2 2 8 P とは、2 2 8 位におけるセリンが、プロリンで置きかえられた、変異体タンパク質または変異体ペプチドを指す。 30

#### 【0019】

[0035]アミノ酸置換は、タンパク質またはペプチドをコードする、核酸配列内の特定のコドンを、異なるアミノ酸をコードするコドンに変化させるように、突然変異により施すことができる。このような突然変異は一般に、可能な最小のヌクレオチド変化を施すことにより施す。この種の置換突然変異を施して、結果として得られるタンパク質内のアミノ酸を、非保存的な形で(すなわち、コドンを、特定のサイズまたは特徴を有するアミノ酸の分類に属するアミノ酸から、別の分類に属するアミノ酸に変化させることにより)変化させることもでき、保存的な形で(すなわち、コドンを、特定のサイズまたは特徴を有するアミノ酸の分類に属するアミノ酸から、同じ分類に属するアミノ酸に変化させることにより)変化させることもできる。このような保存的変化は一般に、結果として得られるタンパク質の構造および機能のより小さな変化をもたらす。 40

#### 【0020】

[0036]以下は、アミノ酸の多様な分類の例である：

- ・非極性 R 基を有するアミノ酸：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、トリプトファン、メチオニン

- ・非帶電極性 R 基を有するアミノ酸：グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チ

ロシン、アスパラギン、グルタミン

・帶電極性R基を有するアミノ酸：(pH 6.0で負に帶電)：アスパラギン酸、グルタミン酸

・塩基性アミノ酸(pH 6.0で正に帶電)：リシン、アルギニン、ヒスチジン(pH 6.0で)。

【0021】

[0037]別の分類は、フェニル基を有するアミノ酸：フェニルアラニン、トリプトファン、チロシンでありうる。

[0038]下記に示す分子量(すなわち、R基のサイズ)に従って別の分類も可能である：

グリシン 75

10

アラニン 89

セリン 105

プロリン 115

バリン 117

トレオニン 119

システイン 121

ロイシン 131

イソロイシン 131

アスパラギン 132

アスパラギン酸 133

20

グルタミン 146

リシン 146

グルタミン酸 147

メチオニン 149

ヒスチジン(pH 6.0で) 155

フェニルアラニン 165

アルギニン 174

チロシン 181

トリプトファン 204。

【0022】

30

[0039]ある特定の実施形態では、修飾ヒンジは、非修飾ヒンジ内に存在するアミノ酸残基と異なるアミノ酸残基で置換された1つまたは複数のアミノ酸残基を含む、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4に由来する。1つまたは複数の置換アミノ酸残基は、220、226、228、229、230、233、234、235、234、237、238、239、243、247、267、268、280、290、292、297、298、299、300、305、309、218、326、330、331、332、333、334、336、339、位における1もしくは複数のアミノ酸残基またはこれらの組合せから選択されるがこれらに限定されない。

【0023】

40

[0040]いくつかの実施形態では、修飾ヒンジは、以下のアミノ酸残基置換：C220S、C226S、S228P、C229S、P230S、E233P、V234A、L234V、L234F、L234A、L235A、L235E、G236A、G237A、P238S、S239D、F243L、P247I、S267E、H268Q、S280H、K290S、K290E、K290N、R292P、N297A、N297Q、S298A、S298G、S298D、S298V、T299A、Y300L、V305I、V309L、E318A、K326A、K326W、K326E、L328F、A330L、A330S、A331S、P331S、I332E、E333A、E333S、E333S、K334A、A339D、A339Q、P396L、のうちの1もしくは複数またはこれらの組合せを含むがこれらに限定されない、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4に由来する(50)。

50

## 【0024】

[0041]いくつかの実施形態では、修飾ヒンジは、以下のアミノ酸配列：

219位 ESKYGP<sub>P</sub>CPS C P A P E F L G G P S V F L F P P K P K D T  
 L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y  
 279位 V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H  
 Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E K T I S K  
 339位 A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T C L V K  
 G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L  
 399位 D S D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E  
 A L H N H Y T Q K S L S L S L G K (配列番号13)

を有するIgG4ヒンジに由来する。

## 【0025】

[0042]ある特定の実施形態では、修飾ヒンジは、非修飾ヒンジ内に存在するアミノ酸残基と異なるアミノ酸残基で置換された1つまたは複数のアミノ酸残基を含むIgG4に由来する。1つまたは複数の置換アミノ酸残基は、220、226、228、229、230、233、234、235、234、237、238、239、243、247、267、268、280、290、292、297、298、299、300、305、309、218、326、330、331、332、333、334、336、339、位における1もしくは複数のアミノ酸残基またはこれらの組合せから選択されるがこれらに限定されない。

## 【0026】

[0043]いくつかの実施形態では、修飾ヒンジは、以下のアミノ酸残基置換であって、非修飾ヒンジ内のアミノ酸が、表示の位置において、上記で同定されたアミノ酸で置換される、アミノ酸残基置換：220S、226S、228P、229S、230S、233P、234A、234V、234F、234A、235A、235E、236A、237A、238S、239D、243L、247I、267E、268Q、280H、290S、290E、290N、292P、297A、297Q、298A、298G、298D、298V、299A、300L、305I、309L、318A、326A、326W、326E、328F、330L、330S、331S、331S、332E、333A、333S、333S、334A、339D、339Q、396L、のうちの1もしくは複数またはこれらの組合せを含むがこれらに限定されない、IgG4に由来する。

## 【0027】

[0044]いくつかの実施形態では、修飾IgG4ヒンジは、228位における、プロリン(P)によるセリン(S)の置換(S228P)、235位における、ロイシン(L)によるグルタミン酸(E)の置換(L235E)、297位における、アスパラギン(N)によるグルタミン(Q)の置換(N297Q)を含むがこれらに限定されない。ある特定の実施形態では、修飾IgG4ヒンジ領域は、以下：

32716CARのための、配列番号1または配列番号3のヌクレオチド814～1500、または

26292CARのための、配列番号2または配列番号4のヌクレオチド793～1479

から選択されるヌクレオチド配列を含みうる。

## 【0028】

[0045]前記ヌクレオチド配列は、以下：

32716CAR内で使用される場合の、配列番号1または配列番号3の残基267～495、または

26292CAR内で使用される場合の、配列番号2または配列番号4の残基260～488

から選択されるアミノ酸配列をコードする。

## 【0029】

10

20

30

40

50

[0046]一実施形態では、修飾 I g G 4 ヒンジ領域は、S 2 2 8 P 置換およびL 2 3 5 E 置換（「S 2 2 8 P + L 2 3 5 E」）を含む（図10および11を参照されたい）。別の実施形態では、修飾 I g G 4 ヒンジ領域は、S 2 2 8 P 置換、L 2 3 5 E 置換、およびN 2 9 7 Q 置換（「S 2 2 8 P + L 2 3 5 E + N 2 9 7 Q」）を含む（図12および13を参照されたい）。

### 【0030】

[0047]いくつかの実施形態では、ヒンジを改変して、C 1 2 3 C A R 内のF c スペーサー領域で、C D 8 a のヒンジ領域など、F c に結合しないスペーサーを置換することができる。代替的に、ヒンジのF c スペーサー領域を、欠失させることもできる。このような置換は、F c への結合を低減するかまたは消失させると予想される。

10

### 【0031】

[0048]本明細書で使用される「位置」という用語は、タンパク質の配列内の配置である。位置は、順次番号付けすることもでき、確立されたフォーマット、例えば、K a b a t によるK a b a t 位置またはE U 位置またはE U インデックスに従い番号付けすることもできる。本明細書で論じられる全ての位置について、番号付けは、E U インデックスまたはE U 番号付けスキーム（参照により全体として本明細書に組み込まれる、K a b a t ら、1 9 9 1、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」、5版、United States Public Health Service、National Institutes of Health, Bethesda）に従う。K a b a t によるE U インデックスまたはE U インデックスまたはE U 番号付けスキームとは、E U による抗体の番号付け（参照により全体として本明細書に組み込まれる、E d e l m a n ら、1 9 6 9、Proc Natl Acad Sci USA、63:78~85）を指す。K a b a t 位置は、当技術分野でもまた周知であるが、所与の位置について、E U 位置から変化しうる。例えば、上記で記載したS 2 2 8 P 置換およびL 2 3 5 E 置換とは、E U 位置を指す。しかし、これらの置換はまた、K a b a t 位置2 4 1 (S 2 4 1 P) および2 4 8 (L 2 4 8 E) にも対応しうる[21]。

20

### 【0032】

[0049]共刺激シグナル伝達ドメインは、4 - 1 B B 共刺激ドメイン、O X - 4 0 共刺激ドメイン、C D 2 7 共刺激ドメイン、またはC D 2 8 共刺激ドメインを含むがこれらに限定されない、任意の適切な共刺激ドメインを含みうる。本明細書で記載される実施形態に従い、C D 1 2 3 C A R は、少なくとも1つの共刺激シグナル伝達ドメインを含みうる。一態様では、C D 1 2 3 C A R は、単一の共刺激シグナル伝達ドメインを有するか、または上記で記載した共刺激シグナル伝達ドメインなど、2つ以上の共刺激シグナル伝達ドメインを含みうる。別の態様では、共刺激ドメインは、上記で記載した共刺激ドメインなど、単一の共刺激ドメインからなる場合もあり、代替的に、2つ以上の共刺激ドメインの2つ以上の部分からなる場合もある。代替的に、いくつかの実施形態では、C D 1 2 3 C A R は、共刺激シグナル伝達ドメインを含まない。

30

### 【0033】

[0050]一実施形態では、C D 1 2 3 C A R は、C D 2 8 共刺激ドメインである、共刺激シグナル伝達ドメインを含む。C D 2 8 シグナル伝達ドメインは、修飾C D 2 8 膜貫通ドメインを含みうる。一実施形態では、このような修飾C D 2 8 膜貫通ドメインは、配列番号1 0 または配列番号1 2 のアミノ酸残基5 3 0 ~ 5 3 1、または配列番号1 1 または配列番号1 3 の残基5 2 3 ~ 5 2 4 における、ロイシン - ロイシン(L L)からグリシン - グリシン(G G)への置換（例えば、R L L H R G G H [22]）を含むがこれらに限定されない、1カ所または複数カ所のアミノ酸置換またはアミノ酸修飾を有する。ある特定の実施形態では、修飾共刺激シグナル伝達ドメイン領域は、以下：

40

3 2 7 1 6 C A R のための、配列番号1 または配列番号3 のヌクレオチド1 5 0 1 ~ 1 7 0 7、または

2 6 2 9 2 C A R のための、配列番号2 または配列番号4 のヌクレオチド1 4 8 0 ~ 1

50

6 8 6

から選択されるヌクレオチド配列を含みうる。

【 0 0 3 4 】

[0051]前記ヌクレオチド配列は、以下：

3 2 7 1 6 C A R 内で使用される場合の、配列番号 1 または配列番号 3 の残基 4 9 8 ~ 5 6 4 、または

2 6 2 9 2 C A R 内で使用される場合の、配列番号 2 または配列番号 4 の残基 4 8 9 ~ 5 5 7

から選択されるアミノ酸配列をコードする。

【 0 0 3 5 】

10

[0052]細胞内シグナル伝達ドメインは、そのシグナル伝達ドメイン部分である、任意の適切な T 細胞受容体 ( T C R ) 複合体を含みうる。いくつかの実施形態では、細胞内シグナル伝達ドメインは、 T C R ゼータ鎖 ( 鎖 ) シグナル伝達ドメインである。ある特定の実施形態では、 鎖シグナル伝達ドメインは、以下：

3 2 7 1 6 C A R のための、配列番号 1 または配列番号 3 のヌクレオチド 1 7 1 7 ~ 2 0 5 2 、または

2 6 2 9 2 C A R のための、配列番号 2 または配列番号 4 のヌクレオチド 1 6 9 6 ~ 2 0 3 1

から選択されるヌクレオチド配列を含みうる。

【 0 0 3 6 】

20

[0053]前記ヌクレオチド配列は、以下：

3 2 7 1 6 C A R 内で使用される場合の、配列番号 1 または配列番号 3 の残基 5 6 8 ~ 6 7 9 、

2 6 2 9 2 C A R 内で使用される場合の、配列番号 2 または配列番号 4 の残基 5 6 1 ~ 6 7 2

から選択されるアミノ酸配列をコードする。

【 0 0 3 7 】

30

[0054]したがって、上記で記載した実施形態に係る実施形態では、 C D 1 2 3 C A R 遺伝子は、配列番号 1 、配列番号 2 、配列番号 3 または配列番号 4 から選択されるヌクレオチド配列を含みうる。他の実施形態では、 C D 1 2 3 C A R 遺伝子は、配列番号 9 、配列番号 1 0 、配列番号 1 1 または配列番号 1 2 から選択されるアミノ酸配列をコードしうる ( 図 1 0 、 1 1 、 1 2 、 1 3 ) 。

【 0 0 3 8 】

C D 1 2 3 C A R 遺伝子の発現および T 細胞の形質導入

[0055]いくつかの実施形態では、 C D 1 2 3 C A R 遺伝子は、発現カセットの一部である。いくつかの実施形態では、発現カセットはまた ( C D 1 2 3 C A R 遺伝子に加えて ) 、アクセサリー遺伝子も含みうる。 T 細胞を介して発現すると、アクセサリー遺伝子は、形質導入された T 細胞の選択マーカー、 i n v i v o におけるトラッキングマーカー、または形質導入された T 細胞のための自殺遺伝子として用いられる。

【 0 0 3 9 】

40

[0056]いくつかの実施形態では、アクセサリー遺伝子は、切断型 E G F R 遺伝子 ( E G F R t ) である。 E G F R t は、非免疫原性選択ツール ( 例えば、 E G F R t 含有構築物をレンチウイルスで形質導入した T 細胞を濃縮するために、ビオチニル化セツキシマブを、抗ビオチンマイクロビーズと組み合わせて使用する免疫磁気選択 ) 、トラッキングマーカー ( 例えば、 T 細胞の生着を追跡するためのフローサイトメトリー解析 ) 、および自殺遺伝子 ( 例えば、セツキシマブ / E r b i t u x ( 登録商標 ) に媒介される抗体依存性細胞介在性細胞傷害作用 ( A D C C ) 経路を介する ) として使用することができる。本明細書で記載される実施形態に従い使用されうる、切断型 E G F R ( E G F R t ) 遺伝子の例は、その対象が、全体が本明細書で提示された場合と同様に、参照により本明細書に組み込まれる、国際出願第 P C T / U S 2 0 1 0 / 0 5 5 3 2 9 号において記載されている。

50

他の実施形態では、アクセサリー遺伝子は、切断型 CD19 遺伝子 (CD19<sup>t</sup>) である。

【0040】

[0057]別の実施形態では、アクセサリー遺伝子は、誘導性自殺遺伝子である。自殺遺伝子とは、その遺伝子を発現させる細胞に、所望の時点において、プログラム細胞死または抗体に媒介されるクリアランスを受けさせる、組換え遺伝子である。一実施形態では、アクセサリー遺伝子として使用されうる誘導性自殺遺伝子は、誘導性カスパーゼ9遺伝子(その対象が、全体が本明細書で提示された場合と同様に、参照により本明細書に組み込まれる、Straathofら(2005)、「An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy」、Blood、6月1日、105(11):4247~4254を参照されたい)である。

【0041】

[0058]いくつかの実施形態では、上記で記載した CD123CAR 遺伝子を含む発現力セットは、標的細胞を送達する(形質導入またはトランスフェクションを介して)ためのベクターに挿入することができる。任意の適切なベクター、例えば、細菌ベクター、ウイルスベクター、またはプラスミドを使用することができる。いくつかの実施形態では、ベクターは、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、アデノウイルスベクター、またはアデノ隨伴ウイルスベクターから選択されるウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、ベクターにより、健常T細胞集団に形質導入することができる。形質導入またはトランスフェクトすることに成功した標的細胞は、発現力セットの一部である1つまたは複数の遺伝子を発現させる。

【0042】

[0059]T細胞の1つまたは複数の集団自体に、CD123CAR 遺伝子を形質導入することもできる。いくつかの実施形態では、CD123CAR 遺伝子は、配列番号1、配列番号2、配列番号3または配列番号4から選択されるヌクレオチド配列を含む。したがって、いくつかの実施形態では、形質導入されたT細胞は、配列番号9、配列番号10、配列番号11または配列番号12(図10、11、12、13)から選択されるアミノ酸配列をコードする、CD123CAR 遺伝子を発現させる。形質導入されたT細胞は、ドナーに由来する場合もあり、AMLを有し、AMLのための処置を必要とする対象に由来する場合もある。いくつかの実施形態では、形質導入されたT細胞を、AMLを処置するための、養子免疫療法による処置において使用する。

【0043】

[0060]さらに、T細胞の1つまたは複数の集団は、対象に投与するための送達のための、薬学的に許容される組成物の一部でもありうる。CD123CARが形質導入されたT細胞に加えて、薬学的に有効な組成物は、1種または複数の薬学的に有効な担体を含みうる。本明細書で使用される「薬学的に許容される担体」とは、目的の処置を、1つの組織、臓器、または体内の一部から、別の組織、臓器、または体内の一部に運ぶかまたは輸送することに関与する、薬学的に許容される材料、組成物、または媒体を指す。このような担体は、例えば、液体、固体、もしくは半固体の充填剤、溶媒、界面活性剤、希釈剤、賦形剤、アジュバント、結合剤、緩衝剤、溶解補助剤、溶媒、封入材料、封鎖剤、分散剤、保存剤、滑沢剤、崩壊剤、増粘剤、乳化剤、抗微生物剤、抗酸化剤、安定化剤、着色剤、またはこれらのいくつかの組合せを含みうる。

【0044】

[0061]担体の各構成要素は、組成物の他の成分と適合性でなければならず、それが遭遇しうる任意の組織、臓器、または体内の一部との接触に適さなければならないという点で「薬学的に許容され」、これは、その治療的有益性を過度に凌駕する、毒性、刺激、アレルギー反応、免疫原性、または任意の他の合併症のリスクを保有してはならないことを意味する。

【0045】

[0062]薬学的に許容される担体として用いられうる材料のいくつかの例は、(1)ラク

10

20

30

40

50

トース、グルコース、およびスクロースなどの糖、(2)トウモロコシデンプンおよびパレイショデンプンなどのデンプン、(3)セルロースおよびカルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、および酢酸セルロースなどのその誘導体、(4)トラガント末、(5)麦芽、(6)ゼラチン、コラーゲン、フィブリン、フィブリノーゲン、ラミニン、デコリン、ヒアルロナン、アルギメント、およびキトサンなどの天然ポリマー、(7)滑石、(8)ココアバターおよび坐剤用ワックスなどの賦形剤、(9)ラッカセイ油、綿実油、サフラワー油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油、およびダイズ油などの油、(10)プロピレングリコールなどのグリコール、(11)グリセリン、ソルビトール、マンニトール、およびポリエチレングリコールなどのポリオール、(12)トリメチレンカーボネート、オレイン酸エチル、およびラウリン酸エチルなどのエステル、(13)寒天、(14)水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウムなどの緩衝剤、(15)アルギン酸(またはアルギメント)、(16)発熱物質非含有水、(17)等張性生理食塩液、(18)リングル液、(19)エチルアルコールおよびプロパンアルコールなどのアルコール、(20)リン酸緩衝液、(21)ポリ乳酸、ポリグリコール酸などの熱可塑性物質、(22)ポリカプロラクトンなどのポリエステル、(23)自己集合性ペプチド、ならびに(24)アセトンなど、医薬処方物中で援用される、他の非毒性の適合性物質を含む。  
10

## 【0046】

[0063]医薬組成物は、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなどのpH調整剤およびpH緩衝剤、毒性調整剤など、生理学的条件に近づけるのに必要な薬学的に許容される補助物質を含有しうる。  
20

## 【0047】

[0064]一実施形態では、薬学的に許容される担体は、水性担体、例えば、緩衝生理食塩液などである。ある特定の実施形態では、薬学的に許容される担体は、極性溶媒、例えば、アセトンおよびアルコールである。

## 【0048】

[0065]これらの処方物中の、CD123CARが形質導入されたT細胞の濃度は、広範に変化する可能性があり、選択される特定の投与方式および生体系の必要に従い、主に、流体容量、粘度、臓器サイズ、体重などに基づき、選択されると予想される。  
30

## 【0049】

[0066]ある特定の実施形態では、AML細胞を標的化し、殺滅させるための方法において使用される、本明細書で記載される細胞など、CD124CAR遺伝子が形質導入されたT細胞(すなわち、CD124CARが形質導入されたT細胞)の集団は、細胞培養物中で成長させることができる。この実施形態のある種の態様では、方法を、AMLの病因におけるCD123の役割について探索する、in vitro状況または研究状況において使用することもでき、新たなCD123CAR構築物の標的化能を査定する、in vitro状況または研究状況において使用することもできる。

## 【0050】

## CD123CARが形質導入されたT細胞によるAMLの処置

[0067]いくつかの実施形態に従い、上記で記載したCD123CAR遺伝子およびCD123CAR遺伝子が形質導入されたT細胞集団など、CD123CAR遺伝子およびCD123CAR遺伝子が形質導入されたT細胞集団を対象におけるAMLを処置するための方法において使用することができる。このような方法は、治療有効量の、少なくとも1つのCD123CAR遺伝子が形質導入された、少なくとも1つのT細胞集団を対象に投与するステップを含みうる。これらの実施形態では、CD123CARが形質導入されたT細胞集団は、上記で記載したCD123CAR遺伝子など、1つまたは複数のCD123CAR遺伝子を発現させる。ある特定の実施形態では、T細胞に、32716CAR(S228P+L235E+N297Q)遺伝子構築物(図12)または26292CAR(S228P+L235E+N297Q)遺伝子構築物(図13)を形質導入し、これらを発現させる。このような細胞を、養子免疫療法による処置を介して投与すると、形質導  
40  
50

入されたT細胞は、*in vivo*において、CD123を発現させる細胞（すなわち、AML細胞）を特異的に標的化し、これらを溶解させ、これにより、がん細胞を消失させるそれらの治療効果を送達する。下記の実施例で記載する通り、ヒンジ領域内にS228PおよびL235E突然変異を有するCD123CAR遺伝子構築物は、*in vitro*で培養された細胞内で十分な応答を発生させるのに十分な、オフターゲット効果からの保護をもたらす。しかしこのデータから、*in vivo*でのこれらの構築物の効果を推測すべきではない。研究者らは、処置の効果についての*in vivo*データへの移行可能性について、*in vitro*のデータを重んじることが多い。場合によっては、*in vitro*データは*in vivo*データとよく一致する。しかし、図8により示される通り、*in vitro*において高度に有効な抗腫瘍細胞効果示したCD123CAR (S228P + L235E) 遺伝子構築物（図10～11）が、*in vivo*において同じ効果を示さなかつたため、この相関は予測不可能である。結果として、ヒンジ領域内に、さらなる突然変異 (N297Q) を施して、CD123CAR (S228P + L235E + N297Q) 構築物を作製した。CD123CAR (S228P + L235E) 遺伝子構築物とは対照的に、これらの構築物の投与は、白血病負荷の顕著な低減を結果としてもたらした。

#### 【0051】

[0068]本明細書で記載される方法に従い使用されうる、1つまたは複数のCD123CAR遺伝子が形質導入されたT細胞の1つまたは複数の集団は、任意の適切な投与経路により、単独で、または医薬組成物の一部として投与することができる。投与経路は、頭蓋内経路、非経口経路、または経皮経路を含むがこれらに限定されない、当技術分野で公知の任意の投与経路を指す場合がある。「非経口」経路とは、一般に注射を随伴する投与経路であって、眼窩下経路、注入、動脈内経路、関節包内経路、心内経路、皮内経路、筋内経路、腹腔内経路、肺内経路、脊髄内経路、胸骨下経路、髄腔内経路、腫瘍内経路、子宮内経路、静脈内経路、くも膜下経路、被膜下経路、皮下経路、経粘膜経路、または経気管経路を含む投与経路を指す。ある特定の実施形態では、形質導入されたT細胞を、静脈内投与または髄腔内投与する。

#### 【0052】

[0069]本明細書で使用される「有効量」という用語は、所望の効果をもたらす薬剤、化合物、処置、または治療の量を指す。例えば、細胞集団を、有効量の薬剤、化合物、処置、または治療と接触させて、*in vitro*における（例えば、細胞培養物中の）その効果について研究するか、または*ex vivo*または*in vitro*において、所望の治療効果をもたらすことができる。有効量の薬剤、化合物、処置、または治療を使用して、標的の状態を防止または処置すること、状態と関連する症状を緩和すること、または所望の生理学的効果をもたらすことなど、対象における治療効果をもたらすことができる。このような場合、有効量の化合物は、「治療有効量」、「治療有効濃度」、または「治療有効用量」である。正確な有効量または治療有効量とは、所与の対象または細胞集団における処置の有効性との関係で、最も有効な結果をもたらす組成物の量である。この量は、化合物の特徴（活性、薬物動態、薬力学、およびバイオアベイラビリティーを含む）、対象または細胞の生理学的状態（年齢、性別、疾患の種類および病期、全身状態、施された投与量に対する応答性、および投薬の種類を含む）、処方物中の1種または複数の薬学的に許容される担体の性質、および投与経路を含むがこれらに限定されない、様々な因子に応じて変化すると予想される。さらに、有効量または治療有効量は、化合物が、単独で投与されるのか、別の化合物、薬物、治療、または他の治療法もしくは治療様式と組み合わせて投与されるのかに応じても変化しうる。臨床技術分野および薬理学技術分野の当業者は、日常的な実験により、すなわち、化合物の投与に対する細胞または対象の応答をモニタリングし、これに応じて投与量を調整することにより、有効量または治療有効量決定することが可能であると予想される。さらなる指針については、参照により、本明細書で全体が提示された場合と同様に、本明細書に組み込まれる、Remington、「The Science and Practice of Pharmacy」、21版、

10

20

30

40

50

U n i v . o f S c i e n c e s i n P h i l a d e l p h i a ( U S I P ) 、 L i p p i n c o t t W i l l i a m s & W i l k i n s 、 P h i l a d e l p h i a 、 P A 、 2 0 0 5 を参照されたい。本明細書で記載される実施形態に係る、所望の効果をもたらす有効量または治療有効量で使用されうる薬剤、化合物、処置、または治療は、 C D 1 2 3 C A R 遺伝子、 C D 1 2 3 C A R 遺伝子を含む発現力セット、 C D 1 2 3 C A R 遺伝子を含む発現力セットを、 C D 1 2 3 C A R 遺伝子が形質導入された、 T 細胞および T 細胞集団などの標的細胞に送達するベクターを含みうるがこれらに限定されない。

#### 【 0 0 5 3 】

[0070] 状態「を処置すること」または状態の「処置」という用語は、状態を防止すること、状態の発症もしくは進行速度を緩徐化させること、状態を進行させるリスクを低減すること、状態と関連する症状の進行を防止するもしくは遅延させること、状態と関連する症状を軽減するもしくは終息させること、状態の完全退縮もしくは部分退縮をもたらすこと、またはこれらのいくつかの組合せを指す場合がある。処置はまた、状態の予防的処置または防止的処置を意味する場合もある。

#### 【 0 0 5 4 】

[0071] 本明細書で使用される「対象」という用語は、ヒトまたは靈長動物（特に、高等靈長動物）、ヒツジ、イヌ、齧歯動物（例えば、マウスまたはラット）、モルモット、ヤギ、ブタ、ネコ、ウサギ、およびウシなど、全ての哺乳動物を含む動物を指す。いくつかの実施形態では、対象は、ヒトである。

#### 【 0 0 5 5 】

[0072] ある特定の実施形態では、 A M L を処置するための方法は、治療有効量の、第 1 の C D 1 2 3 C A R 遺伝子が形質導入された第 1 の T 細胞集団を、治療有効量の、第 2 の C D 1 2 3 C A R 遺伝子が形質導入された第 2 の T 細胞集団と組み合わせて投与するステップを含みうる。

#### 【 0 0 5 6 】

[0073] 他の実施形態では、 C D 1 2 3 C A R が形質導入された T 細胞は、 1 種または複数のさらなる抗がん治療と組み合わせて投与することができる。本明細書で使用される「組み合わせて」または「～と組み合わせて」とは、同じ対象において同じがんを処置する過程で、 2 つ以上の薬剤、薬物、治療剤、手順、処置レジメン、処置様式、またはこれらの組合せを、任意の順序で使用することを意味する。これは、同時的投与のほか、時間的に最大数日の間隔をあけた順序での投与も含む。このような組合せ処置はまた、薬剤、薬物、治療剤、手順、処置レジメン、および処置様式のうちの任意の 1 または複数の複数回投与も含みうる。さらに、 2 つ以上の薬剤、薬物、治療剤、手順、処置レジメン、処置様式、またはこれらの組合せの投与は、同じ投与経路を介する場合もあり、異なる投与経路を介する場合もある。

#### 【 0 0 5 7 】

[0074] 本明細書で記載される方法に従い使用されうる、さらなる抗がん治療は、 1 種または複数の抗がん手順、抗がん処置様式、抗がん治療剤、またはこれらの組合せを含みうる。いくつかの実施形態では、 C D 1 2 3 C A R が形質導入された T 細胞は、幹細胞移植（例えば、同種幹細胞、自己幹細胞、または骨髄非破壊的移植を使用する、骨髄移植または末梢血幹細胞移植）、放射線療法、または手術による切除を含むがこれらに限定されない、 1 種または複数の抗がん手順または抗がん処置様式と組み合わせて投与することができる。他の実施形態では、 C D 1 2 3 C A R が形質導入された T 細胞は、 A M L を処置するのに使用されうる、 1 もしくは複数の抗がん治療剤または抗がん薬であって、化学療法剤、および他の抗がん薬、免疫療法剤、標的化治療剤、またはこれらの組合せを含むがこれらに限定されない、抗がん治療剤または抗がん薬と組み合わせて投与することができる。

#### 【 0 0 5 8 】

[0075] 本明細書で記載される実施形態に係る、 C D 1 2 3 C A R が形質導入された T 細胞と組み合わせて投与されうる、化学療法剤および他の抗がん薬は、オールトランスレチ

10

20

30

40

50

ノイン酸( A T R A )、三酸化ヒ素、アントラサイクリン系抗生剤およびそれらの薬学的に許容される塩( 例えば、ドキソルビシン塩酸塩、ダウノルビシン塩酸塩、イダルビシン、ミトキサントロン )、アルキル化剤( 例えば、シクロホスファミド、ラロムスチン )、代謝拮抗剤の類似体( シタラビン、6 - チオグアニン、6 - メルカプトブリニン、メトレキサート )、脱メチル化剤( 例えば、デシタビン、5 - アザシチジン )、核酸合成阻害剤( 例えば、ヒドロキシ尿素 )、トポイソメラーゼ阻害剤( 例えば、エトポシド )、ビンカアルカロイド( 例えば、ビンクリスチン硫酸塩 )、またはこれらの組合せ( 例えば、シタラビン( A r a - C )、ダウノルビシン塩酸塩、およびエトポシドの組合せを含む組合せ处置である「 A D E 」 )を含むがこれらに限定されない。

## 【 0 0 5 9 】

10

[0076] 本明細書で記載される実施形態に係る、 C D 1 2 3 C A R が形質導入された T 細胞と組み合わせて投与されうる、免疫療法剤は、免疫調節性試薬( 例えば、 S T A T 3 阻害剤であるレナリドマイド ) および治療用モノクローナル抗体を含むがこれらに限定されない。治療用モノクローナル抗体は、( i ) C D 3 3 ( 例えば、ゲムツズマブ、リンツズマブ )、 M U C 1 ( 例えば、カンツズマブ・ラブタンシン、クリバツズマブ・テトラキセタン、ペムツモマブ ) を含むがこれらに限定されない、 1 種または複数の A M L 抗原 ; ( i ) B 細胞抗原( 例えば、リツキシマブ、オファツムマブ ) ; または V E G F もしくは V E G F R などの血管系モジュレーター( 例えば、アラシズマブ・ペゴール、ベバシズマブ、イクルクマブ、ラムシルマブ、ラニビズマブ ) を標的化するようにデザインすることができる。

20

## 【 0 0 6 0 】

[0077] 本明細書で記載される実施形態に係る、 C D 1 2 3 C A R が形質導入された T 細胞と組み合わせて投与されうる、標的化治療剤は、チロシンキナーゼ阻害剤( イマチニブ、ダサチニブ、ニロチニブ、スニチニブ )、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤( 例えば、チピファルニブ )、 F L T 阻害剤、および c - K i t ( または C D 1 1 7 ) 阻害剤( イマチニブ、ダサチニブ、ニロチニブ ) を含むがこれらに限定されない。

## 【 実施例 】

## 【 0 0 6 1 】

実施例 1 : C D 1 2 3 C A R が形質導入された T 細胞は、 i n v i t r o において、 A M L に対する強力な細胞傷害活性および複数のエフェクター機能を示す

30

## 材料と方法

[0078] 細胞株 : そうでないことが弁明されない限りにおいて、全ての細胞株を、以下では完全培地( C M )と称する、 2 m M の L - グルタミン、 2 5 m M の H E P E S 、および 1 0 % の熱不活化 F C S ( H y c l o n e ) を補充した R P M I 1 6 4 0 ( I r v i n e S c i e n t i f i c ) 中で維持した。既に記載されている[ 1 9 ]通りに、末梢血単核細胞( P B M C )を、エプスタイン - バーウイルスで形質転換して、リンパ芽球様細胞株( L C L )を作製した。 L C L - O K T 3 細胞は、膜に結合した O K T 3 を発現させるが、これを、 0 . 4 m g / m l のハイグロマイシンを補充した C M 中で成長させた[ 2 0 ]。 K 5 6 2 細胞は、 A T C C から得、推奨される通りに培養した。 K G 1 a 細胞( R a v i B h a t i a 博士による惠与 )は、 2 5 m M の H E P E S 、 4 m M の L - グルタミン( I r v i n e S c i e n t i f i c )、および 2 0 % の F C S を含む I M D M ( I r v i n e S c i e n t i f i c ) 中で維持した。 2 9 3 T 細胞( T h e C e n t e r f o r B i o m e d i c i n e a n d G e n e t i c s a t C i t y o f H o p e からの惠与 )は、 D M E M + 1 0 % の熱不活化 F C S 中で維持した。

40

## 【 0 0 6 2 】

[0079] 初代 A M L 試料 : 初代 A M L 試料は、患者の末梢血から得た( 本明細書では、 A M L 試料 I D 番号 : 1 7 9 、 3 7 3 、 4 9 3 、 5 1 9 、 5 4 5 、 5 5 9 、 6 0 5 、 7 2 2 、および 8 1 3 と称する )。試料の特徴を、下記の表 1 にまとめる。

[ 表 1 は次頁に記載 ] 。

## 【 0 0 6 3 】

50

## 【表1】

表1.初代AML試料の特徴

AML 試料番号	年齢/ 性別	細胞遺伝学	Flt3の突 然変異 状態	臨床状態	試料の種類	CD123 (RFI) <sup>a</sup>	CD123 陽性%
179	74歳/ 男性	中程度のリスク t(1;7)、t(14;15)	ND	再発	PB	428.32	99.22
373	47歳/ 男性	3つの細胞株でプア リスクの複合異常	ND	再発	PB	1052.83	99.66
493	46歳/ 女性	中程度のリスク トリソミー-8	ND	再発	PB	23.98	76.80
519	44歳/ 女性	del(17p)、dic(11;7) TP53/17p13.1のクローン喪失	ND	再発	PB	63.18	97.40
545	58歳/ 男性	中程度のリスク t(3;6)、del(7)	ND	誘導失敗	PB	52.73	99.32
559	59歳/ 男性	複合異常、 大規模な高二倍性	陰性	再発	アフェレーシス	9.30	45.0
605	55歳/ 男性	正常	陰性	持続	PB	58.48	99.91
722	22歳/ 男性	中程度のリスク t(14;21)、del(9q)	陰性	未処置	PB	33.53	92.74
813	48歳/ 女性	複合異常、 トリソミー-8、 トリソミー-21 add(17)	ND	未処置	PB	37.19	90.93

<sup>a</sup> 相対蛍光指数(RFI)とは、アイソタイプ適合対照染色に対する、CD34<sup>+</sup>集団における9F5で染色したシグナルの中央値の比である。

<sup>b</sup> CD34<sup>+</sup>集団にゲートをかけた。

ND:未決定

PB:末梢血

## 【0064】

[0080] フローサイトメトリー：蛍光色素をコンジュゲートさせたアイソタイプ対照である、抗CD4、抗CD8、抗T細胞受容体（TCR）、抗CD123(9F5)、抗CD34(8G12)、および抗CD38(HIT2)は、BD Biosciencesから購入した。ビオチニル化抗Fc抗体は、Jackson Immunoresearch Laboratoriesから購入した。ビオチニル化セツキシマブ(Eriblitux)は、COH pharmacyから購入したが、これについては既に記載されている[20]。ビオチニル化抗CD2、抗CD3、抗CD7、抗CD10、抗CD11b、抗CD19、抗CD33、および抗CD235Aは、eBioscienceから購入した。データ収集は、FACSCalibur、LSRII(BD Biosciences)、またはMACSQuant Analyzer(Miltenyi Biotech)上で実施し、FCS Express、Version 3(De Novo Software)を使用して解析した。

## 【0065】

[0081] 293T細胞へのCD123のトランスフェクション：CD123 cDNAは、CD123-pMD18-T(Sino Biological Inc.)から、ポリメラーゼ連鎖反応およびプライマー-(CD123-F: 5'-ATAAGGCCCTGC

10

20

30

40

50

C G C C A C C A T G G T C C T C C T T G G C T C A C G - 3' および C D 1 2 3 - R 5' - A T A G C T A G C T C A A G T T T C T G C A C G A C C T G T A C T T C - 3' ) を使用して増幅した。PCR 産物は、S t u I 制限部位および N h e I 制限部位を使用して、p M G P a c にクローニングした。2 9 3 T 細胞には、製造元の指示書に従い、L i p o f e c t a m i n e 2 0 0 0 ( L i f e T e c h n o l o g i e s ) を使用してトランスフェクトした。トランスフェクションの 2 4 時間後、フローサイトメトリーにより、C D 1 2 3 の発現を確認した。

## 【 0 0 6 6 】

[0082] レンチウイルスベクターの作製：本研究において使用される C A R 構築物を作製するため、V H 鎖および V L 鎖、修飾 I g G 4 ヒンジドメインおよび修飾 C D 2 8 膜貫通ドメイン ( R L L H R G G H [ 2 2 ] ) をコードする、コドンを最適化した D N A 配列を合成し ( G E N E A R T ) 、N h e I 部位および R s r I I 部位を使用して、C D 1 9 R C A R - T 2 A E G F R t \_ e p H I V 7 [ 2 0 ] にクローニングして、C D 1 9 R C A R を置きかえた。レンチウイルスは、C a l P h o s ( 商標 ) 哺乳動物細胞トランスフェクションキット ( C l o n t e c h ) を使用して、2 9 3 T 細胞に、レンチウイルスベクター、ならびにパッケージングベクターである p C M V - R e v 2 、p C H G P - 2 、および p C M V - G をトランスフェクトすることにより製造した。これらの 2 6 2 9 2 C A R 構築物および 3 2 7 1 6 C A R 構築物を、本明細書ではまた、2 6 2 9 2 C A R ( S 2 2 8 P + L 2 3 5 E ) または 2 6 2 9 2 C A R ( S 2 2 8 P + L 2 3 5 E + N 2 9 7 Q ) ( 図 1 1 および 1 3 ) および 3 2 7 1 6 C A R ( S 2 2 8 P + L 2 3 5 E ) または 3 2 7 1 6 C A R ( S 2 2 8 P + L 2 3 5 E + N 2 9 7 Q ) ( 図 1 0 および 1 2 ) とも称する。レンチウイルスの上清は、トランスフェクションの 2 4 、4 8 、および 7 2 時間後において回収し、超遠心分離により濃縮した。

## 【 0 0 6 7 】

[0083] 健常ドナーの P B M C および A M L 患者の P B M C への形質導入：匿名化された P B M C は、施設内倫理委員会で承認されたプロトコール下で、説明同意文書に署名した健常ドナーおよび患者から得た。健常ドナーでは、毎週 3 回ずつ、2 5 U / m l の I L - 2 および 0 . 5 n g / m l の I L - 1 5 を補充される C M ( 本明細書では、T 細胞培地と称する ) 中の O K T 3 ( 3 0 n g / m l ) を使用して、T 細胞を活性化させた。活性化の 7 2 時間後、8 0 0 g および 3 2 で 3 0 分間にわたり遠心分離することにより、T 細胞に、レンチウイルスを、M O I = 3 でスピノキュレートした。C A R の発現については、レンチウイルスを形質導入した 1 2 ~ 1 4 日後に、フローサイトメトリーで解析した。E G F R t を発現させる T 細胞は、既に記載されている [ 2 0 ] 通りに濃縮した。T 細胞は、急速増殖法 [ 2 3 ] により、T 細胞培地中で増殖させた。

## 【 0 0 6 8 】

[0084] A M L 患者に由来する T 細胞を遺伝子改変するため、D y n a b e a d s ( 登録商標 ) H u m a n T - E x p a n d e r C D 3 / C D 2 8 ( L i f e T e c h n o l o g i e s ) を使用して、T 細胞培地中に 3 : 1 のビーズ : C D 3 + 細胞比で、融解させた末梢血またはアフェレーシス生成物を刺激した。ビーズによる刺激の 7 2 時間後、細胞に、レンチウイルスを、M O I = 3 でスピノキュレートした。初期刺激の 9 ~ 1 4 日間後、D y n a M a g ( 商標 ) - 5 0 磁石 ( L i f e T e c h n o l o g i e s ) を使用してビーズを除去し、T 細胞を、T 細胞培地中で維持した。A M L 患者に由来する、C A R を発現させる T 細胞株は、殺滅アッセイにおける使用の前に免疫磁気選択しなかった。

## 【 0 0 6 9 】

[0085] C F S E 増殖アッセイ：T 細胞を、製造元の指示書に従い、0 . 5  $\mu$  M のカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル ( C F S E ; M o l e c u l a r P r o b e s ) で標識した。標識された T 細胞を、1 0 U / m l の I L - 2 を補充した C M 中に 2 : 1 の E : T 比で、刺激細胞を伴い、またはこれを伴わずに共培養した。7 2 ~ 9 6 時間後、細胞を採取し、ビオチニル化セツキシマブのほか、ヨウ化プロピジウムまたは D A P I で染色して、死細胞を解析から除外した。試料を、フローサイトメトリーで解析して

10

20

30

40

50

、C F S E の希釈により、E G F R t 陽性生細胞の増殖を査定した。

【0070】

[0086]クロム放出アッセイおよびサイトカイン分泌アッセイ：標的細胞を、1時間にわたり、51Cr (PerkinElmer) で標識し、5回にわたり洗浄し、多様なエフェクター対標的 (E:T) 比でエフェクター細胞を含むウェル1つ当たり  $5 \times 10^3$  個の細胞で、3連でアリコートに分けた。4時間にわたる共培養の後で、上清を採取し、ガンマカウンターまたはTop count (PerkinElmer) を使用して放射線を測定した。特異的溶解パーセントは、既に記載されている [24] 通りに計算した。E:T 比を 10:1 とする共培養の 24 時間後におけるサイトカイン産生は、既に記載されている通りに計算した [25]。

10

【0071】

[0087]CD107a の脱顆粒および細胞内のサイトカイン産生：T 細胞を、E:T を 2:1 とする標的細胞と共に、Golgi Stop (商標) (BD Biosciences) および抗 CD107a クローンである H4A3 またはアイソタイプの対応する対照抗体の存在下、37 度 6 時間にわたり共培養した。6 時間にわたるインキュベーションの終了時において、細胞を採取し、洗浄し、抗 CD3、抗 CD4、抗 CD8、およびビオチニル化セツキシマブで染色した後、PE コンジュゲートストレプトアビジンを使用して二次染色を施した。次いで、細胞を固定し、製造元の指示書に従い、透過処理し (Cytofix/Cytoperm (商標) ; BD Biosciences)、抗 IFN-α (BD Biosciences; クローン B27) および抗 TNF-α (BD Biosciences; クローン MAb11) で染色した。データ収集は、MACSQuant analyzer (Miltenyi Biotech) を使用して実施し、解析は、FC3S Express Version 3 (De Novo Software) を使用して行った。

20

【0072】

[0088]コロニー形成細胞アッセイ：免疫磁気カラムによる分離 (Miltenyi Biotech) を使用して、臍帯血 (CB) 単核細胞または初代 AML 試料に由来する CD34+ 細胞を選択した。10<sup>3</sup> 個の CD34+CB 細胞を、25 × 10<sup>3</sup> 個のエフェクター細胞と共に、4 時間にわたり共培養してから、2 連のウェル内の半固体のメチルセルロースによる前駆細胞培養物 [26] 中に播種した。14~18 日後、顆粒球マクロファージコロニー形成単位 (CFU-GM) コロニーおよび赤芽球バースト形成単位 (BFU-E) コロニーを計数した。AML 試料では、5 × 10<sup>3</sup> 個の CD34+AML 細胞を、125 × 10<sup>3</sup> 個のエフェクター細胞と共に、4 時間にわたり共培養してから、2 連のウェル内の半固体のメチルセルロースによる前駆細胞培養物中に播種した。

30

【0073】

[0089]統計学的解析：統計学的解析は、Graphpad Prism v5.04 を使用して実施した。対応のないスチュードントの t 検定を使用して、処置群間の有意差を確認した。

【0074】

結果

CD123CAR 発現 T 細胞の作製

40

[0090]T 細胞の特異性をリダイレクトするため、CD123CAR をコードするレンチウイルスベクターを開発した。CAR の各々は、それぞれ、2 つの CD123 特異的 scFv である 26292 および 32716 [18] のうちの 1 つをコードする、コドンを最適化した配列を含む。scFv は、ヒト IgG4 Fc 領域と、CD28 共刺激ドメインと、CD3 シグナル伝達ドメインとにインフレームで融合されている。CAR 配列のすぐ下流には、T2A リボソームスキップ配列および切断型ヒト EGFRT (EGFRt) 形質導入マーカー (図 1A) を置く。健常ドナーに由来する、OKT3 で刺激された PBMC に、レンチウイルスで形質導入し、ビオチニル化 Erbitux 抗体を使用する免疫磁気選択により、CAR を発現させる T 細胞を単離した後、抗ビオチン抗体磁気ビーズによ

50

る二次染色を施した。REMサイクルの後、単離された細胞を、フローサイトメトリーで、CARの表面発現およびT細胞の表現型について解析した。FcおよびEGFrのいずれの発現も、3例の健常ドナーから作製されたT細胞株中の90%を超える、最終のT細胞産物は、CD4陽性T細胞とCD8陽性T細胞との混合物からなった(図1B、1C)。

#### 【0075】

CD123CAR T細胞は、CD123を発現させる腫瘍細胞株を特異的に標的化する

[0091] CD123CAR T細胞の特異性を確認するため、遺伝子改変されたT細胞の、CD123を発現するように一過性にトランسفェクトされた293T細胞を溶解させる能力を検討した(293T-CD123;図2A)。いずれのCD123CAR T細胞も、293T-CD123の溶解を効率的にもたらしたが、CD19を発現するように一過性にトランسفェクトされた293T細胞の溶解はもたらさなかったことから、CD123の特異的認識が裏付けられる(図2B)。次に、CD123特異的T細胞の、in vitroにおける、CD123を内因的に発現させる腫瘍細胞株に対する細胞溶解能について探索した。LCL細胞株上およびKG1a細胞株上のCD123の発現は、フローサイトメトリーにより確認した(図2C)。いずれのCD123特異的T細胞株も、LCL標的細胞株およびKG1a標的細胞株を効率的に溶解させたが、CD123-K562細胞株は溶解させなかつた(図2C)。対応するCD19特異的T細胞は、CD19+LCL標的を有効に溶解させたが、CD19-KG1aまたはK562標的は溶解させなかつた(図2D)。mock形質導入親細胞は、陽性対照のLCL-OKT3細胞株だけを溶解させた(図2D)。

#### 【0076】

CD123CAR T細胞は、CD123陽性標的細胞と共に共培養されると、複数のエフェクター機能を活性化させる

[0092] CD123特異的T細胞のエフェクター機能について検討するため、多様な腫瘍細胞株との共培養後における、IFN- $\gamma$ およびTNF- $\alpha$ の分泌を測定した。いずれのCD123CARを発現させるT細胞も、CD123+標的細胞と共に共培養されると、IFN- $\gamma$ およびTNF- $\alpha$ の両方を産生したのに対し、対応するCD19特異的T細胞は、CD19+LCLまたはLCL-OKT3細胞株と共に共培養された場合に限り、これらのサイトカインを分泌した(図3A)。加えて、いずれのCD123特異的T細胞株も、CD123+細胞株であるLCL、LCL-OKT3、またはKG1aのうちのいずれかと共に共培養されると増殖したが、CD123-K562細胞株と共に共培養されると増殖しなかつた(図3B)。これに対し、対応するCD19CARを発現させるT細胞は、LCLまたはLCL-OKT3と共に共培養された場合に限り増殖した(図3B)。

#### 【0077】

CD123CAR T細胞は、初代AML試料と共に共培養されると、複数のエフェクター機能を活性化させる

[0093] 初代AML試料におけるCD123の過剰発現は、十分に記載されており[27~29]、本研究でも確認される(図14)。多面的なT細胞応答は、感染およびワクチンに対する頑健な免疫応答に極めて重要であり、また、CARでリダイレクトしたT細胞の抗腫瘍活性においても役割を果たしうる[30]。初代AML試料に対する複数のエフェクター経路を活性化させる、CD123CAR T細胞の能力について探索するため、操作されたT細胞を、3つの異なるAML患者試料(179、373、および605)と共に、6時間にわたり共培養し、多色フローサイトメトリー(図15に示されるゲーティング戦略)を使用して、CD107aの上方調節およびIFN- $\gamma$ およびTNF- $\alpha$ の産生について査定した。CD123特異的T細胞のCD4区画およびCD8区画のいずれにおいても、CD107aの細胞表面における移動が観察されたのに対し、対応するCD19R T細胞では、初代AML試料に対する感知できるほどの脱顆粒はなかつた(図4A)

10

20

30

40

50

、棒グラフ）。さらにまた、CD107a + CD123CAR T細胞の亜集団も、IFN-、TNF-、または両方のサイトカインを産生した（図4A、円グラフ）。この多機能性応答は、CD4集団およびCD8集団のいずれについても観察された（図4Aおよび4B）。加えて、CARを操作されたT細胞の、初代AML試料との共培養に応答して増殖する能力も検討した。いずれのCD123特異的T細胞株も、AML813試料またはプレB-ALL802試料との共培養後において、増殖することが可能であった（図4C）。増殖は、CD4集団およびCD8集団のいずれについても観察された（図16）。対応するCD19特異的T細胞は、CD19 + プレB-ALL802と共に共培養されると増殖したが、AML813と共に共培養されると増殖しなかった。

## 【0078】

10

CD123CARを発現させるT細胞は、in vitroにおいて、初代AML細胞を標的化する

CD123特異的T細胞は、in vitroにおいて、臍帯血細胞によるコロニー形成を消失させない

[0094] CD123は、骨髓系共通前駆細胞（CMP）上で発現する[31]ことを踏まえると、操作されたT細胞の、CD34に富む正常な臍帯血（CB）試料のコロニー形成能力に対する効果について探索した。CB試料による骨髓系および赤血球系のコロニー形成は、E:Tを25:1とする共培養の4時間後において、CD123-CARを発現させるT細胞により、対応するCD19R CAR T細胞と比較してそれほど低減されなかった（図6AおよびB）。次に、CD123特異的T細胞の、初代クローニング性AML細胞の成長を阻害する能力を、in vitroにおいて検討した。いずれのCD123CAR T細胞株も、白血病コロニーの形成を、対応するCD19R T細胞と比較して著明に減殺した（図6C）。CD123特異的T細胞が、白血病コロニー形成に対して、正常な骨髓系コロニー形成と比較して大きな影響を及ぼしたことは注目に値する（図6D、それぞれ、69%の低減対31%の低減）。

20

## 【0079】

AML患者に由来するT細胞を遺伝子改変して、CD123CARを発現させ、自己腫瘍細胞を特異的に標的化することができる

[0095] AML患者に由来するT細胞は、アクチンを再極性化せず、自己芽球と共に欠損した免疫シナップスを形成することが公知である[32]。加えて、本発明者らが知る限りにおいて、AML患者に由来する、CARを発現させるT細胞はいまだ記載されていない。したがって、AML患者に由来するT細胞を遺伝子改変して、CD123CARを発現させうるのかどうかについて決定した。低温保存されたPBMC（AML605およびAML722）またはアフェレーシス産物（AML559）を、CD3/CD28ビーズで刺激し、レンチウイルスで形質導入して、CD123CARまたはCD19R対照CARのうちのいずれかを発現させた。3例の患者試料に由来するT細胞は全て、26292CAR（40~65%の形質導入効率）、32716CAR（46~70%の形質導入効率）、およびCD19R CARを発現させた（CD123特異的T細胞の、初代AML細胞を死滅させる能力を査定するため、対応するCD19R CARまたはCD123CARを発現させるT細胞を、4時間にわたる<sup>51</sup>Cr放出アッセイにおいて、CD34に富む初代AML患者試料と共に共培養した。対応するCD19R T細胞とは対照的に、いずれのCD123CAR T細胞株も、全ての被験初代AML患者試料を頑健に溶解させた（図5A）。加えて、CD123CARを発現させるT細胞の細胞溶解能力の間で統計学的差違が認められなかったのに対し、いずれのCD123特異的T細胞も、細胞傷害作用の、対応するCD19R-CAR T細胞と比較した顕著な増強を裏付けた（図5B）。

30

## 【0080】

40

[0096] 23~37%の形質導入効率）。AML患者に由来するCAR T細胞の表現型の代表例を、図7Aに示す。次に、4時間にわたる<sup>51</sup>Cr放出アッセイにおいて、CD34に富む自己標的細胞に対する、AML患者に由来するCAR T細胞の細胞溶解の潜

50

在能力を検討した。CD34に富む自己細胞の全ては、百分率および強度を変化させたが、CD123を発現させた(図7B)。AML605およびAML722に由来するT細胞が、自己芽球を効率的に溶解させるのに対し、AML559に由来するT細胞は、おそらくAML559芽球上の低度で不均質なCD123の発現に起因して、低レベルの自己芽球溶解を表した(図7C)。

#### 【0081】

##### 考察

[0097]本明細書で記載される実施形態は、組換え免疫毒素(RIT)に由来するscFvを使用する、2つの新規のCD123標的化CARであって、異なるエピトープに結合し、CD123に対して同様の結合親和性を有する[18]CD123標的化CARである、26292および32716の作製を含む。T細胞集団により発現させると、これらのCD123標的化CAR T細胞は、CD123を発現させる細胞に対する特異性をリダイレクトする。標準的な4時間にわたるクロム51(51Cr)放出アッセイを使用したところ、CD123CARを発現させるように操作された健常ドナーのT細胞は、CD123+細胞株および初代AML患者試料を効率的に溶解させた。加えて、CD123CAR T細胞のいずれも、CD123+細胞株および初代AML患者試料との共培養において、複数のエフェクター機能を活性化させた。さらに、CD123標的化T細胞は、臍帯血(CB)に由来する顆粒球マクロファージコロニー形成単位(CFU-GM)コロニーまたは赤芽球バースト形成単位(BFU-E)コロニーの数を、CD19CAR T細胞と比較してそれほど低減しなかった。CD19特異的T細胞が、初代AML試料の白血病コロニー形成に対して影響をほとんど及ぼさなかったのに対し、CD123標的化T細胞は、in vitroにおける白血病コロニー形成を著明に低減したことは注目に値する。また、AML患者に由来するT細胞が、CD123CARを発現させ、in vitroにおいて自己芽球を溶解させることも示された。

10

20

#### 【0082】

[0098]2つのCD123特異的CARのうちのいずれかを発現させるT細胞も、in vitroにおいて、CD123を発現させる細胞株および初代AML患者試料を特異的に溶解させることができあり、複数のエフェクター機能を、抗原特異的な形で活性化させうことから、いずれのエピトープも、処置のための潜在的な標的であることが裏付けられる。CD123+細胞と共に共培養したところ、CD123CARを操作されたT細胞株の間で、標的細胞の殺滅、サイトカインの分泌、または増殖に関して大きな差異は観察されなかった。これについての1つの可能な説明は、CD123-CARにおいて使用される、CD123特異的scFvの結合親和性が、ナノモル範囲にあり、3倍未満の差違であり、このため、いずれのscFvも、抗原への結合の標的化において顕著な利点を付与しないということである[18]。

30

#### 【0083】

[0099]AML細胞上の複数の細胞表面抗原の発現については、十分に記載されている[4、27、34]。これらの抗原のうちのいくつかに対する、CARを発現させるT細胞を介する標的化は、実現可能でない場合がある。例えば、AML関連抗原であるTIM-3は、消耗したT細胞のサブセット上で発現し[35、36]CARで操作されたT細胞を使用して、TIM-3を標的化する結果として、遺伝子改変細胞の自己溶解がもたらされる可能性がある。加えて、CD47も、遍在的に発現する[37]ため、CARで操作されたT細胞により標的化可能となる可能性が低い。CD33分化抗原は、主に骨髄系細胞上で発現し、現在、CD33/CD3二特異的なT細胞係合抗体であるゲムツズマブオゾガマイシン、およびCD33CARなど、CD33を標的化する免疫療法が、臨床状況および前臨床状況において使用されている[17、38、39]。TIM-3と同様に、CD33も、T細胞のサブセット上で発現することから、CARベースの治療のための理想的な標的とはならない[40]。加えて、CD33標的化療法の抗白血病活性は、正常な造血幹細胞(HSC)の長期にわたる自己再生時における、CD33発現の結果である可能性が高い、造血および血球減少の回復の緩徐化[41]を伴うことが多かった。さ

40

50

らに、肝毒性も、CD33標的化処置の一般的な副作用であり、CD33+クッパー細胞の意図されない標的化に起因する可能性がある[42]。

【0084】

[00100] CD123の発現は、T細胞上では見られず、主に骨髄系統の細胞に限定され[43]、大部分のHSC上でも見られない[27]。まとめると、これらの観察は、CD123を、CARに媒介されるT細胞療法のための魅力的な標的とした。CD123に特異的な治療剤は、第I相試験(Clinical Trials.gov ID:NCT00401739およびNCT00397579)において好適な安全性プロファイルを表した。残念ながら、これらの治療は、処置された患者の大半において寛解を誘導できなかった。本発明で作製された、CD123-CARを発現させるT細胞は、in vitroにおいて、CD123+細胞株および初代AML試料に対する強力な細胞溶解能を表した。下記で記載される研究は、リスクのAMLを有する患者に由来する初代試料が、CD123CAR-T細胞に媒介された細胞傷害作用を受けやすいことを示す。まとめると、短期間の細胞傷害作用アッセイのために使用された初代試料の小規模のコホートでは、診断時において高リスクの特徴を示し、かつ/または化学療法耐性を示したAML患者試料は、CD123+細胞株を使用する実験において観察されたのと同様に、CD123CARによる殺滅に対して感受性であった。さらに、これらの結果が大規模な試料コホートについても当てはまることを確認する解析も必要となろう。

【0085】

[00101]多機能性T細胞応答は、ウイルス感染の制御と関連し、抗腫瘍CAR-T細胞応答においても重要である[44]。実際、CD19CAR-T細胞療法に対して応答性の患者は、ex vivoにおいて、CD19+標的に応答して、治療後における、検出可能なT細胞応答(すなわち、脱顆粒、サイトカインの分泌、または増殖)を示す[11、12、14]。下記の実施例では、CD123+細胞株および初代AML試料の両方に応答した、CD107aの上方調節、炎症性サイトカインの産生、およびCD123特異的T細胞の増殖を解析することにより、CD123-CARを発現させるT細胞の機能性が裏付けられた。さらに、多機能性は、CD4+区画およびCD8+区画のいずれにおいても観察されたが、これは、腫瘍の微小環境内で、持続的な抗白血病活性を促進し、抗白血病活性をブーストする可能性がある[45、46]。4-1BBなど、他の共刺激ドメインの組入れ、および分化の程度が小さな「若い」T細胞の使用はさらに、CD123CAR応答を増進する可能性があり、活発な研究領域である[9、47]。

【0086】

[00102]さらに、CD123特異的T細胞は、正常な前駆細胞によるコロニー形成を阻害しない(E:Tを25:1としてもなお)。系統-CD34+CD38-細胞上のCD123の発現は、骨髄系共通前駆細胞の顕徴であり、このため、CD123CAR-T細胞の標的である可能性が高い[31]。CB細胞を、CD123特異的T細胞とインキュベートしたところ、骨髄系由来コロニーの相対百分率の減少が観察されたが、対応するCD19R CAR-T細胞より顕著な減少ではなかった。限定された試料サイズは、この結果に起因する可能性があり、さらなる実験により、CD123CAR-T細胞で処置された臍帯血試料中のCFU-GM形成の顕著な減少を明らかになる可能性もある。加えて、播種する前の4時間にわたる、T細胞とCB細胞との共培養は、正常な骨髄系前駆細胞のコロニー形成に対する効果を観察するのに十分に長い時間ではない可能性もあり、インキュベーション時間を長くすると、観察される骨髄系由来コロニーの数が減少する可能性もある。しかし、CB細胞に使用されたのと同じ方法を使用して、CD34に富む初代AML患者試料を、CD123CAR-T細胞とインキュベートしたところ、形成される白血病コロニー数の実質的な減少が観察されたことから、4時間にわたるインキュベーション時間は、白血病コロニー形成と正常コロニー形成との間で効果を観察するのに十分であることが示唆される。代替的に、CB細胞上のCD123の相対発現が、AML細胞と比較して小さいことの部分的な結果として、in vitroにおいて、CD123CAR-T細胞に、骨髄系由来コロニーの形成を変化させる能力がない可能性がある。他の研究

10

20

30

40

50

者らは、CD123が、系統 - CD34 + CD38 - HSCの小さな画分内だけで発現することを裏付けており、CD123を標的化する薬剤を使用する2つの第I相試験は、長期の骨髓抑制は見られないことを明らかにしたが、CD123CAR T細胞療法の、造血に対する効果を査定する、さらなる研究が必要とされている。望ましくないオフターゲット毒性を制御するために、EGFRtをレンチウイルス構築物内に組み入れて、CARを発現させるT細胞の除去を可能とした。また、CD123を発現させる正常な細胞を死滅させる潜在的可能性を踏まえ、誘導性カスパーゼ9によるアポトーシススイッチ[48]またはCAR mRNAの電気穿孔[49]など、CAR T細胞活性をモジュレートする他の戦略も、大きな関心の的となっている。

## 【0087】

10

[00103]さらに、活動性疾患を有するAML患者に由来する、低温保存されたPBMCを遺伝子改変して、CD123CARを発現させ、試料3例中の2例において、自己白血病性芽球に対する強力な細胞溶解活性を示しうることも裏付けられた。AML559に由来する、CD123CARを発現させるT細胞は、低レベルのCD123を発現させる自己芽球を溶解させなかつたが、これらのCAR T細胞は、CD123 + LCL細胞株およびCD123 + KG1a細胞株を溶解させた(データは示さない)ことから、作製されたT細胞は、CD123を発現させる標的細胞を標的化する潜在的な可能性を有することが示唆される。本発明者らが知る限りにおいて、これは、AML患者に由来するT細胞を、CARを発現させ、自己芽球に対する抗原特異的細胞傷害作用のリダイレクトを示すように操作しうることの初めての実証である。

20

## 【0088】

[00104]まとめると、下記の実施例において記載される研究の結果により、CD123CAR T細胞は、CD123 + 細胞とCD123 - 細胞とを識別することが可能であり、プアリスクの初代AML患者試料のパネルに対して、T細胞の複数のエフェクター機能を活性化させうることが裏付けられる。CD123特異的T細胞は、in vitroにおいて、正常な前駆細胞コロニーの形成をそれほど変化させず、クローン原性骨髓性白血病性前駆細胞の成長を大幅に低減したことは注目に値する。また、AML患者に由来するT細胞を遺伝子改変して、CD123特異的CARを発現させることができ、in vitroにおいて、自己芽球を溶解させうることも裏付けられた。したがって、CD123CAR T細胞は、AMLの免疫療法のための有望な候補細胞である。

30

## 【0089】

実施例2：CD123CARが形質導入されたT細胞は、in vivoにおいて、白血病の進行を遅延させる

[00105]CD123CAR構築物：26292CAR(S228P + L235E)および32716CAR(S228P + L235E)構築物は、上記の実施例1で記載した通りに作製した。また、さらに2つのCD123CAR構築物であって、各scFvのIgG4ヒンジ内の297位にさらなる突然変異(N297Q)を組み入れた構築物(「26292CAR(S228P + L235E + N297Q)」および「32716CAR(S228P + L235E + N297Q)」)も作製した(図12および13、突然変異を太字とし、下線を付した)。

40

## 【0090】

[00106]NSGマウスに、AML腫瘍細胞を移植し(0日目)、5日目に、26292CAR(S228P + L235E)または26292CAR(S228P + L235E + N297Q)を発現させる、 $5.0 \times 10^6$ 個のCAR + T細胞で処置し、生物発光イメージングにより、白血病の進行をモニタリングした。図8において示される通り、8日目において、白血病負荷は、26292CAR(S228P + L235E)が形質導入されたT細胞で処置する、マウスの処置日と比較して進行したことから、ヒンジ領域の位置S228PおよびL235Eにおける突然変異を有する、CD123CAR構築物が形質導入された細胞は、in vivoにおいて、効果を及ぼさなかつたことが指示される。これに対し、26292CAR(S228P + L235E + N297Q)が形質導入され

50

たT細胞で処置されたマウスは、処置日と比較した腫瘍サイズの低減を示したことから、ヒンジ領域の297位における突然変異(N297Q)の付加は、*in vivo*において、白血病の進行を遅延させることが可能なCD123CAR構築物を結果としてもたらすことが指し示される。

#### 【0091】

##### 参考文献

以下に列挙する参考文献、特許および公開された特許出願、ならびに上記明細書中に引用された全ての参考文献は、本明細書中に完全に記載されているかのように、それらの全体が参照により本明細書中に組込まれる。

#### 【0092】

##### 【化1】

1. Eaves, C.J. and R.K. Humphries, Acute myeloid leukemia and the Wnt pathway. *N Engl J Med*, 2010. 362(24): p. 2326-7.
2. Dohner, H., et al., Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, 2010. 115(3): p. 453-74.
3. Majeti, R., Monoclonal antibody therapy directed against human acute myeloid leukemia stem cells. *Oncogene*, 2011. 30(9): p. 1009-19.
4. Kikushige, Y., et al., TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells. *Cell Stem Cell*, 2010. 7(6): p. 708-17.
5. Jena, B., G. Dotti, and L.J. Cooper, Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor. *Blood*, 2010. 116(7): p. 1035-44.
6. Cooper, L.J., et al., T-cell clones can be rendered specific for CD19: toward the selective augmentation of the graft-versus-B-lineage leukemia effect. *Blood*, 2003. 101(4): p. 1637-44.
7. Hudecek, M., et al., The B-cell tumor-associated antigen ROR1 can be targeted with T cells modified to express a ROR1-specific chimeric antigen receptor. *Blood*, 2010. 116(22): p. 4532-41.
8. Kochenderfer, J.N., et al., Construction and preclinical evaluation of an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *J Immunother*, 2009. 32(7): p. 689-702.
9. Milone, M.C., et al., Chimeric receptors containing CD137 signal transduction domains mediate enhanced survival of T cells and increased antileukemic efficacy *in vivo*. *Mol Ther*, 2009. 17(8): p. 1453-64.
10. Brentjens, R.J., et al., Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nat Med*, 2003. 9(3): p. 279-86.

#### 【0093】

10

20

30

40

## 【化2】

11. Brentjens, R.J., et al., Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory Bcell leukemias. *Blood*, 2011. 118(18): p. 4817-28.
12. Kochenderfer, J.N., et al., B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric antigen-receptor-transduced T cells. *Blood*, 2011.
13. Savoldo, B., et al., CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *J Clin Invest*, 2011. 121(5): p. 1822-6. 10
14. Kalos, M., et al., T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced Leukemia. *Sci Transl Med*, 2011. 3(95): p. 95ra73.
15. Till, B.G., et al., CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results. *Blood*, 2012. 20
16. Peinert, S., et al., Gene-modified T cells as immunotherapy for multiple myeloma and acute myeloid leukemia expressing the Lewis Y antigen. *Gene Ther*, 2010. 17(5): p. 678-86.
17. Dutour, A., et al., In Vitro and In Vivo Antitumor Effect of Anti-CD33 Chimeric Receptor-Expressing EBV-CTL against CD33 Acute Myeloid Leukemia. *Adv Hematol*, 2012. 2012: p. 683065.
18. Du, X., M. Ho, and I. Pastan, New immunotoxins targeting CD123, a stem cell antigen on acute myeloid leukemia cells. *J Immunother*, 2007. 30(6): p. 607-13. 30
19. Pelloquin, F., J.P. Lamelin, and G.M. Lenoir, Human B lymphocytes immortalization by Epstein-Barr virus in the presence of cyclosporin A. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1986. 22(12): p. 689-94.
20. Wang, X., et al., A transgene-encoded cell surface polypeptide for selection, in vivo tracking, and ablation of engineered cells. *Blood*, 2011. 118(5): p. 1255-63.
21. Reddy, M.P., et al., Elimination of Fc receptor-dependent effector functions of a modified IgG4 monoclonal antibody to human CD4. *J Immunol*, 2000. 164(4): p. 1925-33. 40
22. Nguyen, P., I. Moisini, and T.L. Geiger, Identification of a murine CD28 dileucine motif that suppresses single-chain chimeric T-cell receptor expression and function. *Blood*, 2003. 102(13): p. 4320-5.

## 【0094】

## 【化3】

23. Jensen, M.C., et al., Human T lymphocyte genetic modification with naked DNA. *Mol Ther*, 2000. 1(1): p. 49-55.
24. Riddell, S.R. and P.D. Greenberg, The use of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells. *J Immunol Methods*, 1990. 128(2): p. 189-201.
25. Brown, C.E., et al., Recognition and killing of brain tumor stem-like initiating cells by CD8+ cytolytic T cells. *Cancer Res*, 2009. 69(23): p. 8886-93. 10
26. Bhatia, R., et al., Abnormal function of the bone marrow microenvironment in chronic myelogenous leukemia: role of malignant stromal macrophages. *Blood*, 1995. 85(12): p. 3636-45.
27. Jordan, C.T., et al., The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia*, 2000. 14(10): p. 1777-84.
28. Jin, L., et al., Monoclonal antibody-mediated targeting of CD123, IL-3 receptor alpha chain, eliminates human acute myeloid leukemic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2009. 5(1): p. 31-42. 20
29. Munoz, L., et al., Interleukin-3 receptor alpha chain (CD123) is widely expressed in hematologic malignancies. *Haematologica*, 2001. 86(12): p. 1261-9.
30. Seder, R.A., P.A. Darrah, and M. Roederer, T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol*, 2008. 8(4): p. 247-58.
31. Manz, M.G., et al., Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(18): p. 11872-7. 30
32. Le Dieu, R., et al., Peripheral blood T cells in acute myeloid leukemia (AML) patients at diagnosis have abnormal phenotype and genotype and form defective immune synapses with AML blasts. *Blood*, 2009. 114(18): p. 3909-16.
33. Oka, Y., et al., Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(38): p. 13885-90.
34. Majeti, R., et al., CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell*, 2009. 138(2): p. 286-99. 40
35. Golden-Mason, L., et al., Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4+ and CD8+ T cells. *J Virol*, 2009. 83(18): p. 9122-30.

## 【化4】

36. Jin, H.T., et al., Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(33): p. 14733-8.
37. Brown, E.J. and W.A. Frazier, Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol*, 2001. 11(3): p. 130-5.
38. Walter, R.B., et al., Acute myeloid leukemia stem cells and CD33-targeted immunotherapy. *Blood*, 2012. 119(26): p. 6198-208.
39. Aigner, M., et al., T lymphocytes can be effectively recruited for ex vivo and in vivo lysis of AML blasts by a novel CD33/CD3-bispecific BiTE((R)) antibody construct. *Leukemia*, 2012. 10
40. Hernandez-Caselles, T., et al., A study of CD33 (SIGLEC-3) antigen expression and function on activated human T and NK cells: two isoforms of CD33 are generated by alternative splicing. *J Leukoc Biol*, 2006. 79(1): p. 46-58.
41. Sievers, E.L., et al., Efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Oncol*, 2001. 19(13): p. 3244-54. 20
42. Tsimberidou, A.M., et al., The role of gemtuzumab ozogamicin in acute leukaemia therapy. *Br J Haematol*, 2006. 132(4): p. 398-409.
43. Sato, N., et al., Expression and factor-dependent modulation of the interleukin-3 receptor subunits on human hematopoietic cells. *Blood*, 1993. 82(3): p. 752-61.
44. Appay, V., D.C. Douek, and D.A. Price, CD8+ T cell efficacy in vaccination and disease. *Nat Med*, 2008. 14(6): p. 623-8. 30
45. Moeller, M., et al., Sustained antigen-specific antitumor recall response mediated by gene-modified CD4+ T helper-1 and CD8+ T cells. *Cancer Res*, 2007. 67(23): p. 11428-37.
46. Schietinger, A., et al., Bystander killing of cancer requires the cooperation of CD4(+) and CD8(+) T cells during the effector phase. *J Exp Med*, 2010. 207(11): p. 2469-77.
47. Gattinoni, L., et al., A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med*, 2011. 17(10): p. 1290-7. 40
48. Straathof, K.C., et al., An inducible caspase 9 safety switch for T-cell therapy. *Blood*, 2005. 105(11): p. 4247-54.
49. Yoon, S.H., et al., Adoptive immunotherapy using human peripheral blood lymphocytes transferred with RNA encoding Her-2/neu-specific chimeric immune

## 【化5】

receptor in ovarian cancer xenograft model. *Cancer Gene Ther.* 2009. 16(6): p. 489-97.

50. Strohl, W.R., Optimization of Fc-mediated effector functions of monoclonal antibodies. *Curr Op Biotech.* 2009. 20:685-691.

一態様において、本発明は以下であってよい。

[態様1] C D 1 2 3 キメラ抗原受容体 ( C D 1 2 3 C A R ) 遺伝子であって、S 2 2 8 P アミノ酸置換およびL 2 3 5 E アミノ酸置換をコードするヌクレオチド配列 10 を含む修飾 I g G 4 ヒンジ領域と、

T 細胞受容体 ( T C R ) ゼータ鎖のシグナル伝達ドメインと  
にインフレームで融合した抗 C D 1 2 3 s c F v 領域を含む、前記遺伝子。

[態様2] 修飾 I g G 4 ヒンジ領域が、N 2 9 7 Q 置換をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、態様1に記載の C D 1 2 3 C A R 遺伝子。

[態様3] 抗 C D 1 2 3 s c F v 領域が、組換え免疫毒素 2 6 2 9 2 または 3 2 7 1 6 の V H ドメインおよび V L ドメインをコードする、態様1に記載の C D 1 2 3 C A R 遺伝子。

[態様4] 抗 C D 1 2 3 s c F v 領域が、ヒト化されている、態様1に記載の C D 1 2 3 C A R 遺伝子。 20

[態様5] C D 2 7 共刺激シグナル伝達ドメイン、C D 2 8 共刺激シグナル伝達ドメイン、4 - 1 B B 共刺激シグナル伝達ドメイン、O X 4 0 共刺激シグナル伝達ドメイン、またはこれらの任意の組合せから選択される少なくとも1つの共刺激シグナル伝達ドメインをさらに含む、態様1に記載の C D 1 2 3 C A R 遺伝子。

[態様6] 配列番号1、配列番号2、配列番号3、または配列番号4から選択されるヌクレオチド配列を含む、態様1に記載の C D 1 2 3 C A R 遺伝子。

[態様7] 遺伝子が、配列番号9、配列番号10、配列番号11、または配列番号12を含むアミノ酸配列をコードする、態様1に記載の C D 1 2 3 C A R 遺伝子。

[態様8] 遺伝子が、ウイルスベクター内に挿入された発現カセットの一部である、態様1に記載の C D 1 2 3 C A R 遺伝子。 30

[態様9] 発現カセットが、切断型上皮成長因子受容体 ( E G F R t ) 、切断型 C D 1 9 ( C D 1 9 t ) 遺伝子、または誘導性カスパーゼ9遺伝子から選択されるアクセサリー遺伝子をさらに含む、態様7に記載の C D 1 2 3 C A R 遺伝子。

[態様10] C D 1 2 3 C A R 遺伝子を含む発現カセットを含むウイルスベクターにより形質導入されたヒトT細胞集団であって、該遺伝子は、

S 2 2 8 P アミノ酸置換およびL 2 3 5 E アミノ酸置換をコードするヌクレオチド配列を含む修飾 I g G 4 ヒンジ領域と、

少なくとも1つの共刺激シグナル伝達ドメインと、

T 細胞受容体 ( T C R ) ゼータ鎖のシグナル伝達ドメインと  
にインフレームで融合した抗 C D 1 2 3 s c F v 領域を含み、  
C D 1 2 3 C A R 遺伝子を発現する、前記ヒトT細胞集団。 40

[態様11] 修飾 I g G 4 ヒンジ領域が、N 2 9 7 Q アミノ酸置換をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、態様10に記載のヒトT細胞集団。

[態様12] C D 1 2 3 C A R 遺伝子が、配列番号1、配列番号2、配列番号3、または配列番号4から選択されるヌクレオチド配列を含む、態様10に記載のヒトT細胞集団。

[態様13] 遺伝子が、配列番号9、配列番号10、配列番号11、または配列番号12を含むアミノ酸配列をコードする、態様9に記載のヒトT細胞集団。

[態様16] 対象における A M L を処置する方法であって、第1の C D 1 2 3 C A R 遺伝子が形質導入された第1のT細胞集団を対象に投与するステップを含み、第1の C D 1 2 3 C A R 遺伝子が、

S 2 2 8 P 置換、L 2 3 5 E 置換、およびN 2 9 7 Q 置換をコードするヌクレオチド配列を含む修飾 Ig G 4 ヒンジ領域と、

少なくとも1つの共刺激シグナル伝達ドメインと、

T細胞受容体 (TCR) ゼータ鎖のシグナル伝達ドメインと

にインフレームで融合した抗CD123scFv領域を含む、前記方法。

[態様17] 第1のCD123CAR遺伝子が、配列番号3または配列番号4から選択されるヌクレオチド配列を含む、態様16に記載の方法。

[態様18] 第1のCD123CAR遺伝子が形質導入された第1のT細胞集団を、第2のCD123CAR遺伝子が形質導入された第2のT細胞集団と組み合わせて、対象に投与するステップをさらに含み、第2のCD123CAR遺伝子が、

10

S 2 2 8 P 置換、L 2 3 5 E 置換、およびN 2 9 7 Q 置換を含む修飾 Ig G 4 ヒンジ領域と、

少なくとも1つの共刺激シグナル伝達ドメインと、

T細胞受容体 (TCR) ゼータ鎖のシグナル伝達ドメインと

にインフレームで融合した抗CD123scFv領域を含む、態様17に記載の方法。

[態様19] 第2のCD123CAR遺伝子が、配列番号3または配列番号4から選択されるヌクレオチド配列を含み、第2のCD123CAR遺伝子のヌクレオチド配列が、態様17で選択されたヌクレオチド配列と同じではない、態様18に記載の方法。

[態様20] 第1のCD123CAR遺伝子が形質導入された第1のT細胞集団を、幹細胞移植、放射線療法、手術による切除、化学療法剤、免疫療法剤、標的化治療剤、またはこれらの組合せから選択される1種または複数の抗がん治療と組み合わせて投与するステップをさらに含む、態様16に記載の方法。

20

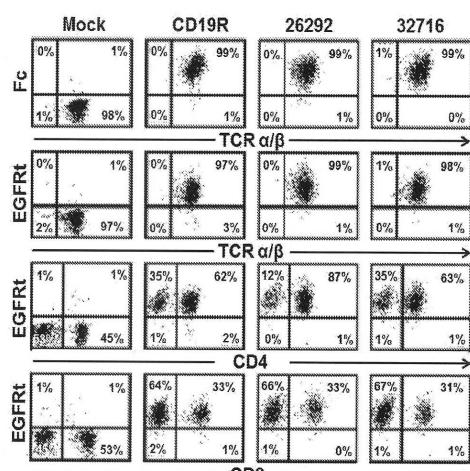
【図1】

Fig. 1

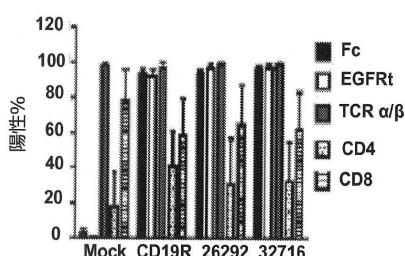
A



B



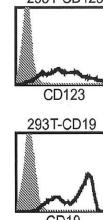
C



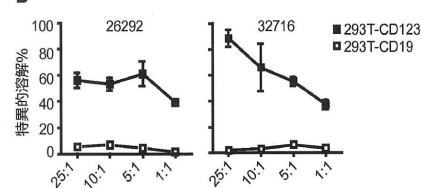
【図2】

Fig. 2

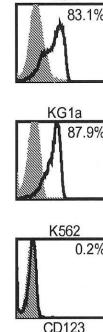
A



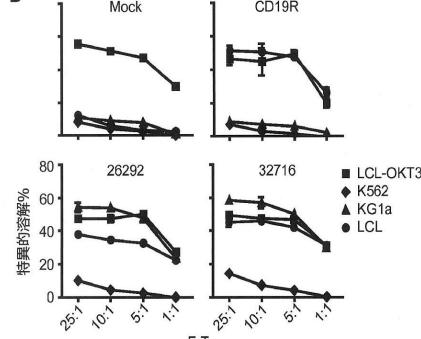
B



C

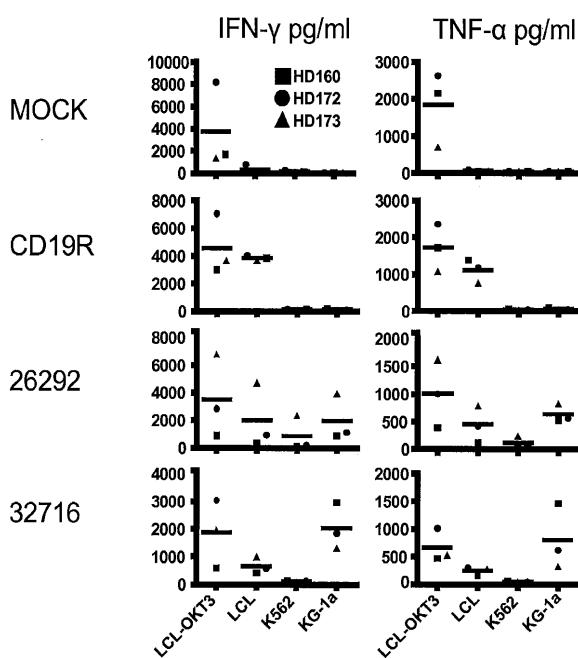


D



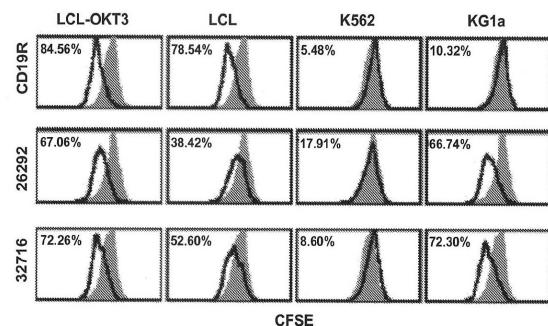
【図3-1】

Fig. 3A



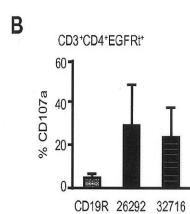
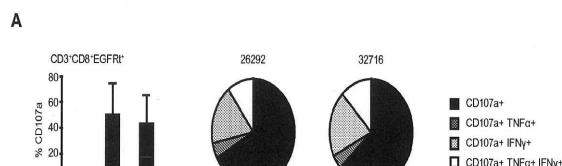
【図3-2】

Fig. 3B

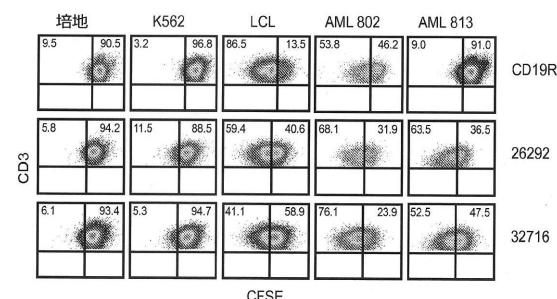


【図4】

Fig. 4

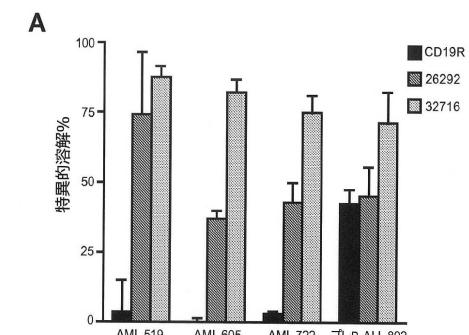


C

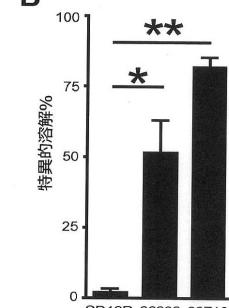


【図5】

Fig. 5



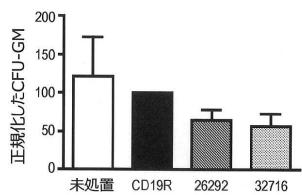
B



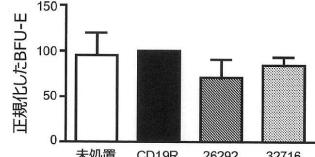
【図6】

Fig. 6

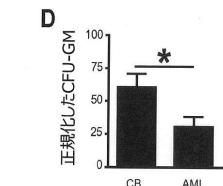
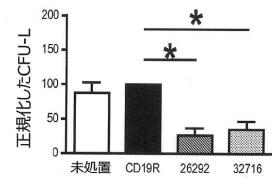
A



B



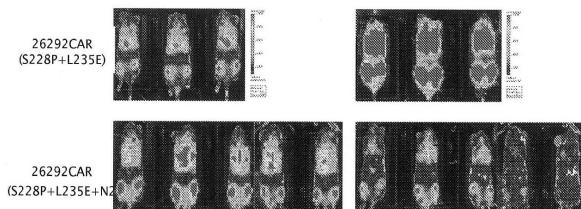
C



【図8】

Fig. 8

4日目

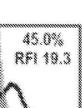
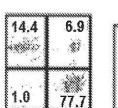
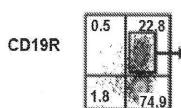


8日目

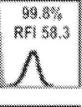
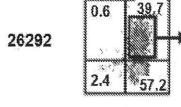
【図7】

Fig. 7

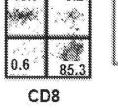
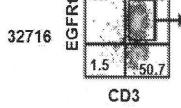
A



AML 559



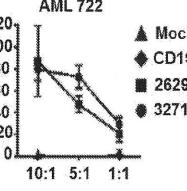
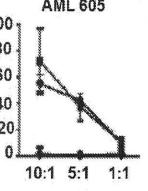
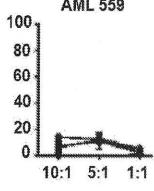
AML 605



AML 722



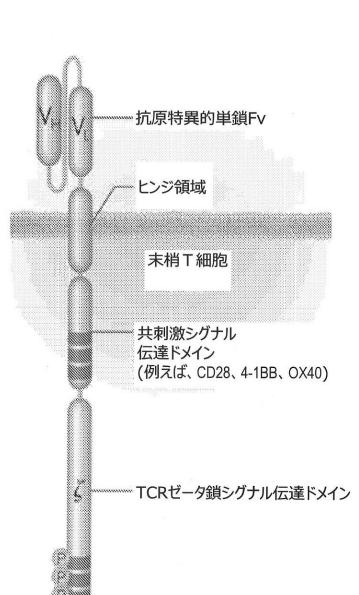
C



▲ Mock  
◆ CD19R  
■ 26292  
● 32716

【図9】

Fig. 9



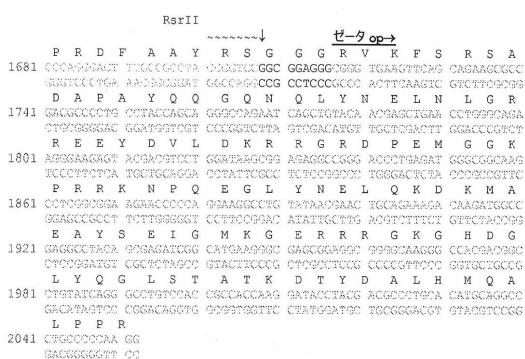
【 図 1 0 - 1 】

Fig. 10



【図 10 - 3】

Fig. 10 (続き)



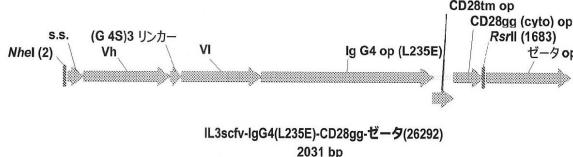
【図 10-2】

Fig. 10 (続き)

	P	V	E	A	D	D	V	A	T	Y	C	Q	O	S	N	E	D	P
721	C	G	G	G	A	G	C	T	A	T	G	C	C	G	C	G	C	P
	G	G	G	G	A	G	C	T	A	T	G	C	C	G	C	G	C	P
	G	G	G	G	A	G	C	T	A	T	G	C	C	G	C	G	C	P
	T	F	G	A	G	T	K	L	E	K	S	E	K	Y	G	P	P	C
781	A	C	T	T	G	G	G	A	G	A	A	G	A	G	T	C	T	G
	T	G	G	A	G	G	C	C	G	T	G	G	G	G	T	C	C	G
	P	C	P	A	P	E	F	E	G	G	P	S	V	F	L	F	P	K
841	C	T	T	G	G	C	G	T	C	G	G	C	G	C	T	C	T	G
	G	G	A	G	G	G	G	G	T	G	G	A	G	G	T	C	T	G
	K	T	D	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	V
901	A	A	G	A	C	A	C	T	G	T	A	G	A	G	T	G	G	A
	T	T	C	T	G	T	G	T	G	A	T	C	A	T	G	T	G	A
	Q	E	D	P	E	V	Q	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A
961	C	A	G	A	G	A	T	C	A	T	G	T	A	T	G	T	G	A
	G	C	T	T	A	G	T	C	G	T	A	T	G	T	G	T	G	A
	K	K	K	P	R	E	E	Q	F	N	S	T	Y	R	V	V	S	V
1021	A	A	G	A	C	A	G	A	G	A	C	A	T	C	T	C	T	G
	T	T	C	T	G	G	T	T	C	T	T	G	A	T	G	T	T	G
	V	V	L	H	D	W	N	G	E	Y	K	C	T	N	S	N	K	
1081	C	A	G	A	C	G	C	A	G	T	A	G	T	G	A	A	C	G
	C	A	G	A	C	G	C	A	G	T	A	G	T	G	A	A	C	G
	L	P	S	S	I	E	K	T	S	I	K	A	G	Q	P	R	E	
1141	C	T	G	C	C	A	G	A	T	C	A	G	C	A	G	T	C	G
	G	A	C	G	G	T	G	T	A	T	T	G	T	G	T	G	T	G
	V	V	T	L	P	S	S	E	M	T	K	N	Q	V	S	T	L	
1201	G	T	G	A	C	C	T	C	G	C	A	G	A	G	T	C	T	G
	C	A	G	T	G	G	A	G	G	A	G	A	G	T	C	T	G	G
	L	V	K	G	F	P	S	D	I	A	V	E	W	S	N	G	P	
1261	C	T	G	T	G	A	G	T	C	A	G	C	G	A	G	T	C	G
	G	A	C	T	G	G	A	G	G	A	G	A	G	T	C	T	G	G
	E	N	N	Y	K	T	T	P	V	L	L	D	S	G	F	F	L	
1321	G	A	G	A	C	A	G	A	C	T	C	T	C	G	A	G	T	G
	T	T	G	T	G	T	G	T	G	T	G	G	G	T	T	T	G	G
	S	R	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	E	N	V	F	S	C	V
1381	A	G	C	G	G	T	G	T	G	A	G	C	G	A	G	T	G	G
	T	G	C	G	G	T	G	T	G	A	G	C	G	A	G	T	G	G
	T	G	C	G	G	T	G	T	G	A	G	C	G	A	G	T	G	G
1441	A	T	G	C	A	G	G	C	T	G	T	G	T	G	T	G	G	G
	T	G	C	G	G	T	G	T	G	A	G	C	G	A	G	T	G	G
	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	S	L	S	L	G	K	
	<b>CD28tm op-2</b>																	
	M	W	V	L	V	V	V	G	G	V	L	A	C	Y	S	L	L	V
1501	A	T	G	T	G	T	G	T	G	T	G	T	G	T	G	T	G	G
	T	G	C	G	G	T	G	T	G	A	G	C	G	A	G	T	G	G
	T	G	C	G	G	T	G	T	G	A	G	C	G	A	G	T	G	G
	<b>CD28gg (cyto) op-2</b>																	
	M	W	V	L	V	V	V	G	G	V	L	A	C	Y	S	L	L	V

### 【 図 1 1 - 1 】

Fig. 11



【図 1-1-2】

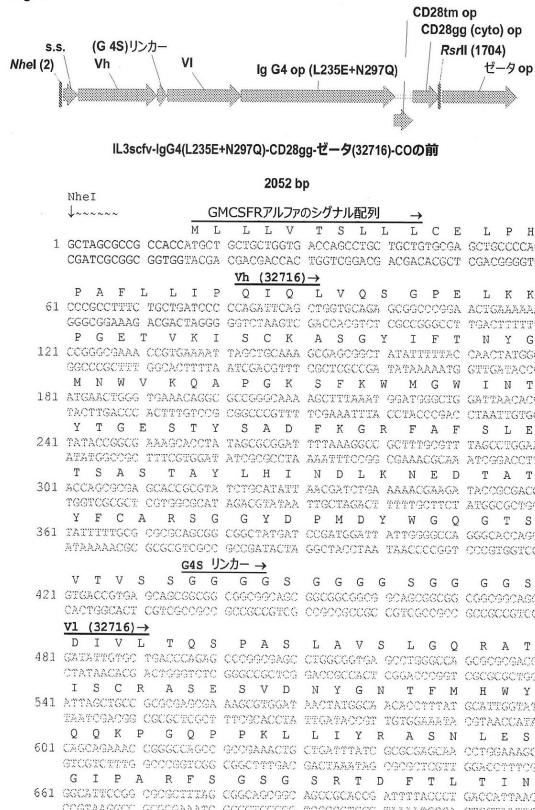
Fig. 11 (続き)

【 図 1 1 - 3 】

Fig. 11 (続き)

【 図 1 2 - 1 】

Fig. 12



【図12-2】

Fig. 12 (続き)

### 【 図 1 2 - 3 】

Fig. 12 (続き)

RsrII ~~~~~↓ ゼータ op→

1681 P R D F A A Y R S G G G R V K F S R S A  
CCCCCGCTT TTTGGCGGAA CCGGTTGGCC GGAGGCGGTT TGGATGTTGG CAGAAAGCGG  
GGTTTCTGGT TGGCGGTTGGG CCGGTTGGCC CCGGTTGGCC  
D A P A Y Q Q G N O L Y N E L N L G R  
1741 SAGGGCCCTT CTTTGGCGGAA CGGGCGGTT CCGGTTGGCC AGGGCGGTTGG CCGGTTGGCC  
CTGGGGCGGAA CGGGTTGGCC CCGGTTGGCC  
R E E Y D V L D K R R G D P E M G K  
1801 AAGGGAGGTTT CGGGTTGGCC CCGGTTGGCC AGGGCGGTTGG CCGGTTGGCC  
CCCCCTGGT TGGCGGTTGG CCGGTTGGCC  
P R R K N P Q E G L Y N E L Q K D K M A  
1861 CGGGCGGTTT AGGGCGGTTGG CCGGTTGGCC  
GGGGCGGTTT CGGGCGGTTGG CCGGTTGGCC  
E A Y S E I G M K G E R R R G K H D G  
1921 GAGGGCTACG TGGAGAGTCGG CATTGGGGGG CAGGGCGGTTGG CCGGTTGGCC  
CGGGCGGTTGG CCGGTTGGCC  
L Y Q G L S T A T K D T Y D A L H M Q A  
1981 CGTGTAGGG CGGGCGGTTGG CCGGTTGGCC  
GGGGCGGTTGG CCGGTTGGCC  
L P P R  
2041 CGGGCGGTTGG CCGGTTGGCC

【図1.3-2】

Fig. 13 (続き)

IgG4op (L235E) →												
	L	E	I	K	E	S	K	Y	G	P	P	C
781	C	T	G	G	A	A	T	A	T	T	C	C
	T	G	G	A	A	T	A	T	T	C	C	G
	G	G	A	A	T	T	C	C	T	T	G	T
841	E	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	D
	G	G	A	A	T	T	C	C	T	T	K	T
	G	G	A	A	T	T	C	C	T	T	G	T
901	C	G	G	A	A	T	T	C	C	T	T	G
	G	G	A	A	T	T	C	C	T	T	G	T
	G	G	A	A	T	T	C	C	T	T	G	T
961	R	T	P	E	V	T	C	V	V	D	S	Q
	G	G	A	A	T	T	C	C	T	T	G	T
	G	G	A	A	T	T	C	C	T	T	G	T
1021	F	N	W	Y	V	G	V	E	V	H	N	A
	G	G	A	A	T	T	C	C	T	T	G	T
	G	G	A	A	T	T	C	C	T	T	G	T
1081	Q	F	G	S	T	Y	R	V	V	S	V	L
	G	G	A	A	T	T	C	C	T	T	G	T
	G	G	A	A	T	T	C	C	T	T	G	T
1141	T	I	S	K	A	R	G	P	E	P	Q	V
	G	G	A	A	T	T	C	C	T	T	G	T
	G	G	A	A	T	T	C	C	T	T	G	T
1201	Q	E	M	T	K	N	Q	S	L	T	C	L
	G	G	A	A	T	T	C	C	T	T	G	T
	G	G	A	A	T	T	C	C	T	T	G	T
1261	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	P
	G	G	A	A	T	T	C	C	T	T	G	T
	G	G	A	A	T	T	C	C	T	T	G	T
1321	P	P	V	L	D	S	G	S	F	F	L	Y
	G	G	A	A	T	T	C	C	T	T	G	T
	G	G	A	A	T	T	C	C	T	T	G	T
1381	S	R	W	Q	E	G	N	V	F	C	S	V
	G	G	A	A	T	T	C	C	T	T	G	T
	G	G	A	A	T	T	C	C	T	T	G	T

【 図 1 3 - 1 】

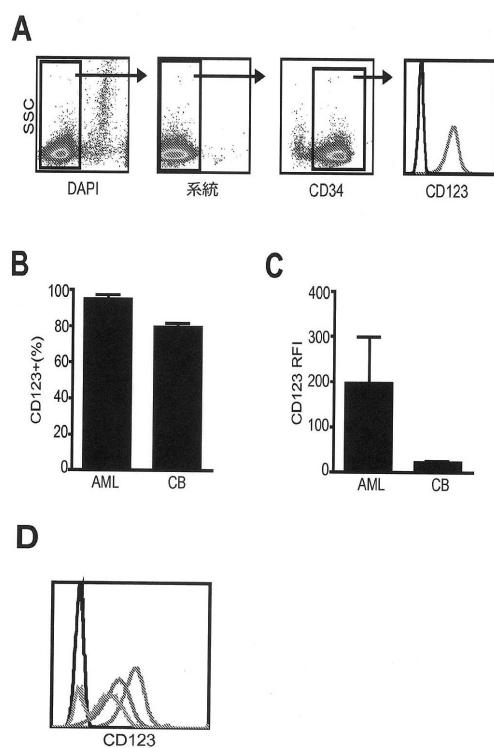
Fig. 13

【図 1.3 - 3】

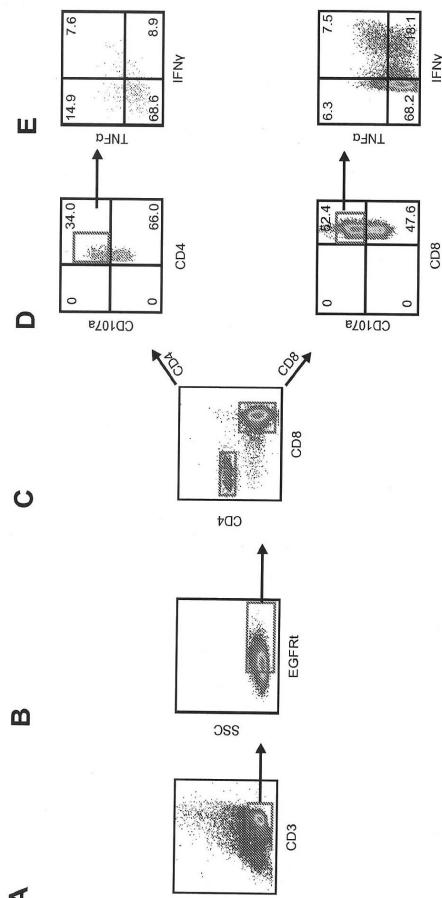
Fig. 13 (続き)

【図14】

Fig. 14



【図15】



【図16-1】

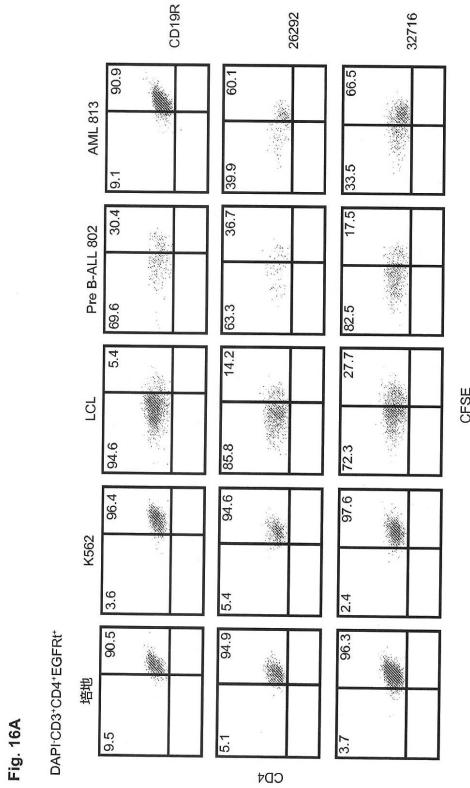


Fig. 15

【図16-2】

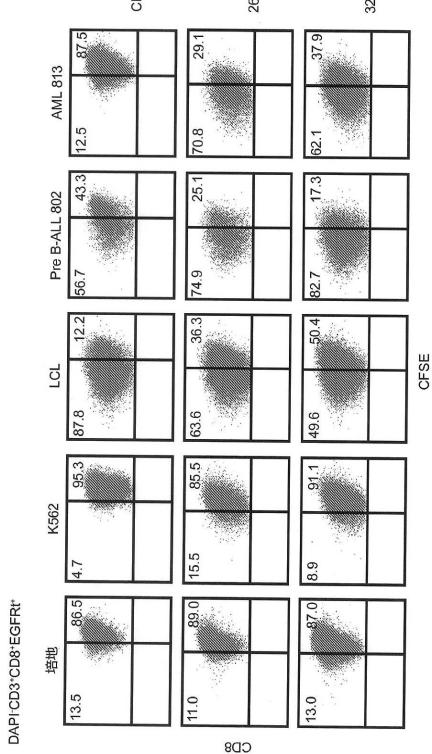


Fig. 16A

DAPI/CD3\*CD4\*EGFR\*

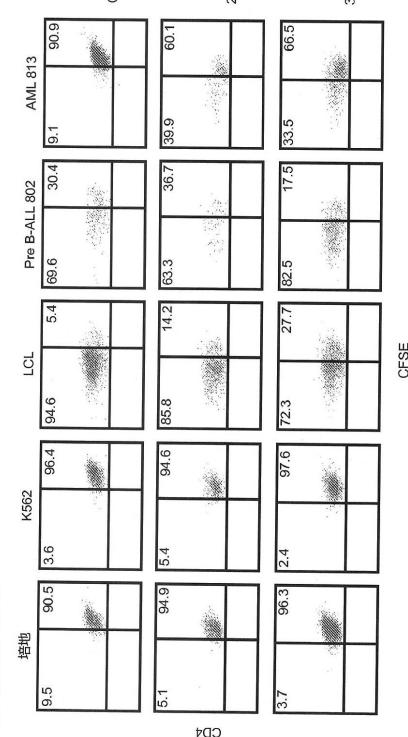
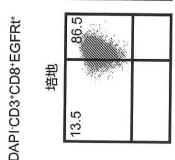


Fig. 16B



【配列表】

0006588004000001.xml

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
C 12 N 5/0783 (2010.01)	C 12 N 5/0783
A 61 K 35/17 (2015.01)	A 61 K 35/17 Z
A 61 P 35/02 (2006.01)	A 61 P 35/02
A 61 K 39/395 (2006.01)	A 61 K 39/395 N

(74)代理人 100101373  
弁理士 竹内 茂雄

(74)代理人 100118902  
弁理士 山本 修

(74)代理人 100135415  
弁理士 中濱 明子

(74)代理人 100188374  
弁理士 一宮 維幸

(72)発明者 フォーマン, スティーヴン・ジェイ  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 91010, デュアーテ, イースト・デュアーテ・ロード 15  
00

(72)発明者 マルディロス, アーメン  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 91202, グレンデール, ノース・コロンブス・アベニュー  
1112

審査官 藤澤 雅樹

(56)参考文献 國際公開第2012/168199 (WO, A1)  
特表2012-501180 (JP, A)  
國際公開第2012/079000 (WO, A1)  
國際公開第2011/056894 (WO, A1)  
British Journal of Haematology (2013) Vol.161, pp.389-401 (First published online 25 Feb. 2013)  
Gene Therapy (2010) Vol.17, pp.1206-1213  
Cancer Research (2013) Vol.73, No.1 Supplement, p.1A22 (Abstract 1A22) (Published January 2013) [online], [検索日 2018.1.23], インターネット <URL: [http://cancerres.aacrjournals.org/content/73/1\\_Supplement/1A22](http://cancerres.aacrjournals.org/content/73/1_Supplement/1A22)>  
Molecular Therapy (2011) Vol.19, No.12, pp.2133-2143  
Cancer Research (2010) Vol.70, No.8 Supplement, p.1944 (Abstract 1944) [online], [検索日 2018.1.23], インターネット <URL: [http://cancerres.aacrjournals.org/content/70/8\\_Supplement/1944](http://cancerres.aacrjournals.org/content/70/8_Supplement/1944)>  
Blood (2012) Vol.120, No.21, p.950 (Abstract 950) [online], [検索日 2017.12.19], インターネット <URL: <http://www.bloodjournal.org/content/120/21/950>>  
Blood (2011) Vol.118, No.21, p.1908 (Abstract 1908) [online], [検索日 2017.12.19], インターネット <URL: <http://www.bloodjournal.org/content/118/21/1908>>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12 N 15 / 00  
C 07 K 1 / 00 - 19 / 00  
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 / W P I D S ( S T N )  
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

UniProt/GenSeq