

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6736540号
(P6736540)

(45) 発行日 令和2年8月5日(2020.8.5)

(24) 登録日 令和2年7月17日(2020.7.17)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z N A Z
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28
C O 7 K 16/30 (2006.01)	C O 7 K 16/30

請求項の数 31 (全 241 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-503488 (P2017-503488)	(73) 特許権者	504389991 ノバルティス アーゲー
(86) (22) 出願日	平成27年7月21日 (2015.7.21)		スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ 35
(65) 公表番号	特表2017-522879 (P2017-522879A)	(73) 特許権者	500429103
(43) 公表日	平成29年8月17日 (2017.8.17)		ザ トラスティーズ オブ ザ ユニバー シティ オブ ペンシルバニア
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/041337		アメリカ合衆国 19104 ペンシルベ ニア州 フィラデルフィア シビック セ ンター ブールバード 3600 ナイン ス フロア
(87) 国際公開番号	W02016/014535	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(87) 国際公開日	平成28年1月28日 (2016.1.28)		
審査請求日	平成30年7月20日 (2018.7.20)	(74) 代理人	100084146 弁理士 山崎 宏
(31) 優先権主張番号	PCT/CN2014/082602		
(32) 優先日	平成26年7月21日 (2014.7.21)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	中国 (CN)		
(31) 優先権主張番号	PCT/CN2014/090500		
(32) 優先日	平成26年11月6日 (2014.11.6)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	中国 (CN)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CLL-1 キメラ抗原受容体を使用した癌の処置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

CLL-1 に特異的に結合するキメラ抗原受容体 (CAR) をコードする単離核酸分子であって、CAR が抗 CLL-1 結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび共刺激ドメインおよび/または一次シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含み、抗 CLL-1 結合ドメインが CLL-1-CAR9、CLL-1-CAR6、CLL-1-CAR10、CLL-1-CAR11 および CLL-1-CAR12 から選択される CLL-1 CAR アミノ酸配列の重鎖相補性決定領域1 (HC CDR1)、重鎖相補性決定領域2 (HC CDR2)、重鎖相補性決定領域3 (HC CDR3)、軽鎖相補性決定領域1 (LC CDR1)、軽鎖相補性決定領域2 (LC CDR2) および軽鎖相補性決定領域3 (LC CDR3) を含み、ここで

前記抗 CLL-1 結合ドメインが含む HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2 及び LC CDR3 のアミノ酸配列の組み合わせは、以下の (a) (i) ~ (v)、(b) (i) ~ (v)、(c) (i) ~ (v) のいずれか

：

(a) Kabat 番号付けによる CDR 配列：

(i) CLL-1-CAR9 について、配列番号 364 の LC CDR1、配列番号 378 の LC CDR2 および配列番号 392 の LC CDR3；および配列番号 322 の HC CDR1、配列番号 336 の HC CDR2 および配列番号 350 の HC CDR3；

(i i) C L L - 1 - C A R 6 について、配列番号 3 6 1 の L C C D R 1、配列番号 3 7 5 の L C C D R 2 および配列番号 3 8 9 の L C C D R 3 ; および配列番号 3 1 9 の H C C D R 1 ; 配列番号 3 3 3 の H C C D R 2 および配列番号 3 4 7 の H C C D R 3 ;

(i i i) C L L - 1 - C A R 1 0 について、配列番号 3 6 5 の L C C D R 1、配列番号 3 7 9 の L C C D R 2 および配列番号 3 9 3 の L C C D R 3 ; および配列番号 3 2 3 の H C C D R 1 ; 配列番号 3 3 7 の H C C D R 2 および配列番号 3 5 1 の H C C D R 3 ;

(i v) C L L - 1 - C A R 1 1 について、配列番号 3 6 6 の L C C D R 1、配列番号 3 8 0 の L C C D R 2 および配列番号 3 9 4 の L C C D R 3 ; および配列番号 3 2 4 の H C C D R 1 ; 配列番号 3 3 8 の H C C D R 2 および配列番号 3 5 2 の H C C D R 3 ;

10

(v) C L L - 1 - C A R 1 2 について、配列番号 3 6 7 の L C C D R 1、配列番号 3 8 1 の L C C D R 2 および配列番号 3 9 5 の L C C D R 3 ; および配列番号 3 2 5 の H C C D R 1 ; 配列番号 3 3 9 の H C C D R 2 および配列番号 3 5 3 の H C C D R 3 ;

(b) C h o t h i a 番号付けによる C D R 配列 :

(i) C L L - 1 - C A R 9 について、配列番号 4 4 8 の L C C D R 1、配列番号 4 6 2 の L C C D R 2 および配列番号 4 7 6 の L C C D R 3 ; および配列番号 4 0 6 の H C C D R 1、配列番号 4 2 0 の H C C D R 2 および配列番号 4 3 4 の H C C D R 3 ;

20

(i i) C L L - 1 - C A R 6 について、配列番号 4 4 5 の L C C D R 1、配列番号 4 5 9 の L C C D R 2 および配列番号 4 7 3 の L C C D R 3 ; および配列番号 4 0 3 の H C C D R 1 ; 配列番号 4 1 7 の H C C D R 2 および配列番号 4 3 1 の H C C D R 3 ;

(i i i) C L L - 1 - C A R 1 0 について、配列番号 4 4 9 の L C C D R 1、配列番号 4 6 3 の L C C D R 2 および配列番号 4 7 7 の L C C D R 3 ; および配列番号 4 0 7 の H C C D R 1 ; 配列番号 4 2 1 の H C C D R 2 および配列番号 4 3 5 の H C C D R 3 ;

(i v) C L L - 1 - C A R 1 1 について、配列番号 4 5 0 の L C C D R 1、配列番号 4 6 4 の L C C D R 2 および配列番号 4 7 8 の L C C D R 3 ; および配列番号 4 0 8 の H C C D R 1 ; 配列番号 4 2 2 の H C C D R 2 および配列番号 4 3 6 の H C C D R 3 ;

30

(v) C L L - 1 - C A R 1 2 について、配列番号 4 5 1 の L C C D R 1、配列番号 4 6 5 の L C C D R 2 および配列番号 4 7 9 の L C C D R 3 ; および配列番号 4 0 9 の H C C D R 1 ; 配列番号 4 2 3 の H C C D R 2 および配列番号 4 3 7 の H C C D R 3 ;

(c) 組み合わせた番号付けによる C D R 配列 :

(i) C L L - 1 - C A R 9 について、配列番号 1 6 4 の L C C D R 1、配列番号 1 7 7 の L C C D R 2 および配列番号 1 9 0 の L C C D R 3 ; および配列番号 1 2 5 の H C C D R 1、配列番号 1 3 8 の H C C D R 2 および配列番号 1 5 1 の H C C D R 3 ;

40

(i i) C L L - 1 - C A R 6 について、配列番号 1 6 1 の L C C D R 1、配列番号 1 7 4 の L C C D R 2 および配列番号 1 8 7 の L C C D R 3 ; および配列番号 1 2 2 の H C C D R 1 ; 配列番号 1 3 5 の H C C D R 2 および配列番号 1 4 8 の H C C D R 3 ;

(i i i) C L L - 1 - C A R 1 0 について、配列番号 1 6 5 の L C C D R 1、配列番号 1 7 8 の L C C D R 2 および配列番号 1 9 1 の L C C D R 3 ; および配列番号 1 2 6 の H C C D R 1 ; 配列番号 1 3 9 の H C C D R 2 および配列番号 1 5 2 の H C C D R 3 ;

50

(i v) C L L - 1 - C A R 1 1 について、配列番号 1 6 6 の L C C D R 1、配列番号 1 7 9 の L C C D R 2 および配列番号 1 9 2 の L C C D R 3 ; および配列番号 1 2 7 の H C C D R 1 ; 配列番号 1 4 0 の H C C D R 2 および配列番号 1 5 3 の H C C D R 3 ;

(v) C L L - 1 - C A R 1 2 について、配列番号 1 6 7 の L C C D R 1、配列番号 1 8 0 の L C C D R 2 および配列番号 1 9 3 の L C C D R 3 ; および配列番号 1 2 8 の H C C D R 1 ; 配列番号 1 4 1 の H C C D R 2 および配列番号 1 5 4 の H C C D R 3 である、
単離核酸分子。

【請求項 2】

10

(a)

(i) 配列番号 8 6 の C L L - 1 - C A R 9、配列番号 8 3 の C L L - 1 - C A R 6、配列番号 8 7 の C L L - 1 - C A R 1 0、配列番号 8 8 の C L L - 1 - C A R 1 1、または配列番号 8 9 の C L L - 1 - C A R 1 2 の軽鎖可変領域のアミノ酸配列 ;

(i i) 配列番号 8 6 の C L L - 1 - C A R 9、配列番号 8 3 の C L L - 1 - C A R 6、配列番号 8 7 の C L L - 1 - C A R 1 0、配列番号 8 8 の C L L - 1 - C A R 1 1、または配列番号 8 9 の C L L - 1 - C A R 1 2 の軽鎖可変領域のアミノ酸配列に少なくとも 1、2 または 3 改変を有するが、改変が 3 0、2 0 または 1 0 を超えないアミノ酸配列 ; または

(i i i) 配列番号 8 6 の C L L - 1 - C A R 9、配列番号 8 3 の C L L - 1 - C A R 6、配列番号 8 7 の C L L - 1 - C A R 1 0、配列番号 8 8 の C L L - 1 - C A R 1 1、または配列番号 8 9 の C L L - 1 - C A R 1 2 の軽鎖可変領域のアミノ酸配列と 9 5 ~ 9 9 % 同一性を有するアミノ酸配列 ;

20

および / または

(b)

(i) 配列番号 7 3 の C L L - 1 - C A R 9、配列番号 7 0 の C L L - 1 - C A R 6、配列番号 7 4 の C L L - 1 - C A R 1 0、配列番号 7 5 の C L L - 1 - C A R 1 1、または配列番号 7 6 の C L L - 1 - C A R 1 2 の重鎖可変領域のアミノ酸配列 ;

(i i) 配列番号 7 3 の C L L - 1 - C A R 9、配列番号 7 0 の C L L - 1 - C A R 6、配列番号 7 4 の C L L - 1 - C A R 1 0、配列番号 7 5 の C L L - 1 - C A R 1 1、または配列番号 7 6 の C L L - 1 - C A R 1 2 の重鎖可変領域のアミノ酸配列に少なくとも 1、2 または 3 改変を有するが、改変が 3 0、2 0 または 1 0 を超えないアミノ酸配列 ; または

30

(i i i) 配列番号 7 3 の C L L - 1 - C A R 9、配列番号 7 0 の C L L - 1 - C A R 6、配列番号 7 4 の C L L - 1 - C A R 1 0、配列番号 7 5 の C L L - 1 - C A R 1 1、または配列番号 7 6 の C L L - 1 - C A R 1 2 の重鎖可変領域のアミノ酸配列と 9 5 ~ 9 9 % 同一性を有するアミノ酸配列

を含む C A R をコードする、請求項 1 に記載の単離核酸分子。

【請求項 3】

(i) コードされた C L L - 1 結合ドメインが、配列番号 4 7、4 4、4 8、4 9、および 5 0 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む ;

40

(i i) コードされた C L L - 1 結合ドメインが、配列番号 4 7、4 4、4 8、4 9、および 5 0 のいずれかに対して少なくとも 1、2 または 3 改変を有するが、改変が 3 0、2 0 または 1 0 を超えないアミノ酸配列を含む ;

(i i i) コードされた C L L - 1 結合ドメインが、配列番号 4 7、4 4、4 8、4 9、および 5 0 のいずれかと 9 5 ~ 9 9 % 同一性を有するアミノ酸配列を含み ; または

(i v) C L L - 1 結合ドメインが配列番号 6 0、5 7、6 1、6 2、または 6 3 からなる群より選択されるヌクレオチド配列、またはそれらと 9 5 ~ 9 9 % 同一性を有する配列によってコードされている、

請求項 1 または 2 に記載の単離核酸分子。

50

【請求項4】

(i)コードされたCARがT細胞受容体のアルファ、ベータまたはゼータ鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137およびCD154からなる群より選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメインを包含し、

(ii)コードされた膜貫通ドメインが、配列番号6のアミノ酸配列、配列番号6のアミノ酸配列に少なくとも1、2または3改変を有するが、改変が20、10または5を超えないアミノ酸配列または配列番号6のアミノ酸配列と95～99%同一性を有する配列を含む；

(iii)膜貫通ドメインをコードする核酸配列が、配列番号17のアミノ酸配列またはそれと95～99%同一性を有する配列を含む；

(iv)膜貫通ドメインをコードする核酸配列が、配列番号112、109、113、114、または115のいずれかに示される配列を含む；および/または

(v)コードされたCLL-1結合ドメインがヒンジ領域によって膜貫通ドメインに接続されており、任意に：

(a)コードされたヒンジ領域が配列番号2のアミノ酸配列またはそれと95～99%同一性を有する配列を含む；または

(b)ヒンジ領域をコードする核酸配列が、配列番号13のヌクレオチド配列またはそれと95～99%同一性を有する配列を含む、

請求項1～3のいずれかに記載の単離核酸分子。

【請求項5】

コードされた細胞内シグナル伝達ドメインが共刺激ドメインを含み、共刺激ドメインが、MHCクラスI分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子(SLAMタンパク質)、活性化NK細胞受容体、BTLA、Tollリガンド受容体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、4-1BB(CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS(CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19aおよびCD83と特異的に結合するリガンドからなる群より選択されるタンパク質に由来する機能的シグナル伝達ドメインを含む、任意に、

(i)コードされた細胞内シグナル伝達ドメインが、共刺激ドメインを含み、共刺激ドメインが、配列番号7のアミノ酸配列、または配列番号7のアミノ酸配列に少なくとも1、2または3改変を有するが、改変が20、10または5を超えないアミノ酸配列または配列番号7のアミノ酸配列と95～99%同一性を有する配列を含む；または

(ii)単離核酸分子が、共刺激ドメインをコードする核酸配列を含み、核酸分子が、配列番号18の核酸配列、またはそれらと95～99%同一性を有する配列

10

20

30

40

50

、または配列番号 112、109、113、114、または 115 のいずれかに示される 4-1BB ドメインをコードする配列、またはそれらと 95～99% 同一性を有する配列を含む、

請求項 1～4 のいずれかに記載の単離核酸分子。

【請求項 6】

(i) コードされた細胞内シグナル伝達ドメインが、4-1BB の機能的シグナル伝達ドメインおよび/または CD3ゼータの機能的シグナル伝達ドメインを含む；

(ii) コードされた細胞内シグナル伝達ドメインが、配列番号 7 のアミノ酸配列および/または配列番号 9 もしくは配列番号 10 のアミノ酸配列；または配列番号 7 のアミノ酸配列および/または配列番号 9 もしくは配列番号 10 のアミノ酸配列に少なくとも 1、2 または 3 改変を有するが、改変が 20、10 または 5 を超えないアミノ酸配列；または配列番号 7 のアミノ酸配列および/または配列番号 9 もしくは配列番号 10 のアミノ酸配列と 95～99% 同一性を有する配列を含む；

(iii) コードされた細胞内シグナル伝達ドメインが、配列番号 7 のアミノ酸配列および配列番号 9 もしくは配列番号 10 のアミノ酸配列を含み、ここで、細胞内シグナル伝達ドメインを含む配列が、同一フレーム内で単一のポリペプチド鎖として発現される；

(iv) 単離核酸分子が、細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列を含み、ここで、核酸分子が、配列番号 18 の核酸配列、またはそれらと 95～99% 同一性を有する配列、および/または

(a) 配列番号 20 または配列番号 21 のヌクレオチド配列、またはそれらと 95～99% 同一性を有する配列、または

(b) 配列番号 112、109、113、114、または 115 のいずれかに示される CD3ゼータドメインをコードする配列またはそれらと 95～99% 同一性を有する配列を含む；

および/または

(v) 単離核酸分子が、配列番号 1 のアミノ酸配列をコードするリーダー配列をさらに含む、

請求項 1～5 のいずれかに記載の単離核酸分子。

【請求項 7】

(a) 単離核酸分子が、以下を含む CAR をコードし：

(i) 配列番号 99、96、100、101、または 102 のいずれかのアミノ酸配列；

(ii) 配列番号 99、96、100、101、または 102 のいずれかに対して少なくとも 1、2 または 3 改変を有するが、改変が 30、20 または 10 を超えないアミノ酸配列；または

(iii) 配列番号 99、96、100、101、または 102 のいずれかと 95～99% 同一性を有するアミノ酸配列；

および/または

(b) 単離核酸分子が、配列番号 112、109、113、114、または 115 のいずれかのヌクレオチド配列、または配列番号 112、109、113、114、または 115 のいずれかと 95～99% 同一性を有するヌクレオチド配列を含む、

請求項 1～6 のいずれかに記載の単離核酸分子。

【請求項 8】

CLL-1 に特異的に結合する単離キメラ抗原受容体 (CAR) ポリペプチドであって、CAR が、抗 CLL-1 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および共刺激ドメインおよび/または一次シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含み、ここで、抗 CLL-1 結合ドメインが、CLL-1-CAR9、CLL-1-CAR6、CLL-1-CAR10、CLL-1-CAR11 および CLL-1-CAR12 から選択される CLL-1-CAR アミノ酸配列の重鎖相補性決定領域 1 (HC CDR1)、重鎖相補性決定領域 2 (HC CDR2)、重鎖相補性決定領域 3 (HC CDR3)、軽鎖相補性決定領域 1 (LC CDR1)、軽鎖相補性決定領域 2 (LC CDR2) および軽鎖

10

20

30

40

50

相補性決定領域3 (LC CDR3) を含み、ここで
前記抗CLL-1結合ドメインが含むHC CDR1、HC CDR2、HC CDR3
、LC CDR1、LC CDR2及びLC CDR3のアミノ酸配列の組み合わせは、
以下の(a)(i)~(v)、(b)(i)~(v)、(c)(i)~(v)のいずれか
:

(a) Kabat 番号付けによるCDR配列:

(i) CLL-1-CAR9について、配列番号364のLC CDR1、配列番号378のLC CDR2および配列番号392のLC CDR3; および配列番号322のHC CDR1、配列番号336のHC CDR2および配列番号350のHC CDR3

10

(ii) CLL-1-CAR6について、配列番号361のLC CDR1、配列番号375のLC CDR2および配列番号389のLC CDR3; および配列番号319のHC CDR1; 配列番号333のHC CDR2および配列番号347のHC CDR3;

(iii) CLL-1-CAR10について、配列番号365のLC CDR1、配列番号379のLC CDR2および配列番号393のLC CDR3; および配列番号323のHC CDR1; 配列番号337のHC CDR2および配列番号351のHC CDR3;

(iv) CLL-1-CAR11について、配列番号366のLC CDR1、配列番号380のLC CDR2および配列番号394のLC CDR3; および配列番号324のHC CDR1; 配列番号338のHC CDR2および配列番号352のHC CDR3;

20

(v) CLL-1-CAR12について、配列番号367のLC CDR1、配列番号381のLC CDR2および配列番号395のLC CDR3; および配列番号325のHC CDR1; 配列番号339のHC CDR2および配列番号353のHC CDR3;

(b) Chothia 番号付けによるCDR配列:

(i) CLL-1-CAR9について、配列番号448のLC CDR1、配列番号462のLC CDR2および配列番号476のLC CDR3; および配列番号406のHC CDR1、配列番号420のHC CDR2および配列番号434のHC CDR3

30

(ii) CLL-1-CAR6について、配列番号445のLC CDR1、配列番号459のLC CDR2および配列番号473のLC CDR3; および配列番号403のHC CDR1; 配列番号417のHC CDR2および配列番号431のHC CDR3;

(iii) CLL-1-CAR10について、配列番号449のLC CDR1、配列番号463のLC CDR2および配列番号477のLC CDR3; および配列番号407のHC CDR1; 配列番号421のHC CDR2および配列番号435のHC CDR3;

(iv) CLL-1-CAR11について、配列番号450のLC CDR1、配列番号464のLC CDR2および配列番号478のLC CDR3; および配列番号408のHC CDR1; 配列番号422のHC CDR2および配列番号436のHC CDR3;

40

(v) CLL-1-CAR12について、配列番号451のLC CDR1、配列番号465のLC CDR2および配列番号479のLC CDR3; および配列番号409のHC CDR1; 配列番号423のHC CDR2および配列番号437のHC CDR3;

(c) 組み合わせた 番号付けによるCDR配列:

(i) CLL-1-CAR9について、配列番号164のLC CDR1、配列番号177のLC CDR2および配列番号190のLC CDR3; および配列番号125のH

50

C CDR 1、配列番号 138 の HC CDR 2 および配列番号 151 の HC CDR 3 ;

(i i) CLL - 1 - CAR 6 について、配列番号 161 の LC CDR 1、配列番号 174 の LC CDR 2 および配列番号 187 の LC CDR 3 ; および配列番号 122 の HC CDR 1 ; 配列番号 135 の HC CDR 2 および配列番号 148 の HC CDR 3 ;

(i i i) CLL - 1 - CAR 10 について、配列番号 165 の LC CDR 1、配列番号 178 の LC CDR 2 および配列番号 191 の LC CDR 3 ; および配列番号 126 の HC CDR 1 ; 配列番号 139 の HC CDR 2 および配列番号 152 の HC CDR 3 ;

(i v) CLL - 1 - CAR 11 について、配列番号 166 の LC CDR 1、配列番号 179 の LC CDR 2 および配列番号 192 の LC CDR 3 ; および配列番号 127 の HC CDR 1 ; 配列番号 140 の HC CDR 2 および配列番号 153 の HC CDR 3 ;

(v) CLL - 1 - CAR 12 について、配列番号 167 の LC CDR 1、配列番号 180 の LC CDR 2 および配列番号 193 の LC CDR 3 ; および配列番号 128 の HC CDR 1 ; 配列番号 141 の HC CDR 2 および配列番号 154 の HC CDR 3 である、

CLL - 1 に特異的に結合する単離キメラ抗原受容体 (CAR) ポリペプチド。

【請求項 9】

(a)

(i) 配列番号 86 の CLL - 1 - CAR 9、配列番号 83 の CLL - 1 - CAR 6、配列番号 87 の CLL - 1 - CAR 10、配列番号 88 の CLL - 1 - CAR 11、または配列番号 89 の CLL - 1 - CAR 12 の軽鎖可変領域のアミノ酸配列 ;

(i i) 配列番号 86 の CLL - 1 - CAR 9、配列番号 83 の CLL - 1 - CAR 6、配列番号 87 の CLL - 1 - CAR 10、配列番号 88 の CLL - 1 - CAR 11、または配列番号 89 の CLL - 1 - CAR 12 の軽鎖可変領域のアミノ酸配列に少なくとも 1、2 または 3 改変を有するが、改変が 30、20 または 10 を超えないアミノ酸配列 ; または

(i i i) 配列番号 86 の CLL - 1 - CAR 9、配列番号 83 の CLL - 1 - CAR 6、配列番号 87 の CLL - 1 - CAR 10、配列番号 88 の CLL - 1 - CAR 11、または配列番号 89 の CLL - 1 - CAR 12 の軽鎖可変領域のアミノ酸配列と 95 ~ 99 % 同一性を有するアミノ酸配列 ;

および / または

(b)

(i) 配列番号 73 の CLL - 1 - CAR 9、配列番号 70 の CLL - 1 - CAR 6、配列番号 74 の CLL - 1 - CAR 10、配列番号 75 の CLL - 1 - CAR 11、または配列番号 76 の CLL - 1 - CAR 12 の重鎖可変領域のアミノ酸配列 ;

(i i) 配列番号 73 の CLL - 1 - CAR 9、配列番号 70 の CLL - 1 - CAR 6、配列番号 74 の CLL - 1 - CAR 10、配列番号 75 の CLL - 1 - CAR 11、または配列番号 76 の CLL - 1 - CAR 12 の重鎖可変領域のアミノ酸配列に少なくとも 1、2 または 3 改変を有するが、改変が 30、20 または 10 を超えないアミノ酸配列 ; または

(i i i) 配列番号 73 の CLL - 1 - CAR 9、配列番号 70 の CLL - 1 - CAR 6、配列番号 74 の CLL - 1 - CAR 10、配列番号 75 の CLL - 1 - CAR 11、または配列番号 76 の CLL - 1 - CAR 12 の重鎖可変領域のアミノ酸配列と 95 ~ 99 % 同一性を有するアミノ酸配列

を含む、請求項 8 に記載の単離 CAR ポリペプチド。

【請求項 10】

(a) 単離 CAR ポリペプチドが、以下を含む :

10

20

30

40

50

(i) 配列番号 47、44、48、49、および 50 からなる群より選択されるアミノ酸配列；

(i i) 配列番号 47、44、48、49、および 50 のいずれかに対して少なくとも 1、2 または 3 改変を有するが、改変が 30、20 または 10 を超えないアミノ酸配列；または

(i i i) 配列番号 47、44、48、49、および 50 のいずれかと 95 ~ 99 % 同一性を有するアミノ酸配列；

(b) 膜貫通ドメインが、T 細胞受容体のアルファ、ベータまたはゼータ鎖、CD28、CD3 イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137 および CD154 からなる群より選択されるタンパク質由来の膜貫通ドメインを含む；

(c) 膜貫通ドメインが、以下を含む

(i) 配列番号 6 のアミノ酸配列、

(i i) 配列番号 6 のアミノ酸配列に少なくとも 1、2 または 3 改変を有するが、改変が 20、10 または 5 を超えないアミノ酸配列、または

(i i i) 配列番号 6 のアミノ酸配列と 95 ~ 99 % 同一性を有する配列；

および / または

(d) CLL - 1 結合ドメインが、ヒンジ領域によって膜貫通ドメインに接続されている、任意に、ヒンジ領域が、配列番号 2 のアミノ酸配列、またはそれらと 95 ~ 99 % 同一性を有する配列を含む、

請求項 8 または 9 に記載の単離 CAR ポリペプチド。

【請求項 11】

(i) 共刺激ドメインが、MHC クラス I 分子、TNF 受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子 (SLAM タンパク質)、活性化 NK 細胞受容体、BTLA、Toll リガンド受容体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM - 1、LFA - 1 (CD11a / CD18)、4 - 1BB (CD137)、B7 - H3、CDS、ICAM - 1、ICOS (CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM (LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、Nkp80 (KLRP1)、Nkp44、Nkp30、Nkp46、CD19、CD4、CD8 アルファ、CD8 ベータ、IL2R ベータ、IL2R ガンマ、IL7R アルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA - 6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA - 1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA - 1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANSCENDANCE / RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB - A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO - 3)、BLAME (SLAMF8)、SELP (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP - 76、PAG / Cbp、CD19a および CD83 と特異的に結合するリガンドからなる群より選択されるタンパク質由来の機能的シグナル伝達ドメインを含む；

(i i) 共刺激ドメインが、配列番号 7 のアミノ酸配列、または配列番号 7 のアミノ酸配列に少なくとも 1、2 または 3 改変を有するが、改変が 20、10 または 5 を超えないアミノ酸配列または配列番号 7 のアミノ酸配列と 95 ~ 99 % 同一性を有する配列を含む；

(i i i) 細胞内シグナル伝達ドメインが、4 - 1BB の機能的シグナル伝達ドメインおよび / または CD3 ゼータの機能的シグナル伝達ドメインを含む；

(i v) 細胞内シグナル伝達ドメインが、配列番号 7 のアミノ酸配列および / または配列番号 9 もしくは配列番号 10 のアミノ酸配列；または配列番号 7 のアミノ酸配列および /

10

20

30

40

50

または配列番号 9 もしくは配列番号 10 のアミノ酸配列に少なくとも 1、2 または 3 改変を有するが、改変が 20、10 または 5 を超えないアミノ酸配列；または配列番号 7 のアミノ酸配列および/または配列番号 9 もしくは配列番号 10 のアミノ酸配列と 95 ~ 99 % 同一性を有する配列を含む；

(v) 細胞内シグナル伝達ドメインが、配列番号 7 のアミノ酸配列および配列番号 9 もしくは配列番号 10 のアミノ酸配列を含み、ここで、細胞内シグナル伝達ドメインを含む配列が、同一フレーム内で単一のポリペプチド鎖として発現される；および/または

(vi) ポリペプチドが、配列番号 1 のアミノ酸配列を含むリーダー配列をさらに含む、請求項 8 - 10 のいずれかに記載の単離 CAR ポリペプチド。

【請求項 12】

(i) 配列番号 99、96、100、101、または 102 のいずれかのアミノ酸配列；

(ii) 配列番号 99、96、100、101、または 102 のいずれかに対して少なくとも 1、2 または 3 改変を有するが、改変が 30、20 または 10 を超えないアミノ酸配列；または

(iii) 配列番号 99、96、100、101、または 102 のいずれかと 95 ~ 99 % 同一性を有するアミノ酸配列

を含む、請求項 8 - 11 のいずれかに記載の単離 CAR ポリペプチド。

【請求項 13】

CLL-1 に特異的に結合する抗 CLL-1 結合ドメインまたは抗 CLL-1 結合ドメインを含むキメラ抗原受容体 (CAR) ポリペプチドであって、前記抗 CLL-1 結合ドメインが

CLL-1-CAR9、CLL-1-CAR6、CLL-1-CAR10、CLL-1-CAR11 および CLL-1-CAR12 から選択される CLL-1 CAR アミノ酸配列の重鎖相補性決定領域 1 (HC CDR1)、重鎖相補性決定領域 2 (HC CDR2)、重鎖相補性決定領域 3 (HC CDR3)、軽鎖相補性決定領域 1 (LC CDR1)、軽鎖相補性決定領域 2 (LC CDR2) および軽鎖相補性決定領域 3 (LC CDR3) を含み、

ここで前記抗 CLL-1 結合ドメインが含む HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2 及び LC CDR3 のアミノ酸配列の組み合わせは、以下の (a) (i) ~ (v)、(b) (i) ~ (v)、(c) (i) ~ (v) のいずれか：

(a) Kabat 番号付けによる CDR 配列：

(i) CLL-1-CAR9 について、配列番号 364 の LC CDR1、配列番号 378 の LC CDR2 および配列番号 392 の LC CDR3；および配列番号 322 の HC CDR1、配列番号 336 の HC CDR2 および配列番号 350 の HC CDR3；

(ii) CLL-1-CAR6 について、配列番号 361 の LC CDR1、配列番号 375 の LC CDR2 および配列番号 389 の LC CDR3；および配列番号 319 の HC CDR1；配列番号 333 の HC CDR2 および配列番号 347 の HC CDR3；

(iii) CLL-1-CAR10 について、配列番号 365 の LC CDR1、配列番号 379 の LC CDR2 および配列番号 393 の LC CDR3；および配列番号 323 の HC CDR1；配列番号 337 の HC CDR2 および配列番号 351 の HC CDR3；

(iv) CLL-1-CAR11 について、配列番号 366 の LC CDR1、配列番号 380 の LC CDR2 および配列番号 394 の LC CDR3；および配列番号 324 の HC CDR1；配列番号 338 の HC CDR2 および配列番号 352 の HC CDR3；

(v) CLL-1-CAR12 について、配列番号 367 の LC CDR1、配列番号 3

10

20

30

40

50

81のLC CDR2および配列番号395のLC CDR3；および配列番号325のHC CDR1；配列番号339のHC CDR2および配列番号353のHC CDR3；

(b) Chothia 番号付けによるCDR配列：

(i) CLL-1-CAR9について、配列番号448のLC CDR1、配列番号462のLC CDR2および配列番号476のLC CDR3；および配列番号406のHC CDR1、配列番号420のHC CDR2および配列番号434のHC CDR3；

(ii) CLL-1-CAR6について、配列番号445のLC CDR1、配列番号459のLC CDR2および配列番号473のLC CDR3；および配列番号403のHC CDR1；配列番号417のHC CDR2および配列番号431のHC CDR3；

(iii) CLL-1-CAR10について、配列番号449のLC CDR1、配列番号463のLC CDR2および配列番号477のLC CDR3；および配列番号407のHC CDR1；配列番号421のHC CDR2および配列番号435のHC CDR3；

(iv) CLL-1-CAR11について、配列番号450のLC CDR1、配列番号464のLC CDR2および配列番号478のLC CDR3；および配列番号408のHC CDR1；配列番号422のHC CDR2および配列番号436のHC CDR3；

(v) CLL-1-CAR12について、配列番号451のLC CDR1、配列番号465のLC CDR2および配列番号479のLC CDR3；および配列番号409のHC CDR1；配列番号423のHC CDR2および配列番号437のHC CDR3；

(c) 組み合わせた番号付けによるCDR配列：

(i) CLL-1-CAR9について、配列番号164のLC CDR1、配列番号177のLC CDR2および配列番号190のLC CDR3；および配列番号125のHC CDR1、配列番号138のHC CDR2および配列番号151のHC CDR3；

(ii) CLL-1-CAR6について、配列番号161のLC CDR1、配列番号174のLC CDR2および配列番号187のLC CDR3；および配列番号122のHC CDR1；配列番号135のHC CDR2および配列番号148のHC CDR3；

(iii) CLL-1-CAR10について、配列番号165のLC CDR1、配列番号178のLC CDR2および配列番号191のLC CDR3；および配列番号126のHC CDR1；配列番号139のHC CDR2および配列番号152のHC CDR3；

(iv) CLL-1-CAR11について、配列番号166のLC CDR1、配列番号179のLC CDR2および配列番号192のLC CDR3；および配列番号127のHC CDR1；配列番号140のHC CDR2および配列番号153のHC CDR3；

(v) CLL-1-CAR12について、配列番号167のLC CDR1、配列番号180のLC CDR2および配列番号193のLC CDR3；および配列番号128のHC CDR1；配列番号141のHC CDR2および配列番号154のHC CDR3である、

CLL-1に特異的に結合する抗CLL-1結合ドメインまたは抗CLL-1結合ドメインを含むキメラ抗原受容体(CAR)ポリペプチド。

【請求項14】

(i) 配列番号47、44、48、49、および50からなる群から選択されるアミノ酸配列；または

10

20

30

40

50

(i i) 配列番号 47、44、48、49、および 50 のいずれかと 95 ~ 99 % 同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 13 に記載の抗 C L L - 1 結合ドメインまたは C A R ポリペプチド。

【請求項 15】

(i) 配列番号 99、96、100、101、または 102 のいずれかのアミノ酸配列；または

(i i) 配列番号 99、96、100、101、または 102 のいずれかと 95 ~ 99 % 同一性を有するアミノ酸配列、を含む、請求項 13 または 14 に記載 C A R ポリペプチド。

【請求項 16】

請求項 13 - 15 のいずれかに記載の抗 C L L - 1 結合ドメインまたは C A R ポリペプチドをコードする単離核酸分子。

【請求項 17】

C L L - 1 に特異的に結合する抗 C L L - 1 結合ドメインまたは抗 C L L - 1 結合ドメインを含むキメラ抗原受容体 (C A R) ポリペプチドであって、ここで、前記抗 C L L - 1 結合ドメインが、

(i) C L L - 1 C A R 9 の配列番号 322 の H C C D R 1、配列番号 336 の H C C D R 2、および配列番号 350 の H C C D R 3 を含む重鎖可変ドメイン；および

(i i) C L L - 1 - C A R 9 の配列番号 364 の L C C D R 1、配列番号 378 の L C C D R 2、および配列番号 392 の L C C D R 3 を含む軽鎖可変ドメイン、

を含む、抗 C L L - 1 結合ドメインまたは抗 C L L - 1 結合ドメインを含むキメラ抗原受容体 (C A R) ポリペプチド。

【請求項 18】

配列番号 47 のアミノ酸配列またはそれと 95 - 99 % 配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 17 に記載の抗 C L L - 1 結合ドメインまたは C A R ポリペプチド。

【請求項 19】

配列番号 99 のアミノ酸配列またはそれと 95 - 99 % 同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 17 または 18 に記載の C A R ポリペプチド。

【請求項 20】

請求項 17 - 19 のいずれかに記載の抗 C L L - 1 結合ドメインまたは C A R をコードする単離核酸分子。

【請求項 21】

ベクターが、DNAベクター、RNAベクター、プラスミド、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクターまたはレトロウイルスベクターからなる群より選択され、任意に、ベクターが配列番号 11 の配列を含む E F - 1 プロモーターをさらに含む、請求項 8 - 15 または 17 - 19 のいずれかに記載の C A R ポリペプチドまたは請求項 13、14、17、または 18 のいずれかに記載の抗 C L L - 1 結合ドメインをコードする核酸分子を含むベクター。

【請求項 22】

請求項 1 - 7、16、または 20 のいずれかに記載の核酸、請求項 8 - 15、または 17 - 19 のいずれかに記載の C A R ポリペプチド、請求項 13、14、17、または 18 のいずれか一項に記載の抗 C L L - 1 結合ドメイン、または請求項 21 に記載のベクターを含む、細胞または細胞集団、例えば、免疫エフェクター細胞、または免疫エフェクター細胞の集団であって、

任意に、細胞が、1 以上の薬学的または生理学的に許容できる担体、希釈剤または賦形剤と組み合わせた医薬組成物中に存在する、細胞または細胞集団。

【請求項 23】

請求項 21 に記載のベクターで免疫エフェクター細胞を形質導入することを含む、細胞、例えば、免疫エフェクター細胞を作製する方法。

【請求項 24】

10

20

30

40

50

インビトロで転写されたRNAまたは合成RNAを細胞に導入することを含む、RNA改変細胞の集団を生成する方法であって、RNAは、請求項8 - 15または17 - 19のいずれかに記載のCARポリペプチドをコードする核酸を含む、方法。

【請求項25】

細胞または細胞集団、例えば、免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞の集団であって、

(i) 細胞または細胞の集団の有効量を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物において抗腫瘍免疫を提供する方法であって、任意に、細胞が自己T細胞または同種異系のT細胞である、方法

(ii) 細胞または細胞の集団の有効量を哺乳動物に投与することを含む、CLL-1の発現に関係する疾患を有する哺乳動物の処置方法；または

(iii) 細胞の有効量を対象に投与することを含む細胞移植の前に対象をコンディショニングする方法であって、任意に：

(a) 細胞移植が幹細胞移植、例えば、造血幹細胞移植、または骨髄移植であり；および/または

(b) 細胞移植の前に対象をコンディショニングすることが、対象におけるCLL-1を発現する細胞、例えば、CLL-1を発現する正常細胞またはCLL-1を発現する癌細胞の数を低減することを含む、方法

における使用のための、

請求項1-7、16、または20のいずれかに記載のCAR核酸、請求項8 - 15または17 - 19のいずれかに記載のCARポリペプチド、請求項13、14、17、または18のいずれかに記載の抗CLL-1結合ドメインまたは請求項21に記載のベクターを含む、細胞または細胞集団、例えば、免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞の集団。

【請求項26】

(i) CLL-1発現に関係する疾患が

(a) 癌もしくは悪性腫瘍または脊髄形成異常、骨髄異形成症候群もしくは前白血病状態の1以上から選択される前癌状態；

(b) CLL-1の発現に関連する非癌関連の徴候；

(c) 血液癌；または

(d) 急性骨髄白血病(AML)、B細胞急性リンパ芽球性白血病(B細胞急性リンパ性白血病、BALL)、T細胞急性リンパ芽球性白血病(T細胞急性リンパ性白血病(TALL))の1以上から選択される急性白血病、B細胞前リンパ球性白血病、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄白血病(CML)、骨髄異形成症候群、形質細胞性骨髄腫またはこれらの組合せ、である；

および/または

(ii) 細胞または細胞の集団が

(a) CAR核酸またはCARポリペプチドを含む細胞の効能を増加させる薬剤；

(b) CAR核酸またはCARポリペプチドを含む細胞の投与に関連する1以上の副作用を改善する薬剤；または

(c) CLL-1の発現に関係する疾患を処置する薬剤、

ここで、任意に、薬剤がmTOR阻害剤であり、かつ細胞が低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、RAD001またはラパマイシンと組み合わせて投与される

の1以上と組み合わせて投与される、

請求項25に記載の使用のための細胞または細胞の集団。

【請求項27】

医薬として使用するための、請求項1-7、16、または20のいずれかに記載の単離核酸分子、請求項8 - 15または17 - 19のいずれかに記載の単離CARポリペプチド分子、請求項13、14、17、または18のいずれかに記載の抗CLL-1結合ドメイン、請求項21に記載のベクターまたは請求項22に記載の細胞。

【請求項 28】

細胞内シグナル伝達ドメインからの陽性シグナルを含む第二のポリペプチドと結合した、阻害分子の少なくとも一部を含む第一のポリペプチドを含む阻害分子をさらに発現し、任意に、阻害分子が P D 1 の少なくとも一部を含む第一のポリペプチドと、共刺激ドメインおよび一次シグナル伝達ドメインを含む第二のポリペプチドとを含む、請求項 22 に記載の細胞、または細胞の集団。

【請求項 29】

化学療法剤と組み合わせて細胞または細胞の集団の有効量を哺乳動物に投与することを含む、C L L - 1 の発現に関係する癌を有する哺乳動物を処置する方法における使用のための細胞または細胞の集団、例えば、免疫エフェクター細胞または免疫エフェクター細胞の集団であって、請求項 1 - 7、16、または 20 のいずれか一項に記載の核酸、請求項 8 - 15 または 17 - 19 のいずれか一項に記載の C A R ポリペプチド、請求項 13、14、17、または 18 のいずれかに記載の抗 C L L - 1 結合ドメイン、または請求項 21 に記載のベクターを含み、ここで、細胞または細胞の集団の前記投与の前に化学療法剤が投与され、さらに、前記化学療法剤が癌細胞上の C L L - 1 発現を増加させ、任意に化学療法剤が、シタラピンである、細胞または細胞の集団。

【請求項 30】

(i) 前記化学療法剤、例えば、シタラピンが、C A R 分子を発現する細胞または細胞の集団の投与の少なくとも 5 日、10 日、15 日、または 30 日前に投与される；および / または

(i i) C L L - 1 の発現に関係する疾患が、血液癌、例えば、白血病、例えば、A M L または血液癌の微小残存病変 (M R D) である、請求項 29 に記載の使用のための細胞または細胞の集団。

【請求項 31】

1 以上の薬学的または生理学的に許容できる担体、希釈剤または賦形剤と組み合わせて、請求項 22 に記載の細胞を含むことにより特徴付けられる、医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2014年7月21日付けで出願された P C T 出願第 P C T / C N 2 0 1 4 / 0 8 2 6 0 2 号および 2014年11月6日付けで出願された P C T 出願第 P C T / C N 2 0 1 4 / 0 9 0 5 0 0 号の優先権を主張するものである。これらの出願それぞれの全内容は、参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

配列表

本出願は、ASCIIフォーマットで電子的に提出された配列表を含有し、その全体は参照により組み入れられる。2015年7月15日に作成された前記ASCIIのコピーは、N2067-7044W03_SL.txt という名称であり、サイズは 339,932 バイトである。

【0003】

本発明は、一般的に、C型レクチン様 1 (C L L - 1) の発現に関係する疾患を処置するための、キメラ抗原受容体 (C A R) を発現するように加工された免疫エフェクター細胞 (例えば、T細胞、NK細胞) の使用に関する。

【背景技術】

【0004】

C型レクチン様 1 (C L L - 1) はまた、M I C L、C L E C 1 2 A、C L E C - 1、樹状細胞関連レクチン 1 および D C A L - 2 としても公知である。C L L - 1 とは、糖タンパク質の受容体であり、免疫の調節に関与する C 型レクチン様受容体の大規模なファミリーのメンバーである。C L L - 1 は、造血細胞、主に、単球、D C、p D C および顆粒球を含む自然免疫細胞 (Cancer Res. 2004; J Immunol 2009)、ならびに骨髄前駆細胞 (Blood, 2007) において発現される。C L L - 1 はまた、急性骨髄 (myeloid) 白血病 (A M L) 性芽

10

20

30

40

50

球および白血病性幹細胞(例えば、 $CD34^+ / CD38^-$)(Zhao et al., Haematologica. 2010, 95(1):71-78)においても見出される。CLL-1の発現はまた、急性骨髄単球性白血病、急性単球性白血病、急性前骨髄球性白血病、慢性骨髄白血病(CML)および骨髄異形成症候群(MDS)など、他の骨髄白血病に關与し得る。

【発明の概要】

【0005】

第一の面において、本発明は、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする単離核酸分子であって、CARは、ヒト抗CLL-1結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、共刺激ドメインおよび/または一次シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメイン)を包含する、抗体または抗体フラグメントを含む、単離核酸分子を特徴とする。ある態様において、CARは、ここに記載されるヒト抗CLL-1結合ドメイン、ここに記載される膜貫通ドメインおよびここに記載される細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、共刺激ドメインおよび/または一次シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメイン)を包含する抗体または抗体フラグメントを含む。

10

【0006】

ある態様において、CARは、ヒト抗CLL-1結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含み、ここで、前記抗CLL-1結合ドメインは、表2に列挙したCLL-1重鎖結合ドメインのいずれかアミノ酸配列の重鎖相補性決定領域1(HC CDR1)、重鎖相補性決定領域2(HC CDR2)および重鎖相補性決定領域3(HC CDR3)を含む。ある態様において、ヒトCLL-1結合ドメインは、軽鎖相補性決定領域1(LC CDR1)、軽鎖相補性決定領域2(LC CDR2)および軽鎖相補性決定領域3(LC CDR3)をさらに含む。ある態様において、ヒトCLL-1結合ドメインは、表2に列挙したCLL-1軽鎖結合ドメインのいずれかアミノ酸配列の軽鎖相補性決定領域1(LC CDR1)、軽鎖相補性決定領域2(LC CDR2)および軽鎖相補性決定領域3(LC CDR3)を含む。

20

【0007】

ある態様において、CARは、ヒトCLL-1結合ドメイン、膜貫通ドメイン、ならびに共刺激ドメインおよび/または一次シグナル伝達ドメインを含む、細胞内シグナル伝達ドメインを含む、抗体または抗体フラグメントを含み、ここで、前記CLL-1結合ドメインは、表2に列挙したCLL-1軽鎖結合ドメインのいずれかアミノ酸配列の軽鎖相補性決定領域1(LC CDR1)、軽鎖相補性決定領域2(LC CDR2)および軽鎖相補性決定領域3(LC CDR3)の1以上、ならびに表2に列挙したCLL-1重鎖結合ドメインのいずれかアミノ酸配列の重鎖相補性決定領域1(HC CDR1)、重鎖相補性決定領域2(HC CDR2)および重鎖相補性決定領域3(HC CDR3)の1以上を含む。

30

【0008】

ある態様において、コードされたヒト抗CLL-1結合ドメインは、ここに記載されるヒト抗CLL-1結合ドメインの、1以上の(例えば全3)軽鎖相補性決定領域1(LC CDR1)、軽鎖相補性決定領域2(LC CDR2)および軽鎖相補性決定領域3(LC CDR3)、および/またはここに記載されるヒト抗CLL-1結合ドメインの、例えば、LC CDRの1以上、例えば全3およびHC CDRの1以上、例えば全3を含むヒトもしくはヒト抗CLL-1結合ドメインの、1以上の(例えば全3)重鎖相補性決定領域1(HC CDR1)、重鎖相補性決定領域2(HC CDR2)および重鎖相補性決定領域3(HC CDR3)を含む。

40

【0009】

ある態様において、コードされたヒト抗CLL-1結合ドメインは、本明細書に(例えば、表2に)記載される軽鎖可変領域および/または本明細書に(例えば、表2に)記載される重鎖可変領域を含む。ある態様において、コードされたヒト抗CLL-1結合ドメインは表2のアミノ酸配列の軽鎖および重鎖を含むscFvである。ある態様において、ヒト抗CLL-1ドメイン(例えば、scFv)は、表2に示される軽鎖可変領域のアミノ酸

50

配列と95～99%同一性を有する配列に少なくとも1、2または3改変(例えば置換、例えば保存的置換)を有するが、改変(例えば置換、例えば保存的置換)が30、20または10を超えないアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；および/または表2に示される重鎖可変領域のアミノ酸配列または表2のアミノ酸配列と95～99%同一性を有する配列に少なくとも1、2または3改変(例えば置換、例えば保存的置換)を有するが、改変(例えば置換、例えば保存的置換)が30、20または10を超えないアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

【0010】

他の態様において、コードされたCLL-1結合ドメインは、表2に列挙したCLL-1重鎖結合ドメインのいずれかのアミノ酸配列のHC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3を含む。ある態様において、CLL-1結合ドメインは、LC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3をさらに含む。ある態様において、CLL-1結合ドメインは、表2に列挙したCLL-1軽鎖結合ドメインのいずれかのアミノ酸配列のLC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3を含む。

10

【0011】

ある態様において、コードされたCLL-1結合ドメインは、表2に列挙したCLL-1軽鎖結合ドメインのいずれかのアミノ酸配列のLC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3の1、2または全部、ならびに表2に列挙したCLL-1重鎖結合ドメインのいずれかのアミノ酸配列のHC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3の1、2または全部を含む。

20

【0012】

ある態様において、コードされたヒト抗CLL-1結合ドメインは、配列番号39～51、65～77、195、78～90または196からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。ある態様において、コードされたCLL-1結合ドメイン(例えば、scFv)は、配列番号39～51、65～77、195、78～90または196のアミノ酸配列または配列番号39～51、65～77、195、78～90または196のアミノ酸配列と95～99%同一性を有する配列に少なくとも1、2または3改変(例えば、置換、例えば、保存的置換)を有するが、改変(例えば、置換、例えば、保存的置換)が30、20もしくは10を超えないアミノ酸配列を含む。別の態様において、コードされたCLL-1結合ドメインは、配列番号65～77または195からなる群より選択されるアミノ酸配列またはそれらと95～99%同一性を有する配列を含む重鎖可変領域を含む。別の態様において、コードされたCLL-1結合ドメインは、配列番号66～74または196からなる群より選択されるアミノ酸配列またはそれらと95～99%同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域を含む。ある態様において、核酸分子は、配列番号52～64からなる群より選択されるヌクレオチド配列またはそれらと95～99%同一性を有する配列を含む。

30

【0013】

ある態様において、ヒト化抗CLL-1結合ドメインは、(Gly₄-Ser)_nリンカーを包含し、ここでnは、1、2、3、4、5または6であり、好ましくは3または4(配列番号26)である。scFvの軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、例えば、以下の配置：軽鎖可変領域-リンカー-重鎖可変領域または重鎖可変領域-リンカー-軽鎖可変領域のいずれであってもよい。

40

【0014】

ある態様において、コードされたCARは、T細胞受容体のアルファ、ベータまたはゼータ鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137およびCD154からなる群より選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメインを包含する。ある態様において、コードされた膜貫通ドメインは、配列番号6の配列を含む。ある態様において、コードされた膜貫通ドメインは、配列番号6のアミノ酸配列に少なくとも1、2または3改変を有するが、改変が20、10または5を

50

超えないアミノ酸配列または配列番号6のアミノ酸配列と95～99%同一性を有する配列を含む。ある態様において、膜貫通ドメインをコードする核酸配列は、配列番号17の配列またはそれと95～99%同一性を有する配列を含む。

【0015】

ある態様において、コードされた抗CLL-1結合ドメインは、ヒンジ領域、例えばここに記載されるヒンジ領域によって膜貫通ドメインに接続されている。ある態様において、コードされたヒンジ領域は、配列番号2またはそれらと95～99%同一性を有する配列を含む。ある態様において、ヒンジ領域をコードする核酸配列は、配列番号13の配列またはそれらと95～99%同一性を有する配列を含む。

【0016】

ある態様において、単離核酸分子は、共刺激ドメイン、例えば、ここに記載される共刺激ドメインをコードする配列をさらに含む。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激ドメインを含む。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、一次シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激ドメインおよび一次シグナル伝達ドメインを含む。

【0017】

ある態様において、コードされた共刺激ドメインは、MHCクラスI分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子(SLAMタンパク質)、活性化NK細胞受容体、BTLA、Tollリガンド受容体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、4-1BB(CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS(CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANSCENDANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19aおよびCD83と特異的に結合するリガンドからなる群より選択されるタンパク質から得られた機能的シグナル伝達ドメインである。ある態様において、コードされた共刺激ドメインは、4-1BB、CD27、CD28またはICOSを含む。

【0018】

ある態様において、4-1BBのコードされた共刺激ドメインは、配列番号7のアミノ酸配列を含む。ある態様において、コードされた共刺激ドメインは、配列番号7のアミノ酸配列に少なくとも1、2または3改変を有するが、改変が20、10または5を超えないアミノ酸配列または配列番号7のアミノ酸配列と95～99%同一性を有する配列を含む。ある態様において、共刺激ドメインをコードする核酸配列は、配列番号18のヌクレオチド配列またはそれと95～99%同一性を有する配列を含む。別の態様において、CD28のコードされた共刺激ドメインは、配列番号482のアミノ酸配列を含む。ある態様において、コードされた共刺激ドメインは、配列番号482のアミノ酸配列に少なくとも1、2または3改変を有するが、改変が20、10または5を超えないアミノ酸配列または配列番号482のアミノ酸配列と95～99%同一性を有する配列を含む。ある態様において、CD28の共刺激ドメインをコードする核酸配列は、配列番号483のヌクレ

10

20

30

40

50

オチド配列またはそれと95～99%同一性を有する配列を含む。別の態様において、CD27のコードされた共刺激ドメインは、配列番号8のアミノ酸配列を含む。ある態様において、コードされた共刺激ドメインは、配列番号8のアミノ酸配列に少なくとも1、2または3改変を有するが、改変が20、10または5を超えないアミノ酸配列または配列番号8のアミノ酸配列と95～99%同一性を有する配列を含む。ある態様において、CD27の共刺激ドメインをコードする核酸配列は、配列番号19のヌクレオチド配列またはそれと95～99%同一性を有する配列を含む。

【0019】

別の態様において、ICOSのコードされた共刺激ドメインは、配列番号484のアミノ酸配列を含む。ある態様において、コードされた共刺激ドメインは、配列番号484のアミノ酸配列に少なくとも1、2または3改変を有するが、改変が20、10または5を超えないアミノ酸配列または配列番号484のアミノ酸配列と95～99%同一性を有する配列を含む。ある態様において、ICOSの共刺激ドメインをコードする核酸配列は、配列番号485のヌクレオチド配列またはそれと95～99%同一性を有する配列を含む。

10

【0020】

ある態様において、コードされた一次シグナル伝達ドメインは、CD3ゼータの機能的シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、CD3ゼータの機能的シグナル伝達ドメインは、配列番号9(変異CD3ゼータ)または配列番号10(野生型ヒトCD3ゼータ)の配列またはそれらと95～99%同一性を有する配列を含む。

20

【0021】

ある態様において、コードされた細胞内シグナル伝達ドメインは、4-1BBの機能的シグナル伝達ドメインおよび/またはCD3ゼータの機能的シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、4-1BBのコードされた細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号7のアミノ酸配列および/または配列番号9もしくは配列番号10のCD3ゼータのアミノ酸配列を含む。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号7のアミノ酸配列および/または配列番号9もしくは配列番号10のアミノ酸配列に少なくとも1、2または3改変を有するが、改変が20、10または5を超えないアミノ酸配列または配列番号7のアミノ酸配列および/または配列番号9もしくは配列番号10のアミノ酸配列と95～99%同一性を有する配列を含む。ある態様において、コードされた細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号7の配列および配列番号9または配列番号10の配列を含み、細胞内シグナル伝達ドメインを含む配列が、同一フレーム内で単一のポリペプチド鎖として発現される。ある態様において、4-1BBの細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列は、配列番号18のヌクレオチド配列またはそれらと95～99%同一性を有する配列および/または配列番号20もしくは配列番号21の配列またはそれらと95～99%同一性を有するCD3ゼータのヌクレオチド配列を含む。

30

【0022】

ある態様において、コードされた細胞内シグナル伝達ドメインは、CD27の機能的シグナル伝達ドメインおよび/またはCD3ゼータの機能的シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、CD27のコードされた細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号8のアミノ酸配列および/または配列番号9または配列番号10のCD3ゼータのアミノ酸配列を含む。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号8のアミノ酸配列および/または配列番号9もしくは配列番号10のアミノ酸配列に少なくとも1、2または3改変を有するが、改変が20、10または5を超えないアミノ酸配列または配列番号8のアミノ酸配列および/または配列番号9もしくは配列番号10のアミノ酸配列と95～99%同一性を有する配列を含む。ある態様において、コードされた細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号8の配列および配列番号9または配列番号10の配列を含み、細胞内シグナル伝達ドメインを含む配列が、同一フレーム内で単一のポリペプチド鎖として発現される。ある態様において、CD27の細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列は、配列番号19のヌクレオチド配列またはそれらと95～99%同一性を有

40

50

する配列および/または配列番号20もしくは配列番号21のCD3ゼータのヌクレオチド配列またはそれらと95~99%同一性を有する配列を含む。

【0023】

ある態様において、コードされた細胞内シグナル伝達ドメインは、CD28の機能的シグナル伝達ドメインおよび/またはCD3ゼータの機能的シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、CD28のコードされた細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号482のアミノ酸配列および/または配列番号9もしくは配列番号10のCD3ゼータのアミノ酸配列を含む。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号482のアミノ酸配列および/または配列番号9もしくは配列番号10のアミノ酸配列に少なくとも1、2または3改変を有するが、改変が20、10または5を超えないアミノ酸配列または配列番号482のアミノ酸配列および/または配列番号9もしくは配列番号10のアミノ酸配列と95~99%同一性を有する配列を含む。ある態様において、コードされた細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号482の配列および配列番号9または配列番号10の配列を含み、細胞内シグナル伝達ドメインを含む配列が、同一フレーム内で単一のポリペプチド鎖として発現される。ある態様において、CD28の細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列は、配列番号483のヌクレオチド配列またはそれらと95~99%同一性を有する配列および/または配列番号20もしくは配列番号21のCD3ゼータのヌクレオチド配列またはそれらと95~99%同一性を有する配列を含む。

10

【0024】

ある態様において、コードされた細胞内シグナル伝達ドメインは、ICOSの機能的シグナル伝達ドメインおよび/またはCD3ゼータの機能的シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、ICOSのコードされた細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号484のアミノ酸配列および/または配列番号9もしくは配列番号10のCD3ゼータのアミノ酸配列を含む。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号484のアミノ酸配列および/または配列番号9もしくは配列番号10のアミノ酸配列に少なくとも1、2または3改変を有するが、改変が20、10または5を超えないアミノ酸配列または配列番号484のアミノ酸配列および/または配列番号9もしくは配列番号10のアミノ酸配列と95~99%同一性を有する配列を含む。ある態様において、コードされた細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号484の配列および配列番号9または配列番号10の配列を含み、細胞内シグナル伝達ドメインを含む配列が、同一フレーム内で単一のポリペプチド鎖として発現される。ある態様において、ICOSの細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列は、配列番号485のヌクレオチド配列またはそれらと95~99%同一性を有する配列および/または配列番号20もしくは配列番号21のCD3ゼータのヌクレオチド配列またはそれらと95~99%同一性を有する配列を含む。

20

30

【0025】

ある態様において、単離されたCAR分子は、リーダー配列、例えば、ここに記載されるリーダー配列をさらに含む。ある態様において、リーダー配列は、配列番号1のアミノ酸配列または配列番号1のアミノ酸配列と95~99%同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0026】

別の面において、本発明は、リーダー配列、例えば、ここに記載されるリーダー配列、例えば、配列番号1のアミノ酸配列；ここに記載される抗CLL-1結合ドメイン、例えば、ここに記載されるLC CDR1、LC CDR2、LC CDR3、HC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3を含むヒト抗CLL-1結合ドメイン(例えば表2に記載のヒト抗CLL-1結合ドメイン)またはそれらと95~99%同一性を有する配列；ここに記載されるヒンジ領域、例えば、配列番号2のアミノ酸配列；ここに記載される膜貫通ドメイン、例えば、配列番号6の配列を含む膜貫通ドメイン；および細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、ここに記載される細胞内シグナル伝達ドメインを含む、CAR構築物をコードする単離核酸分子に関する。ある態様において、コードされた細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激ドメイン、例えば、ここに記載される共刺激ドメイン

40

50

(例えば、配列番号7のアミノ酸配列を有する4-1BB共刺激ドメイン、配列番号482のアミノ酸配列を有するCD28共刺激ドメインまたは配列番号484のアミノ酸配列を有するICOS共刺激ドメインまたは配列番号8のアミノ酸配列を有するCD27共刺激ドメイン)および/または一次シグナル伝達ドメイン、例えば、ここに記載される一次シグナル伝達ドメイン、(例えば、配列番号9または配列番号10の配列を有するCD3ゼータ刺激ドメイン)を含む。

【0027】

ある態様において、CAR構築物をコードする単離核酸分子は、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63および配列番号64の核酸配列またはそれと95~99%同一性を有する配列によってコードされたヒト抗CLL-1結合ドメインを包含する。

10

【0028】

ある態様において、単離核酸分子は、配列番号91、配列番号92、配列番号93、配列番号94、配列番号95、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103または配列番号197のCARアミノ酸配列；または配列番号91、配列番号92、配列番号93、配列番号94、配列番号95、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103または配列番号197のアミノ酸配列に1、2または3改変(例えば、置換、例えば、保存的置換)を有するが、改変が30、20または10を超えないアミノ酸配列；または配列番号91、配列番号92、配列番号93、配列番号94、配列番号95、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103または配列番号197のアミノ酸配列と85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一性を有するアミノ酸配列をコードする核酸を含む(例えば、これらからなる)。

20

【0029】

ある態様において、単離核酸分子は、配列番号104、配列番号105、配列番号106、配列番号107、配列番号108、配列番号109、配列番号110、配列番号111、配列番号112、配列番号113、配列番号114、配列番号115、配列番号116または配列番号198の核酸配列；または配列番号104、配列番号105、配列番号106、配列番号107、配列番号108、配列番号109、配列番号110、配列番号111、配列番号112、配列番号113、配列番号114、配列番号115、配列番号116または配列番号198の核酸配列と85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一性を有する核酸配列を含む(例えば、これらからなる)。

30

【0030】

ある面において、本発明は、抗CLL-1結合ドメインをコードする単離核酸分子であって、抗CLL-1結合ドメインは、ここに記載される抗CLL-1結合ドメインの軽鎖相補性決定領域1(LC CDR1)、軽鎖相補性決定領域2(LC CDR2)および軽鎖相補性決定領域3(LC CDR3)の1以上(例えば、全3)、および/またはここに記載される抗CLL-1結合ドメインの重鎖相補性決定領域1(HC CDR1)、重鎖相補性決定領域2(HC CDR2)および重鎖相補性決定領域3(HC CDR3)の1以上(例えば、全3)を含み、例えば、ヒト化抗CLL-1結合ドメインは、LC CDRの1以上、例えば全3およびHC CDRの1以上、例えば全3を含む、核酸分子に関する。

40

【0031】

他の態様において、CLL-1結合ドメインは、表2に列挙したCLL-1重鎖結合ドメインのいずれかのアミノ酸配列のHC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3を含む。ある態様において、CLL-1結合ドメインは、LC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3をさらに含む。ある態様において、CLL-1結合ドメインは、表2に列挙したCLL-1軽鎖結合ドメインのいずれかのアミノ酸配列のLC CDR

50

1、LC CDR2およびLC CDR3を含む。

【0032】

ある態様において、CLL-1結合ドメインは、表2に列挙したCLL-1軽鎖結合ドメインのいずれかのアミノ酸配列のLC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3の1、2または全部、ならびに表2に列挙したCLL-1重鎖結合ドメインのいずれかのアミノ酸配列のHC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3の1、2または全部を含む。

【0033】

ある態様において、コードされた抗CLL-1結合ドメインは、ここに(例えば、配列番号78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90または196に)記載される軽鎖可変領域および/またはここに(例えば、配列番号65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77または195に)記載される重鎖可変領域を含む。ある態様において、コードされた抗CLL-1結合ドメインは、配列番号39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50または51のアミノ酸配列の軽鎖および重鎖を含むscFvである。ある態様において、抗CLL-1結合ドメイン(例えば、scFv)は、配列番号78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、もしくは196に示される軽鎖可変領域のアミノ酸配列に少なくとも1、2または3改変(例えば置換、例えば保存的置換)を有するが、改変(例えば置換、例えば保存的置換)が30、20または10を超えないアミノ酸配列または配列番号78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、もしくは196のアミノ酸配列と95~99%同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域;および/または配列番号65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、もしくは195に示される重鎖可変領域のアミノ酸配列に少なくとも1、2または3改変(例えば置換、例えば保存的置換)を有するが、改変(例えば置換、例えば保存的置換)が30、20または10を超えないアミノ酸配列または配列番号65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、もしくは195のアミノ酸配列と95~99%同一性を有する配列を含む重鎖可変領域を含む。ある態様において、抗CLL-1結合ドメインは、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50および配列番号51からなる群より選択される配列またはそれらと95~99%同一性を有する配列を含む。ある態様において、コードされた抗CLL-1結合ドメインは、scFvであり、本明細書で、例えば、表2で説明されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域は、本明細書で、例えば、表2で説明されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に、リンカー、例えば、ここに記載されるリンカーを介して結合している。ある態様において、コードされた抗CLL-1結合ドメインは、(Gly₄-Ser)_nリンカーを包含し、ここでnは、1、2、3、4、5または6であり、好ましくは4(配列番号26)である。scFvの軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、例えば、以下の配置:軽鎖可変領域-リンカー-重鎖可変領域または重鎖可変領域-リンカー-軽鎖可変領域のいずれであってもよい。ある態様において、ヒト抗CLL-1結合ドメインをコードする単離された核酸配列は、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63および配列番号64からなる群より選択される配列またはそれらと95~99%同一性を有する配列を含む。

【0034】

別の面において、本発明は、核酸分子によりコードされる、単離されたCAR(例えば、ポリペプチド)分子に関する。ある態様において、単離されたCAR分子は、配列番号91、配列番号92、配列番号93、配列番号94、配列番号95、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103および配列番号197からなる群より選択される配列またはそれら

10

20

30

40

50

と95～99%同一性を有する配列を含む。

【0035】

別の面において、本発明は、抗CLL-1結合ドメイン(例えば、CLL-1に特異的に結合するヒト抗体または抗体フラグメント)、膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、共刺激ドメインおよび/または一次シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメイン)を含む、単離キメラ抗原受容体(CAR)分子(例えば、ポリペプチド)に関する。ある態様において、CARは、ここに記載される抗CLL-1結合ドメイン(例えば、本明細書で説明されているようなCLL-1に特異的に結合するヒト抗体または抗体フラグメント)、ここに記載される膜貫通ドメインおよびここに記載される細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、ここに記載される共刺激ドメインおよび/または一次シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメイン)を包含する抗体または抗体フラグメントを含む。

10

【0036】

ある態様において、抗CLL-1結合ドメインは、ここに記載される抗CLL-1結合ドメインの軽鎖相補性決定領域1(LC CDR1)、軽鎖相補性決定領域2(LC CDR2)および軽鎖相補性決定領域3(LC CDR3)の1以上(例えば、全3)およびここに記載される抗CLL-1ドメインの重鎖相補性決定領域1(HC CDR1)、重鎖相補性決定領域2(HC CDR2)および/または重鎖相補性決定領域3(HC CDR3)の1以上(例えば、全3)を含み、例えば、ヒト抗CLL-1結合ドメインは、LC CDRの1以上、例えば全3およびHC CDRの1以上、例えば全3を含む。ある態様において、抗CLL-1結合ドメインは、本明細書に(例えば、表2に)記載される軽鎖可変領域および/または本明細書に(例えば、表2に)記載される重鎖可変領域を含む。ある態様において、抗CLL-1結合ドメインは、表2に列挙したアミノ酸配列の軽鎖および重鎖を含むscFvである。ある態様において、抗CLL-1結合ドメイン(例えば、scFv)は、表2に示される軽鎖可変領域のアミノ酸配列、もしくは表2に示されるアミノ酸配列と95～99%同一性を有する配列に少なくとも1、2または3改変(例えば置換、例えば保存的置換)を有するが、改変(例えば置換、例えば保存的置換)が30、20または10を超えないアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域;および/または表2に示される重鎖可変領域のアミノ酸配列、もしくは表2に示されるアミノ酸配列と95～99%同一性を有する配列に少なくとも1、2または3改変(例えば置換、例えば保存的置換)を有するが、改変(例えば置換、例えば保存的置換)が30、20または10を超えないアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

20

30

【0037】

他の態様において、コードされたCLL-1結合ドメインは、表2に列挙したCLL-1重鎖結合ドメインのいずれかのアミノ酸配列のHC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3を含む。ある態様において、CLL-1結合ドメインは、LC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3をさらに含む。ある態様において、CLL-1結合ドメインは、表2に列挙したCLL-1軽鎖結合ドメインのいずれかのアミノ酸配列のLC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3を含む。

【0038】

ある態様において、コードされたCLL-1結合ドメインは、表2に列挙したCLL-1軽鎖結合ドメインのいずれかのアミノ酸配列のLC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3の1、2または全部、ならびに表2に列挙したCLL-1重鎖結合ドメインのいずれかのアミノ酸配列のHC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3の1、2または全部を含む。

40

【0039】

ある態様において、抗CLL-1結合ドメインは、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号65～90または配列番号195～196からなる群より選択される配列;または前述の配

50

列のいずれかに対して少なくとも1、2または3改変(例えば置換、例えば保存的置換)を有するが、改変(例えば置換、例えば保存的置換)が30、20または10を超えないアミノ酸配列;または前述の配列のいずれかと95~99%同一性を有する配列を含む。ある態様において、抗CLL-1結合ドメインは、scFvであり、ここに記載される、例えば表2、配列番号271または配列番号273に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域は、ここに記載される、例えば表2、配列番号271または配列番号273に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に、リンカー、例えばここに記載されるリンカーを介して結合している。ある態様において、抗CLL-1結合ドメインは、(Gly₄-Ser)_nリンカーを包含し、ここでnは、1、2、3、4、5または6であり、好ましくは4である(配列番号26)。scFvの軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、例えば、以下の配置: 軽鎖可変領域-リンカー-重鎖可変領域または重鎖可変領域-リンカー-軽鎖可変領域のいずれであってもよい。

10

【0040】

ある態様において、単離されたCAR分子はT細胞受容体のアルファ、ベータまたはゼータ鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137およびCD154からなる群より選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む。ある態様において、膜貫通ドメインは、配列番号6の配列を含む。ある態様において、膜貫通ドメインは、配列番号6のアミノ酸配列に少なくとも1、2または3改変(例えば、置換、例えば保存的置換)を有するが、改変(例えば、置換、例えば保存的置換)が20、10または5を超えないアミノ酸配列または配列番号6のアミノ酸配列と95~99%同一性を有する配列を含む。

20

【0041】

ある態様において、抗CLL-1結合ドメインは、ヒンジ領域、例えばここに記載されるヒンジ領域によって膜貫通ドメインに接続されている。ある態様において、コードされたヒンジ領域は、配列番号2またはそれらと95~99%同一性を有する配列を含む。

【0042】

ある態様において、単離されたCAR分子の細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激ドメインを含む。ある態様において、単離されたCAR分子の細胞内シグナル伝達ドメインは、一次シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、単離されたCAR分子の細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激ドメインおよび一次シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、単離されたCAR分子は、共刺激ドメイン、例えばここに記載される共刺激ドメインをコードする配列をさらに含む。ある態様において、共刺激ドメインは、MHCクラスI分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子(SLAMタンパク質)、活性化NK細胞受容体、BTLA、Tollリガンド受容体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、4-1BB(CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS(CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPL

30

40

50

G(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19aおよびCD83と特異的に結合するリガンドからなる群より選択されるタンパク質の機能的シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、4-1BBの共刺激ドメインは、配列番号7のアミノ酸配列を含む。ある態様において、共刺激ドメインは、配列番号7のアミノ酸配列に少なくとも1、2または3改変(例えば、置換、例えば保存的置換)を有するが、改変(例えば、置換、例えば保存的置換)が20、10または5を超えないアミノ酸配列または配列番号7のアミノ酸配列と95~99%同一性を有する配列を含む。別の態様において、CD28の共刺激ドメインは、配列番号482のアミノ酸配列を含む。ある態様において、共刺激ドメインは、配列番号482のアミノ酸配列に少なくとも1、2または3改変を有するが、改変が20、10または5を超えないアミノ酸配列または配列番号482のアミノ酸配列と95~99%同一性を有する配列を含む。別の態様において、CD27の共刺激ドメインは、配列番号8のアミノ酸配列を含む。ある態様において、共刺激ドメインは、配列番号8のアミノ酸配列に少なくとも1、2または3改変を有するが、改変が20、10または5を超えないアミノ酸配列または配列番号8のアミノ酸配列と95~99%同一性を有する配列を含む。別の態様において、ICOSの共刺激ドメインは、配列番号484のアミノ酸配列を含む。ある態様において、共刺激ドメインは、配列番号484のアミノ酸配列に少なくとも1、2または3改変を有するが、改変が20、10または5を超えないアミノ酸配列または配列番号484のアミノ酸配列と95~99%同一性を有する配列を含む。

10

【0043】

20

ある態様において、一次シグナル伝達ドメインは、CD3ゼータの機能的シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、CD3ゼータの機能的シグナル伝達ドメインは、配列番号9(変異CD3ゼータ)のアミノ酸もしくは配列番号10(野生型ヒトCD3ゼータ)またはそれらと95~99%同一性を有する配列を含む。

【0044】

ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、4-1BBの機能的シグナル伝達ドメインおよび/またはCD3ゼータの機能的シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号7の配列および/または配列番号9もしくは配列番号10の配列を含む。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号7のアミノ酸配列および/または配列番号9もしくは配列番号10のアミノ酸配列に少なくとも1、2または3改変(例えば、置換、例えば保存的置換)を有するが、改変(例えば、置換、例えば保存的置換)が20、10または5を超えないアミノ酸配列または配列番号7のアミノ酸配列および/または配列番号9もしくは配列番号10のアミノ酸配列と95~99%同一性を有する配列を含む。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号7の配列および/または配列番号9もしくは配列番号10の配列を含み、ここで細胞内シグナル伝達ドメインを含む配列は、同一フレーム内で単一のポリペプチド鎖として発現される。

30

【0045】

ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD27の機能的シグナル伝達ドメインおよび/またはCD3ゼータの機能的シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、CD27の細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号8のアミノ酸配列および/または配列番号9もしくは配列番号10のCD3ゼータのアミノ酸配列を含む。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号8のアミノ酸配列および/または配列番号9もしくは配列番号10のアミノ酸配列に少なくとも1、2または3改変を有するが、改変が20、10または5を超えないアミノ酸配列または配列番号8のアミノ酸配列および/または配列番号9もしくは配列番号10のアミノ酸配列と95~99%同一性を有する配列を含む。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号8の配列および配列番号9または配列番号10の配列を含み、細胞内シグナル伝達ドメインを含む配列が、同一フレーム内で単一のポリペプチド鎖として発現される。

40

【0046】

50

ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD28の機能的シグナル伝達ドメインおよび/またはCD3ゼータの機能的シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、CD28のコードされた細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号482のアミノ酸配列および/または配列番号9もしくは配列番号10のCD3ゼータのアミノ酸配列を含む。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号482のアミノ酸配列および/または配列番号9もしくは配列番号10のアミノ酸配列に少なくとも1、2または3改変を有するが、改変が20、10または5を超えないアミノ酸配列または配列番号482のアミノ酸配列および/または配列番号9もしくは配列番号10のアミノ酸配列と95~99%同一性を有する配列を含む。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号482の配列および配列番号9または配列番号10の配列を含み、細胞内シグナル伝達ドメインを含む配列が、同一フレーム内で単一のポリペプチド鎖として発現される。

10

【0047】

ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、ICOSの機能的シグナル伝達ドメインおよび/またはCD3ゼータの機能的シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、コードされたICOSの細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号484のアミノ酸配列および/または配列番号9もしくは配列番号10のCD3ゼータのアミノ酸配列を含む。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号484のアミノ酸配列および/または配列番号9もしくは配列番号10のアミノ酸配列に少なくとも1、2または3改変を有するが、改変が20、10または5を超えないアミノ酸配列または配列番号482のアミノ酸配列および/または配列番号9もしくは配列番号10のアミノ酸配列と95~99%同一性を有する配列を含む。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号484の配列および配列番号9または配列番号10の配列を含み、細胞内シグナル伝達ドメインを含む配列が、同一フレーム内で単一のポリペプチド鎖として発現される。

20

【0048】

ある態様において、単離されたCAR分子は、リーダー配列、例えば、ここに記載されるリーダー配列をさらに含む。ある態様において、リーダー配列は、配列番号1のアミノ酸配列または配列番号1のアミノ酸配列と95~99%同一性を有する配列を含む。

【0049】

別の面において、本発明は、リーダー配列、例えば、ここに記載されるリーダー配列、例えば、配列番号1のリーダー配列またはそれと95~99%同一性を有するリーダー配列；ここに記載される抗CLL-1結合ドメイン、例えば、ここに記載されるLC CDR1、LC CDR2、LC CDR3、HC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3を含む抗CLL-1結合ドメイン、例えば表2に記載の抗CLL-1結合ドメインまたはそれらと95~99%同一性を有する配列；ヒンジ領域、例えばここに記載されるヒンジ領域、例えば、配列番号2のヒンジ領域またはそれらと95~99%同一性を有するヒンジ領域、膜貫通ドメイン、例えば、ここに記載される膜貫通ドメイン、例えば、配列番号6の配列またはそれと95~99%同一性を有する配列を有する膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、ここに記載される細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、共刺激ドメインおよび/または一次シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメイン)を含む、単離されたCAR分子に関する。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激ドメイン、例えば、ここに記載される共刺激ドメイン、例えば、配列番号7の配列を有するかまたはそれらと95~99%同一性を有する4-1BB共刺激ドメインおよび/または一次シグナル伝達ドメイン、例えば、ここに記載される一次シグナル伝達ドメイン、例えば、配列番号9もしくは配列番号10の配列を有するかまたはそれらと95~99%同一性を有するCD3ゼータ刺激ドメインを含む。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激ドメイン、例えば、ここに記載される共刺激ドメイン、例えば、配列番号7の配列を有する4-1BB共刺激ドメインおよび/または一次シグナル伝達ドメイン、例えば、ここに記載される一次シグナル伝達ドメイン

30

40

50

、例えば、配列番号9または配列番号10の配列を有するCD3ゼータ刺激ドメインを含む。

【0050】

ある態様において、単離されたCAR分子は、配列番号91、配列番号92、配列番号93、配列番号94、配列番号95、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103または配列番号197のアミノ酸配列または配列番号91、配列番号92、配列番号93、配列番号94、配列番号95、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103または配列番号197のアミノ酸配列に少なくとも1、2、3、4、5、10、15、20または30改変(例えば、置換、例えば保存的置換)を有するが、改変(例えば、置換、例えば保存的置換)が60、50または40を超えないアミノ酸配列または配列番号91、配列番号92、配列番号93、配列番号94、配列番号95、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103および配列番号197のアミノ酸配列と85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%同一性を有するアミノ酸配列を含む(例えば、からなる)。

10

【0051】

ある面において、本発明は、ここに記載される抗CLL-1結合ドメインの軽鎖相補性決定領域1(LC CDR1)、軽鎖相補性決定領域2(LC CDR2)および/または軽鎖相補性決定領域3(LC CDR3)の1以上(例えば、全3)、ならびにここに記載される抗CLL-1結合ドメインの重鎖相補性決定領域1(HC CDR1)、重鎖相補性決定領域2(HC CDR2)および重鎖相補性決定領域3(HC CDR3)の1以上(例えば、全3)を含む抗CLL-1結合ドメイン、例えば、LC CDRの1以上、例えば全3およびHC CDRの1以上、例えば全3を含むヒト抗CLL-1結合ドメインに関する。

20

【0052】

他の態様において、コードされたCLL-1結合ドメインは、表2に列挙したCLL-1重鎖結合ドメインのいずれかのアミノ酸配列のHC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3を含む。ある態様において、CLL-1結合ドメインは、LC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3をさらに含む。ある態様において、CLL-1結合ドメインは、表2に列挙したCLL-1軽鎖結合ドメインのいずれかのアミノ酸配列のLC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3を含む。

30

【0053】

ある態様において、コードされたCLL-1結合ドメインは、表2に列挙したCLL-1軽鎖結合ドメインのいずれかのアミノ酸配列のLC CDR1、LC CDR2およびLC CDR3の1、2または全部、ならびに表2に列挙したCLL-1重鎖結合ドメインのいずれかのアミノ酸配列のHC CDR1、HC CDR2およびHC CDR3の1、2または全部を含む。

【0054】

ある態様において、抗CLL-1結合ドメインは、ここに(例えば、配列番号78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90または196に)記載される軽鎖可変領域および/またはここに(例えば、配列番号65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77または195に)記載される重鎖可変領域を含む。ある態様において、抗CLL-1結合ドメインは、配列番号39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50または51に列挙したアミノ酸配列の軽鎖および重鎖を含むscFvである。ある態様において、抗CLL-1結合ドメイン(例えば、scFv)は、配列番号78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90または196で示される軽鎖可変領域のアミノ酸配列または配列番号78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90または196で示されるアミノ酸配列と95~99%同一

40

50

性を有する配列に少なくとも1、2または3 変化(例えば置換、例えば保存的置換)を有するが、変化(例えば置換、例えば保存的置換)が30、20または10を超えないアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域; および/または配列番号65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77または195に示される重鎖可変領域のアミノ酸配列または配列番号65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77または195に示されるアミノ酸配列と95~99%同一性を有する配列に少なくとも1、2または3 変化(例えば置換、例えば保存的置換)を有するが、変化(例えば置換、例えば保存的置換)が30、20または10を超えないアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。ある態様において、抗CLL-1結合ドメインは、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50または配列番号51からなる群より選択される配列またはそれらと95~99%同一性を有する配列を含む。ある態様において、抗CLL-1結合ドメインは、scFvであり、本明細書で、例えば、表2、配列番号271または配列番号273で説明されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域は、本明細書で、例えば、表2、配列番号271または配列番号273で説明されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に、リンカー、例えば、ここに記載されるリンカーを介して結合している。ある態様において、抗CLL-1結合ドメインは、(Gly₄-Ser)_nリンカーを包含し、ここでnは、1、2、3、4、5または6であり、好ましくは4(配列番号26)である。scFvの軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、例えば、以下の配置: 軽鎖可変領域-リンカー-重鎖可変領域または重鎖可変領域-リンカー-軽鎖可変領域のいずれであってもよい。

【0055】

別の面において、本発明は、ここに記載される核酸分子、例えば、ここに記載されるCARをコードする核酸分子を含むベクターに関する。ある態様において、ベクターは、DNA、RNA、プラスミド、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクターまたはレトロウイルスベクターからなる群より選択される。

【0056】

ある態様において、ベクターは、レンチウイルスベクターである。ある態様において、ベクターは、プロモーターをさらに含む。ある態様において、プロモーターは、EF-1プロモーターである。ある態様において、EF-1プロモーターは、配列番号11の配列を含む。別の態様において、プロモーターは、PGKプロモーター、例えば、ここに記載されるトランケートされたPGKプロモーターである。

【0057】

ある態様において、ベクターは、インビトロで転写されたベクターであり、例えば、ここに記載される核酸分子のRNAを転写するベクターである。ある態様において、ベクター中の核酸配列は、ポリ(A)テイル、例えばここに記載されるポリAテイル、例えば、約150個のアデノシン塩基を含むポリAテイル(配列番号312)をさらに含む。ある態様において、ベクター中の核酸配列は、3'UTR、例えばここに記載される3'UTR、例えば、ヒトベータ-グロブリン由来の3'UTRの少なくとも1の反復を含む3'UTRをさらに含む。ある態様において、ベクター中の核酸配列は、プロモーター、例えばT2Aプロモーターをさらに含む。

【0058】

別の面において、本発明は、ここに記載されるベクターを含む細胞に関する。ある態様において、細胞は、ここに記載される細胞、例えば、免疫エフェクター細胞、例えば、ヒトT細胞、例えば、ここに記載されるヒトT細胞またはヒトNK細胞、例えば、ここに記載されるヒトNK細胞である。ある態様において、ヒトT細胞は、CD8⁺T細胞である。

【0059】

別の態様において、ここに記載されるCAR発現細胞は、別の薬剤、例えばCAR発現細胞の活性を強化する薬剤をさらに発現していてもよい。例えば、ある態様において、薬

10

20

30

40

50

剤は、阻害分子を阻害する薬剤であってもよい。阻害分子の例としては、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および/またはCEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14またはCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシンおよびTGFRベータが挙げられる。ある態様において、阻害分子を阻害する薬剤は、第一のポリペプチド、例えば細胞に陽性シグナルを提供する第二のポリペプチド、例えば、ここに記載される細胞内シグナル伝達ドメインと結合している阻害分子を含む。ある態様において、薬剤は、例えば、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACA
 M(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および/またはCEACAM-5)、L
 AG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD8
 0、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFR
 SF14またはCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、G
 AL9、アデノシンおよびTGFRベータなどの阻害分子の第一のポリペプチドまたはこ
 れらのうちいずれかのフラグメント(例えば、これらのうちいずれかの細胞外ドメインの
 少なくとも一部)、ならびにここに記載される細胞内シグナル伝達ドメインである[例えば
 、共刺激ドメイン(例えば、41BB、CD27またはCD28、例えば、本明細書で説
 明されているようなもの)および/または一次シグナル伝達ドメイン(例えば、ここに記載
 されるCD3ゼータシグナル伝達ドメイン)を含む]第二のポリペプチドを含む。ある態様
 において、薬剤は、PD1の第一のポリペプチドまたはそれらのフラグメント(例えば、
 PD1の細胞外ドメインの少なくとも一部)、ならびにここに記載される細胞内シグナル
 伝達ドメイン(例えば、ここに記載されるCD28シグナル伝達ドメインおよび/または
 ここに記載されるCD3ゼータシグナル伝達ドメイン)の第二のポリペプチドを含む。

10

20

【0060】

別の面において、本発明は、ここに記載される細胞、例えば、ここに記載される免疫エフェクター細胞、例えば、ここに記載されるT細胞またはNK細胞に、CAR、例えば、ここに記載されるCARをコードする核酸を含むベクターを形質導入することを含む、細胞を作製する方法に関する。

【0061】

本発明はまた、RNA改変細胞の集団、例えばここに記載される細胞の集団、例えば外因性RNAを一過性発現する免疫エフェクター細胞、例えばT細胞またはNK細胞の集団を生成する方法も提供する。本方法は、インビトロで転写されたRNAまたは合成RNAを細胞に導入することを含み、ここで該RNAは、ここに記載されるCAR分子をコードする核酸を含む。

30

【0062】

別の面において、本発明は、哺乳動物において抗腫瘍免疫を提供する方法であって、CAR分子を発現する細胞、例えば、ここに記載されるCAR分子を発現する細胞の有効量を哺乳動物に投与することを含む、方法に関する。ある態様において、細胞は、自己免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞である。ある態様において、細胞は、同種異系免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞である。ある態様において、哺乳動物は、ヒト、例えば、血液癌を有する患者である。別の面において、本発明は、CLL-1発現に関係する疾患(例えば、増殖性疾患、前癌状態およびCLL-1の発現に関連する非癌関連の徴候)を有する哺乳動物の処置方法であって、CAR分子、例えば、ここに記載されるCAR分子を発現する細胞の有効量を哺乳動物に投与することを含む、処置方法に関する。ある態様において、哺乳動物は、ヒト、例えば、血液癌を有する患者である。

40

【0063】

ある態様において、疾患は、ここに記載される疾患である。ある態様において、CLL-1発現に関係する疾患は、血液癌、例えば、急性骨髄性白血病(AML)などを含むが、これに限定されない急性白血病；骨髄異形成症候群；骨髄増殖性新生物；慢性骨髄性白血

50

病(CML)；芽球性形質細胞様樹状細胞の新生物；ならびにこれらに限定されないが、CLL-1を発現する、異型および/または非古典的癌、悪性腫瘍、前癌状態または増殖性疾患などのCLL-1発現に関係する疾患；ならびにそれらの組合せから選択される。ある態様において、CLL-1の発現に関係する疾患は、急性骨髄性白血病(または急性骨髄白血病、AML)、慢性骨髄性白血病(または慢性骨髄白血病、CML)、急性リンパ性白血病(または急性リンパ芽球性白血病、ALL)、慢性リンパ性白血病(または慢性リンパ球性白血病、CLL)および骨髄異形成症候群、B細胞急性リンパ性白血病(「BALL」またはB細胞急性リンパ芽球性白血病)、T細胞急性リンパ性白血病(「TALL」またはT細胞急性リンパ芽球性白血病)、急性リンパ性白血病(ALL)を含むが、これらに限定されない、1以上の急性白血病；慢性骨髄性白血病(CML)、慢性リンパ球性白血病(CLL)を含むが、これらに限定されない、1以上の慢性白血病；B細胞前リンパ球性白血病、芽球性形質細胞様樹状細胞の新生物；多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、パーキットリンパ腫、小細胞型濾胞性リンパ腫および大細胞型濾胞性リンパ腫を含むが、これらに限定されないリンパ腫；パーキットリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、ヘアリーセル白血病、小細胞型濾胞性リンパ腫または大細胞型濾胞性リンパ腫、悪性リンパ増殖性状態、MALTリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、多発性骨髄腫、脊髄形成異常および骨髄異形成症候群、ホジキンリンパ腫、形質芽細胞リンパ腫、形質細胞様樹状細胞の新生物、形質細胞性骨髄腫、ワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症；および骨髄血液細胞の産生の失効(または異形成)によりまとめられる血液学的状態の多様なコレクションである「前白血病」を含むが、これらに限定されない、さらなる血液癌または血液学的状態からなる群より選択される血液癌；ならびにCLL-1を発現する異型癌および/または非古典的癌、悪性腫瘍、前癌状態または増殖性疾患；ならびにこれらの組合せを含むが、これらに限定されない、CLL-1の発現に関係する疾患である。

10

20

【0064】

別の面において、本発明は、ここに記載されるCAR分子を含む細胞の有効量を対象に投与することを含む、細胞移植の前に対象をコンディショニングする方法に関する。ある態様において、細胞移植は、幹細胞移植である。幹細胞移植は、造血幹細胞移植または骨髄移植である。ある態様において、細胞移植は、同種異系移植または自己移植である。

【0065】

ある態様において、細胞移植の前に対象をコンディショニングすることは、対象におけるCLL-1を発現する細胞の数を低減することを含む。対象におけるCLL-1を発現する細胞は、CLL-1を発現する正常細胞またはCLL-1を発現する癌細胞であり、ある場合において、対象におけるコンディショニングが、細胞移植の前にCLL-1を発現する正常および癌細胞の両方を低減する。

30

【0066】

ある態様において、CAR分子、例えばここに記載されるCAR分子発現細胞は、CAR分子発現細胞の効能を増加させる薬剤、例えばここに記載される薬剤と組み合わせて投与される。

【0067】

ある態様において、CAR分子、例えば、ここに記載されるCAR分子を発現する細胞は、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤と組み合わせて投与される。理論に縛られることは望まないが、免疫を増強する低い用量(例えば、免疫系を完全に抑制するには不十分であるが免疫機能を向上させるには十分な用量)での処置は、PD-1陽性T細胞の減少またはPD-1陰性細胞の増加を伴うと考えられる。PD-1陰性T細胞ではなくPD-1陽性T細胞は、PD-1リガンド、例えば、PD-L1またはPD-L2を発現する細胞との接触によって排除することができる。

40

【0068】

ある態様において、このアプローチは、対象におけるここに記載されるCAR細胞の性能を最適化するのに使用できる。理論に縛られることは望まないが、ある態様において、

50

内因性の非改変免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の性能が、向上すると考えられる。理論に縛られることは望まないが、ある態様において、CLL-1 CARを発現する細胞の性能が、向上すると考えられる。他の態様において、CARを発現するように加工されたまたは加工される細胞、例えば、T細胞は、PD1陰性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の数を増加させるかまたはPD1陽性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞に対するPD1陰性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の比率を増加させる量のmTOR阻害剤と接触させることによって、エクスピボで処置され得る。

【0069】

ある態様において、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒性阻害剤の投与は、ここに記載されるCARを発現する細胞、例えば、T細胞の投与の前に開始される。ある態様において、PD1陰性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞のレベルまたはPD1陽性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞に対するPD1陰性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の比率が、少なくとも一過性に増加するように、CAR細胞は、十分な時間または十分なmTOR阻害剤投与の後に投与される。

10

【0070】

ある態様において、本発明は、対象の処置で使用するためのmTOR阻害剤を提供し、ここで、前記mTOR阻害剤は、前記対象の免疫応答を増強し、前記対象は、ここに記載されるCLL-1 CARを発現する免疫エフェクター細胞を受けたことがあるか、受けているかまたは受ける予定である。

20

【0071】

ある態様において、CARを発現するように加工される細胞、例えば、T細胞は、対象におけるまたは対象から回収された、PD1陰性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞のレベルまたはPD1陽性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞に対するPD1陰性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の比率が少なくとも一過性に増加するように、十分な時間の後にまたは十分な低い免疫増強用量のmTOR阻害剤投与の後に回収される。

【0072】

ある態様において、CAR分子、例えば、ここに記載されるCAR分子を発現する細胞は、CAR分子を発現する細胞の投与に関連する1以上の副作用を改善する薬剤、例えば、ここに記載される薬剤と組み合わせて投与される。

30

【0073】

ある態様において、CAR分子、例えばここに記載されるCAR分子発現細胞は、CLL-1に関係する疾患を処置する薬剤、例えばここに記載される薬剤と組み合わせて投与される。別の態様において、CAR分子、例えば、ここに記載されるCAR分子を発現する細胞を、化学療法剤、例えば、ここに記載される化学療法剤と組み合わせて投与する。ある態様において、化学療法剤を、CAR分子、例えば、ここに記載されるCAR分子を発現する細胞の投与の前に投与する。例えば、化学療法剤の1回を超える投与が所望である化学療法レジメンでは、化学療法レジメンを、CAR分子、例えば、ここに記載されるCAR分子を発現する細胞の投与の前に開始または完了する。ある態様において、化学療法剤を、CAR分子を発現する細胞の投与の少なくとも5日、10日、15日、30日前に投与する。ある態様において、化学療法剤は、癌細胞、例えば、腫瘍細胞におけるCLL-1の発現を、例えば、正常細胞または非癌細胞におけるCLL-1の発現と比較して増加させる化学療法剤である。例えば、化学療法剤は、シタラビン(Ara-C)である。ある態様において、化学療法と、ここに記載されるCAR分子を発現する細胞との組合せは、血液癌、例えば、白血病、例えば、AMLまたはここに記載される血液癌の微小残存病変(MRD)を処置するために有用である。

40

【0074】

別の面において、本発明は、例えばここに記載される医薬として使用するための、本発明のCARをコードする単離核酸分子、本発明のCARの単離されたポリペプチド分子、本発明のCARを含むベクターおよび本発明のCARを含む細胞に関する。別の面におい

50

て、本発明は、本発明のCARをコードする単離核酸分子、本発明のCARの単離されたポリペプチド分子、本発明のCARを含むベクターおよびCLL-1を発現する疾患、例えば、ここに記載されるCLL-1を発現する疾患の処置で使用するための本発明のCARを含む細胞に関する。

【0075】

前述の組成物および方法の追加の特色および態様は、以下のものの1以上を包含する。

ある態様において、CLL-1 CAR分子(例えば、ここに記載されるCLL-1 CAR核酸またはCLL-1 CARポリペプチド)またはここに記載されるCLL-1結合ドメインは、表3に示される重鎖可変領域からの1、2または3CDR(例えば、HC CDR1、HC CDR2および/またはHC CDR3);および/または表4に示されるCLL-1 CAR-1、CLL-1 CAR-2、CLL-1 CAR-3、CLL-1 CAR-4、CLL-1 CAR-5、CLL-1 CAR-6、CLL-1 CAR-7、CLL-1 CAR-8、CLL-1 CAR-9、CLL-1 CAR-10、CLL-1 CAR-11、CLL-1 CAR-12、CLL-1 CAR-13または181268の軽鎖可変領域からの1、2または3CDR(例えば、LC CDR1、LC CDR2および/またはLC CDR3);または前述の配列のいずれかに対して実質的に同一な配列(例えば、95~99%同一であるかまたは最大5、4、3、2または1アミノ酸の変化、例えば置換(例えば、保存的置換))を包含する。

【0076】

ある態様において、CLL-1 CAR分子(例えば、ここに記載されるCLL-1 CAR核酸またはCLL-1 CARポリペプチド)またはここに記載される抗CLL-1抗原結合ドメインは、表5に示される重鎖可変領域からの1、2または3CDR(例えば、HC CDR1、HC CDR2および/またはHC CDR3);および/または表6に示されるCLL-1 CAR-1、CLL-1 CAR-2、CLL-1 CAR-3、CLL-1 CAR-4、CLL-1 CAR-5、CLL-1 CAR-6、CLL-1 CAR-7、CLL-1 CAR-8、CLL-1 CAR-9、CLL-1 CAR-10、CLL-1 CAR-11、CLL-1 CAR-12、CLL-1 CAR-13または181268の軽鎖可変領域からの1、2または3CDR(例えば、LC CDR1、LC CDR2および/またはLC CDR3);または前述の配列のいずれかに実質的に同一な配列(例えば、95~99%同一であるかまたは最大5、4、3、2または1アミノ酸の変化、例えば置換(例えば、保存的置換))を包含する。

【0077】

ある態様において、CLL-1 CAR分子(例えば、ここに記載されるCLL-1 CAR核酸またはCLL-1 CARポリペプチド)またはここに記載されるCLL-1結合ドメインは、CLL-1 CAR-1、CLL-1 CAR-2、CLL-1 CAR-3、CLL-1 CAR-4、CLL-1 CAR-5、CLL-1 CAR-6、CLL-1 CAR-7、CLL-1 CAR-8、CLL-1 CAR-9、CLL-1 CAR-10、CLL-1 CAR-11、CLL-1 CAR-12、CLL-1 CAR-13または181268の、表7に提示されている重鎖可変領域に由来する1、2または3CDR(例えば、HC CDR1、HC CDR2および/またはHC CDR3);および/または表8に提示されている軽鎖可変領域に由来する1、2または3CDR(例えば、LC CDR1、LC CDR2および/またはLC CDR3);または前述の配列のいずれかと実質的に同一な(例えば、95~99%同一であるかまたはアミノ酸変化、例えば、置換(例えば、保存的置換)を最大で5、4、3、2または1とする)配列を含む。

【0078】

ある態様において、ここに記載されるCAR分子(例えば、CAR核酸またはCARポリペプチド)は、

(1)以下:

(i)CLL-1 CAR-1の配列番号156のLC CDR1、配列番号169のL

10

20

30

40

50

- C CDR2および配列番号182のLC CDR3 ;
(ii) CLL - 1 CAR - 2の配列番号157のLC CDR1、配列番号170のLC CDR2および配列番号183のLC CDR3 ;
(iii) CLL - 1 CAR - 3の配列番号158のLC CDR1、配列番号171のLC CDR2および配列番号184のLC CDR3 ;
(iv) CLL - 1 CAR - 4の配列番号159のLC CDR1、配列番号172のLC CDR2および配列番号185のLC CDR3 ;
(v) CLL - 1 CAR - 5の配列番号160のLC CDR1、配列番号173のLC CDR2および配列番号186のLC CDR3 ;
(vi) CLL - 1 CAR - 6の配列番号161のLC CDR1、配列番号174のLC CDR2および配列番号187のLC CDR3 ;
(vii) CLL - 1 CAR - 7の配列番号162のLC CDR1、配列番号175のLC CDR2および配列番号188のLC CDR3 ;
(viii) CLL - 1 CAR - 8の配列番号163のLC CDR1、配列番号176のLC CDR2および配列番号189のLC CDR3 ;もしくは
(ix) CLL - 1 CAR - 9の配列番号164のLC CDR1、配列番号177のLC CDR2および配列番号190のLC CDR3 ;
(x) CLL - 1 CAR - 10の配列番号165のLC CDR1、配列番号178のLC CDR2および配列番号191のLC CDR3 ;
(xi) CLL - 1 CAR - 11の配列番号166のLC CDR1、配列番号179のLC CDR2および配列番号192のLC CDR3 ;
(xii) CLL - 1 CAR - 12の配列番号167のLC CDR1、配列番号180のLC CDR2および配列番号193のLC CDR3 ;
(xiii) CLL - 1 CAR - 13の配列番号168のLC CDR1、配列番号181のLC CDR2および配列番号194のLC CDR3 ;
(xiv) 181286の配列番号202のLC CDR1、配列番号203のLC CDR2および配列番号204のLC CDR3
の1つから選択される、1、2または3軽鎖(LC)CDR ;および/または
(2)以下 :
- (i) CLL - 1 CAR - 1の配列番号117のHC CDR1、配列番号130のHC CDR2および配列番号143のHC CDR3 ;
(ii) CLL - 1 CAR - 2の配列番号118のHC CDR1、配列番号131のHC CDR2および配列番号144のHC CDR3 ;
(iii) CLL - 1 CAR - 3の配列番号119のHC CDR1、配列番号132のHC CDR2および配列番号145のHC CDR3 ;
(iv) CLL - 1 CAR - 4の配列番号120のHC CDR1、配列番号133のHC CDR2および配列番号146のHC CDR3 ;
(v) CLL - 1 CAR - 5の配列番号121のHC CDR1、配列番号134のHC CDR2および配列番号147のHC CDR3 ;
(vi) CLL - 1 CAR - 6の配列番号122のHC CDR1、配列番号135のHC CDR2および配列番号148のHC CDR3 ;
(vii) CLL - 1 CAR - 7の配列番号123のHC CDR1、配列番号136のHC CDR2および配列番号149のHC CDR3 ;
(viii) CLL - 1 CAR - 8の配列番号124のHC CDR1、配列番号137のHC CDR2および配列番号150のHC CDR3 ;もしくは
(ix) CLL - 1 CAR - 9の配列番号125のHC CDR1、配列番号138のHC CDR2および配列番号151のHC CDR3 ;
(x) CLL - 1 CAR - 10の配列番号126のHC CDR1、配列番号139のHC CDR2および配列番号152のHC CDR3 ;
(xi) CLL - 1 CAR - 11の配列番号127のHC CDR1、配列番号140の

HC CDR2および配列番号153のHC CDR3 ;
 (xii) CLL - 1 CAR - 12の配列番号128のHC CDR1、配列番号141
 のHC CDR2および配列番号154のHC CDR3 ;
 (xiii) CLL - 1 CAR - 13の配列番号129のHC CDR1、配列番号142
 のHC CDR2および配列番号155のHC CDR3 ;
 (xiv) 181286の配列番号199のHC CDR1、配列番号200のHC CD
 R2および配列番号201のHC CDR3
 の1つからの1、2または3重鎖(HC)CDRを含む。

【0079】

ある態様において、ここに記載されるCAR分子(例えば、CAR核酸またはCARポ
 リペプチド)またはCLL - 1結合ドメインは、

10

(1)以下:

(i) CLL - 1 CAR - 1の配列番号356のLC CDR1、配列番号370のL
 C CDR2および配列番号384のLC CDR3 ;
 (ii) CLL - 1 CAR - 2の配列番号357のLC CDR1、配列番号371のL
 C CDR2および配列番号385のLC CDR3 ;
 (iii) CLL - 1 CAR - 3の配列番号358のLC CDR1、配列番号372の
 LC CDR2および配列番号386のLC CDR3 ;
 (iv) CLL - 1 CAR - 4の配列番号359のLC CDR1、配列番号373のL
 C CDR2および配列番号387のLC CDR3 ;
 (v) CLL - 1 CAR - 5の配列番号360のLC CDR1、配列番号374のL
 C CDR2および配列番号388のLC CDR3 ;
 (vi) CLL - 1 CAR - 6の配列番号361のLC CDR1、配列番号375のL
 C CDR2および配列番号389のLC CDR3 ;
 (vii) CLL - 1 CAR - 7の配列番号362のLC CDR1、配列番号376の
 LC CDR2および配列番号390のLC CDR3 ;
 (viii) CLL - 1 CAR - 8の配列番号363のLC CDR1、配列番号377の
 LC CDR2および配列番号391のLC CDR3 ; もしくは
 (ix) CLL - 1 CAR - 9の配列番号364のLC CDR1、配列番号378のL
 C CDR2および配列番号392のLC CDR3 ;
 (x) CLL - 1 CAR - 10の配列番号365のLC CDR1、配列番号379の
 LC CDR2および配列番号393のLC CDR3 ;
 (xi) CLL - 1 CAR - 11の配列番号366のLC CDR1、配列番号380の
 LC CDR2および配列番号394のLC CDR3 ;
 (xii) CLL - 1 CAR - 12の配列番号367のLC CDR1、配列番号381
 のLC CDR2および配列番号395のLC CDR3 ;
 (xiii) CLL - 1 CAR - 13の配列番号368のLC CDR1、配列番号382
 のLC CDR2および配列番号396のLC CDR3 ;
 (xiv) 181286の配列番号369のLC CDR1、配列番号383のLC CD
 R2および配列番号397のLC CDR3
 の1つから選択される、1、2または3重鎖(LC)CDR ; および/または

20

30

40

(2)以下:

(i) CLL - 1 CAR - 1の配列番号314のHC CDR1、配列番号328のH
 C CDR2および配列番号342のHC CDR3 ;
 (ii) CLL - 1 CAR - 2の配列番号315のHC CDR1、配列番号329のH
 C CDR2および配列番号343のHC CDR3 ;
 (iii) CLL - 1 CAR - 3の配列番号316のHC CDR1、配列番号330の
 HC CDR2および配列番号344のHC CDR3 ;
 (iv) CLL - 1 CAR - 4の配列番号317のHC CDR1、配列番号331のH
 C CDR2および配列番号345のHC CDR3 ;

50

(v) C L L - 1 C A R - 5 の配列番号 3 1 8 の H C C D R 1、配列番号 3 3 2 の H C C D R 2 および配列番号 3 4 6 の H C C D R 3 ;

(vi) C L L - 1 C A R - 6 の配列番号 3 1 9 の H C C D R 1、配列番号 3 3 3 の H C C D R 2 および配列番号 3 4 7 の H C C D R 3 ;

(vii) C L L - 1 C A R - 7 の配列番号 3 2 0 の H C C D R 1、配列番号 3 3 4 の H C C D R 2 および配列番号 3 4 8 の H C C D R 3 ;

(viii) C L L - 1 C A R - 8 の配列番号 3 2 1 の H C C D R 1、配列番号 3 3 5 の H C C D R 2 および配列番号 3 4 9 の H C C D R 3 ; もしくは

(ix) C L L - 1 C A R - 9 の配列番号 3 2 2 の H C C D R 1、配列番号 3 3 6 の H C C D R 2 および配列番号 3 5 0 の H C C D R 3 ;

10

(x) C L L - 1 C A R - 1 0 の配列番号 3 2 3 の H C C D R 1、配列番号 3 3 7 の H C C D R 2 および配列番号 3 5 1 の H C C D R 3 ;

(xi) C L L - 1 C A R - 1 1 の配列番号 3 2 4 の H C C D R 1、配列番号 3 3 8 の H C C D R 2 および配列番号 3 5 2 の H C C D R 3 ;

(xii) C L L - 1 C A R - 1 2 の配列番号 3 2 5 の H C C D R 1、配列番号 3 3 9 の H C C D R 2 および配列番号 3 5 3 の H C C D R 3 ;

(xiii) C L L - 1 C A R - 1 3 の配列番号 3 2 6 の H C C D R 1、配列番号 3 4 0 の H C C D R 2 および配列番号 3 5 4 の H C C D R 3 ;

(xiv) 1 8 1 2 8 6 の配列番号 3 2 7 の H C C D R 1、配列番号 3 4 1 の H C C D R 2 および配列番号 3 5 5 の H C C D R 3

20

の 1 つからの 1、2 または 3 重鎖 (H C) C D R を含む。

【 0 0 8 0 】

ある態様において、ここに記載される C A R 分子 (例えば、C A R 核酸または C A R ポリペプチド) は、

(1) 以下 :

(i) C L L - 1 C A R - 1 の配列番号 4 4 0 の L C C D R 1、配列番号 4 5 4 の L C C D R 2 および配列番号 4 6 8 の L C C D R 3 ;

(ii) C L L - 1 C A R - 2 の配列番号 4 4 1 の L C C D R 1、配列番号 4 5 5 の L C C D R 2 および配列番号 4 6 9 の L C C D R 3 ;

(iii) C L L - 1 C A R - 3 の配列番号 4 4 2 の L C C D R 1、配列番号 4 5 6 の L C C D R 2 および配列番号 4 7 0 の L C C D R 3 ;

30

(iv) C L L - 1 C A R - 4 の配列番号 4 4 3 の L C C D R 1、配列番号 4 5 7 の L C C D R 2 および配列番号 4 7 1 の L C C D R 3 ;

(v) C L L - 1 C A R - 5 の配列番号 4 4 4 の L C C D R 1、配列番号 4 5 8 の L C C D R 2 および配列番号 4 7 2 の L C C D R 3 ;

(vi) C L L - 1 C A R - 6 の配列番号 4 4 5 の L C C D R 1、配列番号 4 5 9 の L C C D R 2 および配列番号 4 7 3 の L C C D R 3 ;

(vii) C L L - 1 C A R - 7 の配列番号 4 4 6 の L C C D R 1、配列番号 4 6 0 の L C C D R 2 および配列番号 4 7 4 の L C C D R 3 ;

(viii) C L L - 1 C A R - 8 の配列番号 4 4 7 の L C C D R 1、配列番号 4 6 1 の L C C D R 2 および配列番号 4 7 5 の L C C D R 3 ; もしくは

40

(ix) C L L - 1 C A R - 9 の配列番号 4 4 8 の L C C D R 1、配列番号 4 6 2 の L C C D R 2 および配列番号 4 7 6 の L C C D R 3 ;

(x) C L L - 1 C A R - 1 0 の配列番号 4 4 9 の L C C D R 1、配列番号 4 6 3 の L C C D R 2 および配列番号 4 7 7 の L C C D R 3 ;

(xi) C L L - 1 C A R - 1 1 の配列番号 4 5 0 の L C C D R 1、配列番号 4 6 4 の L C C D R 2 および配列番号 4 7 8 の L C C D R 3 ;

(xii) C L L - 1 C A R - 1 2 の配列番号 4 5 1 の L C C D R 1、配列番号 4 6 5 の L C C D R 2 および配列番号 4 7 9 の L C C D R 3 ;

(xiii) C L L - 1 C A R - 1 3 の配列番号 4 5 2 の L C C D R 1、配列番号 4 6 6

50

の LC CDR 2 および配列番号 480 の LC CDR 3 ;

(xiv) 181286 の配列番号 453 の LC CDR 1、配列番号 467 の LC CDR 2 および配列番号 481 の LC CDR 3

の 1 つから選択される、1、2 または 3 軽鎖 (LC) CDR ; および / または

(2) 以下 :

(i) CLL - 1 CAR - 1 の配列番号 398 の HC CDR 1、配列番号 412 の HC CDR 2 および配列番号 426 の HC CDR 3 ;

(ii) CLL - 1 CAR - 2 の配列番号 399 の HC CDR 1、配列番号 413 の HC CDR 2 および配列番号 427 の HC CDR 3 ;

(iii) CLL - 1 CAR - 3 の配列番号 400 の HC CDR 1、配列番号 414 の HC CDR 2 および配列番号 428 の HC CDR 3 ;

(iv) CLL - 1 CAR - 4 の配列番号 401 の HC CDR 1、配列番号 415 の HC CDR 2 および配列番号 429 の HC CDR 3 ;

(v) CLL - 1 CAR - 5 の配列番号 402 の HC CDR 1、配列番号 416 の HC CDR 2 および配列番号 430 の HC CDR 3 ;

(vi) CLL - 1 CAR - 6 の配列番号 403 の HC CDR 1、配列番号 417 の HC CDR 2 および配列番号 431 の HC CDR 3 ;

(vii) CLL - 1 CAR - 7 の配列番号 404 の HC CDR 1、配列番号 418 の HC CDR 2 および配列番号 432 の HC CDR 3 ;

(viii) CLL - 1 CAR - 8 の配列番号 405 の HC CDR 1、配列番号 419 の HC CDR 2 および配列番号 433 の HC CDR 3 ; もしくは

(ix) CLL - 1 CAR - 9 の配列番号 406 の HC CDR 1、配列番号 420 の HC CDR 2 および配列番号 434 の HC CDR 3 ;

(x) CLL - 1 CAR - 10 の配列番号 407 の HC CDR 1、配列番号 421 の HC CDR 2 および配列番号 435 の HC CDR 3 ;

(xi) CLL - 1 CAR - 11 の配列番号 408 の HC CDR 1、配列番号 422 の HC CDR 2 および配列番号 436 の HC CDR 3 ;

(xii) CLL - 1 CAR - 12 の配列番号 409 の HC CDR 1、配列番号 423 の HC CDR 2 および配列番号 437 の HC CDR 3 ;

(xiii) CLL - 1 CAR - 13 の配列番号 410 の HC CDR 1、配列番号 424 の HC CDR 2 および配列番号 438 の HC CDR 3 ;

(xiv) 181286 の配列番号 411 の HC CDR 1、配列番号 425 の HC CDR 2 および配列番号 439 の HC CDR 3

の 1 つからの 1、2 または 3 重鎖 (HC) CDR を含む。

【0081】

特に他の定義がない限り、本明細書において使用される全ての専門用語や科学用語は、本発明が属する分野の当業者が一般的に理解するものと同じ意味を有する。以下で好適な方法および材料を説明するが、本発明の実施または試験において、本明細書で説明したものに類似したまたは同等な方法および材料を使用することができる。本明細書で述べられた全ての公報、特許出願、特許および他の参考文献は、参照によりそれら全体が開示に組み入れられる。加えて、材料、方法および実施例は単なる例示にすぎず、限定することを意図しない。見出し、小見出しまたは番号付けもしくは文字で分類された要素、例えば、(a)、(b)、(i)などは、単に読解しやすくするために示されたにすぎない。この文書における見出しまたは番号付けもしくは文字で分類された要素の使用は、工程または要素をアルファベット順に実行することまたは工程または要素が必ずしも互いに不連続であることを必要としない。本発明の他の特色、目的および利点は、明細書および図面から、ならびに特許請求の範囲から明らかである。

【0082】

図面の簡単な説明

本発明の好ましい態様の以下の詳細な説明は、添付の図と併せて読むとさらによく理解

10

20

30

40

50

される。本発明を説明する目的で、現在推奨される態様が図に示されている。しかし、本発明は図に示されている態様の配置および手段に限定されないことは理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0083】

【図1】図1A、1Bおよび1Cを含む図1は、抗CLL-1 CARを形質導入されたJNL細胞株と混合された標的陽性(PL21、THP1、HL60、U937)または標的陰性(K562)細胞株におけるルシフェラーゼレベルを示す一連の図である。

【0084】

【図2】図2A、2Bおよび2Cを含む図2は、抗CLL-1 CARを形質導入されたJNL細胞株におけるFACSにより評価されるCAR発現を示す一連の図である。

10

【0085】

【図3】図3Aおよび3Bを含む図3は、形質導入されたT細胞のパーセンテージを示すFACSからの相対的蛍光強度のヒストグラムプロットを示す一連の図である。図3AはプロテインLを使用する初代T細胞におけるCART発現の検出を示す。図3Bは組換えCLL-1タンパク質を使用する初代T細胞におけるCART発現の検出を示す。

【0086】

【図4】図4A、4Bおよび4Cを含む図4は、ルシフェライズドPL21(図4A)、HL60(図4B)およびU87細胞(図4C)の抗CLL-1 CART細胞死滅を示す一連の図である。

20

【0087】

【図5】図5A、5Bおよび5Cを含む図5は、CART-CLL-1細胞におけるサイトカイン産生を示す一連の図である。非形質導入T細胞(UTD)はバックグランドT細胞効果について非特異的な対照として使用された。TNFアルファ(図5A)、IL-2(図5B)およびインターフェロン(IFN)ガンマ(図5C)が測定された。

【0088】

【図6】図6は、CLL-1がAMLを有する大半の原発患者試料において発現されていることを示す図である(AML芽細胞は標準側方散乱^{low}CD45^{dim}特徴を使用してゲートをかけた)。CLL-1は市販の抗体(クローンHIM3-4、eBioscience)を使用してフローサイトメトリーにより測定した。

30

【0089】

【図7】図7Aおよび7Bを含む図7は、CARを形質導入されたT細胞の形質導入効率を示す一連の図である。

【0090】

【図8】図8Aおよび8Bを含む図8は、CLL1-CART細胞がCLL1+細胞株および初代AML試料への特異的脱顆粒を受けることを示す一連の図である。CD107a脱顆粒はフローサイトメトリーにより測定した(図8A)。CLL-1 CART細胞はTHP1および初代AML試料への特異的脱顆粒を受けたが、対照細胞株への脱顆粒はなかった(図8B)。

【0091】

40

【図9】図9Aおよび9Bを含む図9は、CLL1-CART細胞が、CLL1+細胞株および初代AML試料とのインキュベーション後にTNF- α を産生することを示す一連の図である。

【0092】

【図10】図10Aおよび10Bは、CLL1-CART細胞が、CLL1+細胞株および初代AML試料とのインキュベーション後にIL-2を産生することを示す一連の図である。

【0093】

【図11】図11A~11Dを含む図11は、CLL1-CART細胞がCLL-1+細胞株MOLM14およびTHP-1ならびに初代AML試料を特異的に死滅させることを

50

示す一連の図である。CLL1-CART細胞は、指示されたE対T比でMOLM14(図11D)、THP-1(図11A)および初代AML試料(図11B)の特異的溶解をもたらすが、対照細胞株JEKO(図11C)には溶解をもたらさない。

【0094】

【図12】図12Aおよび12Bを含む図12は、CLL1-CART細胞がMOLM14、THP-1および初代AML試料に応答して増殖することを示す一連の図である。

【0095】

【図13】図13は、自家異種移植片を使用してCLL1-CART細胞の造血幹細胞毒性をアッセイするための模式図を説明する図である。

【0096】

【図14】図14A、14Bおよび14Cを含む図14は、CLL-1がヒト化マウスにおいて異なる骨髄系譜細胞およびB細胞上で発現されていることを示す一連の図である。一マウスの末梢血分析の代表的なFACSプロットが示されている(図14A)。CLL-17は単球(CD14+細胞)、骨髄細胞(CD33+およびCD123+細胞)、B細胞(CD19+細胞)上で発現されるが、血小板(CD41+細胞)またはT細胞(CD3+細胞)上では発現されない。代表的なヒストグラム提示が示されている(図14B)。24マウス由来の末梢血分析の模式的プロット提示が示されている(図14C)。

【0097】

【図15】図15A、15B、15Cおよび15Dを含む図15は、CLL-1がヒト化マウスにおいて異なる骨髄系譜細胞およびB細胞上で発現されていることを示す一連の図である。

【0098】

【図16】図16A、16B、16Cおよび16Dを含む図16は、CLL-1がヒト化マウスにおいて異なる骨髄前駆細胞上および造血幹細胞上で発現されていることを示す一連の図である。

【0099】

【図17】図17は、ヒト化免疫系(HIS)異種移植片を使用してCLL-1 CART細胞の造血幹細胞毒性をアッセイするための模式図を説明する図である。

【0100】

【図18】図18Aおよび18Bを含む図18は、CLL1-CART細胞注入の4週間後の骨髄分析を示す一連の図である。フローサイトメトリー分析はCD34+CD38-成分(造血幹細胞)(図18A)およびCD34+CD38+成分(前駆細胞)(図18B)において実施した。

【0101】

【図19】図19A、19B、19C、19Dおよび19Eを含む図19は、T細胞4週間後の骨髄分析を示す一連の図である。

【0102】

【図20】図20は、T細胞4週間後のHISマウスにおける骨髄分析を示す図である。HIS異種移植片を使用するCLL1-CART細胞の造血幹細胞毒性。

【0103】

【図21】図21A、21B、21C、21Dおよび21Eを含む図21は、T細胞4週間後のHISマウスにおける骨髄分析を示す一連の図である。異なるCART細胞を用いて処置されたマウス由来の骨髄の代表的なプロットが示されている。

【0104】

【図22】図22Aおよび22Bを含む図22は、形質導入されたT細胞のパーセンテージを示すFACS分析からの相対的蛍光強度を示す一連のヒストグラムプロットである。図22AはプロテインLを使用する初代T細胞におけるCART発現の検出を示す。図22Bは組換えCLL-1タンパク質を使用する初代T細胞におけるCART発現の検出を示す。

【0105】

10

20

30

40

50

【図23】図23Aおよび23Bを含む図23は、標的細胞と一緒に培養した場合のCLL-1 CART細胞の増殖能を示す2グラフである。

【0106】

【図24】図24は、CLL-1 CART細胞を用いた処置後のPL-21-luc異種移植片モデルにおけるAML疾患進行を示すグラフ表示である。全動物中の疾病負荷を示す腫瘍細胞の平均生物発光(±SEM)は、全マウスであるROI(関心領域)の光子/秒(p/s)として示されている。

【0107】

【図25】図25Aおよび25Bを含む図25は、PL-21-luc腫瘍担持マウスの末梢血中のCD4⁺(図25A)およびCD8⁺(図25B)CAR⁺T細胞の定量化を示す2グラフである。

10

【0108】

【図26】図26A、26B、26Cおよび26Dを含む図26は、PL-21-luc腫瘍担持マウスの骨髄におけるCD4⁺T細胞(図26A)、CD4⁺CLL-1 CAR発現T細胞(図26B)、CD8⁺T細胞(図26C)およびCD8⁺CLL-1 CAR発現T細胞(図26D)を定量化する棒グラフである。100万骨髄細胞あたりの平均T細胞数(±SEM)が示されている。有意性は一元配置分散分析により計算され、* p < 0.05および** P < 0.01として表される。

【0109】

【図27】図27A、27B、27Cおよび27Dを含む図27は、PL-21-luc腫瘍担持マウスの脾臓におけるCD4⁺T細胞(図27A)、CD4⁺CLL-1 CAR発現T細胞(図27B)、CD8⁺T細胞(図27C)およびCD8⁺CLL-1 CAR発現T細胞(図27D)を定量化する棒グラフである。100万脾細胞あたりの平均T細胞数(±SEM)が示されている。有意性は一元配置分散分析により計算され、* p < 0.05および** P < 0.01として表される。

20

【0110】

【図28】図28A、28B、28Cおよび28Dを含む図28は、導入化学療法に続いてCLL1-CART細胞を用いた処置により初代AML異種移植片において白血病が根絶されることを示している。図28Aは、初代AML異種移植片における化学療法とCLL1-CART細胞の併用療法についての実験計画を説明する模式図である。図28Bは、白血病細胞(生huCD45dimコンパートメント)におけるCLL1の平均蛍光強度(MFI)を示す棒グラフである。図28Cは、指示されているAML注射後の異なる時点での1μlの末梢血あたりの末梢白血球白血病芽細胞数(平均±SD)の定量化を示すグラフである。矢印はAr-a-Cの投与(灰色矢印)およびT細胞の投与(非形質導入またはCLL1-CAR発現T細胞、黒色矢印)を表している。図28Dは、AML異種移植片の生存を示すグラフである。

30

【0111】

【図29】図29A、29B、29C、29Dおよび29Eを含む図29は、単一ベクター上の種々の配置を示しており、例えば、U6調節shRNAはEF1アルファ調節CARコードエレメントの上流または下流にある。図29Aおよび29Bに描かれている例となる構築物では、転写はU6とEF1アルファプロモーターを通して同じ方向に起こる。図29Cおよび29Dに描かれている例となる構築物では、転写はU6とEF1アルファプロモーターを通して異なる方向に起こる。図41Eでは、shRNA(および対応するU6プロモーター)は第1のベクター上にあり、CAR(および対応するEF1アルファプロモーター)は第2のベクター上にある。

40

【0112】

【図30】図30は、2例となるRCAR配置の構造を描いている。抗原結合メンバーは抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよびスイッチドメインを含む。細胞内結合メンバーは、スイッチドメイン、共刺激シグナル伝達ドメインおよび一次シグナル伝達ドメインを含む。2配置は、ここに記載される第1および第2のスイッチドメインが、抗原結合メン

50

パーおよび細胞内結合メンバーに関して異なる方向付けで可能であることを示している。他のRCAR配置は本明細書にさらに記載されている。

【0113】

【図31】図31は、CAR発現形質導入されたT細胞の増殖が細胞培養系において低用量のRAD001により増強されることを示している。CARTは異なる濃度のRAD001の存在下でNALM-6細胞と共培養された。CAR陽性CD3陽性T細胞(黒色)および全T細胞(灰色)の数は共培養の4日後に評価された。

【0114】

【図32】図32は、0.3、1、3および10mg/kg(mpk)での毎日RAD001投与または媒体投与でのNALM6-1uc細胞の腫瘍成長測定を描いている。丸形は媒体を表し、四角形は10mg/kg用量のRAD001を表し、三角形は3mg/kg用量のRAD001を表し、逆三角形は1mg/kg用量のRAD001を表し、菱形は0.3mg/kg用量のRAD001を表す。

10

【0115】

【図33】図33Aおよび33Bを含む図33は、NALM6腫瘍を有するNSGマウスの血液中のRAD001の量を示す薬物動態曲線を示す。図33AはRAD001の最初の投与に続く0日目のPKを示す。図33Bは最終RAD001投与に続く14日目のPKを示す。菱形は10mg/kg用量のRAD001を表し、四角形は1mg/kg用量のRAD001を表し、三角形は3mg/kg用量のRAD001を表し、xは10mg/kg用量のRAD001を示す。

20

【0116】

【図34】図34Aおよび34Bを含む図34は、RAD001投与するおよびしないヒト化CD19 CART細胞のインビボ増殖を示している。毎日の低用量のRAD001(0.003mg/kg)により、huCAR19増殖の正常レベルを超えて、CART細胞増殖は増強される。図34AはCD4⁺CART細胞を示す；図34BはCD8⁺CART細胞を示す。丸形はPBSを表し、四角形はhuCTL019を表し、三角形は3mg/kg RAD001でのhuCTL019を表し、逆三角形は0.3mg/kg RAD001でのhuCTL019を表し、菱形は0.003mg/kg RAD001でのhuCTL019を表し、黒色の丸形は0.003mg/kg RAD001でのhuCTL019を示す。

30

【発明を実施するための形態】

【0117】

定義

特に他の指定がない限り、本明細書において使用される全ての専門用語や科学用語は、本発明が関連する当業者により一般的に理解されるのと同じ意味を有する。

【0118】

単数表現は、文法上の目的語である物品が1であるかまたは1より多い(すなわち、少なくとも1)ことを指す。一例として、「要素」は、1の要素または1より多くの要素を意味する。

【0119】

用語「約」は、量、時間および同種のものなどの測定可能な値を指す場合、規定された値から、±20%の変動またはいくつかの場合において±10%の変動またはいくつかの場合において±5%の変動またはいくつかの場合において±1%の変動またはいくつかの場合において±0.1%の変動を包含することを意味しており、これはなぜなら、このような変動は開示された方法を行うのに適切であるためである。

40

【0120】

用語「キメラ抗原受容体」またはその代わりに「CAR」は、少なくとも細胞外抗原結合ドメインと、膜貫通ドメインと、以下で定義されるような刺激分子由来の機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞質内シグナル伝達ドメイン(また本明細書では、「細胞内シグナル伝達ドメイン」とも称される)とを含む、組換えポリペプチド構築物を指す。ある態

50

様において、CARポリペプチド構築物中のドメインは、同じポリペプチド鎖中にあり、例えば、キメラ融合タンパク質を含む。ある態様において、CARポリペプチド構築物中のドメインは、互いに連続しておらず、例えば、異なるポリペプチド鎖中にあり、例えば、ここに記載されるRCAR中に提供される。

【0121】

ある面において、CARの刺激分子は、T細胞受容体複合体と結合するゼータ鎖である。ある面において、細胞質内のシグナル伝達ドメインは、一次シグナル伝達ドメイン(例えば、CD3-ゼータの一次シグナル伝達ドメイン)を含む。ある面において、細胞質内シグナル伝達ドメインは、以下で定義されるような少なくとも1の共刺激分子由来の1以上の機能的シグナル伝達ドメインをさらに含む。ある面において、共刺激分子は、4-1BB(すなわち、CD137)、CD27、ICOSおよび/またはCD28から選ばれる。ある面において、CARは、細胞外抗原認識ドメインと、膜貫通ドメインと、刺激分子由来の機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインとを含むキメラ融合タンパク質を含む。ある面において、CARは、細胞外抗原認識ドメインと、膜貫通ドメインと、共刺激分子由来の機能的シグナル伝達ドメインおよび刺激分子由来の機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインとを含むキメラ融合タンパク質を含む。ある面において、CARは、細胞外抗原認識ドメインと、膜貫通ドメインと、1以上の共刺激分子由来の2機能的シグナル伝達ドメインおよび刺激分子由来の機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインとを含むキメラ融合タンパク質を含む。ある面において、CARは、細胞外抗原認識ドメインと、膜貫通ドメインと、1以上の共刺激分子由来の少なくとも2機能的シグナル伝達ドメインおよび刺激分子由来の機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインとを含むキメラ融合タンパク質を含む。ある面において、CARは、CAR融合タンパク質のアミノ末端(N-ter)に任意のリーダー配列を含む。ある面において、CARは、細胞外抗原認識ドメインのN末端におけるリーダー配列をさらに含み、ここでリーダー配列は、細胞内プロセッシングおよび細胞膜へのCARの局在化の間に、抗原認識ドメイン(例えば、scFvのアミノ酸)から切断されてもよい。

【0122】

特異的な腫瘍マーカーX(ここでXはここに記載される腫瘍マーカーであり得る)に特異的に結合する抗原結合ドメイン(例えば、scFv、単ドメイン抗体またはTCR(例えば、TCRアルファ結合ドメインまたはTCRベータ結合ドメイン))を含むCARは、XCARとも称される。例えば、CLL-1に特異的に結合する抗原結合ドメインを含むCARは、CLL-1CARと称される。CARは、あらゆる細胞、例えば、ここに記載される免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)中で発現させることができる。

【0123】

用語「シグナル伝達ドメイン」は、第2メッセンジャーを生成することによりまたはこのようなメッセンジャーに反応してエフェクターとして機能化することにより規定のシグナル伝達経路を介して細胞活性を調節するために、細胞内の情報を伝えることによって作用するタンパク質の機能的な部分を指す。

【0124】

本明細書で使用される場合、用語「CLL-1」は、白血病前駆細胞および正常な免疫細胞において検出可能な抗原決定基である、C型レクチン様分子1を指す。C型レクチン様1(CLL-1)はまた、MICL、CLEC12A、CLEC-1、樹状細胞関連レクチン1およびDCAL-2としても公知である。ヒトおよびマウスのアミノ酸配列および核酸配列は、GenBank、UniProtおよびSwiss-Protなど、公表のデータベースにおいて見出すことができる。例えば、ヒトCLL-1のアミノ酸配列は、UniProt/Swiss-Prot受託番号Q5QGZ9として見出すことができ、ヒトCLL-1をコードするヌクレオチド配列は、受託番号NM001207010.1、NM138337.5、NM201623.3およびNM201625.1において見出

10

20

30

40

50

すことができる。ある態様において、C A Rの抗原結合部分は、C L L - 1タンパク質またはそのフラグメントの細胞外ドメイン内のエピトープを認識し、これに結合する。ある態様において、C L L - 1タンパク質は、癌細胞において発現される。

【 0 1 2 5 】

用語「抗体」は、本明細書で使用される場合、抗原と特異的に結合する免疫グロブリン分子由来のタンパク質またはポリペプチド配列を指す。抗体は、ポリクローナルもしくはモノクローナルの、複数もしくは単一の鎖のまたは完全免疫グロブリンであってもよく、自然源由来でも、組換え源由来でもよい。抗体は、免疫グロブリン分子の四量体であってもよい。

【 0 1 2 6 】

用語「抗体フラグメント」は、完全抗体またはそれらの組換え変異体の少なくとも一部を指し、さらに、抗体フラグメントの抗原などの標的への認識および特異的な結合をもたらすのに十分な程度の、抗原結合ドメイン、例えば完全抗体の抗原決定可変領域を指す。抗体フラグメントの例としては、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フラグメント、s c F v抗体フラグメント、線状抗体、単一ドメイン抗体、例えばs d A b (V LまたはV Hのいずれか)、ラクダV H Hドメイン、ならびにヒンジ領域においてジスルフィド架橋で連結された、2以上の、例えば2の、F a bフラグメントまたは2以上の、例えば2の孤立したC D R、もしくは連結された抗体の他のエピトープ結合フラグメントを含む2価フラグメントなどの抗体フラグメントから形成された多重特異性分子が挙げられる。抗体フラグメントはまた、単一ドメイン抗体、マキシボディ、ミニボディ、ナノボディ、イントラボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、v - N A Rおよびビス - s c F vに取り込まれていてもよい(例えば、Hollinger and Hudson, Nature Biotechnology 23:1126-1136, 2005を参照)。抗体フラグメントは、フィブロネクチンIII型(F n 3)などのポリペプチドをベースとした足場にグラフト化することもできる(フィブロネクチンポリペプチドのミニボディを説明している米国特許第6, 7 0 3, 1 9 9号を参照)。

【 0 1 2 7 】

用語「s c F v」は、軽鎖の可変領域を含む少なくとも1抗体フラグメントと重鎖の可変領域を含む少なくとも1抗体フラグメントとを含む融合タンパク質であって、軽鎖および重鎖可変領域が、短い可動性ポリペプチドリンカーを介して連続的に連結されており、単一鎖のポリペプチドとして発現することができ、さらにs c F vが、その元となった完全抗体の特異性を保持している、上記融合タンパク質を指す。特段の規定がなければ、s c F vは、本明細書で使用される場合、V LおよびV H可変領域をいずれの順番で有していてもよく、例えばポリペプチドのN末端およびC末端の終端に関して、s c F vは、V L - リンカー - V Hを含んでも、V H - リンカー - V Lを含んでもよい。

【 0 1 2 8 】

用語「相補性決定領域」または「C D R」は、本明細書で使用される場合、抗原特異性と結合親和性を付与する抗体可変領域内のアミノ酸配列を指す。例えば、一般的に、各重鎖可変領域中に3 C D R (例えば、H C D R 1、H C D R 2およびH C D R 3)および各軽鎖可変領域中に3 C D R (L C D R 1、L C D R 2およびL C D R 3)がある。所与のC D Rの正確なアミノ酸配列の境界は、Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(「K a b a t」番号付けスキーム)、Al-Lazikani et al., (1997)

JMB 273,927-948(「C h o t h i a」番号付けスキーム)によって説明されたものまたはそれらの組合せなどの多数の周知のスキームのいずれかを使用して決定することができる。K a b a t番号付けスキームによれば、ある態様において、重鎖可変ドメイン(V H)におけるC D Rのアミノ酸残基は、3 1 ~ 3 5 (H C D R 1)、5 0 ~ 6 5 (H C D R 2)および9 5 ~ 1 0 2 (H C D R 3)と番号付けされ、軽鎖可変ドメイン(V L)におけるC D Rのアミノ酸残基は、2 4 ~ 3 4 (L C D R 1)、5 0 ~ 5 6 (L C D R 2)および8 9 ~ 9 7 (L C D R 3)と番号付けされる。C h o t h i a番号付けスキームによれば、ある態様に

10

20

30

40

50

において、VHにおけるCDRのアミノ酸は、26～32(HCDR1)、52～56(HCDR2)および95～102(HCDR3)と番号付けされ、VLにおけるCDRのアミノ酸残基は、26～32(LCDR1)、50～52(LCDR2)および91～96(LCDR3)と番号付けされる。KabattおよびChothia番号付けスキームの組合せでは、ある態様において、CDRは、KabattのCDR、ChothiaのCDRまたはその両方の一部であるアミノ酸残基に相当する。例えば、ある態様において、CDRは、VH、例えば哺乳動物のVH、例えばヒトVHにおいて、アミノ酸残基26～35(HCDR1)、50～65(HCDR2)および95～102(HCDR3); ならびにVL、例えば哺乳動物のVL、例えばヒトVLにおいて、アミノ酸残基24～34(LCDR1)、50～56(LCDR2)および89～97(LCDR3)に相当する。

10

【0129】

抗体またはそれらの抗体フラグメントを含む本発明のCAR組成物の一部は、様々な形態で存在していてもよく、例えば、その場合、抗原結合ドメインは、例えば、単ドメイン抗体フラグメント(sdAb)、単鎖抗体(scFv)、例えばヒト抗体などのポリペプチド鎖の一部として発現される(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, New York; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242:423-426)。ある面において、本発明のCAR組成物の抗原結合ドメインは、抗体フラグメントを含む。さらなる面において、CARは、scFvを含む抗体フラグメントを含む。

20

【0130】

用語「結合ドメイン」または「抗体分子」(本明細書では「抗標的(例えば、CLL-1)結合ドメイン」とも称される)は、本明細書で使用される場合、少なくとも1の免疫グロブリン可変ドメイン配列を含む、タンパク質、例えば、免疫グロブリン鎖またはそれらのフラグメントを指す。用語「結合ドメイン」または「抗体分子」は、抗体および抗体フラグメントを包含する。ある態様において、抗体分子は、多重特異性抗体分子であり、例えば、抗体分子は、複数の免疫グロブリンの可変ドメイン配列を含み、ここで複数のもののうち第一の免疫グロブリンの可変ドメイン配列は、第一のエピトープに結合特異性を有し、複数のもののうち第二の免疫グロブリンの可変ドメイン配列は、第二のエピトープに結合特異性を有する。ある態様において、多重特異性抗体分子は、二重特異性抗体分子である。二重特異性抗体は、2以下の抗原に特異性を有する。二重特異性抗体分子は、第一のエピトープに結合特異性を有する第一の免疫グロブリンの可変ドメイン配列および第二のエピトープに結合特異性を有する第二の免疫グロブリンの可変ドメイン配列を特徴とする。

30

【0131】

用語「抗体重鎖」は、それらの天然に存在するコンフォメーションの抗体分子中に存在する2タイプのポリペプチド鎖のうち大きい方を指し、通常これが抗体が属するクラスを決定する。

【0132】

用語「抗体軽鎖」は、それらの天然に存在するコンフォメーションの抗体分子中に存在する2タイプのポリペプチド鎖のうち小さい方を指す。カッパ()およびラムダ()軽鎖は、2主要な抗体軽鎖アイソタイプを指す。

40

【0133】

用語「組換え抗体」は、例えばバクテリオファージまたは酵母発現系によって発現される抗体などの、組換えDNA技術を使用して生成される抗体を指す。この用語はまた、抗体をコードするDNA分子(このDNA分子は抗体タンパク質を発現する)または抗体を指定するアミノ酸配列の合成によって生成された抗体も意味すると解釈されるものとし、ここで、DNAまたはアミノ酸配列は、当業界で利用可能であり周知の組換えDNAまたはアミノ酸配列技術を使用して得られたものである。

【0134】

50

用語「抗原」または「Ag」は、免疫反応を惹起する分子を指す。この免疫反応は、抗体産生または特異的な免疫担当細胞の活性化のいずれかまたはその両方を含み得る。当業者であれば、実質的に全てのタンパク質またはペプチドを包含するあらゆる高分子が抗原として役立つ可能性があることを理解している。さらに抗原は、組換えまたはゲノムDNA由来であってもよい。当業者であれば、免疫反応を惹起するタンパク質をコードするヌクレオチド配列または部分的なヌクレオチド配列を含むあらゆるDNAが、結果的に本明細書において抗原という用語が使用される場合と同様の「抗原」をコードすることを理解している。さらに当業者であれば、抗原は、必ずしも遺伝子の全長ヌクレオチド配列によってのみコードされるわけではないことを理解している。本発明は、これらに限定されないが、1より多くの遺伝子の部分的なヌクレオチド配列の使用を包含すること、さらに望ましい免疫反応を惹起するポリペプチドがコードされるように、これらのヌクレオチド配列は様々な組み合わせで配置されることが容易に理解される。さらに当業者であれば、抗原は、必ずしも「遺伝子」によってコードされていなくてもよいことを理解している。抗原は、生成されるか合成されてもよくまたは生体サンプル由来であってもよくまたはポリペプチド以外にも高分子であってもよいことが容易に理解される。このような生体サンプルとしては、これらに限定されないが、組織サンプル、腫瘍サンプル、細胞または他の生物学的成分を含む流体を挙げることができる。

【0135】

用語「抗腫瘍効果」は、これらに限定されないが、例えば、腫瘍容量の減少、腫瘍細胞数の減少、転移数の減少、余命の延長、腫瘍細胞増殖の減少、腫瘍細胞生存の減少または癌性状態に関連する様々な生理学的な症状の改善などの様々な手段によって証明が可能な生物学的作用を指す。また「抗腫瘍効果」は、最初の場所における腫瘍の出現の予防における本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、細胞および抗体の能力によっても証明することができる。

【0136】

用語「自己」は、後でそれが再導入されることになる個体と同じ個体由来のあらゆる材料を指す。

【0137】

用語「同種異系」は、材料が導入される個体と同じ種の異なる動物由来のあらゆる材料を指す。2以上の個体は、1以上の遺伝子座における遺伝子が同一ではない場合、互いに同種異系といわれる。いくつかの面において、同じ種の個体からの同種異系材料は、抗原的に相互作用するのに十分な程度、遺伝学的に異なってもよい。

【0138】

用語「異種」は、異なる種の動物由来の移植片を指す。

【0139】

用語「アフエーシス」は、本明細書で使用される場合、当業界で認識されている体外プロセスであって、ドナーまたは患者の血液を、そのドナーまたは患者から除去し、選択された特定の成分を分離除去する装置を通過させ、残りを、ドナーまたは患者の循環に、例えば返血によって戻すプロセスを指す。したがって、「アフエーシスサンプル」という表現は、アフエーシスを使用して得られたサンプルを指す。

【0140】

用語「組合せ」は、1用量単位形態における固定された組合せまたは投与の組合せのいずれかを指し、ここで投与の組合せの場合、本発明の化合物と組合せパートナー(例えば、以下で説明されるような、「治療剤」または「共薬剤」とも称される別の薬物)とが、同時に独立してまたは所定の時間間隔で別々に投与されてもよく、特にこれらの時間間隔は、組合せパートナーが協調的な作用、例えば相乗作用を示すことを許容する。単一の構成要素が、キット中にまたは別々にパッケージ化されていてもよい。構成要素(例えば、粉末または液体)の一方または両方は、投与前に、所望の用量に再溶解または希釈されてもよい。本明細書で利用される用語「共投与」もしくは「投与の組合せ」または同種のものは、それらを必要とする単一の対象(例えば患者)への選択された組合せパートナーの投

10

20

30

40

50

与を包含することを意味し、薬剤が必ずしも同じ投与経路でまたは同時に投与されない処置レジメンを包含することが意図される。用語「医薬的な組合せ」は、本明細書で使用される場合、1種より多くの活性成分を混合することまたは組み合わせることによって得られる製品を意味し、固定されたおよび固定されていない活性成分の組合せの両方を包含する。用語「固定された組合せ」は、活性成分、例えば本発明の化合物および組合せパートナーが、両方とも単一の物体または投薬の形態で患者に同時に投与されることを意味する。用語「固定されていない組合せ」は、活性成分、例えば本発明の化合物および組合せパートナーが、両方とも、具体的な時間制限なく、別々の物体として、同時に、並行してまたは逐次的に患者に投与され、このような投与により患者の体内で2化合物の治療上有効なレベルがもたらされることを意味する。後者はまた、カクテル療法、例えば3種以上の活性成分の投与にも適用される。

10

【0141】

用語「癌」は、異常な細胞の急速で制御不能な成長を特徴とする疾患を指す。癌細胞は、局所的にまたは血流およびリンパ系を介して体の他の部分に蔓延する可能性がある。様々な癌の例が本明細書で説明されており、これらに限定されないが、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、皮膚癌、膵臓癌、結腸直腸癌、腎臓癌、肝臓癌、脳腫瘍、リンパ腫、白血病、肺癌および同種のものが挙げられる。用語「腫瘍」および「癌」は、本明細書において同義的に使用され、例えば、どちらの用語も、固形および液性、例えば、びまん性または循環性の腫瘍を包含する。用語「癌」または「腫瘍」は、本明細書で使用される場合、前癌性の、同様に悪性の癌および腫瘍を包含する。

20

【0142】

「由来の」は、この用語が本明細書で使用される場合、第一の分子と第二の分子との関係を示す。これは一般的に、第一の分子と第二の分子との構造的な類似性を指し、第二の分子由来の第一の分子におけるプロセスまたは源の限定を意味したりまたは包含したりすることはない。例えば、CD3ゼータ分子由来の細胞内シグナル伝達ドメインのケースにおいて、細胞内シグナル伝達ドメインは、必要な機能、すなわち、適切な条件下でシグナルを生成する能力を有するのに十分なCD3ゼータ構造を保持する。これは、細胞内シグナル伝達ドメインを生産する特定のプロセスへの限定を意味したりまたは包含したりすることなく、例えば、細胞内シグナル伝達ドメインを提供するために、CD3ゼータ配列から開始して不要な配列を欠失させたりまたは変異を付与したりして、細胞内シグナル伝達ドメインを得なければならないことを意味しない。

30

【0143】

成句「CLL-1発現に係する疾患」としては、これらに限定されないが、CLL-1を発現する細胞に係する疾患、もしくはCLL-1を発現する細胞に関連する状態、例えば、癌もしくは悪性腫瘍などの増殖性疾患、もしくは脊髄形成異常、骨髄異形成症候群もしくは前白血病状態などの前癌状態など；またはCLL-1(例えば、野生型または変異CLL-1)を発現する細胞に関連する非癌関連の徴候が挙げられる。誤解を避けるために言えば、CLL-1発現に係する疾患としては、例えばCLL-1発現が下方調節されているために、例えばCLL-1を標的とする分子、例えば、ここに記載されるCLL-1阻害剤での処置によって、現時点ではCLL-1を発現しないが、ある時期にCLL-1を発現する細胞に関連する状態を挙げることができる。ある面において、CLL-1発現に係する癌は、血液癌である。ある面において、血液癌は、白血病(急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病および骨髄異形成症候群など)およびリンパ腫(多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、ならびに小細胞型濾胞性リンパ腫および大細胞型濾胞性リンパ腫など)を含む悪性リンパ増殖性状態を含むが、これらに限定されない。CLL-1の発現に係するさらなる疾患は、例えば、CLL-1の発現に係する異型癌および/または非古典的癌、悪性腫瘍、前癌状態または増殖性疾患を含むが、これらに限定されない。また、CLL-1の発現に係するが、癌に関しない適応も含まれ得る。ある態様において、腫瘍抗原を発現する細胞は、腫瘍抗原をコードするmRNAを、発現しているかまたはいずれかの時点で発現

40

50

していた。ある態様において、腫瘍抗原を発現する細胞は、腫瘍抗原タンパク質(例えば、野生型または変異)を産生し、腫瘍抗原タンパク質は、正常なレベルまたは低下したレベルで提示され得る。ある態様において、腫瘍抗原を発現する細胞は、ある時点で検出可能なレベルの腫瘍抗原タンパク質を産生し、その後、実質的に検出不可能な腫瘍抗原タンパク質を産生した。

【 0 1 4 4 】

用語「保存的配列改変」または「保存的置換」は、そのアミノ酸配列を含有する抗体または抗体フラグメントの結合特徴に有意に影響を与えたりまたは変更したりしないアミノ酸改変を指す。このような保存的改変としては、アミノ酸の置換、付加および欠失が挙げられる。改変は、部位特異的変異誘発およびPCR介在変異誘発などの当業界公知の標準的な技術によって本発明の抗体または抗体フラグメントに導入することができる。保存的置換とは、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられる置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当業界において定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖を有するアミノ酸(例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電性極性側鎖(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン)、非極性側鎖(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン)、ベータ分岐側鎖(例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン)および芳香族側鎖(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)を包含する。したがって、本発明のCAR内の1以上のアミノ酸残基が、同じ側鎖ファミリーの他のアミノ酸残基で置き換えられていてもよく、変更されたCARは、ここに記載される機能アッセイを使用してテストすることができる。

【 0 1 4 5 】

用語「刺激」は、刺激分子(例えば、TCR/CD3複合体)とその同起源のリガンドとの結合により誘導された一次応答を指し、それによって、これらに限定されないが、TCR/CD3複合体を介したシグナル伝達などのシグナル伝達事象が媒介される。刺激は、TGF- β の下方調節および/または細胞骨格構造の再構築、ならびに同種のものなどの所定の分子の変更された発現を媒介することができる。

【 0 1 4 6 】

用語「刺激分子」は、T細胞のシグナル伝達経路の少なくともいくつかの面に関して、刺激の形態でTCR複合体の一次的な活性化を調節する一次細胞質内シグナル伝達配列をもたらすT細胞によって発現される分子を指す。ある面において、例えば、TCR/CD3複合体とペプチドを提示したMHC分子との結合によって一次シグナルが始動し、それにより、これらに限定されないが、増殖、活性化、分化および同種のものなどのT細胞応答の媒介が起こる。刺激の形態で作用する一次細胞質内シグナル伝達配列(また、「一次シグナル伝達ドメイン」とも称される)は、シグナル伝達モチーフを含有していてもよく、これは、免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフまたはITAMとして知られている。本発明において特定の用途を有する一次細胞質内シグナル伝達配列を含有するITAMの例としては、これらに限定されないが、TCRゼータ、FcRガンマ、FcRベータ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278(また、「ICOS」としても知られている)、FcRIおよびCD66d、DAP10およびDAP12由来のものが挙げられる。本発明の特定のCARにおいて、本発明のいずれか1以上のCARにおける細胞内シグナル伝達ドメインは、細胞内シグナル伝達配列、例えばCD3-ゼータの一次シグナル伝達配列を含む。本発明の特定のCARにおいて、CD3-ゼータの一次シグナル伝達配列は、配列番号9として提供される配列であるかまたは非ヒト種、例えばマウス、げっ歯類、サル、類人猿および同種のものからの等価の残基である。本発明の特定のCARにおいて、CD3-ゼータの一次シグナル伝達配列は、配列番号10で提供される配列であるかまたは非ヒト種、例えばマウス、げっ歯類、サル、類人猿および同種のものからの等価の残基である。

【 0 1 4 7 】

10

20

30

40

50

用語「抗原提示細胞」または「APC」は、その表面上に主要組織適合複合体(MHC)と複合体化した外来抗原を提示するアクセサリ細胞(例えば、B細胞、樹状細胞および同種のもの)などの免疫系細胞を指す。T細胞は、それらのT細胞受容体(TCR)を使用してこれらの複合体を認識する可能性がある。APCは抗原をプロセッシングし、それらをT細胞に提示させる。

【0148】

「細胞内シグナル伝達ドメイン」は、この用語が本明細書において使用される場合、分子の細胞内部分を指す。細胞内シグナル伝達ドメインは、CARを含有する細胞、例えばCART細胞の免疫エフェクター機能を促進するシグナルを生成する。例えばCART細胞における免疫エフェクター機能の例としては、細胞溶解活性およびヘルパー活性、例えばサイトカイン分泌などが挙げられる。ある態様において、細胞内シグナルドメインは、エフェクター機能シグナルを伝達し、細胞に特殊化した機能を実行させる。細胞内シグナル伝達ドメイン全体が採用される場合もあるが、多くの場合において鎖全体を使用することは必ずしも必要ではない。細胞内シグナル伝達ドメインのトランケートされた部分を使用される限りにおいて、このようなトランケートされた部分は、それがエフェクター機能シグナルを伝達しさえすれば完全鎖の代わりに使用することができる。したがって細胞内シグナル伝達ドメインという用語は、エフェクター機能シグナルを伝達するのに十分な細胞内シグナル伝達ドメインのあらゆるトランケートされた部分を包含することを意味する。

10

【0149】

ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、一次細胞内シグナル伝達ドメインを含んでいてもよい。典型的な一次細胞内シグナル伝達ドメインとしては、一次刺激または抗原依存性刺激に関与する分子由来のものが挙げられる。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激細胞内ドメインを含んでいてもよい。典型的な共刺激細胞内シグナル伝達ドメインとしては、共刺激シグナルまたは抗原非依存性刺激に関与する分子由来のものが挙げられる。例えば、CARTの場合において、一次細胞内シグナル伝達ドメインは、T細胞受容体の細胞質内配列を含んでいてもよいし、共刺激細胞内シグナル伝達ドメインは、補助受容体または共刺激分子からの細胞質内配列を含んでいてもよい。

20

【0150】

一次細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフまたはITAMとして公知のシグナル伝達モチーフを含んでいてもよい。ITAMを含有する一次細胞質内シグナル伝達配列の例としては、これらに限定されないが、CD3ゼータ、FcRガンマ、FcRベータ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278(「ICOS」としても公知)、FcRI、CD66d、DAP10およびDAP12由来のものが挙げられる。

30

【0151】

用語「ゼータ」またはその代わりに「ゼータ鎖」、「CD3-ゼータ」もしくは「TCR-ゼータ」は、GenBank受託番号BAG36664.1として提供されるタンパク質または非ヒト種、例えばマウス、げっ歯類、サル、類人猿および同種のものからの等価の残基と定義され、「ゼータ刺激ドメイン」またはその代わりに「CD3-ゼータ刺激ドメイン」もしくは「TCR-ゼータ刺激ドメイン」は、T細胞の活性化に必要な最初のシグナルを機能的に伝えるのに十分な、ゼータ鎖の細胞質内ドメインからのアミノ酸残基と定義される。ある面において、ゼータの細胞質内ドメインは、GenBank受託番号BAG36664.1の残基52から164またはそれらの機能的なオソログである非ヒト種、例えばマウス、げっ歯類、サル、類人猿および同種のものからの等価の残基を含む。ある面において、「ゼータ刺激ドメイン」または「CD3-ゼータ刺激ドメイン」は、配列番号9として提供される配列である。ある面において、「ゼータ刺激ドメイン」または「CD3-ゼータ刺激ドメイン」は、配列番号10として提供される配列である。

40

【0152】

用語「共刺激分子」は、共刺激リガンドと特異的に結合することにより、これらに限定

50

されないが増殖などのT細胞による共刺激応答を媒介する、T細胞上の同起源の結合パートナーを指す。共刺激分子は、効率的な免疫反応に必要な、抗原受容体以外の細胞表面分子またはそれらのリガンドである。共刺激分子としては、これらに限定されないが、MHCクラスI分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子(SLAMタンパク質)、活性化NK細胞受容体、BTLA、Tollリガンド受容体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、4-1BB(CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS(CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKP80(KLRF1)、NKP44、NKP30、NKP46、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19aおよびCD83と特異的に結合するリガンドが挙げられる。

【0153】

共刺激細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激分子の細胞内部分を指す。

【0154】

細胞内シグナル伝達ドメインは、細胞内の部分全体、もしくはそれが得られた分子の天然型細胞内シグナル伝達ドメインの全体またはそれらの機能的なフラグメントを含んでいてもよい。

【0155】

用語「4-1BB」は、GenBank受託番号AAA62478.2として提供される配列アミノ酸配列を有するTNFRスーパーファミリーの一員または非ヒト種、例えばマウス、げっ歯類、サル、類人猿および同種のものからの等価の残基を指し、「4-1BB共刺激ドメイン」は、GenBank受託番号AAA62478.2のアミノ酸残基214~255または非ヒト種、例えばマウス、げっ歯類、サル、類人猿および同種のものからの等価の残基と定義される。ある面において、「4-1BB共刺激ドメイン」は、配列番号7として提供される配列または非ヒト種、例えばマウス、げっ歯類、サル、類人猿および同種のものからの等価の残基である。

【0156】

「免疫エフェクター細胞」は、この用語が本明細書において使用される場合、免疫応答、例えば、免疫エフェクター応答の促進に関与する細胞を指す。免疫エフェクター細胞の例としては、T細胞、例えば、アルファ/ベータT細胞およびガンマ/デルタT細胞、B細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、ナチュラルキラーT(NKT)細胞、肥満細胞、ならびに骨髄系由来の食細胞が挙げられる。

【0157】

「免疫エフェクター機能または免疫エフェクター応答」は、この用語が本明細書において使用される場合、例えば、免疫エフェクター細胞の、標的細胞の免疫攻撃を増強または促進する機能または応答を指す。例えば、免疫エフェクター機能または応答は、標的細胞の成長または増殖の殺滅または阻害を促進するTまたはNK細胞の特性を指す。T細胞のケースにおいて、一次刺激および副刺激が、免疫エフェクター機能または応答の例である。

【0158】

用語「エフェクター機能」は、細胞の特殊化した機能を指す。T細胞のエフェクター機能は、例えば、細胞溶解活性またはサイトカイン分泌などのヘルパー活性であり得る。

【0159】

用語「コード(すること)」は、ヌクレオチド(例えば、rRNA、tRNAおよびmRNA)の規定の配列またはアミノ酸の規定の配列のいずれかを有する、生物学的プロセスにおける他のポリマーおよび高分子の合成のための鋳型として役立つ、遺伝子、cDNAまたはmRNAなどのポリヌクレオチド中のヌクレオチドの特異的配列の固有の特性およびそれにより生じる生物学的な特性を指す。したがって、細胞または他の生物系中で、遺伝子に対応するmRNAの転写および翻訳によりタンパク質が産生される場合、その遺伝子、cDNAまたはRNAは、タンパク質をコードする。そのヌクレオチド配列がmRNA配列と同一であり、通常配列表に示されるコード鎖と、遺伝子またはcDNAの転写のための鋳型として使用される非コード鎖はどちらも、その遺伝子またはcDNAのタンパク質または他の生成物をコードすると称することができる。

10

【0160】

特に他の規定がない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」は、互いの縮重型であるヌクレオチド配列や同じアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列全てを包含する。また、タンパク質またはRNAをコードするヌクレオチド配列という成句は、いくつかの場合においてそのタンパク質をコードするヌクレオチド配列がイントロンを含有し得る程度にイントロンを包含していてもよい。

20

【0161】

用語「有効量」または「治療有効量」は、本明細書では同義的に使用され、本明細書で説明されているような化合物、調合物、材料または組成物の、特定の生物学的な結果を達成するのに有効な量を指す。

【0162】

用語「内因性」は、生物、細胞、組織または系由来の材料またはそれらの内部で産生されたあらゆる材料を指す。

【0163】

用語「外因性」は、生物、細胞、組織または系の外部から導入された材料またはそれらの外部で産生されたあらゆる材料を指す。

30

【0164】

用語「発現」は、プロモーターによって駆動される特定のヌクレオチド配列の転写および/または翻訳を指す。

【0165】

用語「トランスファーベクター」は、単離された核酸を含み、細胞内部に単離された核酸を送達するのに使用できるものの組成物を指す。多数のベクターが当業界公知であり、これらに限定されないが、直鎖状ポリヌクレオチド、イオン性または両親媒性化合物と結合したポリヌクレオチド、プラスミドおよびウイルスなどが挙げられる。したがって、用語「トランスファーベクター」は、自律複製型プラスミドまたはウイルスを包含する。この用語はまた、例えばポリリジン化合物、リボソームおよび同種のものなどの、細胞への核酸のトランスファーを容易にする非プラスミドおよび非ウイルス化合物をさらに包含すると解釈されるものとする。ウイルストランスファーベクターの例としては、これらに限定されないが、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターおよび同種のものが挙げられる。

40

【0166】

用語「発現ベクター」は、発現させるヌクレオチド配列に操作可能に連結した発現制御配列を含む組換えポリヌクレオチドを含むベクターを指す。発現ベクターは、発現のための十分なシス作用性要素を含み、発現のための他の要素は、宿主細胞によって供給されてもよいしまたはインピトロでの発現系中に供給されてもよい。発現ベクターは、当業界公知のあらゆるものを包含し、例えば、組換えポリヌクレオチドを取り込んでいる、コスミ

50

ド、プラスミド(例えば、裸の状態のまたはリボソーム中に含有された)およびウイルス(例えば、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス)が挙げられる。

【0167】

用語「レンチウイルス」は、レトロウイルス科の属の1つを指す。レンチウイルスは、レトロウイルスのなかでも非分裂細胞に感染することができるという点で独特であり、これらは、宿主細胞のDNAに相当量の遺伝情報を送達することができることから、遺伝子送達ベクターの最も効率的な方法の1つである。HIV、SIVおよびFIVは、全てレンチウイルスの例である。

【0168】

用語「レンチウイルスベクター」は、レンチウイルスゲノムの少なくとも一部に由来するベクターを指し、特に、Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009)で示されるような自己不活性化レンチウイルスベクターが挙げられる。診療施設で使用される可能性があるレンチウイルスベクターの他の例としては、これらに限定されないが、例えば、Oxford BioMedica製のLENTIVECTOR(登録商標)遺伝子送達技術、Lentigen製のLENTIMAX™ベクター系および同種のもので挙げられる。非臨床タイプのレンチウイルスベクターも利用可能であり、当業者公知である。

【0169】

用語「相同」または「同一性」は、2高分子間の、例えば2核酸分子間の、例えば2 DNA分子もしくは2 RNA分子間のまたは2ポリペプチド分子間のサブユニット配列の同一性を指す。2分子の両方におけるサブユニットの位置が同じモノマーのサブユニットで占められている場合、例えば、2 DNA分子それぞれにおける位置がアデニンで占められている場合、それらは、その位置において相同または同一である。2配列間の相同性は、マッチした位置または相同な位置の数の一次関数であり、例えば、2配列中の位置の半分(例えば、ポリマーの長さが10個のサブユニット中の5個の位置)が相同である場合、2配列は50%相同であり、位置の90%(例えば、10個のうち9個)がマッチしているかまたは相同である場合、2配列は90%相同である。

【0170】

非ヒト(例えば、マウス)抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小の配列を含有する、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそれらのフラグメント[例えばFv、Fab、Fab'、F(ab')]2または抗体の他の抗原結合部分配列]である。大抵の場合、ヒト化抗体およびそれらの抗体フラグメントは、レシピエントの相補性決定領域(CDR)からの残基が、望ましい特異性、親和性および能力を有するマウス、ラットまたはウサギなどの非ヒト種(ドナー抗体)のCDRからの残基で置き換えられている、ヒト免疫グロブリン(レシピエントの抗体または抗体フラグメント)である。いくつかの場合において、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基で置き換えられている。さらに、ヒト化抗体/抗体フラグメントは、レシピエント抗体でも移入されたCDRまたはフレームワーク配列でも見出されない残基を含んでいてもよい。これらの改変は、抗体または抗体フラグメントの性能をさらに洗練させて最適化する可能性がある。一般的に、ヒト化抗体またはそれらの抗体フラグメントは、CDR領域の全部または実質的に全部が非ヒト免疫グロブリンのCDR領域に相当し、FR領域の全部のまたはかなりの部分がヒト免疫グロブリン配列のFR領域である、少なくとも1の、典型的には2可変ドメインの実質的に全部を含む。ヒト化抗体または抗体フラグメントはまた、免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒト免疫グロブリンの免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部を含んでいてもよい。さらなる詳細に関しては、Jones et al., Nature, 321: 522-525, 1986; Reichmann et al., Nature, 332: 323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596, 1992を参照されたい。

【0171】

「完全にヒト」は、分子全体がヒト由来であるかまたは抗体もしくは免疫グロブリンのヒト形態に同一なアミノ酸配列からなる場合の、免疫グロブリン、例えば抗体または抗体

10

20

30

40

50

フラグメントを指す。

【0172】

用語「単離された」は、天然状態から変更されたまたは天然状態から除去されたことを意味する。例えば、生きた動物中に自然に存在する核酸またはペプチドは「単離されていない」が、同じ核酸またはペプチドでもその天然状態において共存する材料から部分的または完全に分離されていれば、「単離されている」。単離された核酸またはタンパク質は、実質的に精製された形態で存在していてもよいまたは例えば宿主細胞などの非天然の環境中に存在していてもよい。

【0173】

本発明の内容では、以下に示す通常存在する核酸塩基の略語が使用される。「A」はアデノシンを指し、「C」は、シトシンを指し、「G」は、グアノシンを指し、「T」は、チミジン

10

【0174】

用語「操作可能に連結した」または「転写制御」は、調節配列と異種核酸配列とが機能的に連結されて、結果として後者の発現をもたらすことを指す。例えば、第一の核酸配列が第二の核酸配列と機能的な関係で配置される場合、第一の核酸配列は第二の核酸配列と操作可能に連結している。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を与える場合、プロモーターはコード配列に操作可能に連結している。操作可能に連結したDNA配列は、互いに連続していてもよく、例えば2タンパク質のコード領域を合体させることが必要な場合、同じリーディングフレーム内にあってもよい。

20

【0175】

免疫原性組成物の「非経口」投与という用語は、例えば、皮下(s.c.)、静脈内(i.v.)、筋肉内(i.m.)、胸骨内もしくは腫瘍内注射または点滴技術を包含する。

【0176】

用語「核酸」または「ポリヌクレオチド」は、デオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)および一本鎖または二本鎖いずれかの形態のそれらのポリマーを指す。特に限定されない限り、この用語は、参照核酸と類似の結合特性を有し、天然に存在するヌクレオチドと類似の方式で代謝される天然ヌクレオチドの公知の類似体を含む核酸を包含する。特に他の指定がない限り、特定の核酸配列はまた、それらの保存的に改変された変異体(例えば、縮重コドンの置換)、対立遺伝子、オーソログ、SNPおよび相補配列、加えて明確に提示された配列も事実上包含する。具体的に言えば、縮重コドンの置換は、1以上の選択された(または全ての)コドンの第三の位置が混成の塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換されている配列を生成することによって達成される可能性がある[Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); and Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)].

30

【0177】

用語「ペプチド」、「ポリペプチド」および「タンパク質」は、同義的に使用され、ペプチド結合により共有結合で連結されたアミノ酸残基で構成される化合物を指す。タンパク質またはペプチドは、少なくとも2アミノ酸を含有していなければならない。タンパク質またはペプチドの配列を構成し得るアミノ酸の最大数に制限はない。ポリペプチドは、互いにペプチド結合で合体した2以上のアミノ酸を含むあらゆるペプチドまたはタンパク質を包含する。この用語は、本明細書で使用される場合、当業界では一般的に例えばペプチド、オリゴペプチドおよびオリゴマーとも称される短鎖と、当業界では一般的に多くのタイプが存在するタンパク質と称されるそれより長い鎖との両方を指す。「ポリペプチド」としては、例えば、なかでも生物学的に活性なフラグメント、実質的に相同なポリペプチド、オリゴペプチド、ホモ二量体、ヘテロ二量体、ポリペプチドの変異体、改変されたポリペプチド、誘導體、類似体、融合タンパク質が挙げられる。ポリペプチドとしては、天然ペプチド、組換えペプチドまたはそれらの組み合わせが挙げられる。

40

【0178】

用語「プロモーター」は、ポリヌクレオチド配列の特異的転写を開始させるのに必要な

50

、細胞の合成機構によって認識されるDNA配列または導入された合成機構を指す。

【0179】

用語「プロモーター/調節配列」は、プロモーター/調節配列に操作可能に連結した遺伝子産物の発現に必要な核酸配列を指す。いくつかの場合において、この配列はコアプロモーター配列であってもよく、他の例において、この配列はまた、遺伝子産物の発現に必要なエンハンサー配列および他の調節因子を包含していてもよい。プロモーター/調節配列は、例えば、組織特異的な方式で遺伝子産物を発現するプロモーター/調節配列であってもよい。

【0180】

用語「構成的」プロモーターは、遺伝子産物をコードするかまたは遺伝子産物を指定するポリヌクレオチドと操作可能に連結しているとき、細胞のほとんどまたは全ての生理学的条件下において細胞中で遺伝子産物を産生させるヌクレオチド配列を指す。

10

【0181】

用語「誘導性」プロモーターは、遺伝子産物をコードするかまたは遺伝子産物を指定するポリヌクレオチドと操作可能に連結しているとき、実質的にプロモーターに対応する誘導物質が細胞中に存在するときのみ細胞中で遺伝子産物を産生させるヌクレオチド配列を指す。

【0182】

用語「組織特異的」プロモーターは、遺伝子をコードするかまたは遺伝子によって指定されたポリヌクレオチドと操作可能に連結されている場合、実質的に細胞がプロモーター

20

【0183】

用語「可動性ポリペプチドリinker」または「リinker」は、scFvの状況で使用される場合、可変重鎖領域と可変軽鎖領域と一緒に連結するために、単独でまたは組み合わせて使用されるグリシンおよび/またはセリン残基などのアミノ酸からなるペプチドリinkerを指す。ある態様において、可動性ポリペプチドリinkerは、Gly/Serリinkerであり、アミノ酸配列(Gly-Gly-Gly-Ser)_n(配列番号38)を含み、式中nは、1に等しいかまたは1より大きい正の整数である。例えば、n=1、n=2、n=3、n=4、n=5およびn=6、n=7、n=8、n=9およびn=10である。ある態様において、可動性ポリペプチドリinkerとしては、これらに限定されないが、(Gly₄Ser)₄(配列番号27)または(Gly₄Ser)₃(配列番号28)が挙げられる。別の態様において、リinkerは、(Gly₂Ser)、(GlySer)または(Gly₃Ser)の複数の反復を包含する(配列番号29)。参照により本明細書に組み入れられるWO2012/138475で説明されているリinkerも本発明の範囲内に包含される)。

30

【0184】

5'キャップ(RNAキャップ、RNA7-メチルグアノシンキャップまたはRNAm⁷Gキャップともいう)は、本明細書で使用される場合、転写開始直後に真核性メッセンジャーRNAの「前部」または5'末端に付加された改変されたグアニンヌクレオチドである。5'キャップは、最初に転写されるヌクレオチドに連結される末端基からなる。その存在は、リボソームによる認識およびRNAアーゼからの保護にとって重要である。キャップの付加は転写とカップリングされ、それぞれ他方に影響を与えるように共に転写されることによって実行される。転写開始直後、合成されているmRNAの5'末端は、RNAポリメラーゼと結合したキャップを合成する複合体に結合される。この酵素的な複合体は、mRNAのキャッピングに必要な化学反応を触媒する。合成は、多段階の生化学反応として進行する。キャッピング成分を改変して、その安定性または翻訳効率などのmRNAの機能性を調節してもよい。

40

【0185】

「インビトロで転写されたRNA」は、本明細書で使用される場合、インビトロで合成

50

されたRNA、好ましくはmRNAを指す。一般的に、インビトロで転写されたRNAは、インビトロの転写ベクターから生成される。インビトロの転写ベクターは、インビトロで転写されたRNAを生成するのに使用される鋳型を含む。

【0186】

本明細書で使用される場合、「ポリ(A)」は、ポリアデニル化によってmRNAに付着した一連のアデノシンである。一過性発現のための構築物の好ましい態様において、ポリAは、50から5000個の間(配列番号30)であり、好ましくは64個より多く、より好ましくは100個より多く、最も好ましくは300または400個より多い。ポリ(A)配列を化学的または酵素的に改変して、局在化、安定性または翻訳効率などのmRNAの機能性を調節してもよい。

10

【0187】

「ポリアデニル化」は、本明細書で使用される場合、ポリアデニル成分またはその改変された変異体をメッセンジャーRNA分子に共有結合で連結させることを指す。真核生物において、ほとんどのメッセンジャーRNA(mRNA)分子は、3'末端でポリアデニル化されている。3'ポリ(A)テイルは、酵素のポリアデニル酸ポリメラーゼの作用を介してプレ-mRNAに付加されたアデニンヌクレオチドの長い配列(しばしば数百にもなる)である。より高次の真核生物において、ポリ(A)テイルは、特異的配列であるポリアデニル化シグナルを含有する転写物上に付加される。ポリ(A)テイルとそれに結合したタンパク質は、エキソヌクラーゼによる分解からmRNAを保護するのに役立つ。またポリアデニル化は、転写終結、細胞核外へのmRNA輸送および翻訳にとっても重要である。

ポリアデニル化は、RNAへのDNA転写直後に細胞核で起こるが、それに加えて後に細胞質内でも起こる可能性がある。転写が終結した後、mRNA鎖は、RNAポリメラーゼと結合したエンドヌクラーゼ複合体の作用を介して切断される。切断部位は通常、切断部位付近における塩基配列AAUAAAの存在を特徴とする。mRNAが切断された後、切断部位において遊離の3'末端にアデノシン残基が付加される。

20

【0188】

「一過性」は、本明細書で使用される場合、数時間、数日または数週間にわたり統合されていない導入遺伝子が発現されることを指し、ここで発現期間は、宿主細胞中でゲノムに統合されているかまたは安定なプラスミドレプリコン内に含有されている場合の遺伝子の発現期間より短い。

30

【0189】

用語「処置する」、「処置」および「処置すること」は、本明細書で使用される場合、1種または複数の療法(例えば、1種または複数の治療剤、例えば本発明のCAR)の投与の結果生じる、増殖性障害の進行、重症度および/または持続時間の低減もしくは改善または増殖性障害の1種もしくは複数の症状(好ましくは、1種または複数の識別可能な症状)の改善を指す。具体的な態様において、用語「処置する」、「処置」および「処置すること」は、必ずしも患者によって識別可能ではない、腫瘍成長などの増殖性障害の少なくとも1の測定可能な物理的なパラメーターの改善を指す。他の態様において、用語「処置する」、「処置」および「処置すること」は、例えば識別可能な症状の安定化によって物理的に、例えば物理的なパラメーターの安定化によって生理学的にまたはその両方によって増殖性障害の進行を阻害することを指す。他の態様において、用語「処置する」、「処置」および「処置すること」は、腫瘍サイズまたは癌細胞数の低減または安定化を指す。

40

【0190】

用語「シグナル伝達経路」は、細胞のある部分から細胞の別の部分へのシグナル伝達において役割を果たす様々なシグナル伝達分子間の生化学的な関係を指す。成句「細胞表面受容体」は、シグナルを受けて細胞膜を通過してシグナルを伝えることができる分子および分子複合体を包含する。

【0191】

用語「対象」は、免疫反応を惹起させることができる生物(例えば、哺乳動物、ヒト)を

50

包含することが意図される。

【0192】

用語「実質的に精製された」細胞は、他の細胞型を本質的に含まない細胞を指す。また実質的に精製された細胞は、通常その天然に存在する状況で共存する他の細胞型から分離された細胞も指す。いくつかの場合において、実質的に精製された細胞の集団は、細胞の同種の集団を指す。他の例において、この用語は単に、それらの天然の状態において自然に共存する細胞から分離された細胞を指す。いくつかの面において、このような細胞は、インビトロで培養される。他の面において、このような細胞は、インビトロで培養されない。

【0193】

用語「治療」は、本明細書で使用される場合、処置を意味する。治療効果は、病状の回復、抑制、寛解または根絶により得られる。

【0194】

用語「予防」は、本明細書で使用される場合、疾患または病状の予防または予防的処置を意味する。

【0195】

本発明の内容において、「腫瘍抗原」または「過増殖性障害抗原」または「過増殖性障害に関連する抗原」は、特定の過増殖性障害に共通する抗原を指す。ある特定の面において、本発明の過増殖性障害抗原は、原発性もしくは転移性黒色腫、胸腺腫、リンパ腫、肉腫、肺癌、肝臓癌、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、白血病、子宮癌、子宮頸癌、膀胱癌、腎臓癌および腺癌、例えば乳癌、前立腺癌、卵巣癌、膵臓癌および同種のものなどの癌由来であるが、これらに限定されない。

【0196】

用語「トランスフェクション」または「形質転換」または「形質導入」は、宿主細胞に外因性核酸を移入または導入させるプロセスを指す。「トランスフェクション」または「形質転換」または「形質導入」された細胞は、外因性核酸でトランスフェクトされた、形質転換したまたは形質導入された細胞である。細胞は、対象の初代細胞およびその後代を包含する。

【0197】

用語「特異的に結合する」は、サンプル中に存在する同起源の結合パートナー(例えば、T細胞上に存在する刺激および/または共刺激分子)タンパク質を認識してそれと結合する抗体またはリガンドを指すが、これらの抗体またはリガンドは、サンプル中の他の分子を実質的に認識または結合しない。

【0198】

「調節可能なキメラ抗原受容体(RCAR)」は、本明細書で使用される場合、免疫エフェクター細胞中にあるとき、標的細胞、典型的には癌細胞への特異性および細胞内シグナルの生成をその細胞にもたすポリペプチドのセット、最も簡単な態様では典型的には2ポリペプチドのセットを指す。ある態様において、RCARは、少なくとも細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通、ならびに本明細書のCAR分子の文脈で定義された刺激分子および/または共刺激分子由来の機能的シグナル伝達ドメインを含む細胞質内シグナル伝達ドメイン(本明細書では「細胞内シグナル伝達ドメイン」とも称される)を含む。ある態様において、RCAR中のポリペプチドのセットは、互いに連続しておらず、例えば、異なるポリペプチド鎖中にある。ある態様において、RCARは、二量体化分子の存在下でポリペプチドを互いにカップリングでき、例えば抗原結合ドメインを細胞内シグナル伝達ドメインにカップリングできる二量体化スイッチを包含する。ある態様において、RCARは、ここに記載される細胞(例えば、免疫エフェクター細胞)、例えばRCARを発現する細胞(本明細書では「RCARX細胞」とも称される)中で発現される。ある態様において、RCARX細胞はT細胞であり、RCART細胞と称される。ある態様において、RCARX細胞はNK細胞であり、RCARN細胞と称される。RCARは、標的細胞、典型的には癌細胞への特異性およびRCARを発現する細胞の免疫エフェクター特性を最適化する

10

20

30

40

50

ことができる調節可能な細胞内シグナルの生成または増殖を、R C A Rを発現する細胞に提供することができる。ある態様において、R C A R細胞は、抗原結合ドメインによって結合された抗原を含む標的細胞に特異性を提供するのに、抗原結合ドメインに少なくとも部分的に依存する。

【 0 1 9 9 】

「膜アンカー」または「膜係留ドメイン」は、この用語が本明細書において使用される場合、細胞外または細胞内ドメインを原形質膜に固定するのに十分なポリペプチドまたは部分、例えばミリストイル基を指す。

【 0 2 0 0 】

「スイッチドメイン」は、この用語が本明細書において使用される場合、例えばR C A Rについて述べられる場合、二量体化分子の存在下で別のスイッチドメインと結合する物体、典型的にはポリペプチドベースの物体を指す。結合は、第一のスイッチドメインに連結された、例えば融合した第一の物体と、第二のスイッチドメインに連結された、例えば融合した第二の物体との機能的なカップリングを引き起こす。第一および第二のスイッチドメインは、集合的に二量体化スイッチと称される。ある態様において、第一および第二のスイッチドメインは、互いに同じであり、例えばそれらは同じ一次アミノ酸配列を有するポリペプチドであり、集合的にホモ二量体化スイッチと称される。ある態様において、第一および第二のスイッチドメインは、互いに異なっており、例えばそれらは異なる一次アミノ酸配列を有するポリペプチドであり、集合的にヘテロ二量体化スイッチと称される。ある態様において、スイッチは、細胞内である。ある態様において、スイッチは、細胞外である。ある態様において、スイッチドメインは、ポリペプチドベースの物体、例えば、F K B PまたはF R Bベースの物体であり、二量体化分子は、小分子、例えば、ラパログである。ある態様において、スイッチドメインは、ポリペプチドベースの物体、例えばm y cペプチドと結合するs c F vであり、二量体化分子は、ポリペプチド、それらのフラグメントまたはポリペプチドの多量体、例えば、1以上のm y c s c F vに結合するm y cリガンドまたはm y cリガンドの多量体である。ある態様において、スイッチドメインは、ポリペプチドベースの物体、例えばm y c受容体であり、二量体化分子は、抗体またはそれらのフラグメント、例えば、m y c抗体である。

【 0 2 0 1 】

「二量体化分子」は、この用語が本明細書において使用される場合、例えばR C A Rについて述べられる場合、第一のスイッチドメインと第二のスイッチドメインとの結合を促進する分子を指す。ある態様において、二量体化分子は、対象において天然に存在しないかまたは有意な二量体化を引き起こす濃度で存在しない。ある態様において、二量体化分子は、小分子、例えばラパマイシンまたはラパログ、例えばR A D 0 0 1である。

【 0 2 0 2 】

用語「生物学的に同等な」は、参照化合物(例えば、R A D 0 0 1)の参照用量または参照量によって生産された作用と同等な作用を生産するのに必要な、参照化合物(例えば、R A D 0 0 1)以外の薬剤の量を指す。ある態様において、作用は、例えば、P 7 0 S 6キナーゼ阻害によって測定される場合の、例えば、インビボ(in vivo)またはインビトロでのアッセイで評価される場合の、例えば、ここに記載されるアッセイ、例えばB o u l a yアッセイまたはウェスタンブロットによるリン酸化されたS 6のレベルの測定によって測定される場合のm T O R阻害のレベルである。ある態様において、作用は、セルソーティングによって測定される場合のP D - 1陽性/P D - 1陰性T細胞の比率の変更である。ある態様において、m T O R阻害剤の生物学的に同等な量または用量は、参照化合物の参照用量または参照量が達成するのと同じレベルのP 7 0 S 6キナーゼ阻害を達成する量または用量である。ある態様において、m T O R阻害剤の生物学的に同等なものまたは用量は、参照化合物の参照用量または参照量が達成するのと同じレベルの、P D - 1陽性/P D - 1陰性T細胞の比率における変更を達成する量または用量である。

【 0 2 0 3 】

用語「免疫を増強する低い用量」は、m T O R阻害剤、例えばアロステリックm T O R

10

20

30

40

50

阻害剤、例えばRAD001もしくはラパマイシンまたは触媒性mTOR阻害剤と共に使用される場合、例えばP70S6キナーゼ活性阻害によって測定した場合に、mTOR活性を、完全ではないが部分的に阻害するmTOR阻害剤の用量を指す。例えばP70S6キナーゼ阻害によるmTOR活性を評価するための方法が、本明細書で論じられている。この用量は、完全な免疫抑制を引き起こすには不十分であるが、免疫応答を増強するには十分である。ある態様において、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤は、PD-1陽性T細胞の数の減少および/またはPD-1陰性T細胞の数の増加またはPD-1陰性T細胞/ PD-1陽性T細胞の比率の増加を引き起こす。

【0204】

ある態様において、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤は、ナイーブT細胞の数の増加を引き起こす。ある態様において、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤は、以下：

例えばメモリーT細胞、例えばメモリーT細胞前駆体における、以下のマーカー：CD62L^{high}、CD127^{high}、CD27⁺およびBCL2の1以上の発現の増加；

例えばメモリーT細胞、例えばメモリーT細胞前駆体におけるKLRG1発現の減少；および

メモリーT細胞前駆体、例えば、以下の特徴：CD62L^{high}の増加、CD127^{high}の増加、CD27⁺の増加、KLRG1の減少およびBCL2の増加のいずれか1または組合せを有する細胞の数の増加

の1以上を引き起こし、ここで上述した変化はいずれも、例えば未処置の対象と比較して、例えば少なくとも一過性に起こる。

【0205】

「難治性」は、本明細書で使用される場合、疾患、例えば処置に応答しない癌を指す。ある態様において、難治性癌は、処置の前または開始時に、処置に対して耐性である可能性がある。他の態様において、難治性癌は、処置中に耐性になる可能性がある。難治性癌はまた、耐性癌とも呼ばれる。

【0206】

「再発した」または「再発する」は、本明細書で使用される場合、改善または応答期間の後に、例えば、治療、例えば癌治療の以前の処置の後に、疾患(例えば、癌)または癌などの疾患の徴候および症状が再出現することを指す。例えば、応答期間は、癌細胞のレベルが、特定の閾値未満、例えば、20%、1%、10%、5%、4%、3%、2%または1%未満に低下することを含み得る。再出現は、癌細胞のレベルが、特定の閾値より高く、例えば、20%、1%、10%、5%、4%、3%、2%または1%より高く上昇することを含み得る。

【0207】

範囲：本開示全体にわたり、本発明の様々な面は、範囲の様式で示される場合がある。範囲の様式での記載は、単に利便性および簡潔さのためであり、本発明の範囲における柔軟性のない限定として解釈されるべきではないことが理解されるものとする。したがって、範囲の記載は、全ての可能性のある部分範囲、加えてその範囲内の個々の数値を具体的に開示しているとみなされるものとする。例えば、1から6などの範囲の記載は、例えば1から3、1から4、1から5、2から4、2から6、3から6などの具体的に開示された部分範囲、加えてその範囲内の個々の数値、例えば、1、2、2.7、3、4、5、5.3および6を有するとみなされる。別の例として、95~99%同一性などの範囲は、95%、96%、97%、98%または99%同一性を有する何かを包含し、さらに、96~99%、96~98%、96~97%、97~99%、97~98%および98~99%同一性などの部分範囲を包含する。これは、範囲の幅に関係なく適用される。

【0208】

説明

CLL-1キメラ抗原受容体を発現する細胞(CAR)を使用する癌などの疾患を処置するための、物の組成物および使用方法が本明細書において提供される。

10

20

30

40

50

【0209】

ある面において、本発明は、CLL-1タンパク質またはそのフラグメントへの特異的結合が強化されるように加工された抗体または抗体フラグメントを含む多数のキメラ抗原受容体(CAR)を提供する。ある面において、本発明は、CARを発現するように加工された細胞(例えば、免疫エフェクター細胞、例えばT細胞またはNK細胞)を提供し、ここでCAR-T細胞(「CAR-T」は抗腫瘍特性を示す。ある面において、細胞はCARで形質転換され、CAR構築物の少なくとも一部は細胞表面上に発現される。ある態様において、細胞(例えば、免疫エフェクター細胞、例えばT細胞またはNK細胞)は、CARをコードするウイルスベクターで形質導入される。ある態様において、ウイルスベクターは、レトロウイルスベクターである。ある態様において、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。いくつかのこのような態様において、細胞は、CARを安定して発現することができる。別の態様において、細胞(例えば、免疫エフェクター細胞、例えばT細胞またはNK細胞)は、CARをコードする、核酸、例えばmRNA、cDNA、DNAでトランスフェクトされる。いくつかのこのような態様において、細胞は、CARを一過性発現することができる。

10

【0210】

ある面において、CARのヒト抗CLL-1タンパク質結合部分は、scFv抗体フラグメントである。ある面において、このような抗体フラグメントは、それらが、等価な結合アフィニティーを保持する、例えば、それらが、同じ重鎖可変領域および軽鎖可変領域を有するIgG抗体と同じ抗原に、同等な効能で結合するという点で機能的である。ある面において、このような抗体フラグメントは、それらが、これらに限定されないが、当業者によって理解されるような免疫反応の活性化、その標的抗原からのシグナル伝達開始の阻害、キナーゼ活性の阻害および同種のものなどの生体反応をもたらす点で機能的である。

20

【0211】

いくつかの面において、本発明の抗体を、キメラ抗原受容体(CAR)に組み込む。ある面において、CARは、本明細書で配列番号91~103として提示されるポリペプチド配列を含む。

【0212】

ある面において、抗CLL-1結合ドメイン、例えば本発明のCARの一部であるヒトscFvは、その配列のコドンが哺乳動物細胞での発現に最適化された導入遺伝子によってコードされている。ある面において、本発明のCAR構築物全体は、その配列全体のコドンが哺乳動物細胞での発現に最適化された導入遺伝子によってコードされている。コドンの最適化は、コードDNA中の同義コドン(すなわち、同じアミノ酸をコードするコドン)の出現頻度が異なる種で偏っているという発見を指す。このようなコドンの縮重は、同一なポリペプチドを様々なヌクレオチド配列でコードすることを可能にする。様々なコドン最適化方法が当業界公知であり、例えば、少なくとも米国特許第5,786,464号および6,114,148号で開示された方法が挙げられる。

30

【0213】

ある面において、ヒトCLL-1結合ドメインは、配列番号39~51に提示されているscFv部分を含む。ある態様において、ヒト抗CLL-1結合ドメインは、配列番号39に提示されているscFv部分を含む。ある態様において、ヒト抗CLL-1結合ドメインは、配列番号40に提示されているscFv部分を含む。ある態様において、ヒト抗CLL-1結合ドメインは、配列番号41に提示されているscFv部分を含む。ある態様において、ヒト抗CLL-1結合ドメインは、配列番号42に提示されているscFv部分を含む。ある態様において、ヒト抗CLL-1結合ドメインは、配列番号43に提示されているscFv部分を含む。ある態様において、ヒト抗CLL-1結合ドメインは、配列番号44に提示されているscFv部分を含む。ある態様において、ヒト抗CLL-1結合ドメインは、配列番号45に提示されているscFv部分を含む。ある態様において、ヒト抗CLL-1結合ドメインは、配列番号46に提示されているscFv部分を

40

50

含む。ある態様において、ヒト抗CLL-1結合ドメインは、配列番号47に提示されているscFv部分を含む。ある態様において、ヒト抗CLL-1結合ドメインは、配列番号48に提示されているscFv部分を含む。ある態様において、ヒト抗CLL-1結合ドメインは、配列番号49に提示されているscFv部分を含む。ある態様において、ヒト抗CLL-1結合ドメインは、配列番号50に提示されているscFv部分を含む。ある態様において、ヒト抗CLL-1結合ドメインは、配列番号51に提示されているscFv部分を含む。ある面において、本発明のCARは、特異的抗体の抗原結合ドメインを、細胞内シグナル伝達分子と組み合わせる。例えば、いくつかの面において、細胞内シグナル伝達分子は、CD3ゼータ鎖、4-1BBおよびCD28シグナル伝達分子ならびにこれらの組合せを含むが、これらに限定されない。ある面において、抗原結合ドメインは、CLL-1に結合する。ある面において、CLL-1 CARは、配列番号91~103または197の1以上に提示されている配列から選択されるCARを含む。ある面において、CLL-1 CARは、配列番号91に提示されている配列を含む。ある面において、CLL-1 CARは、配列番号92に提示されている配列を含む。ある面において、CLL-1 CARは、配列番号93に提示されている配列を含む。ある面において、CLL-1 CARは、配列番号94に提示されている配列を含む。ある面において、CLL-1 CARは、配列番号95に提示されている配列を含む。ある面において、CLL-1 CARは、配列番号96に提示されている配列を含む。ある面において、CLL-1 CARは、配列番号97に提示されている配列を含む。ある面において、CLL-1 CARは、配列番号98に提示されている配列を含む。ある面において、CLL-1 CARは、配列番号99に提示されている配列を含む。ある面において、CLL-1 CARは、配列番号100に提示されている配列を含む。ある面において、CLL-1 CARは、配列番号101に提示されている配列を含む。ある面において、CLL-1 CARは、配列番号102に提示されている配列を含む。ある面において、CLL-1 CARは、配列番号103に提示されている配列を含む。ある面において、CLL-1 CARは、配列番号197に提示されている配列を含む。さらに本発明は、疾患のなかでも、癌もしくはあらゆる悪性腫瘍またはCLL-1を発現する細胞もしくは組織を伴う自己免疫疾患を処置するための医薬品または方法における、CLL-1 CAR組成物およびそれらの使用を提供する。

【0214】

ある面において、本発明のCARは、CLL-1を発現する正常細胞を根絶するのに使用することができ、それによって細胞移植前の細胞コンディショニング療法として使用するために適用できる。ある面において、CLL-1を発現する正常細胞は、CLL-1を発現する正常幹細胞であり、細胞移植は、幹細胞移植である。

【0215】

ある面において、本発明は、本発明のキメラ抗原受容体(CAR)を発現するように加工された細胞(例えば、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞)であって、抗腫瘍特性を呈示する細胞(例えば、CAR発現免疫エフェクター細胞、例えば、CAR T細胞、例えば、「CART」)を提供する。好ましい抗原は、CLL-1である。ある面において、CARの抗原結合ドメインは、ヒト抗CLL-1抗体フラグメントを含む。ある面において、CARの抗原結合ドメインは、scFvを含むヒト抗CLL-1抗体フラグメントを含む。ある態様において、CARの抗原結合ドメインは、ヒト抗CLL-1 scFvを含む。したがって、本発明は、抗CLL-1結合ドメインを含み、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞へと加工されたCLL-1-CARと、養子療法のためのそれらの使用の方法とを提供する。ある面において、CLL-1-CARは、ヒト抗CLL-1結合ドメインを含む。

【0216】

ある面において、CLL-1-CARは、CD137(4-1BB)シグナル伝達ドメイン、CD28シグナル伝達ドメイン、CD3ゼータシグナルドメインおよびそれらのあらゆる組み合わせの群より選択される少なくとも1の細胞内ドメインを含む。ある面におい

10

20

30

40

50

て、CLL-1-CARは、CD137(4-1BB)またはCD28以外の1以上の共刺激分子由来の少なくとも1の細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0217】

キメラ抗原受容体(CAR)

本発明は、抗CLL-1結合ドメイン(例えば、ここに記載されるヒトまたはヒト化CLL-1結合ドメイン)、膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含むCAR(例えば、CARポリペプチド)であって、前記抗CLL-1結合ドメインは、表2に列挙したいずれかの抗CLL-1重鎖結合ドメインのアミノ酸配列の重鎖相補性決定領域1(HC CDR1)、重鎖相補性決定領域2(HC CDR2)および重鎖相補性決定領域3(HC CDR3)を含む、CARを提供する。CARの抗CLL-1結合ドメインは、表2に列挙したいずれかの抗CLL-1軽鎖結合ドメインのアミノ酸配列の軽鎖相補性決定領域1(LC CDR1)、軽鎖相補性決定領域2(LC CDR2)および軽鎖相補性決定領域3(LC CDR3)をさらに含んでいてもよい。

10

【0218】

本発明はまた、ここに記載されるCARをコードする、例えば、抗CLL-1結合ドメイン(例えば、ここに記載されるヒトまたはヒト化CLL-1結合ドメイン)、膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含むCARをコードする核酸分子であって、前記抗CLL-1結合ドメインは、表2に列挙したいずれかの抗CLL-1重鎖結合ドメインのアミノ酸配列の重鎖相補性決定領域1(HC CDR1)、重鎖相補性決定領域2(HC CDR2)および重鎖相補性決定領域3(HC CDR3)を含む、核酸分子も提供する。

20

【0219】

ある態様において、CARのコードされた抗CLL-1結合ドメインは、表2に列挙したいずれかの抗CLL-1軽鎖結合ドメインのアミノ酸配列の軽鎖相補性決定領域1(LC CDR1)、軽鎖相補性決定領域2(LC CDR2)および軽鎖相補性決定領域3(LC CDR3)をさらに含んでいてもよい。

【0220】

具体的な面において、本発明のCAR構築物は、配列番号39~51からなる群より選択されるscFvドメインを含み、ここでscFvの前に、配列番号1で提供されるもののような任意のリーダー配列、それに続いて配列番号2または配列番号3または配列番号4または配列番号5で提供されるもののような任意のヒンジ配列、配列番号6で提供されるもののような膜貫通領域、配列番号7または配列番号8などの細胞内シグナル伝達ドメインおよび配列番号9または配列番号10などのCD3ゼータ配列が存在していてもよく、例えば、ここでドメインは連続しており同じリーディングフレーム内にあり、単一の融合タンパク質を形成する。また本発明は、配列番号39~51からなる群より選択されるscFvフラグメントのそれぞれのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列も包含する。また本発明は、配列番号39~51からなる群より選択されるscFvフラグメントのそれぞれ、ならびに配列番号1、2および6~9のドメインのそれぞれのポリペプチドをコードするヌクレオチド配列も包含する。ある面において、典型的なCLL-1 CAR構築物は、任意のリーダー配列、細胞外抗原結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメインおよび細胞内刺激ドメインを含む。ある面において、典型的なCLL-1 CAR構築物は、任意のリーダー配列、細胞外抗原結合ドメイン、ヒンジ、膜貫通ドメイン、細胞内共刺激ドメインおよび細胞内刺激ドメインを含む。

30

40

【0221】

ある態様において、本明細書ではまた、全長CAR配列も、表2に示される、配列番号91~103として提示される。

【0222】

典型的なリーダー配列は、配列番号1として提供される。典型的なヒンジ/スペーサー配列は、配列番号2または配列番号3または配列番号4または配列番号5として提供される。典型的な膜貫通ドメイン配列は、配列番号6として提供される。4-1BBタンパク

50

質の細胞内シグナル伝達ドメインの典型的な配列は、配列番号7として提供される。CD27の細胞内シグナル伝達ドメインの典型的な配列は、配列番号8として提供される。典型的なCD3ゼータドメイン配列は、配列番号9または配列番号10として提供される。

【0223】

ある面において、本発明は、CARをコードする核酸分子を含む組換え核酸構築物を包含し、ここで該核酸分子は、例えばここに記載される、例えば細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列と連続しておりそれと同じリーディングフレーム内にある抗CLL-1結合ドメインをコードする核酸配列を含む。ある面において、抗CLL-1結合ドメインは、配列番号39~51の1以上から選択される。ある態様において、抗CLL-1結合ドメインは、配列番号39を含む。ある態様において、抗CLL-1結合ドメインは、配列番号40を含む。ある態様において、抗CLL-1結合ドメインは、配列番号41を含む。ある態様において、抗CLL-1結合ドメインは、配列番号42を含む。ある態様において、抗CLL-1結合ドメインは、配列番号43を含む。ある態様において、抗CLL-1結合ドメインは、配列番号44を含む。ある態様において、抗CLL-1結合ドメインは、配列番号45を含む。ある態様において、抗CLL-1結合ドメインは、配列番号46を含む。ある態様において、抗CLL-1結合ドメインは、配列番号47を含む。ある態様において、抗CLL-1結合ドメインは、配列番号48を含む。ある態様において、抗CLL-1結合ドメインは、配列番号49を含む。ある態様において、抗CLL-1結合ドメインは、配列番号50を含む。ある態様において、抗CLL-1結合ドメインは、配列番号51を含む。

【0224】

ある面において、本発明は、CARをコードする導入遺伝子を含む組換え核酸構築物を包含し、ここで該核酸分子は、配列番号39~51の1以上から選択される抗CLL-1結合ドメインをコードする核酸配列を含み、ここで該配列は、細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸配列と連続しておりそれと同じリーディングフレーム内にある。CARにおいて使用できる典型的な細胞内シグナル伝達ドメインとしては、これらに限定されないが、例えば、CD3-ゼータ、CD28、4-1BBおよび同種のものの1以上の細胞内シグナル伝達ドメインが挙げられる。いくつかの場合において、CARは、CD3-ゼータ、CD28、4-1BBおよび同種のもののあらゆる組み合わせを含んでいてもよい。ある面において、本発明のCAR構築物の核酸配列は、配列番号104~116または198の1以上から選択される。ある面において、CAR構築物の核酸配列は、配列番号104である。ある面において、CAR構築物の核酸配列は、配列番号105である。ある面において、CAR構築物の核酸配列は、配列番号106である。ある面において、CAR構築物の核酸配列は、配列番号107である。ある面において、CAR構築物の核酸配列は、配列番号108である。ある面において、CAR構築物の核酸配列は、配列番号109である。ある面において、CAR構築物の核酸配列は、配列番号110である。ある面において、CAR構築物の核酸配列は、配列番号111である。ある面において、CAR構築物の核酸配列は、配列番号112である。ある面において、CAR構築物の核酸配列は、配列番号113である。ある面において、CAR構築物の核酸配列は、配列番号114である。ある面において、CAR構築物の核酸配列は、配列番号115である。ある面において、CAR構築物の核酸配列は、配列番号116である。ある面において、CAR構築物の核酸配列は、配列番号198である。所望の分子をコードする核酸配列は、当業界公知の組換え方法を使用して得ることができ、例えば遺伝子を発現する細胞からのライブラリーをスクリーニングすること、遺伝子を包含することがわかっているベクターからその遺伝子を抽出することまたはその遺伝子を含有する細胞および組織から標準的な技術を使用して直接単離することなどによって得ることができる。その代わりに、対象の核酸は、クローニングされるのではなく合成的に産生されてもよい。

【0225】

本発明は、細胞に直接形質導入することができる、CARを発現するレトロウイルスおよびレンチウイルスベクター構築物を包含する。

【0226】

本発明はまた、細胞に直接トランスフェクトすることができるRNA構築物も包含する。トランスフェクションで使用するためのmRNAを生成するための方法は、長さが典型的には50～2000塩基の3'および5'非翻訳配列(「UTR」)、5'キャップおよび/または内部リボソーム侵入部位(IRES)、発現させる核酸およびポリAテイルを含有する構築物(配列番号35)を産生するために、インビトロでの特別に設計されたプライマーを用いた鋳型の転写(IVT)、それに続くポリA付加を含む。このようにして産生されたRNAは、異なる種の細胞に効率的にトランスフェクトすることができる。ある態様において、鋳型は、CARに関する配列を包含する。ある態様において、RNA CARベクターは、エレクトロポレーションによってT細胞に形質導入される。

10

【0227】

抗原結合ドメイン

本発明のCARは、標的特異的な結合ドメインを含む。成分の選択は、標的細胞表面を特徴付けるリガンドのタイプおよび数に依存する。例えば、抗原結合ドメインは、特定の病状に関連する標的細胞上の細胞表面マーカーとして作用するリガンドを認識するように選ぶことができる。したがって、本発明のCARにおける抗原結合ドメインのリガンドとして作用し得る細胞表面マーカーの例は、ウイルス感染、細菌感染および寄生虫感染、自己免疫疾患、ならびに癌細胞に関連する細胞表面マーカーを含む。

【0228】

ある面において、所望の抗原と特異的に結合する抗原結合ドメインをCARに取り込ませる目的で、CARが介在するT細胞応答は、対象の抗原に向けられていてもよい。

20

【0229】

ある面において、本発明のCARは、CLL-1に特異的に結合する結合ドメインを含む。ある面において、抗原結合ドメインはヒトCLL-1に特異的に結合する。

【0230】

抗原結合ドメインは、例えば、これらに限定されないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組換え抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体およびそれらの機能的なフラグメント、例えば、これらに限定されないが、単ドメイン抗体、例えばラクダ由来のナノボディの重鎖可変ドメイン(VH)、軽鎖可変ドメイン(VL)および可変ドメイン(VHH)など、ならびに抗原結合ドメインとして機能することが当業界公知の代替足場、例えば組換えフィブロネクチンドメインおよび同種のものなどの抗原に結合するあらゆるドメインであり得る。いくつかの場合において、抗原結合ドメインにとって、CARが最終的に使用される同じ種由来であることが有益である。例えば、ヒトで使用するためには、CARの抗原結合ドメインにとって、抗体または抗体フラグメントの抗原結合ドメインに関してヒトまたはヒト化残基を含むことが有益であり得る。

30

【0231】

場合によって、抗原結合ドメインは、CARが最終的に使用される同じ種に由来することが有益である。例えば、ヒトにおける使用のために、CARの抗原結合ドメインは、抗体または抗体フラグメントの抗原結合ドメインに、ヒト残基またはヒト化残基を含むことが有益であり得る。したがって、ある面において、抗原結合ドメインは、ヒト抗体または

40

【0232】

したがって、ある面において、抗原結合ドメインは、ヒト抗体または抗体フラグメントを含む。ある態様において、ヒト抗CLL-1結合ドメインは、ここに記載されるヒト抗CLL-1結合ドメインの軽鎖相補性決定領域1(LC CDR1)、軽鎖相補性決定領域2(LC CDR2)および軽鎖相補性決定領域3(LC CDR3)の1以上(例えば、全3)および/またはここに記載されるヒト抗CLL-1結合ドメインの重鎖相補性決定領域1(HC CDR1)、重鎖相補性決定領域2(HC CDR2)および重鎖相補性決定領域3(HC CDR3)の1以上(例えば、全3)を含み、例えば、ヒト抗CLL-1結合ドメインは、LC CDRの1以上、例えば全3およびHC CDRの1以上、例えば全3

50

を含む。ある態様において、ヒト抗 C L L - 1 結合ドメインは、ここに記載されるヒト抗 C L L - 1 結合ドメインの重鎖相補性決定領域 1 (H C C D R 1)、重鎖相補性決定領域 2 (H C C D R 2) および重鎖相補性決定領域 3 (H C C D R 3) の 1 以上 (例えば、全 3) を含み、例えば、ヒト抗 C L L - 1 結合ドメインは、それぞれここに記載される H C C D R 1、H C C D R 2 および H C C D R 3 を含む 2 可変重鎖領域を有する。ある態様において、ヒト抗 C L L - 1 結合ドメインは、ここに記載される (例えば、表 4 に記載の) ヒト軽鎖可変領域および / またはここに記載される (例えば、表 3 に記載の) ヒト重鎖可変領域を含む。ある態様において、ヒト抗 C L L - 1 結合ドメインは、ここに記載される (例えば、表 3 に記載の) ヒト重鎖可変領域、例えば、少なくとも 2 ここに記載される (例えば、表 3 に記載の) ヒト重鎖可変領域を含む。ある態様において、抗 C L L - 1 結合ドメインは、表 1 のアミノ酸配列の軽鎖および重鎖を含む s c F v である。ある態様において、抗 C L L - 1 結合ドメイン (例えば、s c F v) は、表 4 に示される軽鎖可変領域のアミノ酸配列に少なくとも 1、2 または 3 改変 (例えば、置換、例えば保存的置換) を有するが、改変 (例えば、置換、例えば保存的置換) が 30、20 または 10 を超えないアミノ酸配列、もしくは表 4 のアミノ酸配列と 95 ~ 99 % 同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域 ; および / または表 3 に示される重鎖可変領域のアミノ酸配列に少なくとも 1、2 または 3 改変 (例えば、置換、例えば保存的置換) を有するが、改変 (例えば、置換、例えば保存的置換) が 30、20 または 10 を超えないアミノ酸配列、もしくは表 3 のアミノ酸配列と 95 ~ 99 % 同一性を有する配列を含む重鎖可変領域を含む。ある態様において、ヒト抗 C L L - 1 結合ドメインは、配列番号 39 ~ 51 からなる群より選択される配列またはそれらと 95 ~ 99 % 同一性を有する配列を含む。ある態様において、ヒト抗 C L L - 1 結合ドメインをコードする核酸配列は、配列番号 52 ~ 64 からなる群より選択される配列またはそれらと 95 ~ 99 % 同一性を有する配列を含む。ある態様において、ヒト抗 C L L - 1 結合ドメインは、s c F v であり、ここに記載される、例えば表 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域は、ここに記載される、例えば表 2 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に、リンカー、例えばここに記載されるリンカーを介して結合している。ある態様において、ヒト抗 C L L - 1 結合ドメインは、(G l y₄ - S e r)_n リンカーを包含し、ここで n は、1、2、3、4、5 または 6 であり、好ましくは 3 または 4 である (配列番号 26)。s c F v の軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、例えば、以下の配置 : 軽鎖可変領域 - リンカー - 重鎖可変領域 または 重鎖可変領域 - リンカー - 軽鎖可変領域のいずれであってもよい。

【 0 2 3 3 】

ある面において、抗原結合ドメインの部分は、配列番号 39 ~ 41 から選択される 1 以上の配列を含む。ある面において、C A R は、配列番号 91 ~ 103 または 197 から選択される 1 以上の配列から選択される。

【 0 2 3 4 】

ある面において、抗 C L L - 1 結合ドメインは、抗体または抗体フラグメントの特定の機能的な特徴または特性を特徴とする。例えば、ある面において、抗原結合ドメインを含む本発明の C A R 組成物の一部は、ヒト C L L - 1 に特異的に結合する。

【 0 2 3 5 】

ある面において、本発明は、抗体または抗体フラグメントを含む抗原結合ドメインであって、ここで抗体結合ドメインは、C L L - 1 タンパク質またはそれらのフラグメントに特異的に結合し、抗体または抗体フラグメントは、配列番号 39 ~ 51 のアミノ酸配列を包含する可変軽鎖および / または可変重鎖を含む、ドメインに関する。ある面において、抗原結合ドメインは、配列番号 39 ~ 51 から選択される s c F v のアミノ酸配列を含む。ある面において、s c F v は、リーダー配列と連続しておりそれと同じリーディングフレーム内にある。ある面において、リーダー配列は、配列番号 1 として提供されるポリペプチド配列である。

【 0 2 3 6 】

ある面において、ヒト抗 C L L - 1 結合ドメインは、フラグメント、例えば単鎖可変フ

10

20

30

40

50

ラグメント(s c F v)である。ある面において、ヒト抗C L L - 1結合ドメインは、F v、F a b、a(F a b')²または二機能性(例えば二重特異的)ハイブリッド抗体[例えば、Lanzavecchia et al., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)]である。ある面において、本発明の抗体およびそのフラグメントは、C L L - 1タンパク質またはそのフラグメントに、野生型のアフィニティーまたは増強されたアフィニティーで結合する。

【0237】

場合によって、ヒトs c F vは、ディスプレイライブラリーに由来し得る。ディスプレイライブラリーとは、実体のコレクションであり、各実体は、アクセス可能なポリペプチド構成要素およびポリペプチド構成要素をコードまたは同定する、回収可能な構成要素を含む。異なるアミノ酸配列が表されるように、ポリペプチド構成要素を変動させる。ポリペプチド構成要素は、例えば、3アミノ酸~300超のアミノ酸のいずれかの長さであり得る。ディスプレイライブラリーの実体は、1を超えるポリペプチド構成要素、例えば、F a bの2ポリペプチド鎖を含み得る。例示的なある態様において、ディスプレイライブラリーを使用して、ヒトC L L - 1結合ドメインを同定することができる。選択において、ライブラリーの各メンバーのポリペプチド構成要素を、C L L - 1またはそのフラグメントによりプロービングし、ポリペプチド構成要素が、C L L - 1に結合すれば、ディスプレイライブラリーのメンバーを、典型的には、支持体における保持により同定される。

【0238】

保持されたディスプレイライブラリーのメンバーは、支持体から回収し、分析する。分析は、増幅および同種または異種の条件下におけるその後の選択を含み得る。例えば、陽性選択と陰性選択とを、交互に行うことができる。分析はまた、ポリペプチド構成要素、すなわち、C L L - 1結合ドメインのアミノ酸配列決定および詳細な特徴付けのためのポリペプチド構成要素の精製も含み得る。

【0239】

様々なフォーマットを、ディスプレイライブラリーのために使用することができる。例は、ファージディスプレイを含む。ファージディスプレイにおいて、タンパク質構成要素は、バクテリオファージコートタンパク質に共有結合的に連結されることが典型的である。連結は、コートタンパク質に融合させたタンパク質構成要素をコードする核酸の翻訳から生じる。連結は、可撓性のペプチドリンカー、プロテアーゼ部位または終止コドンの抑制の結果として組み込まれるアミノ酸を含み得る。ファージディスプレイは、例えば、U . S . 5 , 2 2 3 , 4 0 9 ; Smith (1985) Science 228:1315-1317 ; W O 9 2 / 1 8 6 1 9 ; W O 9 1 / 1 7 2 7 1 ; W O 9 2 / 2 0 7 9 1 ; W O 9 2 / 1 5 6 7 9 ; W O 9 3 / 0 1 2 8 8 ; W O 9 2 / 0 1 0 4 7 ; W O 9 2 / 0 9 6 9 0 ; W O 9 0 / 0 2 8 0 9 ; de Haard et al. (1999) J. Biol. Chem 274:18218-30; Hoogenboom et al. (1998) Immunotechnology 4:1-20; Hoogenboom et al. (2000) Immunol Today 2:371-8 and Hoet et al. (2005) Nat Biotechnol. 23(3)344-8において説明されている。タンパク質構成要素を提示するバクテリオファージは、増殖させ、標準的なファージ調製法、例えば、増殖培地からのP E G沈殿を使用して採取することができる。個別のディスプレイファージの選択の後で、選択されたタンパク質構成要素をコードする核酸を、選択されたファージを感染させた細胞またはファージ自体から、増幅の後で単離することができる。個々のコロニーまたはプラークを選び取り、核酸を単離し、シーケンシングすることができる。

【0240】

他のディスプレイフォーマットは、細胞ベースのディスプレイ(例えば、W O 0 3 / 0 2 9 4 5 6を参照されたい)、タンパク質-核酸融合体(例えば、U S 6 , 2 0 7 , 4 4 6を参照されたい)、リボソームディスプレイ(例えば、Mattheakis et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9022 and Hanes et al. (2000) Nat Biotechnol. 18:1287-92; Hanes et al. (2000) Methods Enzymol. 328:404-30; and Schaffitzel et al. (1999) J Immunol Methods. 231(1-2):119-35を参照されたい)および大腸菌(E. coli)ペリプラズムディスプレイ(2005 Nov 22;PMID: 16337958)を含む。

【0241】

10

20

30

40

50

いくつかの例において、s c F v は、当業界公知の方法に従って調製できる(例えば、Bird et al., (1988) Science 242:423-426およびHuston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883を参照)。s c F v 分子は、可動性ポリペプチドリンカーを使用してV HおよびV L領域を一緒に連結することによって産生することができる。s c F v 分子は、長さおよび/またはアミノ酸組成が最適化されたリンカー(例えば、Ser - Glyリンカー)を含む。リンカーの長さは、s c F v の可変領域がどのようにフォールディングして相互作用するかに大きく影響を与える可能性がある。実際、短いポリペプチドリンカーが採用される場合(例えば、5 ~ 10アミノ酸の間)、鎖内のフォールディングが予防される。鎖間のフォールディングは、2可変領域を一緒に架橋して機能的なエピソード結合部位を形成するのにも必要である。リンカーの方向およびサイズの例に関しては、例えば、参照により本明細書に組み入れられるHollinger et al. 1993 Proc Natl Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448、米国特許出願公開第2005/0100543号、2005/0175606号、2007/0014794号およびPCT公開WO2006/020258およびWO2007/024715を参照されたい。

【0242】

s c F v は、そのV LとV H領域との間に、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50アミノ酸残基またはそれより多くのアミノ酸残基のリンカーを含んでいてもよい。リンカー配列は、あらゆる天然に存在するアミノ酸を含んでいてもよい。ある態様において、リンカー配列は、アミノ酸であるグリシンおよびセリンを含む。別の態様において、リンカー配列は、一連のグリシンおよびセリン反復を含み、例えば(Gly₄Ser)_nを含み、ここで式中nは、1以上の正の整数である(配列番号25)。ある態様において、リンカーは、(Gly₄Ser)₄(配列番号27)または(Gly₄Ser)₃(配列番号28)であってもよい。リンカーの長さを変化させることで、活性を保持したりまたは強化したりすることが可能であり、それにより活性研究において優れた効能がもたらされる。

【0243】

例示的ヒトCLL-1 CAR構築物および抗原結合ドメイン

本明細書で開示される、例示的CLL-1 CAR構築物は、s c F v (例えば、適宜のリーダー配列(例えば、例示的なリーダーアミノ酸配列およびリーダーヌクレオチド配列のそれぞれに、配列番号1および配列番号12)を前置してもよい、本明細書の表2において開示されるヒトs c F v)を含む。ヒトs c F vフラグメント(配列番号39~51のアミノ酸配列および配列番号52~64のヌクレオチド配列)の配列を、本明細書の表2に提示する。CLL-1 CAR構築物は、任意のヒンジドメイン、例えばCD8ヒンジドメイン(例えば、配列番号2のアミノ酸配列または配列番号13の核酸配列によってコードされたアミノ酸配列など);膜貫通ドメイン、例えばCD8膜貫通ドメイン(例えば、配列番号6のアミノ酸配列または配列番号17のヌクレオチド配列によってコードされたアミノ酸配列など);細胞内ドメイン、例えば4-1BB細胞内ドメイン(例えば、配列番号7のアミノ酸配列または配列番号18のヌクレオチド配列によってコードされたアミノ酸配列など);および機能的シグナル伝達ドメイン、例えばCD3ゼータドメイン(例えば、配列番号9もしくは10のアミノ酸配列または配列番号20もしくは21のヌクレオチド配列によってコードされたアミノ酸配列など)をさらに包含していてもよい。ある態様において、ドメインは、同じリーディングフレーム内で連続しており、単一の融合タンパク質を形成する。他の態様において、ドメインは、例えばここに記載されるRCAR分子の場合のように、別々のポリペプチド中にある。

【0244】

ある態様において、全長CLL-1 CAR分子は、表2に示される、CLL-1 CAR-1、CLL-1 CAR-2、CLL-1 CAR-3、CLL-1 CAR-4、CLL-1 CAR-5、CLL-1 CAR-6、CLL-1 CAR-7、CLL-1 CAR-8、CLL-1 CAR-9、CLL-1 CAR-10、CLL-1

10

20

30

40

50

CAR - 11、CLL - 1 CAR - 12、CLL - 1 CAR - 13、181268のヌクレオチド配列またはそれらと実質的に(例えば、95～99%)同一な配列のアミノ酸配列またはそれらによってコードされるアミノ酸配列を包含する。

【0245】

ある態様において、CLL - 1 CAR分子または抗CLL - 1抗原結合ドメインは、表2に提示されている、CLL - 1 CAR - 1、CLL - 1 CAR - 2、CLL - 1 CAR - 3、CLL - 1 CAR - 4、CLL - 1 CAR - 5、CLL - 1 CAR - 6、CL - L1 CAR - 7、CLL - 1 CAR - 8、CLL - 1 CAR - 9、CLL - 1 CAR - 10、CLL - 1 CAR - 11、CLL - 1 CAR - 12、CLL - 1 CAR - 13、181268のscFvアミノ酸配列を含むか；またはCLL - 1 CAR - 1、CLL - 1 CAR - 2、CLL - 1 CAR - 3、CLL - 1 CAR - 4、CLL - 1 CAR - 5、CLL - 1 CAR - 6、CL - L1 CAR - 7、CLL - 1 CAR - 8、CLL - 1 CAR - 9、CLL - 1 CAR - 10、CLL - 1 CAR - 11、CLL - 1 CAR - 12、CLL - 1 CAR - 13、181268のscFvアミノ酸配列、もしくは前述の配列のいずれかと実質的に同一な(例えば、95～99%同一であるかまたはアミノ酸変化、例えば、置換(例えば、保存的置換)が最大で20、15、10、8、6、5、4、3、2または1)配列を含むか、もしくはこれらのヌクレオチド配列によりコードされる。

10

【0246】

ある態様において、CLL - 1 CAR分子または抗CLL - 1抗原結合ドメインは、表2に示される、CLL - 1 CAR - 1、CLL - 1 CAR - 2、CLL - 1 CAR - 3、CLL - 1 CAR - 4、CLL - 1 CAR - 5、CLL - 1 CAR - 6、CL - L1 CAR - 7、CLL - 1 CAR - 8、CLL - 1 CAR - 9、CLL - 1 CAR - 10、CLL - 1 CAR - 11、CLL - 1 CAR - 12、CLL - 1 CAR - 13、181268または前述の配列のいずれかに実質的に同一な配列(例えば、95～99%同一であるかまたは最大20、15、10、8、6、5、4、3、2または1アミノ酸の変化、例えば置換(例えば、保存的置換))の、重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域を包含する。

20

【0247】

ある態様において、CLL - 1 CAR分子または抗CLL - 1抗原結合ドメインは、表3に示される、重鎖可変領域からの1、2または3CDR(例えば、HCDR1、HCDR2および/またはHCDR3)；および/または表4に示される、CLL - 1 CAR - 1、CLL - 1 CAR - 2、CLL - 1 CAR - 3、CLL - 1 CAR - 4、CLL - 1 CAR - 5、CLL - 1 CAR - 6、CL - L1 CAR - 7、CLL - 1 CAR - 8、CLL - 1 CAR - 9、CLL - 1 CAR - 10、CLL - 1 CAR - 11、CLL - 1 CAR - 12、CLL - 1 CAR - 13、181268または前述の配列のいずれかに実質的に同一な配列(例えば、95～99%同一であるかまたは最大5、4、3、2または1アミノ酸の変化、例えば置換(例えば、保存的置換))の、軽鎖可変領域からの1、2または3CDR(例えば、LCDR1、LCDR2および/またはLCDR3)を包含する。

30

40

【0248】

ある態様において、CLL - 1 CAR分子または抗CLL - 1抗原結合ドメインは、表5に示される、重鎖可変領域からの1、2または3CDR(例えば、HCDR1、HCDR2および/またはHCDR3)；および/または表6に示される、CLL - 1 CAR - 1、CLL - 1 CAR - 2、CLL - 1 CAR - 3、CLL - 1 CAR - 4、CLL - 1 CAR - 5、CLL - 1 CAR - 6、CL - L1 CAR - 7、CLL - 1 CAR - 8、CLL - 1 CAR - 9、CLL - 1 CAR - 10、CLL - 1 CAR - 11、CLL - 1 CAR - 12、CLL - 1 CAR - 13、181268または前述の配列のいずれかに実質的に同一な配列(例えば、95～99%同一であるかまたは最大5、4、3、2または1アミノ酸の変化、例えば置換(例えば、保存的置換))の、

50

軽鎖可変領域からの1、2または3 CDR (例えば、LCDR1、LCDR2および/またはLCDR3)を包含する。

【0249】

ある態様において、CLL-1 CAR分子または抗CLL-1抗原結合ドメインは、表7に示される、重鎖可変領域からの1、2または3 CDR (例えば、HCDR1、HCDR2および/またはHCDR3); および/または表8に示される、CLL-1 CAR-1、CLL-1 CAR-2、CLL-1 CAR-3、CLL-1 CAR-4、CLL-1 CAR-5、CLL-1 CAR-6、CL-L1 CAR-7、CLL-1 CAR-8、CLL-1 CAR-9、CLL-1 CAR-10、CLL-1 CAR-11、CLL-1 CAR-12、CLL-1 CAR-13、181268または前述の配列のいずれかに実質的に同一な配列(例えば、95~99%同一であるかまたは最大5、4、3、2または1アミノ酸の変化、例えば置換(例えば、保存的置換))の、軽鎖可変領域からの1、2または3 CDR (例えば、LCDR1、LCDR2および/またはLCDR3)を包含する。

10

【0250】

s c F vドメインのヒト化CDR配列の配列は、重鎖可変ドメインについては表3、5および7に、軽鎖可変ドメインについては表4、6および8に示される。「ID」は、各CDRのそれぞれの配列番号を意味する。

【0251】

表3および4に提示されているCDRは、Kabatによる番号付けスキームと、Chothiaによる番号付けスキームとの組合せに従う。

20

【表 1】

表 3 : 重鎖可変ドメインCDR

候補	HCDR1	ID	HCDR2	ID	HCDR3	ID
CLL-1 CAR 9	ANTFSDHVM H	125	YIHAANGGTHYSQK FQD	138	GGYNSDAFDI	151
CLL-1 CAR 6	GGSFSGYYWS	122	EINHSGSTNYNPSLK S	135	GSGLVVYAIRVGSWF DY	148
CLL-1 CAR 10	GFTFSSYSMN	126	YISSSSSTIYYADSVK G	139	DLSVRAIDAFDI	152
CLL-1 CAR 11	GFTFNSYGLH	127	LIEYDGSNKYYGDS VKG	140	EGNEDLAFDI	153
CLL-1 CAR 12	GFNVSSNYMT	128	VIYSGGATYYGDSV KG	141	DRLYCGNNCYLYYYG MDV	154
CLL-1 CAR 1	GGTFSSYAIS	117	GIPIFGTANYAQKF Q	130	DLEMATIMGGY	143
CLL-1 CAR 2	GFTFDDYAM H	118	LISGDGGSTYYADS VKG	131	VFDSYYMDV	144
CLL-1 CAR 3	GGSISSSYW G	119	SIYYSGSTYYNPSLK S	132	PGTYDYFLSGYYPFY	145
CLL-1 CAR 4	GFTFSSYWMS	120	NINEDGSAKFYVDS VKG	133	DLRSGRY	146
CLL-1 CAR 5	GGPVRSGSHY WN	121	YIYYSGSTNYNPSLE N	134	GTATFDWNFPFDS	147
CLL-1 CAR 7	GFTFSSYSMN	123	SISSSSYIYYADSVK G	136	DPSSSGSYMEDSYYYG MDV	149
CLL-1 CAR 8	GFTFSSYEMN	124	YISSSGSTIYYADSV KG	137	EALGSSWE	150
CLL-1 CAR 13	GYPFTGYIQ	129	WIDPNSGNTGYAQ KFQG	142	DSYGYYYGMDV	155
181268	GFTFSSYEMN	199	YISSSGSTIYYADSV KG	200	DPYSSSWHDAFDI	201

10

20

30

【 0 2 5 2 】

【表 2】

表 4：軽鎖可変ドメインCDR

候補	LCDR1	ID	LCDR2	ID	LCDR3	ID
CLL-1 CAR 9	RASQDISSWLA	164	AASSLQS	177	QQSYSTPLT	190
CLL-1 CAR 6	RASQSISSYLN	161	AASSLQS	174	QQSYSTPPWT	187
CLL-1 CAR 10	QASQDISNYLN	165	DASNLET	178	QQAYSTPFT	191
CLL-1 CAR 11	QASQFIKKNLN	166	DASSLQT	179	QQHDNLPLT	192
CLL-1 CAR 12	RASQSISSYLN	167	AASSLQS	180	QQSYSTPPLT	193
CLL-1 CAR 1	TGTSSDVGGYNYVS	156	DVSNRPS	169	SSYTSSSTLDV V	182
CLL-1 CAR 2	RSSQSLVYTDGNTYLN	157	KVSNRDS	170	MQGTHWSFT	183
CLL-1 CAR 3	RASQGISSYLA	158	AASTLQS	171	QQLNSYPYT	184
CLL-1 CAR 4	RASQSIGSFALA	159	GASSRAT	172	QQYGSSPPT	185
CLL-1 CAR 5	RASQSISSYLN	160	AASSLQS	173	QQSYSTPWT	186
CLL-1 CAR 7	TGSSGSIASNYVQ	162	EDNQRPS	175	QSYDSSNQVV	188
CLL-1 CAR 8	QASQDISNYLN	163	DASNLET	176	QQYDNLPLT	189
CLL-1 CAR 13	RASQGISSALA	168	DASSLES	181	QQFNNYPLT	194
181268	RASQSVSSSYLA	202	GASSRAT	203	QQYGSSPLT	204

10

20

【 0 2 5 3 】

【表 3】

表5：K a b a t 番号付けスキームによる重鎖可変ドメインCDR(Kabat et al. (1991), “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)

候補	HCDR1	ID	HCDR2	ID	HCDR3	ID
146259- CLL-1-CAR9	DHVMH	322	YIHAANGGTHYSQKF QD	336	GGYNSDAFDI	350
139119- CLL-1-CAR6	GYYSWS	319	EINHSGSTNYNPSLKS	333	GSGLVVYAIRVGSG WFDY	347
146261- CLL-1-CAR10	SYSMN	323	YISSSSSTIYYADSVKG	337	DLSVRAIDAFDI	351
146262- CLL-1-CAR11	SYGLH	324	LIEYDGSNKYYGDSVK G	338	EGNEDLAFDI	352
146263- CLL-1-CAR12	SNYMT	325	VIYSGGATYYGDSVKG	339	DRLYCGNNCYLYY YYGMDV	353
139115- CLL-1-CAR1	SYAIS	314	GIPIFGTANYAQKFQG	328	DLEMATIMGGY	342
139116- CLL-1-CAR2	DYAMH	315	LISGDGGSTYYADSVK G	329	VFDSYYMDV	343
139118- CLL-1-CAR3	SSSYWYG	316	SIYYSGSTYYNPSLKS	330	PGTYDFLSGYYPF Y	344
139122- CLL-1-CAR4	SYWMS	317	NINEDGSAKFYVDSVK G	331	DLRSGRY	345
139117- CLL-1-CAR5	SGSHYW N	318	YIYYSGSTNYNPSLEN	332	GTATFDWNFPFDS	346
139120- CLL-1-CAR7	SYSMN	320	SISSSSYIYYADSVKG	334	DPSSSGSYMEDSY YYGMDV	348
139121- CLL-1-CAR8	SYEMN	321	YISSSGSTIYYADSVKG	335	EALGSSWE	349
146264- CLL-1-CAR13	GYIIQ	326	WIDPNSGNTGYAQKF QG	340	DSYGYYYGMDV	354
181268	SYEMN	327	YISSSGSTIYYADSVKG	341	DPYSSSWHDAFDI	355

10

20

30

【 0 2 5 4 】

【表4】

表6：K a b a t 番号付けスキームによる軽鎖可変ドメインCDR(Kabat et al. (1991), “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)

候補	LCDRI	ID	LCDR2	ID	LCDR3	ID
146259- CLL-1-CAR9	RASQDISSWLA	364	AASSLQS	37 8	QQSYSTPLT	392
139119- CLL-1-CAR6	RASQSISSYLN	361	AASSLQS	37 5	QQSYSTPPWT	389
146261- CLL-1-CAR10	QASQDISNYLN	365	DASNLET	37 9	QQAYSTPFT	393
146262- CLL-1-CAR11	QASQFIKKNLN	366	DASSLQT	38 0	QQHDNLPLT	394
146263- CLL-1-CAR12	RASQSISSYLN	367	AASSLQS	38 1	QQSYSTPPLT	395
139115- CLL-1-CAR1	TGTSSDVGGYNYVS	356	DVSNRPS	37 0	SSYTSSSTLDVV	384
139116- CLL-1-CAR2	RSSQSLVYTDGNTYLN	357	KVSNRDS	37 1	MQGTHWSFT	385
139118- CLL-1-CAR3	RASQGISSYLA	358	AASTLQS	37 2	QQLNSYPYT	386
139122- CLL-1-CAR4	RASQSISGSFLA	359	GASSRAT	37 3	QQYGSSPPT	387
139117- CLL-1-CAR5	RASQSISSYLN	360	AASSLQS	37 4	QQSYSTPWT	388
139120- CLL-1-CAR7	TGSSGSIASNYVQ	362	EDNQRPS	37 6	QSYDSSNQVV	390
139121- CLL-1-CAR8	QASQDISNYLN	363	DASNLET	37 7	QQYDNLPLT	391
146264- CLL-1-CAR13	RASQGISSALA	368	DASSLES	38 2	QQFNNYPLT	396
181268	RASQSVSSSYLA	369	GASSRAT	38 3	QQYGSSPLT	397

10

20

30

【 0 2 5 5 】

【表 5】

表 7 : C h o t h i a 番号付けスキームによる重鎖可変ドメインCDR(AI-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948)

候補	HCDR1	ID	HCDR2	ID	HCDR3	ID
146259- CLL-1-CAR9	ANTFSDH	40 6	HAANGG	42 0	GGYNSDAFDI	4 3 4
139119- CLL-1-CAR6	GGSFSGY	40 3	NHSGS	41 7	GSGLVVYAIRVGSWFY	4 3 1
146261- CLL-1-CAR10	GFTFSSY	40 7	SSSSST	42 1	DLSVRAIDAFDI	4 3 5
146262- CLL-1-CAR11	GFTFNYSY	40 8	EYDGSN	42 2	EGNEDLAFDI	4 3 6
146263- CLL-1-CAR12	GFNVSSN	40 9	YSGGA	42 3	DRLYCGNNCYLYYYYGMDV	4 3 7
139115- CLL-1-CAR1	GGTFSSY	39 8	IPIFGT	41 2	DLEMATIMGGY	4 2 6
139116- CLL-1-CAR2	GFTFDY	39 9	SGDGGS	41 3	VFDSYYMDV	4 2 7
139118- CLL-1-CAR3	GGSISSSY	40 0	YYSGS	41 4	PGTYDFLSGYPPFY	4 2 8
139122- CLL-1-CAR4	GFTFSSY	40 1	NEDGSA	41 5	DLRSGRY	4 2 9
139117- CLL-1-CAR5	GGPVRSGSH	40 2	YYSGS	41 6	GTATFDWNFPFDS	4 3 0
139120- CLL-1-CAR7	GFTFSSY	40 4	SSSSSY	41 8	DPSSSGSYMEDSYYYGMDV	4 3 2
139121- CLL-1-CAR8	GFTFSSY	40 5	SSSGST	41 9	EALGSSWE	4 3 3
146264- CLL-1-CAR13	GYPFTGY	41 0	DPNSGN	42 4	DSYGYYYGMDV	4 3 8
181268	GFTFSSY	41	SSSGST	42	DPYSSSWHDAFDI	4

【 0 2 5 6 】

10

20

30

40

【表 6】

表 8 : C h o t h i a 番号付けスキームによる軽鎖可変ドメインCDR
(Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948)

候補	LCDRI	ID	LCDR2	ID	LCDR3	ID
146259- CLL-1-CAR9	SQDISSW	448	AAS	462	SYSTPL	476
139119- CLL-1-CAR6	SQSISSY	445	AAS	459	SYSTPPW	473
146261- CLL-1-CAR10	SQDISNY	449	DAS	463	AYSTPF	477
146262- CLL-1-CAR11	SQFIKKN	450	DAS	464	HDNLPL	478
146263- CLL-1-CAR12	SQSISSY	451	AAS	465	SYSTPPL	479
139115- CLL-1-CAR1	TSSDVGNY	440	DVS	454	YTSSSTLDV	468
139116- CLL-1-CAR2	SQSLVYTDGNTY	441	KVS	455	GTHWSF	469
139118- CLL-1-CAR3	SQGISSY	442	AAS	456	LNSYPY	470
139122- CLL-1-CAR4	SQSISGSF	443	GAS	457	YGSSPP	471
139117- CLL-1-CAR5	SQSISSY	444	AAS	458	SYSTPW	472
139120- CLL-1-CAR7	SSGSIASNY	446	EDN	460	YDSSNQV	474
139121- CLL-1-CAR8	SQDISNY	447	DAS	461	YDNLPL	475
146264- CLL-1-CAR13	SQGISSA	452	DAS	466	FNNYPL	480
181268	SQSVSSSY	453	GAS	467	YGSSPL	481

【 0 2 5 7 】

ある態様において、ここに記載されるCAR分子(例えば、CAR核酸またはCARポリペプチド)は、

(1)以下のうち1つから選択される1、2または3軽鎖(LC)CDR:

(i) CLL-1 CAR-1の配列番号156のLC CDR1、配列番号169のLC CDR2および配列番号182のLC CDR3;

(ii) CLL-1 CAR-2の配列番号157のLC CDR1、配列番号170のLC CDR2および配列番号183のLC CDR3;

(iii) CLL-1 CAR-3の配列番号158のLC CDR1、配列番号171のLC CDR2および配列番号184のLC CDR3;

(iv) CLL-1 CAR-4の配列番号159のLC CDR1、配列番号172のLC CDR2および配列番号185のLC CDR3;

(v) CLL-1 CAR-5の配列番号160のLC CDR1、配列番号173のLC CDR2および配列番号186のLC CDR3;

(vi) CLL-1 CAR-6の配列番号161のLC CDR1、配列番号174のLC CDR2および配列番号187のLC CDR3;

10

20

30

40

50

(vii) C L L - 1 C A R - 7の配列番号162のL C C D R 1、配列番号175のL C C D R 2および配列番号188のL C C D R 3；

(viii) C L L - 1 C A R - 8の配列番号163のL C C D R 1、配列番号176のL C C D R 2および配列番号189のL C C D R 3；もしくは

(ix) C L L - 1 C A R - 9の配列番号164のL C C D R 1、配列番号177のL C C D R 2および配列番号190のL C C D R 3；

(x) C L L - 1 C A R - 10の配列番号165のL C C D R 1、配列番号178のL C C D R 2および配列番号191のL C C D R 3；

(xi) C L L - 1 C A R - 11の配列番号166のL C C D R 1、配列番号179のL C C D R 2および配列番号192のL C C D R 3；

(xii) C L L - 1 C A R - 12の配列番号167のL C C D R 1、配列番号180のL C C D R 2および配列番号193のL C C D R 3；

(xiii) C L L - 1 C A R - 13の配列番号168のL C C D R 1、配列番号181のL C C D R 2および配列番号194のL C C D R 3；

(xiv) 181286の配列番号202のL C C D R 1、配列番号203のL C C D R 2および配列番号204のL C C D R 3；および/または

(2)以下：

(i) C L L - 1 C A R - 1の配列番号117のH C C D R 1、配列番号130のH C C D R 2および配列番号143のH C C D R 3；

(ii) C L L - 1 C A R - 2の配列番号118のH C C D R 1、配列番号131のH C C D R 2および配列番号144のH C C D R 3；

(iii) C L L - 1 C A R - 3の配列番号119のH C C D R 1、配列番号132のH C C D R 2および配列番号145のH C C D R 3；

(iv) C L L - 1 C A R - 4の配列番号120のH C C D R 1、配列番号133のH C C D R 2および配列番号146のH C C D R 3；

(v) C L L - 1 C A R - 5の配列番号121のH C C D R 1、配列番号134のH C C D R 2および配列番号147のH C C D R 3；

(vi) C L L - 1 C A R - 6の配列番号122のH C C D R 1、配列番号135のH C C D R 2および配列番号148のH C C D R 3；

(vii) C L L - 1 C A R - 7の配列番号123のH C C D R 1、配列番号136のH C C D R 2および配列番号149のH C C D R 3；

(viii) C L L - 1 C A R - 8の配列番号124のH C C D R 1、配列番号137のH C C D R 2および配列番号150のH C C D R 3；もしくは

(ix) C L L - 1 C A R - 9の配列番号125のH C C D R 1、配列番号138のH C C D R 2および配列番号151のH C C D R 3；

(x) C L L - 1 C A R - 10の配列番号126のH C C D R 1、配列番号139のH C C D R 2および配列番号152のH C C D R 3；

(xi) C L L - 1 C A R - 11の配列番号127のH C C D R 1、配列番号140のH C C D R 2および配列番号153のH C C D R 3；

(xii) C L L - 1 C A R - 12の配列番号128のH C C D R 1、配列番号141のH C C D R 2および配列番号154のH C C D R 3；

(xiii) C L L - 1 C A R - 13の配列番号129のH C C D R 1、配列番号142のH C C D R 2および配列番号155のH C C D R 3；

(xiv) 181286の配列番号199のH C C D R 1、配列番号200のH C C D R 2および配列番号201のH C C D R 3

の1つからの1、2または3重鎖(H C C D R)を含む。

【0258】

ある態様において、ここに記載されるC A R分子(例えば、C A R核酸またはC A Rポリペプチド)またはC L L - 1結合ドメインは、

(1)以下：

10

20

30

40

50

- (i) C L L - 1 C A R - 1 の配列番号 3 5 6 の L C C D R 1、配列番号 3 7 0 の L C C D R 2 および配列番号 3 8 4 の L C C D R 3 ;
- (ii) C L L - 1 C A R - 2 の配列番号 3 5 7 の L C C D R 1、配列番号 3 7 1 の L C C D R 2 および配列番号 3 8 5 の L C C D R 3 ;
- (iii) C L L - 1 C A R - 3 の配列番号 3 5 8 の L C C D R 1、配列番号 3 7 2 の L C C D R 2 および配列番号 3 8 6 の L C C D R 3 ;
- (iv) C L L - 1 C A R - 4 の配列番号 3 5 9 の L C C D R 1、配列番号 3 7 3 の L C C D R 2 および配列番号 3 8 7 の L C C D R 3 ;
- (v) C L L - 1 C A R - 5 の配列番号 3 6 0 の L C C D R 1、配列番号 3 7 4 の L C C D R 2 および配列番号 3 8 8 の L C C D R 3 ;
- (vi) C L L - 1 C A R - 6 の配列番号 3 6 1 の L C C D R 1、配列番号 3 7 5 の L C C D R 2 および配列番号 3 8 9 の L C C D R 3 ;
- (vii) C L L - 1 C A R - 7 の配列番号 3 6 2 の L C C D R 1、配列番号 3 7 6 の L C C D R 2 および配列番号 3 9 0 の L C C D R 3 ;
- (viii) C L L - 1 C A R - 8 の配列番号 3 6 3 の L C C D R 1、配列番号 3 7 7 の L C C D R 2 および配列番号 3 9 1 の L C C D R 3 ; もしくは
- (ix) C L L - 1 C A R - 9 の配列番号 3 6 4 の L C C D R 1、配列番号 3 7 8 の L C C D R 2 および配列番号 3 9 2 の L C C D R 3 ;
- (x) C L L - 1 C A R - 1 0 の配列番号 3 6 5 の L C C D R 1、配列番号 3 7 9 の L C C D R 2 および配列番号 3 9 3 の L C C D R 3 ;
- (xi) C L L - 1 C A R - 1 1 の配列番号 3 6 6 の L C C D R 1、配列番号 3 8 0 の L C C D R 2 および配列番号 3 9 4 の L C C D R 3 ;
- (xii) C L L - 1 C A R - 1 2 の配列番号 3 6 7 の L C C D R 1、配列番号 3 8 1 の L C C D R 2 および配列番号 3 9 5 の L C C D R 3 ;
- (xiii) C L L - 1 C A R - 1 3 の配列番号 3 6 8 の L C C D R 1、配列番号 3 8 2 の L C C D R 2 および配列番号 3 9 6 の L C C D R 3 ;
- (xiv) 1 8 1 2 8 6 の配列番号 3 6 9 の L C C D R 1、配列番号 3 8 3 の L C C D R 2 および配列番号 3 9 7 の L C C D R 3
- の 1 つから選択される、1、2 または 3 軽鎖 (L C) C D R ; および / または
- (2) 以下 :
- (i) C L L - 1 C A R - 1 の配列番号 3 1 4 の H C C D R 1、配列番号 3 2 8 の H C C D R 2 および配列番号 3 4 2 の H C C D R 3 ;
- (ii) C L L - 1 C A R - 2 の配列番号 3 1 5 の H C C D R 1、配列番号 3 2 9 の H C C D R 2 および配列番号 3 4 3 の H C C D R 3 ;
- (iii) C L L - 1 C A R - 3 の配列番号 3 1 6 の H C C D R 1、配列番号 3 3 0 の H C C D R 2 および配列番号 3 4 4 の H C C D R 3 ;
- (iv) C L L - 1 C A R - 4 の配列番号 3 1 7 の H C C D R 1、配列番号 3 3 1 の H C C D R 2 および配列番号 3 4 5 の H C C D R 3 ;
- (v) C L L - 1 C A R - 5 の配列番号 3 1 8 の H C C D R 1、配列番号 3 3 2 の H C C D R 2 および配列番号 3 4 6 の H C C D R 3 ;
- (vi) C L L - 1 C A R - 6 の配列番号 3 1 9 の H C C D R 1、配列番号 3 3 3 の H C C D R 2 および配列番号 3 4 7 の H C C D R 3 ;
- (vii) C L L - 1 C A R - 7 の配列番号 3 2 0 の H C C D R 1、配列番号 3 3 4 の H C C D R 2 および配列番号 3 4 8 の H C C D R 3 ;
- (viii) C L L - 1 C A R - 8 の配列番号 3 2 1 の H C C D R 1、配列番号 3 3 5 の H C C D R 2 および配列番号 3 4 9 の H C C D R 3 ; もしくは
- (ix) C L L - 1 C A R - 9 の配列番号 3 2 2 の H C C D R 1、配列番号 3 3 6 の H C C D R 2 および配列番号 3 5 0 の H C C D R 3 ;
- (x) C L L - 1 C A R - 1 0 の配列番号 3 2 3 の H C C D R 1、配列番号 3 3 7 の H C C D R 2 および配列番号 3 5 1 の H C C D R 3 ;

10

20

30

40

50

(xi) C L L - 1 C A R - 1 1 の配列番号 3 2 4 の H C C D R 1、配列番号 3 3 8 の H C C D R 2 および配列番号 3 5 2 の H C C D R 3 ;

(xii) C L L - 1 C A R - 1 2 の配列番号 3 2 5 の H C C D R 1、配列番号 3 3 9 の H C C D R 2 および配列番号 3 5 3 の H C C D R 3 ;

(xiii) C L L - 1 C A R - 1 3 の配列番号 3 2 6 の H C C D R 1、配列番号 3 4 0 の H C C D R 2 および配列番号 3 5 4 の H C C D R 3 ;

(xiv) 1 8 1 2 8 6 の配列番号 3 2 7 の H C C D R 1、配列番号 3 4 1 の H C C D R 2 および配列番号 3 5 5 の H C C D R 3 の 1 つからの 1、2 または 3 重鎖 (H C) C D R を含む。

【 0 2 5 9 】

ある態様において、ここに記載される C A R 分子 (例えば、C A R 核酸または C A R ポリペプチド) は、

(1) 以下 :

(i) C L L - 1 C A R - 1 の配列番号 4 4 0 の L C C D R 1、配列番号 4 5 4 の L C C D R 2 および配列番号 4 6 8 の L C C D R 3 ;

(ii) C L L - 1 C A R - 2 の配列番号 4 4 1 の L C C D R 1、配列番号 4 5 5 の L C C D R 2 および配列番号 4 6 9 の L C C D R 3 ;

(iii) C L L - 1 C A R - 3 の配列番号 4 4 2 の L C C D R 1、配列番号 4 5 6 の L C C D R 2 および配列番号 4 7 0 の L C C D R 3 ;

(iv) C L L - 1 C A R - 4 の配列番号 4 4 3 の L C C D R 1、配列番号 4 5 7 の L C C D R 2 および配列番号 4 7 1 の L C C D R 3 ;

(v) C L L - 1 C A R - 5 の配列番号 4 4 4 の L C C D R 1、配列番号 4 5 8 の L C C D R 2 および配列番号 4 7 2 の L C C D R 3 ;

(vi) C L L - 1 C A R - 6 の配列番号 4 4 5 の L C C D R 1、配列番号 4 5 9 の L C C D R 2 および配列番号 4 7 3 の L C C D R 3 ;

(vii) C L L - 1 C A R - 7 の配列番号 4 4 6 の L C C D R 1、配列番号 4 6 0 の L C C D R 2 および配列番号 4 7 4 の L C C D R 3 ;

(viii) C L L - 1 C A R - 8 の配列番号 4 4 7 の L C C D R 1、配列番号 4 6 1 の L C C D R 2 および配列番号 4 7 5 の L C C D R 3 ; もしくは

(ix) C L L - 1 C A R - 9 の配列番号 4 4 8 の L C C D R 1、配列番号 4 6 2 の L C C D R 2 および配列番号 4 7 6 の L C C D R 3 ;

(x) C L L - 1 C A R - 1 0 の配列番号 4 4 9 の L C C D R 1、配列番号 4 6 3 の L C C D R 2 および配列番号 4 7 7 の L C C D R 3 ;

(xi) C L L - 1 C A R - 1 1 の配列番号 4 5 0 の L C C D R 1、配列番号 4 6 4 の L C C D R 2 および配列番号 4 7 8 の L C C D R 3 ;

(xii) C L L - 1 C A R - 1 2 の配列番号 4 5 1 の L C C D R 1、配列番号 4 6 5 の L C C D R 2 および配列番号 4 7 9 の L C C D R 3 ;

(xiii) C L L - 1 C A R - 1 3 の配列番号 4 5 2 の L C C D R 1、配列番号 4 6 6 の L C C D R 2 および配列番号 4 8 0 の L C C D R 3 ;

(xiv) 1 8 1 2 8 6 の配列番号 4 5 3 の L C C D R 1、配列番号 4 6 7 の L C C D R 2 および配列番号 4 8 1 の L C C D R 3

の 1 つから選択される、1、2 または 3 重鎖 (L C) C D R ; および / または

(2) 以下 :

(i) C L L - 1 C A R - 1 の配列番号 3 9 8 の H C C D R 1、配列番号 4 1 2 の H C C D R 2 および配列番号 4 2 6 の H C C D R 3 ;

(ii) C L L - 1 C A R - 2 の配列番号 3 9 9 の H C C D R 1、配列番号 4 1 3 の H C C D R 2 および配列番号 4 2 7 の H C C D R 3 ;

(iii) C L L - 1 C A R - 3 の配列番号 4 0 0 の H C C D R 1、配列番号 4 1 4 の H C C D R 2 および配列番号 4 2 8 の H C C D R 3 ;

(iv) C L L - 1 C A R - 4 の配列番号 4 0 1 の H C C D R 1、配列番号 4 1 5 の H

10

20

30

40

50

C CDR2および配列番号429のHC CDR3 ;
 (v) CLL-1 CAR-5の配列番号402のHC CDR1、配列番号416のH
 C CDR2および配列番号430のHC CDR3 ;
 (vi) CLL-1 CAR-6の配列番号403のHC CDR1、配列番号417のH
 C CDR2および配列番号431のHC CDR3 ;
 (vii) CLL-1 CAR-7の配列番号404のHC CDR1、配列番号418の
 HC CDR2および配列番号432のHC CDR3 ;
 (viii) CLL-1 CAR-8の配列番号405のHC CDR1、配列番号419の
 HC CDR2および配列番号433のHC CDR3 ; もしくは
 (ix) CLL-1 CAR-9の配列番号406のHC CDR1、配列番号420のH 10
 C CDR2および配列番号434のHC CDR3 ;
 (x) CLL-1 CAR-10の配列番号407のHC CDR1、配列番号421の
 HC CDR2および配列番号435のHC CDR3 ;
 (xi) CLL-1 CAR-11の配列番号408のHC CDR1、配列番号422の
 HC CDR2および配列番号436のHC CDR3 ;
 (xii) CLL-1 CAR-12の配列番号409のHC CDR1、配列番号423
 のHC CDR2および配列番号437のHC CDR3 ;
 (xiii) CLL-1 CAR-13の配列番号410のHC CDR1、配列番号424
 のHC CDR2および配列番号438のHC CDR3 ;
 (xiv) 181286の配列番号411のHC CDR1、配列番号425のHC CD 20
 R2および配列番号439のHC CDR3
 の1つからの1、2または3重鎖(HC)CDRを含む。

【0260】

ある態様において、完全ヒト抗CLL-1単鎖可変フラグメントを生成し、4-1BB
 の細胞内CD3ゼータドメインおよび細胞内共刺激ドメインを有する、レンチウイルスC
 AR発現ベクターにクローニングする。例示的な完全ヒトCLL-1 scFvの名称を
 、表1に表示する。

【0261】

【表 7】

表 1 : CAR-CLL-1 構築物

構築物ID	通称
139115	CLL-1(またはCLL-1 CAR-1)
139116	CLL-2(またはCLL-1 CAR-2)
139117	CLL-3(またはCLL-1 CAR-3)
139118	CLL-4(またはCLL-1 CAR-4)
139119	CLL-5(またはCLL-1 CAR-5)
139120	CLL-6(またはCLL-1 CAR-6)
139121	CLL-7(またはCLL-1 CAR-7)
139122	CLL-8(またはCLL-1 CAR-8)
146259	CLL-9(またはCLL-1 CAR-9)
146261	CLL-10(またはCLL-1 CAR-10)
146262	CLL-11(またはCLL-1 CAR-11)
146263	CLL-12(またはCLL-1 CAR-12)
146264	CLL-13(またはCLL-1 CAR-13)

10

20

【 0 2 6 2 】

ある態様において、V LドメインおよびV Hドメインが、s c F vにおいて出現する順序は、変動し(すなわち、V L - V H配向性またはV H - V L配向性)、ここで、各サブユニットが、配列G G G G S (配列番号 2 5)を含む、「G 4 S」(配列番号 2 5)サブユニットの3つまたは4コピー[例えば、(G 4 S)₃(配列番号 2 8)または(G 4 S)₄(配列番号 2 7)]により、可変ドメインを接合して、表 2 に示されるs c F vドメインの全体を作り出す。

30

【 0 2 6 3 】

C L L - 1 s c F vドメインおよびC L L - 1 C A R分子のアミノ酸配列および核酸配列を、表 2 に提示する。各s c F vの可変重鎖および可変軽鎖のアミノ酸配列もまた、表 2 に提示する。リーダー配列(例えば、配列番号 1 のアミノ酸配列または配列番号 1 2 のヌクレオチド配列)を有するs c F vフラグメント(配列番号 3 9 ~ 5 1)もまた、本発明に包含されることが注目される。

40

【 0 2 6 4 】

リーダー(アミノ酸配列)(配列番号 1)

MALPVTALLLPLALLLHAARP

リーダー(核酸配列)(配列番号 1 2)

ATGGCCCTGCTGTGACAGCCCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTGCTGCATGCCGCTAGACCC

【 0 2 6 5 】

C D 8 ヒンジ(アミノ酸配列)(配列番号 2)

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

C D 8 ヒンジ(核酸配列)(配列番号 1 3)

ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGAGCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTG

50

CCGGCCAGCGGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGA

【 0 2 6 6 】

C D 8 膜貫通(アミノ酸配列)(配列番号 6)

IYIWAPLAGTCGVLLLLSLVITLYC

C D 8 膜貫通(核酸配列)(配列番号 1 7)

ATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTACTGC

【 0 2 6 7 】

4 - 1 B B 細胞内ドメイン(アミノ酸配列)(配列番号 7)

KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL

4 - 1 B B 細胞内ドメイン(核酸配列)(配列番号 1 8)

AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGG
CTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG

【 0 2 6 8 】

C D 2 8 細胞内ドメイン(アミノ酸配列)(配列番号 4 8 2)

RSKRSRLHSDYMMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS(配列番号 4 8 2)

C D 2 8 細胞内ドメイン(核酸配列)(配列番号 4 8 3)

AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGGCCACCCGCAAGCAT
TACCAGCCCTATGCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC(配列番号 4 8 3)

【 0 2 6 9 】

I C O S 細胞内ドメイン(アミノ酸配列)(配列番号 4 8 4)

T K K K Y S S S V H D P N G E Y M F M R A V N T A K K S R L T D V T L(配列番号
4 8 4)

I C O S 細胞内ドメイン(核酸配列)(配列番号 4 8 5)

ACAAAAAGAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGTGAATACATGTTTCATGAGAGCAGTGAACACAGCCAAAA
ATCCAGACTCACAGATGTGACCCTA(配列番号 4 8 5)

【 0 2 7 0 】

C D 3 ゼータドメイン(アミノ酸配列)(配列番号 9)

RVKFSRSADAPAYKQGQNLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGER
RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

C D 3 ゼータ(核酸配列)(配列番号 2 0)

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGG
ACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAAC
CTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGCGAGCCG
CGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCA
GGCCCTGCCCTCGC

【 0 2 7 1 】

C D 3 ゼータドメイン(アミノ酸配列 ; N C B I 参照配列 N M _ 0 0 0 7 3 4 . 3)(配列
番号 1 0)

RVKFSRSADAPAYQGGQNLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE IGMKGER
RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

C D 3 ゼータ(核酸配列 ; N C B I 参照配列 N M _ 0 0 0 7 3 4 . 3) ; (配列番号 2 1)

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAG
AACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTT
TGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGA
AGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGG
AGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGC
ACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGC
CCTTCACATGCAGGCCCTGCCCTCGC

【 0 2 7 2 】

I g G 4 ヒンジ(アミノ酸配列)(配列番号 3 6)

10

20

30

40

50

ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKM

【 0 2 7 3 】

I g G 4 ヒンジ(ヌクレオチド配列)(配列番号 3 7)

GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCCGAGTTCTGGGCGGACCCAGCGTGTTCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGGGAGGAGCAGTTCAATAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGTAAAGGTGTCCAA CAAGGGCCTGCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCC CCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTT CCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCC TGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG

【 0 2 7 4 】

ある態様において、これらのクローン(例えば、表 2 におけるクローン)は全て、C D 3 ゼータ鎖に由来する共刺激ドメインのシグナルドメインにおける Q / K 残基の変化を含有した。

【 0 2 7 5 】

【表 8】

表 2 : 抗 CLL-1 scFv ドメインおよび CLL-1 CAR 分子のアミノ酸配列および核酸配列

名称/説明	配列番号	配列
146259		
146259 (CLL-1 CAR9 の scFv ドメインのアミノ酸)	47	QVQLVQSGAEVKEPGASVKVSKAPANTFSDHVMHWVRQAPGQRFEFWNGYIHA ANGGTHYSQKFQDRVTITRDT SANTVYMDLSSLRSED TAVYYCARGGYN SDAF DIWQGQTMVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPSSVSASVGDVRT ITCRASQDISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFNGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIK
146259 (CLL-1 CAR9 の scFv ドメインのヌクレオチド)	60	CAAGTGCAACTCGTCCAGTCCGGTGCAGAAGTCAAGGAACCCGGAGCCTCCGT GAAAGTGTCTGCAAAGCTCCTGCCAACACTTTCTCGGACCACGTGATGCACT GGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGCGCTTCGAATGGATGGGATACATTCATGCC GCCAATGGCGGTACCCACTACTCCAAAAGTTCCAGGATAGAGTCACCATCAC CCGGGACACCAGCGCAAACACCGTGTATATGGATCTGTCCAGCCTGAGGTCCG AGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGGCGGATACAACACTCAGACCGTTC GACATTTGGGGACAGGGTACTATGGTCACCGTGTTCATCCGGGGCGGTGGCAG CGGGGGCGGAGGCTCTGGCGGAGGCGGATCAGGGGAGGAGGGTCCGACATCG TGATGACCCAGTCCCCGTCATCGGTGTCCGCGTCCGTGGGAGACAGAGTGACC ATCACGTGTGCGCCAGCCAGGACATCTCCTCGTGGTTGGCATGGTACCAGCA GAAGCCTGAAAAGGCCCGAAGCTGCTCATCTACGCCGCTCCTCCCTTCAAT CGGGAGTGCCTCGCGTTCAACGGAAGCGGAAGCGGGACAGATTTTACCCTG ACTATTAGCTCGCTGCAGCCGAGGACTTCGCTACTTACTACTGCCAACAGAG CTACTCCACCCACTGACTTTCGGCGGGGTACCAAGGTCGAGATCAAG
146259 (CLL-1 CAR9 の scFv の VH のアミノ酸)	73	QVQLVQSGAEVKEPGASVKVSKAPANTFSDHVMHWVRQAPGQRFEFWNGYIHA ANGGTHYSQKFQDRVTITRDT SANTVYMDLSSLRSED TAVYYCARGGYN SDAF DIWQGQTMVTVSS
146259 (CLL-1 CAR9 の scFv の VL のアミノ酸)	86	DIVMTQSPSSVSASVGDVRTITCRASQDISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASS LQSGVPSRFNGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEI K
146259 (CLL-1 CAR9 の全長 CAR のアミノ酸)	99	MALPVTALLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKEPGASVKVSKAPANTFSDH VMHWVRQAPGQRFEFWNGYIHAANGGTHYSQKFQDRVTITRDT SANTVYMDLSS LRSED TAVYYCARGGYN SDAF DIWQGQTMVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGG SDIVMTQSPSSVSASVGDVRTITCRASQDISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFNGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVE IKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAP LAGTCGVLLLSLVTLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EE EEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLRREEYDVLKRRGRDP EMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKD TYDALHMQUALPPR
146259 (CLL-1 CAR9 の全長 CAR のヌクレオチド)	112	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGC CGCTCGGCCCAAGTGAACCTCGTCCAGTCCGGTGCAGAAGTCAAGGAACCCG GAGCCTCCGTGAAAGTGTCTGCAAAGCTCCTGCCAACACTTTCTCGGACCAC GTGATGCACTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGCGCTTCGAATGGATGGGATA CATTCATGCCGCAATGGCGGTACCCACTACTCCAAAAGTTCCAGGATAGAG TCACCATCACCCGGGACACCAGCGCAAACACCGTGTATATGGATCTGTCCAGC CTGAGGTCCGAGGATACCGCGTGTACTACTGCGCCCGGGCGGATACAACCTC AGACCGTTCGACATTTGGGGACAGGGTACTATGGTCACCGTGTTCATCCGGGG GCGGTGGCAGCGGGGGCGGAGGCTCTGGCGGAGGCGGATCAGGGGGAGGAGGG TCCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCGTCATCGGTGTCCGCGTCCGTGGGAGA CAGAGTGACCATCACGTGTGCGCCAGCCAGGACATCTCCTCGTGGTTGGCAT

10

20

30

40

【表9】

		GGTACCAGCAGAAGCCTGGAAAGGCCCGAAGCTGCTCATCTACGCCGCTCC TCCCTCAATCGGGAGTGCCTCGCGTTCAACGGAAGCGGAAGCGGGACAGA TTTTACCCTGACTATTAGCTCGCTGCAGCCGAGGACTTCGCTACTTACTACT GCCAACAGAGCTACTCCACCCACTGACTTTCGGCGGGGTACCAAGGTCGAG ATCAAGACCACTACCCAGCACCGAGGCCACCCCGGCTCCTACCATCGC CTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCTGGTGGGG CCGTGCATACCCGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCT CTGGCTGGTACTTGGCGGGTCTGCTGCTTCACTCGTGATCACTCTTACTG TAAGCGGGTTCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCTTCATGAGGC CTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGGTTCAGAGGAG GAGGAAGCGGGTTCGGAAGTGCAGTCAAATTCAGCCGAGCGCAGATGCTCC AGCCTACAAGCAGGGGAGAACAGCTCTACAACGAACCTCAATCTTGGTCGGA GAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGC GGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCAAGAGGGCTGTACAACGAGCTCCAAAA GGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAA GAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCCGCCACCAAGGAC ACCTATGACGCTCTTACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG	10
139119			
139119 (CLL-1 C AR6のscFv ^h メイン のアミノ酸)	44	QVQLQESGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWVGEINH SGSTNYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGSLVYVAI RVGSGWFDYWGGTLVTVSSGGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD VTITCRASQSISSYLNWYQQKPKGKAPKLLMYAASSLQSGVPSRFSGSGSD TLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPWTFGQGTKVDIK	20
139119 (CLL-1 C AR6のscFv ^h メイン のヌレオチド)	57	CAAGTCAACTTCAAGAATCAGGCGCAGGACTTCTCAAGCCATCCGAAACACT CTCCCTCACTTGCAGCGGTGACGGGGAAAGCTTCTCGGGATACTACTGGTCCT GGATTAGCGAGCCTCCCGCAAAGGCCTGGAATGGGTGGGGAGATCAACCAC TCCGGTCAACCAACTACAACCCGTCGCTGAAGTCCCGGTGACCATTTCGGT GGACACCTCTAAGAATCAGTTCAGCCTGAAGCTCTCGTCCGTGACCGGGCGG ACACCGCGTCTACTACTGCGCTCGGGATCAGGACTGGTGGTGTACGCCATC CGCGTGGGCTCGGGCTGGTTCGATTACTGGGGCCAGGAACCTGGTCACTGT GTCGTCCGGCGGAGGAGGTTCCGGGGCGGAGACAGCGGTGGAGGGGGTAGCG ACATCCAGATGACCCAGTCCCGTCCCTCGCTGTCCGCTCCGTGGGAGATAGA GTGACCATCACCTGTCCGGCATCCCAGAGCATTTCCAGTCACTGAACTGGTA TCAGCAGAAGCCCGAAAGGCCCTAAGCTGTTGATGTACGCCCCAGCAGCT TGCAGTCGGGCGTCCGAGCCGGTTTTCCGGTTCGGCTCCGGGACTGACTTC ACCCTGACTATCTCATCCCTGCAACCCGAGGACTTCGCCACTATTACTGCCA GCAGTCTACTCAACCCTCCCTGGACGTTCCGACAGGGCACCAAGGTCGATA TCAAG	30
139119 (CLL-1 C AR6のscFvのVH のアミノ酸)	70	QVQLQESGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWVGEINH SGSTNYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGSLVYVAI RVGSGWFDYWGGTLVTVSS	
139119 (CLL-1 C AR6のscFvのVL のアミノ酸)	83	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKGKAPKLLMYAASS LQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPWTFGQGTKVD IK	40
139119 (CLL-1 C AR6の全長CARの アミノ酸)	96	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQESGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGY YWSWIRQPPGKGLEWVGEINHSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSV TAADTAVYYCARGSLVYVAIRVGSGWFDYWGGTLVTVSSGGGGSGGGSDG GGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKGKAPKLLMYA ASSLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPWTFGQGT KVDIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF	

【表 1 1】

146261 (CLL-1 C AR10の scFvの VH のアミノ酸)	74	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYSMNWVRQAPGK GLEWVSYISSSSTIYYADSVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARDLSVRAIDAFDIWQ QGMTVTVSS	
146261 (CLL-1 C AR10の scFvの VL のアミノ酸)	87	DIVLTQSPSSLSASVGD RVTITCQASQDISNYLNWYQ QKPGKAPKLLIYDASNL ETGVPSRFSGSGSGTDF TFTISSLQPEDFATYYCQ QAYSTPFTFGPGTKVEIK	
146261 (CLL-1 C AR10の全長CAR のアミノ酸)	100	MALPVTALLPLALLLHA ARPQVQLVQSGGGLVQPGG SLRLS CAASGFTFSSYS MNWVRQAPGKGLEWVSY ISSSSSTIYYADSVKGR FTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDLS VRAIDAFDIWQQGMTV TVSSGGGGSGGGGSGGG GGSDIVLTQSPSSLSAS VGD RVTITCQASQDISNYLN WYQ QKPGKAPKLLIYDASNL ETGVPSRFSGSGSGTDF TFTI SSLQPEDFATYYCQ QAYSTPFTFGPGTKVEIK TTPAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAG GAVHTRGLDFACDIYWA PLAGT CGVLLLSLVITLYCKR GRKLLYIFKQPFMRPVQT TQ EEDGCSCRFP EEEEEGGC ELRVKFSRSADAPAYK QGNQLY NELNLGRREEYDVL DKRRGRDPEMGGKPRR K NPQEGLYNELQKDKMA EAYSEI GMKGERRR GK GHDGLYQGLSTATK D TYDALHM QALPPR	10
146261 (CLL-1 C AR10の全長CAR のヌクレオチド)	113	ATGGCCCTCCCTGTCAC CGCCCTGCTGCTTCCGCT GGCTCCTTCTGCTCCAC GCCGCTCGGCCCAAGT GCAACTGTTCAATCCGG TGGAGGTCTTGTGCAG CCCCGGA GGATCACTCAGACTGT CGTGC CCCGCCTCTGGGTCACT TTCTCCTCATACTCG ATGA ACTGGGTGCGCCAGGC CGCGGAAAGGGCCTG GAATGGGTGCATACAT C TCCTCCTATCCTCCAC CATCT ACTACGCGGATTCCGT GAAGGGCCGCTTCACT ATTTCC CGGACAACGCGAAAA ACTCGCTCTATCTGCA AATGA ACTCCCTGCGCGCCG AGACAC CGCGTGTACTACTGCG CCCGGACCTGAGCGT GCGGGCTATTGATGCG TTCGACATCTGGGAC AGGGC ACCATGGTCACAGTGT CCAGC GGAGGC GGCGGCAGCGGTGG AGGAGGATCAGGGG GAGGAGGTT CGGGGGCGGTGGCTCC GATATCGT GCTGACCCAGAGCCG TCGAGCCTCTCGCCT CCGTCGGC GACAGAGTGACCATC ACGTGTCAGGCATCC CAGGACATTAGCAACT ACCTGA ATTGGTAC CAGCAGAAGCCTG GAAAGGCACCCAA GTTGCTGATCTACGAC CGCTCCA ACCTG GAAACCGGAGTGCC ATCCAGGTTCTCGGG CAGCGGCTCGGGA ACCGACTTCACTTT TACTATCTCCTCC CTGCAACCCGAGGAT TTCGCGACCTACTACT GCCAGCAGGCTACAG CACCCCTTTCACCT TCGGGCCGGAACTA AGGT CGAAATCAAGACC ACTACCCAGCACCG AGGCCACCCACCCG GCTCCTACCATCGC CTCCAGCCTCTGTCC CTGCGTCCGGAGGC ATGTAGACCCGCA GCTGGTGGGGCCGT GCATAACCGGGTCT TGACTTCGCCTGC GATATCTACATTTGG GGCCCTCTGGCTGG TACTTGCGGGTCTG CTGCTTTCACTCGT GATCACTCTTACTG TAAGCGCGGTCCG AAGAAGCTGCTGT ACATCTTAAGCAAC CCTTCATGAGGCCT GTGCAGACTACTCA AGAGGAGGACGGCT GTTCATGCCGGT TCCAGAGGAGGAGG AAGCGGCTGC GAACTGCGCGTGA AATTCAGCCGAGCG CAGATGCTCCAGC CTACAAGCAGGGG CAGAACCAGCTCT ACAACGAACTCAAT CTTGGTCGGAGAG AGGAGTACGACGTG CTGGACAAGCGG AGAGGACGGACCC CAGAAATGGGCGG GAAGCCGCGCAGAA AGAATCCCAAGAG GGCCTGTACAACG AGCTCCAAAAGG ATAAGATGGCAG AAGCC TATAGCGAGATT GGTATGAAAGGG GAACGCAGAA GAGGCAAAGGCC ACGACGGACTGT GATACCAGGGACT CAGCACCGCCAC CAAGGACACCTAT GACGCTTTCACAT G CAGGCCCTGCCG CTCGG	20
146262			30
146262 (CLL-1 C AR11の scFvト ^メ イ ソのアミノ酸)	49	EVQLVQSGGGVVRSGR SLRLS CAASGFTFNSYGLHW VRQAPGKGLEWVALIEY DGSNKYYGDSVKGR FTISRDKSKSTLYLQ MDNLR AEDTAVYYCAREGNED LAFDIWQQT LVTVSSGGGGSGGG SGGGGSEIVLTQSP SSLSASVGD RVTITCQASQFIKKNL NWYQ HKPGKAPKLLIYDAS SLQTGVPSRFSGNRS GTTFSFTISSLQPE DVATYYCQ QHDLPLTFGGG TKVEIK	40
146262 (CLL-1 C	62	GAAGTGAATTGGT GCAATCAGGAGGAGG AGTGGTCAGATCTG GAAGAAGCCT	

【表 1 2】

AR11のscFv ^{ト_h} メインのヌクレオチド ^{ト_h}		GAGACTGTCATGCGCGGCTTCGGGCTTTACCTTCAACTCCTACGGCCTCCACT GGGTGCGCCAGGCCCGGAAAAGGCCTCGAATGGGTGCGACTGATTGAGTAC GACGGGTCCAACAAGTACTACGGAGATAGCGTGAAGGGCCGCTCACCATCTC ACGGGACAAGTCCAAGTCCACCCTGTATCTGCAAATGGACAACCTGAGGGCCG AGGATACTGCCGTGTACTACTGCGCCCGGAAGGAAACGAAGATCTGGCCTTC GATATTTGGGGCCAGGGTACTCTTGTGACCGTGTGAGCGGAGGGCGGAGGCTC CGGTGGAGGAGGATCGGGGGTGGTGGTTCCGGCGGGGGGGAGCGAAATCG TGCTGACCCAGTCGCCTTCTCCCTCTCCGCTTCCGTGGGGGACCGGGTCACT ATTACGTGTCAGGCGTCCCAATTCATCAAGAAGAATCTGAACTGGTACCAGCA CAAGCCGGGAAAGGCCCCAAACTGCTCATCTACGACGCCAGCTCGCTGCAGA CTGGCGTGCCTTCCCGTTTTCCGGGAACCGGTGCGGAACCACTTCTCATT ACCATCAGCAGCCTCCAGCCGAGGACGTGGCGACCTACTACTGCCAGCAGCA TGACAACCTTCCACTGACTTTCGGCGGGGGACCAAGGTCGAGATTAAG	10
146262 (CLL-1 C AR11のscFvのVHのアミノ酸)	75	EVQLVQSGGGVVRSGRSLRLSCAASGFTFNSYGLHWVRQAPGKGLEWVALIEY DGSNKYYGDSVKGRFTISRDKSKSTLYLQMDNLAEDTAVYYCAREGNEDLAF DIWGQGLVTVSS	
146262 (CLL-1 C AR11のscFvのVLのアミノ酸)	88	EIVLTQSPSSLSASVGRVITTCQASQFIKKNLNWYQHKPGKAPKLLIYDASS LQTGVPSRFSGNRSGTTFSTISSLPEDVATYYCQQHDNPLPTFGGGTKVEI K	
146262 (CLL-1 C AR11の全長CARのアミノ酸)	101	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVQSGGGVVRSGRSLRLSCAASGFTFNSY GLHWVRQAPGKGLEWVALIEYDGSNKYYGDSVKGRFTISRDKSKSTLYLQMDN LRAEDTAVYYCAREGNEDLAFDIWGQGLVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGGG SEIVLTQSPSSLSASVGRVITTCQASQFIKKNLNWYQHKPGKAPKLLIYDAS SLQTGVPSRFSGNRSGTTFSTISSLPEDVATYYCQQHDNPLPTFGGGTKVE IKTTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAP LAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE EEGGCELRVKFSRSADAPAYKQQNQLYNELNLGRREYDVLDRRGRDPEMG GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKD TYDALHMQUALPPR	20
146262 (CLL-1 C AR11の全長CARのヌクレオチド ^{ト_h})	114	ATGGCCCTCCCTGTACCGCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGC CGCTCGGCCGAAGTGAATTGGTGAATCAGGAGGAGGAGTGGTCAGATCTG GAAGAAGCCTGAGACTGTCATGCGCGGCTTCGGGCTTTACCTTCAACTCCTAC GGCCTCCACTGGGTGCGCCAGGCCCGGAAAAGGCCTCGAATGGGTGCGACT GATTGAGTACGACGGGTCCAACAAGTACTACGGAGATAGCGTGAAGGGCCGCT TCACCATCTCACGGACAAGTCCAAGTCCACCCTGTATCTGCAAATGGACAAC CTGAGGGCCGAGGATACTGCCGTGTACTACTGCGCCCGGAAGGAAACGAAGA TCTGGCCTTCGATATTTGGGGCCAGGGTACTCTTGTGACCGTGTGAGCGGAG GCGGAGGCTCCGGTGGAGGAGATCGGGGGTGGTGGTTCCGGCGGCGGGGGG AGCGAAATCGTGCTGACCCAGTCGCCTTCTCCCTCTCCGCTTCCGTGGGGGA CCGGGTCACTATTACGTGTCAGGCGTCCCAATTCATCAAGAAGAATCTGAACT GGTACCAGCACAAGCCGGGAAAGGCCCCCAAACTGCTCATCTACGACGCCAGC TCGCTGCAGACTGGCGTGCCTTCCCGTTTTCCGGGAACCGGTGCGGAACCAC CTTCTCATTACCATCAGCAGCCTCCAGCCGAGGACGTGGCGACCTACTACT GCCAGCAGCATGACAACCTTCCACTGACTTTCGGCGGGGGACCAAGGTCGAG ATTAAGACCACTACCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGC CTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCTGGTGGGG CCGTGCATACCCGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCT CTGGCTGGTACTTGGGGGCTCTGCTGCTTCACTCGTGATCACTCTTACTG TAAGCGGGTGGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTAAGCAACCCCTTCATGAGGC CTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGGTTCAGAGGAG GAGGAAGCGGCTGCGAATGCGCGTGAATTCAGCCGAGCGCAGATGCTCC	30
			40

【表 1 3】

		AGCCTACAAGCAGGGGCGAACCAGCTCTACAACGAACCTCAATCTTGGTCGGA GAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCAGAAATGGGC GGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAA GGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAA GAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCCGCCACCAAGGAC ACCTATGACGCTCTTCACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG	
146263			
146263 (CLL-1 C AR12のscFvト [™] メイ ソのアミノ酸)	50	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNVSSNYMTWVRQAPGKGLEWVSVIYS GGATYYGDSVKGRFTVSRDNSKNTVYLQMNRLTAEDTAVYYCARDRLYCGNNC YLYYYYGMDVWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQVTQSPSSLS ASVGDVRTITCRASQSISSYLNWYQQKPKGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPLTFGQGTKVEIK	10
146263 (CLL-1 C AR12のscFvト [™] メイ ソのヌクレオチド [™])	63	CAAGTGCAACTCGTGAATCAGGCGGAGGACTCGTGCAACCCGAGGTTCCCT TAGACTGTCATGTGCCGCTCCGGTTCAATGTGTCCAGCAACTACATGACCT GGGTCAGACAGGCGCCGGAAAGGGACTTGAATGGGTGTCCGTGATCTACTCC GGTGGAGCAACATACTACGGAGACTCCGTGAAAGGCCGCTTACCCTGTCCCG CGATAACTCGAAGAACCCTGTACTTGCAGATGAACAGGCTGACTGCCGAGG ACACCGCCGTGATTATTGCGCCCGGACAGGCTGTACTGTGGAACAACCTGC TACCTGTACTACTACTACGGGATGGACGTGTGGGGACAGGGCACTCTCGTCAC TGTGTCATCCGGGGGGGGCGGTAGCGGTGGCGGAGGGTCCGGCGGAGGAGGCT CAGGGGAGGCGGAAGCGATATCCAGGTCACCCAGTCTCCCTCCTCGCTGTCC GCCTCCGTGGGCGACCGCGTCACCATTACTTGCCGGCGTCGCAGTCGATCAG CTCCTACCTGAAGTGGTACCAGCAGAAGCCTGAAAGGCCCGAAGCTGCTGA TCTACGCGCCTCGTCCCTGCAAAGCGCGTCCCGTCCGGTTTCAGCGGTTCC GGTTCGGGAACCGACTTACCCTGACTATTTCCCTCCCTGCAACCCGAGGATTT CGCCACTTACTACTGCCAGCAGTCTACTCCACCCACCTCTGACCTTCGGCC AAGGAACCAAGGTGCAAATCAAG	20
146263 (CLL-1 C AR12のscFvのVH のアミノ酸)	76	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNVSSNYMTWVRQAPGKGLEWVSVIYS GGATYYGDSVKGRFTVSRDNSKNTVYLQMNRLTAEDTAVYYCARDRLYCGNNC YLYYYYGMDVWGQGLTVTVSS	
146263 (CLL-1 C AR12のscFvのVL のアミノ酸)	89	DIQVTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQSISSYLNWYQQKPKGKAPKLLIYAASS LQSGVPSRFSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPLTFGQGTKVE IK	30
146263 (CLL-1 C AR12の全長CAR のアミノ酸)	102	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNVSSN YMTWVRQAPGKGLEWVSVIYSGGATYYGDSVKGRFTVSRDNSKNTVYLQMNRL TAEDTAVYYCARDRLYCGNNCYLYYYYGMDVWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSGGGSDIQVTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQSISSYLNWYQQKPKGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPL TFGQGTKVEIKTTTTAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDIYIWAPLAGTCVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLGRREYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKHDGLY QGLSTATKDYPDALHMQALPPR	
146263 (CLL-1 C AR12の全長CAR のヌクレオチド [™])	115	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCTGCTGCTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGC CGCTCGGCCCAAGTGAACCTCGTGAATCAGGCGGAGGACTCGTGCAACCCG GAGGTTCCCTTAGACTGTCATGTGCCGCTCCGGTTCAATGTGTCCAGCAAC TACATGACCTGGGTCAGACAGGCGCCGGAAAGGGACTTGAATGGGTGTCCGT GATCTACTCCGGTGGAGCAACATACTACGGAGACTCCGTGAAAGGCCGCTTA CCGTGTCCCGGATAACTCGAAGAACCCTGTACTTGCAGATGAACAGGCTG ACTGCCGAGGACACCGCGTATTATTGCGCCCGGACAGGCTGTACTGTGG AAACAACCTGCTACCTGTACTACTACTACGGGATGGACGTGTGGGGACAGGGCA	40

【表 1 4】

		CTCTCGTCACTGTGTCATCCGGGGGGGGCGGTAGCGGTGGCGGAGGGTCCGGC GGAGGAGGCTCAGGGGGAGGCGGAAGCGATATCCAGGTCACCCAGTCTCCCTC CTCGTGTCCGCCTCCGTGGGCGACCGCGTACCATTACTTGCCGGGGCGTCGC AGTCGATCAGCTCCTACCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCTGGAAAGGCCCG AAGCTGCTGATCTACGGCGCTCGTCCCTGCAAAGCGGCGTCCCGTCGCGGTT CAGCGGTTCCGGTTCGGGAACCGACTTACCCTGACTATTTCTCCCTGCAAC CCGAGGATTTCCGCACTTACTACTGCCAGCAGTCTACTCCACCCACCTCTG ACCTTCGGCCAAGGAACCAAGGTCGAAATCAAGACCACTACCCAGCACCGAG GCCACCCACCCCGGCTCTACCATCGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGG AGGCATGTAGACCCGAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTC GCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGTCTCTGCT GCTTCACTCGTGTACTCTTTACTGTAAGCGCGGTGGAAAGAAGCTGCTGT ACATCTTAAGCAACCCCTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGAC GGCTGTTGATGCCGTTCCAGAGGAGGAGGAAGCGGCTGCGAACTGCGCGT GAAATTCAGCCGAGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGAGAAACAGC TCTACAACGAACTCAATCTTGGTTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGTGGACAAG CGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCA AGAGGGCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAAGCCTATAGCG AGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTAC CAGGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGC CTGCCGCTCGG			
139115					
139115 (CLL-1 CAR1のscFv ^ト メインのアミノ酸)	39	EVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIP IFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDAVYYCARDLEMATIM GGYWGQGLTLTVSSGGGSGGGGSGGGGQSALTPASVSGSPGQSITISCTG TSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIDVSNRPSGVSNRFSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYCSSYTSSTLDVVFVGGGTKLTVL			10
139115 (CLL-1 CAR1のscFv ^ト メインのヌクレオチド)	52	GAAGTGAACCTCAACAGTCAGGCGCAGAAGTCAAGAAGCCCGGATCGTCAGT GAAAGTGTCTGCAAAGCCTCCGGCGGAACCTTCACTCCTACGCAATCAGCT GGGTGCGGCAGGCGCCCGACAGGGACTGGAGTGGATGGGCGGTATCATTCCG ATCTTTGGCACCGCAATTACGCCCAGAAGTCCAGGGACGCGTACAATCAC CGCCGACGAATCGACTTCCACCGCTACATGGAGCTGTCGTCCTTGAGGAGCG AAGATACCGCGTGTACTACTGCGCTCGGGATCTGGAGATGGCCACTATCATG GGGGTTACTGGGGCCAGGGGACCCTGGTCACTGTGTCTCGGGAGGAGGGGG ATCAGGCGGCGGGTTCGGGGGAGGAGGAAGCCAGTCCGCGCTGACTCAGC CAGCTTCCGTGTCTGGTTCGCCGGGACAGTCCATCACTATTAGCTGTACCGGC ACCAGCAGCGACGTGGGCGCTACAACATATGTGTATGGTACCAGCAGCACCC GGGGAAGGCGCTAAGCTGATGATCTACGACGTGTCCAACCGCCTAGCGGAG TGTC AACAGATTCTCCGGTTCGAAGTCAGGGAACACTGCCTCCCTCACGATT AGCGGGCTGCAAGCCGAGGATGAAGCCGACTACTACTGCTCCTCTATACTC CTCCTCGACCCTGGACGTGGTGTTCGGAGGAGGCACCAAGCTCACCGTCTT			30
139115 (CLL-1 CAR1のscFvのVHのアミノ酸)	65	EVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIP IFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDAVYYCARDLEMATIM GGYWGQGLTLTVSS			40
139115 (CLL-1 CAR1のscFvのVLのアミノ酸)	78	QSALTPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIDV SNRPSGVSNRFSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSTLDVVFVGGG TKLTVL			
139115 (CLL-1 CAR1の全長CARのアミノ酸)	91	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSS LRSEDAVYYCARDLEMATIMGGYWGQGLTLTVSSGGGSGGGGSGGGGQSAL TPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIDVSNR			

【表 16】

		CGGTCCCCGATCGGTTCTCGGGAAGCGGCAGCGACACCGACTTCACGCTGAAG ATTTCCCGCGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCATCTACTACTGTATGCAGGGCAC CCACTGGTCGTTTACCTTCGGACAAGGAACTAGGCTCGAGATCAAG	
139116 (CLL-1 C AR2の scFvの VH のアミノ酸)	66	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKLEWVSLISG DGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCARVFDSEYMD VWGKGTITVSS	
139116 (CLL-1 C AR2の scFvの VL のアミノ酸)	79	EIVLTQSPLSLPVTGQPASISCRSSQSLVYTDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLI YKVSNRDSGVPDRFSGSGSDTDFTLKISRVEAEDVGIYYCMQGTHWSFTFGQG TRLEIK	
139116 (CLL-1 C AR2の 全長CARの アミノ酸)	92	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFDDY AMHWVRQAPGKLEWVSLISG DGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRVEDTAVYYCARVFDSEYMDVWGKGTITVSSGGGGSGGGSGGGSEIVLT QSPLSLPVTGQPASISCRSSQSLVYTDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVS NRDSGVPDRFSGSGSDTDFTLKISRVEAEDVGIYYCMQGTHWSFTFGQGT RLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC RFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGR DPEMGGKPRRNPKQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKHGDL YQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	10
139116 (CLL-1 C AR2の 全長CARの ヌクレオチド)	105	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGC CGCTCGGCCCGAAGTGCAATTGGTGGAAAGCGGAGGAGAGTGGTGCAACCTG GAGGAAGCCTGAGACTGTCATGTGCCGCTCGGGATTCACTTTCGATGACTAC GCAATGCACTGGGTCCGCCAGGCCCGGAAAGGGTCTGGAATGGGTGTCCT CATCTCGGCGATGGGGTTCCACTTACTATGCGGATTCTGTGAAGGGCCGCT TCACAATCTCCGGGACAATTCGAAGAACTCTGTACCTTCAATGAACCTC CTGAGGGTGGAGGACACCGCTGTGTACTACTGCGGAGAGTGTGACTCGTA CTATATGGACGTCTGGGAAAGGGCACCACCGTGACCGTGCCAGCGGTGGCG GTGGATCGGGGGCGGGCTCCGGGAGCGGAGGTTCCGAGATTGTGCTGACT CAGTCGCCGTTGTCACTGCCTGTACCCCCGGGAGCCGGCTCCATTTTCATG CCGGTCCAGCCAGTCCCTGGTCTACACCGATGGGAACACTTACCTCAACTGGT TCCAGCAGCGCCAGGACAGTCCCCGGGAGGCTGATCTACAAAGTGCAAAC CGGGACTCCGGCGTCCCGATCGGTTCTCGGAAGCGGCAGCGACACCGACTT CACGCTGAAGATTTCCCGCGTGAAGCCGAGGACGTGGGCATCTACTACTGTA TGCAGGGCACCCACTGGTCGTTTACCTTCGGACAAGGAAGTGGCTCGAGATC AAGACCACTACCCAGCAGGAGCCACCCACCCGGCTCCTACCATCGCCTC CCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCTGGTGGGGCCG TGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCCTCTG GCTGGTACTTGCGGGTCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTACTGTAA GCGCGTCCGAAGAAGCTGCTGTACATCTTAAGCAACCCTCATGAGGCCTG TGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTCATGCCGTTCCAGAGGAGGAG GAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAATTCAGCCGAGCGCAGATGCTCCAGC CTACAAGCAGGGGCAGAACCAGCTCTACAACGAACCTCAATCTGGTCCGAGAG AGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGG AAGCCGCGCAGAAAGAATCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGA TAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGAGAAGAG GCAAAGGCCACGACGACTGTACCAGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACC TATGACGCTTTCACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG	20
			30
			40
139118			
139118 (CLL-1 C AR3の scFvトメイン のアミノ酸)	41	QVQLQESGPGLVKPSLETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKLEWIGSI YYSGSTYYNPSLKSRSISVDTSKNQFSLKLYVTAADTAVYYCATPGTYDF LSGYYPFYWQGTLTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPSSLSASVGDVR	

【表 17】

		TITCRASQGISSYLAWYQQKPKGKAPKLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPYTFGQGTKLEIK	
139118 (CLL-1 C AR3の scFv ^ト メインのヌクレオチド [*])	54	CAAGTGCAGCTTCAAGAAAAGCGGTCCAGGACTCGTCAAGCCATCAGAACTCTTCCCTCACTTGTACCGTGTGGGAGGCAGCATCTCCTCGAGCTCCTACTACTGGGGTTGGATTAGACAGCCCCGGGAAAAGGGGTTGGAGTGGATCGGTTCCATCTACTACTCCGGGTCGACCTACTACAACCCTTCCCTGAAATCTCGGGTGTCCATCTCCGTCGACACCTCCAAGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTGAAATATGTGACCGCGGCCGATACTGCCGTGTACTATTGCGCCACCCCGGAACCTACTACGACTTCTCTCGGGTACTACCCGTTTTACTGGGACAGGGGACTCTCGTGACCGTGTCTCGGGCGCGGAGGTTGAGCGGTGGCGGATCGGGGGAGGAGGCTCAGACATTGTGATGACCCAGAGCCCGTCCAGCCTGAGCGCCTCCGTGGGCGATAGGGTACGATTACTTGCCGGGCGTCCAGGGAATCTCAAGCTACCTGGCCTGGTACCAACAGAAGCCCGAAAAGGCACCCAAGTTGCTGATCTATGCCGCTAGCACTCTGCAGTCCGGGGTGCCTTCCCGCTTCTCCGGCTCCGGCTCGGGCACCAGACTTCACCCTGACCATTTCTCACTGCAACCCGAGGACTTCGCCACTTACTACTGCCAGCAGCTGAACTCCTACCCTTACACATTCGGACAGGGAACCAAGCTGAAATCAAG	10
139118 (CLL-1 C AR3の scFvの VHのアミノ酸)	67	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYSGSTYYNPSLKSRSVISVDTSKNQFSLKLYVTAADTAVYYCATPGTYDFLSGYPPFYWGQGLTVTVSS	
139118 (CLL-1 C AR3の scFvの VLのアミノ酸)	80	DIVMTQSPSSLSASVDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPKGKAPKLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPYTFGQGTKLEIK	20
139118 (CLL-1 C AR3の 全長CARのアミノ酸)	93	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYSGSTYYNPSLKSRSVISVDTSKNQFSLKLYVTAADTAVYYCATPGTYDFLSGYPPFYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIVMTQSPSSLSASVDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPKGKAPKLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPYTFGQGTKLEIKTIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR	30
139118 (CLL-1 C AR3の 全長CARのヌクレオチド [*])	106	ATGGCCCTCCCTGTACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGCGCTCGGCCCAAGTGCAGCTTCAAGAAAGCGGTCCAGGACTCGTCAAGCCATCAGAAACTCTTCCCTCACTTGTACCGTGTGGGAGGCAGCATCTCCTCGAGCTCCTACTACTGGGGTTGGATTAGACAGCCCCGGGAAAAGGGGTTGGAGTGGATCGGTTCCATCTACTACTCCGGTTCGACCTACTACAACCCTTCCCTGAAATCTCGGGTGTCCATCTCCGTCGACACCTCCAAGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTGAAATATGTGACCGCGGCCGATACTGCCGTGTACTATTGCGCCACCCCGGAACCTACTACGACTTCCCTCTCGGGTACTACCCGTTTTACTGGGGACAGGGGACTCTCGTGACCGTGTCTCGGGCGCGGAGGTTGAGCGGTGGCGGATCGGGGGAGGAGGCTCAGACATTGTGATGACCCAGAGCCCGTCCAGCCTGAGCGCCTCCGTGGGCGATAGGGTCACGATTACTTGCCGGCGTCCAGGGAATCTCAAGCTACCTGCCCTGGTACCAACAGAAGCCCGGAAAGGCACCCAAGTTGCTGATCTATGCCGCTAGCACTCTGCAGTCCGGGTGCCTTCCCGCTTCTCCGGCTCCGGCTCGGGCACGACTTCAACCCTGACCATTTCCCTCACTGCAACCCGAGGACTTCGCCACTTACTACTGCCAGCAGCTGAACTCCTACCCTTACACATTCGGACAGGGAACCAAGCTGAAATCAAGACCACTACCCAGCACCAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCTGGTGGGCGGTGCATACCCGGGTCTTGACTTCGCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGGGGTCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTA	40

【表 18】

		CTGTAAGCGGGTCCGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCTTCATGAGGCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGGTCCCAGAGGAGGAGGAAGCGGGCTGCGAACTGCGCGTGAAATTCAGCCGACGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCGAACCAGCTCTACAACGAACCTAATCTTGGTGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGCGGGAAAGCCGCGCAGAAAAGAAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCA AAAGGATAAGATGGCAGAAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAAGGGGAACGCA GAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCCACCAAG GACACCTATGACGCTCTTCACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG	
139122			10
139122 (CLL-1 CAR4のscFv ^ト メインのアミノ酸)	42	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANINE DGS AKFYVDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDLRSGRYW GQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGSEIVLTQSPGTLSPGGRATLSCRASQSI SG SFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQQYGSSPPTFGLGKLEIK	
139122 (CLL-1 CAR4のscFv ^ト メインのヌレオチド ^ト)	55	CAAGTGCAACTCGTGGAATCTGGTGGAGGACTCGTGCAACCCGGAGGATCATT GCGACTCTCGTGTGCGGCATCCGGCTTTACCTTTTCATCTACTGGATGTCCT GGGTCAGACAGGCCCGGGAAGGGACTGGAATGGGTGCGCAACATCAACGAG GACGGCTCGGCCAAGTTCTACGTGGACTCCGTGAAGGGCCGCTTACGATCTC ACGGGATAACGCCAAGAATTCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGGGCCG AGGACTGCGGTGTACTTCTGCGCACGACCTGAGGTCCGGGAGATACTGG GGACAGGGCACCTCGTGACCGTGTGAGCGGAGGAGGGGGTCCGGCGCGG CGGTTCCGGTGGCGCGGTAGCGAAATTGTGTTGACCCAGTCCCTGGAACCC TGAGCCTGTACCTGGAGGACGCGCCACCCTGTCTGCGGGCCAGCCAGAGC ATCTCAGGGTCTTCTGGCTTGGTACCAGCAGAAGCCGGGACAGGCTCCGAG ACTTCTGATCTACGGCGCTCCTCGCGGGCGACCGGAATCCCGGATCGGTTCT CCGGCTCGGGAAGCGGAACTGACTTCACTTTACCATTCCCGCTGGAGCCG GAAGATTCGCCGTGACTACTGCCAGCAGTACGGGTCATCCCTCCAACCTT CGGCCTGGAACTAAGCTGGAATCAAA	20
139122 (CLL-1 CAR4のscFvのVHのアミノ酸)	68	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANINE DGS AKFYVDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYFCARDLRSGRYW GQGT LVTVSS	
139122 (CLL-1 CAR4のscFvのVLのアミノ酸)	81	EIVLTQSPGTLSPGGRATLSCRASQSI SG SFLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPPTFGLGKLE IK	30
139122 (CLL-1 CAR4の全長CARのアミノ酸)	94	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY WMSWVRQAPGKGLEWVANINEDGS AKFYVDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMN S LRAEDTAVYFCARDLRSGRYW GQGT LVTVSSGGGGSGGGGSEIVLTQS PGTLSLSPGGRATLSCRASQSI SG SFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPPTFGLGKLEIKTTTPA PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGV LLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLRREEYDVLKRRGRDPEMGGKPRRKN PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR	40
139122 (CLL-1 CAR4の全長CARのヌレオチド ^ト)	107	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCCTGCTGCTTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGC CGCTCGGCCCAAGTGCAACTCGTGGAATCTGGTGGAGGACTCGTGCAACCCG GAGGATCATTGCGACTCTCGTGTGCGGCATCCGGCTTTACCTTTTCATCCTAC TGGATGTCCTGGGTCAGACAGGCCCGGGAAGGGACTGGAATGGGTCGCGAA CATCAACGAGGACGGCTCGGCCAAGTTCTACGTGGACTCCGTGAAGGGCCGCT TCACGATCTACGGGATAACGCCAAGAATTCCTGTATCTGCAAATGAACAGC	

【表 19】

		CTGAGGGCCGAGGACACTGCGGTGTA CTTCTGCGCACGCGACTGAGGTCCGG GAGATACTGGGGACAGGGCACCTCGT GACCGTGTGAGCGGAGGAGGGGGT CGGGCGGGCGGTTCCGGTGGCGGCGG TAGCGAAATTGTGTGACCCAGTCC CCTGGAACCTGAGCCTGTACCTGGAGG ACGCGCCACCCTGTCTGCCGGGC CAGCCAGAGCATCTCAGGGTCCTTCT GGCTTGGTACCAGCAGAAGCCGGGAC AGGCTCCGAGACTTCTGATCTACGGCG CCTCCTCGGGGCGACCGGAATCCCG GATCGGTTCTCCGGCTCGGGAAGCGGA ACTGACTTACTCTTACCATTTCCCG CCTGGAGCCGGAAGATTTCCGCGTGT ACTACTGCCAGCAGTACGGGTCATCCC CTCCAACCTTCGGCCTGGGAACTAAG CTGAAATCAAAACCACTACCCCAGCA CCGAGGCCACCCACCCCGCTCTACCAT CGCCTCCCAGCCTCTGTCCCTGCG TCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCTGGT GGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTG ACTTCGCTGCGATATCTACATTTGGG CCCCTCTGGCTGGTACTTGGCGGGTC CTGCTGCTTCTACTCGTGACTCTTTA CTGTAAGCGCGGTGCGAAGAAGCT GCTGTACATCTTTAAGCAACCCTTCA TGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAG GAGGACGGCTGTTTCATGCCGGTTC CCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCG AACTGCGCGTAAAATTCAGCCGACG CGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAG GGGCAGAACAGCTCTACAACGAAC TCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGT ACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGG ACCGGACCCAGAAATGGGCGGAAG CCGCGCAGAAAGAAATCCCCAAGAG GGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAG GATAAGATGGCAGAAGCCTAGCGA GATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGA AGAGGCAAAGGCCACGACGGACT GACACCGCCACCAAGGACACCTAT GACGCTTTCACATGACGGCCTGCC CGCTCGG			
139117					
139117 (CLL-1 CAR5のscFvトメインのアミノ酸)	43	EVQLQQSGPGLVRPSETLSLTCTVSGGPVRS SHYWNWIRQPPGRGLEWIGYI YYSGSTNYNPSLENRVTISIDTSNNHFL KLSVTAADTALYFCARGTATFDW NFPFDSWGQGLVTVSSGGGGSGGGSG SDIQMTQSPSSLSASIGDRVITCRASQ SISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQSYSTPWFQGGTKLEIK		10	
139117 (CLL-1 CAR5のscFvトメインのヌクレオチド)	56	GAAGTGCAACTCCAACAATCCGGTCCAGG ACTCGTCAGACCCTCCGAACTCTCTCG CTTACATGCACTGTGTCCGGCGGCCCT GTGCGGTCGGCTCTCATTACTGGAAC TGGATTCCGCCAGCCCCGGGACGCGG ACTGGAGTGGATCGGCTACATCTATTA CTCGGGTTCGACTAACTACAACCCGAG CCTGGAAAAATAGAGTGACCATCTCA ATCGACACGTCCAACAACCACTTCTCG CTGAAAGTTGCTCCTCCGTGACTGCC CGCGATACTGCCCTGTACTTCTGTGCT CGCGGAACCGCCACCTTCGACTGGA ACTTCCCTTTTACTCATGGGGCCAGGG GACCCTTGTGACCGTGTCCAGCGGAG GAGGAGGCTCCGGTGGTGGCGGGAG CGGTAGCGGCGGAAGCGACATCCAGA TGACCCAGTCACCGTCTCGCTGTCCG CATCCATTGGGGATCGGGTCACTATT ACTTCCGGGCGTCCCAGTCCATCTCGT CCTACCTGAACTGGTATCAGCAGAA GCCAGGAAAGCCCCAAGCTGCTGATCT ACGCGGCCAGCAGCCTGCAGTCAGG AGTGCCTTCAAGGTTTAGCGGCAGCG GATCGGGAACCGACTTACCCTGACC ATTTCTCCCTCCAACCCGAGGATTT CGCCACCTACTACTGCCAGCAGTCT CTCCACCCCGTGACCTTCGGACAGG GAACCAAGCTGGAGATCAAG		20	
139117 (CLL-1 CAR5のscFvのVHのアミノ酸)	69	EVQLQQSGPGLVRPSETLSLTCTVSGGPVRS SHYWNWIRQPPGRGLEWIGYI YYSGSTNYNPSLENRVTISIDTSNNHFL KLSVTAADTALYFCARGTATFDW NFPFDSWGQGLVTVSS		30	
139117 (CLL-1 CAR5のscFvのVLのアミノ酸)	82	DIQMTQSPSSLSASIGDRVITCRASQSISS YLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYY CQQSYSTPWFQGGTKLEIK		40	
139117 (CLL-1 CAR5の全長CARのアミノ酸)	95	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLQQSGP GLVRPSETLSLTCTVSGGPVRS SHYWNWIRQPPGRGLEWIGYI YYSGSTNYNPSLENRVTISIDTSNNHFL KLSVTAADTALYFCARGTATFDW NFPFDSWGQGLVTVSSGGGGSGGG SGSGGS			

【表 2 1】

		CGTGCAGTGGTACCAGCAGCGCCCGGCAGCGCCCCACCACTGTCATCTACG AGGATAACCAGCGGCCGTCGGGTGTCCCAGACCGTTTTCCGGTTCGATCGAT AGCAGCAGCAACAGCGCCTCCCTGACCATTTCCGGCCTCAAGACCGAGGATGA GGCTGACTACTACTGCCAGTCGTATGACTCCTCGAACCAAGTGGTGTTCGGTG GCGGCACCAAGCTGACTGTGCTG	
139120 (CLL-1 C AR7の scFvの VH のアミノ酸)	71	EVQLVESGGGLV KPGGSLRLS CAASGFTFSSYS MNWVRQAPGKGLEWVSSISS SSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPSSSGSY YMEDSYYYGMDVWGQGT VTVSS	
139120 (CLL-1 C AR7の scFvの VL のアミノ酸)	84	NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTGSSGSIASNYVQWYQQRPGSAPTTVIYEDN QRPSGVPDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSNQVVFGGGT KLTVL	10
139120 (CLL-1 C AR7の全長CARの アミノ酸)	97	MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLV KPGGSLRLS CAASGFTFSSY SMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDPSSSGSYMEDSYYYGMDVWGQGT VTVSSGGGGSGGGG SGGGGSNFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTGSSGSIASNYVQWYQQRPGSAPTT VIYEDNQRPSGVPDRFSGSIDSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSNQV VFGGGKLTVLTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEED GCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLY QGLSTATKDYDALHMQUALPPR	20
139120 (CLL-1 C AR7の全長CARの ヌクレオチド)	110	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCTGCTGCTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGC CGCTCGGCCCGAAGTGCAATTGGTGAATCTGGAGGAGGACTTGTGAAACCTG GTGGAAGCCTGAGACTTTCCTGTGCGGCCTCGGGATTCATTTCTCCTCCTAC TCCATGAACTGGGTGACAGGCCCTGGGAAGGGACTGGAATGGGTGTCATC CATCTCCTCCTCATCGTCGTACATCTACTACGCCGATAGCGTGAAGGGCGGT TCACCATTTCCCGGACAACGCTAAGAACAGCCTCTATCTGCAAAATGAATTCC CTCCGCGCCGAGGACTGCGGTGACTACTGCGGAGGGACCCCTCATCAAG CGGCAGCTACTACATGGAGGACTCGTATTACTACGGAATGGACGTCTGGGGCC AGGGAACCACTGTGACGGTGTCTCCGGTGGAGGGGGCTCCGGGGCGGGGGA TCTGGCGGAGGAGGCTCCAACCTCATGCTGACCCAGCCGCACTCCGTGTCCGA AAGCCCCGAAAGACCGTGACAATTTCTGCACCGGGTCTCCGGCTCGATCG CATCAAACCTACGTGCAGTGGTACCAGCAGCGCCCGGGCAGCGCCCCACCACT GTCATCTACGAGGATAACCAGCGCCGTCGGGTGTCCCAGACCGGTTTTCCGG TTCGATCGATAGCAGCAGCAACAGCGCCTCCCTGACCATTTCCGGCCTCAAGA CCGAGGATGAGGCTGACTACTACTGCCAGTCGTATGACTCCTCGAACCAAGTG GTGTTCCGGTGGCGGCACCAAGCTGACTGTGCTGACCACTACCCAGCACCGAG GCCACCCACCCCGGCTCTACCATCGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGG AGGCATGTAGACCCGACGTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGTCTTGACTTC GCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGGGGGTCTGCT GCTTTCACTCGTGATCACTCTTTACTGTAAGCGGGTCCGGAAGAAGCTGCTGT ACATCTTAAGCAACCTTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGAC GGCTGTTCATGCCGTTCCAGAGGAGGAGGAAGCGGGTGCAGAACTGCGCGT GAAATTCAGCCGAGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAACCAGC TCTACAACGAACTCAATCTTGGTCCGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAG CGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCA AGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCG AGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTAC CAGGGACTCAGACCCGCCAACCAAGGACACCTATGACGCTCTTACATGCAGGC CCTGCCGCTCGG	30
139121			40

【表 2 2】

139121 (CLL-1 C AR8の scFv ^ト メインのアミノ酸)	46	QVNLRESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYEMNWVRQAPGKGLEWVSYISS SGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREALGSSWE WGQGT ^ト TVVSSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD ^ト RVTITCQASQ DISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDF ^ト TFTISSLQP EDIATYYCQQYDNLPLTFGGGKLEIK
139121 (CLL-1 C AR8の scFv ^ト メインのヌレオチド ^ト)	59	CAAGTGAACCTGAGAGAAAGCGGCGGAGGACTTGTGCAACCTGGAGGAAGCCT GAGACTGTCATGTGCCGCGTCCGGCTTACCTTCTCGTCCTACGAGATGAACT GGGTCCGCCAGGCACCGGGCAAAGGACTGGAATGGGTGTCCTACATTTCTCG TCCGGGTCCACCATCTATTACGCCGACTCCGTGAAGGGACGGTTCACCATCTC CCGGGACAACGCCAAGAACTCCCTCTACCTCAAATGAACTCACTGAGGGCAG AGGACACTGCGGTCTACTACTGCGCCCGGAAGCTTTGGGTAGCTCCTGGGAG TGGGGCCAGGAACCACTGTGACCGTGTCTCGGTGGAGGGGGCTCCGGTGG CGGGGGTTCAGGGGGTGGCGGAAGCGATATCCAGATGACTCAGTCACCAAGCT CCCTGAGCGCCTCAGTGGGAGATCGGGTACAATCACGTGCCAGGCGTCCCAG GACATTTCTAACTACCTCAATTGGTACCAGCAGAAGCCGGGAAGCCCCCAA GCTTCTGATCTACGATGCCTCCAACCTGAAAACCGGCGTGCCTCCCGCTTCT CGGGATCGGGCAGCGGCACTGACTTACCTTTACCATCTCGTCCCTGCAACCT GAGGACATCGCCACCTATTACTGCCAGCAGTACGATAACCTCCCGCTGACTTT CGGAGGCGGAAC ^ト TAAGCTGGAGATTAAG
139121 (CLL-1 C AR8の scFv ^ト の VHのアミノ酸)	72	QVNLRESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYEMNWVRQAPGKGLEWVSYISS SGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREALGSSWE WGQGT ^ト TVVSS
139121 (CLL-1 C AR8の scFv ^ト の VLのアミノ酸)	85	DIQMTQSPSSLSASVGD ^ト RVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASN LETGVPSRFSGSGSGTDF ^ト TFTISSLQPEDIATYYCQQYDNLPLTFGGGKLEIK
139121 (CLL-1 C AR8の 全長CARのアミノ酸)	98	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVNLRESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY EMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNS LRAEDTAVYYCAREALGSSWEWGQGT ^ト TVVSSGGGGSGGGGSDIQMTQ SPSSLSASVGD ^ト RVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGV PSRFSGSGSGTDF ^ト TFTISSLQPEDIATYYCQQYDNLPLTFGGGKLEIKTTTPA PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGV LLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRN PQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHM QALPPR
139121 (CLL-1 C AR8の 全長CARのヌレオチド ^ト)	111	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCTGCTGCTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGC CGCTCGGCCCAAGTGAACCTGAGAGAAAGCGGCGGAGGACTTGTGCAACCTG GAGGAAGCCTGAGACTGTCATGTGCCGCGTCCGGCTTACCTTCTCGTCCTAC GAGATGAACTGGGTCCGCCAGGCACCGGGCAAAGGACTGGAATGGGTGTCCTA CATTTCTCGTCCGGGTCCACCATCTATTACGCCGACTCCGTGAAGGGACGGT TCACCATCTCCGGGACAACGCCAAGAACTCCCTCTACCTCAAATGAACTCA CTGAGGGCAGAGGACACTGCGGTCTACTACTGCGCCCGGAAGCTTTGGGTAG CTCCTGGGAGTGGGGCCAGGAACCACTGTGACCGTGTCTCGGTGGAGGGG GCTCCGGTGGCGGGGGTTCAGGGGGTGGCGGAAGCGATATCCAGATGACTCAG TCACCAAGCTCCCTGAGCGCTCAGTGGGAGATCGGGTACAATCACGTGCCA GGGCTCCAGGACATTTCTAACTACCTCAATTGGTACCAGCAGAAGCCGGGGA AGGCCCAAGCTTCTGATCTACGATGCCTCCAACCTGAAAACCGGCGTGGCC TCCCGCTTCTCGGGATCGGGCAGCGGCACTGACTTACCTTTACCATCTCGTC CCTGCAACCTGAGGACATCGCCACCTATTACTGCCAGCAGTACGATAACCTCC CGCTGACTTTTCGGAGGCGGAAC ^ト TAAGCTGGAGATTAAGACCACTACCCCAGCA CCGAGGCCACCCACCCCGCTCCTACCATCGCTCCAGCCTCTGTCCCTGGC

10

20

30

40

【表 2 3】

		TCCGGAGGCATGTAGACCCGCAGCTGGTGGGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTG ACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTGGCTGGTACTTGCGGGGTC CTGCTGCTTTCCTACTCGTATCACTCTTTACTGTAAGCGCGGTGCGAAGAAGCT GCTGTACATCTTTAAGCAACCCCTTCATGAGGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGG AGGACGGCTGTTTCATGCCGGTCCCAGAGGAGGAGGAAGGCGGCTGCGAACTG CGCGTAAAATTCAGCCGCAGCGCAGATGCTCCAGCCTACAAGCAGGGGCAGAA CCAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGGTCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGG ACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAAT CCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTA TAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAGGCAAAGGCCACGACGGAC TGTACCAGGGACTCAGCACCGCCACCAAGGACACCTATGACGCTCTTCACATG CAGGCCCTGCCGCTCGG	10
146264			
146264-(CLL-1 CAR13のscFvト ^メ インのアミノ酸)	51	QVQLVQSGAEVKKSGASVKVSKASGYPFTGYYIQWVRQAPGGLEWMGWIDP NSGNTGYAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCASDSYGYYYG MDVWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD RVTFTCRASQGISSALAWYQQKPKPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDF LTISSLQPEDFATYYCQQFNLYPLTFGGGTKVEIK	
146264 (CLL-1 CAR13のscFvト ^メ インのヌレオト ^メ)	64	CAAGTGCAACTCGTCCAGTCCGGTGCAGAAGTAAAAAGAGCGGAGCCTCAGT GAAAGTGTCTGCAAGGCCTCCGGTACCCTTCACTGGATACTACATTCAGT GGGTCCGCAAGCCCGGGACAGGGTCTGGAGTGGATGGGGTGGATTGACCCT AACTCGGGAATACGGGATACGCGCAGAAGTCCAGGGCCGCGTGACCATGAC CAGGAACACCTCGATCAGCACCGCCTACATGGAAGTGTCTCCCTGCGGTCCG AGGATACTGCCGTGTACTACTGCGCCTCCGATTCTATGGGTACTACTACGGA ATGGACGTCTGGGACAGGGCACCTCGTGACCGTGTCTCGGGAGGCGGAGG GAGCGGCGGGGTGGATCGGGAGGAGCGGCTCCGGCGGCGCGGTAGCGACA TCCAGATGACCCAGTCAACATCAAGCCTTAGCGCCTCCGTGGGCGACAGAGTG ACATTCACTTGTCCGGCGTCCAGGGAATCTCCTCCGCTCTGGCTTGGTATCA GCAGAAGCCTGGGAAGCCTCCGAAGCTGTTGATCTACGACGCGAGCAGCCTGG AATCAGGGGTGCCCTCCCGGTTTTCCGGGTCCGGTCTGGCACCGATTTCACC CTGACCATTTCTGTCCTCAACCCGAGGACTTCGCCACTTACTACTGCCAGCA GTTCAACAACCTACCCGCTGACCTTCGGAGGAGGCACTAAGTGCAGATCAAG	20
146264 (CLL-1 CAR13のscFvのVHのアミノ酸)	77	QVQLVQSGAEVKKSGASVKVSKASGYPFTGYYIQWVRQAPGGLEWMGWIDP NSGNTGYAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCASDSYGYYYG MDVWGQGLVTVSS	30
146264 (CLL-1 CAR13のscFvのVLのアミノ酸)	90	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTFTCRASQGISSALAWYQQKPKPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDF LTISSLQPEDFATYYCQQFNLYPLTFGGGTKVEIK	
146264 (CLL-1 CAR13の全長CARのアミノ酸)	103	MALPVTALLLPLALLLHAARPQVQLVQSGAEVKKSGASVKVSKASGYPFTGY YIQWVRQAPGGLEWMGWIDPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSS LRSEDTAVYYCASDSYGYYYGMDVWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGG GSDIQMTQSPSSLSASVGD RVTFTCRASQGISSALAWYQQKPKPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDF LTISSLQPEDFATYYCQQFNLYPLTFGGGTKVEIKTTTTAPRPPTPAPT IASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA PLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPE EEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEM GGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGYQLSTATK DTYDALHMQALPPR	40
146264 (CLL-1 CAR13の全長CARのヌレオト ^メ)	116	ATGGCCCTCCCTGTCCAGCCCTGCTGCTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGC CGCTCGGCCCCAAGTGAACCTCGTCCAGTCCGGTGCAGAAGTAAAAAGAGCG GAGCCTCAGTGAAAGTGTCTGCAAGGCCTCCGGTACCCTTCACTGGATAC	

【表 2 4】

		TACATTCAAGTGGGTCCGCCAAGCCCCGGGACAGGGTCTGGAGTGGATGGGGTG GATTGACCCTAACTCGGAAATACGGGATACGCGCAGAAGTTCAGGGCCGCG TGACCATGACCAGGAACACCTCGATCAGCACCGCCTACATGGAAGTGTCTCC CTGCGGTCCGAGGATACTGCCGTGTACTACTGCGCCTCCGATTCTATGGGTA CTACTACGGAATGGACGTCTGGGGACAGGGCACCCCTCGTGACCGTGTCTCCGG GAGGCGGAGGGAGCGGGGGGGTGGATCGGGAGGAGGCGGCTCCGGCGGGCGG GGTAGCGACATCCAGATGACCCAGTCACCATCAAGCCTTAGCGCCTCCGTGGG CGACAGAGTGACATTCCTTGTTCGGGGTCCCAGGGAATCTCTCCGCTCTGG CTTGGTATCAGCAGAAGCCTGGGAAGCCTCCGAAGCTGTTGATCTACGACCG AGCAGCCTGGAATCAGGGGTGCCCTCCCGGTTTTCCGGTCCGGTTCTGGCAC CGATTTACCCTGACCATTTCTGTCCTCCAACCCGAGGACTTCGCCACTTACT ACTGCCAGCAGTTCAACAACCTACCCGCTGACCTTCGGAGGAGGCACTAAGGTC GAGATCAAGACCACTACCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCTACCAT CGCCTCCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGAGCTGGTG GGGCCGTGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCC CCTCTGGCTGGTACTTGGGGGTCTGCTGCTTTCACTCGTGATCACTCTTTA CTGTAAGCGCGGTCCGAAGAAGCTGCTGTACATCTTTAAGCAACCCTTCATGA GGCCTGTGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGTTCCCAGAG GAGGAGGAAGGCGGCTCGAACTGCGCGTGAAATTCAGCCGACGCGCAGATGC TCCAGCCTACAAGCAGGGGCGAACCAGCTCTACAACGAACCTAATCTTGGTC GGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATG GGCGGGAAGCCGCGCAGAAAGAATCCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCA AAAGGATAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCA GAAGAGGCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCGCCACCAAG GACACCTATGACGCTCTTCACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG		
181268				
181268 (scFvのVHのアミノ酸)	195	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYEMNWVRQAPGKGLEWVSYISS SGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMSLRAEDTAVYYCARDPYSSSWH DAFDIWGQGTMTVSS		10
181268 (scFvのVLのアミノ酸)	196	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS SRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPLTFGGGTKVD IK		20
181268 (全長CARのアミノ酸)	197	MALPVTALLLPLALLLHARPEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY EMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMS LRAEDTAVYYCARDPYSSSWHDAFDIWGQGTMTVSSGGGSGGGGSGGGGSE IVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASS RATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPLTFGGGTKVDI KTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPL AGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEE EGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGG KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKHDGLYQGLSTATKDT YDALHMQUALPPR		30
181268 (全長CARのヌクレオチド)	198	ATGGCCCTCCCTGTCACCGCCTGCTGCTCCGCTGGCTCTTCTGCTCCACGC CGCTCGGCCCGAAGTGCAACTCGTGGAAAGCGGTGGAGGTCTGTGCAACCTG GAGGTTCTTGCCTGTGATGTGCAGCTTCGGCTTCACTTCTCTCTCGTAC GAGATGAATTGGGTGCGGCAGGCGCCTGAAAGGGGCTGGAATGGGTGTCTA CATCTCAAGCTCCGGCTCGACCATCTACTACGCGGACAGCGTGAAGGGGCGGT TCACGATTTCCAGGGACAACGCCAAGAAGCTCGCTCTATCTGCAAAATGAACTCC CTGAGAGCCGAGGACACCGCTGTGTATTACTGCGCCCGGACCCCTACTCTC CTCATGGCAGCAGCCTTTGATATCTGGGGCCAGGGAACCATGGTCACCGTCA GCAGCGGGGGCGGAGGTTCCGGGGGAGGGGCTCCGGCGGAGGAGGCTCCGAG		40

【表 2 5】

		<p>ATTGTGTGACTCAGAGCCCGGTACCCTGTCGCTGAGCCCCGGAGAGCGGGC CACCCTTTCATGCCGCGCCAGCCAGTCCGTGTCCTCATCCTACCTCGCGTGGT ACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCCCGCGGCTGCTGATCTACGGCGCCTCCTCG CGCGCAACCGGAATCCCCGACCGGTTCTCCGGTCTGGCAGCGGAACCGACTT CACTCTACCATTTCGAGGCTGGAGCCGGAAGATTCGCCGTGTAATACTGCC AGCAGTACGGCTCCTCGCCACTGACTTTCGGCGGAGGAACCAAGGTCGATATC AAGACCACTACCCCAGCACCGAGGCCACCCACCCCGGCTCCTACCATCGCCTC CCAGCCTCTGTCCCTGCGTCCGGAGGCATGTAGACCCGCAGCTGGTGGGGCCG TGCATACCCGGGGTCTTGACTTCGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCTCTG GCTGGTACTTGCGGGTCTGCTGCTTTCCTCGTGATCACTCTTTACTGTAA GCGCGTCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTAAGCAACCCTTCATGAGGCCTG TGCAGACTACTCAAGAGGAGGACGGCTGTTTCATGCCGGTCCAGAGGAGGAG GAAGGCGGCTGCGAACTGCGCGTGAATTCAGCCGCAGCGCAGATGCTCCAGC CTACAAGCAGGGGCAGAACCAGCTCTACAACGAACTCAATCTTGGTCGGAGAG AGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGAGAGGACGGGACCCAGAAATGGGCGGG AAGCCGCGCAGAAAGAATCCCAAGAGGGCCTGTACAACGAGCTCCAAAAGGA TAAGATGGCAGAAGCCTATAGCGAGATTGGTATGAAAGGGGAACGCAGAAGAG GCAAAGGCCACGACGGACTGTACCAGGGACTCAGCACCCGCCACCAAGGACACC TATGACGCTCTTCACATGCAGGCCCTGCCGCTCGG</p>
--	--	--

10

【 0 2 8 4 】

20

ある態様において、CARのscFvフラグメントを、レンチウイルスベクターにクローニングして、単一のコーディングフレーム中に、プロモーター、例えば発現のためのEF1アルファプロモーター(配列番号11)を使用して、全長CAR構築物を作り出す。

【 0 2 8 5 】

EF1アルファプロモーター

CGTGAGGCTCCGGTGCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCGAGAAGTTGGGGGAGGGGTCCGCAAT
TGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTGCTGTAAGTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGG
TGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGGCCGACAGACACAGGTAA
GTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCCTGCAATTACTTCCACCTGGCTG
CAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCCAGGCCTTGCCTTAAGGAGCCCTTC
GCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCG
CTGCTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTA
AATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCCGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCAC
ATGTTCCGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGCCACCGAGAATCGGACGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGG
TGCCTGGCCTCGCGCCGCGTGTATCGCCCGCCCTGGGCGCAAGGCTGGCCCGGTCCGACACAGTTGCGTGAGCGGAA
AGATGGCCGCTTCCCGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAATCACC
CACAAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGTTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCAGGCACC
TCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACT
GAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGCCAGCTTGGCACTTGTGTAATTTCTCCTTGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATC
TTGGTTCAATCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTCCAGGTGTCGTGA。

30

40

【 0 2 8 6 】

Gly / Ser (配列番号 2 5)

GGGS

【 0 2 8 7 】

Gly / Ser (配列番号 2 6) : この配列は、1 ~ 6 個の「Gly Gly Gly Gly Ser」反復単位を包含していてもよい。

GGGSGGGS GGGSGGGGS GGGSGGGGS

【 0 2 8 8 】

Gly / Ser (配列番号 2 7)

GGGSGGGS GGGSGGGGS

50

【 0 2 8 9 】

G l y / S e r (配列番号 2 8)

GGGSGGGGS GGGGS

【 0 2 9 0 】

G l y / S e r (配列番号 2 9)

GGGS

【 0 2 9 1 】

ポリ A : (A) _{5 0 0 0} (配列番号 3 0)

この配列は、5 0 ~ 5 0 0 0 個のアデニンを包含し得る。

【 0 2 9 2 】

ポリ A : (T) _{1 0 0 0} (配列番号 3 1)

ポリ A : (T) _{5 0 0 0} (配列番号 3 2)

この配列は、5 0 ~ 5 0 0 0 個のチミンを包含し得る。

【 0 2 9 3 】

ポリ A : (A) _{5 0 0 0} (配列番号 3 3)

この配列は、1 0 0 ~ 5 0 0 0 個のアデニンを包含し得る。

【 0 2 9 4 】

ポリ A : (A) _{4 0 0 0} (配列番号 3 4)

ポリ A : (A) _{2 0 0 0} (配列番号 3 5)

【 0 2 9 5 】

G l y / S e r (配列番号 3 8): この配列は、1 ~ 1 0 個の「Gly Gly Gly Ser」反復単位を包含していてもよい。

GGGSGGGSGG GSGGGSGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGS

【 0 2 9 6 】

ある態様において、C L L - 1 C A R は、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、P C T 公開第 W O 2 0 1 4 / 0 5 1 4 3 3 号において開示されている抗 C L L - 1 (C L E C 1 2 A) 抗体の、重鎖可変ドメインの 1 以上の、例えば、1、2 または 3 C D R および / または軽鎖可変ドメインの 1 以上の、例えば、1、2 または 3 C D R または可変重鎖 (V H) もしくは可変軽鎖 (V L) を含み得る。

【 0 2 9 7 】

C A R の s c F v フラグメントを、レンチウイルスベクターにクローニングして、単一のコーディングフレーム中に、発現のための E F 1 アルファプロモーター (配列番号 1 1) を使用して、全長 C A R 構築物を作り出すことができる。

【 0 2 9 8 】

C A R 構築物は、以下の配列 : G G G G S (配列番号 2 5) の 1 以上を有する G l y / S e r リンカー ; 1 ~ 6 個の「G l y Gly Gly Gly Ser」反復単位を包含するもの、例えば、GGGSGGGGS GGGSGGGGS GGGSGGGGS (配列番号 2 6) ; GGGSGGGGS GGGSGGGGS (配列番号 2 7) ; GGGSGGGGS GGGGS (配列番号 2 8) ; GGGGS (配列番号 2 9) ; または 1 ~ 1 0 個の「Gly Gly Gly Ser」反復単位を包含するもの、例えば、GGGSGGGSGG GSGGGSGGGS GGGSGGGSGG GSGGGSGGGS (配列番号 3 8) を包含していてもよい。ある態様において、C A R 構築物は、ポリ A 配列、例えば、5 0 ~ 5 0 0 0 または 1 0 0 ~ 5 0 0 0 個のアデニンを包含する配列 (例えば、配列番号 3 0、配列番号 3 3、配列番号 3 4 または配列番号 3 5) または 5 0 ~ 5 0 0 0 個のチミンを包含する配列 (例えば、配列番号 3 1、配列番号 3 2) を包含する。代替として、C A R 構築物としては、例えば、配列 GSTSGSGKPGSGEGSTKG (配列番号 4 8 6) を包含するリンカーを挙げることができる。

【 0 2 9 9 】

二重特異性 C A R

ある態様において、多重特異性抗体分子は、二重特異性抗体分子である。二重特異性抗体は、2 以下の抗原に特異性を有する。二重特異性抗体分子は、第一のエピトープに結合特異性を有する第一の免疫グロブリンの可変ドメイン配列および第二のエピトープに結合

10

20

30

40

50

特異性を有する第二の免疫グロブリンの可変ドメイン配列を特徴とする。ある態様において、第一および第二のエピトープは、同じ抗原、例えば、同じタンパク質(または多量体タンパク質のサブユニット)上にある。ある態様において、第一および第二のエピトープは、オーバーラップしている。ある態様において、第一および第二のエピトープは、オーバーラップしていない。ある態様において、第一および第二のエピトープは、異なる抗原、例えば、異なるタンパク質(または異なる多量体タンパク質のサブユニット)上にある。ある態様において、二重特異性抗体分子は、第一のエピトープに結合特異性を有する重鎖可変ドメイン配列および軽鎖可変ドメイン配列、ならびに第二のエピトープに結合特異性を有する重鎖可変ドメイン配列および軽鎖可変ドメイン配列を含む。ある態様において、二重特異性抗体分子は、第一のエピトープに結合特異性を有する半抗体および第二のエピトープに結合特異性を有する半抗体を含む。ある態様において、二重特異性抗体分子は、第一のエピトープに結合特異性を有する半抗体またはそれらのフラグメントおよび第二のエピトープに結合特異性を有する半抗体またはそれらのフラグメントを含む。ある態様において、二重特異性抗体分子は、第一のエピトープに結合特異性を有する s c F v またはそれらのフラグメントおよび第二のエピトープに結合特異性を有する s c F v またはそれらのフラグメントを含む。

【0300】

ある態様において、抗体分子は、多重特異性(例えば、二重特異性または三重特異性)抗体分子である。二重特異性またはヘテロ二量体抗体分子を生成するためのプロトコールは当業界において公知であり、例えば、これらに限定されないが、例えばUS 5 7 3 1 1 6 8 で説明されている、例えば、「ノブ・イン・ア・ホール」アプローチ；例えばWO 0 9 / 0 8 9 0 0 4、WO 0 6 / 1 0 6 9 0 5 およびWO 2 0 1 0 / 1 2 9 3 0 4 で説明されている、静電的操作によるFc対形成；例えばWO 0 7 / 1 1 0 2 0 5 で説明されている、鎖交換加工ドメイン(Strand Exchange Engineered Domains: SEED)ヘテロ二量体形成；例えばWO 0 8 / 1 1 9 3 5 3、WO 2 0 1 1 / 1 3 1 7 4 6 およびWO 2 0 1 3 / 0 6 0 8 6 7 で説明されている、Fabアーム交換；例えばUS 4 4 3 3 0 5 9 で説明されている、例えば、アミン応答性基とスルフヒドリル応答性基とを有するヘテロ二官能性試薬を使用して二重特異性構造を生成するための抗体架橋による、二重の抗体コンジュゲート；例えばUS 4 4 4 4 8 7 8 で説明されている、2重鎖間のジスルフィド結合の還元および酸化のサイクルを介して異なる抗体からの半抗体(重鎖-軽鎖対またはFab)を組み換えることによって生成された二重特異性抗体決定基；例えばUS 5 2 7 3 7 4 3 で説明されている、スルフヒドリル応答性基を介して架橋された三官能性の抗体、例えば、3Fab'フラグメント；例えばUS 5 5 3 4 2 5 4 で説明されている、C末端尾部を介して架橋された、好ましくはジスルフィドまたはアミン応答性の化学的架橋を介した、生合成結合タンパク質、例えばs c F v 対；例えばUS 5 5 8 2 9 9 6 で説明されている、二機能性抗体、例えば、定常ドメインと置き換えられたロイシンジッパー(例えば、c - f o s およびc - j u n)を介して二量体化された異なる結合特異性を有するFabフラグメント；例えばUS 5 5 9 1 8 2 8 で説明されている、二重特異性および多重特異性のモノ-および多価受容体、例えば、一方の抗体のCH1領域と、典型的には軽鎖が結合した他方の抗体のVH領域との間でポリペプチドスペーサーを介して連結された2抗体(2Fabフラグメント)のVH-CH1領域；例えばUS 5 6 3 5 6 0 2 で説明されている、二重特異性DNA-抗体コンジュゲート、例えば、DNAの二本鎖断片を介した抗体またはFabフラグメントの架橋形成；例えばUS 5 6 3 7 4 8 1 で説明されている、二重特異性融合タンパク質、例えば、親水性のらせん状ペプチドリンカーを間に有する2 s c F v および完全な定常領域を含有する発現構築物；例えばUS 5 8 3 7 2 4 2 で説明されている、多価および多重特異性結合タンパク質、例えば、一般的にダイアボディと呼ばれるIg重鎖可変領域の結合領域を有する第一のドメインとIg軽鎖可変領域の結合領域を有する第二のドメインとを有するポリペプチドの二量体(二重特異性、三重特異性または四重特異性の分子のために作り出されるより高次の構造も包含される)；例えばUS 5 8 3 7 8 2 1 で説明されている、VLおよびVH鎖が連結されており、さらにペプチドスペー

10

20

30

40

50

ーを用いて抗体のヒンジ領域およびC H 3 領域と接続されているミニボディ構築物であ
 って、二量化されて二重特異性 / 多価分子を形成することができるミニボディ構築物 ;
 短いペプチドリンカー (例えば、5 または 10 アミノ酸) を用いてまたはまったくリンカー
 を用いずにいずれかの方向で連結された V H および V L ドメインであって、二量体を形成
 して、二重特異性ダイアボディを形成することができる、ドメイン ; 例えば U S 5 8 4 4
 0 9 4 で説明されている、三量体および四量体 ; 例えば U S 5 8 6 4 0 1 9 で説明されて
 いる、C 末端で架橋性基を用いたペプチド結合によって接続され、V L ドメインとさらに
 結合して一連の F V (または s c F v) を形成する、V H ドメイン (またはファミリーメン
 10
 バー中の V L ドメイン) のストリング ; ならびに例えば U S 5 8 6 9 6 2 0 で説明されて
 いる、V H および V L ドメインの両方がペプチドリンカーを介して連結された単一の鎖結
 合ポリペプチドであって、非共有結合または化学的な架橋形成を介して多価構造に組み合
 わされて、s c F V またはダイアボディタイプの様式の両方を使用して例えばホモ 2 価、
 ヘテロ 2 価、3 価および 4 価構造を形成する、ポリペプチドが挙げられる。追加の例示的
 な多重特異性および二重特異性分子ならびにそれらの作製方法は、例えば、U S 5 9 1 0
 5 7 3、U S 5 9 3 2 4 4 8、U S 5 9 5 9 0 8 3、U S 5 9 8 9 8 3 0、U S 6 0 0 5
 0 7 9、U S 6 2 3 9 2 5 9、U S 6 2 9 4 3 5 3、U S 6 3 3 3 3 9 6、U S 6 4 7 6
 1 9 8、U S 6 5 1 1 6 6 3、U S 6 6 7 0 4 5 3、U S 6 7 4 3 8 9 6、U S 6 8 0 9
 1 8 5、U S 6 8 3 3 4 4 1、U S 7 1 2 9 3 3 0、U S 7 1 8 3 0 7 6、U S 7 5 2 1
 0 5 6、U S 7 5 2 7 7 8 7、U S 7 5 3 4 8 6 6、U S 7 6 1 2 1 8 1、U S 2 0 0 2
 0 0 4 5 8 7 A 1、U S 2 0 0 2 0 7 6 4 0 6 A 1、U S 2 0 0 2 1 0 3 3 4 5 A 1、U
 20
 S 2 0 0 3 2 0 7 3 4 6 A 1、U S 2 0 0 3 2 1 1 0 7 8 A 1、U S 2 0 0 4 2 1 9 6 4
 3 A 1、U S 2 0 0 4 2 2 0 3 8 8 A 1、U S 2 0 0 4 2 4 2 8 4 7 A 1、U S 2 0 0 5
 0 0 3 4 0 3 A 1、U S 2 0 0 5 0 0 4 3 5 2 A 1、U S 2 0 0 5 0 6 9 5 5 2 A 1、U
 S 2 0 0 5 0 7 9 1 7 0 A 1、U S 2 0 0 5 1 0 0 5 4 3 A 1、U S 2 0 0 5 1 3 6 0 4
 9 A 1、U S 2 0 0 5 1 3 6 0 5 1 A 1、U S 2 0 0 5 1 6 3 7 8 2 A 1、U S 2 0 0 5
 2 6 6 4 2 5 A 1、U S 2 0 0 6 0 8 3 7 4 7 A 1、U S 2 0 0 6 1 2 0 9 6 0 A 1、U
 S 2 0 0 6 2 0 4 4 9 3 A 1、U S 2 0 0 6 2 6 3 3 6 7 A 1、U S 2 0 0 7 0 0 4 9 0
 9 A 1、U S 2 0 0 7 0 8 7 3 8 1 A 1、U S 2 0 0 7 1 2 8 1 5 0 A 1、U S 2 0 0 7
 1 4 1 0 4 9 A 1、U S 2 0 0 7 1 5 4 9 0 1 A 1、U S 2 0 0 7 2 7 4 9 8 5 A 1、U
 S 2 0 0 8 0 5 0 3 7 0 A 1、U S 2 0 0 8 0 6 9 8 2 0 A 1、U S 2 0 0 8 1 5 2 6 4
 30
 5 A 1、U S 2 0 0 8 1 7 1 8 5 5 A 1、U S 2 0 0 8 2 4 1 8 8 4 A 1、U S 2 0 0 8
 2 5 4 5 1 2 A 1、U S 2 0 0 8 2 6 0 7 3 8 A 1、U S 2 0 0 9 1 3 0 1 0 6 A 1、U
 S 2 0 0 9 1 4 8 9 0 5 A 1、U S 2 0 0 9 1 5 5 2 7 5 A 1、U S 2 0 0 9 1 6 2 3 5
 9 A 1、U S 2 0 0 9 1 6 2 3 6 0 A 1、U S 2 0 0 9 1 7 5 8 5 1 A 1、U S 2 0 0 9
 1 7 5 8 6 7 A 1、U S 2 0 0 9 2 3 2 8 1 1 A 1、U S 2 0 0 9 2 3 4 1 0 5 A 1、U
 S 2 0 0 9 2 6 3 3 9 2 A 1、U S 2 0 0 9 2 7 4 6 4 9 A 1、E P 3 4 6 0 8 7 A 2、
 W O 0 0 0 6 6 0 5 A 2、W O 0 2 0 7 2 6 3 5 A 2、W O 0 4 0 8 1 0 5 1 A 1、W O
 0 6 0 2 0 2 5 8 A 2、W O 2 0 0 7 0 4 4 8 8 7 A 2、W O 2 0 0 7 0 9 5 3 3 8 A 2
 、W O 2 0 0 7 1 3 7 7 6 0 A 2、W O 2 0 0 8 1 1 9 3 5 3 A 1、W O 2 0 0 9 0 2 1
 7 5 4 A 2、W O 2 0 0 9 0 6 8 6 3 0 A 1、W O 9 1 0 3 4 9 3 A 1、W O 9 3 2 3 5
 40
 3 7 A 1、W O 9 4 0 9 1 3 1 A 1、W O 9 4 1 2 6 2 5 A 2、W O 9 5 0 9 9 1 7 A 1
 、W O 9 6 3 7 6 2 1 A 2、W O 9 9 6 4 4 6 0 A 1 で見出される。上記で参照した出願
 の内容は、この参照によりそれらの全体が開示に組み入れられる。

【 0 3 0 1 】

二重特異性抗体分子の各抗体または抗体フラグメント (例えば、s c F v) 内で、V H は
 、V L の上流であってもよいしまたは下流であってもよい。ある態様において、上流の抗
 体または抗体フラグメント (例えば、s c F v) は、全体的な二重特異性抗体分子が V H₁
 - V L₁ - V L₂ - V H₂ のアレンジメントを有するように、その V L (V L₁) の上流に
 その V H (V H₁) があるようにアレンジされ、下流の抗体または抗体フラグメント (例え
 ば、s c F v) は、その V H (V H₂) の上流にその V L (V L₂) があるようにアレンジさ
 50

れる。他の態様において、上流の抗体または抗体フラグメント(例えば、 $s c F v$)は、全体的な二重特異性抗体分子が $V L_1 - V H_1 - V H_2 - V L_2$ のアレンジメントを有するように、その $V H(V H_1)$ の上流がその $V L(V L_1)$ にあるようにアレンジされ、下流の抗体または抗体フラグメント(例えば、 $s c F v$)は、その $V L(V L_2)$ の上流にその $V H(V H_2)$ があるようにアレンジされる。リンカーは、2抗体または抗体フラグメント(例えば、 $s c F v$)の間に配置されてもよく、例えば、構築物が $V H_1 - V L_1 - V L_2 - V H_2$ のようにアレンジされる場合は $V L_1$ と $V L_2$ との間にまたは構築物が $V L_1 - V H_1 - V H_2 - V L_2$ のようにアレンジされる場合は $V H_1$ と $V H_2$ との間に配置されてもよい。リンカーは、ここに記載されるリンカー、例えば、 $(G l y_4 - S e r)_n$ リンカーであってもよく、ここで n は、1、2、3、4、5または6であり、好ましくは4(配列番号64)である。一般的に、2 $s c F v$ 間のリンカーは、2 $s c F v$ のドメイン間での誤った対形成が回避される程度に長くなければならない。リンカーは、第一の $s c F v$ の $V L$ と $V H$ との間に配置されてもよい。リンカーは、第二の $s c F v$ の $V L$ と $V H$ との間に配置されてもよい。複数のリンカーを有する構築物において、リンカーのいずれか2以上は、同一のものであってもよいしまたは異なるものであってもよい。したがって、ある態様において、二重特異性 $C A R$ は、ここに記載されるアレンジメントにおいて、 $V L$ 、 $V H$ および任意に1以上のリンカーを含む。

【0302】

ある面において、二重特異性抗体分子は、 $C L L - 1$ に結合特異性を有し、例えば、ここに記載される、例えば表2で説明される $s c F v$ を含むかまたはここに記載される $C L L - 1$ $s c F v$ からの軽鎖 $C D R$ および/または重鎖 $C D R$ を含む、第一の免疫グロブリンの可変ドメイン配列、例えば $s c F v$ と、異なる抗原における第二のエピトープに結合特異性を有する第二の免疫グロブリンの可変ドメイン配列とを特徴とする。いくつかの面において、第二の免疫グロブリンの可変ドメイン配列は、 $A M L$ 細胞上で発現される抗原、例えば、 $C L L - 1$ 以外の抗原に結合特異性を有する。例えば、第二の免疫グロブリンの可変ドメイン配列は、 $C D 1 2 3$ に結合特異性を有する。別の例として、第二の免疫グロブリンの可変ドメイン配列は、 $C D 3 3$ に結合特異性を有する。別の例として、第二の免疫グロブリンの可変ドメイン配列は、 $C D 3 4$ に結合特異性を有する。別の例として、第二の免疫グロブリンの可変ドメイン配列は、 $F L T 3$ に結合特異性を有する。例えば、第二の免疫グロブリンの可変ドメイン配列は、葉酸受容体ベータに結合特異性を有する。いくつかの面において、第二の免疫グロブリンの可変ドメイン配列は、 B 細胞上で発現される抗原、例えば、 $C D 1 9$ 、 $C D 2 0$ 、 $C D 2 2$ または $P O R 1$ に結合特異性を有する。

【0303】

キメラ $T C R$

ある面において、本発明の抗 $C L L - 1$ 抗体および抗体フラグメント(例えば、表2で開示されたもの)を、 T 細胞受容体(「 $T C R$ 」)鎖、例えば、 $T C R$ アルファまたは $T C R$ ベータ鎖の1以上の定常ドメインにグラフト化して、 $C L L - 1$ に特異的に結合するキメラ $T C R$ を作り出すこともできる。理論に縛られることはないが、キメラ $T C R$ は、抗原結合の際に $T C R$ 複合体を介してシグナル伝達すると考えられる。例えば、本明細書で開示される $C L L - 1$ $s c F v$ は、 $T C R$ 鎖、例えば、 $T C R$ アルファ鎖および/または $T C R$ ベータ鎖の、定常ドメイン、例えば細胞外定常ドメインの少なくとも一部、膜貫通ドメインおよび細胞質内ドメインにグラフト化されてもよい。別の例として、 $C L L - 1$ 抗体フラグメント、例えばここに記載される $V L$ ドメインは、 $T C R$ アルファ鎖の定常ドメインにグラフト化されてもよいし、 $C L L - 1$ 抗体フラグメント、例えばここに記載される $V H$ ドメインは、 $T C R$ ベータ鎖の定常ドメインにグラフト化されてもよい(または代替として、 $V L$ ドメインは、 $T C R$ ベータ鎖の定常ドメインにグラフト化されてもよいし、 $V H$ ドメインは、 $T C R$ アルファ鎖にグラフト化されてもよい)。別の例として、 $C L L - 1$ 抗体または抗体フラグメントの $C D R$ 、例えば、表3、4、5、6、7または8に記載される $C L L - 1$ 抗体または抗体フラグメントの $C D R$ を、 $T C R$ アルファおよ

10

20

30

40

50

びノまたはベータ鎖にグラフト化して、C L L - 1 に特異的に結合するキメラ T C R を作り出してもよい。例えば、ここに記載した L C D R は、T C R アルファ鎖の可変ドメインにグラフト化されてもよいし、ここに記載した H C D R は、T C R ベータ鎖の可変ドメインにグラフト化されてもよくまたは逆もまた同様である。このようなキメラ T C R は、当業界において公知の方法によって生産され得る(例えば、Willemssen RA et al, Gene Therapy 2000; 7: 1369-1377; Zhang T et al, Cancer Gene Ther 2004; 11: 487-496; Aggen et al, Gene Ther. 2012 Apr;19(4):365-74)。

【 0 3 0 4 】

膜貫通ドメイン

膜貫通ドメインに関して、様々な態様において、C A R の細胞外ドメインに付着した膜貫通ドメインが含まれるように、C A R を設計することができる。膜貫通ドメインは、膜貫通領域に隣接する 1 以上の追加のアミノ酸、例えば、膜貫通が誘導されたタンパク質の細胞外領域と結合する 1 以上のアミノ酸(例えば、細胞外領域の 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 から最大 15 のアミノ酸)およびノまたは膜貫通タンパク質が誘導されたタンパク質の細胞内領域に結合した 1 以上の追加のアミノ酸(例えば、細胞内領域の 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 から最大 15 のアミノ酸)を包含していてもよい。ある面において、膜貫通ドメインは、使用される C A R の他のドメインの 1 つと結合しているドメインである。いくつかの場合において、膜貫通ドメインが同一または異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインと結合しないように、例えば、受容体複合体の他の一員との相互作用が最小化されるように、膜貫通ドメインを選択してもよいしまたはアミノ酸置換によって改変してもよい。ある面において、膜貫通ドメインは、C A R T 細胞の表面上で別の C A R とホモ二量体化することができる。異なる面において、膜貫通ドメインのアミノ酸配列は、同じ C A R T に存在する天然型の結合パートナーの結合ドメインとの相互作用を最小化するように改変または置換されていてもよい。

【 0 3 0 5 】

膜貫通ドメインは、天然源から得てもよいしまたは組換え源から得てもよい。源が天然である場合、そのドメインは、あらゆる膜結合タンパク質または膜貫通タンパク質に由来するものであってもよい。ある面において、膜貫通ドメインは、C A R が標的に結合したときはいつでも細胞内ドメインにシグナル伝達することができる。本発明において特定の用途を有する膜貫通ドメインは、少なくとも、例えば、T 細胞受容体のアルファ、ベータまたはゼータ鎖、C D 2 8、C D 3 イプシロン、C D 4 5、C D 4、C D 5、C D 8 (例えば、C D 8 アルファ、C D 8 ベータ)、C D 9、C D 1 6、C D 2 2、C D 3 3、C D 3 7、C D 6 4、C D 8 0、C D 8 6、C D 1 3 4、C D 1 3 7、C D 1 5 4 の膜貫通領域を包含していてもよい。ある態様において、膜貫通ドメインは、共刺激分子の少なくとも膜貫通領域、例えば、M H C クラス I 分子、T N F 受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子(S L A M タンパク質)、活性化 N K 細胞受容体、B T L A、T o l l リガンド受容体、O X 4 0、C D 2、C D 7、C D 2 7、C D 2 8、C D 3 0、C D 4 0、C D 5、I C A M - 1、L F A - 1 (C D 1 1 a / C D 1 8)、4 - 1 B B (C D 1 3 7)、B 7 - H 3、C D 5、I C A M - 1、I C O S (C D 2 7 8)、G I T R、B A F F R、L I G H T、H V E M (L I G H T R)、K I R D S 2、S L A M F 7、N K p 8 0 (K L R F 1)、N K p 4 4、N K p 3 0、N K p 4 6、C D 1 9、C D 4、C D 8 アルファ、C D 8 ベータ、I L 2 R ベータ、I L 2 R ガンマ、I L 7 R アルファ、I T G A 4、V L A 1、C D 4 9 a、I T G A 4、I A 4、C D 4 9 D、I T G A 6、V L A - 6、C D 4 9 f、I T G A D、C D 1 1 d、I T G A E、C D 1 0 3、I T G A L、C D 1 1 a、L F A - 1、I T G A M、C D 1 1 b、I T G A X、C D 1 1 c、I T G B 1、C D 2 9、I T G B 2、C D 1 8、L F A - 1、I T G B 7、N K G 2 D、N K G 2 C、T N F R 2、T R A N C E / R A N K L、D N A M 1 (C D 2 2 6)、S L A M F 4 (C D 2 4 4、2 B 4)、C D 8 4、C D 9 6 (T a c t i l e)、C E A C A M 1、C R T A M、L y 9 (C D 2 2 9)、C D 1 6 0 (B Y 5 5)、P S G L 1、C D 1 0 0 (S E M A 4 D)、C D 6 9、S L A M F 6 (N T B

10

20

30

40

50

- A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SEPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19aおよびCD83と特異的に結合するリガンドを包含していてもよい。

【0306】

いくつかの例において、膜貫通ドメインは、ヒンジ、例えばヒトタンパク質由来のヒンジを介して、CARの細胞外領域、例えばCARの抗原結合ドメインに付着することができる。例えば、ある態様において、ヒンジは、ヒトIg(免疫グロブリン)のヒンジ、例えばIgG4ヒンジまたはCD8aヒンジであってもよい。ある態様において、ヒンジまたはスペーサーは、配列番号2のアミノ酸配列を含む(例えば、からなる)。ある面において、膜貫通ドメインは、配列番号6の膜貫通ドメインを含む(例えば、からなる)。

10

【0307】

ある面において、ヒンジまたはスペーサーは、IgG4ヒンジを含む。例えば、ある態様において、ヒンジまたはスペーサーは、アミノ酸配列ESKYGPPCPPPAPEFLGSPVFLFPPKPKDTLMSRTEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK(配列番号3)のヒンジを含む。ある態様において、ヒンジまたはスペーサーは、GAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCCCTGCCCCGAGTTCCTGGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCAAGCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGACCCGAGGTCCAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCGGAGGAGCAGTTCATAGCACCTACCGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGCAAGGAATACAAGTGTAAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCAGCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGCCAGCCTCGGGAGCCCAAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCCAAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCTGGTGAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGACAACGCCAGCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCCGGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGGAGGGCAACGTCTTTAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAGATG(配列番号14)のヌクレオチド配列によってコードされたヒンジを含む。

20

【0308】

ある面において、ヒンジまたはスペーサーは、IgDヒンジを含む。例えば、ある態様において、ヒンジまたはスペーサーは、アミノ酸配列RWPEPKAQASSVPTAQPAEGLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEEQEERETKTPECPSTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVP TGGVEEGLLERHSNGSQSQRSLTLPRSLWNAAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAPVVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQATYTCVVSHESTRLLNASRSLEVSIVTDH(配列番号4)のヒンジを含む。ある態様において、ヒンジまたはスペーサーは、AGGTGGCCCGAAAGTCCCAAGGCCAGGCATCTAGTGTCTACTGCACAGCCCCAGGCAGAAGGCAGCCTAGCCAAAGCTACTACTGCACCTGCCACTACGCGCAATACTGGCCGTGGCGGGAGGAGAAGAAAAAGGAGAAAGAGAAAGAACAAGGAGAGGGAGACCAAGACCCCTGAATGTCCATCCCATACCCAGCCGCTGGGCGTCTATCTTTGACTCCCGCAGTACAGGACTTGTGGCTTAGAGATAAGGCCACCTTTACATGTTTCGTGCTGGGCTCTGACCTGAAGGATGCCATTTGACTTGGGAGGTTGCCGAAAGGTACCCACAGGGGGGTTGAGGAAGGTTGCTGGAGCGCCATTCCAATGGCTCTCAGAGCCAGCACTCAAGACTCACCCCTCCGAGATCCCTGTGGAACGCCGGGACCTCTGTACATGTACTCTAAATCATCCTAGCCTGCCCCCACAGCGTCTGATGGCCCTTAGAGAGCCAGCCGCCAGGCACAGTTAAGCTTAGCCTGAATCTGCTCGCCAGTAGTGATCCCCAGAGGCCGAGCTGGCTTATGCGAAGTGTCCGGCTTTAGCCCGCCAACATCTTGCTCATGTGGCTGGAGGACAGCGAGAAGTGAACACCAGCGCTTCGCTCCAGCCCGCCCCACCCAGCCGGTCTACCACATTCTGGCCCTGGAGTGTCTTAAGGGTCCAGCACCTAGCCCCAGCCAGCCACATACACCTGTGTTGTGTCCCATGAAGATAGCAGGACCCTGCTAAATGCTTCTAGGAGTCTGGAGGTTTCTACGTGACTGACCATT(配列番号15)のヌクレオチド配列によってコードされたヒンジを含む。

30

40

【0309】

ある面において、膜貫通ドメインは組換えであってもよく、その場合、膜貫通ドメインは、主としてロイシンおよびバリンなどの疎水性残基を含む。ある面において、フェニルアラニン、トリプトファンおよびバリンの三つ組は、組換え膜貫通ドメインのそれぞれの

50

末端で見出すことができる。

【0310】

CARの膜貫通ドメインと細胞質内領域との間で、長さが2から10アミノ酸の間の短いオリゴリンカーまたはポリペプチドリナーが連結を形成していてもよい。グリシン-セリンの二つ組が特に好適なリンカーを付与する。例えば、ある面において、リンカーは、GGGSGGGGS(配列番号5)のアミノ酸配列を含む。ある態様において、リンカーは、GGTGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC(配列番号16)のヌクレオチド配列によってコードされる。

【0311】

ある面において、ヒンジまたはスペーサーは、KIR2DS2ヒンジを含む。

【0312】

細胞質内ドメイン

本発明のCARの細胞質内ドメインまたは領域は、細胞内シグナル伝達ドメインを包含する。細胞内シグナル伝達ドメインは、一般的に、CARが導入されている免疫細胞の正常なエフェクター機能の少なくとも1の活性化に關与する。

【0313】

本発明のCARで使用するための細胞内シグナル伝達ドメインの例としては、抗原受容体と接触した後にシグナル伝達を開始させるように協同して作用するT細胞受容体(TCR)および補助受容体の細胞質内配列、加えて同じ機能的な能力を有するこれらの配列およびあらゆる組換え配列のあらゆる誘導體または変異体が挙げられる。

【0314】

TCR単独により生成されたシグナルは、T細胞を完全に活性化させるには不十分であり、さらに二次的および/または共刺激シグナルも必要であることが知られている。したがって、T細胞の活性化は、細胞質内シグナル伝達配列の2の別個のクラス：TCRを介した抗原依存性の一次活性化を開始させるクラス(一次細胞内シグナル伝達ドメイン)および抗原非依存性の方式で作用して二次シグナルまたは共刺激シグナルを提供するクラス(二次細胞質内ドメイン、例えば共刺激ドメイン)によって媒介されるということができ

【0315】

一次シグナル伝達ドメインは、刺激による方式または阻害による方式のいずれかでTCR複合体の一次的な活性化を調節する。刺激による方式で作用する一次細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフまたはITAMとして知られるシグナル伝達モチーフを含有していてもよい。

【0316】

本発明において特に有用なITAMを含有する一次細胞内シグナル伝達ドメインの例としては、TCRゼータ、FcRガンマ、FcRベータ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278(「ICOS」としても公知)FcRI、DAP10、DAP12およびCD66dの上記ドメインが挙げられる。ある態様において、本発明のCARは、細胞内シグナル伝達ドメイン、例えばCD3-ゼータの一次シグナル伝達ドメインを含む。

【0317】

ある態様において、一次シグナル伝達ドメインは、改変されたITAMドメイン、例えば、天然ITAMドメインと比較して活性が変更された(例えば、増加または減少した)、変異したITAMドメインを含む。ある態様において、一次シグナル伝達ドメインは、改変されたITAMを含有する一次細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、最適化および/またはトランケートされたITAMを含有する一次細胞内シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、一次シグナル伝達ドメインは、1、2、3、4以上のITAMモチーフを含む。

【0318】

本発明において特定の用途を有する一次細胞内シグナル伝達ドメインを含有する分子のさらなる例としては、DAP10、DAP12およびCD32のものが挙げられる。

10

20

30

40

50

【0319】

CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、一次シグナル伝達ドメイン、例えば、CD3-ゼータシグナル伝達ドメインそれ自身を含んでいてもよいしまたは本発明のCARの状況において有用な他のあらゆる所望の細胞内シグナル伝達ドメインと組み合わせることができる。例えば、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、一次シグナル伝達ドメイン、例えばCD3ゼータ鎖の部分および共刺激シグナル伝達ドメインを含んでいてもよい。共刺激シグナル伝達ドメインは、共刺激分子の細胞内ドメインを含むCARの一部を指す。共刺激分子とは、抗原に対する効率的なリンパ球応答に必要な、抗原受容体以外の細胞表面分子またはそのリガンドである。このような分子の例としては、MHCクラスI分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子(SLAMタンパク質)、活性化NK細胞受容体、BTLA、Tollリガンド受容体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、4-1BB(CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS(CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANSCENDENT/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19aおよびCD83と特異的に結合するリガンドおよび同種のもものが挙げられる。例えば、CD27の共刺激は、インビトロにおけるヒトCAR T細胞の拡大、エフェクター機能および生存を強化し、インビボにおけるヒトT細胞の持続性および抗腫瘍活性を増大させることが実証されている(Song et al. Blood. 2012; 119(3):696-706)。本発明のCARの細胞質内部分内の細胞内シグナル伝達配列は、ランダムな順番または特定の順番で互いに連結されていてもよい。例えば長さが2から10アミノ酸の間(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9または10アミノ酸)の短いオリゴリンカーまたはポリペプチドリンカーが、細胞内シグナル伝達配列間の連結を形成していてもよい。ある態様において、好適なリンカーとして、グリシン-セリンの二つ組を使用することができる。ある態様において、好適なリンカーとして、単一のアミノ酸、例えばアラニン、グリシンを使用することができる。

【0320】

ある面において、細胞内シグナル伝達ドメインは、2以上、例えば、2、3、4、5またはそれより多くの共刺激シグナル伝達ドメインが含まれるように設計される。ある態様において、2以上、例えば、2、3、4、5またはそれより多くの共刺激シグナル伝達ドメインは、リンカー分子、例えばここに記載されるリンカー分子によって隔てられる。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、2共刺激シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、リンカー分子は、グリシン残基である。ある態様において、リンカーは、アラニン残基である。

【0321】

ある面において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3-ゼータのシグナル伝達ドメインおよびCD28のシグナル伝達ドメインを含むように設計される。ある面において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3-ゼータのシグナル伝達ドメインおよび4-1BBのシグナル伝達ドメインを含むように設計される。ある面において、4-1BBのシグ

10

20

30

40

50

ナル伝達ドメインは、配列番号7のシグナル伝達ドメインである。ある面において、CD3 - ゼータのシグナル伝達ドメインは、配列番号9(変異CD3ゼータ)または配列番号10(野生型ヒトCD3ゼータ)のシグナル伝達ドメインである。

【0322】

ある面において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3 - ゼータのシグナル伝達ドメインおよびCD27のシグナル伝達ドメインを含むように設計される。ある面において、CD27のシグナル伝達ドメインは、QRRKYRSNKGESPVEPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP(配列番号8)のアミノ酸配列を含む。ある面において、CD27のシグナル伝達ドメインは、AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACGACCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC(配列番号19)の核酸配列によってコードされる。

10

【0323】

ある面において、細胞内は、CD3 - ゼータのシグナル伝達ドメインおよびCD28のシグナル伝達ドメインを含むように設計される。ある面において、CD28のシグナル伝達ドメインは、配列番号482のアミノ酸配列を含む。ある面において、CD28のシグナル伝達ドメインは、配列番号483の核酸配列によってコードされる。

【0324】

ある面において、細胞内は、CD3 - ゼータのシグナル伝達ドメインおよびICOSのシグナル伝達ドメインを含むように設計される。ある面において、CD28のシグナル伝達ドメインは、配列番号484のアミノ酸配列を含む。ある面において、ICOSのシグナル伝達ドメインは、配列番号485の核酸配列によってコードされる。

20

【0325】

ある面において、ここに記載されるCAR発現細胞は、例えば、第二のCAR、例えば、同じ標的(CLL-1)または異なる標的(例えば、CD123、CD33、CD34、FLT3または葉酸受容体ベータ)に対する、異なる抗原結合ドメインを含む、第二のCARをさらに含み得る。ある態様において、第二のCARは、例えば、CD123、CD33、CD34、FLT3または葉酸受容体ベータなど、急性骨髄白血病細胞において発現する標的に対する抗原結合ドメインを含む。ある態様において、CARを発現する細胞は、第一の抗原に特異的に結合し、共刺激シグナル伝達ドメインを有するが一次シグナル伝達ドメインを有さない細胞内シグナル伝達ドメインを包含する第一のCARおよび第二の異なる抗原に特異的に結合し、一次シグナル伝達ドメインを有するが共刺激シグナル伝達ドメインを有さない細胞内シグナル伝達ドメインを包含する第二のCARを含む。理論に縛られることは望まないが、第一のCARにおける、共刺激シグナル伝達ドメイン、例えば4-1BB、CD28、CD27、ICOSまたはOX-40および第二のCARにおける、一次シグナル伝達ドメイン、例えばCD3ゼータの設置は、両方の標的が発現される細胞に対するCAR活性を制限することができる。ある態様において、CAR発現細胞は、CLL-1結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび共刺激ドメインを含む、第一のCLL-1 CARと、CLL-1以外の抗原(例えば、AML細胞において発現する抗原、例えば、CD123、CD33、CD34、FLT3または葉酸受容体ベータ)に特異的に結合し、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび一次シグナル伝達ドメインを含む、第二のCARを含む。別の態様において、CAR発現細胞は、CLL-1結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび一次シグナル伝達ドメインを含む、第一のCLL-1 CARと、CLL-1以外の抗原(例えば、AML細胞において発現する抗原、例えば、CD123、CD33、CD34、FLT3または葉酸受容体ベータ)に特異的に結合し、抗原に対する抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび共刺激シグナル伝達ドメインを含む、第二のCARを含む。

30

40

【0326】

ある態様において、CARを発現する細胞は、ここに記載されるCLL-1 CARおよび阻害性CARを含む。ある態様において、阻害性CARは、正常細胞上で見出されるが、癌細胞、例えばCLLも発現する正常細胞では見出されない抗原と結合する抗原結合

50

ドメインを含む。ある態様において、阻害性CARは、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび阻害分子の細胞内ドメインを含む。例えば、阻害性CARの細胞内ドメインは、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および/またはCEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14またはCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシンおよびTGFRベータの細胞内ドメインであってもよい。

【0327】

ある態様において、CAR発現細胞が2種以上の異なるCARを含む場合、異なるCARの抗原結合ドメインは、抗原結合ドメインが互いに相互作用しないようになっていてもよい。例えば、第一および第二のCARを発現する細胞は、例えばフラグメント、例えばscFvとして、第二のCARの抗原結合ドメインとの結合を形成しない第一のCARの抗原結合ドメインを有していてもよく、例えば、第二のCARの抗原結合ドメインは、VHHである。

10

【0328】

ある態様において、抗原結合ドメインは、相補性決定領域が単一ドメインのポリペプチドの一部である分子を含む単一ドメイン抗原結合(SDAB)分子を含む。例としては、これらに限定されないが、重鎖可変ドメイン、天然に軽鎖が欠失した結合分子、従来の4鎖抗体由来の単一ドメイン、加工されたドメインおよび抗体由来のもの以外の単一ドメイン足場が挙げられる。SDAB分子は、当業界のいずれかのものかまたはいずれかの将来的な単一ドメイン分子でもよい。SDAB分子は、あらゆる種由来であってもよく、これらに限定されないが、マウス、ヒト、ラクダ、ラマ、ヤツメウナギ、魚類、サメ、ヤギ、ウサギおよびウシ由来であってもよい。またこの用語は、ラクダ科動物およびサメ以外の種からの天然に存在する単一ドメイン抗体分子も包含する。

20

【0329】

ある面において、SDAB分子は、魚類に見出される免疫グロブリンの可変領域由来、例えば、サメ血清中に見出される新規の抗原受容体(NAR)として公知の免疫グロブリンアイソタイプ由来の免疫グロブリンの可変領域などであってもよい。NAR(「IgNAR」)の可変領域由来の単一ドメイン分子を生産する方法は、WO03/014161およびStreltsov (2005) Protein Sci. 14:2901-2909で説明されている。

30

【0330】

別の面によれば、SDAB分子は、軽鎖が欠失した重鎖として公知の天然に存在する単一ドメイン抗原結合分子である。このような単一ドメイン分子は、例えば、WO9404678およびHamers-Casterman, C. et al. (1993) Nature 363:446-448に開示されている。明確さの理由のために、天然に軽鎖が欠失した重鎖分子由来のこの可変ドメインは、本明細書において、それを従来の4鎖の免疫グロブリンのVHと区別するために、VHHまたはナノボディとして理解される。このようなVHH分子は、ラクダ科の種由来であってもよく、例えばラクダ、ラマ、ヒトコブラクダ、アルパカおよびグアナコ中にある。ラクダ科以外の他の種が天然に軽鎖が欠失した重鎖分子を生産する可能性があり、このようなVHHは、本発明の範囲内である。

40

【0331】

SDAB分子は、組換え、CDRグラフト化、ヒト化、ラクダ化、脱免疫化および/またはインビトロで生成されてもよい(例えば、ファージディスプレイによって選択される)。

【0332】

また、受容体の抗原結合ドメイン間で相互作用する抗原結合ドメインを含む複数のキメラ膜貫通型受容体を有する細胞は、例えばその同種抗原と結合する抗原結合ドメインの1以上の能力を阻害することから、望ましくない可能性があることも発見された。したがって、このような相互作用を最小化する抗原結合ドメインを含む第一および第二の天然に存

50

在しないキメラ膜貫通型受容体を有する細胞が、本明細書で開示される。さらに、このような相互作用を最小化する抗原結合ドメインを含む第一および第二の天然に存在しないキメラ膜貫通型受容体をコードする核酸、加えてこのような細胞および核酸の作製および使用方法も本明細書で開示される。ある態様において、前記第一、前記第二の天然に存在しないキメラ膜貫通型受容体のうち一方の抗原結合ドメインは、s c F vを含み、他方は、単一のV Hドメイン、例えば、ラクダ、サメ、もしくはヤツメウナギの単一のV Hドメインまたはヒトもしくはマウス配列由来の単一のV Hドメインを含む。

【0333】

ある態様において、請求される本発明は、第一および第二のC A Rを含み、前記第一のC A R、前記第二のC A Rのうち一方の抗原結合ドメインは、可変軽鎖ドメインおよび可変重鎖ドメインを含まない。ある態様において、前記第一のC A R、前記第二のC A Rのうち一方の抗原結合ドメインは、s c F vであり、他方は、s c F vではない。ある態様において、前記第一のC A R、前記第二のC A Rのうち一方の抗原結合ドメインは、単一のV Hドメイン、例えば、ラクダ、サメまたはヤツメウナギの単一のV Hドメインまたはヒトもしくはマウス配列由来の単一のV Hドメインを含む。ある態様において、前記第一のC A R、前記第二のC A Rのうち一方の抗原結合ドメインは、ナノボディを含む。ある態様において、前記第一のC A R、前記第二のC A Rのうち一方の抗原結合ドメインは、ラクダV H Hドメインを含む。

10

【0334】

ある態様において、前記第一のC A R、前記第二のC A Rのうち一方の抗原結合ドメインはs c F vを含み、他方は、単一のV Hドメイン、例えば、ラクダ、サメまたはヤツメウナギの単一のV Hドメインまたはヒトもしくはマウス配列由来の単一のV Hドメインを含む。ある態様において、前記第一のC A R、前記第二のC A Rのうち一方の抗原結合ドメインはs c F vを含み、他方は、ナノボディを含む。ある態様において、前記第一のC A Rまたは前記第二のC A Rのうち一方の抗原結合ドメインは、s c F vを含み、他方は、ラクダV H Hドメインを含む。

20

【0335】

ある態様において、細胞表面上に提示される場合、前記第一のC A Rの抗原結合ドメインのその同種抗原への結合は、前記第二のC A Rの存在によって実質的に低減されない。ある態様において、前記第二のC A Rの存在下における前記第一のC A Rの抗原結合ドメインのその同種抗原への結合は、前記第二のC A Rの非存在下における前記第一のC A Rの抗原結合ドメインのその同種抗原への結合の、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%である。

30

【0336】

ある態様において、細胞表面上に提示される場合、前記第一のC A R、前記第二のC A Rの抗原結合ドメインは、両方がs c F v抗原結合ドメインの場合よりも低い程度に互いに結合している。ある態様において、前記第一のC A R、前記第二のC A Rの抗原結合ドメインは、両方がs c F v抗原結合ドメインの場合よりも、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%低い程度に互いに結合している。

【0337】

別の面において、ここに記載されるC A Rを発現する細胞は、別の薬剤、例えばC A Rを発現する細胞の活性を増強する薬剤をさらに発現することができる。例えば、ある態様において、薬剤は、阻害分子を阻害する薬剤であってもよい。阻害分子、例えばP D 1は、ある態様において、C A Rを発現する細胞の免疫エフェクター応答を展開する能力を低減することができる。阻害分子の例としては、P D 1、P D - L 1、P D - L 2、C T L A 4、T I M 3、C E A C A M(例えば、C E A C A M - 1、C E A C A M - 3および/またはC E A C A M - 5)、L A G 3、V I S T A、B T L A、T I G I T、L A I R 1、C D 1 6 0、2 B 4、C D 8 0、C D 8 6、B 7 - H 3(C D 2 7 6)、B 7 - H 4(V T C N 1)、H V E M(T N F R S F 1 4またはC D 2 7 0)、K I R、A 2 a R、M H CクラスI、M H CクラスII、G A L 9、アデノシンおよびT G F Rベータが挙げられる。

40

50

ある態様において、阻害分子を阻害する薬剤は、細胞に陽性シグナルを提供する第二のポリペプチド、例えばここに記載される細胞内シグナル伝達ドメインと結合した、第一のポリペプチド、例えば阻害分子を含む。ある態様において、薬剤は、例えば、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および/またはCEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14またはCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシンおよびTGFβまたはこれらのいずれかのフラグメント(例えば、これらのいずれかの細胞外ドメインの少なくとも一部)などの阻害分子の第一のポリペプチド、ならびにここに記載される細胞内シグナル伝達ドメインである[例えば、共刺激ドメイン(例えば、ここに記載されるような4-1BB、CD27、ICOSまたはCD28)および/または一次シグナル伝達ドメイン(例えば、ここに記載されるCD3ゼータシグナル伝達ドメインを含む]第二のポリペプチドを含む。ある態様において、薬剤は、PD1またはそれらのフラグメントの第一のポリペプチド(例えば、PD1の細胞外ドメインの少なくとも一部)およびここに記載される細胞内シグナル伝達ドメインの第二のポリペプチド(例えば、ここに記載されるCD28シグナル伝達ドメインおよび/またはここに記載されるCD3ゼータシグナル伝達ドメイン)を含む。ある態様において、ここに記載されるCARを発現する細胞は、例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられるWO2013/019615で説明されているような、スイッチ共刺激受容体を含む。PD1は、CD28、CTLA-4、ICOSおよびBTLAも包含するCD28受容体ファミリーの阻害性の一員である。PD-1は、活性化されたB細胞、T細胞および骨髄細胞で発現される(Agata et al. 1996 Int. Immunol 8:765-75)。PD1、PD-L1およびPD-L2に対する2リガンドは、PD1に結合したときのT細胞の活性化を下方調節することが示されている(Freeman et al. 2000 J Exp Med 192:1027-34; Latchman et al. 2001 Nat Immunol 2:261-8; Carter et al. 2002 Eur J Immunol 32:634-43)。PD-L1は、ヒト癌において豊富である(Dong et al. 2003 J Mol Med 81:281-7; Blank et al. 2005 Cancer Immunol Immunother 54:307-314; Konishi et al. 2004 Clin Cancer Res 10:5094)。免疫抑制は、PD1とPD-L1との局所的な相互作用を阻害することによって、回復させることができる。

【0338】

ある態様において、薬剤は、阻害分子、例えばプログラム死1(PD1: Programmed Death 1)の細胞外ドメイン(ECD)を含み、4-1BBおよびCD3ゼータなどの膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインに融合させることができる(また本明細書では、PD1CARとも称される)。ある態様において、PD1CARは、ここに記載されるCLL-1CARと組み合わせて使用される場合、CAR発現細胞、例えばT細胞またはNK細胞の持続性を向上させる。ある態様において、CARは、配列番号24において下線で示されたPD1の細胞外ドメインを含むPD1CARである。ある態様において、PD1CARは、配列番号24のアミノ酸配列を含む。

MalpvtaIIlplalIIhaarppgwfldspdrpwnpptfspallvvtegdnatftcsfsntsesfvlnwyrmspsnqtdklaafpedrsqpgqdcfrvrtqlpngrdfhmsvvrarrndsgtylcgaislapkaqikeslraelrvterraevptahpspsprpagqfqlvtttpaprpptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrglldfacdiyiwaplagtgcgvlllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpvqtqeedgcscrfeeeggcelrvkfsrsadapaykqqnqlynelnigrreeydvldkrgrdpemggkprkrknpqeglynelqkdkmaeayseigmkgerrrgkghdglyqglstatkdydalhmqalppr(配列番号24)。

【0339】

ある態様において、PD1CARは、以下に示されるアミノ酸配列(配列番号22)を含む。

pgwfldspdrpwnpptfspallvvtegdnatftcsfsntsesfvlnwyrmspsnqtdklaafpedrsqpgqdcfrvrtqlpngrdfhmsvvrarrndsgtylcgaislapkaqikeslraelrvterraevptahpspsprpagqfqlvtttpaprp

ptpaptiasqplslrpeacrpaaggavhtrglldfacdiyiwaplagtgcgvllllslvitlyckrgrkkllyifkqpfmrpv
qt t qeedgcscr fpeeeeggcelrvkfsrsadapaykqqnqlynelnlgrreeydvldkrrgrdpemggkpr rknpqeg
lynelqkdkmaeayseigmkgerrrrgkghdglyqglstaktdyaldhmqalppr (配列番号 2 2)。

【 0 3 4 0 】

ある態様において、薬剤は、PD1 CAR、例えばここに記載されるPD1 CAR
をコードする核酸配列を含む。ある態様において、PD1 CARに関する核酸配列は、
以下に示され、PD1 ECDは、以下の配列番号 2 3 において下線で示される。

atggccctccctgtcactgccctgcttctccccctcgcactcctgctccacgccgtagaccaccggatggtttctg
gacttccggatcgccccgtggaatcccccaaccttctcaccggcactcttggtgtgactgagggcgataatgcgacctt
cacgtgctcgttctccaacacctccgaatcatctcgtgctgaaactggtagccgcatgagcccgtaaacaccagaccgacaagc
tcgccgcttccggaagatcggtcgcaaccgggacaggattgtcggttccgcgtgactcaactgccgaatggcagagac
tccacatgagcgtggtccgcgctaggcgaaacgactccgggacctacctgtgcggagccatctcgctggcgcc taaggc
ccaaatcaaagagagcttgagggccgaactgagagtgaccgagcgcagagctgaggtgccaaactgcacatccatccccat
cgctcggcctgccccggcagttttagacctgggtcagcaccactccggcgccgcgcccaccgactccggccccaaactatc
gcgagccagccccgtcgctgagggccgaagcatgccgccccgccgagggtgctgtgcataccggggatggactt
cgcatgcgacatctacattgggctcctctcgccggaactgtggcgtgctccttctgtccctgggtcatcacctgtact
gcaagcggggtcgaaaaagcttctgtacatttcaagcagcccttcatgaggcccgtaaacaccaccaggaggaggac
ggtgctcctgccggttccccgaagaggaagaaggaggtgagcgtgagcgtgaagtctcccggagcggcagcggcc
cgctataagcagggccagaaccagctgtacaacgaactgaacctgggacggcgggaagagtacgatgtgctggacaagc
ggcgcgccgggacccccgaaatgggcgggaagcctagaagaaagaacctcaggaaggcctgtataacgagctgcagaag
gacaagatggccgaggcctactccgaaatgggatgaaggagagcggcggaggggaaaggggcacgacggcctgtacca
aggactgtccaccgccaccaaggacacatagcatgccctgcacatgcaggcccttccccctcgc (配列番号 2 3)。

10
20
30

【 0 3 4 1 】

別の面において、本発明は、CARを発現する細胞、例えば、CAR T細胞またはCAR
を発現するNK細胞の集団を提供する。ある態様において、CARを発現する細胞の集
団は、異なるCARを発現する細胞の混合物を含む。例えば、ある態様において、CAR
を発現する細胞(例えば、CAR T細胞またはCARを発現するNK細胞)の集団は、ここ
に記載される抗CLL-1結合ドメインを有するCARを発現する第一の細胞および異なる
抗CLL-1結合ドメイン、例えば、第一の細胞によって発現されるCARにおける抗
CLL-1結合ドメインとは異なるここに記載される抗CLL-1結合ドメインを有する
CARを発現する第二の細胞を包含していてもよい。別の例として、CARを発現する細
胞の集団は、抗CLL-1結合ドメイン、例えばここに記載される抗CLL-1結合ドメ
インを包含するCARを発現する第一の細胞およびCLL-1以外の標的(例えば、CD
123、CD33、CD34、FLT3または葉酸受容体ベータ)に対する抗原結合ドメ
インを包含するCARを発現する第二の細胞を包含していてもよい。ある態様において、
CAR発現細胞の集団は、例えば、一次細胞内シグナル伝達ドメインを包含する第一のC
AR発現細胞および二次シグナル伝達ドメイン、例えば共刺激シグナル伝達ドメインを包
含する第二のCAR発現細胞を包含する。

30
40

【 0 3 4 2 】

別の面において、本発明は、集団中の少なくとも1種の細胞が、ここに記載される抗C
LL-1ドメインを有するCARを発現し、第二の細胞が、別の薬剤、例えばCARを発
現する細胞の活性を増強する薬剤を発現する、細胞の集団を提供する。例えば、ある態
様において、薬剤は、阻害分子を阻害する薬剤であってもよい。ある態様において、阻害分
子は、例えば、免疫エフェクター応答を仕掛けるCAR発現細胞の能力を減少させること
ができる。阻害分子の例としては、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および/またはCE
ACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD16
0、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、
HVEM(TNFRSF14またはCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、M
HCクラスII、GAL9、アデノシンおよびTGFRベータが挙げられる。ある態様にお

40
50

いて、阻害分子を阻害する薬剤は、第一のポリペプチド、例えば阻害分子を含み、このようなポリペプチドは、細胞に陽性シグナルを提供する第二のポリペプチド、例えば、ここに記載される細胞内シグナル伝達ドメインと結合している。ある態様において、薬剤は、例えば、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および/またはCEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14またはCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシンおよびTGFRベータまたはこれらのいずれかのフラグメント(例えば、これらのいずれかの細胞外ドメインの少なくとも一部)などの阻害分子の第一のポリペプチド、ならびにここに記載される細胞内シグナル伝達ドメインである(例えば、共刺激ドメイン(例えば、ここに記載されるような4-1BB、CD27、ICOSまたはCD28)および/または一次シグナル伝達ドメイン(例えば、ここに記載されるCD3ゼータシグナル伝達ドメインを含む)第二のポリペプチドを含む。ある態様において、薬剤は、PD1またはそれらのフラグメントの第一のポリペプチド(例えば、PD1の細胞外ドメインの少なくとも一部)およびここに記載される細胞内シグナル伝達ドメインの第二のポリペプチド(例えば、ここに記載されるCD28シグナル伝達ドメインおよび/またはここに記載されるCD3ゼータシグナル伝達ドメイン)を含む。

10

【0343】

ある面において、本発明は、CARを発現する細胞(例えば、CAR T細胞またはCARを発現するNK細胞)の集団、例えば、異なるCARを発現する細胞の混合物を、別の薬剤、例えばここに記載されるキナーゼ阻害剤などのキナーゼ阻害剤と組み合わせて投与することを含む方法を提供する。別の面において、本発明は、細胞の集団を、別の薬剤、例えばここに記載されるキナーゼ阻害剤などのキナーゼ阻害剤と組み合わせて投与することを含む方法であって、集団中の少なくとも1種の細胞が、ここに記載される抗癌関連抗原結合ドメインを有するCARを発現し、第二の細胞が、別の薬剤、例えばCARを発現する細胞の活性を増強する薬剤を発現する、方法を提供する。

20

【0344】

ナチュラルキラー細胞受容体(NKR)CAR

ある態様において、ここに記載されるCAR分子は、ナチュラルキラー細胞受容体(NKR)の1以上の構成要素を含み、それによってNKR-CARを形成する。NKRの構成要素は、以下のナチュラルキラー細胞受容体：キラー細胞免疫グロブリン様受容体(KIR)、例えば、KIR2DL1、KIR2DL2/L3、KIR2DL4、KIR2DL5A、KIR2DL5B、KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS3、KIR2DS4、DIR2DS5、KIR3DL1/S1、KIR3DL2、KIR3DL3、KIR2DP1およびKIR3DP1；天然細胞毒性受容体(NCR)、例えば、Nkp30、Nkp44、Nkp46；免疫細胞受容体のシグナル伝達リンパ球活性化分子(SLAM)ファミリー、例えば、CD48、CD229、2B4、CD84、NTB-A、CRACC、BLAMEおよびCD2F-10；Fc受容体(FcR)、例えば、CD16およびCD64；ならびにLy49受容体、例えば、LY49A、LY49Cのいずれかからの、膜貫通ドメイン、ヒンジドメインまたは細胞質内ドメインであり得る。ここに記載されるNKR-CAR分子は、アダプター分子または細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、DAP12と相互作用する可能性がある。NKR構成要素を含むCAR分子の例示的な配置および配列は、その内容が参照により本明細書に組み入れられる国際公報WO2014/145252号で説明されている。

30

40

【0345】

キメラ抗原受容体を調節するための戦略

CAR活性を調節することができる多くの方法がある。ある態様において、CAR活性を制御することができる調節可能なCAR(RCAR)は、CAR療法の安全性および効能を最適化するのに望ましい。例えば二量体化ドメインに融合したカスパーゼを使用してア

50

ポトーシスを誘導すること(例えば、Di et al., N Engl. J. Med. 2011 Nov. 3;365(18):1673-1683を参照)は、例えば本発明のCAR療法における安全性スイッチとして使用できる。別の例において、CARを発現する細胞はまた、二量体化剤(例えば、リミツシド(ri miducid)(AP1903(Bellicum Pharmaceuticals)またはAP20187(Ariad)とも呼ばれる)投与の際にカスパーゼ-9の活性化および細胞のアポトーシスを引き起こす誘導性カスパーゼ-9(iカスパーゼ-9)分子も発現することができる。iカスパーゼ-9分子は、CIDの存在下で二量体化を媒介する二量体化(CID)結合ドメインの化学的な誘導物質を含有する。これは、CARを発現する細胞の誘導性で選択的な枯渇を引き起こす。いくつかの場合において、iカスパーゼ-9分子は、CARをコードするベクターとは別の核酸分子によってコードされる。いくつかの場合において、iカスパーゼ-9分子は、CARをコードするベクターと同じ核酸分子によってコードされる。iカスパーゼ-9は、CARを発現する細胞のあらゆる毒性を回避するための安全性スイッチを提供することができる。例えば、Song et al. Cancer Gene Ther. 2008; 15(10):667-75;臨床試験識別番号NCT02107963;およびDi Stasi et al. N. Engl. J. Med. 2011; 365:1673-83を参照されたい。

【0346】

本発明のCAR療法を調節するための代替の戦略としては、例えば、CARを発現する細胞を欠失させることによって、例えば、抗体依存性細胞媒介性細胞毒性(ADCC)を誘導することによって、CAR活性を非活性化したりまたは止めたりする小分子または抗体を利用することが挙げられる。例えば、ここに記載されるCARを発現する細胞もまた、細胞死、例えばADCCまたは補体誘導性の細胞死を誘導することが可能な分子によって認識される抗原を発現する可能性がある。例えば、ここに記載されるCARを発現する細胞はまた、抗体または抗体フラグメントによって標的化される可能性がある受容体を発現する可能性もある。このような受容体の例としては、EPCAM、VEGFR、インテグリン(例えば、インテグリン 3、4、3/4 3、4 7、5 1、

3、)、TNF受容体スーパーファミリーのメンバー(例えば、TRAIL-R1、TRAIL-R2)、PDGF受容体、インターフェロン受容体、葉酸受容体、GPNMB、ICAM-1、HLA-DR、CEA、CA-125、MUC1、TAG-72、IL-6受容体、5T4、GD2、GD3、CD2、CD3、CD4、CD5、CD11、CD11a/LFA-1、CD15、CD18/ITGB2、CD19、CD20、CD22、CD23/IgE受容体、CD25、CD28、CD30、CD33、CD38、CD40、CD41、CD44、CD51、CD52、CD62L、CD74、CD80、CD125、CD147/ベシジン、CD152/CTLA-4、CD154/CD40L、CD195/CCR5、CD319/SLAMF7およびEGFR、ならびにそれらのトランケートされたバージョン(例えば、1以上の細胞外のエピトープを保存するが細胞質内ドメイン内の1以上の領域が欠失したバージョン)が挙げられる。例えば、ここに記載されるCARを発現する細胞はまた、シグナル伝達能力を欠失しているが、ADCC、例えばセツキシマブ(アービタックス(登録商標))を誘導することが可能な分子によって認識されるエピトープを保持するトランケートされた上皮増殖因子受容体(EGFR)を発現してもよく、それにより、セツキシマブの投与が、ADCCとその後のCARを発現する細胞の枯渇を誘導するようになる(例えば、WO2011/056894およびJonnalagadda et al., Gene Ther. 2013; 20(8)853-860を参照)。別の戦略としては、リツキシマブと結合し、その結果として例えばADCCによるCARを発現する細胞の選択的な枯渇を引き起こす、ここに記載されるCARを発現する細胞中でCD32およびCD20抗原の両方からの標的エピトープを組み合わせた高度に小型のマーカ-自殺遺伝子が発現することが挙げられる(例えば、Philip et al., Blood. 2014; 124(8)1277-1287を参照)。ここに記載されるCARを発現する細胞を枯渇させるための他の方法としては、例えばADCCを誘導することによる破壊のために、成熟リンパ球、例えばCARを発現する細胞と選択的に結合してそれを標的とする、モノクローナル抗CD52抗体であるキャンパスの投与が挙げられる。他の態様において、CARを発現する細胞は、CARリガンド、例えば抗イディオタイプ抗体を使用して選択的に標的化され得る。ある態様にお

10

20

30

40

50

いて、抗イディオタイプ抗体は、エフェクター細胞活性、例えばA D C CまたはA D C 活性を引き起こすことによって、C A Rを発現する細胞の数を低減させることができる。他の態様において、C A Rリガンド、例えば抗イディオタイプ抗体は、細胞の殺滅を誘導する薬剤、例えば毒素とカップリングされることによって、C A Rを発現する細胞の数を低減させることができる。代替として、C A R分子それ自身が、後述するように、活性を調節することができる、例えば開始させたり止めたりできるように設計されていてもよい。

【0347】

ある態様において、R C A Rは、ポリペプチドのセットを含み、最も簡単な態様において、典型的には、2ポリペプチドのセットであって、ここに記載される標準的なC A Rの構成要素、例えば抗原結合ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインが別々のポリペプチドまたはメンバーに分配されているものである。ある態様において、ポリペプチドのセットは、二量体化分子の存在下でポリペプチドを互いにカップリングができ、例えば抗原結合ドメインを細胞内シグナル伝達ドメインにカップリングができる二量体化スイッチを包含する。このような調節可能なC A Rの追加の説明および例示的な配置は、本明細書で、さらにその全体が参照により本明細書に組み入れられる国際公報W O 2 0 1 5 / 0 9 0 2 2 9号で示される。

【0348】

ある面において、R C A Rは、2ポリペプチドまたはメンバー：1)細胞内シグナル伝達ドメイン、例えばここに記載される一次細胞内シグナル伝達ドメインおよび第一のスイッチドメインを含む細胞内シグナル伝達メンバー；2)例えばここに記載される腫瘍抗原に特異的に結合する、ここに記載される抗原結合ドメインおよび第二のスイッチドメインを含む抗原結合メンバーを含む。R C A Rは、ここに記載される膜貫通ドメインを含んでいてもよい。ある態様において、膜貫通ドメインは、細胞内シグナル伝達メンバー、抗原結合メンバーまたは両方に配置されていてもよい。(特に他の指定がない限り、本明細書においてR C A Rのメンバーまたは要素が記載される場合、順番は示された通りであっててもよいが、他の順番も同様に包含される。言い換えれば、ある態様において、順番は本文で設定された通りであるが、他の態様において順番は異なってもよい。例えば、膜貫通領域の一方の側における要素の順番は例とは異なってもよく、例えば、細胞内シグナル伝達ドメインに対するスイッチドメインの位置は異なってもよく、例えば逆でもよい)。

【0349】

ある態様において、第一および第二のスイッチドメインは、細胞内または細胞外の二量体化スイッチを形成することができる。ある態様において、二量体化スイッチは、例えば第一および第二のスイッチドメインが同一のホモ二量体化スイッチであってもよくまたは例えば第一および第二のスイッチドメインが互いに異なるヘテロ二量体化スイッチであってもよい。

【0350】

ある態様において、R C A Rは、「マルチスイッチ」を含んでいてもよい。マルチスイッチは、ヘテロ二量体化スイッチドメインまたはホモ二量体化スイッチドメインを含んでいてもよい。マルチスイッチは、第一のメンバー、例えば抗原結合メンバーおよび第二のメンバー、例えば細胞内シグナル伝達メンバーに、独立して、複数の、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9または10のスイッチドメインを含む。ある態様において、第一のメンバーは、複数の第一のスイッチドメイン、例えばF K B Pベースのスイッチドメインを含んでいてもよく、第二のメンバーは、複数の第二のスイッチドメイン、例えばF R Bベースのスイッチドメインを含んでいてもよい。ある態様において、第一のメンバーは、第一および第二のスイッチドメイン、例えばF K B PベースのスイッチドメインおよびF R Bベースのスイッチドメインを含んでいてもよく、第二のメンバーは、第一および第二のスイッチドメイン、例えばF K B PベースのスイッチドメインおよびF R Bベースのスイッチドメインを含んでいてもよい。

【0351】

ある態様において、細胞内シグナル伝達メンバーは、1以上の細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば一次細胞内シグナル伝達ドメインおよび1以上の共刺激シグナル伝達ドメインを含む。

【0352】

ある態様において、抗原結合メンバーは、1以上の細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、1以上の共刺激シグナル伝達ドメインを含んでいてもよい。ある態様において、抗原結合メンバーは、複数の、例えば2または3、例えば4-1BB、CD28、CD27、ICOSおよびOX40から選択されるここに記載される共刺激シグナル伝達ドメインを含み、態様において、一次細胞内シグナル伝達ドメインを含まない。ある態様において、抗原結合メンバーは、細胞外から細胞内の方向に、以下の共刺激シグナル伝達ドメイン：
4-1BB-CD27；4-1BB-CD27；CD27-4-1BB；4-1BB-CD28；CD28-4-1BB；OX40-CD28；CD28-OX40；CD28-4-1BB；または4-1BB-CD28を含む。このような態様において、細胞内の結合メンバーは、CD3ゼータドメインを含む。このような態様の一つにおいて、RCARは、(1)抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび2共刺激ドメイン、ならびに第一のスイッチドメインを含む抗原結合メンバー；ならびに(2)膜貫通ドメインまたは膜係留ドメインおよび少なくとも1の一次細胞内シグナル伝達ドメイン、ならびに第二のスイッチドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む。

【0353】

ある態様は、抗原結合メンバーがCAR細胞の表面に係留されていないRCARを提供する。これは、細胞内シグナル伝達メンバーを有する細胞が、抗原結合メンバーをコードする配列で細胞が形質転換されることなく、1以上の抗原結合ドメインとうまく対を形成することを可能にする。このような態様において、RCARは、1)第一のスイッチドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば一次細胞内シグナル伝達ドメインおよび第一のスイッチドメインを含む細胞内シグナル伝達メンバー；ならびに2)抗原結合ドメインおよび第二のスイッチドメインを含む抗原結合メンバーであって、膜貫通ドメインまたは膜係留ドメインを含まず、さらに細胞内シグナル伝達ドメインを含まない可能性がある、抗原結合メンバーを含む。ある態様において、RCARは、3)第二の抗原結合ドメイン、例えば抗原結合ドメインと結合するものとは異なる抗原と結合する第二の抗原結合ドメイン；および第二のスイッチドメインを含む第二の抗原結合メンバーをさらに含んでいてもよい。

【0354】

また、抗原結合メンバーが二重特異的な活性および標的化能力を含むRCARも本明細書で示される。この態様において、抗原結合メンバーは、複数の、例えば2、3、4または5抗原結合ドメイン、例えばscFvを含んでいてもよく、ここで各抗原結合ドメインは、標的抗原、例えば異なる抗原または同じ抗原、例えば同じ抗原上の同一または異なるエピトープに結合する。ある態様において、複数の抗原結合ドメインは、タンデム状であり、抗原結合ドメインのそれぞれの間、リンカーまたはヒンジ領域が配置されていてもよい。好適なリンカーおよびヒンジ領域は、ここに記載される。

【0355】

ある態様は、増殖の切り換えを可能にする配置を有するRCARを提供する。この態様において、RCARは、1)任意に膜貫通ドメインまたは膜係留ドメイン；例えば4-1BB、CD28、CD27、ICOSおよびOX40から選択される、1以上の共刺激シグナル伝達ドメイン、ならびにスイッチドメインを含む細胞内シグナル伝達メンバー；ならびに2)抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび一次細胞内シグナル伝達ドメイン、例えばCD3ゼータドメインを含む抗原結合メンバーであって、抗原結合メンバーはスイッチドメインを含まないかまたは細胞内シグナル伝達メンバーにおいてスイッチドメインと二量体化するスイッチドメインを含まない、抗原結合メンバーを含む。ある態様において、抗原結合メンバーは、共刺激シグナル伝達ドメインを含まない。ある態様において、細胞内シグナル伝達メンバーは、ホモ二量体化スイッチからのスイッチドメインを含む。

ある態様において、細胞内シグナル伝達メンバーは、ヘテロ二量体化スイッチの第一のスイッチドメインを含み、RCARは、ヘテロ二量体化スイッチの第二のスイッチドメインを含む第二の細胞内シグナル伝達メンバーを含む。このような態様において、第二の細胞内シグナル伝達メンバーは、細胞内シグナル伝達メンバーと同じ細胞内シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、二量体化スイッチは、細胞内である。ある態様において、二量体化スイッチは、細胞外である。

【0356】

ここで説明したRCAR配置のいずれかにおいて、第一および第二のスイッチドメインは、ここに記載されるFKBP - FRBベースのスイッチを含む。

【0357】

また、ここに記載されるRCARを含む細胞も本明細書で示される。RCARを発現するように加工されたあらゆる細胞が、RCARX細胞として使用することができる。ある態様において、RCARX細胞はT細胞であり、RCART細胞と称される。ある態様において、RCARX細胞はNK細胞であり、RCARN細胞と称される。

【0358】

また、RCARをコードする配列を含む核酸およびベクターも本明細書で示される。RCARの様々な要素をコードする配列は、同じ核酸分子、例えば同じプラスミドまたはベクター、例えばウイルスベクター、例えばレンチウイルスベクターに配置させることができる。ある態様において、(i)抗原結合メンバーをコードする配列および(ii)細胞内シグナル伝達メンバーをコードする配列は、同じ核酸、例えばベクターに存在していてもよい。対応するタンパク質の生産は、例えば、別のプロモーターの使用によってまたはパイシストロン性の転写産物(単一の翻訳産物の切断によってまたは2の別々のタンパク質産物の翻訳によって2タンパク質の生産を引き起こすことができる)の使用によって達成することができる。ある態様において、切断可能なペプチドをコードする配列、例えばP2AまたはF2A配列は、(i)と(ii)との間に配置される。ある態様において、IRES、例えばEMCVまたはEV71 IRESをコードする配列は、(i)と(ii)との間に配置される。これらの態様において、(i)および(ii)は単一のRNAとして転写される。ある態様において、(i)および(ii)が別々のmRNAとして転写されるように、第一のプロモーターは(i)に操作可能に連結しており、第二のプロモーターは(ii)に操作可能に連結している。

【0359】

代替として、RCARの様々な要素をコードする配列は、異なる核酸分子、例えば異なるプラスミドまたはベクター、例えばウイルスベクター、例えばレンチウイルスベクターに配置させてもよい。例えば、(i)抗原結合メンバーをコードする配列は第一の核酸、例えば第一のベクターに存在していてもよいし、(ii)細胞内シグナル伝達メンバーをコードする配列は第二の核酸、例えば第二のベクターに存在していてもよい。

【0360】

二量体化スイッチ

二量体化スイッチは、非共有結合でもよいしまたは共有結合でもよい。非共有結合の二量体化スイッチにおいて、二量体化分子は、スイッチドメイン間の非共有結合の相互作用を促進する。共有結合の二量体化スイッチにおいて、二量体化分子は、スイッチドメイン間の共有結合の相互作用を促進する。

【0361】

ある態様において、RCARは、FKBP / FRAPまたはFKBP / FRBベースの二量体化スイッチを含む。FKBP12(FKBPまたはFK506結合タンパク質)は、天然産物の免疫抑制薬であるラパマイシンにとって最初の細胞内標的として役立つ豊富な細胞質内タンパク質である。ラパマイシンは、FKBPおよび大きいPI3K相同体のFRAP(RAFT、mTOR)に結合する。FRBは、FKBP - ラパマイシン複合体と結合するのに十分なFRAPの93アミノ酸の部分である(Chen, J., Zheng, X. F., Brown, E. J. & Schreiber, S. L. (1995) Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-b

10

20

30

40

50

inding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. Proc Natl Acad Sci U S A 92: 4947-51)。

【 0 3 6 2 】

ある態様において、FKBP / FRAP、例えばFKBP / FRBベースのスイッチは、二量体化分子、例えばラパマイシンまたはラパマイシン類似体を使用することができる。

【 0 3 6 3 】

FKBPのアミノ酸配列は、以下の通りである：

D V P D Y A S L G G P S S P K K K R K V S R G V Q V E T I S P G D G R T F P K
R G Q T C V V H Y T G M L E D G K K F D S S R D R N K P F K F M L G K Q E V I R
G W E E G V A Q M S V G Q R A K L T I S P D Y A Y G A T G H P G I I P P H A T L
V F D V E L L K L E T S Y(配列番号205)

10

【 0 3 6 4 】

ある態様において、FKBPスイッチドメインは、ラパマイシンまたはラパログの存在下でFRBと結合する能力を有するFKBPフラグメントまたはそれらのフラグメントもしくは類似体、例えば以下に示す配列番号205の下線で示された部分を含んでいてもよい：

V Q V E T I S P G D G R T F P K R G Q T C V V H Y T G M L E D G K K F D S S R
D R N K P F K F M L G K Q E V I R G W E E G V A Q M S V G Q R A K L T I S P D Y
A Y G A T G H P G I I P P H A T L V F D V E L L K L E T S(配列番号206)

20

【 0 3 6 5 】

FRBのアミノ酸配列は、以下の通りである：

I L W H E M W H E G L E E A S R L Y F G E R N V K G M F E V L E P L H A M M E R G P Q T L K E T S F N Q A Y G R D L M E A Q E W C R K Y M K S
G N V K D L T Q A W D L Y Y H V F R R I S K(配列番号207)

【 0 3 6 6 】

「FKBP / FRAP、例えばFKBP / FRBベースのスイッチ」は、この用語が本明細書において使用される場合、ラパマイシンまたはラパログの存在下でFRBと結合する能力を有するFKBPフラグメントもしくはそれらの類似体またはそれらのフラグメントもしくは類似体、例えば、RAD001を含み、配列番号54または55のFKBP配列と、少なくとも70、75、80、85、90、95、96、97、98または99%同一性を有するかまたはそれとは30、25、20、15、10、5、4、3、2または1以下のアミノ酸残基が異なる、第一のスイッチドメイン；ならびにラパマイシンまたはラパログの存在下でFRBと結合する能力を有するFRBフラグメントもしくはそれらの類似体またはそれらのフラグメントもしくは類似体を含み、配列番号56のFRB配列と、少なくとも70、75、80、85、90、95、96、97、98または99%同一性を有するかまたはそれとは30、25、20、15、10、5、4、3、2または1以下のアミノ酸残基が異なる、第二のスイッチドメインを含む二量体化スイッチを指す。ある態様において、ここに記載されるRCARは、配列番号205(または配列番号206)に開示されたアミノ酸残基を含む1スイッチドメインおよび配列番号207に開示されたアミノ酸残基を含む1スイッチドメインを含む。

30

40

【 0 3 6 7 】

ある態様において、FKBP / FRB二量体化スイッチは、FRBベースのスイッチドメイン間の、変更された、例えば増強された複合体形成を示す、改変されたFRBスイッチドメインを含み、例えば、改変されたFRBスイッチドメイン、FKBPベースのスイッチドメインおよび二量体化分子、例えばラパマイシンまたはラパログ、例えばRAD001を含む。ある態様において、改変されたFRBスイッチドメインは、野生型アミノ酸が他のいずれかの天然に存在するアミノ酸に変異した、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上の、アミノ酸位置L2031、E2032、S2035、R2036、F2039、G2040、T2098、W2101、D2102、Y2105およびF2108における変異から選択される1以上の変異を含む。ある態様において、変異F

50

FRBは、E2032における変異を含み、ここでE2032は、フェニルアラニン(E2032F)、メチオニン(E2032M)、アルギニン(E2032R)、バリン(E2032V)、チロシン(E2032Y)、イソロイシン(E2032I)、例えば配列番号208またはロイシン(E2032L)に変異しており、例えば、配列番号209である。ある態様において、変異FRBは、T2098における変異を含み、ここでT2098は、フェニルアラニン(T2098F)またはロイシン(T2098L)に変異しており、例えば、配列番号210である。ある態様において、変異FRBは、E2032およびT2098における変異を含み、ここでE2032は、いずれかのアミノ酸に変異しており、T2098は、いずれかのアミノ酸に変異しており、例えば、配列番号211である。ある態様において、変異FRBは、E2032IおよびT2098Lの変異を含み、例えば、配列番号212である。ある態様において、変異FRBは、E2032LおよびT2098Lの変異を含み、例えば、配列番号213である。

【0368】

【表26】

表9. 二量体化分子への親和性が増加した例示的な突然変異FRB。

FRB 突然変異体	アミノ酸配列	配列番号
E2032I 突然変異体	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMFVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRISKTS	208
E2032L 突然変異体	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKGMFVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRISKTS	209
T2098L 突然変異体	ILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISKTS	210
E2032, T2098 突然変異体	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMFVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLXQAWDLYYHVFRRISKTS	211
E2032I, T2098L 突然変異体	ILWHEMWHEGLIEASRLYFGERNVKGMFVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISKTS	212
E2032L, T2098L 突然変異体	ILWHEMWHEGLLEASRLYFGERNVKGMFVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAQEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISKTS	213

【0369】

他の好適な二量体化スイッチとしては、GyrB-GyrBベースの二量体化スイッチ、ジベレリンベースの二量体化スイッチ、タグ/結合剤の二量体化スイッチおよびハロ-タグ/スナップ-タグ二量体化スイッチが挙げられる。本明細書で示される指針に従って、このようなスイッチおよび関連する二量体化分子は、当業者に明らかである。

【0370】

二量体化分子

スイッチドメイン間の結合は、二量体化分子によって促進される。二量体化分子の存在下で、スイッチドメイン間の相互作用または結合は、第一のスイッチドメインと結合した、例えば融合したポリペプチドと、第二のスイッチドメインと結合した、例えば融合したポリペプチドとの間のシグナル伝達を可能にする。非限定的なレベルの二量体化分子の存在下で、シグナル伝達は、例えばここに記載されるシステムで測定した場合、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、5、10、50、100倍に増加する。

【0371】

ラパマイシンおよびラパマイシン類似体(時にはラパログと称される)、例えばRAD001は、ここに記載されるFKBP/FRBベースの二量体化スイッチにおける二量体化分子として使用することができる。ある態様において、二量体化分子は、ラパマイシン(シロリムス)、RAD001(エベロリムス)、ゾタロリムス、テムシロリムス、AP-23573(リダフォロリムス)、バイオリムスおよびAP21967から選択することができる。FKBP/FRBベースの二量体化スイッチを伴う使用に適する、さらなるラパマ

イシン類似体については、「併用療法」と題される節または「低用量mTOR阻害剤との組合せ」と題される小節においてさらに説明されている。

【0372】

スプリットCAR

ある態様において、CARを発現する細胞は、スプリットCARを使用する。スプリットCARアプローチは、参照により本明細書に組み入れられる公報WO2014/055442およびWO2014/055657でより詳細に説明されている。簡単に言えば、スプリットCARシステムは、第一の抗原結合ドメインおよび共刺激ドメイン(例えば、41BB)を有する第一のCARを発現する細胞を含み、この細胞は、第二の抗原結合ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、CD3ゼータ)を有する第二のCARも発現する。細胞が第一の抗原と遭遇すると、共刺激ドメインが活性化され、細胞は増殖する。細胞が第二の抗原と遭遇すると、細胞内シグナル伝達ドメインが活性化され、細胞を殺滅する活性が開始される。したがって、CARを発現する細胞は、両方の抗原の存在下でのみ完全に活性化される。ある態様において、第一の抗原結合ドメインは、CLL-1を認識し、例えばここに記載される抗原結合ドメインを含み、第二の抗原結合ドメインは、急性骨髄性白血病細胞上で発現される抗原、例えば、CD123、CD33、CD34、FLT3または葉酸受容体ベータを認識する。ある態様において、第一の抗原結合ドメインは、CLL-1を認識し、例えばここに記載される抗原結合ドメインを含み、第二の抗原結合ドメインは、B細胞上で発現される抗原、例えば、CD19、CD20、CD22またはROR1を認識する。

10

20

【0373】

安定性および変異

CLL-1結合ドメイン、例えばscFv分子(例えば、可溶性scFv)の安定性は、従来の対照scFv分子または全長抗体の生物物理学的特性(例えば、熱安定性)を参照して評価することができる。ある態様において、ヒトscFvは、説明されているアッセイにおいて、対照結合分子(例えば従来のscFv分子)よりも、約0.1、約0.25、約0.5、約0.75、約1、約1.25、約1.5、約1.75、約2、約2.5、約3、約3.5、約4、約4.5、約5、約5.5、約6、約6.5、約7、約7.5、約8、約8.5、約9、約9.5、約10、約11、約12、約13、約14または約15高い熱安定性を有する。

30

【0374】

抗CLL-1結合ドメイン、例えばscFvの熱安定性の向上は、続いてCLL-1CAR構築物全体にも付与されることから、CLL-1CAR構築物の治療特性の向上をもたらされる。抗CLL-1結合ドメイン、例えばscFvの熱安定性は、従来の抗体と比較して少なくとも約2または3向上させることができる。ある態様において、抗CLL-1結合ドメイン、例えばscFvは、従来の抗体と比較して1向上した熱安定性を有する。別の態様において、抗CLL-1結合ドメイン、例えばscFvは、従来の抗体と比較して2向上した熱安定性を有する。別の態様において、scFvは、従来の抗体と比較して4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15向上した熱安定性を有する。例えば、本明細書で開示されるscFv分子と、全長抗体との間で、比較を行うことができる。熱安定性は、当業界公知の方法を使用して測定することができる。例えば、ある態様において、Tmを測定することができる。Tmを測定するための方法およびタンパク質の安定性を決定する他の方法については、下記でより詳細に説明する。

40

【0375】

scFvにおける変異は、scFvの安定性を変更し、scFvおよびCARTCLL-1構築物の全体的な安定性を改善する。ヒトscFvの安定性は、Tm、変性温度および凝集温度などの測定を使用して決定する。

【0376】

変異scFvの結合能力は、実施例で説明されるアッセイを使用して決定することがで

50

きる。

【0377】

ある態様において、変異した $s c F v$ によって $C L L - 1$ $C A R$ 構築物に安定性の向上が付与されるように、抗 $C L L - 1$ 結合ドメイン、例えば $s c F v$ は、少なくとも1の変異を含む。別の態様において、変異した $s c F v$ によって $C L L - 1$ $C A R$ 構築物に安定性の向上が付与されるように、抗 $C L L - 1$ 結合ドメイン、例えば $s c F v$ は、ヒト化プロセスから生じる少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10の変異を含む。

【0378】

タンパク質の安定性を評価する方法

10

抗原結合ドメインの安定性は、例えば後述される方法を使用して検討してもよい。このような方法によれば、最も安定でないドメインがそもそもフォールディングしないかまたは協調的にフォールディングしないマルチドメインユニット(例えば、単一のアンフォールディング転移を示すマルチドメインタンパク質)の全体的な安定性の限界を制限するかのいずれかである複数の熱的アンフォールディング転移を決定することができる。最も安定でないドメインは、多数の追加の方法で同定することができる。どのドメインが全体的な安定性を制限するのかを探索するために、変異誘発を行うことができる。加えて、マルチドメインタンパク質のプロテアーゼ耐性は、最も安定でないドメインが本質的にフォールディングされないことがわかっている条件下で、 $D S C$ または他の分光分析方法を介して達成することができる (Fontana, et al., (1997) *Fold. Des.*, 2: R17-26; Dimasi et al. (2009) *J. Mol. Biol.* 393: 672-692)。最も安定でないドメインが同定されたら、このドメイン(またはそれらの一部)をコードする配列が、本方法におけるテスト配列として採用される可能性がある。

20

【0379】

a) 熱安定性

組成物の熱安定性は、多数の非限定的な生物物理学的または生化学的な当業界公知の技術を使用して分析することができる。所定の態様において、熱安定性は、解析的分光分析によって評価される。

【0380】

典型的な解析的分光分析方法は、示差走査熱量測定 ($D S C$) である。 $D S C$ は、大部分のタンパク質またはタンパク質ドメインのアンフォールディングに伴う吸熱に感受性を有する熱量計を採用する(例えば、Sanchez-Ruiz, et al., *Biochemistry*, 27: 1648-52, 1988を参照)。タンパク質の熱安定性を決定するためには、熱量計にタンパク質のサンプルを挿入し、 $F a b$ または $s c F v$ がフォールディングしなくなるまで温度を上げる。タンパク質がフォールディングしない温度が、全体的なタンパク質の安定性の指標である。

30

【0381】

別の典型的な解析的分光分析方法は、円偏光二色性 ($C D$) 分光法である。 $C D$ 分光分析は、組成物の光学活性を、温度上昇の関数として測定する。円偏光二色性 ($C D$) 分光法は、構造的な非対称によって生じる左回り偏光と右回り偏光との吸収の差を測定する。無秩序なまたはフォールディングしていない構造は、規則正しいまたはフォールディングしている構造の $C D$ スペクトルとは極めて異なる $C D$ スペクトルをもたらす。 $C D$ スペクトルは、温度上昇による変性作用に対するタンパク質の感受性を反映することから、タンパク質の熱安定性の指標である (van Mierlo and Steemsma, *J. Biotechnol.*, 79(3):281-98, 2000を参照)。

40

【0382】

熱安定性を測定するための別の典型的な解析的分光分析方法は、蛍光発光分光法である(上記の van Mierlo and Steemsma を参照)。熱安定性を測定するためのさらに別の典型的な解析的分光分析方法は、核磁気共鳴 ($N M R$) 分光法である(例えば上記の van Mierlo and Steemsma を参照)。

【0383】

50

組成物の熱安定性は、生化学的に測定することができる。熱安定性を検討するための典型的な生化学的方法は、熱的誘発アッセイ(thermal challenge assay)である。「熱的誘発アッセイ」において、組成物は、設定された期間にわたり一連の温度上昇に晒される。例えば、ある態様において、テスト s c F v 分子または s c F v 分子を含む分子は、例えば 1 ~ 1.5 時間にわたり一連の温度上昇に晒される。次いでタンパク質の活性が、適切な生化学アッセイによってアッセイされる。例えば、タンパク質が結合タンパク質(例えば s c F v または s c F v 含有ポリペプチド)である場合、結合タンパク質の結合活性は、機能的または定量的 E L I S A によって決定することができる。

【0384】

このようなアッセイは、ハイスループット様式で行ってもよいし、E.コリ(E. coli)とハイスループットスクリーニングを使用した実施例で開示された様式で行ってもよい。抗 C L L - 1 結合ドメイン、例えば s c F v 変異体のライブラリーは、当業界公知の方法を使用して作り出すこともできる。抗 C L L - 1 結合ドメイン、例えば s c F v の発現を誘導してもよいし、抗 C L L - 1 結合ドメイン、例えば s c F v を熱的誘発に晒してもよい。誘発されたテストサンプルを結合に関してアッセイしてもよく、そのうち安定な抗 C L L - 1 結合ドメイン、例えば s c F v をスケールアップしてさらに特徴付けてもよい。

【0385】

熱安定性は、上記の技術のいずれか(例えば解析的分光法技術)を使用して組成物の融解温度(T_m)を測定することによって評価される。融解温度とは、組成物の分子の 50% がフォールディングした状況である温度遷移曲線の midpoint における温度である[例えば、Dimasi et al. (2009) J. Mol Biol. 393: 672-692を参照]。ある態様において、抗 C L L - 1 結合ドメイン、例えば s c F v の T_m 値は、約 40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100 である。ある態様において、Ig G の T_m 値は、約 40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100 である。ある態様において、多価抗体の T_m 値は、約 40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100 である。

【0386】

また熱安定性は、分析的な熱量測定技術(例えば D S C)を使用して組成物の比熱または熱容量(C_p)を測定することによっても評価される。組成物の比熱とは、1 mol の水の温度を 1 上昇させるのに必要なエネルギー(例えば kcal/mol で示される)である。 C_p が大きいほど、変性タンパク質または不活性なタンパク質の組成物であることの品質証明になる。組成物の熱容量(C_p)の変化は、その温度遷移の前と後に組成物の比熱を決定することによって測定される。また熱安定性は、アンフォールディングのギブスの

10

20

30

40

50

自由エネルギー(G)、アンフォールディングのエンタルピー(H)またはアンフォールディングのエントロピー(S)などの熱力学的な安定性の他のパラメーターを測定または決定することによっても評価できる。上記の生化学アッセイの1種または複数(例えば熱的誘発アッセイ)を使用して、組成物の50%がその活性(例えば結合活性)を保持する温度(すなわち T_c 値)が決定される。

【0387】

加えて、抗CLL-1結合ドメイン、例えばscFvへの変異により、抗CLL-1結合ドメイン、例えばscFvの熱安定性は、変異していない抗CLL-1結合ドメイン、例えばscFvと比較して変化する。ある態様において、抗CLL-1結合ドメイン、例えばscFvは、抗CLL-1結合ドメイン、例えばscFvに熱安定性を付与する単一の変異を含む。別の態様において、抗CLL-1結合ドメイン、例えばscFvは、抗CLL-1結合ドメイン、例えばscFvに熱安定性を付与する複数の変異を含む。ある態様において、抗CLL-1結合ドメイン、例えばscFv中の複数の変異は、抗CLL-1結合ドメイン、例えばscFvの熱安定性に対する相加効果を有する。

【0388】

b)凝集%

組成物の安定性は、その凝集する性質を測定することによって決定することができる。凝集は、多数の非限定的な生化学的または生物物理学技術によって測定できる。例えば、組成物の凝集は、クロマトグラフィー、例えばサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を使用して評価してもよい。SECは、サイズに基づき分子を分離する。カラムは、イオンや小分子はそれらの内部に通すが大きいものは通さない高分子ゲルの半固体のビーズで充填されている。タンパク質組成物がカラム上部に適用されると、小型のフォールディングしたタンパク質(すなわち凝集していないタンパク質)は、大きいタンパク質凝集体を受け入れられる容量より大きい容量の溶媒中に分散される。結果的に大きい凝集体はカラムをより迅速に移動するので、このようにして混合物を分離したりまたはその構成要素に分画したりすることが可能になる。各画分は、ゲルから溶出したときに別々に定量することができる(例えば光散乱によって)。したがって、組成物の凝集%は、画分の濃度をゲルに適用されたタンパク質の総濃度と比較することによって決定することができる。安定な組成物は、本質的に単一の画分としてカラムから溶出して、溶出プロファイルまたはクロマトグラムにおいて本質的に単一のピークとして出現する。

【0389】

c)結合親和性

組成物の安定性は、その目標とする結合親和性を決定することによって検討することができる。結合親和性を決定するための多種多様の方法が当業界公知である。結合親和性を決定するための典型的な方法は、表面プラズモン共鳴を採用するものである。表面プラズモン共鳴とは、例えばBIAcoreのシステム(Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, SwedenおよびPiscataway, N.J.)を使用して、バイオセンサーマトリックス内のタンパク質濃度変化を検出することにより、リアルタイムの生体特異的な相互作用の分析を可能にする光学現象である。さらなる説明については、Jonsson, U., et al. (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jonsson, U., et al. (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnson, B., et al. (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131; およびJohnson, B., et al. (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277を参照されたい。

【0390】

ある面において、CARの抗原結合ドメインは、ここに記載される抗原結合ドメインのアミノ酸配列に相同なアミノ酸配列を含み、抗原結合ドメインは、ここに記載される抗CLL-1抗体フラグメントの所望の機能特性を保持する。具体的なある面において、本発明のCAR組成物は、抗体フラグメントを含む。さらなる面において、その抗体フラグメントは、scFvを含む。

【0391】

様々な面において、CARの抗原結合ドメインは、一方または両方の可変領域(例えば

、V Hおよび/またはV L)内、例えば1以上のCDR領域内および/または1以上のフレームワーク領域内の、1以上のアミノ酸を改変することによって加工される。具体的なある面において、本発明のCAR組成物は、抗体フラグメントを含む。さらなる面において、その抗体フラグメントは、scFvを含む。

【0392】

本発明の抗体または抗体フラグメントは、それらの所望の活性は変化させずにアミノ酸配列が変化するように(例えば、野生型から)さらに改変されてもよいことは、当業者には理解される。例えば、「非必須」アミノ酸残基においてアミノ酸置換をもたらす追加のヌクレオチド置換がタンパク質になされてもよい。例えば、分子中の非必須アミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリーからの別のアミノ酸残基で置き換えられていてもよい。別の態様において、アミノ酸の鎖が、側鎖ファミリーの一員の、順番および/または組成において異なる構造的に類似した鎖で置き換えられていてもよく、例えば、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられる保存的置換がなされてもよい。

10

【0393】

類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当業界において定義されており、塩基性側鎖(例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電性極性側鎖(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、ベータ分岐側鎖(例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン)および芳香族側鎖(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)を包含する。

20

【0394】

2以上の核酸またはポリペプチド配列の状況における同一パーセントとは、2以上の配列が同一であることを指す。以下の配列比較アルゴリズムの1つを使用してまたは手作業でのアライメントと目視検査により測定する場合、比較ウィンドウまたは指示された領域にわたり最大限一致するように比較して並べたときに、2配列が、同一であるアミノ酸残基またはヌクレオチドの特定のパーセンテージ(例えば、特定の領域にわたりまたは特に指定されない場合は配列全体にわたり、60%同一性であり、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性であってもよい)を有する場合、その2配列は「実質的に同一」である。同一性は、長さが少なくとも約50ヌクレオチド(または10アミノ酸)の領域にわたりまたはより好ましくは長さが100から500もしくは1000以上のヌクレオチド(または20、50、200以上のアミノ酸)の領域にわたり存在してもよい。

30

【0395】

配列の比較のために、典型的には1配列が、テスト配列と比較される参照配列として作用する。配列比較アルゴリズムを使用する場合、テストおよび参照配列をコンピューターに入力し、部分配列の座標を指定し、必要に応じて配列アルゴリズムのプログラムパラメーターを指定する。デフォルトプログラムのパラメーターを使用してもよいしまたは代替パラメーターを指定してもよい。次いで配列比較アルゴリズムは、プログラムパラメーターに基づき参照配列に対するテスト配列のパーセント配列同一性を計算する。比較のための配列のアライメント方法は当業界周知である。比較のための最適な配列のアライメントは、例えば、Smith and Waterman, (1970) Adv. Appl. Math. 2:482cのローカルホモロジーアルゴリズムによって、Needleman and Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48:443のホモロジーアライメントアルゴリズムによって、Pearson and Lipman, (1988) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:2444の類似性検索方法によって、これらのアルゴリズムのコンピューター化された実行(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WIにおける、GAP, BESTFIT, FASTAおよびTFASTA)によってまたは手作業でのアライメントと目視検査[例えば、Brent et al., (2003) Current Prot

40

50

ocols in Molecular Biologyを参照]によって行うことができる。

【0396】

パーセント配列同一性および配列類似性を決定するのに好適なアルゴリズムの2例は、BLASTおよびBLAST 2.0アルゴリズムであり、これらはそれぞれ、Altschul et al., (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402; およびAltschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410で説明されている。BLAST分析を行うためのソフトウェアは、国立バイオテクノロジー情報センター(National Center for Biotechnology Information)を介して公共的に利用可能である。

【0397】

また2アミノ酸配列間のパーセント同一性は、ALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれ、PAM120重量残基表、12のギャップの伸長ペナルティーおよび4のギャップペナルティーを使用するE. MeyersおよびW. Miller [(1988) Comput. Appl. Biosci. 4:11-17]のアルゴリズムを使用しても決定することができる。加えて、2アミノ酸配列間のパーセント同一性は、GCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラム(www.gcg.comで利用可能)に組み込まれ、Blossom62マトリックスまたはPAM250マトリックスのいずれか、ならびに16、14、12、10、8、6または4のギャップウェイトおよび1、2、3、4、5または6のレングスウェイトを使用するNeedlemanおよびWunsch((1970) J. Mol. Biol. 48:444-453)のアルゴリズムを使用して決定することもできる。

【0398】

ある面において、本発明は、機能的に同等な分子を生成する開始時の抗体またはフラグメント(例えば、scFv)のアミノ酸配列の改変を意図している。例えば、CARに含まれる、抗CLL-1結合ドメイン、例えばscFvのVHまたはVLは、抗CLL-1結合ドメイン、例えばscFvの開始時のVHまたはVLフレームワーク領域の、少なくとも約70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性が保持されるように改変してもよい。本発明は、機能的に同等な分子を生成するために、CAR構築物全体の改変、例えば、CAR構築物の様々なドメインの1以上のアミノ酸配列における改変を意図している。CAR構築物は、開始時のCAR構築物の、少なくとも約70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同一性が保持されるように改変してもよい。

【0399】

RNAトランスフェクション

本明細書において、インビトロで転写されたRNA CARを産生する方法が開示される。本発明はまた、細胞に直接トランスフェクトすることができる、CARをコードするRNA構築物も包含する。トランスフェクションで使用するためのmRNAを生成するための方法は、長さが典型的には50~2000塩基の3'および5'非翻訳配列(「UTR」)、5'キャップおよび/または内部リボソーム侵入部位(IRES)、発現させる核酸およびポリAテイルを含有する構築物(配列番号35)を産生するために、インビトロでの特別に設計されたプライマーを用いた鋳型の転写(IVT)、それに続くポリA付加を含んでいてもよい。このようにして産生されたRNAは、異なる種の細胞に効率的にトランスフェクトすることができる。ある面において、鋳型は、CARに関する配列を包含する。

【0400】

ある面において、抗CLL-1 CARは、メッセンジャーRNA(mRNA)によってコードされる。ある面において、抗CLL-1 CARをコードするmRNAは、CAR T細胞の産生のために、T細胞に導入される。

【0401】

ある態様において、インビトロで転写されたRNA CARは、一過性トランスフェクションの形態として細胞に導入することができる。RNAは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)で生成した鋳型を使用したインビトロでの転写によって産生される。あらゆる源からの対象のDNAを、インビトロでの適切なプライマーおよびRNAポリメラーゼを使用したmRNA合成のための鋳型に直接PCRで変換させることができる。DNA源は、例えば、ゲノムDNA、プラスミドDNA、ファージDNA、cDNA、合成DNA配列または他のあらゆる適切なDNA源であってもよい。インビトロでの転写のための所望の鋳型は、本発明のCARである。例えば、RNA CARのための鋳型は、抗腫瘍抗体の単一の鎖可変ドメインを含む細胞外領域；ヒンジ領域、膜貫通ドメイン(例えば、CD8aの膜貫通ドメイン)；ならびに細胞内シグナル伝達ドメインを包含する細胞質内領域、例えば、CD3-ゼータのシグナル伝達ドメインおよび4-1BBのシグナル伝達ドメインを含む細胞質内領域を含む。

10

【0402】

ある態様において、PCRに使用するDNAは、オープンリーディングフレームを含有する。DNAは、生物のゲノムからの天然に存在するDNA配列由来であってもよい。ある態様において、核酸は、5'および/または3'非翻訳領域(UTR)の一部または全部を包含していてもよい。核酸は、エキソンおよびイントロンを包含していてもよい。ある態様において、PCRに使用するDNAは、ヒト核酸配列である。別の態様において、PCRに使用するDNAは、5'および3'UTRを包含するヒト核酸配列である。その代わりにDNAは、天然に存在する生物では通常発現されない人工DNA配列であってもよい。典型的な人工DNA配列は、一緒にライゲートして融合タンパク質をコードするオープンリーディングフレームを形成する遺伝子の一部を含有する配列である。一緒にライゲートされるDNAの一部は、単一の生物由来であってもよいしまたは1種より多くの生物由来であってもよい。

20

【0403】

PCRは、トランスフェクションに使用されるmRNAのインビトロでの転写のための鋳型を生成するために使用される。PCRを行う方法は当業界周知である。PCRで使用するためのプライマーは、PCRのための鋳型として使用するDNAの領域に実質的に相補的な領域が含まれるように設計される。「実質的に相補的」は、本明細書で使用される場合、プライマー配列中の塩基の大部分または全部が相補的であるかまたは1以上の塩基が非相補的であるかもしくは mismatchesのヌクレオチド配列を指す。実質的に相補的な配列は、PCRに使用されるアニーリング条件下で、意図したDNA標的にアニールしたりまたは意図したDNA標的とハイブリダイズしたりすることが可能である。プライマーは、DNA鋳型のいずれかの部分に実質的に相補的になるように設計することができる。例えば、プライマーは、5'および3'UTRを包含する細胞中で正常に転写される核酸(オープンリーディングフレーム)の一部が増幅されるように設計することができる。またプライマーは、対象の特定のドメインをコードする核酸の一部が増幅されるように設計することもできる。ある態様において、プライマーは、5'および3'UTRの全部または一部を包含するヒトcDNAのコード領域が増幅されるように設計される。PCRに有用なプライマーは、当業界周知の合成方法によって生成することができる。「フォワードプライマー」は、増幅されるべきDNA配列の上流でDNA鋳型におけるヌクレオチドに実質的に相補的なヌクレオチドの領域を含有するプライマーである。「上流」は、本明細書において、コード鎖に関して増幅するDNA配列の5位を指すものとして使用される。「リバースプライマー」は、増幅されるべきDNA配列の下流で二本鎖DNA鋳型に実質的に相補的なヌクレオチドの領域を含有するプライマーである。「下流」は、本明細書において、コード鎖に関して増幅するDNA配列の3'位を指すものとして使用される。

30

40

【0404】

ここに記載した方法において、PCRに有用なあらゆるDNAポリメラーゼを使用することができる。試薬およびポリメラーゼは、多数の供給元から市販されている。

50

【0405】

安定性および/または翻訳効率を促進する能力を有する化学構造も使用が可能である。RNAは、好ましくは5'および3' UTRを有する。ある態様において、5' UTRは、長さが1から3000ヌクレオチドの間である。コード領域に付加する5'および3' UTR配列の長さは、これらに限定されないが、UTRの異なる領域にアニールするPCRのためのプライマーを設計することなど様々な方法によって変更することができる。このアプローチを使用すれば、当業者は、転写されたRNAのトランスフェクション後に最適な翻訳効率を達成するのに必要な5'および3' UTRの長さを改変することができる。

【0406】

5'および3' UTRは、対象の核酸にとって、天然に存在する内因性5'および3' UTRであってもよい。その代わりに、フォワードおよびリバースプライマーにUTR配列を取り入れることによってまたは鋳型の他のあらゆる改変によって、対象の核酸にとって内因性ではないUTR配列を付加してもよい。対象の核酸にとって内因性ではないUTR配列の使用は、RNAの安定性および/または翻訳効率を改変するのに有用な可能性がある。例えば、3' UTR配列中のAUリッチ要素は、mRNAの安定性を減少させる可能性があることが知られている。それゆえに、当業界周知のUTRの特性に基づき転写されたRNAの安定性を増加させるには、3' UTRを選択または設計することができる。

【0407】

ある態様において、5' UTRは、内因性核酸のコザック配列を含有していてもよい。その代わりに、対象の核酸にとって内因性ではない5' UTRを上述したようにPCRによって付加する場合、5' UTR配列を付加することによってコンセンサスコザック配列の設計を改めてもよい。コザック配列は一部のRNA転写物の翻訳効率を増加させることができるが、効率的な翻訳を可能にするために全てのRNAに必要であるとは考えられていない。多くのmRNAにとってのコザック配列の必要条件は当業界公知である。他の態様において、5' UTRは、RNAのゲノムが細胞中で安定であるRNAウイルスの5' UTRであってもよい。他の態様において、様々なヌクレオチド類似体は、3'または5' UTRにおいて、エキソヌクレアーゼによるmRNAの分解を妨害するのに使用できる。

【0408】

遺伝子クローニングを必要とすることなくDNA鋳型からのRNAの合成を可能にするためには、転写プロモーターは、転写する配列の上流でDNA鋳型に付着しなければならない。RNAポリメラーゼのプロモーターとして機能する配列がフォワードプライマーの5'末端に付加される場合、RNAポリメラーゼのプロモーターは、転写するオープンリーディングフレームの上流でPCR産物に取り入れられるようになる。好ましいある態様において、プロモーターは、本明細書の他所で説明したように、T7ポリメラーゼプロモーターである。他の有用なプロモーターとしては、これらに限定されないが、T3およびSP6 RNAポリメラーゼプロモーターが挙げられる。T7、T3およびSP6プロモーターのコンセンサスヌクレオチド配列は、当業界公知である。

【0409】

好ましい態様において、mRNAは、5'末端上のキャップと3'ポリ(A)テイルの両方を有しており、これらガリボソーム結合、翻訳開始および細胞中でのmRNAの安定性を決定する。環状DNA鋳型、例えばプラスミドDNAにおいて、RNAポリメラーゼは、真核細胞での発現には好適ではない長いコンカテマー様の生成物を産生する。3' UTRの末端で直線化したプラスミドDNAの転写は、正常なサイズのmRNAをもたらすが、これは転写後にポリアデニル化されたとしても真核性のトランスフェクションにおいて有効ではない。

【0410】

直鎖状DNA鋳型において、ファージT7 RNAポリメラーゼは、鋳型の最後の塩基を過ぎても転写物の3'末端を伸長することができる((Schenborn and Mierendorf, Nuc Ac

10

20

30

40

50

ids Res., 13:6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, Eur. J. Biochem., 270:1485-65 (2003))。

【0411】

ポリA/TストレッチをDNA鋳型に統合する従来の方法は、分子クローニングである。しかしながら、プラスミドDNAに統合されたポリA/T配列は、プラスミドを不安定化する可能性があり、これが、なぜ細菌細胞から得られたプラスミドのDNA鋳型に、欠失や他の異常が高度に混入していることが多いのかの理由である。そのため、クローニング手法は面倒で時間がかかるだけでなく、信頼できないものになっている。これが、クローニングを用いずにポリA/T 3'ストレッチを有するDNA鋳型の構築が可能になる方法が極めて望ましい理由である。

10

【0412】

転写のDNA鋳型のポリA/Tセグメントは、PCR中に、ポリTテイル、例えば100Tテイル(配列番号31)[サイズは、50~5000のTであってもよい(配列番号32)]を含有するリバースプライマーを使用することによってまたはPCR後に、これらに限定されないが、DNAライゲーションまたはインビトロでの組換えなどの他のあらゆる方法によって産生することができる。またポリ(A)テイルは、RNAに安定性ももたらし、それらの分解を少なくする。一般的に、ポリ(A)テイルの長さは、転写されたRNAの安定性と正の相関がある。ある態様において、ポリ(A)テイルは、100から5000アデノシンの間である(配列番号33)。

【0413】

RNAのポリ(A)テイルは、E.コリのポリAポリメラーゼ(E-PAP)などのポリ(A)ポリメラーゼを使用して、インビトロでの転写の後にさらに伸長させることができる。ある態様において、ポリ(A)テイルの長さを100ヌクレオチドから、300~400ヌクレオチド(配列番号34)に増加させることにより、RNAの翻訳効率約2倍の増加がもたらされる。加えて、3'末端への異なる化学基の付着は、mRNAの安定性を増加させることができる。このような付着は、改変された/人工ヌクレオチド、アダプターおよび他の化合物を含有していてもよい。例えば、ATP類似体は、ポリ(A)ポリメラーゼを使用してポリ(A)テイルに取り入れられてもよい。ATP類似体は、RNAの安定性をさらに増加させることができる。

20

【0414】

また5'キャップは、RNA分子に安定性ももたらす。好ましい態様において、ここに記載した方法によって産生されたRNAは、5'キャップを包含する。5'キャップは、当業界公知の技術やここに記載される技術を使用してもたらされる(Cougot, et al., Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., RNA, 7:1468-95 (2001); Elango, et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005))。

30

【0415】

ここに記載した方法によって産生されたRNAはまた、内部リボソーム侵入部位(IRES)配列を含有していてもよい。IRES配列は、あらゆるウイルス配列、染色体配列または人工的に設計された配列であってもよく、これは、キャップ非依存性のmRNAへのリボソーム結合を開始させて翻訳開始を容易にするものである。細胞のエレクトロポレーションに好適なあらゆる溶質、すなわち糖、ペプチド、脂質、タンパク質、抗酸化剤および界面活性剤などの細胞の透過性および生存能力を助長する因子を含有し得る溶質が包含されていてもよい。

40

【0416】

RNAは、多数の異なる方法、例えば市販の方法のいずれかを使用して標的細胞に導入することができ、このような方法としては、これらに限定されないが、エレクトロポレーション[Amaxa Nucleofector-II(Amaxa Biosystems, Cologne, Germany)], [ECM830(BTX)(Harvard Instruments, Boston, Mass.)またはジーンパルサーII(BioRad, Denver, Colo.)]、マルチポレーター(Eppendorf, Hamburg Germany)、リポフェクションを使用したカチオン性リボソーム介在トランスフェクション、ポリマーのカプセル封入、ペプチド介在ト

50

ランスフェクションまたは遺伝子銃粒子送達系、例えば「ジーンガン」[例えば、Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12(8):861-70 (2001)を参照]が挙げられる。

【0417】

非ウイルス送達方法

いくつかの面において、非ウイルス方法は、細胞または組織または対象にここに記載されるCARをコードする核酸を送達するのに使用することができる。

【0418】

ある態様において、非ウイルス方法としては、トランスポゾン(転移因子とも呼ばれる)の使用が挙げられる。ある態様において、トランスポゾンは、ゲノム中の位置にそれ自身を挿入することができるDNAの断片、例えば、自己増殖してそのコピーをゲノムに挿入することができるDNAの断片またはより長い核酸からプライミングしてゲノム中の別の場所に挿入することができるDNAの断片である。例えば、トランスポゾンは、転移のための遺伝子の端にある逆方向反復配列で構成されるDNA配列を含む。

【0419】

トランスポゾンを使用する核酸送達の例示的な方法としては、スリーピングビューティートランスポゾンシステム(SBTS)およびpiggyBac(PB)トランスポゾンシステムが挙げられる。例えば、全てが参照により本明細書に組み入れられる、Aronovich et al. Hum. Mol. Genet. 20.R1(2011):R14-20; Singh et al. Cancer Res. 15(2008):2961-2971; Huang et al. Mol. Ther. 16(2008):580-589; Grabundzija et al. Mol. Ther. 18(2010):1200-1209; Kebriaei et al. Blood. 122.21(2013):166; Williams. Molecular Therapy 16.9(2008):1515-16; Bell et al. Nat. Protoc. 2.12(2007):3153-65;およびDing et al. Cell. 122.3(2005):473-83を参照されたい。

【0420】

SBTSは、2構成要素：1)導入遺伝子を含むトランスポゾンおよび2)トランスポゼース酵素源を包含する。トランスポゼースは、担体プラスミド(または他のドナーDNA)から標的DNA、例えば宿主細胞染色体/ゲノムにトランスポゾンを転移させることができる。例えば、トランスポゼースは、担体プラスミド/ドナーDNAに結合し、プラスミドからトランスポゾン(導入遺伝子を含む)を切り出して、それを宿主細胞のゲノムに挿入する。例えば上記のAronovich et al.を参照されたい。

【0421】

例示的なトランスポゾンとしては、pT2ベースのトランスポゾンが挙げられる。例えば、全てが参照により本明細書に組み入れられる、Grabundzija et al. Nucleic Acids Res. 41.3(2013):1829-47;およびSingh et al. Cancer Res. 68.8(2008): 2961-2971を参照されたい。例示的なトランスポゼースとしては、Tc1/マリナー型トランスポゼース、例えばSB10トランスポゼースまたはSB11トランスポゼース(例えばサイトメガロウイルスプロモーターから発現させることができる過剰活性化トランスポゼース)が挙げられる。例えば、全てが参照により本明細書に組み入れられるAronovich et al.; Kebriaei et al.; およびGrabundzija et al.を参照されたい。

【0422】

SBTSの使用は、導入遺伝子、例えば、ここに記載されるCARをコードする核酸の効率的な統合および発現を許容する。例えばSBTSなどのトランスポゾンシステムを使用してここに記載されるCARを安定して発現する細胞、例えばT細胞またはNK細胞を生成する方法が本明細書で示される。

【0423】

ここに記載される方法によれば、ある態様において、SBTS構成要素を含む1以上の核酸、例えばプラスミドが、細胞(例えば、TまたはNK細胞)に送達される。例えば、核酸は、核酸(例えば、プラスミドDNA)送達の標準的な方法、例えばここに記載される方法、例えば、エレクトロポレーション、ランスフェクションまたはリポフェクションによって送達される。ある態様において、核酸は、導入遺伝子、例えば、ここに記載されるCARをコードする核酸を含むトランスポゾンを含む。ある態様において、核酸

10

20

30

40

50

は、導入遺伝子(例えば、ここに記載されるCARをコードする核酸)に加えてトランスポゼース酵素をコードする核酸配列を含むトランスポゾンを含む。他の態様において、2核酸を含むシステムが提供され、例えば、二重プラスミドシステム、例えば、第一のプラスミドが導入遺伝子を含むトランスポゾンを含むし、第二のプラスミドがトランスポゼース酵素をコードする核酸配列を含むシステムが提供される。例えば、第一および第二の核酸は、宿主細胞に共に送達される。

【0424】

ある態様において、ここに記載されるCARを発現する細胞、例えば、TまたはNK細胞は、SBTSを使用した遺伝子挿入と、ヌクレアーゼ(例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、CRISPR/Casシステムまたは加工されたメガヌクレアーゼを再加工したホーミングエンドヌクレアーゼ)を使用した遺伝学的編集との組合せを使用することによって生成される。

10

【0425】

ある態様において、送達の方法の使用は、細胞、例えばTまたはNK細胞の再プログラミングおよび細胞の対象への直接注入を許容する。非ウイルスベクターの利点としては、これらに限定されないが、患者集団を充足させるのに必要となる十分な量を生産するのが容易且つ比較的低コストであること、貯蔵中の安定性および免疫原性の欠如が挙げられる。

【0426】

CARをコードする核酸構築物

20

本発明はまた、ここに記載される1種または複数のCAR構築物をコードする核酸分子も提供する。ある面において、核酸分子は、メッセンジャーRNAの転写物として提供される。ある面において、核酸分子は、DNA構築物として提供される。

【0427】

したがって、ある面において、本発明は、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする単離核酸分子であって、CARは、抗CLL-1結合ドメイン(例えば、ヒト抗CLL-1結合ドメイン)、膜貫通ドメイン、ならびに刺激ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、共刺激シグナル伝達ドメインおよび/または一次シグナル伝達ドメイン、例えばゼータ鎖を含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む、核酸分子に関する。ある態様において、抗CLL-1結合ドメインは、ここに記載される抗CLL-1結合ドメインであり、例えば、配列番号39~51からなる群より選択される配列またはそれらと95~99%同一性を有する配列を含む抗CLL-1結合ドメインである。ある態様において、膜貫通ドメインは、例えば、T細胞受容体のアルファ、ベータまたはゼータ鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137およびCD154からなる群より選択されるここに記載されるタンパク質の膜貫通ドメインである。ある態様において、膜貫通ドメインは、配列番号6の配列またはそれと95~99%同一性を有する配列を含む。ある態様において、抗CLL-1結合ドメインは、ヒンジ領域、例えばここに記載されるヒンジによって膜貫通ドメインに接続されている。ある態様において、ヒンジ領域は、配列番号2もしくは配列番号3もしくは配列番号4もしくは配列番号5またはそれらと95~99%同一性を有する配列を含む。ある態様において、単離核酸分子は、共刺激ドメインをコードする配列をさらに含む。ある態様において、共刺激ドメインは、例えば、MHCクラスI分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子(SLAMタンパク質)、活性化NK細胞受容体、BTLA、Tollリガンド受容体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、4-1BB(CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS(CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL2R

30

40

50

ベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANSCENDANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19aおよびCD83と特異的に結合するリガンドからなる群より選択されるここに記載されるタンパク質の機能的シグナル伝達ドメインである。

【0428】

ある態様において、共刺激ドメインは、配列番号7の配列もしくはそれと95~99%同一性を有する配列を含む。ある態様において、共刺激ドメインは、配列番号16の配列またはそれと95~99%同一性を有する配列を含む。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、4-1BBの機能的シグナル伝達ドメインおよびCD3ゼータの機能的シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号7もしくは配列番号8の配列またはそれらと95~99%同一性を有する配列および配列番号9もしくは配列番号10の配列またはそれらと95~99%同一性を有する配列

【0429】

別の面において、本発明は、配列番号1のリーダー配列、配列番号39~51(もしくはそれらと95~99%同一性を有する配列)からなる群より選択される配列を有するscFvドメイン、配列番号2もしくは配列番号3もしくは配列番号4もしくは配列番号5(もしくはそれらと95~99%同一性を有する配列)のヒンジ領域、配列番号6の配列(もしくはそれと95~99%同一性を有する配列)を有する膜貫通ドメイン、配列番号7の配列を有する4-1BB共刺激ドメインまたは配列番号8の配列(もしくはそれと95~99%同一性を有する配列)を有するCD27共刺激ドメインまたは配列番号482の配列(もしくはそれと95~99%同一性を有する配列)を有するCD28共刺激ドメインまたは配列番号483の配列を有するICOS共刺激ドメイン(もしくはそれと95~99%同一性を有する配列)および配列番号9もしくは配列番号10の配列を有するCD3ゼータ刺激ドメイン(もしくはそれらと95~99%同一性を有する配列)を含む、CAR構築物をコードする単離核酸分子に関する。

【0430】

別の面において、本発明は、上記核酸分子によってコードされた単離されたポリペプチド分子に関する。ある態様において、単離されたポリペプチド分子は、配列番号91~103からなる群より選択される配列またはそれらと95~99%同一性を有する配列を含む。

【0431】

別の面において、本発明は、抗CLL-1結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび刺激ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体(CAR)分子をコードする核酸分子であって、前記抗CLL-1結合ドメインは、配列番号39~51からなる群より選択される配列またはそれらと95~99%同一性を有する配列を含む、核酸分子に関する。

【0432】

ある態様において、コードされたCAR分子は、共刺激ドメインをコードする配列をさらに含む。ある態様において、共刺激ドメインは、例えば、MHCクラスI分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、

10

20

30

40

50

シグナル伝達リンパ球活性化分子(SLAMタンパク質)、活性化NK細胞受容体、BTLA、Tollリガンド受容体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、4-1BB(CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS(CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRP1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19aおよびCD83と特異的に結合するリガンドからなる群より選択されるタンパク質の機能的シグナル伝達ドメインである。ある態様において、4-1BB共刺激ドメインは、配列番号7のアミノ酸配列を含む。ある態様において、CD27共刺激ドメインは、配列番号8のアミノ酸配列を含む。ある態様において、CD28共刺激ドメインは、配列番号482のアミノ酸配列を含む。ある態様において、ICOS共刺激ドメインは、配列番号484のアミノ酸配列を含む。

10

20

【0433】

ある態様において、膜貫通ドメインは、T細胞受容体のアルファ鎖、ベータ鎖またはゼータ鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、MHCクラスI分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子(SLAMタンパク質)、活性化NK細胞受容体、BTLA、Tollリガンド受容体、OX40、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、4-1BB(CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS(CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRP1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8beta、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19aおよびCD83と特異的に結合するリガンドからなる群より選択される、タンパク質の膜貫通ドメインである。ある態様において、膜貫通ドメインは、配列番号6の配列を含む。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、4-1BBの機能的シグナル伝達ドメインおよびゼータの機能的シグナル伝達ドメインを含む。ある態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号7の配列および配列

30

40

50

番号9の配列を含み、ここで細胞内シグナル伝達ドメインを含む配列は、同一フレーム内で単一のポリペプチド鎖として発現される。ある態様において、抗CLL-1結合ドメインは、ヒンジ領域によって膜貫通ドメインに接続されている。ある態様において、ヒンジ領域は、配列番号2を含む。ある態様において、ヒンジ領域は、配列番号3または配列番号4または配列番号5を含む。

【0434】

別の面において、本発明は、配列番号1のリーダー配列、配列番号59～51またはそれらと95～99%同一性を有する配列からなる群より選択される配列を有するscFvドメイン、配列番号2もしくは配列番号3もしくは配列番号4もしくは配列番号5のヒンジ領域、配列番号6の配列を有する膜貫通ドメイン、配列番号7の配列を有する4-1BB共刺激ドメインまたは配列番号8の配列を有するCD27共刺激ドメインおよび配列番号9もしくは配列番号10の配列を有するCD3ゼータ刺激ドメインを含むコードされたCAR分子に関する。ある態様において、コードされたCAR分子は、配列番号91～103からなる群より選択される配列またはそれらと95～99%同一性を有する配列を含む。

10

【0435】

所望の分子をコードする核酸配列は、当業界公知の組換え方法を使用して得ることができ、例えば遺伝子を発現する細胞からのライブラリーをスクリーニングすること、遺伝子それを包含することがわかっているベクターからその遺伝子を抽出することまたはその遺伝子を含有する細胞および組織から標準的な技術を使用して直接単離することなどによって得ることができる。その代わりに、対象の遺伝子は、クローニングされるのではなく合成的に産生されてもよい。

20

【0436】

本発明はまた、本発明のDNAが挿入されるベクターも提供する。レンチウイルスなどのレトロウイルス由来ベクターは、導入遺伝子の長期にわたり安定な統合および娘細胞中でのその増殖を可能にすることから、長期にわたる遺伝子移入を達成するためのツールとして好適である。レンチウイルスベクターは、肝細胞などの非増殖細胞に形質導入することができるという点で、マウス白血病ウイルスなどのオンコレトロウイルス由来のベクターに勝る追加の利点を有する。またレンチウイルスベクターは、低い免疫原性という追加の利点も有する。またレトロウイルスベクターは、例えば、ガンマレトロウイルスベクターであってもよい。ガンマレトロウイルスベクターは、例えば、プロモーター、パッケージングシグナル()、プライマー結合部位(PBS)、1以上の(例えば、2)ロングターミナルリピート(LTR)および目的の導入遺伝子、例えば、CARをコードする遺伝子を包含していてもよい。ガンマレトロウイルスベクターは、gag、polおよびenvなどのウイルスの構造遺伝子(gens)を欠失していてもよい。例示的なガンマレトロウイルスベクターとしては、マウス白血病ウイルス(MLV)、脾フォーカス形成ウイルス(SFFV)および骨髄増殖性肉腫ウイルス(MPSV)およびそれら由来のベクターが挙げられる。他のガンマレトロウイルスベクターは、例えば、Tobias Maetzig et al., "Gammaretroviral Vectors: Biology, Technology and Application" Viruses. 2011 Jun; 3(6): 677-713で説明されている。

30

40

【0437】

別の態様において、本発明の所望のCARをコードする核酸を含むベクターは、アデノウイルスベクター(A5/35)である。別の態様において、CARをコードする核酸の発現は、スリーピングピューティー、CRISPR、CAS9およびジンクフィンガーヌクレアーゼなどのトランスポゾンを使用して達成することができる。以下の、参照により本明細書に組み入れられるJune et al. 2009 Nature Reviews Immunology 9.10: 704-716を参照されたい。

【0438】

簡単にまとめると、CARをコードする天然または合成核酸の発現は、典型的には、CARポリペプチドまたはそれらの一部をコードする核酸をプロモーターに操作可能に連結

50

して、その構築物を発現ベクターに取り入れることによって達成される。ベクターは、真核生物の複製および統合に好適であってもよい。典型的なクローニングベクターは、転写および翻訳ターミネーター、開始配列、ならびに所望の核酸配列の発現の調節に有用なプロモーターを含有する。

【0439】

発明の発現構築物は、標準的な遺伝子送達プロトコールを使用して核酸の免疫化および遺伝子治療にも使用することができる。遺伝子送達方法は、当業界公知である。例えば、参照によりそれらの全体が本明細書に組み入れられる米国特許第5,399,346号、5,580,859号、5,589,466号を参照されたい。別の態様において、本発明は、遺伝子治療用ベクターを提供する。

10

【0440】

核酸は、多数のタイプのベクターにクローニングすることができる。例えば、核酸は、これらに限定されないが、プラスミド、ファージミド、ファージ誘導體、動物ウイルスおよびコスミドなどのベクターにクローニングすることができる。特に興味深いベクターとしては、発現ベクター、複製ベクター、プローブ生成ベクター(probe generation vector)および配列決定ベクターが挙げられる。

【0441】

さらに、発現ベクターは、ウイルスベクターの形態で細胞に供給されてもよい。ウイルスベクター技術は当業界周知であり、例えば、Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NYや他のウイルス学および分子生物学マニュアルで説明されている。ベクターとして有用なウイルスとしては、これらに限定されないが、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルスおよびレンチウイルスが挙げられる。一般的に、好適なベクターは、少なくとも1種の生物において機能的な複製起点、プロモーター配列、便利な制限エンドヌクレアーゼ部位および1以上の選択マーカーを含有する(例えば、WO 01/96584; WO 01/29058; および米国特許第6,326,193号)。

20

【0442】

哺乳動物細胞への遺伝子移入のための多数のウイルスベース系が開発されてきた。例えば、レトロウイルスは、遺伝子送達系に便利なプラットフォームを提供する。選択された遺伝子を、当業界公知の技術を使用してベクターに挿入し、レトロウイルス粒子中にパッケージ化してもよい。次いで組換えウイルスを単離して、インビボまたはエクスピボのいずれかで対象の細胞に送達してもよい。多数のレトロウイルス系が当業界公知である。ある態様において、アデノウイルスベクターが使用される。多数のアデノウイルスベクターが当業界公知である。ある態様において、レンチウイルスベクターが使用される。

30

【0443】

追加のプロモーター要素、例えばエンハンサーは、転写開始の頻度を調節する。これらは、典型的には開始部位上流の領域30~110bpに配置されるが、多数のプロモーターが開始部位の下流に同様に機能的な要素を含有することが示されている。要素が互いに逆転または移動したときにプロモーターの機能が保存されるように、プロモーター要素間の間隔はフレキシブルであることが多い。チミジンキナーゼ(tk)プロモーターにおいて、プロモーター要素間の間隔は、活性が衰退し始める手前の50bpの間隔まで大きくすることができる。個々の要素は、転写を活性化するために、プロモーターに応じて協調的または独立的のいずれかによって機能する可能性があることが考えられる。

40

【0444】

哺乳動物のT細胞においてCARの導入遺伝子を発現することができるプロモーターの例は、EF1aプロモーターである。天然型のEF1aプロモーターは、アミノアシルtRNAのリボソームへの酵素による送達に関与する延長因子-1複合体のアルファサブユニットの発現を駆動する。EF1aプロモーターは、哺乳動物の発現プラスミドにおいて広く使用されており、レンチウイルスベクターにクローニングした導入遺伝子からのCAR発現の駆動において有効であることが示されてきた。例えば、Milone et al., Mol. Ther

50

17(8): 1453-1464 (2009)を参照されたい。ある面において、E F 1 aプロモーターは、配列番号11として提供される配列を含む。

【0445】

プロモーターの別の例は、前初期サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター配列である。このプロモーター配列は、それに操作可能に連結したあらゆるポリヌクレオチド配列の高レベルの発現を駆動することができる強い構成的プロモーター配列である。しかしながら他の構成的プロモーター配列も使用が可能であり、このような構成的プロモーター配列としては、これらに限定されないが、シミアンウイルス40(SV40)初期プロモーター、マウス乳癌ウイルス(MMTV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)ロングターミナルリピート(LTR)プロモーター、MoMuLVプロモーター、トリ白血病ウイルスプロモーター、エプスタイン-バーウイルス前初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、加えてヒト遺伝子プロモーター、例えば、これらに限定されないが、アクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、延長因子-1プロモーター、ヘモグロビンプロモーターおよびクレアチンキナーゼプロモーターなどが挙げられる。さらに本発明は、構成的プロモーターの使用に限定されないものとする。誘導性プロモーターも、本発明の一部として意図される。誘導性プロモーターの使用は、分子スイッチを提供し、このような分子スイッチは、分子スイッチが操作可能に連結したポリヌクレオチド配列の発現が望ましい場合に、そのポリヌクレオチド配列の発現を開始させまたは発現が望ましくない場合に、その発現を停止させることができる。誘導性プロモーターの例としては、これらに限定されないが、メタロチオネインプロモーター、グルココルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモーターおよびテトラサイクリンプロモーターが挙げられる。

【0446】

プロモーターの別の例は、ホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)プロモーターである。ある態様において、トランケートされたPGKプロモーター(例えば、野生型PGKプロモーター配列と比較した場合、1以上の、例えば、1、2、5、10、100、200、300または400個のヌクレオチド欠失を有するPGKプロモーター)が望ましい場合がある。例示的なPGKプロモーターのヌクレオチド配列を以下に示す。

【0447】

WT PGKプロモーター

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGT
GGCGCGCCCGTCCCTTGTCCCGGTGTGATGGCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCC
GCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACGAGGGACCGCGACAGGCAGA
CGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCAAGGCAAATAGTGCAGCCCGTGCGGCGCTTGGCGTTCCTTGAAGGGCTGAATC
CCCGCTCGTCCCTTCGACGCGGCCCGGGTGTTCATCGCGCTTCTAGGCCACTGCGACGCTTGCCTGCACTTCT
TACACGCTCTGGTCCCAGCCGCGCGACGCAAAGGGCCTTGGTGCGGTCTCGTCGGCGCAGGGACGCGTTTGGTCCC
GACGGAACCTTTTCCGCGTTGGGGTTGGGGCACCATAAGCT

(配列番号487)

【0448】

例示的なトランケートされたPGKプロモーター:

PGK100:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGT
GGCGCGCCCGTCCCTTGTCCCGGTGTGATGGCGGGGTG

(配列番号488)

【0449】

PGK200:

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGT
GGCGCGCCCGTCCCTTGTCCCGGTGTGATGGCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCC
GCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTCGGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACG

(配列番号489)

【0450】

10

20

30

40

50

P G K 3 0 0 :

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGT
GGCGCGCCCGTCTTGTCCCGGTGTGATGGCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCC
GCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTGCGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACGAGGGACCGCGACAGGCAGA
CGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATAGTGCAGGCCGTGCGGGCGTTGGCGTTCCTTGAAGGGCTGAATC
CCCG

(配列番号 4 9 0)

【 0 4 5 1 】

P G K 4 0 0 :

ACCCCTCTCTCCAGCCACTAAGCCAGTTGCTCCCTCGGCTGACGGCTGCACGCGAGGCCTCCGAACGTCTTACGCCTTGT
GGCGCGCCCGTCTTGTCCCGGTGTGATGGCGGGGTGTGGGGCGGAGGGCGTGGCGGGGAAGGGCCGGCGACGAGAGCC
GCGCGGGACGACTCGTCGGCGATAACCGGTGTGCGGTAGCGCCAGCCGCGCGACGGTAACGAGGGACCGCGACAGGCAGA
CGCTCCCATGATCACTCTGCACGCCGAAGGCAAATAGTGCAGGCCGTGCGGGCGTTGGCGTTCCTTGAAGGGCTGAATC
CCCGCTCGTCTTTCGACGCGGCCCGGGTGTTCATCGCCGCTTCTAGGCCACTGCGACGCTTGCCTGCCTTCT
TACACGCTCTGGGTCCCAGCCG

(配列番号 4 9 1)

【 0 4 5 2 】

ベクターはまた、例えば、分泌を容易にするためのシグナル配列、ポリアデニル化シグナルおよび転写ターミネーター(例えば、ウシ成長ホルモン(BGH)遺伝子からの)、エピソードの複製および原核生物における複製を可能にする要素(例えばSV40オリジンおよびColE1または当業界において公知の他のもの)および/または選択を可能にする要素(例えば、アンピシリン耐性遺伝子および/またはゼオシンマーカー)を包含している。

【 0 4 5 3 】

CARポリペプチドまたはそれらの一部の発現を検討するために、細胞に導入する発現ベクターはまた、ウイルスベクターを介してトランスフェクトまたは感染させたようにする細胞の集団から発現する細胞を同定および選択しやすくするために、選択マーカー遺伝子もしくはレポーター遺伝子のいずれかまたはその両方を含有している。他の面において、選択マーカーは、DNAの別の断片に搭載させてコトランスフェクション手法で使用されてもよい。選択マーカーおよびレポーター遺伝子はどちらも、宿主細胞で発現できるように適切な調節配列を端部に有している。有用な選択マーカーとしては、例えば、neoなどの抗生物質耐性遺伝子および同種のもので挙げられる。

【 0 4 5 4 】

レポーター遺伝子は、トランスフェクトされる可能性がある細胞を同定するために、さらには調節配列の機能性を評価するために使用することができる。一般的に、レポーター遺伝子は、レシピエント生物または組織に存在しないかまたはそれらによって発現されない遺伝子であり、さらに、その発現がいくつかの容易に検出可能な特性、例えば酵素活性によって証明されるポリペプチドをコードする遺伝子である。レポーター遺伝子の発現は、DNAがレシピエントの細胞に導入された後の好適な時間にアッセイされる。好適なレポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、分泌型アルカリホスファターゼをコードする遺伝子または緑色蛍光タンパク質遺伝子を挙げることができる(例えば、Ui-Tei et al., 2000 FBS Letters 479: 79-82)。好適な発現系は周知であり、公知の技術を使用して調製してもよいまたは商業的に入手してもよい。一般的に、レポーター遺伝子の最大レベルの発現を示す最小の5'フランキング領域を有する構築物は、プロモーターとして同定される。このようなプロモーター領域は、レポーター遺伝子に連結されて、プロモーターによって駆動された転写をコンディショニングする能力に関して薬剤を評価するために使用することができる。

【 0 4 5 5 】

ある態様において、ベクターは、第二のCARをコードする核酸をさらに含んでいても

よい。ある態様において、第二のCARは、急性骨髄性白血病細胞上で発現される標的、例えば、CD123、CD33、CD34、FLT3、もしくは葉酸受容体ベータに対する抗原結合ドメインを包含する。ある態様において、ベクターは、第一の抗原と特異的に結合し、共刺激シグナル伝達ドメインを有するが一次シグナル伝達ドメインを有さない細胞内シグナル伝達ドメインを包含する第一のCARをコードする核酸配列および第二の異なる抗原と特異的に結合し、一次シグナル伝達ドメインを有するが共刺激シグナル伝達ドメインを有さない細胞内シグナル伝達ドメインを包含する第二のCARをコードする核酸を含む。ある態様において、ベクターは、CLL-1結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび共刺激ドメインを包含する第一のCLL-1 CARをコードする核酸、ならびにCLL-1以外の抗原(例えば、AML細胞上で発現される抗原、例えば、CD123、CD33、CD34、FLT3、もしくは葉酸受容体ベータ)に特異的に結合し、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび一次シグナル伝達ドメインを包含する第二のCARをコードする核酸を含む。別の態様において、ベクターは、CLL-1結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび一次シグナル伝達ドメインを包含する第一のCLL-1 CARをコードする核酸、ならびにCLL-1以外の抗原(例えば、AML細胞上で発現される抗原、例えば、CD123、CD33、CD34、FLT3、もしくは葉酸受容体ベータ)と特異的に結合し、抗原に対する抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび共刺激シグナル伝達ドメインを包含する第二のCARをコードする核酸を含む。

10

【0456】

ある態様において、ベクターは、ここに記載されるCLL-1 CARをコードする核酸および阻害性CARをコードする核酸を含む。ある態様において、阻害性CARは、正常細胞上で見出されるが、癌細胞、例えばCLLも発現する正常細胞では見出されない抗原と結合する抗原結合ドメインを含む。ある態様において、阻害性CARは、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよび阻害分子の細胞内ドメインを含む。例えば、阻害性CARの細胞内ドメインは、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および/またはCEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14またはCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシンおよびTGFRベータの細胞内ドメインであってもよい。

20

30

【0457】

ある態様において、ベクターは、CAR、例えばここに記載されるCLL-1 CARおよび第二のCAR、例えば、阻害性CARまたはCLL-1以外の抗原(例えば、AML細胞上で発現される抗原、例えば、CD123、CD33、CD34、FLT3、もしくは葉酸受容体ベータ)に特異的に結合するCARをコードする2以上の核酸配列を含んでいてもよい。このような態様において、CARをコードする2以上の核酸配列は、同一フレーム内で単一のポリペプチド鎖として単一の核酸分子によってコードされる。この面において、2以上のCARは、例えば、1以上のペプチド切断部位(例えば、自動切断部位または細胞内プロテアーゼの基質)によって分離していてもよい。ペプチド切断部位の例としては、以下が挙げられ、ここでGSG残基は任意である：

40

T2A : (GSG) EGRGSLLTCTGDVEENPGP(配列番号492)

P2A : (GSG) ATNFSLLKQAGDVEENPGP(配列番号493)

E2A : (GSG) QCTNYALLKLAGDVESNPGP(配列番号494)

F2A : (GSG) VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP(配列番号495)

【0458】

遺伝子を細胞に導入して発現させる方法は当業界公知である。発現ベクターの場合において、ベクターは、当業界におけるあらゆる方法によって宿主細胞、例えば哺乳動物、細菌、酵母または昆虫細胞に容易に導入することができる。例えば、発現ベクターは、物理的、化学的または生物学的な手段によって宿主細胞に移入させることができる。

【0459】

50

宿主細胞にポリヌクレオチドを導入する物理的な方法としては、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、粒子衝撃、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションおよび同種のもものが挙げられる。ベクターおよび/または外因性核酸を含む細胞を産生する方法は当業界周知である。例えば、Sambrook et al., 2012, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NYを参照されたい。宿主細胞にポリヌクレオチドを導入する好ましい方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションである。

【0460】

宿主細胞を対象のポリヌクレオチドを導入する生物学的な方法としては、DNAおよびRNAベクターの使用が挙げられる。ウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターは、哺乳動物、例えばヒト細胞に遺伝子を挿入するための最も広く使用されている方法になりつつある。他のウイルスベクターは、レンチウイルス、ポックスウイルス、単純疱疹ウイルスI、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス、ならびに同種のもの由来のものであってもよい。例えば、米国特許第5,350,674号および5,585,362号を参照されたい。

10

【0461】

宿主細胞にポリヌクレオチドを導入するための化学的手段としては、例えば高分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズなどのコロイド分散系、ならびに水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセルおよびリポソームなどの脂質ベースの系が挙げられる。インビトロおよびインビボでの送達媒体として使用するための典型的なコロイド系は、リポソーム(例えば人工膜小胞)である。最先端の核酸の標的化送達の他の方法が利用可能であり、例えば、標的化ナノ粒子を用いたポリヌクレオチドの送達または他の好適なサブミクロンサイズの送達システムなどが挙げられる。

20

【0462】

非ウイルス送達システムが利用されるケースにおいて、典型的な送達媒体は、リポソームである。脂質調合物の使用は、宿主細胞への核酸の導入(インビトロ、エクスピボまたはインビボ)を意図している。別の面において、核酸は、脂質と結合していてもよい。脂質に結合した核酸は、リポソームの水性の内部に封入されていてもよいし、リポソームの脂質二重層内に点在させてもよいし、リポソームとオリゴヌクレオチドの両方と結合する連結分子を介してリポソームに付着していてもよいし、リポソーム中に閉じ込められていてもよいし、リポソームと複合体化していてもよいし、脂質を含有する溶液中に分散されていてもよいし、脂質と混合されてもよいし、脂質と組み合わせられていてもよいし、脂質中の懸濁液として含有されてもよいし、ミセルと共に含有されるかもしくはミセルと複合体化していてもよいしまたはそれ以外の方法で脂質と結合していてもよい。脂質、脂質/DNAまたは脂質/発現ベクターが結合した組成物は、溶液中におけるいかなる特定の構造にも限定されない。例えば、上記組成物は、二重層構造で、ミセルとしてまたは「崩壊した」構造で存在していてもよい。また上記組成物は、単に溶液中に点在した状態であってもよく、サイズまたは形状が均一でない凝集体を形成する可能性もある。脂質は、天然に存在する可能性がある脂肪性の物質であるかまたは合成脂質である。例えば、脂質としては、細胞質中で自然に発生する脂肪の小滴、加えて長鎖脂肪族炭化水素およびそれらの誘導体、例えば脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコール、ならびにアルデヒドなどを含有する化合物のクラスが挙げられる。

30

40

【0463】

使用に好適な脂質は、商業的な供給源から得ることができる。例えば、ジミリスチルホスファチジルコリン(「DMPC」)は、Sigma, St.Louis, MOから得ることができ、リン酸ジセチル(「DCP」)は、K&K Laboratories(Plainview, NY)から得ることができ、コレステロール(「Choi」)は、Calbiochem-Behringから得ることができ、ジミリスチルホスファチジルグリセロール(「DMPG」)および他の脂質は、Avanti Polar Lipids, Inc.(Birmingham, AL)から得ることができる。クロロホルムまたはクロロホルム/メタノール中の脂質のストック溶液は、約 - 20 で保存することができる。クロロホルムは、メ

50

タノールより容易に蒸発するため、唯一の溶媒として使用される。「リポソーム」は、封入された脂質二重層または凝集体の生成によって形成された様々な単層および多層の脂質小胞を包括する一般名称である。リポソームは、リン脂質二重層膜と内部の水性媒体とを有する小胞構造を有することを特徴とすることができる。多重膜リポソームは、水性媒体によって隔てられた複数の脂質層を有する。これらは、リン脂質が過量の水溶液中に懸濁されると自発的に形成される。脂質成分は、閉じた構造が形成される前に自己再構成を経て、水を閉じ込め、脂質二重層の間に溶質を溶解させる(Ghosh et al., 1991 Glycobiology 5: 505-10)。しかしながら、溶液中で通常の小胞構造とは異なる構造を有する組成物も包括される。例えば、脂質は、ミセル構造であると推定することができまたは単に脂質分子の不均一な凝集体として存在する可能性もある。また、リポフェクトアミン - 核酸複合体も考慮される。

10

【0464】

宿主細胞に外因性核酸を導入するのに使用される方法またはそれとは別に細胞を本発明の阻害剤に晒す方法にかかわらず、宿主細胞中の組換えDNA配列の存在を確認するために様々なアッセイを行うことができる。このようなアッセイとしては、例えば、当業者周知の「分子生物学的な」アッセイ、例えばサザンおよびノーザンブロッティング、RT-PCRおよびPCR；「生化学的な」アッセイ、例えば、免疫学的な手段(ELISAおよびウェスタンブロット)によるまたは本発明の範囲内に含まれる薬剤を同定するためのここに記載されるアッセイによる、特定のペプチドの存在または非存在の検出などが挙げられる。

20

【0465】

本発明はさらに、CARをコードする核酸分子を含むベクターを提供する。ある面において、CARベクターは、細胞、例えば免疫エフェクター細胞、例えばT細胞またはNK細胞に直接形質導入することができる。ある面において、ベクターは、クローニングまたは発現ベクターであり、例えば、これらに限定されないが、1以上のプラスミド(例えば、発現プラスミド、クローニングベクター、ミニサークル、ミニベクター、二重微小染色体)、レトロウイルスおよびレンチウイルスベクター構築物などのベクターである。ある面において、ベクターは、哺乳動物のT細胞中でCAR構築物を発現することができる。ある面において、哺乳動物のT細胞は、ヒトT細胞である。

30

【0466】

細胞源

細胞源(例えば免疫エフェクター細胞、例えばT細胞またはNK細胞)は、拡大および遺伝学的改変の前に、対象から得られる。用語「対象」は、免疫反応を惹起させることができる生物(例えば、哺乳動物)を包含することが意図される。対象の例としては、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラットおよびそれらのトランスジェニック種が挙げられる。T細胞は、末梢血単核細胞、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位からの組織、腹水、胸膜滲出、脾臓組織および腫瘍などの多数の源から得ることができる。

【0467】

本発明のある面において、当業界において利用可能な多数の免疫エフェクター細胞(例えばT細胞またはNK細胞)株を使用することができる。本発明のある面において、T細胞は、Ficoll™セパレーションなどの当業者公知の多数の技術を使用して対象から収集された血液のユニットから得ることができる。好ましいある面において、個体の循環血液からの細胞は、アフエレーシスによって得られる。アフエレーシス産物は、典型的には、T細胞などのリンパ球、単球、顆粒球、B細胞、他の有核の白血球、赤血球および血小板を含有する。ある面において、アフエレーシスによって収集された細胞を洗浄して血漿画分を除去し、それに続く処理工程のために細胞を適切な緩衝液または培地中に置くことができる。本発明のある面において、細胞は、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄される。代替の面において、洗浄溶液はカルシウムを含まず、マグネシウムを含んでいなくもよくまたは2価カチオンの全てとはいかないまでもその多くを含んでいなくてもよい。カルシウムの非存在下における初期の活性化工程により、活性化を増大させることができ

40

50

る。当業者であれば容易に認識するが、洗浄工程は、当業者公知の方法によって、例えば半自動の「流水式」遠心分離機(例えば、Cobe 2991 cell processor、Baxter CytoMateまたはHaemonetics Cell Saver 5)を製造元の説明書に従って使用することによって達成されてもよい。洗浄後、細胞は、様々な生体適合性緩衝液、例えばCa非含有、Mg非含有PBS、PlasmaLyte Aなどまたは他の緩衝液含有または非含有食塩水に再懸濁されもよい。その代わりに、アフエーシスサンプルの望ましくない成分を除去し、細胞を培養培地に直接再懸濁させてもよい。

【0468】

適用方法は、5%またはそれ未満、例えば2%のヒトAB血清を含む培養培地条件を利用でき、公知の培養培地条件および組成、例えばSmith et al., “Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement” *Clinical & Translational Immunology* (2015) 4, e31; doi:10.1038/cti.2014.31で説明されるものを採用できることが認識されている。

【0469】

ある面において、T細胞は、例えば、PERCOLL™の勾配を介した遠心分離によってまたは対向流遠心溶出法によって赤血球を溶解させ単球を枯渇させることにより末梢血リンパ球から単離される。陽性または陰性選択技術によって、特定のT細胞部分集団、例えばCD3⁺、CD28⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺およびCD45RO⁺T細胞をさらに単離することができる。例えば、ある面において、所望のT細胞の陽性選択に十分な期間にわたり、抗CD3/抗CD28(例えば、3×28)がコンジュゲートしたビーズ、例えばDYNABEADS(登録商標)M-450 CD3/CD28Tとインキュベートすることによって、T細胞が単離される。ある面において、期間は、約30分である。さらなる面において、期間は、30分から36時間の範囲またはそれより長くおよびその間の全ての整数値である。さらなる面において、期間は、少なくとも1、2、3、4、5または6時間である。さらに別の好ましい面において、期間は、10から24時間である。ある面において、インキュベート期間は、24時間である。腫瘍組織または免疫不全個体から腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を単離する場合のように、他の細胞型と比較してT細胞がわずかしかないあらゆる状況においてT細胞を単離するためには、より長いインキュベート時間が使用される可能性がある。さらに、より長いインキュベート時間の使用は、CD8⁺T細胞の捕獲効率を増加させることができる。したがって、時間を単に短くしたりまたは長くしたりすることによって、T細胞をCD3/CD28ビーズに結合させることができおよび/またはT細胞に対するビーズの比率(本明細書でさらに説明されるように)を増加または減少させることによって、培養開始時またはプロセス中の他のタイムポイントで、T細胞の部分集団を可否に応じて優先的に選択することができる。加えて、ビーズまたは他の表面に対する抗CD3および/または抗CD28抗体の比率を増加または減少させることによって、培養開始時または他の所望のタイムポイントで、T細胞の部分集団を可否に応じて優先的に選択することができる。当業者であれば、本発明の状況において複数回の選択も使用できることを認識する。ある面において、活性化および拡大プロセス中に、選択手法を行って「未選択」細胞を使用することが望ましい場合がある。また「未選択」細胞は、追加の回の選択で処理してもよい。

【0470】

陰性選択によるT細胞集団の濃縮は、陰性選択された細胞に独特な表面マーカール向けられた抗体の組み合わせを用いて達成することができる。1方法は、セルソーティングおよび/または負磁気免疫接着を介した選択または陰性選択された細胞に存在する細胞表面マーカール向けられたモノクローナル抗体のカクテルを使用するフローサイトメトリーである。例えば、陰性選択によってCD4⁺細胞を濃縮するためには、モノクローナル抗体カクテルは、典型的には、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DRおよびCD8に対する抗体を包含する。ある面において、典型的にはCD4⁺、CD25⁺、CD62Lhi、GITR⁺およびFoxP3⁺を発現する制御性T細胞を濃縮するかまたは陽性選択することが望ましい場合がある。その代わりに、ある面において、抗C2

5 がコンジュゲートしたビーズまたは他の類似の選択方法によって、制御性T細胞を枯渇させる。

【0471】

ここに記載される方法は、例えば陰性選択技術、例えばここに記載される選択技術を使用した、免疫エフェクター細胞の特定の部分集団、例えば調節性T細胞枯渇、CD25⁺細胞枯渇集団であるT細胞の選択を包含してもよい。好ましくは、調節性T細胞枯渇集団は、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%未満のCD25⁺細胞を含有する。

【0472】

ある態様において、調節性T細胞、例えばCD25⁺T細胞は、抗CD25抗体、もしくはそれらのフラグメントまたはCD25結合リガンド、IL-2を使用して集団から除去される。ある態様において、抗CD25抗体、もしくはそれらのフラグメントまたはCD25結合リガンドは、基質、例えばビーズにコンジュゲートされているかまたは別の方法で基質、例えばビーズ上にコーティングされている。ある態様において、抗CD25抗体またはそれらのフラグメントは、ここに記載される基質にコンジュゲートされている。

10

【0473】

ある態様において、調節性T細胞、例えばCD25⁺T細胞は、Miltenyi™からのCD25枯渇試薬を使用して、集団から除去される。ある態様において、CD25枯渇試薬に対する細胞の比率は、20μLに対して細胞1×10⁷個または15μLに対して細胞1×10⁷個または10μLに対して細胞1×10⁷個または5μLに対して細胞1×10⁷個または2.5μLに対して細胞1×10⁷個または1.25μLに対して細胞1×10⁷個である。ある態様において、例えば調節性T細胞、例えばCD25⁺枯渇の場合、細胞5億個/mlより多くが使用される。さらなる面において、細胞6億、7億、8億または9億個/mlの細胞濃度が使用される。

20

【0474】

ある態様において、枯渇させる免疫エフェクター細胞の集団は、約6×10⁹個のCD25⁺T細胞を包含する。他の面において、枯渇させる免疫エフェクター細胞の集団は、約1×10⁹から1×10¹⁰個およびその間のあらゆる整数値のCD25⁺T細胞を包含する。ある態様において、結果得られた調節性T細胞枯渇集団は、2×10⁹個またはそれ未満の調節性T細胞、例えばCD25⁺細胞(例えば、1×10⁹、5×10⁸、1×10⁸、5×10⁷、1×10⁷個またはそれ未満のCD25⁺細胞)を有する。

30

【0475】

ある態様において、調節性T細胞、例えばCD25⁺細胞は、CliniMACシステムを例えばチュービング162-01などの枯渇チュービングセットと共に使用して、集団から除去される。ある態様において、CliniMACシステムは、例えばDEPLETION 2.1などの枯渇設定で実行される。

【0476】

特定の理論に縛られることは望まないが、アフエレーシスの前またはCARを発現する細胞生成物の製造中に、対象において免疫細胞の負の調節因子のレベルを減少させること(例えば、不要な免疫細胞、例えばT_{REG}細胞の数を減少させること)は、対象の再発リスクを低減させる可能性がある。例えば、T_{REG}細胞を枯渇させる方法は、当業界において公知である。T_{REG}細胞を減少させる方法としては、これらに限定されないが、シクロホスファミド、抗GITR抗体(ここに記載される抗GITR抗体)、CD25-枯渇およびそれらの組合せが挙げられる。

40

【0477】

ある態様において、製造方法は、CARを発現する細胞の製造前に、T_{REG}細胞の数を低減すること(例えば、を枯渇させること)を含む。例えば、製造方法は、例えば、CARを発現する細胞(例えば、T細胞、NK細胞)生成物の製造前にT_{REG}細胞を枯渇させるために、サンプル、例えばアフエレーシスサンプルを、抗GITR抗体および/または抗CD25抗体(もしくはそれらのフラグメントまたはCD25結合リガンド)と接触させ

50

ることを含む。

【0478】

ある態様において、対象は、CARを発現する細胞生成物の製造のために細胞を収集する前に、T_{REG}細胞を低減させる1以上の療法で前処置され、それによって対象がCARを発現する細胞の処置に戻るリスクを低減させる。ある態様において、T_{REG}細胞を減少させる方法としては、これらに限定されないが、シクロホスファミド、抗GITR抗体、CD25枯渴の1以上またはそれらの組合せを対象に投与することが挙げられる。シクロホスファミド、抗GITR抗体、CD25 - 枯渴の1以上またはそれらの組合せの投与は、CARを発現する細胞生成物の注入の前に、その間にまたはその後に行うことができる。

10

【0479】

ある態様において、対象は、CARを発現する細胞生成物の製造のために細胞を収集する前に、シクロホスファミドで前処置され、それによって対象がCARを発現する細胞の処置に戻るリスクを低減させる。ある態様において、対象は、CARを発現する細胞生成物の製造のために細胞を収集する前に、抗GITR抗体で前処置され、それによって対象がCARを発現する細胞の処置に戻るリスクを低減させる。

【0480】

ある態様において、除去される細胞の集団は、調節性T細胞または腫瘍細胞ではなく、別の様式でCAR⁺細胞、例えばCD14、CD11b、CD33、CD15または免疫抑制細胞によって発現される可能性がある他のマーカーを発現する細胞の拡張および/または機能に負の影響を与える細胞である。ある態様において、このような細胞は、調節性T細胞および/または腫瘍細胞と同時にまたは前記枯渴の後にまたは別の順番で除去されることが想定される。

20

【0481】

ここに記載される方法は、1以上の選択工程、例えば1以上の枯渴工程を包含していてもよい。陰性選択によるT細胞集団の濃縮は、例えば、陰性選択された細胞に独特な表面マーカーに向けられた抗体の組合せを用いて達成することができる。1方法は、陰性選択された細胞上に提示される細胞表面マーカーに向けられたモノクローナル抗体のカクテルを使用する負磁気免疫接着またはフローサイトメトリーによるセルソーティングおよび/または選択である。例えば、陰性選択によりCD4⁺細胞を濃縮するために、モノクローナル抗体カクテルは、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DRおよびCD8に対する抗体を包含していてもよい。

30

【0482】

ここに記載される方法は、集団から、腫瘍抗原、例えばCD25を含まない腫瘍抗原、例えばCD19、CD30、CD38、CD123、CD20、CD14またはCD11bを発現する細胞を除去することにより、CAR、例えばここに記載されるCARの発現に好適な、調節性T細胞枯渴、例えばCD25⁺枯渴および腫瘍抗原枯渴細胞の集団を提供することをさらに包含していてもよい。ある態様において、腫瘍抗原を発現する細胞は、調節性T細胞、例えばCD25⁺細胞と同時に除去される。例えば、抗CD25抗体またはそれらのフラグメントおよび抗腫瘍抗原抗体またはそれらのフラグメントは、同じ基質、例えば細胞を除去するのに使用できるビーズに付着することができまたは抗CD25抗体もしくはそれらのフラグメントまたは抗腫瘍抗原抗体もしくはそれらのフラグメントは、別々のビーズに付着することができ、それらの混合物は、細胞を除去するのに使用することができる。他の態様において、調節性T細胞、例えばCD25⁺細胞の除去および腫瘍抗原を発現する細胞の除去は、逐次的であり、例えばどちらの順番でも行うことができる。

40

【0483】

また、集団から、チェックポイント阻害剤、例えばここに記載されるチェックポイント阻害剤を発現する細胞、例えばPD1⁺細胞、LAG3⁺細胞およびTIM3⁺細胞の1種または複数除去することによって、調節性T細胞枯渴、例えばCD25⁺枯渴細胞お

50

よびチェックポイント阻害剤枯渇細胞、例えばPD1+、LAG3+および/またはTIM3+枯渇細胞の集団を提供することを包含する方法も提供される。例示的なチェックポイント阻害剤としては、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および/またはCEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14またはCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシンおよびTGFRベータが挙げられる。ある態様において、チェックポイント阻害剤を発現する細胞は、調節性T細胞、例えばCD25+細胞と同時に除去される。例えば、抗CD25抗体またはそれらのフラグメントおよび抗チェックポイント阻害剤抗体またはそれらのフラグメントは、同じビーズに付着していてもよく、これは、細胞を除去するのに使用することができまたは抗CD25抗体またはそれらのフラグメントおよび抗チェックポイント阻害剤抗体またはそれらのフラグメントは、別々のビーズに付着することができ、その混合物は、細胞を除去するのに使用することができる。他の態様において、調節性T細胞、例えばCD25+細胞の除去およびチェックポイント阻害剤を発現する細胞の除去は、逐次的であり、例えばどちらの順番でも行うことができる。

10

【0484】

ある態様において、IFN-、TNF、IL-17A、IL-2、IL-3、IL-4、GM-CSF、IL-10、IL-13、グランザイムBおよびパーフォリンの1種または複数または他の適切な分子、例えば他のサイトカインを発現するT細胞集団を選択する場合がある。細胞発現に関してスクリーニングする方法は、例えば、PCT公開WO2013/126712で説明されている方法によって決定することができる。

20

【0485】

陽性または陰性選択によって細胞の所望の集団を単離するために、細胞および表面(例えば、ビーズなどの粒子)の濃度は様々であってもよい。ある面において、細胞およびビーズの接触を最大にするために、ビーズおよび細胞と一緒に混合される容量を有意に減少させる(例えば、細胞濃度を増加させる)ことが望ましい場合がある。例えば、ある面において、細胞20億/mlの濃度が使用される。ある面において、細胞10億/mlの濃度が使用される。さらなる面において、1mlあたり細胞100万より多くが使用される。さらなる面において、1mlあたり、細胞1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万または5000万の細胞濃度が使用される。さらなるある面において、1mlあたり、細胞7500万以上、8000万以上、8500万以上、9000万以上、9500万以上または1億の細胞濃度が使用される。さらなる面において、1mlあたり細胞1億2500万または1億5000万の濃度が使用できる。高濃度の使用は、細胞収量、細胞の活性化および細胞拡大の増加をもたらすことができる。さらに、高い細胞濃度の使用は、CD28陰性T細胞などの対象の標的抗原の発現が弱い可能性がある細胞または多くの腫瘍細胞が存在するサンプル(例えば、白血病の血液、腫瘍組織など)からの細胞のより効率的な捕獲を可能にする。このような細胞集団は治療的価値を有する可能性があり、取得が望ましい。例えば、高濃度の細胞の使用は、通常のCD28発現が比較的弱いCD8+T細胞のより効率的な選択を可能にする。

30

40

【0486】

関連する面において、より低い細胞の濃度を使用することが望ましい場合がある。T細胞および表面(例えば、ビーズなどの粒子)の混合物を相当に希釈することによって、粒子と細胞との相互作用を最小化する。それにより、粒子に結合させるために、大量の所望の抗原を発現する細胞が選択される。例えば、CD4+T細胞は、より高レベルのCD28を発現するが、薄い濃度でCD8+T細胞より効率的に捕捉される。ある面において、使用される細胞の濃度は、 5×10^6 / mlである。他の面において、使用される濃度は、約 1×10^5 / mlから 1×10^6 / mlまでおよびその間のあらゆる整数値であってもよい。

50

【0487】

他の面において、細胞は、回転器で、様々な長さの時間にわたり、様々な速度、2～10 または室温のいずれかでインキュベートすることができる。

【0488】

刺激のためのT細胞を洗浄工程後に凍結してもよい。理論に縛られるつもりはないが、凍結工程とそれに続く融解工程は、細胞集団中の顆粒球とある程度の単球を除去することによってより均一な生成物をもたらす。血漿と血小板を除去する洗浄工程の後、細胞を凍結溶液に懸濁してもよい。多くの凍結のための溶液およびパラメーターが当業界公知であり、この状況において有用であるが、1方法は、20% DMSOおよび8% ヒト血清アルブミンを含有するPBSまたは10% デキストラン40および5% デキストロース、20% ヒト血清アルブミンならびに7.5% DMSOを含有する培養培地または31.25% Plasmalyte-A、31.25% デキストロース5%、0.45% NaCl、10% デキストラン40および5% デキストロース、20% ヒト血清アルブミンおよび7.5% DMSOを含有する培養培地または例えばヘスパンおよびPlasmalyte-Aを含有する他の好適な細胞凍結媒体を使用し、次いで細胞を1度/分の速度で-80 に凍結させ、液体窒素貯蔵タンクの蒸気相中で保存することを含む。他の制御冷凍方法を使用してもよいし、同様に-20 で即座にまたは液体窒素中で非制御冷凍してもよい。

10

【0489】

ある面において、低温保存した細胞を融解させて、本明細書で説明したようにして洗浄し、本発明の方法を使用して活性化する前に室温で1時間そのまま置く。

20

【0490】

また、本発明の状況では、本明細書で説明したようにして拡大させた細胞が必要になるかもしれないときの前の期間に、対象から血液サンプルまたはアフエーシス産物を収集することも考慮される。そのようなものとして、拡大させようとする細胞の源を必要なあらゆる時点で収集することができ、さらに、ここに記載されるものなどの細胞治療、例えばT細胞治療によって利益を得る多数の疾患または状態のための細胞治療、例えばT細胞治療で後に使用するために、免疫エフェクター細胞、例えばT細胞またはNK細胞などの所望の細胞を単離して凍結してもよい。ある面において、血液サンプルまたはアフエーシスは、一般的に健康な対象から採取される。ある面において、血液サンプルまたはアフエーシスは、疾患を発症させる危険性があるが、まだ疾患を発症させていない、一般的に健康な対象から採取され、さらに、後の使用のために対象の細胞を単離して凍結してもよい。ある面において、免疫エフェクター細胞、例えばT細胞またはNK細胞は、後の時点で拡大、凍結および使用されてもよい。ある面において、本明細書で説明したような特定の疾患の診断の直後に、しかし、あらゆる処置の前に、サンプルが患者から収集される。さらなる面において、ナタリズマブ、エファリズマブなどの薬剤、抗ウイルス剤、化学療法、放射線、免疫抑制剤、例えばシクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノール酸塩およびFK506、抗体または他の免疫除去剤、例えばキャンパス、抗CD3抗体、シトキサン、フルダラビン、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、マイコフェノール酸、ステロイド、FR901228および放射線照射での処置などを含むが、これらに限定されない多数の関連する処置様式の前に、細胞が、対象からの血液サンプルまたはアフエーシスから単離される。

30

40

【0491】

本発明のさらなる面において、対象に機能的なT細胞を残す処置の後に、患者から直接T細胞を得る。これに関して、所定の癌処置の後、特定には、免疫系にダメージを与える薬物での処置の後、患者が通常処置から回復する期間中の処置の直後に、得られたT細胞の品質が、エクスピボで拡大するそれらの能力に関して最適であるかまたは向上している可能性があることが観察されている。同様に、ここに記載される方法を使用したエクスピボでの操作の後、これらの細胞は、生着およびインピボでの拡大の強化にとって好ましい状況にある可能性がある。したがって、本発明の内容において、この回収期間中に、T細胞、樹状細胞または造血細胞系の他の細胞を包含する血液細胞を収集することが考慮され

50

る。さらに、ある面において、動員(例えば、GM-CSFを用いた動員)およびコンディショニングレジメンを使用して、特に療法後の規定の時間帯中に、特定の細胞型の再増殖、再循環、再生および/または拡大にとって好都合な対象における状態を作り出すことができる。例示的な細胞型としては、T細胞、B細胞、樹状細胞および他の免疫系細胞が挙げられる。

【0492】

ある態様において、CAR分子、例えば、ここに記載されるCAR分子を発現する免疫エフェクター細胞は、低い免疫増強用量のmTOR阻害剤を受けた対象から得られる。ある態様において、対象におけるまたは対象から回収された、PD1陰性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞のレベルまたはPD1陰性免疫エフェクター細胞の比率、例えばT細胞/PD1陽性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞が少なくとも一過性に増加した状態になるように、十分な時間の後または十分な低い免疫増強用量のmTOR阻害剤投与の後に、CARを発現するように加工される免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の集団が回収される。

10

【0493】

他の態様において、CARを発現するように加工されているかまたは加工される免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の集団は、PD1陰性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞の数を増加させるまたはPD1陰性免疫エフェクター細胞の比率、例えばT細胞/PD1陽性免疫エフェクター細胞、例えばT細胞を増加させる量のmTOR阻害剤との接触によって、エクスピボで処置され得る。

20

【0494】

ある態様において、T細胞集団は、ジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)欠損である。DGK欠損細胞は、DGKのRNAまたはタンパク質を発現しない細胞を包含するかまたは低減または阻害されたDGK活性を有する。DGK欠損細胞は、遺伝学的アプローチによって、例えば、DGK発現を低減または予防するためにRNA干渉剤、例えばsiRNA、shRNA、miRNAを投与することによって生成することができる。代替として、DGK欠損細胞は、ここに記載されるDGK阻害剤での処置によって生成することができる。

【0495】

ある態様において、T細胞集団は、イカロス欠損である。イカロス欠損細胞は、イカロスのRNAまたはタンパク質を発現しない細胞を包含するかまたは低減または阻害されたイカロス活性を有する。イカロス欠損細胞は、遺伝学的アプローチによって、例えば、イカロス発現を低減または予防するためにRNA干渉剤、例えばsiRNA、shRNA、miRNAを投与することによって生成することができる。代替として、イカロス欠損細胞は、イカロス阻害剤、例えばレナリドマイドでの処置によって生成することができる。

30

【0496】

ある態様において、T細胞集団は、DGK欠損およびイカロス欠損であり、例えば、DGKおよびイカロスを発現しないかまたは低減もしくは阻害されたDGKおよびイカロス活性を有する。このようなDGKおよびイカロス欠損細胞は、ここに記載される方法のいずれかによって生成することができる。

40

【0497】

ある態様において、NK細胞は、対象から得られる。別の態様において、NK細胞は、NK細胞株、例えばNK-92細胞株(Conkwest)である。

【0498】

同種異系CAR

ここに記載される態様において、免疫エフェクター細胞は、同種異系の免疫エフェクター細胞、例えばT細胞またはNK細胞であってもよい。例えば、細胞は、同種異系のT細胞、例えば、機能的なT細胞受容体(TCR)および/またはヒト白血球抗原(HLA)、例えばHLAクラスIおよび/またはHLAクラスIIの発現が欠失した同種異系のT細胞であってもよい。

50

【0499】

機能的なTCRが欠失したT細胞は、例えば、その表面上にいかなる機能的なTCRも発現しないように加工されていてもよいし、機能的なTCRを含む1以上のサブユニットを発現しないように加工されていてもよいし(例えば、TCRアルファ、TCRベータ、TCRガンマ、TCRデルタ、TCRイプシロンまたはTCRゼータを発現しない(またはその低減された発現を示す)ように加工される)またはその表面上に非常にわずかな機能的なTCRしか生産しないように加工されていてもよい。代替として、T細胞は、例えば、TCRのサブユニットの1以上の変異またはトランケートされた形態の発現によって、実質的に機能が損なわれたTCRを発現することができる。用語「実質的に機能が損なわれたTCR」は、このTCRが、宿主において有害な免疫反応を惹起しないことを意味する。

10

【0500】

ここに記載されるT細胞は、例えば、その表面上に機能的なHLAを発現しないように加工されていてもよい。例えば、ここに記載されるT細胞は、HLA、例えばHLAクラスIおよび/またはHLAクラスIIの細胞表面での発現が下方調節されるように加工されていてもよい。いくつかの面において、HLAの下方調節は、ベータ-2ミクログロブリン(B2M)の発現を低減したりまたはなくしたりすることによって達成され得る。

【0501】

ある態様において、T細胞は、機能的なTCRおよび機能的なHLA、例えばHLAクラスIおよび/またはHLAクラスIIを欠失していてもよい。

20

【0502】

機能的なTCRおよび/またはHLAの発現が欠失した改変T細胞は、TCRまたはHLAの1以上のサブユニットのノックアウトまたはノックダウンなどのあらゆる好適な手段により得ることができる。例えば、T細胞は、siRNA、shRNA、クラスター化規則的間隔短鎖回文配列リピート(CRISPR)転写活性化剤様のエフェクターヌクレアーゼ(TALEN)またはジンクフィンガーエンドヌクレアーゼ(ZFN)を使用した、TCRおよび/またはHLAのノックダウンを包含していてもよい。

【0503】

ある態様において、同種異系の細胞は、阻害分子を発現しないかまたは低いレベルで発現する細胞、例えばここに記載されるいずれかの方法によって加工された細胞であってもよい。例えば、細胞は、阻害分子を発現しないかまたは低いレベルで発現する細胞、例えば、CARを発現する細胞の免疫エフェクター応答を展開する能力を減少させることができる細胞であってもよい。阻害分子の例としては、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および/またはCEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAI R1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14またはCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシンおよびTGFRベータが挙げられる。阻害分子の阻害、例えばDNA、RNAまたはタンパク質レベルでの阻害による阻害は、CARを発現する細胞の性能を最適化することができる。ある態様において、阻害核酸、例えば、ここに記載される阻害核酸、例えばdsRNA、例えばsiRNAまたはshRNA、クラスター化規則的間隔短鎖回文配列リピート(CRISPR)、転写活性化剤様のエフェクターヌクレアーゼ(TALEN)またはジンクフィンガーエンドヌクレアーゼ(ZFN)が使用できる。

30

40

【0504】

TCRまたはHLAを阻害するsiRNAおよびshRNA

ある態様において、TCRの発現および/またはHLAの発現は、細胞におけるTCRおよび/またはHLAおよび/またはここに記載される阻害分子(例えば、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および/またはCEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTL

50

A、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14またはCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシンおよびTGFRベータ)をコードする核酸を標的とするsiRNAまたはshRNAを使用して阻害することができる。

【0505】

T細胞におけるsiRNAおよびshRNAの発現は、例えば、レンチウイルス発現系など、任意の従来発現系を使用して達成することができる。

【0506】

TCRの構成要素の発現を下方調節する、例示的なshRNAは、例えば、米国特許出願公開第2012/0321667号において説明されている。HLAクラスIおよび/またはHLAクラスII遺伝子の発現を下方調節する、例示的なsiRNAおよびshRNAは、例えば、米国特許出願公開第US2007/0036773号において説明されている。

【0507】

TCRまたはHLAを阻害するCRISPR

本明細書で使用される場合、「CRISPR」または「TCRおよび/またはHLAに対するCRISPR」または「TCRおよび/またはHLAを阻害するCRISPR」とは、クラスター化規則的間隔短鎖回文配列リピートのセットまたはリピートのこのようなセットを含む系を指す。本明細書で使用される場合、「Cas」とは、CRISPR関連タンパク質を指す。「CRISPR/Cas」系とは、CRISPRおよびCasに由来する系であって、TCR遺伝子および/またはHLA遺伝子、および/またはここに記載される阻害分子(例えば、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および/またはCEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14またはCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシンおよびTGFRベータ)をサイレンシングするかまたは変異させるのに使用し得る系を指す。

【0508】

天然に存在するCRISPR/Cas系は、シーケンシングされた真正細菌ゲノムの約40%およびシーケンシングされた古細菌の90%において見出される(Grissa et al. (2007) BMC Bioinformatics 8: 172)。この系は、プラスミドおよびファージなど、外来の遺伝子要素に対する耐性を付与し、獲得免疫の形態をもたらす、原核生物免疫系のタイプである(Barrangou et al. (2007) Science 315: 1709-1712; Marragini et al. (2008) Science 322: 1843-1845)。

【0509】

CRISPR/Cas系を、マウスまたは霊長動物など、真核生物における遺伝子編集(特異的な遺伝子をサイレンシングするか、増強するかまたは変化させること)における使用のために改変した(Wiedenheft et al. (2012) Nature 482: 331-8)。これは、真核細胞に、特異的に設計されたCRISPRおよび1以上の適切なCasを含有するプラスミドを導入することにより達成される。

【0510】

CRISPR遺伝子座と呼ばれることもあるCRISPR配列は、リピートとスペーサーとの交代を含む。天然に存在するCRISPRにおいて、スペーサーは通常、プラスミド配列またはファージ配列など、細菌に対して外来の配列を含み、TCRおよび/またはHLAのCRISPR/Cas系において、スペーサーは、TCRまたはHLA遺伝子配列に由来する。

【0511】

CRISPR遺伝子座に由来するRNAは、構成的に発現し、Casタンパク質により

10

20

30

40

50

、低分子RNAにプロセシングされる。これらは、リピート配列で挟んだスペーサーを含む。RNAは、他のCasタンパク質が、外因性遺伝子要素を、RNAレベルまたはDNAレベルでサイレンシングするように導く(Horvath et al. (2010) Science 327: 167-170; Makarova et al. (2006) Biology Direct 1: 7)。したがって、スペーサーは、siRNAと同様に、RNA分子の鋳型として機能する(Pennisi (2013) Science 341: 833-836)。

【0512】

これらは、細菌の多くの異なるタイプにおいて天然に存在するので、CRISPRの正確な配置、ならびにCas遺伝子およびそれらの産物の構造、機能および数は、種によっていくぶん異なる(Haft et al. (2005) PLoS Comput. Biol. 1: e60; Kunin et al. (2007) Genome Biol. 8: R61; Mojica et al. (2005) J. Mol. Evol. 60: 174-182; Bolotin et al. (2005) Microbiol. 151: 2551-2561; Pourcel et al. (2005) Microbiol. 151: 653-663; およびStern et al. (2010) Trends. Genet. 28: 335-340)。例えば、Cse(Casサブタイプ、E. coli)タンパク質(例えば、CasA)は、機能的な複合体であるCascadeを形成し、Cascadeは、CRISPR RNA転写物を、Cascadeが保持するスペーサー-リピート単位にプロセシングする[Brouns et al. (2008) Science 321: 960-964]。他の原核生物において、Cas6は、CRISPR転写物をプロセシングする。E. coliにおけるCRISPRベースのファージ不活化は、CascadeおよびCas3を必要とするが、Cas1またはCas2は必要としない。Pyrococcus furiosusおよび他の原核生物におけるCmr(Cas RAMPモジュール)タンパク質は、相補的な標的RNAを認識し、切断する、低分子CRISPR RNAと、機能的な複合体を形成する。より単純なCRISPR系は、二重螺旋の各鎖に1ずつ、2活性の切断部位を有するヌクレアーゼである、Cas9タンパク質に依拠する。Cas9と、改変されたCRISPR遺伝子座のRNAとの組合せは、遺伝子編集のための系において使用することができる(Pennisi (2013) Science 341: 833-836)。

【0513】

したがって、CRISPR/Cas系を使用して、TCR遺伝子および/またはHLA遺伝子を編集すること(塩基対を付加または欠失させること)もでき、未成熟停止を導入して、TCRおよび/またはHLAの発現を減少させることもできる。あるいは、CRISPR/Cas系を、RNA干渉と同様に使用し、TCR遺伝子および/またはHLA遺伝子を可逆的にオフにすることもできる。例えば、哺乳動物細胞において、CRISPR/Cas系RNAは、Casタンパク質を、TCRプロモーターおよび/またはHLAプロモーターに導き、RNAポリメラーゼを立体的に遮断し得る。

【0514】

当業界公知の技術、例えば、米国特許出願公開第20140068797号およびCong (2013) Science 339: 819-823において説明されている技術を使用して、TCRおよび/またはHLAを阻害する人工CRISPR/Cas系を生成することができる。TCRおよび/またはHLAを阻害する、当業界公知の他の人工CRISPR/Cas系であって、例えば、Tsai (2014) Nature Biotechnol., 32:6 569-576、米国特許第8,871,445号; 同第8,865,406号; 同第8,795,965号; 同第8,771,945号; および同第8,697,359号において説明されている人工CRISPR/Cas系もまた、生成することができる。

【0515】

TCRおよび/またはHLAを阻害するTALEN

「TALEN」または「HLAおよび/またはTCRに対するTALEN」または「HLAおよび/またはTCRを阻害するTALEN」とは、HLA遺伝子および/またはTCR遺伝子、および/またはここに記載される阻害分子[例えば、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および/またはCEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD27

10

20

30

40

50

6)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14またはCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシンおよびTGFRベータ]を編集するのに使用し得る人工ヌクレアーゼである、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼを指す。

【0516】

TALENは、TALEエフェクターDNA結合ドメインを、DNA切断ドメインに融合させることにより、人工的に作製される。転写活性化因子様エフェクター(effects)(TALE)は、HLA遺伝子またはTCR遺伝子の一部を含む、任意の所望のDNA配列に結合するように加工することができる。加工されたTALEを、DNA切断ドメインと組み合わせることにより、HLA配列またはTCR配列を含む、任意の所望のDNA配列に特異的な制限酵素を作製することができる。次いで、これらを、細胞に導入し、そこで、これらを、ゲノム編集のために使用することができる(Boch (2011) Nature Biotech. 29: 135-6; およびBoch et al. (2009) Science 326: 1509-12; Moscou et al. (2009) Science 326: 3501)。

10

【0517】

TALEとは、ザントモナス属細菌により分泌されるタンパク質である。DNA結合ドメインは、12番目のアミノ酸および13番目のアミノ酸を除き、反復的で、高度に保存的な33~34アミノ酸の配列を含有する。これらの2位置は、高度に可変性であり、特異的なヌクレオチド認識との強い相関を示す。したがって、これらを、所望のDNA配列に結合するように加工することができる。

20

【0518】

TALENを作製するために、TALEタンパク質を、野生型FokIエンドヌクレアーゼまたは変異させたFokIエンドヌクレアーゼである、ヌクレアーゼ(N)に融合させる。TALENにおけるその使用のために、FokIに対する数々の変異が施されており、これらは、例えば、切断特異性または切断活性を改善する[Cermak et al. (2011) Nucl. Acids Res. 39: e82; Miller et al. (2011) Nature Biotech. 29: 143-8; Hockemeyer et al. (2011) Nature Biotech. 29: 731-734; Wood et al. (2011) Science 333: 307; Doyon et al. (2010) Nature Methods 8: 74-79; Szczepek et al. (2007) Nature Biotech. 25: 786-793; およびGuo et al. (2010) J. Mol. Biol. 200: 96]。

30

【0519】

FokIドメインは、二量体として機能し、標的ゲノムにおける部位に対する固有のDNA結合ドメインであって、適正な配向性および間隔を有するDNA結合ドメインを有する、2構築物を必要とする。TALE DNA結合ドメインとFokI切断ドメインとの間のアミノ酸残基の数および2個別のTALEN結合部位の間の塩基の数のいずれもが、高レベルの活性を達成するための重要なパラメータであると考えられる[Miller et al. (2011) Nature Biotech. 29: 143-8]。

【0520】

HLA TALENまたはTCR TALENを、細胞内で使用して、二本鎖切断(DSB)を施すことができる。修復機構による、非相同な末端接合を介する切断の修復が適正でない場合は、切断部位に変異を導入することができる。例えば、不適正な修復は、フレームシフト変異を導入する場合がある。あるいは、外来DNAを、TALENと共に、細胞に導入することもでき、外来DNAの配列および染色体配列に応じて、この過程を使用して、HLA遺伝子またはTCR遺伝子における欠損を是正することもでき、このような欠損を、wt HLA遺伝子またはwt TCR遺伝子に導入して、HLAまたはTCRの発現を減少させることもできる。

40

【0521】

モジュール構成要素を使用する種々のスキームを含む、当業界公知の任意の方法を使用して、HLAまたはTCRにおける配列に特異的なTALENを構築することができる[Zhang et al. (2011) Nature Biotech. 29: 149-53; Geibler et al. (2011) PLoS ONE 6: e19509]。

50

【0522】

H L Aおよび/またはT C Rを阻害するジンクフィンガーヌクレアーゼ

「Z F N」または「ジンクフィンガーヌクレアーゼ」または「H L Aおよび/またはT C Rに対するZ F N」または「H L Aおよび/またはT C Rを阻害するZ F N」とは、H L A遺伝子および/またはT C R遺伝子、および/またはここに記載される阻害分子[例えば、P D 1、P D - L 1、P D - L 2、C T L A 4、T I M 3、C E A C A M(例えば、C E A C A M - 1、C E A C A M - 3および/またはC E A C A M - 5)、L A G 3、V I S T A、B T L A、T I G I T、L A I R 1、C D 1 6 0、2 B 4、C D 8 0、C D 8 6、B 7 - H 3(C D 2 7 6)、B 7 - H 4(V T C N 1)、H V E M(T N F R S F 1 4またはC D 2 7 0)、K I R、A 2 a R、M H CクラスI、M H CクラスII、G A L 9、アデノシンおよびT G F Rベータ]を編集するのに使用し得る人工ヌクレアーゼである、ジンクフィンガーヌクレアーゼを指す。

10

【0523】

T A L E Nと同様に、Z F Nは、D N A結合ドメインに融合させたF o k Iヌクレアーゼドメイン(またはその誘導体)を含む。Z F Nの場合、D N A結合ドメインは、1以上のジンクフィンガーを含む(Carroll et al. (2011) Genetics Society of America 188: 773-782; およびKim et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1156-1160)。

【0524】

ジンクフィンガーとは、1以上の亜鉛イオンにより安定化する、低分子タンパク質構造モチーフである。ジンクフィンガーは、例えば、C y s 2 H i s 2を含むことが可能であり、およそ3 b pの配列を認識し得る。特異性が公知の種々のジンクフィンガーを組み合わせて、約6、9、12、15または18 b pの配列を認識するマルチフィンガーポリペプチドを作製することができる。ジンクフィンガー(およびその組合せ)を生成するのに、特異的な配列を認識する、種々の選択技術およびモジュールアセンブリー技術であって、ファージディスプレイ、酵母1ハイブリッド系、細菌1ハイブリッド系および細菌2ハイブリッド系、ならびに哺乳動物細胞を含む技術が利用可能である。

20

【0525】

T A L E Nと同様に、Z F Nも、D N Aを切断するのに二量体化しなければならない。したがって、非パリンδροミックのD N A部位を標的とするには、Z F Nの対が必要とされる。2個別のZ F Nは、それらのヌクレアーゼが適正な間隔で隔てられた状態で、D N A逆鎖に結合しなければならない(Bitinaite et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. US A 95: 10570-5)。

30

【0526】

これもまたT A L E Nと同様に、Z F Nも、D N Aにおいて二本鎖切断を作り出すことが可能であり、修復が適正でない場合は、これにより、フレームシフト変異を作り出し、細胞におけるH L Aおよび/またはT C Rの発現および量の減少をもたらす。Z F Nはまた、H L A遺伝子またはT C R遺伝子に変異を施すように、相同組換えと共に使用することもできる。

【0527】

当業界公知の任意の方法を使用して、H L Aおよび/またはT C Rにおける配列に特異的なZ F Nを構築することができる。例えば、Provasi (2011) Nature Med. 18: 807-815; Torikai (2013) Blood 122: 1341-1349; Cathomen et al. (2008) Mol. Ther. 16: 1200-7; Guo et al. (2010) J. Mol. Biol. 400: 96; 米国特許公開第2011/0158957号; および米国特許公開第2012/0060230号を参照されたい。

40

【0528】

テロメラーゼ発現

いかなる特定の理論にも縛られるつもりはないが、ある態様において、患者における治療的T細胞の持続性は、T細胞におけるテロメアの短縮に起因して短期間であり、したがって、テロメラーゼ遺伝子のトランスフェクションは、T細胞のテロメアを長くし、患者におけるT細胞の持続性を改善する可能性がある。Carl June, "Adoptive T cell thera

50

py for cancer in the clinic”, Journal of Clinical Investigation, 117:1466-1476 (2007)を参照されたい。したがって、ある態様において、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞は、テロメラーゼサブユニット、例えば、テロメラーゼの触媒性サブユニット、例えば、TERT、例えば、hTERTを異所的に発現する。いくつかの面において、本開示は、CAR発現細胞を作製する方法であって、細胞を、テロメラーゼサブユニット、例えば、テロメラーゼの触媒性サブユニット、例えば、TERT、例えば、hTERTをコードする核酸と接触させることを含む方法を提示する。細胞は、CARをコードする構築物と接触させる前に、核酸と接触させることもでき、これと並列して接触させることもでき、この後で接触させることもできる。

【0529】

ある面において、本開示は、免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)の集団を作製する方法を特徴とする。ある態様において、方法は、免疫エフェクター細胞の集団(例えば、T細胞またはNK細胞)を用意することと；免疫エフェクター細胞の集団を、CARをコードする核酸と接触させることと；CARおよびテロメラーゼの発現を可能とする条件下で、免疫エフェクター細胞の集団をテロメラーゼサブユニット、例えば、hTERTをコードする核酸と接触させることとを含む。

【0530】

ある態様において、テロメラーゼサブユニットをコードする核酸は、DNAである。ある態様において、テロメラーゼサブユニットをコードする核酸は、テロメラーゼサブユニットの発現を駆動することが可能なプロモーターを含む。

【0531】

ある態様において、hTERTは、GenBank Protein ID AAC51724.1のアミノ酸配列[Meyerson et al., “hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization” Cell Volume 90, Issue 4, 22 August 1997, Pages 785-795]であって、以下：

MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATFVRRLLGPGQWRLVQRGDPAAFRALVAQCLVCPWDARPPPAAPSFRQVSCLK
ELVARVLQRLCERGAKNVLAFGFALLDGARGGPEAFTTSSVRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRVGDVHLLARCAL
FVLVAPSCAYQVCGPLYQLGAATQARPPPHASGPRRLGCERAWNHSVREAGVPLGLPAPGARRRGGSSASRSLPLPKRP
RRGAPEPERTPVGQGSWAHPGRTRGSPDRGFCVSPARPAEATSLEGALSGTRHSHPSVGRQHHAGPPSTSRPPRPWD
TPCPPVYAETKHFYSSGDKEQLRPSFLLSSLRPSLTGARRLVETIFLGSRPWMPGTPRRLPRLPQRYWQMRPLFLELLG
NHAQCPYGVLLKTHCPLRAAVTPAAGVCAREKPGGSVAAPPEEEDTPRRLVQLLRQHSSPWQVYGFVRACLRRLVPPGLW
GSRHNERRFLRNTKKFI SLGKHAKLSLQELTWKMSVRGCAWLRSPGVGCVPAEHLREEI LAKFLHWLMSVYVVELLR
SFFYVTETTFQKNRLFFYRKSVMWVSKLQSIGIRQHLKRVQLRELSEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPIVNMDY
VVGARTFRREKRAERLTSRVKALFVNLNYERARRPGLLGASVGLDDI HRAWRTFVLRVRAQDPPPELYFVKVDVTGAYD
TIPQDRLTEV IASIIKPQNTYCVRRYAVVQKAAHGHVRKAFKSHVSTLTDLQPYMRQFVAHLQETSPLRDAVVI EQSSSL
NEASSGLFDVFLRFMCHHAVRIRGKSYVQCQGI PQGSI LSTLLCGLCYGDMENKLFAGIRRDGLLLRLVDDFLLVTPHLT
HAKTFLRTLVRGVPEYGCVVNLRKTVVNFVVEDEALGGTAFVQMPAHGLFPWCGLLLDTRTLEVQSDYSSYARTSIRASL
TFNRGFKAGRNMRRKLFGLVRLKCHSLFLDLQVNSLQTVCTNIYKILLLQAYRFHACVLQLPFHQVWKNPTFFLRV I SD
TASLCYSILKAKNAGMSLGAKGAAGPLPSEAVQWLCHQAFLLKLRHRVTVYVPLLGSRLTAQTQLSRKLP GTTLLTALEAA
ANPALPSDFKTILD(配列番号214)

のアミノ酸配列を有する。

【0532】

ある態様において、hTERTは、配列番号214の配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一な配列を有する。ある態様において、hTERTは、配列番号214の配列を有する。ある態様において、hTERTは、N末端、C末端またはこれらの両方において、欠失(例えば、5、10、15、20または30アミノ酸を超えない)を含む。ある態様において、hTERTは、N末端、C末端またはこれらの両方において、トランスジェニックのアミノ酸配列(例えば、5、10、15、20または30アミノ酸を超えない)を含む。

【0533】

10

20

30

40

50

ある態様において、h T E R Tは、G e n B a n k 受託番号 A F 0 1 8 1 6 7 の核酸配列 (Meyerson et al., "hEST2, the Putative Human Telomerase Catalytic Subunit Gene, Is Up-Regulated in Tumor Cells and during Immortalization" Cell Volume 90, Issue 4, 22 August 1997, Pages 785-795) :

```

1  caggcagcgt ggtcctgctg cgcacgtggg aagccctggc cccggccacc cccgcgatgc
61  cgcgcgctcc ccgctgccga gccgtgcgct ccctgctgcg cagccactac cgcgagggtgc
121 tgccgctggc cacgttcgtg cggcgccctgg ggccccaggg ctggcggtg gtgcagcgcg
181 gggaccgggc ggctttccgc gcgctggtgg cccagtgcct ggtgtgctg ccctggggacg
241 cacggccgcc ccccgccgcc ccctccttcc gccagggtgc ctgcctgaag gagctggtgg
301 cccgagtgtc gcagaggctg tgcgagcgcg gcgcaagaa cgtgctggcc ttcggcttcg
361 cgctgctgga cggggcccg cggggccccc ccgaggcctt caccaccagc gtgcgcagct
421 acctgcccac cacggtgacc gacgactgc gggggagcgg ggcgtgggg ctgctgttgc
481 gccgctggg cgacgacgtg ctggttcacc tgctggcacg ctgcgcgctc tttgtgctgg
541 tggctcccag ctgcgctac cagggtgtcg ggccgccgct gtaccagctc ggcgtgccca
601 ctacggcccc gccccgcca cacgctagtg gaccccgaag gcgtctggga tgcgaacggg
661 cctggaacca tagcgtcagg gaggccgggg tccccctggg cctgccagcc ccgggtgcga
721 ggaggcgcg ggccagtgc agccgaagtc tgccgttgcc caagaggccc aggcgtggcg
781 ctgcccctga gccggagcgg acgcccgtt ggccaggggtc ctgggcccac ccgggcagga
841 cgcgctggacc gactgaccgt ggtttctgtg tgggtgcacc tgccagacc gccgaagaag
901 ccacctctt ggagggtgc ctctctggca cgcgccactc ccaccatcc gtgggcccgc
961 agcaccacgc gggccccca tccacatgc ggccaccacg tccctgggac acgccttgtc
1021 ccccggtgta cgccgagacc aagcacttcc tctactctc aggcgacaag gagcagctgc
1081 ggccctcct cctactcagc tctctgaggc ccagcctgac tggcgtcgg aggcctgtgg
1141 agaccatct tctgggttcc aggccttga tgccagggac tccccgagg ttgccccgcc
1201 tgccccagcg ctactggcaa atgcccggc tgtttctgga gctgctggg aaccacgcgc
1261 agtggcccta cgggtgctc ctcaagacgc actgcccgt gcgagctgc gtcacccag
1321 cagccggtgt ctgtgcccgg gagaagcccc agggctctgt ggccgcccc gaggaggagg
1381 acacagacc ccgtgcctg gtgcagctgc tccgccagca cagcagcccc tggcaggtgt
1441 acggcttcgt gcgggctgc ctgcgccggc tgggtgcccc aggcctctgg ggctccaggc
1501 acaacgaac ccgcttctc aggaacacca agaagttcat ctccctgggg aagcatgccca
1561 agctctcgct gcaggagctg acgtggaaga tgagcgtgcg ggcgtgcgt tggctgcgca
1621 ggagcccagg ggttggctgt gttccggccg cagagcaccg tctgctgag gagatcctgg
1681 ccaagtctc gactggctg atgagtgtg acgtcgtcga gctgctcagg tctttctttt
1741 atgtcacgga gaccacgtt caaaagaaca ggctctttt ctaccggaag agtgtctgga
1801 gcaagttgca aagcattgga atcagacagc acttgaagag ggtgcagctg cgggagctgt
1861 cggaagcaga ggtcaggcag catcgggaag ccaggcccc cctgctgacg tccagactcc
1921 gcttcatccc caagcctgac gggctgcggc cgattgtgaa catggactac gtcgtgggag
1981 ccagaacgtt ccgagagaa aagagggccg agcgtctcac ctgaggggtg aaggcactgt
2041 tcagcgtgct caactacgag cggcgccggc gccccggcct cctgggcgcc tctgtgctgg
2101 gcctggacga tatccacagg gcctggcgca ccttcgtgct gcgtgtgcgg gcccaggacc
2161 cgccgctgta gctgtacttt gtcaagggtg atgtgacggg cgcgtacgac accatcccc
2221 aggacaggct cacggaggtc atcgccagca tcatcaaac ccagaacacg tactgcgtgc
2281 gtcggtatgc cgtggtccag aaggccgcc atgggcacgt ccgcaaggcc tcaagagcc
2341 acgtctctac cttgacagac ctccagccgt acatgcgaca gttcgtggct cacctgcagg
2401 agaccagccc gctgagggat gccgtcgtca tcgagcagag ctctccctg aatgaggcca
2461 gcagtggcct cttcgacgct ttctacgct tcatgtgcca ccacccgtg cgcatcaggg
2521 gcaagtccca cgtccagtgc caggggatcc cgcagggctc catcctctcc acgctgctct
2581 gcagcctgtg ctacggcgac atggagaaca agctgtttgc ggggatcgg cgggacgggc
2641 tgctcctgcg tttggtggat gatctctgt tgggtgacacc tcacctacc cacgcgaaaa
2701 ccttctcag gacctggct cgagggttcc ctgagtatgg ctgcgtgggt aacttgcgga

```

2761 agacagtggg gaacttcctt gtagaagacg aggccctggg tggcacggct ttgtttcaga
 2821 tgccggccca cggcctattc ccctgggtgc gcctgctgct ggatacccgg accctggagg
 2881 tgcagagcga ctactccagc tatgcccgga cctccatcag agccagtctc accttcaacc
 2941 gcggcttcaa ggctgggagg aacatgcgtc gcaaactctt tggggtcttg cggctgaagt
 3001 gtcacagcct gtttctggat ttgcaggatga acagcctcca gacggtgtgc accaacatct
 3061 acaagatcct cctgctgcag gcgtacaggt ttcacgcatg tgtgctgcag ctcccatttc
 3121 atcagcaagt ttggaagaac cccacatttt tcctgcgctg catctctgac acggcctccc
 3181 tctgctactc catcctgaaa gccaagaacg cagggatgtc gctgggggcc aagggcgccg
 3241 ccggccctct gccctccgag gccgtgcagt ggctgtgcca ccaagcattc ctgctcaagc
 3301 tgactcgaca ccgtgtcacc tacgtgccac tcctgggggtc actcaggaca gccagacgc
 3361 agctgagtcg gaagctcccg gggacgacgc tgactgccct ggaggccgca gccaacccgg
 3421 cactgccctc agacttcaag accatcctgg actgatggcc acccgccac agccaggccg
 3481 agagcagaca ccagcagccc tgtcacgccg ggctctacgt cccaggagg gaggggcggc
 3541 ccacaccag gcccgaccg ctgggagtct gaggcctgag tgagtgtttg gccgaggcct
 3601 gcatgtccgg ctgaaggctg agtgtccggc tgaggcctga gcgagtgtcc agccaagggc
 3661 tgagtgtcca gcacacctgc cgtcttact tccccacagg ctggcgctcg gctccacccc
 3721 agggccagct tttcctcacc aggagcccgg ctccactcc ccacatagga atagtccatc
 3781 cccagattcg ccattgttca cccctcgccc tggcctcctt tgcctccac cccaccatc
 3841 caggtggaga ccctgagaag gaccctggga gctctgggaa ttggagtga ccaaaggtgt
 3901 gccctgtaca caggcgagga ccctgcacct ggatgggggt ccctgtgggt caaattgggg
 3961 ggaggtgctg tggagtaaa atactgaata tatgagtttt tcagttttga aaaaaaaaa
 4021 aaaaaaa(配列番号 2 1 5)

10

20

によりコードされる。

【0534】

ある態様において、h T E R Tは、配列番号 2 1 5 の配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % または 9 9 % 同一な配列を有する核酸によりコードされる。ある態様において、h T E R Tは、配列番号 2 1 5 の核酸によりコードされる。

【0535】

T細胞活性化および拡大

T細胞は、一般的に、例えば米国特許第 6,352,694号; 6,534,055号: 6,905,680号: 6,692,964号: 5,858,358号: 6,887,466号: 6,905,681号: 7,144,575号: 7,067,318号: 7,172,869号: 7,232,566号: 7,175,843号: 5,883,223号: 6,905,874号: 6,797,514号: 6,867,041号: および米国特許出願公開第 20060121005号で説明されているような方法を使用して活性化させて拡大させてもよい。

30

【0536】

一般的に、C D 3 / T C R 複合体関連シグナルを刺激する薬剤と、T細胞の表面上の共刺激分子を刺激するリガンドとを付着させた表面と接触させることによって、本発明のT細胞を拡大させることができる。特定には、本明細書で説明したようにして、例えば、表面上に固定された抗 C D 3 抗体もしくはそれらの抗原結合フラグメントまたは抗 C D 2 抗体と接触させることによってまたはカルシウムイオノフォアと共にプロテインキナーゼ C 活性化剤(例えば、プリオスタチン)と接触させることによって、T細胞集団を刺激してもよい。T細胞表面上のアクセサリー分子の共刺激のために、アクセサリー分子に結合するリガンドが使用される。例えば、T細胞の増殖を刺激するのに適切な条件下で、T細胞の集団を抗 C D 3 抗体および抗 C D 2 8 抗体と接触させてもよい。C D 4 ⁺ T細胞または C D 8 ⁺ T細胞のいずれかの増殖を刺激するため、抗 C D 3 抗体および抗 C D 2 8 抗体を使用することができる。抗 C D 2 8 抗体の例としては、9.3、B-T3、XR-CD28 (Diacclone, Besancon, France)が挙げられ、これらは、一般的に当業界で知られている他の方法と同様にして使用することができる(Berg et al., Transplant Proc. 30(8):3975-

40

50

3977, 1998 ; Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9):13191328, 1999 ; Garland et al., J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, 1999)。

【 0 5 3 7 】

ある面において、T細胞に関する一次刺激シグナルおよび共刺激シグナルは、様々なプロトコールによって供給することができる。例えば、各シグナルを供給する薬剤は、溶解した状態かまたは表面にカップリングされていてもよい。表面にカップリングされる場合、薬剤は、同じ表面にカップリングされてもよいし(すなわち、「シス」形成)または別の表面に(すなわち、「トランス」形成)カップリングされてもよい。その代わりに、1種の薬剤が表面にカップリングされ、他の薬剤が溶解した状態であってもよい。ある面において、共刺激シグナルを供給する薬剤が細胞表面に結合しており、一次活性化シグナルを供給する薬剤が、溶解した状態かまたは表面にカップリングされていてもよい。ある面において、両方の薬剤が溶解した状態であってもよい。ある面において、薬剤は、可溶性の形態であってもよく、次いで、Fc受容体を発現する細胞などの表面にまたは薬剤に結合する抗体もしくは他の結合剤に架橋されていてもよい。これに関して、例えば、本発明においてT細胞を活性化して拡大させることに使用することが意図された人工抗原提示細胞(aAPC)に関する米国特許出願公開第20040101519号および20060034810号を参照されたい。

10

【 0 5 3 8 】

ある面において、2種の薬剤が、同じビーズ上、すなわち「シス」または別のビーズ上、すなわち「トランス」のいずれかでビーズ上に固定される。一例として、一次活性化シグナルを供給する薬剤は、抗CD3抗体またはそれらの抗原結合フラグメントであり、共刺激シグナルを供給する薬剤は、抗CD28抗体またはそれらの抗原結合フラグメントであり、どちらの薬剤も、等しい分子の量で同じビーズに共に固定される。ある面において、CD4⁺T細胞の拡大およびT細胞成長のために、ビーズに結合した1:1の比率の各抗体が使用される。本発明のある面において、1:1の比率を使用して観察された拡大と比較してT細胞拡大の増加が観察されるような、ビーズに結合した抗CD3:CD28抗体の比率が使用される。特定のある面において、1:1の比率を使用して観察された拡大と比較して、約1から約3倍の増加が観察される。ある面において、ビーズに結合したCD3:CD28抗体の比率は、100:1から1:100の範囲およびその間の全ての整数値である。本発明のある面において、抗CD3抗体より多くの抗CD28抗体が、粒子に結合しており、すなわちCD3:CD28の比率は1未満である。本発明のある面において、ビーズに結合した抗CD28抗体と抗CD3抗体との比率は、2:1より大きい。特定のある面において、1:100のCD3:CD28の比率のビーズに結合した抗体が使用される。ある面において、1:75のCD3:CD28の比率のビーズに結合した抗体が使用される。さらなる面において、1:50のCD3:CD28の比率のビーズに結合した抗体が使用される。ある面において、1:30のCD3:CD28の比率のビーズに結合した抗体が使用される。好ましいある面において、1:10のCD3:CD28の比率のビーズに結合した抗体が使用される。ある面において、1:3のCD3:CD28の比率のビーズに結合した抗体が使用される。さらなるある面において、3:1のCD3:CD28の比率のビーズに結合した抗体が使用される。

20

30

40

【 0 5 3 9 】

T細胞または他の標的細胞を刺激するために、1:500から500:1までおよびその間のあらゆる整数値の粒子と細胞との比率を使用することができる。当業者であれば容易に認識できるように、粒子と細胞との比率は、標的細胞に対する粒度によって決まる可能性がある。例えば、小さいサイズのビーズは、わずかな数の細胞としか結合できないが、より大きいビーズは多くと結合できる。ある面において、細胞と粒子との比率は、1:100から100:1の範囲およびその間のあらゆる整数値であり、さらなる面において、この比率は、1:9から9:1およびその間のあらゆる整数値を含み、T細胞を刺激するのに使用することができる。抗CD3および抗CD28がカップリングされた粒子とT細胞との、T細胞の刺激をもたらす比率は上述したように様々なであってもよいが、所定

50

の好ましい値としては、1 : 100、1 : 50、1 : 40、1 : 30、1 : 20、1 : 10、1 : 9、1 : 8、1 : 7、1 : 6、1 : 5、1 : 4、1 : 3、1 : 2、1 : 1、2 : 1、3 : 1、4 : 1、5 : 1、6 : 1、7 : 1、8 : 1、9 : 1、10 : 1および15 : 1が挙げられ、1好ましい比率は、粒子とT細胞とが少なくとも1 : 1である。ある面において、1 : 1またはそれ未満の粒子と細胞との比率が使用される。特定のある面において、好ましい粒子 : 細胞の比率は、1 : 5である。さらなる面において、粒子と細胞との比率は、刺激の日に応じて変更することができる。例えば、ある面において、粒子と細胞との比率は、1日目では1 : 1から10 : 1であり、その後、毎日または1日おきに最大10日まで細胞に追加の粒子が添加され、最終的には1 : 1から1 : 10の比率である(添加した日の細胞数に基づく)。特定のある面において、粒子と細胞との比率は、刺激の1日目には1 : 1であり、刺激の3日目および5日目には1 : 5に調整される。ある面において、粒子は、毎日または1日おきに添加して、1日目に最終的な1 : 1の比率にし、刺激の3日目および5日目に1 : 5にする。ある面において、粒子と細胞との比率は、刺激の1日目には2 : 1であり、刺激の3日目および5日目には1 : 10に調整される。ある面において、粒子は、毎日または1日おきに添加して、1日目に最終的な1 : 1の比率にし、刺激の3日目および5日目に1 : 10にする。当業者であれば、様々な他の比率が本発明で使用するのに適している可能性があることを認識する。特に、比率は、粒度ならびに細胞のサイズおよびタイプに応じて様々である。ある面において、使用のための最も典型的な比率は、1日目に1 : 1、2 : 1および3 : 1の付近である。

【0540】

本発明のさらなる面において、T細胞などの細胞は、薬剤でコーティングされたビーズと組み合わせられ、その後ビーズおよび細胞を分離して、次いで細胞を培養する。代替の面において、培養の前に薬剤でコーティングしたビーズと細胞とを分離せずに、一緒に培養する。さらなる面において、まず磁力などの力の適用によってビーズおよび細胞を濃縮し、その結果として細胞表面マーカーのライゲーションを増加させることにより、細胞の刺激を誘導する。

【0541】

一例として、抗CD3および抗CD28が結合している常磁性ビーズ(3 × 28個のビーズ)をT細胞に接触させることによって、細胞表面タンパク質をライゲートさせることができる。ある面において、細胞(例えば、 $10^4 \sim 10^9$ のT細胞)およびビーズ[例えば、DYNABEADS(登録商標)M-450CD3/CD28T常磁性ビーズを1 : 1の比率で]を、緩衝液、例えばPBS(カルシウムおよびマグネシウムなどの2価カチオンを含まない)中で組み合わせる。ここでも、あらゆる細胞濃度が使用できることは、当業者であれば容易に認識することができる。例えば、標的細胞は、サンプル中で極めて希少であってもよいし、サンプルのわずか0.01%しか含んでいなくてもよいまたはサンプル全体(すなわち、100%)が対象の標的細胞を構成していてもよい。したがって、あらゆる細胞数が本発明の内容に含まれる。ある面において、細胞と粒子とが最大限に接触するように、粒子および細胞と一緒に混合されている容量を有意に減少させること(すなわち、細胞の濃度を増加させること)が望ましい場合がある。例えば、ある面において、細胞約20億/mlの濃度が使用される。ある面において、1mlあたり1億より多くの細胞が使用される。さらなる面において、1mlあたり細胞1000万、1500万、2000万、2500万、3000万、3500万、4000万、4500万または5000万の細胞の濃度が使用される。さらなるある面において、1mlあたり細胞7500万、8000万、8500万、9000万、9500万または1億の細胞の濃度が使用される。例えば、ある面において、1mlあたりの細胞約100億、1mlあたりの細胞90億、1mlあたりの細胞80億、1mlあたりの細胞70億、1mlあたりの細胞60億、1mlあたりの細胞50億または1mlあたりの細胞20億の濃度を使用する。ある面において、1mlあたりの細胞1億超を使用する。さらに、高い細胞濃度の使用は、CD28陰性T細胞などの対象の標的抗原の発現が弱い可能性がある細胞のより効率的な捕獲を可能にする。ある面において、このような細胞集団は治療的価値を有する可能性があり、取得が望ましい。例えば

、高濃度の細胞の使用は、通常のCD28発現が比較的弱いCD8⁺T細胞のより効率的な選択を可能にする。

【0542】

ある態様において、CARをコードする核酸、例えば、ここに記載されるCARで形質導入した細胞を、例えば、ここに記載される方法により拡大する。ある態様において、細胞を、培養物中で、数時間(例えば、約2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、18、21時間)~約14日間(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13または14日間)にわたり拡大させる。ある態様において、細胞を、4~9日間にわたり拡大させる。ある態様において、細胞を、8日間またはこれ未満、例えば、7、6または5日間にわたり拡大させる。ある態様において、細胞、例えば、ここに記載されるCLL-1 CAR細胞を、培養物中で、5日間にわたり拡大させると、結果として得られる細胞は、培養物中の同じ培養条件下において9日間にわたり拡大させた同じ細胞より強力である。効力は、例えば、種々のT細胞機能、例えば、増殖、標的細胞の殺滅、サイトカインの産生、活性化、遊走またはこれらの組合せにより規定することができる。ある態様において、細胞、例えば、ここに記載されるCLL-1 CAR細胞であって、5日間にわたり拡大させたCLL-1 CAR細胞は、抗原刺激時に、培養物中の同じ培養条件下において9日間にわたり拡大させた同じ細胞と比較して、細胞倍加の少なくとも1、2、3または4倍の増加を示す。ある態様において、細胞、例えば、ここに記載されるCLL-1 CARを発現する細胞を、培養物中で、5日間にわたり拡大させると、結果として得られる細胞は、培養物中の同じ培養条件下において9日間にわたり拡大させた同じ細胞と比較して、高度な炎症促進性サイトカインの産生、例えば、IFN- γ レベルおよび/またはGM-CSFレベルを呈示する。ある態様において、細胞、例えば、ここに記載されるCLL-1 CAR細胞であって、5日間にわたり拡大させたCLL-1 CAR細胞は、培養物中の同じ培養条件下において9日間にわたり拡大させた同じ細胞と比較して、炎症促進性サイトカインの産生、例えば、IFN- γ レベルおよび/またはGM-CSFレベルの、pg/ml単位で、少なくとも1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍以上の増加を示す。

【0543】

本発明のある面において、混合物は、数時間(約3時間)から約14日間またはその間の1時間毎のあらゆる整数値の時間、培養されてもよい。ある面において、混合物は、21日間培養されてもよい。本発明のある面において、ビーズおよびT細胞は、約8日間、一緒に培養される。ある面において、ビーズおよびT細胞は、2~3日間、一緒に培養される。またT細胞の培養時間が60日間またはそれより長くなるように、数サイクルの刺激が望ましい場合がある。T細胞培養に適切な条件としては、血清(例えば、ウシ胎児またはヒト血清)、インターロイキン-2(IL-2)、インスリン、IFN- γ 、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-12、IL-15、TGF- β およびTNF- α などの増殖および生存能力に必要な因子または当業者公知の細胞成長に関する他のあらゆる添加剤を含有していてもよい適切な培地(例えば、最小必須培地またはRPMI培地1640または、X-vivo 15(Lonza))が挙げられる。細胞成長に関する他の添加剤としては、これらに限定されないが、界面活性剤、プラスマネート、ならびにN-アセチルシステインおよび2-メルカプトエタノールなどの還元剤が挙げられる。培地としては、アミノ酸、ピルビン酸ナトリウムおよびビタミンが添加され、無血清であるかまたは適切な量の血清(または血漿)または規定された一連のホルモンおよび/またはT細胞の成長および拡大に十分な量のサイトカインが補充されたかのいずれかの、RPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、 α -MEM、F-12、X-Vivo 15およびX-Vivo 20、Optimizerを挙げることができる。抗生物質、例えばペニシリンおよびストレプトマイシンは、実験的培養の場合のみに包含され、対象に注入する細胞の培養の場合には包含されない。標的細胞は、例えば、適切な温度(例えば、37 $^{\circ}$ C)および雰囲気(例えば、空気および5%CO₂)などの成長を支持するのに必要な条件下で維持される。

【0544】

ある態様において、細胞を、1以上のインターロイキンを含む、適切な培地(例えば、ここに記載される培地)中で拡大させ、これにより、14日間の拡大期間にわたり、例えば、フローサイトメトリーなど、ここに記載される方法により測定される通り、細胞の、少なくとも200倍(例えば、200倍、250倍、300倍、350倍)の増加を結果としてもたらず。ある態様において、細胞を、IL-15および/またはIL-7(例えば、IL-15およびIL-7)の存在下において拡大させる。

【0545】

ある態様において、ここに記載される方法、例えば、CAR発現細胞を製造する方法は、例えば、抗CD25抗体、もしくはそのフラグメントまたはCD25結合リガンドであるIL-2を使用して、調節性T細胞、例えば、CD25⁺T細胞を、細胞集団から除去することを含む。調節性T細胞、例えば、CD25⁺T細胞を、細胞集団から除去する方法は、ここに記載される。ある態様において、方法、例えば、製造する方法は、細胞集団(例えば、CD25⁺T細胞などの調節性T細胞を枯渇させた細胞集団；または抗CD25抗体、そのフラグメント、もしくはCD25結合リガンドとあらかじめ接触させた細胞集団)をIL-15および/またはIL-7と接触させることをさらに含む。例えば、細胞集団(例えば、抗CD25抗体、そのフラグメント、もしくはCD25結合リガンドとあらかじめ接触させた細胞集団)を、IL-15および/またはIL-7の存在下において拡大させる。

10

【0546】

ある態様において、ここに記載されるCAR発現細胞を、CAR発現細胞の製造時に、例えば、エクスピボにおいて、インターロイキン15(IL-15)ポリペプチド、インターロイキン15受容体アルファ(IL-15Ra)ポリペプチドまたはIL-15ポリペプチドおよびIL-15Raポリペプチド、例えば、hetIL-15の両方の組合せを含む組成物と接触させる。ある態様において、ここに記載されるCAR発現細胞を、CAR発現細胞の製造時に、例えば、エクスピボにおいて、IL-15ポリペプチドを含む組成物と接触させる。ある態様において、ここに記載されるCAR発現細胞を、CAR発現細胞の製造時に、例えば、エクスピボにおいて、IL-15ポリペプチドおよびIL-15Raポリペプチドの両方の組合せを含む組成物と接触させる。ある態様において、ここに記載されるCAR発現細胞を、CAR発現細胞の製造時に、例えば、エクスピボにおいて、hetIL-15を含む組成物と接触させる。

20

30

【0547】

ある態様において、ここに記載されるCAR発現細胞を、エクスピボにおける拡大時に、hetIL-15を含む組成物と接触させる。ある態様において、ここに記載されるCAR発現細胞を、エクスピボにおける拡大時に、IL-15ポリペプチドを含む組成物と接触させる。ある態様において、ここに記載されるCAR発現細胞を、エクスピボにおける拡大時に、IL-15ポリペプチドおよびIL-15Raポリペプチドの両方を含む組成物と接触させる。ある態様において、接触させることは、リンパ球亜集団、例えば、CD8⁺T細胞の生存および増殖を結果としてもたらず。

【0548】

様々な刺激時間に晒されたT細胞は、異なる特徴を示す可能性がある。例えば、典型的な血液またはアフエーシスで得られた末梢血単核細胞産物は、細胞毒性またはサプレッサーT細胞集団(TC、CD8⁺)より大きいヘルパーT細胞集団(TH、CD4⁺)を有する。エクスピボでのCD3およびCD28受容体を刺激することによるT細胞拡大は、約8~9日目には主としてTH細胞からなるT細胞集団を産生するが、約8~9日目の後、T細胞の集団は、よりいっそう多くのTC細胞集団を含む。したがって、処置目的に応じて、主としてTH細胞を含むT細胞集団を対象に注入することが有利な場合がある。同様に、TC細胞の抗原特異的なサブセットが単離された場合、このようなサブセットは、このサブセットをより高度に拡大させるのに有益な場合がある。

40

【0549】

さらに、CD4およびCD8マーカーに加えて、細胞拡大プロセスの経過中、他の表現

50

型マーカーが有意に、ただし大部分は再生可能に変化する。したがって、このような再現性は、活性化されたT細胞産物を特定の目的に合わせる能力を可能にする。

【0550】

CLL-1 CARが構築されたら、これらに限定されないが、抗原刺激後にT細胞を拡大させて再刺激の非存在下でT細胞の拡大を維持する能力および適切なインビトロおよび動物モデルにおける抗癌活性などの分子の活性を評価するために、様々なアッセイを使用することができる。CLL-1 CARの作用を評価するためのアッセイは、以下のさらなる詳細で説明される。

【0551】

初代T細胞におけるCAR発現のウェスタンブロット分析は、単量体および二量体の存在を検出するのに使用できる。例えば、Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)を参照されたい。極めて簡単に言えば、CARを発現するT細胞(CD4⁺およびCD8⁺T細胞の1:1混合物)を、インビトロで10日より長く拡大させ、続いて溶解させて還元条件下でSDS-PAGEを行う。全長TCR-細胞質内ドメインおよび内因性TCR-鎖を含有するCARを、TCR-鎖に対する抗体を使用するウェスタンブロットティングによって検出する。同じT細胞サブセットを、共有結合による二量体形成の評価を許容する非還元条件下でSDS-PAGE分析に使用する。

10

【0552】

インビトロにおける抗原刺激後のCAR⁺T細胞拡大は、フローサイトメトリーによって測定することができる。例えば、CD4⁺およびCD8⁺T細胞の混合物を、CD3 / CD28のaAPCで刺激し、続いて分析するプロモーターの制御下でGFPを発現するレンチウイルスベクターを移入させる。典型的なプロモーターとしては、CMV IE遺伝子、EF-1、ユビキチンCまたはホスホグリセロキナーゼ(PGK)プロモーターが挙げられる。培養から6日目に、CD4⁺および/またはCD8⁺T細胞サブセットにおいてGFP蛍光をフローサイトメトリーによって評価する。例えば、Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)を参照されたい。その代わりに、0日目に、CD4⁺およびCD8⁺T細胞の混合物を、CD3 / CD28でコーティングされた磁気ビーズで刺激し、1日目に、2Aリボゾームスキッピング配列(ribosomal skipping sequence)を使用してeGFPと共にCARを発現するバイシストロン性のレンチウイルスベクターを使用して、CARで形質導入する。培養物は、CLL-1発現細胞により再刺激することができる。

20

30

【0553】

再刺激の非存在下において持続されるCAR⁺T細胞拡大もまた、測定することができる。例えば、Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)を参照されたい。略述すると、0日目に、CD3 / CD28でコーティングされた磁気ビーズによる刺激および1日目に、表示のCARの形質導入に続き、Coulter Multisizer III粒子カウンター、Nexcelom Cellometer VisionまたはMillipore Scepterを使用して、培養の8日目に、平均T細胞容量(f1)を測定する。

【0554】

CART活性を測定するのに、動物モデルもまた使用することができる。例えば、ヒトCLL-1特異的CAR⁺T細胞を使用して、免疫不全マウスにおける原発性ヒトAMLを処置する異種移植片モデルを使用することができる。ごく簡単に略述すると、腫瘍の確立の後で、マウスを、処置群について無作為化する。CLL-1 CART細胞を、免疫不全マウスに、例えば、静脈内注射する。動物を、癌細胞について、毎週の間隔で評価する。末梢血中のCLL-1を発現するAML細胞の数を、CLL-1 CART細胞またはmock形質導入T細胞を注射されたマウスにおいて測定する。ログランク検定を使用してグループごとの生存曲線を比較する。

40

【0555】

細胞毒性は、標準的な⁵¹Cr放出アッセイにより評価することができる。例えば、[Milone et al., *Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)]を参照されたい。略述する

50

と、標的細胞に、 ^{51}Cr (NaCrO_4 として、New England Nuclear, Boston, MA)を、頻りに攪拌しながら37で2時間にわたりロードし、完全RPMI中で2回にわたり洗浄し、マイクロ滴定プレートに播種した。完全RPMI中で、エフェクターT細胞とウェル中の標的細胞とを、エフェクター細胞：標的細胞(E:T)の様々な比率で混合する。さらに、培地のみ(自発的な放出、SR)またはトリトン-X100洗浄剤の1%溶液(合計の放出、TR)を含有する追加のウェルも調製する。37で4時間インキュベートした後、各ウェルからの上清を回収する。次いでガンマ粒子カウンター(Packard Instrument Co., Waltham, MA)を使用して放出された ^{51}Cr を測定する。各条件を少なくとも3連で行い、式： $\% \text{溶解物} = (\text{ER} - \text{SR}) / (\text{TR} - \text{SR})$ を使用して溶解物のパーセンテージを計算し、ここで式中、ERは、各実験条件で放出された平均 ^{51}Cr を表す。

10

【0556】

腫瘍を有する動物モデルにおけるCARの特異的なトラフィックおよび増殖を評価するために、イメージング技術を使用することができる。このようなアッセイは、例えば、Barrett et al., Human Gene Therapy 22:1575-1586 (2011)において説明されている。略述すると、NOD/SCID/ γ^c (NSG)マウスに、T細胞をIV注射した7日後、CAR構築物によるエレクトロポレーションの4時間後におけるNa1m-6細胞を注射した。T細胞に、ホタルルシフェラーゼを発現するレンチウイルス構築物を安定的にトランスフェクトし、マウスを、生物発光についてイメージングする。あるいは、Na1m-6異種移植片モデルにおける、CAR⁺T細胞の単回注射の治療効果および治療特異性は、以下の通りに測定することもできる：NSGマウスに、ホタルルシフェラーゼを安定的に発現するように形質導入されたNa1m-6細胞を注射した7日後、CLL-1 CARでエレクトロポレーションしたT細胞の、単回の尾静脈注射を施す。注射後の様々なタイムポイントで動物を画像化する。例えば、5日目(処置の2日前)および8日目(CAR⁺PBLから24時間後)の代表的なマウスにおけるホタルルシフェラーゼ陽性白血病の光子密度のヒートマップを作製することができる。

20

【0557】

また、他のアッセイ、例えば本明細書における実施例の章で説明されているアッセイ、同様に当業界公知のアッセイなども、本発明のCLL-1 CAR構築物を評価するのに使用することができる。

【0558】

ここに記載した方法に代えてまたはそれと組み合わせて、CAR発現細胞の検出および/または定量化(例えば、インビトロまたはインビボ(例えば、臨床モニタリング))；免疫細胞の拡大および/または活性化；および/またはCARリガンドの使用を伴う、CAR特異的選択の1以上のための方法および組成物も開示される。例示的なある態様において、CARリガンドは、CAR分子に結合する抗体、例えば、CARの細胞外抗原結合ドメインに結合する抗体(例えば、抗原結合ドメインに結合する抗体、例えば、抗イディオタイプ抗体；または細胞外結合ドメインの定常領域に結合する抗体)である。他の態様において、CARリガンドは、CAR抗原分子(例えば、ここに記載されるCAR抗原分子)である。

30

【0559】

ある面において、CAR発現細胞を検出および/または定量化するための方法が開示される。例えば、CARリガンドを使用して、インビトロまたはインビボにおいて、CAR発現細胞を検出および/または定量化する(例えば、患者におけるCAR発現細胞または患者への投与の臨床モニタリングを行う)ことができる。方法は、

40

CARリガンド(適宜、標識されたCARリガンド、例えば、タグ、ビーズ、放射性標識または蛍光標識を含むCARリガンド)を用意することと；

CAR発現細胞を得ること(例えば、製造用サンプルまたは臨床サンプルなど、CAR発現細胞を含有するサンプルを得ること)と；

結合が生じる条件下において、CAR発現細胞を、CARリガンドと接触させ、これにより、存在するCAR発現細胞のレベル(例えば、量)を検出することと

50

を含む。CAR発現細胞の、CARリガンドとの結合は、FACS、ELISAなど、標準的な技術を使用して検出することができる。

【0560】

別の面において、細胞(例えば、免疫エフェクター細胞)を拡大および/または活性化させる方法が開示される。方法は、

CAR発現細胞(例えば、第一のCAR発現細胞またはCARを一過性に発現する細胞)を用意することと;

前記CAR発現細胞を、CARリガンド、例えば、ここに記載されるCARリガンドと、免疫細胞の拡大および/または増殖が生じる条件下において接触させ、これにより、活性化および/または拡大させた細胞集団をもたらすことと
10

【0561】

ある態様において、CARリガンドは、存在する(例えば、基質、例えば、天然では存在しない基質に固定化するかまたは接合させる)。ある態様において、基質は、非細胞性基質である。非細胞性基質は、例えば、プレート(例えば、マイクロ滴定プレート)、膜(例えば、ニトロセルロース膜)、マトリックス、チップまたはビーズから選択される固体支持体であり得る。ある態様において、CARリガンドは、基質(例えば、基質表面上)に存在する。CARリガンドは、基質に固定化することもでき、接合させることもでき、共有結合的または非共有結合的に結合させる(例えば、架橋する)こともできる。ある態様において、CARリガンドは、ビーズに接合させる(例えば、共有結合的に接合させる)こと
20

ができる。前述の態様において、免疫細胞集団は、インピトロまたはエクスピボにおいて拡大させることができる。方法はさらに、例えば、ここに記載される方法のいずれかを使用して、CAR分子のリガンドの存在下において、免疫細胞の集団を培養することを含み得る。

【0562】

他の態様において、細胞を拡大および/または活性化させる方法は、第二の刺激分子、例えば、CD28の添加をさらに含む。例えば、CARリガンドおよび第二の刺激分子を、基質、例えば、1以上のビーズに固定化し、これにより、細胞の拡大および/または活性化を増加させることができる。

【0563】

さらに別の面において、CAR発現細胞について選択または濃縮する方法が提供される。方法は、CAR発現細胞を、ここに記載されるCARリガンドと接触させることと; CARリガンドの結合に基づき、細胞を選択することとを含む。
30

【0564】

さらに他の態様において、CAR発現細胞を枯渇させ、低減し、かつ/または死滅させるための方法が提供される。方法は、CAR発現細胞を、ここに記載されるCARリガンドと接触させることと; CARリガンドの結合に基づき、細胞を標的とし、これにより、CAR発現細胞の数を低減し、かつ/またはこれらを死滅させることとを含む。ある態様において、CARリガンドを、毒性薬剤(例えば、毒素または細胞除去薬)にカップリングさせることができる。別の態様において、抗イディオタイプ抗体は、エフェクター細胞活性、例えば、ADCCまたはADC活性を引き起こし得る。
40

【0565】

ここに記載した方法において使用し得る例示的な抗CAR抗体は、例えば、その内容が参照により組み入れられる、WO2014/190273およびJena et al., "Chimeric Antigen Receptor (CAR)-Specific Monoclonal Antibody to Detect CD19-Specific T cells in Clinical Trials", PLOS March 2013 8:3 e57838において説明されている。ある態様において、抗イディオタイプ抗体分子は、抗CD19抗体分子、例えば、抗CD19 scFvを認識する。例えば、抗イディオタイプ抗体分子は、結合について、Jena et al., PLOS March 2013 8:3 e57838において説明されている、CD19特異的CAR mAbクローン番号136.20.1と競合する場合もあり、CD19特異的CAR mAb
50

bクローン番号136.20.1と同じCDR(例えば、Kabatatによる定義、Chothiaによる定義またはKabatatによる定義とChothiaによる定義との組合せを使用する、VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3(CH CDR3)、VL CDR1、VL CDR2およびVL CDR3の1以上、例えば、これらの全て)を有する場合もあり、CD19特異的CAR mAbクローン番号136.20.1と同じ可変領域の1以上(例えば、2)を有する場合もあり、CD19特異的CAR mAbクローン番号136.20.1を含む場合もある。ある態様において、抗イディオタイプ抗体は、Jena et al.において説明されている方法に従い作製した。別の態様において、抗イディオタイプ抗体分子は、WO2014/190273において説明されている抗イディオタイプ抗体分子である。ある態様において、抗イディオタイプ抗体分子は、136.20.1など、WO2014/190273の抗体分子と同じCDR(例えば、VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2およびVL CDR3の1以上、例えば、これらの全て)を有し、WO2014/190273の抗体分子の1以上(例えば、2)の可変領域を有する場合もあり、136.20.1など、WO2014/190273の抗体分子を含む場合もある。他の態様において、抗CAR抗体は、例えば、WO2014/190273において説明されている、CAR分子の細胞外結合ドメインの定常領域に結合する。ある態様において、抗CAR抗体は、CAR分子の細胞外結合ドメインの定常領域、例えば、重鎖定常領域(例えば、CH₂-CH₃間ヒンジ領域)または軽鎖定常領域に結合する。例えば、ある態様において、抗CAR抗体は、結合について、WO2014/190273において説明されている、2D3モノクローナル抗体と競合し、2D3(例えば、VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2およびVL CDR3の1以上、例えば、これらの全て)と同じCDRを有するかまたは2D3の1以上(例えば、2)の可変領域を有するかまたはWO2014/190273において説明されている2D3を含む。

10

20

【0566】

いくつかの面および態様において、本明細書における組成物および方法を、例えば、その内容が参照によりそれらの全体において本明細書に組み入れられる、2014年7月31日に出願された米国第62/031,699号において説明されている通り、T細胞の特異的なサブセットについて最適化する。ある態様において、T細胞の最適化されたサブセットは、対照T細胞、例えば、同じ構築物を発現する、異なるタイプのT細胞(例えば、CD8⁺T細胞またはCD4⁺T細胞)と比較して、持続性の増強を提示する。

30

【0567】

ある態様において、CD4⁺T細胞は、ここに記載されるCARであって、CD4⁺T細胞に適する細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、CD4⁺T細胞について最適化された細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、CD4⁺T細胞における持続性の増強をもたらす細胞内シグナル伝達ドメイン)、例えば、ICOSドメインを含むCARを含む。ある態様において、CD8⁺T細胞は、ここに記載されるCARであって、CD8⁺T細胞に適する細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、CD8⁺T細胞について最適化された細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、CD8⁺T細胞における持続性の増強をもたらす細胞内シグナル伝達ドメイン)、例えば、4-1BBドメイン、CD28ドメインまたはICOSドメイン以外の、別の共刺激ドメインを含むCARを含む。ある態様において、ここに記載されるCARは、ここに記載される抗原結合ドメイン、例えば、CARは、CLL-1に特異的に結合する抗原結合ドメイン、例えば、表2の抗原結合ドメインを含む。

40

【0568】

ある面において、本明細書では、対象、例えば、癌を有する対象を処置する方法が説明される。方法は、前記対象に、

1) CAR(CARCD4⁺)を含むCD4⁺T細胞であって、

抗原結合ドメイン、例えば、ここに記載される抗原結合ドメイン、例えば、CLL-1に特異的に結合する抗原結合ドメイン、例えば、表2の抗原結合ドメインと；

膜貫通ドメインと；

50

細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、第一の共刺激ドメイン、例えば、ICOSドメインと

を含むCD4⁺T細胞；および

2) CAR(CARCD8⁺)を含むCD8⁺T細胞であって、

抗原結合ドメイン、例えば、ここに記載される抗原結合ドメイン、例えば、CLL-1に特異的に結合する抗原結合ドメイン、例えば、表2の抗原結合ドメインと；

膜貫通ドメインと；

細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、第二の共刺激ドメイン、例えば、4-1BBドメイン、CD28ドメインまたはICOSドメイン以外の、別の共刺激ドメインと

を含み、

CARCD4⁺とCARCD8⁺とが互いに異なる、

CD8⁺T細胞

の有効量を投与することを含む。

【0569】

方法はさらに、

3) CAR(第二のCARCD8⁺)を含む、第二のCD8⁺T細胞であって、

抗原結合ドメイン、例えば、ここに記載される抗原結合ドメイン、例えば、CLL-1に特異的に結合する抗原結合ドメイン、例えば、表2の抗原結合ドメインと；

膜貫通ドメインと；

細胞内シグナル伝達ドメインと

を含み、第二のCARCD8⁺が、細胞内シグナル伝達ドメイン、例えば、CARCD8⁺において存在しない共刺激シグナル伝達ドメインを含み、適宜、ICOSシグナル伝達ドメインを含まない、第二のCD8⁺T細胞

を投与することを含んでもよい。

【0570】

治療的適用

CLL-1と関係する疾患および/または障害

本発明はとりわけ、癌を処置するための組成物および方法を提供する。ある面において、癌は、白血病(急性骨髄性白血病(AML)、慢性骨髄性白血病(CML)、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、B細胞急性リンパ芽球性白血病(B細胞急性リンパ性白血病(BALL))、T細胞急性リンパ芽球性白血病(T細胞急性リンパ性白血病(TALL))、B細胞前リンパ球性白血病、形質細胞性骨髄腫および骨髄異形成症候群など)およびリンパ腫(多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、パーキットリンパ腫、ならびに小細胞型濾胞性リンパ腫および大細胞型濾胞性リンパ腫など)を含む悪性リンパ増殖性状態を含むが、これらに限定されない血液癌である。

【0571】

治療的適用

ある面において、本発明は、CLL-1発現に関係する疾患を処置するための方法を提供する。ある面において、本発明は、腫瘍の一部がCLL-1に関して陰性であり、腫瘍の一部がCLL-1に関して陽性である疾患を処置するための方法を提供する。例えば、本発明のCARは、上昇したCLL-1の発現に関係する疾患に関する処置を受けた対象を処置するのに有用であり、ここで上昇したCLL-1のレベルに関する処置を受けた対象は、上昇したCLL-1のレベルに関係する疾患を示す。ある態様において、本発明のCARは、CLL-1の発現に関係する疾患のための処置を受けた対象を処置するために有用であり、ここで、CLL-1の発現に関する処置を受けた対象は、CLL-1の発現に関係する疾患を呈示する。

【0572】

ある面において、本発明は、哺乳動物免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞における発現のためのプロモーターに作動可能に連結したCLL-1 CARを含むベクターに関する。ある面において、本発明は、CLL-1 CARを発現する、組換

10

20

30

40

50

え免疫エフェクター細胞、例えば、組換えT細胞または組換えNK細胞であって、CLL-1を発現する腫瘍の処置における使用のための組換え免疫エフェクター細胞を提供するが、ここで、CLL-1 CARを発現する組換え免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)を、CLL-1 CAR発現細胞(例えば、CLL-1 CARTまたはCLL-1 CAR発現NK細胞)と称する。ある面において、本発明のCLL-1 CAR発現細胞(例えば、CLL-1 CARTまたはCLL-1 CAR発現NK細胞)は、CLL-1 CAR発現細胞(例えば、CLL-1 CARTまたはCLL-1 CAR発現NK細胞)が、腫瘍細胞を標的とし、腫瘍の成長を阻害するように、腫瘍細胞を、その表面上で発現される、少なくとも1の本発明のCLL-1 CARと接触させることが可能である。

10

【0573】

ある面において、本発明は、CLL-1を発現する腫瘍細胞の成長を阻害する方法であって、CLL-1 CAR発現細胞(例えば、CLL-1 CARTまたはCLL-1 CAR発現NK細胞)が、抗原に応答して活性化し、癌細胞を標的とし、腫瘍の成長を阻害するように、腫瘍細胞を、本発明のCLL-1 CAR発現細胞(例えば、CLL-1 CARTまたはCLL-1 CAR発現NK細胞)と接触させることを含む方法に関する。

【0574】

ある面において、本発明は、対象における癌を処置する方法に関する。方法は、癌を、対象において処置するように、対象に、本発明のCLL-1 CAR発現細胞(例えば、CLL-1 CARTまたはCLL-1 CAR発現NK細胞)を投与することを含む。本発明のCLL-1 CAR発現細胞(例えば、CLL-1 CARTまたはCLL-1 CAR発現NK細胞)により処置可能な癌の例は、CLL-1の発現に関連する癌である。ある面において、CLL-1の発現に関連する癌は、血液癌である。ある面において、血液癌は、白血病(急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病および骨髄異形成症候群など)およびリンパ腫(多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、パーキットリンパ腫、ならびに小細胞型濾胞性リンパ腫および大細胞型濾胞性リンパ腫など)を含む悪性リンパ増殖性状態を含むが、これらに限定されない。他の態様において、血液癌は、例えば、白血病、例えば、AMLまたはMDSの微小残存病変MRDを含み得る。

20

30

【0575】

本発明は、キメラ抗原受容体(CAR)を発現するように、免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)を遺伝子改変し、それを必要とするレシピエントに、CLL-1 CAR発現細胞(例えば、CLL-1 CARTまたはCLL-1 CAR発現NK細胞)を注入する、細胞療法タイプを含む。注入される細胞は、レシピエントにおける腫瘍細胞を死滅させることが可能である。抗体療法と異なり、CARで改変された細胞(例えば、CARで改変されたT細胞またはCARで改変されたNK細胞)は、インビボにおける複製が可能であり、持続的な腫瘍制御につながり得る、長期にわたる持続性を結果としてもたらす。種々の面において、患者に投与された免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)またはそれらの子孫細胞は、免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)の、患者への投与後、少なくとも4カ月間、5カ月間、6カ月間、7カ月間、8カ月間、9カ月間、10カ月間、11カ月間、12カ月間、13カ月間、14カ月間、15カ月間、16カ月間、17カ月間、18カ月間、19カ月間、20カ月間、21カ月間、22カ月間、23カ月間、2年間、3年間、4年間または5年間にわたり、患者において存続する。

40

【0576】

本発明はまた、例えば、インビトロにおいて転写されるRNAにより、キメラ抗原受容体(CAR)を一過性に発現するように、免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)を改変し、それを必要とするレシピエントに、CLL-1 CAR発現細胞(例えば、CLL-1 CAR T細胞またはCLL-1 CAR発現細胞)を注入する、細胞

50

療法のタイプも含む。注入される細胞は、レシピエントにおける腫瘍細胞を死滅させることが可能である。したがって、種々の面において、患者に投与される免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)は、免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)の、患者への投与後、1カ月間未満、例えば、3週間、2週間、1週間にわたり存在する。

【0577】

いかなる特定の理論にも縛られるつもりはないが、CARで改変された免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)により惹起される抗腫瘍免疫応答は、能動的免疫応答の場合もあり、受動的免疫応答の場合もあり、代替的に、間接的免疫応答と対比される直接的免疫応答に起因する場合もある。ある面において、CARで形質導入された免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)は、CLL-1を発現するヒト癌細胞に

10

応答して、特異的な炎症促進性サイトカインの分泌および強力な細胞溶解活性を呈示し、可溶性CLL-1による障害に抵抗し、バスタンダー殺滅を媒介し、確立されたヒト腫瘍の退縮を媒介する。例えば、CLL-1を発現する腫瘍による不均質場内の無抗原腫瘍細胞は、CLL-1によりリダイレクトされた免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)であって、隣接する抗原陽性癌細胞に対してあらかじめ反応している免疫エフェクター細胞による間接的破壊を受けやすい。

【0578】

ある面において、本発明の完全ヒトCARで改変された免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)は、エクスピボにおける免疫化のためのワクチンのタイプであ

20

ってもよく、かつ/または哺乳動物におけるインピボ治療のためのワクチンのタイプであってもよい。ある面において、哺乳動物は、ヒトである。

【0579】

エクスピボでの免疫化に関して、哺乳動物に細胞を投与する前に、インピトロで、以下：i)細胞の拡大、ii)細胞へのCARをコードする核酸の導入またはiii)細胞の低温保存のうち少なくとも1つが行われる。

【0580】

エクスピボの手法は当業界周知であり、以下でより詳細に論じられる。簡単に言えば、哺乳動物(例えば、ヒト)から細胞を単離し、ここに記載したCARを発現するベクターで遺伝子改変する(すなわち、インピトロで形質導入またはトランスフェクトする)。CARで改変された細胞を哺乳動物のレシピエントに投与することによって、治療的利益をもたらすことができる。哺乳動物のレシピエントはヒトであってもよいし、CARで改変された細胞はレシピエントにとって自己であってもよい。その代わりに、細胞は、レシピエントにとって同種異系、同系または異種であってもよい。

30

【0581】

エクスピボで造血幹および前駆細胞を拡大させる手法は、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,199,942号で説明されており、本発明の細胞に適用することができる。他の好適な方法が当業界公知であり、それゆえに本発明は、いかなる特定のエクスピボでの細胞拡大方法にも限定されない。簡単に言えば、エクスピボでのT細胞の培養および拡大は、(1)末梢血液の回収物または骨髓外植片から、哺乳動物由来のCD34+造血幹および前駆細胞を収集すること；および(2)このような細胞をエクスピボで拡大させることを含む。米国特許第5,199,942号で説明されている細胞成長因子に加えて、flt3-L、IL-1、IL-3およびc-kitリガンドなどの他の因子を細胞の培養および拡大に使用することができる。

40

【0582】

エクスピボでの免疫化に関して細胞ベースのワクチンを使用することに加えて、本発明はまた、患者中の抗原に対して向けられた免疫反応を惹起するための、インピボでの免疫化のための組成物および方法も提供する。

【0583】

一般的に、本明細書で説明したようにして活性化され拡大させた細胞は、免疫不全の個

50

体において生じた疾患の処置および予防で利用することができる。特に、本発明のCARで改変された免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)は、CLL-1の発現に関係する疾患、障害および状態の処置において使用される。ある面において、本発明の細胞は、CLL-1の発現に関係する疾患、障害および状態を発症する危険性がある患者の処置に使用することができる。したがって、本発明は、CLL-1の発現に関係する疾患、障害および状態の処置または予防のための方法であって、それを必要とする対象に、本発明のCARで改変された免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)の治療有効量を投与することを含む方法を提供する。ある面において、本発明のCAR発現細胞、例えば、CAR T細胞またはCAR発現NK細胞)を使用して、癌もしくは悪性腫瘍などの増殖性疾患または脊髄形成異常、骨髄異形成症候群、もしくは前白血病などの前癌状態または細胞の異常な増殖を特徴とする、過増殖性障害、過形成、もしくは異形成を処置することができる。

10

【0584】

ある面において、本発明のCAR発現細胞(例えば、CAR T細胞またはCAR発現NK細胞)を使用して、癌を処置するが、ここで、癌は、血液癌である。血液癌状態とは、白血病、ならびに血液、骨髄およびリンパ系に影響を及ぼす悪性リンパ増殖性状態などの癌のタイプである。

【0585】

ある面において、本発明の組成物およびCAR発現細胞(例えば、CAR T細胞またはCAR発現NK細胞)は、特に、骨髄白血病、AMLおよびその亜型、慢性骨髄白血病(CML)、ならびに骨髄異形成症候群(MDS)を処置するために有用である。

20

【0586】

白血病は、急性白血病および慢性白血病として分類することができる。急性白血病はさらに、急性骨髄性白血病(AML)および急性リンパ性白血病(ALL)として分類することができる。慢性白血病は、慢性骨髄性白血病(CML)および慢性リンパ性白血病(CLL)を含む。他の関連する状態は、骨髄血液細胞の産生の失効(または異形成)およびAMLへの形質転換の危険性によりまとめられる血液学的状態の多様なコレクションである、骨髄異形成症候群(かつては「前白血病」として公知であったMDS)を含む。

【0587】

リンパ腫とは、リンパ球から発症する血液細胞腫瘍の群である。例示的なリンパ腫は、非ホジキンリンパ腫およびホジキンリンパ腫を含む。

30

【0588】

AMLにおいて、分化が異常であり、寿命の長い骨髄前駆細胞の、悪性形質転換および制御不能の増殖は、血液の未成熟形態の循環数の増大および悪性細胞による正常骨髄の置き換えを結果としてもたらす。症状は、疲労、蒼白、あざおよび出血のしやすさ、発熱および感染を含み、白血病性浸潤の症状は、患者の約5%だけに存在する(皮膚症状として存在することが多い)。末梢血スメアおよび骨髄の検査は、診断的である。既存の処置は、寛解を達成する誘導化学療法と、再発を回避する寛解後化学療法(幹細胞移植を伴うかまたは伴わない)とを含む。

【0589】

AMLは、形状、免疫表現型および細胞化学により互いと識別される多数の亜型を有する。5クラスは、骨髄系、骨髄単球系、単球系、赤血球系および巨核球系を含む主要な細胞型に基づき説明される。

40

【0590】

寛解誘導率は、50~85%の範囲である。長期無病生存は、患者の20~40%において生じ、幹細胞移植により処置される若年患者においては、40~50%まで増加することが報告されている。

【0591】

潜在的な有益性は、処置毒性の増加を正当化すると考えられるため、予後診断因子は、処置のプロトコールおよび強度を決定する一助となり、予後診断の負の特徴が強く見込ま

50

れる患者には通常、より強い治療形態を施す。最も重要な予後診断因子は、白血病細胞の核型であり、好適な核型は、 $t(15; 17)$ 、 $t(8; 21)$ および $inv(16)(p13; q22)$ を含む。負の因子は、高齢、骨髄異形成相の前駆、続発性白血病、高WBC数およびアウエル小体の非存在を含む。

【0592】

初期治療では、寛解の誘導を試みるが、AMLが応答する薬物は少数であるという点において、ALLとはほとんど異なる。基本的な誘導レジメンは、連続的なIV注入または高用量による、5～7日間にわたるシタラピンを含み、この期間中に、ダウノルビシンまたはイダルビシンを、IVにより3日間にわたり施す。一部のレジメンは、6-チオグアニン、エトポシド、ピンクリスチンおよびプレドニゾンを含むが、それらの寄与は不明である。処置は通常、感染または出血を伴う、著明な骨髄抑制を結果としてもたらし、骨髄が回復するには、多大な待機時間を要する。この期間中には、細心の予防ケアおよび支持ケアが死活的に重要である。

10

【0593】

慢性骨髄性(または骨髄)白血病(CML)はまた、慢性顆粒球性白血病としても公知であり、白血球の癌として特徴付けられる。CMLのための一般的な処置レジメンは、Bcr-Ablチロシンキナーゼ阻害剤であるイマチニブ[グリベック(登録商標)]、ダサチニブおよびニロチニブを含む。Bcr-Ablチロシンキナーゼ阻害剤は、フィラデルフィア染色体転座を伴うCML患者にとりわけ有用である。

【0594】

骨髄異形成症候群(MDS)とは、造血または血液産生の不全および失効を特徴とする医学的血液状態である。したがって、血液形成細胞の数および品質が、不可逆的に減衰する。MDSを有するある患者は、重度の貧血を発症し得るが、他の患者は無症状性である。

20

【0595】

MDSの分類スキームは、当業界公知であり、特定の血液細胞型、例えば、骨髄芽球、単球および赤血球前駆体の比または頻度を指定する基準を有する。MDSは、不応性貧血、環状鉄芽球を伴う不応性貧血、芽球が過剰な不応性貧血、形質転換した芽球が過剰な不応性貧血、慢性骨髄単球性白血病(CMML)を含む。

【0596】

MDSのための処置は、症状の重症度と共に変動する。重度の症状を経つつある患者のための処置の積極的形態は、骨髄移植および血液生成物による支持(例えば、輸血)および造血性増殖因子(例えば、エリスロポエチン)による支持ケアを含む。MDSを処置するには、他の薬剤：5-アザシチジン、デシタピンおよびレナリドマイドも頻繁に使用される。場合によって、鉄キレート剤であるデフェロキサミン(デスフェラル(登録商標))およびデフェラシロクス(エクジェイド(登録商標))もまた、投与することができる。

30

【0597】

別の態様において、本発明のCAR発現細胞(例えば、CAR T細胞またはCAR発現NK細胞)を使用して、白血病幹細胞を有する癌または白血病を処置する。例えば、白血病幹細胞は、 $CD34^+ / CD38^-$ 白血病細胞である。

【0598】

本発明はとりわけ、癌を処置するための組成物および方法を提供する。ある面において、癌は、白血病(急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病および骨髄異形成症候群など)およびリンパ腫(多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、パーキットリンパ腫、ならびに小細胞型濾胞性リンパ腫および大細胞型濾胞性リンパ腫など)を含む悪性リンパ増殖性状態を含むが、これらに限定されない血液癌である。

40

【0599】

ある面において、本発明のCAR発現細胞(例えばCAR T細胞またはCAR発現NK細胞)は、他の癌および悪性腫瘍を処置するのに使用でき、限定されるものではないが、癌および悪性腫瘍としては、これらに限定されないが、例えば、B細胞急性リンパ性白血病(「BALL」)、T細胞急性リンパ性白血病(「TALL」)、急性リンパ性白血病(A

50

LL)を包含する、急性白血病；これらに限定されないが、例えば、慢性骨髄性白血病(CML)、慢性リンパ球性白血病(CLL)を包含する、1種または複数の慢性白血病；これらに限定されないが、例えば、B細胞前リンパ球性白血病、芽球性形質細胞様樹状細胞の新生物、パーキットリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、ヘアリーセル白血病、小細胞型または大細胞型濾胞性リンパ腫、悪性のリンパ増殖性状態、MALTLリンパ腫、マンテル細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、多発性骨髄腫、脊髄形成異常および骨髄異形成症候群、非ホジキンリンパ腫、形質芽細胞リンパ腫、形質細胞様樹状細胞の新生物、ワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症および骨髄の血液細胞の効果が認められない産生(または異形成)に共通する様々な血液学的状態の一群である「前白血病状態」を包含する、追加の血液癌または血液学的状態、ならびに同種のものなどが挙げられる。本発明のCARで改変された免疫エフェクター細胞(例えばT細胞またはNK細胞)は、単独で投与されてもよいしまたは希釈剤とおよび/またはIL-2もしくは他のサイトカインなどの他の成分もしくは細胞集団と組み合わせさせた医薬組成物として投与されてもよい。

10

【0600】

本発明はまた、CLL-1発現細胞集団の増殖を阻害するかまたはCLL-1発現細胞集団を低減するための方法であって、細胞の集団を、本発明のCLL-1 CAR発現細胞(例えば、CLL-1 CART細胞またはCLL-1 CAR発現NK細胞)であり、CLL-1発現細胞に結合するCLL-1 CAR発現細胞と接触させることを含む方法も提供する。具体的な面において、本発明は、CLL-1を発現する癌細胞の集団の増殖を阻害するかまたはCLL-1を発現する癌細胞の集団を低減するための方法であって、BMCA発現癌細胞集団を、本発明のCLL-1 CAR発現細胞(例えば、CLL-1 CART細胞またはCLL-1 CAR発現NK細胞)であり、CLL-1発現細胞に結合するCLL-1 CAR発現細胞と接触させることを含む方法を提供する。ある面において、本発明は、CLL-1を発現する癌細胞の集団の増殖を阻害するかまたはCLL-1を発現する癌細胞の集団を低減するための方法であって、CLL-1発現癌細胞集団を、本発明のCLL-1 CAR発現細胞(例えば、CLL-1 CART細胞またはCLL-1 CAR発現NK細胞)であり、CLL-1発現細胞に結合するCLL-1 CAR発現細胞と接触させることを含む方法を提供する。ある特定の面において、本発明のCLL-1 CAR発現細胞(例えば、CLL-1 CART細胞またはCLL-1 CAR発現NK細胞)は、細胞および/または癌細胞の量、数、数量またはパーセンテージを、骨髄性白血病またはCLL-1発現細胞に関連する別の癌を有する対象またはこれらのための動物モデルにおいて、陰性対照と比べて、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも65%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも95%または少なくとも99%低減する。ある面において、対象は、ヒトである。

20

30

【0601】

本発明はまた、CLL-1発現細胞(例えば、CLL-1を発現する血液癌または異型癌)に関係する疾患を予防、処置および/または管理するための方法であって、それを必要とする対象に、本発明のCLL-1 CAR発現細胞(例えば、CLL-1 CART細胞またはCLL-1 CAR発現NK細胞)であり、CLL-1発現細胞に結合するCLL-1 CAR発現細胞を投与することを含む方法も提供する。ある面において、対象は、ヒトである。CLL-1を発現する細胞に関連する障害の非限定的な例は、自己免疫障害(ループスなど)、炎症性障害(アレルギーおよび喘息など)および癌(CLL-1を発現する血液癌または非定型癌など)を含む。

40

【0602】

本発明はまた、CLL-1発現細胞に関係する疾患を予防、処置および/または管理するための方法であって、それを必要とする対象に、本発明のCLL-1 CAR発現細胞(例えば、CLL-1 CART細胞またはCLL-1 CAR発現NK細胞)であり、CLL-1発現細胞に結合するCLL-1 CAR発現細胞を投与することを含む方法も提

50

供する。ある面において、対象は、ヒトである。

【0603】

本発明は、CLL-1発現細胞に関連する癌の再発を予防するための方法であって、それを必要とする対象に、本発明のCLL-1 CAR発現細胞(例えば、CLL-1 CART細胞またはCLL-1 CAR発現NK細胞)であり、CLL-1発現細胞に結合するCLL-1 CAR発現細胞を投与することを含む方法を提供する。ある面において、方法は、それを必要とする対象に、ここに記載されるCLL-1 CAR発現細胞(例えば、CLL-1 CART細胞またはCLL-1 CAR発現NK細胞)であって、CLL-1発現細胞に結合するCLL-1 CAR発現細胞の有効量を、別の治療の有効量と組み合わせて投与することを含む。

10

【0604】

併用療法

ここに記載されるCAR発現細胞は、他の公知の薬剤および療法と組み合わせて使用してもよい。「組み合わせる」投与されるとは、本明細書で使用される場合、対象が障害に罹っている間に、2種の(またはそれより多くの)異なる処置が対象に送達されることを意味し、例えば、対象が障害を有すると診断された後、かつ障害が治癒もしくは除去されたりまたは他の理由で処置が中止されたりする前に、2種以上の処置が送達される。ある態様において、投与に関して重複があるように、1種の処置の送達が、第二の送達が始まる時にもなお行われている。これは、本明細書では「同時」または「並列送達」とも称されることもある。他の態様において、1処置の送達は、他の処置の送達が始まる前に終わる。いずれのケースのある態様において、投与を組み合わせることによって、処置はより有効である。例えば、第二の処置を行わなかった場合と等しい作用が見られるかまたは第一の処置の非存在下で第二の処置が投与された場合に見られる程度、もしくは第一の処置を用いて類似の状況が見られる程度より大きい程度に、第二の処置が症状を低減する場合、例えば、第二の処置はより有効である。ある態様において、送達は、症状または障害に関する他のパラメーターの低減が、他方の非存在下で送達された一方の処置で観察されるパラメーターの低減より大きくなるような送達である。2処置の作用は、部分的に相加的、全体的に相加的またはそれより大きく相加的であってもよい。送達は、送達された第一の処置の作用が、第二が送達されたときにもなお検出可能になるような送達であってもよい。

20

【0605】

ここに記載されるCAR発現細胞および少なくとも1種の追加の治療剤は、同じまたは別の組成物で同時に投与されてもよいしまたは逐次的に投与されてもよい。逐次的な投与の場合、ここに記載されるCAR発現細胞を最初に投与し、2番目に追加の薬剤を投与してもよいしまたは投与順はその逆でもよい。

30

【0606】

CAR療法および/または他の治療剤、手順、もしくはモダリティーは、障害が活性である期間において投与することもでき、寛解期間または疾患がそれほど活性でない期間において投与することもできる。CAR療法は、他の処置の前に投与することもでき、他の処置と並列して投与することもでき、他の処置後に投与することもでき、障害の寛解時に投与することもできる。

40

【0607】

組み合わせる投与する場合、CAR療法およびさらなる薬剤(例えば、第二の薬剤または第三の薬剤)または全ての薬剤は、個別に、例えば、単剤療法として使用される各薬剤の量または投与量より高量または高用量で投与することもでき、これより低量または低用量で投与することもでき、これと同量または同用量で投与することもできる。ある態様において、CAR療法、さらなる薬剤(例えば、第二の薬剤または第三の薬剤)または全ての薬剤の投与される量または投与量は、個別に、例えば、単剤療法として使用される各薬剤の量または投与量より低量または低投与量(例えば、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%または少なくとも50%の量または投与量)である。他の態様において、所望の効果(例えば、癌の処置)を結果としてもたらず、CAR療法、さらなる薬剤

50

(例えば、第二の薬剤または第三の薬剤)または全ての薬剤の量または投与量は、同じ治療効果を達成するのに必要とされる個別に、例えば、単剤療法として使用される各薬剤の量または投与量より低量または低投与量(例えば、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%または少なくとも50%の低量または低投与量)である。

【0608】

さらなる面において、ここに記載されるCAR発現細胞は、外科手術、化学療法、放射線、免疫抑制剤、例えばシクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノール酸塩およびFK506、抗体または他の免疫除去剤、例えばキャンパス、抗CD3抗体もしくは他の抗体療法、シトキサン(cytosin)、フルダラビン、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、マイコフェノール酸、ステロイド、FR901228、サイトカイン、ならびに放射線照射、ペプチドワクチン、例えばIzumoto et al. 2008 J Neurosurg 108:963-971で説明されているものと組み合わせた処置レジメンで使用することができる。

10

【0609】

ある特定の場合、本発明の化合物を、他の抗癌剤、抗アレルギー剤、吐き気止め(または制吐剤)、鎮痛剤、細胞保護剤およびこれらの組合せなど、他の治療剤と組み合わせる。

【0610】

ある態様において、ここに記載されるCAR発現細胞は、化学療法剤と組み合わせて使用することができる。典型的な化学療法剤としては、アントラサイクリン(例えば、ドキソルビシン(例えば、リポソーマルドキソルビシン))、ピンカアルカロイド(例えば、ピンブラスチン、ピンクリスチン、ピンデシン、ピノレルピン)、アルキル化剤(例えば、シクロホスファミド、ダカルバジン、メルファラン、イフォスファミド、テモゾロマイド)、免疫細胞抗体(例えば、アレムツズマブ、ゲムツズマブ、リツキシマブ、オファツムマブ、トシツモマブ、プレツキシマブ)、代謝拮抗物質(例えば、葉酸アンタゴニスト、ピリミジン類似体、プリン類似体およびアデノシン - デアミナーゼ阻害剤(例えば、フルダラビン)など)、mTOR阻害剤、TNFRグルココルチコイド誘導性TNFR関連タンパク質(GITR)アゴニスト、プロテアソーム阻害剤(例えば、アクラシノマイシンA、グリオトキシシンまたはボルテゾミブ)、イムノモジュレーター、例えばサリドマイドまたはサリドマイド誘導体(例えば、レナリドマイド)が挙げられる。

20

30

【0611】

併用療法で使用するために考慮される一般的な化学療法剤としては、アナストロゾール(Arimidex(登録商標))、ピカルタミド(Casodex(登録商標))、硫酸ブレオマイシン(Blenoxane(登録商標))、ブスルファン(Myleran(登録商標))、ブスルファン注射剤(Busulfex(登録商標))、カペシタピン(Xeloda(登録商標))、N4 - ペントキシカルボニル - 5 - デオキシ - 5 - フルオロシチジン、カルボプラチン(Paraplatin(登録商標))、カルムスチン(BicNU(登録商標))、クロラムブシル(Leukeran(登録商標))、シスプラチン(Platinol(登録商標))、クラドリピン(Leustatin(登録商標))、シクロホスファミド(Cytosar(登録商標))またはNeosar(登録商標))、シタラビン、シトシンアラビノシド(Cytosar-U(登録商標))、シタラビンリポソーム注射剤(DepoCyt(登録商標))、ダカルバジン(DTIC-Dome(登録商標))、ダクチノマイシン(アクチノマイシンD、コスメガン(Cosmegam))、塩酸ダウノルビシン(Cerubidine(登録商標))、クエン酸ダウノルビシンリポソーム注射剤(DaunoXome(登録商標))、デキサメタゾン、ドセタキセル(Taxotere(登録商標))、塩酸ドキソルビシン(Adriamycin(登録商標))、Rubex(登録商標))、エトポシド(Vepesid(登録商標))、リン酸フルダラビン(Fludara(登録商標))、5 - フルオロウラシル(Adrucil(登録商標))、Efudex(登録商標))、フルタミド(Eulixin(登録商標))、テザシチピン(tezacitibine)、ゲムシタピン(ジフルオロデオキシシチジン)、ヒドロキシ尿素(Hydraea(登録商標))、イダルビシン(Idamycin(登録

40

50

商標))、イフォスファミド(IFEX(登録商標))、イリノテカン(Campotosar(登録商標))、L-アスパラギナーゼ(ELSPAR(登録商標))、ロイコボリンカルシウム、メルファラン(Alkeran(登録商標))、6-メルカプトプリン(Purinethol(登録商標))、メトトレキセート(Folex(登録商標))、ミトキサントロン(Novantrone(登録商標))、マイロターグ、パクリタキセル(Taxol(登録商標))、フェニックス(イットリウム90/MX-DTPA)、ペントスタチン、カルムスチンインプラント含有ポリフェプロサン20(Gliadel(登録商標))、クエン酸タモキシフェン(Nolvadex(登録商標))、テニボシド(Vumon(登録商標))、6-チオグアニン、チオテパ、チラパザミン(Tirazone(登録商標))、注射用の塩酸トポテカン(Hycamptin(登録商標))、ビンブラスチン(Velban(登録商標))、ピンクリスチン(Oncovin(登録商標))およびビノレルピン(Navelbine(登録商標))が挙げられる。

10

【0612】

化学療法剤と、ここに記載されるCLL-1 CAR分子を発現する細胞との組合せによる処置を使用して、ここに記載される血液癌、例えば、AMLを処置することができる。ある態様において、化学療法剤と、CLL-1 CAR発現細胞との組合せは、例えば、AMLを有する対象における、癌幹細胞、例えば、白血病性幹細胞を標的とする、例えば、死滅させるために有用である。ある態様において、化学療法剤と、CLL-1 CAR発現細胞との組合せは、微小残存病変(MRD)を処置するために有用である。MRDとは、処置時、例えば、化学療法時にまたは処置後に、対象において残存する、少数の癌細胞を指す。MRDは、再発の大きな原因となることが多い。本発明は、癌、例えば、MRDを処置するための方法であって、化学療法剤を、例えば、ここに記載されるCLL-1 CAR発現細胞と組み合わせて投与することを含む方法を提供する。

20

【0613】

ある態様において、化学療法剤を、CAR分子、例えば、ここに記載されるCAR分子を発現する細胞の投与の前に投与する。化学療法剤の1回を超える投与が所望される化学療法レジメンにおいて、化学療法レジメンを、CAR分子、例えば、ここに記載されるCAR分子を発現する細胞の投与の前に開始または完了する。ある態様において、化学療法剤を、CAR分子を発現する細胞の投与の少なくとも1日間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、13日間、14日間、15日間、20日間、25日間または30日間前に投与する。ある態様において、化学療法レジメンを、CAR分子を発現する細胞の投与の少なくとも1日間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、13日間、14日間、15日間、20日間、25日間または30日間前に開始または完了する。ある態様において、化学療法剤は、癌細胞、例えば、腫瘍細胞におけるCLL-1の発現を、例えば、正常細胞または非癌細胞におけるCLL-1の発現と比較して増加させる化学療法剤である。CLL-1の発現は、例えば、免疫組織化学染色またはフローサイトメトリー分析により決定することができる。例えば、化学療法剤は、シタラビン(Ara-C)である。

30

【0614】

本発明の化合物と組み合わせるための、特に目的の抗癌剤は、代謝拮抗剤；カルシウム依存性ホスファターゼであるカルシニューリンもしくはp70S6キナーゼであるFK506を阻害する薬物またはp70S6キナーゼを阻害する薬物；アルキル化剤；mTOR阻害剤；イムノモジュレーター；アントラサイクリン；ピンカアルカロイド；プロテアソーム(proteasome)阻害剤；GITRアゴニスト；タンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤；CDK4キナーゼ阻害剤；BTKキナーゼ阻害剤；MKNキナーゼ阻害剤；DGKキナーゼ阻害剤；または腫瘍崩壊ウイルスを含む。

40

【0615】

例示的な代謝拮抗剤は、限定なしに述べると、葉酸アンタゴニスト(本明細書ではまた、葉酸拮抗剤とも称する)、ピリミジン類似体、プリン類似体およびアデノシンデアミナ

50

ーゼ阻害剤)：メトトレキサート(Rheumatrex(登録商標)、Trexall(登録商標))、5-フルオロウラシル(Adrucil(登録商標)、Efudex(登録商標)、Fluoroplex(登録商標))、フロクスウリジン(FUDF(登録商標))、シタラピン(Cytosar-U(登録商標)、Tarabine PFS)、6-メルカプトプリン(Puri-Nethol(登録商標))、6-チオグアニン(チオグアニン Tablet(登録商標))、フルダラビンリン酸エステル(Fludara(登録商標))、ペントスタチン(Nipent(登録商標))、ペメトレキセド(Alimta(登録商標))、ラルチトレキセド(Tomudex(登録商標))、クラドリピン(Leustatin(登録商標))、クロファラビン(Clofarex(登録商標)、Clolar(登録商標))、メルカプトプリン(Puri-Nethol(登録商標))、カペシタビン(ゼローダ(登録商標))、ネララピン(Arranon(登録商標))、アザシチジン(Vidaza(登録商標))およびゲムシタピン(Gemzar(登録商標))を含む。好ましい代謝拮抗剤は、例えば、5-フルオロウラシル(Adrucil(登録商標)、Efudex(登録商標)、Fluoroplex(登録商標))、フロクスウリジン(FUDF(登録商標))、カペシタビン(ゼローダ(登録商標))、ペメトレキセド(Alimta(登録商標))、ラルチトレキセド(Tomudex(登録商標))およびゲムシタピン(Gemzar(登録商標))を含む。

【0616】

典型的なアルキル化剤としては、これらに限定されないが、ナイトロジェンマスタード、エチレンイミン誘導体、スルホン酸アルキル、ニトロソウレアおよびトリアゼン)：ウラシルマスタード(Aminouracil Mustard(登録商標)、Chlorethaminacil(登録商標)、Demethyldopan(登録商標)、Desmethyldopan(登録商標)、Haemanthamine(登録商標)、Nordopan(登録商標)、Uracil nitrogen mustard(登録商標)、Uracillost(登録商標)、Uracilmostaza(登録商標)、Uramustin(登録商標)、Uramustine(登録商標)、chlormethine(Mustargen(登録商標))、シクロホスファミド(Cytosoxan(登録商標)、Neosar(登録商標)、Clafen(登録商標)、Endoxan(登録商標)、Procytox(登録商標)、RevimmuneTM)、イフォスファミド(Mitoxana(登録商標))、メルファラン(Alkeran(登録商標))、クロラムブシル(Leukeran(登録商標))、ピポプロマン(Amedel(登録商標)、Vercyte(登録商標))、トリエチレンメラミン(Hemel(登録商標)、Hexalen(登録商標)、Hexastat(登録商標))、トリエチレンチオホスファラミン、テモゾロマイド(Temodar(登録商標))、チオテパ(Thioplex(登録商標))、ブスルファン(Busilvex(登録商標)、Myleran(登録商標))、カルムスチン(BiCNU(登録商標))、ロムスチン(CeeNU(登録商標))、ストレプトゾシン(Zanosar(登録商標))およびダカルバジン(DTIC-Dome(登録商標))が挙げられる。追加の典型的なアルキル化剤としては、これらに限定されないが、オキサリプラチン(Elloxatin(登録商標))；テモゾロマイド(Temodar(登録商標))およびTemodal(登録商標))；ダクチノマイシン(また、アクチノマイシン-Dとしても公知、Cosmegen(登録商標))；メルファラン(また、L-PAM、L-サルコリシンおよびフェニルアラニンマスタードとしても公知、Alkeran(登録商標))；アルトレタミン(また、ヘキサメチルメラミン(HMM)としても公知、Hexalen(登録商標))；カルムスチン(BiCNU(登録商標))；ベンダムスチン(Treanda(登録商標))；ブスルファン(Busulfex(登録商標))およびMyleran(登録商標))；カルボプラチン(Paraplatin(登録商標))；ロムスチン(また、CCNUとしても公知、CeeNU(登録商標))；シスプラチン(また、CDDPとしても公知、Platinol(登録商標))およびPlatinol(登録商標)-AQ)；クロラムブシル(Leukeran(登録商標))；シクロホスファミド(Cytosoxan(登録商標))およびNeosar(登録商標))；ダカルバジン(また、DTIC、DICおよびイミダゾールカルボキサミドとしても公知、DTIC-Dome(登録商標))；アルトレタミン(また、ヘキサメチルメラミン(HMM)としても公知、Hexalen(登録

10

20

30

40

50

商標)) ; イフォスファミド(I f e x (登録商標)) ; プレドニマスチン(prednumustine) ; プロカルバジン(M a t u l a n e (登録商標)) ; メクロレタミン(また、ナイトロジェンマスタード、ムスチンおよび塩酸メクロレタミン(mechloroethamine)としても公知、M u s t a r g e n (登録商標)) ; ストレプトゾシン(Z a n o s a r (登録商標)) ; チオテパ(また、チオホスファミド(thiophosphoamide)、T E S P A および T S P A としても公知、T h i o p l e x (登録商標)) ; シクロホスファミド(E n d o x a n (登録商標)、C y t o x a n (登録商標)、N e o s a r (登録商標)、P r o c y t o x (登録商標)、R e v i m m u n e (登録商標)) ; およびベンダムスチンH C l (T r e a n d a (登録商標))が挙げられる。

【0617】

ある態様において、ここに記載されるC A R 発現細胞を、対象に、フルダラビン、シクロホスファミドおよび/またはリツキシマブと組み合わせて投与する。ある態様において、ここに記載されるC A R 発現細胞を、対象に、フルダラビン、シクロホスファミドおよびリツキシマブ(F C R)と組み合わせて投与する。ある態様において、対象は、C L L を有する。例えば、対象は、第17染色体の短腕部における欠失[例えば、白血病性細胞におけるd e l (1 7 p)]を有する。他の例において、対象は、d e l (1 7 p)を有さない。ある態様において、対象は、免疫グロブリン重鎖可変領域(I g V_H)遺伝子において変異を含む白血病性細胞を含む。他の態様において、対象は、免疫グロブリン重鎖可変領域(I g V_H)遺伝子において変異を含む白血病性細胞を含まない。ある態様において、フルダラビンを、約10~50mg/m²(例えば、約10~15、15~20、20~25、25~30、30~35、35~40、40~45または45~50mg/m²)の投与量で、例えば、静脈内投与する。ある態様において、シクロホスファミドを、約200~300mg/m²(例えば、約200~225、225~250、250~275または275~300mg/m²)の投与量で、例えば、静脈内投与する。ある態様において、リツキシマブを、約400~600mg/m²(例えば、400~450、450~500、500~550または550~600mg/m²)の投与量で、例えば、静脈内投与する。

【0618】

ある態様において、ここに記載されるC A R 発現細胞を、対象に、ベンダムスチンおよびリツキシマブと組み合わせて投与する。ある態様において、対象は、C L L を有する。例えば、対象は、第17染色体の短腕部における欠失[例えば、白血病性細胞におけるd e l (1 7 p)]を有する。他の例において、対象は、d e l (1 7 p)を有さない。ある態様において、対象は、免疫グロブリン重鎖可変領域(I g V_H)遺伝子において変異を含む白血病性細胞を含む。他の態様において、対象は、免疫グロブリン重鎖可変領域(I g V_H)遺伝子において変異を含む白血病性細胞を含まない。ある態様において、ベンダムスチンを、約70~110mg/m²(例えば、70~80、80~90、90~100または100~110mg/m²)の投与量で、例えば、静脈内投与する。ある態様において、リツキシマブを、約400~600mg/m²(例えば、400~450、450~500、500~550または550~600mg/m²)の投与量で、例えば、静脈内投与する。

【0619】

ある態様において、ここに記載されるC A R 発現細胞を、対象に、リツキシマブ、シクロホスファミド、ドキシソルピシン、ピンクリスチンおよび/またはコルチコステロイド(例えば、プレドニゾン)と組み合わせて投与する。ある態様において、ここに記載されるC A R 発現細胞を、対象に、リツキシマブ、シクロホスファミド、ドキシソルピシン、ピンクリスチンおよびプレドニゾン(R - C H O P)と組み合わせて投与する。ある態様において、対象は、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(D L B C L)を有する。ある態様において、対象は、巨大腫瘍がない限局期D L B C L(例えば、サイズ/直径が7cm未満である腫瘍を含む)を有する。ある態様において、対象を、R - C H O Pと組み合わせた放射線により処置する。例えば、対象に、R - C H O P(例えば、R - C H O Pの1~6サイクル、例えば、1、2、3、4、5または6サイクル)に続いて、放射線を投与する。場合に

10

20

30

40

50

よって、対象に、R - C H O P (例えば、R - C H O P の 1 ~ 6 サイクル、例えば、1、2、3、4、5 または 6 サイクル) に続いて、放射線を投与する。

【 0 6 2 0 】

ある態様において、ここに記載される C A R 発現細胞を、対象に、エトポシド、プレドニゾン、ビンクリスチン、シクロホスファミド、ドキシソルピシンおよび/またはリツキシマブと組み合わせて投与する。ある態様において、ここに記載される C A R 発現細胞を、対象に、エトポシド、プレドニゾン、ビンクリスチン、シクロホスファミド、ドキシソルピシンおよびリツキシマブ (E P O C H - R) と組み合わせて投与する。ある態様において、ここに記載される C A R 発現細胞を、対象に、用量を調整した E P O C H - R (D A - E P O C H - R) と組み合わせて投与する。ある態様において、対象は、B 細胞リンパ腫、例えば、M y c が再構成された侵襲性 B 細胞リンパ腫を有する。

10

【 0 6 2 1 】

ある態様において、ここに記載される C A R 発現細胞を、対象に、リツキシマブおよび/またはレナリドマイドと組み合わせて投与する。レナリドマイド ((R S) - 3 - (4 - アミノ - 1 - オキソ 1, 3 - ジヒドロ - 2 H - イソインドール - 2 - イル) ピペリジン - 2, 6 - ジオン) は、イムノモジュレーターである。ある態様において、ここに記載される C A R 発現細胞を、対象に、リツキシマブおよびレナリドマイドと組み合わせて投与する。ある態様において、対象は、濾胞性リンパ腫 (F L) またはマントル細胞リンパ腫 (M C L) を有する。ある態様において、対象は、F L を有し、かつて癌治療により処置されたことがない。ある態様において、レナリドマイドを、約 1 0 ~ 2 0 mg (例えば、1 0 ~ 1 5 または 1 5 ~ 2 0 mg) の投与量で、例えば、毎日投与する。ある態様において、リツキシマブを、約 3 5 0 ~ 5 5 0 mg / m² (例えば、3 5 0 ~ 3 7 5 mg / m²、3 7 5 ~ 4 0 0 mg / m²、4 0 0 ~ 4 2 5 mg / m²、4 2 5 ~ 4 5 0 mg / m²、4 5 0 ~ 4 7 5 mg / m² または 4 7 5 ~ 5 0 0 mg / m²) の投与量で、例えば、静脈内投与する。

20

【 0 6 2 2 】

典型的な m T O R 阻害剤としては、例えば、テムシロリムス；リダフォロリムス (公式には、デフォロリムス、(1 R, 2 R, 4 S) - 4 - [(2 R) - 2 [(1 R, 9 S, 1 2 S, 1 5 R, 1 6 E, 1 8 R, 1 9 R, 2 1 R, 2 3 S, 2 4 E, 2 6 E, 2 8 Z, 3 0 S, 3 2 S, 3 5 R) - 1, 1 8 - ジヒドロキシ - 1 9, 3 0 - ジメトキシ - 1 5, 1 7, 2 1, 2 3, 2 9, 3 5 - ヘキサメチル - 2, 3, 1 0, 1 4, 2 0 - ペンタオキソ - 1 1, 3 6 - ジオキサ - 4 - アザトリシクロ [3 0.3.1.0^{4,9}]ヘキサトリアコンタ - 1 6, 2 4, 2 6, 2 8 - テトラエン - 1 2 - イル]プロピル] - 2 - メトキシシクロヘキシルジメチルホスフィネートとして公知であり、また、A P 2 3 5 7 3 および M K 8 6 6 9 としても公知であり、P C T 公開 W O 0 3 / 0 6 4 3 8 3 で説明されている)；エベロリムス (A f i n i t o r (登録商標) または R A D 0 0 1)；ラパマイシン [A Y 2 2 9 8 9、S i r o l i m u s (登録商標)]；セマピモド (C A S 1 6 4 3 0 1 - 5 1 - 3)；テムシロリムス、(5 - {2, 4 - ビス [(3 S) - 3 - メチルモルホリン - 4 - イル]ピリド [2, 3 - d]ピリミジン - 7 - イル} - 2 - メトキシフェニル)メタノール (A Z D 8 0 5 5)；2 - アミノ - 8 - [トランス - 4 - (2 - ヒドロキシエトキシ)シクロヘキシル] - 6 - (6 - メトキシ - 3 - ピリジニル) - 4 - メチル - ピリド [2, 3 - d]ピリミジン - 7 (8 H) - オン (P F 0 4 6 9 1 5 0 2、C A S 1 0 1 3 1 0 1 - 3 6 - 4)；および N² - [1, 4 - ジオキソ - 4 - [[4 - (4 - オキソ - 8 - フェニル - 4 H - 1 - ベンゾピラン - 2 - イル)モルホリニウム - 4 - イル]メトキシ]ブチル] - L - アルギニルグリシル - L - アスパルチル L - セリン - (配列番号 3 1 3)、分子内塩 (S F 1 1 2 6、C A S 9 3 6 4 8 7 - 6 7 - 1) および X L 7 6 5 が挙げられる。

30

40

【 0 6 2 3 】

典型的なイムノモジュレーターとしては、例えば、アフツズマブ (R o c h e (登録商標) より入手可能)；ペグフィルグラスチム (N e u l a s t a (登録商標))；レナリドマイド (C C - 5 0 1 3、R e v l i m i d (登録商標))；サリドマイド (T h a l o m i d (登録商標))、アクチミド (C C 4 0 4 7)；および I R X - 2 (インターロイキン 1、インター

50

ロイキン2およびインターフェロン などのヒトサイトカインの混合物、CAS 951209-71-5、IRX Therapeuticsより入手可能)が挙げられる。

【0624】

典型的なアントラサイクリンとしては、例えば、ドキシソルピシン(Adriamycin(登録商標)およびRubeX(登録商標));ブレオマイシン(lenoxane(登録商標));ダウノルピシン(塩酸ダウノルピシン(dauorubicin hydrochloride)、ダウノマイシンおよび塩酸ルビドマイシン、Cerubidine(登録商標));ダウノルピシンリポソーム(クエン酸ダウノルピシンリポソーム、DaunoXome(登録商標));ミトキサントロン(DHAD、Novantrone(登録商標));エピルピシン(Ellence^TM);イダルピシン(Idamycin(登録商標)、Idamycin PFS(登録商標));マイトマイシンC(Mutamycin(登録商標));ゲルダナマイシン;ハービマイシン;ラビドマイシン;およびデスアセチルラビドマイシンが挙げられる。

10

【0625】

典型的なピンカアルカロイドとしては、例えば、酒石酸ピノレルピン(Navelbine(登録商標))、ピンクリスチン(Oncovin(登録商標)およびビンデシン(Eldisine(登録商標));ピンプラスチン(また、硫酸ピンプラスチン、ピンカロイコプラスチンおよびVLBとしても公知、Alkabon-AQ(登録商標)およびVelban(登録商標));およびピノレルピン(Navelbine(登録商標))が挙げられる。

【0626】

典型的なプロテオソーム阻害剤としては、ボルテゾミブ(Velcade(登録商標));カーフィルゾミブ(PX-171-007、(S)-4-メチル-N-((S)-1-((S)-4-メチル-1-((R)-2-メチルオキシラン-2-イル)-1-オキソペンタン-2-イル)アミノ)-1-オキソ-3-フェニルプロパン-2-イル)-2-((S)-2-(2-モルホリノアセトアミド)-4-フェニルブタンアミド)-ペンタンアミド);マリゾミブ(NPI-0052);クエン酸イキサゾミブ(MLN-9708);デランゾミブ(CEP-18770);およびO-メチル-N-[(2-メチル-5-チアゾリル)カルボニル]-L-セリル-O-メチル-N-[(1S)-2-[(2R)-2-メチル-2-オキシラニル]-2-オキソ-1-(フェニルメチル)エチル]-L-セリンアミド(ONX-0912)が挙げられる。

20

【0627】

ある態様において、ここに記載されるCAR発現細胞を、対象に、ブレンツキシマブと組み合わせて投与する。ブレンツキシマブとは、抗CD30抗体とモノメチルアウリスタチンEとの抗体-薬物コンジュゲートである。ある態様において、対象は、ホジキンリンパ腫(HL)、例えば、再発性HLまたは不応性HLを有する。ある態様において、対象は、CD30+ HLを含む。ある態様において、対象は、自己幹細胞移植(ASCT)を受けている。ある態様において、対象は、ASCTを経ていない。ある態様において、ブレンツキシマブを、約1~3mg/kg(例えば、約1~1.5、1.5~2、2~2.5または2.5~3mg/kg)の投与量で、例えば、静脈内において、例えば、3週間ごとに投与する。

30

【0628】

ある態様において、ここに記載されるCAR発現細胞を、対象に、ブレンツキシマブおよびダカルバジンと組み合わせるかまたはブレンツキシマブおよびベンダムスチンと組み合わせて投与する。ダカルバジンとは、化学名を5-(3,3-ジメチル-1-トリアゼニル)イミダゾール-4-カルボキサミドとするアルキル化剤である。ベンダムスチンとは、化学名を4-[5-[ビス(2-クロロエチル)アミノ]-1-メチルベンズイミダゾール-2-イル]ブタン酸とするアルキル化剤である。ある態様において、対象は、ホジキンリンパ腫(HL)を有する。ある態様において、対象は、かつて癌治療により処置されたことがない。ある態様において、対象は、少なくとも60歳であり、例えば、60歳、65歳、70歳、75歳、80歳、85歳以上の。ある態様において、ダカルバジンを、約300~450mg/m²(例えば、約300~325、325~350、350~375、375~400、400~425または425~450mg/m²)の投与量で、例えば、

40

50

静脈内投与する。ある態様において、ペンダムスチンを、約75～125mg/m²(例えば、75～100または100～125mg/m²の投与量で、例えば、約90mg/m²)、例えば、静脈内投与する。ある態様において、ブレンツキシマブを、約1～3mg/kg(例えば、約1～1.5、1.5～2、2～2.5または2.5～3mg/kg)の投与量で、例えば、静脈内において、例えば、3週間ごとに投与する。

【0629】

ある態様において、ここに記載されるCAR発現細胞を、対象に、CD20阻害剤、例えば、抗CD20抗体(例えば、抗CD20単一特異性抗体または抗CD20二特異性抗体)またはそのフラグメントと組み合わせて投与する。例示的な抗CD20抗体は、リツキシマブ、オファツムマブ、オクレリズマブ、ベルツズマブ、オビヌツズマブ、TRU-015(Trubion Pharmaceuticals)、オカラツズマブおよびPro131921(Genentech)を含むが、これらに限定されない。例えば、Lim et al. Haematologica. 95.1(2010):135-43を参照されたい。

10

【0630】

ある態様において、抗CD20抗体は、リツキシマブを含む。リツキシマブとは、例えば、www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/103705s5311bl.pdfにおいて説明されている通りに、CD20に結合し、CD20を発現する細胞の細胞溶解を引き起こす、マウス/ヒトキメラモノクローナル抗体IgG1カッパ鎖である。ある態様において、ここに記載されるCAR発現細胞を、対象に、リツキシマブと組み合わせて投与する。ある態様において、対象は、CLLまたはSLLを有する。

20

【0631】

ある態様において、リツキシマブを、静脈内投与する、例えば、静脈内注入として投与する。例えば、各回の注入は、約500～2000mg(例えばmg、約500～550mg、550～600mg、600～650mg、650～700mg、700～750mg、750～800mg、800～850mg、850～900mg、900～950mg、950～1000mg、1000～1100mg、1100～1200mg、1200～1300mg、1300～1400mg、1400～1500mg、1500～1600mg、1600～1700mg、1700～1800mg、1800～1900mgまたは1900～2000mg)のリツキシマブを施す。ある態様において、リツキシマブを、150mg/m²～750mg/m²、例えば、約150～175mg/m²、175～200mg/m²、200～225mg/m²、225～250mg/m²、250～300mg/m²、300～325mg/m²、325～350mg/m²、350～375mg/m²、375～400mg/m²、400～425mg/m²、425～450mg/m²、450～475mg/m²、475～500mg/m²、500～525mg/m²、525～550mg/m²、550～575mg/m²、575～600mg/m²、600～625mg/m²、625～650mg/m²、650～675mg/m²または675～700mg/m²(表記中、m²は、対象の体表面積を指し示す)の用量で投与する。ある態様において、リツキシマブを、少なくとも4日間、例えば、4、7、14、21、28、35日間以上の投与間隔で投与する。例えば、リツキシマブを、少なくとも0.5週間、例えば、0.5、1、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間以上の投与間隔で投与する。ある態様において、リツキシマブを、ここに記載される用量および投与間隔で、ある期間、例えば、少なくとも2週間、例えば、少なくとも、2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、11週間、12週間、13週間、14週間、15週間、16週間、17週間、18週間、19週間、20週間以上の期間にわたり投与する。例えば、リツキシマブを、ここに記載される用量および投与間隔で、処置サイクル1あたり、のべ少なくとも4回の投与(例えば、処置サイクル1あたり、少なくとも4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16以上の投与)にわたり投与する。

30

40

【0632】

ある態様において、抗CD20抗体は、オファツムマブを含む。オファツムマブとは、分子量を約149kDaとする、抗CD20 IgG1 ヒトモノクローナル抗体である

50

。例えば、オフアツムマブは、トランスジェニックマウスおよびハイブリドーマ技術を使用して生成し、組換えマウス細胞株(N S 0)から発現し、精製する。例えば、www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/1253261bl.pdf ; ならびに臨床試験識別番号 N C T 0 1 3 6 3 1 2 8、N C T 0 1 5 1 5 1 7 6、N C T 0 1 6 2 6 3 5 2 および N C T 0 1 3 9 7 5 9 1 を参照されたい。ある態様において、ここに記載される C A R 発現細胞を、対象に、オフアツムマブと組み合わせて投与する。ある態様において、対象は、C L L または S L L を有する。

【 0 6 3 3 】

ある態様において、オフアツムマブを、静脈内注入として投与する。例えば、各回の注入は、約 1 5 0 ~ 3 0 0 0 mg(例えば、約 1 5 0 ~ 2 0 0 mg、2 0 0 ~ 2 5 0 mg、2 5 0 ~ 3 0 0 mg、3 0 0 ~ 3 5 0 mg、3 5 0 ~ 4 0 0 mg、4 0 0 ~ 4 5 0 mg、4 5 0 ~ 5 0 0 mg、5 0 0 ~ 5 5 0 mg、5 5 0 ~ 6 0 0 mg、6 0 0 ~ 6 5 0 mg、6 5 0 ~ 7 0 0 mg、7 0 0 ~ 7 5 0 mg、7 5 0 ~ 8 0 0 mg、8 0 0 ~ 8 5 0 mg、8 5 0 ~ 9 0 0 mg、9 0 0 ~ 9 5 0 mg、9 5 0 ~ 1 0 0 0 mg、1 0 0 0 ~ 1 2 0 0 mg、1 2 0 0 ~ 1 4 0 0 mg、1 4 0 0 ~ 1 6 0 0 mg、1 6 0 0 ~ 1 8 0 0 mg、1 8 0 0 ~ 2 0 0 0 mg、2 0 0 0 ~ 2 2 0 0 mg、2 2 0 0 ~ 2 4 0 0 mg、2 4 0 0 ~ 2 6 0 0 mg、2 6 0 0 ~ 2 8 0 0 mg または 2 8 0 0 ~ 3 0 0 0 mg) のオフアツムマブを施す。ある態様において、オフアツムマブを、約 3 0 0 mg の出発投与量に続いて、2 0 0 0 mg で、例えば、約 1 1 回の投与、例えば、2 4 週間にわたり投与する。ある態様において、オフアツムマブを、少なくとも 4 日間、例えば、4 日間、7 日間、1 4 日間、2 1 日間、2 8 日間、3 5 日間以上の投与間隔で投与する。例えば、オフアツムマブを、少なくとも 1 週間、例えば週間、1 週間、2 週間、3 週間、4 週間、5 週間、6 週間、7 週間、8 週間、9 週間、1 0 週間、1 1 週間、1 2 週間、2 4 週間、2 6 週間、2 8 週間、2 0 週間、2 2 週間、2 4 週間、2 6 週間、2 8 週間、3 0 週間以上の投与間隔で投与する。ある態様において、オフアツムマブを、ここに記載される用量および投与間隔で、ある期間、例えば、少なくとも 1 週間、例えば、1 週間、2 週間、3 週間、4 週間、5 週間、6 週間、7 週間、8 週間、9 週間、1 0 週間、1 1 週間、1 2 週間、1 3 週間、1 4 週間、1 5 週間、1 6 週間、1 7 週間、1 8 週間、1 9 週間、2 0 週間、2 2 週間、2 4 週間、2 6 週間、2 8 週間、3 0 週間、4 0 週間、5 0 週間、6 0 週間以上または 1 カ月間、2 カ月間、3 カ月間、4 カ月間、5 カ月間、6 カ月間、7 カ月間、8 カ月間、9 カ月間、1 0 カ月間、1 1 カ月間、1 2 カ月間以上または 1 年間、2 年間、3 年間、4 年間、5 年間以上にわたり投与する。例えば、オフアツムマブを、ここに記載される用量および投与間隔で、処置サイクル 1 あたり、のべ少なくとも 2 回の投与(例えば、処置サイクル 1 あたり、少なくとも、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 8、2 0 以上の投与) にわたり投与する。

【 0 6 3 4 】

場合によって、抗 C D 2 0 抗体は、オクレリズマブを含む。オクレリズマブとは、例えば、臨床試験識別番号 N C T 0 0 0 7 7 8 7 0、N C T 0 1 4 1 2 3 3 3、N C T 0 0 7 7 9 2 2 0、N C T 0 0 6 7 3 9 2 0、N C T 0 1 1 9 4 5 7 0 および Kappos et al. Lancet. 19.378(2011):1779-87において説明されている、ヒト化抗 C D 2 0 モノクローナル抗体である。

【 0 6 3 5 】

場合によって、抗 C D 2 0 抗体は、ベルツズマブを含む。ベルツズマブとは、C D 2 0 に対するヒト化モノクローナル抗体である。例えば、臨床試験識別番号 N C T 0 0 5 4 7 0 6 6、N C T 0 0 5 4 6 7 9 3、N C T 0 1 1 0 1 5 8 1 および Goldenberg et al. Leuk Lymphoma. 51(5) (2010):747-55を参照されたい。

【 0 6 3 6 】

場合によって、抗 C D 2 0 抗体は、G A 1 0 1 を含む。G A 1 0 1 (オビヌツズマブまたは R O 5 0 7 2 7 5 9 とともにまた呼ばれる)とは、ヒト化され、糖鎖加工された、抗 C D 2 0 モノクローナル抗体である。例えば、Robak. Curr. Opin. Investig. Drugs. 10.6(2009):588-96 ; 臨床試験識別番号 N C T 0 1 9 9 5 6 6 9、N C T 0 1 8 8 9 7 9 7、N

10

20

30

40

50

C T 0 2 2 2 9 4 2 2 および N C T 0 1 4 1 4 2 0 5 ; ならびに www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/125486s000lbl.pdf を参照されたい。

【 0 6 3 7 】

場合によって、抗 C D 2 0 抗体は、A M E - 1 3 3 v を含む。A M E - 1 3 3 v (L Y 2 4 6 9 2 9 8 またはオカラツズマブともまた呼ばれる) は、C D 2 0 に対するヒト化 I g G 1 モノクローナル抗体であって、リツキシマブと比較して、F c R I I I a 受容体に対するアフィニティーを増加させ、抗体依存性細胞介在性細胞毒性 (A D C C) 活性を増強した、ヒト化 I g G 1 モノクローナル抗体である。例えば、Robak et al. BioDrugs 25.1(2011):13-25 ; および Forero-Torres et al. Clin Cancer Res. 18.5(2012):1395-403 を参照されたい。

10

【 0 6 3 8 】

場合によって、抗 C D 2 0 抗体は、P R O 1 3 1 9 2 1 を含む。P R O 1 3 1 9 2 1 とは、リツキシマブと比較して、F c R I I I a への結合が良好となり、A D C C が増強されるように加工された、ヒト化抗 C D 2 0 モノクローナル抗体である。例えば、Robak et al. BioDrugs 25.1(2011):13-25 ; および Casulo et al. Clin Immunol. 154.1(2014):37-46 ; ならびに臨床試験識別番号 N C T 0 0 4 5 2 1 2 7 を参照されたい。

【 0 6 3 9 】

場合によって、抗 C D 2 0 抗体は、T R U - 0 1 5 を含む。T R U - 0 1 5 とは、C D 2 0 に対する抗体のドメインに由来する、抗 C D 2 0 融合タンパク質である。T R U - 0 1 5 は、モノクローナル抗体より小型であるが、F c に媒介されるエフェクター機能を保持する。例えば、Robak et al. BioDrugs 25.1(2011):13-25 を参照されたい。T R U - 0 1 5 は、ヒト I g G 1 のヒンジドメイン、C H 2 ドメインおよび C H 3 ドメインに連結されているが、C H 1 ドメインおよび C L ドメインを欠く、抗 C D 2 0 単鎖可変性フラグメント (s c F v) を含有する。

20

【 0 6 4 0 】

ある態様において、ここに記載される抗 C D 2 0 抗体を、ここに記載される治療剤、例えば、化学療法剤 (例えば、サイトキサン、フルダラビン、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、脱メチル化剤、ペプチドワクチン、抗腫瘍抗生剤、チロシンキナーゼ阻害剤、アルキル化剤、抗微小管剤または抗有糸分裂薬剤)、抗アレルギー剤、吐き気止め (または制吐剤)、鎮痛剤または細胞保護剤にコンジュゲートさせるかまたは他の形で結合させる。

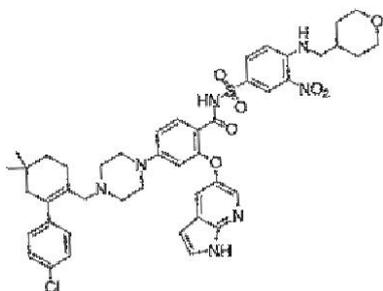
30

【 0 6 4 1 】

ある態様において、ここに記載される C A R 発現細胞を、対象に、B 細胞リンパ腫 2 (B C L - 2) 阻害剤 (例えば、A B T - 1 9 9 または G D C - 0 1 9 9 とともに呼ばれるベネトクラクス) および / またはリツキシマブと組み合わせて投与する。ある態様において、ここに記載される C A R 発現細胞を、対象に、ベネトクラクスおよびリツキシマブと組み合わせて投与する。ベネトクラクスとは、抗アポトーシスタンパク質である B C L - 2 を阻害する低分子である。ベネトクラクス { 4 - (4 - { [2 - (4 - クロロフェニル) - 4 , 4 - ジメチルシクロヘキス - 1 - エン - 1 - イル] メチル } ピペラジン - 1 - イル) - N - ({ 3 - ニトロ - 4 - [(テトラヒドロ - 2 H - ピラン - 4 - イルメチル) アミノ] フェニル } スルホニル) - 2 - (1 H - ピロロ [2 , 3 - b] ピリジン - 5 - イルオキシ) ベンズアミド } の構造を、下記に示す。

40

【 化 1 】



50

【0642】

ある態様において、対象は、CLLを有する。ある態様において、対象は、再発性CLL、例えば、対象は、かつて、癌治療を投与されたことがある。ある態様において、ベネトクラクスを、約15～600mg(例えば、15～20mg、20～50mg、50～75mg、75～100mg、100～200mg、200～300mg、300～400mg、400～500mgまたは500～600mg)の投与量で、例えば、毎日投与する。ある態様において、リツキシマブを、約350～550mg/m²(例えば、350～375mg/m²、375～400mg/m²、400～425mg/m²、425～450mg/m²、450～475mg/m²または475～500mg/m²)の投与量で、例えば、静脈内において、例えば、毎月投与する。

10

【0643】

ある態様において、ここに記載されるCAR発現細胞を、腫瘍崩壊ウイルスと組み合わせて投与する。ある態様において、腫瘍崩壊ウイルスは、癌細胞において選択的に複製され、癌細胞の死を惹起するかまたはその増殖を遅らせることが可能である。場合によって、腫瘍崩壊ウイルスは、非癌細胞に対して影響を及ぼさないかまたはその影響が最小限である。腫瘍崩壊ウイルスは、腫瘍崩壊アデノウイルス、腫瘍崩壊単純ヘルペスウイルス、腫瘍崩壊レトロウイルス、腫瘍崩壊パルボウイルス、腫瘍崩壊ワクシニアウイルス、腫瘍崩壊シンドビスウイルス、腫瘍崩壊インフルエンザウイルスまたは腫瘍崩壊RNAウイルス[例えば、腫瘍崩壊レオウイルス、腫瘍崩壊ニューカッスル病ウイルス(NDV)、腫瘍崩壊麻疹ウイルスまたは腫瘍崩壊水泡性口内炎ウイルス(VSV)]を含むが、これらに限定されない。

20

【0644】

ある態様において、腫瘍崩壊ウイルスとは、ウイルス、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、US2010/0178684A1において説明されている、組換え腫瘍崩壊ウイルスである。ある態様において、組換え腫瘍崩壊ウイルスは、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、US2010/0178684A1において説明されている、免疫応答または炎症応答の阻害剤をコードする核酸配列(例えば、異種核酸配列)を含む。ある態様において、組換え腫瘍崩壊ウイルス、例えば、腫瘍崩壊NDVは、アポトーシス促進性タンパク質(例えば、アポブチン)、サイトカイン(例えば、GM-CSF、インターフェロンガンマ、インターロイキン2(IL-2)、腫瘍壊死因子アルファ)、免疫グロブリン(例えば、ED-Bフィブロネクチンに対する抗体)、腫瘍関連抗原、二特異性アダプタータンパク質(例えば、NDV HNタンパク質およびCD3またはCD28などのT細胞共刺激受容体に対して方向付けられた、二特異性抗体または二特異性抗体フラグメント；またはヒトIL-2と、NDV HNタンパク質に対して方向付けられた単鎖抗体との融合タンパク質)を含む。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、Zamarin et al. Future Microbiol. 7.3(2012):347-67を参照されたい。ある態様において、腫瘍崩壊ウイルスとは、それらの各々が参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、US8591881B2、US2012/0122185A1またはUS2014/0271677A1において説明されている、キメラ腫瘍崩壊NDVである。

30

40

【0645】

ある態様において、腫瘍崩壊ウイルスは、癌細胞においてもっぱら複製されるように設計された、条件づけ複製型アデノウイルス(CRAD)を含む。例えば、Alemany et al. Nature Biotechnol. 18(2000):723-27を参照されたい。ある態様において、腫瘍崩壊アデノウイルスは、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、Alemany et al.の725頁の表1において説明されている、腫瘍崩壊アデノウイルスを含む。

【0646】

例示的な腫瘍崩壊ウイルスは、以下：

群B腫瘍崩壊アデノウイルス(Co1oAd1)(PsiOxus Therapeutics Ltd.)(例えば、臨床試験識別子：NCT02053220を参照されたい)；

50

顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)を含むアデノウイルスである、ONCOS-102(旧称:CGTG-102)(Oncos Therapeutics)(例えば、臨床試験識別子:NCT01598129を参照されたい);

ヒトPH20ヒアルロニダーゼをコードする、遺伝子改変された腫瘍崩壊ヒトアデノウイルスである、VCN-01(VCN Biosciences, S.L.)(例えば、臨床試験識別子:NCT02045602およびNCT02045589を参照されたい);

網膜芽細胞腫/E2F経路が調節異常である癌細胞(Institut Catala d'Oncologia)において選択的に複製されるように改変された、野生型ヒトアデノウイルス血清型5(Had5)に由来するウイルスである、条件づけ複製型アデノウイルスであるICOVIR-5(例えば、臨床試験識別子:NCT01864759を参照されたい);

腫瘍崩壊アデノウイルスである、ICOVIR5を感染させた骨髄由来の自己間葉系幹細胞(MSC)(Hospital Infantil Universitario Nino Jesus, Madrid, Spain/Ramon Alamanry)を含む、Celyvir(例えば、臨床試験識別子:NCT01844661を参照されたい);

ヒトE2F-1プロモーターが、不可欠のE1ウイルス遺伝子の発現を駆動し、これにより、ウイルスの複製および細胞毒性を、Rb経路欠損腫瘍細胞に制限する、条件づけ複製型腫瘍崩壊血清型5アデノウイルス(Ad5)である、CG0070(Cold Genesys, Inc.)(例えば、臨床試験識別子:NCT02143804を参照されたい); または

網膜芽細胞腫(Rb)経路欠損細胞において選択的に複製され、インテグリンに結合するある特定のRGDを発現する細胞により効率的に感染するように加工されたアデノウイルスである、DNX-2401(旧称:Delta-24-RGD)(Clinica Universidad de Navarra, Universidad de Navarra/DNatrix, Inc.)(例えば、臨床試験識別子:NCT01956734を参照されたい)を含むが、これらに限定されない。

【0647】

ある態様において、ここに記載される腫瘍崩壊ウイルスを、注射、例えば、皮下注射、動脈内注射、静脈内注射、筋内注射、髄腔内注射または腹腔内注射により投与する。ある態様において、ここに記載される腫瘍崩壊ウイルスを、腫瘍内投与、皮内投与、経粘膜投与、経口投与、鼻腔内投与するかまたは肺内投与を介して投与する。

【0648】

ある態様において、ここに記載されるCARを発現する細胞を、対象に、T_{REG}細胞集団を減少させる分子と組み合わせて投与する。T_{REG}細胞の数を減少させる(例えば、枯渇させる)方法は、当業界公知であり、例えば、CD25の枯渇、シクロホスファミドの投与、GITR機能をモジュレートすることを含む。理論に縛られるつもりはないが、アフエーシスの前またはここに記載されるCAR発現細胞の投与の前に、対象におけるT_{REG}細胞の数を低減することは、腫瘍微小環境における望ましくない免疫細胞(例えば、T_{REG})の数を低減し、対象の再発の危険性を低減すると考えられる。

【0649】

ある態様において、ここに記載されるCAR発現細胞を、対象に、GITRアゴニストおよび/または調節性T細胞(T_{REG})を枯渇させるGITR抗体など、GITRを標的とする分子および/またはGITR機能をモジュレートする分子と組み合わせて投与する。ある態様において、ここに記載されるCARを発現する細胞を、対象に、シクロホスファミドと組み合わせて投与する。ある態様において、GITR結合分子および/またはGITR機能をモジュレートする分子(例えば、GITRアゴニストおよび/またはT_{REG}を枯渇させるGITR抗体)を、CAR発現細胞の投与の前に投与する。例えば、ある態様において、GITRアゴニストは、細胞のアフエーシスの前に投与することができる。ある態様において、シクロホスファミドを、対象に、CAR発現細胞の投与(例えば、注入または再注入)の前または細胞のアフエーシスの前に投与する。ある態様において、シクロホスファミドおよび抗GITR抗体を、対象に、CAR発現細胞の投与(例えば、注入または再注入)の前または細胞のアフエーシスの前に投与する。ある態様にお

10

20

30

40

50

いて、対象は、癌(例えば、固形癌または、ALL、もしくはCLLなどの血液癌)を有する。ある態様において、対象は、CLLを有する。ある態様において、対象は、ALLを有する。ある態様において、対象は、固形癌、例えば、ここに記載される固形癌を有する。典型的なGITRアゴニストとしては、例えば、GITR融合タンパク質および抗GITR抗体(例えば、2価抗GITR抗体)、例えば、米国特許第6,111,090号、欧州特許第090505号B1、米国特許第8,586,023号、PCT公開WO2010/003118および2011/090754で説明されているGITR融合タンパク質または例えば米国特許第7,025,962号、欧州特許第1947183号B1、米国特許第7,812,135号、米国特許第8,388,967号、米国特許第8,591,886号、欧州特許EP1866339号、PCT公開WO2011/028683、PCT公開WO2013/039954、PCT公開WO2005/007190、PCT公開WO2007/133822、PCT公開WO2005/055808、PCT公開WO99/40196、PCT公開WO2001/03720、PCT公開WO99/20758、PCT公開WO2006/083289、PCT公開WO2005/115451、米国特許第7,618,632号およびPCT公開WO2011/051726で説明されている抗GITR抗体が挙げられる。

10

【0650】

ある態様において、ここに記載されるCARを発現する細胞は、mTOR阻害剤、例えばここに記載されるmTOR阻害剤、例えばエベロリムスなどのラパログと組み合わせて対象に投与される。ある態様において、mTOR阻害剤は、CAR発現細胞の前に投与される。例えば、ある態様において、mTOR阻害剤は、細胞のアフェレーシスの前に投与されてもよい。

20

【0651】

ある態様において、ここに記載されるCARを発現する細胞は、GITRアゴニスト、例えばここに記載されるGITRアゴニストと組み合わせて対象に投与される。ある態様において、GITRアゴニストは、CAR発現細胞の前に投与される。例えば、ある態様において、GITRアゴニストは、細胞のアフェレーシスの前に投与されてもよい。

【0652】

ある態様において、ここに記載されるCAR発現細胞を、対象に、タンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤、例えば、ここに記載される、タンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤と組み合わせて投与する。ある態様において、タンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤は、SHP-1阻害剤、例えば、スチボグルコン酸ナトリウムなど、例えば、ここに記載されるSHP-1阻害剤である。ある態様において、タンパク質チロシンホスファターゼ阻害剤は、SHP-2阻害剤、例えば、ここに記載されるSHP-2阻害剤である。

30

【0653】

ある態様において、ここに記載されるCAR発現細胞は、キナーゼ阻害剤と組み合わせて使用することができる。ある態様において、キナーゼ阻害剤は、CDK4阻害剤、例えば、ここに記載されるCDK4阻害剤、例えば、6-アセチル-8-シクロペンチル-5-メチル-2-(5-ピペラジン-1-イル-ピリジン-2-イルアミノ)-8H-ピリド[2,3-d]ピリミジン-7-オン塩酸塩(パルボシクリブまたはPD0332991ともまた称する)などの、例えば、CDK4/6阻害剤である。ある態様において、キナーゼ阻害剤は、BTK阻害剤、例えば、イブルチニブなど、例えば、ここに記載されるBTK阻害剤である。ある態様において、キナーゼ阻害剤は、mTOR阻害剤、例えば、ラパマイシン、ラパマイシン類似体である、OSI-027など、例えば、ここに記載されるmTOR阻害剤である。mTOR阻害剤は、例えば、mTORC1阻害剤および/またはmTORC2阻害剤、例えば、mTORC1阻害剤および/またはここに記載されるmTORC2阻害剤であり得る。ある態様において、キナーゼ阻害剤は、MNK阻害剤、例えば、4-アミノ-5-(4-フルオロアニリノ)-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジンなど、例えば、ここに記載されるMNK阻害剤である。MNK阻害剤は、例えば、MNK1a阻害

40

50

剤、MNK 1 b 阻害剤、MNK 2 a 阻害剤および/またはMNK 2 b 阻害剤であり得る。ある態様において、キナーゼ阻害剤は、例えば、PF - 0 4 6 9 5 1 0 2 など、ここに記載されるPI 3 K / m T O R 二重阻害剤である。ある態様において、キナーゼ阻害剤は、DGK 阻害剤、例えば、DGK i n h 1 (D 5 9 1 9) または DGK i n h 2 (D 5 7 9 4) など、例えば、ここに記載されるDGK 阻害剤である。ある態様において、キナーゼ阻害剤は、アロイシン A ; 2 - (2 - クロロフェニル) - 5, 7 - ジヒドロキシ - 8 - [(3 S, 4 R) - 3 - ヒドロキシ - 1 - メチル - 4 - ピペリジニル] - 4 - クロメノンである、フラボピリドールまたは HMR - 1 2 7 5 ; クリゾチニブ (PF - 0 2 3 4 1 0 6 6 ; 2 - (2 - クロロフェニル) - 5, 7 - ジヒドロキシ - 8 - [(2 R, 3 S) - 2 - (ヒドロキシメチル) - 1 - メチル - 3 - ピロリジニル] - 4 H - 1 - ベンゾピラン - 4 - オン塩酸塩 (P 2 7 6 - 0 0) ; 1 - メチル - 5 - [[2 - [5 - (トリフルオロメチル) - 1 H - イミダゾール - 2 - イル] - 4 - ピリジニル]オキシ] - N - [4 - (トリフルオロメチル)フェニル] - 1 H - ベンズイミダゾール - 2 - アミン (RAF 2 6 5) ; インジスラム (E 7 0 7 0) ; ロスコピチン (CYC 2 0 2) ; パルボシクリブ (PD 0 3 3 2 9 9 1) ; ジナシクリブ (SCH 7 2 7 9 6 5) ; N - [5 - [(5 - tert - ブチルオキサゾール - 2 - イル)メチル]チオ]チアゾール - 2 - イル]ピペリジン - 4 - カルボキサミド (BMS 3 8 7 0 3 2) ; 4 - [[9 - クロロ - 7 - (2, 6 - ジフルオロフェニル) - 5 H - ピリミド[5, 4 - d][2]ベンズアゼピン - 2 - イル]アミノ] - 安息香酸 (MLN 8 0 5 4) ; 5 - [3 - (4, 6 - ジフルオロ - 1 H - ベンズイミダゾール - 2 - イル) - 1 H - インダゾール - 5 - イル] - N - エチル - 4 - メチル - 3 - ピリジンメタンアミン (AG - 0 2 4 3 2 2) ; 4 - (2, 6 - ジクロロベンゾイルアミノ) - 1 H - ピラゾール - 3 - カルボン酸 N - (ピペリジン - 4 - イル)アミド (AT 7 5 1 9) ; 4 - [2 - メチル - 1 - (1 - メチルエチル) - 1 H - イミダゾール - 5 - イル] - N - [4 - (メチルスルホニル)フェニル] - 2 - ピリミジンアミン (AZD 5 4 3 8) ; および XL 2 8 1 (BMS 9 0 8 6 6 2) から選択される CDK 4 阻害剤である。

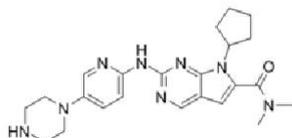
【0654】

ある態様において、キナーゼ阻害剤は、CDK 4 阻害剤、例えば、パルボシクリブ (PD 0 3 3 2 9 9 1) であり、パルボシクリブを、約 5 0 mg、6 0 mg、7 0 mg、7 5 mg、8 0 mg、9 0 mg、1 0 0 mg、1 0 5 mg、1 1 0 mg、1 1 5 mg、1 2 0 mg、1 2 5 mg、1 3 0 mg、1 3 5 mg (例えば、7 5 mg、1 0 0 mg または 1 2 5 mg) の用量で、ある期間にわたり毎日、例えば、2 8 日間のサイクルの 1 4 ~ 2 1 日間にわたり毎日または 2 1 日間のサイクルの 7 ~ 1 2 日間にわたり毎日投与する。ある態様において、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 以上のサイクルのパルボシクリブを投与する。

【0655】

ある態様において、ここに記載される CAR 発現細胞を、対象に、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) 4 阻害剤または CDK 6 阻害剤、例えば、ここに記載される CDK 4 阻害剤または CDK 6 阻害剤と組み合わせて投与する。ある態様において、ここに記載される CAR 発現細胞を、対象に、CDK 4 / 6 阻害剤 (例えば、CDK 4 および CDK 6 の両方を標的とする阻害剤)、例えば、ここに記載される CDK 4 / 6 阻害剤と組み合わせて投与する。ある態様において、対象は、MCL を有する。MCL とは、現行で利用可能な治療に対する応答性が不良である、すなわち、本質的に治癒不可能である、侵襲性の癌である。MCL の多くの症例において、サイクリン D 1 (CDK 4 / 6 の調節因子) は、MCL 細胞において (例えば、免疫グロブリンおよび Cyclin D 1 遺伝子を伴う染色体転座に起因して) 発現される。したがって、理論に縛られずに述べると、MCL 細胞は、CDK 4 / 6 の阻害に対して、高度な特異性で、高度に感受性である (すなわち、正常な免疫細胞に対する影響は最小限である) と考えられる。CDK 4 / 6 阻害剤は、単独でも、MCL の処置において、ある程度の効果をもたらしたが、部分寛解を達成したのにとどまり、再発率は高かった。例示的な CDK 4 / 6 阻害剤は、LEE 0 1 1 (リボシクリブともまた呼ばれる) であり、その構造を下記に示す。

【化2】



【0656】

理論に縛られずに述べると、ここに記載されるCAR発現細胞の、CDK4/6阻害剤(例えば、LEE011または他のここに記載されるCDK4/6阻害剤)を伴う投与は、例えば、CDK4/6阻害剤単独と比較して、例えば、高い寛解率および/または低い再発率を伴う、高い応答性を達成し得ると考えられる。

10

【0657】

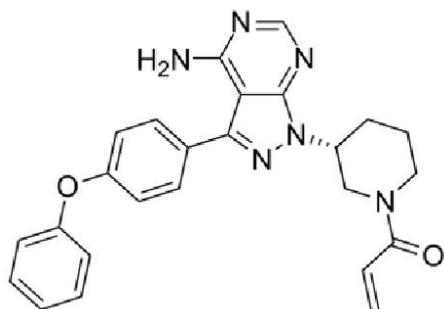
ある態様において、キナーゼ阻害剤は、イブルチニブ(PCI-32765); GDC-0834; RN-486; CGI-560; CGI-1764; HM-71224; CC-292; ONO-4059; CNX-774; およびLFM-A13から選択されるBTK阻害剤である。好ましい態様において、BTK阻害剤は、インターロイキン2誘導性キナーゼ(ITK)のキナーゼ活性を低減または阻害せず、GDC-0834; RN-486; CGI-560; CGI-1764; HM-71224; CC-292; ONO-4059; CNX-774; およびLFM-A13から選択される。

【0658】

ある態様において、キナーゼ阻害剤は、BTK阻害剤、例えば、イブルチニブ(PCI-32765)である。ある態様において、ここに記載されるCAR発現細胞を、対象に、BTK阻害剤(例えば、イブルチニブ)と組み合わせて投与する。ある態様において、ここに記載されるCAR発現細胞を、対象に、イブルチニブ(PCI-32765ともまた呼ばれる)と組み合わせて投与する。イブルチニブ{1-[(3R)-3-[4-アミノ-3-(4-フェノキシフェニル)-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-1-イル]プロパン-2-イル]ピペリジン}の構造を、下記に示す。

20

【化3】



30

【0659】

ある態様において、対象は、CLL、マンテル細胞リンパ腫(MCL)または小リンパ球性リンパ腫(SLL)を有する。例えば、対象は、第17染色体の短腕部における欠失(例えば、白血病性細胞におけるdel(17p))を有する。他の例において、対象は、del(17p)を有さない。ある態様において、対象は、再発性CLLまたはSLLを有し、例えば、対象は、かつて、癌治療を投与されたことがある(例えば、かつて、1、2、3または4既往の癌治療を投与されたことがある)。ある態様において、対象は、不応性CLLまたはSLLを有する。他の態様において、対象は、濾胞性リンパ腫、例えば、再発性リンパ腫または不応性濾胞性リンパ腫を有する。ある態様において、イブルチニブを、約300~600mg/日(例えば、約300~350mg/日)、350~400mg/日)、400~450mg/日)、450~500mg/日)、500~550mg/日)または550~600mg/日、例えば、約420mg/日または約560mg/日)の投与量で、例えば、経口投与する。ある態様において、イブルチニブを、約250mg、300mg、350mg、

40

50

400 mg、420 mg、440 mg、460 mg、480 mg、500 mg、520 mg、540 mg、560 mg、580 mg、600 mg(例えば、250 mg、420 mgまたは560 mg)の用量で、ある期間にわたり毎日、例えば、21日間のサイクルにわたり毎日または28日間のサイクルにわたり毎日投与する。ある態様において、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12以上のサイクルのイブルチニブを投与する。ある態様において、イブルチニブを、リツキシマブと組み合わせて投与する。例えば、Burger et al. (2013) Ibrutinib In Combination With Rituximab (iR) Is Well Tolerated and Induces a High Rate Of Durable Remissions In Patients With High-Risk Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): New, Updated Results Of a Phase II Trial In 40 Patients, Abstract 675 presented at 55th ASH Annual Meeting and Exposition, New Orleans, LA 7-10 Decを参照されたい。理論に縛られずに述べると、イブルチニブの添加は、T細胞増殖性応答を増強し、T細胞を、ヘルパーT2(Th2)表現型から、ヘルパーT1(Th1)表現型にシフトさせると考えられる。Th1およびTh2は、ヘルパーT細胞の表現型であり、Th1は、Th2と対比して、異なる免疫応答経路を方向付ける。Th1表現型は、例えば、細胞内病原体/ウイルスまたは癌性細胞などの細胞を死滅させるための炎症促進性応答または永続的な自己免疫応答に関連する。Th2表現型は、好酸球の蓄積および抗炎症性応答に関連する。

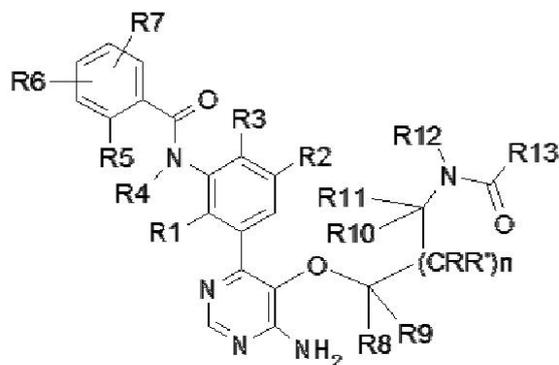
10

【0660】

本明細書の方法、使用および組成物のある態様において、BTK阻害剤は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、国際出願第WO/2015/079417号において説明されている、BTK阻害剤である。例えば、ある態様において、BTK阻害剤は、式(I)の化合物または薬学的に許容されるその塩である。

20

【化4】



30

[式中、

R1は、水素、ヒドロキシにより適宜置換される、C₁~C₆アルキルであり、

R2は、水素もしくはハロゲンであり、

R3は、水素もしくはハロゲンであり、

R4は、水素であり、

R5は、水素もしくはハロゲンであるか、

またはR4およびR5は、互いと接合し、結合、-CH₂-、-CH₂-CH₂-、-CH=CH-、-CH=CH-CH₂-；-CH₂-CH=CH-；もしくは-CH₂-CH₂-CH₂-を表し、

40

R6およびR7は、互いと独立に、H、ヒドロキシルにより適宜置換される、C₁~C₆アルキル、ハロゲンもしくはヒドロキシにより適宜置換される、C₃~C₆シクロアルキルまたはハロゲンを表し、

R8、R9、R、R'、R10およびR11は、互いと独立に、H、もしくはC₁~C₆アルコキシにより適宜置換される、C₁~C₆アルキルを表すか；またはR8、R9、R、R'、R10およびR11の任意の2つは、それらが結合する炭素原子と併せて、3~6員の飽和炭素環を形成することが可能であり、

R12は、水素またはハロゲンもしくはC₁~C₆アルコキシにより適宜置換される、

50

C₁ ~ C₆ アルキルであり、

または R 1 2 および R 8、R 9、R、R'、R 1 0 または R 1 1 の任意の 1 つは、それらが結合する原子と併せて、4、5、6 または 7 員のアザシクロ環を形成することが可能であり、この環は、ハロゲン、シアノ、ヒドロキシル、C₁ ~ C₆ アルキルまたは C₁ ~ C₆ アルコキシにより適宜置換され、

n は、0 または 1 であり、

R 1 3 は、C₁ ~ C₆ アルキル、C₁ ~ C₆ アルコキシ、もしくは N,N-ジ-C₁ ~ C₆ アルキルアミノにより適宜置換される、C₂ ~ C₆ アルケニル；C₁ ~ C₆ アルキルもしくは C₁ ~ C₆ アルコキシにより適宜置換される、C₂ ~ C₆ アルキニル；または C₁ ~ C₆ アルキルにより適宜置換される、C₂ ~ C₆ 酸化アルキレニルである]

【0661】

ある態様において、式 I の BTK 阻害剤は、N-(3-(5-((1-アクリロイルアゼチジン-3-イル)オキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；(E)-N-(3-(6-アミノ-5-((1-(ブタ-2-エノイル)アゼチジン-3-イル)オキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；N-(3-(6-アミノ-5-((1-プロピオロイルアゼチジン-3-イル)オキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；N-(3-(6-アミノ-5-((1-(ブタ-2-イノイル)アゼチジン-3-イル)オキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；N-(3-(5-((1-アクリロイルピペリジン-4-イル)オキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；N-(3-(6-アミノ-5-(2-(N-メチルアクリルアミド)エトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；(E)-N-(3-(6-アミノ-5-(2-(N-メチルブタ-2-エンアミド)エトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；N-(3-(6-アミノ-5-(2-(N-メチルプロピオールアミド)エトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；(E)-N-(3-(6-アミノ-5-(2-(4-メトキシ-N-メチルブタ-2-エンアミド)エトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；N-(3-(6-アミノ-5-(2-(N-メチルブタ-2-インアミド)エトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；N-(2-((4-アミノ-6-(3-(4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)ピリミジン-5-イル)オキシ)エチル)-N-メチルオキシラン-2-カルボキサミド；N-(2-((4-アミノ-6-(3-(6-シクロプロピル-8-フルオロ-1-オキソイソキノリン-2(1H)-イル)フェニル)ピリミジン-5-イル)オキシ)エチル)-N-メチルアクリルアミド；N-(3-(5-(2-アクリルアミドエトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；N-(3-(6-アミノ-5-(2-(N-エチルアクリルアミド)エトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；N-(3-(6-アミノ-5-(2-(N-(2-フルオロエチル)アクリルアミド)エトキシ)ピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；N-(3-(5-((1-アクリルアミドシクロプロピル)メトキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；(S)-N-(3-(5-(2-アクリルアミドプロポキシ)-6-アミノピリミジン-4-イル)-5-フルオロ-2-メチルフェニル)-4-シクロプロピル-2-フルオロベンズアミド；(S)-N-(3-(6-アミノ-5-(2-

10

20

30

40

50

- (ブタ - 2 - インアミド)プロポキシ)ピリミジン - 4 - イル) - 5 - フルオロ - 2 - メチルフェニル) - 4 - シクロプロピル - 2 - フルオロベンズアミド; (S) - N - (3 - (6 - アミノ - 5 - (2 - (N - メチルアクリルアミド)プロポキシ)ピリミジン - 4 - イル) - 5 - フルオロ - 2 - メチルフェニル) - 4 - シクロプロピル - 2 - フルオロベンズアミド; (S) - N - (3 - (6 - アミノ - 5 - (2 - (N - メチルブタ - 2 - インアミド)プロポキシ)ピリミジン - 4 - イル) - 5 - フルオロ - 2 - メチルフェニル) - 4 - シクロプロピル - 2 - フルオロベンズアミド; N - (3 - (6 - アミノ - 5 - (3 - (N - メチルアクリルアミド)プロポキシ)ピリミジン - 4 - イル) - 5 - フルオロ - 2 - メチルフェニル) - 4 - シクロプロピル - 2 - フルオロベンズアミド; (S) - N - (3 - (5 - ((1 - アクリロイルピロリジン - 2 - イル)メトキシ) - 6 - アミノピリミジン - 4 - イル) - 5 - フルオロ - 2 - メチルフェニル) - 4 - シクロプロピル - 2 - フルオロベンズアミド; (S) - N - (3 - (6 - アミノ - 5 - ((1 - (ブタ - 2 - イノイル)ピロリジン - 2 - イル)メトキシ)ピリミジン - 4 - イル) - 5 - フルオロ - 2 - メチルフェニル) - 4 - シクロプロピル - 2 - フルオロベンズアミド; (S) - 2 - (3 - (5 - ((1 - アクリロイルピロリジン - 2 - イル)メトキシ) - 6 - アミノピリミジン - 4 - イル) - 5 - フルオロ - 2 - (ヒドロキシメチル)フェニル) - 6 - シクロプロピル - 3, 4 - ジヒドロイソキノリン - 1(2H) - オン; N - (2 - (4 - アミノ - 6 - (3 - (6 - シクロプロピル - 1 - オキソ - 3, 4 - ジヒドロイソキノリン - 2(1H) - イル) - 5 - フルオロ - 2 - (ヒドロキシメチル)フェニル)ピリミジン - 5 - イル)オキシ)エチル) - N - メチルアクリルアミド; N - (3 - (5 - ((2S, 4R) - 1 - アクリロイル - 4 - メトキシピロリジン - 2 - イル)メトキシ) - 6 - アミノピリミジン - 4 - イル) - 5 - フルオロ - 2 - メチルフェニル) - 4 - シクロプロピル - 2 - フルオロベンズアミド; N - (3 - (6 - アミノ - 5 - (((2S, 4R) - 1 - (ブタ - 2 - イノイル) - 4 - メトキシピロリジン - 2 - イル)メトキシ)ピリミジン - 4 - イル) - 5 - フルオロ - 2 - メチルフェニル) - 4 - シクロプロピル - 2 - フルオロベンズアミド; 2 - (3 - (5 - (((2S, 4R) - 1 - アクリロイル - 4 - メトキシピロリジン - 2 - イル)メトキシ) - 6 - アミノピリミジン - 4 - イル) - 5 - フルオロ - 2 - (ヒドロキシメチル)フェニル) - 6 - シクロプロピル - 3, 4 - ジヒドロイソキノリン - 1(2H) - オン; N - (3 - (5 - (((2S, 4S) - 1 - アクリロイル - 4 - メトキシピロリジン - 2 - イル)メトキシ) - 6 - アミノピリミジン - 4 - イル) - 5 - フルオロ - 2 - メチルフェニル) - 4 - シクロプロピル - 2 - フルオロベンズアミド; N - (3 - (6 - アミノ - 5 - (((2S, 4S) - 1 - (ブタ - 2 - イノイル) - 4 - メトキシピロリジン - 2 - イル)メトキシ)ピリミジン - 4 - イル) - 5 - フルオロ - 2 - メチルフェニル) - 4 - シクロプロピル - 2 - フルオロベンズアミド; N - (3 - (5 - (((2S, 4R) - 1 - アクリロイル - 4 - フルオロピロリジン - 2 - イル)メトキシ) - 6 - アミノピリミジン - 4 - イル) - 5 - フルオロ - 2 - メチルフェニル) - 4 - シクロプロピル - 2 - フルオロベンズアミド; (S) - N - (3 - (5 - ((1 - アクリロイルアゼチジン - 2 - イル)メトキシ) - 6 - アミノピリミジン - 4 - イル) - 5 - フルオロ - 2 - メチルフェニル) - 4 - シクロプロピル - 2 - フルオロベンズアミド; (S) - N - (3 - (6 - アミノ - 5 - ((1 - プロピオイルアゼチジン - 2 - イル)メトキシ)ピリミジン - 4 - イル) - 5 - フルオロ - 2 - メチルフェニル) - 4 - シクロプロピル - 2 - フルオロベンズアミド; (S) - 2 - (3 - (5 - ((1 - アクリロイルアゼチジン - 2 - イル)メトキシ) - 6 - アミノピリミジン - 4 - イル) - 5 - フルオロ - 2 - (ヒドロキシメチル)フェニル) - 6 - シクロプロピル - 3, 4 - ジヒドロイソキノリン - 1(2H) - オン; (R) - N - (3 - (5 - ((1 - アクリロイルアゼチジン - 2 - イル)メトキシ) - 6 - アミノピリミジン - 4 - イル) - 5 - フルオロ - 2 - メチルフェニル) - 4 - シクロプロピル - 2 - フルオロベンズアミド; (R) - N - (3 - (5 - ((1 - アクリロイルペリジン - 3 - イル)メトキシ) - 6 - アミノピリミジン - 4 - イル) - 5 - フルオロ - 2 - メチルフェニル) - 4 - シクロプロピル - 2 - フルオロベンズアミド; N - (3 - (5 - (((2R, 3S) - 1 - アクリロイル - 3 -

メトキシピロリジン - 2 - イル)メトキシ) - 6 - アミノピリミジン - 4 - イル) - 5 - フルオロ - 2 - メチルフェニル) - 4 - シクロプロピル - 2 - フルオロベンズアミド ; N - (3 - (5 - (((2 S , 4 R) - 1 - アクリロイル - 4 - シアノピロリジン - 2 - イル)メトキシ) - 6 - アミノピリミジン - 4 - イル) - 5 - フルオロ - 2 - メチルフェニル) - 4 - シクロプロピル - 2 - フルオロベンズアミド ; または N - (3 - (5 - (((2 S , 4 S) - 1 - アクリロイル - 4 - シアノピロリジン - 2 - イル)メトキシ) - 6 - アミノピリミジン - 4 - イル) - 5 - フルオロ - 2 - メチルフェニル) - 4 - シクロプロピル - 2 - フルオロベンズアミドから選択される。

【 0 6 6 2 】

他の形で提示されない限りにおいて、式 I の B T K 阻害剤を説明するのに上記で使
10
用した化学用語は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる、国際出願第 W O / 2 0
1 5 / 0 7 9 4 1 7 号において明示されるそれらの意味に従い使用する。

【 0 6 6 3 】

ある態様において、キナーゼ阻害剤は、テムシロリムス ; A P 2 3 5 7 3 および M K 8
6 6 9 としてもまた公知の、リダホロリムス { (1 R , 2 R , 4 S) - 4 - [(2 R) - 2 [(1 R
, 9 S , 1 2 S , 1 5 R , 1 6 E , 1 8 R , 1 9 R , 2 1 R , 2 3 S , 2 4 E , 2 6 E , 2 8 Z , 3 0
S , 3 2 S , 3 5 R) - 1 , 1 8 - ジヒドロキシ - 1 9 , 3 0 - ジメトキシ - 1 5 , 1 7 , 2 1 ,
2 3 , 2 9 , 3 5 - ヘキサメチル - 2 , 3 , 1 0 , 1 4 , 2 0 - ペンタオキソ - 1 1 , 3 6 - ジ
20
オキサ - 4 - アザトリシクロ [3 0 . 3 . 1 . 0 ⁴ , ⁹] ヘキサトリアコンタ - 1 6 , 2 4 , 2 6
, 2 8 - テトラエン - 1 2 - イル] プロピル] - 2 - メトキシシクロヘキシルジメチルホス
フィネート} ; エベロリムス (R A D 0 0 1) ; ラパマイシン (A Y 2 2 9 8 9) ; セマピモ
ド ; (5 - { 2 , 4 - ビス [(3 S) - 3 - メチルモルホリン - 4 - イル] ピリド [2 , 3 - d] ピ
リミジン - 7 - イル } - 2 - メトキシフェニル) メタノール (A Z D 8 0 5 5) ; 2 - アミノ
- 8 - [t r a n s - 4 - (2 - ヒドロキシエトキシ) シクロヘキシル] - 6 - (6 - メトキ
シ - 3 - ピリジニル) - 4 - メチル - ピリド [2 , 3 - d] ピリミジン - 7 (8 H) - オン (P
F 0 4 6 9 1 5 0 2) ; および N ² - [1 , 4 - ジオキソ - 4 - [[4 - (4 - オキソ - 8 - フ
エニル - 4 H - 1 - ベンゾピラン - 2 - イル) モルホリニウム - 4 - イル] メトキシ] プチ
ル] - L - アルギニルグリシル - L - アスパルチル L - セリン - (配列番号 3 1 3) の
分子内塩 (S F 1 1 2 6) ; および X L 7 6 5 から選択される、 m T O R 阻害剤である。

【 0 6 6 4 】

ある態様において、キナーゼ阻害剤は、 m T O R 阻害剤、例えば、ラパマイシンであり
30
、ラパマイシンを、約 3 mg、4 mg、5 mg、6 mg、7 mg、8 mg、9 mg、1 0 mg (例えば、6 m
g) の用量で、ある期間にわたり毎日、例えば、2 1 日間のサイクルにわたり毎日または 2
8 日間のサイクルにわたり毎日投与する。ある態様において、1、2、3、4、5、6、
7、8、9、1 0、1 1、1 2 以上のサイクルのラパマイシンを投与する。ある態様にお
いて、キナーゼ阻害剤は、 m T O R 阻害剤、例えば、エベロリムスであり、エベロリムス
を、約 2 mg、2 . 5 mg、3 mg、4 mg、5 mg、6 mg、7 mg、8 mg、9 mg、1 0 mg、1 1 mg、
1 2 mg、1 3 mg、1 4 mg、1 5 mg (例えば、1 0 mg) の用量で、ある期間にわたり毎日、例
えば、2 8 日間のサイクルにわたり毎日投与する。ある態様において、1、2、3、4、
40
5、6、7、8、9、1 0、1 1、1 2 以上のサイクルのエベロリムスを投与する。

【 0 6 6 5 】

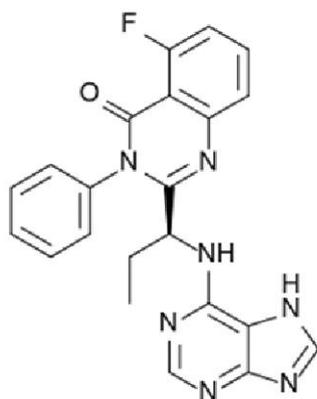
ある態様において、キナーゼ阻害剤は、 C G P 0 5 2 0 8 8 ; 4 - アミノ - 3 - (p -
フルオロフェニルアミノ) - ピラゾロ [3 , 4 - d] ピリミジン (C G P 5 7 3 8 0) ; セルコ
スポラミド ; E T C - 1 7 8 0 4 4 5 - 2 ; および 4 - アミノ - 5 - (4 - フルオロアニ
リノ) - ピラゾロ [3 , 4 - d] ピリミジンから選択される、 M N K 阻害剤である。

【 0 6 6 6 】

ある態様において、ここに記載される C A R 発現細胞を、対象に、ホスホイノシチド 3
キナーゼ (P I 3 K) 阻害剤 (例えば、ここに記載される P I 3 K 阻害剤、例えば、イデラ
リシブまたはドゥベリシブ) および / または リツキシマブ と組み合わせて投与する。ある
態様において、ここに記載される C A R 発現細胞を、対象に、イデラリシブおよびリツキ
50

シマブと組み合わせて投与する。ある態様において、ここに記載されるCAR発現細胞を、対象に、ドゥベリシブおよびリツキシマブと組み合わせて投与する。イデラリシブ(GS-1101またはCAL-101ともまた呼ばれる; Gilead)は、PI3Kのデルタアイソフォームを遮断する低分子である。イデラリシブ{5-フルオロ-3-フェニル-2-[(1S)-1-(7H-プリン-6-イルアミノ)プロピル]-4(3H)-キナゾリノン}の構造を、下記に示す。

【化5】

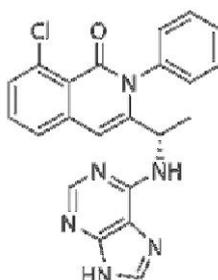


10

【0667】

ドゥベリシブ(IPI-145ともまた呼ばれる; Infinity PharmaceuticalsおよびAbbvie)は、PI3K- δ 、PI3K- γ を遮断する低分子である。ドゥベリシブ{8-クロロ-2-フェニル-3-[(1S)-1-(9H-プリン-6-イルアミノ)エチル]-1(2H)-イソキノリノン}の構造を、下記に示す。

【化6】



30

【0668】

ある態様において、対象は、CLLを有する。ある態様において、対象は、再発性CLL、例えば、対象は、かつて、癌治療を投与されたことがある(例えば、かつて、抗CD20抗体を投与されたことがあるかまたはイブルチニブを投与されたことがある)。例えば、対象は、第17染色体の短腕部における欠失[例えば、白血病性細胞におけるdel(17p)]を有する。他の例において、対象は、del(17p)を有さない。ある態様において、対象は、免疫グロブリン重鎖可変領域(IgV_H)遺伝子において変異を含む白血病性細胞を含む。他の態様において、対象は、免疫グロブリン重鎖可変領域(IgV_H)遺伝子において変異を含む白血病性細胞を含まない。ある態様において、対象は、第11染色体の長腕部における欠失[del(11q)]を有する。他の態様において、対象は、del(11q)を有さない。ある態様において、イデラリシブを、約100~400mg(例えばmg、100~125mg、125~150mg、150~175mg、175~200mg、200~225mg、225~250mg、250~275mg、275~300mg、325~350mg、350~375mgまたは375~400mg)の投与量で、例えば、毎日2回投与する。ある態様において、ドゥベリシブを、約15~100mg(例えばmg、約15~25mg、25~50mg、50~75mgまたは75~100mg)の投与量で、例えば、毎日2回投与する。ある態様において、リツキシマブを、約350~550mg/m²(例えば、35

40

50

0 ~ 375 mg/m²、375 ~ 400 mg/m²、400 ~ 425 mg/m²、425 ~ 450 mg/m²、450 ~ 475 mg/m² または 475 ~ 500 mg/m²)の投与量で、例えば、静脈内投与する。

【0669】

ある態様において、キナーゼ阻害剤は、2 - アミノ - 8 - [trans - 4 - (2 - ヒドロキシエトキシ)シクロヘキシル] - 6 - (6 - メトキシ - 3 - ピリジニル) - 4 - メチル - ピリド[2,3 - d]ピリミジン - 7(8H) - オン(PF - 04691502); N - [4 - [[4 - (ジメチルアミノ) - 1 - ピペリジニル]カルボニル]フェニル] - N' - [4 - (4,6 - ジ - 4 - モルホリニル - 1,3,5 - トリアジン - 2 - イル)フェニル]尿素(PF - 05212384、PKI - 587); 2 - メチル - 2 - {4 - [3 - メチル - 2 - オキソ - 8 - (キノリン - 3 - イル) - 2,3 - ジヒドロ - 1H - イミダゾ[4,5 - c]キノリン - 1 - イル]フェニル}プロパンニトリル(BEZ - 235); アピトリシブ(GDC - 0980、RG7422); 2,4 - ジフルオロ - N - {2 - (メチルオキシ) - 5 - [4 - (4 - ピリダジニル) - 6 - キノリニル] - 3 - ピリジニル}ベンゼンスルホンアミド(GSK2126458); 8 - (6 - メトキシピリジン - 3 - イル) - 3 - メチル - 1 - (4 - (ピペラジン - 1 - イル) - 3 - (トリフルオロメチル)フェニル) - 1H - イミダゾ[4,5 - c]キノリン - 2(3H) - オンマレイン酸(NVP - BGT226); 3 - [4 - (4 - モルホリニルピリド[3',2':4,5]フロ[3,2 - d]ピリミジン - 2 - イル]フェノール(PI - 103); 5 - (9 - イソプロピル - 8 - メチル - 2 - モルホリノ - 9H - プリン - 6 - イル)ピリミジン - 2 - アミン(VS - 5584、SB2343); および N - [2 - [(3,5 - ジメトキシフェニル)アミノ]キノキサリン - 3 - イル] - 4 - [(4 - メチル - 3 - メトキシフェニル)カルボニル]アミノフェニルスルホンアミド(XL765)から選択される、ホスファチジルイノシトール3キナーゼ(PI3K)およびmTORの二重阻害剤である。

【0670】

ある態様において、ここに記載されるCAR発現細胞を、対象に、未分化リンパ腫キナーゼ(ALK)阻害剤と組み合わせて投与する。例示的なALKキナーゼは、クリゾチニブ(Pfizer)、セリチニブ(Novartis)、アレクチニブ(中外)、ブリガチニブ(AP26113ともまた呼ばれる; Ariad)、エントレクチニブ(Ignyta)、PF - 06463922 (Pfizer)、TSR - 011 (Tesaro)(例えば、臨床試験識別番号NCT02048488を参照されたい)、CEP - 37440 (Teva)およびX - 396 (Xcovery)を含むが、これらに限定されない。ある態様において、対象は、固形癌、例えば、ここに記載される固形癌、例えば、肺癌を有する。

【0671】

クリゾチニブの化学名は、3 - [(1R) - 1 - (2,6 - ジクロロ - 3 - フルオロフェニル)エトキシ] - 5 - (1 - ピペリジン - 4 - イルピラゾール - 4 - イル)ピリジン - 2 - アミンである。セリチニブの化学名は、5 - クロロ - N² - [2 - イソプロポキシ - 5 - メチル - 4 - (4 - ピペリジニル)フェニル] - N⁴ - [2 - (イソプロピルスルホニル)フェニル] - 2,4 - ピリミジンジアミンである。アレクチニブの化学名は、9 - エチル - 6,6 - ジメチル - 8 - (4 - モルホリノピペリジン - 1 - イル) - 11 - オキソ - 6,11 - ジヒドロ - 5H - ベンゾ[b]カルバゾール - 3 - カルボニトリルである。ブリガチニブの化学名は、5 - クロロ - N² - {4 - [4 - (ジメチルアミノ) - 1 - ピペリジニル] - 2 - メトキシフェニル} - N⁴ - [2 - (ジメチルホスホリル)フェニル] - 2,4 - ピリミジンジアミンである。エントレクチニブの化学名は、N - (5 - (3,5 - ジフルオロベンジル) - 1H - インダゾール - 3 - イル) - 4 - (4 - メチルピペラジン - 1 - イル) - 2 - ((テトラヒドロ - 2H - ピラン - 4 - イル)アミノ)ベンズアミドである。PF - 06463922の化学名は、(10R) - 7 - アミノ - 12 - フルオロ - 2,10,16 - トリメチル - 15 - オキソ - 10,15,16,17 - テトラヒドロ - 2H - 8,4 - (メテノ)ピラゾロ[4,3 - h][2,5,11] - ベンゾキサジアザシクロテトラデシン - 3 - カルボニトリルである。CEP - 37440の化学構造は、(S) - 2 - ((5 - クロロ - 2 - ((6 - (4 - (2 - ヒドロキシエチル)ピペラジン - 1 - イル) - 1 - メトキシ - 6,7,8,9 - テトラヒドロ -

5 H - ベンゾ[7]アヌレン - 2 - イル)アミノ)ピリミジン - 4 - イル)アミノ) - N - メチルベンズアミドである。X - 396の化学名は、(R) - 6 - アミノ - 5 - (1 - (2,6 - ジクロロ - 3 - フルオロフェニル)エトキシ) - N - (4 - (4 - メチルピペラジン - 1 - カルボニル)フェニル)ピリダジン - 3 - カルボキサミドである。

【0672】

カルシウム依存性ホスファターゼであるカルシニューリンを阻害する薬物(サイクロスポリンおよびFK506)または増殖因子によって誘導されたシグナル伝達に重要なp70S6キナーゼを阻害する薬物(ラパマイシン)(Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993)のいずれかも使用することができる。さらなる面において、本発明の細胞組成物は、骨髄移植、フルダラビンなどの化学療法剤を使用したT細胞除去療法、外部ビーム放射線療法(XRT)、シクロホスファミドおよび/またはOKT3もしくはキャンパスなどの抗体と共に(例えば、その前、それと同時にまたはその後)患者に投与することができる。ある面において、本発明の細胞組成物は、CD20と反応する薬剤、例えばリツキサンなどのB細胞除去療法の後に投与される。例えば、ある態様において、対象は、高用量化学療法、それに続いて末梢血幹細胞移植での標準的な処置を受けてもよい。所定の態様において、移植後、対象は、本発明の拡大させた免疫細胞の注入を受ける。さらなる態様において、拡大させた細胞は、外科手術の前にまたはその後投与される。

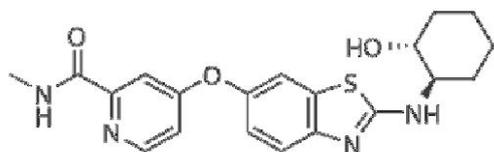
【0673】

ある態様において、ここに記載されるCAR発現細胞を、対象に、インドールアミン2,3 - ジオキシゲナーゼ(IDO)阻害剤と組み合わせて投与する。IDOとは、アミノ酸であるL - トリプトファンの、キヌレニンへの分解を触媒する酵素である。多くの癌、例えば、前立腺癌、結腸直腸癌、膵臓癌、子宮頸癌、胃癌、卵巣癌、頭部癌および肺癌は、IDOを過剰発現する。pDC、マクロファージおよび樹状細胞(DC)は、IDOを発現し得る。理論に縛られずに述べると、L - トリプトファンの減少(例えば、IDOにより触媒される)は、T細胞のアネルギーおよびアポトーシスを誘導することにより、免疫抑制環境を結果としてもたらすと考えられる。したがって、理論に縛られずに述べると、IDO阻害剤は、例えば、CAR発現免疫細胞の抑制または死を減少させることにより、ここに記載されるCAR発現細胞の効能を増強し得ると考えられる。ある態様において、対象は、充実性腫瘍、例えば、ここに記載される充実性腫瘍、例えば、前立腺癌、結腸直腸癌、膵臓癌、子宮頸癌、胃癌、卵巣癌、頭部癌または肺癌を有する。例示的なIDO阻害剤は、1 - メチル - トリプトファン、インドキシモド(NewLink Genetics)(例えば、臨床試験識別番号: NCT01191216; NCT01792050を参照されたい)およびINCB024360(Incyte Corp.)(例えば、臨床試験識別番号: NCT01604889; NCT01685255を参照されたい)を含むが、これらに限定されない。

【0674】

ある態様において、ここに記載されるCAR発現細胞を、対象に、骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)のモジュレーターと組み合わせて投与する。MDSCは、末梢および多くの充実性腫瘍の腫瘍部位に蓄積される。これらの細胞は、T細胞応答を抑制し、これにより、CAR発現細胞療法の効能を妨げる。理論に縛られずに述べると、MDSCモジュレーターの投与は、ここに記載されるCAR発現細胞の効能を増強すると考えられる。ある態様において、対象は、充実性腫瘍、例えば、ここに記載される充実性腫瘍、例えば、神経膠芽腫を有する。例示的なMDSCモジュレーターは、MCS110およびBLZ945を含むが、これらに限定されない。MCS110とは、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)に対するモノクローナル抗体(mAb)である。例えば、臨床試験識別番号NCT00757757を参照されたい。BLZ945とは、コロニー刺激因子1受容体(CSF1R)の低分子阻害剤である。例えば、Pyonteck et al. Nat. Med. 19(2013):1264-72を参照されたい。BLZ945の構造を、下記に示す。

【化7】



【0675】

ある態様において、ここに記載されるCAR発現細胞を、対象に、CD19 CAR細胞(例えば、参照により本明細書に組み入れられる、WO2012/079000において説明されている、例えば、CTL019)と組み合わせて投与する。ある態様において、対象は、急性骨髄性白血病(AML)、例えば、CD19陽性AMLまたはCD19陰性AMLを有する。ある態様において、対象は、CD19+リンパ腫、例えば、CD19+非ホジキンリンパ腫(NHL)、CD19+FLまたはCD19+DLBCLを有する。ある態様において、対象は、再発性CD19+リンパ腫または不応性CD19+リンパ腫を有する。ある態様において、リンパ枯渇化学療法を、対象に、CD19 CAR細胞の投与(例えば、注入)の前に、投与と並列してまたは投与の後で投与する。ある例では、リンパ枯渇化学療法を、対象に、CD19 CAR細胞の投与の前に投与する。例えば、リンパ枯渇化学療法は、CD19 CAR細胞の注入の1~4日(例えば、1、2、3または4日)前に終了する。ある態様において、CD19 CAR細胞の複数回投与を、例えば、ここに記載される通りに行う。例えば、単回投与は、CD19 CAR細胞約 5×10^8 個を含む。ある態様において、リンパ枯渇化学療法を、対象に、ここに記載されるCAR発現細胞、例えば、非CD19 CAR発現(expressing)細胞の投与(例えば、注入)の前に、投与と並列してまたは投与の後で投与する。ある態様において、CD19 CARを、対象に、非CD19 CAR発現細胞、例えば、ここに記載される非CD19 CAR発現細胞の投与(例えば、注入)の前に、投与と並列してまたは投与の後で投与する。

【0676】

ある態様において、ここに記載されるCAR発現細胞を、対象に、CD19 CAR発現細胞、例えば、参照により本明細書に組み入れられる、WO2012/079000において説明されている、例えば、CTL019と組み合わせて、CLL-1の発現に関係する疾患、例えば、ここに記載される癌の処置のために投与する。理論に縛られずに述べると、CD19 CAR発現細胞を、CAR発現細胞と組み合わせて投与することは、初期系統の癌幹細胞、例えば、癌幹細胞を標的とし、免疫応答をモジュレートし、調節性B細胞を枯渇させ、かつ/または腫瘍微小環境を改善することにより、ここに記載されるCAR発現細胞の効能を改善すると考えられる。例えば、CD19 CAR発現細胞が、初期系統マーカーを発現する癌細胞、例えば、癌幹細胞およびCD19発現細胞を標的とするのに対し、ここに記載されるCAR発現細胞は、後期系統マーカーを発現する癌細胞、例えば、CLL-1を標的とする。このプレコンディショニング法は、ここに記載されるCAR発現細胞の効能を改善し得る。このような態様において、CD19 CAR発現細胞を、ここに記載されるCAR発現細胞投与(例えば、注入)の前に、投与と並列してまたは投与の後で投与する。

【0677】

ある態様において、ここに記載されるCAR発現細胞はまた、CD19を標的とするCAR、例えば、CD19 CARも発現する。ある態様において、ここに記載されるCARおよびCD19 CARを発現する細胞を、対象に、ここに記載される癌、例えば、AMLの処置のために投与する。ある態様において、CAR分子の一方または両方の配置は

10

20

30

40

50

、一次細胞内シグナル伝達ドメインと、共刺激シグナル伝達ドメインとを含む。別の態様において、CAR分子の一方または両方の配置は、一次細胞内シグナル伝達ドメインと、2以上の、例えば、2、3、4、もしくは5以上の共刺激シグナル伝達ドメインとを含む。このような態様において、ここに記載されるCAR分子と、CD19 CARとは、同じ一次細胞内シグナル伝達ドメインを有してもよく、異なる一次細胞内シグナル伝達ドメインを有してもよく、同じ共刺激シグナル伝達ドメインを有してもよく、異なる共刺激シグナル伝達ドメインを有してもよく、同じ数の共刺激シグナル伝達ドメインを有してもよく、異なる数の共刺激シグナル伝達ドメインを有してもよい。あるいは、ここに記載されるCARと、CD19 CARとは、CAR分子の1つが、抗原結合ドメインおよび共刺激ドメイン(例えば、4-1BB)を含むのに対し、他のCAR分子は、抗原結合ドメインおよび一次細胞内シグナル伝達ドメイン(例えば、CD3ゼータ)を含む、スプリットCARとしても配置される。

10

【0678】

ある態様において、ここに記載されるCAR発現細胞を、対象に、インターロイキン15(IL-15)ポリペプチド、インターロイキン15受容体アルファ(IL-15Ra)ポリペプチドまたはIL-15ポリペプチドおよびIL-15Raポリペプチド、例えば、hetIL-15(Admune Therapeutics, LLC)の両方の組合せと組み合わせて投与する。hetIL-15とは、IL-15とIL-15Raとの、ヘテロ二量体の非共有結合的複合体である。hetIL-15は、例えば、参照により本明細書に組み入れられる、U.S.8,124,084、U.S.2012/0177598、U.S.2009/0082299、U.S.2012/0141413およびU.S.2011/0081311において説明されている。ある態様において、het-IL-15を、皮下投与する。ある態様において、対象は、癌、例えば、固形癌、例えば、黒色腫または結腸癌を有する。ある態様において、対象は、転移性癌を有する。

20

【0679】

ある態様において、ここに記載される疾患、例えば、血液障害、例えば、AMLまたはMDSを有する対象に、ここに記載されるCAR発現細胞を、薬剤、例えば、細胞毒性剤または化学療法剤、生物療法(例えば、抗体、例えば、モノクローナル抗体または細胞療法)または阻害剤(例えば、キナーゼ阻害剤)と組み合わせて投与する。ある態様において、対象に、ここに記載されるCAR発現細胞を、細胞毒性剤、例えば、CPX-351(Celator Pharmaceuticals)、シタラピン、ダウノルピシン、ボサロキシシン(Sunesis Pharmaceuticals)、サパシタピン(Cyclacel Pharmaceuticals)、イダルピシンまたはミトキサントロンと組み合わせて投与する。CPX-351とは、シタラピンとダウノルピシンとを5:1のモル比で含むリポソーム製剤である。ある態様において、対象に、ここに記載されるCAR発現細胞を、低メチル化剤、例えば、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤、例えば、アザシチジンまたはデシタピンと組み合わせて投与する。ある態様において、対象に、ここに記載されるCAR発現細胞を、生物療法、例えば、抗体または細胞療法、例えば、225Ac-リンツズマブ(Actimab-A; Actinium Pharmaceuticals)、IPH2102(Innate Pharma/Bristol Myers Squibb)、SGN-CD33A(Seattle Genetics)またはゲムツズマブオゾガマイシン(Mylotag; Pfizer)と組み合わせて投与する。SGN-CD33Aとは、抗CD33抗体へと接合させたピロロベンゾジアゼピン二量体を含む、抗体-薬物コンジュゲート(ADC)である。Actimab-Aとは、抗CD33抗体(リンツズマブ)で標識されたアクチニウムである。IPH2102とは、キラー免疫グロブリン様受容体(KIR)を標的とするモノクローナル抗体である。ある態様において、対象に、ここに記載されるCAR発現細胞を、FLT3阻害剤、例えば、ソラフェニブ(Bayer)、ミドスタウリン(Novartis)、キザルチニブ(Daiichi Sankyo)、クレノラニブ(Arog Pharmaceuticals)、PLX3397(Daiichi Sankyo)、AKN-028(Akinion Pharmaceuticals)またはASP2215(Astellas)と組み合わせて投与する。ある態様において、対象に、ここに記載されるCAR発現細胞を、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ(IDH)阻害剤、例えば、AG-221(Celgene/Agios)またはAG-120(Agios/Celgene

30

40

50

)と組み合わせて投与する。ある態様において、対象に、ここに記載されるCAR発現細胞を、細胞周期調節因子、例えば、ポロ様キナーゼ1(Plk1)阻害剤、例えば、ボラセルチブ(Boehringer Ingelheim)；またはサイクリン依存性キナーゼ9(Cdk9)阻害剤、例えば、アルボシジブ(Tolero Pharmaceuticals/Sanofi Aventis)と組み合わせて投与する。ある態様において、対象に、ここに記載されるCAR発現細胞を、B細胞受容体シグナル伝達ネットワーク阻害剤、例えば、B細胞リンパ腫2(Bcl-2)阻害剤(inhibitor)、例えば、ベネトクラクス(Abbvie/Roche)；またはブルトン型チロシンキナーゼ(Btk)阻害剤、例えば、イブルチニブ(Pharmacoclics/Johnson & Johnson Janssen Pharmaceuticals)と組み合わせて投与する。ある態様において、対象に、ここに記載されるCAR発現細胞を、M1アミノペプチダーゼ阻害剤、例えば、トセドスタット(CTI BioPharma/Vernalis)；ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDAC)、例えば、プラシノスタット(MEIPharma)；マルチキナーゼ阻害剤、例えば、リゴサチブ(Onconova Therapeutics/Baxter/SymBio)；またはペプチドCXCR4インバーサゴニスト、例えば、BL-8040(BioLineRx)と組み合わせて投与する。ある態様において、対象に、CLL-1を標的とするCAR発現細胞を、CLL-1以外の抗原、例えば、CLL、BCMA、CD123、CD19、FLT-3または葉酸受容体ベータに特異的に結合するCAR発現細胞と組み合わせて投与する。

【0680】

別の態様において、対象に、細胞の移植、例えば、同種異系幹細胞移植の前に、本発明のCLL-1発現細胞組成物の注入を施す。好ましい態様において、CLL-1発現細胞は、例えば、mRNA CLL-1 CARのエレクトロポレーションにより、CLL-1 CARを一過性に発現させるが、ここで、生着の失敗を回避するように、CLL-1の発現は、ドナー幹細胞の注入の前に終了させる。

【0681】

一部の患者は、投与時または投与後において、本発明の化合物および/または他の抗癌剤に対して、アレルギー反応を起こす場合があり、したがって、アレルギー反応の危険性を最小化するのに、抗アレルギー剤を投与することが多い。好適な抗アレルギー剤は、デキサメタゾン(例えば、Decadron(登録商標))、ベクロメタゾン(例えば、Becloment(登録商標))、ヒドロコルチゾン(コルチゾン、ヒドロコルチゾンコハク酸エステルナトリウム、ヒドロコルチゾンリン酸エステルナトリウムとしてもまた公知であり、Ala-Cort(登録商標)、ヒドロコルチゾンリン酸エステル、Solu-Cortef(登録商標)、Hydrocort Acetate(登録商標)およびLanacort(登録商標)の商標名で販売されている)、プレドニゾロン(Delta-Cortel(登録商標)、Orapred(登録商標)、Pediapred(登録商標)およびPrelone(登録商標)の商標名で販売されている)、プレドニゾン(Deltasone(登録商標)、Liquid Red(登録商標)、Meticorten(登録商標)およびOrasone(登録商標)の商標名で販売されている)、メチルプレドニゾロン(6-メチルプレドニゾロン、メチルプレドニゾロン酢酸エステル、メチルプレドニゾロンコハク酸エステルナトリウムとしてもまた公知であり、Duralone(登録商標)、Medralone(登録商標)、Medrol(登録商標)、M-Prednisol(登録商標)およびSolu-Medrol(登録商標)の商標名で販売されている)などのコルチコステロイド；ジフェンヒドラミン(例えば、Benadryl(登録商標))、ヒドロキシジンおよびシプロヘプタジンなどの抗ヒスタミン剤；ならびにベータ-アドレナリン作動性受容体アゴニスト、アルブテロール(例えば、Proventil(登録商標))およびテルブタリン(Brethine(登録商標))などの気管支拡張剤を含む。

【0682】

一部の患者は、本発明の化合物および/または他の抗癌剤の投与時および投与後において、悪心を起こす場合があり、したがって、制吐剤は、悪心(胃上部)および嘔吐を予防するのに使用する。適切な制吐剤は、アプレピタント(Emend(登録商標))、オンダンセトロン(Zofran(登録商標))、グラニセトロンHCl(Kytril(登録商標))、口

10

20

30

40

50

ラゼパム(A t i v a n(登録商標))、デキサメタゾン(D e c a d r o n(登録商標))、プロクロルペラジン(C o m p a z i n e(登録商標))、カソピタント(R e z o n i c(登録商標))およびZ u n r i s a(登録商標))およびその組合せを含む。

【0683】

処置期間中に起きた疼痛を緩和する薬を処方して、患者を快適にすることが多い。T y l e n o l(登録商標)など、一般的な市販の鎮痛薬を使用することが多い。しかし、ヒドロコドン/パラセタモールまたはヒドロコドン/アセトアミノフェン(例えば、V i c o d i n(登録商標))、モルヒネ(例えば、A s t r a m o r p h(登録商標)またはA v i n z a(登録商標))、オキシコドン(例えば、O x y C o n t i n(登録商標)またはP e r c o c e t(登録商標))、オキシモルフォン塩酸塩(O p a n a(登録商標))およびフェンタニル(例えば、D u r a g e s i c(登録商標))などのオピオイド鎮痛薬もまた、中程度または重度の疼痛に有用である。

10

【0684】

正常細胞を処置毒性から保護し、臓器毒性を制限する取組みにおいて、細胞保護剤(神経保護剤、フリーラジカルスカベンジャー、心保護剤、アントラサイクリン溢出中和剤、栄養物など)を、補助治療として使用することができる。適切な細胞保護剤は、アミホスチン[E t h y o l(登録商標)]、グルタミン、ジメスナ[T a v o c e p t(登録商標)]、メスナ[M e s n e x(登録商標)]、デクスラゾキサナ[Z i n e c a r d(登録商標)またはT o t e c t(登録商標)]、キサリプロデン[X a p r i l a(登録商標)]およびロイコボリン(ロイコボリンカルシウム、シトロボラム因子およびフォリン酸としてもまた公知)を含む。

20

【0685】

コード番号、一般名または商標名により同定される活性化合物の構造は、標準的なコンパニウムである“The Merck Index”の最新版またはデータベース、例えば、Patents International(例えば、IMS World Publications)から取り出すことができる。

【0686】

上記で言及された化合物であって、本発明の化合物と組み合わせて使用し得る化合物は、上記で引用した文献など、当業界で説明される通りに調製および投与することができる。

【0687】

ある態様において、本発明は、本発明の少なくとも1の化合物(例えば、本発明の1化合物)または薬学的に許容されるその塩を、ヒト対象または動物対象への投与に適する、薬学的に許容される担体と併せて含む医薬組成物を、単独でまたは他の抗癌剤と併せて提供する。

30

【0688】

ある態様において、本発明は、癌などの細胞増殖性疾患を患う、ヒト対象または動物対象を処置する方法を提供する。本発明は、このような処置を必要とするヒト対象または動物対象を処置する方法であって、対象に、本発明の化合物(例えば、本発明の化合物)または薬学的に許容されるその塩の治療有効量を、単独でまたは他の抗癌剤と組み合わせて投与することを含む方法を提供する。

40

【0689】

特に、組成物は、併用療法として併せて製剤化するかまたは個別に投与する。

【0690】

併用療法において、本発明の化合物および他の抗癌剤は、具体的な期限を伴わずに、同時に投与することもでき、並列して投与することもでき、逐次的に投与することもでき、ここで、このような投与は、患者の体内に、2化合物の治療有効レベルをもたらす。

【0691】

好ましい態様において、本発明の化合物および他の抗癌剤は一般に、注入または経口により、任意の順序で、逐次的に投与する。投与レジメンは、病期、患者の身体健康、個々の薬物の安全性プロファイル、個々の薬物の忍容性の他、組合せを投与する主治医および

50

医療従事者に周知の他の基準に応じて変動し得る。本発明の化合物および他の抗癌剤は、処置のために使用される特定のサイクルに応じて、互いから数分間以内に投与することもでき、数時間以内に投与することもでき、数日間以内に投与することもでき、なおまたは数週間以内に投与することもできる。加えて、サイクルは、処置サイクル中に、1薬物の投与を、他の薬物より高頻度で、かつ、薬物の投与1回当たり異なる用量で含むことも可能であろう。

【0692】

本発明の別の面において、本発明の1以上の化合物と、本明細書で開示される組合せパートナーを含むキットも提供される。代表的なキットは、(a)本発明の化合物または薬学的に許容されるその塩と、(b)例えば、上記で指し示した、少なくとも1の組合せパートナーを含み、ここで、このようなキットは、投与のための指示を含む、パッケージの添付文書または他の表示を含み得る。

10

【0693】

本発明の化合物はまた、公知の治療プロセス、例えば、ホルモンの投与、とりわけ、放射線と有利に組み合わせるのにも使用することができる。本発明の化合物は特に、とりわけ、放射線療法に対する感受性の不良を呈示する腫瘍の処置のための、放射線増感剤として使用することができる。

【0694】

ある態様において、対象は、CAR発現細胞の投与に関連する副作用を低減または改善する薬剤を投与されてもよい。CAR発現細胞の投与に関連する副作用としては、これらに限定されないが、CRSおよびマクロファージ活性化症候群(MAS)とも称される血球貪食性リンパ組織球症(HLH)が挙げられる。CRSの症状としては、高熱、吐き気、一過性の低血圧、低酸素症および同種のもものが挙げられる。CRSは、発熱、疲労、食欲不振、筋肉痛、関節痛、悪心、嘔吐および頭痛などの臨床的全身徴候および臨床的全身症状を含み得る。CRSは、発赤などの臨床的皮膚徴候および臨床的皮膚症状を含み得る。CRSは、悪心、嘔吐および下痢などの臨床的消化管徴候および臨床的消化管症状を含み得る。CRSは、頻呼吸および低酸素血などの臨床的呼吸器徴候および臨床的呼吸器症状を含み得る。CRSは、頻脈、脈圧拡大、低血圧、心拍出量の増加(初期)および心拍出量の潜在的な減少(後期)などの臨床的心血管徴候および臨床的心血管症状を含み得る。CRSは、d-ダイマーの増加、出血を伴うかまたは伴わない低フィブリノーゲン血症などの臨床的凝固徴候および臨床的凝固症状を含み得る。CRSは、高窒素血症などの臨床的腎臓徴候および臨床的腎臓症状を含み得る。CRSは、高トランスアミナーゼ血症および高ビリルビン血症などの臨床的肝臓徴候および臨床的肝臓症状を含み得る。CRSは、頭痛、精神状態の変化、精神錯乱、せん妄、喚語困難または完全な失語症、幻覚、振戦、ディスメトリア、歩行の異変および発作などの臨床的神経徴候および臨床的神経症状を含み得る。したがって、ここに記載される方法は、ここに記載されるCAR発現細胞を対象に投与することと、1以上の薬剤をさらに投与して、CAR発現細胞による処置から生じる可溶性因子のレベルの上昇を管理することとを含み得る。ある態様において、対象において上昇する可溶性因子は、IFN- γ 、TNF- α 、IL-2およびIL-6の1以上である。ある態様において、対象において上昇する因子は、IL-1、GM-CSF、IL-10、IL-8、IL-5およびフラクタルカインの1以上である。したがって、この副作用を処置するのに投与される薬剤は、これらの可溶性因子の1以上を中和する薬剤であり得る。ある態様において、これらの可溶性形態の1以上を中和する薬剤は、抗体またはその抗体。このような薬剤の例は、ステロイド(例えば、コルチコステロイド)、TNF阻害剤およびIL-6の阻害剤を含むが、これらに限定されない。TNF阻害剤の例は、インフリキシマブ、アダリムマブ、セルトリズマブペゴルおよびゴリムマブなどの抗TNF抗体分子である。TNF阻害剤の別の例は、融合タンパク質、エタネルセプトなどである。TNFの低分子阻害剤は、キサンチン誘導体(例えば、ペントキシフィリン)およびブプロピオンを含むが、これらに限定されない。IL-6阻害剤の例は、トシリズマブ(toc)、サリルマブ、エルシリモマブ、CNTO 328、ALD518/BMS-

20

30

40

50

945429、CNTO 136、CPSI-2364、CDP6038、VX30、ARGX-109、FE301およびFM101などの抗IL-6抗体分子である。ある態様において、抗IL-6抗体分子は、トシリズマブである。IL-1Rベースの阻害剤の例は、アナキンラである。

【0695】

ある態様において、対象に、CAR発現細胞の活性を増強する薬剤を投与することができる。例えば、ある態様において、薬剤は、阻害分子を阻害する薬剤であることが可能であり、例えば、薬剤は、チェックポイント阻害剤である。ある態様において、阻害性分子、例えば、プログラム死1(PD1)は、CAR発現細胞が、免疫エフェクター応答を誘発する能力を減少させ得る。阻害分子の例は、PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、CEACAM(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および/またはCEACAM-5)、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、CD80、CD86、B7-H3(CD276)、B7-H4(VTCN1)、HVEM(TNFRSF14またはCD270)、KIR、A2aR、MHCクラスI、MHCクラスII、GAL9、アデノシンおよびTGFRベータを含む。例えば、DNAレベル、RNAレベルまたはタンパク質レベルにおける阻害による阻害分子の阻害は、CAR発現細胞の性能を最適化し得る。ある態様において、例えば、阻害核酸、例えば、dsRNA、例えば、siRNAまたはshRNA、を使用して、CAR発現細胞における阻害分子の発現を阻害することができる。ある態様において、阻害剤は、shRNAである。ある態様において、阻害分子は、CAR発現細胞内で阻害される。これらの態様において、阻害分子の発現を阻害するdsRNA分子は、構成要素、例えばCARの構成要素の全てをコードする核酸に連結されている。

【0696】

ある態様において、T細胞の機能をモジュレートまたは調節する、例えば、T細胞の機能を阻害する分子の発現を阻害するdsRNA分子が発現される、例えば、CAR発現細胞内で発現されるように、T細胞の機能をモジュレートまたは調節する、例えば、T細胞の機能を阻害する分子の発現を阻害するdsRNA分子をコードする核酸分子を、プロモーター、例えば、H1由来のプロモーターまたはU6由来のプロモーターに作動可能に連結する。例えば、Tiscornia G., "Development of Lentiviral Vectors Expressing siRNA," Chapter 3, in *Gene Transfer: Delivery and Expression of DNA and RNA* (eds. Friedmann and Rossi). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2007; Brummelkamp TR, et al. (2002) *Science* 296: 550-553; Miyagishi M, et al. (2002) *Nat. Biotechnol.* 19: 497-500を参照されたい。ある態様において、T細胞の機能をモジュレートまたは調節する、例えば、T細胞の機能を阻害する分子の発現を阻害するdsRNA分子をコードする核酸分子は、同じベクター、例えば、CARの構成要素、例えば、構成要素の全てをコードする核酸分子を含むレンチウイルスベクターに存在する。このような態様において、T細胞の機能をモジュレートまたは調節する、例えば、T細胞の機能を阻害する分子の発現を阻害するdsRNA分子をコードする核酸分子は、ベクター、例えば、レンチウイルスベクターの、CARの構成要素、例えば、構成要素の全てをコードする核酸に対して、5'側または3'側に配置される。T細胞の機能をモジュレートまたは調節する、例えば、T細胞の機能を阻害する分子の発現を阻害するdsRNA分子をコードする核酸分子は、CARの構成要素、例えば、構成要素の全てをコードする核酸と、同じ方向に転写される場合もあり、異なる方向に転写される場合もある。ある態様において、T細胞の機能をモジュレートまたは調節する、例えば、T細胞の機能を阻害する分子の発現を阻害するdsRNA分子をコードする核酸分子は、CARの構成要素、例えば、構成要素の全てをコードする核酸分子を含むベクター以外のベクターに存在する。ある態様において、T細胞の機能をモジュレートまたは調節する、例えば、T細胞の機能を阻害する分子の発現を阻害するdsRNA分子をコードする核酸分子は、CAR発現細胞内で一過性に発現される。ある態様において、T細胞の機能をモジュレートまたは調節する、例えば、T細胞の機能を阻害する分子の発現を阻害するdsRNA分子を

10

20

30

40

50

コードする核酸分子は、CAR発現細胞のゲノムに安定的に統合される。図29A~29Eは、CARの構成要素、例えば、構成要素の全てを、T細胞の機能をモジュレートまたは調節する、例えば、T細胞の機能を阻害する分子の発現を阻害するdsRNA分子と共に発現するベクターの例を描示する。

【0697】

T細胞の機能をモジュレートまたは調節する、例えば、T細胞の機能を阻害する分子の発現を阻害するために有用なdsRNA分子であって、T細胞の機能をモジュレートまたは調節する、例えば、T細胞の機能を阻害する分子が、PD-1である、dsRNA分子の例を、下記に提示する。

【0698】

下記の表10に、PDCD1(PD1)RNAi剤(マウスPDCD1の遺伝子配列であるNM_008798.2におけるそれらの位置に由来する)の名称を、DNA配列を表す配列番号216~263と共に提示する。19マーおよび21マーの配列として表示される、センス(S)配列およびアンチセンス(AS)配列の両方を、この表に示す。また、位置(Pos、例えば、176)は、マウスPDCD1の遺伝子配列であるNM_008798.2における位置の番号に由来することにも注目されたい。「センス19」配列番号216~227；「センス21」配列番号228~239；「アセンス(asense)21」配列番号240~251；「アセンス19」配列番号252~263に対応する配列番号を、12の群において指し示す。

【0699】

10

20

【表 27】

表10：マウスPDCD1(PD1)のshRNA配列

NM_0087 98.2に おける 位置	標的 領域	センス19	センス21	アセンス21	アセンス19
176	CDS	GGAGGTCCC TCACCTTCTA (配列番号216)	CTGGAGGTC CCTCACCTT CTA (配列番号228)	TAGAAGGTG AGGGACCTC CAG (配列番号240)	TAGAAGGTG AGGGACCTC C (配列番号252)
260	CDS	CGGAGGATC TTATGCTGAA (配列番号217)	GTCGGAGGA TCTTATGCTG AA (配列番号229)	TTCAGCATAA GATCCTCCG AC (配列番号241)	TTCAGCATAA GATCCTCCG (配列番号253)
359	CDS	CCCGCTTCC AGATCATAACA (配列番号218)	TGCCCGCTT CCAGATCATA CA (配列番号230)	TGTATGATCT GGAAGCGGG CA (配列番号242)	TGTATGATCT GGAAGCGGG (配列番号254)
528	CDS	GGAGACCTC AACAAGATAT (配列番号219)	CTGGAGACC TCAACAAGAT AT (配列番号231)	ATATCTTGTT GAGGTCTCC AG (配列番号243)	ATATCTTGTT GAGGTCTCC (配列番号255)
581	CDS	AAGGCATGG TCATTGGTAT (配列番号220)	TCAAGGCAT GGTCATTGGT AT (配列番号232)	ATACCAATGA CCATGCCTT GA (配列番号244)	ATACCAATGA CCATGCCTT (配列番号256)
584	CDS	GCATGGTCA TTGGTATCAT (配列番号221)	AGGCATGGT CATTGGTATC AT (配列番号233)	ATGATACCAA TGACCATGC CT (配列番号245)	ATGATACCAA TGACCATGC (配列番号257)

10

20

30

【表 28】

588	CDS	GGTCATTGGT ATCATGAGT (配列番号222)	ATGGTCATTG GTATCATGAG T (配列番号234)	ATGGTCATTG GTATCATGAG T (配列番号246)	ATGGTCATTG GTATCATGA (配列番号258)
609	CDS	CCTAGTGGG TATCCCTGTA (配列番号223)	GCCCTAGTG GGTATCCCT GTA (配列番号235)	GCCCTAGTG GGTATCCCT GTA (配列番号247)	GCCCTAGTG GGTATCCCT G (配列番号259)
919	CDS	GAGGATGGA CATTGTTCTT (配列番号224)	ATGAGGATG GACATTGTTCTT (配列番号236)	ATGAGGATG GACATTGTTCTT (配列番号248)	ATGAGGATG GACATTGTTCTT (配列番号260)
1021	3'UTR	GCATGCAGG CTACAGTTCA (配列番号225)	GAGCATGCA GGCTACAGTT CA (配列番号237)	GAGCATGCA GGCTACAGTT CA (配列番号249)	GAGCATGCA GGCTACAGTT (配列番号261)
1097	3'UTR	CCAGCACAT GCACTGTTGA (配列番号226)	TTCCAGCACACA TGCCTGTTGA A (配列番号238)	TTCCAGCACACA TGCCTGTTGA A (配列番号250)	TTCCAGCACACA TGCCTGTTGA (配列番号262)
1101	3'UTR	CACATGCACT GTTGAGTGA (配列番号227)	AGCACATGC ACTGTTGAGT GA (配列番号239)	AGCACATGC ACTGTTGAGT GA (配列番号251)	AGCACATGC ACTGTTGAGT (配列番号263)

10

20

【0700】

下記の表11に、PDCD1(PD1)RNAi剤(ヒトPDCD1の遺伝子配列におけるそれらの位置に由来する)の名称を、DNA配列を表す配列番号264~311と共に提示する。センス(S)配列およびアンチセンス(AS)配列の両方を、19マーおよび21マーの配列として表示する。「センス19」配列番号264~275;「センス21」配列番号276~287;「アセンス21」配列番号288~299;「アセンス19」配列番号300~311に対応する配列番号を、12の群において指し示す。

30

【0701】

【表 29】

表 11 : ヒト PDCD1 (PD1) の s h RNA 配列

NM_0050 18.2に おける 位置	標的 領域	センス19	アセンス19	センス21	アセンス21
145	CDS	GGCCAGGAT GGTTCCTAGA (配列番号264)	TCTAAGAACC ATCCTGGCC (配列番号276)	GCGGCCAGG ATGGTTCCTA GA (配列番号288)	TCTAAGAACC ATCCTGGCC GC (配列番号300)
271	CDS	GCTTCGTGCT AAACTGGTA (配列番号265)	TACCAGTTTA GCACGAAGC (配列番号277)	GAGCTTCGT GCTAAACTG GTA (配列番号289)	TACCAGTTTA GCACGAAGC TC (配列番号301)
393	CDS	GGGCGTGAC TTCCACATGA (配列番号266)	TCATGTGGAA GTCACGCC (配列番号278)	ACGGGCGTG ACTTCCACAT GA (配列番号290)	TCATGTGGAA GTCACGCC GT (配列番号302)
1497	3' UTR	CAGGCCTAG AGAAGTTTCA (配列番号267)	TGAAACTTCT CTAGGCCTG (配列番号279)	TGCAGGCCT AGAGAAGTTT CA (配列番号291)	TGAAACTTCT CTAGGCCTG CA (配列番号303)
1863	3' UTR	CTTGGAACC CATTCCCTGAA (配列番号268)	TTCAGGAATG GGTCCAAG (配列番号280)	TCCTTGGAAC CCATTCCCTGA A (配列番号292)	TTCAGGAATG GGTCCAAG GA (配列番号304)
1866	3' UTR	GGAACCCAT TCCTGAAATT (配列番号269)	AATTTTCAGGA ATGGGTTC (配列番号281)	TTGGAACCC ATTCCTGAAA TT (配列番号293)	AATTTTCAGGA ATGGGTTC AA (配列番号305)

10

20

30

【表 3 0】

1867	3' UTR	GAACCCATTC CTGAAATTA (配列番号270)	TAATTTTCAGG AATGGGTTCC (配列番号282)	TGGAACCCAT TCCTGAAATT A (配列番号294)	TAATTTTCAGG AATGGGTTCC A (配列番号306)
1868	3' UTR	AACCCATTCC TGAAATTAT (配列番号271)	ATAATTTTCAG GAATGGGTT (配列番号283)	GGAACCCATT CCTGAAATTA T (配列番号295)	ATAATTTTCAG GAATGGGTTCC C (配列番号307)
1869	3' UTR	ACCCATTCCT GAAATTATT (配列番号272)	AATAATTTCA GGAATGGGT (配列番号284)	GAACCCATTC CTGAAATTAT T (配列番号296)	AATAATTTCA GGAATGGGTT C (配列番号308)
1870	3' UTR	CCCATTCCTG AAATTATTT (配列番号273)	AAATAATTTTC AGGAATGGG (配列番号285)	AACCCATTCC TGAAATTATT T (配列番号297)	AAATAATTTTC AGGAATGGG TT (配列番号309)
2079	3' UTR	CTGTGGTTCT ATTATATTA (配列番号274)	TAATATAATA GAACCACAG (配列番号286)	CCCTGTGGTT CTATTATATT A (配列番号298)	TAATATAATA GAACCACAG GG (配列番号310)
2109	3' UTR	AAATATGAGA GCATGCTAA (配列番号275)	TTAGCATGCT CTCATATTT (配列番号287)	TTAAATATGA GAGCATGCT AA (配列番号299)	TTAGCATGCT CTCATATTTA A (配列番号311)

10

20

【 0 7 0 2】

ある態様において、阻害シグナルの阻害剤は、例えば阻害分子に結合する抗体または抗体フラグメントであってもよい。例えば、薬剤は、PD1、PD-L1、PD-L2またはCTLA4に結合する抗体または抗体フラグメントであってもよい(例えば、イピリムマブ(また、MDX-010およびMDX-101とも称され、Yervoy(登録商標)として販売されている; Bristol-Myers Squibb; トレメリムマブ(Pfizerより入手可能なIgG2モノクローナル抗体、以前はチシリムマブとして公知、CP-675,206))。ある態様において、薬剤は、TIM3に結合する抗体または抗体フラグメントである。ある態様において、薬剤は、LAG3に結合する抗体または抗体フラグメントである。ある態様において、CAR発現細胞の活性を増強する薬剤、例えば、阻害分子の阻害剤を、同種異系のCAR、例えば、ここに記載される(例えば、本明細書の「同種異系のCAR」節において説明される)同種異系のCARと組み合わせて投与する。

30

40

【 0 7 0 3】

PD-1は、CD28、CTLA-4、ICOSおよびBTLAも包含する受容体のCD28ファミリーの阻害性の一員である。PD-1は、活性化されたB細胞、T細胞および骨髄細胞で発現される(Agata et al. 1996 Int. Immunol 8:765-75)。PD-1、PD-L1およびPD-L2に関する2リガンドは、PD-1に結合する際にT細胞の活性化を下方調節することが示されている(Freeman et al. 2000 J Exp Med 192:1027-34; Latchman et al. 2001 Nat Immunol 2:261-8; Carter et al. 2002 Eur J Immunol 32:634-43)。PD-L1は、ヒト癌において豊富である(Dong et al. 2003 J Mol Med 81:281-7; Blank et al. 2005 Cancer Immunol. Immunother 54:307-314; Konishi et al. 2004 Clin Cancer Res 10:5094)。免疫抑制は、PD-1とPD-L1との局所的な相互作用を阻害す

50

ることによって、回復させることができる。当業界では、PD-1、PD-L1およびPD-L2の、抗体、抗体フラグメントおよび他の阻害剤が利用可能であり、ここに記載される本発明のCARと組み合わせて使用することができる。例えば、ニボルマブ(また、BMS-936558またはMDX1106とも称される; Bristol-Myers Squibb)は、PD-1を特異的にブロックする完全ヒトIgG4モノクローナル抗体である。PD-1に特異的に結合するニボルマブ(クローン5C4)および他のヒトモノクローナル抗体は、US8,008,449およびWO2006/121168に開示されている。ピジリズマブ(Pidilizumab)(CT-011; Cure Tech)は、PD-1ピジリズマブに結合するヒト化IgG1kモノクローナル抗体であり、他のヒト化抗PD-1モノクローナル抗体は、WO2009/101611に開示されている。ペンブロリズマブ(かつては、ランプロリズマブとして公知であり、また、MK03475とも称する; Merck)とは、PD-1に結合するヒト化IgG4モノクローナル抗体である。ペンブロリズマブおよび他のヒト化抗PD-1抗体は、US8,354,509およびWO2009/114335において開示されている。MED14736(Medimmune)は、PD-L1に結合するヒトモノクローナル抗体であり、リガンドの、PD1との相互作用を阻害する。MDPL3280A(Genentech/Roche)は、PD-L1に結合するヒトFcに最適化されたIgG1モノクローナル抗体である。MDPL3280Aおよび他のPD-L1に対するヒトモノクローナル抗体は、米国特許第7,943,743号および米国特許出願公開第20120039906号に開示されている。他の抗PD-L1結合剤としては、YW243.55.S70(WO2010/077634において、重鎖および軽鎖可変領域は、配列番号20および21に示される)およびMDX-1105(また、BMS-936559とも称され、例えばWO2007/005874で開示された抗PD-L1結合剤である)が挙げられる。AMP-224(B7-DCIg; アンプリミューン; 例えば、WO2010/027827およびWO2011/066342で開示されたもの)は、PD-1とB7-H1との相互作用をブロックするPD-L2Fc融合可溶性受容体である。他の抗PD-1抗体としては、なかでもAMP514(アンプリミューン)が挙げられ、例えば、US8,609,089、US2010028330および/またはUS20120114649で開示された抗PD-1抗体である。

【0704】

TIM3(T細胞免疫グロブリン3)もまた、特に、IFN- γ を分泌するCD4⁺1型ヘルパーT細胞およびCD8⁺1型細胞毒性T細胞において、T細胞の機能を負に調節し、T細胞の枯渇において極めて重要な役割を果たす。TIM3と、そのリガンド、例えば、ガレクチン9(Gal9)、ホスファチジルセリン(PS)およびHMGB1との相互作用の阻害は、免疫応答を増加させ得る。当業界では、TIM3およびそのリガンドの抗体、抗体フラグメントおよび他の阻害剤が利用可能であり、ここに記載されるCD19CARと組み合わせて使用することができる。例えば、TIM3を標的とする、抗体、抗体フラグメント、低分子またはペプチド阻害剤は、TIM3のIgVドメインに結合して、そのリガンドとの相互作用を阻害する。TIM3を阻害する抗体およびペプチドは、WO2013/006490およびUS20100247521において開示されている。他の抗TIM3抗体は、RMT3-23(Ngiow et al., 2011, Cancer Res, 71:3540-3551において開示されている)およびクローン8B.2C12(Monney et al., 2002, Nature, 415:536-541において開示されている)のヒト化形を含む。TIM3およびPD-1を阻害する二特異性抗体は、US20130156774において開示されている。

【0705】

他の態様において、CAR発現細胞の活性を増強する薬剤は、CEACAM阻害剤(例えば、CEACAM-1、CEACAM-3および/またはCEACAM-5阻害剤)である。ある態様において、CEACAMの阻害剤は、抗CEACAM抗体分子である。例示的な抗CEACAM-1抗体は、WO2010/125571、WO2013/082366、WO2014/059251およびWO2014/022332において説明されており、例えば、US2004/0047858、US7,132,255およびWO9

10

20

30

40

50

9 / 0 5 2 5 5 2 において説明されている、例えば、モノクローナル抗体である、3 4 B 1、2 6 H 7 および 5 F 4 またはこれらの組換え形態である。他の態様において、抗 C E A C A M 抗体は、例えば、Zheng et al. PLoS One. 2010 Sep 2;5(9). pii: e12529 (DOI :10:1371/journal.pone.0021146) において説明されている C E A C A M - 5 に結合するかまたは例えば、W O 2 0 1 3 / 0 5 4 3 3 1 および U S 2 0 1 4 / 0 2 7 1 6 1 8 において説明されている、C E A C A M - 1 および C E A C A M - 5 と交差反応する。

【 0 7 0 6 】

理論に縛られるつもりはないが、C E A C A M - 1 および C E A C A M - 5 などの癌胎児性抗原細胞接着分子(C E A C A M)は、少なくとも部分的に、抗腫瘍免疫応答の阻害を媒介すると考えられる(例えば、Markel et al. J Immunol. 2002 Mar 15;168(6):2803-10 ; Markel et al. J Immunol. 2006 Nov 1;177(9):6062-71; Markel et al. Immunology. 2009 Feb;126(2):186-200; Markel et al. Cancer Immunol Immunother. 2010 Feb;59(2) :215-30; Ortenberg et al. Mol Cancer Ther. 2012 Jun;11(6):1300-10; Stern et al. J Immunol. 2005 Jun 1;174(11):6692-701; Zheng et al. PLoS One. 2010 Sep 2;5(9). pii: e12529を参照されたい)。例えば、C E A C A M - 1 は、T I M - 3 に対する異好性リガンドとして、T I M - 3 に媒介されるT細胞の忍容性および枯渇において、役割を果たすものとして説明されている(例えば、W O 2 0 1 4 / 0 2 2 3 3 2 ; Huang, et al. (2014) Nature doi:10.1038/nature13848を参照されたい)。ある態様において、C E A C A M - 1 および T I M - 3 の共遮断は、異種移植片結腸直腸癌モデルにおいて、抗腫瘍免疫応答を増強することが示されている(例えば、W O 2 0 1 4 / 0 2 2 3 3 2 ; Huang, et al. (2014), supraを参照されたい)。他の態様において、C E A C A M - 1 および P D - 1 の共遮断は、例えば、W O 2 0 1 4 / 0 5 9 2 5 1 において説明されている、T細胞忍容性を低減する。したがって、C E A C A M 阻害剤は、癌、例えば、黒色腫、肺癌(例えば、N S C L C)、膀胱癌、結腸癌、卵巣癌およびここに記載される他の癌に対する免疫応答を増強するのに、ここに記載される他のイムノモジュレーター(例えば、抗 P D - 1 および / または抗 T I M - 3 阻害剤)と共に使用することができる。

【 0 7 0 7 】

L A G 3 (リンパ球活性化遺伝子3またはC D 2 2 3)は、活性化したT細胞およびB細胞において発現される細胞表面分子であって、C D 8 ⁺ T細胞の枯渇において役割を果たすことが示されている細胞表面分子である。当業界では、L A G 3 およびそのリガンドの抗体、抗体フラグメントおよび他の阻害剤が利用可能であり、ここに記載されるC D 1 9 C A R と組み合わせ使用することができる。例えば、B M S - 9 8 6 0 1 6 (Bristol-Myers Squib)は、L A G 3 を標的とするモノクローナル抗体である。I M P 7 0 1 (Immutep)は、L A G 3 アンタゴニスト抗体であり、I M P 7 3 1 (ImmutepおよびGlaxoSmith Kline)は、L A G 3 枯渇抗体である。他のL A G 3 阻害剤は、L A G 3 の可溶性部分と、M H C クラスII分子に結合し、抗原提示細胞(A P C)を活性化させる、I g との組換え融合タンパク質である、I M P 3 2 1 (Immutep)を含む。他の抗体は、例えば、W O 2 0 1 0 / 0 1 9 5 7 0 において開示されている。

【 0 7 0 8 】

ある態様において、C A R 発現細胞の活性を強化する薬剤は、例えば、第一のドメインおよび第二のドメインを含む融合タンパク質であってもよく、ここで第一のドメインは阻害分子またはそれらのフラグメントであり、第二のドメインは、陽性シグナルと結合するポリペプチドであり、例えば、本明細書で説明したような細胞内シグナル伝達ドメインを含むポリペプチドである。ある態様において、陽性シグナルと結合するポリペプチドとしては、C D 2 8、C D 2 7、I C O S の共刺激ドメイン、例えば、C D 2 8、C D 2 7 および / または I C O S の細胞内シグナル伝達ドメインおよび / または例えば、本明細書で説明されたような、例えばC D 3 ゼータの一次シグナル伝達ドメインを挙げることができる。ある態様において、融合タンパク質は、C A R を発現した同じ細胞によって発現される。別の態様において、融合タンパク質は、細胞、例えば抗 C L L - 1 C A R を発現しないT細胞によって発現される。

10

20

30

40

50

【0709】

ある態様において、ここに記載されるCAR発現細胞の活性を強化する薬剤は、miR-17-92である。

【0710】

ある態様において、ここに記載されるCARの活性を増強する薬剤は、サイトカインである。サイトカインは、T細胞の拡大、分化、生存およびホメオスタシスに関する、重要な機能を有する。ここに記載されるCAR発現細胞を施される対象に投与し得るサイトカインは、IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15、IL-18およびIL-21またはこれらの組合せを含む。好ましい態様において、投与されるサイトカインは、IL-7、IL-15またはIL-21またはこれらの組合せである。サイトカインは、毎日1回または毎日1回を超えて、例えば、毎日2回、毎日3回または毎日4回投与することができる。サイトカインは、1日超にわたり投与することができ、例えば、サイトカインを、2日間にわたり、3日間、4日間、5日間、6日間、1週間、2週間、3週間または4週間にわたり投与する。例えば、サイトカインを、毎日1回ずつ7日間にわたり投与する。

10

【0711】

ある態様において、サイトカインを、CAR発現T細胞と組み合わせて投与する。サイトカインは、CAR発現T細胞と同時に投与することもでき、並列して、例えば、同じ日に投与することもできる。サイトカインは、CAR発現T細胞と同じ医薬組成物中に調製することもでき、別個の医薬組成物中に調製することもできる。あるいは、サイトカインは、CAR発現T細胞の投与の直後に、例えば、CAR発現T細胞の投与の1日後、2日後、3日後、4日後、5日後、6日後または7日後に投与することができる。サイトカインを、1日超にわたり施される投与レジメンにおいて投与する、態様において、サイトカイン投与レジメンの1日目は、CAR発現T細胞の投与と同じ日であってもよく、サイトカイン投与レジメンの1日目は、CAR発現T細胞の投与の1日後、2日後、3日後、4日後、5日後、6日後または7日後であってもよい。ある態様において、1日目に、CAR発現T細胞を、対象に投与し、2日目に、サイトカインを、毎日1回ずつ、次の7日間にわたり投与する。好ましい態様において、CAR発現T細胞と組み合わせて投与されるサイトカインは、IL-7、IL-15またはIL-21である。

20

【0712】

他の態様において、サイトカインを、CAR発現細胞の投与後、ある期間にわたり、例えば、CAR発現細胞を投与して、少なくとも2週間、3週間、4週間、6週間、8週間、10週間、12週間、4カ月間、5カ月間、6カ月間、7カ月間、8カ月間、9カ月間、10カ月間、11カ月間、もしくは1年間以上の後に投与する。ある態様において、サイトカインを、対象の、CAR発現細胞への応答を評価した後で投与する。例えば、対象に、ここに記載される投与量およびレジメンに従い、CAR発現細胞を投与する。ここに記載される方法のいずれかを使用して、対象の、CAR発現細胞療法への応答であって、腫瘍増殖の阻害、循環腫瘍細胞の低減または腫瘍の退縮を含む応答を、CAR発現細胞を投与した、2週間、3週間、4週間、6週間、8週間、10週間、12週間、4カ月間、5カ月間、6カ月間、7カ月間、8カ月間、9カ月間、10カ月間、11カ月間、もしくは1年間以上の後に評価する。CAR発現細胞療法に対して十分な応答を呈示しない対象には、サイトカイン投与することができる。CAR発現細胞療法に対する応答が最適未満である対象へのサイトカインの投与は、CAR発現細胞の効能または抗癌活性を改善する。好ましい態様において、CAR発現細胞の投与の後で投与されるサイトカインは、IL-7である。

30

40

【0713】

mTOR阻害剤の、免疫を増強する低用量との組合せ

ここに記載される方法は、mTOR阻害剤、例えば、RAD001など、ラパログを含む、mTORのアロステリック阻害剤の、免疫を増強する低用量を使用する。mTOR阻害剤の、免疫を増強する低用量(例えば、免疫系を完全に抑制するには不十分であるが、

50

免疫機能を改善するには十分な用量)の投与は、対象における免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはCAR発現細胞の性能を最適化し得る。mTORの阻害を測定するための方法、投与量、処置レジメンおよび適切な医薬組成物は、参照により本明細書に組み入れられる、米国特許出願第2015/01240036号において説明されている。

【0714】

ある態様において、mTOR阻害剤の、免疫を増強する低用量の投与は、以下：

i) PD-1陽性免疫エフェクター細胞の数の減少；
ii) PD-1陰性免疫エフェクター細胞の数の増加；
iii) PD-1陰性免疫エフェクター細胞 / PD-1陽性免疫エフェクター細胞の比の増加；

10

iv) ナイーブT細胞の数の増加；

v) 例えば、メモリーT細胞、例えば、メモリーT細胞前駆体における、以下のマーカー：CD62L^{high}、CD127^{high}、CD27⁺およびBCL2、の1以上の発現の増加；

vi) 例えば、メモリーT細胞、例えば、メモリーT細胞前駆体における、KLRG1の発現の減少；または

vii) メモリーT細胞前駆体、例えば、以下の特徴：CD62L^{high}の増加、CD127^{high}の増加、CD27⁺の増加、KLRG1の減少およびBCL2の増加の任意の1つまたはこれらの組合せを有する細胞の数の増加；

の1以上を結果としてもたらすことが可能であり、

20

ここで、前出、例えば、i)、ii)、iii)、iv)、v)、vi)またはvii)のいずれかは、例えば、処置されていない対象と比較して、例えば、少なくとも一過性に生じる。

【0715】

別の態様において、mTOR阻害剤の、免疫を増強する低用量の投与は、例えば、培養物または対象における、CAR発現細胞の増殖または持続性の、例えば、処置されていないCAR発現細胞または処置されていない対象と比較した増加または延長を結果としてもたらす。ある態様において、増殖の増加は、CAR発現細胞の数の増加に関連する。増殖の増加または延長を測定するための方法は、実施例8および9において説明されている。

別の態様において、mTOR阻害剤の、免疫を増強する低用量の投与は、例えば、培養物または対象における、CAR発現細胞による癌細胞の殺滅の、例えば、処置されていないCAR発現細胞または処置されていない対象と比較した増加を結果としてもたらす。ある態様において、癌細胞の殺滅の増加は、腫瘍容量の減少に関連する。癌細胞の殺滅の増加を測定するための方法は、本明細書の実施例2において説明される。

30

【0716】

ある態様において、CAR分子、例えば、ここに記載されるCAR分子を発現する細胞を、mTOR阻害剤、例えば、mTORのアロステリック阻害剤、例えば、RAD001またはmTORの触媒阻害剤の、免疫を増強する低用量と組み合わせて投与する。例えば、mTOR阻害剤の、免疫を増強する低用量の投与は、ここに記載されるCAR発現細胞の投与の前に開始し、ここに記載されるCAR発現細胞の投与の前に完了することもでき、ここに記載されるCAR発現細胞の投与と同時に開始し、ここに記載されるCAR発現細胞の投与と重複させることもでき、ここに記載されるCAR発現細胞の投与の後で持続することもできる。

40

【0717】

これとは別にまたはこれに加えて、mTOR阻害剤の、免疫を増強する低用量の投与は、ここに記載されるCAR分子を発現するように加工される、免疫エフェクター細胞を最適化することができる。このような態様において、mTOR阻害剤、例えば、アロステリック阻害剤、例えば、RAD001または触媒阻害剤の、免疫を増強する低用量の投与を、ここに記載されるCAR分子を発現するように加工される、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞の、対象からの採取の前に開始または完了する。

【0718】

50

別の態様において、ここに記載されるCAR分子を発現するように加工される、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞を、例えば、対象からの採取の後で、mTOR阻害剤の、免疫を増強する低用量の存在下において培養することもでき、CAR発現免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞またはNK細胞を、例えば、対象への投与の前に、mTOR阻害剤の、免疫を増強する低用量の存在下において培養することもできる。

【0719】

ある態様において、対象への、mTOR阻害剤の、免疫を増強する低用量の投与は、例えば、毎週1回、例えば、即放剤形で、0.1~20mg、0.5~10mg、2.5~7.5mg、3~6mg、もしくは約5mgのRAD001またはその生物学的同等用量を投与することを含む。ある態様において、対象への、mTOR阻害剤の、免疫を増強する低用量の投与は、例えば、毎週1回、例えば、徐放剤形で、0.3~60mg、1.5~30mg、7.5~22.5mg、9~18mg、もしくは約15mgのRAD001またはその生物学的同等用量を投与することを含む。

10

【0720】

ある態様において、mTOR阻害剤の用量は、少なくとも5%であるが90%を超えないか、少なくとも10%であるが90%を超えないか、少なくとも15%であるが90%を超えないか、少なくとも20%であるが90%を超えないか、少なくとも30%であるが90%を超えないか、少なくとも40%であるが90%を超えないか、少なくとも50%であるが90%を超えないか、少なくとも60%であるが90%を超えないか、少なくとも70%であるが90%を超えないか、少なくとも5%であるが80%を超えないか、少なくとも10%であるが80%を超えないか、少なくとも15%であるが80%を超えないか、少なくとも20%であるが80%を超えないか、少なくとも30%であるが80%を超えないか、少なくとも40%であるが80%を超えないか、少なくとも50%であるが80%を超えないか、少なくとも60%であるが80%を超えないか、少なくとも5%であるが70%を超えないか、少なくとも10%であるが70%を超えないか、少なくとも15%であるが70%を超えないか、少なくとも20%であるが70%を超えないか、少なくとも30%であるが70%を超えないか、少なくとも40%であるが70%を超えないか、少なくとも50%であるが70%を超えないか、少なくとも5%であるが60%を超えないか、少なくとも10%であるが60%を超えないか、少なくとも15%であるが60%を超えないか、少なくとも20%であるが60%を超えないか、少なくとも30%であるが60%を超えないか、少なくとも40%であるが60%を超えないか、少なくとも5%であるが50%を超えないか、少なくとも10%であるが50%を超えないか、少なくとも15%であるが50%を超えないか、少なくとも20%であるが50%を超えないか、少なくとも30%であるが50%を超えないか、少なくとも40%であるが50%を超えないか、少なくとも5%であるが40%を超えないか、少なくとも10%であるが40%を超えないか、少なくとも15%であるが40%を超えないか、少なくとも20%であるが40%を超えないか、少なくとも30%であるが40%を超えないか、少なくとも35%であるが40%を超えないか、少なくとも5%であるが30%を超えないか、少なくとも10%であるが30%を超えないか、少なくとも15%であるが30%を超えないか、少なくとも20%であるが30%を超えないかまたは少なくとも25%であるが30%を超えない、mTORの阻害に関連するかまたはmTORの阻害をもたらす。

20

30

40

【0721】

mTOR阻害の程度は、P70 S6キナーゼ阻害の程度として伝え得るかまたはこれに対応し得る、例えば、mTOR阻害の程度は、P70 S6キナーゼ活性の減少のレベルにより、例えば、P70 S6キナーゼ基質のリン酸化の減少により決定することができる。mTOR阻害のレベルは、参照により本明細書に組み入れられる、米国特許出願第2015/01240036号において説明されているまたは参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第7,727,950号において説明されている、ブーレーアッセイにより、P70 S6キナーゼ活性を測定すること；ウェスタンブロットによりリン酸化したS6のレベルを測定すること；またはPD1陰性免疫エフェクター細胞の、PD1陽

50

性免疫エフェクター細胞に対する比の変化を評価することなど、種々の方法により評価することができる。

【0722】

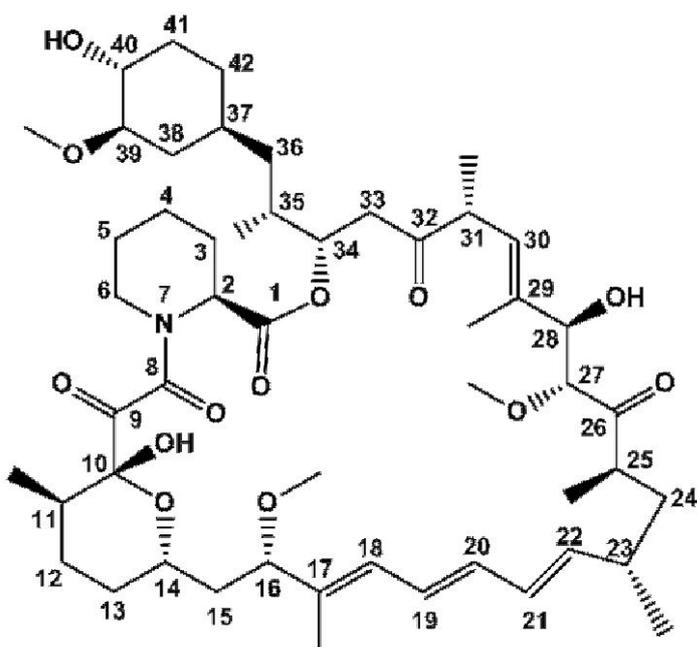
本明細書で使用される場合、用語「mTOR阻害剤」は、細胞内のmTORキナーゼを阻害する化合物もしくはリガンドまたは薬学的に許容されるその塩を指す。ある態様において、mTOR阻害剤は、アロステリック阻害剤である。mTORのアロステリック阻害剤は、中性の三環式化合物であるラパマイシン(シロリムス)、ラパマイシンと構造的類似性および機能的な類似性を有する化合物であり、例えば、ラパマイシン誘導体、ラパマイシン類似体(ラパログともまた称する)を含む、ラパマイシン関連化合物およびmTOR活性を阻害する、他のマクロリド化合物を含む。ある態様において、mTOR阻害剤は、触媒阻害剤である。

10

【0723】

ラパマイシンとは、*Streptomyces hygroscopicus*により産生される、公知のマクロリド抗生剤であって、式Aに示される構造を有する抗生剤である。

【化8】



20

30

(A)

【0724】

例えば、McAlpine, J.B., et al., *J. Antibiotics* (1991) 44: 688; Schreiber, S.L., et al., *J. Am. Chem. Soc.* (1991) 113: 7433; 米国特許第3,929,992号を参照されたい。ラパマイシンについては、種々の番号付けスキームが提起されている。混乱を回避するために、本明細書では、具体的なラパマイシン類似体を名づける場合、式Aの番号付けスキームを使用する、ラパマイシンを参照して、名称を与える。

40

【0725】

本発明において有用なラパマイシン類似体は、例えば、ラパマイシンのシクロヘキシル環におけるヒドロキシル基を、OR₁[式中、R₁は、ヒドロキシアルキル、ヒドロキシアルコキシアルキル、アシルアミノアルキルまたはアミノアルキルである]により置きかえた、O置換された類似体；例えば、各々の内容が参照により組み入れられる、US5,665,772およびWO94/09010において説明されている、エベロリムスとしてもまた公知のRAD001である。他の適切なラパマイシン類似体は、26位または28位において置換されたラパマイシン類似体を含む。ラパマイシン類似体は、上述の類似体のエピマー、特に、40、28または26位において置換された類似体のエピマーであることが可能であり、例えば、それらの内容が参照により組み入れられるUS6,015,

50

815、WO95/14023およびWO99/15530において説明されている通り、さらに水素化してもよく、例えば、ゾタロリムスとしてもまた公知のABT578またはそれらの内容が参照により組み入れられる、US7,091,213、WO98/02441およびWO01/14387において説明されている、ラパマイシン類似体、例えば、リダホロリムスとしてもまた公知のAP23573であり得る。

【0726】

本発明における使用に適するラパマイシン類似体の例であって、US5,665,772による例は、40-O-ベンジル-ラパマイシン、40-O-(4'-ヒドロキシメチル)ベンジル-ラパマイシン、40-O-[4'-(1,2-ジヒドロキシエチル)]ベンジル-ラパマイシン、40-O-アリル-ラパマイシン、40-O-[3'-(2,2-ジメチル-1,3-ジオキサラン-4(S)-イル)-プロパ-2'-エン-1'-イル]-ラパマイシン、(2'E,4'S)-40-O-(4',5'-ジヒドロキシペンタ-2'-エン-1'-イル)-ラパマイシン、40-O-(2-ヒドロキシ)エトキシカルボニルメチル-ラパマイシン、40-O-(2-ヒドロキシ)エチル-ラパマイシン、40-O-(3-ヒドロキシ)プロピル-ラパマイシン、40-O-(6-ヒドロキシ)ヘキシル-ラパマイシン、40-O-[2-(2-ヒドロキシ)エトキシ]エチル-ラパマイシン、40-O-[(3S)-2,2-ジメチルジオキサラン-3-イル]メチル-ラパマイシン、40-O-[(2S)-2,3-ジヒドロキシプロパ-1-イル]-ラパマイシン、40-O-(2-アセトキシ)エチル-ラパマイシン、40-O-(2-ニコチノイルオキシ)エチル-ラパマイシン、40-O-[2-(N-モルホリノ)アセトキシ]エチル-ラパマイシン、40-O-(2-N-イミダゾリルアセトキシ)エチル-ラパマイシン、40-O-[2-(N-メチル-N'-ピペラジニル)アセトキシ]エチル-ラパマイシン、39-O-デスメチル-39,40-O,0-エチレン-ラパマイシン、(26R)-26-ジヒドロ-40-O-(2-ヒドロキシ)エチル-ラパマイシン、40-O-(2-アミノエチル)-ラパマイシン、40-O-(2-アセトアミノエチル)-ラパマイシン、40-O-(2-ニコチンアミドエチル)-ラパマイシン、40-O-(2-(N-メチル-イミダゾ-2'-イル)カルボエトキサミド)エチル-ラパマイシン、40-O-(2-エトキシカルボニルアミノエチル)-ラパマイシン、40-O-(2-トリルスルホンアミドエチル)-ラパマイシンおよび40-O-[2-(4',5'-ジカルボエトキシ-1',2',3'-トリアゾール-1'-イル)-エチル]-ラパマイシンを含むが、これらに限定されない。

【0727】

本発明において有用な他のラパマイシン類似体は、ラパマイシンのシクロヘキシル環におけるヒドロキシル基および/または28位におけるヒドロキシ基を、ヒドロキシエステル基により置きかえた類似体であり、例えば、USRE44,768において見出されるラパマイシン類似体、例えば、テムシロリムスが公知である。

【0728】

本発明において有用な他のラパマイシン類似体は、16位におけるメトキシ基を、別の置換基、好ましくはアルキニルオキシ、ベンジル、オルトメトキシベンジル、もしくはクロロベンジルにより置きかえ(ヒドロキシ適宜置換される)、かつ/またはラパマイシンのシクロヘキシル環が、39位のメトキシ基を欠くシクロペンチル環となるように、39位におけるメトキシ基を、39炭素と併せて欠失させた類似体であって、例えば、それらの内容が参照により組み入れられる、WO95/16691およびWO96/41807において説明されている類似体を含む。類似体は、ラパマイシンの40位におけるヒドロキシをアルキル化し、かつ/または32カルボニルを還元するように、さらに改変することができる。

【0729】

WO95/16691によるラパマイシン類似体は、16-デメトキシ-16-(ペンタ-2-イニル)オキシ-ラパマイシン、16-デメトキシ-16-(ブタ-2-イニル)オキシ-ラパマイシン、16-デメトキシ-16-(プロパルギル)オキシ-ラパマイシン、16-デメトキシ-16-(4-ヒドロキシ-ブタ-2-イニル)オキシ-ラパマイシン

10

20

30

40

50

、 16 - デメトキシ - 16 - ベンジルオキシ - 40 - O - (2 - ヒドロキシエチル) - ラパマイシン、 16 - デメトキシ - 16 - ベンジルオキシ - ラパマイシン、 16 - デメトキシ - 16 - オルト - メトキシベンジル - ラパマイシン、 16 - デメトキシ - 40 - O - (2 - メトキシエチル) - 16 - ペンタ - 2 - イニル)オキシ - ラパマイシン、 39 - デメトキシ - 40 - デスオキシ - 39 - ホルミル - 42 - ノル - ラパマイシン、 39 - デメトキシ - 40 - デスオキシ - 39 - ヒドロキシメチル - 42 - ノル - ラパマイシン、 39 - デメトキシ - 40 - デスオキシ - 39 - カルボキシ - 42 - ノル - ラパマイシン、 39 - デメトキシ - 40 - デスオキシ - 39 - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル)カルボニル - 42 - ノル - ラパマイシン、 39 - デメトキシ - 40 - デスオキシ - 39 - (モルホリン - 4 - イル)カルボニル - 42 - ノル - ラパマイシン、 39 - デメトキシ - 40 - デスオキシ - 39 - [N - メチル、 N - (2 - ピリジン - 2 - イル - エチル)]カルバモイル - 42 - ノル - ラパマイシンおよび 39 - デメトキシ - 40 - デスオキシ - 39 - (p - トルエン スルホニルヒドラゾノメチル) - 42 - ノル - ラパマイシンを含むが、これらに限定されない。

10

【0730】

WO96/41807によるラパマイシン類似体は、 32 - デオキソ - ラパマイシン、 16 - O - ペント - 2 - イニル - 32 - デオキソ - ラパマイシン、 16 - O - ペント - 2 - イニル - 32 - デオキソ - 40 - O - (2 - ヒドロキシ - エチル) - ラパマイシン、 16 - O - ペント - 2 - イニル - 32 - (S) - ジヒドロ - 40 - O - (2 - ヒドロキシエチル) - ラパマイシン、 32 (S) - ジヒドロ - 40 - O - (2 - メトキシ)エチル - ラパマイシン および 32 (S) - ジヒドロ - 40 - O - (2 - ヒドロキシエチル) - ラパマイシンを含むが、これらに限定されない。

20

【0731】

別の適切なラパマイシン類似体は、その内容が参照により組み入れられる、US2005/0101624において説明されている、ウミロリムスである。

【0732】

他にエベロリムス[Affinitor(登録商標)]としても公知のRAD001は、各々の内容が参照により組み入れられる、US5,665,772およびWO94/09010において説明されている通り、化学名(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28E,30S,32S,35R) - 1,18 - ジヒドロキシ - 12 - {(1R) - 2 - [(1S,3R,4R) - 4 - (2 - ヒドロキシエトキシ) - 3 - メトキシシクロヘキシル] - 1 - メチルエチル} - 19,30 - ジメトキシ - 15,17,21,23,29,35 - ヘキサメチル - 11,36 - ジオキサ - 4 - アザ - トリシクロ[30.3.1.04,9]ヘキサトリアコンタ - 16,24,26,28 - テトラエン - 2,3,10,14,20 - ペンタオンを有する。

30

【0733】

mTORのアロステリック阻害剤のさらなる例は、シロリムス(ラパマイシン、AY-22989)、40 - [3 - ヒドロキシ - 2 - (ヒドロキシメチル) - 2 - メチル - プロパノエート] - ラパマイシン(テムシロリムスまたはCCI-779ともまた呼ばれる)およびリダホロリムス(AP-23573/MK-8669)を含む。mTorのアロステリック阻害剤の他の例は、ゾタロリムス(ABT578)およびウミロリムスを含む。

40

【0734】

これとは別にまたはこれに加えて、mTORキナーゼドメインを直接標的とし、mTORC1およびmTORC2の両方を標的とする、mTORのATP競合型触媒阻害剤も見出されている。これらはまた、4EBP1-T37/46のリン酸化およびキャップ依存性翻訳など、ラパマイシン耐性mTORC1のアウトプットをモジュレートするため、ラパマイシンなど、mTORのアロステリック阻害剤より有効な、mTORC1の阻害剤でもある。

【0735】

触媒阻害剤は、BEZ235、もしくは 2 - メチル - 2 - [4 - (3 - メチル - 2 - オキ

50

ソ - 8 - キノリン - 3 - イル - 2, 3 - ジヒドロ - イミダゾ[4, 5 - c]キノリン - 1 - イル) - フェニル] - プロピオニトリルまたはモノチル酸塩形態 (B E Z 2 3 5 の合成は、W O 2 0 0 6 / 1 2 2 8 0 6 において説明されている ; 化学名 { 5 - [2, 4 - ビス - ((S) - 3 - メチル - モルホリン - 4 - イル) - ピリド [2, 3 d] ピリミジン - 7 - イル] - 2 - メトキシ - フェニル } - メタノールを有する、C C G 1 6 8 [他に A Z D - 8 0 5 5 としても公知である ; Chresta, C.M., et al., Cancer Res, 2010, 70(1), 288-298] ; 3 - [2, 4 - ビス [(3 S) - 3 - メチルモルホリン - 4 - イル] ピリド [2, 3 - d] ピリミジン - 7 - イル] - N - メチルベンズアミド (W O 0 9 1 0 4 0 1 9) ; 3 - (2 - アミノベンゾ [d] オキサゾール - 5 - イル) - 1 - イソプロピル - 1 H - ピラゾロ [3, 4 - d] ピリミジン - 4 - アミン (W O 1 0 0 5 1 0 4 3 および W O 2 0 1 3 0 2 3 1 8 4) ; N - (3 - (N - (3 - ((3, 5 - ジメトキシフェニル) アミノ) キノキサリン - 2 - イル) スルファモイル) フェニル) - 3 - メトキシ - 4 - メチルベンズアミド (W O 0 7 0 4 4 7 2 9 および W O 1 2 0 0 6 5 5 2) ; 化学名 1 - [4 - [4 - (ジメチルアミノ) ピペリジン - 1 - カルボニル] フェニル] - 3 - [4 - (4, 6 - ジモルホリノ - 1, 3, 5 - トリアジン - 2 - イル) フェニル] 尿素を有する、P K I - 5 8 7 (Venkatesan, A.M., J. Med.Chem., 2010, 53, 2636-2645) ; 化学名 2, 4 - ジフルオロ - N - { 2 - メトキシ - 5 - [4 - (4 - ピリダジニル) - 6 - キノリニル] - 3 - ピリジニル } ベンゼンスルホンアミドを有する、G S K - 2 1 2 6 4 5 8 (ACS Med. Chem. Lett., 2010, 1, 39-43) ; 5 - (9 - イソプロピル - 8 - メチル - 2 - モルホリノ - 9 H - プリン - 6 - イル) ピリミジン - 2 - アミン (W O 1 0 1 1 4 4 8 4) ; (E) - N - (8 - (6 - アミノ - 5 - (トリフルオロメチル) ピリジン - 3 - イル) - 1 - (6 - (2 - シアノプロパン - 2 - イル) ピリジン - 3 - イル) - 3 - メチル - 1 H - イミダゾ [4, 5 - c] キノリン - 2 (3 H) - イリデン) シアナミド (W O 1 2 0 0 7 9 2 6) を含む。

10

20

【 0 7 3 6 】

さらなる m T O R の触媒阻害剤の例は、8 - (6 - メトキシ - ピリジン - 3 - イル) - 3 - メチル - 1 - (4 - ピペラジン - 1 - イル - 3 - トリフルオロメチル - フェニル) - 1, 3 - ジヒドロ - イミダゾ [4, 5 - c] キノリン - 2 - オン (W O 2 0 0 6 / 1 2 2 8 0 6) および K u - 0 0 6 3 7 9 4 [Garcia-Martinez JM, et al., Biochem J., 2009, 421(1), 29-42 ; K u - 0 0 6 3 7 9 4 とは、ラパマイシンの哺乳動物標的 (m T O R) の特異的阻害剤である] を含む。W Y E - 3 5 4 とは、別の m T o r の触媒阻害剤の例である (Yu K, et al. (2009). Biochemical, Cellular, and In vivo Activity of Novel ATP-Competitive and Selective Inhibitors of the Mammalian Target of Rapamycin. Cancer Res. 69(15): 6232-6240)。

30

【 0 7 3 7 】

本発明に従い有用な m T O R 阻害剤はまた、前出のいずれかのプロドラッグ、誘導体、薬学的に許容される塩または類似体も含む。

【 0 7 3 8 】

R A D 0 0 1 などの m T O R 阻害剤は、ここに記載される特定の投与に基づく、当業界で十分に確立された方法に基づく送達のために製剤化することができる。特に、米国特許第 6, 0 0 4, 9 7 3 号 (参照により本明細書に組み入れられる) は、ここに記載される m T O R 阻害剤と共に使用可能な製剤の例を提示している。

40

【 0 7 3 9 】

C A R の有効性またはサンプルの適性を評価するための方法およびバイオマーカー

別の面において、本発明は、対象 (例えば、癌、例えば、血液癌を有する対象) における、C A R 発現細胞療法 (例えば、C L L - 1 C A R 療法) の有効性または C A R 療法 (例えば、C L L - 1 C A R 療法) のためのサンプル (例えば、アフエレーシスサンプル) の適性を評価またはモニタリングする方法を特徴とする。方法は、C A R 療法の有効性またはサンプルの適性の値を得ることを含み、ここで、前記値は、C A R 発現細胞療法の有効性または適性を指し示す。

【 0 7 4 0 】

50

ある態様において、CAR療法の有効性またはサンプルの適性の値は、以下：

(i) サンプル(例えば、アフエーシスサンプルまたは製造されたCAR発現細胞生成物のサンプル)中の休眠中の $T_{E F F}$ 細胞、休眠中の $T_{R E G}$ 細胞、幼若T細胞(例えば、幼若CD4細胞もしくは幼若CD8細胞またはガンマ/デルタT細胞)、もしくは初期メモリーT細胞またはこれらの組合せの1、2、3以上(例えば、全て)のレベルまたは活性；

(ii) サンプル(例えば、アフエーシスサンプルまたは製造されたCAR発現細胞生成物のサンプル)中の、活性化した $T_{E F F}$ 細胞、活性化した $T_{R E G}$ 細胞、経時T細胞(例えば、経時CD4細胞または経時CD8細胞)、もしくは後期メモリーT細胞またはこれらの組合せの1、2、3以上(例えば、全て)のレベルまたは活性；

(iii) サンプル(例えば、アフエーシスサンプルまたは製造されたCAR発現細胞生成物のサンプル)中の、免疫細胞枯渇マーカー、例えば、1、2以上の免疫チェックポイント阻害剤(例えば、PD-1、PD-L1、TIM-3および/またはLAG-3)のレベルまたは活性。ある態様において、免疫細胞は、枯渇表現型を有する、例えば、少なくとも2枯渇マーカーを共発現する、例えば、PD-1およびTIM-3を共発現する。他の態様において、免疫細胞は、枯渇表現型を有する、例えば、少なくとも2枯渇マーカーを共発現する、例えば、PD-1およびLAG-3を共発現する；

(iv) サンプル(例えば、アフエーシスサンプルまたは製造されたCAR発現細胞生成物のサンプル)中の、例えば、 $CD4^+$ T細胞集団内または $CD8^+$ T細胞集団内の、CD27および/またはCD45RO-(例えば、 $CD27^+ CD45RO^-$)免疫エフェクター細胞のレベルまたは活性；

(v) CCL20、IL-17aおよび/またはIL-6、PD-1、PD-L1、LAG-3、TIM-3、CD57、CD27、CD122、CD62L、KLRG1から選択されるバイオマーカーの1、2、3、4、5、10、20以上のレベルまたは活性；

(vi) CAR発現細胞生成物のサンプル中、例えば、CLL-1発現細胞生成物のサンプル中の、サイトカインのレベルまたは活性(例えば、サイトカインレパートリーの品質)；または

(vii) 製造されたCAR発現細胞生成物のサンプル中の、CAR発現細胞の形質導入効率の1、2、3、4、5、6以上(全て)の尺度を含む。

【0741】

ここに記載した方法のいずれかの、ある態様において、CAR発現細胞療法は、複数のCAR発現免疫エフェクター細胞(例えば、CAR発現免疫エフェクター細胞の集団)、例えば、複数のT細胞またはNK細胞(例えば、T細胞またはNK細胞の集団)またはこれらの組合せを含む。ある態様において、CAR発現細胞療法は、CLL-1 CAR療法である。

【0742】

ここに記載した方法のいずれかの、ある態様において、(i)~(vii)の1以上の尺度は、対象から入手されたアフエーシスサンプルから得る。アフエーシスサンプルは、注入または再注入の前に評価することができる。

【0743】

ここに記載した方法のいずれかの、ある態様において、(i)~(vii)の1以上の尺度は、製造されたCAR発現細胞生成物のサンプル、例えば、CLL-1 CAR発現細胞生成物のサンプルから得る。製造されたCAR発現細胞生成物は、注入または再注入の前に評価することができる。

【0744】

ここに記載した方法のいずれかの、ある態様において、CAR発現細胞療法を施される前に、これを施される時にまたはこれを施された後で、対象を評価する。

【0745】

ここに記載した方法のいずれかの、ある態様において、(i)~(vii)の1以上の尺度は

10

20

30

40

50

、遺伝子発現、フローサイトメトリーまたはタンパク質発現の1以上についてのプロファイルを評価する。

【0746】

ここに記載した方法のいずれかの、ある態様において、方法は、(i)~(vii)の1以上の尺度に基づき、対象を、応答例、非応答例、再発例または非再発例として同定することをさらに含む。

【0747】

ここに記載した方法のいずれかの、ある態様において、応答例(例えば、完全応答例)は、GZMK、PPF1BP2またはナイーブT細胞の1、2以上(全て)の、非応答例と比較して、高度なレベルまたは大きな活性を有するかまたはこれを有するものとして同定される。

10

【0748】

ここに記載した方法のいずれかの、ある態様において、非応答例は、IL22、IL-2RA、IL-21、IRF8、IL8、CCL17、CCL22、エフェクターT細胞または調節性T細胞の1、2、3、4、5、6、7以上(例えば、全て)の、応答例と比較して、高度なレベルまたは大きな活性を有するかまたはこれを有するものとして同定される。

【0749】

ある態様において、再発例とは、以下の遺伝子：MIR199A1、MIR1203、uc021ovp、ITM2CおよびHLA-DQB1の1以上(例えば、以下の遺伝子の2、3、4または全て)の発現レベルの、非再発例と比較した上昇、および/または以下の遺伝子：PPIAL4D、TTY10、TXLNG2P、MIR4650-1、KDM5D、USP9Y、PRKY、RPS4Y2、RPS4Y1、NCRNA00185、SULT1E1およびEIF1AYの1以上(例えば、以下の遺伝子の2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または全て)の発現のレベルの、非再発例と比較した低下を有するかまたはこれを有するものとして同定される患者である。

20

【0750】

ここに記載した方法のいずれかの、ある態様において、完全応答例は、参照値、例えば、非応答例におけるCD8⁺T細胞のパーセンテージと比較して大きな、例えば、統計学的に有意な大きな、CD8⁺T細胞のパーセンテージを有するかまたはこれを有するものとして同定される。

30

【0751】

ここに記載した方法のいずれかの、ある態様において、完全応答例は、参照値、例えば、非応答例におけるCD27⁺CD45RO-免疫エフェクター細胞の数と比較して大きな、例えば、CD8⁺集団内の、CD27⁺CD45RO-免疫エフェクター細胞のパーセンテージを有するかまたはこれを有するものとして同定される。

【0752】

ここに記載した方法のいずれかの、ある態様において、完全応答例または部分応答例は、参照値、例えば、非応答例におけるCD4⁺T細胞のパーセンテージと比較して大きな、例えば、統計学的に有意な大きな、CD4⁺T細胞のパーセンテージを有するかまたはこれを有するものとして同定される。

40

【0753】

ここに記載した方法のいずれかの、ある態様において、完全応答例は、休眠中のT_{EF}細胞、休眠中のT_{REG}細胞、幼若T細胞(例えば、幼若CD4細胞もしくは幼若CD8細胞またはガンマ/デルタT細胞)、もしくは初期メモリーT細胞またはこれらの組合せの1、2、3以上(例えば、全て)の、参照値、例えば、非応答例における休眠中のT_{EF}細胞、休眠中のT_{REG}細胞、幼若T細胞(例えば、幼若CD4細胞または幼若CD8細胞)または初期メモリーT細胞の数と比較して大きなパーセンテージを有するかまたはこれを有するものとして同定される。

【0754】

50

ここに記載した方法のいずれかの、ある態様において、非応答例は、活性化した $T_{E F}$ 細胞、活性化した $T_{R E G}$ 細胞、経時 T 細胞 (例えば、経時 CD 4 細胞または経時 CD 8 細胞)、もしくは後期メモリー T 細胞またはこれらの組合せの 1、2、3 以上 (例えば、全て) の、参照値、例えば、応答例における活性化した $T_{E F F}$ 細胞、活性化した $T_{R E G}$ 細胞、経時 T 細胞 (例えば、経時 CD 4 細胞または経時 CD 8 細胞) または後期メモリー T 細胞の数と比較して大きなパーセンテージを有するかまたはこれを有するものとして同定される。

【0755】

ここに記載した方法のいずれかの、ある態様において、非応答例は、免疫細胞枯渇マーカー、例えば、1、2 以上の免疫チェックポイント阻害剤 (例えば、PD - 1、PD - L 1、TIM - 3 および / またはLAG - 3) 大きなパーセンテージを有するかまたはこれを有するものとして同定される。ある態様において、非応答例は、PD - 1、PD - L 1 またはLAG - 3 を発現する免疫エフェクター細胞 (例えば、CD 4⁺ T 細胞および / またはCD 8⁺ T 細胞) (例えば、CAR 発現 CD 4⁺ 細胞および / またはCD 8⁺ T 細胞) の、応答例に由来する PD - 1 またはLAG - 3 を発現する免疫エフェクター細胞のパーセンテージと比較して大きなパーセンテージを有するかまたはこれを有するものとして同定される。

10

【0756】

ある態様において、非応答例は、枯渇表現型を有する免疫細胞、例えば、少なくとも 2 枯渇マーカーを共発現する、例えば、PD - 1、PD - L 1 および / またはTIM - 3 を共発現する免疫細胞大きなパーセンテージを有するかまたはこれを有するものとして同定される。他の態様において、非応答例は、枯渇表現型を有する免疫細胞、例えば、少なくとも 2 枯渇マーカーを共発現する、例えば、PD - 1 およびLAG - 3 を共発現する免疫細胞が大きなパーセンテージを有するかまたはこれを有するものとして同定される。

20

【0757】

ここに記載した方法のいずれかの、ある態様において、非応答例は、CAR 発現細胞集団 (例えば、CLL - 1 CAR + 細胞集団) 内の PD - 1 / PD - L 1 + / LAG - 3 + 細胞の、CAR 発現細胞療法による応答例 (例えば、完全応答例) と比較して大きなパーセンテージを有するかまたはこれを有するものとして同定される。

【0758】

ここに記載した方法のいずれかの、ある態様において、部分応答例は、CAR 発現細胞集団 (例えば、CLL - 1 CAR + 細胞集団) 内の PD - 1 / PD - L 1 + / LAG - 3 + 細胞の、応答例より高度なパーセンテージを有するかまたはこれを有するものとして同定される。

30

【0759】

ここに記載した方法のいずれかの、ある態様において、非応答例は、CAR 発現細胞集団 (例えば、CLL - 1 CAR + 細胞集団) 内の PD 1 / PD - L 1 + CAR + の枯渇表現型およびLAG 3 の共発現を有するかまたはこれを有するものとして同定される。

【0760】

ここに記載した方法のいずれかの、ある態様において、非応答例は、CAR 発現細胞集団 (例えば、CLL - 1 CAR + 細胞集団) 内の PD - 1 / PD - L 1 + / TIM - 3 + 細胞の、応答例 (例えば、完全応答例) と比較して大きなパーセンテージを有するかまたはこれを有するものとして同定される。

40

【0761】

ここに記載した方法のいずれかの、ある態様において、部分応答例は、CAR 発現細胞集団 (例えば、CLL - 1 CAR + 細胞集団) 内の PD - 1 / PD - L 1 + / TIM - 3 + 細胞の、応答例より高度なパーセンテージを有するかまたはこれを有するものとして同定される。

【0762】

ここに記載した方法のいずれかの、ある態様において、アフエレーシスサンプル中の C

50

CD8⁺ CD27⁺ CD45RO⁻ T細胞の存在は、CAR発現細胞療法(例えば、CLL-1 CAR療法)に対する対象の応答の、陽性の予測因子である。

【0763】

ここに記載した方法のいずれかの、ある態様において、アフエレーシスサンプル中のPD1⁺ CAR⁺ T細胞およびLAG3⁺ T細胞またはTIM3⁺ T細胞の高度なパーセンテージは、CAR発現細胞療法(例えば、CLL-1 CAR療法)に対する対象の応答の、予後不良の予測因子である。

【0764】

ここに記載した方法のいずれかの、ある態様において、応答例(例えば、完全応答例または部分応答例)以下のプロファイル：

(i) CD27⁺ 免疫エフェクター細胞の数が、参照値、例えば、非応答例におけるCD27⁺ 免疫エフェクター細胞の数と比較して大きいこと；

(ii) CD8⁺ T細胞の数が、参照値、例えば、非応答例におけるCD8⁺ T細胞の数と比較して大きいこと；

(iii) 1以上のチェックポイント阻害剤、例えば、PD-1、PD-L1、LAG-3、TIM-3、もしくはKLRG-1またはこれらの組合せから選択されるチェックポイント阻害剤を発現する免疫細胞の数が、参照値、例えば、非応答例における1以上のチェックポイント阻害剤を発現する細胞の数と比較して小さいこと；または

(iv) 休眠中のT_{EFF}細胞、休眠中のT_{REG}細胞、ナイーブCD4細胞、刺激されていないメモリー細胞もしくは初期メモリーT細胞またはこれらの組合せの1、2、3、4以上(全て)の数が、参照値、例えば、非応答例における休眠中のT_{EFF}細胞、休眠中のT_{REG}細胞、ナイーブCD4細胞、刺激されていないメモリー細胞または初期メモリーT細胞の数と比較して大きいこと

の1、2、3以上(または全て)を有する。

【0765】

ここに記載した方法のいずれかの、ある態様において、(vi)のサイトカインのレベルまたは活性は、サイトカインである、CCL20/MIP3a、IL17A、IL6、GM-CSF、IFN、IL10、IL13、IL2、IL21、IL4、IL5、IL9、もしくはTNF またはこれらの組合せの1、2、3、4、5、6、7、8以上(全て)から選択される。サイトカインは、IL-17a、CCL20、IL2、IL6またはTNFαの1、2、3、4以上(全て)から選択することができる。ある態様において、サイトカインのレベルの上昇または活性の増加は、IL-17aおよびCCL20の一方または両方から選択され、応答性の増加または再発の減少を指し示す。

【0766】

ここに記載した方法のいずれかの、ある態様において、(vii)における形質導入効率が15%以上のことは、応答性の増加または再発の減少を指し示す。

【0767】

ここに記載した方法のいずれかの、ある態様において、(vii)における形質導入効率が15%未満であることは、応答性の減少または再発の増加を指し示す。

【0768】

ある態様において、本明細書の方法により同定される応答例、非応答例、再発例または非再発例は、臨床基準に従い、さらに評価することができる。例えば、完全応答例は、疾患、例えば、癌を有するかまたはこれを有する対象であって、処置に対する完全応答、例えば、完全寛解を呈示する対象として同定される。完全応答は、例えば、ここに記載される通り、NCCN Guidelines(登録商標)またはCheson et al., J Clin Oncol 17:1244 (1999)およびCheson et al., "Revised Response Criteria for Malignant Lymphoma", J Clin Oncol 25:579-586 (2007)(これらのいずれもが参照によりそれらの全体において本明細書に組み入れられる)を使用して同定することができる。部分応答例は、疾患、例えば、癌を有するかまたはこれを有する対象であって、処置に対する部分応答、例えば、部分寛解を呈示する対象として同定される。部分応答は、例えば、ここに記載

10

20

30

40

50

される通り、NCCN Guidelines (登録商標)またはChesonによる基準を使用して同定することができる。非応答例は、疾患、例えば、癌を有するかまたはこれを有する対象であって、処置に対する応答を呈示しない対象として同定され、例えば、患者は、安定(stable disease)または進行(progressive disease)を示す。非応答例は、例えば、ここに記載される通り、NCCN Guidelines (登録商標)またはChesonによる基準を使用して同定することができる。

【0769】

ここに記載した方法に代えてまたはそれと組み合わせて、前記値に応じて、

例えば、応答例または非再発例に、CAR発現細胞療法を投与すること；

CAR発現細胞療法の用量を変更して投与すること；

CAR発現細胞療法のスケジュールまたは時間経過を変更すること；

例えば、非応答例または部分応答例に、CAR発現細胞療法と組み合わせたさらなる薬剤、例えば、ここに記載されるチェックポイント阻害剤、例えば、チェックポイント阻害剤を投与すること；

非応答例または部分応答例に、CAR発現細胞療法による処置の前に、対象における幼若T細胞の数を増加させる治療を投与すること；

CAR発現細胞療法の製造工程を改変すること、例えば、CARをコードする核酸を導入する前に、幼若T細胞を濃縮することまたは、例えば、非応答例もしくは部分応答例として同定された対象について、形質導入効率を増加させること；

例えば、非応答例または部分応答例または再発例のための代替的治療を投与すること；
または

対象が、非応答例または再発例であるかまたはこれとして同定される場合、例えば、CD25の枯渇、シクロホスファミド、抗GITR抗体またはこれらの組合せの投与の1以上により、T_{REG}細胞集団および/またはT_{REG}遺伝子署名を減少させることの1、2、3、4以上を実施する。

【0770】

ある態様において、対象を、抗GITR抗体により前処置する。ある態様において、注入または再注入の前に、対象を、抗GITR抗体により処置する。

【0771】

バイオポリマーの送達法

ある態様において、ここに記載した、1以上のCAR発現細胞を、対象に、バイオポリマー足場、例えば、バイオポリマーインプラントを介して、投与または送達することができる。バイオポリマー足場は、ここに記載されるCAR発現細胞の送達、拡大および/または分散を支援または増強し得る。バイオポリマー足場は、天然に存在する場合もあり、合成の場合もある、生体適合性ポリマー(例えば、炎症応答または免疫応答を実質的に誘導しない)および/または生体分解性ポリマーを含む。

【0772】

適切なバイオポリマーの例は、寒天、アガロース、アルギン酸、アルギン酸/リン酸カルシウムセメント(CPC)、ベータ-ガラクトシダーゼ(β-GAL)、(1,2,3,4,6-ペンタアセチルα-D-ガラクトース)、セルロース、キチン、キトサン、コラーゲン、エラスチン、ゼラチン、ヒアルロン酸コラーゲン、ヒドロキシアパタイト、ポリ(3-ヒドロキシ酪酸-コ-3-ヒドロキシ-ヘキサ酸)(PHBHHx)、ポリ(ラクチド)、ポリ(カプロラクトン)(PCL)、ポリ(ラクチド-コ-グリコリド)(PLG)、ポリエチレンオキシド(PEO)、ポリ(乳酸-コ-グリコール酸)(PLGA)、ポリ酸化プロピレン(PPG)、ポリビニルアルコール(PVA)、シルク、ダイズタンパク質および単独または任意の濃度および任意の比で、他の任意のポリマー組成物と組み合わせたダイズタンパク質単離物を含むが、これらに限定されない。バイオポリマーは、接着促進分子または遊走促進分子、例えば、リンパ球のコラーゲン受容体に結合するコラーゲン模倣ペプチドおよび/または送達される細胞の送達、拡大または機能、例えば、抗癌活性を増強する刺激分子により強化または改変することができる。バイオポリマー足場は、注射剤、例えば、

10

20

30

40

50

ゲル組成物もしくは半固体組成物または固体組成物であり得る。

【0773】

ある態様において、ここに記載されるCAR発現細胞を、対象への送達の前に、バイオポリマー足場に播種する。ある態様において、バイオポリマー足場は、例えば、足場のバイオポリマーに組み込むかまたはコンジュゲートさせた、ここに記載される1以上のさらなる治療剤(例えば、別のCAR発現細胞、抗体または低分子)またはCAR発現細胞の活性を増強する薬剤をさらに含む。ある態様において、バイオポリマー足場を、腫瘍においてまたは抗腫瘍効果を媒介するのに十分な腫瘍の近傍内に、例えば、腫瘍内注射するかまたは手術により植え込む。それらの送達のためのバイオポリマー組成物および方法さらなる例は、Stephan et al., Nature Biotechnology, 2015, 33:97-101; およびWO 2014/110591において説明されている。

10

【0774】

医薬組成物および処置

本発明の医薬組成物は、CAR発現細胞、例えば本明細書で説明したような複数のCAR発現細胞を、1以上の薬学的または生理学的に許容できる担体、希釈剤または賦形剤と組み合わせて含んでいてもよい。このような組成物は、緩衝液、例えば中性緩衝食塩水、リン酸緩衝生理食塩水および同種のもの;炭水化物、例えばグルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン、マンニトール;タンパク質;ポリペプチドまたはアミノ酸、例えばグリシン;抗酸化剤;キレート剤、例えばEDTAまたはグルタチオン;アジュバント(例えば、水酸化アルミニウム);および保存剤を含んでいてもよい。ある面において、本発明の組成物は、静脈内投与用に製剤化される。

20

【0775】

本発明の医薬組成物は、処置する(または予防する)疾患に適切な方式で投与されてもよい。投与の量および頻度は、患者の状態、ならびに患者の疾患のタイプおよび重症度のよう要素によって決定されるが、適切な投薬は臨床試験によって決定してもよい。

【0776】

ある態様において、医薬組成物は、例えば、内毒素、マイコプラズマ、複製能を有するレンチウイルス(RCL)、p24、VSV-G核酸、HIV gag、残留した抗CD3/抗CD28でコーティングされたビーズ、マウス抗体、プールされたヒト血清、ウシ血清アルブミン、ウシ血清、培養培地の成分、ベクターのパッケージング細胞またはプラスミド成分、細菌および真菌からなる群より選択される汚染物質を実質的に含まず、例えば、それらのレベルが検出可能ではない。ある態様において、細菌は、アルカリゲネス・フェカリス(*Alcaligenes faecalis*)、カンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)、エシェリキア・コリ(*Escherichia coli*)、ヘモフィルス・インフルエンザ(*Haemophilus influenza*)、ナイセリア・メニンギティディス(*Neisseria meningitidis*)、シュードモナス・アエルギノーサ(*Pseudomonas aeruginosa*)、スタフィロコッカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*)、ストレプトコッカス・ニューモニエ(*Streptococcus pneumonia*)およびストレプトコッカス・ピオゲネス(*Streptococcus pyogenes*) A群からなる群より選択される少なくとも1つである。

30

【0777】

「免疫学的有効量」、「抗腫瘍有効量」、「腫瘍阻害有効量」または「治療量」が提示される場合、投与する本発明の組成物の正確な量は、患者(対象)の年齢、体重、腫瘍のサイズ、感染または転移の程度および状態の個体差を医師が検討することによって決定することができる。一般的に、ここに記載されるT細胞を含む医薬組成物は、範囲内の全ての整数値を含め、細胞 10^4 から 10^9 個/kg体重の投薬量、いくつかの場合において細胞 10^5 から 10^6 個/kg体重の投薬量で投与されてもよいと概説することができる。またT細胞組成物は、これらの投薬量で複数回投与してもよい。細胞は、免疫療法で一般的によく知られている注入技術を使用することによって投与してもよい(例えば、Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988を参照)。

40

【0778】

50

ある面において、対象に活性化されたT細胞を投与し、その後続いて再度採血し(またはアフエーシスが行われ)、それからのT細胞を本発明に従って活性化し、これらの活性化され拡大したT細胞を患者に再注入することが望ましい場合がある。このプロセスは、数週間に複数回実行してもよい。ある面において、10ccから400ccの採取された血液から、T細胞を活性化することができる。ある面において、20cc、30cc、40cc、50cc、60cc、70cc、80cc、90ccまたは100ccの採取された血液から、T細胞を活性化する。

【0779】

本組成物の投与は、例えばエアロゾル吸入法、注射、取り込み、輸注、埋め込みまたは移植などによるあらゆる便利な方式で実行することができる。ここに記載される組成物は、動脈経由、皮下、皮内、腫瘍内、リンパ節経由、髄内、筋肉内、静脈内(i.v.)注射でまたは腹腔内で、患者に投与されてもよい。ある面において、本発明のT細胞組成物は、皮内または皮下注射によって患者に投与される。ある面において、本発明のCAR発現細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)組成物を、i.v.注射により投与する。CAR発現細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)の組成物は、腫瘍、リンパ節または感染部位に直接注射することができる。

【0780】

特定の例示的な面において、対象は、リユーカフェーシスを受ける可能性があり、ここで、目的の細胞、例えば、免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)を選択および/または単離するように、白血球を、エクスピボにおいて集めるか、濃縮するかまたは枯渇させる。これらの免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)単離物を、当業界公知の方法により拡大し、本発明の1以上のCAR構築物を導入し、これにより、本発明のCAR発現細胞(例えば、CAR T細胞またはCAR発現NK細胞)を創出し得るように処置することができる。それを必要とする対象は、その後、高用量の化学療法による標準的な処置に続き、末梢血幹細胞移植を受ける場合がある。ある特定の面において、移植に続きまたは移植と並列して、対象に、拡大させた本発明のCAR発現細胞(例えば、CAR T細胞またはCAR発現NK細胞)の注入を施す。さらなる面において、拡大させた細胞を、手術の前にまたは手術に続いて投与する。

【0781】

患者に投与する上記の処置の投与は、処置される状態の正確な性質および処置を受けるレシピエントに応じて様々である。ヒトへの投与に関する投薬量の尺度化は、当業界で容認された実施に従って行うことができる。例えばキャンパスに関する用量は、一般的に、成人の患者の場合、1mgから約100mgの範囲であり、通常1日から30日までの期間毎日投与される。好ましい1日用量は、1mgから10mg/1日であるが、いくつかの場合において、それより多くの最大40mg/日の用量が使用される場合もある(米国特許第6,120,766号で説明されている)。

【0782】

ある態様において、例えば、インビトロにおける転写を使用して、CARを、免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)に導入し、対象(例えば、ヒト)に、本発明のCAR発現免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)の初回投与および本発明のCAR発現免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)の1回または複数回の後続投与を施し、1回または複数回の後続投与を、先行投与の15日未満後、例えば、14日、13日、12日、11日、10日、9日、8日、7日、6日、5日、4日、3日または2日後に行う。ある態様において、本発明のCAR発現免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)の、1回を超える投与を、対象(例えば、ヒト)に、毎週行う、例えば、本発明のCAR発現免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)の、2回、3回または4回の投与を、毎週行う。ある態様において、対象(例えば、ヒト)に、CAR発現免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)の、1回を超える毎週の投与(例えば、2回、3回または4回にわたる毎週の投与)(本明細書ではまた、サイクルとも称する)を施すのに続いて、1週間にわたり、CAR発現免疫エフェクター細

10

20

30

40

50

胞(例えば、T細胞、NK細胞)を投与せず、次いで、CAR発現免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)の、1回または複数回のさらなる投与[例えば、CAR発現免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)の、1回を超える毎週の投与]を、対象に行う。別の態様において、対象(例えば、ヒト対象)に、1を超えるサイクルのCAR発現免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を施し、各サイクルの間の時間は、10日間、9日間、8日間、7日間、6日間、5日間、4または3日間未満である。ある態様において、CAR発現免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を、隔日で、毎週3回の投与にわたり投与する。ある態様において、本発明のCAR発現免疫エフェクター細胞(例えば、T細胞、NK細胞)を、少なくとも2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間またはこれを超えて投与する。

10

【0783】

ある面において、レンチウイルスなど、レンチウイルスベクターを使用して、CLL-1 CAR発現細胞(例えば、CLL-1 CARTまたはCLL-1 CAR発現NK細胞)を生成する。このようにして生成されたCAR発現細胞、例えば、CLL-1 CARTまたはCAR発現NK細胞は、安定的なCAR発現を示すであろう。

【0784】

ある面において、ガンマレトロウイルスベクター、例えば、ここに記載されるガンマレトロウイルスベクターなどのウイルスベクターを使用して、CAR発現細胞、例えば、CARTまたはCAR発現NK細胞を生成する。これらのベクターを使用して生成されたCAR発現細胞、例えば、CARTまたはCAR発現NK細胞は、安定的なCAR発現を示し得る。

20

【0785】

ある面において、CAR発現細胞(例えば、CARTまたはCAR発現NK細胞)は、CARベクターを、形質導入後4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15日間にわたり、一過性に発現する。CARの一過性発現は、RNA CARベクターの送達により実行することができる。ある面において、CAR RNAで、T細胞を、エレクトロポレーションにより形質導入する。

【0786】

CARTを使用して[特に、マウス scFv を保有するCAR発現細胞(例えば、CARTまたはCAR発現NK細胞)により]処置される患者において生じ得る潜在的な問題は、複数回にわたる処置後におけるアナフィラキシーである。

30

【0787】

この理論に縛られることは望まないが、このようなアナフィラキシー応答は、患者が体液性抗CAR応答、すなわち抗IgEアイソタイプを有する抗CAR抗体を発生させることによって引き起こされる可能性があると考えられる。抗原曝露が10日から14日中断されると、患者の抗体産生細胞が、IgGアイソタイプ(アナフィラキシーを引き起こさない)からIgEアイソタイプへのクラススイッチを経ると考えられる。

【0788】

患者が、一過性CAR療法の経過中に、抗CAR抗体応答(RNAの形質導入により発生する抗CAR抗体応答など)を発生させる危険性が高い場合も、CARTの注入の中断は、10~14日間を超えないものとする。

40

【実施例】**【0789】**

以下の実施例を参照しながら本発明をさらに詳細に説明する。これらの実施例は単に例示のために示されたものであり、特に他の規定がない限り限定を意図していない。したがって、本発明は、以下の実施例に限定されると決して解釈されず、本明細書で示された教示の結果として明らかになるありとあらゆるバリエーションを包含すると解釈されるものとする。

【0790】

当業者は、さらなる説明がなくても、前述の説明および以下の説明に役立つ例を使用し

50

て、本発明の化合物を作製し利用して、特許請求された方法を実施することができると考えられる。以下の実施例は、本発明の様々な面を具体的に指摘するが、開示のその他の部分を限定すると決して解釈されないものとする。

【0791】

実施例1：CAR構築物の作製

完全ヒト抗CD33一本鎖可変断片(scFv)を作製し、細胞内CD3ゼータ鎖および4-1BBの細胞内共刺激ドメインと一緒にレンチウイルス発現ベクター内にクローニングし、表1に描かれている名称を与えた(発明を実施するための形態に示されている)。

表2に示されるように、VLとVHドメインがscFvに出現する順番は変えられ(すなわち、VL-VHまたはVH-VL配向)、それぞれのサブユニットが配列GGGS(配列番号25)を含む「G4S」(配列番号25)サブユニットの3または4コピー[例えば、(G4S)₃(配列番号28)または(G4S)₄(配列番号27)]が可変ドメインを接続してscFvドメインの全体を作り出す。

ヒトscFv断片の配列(配列番号39~51)は本明細書の表2(発明を実施するための形態)に提供されている。これらのクローンは全て、CD3ゼータ鎖由来の共刺激ドメインのシグナルドメインにQ/K残基変化を含有していた。次に、CAR scFv断片はレンチウイルスベクターにクローニングされ、発現のためのEF1アルファプロモーター(配列番号11)を使用して単一コードフレームで完全長CAR構築物を作り出した。

CAR構築物の配列およびそのドメイン配列は発明を実施するための形態に記載されている。ヒトCAR構築物の分析は実施例2~5に記載される通りに行った。

【0792】

実施例2：ヒトscFv担持CARTの分析およびインビトロ活性

抗CLL-1 CAR構築物は、NFATプロモーターにより推進されるルシフェラーゼレポーターを含有するジャーカット細胞株(JNL細胞と名付けられた)を使用して活性について評価した。CAR活性はこのNFAT推進レポーターの活性化として測定される。CART構築物を含有するレンチウイルス上清を形質導入のためにJNL細胞に添加した。形質導入4~6日後、JNL細胞は下に記載される(図2A、2Bおよび2C)FACSによるCAR発現について評価するまたは活性化を始動させるために標的陽性(PL21、THP1、HL60、U937)もしくは標的陰性(K562)細胞株と指示されたエフェクター(JNL)対標的細胞株(E対T)比で混合させた。共培養の20時間後、ルシフェラーゼシグナルをEnVision装置上でBright-GloTMルシフェラーゼアッセイを使用して測定した(図1A、1Bおよび2C)。

最適抗CLL-1 CAR構築物は、CLL-1発現(「CLL-1+」)標的に応答してのCLL-1 CAR形質導入T細胞(「CART-CLL-1」または「CART-CLL-1T細胞」)のエフェクターT細胞応答の量と質に基づいて選択される。エフェクターT細胞応答には、細胞拡大、増殖、倍加、サイトカイン産生および標的細胞死滅または細胞溶解反応(脱顆粒)が含まれるがこれらに限定されない。

【0793】

CART-CLL-1の作製

ヒトscFvコードレンチウイルス移送ベクターを使用してVSVgシュードタイプ化レンチウイルス粒子にパッケージングされたゲノム物質を作製した。レンチウイルス移送ベクターDNAは、リポフェクタミン試薬と組み合わせて、3パッケージング成分、VSVg、gag/polおよびrevと混合させ、Lenti-X 293T細胞(Clonotech)内に一緒にトランスフェクトした。

30時間後、培地を収集し、濾過して-80で保存した。治療CART-CLL-1は、T細胞、CD4⁺およびCD8⁺リンパ球についての負の選択によりその未処理のT細胞が得られる正常なアフエレス処理されたドナー由来の血液から始めることにより作製した。これらの細胞は、RPMI1640、10%熱不活ウシ胎仔血清(FCS)、2mMのLグルタミン、1xペニシリン/ストレプトマイシン、100μMの可欠アミノ酸、1mMのNaピルベート、10mMのHepesおよび55μMの2-メルカプトエタノ

ール中37%、5%CO₂で、1対3の比のCD3×28ビーズ[Dynabeads(登録商標)Human T-Expander CD3/CD28、Invitrogen]により活性化した。T細胞は、24ウェルプレートのウェルあたり0.5mLの培地中1×10⁶T細胞で培養した。24時間後、T細胞は芽球化しており、0.5mLのウイルス上清を添加した。T細胞は対数成長パターンで分裂し始め、これはmLあたりの細胞数を測定することによりモニターされ、T細胞は2日ごとに新鮮な培地に希釈された。およそ10日後にT細胞が休止し始めると、対数成長は衰えた。緩慢な成長速度と約300fLに近づくT細胞サイズの組合せが、後の分析のためにT細胞を冷凍保存する状態を決定する。

冷凍保存する前に、形質導入された細胞(細胞表面で抗CLL-1 CARを発現している)のパーセンテージおよび発現のその相対的蛍光強度は、検出試薬としてプロテインL(図3Aおよび22A)またはビオチン化組換えヒトCLL-1タンパク質(図3Bおよび22B)を使用して、BD LSRFortessaまたはBD-FACSCanto上でのフローサイトメトリー分析により決定した。そのFACSからの相対的蛍光強度のヒストグラムプロットは、形質導入されたT細胞のパーセンテージを示した。形質導入により、CART陽性細胞の範囲は10~50%になる。

【0794】

CART-CLL-1リダイレクトT細胞の細胞活性およびサイトカイン分泌の評価

サイトカインを死滅させ分泌するCART-CLL-1 T細胞の機能的能力を評価するため、細胞を解凍し一晩回復させておいた。

T細胞死滅は、ルシフェラーゼを安定的に発現しているCLL-1発現PL21(図4A)およびHL-60(図4B)急性骨髄性白血病細胞株に向けられた。非CLL-1発現U87細胞は対照として使用され(図4C)、非形質導入T細胞は非特異的バックグランド死滅レベルを判定するのに使用された。CART-CLL-1の細胞溶解反応は、10対1のエフェクター対標的細胞比およびエフェクターが抗CLL-1キメラ受容体を発現しているT細胞として定義されていた場合はT細胞の3倍下方希釈の滴定として測定された。アッセイは、適切な数のT細胞と一定数の標的細胞を混合することにより開始した。20時間後、ルシフェラーゼシグナルは、EnVision装置上でBright-Glo™ルシフェラーゼアッセイを使用して測定した。

エフェクター細胞の量を滴定して、これらの死滅曲線を比較すると、CLL-1を発現している細胞が破壊されたことを示している。どちらかのヒトscFv担持CAR-CLL-1細胞を形質導入された同じドナー由来のT細胞はCLL-1+標的を選択的に死滅させることができた。興味深いことに、全てのCART-CLL-1細胞が活性であったわけではなかった。クローン13を含有するCART細胞はこのアッセイでは、標的発現細胞の存在下でも不活性であった。

CART-CLL-1細胞のサイトカイン産生を測定するため、細胞を解凍し一晩回復させておいた。非形質導入T細胞(UTD)はバックグランドT細胞効果の非特異的対照として使用した。T細胞はHL-60、PL21またはU87細胞に向けられた。アッセイは、エフェクターが抗CLL-1 CARを発現しているT細胞として定義されていた場合、言及されている1対1または10対1のエフェクター対標的比を試験した。アッセイは細胞の混合の24時間後に実行され、その時点でヒトサイトカイン検出用のCBA-Flexキットを使用するサイトカイン、TNFアルファ(図5A)、IL-2(図5B)およびINFガンマ(図5C)の分析のために培地が取り除かれる。

CART-CLL-1 T細胞を、CLL-1を内因的に発現している癌細胞と一緒に培養すると、CLL-1-13を除く全てのCLL-1-CARTが標的発現細胞にตอบสนองしてサイトカインを産生した。低CLL-1-発現標的細胞に対する種々のCLL-1-CARTクローンの反応性の違いは、これらの構築物を形質導入されているCART細胞のより良い臨床効能に置き換えられる可能性がある。

【0795】

CART-CLL-1の増殖能を評価する

CART-CLL1 T細胞を、標的細胞上での抗原への曝露に応答して増殖するその能力について試験した。複数のCLL-1 CAR構築物、CLL-6、CLL-9、CLL-10、CLL-11、CLL-12およびCLL-13を試験した。標的細胞には、U937、PL-21、HL60およびMolm13細胞が含まれた。アッセイの日(0日目)、標的細胞を計数し、 3×10^6 細胞/mlで50mlチューブの6mlのT細胞培地に移した。標的細胞は氷上10,000ラドで照射された。照射後、標的細胞はT細胞培地で2度洗浄し、計数して、氷上でT細胞培地の 5×10^5 細胞/mlに再懸濁した。

凍結した形質導入T細胞を解凍し、10mlの完全T細胞培地で洗浄し、300gで10分間回転させ、室温で3mlの完全T細胞培地に穏やかに再懸濁させた。次に、T細胞はセロメーター(Cellometer)で計数し、10mlの培地中 2.5×10^6 /mlに再懸濁させた。96ウェルU字型底プレートでは、25,000照射標的細胞と25,000形質導入CAR T細胞(1対1比)を2連のウェルで組み合わせた。別々のウェルにおいて、75,000抗CD3/CD28ビーズを100 μ lの培地で25,000形質導入T細胞に添加し、正の対照として1対3細胞対ビーズ比を作り出し、別のウェルでは、100 μ lの培地を培地のみの対照として25,000形質導入T細胞単独に添加した。細胞は37、5%CO₂で4日間インキュベートした。

4日目、細胞を収穫し、複製物をピペットで取ってU字型底プレート上の同じウェルに移すことにより組み合わせ、プロテインLまたは組換えヒトCLL1タンパク質を使用するCD4、CD8およびCARのFACSのために染色する。染色後、細胞は120 μ lのMACS+0.5%のBSA緩衝液に再懸濁し、20 μ l/ウェルのカウントブライトビーズをそれぞれのウェルに添加した。増殖は、2500ビーズを計数するのに使用した期間に検出されたFACS陽性細胞の数として測定した。

図23Aおよび23Bに示すように、CLL-1 CAR構築物、CLL-6、CLL-9、CLL-10、CLL-11およびCLL-12を発現している細胞は異なる標的細胞の存在下で増殖した。

【0796】

実施例3：CLL-1毒性研究

CLL-1は市販の抗体(クローン、HIM3-4、eBioscience)を使用してフローサイトメトリーにより測定した。本明細書の結果では、CLL-1はAMLを有する大半の原発患者試料で発現されたことが示されている(AML芽細胞は標準側方散乱lowCD45dim特徴を使用してゲートをかけた)(図6)。

2人の異なるドナー由来のT細胞はCLL-1を形質導入され(図6)、35~45%の形質導入効率を得た。T細胞はまずCD3/CD28 Dynabeads(Invitrogen)を用いて刺激され、IL-2サポートと一緒に無血清T細胞培地で維持された。次に、T細胞は次の日にレンチウイルスベクターを使用してCLL-1(図6)CARを形質導入し、約10日間培地で拡大させた。次に、T細胞は細胞容量中央値が300flに近づくと凍結させた。T細胞上でのCAR発現は、ストレプトアビジンを使用する二次染色を用いたビオチン化CLL-1タンパク質(Sino Biological)を使用してフローサイトメトリーにより検出された。本明細書に提示される結果は、CARを形質導入されたT細胞の形質導入効率を示している(図7Aおよび7B)。

CART123、CLL1-CART細胞および非形質導入T細胞は、CD123+/CLL1+細胞株THP-1、CLL1+/CD123+である2初代AML試料および対照ALL細胞株NALM6と一緒に4時間インキュベートした。CD107a脱顆粒はフローサイトメトリーにより測定した(8A)。CLL-1 CART細胞はTHP1および初代AML試料には特異的な脱顆粒を受けたが対照細胞株には脱顆粒を受けなかった(図8B)。本明細書に提示される結果は、CLL1-CART細胞がCLL1+細胞株および初代AML試料に特異的な脱顆粒を受けたことを示している。

【0797】

CART123、CLL1-CART細胞および非形質導入T細胞は、CD123+/CLL1+細胞株THP-1、CLL1+/CD123+である2初代AML試料および

対照 A L L 細胞株 N A L M 6 と一緒に 4 時間インキュベートした。次に、細胞を収穫し、細胞質内 T N F はフローサイトメトリーにより測定した。特に T H P 1 および初代 A M L 試料とのインキュベーション後はより多くの C L L - 1 C A R T 細胞が T N F を産生したが、対照細胞株と一緒にインキュベーションでは産生しなかった。本明細書に提示される結果は、C L L 1 - C A R T 細胞が C L L 1 + 細胞株および初代 A M L 試料とのインキュベーション後に T N F を産生したことを示している(図 9 A および 9 B)。

C A R T 1 2 3、C L L 1 - C A R T 細胞および非形質導入 T 細胞は、C D 1 2 3 + / C L L 1 + 細胞株 T H P - 1、C L L 1 + / C D 1 2 3 + である 2 初代 A M L 試料および対照 A L L 細胞株 N A L M 6 と一緒に 4 時間インキュベートした。次に、細胞を収穫し、細胞質内 I L - 2 はフローサイトメトリーにより測定した。特に T H P 1 および初代 A M L 試料とのインキュベーション後はより多くの C L L - 1 C A R T 細胞が I L - 2 を産生したが、対照細胞株と一緒にインキュベーションでは産生しなかった。本明細書に提示される結果は、C L L 1 - C A R T 細胞が C L L 1 + 細胞株および初代 A M L 試料とのインキュベーション後に I L - 2 を産生したことを示している(図 1 0 A および 1 0 B)。

【 0 7 9 8 】

C A R T 1 2 3、C L L 1 - C A R T 細胞および非形質導入 T 細胞は、C D 1 2 3 + / C L L 1 + 細胞株 T H P - 1 および M O L M 1 4、C L L 1 + / C D 1 2 3 + である初代 A M L 試料ならびに対照マントル細胞リンパ腫細胞株 J E K O と一緒に 2 4 時間インキュベートした。次に、細胞を収穫し、7 - A A D および計数ビーズを添加した。次に、死滅は腫瘍細胞の C F S E 標識化の後フローサイトメトリーベースのアッセイを使用して(例えば、Cao et al, Cytometry Part A 2010;7&A:534-545)または C A R T 細胞をルシフェラーゼ発現標的細胞と様々なエフェクター対標的比で最大 2 0 時間一緒にインキュベートし、続いて標的細胞により発せられる光子についての光撮像により測定した。この後者のアッセイでは、生標的細胞の数は発せられた光子の数と明らかに相関している。C L L 1 - C A R T 細胞は、指示されている E 対 T 比で、M O L M 1 4 (図 1 1 D)、T H P - 1 (図 1 1 A) および初代 A M L 試料(図 1 1 B) の特異的溶解をもたらし、対照細胞株 J E K O は溶解しなかった(図 1 1 C)。本明細書に提示される結果は、C L L 1 - C A R T 細胞が C L L - 1 + 細胞株 M O L M 1 4 および T H P - 1 ならびに初代 A M L 試料を特異的に死滅させたことを示している(図 1 1 A ~ 1 1 D)。

C A R T 1 2 3、C A R T 3 3 および C L L 1 - C A R T 細胞の増殖は M O L M 1 4、T H P - 1 および 2 初代 A M L 試料への応答で測定された。T 細胞は C F S E で標識され、1 対 1 のエフェクター対標的比で 1 2 0 時間、標的と一緒にインキュベートされた。C L L 1 - C A R T 細胞は M O L M 1 4、T H P - 1 および初代 A M L 試料に応答して特異的増殖を受けた。非増殖 T 細胞は C F S E 発現の単一明ピークを保持し(F I T C チャンネルにおける緑色蛍光により)、増殖している C A R T 細胞は 1 を超える C F S E ピークおよびベースラインよりも低い発現を有していた。本明細書に提示される結果は、C L L 1 - C A R T 細胞が M O L M 1 4、T H P - 1 および初代 A M L 試料に応答して増殖したことを示している(図 1 2 A および 1 2 B)。

【 0 7 9 9 】

図 1 3 は、自家異種移植片を使用して C L L - 1 C A R T 細胞の造血幹細胞毒性をアッセイするための模式図を表している。N S G S (I L - 3、G M - C S F、幹細胞因子に対してトランスジェニックである N O D - S C I D ガンママウス)マウスは腹腔内にブスルファンを、続いて次の日に正常ドナー由来の T 細胞枯渇骨髓を受けた。生着は 4 週間後の末梢血のフローサイトメトリー分析により確かめられ、> 1 % の循環 C D 4 5 陽性細胞と定義された。次に、マウスは静脈内尾部血管注射により自家 T 細胞を用いて処置された。T 細胞は同じドナー由来であり C A R T 3 3、C L L 1 - C A R または U T D を形質導入された。第 4 の群は処置を受けなかった。次に、マウスは続いて 7 日目、1 4 日目および 2 1 日目に後眼窩出血させた。

C L L - 1 発現は、ヒト化異種移植片由来の異なる末梢血細胞で測定された。マウスは標準技法を使用して、麻酔をかけた後、後眼窩静脈を通して出血させた。次に、標準容量

10

20

30

40

50

の50～60 μlの血液を1mlのACK溶解緩衝液に溶解させた。次に、血液は蛍光的に標識された抗体を使用して染色し、異なる末梢血細胞上でのCLL-1の発現はフローサイトメトリーを使用して検出した。この分析は、T細胞枯渇正常ドナー骨髄の生着後および任意の処置に先立ってベースラインで実施した。マウスの末梢血分析の代表的FACSプロットが示されている(図14A)。CLL-1は、単球(CD14+細胞)、骨髄細胞(CD33+およびCD123+細胞)、B細胞(CD19+細胞)上で発現されるが、血小板(CD41+細胞)またはT細胞(CD3+細胞)上では発現されない。代表的なヒストグラム表示が示されている(図14B)。24マウス由来の末梢血分析の模式的プロット表示が示されている(図14C)。本明細書に提示される結果は、CLL-1がヒト化マウスにおいて異なる骨髄系譜細胞およびB細胞上で発現されたことを示している。

10

CLL1-CART細胞の造血幹細胞毒性は自家モデルを使用して判定した。フローサイトメトリーによる末梢血分析の代表的プロット。CART33またはCLL1-CART細胞を用いた処置により骨髄細胞(CD123+、CD33+、CLL1+)およびCD14+単球が有意に減少した。本明細書に提示される結果は、CLL-1がヒト化マウスにおいて異なる骨髄系譜細胞およびB細胞上で発現されたことを示している。

【0800】

ヒト化異種移植片由来の異なる骨髄前駆細胞上でのCLL-1発現をアッセイした。T細胞を用いた処置の4週間後、マウスは安楽死させ、骨髄を収穫して分析した。骨髄は大腿骨をフラッシュすることにより収穫した。対照非処置動物由来の骨髄試料は、異なる前駆細胞上でのCLL-1の発現を分析するための基準として使用した。次に、試料は蛍光的に標識された抗体を使用して染色し、異なる前駆細胞上でのCLL-1の発現はフローサイトメトリーを使用して検出した。CLL-1はCD34+CD38-造血幹細胞、CD123bright、CD123dimおよびCD33陽性細胞上で発現された。CD45dim, LIN-, 生細胞でゲートをかけた。本明細書に提示される結果は、CLL-1がヒト化マウスにおいて異なる骨髄前駆細胞上および造血幹細胞上で発現されたことを示している(図16A～16D)。

20

図17は、ヒト化免疫系(HIS)異種移植片を使用してCLL-1 CART細胞の造血幹細胞毒性をアッセイするための模式図を示している。HISマウスはヒト細胞の生着を確かめるために、CD34+胎仔肝の注射6～8週間後に後眼窩に出血させ、次にCLL1-CART、CART123、CART33-CD8ヒンジ、CART33-IgG4ヒンジ、非形質導入T細胞のいずれかを用いて処置するまたは処置しなかった。次にマウスは続いて連続して毎週後眼窩出血させた。次にマウスは28日目に安楽死させ、臓器を収穫して分析した。

30

【0801】

骨髄はT細胞注入の4週間後に分析された。CLL1-CART細胞の造血幹細胞毒性はHIS異種移植片を使用して測定した。マウスはT細胞注入の4週間後に安楽死させ、大腿骨を収穫してフラッシュして骨髄を得た。次に、試料は蛍光的に標識された抗体を使用して染色した。異なるCART細胞を用いて処置した全てのマウスの模式的プロット。CLL1-CART細胞を用いて処置すると、CD34+CD38-成分(造血幹細胞)(図18A)およびCD34+CD38+成分(前駆細胞)(図18B)が有意に減少した。異なるCART細胞を用いて処置したマウス由来の骨髄の代表的プロットが示されている。CD45dim, LIN-細胞でゲートをかけた(図19A～19E)。

40

骨髄はT細胞注入の4週間後にHISマウスにおいて分析された。HIS異種移植片を使用するCLL1-CART細胞の造血幹細胞毒性。マウスはT細胞注入の4週間後に安楽死させ、大腿骨を収穫してフラッシュして骨髄を得た。次に、試料は蛍光的に標識された抗体を使用して染色した。異なるCART細胞を用いて処置した全てのマウスについて模式的プロットが示されている(図20)。CLL1-CART細胞を用いて処置してもCD123bright集団は有意に減少することはなかった。次に、試料は蛍光的に標識された抗体を使用して染色した。異なるCART細胞を用いて処置したマウス由来の骨髄の代表的プロットが示されている(図21)。

50

【0802】

実施例4：CLL-1 CART細胞のインビボでの評価

PL-21は難治性急性前骨髄球性白血病を抱えた24歳の男性患者の末梢血から単離したヒト急性骨髄球性白血病細胞株であり、免疫無防備状態のマウスにおいて異種移植片として成長させることが可能である。異種移植片はヒトで見られる骨髄における疾患を模倣し、骨におけるAMLに対する治療の効能を試験するために用いるモデルを確立する。これらのマウスを使用すれば、CLL-1などの急性骨髄球性(または前骨髄球性)白血病細胞上で見出せる細胞マーカー(C型レクチン型分子)に特異的なキメラ抗原受容体(CART)細胞の効能を試験することが可能である。PL-21細胞にはホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子がタグ付けされており、NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/Szj(NSG)マウスにおいて急性骨髄性白血病(AML)の同所性モデルで使用されて、CLL-1に特異的なCART細胞の効能を試験した。

10

CLL-1発現はPL-21細胞上で試験され、これらの細胞をインビトロアッセイにおいて使用して、標的を認識し応答するCLL-1特異的CART細胞の能力を調べた。インビボではPL-21細胞は尾静脈を経て静脈内に移植されると成長し、その成長は主に骨髄に限定される。腫瘍細胞を移植して1週間後、疾患は完全に骨に移動し指数関数的速度で成長し始める。未処置のままにしておくと、腫瘍移植の4~6週間後マウスは臨床症状および後肢麻痺を呈し始める。この実施例に記載されている研究は、インビトロスクリーニング由来のCLL-1特異的scFvクローンのうちのどれかがこのインビボ異種移植片モデルにおいて腫瘍に対する活性を示すのかどうかを調査する。

20

以下の材料および方法はここに記載される実験において使用された。

【0803】

材料および方法

PL-21細胞株：PL-21ヒトAML細胞株は急性前骨髄球性白血病を有する患者の末梢血から開発した。次に、細胞にホタルルシフェラーゼをタグ付けした。これらの懸濁細胞は、10%熱失活したウシ胎仔血清を補充したRPMIにおいて成長する。

【0804】

マウス：6週齢のNSG(NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/Szj)マウスをJackson Laboratory(ストック番号005557)から受け取った。実験前の少なくとも3日間にわたり動物をそのままNovartisのNIBRI動物施設に順応させた。動物は、NovartisのACUCの規則とガイドラインに従って扱われた。

30

【0805】

腫瘍移植：PL-21-luc細胞を10%熱失活したウシ胎仔血清を補充したRPMIにおいてインビトロで成長させ拡大させた。次に、細胞は15mlのコニカルチューブに移し、冷たい無菌PBSを用いて2度洗浄した。次に、PL-21-luc細胞を計数し、ミリリットルのPBSあたり 10×10^6 細胞の濃度で再懸濁させた。細胞を氷上に置き、直ちに(1時間以内)マウスに移植した。PL-21-luc細胞は尾静脈を経て静脈内に100 μ l容量で注射され、マウスあたり総数で 1×10^6 細胞であった。

40

【0806】

CART細胞投与：マウスは腫瘍移植の8日後 5×10^6 CART⁺T細胞を投与された。細胞は37℃の水浴中で部分的に解凍し、次に細胞を含有するチューブに1mlの冷たい無菌PBSを添加することにより完全に解凍させた。解凍された細胞は15mlのファルコンチューブに移し、PBSを用いて最終容量10mlに調整した。細胞は、毎度1000rpmで10分間2度洗浄し、次に血球計数器上で計数した。CART細胞は、それぞれの群が同じパーセンテージのCART⁺T細胞を有するように、CART形質導入について標準化された。次に、 5×10^6 CART⁺T細胞をmlの冷PBSあたり 50×10^6 CART⁺T細胞の濃度で再懸濁し、マウスに投与するまで氷上で保管した。マウスは尾静脈を経て静脈内に100 μ lのCART細胞を注射され、マウスあたり 5×10^6 CART⁺T細胞の用量であった。

50

群あたり8マウスを、100 μ lのPBS単独(PBS)、CD19対照CAR T細胞(CD19)、CLL-1-6(クローン6)CAR T細胞、CLL-1-9(クローン9)CAR T細胞、CLL-1-10(クローン10)CAR T細胞、CLL-1-11(クローン11)CAR T細胞およびCLL-1-12(クローン12)CAR T細胞のいずれかを用いて処置した。T細胞は全て同じヒトドナーから同時に調製された。

【0807】

動物モニタリング：週2回の体重測定を含むマウスの健康状態は毎日にモニターされた。体重のパーセント変化は、 $(BW_{current} - BW_{initial}) / (BW_{initial}) \times 100\%$ として計算した。腫瘍負荷は生物発光撮像により週2回モニターした。マウスは、麻酔をかけXenogenを用いてマウスを撮像する10分前にD-ルシフェリンを腹腔内に注射した。疾病負荷は、腫瘍細胞の生物発光(光子/秒)を計算することにより計算した。

パーセント処置/対照(T/C)値は以下の式を使用して計算した：

T = 0の場合、 $\%T/C = 100 \times T/C$ ；

T < 0の場合、 $\%退縮 = 100 \times T/T_{initial}$ ；

式中、T = 研究最終日の薬物処置群の平均生物発光； $T_{initial}$ = 投与開始日の薬物処置群の平均生物発光； $T =$ 研究最終日の薬物処置群の平均生物発光 - 投与開始日の薬物処置群の平均生物発光；C = 研究最終日の対照群の平均生物発光；および $C =$ 研究最終日の対照群の平均生物発光 - 投与開始日の対照群の平均生物発光。

100%から42%の範囲のT/C値は抗腫瘍活性が全くないまたは最小の抗腫瘍活性を有すると解釈され；42%かつ>10%であるT/C値は抗腫瘍活性または腫瘍成長阻害を有すると解釈される。10%のT/C値または-10%の退縮値は腫瘍停滞だと解釈される。<-10%の退縮値は退縮として報告される。

【0808】

末梢血FACS分析：マウスの末梢血中のT細胞もモニターした。マウスは、氷上に保たれたEDTA被覆チューブ内に尾静脈を介して毎週血を採った。10 μ lの血液をチューブから氷上の96ウェルプレートに播いた。赤血球はACK赤血球溶解バッファー(Life Technologies、カタログ番号A10492-01)を用いて溶解させ、次に、冷PBSで2度洗浄した。細胞は、ヒトとマウスFcブロック(Miltenyi Biotec、カタログ番号130-059-901および130-092-575)のFcブロッキング混合物と一緒に30分間インキュベートし、次に、抗マウスCD11b、抗ヒトCD45、抗ヒトCD4、抗ヒトCD8およびCLL-1-FcまたはプロテインL抗体と、続いて二次と一緒にインキュベートした。細胞は2%パラホルムアルデヒド溶液を用いて20分間固定化し、洗浄してBD Fortessa上での分析に先立って一晚PBS+2%FBS中で保存し、続いてFlowJo FACS分析ソフトウェアを使用してさらに分析した。細胞は分析して、PL-21-luc腫瘍担持NSGマウスにおいてミリリットルの血液あたりのCAR⁺CD4⁺およびCD8⁺T細胞の数を決定した。血液中のT細胞数は平均 \pm 平均値の標準偏差(SEM)として報告している。

【0809】

結果

CLL-1特異的CAR T細胞のパネル(クローン6、9、10、11および12)の抗腫瘍活性を、ヒトAMLのPL-21モデルにおいて評価し、直接比較した。0日目の腫瘍移植に続いて、マウスは処置群に無作為化し、8日目に 5×10^6 CAR⁺T細胞を用いて静脈内に処置した。AML疾患負荷および動物健康は、動物がエンドポイントに到達するまでモニターした。対照PBSおよびCD19群のマウスは、CLL-1-11およびCLL-1-12群と併せて、対照群の疾病負荷が撮像により最大発光に近づいているCAR T細胞投与後の18日目(腫瘍移植の26日後)に安楽死させた。残りのCLL-1 CAR T細胞処置群(CLL-1-6、CLL-1-9およびCLL-1-10)のマウスはCAR T細胞投与後の25日目(腫瘍移植の33日後)に安楽死させ、群終末試料の全ての比較を可能にした。

対照群とCLL-1-6、CLL-1-9およびCLL-1-10処置群の間で疾患進行の遅延が観察され、CLL-1-11およびCLL-1-12 CAR T細胞処置群では後期時点で腫瘍成長の緩徐化が観察された。全ての群が表示される最終時点(CAR T細胞投与の18日後)で計算すると、CLL-1 CAR T細胞群の全てが対照群とは有意に異なっていた。PBS処置マウスと比べると、CD19 CAR T細胞処置群は有意性を示さず、0.496のP値であった。PBSと比べたCLL-1 CAR T細胞処置群の全てがP = 0.01を有していた(クローン6 P = 0.0008; クローン9 P = 0.0006; クローン10 P = 0.0006; クローン11 P = 0.0013; クローン12 P = 0.0109)。腫瘍進行の最初の遅延を示した3 CLL-1クローン、クローン6、9および10はCAR T細胞投与の18日後には腫瘍成長の停滞を示した。その他の2 CLL-1クローン、クローン11および12は、この時点まで抗腫瘍活性を示したが、それより早い時点ではこの2クローンは疾患進行のいかなる遅延も示さなかった。T細胞投与の18日後に計算すると、PBS対照群と比べた処置群ごとのパーセントデルタT/C値は以下の通りであり、CD19で98.38%、CLL-1-6で3.15%、CLL-1-9で2.04%、CLL-1-10で4.92%、CLL-1-11で13.42%およびCLL-1-12で25.19%であった。これらの値に基づけば、CD19 CAR T細胞処置群は全く活性を示さず、CLL-1-6、-9および-10 CAR T細胞処置群は腫瘍成長の停滞を示し、CLL-1-11および-12 CAR T細胞処置群は抗腫瘍活性を示した。

【0810】

この研究の生物発光撮像結果は図24に示されている。いかなるT細胞も受けなかったPBS処置群は、静脈内に移植されたNSGマウスにおいてベースラインのPL-21腫瘍成長動態を示した。CD19処置群は対照CD19 CAR T細胞を受け、これはCAR T細胞と同じインビトロ拡大過程を受けたPL-21細胞に特異的ではなかった。これらの細胞は、この腫瘍モデルにおいてT細胞の非特異的応答を示すためのT細胞対照の働きをした。PBSとCD19 CAR T細胞処置群の両方が、実験中はずっと連続する腫瘍進行を示した。

生物発光により疾病負荷をモニターすることに加えて、それぞれの群中のCAR⁺T細胞数も末梢血FACS分析によってモニターした。この研究のFACS結果は図25Aおよび25Bに示されている。CAR T細胞処置後に最大の抗腫瘍活性および腫瘍成長の遅延を示した群は、後期の時点で末梢血においてCD4⁺CAR⁺(図25A)およびCD8⁺CAR⁺T細胞(図25B)の両方の増加を示した。初期の時点では末梢血では観察される細胞の数は限られていた。AMLは主に骨髄中にあり、CAR T細胞もこれらの時点では骨髄中にある可能性がある。しかし、この群は抗腫瘍活性を示さなかった。最終時点で、CLL-1-6、CLL-1-9およびCLL-1-10群では末梢血中においてCAR T細胞の集団が拡大していた。

【0811】

研究終了時、脾細胞および骨髄細胞をマウスから収穫し分析して、CAR T細胞が残留しているかどうかを判定した。図26A~26Dに見られるように、CLL-1-9およびCLL-1-10処置群においてCD4およびCD8 CAR⁺T細胞がかなりの数見られた。その他の群のいくつか、特にCLL-1-12 CAR T細胞処置群ではT細胞の拡大も見られた。しかし、この群の骨髄には多数のCD4⁺およびCD8⁺T細胞の両方が見られたが、その細胞はCAR⁺ではなく、これらのマウスではT細胞の非特異的拡大を示している。CLL-1-6、CLL-1-9およびCLL-1-10は最大の抗腫瘍効果および腫瘍成長の遅延を示し、これは終末骨髄CAR⁺T細胞数に対応していた。注目すべきことに、CLL-1-6 CARは十分に検出されず、したがって、この群でのCAR⁺数は過小評価される可能性がある。CLL-1-11群でのCD4とCD8 T細胞の両方のわずかな残留性およびCLL-1-12群のこれらの細胞の大きな数は腫瘍に対する非特異的後期段階活性と相関がある可能性があり、図24では、腫瘍負荷のわずかな下落が後期の時点で見られる。

研究終了時、脾臓中の細胞の表現型も判定した。図27A～27Dに示されるように、これらのマウスの骨髄試料において観察されたことに類似して、脾臓中にかなりの数のCD4およびCD8 CAR⁺T細胞を有する唯一の群はCLL-1-9およびCLL-1-10群であった。これらの群は、脾臓中に多数のCD4⁺およびCD8⁺T細胞を有する唯一の群でもあった。CLL-1-11およびCLL-12群は、骨髄試料で観察されたT細胞の非CAR蓄積を脾臓では示さなかった。CLL-1-10マウスの脾臓試料で検出されたCAR⁺T細胞の大きな変動のために、この群は対照群と比べた場合、有意に異なるとして相関していなかった。

【0812】

考察：

新規のCLL-1 CAR形質導入T細胞の抗腫瘍活性をヒトAMLの異種移植片モデルを担持するNSGマウスでの効能研究において評価した。これらの研究によれば、PL-21-1ucモデルはNSGマウスでヒトAMLを再現し、CLL-1 CAR T細胞の標的になることができることが示された(図24)。この研究によれば、CLL-1 CARのうちの3(CLL-1-6、CLL-1-9およびCLL-1-10)はAMLの異種移植片モデルにおいて抗腫瘍応答を開始することができたことが示されている(図24)。群の全てについて血液中で最小数のCAR T細胞が検出されたが、後期の時点でCLL-1-6、CLL-1-9およびCLL-1-10群では、CAR T細胞は数が増加するのが見られた(図25Aおよび25B)。これら3CAR T細胞を用いて処置された群は腫瘍成長の遅延を示し、特に、CLL-1-9およびCLL-1-10群は、研究の終了時には終末骨髄および脾臓試料において著しい数のCAR T細胞を示した(図26A～26Dおよび27A～27D)。CLL-1-6群も腫瘍成長の最初のおよび長期の遅延を示したが、終末CAR T細胞数は、T細胞の表面でのscFvの発現を検出するのが困難であったために、正確に計算することができなかった。総合すると、CLL-1-9およびCLL-1-10群は、腫瘍成長の遅延、末梢血でのCD4⁺CAR⁺T細胞およびCD8⁺CAR⁺T細胞の増加を、終末骨髄および脾臓試料における著しい数のCD4⁺CAR⁺T細胞およびCD8⁺CAR⁺T細胞と共に示した。CLL-1-9群のみが、骨髄と脾臓の両方で対照群と比べた場合、有意に異なる量のCD4⁺CAR⁺およびCD8⁺CAR⁺T細胞を有していた。

【0813】

実施例5：化学療法とCLL1-CARの併用療法

化学療法と組み合わせたCLL-1 CAR療法の効果は、インビボAMLマウスモデルを使用して調べた。導入化学療法に続いてCLL1-CART細胞(クローン6)を用いて処置すると、初代AML異種移植片において白血病が根絶される。

幹細胞因子、GM-CSFおよびIL-3にさらにトランスジェニックであるNSGマウス(NSG-S)に初代AML芽細胞を注射した(尾部静脈注射を経て 3×10^6 、0日目)。4～6週間後、末梢血(PB)を収集して、>1%の循環白血病細胞(生ヒトCD45dim細胞)が存在すると定義される生着を確かめた。次に、AML異種移植片をシタラピンを用いて処置した(Ara-C、35～39日目の間で毎日、腹腔内注射により60mg/kg)。末梢血数をモニターし、次に、これらの異種移植片は55日目に無作為化して、CLL1ダイレクトCART細胞または対照非形質導入T細胞を受けた(1×10^5 静脈内)。それに続いて、連続後眼窩出血を実施し、絶対白血病芽細胞数を疾病負荷の基準として計算し異種移植片は生存について追跡した。

図33Bは、白血病細胞(生hucd45dimコンパートメント)におけるCLL1の平均蛍光強度(MFI)の代表的プロットを含み、化学療法を用いた処置により残留AMLにおいてCLL-1抗原が上方調節されていることを示している。シタラピン化学療法を用いた処置の2週間後AML異種移植片ではCLL1-MFIが有意に増加していた。

導入化学療法に続いて非形質導入T細胞を用いて処置されたマウスは末梢血白血病芽細胞数の減少を示さなかった。これとは対照的に、図33Cに示されるように、導入化学療法に続いてCLL1-CART細胞を用いて処置されたマウスは、末梢血白血病芽細胞数

10

20

30

40

50

が有意に減少し、AML異種移植片において白血病が根絶されていた。プロットは、指示されているAML注射後の異なる時点での1 μ lの末梢血あたりの末梢血絶対白血病芽細胞数(平均 \pm SD)を表している。全生存の分析でも、導入化学療法に続いてCLL1-CARTはAML異種移植片での全生存に有意に有利であるが、導入化学療法に続いて非形質導入T細胞ではそうではないことを示していた(図33D)。

【0814】

実施例6：低用量のRAD001は細胞培養モデルにおいてCART増殖を刺激するインビトロでのCART細胞増殖に対する低用量のRAD001の効果を、CART発現細胞を異なる濃度のRAD001の存在下で標的細胞と共培養することにより評価した。

【0815】

材料および方法

CAR形質導入T細胞の生成

ヒト化抗ヒトCD19 CAR(huCAR19)レンチウイルス移送ベクター(transfer vector)を使用して、VSVgシュードタイプ化レンチウイルス粒子にパッケージングされたゲノム物質を生成した。ヒト化抗ヒトCD19 CAR(huCAR19)のアミノ酸およびヌクレオチド配列は、2014年3月15日に提出されたPCT出願、WO2014/153270に記載されるCAR1、ID 104875であり、その中で配列番号85および31と命名されている。

レンチウイルス移送ベクターDNAは、Lenti-X 293T細胞をトランスフェクトするためのリポフェクタミン試薬と組み合わせて、3パッケージング成分、VSVg env、gag/polおよびrevと混合させる。培地はその後24時間および30時間後に交換し、ウイルス含有培地は収集し、濾過して-80で保存する。CARTは、健康なドナーの血液またはロイコパック(leukopak)の負磁気選択により得られる新鮮なまたは凍結未処理のT細胞の形質導入により生成される。T細胞は抗CD3/抗CD28ビーズと一緒に24時間のインキュベーションにより活性化され、その後ウイルス上清または濃縮されたウイルス(それぞれ、MOI=2または10)が培養物に添加される。改変されたT細胞は約10日間拡大させておく。形質導入された細胞(細胞表面でCARを発現している)のパーセンテージおよびCAR発現のレベル(相対的蛍光強度、幾何平均)は7日目から9日目の間でフローサイトメリー分析により決定される。遅い成長速度と約350fLに近づくT細胞サイズの組合せによりT細胞が後の分析のために凍結保存される状態が決定される。

【0816】

CARTの増殖評価

CARTの機能性を評価するため、T細胞を解凍し、計数し、生存率をセロメーター(Cellometer)により評価する。それぞれの培養物中のCAR陽性細胞の数は非形質導入T細胞(UTD)を使用して標準化する。CARTに対するRAD001の効果はRAD001を用いた滴定において試験し、50nMで開始した。共培養実験全てにおいて使用する標的細胞株はNalm-6、CD19を発現シルシフェラーゼを発現するように形質導入されているヒトブレB細胞急性リンパ性白血病(ALL)細胞株である。

CARTの増殖を測定するため、T細胞は1対1の比で標的細胞と一緒に培養する。細胞がCD3、CD4、CD8およびCAR発現のために染色されるとき、アッセイは4日間実行される。T細胞の数は基準としてビーズの計数を使用するフローサイトメリーにより評価する。

【0817】

結果

CART細胞の増殖能力を4日間共培養アッセイにおいて試験した。CAR陽性CD3陽性T細胞(暗いバー)および全CD3陽性T細胞(明るいバー)の数は、CAR形質導入および非形質導入T細胞をNalm-6と一緒に培養した後に評価した(図31)。huCAR19細胞は、0.016nM未満のRAD001の存在下で培養すると拡大し、もっ

10

20

30

40

50

と高い濃度の化合物では拡大の程度はそれよりも少なかった。重要なのは、0.0032と0.016 nMのRAD001の両方で増殖はRAD001の添加なしで観測された場合より高かったことである。非形質導入T細胞(UTD)は検出可能な拡大を示さなかった。

【0818】

実施例7：低用量のRAD001はCART発現をインビボで刺激する

この実施例では、異なる濃度のRAD001と一緒にインビボで増殖するhuCAR19細胞の能力を評価する。

【0819】

材料および方法

NALM6-luc細胞：NALM6ヒト急性リンパ性白血病(ALL)細胞株を再発ALLに罹った患者の末梢血から発現させた。次に、細胞にホタルルシフェラーゼをタグ付けした。これらの懸濁細胞は10%の熱失活させたウシ胎仔血清を補充したRPMIにおいて成長する。

【0820】

マウス：生後6週間のNSG(NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wj}/SzJ)マウスはJackson Laboratory(ストック番号005557)から入手した。

【0821】

腫瘍移植：NALM6-luc細胞を10%熱失活させたウシ胎仔血清を補充したRPMIにおいてインビトロで成長させ拡大させた。次に、細胞は15mlのコニカルチューブに移し、冷たい無菌PBSを用いて2度洗浄した。次に、NALM6-luc細胞を計数し、ミリリットルのPBSあたり 10×10^6 細胞の濃度で再懸濁させた。細胞を氷上に置き、直ちに(1時間以内)マウスに移植した。NALM6-luc細胞は尾静脈を経て静脈内に100 μ l容量で注射され、マウスあたり総数で 1×10^6 細胞であった。

【0822】

CART細胞投与：マウスは腫瘍移植の7日後 5×10^6 T細胞を投与された。細胞は37℃の水浴中で部分的に解凍し、次に細胞を含有するチューブに1mlの冷たい無菌PBSを添加することにより完全に解凍させた。解凍された細胞は15mlのファルコンチューブに移し、PBSを用いて最終容量10mlに調整した。細胞は、毎回1000 rpmで10分間2度洗浄し、次に血球計数器上で計数した。次に、T細胞は冷PBS 1mlあたり 50×10^6 CART細胞の濃度で再懸濁し、マウスに投与するまで氷上で保管した。マウスは尾静脈を経て静脈内に100 μ lのCART細胞を注射され、マウスあたり 5×10^6 CART細胞の用量であった。群あたり8マウスを100 μ lのPBS単独で(PBS)またはヒト化CD19 CART細胞で処置した。

【0823】

RAD001投与：1mgのRAD001に等しい濃縮したマイクロエマルジョン50mgを処方し、次に、投与時にD5W(デキストロース5%水溶液)に再懸濁した。マウスには毎日、所望の用量のRAD001を、200 μ lを用いて経口投与した(経口経管栄養を介して)。

【0824】

PK分析：マウスは腫瘍移植の7日後に開始してRAD001を毎日投与した。投与群は以下の通りであった：0.3 mg/kg、1 mg/kgおよび10 mg/kg。マウスは最初と最後のRAD001投与に続いて0日目および14日目にPK分析のため以下の時点で血を採った：15分、30分、1時間、2時間、4時間、8時間、12時間および24時間。

【0825】

結果：

RAD001の展開および薬物動態はNSGマウスにおいてNALM6-luc腫瘍を用いて試験した。RAD001だけを毎日経口投与してもNALM6-luc腫瘍の成長には影響を及ぼさなかった(図32)。RAD001の薬物動態分析によれば、腫瘍担持マ

10

20

30

40

50

ウスの血液中ではRAD001はかなり安定していることが示されている(図33Aおよび33B)。0日目と14日目の両方でのPK分析では、血液中のRAD001濃度は、試験されたもっとも低い用量(0.3mg/kg)での投与の24時間後でも約10nmであることを示している。

これらの用量に基づいて、huCAR19 CAR T細胞は、これらの細胞の増殖能力を判定するためにRAD001と一緒におよびそれなしで投与された。使用したもっとも高い用量は、投与の24時間後の血液中のRAD001レベルに基づいて3mg/kgであった。RAD001の濃度はRAD001の最終投与の24時間後10nMを超えていたので、CAR T細胞を用いたインビボ研究ではいくつかのもっとも低い用量のRAD001が使用された。CAR T細胞は毎日経口RAD001投与の開始に1日先立って静脈内投与された。マウスはT細胞拡大ではFACSを介してモニターされた。

10

最も低い用量のRAD001は、CAR T細胞の増強された増殖を示している(図34)。この増強された増殖は、CD8⁺CAR T細胞よりもCD4⁺CAR T細胞を用いるほうが明白であり長期である。しかし、CD8⁺CAR T細胞を用いると増強された増殖は、CAR T細胞投与に続く初期の時点で見ることが可能である。

【0826】

均等物

本明細書において引用されたありとあらゆる特許、特許出願および出版物の開示は、それによってそれらの全体が参照により本明細書に組み入れられる。本発明を具体的な面を参照しながら開示してきたが、本発明の他の面およびバリエーションが、本発明の真の本質および範囲から逸脱することなく当業者によって考え出され得ることは明らかである。添付の特許請求の範囲は、このような面および等価なバリエーションの全てを包含するものと解釈されることが意図される。

20

【図1A】

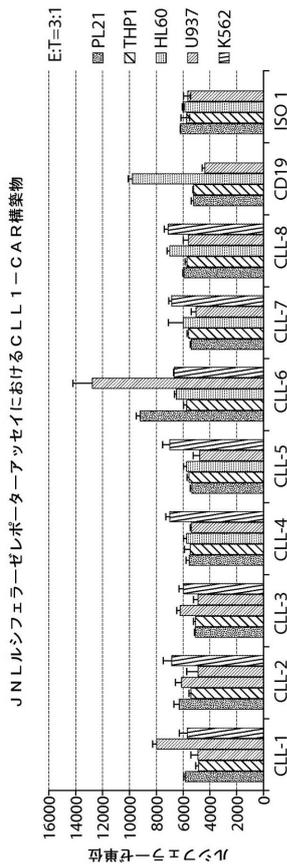
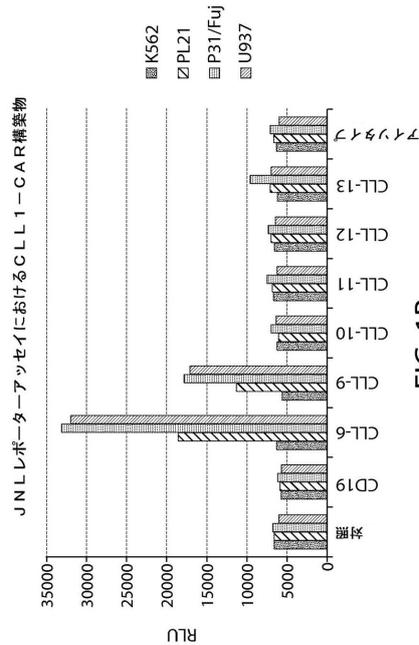


FIG. 1A

【図1B】



【 図 1 C 】

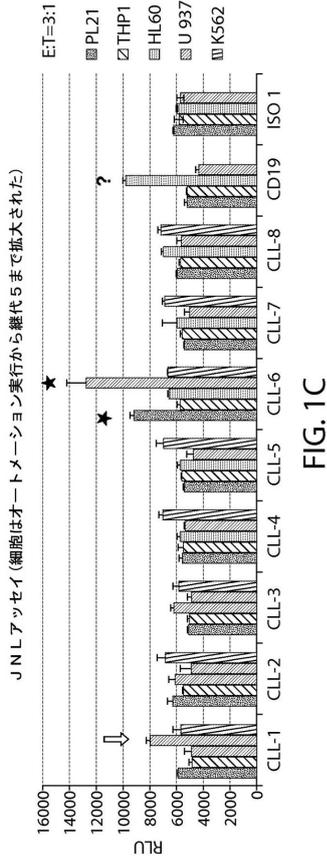


FIG. 1C

【 図 2 - 1 】

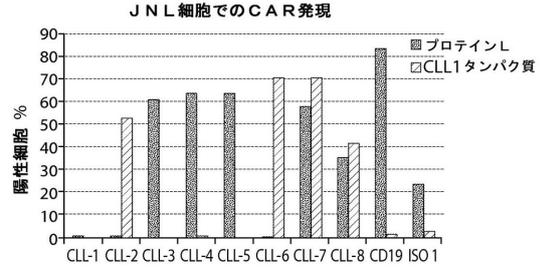


FIG. 2A

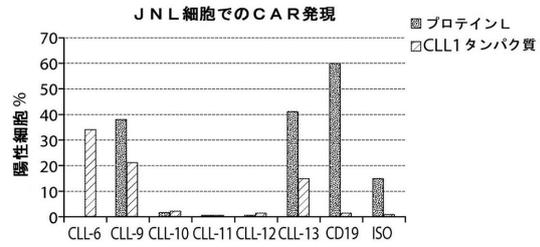


FIG. 2B

【 図 2 - 2 】

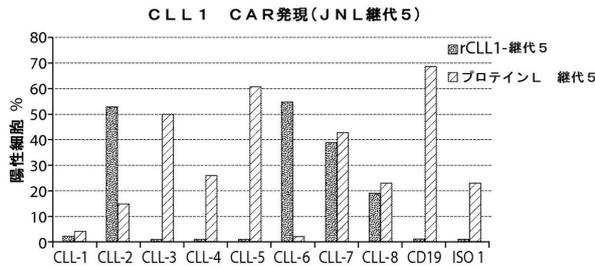


FIG. 2C

【 図 3 A 】

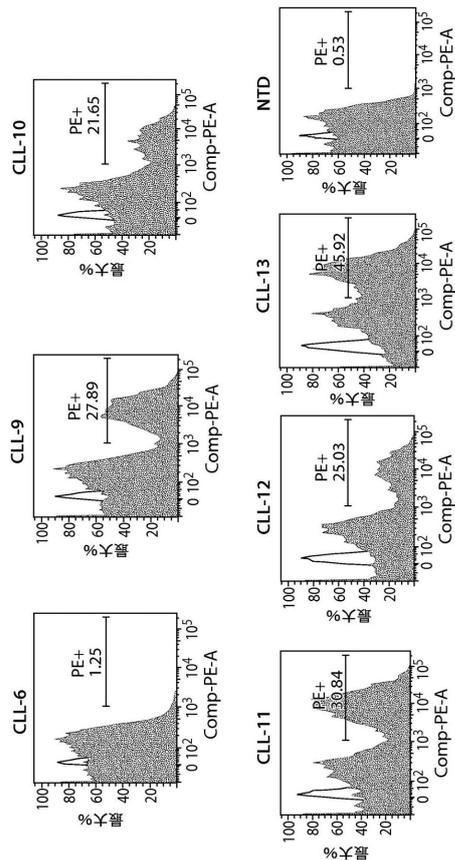


FIG. 3A

【 図 3 B 】

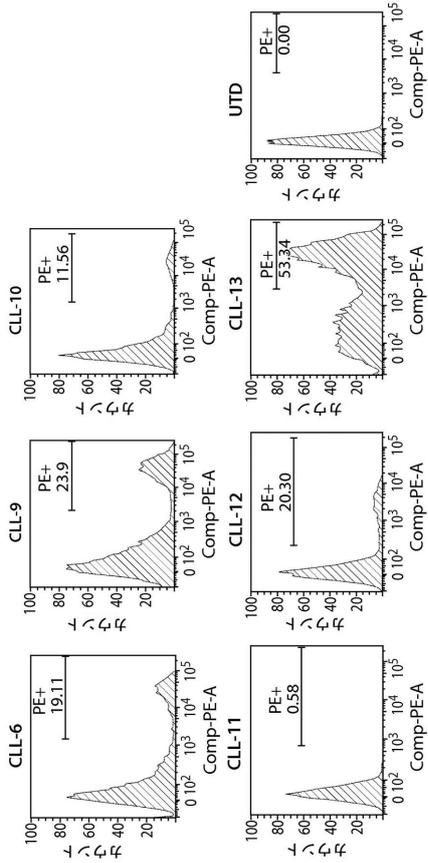


FIG. 3B

【 図 4 - 1 】

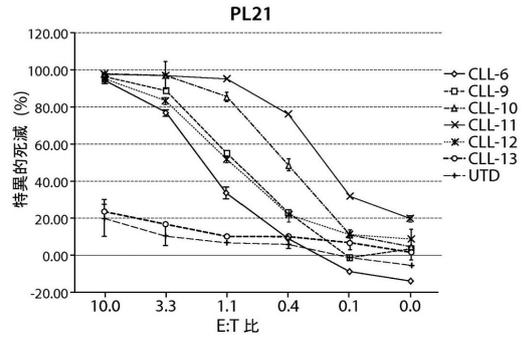


FIG. 4A

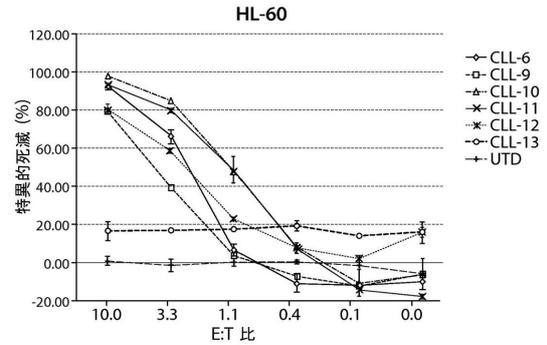


FIG. 4B

【 図 4 - 2 】

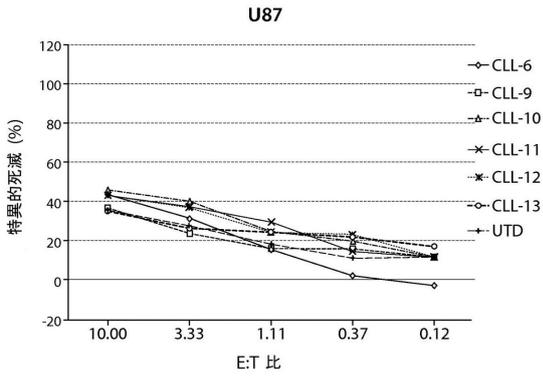


FIG. 4C

【 図 5 A 】

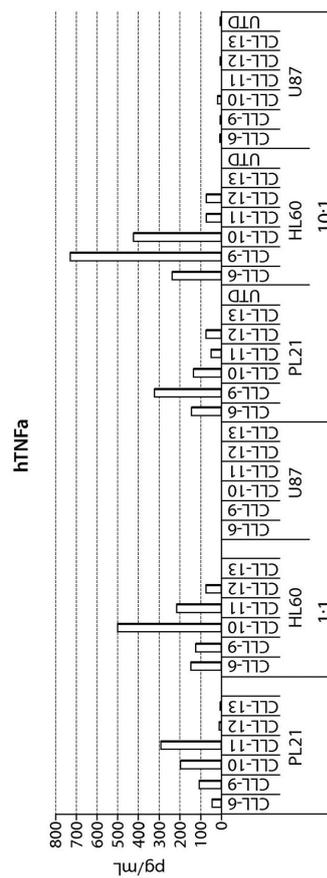


FIG. 5A

【 5 B 】

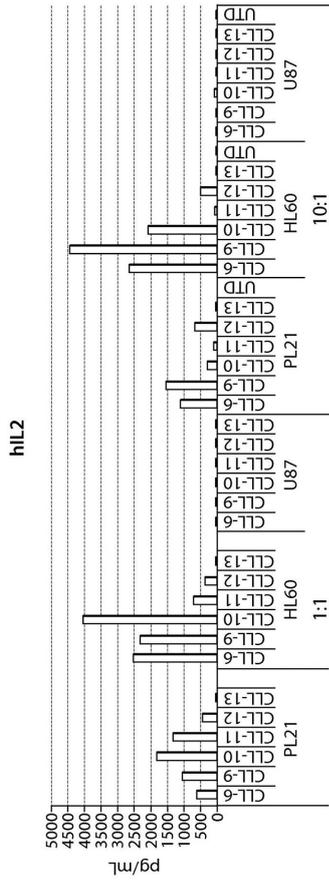


FIG. 5B

【 5 C 】

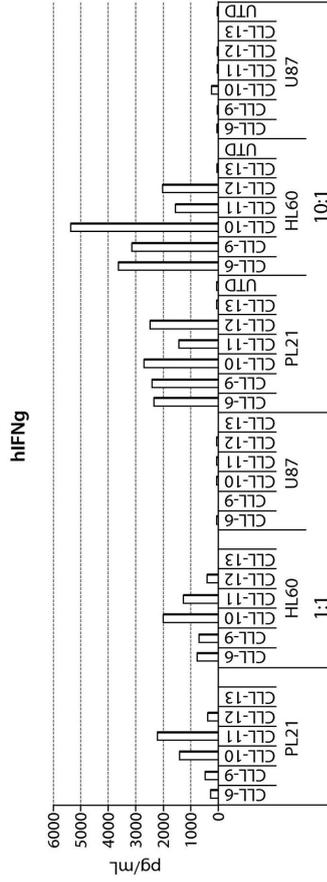


FIG. 5C

【 6 】

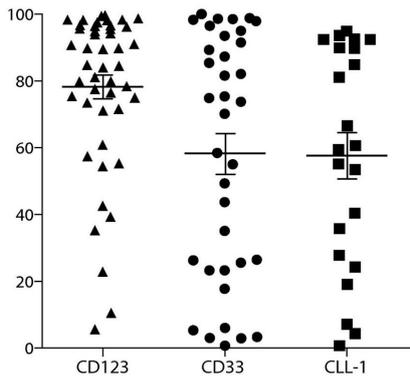


FIG. 6

【 7 】

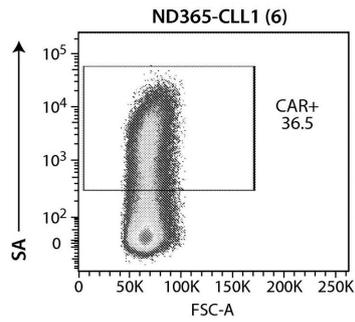


FIG. 7A

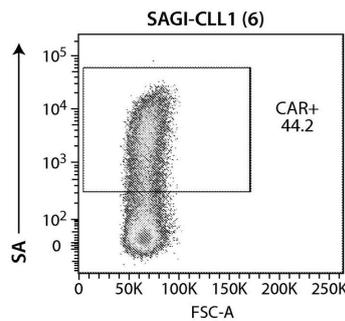


FIG. 7B

【 8 A 】

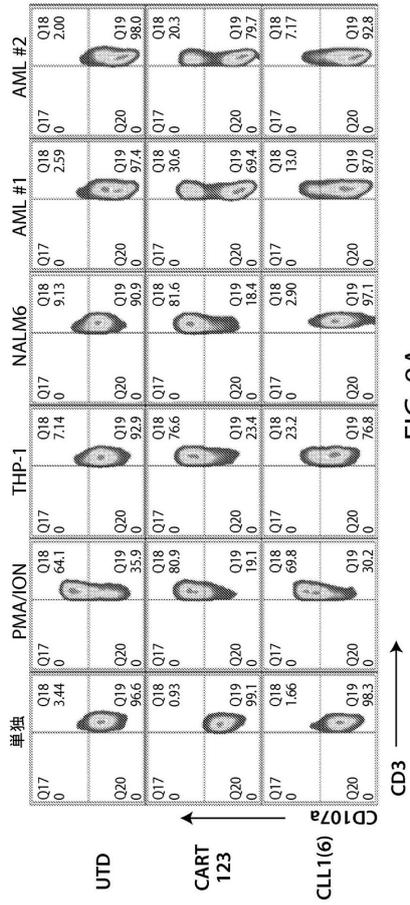


FIG. 8A

【 8 B 】

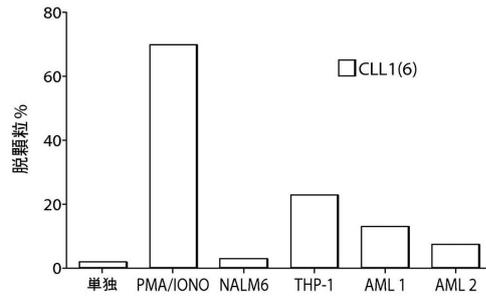


FIG. 8B

【 9 A 】

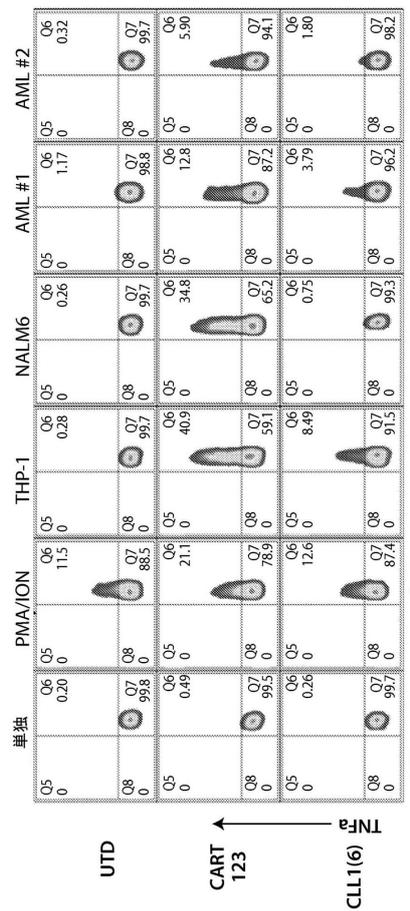


FIG. 9A

【 9 B 】

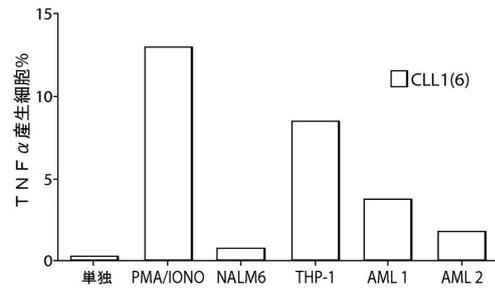


FIG. 9B

【 10A 】

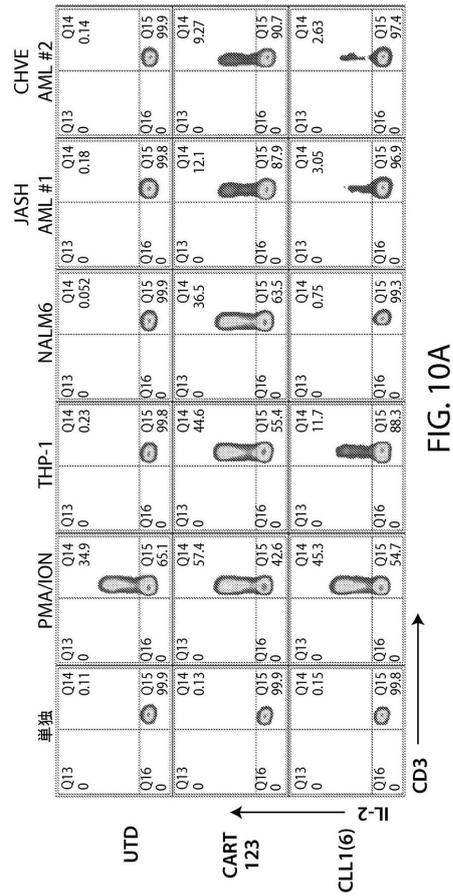


FIG. 10A

【 10B 】

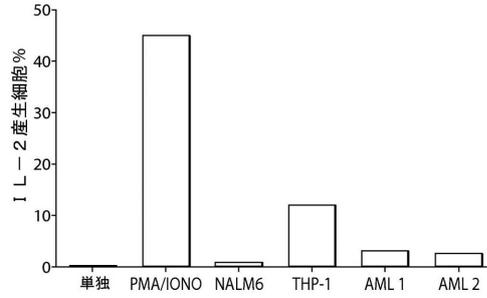


FIG. 10B

【 11-1 】

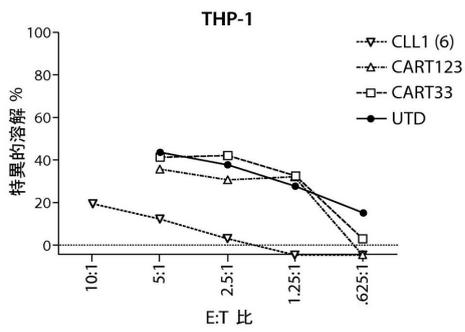


FIG. 11A

【 11-2 】

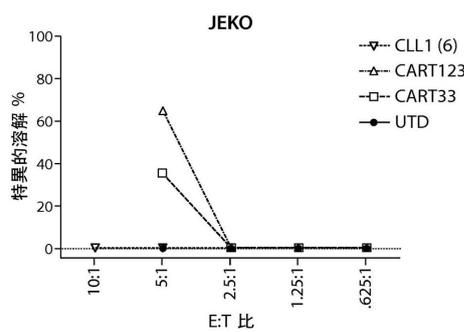


FIG. 11C

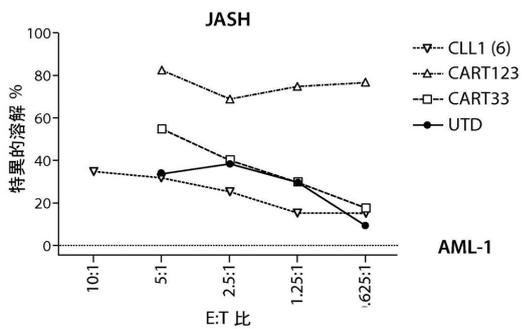


FIG. 11B

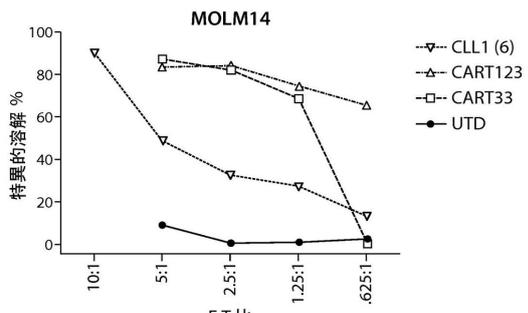


FIG. 11D

【 図 1 2 A 】

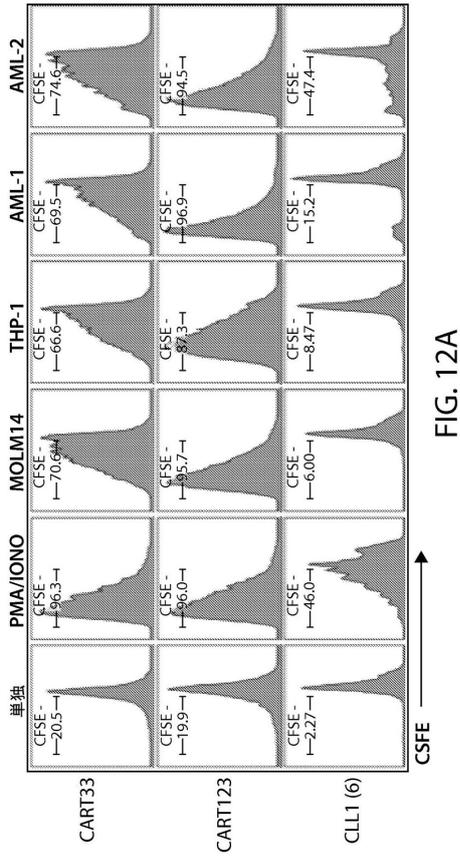


FIG. 12A

【 図 1 2 B 】

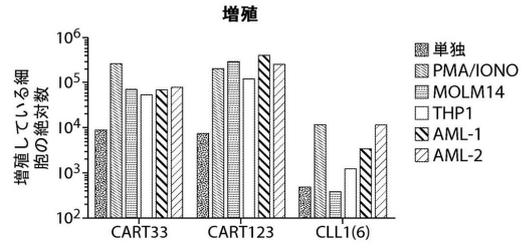


FIG. 12B

【 図 1 3 】

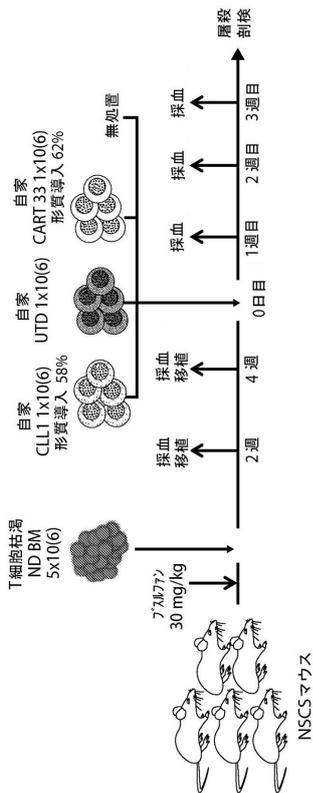


FIG. 13

【 図 1 4 A 】

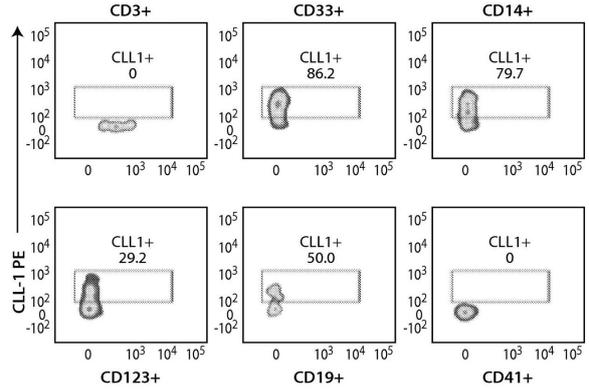


FIG. 14A

【 図 1 4 B 】

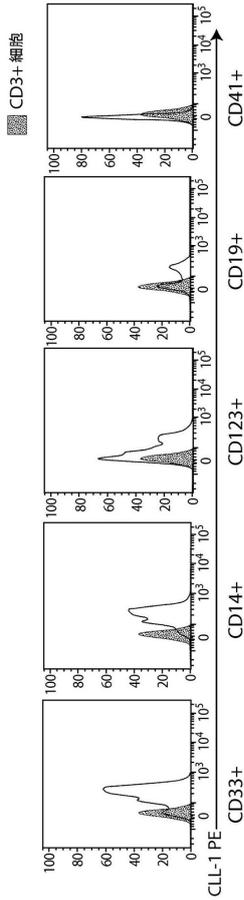


FIG. 14B

【 図 1 4 C 】

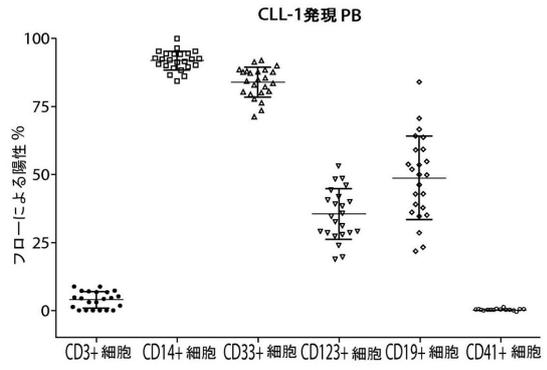


FIG. 14C

【 図 1 5 - 1 】

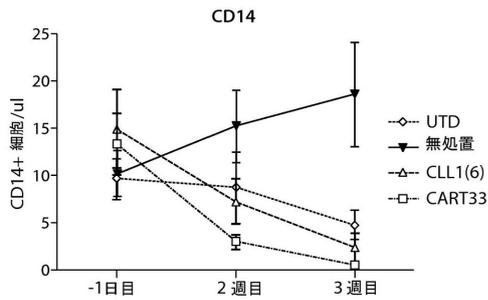


FIG. 15A

【 図 1 5 - 2 】

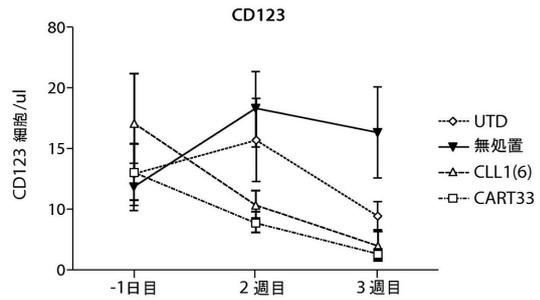


FIG. 15C

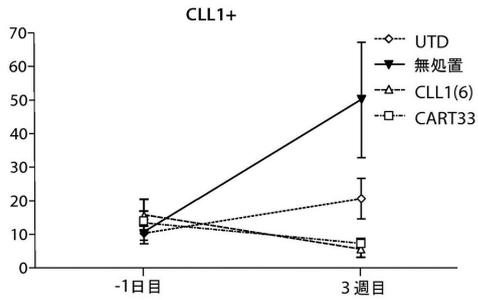


FIG. 15B

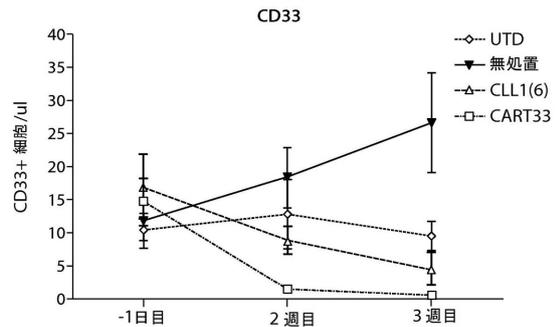
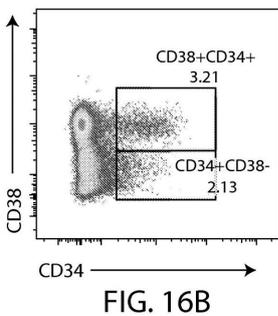
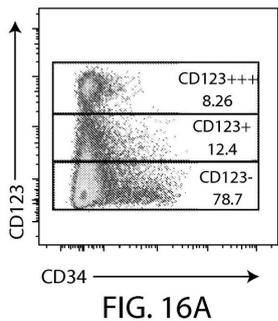
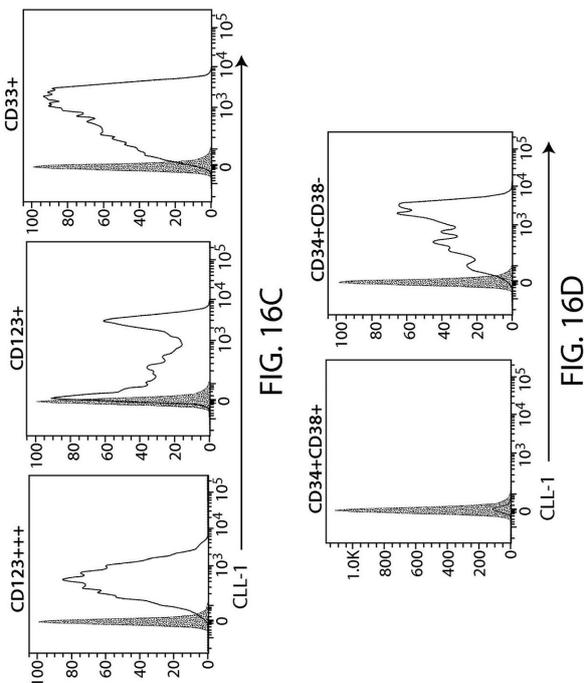


FIG. 15D

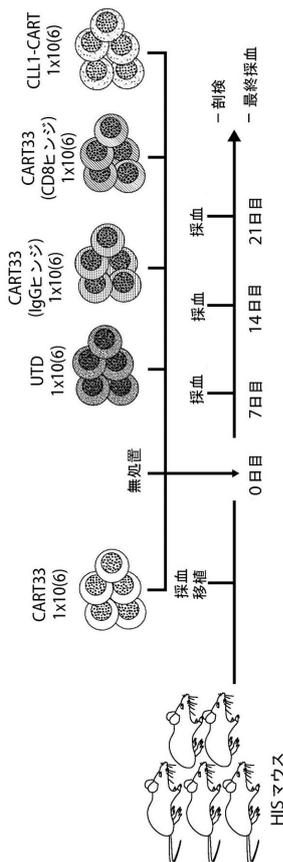
【 図 16 - 1 】



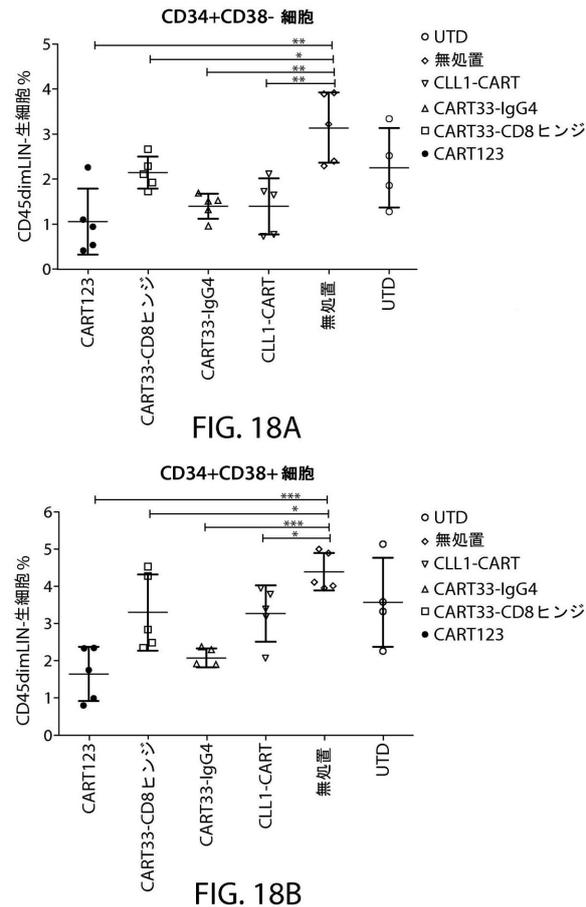
【 図 16 - 2 】



【 図 17 】



【 図 18 】



【図19】

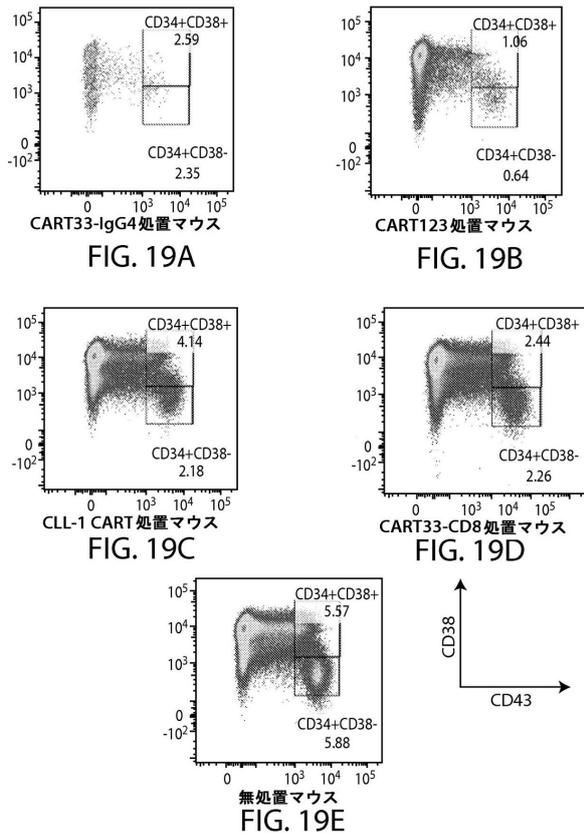


FIG. 19A

FIG. 19B

FIG. 19C

FIG. 19D

FIG. 19E

【図20】

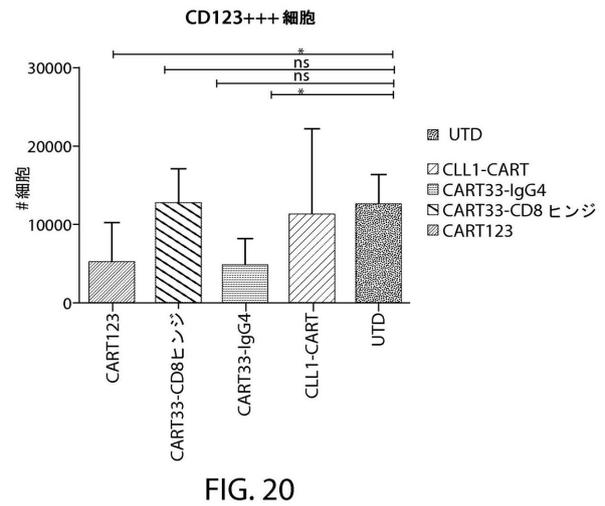


FIG. 20

【図21】

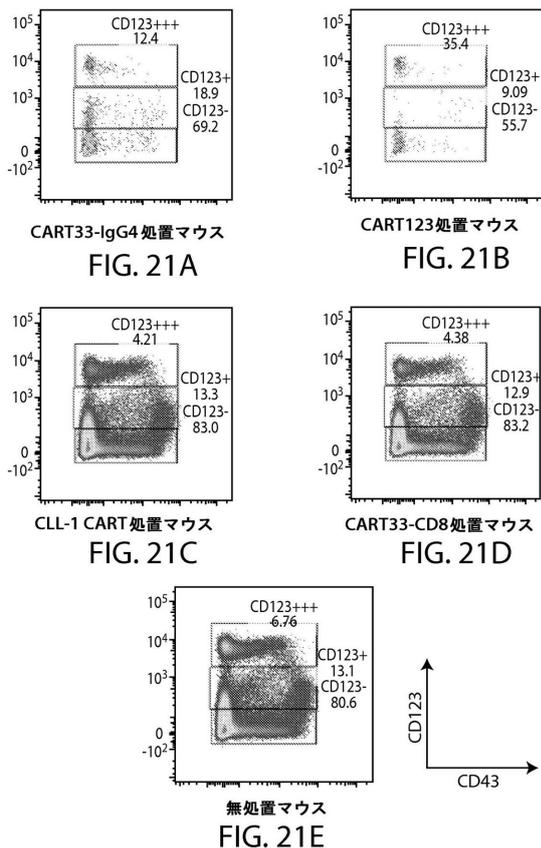


FIG. 21A

FIG. 21B

FIG. 21C

FIG. 21D

FIG. 21E

【図22A】

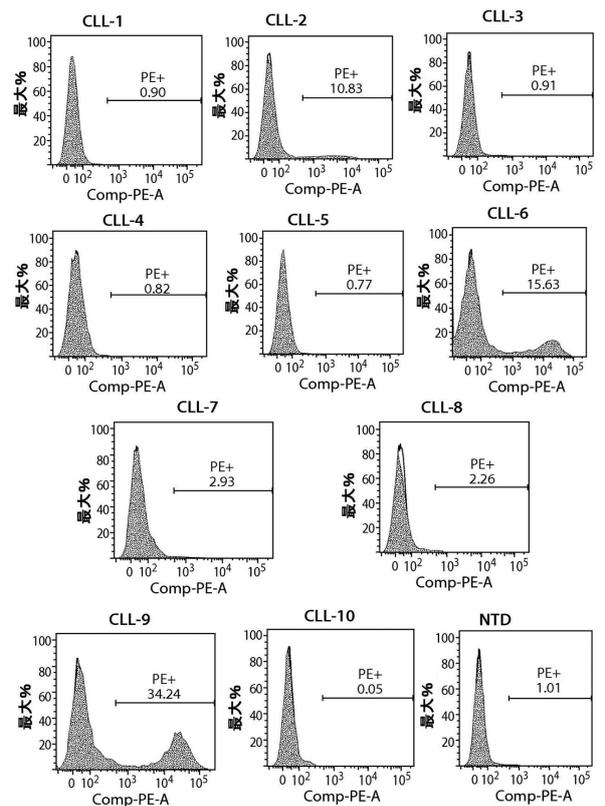


FIG. 22A

【 図 2 2 B 】

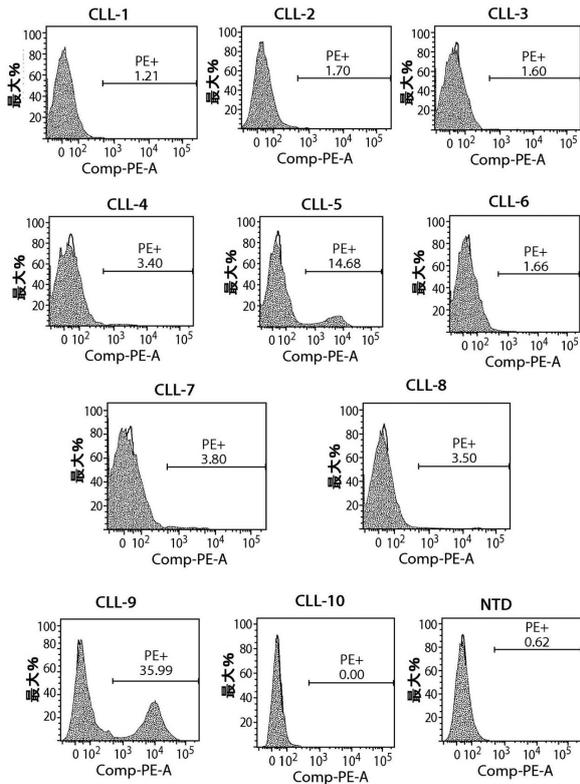


FIG. 22B

【 図 2 3 A 】

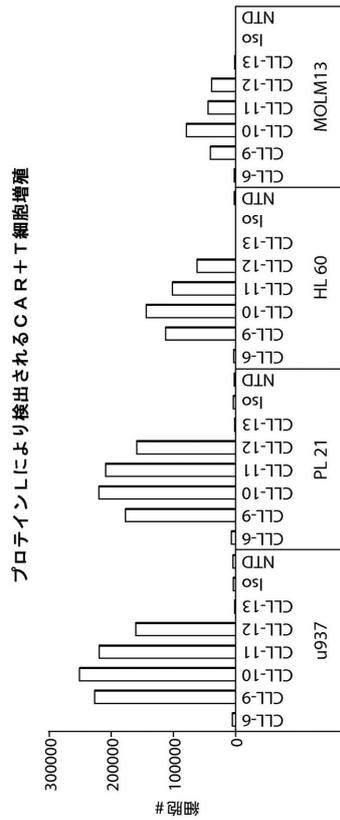


FIG. 23A

【 図 2 3 B 】

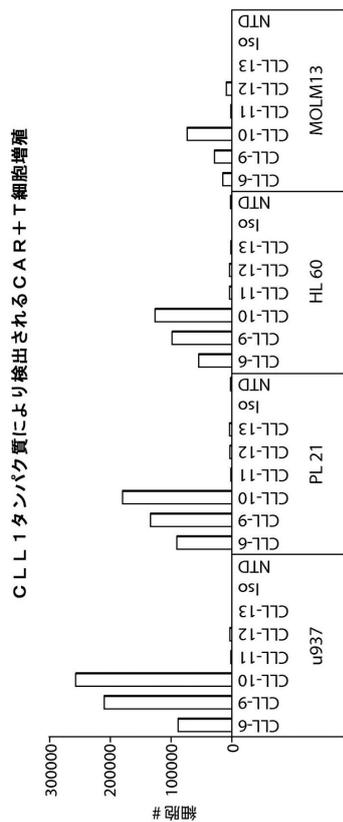


FIG. 23B

【 図 2 4 】

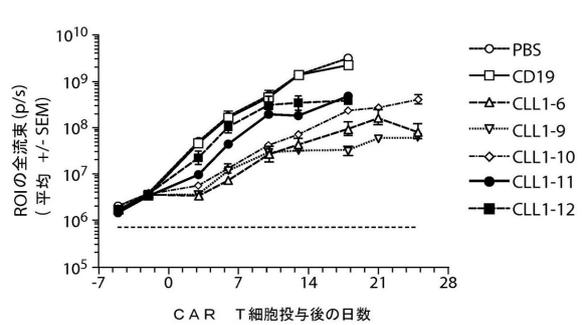


FIG. 24

【 図 2 5 】

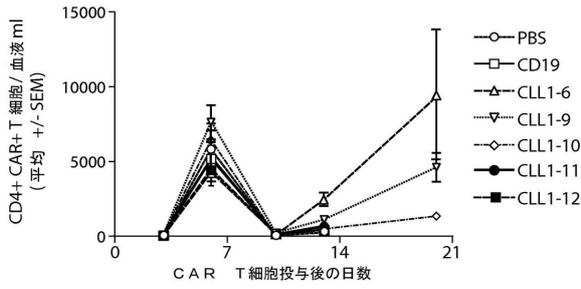


FIG. 25A

【 図 2 6 - 1 】

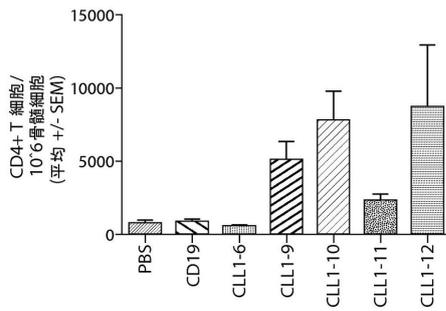


FIG. 26A

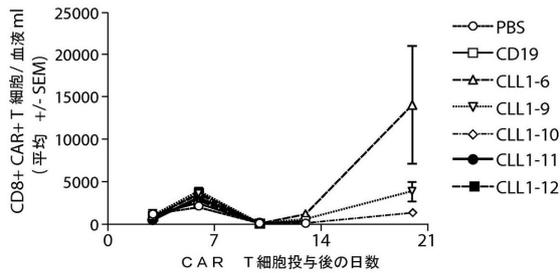


FIG. 25B

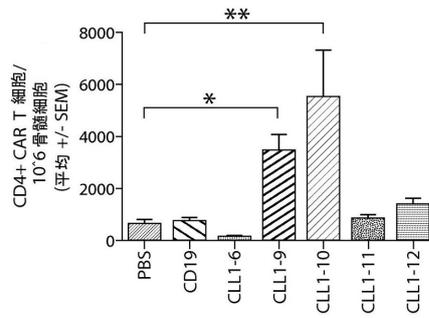


FIG. 26B

【 図 2 6 - 2 】

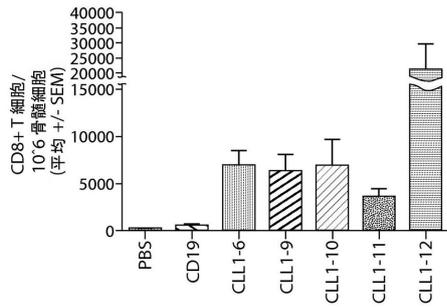


FIG. 26C

【 図 2 7 - 1 】

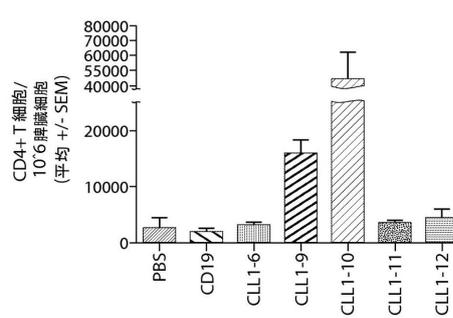


FIG. 27A

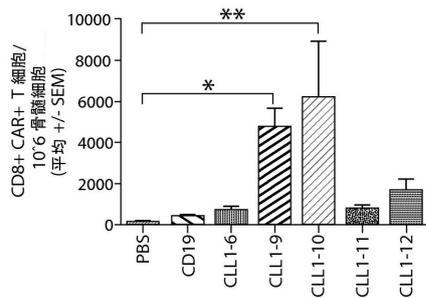


FIG. 26D

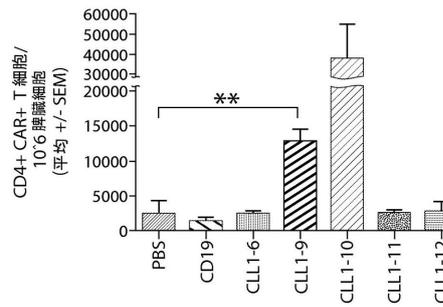
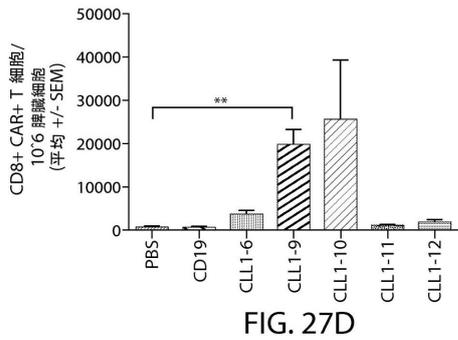
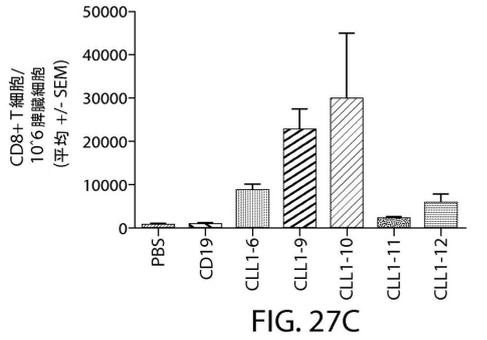
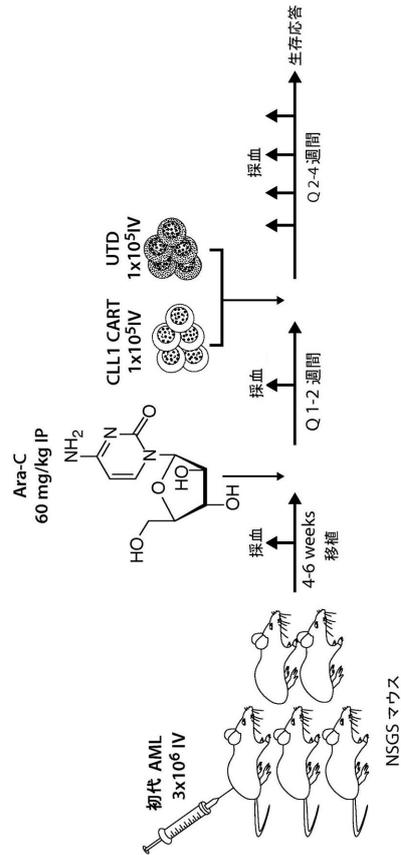


FIG. 27B

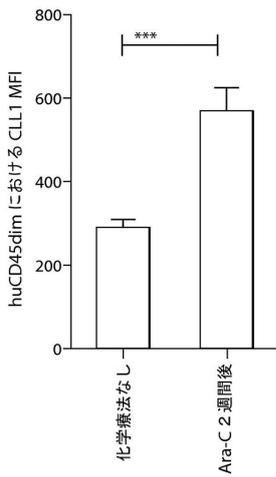
【 図 27 - 2 】



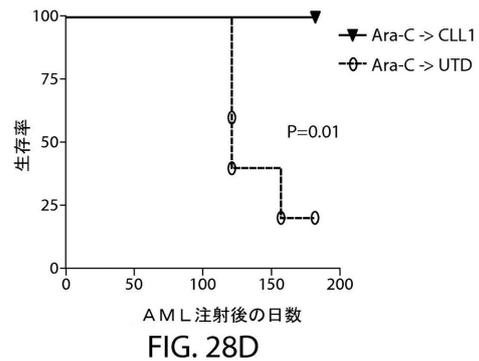
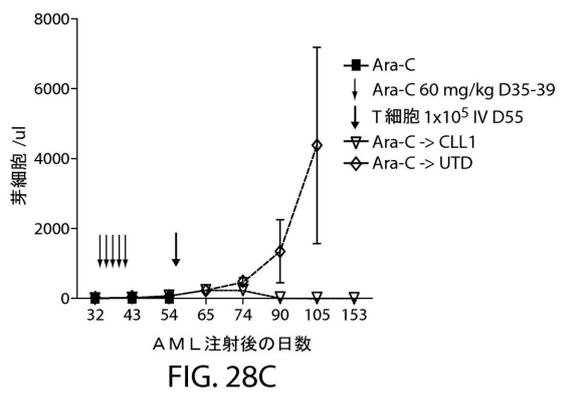
【 図 28 - 1 】



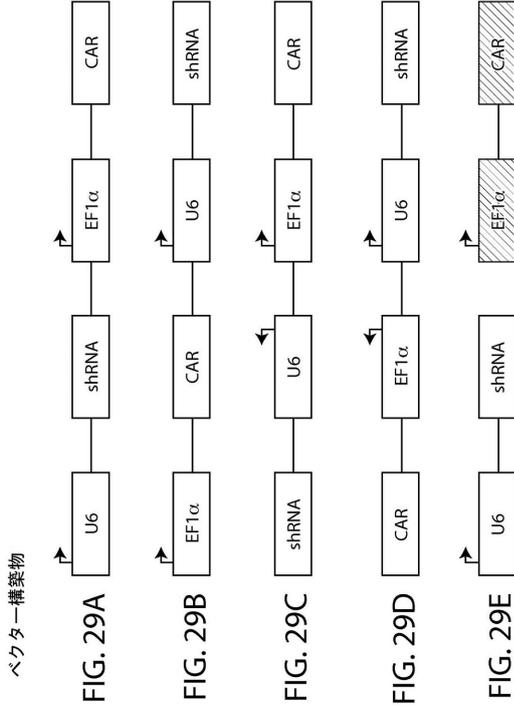
【 図 28 - 2 】



【 図 28 - 3 】



【 図 29 】



【 図 30 】

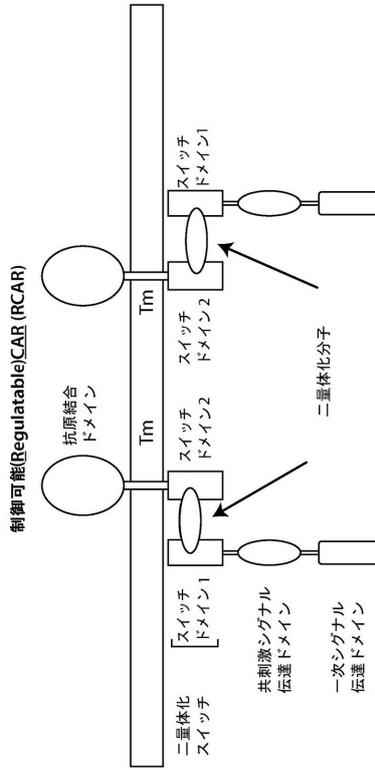


Fig. 30

【 図 31 】

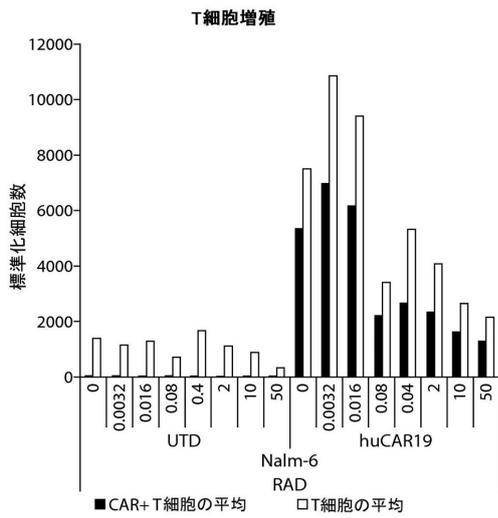


FIG. 31

【 図 32 】

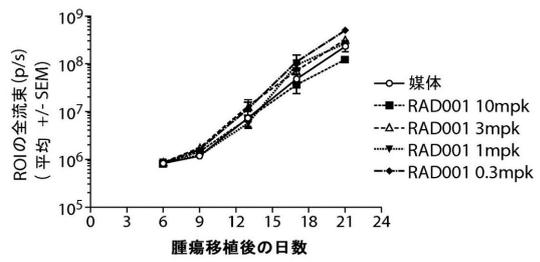
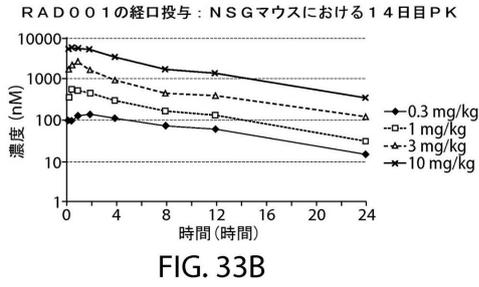
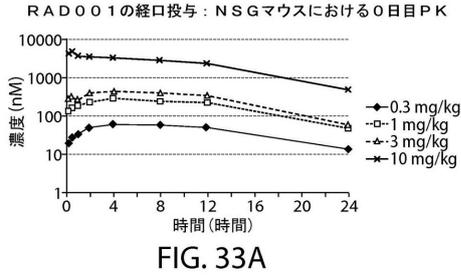
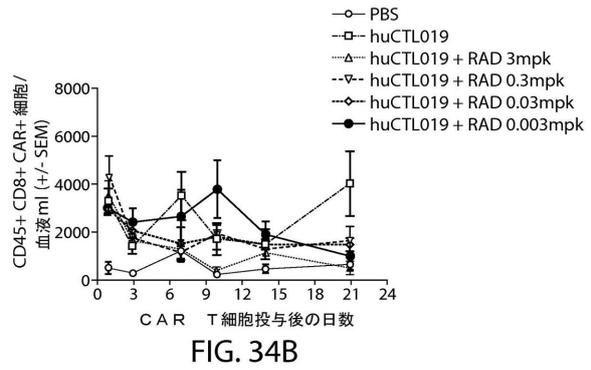
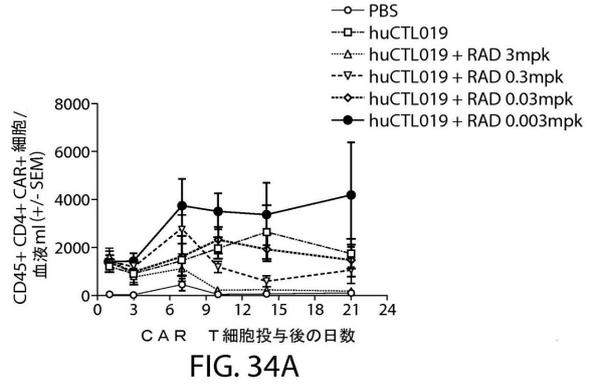


FIG. 32

【 図 3 3 】



【 図 3 4 】



【 配 列 表 】

0006736540000001 . app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 0 7 K	14/725 (2006.01)	C 0 7 K	14/725
C 0 7 K	14/705 (2006.01)	C 0 7 K	14/705
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63 Z
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02
A 6 1 P	19/08 (2006.01)	A 6 1 P	19/08
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 K	31/7088 (2006.01)	A 6 1 K	31/7088
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 2 1
A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 K	35/12
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17 A
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1
A 6 1 K	31/436 (2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 K	31/7068 (2006.01)	A 6 1 K	31/436
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	A 6 1 K	31/7068
C 1 2 N	5/078 (2010.01)	C 1 2 P	21/08
		C 1 2 N	5/078

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(72)発明者 ジェニファー・プログドン

アメリカ合衆国02139マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー250番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイテッド

(72)発明者 ヒルマー・エーバースバッハ

スイス、ツェーハー - 4002バーゼル、ポストファッハ、ノバルティス・ファルマ・アクチェンゲゼルシャフト

(72)発明者 サール・ギル

アメリカ合衆国19106ペンシルベニア州フィラデルフィア、ノース・サード・ストリート30番、アパートメント4エイ番

(72)発明者 デイビッド・グラス

アメリカ合衆国02139マサチューセッツ州ケンブリッジ、テクノロジー・スクエア100番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイテッド

(72)発明者 ユリア・ヤスクア

スイス、ツェーハー - 4002バーゼル、ポストファッハ、ノバルティス・ファルマ・アクチェンゲゼルシャフト

(72)発明者 サード・ケンデリアン

アメリカ合衆国19146ペンシルベニア州フィラデルフィア、サージョン・ジェネラルズ・コート103番

(72)発明者 ジョアン・マニック

アメリカ合衆国02139マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー220番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイテッド

(72)発明者 マイケル・シー・ミローン

- アメリカ合衆国08002ニュージャージー州チェリー・ヒル、サリー・ロード314番
- (72)発明者 レオン・マーフィー
アメリカ合衆国02139マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー250番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイテッド
- (72)発明者 セレスト・リチャードソン
アメリカ合衆国02139マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー220番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイテッド
- (72)発明者 ラシュマ・シン
アメリカ合衆国02139マサチューセッツ州ケンブリッジ、マサチューセッツ・アベニュー250番、ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ・インコーポレイテッド
- (72)発明者 ウェイ・ライ
中華人民共和国201203シャanghai、チャンジアン・ハイ-テク・パーク、ジンク・ロード、レイン3728、ナンバー3ビルディング、チャイナ・ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ
- (72)発明者 チーロン・ウー
中華人民共和国201203シャanghai、チャンジアン・ハイ-テク・パーク、ハレイ・ロード、レイン898、ナンバー8ビルディング、チャイナ・ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ
- (72)発明者 ヤン・チウメイ
中華人民共和国201203シャanghai、チャンジアン・ハイ-テク・パーク、ハレイ・ロード、レイン898、ナンバー8ビルディング、チャイナ・ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ
- (72)発明者 ジャン・ジーチュエン
中華人民共和国201203シャanghai、チャンジアン・ハイ-テク・パーク、ジンク・ロード、レイン3728、ナンバー3ビルディング、チャイナ・ノバルティス・インスティテューツ・フォー・バイオメディカル・リサーチ

審査官 堂畑 厚志

- (56)参考文献 国際公開第2005/000894(WO, A1)
国際公開第2013/139906(WO, A1)
特表2013-543879(JP, A)
特表2013-525260(JP, A)
CANCER RESEARCH, 米国, 2004年11月15日, VOL:64, NR:22, PAGE(S):8443 - 8450, URL, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1659>
BLOOD, 2014年 4月10日, vol. 123, no. 15, p. 2343-2354
Leukemia, 2014年 2月21日, vol. 28, p. 1596-1605
BLOOD, 2013年11月, VOL:122, NR:20, P:3461-3472, URL, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-04-493361>
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/
C07K 16/
C12N 1/00 - 7/08
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)