

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7339944号
(P7339944)

(45)発行日 令和5年9月6日(2023.9.6)

(24)登録日 令和5年8月29日(2023.8.29)

(51)国際特許分類	F I		
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z Z N A	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13		
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12		
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		
請求項の数 27 (全56頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2020-524547(P2020-524547)	(73)特許権者	508152917
(86)(22)出願日	平成30年11月6日(2018.11.6)		ザ ボード オブ リージェンツ オブ ザ
(65)公表番号	特表2021-502808(P2021-502808 A)		ユニバーシティ オブ テキサス シス
(43)公表日	令和3年2月4日(2021.2.4)		テム
(86)国際出願番号	PCT/US2018/059362		アメリカ合衆国 7 8 7 0 1 テキサス,
(87)国際公開番号	WO2019/094360		オースティン, ウェスト 7 番 ストリ
(87)国際公開日	令和1年5月16日(2019.5.16)	(74)代理人	100102978
審査請求日	令和3年8月24日(2021.8.24)		弁理士 清水 初志
(31)優先権主張番号	62/582,769	(74)代理人	100160923
(32)優先日	平成29年11月7日(2017.11.7)		弁理士 山口 裕孝
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100119507
(31)優先権主張番号	62/583,825		弁理士 刑部 俊
(32)優先日	平成29年11月9日(2017.11.9)	(74)代理人	100142929
	最終頁に続く		弁理士 井上 隆一
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 がんの処置におけるCAR-T細胞またはCAR-NK細胞を用いるLILRB4のターゲットニング法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

LILRB4に結合する、キメラ抗原受容体(CAR)タンパク質であって、
(i) SEQ ID NO:1~3のVH CDR 1~3およびSEQ ID NO:4~6のVL CDR 1~3、または
(ii) SEQ ID NO:11~13のVH CDR 1~3およびSEQ ID NO:14~16のVL CDR 1~3
を含む、前記CARタンパク質。

【請求項2】

1 nMを下回るがゼロより大きい、LILRB4に対する結合親和性(ELISAによって測定されたEC₅₀)を有する、請求項1に記載のCARタンパク質。

【請求項3】

前記結合親和性が、0.05~0.99 nMである、請求項2に記載のCARタンパク質。

【請求項4】

SEQ ID NO:7と少なくとも90%同一であるVHアミノ酸配列およびSEQ ID NO:9と少なくとも90%同一であるVLアミノ酸配列を含む、請求項1に記載のCARタンパク質。

【請求項5】

SEQ ID NO:7と少なくとも90%同一であるVHアミノ酸配列およびSEQ ID NO:9と同一であるVLアミノ酸配列を含む、請求項1に記載のCARタンパク質。

【請求項6】

SEQ ID NO:17と少なくとも90%同一であるVHアミノ酸配列およびSEQ ID NO:19と少なくとも90%同一であるVLアミノ酸配列を含む、請求項1に記載のCARタンパク質。

【請求項 7】

SEQ ID NO:17と少なくとも90%同一であるVHアミノ酸配列およびSEQ ID NO:19と同一であるVLアミノ酸配列を含む、請求項1に記載のCARタンパク質。

【請求項 8】

SEQ ID NO:21～23、31～33、または40～41と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項1に記載のCARタンパク質。

【請求項 9】

SEQ ID NO:21～23、31～33、または40～41と同一であるアミノ酸配列を含む、請求項1に記載のCARタンパク質。

【請求項 10】

請求項1～9のいずれか1項に記載のCARタンパク質をコードする、ポリヌクレオチド分子。

10

【請求項 11】

真核生物細胞において活性化プロモーターをさらに含む、請求項10に記載のポリヌクレオチド分子。

【請求項 12】

発現ベクターとしてさらに定義される、請求項10に記載のポリヌクレオチド分子。

【請求項 13】

LILRB4に結合するキメラ抗原受容体(CAR)をコードするポリヌクレオチド分子を含む、操作された細胞であって、前記ポリヌクレオチド分子が請求項1～9のいずれか1項に記載のCARをコードする、前記細胞。

20

【請求項 14】

T細胞である、請求項13に記載の細胞。

【請求項 15】

NK細胞である、請求項13に記載の細胞。

【請求項 16】

トランスポザーゼをさらに含む、請求項13に記載の細胞。

【請求項 17】

ヒト対象においてがんを処置するための薬学的組成物であって、有効量の細胞療法を該対象に実施するための請求項13～16のいずれか1項に記載の1種類または複数種類の細胞を含む、前記薬学的組成物。

30

【請求項 18】

第2のがん療法と組み合わせて使用するための、請求項17に記載の薬学的組成物。

【請求項 19】

前記第2のがん療法が、化学療法、免疫療法、放射線療法、ホルモン療法、または手術である、請求項18に記載の薬学的組成物。

【請求項 20】

前記第2のがん療法が前記細胞療法と同時に実施される、請求項18に記載の薬学的組成物。

【請求項 21】

前記第2のがん療法が前記細胞療法の前または後に実施される、請求項18に記載の薬学的組成物。

40

【請求項 22】

請求項13～16のいずれか1項に記載の1種類または複数種類の細胞の有効量についての第2の投与と組み合わせて使用するための、請求項17に記載の薬学的組成物。

【請求項 23】

前記がんが、転移性、再発性、または薬物耐性のがんである、請求項17に記載の薬学的組成物。

【請求項 24】

前記細胞療法が、がん部位局所的に、がん部位を構成する領域に、または全身的に実施

50

される、請求項17に記載の薬学的組成物。

【請求項25】

前記がんがAMLである、請求項17に記載の薬学的組成物。

【請求項26】

前記がんが血液悪性腫瘍であり、該血液悪性腫瘍が、前駆B細胞急性リンパ性白血病（前駆B ALL）、B細胞白血病、慢性リンパ芽球性白血病（CLL）、多発性骨髄腫（MM）、および芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍（BPDCN）を含む、請求項17に記載の薬学的組成物。

【請求項27】

前記がんが固形がんであり、該固形がんが、乳がん、肺がん、または前立腺がんを含む、請求項17に記載の薬学的組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権主張

本願は、2017年11月7日出願の米国特許仮出願第62/582,769号、2017年11月9日出願の同第62/583,825号、および2017年11月11日出願の同第62/584,770号からの優先権の恩典を主張し、各々の内容を参照により本明細書に組み入れる。

【0002】

1. 技術分野

20

本開示は、概して、医学、免疫学、細胞生物学、および分子生物学の分野に関する。特定の局面において、本開示の分野は、免疫療法に関する。より具体的に、キメラ抗原受容体（CAR）T細胞およびNK細胞、ならびにそのような細胞を使用する治療法に関する。

【背景技術】

【0003】

2. 背景

T細胞は、選択された標的細胞型の細胞表面抗原を非MHC拘束様式で特異的に認識する、膜貫通ドメインおよびシグナル伝達分子または分子群を含む細胞内ドメインに融合された抗体の単鎖可変フラグメント（scFv）をコードする遺伝物質により形質導入され得る。腫瘍関連抗原を標的にするそのようなキメラ抗原受容体（CAR）-T細胞は、いくつかの悪性腫瘍、最も注目すべきは前駆B細胞急性リンパ芽球性白血病の処置における可能性を示した。しかし、他の腫瘍の処置のためのCAR-T細胞療法に対する大きな制約は、正常な細胞のon-target/off-tumor除去の可能性である。CAR-T細胞を腫瘍に対して効果的に利用するためには、腫瘍細胞または腫瘍微小環境細胞に対して高い特異性を有する抗原が同定され標的にされなければならない。

30

【0004】

ナチュラルキラー（NK）細胞は、自然免疫の重要な部分をなしている。T細胞と異なり、NK細胞は、事前の感作なしで抗腫瘍細胞障害を開始することができ、潜在的に、サイトカイン放出症候群に起因する合併症およびon-target/off-tumor効果をわずかに有するのみであり得る（Hermanson and Kaufman, 2015）。T細胞およびNK細胞において共有されているシグナル活性化機構のため、CD3- 活性化ドメインを含むCARコンストラクトは、NK細胞も活性化することができる（Schonfeld et al., 2015）。

40

【発明の概要】

【0005】

概要

第1の態様において、LILRB4に結合するキメラ抗原受容体（CAR）タンパク質が提供される。CARタンパク質は、1 nMを下回るがゼロより大きい、例えば、0.05~0.99 nM、0.05~0.9 nM、0.05~0.8 nM、0.05~0.7 nM、0.05~0.6 nM、0.05~0.5 nM、0.05~0.4 nM、0.05~0.3 nM、0.05~0.2 nM、または0.05~0.1 nMの、LILRB4に対する結合親和性（ELISAによって測定されたEC₅₀）を有し得る。CARタンパク質は、（

50

i) SEQ ID NO:1~3のVH CDR 1~3およびSEQ ID NO:4~6のVL CDR 1~3、または (ii) SEQ ID NO:11~13のVH CDR 1~3およびSEQ ID NO:14~16のVL CDR 1~3 を含み得る。CARタンパク質は、SEQ ID NO:7と少なくとも90%同一であるVHアミノ酸配列およびSEQ ID NO:9と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%同一であるVLアミノ酸配列を含み得る。CARタンパク質は、SEQ ID NO:7と少なくとも90%同一であるVHアミノ酸配列およびSEQ ID NO:9と同一であるVLアミノ酸配列を含み得る。CARタンパク質は、SEQ ID NO:17と少なくとも90%同一であるVHアミノ酸配列およびSEQ ID NO:19と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%同一であるVLアミノ酸配列を含み得る。CARタンパク質は、SEQ ID NO:17と少なくとも90%同一であるVHアミノ酸配列およびSEQ ID NO:19と同一であるVLアミノ酸配列を含み得る。CARタンパク質は、SEQ ID NO:21~23、31~33、または40~41と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含み得る。CARタンパク質は、SEQ ID NO:21~23、31~33、または40~41と同一であるアミノ酸配列を含み得る。

10

【0006】

別の態様において、上記のCARタンパク質をコードするポリヌクレオチド分子が提供される。ポリヌクレオチド分子はさらに、真核生物細胞において活性なプロモーターを含み得る。ポリヌクレオチドはさらに、発現ベクターとして定義され得る。LILRB4に結合するキメラ抗原受容体(CAR)をコードするポリヌクレオチド分子を含む操作された細胞も提供される。ポリヌクレオチド分子は、上記のCARタンパク質をコードし得る。細胞は、T細胞またはNK細胞であり得る。細胞は、トランスポザーゼをさらに含み得る。

20

【0007】

さらに別の態様において、それを必要とするヒト対象においてがんを処置する方法であって、上記の操作された細胞の有効量を対象に投与する工程を含む、方法が提供される。この方法はさらに、ヒト対象に第2のがん療法、例えば、化学療法、免疫療法、放射線療法、ホルモン療法、または手術を実施する工程を含み得る。第2のがん療法は、細胞療法と同時に実施され得るか、または細胞療法の前もしくは後に実施され得る。この方法はさらに、上記の操作された細胞の有効量についての第2の投与をヒト対象に実施する工程を含み得る。がんは、デノボ、転移性、再発性、難治性、または薬物耐性のがんであり得る。細胞療法は、がん部位局所的に、がん部位を構成する領域に、または全身的に実施され得る。がんは、急性骨髄性白血病(AML)であり得る。がんは、血液悪性腫瘍、例えば、前駆B細胞急性リンパ芽球性白血病(前駆B ALL)、慢性リンパ球性白血病(CLL)、多発性骨髄腫(MM)、および芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍(BPDCN)であり得る。がんは固形がんであり得、該固形がんは、乳がん、肺がん、または前立腺がんを含む。

30

【0008】

[本発明1001]

LILRB4に結合する、キメラ抗原受容体(CAR)タンパク質。

[本発明1002]

1 nMを下回るがゼロより大きい、LILRB4に対する結合親和性(ELISAによって測定されたEC₅₀)

40

を有する、本発明1001のCARタンパク質。

[本発明1003]

前記結合親和性が、0.05~0.99 nM、0.05~0.9 nM、0.05~0.8 nM、0.05~0.7 nM、0.05~0.6 nM、0.05~0.5 nM、0.05~0.4 nM、0.05~0.3 nM、0.05~0.2 nM、または0.05~0.1 nMである、本発明1002のCARタンパク質。

[本発明1004]

(i) SEQ ID NO:1~3のVH CDR 1~3およびSEQ ID NO:4~6のVL CDR 1~3、または(ii) SEQ ID NO:11~13のVH CDR 1~3およびSEQ ID NO:14~16のVL CDR 1~3を含む、本発明1001のCARタンパク質。

[本発明1005]

50

SEQ ID NO:7と少なくとも90%同一であるVHアミノ酸配列およびSEQ ID NO:9と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%同一であるVLアミノ酸配列を含む、本発明1001のCARタンパク質。

[本発明1006]

SEQ ID NO:7と少なくとも90%同一であるVHアミノ酸配列およびSEQ ID NO:9と同一であるVLアミノ酸配列を含む、本発明1001のCARタンパク質。

[本発明1007]

SEQ ID NO:17と少なくとも90%同一であるVHアミノ酸配列およびSEQ ID NO:19と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%同一であるVLアミノ酸配列を含む、本発明1001のCARタンパク質。

10

[本発明1008]

SEQ ID NO:17と少なくとも90%同一であるVHアミノ酸配列およびSEQ ID NO:19と同一であるVLアミノ酸配列を含む、本発明1001のCARタンパク質。

[本発明1009]

SEQ ID NO:21~23、31~33、または40~41と少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む、本発明1001のCARタンパク質。

[本発明1010]

SEQ ID NO:21~23、31~33、または40~41と同一であるアミノ酸配列を含む、本発明1001のCARタンパク質。

20

[本発明1011]

本発明1001~1010のいずれかのCARタンパク質をコードする、ポリヌクレオチド分子。

[本発明1012]

真核生物細胞において活性化プロモーターをさらに含む、本発明1011のポリヌクレオチド分子。

[本発明1013]

発現ベクターとしてさらに定義される、本発明1011のポリヌクレオチド分子。

[本発明1014]

LILRB4に結合するキメラ抗原受容体(CAR)をコードするポリヌクレオチド分子を含む、操作された細胞。

30

[本発明1015]

前記ポリヌクレオチド分子が本発明1001~1010のいずれかのCARをコードする、本発明1014の細胞。

[本発明1016]

T細胞である、本発明1014の細胞。

[本発明1017]

NK細胞である、本発明1014の細胞。

[本発明1018]

トランスポザーゼをさらに含む、本発明1014の細胞。

[本発明1019]

それを必要とするヒト対象においてがんを処置する方法であって、有効量の細胞療法を該対象に実施する工程を含み、該細胞療法が、本発明1014~1018のいずれかの細胞を1種類または複数種類含む、該方法。

40

[本発明1020]

第2のがん療法を前記ヒト対象に実施する工程をさらに含む、本発明1019の方法。

[本発明1021]

前記第2のがん療法が、化学療法、免疫療法、放射線療法、ホルモン療法、または手術である、本発明1020の方法。

[本発明1022]

前記第2のがん療法が前記細胞療法と同時に実施される、本発明1020の方法。

50

[本発明1023]前記第2のがん療法が前記細胞療法の前または後に実施される、本発明1020の方法。[本発明1024]本発明1014～1018のいずれかの1種類または複数種類の細胞の有効量についての第2の投与を前記ヒト対象に実施する工程をさらに含む、本発明1019の方法。[本発明1025]前記がんが、転移性、再発性、または薬物耐性のがんである、本発明1019の方法。[本発明1026]前記細胞療法が、がん部位局所的に、がん部位を構成する領域に、または全身的に実施される、本発明1019の方法。[本発明1027]前記がんがAMLである、本発明1019の方法。[本発明1028]前記がんが血液悪性腫瘍であり、該血液悪性腫瘍が、前駆B細胞急性リンパ性白血病（前駆B ALL）、B細胞白血病、慢性リンパ芽球性白血病（CLL）、多発性骨髄腫（MM）、および芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍（BPDCN）を含む、本発明1019の方法。[本発明1029]前記がんが固形がんであり、該固形がんが、乳がん、肺がん、または前立腺がんを含む、本発明1019の方法。

本開示の他の目的、特徴、および利点は、以下の詳細な説明から明らかとなるであろう。しかし、詳細な説明および具体的実施例は、本開示の好ましい態様を示しているものの、この詳細な説明から本開示の精神および範囲内での様々な変更および改変が当業者に明らかとなることから、例示目的で提供されるにすぎないことを理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】**【0009】**

以下の図面は、本明細書の一部を形成し、本開示の特定の局面をさらに示すために含まれるものである。本開示は、本明細書に示される具体的な態様の詳細な説明とともにこれらの図面の1つまたは複数を参照することによってより理解され得る。

【図1】図1A～H。LILRB4は、正常な発現が単球系統の細胞に限定され、正常なCD34⁺造血幹細胞においては発現を示さない、単球性AMLに特異的なマーカーである。（図1A）骨髄単球性AML（M4、赤）および単球性AML（M5、青）の代表的な患者サンプルのフローサイトメトリープロットは、LILRB4が単球性AMLにおいて白血病芽細胞により発現されることを示している。（図1B）105名のAML患者におけるLILRB4発現の定量フローサイトメトリー分析は、LILRB4が単球性AML（M5）患者において白血病細胞の98%超（SD 2.78%）で発現されることを示している。（図1C～D）正常組織におけるmRNAおよびタンパク質レベルでのLILRB4の発現を、それぞれ、遺伝子発現分析および質量分析によるプロテオミクス分析によって評価し、LILRB4が単球系統の細胞において限定的な発現を示すことが示された。（図1E～F）フローサイトメトリーによって評価されるLILRB4の表面発現は、対応する正常な単球（青）と比較して、単球性AML芽細胞（赤）において有意に増大する。（図1G）代表的なフローサイトメトリープロットは、LILRB4が健康なヒト骨髄細胞においてCD34と共発現されないことを示している。しかし、それは、LILRB4⁺/CD34⁺ AML-M5白血病細胞の部分集団を標識する。（図1H）AML細胞株THP-1におけるLILRB4発現（赤）およびMV4-11（青、アイソタイプ対照）におけるそのフローサイトメトリー分析。

【図2】LILRB4 CARコンストラクトの概要図。CD3⁻活性化ドメインと共にCD28または4-1BB共刺激ドメインを含む第2世代CARコンストラクト。CD3⁻活性化ドメインと共にCD28または4-1BB共刺激ドメインを含む第3世代CARコンストラクト。抗LILRB4モノクローナル抗体由来のscFv：ヒト化#128-3（scFv-Hu128）およびヒト化#8（scFv Hu8）。

【図3】図3A～B。LILRB4 CAR T細胞の効率的生成。ヒト初代T細胞に、LILRB4 CAR

10

20

30

40

50

(scFv Hu128) をコードするレンチウイルスを用いて形質導入を行った。(図3A) 形質導入後、細胞を、ピューロマイシン処理によって選択し、培養下で2~3週間増大させた。LILRB4 CAR-T細胞を、LILRB4-Fc融合タンパク質への結合によって同定した。(図3B) 形質導入後、GFP陽性LILRB4 CAR-T細胞は、LILRB4-Fc融合タンパク質への結合を示す。ついでGFP陽性細胞をフローサイトメトリーによって選別し、培養下で2~3週間増大させた。

【図4】図4A~C。抗LILRB4 CAR-T細胞はLILRB4⁺ AML細胞によって刺激された場合に、強力なインビトロ細胞障害性および特定のサイトカインの放出を示す。(A) 抗LILRB4 CAR-T細胞は、複数のLILRB4⁺ AML細胞株に対して効果的な細胞障害性を示す。AML細胞株を、対照T細胞(青)または抗LILRB4 CAR-T細胞(赤)と、1:1~10:1のE:T範囲で4時間共培養した。細胞障害性を、フローサイトメトリーベースのアッセイを用いて判定した。(B) 抗LILRB4 CAR-T細胞は、LILRB4⁺初代AMLサンプルおよびLILRB4⁺正常単球に対して効果的な細胞障害性を示す。(C) 抗LILRB4 CAR-T細胞(赤)または対照T細胞(青)とMV4-11細胞(E:T-1:1)の24時間の共培養の後に上清を収集し、ELISAによりIFN およびTNF 放出についてアッセイした。抗LILRB4 CAR-T細胞は、MV4-11 AML細胞により活性化された場合に、対照T細胞と比較して、有意に増大したサイトカイン放出を示す。すべてのパネルにおいて、*p 0.05, ***p 0.001。

【図5】図5A~E。LILRB4 CAR-T細胞はMV4-11 AML異種移植マウスモデルにおいて白血病量(leukemia burden)を有意に減少させる。免疫不全NSGマウスに照射を行い、次の日(第0日)に 1×10^6 個のMV4-11ルシフェラーゼ発現AML細胞を注射した。マウスを、第4日に、PBS、対照T細胞(細胞 2×10^6 個/200 μ l CN-T)またはLILRB4 CAR-T細胞(細胞 2×10^6 個/200 μ l CAR-T)で処置した。(図5A)対照T細胞およびLILRB4 CAR-T細胞処置マウスの毎週の生物発光画像化(BLI)。(図5B)BLIデータの要約(全流束(p/s))は、LILRB4 CAR-T細胞処置マウスが対照T細胞処置マウスと比較して有意に減少した白血病量を示すことを示している。(図5C~D)第28日の末梢血(図5C)および骨髓(図5D)におけるヒト白血病芽細胞パーセント。LILRB4 CAR-T細胞処置マウスは、PBSおよび対照T細胞処置マウスと比較して、末梢血および骨髓において有意に減少した循環白血病芽細胞を示す。(図5E)MV4-11マウス異種移植片の生存分析。LILRB4 CAR-T細胞処置マウスは、PBSまたは対照T細胞処置マウスと比較して有意に改善された生存率を示す。*p 0.05, **p 0.01。

【図6】図6A~D。LILRB4はヒトHSCにおいて発現されず、かつ抗LILRB4 CAR-T細胞はインビトロまたはインビボでヒトHSPCに対して毒性を有さない。(図6A)正常な健康成人骨髓から得たヒトHSCおよびMPPにおけるLILRB4発現のフローサイトメトリー分析。細胞を、低SSC/低FSC/CD45-Dimからゲートした。(図6B)UCB-CD34細胞を、対照T細胞または抗LILRB4 CAR-T細胞と、E:T 10:1で4時間共培養した。総細胞培養物を、Methocult Classic (Stemcell)中に再懸濁し、プレートし、10日後にコロニーを計数した。PBSで処理した細胞、対照(非形質導入)T細胞または抗LILRB4 CAR-T細胞において赤芽球バースト形成単位(BFU-E)、顆粒球コロニー形成単位(CFU-G)、単球CFU-(M)、CFU-GMまたはCFU-GEMMコロニー数に有意差が見られなかった。(図6C~D) 8×10^4 個の臍帯血CD34⁺(UCB-CD34)細胞をNSGマウスに移植し、ヒト化造血系再構成マウスモデルを作製した。生着後にマウスをPBS(n=3)または抗LILRB4 CAR-T細胞(n=5)で処置し、(図6C)BM中のヒトCD34⁺/C38⁻HSC集団について分析し(代表的なマウスのフローサイトメトリープロット)、(図6D)骨髓中のHSC(CD34⁺/C38⁻)、骨髓(CD33)、単球(CD14)、およびB細胞(CD19)集団ならびに末梢血中の血小板(CD41)集団について定量した。抗LILRB4 CAR-T細胞で処置したマウスとPBS処置条件下のそれらとの間でいかなる細胞集団においても差が観察されなかった。

【図7】図7A~E。LILRB4 CAR-NKはインビトロでAML細胞株に対して特異的な細胞障害性を示す。(図7A) LILRB4 CAR-NKL(128-41BB NKL)または対照NKL(NKL)細胞を、MV4-11細胞(左パネル)またはTHP-1細胞(右パネル)と様々なE:T比(3:1~6:1)で共培養した。代表的なフロープロットに示されるように、細胞障害性を、フローサ

10

20

30

40

50

イトメトリーによって判定した。(図7B)フローサイトメトリーベースのアッセイの細胞障害性の定量。(図7C)E:T=3で様々なコンストラクト(8-CD28 NKL、8-41BB NKL、128-41BB NKL)のLILRB4 CAR-NKL細胞を用いたMV4-11に対する細胞障害性アッセイ。(図7D)E:T=6で様々なコンストラクト(8-CD28 NKL、8-41BB NKL、128-41BB NKL)のLILRB4 CAR-NKL細胞を用いたTHP-1に対する細胞障害性アッセイ。(図7E)初代LILRB4 CAR-NK(CAR128-41BB UCBNK)または対照NK(UCB-NK)細胞を、THP-1細胞とE:T比=3で共培養した。細胞障害性をフローサイトメトリーによって測定した。* p 0.05、*** p 0.001。

【図8】図8A~B。白血病細胞による刺激後のLILRB4 CAR-NKLによるサイトカイン放出。(図8A)CAR-NKL(#8-CD28)細胞を、1:1 E:T比でMV4-11細胞、MOLM13またはMOLM13-LILRB4 KO細胞を用いて10時間刺激した。IFN- γ の放出を、培養上清においてELISAキットにより検出した。(図8B)CAR-NKL(128-41BB)細胞を、1:1 E:T比でMV4-11細胞またはMOLM13を用いて10時間刺激した。IFN- γ の放出を、培養上清においてELISAキットによって検出した。*** p 0.001。

【図9】図9A~D。LILRB4 CAR-NKL細胞はMV4-11 AMLマウス異種移植モデルにおいて白血病の生着を減少させる。(図9A)インビボ異種移植実験の概要。(図9B)BLIデータ、全流束(p/s)の要約。LILRB4 CAR-NKL(128-41BB CAR NKL)は、PBSおよび対照NKL細胞処置マウスに対して有意に減少した白血病量を示している。(図9C)末梢血におけるNKL細胞パーセント。LILRB4 CAR NKLは、MV4-11細胞を移植したNSGマウスにおいて、対照NKL細胞よりも増大された。* p 0.05。(図9D)第37日の対照NKL(NKL)対LILRB4 CAR-NKL(CAR-NKL)細胞処置マウスの生物発光画像。

【図10】図10A~D。LILRB4 CAR-NKL細胞はMV4-11 AMLマウス異種移植モデルにおいて白血病量を減少させる。(図10A)インビボ異種移植実験の概要。(図10B)第24日のCN-NKL対LILRB4 CAR-NKL(#128-41BB)細胞処置マウスの生物発光画像化。(図10C)第29日の末梢血におけるヒト白血病芽細胞およびNKL細胞のパーセント。LILRB4 CAR-NKL(#128-41BB)細胞処置マウスは、末梢血において、CN-NKL細胞処置マウスと比較して有意に減少した循環白血病芽細胞(MV4-11細胞の表面表現型としてはhCD45⁺CD4⁺)および増大したNK細胞(NKL細胞の表面表現型としてはhCD45⁺CD4⁻)を示している。(図10D)LILRB4 CAR-NKL(128-41BB)細胞は、MV4-11マウス異種移植モデルのPBにおいて対照NKL細胞よりも有意に大きな増大を示した。

【図11】図11A~E。LILRB4は多発性骨髄腫の特異的マーカーでありCAR-T細胞によって認識される。(図11A)LILRB4は、初代多発性骨髄腫細胞(CD38⁺、左パネル)ならびに骨髄腫細胞株OPM2およびKMS26(右パネル)において発現される。(図11B)LILRB4 CAR-Tまたは対照T細胞を、OPM2細胞と4時間(左パネル)または24時間(右パネル)共培養した。細胞障害性をフローサイトメトリーによって判定した。(図11C)(1:1のE:T比の)LILRB4 CAR-T細胞およびOPM2細胞の24時間の共培養後に上清を収集し、ELISAにより腫瘍壊死因子放出についてアッセイした。LILRB4 CAR-T細胞は、OPM2細胞によって活性化された場合に、対照T細胞(CN-T)と比較して有意に増大したサイトカイン放出を示している。*** p 0.001。(図11D)NSGマウスに2.5 Gy X線を照射し、次の日(第0日)に 1×10^6 個のOPM2ルシフェラーゼ発現AML細胞を注射した。第5日にマウスをPBS、対照T細胞(1×10^6 個の細胞、CN-T)またはLILRB4 CAR-T細胞(1×10^6 個の細胞、CAR-T)で処置した。1ヶ月後に生物発光画像化(BLI)を行った。(図11E)OPM2マウス異種移植片の生存分析。LILRB4 CAR-T細胞処置マウスは、PBSおよび対照T細胞処置マウスと比較して有意に改善された生存率を示している。

【図12】図12A~F。LILRB4は前駆B ALLの特異的マーカーでありCAR細胞によって認識される。LILRB4は、初代MLL前駆B ALL患者サンプル(図12A)、ならびにB白血病細胞株RS4;11、KOPN8、およびRCH-ACV(図12B)において発現される。(図12C)LILRB4 CAR-NKLまたはNKL細胞を、RS4;11細胞と4時間共培養した。細胞障害性をフローサイトメトリーによって判定した。(図12D)LILRB4 CAR-NKLまたはNKL細胞をKOPN8細胞(左パネル)およびRCH-ACV WTまたはRCH-ACV LILRB4 KO細胞(右パネル)

10

20

30

40

50

と共培養した。共培養から4時間後に細胞障害性をフローサイトメトリーによって測定した。(図12E)(1:1のE:T比の)LILRB4 CAR-NKLまたはNKL細胞と前駆B ALL細胞の24時間の共培養後に上清を収集し、ELISAによりIFN-放出についてアッセイした。(図12F)LILRB4 CAR-Tまたは対照T細胞を、RS4;11細胞と4時間共培養した。細胞障害性をフローサイトメトリーによって測定した。 ** p 0.01, *** p 0.001。

【発明を実施するための形態】

【0010】

例示的な態様の説明

急性骨髄性白血病(AML)は、処置が困難な疾患であることが確認されており、患者のほぼ40~60%が再発性または難治性の疾患により死亡する。集中的な多剤化学療法および幹細胞移植を用いる従来の処置は、転帰を改善することができず、したがって、新しい治療戦略が必要とされている。CD19に対するキメラ抗原受容体-T(CAR-T)細胞は、前駆B ALLにおいて持続的な疾患寛解を首尾よく達成および維持することが証明されているが、AML白血病細胞で特異的に発現しかつ正常な造血幹細胞および前駆細胞(HSPC)では発現しない同様の標的は、AMLのCAR-T処置を支援するためには同定されていない。

【0011】

白血球免疫グロブリン様受容体B4(LILRB4)は、発生の前単球段階でのみ開始される単球系統の細胞に限定的な発現を示すITIM含有受容体である。本発明者らは、LILRB4が、急性単球性白血病(FAB M4、M5)において有意に上方調節され、そして重要なことに白血病幹細胞集団において発現している、腫瘍関連抗原であることを特定した。したがって、本発明者らは、LILRB4が、正常な造血を維持しつつAMLおよびその白血病幹細胞を根絶することができるAML指向CAR-T細胞療法の優れた標的であるかどうかを判定することを試みた。

【0012】

以下の実施例に示されるように、本発明者らは、後にヒト化される一組のウサギモノクローナル抗体由来の単鎖可変フラグメント(scFv)を用いて、LILRB4に対して高い親和性および特異性を有するLILRB4-CARを作製した。このscFvを、CD28または4-1BB共刺激ドメインのいずれかに、ついでCD3-活性化ドメインに融合した。このコンストラクトを、レンチウイルス形質導入によって初代ヒトT細胞またはNKL細胞株において発現させた。それらは、LILRB4 CAR-T細胞が、細胞膜上でまたは懸濁液中のLILRB4-Fc融合タンパク質として、LILRB4にも特異的に結合することができたことを示している。

【0013】

細胞障害性を、LILRB4 CAR-T細胞と、LILRB4を安定的に発現する白血病細胞株K562またはいずれも内因性LILRB4発現を示す単球性AML細胞株であるTHP-1またはMV4-11との共培養により評価した。LILRB4 CAR-T細胞は、LILRB4の発現に関して陰性の標的細胞を逃しつつ、対照非形質導入T細胞と比較してすべての細胞株に対して強い細胞障害作用を示した。

【0014】

LILRB4 CAR-T細胞の効果を、インビボでAMLマウス異種移植モデルにおいて試験した。免疫不全NSGマウスに 0.5×10^6 個のMV4-11ルシフェラーゼAML細胞を、ついで $1 \sim 2 \times 10^6$ 個のLILRB4 CAR-T細胞を注射した。毎週の生物発光画像化(BLI)を使用してAMLの発展を追跡した。LILRB4 CAR-T(128-41BB)処置マウスは、対照条件(PBS形質導入または非形質導入T細胞)下のマウスと比較して、処置後に有意に減少した白血病量を示した。さらに、CAR-T処置マウスは、対照条件下のマウスと比較して長い生存を示した。

【0015】

AMLの処置のために試験および開発されている現在のCAR-T細胞は、これらの標的抗原が白血病細胞および正常幹細胞の両方で共有されていることから、正常なHSPCに対するon-target/off-tumor毒性を示し、骨髄抑制または骨髄破壊をもたらす。したがって本発明者らは、正常なCD34⁺臍帯血(CD34⁺-UCB)細胞に対するLILRB4 CAR-T細胞の潜在

10

20

30

40

50

的細胞障害性を評価した。LILRB4は、フローサイトメトリー分析によって判定された場合、CD34⁺-UCB細胞において発現していなかった。CAR-T細胞とCD34⁺-UCB細胞の6時間の共培養後、コロニー形成単位（CFU）アッセイを行った。対照T細胞で処置された培養物およびLILRB4 CAR-T細胞処置条件で処置されたそれらにおいて、同様のCFU-GM/GEMM（顆粒球単球コロニー形成単位）およびBFU-E（赤芽球バースト形成単位）コロニー群が検出された。ついでコロニーを可溶化し、フローサイトメトリーによって分析した。対照T細胞およびLILRB4 CAR-T細胞処置条件下で、CD34⁺またはCD38⁺細胞集団における差は観察されなかった。重要なことに、このことは、本発明者らが本明細書において、LILRB4 CAR-T細胞が正常なヒトHSPCに対してインビトロ毒性を有さず、したがってAMLのための現在のCAR-T細胞に対するより安全な代替品となることを示したことを示している。

10

【0016】

したがって、本発明者らは、AML腫瘍関連抗原であるLILRB4を特異的に標的にし、インビトロおよびインビボ異種移植モデルの両方で効果的な白血病細胞死滅をもたらす、新規のLILRB4 CAR-T細胞の構築を初めて示した。この研究は、正常なHSPCに対するon-target/off-tumor毒性の危険を最小限に抑えつつ白血病を除去する能力を有する、単球性AMLについての転帰を改善する新規の処置戦略を提供する。本開示のこれらおよび他の局面は、以下で詳細に議論されている。

【0017】

I. 定義

本開示において、それ以外のことが具体的に示されていない限り、単数形の使用は複数形を含み、「1つの(a)」または「1つの(an)」という語は、「少なくとも1つ」を意味し、「または」の使用は、「および/または」を意味する。さらに、「含む(including)」という用語ならびに他の形態、例えば「含む(includes)」および「含まれる(included)」の使用は、非限定的な意味で使用される。また、「要素」または「成分」等の用語は、それ以外のことが具体的に示されていない限り、1つの単位を含む要素および成分ならびに2つ以上の単位を含む要素または成分の両方を含む。

20

【0018】

本明細書で使用される場合、「約」という用語は、百分率または他の数量と組み合わせて使用される場合、その百分率または他の数量のプラスまたはマイナス10%を意味する。例えば、「約80%」という用語は、80%プラスまたはマイナス8%を含む。

30

【0019】

本明細書で使用される小節の表題は、編集上の目的しか有さず、記載される主題の限定をなすものではない。特許、特許出願、記事、書籍、および論文を含むがこれらに限定されない本願で引用されるすべての文献または文献の一部は、明示的に、あらゆる目的で、それらの全体が参照により本明細書に組み入れられる。組み入れられる文献および同様の資料の1つまたは複数が、ある用語を、本願におけるその用語の定義と相反する形で定義している場合、本願が優先される。

【0020】

本開示の他の目的、特徴、および利点は、以下の詳細な説明から明らかとなるであろう。しかし、詳細な説明および具体的実施例は、本開示の好ましい態様を示すものであるが、この詳細な説明から本開示の精神および範囲内での様々な変更および改変が当業者に明らかとなることから、例示のみの目的で提供されるにすぎないことが理解されるべきである。

40

【0021】

本明細書で使用される場合、それ以外のことが示されていない限り、「疾患」、「障害」、または「状態」という用語は、本明細書に提供される化合物、薬学的組成物、または方法を用いて処置することができる、患者または対象の身体の状態または健康状態を表す。いくつかの態様において、疾患は、がん（例えば、膵臓がん、結腸がん、胃がん、肺がん、卵巣がん、骨肉腫、膀胱がん、子宮頸がん、肝臓がん、腎臓がん、皮膚がん（メルケ

50

ル細胞がん)、精巣がん、白血病、リンパ腫、頭頸部がん、結腸直腸がん、前立腺がん、膵臓がん、黒色腫、乳がん、神経芽腫、胃がん)である。

【0022】

本明細書で使用される場合、それ以外のことが示されていない限り、「処置する」または「処置」という用語は、任意の客観的または主観的パラメータ、例えば、症状の減退、寛解、減少、または損傷、病理もしくは状態を患者にとってより許容できるものにする事;変性または低下の速度を遅くすること;変性の最終点をより弱体化させること;患者の身体的または精神的状態を改善することを含む、損傷、疾患、病理、または状態の処置または改善における任意の成功の証を表す。症状の処置または改善は、身体検査、神経精神検査および/または精神評価の結果を含む、客観的または主観的パラメータに基づき得る。「処置する」という用語およびその活用は、損傷、病理、状態または疾患の予防を含む。いくつかの態様において、「処置する」は、がんの処置を表す。

10

【0023】

本明細書で使用される場合、それ以外のことが示されていない限り、「予防する (prevent)」、「予防する (preventing)」、および「予防」という用語は、患者ががんに関連する障害を患う前に行われ、がんの発症を遅延させかつ/またはがんを阻止するかもしれないががんの重篤度を低下させる、行為を含む。

【0024】

本明細書で使用される場合、それ以外のことが示されていない限り、「管理する (manage)」、「管理する (managing)」、および「管理」という用語は、そのような疾患、障害、または状態にすでに罹患している患者において、がんなどの障害の再発を予防すること、該再発を遅延させること、または該再発の重篤度を低下させることを含む。この用語は、がんに関連する障害の閾値、発症、および/もしくは期間を変更すること、または患者ががんに関する障害にどのように応答するかを変化させることを含む。

20

【0025】

本明細書で使用される場合、それ以外のことが示されていない限り、化合物の「治療有効量」は、電気的に活性な細胞が関連する障害、例えば非限定的に、神経機能障害、神経媒介障害、眼障害、もしくは心臓障害などの処置もしくは管理において任意の治療的利益を提供するのに、または電気的に活性な細胞に関連する障害、例えば非限定的に、神経機能障害、神経媒介障害、眼障害、もしくは心臓障害などに付随する1つもしくは複数の症状を遅延させるもしくは最小化するのに十分な量である。化合物の治療有効量は、電気的に活性な細胞が関連する障害、例えば非限定的に、神経機能障害、神経媒介障害、眼障害、または心臓障害などの処置または管理において任意の治療的利益を提供する、化合物単独の量または1つもしくは複数の他の治療および/もしくは治療剤と組み合わせられた化合物の量を意味する。

30

【0026】

本明細書で使用される場合、それ以外のことが示されていない限り、「有効量」は、化合物が、その化合物が存在しない場合と比較して言及されている目的を達成するのに(例えば、それを投与する目的である効果を達成するのに、疾患を処置するのに、酵素活性を減少させるのに、酵素活性を増大させるのに、シグナル伝達経路を減少させるのに、または疾患もしくは状態の1つもしくは複数の症状を減少させるのに)十分な量である。「治療有効量」の例は、疾患の症状または症状群の処置、予防または減少に貢献するのに十分な量であり、それは「治療有効量」とも称され得る。症状または症状群の「減少」(およびこの語句の文法上の同義語)は、症状の重篤度もしくは頻度の減少、または症状の消滅を意味する。正確な量は、処置の目的に依存し、公知の技術を用いて当業者により確認され得る(例えば、Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (vols. 1-3, 1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999); Pickar, Dosage Calculations (1999);およびRemington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkinsを参照のこと)。

40

50

【 0 0 2 7 】

本明細書で使用される場合、それ以外のことが示されていない限り、化合物の「予防有効量」は、がんもしくはがんに関連する1つもしくは複数の症状の発症を予防するもしくは遅延させるのに、またはその再発を予防するもしくは遅延させるのに十分な量である。化合物の予防有効量は、化合物単独の量または障害、例えばがんの予防において予防的利益を提供する1つもしくは複数の他の処置および/もしくは予防剤と組み合わせられた化合物の量を意味する。「予防有効量」という用語は、障害、例えばがんを予防する量、予防全体を改善する量、または別の予防剤の予防効果を強化する量を含み得る。「予防有効量」は、例えば、障害、例えばがんの発生の前に、処方され得る。

【 0 0 2 8 】

本明細書で使用される場合、「患者」または「それを必要とする対象」は、本明細書に提供される組成物または薬学的組成物の投与により処置され得る疾患または状態に罹患しているかまたは罹患し易い、生物を表す。非限定的な例は、ヒト、霊長類、コンパニオン動物（例えば、イヌ、ネコ等）、他の哺乳動物、例えば非限定的に、ウシ（bovine）、ラット、マウス、サル、ヤギ、ヒツジ、ウシ（cow）、シカなど、および他の非哺乳動物を含む。いくつかの態様において、患者はヒトである。

【 0 0 2 9 】

本明細書で使用される場合、「保存的置換」という用語は、概して、タンパク質またはポリペプチドの構造のおよび機能的特性を保存するアミノ酸置換を表す。そのような機能的に等価な（保存的置換）ペプチドのアミノ酸配列は、機能的に等価な遺伝子産物を生成する静的変化をもたらすヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列内でのアミノ酸残基の付加または置換を含むがこれらに限定されない。保存的アミノ酸置換は、関与する残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性および/または両親媒性の類似性に基づき行われ得る。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸は、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびメチオニンを含み、極性中性アミノ酸は、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、およびグルタミンを含み、正荷電（塩基性）アミノ酸は、アルギニン、リジンおよびヒスチジンを含み、負荷電（酸性）アミノ酸は、アスパラギン酸およびグルタミン酸を含む。

【 0 0 3 0 】

本明細書で使用される略語は、化学および生物学分野におけるそれらの従来の意味を有する。本明細書に示される化学構造および式は、化学分野において公知となっている原子価の標準的規則にしたがい構成される。

【 0 0 3 1 】

それ以外の定義がなされていない限り、本明細書で使用される技術および科学用語は、当業者により広く理解されているのと同じ意味を有する。例えば、Singleton et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, N.Y. 1994); Sambrook et al., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989) を参照のこと。本開示の実施にあたっては、本明細書に記載されているのと同様または同等の任意の方法、デバイスおよび材料が使用され得る。以下の定義は、本明細書で頻繁に使用される特定の用語の理解を促進するために提供されるものであり、本開示の範囲を限定することは意図されていない。

【 0 0 3 2 】

「生物学的サンプル」または「サンプル」は、対象または患者から得られるまたはそれら由来である、物質を表す。生物学的サンプルは、組織の切片、例えば、生検および部検サンプル、ならびに組織学的目的で採取される凍結切片を含む。そのようなサンプルは、体液、例えば、血液および血液画分または産物（例えば、血清、血漿、血小板、赤血球等）、唾液、組織、培養細胞（例えば、初代培養物、外植片および形質転換細胞）、便、尿、滑液、関節組織、滑膜組織、滑膜細胞、線維芽細胞様滑膜細胞、マクロファージ様滑膜

10

20

30

40

50

細胞、免疫細胞、造血細胞、線維芽細胞、マクロファージ、T細胞等を含む。生物学的サンプルは典型的に、真核生物、例えば哺乳動物、例えば霊長類、例えばチンパンジーまたはヒト；ウシ；イヌ；ネコ；げっ歯類、例えばモルモット、ラット、マウス；ウサギ；または鳥類；爬虫類；または魚類から得られる。

【0033】

「細胞」は、本明細書で使用される場合、そのゲノムDNAを保存または複製するのに十分な代謝または他の機能を実行する細胞を表す。細胞は、例えば、インタクトな膜の存在、特定の色素による染色、子孫を生成する能力または、配偶子の場合、第2の配偶子と組み合わせたり生きた子孫を生成する能力を含む、当技術分野で周知の方法によって同定され得る。細胞は、原核生物および真核生物細胞を含み得る。原核生物細胞は、細菌を含むがこれらに限定されない。真核生物細胞は、酵母細胞ならびに植物および動物由来の細胞、例えば哺乳動物、昆虫（例えば、スポドプテラ（Spodoptera））およびヒト細胞を含むがこれらに限定されない。細胞は、本来的に非接着性である場合に、または、例えばトリプシン処理によって、表面に接着しないよう処理されている場合に、有用であり得る。

10

【0034】

「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、本明細書で言い換え可能に使用され、任意でアミノ酸からならない部分に結合され得る、アミノ酸残基のポリマーを表す。この用語は、1つまたは複数のアミノ酸残基が対応する天然アミノ酸の人工化学模倣体であるアミノ酸ポリマー、ならびに天然に存在するアミノ酸ポリマーおよび天然に存在しないアミノ酸ポリマーに適用される。「融合タンパク質」は、組み換えにより単一部分として発現される2つまたはそれ以上の別個のタンパク質配列をコードするキメラタンパク質を表す。

20

【0035】

「核酸」は、一本鎖または二本鎖のいずれかの形態のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドおよびそれらのポリマー、ならびにそれらの相補体を表す。「ポリヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチドの直鎖配列を表す。「ヌクレオチド」という用語は、典型的に、ポリヌクレオチドの1単位、すなわちモノマーを表す。ヌクレオチドは、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチドまたはそれらの修飾版であり得る。本明細書で想定されているポリヌクレオチドの例は、一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖および二本鎖RNA（siRNAを含む）、ならびに一本鎖および二本鎖DNAおよびRNAの混合物を含むハイブリッド分子を含む。核酸は、本明細書で使用される場合、天然に存在する核酸と同じ基本化学構造を有する核酸も表す。そのようなアナログは、修飾糖および/または修飾環置換体を有するが、天然に存在する核酸と同じ基本化学構造を保持している。核酸模倣体は、ある核酸の全体的化学構造と異なる構造を有するが、天然に存在する核酸と同様の様式で機能する化学的化合物を表す。そのようなアナログの例は、非限定的に、ホスホリチオエート、ホスホロアミダイト、メチルホスホネート、キラル・メチルホスホネート、2-O-メチルリボヌクレオチド、およびペプチド核酸（PNA）を含む。

30

【0036】

「配列同一性の比率%」は、比較ウィンドウ内で2つの最適に整列させた配列を比較することによって決定され、ここで、2つの配列の最適な整列のために、比較ウィンドウ内のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の一部は（付加または欠失を含まない）参照配列と比較して付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含み得る。比率%は、両方の配列において同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が存在する位置の数を決定して一致する位置の数を導き出し、この一致する位置の数を比較ウィンドウ内の総位置数で割り、その結果に100をかけて配列同一性の比率%を導き出すことによって算出される。

40

【0037】

2つまたはそれ以上の核酸またはポリペプチド配列との関係でいう「同一」または「同一性」パーセントという用語は、2つまたはそれ以上の配列または部分配列が、比較ウィンドウ内でまたは以下の配列比較アルゴリズムの1つを用いてまたは手作業による整列および目視検査により測定された場合は指定領域内で、最大一致となるよう比較および整列

50

させた場合に、同じであること、または同じである特定比率%のアミノ酸残基もしくはヌクレオチド（すなわち、例えば開示されるポリペプチド配列全体または本開示のポリペプチドの個々のドメインの特定領域における60%の同一性、任意で65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%の同一性）を有することを表す。そのような配列は、その後、「実質的に同一」とであると言われる。この定義はまた、試験配列の相補鎖も表す。任意で、同一性は、少なくとも約50ヌクレオチドの長さの領域にわたって、またはより好ましくは100~500個または1000個もしくはそれ以上のヌクレオチドの長さの領域にわたって見られる。本開示は、本明細書で同定されたいずれかと実質的に同一であるポリペプチドを含む。

【0038】

「発現」または「発現される」という用語は、遺伝子に関して本明細書で使用される場合、その遺伝子の転写および/または翻訳産物を意味する。細胞内でのDNA分子の発現レベルは、その細胞内に存在する対応するmRNAの量またはその細胞により生成されるそのDNAによりコードされるタンパク質の量のいずれかに基づき決定され得る。非コード核酸分子（例えば、siRNA）の発現レベルは、当技術分野で周知の標準的なPCRまたはノーザンブロット法により検出され得る。Sambrook et al., 1989 MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 18.1-18.88を参照のこと。トランスフェクトした遺伝子の発現は、細胞内で一過的にまたは安定的に行われ得る。「一過的」発現の間、トランスフェクトした遺伝子は、細胞分裂時に娘細胞に移されない。その発現はトランスフェクトした細胞に制限されるので、その遺伝子の発現は時間と共に失われる。これに対して、トランスフェクトした遺伝子の安定的発現は、その遺伝子が、トランスフェクトされた細胞に選択的優位性を付与する別の遺伝子と共にトランスフェクトした場合に、起こり得る。そのような選択的優位性は、細胞に対して提示される特定の毒素に対する耐性であり得る。トランスフェクトした遺伝子の発現はさらに、トランスポゾンを通じた宿主ゲノムへの挿入によって達成され得る。トランスポゾンを通じた挿入の間、その遺伝子は、宿主ゲノムへの挿入およびその後の切り出しを可能にする2つのトランスポゾンリンカー配列間に予測可能な様式で配置される。トランスフェクトした遺伝子の安定的発現はさらに、感染後に細胞ゲノムの一部を形成し（細胞ゲノムに統合され）、それによってその遺伝子の安定的発現をもたらすレンチウイルスベクターに細胞を感染させることによって達成され得る。

【0039】

「プラスミド」、「ベクター」、または「発現ベクター」という用語は、遺伝子および/または遺伝子の発現に必要とされる調節エレメントをコードする核酸分子を表す。プラスミドからの遺伝子の発現は、シスまたはトランスで生じ得る。遺伝子がシスで発現される場合、その遺伝子および調節エレメントは、同じプラスミドによってコードされる。イントランスの発現は、その遺伝子および調節エレメントが別のプラスミドによってコードされる例を表す。

【0040】

「トランスフェクション」、「形質導入」、「トランスフェクトする」、または「形質導入する」という用語は、言い換え可能に使用することができ、核酸分子またはタンパク質を細胞に導入するプロセスとして定義される。核酸は、非ウイルスまたはウイルスベースの方法を用いて導入される。核酸分子は、完全なタンパク質またはその機能的な一部分をコードする遺伝子配列であり得る。非ウイルストランスフェクション法は、核酸分子を細胞に導入するための送達システムとしてウイルスDNAまたはウイルス粒子を使用しない任意の適切なトランスフェクション法を含む。例示的な非ウイルストランスフェクション法は、リン酸カルシウムトランスフェクション、リポソームトランスフェクション、ヌクレオフェクション、ソノポレーション、熱ショックを通じたトランスフェクション、磁化、およびエレクトロポレーションを含む。いくつかの態様において、核酸分子は、当技術分野で周知の標準的手順にしたがうエレクトロポレーションを用いて細胞に導入される。ウイルスベースのトランスフェクション法においては、任意の有用なウイルスベクターが本発明に記載される方法で使用され得る。ウイルスベクターの例は、レトロウイルス、ア

10

20

30

40

50

デノウイルス、レンチウイルス、およびアデノ随伴ウイルスベクターを含むがこれらに限定されない。いくつかの態様において、核酸分子は、当技術分野で周知の標準的手順にしたがいレトロウイルスベクターを用いて細胞に導入される。「トランスフェクション」または「形質導入」という用語はまた、外部環境から細胞へのタンパク質の導入を表す。典型的に、タンパク質の形質導入またはトランスフェクションは、細胞膜を通過することができるペプチドまたはタンパク質を、関心対象のタンパク質に付加することに基づく。例えば、Ford et al. (2001) and Prochiantz (2007)を参照のこと。

【0041】

「抗体」は、抗原に特異的に結合および認識する免疫グロブリン遺伝子由来のフレームワーク領域を含むポリペプチドまたはそのフラグメントを表す。知られている免疫グロブリン遺伝子は、 κ 、 λ 、 μ 、 δ 、および α 定常領域遺伝子、ならびに多数の免疫グロブリン可変領域遺伝子を含む。軽鎖は、 κ または λ のいずれかに分類される。重鎖は、 μ 、 δ 、 α 、または γ に分類され、これらはそれぞれ、免疫グロブリンクラスIgG、IgM、IgA、IgD、およびIgEを定義する。典型的に、抗体の抗原結合領域は、結合の特異性および親和性の決定に大きな役割を果たす。いくつかの態様において、抗体または抗体のフラグメントは、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、ラクダ等を含む異なる生物由来であり得る。抗体は、その抗体の所望の機能（例えば、グリコシル化、発現、抗原認識、エフェクター機能、抗原結合性、特異性等）を改善または調整するよう1つまたは複数のアミノ酸位置で修飾または変異させた抗体を含み得る。

【0042】

タンパク質またはペプチドに言及する場合、抗体に「特異的に（もしくは選択的に）結合する」または「特異的に（もしくは選択的に）免疫反応する」という語句は、多くの場合はタンパク質および他の生体物質の異種集団における、そのタンパク質の存在の決定要因となる結合反応を表す。したがって、示された免疫アッセイ条件下で、示されている抗体は、バックグラウンドの少なくとも2倍、より典型的にはバックグラウンドの10~100倍超、特定のタンパク質に結合する。そのような条件下での抗体に対する特異的結合は、典型的に、特定のタンパク質に対するその特異性について選択された抗体を必要とする。例えば、ポリクローナル抗体は、選択された抗原に対して特異的に免疫反応し、他のタンパク質に対しては免疫反応しない抗体のサブセットのみを得るよう選択され得る。この選択は、他の分子と交差反応する抗体を除外することによって達成され得る。様々な免疫アッセイ様式が、特定のタンパク質と特異的に免疫反応する抗体を選択するために使用され得る。例えば、固相ELISA免疫アッセイが、あるタンパク質と特異的に免疫反応する抗体を選択するために従来的に使用されている（例えば、特異的免疫反応を判定するために使用され得る免疫アッセイ様式および条件の説明について、Harlow & Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual (1998)を参照のこと）。

【0043】

「単離された」という用語は、核酸またはタンパク質に適用される場合、その核酸またはタンパク質が、それが自然状態にある場合に付随する他の細胞成分を実質的に含まないことを意味する。それは、例えば、均質な状態であり得、乾燥または水溶液中のいずれかであり得る。純度および均質度は、典型的に、分析化学技術、例えばポリアクリルアミドゲル電気泳動または高速液体クロマトグラフィーを用いて決定される。ある調製物中に存在する優勢種であるタンパク質は、実質的に精製されている。

【0044】

「対照」サンプルまたは値は、試験サンプルと比較するための参照、通常は既知参照として機能するサンプルを表す。例えば、試験サンプルは、試験条件から、例えば試験化合物の存在下で採取され得、そして既知条件由来の、例えば試験化合物の非存在下（陰性対照）または既知化合物の存在下（陽性対照）のサンプルと比較され得る。対照はまた、多数の試験または結果から集計された平均値であり得る。当業者は、対照が、任意の数のパラメータを評価するよう設計され得ることを理解しているであろう。例えば、対照は、薬理的データ（例えば、半減期）または治療基準（例えば、副作用の比較）に基づき治療

10

20

30

40

50

的利益を比較するよう設計され得る。当業者は、どの対照がその状況下で価値があり、対照値との比較に基づきデータを分析することができるかどうかを理解しているであろう。対照はまた、データの有意性の判定においても価値がある。例えば、あるパラメータに関する値が対照間で大きくばらついている場合、試験サンプル間のばらつきは有意であるとみなされない。

【0045】

本明細書で使用される場合、「転移」、「転移性」、および「転移性がん」という用語は、言い換え可能に使用することができ、1つの臓器または別の非隣接臓器もしくは身体部分からの増殖性疾患または障害、例えばがんの拡散を表す。がんは、当初部位、例えば乳房において生じ、この部位は原発性腫瘍、例えば原発性乳がんと呼ばれる。原発性腫瘍または当初部位の一部のがん細胞は、その局所領域における周囲の正常な組織に浸透および浸潤する能力ならびに/またはリンパ系もしくは血管系の壁を通過し、その系を通じて身体の他の部位および組織に循環する能力を獲得する。原発性腫瘍のがん細胞から形成される第2の臨床的に検出可能な腫瘍は、転移性または二次腫瘍と称される。がん細胞が転移した場合、転移性腫瘍およびその細胞は、元の腫瘍のそれらと同様であると推定される。したがって、肺がんが乳房に転移した場合、乳房の部位におけるその二次腫瘍は、異常な肺細胞からなり、異常な乳房細胞かなるものではない。乳房における二次腫瘍は、転移性肺がんと呼ばれる。したがって、転移性がんという語句は、対象が原発性腫瘍を有しておりまたは有していたことがあり、かつ1つまたは複数の二次腫瘍を有する疾患を表す。非転移性がんまたは転移性でないがんを有する対象という語句は、対象が原発性腫瘍を有しているが、1つまたは複数の二次腫瘍を有さない疾患を表す。例えば、転移性肺がんは、原発性肺腫瘍またはその病歴を有し、かつ第2の位置または複数の位置において、例えば乳房において1つまたは複数の二次腫瘍を有する対象における疾患を表す。

【0046】

「抗がん剤」は、その明白な通常の意味にしたがい使用され、抗新生物性または細胞の成長もしくは増殖を阻害する能力を有する組成物（例えば、化合物、薬物、アンタゴニスト、阻害剤、調整剤）を表す。いくつかの態様において、抗がん剤は、化学療法剤である。いくつかの態様において、抗がん剤は、がんを処置する方法において有用性を有することが本明細書で特定されている剤である。いくつかの態様において、抗がん剤は、がんの処置に関してFDAまたは米国以外の国の同等の規制当局によって承認された剤である。

【0047】

II. 急性骨髄性白血病

急性骨髄性白血病（AML）は、骨髄において増殖する異常な白血球の急激な成長および正常な血液細胞の産生との干渉により特徴づけられる、骨髄系の血液細胞のがんである。AMLは、成人が罹患する最も一般的な急性白血病であり、その罹患率は年齢と共に上昇する。AMLは、米国におけるがんによる死亡のおよそ1.2%または人口100,000人あたり3.7人と見積もられる比較的まれな疾患であるが、症例の数は、集団の高齢化に伴い増加すると考えられる。AMLはまた、およそ15~20%の小児急性白血病症例を含む。

【0048】

AMLの症状は、赤血球、血小板、および正常な白血球の減少を引き起こす、白血病細胞による正常な骨髄の置き換えにより引き起こされる。これらの症状は、倦怠感、息切れ、あざおよび出血が起こりやすくなること、ならびに感染の危険の増大を含む。様々な危険因子および分子ならびに染色体異常が同定されているが、具体的原因は明らかでない。急性白血病として、未処置の状態で放置すると、AMLは急激に進行し、典型的に数週間または数ヶ月以内に致死的になる。

【0049】

AMLは様々なサブタイプを有し、処置および予防はサブタイプ間で相違する。AMLは、60歳未満の人の35~40%および60歳以上の5~15%で治癒する。集中的な化学療法に耐えることができない高齢者は、平均生存期間が5~10ヶ月である。

【0050】

10

20

30

40

50

AMLは、最初に、寛解の誘導を目的とする化学療法により処置され、その後、追加の化学療法または造血幹細胞移植が行われ得る。AMLの遺伝学に関する最近の研究は、どの薬物または薬物群が個々の人に対して最良の働きをするかまたはその人がどのくらい長く生存するかを予測することができる試験を利用可能にした。AMLの処置および予後は、一部、細胞の分化が同じではなく；より多くの芽細胞（骨髄芽球；単芽球；および巨核芽球）を含むより高い比率%の脱分化および未分化細胞をAMLが伴うため、慢性骨髄性白血病（CML）のそれと相違する。

【 0 0 5 1 】

AMLのほとんどの兆候および症状は、白血病細胞による正常な血液細胞の置換に起因する。正常な白血球産生の欠如は、人々をより感染しやすくし；白血病細胞自体は白血球前駆体由来であるが、それらは感染抵抗能力を有さない。赤血球数の減少（貧血）は、倦怠感、蒼白および息切れをもたらす得、疾患の進行とともに重度または生命を脅かす貧血が起こり得る。血小板の欠如は、小さな外傷による容易なあざおよび出血をもたらす得、重度の出血症状をもたらすこともある。

10

【 0 0 5 2 】

AMLの初期兆候は、多くの場合、不明瞭かつ非特異的であり、インフルエンザまたは他の一般的な疾病のそれらと類似し得る。いくつかの一般的な症状は、発熱、倦怠感、体重減または食欲不振、息切れ、貧血、容易なあざまたは出血、点状出血（出血によって引き起こされる皮膚下の平らなピンヘッドサイズの斑点）、骨および関節痛、ならびに持続的または高頻度の感染を含む。

20

【 0 0 5 3 】

脾臓の肥大がAMLにおいて起こり得るが、それは典型的には軽度であり無症状性である。急性リンパ芽球性白血病とは異なり、AMLにおいては、リンパ節の腫脹は稀である。皮膚は、皮膚白血病の形成における時間の約10%で影響を受ける。稀に、皮膚の腫瘍随伴性炎症であるスイート病が、AMLと共に起こり得る。

【 0 0 5 4 】

AMLを有する人の一部は、歯肉組織への白血病細胞の浸潤により歯肉の膨張を体験し得る。稀に、白血病の最初の兆候は、緑色腫と呼ばれる、骨髄外での固形白血病塊または腫瘍の発生であり得る。時々、人は症状を示さないことがあり、白血病は、日常的な血液検査の際に偶発的に発見され得る。

30

【 0 0 5 5 】

他の血液障害、化学的曝露、電離放射線照射、および遺伝を含む、AMLの発症の多くの危険因子が同定されている。

【 0 0 5 6 】

AMLの診断のための最初の手がかりは典型的に、全血球計算における異常な結果である。過剰な異常白血球（白血球増加症）が白血病の共通の知見であり、白血病芽細胞が時々観察されるが、AMLはまた、血小板、赤血球の個々の減少または低白血球数（白血球減少症）さえも示し得る。循環する白血病芽細胞が確認される場合、末梢血スミアの試験によりAMLの予測診断が行われ得るが、決定的な診断は通常、十分な骨髄吸引および生検、ならびに悪性貧血（ビタミンB12欠乏症）、葉酸欠乏症、および銅欠乏症の排除を必要とする。

40

【 0 0 5 7 】

白血病の存在を診断するため、AMLを他のタイプの白血病（例えば、急性リンパ芽球性白血病 - ALL）と区別するため、および疾患のサブタイプを分類するため、骨髄または血液が、光学顕微鏡およびフローサイトメトリー下で試験される。骨髄または血液のサンプルはまた、典型的に、従来の細胞遺伝学または蛍光インサイチューハイブリダイゼーションにより染色体異常についても試験される。遺伝子研究もまた、疾患の転帰に影響し得る遺伝子、例えばFLT3、ヌクレオホスミン、およびKIT内の特定の変異を調査するために実施され得る。

【 0 0 5 8 】

50

血液および骨髄スミアに対する細胞化学染色は、AMLとALLの区別およびAMLの細分類に有用である。ミエロペルオキシダーゼまたはスダン黒染色と非特異的エステラーゼ染色の組み合わせは、大部分の例において望まれる情報を提供すると考えられる。ミエロペルオキシダーゼまたはスダン黒反応は、AMLを同定するおよびそれをALLから区別する上で最も有用である。非特異的エステラーゼ染色は、AMLにおいて単球成分を同定するためおよび低分化単芽球性白血病をALLから区別するために使用される。

【0059】

AMLの診断および分類は、困難な作業であり得、熟練の血液病理学者または血液学者により行われるべきである。単純な例において、特定の形態学的特徴（例えば、アウエル小体）の存在または特定のフローサイトメトリー結果がAMLを他の白血病から区別し得るが、そのような特徴の非存在下では、診断はより困難であり得る。

10

【0060】

2つの最も一般的に使用されているAMLの分類法は、より古いフランス・アメリカ・イギリス（FAB）体系およびより新しい世界保健機関（WHO）体系である。広く使用されているWHO基準によれば、AMLの診断は、遺伝子異常の存在が芽細胞の比率%に関わらず診断指標となる再発性遺伝子異常（t(8;21)、inv(16)、およびt(15;17)）を有する急性骨髄性白血病の3つの最良の予後形態を除いて、白血病性骨髄芽球による血液および/または骨髄の20%超の関与を確認することにより行われる。フランス・アメリカ・イギリス（FAB）分類は、それよりやや厳格であり、AMLの診断に関して、骨髄（BM）または末梢血（PB）における少なくとも30%の芽細胞比率を必要とする。AMLは、異なる方法で処置される「前白血病」状態、例えば、骨髄異形成性または骨髄増殖性症候群から慎重に区別されなければならない。

20

【0061】

急性前骨髄球性白血病（APL）は最も高い治癒可能性を有し、特別な形態の処置を必要とするので、このサブタイプの白血病の診断を直ちに確立または実行することが重要である。APLを特徴づける染色体転座[t(15;17)(q22;q12);]を容易に同定することから、血液または骨髄に対して行う蛍光インサイチュールハイブリダイゼーションが、多くの場合、この目的で使用される。その転座の発がん性産物であるPML/RARA融合タンパク質の存在を分子的に検出する必要もある。

【0062】

AMLの最前線の処置は、主として化学療法からなるものであり、導入および寛解後（または強化）療法の2つの相に分けられる。導入療法の目的は、白血病細胞の数を非検出可能レベルまで減少させることにより完全な寛解を達成することであり；強化療法の目的は、残存する非検出可能な疾患を排除し、治癒を達成することである。通常、導入化学療法が失敗した場合または再発を起こした後に造血幹細胞移植が検討されるが、高リスク疾患を有する人に対する最前線治療として時々移植も使用される。AMLにおいてチロシンキナーゼ阻害剤を使用する試みも続けられている。

30

【0063】

M3を除くすべてのFABサブタイプは通常、シタラピン（ara-C）およびアントラサイクリン（最も多いのはダウノルピシン）を用いた導入化学療法に供される。この導入化学療法レジメンは、シタラピンが連続IV輸注として連続7日間投与され、アントラサイクリンがIVプッシュとして連続3日間投与されることから、「7+3」（または「3+7」）として公知である。AMLを有する人の最大70%が、このプロトコールにより寛解を達成すると考えられる。高用量シタラピン単独、FLAG様レジメンまたは治験薬を含む他の代替の導入レジメンも使用され得る。骨髄抑制および感染リスク増大を含む治療の有害効果から、導入化学療法は高齢者には適用されない場合があり、その代替策は、低強度化学療法または緩和ケアを含み得る。小児AMLは、エトポシドに加えてシタラピンまたはアントラサイクリンを含む化学療法の基本骨格からなる共通のレジメンを用いて同様に処置される。

40

【0064】

急性前骨髄球性白血病（APL）としても公知である、AMLのM3サブタイプは、ほぼ共

50

通して、導入化学療法、通常アントラサイクリンに加えて全トランスレチノイン酸（ATRA）薬を用いて処置される。前骨髄球がそれらの顆粒の内容物を末梢の循環に放出する際、APLの処置を複雑にする播種性血管内凝固（DIC）を予防するためのケアが行われなければならない。APLは、十分に実証されている処置プロトコールを用いて完全に治癒可能である。

【0065】

導入相の目的は、完全な寛解を達成することである。完全な寛解は、疾患が治癒したことを意味するのではなく、それは利用可能な診断法を用いていかなる疾患も検出できないことを意味する。完全な寛解は、新たに診断された成人の約50%～75%で達成されるが、これは上記の予後因子により変化し得る。寛解の長さは、元の白血病の予後の特徴に依存する。一般に、すべての寛解は、追加の強化療法なしでは失敗すると考えられる。

10

【0066】

完全な寛解が達成された後でさえ、白血病細胞は、現在の診断技術を用いて検出するには少なすぎる数で残存している可能性がある。さらなる寛解後または強化療法が行われなければ、AMLを有するほぼすべての人は、最終的に再発すると考えられる。したがって、非検出可能な疾患を除去するためおよび再発を防止するため、すなわち、治癒を達成するためにさらなる治療が必要である。

【0067】

寛解後療法の具体的なタイプは、人の予後因子（上記参照）および全体的健康に基づき個別に決定される。予後良好の白血病（すなわち、inv(16)、t(8;21)およびt(15;17)）の場合、人々は典型的に、さらに3～5回の、強化化学療法として公知の集中的化学療法を受ける。再発リスクが高い人々（例えば、高リスク細胞遺伝学を示す、MDSを起こした、または治療関連AMLを示す人々）の場合、その人が移植に耐えることができかつ適切なドナーがいる場合は、通常、同種異系幹細胞移植が推奨される。中程度リスクのAML（正常な細胞遺伝学または低リスクもしくは高リスク群に入らない細胞遺伝学的変化）のための最良の寛解後療法は、明確でなく、それは、その人の年齢および全体的健康、その人の値、および適切な幹細胞ドナーが存在するかどうかを含む個別の状況に依存する。

20

【0068】

幹細胞移植を実施できない人の場合、強化の完了後のヒスタミン二塩酸塩（Ceplene）およびインターロイキン2（Proleukin）の組み合わせを用いる免疫療法が、絶対再発リスクを14%減少させることが示されており、これは、寛解維持の可能性の50%増加に換算される。

30

【0069】

AMLが再発した人の場合、唯一の証明されている治癒の可能性のある治療は、すでにそれを行ってないなら、造血幹細胞移植である。2000年に、高用量化学療法の候補ではない再発AMLを有する60歳超の年齢の人に対して、モノクローナル抗体連結細胞障害剤ゲムツズマブオゾガマイシン（Mylotarg）が米国で承認された。この薬物は、2010年にその製造者であるファイザー社によって自発的に市場から引き上げられ、その後2017年に異なるラベル（より少ない推奨用量、化学療法と組み合わせたまたはそれ独自の異なるスケジュール、および新しい患者集団）と共に再度市場に戻された。再発AMLに対する処置選択肢は非常に限られているので、緩和ケアまたは臨床試験への参加が提案され得る。再発急性前骨髄球性白血病（APL）に対しては、三酸化ヒ素が米国FDAによって承認されている。ATRAと同様、三酸化ヒ素は、AMLの他のサブタイプでは有効でない。

40

【0070】

III. キメラ抗原受容体

「キメラ抗原受容体」（CAR）は、本明細書で使用される場合、免疫エフェクター細胞、例えばT細胞およびNK細胞に、所望の抗原特異性を植え付けることができる人工受容体を表す。典型的に、CARタンパク質は、所望の特異性を導入する細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および免疫エフェクター細胞が抗原に結合した場合に免疫エフェクター細胞にシグナルを伝達する細胞内ドメインを含む。特定の態様において、細胞外ドメインは、リ

50

ーダーペプチド、抗原認識領域およびスペーサー領域を含む。特定の態様において、抗原認識領域は、その抗原に特異的に結合する抗体由来である。特定の態様において、抗原認識領域は、その抗体由来の単鎖可変フラグメント（scFv）である。特定の態様において、単鎖可変フラグメント（scFv）は、ヒト化抗体由来である（HuCAR scFv）。特定の態様において、単鎖可変フラグメントは、フレキシブルリンカーを通じて軽鎖可変領域に融合された重鎖可変領域を含む。

【0071】

本明細書で言及される場合の「リーダーペプチド」という用語は、当技術分野におけるその通常の意味で使用され、約5～30アミノ酸の長さを有するペプチドを表す。リーダーペプチドは、分泌経路の一部を形成する新たに合成されるタンパク質のN末端に存在する。分泌経路のタンパク質は、特定のオルガネラ（小胞体、ゴルジ体またはエンドソーム）のいずれかに存在するか、細胞から分泌されるか、または細胞膜に挿入される、タンパク質を含むがこれらに限定されない。いくつかの態様において、リーダーペプチドは、タンパク質の膜貫通ドメインの一部を形成する。

10

【0072】

1つの局面において、本開示は、LILRB4に結合するCARタンパク質（LILRB4 CARタンパク質）を提供する。LILRB4は抗原であり、キメラ抗原受容体（またはCARタンパク質）は他の膜および細胞内成分との関係でLILRB4に対する抗体もしくはLILRB4を認識する結合フラグメントである。いくつかの態様において、抗LILRB4抗体またはLILRB4結合フラグメントはヒト化され、そのようなヒト化抗体またはフラグメントを含むCARタンパク質は、「LILRB4 HuCAR」と称され得る。いくつかの態様において、LILRB4 CARタンパク質は、N末端からC末端に向かって、リーダーペプチド、抗LILRB4重鎖可変ドメイン、リンカードメイン、抗LILRB4軽鎖可変ドメイン、CD8 ヒンジ領域、CD8 膜貫通ドメイン（またはCD28膜貫通ドメイン）、4-1BB細胞内共刺激シグナルドメイン（またはCD28細胞内共刺激シグナルドメイン、またはCD28細胞内共刺激シグナルドメインとそれに続く4-1BB細胞内共刺激シグナルドメイン）および2つのアイソフォーム（CD3zIso1またはCD3zIso3）の1つのCD3- 細胞内T細胞シグナルドメインを含む。

20

【0073】

いくつかの態様において、タンパク質は、N末端からC末端に向かって、CD8 リーダーペプチド、LILRB4 HuCAR scFv、ヒトCD8 ヒンジドメイン、CD28膜貫通ドメインおよび細胞内共刺激シグナルドメイン、ならびにヒトCD3複合体T細胞シグナルドメインのゼータ（ ）鎖を含む。

30

【0074】

いくつかの態様において、タンパク質は、N末端からC末端に向かって、CD8 リーダーペプチド、LILRB4 HuCAR scFv、ヒトCD8 ヒンジドメインおよび膜貫通ドメイン、CD28細胞内共刺激シグナルドメイン、ならびにヒトCD3複合体T細胞シグナルドメインのゼータ（ ）鎖を含む。

【0075】

他の態様において、タンパク質は、N末端からC末端に向かって、CD8 リーダーペプチド、LILRB4 HuCAR scFv、ヒトCD8 ヒンジドメインおよび膜貫通ドメイン、4-1BB細胞内共刺激シグナルドメイン、ならびにヒトCD3複合体T細胞シグナルドメインのゼータ（ ）鎖を含む。

40

【0076】

代替の態様において、タンパク質は、N末端からC末端に向かって、CD8 リーダーペプチド、LILRB4 HuCAR scFv、ヒトCD8 ヒンジドメインおよび膜貫通ドメイン、CD28細胞内共刺激シグナルドメイン、4-1BB細胞内共刺激シグナルドメイン、ならびにヒトCD3複合体T細胞シグナルドメインのゼータ（ ）鎖を含む。

【0077】

別の態様において、タンパク質は、N末端からC末端に向かって、リーダーペプチド、抗LILRB4重鎖可変ドメイン、リンカードメイン、抗LILRB4軽鎖可変ドメイン、ヒトIgG1-

50

CH2-CH3ドメイン、スペーサー領域、CD28膜貫通ドメイン、4-1BB細胞内共刺激シグナル、およびヒトCD3複合体T細胞シグナルドメインのゼータ()鎖を含む。

【0078】

いくつかの態様において、コンストラクトは、Clontech製のベクターpLVX-EF1 -IRES-ZsGreen、またはpSIN-EF1 -IRES-ピューロマイシンもしくは(IRES-ピューロマイシンが除去された)pSIN-EF1 内に示される核酸配列を含み、CAR-128-CD28 (SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 40)、CAR-128-41BB (SEQ ID NO: 22)、CAR-8-CD28 (SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 41)、CAR-8-41BB (SEQ ID NO: 31)、CAR-128-CD28-41BB (SEQ ID NO: 32)、CAR-8-CD28-41BB (SEQ ID NO: 33)と命名される(表2を参照のこと)。

10

【0079】

いくつかの態様において、核酸は、LILRB4に結合する抗体由来の抗体重鎖可変ドメインおよび抗体軽鎖可変ドメインをコードする。

【0080】

別の局面において、その態様を含む本明細書に提供される核酸を含む発現ベクターが提供される。別の局面において、その態様を含む本明細書に提供される発現ベクターを含むTリンパ球が提供される。別の局面において、その態様を含む本明細書に提供される発現ベクターを含む哺乳動物細胞が提供される。別の局面において、組み換えタンパク質が提供される。組み換えタンパク質は、(i)重鎖可変(VH)領域および軽鎖可変(VL)領域によって形成される中央空洞部を含む抗体領域であって、中央空洞部がフレームワーク領域アミノ酸残基を含むペプチド結合部位を形成する、抗体領域；および(ii)膜貫通ドメインを含む。

20

【0081】

別の局面において、組み換えタンパク質が提供される。組み換えタンパク質は、抗体重鎖可変ドメインを含む第1の部分、ならびに抗体軽鎖可変ドメインおよび抗体軽鎖定常ドメインを含む第2の部分を含み、第1の部分は膜貫通ドメインをさらに含み、抗体重鎖可変ドメイン、抗体軽鎖可変ドメイン、および抗体軽鎖定常ドメインはひとつになって抗体領域を形成する。

【0082】

別の局面において、組み換えタンパク質が提供される。組み換えタンパク質は、抗体重鎖可変ドメインを含む第1の部分および抗体軽鎖可変ドメインを含む第2の部分を含み、第1の部分は膜貫通ドメインをさらに含み、抗体重鎖可変ドメインおよび抗体軽鎖可変ドメインはひとつになって抗体領域を形成する。

30

【0083】

別の局面において、組み換えタンパク質が提供される。組み換えタンパク質は、抗体重鎖可変ドメインおよび抗体重鎖定常ドメインを含む第1の部分、ならびに抗体軽鎖可変ドメインを含む第2の部分を含み、第1の部分は膜貫通ドメインをさらに含み、抗体重鎖可変ドメイン、抗体重鎖定常ドメイン、および抗体軽鎖可変ドメインはひとつになって抗体領域を形成する。

【0084】

別の局面において、組み換えタンパク質が提供される。組み換えタンパク質は、抗体重鎖可変ドメインを含む第1の部分ならびに抗体軽鎖可変ドメインおよび抗体軽鎖定常ドメインを含む第2の部分を含み、第2の部分は膜貫通ドメインをさらに含み、抗体重鎖可変ドメイン、抗体軽鎖可変ドメイン、および抗体軽鎖定常ドメインはひとつになって抗体領域を形成する。

40

【0085】

別の局面において、組み換えタンパク質が提供される。組み換えタンパク質は、抗体重鎖可変ドメインを含む第1の部分および抗体軽鎖可変ドメインを含む第2の部分を含み、第2の部分は膜貫通ドメインをさらに含み、抗体重鎖可変ドメインおよび抗体軽鎖可変ドメインはひとつになって抗体領域を形成する。

50

【 0 0 8 6 】

別の局面において、その態様を含む本明細書に提供される組み換えタンパク質を含む哺乳動物細胞であって、哺乳動物細胞の細胞膜内に膜貫通ドメインが存在する、哺乳動物細胞が提供される。

【 0 0 8 7 】

いくつかの態様において、膜貫通ドメインは、CD8 膜貫通ドメインである。本明細書に提供される「CD8 膜貫通ドメイン」という用語は、CD8 の膜貫通ドメインの組み換え形態または天然形態のいずれかを含む。いくつかの局面において、その変種またはホモログは、天然CD8 膜貫通ドメインポリペプチドと比較して、その配列全体または配列の一部にわたって少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、
10
少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも100%のアミノ酸配列同一性を有する。いくつかの態様において、CD8 膜貫通ドメインは、
IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT (SEQ ID NO: 34)

のポリペプチド配列を有する。いくつかの態様において、CD8 膜貫通ドメインは、
ATCTACATCTGGGCTCCACTGGCAGGAACCTGTGGCGTGCTGCTGCTGCTGCCCTGG
TCATCACA (SEQ ID NO: 35)

の核酸配列によってコードされるタンパク質である。

【 0 0 8 8 】

いくつかの態様において、膜貫通ドメインは、CD28膜貫通ドメインである。本明細書に提供される「CD28膜貫通ドメイン」という用語は、CD28の膜貫通ドメインの組み換え形態もしくは天然形態のいずれか、またはCD28膜貫通ドメイン活性を保持するその変種もしくはホモログを含む。いくつかの局面において、その変種またはホモログは、天然CD28膜貫通ドメインポリペプチドと比較して、その配列全体または配列の一部にわたって少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、
20
少なくとも99%、または少なくとも100%のアミノ酸配列同一性を有する。いくつかの態様において、CD28膜貫通ドメインは、
FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV (SEQ ID NO: 36)

のポリペプチド配列を有する。いくつかの態様において、CD28膜貫通ドメインは、
TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAA
CAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTG (SEQ ID NO: 37)

の核酸配列によってコードされるタンパク質である。

【 0 0 8 9 】

いくつかの態様において、細胞内T細胞シグナルドメインは、CD3- 細胞内T細胞シグナルドメインである。いくつかの態様において、細胞内T細胞シグナルドメインは、ヒトCD3複合体のゼータ()鎖のシグナルドメインを含む。いくつかの態様において、細胞内T細胞シグナルドメインは、CD3- 細胞内T細胞シグナルドメインである。いくつかの態
40
様において、細胞内T細胞シグナルドメインは、
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPKRRKNP
QEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHGLYQGLSTATKDTYDALHMQA
LPPR (SEQ ID No: 42)

のアミノ酸配列を有するタンパク質CD3zIso1である。いくつかの態様において、細胞内T細胞シグナルドメインは、

10

20

30

40

50

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAA
 CCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGA
 CAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACC
 CTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACA
 GTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTT
 TACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAG
 GCCCTGCCCCCTCGCTAA (SEQ ID NO: 29)

10

の核酸配列によってコードされる

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENMGKPRRKNPQ
 EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGQGLSTATKDTYDALHMQUAL
 PPR (SEQ ID No: 43)

のアミノ酸配列を有するタンパク質CD3zIso3である。

【0090】

いくつかの態様において、本明細書に提供される単離された核酸は、細胞内共刺激シグナルドメインをコードする細胞内共刺激シグナル配列を含む。本明細書に提供される「細胞内共刺激シグナルドメイン」は、その態様を含む本明細書に提供される抗体領域への抗原の結合に応答して共刺激シグナルを提供することができるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、共刺激シグナルドメインのシグナルは、サイトカインの産生およびそれを発現するT細胞の増殖をもたらす。いくつかの態様において、細胞内共刺激シグナルドメインは、CD28細胞内共刺激シグナルドメイン、4-1BB細胞内共刺激シグナルドメインである。いくつかの態様において、細胞内共刺激シグナルドメインは、CD28細胞内共刺激シグナルドメイン、4-1BB細胞内共刺激シグナルドメイン、ICOS細胞内共刺激シグナルドメイン、OX-40細胞内共刺激シグナルドメイン、またはそれらの任意の組み合わせを含む。いくつかの態様において、CD28共刺激ドメインは、

20

RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 38)

30

のポリペプチド配列を有する。いくつかの態様において、CD28細胞内共刺激シグナルドメインは、

AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGC
 CGCCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCG
 CAGCCTATCGCTCC (SEQ ID NO: 27)

の核酸配列によってコードされるタンパク質である。いくつかの態様において、4-1BB細胞内共刺激シグナルドメインは、

40

KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 39)

のポリペプチド配列を有する。いくつかの態様において、4-1BB細胞内共刺激シグナルドメインは、

AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCA
 GTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAA
 GAAGGAGGATGTGAACTG (SEQ ID NO: 28)

の核酸配列によってコードされるタンパク質である。

50

【0091】

いくつかの態様において、本明細書に提供される単離された核酸は、スパーサー領域をコードするスパーサー配列を含む。本明細書に提供される「スパーサー領域」は、抗体領域と膜貫通ドメインを接続する、または抗体領域の様々な成分を接続する、ポリペプチドである。いくつかの態様において、スパーサー領域は、抗体領域と膜貫通ドメインの間にある。いくつかの態様において、スパーサー領域は、重鎖可変領域と膜貫通ドメインを接続する。いくつかの態様においてスパーサー領域は、重鎖定常領域と膜貫通ドメインを接続する。いくつかの態様において、スパーサー領域は、軽鎖可変領域と膜貫通ドメインを接続する。いくつかの態様において、スパーサー領域は、軽鎖定常領域と膜貫通ドメインを接続する。いくつかの態様において、抗原に対する抗体領域の結合親和性は、スパーサー領域が存在しない場合と比較して増大する。いくつかの態様において、抗体領域と抗原の間の立体障害は、スパーサー領域の存在下で減少する。

10

【0092】

いくつかの態様において、スパーサー領域は、ヒンジ領域を含む。いくつかの態様において、ヒンジ領域は、CD8 ヒンジ領域である。いくつかの態様において、ヒンジ領域は、CD28ヒンジ領域である。

【0093】

いくつかの態様において、スパーサー領域は、Fc領域を含む。本明細書に提供される組成物および方法において想定されているスパーサー領域の例は、非限定的に、免疫グロブリン分子またはそのフラグメント（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）およびFc受容体結合に影響する変異を含む免疫グロブリン分子またはそのフラグメント（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）を含む。いくつかの態様において、スパーサー領域は、CH2ドメインの欠失を含むIgG（例えば、IgG4）のフラグメントである。スパーサー領域は、ペプチドリンカーであり得る。いくつかの態様において、核酸は、スパーサー領域をコードするスパーサー配列を含まない。

20

【0094】

いくつかの態様において、スパーサー領域は、抗体領域の様々な成分を接続する。いくつかの態様において、スパーサー領域は、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を接続する。

【0095】

いくつかの態様において、本明細書に提供される単離された核酸は、リンカードメインをコードするリンカー配列を含む。いくつかの態様において、リンカードメインは、scFvのVHとVLの間に挿入される。いくつかの態様において、リンカードメインは、膜貫通ドメインと細胞内T細胞シグナルドメインの間にある。いくつかの態様において、リンカードメインは、細胞内T細胞シグナルドメインと細胞内共刺激シグナルドメインの間にある。いくつかの態様において、リンカードメインは、配列
GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 25)

30

を含む。

【0096】

いくつかの態様において、本明細書に提供される単離された核酸は、リンカードメインをコードするリンカー配列を含まない。

40

【0097】

いくつかの態様において、核酸は、(i)可変重鎖ドメインおよび膜貫通ドメインを含む、そのタンパク質の重鎖ドメインをコードする重鎖配列、ならびに(ii)可変軽鎖ドメインを含む、そのタンパク質の軽鎖ドメインをコードする軽鎖配列を含み、可変重鎖ドメインおよび可変軽鎖ドメインはひとつになって抗体領域の少なくとも一部を形成する。

【0098】

いくつかの態様において、核酸は、(i)可変重鎖ドメインを含む、そのタンパク質の重鎖ドメインをコードする重鎖配列、ならびに(ii)可変軽鎖ドメインおよび膜貫通ドメインを含む、そのタンパク質の軽鎖ドメインをコードする軽鎖配列を含み、可変重鎖ドメイ

50

ンおよび可変軽鎖ドメインはひとつになって抗体領域の少なくとも一部を形成する。

【0099】

本明細書に提供される「重鎖配列」は、本明細書に提供される重鎖ドメインをコードする核酸配列を表す。本明細書に提供される重鎖ドメインは、重鎖可変(VH)領域および/または重鎖定常領域(CH)を含み得る。本明細書に提供される「軽鎖配列」は、本明細書に提供される軽鎖ドメインをコードする核酸配列を表す。本明細書に提供される軽鎖ドメインは、軽鎖可変(VL)領域および/または軽鎖定常領域(CL)を含み得る。本明細書で言及される場合の「重鎖ドメイン」という用語は、当技術分野におけるその通常の意味にしたがい使用され、重鎖可変(VH)領域および重鎖定常領域(CH)を含むポリペプチドを表す。本明細書で言及される場合の「軽鎖ドメイン」という用語は、当技術分野におけるその通常の意味にしたがい使用され、軽鎖可変(VL)領域および軽鎖定常領域(CL)を含むポリペプチドを表す。いくつかの態様において、抗体重鎖可変ドメインおよび抗体軽鎖可変ドメインは、ヒト化される。

10

【0100】

いくつかの態様において、その態様を含む本明細書に提供されるタンパク質または抗体領域は、LILRB4に結合する抗体と同じ抗原またはエピトープとの抗原結合に関して競合する、同じ抗原またはエピトープに特異的に結合する、ならびに/またはLILRB4に結合する抗体の、例えば、重鎖CDR1、2、および/もしくは3、および/もしくは軽鎖CDR1、2、および/もしくは3を含む、1つの、より多くの、もしくはすべてのCDR(もしくは該CDRに対して少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも91、少なくとも92、少なくとも93、少なくとも94、少なくとも95、少なくとも96、少なくとも97、少なくとも98、もしくは少なくとも99%、もしくは、約75、約80、約85、約90、約91、約92、約93、約94、約95、約96、約97、約98、もしくは約99%の同一性を有するCDR)を含む。

20

【0101】

いくつかの態様において、核酸は、LILRB4に結合する抗体由来の抗体重鎖可変ドメインおよび抗体軽鎖可変ドメインをコードする。いくつかの態様において、抗体重鎖可変ドメインをコードする核酸は、SEQ ID NO:8またはSEQ ID NO:18によって特定される(表1を参照のこと)。いくつかの態様において、抗体軽鎖可変ドメインをコードする核酸は、SEQ ID NO:10またはSEQ ID NO:20によって特定される(表1を参照のこと)。

30

【0102】

いくつかの態様において、タンパク質は、細胞内共刺激シグナルドメインおよびCD3-細胞内T細胞シグナルドメインを含む。いくつかの態様において、タンパク質は、アミノ末端からカルボキシル末端に向かって、重鎖可変ドメイン、軽鎖可変ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内共刺激シグナルドメイン、およびCD3-細胞内T細胞シグナルドメインを含む。

【0103】

いくつかの態様において、タンパク質は、細胞内共刺激シグナルドメインおよびCD3-細胞内T細胞シグナルドメインを含む。いくつかの態様において、タンパク質は、アミノ末端からカルボキシル末端に向かって、軽鎖可変ドメイン、重鎖可変ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内共刺激シグナルドメイン、およびCD3-細胞内T細胞シグナルドメインを含む。

40

【0104】

いくつかの態様において、組み換えタンパク質は、抗体重鎖可変ドメインを含む第1の部分、および抗体軽鎖可変ドメインを含む第2の部分を含む。いくつかの態様において、第1の部分は、細胞内共刺激シグナルドメインおよびCD3-細胞内T細胞シグナルドメインを含む。いくつかの態様において、第1の部分は、アミノ末端からカルボキシル末端に向かって、重鎖可変ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内共刺激シグナルドメイン、およびCD3-細胞内T細胞シグナルドメインを含む。

【0105】

50

いくつかの態様において、組み換えタンパク質は、抗体重鎖可変ドメインおよび重鎖定常ドメインを含む第1の部分、ならびに抗体軽鎖可変ドメインを含む第2の部分を含む。いくつかの態様において、第1の部分は、細胞内共刺激シグナルドメインおよびCD3- 細胞内T細胞シグナルドメインを含む。いくつかの態様において、第1の部分は、アミノ末端からカルボキシル末端に向かって、重鎖可変ドメイン、重鎖定常ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内共刺激シグナルドメイン、およびCD3- 細胞内T細胞シグナルドメインを含む。

【0106】

いくつかの態様において、タンパク質は、CD3- 細胞内T細胞シグナルドメインおよび細胞内共刺激シグナルドメインを含む。いくつかの態様において、タンパク質は、アミノ末端からカルボキシル末端に向かって、重鎖可変ドメイン、軽鎖可変ドメイン、膜貫通ドメイン、CD3- 細胞内T細胞シグナルドメイン、および細胞内共刺激シグナルドメインを含む。

10

【0107】

いくつかの態様において、組み換えタンパク質は、抗体重鎖可変ドメインを含む第1の部分、および抗体軽鎖可変ドメインを含む第2の部分を含む。いくつかの態様において、第1の部分は、CD3- 細胞内T細胞シグナルドメインおよび細胞内共刺激シグナルドメインを含む。いくつかの態様において、第1の部分は、アミノ末端からカルボキシル末端に向かって、重鎖可変ドメイン、膜貫通ドメイン、CD3- 細胞内T細胞シグナルドメイン、および細胞内共刺激シグナルドメインを含む。

【0108】

いくつかの態様において、組み換えタンパク質は、抗体重鎖可変ドメインおよび重鎖定常ドメインを含む第1の部分、ならびに抗体軽鎖可変ドメインを含む第2の部分を含む。いくつかの態様において、第1の部分は、CD3- 細胞内T細胞シグナルドメインおよび細胞内共刺激シグナルドメインを含む。いくつかの態様において、第1の部分は、アミノ末端からカルボキシル末端に向かって、重鎖可変ドメイン、重鎖定常ドメイン、膜貫通ドメイン、CD3- 細胞内T細胞シグナルドメイン、および細胞内共刺激シグナルドメインを含む。

20

【0109】

いくつかの態様において、単離された核酸は、N末端からC末端に向かって、リーダーペプチド、抗LILRB4重鎖可変ドメイン、リンカードメイン、抗LILRB4軽鎖可変ドメイン、ヒトIgG1-CH2-CH3ドメイン、スペーサー領域、CD28膜貫通ドメイン、4-1BB細胞内共刺激シグナルドメイン、およびCD3- 細胞内T細胞シグナルドメインを含むタンパク質をコードする。

30

【0110】

いくつかの態様において、単離された核酸は、N末端からC末端に向かって、リーダーペプチド、抗LILRB4重鎖可変ドメイン、リンカードメイン、抗LILRB4軽鎖可変ドメイン、スペーサー領域、CD28膜貫通ドメイン、4-1BB細胞内共刺激シグナルドメイン、およびCD3- 細胞内T細胞シグナルドメインを含むタンパク質をコードする。

【0111】

いくつかの態様において、単離された核酸は、N末端からC末端に向かって、リーダーペプチド、抗LILRB4重鎖可変ドメイン、リンカードメイン、抗LILRB4軽鎖可変ドメイン、スペーサー領域、CD28膜貫通、および共刺激ドメイン、ならびにCD3- 細胞内T細胞シグナルドメインを含むタンパク質をコードする。

40

【0112】

いくつかの態様において、単離された核酸は、N末端からC末端に向かって、リーダーペプチド、抗LILRB4重鎖可変ドメイン、リンカードメイン、抗LILRB4軽鎖可変ドメイン、スペーサー領域、CD8 膜貫通ドメイン（またはCD28膜貫通ドメイン）、4-1BB細胞内共刺激シグナルドメイン（またはCD28細胞内共刺激シグナルドメイン）、およびCD3- 細胞内T細胞シグナルドメインを含むタンパク質をコードする。

【0113】

50

いくつかの態様において、タンパク質は、N末端からC末端に向かって、
 ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCG
 CCAGGCCG (SEQ ID NO: 24)

の核酸によってコードされるリーダーペプチド、SEQ ID NO:8またはSEQ ID NO:18 (表1を参照のこと)の核酸によってコードされる抗LILRB4重鎖可変ドメイン、
 GGTGGAGGCGGTTTCAGGTGGCGGCGGTTTCGGGCGGTGGCGGCTCT (SEQ ID NO: 30)

の核酸によってコードされるリンカードメイン、SEQ ID NO:10またはSEQ ID NO:20 (表1を参照のこと)の核酸によってコードされる抗LILRB4軽鎖可変ドメイン、
 ACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGTCGCAG
 CCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCAC
 ACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGAT (SEQ ID NO: 26)

の核酸によってコードされるヒンジ領域、SEQ ID NO:27の核酸によってコードされるCD28細胞内共刺激シグナルドメイン、SEQ ID NO:28の核酸によってコードされる4-1BB細胞内共刺激シグナルドメイン、およびSEQ ID NO:29の核酸によってコードされるCD3-細胞内T細胞シグナルドメインを含む。

【0114】

いくつかの態様において、提供される単離された核酸分子は、リーダーペプチドをコードするSEQ ID NO:24、抗LILRB4重鎖可変ドメインをコードするSEQ ID NO:8またはSEQ ID NO:18 (表1を参照のこと)、リンカードメインをコードするSEQ ID NO:30、抗LILRB4軽鎖可変ドメインをコードするSEQ ID NO:10またはSEQ ID NO:20 (表1を参照のこと)、ヒンジ領域をコードするSEQ ID NO:26、CD28細胞内共刺激シグナルドメインをコードするSEQ ID NO:27、4-1BB細胞内共刺激シグナルドメインをコードするSEQ ID NO:28、およびCD3-細胞内T細胞シグナルドメインをコードするSEQ ID NO:29を含む。

【0115】

特定の態様において、本明細書に提供されるLILRB4 CARタンパク質は、LILRB4に対して高い親和性を示す。特定の態様において、本明細書に提供されるCARタンパク質は、1 nM未満、0.9 nM未満、0.8 nM未満、0.7 nM未満、0.6 nM未満、0.5 nM未満、0.4 nM未満、0.3 nM未満、0.2 nM未満、0.1 nM未満、0.09 nM未満、0.08 nM未満、0.07 nM未満、0.06 nM未満、または0.05 nM未満のLILRB4に対する結合親和性 (ELISAによって測定されたEC₅₀) を有する。本願の目的上、ELISA EC₅₀値は、以下のようにして決定され得る。(C末端に6 HISタグを有する) LILRB-4細胞外ドメインタンパク質をHEK293細胞において組み換え生産し、4 で14~16時間、1 μg/ml濃度 (100 μl/ウェル) となるよう高結合性96ウェル透明プレート (Corning-Costar, Fisher Scientific) 上にコーティングした。コーティングしたプレートを、pH 7.4のPBSで軽く洗浄し、37 で2時間、200 μl/ウェルのPBS中5%脱脂乳によりブロックした。10 μg/mlから始まる、12段階の3倍滴定物である試験モノクローナル抗体 (IgGまたはscFvフラグメント) の連続希釈物を、37 で45分間のインキュベーションによる結合のために96ウェルプレートに添加し、このアッセイプレートにカバーをのせた。ついで、このプレートをTween 20 (0.05%濃度) を含むPBSで3回、PBSで1回洗浄した。製造元の推奨する希釈率での室温で1時間のインキュベーションのためにHRPが結合した抗ヒトもしくは抗ウサギの二次抗体、または他種IgG特異的抗体 (Jackson ImmunoResearch) を添加した。検出は、HRP基質、TMB (ThermoFisher) を10分間添加することによって実施し、50 μl/ウェルの2N H₂SO₄を添加することによって停止させた。このプレートを、プレートリーダー (Spectra Max M4, Molecular Devices) を用いて450 nmの吸光度に関して読み取った。データを収集し、EC₅₀の計算のためにGrapPad Prism 7ソフトウェアを用いて4パラメータフ

ィッティング曲線を用いてグラフ化した。

【0116】

別の局面において、その態様を含む本明細書に提供される組み換えタンパク質を含むTリンパ球であって、そのTリンパ球の細胞膜内に膜貫通ドメインが存在する、Tリンパ球が提供される。

【0117】

別の局面において、がんを処置する方法が提供される。この方法は、それを必要とする対象に、抗体領域が抗がん抗体領域である、その態様を含む本明細書に提供される哺乳動物細胞の有効量を投与する工程を含む。別の局面において、がんを処置する方法が提供される。この方法は、それを必要とする対象に、抗体領域が抗がん抗体領域である、その態様を含む本明細書に提供されるTリンパ球の有効量を投与する工程を含む。別の局面において、Tリンパ球を再プログラムする方法が提供される。この方法は、Tリンパ球を、その態様を含む本明細書に提供される発現ベクターと接触させる工程を含む。別の局面において、がんを検出する方法が提供される。この方法は、(i)がん患者に、その態様を含む本明細書に提供される組み換えタンパク質を含むTリンパ球およびペプチド結合部位に結合することができるペプチジル部分を含む化合物を有効量投与する工程を含み、該化合物はさらに検出可能な標識を含み、抗体領域は抗がん抗体領域である。この方法は、(ii)化合物をペプチド結合部位に結合させ、それによって組み換えタンパク質・化合物複合体を形成する工程を含む。そして(iii)組み換えタンパク質・化合物複合体ががん患者において検出され、それによってがんが検出される。

【0118】

IV. 宿主細胞

本開示の特定の態様は、キメラ抗原受容体(CAR)を発現する免疫細胞に関する。免疫細胞は、T細胞(例えば、制御性T細胞、CD4+ T細胞、CD8+ T細胞、もしくはT細胞)、ナチュラルキラー(NK)細胞、インバリアントNK細胞、またはNKT細胞であり得る。免疫細胞を製造および操作する方法、ならびに該細胞が自己または同種異系であり得る場合の養子細胞療法のために該細胞を使用および投与する方法も、本明細書に提供される。したがって、免疫細胞は、免疫療法として、例えばがん細胞を標的にするために使用され得る。

【0119】

免疫細胞は、対象、特にヒト対象から単離され得る。免疫細胞は、関心対象の細胞、例えば、特定の疾患もしくは状態を有することが疑われる対象、特定の疾患もしくは状態にかかりやすいことが疑われる対象、特定の疾患もしくは状態に対する治療を受けている対象、健常ボランティアもしくは健常ドナーである対象から、または血液バンクから入手され得る。免疫細胞は、血液、臍帯血、脾臓、胸腺、リンパ節、および骨髄を含むがこれらに限定されない、免疫細胞が対象内で存在する任意の場所から、収集され得る。単離された免疫細胞は直接使用され得るか、またはそれらは一定期間、例えば凍結により保存され得る。

【0120】

免疫細胞は、血液(血液バンクまたは臍帯血バンクにより収集された血液を含む)、脾臓、骨髄、外科手術の間に取り出されたおよび/または露出させた組織、ならびに生検術を通じて得られた組織を含むがこれらに限定されない、それらが存在する任意の組織から濃縮/精製され得る。免疫細胞が濃縮、単離、および/または精製される組織/臓器は、生きていない対象および生きていない対象の両方から単離され得、生きていない対象は、臓器ドナーである。特定の態様において、免疫細胞は、血液、例えば末梢血または臍帯血から単離される。いくつかの局面において、臍帯血から単離された免疫細胞は、CD4またはCD8陽性T細胞抑制により測定される増強された免疫調整能力を有する。特定の局面において、免疫細胞は、免疫調整能力の増強のために、プールされた血液、特にプールされた臍帯血から単離される。プールされた血液は、2種類またはそれ以上の供給源、例えば3、4、5、6、7、8、9、10種類、またはそれ以上の供給源(例えば、ドナー対象)由来であ

り得る。

【0121】

免疫細胞の集団は、治療を必要とする対象、または免疫細胞活性の減少に関連する疾患を患っている対象から取得され得る。したがって、細胞は、治療を必要とする対象にとって自己である。あるいは、免疫細胞の集団は、ドナー、好ましくは組織適合ドナーから取得され得る。免疫細胞集団は、対象またはドナーの末梢血、臍帯血、骨髄、脾臓、または免疫細胞が存在する任意の他の臓器/組織から収集され得る。免疫細胞は、対象および/またはドナーのプールから、例えばプールされた臍帯血から単離され得る。

【0122】

免疫細胞の集団が対象とは別のドナーから取得される場合、ドナーは好ましくは同種異系であるが、対象に導入することができるという点で取得される細胞が対象適合性を有する必要がある。同種異系ドナー細胞は、ヒト白血球抗原 (HLA) 適合性である場合もそうでない場合もある。対象適合性にするために、同種異系細胞は、免疫原性が減少するように処理され得る。

10

【0123】

A. T細胞

いくつかの態様において、免疫細胞はT細胞である。この20年の間に、機能的な抗腫瘍エフェクター細胞の誘導、活性化、および増大のための様々な基本的アプローチが報告された。これらは、自己細胞、例えば腫瘍浸潤性リンパ球 (TIL) ; 自己DC、リンパ球、人工抗原提示細胞 (APC) もしくはT細胞リガンドおよび活性化抗体でコーティングされたビーズ、または標的細胞膜を捕捉することによって単離された細胞を用いてエキスピボ活性化されたT細胞 ; 生来的に抗宿主腫瘍T細胞受容体 (TCR) を発現する同種異系細胞 ; ならびに「T-ボディ」として公知の抗体様腫瘍認識能力を示す腫瘍反応性TCRまたはキメラTCR分子を発現するよう遺伝的に再プログラムされたまたは「リダイレクト」された非腫瘍特異的自己または同種異系細胞を含む。これらのアプローチは、本明細書に記載される方法において使用され得るT細胞の調製および免疫化のための多くのプロトコールを生み出した。

20

【0124】

いくつかの態様において、T細胞は、血液、骨髄、リンパ、臍帯、またはリンパ器官由来である。いくつかの局面において、細胞は、ヒト細胞である。細胞は、典型的に、初代細胞、例えば対象から直接単離されたものおよび/または対象から単離され凍結されたものである。いくつかの態様において、細胞は、T細胞または他の細胞型の1つまたは複数のサブセット、例えば総T細胞集団、CD4⁺細胞、CD8⁺細胞、およびそれらの部分集団、例えば機能、活性化状態、成熟度、分化、増大、再循環、局在化、および/もしくは持続能に関する可能性、抗原特異性、抗原受容体のタイプ、特定の臓器または区画における存在、マーカーもしくはサイトカイン分泌プロファイル、ならびに/または分化度により定義されるものを含む。処置される対象に関して、細胞は、同種異系および/または自己であり得る。いくつかの局面において、例えば既製品化技術に関して、細胞は、多能性および/または多分化能、例えば幹細胞、例えば人工多能性幹細胞 (iPSC) である。いくつかの態様において、この方法は、対象から細胞を単離する工程、本明細書に記載されるように該細胞を調製、処理、培養、および/または操作する工程、ならびに凍結保存前もしくは後にそれらを同じ患者に再導入する工程を含む。

30

40

【0125】

T細胞のサブタイプおよび部分集団 (例えば、CD4⁺および/またはCD8⁺ T細胞) の中には、ナイーブT (T_N) 細胞、エフェクターT細胞 (T_{EFF})、メモリーT細胞、およびそれらのサブタイプ、例えば幹細胞メモリーT (T_{SCM})、セントラルメモリーT (T_{CM})、エフェクターメモリーT (T_{EM}) または最終分化エフェクターメモリーT細胞、腫瘍浸潤性リンパ球 (TIL)、未成熟T細胞、成熟T細胞、ヘルパーT細胞、細胞障害性T細胞、粘膜関連インバリアントT (MAIT) 細胞、内在および適応制御性T (T_{reg}) 細胞、ヘルパーT細胞、例えばTH1細胞、TH2細胞、TH3細胞、TH17細胞、TH9細胞、TH22細胞、濾胞性へ

50

ルパーT細胞、 / T細胞、および / T細胞がある。

【0126】

いくつかの態様において、T細胞集団の1つまたは複数は、表面マーカーなどの特定のマーカーに関して陽性である細胞もしくは特定のマーカーに関して陰性である細胞に関して濃縮されるか、またはそのような細胞を除去される。いくつかの例において、そのようなマーカーは、T細胞の特定の集団（例えば、非メモリー細胞）において存在しないかまたは相対的に低レベルで発現しているが、T細胞の特定の他の集団（例えば、メモリー細胞）において存在するかまたは相対的に高レベルで発現しているものである。

【0127】

いくつかの態様において、T細胞は、非T細胞、例えばB細胞、単球、または他の白血球において発現しているマーカー、例えばCD14の負の選択によってPBMCサンプルから分離される。いくつかの局面において、CD4⁺またはCD8⁺選択工程が、CD4⁺ヘルパーとCD8⁺細胞障害性T細胞を分離するために使用される。そのようなCD4⁺およびCD8⁺集団はさらに、1つまたは複数のナイーブ、メモリー、および / またはエフェクターT細胞部分集団において発現しているかまたは相対的に高度に発現しているマーカーに関する正または負の選択により、部分集団に分別され得る。

10

【0128】

いくつかの態様において、CD8⁺ T細胞はさらに、例えば各部分集団に関連する表面抗原に基づく正または負の選択によって、ナイーブ、セントラルメモリー、エフェクターメモリー、および / またはセントラルメモリー幹細胞に関して濃縮されるかまたはそれらを除去される。いくつかの態様において、セントラルメモリーT (T_{CM}) 細胞の濃縮は、効率を高めるよう、例えば投与後の長期間生存、増大、および / または生着を改善するよう行われ、これらは、いくつかの局面において、そのような部分集団においてより確実となる。Terakura et al. (2012); Wang et al. (2012)を参照のこと。

20

【0129】

いくつかの態様において、T細胞は、自己T細胞である。この方法において、腫瘍サンプルが患者から取得され、単一細胞懸濁物が取得される。単一細胞懸濁物は、任意の適切な様式で、例えば機械的に（例えばgentleMACS（商標）Dissociator, Miltenyi Biotec, Auburn, Calif.を用いた腫瘍の解体）または酵素的に（例えば、コラゲナーゼもしくはDNase）取得され得る。腫瘍の酵素消化物の単一細胞懸濁物は、インターロイキン-2 (IL-2) 下で培養される。細胞は、コンフルエンス（例えば、約2 × 10⁶個のリンパ球）に達するまで、例えば、約5日間から約21日間まで、好ましくは約10日間から約14日間まで培養される。例えば、細胞は、5日間、5.5日間、または5.8日間から21日間、21.5日間、または21.8日間まで、例えば、10日間、10.5日間、または10.8日間から14日間、14.5日間、または14.8日間まで培養され得る。

30

【0130】

培養されたT細胞は、プールされ、急速に増大され得る。急速な増大は、約10～約14日間の期間にわたる抗原特異的T細胞の数の少なくとも約50倍（例えば、50、60、70、80、90、もしくは100倍、またはそれ以上）の増加を提供する。より好ましくは、急速な増大は、約10～約14日間の期間にわたる少なくとも約200倍（例えば、200、300、400、500、600、700、800、900倍、またはそれ以上）の増加を提供する。

40

【0131】

増大は、当技術分野で公知の多くの方法のいずれかによって達成され得る。例えば、T細胞は、フィーダーリンパ球と、インターロイキン-2 (IL-2) またはインターロイキン-15 (IL-15) のいずれか、好ましくはIL-2との存在下での非特異的T細胞受容体刺激を用いて急速に増大され得る。非特異的T細胞受容体刺激は、約30 ng/mlのOKT3、マウスモノクローナル抗CD3抗体 (Ortho-McNeil (登録商標), Raritan, N.J.から入手可能) を含み得る。あるいは、T細胞は、T細胞成長因子の存在下で、例えば、300 IU/mlのIL-2またはIL-15、好ましくはIL-2の存在下で、任意でベクターから発現され得る、がんの1つの抗原または複数の抗原（その抗原性部分、例えばエピトープ、または細胞を含む）、例え

50

ばヒト白血球抗原A2 (HLA-A2) 結合ペプチドを用いたインビトロでの末梢血単核細胞 (PBMC) の刺激によって急速に増大され得る。インビトロ誘導されたT細胞は、同じがんの抗原をHLA-A2発現抗原提示細胞にパルスする再刺激により急速に増大される。あるいは、T細胞は、例えば、照射された自己リンパ球によりまたは照射されたHLA-A2+同種異系リンパ球およびIL-2により再刺激され得る。

【0132】

自己T細胞は、自己T細胞の成長および活性化を促進するT細胞成長因子を発現するよう修飾され得る。適切なT細胞成長因子は、例えば、インターロイキン (IL) -2、IL-7、IL-15およびIL-12を含む。適切な修飾方法は、当技術分野で公知である。例えば、Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001;およびAusubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994を参照のこと。特定の局面において、修飾された自己T細胞は、T細胞成長因子を高レベルで発現する。T細胞成長因子コード配列、例えば、IL-12のそれは、当技術分野で容易に入手可能であり、そのT細胞成長因子コード配列への機能的連結が高レベル発現を促進するプロモーターについても同様である。

【0133】

B. NK細胞

いくつかの態様において、免疫細胞は、ナチュラルキラー (NK) 細胞である。ナチュラルキラー (NK) 細胞は、様々な腫瘍細胞、ウイルス感染細胞ならびに骨髄および胸腺の一部の正常細胞に対する自然細胞障害性を有するリンパ球の部分集団である。NK細胞は、形質転換したおよびウイルス感染した細胞に対する初期の自然免疫応答の重要なエフェクターである。NK細胞は、ヒト末梢血におけるリンパ球の約10%を占める。リンパ球がインターロイキン2 (IL-2) の存在下で培養されると、強い細胞障害反応性が生じる。NK細胞は、それらの大きなサイズおよびそれらの細胞質における特徴的なアズール親和性顆粒の存在から、大顆粒リンパ球として公知となっているエフェクター細胞である (Herberman, 1986)。NK細胞は、骨髄、リンパ節、脾臓、扁桃腺、および胸腺において分化および成熟する。NK細胞は、特定の表面マーカー、例えばヒトにおいてはCD16、CD56、およびCD8によって検出され得る。NK細胞は、T細胞抗原受容体、汎TマーカーCD3または表面免疫グロブリンB細胞受容体を発現しない。

【0134】

NK細胞の刺激は、細胞表面活性化および阻害受容体からのシグナルのクロストークを通じて達成される。NK細胞の活性化状態は、多数の生殖系がコードする活性化および阻害受容体から受け取る細胞内シグナルの均衡によって制御される (Campbell, 2006)。NK細胞が異常な細胞 (例えば、腫瘍またはウイルス感染細胞) と遭遇し、活性化シグナルが優勢となる場合、NK細胞は、パーフォリンおよびグランザイムを含む細胞溶解性顆粒の方向づけられた分泌または死ドメイン含有受容体の結合を通じて標的細胞のアポトーシスを迅速に誘導し得る。活性化されたNK細胞はまた、自然および適応の両方の免疫細胞を活性化するI型サイトカイン、例えばインターフェロン、腫瘍壊死因子 および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、ならびに他のサイトカインも分泌し得る。初期自然免疫応答におけるNK細胞によるこれらの可溶性因子の産生は、他の造血細胞の動員および機能に大きく影響する。また、物理的接触およびサイトカイン産生を通じて、NK細胞は、免疫応答を促進または抑制する樹状細胞および好中球との制御クロストーク網において中心的なプレイヤーとなる。

【0135】

特定の態様において、NK細胞は、当技術分野で周知の方法により、ヒト末梢血単核細胞 (PBMC)、未刺激白血球除去療法産物 (PBSC)、ヒト胚性幹細胞 (hESC)、人工多能性幹細胞 (iPSC)、骨髄、または臍帯血から得られる。特に、臍帯CBが、NK細胞を得るために使用される。特定の局面において、NK細胞は、単離され、以前に記載されたNK細胞のエクスピボ増大方法によって増大される (Spanholtz et al., 2011; Shah et al., 2

10

20

30

40

50

013)。この方法において、CB単核細胞は、フィコール密度勾配遠心分離によって単離され、IL-2および人工抗原提示細胞（aAPC）と共にバイオリアクタ内で培養される。7日後、細胞培養物からCD3を発現する細胞が除去され、さらに7日間再培養される。この細胞は再度、CD3除去され、そしてCD56⁺/CD3⁻細胞またはNK細胞の比率%を決定するよう特徴づけられる。他の方法において、臍帯CBは、CD34⁺細胞の単離ならびにSCF、IL-7、IL-15、およびIL-2を含む培地中で培養することによるCD56⁺/CD3⁻細胞への分化によりNK細胞を得るために使用される。

【0136】

C. 宿主細胞の操作

免疫細胞（例えば、自己または同種異系T細胞（例えば、制御性T細胞、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、もしくはT細胞）、NK細胞、インバリアントNK細胞、またはNKT細胞）は、抗原受容体、例えば操作されたTCRおよび/またはキメラ抗原受容体（CAR）を発現するよう遺伝子操作され得る。例えば、宿主細胞（例えば、自己または同種異系T細胞）は、がん抗原に対する抗原特異性を有するT細胞受容体（TCR）を発現するよう改変される。特定の態様において、NK細胞は、TCRを発現するよう操作される。NK細胞はさらに、CARを発現するよう操作され得る。例えば異なる抗原に対する、複数のCARおよび/またはTCRが、単一の細胞型、例えばT細胞またはNK細胞に添加され得る。

【0137】

適切な改変方法は、当技術分野で公知である。例えば、Sambrook and Ausubel、前記を参照のこと。例えば、細胞は、Heemskerk et al. (2008)およびJohnson et al. (2009)に記載される形質導入技術を用いてがん抗原に対する抗原特異性を有するT細胞受容体（TCR）を発現するよう形質導入され得る。

【0138】

いくつかの態様において、細胞は、1つまたは複数の抗原受容体をコードする遺伝子操作を通じて導入された1つまたは複数の核酸ならびにそのような核酸の遺伝子操作産物を含む。いくつかの態様において、核酸は、異種である、すなわち、細胞または細胞から得られるサンプル中に本来的に存在しない、例えば、例えば操作される細胞および/またはそのような細胞の元となる生物において通常見られない、別の生物または細胞から得られるものである。いくつかの態様において、核酸は、非天然である、例えば自然界で見いだされない核酸（例えば、キメラ）である。

【0139】

V. 使用方法

A. 処置

いくつかの態様において、本開示は、本開示の免疫細胞の有効量を投与する工程を含む免疫療法を提供する。1つの態様において、医学的疾患または障害が、免疫応答を誘発する免疫細胞集団の導入によって処置される。本開示の特定の態様において、がんまたは感染が、免疫応答を誘発する免疫細胞集団の導入によって処置される。有効量の抗原特異的細胞療法を個体に実施する工程を含む、個体においてがんを処置するかまたはがんの進行を遅延させる方法が、本明細書に提供される。本開示は、免疫障害、固形がん、血液がん、およびウイルス感染の処置のために適用され得る。

【0140】

本処置方法が有効な腫瘍は、任意の悪性細胞型、例えば、固形腫瘍または血液腫瘍において見いだされるものを含む。例示的な固形腫瘍は、膵臓、結腸、盲腸、胃、脳、頭部、頸部、卵巣、腎臓、喉頭、肉腫、肺、膀胱、黒色腫、前立腺、および乳房からなる群より選択される臓器の腫瘍を含み得るが、これらに限定されない。例示的な血液腫瘍は、骨髄の腫瘍、TまたはB細胞悪性腫瘍、白血病、リンパ腫、芽細胞腫、骨髄腫等を含む。本明細書に提供される方法を用いて処置され得るがんのさらなる例は、肺がん（小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺の腺がん、および肺の扁平上皮がんを含む）、腹膜のがん、胃（gastric）または胃（stomach）がん（消化器がんおよび消化管間質がんを含む）、膵臓がん、子宮頸がん、卵巣がん、肝臓がん、膀胱がん、乳がん、結腸がん、結腸直腸がん、子宮

10

20

30

40

50

内臓がんまたは子宮がん、唾液腺がん、腎臓 (kidney) または腎臓 (renal) がん、前立腺がん、外陰がん、甲状腺がん、様々なタイプの頭頸部がん、および黒色腫を含むがこれらに限定されない。

【0141】

がんは、具体的に、以下の組織学的タイプのものであり得るが、これらに限定されない：新生物、悪性腫瘍；がん腫；がん腫、未分化；巨細胞紡錘形細胞がん；小細胞がん；乳頭がん；扁平上皮がん；リンパ上皮がん；基底細胞がん；ピロマトリックスがん；移行上皮がん；乳頭状移行上皮がん；腺がん；ガストリノーマ、悪性；胆管がん；肝細胞がん；肝細胞がんと胆管がんの混合型；索状腺がん；腺様嚢胞がん；腺腫様ポリープにおける腺がん；腺がん、家族性大腸ポリポーシス；固形がん；カルチノイド腫瘍、悪性；細気管支肺胞腺がん；乳頭腺がん；色素嫌性がん；好酸性がん；好酸性腺がん；好塩基性がん；明細胞腺がん；顆粒細胞がん；濾胞状腺がん；乳頭状濾胞腺がん；非被包性硬化性がん；副腎皮質がん；類内膜がん；皮膚付属器がん；アポクリン腺がん；皮脂腺がん；耳垢腺がん；粘表皮がん；嚢胞腺がん；乳頭状嚢腺がん；乳頭状漿液嚢胞腺がん；粘液性嚢腺腫；膠様腺がん；印環細胞がん；浸潤性導管がん；髄様がん；小葉がん；炎症性がん；ページェット病、乳房；腺房細胞がん；腺扁平上皮がん；扁平上皮化生随伴腺がん；胸腺腫、悪性；卵巣間質性腫瘍、悪性；卵胞膜細胞腫、悪性；顆粒膜細胞腫、悪性；男性胚腫、悪性；セルトリ細胞腫；ライジッヒ細胞腫、悪性；脂質細胞腫、悪性；傍神経節腫瘍、悪性；乳房外傍神経節腫瘍、悪性；褐色細胞腫；血管球血管肉腫；悪性黒色腫；メラニン欠乏性黒色腫；表層進展性黒色腫；悪性黒子性黒色腫；末端黒子性黒色腫；結節性黒色腫；巨大色素性母斑内の悪性黒色腫；類上皮細胞黒色腫；青色母斑、悪性；肉腫；繊維肉腫；線維性組織球腫、悪性；粘液肉腫；脂肪肉腫；平滑筋肉腫；横紋筋肉腫；胎児型横紋筋肉腫；泡巣状横紋筋肉腫；間質性肉腫；混合腫瘍、悪性；ミュラー管混合腫瘍；腎芽腫；肝芽腫；がん肉腫；間葉腫、悪性；プレナー腫瘍、悪性；葉状腫瘍、悪性；滑膜肉腫；中皮腫、悪性；未分化胚細胞腫；胎生期がん；奇形腫、悪性；卵巣甲状腺腫、悪性；絨毛がん；中腎腫、悪性；血管肉腫；血管内皮腫、悪性；カポジ肉腫；血管外皮腫、悪性；リンパ肉腫；骨肉腫；傍骨性骨肉腫；軟骨肉腫；軟骨芽細胞腫、悪性；間葉性軟骨肉腫；骨の巨細胞腫；ユーイング肉腫；歯源性腫瘍、悪性；エナメル上皮歯牙肉腫；エナメル上皮腫、悪性；エナメル上皮線維肉腫；松果体腫、悪性；脊索腫；神経膠腫、悪性；上衣腫；星細胞腫；原形質性星細胞腫；原線維性星細胞腫；星芽腫；膠芽腫；乏突起神経膠腫；乏突起膠芽細胞腫；原始神経外胚葉性腫瘍；小脳肉腫；神経節芽腫；神経芽腫；網膜芽腫；嗅神経腫瘍；髄膜腫、悪性；神経線維肉腫；神経鞘腫、悪性；顆粒細胞腫、悪性；悪性リンパ腫；ホジキン病；ホジキン；側肉芽腫；悪性リンパ腫、小リンパ球性；悪性リンパ腫、大細胞、びまん性；悪性リンパ腫、濾胞性；菌状息肉症；他の特定される非ホジキンリンパ腫；B細胞リンパ腫；軽度／濾胞性非ホジキンリンパ腫 (NHL)；小リンパ球性 (SL) NHL；中等度／濾胞性NHL；中等度びまん性NHL；重度免疫芽球性リンパ腫NHL；重度リンパ芽球性NHL；重度小型非切れ込み核細胞性NHL；バルキー病変NHL；マントル細胞リンパ腫；AIDS関連リンパ腫；ワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症；悪性組織球症；多発性骨髄腫；肥満細胞肉腫；免疫増殖性小腸疾患；白血病；リンパ性白血病；形質細胞白血病；赤白血病；リンパ肉腫細胞性白血病；骨髄性白血病；好塩基球性白血病；好酸球性白血病；単球性白血病；肥満細胞性白血病；巨核芽球性白血病；骨髄性肉腫；有毛状細胞性白血病；慢性リンパ性白血病 (CLL)；急性リンパ芽球性白血病 (ALL)；急性骨髄性白血病 (AML)；慢性骨髄芽球性白血病 (CML)；および芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍 (BPDCN)。

【0142】

特定の態様は、白血病の処置方法に関する。白血病は、血液、または骨髄のがんであり、血液細胞、通常は白血球 (white blood cell) (白血球 (leukocyte)) の異常な増殖 (乗算的生成) により特徴づけられる。それは、血液腫瘍と呼ばれる広範囲の疾患群の一部である。白血病は、多数の疾患を網羅する広義の用語である。白血病は、臨床的および病理学的に、急性および慢性の形態に分類される。

10

20

30

40

50

【0143】

本開示の特定の態様において、免疫細胞が、それを必要とする個体、例えば、がんを有する個体に送達される。細胞はその後、各々のがん細胞を攻撃するようその個体の免疫系を強化する。いくつかの例において、個体は、1用量または複数用量の免疫細胞を提供される。個体が1用量またはそれ以上の用量の免疫細胞を提供される例において、投与間の期間は、その個体内での増殖のための時間を確保するのに十分であるべきであり、特定の態様において、投与間の期間は、1、2、3、4、5、6、7日間、またはそれ以上である。

【0144】

いくつかの態様において、対象は、免疫細胞療法の前に、非骨髄破壊リンパ球除去化学療法を実施され得る。非骨髄破壊リンパ球除去化学療法は、任意の適切な経路によって実施され得る任意の適切なそのような療法であり得る。非骨髄破壊リンパ球除去化学療法は、例えば、特に、がんが転移性であり得る黒色腫である場合、シクロホスファミドおよびフルダラビンの投与を含み得る。シクロホスファミドおよびフルダラビンの例示的な投与経路は、静脈内である。同様に、任意の適切な用量のシクロホスファミドおよびフルダラビンが投与され得る。特定の局面において、約60 mg/kgのシクロホスファミドが2日間投与され、その後約25 mg/m²フルダラビンが5日間投与される。

10

【0145】

特定の態様において、免疫細胞の成長および活性化を促進する成長因子が、免疫細胞と同時または免疫細胞の後のいずれかで対象に投与される。免疫細胞成長因子は、免疫細胞の成長および活性化を促進する任意の適切な成長因子であり得る。適切な免疫細胞成長因子の例は、インターロイキン(IL)-2、IL-7、IL-15、およびIL-12を含み、これらは単独でまたは様々な組み合わせ、例えばIL-2およびIL-7、IL-2およびIL-15、IL-7およびIL-15、IL-2、IL-7およびIL-15、IL-12およびIL-7、IL-12およびIL-15、またはIL-12およびIL2で使用され得る。

20

【0146】

治療有効量の免疫細胞は、非経口投与、例えば、静脈内、腹腔内、筋内、胸骨内、もしくは動脈内注射、または注入を含む、多くの経路によって投与され得る。

【0147】

免疫細胞集団は、疾患に適合する処置レジメン、例えば、疾患の状況を改善するための1日～数日間にわたる1回もしくは数回の投薬、または疾患の進行を妨げ、疾患の再発を防ぐための長期間にわたる定期的投薬により投与され得る。配合物で使用される正確な用量は、投与経路、および疾患または障害の重篤度にも依存し、それは担当医の判断および各患者の環境にしたがい決定されるべきである。治療有効数の免疫細胞は、処置される対象、疾患の重篤度およびタイプ、ならびに投与様式に依存すると考えられる。いくつかの態様において、ヒト対象の処置に使用され得る用量は、免疫細胞少なくとも 3.8×10^4 、少なくとも 3.8×10^5 、少なくとも 3.8×10^6 、少なくとも 3.8×10^7 、少なくとも 3.8×10^8 、少なくとも 3.8×10^9 、または少なくとも 3.8×10^{10} 個/m²の範囲である。特定の態様において、ヒト対象の処置に使用される用量は、免疫細胞約 3.8×10^9 ～約 3.8×10^{10} 個/m²の範囲である。さらなる態様において、治療有効数の免疫細胞は、kg体重あたり細胞約 5×10^6 個～kg体重あたり細胞約 7.5×10^8 個、例えばkg体重あたり細胞約 2×10^7 個～細胞約 5×10^8 個、またはkg体重あたり細胞約 5×10^7 個～細胞約 2×10^8 個まで様々であり得る。免疫細胞の正確な数は、対象の年齢、体重、性別、および生理学的状態に基づき当業者によって容易に決定される。有効用量は、インビトロまたは動物モデル試験システムから導かれる用量応答曲線から推測され得る。

30

40

【0148】

B. 薬学的組成物

免疫細胞(例えば、T細胞またはNK細胞)および薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物および配合物も、本明細書に提供される。

【0149】

本明細書に記載される薬学的組成物および配合物は、凍結乾燥配合物または水溶液の形

50

態で、所望の純度を有する活性成分（例えば、抗体またはポリペプチド）を1つまたは複数の任意の薬学的に許容される担体（Remington's Pharmaceutical Sciences 22nd edition, 2012）と混合することによって調製され得る。薬学的に許容される担体は、通常、使用される用量および濃度でレシipientに対して非毒性であり、緩衝液、例えばリン酸、クエン酸および他の有機酸；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化物質；保存剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルもしくはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えばメチルもしくはプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチンもしくは免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンもしくはリジン；グルコース、マンノースもしくはデキストリンを含む、単糖、二糖および他の炭水化物；キレート剤、例えばEDTA；糖、例えばスクロース、マンニトール、トレハロースもしくはソルビトール；塩形成対イオン、例えばナトリウム；金属錯体（例えば、Znタンパク質錯体）；ならびに/または非イオン性界面活性剤、例えばポリエチレングリコール（PEG）を含むがこれらに限定されない。本明細書における例示的な薬学的に許容される担体はさらに、間質薬物分散剤（interstitial drug dispersion agent）、例えば可溶性中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質（sHASEGP）、例えばヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質、例えばrHuPH20（HYLENEX（登録商標）、Baxter International, Inc.）を含む。rHuPH20を含む特定の例示的なsHASEGPおよび使用方法は、米国特許出願公開第2005/0260186号および同第2006/0104968号に記載されている。1つの局面において、sHASEGPは、1つまたは複数のさらなるグリコサミノグリカナーゼ、例えばコンドロイチナーゼと組み合わせられる。

【0150】

C. 併用療法

特定の態様において、本態様の組成物および方法は、少なくとも1つの追加治療と組み合わせる免疫細胞集団を用いる。追加治療は、放射線療法、手術（例えば、乳腺腫瘍摘出術および乳房切除術）、化学療法、遺伝子療法、DNA療法、ウイルス療法、RNA療法、免疫療法、骨髄移植、ナノ療法、モノクローナル抗体療法、または上記の組み合わせであり得る。追加治療は、アジュバントまたはネオアジュバント療法の形態であり得る。

【0151】

いくつかの態様において、追加治療は、低分子酵素阻害剤または代謝拮抗剤の投与である。いくつかの態様において、追加治療は、副作用抑制剤（例えば、処置の副作用の出現および/または重篤度を低下させることが意図されている剤、例えば制吐剤等）の投与である。いくつかの態様において、追加治療は、放射線療法である。いくつかの態様において追加治療は、手術である。いくつかの態様において追加治療は、放射線療法と手術の組み合わせである。いくつかの態様において、追加治療は、線照射である。いくつかの態様において、追加治療は、PBK/AKT/mTOR経路を標的にする治療、HSP90阻害剤、チューブリン阻害剤、アポトーシス阻害剤、および/または化学予防剤である。追加治療は、当技術分野で公知の化学療法剤のうちの1つまたは複数であり得る。

【0152】

免疫細胞療法は、追加のがん療法、例えば免疫チェックポイント療法の前、間、後、または様々な組み合わせで実施され得る。実施は、同時から数分～数日～数週間の範囲の間隔で行われ得る。免疫細胞療法が追加の治療剤とは別に患者に提供されるいくつかの態様において、一般に、その2つの化合物が依然として患者に対して有益な併用効果を発揮することができるよう、各送達時間の間で相当な期間が経過しないようにすることが確実にされると考えられる。そのような例において、相互から約12～24または72時間以内、より具体的に、相互から約6～12時間以内に抗体療法および抗がん療法が患者に提供されることが想定される。いくつかの状況において、各実施の間に数日間（2、3、4、5、6、

10

20

30

40

50

または7日間) ~ 数週間 (1、2、3、4、5、6、7、または8週間) が経過するよう、処置期間を大きく拡大することが望まれ得る。

【0153】

様々な組み合わせが用いられ得る。以下の例では、免疫細胞療法が「A」であり、抗がん療法が「B」である。

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

10

【0154】

患者に対する本態様の任意の化合物の投与または任意の治療の実施は、存在する場合はこの作用物質の毒性を考慮しつつ、そのような化合物の投与に関する一般的プロトコールにしたがう。したがって、いくつかの態様において、併用療法に起因する毒性をモニタリングする工程が存在する。

【0155】

1. 化学療法

幅広い様々な化学療法剤が、本態様にしがいが使用され得る。「化学療法」という用語は、がんを処置するための薬物の使用を表す。「化学療法剤」は、がんの処置において投与される化合物または組成物を含意するよう使用される。これらの剤または薬物は、細胞内でのそれらの作用様式、例えば、それらが細胞周期に影響するかどうかおよびどの段階で影響するかにより分類される。あるいは、剤は、DNAに直接架橋する、DNA内に挿入される、または核酸合成に影響を及ぼすことにより染色体および有糸分裂異常を誘導するその能力に基づき特徴づけられ得る。

20

【0156】

化学療法剤の例は、アルキル化剤、例えばチオテパおよびシクロホスファミド；スルホン酸アルキル、例えばブスルファン、インプロスルファンおよびピボスルファン；アジリジン、例えばベンゾドパ、カルボコン、メツレドパおよびウレドパ；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド (triet hiylenethiophosphoramid) およびトリメチロロメラミン (trimethylolomelamine) を含む、エチレンイミンおよびメチラメラミン (methylamelamine)；アセトゲニン (特に、プラタシンおよびプラタシノン)；カンプトテシン (合成アナログであるトポテカンを含む)；プリオスタチン；カリスタチン；CC-1065 (そのアドゼレシン、カルゼレシンおよびビゼレシン合成アナログを含む)；クリプトフィシン (特に、クリプトフィシン1およびクリプトフィシン8)；ドラスタチン；デュオカルマイシン (合成アナログであるKW-2189およびCB1-TM1を含む)；エリユーセロピン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンジスタチン；ナイトロジェンマスタード、例えばクロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベムピシン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミドおよびウラルシルマスタード；ニトロソ尿素、例えばカルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムスチン；抗生物質、例えばエンジン抗生物質 (例えば、カリケアマイシン、特にカリケアマイシン IIおよびカリケアマイシンオメガI1)；ダイネマイシンAを含む、ダイネマイシン；ビスホスホネート、例えばクロドロネート；エスペラマイシン；ならびにネオカルジノスタチンクロモフォアおよび関連色素タンパク質エンジン抗生物質クロモフォア、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラナイシン (authranycin)、アザセエリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カラピシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルピシン (モルホリノ-ドキシソルピシン、シアノモルホリノ-ドキシソルピシン、2-ピロリノ-ドキシソルピシンおよびデオキシドキシソルピ

30

40

50

シンを含む)、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、例えばマイトマイシンC、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン (potfiromycin)、ピューロマイシン、ケラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチンおよびゾルピシン;代謝拮抗剤、例えばメトトレキサートおよび5-フルオロウラシル (5-FU);葉酸アナログ、例えばデノプテリン、プテロプテリンおよびトリメトトレキサート;プリンアナログ、例えばフルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリンおよびチオグアニン;ピリミジンアナログ、例えばアンシタピン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピンおよびフロクスウリジン;アンドロゲン、例えばカルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタンおよびテストラクトン;抗アドレナリン、例えばミトタンおよびトリロスタン;葉酸補給剤、例えばフォリン酸 (folic acid);アセグラトン;アルドホスファミドグリコシド;アミノレプリン酸;エニルウラシル;アムサクリン;ベストラブシル;ピサントレン;エダトレキサート;デフォファミン (defofamine);デメコルシン;ジアジコン;エルフォルミシン (elformithine);酢酸エリプチニウム;エポチロン;エトグルシド;硝酸ガリウム;ヒドロキシ尿素;レンチナン;ロニダイニン;メイタンシノイド、例えばメイタンシンおよびアンサマイトシン;ミトグアゾン;ミトキサントロン;モピダンモール (mopidanmol);ニトラエリン (nitraerine);ペントスタチン;フェナメット;ピラルピシン;ロソキサントロン;ポドフィリン酸;2-エチルヒドラジド;プロカルバジン;PSK多糖複合体;ラゾキサン;リゾキシン;シゾフィラン;スピロゲルマニウム;テヌアゾン酸;トリアジコン;2,2',2''-トリクロロトリエチルアミン;トリコテセン (特にT-2毒素、ベラキュリンA (verrucarin A)、ロリジンAおよびアンゲイジン);ウレタン;ビンデシン;ダカルバジン;マンノムスチン;ミトプロニトール;ミトラクトール;ピポプロマン;ガシトシン (gacytosine);アラビノシド (「Ara-C」);シクロホスファミド;タキソイド、例えばパクリタキセルおよびドセタキセルゲムシタピン;6-チオグアニン;メルカプトプリン;白金配位錯体、例えばシスプラチン、オキサリプラチンおよびカルボプラチン;ピンブラスチン;白金;エトポシド (VP-16);イホスファミド;ミトキサントロン;ピンクリスチン;ピノレルピン;ノバントロン;テニポシド;エダトレキサート;ダウノマイシン;アミノプテリン;ゼローダ;イバンドロネート;イリノテカン (例えば、CPT-11);トポイソメラーゼ阻害剤RFS 2000;ジフルオロメチルオルニチン (DMFO);レチノイド、例えばレチノイン酸;カペシタピン;カルボプラチン、プロカルバジン、プリコマイシン (plicomycin)、ゲムシタピン、ナベルピン、ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼ阻害剤、トランス白金、ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体を含む。

【0157】

2. 放射線療法

DNA損傷を引き起こす、広く使用されている他の因子は、 γ 線、X線として一般に公知となっているものおよび/または放射性同位体の腫瘍細胞へと方向づけられた送達を含む。他の形態のDNA損傷因子、例えばマイクロ波、陽子線照射 (米国特許第5,760,395号および同第4,870,287号)ならびにUV照射も想定されている。これらの因子はすべて、DNAに対する、DNAの前駆体に対する、DNAの複製および修復に対する、ならびに染色体の構築および維持に対する広範囲の損傷を及ぼすと考えられる。X線の線量範囲は、長期間 (3~4週間)の間の一日50~200レントゲンの線量から2000~6000レントゲンの単回線量に及ぶ。放射性同位体の線量範囲は様々であり、その同位体の半減期、照射される放射線の強度およびタイプ、ならびに新生物細胞による取り込みに依存する。

【0158】

3. 免疫療法

当業者は、さらなる免疫療法が、本態様の方法と併用してまたは関連して使用され得ることを理解するであろう。がんの処置において、免疫療法は、一般に、がん細胞を標的に

10

20

30

40

50

して破壊する免疫エフェクター細胞および分子の使用に基づくものである。リツキシマブ（RITUXAN（登録商標））は、そのような例である。免疫エフェクターは、例えば、腫瘍細胞の表面上のいくつかのマーカースに特異的な抗体であり得る。抗体は単独で治療のエフェクターとして機能し得るか、または、それは細胞殺滅を実際に行う他の細胞を動員し得る。抗体はまた、薬物または毒素（化学療法剤、放射性核種、リシンA鎖、コレラ毒素、百日咳毒素等）とコンジュゲートされ、ターゲティング剤として機能し得る。あるいは、エフェクターは、腫瘍細胞標的と、直接的または間接的のいずれかで、相互作用する表面分子を有するリンパ球であり得る。様々なエフェクター細胞は、細胞障害性T細胞およびNK細胞を含む。

【0159】

抗体-薬物コンジュゲートは、がん治療の開発におけるブレイクスルーアプローチとして登場した。がんは、世界で上位の死因の一つである。抗体-薬物コンジュゲート（ADC）は、細胞殺滅薬物に共有結合により連結されたモノクローナル抗体（MAb）を含む。このアプローチは、それらの抗原標的に対するMAbの高い特異性と、非常に強力な細胞障害性薬物を組み合わせ、それによって高レベルの抗原を有する腫瘍細胞にペイロード（薬物）を送達する「武装」したMAbを生成する。薬物の標的送達はまた、正常組織におけるその曝露を最小化し、それによって毒性を減少させ、治療指数を改善する。FDAによる2011年のADCETRIS（登録商標）（プレントキシマブベドチン）および2013年のKADCYLA（登録商標）（トラスツマブエムタンシンまたはT-DM1）の2つのADC薬の承認により、このアプローチが確認された。現在、30を超えるADC薬候補が、がん処置に関する臨床試験の様々な段階にある（Leal et al., 2014）。抗体エンジニアリングおよびリンカー・ペイロード最適化はますます成熟しつつあり、新たなADCの発見および開発はますます、このアプローチに適した新たな標的の同定および検証とターゲティングMAbの生成に依存するようになってきている。ADC標的の2つの基準は、腫瘍細胞における上方調節された/高レベルの発現ならびに確実な内部移行である。

【0160】

免疫療法の1つの局面において、腫瘍細胞は、ターゲティングが可能な、すなわち、他の細胞の大部分に存在しない、いくつかのマーカースを有していなければならない。多くの腫瘍マーカースが存在し、これらのいずれも、本態様におけるターゲティングに適し得る。一般的な腫瘍マーカースは、CD20、がん胎児性抗原、チロシナーゼ（p97）、gp68、TAG-72、HMFG、シアリルルイス抗原、MucA、MucB、PLAP、ラミニン受容体、erbB、およびp155を含む。免疫療法の別の局面は、抗がん作用と免疫刺激作用を組み合わせることである。サイトカイン、例えばIL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、 γ -IFN、ケモカイン、例えばMIP-1、MCP-1、IL-8、および成長因子、例えばFLT3リガンドを含む、免疫刺激分子も存在する。

【0161】

現在試験中または使用中の免疫療法の例は、免疫アジュバント、例えばウシ型結核菌（*Mycobacterium bovis*）、熱帯熱マラリア原虫（*Plasmodium falciparum*）、ジニトロクロロベンゼンおよび芳香族化合物（米国特許第5,801,005号および同第5,739,169号；Hui and Hashimoto, 1998；Christodoulides et al., 1998）、サイトカイン療法、例えばインターフェロン α 、 β 、および γ 、IL-1、GM-CSF、およびTNF（Bukowski et al., 1998；Davidson et al., 1998；Hellstrand et al., 1998）；遺伝子療法、例えばTNF、IL-1、IL-2、およびp53（Qin et al., 1998；Austin-Ward and Villaseca, 1998；米国特許第5,830,880号および同第5,846,945号）；ならびにモノクローナル抗体、例えば抗CD20、抗ガングリオシドGM2および抗p185（Hollander, 2012；Hanibuchi et al., 1998；米国特許第5,824,311号）である。1つまたは複数の抗がん療法が本明細書に記載される抗体療法と共に用いられ得ることが想定されている。

【0162】

いくつかの態様において、免疫療法は、免疫チェックポイント阻害剤であり得る。免疫チェックポイントは、シグナルを増幅する（例えば、共刺激分子）か、またはシグナルを

10

20

30

40

50

減少させる。免疫チェックポイント遮断により標的にされ得る阻害性免疫チェックポイントは、アデノシンA2A受容体(A2AR)、B7-H3(CD276としても公知)、BおよびTリンパ球減衰因子(BTLA)、細胞障害性Tリンパ球関連タンパク質4(CTLA-4、CD152としても公知)、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ(IDO)、キラー細胞免疫グロブリン(KIR)、リンパ球活性化遺伝子3(LAG3)、プログラム死1(PD-1)、T細胞免疫グロブリンドメインおよびムチンドメイン3(TIM-3)ならびにT細胞活性化のVドメインg抑制因子(VISTA)を含む。特に、免疫チェックポイント阻害剤は、PD1軸および/またはCTLA-4を標的にする。

【0163】

免疫チェックポイント阻害剤は、薬物、例えば低分子、組み換え形態のリガンドもしくは受容体、または、特に、抗体、例えばヒト抗体である(例えば、国際特許公報WO2015016718; Pardoll, Nat Rev Cancer, 12(4): 252-64, 2012; 両方とも参照により本明細書に組み入れられる)。免疫チェックポイントタンパク質の既知の阻害剤またはそのアナログが使用され得る、特に、キメラ化された、ヒト化された、またはヒト形態の抗体が使用され得る。当業者が理解しているように、代替または同等の名称が、本開示で言及されている特定の抗体に関して使用され得る。そのような代替および/または同等の名称は、本開示において言い換え可能である。例えば、ラムプロリズマブは、MK-3475およびペムプロリズマブという代替または同等の名称の下でも知られていることが公知である。

10

【0164】

いくつかの態様において、PD-1結合アンタゴニストは、そのリガンド結合パートナーに対するPD-1の結合を阻害する分子である。特定の局面において、PD-1リガンド結合パートナーは、PDL1および/またはPDL2である。別の態様において、PDL1結合アンタゴニストは、その結合パートナーに対するPDL1の結合を阻害する分子である。特定の態様において、PDL1結合パートナーは、PD-1および/またはB7-1である。別の態様において、PDL2結合アンタゴニストは、その結合パートナーに対するPDL2の結合を阻害する分子である。特定の局面において、PDL2結合パートナーは、PD-1である。アンタゴニストは、抗体、その抗原結合フラグメント、イムノアドヘシン、融合タンパク質またはオリゴペプチドであり得る。例示的な抗体は、米国特許第8,735,553号、同第8,354,509号、および同第8,008,449号に記載されており、すべて参照により本明細書に組み入れられる。本明細書に提供される方法において使用される他のPD-1軸アンタゴニストは、米国特許出願公開第20140294898号、同第2014022021号、および同第20110008369号に記載されているように当技術分野で公知であり、すべて参照により本明細書に組み入れられる。

20

30

【0165】

いくつかの態様において、PD-1結合アンタゴニストは、抗PD-1抗体(例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体)である。いくつかの態様において、抗PD-1抗体は、ニボルマブ、ペムプロリズマブ、およびCT-011からなる群より選択される。いくつかの態様において、PD-1結合アンタゴニストは、イムノアドヘシン(例えば、定常領域(例えば、免疫グロブリン配列のFc領域)に融合されたPDL1またはPDL2の細胞外またはPD-1結合部分を含むイムノアドヘシン)である。いくつかの態様において、PD-1結合アンタゴニストは、AMP-224である。MDX-1106-04、MDX-1106、ONO-4538、BMS-936558、およびOPDIVO(登録商標)としても公知のニボルマブは、WO2006/121168に記載されている抗PD-1抗体である。MK-3475、Merck 3475、ラムプロリズマブ、KEYTRUDA(登録商標)、およびSCH-900475としても公知のペムプロリズマブは、WO2009/114335に記載されている抗PD-1抗体である。hBATまたはhBAT-1としても公知のCT-011は、WO2009/101611に記載されている抗PD-1抗体である。B7-DCIgとしても公知のAMP-224は、WO2010/027827およびWO2011/066342に記載されるPDL2-Fc融合可溶性受容体である。

40

【0166】

本明細書に提供される方法において標的にされ得る別の免疫チェックポイントは、CD152としても公知の細胞障害性Tリンパ球関連タンパク質4(CTLA-4)である。ヒトCTLA-

50

4の完全なcDNA配列は、Genbankアクセッション番号L15006を有する。CTLA-4は、T細胞の表面において見いだされ、抗原提示細胞の表面上のCD80またはCD86に結合した場合、「オフ」スイッチとして作用する。CTLA4は、ヘルパーT細胞の表面において発現している免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり、T細胞に阻害シグナルを伝達する。CTLA4は、T細胞共刺激タンパク質であるCD28に類似し、両分子は、抗原提示細胞上の、それぞれB7-1およびB7-2とも呼ばれる、CD80およびCD86に結合する。CTLA4はT細胞に阻害シグナルを伝達し、CD28は刺激シグナルを伝達する。細胞内CTLA4は、制御性T細胞においても見いだされ、それらの機能にとって重要であり得る。T細胞受容体およびCD28を通じたT細胞活性化は、B7分子の阻害受容体であるCTLA-4の発現増大をもたらす。

10

【0167】

いくつかの態様において、免疫チェックポイント阻害剤は、抗CTLA-4抗体（例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体、もしくはキメラ抗体）、その抗原結合フラグメント、イムノアドヘシン、融合タンパク質またはオリゴペプチドである。

【0168】

本方法における使用に適した抗ヒトCTLA-4抗体（またはそれ由来のVHおよび/もしくはVLドメイン）は、当技術分野で周知の方法を用いて生成され得る。あるいは、当技術分野で知られている抗CTLA-4抗体が使用され得る。例えば、米国特許第8,119,129号、WO 01/14424、WO 98/42752；WO 00/37504（トレメリムマブ；以前はチシリムマブとしても公知のCP675,206）、米国特許第6,207,156号；Hurwitz et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(17): 10067-10071；Camacho et al. (2004) J Clin Oncology 22(145): Abstract No. 2505 (antibody CP-675206)；およびMokyr et al. (1998) Cancer Res 58:5301-5304に記載される抗CTLA-4抗体が、本明細書に開示される方法において使用され得る。上記刊行物の各々の教示は、参照により本明細書に組み入れられる。CTLA-4に対する結合に関してこれらの当技術分野で知られている抗体のいずれかと競合する抗体も使用され得る。例えば、ヒト化CTLA-4抗体は、すべて参照により本明細書に組み入れられる、国際特許出願番号WO2001014424、同WO2000037504、および米国特許第8,017,114号に記載されている。

20

【0169】

例示的なCTLA-4抗体は、イピリムマブ（10D1、MDX-010、MDX-101、およびYervoy（登録商標）としても公知）またはその抗原結合フラグメントおよび変種である（例えば、WO 01/14424を参照のこと）。他の態様において、抗体は、イピリムマブの重鎖および軽鎖CDRまたはVRを含む。したがって、1つの態様において、抗体は、イピリムマブのVH領域のCDR1、CDR2、およびCDR3ドメインならびにイピリムマブのVL領域のCDR1、CDR2、およびCDR3ドメインを含む。別の態様において、抗体は、上記抗体とCTLA-4上の同じエピトープに対する結合に関して競合するおよび/または同じエピトープに結合する。別の態様において、抗体は、上記抗体に対する少なくとも約90%の可変領域アミノ酸配列同一性（例えば、イピリムマブに対する少なくとも約90%、少なくとも約95%、または少なくとも約99%の可変領域同一性）を有する。

30

【0170】

CTLA-4を調整するための他の分子は、すべて参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5844905号、同第5885796号、および国際特許出願番号WO1995001994および同WO1998042752に記載されるようなCTLA-4リガンドおよび受容体ならびに参照により本明細書に組み入れられる米国特許第8329867号に記載されるようなイムノアドヘシンを含む。

40

【0171】

4. 手術

がんを有する人のおよそ60%は、予防、診断、または病期判定、治癒および緩和手術を含む、何らかのタイプの手術を受けると考えられる。治癒手術は、がん組織のすべてまたは一部を物理的に除去、摘出、および/または破壊する切除を含み、他の治療、例えば本

50

態様の処置、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、遺伝子療法、免疫療法、および/または代替療法と組み合わせて使用され得る。腫瘍切除は、腫瘍の少なくとも一部の物理的除去を表す。腫瘍切除に加えて、手術による処置は、レーザー手術、凍結手術、電気外科手術、および顕微鏡監視手術（モース手術）を含む。

【0172】

がん細胞、組織、または腫瘍の一部またはすべてを切除すると、体内に空洞が形成され得る。処置は、さらなる抗がん療法によるその領域の灌流、直接注射または局所的適用により達成され得る。そのような処置は、例えば、1、2、3、4、5、6、もしくは7日ごと、または1、2、3、4、および5週間ごともしくは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、もしくは12ヶ月ごとに反復され得る。これらの処置もまた、様々な用量のものであり得る。

10

【0173】

5. 他の作用物質

処置の治療効果を改善するために、本態様の特定の局面と組み合わせて他の作用物質が使用されることが想定されている。これらのさらなる作用物質は、細胞表面受容体およびGAP結合の上方調節に影響を与える作用物質、細胞増殖抑制および分化剤、細胞接着の阻害剤、アポトーシス誘導因子に対する過剰増殖性細胞の感度を増大させる作用物質、または他の生物学的物質を含む。GAP結合の数を増加させることによる細胞内シグナルの増大は、隣接する過剰増殖性細胞集団に対する抗過剰増殖効果を増大させ得る。他の態様において、細胞増殖抑制または分化剤が、処置の抗過剰増殖効果を改善するために本態様の特定の局面と組み合わせて使用され得る。細胞接着の阻害剤は、本態様の効果を改善すると考えられる。細胞接着阻害剤の例は、接着斑キナーゼ（FAK）阻害剤およびロバスタチンである。アポトーシスに対する過剰増殖性細胞の感度を増大させる他の作用物質、例えば抗体c225が、処置の効果を改善するために本態様の特定の局面と組み合わせて使用され得ることがさらに想定される。

20

【0174】

VI. 製造物またはキット

免疫細胞を含む製造物またはキットもまた、本明細書に提供される。製造物またはキットはさらに、個体においてがんを処置するかもしくはがんの進行を遅延させるために、またはがんを有する個体の免疫機能を強化するために免疫細胞を使用するための指示を含むパッケージ同封物を含み得る。本明細書に記載される任意の抗原特異的免疫細胞が、製造物またはキットに含まれ得る。適切な容器は、例えば、ボトル、バイアル、バッグ、およびシリンジを含む。容器は、様々な素材、例えばガラス、プラスチック（例えば、塩化ポリビニルもしくはポリオレフィン）、または合金（例えば、ステンレス鋼もしくは Hastelloy）から形成され得る。いくつかの態様において、容器は配合物を保持し、容器上または容器に付随するラベルは使用のための指示を示し得る。製造物またはキットはさらに、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、および使用のための指示を含むパッケージ同封物を含む、商業的なおよびユーザーの観点から望ましい他の物質を含み得る。いくつかの態様において、製造物はさらに、1つまたは複数の別の剤（例えば、化学療法剤および抗新生物剤）を含む。1つまたは複数の剤のための適切な容器は、例えば、ボトル、バイアル、バッグ、およびシリンジを含む。

30

40

【実施例】

【0175】

VII. 実施例

以下の実施例の節は、様々な態様の実施例に関するさらなる詳細を提供する。以下の実施例において開示されている技術は、十分に機能することが本発明者らによって見いだされた技術および/組成物であることが当業者によって理解されるはずである。しかし、当業者は、本開示に照らして、本開示の精神および範囲から逸脱することなく開示される具体的態様において多くの変更を加えることができ、かつそれでもなお類似または同様の結果を得ることができることを理解するはずである。これらの実施例は、本明細書に記載さ

50

れる方法およびシステムの例であり、本開示の範囲を限定することは意図されていない。それらの非限定的な例は、以下に示されるものを含むがこれらに限定されない。

【0176】

実施例1 - 方法

細胞および細胞株。K562、THP-1、MV4-11、MOLM13、OPM2、KMS26、RS4-11、KOPN8、およびRCH-ACV細胞株は、10%熱不活性化FBS (Sigma Aldrich) + 1%ペニシリンおよびストレプトマイシンを補充したRPMI 1640中で維持した。健康ドナー由来の初代ヒトT細胞 (CD3⁺、凍結) は、All Cellsから購入した。T細胞は、300 u/mlの組み換えヒトIL2を補充したImmunocult-XF T細胞増大培地 (Stemcell) 中で維持した。NKL細胞株は、10%熱不活性化FBS (Sigma Aldrich) + 1%ペニシリンおよびストレ

10

【0177】

レンチウイルスの生成。示されているレンチウイルスコンストラクトを、psPAX2およびpMD2.G (Addgene) と4:3:1の比で混合し、Polyjetトランスフェクション試薬 (Signagen) を用いて293T細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションから48~72時間後にウイルス含有上清を収集し、20%スクロースクッション上で、25k RPMで90分間の遠心分離により濃縮した。濃縮されたウイルスを、2~4時間攪拌しつつ500 μlのT細胞培地 (100~300 U/mlヒトIL-2を含むImmunocult) 中に再懸濁した。

【0178】

CAR-T細胞の形質導入。第0日に、 1×10^6 個のT細胞を、1.5 ml T細胞培地中で解凍し、25 ml フラスコ中で直立させ、抗CD3/CD28磁気ビーズまたは四量体抗体を製造元の指示にしたがい用いて刺激した。第1日に、500 μlの濃縮レンチウイルスを、直立させたフラスコ中のT細胞に添加した。第2~3日に、培地の色がオレンジ色に変化するまで細胞培養物を観察した。培地を総量4 mlとなるよう添加し、その後にフラスコを横にした。第4日に、ウイルス含有培地およびビーズを除去し、細胞を新しいT細胞培地中に細胞約 1×10^6 個/mlとなるよう再懸濁した。pSIN-Puro CAR-Tコンストラクトの場合、第5~8日に、ピューロマイシンを0.5 μg/mlとなるよう48時間添加した。死細胞を、Ficoll上での分離によって除去した (1gでの遠心分離、ブレーキなし)。その後に1 μg/mlピューロマイシン選択を24時間行い、その後に死細胞を除去した。CART-LILRB4の比率%を、フローサイトメトリーベースのLILRB4結合アッセイによって決定した。第9~21日に、T細胞を、3日間、抗CD3/CD28ビーズを用いて活性化させ、その後に新しい培地に置き換え培養物を増大させた。pLVX-GFP CAR-Tコンストラクトの場合、第5~7日に、約 5×10^6 個のGFP⁺細胞をさらなる増大のために選別した。少数のGFP⁺細胞が選別される場合、直立させたフラスコ中での増大が行われると考えられる。次に、T細胞を、3日間、抗CD3/CD28磁気ビーズを用いて活性化させ、その後に新しい培地に置き換え第21日まで培養物を増大させた。代替の形質導入方法：第0日に、 2×10^6 個のT細胞を解凍し、24~48時間、抗CD3/CD28ビーズを用いて活性化させた。レトロネクチン (Takara) コートプレートを製造元の指示にしたがい準備した。製造元の指示にしたがうプレートの遠心分離により、濃縮レンチウイルスをレトロネクチンに結合させた (レトロネクチン結合ウイルス [RBV])。この後、活性化されたT細胞をRBVプレートに添加し、100 U/ml組み換えヒトIL2を含むT細胞培地中で、細胞密度を細胞約 1×10^6 個/mlで維持しつつ合計7~10日間培養した。培養第5日に、磁気ビーズを除去し、培地を交換した。CART-LILRB4の比率%を、フローサイトメトリーベースのLILRB4結合アッセイによって決定した。ついで細胞を、後の使用のために、生きた状態で凍結させた。

20

30

40

【0179】

NK細胞の形質導入。NKLを、8 μg/mlポリブレンを含むpLVX-GFP CAR-Tコンストラクトのウイルス上清中に再懸濁させ (細胞 1×10^6 個/ml)、1800 rpmで120分間遠心分離し、さらに4時間インキュベートした。ついで、ウイルス上清を、10%熱不活性化FBS (Sigma Aldrich) + 1%ペニシリンおよびストレプトマイシンならびに150単位/mlヒ

50

トIL-2 (Peprortech) を補充したRPMI-1640培地で置き換えた。GFP⁺細胞を、CAR NK細胞として選別した。初代CAR-NK細胞の場合、CARコンストラクトをレトロウイルス骨格XZ201にクローン化し、phenix-ampho 297T細胞にトランスフェクトした。トランスフェクトから48時間および72時間後にレトロウイルス上清を収集し、レトロネクチンコートプレートに結合させた。初代NK細胞を、autoMACSを用いてCD3⁺細胞およびCD14⁺細胞を除去することにより臍帯血 (UCB) から単離した。ついで、NK細胞を、10% 熱不活性化FBS (Sigma Aldrich) + 1% ペニシリンおよびストレプトマイシンならびに150 U/mlヒトIL-2 (Peprortech) を補充したRPMI-1640培地中、K562-4-1BBLフィーダー細胞 (レンチウイルスによりTNFSF9遺伝子のcDNAでトランスフェクトされたK562細胞) と共培養した。5日後、増大したNK細胞をレトロネクチン結合ウイルス [RBV] プレートに添加し、さらに5~9日間培養した。NK細胞の培養中、IL2を含む培養培地を2日ごとに交換した。

10

【0180】

T細胞フローベースの死滅アッセイ。T細胞 (CAR-Tまたは対照) を、96ウェルU字底プレートにおいて、RPMI中で4~6時間、示されたE:T比でDDAO-SE標識標的AML細胞と共培養した。この後、各サンプルをPIと混合し (1:1000総量)、フローサイトメトリーカウントビーズを添加した (約10K/サンプル)。細胞障害性を、生きたMV4-11細胞:DDAOSE (+)、PI (-); $MV411 = MV4-11 \text{細胞計測数} / \text{ビーズ数} (T \text{細胞なしの共培養})$; $X = \text{生きた標的細胞の細胞計測数} / \text{ビーズ数} (T \text{細胞ありの共培養})$; 細胞障害性% = $(MV411-X) / MV411 * 100$ として計算した。

20

【0181】

NK細胞フローベースの死滅アッセイ。U字底96ウェルプレートにおいて、4~6時間、非形質転換NKL細胞またはCAR NK細胞をカルボキシフルオセイン二酢酸スクシニミジルエステル (CFSE) 標識白血病細胞と共培養することによってフローベースの死滅アッセイを行った。この後、各サンプルをPIと混合し、FACS Calibur1 (BD bioscience) により分析した。細胞溶解を、総白血病細胞中のPI陽性白血病細胞の比率%として計算した。(エフェクター細胞の存在下での) 総死滅から自然細胞死 (エフェクター細胞なし) を差し引いた。

【0182】

サイトカイン産生。5 × 10⁴個の非形質転換NKL細胞またはCAR NK細胞を、U字底96ウェルプレートにおいて、10時間、5 × 10⁴個の標的細胞と共培養した。IFN- の放出を、販売元により提供されたマニュアルにしたがい、ELISAキット (biolegend) により培養上清において検出した。

30

【0183】

ヒトAML異種移植片。CAR-T実験のために、6~8週齢のNSGマウスを、非致死的に照射した (200 cGy)。1日後、各マウスに、200 μl PBS中に再懸濁された5 × 10⁵個のヒト白血病細胞を、尾静脈注射を通じて投与した。4日後、200 μl PBS中に再懸濁された2 × 10⁶個のCAR-T細胞を、尾静脈注射を通じて各マウスに注射した。体重、末梢血およびBLIを毎週観察および分析した。生存曲線実験のために、瀕死の動物を安楽死させた場合にマウスの死を記録した。

40

【0184】

CAR-NK実験のために、6~8週齢のNSGマウスを、200 cGy X線で非致死的に照射した。1日後 (第0日と定義した)、各マウスに、200 μl PBS中に再懸濁された3 × 10⁵個のMV4-11-luciを、尾静脈注射を通じて投与した。白血病の定着の阻止におけるCAR-NK細胞の機能を研究するため、第0日に、5 × 10⁶個の非形質転換NKLまたはCAR-NKL細胞を、尾静脈を通じて各マウスに移植し、その後、3日ごとに、5 × 10⁶個の非形質転換NKLまたはCAR-NKL細胞の4回のさらなる注射を行った。白血病負荷の減少におけるCAR-NK細胞の機能を研究するため、第7日に、5 × 10⁶個の非形質転換NKLまたはCAR-NKL細胞を、尾静脈注射を通じて各マウスに移植し、その後、3日ごとに、5 × 10⁶個の非形質転換NKLまたはCAR-NKL細胞の3回のさらなる注射を行った。NKL細胞を注射する際に毎回、I.P.

50

注射を通じて一緒にヒトIL2 (10000 IU) を各マウスに投与した。体重、末梢血、およびBLIを毎週観察した。

【0185】

CFUアッセイ。ヒト臍帯血 (1×10^3) CD34+細胞を、 1×10^4 個の示されているタイプのT細胞またはNKL細胞と4時間共培養し、ついで、MethoCult Optimum (STEMCELL Technologies) 中に10日間再懸濁し、その後CFUの計数を行った。ついで、コロニーを一晩RPMIに溶解させ、細胞の一部をフローサイトメトリー分析に使用した。

【0186】

実施例2 - 結果

最近、本発明者らは、いくつかのLILRBおよび関連するITIM含有受容体であるLAIR1が、様々な造血細胞および固形がん細胞において腫瘍促進機能を有することを示した (Zhen g et al., 2012; Kang et al., 2015; Kang et al., 2016; Chen et al., 2015)。彼らは、テキサス大学サウスウェスタンメディカルセンター (UTSW) からの105個のAML患者サンプルにおいてLILRBの表面発現を体系的に分析した。LILRB4は、単球性AML細胞 (FAB M4、M5) においてのみ検出され、他のAMLサブタイプでは検出されなかった (図1A~B)。注目すべきは、ヒト単球性AML細胞におけるLILRB4は、成熟単球性AML細胞マーカーであるCD14のそれよりも高感度かつ高特異性であることである (図1A)。重要なことに、LILRB4レベルは、正常な単球におけるそれと比較して単球性AML細胞において高かった (図1E~F)。同様に、本発明者らは、LILRB4の発現パターンが、AML幹細胞活性が豊富であり得るCD34+ AML前駆体において発現され得ることを観察した (図1G、右パネル)。重要なことに、正常なヒトサンプルにおいて、LILRB4は、正常な単球細胞および免疫抑制性寛容原性樹状細胞でのみ発現され、造血幹細胞 (HSC) を含む他の細胞における発現は示さなかった (mRNAレベルに関する図1C、表面タンパク質レベルに関する図1D、図1G、左パネル)。がん患者において、LILRB4はまた、腫瘍保護性免疫細胞、例えば、寛容原性樹状細胞、骨髄由来サプレッサー細胞および腫瘍随伴マクロファージにおいても発現される (Kang et al., 2016)。これらの結果は、LILRB4が、単球性AMLのマーカーとして、このタイプのAMLを処置する上での理想的な標的であり得ることを示している。

【0187】

本発明者らは、いくつかのヒト化抗LILRB4抗体を開発し、これらは、様々なAMLの異種移植マウスモデルにおいて疾患量を減少させ、生存期間を延ばすことが実証された。これに基づき、本発明者らは、新しいLILRB4 CAR-T細胞のいくつかのバリエーションを作製した (図2)。抗LILRB4抗体 #128-3 (ヒト化ab) および #8 (ヒト化ab) から抗原認識ドメイン・単鎖可変フラグメント (scFv) を得た。これは、クローン化されたCD8 ヒンジおよび膜貫通ドメイン、続いて、どちらもCD3- 活性化ドメインで終わるCD28または4-1BB共刺激ドメインのいずれかであった。いくつかのCARコンストラクトを、ヒト細胞における発現に関してコドン最適化した (Genescript)。初代ヒトT細胞は、LILRB4 CARをコードするレンチウイルスにより効果的に形質導入することができた (図3A~B)。これらのLILRB4 CAR-T細胞はまた、標的タンパク質LILRB4に対して特異的結合を示した (図3A~B)。重要なことに、これらの結果は、これらの細胞が、共培養実験においてLILRB4+標的AML細胞を効果的に溶解したこと (図4A~C) およびAML異種移植実験において白血球量を減少させたこと (図5A~D) を示している。これに対して、対照T細胞は、特異的な細胞障害活性を有さなかった (図4A~C、図5A~D)。重要なことに、LILRB4 CAR-T細胞は、CFUアッセイにおいて正常なヒト臍帯血CD34+ HSCに対して毒性を示さなかった (図6)。

【0188】

ナチュラルキラー (NK) 細胞は、自然免疫の重要な部分をなしている。T細胞と異なり、NK細胞は、事前の感作なしで抗腫瘍細胞障害を開始することができ、潜在的に、サイトカイン放出症候群に起因する合併症およびon-target/off-tumor効果をわずかに有するのみであり得る (Hermanson and Kaufman, 2015)。T細胞およびNK細胞において共有

10

20

30

40

50

されているシグナル活性化機構のため、CD3- 活性化ドメインを含むCARコンストラクトは、NK細胞も活性化することができる (Schonfeld et al., 2015)。本発明者らは、LILRB4 CAR-NKL細胞を生成するためのヒトNKL細胞株へのLILRB4 CARの導入が、インビトロ (図7A~D、図8A~B) およびインビボ (図9A~10D、図10A~D) の両方で単球性AMLを特異的に標的にすることができることを示した。本発明者らはまた、LILRB4 CAR-UCBNK細胞を生成するためのヒトUCB NK細胞へのLILRB4 CARの導入が、単球性AMLを特異的に標的にすることができることを示した (図7E)。これらのLILRB4 CAR-NK細胞は、安全かつ制御可能な特性を有する代替の汎用性のある「既製」CAR製品を提供し得る。

【0189】

LILRB4 CAR-T細胞およびCAR-NKL細胞は、単球性AMLを効果的に標的にし得、正常な細胞に対する毒性を最小限に抑えつつ、LILRB4⁺ CLL、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫、および芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍 (BPDCN) のいくつかの症例において有用であり得る。LILRB4 CARはまた、固形がんにおいて骨髄由来サプレッサー細胞 (MDSC)、腫瘍随伴マクロファージ (TAM) および寛容原性樹状細胞を除去し得る。さらに、単球系APCはCAR-T細胞療法の間観察されるCRSにおけるIL-6の主要な供給源なので (Barrett et al., 2016)、LILRB4 CARは潜在的に、単球性AMLを除去しつつIL-6産生性単球系APCを標的にすることにより、この生命を脅かす副作用のリスクを低下させ得る。

【0190】

(表1) 重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメイン

10

20

30

40

50

	重鎖配列 (VH)			軽鎖配列 (VL)		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
	アミノ酸配列 核酸配列			アミノ酸配列 核酸配列		
128	GIDFSNHYY (SEQ ID NO: 1)	IFSGDSAST (SEQ ID NO: 2)	ARGMSTNDWASD L (SEQ ID NO: 3)	ESINSIY (SEQ ID NO: 4)	RAS (SEQ ID NO: 5)	QQSYDWGDVE NT (SEQ ID NO: 6)
	EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLCAASGIDFSNHYYIYWVRQA PGKGLEWIGCIFSGDSASTYYASWAKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVVYCARGMSTNDWASDLWGQGLTVVSS (SEQ ID NO: 7)			DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASEINSIYLAWYQQK PGKAPKLLIYRASTLASGVPSRFSGSGSDFTLTISLQPE DFATYYCQQSYDWGDVENTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 9)		
	GAGGTGCAGCTGCTGGAGAGCGGAGGAGGCCTGGTGCA GCCTGGAGGATCCCTGAGGCTGTCTGTGCCGCTCCGGC ATCGACTTCTCAACCACTACTACACTACTGGGTGAGGCA GGCTCCCGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGCTGTATCTT TCCGGCGACTCCGCTCCACTACTACGCTCTGGGCCAA GGGCAGTTTACCATCTCCGGGACAACCTCAAGAACACC CTGTACTGCAGATGAACCTCCTGAGGGCCGAGGACACCG CTGTACTACTGCGCCAGGGGCATGTCCACCAACGACTG GGCTTCCGATCTGTGGGGCCAGGGCACACTGGTGACCGT GTCCAGC (SEQ ID NO: 8)			GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTTCTCCCTGTCCGCT TCCGTGGGCGATAGGGTGACCATCACCTGCCAGGCCTC CGAGTCCATCAACAGCATCTACCTGGCTGGTACCAGC AGAAGCCCGCAAGGCCCAAGCTGTGTATCTATCGG GCTTCCACACTGGCTCCGGAGTGCCTTCCAGGTTTTC CGGCTCCGGCTCCGGCACCGACTTCCACCTGACCATCT CCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACTACTACTGC CAGCAGTCTACGACTGGGGCGACGTGGAGAACACCT TTGGCGGCGGCCAACAGGTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 10)		
8	GFSLISYD (SEQ ID NO: 11)	IYSDGYT (SEQ ID NO: 12)	ATNAFAL (SEQ ID NO: 13)	QNVYNNNW (SEQ ID NO: 14)	TAS (SEQ ID NO: 15)	AGGYS GPIYT (SEQ ID NO: 16)
	EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFSLISYDMYVVRQAP GKLEIYIGIYSDGYTFYATGAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVVYCATNAFALWGRGLTVVSS (SEQ ID NO: 17)			AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCQSSQNVYNNNWLVLWLQ QKPGKAPKRLIYASSLASGVPSRFSGSGSDFTLTISLQ PEDFATYYCAGGYS GPIYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 19)		
	GAGGTGCAGCTGCTGGAATCCGGAGGAGGACTGGTGCA GCCTGGCGGATCCCTGAGGCTGTCTGCGCTGCTCCGGC TTCTCCCTGATCAGCTACGACATGTAAGGGTGGAGGAGG CTCTGGCAAGGGCCTGGAGTACATCGGCATCATCTACTC GACGGCTACACCTTCTACGCCACCGCGCCAAGGGCAGG TTCACCATCTCCAGGGACAACCTCAAGAACACCTGTACTC GCAGATGAACCTTCCGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTA CTACTGCGCCACCAACGCTTCTGCTGTGGGGCAGGGGC ACACTGGTGACCGTCTCTCC (SEQ ID NO: 18)			GCCATCCAGCTGACCCAGTCCCCTTCTCCCTGTCCGCT TCCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCCAGTCCTC CCAGAAGCTGTACAACAACACTGGCTGGTCTGGCTGC AGCAGAAGCCCGCAAGGCCCTAAGAGGCTGATCTA CACCGTTCCTCCCTGGCTCCGGAGTGCCTCCAGGT TTTCCGGCTCCGGCTCCGGCACCGATTTCACCTGACC ATCTCTCCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACTACTAC TGCGCCGCGGCTACTCCGGCCCTATACACCTTCCGGC GGCGGCCAACAGGTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 20)		

10

20

30

【 0 1 9 1 】

(表 2) CARコンストラクト

40

50

CARタンパク質名	部分的なコンストラクトの構成(N末端-C末端)
CAR-128-CD28 (SEQ ID NO: 21)	CD8a H, CD8a TM, CD28 cyto, CD3zIso1
CAR-128-41BB (SEQ ID NO: 22)	CD8a H, CD8a TM, 41BB cyto, CD3zIso1
CAR-8-CD28 (SEQ ID NO: 23)	CD8a H, CD8a TM, CD28 cyto, CD3zIso1
CAR-8-41BB (SEQ ID NO: 31)	CD8a H, CD8a TM, 41BB cyto, CD3zIso1
CAR-128-CD28-41BB (SEQ ID NO: 32)	CD8a H, CD8a TM, CD28 cyto, 41BB cyto, CD3zIso1
CAR-8-CD28-41BB (SEQ ID NO: 33)	CD8a H, CD8a TM, CD28 cyto, 41BB cyto, CD3zIso1
CAR-128-CD28 (SEQ ID NO: 40)	CD8a H, CD28 TM, CD28 cyto, CD3zIso3
CAR-8-CD28 (SEQ ID NO: 41)	CD8a H, CD28 TM, CD28 cyto, CD3zIso3
CD3zIso1 (SEQ ID: 42)	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR EEYDVLDKRRGRDPGKPKRRKPNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
CD3zIso3 (SEQ ID: 43)	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR EEYDVLDKRRGRDPGKPKRRKPNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

【 0 1 9 2 】

本願で開示され特許請求されている方法はすべて、本開示に照らして、過度の実験なしに準備および実施することができる。本開示の組成物および方法は、好ましい態様の観点で記載されているが、本開示の概念、精神、および範囲から逸脱することなく、本明細書に記載される方法に対して、および本明細書に記載される方法の工程においてまたは工程の順においてバリエーションが適用され得ることが当業者に明らかであろう。より具体的に、同一または同様の結果を達成しつつ、化学的および生理学的の両面で関連する特定の作用物質が、本明細書に記載される作用物質と置き換えられ得ることが明らかであると考えられる。当業者に明らかなすべてのそのような同様の置換および改変は、添付の特許請求の範囲により定義される本開示の精神、範囲および概念に包含されるとみなされる。

20

【 0 1 9 3 】

VIII. 参照文献

以下の参照文献は、それらが本明細書に示されているものを補足する例示的な手順または他の詳細を提供する程度まで、個々に参照により本明細書に組み入れられる。

30

40

50

- Zheng *et al.*, (2012) Inhibitory receptors bind ANGPTLs and support blood stem cells and leukaemia development. *Nature*, **485**, 656-660.
- Kang *et al.*, (2015) The ITIM-containing receptor LAIR1 is essential for acute myeloid leukaemia development. *Nat Cell Biol*, **17**, 665-677.
- Barrett *et al.* (2016) Interleukin 6 Is Not Made By Chimeric Antigen Receptor T Cells and Does Not Impact Their Function. *Blood*, **128**, 654.
- Kang *et al.*, (2016) Inhibitory leukocyte immunoglobulin-like receptors: Immune checkpoint proteins and tumor sustaining factors. *Cell Cycle*, **15**, 25-40. 10
- Chen *et al.*, (2015) Signalling thresholds and negative B-cell selection in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*, **521**, 357-361.
- Hermanson, D.L. and Kaufman, D.S. (2015) Utilizing chimeric antigen receptors to direct natural killer cell activity. *Front Immunol*, **6**, 195.
- Schonfeld *et al.* (2015) Selective inhibition of tumor growth by clonal NK cells expressing an ErbB2/HER2-specific chimeric antigen receptor. *Mol Ther*, **23**, 330-338. 20
- 米国特許出願公開第 US20050260186 号
- 米国特許出願公開第 US20060104968 号
- 米国特許出願公開第 US20140294898 号
- 米国特許出願公開第 US2014022021 号
- 米国特許出願公開第 US20110008369 号
- Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (vols. 1-3, 1992)
- Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999)
- Pickar, Dosage Calculations (1999) 30
- Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins.
- Heemskerk *et al.*, *Hum Gene Ther*. 19:496-510 (2008).
- Johnson *et al.*, *Blood* 114:535-46 (2009).
- Terakura *et al.* (2012) *Blood*. 1:72- 82.
- Wang *et al.* (2012) *J Immunother*. 35(9):689-701.

- Ford *et al.* (2001) *Gene Therapy* 8:1-4.
- Prochiantz (2007) *Nat. Methods* 4:119-20.
- Singleton *et al.*, *DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY*, 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, N.Y. 1994).
- Sambrook *et al.*, *MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL*, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989).
- Ausubel *et al.*, *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994. 10
- Hurwitz *et al.* (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95(17): 10067-10071.
- Camacho *et al.* (2004) *J Clin Oncology* 22(145): Abstract No. 2505.
- Mokyr *et al.* (1998) *Cancer Res* 58:5301-5304.
- Pardoll, (2012b) *Nat Rev Cancer*, 12(4): 252-64.
- Spanholtz *et al.*, (2011) *PLoS One*, 6(6):e20740.
- Shah *et al.*, (2013) *PLoS One*, 8:e776781.
- Hui and Hashimoto, (1998) *Infection Immun.*, 66(11):5329-5336.
- Christodoulides *et al.*, (1998) *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-3037. 20
- Bukowski *et al.*, (1998) *Clinical Cancer Res.*, 4(10):2337-2347.
- Davidson *et al.*, (1998) *J. Immunother.*, 21(5):389-398.
- Hellstrand *et al.*, (1998) *Acta Oncologica*, 37(4):347-353.
- Qin *et al.*, (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(24):14411-14416.
- Austin-Ward and Villaseca, (1998) *Revista Medica de Chile*, 126(7):838-845.
- Hollander, (201) *Front. Immun.*, 3:3.
- Hanibuchi *et al.*, (1998) *Int. J. Cancer*, 78(4):480-485.
- John *et al.*, (2018) *Mol. Ther.*, 26(10):2487-2495.
- 米国特許第 5,824,311 号 30
- 米国特許第 5,844,905 号
- 米国特許第 5,885,796 号
- 米国特許第 5,801,005 号
- 米国特許第 5,739,169 号
- 米国特許第 5,830,880 号
- 米国特許第 5,846,945 号
- 米国特許第 6,207,156 号
- 米国特許第 8,735,553 号
- 米国特許第 8,354,509 号 40

米国特許第 8,008,449 号

米国特許第 8,017,114 号

米国特許第 8,119,129 号

米国特許第 8,329,867 号

WO2009/114335

WO2009/101611

WO2010/027827

10

WO2011/066342

WO2015016718

WO 01/14424

WO 98/42752

WO 00/37504

WO2001014424

WO2000037504

20

WO 01/14424

WO1995001994

WO1998042752

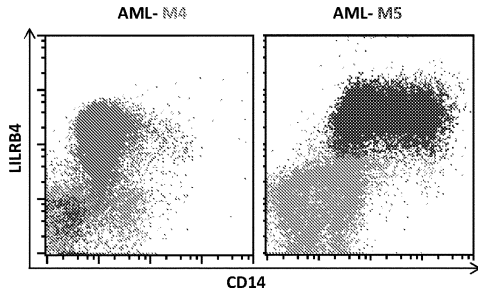
30

40

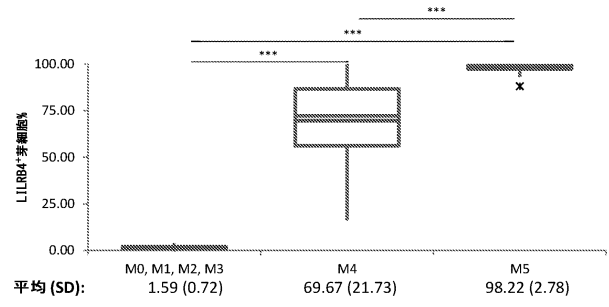
50

【図面】

【図 1 A】

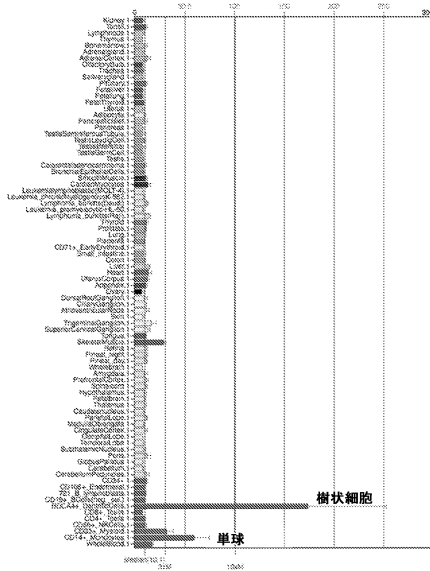


【図 1 B】



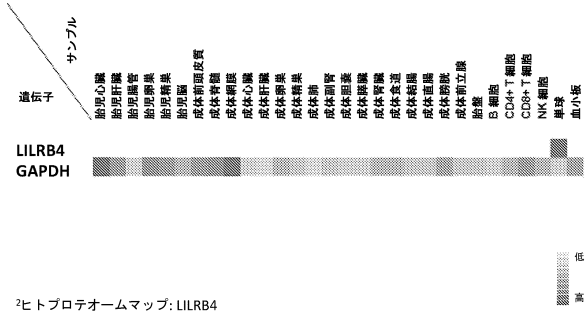
10

【図 1 C】



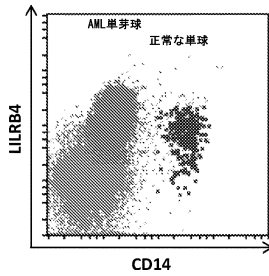
¹GeneAtlas (GSE1133): LILRB4 [210152_at]

【図 1 D】

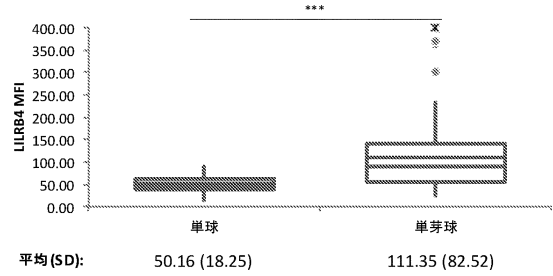


20

【図 1 E】



【図 1 F】

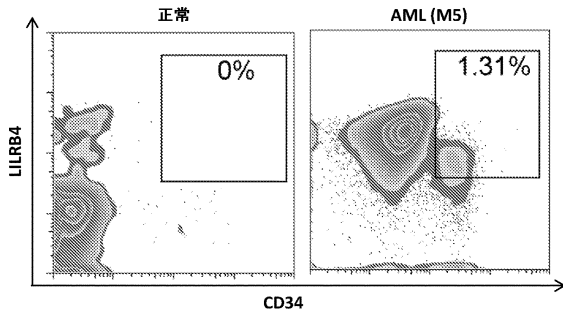


30

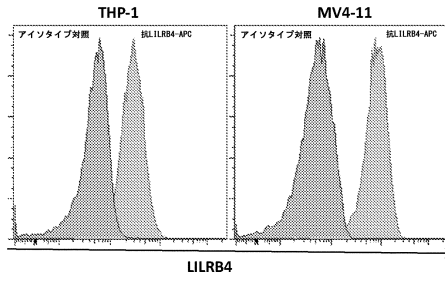
40

50

【図 1 G】



【図 1 H】



10

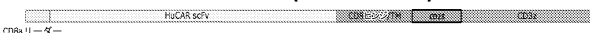
【図 2】

抗LILRB4 scFv-CD28-CD3z (CD28 TMあり)



CD8a リーダー

抗LILRB4 scFv-CD28-CD3z (CD8 TMあり)



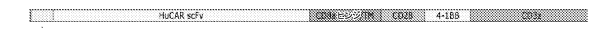
CD8a リーダー

抗LILRB4 scFv-41BB-CD3z

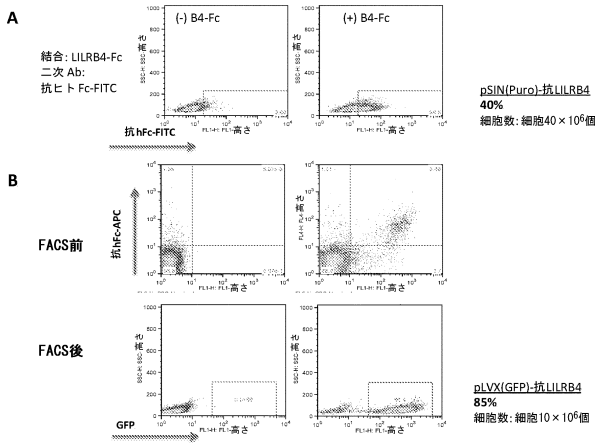


CD8a リーダー

抗LILRB4 scFv-CD28-41BB-CD3z

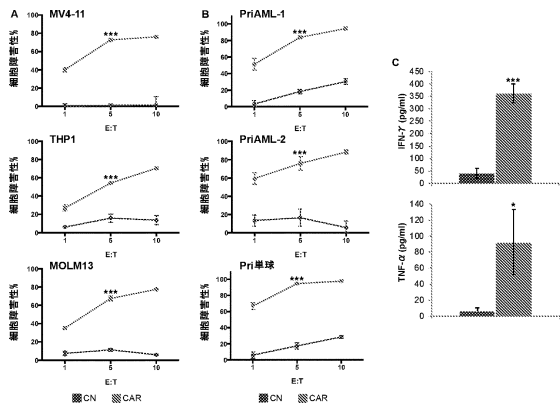


【図 3】

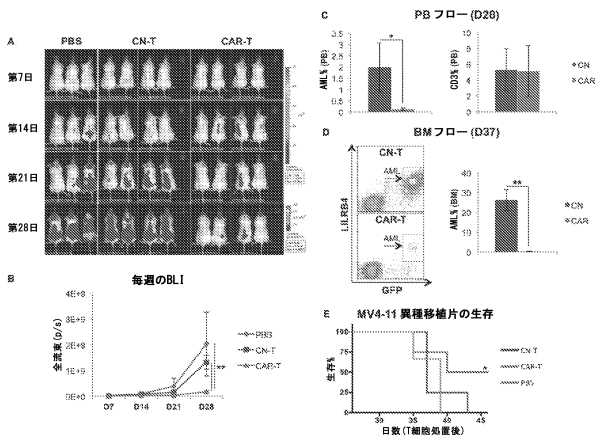


20

【図 4】



【図 5】

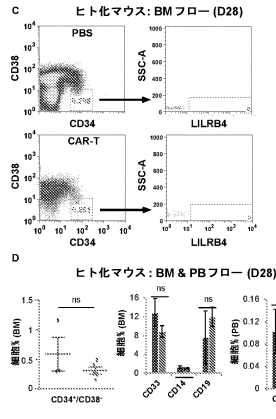
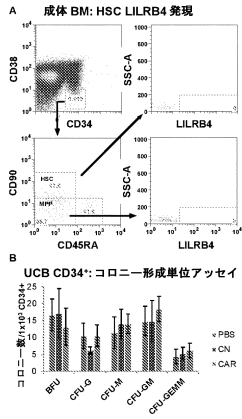


30

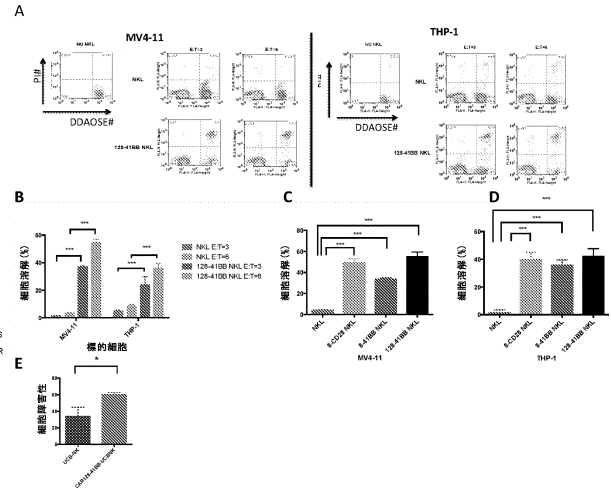
40

50

【図6】

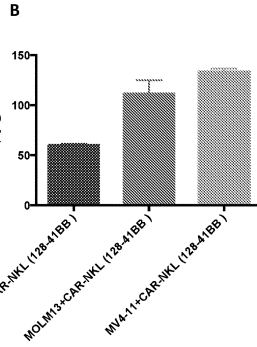
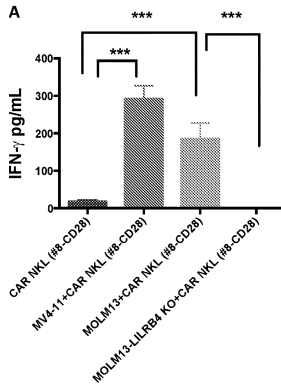


【図7】

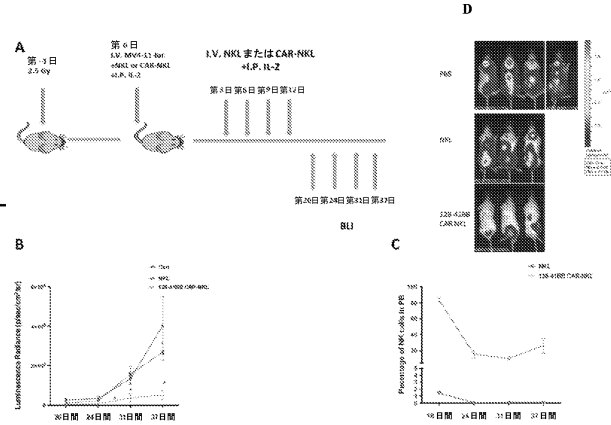


10

【図8】



【図9】



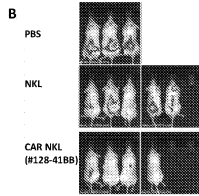
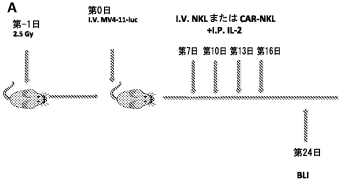
20

30

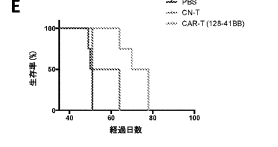
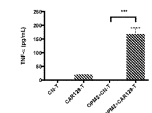
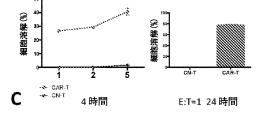
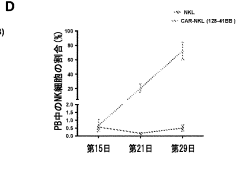
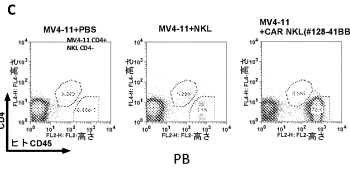
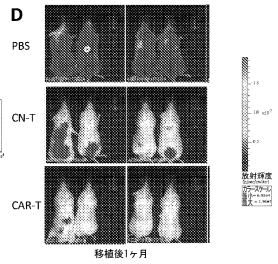
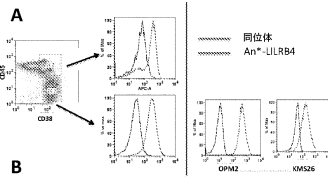
40

50

【図 1 0】

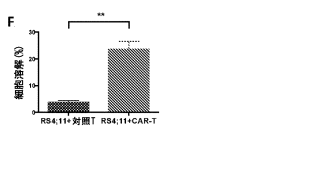
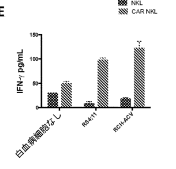
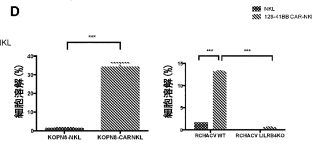
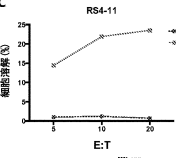
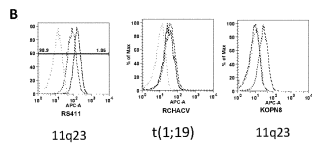
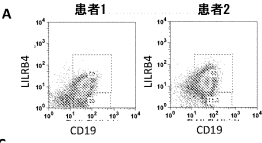


【図 1 1】



10

【図 1 2】



20

【配列表】

0007339944000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 0 7 K 19/00 (2006.01)
 C 0 7 K 16/28 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 P 35/02 (2006.01)
 A 6 1 P 35/04 (2006.01)
 A 6 1 K 35/17 (2015.01)
 A 6 1 K 45/00 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)

F I

C 0 7 K 19/00
 C 0 7 K 16/28
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 35/02
 A 6 1 P 35/04
 A 6 1 K 35/17
 A 6 1 K 45/00 1 0 1
 A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 K 39/395 T

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/584,770

(32)優先日 平成29年11月11日(2017.11.11)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 チャン チェンチェン

アメリカ合衆国 7 5 2 0 5 テキサス州 ダラス ドルイド レーン 4 5 0 1 アパートメント 1 1 7

(72)発明者 ジョン サミュエル

アメリカ合衆国 7 5 3 9 0 テキサス州 ダラス ハリー ハイネズ ブールバード 5 3 2 3 ケア
オブ ユーティー サウスウェスタン メディカル センター

(72)発明者 チェン ヘユ

アメリカ合衆国 7 5 3 9 0 テキサス州 ダラス ハリー ハイネズ ブールバード 5 3 2 3 ケア
オブ ユーティー サウスウェスタン メディカル センター

(72)発明者 ドン ミ

アメリカ合衆国 7 5 0 9 3 テキサス州 プレイノ ブル ラン ドライブ 4 7 1 2

(72)発明者 ギイ シュン

アメリカ合衆国 7 7 0 3 0 テキサス州 ヒューストン ファニン ストリート 7 0 0 0 スイート
7 2 0 ケア オブ ユーティー ヘルス サイエンス センター アット ヒューストン

(72)発明者 チャン ニンギャン

アメリカ合衆国 7 7 0 3 0 テキサス州 ヒューストン ファニン ストリート 7 0 0 0 スイート
7 2 0 ケア オブ ユーティー ヘルス サイエンス センター アット ヒューストン

(72)発明者 アン ジチャン

アメリカ合衆国 7 7 0 3 0 テキサス州 ヒューストン ファニン ストリート 7 0 0 0 スイート
7 2 0 ケア オブ ユーティー ヘルス サイエンス センター アット ヒューストン

審査官 野村 英雄

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 6 / 1 4 4 7 2 8 (W O , A 2)

特表 2 0 1 6 - 5 1 4 4 5 7 (J P , A)

特表 2014 - 507118 (JP, A)

特表 2016 - 525881 (JP, A)

国際公開第 2016 / 123333 (WO, A1)

KANG, X., et al., "Inhibitory leukocyte immunoglobulin-like receptors: Immune checkpoint proteins and tumor sustaining factors.", CELL CYCLE, 2016年, Vol.15, No.1, pp.25 - 40, DOI: 10.1080/15384101.2015.1121324

ROTIROTI, M.C., et al., "Acute Myeloid Leukemia Targeting by Chimeric Antigen Receptor T Cells: Bridging the Gap from Preclinical Modeling to Human Studies.", HUMAN GENE THE RAPHY, 2017年03月01日, Vol.28, No.3, pp.231 - 241, DOI: 10.1089/hum.2016.092

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C07K 1/00 - 19/00

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)

UniProt / GeneSeq

PubMed