

(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

C 0 7 K	14/705 (2006.01)	F I	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 2015 ニュー サ
 ウス ウェールズ, イヴリー, コーン
 ウオリス 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 145
 (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】 カッパ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(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)に特異的に結合し、かつ免疫グロブリン(Ig)カッパ重鎖を伴う免疫グロブリン(Ig)カッパ軽鎖に結合しない一本鎖可変断片(scFv)を含み、前記scFvは、Kappaモノクローナル抗体(KappaMab)に由来する相補性決定領域(CDR)を含み、前記KappaMab CDRは、配列番号3~8を含む、キメラ抗原受容体(CAR)。

【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CAR。

【請求項3】

前記1つ以上の共刺激エンドドメインは、CD28ドメイン、CD3ドメイン、4-1BBドメイン、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、請求項2に記載のCAR。

【請求項4】

前記scFvは、KappaMabからのVL鎖およびVH鎖を含み、前記VL鎖は、配列番号2_1を含み、前記VH鎖は、配列番号2_2を含む、請求項1に記載のCAR。

【請求項5】

10

20

前記 KappaMab からの前記 VL 鎌および前記 VH 鎌は、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、(Gly₄Ser)₃ を含む 15 アミノ酸リンカーである、請求項 1 に記載の CAR。

【請求項 6】

前記 scFv 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おり、前記スペーサーは、免疫グロブリン定常領域または CD8 鎌である、請求項 1 に記載の CAR。

【請求項 7】

前記免疫グロブリン定常領域は、IgG ヒンジドメイン、IgG CH2 ドメインおよび IgG CH3 ドメインの 1 つ以上を含む、請求項 6 に記載の CAR。 10

【請求項 8】

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 scFv に結合しており、前記グリシン - セリンリンカーは、(Gly₄Ser)₃ 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 CAR。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の CAR 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。 20

【請求項 11】

前記 1 つ以上の追加の生体分子は、IL-12、肝細胞成長因子 (HGF) 結合タンパク質、ガレクチン - 3C (GAL3C) または SANT7 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】

対象におけるカッパ骨髄腫抗原 (KMA) 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、KMA に特異的に結合し、かつ免疫グロブリン (Ig) カッパ重鎖を伴う免疫グロブリン (Ig) カッパ軽鎖に結合しない一本鎖可変断片 (scFv) を含み、前記 scFv は、Kappaモノクローナル抗体 (KappaMab) に由来する相補性決定領域 (CDR) を含み、前記 KappaMab CDR は、配列番号 3 ~ 8 を含む、使用。 30

【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 KMA 発現悪性腫瘍は、多発性骨髄腫、ワルデンシュトーレ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)、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】

対象におけるカッパ骨髄腫抗原 (KMA) 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、KMA に特異的に結合し、かつ免疫グロブリン (Ig) カッパ重鎖を伴う免疫グロブリン (Ig) カッ 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、Kappaモノクローナル抗体 (KappaMab) に由来する相補性決定領域 (C D R) を含み、前記 KappaMab C D R は、配列番号 3 ~ 8 を含む、組成物。

【請求項 18】

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17に記載の組成物。

【請求項 19】

前記遺伝子改変T細胞は、前記対象に由来する、請求項17または18に記載の組成物。

【請求項 20】

前記KMA発現悪性腫瘍は、多発性骨髄腫、ワルデンシュトライ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 (DLBC) 、またはアミロイドーシスである、請求項17~19のいずれか一項に記載の組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

米国仮特許出願の相互参照

本出願は、2015年4月23日に出願された米国仮特許出願第62/151,968号、および2015年5月7日に出願された米国仮特許出願第62/158,407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考によりその全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0002】

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、参考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、HMLX_002_02_WO_SeqList_ST25.txtである。テキストファイルは、約63KBであり、2016年4月22日に作成されたものであり、EFS-Webを介して電子的に提出されている。

30

【背景技術】

【0003】

多発性骨髄腫 (MM) 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。

【0004】

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60%に生じ、カッパ骨髄腫抗原 (KMA) 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。KappaMab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KMA特異的モノクローナル抗体である。

40

【0005】

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。

【0006】

キメラ抗原受容体を保持するT細胞 (CAR-T細胞) は、この問題に対する解決策となる可能性がある。CAR-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

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。

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

20

本発明は、カッパ骨髄腫抗原（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】

30

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、およびカッパ骨髄腫抗原（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。

40

【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、KappaMab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

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、リンカーレス、(Gly₄Ser)_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-セリンリンカーレス、15～20アミノ酸リンカーレスである。さらに別の実施形態において、リンカーレス、15アミノ酸グリシンセリンリンカーレスであり、(Gly₄Ser)₃を含む。一実施形態において、(Gly₄Ser)₃リンカーレスは、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。具体的な実施形態において、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-セリンリンカーレスを介してscFvに結合している。さらに別の実施形態において、リンカーレス、(Gly₄Ser)_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-セリンリンカーレス、15～20アミノ酸リンカーレスである。さらに別の実施形態において、リンカーレス、15アミノ酸グリシンセリンリンカーレスであり、(Gly₄Ser)₃を含む。一実施形態において、(Gly₄Ser)₃リンカーレスは、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。具体的な実施形態において、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、柔軟性リンカーレスにより繋がった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、(Gly₄Ser)₃リンカーレス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およびGAL3Cを発現する。

10

20

30

40

50

T 7、 G A L 3 C および選択可能マークを発現する。

【 0 0 1 1 】

一実施形態において、本発明の C A R T 細胞はまた、肝細胞成長因子 (H G F) 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 H G F 結合タンパク質を発現する。一態様において、 H G F 結合タンパク質は、抗体またはその断片である。

【 0 0 1 2 】

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 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、 K M A 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、 P i g g y B a c 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、 C A R 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、 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。一実施形態において、 C A R の 1 つ以上の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 ドメインを含む。別の実施形態において、 C A R の 1 つ以上の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 ドメインを含む。さらに別の実施形態において、 C A R の 1 つ以上の共刺激エンドドメインは、 C D 3 ドメイン、 C D 2 8 ドメインおよび O X - 4 0 ドメインを含む。さらに別の実施形態において、 C A R の 1 つ以上の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 ドメインを含む。さらに別の実施形態において、 C A R の 1 つ以上の共刺激エンドドメインは、 C D 3 ドメイン、 C D 2 8 ドメインおよび 4 - 1 B B ドメインを含む。さらに別の実施形態において、 C A R の 1 つ以上の共刺激エンドドメインは、 C D 3 ドメイン、 4 - 1 B B ドメインおよび O X - 4 0 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、 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。さらに別の実施形態において、 s c F v は、 K a p p a M a b に由来する相補性決定領域 (C D R) を含む。さらに別の実施形態において、 s c F v は、配列番号 6 ~ 8 の V L C D R を含む。さらに別の実施形態において、 s c F V は、配列番号 2 1 の V L 領域を含む。さらに別の実施形態において、 s c F v は、配列番号 3 ~ 5 の V H C D R を含む。さらに別の実施形態において、 s c F V は、配列番号 2 2 の V H 領域を含む。さらなる実施形態において、 s c F v は、配列番号 6 ~ 8 の V L C D R および配列番号 3 ~ 5 の V H C D R を含む。さらなる実施形態において、 s c F v は、配列番号 2 1 の V L 領域および配列番号 2 2 の V H 領域を含む。一実施形態において、配列番号 2 の V L 鎖および配列番号 1 の 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。一実施形態において、配列番号 2 1 の V L 領域および配列番号 2 2 の V H 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、 1 5 ~ 2 0 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、 1 5 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) 3 を含む。一実施形態において、 (G l y 4 S e r) 3 リンカーは、配列番号 2 3 である。一実施形態において、 s c F v 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、 s c F v 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、 I g G ヒンジ、 I g G C H 2 および I g G C H 3 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 C H 3 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、 I g G C H 2 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、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*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、(Gly4Ser)_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、(Gly4Ser)₃を含む。一実施形態において、(Gly4Ser)₃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、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、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コードする配列を含む。一実施形態において、IL-12 p35およびIL-12 p40は、(G4S)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ポリペプチドをコードする配列は、生物活性IL-12 p70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IL-12 p35およびIL-12 p40を含む一本鎖IL-12ポリペプチド、ならびに2Aリボソームスキップにより一本鎖IL-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、SANT7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、SANT7および選択可能マーカーを含む。一実施形態において、SANT7および選択可能マーカーをコードする配列は、2A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、GAL3cおよび選択可能マーカーを含む。一実施形態において、GAL3C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、CAR-T細胞は、IL-12、SANT7および選択可能マーカーを含む。一実施形態において、IL-12をコードする配列は、2A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、SANT7をコードする配列は、追加の2AリボソームスキップによりIL-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、CAR-T細胞は、GAL3C、SANT7および選択可能マーカーを含む。一実施形態において、GAL3Cをコードする配列は、2A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、SANT7をコードする配列は、追加の2AリボソームスキップによりGAL3C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、CAR-T細胞は、IL-12、GAL3Cおよび選択可能マーカーを含む。一実施形態において、IL-12をコードする配列は、2A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、GAL3Cをコードする配列は、追加の2AリボソームスキップによりIL-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、CAR-T細胞は、GAL3C、SANT7、IL-12および選択可能マーカーを含む。一実施形態において、GAL3C、SANT7、IL-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、2Aリボソームスキップ配列を介して接続される。

【0013】

一実施形態において、KMA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、KMA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、ワルデンシュトーレ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)、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、ワルデンシュトーレ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K M A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、C A R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、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。一実施形態において、C A Rの1つ以上の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 ドメインを含む。別の実施形態において、C A Rの1つ以上の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 ドメインを含む。さらに別の実施形態において、C A Rの1つ以上の共刺激エンドドメインは、C D 3 ドメイン、C D 2 8 ドメインおよびO X - 4 0 ドメインを含む。さらに別の実施形態において、C A Rの1つ以上の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 ドメインを含む。さらに別の実施形態において、C A Rの1つ以上の共刺激エンドドメインは、C D 3 ドメイン、C D 2 8 ドメインおよびO X - 4 0 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、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。さらに別の実施形態において、s c F vは、KappaMabに由来する相補性決定領域(C D R)を含む。さらに別の実施形態において、s c F vは、配列番号6～8のV L C D Rを含む。さらに別の実施形態において、s c F Vは、配列番号21のV L領域を含む。さらに別の実施形態において、s c F vは、配列番号3～5のV H C D Rを含む。さらに別の実施形態において、s c F Vは、配列番号22のV H領域を含む。さらなる実施形態において、s c F vは、配列番号6～8のV L C D Rおよび配列番号3～5のV H C D Rを含む。さらなる実施形態において、s c F vは、配列番号21のV L領域および配列番号22のV H領域を含む。一実施形態において、配列番号2のV L鎖および配列番号1の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。一実施形態において、配列番号21のV L領域および配列番号22のV H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、(G l y 4 S e r)_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、(G l y 4 S e r)₃を含む。一実施形態において、(G l y 4 S e r)₃リンカーは、配列番号23である。一実施形態において、s c F v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、s c F v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、I g Gヒンジ、I g G C H 2 およびI g G C H 3 ドメインの1つ以上を含む。具体的な実施形態において、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C H 3 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、I g G C H 2 ドメインを含む。さ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inker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)_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inkerは、15～20アミノ酸リンinkerである。さらに別の実施形態において、リンinkerは、15アミノ酸グリシンセリンリンinkerであり、(G l y 4 S e r)₃を含む。一実施形態において、(G l y 4 S e r)₃リンinker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、I L - 1 2 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、C A R T細胞は、柔軟性リンinker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、(G4S)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、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 紹介細胞は、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 紹介細胞は、IL-12、SANT7、GAL3C および選択可能マーカーを発現する。

【0014】

さらなる実施形態において、方法は、多発性骨髄腫、ワルデンシュトーレ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クレクトされる。

【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。具体的な実施形態において、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ポマリドミドである。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statt、ボリノstatt、トリコスタチンA、デブシペチド、フェニル酪酸、バルプロ酸、ベリノstatt、LAQ824、エンチノstatt、CI944、またはモセチノstatt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。

【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。

【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、そのいくつかが図に示され、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)。

10

20

30

40

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CAR。

(項目3)

前記1つ以上の共刺激エンドドメインは、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、項目2に記載のCAR。

(項目4)

前記共刺激エンドドメインは、CD3ドメインおよびCD28ドメインである、項目3に記載のCAR。

10

(項目5)

前記共刺激エンドドメインは、CD3ドメインおよびOX-40ドメインである、項目3に記載のCAR。

(項目6)

OX-40ドメインをさらに含む、項目4に記載のCAR。

(項目7)

前記共刺激エンドドメインは、CD3ドメインおよび4-1BBドメインである、項目3に記載のCAR。

(項目8)

4-1BBドメインをさらに含む、項目4に記載のCAR。

20

(項目9)

OX-40ドメインをさらに含む、項目7に記載のCAR。

(項目10)

前記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、項目1に記載のCAR。

(項目11)

前記scfvは、KappaMabモノクローナル抗体に由来する相補性決定領域(CDR)を含み、前記KappaMab CDRは、配列番号3~8を含む、項目10に記載のCAR。

(項目12)

前記scfvは、KappaMabからのVL鎖およびVH鎖を含み、前記VL鎖は、配列番号2を含み、VH鎖は、配列番号1を含む、項目10に記載のCAR。

30

(項目13)

KappaMabからの前記VL鎖およびVH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11に記載のCAR。

(項目14)

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13に記載のCAR。

(項目15)

前記15アミノ酸リンカーは、(GlySer)₃を含む、項目14に記載のCAR。

40

(項目16)

前記scfv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10に記載のCAR。

(項目17)

前記スペーサーは、免疫グロブリン定常領域またはCD8鎖である、項目16に記載のCAR。

(項目18)

前記免疫グロブリン定常領域は、IgGヒンジドメイン、IgG CH2ドメインおよびIgG CH3ドメインの1つ以上を含む、項目17に記載のCAR。

(項目19)

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18に記載のCAR。

(項目20)

前記免疫グロブリン定常領域は、IgG CH3ドメインをさらに含む、項目19に記載のCAR。

(項目21)

前記免疫グロブリン定常領域は、IgG CH2ドメインをさらに含む、項目19または20に記載のCAR。

(項目22)

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scFVに結合している、項目17～21のいずれか一項に記載のCAR。

10

(項目23)

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22に記載のCAR。

(項目24)

前記15アミノ酸リンカーは、(Gly₄Ser)₃を含む、項目23に記載のCAR。

(項目25)

項目1～24のいずれか一項に記載のCARを発現するように操作された、遺伝子改変T細胞。

20

(項目26)

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25に記載の遺伝子改変T細胞。

(項目27)

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26に記載の遺伝子改変T細胞。

(項目28)

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により発現される、項目26に記載の遺伝子改変T細胞。

30

(項目29)

前記柔軟性リンカーは、(Gly₄Ser)₃リンカーである、項目28に記載の遺伝子改変T細胞。

(項目30)

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29に記載の遺伝子改変T細胞。

(項目31)

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26に記載の遺伝子改変T細胞。

40

(項目32)

SANT-7を発現するように操作された、項目26に記載の遺伝子改変T細胞。

(項目33)

SANT-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26に記載の遺伝子改変T細胞。

(項目34)

SANT7を発現するようにさらに操作された、項目31に記載の遺伝子改変T細胞。

(項目35)

GAL3Cを発現するように操作された、項目26に記載の遺伝子改変T細胞。

(項目36)

50

G A L 3 C および選択可能マーク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、カッパ骨髓腫抗原 (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、Kappa Mab モノクローナル抗体の V L 鎮および V H 鎮を含み、前記 V L 鎮は、配列番号 2 を含み、前記 V H 鎮は、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、(Gly4Ser)₃ 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 鎮である、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、IgG ヒンジドメイン、IgG CH2 ドメインおよび IgG CH3 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、IgG CH3 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、IgG CH2 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、(Gly4Ser)₃ 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、(Gly4Ser)₃ 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。

10

(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。

20

(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。

30

(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、カッパ骨髄腫抗原 (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。

40

(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。

50

(項目 8 4)

前記共刺激エンドドメインは、CD3 ドメインおよびCD28 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、CD3 ドメインおよびOX-40 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、OX-40 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、CD3 ドメインおよび41-BB ドメインである、項目 8 3 に記載の方法。

10

(項目 8 8)

41-BB 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、KMA を特異的に認識するscFv を含む、項目 8 0 に記載の方法。

(項目 9 0)

前記scFv は、KMA を認識し、KappaMab モノクローナル抗体に由来する相補性決定領域(CDR) を含み、前記CDR は、配列番号3~8 を含む、項目 8 9 に記載の方法。

20

(項目 9 1)

前記scFv は、KappaMab モノクローナル抗体のVL鎖およびVH鎖を含み、前記VL鎖は、配列番号2 を含み、前記VH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VL および配列番号1 のVH 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、15~20 アミノ酸リンカーである、項目 9 2 に記載の方法。

30

(項目 9 4)

前記15 アミノ酸リンカーは、(GlySer)₃ を含む、項目 9 3 に記載の方法。

(項目 9 5)

前記scFv 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CD8 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、IgG ヒンジドメイン、およびIgG CH2 ドメイン、およびIgG CH3 ドメインの1つ以上を含む、項目 9 6 に記載の方法。

40

(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、IgG CH3 ドメインをさらに含む、項目 9 8 に記載の方法。

(項目 10 0)

前記免疫グロブリン定常領域は、IgG CH2 ドメインをさらに含む、項目 9 8 または

50

9.9 に記載の方法。(項目 101)

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 96 ~ 100 のいずれか一項に記載の C A R。

(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 C A R。

(項目 103)

前記 15 アミノ酸リンカーは、(Gly₄Ser)₃ を含む、項目 102 に記載の C A R

—

(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、柔軟性リンカーリにより繋がった 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。

(項目 107)

前記柔軟性リンカーハ、(Gly₄Ser)₃ リンカーハある、項目 106 に記載の方法。

(項目 108)

柔軟性リンカーリにより繋がった 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 C A R 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 C A R 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。

(項目 111)

前記 C A R 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 C A R 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 C A R 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。

(項目 114)

前記 C A R 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 C A R 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。

10

20

30

40

50

(項目 117)

前記 1つ以上の追加の生物学的に活性な薬剤は、IL-12、IL-6 受容体拮抗薬またはSANT7 を含む、項目 116 に記載の方法。

(項目 118)

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 116 に記載の方法。

(項目 119)

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 116 に記載の方法。

(項目 120)

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 119 に記載の方法。

10

(項目 121)

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 120 に記載の方法。

(項目 122)

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 116 に記載の方法。

(項目 123)

前記ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬は、パノビノstatt、ボリノstatt、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statt、LAQ824、エンチノstatt、C1944、またはモセチノstattである、項目 122 に記載の方法。

20

(項目 124)

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 116 に記載の方法。

(項目 125)

前記遺伝子改変 T 細胞は、静脈内投与される、項目 80 に記載の方法。

(項目 126)

前記遺伝子改変 T 細胞は、患者に由来する、項目 80 に記載の方法。

(項目 127)

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 80 に記載の方法。

30

(項目 128)

HGF 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 26 または 27 に記載の遺伝子改変 T 細胞。

(項目 129)

前記 HGF 結合タンパク質は、HGF 抗体またはその断片である、項目 128 に記載の遺伝子改変 T 細胞。

(項目 130)

前記 1つ以上の追加の生体分子は、HGF 結合タンパク質である、項目 67 または 104 に記載の方法。

40

(項目 131)

前記 HGF 結合タンパク質は、抗体またはその断片である、項目 130 に記載の方法。

(項目 132)

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 80 に記載の方法。

(項目 133)

前記幹細胞移植は、同種幹細胞移植である、項目 132 に記載の方法。

(項目 134)

前記幹細胞移植は、同種異系幹細胞移植である、項目 132 に記載の方法。

【図面の簡単な説明】【0018】

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実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、ポリペプチドリンクタ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⁺T細胞のインターフェロンガンマ（IFN）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⁺T細胞のインターフェロンガンマ（IFN）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⁺T細胞のインターフェロンガンマ（IFN）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】 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ の骨髓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⁺RPMI9226細胞による骨髓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】骨髓内のCD138⁺/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SANT7ベクターを示す図である。

【図8A】実施例3に記載のコンストラクトによるKM.CAR-T細胞増加およびCAR発現を示す図である。図8Aは、KMA発現JJN3細胞株の添加あり(左)およびなし(右)での、CAR-T細胞培養物中の全細胞の増加を示す。図8Bは、KMA発現JJN3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GFPにより測定されるCAR発現を示す。 $hCH2CH3 = KM.CAR_hCH2CH3_28z$ T細胞、 $hCH2CH3mut = KM.CAR_hCH2CH3mut_28TM_41BBz$ T細胞、 $h = KM.CAR_h_28TM_41BBz$ T細胞、 $CD8a = KM.CAR_8a_28TM_41BBz$ T細胞。

【図8B】実施例3に記載のコンストラクトによるKM.CAR-T細胞増加およびCAR発現を示す図である。図8Aは、KMA発現JJN3細胞株の添加あり(左)およびなし(右)での、CAR-T細胞培養物中の全細胞の増加を示す。図8Bは、KMA発現JJN3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GFPにより測定されるCAR発現を示す。 $hCH2CH3 = KM.CAR_hCH2CH3_28z$ T細胞、 $hCH2CH3mut = KM.CAR_hCH2CH3mut_28TM_41BBz$ T細胞、 $h = KM.CAR_h_28TM_41BBz$ T細胞、 $CD8a = KM.CAR_8a_28TM_41BBz$ 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。IR=逆方向反復、Ins=遺伝子挿入の2つの末端に隣接するインシュレーター、NFATpro=活性化誘導性プロモーター、BGHPA=ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル、EF1=ヒト延長因子-1アルファプロモーター、RQR8=マーカー、SV40=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eGFPの発現を示す図である。PMAおよびイオノマイシンで刺激された形質導入PBMC(右プロット)を、RQR8(x軸)およびeGFP(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eGFP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eGFPを発現した。

【図11】CAR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。IR=逆方向反復、Ins=遺伝子挿入の2つの末端に隣接するインシュレーター、NFATpro=活性化誘導性プロモーター、BGHPA=ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル、EF1=ヒト延長因子-1アルファプロモーター、SV40=シミアンウイルス後期ポリアデニル化シグナル。

【図12A】KMA+およびKMA-細胞株を用いたKM.CAR_hCH2CH3_28z T細胞(図12A)またはKM.CAR_h_28TM_41BBz T細胞(図12B)標準クロム放出アッセイの、KMA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KMA陽性細胞株は、JJN3、Pfeiffer、NCI-H929を含んでおり、一方KMA陰性細胞株は、Nalm-6およびMoltを含んでいた。

【図12B】KMA+およびKMA-細胞株を用いたKM.CAR_hCH2CH3_28z T細胞(図12A)またはKM.CAR_h_28TM_41BBz T細胞(図12B)標準クロム放出アッセイの、KMA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KMA陽性細胞株は、JJN3、Pfeiffer、NCI-H929を含んでおり、一方KMA陰性細胞株は、Nalm-6およびMolt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

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PigglyBac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（scFv）、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⁺、CD8⁺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の部分を意味する。「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の部分を意味する。「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。

【 0 0 2 8 】

「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。

【 0 0 2 9 】

「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) 2 、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。

【 0 0 3 0 】

「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 ') 2 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。

【 0 0 3 1 】

「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。

【 0 0 3 2 】

「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。

【 0 0 3 3 】

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。

【 0 0 3 4 】

「 KappaMab 」とは、以前に I S T - 1097 または M D X - 1097 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、Kappa Ma bは、Kappa Ma 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、「Kappa Ma 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。「Kappa Ma 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、Kappa Ma 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。

【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。

【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CHYSIEL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つてもよい。

【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、ポ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「HD-I」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。HD-I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、ボリノスタット(SAH A)、ベリノスタット(PXD101)、LAQ824、パノビノスタット(LBH589)を含むヒロキサム酸(hyroxamic 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)、C1994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族化合物を含む。

【0040】

10

20

30

40

50

カッパ骨髄腫抗原および抗体

カッパ骨髄腫抗原またはKMAは、骨髄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パ軽鎖からなる(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、KappaMab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。KappaMab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、カッパ鎖が重鎖に関連していない、したがって無傷カッパ鎖含有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、ヒトカッパ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(Hutchins on et al. (2011) Mol. Immunol.)。患者の骨髄生検に由来する原発性骨髄腫細胞上のKMAの典型的な発現は、図3においてKappaMab結合により示されている。KappaMab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、KappaMab 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、KappaMab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もよい。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、KappaMab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、KappaMab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、KappaMab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. KappaMab 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、KappaMab VLは、柔軟性リンカーを介してKappaMab 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(Gly₄Ser)₃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し、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

る。

【0044】

I II . 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 Ig G 1 ヒンジ領域、または Ig G 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 鎮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)_x (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)₃ を含む。

【0045】

I V . 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 鎮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。

【0046】

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、マウスマodel 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

10

20

30

40

50

8、4-1BB、ICOS、CD27、CD270、CD30およびOX-40を含むいくつかが調査されている。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。

10

【0047】

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(Airaldi, 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、固体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-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(Airaldi, 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、不良な予後に相關している(Rawstron, et al. (2000) Blood 96(12):3880-3886, Ludwig, et

40

50

a 1 . (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、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 , et al . (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 II 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 et al (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 et al . (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 × 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 , et al . (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 et al . (2 0 0 2) 、 B o r s e t , et al . (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

囲の骨病変に相関する(Seidel et al. (1998)、Wader, et al. (2008)、Alexandrakis, et al. (2003))。さらに、KappaMab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、KappaMab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SANT7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GAL3C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GAL3C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SANT7およびGAL3C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SANT7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、SANT7およびGAL3Cを発現する。10

【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SANT7)、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。20

【0054】

一実施形態において、T細胞は、静脈穿刺、骨髄の吸引、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CD3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CD4またはCD8の発現に基づいて分類され、CD4⁺T細胞またはCD8⁺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。30

【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、SANT7、GAL3C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、Piggly Bac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Pi40

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。

【 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。

【 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。

【 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

10

20

30

40

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) またはボ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、パノビノstatt、ボリノstatt、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statt、LAQ824、エンチノstatt、C1944またはモセチノstatt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、以下の実験的実施例を参照して、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】

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 Manage 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KMA.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】

10

20

30

40

50

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

【0069】

KappaMab抗体軽鎖可変領域は、DIVMTQSQQKFMSTSVD
RVSVCCKASQNVTNVAWYQQKPGQSPKALIYSTSYRYSGVPDR
FTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPYT
FGGTTKLEIK(配列番号21)である。

【0070】

重鎖可変領域は、EVQLQQSGAELVKPGASV
KLSCTAGFNIKDTYMH
WVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQGKATII
ADTSSNTAYLQLSSLTSE
DTAVYYCARGVYHDYDGDYWGQ
GTTLT
VSSYVTVSS(配列番号22)である。

10

【0071】

(G4S)₃柔軟性リンカーは、GGGGSGGGGS
GGGGS(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
SSQDPAEPKSPDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKD
TLMISRTPEVTCVV
VVDVSHE
DPEV
KFNWYV
DGVEVHN
AKTKP
REEQYN
NSTYRV
VSVLTV
LHQDWLN
GKEYK
CKVSN
KALP
APIEKT
ISKAKGQ
PREPQV
YTLPPSR
DELTKNQ
VS
LTCLV
KG
FYPS
SDIA
VEWE
SNGQ
PENN
YKTT
PPVLD
SDGS
FFLYSK
LT
V
DKSRW
QQGN
VFSC
SVM
HEAL
HNHY
TQKS
LSLSPG
KKD
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
LVVVGGVLACYS
LLVTVAF
IIFW
VRSK
RSRL
LHSDY
MNMT
P
RRPG
PTRK
HYQPYAPP
RDFAA
YRS(配列番号25)である。

30

【0074】

ヒトCD3ゼータ(Uniprot P20693)の細胞内ドメインは、
RVKF
S
R
S
ADAP
AYQQG
QNQLY
NE
LN
LGR
RE
EYD
VLD
DKR
RG
DPEM
GGK
P
RRK
NPQ
EG
LYNELQ
KD
KMA
EAY
SE
IG
MK
GE
RR
RG
KG
HD
GLY
QGL
STAT
KDT
YDAL
HM
QAL
PPR(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

50

【化1】

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSR DIVMTQS QKFMSTSVGDRV SVTCKASQNVGTNVA
 WYQQKPGQSPKALIYSTSYRSGVPDRFTGSGSGTDFLTISNVQSEDLAEYFCQQY
 NSYPYTFGGGT KLEIKGGGGSGGGSGGGSEVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTAS
 GFNIKDTYMHWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQGKATIIADTSSNTAYLQ

LSSLTSEDTAVYYCARGVYHDYDGDYWGGTTLVSSYVTVSSQDPAEPKSPDKTH
 TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
 10 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTS
 KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPGKKDP
 KFWVLVVVGVLACYSLLTVAFIIFWVRSKRSRLLHS DYMNMTPRRPGPTRKHYQ
 PYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQQNQLYNENLGRREYDVLDKRRGRDP
 EMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATK
 DTYDALHMQALPPR (配列番号27)。

20

【0076】

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。

【0077】

30

40

50

【化2 - 1】

ATGGAGTTGGGCTGAGCTGGCTTTCTTGTGGCTATTTAAAAGGTGTC
 CAGTGCTCTAGAGACATCGTCATGACCCAGTCTCAAAATTGATGCCACATCAG
 TAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATG
 TAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTGATTACTCGAC
 ATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTCACAGGCAGTGGATCTGGGACA
 GATTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTCT
 GTCAGCAATATAACAGCTATCCGTACACGTTGGAGGGGGACCAAGCTGGAAA
 TAAAGGGTGGCGGTGGCTGGCGGTGGTGGGTGGCGGCGGATCTGAGG
 TGCAGCTGCAGCAGTCAGGGCGGAGCTGTGAAGCCAGGGCCTCAGTCAAGT
 TGTCTGTACAGCTCTGGCTAACATTAAGACACCTATATGCACTGGTGAA
 GCAGAGGCCTAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAATGG
 TAACACTAAATATGACCCGAAGTCCAGGGCAAGGCCACTATAATAGCAGACAC
 ATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCC
 GTCTATTACTGTGCTAGGGGGTCTACCATGATTACGACGGGACTACTGGGCC
 AAGGGACCACGCTACCGTCTCCTCACGTACCGTCTTCACAGGATCCGC
 CGAGCCCAAATCTCCTGACAAACTCACACATGCCACCAGTGCACCTGA
 ACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTCCTCTCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTC
 ATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAA
 GACCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC
 AAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC
 CTCACCGTCCCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTC
 TCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGG
 CAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCGGGATGAGCTGACC

10

20

30

40

50

【化 2 - 2】

AAGAACCCAGGTCA GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC
 GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAACCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCC
 TCCC GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTCTTACAGCAAGCTACCCGTGGAC
 AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT
 CTGCACAACCACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAAAAAGAT
 CCCAAATTGGGTGCTGGTGGTGGAGTCCTGGCTATAGCTTG
 TAGTAACAGTGGCCTTATTATTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCT
 GCACAGTGA C TACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCCCACCCGCAAGCA
 TTACCAGCCCTATGCC ACCACCGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAG
 TTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTAC CAGCAGGCCAGAACCCAGCTCTAT
 AACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTGACAAGAGACGT
 GGCCGGGACCCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGG
 CCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGG
 GATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGCAAGGGCACGATGGCCTTACCA GGGTCT
 CAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCC TTACATGCAGGCCCTGCC
 CGC (配列番号 28)。

10

20

30

【0078】

このコンストラクトの構築に関して、5' Eco RI 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Ala I 制限酵素部位を組み込んだ IgG 1 定常領域の一部からなる遺伝子配列を、GeneArt (Thermo Fisher Scientific)により合成し、配列を検証し、次いで pIRII-CAR.CD 19-28z Piggy Bac 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 Piggy Bac トランスポザー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。Piggy Bac トランスポゾン / トランスポザーゼ系は、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。Piggy Bac 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。

【0079】

KM.CAR-hCH2CH3-28z 発現 T 細胞を、10ng/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。

【0080】

3 週間の終わりにおいて、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+ 骨髓腫および 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】

40

50

実施例 2：ヒト骨髄腫異種移植片マウスモデルの確立。

多発性骨髄腫のマウスへのヒト骨髄腫の異種移植モデルを確立した。R P M I 8 2 2 6 または代替の骨髄腫細胞株を、R a g 2 - / - c - / - (B A L B / c) マウスに静脈内接種し、R a g MM モデルを形成した(図 5 A ~ 5 D)。R a g 2 - / - c - / - (B A L B / c) マウスは、マウスリンパ球(T、B および N K 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 5 E)。我々は、K M A . C A R 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。

【 0 0 8 2 】

実施例 3：最適化された K M A . C A R コンストラクト

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、C D 2 8 または 4 - 1 B B (C D 1 3 7 - U n i p o r t Q 0 7 0 1 1))を有する実施例 1 に記載の K M s c F v を含有する 6 つの C A R コンストラクトを C D 3 ゼータエンドドメインと共に構築した(図 2 および図 6 B ~ 6 D)。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、K M A . C A R の安定な T 細胞表面発現を確実とするために、C D 2 8 膜貫通ドメインを使用した。スペーサーとして I g G 1 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(G 4 S)₃柔軟性リンクを s c F v とスペーサー領域との間に配置した。これらの C A R は、g e n s c r i p t により商業的に合成され、さらなる試験のために、p V A X 1 P B P i g g y B a c トランスポゾンプラスミド内にクローニングされた。

【 0 0 8 3 】

6 つの K M . C A R コンストラクトのうちの 3 つは、C D 2 8 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。

【 0 0 8 4 】

この群の第 1 のコンストラクトは、K M . C A R _ h C H 3 _ 2 8 z コンストラクトであったが、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および C H 3 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 5 】

10

20

30

40

50

【化3-1】

ATGGAGTTGGGCTGAGCTGGCTTTCTTGTGGCTATTAAAAGGTGTC
 CAGTGCTCTAGAGACATCGTCATGACCCAGTCTCAAAATTATGTCCACATC
 AGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTAC
 TAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTGATT
 TACTCGACATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGT
 GGATCTGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACT
 TGGCAGAGTATTCTGTCAAGCAATATAACAGCTATCCGTACACGTTGGAGG
GGGGACCAAGCTGGAAATAAGGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGT
GGTGGCGCGGATCTGAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGGCGGAGCTTGT
AGGGGCCTCAGTCAAGTGTCCGTACAGCTCTGGCTCAACATTAAGACACCTATA
TGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCCTGAACAGGGCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATC
CTGCGAATGGTAACACTAAATATGACCCGAAGTCCAGGGCAAGGCCACTATAATAGC
AGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACT
GCCGTCTATTACTGTGCTAGGGGGTCTACCATGATTACGACGGGACTACTGGGGC
CAAGGGACACGCTCACCGTCTCCCGGTGGAGGCGGGTCTGGGGCGGAGGTT
CAGGCAGGGGTGGTCCGAGCCCCAAATCTCCTGACAAAACACACATGCC
AGGGCAGCCCCGAGAACCAACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCAGGATGA
GCTGACCAAGAACCAAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGCTAAAGGCTCTATCC
CAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAACAACTA
CAAGACCCACGCCTCCCGTGGACTCCGACGGCTCCCTCTACAGC
AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAACAGAGCCTCTCC
CTGTCTCCGGTAAATTGGGTGCTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCT
ATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTATTATTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGC
AGGCTCCTGCACAGTGAATGAAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCCCACCC
GCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCAACCACGCGACTTCGAGCCTATCGCTCCAGA
GTGAAGTTCAAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACCGAGCAGGCCAGAACAGCT
CTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTGGACAAGAGACGT
GGCCGGACCCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCT
GTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAA
GGCGAGCGCCGGAGGGCAAGGGCACGATGGCCTTACCAAGGGTCTCAGTACAGC

10

20

30

40

【化3-2】

CACCAAGGACACCTACGACGCCCTCACATGCAGGCCCTGCCCTCGC (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、Kap
 paMab軽鎖可変領域、(G4S)₃リンカー、KappaMab重鎖可変領域、第2
 の(G4S)₃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 】

10

ATGGAGTTGGCTGAGCTGGCTTTCTGTGGCTTTAAAAGGTGTC
 CAGTGCTCTAGAGACATCGTCATGACCCAGTCTCAAAATTATGTCCACATC
AGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTAC
TAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTGATT
TACTCGACATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGT
GGATCTGGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACT
TGGCAGAGTATTCTGTCAAGCAATAAACAGCTATCCGTACACGTTGGAGG
GGGGACCAAGCTGGAAATAAAGGGGTGGCGGTGGCTGGGCGGTGGTGGTCG
GGTGGCGCGGATCTGAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGGCGGAGCTGTGAAGCC
AGGGGCCTCAGTCAAGTTGCTCTGTACAGCTTCTGGCTAACATTAAGACACCTATA
TGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATC
CTGCGAATGGTAACACTAAATATGACCCGAAGTCCAGGGCAAGGCCACTATAATAGC
AGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACT
GCCGTCTATTACTGTGCTAGGGGGTCTACCATGATTACGACGGGACTACTGGGGC
CAAGGGACCACGCTACCGTCTCCGGTGGAGGCAGGGTCTGGGGCGGAGGTT
CAGGCAGGGGTGGTCCGAGCCCAAATCTCCTGACAAACTCACACATGCCA
TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAAC
AGTGGCCTTATTATTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTG
ACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAAGCCC
TATGCCCAACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAAGTTCAAGCAGGAG
CGCAGACGCCCGCGTACCAAGCAGGGCCAGAACAGCTCTATAACGAGCTCAATCT
AGGACGAAGAGAGGAGTACGATTTGGACAAGAGACGTGGCCGGACCCCTGAGAT
GGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCCTAGGAAGGCCTGTACAATGAACCTGCAGAA
AGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGG
GCAAGGGGCACGATGGCCTTACCAAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACG
ACGCCCTCACATGCAGGCCCTGCCCTCGC (配列番号 30) 。

【 0 0 8 9 】

5' から 3' まで、このコンストラクト(配列番号 30)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)₃ リンカー、K a p p a M a b 重鎖可変領域、第 2 の(G 4 S)₃ 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。

20

20

30

40

50

【0090】

この群の第3のコンストラクトは、K M . C A R _ C D 8 a _ 2 8 z コンストラクトであったが、これは、スペーサーとしてC D 8 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。

【0091】

【化5】

ATGGAGTTGGGCTGAGCTGGCTTTCTTGTGGCTATTAAAAGG
 TGTCCAGTGCTCTAGAGACATCGTCATGACCCAGTCTCAAAATT
 CATGTCCA
 CATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGG
 GTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCTAAAGCACT
 GATTTACTCGACATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGC
 AGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAG
 ACTTGGCAGAGTATTCTGTCAAGCAATATAACAGCTATCCGTACACGTTCGG
AGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAGGGTGGCGGTGGCTGGCGGTGGTGGG
TCGGGTGGCGGCGGATCTGAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGGCGGAGCTTGAA
 GCCAGGGGCCTCAGTCAAGTGTCCGTACAGCTCTGGCTAACATAAAGACACC
 TATATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATT
 GATCCTCGAATGGTAACACTAAATATGACCCGAAGTCCAGGGCAAGGCCACTATAA
 TAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGA
 CACTGCCGTCTATTACTGTGCTAGGGGGTCTACCATGATTACGACGGGGACTACTGG
GGCCAAGGGACCACGCTACCGCTCCTCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCA
CCAACACCGGCCACCACATCGCGTCGCAGCCCCGTCCCTGCGCCCAGAG
GCGTGCCGGCCAGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGCTGGACTT
CGCCTGTGATTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGAGTCCCTGGCTATAGC
 TTGCTAGTAACAGTGGCCTTATTATTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGGAGCAGGCT
 CCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCACCCGCAAG
 CATTACCAGCCCTATGCCCAACACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGAGTGAA
GTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACCGAGCAGGGCCAGAACCAAGCTCTATAA
CGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGGAGTACGATGTTGGACAAGAGACGTGGCG
GGACCCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCTGTACAA
TGAACCTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATGGGATGAAAGGCGA
GCGCCGGAGGGCAAGGGCACCGATGGCCTTACCGGGTCTCAGTACAGGCCACCA
AGGACACCTACGACGCCCTCACATGCAGGCCCTGCCCTCGC (配列番号31)。

10

20

30

40

【0092】

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、K a p p a M a b 軽鎖可変領域、（G 4 S）₃ 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。

【0093】

この実施例に記載の6つのK M . C A R コンストラクトのうちの残りの3つは、4 - 1

50

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、 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 】

ATGGAGTTGGGCTGAGCTGGCTTTCTGTGGCTATTTAAAAGG
 TGTCAGTGCTCTAGAGACATCGTCATGACCCAGTCTCAAAATTATGTCCA
 CATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGG
 GTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACT
 GATTTACTCGACATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGC
 AGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAG
 ACTTGGCAGAGTATTCTGTCAAGCAATATAACAGCTATCCGTACACGTTGG
AGGGGGGACCAAGCTGAAATAAGGGTGGCGGTGGCTGGCGGTGGTGGG
TCGGGTGGCGGCGGATCTGAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGGCGGAGCTTGAA
 GCCAGGGGCCTCAGTCAGTTGCTGTACAGCTCTGGCTCAACATTAAAGACACC
 TATATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCTGGAGTGGATTGGAAGGATT
 GATCCTGCGAATGGTAACACTAAATATGACCCGAAGTCCAGGGCAAGGCCACTATAA
 TAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGA
 CACTGCCGTCTATTACTGTGCTAGGGGGTCTACCATGATTACGACGGGACTACTGG
GGCCAAGGGACCACGCTACCGTCTCCCGTGGAGGCGGGTCTGGGGCGGAG
GTTCAAGGCAGGGGGTGGTCCGAGCCCCAAATCTCCTGACAAAACACTCACACATGC
CCATTGGGTGCTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGT
AACAGTGGCCTTATTATTTCTGGGTGAAACGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATA
TATTCAAACAACCATTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGT
AGCTGCCGATTCCAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACGTGAGAGTGAAGTTICAG
CAGGAGCGCAGACGCCCGTACAGCAGGCCAGAACAGCTCTATAACGAGCT

10

20

30

【 化 6 - 2 】

CAATCTAGGACGAAGAGAGGGAGTACGATGTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGACCC
TGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAAC
GCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGGAGATGAAAGGCGAGCGCCG
GAGGGCAAGGGCAGCGATGCCCTTACCAAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACAC

40

CTACGACGCCCTCACATGCAGGCCCTGCCCTCGC (配列番号 3 2) 。

【 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) 3 リンカー、 K a p p a M a b 重鎖可変領域、第 2 の (G 4 S) 3 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、スペーサーとして 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 】

ATGGAGTTGGGCTGAGCTGGCTTTCTTGTGGCTATTAAAAGG
 10
 TGTCAGTGCTTAGAGACATCGTCATGACCCAGTCTAAAAATTCAATGTCCA
 CATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGG
 GTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACT
 GATTACTCGACATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGC
 AGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAG
 ACTTGGCAGAGTATTCTGTCAAGCAATAAACAGCTATCCGTACACGTTGG
 AGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAGGGTGGCGGTGGCTGGCGGTGGTGG
 20
TCGGGTGGCGGCGATCTGAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGGCGGAGCTTGAA
 GCCAGGGGCCTCAGTCAGTTGTCCGTACAGCTTCTGGCTCAACATTAAAGACACC
 TATATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCCTAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATT
 GATCCTGCGAATGGTAACACTAAATATGACCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAA
 TAGCAGACACATCCTCAAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGA
 CACTGCCGTCTATTACTGTCTAGGGGGTCTACCATGATTACGACGGGGACTACTGG
 GGCCAAGGGACCACGCTACCGCTCCTCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCA
CCAACACCGCGCCCACCATCGCGTCGCAGCCCCGTCCCTGCGCCCAGAG
GCGTGCCGCCAGCGGGGGCGCAGTGACACAGAGGGGCTGGACTT
CGCCTGTGATTGGGTGCTGGTGGTGGAGTCCTGGCTGCTATAGC
TTGCTAGTAACAGTGGCCTTATTATTTCTGGGTGAAACGGGGCAGAAAGAAACT
CCTGTATATATTCAAACAACCATTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAG
ATGGCTGTAGCTGCCGATTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACGTGAGAGT
GAAGTTCAAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACCAAGCAGGCCAGAACCGAGCTTA
TAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGGAGTACGATGTTGGACAAGAGACGTGGC
CGGGACCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCCTGTA
CAATGAACCTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATGGGATGAAAGGC
GAGCGCCGGAGGGCAAGGGCACGATGCCCTTACCAAGGGTCTCACTACAGGCCAC
CAAGGACACCTACGACGCCCTCACATGCAGGCCCTGCCCTCGC (配列番号 3 3)。

【 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)₃ 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

10

20

30

40

50

3 ゼータ細胞内ドメインを有する。

【0100】

この群の第3のコンストラクトは、K M . C A R _ h C H 2 C H 3 m u t _ 2 8 T M _ 4 1 B B z であり、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、C H 2 およびC H 3 ドメインを含有し、F c 受容体とのC H 2 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C A R T 細胞のクリアランスにより、in-vivoでの低減されたC A R 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。

【0101】

【化8-1】

ATGGAGTTGGCTGAGCTGGCTTTCTTGTGGCTATTAAAAGG
 TGTCCAGTGCTCTAGAGACATCGTCATGACCCAGTCTAAAAATTCAATGTCCA
 CATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGG
 GTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACT
 GATTTACTCGACATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGC
 AGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAG
 ACTTGGCAGAGTATTCTGTCAAGCAATATAACAGCTATCCGTACACGTTCGG
AGGGGGGACCAAGCTGAAATAAAGGGTGGCGGTGGCTGGCGGTGGTGGGG
TCGGGTGGCGGCGGATCTGAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGGGCGGAGCTTGAA
 GCCAGGGGCCTCAGTCAGTTGCTCTGTACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACACC
 TATATGCACIGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATT
 GATCCTGCGAATGGTAACACTAAATATGACCCGAAGTCCAGGGCAAGGCCACTATAA
 TAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGA
 CACTGCCGTCTATTACTGTGCTAGGGGGTCTACCATGATTACGACGGGGACTACTGG
GGCCAAGGGACCACGCTACCGTCCTCCGGTGGAGGCAGGTCTGGGGCGGAG
GTTCAAGGCAGGGGGTGGTTCCGAGCCCCAAATCTCCTGACAAAACCTCACACATGC

10

20

30

40

50

【化 8 - 2】

CCACCGTCCCCAGCACCTCCACTGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC
CAAAACCCAAGGACACCCCATGATCCCCGGACCCCTGAGGTACATGCG
TGGTGGTGAAGTGAGGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG
TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG
TACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGAC
TGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCA
GCCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA
CAGGTGTACACCCCTGCCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAG
AGCCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAG
TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAACGCCCTCCCGTG
CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGATGAGGCTC
GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGAGGCTC
TGCACAACCAACTACACACAGAACAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATTG
GGTGCTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTGCTATAGCTTGCTAGAACAGTGG
CCTTTATTATTTCTGGGTGAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAA
CAACCATTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCG
ATTTCCAGAAGAAGAACGAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCG
CAGACGCCCGCGTACCAGCAGGCCAGAACCCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAG
GACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGACCCCTGAGATGG
GGGGAAAGCCGAGAACGAGAACCCCTCAGGAAGGCCGTACAATGAACTGCAGAAAG
ATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGC
AAGGGCACGATGCCCTTACCAAGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGAC

10

20

30

GCCCTCACATGCAGGCCCTGCCCTCGC (配列番号34)。

【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、Kap p a Ma b 軽鎖可変領域、(G4S)₃リンカー、Kappa Ma b 重鎖可変領域、第2の(G4S)₃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。

【 0 1 0 5 】

2 8 z エンドドメイン_2 A_G F P 含有コンストラクト：

【 0 1 0 6 】

1 . p V A X 1 P B K M . C A R _ h C H 2 C H 3 _ 2 8 z _ 2 A _ G F P

【 0 1 0 7 】

2 . p V A X 1 P B K M . C A R _ h C H 3 _ 2 8 z _ 2 A _ G F P

【 0 1 0 8 】

3 . p V A X 1 P B K M . C A R _ h _ 2 8 z _ 2 A _ G F P

10

【 0 1 0 9 】

4 . p V A X 1 P B K M . C A R _ 8 a _ 2 8 z _ 2 A _ G F P

【 0 1 1 0 】

4 1 B B z エンドドメイン_2 A_G F P 含有コンストラクト：

【 0 1 1 1 】

1 . p V A X 1 P B K M . C A R _ h _ 2 8 T M _ 4 1 B B z _ 2 A _ G F P

【 0 1 1 2 】

2 . p V A X 1 P B K M . C A R _ 8 a _ 2 8 T M _ 4 1 B B z _ 2 A _ G F P

【 0 1 1 3 】

3 . p V A X 1 P B K M . C A R _ h C H 2 C H 3 m u t _ 2 8 T M _ 4 1 B B z _ 2 A _ G F P

20

【 0 1 1 4 】

4 - 1 B B 共刺激ドメインを有する K M . C A R T 細胞の生成

【 0 1 1 5 】

予備の K M . C A R _ h C H 2 C H 3 _ 2 8 z と 4 - 1 B B 含有 C A R 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 P i g g y B a c 系を使用したエレクトロポレーションにより、K M . C A R T 細胞を生成した。健常ドナーからの 4 0 0 万の末梢血液単核細胞(P B M C)を、N e o n エレクトロポレーションシステムにより、2 4 0 0 V で 2 0 m s の単一パルスで、それぞれ 5 u g の P i g g y B a c トランスポザーゼおよび P i g g y B a c 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 K M A . C A R コンストラクトは、K M . C A R _ h C H 2 C H 3 _ 2 8 z _ 2 A _ G F P 、K M . C A R _ h _ 2 8 T M _ 4 1 B B z _ 2 A _ G F P 、K M . C A R _ 8 a _ 2 8 T M _ 4 1 B B z _ 2 A _ G F P 、または K M . C A R _ h C H 2 C H 3 m u t _ 2 8 T M _ 4 1 B B z _ 2 A _ G F P を含んでいた。

30

【 0 1 1 6 】

エレクトロポレーションされた P B M C (C A R - P B M C)を、1 0 % ウシ胎仔血清を含む A I M V (A I M - V C M)中で一晩静置し、回収し、洗浄し、A I M - V C M 中に $1 \times 10^6 / m l$ で再懸濁させた。C A R - P B M C を、5 : 1 C A R - P B M C : J J N 3 比での照射 K M A 発現 J J N 3 細胞あり、またはなしで、自己照射 P B M C フィーダー細胞と共に培養した。インターロイキン-15 (I L - 15)を、3 日毎に 1 0 n g / m l 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

【 0 1 1 7 】

K M . C A R 発現の評価

【 0 1 1 8 】

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 K M . C A R 発現を評価した(図 8 A ~ 8 B)。K M . C A R T 細胞を、抗ヒト C D 3 抗体で表面染色し、C A R 発現を G F P 発現により評価した。

【 0 1 1 9 】

50

K M . C A R T 細胞は、*in-vitro*で存続するためにカッパ骨髄腫抗原を必要とする

【0120】

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(28%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(29%の C A R 発現の 6 倍増加と比較して、38%の C A R 発現の 15 倍増加)。

10

【0121】

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(26%の C A R 発現および 17 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 ヒンジのみのスペーサーを含有する 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 17%、なしでは 9%)。C D 8 アルファ鎖スペーサーを含有する 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

【0122】

K M . C A R T 細胞の機能的評価

【0123】

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)。

【0124】

30

サイトカインフローサイトメトリーのために、 2×10^5 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 μM)(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 μg / 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 ng / 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 ug / 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。

40

【0125】

標準クロム($^{51} C r$)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(N a₂ $^{51} C r O_4$)(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、N K 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% C O₂ 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Piggycbac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) を含有する單一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 Manager 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) - GGAGGAAAAACTGTTCATACAGAAGGGCGT (配列番号35) に続く、最小IL-2プロモーター - ACATTTGACACCCCCATAATATT TTTCCAGAATTAACAGTATAAAATTGCATCTCTTGTTCAG A G T T C C C T A T C A C T C T T T A A T C A C T A C T C A C A G T A A C C T C A A C T C C T G (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】

GGAGGAAAAACTGTTCATACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAA
ACTGTTCATACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAAACTGTTCATACAGAAGG
CGTCAATTGTCCCATCGAATTAGGAGGAAAAACTGTTCATACAGAAGGCGTCA
ATTAGGAGGAAAAACTGTTCATACAGAAGGCGTCAATTAGGAGGAAAAACTGT

TTCATACAGAAGGCGTCAATTGTCGGGACATTTGACACCCCCATAATATT
TTCCAGAATTAACAGTATAAATTGCATCTCTTGTCAAGAGTTCCCTATCACT
CTCTTAATCACTACTCACAGTAACCTCAACTCCTGAACCTCCATGGATGGTGAG
CAAGGGCGAGGAGCTGTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCG
ACGTAACGCCACAAGTCAGCGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAC
GGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGACCACCGGCAAGCTGCCGTGCCCTGCC
ACCCCTCGTGAACCAACCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCAC
ATGAAGCAGCACGACTTCTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGC
ACCATCTTCTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCAGGTGAAGTTGAG
GGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTCAAGGAGGACGGC
AACATCCTGGGGACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGG
CCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGA
CGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGATCCGGAG
CCACGAACTTCTCTGTTAAAGCAAGCAGCAGGAGACGTTGAAGAAAACCCGGTC
CTATTAAATCCTCGACTGTGCCCTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCC
CTCCCCCGTGCCTTCCTGACCCCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCCTTCC
TAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGCTGAGTAGGTGTCAATTCTATT
TGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAAT

AGCAGGCATGCTGGGATCGGGTGGGCTATGGC (配列番号：37)。

【0129】

5'から3'まで、このコンストラクトは、N F A T - R E、I L - 2 最小プロモーター、e G F P、およびB G Hポリアデニル化シグナルを含有する。

【0130】

このカセットは、G e n s c r i p tにより商業的に合成され、5' c H S 4 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p V A X 1 P B 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、Q B E n d 1 0 モノクローナル抗体により認識されるC D 3 4 のエピトープ、およびC D 2 0 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R Q R 8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(p V A X 1 P B N F A T G F P - R Q R 8 プラスミド)。p V A X 1 P B N F A T G F P - R Q R 8 トランスポゾンプラスミドおよびp V A X 1 P B a s e 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N F A T G F P - R Q R 8 遺伝子挿入の永久的統合をもたらす。

10

20

30

40

50

【0131】

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pVAX1PB-NFATGFP-RQR8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、 4×10^6 のPBM Cを、それぞれ5ug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50ng/mlのホルボルミリスチン酸アセテート（PMA：Sigma-Aldrich）および1ug/mlのイオノマイシン（Sigma-Aldrich）で一晩非特異的に刺激し、非刺激対照と比較した。形質導入された細胞を、RQR8マーカー発現に関してQBEnd10染色により識別し、活性化誘導遺伝子発現（eGFP）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、eGFPを発現することが確認された（図10）。 10

【0132】

実施例5：KM.CAR制御生物学的療法の設計

IL-12および/またはインターロイキン-6受容体拮抗薬SANT7を含有し、また活性化誘導性プロモーターの制御下でIL-12および/またはSANT7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（Hooijberg et al. 2000）もまた構築した。SANT-7配列は、Prof Rocco Savinoにより提供され、Savino et al 1994およびSporen et al 1996（14～17）に従い提供される野生型IL-6遺伝子配列（NCBI参考配列：NM_000600.4）の突然変異に基づいていた。配列を、Clone Manager 20（Sci-Ed Software）にインポートし、ELISAによる上澄み中の検出のために $6 \times$ Hisタグを追加した。

【0133】

SANT-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。

【0134】

【化10】

```
MNSFSTSAFGPVAFSLGLLLVLPAAPVPPGEDSKDVAAPHRQPLTS
SERIDKQIRDILDISALRKETCNKSNMCESSKEADAIWNLNLPKMAEKDGCFYKGF
NEETCLVKIITGLLEFEVYLEYLQNRFESSEEQARAVQMRTKDLIQFLQKKAKNLDAI
TTPDPTTNASLLTKLQAQNQWLQDMTTHLILRSFKEFLIRSLRALRAMHHHHHH
```

（配列番号：38）。ヌクレオチド置換は、Y31D、G35F、L57D、E59F、N60W、Q75Y、S76K、S118R、V121D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Q211A置換を含有していた。 30

【0135】

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

【0136】

40

50

【化11】

ATGAACTCCTCTCCACAAGCGCCTCGGTCCAGTTGCCTTCTCCCT
 GGGGCTGCTCCTGGTGGTGCCTGCTGCCTCCCTGCCAGTACCCCCAGGAGAA
 GATTCCAAGATGTAGCCGCCCCACACAGACAGCCACTCACGAGCTCAGAACGA
 ATTGACAAACAAATTGGGACATCCTCGACTTATCTCAGCCTTAAGAAAGGAGA
 CATGTAACAAGAGTAACATGTGTGAGAGCTCAAAGAGGCAGACGCATTCTGGA
 ACCTGAACCTCCAAGATGGCTAAAAAGATGGATGCTTCTACAAAGGATTCA
 ATGAGGAGACTTGCCTGGTGAAAATCATCACTGGTCTTCAGGTTGAGGTATA
 CCTAGAGTACCTCCAGAACAGATTGAGAGTAGTGAGGAACAAAGCCAGAGCTGT
 GCAGATGCGCACAAAGACCTGATCCAGTTCCCTGCAGAAAAAGGCAAAGAATCT
 AGATGCAATAACCACCCCTGACCCAACCACAAATGCCAGCCTGCTGACGAAGCT
 GCAGGCACAGAACCAAGTGGCTGCAGGACATGACAACATCTCATCTGAGATC
 TTTTAAGGAGTTCTGATCCGTAGCCTGAGGGCTTCGGCTATGCATCATCAC
 CATCACCAC (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 (G4S) 3 リンカーに繋げることにより設計し (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 SANT7 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】

30

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 SANT7 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 Piggy Bac プラスミド内にクローニングすることができた。

【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】

MCHQQLVISWFSLVFLASPLVAIWELKKDVYVVVELDWYPDAPGEM
 VVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQKEFGDAGQYTCHKGGEVLS
 HSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDL
 TFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVRGDNKEYEYSVECQEDSACPAAEESLP
 IEVMVDAVHKLKYE NYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDT
 WSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYY
 SSSWSEWASVPCSGGGGGGGGGSRNLPVATPDPMFPCLHHSQNLLRAVS
NMLQKARQTLEFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACPLETKNESCLNSRETTSFITN
GSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQJFLDQNMLAVI
DELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS

(配列番号：40)。

10

【0141】

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)3リンカー、およびIL-12 p35サブユニットを含有する。

20

【0142】

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。

【0143】

30

40

50

【化13】

ATGTGTCACCAGCAGTGGCATCTCTGGTTCCCTGGTTTCT
 GGCATCTCCCTCGTGGCATATGGAACTGAAGAAAGATGTTATGTCGTAGAA
 TTGGATTGGTATCCGGATGCCCTGGAGAAATGGTGGCCTCACCTGTGACACCC
 CTGAAGAAGATGGTATCACCTGGACCTGGACCAGAGCAGTGAGGTCTTAGGCT
 CTGGCAAAACCTGACCATCCAAGTCAAAGAGTTGGAGATGCTGCCAGTACA
 CCTGTCACAAAGGAGGCGAGGTTCAAGCCATTGCTCCTGCTGCTCACAAAAAA
 GGAAGATGGAATTGGTCCACTGATATTAAAGGACCAGAAAGAACCCAAAAAA
 TAAGACCTTCTAAGATGCGAGGCCAAGAATTATTCTGGACGTTCACCTGCTGG
 TGGCTGACGACAATCAGTACTGATTGACATTCACTGTCAAAAGCAGCAGAGGC
 TCTTCTGACCCCCAAGGGGTGACGTGCGGAGCTGCTACACTCTGCAGAGAGAG
 TCAGAGGGGACAACAAGGAGTATGAGTACTCAGTGGAGTGCCAGGAGGACAGT
 GCCTGCCAGCTGCTGAGGAGAGTCTGCCATTGAGGTATGGTGGATGCCGTT
 ACAAGCTCAAGTATGAAAACACACCAGCAGCTTCTCATCAGGGACATCATCA
 AACCTGACCCACCAAGAACTTGCAAGCCATTAAAGAATTCTGGCAGG
 TGGAGGTCAGCTGGAGTACCCGTACACCTGGAGTACTCCACATTCTACTTCTC
 CCTGACATTCTCGCTTCAGGTCCAGGGCAAGAGCAAGAGAGAAAAGAAAGATAG
 AGTCTTCACGGACAAGACCTCAGCCACGGTCATCTGCCGAAAAATGCCAGCAT
 TAGCGTGGGGCCCAGGACCGCTACTATAGCTATCTGGAGCGAATGGGCATCT
 GTGCCCTGCAGTGGTGGCGGTGGAAGCGGGGTGGCGGAAGCGGGGTGGCGGC
 AGCAGAAACCTCCCCGTGGCCACTCCAGACCCAGGAATGTTCCATGCCCTCACC
 ACTCCAAAACCTGCTGAGGGCCGTCAAGAACATGCTCCAGAAGGCCAGACAAA
 CTCTAGAATTTCACCTTGCACTTCTGAAGAGATTGATCATGAAGATATCACAAA
 AGATAAAACCAAGCACAGTGGAGGCCTGTTACCATGGAATTAAACCAAGAATGA
 GAGTTGCCTAAATTCCAGAGAGACCTCTTCATAACTAATGGGAGTTGCCTGCC
 TCCAGAAAGACCTTTTATGATGGCCCTGTGCCTAGTAGTATTATGAAGACTT
 GAAGATGTACCAAGGTGGAGTTCAAGACCATGAATGCAAAGCTCTGATGGATCC
 TAAGAGGCAGATCTTCTAGATCAAACATGCTGGCAGTTATTGATGAGCTGATG
 CAGGCCCTGAATTCAACAGTGAGACTGTGCCACAAAATCCTCCCTGAAGAAC
 CGGATTAAACTAAATCAAGCTCTGCATACTCTCATGCTTCAGAATT
 CGGGCAGTGACTATTGATAGAGTGAGCTATCTGAATGCTTCC (配列番号:41)。 40

【0144】

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GAL3C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CD8-アルファリーダーペプチド、および検出のための6×Hisタグを含有する。GAL3Cのアミノ酸配列を、以下に列挙する。

【0145】

10

20

30

40

50

【化14】

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSRHHHHHGAPAGPLIVPYNLPLPGGV

VPRMLITILGTVKPNANRIALDFQRGNDVAFHFNPRFNENNRRVIVCNTKLDNNWGR
EERQSVFPFESGKPKIQVLVEPDHFKVAVNDAHLLQYNHRVKKLNEISKLGISGDID

LTSASYTMI (配列番号: 42)

【0146】

G A L 3 C コンストラクトの対応する D N A 配列を、以下に記載する。

10

【0147】

【化15】

ATGGAGTTGGGCTGAGCTGGCTTTCTTGTGGCTATTTAAAAGG
TGTCCAGTGCTCTAGACATCATCACCATACCACGGCGCCCTGCTGGGCCACTG
ATTGTGCCTTATAACCTGCCTTGCCCTGGGGAGTGGTGCCTCGCATGCTGATAA
CAATTCTGGGCACGGTGAAGCCCAATGCAAACAGAATTGCTTAGATTCCAAAG
AGGGAATGATGTTGCCTTCACTTAACCCACGCTTCATGAGAACAAACAGGAG
AGTCATTGTTGCAATACAAAGCTGGATAATAACTGGGAAGGGAAGAAAGACA
GTCGGTTTCCCATTGAAAGTGGAAACCATTCAAAATACAAGTACTGGTGAA
CCTGACCACTTCAAGGTTGCAGTGAATGATGCTCACTGTTGCAGTACAATCATC
GGGTAAAAAAACTCAATGAAATCAGCAAACGGGAATTCTGGTGACATAGACC
TCACCAGTGCTTCATATACCATGATA (配列番号: 43)

20

【0148】

C A R および「生物製剤」トランスポゾンプラスミドは、 I L - 1 2 のみ、 S A N T 7 のみ、 G A L 3 C のみ、または I L - 1 2 および S A N T 7 の両方、または I L 1 2 および G A L 3 C の両方、または S A N T 7 および G A L 3 C の両方、または I L - 1 2 の 3 つ全てのいずれかを発現する C A R T 細胞を生成するために核酸注入される。 S A N T 7 および G A L 3 C 。「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。 I L - 1 2 、 S A N T 7 のレベル。およびまたは G A L 3 C 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 E L I S A により C A R T 細胞培養物の上澄み中で測定され、 C A R のみを発現する対照 T 細胞と比較される。 C A R 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髄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 C A R コンストラクトは、 I L - 1 2 、 G A L 3 C および / または S A N T 7 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

【0149】

以前に確立された R P M I - R a g ヒト骨髄腫マウス異種移植片モデルに基づいて、我々の C A R T 細胞の i n - v i v o での機能を評価するために、 R P M I - R a g - L u c (K M A -) および J J N 3 - R a g - L u c (K M A +) モデルが開発される。 J J N 3 および R P M I 8 2 2 6 細胞が、 L u c - 1 で形質導入され、次いで R a g 2 - / - c - / - (B A L B / c) マウスに静脈内接種され、 J J N 3 - R a g - L u c および R P M I - R a g - L u c M M 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 I P 注射後の光学的画像化により監視され、血清ヒトカッパ (J J N 3) およびラムダ (R P M I) 軽鎖のレベルのレベルと関連付けられる。候補 C A R T 細胞の

40

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JJN3-Rag-LucおよびRPMI-Rag-Lucマウスのコホートが、 1×10^6 の全細胞から開始する増加用量のCAR T細胞(IL-12/SANT7発現あり、およびなし)でIV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(SFLC)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、MM細胞およびCAR 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】

10

参照文献

1. Rossig C, Pscherer S, Landmeier S, Altvat er 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. *Cytother*apy. 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, Jalla s AC, Vivien R, Rousseau R, Marabelle A, et a

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, Kopecky A, Linch 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 receptors 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, Sporenno 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. Sporenno E, Savino R, Ciapponi L, Paonessa 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 .

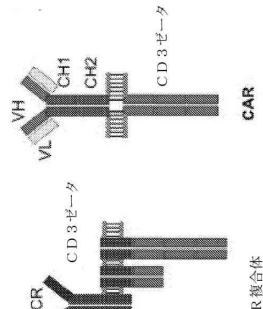
18 . Zhang L , Kerkar SP , Yu Z , Zheng Z , Yang S , Restifo NP , et al . Improving adoptive T cell therapy by targeting and controlling IL - 12 expression to the tumor environment . Mol Ther . 2011 ; 19 (4) : 751 - 9 .

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 .

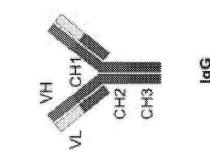
【図面】

【図 1】

【図 1 A】

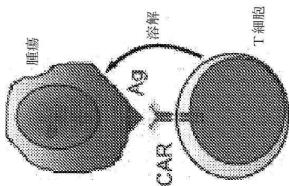


TCR複合体



IgG

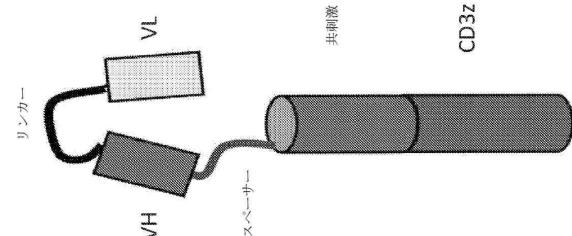
【図 1 B】



T細胞

【図 2】

【図 2】



CD3z

10

20

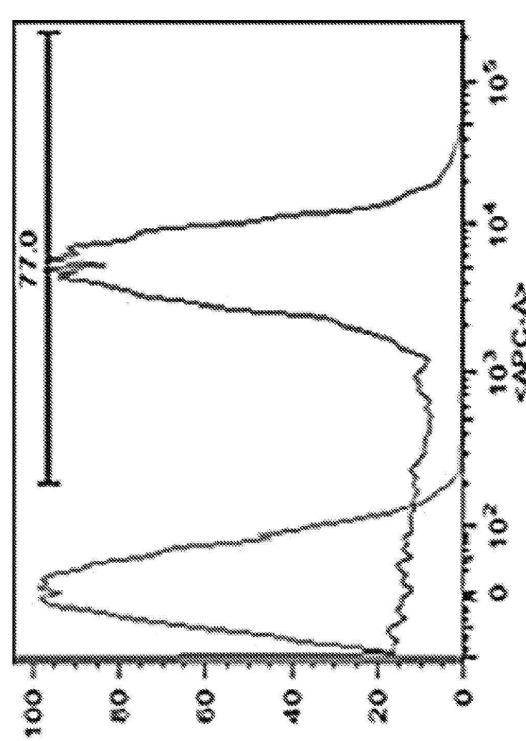
30

40

50

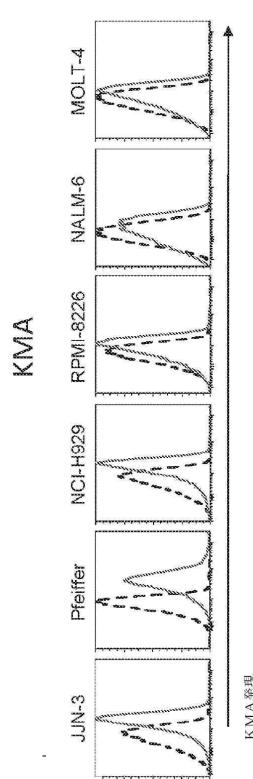
【図 3】

【図 3】



【図 4 A】

【図 4 A】



10

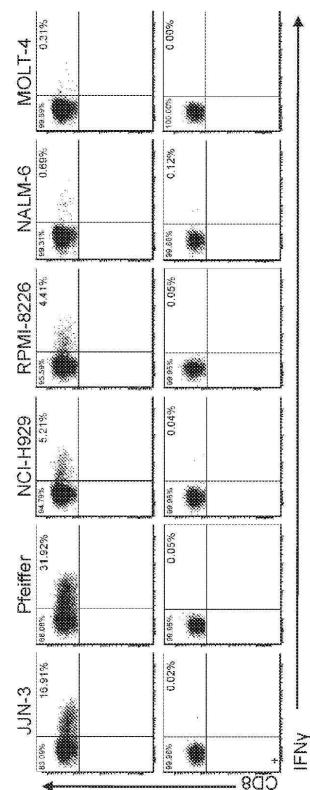
20

30

40

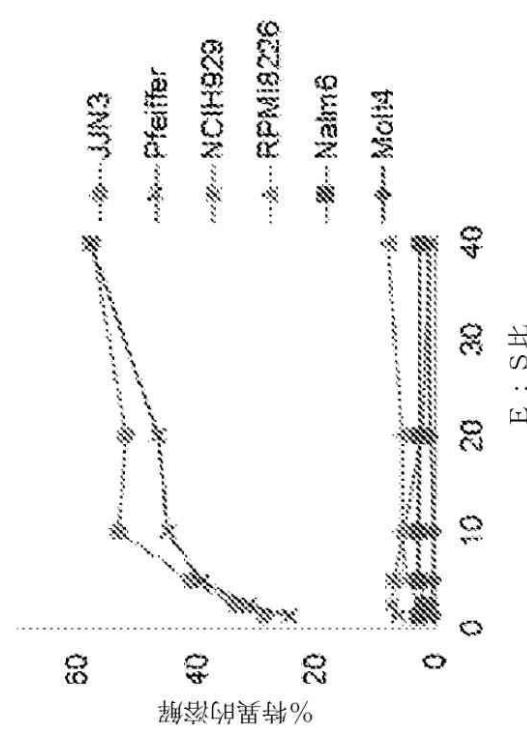
【図 4 B】

【図 4 B】



【図 4 C】

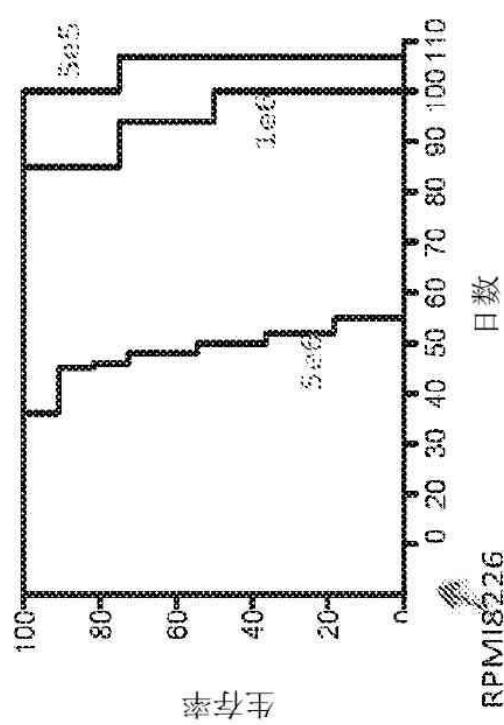
【図 4 C】



50

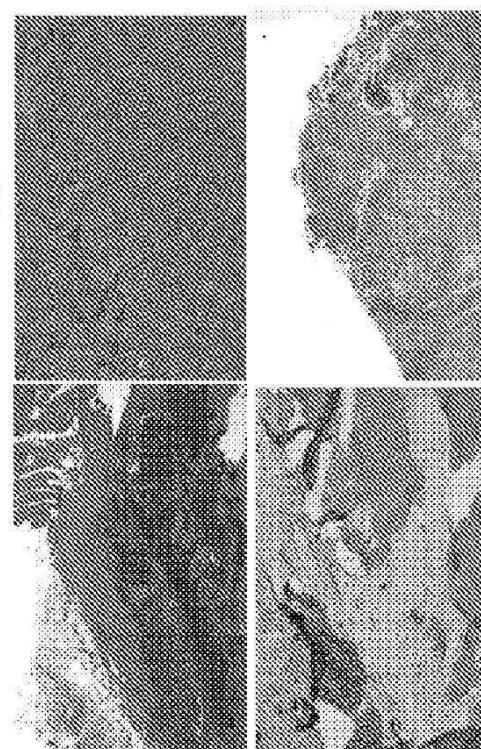
【図 5 A】

【図 5 A】



【図 5 B】

【図 5 B】



10

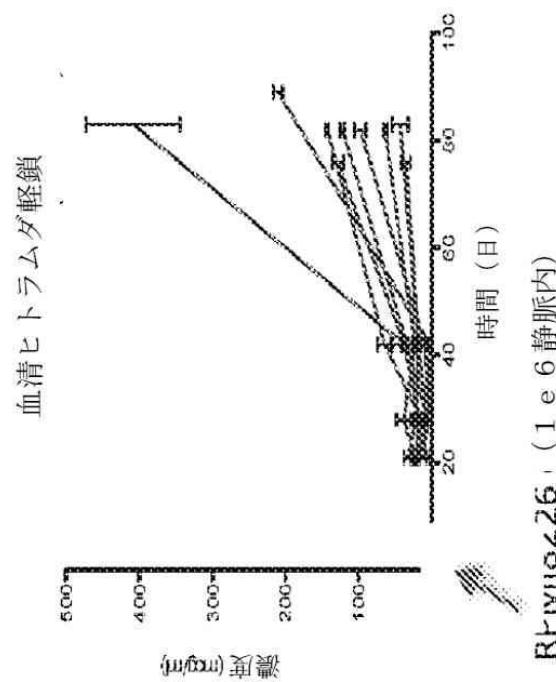
20

30

40

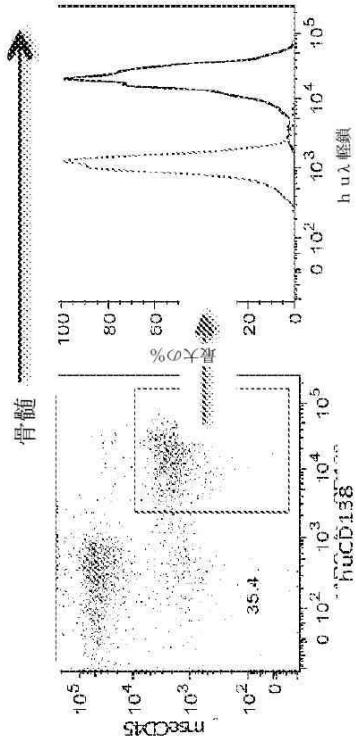
【図 5 C】

【図 5 C】



【図 5 D】

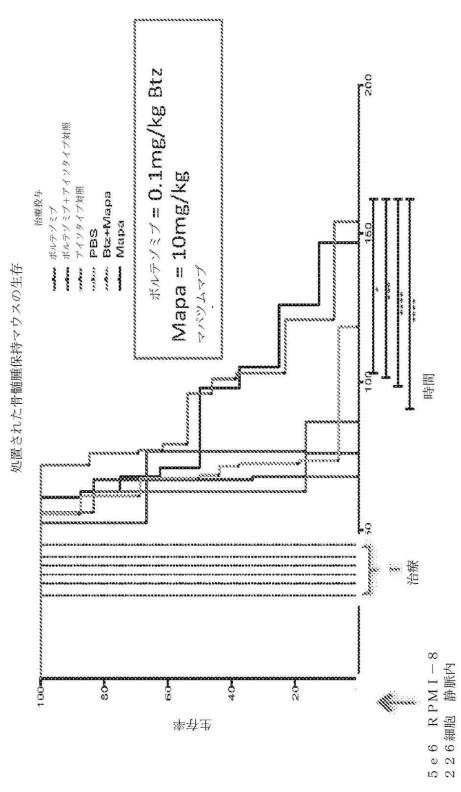
【図 5 D】



50

【図 5 E】

【図 5 E】



【図 6 A】

【図 6 A】

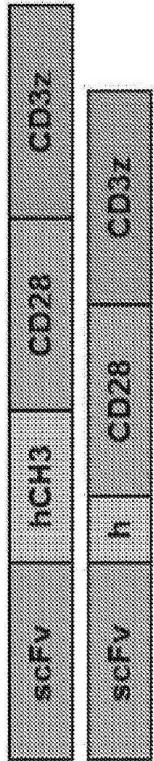


10

20

【図 6 B】

【図 6 B】



【図 6 C】

【図 6 C】

scFv	opti	4-1BB	CD32
scFv	opti	OX-40	CD32
scFv	opti	CD28	OX-40
scFv	opti	CD28	4-1BB
scFv	opti	4-1BB	CD32

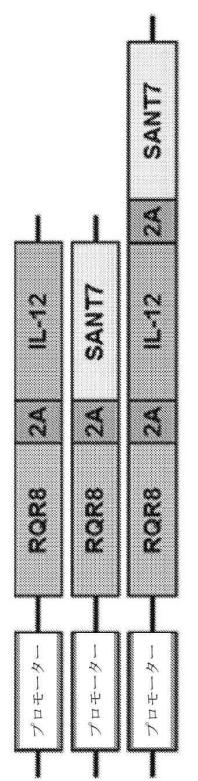
30

40

50

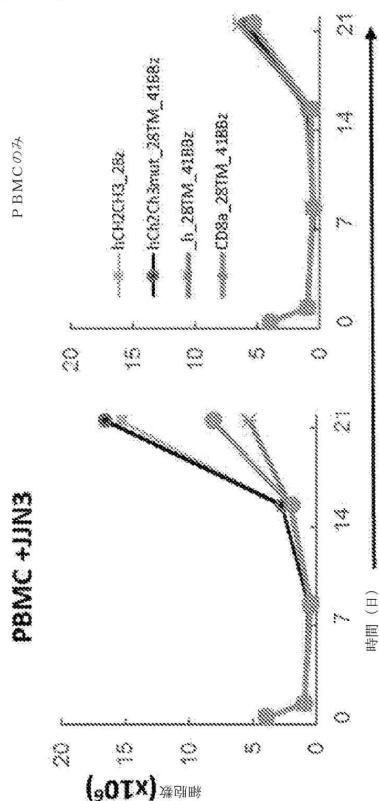
【図 7】

【図 7】



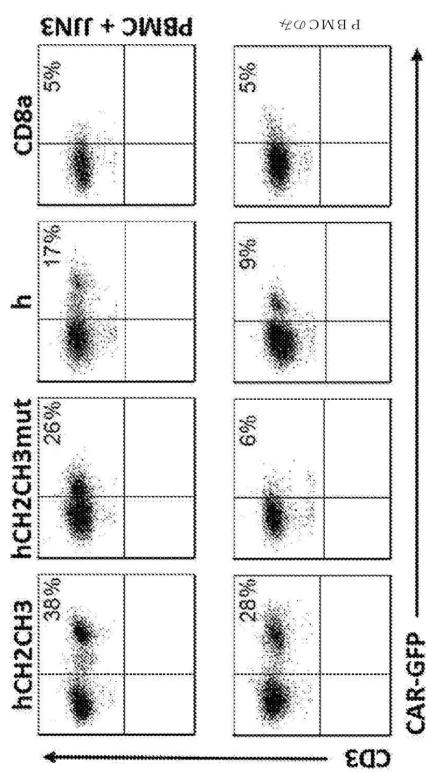
【図 8 A】

【図 8 A】



【図 8 B】

【図 8 B】



【図 9】

【図 9】



10

20

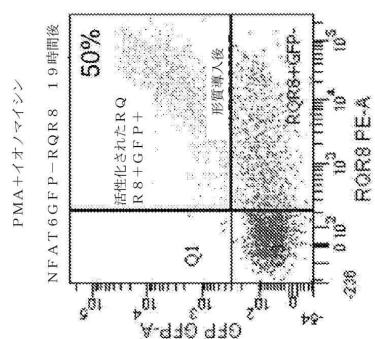
30

40

50

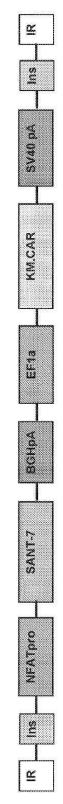
【図 1 0】

【図 1 0】



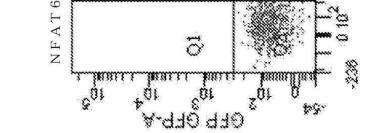
【図 1 1】

【図 1 1】



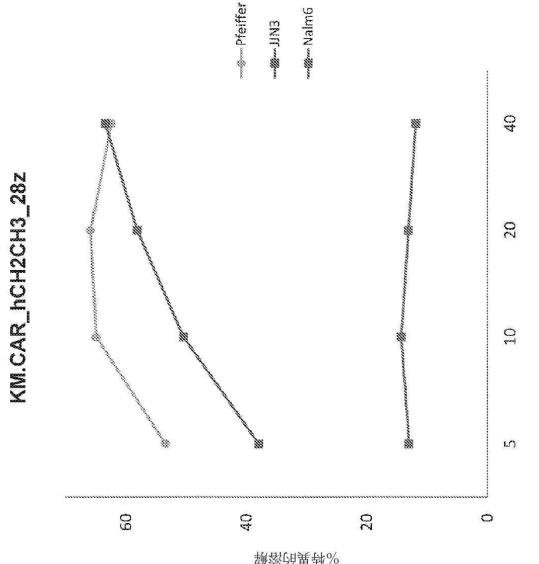
10

20



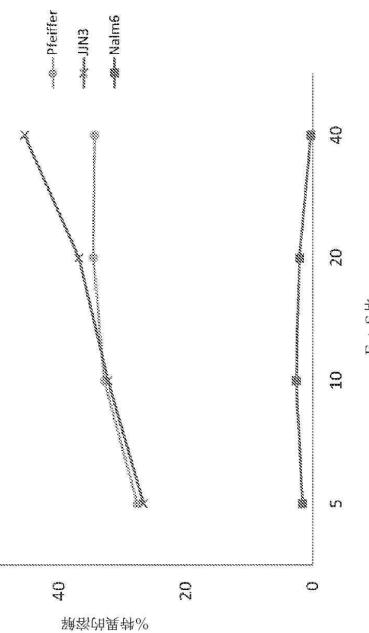
【図 1 2 A】

【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 2145 ニュー サウス ウエールズ, ウエストミード, インスティテュート
ロード, ウエスタン 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 2015 ニュー サウス ウエールズ, 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 145, 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 ゴットリープ, ディビッド

オーストラリア国 2145 ニュー サウス ウエールズ, ウエストミード, インスティテュート
ロード, ウエスタン 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 2145 ニュー サウス ウエールズ, ウエストミード, ハークスベリー 口
ード 214, 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2005-504018 (JP, A)

特表2012-522811 (JP, A)

Blood (2006) Vol. 108, No. 12, p. 3890 - 3897

Int. J. Hematol. (2014) Vol. 99, p. 361 - 371

Discov. Med. (2014) Vol. 17, No. 91, p. 37 - 46

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N15/00-15/62

C07K14/00-16/30

CA / BIOSIS / WPIDS (STN)

PubMed

Uniprot / Geneseq