

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7229768号

(P7229768)

(45)発行日 令和5年2月28日(2023.2.28)

(24)登録日 令和5年2月17日(2023.2.17)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 14/705 (2006.01)

C 0 7 K 14/705

A 6 1 K 35/17 (2015.01)

A 6 1 K 35/17

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 K 45/00

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 1 2 1

請求項の数 20 (全60頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-506815(P2018-506815)

(86)(22)出願日 平成28年4月25日(2016.4.25)

(65)公表番号 特表2018-519356(P2018-519356

A)

(43)公表日 平成30年7月19日(2018.7.19)

(86)国際出願番号 PCT/US2016/029203

(87)国際公開番号 WO2016/172703

(87)国際公開日 平成28年10月27日(2016.10.27)

審査請求日 平成31年4月23日(2019.4.23)

審判番号 不服2021-1953(P2021-1953/J1)

審判請求日 令和3年2月12日(2021.2.12)

(31)優先権主張番号 62/151,968

(32)優先日 平成27年4月23日(2015.4.23)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

最終頁に続く

(73)特許権者 517368556

ヒーマロジックス プロプライエタリー  
リミテッドオーストラリア国 2 0 1 5 ニュー サ  
ウス ウェールズ, イヴリー, コーン  
ウォリス ストリート 4, エーティー  
ピー, ナショナル イノベーション セ  
ンター, スイート 1 4 5

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 カップ骨髄腫抗原キメラ抗原受容体およびその使用

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

1 つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインおよび細胞外抗原結合ドメインを含むキメラ抗原受容体 (C A R) であって、前記細胞外抗原結合ドメインは、カップ骨髄腫抗原 (K M A) に特異的に結合し、かつ免疫グロブリン (I g) カップ重鎖を伴う免疫グロブリン (I g) カップ軽鎖に結合しない一本鎖可変断片 (s c F v) を含み、前記 s c F v は、K a p p a モノクローナル抗体 (K a p p a M a b) に由来する相補性決定領域 (C D R) を含み、前記 K a p p a M a b C D R は、配列番号 3 ~ 8 を含む、キメラ抗原受容体 (C A R)。

## 【請求項 2】

前記 1 つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインは、1 つ以上の共刺激エンドドメインを含む、請求項 1 に記載の C A R。

## 【請求項 3】

前記 1 つ以上の共刺激エンドドメインは、C D 2 8 ドメイン、C D 3 ドメイン、4 - 1 B B ドメイン、O X - 4 0 ドメインまたはそれらの組み合わせの 1 つ以上である、請求項 2 に記載の C A R。

## 【請求項 4】

前記 s c F v は、K a p p a M a b からの V L 鎖および V H 鎖を含み、前記 V L 鎖は、配列番号 2 1 を含み、前記 V H 鎖は、配列番号 2 2 を含む、請求項 1 に記載の C A R。

## 【請求項 5】

10

20

前記 K a p p a M a b からの前記 V L 鎖および前記 V H 鎖は、グリシン - セリンリンカーを介して結合しており、前記グリシン - セリンリンカーは、( G l y 4 S e r )<sub>3</sub>を含む 15 アミノ酸リンカーである、請求項 1 に記載の C A R。

【請求項 6】

前記 s c F v は、スパーサーを介して前記 1 つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインに結合しており、前記スパーサーは、免疫グロブリン定常領域または C D 8 鎖である、請求項 1 に記載の C A R。

【請求項 7】

前記免疫グロブリン定常領域は、I g G ヒンジドメイン、I g G C H 2 ドメインおよび I g G C H 3 ドメインの 1 つ以上を含む、請求項 6 に記載の C A R。

【請求項 8】

前記スパーサーは、グリシン - セリンリンカーを介して前記 s c F V に結合しており、前記グリシン - セリンリンカーは、( G l y 4 S e r )<sub>3</sub>を含む 15 アミノ酸リンカーである、請求項 6 または 7 に記載の C A R。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の C A R を発現するように操作された、遺伝子改変 T 細胞。

【請求項 10】

1 つ以上の追加の生体分子を発現するようにさらに操作された、請求項 9 に記載の遺伝子改変 T 細胞。

【請求項 11】

前記 1 つ以上の追加の生体分子は、I L - 1 2、肝細胞成長因子 ( H G F ) 結合タンパク質、ガレクチン - 3 C ( G A L 3 C ) または S A N T 7 の 1 つ以上を含む、請求項 10 に記載の遺伝子改変 T 細胞。

【請求項 12】

選択可能マーカーを発現するようにさらに操作された、請求項 10 に記載の遺伝子改変 T 細胞。

【請求項 13】

対象におけるカップパ骨髓腫抗原 ( K M A ) 発現悪性腫瘍を処置するための医薬の製造における、1 つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインおよび細胞外抗原結合ドメインを発現するように操作された遺伝子改変 T 細胞の使用であって、前記細胞外抗原結合ドメインは、K M A に特異的に結合し、かつ免疫グロブリン ( I g ) カップパ重鎖を伴う免疫グロブリン ( I g ) カップパ軽鎖に結合しない一本鎖可変断片 ( s c F v ) を含み、前記 s c F v は、K a p p a モノクローナル抗体 ( K a p p a M a b ) に由来する相補性決定領域 ( C D R ) を含み、前記 K a p p a M A b C D R は、配列番号 3 ~ 8 を含む、使用。

【請求項 14】

前記医薬が、1 つ以上の薬学的に活性な薬剤と共に提供され、前記 1 つ以上の薬学的に活性な薬剤は、1 つ以上の化学療法剤、免疫調節薬またはヒストン脱アセチル化酵素阻害薬を含む、請求項 13 に記載の使用。

【請求項 15】

前記遺伝子改変 T 細胞は、前記対象に由来する、請求項 13 または 14 に記載の使用。

【請求項 16】

前記 K M A 発現悪性腫瘍は、多発性骨髓腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 ( D L B C L )、またはアミロイドーシスである、請求項 13 ~ 15 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 17】

対象におけるカップパ骨髓腫抗原 ( K M A ) 発現悪性腫瘍を処置するための、1 つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインおよび細胞外抗原結合ドメインを発現するように操作された遺伝子改変 T 細胞を含む組成物であって、前記細胞外抗原結合ドメインは、K M A に特異的に結合し、かつ免疫グロブリン ( I g ) カップパ重鎖を伴う免疫グロブリン ( I g ) カッ

10

20

30

40

50

パ軽鎖に結合しない一本鎖可変断片 ( s c F v ) を含み、前記 s c F v は、K a p p a モノクローナル抗体 ( K a p p a M a b ) に由来する相補性決定領域 ( C D R ) を含み、前記 K a p p a M A b C D R は、配列番号 3 ~ 8 を含む、組成物。

【請求項 1 8】

前記組成物は、1 つ以上の薬学的に活性な薬剤と組み合わせて投与されることを特徴とし、前記 1 つ以上の薬学的に活性な薬剤は、1 つ以上の化学療法剤、免疫調節薬またはヒストン脱アセチル化酵素阻害薬を含む、請求項 1 7 に記載の組成物。

【請求項 1 9】

前記遺伝子改変 T 細胞は、前記対象に由来する、請求項 1 7 または 1 8 に記載の組成物。

【請求項 2 0】

前記 K M A 発現悪性腫瘍は、多発性骨髄腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 ( D L B C L )、またはアミロイドーシスである、請求項 1 7 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

米国仮特許出願の相互参照

本出願は、2 0 1 5 年 4 月 2 3 日に出願された米国仮特許出願第 6 2 / 1 5 1 , 9 6 8 号、および 2 0 1 5 年 5 月 7 日に出願された米国仮特許出願第 6 2 / 1 5 8 , 4 0 7 号からの優先権を主張し、これらはそれぞれ、全ての目的において参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 2】

配列表に関する記述

本出願に関連する配列表は、紙面の代わりにテキスト形式で提供され、参照により本明細書に組み込まれる。配列表を含むテキストファイルの名前は、H M L X \_ 0 0 2 \_ 0 2 W O \_ S e q L i s t \_ S T 2 5 . t x t である。テキストファイルは、約 6 3 K B であり、2 0 1 6 年 4 月 2 2 日に作成されたものであり、E F S - W e b を介して電子的に提出されている。

【背景技術】

【0 0 0 3】

多発性骨髄腫 ( M M ) は、治療における最近の進展にも関わらず未だに治癒不能である、骨髄形質細胞の悪性腫瘍である。その臨床経過は、治療に対する初期の反応に続いて、最終的に全ての形態の処置に対する耐性を伴う度重なる再発を特徴とする。これはまた、重篤な病的状態および障害に関連するが、これらは共に、疾患自体および利用可能な処置からの毒性に起因する。

【0 0 0 4】

多発性骨髄腫は、カッパまたはラムダ軽鎖制限モノクローナルパラプロテインのいずれかを分泌する悪性形質細胞を特徴とする。カッパ制限は、骨髄腫患者の 6 0 % に生じ、カッパ骨髄腫抗原 ( K M A ) の発現は、多発性骨髄腫および B 細胞悪性腫瘍に大きく制限される。K a p p a M a b は、第 1 相および第 2 相臨床試験において安全性および効能を示した K M A 特異的モノクローナル抗体である。

【0 0 0 5】

モノクローナル抗体単独による処置は、治癒的ではなく、腫瘍の不完全な根絶を伴い、最終的には再発をもたらす。これは、( 受動拡散による ) 腫瘍内への抗体の不十分な貫通、腫瘍細胞上での抗原発現の不均一性、または抗体依存的細胞毒性のメカニズムに対する腫瘍細胞の抵抗性に起因し得る。したがって、長期的疾患治癒を提供し得る、毒性の低い効果的な治療法が必要とされている。

【0 0 0 6】

キメラ抗原受容体を保持する T 細胞 ( C A R T 細胞 ) は、この問題に対する解決策となる可能性がある。C A R T 細胞は、モノクローナル抗体の抗原結合ドメインを、T 細胞

10

20

30

40

50

胞の1つ以上の細胞内シグナル伝達ドメイン（複数可）と合わせ、局所的な腫瘍特異的免疫反応を生成する。CAR T細胞は、腫瘍内に活発に移動する、抗原を保持する腫瘍細胞に応答して増殖する、免疫応答の他のアームを動員する因子を分泌する、および長期的に生存して再発からの持続的保護を提供し得るといった、モノクローナル抗体に勝るいくつかの利点を有する。同じ抗原を標的化する抗体治療に勝るCAR-T細胞の別の利益は、CAR T細胞がまた、安全性および機能を向上させるためにさらに改質され得るという点である。例えば、T細胞は、T細胞特異性、およびT細胞（複数可）ががん細胞もしくは腫瘍に浸潤する能力を向上させるホーミング受容体の発現を含むように改質され得るか、または、それらは、毒性が生じた場合に細胞を排除するように機能し得る「オフスイッチ」を含んでもよい。さらに、ならびに多発性骨髄腫およびの関連障害の処置に重要なことに、T細胞は、例えば腫瘍抑制サイトカイン等の抗腫瘍反応を向上させ得る、追加の生物学的に活性または薬学的に活性な分子を発現するように改質されてもよい。本明細書に記載のように、本発明者は、MM細胞上にのみ発現した特定の立体構造KMAエピトープに特異的に結合することができる、新規CARコンストラクトを設計し、またこのエピトープに特異的な細胞外抗原結合ドメイン、および細胞内T細胞シグナル伝達ドメインを単独で、または抗腫瘍免疫メディエーターの発現と組み合わせて発現するように、CAR T細胞を操作した。

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0007】

本発明は、カップ骨髄腫抗原（KMA）に特異的であるが、抗KMA T細胞反応を誘発することができる細胞内シグナル伝達ドメインを含有するキメラ抗体受容体（CAR）、そのようなCARを含有するT細胞、およびKMA特異的CARを投与することにより多発性骨髄腫および関連障害を処置する方法を対象とする。得られるCAR T細胞は、モノクローナル抗体および/または抗腫瘍サイトカインの全身送達に関連した望ましくない副作用を回避しながら、がん細胞に対する標的化された免疫反応を媒介することができる。

#### 【0008】

一実施形態において、本発明のキメラ抗原受容体（CAR）は、1つ以上の細胞内シグナル伝達ドメイン、およびカップ骨髄腫抗原（KMA）を特異的に認識する細胞外抗原結合ドメインを含む。一実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、1つ以上の共刺激エンドドメインである。別の実施形態において、1つ以上の共刺激ドメインは、CD28ドメイン、CD3ドメイン、4-1BBドメインもしくはOX-40ドメインまたはそれらの組み合わせの1つ以上である。一実施形態において、CARの1つ以上の共刺激エンドドメインは、CD3ドメインおよびCD28ドメインを含む。別の実施形態において、CARの1つ以上の共刺激エンドドメインは、CD3ドメインおよびOX-40ドメインを含む。さらに別の実施形態において、CARの1つ以上の共刺激エンドドメインは、CD3ドメイン、CD28ドメインおよびOX-40ドメインを含む。さらに別の実施形態において、CARの1つ以上の共刺激エンドドメインは、CD3ドメインおよび4-1BBドメインを含む。さらに別の実施形態において、CARの1つ以上の共刺激エンドドメインは、CD3ドメイン、CD28ドメインおよび4-1BBドメインを含む。さらに別の実施形態において、CARの1つ以上の共刺激エンドドメインは、CD3ドメイン、4-1BBドメインおよびOX-40ドメインを含む。

#### 【0009】

一実施形態において、細胞外結合ドメインは、KMAを特異的に認識する一本鎖可変断片（scFv）を含む。さらに別の実施形態において、scFvは、KappaMa bに由来する相補性決定領域（CDR）を含む。さらに別の実施形態において、scFvは、配列番号6～8のVLC DRを含む。さらに別の実施形態において、scFVは、配列番号21のVL領域を含む。さらに別の実施形態において、scFvは、配列番号3～5のVH CDRを含む。さらに別の実施形態において、scFVは、配列番号22のVH

10

20

30

40

50

領域を含む。さらなる実施形態において、 $scFv$ は、配列番号6～8のVL CDRおよび配列番号3～5のVH CDRを含む。さらなる実施形態において、 $scFv$ は、配列番号21のVL領域および配列番号22のVH領域を含む。一実施形態において、配列番号2のVL鎖および配列番号1のVH鎖は、グリシン-セリンリンカーを介して結合している。一実施形態において、配列番号21のVL領域および配列番号22のVH領域は、グリシン-セリンリンカーを介して結合している。さらに別の実施形態において、リンカーは、 $(Gly_4Ser)_x$ であり、式中、Xは、1～5である。さらに別の実施形態において、グリシン-セリンリンカーは、15～20アミノ酸リンカーである。さらに別の実施形態において、リンカーは、15アミノ酸グリシンセリンリンカーであり、 $(Gly_4Ser)_3$ を含む。一実施形態において、 $(Gly_4Ser)_3$ リンカーは、配列番号23である。一実施形態において、 $scFv$ は、スペーサーにより1つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインに結合している。さらに別の実施形態において、 $scFv$ は、免疫グロブリン定常領域を含むスペーサーにより1つ以上の細胞内ドメインに結合している。一実施形態において、免疫グロブリン定常領域は、IgGヒンジ、IgG CH2およびIgG CH3ドメインの1つ以上を含む。具体的実施形態において、免疫グロブリン定常領域は、免疫グロブリンヒンジドメインを含む。さらに別の実施形態において、免疫グロブリン定常領域は、免疫グロブリンCH3ドメインを含む。さらに別の実施形態において、免疫グロブリン定常領域は、IgG CH2ドメインを含む。さらに別の実施形態において、 $scFv$ は、CD8ドメインを含むスペーサーにより1つ以上の細胞内ドメインに結合している。一実施形態において、スペーサーは、グリシン-セリンリンカーを介して $scFv$ に結合している。さらに別の実施形態において、リンカーは、 $(Gly_4Ser)_x$ であり、式中、Xは、1～5である。さらに別の実施形態において、グリシン-セリンリンカーは、15～20アミノ酸リンカーである。さらに別の実施形態において、リンカーは、15アミノ酸グリシンセリンリンカーであり、 $(Gly_4Ser)_3$ を含む。一実施形態において、 $(Gly_4Ser)_3$ リンカーは、配列番号23である。

#### 【0010】

一実施形態において、本発明は、キメラ抗原受容体を含むT細胞(CAR T細胞)を提供する。一実施形態において、CAR T細胞は、1つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインおよび細胞外結合ドメインを含むCARを含む。具体的実施形態において、細胞外結合ドメインは、カッパ骨髄腫抗原を特異的に認識する。一実施形態において、CAR T細胞は、1つ以上の追加の生体分子を発現するようにさらに操作される。一実施形態において、追加の1つ以上の分子は、IL-12および/またはSANT7および/またはガレクチン-3C(GAL3C)を含む。一実施形態において、CAR T細胞は、柔軟性リンカーにより繋がった1つのIL-12 p35サブユニットおよび1つのIL-12 p40サブユニットを含む一本鎖ポリペプチドを発現する。一実施形態において、IL-12 p35およびIL-12 p40は、 $(G_4S)_3$ リンカーにより繋がっている。一実施形態において、一本鎖IL-12ポリペプチドは、生物活性IL-12 p70ヘテロ二量体を形成する。一実施形態において、CAR T細胞は、IL-12および選択可能マーカーを発現する。一実施形態において、1つ以上の生体分子は、SANT7である。一実施形態において、CAR T細胞は、GAL3Cを発現する。一実施形態において、CAR T細胞は、GAL3Cおよび選択可能マーカーを発現する。一実施形態において、CAR T細胞は、SANT7およびGAL3Cを発現する。一実施形態において、CAR T細胞は、SANT7、GAL3Cおよび選択可能マーカーを発現する。一実施形態において、CAR T細胞は、IL-12およびGAL3Cを発現する。一実施形態において、CAR T細胞は、IL-12、GAL3Cおよび選択可能マーカーを発現する。一実施形態において、CAR T細胞は、SANT7および選択可能マーカーを発現する。一実施形態において、CAR T細胞は、IL-12およびSANT7を発現する。一実施形態において、CAR T細胞は、IL-12、SANT7および選択可能マーカーを発現する。一実施形態において、CAR T細胞は、IL-12、SANT7およびGAL3Cを発現する。一実施形態において、CAR T細胞は、IL-12、SANT7

T7、GAL3Cおよび選択可能マーカーを発現する。

【0011】

一実施形態において、本発明のCAR T細胞はまた、肝細胞成長因子(HGF)シグナル伝達およびエフェクター機能を阻害することができるHGF結合タンパク質を発現する。一態様において、HGF結合タンパク質は、抗体またはその断片である。

【0012】

一態様において、本発明は、遺伝子改変T細胞を生成するための方法であって、1つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインおよび細胞外抗原結合ドメインを含むCARをコードする発現ベクターをT細胞に導入することを含む方法を提供する。具体的実施形態において、細胞外抗原結合ドメインは、KMAを特異的に認識する。一実施形態において、発現ベクターは、転位ベクター発現系である。ある特定の実施形態において、発現ベクターは、PiggyBacトランスポゾン発現ベクターである。別の実施形態において、発現ベクターは、ウイルスベクターである。一実施形態において、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターまたはレトロウイルスベクターである。一実施形態において、発現ベクターは、エレクトロポレーションにより細胞内に導入される。一実施形態において、CAR内の1つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインは、1つ以上の共刺激エンドドメインである。別の実施形態において、1つ以上の共刺激ドメインは、CD28ドメイン、CD3ドメイン、4-1BBドメインもしくはOX-40ドメインまたはそれらの組み合わせの1つ以上である。一実施形態において、CARの1つ以上の共刺激エンドドメインは、CD3ドメインおよびCD28ドメインを含む。別の実施形態において、CARの1つ以上の共刺激エンドドメインは、CD3ドメインおよびOX-40ドメインを含む。さらに別の実施形態において、CARの1つ以上の共刺激エンドドメインは、CD3ドメイン、CD28ドメインおよびOX-40ドメインを含む。さらに別の実施形態において、CARの1つ以上の共刺激エンドドメインは、CD3ドメインおよび4-1BBドメインを含む。さらに別の実施形態において、CARの1つ以上の共刺激エンドドメインは、CD3ドメイン、CD28ドメインおよび4-1BBドメインを含む。さらに別の実施形態において、CARの1つ以上の共刺激エンドドメインは、CD3ドメイン、4-1BBドメインおよびOX-40ドメインを含む。一実施形態において、細胞外結合ドメインは、KMAを特異的に認識する一本鎖可変断片(scFv)を含む。さらに別の実施形態において、scFvは、KappaMa bに由来する相補性決定領域(CDR)を含む。さらに別の実施形態において、scFvは、配列番号6~8のVL CDRを含む。さらに別の実施形態において、scFvは、配列番号21のVL領域を含む。さらに別の実施形態において、scFvは、配列番号3~5のVH CDRを含む。さらに別の実施形態において、scFvは、配列番号22のVH領域を含む。さらなる実施形態において、scFvは、配列番号6~8のVL CDRおよび配列番号3~5のVH CDRを含む。さらなる実施形態において、scFvは、配列番号21のVL領域および配列番号22のVH領域を含む。一実施形態において、配列番号2のVL鎖および配列番号1のVH鎖は、グリシン-セリンリンカーを介して結合している。一実施形態において、配列番号21のVL領域および配列番号22のVH領域は、グリシン-セリンリンカーを介して結合している。さらに別の実施形態において、グリシン-セリンリンカーは、15~20アミノ酸リンカーである。さらに別の実施形態において、リンカーは、15アミノ酸グリシンセリンリンカーであり、(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>を含む。一実施形態において、(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>リンカーは、配列番号23である。一実施形態において、scFvは、スペーサーにより1つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインに結合している。さらに別の実施形態において、scFvは、免疫グロブリン定常領域を含むスペーサーにより1つ以上の細胞内ドメインに結合している。一実施形態において、免疫グロブリン定常領域は、IgGヒンジ、IgG CH2およびIgG CH3ドメインの1つ以上を含む。具体的実施形態において、免疫グロブリン定常領域は、免疫グロブリンヒンジドメインを含む。さらに別の実施形態において、免疫グロブリン定常領域は、免疫グロブリンCH3ドメインを含む。さらに別の実施形態において、免疫グロブリン定常領域は、IgG CH2ドメインを含む。さ

10

20

30

40

50

らに別の実施形態において、s c F v は、C D 8 ドメインを含むスペーサーにより1つ以上の細胞内ドメインに結合している。一実施形態において、スペーサーは、グリシン - セリンリンカーを介してs c F V に結合している。さらに別の実施形態において、リンカーは、( G l y 4 S e r )<sub>x</sub>であり、式中、X は、1 ~ 5 である。さらに別の実施形態において、グリシン - セリンリンカーは、15 ~ 20 アミノ酸リンカーである。さらに別の実施形態において、リンカーは、15 アミノ酸グリシンセリンリンカーであり、( G l y 4 S e r )<sub>3</sub>を含む。一実施形態において、( G l y 4 S e r )<sub>3</sub>リンカーは、配列番号23 である。一実施形態において、方法は、1つ以上の追加の生体分子を発現するように操作された1つ以上の追加の発現ベクターを導入することをさらに含む。一実施形態において、追加の1つ以上の分子は、I L - 12 および / または S A N T 7 および / または G A L 3 C を含む。一実施形態において、1つ以上の追加の発現ベクターは、柔軟性リンカーにより繋がった1つのI L - 12 p 35 サブユニットおよび1つのI L - 12 p 40 サブユニットを含む一本鎖ポリペプチドをコードする配列を含む。一実施形態において、I L - 12 p 35 および I L - 12 p 40 は、( G 4 S )<sub>3</sub>リンカーにより繋がっている。一実施形態において、一本鎖I L - 12 ポリペプチドをコードする配列は、生物活性I L - 12 p 70 ヘテロ二量体をコードする。一実施形態において、1つ以上の生物学的に活性な薬剤を発現する発現ベクターはまた、選択可能マーカーを含む。一実施形態において、発現ベクターは、柔軟性リンカーにより繋がったI L - 12 p 35 および I L - 12 p 40 を含む一本鎖I L - 12 ポリペプチド、ならびに2 A リボソームスキップにより一本鎖I L - 12 に繋がった選択可能マーカーをコードする配列を含む。一実施形態において、1つ以上の生体分子は、S A N T 7 である。一実施形態において、1つ以上の生物学的に活性な薬剤を発現する発現ベクターは、S A N T 7 および選択可能マーカーを含む。一実施形態において、S A N T 7 および選択可能マーカーをコードする配列は、2 A リボソームスキップ配列により繋がっている。一実施形態において、1つ以上の生物学的に活性な薬剤を発現する発現ベクターは、G A L 3 c および選択可能マーカーを含む。一実施形態において、G A L 3 C および選択可能マーカーをコードする配列は、リボソームスキップ配列により繋がっている。一実施形態において、C A R T 細胞は、I L - 12、S A N T 7 および選択可能マーカーを含む。一実施形態において、I L - 12 をコードする配列は、2 A リボソームスキップを介して選択可能マーカーに連結され、S A N T 7 をコードする配列は、追加の2 A リボソームスキップによりI L - 12 をコードする配列に接続されている。一実施形態において、C A R T 細胞は、G A L 3 C、S A N T 7 および選択可能マーカーを含む。一実施形態において、G A L 3 C をコードする配列は、2 A リボソームスキップを介して選択可能マーカーに連結され、S A N T 7 をコードする配列は、追加の2 A リボソームスキップによりG A L 3 C をコードする配列に接続されている。一実施形態において、C A R T 細胞は、I L - 12、G A L 3 C および選択可能マーカーを含む。一実施形態において、I L - 12 をコードする配列は、2 A リボソームスキップを介して選択可能マーカーに連結され、G A L 3 C をコードする配列は、追加の2 A リボソームスキップによりI L - 12 をコードする配列に接続されている。一実施形態において、C A R T 細胞は、G A L 3 C、S A N T 7、I L - 12 および選択可能マーカーを含む。一実施形態において、G A L 3 C、S A N T 7、I L - 12 および選択可能マーカーのそれぞれをコードする配列は、2 A リボソームスキップ配列を介して接続される。

#### 【 0 0 1 3 】

一実施形態において、K M A 発現悪性腫瘍を処置するための方法が提供される。一実施形態において、K M A 発現悪性腫瘍は、B 細胞悪性腫瘍である。さらなる実施形態において、B 細胞悪性腫瘍は、多発性骨髄腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、びまん性大細胞型B 細胞リンパ腫 ( D L B C L )、またはアミロイドーシスである。具体的実施形態において、方法は、多発性骨髄腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、びまん性大細胞型B 細胞リンパ腫 ( D L B C L )、アミロイドーシス、またはK M A を発現する別のB 細胞悪性腫瘍に罹患した対象に、1つ以上の細胞内シグナル伝達ドメイン

10

20

30

40

50

、およびKMAを特異的に認識する細胞外抗原結合ドメインを発現するように操作された遺伝子改変T細胞を投与することを含む。一実施形態において、CAR内の1つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインは、1つ以上の共刺激エンドドメインである。別の実施形態において、1つ以上の共刺激ドメインは、CD28ドメイン、CD3ドメイン、4-1BBドメインもしくはOX-40ドメインまたはそれらの組み合わせの1つ以上である。一実施形態において、CARの1つ以上の共刺激エンドドメインは、CD3ドメインおよびCD28ドメインを含む。別の実施形態において、CARの1つ以上の共刺激エンドドメインは、CD3ドメインおよびOX-40ドメインを含む。さらに別の実施形態において、CARの1つ以上の共刺激エンドドメインは、CD3ドメイン、CD28ドメインおよびOX-40ドメインを含む。さらに別の実施形態において、CARの1つ以上の共刺激エンドドメインは、CD3ドメイン、4-1BBドメインおよびOX-40ドメインを含む。一実施形態において、細胞外結合ドメインは、KMAを特異的に認識する一本鎖可変断片(scfv)を含む。さらに別の実施形態において、scfvは、KappaMa bに由来する相補性決定領域(CDR)を含む。さらに別の実施形態において、scfvは、配列番号6~8のVL CDRを含む。さらに別の実施形態において、scfvは、配列番号21のVL領域を含む。さらに別の実施形態において、scfvは、配列番号3~5のVH CDRを含む。さらに別の実施形態において、scfvは、配列番号22のVH領域を含む。さらなる実施形態において、scfvは、配列番号6~8のVL CDRおよび配列番号3~5のVH CDRを含む。さらなる実施形態において、scfvは、配列番号21のVL領域および配列番号22のVH領域を含む。一実施形態において、配列番号2のVL鎖および配列番号1のVH鎖は、グリシン-セリンリンカーを介して結合している。一実施形態において、配列番号21のVL領域および配列番号22のVH領域は、グリシン-セリンリンカーを介して結合している。さらに別の実施形態において、リンカーは、(Gly4Ser)<sub>x</sub>であり、式中、Xは、1~5である。さらに別の実施形態において、グリシン-セリンリンカーは、15~20アミノ酸リンカーである。さらに別の実施形態において、リンカーは、15アミノ酸グリシンセリンリンカーであり、(Gly4Ser)<sub>3</sub>を含む。一実施形態において、(Gly4Ser)<sub>3</sub>リンカーは、配列番号23である。一実施形態において、scfvは、スペーサーにより1つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインに結合している。さらに別の実施形態において、scfvは、免疫グロブリン定常領域を含むスペーサーにより1つ以上の細胞内ドメインに結合している。一実施形態において、免疫グロブリン定常領域は、IgGヒンジ、IgG CH2およびIgG CH3ドメインの1つ以上を含む。具体的実施形態において、免疫グロブリン定常領域は、免疫グロブリンヒンジドメインを含む。さらに別の実施形態において、免疫グロブリン定常領域は、免疫グロブリンCH3ドメインを含む。さらに別の実施形態において、免疫グロブリン定常領域は、IgG CH2ドメインを含む。さらに別の実施形態において、scfvは、CD8ドメインを含むスペーサーにより1つ以上の細胞内ドメインに結合している。一実施形態において、スペーサーは、グリシン-セリンリンカーを介してscfvに結合している。さらに別の実施形態において、リンカーは、(Gly4Ser)<sub>x</sub>であり、式中、Xは、1~5である。さらに別の実施形態において、グリシン-セリンリンカーは、15~20アミノ酸リンカーである。さらに別の実施形態において、リンカーは、15アミノ酸グリシンセリンリンカーであり、(Gly4Ser)<sub>3</sub>を含む。一実施形態において、(Gly4Ser)<sub>3</sub>リンカーは、配列番号23である。別の実施形態において、遺伝子改変T細胞は、1つ以上の追加の生体分子を発現するようにさらに操作される。一実施形態において、追加の1つ以上の分子は、IL-12および/またはSANT7および/またはGAL3Cを含む。一実施形態において、CAR T細胞は、柔軟性リンカーにより繋がった1つのIL-12 p35サブユニットおよび1つのIL-12 p40サブユニットを含む一本鎖ポリペプチドを発現する。一実

10

20

30

40

50



施形態において、IL-12 p35およびIL-12 p40は、(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>リンカーにより繋がっている。一実施形態において、一本鎖IL-12ポリペプチドは、生物活性IL-12 p70ヘテロ二量体を形成する。一実施形態において、CAR T細胞は、IL-12および選択可能マーカーを発現する。一実施形態において、1つ以上の生体分子は、SANT7である。一実施形態において、CAR T細胞は、SANT7および選択可能マーカーを発現する。一実施形態において、選択可能マーカーは、GAL3Cである。一実施形態において、CAR T細胞は、GAL3Cおよび選択可能マーカーを発現する。一実施形態において、CAR T細胞は、IL-12、SANT7および選択可能マーカーを発現する。一実施形態において、CAR T細胞は、IL-12、GAL3Cおよび選択可能マーカーを発現する。一実施形態において、CAR T細胞は、SANT7、GAL3Cおよび選択可能マーカーを発現する。一実施形態において、CAR T細胞は、IL-12、SANT7、GAL3Cおよび選択可能マーカーを発現する。

10

#### 【0014】

さらなる実施形態において、方法は、多発性骨髄腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)、アミロイドーシス、またはKMAを発現する別のB細胞悪性腫瘍に罹患した患者に、HGF結合タンパク質をさらに投与することを含む。一実施形態において、HGF結合タンパク質は、抗体またはその断片である。一実施形態において、得られるCAR T細胞がHGF結合タンパク質も発現するように、HGF結合タンパク質を含む発現ベクターが、CARコンストラクトをコードする発現ベクターと共にT細胞内に共トランスフェクトされる。

20

#### 【0015】

別の実施形態において、方法は、1つ以上の追加の生物学的または薬学的に活性な薬剤を投与することを含む。一実施形態において、1つ以上の追加の薬学的に活性な薬剤は、化学療法剤である。別の実施形態において、1つ以上の薬学的に活性な薬剤は、免疫調節薬である。具体的実施形態において、免疫調節薬は、サリドマイドまたはその類似体である。さらに別の実施形態において、サリドマイド類似体は、アクチミド、レナリドミドまたはボマリドミドである。さらに別の実施形態において、追加の薬学的に活性な薬剤は、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬である。さらに別の実施形態において、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬は、パノビノスタット、ポリノスタット、トリコスタチンA、デブシペプチド、フェニル酪酸、パルプロ酸、ベリノスタット、LAQ824、エンチノスタット、CI944、またはモセチノスタットである。さらに別の実施形態において、1つ以上の追加の生物学的または薬学的に活性な薬剤は、上記遺伝子改変T細胞による処置の前、その間、またはその後に投与される。さらに別の実施形態において、遺伝子改変T細胞は、静脈内投与される。さらに別の実施形態において、遺伝子改変T細胞は、上記患者に由来する。さらに別の実施形態において、遺伝子改変T細胞は、上記患者に由来するものではない。

30

#### 【0016】

一実施形態において、本発明のCAR T細胞は、同種幹細胞移植の前、その間またはその後に投与される。さらに別の実施形態において、本発明のCAR T細胞は、同種幹細胞移植の前、その間またはその後に投与される。

40

#### 【0017】

本発明の上記で特徴付けられたこれらの態様、および他の態様は、いくつかの解説された実践および応用において例示されるが、そのいくつかは図に示され、続く特許請求の範囲のセクションにおいて特徴付けられる。しかしながら、上記概要は、本発明のそれぞれの解説された実施形態または全ての実践を説明することを意図しない。

本発明の実施形態の例として、以下の項目が挙げられる。

#### (項目1)

1つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインおよび細胞外抗原結合ドメインを含むキメラ抗原受容体(CAR)であって、前記細胞外抗原結合ドメインは、カッパ骨髄腫抗原(KMA)を特異的に認識する、キメラ抗原受容体(CAR)。

50

( 項目 2 )

前記 1 つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインは、1 つ以上の共刺激エンドドメインを含む、項目 1 に記載の C A R。

( 項目 3 )

前記 1 つ以上の共刺激エンドドメインは、C D 2 8 ドメイン、C D 3 ドメイン、4 - 1 B B ドメインもしくは O X - 4 0 ドメインまたはそれらの組み合わせの 1 つ以上である、項目 2 に記載の C A R。

( 項目 4 )

前記共刺激エンドドメインは、C D 3 ドメインおよび C D 2 8 ドメインである、項目 3 に記載の C A R。

10

( 項目 5 )

前記共刺激エンドドメインは、C D 3 ドメインおよび O X - 4 0 ドメインである、項目 3 に記載の C A R。

( 項目 6 )

O X - 4 0 ドメインをさらに含む、項目 4 に記載の C A R。

( 項目 7 )

前記共刺激エンドドメインは、C D 3 ドメインおよび 4 - 1 B B ドメインである、項目 3 に記載の C A R。

( 項目 8 )

4 - 1 B B ドメインをさらに含む、項目 4 に記載の C A R。

20

( 項目 9 )

O X - 4 0 ドメインをさらに含む、項目 7 に記載の C A R。

( 項目 1 0 )

前記細胞外結合ドメインは、K M A を特異的に認識する一本鎖可変断片 ( s c F v ) を含む、項目 1 に記載の C A R。

( 項目 1 1 )

前記 s c F v は、K a p p a M a b モノクローナル抗体に由来する相補性決定領域 ( C D R ) を含み、前記 K a p p a M a b C D R は、配列番号 3 ~ 8 を含む、項目 1 0 に記載の C A R。

( 項目 1 2 )

30

前記 s c F v は、K a p p a M a b からの V L 鎖および V H 鎖を含み、前記 V L 鎖は、配列番号 2 を含み、V H 鎖は、配列番号 1 を含む、項目 1 0 に記載の C A R。

( 項目 1 3 )

K a p p a M a b からの前記 V L 鎖および V H 鎖は、グリシン - セリンリンカーを介して結合している、項目 1 1 に記載の C A R。

( 項目 1 4 )

前記グリシン - セリンリンカーは、1 5 ~ 2 0 アミノ酸リンカーである、項目 1 3 に記載の C A R。

( 項目 1 5 )

前記 1 5 アミノ酸リンカーは、( G l y 4 S e r ) 3 を含む、項目 1 4 に記載の C A R。

40

( 項目 1 6 )

前記 s c F v は、スペーサーを介して前記 1 つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインに結合している、項目 1 0 に記載の C A R。

( 項目 1 7 )

前記スペーサーは、免疫グロブリン定常領域または C D 8 鎖である、項目 1 6 に記載の C A R。

( 項目 1 8 )

前記免疫グロブリン定常領域は、I g G ヒンジドメイン、I g G C H 2 ドメインおよび I g G C H 3 ドメインの 1 つ以上を含む、項目 1 7 に記載の C A R。

( 項目 1 9 )

50

前記免疫グロブリン定常領域は、免疫グロブリンヒンジドメインを含む、項目 1 8 に記載の C A R。

( 項目 2 0 )

前記免疫グロブリン定常領域は、I g G C H 3 ドメインをさらに含む、項目 1 9 に記載の C A R。

( 項目 2 1 )

前記免疫グロブリン定常領域は、I g G C H 2 ドメインをさらに含む、項目 1 9 または 2 0 に記載の C A R。

( 項目 2 2 )

前記スペーサーは、グリシン - セリンリンカーを介して前記 s c F V に結合している、項目 1 7 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の C A R。

( 項目 2 3 )

前記グリシン - セリンリンカーは、1 5 ~ 2 0 アミノ酸リンカーである、項目 2 2 に記載の C A R。

( 項目 2 4 )

前記 1 5 アミノ酸リンカーは、( G l y <sub>4</sub> S e r )<sub>3</sub> を含む、項目 2 3 に記載の C A R。

( 項目 2 5 )

項目 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の C A R を発現するように操作された、遺伝子改変 T 細胞。

( 項目 2 6 )

1 つ以上の追加の生体分子を発現するようにさらに操作された、項目 2 5 に記載の遺伝子改変 T 細胞。

( 項目 2 7 )

前記 1 つ以上の追加の生体分子は、I L - 1 2 、G A L 3 C または S A N T 7 の 1 つ以上を含む、項目 2 6 に記載の遺伝子改変 T 細胞。

( 項目 2 8 )

前記 1 つ以上の追加の生体分子は、I L - 1 2 であり、前記 I L - 1 2 は、柔軟性リンカーにより繋がった 1 つの I L - 1 2 p 3 5 サブユニットおよび 1 つの I L - 1 2 p 4 0 サブユニットを含む一本鎖ポリペプチドにより発現される、項目 2 6 に記載の遺伝子改変 T 細胞。

( 項目 2 9 )

前記柔軟性リンカーは、( G <sub>4</sub> S )<sub>3</sub> リンカーである、項目 2 8 に記載の遺伝子改変 T 細胞。

( 項目 3 0 )

柔軟性リンカーにより繋がった 1 つの I L - 1 2 p 3 5 サブユニットおよび 1 つの I L - 1 2 p 4 0 サブユニットを含む前記一本鎖ポリペプチドは、生物活性 p 7 0 I L - 1 2 ヘテロ二量体を形成する、項目 2 9 に記載の遺伝子改変 T 細胞。

( 項目 3 1 )

I L - 1 2 および選択可能マーカーを発現するように操作された、項目 2 6 に記載の遺伝子改変 T 細胞。

( 項目 3 2 )

S A N T - 7 を発現するように操作された、項目 2 6 に記載の遺伝子改変 T 細胞。

( 項目 3 3 )

S A N T - 7 および選択可能マーカーを発現するように操作された、項目 2 6 に記載の遺伝子改変 T 細胞。

( 項目 3 4 )

S A N T 7 を発現するようにさらに操作された、項目 3 1 に記載の遺伝子改変 T 細胞。

( 項目 3 5 )

G A L 3 C を発現するように操作された、項目 2 6 に記載の遺伝子改変 T 細胞。

( 項目 3 6 )

10

20

30

40

50

G A L 3 C および選択可能マーカーを発現するように操作された、項目 2 6 に記載の遺伝子改変 T 細胞。

( 項目 3 7 )

G A L 3 C を発現するようにさらに操作された、項目 3 1 に記載の遺伝子改変 T 細胞。

( 項目 3 8 )

G A L 3 C および S A N T 7 を発現するようにさらに操作された、項目 3 1 に記載の遺伝子改変 T 細胞。

( 項目 3 9 )

G A L 3 C を発現するようにさらに操作された、項目 3 3 に記載の遺伝子改変 T 細胞。

( 項目 4 0 )

遺伝子改変 T 細胞を生成するための方法であって、1 つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインおよび細胞外抗原結合ドメインを含む C A R をコードする発現ベクターを T 細胞に導入することを含み、前記細胞外抗原結合ドメインは、カッパ骨髄腫抗原 ( K M A ) を特異的に認識する方法。

( 項目 4 1 )

前記発現ベクターは、転位ベクター発現系である、項目 4 0 に記載の方法。

( 項目 4 2 )

前記発現ベクターは、P i g g y B a c トランスポゾン発現系である、項目 4 0 に記載の方法。

( 項目 4 3 )

前記導入することは、エレクトロポレーションを含む、項目 4 0 に記載の方法。

( 項目 4 4 )

前記 1 つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインは、1 つ以上の共刺激エンドドメインを含む、項目 4 0 に記載の方法。

( 項目 4 5 )

前記 1 つ以上の共刺激エンドドメインは、C D 2 8 ドメイン、C D 3 ドメイン、4 - 1 B B ドメインもしくは O X - 4 0 ドメインまたはそれらの組み合わせの 1 つ以上である、項目 4 4 に記載の方法。

( 項目 4 6 )

前記共刺激エンドドメインは、C D 3 ドメインおよび C D 2 8 ドメインである、項目 4 5 に記載の方法。

( 項目 4 7 )

前記共刺激エンドドメインは、C D 3 ドメインおよび O X - 4 0 ドメインである、項目 4 5 に記載の方法。

( 項目 4 8 )

前記 C A R は、O X - 4 0 ドメインをさらに含む、項目 4 6 に記載の方法。

( 項目 4 9 )

前記共刺激エンドドメインは、C D 3 ドメインおよび 4 - 1 B B ドメインである、項目 4 5 に記載の方法。

( 項目 5 0 )

前記 C A R は、4 - 1 B B ドメインをさらに含む、項目 4 6 に記載の方法。

( 項目 5 1 )

前記 C A R は、O X - 4 0 ドメインをさらに含む、項目 5 0 に記載の方法。

( 項目 5 2 )

前記細胞外結合ドメインは、K M A を特異的に認識する s c F v を含む、項目 4 0 に記載の方法。

( 項目 5 3 )

前記 s c F v は、K a p p a M a b モノクローナル抗体に由来する相補性決定領域 ( C D R ) を含み、前記 C D R は、配列番号 3 ~ 8 を含む、項目 5 2 に記載の方法。

( 項目 5 4 )

10

20

30

40

50

前記 s c F v は、K a p p a M a b モノクローナル抗体の V L 鎖および V H 鎖を含み、前記 V L 鎖は、配列番号 2 を含み、前記 V H 鎖は、配列番号 1 を含む、項目 5 3 に記載の方法。

( 項目 5 5 )

前記 V L C D R および V H C D R は、グリシン - セリンリンカーを介して結合している、項目 5 4 に記載の方法。

( 項目 5 6 )

前記グリシン - セリンリンカーは、15 ~ 20 アミノ酸リンカーである、項目 5 5 に記載の方法。

( 項目 5 7 )

前記 15 アミノ酸リンカーは、( G l y<sub>4</sub> S e r )<sub>3</sub> を含む、項目 5 6 に記載の方法。

( 項目 5 8 )

前記 s c F v は、スペーサーを介して前記 1 つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインに結合している、項目 5 2 に記載の方法。

( 項目 5 9 )

前記スペーサーは、免疫グロブリン定常領域または C D 8 鎖である、項目 5 8 に記載の方法。

( 項目 6 0 )

前記免疫グロブリン定常領域は、I g G ヒンジドメイン、I g G C H 2 ドメインおよび I g G C H 3 ドメインの 1 つ以上を含む、項目 5 9 に記載の方法。

( 項目 6 1 )

前記免疫グロブリン定常領域は、免疫グロブリンヒンジドメインを含む、項目 5 9 に記載の方法。

( 項目 6 2 )

前記免疫グロブリン定常領域は、I g G C H 3 ドメインをさらに含む、項目 6 1 に記載の方法。

( 項目 6 3 )

前記免疫グロブリン定常領域は、I g G C H 2 ドメインをさらに含む、項目 6 1 または 6 2 に記載の方法。

( 項目 6 4 )

前記スペーサーは、グリシン - セリンリンカーを介して前記 s c F V に結合している、項目 5 9 ~ 6 3 のいずれか一項に記載の C A R。

( 項目 6 5 )

前記グリシン - セリンリンカーは、15 ~ 20 アミノ酸リンカーである、項目 2 2 に記載の C A R。

( 項目 6 6 )

前記 15 アミノ酸リンカーは、( G l y<sub>4</sub> S e r )<sub>3</sub> を含む、項目 2 3 に記載の C A R。

( 項目 6 7 )

1 つ以上の追加の生体分子を発現することができる 1 つ以上の追加の発現ベクターを導入することをさらに含む、項目 4 0 に記載の方法。

( 項目 6 8 )

前記 1 つ以上の追加の生体分子は、I L - 1 2、G A L 3 C または S A N T 7 の 1 つ以上を含む、項目 6 7 に記載の方法。

( 項目 6 9 )

前記 1 つ以上の追加の生体分子は、I L - 1 2 であり、前記 I L - 1 2 は、柔軟性リンカーにより繋がった I L - 1 2 p 3 5 サブユニットおよび I L - 1 2 p 4 0 サブユニットを含む一本鎖コンストラクトにより発現される、項目 6 8 に記載の方法。

( 項目 7 0 )

前記柔軟性リンカーは、( G<sub>4</sub> S )<sub>3</sub> リンカーである、項目 6 9 に記載の方法。

( 項目 7 1 )

10

20

30

40

50

柔軟性リンカーにより繋がった I L - 1 2 p 3 5 サブユニットおよび I L - 1 2 p 4 0 サブユニットを含む前記一本鎖コンストラクトは、生物活性 p 7 0 I L - 1 2 ヘテロ二量体を形成する、項目 7 0 に記載の方法。

(項目 7 2)

1 つ以上の追加の生物学的作用物質は、選択可能マーカーをさらにコードするコンストラクトを介して発現される、項目 6 7 に記載の方法。

(項目 7 3)

前記コンストラクトは、I L - 1 2 および選択可能マーカーをコードし、前記選択可能マーカーおよび I L - 1 2 のコード配列は、2 A リボソームスキップをコードする配列により繋がっている、項目 7 2 に記載の方法。

(項目 7 4)

前記コンストラクトは、S A N T 7 および選択可能マーカーをコードし、前記選択可能マーカーおよび S A N T 7 のコード配列は、2 A リボソームスキップをコードする配列により繋がっている、項目 7 2 に記載の方法。

(項目 7 5)

前記コンストラクトは、G A L 3 C および選択可能マーカーをコードし、前記選択可能マーカーおよび G A L 3 C のコード配列は、リボソームスキップをコードする配列により繋がっている、項目 7 2 に記載の方法。

(項目 7 6)

前記コンストラクトは、G A L 3 C をさらにコードし、G A L 3 C のコード配列は、追加の 2 A リボソームスキップを介して、コンストラクト内の S A N T 7 のコード配列に繋がっている、項目 7 4 に記載の方法。

(項目 7 7)

前記コンストラクトは、S A N T 7 をさらにコードし、S A N T 7 のコード配列は、2 A リボソームスキップの追加のコード配列を介して、コンストラクト内の I L - 1 2 のコード配列に繋がっている、項目 7 3 に記載の方法。

(項目 7 8)

前記コンストラクトは、G A L 3 C をさらにコードし、G A L 3 C のコード配列は、2 A リボソームスキップの追加のコード配列を介して、コンストラクト内の I L - 1 2 のコード配列に繋がっている、項目 7 3 に記載の方法。

(項目 7 9)

前記コンストラクトは、S A N T 7 をさらにコードし、I L - 1 2、S A N T 7、G A L 3 C および前記選択可能マーカーのそれぞれのコード配列は、2 A リボソームスキップを介して繋がっている、項目 7 8 に記載の方法。

(項目 8 0)

それを必要とする対象における K M A 発現悪性腫瘍を処置する方法であって、1 つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインおよび細胞外抗原結合ドメインを発現するように操作された遺伝子改変 T 細胞を投与することを含み、前記細胞外抗原結合ドメインは、カップ骨髄腫抗原 ( K M A ) を特異的に認識する方法。

(項目 8 1)

前記 K M A 発現悪性腫瘍は、多発性骨髄腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 ( D L B C L )、またはアミロイドーシスである、項目 8 0 に記載の方法。

(項目 8 2)

前記 1 つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインは、1 つ以上の共刺激エンドドメインを含む、項目 8 0 に記載の方法。

(項目 8 3)

前記 1 つ以上の共刺激エンドドメインは、C D 2 8 ドメイン、C D 3 ドメイン、4 - 1 B B ドメインもしくは O X - 4 0 ドメインまたはそれらの組み合わせの 1 つ以上である、項目 8 2 に記載の方法。

10

20

30

40

50

( 項目 8 4 )

前記共刺激エンドドメインは、C D 3 ドメインおよびC D 2 8 ドメインである、項目 8 3 に記載の方法。

( 項目 8 5 )

前記共刺激エンドドメインは、C D 3 ドメインおよびO X - 4 0 ドメインである、項目 8 3 に記載の方法。

( 項目 8 6 )

前記細胞内シグナル伝達ドメインは、O X - 4 0 ドメインをさらに含む、項目 8 4 に記載の方法。

( 項目 8 7 )

前記共刺激エンドドメインは、C D 3 ドメインおよび4 1 - B B ドメインである、項目 8 3 に記載の方法。

( 項目 8 8 )

4 1 - B B ドメインをさらに含む、項目 8 4 に記載の方法。

( 項目 8 9 )

前記細胞外結合ドメインは、K M A を特異的に認識するs c F vを含む、項目 8 0 に記載の方法。

( 項目 9 0 )

前記s c F vは、K M A を認識し、K a p p a M a bモノクローナル抗体に由来する相補性決定領域 ( C D R ) を含む、前記C D R は、配列番号 3 ~ 8 を含む、項目 8 9 に記載の方法。

( 項目 9 1 )

前記s c F vは、K a p p a M a bモノクローナル抗体のV L鎖およびV H鎖を含み、前記V L鎖は、配列番号 2 を含む、前記V H鎖は、配列番号 1 を含む、項目 8 9 に記載の方法。

( 項目 9 2 )

前記配列番号 2 のV Lおよび配列番号 1 のV Hは、グリシン - セリンリンカーを介して結合している、項目 9 1 に記載の方法。

( 項目 9 3 )

前記グリシン - セリンリンカーは、1 5 ~ 2 0 アミノ酸リンカーである、項目 9 2 に記載の方法。

( 項目 9 4 )

前記1 5 アミノ酸リンカーは、( G l y 4 S e r )<sub>3</sub>を含む、項目 9 3 に記載の方法。

( 項目 9 5 )

前記s c F vは、スペーサーを介して前記1つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインに結合している、項目 8 9 に記載の方法。

( 項目 9 6 )

前記スペーサーは、免疫グロブリン定常領域またはC D 8 鎖である、項目 9 5 に記載の方法。

( 項目 9 7 )

前記免疫グロブリン定常領域は、I g G ヒンジドメイン、およびI g G C H 2 ドメイン、およびI g G C H 3 ドメインの1つ以上を含む、項目 9 6 に記載の方法。

( 項目 9 8 )

前記免疫グロブリン定常領域は、免疫グロブリンヒンジドメインを含む、項目 9 7 に記載の方法。

( 項目 9 9 )

前記免疫グロブリン定常領域は、I g G C H 3 ドメインをさらに含む、項目 9 8 に記載の方法。

( 項目 1 0 0 )

前記免疫グロブリン定常領域は、I g G C H 2 ドメインをさらに含む、項目 9 8 または

10

20

30

40

50

9.9に記載の方法。

(項目101)

前記 Spacer は、グリシン - セリンリンカーを介して前記 scFV に結合している、  
項目96 ~ 100のいずれか一項に記載の CAR。

(項目102)

前記グリシン - セリンリンカーは、15 ~ 20 アミノ酸リンカーである、項目101に  
記載の CAR。

(項目103)

前記15アミノ酸リンカーは、(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>を含む、項目102に記載の CAR  
。

10

(項目104)

前記遺伝子改変 T 細胞は、1つ以上の追加の生体分子を発現するようにさらに操作され  
た、項目80に記載の方法。

(項目105)

前記1つ以上の追加の生体分子は、IL - 12、GAL3CまたはSANT7の1つ以  
上を含む、項目104に記載の方法。

(項目106)

前記1つ以上の追加の生体分子は、IL - 12であり、前記IL - 12は、柔軟性リン  
カーにより繋がったIL - 12 p35サブユニットおよびIL - 12 p40サブユニッ  
トを含む一本鎖ポリペプチドとして発現される、項目104に記載の方法。

20

(項目107)

前記柔軟性リンカーは、(G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>リンカーである、項目106に記載の方法。

(項目108)

柔軟性リンカーにより繋がったIL - 12 p35サブユニットおよびIL - 12 p4  
0サブユニットを含む前記一本鎖ポリペプチドは、生物活性p70 IL - 12ヘテロ二  
量体を形成する、項目106に記載の方法。

(項目109)

前記CAR T細胞は、IL - 12および選択可能マーカーを発現するように操作された  
、項目105に記載の方法。

(項目110)

前記CAR T細胞は、SANT7および選択可能マーカーを発現するように操作された  
、項目104に記載の方法。

30

(項目111)

前記CAR T細胞は、GAL3Cおよび選択可能マーカーを発現するように操作された  
、項目104に記載の方法。

(項目112)

前記CAR T細胞は、SANT7、IL - 12および選択可能マーカーを発現するよう  
に操作された、項目104に記載の方法。

(項目113)

前記CAR T細胞は、SANT7、GAL3Cおよび選択可能マーカーを発現するよう  
に操作された、項目104に記載の方法。

40

(項目114)

前記CAR T細胞は、IL - 12、GAL3Cおよび選択可能マーカーを発現するよう  
に操作された、項目104に記載の方法。

(項目115)

前記CAR T細胞は、IL - 12、GAL3C、SANT7および選択可能マーカーを  
発現するように操作された、項目104に記載の方法。

(項目116)

1つ以上の追加の生物学的または薬学的に活性な薬剤を投与することをさらに含む、項  
目80に記載の方法。

50



( 項目 1 1 7 )

前記 1 つ以上の追加の生物学的に活性な薬剤は、I L - 1 2、I L - 6 受容体拮抗薬または S A N T 7 を含む、項目 1 1 6 に記載の方法。

( 項目 1 1 8 )

前記追加の薬学的に活性な薬剤は、1 つ以上の化学療法剤を含む、項目 1 1 6 に記載の方法。

( 項目 1 1 9 )

前記追加の薬学的に活性な薬剤は、免疫調節薬である、項目 1 1 6 に記載の方法。

( 項目 1 2 0 )

前記免疫調節薬は、サリドマイドまたはその類似体である、項目 1 1 9 に記載の方法。

10

( 項目 1 2 1 )

前記サリドマイド類似体は、アクチミド、レナリドミドまたはポマリドミドである、項目 1 2 0 に記載の方法。

( 項目 1 2 2 )

前記追加の薬学的に活性な薬剤は、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬である、項目 1 1 6 に記載の方法。

( 項目 1 2 3 )

前記ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬は、パノビノスタット、ボリノスタット、トリコスタチン A、デプシペプチド、フェニル酪酸、バルプロ酸、ベリノスタット、L A Q 8 2 4、エンチノスタット、C I 9 4 4、またはモセチノスタットである、項目 1 2 2 に記載の方法。

20

( 項目 1 2 4 )

前記 1 つ以上の追加の生物学的または薬学的に活性な薬剤は、遺伝子改変 T 細胞による処置の前、その間、またはその後に投与される、項目 1 1 6 に記載の方法。

( 項目 1 2 5 )

前記遺伝子改変 T 細胞は、静脈内投与される、項目 8 0 に記載の方法。

( 項目 1 2 6 )

前記遺伝子改変 T 細胞は、患者に由来する、項目 8 0 に記載の方法。

( 項目 1 2 7 )

前記遺伝子改変 T 細胞は、患者に由来するものではない、項目 8 0 に記載の方法。

30

( 項目 1 2 8 )

H G F 結合タンパク質を発現するようにさらに操作された、項目 2 6 または 2 7 に記載の遺伝子改変 T 細胞。

( 項目 1 2 9 )

前記 H G F 結合タンパク質は、H G F 抗体またはその断片である、項目 1 2 8 に記載の遺伝子改変 T 細胞。

( 項目 1 3 0 )

前記 1 つ以上の追加の生体分子は、H G F 結合タンパク質である、項目 6 7 または 1 0 4 に記載の方法。

( 項目 1 3 1 )

前記 H G F 結合タンパク質は、抗体またはその断片である、項目 1 3 0 に記載の方法。

40

( 項目 1 3 2 )

前記遺伝子改変 T 細胞は、幹細胞移植の前、その間またはその後に投与される、項目 8 0 に記載の方法。

( 項目 1 3 3 )

前記幹細胞移植は、同種幹細胞移植である、項目 1 3 2 に記載の方法。

( 項目 1 3 4 )

前記幹細胞移植は、同種異系幹細胞移植である、項目 1 3 2 に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 8 】

50

本発明の新規な特徴は、付属する特許請求の範囲において詳細に記載される。本発明の特徴および利点のより良い理解は、本発明の原理が利用される例示的实施形態を記載する以下の発明を実施するための形態、および添付の図面を参照することにより得られる。

【0019】

【図1】免疫グロブリン(IgG)およびT細胞受容体(TCR)に対するCARの構造的関係を示す図である。図1Aは、ポリペプチドリンカーにより重鎖可変領域(VH)に繋がった親抗体の軽鎖可変領域(VL)からなる一本鎖可変断片(scFv)が、CARに抗原特異性を付与することを示している。柔軟なヒンジが、scFvを、CD3ゼータが続くCD28、4-1BBまたはOX-40等の共刺激分子の膜貫通および細胞内シグナル伝達ドメインに接続する。図1Bは、CARで形質導入されたT細胞が、標的抗原(Ag)を保持する遭遇する腫瘍細胞上で活性化され、腫瘍細胞溶解をもたらすことを示す。

10

【図2】キメラ抗原受容体機能の構造的決定因子を示す図である。

【図3】原発性骨髄腫細胞上でのKMA発現を示す図である。

【図4A】KMA・CAR-28z機能を示す図である。図4Aは、様々な細胞株上のKMA発現のフローサイトメトリー分析であり、図4Bは、KMA・CAR-28z形質導入(上のプロット)および非形質導入(下のプロット)CD8<sup>+</sup>T細胞のインターフェロングamma(IFN $\gamma$ )発現である。図4Cは、KMA・CAR-28z形質導入T細胞によるKMA陽性および陰性細胞株の特異的溶解を示す図である。

【図4B】KMA・CAR-28z機能を示す図である。図4Aは、様々な細胞株上のKMA発現のフローサイトメトリー分析であり、図4Bは、KMA・CAR-28z形質導入(上のプロット)および非形質導入(下のプロット)CD8<sup>+</sup>T細胞のインターフェロングamma(IFN $\gamma$ )発現である。図4Cは、KMA・CAR-28z形質導入T細胞によるKMA陽性および陰性細胞株の特異的溶解を示す図である。

20

【図4C】KMA・CAR-28z機能を示す図である。図4Aは、様々な細胞株上のKMA発現のフローサイトメトリー分析であり、図4Bは、KMA・CAR-28z形質導入(上のプロット)および非形質導入(下のプロット)CD8<sup>+</sup>T細胞のインターフェロングamma(IFN $\gamma$ )発現である。図4Cは、KMA・CAR-28z形質導入T細胞によるKMA陽性および陰性細胞株の特異的溶解を示す図である。

【図5A】 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ の骨髄腫細胞を注射されたRPMI-Ragマウスを示す図である。

30

【図5B】CD138<sup>+</sup>RPMI9226細胞による骨髄および脾臓の浸潤を示す図である。

【図5C】進行性疾患に対する血清ヒトラムダ軽鎖の上昇したレベルを示す図である。

【図5D】骨髄内のCD138<sup>+</sup>/細胞質ラムダ軽鎖陽性細胞を示す図である。

【図5E】治療モデルとしてのRPMI-Ragマウスを示す図である。

【図6A】KMA・CARの最適化を示す図である。図6Aは、初期KMA・CAR-28zコンストラクトを示し、図6Bは、Ig重鎖ヒンジおよびCH3またはヒンジのみを有するコンストラクトを示す。図6Cは、最適ヒンジ領域(opti)を、様々な共刺激分子エンドドメインおよびCD3ゼータの組み合わせと組み合わせたコンストラクトを示す。

40

【図6B】KMA・CARの最適化を示す図である。図6Aは、初期KMA・CAR-28zコンストラクトを示し、図6Bは、Ig重鎖ヒンジおよびCH3またはヒンジのみを有するコンストラクトを示す。図6Cは、最適ヒンジ領域(opti)を、様々な共刺激分子エンドドメインおよびCD3ゼータの組み合わせと組み合わせたコンストラクトを示す。

【図6C】KMA・CARの最適化を示す図である。図6Aは、初期KMA・CAR-28zコンストラクトを示し、図6Bは、Ig重鎖ヒンジおよびCH3またはヒンジのみを有するコンストラクトを示す。図6Cは、最適ヒンジ領域(opti)を、様々な共刺激分子エンドドメインおよびCD3ゼータの組み合わせと組み合わせたコンストラクトを示す。

50

【図 7】IL - 12 および S A N T 7 ベクターを示す図である。

【図 8 A】実施例 3 に記載のコンストラクトによる K M . C A R T 細胞増加および C A R 発現を示す図である。図 8 A は、K M A 発現 J J N 3 細胞株の添加あり（左）およびなし（右）での、C A R T 細胞培養物中の全細胞の増加を示す。図 8 B は、K M A 発現 J J N 3 細胞株あり（上のプロット）およびなし（下のプロット）での培養物中の G F P により測定される C A R 発現を示す。h C H 2 C H 3 = K M . C A R \_\_ h C H 2 C H 3 \_\_ 2 8 z T 細胞、h C H 2 C H 3 m u t = K M . C A R h C H 2 C H 3 m u t \_\_ 2 8 T M \_\_ 4 1 B B z T 細胞、h = K M . C A R \_\_ h \_\_ 2 8 T M \_\_ 4 1 B B z T 細胞、C D 8 a = K M . C A R \_\_ 8 a \_\_ 2 8 T M \_\_ 4 1 B B z T 細胞。

【図 8 B】実施例 3 に記載のコンストラクトによる K M . C A R T 細胞増加および C A R 発現を示す図である。図 8 A は、K M A 発現 J J N 3 細胞株の添加あり（左）およびなし（右）での、C A R T 細胞培養物中の全細胞の増加を示す。図 8 B は、K M A 発現 J J N 3 細胞株あり（上のプロット）およびなし（下のプロット）での培養物中の G F P により測定される C A R 発現を示す。h C H 2 C H 3 = K M . C A R \_\_ h C H 2 C H 3 \_\_ 2 8 z T 細胞、h C H 2 C H 3 m u t = K M . C A R h C H 2 C H 3 m u t \_\_ 2 8 T M \_\_ 4 1 B B z T 細胞、h = K M . C A R \_\_ h \_\_ 2 8 T M \_\_ 4 1 B B z T 細胞、C D 8 a = K M . C A R \_\_ 8 a \_\_ 2 8 T M \_\_ 4 1 B B z T 細胞。

【図 9】活性化誘導性トランスポゾンカセットの構造を示す図である。I R = 逆方向反復、I n s = 遺伝子挿入の 2 つの末端に隣接するインシュレーター、N F A T p r o = 活性化誘導性プロモーター、B G H p A = ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル、E F 1 = ヒト延長因子 - 1 アルファプロモーター、R Q R 8 = マーカー、S V 4 0 = シミアンウイルス後期ポリアデニル化シグナル。

【図 10】活性化誘導プロモーター制御下での e G F P の発現を示す図である。P M A およびイオノマイシンで刺激された形質導入 P B M C（右プロット）を、R Q R 8（x 軸）および e G F P（y 軸）の同時発現に関して評価し、非刺激対照（左プロット）と比較した。形質導入された細胞は、刺激の非存在下では e G F P を発現しなかった。形質導入された細胞の 50 パーセントは、刺激により e G F P を発現した。

【図 11】C A R および生物製剤を有する活性化誘導性トランスポゾンカセットの構造を示す図である。I R = 逆方向反復、I n s = 遺伝子挿入の 2 つの末端に隣接するインシュレーター、N F A T p r o = 活性化誘導性プロモーター、B G H p A = ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル、E F 1 = ヒト延長因子 - 1 アルファプロモーター、S V 4 0 = シミアンウイルス後期ポリアデニル化シグナル。

【図 12 A】K M A + および K M A - 細胞株を用いた K M . C A R \_\_ h C H 2 C H 3 \_\_ 2 8 z T 細胞（図 12 A）または K M . C A R \_\_ h \_\_ 2 8 T M \_\_ 4 1 B B z T 細胞（図 12 B）標準クロム放出アッセイの、K M A 特異的インターフェロンガンマ生成および細胞毒性を示す図である。使用された K M A 陽性細胞株は、J J N 3、P f e i f f e r、N C I - H 9 2 9 を含んでおり、一方 K M A 陰性細胞株は、N a l m - 6 および M o l t を含んでいた。

【図 12 B】K M A + および K M A - 細胞株を用いた K M . C A R \_\_ h C H 2 C H 3 \_\_ 2 8 z T 細胞（図 12 A）または K M . C A R \_\_ h \_\_ 2 8 T M \_\_ 4 1 B B z T 細胞（図 12 B）標準クロム放出アッセイの、K M A 特異的インターフェロンガンマ生成および細胞毒性を示す図である。使用された K M A 陽性細胞株は、J J N 3、P f e i f f e r、N C I - H 9 2 9 を含んでおり、一方 K M A 陰性細胞株は、N a l m - 6 および M o l t を含んでいた。

【発明を実施するための形態】

【0020】

別段に定義されていない限り、本明細書で使用されている技術的および科学的用語は全て、本発明が関連する技術分野の当業者により一般的に理解されているのと同じ意味を有する。本明細書で説明されているのと同様または等価のいかなる方法および材料も、本発明の試験の実践において使用することができるが、好ましい材料および方法が本明細書に

10

20

30

40

50

において説明される。本発明を説明および請求する上で、以下の定義が使用される。また、本明細書において使用される専門用語は、限定を意図せず、むしろ具体的実施形態を説明するために本明細書において使用されることが理解される。

【0021】

冠詞「a」および「an」は、本明細書において、冠詞の文法的な目的語の1つまたは2つ以上（すなわち少なくとも1つまたは1つ以上）を指すように使用される。

【0022】

「発現ベクター」という用語は、本明細書において使用される場合、発現される核酸配列に動作可能に連結した少なくとも1つの発現制御配列を含む組み換え核酸配列を含むベクターを指す。発現ベクターは、発現に要する全ての必要なシス作用要素を含む。発現ベクターの例は、これらに限定されないが、プラスミド、コスミド、および発現される組み換えポリヌクレオチドをコードするウイルスを含む。いくつかの実施形態において、発現ベクターは、ゲノム、例えばPiggyBac発現系に統合することができる転位因子を含む。いくつかの実施形態において、発現ベクターは、宿主ゲノム内への発現ベクターの内容の統合を可能にするウイルスベクター、例えばレトロウイルスおよびレンチウイルスベクターである。

10

【0023】

「キメラ抗原受容体」または「CAR」とは、細胞外抗原結合ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含む操作された受容体を意味する。CARの最も一般的な種類は、T細胞共受容体の膜貫通および細胞内ドメインに融合したモノクローナル抗体に由来する一本鎖可変断片(s c F v)、例えばCD3 鎖を含むが、本明細書に記載の発明は、これらのドメインに限定されない。むしろ、本明細書において使用される場合、「キメラ抗体受容体」または「CAR」は、発現するように操作された任意の受容体、および任意の細胞内シグナル伝達分子に融合または連結した細胞外抗原結合ドメインを指す。

20

【0024】

本明細書において使用される場合、「CAR-T細胞」は、CARを発現するように遺伝子操作されたTリンパ球を指す。CAR-T細胞の定義は、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T細胞、およびエフェクターT細胞、記憶T細胞、制御性T細胞等を含むTリンパ球の全てのクラスおよびサブクラスを包含する。遺伝子改変されたTリンパ球は、遺伝子改変T細胞を使用した処置を受ける対象に「由来する」、もしくはその対象から「得られた」ものであってもよく、または、それらは、異なる対象に「由来する」、もしくはその対象から「得られた」ものであってもよい。

30

【0025】

「細胞内シグナル伝達ドメイン」とは、T細胞内に見られる、または見られるように操作されているCARの部分の意味する。「細胞内シグナル伝達ドメイン」は、T細胞の形質膜にCARを固定する「膜貫通ドメイン」もまた含有してもよく、または含有しなくてもよい。一実施形態において、「膜貫通ドメイン」および「細胞内シグナル伝達ドメイン」は、同じタンパク質に由来し（例えばCD3）、他の実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインおよび膜貫通ドメインは、異なるタンパク質に由来する（例えば、CD3の膜貫通ドメインおよびCD28分子の細胞内シグナル伝達ドメイン、またはその逆も成り立つ）。

40

【0026】

「共刺激エンドドメイン」とは、T細胞共刺激分子に由来する細胞内シグナル伝達ドメインまたはその断片を意味する。T細胞共刺激分子の限定されないリストは、CD3、CD28、OX-40、4-1BB、CD27、CD270、CD30およびICOSを含む。共刺激エンドドメインは、同じまたは異なる共刺激エンドドメインからの膜貫通ドメインを含んでもよく、または含まなくてもよい。

【0027】

「細胞外抗原結合ドメイン」とは、対象となる抗原を特異的に認識しそれに結合するCARの部分の意味する。「細胞外結合ドメイン」は、モノクローナル抗体に由来してもよ

50

い。例えば、「細胞外結合ドメイン」は、モノクローナル抗体からのF a bドメインの全てまたは一部を含んでもよい。ある特定の実施形態において、「細胞外結合ドメイン」は、特定のモノクローナル抗体の相補性決定領域を含む。さらに別の実施形態において、「細胞外結合ドメイン」は、一本鎖可変断片(s c F v)である。

【0028】

「一本鎖可変断片」または「s c F v」とは、抗体の可変重(V H)鎖および可変軽(V L)鎖の融合タンパク質を意味し、V LとV Hとの間にペプチドリンカーを有する。リンカーの長さおよび組成は、使用される抗体部分に依存して変動するが、一般に、約10から約25アミノ酸の間の長さである。いくつかの実施形態において、ペプチドリンカーは、柔軟性を提供するためにグリシンに富む。いくつかの実施形態において、リンカーはまた、理論に束縛されないが、溶解度に役立ち得るセリンおよび/またはトレオニンを含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、配列番号23を有するアミノ酸である。S c F vは、免疫グロブリン重鎖を有さないにも関わらず、可変鎖が由来した親抗体の抗原結合特異性を保持するように設計される。いくつかの実施形態において、V HおよびV Lからの相補性決定領域(C D R)のみが、s c F Vにおいて使用される。いくつかの実施形態において、V LおよびV H鎖全体が使用される。

【0029】

「抗体」という用語は、本明細書において使用される場合、抗原に特異的に結合する免疫グロブリン分子を指す。抗体は、天然源または組み換え源に由来する無傷免疫グロブリンであってもよく、また無傷免疫グロブリンの免疫反応性部分であってもよい。本発明における抗体は、例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、F v、F a bおよびF ( a b )<sub>2</sub>、ならびに一本鎖抗体およびヒト化抗体を含む、様々な形態で存在し得る(Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y.; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426)。本明細書において使用される場合、「抗体」という用語はまた、抗体断片を包含する。

【0030】

「抗体断片」という用語は、無傷抗体の一部を指し、無傷抗体の抗原決定可変領域を指す。抗体断片の例は、これらに限定されないが、F a b、F a b'、F ( a b' )<sub>2</sub>およびF v断片、直鎖抗体、s c F v抗体、ならびに抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

【0031】

「抗体重鎖」は、本明細書において使用される場合、その自然発生的立体構造における全ての抗体分子に存在する2種のポリペプチド鎖の大きい方を指す。

【0032】

「抗体軽鎖」は、本明細書において使用される場合、その自然発生的立体構造における全ての抗体分子に存在する2種のポリペプチド鎖の小さい方を指す。 および 軽鎖は、2つの主要な抗体軽鎖アイソタイプを指す。

【0033】

本明細書において使用される場合、「相補性決定領域」または「C D R」という用語は、特定の抗原を認識しそれに結合する抗体の2つの可変鎖(重鎖および軽鎖)の一部を指す。C D Rは、可変鎖の最も可変の部分であり、抗体にその特異性を提供する。可変重(V H)鎖および可変軽(V L)鎖のそれぞれにおいて3つのC D Rが存在し、したがって、抗体分子当たり合計6つのC D Rが存在する。

【0034】

「K a p p a M a b」とは、以前にI S T - 1 0 9 7またはM D X - 1 0 9 7と呼ばれ

10

20

30

40

50

ていたモノクローナル抗体を意味する。さらに、本明細書において使用される場合、KappaMa bは、KappaMa b抗体の完全抗体配列を指してもよい（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第7,344,715号および米国特許第7,556,803号を参照されたい）。さらに、「KappaMa b」という用語は、本明細書において使用される場合、配列番号3～8のCDR配列、および/または配列番号2のVL配列、および配列番号1のVH配列を含有する任意のポリペプチドを包含するように使用される。「KappaMa b」という用語は、本明細書において使用される場合、配列番号21のVL配列および配列番号22のVH配列を含有する任意のポリペプチドを包含し得る。本発明の組成物および方法において、KappaMa bは、完全モノクローナル抗体、またはFabおよびscFvを含むその任意の抗原結合断片を含んでもよい。

10

#### 【0035】

「抗原」または「Ag」という用語は、本明細書において使用される場合、免疫細胞受容体（例えば、T細胞受容体、B細胞受容体/免疫グロブリン）により認識される分子として定義される。いくつかの実施形態において、抗原は、免疫反応を惹起する分子である。この免疫反応は、抗体生成、あるいは特定の免疫適格細胞の活性化、細胞毒性メディエーター、または免疫刺激もしくは制御性サイトカインの放出のいずれかを含み得る。当業者には、事実上全てのタンパク質またはペプチドを含む任意の巨大分子が、抗原として機能し得ることが理解される。

#### 【0036】

本明細書において使用される場合、「特異的に結合する」または「特異的に認識する」という用語は、抗体、抗体断片またはCARに関連して使用される際には、特定の抗原を認識するが試料中の他の分子を実質的に認識しない、またはそれに結合しない抗体、抗体断片またはCARを指す。

20

#### 【0037】

「リボソームスキップ」とは、特定のペプチドが、細胞のリボソームが新たに挿入されたアミノ酸を共有結合的に連結するのを防止し、その代わりに翻訳を継続させ、したがってポリタンパク質の共翻訳開裂をもたらす、代替の翻訳メカニズムを意味する。このプロセスは、「2Aリボソームスキップ」要素またはシス作用加水分解酵素要素（例えばCHYSEL配列）により誘導される。いくつかの実施形態において、この配列は、強いアルファ螺旋傾向を有する非保存アミノ酸配列に続いてコンセンサス配列-D(V/I)EXNPGP（式中、x=任意のアミノ酸である）を含む。GとPとの間で明らかな開裂が生じる。いくつかの実施形態において、リボソームスキップ要素は、2Aリボソームスキップ要素である。2Aリボソームスキップ要素は、5'T2Aリボソームスキップ要素であってもよい。

30

#### 【0038】

本明細書において使用される場合、「免疫調節薬」または「IMiD」は、サリドマイドおよびその類似体を構成する薬物のクラスである。サリドマイド類似体は、レナリドミド、ボマリドミドおよびアプレミラストを含む。

#### 【0039】

本明細書において使用される場合、「ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬」または「HDAC阻害薬」または「HDI」は、ヒストン脱アセチル化酵素の機能に干渉する化合物のクラスを指す。HDIの例は、これらに限定されないが、例えばトリコスタチンA、ポリノスタット(SAHA)、ペリノスタット(PXD101)、LAQ824、パノピノスタット(LBH589)を含むヒロキサム酸(hydroxamic acid)；例えばデブシペプチドおよびタポキシン(tapoxin)Bを含む環状トリペプチド；例えばエンチノスタット(MS-275)、CI994およびモセチノスタット(MGCD0103)を含むベンズアミド；求電子性ケトン；ならびに例えばフェニルブチレートおよびバルプロ酸等の脂肪酸化合物を含む。

40

#### 【0040】

50

## カップ骨髓腫抗原および抗体

カップ骨髓腫抗原またはKMAは、骨髓腫細胞の表面上に見られる細胞膜抗原である。具体的には、KMAは、細胞膜上のアクチンと非共有結合的に関連した遊離カップ軽鎖からなる(Goodnow et al. (1985) J. Immunol. 135: 1276)。KMAに特異的に結合する任意の抗体が、本明細書に従って使用され得るが、好ましい実施形態において、Kappa Mabモノクローナル抗体は、本発明のCARの細胞外抗原結合ドメインの基礎として使用される。Kappa Mabとして指定される(以前はIST-1097として指定されていた、MDX-1097としても知られる)モノクローナル抗体は、カップ鎖が重鎖に関連していない、したがって無傷カップ鎖含有IgG、IgM、IgEまたはIgAに結合していない場合にのみ利用可能である、ヒトカップ遊離軽鎖のスイッチ領域における立体構造エピトープに結合する(Hutchinson et al. (2011) Mol. Immunol.)。患者の骨髓生検に由来する原発性骨髓腫細胞上のKMAの典型的な発現は、図3においてKappa Mab結合により示されている。Kappa Mab抗体は、配列番号1のVH鎖および配列番号2のVL鎖を含み得る。より具体的には、Kappa Mab VH鎖は、配列番号3~5のCDR、および配列番号6~8のVL CDRを含み得る。さらに、Kappa Mabは、配列番号22のVH領域および配列番号21のVL領域を含み得る。

### 【0041】

## キメラ抗原受容体

キメラ抗原受容体(CAR)は、一連のリンカー(複数可)およびスペーサー(複数可)により互いに保持された、モノクローナル抗体の腫瘍抗原結合領域、および単一ポリペプチド鎖におけるT細胞受容体複合体の細胞内活性化部分からなる、人工的受容体である(図1A~1B)。最も一般的には、CARは、CD3 膜貫通ドメインに融合した一本鎖可変断片(ScFv)の融合タンパク質である。しかしながら、CD28、41-BBおよびOx40等の他の細胞内シグナル伝達ドメインが、様々な組み合わせで使用され、所望の細胞内シグナルを生じてよい。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるCARは、Ig重鎖リーダーペプチドを含む。リーダーペプチドは、配列番号20であってもよい。

### 【0042】

## I. 細胞外抗原結合ドメイン

一実施形態において、本発明のCARは、MM細胞上に発現した1つ以上のKMAエピトープに特異的であるモノクローナル抗体からの細胞外抗原結合ドメインを含む。一実施形態において、本発明のCARは、Kappa Mabからの細胞外抗原結合ドメインを含む。一実施形態において、細胞外結合ドメインは、配列番号6~8のVL CDRおよび配列番号3~5のVH CDRを含む。具体的実施形態において、細胞外結合ドメインは、Kappa MabのVL(配列番号2)ドメインおよびVH(配列番号1)ドメインを含むscFvである。別の実施形態において、細胞外結合ドメインは、Kappa MabのVL(配列番号21)ドメインおよびVH(配列番号22)ドメインを含むscFvである。

### 【0043】

## II. Kappa Mab scFvのVLドメインとVHドメインとの間のリンカー

さらなる実施形態において、Kappa Mab VLは、柔軟性リンカーを介してKappa Mab VHに連結している。具体的には、柔軟性リンカーは、約10~30アミノ酸(例えば、30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、または5アミノ酸)のグリシン/セリンリンカーであり、構造(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>を含む。具体的実施形態において、リンカーは、15アミノ酸の長さである。リンカーの長さは、CARの重要な決定因子である。理論に束縛されないが、より短いリンカーは、親和性を向上させ得るが、同時に細胞内多量体形成をもたらす、したがってCARの発現を低下させ得、一方、より長いリンカーは、VLおよびVH CDRを空間的により遠くに移動させることにより、抗原親和性を減少させる傾向を有す

10

20

30

40

50

る。

#### 【 0 0 4 4 】

Ⅲ．細胞外抗原結合ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインとの間のスペーサー

細胞外抗原結合ドメイン（例えばKappaMab scFv）は、「スペーサー」の使用により、細胞内シグナル伝達ドメインに連結している。スペーサーは、抗原認識および結合を促進するような様式での抗原結合ドメインの配向を可能にするのに十分に柔軟となるように設計される。スペーサーは、免疫グロブリン自体に由来してもよく、またIgG1ヒンジ領域、またはIgGのCH2および/もしくはCH3領域を含み得る。代替として、ヒンジは、CD8 鎖の全てまたは一部を含んでもよい。スペーサー（複数可）の長さおよび柔軟性は、抗原認識ドメインおよび細胞内結合領域の両方に依存し、1つのCARコンストラクトに対して機能的および/または最適となり得るものは、別のCARに対してはそうではない可能性がある。ある特定の場合において、最適なスペーサーの識別および長さが、使用される細胞外結合部分および選択される細胞内シグナル伝達ドメインに依存して変動することを示すために、スペーサーは、本明細書において「opti」として指定され得る（例えば図6A～6C）。ある特定の実施形態において、IgGヒンジのみが使用される。他の実施形態において、IgGヒンジは、IgG CH2ドメインの全てまたは一部と共に使用される。他の実施形態において、IgGヒンジは、IgG CH3ドメインの全てまたは一部と共に使用される。他の実施形態において、IgGヒンジは、IgG CH2およびCH3ドメインの両方の全てまたは一部と共に使用される。他の実施形態において、IgG CH2ドメインの全てまたは一部が使用される。他の実施形態において、IgG CH3ドメインの全てまたは一部が使用される。さらに他の実施形態において、IgG CH2およびCH3ドメインの両方の全てまたは一部が使用される。一実施形態において、本明細書で提供されるコンストラクトのいずれかにおいて使用されるヒンジ、CH2およびCH3ドメインは、UniProt P01857のアミノ酸位置103におけるヒンジ領域でのCからPの突然変異を含む。一実施形態において、本明細書で提供されるコンストラクトのいずれかにおいて使用されるヒンジ、CH2およびCH3ドメインは、配列番号24である。別の実施形態において、ヒンジは、IgG CH2およびCH3ドメインの両方の全てまたは一部と共に使用され、Fc受容体とのCH2相互作用に重要なアミノ酸において突然変異が導入される。これらの突然変異は、本明細書で提供されるCAR T細胞とのFc相互作用を減少させることにより、改善された注入後生存率を媒介し得る。これらの突然変異の例は、本明細書で提供されるような実施例3において示されるKM-CAR\_hCH2CH3mut\_28TM\_41BBzコンストラクトにおいて確認され得る。さらなる実施形態において、CD8 ポリペプチドが使用される。さらなる実施形態において、スペーサー（例えば、本明細書に記載のような免疫グロブリンドメインに由来する）は、柔軟性リンカーを介してscFVに結合してもよい。具体的には、柔軟性リンカーは、約10～30アミノ酸（例えば、30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、または5アミノ酸）のグリシン/セリンリンカーであり、構造(Gly4Ser)<sub>x</sub>（式中、Xは、1～5である）を含む。他の実施形態において、グリシン/セリンリンカーは、(Gly4Ser)<sub>3</sub>を含む。

#### 【 0 0 4 5 】

Ⅳ．細胞内シグナル伝達ドメイン

細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3 鎖の全てまたは一部を含む。CD247としても知られるCD3 は、CD4またはCD8 T細胞共受容体のいずれかと共に、細胞外抗原認識を細胞内シグナル伝達カスケードに連結することを担う。一実施形態において、本明細書で提供されるコンストラクトのいずれかにおいて使用されるCD3 は、配列番号26である。

#### 【 0 0 4 6 】

CD3 シグナル伝達ドメインを含むことに加えて、共刺激分子の含有は、マウスモデルおよび臨床試験におけるCAR T細胞活性を向上させることが示されている。CD2



8、4-1BB、ICOS、CD27、CD270、CD30およびOX-40を含むいくつかの調査されている。本発明のCARは、KappaMab scFv、柔軟性リンカー、最適ヒンジおよびCD3鎖を含むことに加えて、例えばCD28、4-1BB、ICOS、CD27、CD270、CD30および/またはOX-40からの1つ以上の追加の共刺激ドメインも含む。これらの共刺激ドメインは、得られるCAR T細胞の所望の機能性に基づいて選択される。例示的な組み合わせが、例えば図6A~6Cに示されている。細胞外ヒンジの長さを変更することに加えて、共刺激ドメイン（例えば、CD28、OX-40、4-1BB）の特定の組み合わせの含有もまた、CAR T細胞の*in vivo*での増殖および生存を向上させる。一実施形態において、本明細書で提供されるコンストラクトのいずれかにおいて使用されるCD28ドメインは、配列番号25である。  
【0047】

10

#### 生物学的に活性な分子の同時発現

本発明のCAR T細胞は、KappaMab単独の使用と比較して、組成物の抗腫瘍機能および/または安全性を向上させるために追加の生物学的に活性な分子を含有するようにさらに改変可能である追加的利益を有する。一実施形態において、CAR T細胞は、全身毒性を回避しながら腫瘍微小環境/がん細胞への集中的な送達を可能にする、抗腫瘍サイトカインを生成するようにさらに遺伝子改変され得る。本発明のCAR T細胞の抗腫瘍反応を向上させ得る追加の生物学的に活性な分子の例は、これらに限定されないが、IL-12、炭水化物結合タンパク質ガレクチン-3 (GAL3) またはその切断形態GAL3C、およびサイトカイン受容体超拮抗薬SANT7を含む。別の実施形態において、本発明のCAR T細胞はまた、肝細胞成長因子(HGF)結合タンパク質を発現するプラスミドと同時形質導入されてもよい。一実施形態において肝細胞成長因子タンパク質は、HGFに結合してその機能を阻害し得る抗体またはその断片である。

20

#### 【0048】

IL-12は、腫瘍成長および血管形成を減少させ、腫瘍特異的免疫反応を向上させる、強力な腫瘍抑制サイトカインである。多発性骨髄腫細胞は、IL-12受容体の発現を維持し、骨髄腫保持マウスへのIL-12の投与は、単剤として腫瘍進行を減少させ、プロテアソーム阻害薬ボルテゾミブと相乗的に作用する(Airol di, et al. (2008) Blood, 112(3): 750-759、Wang, et al. (2014) Anticancer Drugs, 25(3): 282-288)。CAR T細胞によるIL-12の発現は、固形腫瘍を根絶するその能力を劇的に向上させるが、このアプローチは、多発性骨髄腫においてはまだ調査されていない(Pegram, (2012) Blood, 119(180): 4133-4141およびZhang, et al. (2011) Mol. Ther. 19(4): 751-759)。

30

#### 【0049】

SANT7は、サイトカイン受容体超拮抗薬である。これは、IL-6受容体サブユニットへの結合を70倍向上させるように遺伝子改変されたIL-6の類似体であり、gp130シグナル伝達サブユニットとの相互作用は事実上ない。SANT7は、*in vitro*でIL-6依存性骨髄腫細胞株におけるアポトーシスを誘導し、*in vitro*およびマウスモデルにおいてデキサメタゾンに対する間質媒介耐性を克服し、NF- $\kappa$ B阻害薬と組み合わせてアポトーシスに対する耐性を完全に克服する。IL-6は、多発性骨髄腫、肺がん、結腸直腸がん、乳がんおよびその他を含む様々な腫瘍の成長および生存において役割を担うサイトカインである。IL-6のその受容体への結合は、JAK-STAT経路を活性化し、その後、アポトーシスに対する耐性をもたらす、BCL-XLおよびp53等のアポトーシス関連遺伝子の発現を調節するSTAT3のリン酸化を伴う。IL-6はまた、骨髄腫細胞上でのIL-12受容体の下方制御を促進し、IL-12の腫瘍抑制特性を減少させる(Airol di, et al. (2008) Blood, 112(3): 750-759)。IL-6受容体は、骨髄腫において上方制御され、IL-6の上昇した全身レベルは、不良な予後に相関している(Rawstron, et al. (2000) Blood 96(12): 3880-3886、Ludwig, et

40

50

a l . ( 1 9 9 1 ) B l o o d , 7 7 ( 1 2 ) : 2 7 9 4 - 2 7 9 5 ) 。 I L - 6 に対するモノクローナル抗体が、臨床的使用に開発されているが、骨髄腫における初期の臨床試験は測定可能な生物学的効果を示したものの、抗体は、循環 I L - 6 と複合体を形成し、クリアランスの低減およびその効用の潜在的な制限をもたらすと思われる ( B a t a i l l e , e t a l . ( 1 9 9 5 ) B l o o d , 8 6 ( 2 ) : 6 8 5 - 6 9 1 ) 。最近、キメラ I L - 6 特異的モノクローナル抗体シルツキシマブが、再発性および難治性多発性骨髄腫における第 I 相および第 I I 相臨床試験において評価された。シルツキシマブ単独に対する反応はなかったが、治療関連感染症を経験した過半数において血液毒性が共通していた。

#### 【 0 0 5 0 】

ガレクチン - 3 は、腫瘍接着および浸潤において役割を担い得る炭水化物結合タンパク質である。ガレクチン - 3 の切断された形態である G a l 3 C は、ドミナントネガティブ型として機能し、骨髄腫細胞成長および浸潤を阻害し得る。活性化誘導分泌のための G a l 3 C コンストラクトは、J o h n e t a l ( 2 0 0 3 ) C l i n C a n c e r R e s . , 9 ( 6 ) : 2 3 7 4 - 8 3 および M i r a n d o l a e t a l . ( 2 0 1 1 ) P L o S O n e , 6 ( 7 ) : e 2 1 8 1 1 に基づいて設計された。これは、その炭水化物結合特性を保持するが、リガンド架橋に必要な N 末端アミノ酸を有さない 1 4 3 アミノ酸カルボキシ末端からなる。コンストラクトはまた、分泌を誘導するための C D 8 - アルファリーダーペプチド、および検出のための 6 x H i s タグを含有する。

#### 【 0 0 5 1 】

ある特定の実施形態において、上述の C A R コンストラクトを含有する発現ベクターに加えて、T 細胞は、I L - 1 2、S A N T 7 および / または G A L 3 C を含む 1 つ以上の発現ベクターでさらに改変される。具体的には、I L - 1 2 p 4 0 サブユニットに連結した I L - 1 2 p 3 5 サブユニットを含む一本鎖 I L - 1 2 を発現する発現コンストラクトは、得られるタンパク質が完全に生物活性である I L - 1 2 p 7 0 ヘテロ二量体であるという点で特に有用であるが、単鎖ポリペプチドとして発現される。一実施形態において、F l e x i - 1 2 と呼ばれる一本鎖 I L - 1 2 コンストラクトは、例えば A n d e r s o n , e t a l . ( 1 9 9 7 ) H u m . G e n e T h e r . 8 ( 9 ) : 1 1 2 5 - 3 5 において説明され、使用される。I L - 1 2 一本鎖コンストラクトは、C A R コンストラクトと同じ発現ベクターにおいて発現されてもよく、または、別個の発現ベクターにおいて発現され、T 細胞内に同時形質導入されてもよい。同様に、上述の C A R コンストラクトで形質導入された T 細胞は、S A N T 7 および / または G A L 3 C を含む追加の発現ベクターで同時形質導入されてもよく、代替として、1 つの発現ベクターを使用して、S A N T 7 および G A L 3 C の単独または組み合わせ、ならびに上述の C A R コンストラクトの両方で T 細胞が形質導入されてもよい。別の実施形態において、1 つは C A R コンストラクトを発現し、1 つは一本鎖 I L - 1 2 コンストラクトを発現し、1 つは S A N T 7 コンストラクトを発現する 3 つの発現ベクターが使用されてもよい。同様の戦略を使用して、G A L 3 C を I L - 1 2 および / または S A N T 7 と同時発現させてもよい。代替として、I L - 1 2、G A L 3 C および / または S A N T 7 コンストラクトは、単一の発現ベクターを介して発現されてもよく、一方 C A R コンストラクトは、それ自身の発現ベクターにより発現される。当業者には、同じ T 細胞におけるこれらの分子の発現の異なる組み合わせおよび可能性が理解される。

#### 【 0 0 5 2 】

##### H G F 結合タンパク質

肝細胞成長因子 ( H G F ) およびその受容体である M E T は、がんの発生および進行、特に腫瘍浸潤および転移性疾患への進行に関与している。多発性骨髄腫は、H G F および M E T の両方を発現し、したがって自己分泌および傍分泌ループの両方を形成する一方で、正常な形質細胞は H G F を発現しない ( Z h a n e t a l . ( 2 0 0 2 )、B o r s e t , e t a l . ( 1 9 9 6 ) ) 。さらに、H G F 濃度は、多発性骨髄腫に罹患した血漿患者の血液および骨髄中で著しく増加し、血清 H G F レベルは、進行期の疾患および広範

10

20

30

40

50

図の骨病変に相関する (Seidel et al. (1998)、Wader, et al. (2008)、Alexandrakis, et al. (2003))。さらに、Kappa Mab による第 1 相臨床試験における患者の血清バイオマーカー分析では、対照と比較して、Kappa Mab による処置後の血清 HGF における統計的に有意な用量関連減少が示されている。血清 HGF におけるこの低減を向上させるために、ある特定の実施形態において、HGF 結合タンパク質が、本発明の CAR T 細胞において発現される。具体的実施形態において、発現される HGF 結合タンパク質は、抗体またはその断片である。具体的実施形態において、抗 HGF 結合タンパク質は、抗体、ジアボディ、scFv または Fab である。一実施形態において、HGF 結合タンパク質は、CAR コンストラクトと同じ発現ベクターにおいて発現される。さらなる実施形態において、HGF 結合タンパク質は、別個の発現ベクターにおいて発現されるが、CAR コンストラクトと同時形質導入される。さらなる実施形態において、CAR-T 細胞は、CAR、HGF 結合タンパク質および IL-12 を発現する。さらなる実施形態において、CAR-T 細胞は、CAR、HGF 結合タンパク質および S ANT 7 を発現する。さらなる実施形態において、CAR-T 細胞は、CAR、HGF 結合タンパク質および GAL 3 C を発現する。さらなる実施形態において、CAR-T 細胞は、CAR、HGF 結合タンパク質および IL-12 および GAL 3 C を発現する。さらなる実施形態において、CAR-T 細胞は、CAR、HGF 結合タンパク質および S ANT 7 および GAL 3 C を発現する。さらに別の実施形態において、CAR-T 細胞は、CAR、抗 HGF 結合タンパク質、IL-12 および S ANT 7 を発現する。さらなる実施形態において、CAR-T 細胞は、CAR、HGF 結合タンパク質、IL-12、S ANT 7 および GAL 3 C を発現する。

#### 【0053】

本発明の CAR T 細胞を生成する方法

一態様において、本明細書に記載の CAR (複数可)、ならびに任意選択で 1 つ以上の抗腫瘍サイトカイン (例えば IL-12 および / もしくは S ANT 7)、ならびに / または 1 つ以上の HGF 結合タンパク質を発現する CAR T 細胞を生成するための方法が提供される。本発明の CAR および抗腫瘍サイトカイン / 抗体を含有する発現ベクターを構築する好ましい方法が本明細書に記載されるが、これらの構成成分を発現するために T 細胞を形質導入することができる任意の方法が使用され得ることが、当業者に容易に理解される。

#### 【0054】

一実施形態において、T 細胞は、静脈穿刺、骨髓の吸引、定常状態の白血球除去輸血またはサイトカイン刺激白血球除去輸血、およびその後の密度勾配分離を使用した T 細胞を含む末梢血単核細胞の単離により、対象の血液から得られる。ある特定の実施形態において、赤血球の溶解後、T 細胞は、フローサイトメトリーにより分類され、または T 細胞および磁性ビーズ上に発現された抗原に対する抗体を使用して精製され、純粋な T 細胞の集団が得られる。具体的実施形態において、T 細胞は、その CD 3 の発現に基づいて分類され、完全 T 細胞分画が得られる。別の実施形態において、T 細胞は、その CD 4 または CD 8 の発現に基づいて分類され、CD 4<sup>+</sup> T 細胞または CD 8<sup>+</sup> T 細胞の集団が得られる。具体的実施形態において、T 細胞は、CAR T 細胞治療を必要とする対象から得られる。別の実施形態において、T 細胞は、CAR T 細胞治療の意図される受容者ではないドナー対象から得られる。

#### 【0055】

一実施形態において、分離された T 細胞は、その生存に好適な条件下で *in vivo* で培養され、本明細書に記載の CAR ならびに / または IL-12、S ANT 7、GAL 3 C および / もしくは HGF 結合タンパク質の発現に必要な配列を含有する発現ベクターで形質導入される。一実施形態において、発現ベクターは、転位ベクター発現系である。具体的実施形態において、発現ベクターは、Piggy Back トランスポゾン発現プラスミドまたはウイルスベクター (例えば、レトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクター) である。一実施形態において、例えば本明細書で提供される実施例に記載の P i

g g y B a c トランスポゾンプラスミド等の P i g g y B a c トランスポゾンプラスミドが誘導可能である。一実施形態において、P i g g y B a c トランスポゾン発現プラスミドは、構成的に活性なプロモーターおよび/または活性化誘導性プロモーターを含む。構成的に活性なプロモーターは、延長因子 - 1 アルファ ( E F 1 アルファ ) プロモーターであってもよい。活性化誘導性プロモーターは、( N F A T p r o ) プロモーターであってもよい。一実施形態において、P i g g y B a c 発現プラスミドが使用され、C A R、I L - 1 2、S A N T - 7、G A L 3 C および/または H G F 結合タンパク質をコードする配列を切断して T 細胞のゲノム内にペーストすることにより、C A R の永久的統合を生成する。具体的実施形態において、本発明の発現ベクターは、1 つ以上の発現ベクターで成功裏に形質導入された T 細胞の識別を可能にする、検出可能マーカーをさらに含む。一実施形態において、検出可能マーカーは、C D 3 4 または C D 2 0 または別の表面タンパク質等の細胞表面マーカー、フルオレセインイソチオシアネート、または例えばレーザー等によってより高いエネルギー状態に励起された場合に光を放出する任意の他の蛍光染料等のフルオロフォア、およびカナマイシン耐性、アンピシリン耐性、または形質導入された T 細胞が培養される培地中に含有される抗生物質に対する耐性を付与する任意の他のカセット等の抗生物質耐性カセットからなる群から選択される。一実施形態において、検出可能マーカーは、緑色蛍光タンパク質 ( G F P ) である。G F P は、向上した G F P、例えば本明細書で提供される実施例において示されるコンストラクト等であってもよい。具体的実施形態において、使用される各発現ベクター (例えば、1 つの発現ベクターは C A R を含み、1 つは I L - 1 2、G A L 3 C および/または S A N T - 7 を含み、1 つは H G F 結合タンパク質を含む) は、固有の検出可能マーカーを含む。一実施形態において、発現ベクターは、選択された発現ベクター (複数可) に好適な方法により、T 細胞内に形質導入される。一実施形態において、P i g g y B a c 発現ベクターは、エレクトロポレーションにより T 細胞内に形質導入される。

10

20

#### 【 0 0 5 6 】

適切な発現ベクターの導入後、T 細胞は、自己末梢血単核細胞 ( P B M C ) および適切な成長因子との共培養により i n v i t r o で培養および増加され、さらに 1 つ以上の検出可能マーカーの存在に関してさらにスクリーニングされてもよい。選択された発現ベクターの適切な検出可能マーカーを発現する細胞は、次いで、本発明の方法における使用のために分類および精製されてもよい。

30

#### 【 0 0 5 7 】

##### K M A 発現悪性腫瘍を処置する方法

一態様において、本明細書で提供される C A R T 細胞により、それを必要とする対象を処置するための方法が提供される。具体的態様において、それを必要とする対象は、K M A を発現する悪性腫瘍、例えば K M A を発現する B 細胞悪性腫瘍を有すると診断された、またはそれを有することが疑われるヒト対象である。ある特定の実施形態において、患者は、多発性骨髄腫 ( M M )、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 ( D L B C L )、またはアミロイドーシスを有する、または有することが疑われる。K M A を発現する B 細胞悪性腫瘍、例えば、多発性骨髄腫 ( M M )、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 ( D L B C L )、およびアミロイドーシスを診断するための方法は、当技術分野において知られており、したがって本明細書において詳細には説明されない。C A R T 細胞は、単独で、または多発性骨髄腫 ( M M )、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 ( D L B C L )、アミロイドーシスもしくは K M A を発現する別の B 細胞悪性腫瘍の処置のための他の治療有効薬剤と組み合わせて使用され得る。ある特定の態様において、本発明の C A R T 細胞は、静脈内送達に好適な医薬製剤として投与される。

40

#### 【 0 0 5 8 】

ある特定の態様において、本発明の C A R T 細胞は、1 つ以上の免疫調節薬の前、その間またはその後に投与される。具体的態様において、1 つ以上の免疫調節薬は、サリド

50

マイドまたはサリドマイド類似体、例えばレノリドミド (lenolidomide) またはポマリドミド等である。

【0059】

本発明のある特定の態様において、本発明のCAR T細胞は、1つ以上の免疫調節薬と共に投与された場合、相乗的に作用する。

【0060】

さらなる実施形態において、本発明のCAR T細胞は、パノピノスタット、ボリノスタット、トリコスタチンA、デブシペプチド、フェニル酪酸、バルプロ酸、ベリノスタット、LAQ824、エンチノスタット、CI944またはモセチノスタット等の1つ以上のヒストン脱アセチル化酵素阻害薬による処置の前、その間、またはその後に投与される。

10

【0061】

本発明のある特定の態様において、本発明のCAR T細胞は、1つ以上のヒストン脱アセチル化酵素阻害薬と組み合わせて投与された場合、相乗的に作用する。

【0062】

本発明のある特定の態様において、本発明のCAR T細胞は、中間または高用量の化学療法剤と組み合わせて投与された場合、および自己または同種ヒト血液幹細胞の投与後に、相乗的に作用する。

【0063】

一実施形態において、本発明のCAR T細胞は、同種幹細胞移植の前、その間またはその後に投与される。さらに別の実施形態において、本発明のCAR T細胞は、同種幹細胞移植の前、その間またはその後に投与される。理論に束縛されないが、本発明のCAR T細胞は、自己または同種異系幹細胞移植と組み合わせて投与された場合、幹細胞移植前の骨髄の不完全なアブレーションにより、またはKMAを発現する悪性B細胞クローンの再発により生じ得る最小限の残存疾患の出現を防止する。

20

【0064】

本明細書において引用される全ての特許、特許出願および出版物は、参照により全ての目的においてその全体が本明細書に明示的に組み込まれる。

【実施例】

【0065】

本発明は、以下の実験的实施例を参照して、より詳細に説明される。これらの実施例は、例示のみを目的として提供され、別段に指定されない限り、限定を意図しない。したがって、本発明は、決して以下の実施例に限定されるものとして解釈されるべきではなく、むしろ、本明細書で提供される教示の結果明らかとなるありとあらゆる変形例を包含するように解釈されるべきである。

30

【0066】

さらに説明することなく、当業者は、上記の説明および以下の実施例を使用して、本発明の化合物を作製および利用し、請求される方法を実践することができると考えられる。したがって、以下の実例は、本発明の好ましい実施形態を具体的に指摘するものであり、決して本開示の残りの部分を限定するものとして解釈されるべきではない。

【0067】

40

実施例1：KMA・CAR-28zの生成

KappaMabの可変領域をコードするヌクレオチド配列（配列番号9および10）に基づいて、scFvを設計し、免疫グロブリン重鎖ヒンジ、CD28共刺激ドメインおよびCD3-ゼータエンドドメインを含有するCARコンストラクト内にクローニングした（図6A）。コンストラクトは、Haemalogix Pty Ltd.により提供された抗体可変領域の遺伝子配列を使用して、Clone Manager 9 (Sci-Ed Software)において設計した。このコンストラクト（すなわちKM・CAR-hCH2CH3-28z、図6A）の一部の5'から3'のアミノ酸配列は、以下の通りである。

【0068】

50

I g 重鎖リーダーペプチド (Uniprot P01764) は、MEFGLSWLF  
LVAILKGVQCSR (配列番号20) である。

【0069】

KappaMa b 抗体軽鎖可変領域は、DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSV  
TCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALITYSTSYRYSQVPPDR  
FTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPYTFGGG  
TKLEIK (配列番号21) である。

【0070】

重鎖可変領域は、EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKD  
TYMHWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQGKATII  
ADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCARGVYHDYDGDYWGQ  
GTTTLTVSSYVTVSS (配列番号22) である。

10

【0071】

(G4S)<sub>3</sub> 柔軟性リンカーは、GGGGSGGGGSGGGGS (配列番号23) である。

【0072】

アミノ酸位置103におけるヒンジ領域でのC>P突然変異を有するIgG1定常領域  
(Uniprot P01857) のヒンジ、CH2およびCH3ドメインは、YVTV  
SSQDPAEPKSPDKTHTCPPELPGPSVFLFPPKPKD  
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT  
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP  
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV  
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSGFFLYSK  
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKKD  
PK (配列番号24) である。

20

【0073】

CD28 (Uniprot P10747) の膜貫通および細胞内ドメインは、FWV  
LVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMT  
PRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (配列番号25) である。

【0074】

30

ヒトCD3ゼータ (Uniprot P20693) の細胞内ドメインは、RVKFS  
RSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP  
EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG  
HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (配列番号26) である。

【0075】

全長アミノ酸配列は、以下の通りである。

40

## 【化 1】

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRDIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVA  
WYQQKPGQSPKALIYSTSYRYSGVPDRFTGSGSGTDFLTISNVQSEDLAEYFCQQY  
NSYPYTFGGGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTAS  
GFNIKDTYMHWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQGKATHADTSSNTAYLQ

LSSLTSEDTAVYYCARGVYHDYDGDYWGQGTTLTVSSYVTVSSQDPAEPKSPDKTH  
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG  
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS  
KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT  
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKLSLSPGKKDP  
KFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYYQ  
PYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP  
EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATK  
DTYDALHMQALPPR (配列番号 27)。

10

20

## 【 0 0 7 6 】

このアミノ酸配列 (配列番号 27) は、以下の DNA 配列によりコードされる。

## 【 0 0 7 7 】

30

40

50

## 【化 2 - 1】

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTC  
CAGTGCTCTAGAGACATCGTCATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAG  
TAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATG  
TAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTGATTTACTCGAC  
ATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACA  
GATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCT  
GTCAGCAATATAACAGCTATCCGTACACGTTCCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAA  
TAAAGGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGCGGATCTGAGG  
TGCAGCTGCAGCAGTCAGGGGCGGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCAAGT  
TGTCTGTACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGTGAA  
GCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAATGG  
TAACACTAAATATGACCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAATAGCAGACAC  
ATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCC  
GTCTATTACTGTGCTAGGGGGGTCTACCATGATTACGACGGGGACTACTGGGGCC  
AAGGGACCACGCTCACCGTCTCCTCCTACGTCACCGTCTCTTCACAGGATCCCGC  
CGAGCCCAAATCTCCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGA  
ACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTC  
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA  
GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC  
AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC  
CTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC  
TCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG  
CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACC

10

20

30

40

50



## 【化 2 - 2】

AAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC  
 GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAACCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCC  
 TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC  
 AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT  
 CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAAAAGAT  
 CCCAAATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGC  
 TAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCT  
 GCACAGTGAATGACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCA  
 TTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCGAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAG  
 TTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTAT  
 AACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGT  
 GGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGG  
 CCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGG  
 GATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCT  
 CAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCT  
 CGC (配列番号 28)。

10

20

## 【0078】

このコンストラクトの構築に関して、5' EcoRI 制限酵素部位、5' Kozak 配列、リーダーペプチド、一本鎖可変断片および AleI 制限酵素部位を組み込んだ IgG1 定常領域の一部からなる遺伝子配列を、GeneArt (ThermoFisher Scientific) により合成し、配列を検証し、次いで pIRII-CAR-CD19-28z PiggyBac トランスポゾン発現プラスミド内にクローニングした。次いでこれを、安定な統合を媒介するための PiggyBac トランスポザゼプラスミドとの共エレクトロポレーションにより、2つの正常ドナーからのドナーT細胞内に導入した。PiggyBac トランスポゾン/トランスポザゼ系は、対象となる遺伝子を切断し、標的細胞ゲノム内にペーストすることにより、CARの永久的統合を生成する。PiggyBac 発現系は、レトロウイルスベクターのコストの断片での高レベルの永久的遺伝子改変を生成することができるため、選択された。しかしながら、レトロウイルスベクターを含む他の発現系もまた本発明に従って使用され得ることが、当業者に理解される。

30

## 【0079】

KM-CAR-hCH2CH3-28z 発現T細胞を、10 ng/ml のインターロイキン-15 (IL-15) を添加した自己末梢血単核 (PBMC) フィーダー細胞との共培養により、我々の最適化されたプロトコルに従って増加させた。毎週 PBMC を交換し、IL-15 を週に 2~3 回補充して 3 週間培養した後、T細胞を回収し、表現型および CAR 発現に関してフローサイトメトリーにより、KMA 特異的機能に関して KMA+ および KMA- 細胞株での刺激後のインターフェロンガンマ細胞内サイトカインフローサイトメトリーにより (図 4A)、ならびに同じ細胞株の細胞毒性に関してクロム放出アッセイにおいて評価した。

40

## 【0080】

3 週間の終わりににおいて、培養物は主に CAR 発現 CD3+ T細胞であり (生存細胞の 55% および 70%)、KMA+ 骨髄腫および B細胞株に反応してインターフェロンガンマを発現し (図 4B)、KMA 特異的細胞毒性を示した (図 4C)。

## 【0081】

50

実施例 2：ヒト骨髓腫異種移植片マウスモデルの確立。

多発性骨髓腫のマウスへのヒト骨髓腫の異種移植モデルを確立した。RPMI 8226 または代替の骨髓腫細胞株を、Rag2-/-c-/- (BALB/c) マウスに静脈内接種し、Rag MMモデルを形成した (図 5A ~ 5D)。Rag2-/-c-/- (BALB/c) マウスは、マウスリンパ球 (T、B および NK 細胞) を有さず、ヒト異種移植試験の受容宿主である。このモデルは、新規抗体と組み合わせてボルテゾミブ等の新規治療薬を試験するために成功裏に使用されている (図 5E)。我々は、KMA-CAR T細胞を試験およびさらに最適化するために、このMMモデルを使用する。

【0082】

実施例 3：最適化された KMA-CAR コンストラクト

10

実施例 1 に記載のコンストラクトに基づいて、可変長スペーサー領域および共刺激エンドドメイン (例えば、CD28 または 4-1BB (CD137-Uniport Q07011)) を有する実施例 1 に記載の KM-scFv を含有する 6 つの CAR コンストラクトを CD3 ゼータエンドドメインと共に構築した (図 2 および図 6B ~ 6D)。スペーサー長を変化させることにより、T 細胞と標的細胞との間の距離が改変され、スペーサーが短いほど、標的細胞溶解を向上させることができた。全てのコンストラクトにおいて、KMA-CAR の安定な T 細胞表面発現を確実にするために、CD28 膜貫通ドメインを使用した。スペーサーとして IgG1 重鎖定常領域の成分が使用された全ての場合において、第 2 の (G4S)<sub>3</sub> 柔軟性リンカーを scFv とスペーサー領域との間に配置した。これらの CAR は、gen script により商業的に合成され、さらなる試験のために、pVAX1PB PiggyBac トランスポゾンプラスミド内にクローニングされた。

20

【0083】

6 つの KM-CAR コンストラクトのうちの 3 つは、CD28 共刺激エンドドメインを含有しており、以下の通りであった。

【0084】

この群の第 1 のコンストラクトは、KM-CAR<sub>hCH3</sub>28z コンストラクトであったが、これは、スペーサーとして IgG1 重鎖定常領域のヒンジおよび CH3 ドメインのみを含有し、その核酸配列は以下の通りである。

【0085】

30

40

50

## 【化 3 - 1】

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTC  
 CAGTGCTCTAGAGACATCGTCATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATC  
 AGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTAC  
 TAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTGATT  
 TACTCGACATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGT  
 GGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACT  
 TGGCAGAGTATTTCTGTCAGCAATATAACAGCTATCCGTACACGTTCCGAGG  
 GGGGACCAAGCTGGAAATAAAGGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGCG  
 GGTGGCGGCGGATCTGAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGGGCGGAGCTTGTGAAGCC  
 AGGGGCTCAGTCAAGTTGTCCTGTACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATA  
 TGCAGTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATC  
 CTGCGAATGGTAACACTAAATATGACCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAATAGC  
 AGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACT  
 GCCGTCTATTACTGTGCTAGGGGGGTCTACCATGATTACGACGGGGACTACTGGGGC  
 CAAGGGACCACGCTCACCGTCTCCTCCGGTGGAGGCGGGTCTGGGGGCGGAGGTT  
 CAGGCGGGGGTGGTTCCGAGCCCAAATCTCCTGACAAAACCTCACACATGCCC  
 AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGA  
 GCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC  
 CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACATA  
 CAAGACCACGCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGC  
 AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC  
 TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCC  
 CTGTCTCCGGGTAAATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTGGCTTGCT  
 ATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGC  
 AGGCTCCTGCACAGTGAATGAACTGACTCCCCGCCGCCCGGGGCCACCC  
 GCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGA  
 GTGAAGTTACAGAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCT  
 CTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGT  
 GGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCT  
 GTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAA  
 GGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGC

10

20

30

40

## 【化 3 - 2】

CACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (配列番号 2

9)。

## 【0086】

5' から 3' まで、このコンストラクト (配列番号 29) は、リーダーペプチド、KappaMa b 軽鎖可変領域、(G4S)<sub>3</sub> リンカー、KappaMa b 重鎖可変領域、第 2 の (G4S)<sub>3</sub> リンカー、IgG1 ヒンジおよび CH3 定常領域ドメイン、CD28 膜貫

50

通および細胞内ドメイン、ならびに C D 3 ゼータ細胞内ドメインを有する。このコンストラクトの図を、図 6 B に示す。

【 0 0 8 7 】

この群の第 2 のコンストラクトは、K M . C A R \_ h \_ 2 8 z コンストラクトであるが、これは、スペーサーとして I g G 1 重鎖定常領域のヒンジドメインのみを含有し、その核酸配列は以下の通りである。

【 0 0 8 8 】

【 化 4 】

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGGTGTC  
CAGTGCTCTAGAGACATCGTCATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATC  
AGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTAC  
TAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTGATT  
TACTCGACATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGT  
GGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACT  
TGGCAGAGTATTTCTGTCAGCAATATAACAGCTATCCGTACACGTTCCGAGG  
GGGGACCAAGCTGGAAATAAAGGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTCCG  
GGTGGCGGCGGATCTGAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGGGCGGAGCTTGTGAAGCC  
AGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCTGTACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATA  
TGCAGTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATC  
CTGCGAATGGTAACACTAAATATGACCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAATAGC  
AGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACT  
GCCGTCTATTACTGTGCTAGGGGGGTCTACCATGATTACGACGGGGACTACTGGGGC  
CAAGGGACCACGCTCACCGTCTCCTCCGGTGGAGGCGGGTCTGGGGGCGGAGGTT  
CAGGCGGGGGTGGTTCCGAGCCCAAATCTCCTGACAAAACCTCACACATGCCCA  
TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAAC  
AGTGGCCTTTATTATTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTG  
ACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCC  
TATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAG  
CGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCT  
AGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGAT  
GGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAA  
AGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGG  
GCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACG  
ACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (配列番号 3 0)。

【 0 0 8 9 】

5' から 3' まで、このコンストラクト (配列番号 3 0) は、リーダーペプチド、K a p p a M a b 軽鎖可変領域、( G 4 S )<sub>3</sub> リンカー、K a p p a M a b 重鎖可変領域、第 2 の ( G 4 S )<sub>3</sub> リンカー、I g G 1 ヒンジ定常領域ドメイン、C D 2 8 膜貫通および細胞内ドメイン、ならびに C D 3 ゼータ細胞内ドメインを有する。このコンストラクトの図を、図 6 B に示す。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 9 0 】

この群の第3のコンストラクトは、KM・CAR<sub>CD8α</sub>28zコンストラクトであったが、これは、スペーサーとしてCD8アルファストーク(Uniprot P01732、アミノ酸138~182)を含有し、その核酸配列は以下の通りである。

## 【 0 0 9 1 】

## 【 化 5 】

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGG  
 TGTCCAGTGCTCTAGAGACATCGTCATGACCCAGTCTCAAAAATTTCATGTCCA  
 CATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGG 10  
 GTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACT  
 GATTACTCGACATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGC  
 AGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAG  
 ACTTGGCAGAGTATTTCTGTTCAGCAATATAACAGCTATCCGTACACGTTCCG  
 AGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAGGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGG  
 TCGGGTGGCGGCGGATCTGAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGGGCGGAGCTTGTGAA  
 GCCAGGGGCTCAGTCAAGTTGTCTGTACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACACC  
 TATATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATT 20  
 GATCCTGCGAATGGTAACACTAAATATGACCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAA  
 TAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGA  
 CACTGCCGTCTATTACTGTGCTAGGGGGGTCTACCATGATTACGACGGGGACTACTGG  
 GGCCAAGGGACCACGCTACCGTCTCCTCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCA  
CCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAG  
GCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTT  
CGCCTGTGATTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGC  
 TTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCT 30  
 CCTGCACAGTGAATACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAG  
 CATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAA  
 GTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAA  
 CGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCG  
 GGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAA  
 TGAAGTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGA  
 GCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCA 40  
 AGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (配列番号31)。

## 【 0 0 9 2 】

5'から3'まで、このコンストラクト(配列番号31)は、リーダーペプチド、KappaMaab軽鎖可変領域、(G4S)<sub>3</sub>リンカー、KappaMaab重鎖可変領域、CD8アルファストーク、CD28膜貫通および細胞内ドメイン、ならびにCD3ゼータ細胞内ドメインを有する。

## 【 0 0 9 3 】

この実施例に記載の6つのKM・CARコンストラクトのうちの残りの3つは、4-1

B B ( C D 1 3 7 ) 共刺激エンドドメインを含有し、以下の通りであった。

【 0 0 9 4 】

この群の第 1 のコンストラクトは、K M . C A R \_ h \_ 2 8 T M \_ 4 1 B B z であり、これは、スパーサーとして I g G 1 重鎖定常領域のヒンジドメインのみを含有し、C D 2 8 の細胞内ドメインが 4 - 1 B B 共刺激分子の細胞内ドメインで置き換えられており、その核酸配列は以下の通りである。

【 0 0 9 5 】

【 化 6 - 1 】

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGG  
TGTCCAGTGCTCTAGAGACATCGTCATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCA  
CATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGG  
GTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACT  
GATTTACTCGACATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGC  
AGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAG  
ACTTGGCAGAGTATTTCTGTCAGCAATATAACAGCTATCCGTACACGTTCCG  
AGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAGGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGG  
TCGGGTGGCGGCGGATCTGAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGGGCGGAGCTTGTGAA  
GCCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGTACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACACC  
TATATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGAAGGATT  
GATCCTGCGAATGGTAACACTAAATATGACCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAA  
TAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGA  
CACTGCCGTCTATTACTGTGCTAGGGGGGTCTACCATGATTACGACGGGGACTACTGG  
GGCCAAGGGACCACGCTCACCGTCTCCTCCGGTGGAGGGCGGGTCTGGGGGCGGAG  
GTTACAGGCGGGGGTGGTTCCGAGCCCAAATCTCCTGACAAAACCTCACACATGC  
CCATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGT  
AACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATA  
TATTCAAACAACCATTTATGAGACCAAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGT  
AGCTGCCGATTTCAGAAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAG  
CAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCCAGCTCTATAACGAGCT

10

20

30

【 化 6 - 2 】

CAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCC  
TGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACT  
GCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCG  
GAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACAC  
CTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (配列番号 3 2)。

40

【 0 0 9 6 】

5' から 3' まで、このコンストラクト (配列番号 3 2) は、リーダーペプチド、K a p p a M a b 軽鎖可変領域、( G 4 S )<sub>3</sub> リンカー、K a p p a M a b 重鎖可変領域、第 2 の ( G 4 S )<sub>3</sub> リンカー、I g G ヒンジ定常領域ドメイン、C D 2 8 膜貫通ドメイン、4

50

- 1 B B 細胞内ドメイン、および C D 3 ゼータ細胞内ドメインを有する。

【 0 0 9 7 】

この群の第 2 のコンストラクトは、K M . C A R \_ 8 a \_ 2 8 T M \_ 4 1 B B z であり、これは、スパーサーとして C D 8 アルファストーク ( U n i p r o t P 0 1 7 3 2 、アミノ酸 1 3 8 ~ 1 8 2 ) を含有し、C D 2 8 の細胞内ドメインが 4 - 1 B B 共刺激分子の細胞内ドメインで置き換えられており、その核酸配列は以下の通りである。

【 0 0 9 8 】

【 化 7 】

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGG

10

TGTCCAGTGCTCTAGAGACATCGTCATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCA  
CATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGG  
GTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACT  
GATTTACTCGACATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGC  
AGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAG  
ACTTGGCAGAGTATTTCTGTCAGCAATATAACAGCTATCCGTACACGTTCCG  
AGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAGGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGG  
TCGGGTGGCGGCGGATCTGAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGGGCGGAGCTTGTGAA  
GCCAGGGGCGCTCAGTCAAGTTGTCTGTACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACACC  
TATATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATT  
GATCCTGCGAATGGTAACACTAAATATGACCCGAAGTTCAGGGCAAGGCCACTATAA  
TAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGA  
CACTGCCGTCTATTACTGTGCTAGGGGGGTCTACCATGATTACGACGGGGACTACTGG  
GGCCAAGGGACCACGCTCACCGTCTCTCTCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCA  
CCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAG  
GCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTT  
CGCCTGTGATTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGC  
TTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAAACGGGGCAGAAAGAAACT

20

30

CCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAG  
ATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGT  
GAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTA  
TAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGC  
CGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTA  
CAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGC  
GAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCAC  
CAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (配列番号 3 3)。

40

【 0 0 9 9 】

5 ' から 3 ' まで、このコンストラクト ( 配列番号 3 3 ) は、リーダーペプチド、K a p p a M a b 軽鎖可変領域、( G 4 S )<sub>3</sub> リンカー、K a p p a M a b 重鎖可変領域、C D 8 アルファストーク、C D 2 8 膜貫通ドメイン、4 - 1 B B 細胞内ドメイン、および C D

50

3 ゼータ細胞内ドメインを有する。

【 0 1 0 0 】

この群の第3のコンストラクトは、KM . CAR \_ hCH2CH3mut \_ 28 TM \_ 41 BBzであり、これは、スペーサーとしてIgG1重鎖定常領域のヒンジ、CH2およびCH3ドメインを含有し、Fc受容体とのCH2相互作用に重要なアミノ酸において突然変異が導入されており(3~6)、これは、細網内皮系におけるCAR T細胞のクリアランスにより、in-vivoでの低減されたCAR T細胞生存を媒介し得る(3、6、7)。核酸配列は、以下の通りである。

【 0 1 0 1 】

【 化 8 - 1 】

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGGCTATTTTAAAAGG  
TGTCAGTGCTCTAGAGACATCGTCATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCA  
CATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGG  
GTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACT  
GATTTACTCGACATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGC  
AGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAG  
ACTTGGCAGAGTATTTCTGTCAGCAATATAACAGCTATCCGTACACGTTTCGG  
AGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAGGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGG  
TCGGGTGGCGGCGGATCTGAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGGGCGGAGCTTGTGAA  
GCCAGGGGCGCTCAGTCAAGTTGTCCTGTACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACACC  
TATATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATT  
GATCCTGCGAATGGTAACACTAAATATGACCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAA  
TAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGA  
CACTGCCGTCTATTACTGTGCTAGGGGGGTCTACCATGATTACGACGGGGACTACTGG  
GGCCAAGGGACCACGCTACCGTCTCCTCCGGTGGAGGCGGGTCTGGGGGCGGAG  
GTTCAGGCGGGGGTGGTTCCGAGCCCAAATCTCCTGACAAAACCTCACACATGC

10

20

30

40

50



## 【化 8 - 2】

CCACCGTGCCACGACCTCCAGTCGCGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC  
CAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCGGCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCG  
TGGTGGTGAACTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG  
TGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG  
TACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGAC  
TGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA  
GCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA  
CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTC  
AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG  
TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTG  
CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAACAAGA  
GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC  
TGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAATTTTG  
GGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGG  
CCTTTATTATTTTCTGGGTGAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAA  
CAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCG  
ATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCG  
CAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAG  
GACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCCTGAGATGG  
GGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAG  
ATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGC  
AAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGAC  
GCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC (配列番号 34)。

10

20

30

## 【0102】

5' から 3' まで、このコンストラクト (配列番号 34) は、リーダーペプチド、KappaMa b 軽鎖可変領域、(G4S)<sub>3</sub> リンカー、KappaMa b 重鎖可変領域、第 2 の (G4S)<sub>3</sub> リンカー、突然変異 IgG1 ヒンジ、CH2 および CH3 定常領域ドメイン、CD28 膜貫通ドメイン、4-1BB 細胞内ドメイン、ならびに CD3 ゼータ細胞内ドメインを有する。突然変異 IgG1 ヒンジドメインは、5' から 3' まで、このコンストラクト (配列番号 34) の影付きのボックス内で強調される、E233P、L234V、L235A、G236-、S254A、D265N、および N297A 突然変異を有する。これらの部位における突然変異 (E233P、L234V、L235A、G236-、S254A、D265N、N297A) は、CAR T 細胞との Fc 相互作用を減少させ、改善された注入後の生存を可能にし得る。

40

## 【0103】

2A リボソームスキップ要素および eGFP の KM、CAR への追加

## 【0104】

上述の CAR のそれぞれを発現する T 細胞の検出の容易性のために、重複配列を有する 5' T2A リボソームスキップ要素を有する eGFP を、CAR-CD3 ゼータエンドドメインおよびプラスミド骨格を用いて合成した。次いで、これを制限酵素分解および pV

50

A X 1 P Bトランスポゾンプラスミドを含有するC A Rへのライゲーションによりクローニングして、以下を形成した。

【0105】

28zエンドドメイン\_\_2A\_\_GFP含有コンストラクト：

【0106】

1. pVAX1PB KM.CAR\_\_hCH2CH3\_\_28z\_\_2A\_\_GFP

【0107】

2. pVAX1PB KM.CAR\_\_hCH3\_\_28z\_\_2A\_\_GFP

【0108】

3. pVAX1PB KM.CAR\_\_h\_\_28z\_\_2A\_\_GFP

10

【0109】

4. pVAX1PB KM.CAR\_\_8a\_\_28z\_\_2A\_\_GFP

【0110】

41BBzエンドドメイン\_\_2A\_\_GFP含有コンストラクト：

【0111】

1. pVAX1PB KM.CAR\_\_h\_\_28TM\_\_41BBz\_\_2A\_\_GFP

【0112】

2. pVAX1PB KM.CAR\_\_8a\_\_28TM\_\_41BBz\_\_2A\_\_GFP

【0113】

3. pVAX1PB KM.CAR\_\_hCH2CH3mut\_\_28TM\_\_41BBz\_\_2A\_\_GFP

20

【0114】

4-1BB共刺激ドメインを有するKM.CAR T細胞の生成

【0115】

予備のKM.CAR\_\_hCH2CH3\_\_28zと4-1BB含有CARとの間の比較を行った。本明細書において前述したような、および当技術分野(2)において説明されているようなPiggyBac系を使用したエレクトロポレーションにより、KM.CAR T細胞を生成した。健常ドナーからの400万の末梢血液単核細胞(PBMC)を、Neonエレクトロポレーションシステムにより、2400Vで20msの単一パルスで、それぞれ5ugのPiggyBacトランスポザゼおよびPiggyBacトランスポゾンプラスミドの存在下でエレクトロポレーションした。試験したKMA.CARコンストラクトは、KM.CAR\_\_hCH2CH3\_\_28z\_\_2A\_\_GFP、KM.CAR\_\_h\_\_28TM\_\_41BBz\_\_2A\_\_GFP、KM.CAR\_\_8a\_\_28TM\_\_41BBz\_\_2A\_\_GFP、またはKM.CAR\_\_hCH2CH3mut\_\_28TM\_\_41BBz\_\_2A\_\_GFPを含んでいた。

30

【0116】

エレクトロポレーションされたPBMC(CAR-PBMC)を、10%ウシ胎仔血清を含むAIMV(AIM-V CM)中で一晩静置し、回収し、洗浄し、AIM-V CM中に $1 \times 10^6 / \text{ml}$ で再懸濁させた。CAR-PBMCを、5:1CAR-PBMC:JJN3比での照射KMA発現JJN3細胞あり、またはなしで、自己照射PBMCフィーダー細胞と共培養した。インターロイキン-15(IL-15)を、3日毎に10ng/mlで添加した。トリパンブルー排除により細胞を計数し、新鮮な照射刺激/フィーダー細胞を7日毎に添加した。

40

【0117】

KM.CAR発現の評価

【0118】

培養開始時(1日目)、15日目および21日目に、フローサイトメトリーによりKM.CAR発現を評価した(図8A~8B)。KM.CAR T細胞を、抗ヒトCD3抗体で表面染色し、CAR発現をGFP発現により評価した。

【0119】

50

K M . C A R T 細胞は、i n - v i t r o で存続するためにカップパ骨髓腫抗原を必要とする

#### 【 0 1 2 0 】

K M A 発現 J J N 3 細胞株を含有する培養物は、P B M C のみでの培養物と比較して、より高い全体的増加、増加した K M . C A R 発現のいずれか、またはその両方を示した ( 図 8 A ~ 8 B ) 。 I g G 定常領域 - C H 2 ドメインの F c - 受容体との既知の相互作用と一致して、K M . C A R \_ h C H 2 C H 3 \_ 2 8 z 発現 T 細胞は、P B M C のみの存在下で高濃度であった ( 2 8 % の C D 3 + T 細胞 ) が、J J N 3 細胞の追加によってより高い増加および高濃度化を示した ( 2 9 % の C A R 発現の 6 倍増加と比較して、3 8 % の C A R 発現の 1 5 倍増加 ) 。

10

#### 【 0 1 2 1 】

K M . C A R \_ h C H 2 C H 3 m u t \_ 2 8 T M \_ 4 1 B B z 発現 T 細胞は、J J N 3 との共培養 ( 2 6 % の C A R 発現および 1 7 倍の増加 ) と比較して、P B M C のみでは低レベルの C A R 発現 ( 6 % ) および増加 ( 6 倍 ) を示すのみであった。I g G 1 ヒンジのみのスパーサーを含有する K M . C A R T 細胞は、同様の増加を示した ( J J N 3 ありでは 5 倍、J J N 3 なしでは 6 倍 ) が、C A R 発現は増加した ( J J N 3 ありでは 1 7 % 、なしでは 9 % ) 。C D 8 アルファ鎖スパーサーを含有する K M . C A R T 細胞のみは、J J N 3 細胞の存在下で増加または高濃度化のいかなる向上も示さなかった ( J J N 3 なしでの 5 倍の増加および 5 % の C A R 発現と比較して、J J N 3 の存在下では 8 倍の増加および 5 % の C A R 発現 ) 。

20

#### 【 0 1 2 2 】

K M . C A R T 細胞の機能的評価

#### 【 0 1 2 3 】

K M A 特異的インターフェロンガンマ生成および K M . C A R T 細胞の細胞毒性を、以前に説明されたプロトコル ( 2 ) を使用して、K M A + および K M A - 細胞株での細胞内サイトカインフローサイトメトリーおよび標準クロム放出アッセイにより評価した。使用した K M A 陽性細胞株は、J J N 3 、P f e i f f e r 、N C I - H 9 2 9 を含んでいた。K M A 陰性細胞株は、N a l m - 6 および M o l t を含んでいた ( 図 1 2 A ~ 1 2 B ) 。

#### 【 0 1 2 4 】

サイトカインフローサイトメトリーのために、 $2 \times 10^5$  の K M . C A R T 細胞を、1 : 1 の比で標的細胞と共に 5 時間刺激した。1 時間後、モネンシン (  $2 \mu\text{M}$  ) ( B D B i o s c i e n c e s ) およびブレフェルジン A (  $1 \mu\text{g} / \text{mL}$  ) ( B D B i o s c i e n c e s ) を添加した。C A R T 細胞を、 $50 \text{ ng} / \text{ml}$  のホルボールミリスチン酸アセテート ( P M A : S i g m a - A l d r i c h ) および  $1 \mu\text{g} / \text{ml}$  のイオノマイシン ( S i g m a - A l d r i c h ) で非特異的に活性化し、非刺激細胞を陽性および陰性対照として使用した。次いで、C A R T 細胞を回収し、C D 3 、C D 4 および C D 8 に関して表面染色した。C A R T 細胞を、c y t o f i x および p e r m / w a s h 緩衝液 ( B D B i o s c i e n c e s ) で固定および透過処理し、抗インターフェロンガンマ抗体 ( B D B i o s c i e n c e s ) で染色し、続いて p e r m / w a s h 緩衝液でさらに洗浄した。F A C S C a n t o ( 商標 ) I I フローサイトメーターを使用して、少なくとも 30 , 000 イベントの取得で、染色された細胞を分析した。

30

40

#### 【 0 1 2 5 】

標準クロム (  $^{51}\text{Cr}$  ) 放出アッセイを使用して、K M A 特異的細胞毒性を評価した。クロム酸ナトリウム (  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  ) ( P e r k i n - E l m e r 、W a l t h a m 、M A 、U S A ) で標的細胞を標識化した。K M . C A R T 細胞を K 5 6 2 細胞株と共に 1 : 1 の比で事前にインキュベートし、NK 細胞活性を吸収させた。クロム標識化標的細胞を、40 : 1 から 1 . 25 : 1 の範囲のエフェクター : 標的比で K M . C A R T 細胞に 3 回添加し、37 、5 %  $\text{CO}_2$  で 4 時間でインキュベートした。3 回分の標的を、10 % のドデシル硫酸ナトリウムで溶解して最大放出を決定し、エフェクターを有さな

50

い3回分の標的を使用して、自然放出を評価した。上澄みを吸引し、MicroBeta 2 Plate Counter (PerkinElmer) を使用して読み出した。標準的な式 - %特異的溶解 = (試験放出 - 自然放出) / (最大放出 - 自然放出) × 100 を使用して、特異的溶解のパーセンテージを計算した。

【0126】

実施例4：活性化誘導性プロモーターによるPiggyBacトランスポゾンプラスミドの生成

構成的に活性なプロモーター (EF1アルファ) および活性化誘導性プロモーター (NFATpro) を含有する単トランスポゾンカセットを設計し、クローニングした。活性化誘導性遺伝子発現カセットは、Fiering et al (8) に基づき、Clone Manage 9 (Sci-Ed Software) を使用してNFATproを設計することにより生成した。これは、第4染色体上に見られる、活性化T細胞の核因子 (NFAT-RE) が結合した30塩基対DNA配列の6つのコピー (反応要素-RE) - GGAGGGA AAAA CTGTTT CATACAGAA GGCGT (配列番号35) に続く、最小IL-2プロモーター - ACATTTT TGACACCC CATAATATT TTTCCAGAA TTAACAGTATAAATTGCATCTCTTGTTC AAG AGTTCCCTATCACTCTCTTTAATCACTACTCACAGTAACC TCAACTCCTG (配列番号36) を含む (NCBI参照配列: NG\_016779.1)。

【0127】

活性化誘導遺伝子発現の検出を可能にするために、高感度緑色蛍光タンパク質 (eGFP) DNA配列に続くウシ成長ホルモン (BGH) ポリアデニル化シグナル (9~11) を、NFATproの3'に配置した。この遺伝子カセットのDNA配列は、以下の通りである。

【0128】

10

20

30

40

50

【化 9】

GGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAA  
ACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGG  
CGTCAATTGTCCCATCGAATTAGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCA  
ATTAGGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAACTGT  
TTCATACAGAAGGCGTCAATTGTCCCGGGACATTTTGACACCCCCATAATATTT  
TTCCAGAATTAACAGTATAAATTGCATCTCTTGTTCAGAGTTCCCTATCACT  
CTCTTTAATCACTACTCACAGTAACCTCAACTCCTGAACTCCATGGATGGTGAG  
CAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCG  
ACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAC  
GGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCC  
ACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCAC  
ATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCAAGGCTACGTCCAGGAGCGC  
ACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAG  
GGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGC  
AACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGG  
CCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGA  
CGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGATCCGGAG  
CCACGAACCTTCTCTCTGTAAAGCAAGCAGGAGACGTTGAAGAAAACCCCGGTC  
CTATTTAAATCCTCGACTGTGCGCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCC  
CTCCCCCGTGCTTCCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCC  
TAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTC  
TGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGGAGGATTGGGAAGACAAT  
AGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGC (配列番号：37)。

【0129】

5' から 3' まで、このコンストラクトは、NFAT-RE、IL-2 最小プロモーター、eGFP、および BGH ポリアデニル化シグナルを含有する。

【0130】

このカセットは、Genscript により商業的に合成され、5' cHS4 インシュレーター (GenBank: U78775.2) (12) とヒト延長因子 1 プロモーターとの間の pVAX1 PB トランスポゾンプラスミド内にクローニングされた。最初の実験において形質導入された T 細胞を識別するために、QBEnd10 モノクローナル抗体により認識される CD34 のエピトープ、および CD20 特異的モノクローナル抗体リツキシマブ (13) のミモトープからなるキメラ RQR8 マーカーを、トランスポゾンマルチクローニングサイト内にクローニングし、図 9 に示されるトランスポゾン遺伝子挿入を生成した (pVAX1 PB NFATGFP-RQR8 プラスミド)。pVAX1 PB NFATGFP-RQR8 トランスポゾンプラスミドおよび pVAX1 PB base トランスポザーゼプラスミドを含有する活性化誘導性遺伝子カセットの共エレクトロポレーションは、図 9 に見られる NFATGFP-RQR8 遺伝子挿入の永久的統合をもたらす。

## 【 0 1 3 1 】

活性化誘導性遺伝子含有トランスポゾンの機能の実証

実施例 4 からの p V A X 1 P B N F A T G F P - R Q R 8 トランスポゾン ( 図 9 を参照されたい ) の機能を実証するために、 $4 \times 10^6$  の P B M C を、それぞれ 5 u g のトランスポゾンおよびトランスポザーゼプラスミドの存在下でエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションされた細胞を 24 時間静置し、次いで 50 n g / m l のホルボールミリスチン酸アセテート ( P M A : S i g m a - A l d r i c h ) および 1 u g / m l のイオノマイシン ( S i g m a - A l d r i c h ) で一晚非特異的に刺激し、非刺激対照と比較した。形質導入された細胞を、R Q R 8 マーカー発現に関して Q B E n d 10 染色により識別し、活性化誘導遺伝子発現 ( e G F P ) を 19 時間で評価した。その時点において、形質導入細胞の 50 % が、e G F P を発現することが確認された ( 図 10 )。

10

## 【 0 1 3 2 】

実施例 5 : K M . C A R 制御生物学的療法の設計

I L - 12 および / またはインターロイキン - 6 受容体拮抗薬 S A N T 7 を含有し、また活性化誘導性プロモーターの制御下で I L - 12 および / または S A N T 7 の発現を有する最適化されたキメラ抗原受容体を含有する発現プラスミド ( H o o i j b e r g e t a l . 2000 ) もまた構築した。S A N T - 7 配列は、P r o f R o c c o S a v i n o により提供され、S a v i n o e t a l 1994 および S p o r e n o e t a l 1996 ( 14 ~ 17 ) に従い提供される野生型 I L - 6 遺伝子配列 ( N C B I 参照配列 : N M \_ 000600 . 4 ) の突然変異に基づいていた。配列を、C l o n e M a n a g e 9 ( S c i - E d S o f t w a r e ) にインポートし、E L I S A による上澄み中での検出のために 6 x H i s タグを追加した。

20

## 【 0 1 3 3 】

S A N T - 7 のヌクレオチド配列は、以下で強調および列挙され、下線が付されたアミノ酸置換により提供される。

## 【 0 1 3 4 】

## 【 化 10 】

MNSFSTSAFGPVAFSLGLLLVLPAAFPAPVPPGEDSKDVAAPHRQPLTS  
SERIDKQIRDILDIISALRKETCNKSNMCESSEKADAIWNLNLPKMAEKDGCFYKGF  
NEETCLVKIITGLLEFEVYLEYLQNRFSSEEQARAVQMRTKDLIQFLQKKAKNLDAI  
TTPDPTTNASLLTKLQAQNQWLQDMTTHLILRSFKEFLIRSLRALRAMHHHHHH

30

( 配列番号 : 38 ) 。ヌクレオチド置換は、Y 31 D、G 35 F、L 57 D、E 59 F、N 60 W、Q 75 Y、S 76 K、S 118 R、V 121 D に対応する。提供された配列はまた、公開された配列には列挙されていない Q 211 A 置換を含有していた。

## 【 0 1 3 5 】

このアミノ酸配列 ( すなわち配列番号 : 38 ) に対応する D N A 配列は、以下の通りである。

## 【 0 1 3 6 】

40

## 【化 1 1】

ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGCCTTCGGTCCAGTTGCCTTCTCCCT  
GGGGCTGCTCCTGGTGTTCCTGCTGCCTTCCCTGCCCCAGTACCCCCAGGAGAA  
GATTCCAAAGATGTAGCCGCCCCACACAGACAGCCACTCACGAGCTCAGAACGA  
ATTGACAAACAAATTCGGGACATCCTCGACTTTATCTCAGCCTTAAGAAAGGAGA  
CATGTAACAAGAGTAACATGTGTGAGAGCTCCAAAGAGGCAGACGCATTCTGGA  
ACCTGAACCTTCCAAAGATGGCTGAAAAAGATGGATGCTTCTACAAAGGATTCA  
ATGAGGAGACTTGCCTGGTGAAAATCATCACTGGTCTTCTCGAGTTTGAGGTATA  
CCTAGAGTACCTCCAGAACAGATTTGAGAGTAGTGAGGAACAAGCCAGAGCTGT  
GCAGATGCGCACAAAAGACCTGATCCAGTTCCTGCAGAAAAAGGCCAAAGAATCT  
AGATGCAATAACCACCCCTGACCCAACCACAAATGCCAGCCTGCTGACGAAGCT  
GCAGGCACAGAACCAGTGGCTGCAGGACATGACAACTCATCTCATTCTGAGATC  
TTTTAAGGAGTTCCTGATCCGTAGCCTGAGGGCTCTTCGGGCTATGCATCATCAC  
CATCACCACT (配列番号：39)。

10

## 【0137】

20

一本鎖インターロイキン-12 (Flexi-IL-12) コンストラクトは、IL-12 p40 および p35 サブユニット (Uniprot P29459 および P29460) を Zhang et al および Chinnasamy et al (18、19) と同様の柔軟性 (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub> リンカーに繋げるにより設計し (これにより、両方のサブユニットは、生物活性 p70 ヘテロ二量体を容易に形成する単一ペプチド鎖として発現することができる)、使用した。Flexi-IL-12 コンストラクトを合成し、IL-12 および S ANT 7 を含有するコンストラクトを、本明細書に記載され図 11 に示される活性化誘導性トランスポゾンカセット内にクローニングした。

## 【0138】

さらに、Flexi-IL-12 コンストラクトを合成することができ、2A リボソームスキップ要素により隔てられた IL-12 および S ANT 7 を含有するコンストラクトを、本明細書に記載され図 7 に示される PiggyBac プラスミド内にクローニングすることができた。

30

## 【0139】

Flexi-IL-12 のアミノ酸配列は、以下の通りである。

## 【0140】

40

50

## 【化 1 2】

MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEM  
VVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLS  
HSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFRLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDL  
TFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVGRDNKEYEYSVEQCQEDSACPAAEESLP  
IEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDT  
WSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYY  
SSSWSEWASVPCSGGGGSGGGGSGGGGSRNLPVATPDPGMFPC LHHSQNLLRAVS  
NMLQKARQTLEFYPTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITN  
GSCLASRKTSFMMALCLSSIIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVI  
DELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

10

(配列番号：40)。

## 【0 1 4 1】

5' から 3' まで、Flexi-IL-12 コンストラクトは、リーダーペプチド、IL-12 p40 サブユニット、(G4S)<sub>3</sub> リンカー、および IL-12 p35 サブユニットを含有する。

20

## 【0 1 4 2】

上記アミノ酸配列(すなわち配列番号：40)に対応するDNA配列は、以下の通りである。

## 【0 1 4 3】

30

40

50



## 【化 1 3】

ATGTGTCACCAGCAGTTGGTCATCTCTTGGTTTTCCCTGGTTTTTCT  
 GGCATCTCCCCTCGTGGCCATATGGGAACTGAAGAAAGATGTTTATGTCGTAGAA  
 TTGGATTGGTATCCGGATGCCCCTGGAGAAATGGTGGTCCTCACCTGTGACACCC  
 CTGAAGAAGATGGTATCACCTGGACCTTGGACCAGAGCAGTGAGGTCTTAGGCT  
 CTGGCAAAACCCTGACCATCCAAGTCAAAGAGTTTGGAGATGCTGGCCAGTACA  
 CCTGTCACAAAGGAGGCGAGGTTCTAAGCCATTGCTCCTGCTGCTTCACAAAAA  
 GGAAGATGGAATTTGGTCCACTGATATTTTAAAGGACCAGAAAGAACCCAAAAA  
 TAAGACCTTTCTAAGATGCGAGGCCAAGAATTATTCTGGACGTTTCACCTGCTGG  
 TGGCTGACGACAATCAGTACTGATTTGACATTCAGTGTCAAAAGCAGCAGAGGC  
 TCTTCTGACCCCCAAGGGGTGACGTGCGGAGCTGCTACACTCTCTGCAGAGAGAG  
 TCAGAGGGGACAACAAGGAGTATGAGTACTCAGTGGAGTGCCAGGAGGACAGT  
 GCCTGCCCAGCTGCTGAGGAGAGTCTGCCCATTGAGGTCATGGTGGATGCCGTTT  
 ACAAGCTCAAGTATGAAAACCTACACCAGCAGCTTCTTCATCAGGGACATCATCA  
 AACCTGACCCACCCAAGAACTTGCAGCTGAAGCCATTAAAGAATTCTCGGCAGG  
 TGGAGGTCAGCTGGGAGTACCCTGACACCTGGAGTACTCCACATTCCTACTTCTC  
 CCTGACATTCTGCGTTCAGGTCCAGGGCAAGAGCAAGAGAGAAAAGAAAGATAG  
 AGTCTTCACGGACAAGACCTCAGCCACGGTCATCTGCCGCAAAAATGCCAGCAT  
 TAGCGTGCGGGCCCAGGACCGCTACTATAGCTCATCTTGGAGCGAATGGGCATCT  
 GTGCCCTGCAGTGGTGGCGGTGGAAGCGGCGGTGGCGGAAGCGGCGGTGGCGGC  
 AGCAGAAACCTCCCCGTGGCCACTCCAGACCCAGGAATGTTCCCATGCCTTACC  
 ACTCCCAAAACCTGCTGAGGGCCGTCAGCAACATGCTCCAGAAGGCCAGACAAA  
 CTCTAGAATTTTACCCCTGCACTTCTGAAGAGATTGATCATGAAGATATCACAAA  
 AGATAAAACCAGCACAGTGGAGGCCTGTTTACCATTGGAATTAACCAAGAATGA  
 GAGTTGCCTAAATTCCAGAGAGACCTCTTTCATAACTAATGGGAGTTGCCTGGCC  
 TCCAGAAAGACCTCTTTTATGATGGCCCTGTGCCCTTAGTAGTATTTATGAAGACTT  
 GAAGATGTACCAGGTGGAGTTCAAGACCATGAATGCAAAGCTTCTGATGGATCC  
 TAAGAGGCAGATCTTTCTAGATCAAAACATGCTGGCAGTTATTGATGAGCTGATG  
 CAGGCCCTGAATTTCAACAGTGAGACTGTGCCACAAAAATCCTCCCTTGAAGAAC  
 CGGATTTTTATAAACTAAAATCAAGCTCTGCATACTTCTTCATGCTTTCAGAATT  
 CGGGCAGTGACTATTGATAGAGTGATGAGCTATCTGAATGCTTCC (配列番号 : 4 1)。

10

20

30

40

## 【 0 1 4 4】

さらに、ガレクチン - 3 の切断されたドミナントネガティブ型である G A L 3 C もまた構築される。コンストラクトは、分泌を誘導するための C D 8 - アルファリーダーペプチド、および検出のための 6 x H i s タグを含有する。G A L 3 C のアミノ酸配列を、以下に列挙する。

## 【 0 1 4 5】

## 【化 1 4】

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRHHHHHHGAPAGPLIVPYNLPLPGGV

VPRMLITILGTVKPNANRIALDFQRGNDVAFHFNPRFNENNRRVIVCNTKLDNNWGR

EERQSVFPFESGKPFKIQVLVEPDHFKVAVNDAHLLQYNHRVKKLNEISKLGISGDID

LTSASYTMI (配列番号：42)

## 【0146】

GAL 3Cコンストラクトの対応するDNA配列を、以下に記載する。

10

## 【0147】

## 【化 1 5】

ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTTTTTCTTGTTGGCTATTTTAAAAGG

TGTCCAGTGCTCTAGACATCATCACCATCACCACGGCGCCCCTGCTGGGCCACTG

ATTGTGCCTTATAACCTGCCTTTGCCTGGGGGAGTGGTGCCTCGCATGCTGATAA

CAATTCTGGGCACGGTGAAGCCCAATGCAAACAGAATTGCTTTAGATTTCCAAAG

AGGGAATGATGTTGCCTTCCACTTTAACCCACGCTTCAATGAGAACAACAGGAG

AGTCATTGTTTGCAATACAAAGCTGGATAATAACTGGGGAAGGGAAGAAAGACA

20

GTCGGTTTTCCCATTTGAAAGTGGGAAACCATTCAAAATACAAGTACTGGTTGAA

CCTGACCACTTCAAGGTTGCAGTGAATGATGCTCACTTGTTCAGTACAATCATC

GGGTAAAAAACTCAATGAAATCAGCAAACCTGGGAATTTCTGGTGACATAGACC

TCACCAGTGCTTCATATACCATGATA (配列番号：43)

## 【0148】

CARおよび「生物製剤」トランスポゾンプラスミドは、IL-12のみ、SANT7のみ、GAL3Cのみ、またはIL-12およびSANT7の両方、またはIL-12およびGAL3Cの両方、またはSANT7およびGAL3Cの両方、またはIL-12の3つ全てのいずれかを発現するCAR T細胞を生成するために核酸注入される。SANT7およびGAL3C。「生物製剤」コンストラクトで成功裏に形質導入された細胞は、選択可能マーカー発現により、例えばフローサイトメトリーにより識別され得る。IL-12、SANT7のレベル。およびまたはGAL3Cは、サイトカインフローサイトメトリーにより細胞内で測定され、市販のキットおよび試薬を使用してELISAによりCAR T細胞培養物の上澄み中で測定され、CARのみを発現する対照T細胞と比較される。CAR T細胞は、機能に関して上述のサイトカインフローサイトメトリーおよび細胞毒性アッセイにより、ならびに腫瘍成長の阻害を評価するために骨髓腫細胞株との共培養アッセイにより評価される。実験は3回行われ、識別される2つの最適CARコンストラクトは、IL-12、GAL3Cおよび/またはSANT7発現あり、およびなしでのマウスモデルにおいて評価されるように選択される。

30

40

## 【0149】

以前に確立されたRPMI-Ragヒト骨髓腫マウス異種移植片モデルに基づいて、我々のCAR T細胞のin-vivoでの機能を評価するために、RPMI-Rag-Luc(KMA-)およびJJN3-Rag-Luc(KMA+)モデルが開発される。JJN3およびRPMI8226細胞が、Luc-1で形質導入され、次いでRag2-/-c-/- (BALB/c) マウスに静脈内接種され、JJN3-Rag-LucおよびRPMI-Rag-Luc MMモデルが形成される。生着および疾患レベルは、ルシフェリンのIP注射後の光学的画像化により監視され、血清ヒトカップ(JJN3)およびラムダ(RPMI)軽鎖のレベルのレベルと関連付けられる。候補CAR T細胞の

50

接種の最適時間は、通常は5～8週目からの後肢麻痺の発生前に光学的画像化を使用して確立される。6匹のJ J N 3 - R a g - L u cおよびR P M I - R a g - L u cマウスのコホートが、 $1 \times 10^6$ の全細胞から開始する増加用量のC A R T細胞（I L - 1 2 / S A N T 7発現あり、およびなし）でI V接種され、治療用量が確立される。0日目、+1日目、+3日目、+8日目およびその後毎週、マウスは、後肢麻痺の発生、血清不含軽鎖（S F L C）の増加または他の施設のガイドラインにより決定される疾患進行の発達まで画像化される。骨髄および髄外腫瘍が収集され、M M細胞およびC A R T細胞の分布に関して組織学的に検査される。対照と比較して反応および生存を画像化することにより、効能が決定される。

#### 【0150】

##### 参考文献

1. Rossig C, Pscherer S, Landmeier S, Altvater B, Jurgens H, Vormoor J. Adoptive cellular immunotherapy with CD19-specific T cells. *Klin Padiatr*. 2005; 217(6): 351-6.

2. Ramanayake S, Bilmon I, Bishop D, Dubosq MC, Blyth E, Clancy L, et al. Low-cost generation of Good Manufacturing Practice-grade CD19-specific chimeric antigen receptor-expressing T cells using piggyBac gene transfer and patient-derived materials. *Cytotherapy*. 2015.

3. Hombach A, Hombach AA, Abken H. Adoptive immunotherapy with genetically engineered T cells: modification of the IgG1 Fc 'spacer' domain in the extracellular moiety of chimeric antigen receptors avoids 'off-target' activation and unintended initiation of an innate immune response. *Gene Ther*. 2010; 17(10): 1206-13.

4. Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, et al. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem*. 2001; 276(9): 6591-604.

5. Armour KL, van de Winkel JG, Williamson LM, Clark MR. Differential binding to human Fc gamma RIIa and Fc gamma RIIb receptors by human IgG wildtype and mutant antibodies. *Mol Immunol*. 2003; 40(9): 585-93.

6. Hudecek M, Sommermeyer D, Kosasih PL, Silva-Benedict A, Liu L, Rader C, et al. The non signaling extracellular spacer domain of chimeric antigen receptors is decisive for in vivo antitumor activity. *Cancer immunology research*. 2015; 3(2): 125-35.

7. Clemenceau B, Valsesia-Wittmann S, Jallas AC, Vivien R, Rousseau R, Marabelle A, et al

10

20

30

40

50

1. In Vitro and In Vivo Comparison of Lymphocytes Transduced with a Human CD16 or with a Chimeric Antigen Receptor Reveals Potential Off-Target Interactions due to the IgG2 CH2-CH3 CAR-Spacer. *J Immunol Res.* 2015; 2015:482089.

8. Fiering S, Northrop JP, Nolan GP, Mattila PS, Crabtree GR, Herzenberg LA. Single cell assay of a transcription factor reveals a threshold in transcription activated by signals emanating from the T-cell antigen receptor. *Genes Dev.* 1990; 4(10):1823-34.

10

9. Miller WL, Martial JA, Baxter JD. Molecular cloning of DNA complementary to bovine growth hormone mRNA. *J Biol Chem.* 1980; 255(16):7521-4.

10. Miller WL, Thirion JP, Martial JA. Cloning of DNA complementary to bovine prolactin mRNA. *Endocrinology.* 1980; 107(3):851-3.

11. Goodwin EC, Rottman FM. The 3'-flanking sequence of the bovine growth hormone gene contains novel elements required for efficient and accurate polyadenylation. *J Biol Chem.* 1992; 267(23):16330-4.

20

12. Chung JH, Bell AC, Felsenfeld G. Characterization of the chicken beta-globin insulator. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(2):575-80.

13. Philip B, Thomas S, Marin V, Jathoul A, Kopeck A, Lynch DC, et al. A Highly Compact Epitope-Based Marker-Suicide Gene for More Convenient and Safer T-Cell Adoptive Immunotherapy. *ASH Annual Meeting Abstracts.* 2010; 116(21):1473-.

30

14. Demartis A, Bernassola F, Savino R, Melino G, Ciliberto G. Interleukin 6 receptor superantagonists are potent inducers of human multiple myeloma cell death. *Cancer Res.* 1996; 56(18):4213-8.

15. Savino R, Ciapponi L, Lahm A, Demartis A, Cabibbo A, Toniatti C, et al. Rational design of a receptor super-antagonist of human interleukin-6. *EMBO J.* 1994; 13(24):5863-70.

40

16. Savino R, Lahm A, Salvati AL, Ciapponi L, Sporeno E, Altamura S, et al. Generation of interleukin-6 receptor antagonists by molecular-modeling guided mutagenesis of residues important for gp130 activation. *EMBO J.* 1994; 13(6):1357-67.

17. Sporeno E, Savino R, Ciapponi L, Paoness

50

a G, Cabibbo A, Lahm A, et al. Human interleukin-6 receptor super-antagonists with high potency and wide spectrum on multiple myeloma cells. *Blood*. 1996; 87(11): 4510-9.

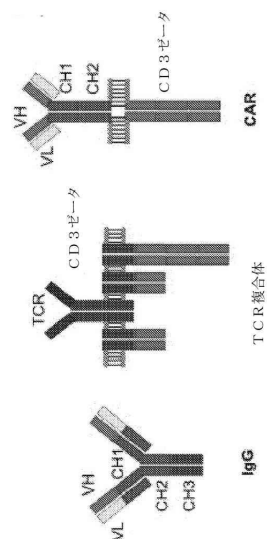
18. Zhang L, Kerkar SP, Yu Z, Zheng Z, Yang S, Restifo NP, et al. Improving adoptive T cell therapy by targeting and controlling IL-12 expression to the tumor environment. *Mol Ther*. 2011; 19(4): 751-9.

19. Chinnasamy D, Yu Z, Kerkar SP, Zhang L, Morgan RA, Restifo NP, et al. Local delivery of interleukin-12 using T cells targeting VEGF receptor-2 eradicates multiple vascularized tumors in mice. *Clin Cancer Res*. 2012; 18(6): 1672-83.

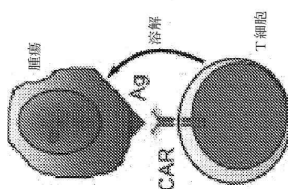
【図面】

【図1】

【図1 A】

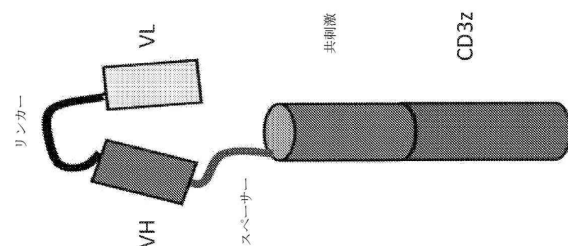


【図1 B】



【図2】

【図2】



10

20

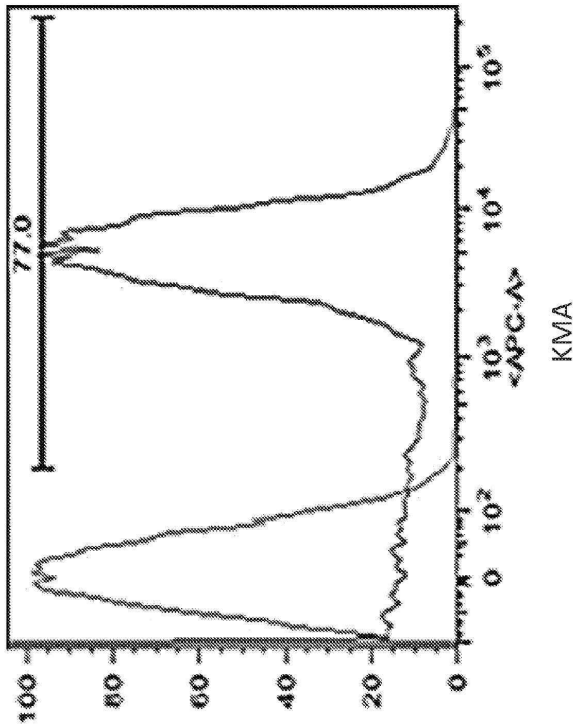
30

40

50

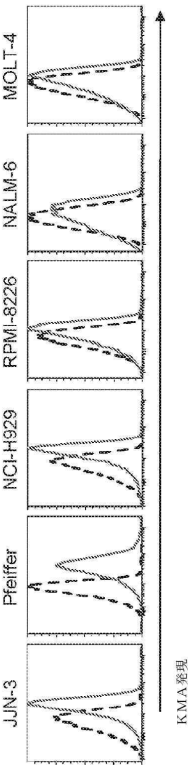
【図 3】

【図 3】



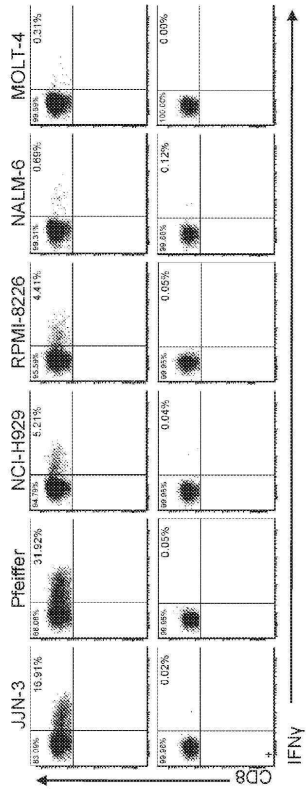
【図 4 A】

【図 4 A】



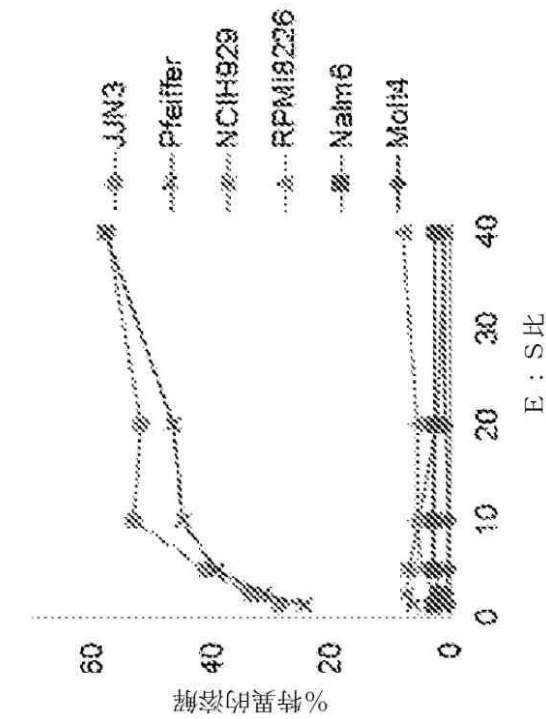
【図 4 B】

【図 4 B】



【図 4 C】

【図 4 C】



10

20

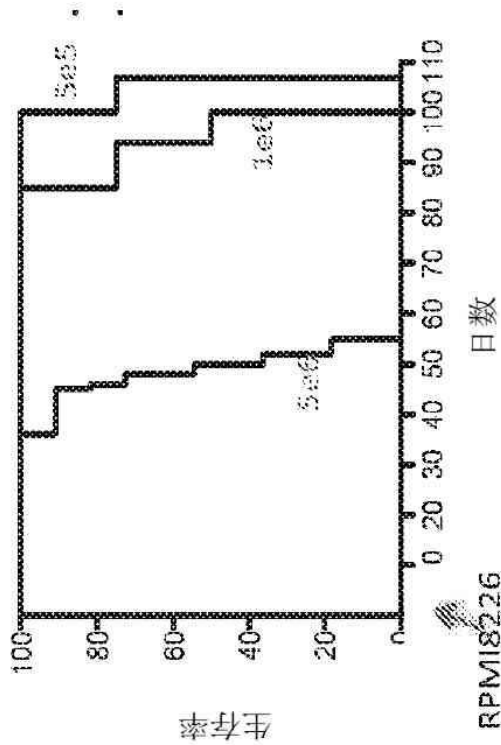
30

40

50

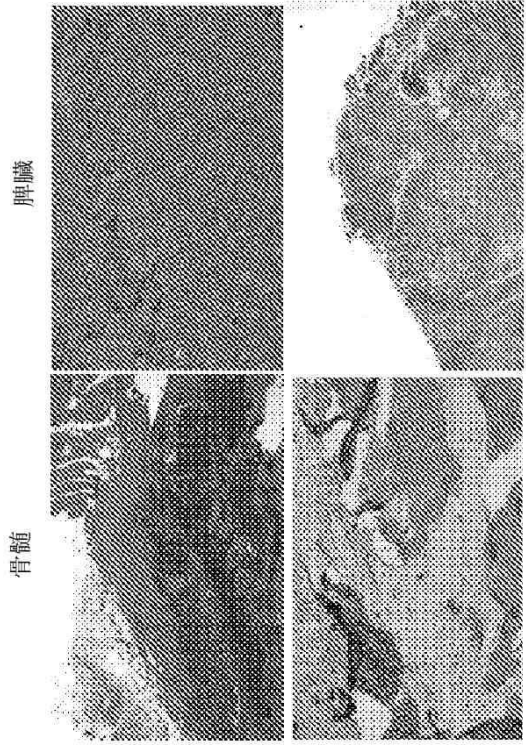
【図 5 A】

【図 5 A】



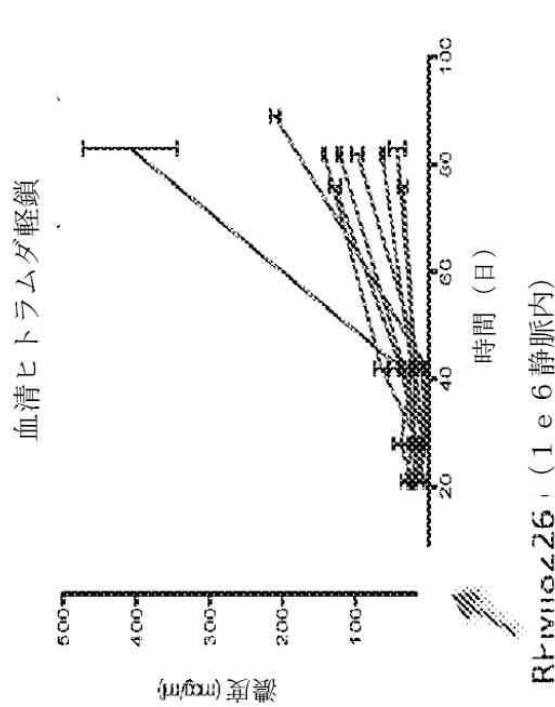
【図 5 B】

【図 5 B】



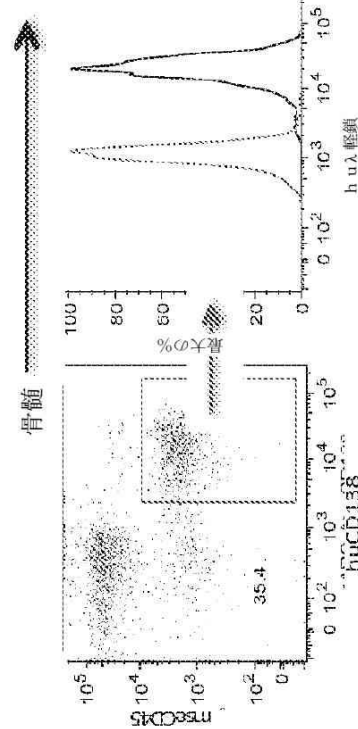
【図 5 C】

【図 5 C】



【図 5 D】

【図 5 D】



10

20

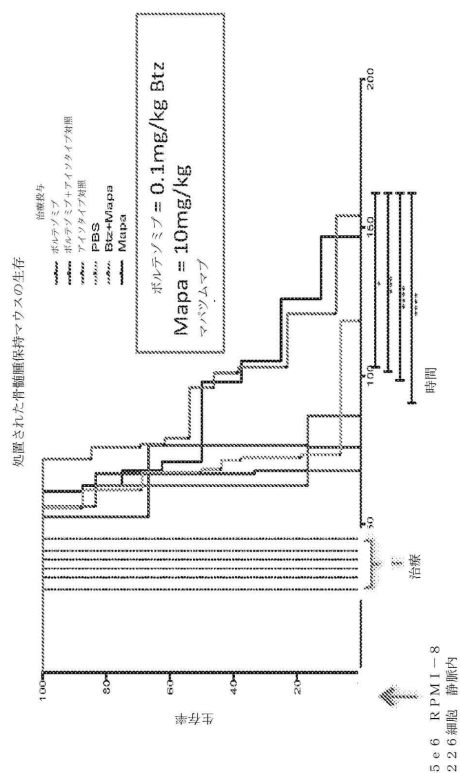
30

40

50

【 図 5 E 】

【図 5 E】



## 【圖 6 A】

【図 6 A】

scFv	hCH2CH3	CD28	CD3z
scFv	hCH2CH3	CD28	CD3z

10

20

【 図 6 B 】

【図 6 B】

scFv	hCH3	CD28	CD3z
scFv	h	CD28	CD3z

【 図 6 C 】

【図 6 C】

scFv	opti	4-1BB	CD3z
scFv	opti	OX-40	CD3z
scFv	opti	CD28	OX-40
scFv	opti	CD28	4-1BB
scFv	opti	4-1BB	OX-40

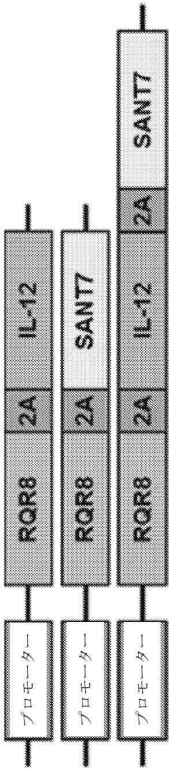
30

40



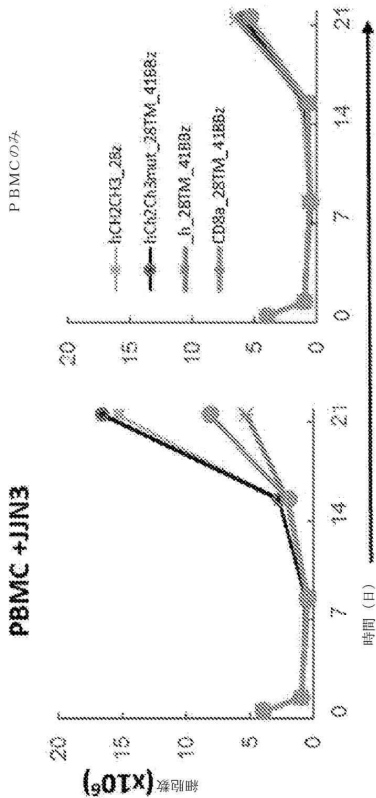
【 図 7 】

【 図 7 】



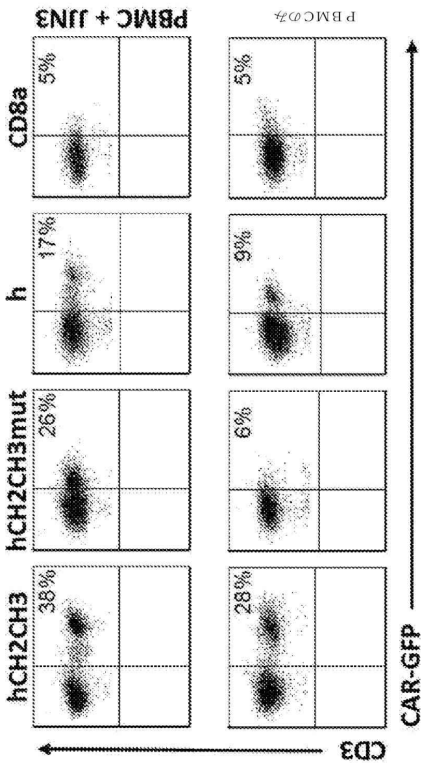
【 図 8 A 】

【 図 8 A 】



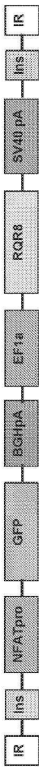
【 図 8 B 】

【 図 8 B 】



【 図 9 】

【 図 9 】



10

20

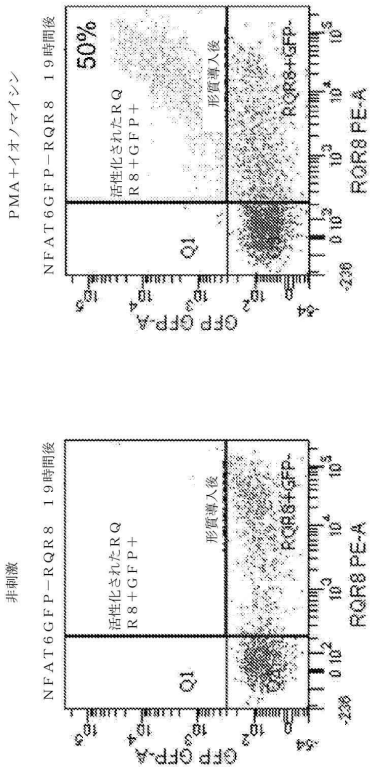
30

40

50

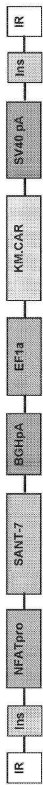
【図 1 0】

【図 1 0】



【図 1 1】

【図 1 1】

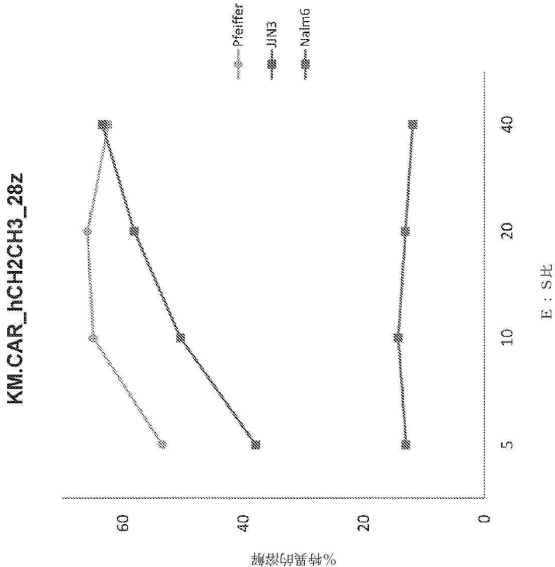


10

20

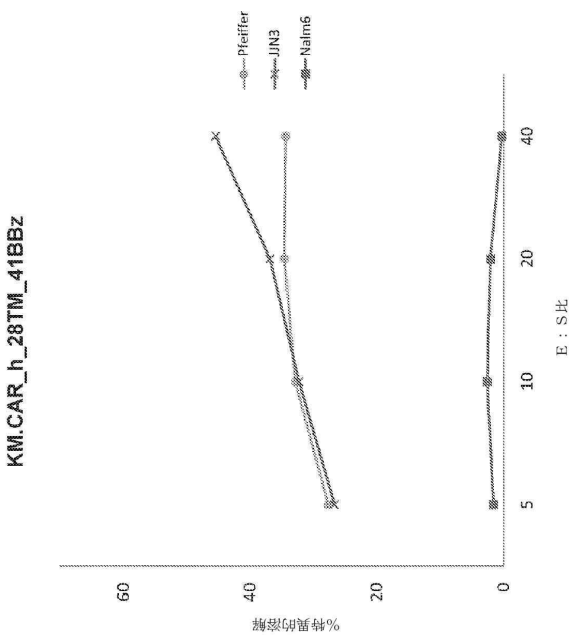
【図 1 2 A】

【図 1 2 A】



【図 1 2 B】

【図 1 2 B】



30

40

50

【配列表】

0007229768000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 16/30 (2006.01)

C 0 7 K 16/30

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 0 7 K 19/00

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62

Z Z N A

(31)優先権主張番号 62/158,407

(32)優先日 平成27年5月7日(2015.5.7)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ミックレスウェイト, ケネス

オーストラリア国 2 1 4 5 ニュー サウス ウェールズ, ウェストミード, インスティテュート  
ロード, ウェスタン シドニー ローカル ヘルス ディストリクト 気付

(72)発明者 ダン, ロザンヌ

オーストラリア国 2 0 1 5 ニュー サウス ウェールズ, イヴリー, コーンウォリス ストリート  
4, エーティーピー, ナショナル イノベーション センター, スイート 1 4 5, ヒーマ  
ロジックス プロプライエタリー リミテッド 気付

(72)発明者 ゴットリーブ, デイビッド

オーストラリア国 2 1 4 5 ニュー サウス ウェールズ, ウェストミード, インスティテュート  
ロード, ウェスタン シドニー ローカル ヘルス ディストリクト 気付

(72)発明者 ローガン, グラント

オーストラリア国 2 1 4 5 ニュー サウス ウェールズ, ウェストミード, ハークスベリー ロ  
ード 2 1 4, チルドレンズ メディカル リサーチ インスティテュート 気付

## 合議体

審判長 上條 肇

審判官 高堀 栄二

審判官 川合 理恵

(56)参考文献 特表 2 0 0 5 - 5 0 4 0 1 8 ( J P , A )

特表 2 0 1 2 - 5 2 2 8 1 1 ( J P , A )

B l o o d ( 2 0 0 6 ) V o l . 1 0 8 , N o . 1 2 , p . 3 8 9 0 - 3 8 9 7

I n t . J . H e m a t o l . ( 2 0 1 4 ) V o l . 9 9 , p . 3 6 1 - 3 7 1

D i s c o v . M e d . ( 2 0 1 4 ) V o l . 1 7 , N o . 9 1 , p . 3 7 - 4 6

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N15/00-15/62

C07K14/00-16/30

C A / B I O S I S / W P I D S ( S T N )

P u b M e d

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