

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-530182

(P2023-530182A)

(43)公表日 令和5年7月13日(2023.7.13)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z 4 B 0 6 5
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	Z N A 4 C 0 7 6
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C 0 8 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1 4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全88頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2022-578892(P2022-578892)	(71)出願人	501177609
(86)(22)出願日	令和3年6月22日(2021.6.22)		ラモット・アット・テル・アビブ・ユニ
(85)翻訳文提出日	令和5年2月17日(2023.2.17)		バーシティ・リミテッド
(86)国際出願番号	PCT/IL2021/050763		RAMOT AT TEL AVIV UN
(87)国際公開番号	WO2021/260696		IVERSITY LTD.
(87)国際公開日	令和3年12月30日(2021.12.30)		イスラエル6139201テル・アビブ
(31)優先権主張番号	63/042,080		、ピー・オー・ボックス39296
(32)優先日	令和2年6月22日(2020.6.22)	(74)代理人	110002952
(33)優先権主張国・地域又は機関			弁理士法人鷲田国際特許事務所
	米国(US)	(72)発明者	カルミ ヤロン
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		イスラエル国 テルーアビブ ピー・ オー・ ボックス 3 9 2 9 6 ラモット ア ット テル アビブ ユニバーシティ リミ テッド内
		(72)発明者	ライダー ペレグ
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 多重サブユニットタンパク質モジュール、それを発現する細胞、及びその使用

(57)【要約】

多重サブユニットタンパク質モジュールを提供する。したがって、Fc受容体共通ガンマ鎖（FcRγ）のアミノ酸配列を各々含む少なくとも3種の細胞膜ポリペプチドを含む多重サブユニットタンパク質モジュールであって、当該アミノ酸配列が活性化シグナルを伝達可能であり、当該少なくとも3種のポリペプチドのうちの少なくとも1種だがすべてではないポリペプチドが、免疫細胞の標的となる細胞の細胞表面上に提示される標的を結合することができる細胞外結合ドメインを含み、それにより、当該標的への当該細胞外結合ドメインの結合のときに、当該活性化シグナルが当該多重サブユニットタンパク質モジュールを発現する免疫細胞において伝達される、多重サブユニットタンパク質モジュールを提供する。また、多重サブユニットタンパク質モジュールを発現する細胞、及びその使用も提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

Fc 受容体共通 γ 鎖 (FcR γ) のアミノ酸配列を各々含む少なくとも 3 種の細胞膜ポリペプチドを含む多重サブユニットタンパク質モジュールであって、前記アミノ酸配列が活性化シグナルを伝達可能であり、前記少なくとも 3 種のポリペプチドのうちの少なくとも 1 種だがすべてではないポリペプチドが、免疫細胞の標的となる細胞の細胞表面上に提示される標的を結合することができる細胞外結合ドメインを含み、それにより、前記標的への前記細胞外結合ドメインの結合のときに、前記活性化シグナルが前記多重サブユニットタンパク質モジュールを発現する免疫細胞において伝達される、多重サブユニットタンパク質モジュール。

10

【請求項 2】

前記結合ドメインが受容体のものであり、且つ前記標的が前記受容体のリガンドである、請求項 1 に記載の多重サブユニットタンパク質モジュール。

【請求項 3】

前記結合ドメインが Fc γ 受容体のものであり、且つ前記標的が Fc リガンドである、請求項 1 または 2 に記載の多重サブユニットタンパク質モジュール。

【請求項 4】

前記結合ドメインがリガンドのものであり、且つ前記標的が前記リガンドの受容体である、請求項 1 に記載の多重サブユニットタンパク質モジュール。

【請求項 5】

前記結合ドメインが抗体のものであり、且つ前記標的が抗原である、請求項 1 に記載の多重サブユニットタンパク質モジュール。

20

【請求項 6】

前記結合ドメインが s c F v を含む、請求項 5 に記載の多重サブユニットタンパク質モジュール。

【請求項 7】

前記結合ドメインを含む前記少なくとも 1 種のポリペプチドが、前記標的への前記結合ドメインの結合のときに、前記多重サブユニットタンパク質モジュールの中に含まれる前記 FcR γ のアミノ酸配列を含む前記少なくとも 3 種のポリペプチドのうちのポリペプチドを動員することができるアミノ酸配列を含む、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の多重サブユニットタンパク質モジュール。

30

【請求項 8】

他のポリペプチドを動員することができる前記アミノ酸配列が、Fc 受容体の膜貫通ドメインを含む、請求項 7 に記載の多重サブユニットタンパク質モジュール。

【請求項 9】

前記 Fc 受容体が Fc γ 受容体である、請求項 8 に記載の多重サブユニットタンパク質モジュール。

【請求項 10】

前記 Fc γ 受容体が CD 64 である、請求項 3 及び 9 のいずれか一項に記載の多重サブユニットタンパク質モジュール。

40

【請求項 11】

前記少なくとも 3 種の細胞膜ポリペプチドのうちの少なくとも 2 種が二量体化部分を含む、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の多重サブユニットタンパク質モジュール。

【請求項 12】

前記 FcR γ のアミノ酸配列を含み且つ前記結合ドメインを含まない前記ポリペプチドが、二量体化部分を含む、請求項 1～11 のいずれか一項に記載の多重サブユニットタンパク質モジュール。

【請求項 13】

前記二量体化部分が前記 FcR γ の膜貫通ドメインのアミノ酸配列を含む、請求項 11 または 12 に記載の多重サブユニットタンパク質モジュール。

50

【請求項 14】

前記結合ドメインがCD64のものであり且つ前記標的がFcリガンドであり、前記結合ドメインを含む前記少なくとも1種のポリペプチドがCD64の膜貫通ドメインを含み、さらに前記FcRγのアミノ酸配列を含み且つ前記結合ドメインを含まない前記ポリペプチドが、二量体化部分として前記FcRγの膜貫通ドメインのアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の多重サブユニットタンパク質モジュール。

【請求項 15】

前記免疫細胞の標的となる細胞が病的細胞である、請求項1～14のいずれか一項に記載の多重サブユニットタンパク質モジュール。

【請求項 16】

請求項1～15のいずれか一項に記載の多重サブユニットタンパク質モジュールをコードする、少なくとも1種のポリヌクレオチド。

【請求項 17】

前記少なくとも1種のポリヌクレオチドが、CD64の細胞外ドメイン及び膜貫通ドメインとFcRγの細胞内ドメインとを含む第1のポリペプチドをコードする核酸配列、並びにFcRγの細胞外ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含む第2のポリペプチドをコードする核酸配列を含む、請求項16に記載の少なくとも1種のポリヌクレオチド。

【請求項 18】

前記多重サブユニットタンパク質モジュールが、単一のポリヌクレオチドによってコードされる、請求項16または17に記載の少なくとも1種のポリヌクレオチド。

【請求項 19】

前記ポリヌクレオチドが、前記第1のポリペプチドをコードする核酸配列と、前記第2のポリペプチドをコードする核酸配列との間に、2Aスキップペプチドをコードする核酸配列を含む、請求項16～18のいずれか一項に記載の少なくとも1種のポリヌクレオチド。

【請求項 20】

請求項16～19のいずれか一項に記載の少なくとも1種のポリヌクレオチドを発現するように遺伝子操作された、免疫細胞。

【請求項 21】

請求項16～19のいずれか一項に記載の少なくとも1種のポリヌクレオチドを発現する、免疫細胞。

【請求項 22】

請求項1～15のいずれか一項に記載の多重サブユニットタンパク質モジュールを発現する、免疫細胞。

【請求項 23】

免疫細胞内で多重サブユニットタンパク質モジュールを発現させる方法であって、請求項16～19のいずれか一項に記載の少なくとも1種のポリヌクレオチドを、前記多重サブユニットタンパク質モジュールの発現を許容する条件下で免疫細胞内に導入することを含む、方法。

【請求項 24】

前記導入をインビトロ又はエキスピボで実施する、請求項23に記載の方法。

【請求項 25】

前記免疫細胞がT細胞である、請求項1～24のいずれか一項に記載の多重サブユニットタンパク質モジュール、少なくとも1種のポリヌクレオチド、免疫細胞、又は方法。

【請求項 26】

前記免疫細胞がNK細胞である、請求項1～24のいずれか一項に記載の多重サブユニットタンパク質モジュール、少なくとも1種のポリヌクレオチド、免疫細胞、又は方法。

【請求項 27】

病的細胞に関連する疾患の処置を必要とする対象において前記疾患を処置する方法であ

10

20

30

40

50

って、前記対象に、治療有効量の請求項 20～22 及び請求項 25～26 のいずれか一項に記載の免疫細胞を投与することを含み、前記病的細胞がその細胞表面上に前記標的を提示し、前記投与により前記対象における前記疾患を処置する、方法。

【請求項 28】

病的細胞と関連する疾患の処置を必要とする対象に対する前記疾患の処置における使用のための免疫細胞であって、前記病的細胞がその細胞表面上に前記標的を提示する、請求項 20～22 及び請求項 25～26 のいずれか一項に記載の免疫細胞。

【請求項 29】

前記対象が、前記標的を含む治療用組成物を用いて処置され、前記治療用組成物が前記病的細胞に対して特異的である、請求項 27 に記載の方法又は請求項 28 に記載の使用のための免疫細胞。

【請求項 30】

前記標的を含む治療有効量の治療用組成物を前記対象へ投与することを含み、前記治療用組成物が前記病的細胞に対して特異的である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 31】

病的細胞と関連する疾患の処置を必要とする対象に対する前記疾患の処置における使用のためのものである、請求項 20～22 及び請求項 25～26 のいずれか一項に記載の免疫細胞と、前記病的細胞に対して特異的な、前記標的を含む治療用組成物。

【請求項 32】

請求項 20～22 及び請求項 25～26 のいずれか一項に記載の免疫細胞と、前記標的を含む治療用組成物とを包装する包装材料を含む、製品。

【請求項 33】

前記治療用組成物が、病的細胞に対して特異的である、請求項 32 に記載の製品。

【請求項 34】

前記標的が Fc リガンドであるとき、治療用組成物が Fc 融合タンパク質である、請求項 27～33 のいずれか一項に記載の方法、使用のための免疫細胞、又は製品。

【請求項 35】

前記標的が Fc リガンドであるとき、治療用組成物が抗体である、請求項 27～33 のいずれか一項に記載の方法、使用のための免疫細胞、又は製品。

【請求項 36】

前記免疫細胞が T 細胞であり、前記結合ドメインが CD64 のものであり、前記標的が Fc リガンドであり、さらに治療用組成物が前記病的細胞に対して特異的な抗体である、請求項 27～33 のいずれか一項に記載の方法、使用のための免疫細胞、又は製品。

【請求項 37】

病的細胞に対する抗体の殺滅能力を増大させることを必要とする対象において、前記殺滅能力を増大させる方法であって、前記対象へ治療有効量の

(i) 前記病的細胞に対して特異的な抗体、及び

(ii) 前記免疫細胞が T 細胞であり、前記結合ドメインが CD64 のものであり、且つ前記標的が Fc リガンドである、請求項 20～22 のいずれか一項に記載の免疫細胞を投与し、それにより、前記病的細胞に対する前記抗体の前記殺滅能力を増大させることを含む、方法。

【請求項 38】

前記抗体が IgG である、請求項 35～37 のいずれか一項に記載の方法、使用のための免疫細胞、又は製品。

【請求項 39】

前記病的細胞が癌性細胞であり、疾患が癌である、請求項 15～38 のいずれか一項に記載の多重サブユニットタンパク質、少なくとも 1 種のポリヌクレオチド、免疫細胞、方法、使用のための免疫細胞、又は製品。

【請求項 40】

前記癌が、黒色腫、リンパ腫、結腸癌、肺癌、乳癌、及び膵癌からなる群から選択され

10

20

30

40

50

る、請求項 39 に記載の多重サブユニットタンパク質、少なくとも 1 種のポリヌクレオチド、免疫細胞、方法、使用のための免疫細胞、又は製品。

【請求項 41】

前記癌が、黒色腫又はリンパ腫である、請求項 39 に記載の多重サブユニットタンパク質、少なくとも 1 種のポリヌクレオチド、免疫細胞、方法、使用のための免疫細胞、又は製品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、参照により本明細書に援用される 2020 年 6 月 22 日出願の米国仮特許出願第 63 / 042, 080 号明細書の優先権を主張する特許出願である。

【0002】

配列表の陳述

本出願の出願と同時に提出される、2021 年 6 月 22 日作成の 102, 393 バイトを含む ASCII ファイル（ファイル名：88183 Sequence Listing. text）は、参照により本明細書に援用する。

【0003】

本発明は、そのいくつかの実施形態において、多重サブユニットタンパク質モジュール、それを発現する細胞、及びその使用に関する。

【背景技術】

【0004】

細胞ベースの療法、抗体療法、及びサイトカイン療法を含む癌免疫療法は、薬剤耐性の遺伝子レベル及び細胞レベルの機序を回避し、且つ健全組織をよけながら腫瘍細胞を標的とするその能力により、様々なタイプの癌を処置するための有望な戦略として過去数年の間に出現してきた。

【0005】

モノクローナル抗体、抗体融合タンパク質、及び抗体薬剤複合体（ADC）などの抗体ベースの癌免疫療法は、非癌性細胞と比較して癌細胞において差次的に発現する細胞表面分子の認識、及び／又は免疫チェックポイント遮断に依存する。癌細胞への抗体ベースの免疫療法の結合は、様々な機序、例えば、抗体依存性細胞障害作用（ADCC）、補体依存性細胞傷害作用（CDC）、抗体薬物複合体（ADC）からのペイロードの直接的な細胞毒性活性、又は抑制性チェックポイント遮断を介して、癌細胞の死滅につながり得る。これらの機序の多くは、細胞に結合した抗体の Fc ドメインが、造血細胞上の特殊な細胞表面受容体（Fc 受容体）へ結合することを経て始まる。

【0006】

例えば、非癌性細胞と比較して、癌細胞上において MHC クラス I 分子に関連して差次的に発現する抗原に対して特異的な T 細胞受容体（TCR）を有する T 細胞を用いた細胞ベースの療法は、いくつかのタイプの癌、例えば造血器悪性腫瘍において抗腫瘍効果を発揮することが示された。しかしながら、抗原特異的エフェクターであるリンパ球は非常に稀有であり、個体特異的であり、当該リンパ球の認識スペクトルにおいて制限されており、ほとんどの悪性腫瘍に対して得られることが困難である。

【0007】

CAR T 細胞及び、抗体と Fc 受容体を発現する T 細胞との併用処置など、抗体ベースの癌免疫療法及び細胞ベースの療法の原理を組み合わせる戦略が開示されている（例えば、欧州特許第 0340793 号明細書、国際公開第 2017205254 号パンフレット及び同第 2015179833 号パンフレット、米国特許出願公開第 20150139943 号明細書、同第 20180008638 号明細書、及び同第 20160355566 号明細書、Clemenceau et al. Blood. 2006; 107:4669-4677、並びに Urbanska et al. Molecular Therapy. 2014;22 (Supplement 1): S297-S298 を参照

10

20

30

40

50

されたい)。しかしながら、固形腫瘍に対してこれらの細胞を繫留する試行は今日まで失望に終わっていた。したがって、より高い安全性特性を特徴とする、且つ宿主T細胞のレパートリーに排他的に依存することがない、固形腫瘍を根絶することができる処置を開発する喫緊の必要性がなお残っている。

【0008】

追加の背景技術は、Rasoulouniriana et al. J Clin Invest. (2019) 129(10): 4151-4164、米国特許第8313943号明細書及び同第6111166号明細書、並びに国際公開第2015121454号パンフレットを含む。

【発明の概要】

【0009】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によると、Fc受容体共通 γ 鎖(FcR γ)のアミノ酸配列を各々含む少なくとも3種の細胞膜ポリペプチドを含む多重サブユニットタンパク質モジュールであって、アミノ酸配列が活性化シグナルを伝達可能であり、少なくとも3種のポリペプチドのうちの少なくとも1種だがすべてではないポリペプチドが、免疫細胞の標的となる細胞の細胞表面上に提示される標的を結合することができる細胞外結合ドメインを含み、それにより、標的への細胞外結合ドメインの結合のときに、活性化シグナルが前記多重サブユニットタンパク質モジュールを発現する免疫細胞において伝達される、多重サブユニットタンパク質モジュールが提供される。

【0010】

本発明のいくつかの実施形態によると、結合ドメインは受容体のものであり、標的は受容体のリガンドである。

【0011】

本発明のいくつかの実施形態によると、結合ドメインはFc γ 受容体のものであり、標的はFcリガンドである。

【0012】

本発明のいくつかの実施形態によると、結合ドメインはリガンドのものであり、標的はリガンドの受容体である。

【0013】

本発明のいくつかの実施形態によると、結合ドメインは抗体のものであり、標的は抗原である。

【0014】

本発明のいくつかの実施形態によると、結合ドメインはs c F vを含む。

【0015】

本発明のいくつかの実施形態によると、結合ドメインを含む少なくとも1種のポリペプチドは、標的への結合ドメインの結合のときに、多重サブユニットタンパク質モジュールの中に含まれるFcR γ のアミノ酸配列を含む少なくとも3種のポリペプチドからなるポリペプチドを動員することができるアミノ酸配列を含む。

【0016】

本発明のいくつかの実施形態によると、他のポリペプチドを動員することができるアミノ酸配列は、Fc受容体の膜貫通ドメインを含む。

【0017】

本発明のいくつかの実施形態によると、Fc受容体はFc γ 受容体である。

【0018】

本発明のいくつかの実施形態によると、Fc γ 受容体はCD64である。

【0019】

本発明のいくつかの実施形態によると、少なくとも3種の細胞膜ポリペプチドのうちの少なくとも2種は、二量体化部分を含む。

【0020】

本発明のいくつかの実施形態によると、FcR γ のアミノ酸配列を含み且つ結合ドメインを含まないポリペプチドは、二量体化部分を含む。

10

20

30

40

50

【0021】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によると、FcRγの膜貫通ドメインのアミノ酸配列を含む二量体化部分が提供される。

【0022】

本発明のいくつかの実施形態によると、結合ドメインはCD64のものであり、標的はFcリガンドであり、結合ドメインを含む少なくとも1種のポリペプチドは、CD64の膜貫通ドメインを含み、FcRγのアミノ酸配列を含み且つ結合ドメインを含まないポリペプチドは、二量体化部分としてFcRγの膜貫通ドメインのアミノ酸配列を含む。

【0023】

本発明のいくつかの実施形態によると、免疫細胞の標的となる細胞は病的細胞である。

10

【0024】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によると、多重サブユニットタンパク質モジュールをコードする少なくとも1種のポリヌクレオチドが提供される。

【0025】

本発明のいくつかの実施形態によると、少なくとも1種のポリヌクレオチドは、CD64の細胞外ドメイン及び膜貫通ドメインとFcRγの細胞内ドメインとを含む第1のポリペプチドをコードする核酸配列、並びにFcRγの細胞外ドメインと膜貫通ドメインと細胞内ドメインとを含む第2のポリペプチドをコードする核酸配列を含む。

【0026】

本発明のいくつかの実施形態によると、多重サブユニットタンパク質モジュールは、単一のポリヌクレオチドによってコードされる。

20

【0027】

本発明のいくつかの実施形態によると、ポリヌクレオチドは、第1のポリペプチドをコードする核酸配列と、第2のポリペプチドをコードする核酸配列と、の間にある2Aスキップペプチドをコードする核酸配列を含む。

【0028】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によると、少なくとも1種のポリヌクレオチドを発現するよう遺伝子操作された免疫細胞が提供される。

【0029】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によると、少なくとも1種のポリヌクレオチドを発現する免疫細胞が提供される。

30

【0030】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によると、多重サブユニットタンパク質モジュールを発現する免疫細胞が提供される。

【0031】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によると、免疫細胞内で多重サブユニットタンパク質モジュールを発現させる方法であって、少なくとも1種のポリヌクレオチドを、多重サブユニットタンパク質モジュールの発現を許容する条件下で免疫細胞内に導入することを含む、方法が提供される。

【0032】

本発明のいくつかの実施形態によると、導入をインビトロ又はエキスピボで実施する。

40

【0033】

本発明のいくつかの実施形態によると、免疫細胞はT細胞である。

【0034】

本発明のいくつかの実施形態によると、免疫細胞はNK細胞である。

【0035】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によると、ポリペプチド複合体を発現するT細胞であって、ポリペプチド複合体が少なくとも第1のポリペプチドと第2のポリペプチドとを含み、第1のポリペプチド及び第2のポリペプチドが翻訳段階で融合しておらず、第1のポリペプチドがFc受容体共通γ鎖（FcRγ）のアミノ酸配列を含み、このアミノ酸

50

配列が活性化シグナルを伝達可能であり、且つホモ二量体を形成可能であり、第 2 のポリペプチドが、

(i) F c リガンドを結合することができる F c γ 受容体の細胞外リガンド結合ドメインと、

(i i) 活性化シグナルを伝達することができるアミノ酸 F c R γ と、

(i i i) 第 1 のポリペプチドを動員することができるアミノ酸配列と、
を含み、それにより、F c γ 受容体の細胞外リガンド結合ドメインへの F c リガンドの結合の際に、活性化シグナルが伝達される、T 細胞が提供される。

【 0 0 3 6 】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によると、病的細胞と関連する疾患の処置を必要とする対象において当該疾患を処置する方法であって、当該方法は、対象に治療有効量の免疫細胞を投与することを含み、病的細胞がその細胞表面上に標的を提示し、当該投与により、対象における疾患を処置する、方法が提供される。

10

【 0 0 3 7 】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によると、病的細胞と関連する疾患の処置を必要とする対象に対する疾患の処置における使用のための免疫細胞であって、病的細胞がその細胞表面上に前記標的を提示する、免疫細胞が提供される。

【 0 0 3 8 】

本発明のいくつかの実施形態によると、対象は、標的を含む治療用組成物を用いて処置され、治療用組成物は病的細胞に対して特異的である。

20

【 0 0 3 9 】

本発明のいくつかの実施形態によると、この方法は、標的を含む治療有効量の治療用組成物を対象へ投与することを含み、治療用組成物は前記病的細胞に対して特異的である。

【 0 0 4 0 】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によると、病的細胞と関連する疾患の処置を必要とする対象に対する疾患の処置における使用のためのものであり、病的細胞に対して特異的である、免疫細胞、並びに標的を含む治療用組成物が提供される。

【 0 0 4 1 】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によると、免疫細胞と、標的を含む治療用組成物とを包装する包装材料を含む、製品が提供される。

30

【 0 0 4 2 】

本発明のいくつかの実施形態によると、治療用組成物は、病的細胞に対して特異的である。

【 0 0 4 3 】

本発明のいくつかの実施形態によると、標的が F c リガンドであるとき、治療用組成物は F c 融合タンパク質である。

【 0 0 4 4 】

本発明のいくつかの実施形態によると、標的が F c リガンドであるとき、治療用組成物は抗体である。

【 0 0 4 5 】

本発明のいくつかの実施形態によると、免疫細胞は T 細胞であり、結合ドメインは C D 6 4 のものであり、標的は F c リガンドであり、治療用組成物は病的細胞に対して特異的な抗体である。

40

【 0 0 4 6 】

本発明のいくつかの実施形態の一態様によると、病的細胞に対する抗体の殺滅能力を増大させることを必要とする対象において、殺滅能力を増大させる方法であって、対象へ治療有効量の

(i) 病的細胞に対して特異的な抗体、及び

(i i) T 細胞であり、結合ドメインが C D 6 4 のものであり、標的が F c リガンドである、免疫細胞

50

を投与し、それにより、病的細胞に対する抗体の殺滅能力を増大させることを含む、方法が提供される。

【0047】

本発明のいくつかの実施形態によると、抗体はIgGである。

【0048】

本発明のいくつかの実施形態によると、病的細胞は癌性細胞であり、疾患は癌である。

【0049】

本発明のいくつかの実施形態によると、癌は、黒色腫、リンパ腫、結腸癌、肺癌、乳癌、及び膀胱癌からなる群から選択される。

【0050】

本発明のいくつかの実施形態によると、癌は、黒色腫又はリンパ腫である。

【0051】

別段の定義がない限り、本明細書で使用される技術用語及び／又は科学用語はすべて、本発明が属する当業者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。本明細書で説明されるものと同様の又は同等の方法及び材料は、本発明の実施形態の実施又は試験において使用することができるが、例示的な方法及び／又は材料を以下に説明する。矛盾する場合、定義を含む特許明細書が優先される。加えて、材料、方法、及び例は、説明のためのみあるのであり、必ずしも制限するよう意図されているのではない。

【0052】

本発明のいくつかの実施形態は例示に過ぎないが、添付の図面を参照して本明細書で説明される。ここで、特に図面に関して詳細には、示される特定のものが例としてであるに過ぎず、本発明の実施形態の実例となる論議の目的のためであることは強調される。この点において、図面に伴う説明は、本発明の実施形態がどのように実施され得るのかを当業者に対して明らかにする。

【図面の簡単な説明】

【0053】

【図1A】使用した構築物の概略表現、及び発現したタンパク質としての受容体の図を示す。図1Aは、FcγRIの細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞内ドメイン、T2Aスキップペプチド、並びにFcRγ（配列番号1～2）をコードする、アルファ-2A-ガンマと本明細書に記載する構築物を示す。

【図1B】図1Bは、FcRγの細胞内ドメインへ融合したFcγRIの細胞外ドメイン及び膜貫通ドメイン、T2Aスキップペプチド、並びにFcRγ（配列番号3～4）をコードする、アルファ-ガンマ2A-ガンマと本明細書に記載する構築物を示す。

【図2A】アルファ-2A-ガンマ（図2A）構築物又はアルファ-ガンマ-2a-ガンマ（図2B）構築物を発現し、且つTCRβ、FcγRI、及びGFPについて染色された細胞の共焦点顕微鏡画像を示す。倍率200倍。

【図2B】同上

【図3】1視野についてIncucyte画像作成装置によって計数された細胞の数と、96ウェルプレートの1ウェルにおける培養されたB16-H2B-t dTomato細胞の数との間にある相関を示すグラフである。

【図4A】異なる比におけるアルファ-2A-ガンマ感染細胞によるB16標的細胞の殺滅を示す。図4Aは、アルファ-2A-ガンマ及びB16-H2B-t dTomatoを0.5:1～16:1の範囲の示されたエフェクター：標的比で感染させたCD8+ T細胞を抗TRP-1抗体の存在下で2日間共培養した後の、Incucyte画像作成装置によって撮影された代表的な画像を示す。倍率100倍。

【図4B】図4Bは、アルファ-2A-ガンマ及びB16-H2B-t dTomatoを異なるエフェクター：標的比で感染させたCD4+ T細胞又はCD8+ T細胞を、抗TRP-1抗体の存在下又は非存在下で2日間共培養した後の、Incucyte画像作成装置によって計数された標的細胞の数を示すグラフである。

【図5A】アルファ-ガンマ-2a-ガンマを感染させた細胞によるB16標的細胞の殺

10

20

30

40

50

滅を示す。図 5 A は、アルファーガンマ-2 A-ガンマ及び B 1 6-H 2 B-t d T o m a t o を 2 : 1 のエフェクター : 標的比で感染させた C D 8 + T 細胞を抗 T R P - 1 抗体の存在下又は非存在下で 2 日間共培養した後の、I n c u C y t e 画像作成装置によって撮影された代表的な画像を示す。倍率 1 0 0 倍。

【図 5 B】図 5 B ~ 図 5 C は、アルファーガンマ-2 A-ガンマを 2 : 1 のエフェクター : 標的比で感染させた C D 4 + (図 5 B) T 細胞又は C D 8 + (図 5 C) T 細胞を、抗 T R P - 1 抗体の存在下又は非存在下で 2 日間共培養した後の、I n c u C y t e 画像作成装置によって計数された標的細胞の数を示すグラフを示す。また、以下の対照、すなわち、単独で培養した B 1 6 H 2 B-t d T o m a t o 標的細胞、抗 T R P - 1 抗体とともに培養した B 1 6 H 2 B-t d T o m a t o 標的細胞、非感染 C D 4 + T 細胞又は C D 8 + T 細胞 (疑似) と共培養した B 1 6 H 2 B-t d T o m a t o 標的細胞、非感染 C D 4 + T 細胞又は C D 8 + T 細胞 (疑似) 及び抗 T R P - 1 抗体と共培養した B 1 6 H 2 B-t d T o m a t o 標的細胞も示している。

10

【図 5 C】同上

【図 6 A】感染したエフェクター T 細胞における G F P 及び F c γ R I (C D 6 4) 発現を示す。図 6 A は、B 1 6-H 2 B-t d T o m a t o を、アルファーガンマ-2 A-ガンマを感染させた C D 4 + T 細胞又は C D 8 + T 細胞、及び抗 T R P - 1 抗体と共培養した後に、明視野、赤色及び緑色のフィルタを備えた I n c u C y t e 画像作成装置を用いて撮影した画像を示す。倍率 2 0 0 倍。

【図 6 B】図 6 B は、非感染 (疑似) 又はアルファーガンマ-2 A-ガンマ感染のマウス C D 4 + T 細胞、マウス C D 8 + T 細胞又はヒト J u r k a t T 細胞のフローサイトメトリー解析を示す。細胞を F c γ R I (C D 6 4) 染色及び G F P 発現について解析した。

20

【図 7】アルファーガンマ-2 a-ガンマ感染した細胞による B 1 6 標的細胞の殺滅を示す。非感染細胞 (疑似) と比較した場合の、アルファーガンマ-2 A-ガンマを感染させた C D 4 + T 細胞又は C D 8 + T 細胞とともに、抗 T R P - 1 抗体の存在下又は非存在下で 6 0 時間共培養した後に、I n c u C y t e 画像作成装置によって計数した B 1 6-H 2 B-t d T o m a t o 標的細胞の数を示す。また、単独で培養した B 1 6 H 2 B-t d T o m a t o 標的細胞の対照も示す。

【図 8 A】共受容体 F c R γ 鎖の二量体を経てシグナル伝達する F c γ R I 受容体の必要性を示す。図 8 A は、シグナル伝達性の細胞内ガンマ (配列番号 5 ~ 6) と一緒に、C D 8 a のヒンジドメイン及び膜貫通ドメインへ融合した F c R I アルファ鎖細胞外 D 1 ~ D 3 ドメインから構成された、アルファー C D 8-ガンマと本明細書に記載する構築物、並びにアルファーガンマ-2 A-ガンマ構築物の同じ配列から構成されるが、二量体化を容易にする S-S 結合を防ぐために、膜貫通ドメインにおける 2 種のシステイン残基 (システイン 2 5 及び 4 4) をグリシンへ突然変異した、アルファーガンマ-2 A-ガンマ (変異) と本明細書に記載する構築物の概略表現を示す (配列番号 7 ~ 8) 。

30

【図 8 B】図 8 B は、単独で又は未感染の C D 8 + T 細胞 (疑似)、アルファ-2 A-ガンマ、アルファ- C D 8-ガンマ、アルファ-ガンマ-2 A-ガンマ、又はアルファ-ガンマ-2 A-ガンマ (変異) を感染させた C D 8 + T 細胞とともに 4 8 時間共培養した後のいずれかで抗 T R P - 1 抗体で処理した B 1 6-H 2 B-t d T o m a t o 標的細胞の代表的な画像を示す。画像は、明視野、赤色及び緑色のフィルタを用いて撮影し、倍率 2 0 0 倍とした。

40

【図 8 C】図 8 C は、図 8 B において説明した C D 8 + T 細胞とともに共培養した後の標的細胞計数を示すグラフである。

【図 9】アルファーガンマ-2 a-ガンマ感染細胞による Y U M M 1. 7-H 2 B-t d T o m a t o 標的細胞の殺滅を示す。抗 T R P - 1 抗体の有無の下で、2 : 1 のエフェクター : 標的比でアルファーガンマ-2 A-ガンマ感染 C D 8 T 細胞とともに 2 日間共培養した Y U M M 1. 7-H 2 B-t d T o m a t o の代表的な画像を示す。画像は、明視野、赤色及び緑色のフィルタを用いて撮影し、標的細胞核 t d T o m a t o 及び G F P を

50

、感染 T 細胞集団において示した。

【図 10 A】アルファ-ガンマ-2 a-ガンマ感染細胞による A 20 B 細胞リンパ腫標的細胞の殺滅を示す。図 10 A は、アルファ-ガンマ-2 A-ガンマ細胞を 2 : 1 のエフェクター : 標的比で感染させた CD 8 + T 細胞とともに、抗 CD 20 抗体の有無の下で共培養した A 20 細胞の代表的な共焦点顕微鏡画像を示す。細胞を T 細胞マーカー T C R β 及び B 細胞マーカー B 2 2 0 について染色した。倍率 2 0 0 倍。

【図 10 B】図 10 B は、アルファ-ガンマ-2 A-ガンマ CD 8 + T 細胞とともに、抗 CD 20 抗体の有無の下で 2 4 時間共培養した後の、A 20 B リンパ腫細胞のアネキシン V 染色に対するフローサイトメトリー解析を示す。

【図 11】2 4 時間の共培養後の、抗 T R P - 1 抗体と又は抗 CD 4 4 抗体と組み合わせたアルファ-ガンマ-2 a-ガンマ感染 CD 8 + T 細胞による B 1 6 標的細胞の殺滅を示す。

【図 12】アルファ-ガンマ-2 a-ガンマ感染 T 細胞のインビボでの抗腫瘍効果を示す。B 1 6 細胞 (2×10^5 個) を皮下注射し、且つ、抗 T R P - 1 抗体の有無の下で (各群において $n = 4$) アルファ-ガンマ-2 A-ガンマ感染 CD 3 + T 細胞で処理したマウスの腫瘍サイズを、未感染 (疑似) CD 3 + T 細胞及び抗 T R P - 1 抗体で未処理 ($n = 3$) の又は処理した ($n = 3$) 対照と比較して示す。マウス処理は、腫瘍細胞注射の 7 日後に開始し、7 日後、1 1 日後、1 4 日後の 3 回注射を含んだ。CD 3 + T 細胞は静脈内注射するのに対し、抗 T R P - 1 は皮下注射した。

【図 13】F c R γ の細胞内ドメインへ融合した F c γ R I の細胞外 D 3 ドメイン及び膜貫通ドメインへ融合した抗 E G F R s c F v と、T 2 A スキップペプチドと、配列番号 3 7 ~ 3 8) の F c R γ とをコードする、s c F v - アルファ-ガンマ-2 A-ガンマとして本明細書に記載する構築物の概略表現を示す。

【図 14 A】アルファ-2 A-ガンマ (A 2 G) 感染 T 細胞と比較した、アルファ-ガンマ-2 a-ガンマ (A G 2 G) 感染 T 細胞による H E R 2 標的細胞の殺滅を示す。図 14 A は、感染 1 0 日後に、A G 2 G - I R E S - G F P レトロウイルスを感染させたヒト T 細胞の代表的なフローサイトメトリープロットを示す。

【図 14 B】図 14 B は、A G 2 G - I R E S - G F P を感染させ、F c γ R I (C D 6 4) について染色したヒト T 細胞の代表的な共焦点顕微鏡画像を示す。

【図 14 C】図 14 C は、H E R 2 及び H 2 b - t d T o m a t o を感染させ且つ H E R 2 について染色したヒト H T 2 9 結腸癌細胞株の代表的な共焦点顕微鏡画像を示す。

【図 14 D】図 14 D は、E G F R 及び H 2 b - t d T o m a t o を感染させ且つ E G F R について染色したヒト H T 2 9 結腸癌細胞株の代表的な共焦点顕微鏡画像を示す。

【図 14 E】図 14 E は、未感染 (疑似) ヒト T 細胞又は A 2 G - I R E S - G F P 感染ヒト T 細胞又は A G 2 G - I R E S - G F P 感染ヒト T 細胞と共培養され且つ関連抗 H E R 2 抗体トラスツズマブで処理した H T 2 9 - H 2 b - t d T o m a t o H E R 2 細胞の I n c u C y t e 画像作成装置によって計数された標的細胞数を示すグラフである ($n = 4$) 。

【図 14 F】図 14 F は、疑似感染ヒト T 細胞又は A 2 G 又は A G 2 G - I R E S - G F P 感染ヒト T 細胞とともに共培養され且つ非関連抗 H E R 2 抗体トラスツズマブで処理した H T 2 9 - H 2 b - t d T o m a t o E G F R H T 2 9 細胞の I n c u C y t e 画像作成装置によって計数された標的細胞数を示すグラフである ($n = 4$) 。

【図 15 A】関連抗体と組み合わせてアルファ-ガンマ-2 a-ガンマ (A G 2 G) p M S V G . 1 ベクターを感染させた T 細胞による、H E R 2 標的細胞及び E G F R 標的細胞の殺滅を示す。図 15 A は、p M S V G . 1 - A G 2 G 構築物を感染させ且つ C D 6 4 について染色した T 細胞の代表的な共焦点顕微鏡画像を示す。

【図 15 B】図 15 B は、関連抗 H E R 2 抗体トラスツズマブを用いた処理の有無の下で、疑似又は A G 2 G 感染ヒト T 細胞とともに共培養した、H 2 b - t d T o m a t o H E R 2 + H T 2 9 細胞の I n c u C y t e 画像作成装置によって計数された標的細胞数を示すグラフである ($n = 4$) 。

10

20

30

40

50

【図15C】図15Cは、非関連抗EGFR抗体セツキシマブを用いた処理の有無の下で、疑似又はAG2G感染ヒトT細胞とともに共培養した、H2b-t dTomatoHER2+ HT29細胞のIncucyte画像作成装置によって計数された標的細胞数を示すグラフである（n=4）。

【図15D】図15D～図15Eは、関連抗HER2抗体トラスツズマブを用いた処理の有無の下で、疑似又はAG2G感染ヒトT細胞とともに、4:1、2:1、又は1:1のエフェクター：標的比で共培養した、ELISAによって決定したH2b-t dTomatoHER2+ HT29ヒト結腸癌の上清におけるTNF α （図15D）及びIFN γ （図15E）濃度を示すグラフを示す。

【図15E】同上

【図15F】図15Fは、関連する抗HER2抗体トラスツズマブ、又は非関連抗体セツキシマブ若しくはレツキシマブ（Retuximab）を用いた処理の有無の下で、疑似又はAG2G感染ヒトT細胞とともに共培養した、H2b-t dTomatoHER2+ HT29細胞のIncucyte画像作成装置によって計数された標的細胞数を示すグラフである。

【図16】本発明のいくつかの実施形態のポリペプチドへ付加することができる共刺激ドメイン及びサイトカイン受容体シグナル伝達ドメインの概略表現を示す。

【図17】感染9日後の、アルファガンマ-2 α -ガンマ（AG2G）-IRES-GFPベクターを感染させたヒト $\gamma\delta$ T細胞におけるGFP及びFc γ RI（CD64）発現を示す。健康ドナー由来のヒトPBMCを回収し、ゾレドロナート及びIL-2を用いた増殖後に単離された $\gamma\delta$ T細胞を、pMIGIIベクターにおいてクローン化されたAG2Gのためのレトロウイルスで形質導入し、GFP発現について、及び $\gamma\delta$ -TCR-APC染色又はCD64-APC染色について画像化した。

【図18A】アルファガンマ-2 α -ガンマ（AG2G）pMSVG.1ベクターを感染させたNK-92細胞株におけるCD56及びFc γ RI（CD64）の発現を示す。図18Aは、抗CD64-APC抗体を用いたAG2Gの発現を示す代表的なフローサイトメトリープロットを示す。

【図18B】図18Bは、抗CD56-APC抗体を用いたNKマーカーCD56の発現と、抗CD64-APC抗体を用いたAG2Gの発現とを示す代表的な免疫染色画像を示す。

【発明を実施するための形態】

【0054】

本発明は、そのいくつかの実施形態において、多重サブユニットタンパク質モジュール、それを発現する細胞、及びそれらの使用に関する。

【0055】

本発明の少なくとも1種の実施形態を詳細に説明する前に、本発明が、後続の説明において説明される詳細への、又は実施例によって具現化される詳細への本発明の応用において、制限されないことは理解されるものとする。本発明は、他の実施形態が、又は様々な方法で実行若しくは実施されることが、可能である。

【0056】

癌免疫療法は、細胞ベースの療法、抗体療法、及びサイトカイン療法を含め、様々なタイプの癌を処置するための有望な戦略として過去数年の間に出現してきた。抗体ベースの癌免疫療法は、非癌性細胞と比較して癌細胞において差次的に発現する細胞表面分子の認識、及び／又は免疫チェックポイント遮断に依存する。他方、例えば、非癌性細胞と比較して、癌細胞上においてMHCクラスI分子と関連して差次的に発現する抗原に特異的なT細胞受容体（TCR）を有するT細胞を用いた細胞ベースの療法は、いくつかのタイプの癌、例えば、造血器悪性腫瘍において、抗腫瘍効果を発揮することが示された。抗体ベースの癌免疫療法の原理と細胞ベースの療法の原理とを組み合わせる戦略が示唆されている。

【0057】

本教示の具体的な実施形態は、Fcγ鎖活性化ドメインを各々含む3ポリペプチド構造の形成が、Fcγ鎖活性化ドメインを含む単一ポリペプチド、又はFcγ鎖を含む2ポリペプチド（例えば、Fcγ鎖の膜貫通ドメインの二量体化特性によってつくられる）と比較して、驚くべきことに有利であることを示唆している。

【0058】

後続の実施例の項において示されるように、本発明者らは、T細胞において、高親和性Fcγ受容体FcγRI（CD64）の結合ドメインを含む第1のポリペプチド、及びホモ二量体を形成することができるFcγ鎖を含む第2の異なるポリペプチドを外来性発現させた。これらの操作されたT細胞は、抗腫瘍抗体との組み合わせで腫瘍細胞のインビトロでの殺滅能を発揮し、このことは、FcγRIの結合ドメインとFcγ鎖の活性化ドメインとをいずれも含む単一のポリペプチドを外来性発現するT細胞にとって有利であった（後続の実施例の項の実施例1）。しかしながら、本発明者らは、この2種のアプローチを組み合わせ、FcγRIの結合ドメインとFcγ鎖の活性化ドメインとをいずれも含む第1のポリペプチド、及びホモ二量体を形成することができるFcγ鎖を含む第2の異なるポリペプチドを外来性発現させることによって、操作されたT細胞がより堅牢な、且つより低濃度でインビトロでの殺滅能を発揮したことを発見した（後続の実施例の項の実施例1）。重要なことに、これらの細胞はまた、インビボのマウス腫瘍モデルにおいて顕著な抗腫瘍効果も有していた（後続の実施例の項の実施例2）。

10

【0059】

したがって、本発明の一態様によると、Fc受容体共通γ鎖（FcRγ）のアミノ酸配列を各々含む少なくとも3種の細胞膜ポリペプチドを含む多重サブユニットタンパク質モジュールであって、アミノ酸配列が活性化シグナルを伝達可能であり、少なくとも3種のポリペプチドのうちの少なくとも1種だがすべてではないポリペプチドが、免疫細胞の標的となる細胞の細胞表面上に提示される標的を結合することができる細胞外結合ドメインを含み、それにより、標的への細胞外結合ドメインの結合のときに、活性化シグナルが前記多重サブユニットタンパク質モジュールを発現する免疫細胞において伝達される、多重サブユニットタンパク質モジュールが提供される。

20

【0060】

本明細書で使用する場合、「多重サブユニットタンパク質モジュール」という句は、少なくとも3種である複数のポリペプチドであって、標的細胞の細胞表面上に提示されるこれらの標的に対する細胞外ドメインの結合の際に、それらが多重サブユニットタンパク質モジュールを発現する免疫細胞において活性化シグナルを伝達する活性を有するものを指す。

30

【0061】

具体的な実施形態によると、多重サブユニットタンパク質モジュールは、3種、4つ、5つ、6つ、又はそれより多数のポリペプチドを含む。

【0062】

具体的な実施形態によると、多重サブユニットタンパク質モジュールは、3種のポリペプチドを含む。

【0063】

具体的な実施形態によると、複数のポリペプチドは、一緒に多重化される（又は集合する）（例えば、細胞外結合ドメインがその標的へ結合した後）。

40

【0064】

具体的な実施形態によると、当該少なくとも1種のポリペプチドは、1種のポリペプチドである。

【0065】

具体的な実施形態によると、当該少なくとも2種のポリペプチドは、2種のポリペプチドである。

【0066】

具体的な実施形態によると、当該少なくとも3種のポリペプチドは、3種のポリペプチ

50

ドである。

【0067】

本明細書で使用する場合、「FcRγ」と略記される「Fc受容体共通γ鎖」という句は、FCER1G遺伝子（Gene ID 2207）のポリペプチド発現産物を指す。具体的な実施形態によると、FcRγはヒトFcRγである。具体的な実施形態によると、FcRγタンパク質は、後続のGenBank、NP_004097（配列番号11）において提供されるような、ヒトタンパク質を指す。

【0068】

本明細書で使用する場合、「活性化シグナルを伝達することができるFc受容体共通γ鎖（FcRγ）のアミノ酸配列」という句は、細胞内ドメインを含み、且つFcリガンドへのFcγ受容体の結合のとき、Fcγ受容体を発現する細胞において少なくとも活性化シグナルを伝達する能力を維持する、完全長FcRγ若しくはその断片又はその相同体を指す。

10

【0069】

「アミノ酸（amino acid）」又は「アミノ酸（amino acids）」という用語は、20の天然アミノ酸と、例えば、ヒドロキシプロリン、ホスホセリン、及びホスホトレオニンを含む、しばしばインビボで翻訳後修飾された20の天然アミノ酸と、2-アミノアジピン酸、ヒドロキシリジン、イソデスモシン、ノルバリン、ノルロイシン、及びオルニチンを含むがこれらに限定されない他の稀なアミノ酸とを含むと理解されている。さらに、「アミノ酸」という用語は、D型アミノ酸及びL型アミノ酸をいずれも含む。

20

【0070】

具体的な実施形態によると、活性化シグナルを伝達することができるFc受容体共通γ鎖（FcRγ）のアミノ酸配列は、ITAMモチーフを含む。

【0071】

本明細書で使用する場合、「活性化する」又は「活性化」という用語は、細胞の増殖、成熟、サイトカイン産生、走化性、及び／又はエフェクター機能の誘導を結果として生じる、T細胞を刺激するプロセスを指す。

【0072】

活性化シグナルのシグナル伝達を決定する方法は、当該技術分野で周知であり、キナーゼ活性アッセイなどの酵素活性アッセイ、並びに、例えば、PCR、ウェスタンブロット、免疫沈降、及び免疫組織化学を用いた、シグナル伝達カスケードに関与する分子の発現を含むがこれらに限定されない。追加として、又は代替として、活性化シグナルの伝達を決定することは、T細胞の活性化又は機能を評価することによって成し遂げることができる。T細胞の活性化又は機能を評価する方法は、当該技術分野で周知であり、CFSE染色、MTT、アラマルブルー、BRDU、及びチミジン取込みなどの増殖アッセイと、CFSE染色、クロム放出、カルシウムAMなどの細胞毒性アッセイと、細胞内サイトカイン染色、ELISPOT、及びELISAなどのサイトカイン分泌アッセイと、フローサイトメトリーを用いたCD25、CD69、CD137、CD107a、PD1、及びCD62Lなどの活性化マーカーの発現とを含むが、これらに限定されない。

30

40

【0073】

具体的な実施形態によると、FcRγのアミノ酸配列は、完全長のFcRγを含む。

【0074】

したがって、本発明のいくつかの実施形態のポリペプチドは、完全長のFcRγを含む。

【0075】

具体的な実施形態によると、FcRγのアミノ酸配列は、細胞内ドメインを含み、且つ、FcリガンドへのFcγ受容体の結合のとき、Fcγ受容体を発現する細胞において少なくとも活性化シグナルを伝達する能力を維持する、その断片又はその相同体を含む。

【0076】

50

本発明のいくつかの実施形態のポリペプチドは、活性化シグナルを伝達することができる F c R γ の細胞内ドメインを含み、F c R γ の膜ドメイン及び細胞外ドメインを欠いている。

【0077】

具体的な実施形態によると、多重サブユニットタンパク質モジュールは、活性化シグナルを伝達することができる F c R γ の細胞内ドメインを含み、且つ F c R γ の膜ドメイン及び細胞外ドメインを欠いている、少なくとも1種のポリペプチドと、完全長の F c R γ を含む少なくとも2種のポリペプチドと、を含む。

【0078】

具体的な実施形態によると、多重サブユニットタンパク質モジュールは、活性化シグナルを伝達することができる F c R γ の細胞内ドメインを含み、且つ F c R γ の膜ドメイン及び細胞外ドメインを欠いている、単一のポリペプチドと、完全長の F c R γ を含む2種のポリペプチドと、を含む。

【0079】

具体的な実施形態によると、活性化シグナルを伝達することができる F c R γ のアミノ酸配列は、配列番号12又は39を含む。

【0080】

具体的な実施形態によると、活性化シグナルを伝達することができる F c R γ のアミノ酸配列は、配列番号12又は39からなる。

【0081】

相同体（天然の又は合成で／組換えで生成された）は、例えば、所望の活性を呈する（すなわち、細胞内ドメインを含み、且つ F c リガンドへの F c γ 受容体の結合のとき、F c γ 受容体を発現する細胞において少なくとも活性化シグナルを伝達する能力を維持する）配列番号11、12、又は39において提供されるポリペプチド又はその機能的断片と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、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95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%同一又は相同であり得、或いはそれをコードするポリヌクレオチド配列と少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、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95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、又は100%同一であり得る。

【0082】

相同体（天然の又は合成で／組換えで生成された）は、例えば、所望の活性を呈する（すなわち、細胞内ドメインを含み、且つ F c リガンドへの F c γ 受容体の結合のとき、F c γ 受容体を発現する細胞において少なくとも活性化シグナルを伝達する能力を維持する）配列番号11、12、又は39において提供されるポリペプチドと少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、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%、少なくとも99%、又は100%同一又は相同であり得、或いはそれをコードするポリヌクレオチド配列と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、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%、少なくとも99%、又は100%同一であり得る。

【0083】

配列同一性又は配列相同性は、B l a s t、C l u s t a l W、及び M U S C L E など

の何らかのタンパク質又は核酸配列アラインメントアルゴリズムを用いて決定することができる。

【0084】

相同体はまた、後述するように、保存的アミノ酸置換及び非保存的アミノ酸置換を含む、オルソログ変異体、欠失変異体、挿入変異体、又は置換変異体も指し得る。

【0085】

具体的な実施形態によると、FcRγのアミノ酸配列は、保存的及び／又は非保存的アミノ酸置換を含み得る。

【0086】

本明細書で使用する場合の「保存的置換」という用語は、ペプチドにおいて本来の配列中に存在するアミノ酸を、類似の立体特性を有する天然アミノ酸、非天然アミノ酸、又はペプチド模倣体によって置き換えることを指す。置き換えられる本来のアミノ酸の側鎖が極性又は疎水性のいずれかである場合、保存的置換は、（置き換えられるアミノ酸の側鎖と同じ立体特性を有することに加えて）極性又は疎水性でもある天然アミノ酸、非天然アミノ酸、又はペプチド模倣体部分によるものとする。

【0087】

天然アミノ酸が典型的にはそれらの特性によって群別されるので、天然アミノ酸による保存的置換は、本発明に従って、立体的に類似の非帯電アミノ酸による帯電アミノ酸の置き換えが保存的置換とみなされる事実を念頭に置いて、容易に決定することができる。

【0088】

非天然アミノ酸による保存的置換を生じるために、当該技術分野で周知のアミノ酸類似体（合成アミノ酸）を使用することも可能である。天然アミノ酸のペプチド模倣体は、当業者に公知の文献において十分に文書化されている。

【0089】

保存的置換をもたらすとき、置換するアミノ酸は、元のアミノ酸と同じ又は類似の官能基を側鎖に有するものとする。

【0090】

本明細書で使用する場合の「非保存的置換」という句は、親配列中に存在するアミノ酸を、異なる電気化学的特性及び／又は立体特性を有する別の天然アミノ酸又は非天然アミノ酸によって置き換えることを指す。したがって、置換アミノ酸の側鎖は、置換される未変性アミノ酸の側鎖よりも有意に大きく（又は小さく）あり得、且つ／又は置換されるアミノ酸とは有意に異なる電子特性を有する官能基を有し得る。このタイプの非保存的置換の例としては、アラニンのフェニルアラニン又はシクロヘキシルメチルグリシンへの置換、グリシンのイソロイシンへの置換、又はアスパラギン酸の $-NH-CH[(CH_2)_5-COOH]-COO-$ への置換がある。本発明の範囲の下に収まる当該非保存的置換は、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンを結合することができるアミノ酸配列を依然として構成するものである。

【0091】

本明細書で開示される多重サブユニットタンパク質モジュールの中に含まれる少なくとも3種の細胞膜ポリペプチドのうちの少なくとも1種だがすべてではないものは、免疫細胞の標的となる細胞の細胞表面上に提示される標的を結合することができる細胞外結合ドメインを含む。

【0092】

具体的な実施形態によると、本明細書で開示される多重サブユニットタンパク質モジュールの中に含まれる少なくとも3種の細胞膜ポリペプチドのうちの1種は、免疫細胞の標的となる細胞の細胞表面上に提示される標的を結合することができる細胞外結合ドメインを含む。

【0093】

したがって、具体的な実施形態によると、細胞膜ポリペプチドは、免疫細胞の標的となる細胞の細胞表面上に提示される標的を結合することができる細胞外結合ドメインを含む

10

20

30

40

50

。

【0094】

他の具体的な実施形態によると、細胞膜ポリペプチドは、免疫細胞の標的となる細胞の細胞表面上に提示される標的を結合することができる細胞外結合ドメインを欠いている。

【0095】

具体的な実施形態によると、多重サブユニットタンパク質モジュールは、FcRγのアミノ酸配列を各々含む3種の細胞膜ポリペプチドであって、細胞膜ポリペプチドのうちの1種がさらに、免疫細胞の標的となる細胞の細胞表面上に提示される標的を結合することができる細胞外結合ドメインを含み、その他2種の細胞膜ポリペプチドが、かかる細胞外結合ドメインを欠いている、3種の細胞膜ポリペプチドを含む。

10

【0096】

本明細書で使用する場合、「標的を結合することができる細胞外結合ドメイン」という句は、標的細胞上に提示される目的の標的に対する結合親和性（例えば、 10^{-4} nM未満）を有するタンパク質性部分を指す。結合ドメインの非限定例としては、さらに後述するように、受容体の結合ドメイン、リガンドの結合ドメイン、ホルモン（例えば、レプチン）の結合ドメイン、及び抗体等の抗原結合部分がある。

【0097】

結合を試験するためのアッセイは、当該技術分野で周知であり、フローサイトメトリー、バイオレイヤー干渉法Blitz（登録商標）アッセイ、HPLC、表面プラズモン共鳴（例えば、Biacore）を含むが、これらに限定されない。

20

【0098】

具体的な実施形態によると、細胞外結合ドメインは、細胞上に提示される標的を、 $K_d > 10^{-6}$ M、 $> 10^{-7}$ M、 $> 10^{-8}$ M、又は $> 10^{-9}$ Mで結合し、各々の可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。

【0099】

具体的な実施形態によると、細胞外結合ドメインは、細胞上に提示される標的を $K_d > 10^{-9}$ Mで結合する。

【0100】

本明細書で使用する場合、「免疫細胞の標的となる細胞」という句は、免疫細胞による認識のとき、本明細書で説明される多重サブユニットタンパク質モジュールを介して、免疫細胞の活性化を生じる、細胞を指す。

30

【0101】

具体的な実施形態によると、標的細胞は病的（罹患）細胞である。

【0102】

具体的な実施形態によると、標的細胞は癌性細胞である。

【0103】

本明細書で使用する場合、「提示される」という語は、標的細胞によって発現した標的（例えば、抗原）、又は標的細胞へ結合した（標的細胞によってまだ発現していない）標的（例えば、標的細胞によって発現した抗原を結合する抗体）を指す。

【0104】

具体的な実施形態によると、標的は、他の細胞（例えば、健常細胞）と比較して、標的細胞の細胞表面上で過剰提示されるか又は提示されるに過ぎない。

40

【0105】

細胞表面提示を決定する方法は、当該技術分野で周知であり、フローサイトメトリー及び免疫細胞化学を含むが、これらに限定されない。

【0106】

具体的な実施形態によると、結合ドメインは、抗体のものであり、標的は抗原である。

【0107】

本発明で使用する場合の「抗体」という用語は、完全な分子だけでなく、その機能的断片（抗原のエピトープへ結合することができる）をも含む。

50

【0108】

本明細書で使用する場合、「エピトープ」という用語は、抗体のパラトープが結合する抗原上の何らかの抗原性決定因子を指す。エピトープ性決定因子は通常、アミノ酸又は炭水化物側鎖など、分子の化学的に活性のある表面の群別からなり、通常、特異的な三次元構造の特徴、及び特異的な帯電特徴を有する。

【0109】

具体的な実施形態によると、抗体は、全抗体又は完全抗体である。

【0110】

具体的な実施形態によると、抗体は、Fcドメインを含む。

【0111】

具体的な実施形態によると、抗体は、抗体断片である。

【0112】

具体的な実施形態によると、抗体断片は、一本鎖、Fab断片、Fab'断片、及びF(ab')₂断片、Fd、Fcab、Fv、dsFv、scFv、ダイアボディ、ミニボディ、ナノボディ、Fab発現ライブラリ、又はHLAにより制限された様式で抗原のエピトープへ結合することができるVH及びVLなどの単ドメイン分子を含むがこれらに限定されない。

【0113】

本発明のいくつかの実施形態を実行するのに適した抗体断片は、免疫グロブリン軽鎖（本明細書では「軽鎖」と称される）の相補性決定領域（CDR）、免疫グロブリン重鎖（本明細書では「重鎖」と称される）の相補性決定領域、軽鎖の可変領域、重鎖の可変領域、軽鎖、重鎖、Fd断片、並びにFv、一本鎖Fv（scFv）、ジスルフィド安定化Fv（dsFv）、Fab、Fab'、及びF(ab')₂など、軽鎖及び重鎖の両方の可変領域の本質的に全体を含む抗体断片、又は抗体のFc領域を含む抗体断片を含む。

【0114】

具体的な実施形態によると、可変領域及び／又はCDRを構成する抗体におけるアミノ酸残基の同一性は、Kabataらの方法によって決定される（例えば、Kabata et al., 1992, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C.を参照されたい）。

【0115】

軽鎖及び重鎖の両方の可変領域全体又は本質的に可変領域全体を含む機能的抗体断片は、以下の通り定義される。具体的には、

(i) 2本の鎖として表される軽鎖の可変領域（VL）と重鎖の可変領域（VH）とからなる遺伝子操作された断片として定義される、Fv、

(ii) 遺伝子融合した一本鎖分子として適切なポリペプチドリンカーによって連結された、軽鎖の可変領域と重鎖の可変領域とを含む遺伝子操作された一本鎖分子である、一本鎖Fv（「scFv」）、

(iii) 遺伝子操作されたジスルフィド結合によって連結された、軽鎖の可変領域と重鎖の可変領域とを含む遺伝子操作された抗体である、ジスルフィド安定化Fv（「dsFv」）、

(iv) 完全な軽鎖と、重鎖の可変ドメイン及びCH1ドメインからなる重鎖のFd断片とを生じるよう、抗体全体をパイン酵素で処理することによって得ることができる、抗体分子の一価の抗原結合部分を含有する抗体分子の断片である、Fab、

(v) 抗体全体をペプシン酵素で処理し、続いて還元することによって得ることができる、抗体分子の一価の抗原結合部分を含有する抗体分子の断片である、Fab'（抗体1分子あたり、2種のFab'断片が得られる）、

(vi) 抗体全体をペプシン酵素で処理することによって得ることができる、抗体分子の一価の抗原結合部分を含有する抗体分子の断片である、F(ab')₂（すなわち、2種のジスルフィド結合によってまとまって保持されるFab'断片の二量体）、

(vii) 抗原に対する十分な親和性を呈する単一のVHドメイン又はVLドメインか

10

20

30

40

50

ら構成される、単一のドメイン抗体又はナノボディ、及び

(v i i i) 抗原結合能を抗体の F c 領域内へと導入することによって、抗原結合ドメインとして発達した抗体の F c 部分を含有する抗体分子の断片である、F c a b、である。

【0116】

具体的な実施形態によると、標的を結合することができる細胞外結合ドメインは、s c F vを含む。

【0117】

ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体並びにその断片を生成する方法は、当該技術分野で周知である（例えば、参照により本明細書に援用する Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988を参照されたい）。

【0118】

ヒト療法については、ヒト化抗体が好ましくは用いられることは理解されるであろう。

【0119】

具体的な実施形態によると、抗体はヒト化抗体である。ヒト化形態の非ヒト（例えば、マウス）抗体は、免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、又は非ヒト免疫グロブリン由来の最小限の配列を含有するその断片（F v、F a b、F a b'、F (a b')₂・s u b・2又は抗体の他の抗原結合性部分配列）のキメラ分子である。ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域（C D R）由来の残基が、所望の特異性、親和性、及び能力を有するマウス、ラット、又はウサギなどの非ヒト種の C D R 由来の残基（ドナー抗体）によって置き換えられたヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）を含む。いくつかの場合において、ヒト免疫グロブリンの F v フレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置き換えられる。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体においても導入された C D R 配列又はフレームワーク配列においても認められない残基も含み得る。概して、ヒト化抗体は、少なくとも1種の典型的には2種の可変ドメインのうちの実質的にすべてを含むであろうし、C D R 領域のすべて又は実質的にすべては、非ヒト免疫グロブリンの C D R 領域に対応し、F R 領域のすべて又は実質的にすべては、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列の F R 領域である。ヒト化抗体はまた最適に、免疫グロブリン定常領域（F c）の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンの F c の少なくとも一部を含む [Jones et al., *Nature*, 321:522-525(1986)、Riechmann et al., *Nature*, 332:323-329(1988)、及び Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596(1992)]。

【0120】

非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該技術分野で周知である。概して、ヒト化抗体は、非ヒトである源から当該ヒト化抗体内へと導入される1種以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基はしばしば、導入残基と称され、典型的には導入可変ドメインから持ち込まれる。ヒト化は本質的には、Winter 及び共同研究者の方法 [Jones et al., *Nature*, 321:522-525(1986)、Riechmann et al., *Nature* 332:323-327(1988)、Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536(1988)] に従って、ヒト抗体の C D R 又は C D R 配列を、齧歯類の対応する配列へと置換することによって実行することができる。したがって、かかるヒト化抗体は、キメラ抗体であり（米国特許第4,816,567号明細書）、完全なヒト可変ドメインよりも実質的に短い部分が、非ヒト種由来の対応する配列によって置換されている。実際、ヒト化抗体は典型的には、いくつかの C D R 残基及びおそらくいくつかの F R 残基が齧歯類抗体における類似の部位に由来する残基によって置換されたヒト抗体である。

【0121】

具体的な実施形態によると、抗体はヒト抗体である。

【0122】

ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリーを含む、当該技術分野で公知の様々な技術を用いても生成することができる [Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Bi*

10

20

30

40

50

ol., 227:381(1991)、Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581(1991)]。Coleら及びBoernerらの技術もまた、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用可能である (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p.77(1985)及びBoerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95(1991)]。同様に、ヒト抗体は、形質転換動物、例えば、内在性免疫グロブリン遺伝子が部分的に又は完全に不活性化されたマウス内へのヒト免疫グロブリンの座の導入によって作製することができる。負荷の際、遺伝子の再編成、集合、及び抗体レパートリーを含むすべての点においてヒトでみられるものと密接に類似しているヒト抗体の産生が観察される。このアプローチは、例えば、米国特許第5,545,807号明細書、同第5,545,806号明細書、同第5,569,825号明細書、同第5,625,126号明細書、同第5,633,425号明細書、同第5,661,016号明細書において、並びに以下の科学公表物、すなわち、Marks et al., Bio/Technology 10,:779-783(1992)、Lonberg et al., Nature 368:856-859(1994)、Morrison, Nature 368 812-13(1994)、Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-51(1996)、Neuberger, Nature Biotechnology 14:826(1996)、及びLonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13, 65-93(1995)において説明されている。

10

【0123】

具体的な実施形態によると、抗体は、病的細胞、例えば、癌性細胞によって過剰発現される又は癌性細胞のみが発現する抗原を結合する。

20

【0124】

公知の癌抗原についての非限定例としては、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-AS、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-AS、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-ALL、MAGE-A12、GAGE-I、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、BAGE-1、RAGE-1、LB33/MUM-1、PRAME、NAG、MAGE-Xp2 (MAGE-B2)、MAGE-Xp3 (MAGE-B3)、MAGE-Xp4 (MAGE-B4)、MAGE-CL/CT7、MAGE-C2、NY-ESO-1、LAGE-1、SSX-1、SSX-2 (HOM-MEL-40)、SSX-3、SSX-4、SSX-5、SCP-1及びXAGE、メラニン細胞分化抗原、p53、ras、CEA、MUCI、PMSA、PSA、チロシナーゼ、Melan-A、MART-1、gp100、gp75、アルファアクチニン-4、Bcr-Abl融合タンパク質、Casp-8、ベータカテニン、cdc27、cdk4、cdkn2a、coaxl、dek-can融合タンパク質、EF2、ETV6-AML1融合タンパク質、LDLR-フコシルトランスフェラーゼAS融合タンパク質、HLA-A2、HLA-ALL、hsp70-2、KIAA0205、Mart2、Mum-2、及び3、ネオ-PAP、クラスIミオシン、OS-9、pml-RARアルファ融合タンパク質、PTPRK、K-ras、N-ras、トリオースリン酸イソメラーゼ、GnTV、Herv-K-mel、NA-88、SP17、並びにTRP2-Int2、(MART-1)、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、エプスタイン・バーウイルス抗原、EBNA、ヒトパピローマウイルス (HPV) 抗原E6及びE7、TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、p185erbB2、p185erbB-3、c-met、nm-23H1、PSA、TAG-72-4、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、アルファ-フェトプロテイン、13HCG、BCA225、BTAA、CA 125、CA 15-3 (CA 27.29/BCAA)、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、CD68/KP1、C0-029、FGF-5、0250、Ga733 (EpCAM)、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB/170K、NYCO-I、RCASI、SDCCAG16、TA-90 (Mac-2結合タンパク質/シクロフィリンC関連タンパク質)、TAAL6、TAG72、TLP、TPS、チロシナーゼ関連タンパク質、TRP-1、又はTRP-2がある。

30

40

50

【0125】

具体的な実施形態によると、抗体は、EGFR、TRP-1、CD44、PD-L1、HER-2、MUC-1、MUC-16、CEA、又はEpCAMを結合する。

【0126】

具体的な実施形態によると、抗体は、EGFRを結合する。

【0127】

具体的な実施形態によると、抗体は、配列番号41を含む可変重鎖及び／又は配列番号42を含む可変軽鎖を含む抗EGFRである。

【0128】

具体的な実施形態によると、標的を結合することができる細胞外結合ドメインは、配列番号43を含む抗EGFR scFvを含む。 10

【0129】

他の具体的な実施形態によると、細胞外結合ドメインはリガンドのものであり、標的はリガンドの受容体である。癌性細胞を標的とするために使用することができるかかるリガンド-受容体対の非限定例としては、チロシンキナーゼ受容体のリガンド-チロシンキナーゼ受容体、EGF-EGFR、CD19リガンド-CD19、ヒアルロン酸-CD44がある。

【0130】

他の具体的な実施形態によると、細胞外結合ドメインは受容体のものであり、当該標的は受容体のリガンドである。癌性細胞を標的とするために使用することができるかかる受容体-リガンド対の非限定例としては、PD-1-PD-L1、CD137-CD137L、インテグリンアルファ2ベータ1-E-カドヘリンがある。 20

【0131】

具体的な実施形態によると、標的は、標的細胞へ結合している。したがって、例えば、標的は、標的細胞によって発現した抗原を結合することができる抗体又はFc融合体であり得る。

【0132】

したがって、具体的な実施形態によると、細胞外結合ドメインは、Fcγ受容体のものであり、標的は、標的細胞へ結合したFcリガンドである。

【0133】

本明細書で使用する場合、「Fcγ受容体の細胞外結合ドメイン」という句は、Fcリガンドを結合することができる細胞外ドメインを含むFcγ受容体の少なくとも1種の断片を指す。 30

【0134】

本明細書で使用する場合、「Fcリガンド」という用語は、抗体のものなどのFcドメインを指す。

【0135】

具体的な実施形態によると、Fcリガンドは、IgG Fcドメインである。

【0136】

本明細書で使用する場合、「Fcγ受容体」という用語は、IgG抗体のFcドメインに対する結合特異性を呈する細胞表面受容体を指す。Fcγ受容体の例としては、CD64A、CD64B、CD64C、CD32A、CD32B、CD16A、及びCD16Bがあるが、これらに限定されない。「Fcγ受容体」という用語はまた、機能的相同体（天然に又は合成で／組換えで生成）並びに／又は保存的アミノ酸置換及び非保存的アミノ酸置換を含む、所望の活性（すなわち、IgG Fc結合ドメインを結合する能力）を呈するFc受容体も包含する。 40

【0137】

具体的な実施形態によると、Fcγ受容体は、CD64である。

【0138】

本明細書で使用する場合、FcγRIとしても公知の「CD64」という用語は、Fc 50

G R 1 A 遺伝子、F C G R 1 B 遺伝子、又は F C G R 1 C 遺伝子（それぞれ G e n e I D 2 2 0 9、2 2 1 0、2 2 1 1）のポリペプチド発現産物を指し、C D 6 4 A、C D 6 4 B、及び C D 6 4 C を含む。完全長の C D 6 4 は、細胞外ドメインと、膜貫通ドメインと、細胞内ドメインとを含み、I g G（I g G 1 及び I g G 3）F c ドメインを少なくとも結合することができ、且つ F c R γ を動員することができる。F c R γ の結合及び動員を決定する方法は、当該技術分野で周知であり、本明細書で上述及び後述している。

【0139】

具体的な実施形態によると、C D 6 4 は、ヒト C D 6 4 である。具体的な実施形態によると、C D 6 4 タンパク質は、以下の U n i P r o t 番号 P 1 2 3 1 4 において提供されるようなヒト C D 6 4 A タンパク質を指す。

10

【0140】

具体的な実施形態によると、C D 6 4 タンパク質は、以下の U n i P r o t 番号 Q 9 2 6 3 7 において提供されるようなヒト C D 6 4 B タンパク質を指す。

【0141】

具体的な実施形態によると、C D 6 4 タンパク質は、以下の G e n B a n k 番号 X M _ 0 0 1 1 3 3 1 9 8 において提供されるようなヒト C D 6 4 C タンパク質を指す。

【0142】

完全長 C D 6 4 の細胞外ドメインは、N から C へと D 1 ~ D 3 と称される 3 種の免疫グロブリン（I g）ドメインを含む。

【0143】

具体的な実施形態によると、C D 6 4 の細胞外結合ドメインは、I g ドメイン D 1 ~ D 3 をすべて含む。

20

【0144】

具体的な実施形態によると、C D 6 4 の細胞外結合ドメインは、配列番号 1 4、4 4、又は 6 4 を含む。

【0145】

具体的な実施形態によると、C D 6 4 の細胞外結合ドメインは、配列番号 1 4、4 4、又は 6 4 からなる。

【0146】

具体的な実施形態によると、C D 6 4 の細胞外結合ドメインは、配列番号 1 4 又は 4 4 を含む。

30

【0147】

具体的な実施形態によると、C D 6 4 の細胞外結合ドメインは、配列番号 1 4 又は 4 4 からなる。

【0148】

具体的な実施形態によると、C D 6 4 の細胞外結合ドメインは、2 種の I g ドメイン D 1 ~ D 2 を含む。

【0149】

具体的な実施形態によると、C D 6 4 の細胞外結合ドメインは、配列番号 4 5 又は 4 6 を含む。

40

【0150】

具体的な実施形態によると、C D 6 4 の細胞外結合ドメインは、配列番号 4 5 又は 4 6 からなる。

【0151】

「C D 6 4 の細胞外結合ドメイン」という用語はまた、所望の活性（すなわち、I g G F c ドメインを結合すること）を呈する機能的相同体（天然に又は合成で／組換えで生成）も包含する。かかる相同体は例えば、配列番号 1 4、4 4、6 4、4 5、若しくは 4 6 のポリペプチドと少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 1 %、少なくとも 8 2 %、少なくとも 8 3 %、少なくとも 8 4 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 8 6 %、少なくとも 8 7 %、少なくとも 8 8 %、少なくとも 8 9 %、少なくと

50

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%、少なくとも 99%、若しくは 100% 同一若しくは相同であり、又はそれをコードするポリヌクレオチド配列と少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 81%、少なくとも 82%、少なくとも 83%、少なくとも 84%、少なくとも 85%、少なくとも 86%、少なくとも 87%、少なくとも 88%、少なくとも 89%、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%、少なくとも 99%、若しくは 100%、同一である。

【0152】

具体的な実施形態によると、CD64 の細胞外結合ドメインは、保存的アミノ酸置換及び非保存的アミノ酸置換を含み得る。

【0153】

具体的な実施形態によると、細胞外結合ドメインを含む少なくとも 1 種のポリペプチドは、標的への結合ドメインの結合のとき、多重サブユニットタンパク質モジュールの部分である Fc γ のアミノ酸配列を含む他のポリペプチドを動員することができるアミノ酸配列を含む。

【0154】

かかる動員は、標的への細胞外結合ドメインの結合のとき、複合体を形成し、多重サブユニットタンパク質モジュールを発現する免疫細胞において Fc γ のアミノ酸配列によって活性化シグナルの伝達を可能にするであろう。

【0155】

具体的な実施形態によると、動員は、多重サブユニットタンパク質モジュールの部分である少なくとも 3 種のポリペプチドのオリゴマー化、例えば、三量体化を指す。

【0156】

具体的な実施形態によると、他のポリペプチドを動員することができるアミノ酸配列は、他のポリペプチドを直接（すなわち、中間体ポリペプチドなしで）動員する。

【0157】

かかるアミノ酸配列は、当業者に周知であり、例えば、CD64、CD16A、CD16B、Fc ϵ RI β 、Fc α RI (CD89) などだがこれらに限定されないいくつかの Fc 受容体の膜貫通ドメイン及び／又は細胞質ドメインを含む。

【0158】

具体的な実施形態によると、他のポリペプチドを動員することができるアミノ酸配列は、Fc ϵ 受容体 (Fc ϵ R) のものではない。

【0159】

ポリペプチドの動員を決定する方法は、当該技術分野で周知であり、キナーゼ活性アッセイなどの酵素活性アッセイ、並びに、例えば、PCR、ウェスタンブロット、免疫沈降、及び免疫組織化学を用いたシグナル伝達カスケードに関与する分子の発現を含むが、これらに限定されない。追加として又は代替として、当該ポリペプチドの動員を決定することは、CFSE 染色、MTT、アラマルブルー、BRDU、及びチミジン取込みなどの増殖アッセイ、CFSE 染色、クロム放出、カルシウム AM などの細胞毒性アッセイ、並びにこれらに類するものなどだが、それらに限定されない、当該技術分野で周知の方法によって、細胞の活性化又は機能を評価することによって果たすことができる。動員を決定するための例示的な方法は、例えば、その内容が参照により本明細書に完全に援用する Kim, M.K., et al. (2003) Blood 101(11):4479-4484、及び Harrison, P.T., et al. (1995) Mol Membr Biol 12(4):309-312 において開示されている。

【0160】

具体的な実施形態によると、Fc γ のアミノ酸配列を含む他のポリペプチドを動員することができるアミノ酸配列は、Fc 受容体の膜貫通ドメインを含む。

【0161】

10

20

30

40

50

具体的な実施形態によると、FcRγのアミノ酸配列を含む他のポリペプチドを動員することができるアミノ酸配列は、Fcγ受容体の膜貫通ドメインを含む。

【0162】

具体的な実施形態によると、FcRγのアミノ酸配列を含む他のポリペプチドを動員することができるアミノ酸配列は、CD64の膜貫通ドメインを含む。

【0163】

具体的な実施形態によると、FcRγのアミノ酸配列を含む他のポリペプチドを動員することができるアミノ酸配列は、CD64の膜貫通ドメインからなる。

【0164】

具体的な実施形態によると、他のポリペプチドを動員することができるアミノ酸配列は、配列番号16又は47と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、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%、少なくとも99%又は100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0165】

具体的な実施形態によると、他のポリペプチドを動員することができるアミノ酸配列は、配列番号16又は47を含む。

【0166】

具体的な実施形態によると、他のポリペプチドを動員することができるアミノ酸配列は、配列番号16又は47からなる。

20

【0167】

具体的な実施形態によると、細胞外結合ドメインと他のポリペプチドを動員することができるアミノ酸配列とはいずれも、CD64のものである。

【0168】

この故に、具体的な実施形態によると、細胞外結合ドメインを含む少なくとも1種のポリペプチドは、CD64の細胞外ドメイン及び膜貫通ドメインを含む。

【0169】

具体的な実施形態によると、細胞外結合ドメインを含む少なくとも1種のポリペプチドは、配列番号18又は48と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、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%、少なくとも99%又は100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

30

【0170】

具体的な実施形態によると、細胞外結合ドメインを含む少なくとも1種のポリペプチドは、配列番号18又は48を含む。

【0171】

具体的な実施形態によると、細胞外結合ドメインを含む少なくとも1種のポリペプチドは、配列番号19又は49と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、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%、少なくとも99%又は100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

40

【0172】

具体的な実施形態によると、細胞外結合ドメインを含む少なくとも1種のポリペプチドは、配列番号19又は49を含む。

50

【0173】

具体的な実施形態によると、細胞外結合ドメインを含む少なくとも1種のポリペプチドは、配列番号19又は49からなる。

【0174】

具体的な実施形態によると、多重サブユニットモジュールにおけるポリペプチドのうちの少なくとも2種は、二量体を形成することができる。

【0175】

二量体は、ホモ二量体又はヘテロ二量体であり得る。

【0176】

具体的な実施形態によると、二量体はホモ二量体である。

10

【0177】

したがって、具体的な実施形態によると、FcRγのアミノ酸配列を含む少なくとも3種の細胞膜ポリペプチドのうちの少なくとも2種は、二量体化部分を含む。

【0178】

具体的な実施形態によると、細胞外結合ドメインを欠いているポリペプチドは、二量体を形成することができる。

【0179】

この故に、具体的な実施形態によると、FcRγのアミノ酸配列を含み且つ結合ドメインを含まないポリペプチドは、二量体化部分を含む。

【0180】

20

本明細書で使用する場合、「二量体化部分」という用語は、ポリペプチド二量体を形成することができるアミノ酸配列を指す。かかるアミノ酸は、例えば、チオール基間にジスルフィド結合の形成を可能にする少なくとも2種のシステイン残基を含むアミノ酸配列を含み得る。免疫沈降、サイズ排除クロマトグラフィー、高速タンパク質液体クロマトグラフィー（FPLC）、多角度光散乱（SEC-MALS）分析、SDS-PAGE分析、ナノDSF、酵母ツーハイブリッド系（例えば、RRS）、及びフローサイトメトリーを含むがこれらに限定されない、二量体化を決定する方法は、当該技術分野で公知である。

【0181】

本発明のいくつかの実施形態の二量体化部分がまた、多量体（例えば、少なくとも三量体）を形成することもできることは理解されるであろう。

30

【0182】

当該技術分野で公知のいずれかの公知の二量体化部分は、本発明の具体的な実施形態とともに使用することができる。本発明の具体的な実施形態とともに使用することができるかかる二量体化部分の非限定例としては、FcRγの膜貫通ドメインのアミノ酸配列がある。

【0183】

したがって、例えば、具体的な実施形態によると、二量体化部分は、配列番号21又は50と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、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%、少なくとも99%、又は100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

40

【0184】

具体的な実施形態によると、二量体化部分は、配列番号21又は50を含む。

【0185】

具体的な実施形態によると、二量体化部分は、配列番号21又は50からなる。

【0186】

本発明のいくつかの実施形態の多重サブユニットタンパク質モジュールは、以下の要素

50

の組み合わせを含む。すなわち、結合ドメインはFcγ受容体（例えば、CD64）のものであり、標的はFcリガンドである；当該結合ドメインを含む少なくとも1種のポリペプチドは、Fcγ受容体（例えば、CD64）の膜貫通ドメインを含む；及び当該FcRγのアミノ酸配列を含み且つ当該結合ドメインを含まないポリペプチドは、二量体化部分として当該FcRγの膜貫通ドメインのアミノ酸配列を含む。

【0187】

この故に、本発明の一態様によると、Fc受容体共通γ鎖（FcRγ）のアミノ酸配列を各々含む少なくとも3種の細胞膜ポリペプチドを含む多重サブユニットタンパク質モジュールであって、当該アミノ酸配列が活性化シグナルを伝達可能であり、当該少なくとも3種のポリペプチドのうちの少なくとも1種だがすべてではないポリペプチドが、CD64の膜貫通ドメインと、Fcリガンドを結合することができるCD64の細胞外結合ドメインとを含み、当該FcRγのアミノ酸配列を含み且つ当該結合ドメインを含まない当該ポリペプチドが、二量体化部分として当該FcRγの膜貫通ドメインのアミノ酸配列を含み、それにより、当該Fcリガンドへの当該細胞外結合ドメインの結合のとき、当該活性化シグナルが当該多重サブユニットタンパク質モジュールを発現する免疫細胞において伝達される、多重サブユニットタンパク質モジュールが提供される。

10

【0188】

具体的な実施形態によると、多重サブユニットタンパク質モジュールにおけるポリペプチドのうちの少なくとも1種は、配列番号23、51、又は71と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、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%、少なくとも99%、又は100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

20

【0189】

具体的な実施形態によると、多重サブユニットタンパク質モジュールにおけるポリペプチドのうちの少なくとも1種は、配列番号23、51、又は71を含む。

【0190】

具体的な実施形態によると、多重サブユニットタンパク質モジュールにおける少なくとも3種の細胞膜ポリペプチドのうちの少なくとも1種は、配列番号23、51、又は71からなる。

30

【0191】

具体的な実施形態によると、多重サブユニットタンパク質モジュールにおけるポリペプチドのうちの少なくとも2種は、配列番号23、51、又は71と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、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%、少なくとも99%、又は100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

40

【0192】

具体的な実施形態によると、多重サブユニットタンパク質モジュールにおけるポリペプチドのうちの少なくとも2種は、配列番号23、51、又は71を含む。

【0193】

具体的な実施形態によると、多重サブユニットタンパク質モジュールにおける少なくとも3種の細胞膜ポリペプチドのうちの少なくとも2種は、配列番号23、51、又は71からなる。

【0194】

本発明の具体的な実施形態によって包含される多重サブユニットタンパク質モジュール

50

の具体例は、

(i) 二量体におけるポリペプチドの各々が、活性化シグナルを伝達することができる FcR γ のアミノ酸配列 (例えば、FcR γ の細胞内ドメイン) と、二量体化部分 (例えば、FcR γ 膜貫通ドメイン) とを含む、ポリペプチド二量体、及び

(ii) 免疫細胞の標的となる細胞によって提示される標的を結合することができる細胞外結合ドメイン (例えば、CD64 細胞外ドメイン、s c F v) と、結合ドメイン標的の結合後にポリペプチド二量体を動員することができるアミノ酸配列 (例えば、CD64 膜貫通ドメイン) と、活性化シグナルを伝達することができる FcR γ のアミノ酸配列 (例えば、FcR γ 細胞内ドメイン) とを含む、ポリペプチド

を含み、それにより、標的への細胞外結合ドメインの結合のとき、活性化シグナルが多重サブユニットタンパク質モジュールを発現する免疫細胞において伝達される。

10

【0195】

具体的な実施形態によると、多重サブユニットタンパク質モジュールは、

(i) FcR γ 細胞内ドメインと FcR γ 膜貫通ドメインとを含む、ポリペプチド二量体、及び

(ii) CD64 細胞外ドメインと、CD64 膜貫通ドメインと、FcR γ 細胞内ドメインとを含む、ポリペプチドを含む。

【0196】

かかる多重サブユニットタンパク質モジュールの非限定例は、図2Bにおいて概略的に示されている。

20

【0197】

具体的な実施形態によると、(i) のポリペプチド二量体におけるポリペプチドの各々は、配列番号23、51、又は71を含み、(ii) のポリペプチドは、配列番号19又は49を含む。

【0198】

具体的な実施形態によると、(i) のポリペプチド二量体におけるポリペプチドの各々は、配列番号23、51、又は71からなり、(ii) のポリペプチドは、配列番号19又は49からなる。

【0199】

具体的な実施形態によると、多重サブユニットタンパク質モジュールは、

(i) 二量体におけるポリペプチドの各々が、FcR γ 細胞内ドメインと FcR γ 膜貫通ドメインとを含む、ポリペプチド二量体、及び

(ii) s c F v と、CD64 膜貫通ドメインと、FcR γ 細胞内ドメインとを含む、ポリペプチドを含む。

30

【0200】

かかる多重サブユニットタンパク質モジュールの非限定例は、図13に概略的に示されている。

【0201】

具体的な実施形態によると、(i) のポリペプチド二量体におけるポリペプチドの各々は、配列番号23、51、又は71を含み、(ii) のポリペプチドは、配列番号52を含む。

40

【0202】

具体的な実施形態によると、(i) のポリペプチド二量体におけるポリペプチドの各々は、配列番号23、51、又は71からなり、(ii) のポリペプチドは、配列番号52からなる。

【0203】

具体的な実施形態によると、本明細書に開示されるポリペプチドのいずれかは、共刺激シグナル伝達ドメインを含むことができる。

50

【0204】

具体的な実施形態によると、細胞外結合ドメインを含む少なくとも1種のポリペプチドは、共刺激シグナル伝達ドメインを含む。

【0205】

具体的な実施形態によると、細胞外結合ドメインを欠いているポリペプチドは、共刺激シグナル伝達ドメインを含む。

【0206】

他の具体的な実施形態によると、本明細書で開示されるポリペプチドは、共刺激シグナル伝達ドメインを含まない。

【0207】

具体的な実施形態によると、細胞外結合ドメインを含む少なくとも1種のポリペプチドは、共刺激シグナル伝達ドメインを含まない。

【0208】

具体的な実施形態によると、細胞外結合ドメインを欠いているポリペプチドは、共刺激シグナル伝達ドメインを含まない。

【0209】

本明細書で使用する場合、「共刺激シグナル伝達ドメイン」という句は、免疫細胞（例えば、T細胞）の活性化を結果的にもたらす二次的な刺激シグナルを伝達することができる共刺激分子のアミノ酸配列を指す。典型的には、共刺激シグナル伝達ドメインは、ITAMドメインを含まない。

【0210】

いずれかの公知の共刺激シグナル伝達ドメインは、本発明の具体的な実施形態とともに使用することができる。共刺激シグナル伝達ドメインの非限定例としては、4-1BB、CD28、OX40、ICOS、CD27、GITR、HVEM、TIM1、LFA1（CD11a）、CD2がある。本発明の具体的な実施形態のポリペプチドへ付加することができる共刺激ドメインの非限定的な概略表現は、図16に提供される。

【0211】

具体的な実施形態によると、共刺激シグナル伝達ドメインは、4-1BB及び／又はOX40である。

【0212】

共刺激シグナル伝達ドメインの具体的な配列の非限定例は、配列番号25（OX40）、配列番号26（4-1BB）において提供される。

【0213】

具体的な実施形態によると、本明細書で開示されるポリペプチドのいずれかは、サイトカイン受容体シグナル伝達ドメインを含むことができる。

【0214】

具体的な実施形態によると、細胞外結合ドメインを含む少なくとも1種のポリペプチドは、サイトカイン受容体シグナル伝達ドメインを含む。

【0215】

具体的な実施形態によると、細胞外結合ドメインを欠いているポリペプチドは、サイトカイン受容体シグナル伝達ドメインを含む。

【0216】

他の具体的な実施形態によると、本明細書で開示されるポリペプチドは、サイトカイン受容体シグナル伝達ドメインを含まない。

【0217】

具体的な実施形態によると、細胞外結合ドメインを含む少なくとも1種のポリペプチドは、サイトカイン受容体シグナル伝達ドメインを含まない。

【0218】

具体的な実施形態によると、細胞外結合ドメインを欠いているポリペプチドは、サイトカイン受容体シグナル伝達ドメインを含まない。

10

20

30

40

50

【0219】

本明細書で使用する場合、「サイトカイン受容体シグナル伝達ドメイン」という句は、T細胞の活性化を結果的に生じる刺激シグナルを伝達することができるサイトカイン受容体のアミノ酸配列を指す。

【0220】

いずれかの公知のサイトカイン受容体シグナル伝達ドメインは、本発明の具体的な実施形態とともに用いることができる。サイトカイン受容体シグナル伝達ドメインの非限定例としては、IL2受容体共通ガンマ鎖（例えば、配列番号27に提供されるような）であるIL2rg、myd88受容体のシグナル伝達ドメインであるToll/IL1受容体相同ドメイン（TIR）、TNF受容体細胞内ドメイン（例えば、配列番号28において提供されるような）、IL12-Rb1細胞内ドメイン（例えば、配列番号29において提供されるような）、IL12-Rb1細胞内ドメイン（例えば、配列番号30において提供されるような）、IL23受容体細胞内ドメイン（配列番号31において提供されるような）、IFN γ 受容体1細胞内ドメイン（配列番号32において提供されるような）、IFN γ 受容体2細胞内ドメイン（例えば、配列番号33において提供されるような）、IL2Rb細胞内ドメイン（例えば、配列番号34において提供されるような）、IL1受容体細胞内ドメイン（例えば、配列番号35において提供されるような）、IL1AcP受容体細胞内ドメイン（例えば、配列番号36において提供されるような）がある。

10

【0221】

本発明のいくつかの実施形態のポリペプチドへ付加することができるサイトカイン受容体シグナル伝達ドメインの非限定的な概略表現は、図16に提供される。

20

【0222】

本明細書で説明されるような単一ポリペプチドに含まれる構成要素のうちのいずれかは、リンカーを介して直接、互いに連結され得、各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【0223】

当該技術分野で公知のいずれかのリンカーは、本発明の具体的な実施形態とともに使用することができる。

【0224】

具体的な実施形態によると、リンカーは、天然の多重ドメインタンパク質に由来し得、又は例えば、その全体の内容が参照により本明細書により援用するChichili et al., (2013), Protein Sci.22(2):153-167、Chen et al., (2013), Adv Drug Deliv Rev.65(10):1357-1369において説明されるような、経験に基づくリンカーである。いくつかの実施形態において、リンカーは、その全体の内容が参照により本明細書により援用するChen et al., (2013), Adv Drug Deliv Rev.65(10):1357-1369、及びCrasto et al., (2000), Protein Eng.13(5):309-312において説明されるものなどのリンカー設計データベース及びコンピュータプログラムを用いて設計され得る。

30

【0225】

具体的な実施形態によると、リンカーは、合成リンカーである。

【0226】

具体的な実施形態によると、リンカーは、ポリペプチドである。

40

【0227】

使用することができるリンカーの非限定例としては、AS、GS、(GGGGS) $_n$ ($n=1\sim4$) (配列番号53)、GGGSGGGG (配列番号54)、(Gly) $_8$ (配列番号55)、(Gly) $_6$ (配列番号56)、(EAAAK) $_n$ ($n=1\sim3$) (配列番号57)、PAPAP (配列番号58)がある。

【0228】

具体的な実施形態によると、リンカーは、GGGSGGGSGGGGS (配列番号59) リンカーである。

【0229】

50

具体的な実施形態によると、抗体（例えば、s c F v）の軽鎖及び重鎖は、例えば、配列番号 59 のリンカーを介して連結される。

【0230】

具体的な実施形態によると、リンカーは、C D 6 4 の細胞外 I g D 3 ドメインを含む（例えば、配列番号 60 ~ 61）。

【0231】

具体的な実施形態によると、抗体（例えば、s c F v）は、例えば、配列番号 60 又は 61 のリンカーを介してポリペプチドの膜貫通ドメインへ融合する。

【0232】

具体的な実施形態によると、多重サブユニットタンパク質モジュールは、組換え D N A 技術によって生成される。

【0233】

したがって、本発明の一態様によると、多重サブユニットタンパク質モジュールをコードする少なくとも 1 種のポリヌクレオチドが提供される。

【0234】

これ故に、本発明の一態様によると、F c 受容体共通 γ 鎖（F c R γ ）のアミノ酸配列を各々含む少なくとも 3 種の細胞膜ポリペプチドを含む多重サブユニットタンパク質モジュールをコードする少なくとも 1 種のポリヌクレオチドであって、当該アミノ酸配列が活性化シグナルを伝達可能であり、少なくとも 3 種のポリペプチドのうちの少なくとも 1 種だがすべてではないポリペプチドが、免疫細胞の標的となる細胞の細胞表面上に提示される標的を結合することができる細胞外結合ドメインを含み、それにより、標的への細胞外結合ドメインの結合のときに、活性化シグナルが多重サブユニットタンパク質モジュールを発現する免疫細胞において伝達される、ポリヌクレオチドが提供される。

【0235】

本発明の追加の又は代替の態様によると、F c 受容体共通 γ 鎖（F c R γ ）のアミノ酸配列を各々含む少なくとも 3 種の細胞膜ポリペプチドを含む多重サブユニットタンパク質モジュールをコードする少なくとも 1 種のポリヌクレオチドであって、当該アミノ酸配列が活性化シグナルを伝達可能であり、当該少なくとも 3 種のポリペプチドのうちの少なくとも 1 種だがすべてではないポリペプチドが、C D 6 4 の膜貫通ドメインと、F c リガンドを結合することができる C D 6 4 の細胞外結合ドメインとを含み、当該 F c R γ のアミノ酸配列を含み且つ当該結合ドメインを含まない当該ポリペプチドが、二量体化部分として当該 F c R γ の膜貫通ドメインのアミノ酸配列を含み、それにより当該 F c リガンドへの当該細胞外結合ドメインの結合のとき、当該活性化シグナルが当該多重サブユニットタンパク質モジュールを発現する免疫細胞において伝達される、ポリヌクレオチドが提供される。

【0236】

本明細書で使用する場合、「ポリヌクレオチド」という用語は、R N A 配列、相補的ポリヌクレオチド配列（c D N A）、ゲノムポリヌクレオチド配列、及び／又は複合ポリヌクレオチド配列（例えば、上述の組み合わせ）の形態で単離及び提供される一本鎖又は二本鎖の核酸配列を指す。この用語は、天然の核酸分子（例えば、R N A 又は D N A）由来のポリヌクレオチド、天然の塩基、糖、及び共有結合性ヌクレオシド間結合（例えば、バックボーン）、並びに個々の天然部分と類似して機能する非天然部分を有する合成ポリヌクレオチド及び／又は合成オリゴヌクレオチドから構成される合成ポリヌクレオチド分子を含む。

【0237】

かかる修飾されたポリヌクレオチドは、いずれかのバックボーン、ヌクレオシド間結合、又は塩基において修飾を含み得る。修飾されたポリヌクレオチドは、具体的な実施形態に係る本来の形態よりも好ましく、その理由は、例えば、細胞の取り込みの増強、核酸標的に対する親和性の増強、及びヌクレアーゼの存在下での安定性の上昇など、望ましい特性のためである。

10

20

30

40

50

【0238】

具体的な実施形態によると、ポリヌクレオチドは、修飾されたポリヌクレオチド、例えば、修飾されたRNAである。

【0239】

具体的な実施形態によると、少なくとも1種のポリヌクレオチドは、CD64の細胞外ドメイン及び膜貫通ドメイン、並びにFcRγの細胞内ドメインを含む第1のポリペプチドをコードする核酸配列と、FcRγの細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞内ドメインを含む第2の異なるポリペプチドをコードする核酸配列とを含む。

【0240】

具体的な実施形態によると、本明細書で説明される少なくとも3種の細胞膜ポリペプチドは、単一のポリヌクレオチドによってコードされる。単一のポリヌクレオチドからの複数のポリペプチドの発現に関するさらなる説明は、本明細書で後述する。

10

【0241】

したがって、具体的な実施形態によると、少なくとも1種のポリヌクレオチドは、1種のポリヌクレオチドである。

【0242】

他の具体的な実施形態によると、いくつかのポリヌクレオチドは、多重サブユニットタンパク質モジュールのポリペプチドをコードするために使用される。

【0243】

具体的な実施形態によると、本明細書で説明される少なくとも3種の細胞膜ポリペプチドは、異なるポリヌクレオチドによってコードされる。

20

【0244】

具体的な実施形態によると、本明細書で開示される細胞外結合ドメインを含む少なくとも1種のポリペプチドは、第1のポリヌクレオチドによってコードされ、本明細書で開示される細胞外結合ドメインを含まないポリペプチドは、第2のポリヌクレオチドによってコードされる。

【0245】

したがって、具体的な実施形態によると、少なくとも1種のポリヌクレオチドは、少なくとも2種のポリヌクレオチドである。

【0246】

そのように具体的な実施形態に従って、少なくとも1種のポリヌクレオチドは、2種のポリヌクレオチドである。

30

【0247】

開示されたポリペプチドのいずれかを細胞において発現させるために、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、好ましくは細胞発現に適した核酸構築物へとライゲートされる。かかる核酸構築物は、核酸配列の発現を指向させるための少なくとも1種のシス作用性調節エレメントを含む。シス作用性調節配列は、ヌクレオチド配列の構成的発現を指向させるためのもの、及びある特定の条件下でのみヌクレオチド配列の誘導性発現を指向させるためのものを含む。したがって、例えば、細胞においてポリヌクレオチド配列の転写を構成的な又は誘導性の様式で指向させるためのプロモーター配列が、核酸構築物に含まれる。mRNAの場合、RNA源からの遺伝子発現が転写を必要としないので、本明細書で後述する転写に参与するプロモーター配列又は追加の配列は必要ない。

40

【0248】

本発明のいくつかの実施形態の核酸構築物（本明細書で「発現ベクター」とも称される）は、ベクターを複製及び組込みに適するようにする追加の配列を含む（例えば、シャトルベクター）。加えて、典型的なクローニングベクターはまた、転写及び翻訳開始配列、転写及び翻訳終結因子、並びにポリアデニル化シグナルも含有し得る。例として、かかる構築物は典型的には、5'LTR、tRNA結合部位、包装シグナル、第2の鎖のDNA合成の起源、及び3'LTR又はその一部分を含むであろう。

【0249】

50

本発明のいくつかの実施形態の核酸構築物は典型的には、細胞表面をポリペプチドの標的とするためのシグナル配列を含むか又はコードする。具体的な実施形態によると、この目的のためのシグナル配列は、哺乳動物シグナル配列又は、本発明のいくつかの実施形態のポリペプチド変異体のシグナル配列である。

【0250】

真核生物プロモーターは典型的には、2種のタイプの認識配列であるTATAボックス及び上流のプロモーターエレメントを含有する。TATAボックスは、転写開始部位から25～30塩基対上流に位置し、RNA合成を開始するためにRNAポリメラーゼを指向させることに関与すると考えられている。他の上流プロモーターエレメントは、転写が開始される速度を決定する。

【0251】

好ましくは、本発明のいくつかの実施形態の核酸構築物によって利用されるプロモーターは、形質転換される特定の細胞集団、すなわち、T細胞において活性がある。T細胞特異的プロモーターの例としては、リンパ系特異的プロモーター [Calame et al., (1988) Adv. Immunol. 43:235-275]、特にT細胞受容体のプロモーター [Winoto et al., (1989) EMBO J. 8:729-733] を含む。

【0252】

エンハンサーエレメントは、連結された相同プロモーター又は非相同プロモーターから転写を最大で1000倍刺激することができる。エンハンサーは、転写開始部位から下流又は上流に位置すると活性がある。ウイルスに由来する多くのエンハンサーエレメントは、広範な宿主範囲を有し、様々な組織において活性がある。例えば、SV40初期遺伝子エンハンサーは、多くの細胞タイプに適している。本発明のいくつかの実施形態に適した他のエンハンサー／プロモーターの組み合わせは、ポリオマウイルス由来のもの、ヒト又はマウスサイトメガロウイルス (CMV) 由来のもの、マウス白血病ウイルス、マウス又はラウス肉腫ウイルスなどのさまざまなレトロウイルス由来の長期反復由来のもの、及びHIV由来のものを含む。参照により本明細書に援用するEnhancers and Eukaryotic Expression, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1983を参照されたい。

【0253】

発現ベクターの構築において、プロモーターは好ましくは、それがその天然の設定において転写開始部位から離れているのと同じ距離だけ、非相同転写開始部位から離れて位置している。しかしながら、当該技術分野で公知のように、この距離にはいくばくかの変更が、プロモーター機能の喪失なく収容されることができる。

【0254】

ポリアデニル化配列はまた、mRNA翻訳の効率を高めるために、発現ベクターへ付加することもできる。2種の異なる配列エレメント、すなわち、ポリアデニル化部位から下流に位置するGU又はUの豊富な配列と、11～30個のヌクレオチドほど上流に位置する6つのヌクレオチドからなる高度に保存された配列AUAUAは、正確且つ効率的なポリアデニル化に必要とされている。本発明のいくつかの実施形態に適している終止シグナル及びポリアデニル化シグナルは、SV40由来のものを含む。

【0255】

ベクターはまた、転写終結因子 (例えば、ウシ成長ホルモン (BGH) 遺伝子由来)、原核生物においてエピソーム複製及び複製を許容するエレメント (例えば、SV40起源及びColE1又は当該技術分野で公知の他のもの)、並びに／又は選択を許容するエレメント (例えば、アンピシリン耐性遺伝子及び／又はゼオシンマーカー) も含み得る。

【0256】

ポリペプチド又はその部分の発現を評価するために、発現ベクターはまた、選択可能なマーカー遺伝子若しくはレポーター遺伝子のいずれか又はその両方を含有することで、ウイルスベクターによる移入又は導入を行おうとする細胞の集団から、発現細胞を容易に同定及び選別することもできる。或いは、選択可能なマーカーを別個のポリヌクレオチド上

10

20

30

40

50

に保持し、同時移入手順において使用してもよい。選択可能なマーカー及びレポーター遺伝子は両方とも、宿主細胞における発現を可能にするために適切な調節配列と隣接され得る。有用な選択可能なマーカーは、例えば、ネオ及びこれらに類するものなど、抗生物質耐性遺伝子を含む。レポーター遺伝子はおそらく、潜在的に移入された細胞を同定するために、及び調節配列の機能性を評価するために使用されるものとする。概して、レポーター遺伝子は、レシピエント生物若しくは組織に存在せず、又は当該生物若しくは組織によって発現せず、且つ、その発現がいくばくか容易に検出可能な特性、例えば、酵素活性によって明らかにされるポリペプチドをコードする、遺伝子である。レポーター遺伝子の発現は、ベクターが宿主細胞内へと導入された後の適切な時にアッセイされる。適切なレポーター遺伝子には、ルシフェラーゼ、ベクターガラクトシダーゼ、クロラムフェニコール

10

アセチルトランスフェラーゼ、分泌型アルカリホスファターゼをコードする遺伝子、又は緑色蛍光タンパク質遺伝子を含み得る（例えば、Ui-Tei et al., 2000 FEBS Letters 479:79-82）。

【0257】

すでに説明されたエレメントに加えて、本発明のいくつかの実施形態の発現ベクターは典型的には、クローン形成された核酸の発現レベルを高めるよう、又は組換えDNAを保持する細胞の同定を容易にするよう意図された他の特殊なエレメントを含有し得る。例えば、いくつかの動物ウイルスは、許容される細胞タイプにおけるウイルスゲノムのさらなる染色体複製を促進するDNA配列を含有する。これらのウイルスレプリコンを保有する

20

プラスミドは、適切な因子が、プラスミド上で保持されるか又は宿主細胞のゲノムとともに保持されるかのいずれかである遺伝子によって提供される限り、エピソームで複製される。

【0258】

ベクターは、真核生物レプリコンを含んでも又は含まなくてもよい。真核生物レプリコンが存在する場合、ベクターは、適切な選択可能なマーカーを用いて、真核細胞において増幅可能である。ベクターが、真核生物レプリコンを含まない場合、エピソーム増幅は不可能である。代わりに、組換えDNAが、操作された細胞のゲノム内へと組込まれ、当該細胞において、プロモーターが所望の核酸の発現を指向する。

【0259】

本発明のいくつかの実施形態の発現ベクターはさらに、例えば、内部リボソーム進入部位（IRES）又は自己開裂可能なペプチドなど、単一のmRNAからのいくつかのタンパク質の翻訳を可能にする追加のポリヌクレオチド配列、及びプロモーターキメラポリペプチドのゲノム組み込みのための配列を含むことができる。

30

【0260】

具体的な実施形態によると、本明細書で説明される多重サブユニットタンパク質モジュールのポリペプチドは、異なる構築物から発現する。

【0261】

他の具体的な実施形態によると、本明細書で説明される多重サブユニットタンパク質モジュールのポリペプチドは、多重シストロン性、例えば、ニシストロン性様式で単一の構築物から発現する。かかる発現は、内部リボソーム進入部位（IRES）配列及び／又は自己開裂可能なペプチド、例えば、2Aペプチド（例えば、P2A、T2A、E2A）をコードする核酸配列を用いるなどだがこれらに限定されない、当該技術分野で周知の方法によって達成することができる。

40

【0262】

この故に、具体的な実施形態によると、ポリヌクレオチド又は構築物は、自己開裂可能なペプチド（例えば、配列番号76～77において提供されるような、例えば、2Aスキップペプチド）を含む。

【0263】

具体的な実施形態によると、ポリヌクレオチド又は構築物は、CD64の細胞外ドメイン及び膜貫通ドメインとFcRγの細胞内ドメインとを含む第1のポリペプチドをコード

50

する核酸配列と、FcRγの細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞内ドメインを含む第2の異なるポリペプチドをコードする核酸配列との間に、自己開裂可能なペプチド、例えば、2AペプチドをコードするIRES配列又は核酸配列を含む。

【0264】

本発明の具体的な実施形態によって包含されるポリヌクレオチドの具体例は、5'から3'へと連続して、CD64の細胞外ドメインをコードする核酸配列と、CD64の膜貫通ドメインをコードする核酸配列と、FcRγの細胞内ドメインをコードする核酸配列と、2Aスキップペプチドをコードする核酸配列と、FcRγの細胞外ドメインをコードする核酸配列と、FcRγの膜貫通ドメインをコードする核酸配列と、FcRγの細胞内ドメインをコードする核酸配列とを含む。

10

【0265】

具体的な実施形態によると、CD64の細胞外ドメイン、CD64の膜貫通ドメイン、及びFcRγの細胞内ドメインは、翻訳段階で融合する。

【0266】

具体的な実施形態によると、FcRγの細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞内ドメインは、翻訳段階で融合する。

【0267】

本発明のいくつかの実施形態の多重サブユニットタンパク質モジュールをコードする核酸構築物の非限定例は、配列番号4、63、及び38において提供される。

【0268】

発現ベクターに含まれる個々のエレメントが、さまざまな立体配置において配置することができることは理解されるであろう。例えば、エンハンサーエレメント、プロモーター、及びこれらに類するもの、並びにポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列でさえ、「ヘッド・トゥ・テール」配置することができ、さかさまの補体として、又は相補的な立体配置で、逆平行鎖として存在し得る。かかるさまざまな立体配置が、発現ベクターの非コードエレメントで生じる可能性はより高いが、発現ベクター内でのコード配列の代替的な立体配置も想定される。

20

【0269】

本発明の実施形態を生成する様々な方法が採用され得る。例えば、ベクターは、細胞、例えば、免疫細胞、例えば、T細胞又はNK細胞内へと直接導入することができる。具体的な実施形態によると、ベクターは、クローニングベクター又は発現ベクターであり、例えば、1種以上のプラスミド（例えば、発現プラスミド、クローニングベクター、ミニサークル、ミニベクタ、二重微小染色体）、レトロウイルスベクター構築物、及びレンチウイルスベクター構築物を含むがこれらに限定されないベクターである。具体的な実施形態によると、ベクターは、哺乳動物、例えばヒトT細胞において、ポリヌクレオチドを発現することができる。具体的な実施形態によると、ベクターは、哺乳動物、例えばヒトNK細胞においてポリヌクレオチドを発現させることができる。

30

【0270】

哺乳動物発現ベクターについての例としては、Invitrogenから入手可能であるpcDNA3、pcDNA3.1(+/-)、pGL3、pZeoSV2(+/-)、pSecTag2、pDisplay、pEF/myc/cyto、pCMV/myc/cyto、pCR3.1、pSinRep5、DH26S、DHBB、pNMT1、pNMT41、pNMT81、Promegaから入手可能であるpCI、Stratageneから入手可能であるpMbac、pPbac、pBK-RSV、及びpBK-CMV、Clontechから入手可能であるpTRES、並びにこれらの誘導体があるが、これらに限定されない。

40

【0271】

レトロウイルスなどの真核生物ウイルス由来の調節エレメントを含有する発現ベクターもまた使用することができる。SV40ベクターとしては、pSVT7及びpMT2がある。ウシパピローマウイルス由来のベクターとしては、pBV-1MTHAがあり、エプ

50

スタイン・バーウイルス由来のベクターとしては、pHEBO、及びp205がある。他の例示的なベクターとしては、pMSG、pAV009/A⁺、pMTO10/A⁺、pMAMneo-5、バキュロウイルスpDSVE、及びSV-40初期プロモーター、SV-40後期プロモーター、メタロチオネインプロモーター、マウス乳癌ウイルスプロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、ポリヘドリンプロモーター、又は真核細胞における発現に有効と示された他のプロモーターの指令の下でタンパク質の発現を許容するいずれかの他のベクターがある。

【0272】

上述で説明したように、ウイルスは、進化した非常に特殊化した感染性作用因子であり、多くの場合、宿主防御機構を回避する。典型的には、ウイルスは、特定の細胞型において感染し増殖する。ウイルスベクターの標的指向特異性は、所定の細胞型を特異的に標的とするためにその天然の特異性を利用し、それにより、宿主細胞内へと組換え遺伝子を導入する。T細胞を形質転換するのに適したベクターを選択することができることは十分に、当業者の能力のうちであり、このようなものとして、選択考慮の一般的な説明は本明細書では提供されない。

【0273】

「感染させること」及び「導入すること」という用語は、本明細書では相互交換可能に使用され、ウイルスベクターの使用を経た細胞の改変を指す。

【0274】

組換えウイルスベクターは、本発明のいくつかの実施形態のポリペプチドの発現に有用であり、その理由は、水平感染及び標的指向特異性などの利点を提供するからである。水平感染は、例えば、レトロウイルスの生活環において固有であり、単一の感染細胞が多くの後代ビリオンを生じ、それが出芽して、隣接細胞を感染させるプロセスである。その結果、大きな面積が迅速に感染し、そのほとんどは元のウイルス粒子によって初期的に感染していなかった。このことは、感染性作用因子が娘後代を経てのみ広がる垂直感染とは対照的である。水平に広がることのできないウイルスベクターもまた生成することができる。この特徴は、所望の目的が、特定の遺伝子を、限局数の標的細胞のみへと導入することになる場合に有用であり得る。

【0275】

様々な方法が、本発明のいくつかの実施形態の発現ベクターを細胞内へと導入するために使用することにできる。かかる方法は概して、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md.(1989)中のSambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989,1992)、Chang et al., Somatic Gene Therapy, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995)、Vega et al., Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995)、Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass.(1988)、及びGilboa et al. [Biotechniques 4(6):504-512, 1986]において説明されており、例えば、一過性移入、リポフェクション、電気穿孔法、及び組換えウイルスベクターを用いた感染を含む。加えて、陽性-陰性選別法については、米国特許第5,464,764号明細書及び同第5,487,992号明細書を参照されたい。

【0276】

本明細書で説明される構築物は、目的の細胞内への様々な技術による導入に適している。例えば、発現ベクターは、宿主細胞、例えば、哺乳動物細胞、細菌細胞、酵母細胞、又は昆虫細胞内へと当該技術分野のいずれかの方法によって容易に導入することができる。例えば、発現ベクターは、宿主細胞内へと物理的、化学的、又は生物学的な手段によって転移することができる。ポリヌクレオチドを宿主細胞内へと導入するための物理的な方法としては、リン酸カルシウム沈降、リポフェクション、粒子衝突、微量注射、電気穿孔法、及びこれらに類するものなどがある。ベクター及び／又は外来性核酸を含む細胞を作製するための方法は、当該技術分野で周知である。例えば、Sambrook et al, 2012, M

10

20

30

40

50

OLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, volumes 1-4, Cold Spring Harbor Press, NY) を参照されたい。宿主細胞内へのポリヌクレオチドの導入のための代替法は、例えば、リポフェクタミン (Life Technologies) を用いたリポフェクションである。目的のポリヌクレオチドを宿主細胞内へと導入するための生物学的方法としては、DNA ベクター及び RNA ベクターの使用がある。ウイルスベクター、特にレトロウイルスベクターは、遺伝子を哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞内へと挿入するための最も広く使用される方法となってきた。他のウイルスベクターは、レンチウイルス、ポックスウイルス、単純ヘルペスウイルス I 型、アデノウイルス、及びアデノ随伴ウイルス、並びにこれらに類するものに由来し得る。

【0277】

ポリヌクレオチドを宿主細胞内へと導入するための化学的手段としては、マクロ分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズなどのコロイド分散系、並びに水中油エマルジョン、ミセル、混合ミセル、及びリポソームを含む脂質ベースの系がある。インビトロ及びインビボでの送達ベヒクルとして使用するための例示的なコロイドの系は、リポソーム (例えば人工膜小胞) である。標的指向型ナノ粒子又は他の適切なミクロン未満の大きさの送達系を用いたポリヌクレオチドの送達など、核酸の最先端の標的指向送達に関する他の方法が利用可能である。非ウイルス性送達系が利用される場合、例示的な送達ベヒクルはリポソームである。脂質製剤の使用は、核酸を宿主細胞内へと (インビトロ、エクスピボ、又はインビボで) 導入するために企図されている。追加の又は代替の実施形態によると、核酸は、脂質と会合していてもよい。脂質と会合した核酸は、リポソームの水性内部に封入され得るか、リポソームの脂質二重層内に散在し得るか、リポソーム及びオリゴヌクレオチドの両方と会合している連結分子を介してリポソームへ結合し得るか、リポソーム内に捕捉され得るか、リポソームと複合体を形成し得るか、脂質を含有する溶液中に分散し得るか、脂質と混合し得るか、脂質と組み合わせられ得るか、脂質中の懸濁液として含有され得るか、ミセルを含有する若しくはミセルと複合体を形成し得るか、あるいは脂質と会合し得る。脂質、脂質/DNA、又は脂質/発現ベクターが会合した組成物は、溶液中のいずれの特定の構造にも制限されない。例えば、これらは、二層構造中に、ミセルとして、又は「崩壊した」構造で存在し得る。これらはまた単純に、溶液中に散在し得る、大きさ又は形状が均一ではない凝集体を形成する可能性があり得る。脂質は、天然の又は合成の脂質であり得る脂肪性物質である。例えば、脂質としては、細胞質中で天然である脂肪滴と、脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコール、及びアルデヒドなど、長鎖脂肪族炭化水素及び長鎖脂肪族炭化水素の誘導体を含有する化合物の類がある。

【0278】

使用に適した脂質は、商業源から得ることができる。例えば、ジミリスチルホスファチジルコリン (「DMPC」) は、ミズーリ州、セントルイス、Sigma 社から入手することができ、ジセチルホスファート (「DCP」) は、K & K Laboratories (ニュウヨーク州、プレインビュー) から得ることができ、コレステロール (「Choi」) は、Calbiochem-Behring から入手することができ、ジミリスチルホスファチジルグリセロール (「DMPG」) 及び他の脂質は、Avanti Polar Lipids, Inc. (アラバマ州、バーミングハム) から入手し得る。クロロホルム又はクロロホルム/メタノール中の脂質のストック溶液は、約 -20°C で保存することができる。クロロホルムは、メタノールよりも容易に蒸発するので、唯一の溶媒として使用される。「リポソーム」は、封入された脂質二重層又は凝集体の生成によって形成される様々な単一の及び多重層の脂質ベヒクルを包含する包括的な用語である。リポソームは、リン脂質二重層膜と、内側の水性媒体とを備えた小胞構造を有することを特徴とすることができる。多層リポソームは、水性媒体によって分離された多重脂質層を有する。これらは、リン脂質が過剰の水溶液中に懸濁された時に自発的に形成される。脂質構成エレメントは、閉じた構造の形成の前に自己再配列をし、水及び溶解した溶質を脂質二重層の間に捕捉する (Ghosh et al, 1991 Glycobiology 5:505-10)。しかしながら、溶液中に通常の小胞構造とは異なる構造を有する組成物もまた包含される。例えば、

10

20

30

40

50

脂質は、ミセル構造を仮定し得、又は単に脂質分子からなる不均一な凝集体として存在し得る。また、リポフェクタミン-核酸複合体も企図される。

【0279】

実施形態の方法は、細胞に、本明細書で説明される多重サブユニットタンパク質モジュール及び、いくつかの場合においてはトランスポザーゼをコードするDNAを移入することに関し得る。かかる細胞移入法はまた、電気穿孔法など、非常に効率的な移入法も採用し得る。例えば、核酸は、ヌクレオフェクション装置を用いて細胞内へと導入され得る。かかる方法が採用される場合、移入ステップは好ましくは、細胞に、遺伝子毒性を生じることができ、且つ／又は処置される対象においてウイルス配列を含有する細胞に対する免疫応答につながる可能性があるウイルスを感染させる又は導入することを包含しない。かかる方法は細胞に多重サブユニットタンパク質モジュールをコードする発現ベクターを移入することを包含し得る。広範な範囲の構築物及びそのための発現ベクターは当該技術分野で公知であり、本明細書でさらに詳述される。例えば、いくつかの実施形態において、発現ベクターは、プラスミド、線形発現ベクター、又はエピソームなどのDNA発現ベクターである。いくつかの実施形態において、このベクターは、ポリヌクレオチドの発現を容易にする配列、かかるプロモーター、エンハンサー、ポリAシグナル、及び／又は1種以上のイントロンなど、追加の配列を含む。いくつかの実施形態において、コード配列は、トランスポゾン配列によって隣接され、それによりトランスポザーゼの存在で、コード配列が移入された細胞のゲノム内へと組込むことができる。

10

【0280】

いくつかの方法は、細胞にさらにトランスポザーゼを移入して、当該トランスポザーゼが、移入を受けた細胞のゲノム内へのコード配列の組込みを容易にすることを必要とし得る。いくつかの実施形態において、トランスポザーゼは、DNA発現ベクターとして提供される。言い換えれば、トランスポザーゼは、その長期の発現が遺伝形質転換細胞において生じないように、発現可能なRNA又はタンパク質として提供される。例えば、トランスポザーゼは、mRNA（例えば、キャップとポリA尾部とを含むmRNA）として提供され得る。いずれかのトランスポザーゼ系が、実施形態に従って使用され得る。しかしながら、いくつかの態様において、トランスポザーゼは、サケ類型Tc1様トランスポザーゼ（SB）である。例えば、トランスポザーゼは、いわゆる「眠りの森の姫」トランスポザーゼであり得、例えば、参照により本明細書に援用する米国特許第6,489,458号明細書を参照されたい。ある特定の態様において、トランスポザーゼは、高い酵素活性をもつ遺伝子操作された酵素である。トランスポザーゼのいくつかの具体例としては、SB10トランスポザーゼ、SB11トランスポザーゼ、又はSB100×トランスポザーゼがあるが、これらに限定されない（例えば、参照により本明細書に援用されるMates et al., 2009）。例えば、方法は、SB10トランスポザーゼ、SB11トランスポザーゼ、又はSB100×トランスポザーゼをコードするmRNAを用いた細胞の電気穿孔法を包含することができる。

20

30

【0281】

外来性核酸を宿主細胞内へと導入するために、あるいは本発明の実施形態へ細胞を曝露するために使用される方法に関係なく、宿主細胞において組換えDNA配列の存在を確認するために、様々なアッセイが行われ得る。かかるアッセイとしては、例えば、サザンブロット法、ノザンブロット法、RT-PCR、及びPCRなど、当業者に周知の「分子生物学的」アッセイ、特定のペプチドを例えば免疫学的手段（ELISA及びウェスタンブロット）によって、又は本発明の範囲内に収まる作用因子を同定するための、本明細書に説明されるアッセイによって、特定のペプチドの有無を検出するなどの「生化学的」アッセイがある。

40

【0282】

多重サブユニットタンパク質モジュールを発現させるための細胞の改変は、アデノウイルス、レンチウイルス、単純ヘルペスウイルスI型、又はアデノ随伴ウイルス（AAV）及び脂質ベースの系など、ウイルス構築物又は非ウイルス構築物を用いて行われ得る。遺

50

伝子の脂質介在性転移に有用な脂質は、例えば、DOTMA、DOPE、及びDC-Cholである [Tonkinson et al., Cancer Investigation, 14(1):54-65(1996)]。

【0283】

ウイルス感染による核酸の導入は、リポフェクション及び電気穿孔法など、他の方法を上回るいくつかの利点を提供し、その理由は、より高い形質導入効率がウイルスの感染性質により得ることができるからである。例えば、遺伝子療法における使用に好ましい構築物は、ウイルス、最も好ましくはアデノウイルス、AAV、レンチウイルス、又はレトロウイルスである。レトロウイルス構築物などのウイルス構築物は、少なくとも1種の転写プロモーター／エンハンサー又は座定義エレメント、又は選択的スプライシング、核RNAの輸出、又はメッセンジャーの翻訳後修飾などの他の手段によって遺伝子発現を制御する他のエレメントを含む。かかるベクター構築物はまた、ウイルス構築物内に既に存在しているのではない限り、包装シグナル、末端反復 (LTR) 又はその部分、並びに使用されるウイルスに適切なプラス鎖及びマイナス鎖のプライマー結合部位も含む。加えて、かかる構築物は典型的には、細胞内の所望の部位へポリペプチドを標的指向させるためのシグナル配列を含む。具体的な実施形態によると、シグナル配列は、膜輸送配列を含む。かかる配列は、当該技術分野で公知である。非限定例は、配列番号72～73及び配列番号74～75において提供される。場合により、構築物はまた、ポリアデニル化を標的指向するシグナル、並びに1種以上の制限部位及び翻訳終結配列も含み得る。例として、かかる構築物は典型的には、5' LTR、tRNA結合部位、包装シグナル、第2の鎖のDNA合成起点、及び3' LTR又はその一部分を含むであろう。カチオン性脂質、ポリリジン、及びデンドリマーなど、非ウイルス性である他のベクターを使用することができる。

10

20

【0284】

本発明の具体的な実施形態はまた、本明細書で説明される多重サブユニットタンパク質モジュールを発現する免疫細胞、及びその作製方法も企図する。

【0285】

したがって、本発明の一態様によると、少なくとも1種のポリヌクレオチドを発現するよう遺伝子操作された免疫細胞が提供される。

【0286】

本発明の追加の又は代替の態様によると、少なくとも1種のポリヌクレオチドを発現する免疫細胞が提供される。

30

【0287】

本発明の追加の又は代替の態様によると、Fc受容体共通γ鎖 (FcRγ) のアミノ酸配列を各々含む少なくとも3種の細胞膜ポリペプチドを含む多重サブユニットタンパク質モジュールをコードする少なくとも1種のポリヌクレオチドを発現する免疫細胞であって、当該アミノ酸配列が活性化シグナルを伝達可能であり、当該少なくとも3種のポリペプチドのうちの少なくとも1種だがすべてではないポリペプチドが、免疫細胞の標的となる細胞の細胞表面上に提示される標的を結合することができる細胞外結合ドメインを含み、それにより、当該標的への当該細胞外結合ドメインの結合のとき、当該活性化シグナルが免疫細胞において伝達される、免疫細胞が提供される。

【0288】

40

本発明の追加の又は代替の態様によると、Fc受容体共通γ鎖 (FcRγ) のアミノ酸配列を各々含む少なくとも3種の細胞膜ポリペプチドを含む多重サブユニットタンパク質モジュールをコードする少なくとも1種のポリヌクレオチドを発現する免疫細胞であって、当該アミノ酸配列が活性化シグナルを伝達可能であり、当該少なくとも3種のポリペプチドのうちの少なくとも1種だがすべてではないポリペプチドが、CD64の膜貫通ドメインと、Fcリガンドを結合することができるCD64の細胞外結合ドメインとを含み、当該FcRγのアミノ酸配列を含み且つ当該結合ドメインを含まない当該ポリペプチドが、二量体化部分として当該FcRγの膜貫通ドメインのアミノ酸配列を含み、それにより、当該Fcリガンドへの当該細胞外結合ドメインの結合のとき、当該活性化シグナルが免疫細胞において伝達される、免疫細胞が提供される。

50

【0289】

本発明の追加の又は代替の態様によると、多重サブユニットタンパク質モジュールを発現する免疫細胞が提供される。

【0290】

本発明の追加の又は代替の態様によると、Fc受容体共通γ鎖（FcRγ）のアミノ酸配列を各々含む少なくとも3種の細胞膜ポリペプチドを含む多重サブユニットタンパク質モジュールを発現する免疫細胞であって、当該アミノ酸配列が活性化シグナルを伝達可能であり、当該少なくとも3種のポリペプチドのうちの少なくとも1種だがすべてではないポリペプチドが、免疫細胞の標的となる細胞の細胞表面上に提示される標的を結合することができる細胞外結合ドメインを含み、それにより、当該標的への当該細胞外結合ドメインの結合のとき、当該活性化シグナルが免疫細胞において伝達される、免疫細胞が提供される。

10

【0291】

本発明の追加の又は代替の態様によると、Fc受容体共通γ鎖（FcRγ）のアミノ酸配列を各々含む少なくとも3種の細胞膜ポリペプチドを含む多重サブユニットタンパク質モジュールを発現する免疫細胞であって、当該アミノ酸配列が活性化シグナルを伝達可能であり、少なくとも3種のポリペプチドのうちの少なくとも1種だがすべてではないポリペプチドが、CD64の膜貫通ドメインと、Fcリガンドを結合することができるCD64の細胞外結合ドメインとを含み、当該FcRγのアミノ酸配列を含み且つ当該結合ドメインを含まない当該ポリペプチドが、二量体化部分として当該FcRγのアミノ酸配列の膜貫通ドメインのアミノ酸配列を含み、それにより、当該Fcリガンドへの当該細胞外結合ドメインの結合のとき、当該活性化シグナルが免疫細胞において伝達される、免疫細胞が提供される。

20

【0292】

本発明の追加の又は代替の態様によると、免疫細胞において多重サブユニットタンパク質モジュールを発現する方法であって、当該多重サブユニットタンパク質モジュールの発現を可能にする条件下で、免疫細胞内へと少なくとも1種のポリヌクレオチドを導入することを含む、方法が提供される。

【0293】

かかる条件は例えば、適切な温度（例えば、37℃）、雰囲気（例えば、空気＋5％CO₂）、pH、照明、媒体、添加物、及びこれらに類するものであり得る。

30

【0294】

他の具体的な実施形態によると、導入は、インビボで実施する。

【0295】

具体的な実施形態によると、導入は、インビトロ又はエクスピボで実施する。

【0296】

免疫細胞を得る方法は、当該技術分野で周知である。したがって、例えば、PBMCは、全血を対象から採血し、抗凝固薬（例えば、ヘパリン又はクエン酸塩）を含有する容器内に収集すること、及びアフエレーシスによって単離することができる。他の具体的な実施形態によると、免疫細胞は、病理学的性質と関係した細胞を含む組織から得られる。組織試料を対象から得るための方法は、当該技術分野で周知であり、例えば、生検、手術、又は剖検、及びその単一細胞懸濁液を調製することを含む。その後、具体的な実施形態によると、免疫細胞の少なくとも1種の型を末梢血から、又は単一細胞懸濁液から精製する。白血球分離、沈降、密度勾配遠心分離（例えば、ficoll）、遠心分離型懸濁分離、分画、例えば赤血球の化学的溶解（例えば、ACKによる）、細胞表面マーカーを用いた特定の細胞型の選別（例えば、Invitrogen、Stemcell Technologies、Cellpro、Advanced Magnetix、又はMiltenyi Biotecから入手可能であるような、例えば、FACS選別装置又は磁気細胞分離技術を使用）、及び特異的抗体を用いた、又は陰性選別（例えば、磁気細胞分離技術、FACS選別装置及び／又は捕捉ELISA標識を使用）に基づいた親和性ペー

40

50

スの精製による、根絶（例えば、殺滅）などの方法による特定の細胞型の枯渇など、免疫細胞を精製するための、当業者に公知の方法及び試薬がいくつかある。かかる方法は、例えば、THE HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, Volumes 1 to 4 (D.N. Weir 編) 及び FLOW CYTOMETRY AND CELL SORTING (A. Radbruch 編、Springer Verlag, 2000) において説明されている。

【0297】

具体的な実施形態によると、免疫細胞はヒト細胞である。

【0298】

具体的な実施形態によると、免疫細胞は健常対象のものである。

【0299】

具体的な実施形態によると、免疫細胞は病理学的性質（例えば、癌）に罹患している対象のものである。

【0300】

本発明の具体的な実施形態とともに使用することができる免疫細胞の非限定例としては、T細胞、NK細胞、NKT細胞、B細胞、マクロファージ、単球、樹状細胞（DC）、及び顆粒球がある。

【0301】

具体的な実施形態によると、免疫細胞は、T細胞、NK細胞、及びNKT細胞からなる群から選択される。

【0302】

具体的な実施形態によると、免疫細胞は、内因性FcRγを発現しないものであり、これはフローサイトメトリー又はウェスタンブロットによって決定される。

【0303】

具体的な実施形態によると、免疫細胞はT細胞である。

【0304】

本発明の追加の又は代替の態様によると、ポリペプチド複合体を発現するT細胞であって、ポリペプチド複合体が少なくとも第1のポリペプチドと第2のポリペプチドとを含み、当該第1及び第2のポリペプチドが翻訳段階で融合しておらず、第1のポリペプチドがFc受容体共通γ鎖（FcRγ）のアミノ酸配列を含み、当該アミノ酸配列が活性化シグナルを伝達することができ且つホモ二量体を形成することができ、当該第2のポリペプチドが

(i) Fcリガンドを結合することができるFcγ受容体（例えば、CD64）の細胞外リガンド結合ドメインと、

(ii) 活性化シグナルを伝達することができるアミノ酸FcRγと、

(iii) 当該第1のポリペプチドを動員することができるアミノ酸配列（例えば、Fc受容体の膜貫通ドメイン）と、
を含み、それにより、当該Fcγ受容体の当該細胞外リガンド結合ドメインへの当該Fcリガンドの結合のとき、当該活性化シグナルが伝達される、T細胞が提供される。

【0305】

本明細書で使用する場合、「ポリペプチド複合体」という句は、複数の少なくとも2種の個別の（すなわち、翻訳段階で融合していない）ポリペプチドであって、Fcγ受容体の細胞外ドメインのFcリガンドへの結合のとき、ポリペプチド複合体を発現する免疫細胞においてそれらがまとめて活性化シグナルを伝達する活性を有するものを指す。

【0306】

本明細書で使用する場合、「T細胞」という用語は、CD3+で分化したリンパ球を指し、T細胞受容体（TCR）+は、CD4+又はCD8+のいずれかの表現型を有する。

【0307】

具体的な実施形態によると、T細胞は、エフェクター細胞である。

【0308】

本明細書で使用する場合、「エフェクターT細胞」という用語は、例えば、サイトカイ

10

20

30

40

50

ンを産生することによって他の免疫細胞を活性化する若しくは指向する、又は細胞毒性活性、例えば、CD4+、Th1/Th2、CD8+細胞毒性Tリンパ球を有する、T細胞を指す。

【0309】

具体的な実施形態によると、T細胞は、CD4+ T細胞である。

【0310】

他の具体的な実施形態によると、T細胞は、CD8+ T細胞である。

【0311】

具体的な実施形態によると、T細胞は、 $\alpha\beta$ T細胞である。

【0312】

具体的な実施形態によると、T細胞は、 $\gamma\delta$ T細胞である。

【0313】

具体的な実施形態によると、T細胞は、ナイーブT細胞である。

【0314】

具体的な実施形態によると、T細胞は、記憶T細胞である。記憶T細胞の非限定例としては、CD3+/CD4+/CD45RA-/CCR7-表現型を有するエフェクター記憶CD4+ T細胞、CD3+/CD4+/CD45RA-/CCR7+表現型を有する中央記憶CD4+ T細胞、CD3+/CD8+/CD45RA-/CCR7-を有するエフェクター記憶CD8+ T細胞、CD3+/CD8+/CD45RA-/CCR7+表現型を有する中央記憶CD8+ T細胞がある。

【0315】

具体的な実施形態によると、T細胞は、増殖性細胞である。

【0316】

本明細書で使用する場合、「増殖性細胞」という句は、CFSE染色、MTS、アラマルブルー、BRDU、チミジン取込み、及びこれらに類するものなどだがそれらに限定されない細胞増殖アッセイによって定義されるような刺激のときに増殖するT細胞を指す。

【0317】

具体的な実施形態によると、T細胞は、増殖性CD4+ T細胞である。

【0318】

具体的な実施形態によると、T細胞は、増殖性CD8+ T細胞である。

【0319】

具体的な実施形態によると、T細胞は、病的（罹患した、例えば、癌）細胞に特異的なT細胞受容体を発現しており、すなわち、非病的細胞と比較して、病的細胞が過剰発現している又は病的細胞のみが発現している、MHCに関連して提示される抗原を認識する。癌抗原の非限定例はさらに、本明細書で上述に説明されている。

【0320】

具体的な実施形態によると、T細胞は、病的細胞（例えば、癌性細胞）に特異的なT細胞受容体を内在的に発現している。

【0321】

具体的な実施形態によると、T細胞は、T細胞受容体（TCR）を導入された操作されたT細胞である。

【0322】

本明細書で使用する場合、「TCRを導入された」又は「TCRを発現するよう遺伝子操作された」という句は、MHCに関連して提示される所望の抗原に対する特異性を有するT細胞からの可変性の α 鎖及び β 鎖のクローン化を指す。TCRを導入する方法は当該技術分野で公知であり、例えば、Nicholson et al. Adv Hematol. 2012; 2012:404081、Wang and Riviere Cancer Gene Ther. 2015 Mar;22(2):85-94、及び Lamers et al, Cancer Gene Therapy (2002) 9, 613-623において開示されている。具体的な実施形態によると、TCRは、病的細胞に対して特異的である。

【0323】

10

20

30

40

50

具体的な実施形態によると、T細胞は、キメラ抗原受容体（CAR）を導入された操作されたT細胞である。

【0324】

本明細書で使用する場合、「CARを導入された」又は「CARを発現するよう遺伝子操作された」という句は、キメラ抗原受容体（CAR）をコードする核酸配列のクローン化であって、CARが抗原認識部分とT細胞活性化部分とを含む、クローン化を指す。キメラ抗原受容体（CAR）は、T細胞シグナル伝達又はT細胞活性化ドメインへ連結された抗体（例えば、一本鎖可変断片（scFv））の抗原結合ドメインを含有する人工的に構築された複合タンパク質又はポリペプチドである。CARを導入する方法は、当該技術分野で公知であり、例えば、Davila et al. Oncoimmunology. 2012 Dec 1;1(9): 1577-1583、Wang and Riviere Cancer Gene Ther. 2015 Mar;22(2):85-94、Maus et al. Blood. 2014 Apr 24;123(17):2625-35、Porter DL The New England journal of medicine. 2011, 365(8):725-733、Jackson HJ, Nat Rev Clin Oncol. 2016; 13(6):370-383、及びGloberson-Levin et al. Mol Ther. 2014;22(5):1029-1038において開示されている。具体的な実施形態によると、抗原認識部分は、病的細胞に特異的である。

10

【0325】

他の具体的な実施形態によると、T細胞は、CARを導入されていない（すなわち、発現していない）。

【0326】

20

具体的な実施形態によると、免疫細胞は、NK細胞を含む。

【0327】

本明細書で使用する場合、「NK細胞」という用語は、CD16+ CD56+及び／又はCD57+ TCR-表現型を有する分化したリンパ球を指す。NKは、特異的細胞溶解酵素の活性化によって「自己の」MHC／HLA抗原を発現し損ねている細胞へ結合しこれを殺滅する能力、NK活性化受容体に対するリガンドを発現する腫瘍細胞又は他の罹患細胞を殺滅する能力、及び免疫応答を刺激又は阻害するサイトカインと呼ばれるタンパク質分子を放出する能力を特徴とする。

【0328】

具体的な実施形態によると、免疫細胞は、NKT細胞を含む。

30

【0329】

本明細書で使用する場合、「NKT細胞」という用語は、半非変異体 $\alpha\beta$ T細胞受容体を発現するが、典型的にはNK1.1などのNK細胞と会合している様々な分子マーカーも発現するT細胞の特殊化した集団を指す。NKT細胞には、NK1.1+細胞及びNK1.1-細胞、並びにCD4+細胞、CD4-細胞、CD8+細胞、及びCD8-細胞がある。NKT細胞上のTCRは、MHC I様分子であるCD1dによって提示される糖脂質抗原を認識する点で独特である。NKT細胞は、炎症又は免疫寛容のいずれかを促進するサイトカインを産生する能力により、保護作用又は有害作用のいずれかを有し得る。

【0330】

40

具体的な実施形態によると、免疫細胞は、B細胞を含む。

【0331】

本明細書で使用する場合、「B細胞」という用語は、B細胞受容体（BCR）+、CD19+、及び又はB220+表現型を有するリンパ球を指す。B細胞は、特異的抗原を結合し且つ液性応答を誘発する能力を特徴とする。

【0332】

具体的な実施形態によると、免疫細胞は、食作用細胞を含む。

【0333】

本明細書で使用する場合、「食作用細胞」という用語は、食作用ができる細胞を指し、専門の食作用細胞と非専門の食作用細胞の両方を含む。食作用を解析する方法は、当該技

50

術分野で周知であり、例えば、死滅アッセイ、フローサイトメトリー及び／又は顕微鏡評価（生細胞撮像、蛍光顕微鏡、共焦点顕微鏡、電子顕微鏡）がある。具体的な実施形態によると、食作用細胞は、単球、樹状細胞（DC）、及び顆粒球からなる群から選択される。

【0334】

具体的な実施形態によると、免疫細胞は単球を含む。

【0335】

具体的な実施形態によると、「単球」という用語は、循環単球と、組織中のマクロファージ（単核食細胞とも称される）との両方を指す。

【0336】

具体的な実施形態によると、単球は、マクロファージを含む。典型的には、マクロファージの細胞表面表現型は、CD14、CD40、CD11b、CD64、F4／80（マウス）／EMR1（ヒト）、リゾチームM、MAC-1／MAC-3、及びCD68を含む。

【0337】

具体的な実施形態によると、単球は、循環単球を含む。典型的には、循環単球の細胞表面表現型は、CD14及びCD16（例えば、CD14++CD16-、CD14+CD16++、CD14++CD16+）を含む。

【0338】

具体的な実施形態によると、免疫細胞は、DCを含む。

【0339】

本明細書で使用する場合、「樹状細胞（DC）」という用語は、リンパ組織及び非リンパ組織においてみられる形態学的に同様の細胞型の種々の集団のいずれかのメンバーを指す。DCは、専門の抗原提示細胞の1クラスであり、HLA制限T細胞を感作させるための高い能力を有する。DCには例えば、形質細胞様樹状細胞、骨髄系樹状細胞（未成熟樹状細胞及び成熟樹状細胞を含む）、ランゲルハンス細胞、指状嵌入細胞、濾胞樹状細胞がある。樹状細胞は、機能によって、又は表現型によって、特に細胞表面表現型によって認識され得る。これらの細胞は、細胞表面上のペルメア様突起を有する特有の形態学的特性、中～高レベルの表面HLAクラスII発現、及びT細胞、特にナイーブT細胞に対して抗原を提示する能力を特徴とする（Steinman R, et al., Ann. Rev. Immunol. 1991; 9:271-196を参照されたい）。典型的には、DCの細胞表面表現型としては、CD1a+、CD4+、CD86+、又はHLA-DRがある。DCという用語は、未成熟DC及び成熟DCの両方を包含する。

【0340】

具体的な実施形態によると、免疫細胞は、顆粒球を含む。

【0341】

本明細書で使用する場合、用語「顆粒球」は、その細胞質中の顆粒の存在を特徴とする多形核白血球を指す。

【0342】

具体的な実施形態によると、顆粒球は、好中球を含む。

【0343】

具体的な実施形態によると、顆粒球は、マスト細胞を含む。

【0344】

具体的な実施形態によると、免疫細胞は、例えば、液体窒素の温度で、いずれかの段階で将来の使用のために長期間（例えば、数か月間、数年間）、新鮮に単離され、保存され、例えば、凍結保存される（すなわち、冷凍される）ことができ、及び細胞株であり得る。

【0345】

凍結保存の方法は通常、当業者に公知であり、例えば、国際公開第2007054160号パンフレット及び同第2001039594号パンフレット、並びに米国特許出願公

10

20

30

40

50

開第 2 0 1 2 0 1 4 9 1 0 8 号明細書において開示されている。

【 0 3 4 6 】

具体的な実施形態によると、免疫細胞は、細胞バンク又は細胞保管所又は細胞保存施設において保存することができる。

【 0 3 4 7 】

結果として、本教示の具体的な実施形態はさらに、病的細胞に対して免疫細胞を活性化することが有利に働く疾患、例えば、過剰増殖性疾患、免疫抑制と関連する疾患、及び感染のための養子免疫細胞療法のための源としてだがこれに限定されない、本明細書に開示される免疫細胞（例えば、T細胞）及び方法の使用を示唆している。

【 0 3 4 8 】

したがって、本発明の一態様によると、本明細書で開示される免疫細胞は、養子細胞療法における使用のためである。

【 0 3 4 9 】

本発明の具体的な実施形態により使用される免疫細胞は、自己又は非自己であり得、当該免疫細胞は、同系又は非同系であり得、対象に対して同種異系又は異種であり得、各々の可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【 0 3 5 0 】

具体的な実施形態によると、細胞は、当該対象に対して同系である。

【 0 3 5 1 】

具体的な実施形態によると、細胞は、当該対象に対して非同系である。

【 0 3 5 2 】

具体的な実施形態によると、本明細書に説明される免疫細胞は、対象への投与前にエクスピボで培養され、増殖され、及び／又は活性化される。

【 0 3 5 3 】

免疫細胞を培養、増殖、及び活性化する方法は、当業者に周知である。例えば、T細胞は、抗CD3抗体、抗CD28抗体、抗CD3及び抗CD28被覆ビーズ（Miltenyi Biotecから得られるCD3CD28 MACSiBeadsなど）、IL-2、植物凝集素、抗原負荷型抗原提示細胞（APC、例えば、樹状細胞）、ペプチド負荷組換えMHCなどだが、これらに限定されない1種以上の分子の存在下、エクスピボで活性化され得る。

【 0 3 5 4 】

本発明の具体的な実施形態の免疫細胞が、免疫細胞の標的となる細胞の細胞表面上で提示される標的への細胞外結合ドメインの結合のときに活性化されるので、当該免疫細胞は、細胞表面上に標的を提示する病的細胞と関連する疾患を処置するために使用され得るがこれに限定されない。

【 0 3 5 5 】

したがって、本発明の一態様によると、病的細胞と関連する疾患の処置を必要とする対象において当該疾患を処置する方法であって、対象に、治療有効量の本明細書で開示される免疫細胞を投与することを含み、当該病的細胞がその細胞表面上に当該標的を提示し、当該投与により対象において疾患を処置する、方法が提供される。

【 0 3 5 6 】

本発明の追加の又は代替の態様によると、病的細胞と関連する疾患の処置を必要とする対象に対する前記疾患の処置における使用のための本明細書で開示される免疫細胞であって、病的細胞がその細胞表面上に前記標的を提示する、免疫細胞が提供される。

【 0 3 5 7 】

本発明の追加の又は代替の態様によると、病的細胞と関連する疾患の処置を必要とする対象において当該疾患を処置する方法であって、対象へ、各々がFc受容体共通γ鎖（FcRγ）のアミノ酸配列を含む少なくとも3種の細胞膜ポリペプチドを含む多重サブユニットタンパク質モジュールを発現する治療有効量のT細胞を投与することを含み、当該アミノ酸配列が活性化シグナルを伝達可能であり、当該少なくとも3種のポリペプチドのう

10

20

30

40

50

ちの少なくとも1種だがすべてではないポリペプチドが、当該病的細胞上に提示される標的に結合することができる細胞外結合ドメインを含み、それにより、当該標的へ当該細胞外結合ドメインが結合したとき、当該活性化シグナルがT細胞に伝達され、それにより対象における疾患を処置する、方法が提供される。

【0358】

本発明の追加の又は代替の態様によると、病的細胞と関連する疾患の処置を必要とする対象において当該疾患を処置するT細胞であって、Fc受容体共通γ鎖（FcRγ）のアミノ酸配列を各々が含む少なくとも3種の細胞膜ポリペプチドを含む多重サブユニットタンパク質モジュールを発現する治療有効量のT細胞であって、当該アミノ酸配列が活性化シグナルを伝達可能であり、当該少なくとも3種のポリペプチドのうちの少なくとも1種

10

【0359】

本発明の具体的な実施形態の免疫細胞は、病的細胞の細胞表面に結合した標的へ細胞外結合ドメインが結合したときに活性化されるので、当該免疫細胞は、病的細胞を結合するように指向された標的、すなわち、非病的細胞と比較して、病的（例えば、癌性）細胞によって過剰発現されるか又は病的細胞にのみ発現される抗原を結合する標的、を含む治療用組成物と組み合わせて、病的細胞と関連する疾患を処置するために使用することができるが、これに限定されない。例えば、細胞外結合ドメインがCD64由来であり、標的がFcリガンドであるとき、治療用組成物は、病的細胞によって過剰発現されるか又は病的細胞によってのみ発現される抗原を結合するように指向されるFcドメイン（例えば、抗体）を含む。

20

【0360】

したがって、具体的な実施形態によると、対象は、当該標的を含む治療用組成物で処置され、当該治療用組成物は、当該病的細胞に対して特異的である。

【0361】

具体的な実施形態によると、Fcドメインを含む治療用組成物は、病的細胞に対して特異的である。

30

【0362】

具体的な実施形態によると、方法は、当該対象へ、当該標的を含む治療有効量の治療用組成物を投与することを含み、当該治療用組成物は、当該病的細胞に対して特異的である。

【0363】

本発明の追加の又は代替の態様によると、対象における疾患を処置する方法であって、病的細胞と関連する疾患の処置を必要とする対象において当該疾患を処置する方法であって、対象へ治療有効量の本明細書で開示される免疫細胞、及び当該標的を含む治療用組成物を投与することを含み、当該治療用組成物が当該病的細胞に対して特異的である、方法が提供される。

40

【0364】

本発明の追加の又は代替の態様によると、病的細胞と関連する疾患の処置を必要とする対象に対する疾患の処置における使用のためのものである、本明細書で開示される免疫細胞と、当該病的細胞に対して特異的な、当該標的を含む治療用組成物が提供される。

【0365】

本明細書で使用する場合、「対象」又は「～を必要とする対象」という用語は、いずれの年齢又は性別の哺乳動物、好ましくはヒトを含む。対照は、健常であり得るか又は病理学的性質、例えば、癌の予備的な兆候を示し得る。この用語はまた、この病理学的性質を発症するリスクがある個体も包含する。

【0366】

50

本明細書で使用する場合、「処置する」という用語は、疾患又は障害（例えば、癌）の有害作用を治癒する、逆転させる、減弱させる、軽減する、最小限にする、抑制する、又は停止させることを指す。当業者は、様々な方法論及びアッセイが病理学的性質の発症を評価するために使用することができること、並びに同様に、さまざまな方法論及びアッセイが、後述で論議されるように、病理学的性質（例えば、悪性腫瘍）の低減、寛解、又は退行を評価するために使用され得る。

【0367】

本明細書で使用する場合、「予防すること」という用語は、疾患についてのリスクがあり得るが、疾患に罹患しているとはまだ診断されていない対象において疾患、障害又は容態が発症しないようにすることを指す。

【0368】

本明細書で使用する場合、「病的細胞と関連する疾患」という句は、病的細胞がこの疾患の発症及び／又は進行を駆動することを意味する。

【0369】

具体的な実施形態によると、この疾患に対して、対象の免疫細胞を活性化することが有益に働き得る。

【0370】

本明細書で使用する場合、「免疫細胞を活性化することが利益に働き得る疾患」という句は、対象の免疫応答活性が疾患の症状を少なくとも緩和させる又は発症を遅滞させるのに十分であり得るが、理由に関わらず、対象の免疫応答の活性が最適よりも下回っている疾患を指す。

【0371】

本発明のいくつかの実施形態によって処置される疾患の非限定例としては、過剰増殖性疾患、免疫抑制と関連する疾患、投薬（例えば、mTOR阻害薬、カルシニューリン阻害薬、ステロイド）及び感染によって生じる免疫抑制がある。

【0372】

具体的な実施形態によると、疾患は感染を含む。

【0373】

本明細書で使用する場合、「感染」又は「感染症」という用語は、病原体によって誘発される疾患を指す。病原体の具体例としては、ウイルス性病原体、細菌性病原体、例えば、細胞内マイコバクテリア病原体（例えば、結核菌（*Mycobacterium tuberculosis*）など）、細胞内細菌性病原体（例えば、リステリア・モノサイトゲネス（*Listeria monocytogenes*）など）、又は細胞内原生動物病原体（例えば、リーシュマニア（*Leishmania*）及びトリパノソーマ（*Trypanosoma*）など）がある。

【0374】

感染症を発症させるウイルス性病原体の具体的な種類としては、レトロウイルス、シロコウイルス、パルボウイルス、パポウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、イリドウイルス、ポックスウイルス、ヘパドナウイルス、ピコルナウイルス、カリシウイルス、トガウイルス、フラビウイルス、レオウイルス、オルトミクソウイルス、パラミクソウイルス、ラブドウイルス、ブニヤウイルス、コロナウイルス、アレナウイルス、及びフィロウイルスがあるが、これらに限定されない。

【0375】

本発明の具体的な実施形態により処置され得るウイルス感染の具体例としては、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）誘発性後天性免疫不全症候群（AIDS）、インフルエンザ、ライノウイルス感染症、ウイルス性髄膜炎、エプスタイン・バーウイルス（EBV）感染症、A型、B型、又はC型肝炎ウイルス感染症、麻疹、パピローマウイルス感染症／疣贅、サイトメガロウイルス（CMV）感染症、単純ヘルペスウイルス感染症、黄熱症、エボラウイルス感染症、恐水病などがあるが、これらに限定されない。

【0376】

10

20

30

40

50

具体的な実施形態によると、疾患は、過剰増殖性疾患を含む。

【0377】

具体的な実施形態によると、過剰増殖性疾患は、硬化症、線維症、特発性肺線維症、乾癬、全身性強皮症／強皮症、原発性胆汁性胆管炎、原発性硬化性胆管炎、肝線維症、放射線誘発性肺線維症の予防、骨髄線維症、又は後腹膜線維症を含む。

【0378】

他の具体的な実施形態によると、過剰増殖性疾患は、癌を含む。

【0379】

したがって、具体的な実施形態によると、病的細胞は、癌性細胞である。

【0380】

本発明のいくつかの実施形態によって処置され得る癌は、いずれかの固形腫瘍若しくは非固形腫瘍（液性癌を含む）、癌転移、及び／又は前癌であり得る。

【0381】

具体的な実施形態によると、癌は、悪性癌である。

【0382】

癌の例としては、癌腫、芽細胞腫、肉腫、及びリンパ腫があるが、これらに限定されない。かかる癌のより詳細な例としては、消化管の腫瘍（結腸癌、直腸癌、大腸癌（colorectal carcinoma）、大腸癌（colorectal cancer）、大腸腺腫、遺伝性非ポリポーシス大腸腫瘍1型、遺伝性非ポリポーシス大腸腫瘍2型、遺伝性非ポリポーシス大腸腫瘍3型、遺伝性非ポリポーシス大腸腫瘍6型、大腸癌、遺伝性非ポリポーシス大腸腫瘍7型、小腸癌及び／若しくは大腸癌、食道癌、食道癌随伴性肝臓、胃癌、膵癌、膵内分泌腫瘍）、子宮内膜癌、隆起性皮膚線維肉腫、胆嚢癌、胆道腫瘍、前立腺癌、前立腺腺癌、腎癌（例えば、ウィルムス腫瘍2型又は1型）、肝癌（例えば、肝芽腫、肝細胞癌（hepatocellular carcinoma）、肝細胞癌（hepatocellular cancer））、膀胱癌、胎児性横紋筋肉腫、胚細胞腫瘍、絨毛性腫瘍、精巣生殖細胞腫瘍、卵巣・子宮・上皮性卵巣の未熟奇形腫、仙尾骨腫瘍、絨毛癌、胎盤部トロホブラスト腫瘍、成人上皮性腫瘍、卵巣癌、漿液性卵巣癌、卵巣性索腫瘍、子宮頸癌（cervical carcinoma）、子宮頸癌（uterine cervix carcinoma）、小細胞肺癌及び非小細胞肺癌、上咽頭癌、乳癌（例えば、乳管癌、浸潤性乳腺管内癌（散発性）、乳癌、乳癌の疑い、4型乳癌、1型乳癌、3型乳癌、乳房－卵巣癌）、扁平上皮癌（例えば、頭頸部における）、神経原性腫瘍、星状細胞腫、神経節芽細胞腫、神経芽腫、リンパ腫（例えば、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、B細胞、バーキット、皮膚T細胞性、組織球、リンパ芽球性、T細胞、胸腺）、神経膠腫、腺癌、副腎腫瘍、遺伝性副腎皮質癌、脳悪性腫瘍（腫瘍）、様々な他の癌腫（例えば、気管支原性大細胞肺癌、管、エールリッヒ・レター腹水、類上皮、大細胞、ルイス肺、髄様、粘膜類表皮、燕麦細胞、小細胞、紡錘細胞、有棘細胞、移行上皮、未分化、癌肉腫、絨毛癌、嚢胞腺癌）、上衣芽腫、上皮腫、赤白血病（例えば、フレンド、リンパ芽球）、線維肉腫、巨細胞腫、神経膠腫、膠芽腫（例えば、多形、星状細胞腫）、神経膠腫肝細胞腫、ヘテロハイブリドーマ、ヘテロ骨髄腫、組織球腫、ハイブリドーマ（例えば、B細胞性）、腎細胞癌、インスリノーマ、膵島腫瘍、角化腫、平滑筋芽腫、平滑筋肉腫、白血病（例えば、急性リンパ性、急性リンパ芽球性、前B細胞性急性リンパ芽球性、T細胞性急性リンパ芽球性白血病、急性巨核芽球性、単球性白血病、急性骨髄性（acute myelogenous）、急性骨髄性（acute myeloid）、好酸球性急性骨髄性、B細胞、好塩基球、慢性骨髄性、慢性、B細胞、好酸球、フレンド、顆粒球又は骨髄性、有毛細胞、リンパ性、巨核芽球性、単球性、単球性－マクロファージ、骨髄芽球性、骨髄性、骨髄単球性、形質細胞、前B細胞、前骨髄球性、亜急性、T細胞、リンパ性腫瘍、骨髄性悪性腫瘍の素因、急性非リンパ性白血病）、リンパ肉腫、黒色腫、乳癌、肥満細胞腫、髄芽腫、中皮腫、転移性腫瘍、単球性腫瘍、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、骨髄腫、腎芽腫、神経組織神経膠腫、神経組織ニューロン性腫瘍、神経鞘腫、神経芽腫、乏突起膠腫、骨軟骨腫、骨髄腫、骨肉腫（例えば、ユーイング肉腫）、

10

20

30

40

50

乳頭腫、移行細胞、褐色細胞腫、下垂体腫瘍（浸潤性）、形質細胞腫、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、肉腫（例えば、ユーイング、組織球、ジェンセン、骨肉、細網）、神経鞘腫、皮下腫瘍、悪性奇形腫（例えば、多分化能性）、奇形腫、精巣腫瘍、胸腺腫及び毛包上皮腫、胃癌、線維肉腫、多形膠芽腫、多発性グロムス腫瘍、リー・フラウメニ症候群、脂肪肉腫、リンチ家族性癌症候群ⅠⅠ型、男性胚細胞腫瘍、肥満細胞性白血病、甲状腺髄様、多発性髄膜腫、内分泌腫瘍性粘液肉腫、傍神経節腫、家族性非クロム親和性、毛母腫、乳頭状、家族性及び散発性、横紋筋肉腫様素因症候群、家族性、横紋筋肉腫様腫瘍、軟部組織肉腫、並びに膠芽腫随伴性ターコット症候群があるが、これらに限定されない。

【0383】

具体的な実施形態によると、癌は、前悪性癌である。

10

【0384】

前癌は、十分に特徴づけられており、当該技術分野で公知である（例えば、Berman J. and Henson DE., 2003. Classifying the pre-cancers: a metadata approach. BMC Med Inform Decis Mak. 3:8を参照されたい）。前癌の例としては、後天性の小さな前癌、核の異型を伴う後天性の大きな病変、癌へ進行する遺伝性過形成症候群を随伴する前駆病変、並びに後天性散発性過形成及び散発性異形成があるがこれらに限定されない。小さな前癌の非限定例としては、HGSIL（子宮頸部の高度扁平上皮内病変）、AIN（肛門上皮内腫瘍）、声帯の異形成、（結腸の）異常腺窩、PIN（前立腺上皮内腫瘍）があるがこれらに限定されない。

【0385】

20

核の異型を伴う後天性の大きな病変の非限定例としては、管状腺腫、AILD（異常タンパク血症随伴性血管免疫芽球性リンパ節症）、異型髄膜腫、胃ポリープ、大局面型類乾癬、脊髄形成異常、インサイチュ乳頭移行上皮癌、芽球増加性不応性貧血、及びシュナイダー乳頭腫がある。癌へ進行する遺伝性過形成症候群を随伴する前駆病変の非限定例としては、異型奇胎症候群、C細胞性腺腫症、及びMEAがある。後天性散発性過形成及び散発性異形成の非限定例としては、骨パジェット病及び潰瘍性大腸炎がある。

【0386】

本方法によって処置することができる固形腫瘍の例としては、リンパ系の癌以外の腫瘍及び／又は転移（位置を問わない）、例えば、脳及び他の中枢神経系の腫瘍（髄膜、脳、脊髄、脳神経及び中枢神経系の他の部位の腫瘍、例えば、膠芽腫又は髄芽腫を含むがこれらに限定されない）、頭頸部癌、乳房腫瘍、循環器系腫瘍（心臓、縦隔及び胸膜、並びに他の胸腔内器官、血管腫瘍、及び腫瘍関連血管組織を含むがこれらに限定されない）、排泄系腫瘍（腎臓、腎盂、尿管、膀胱、他の及び分類不能な泌尿器の腫瘍を含むがこれらに限定されない）、消化管の腫瘍（食道、胃、小腸、結腸、大腸、直腸S状部、直腸、肛門及び肛門管の腫瘍、肝臓及び肝内胆管、胆嚢、胆道、膵臓、その他及び消化器系器官の他の及び分類不能な部分を包含する腫瘍を含むが、これらに限定されない）、口腔腫瘍（口唇、舌、歯肉、口腔底、口蓋、及び口の他の部分、耳下腺、及び唾液腺の他の部分、扁桃、中咽頭、咽頭鼻部、梨状陥凹、下咽頭、並びに口唇、口腔及び咽頭の他の部位の腫瘍を含むがこれらに限定されない）、生殖器系腫瘍（外陰、陰、子宮頸部、子宮体部、子宮、卵巣、及び女性器と関係する他の部位、胎盤、陰茎、前立腺、精巣、及び男性器と関係する他の部位の腫瘍を含むがこれらに限定されない）、気道腫瘍（鼻腔及び中耳、副鼻腔、喉頭、気管、気管支及び肺の腫瘍、例えば、小細胞肺癌及び非小細胞肺癌を含むがこれらに限定されない）、骨格系腫瘍（四肢の骨及び関節軟骨、骨関節軟骨、及び他の部位の腫瘍を含むがこれらに限定されない）、皮膚腫瘍（皮膚の悪性黒色腫、非黒色腫性皮膚癌、皮膚の基底細胞癌、皮膚の扁平上皮癌、中皮腫、カポジ肉腫を含むがこれらに限定されない）、並びに末梢神経及び自律神経系、結合組織及び軟組織、腹膜後腔及び腹膜、眼及び付属器、甲状腺、副腎及び他の内分泌腺及び関連構造、リンパ節の二次的な及び分類不能な悪性腫瘍、呼吸器系及び消化器系の二次的な及び分類不能な悪性腫瘍、及び他の部位の二次的な悪性腫瘍を含む、他の組織を包含する腫瘍がある。

30

40

【0387】

50

いくつかの例において、本開示の方法によって処置される固形腫瘍は、膀胱癌、膀胱癌、結腸癌、肝癌、大腸癌（結腸癌又は直腸癌）、乳癌、前立腺癌、腎癌、肝細胞癌、肺癌、卵巣癌、子宮頸癌、胃癌、食道癌、頭頸部癌、黒色腫、神経内分泌癌、中枢神経系癌、脳腫瘍、皮膚癌、眼腫瘍、絨毛癌（胎盤の腫瘍）、肉腫、又は軟部組織癌である。

【0388】

いくつかの例において、本開示の方法によって処置されることになる固形腫瘍は、選択された膀胱癌、骨癌、乳癌、子宮頸癌、中枢神経系癌、結腸癌、眼腫瘍、腎癌、肺癌、膀胱癌、絨毛癌（胎盤の腫瘍）、前立腺癌、肉腫、皮膚癌、軟部組織癌、又は胃癌である。

【0389】

いくつかの例において、本開示の方法によって処置される固形腫瘍は、乳癌である。本方法によって処置することができる乳癌の非限定例としては、インサイチュでの管癌（DCIS又は腺管内癌）、インサイチュでの小葉癌（LCIS）、浸潤性（invasive）（又は浸潤性（infiltrating））管癌、浸潤性（invasive）（又は浸潤性（infiltrating））小葉癌、炎症性乳癌、トリプルネガティブ乳癌、乳首バジェット病、葉状腫瘍（葉状腫瘍又は葉状嚢胞肉腫）、血管肉腫、腺様嚢胞（adenoid cystic）（又は腺様嚢胞（adenocystic））癌、軽度悪性腺扁平上皮癌、髄様癌、乳頭状癌、管状癌、化生癌、微小乳頭癌、及び混合癌がある。

10

【0390】

いくつかの例において、本開示の方法によって処置される固形腫瘍は、骨癌である。本方法によって処置することができる骨癌の非限定例としては、骨肉腫、軟骨肉腫、ユーイング肉腫腫瘍ファミリー（ESFT）がある。

20

【0391】

いくつかの例において、本開示の方法によって処置される固形腫瘍は、皮膚癌である。本方法によって処置することができる皮膚癌の非限定例としては、黒色腫、皮膚基底細胞癌、及び皮膚扁平上皮癌がある。

【0392】

いくつかの例において、本開示の方法によって処置される固形腫瘍は、眼腫瘍である。本開示の方法によって処置することができる眼腫瘍の非限定例は、眼腫瘍が脈絡膜母斑、脈絡膜黒色腫、脈絡膜転移、脈絡膜血管腫、脈絡膜骨腫、虹彩黒色腫、ぶどう膜黒色腫、眼内リンパ腫、黒色細胞腫、転移性網膜毛細血管腫、RPEの先天性肥大、RPE腺腫又は網膜芽細胞腫であることを含む。いくつかの実施形態において、処置される癌は、液性癌である。本明細書で提供される方法によって処置することができる液性癌の例としては、白血病、骨髄腫、及び液性リンパ腫があるがこれらに限定されない。具体的な実施形態において、説明される方法に従って処置することができる液性癌としては、リンパ腫、白血病、及び骨髄腫があるがこれらに限定されない。説明される方法に従って処置することができる例示的な液性リンパ腫及び白血病としては、急性骨髄性白血病（AML）、骨髄異形成症候群（MDS）、慢性リンパ性白血病／小リンパ球性リンパ腫、B細胞前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫（ワルデンシュトレーム・マクログロブリン血症など）、脾辺縁帯リンパ腫、形質細胞性骨髄腫、形質細胞腫、モノクローナル免疫グロブリン沈着症、重鎖病、モルトリンパ腫とも呼ばれる、節外性辺縁帯B細胞性リンパ腫、結節性辺縁帯B細胞性リンパ腫（nmz l）、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫、縦隔（胸腺）大細胞型B細胞性リンパ腫、血管内大細胞型B細胞性リンパ腫、原発性滲出性リンパ腫、バーキットリンパ腫／白血病、T細胞性前リンパ性白血病、T細胞性大顆粒リンパ球性白血病、アグレッシブNK細胞白血病、成人T細胞白血病／リンパ腫、節外性NK／T細胞リンパ腫、鼻型、腸症型T細胞リンパ腫、肝脾T細胞リンパ腫、芽球性NK細胞性リンパ腫、菌状息肉症／セザリー症候群、原発性皮膚CD30陽性T細胞リンパ増殖性疾患、原発性皮膚未分化大細胞リンパ腫、リンパ腫様丘疹症、血管免疫芽球性T細胞リンパ腫、末梢性T細胞リンパ腫、分類不能な未分化大細胞リンパ腫、古典的ホジキンリンパ腫（結節性硬化症、混合細胞型、高リンパ球、リ

30

40

50

ンパ球枯渇又は非枯渇)、及び結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫があるが、これらに限定されない。一態様において、骨髓異形成症候群(MDS)は、異なる形態学的な骨髓の変化、異常な血球数、共通した細胞遺伝学的異常、及び再発性突然変異を特徴とする、クローン性の造血幹細胞障害の異種群である。MDSは、高齢者で有意に生じ得る。MDSの処置は、国際予後予測スコアリングシステム(International Prognostic Scoring System)(IPSS)又は改訂IPSS(IPSS-R)が最も普遍的な分類システムである、リスクの層別化に基づることができる。低リスクMDS患者は、支持ケア又は造血性成長因子を受けることができる。5qの欠失を有する患者の部分セットは、レナリドマイドで処置することができる。高リスク患者は、低メチル化薬(例えば、アザシチジン、デシタビン)、集中的化学療法、及び／又は同種異系間幹細胞移植で処置することができる。いくつかの症例では、MDS患者はAMLへ転換し得る。一部のMDS患者は、進行性骨髓機能不全を発症し得、及び／又は好中球減少症と関連した合併症(例えば、感染症)若しくは血小板減少症と関連した合併症(例えば、出血)で死亡し得る。MDSの初期管理は、リスクの層別化に基づき得る。より新たなIPSS-Rは、患者を5つの分類へと分けることができ、すなわち、非常に良い、良い、中間、高い、及び非常に高いリスクの群である。非常に良い、良い、の患者、及び少数の中間リスクの患者は、「低リスク」と分類することができるのに対し、高い、非常に高い、及びある一定の中間リスクの患者は、「高リスク」群と分類することができる。アザシチジン(5'-アザシチジン)及びデシタビン(5'-アザ-2'-デオキシシチジン)はいずれもシトシン類似体であるが、DNAメチル基転移酵素(DNMT)の阻害につながることができ、低メチル化薬として作用することができる。

10

20

【0393】

別の態様において、急性骨髓性白血病(AML)は、造血不全に伴う骨髓細胞の増殖及び蓄積を特徴とする。AMLは、化学的曝露、先行の化学療法及び放射線、又は他の環境毒素によって発症し得る。

【0394】

具体的な実施形態によると、癌は、黒色腫、リンパ腫、結腸癌、肺癌、乳癌、及び膀胱癌からなる群から選択される。

【0395】

具体的な実施形態によると、癌は、黒色腫又はリンパ腫である。

30

【0396】

具体的な実施形態によると、癌又は癌性細胞は、PD L-1、E-カドヘリン、CD 19、MUC 1、TRP-1、及びTRP-2からなる群から選択されるマーカーを発現する。

【0397】

具体的な実施形態によると、癌又は癌性細胞は、PD L-1を発現する。

【0398】

言及した通り、具体的な実施形態によると、免疫細胞は、標的を含む治療用組成物との組み合わせで対象へ投与される。

【0399】

したがって、例えば、標的がFcリガンドであるとき、治療用組成物はFcドメインを含む。病的細胞に対して特異的なFcドメインを含む治療用組成物は、当該技術分野で周知であり、Fc融合タンパク質及び抗体を含むが、これらに限定されない。

40

【0400】

具体的な実施形態によると、Fcドメインは、IgG抗体のものである。

【0401】

具体的な実施形態によると、治療用組成物は、Fc融合タンパク質である。

【0402】

本明細書で使用する場合、「Fc融合タンパク質」という用語は、抗体のFcドメインと組み合わされた病的細胞を結合することができるアミノ酸配列を含む分子(すなわち、

50

病的細胞上で過剰発現するか又は病的細胞のみが発現する抗原)を指す。

【0403】

使用されるFc融合タンパク質の選択は十分、当業者の能力のうちにあり、疾患のタイプ、及びその病理学的性質と関係する病的細胞によって発現される抗原による。

【0404】

具体的な実施形態とともに使用することができるFc融合タンパク質の非限定例は、W eidle et al. Cancer Genomics and Proteomics (2012) 9(6):357-372、及び Sioud et al. Molecular Therapy-Methods & Clinical Development (2015) 2, 15043において開示されており、その内容は完全に参照により本明細書に援用される。

10

【0405】

具体的な実施形態によると、治療用組成物は、抗体である。

【0406】

使用される治療用抗体の選択は十分、当業者の能力のうちにあり、疾患のタイプ、及びその病理学的性質と関係する病的細胞によって発現される抗原による。

【0407】

具体的な実施形態によると、治療用抗体は、腫瘍細胞によって過剰発現されるか又は腫瘍細胞のみが発現する抗原を結合する。腫瘍抗原の非限定例は、本明細書に上述でさらに説明されている。

【0408】

具体的な実施形態によると、抗体は、IgG抗体(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)である。

20

【0409】

具体的な実施形態によると、抗体のアイソタイプは、IgG1又はIgG3である。

【0410】

具体的な実施形態によると、治療用抗体は、抗TRP-1又は抗CD44抗体である。

【0411】

本発明のいくつかの実施形態によると、治療用抗体は、アテゾリズマブ、アベルマブ、アレムツズマブ、セツキシマブ、パニツムマブ、ニモツズマブ、リツキシマブ、ガチポツズマブ(Pankomab-GEX(登録商標)として既に公知)、トラスツズマブ、アレムツズマブ、ベバシズマブ、オフアツムマブ、ペルツズマブ、オフアツムマブ、オビヌツズマブ、及びIVIgからなる群から選択される。

30

【0412】

具体的な実施形態によると、治療用抗体は、アテゾリズマブ、リツキシマブ、セツキシマブ、ガチポツズマブ、及びIVIgからなる群から選択される。

【0413】

具体的な実施形態によると、治療用抗体は、抗PD-L1である。

【0414】

具体的な実施形態によると、癌性細胞はPD-L1を発現し、治療用抗体は抗PD-L1である。

40

【0415】

具体的な実施形態によると、抗体は、アテゾリズマブである。

【0416】

本発明の一態様によると、病的細胞と関連する疾患の処置を必要とする対象において、当該疾患を処置する方法であって、対象へ治療有効量の

(i) 当該病的細胞に対して特異的な抗体、及び

(ii) Fc受容体共通γ鎖(FcRγ)のアミノ酸配列を各々含む少なくとも3種の細胞膜ポリペプチドを含む多重サブユニットタンパク質モジュールを発現するT細胞であって、当該アミノ酸配列が活性化シグナルを伝達可能であり、当該少なくとも3種のポリペプチドのうちの少なくとも1種だがすべてではないポリペプチドが、Fcリガンドを結

50

合することができるCD64の細胞外結合ドメインを含み、当該Fcリガンドへ当該細胞外結合ドメインが結合したとき、当該活性化シグナルが当該T細胞において伝達され、それにより対象における疾患を処置する、T細胞を投与することを含む、方法が提供される。

【0417】

本発明の追加の又は代替の態様によると、病的細胞と関連する疾患の処置を必要とする対象において当該疾患の処置に使用するための、治療有効量の

(i) 当該病的細胞に対して特異的な抗体、及び

(ii) Fc受容体共通γ鎖(FcRγ)のアミノ酸配列を各々含む少なくとも3種の細胞膜ポリペプチドを含む多重サブユニットタンパク質モジュールを発現するT細胞であって、当該アミノ酸配列が活性化シグナルを伝達可能であり、当該少なくとも3種のポリペプチドのうちの少なくとも1種だがすべてではないポリペプチドが、Fcリガンドを結合することができるCD64の細胞外結合ドメインを含み、当該Fcリガンドへ当該細胞外結合ドメインが結合したとき、当該活性化シグナルが当該T細胞において伝達される、T細胞

が提供される。

【0418】

本発明の追加の又は代替の態様によると、病的細胞に対する抗体の殺滅能力の増大を必要とする対象において、当該殺滅能力を増大させる方法であって、対象へ治療有効量の

(i) 病的細胞に対して特異的な抗体、及び

(ii) Fc受容体共通γ鎖(FcRγ)のアミノ酸配列を各々含む少なくとも3種の細胞膜ポリペプチドを含む多重サブユニットタンパク質モジュールを発現するT細胞であって、当該アミノ酸配列が活性化シグナルを伝達可能であり、当該少なくとも3種のポリペプチドのうちの少なくとも1種だがすべてではないポリペプチドが、Fcリガンドを結合することができるCD64の細胞外結合ドメインを含み、当該Fcリガンドへ当該細胞外結合ドメインが結合したとき、当該活性化シグナルが当該T細胞において伝達される、T細胞

を投与し、それにより、病的細胞に対する抗体の殺滅能力を増大させることを含む、方法が提供される。

【0419】

免疫細胞の投与及び治療用組成物の投与は、同じ経路において又は別個の経路で実施することができる。

【0420】

免疫細胞の投与は、標的を含む治療用組成物に続いて又はそれと同時であり得る。

【0421】

具体的な実施形態によると、本明細書で開示される免疫細胞は、標的を含む治療用組成物を用いた処置の後に対象へ投与される。

【0422】

他の具体的な実施形態によると、本明細書で開示される免疫細胞は、標的を含む治療用組成物と同時に対象へ投与される。

【0423】

免疫細胞の複数回の投与、及び標的を含む複数回用量の治療用組成物を投与することができる。したがって、具体的な実施形態によると、本明細書で開示される免疫細胞の投与は、標的を含む治療用組成物の少なくとも1回の投与後に行われる。具体的な実施形態によると、本明細書で開示される細胞の投与は、標的を含む治療用組成物を用いた処置と連続した順序で行われる。

【0424】

具体的な実施形態によると、多重サブユニットタンパク質モジュールは、標的に結合可能な細胞外結合ドメインと、活性化シグナルを伝達することができるFcRγのアミノ酸配列とを単一のポリペプチドのみを発現する同じ型の免疫細胞、あるいは活性化シグナル

10

20

30

40

50

を伝達することができるFcRγのアミノ酸配列を含む第1のポリペプチドと、標的に結合可能な細胞外結合ドメインを含むが、活性化シグナルを伝達することができるFcRγのアミノ酸配列を欠いている第2のポリペプチドとを含むペプチド複合体と比較して、当該モジュールを発現する免疫細胞（例えば、T細胞）を活性化する上で、標的への結合後により効率的（例えば、少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍）である。

【0425】

具体的な実施形態によると、効率の増大は、エフェクター細胞：標的細胞の比の低減（例えば、4：1未満、5：1未満、6：1未満、7：1未満、8：1未満）によって実現され得る。

【0426】

具体的な実施形態によると、効率の増大は、対象へ注入された低減された数の免疫細胞によって実現され得る。

【0427】

具体的な実施形態によると、免疫細胞及び本明細書で開示される標的を含む治療用組成物は、対象へ、当該技術分野で周知である鎮痛薬、化学治療薬、放射線治療薬、細胞毒性療法（コンディショニング）、ホルモン療法、及び他の処置投与計画（例えば、手術）を含むがこれらに限定されない、病的細胞と関連する疾患（例えば、癌）を処置するための他の確立された又は実験的な治療投与計画と組み合わせて投与することができる。

【0428】

具体的な実施形態によると、処置方法は第1に、細胞療法のためのプレコンディショニングを用いることを包含する。したがって、いくつかの実施形態の方法は、免疫細胞（例えば、T細胞）を投与する前にプレコンディショニング作用因子を投与することを含む。例えば、T細胞療法に先立って患者をプレコンディショニングすることは典型的には、内在性リンパ球数を低減させること、並びに患者において存在する恒常性サイトカイン及び／又は免疫前駆因子の血清レベルを増大させることによって、T細胞療法の有効性を改善する。このことは、いったん患者へ投与されると、移植されたT細胞が増殖するためのより最適な微小環境をつくり、内在性リンパ球の数を低減させる。プレコンディショニング作用因子の非限定例としては、シクロホスファミド及び／又はフルドラビン（fludarabine）がある。

【0429】

本明細書で開示される免疫細胞及び／又は本明細書で開示される治療用組成物は、対象自体へ、又は適切な担体若しくは賦形剤と混合される医薬組成物で投与することができる。

【0430】

本明細書で使用する場合、「医薬組成物」は、本明細書で説明される有効成分のうちの1種以上の、生理学的に適切な担体及び賦形剤などの他の化学的構成要素との調製物を指す。医薬組成物の目的は、生物への化合物の投与を容易にすることである。

【0431】

本明細書では、「有効成分」という用語は、生物学的効果について説明可能な免疫細胞及び／又は治療用組成物を指す。

【0432】

具体的な実施形態によると、免疫細胞は、製剤中の有効成分である。

【0433】

以後、相互交換可能に使用され得る「生理学的に許容され得る担体」及び「医薬として許容され得る担体」という句は、生物に対して有意な刺激を生じない、且つ投与される化合物の生物活性及び特性を無効にしない、担体又は希釈剤を指す。アジュバントは、これらの句の下に含まれる。

【0434】

本明細書において、「賦形剤」という用語は、有効成分の投与をさらに容易にするため

10

20

30

40

50

に医薬組成物へ添加される不活性物質を指す。賦形剤の例としては、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖及び複数のタイプのデンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油、及びポリエチレングリコールがあるが、これらに限定されない。

【0435】

薬物の製剤及び投与のための技術は、参照により本明細書に援用する“Remington's Pharmaceutical Sciences”, Mack Publishing Co., Easton, PAの最新版に見出すことができる。

【0436】

適切な投与経路としては、例えば、経口送達、直腸内送達、経粘膜送達、特に経鼻送達、腸管送達或いは、筋肉内注射、皮内注射、皮下注射、及び髄内注射、並びに髄腔内注射、直接的な脳室内注射、例えば、右心室腔若しくは左心室腔内への心内注射、総冠動脈内への心内注射、静脈内注射、腹膜内注射、鼻腔内注射、又は眼内注射を含む非経口送達があり得る。

10

【0437】

中枢神経系(CNS)への薬物送達のための従来のアプローチとしては、神経外科的戦略(例えば、脳内注射又は脳室内注入)、BBBの内在性輸送経路のうちの1種を探索する試みにおける作用因子の分子レベルの操作(例えば、BBBを交差することが作用因子自体できない当該作用因子との組み合わせで、内皮細胞表面分子に対する親和性を有する輸送ペプチドを含む、キメラ融合タンパク質の生成)、作用因子の脂質溶解度を増大させるよう設計された薬理学的戦略(例えば、脂質又はコレステロールの担体への水溶性作用因子の結合)、及び高浸透圧性崩壊(頸動脈内へのマンニトール溶液の注入、又はアンギオテンシンペプチドなどの生物活性作用因子の使用、から結果的に発生)がある。しかしながら、これらの戦略の各々は、侵襲的外科手順と関係する固有のリスク、内在性輸送系において固有の制限によって与えられる大きさの制限、CNSの外部で活性があり得る担体モチーフから構成されたキメラ分子の全身投与と関係する潜在的に望ましくない生物学的副作用、及びBBBが崩壊する脳の領域内での起こり得る脳損傷のリスクなどの制限を有し、このことによって、当該戦略の各々が最適未満の送達方法となっている。

20

【0438】

或いは、全身様式よりも、例えば、患者の組織領域内へと医薬組成物を直接注射することを介した局所様式で医薬組成物を投与してもよい。

30

【0439】

具体的な実施形態によると、本明細書で開示される免疫細胞又はそれを含む医薬組成物は、IV経路を介して投与される。

【0440】

本発明のいくつかの実施形態の医薬組成物は、当該技術分野で周知のプロセスによって、例えば、従来の混合プロセス、溶解プロセス、造粒プロセス、糖衣錠製剤プロセス、乳化プロセス、封入プロセス、捕捉プロセス、又は凍結乾燥プロセスによって製造され得る。

【0441】

本発明のいくつかの実施形態に従った使用のための医薬組成物はしたがって、有効成分を、医薬として使用することができる調製物へと加工することを容易にする、賦形剤及び補助剤を含む1種以上の生理学的に許容され得る担体を用いる従来様式で製剤され得る。適切な製剤は、選択される投与経路による。

40

【0442】

注射用には、医薬組成物の有効成分は、水溶液中で、好ましくは、ハンクス溶液、リンガー溶液、又は生理学的塩類緩衝液など、生理学的に和合性のある緩衝液中で製剤され得る。経粘膜投与用には、浸透する閥門に適切な浸透剤を製剤に使用する。かかる浸透剤は概して、当該技術分野で公知である。

【0443】

経口投与用には、医薬組成物は、活性のある化合物を当該技術分野で周知の医薬として

50

許容され得る担体と組み合わせることによって容易に製剤することができる。かかる担体は、医薬組成物を、患者による経口消化のために、錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル剤、液剤、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤、及びこれらに類するものとして製剤可能にする。経口用途のための医薬調製物は、固体賦形剤を用いて、場合により、結果として得られる混合物を粉砕することによって、顆粒からなる混合物を加工することによって、所望の場合、適切な補助剤を添加して錠剤又は糖衣錠の芯を得た後に調製することができる。適切な補助剤は特に、ラクトース、スクロース、マンニトール、若しくはソルビトールを含む糖類などの充填剤、例えば、トウモロコシデンプン、コムギデンプン、コメデンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントガム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボメチルセルロースナトリウム、及び／又はポリビニルピロリドン（PVP）などの生理学的に許容され得る重合体である。所望の場合、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、又はアルギン酸若しくはアルギン酸ナトリウムのようなその塩など、崩壊剤を添加してもよい。

10

【0444】

糖衣錠の芯は、適切なコーティングとともに提供される。この目的のために、場合によりアラビアガム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコール、二酸化チタン、ラッカー溶液、及び適切な有機溶媒又は溶媒混合物を含有し得る、濃縮糖液を使用し得る。染料（*dye stuff*）又は色素（*pigment*）は、識別のために又は活性のある化合物の用量の異なる組み合わせを特徴づけるために、錠剤又は糖衣錠のコーティングへ添加してもよい。

20

【0445】

経口使用することができる医薬組成物としては、ゼラチンでできた押込みばめカプセル剤、並びにゼラチン及びグリセロール又はソルビトールなどの可塑剤でできた密封性軟カプセル剤がある。押込みばめカプセル剤は、有効成分を、ラクトースなどの充填剤、デンプンなどの結合剤、タルク又はステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤、及び、場合により、安定剤との混合状態で含有し得る。軟カプセルにおいて、有効成分は、脂肪油、液状パラフィン、又は液状ポリエチレングリコールなど、適切な液体中に溶解又は懸濁され得る。加えて、安定剤を添加してもよい。経口投与のための製剤はすべて、選択される投与経路に適した薬用量であるものとする。

【0446】

頬側投与用には、組成物は、従来様式で製剤される錠剤又はロゼンジ剤の形態をとり得る。

30

【0447】

経鼻吸入による投与用には、本発明のいくつかの実施形態による使用のための有効成分は、加圧型パック又は適切な噴射剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、又は二酸化炭素の使用によるネブライザーからのエアゾールスプレーの様相の形態で簡便に送達される。加圧型エアゾールの場合、薬用量単位は、測量された量を送達するために弁を提供することによって決定され得る。化合物とラクトース又はデンプンなどの適切な粉末基剤との粉状混合物を含有する、ディスペンサー内での使用のための、例えば、ゼラチンのカプセル及びカートリッジが製剤され得る。

40

【0448】

本明細書で説明される医薬組成物は、非経口投与のために、例えば、ボラス注射又は持続注入によって製剤され得る。注射用製剤は、単位薬用量形態で、例えば、場合により添加される保存剤を含有するアンプル内に又は複数回用量の容器内にあり得る。組成物は、油性又は水性のベヒクル中の懸濁剤、液剤、又はエマルジョン剤であり得、懸濁作用因子、安定化作用因子、及び／又は分散作用因子などの製剤作用因子を含有し得る。

【0449】

非経口投与のための医薬組成物としては、水溶性形態で活性のある調製物の水溶液がある。加えて、有効成分の懸濁剤は、適切な油性の又は水を基剤とした注射用懸濁剤として

50

調製され得る。適切な親油性溶媒又は親油性ベヒクルとしては、ゴマ油などの脂肪油、又はオレイン酸エチルなどの合成脂肪酸エステル、トリグリセリド、又はリポソームがある。水性注射用懸濁剤は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、又はデキストランなど、懸濁剤の粘度を増大させる物質を含有してもよい。場合により、懸濁剤はまた、適切な安定剤、又は高濃度の溶液の調製を可能にするために有効成分の溶解度を増大させる作用因子も含有してもよい。

【0450】

或いは、有効成分は、適切なベヒクル、例えば、滅菌済みの発熱物質非含有水を基剤とした溶液で、使用前に構成するために粉状であってもよい。

【0451】

本発明のいくつかの実施形態の医薬組成物はまた、例えば、カカオバター又は他のグリセリドなどの従来の坐剤基剤を用いた、坐剤又は停留注腸などの、直腸組成物中でも製剤され得る。

【0452】

代替の実施形態としては、当該技術分野で周知であるように、対象において有効成分の持続した徐放、又は当該有効成分の活性の長い持続時間を提供するデポーがある。

【0453】

本発明のいくつかの実施形態の文脈における使用に適した医薬組成物としては、有効成分が、意図した目的を達成するのに有効な量で含有される組成物がある。より具体的には、治療有効量は、障害（例えば、癌）の症状を予防、緩和若しくは改善するために、又は処置中の対象の生存を長くするために有効な有効成分量を意味する。

【0454】

治療有効量の決定は、本明細書で提供される詳細な開示の点で、十分に当業者の能力のうちである。

【0455】

本発明の方法において使用されるいずれかの調製物のために、治療有効量又は治療有効用量が、インビトロアッセイから及び細胞培養アッセイから初期的に概算することができる。例えば、用量は、所望の濃度又は力価を達成するために、動物モデルにおいて考案することができる。かかる情報は、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定するために使用することができる。

【0456】

本明細書で説明される有効成分の毒性及び治療有効性は、標準的な医薬手順によってインビトロで、細胞培養物又は実験動物において決定することができる。これらのインビトロの及び細胞培養物のアッセイ並びに動物試験から得られたデータは、ヒトにおける使用のための薬用量の範囲を考案する上で使用することができる。薬用量は、採用される剤形及び利用される投与経路によってさまざまであり得る。実際の製剤、投与経路、及び薬用量は、患者の容態の観点で個々の医師によって選択されることができる。（例えば、“The Pharmacological Basis of Therapeutics”, Ch.1 p.1におけるFingl, et al., 1975を参照されたい）。

【0457】

薬用量及び間隔は、生物学的効果を誘導又は抑制するのに十分である有効成分のレベル（最小有効濃度（MEC））を提供するために、個々に調整され得る。MECは、各調製物について様々であろうが、インビトロのデータから概算することができる。MECを達成するために必要な薬用量は、個体の特徴及び投与経路によるであろう。検出アッセイは、血漿濃度を決定するために使用することができる。

【0458】

処置される容態の重症度及び応答性により、投薬は、単回投与又は複数回投与であり得、処置の経過は、数日間から数週間まで又は治療がもたらされ若しくは病状の低減が達成されるまで継続することができる。

【0459】

投与される組成物の量は、もちろん、処置される対象、罹病の重症度、投与様式、処方医の判断などによるであろう。

【0460】

本発明のいくつかの実施形態の組成物は、所望の場合、有効成分を含有する1種以上の単位剤形を含有し得る、FDA承認済みキットなど、パック又はディスペンサー装置内にあり得る。パックは、例えば、プリスターパックなど、金属又はプラスチックのホイルを備え得る。パック又はディスペンサー装置は、投与のための説明書が添付され得る。パック又はディスペンサー装置はまた、医薬品の製造、使用、又は販売を規制する政府機関によって定められた様式で容器と関係づけられた注意書きも添付されてもよく、この注意書きは、組成物又はヒト若しくは動物への投与の形態に関する省庁による承認を反映している。かかる注意書きは、例えば、処方薬についての又は承認された製品の添付文書に関する、米国食品医薬品局によって承認されたラベル貼付であってもよい。和合性のある医薬担体中で製剤された本発明の調製物を含む組成物はまた、上述でさらに詳述したように、適切な容器内に調製及び配置されてもよく、示される容態の処置についてラベル貼付されていてもよい。

10

【0461】

本発明の別の態様によると、本明細書で開示される免疫細胞を包装する包装材料と、当該標的を含む治療用組成物とを備えた製品が提供される。

【0462】

具体的な実施形態によると、治療用組成物は、病的細胞に対して特異的である。

20

【0463】

特異的な実施形態によると、免疫細胞はT細胞であり、治療用組成物は抗体である。

【0464】

本発明の一態様によると、抗体及び、Fc受容体共通 γ 鎖（FcR γ ）のアミノ酸配列を各々含む少なくとも3種の細胞膜ポリペプチドを含む多重サブユニットタンパク質モジュールを発現するT細胞を包装する包装材料を備えた製品であって、当該アミノ酸配列が、活性化シグナルを伝達可能であり、当該少なくとも3種のポリペプチドのうちの少なくとも1種だがすべてではないポリペプチドが、Fcリガンドを結合することができるFc γ 受容体（例えば、CD64）の細胞外結合ドメインを含み、当該Fcリガンドへの当該細胞外結合ドメインが結合したとき、当該活性化シグナルが当該T細胞において伝達される、製品が提供される。具体的な実施形態によると、製品は、病的細胞（例えば、癌）と関連する疾患の処置のために、それと認識される。

30

【0465】

具体的な実施形態によると、本明細書で開示される免疫細胞（例えば、T細胞）、及び標的（例えば、抗体）を含む治療用組成物は、別個の容器内に包装される。

【0466】

具体的な実施形態によると、本明細書で開示される免疫細胞（例えば、T細胞）、及び標的（例えば、抗体）を含む治療用組成物は、共製剤で包装される。

【0467】

具体的な実施形態によると、製品はさらに、プレコンディショニング作用因子を備える。さらなる説明及び非限定的な例示的作用因子は、本明細書で上述にさらに提供されている。

40

【0468】

本明細書で使用する場合、「約」という用語は、 $\pm 10\%$ を指す。

【0469】

「を含む（comprises）」、「を含んでいる（comprising）」、「を含む（includes）」、「を含んでいる（including）」、「を有する」という用語、及びそれらの複合物は、「～を含むがこれらに限定されない」を意味する。

【0470】

50

「～からなる」という用語は、「～を含みこれらに限定される」を意味する。

【0471】

「～から実質的になる」という用語は、組成物、方法、又は構造が、追加の成分、ステップ、及び／又は部分を含み得ることを意味するが、追加の成分、ステップ、及び／又は部分が単に、特許請求される組成物、方法、又は構造の基本的な及び新規の特徴を実質的に変化させない場合にのみそうである。

【0472】

本明細書で使用する場合、「1種の(a)」、「1種の(an)」、及び「その(the)」という単数形は、別段の明確な記載がない限り、複数の指示対象を含む。例えば、「化合物」又は「少なくとも1種の化合物」は、その混合物を含む複数の化合物を含み得る。

10

【0473】

本出願のいたるところで、本発明の様々な実施形態が範囲の形式で提示され得る。範囲の形式における説明が単に簡便性及び簡潔性のためであり、本発明の範囲に関する変更不可能な制限として解釈されるものではないとすることは理解されるものとする。したがって、範囲の説明は、起こり得る部分範囲、及び当該範囲内の個々の数値をすべて具体的に開示したとみなされるべきである。例えば、1～6などの範囲の説明は、1～3、1～4、1～5、2～4、2～6、3～6などのように具体的に開示された部分範囲、並びに、当該範囲内の個々の数、例えば、1、2、3、4、5、及び6を有するとみなされるべきである。このことは、範囲の幅にかかわらず適用される。

20

【0474】

数的範囲が本明細書で示されているときはいつでも、示された範囲内でいずれの引用された数(分数又は整数)も含むことを意味する。第1の指示数と第2の指示数「との範囲／間にある範囲」及び第1の指示数「から」第2の指示数「までの範囲／の範囲」いう句は本明細書で相互交換可能に使用されており、第1及び第2の指示数並びにその間の分数及び整数値をすべて含むことを意味する。

【0475】

本明細書で使用する場合、「方法」という用語は、化学、薬理学、生物学、生化学、及び医学の分野の当業者に公知であるか又は当該当業者によって公知の様式、手段、技術、及び手順から容易に開発されるかのいずれかである様式、手段、技術、及び手順を含むがこれらに限定されない所与の課題を達成するための様式、手段、技術、及び手順を指す。

30

【0476】

特定の配列表に対する参照がなされるとき、かかる参照は、例えば、配列エラー、クローニングエラー、又は塩基置換、塩基欠失、若しくは塩基付加を結果として生じる他の変化から結果として生じるわずかな配列の変化を含むとして、その相補的な配列に実質的に対応する配列も包含するが、但し、かかる変化の頻度が50個のヌクレオチドの中1個未満、或いは、100個のヌクレオチド中1個未満、或いは、200個のヌクレオチド中1個未満、或いは、500個のヌクレオチド中1個未満、或いは、1000個のヌクレオチド中1個未満、或いは、5,000個のヌクレオチド中1個未満、或いは、10,000個のヌクレオチド中1個未満であることを条件とすることは理解されるべきである。

40

【0477】

本出願において引用される各特許文献、公開公報、及び非特許文献は、各々が個々に参照により援用されるかのように、それらの全てが本参照により本明細書により援用される。

【0478】

個別の実施形態の文脈において簡潔性のために説明されている、本発明のある特定の特徴がまた、単一の実施形態において組み合わせでも提供され得ることは認識される。逆に、単一の実施形態の文脈において簡潔性のために説明されている、本発明の様々な特徴はまた、個別でも、又はいずれかの適切な部分組み合わせにおいても、又は本発明のいずれかの他の説明された実施形態において適切であるとしても提供され得る。さまざまな実施

50

形態の文脈において説明されるある特定の特徴は、実施形態がそれらの要素なしでは使用不可能ではない限り、当該実施形態の必須の特徴とみなされるべきではない。

【0479】

本明細書で上記に詳述されるような且つ後述の特許請求の範囲の項において特許請求されるような、本発明のさまざまな実施形態及び態様は、以下の実施例において実験による支持を認める。

【実施例】

【0480】

ここでは、以下の実施例に対して参照がなされ、この実施例は、上述の説明とまとまって、本発明のいくつかの実施形態を非限定様式で説明する。

【0481】

本明細書において使用される命名法および本発明に使用する実験手順としては、通常、分子的技術、生化学的技術、微生物学的技術および組換えDNA技術が挙げられる。このような技術は、文献において十分に説明されている。例えば、"Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989)、"Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994)、Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989)、Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988)、Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York、Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998)、米国特許第4,666,828号明細書、第4,683,202号明細書、第4,801,531号明細書、第5,192,659号明細書、および第5,272,057号明細書に記載された方法、"Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994)、"Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994)、Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994)、Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980)を参照されたい。利用可能なイムノアッセイは、特許および科学文献に広く記載されており、例えば、米国特許第3,791,932号明細書、第3,839,153号明細書、第3,850,752号明細書、第3,850,578号明細書、第3,853,987号明細書、第3,867,517号明細書、第3,879,262号明細書、第3,901,654号明細書、第3,935,074号明細書、第3,984,533号明細書、第3,996,345号明細書、第4,034,074号明細書、第4,098,876号明細書、第4,879,219号明細書、第5,011,771号明細書、および第5,281,521号明細書、"Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984)、"Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985)、"Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., Eds. (1984)、"Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986)、"Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986)、"A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) and "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press, "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990)、Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996)を参照されたい。上記文献の全てが、本参照により本明細書に完全に援用されるものとする。その他の一般的な参考文献は、本明細書を通じて提供される。それらに記載の手順は、当技術分野で周知であると考えられ、読者の便宜のために提供する。それらに含まれるすべての情報が、本参照により本明細書に援用される。

【0482】

10

20

30

40

50

材料及び方法

マウス—野生型 (WT) C57BL/6 マウス又はBALB/c マウスをEnvigo (イスラエル国、エルサレム) から、及びJackson Laboratories (米国、メイン州、バーハーバー) から入手した。マウスはすべて、認可動物施設であり且つ特定病原体非含有条件下で維持されているAmerican Association for the Accreditation of Laboratory Animal Careにおいて飼育された。雌雄の8~12週齢のマウスをすべての実験において使用した。動物実験はすべて、テルアビブ大学又はスタンフォード大学の動物実験委員会によって承認された。

【0483】

細胞株—B16F10細胞 (CRL-6475, ATCC)、YUMM1.7 (CRL-3362, ATCC)、HEK-293FT (マサチューセッツ州、ワルサム、Thermo Fisher Scientific)、A20細胞 (Nahmad et al. bioRxiv 2020.02.28.970822 ;doi:www.doi(dot)org/10.1101/2020.02.28.970822)、Jurkat細胞 (Aqaue et al. Cancer Res. 2019 Aug 1; 79(15):3862-3876)、293GP (Burns JC et al. PNAS USA. 1993 Sep 1; 90(17):8033-7)、及びHT-29 (ヒト結腸腺癌、HTB-38, ATCC) を、10%熱失活FBS (イスラエル国、Biological Industries)、2mM L-グルタミン、及び100 µg/mLペニシリン/ストレプトマイシン (GIBCO) を補充したDMEM (GIBCO) 中で、標準的な条件下で培養した。細胞を、製造元の説明書によりEZ-PCR Mycoplasma Test Kit (イスラエル国、Biological Industries) を用いてマイコプラズマについて通常どおり試験した。B16F10細胞及びYUMM1.7細胞に、pLVX-H2B-tdTomatoを含有するレンチウイルスを感染させ、FACS (BD FACSAria (商標) III, ニュージャージー州、フランクリンレイク、BD Biosciences) によって多量発現のtdTomato集団について選別した。NK-92細胞 (CRL-2407, ATCC) を200UのヒトIL-2 (PeproTech) を補充したRPMI 中で培養した。

【0484】

レンチウイルス感染—HEK-293FT細胞へ、H2B-tdTomatoを含有するpLVXプラスミドをEF1プロモーターの下でpSPAX2 (Addgeneプラスミド番号12260) 及びpCMV-VSV-G (Addgeneプラスミド番号8454) と一緒に移入した。培地含有ウイルスを24時間後及び48時間後に回収した。感染のために、B16F10細胞又はHT-29細胞をウイルス及び100 µg/mLのポリブレン (イスラエル国、メルク社、Sigma Aldrich) とともに30分間インキュベートし、続いて30分間遠心分離した後、培地を置き換えた。3日後、tdTomatoを発現した細胞をFACSAria IIIによって選別した。

【0485】

構築物設計—FcγRI及びFcγRγを発現させるために、いくつかの構築物を作製した (図1A、図1B、及び図8A、配列番号1~8を参照されたい)。具体的には、融合配列のインサートをGeneART (Thermo Fisher Scientific) によってpMKベクター内へと合成し、さらに、IRES-GFP配列に対して上流のEcoRI/XhoI部位を用いてpMIGII内へと、又はNcoI/NotIを用いて切断したpMSVG.1ベクター内へとクローニングした。クローンをpBABE5' 及びIRES-Revプライマー配列決定によって確認した (HyLabs Israel)。ヒストンH2B配列をAATAACACTAGTGCCACCATGCCTGAACCGGCAAAAT (配列番号9) プライマー及びAACAAACCCCGGGACTTGTCGTCAATCGTCTTTGT (配列番号10) プライマーで増幅し、EF1プロモーターを含有するpLVXベクター (Clontech) 内へと、tdTomatoとインフレームでSpeI/XmaI部位へとクローニングした。配列をMSC/v順方

10

20

30

40

50

向プライマー及び t d T o m a t o 逆方向プライマーによって確認した (H y L a b s I s r a e l) 。 ヒト H E R 2 又は E G F R の細胞外領域及び膜貫通領域及び細胞内領域 7 残基を p L V X ベクター内へと、 S p e I / N o t I 又は E o R I / N o t I それぞれ) 部位を用いてクローニングした。

【0486】

レトロウイルス感染—マウス総 C D 3 ⁺ T 細胞又は特異的 C D 4 ⁺ T 細胞又は C D 8 ⁺ T 細胞をマウスの血液から単離し、上述の構築物を以下の通り感染させた。 P l a t i n u m E 細胞を 10 c m の培養プレート上へ播種し、2 : 1 のモル濃度比の p M I G I I 4 5 プラスミド及び P C L - E c o プラスミドを、 P o l y p l u s j e t P R I M E (登録商標) 試薬 (P o l y p l u s t r a n s f e c t i o n s) を用いて同時移入した。24 時間後、培地を、0 . 0 7 5 % 重炭酸ナトリウムを補充した完全 D M E M で置き換えた。培地含有ウイルスを24 時間後及び48 時間後に回収し、100, 000 g で1 時間遠心分離した。ペレットを1 m L 培地中に穏やかに再懸濁し、4 °C で一晚回復させておいた。移入に先立って、脾 C D 4 ⁺ T 細胞又は脾 C D 8 ⁺ T 細胞を、高用量の I L - 2 (1 , 0 0 0 I U / m L) を含有する T 細胞培地中で抗 C D 3 (0 . 5 μ g / m L) を事前に被覆しておいたプレート上でインキュベートした。次に、0 . 3 m L の濃レトロウイルスを、10 μ g / m L のポリブレンとともに、2 × 10⁶ 個ごとの C D 4 ⁺ T 細胞又は C D 8 ⁺ T 細胞へ添加した。細胞を37 °C、5 % C O ₂ において30 分間インキュベートし、37 °C、1, 200 r p m で1 時間遠心分離した。続いて、培地の80 % を置き換え、T 細胞を、高用量の I L - 2 を含有する T 細胞培地中でさらに3 日間培養した。ヒト細胞 (P B M C 、 N K - 9 2 又は γ δ - T 細胞) の感染のために、1 . 2 × 10⁶ 個の293 GP 細胞を、P L L 被覆した6 ウェルプレート内で培養し、J e t O p t i m u s (P o l y p l u s t r a n s f e c t i o n s) を用いて、1 . 4 μ g の R D 1 1 4 エンベローププラスミド及び2 μ g の p M I G I I プラスミド又は p M S V G . 1 プラスミドを移入した。48 時間後に、上清を回収し、0 . 4 5 μ M P V D F フィルタで濾過し、1 . 5 × 10⁵ 個の細胞を、レトロネクチン (タカラ) で被覆した24 ウェル懸濁プレート内で感染させた。

【0487】

初代ヒト細胞—ヒト P B M C を健常ドナーから回収し、F i c o l l H i s t o p a q u e - 1 0 7 7 H Y B R I - M A X (S i g m a a l d r i c h) を用いて分離し、U l t r a - L E A F (商標) P u r i f i e d 抗ヒト C D 3 抗体 (O K T 3 , B i o L e g e n d) とともに、1000 U の I L - 2 (P e p r o t e c h) と一緒に48 時間活性化させ、続いてレトロウイルス感染させた。γ δ T 細胞については、健常ドナーからのヒト P B M C を回収し、ゾレドロナート (5 μ M 、 N o v a r t i s) 及び I L - 2 (500 U , P e p r o t e c h) とともに8 日間培養し、E a s y S e p (商標) H u m a n G a m m a / D e l t a T C e l l I s o l a t i o n K i t (S t e m C e l l t e c h n o l o g i e s) を用いて分離し、説明したとおり、レトロウイルスベクターを導入した。

【0488】

共焦点顕微鏡法—感染させた C D 3 ⁺ T 細胞又は C D 4 ⁺ T 細胞及び C D 8 ⁺ 細胞をガラス底共焦点プレート上に播種し、抗 C D 3 (クローン 17 A 2 , B i o L e g e n d) 、抗 T C R β (H 5 7 - 5 9 7) 、抗 F c R I (X 5 4 - 5 / 7 . 1 , B i o L e g e n d) を用いて染色した。A 20 細胞を、抗 B 2 2 0 抗体 (R A - 3 - 6 B 2 , B i o L e g e n d) を用いて染色した。ヒト初代細胞を抗ヒト C D 3 (H I T 3 a , B i o L e g e n d) 、A l e x a F l u o r (登録商標) 647 抗ヒト T C R γ / δ (B 1 , B i o L e g e n d) A P C 抗ヒト C D 6 4 (10 . 1 , B i o L e g e n d) A P C 抗ヒト C D 5 6 (5 . 1 H 1 1 , B i o L e g e n d) で染色した。H T - 2 9 を A l e x a F l u o r (登録商標) 488 抗ヒト C D 3 4 0 (e r b B 2 / H E R - 2 , 2 4 D 2 , B i o L e g e n d) 、A l e x a F l u o r (登録商標) 488 抗ヒト E G F R 抗体 (A Y 1 3 , B i o L e g e n d) で染色した。画像を Z e i s s L S M 8

00共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて収集し、ZENソフトウェア(Carl Zeiss Microscopy)を用いて解析した。

【0489】

殺滅アッセイ-IncuCyte画像作成装置殺滅アッセイを、いくつかのエフェクター：標的比で未感染の又は感染したCD4+ T細胞又はCD8+ T細胞とともに、96ウェルプレート内で 10^4 個のH2B-tdTomato B16F10標的細胞又はYUMM1.7-H2B標的細胞を培養することによって行った。2時間後、記載のとおり、細胞に200 μ L培地中の15 μ gの抗TRP-1(TA99, BioXcell)抗体又は抗CD44(IM7, BioLegend)抗体を添加した。ヒト細胞殺滅アッセイについては、 10^4 個のHT-29を96ウェルプレート内で培養し、24時間後に、ヒトエフェクター細胞を指定した比で、60 μ g/mLのトラスツズマブ(HY-P9907, MedChemExpress)又はセツキシマブ(HY-P9905, MedChemExpress)とともに又はそれなしで添加した。細胞をIncuCyte S3画像作成装置(Sartorius)によって24~60時間撮像した。次に、画像を用いて標的細胞の数をIncuCyteソフトウェアによって計算した。ヒトTNF- α DuoSet ELISA(DY210, R&D Systems)を用いてTNF α サイトカインレベルを、及びヒトIFN γ DuoSet ELISA(DY285, R&D Systems)を用いてIFN γ レベルを測定することによって、ヒトT細胞活性もまた評価した。A20殺滅を、BALB/c脾細胞から単離した感染CD8+ T細胞を含有するu字型の96ウェルプレート内でA20細胞の、10 μ gの抗CD20抗体(18B12, Absolute antibody)との又はそれなしでの24時間の共培養後に評価した。A20細胞の殺滅は、APC-Annexin V染色キット(BioLegend)によってフローサイトメーターにおいて決定した。

10

20

【0490】

フローサイトメトリー-精製したT細胞を、フローサイトメトリー(CytoFLEX, インディアナ州、インディアナポリス、レイクビル、Beckman Coulter)を用いて、発現したGFPについて、又はAlexa Fluor(登録商標)647抗マウスCD64(FcyRI)抗体(X54-5/7.1, BioLegend)、Brilliant Violet 421、又はAPC抗ヒトCD64抗体(10.1, BioLegend)、Alexa Fluor(登録商標)488-抗ヒトCD3(HIT3a, BioLegend)で染色することによって解析した。A20細胞をPE抗CD45R/B220抗体(RA-3-6B2, BioLegend)によって染色した。データセットは、FlowJoソフトウェア(Tree Star)を用いて解析した。

30

【0491】

インビボ腫瘍モデル-50 μ LのDMEM中に懸濁した 2×10^5 個のB16F10細胞をC57BL/6マウスへ、右脇腹上に皮下注射(s.c.)し、成長する腫瘍の大きさを週2回、キャリパーを用いて測定した。腫瘍が120mm²に到達すると、マウスを倫理上の考慮のために殺した。動物に、 2×10^6 個のCD3+ T細胞を未感染(疑似)で又はpMIGI- α アルファガンマ-2A-ガンマ(配列番号4)でレトロウイルス感染させて静脈内(i.v.)注射するとともに、300 μ gの抗TRP1抗体(クローンTA99)をs.c.注射し又はしなかった。処理を腫瘍注射の7日後、11日後、及び14日後に適用した。

40

【0492】

統計解析-各実験を3回行った。各実験群は、少なくとも3匹のマウスからなった。結果の有意性は、複数の群を解析するとき、ノンパラメトリック一元配置ANOVAを用いて決定し、又はノンパラメトリックStudentのt検定を用いて決定した。

【0493】

実施例1

CD4+ T細胞及びCD8+ T細胞におけるFcR γ の細胞内ドメインへ融合したFcR γ 及びFc γ RIの外因性発現は、有効な腫瘍細胞溶解を誘導する

50

以下の構築物をクローニングした。すなわち、アルファ-2A-ガンマと本明細書に記載する、FcγRIの細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞内ドメイン、T2Aスキップペプチド、並びにFcRγ（配列番号1～2）（図1A）、アルファ-ガンマと本明細書に記載する、FcRγの細胞内ドメインへ融合したFcγRIの細胞外ドメイン及び膜貫通ドメイン、T2Aスキップペプチド、並びにFcRγ（配列番号3～4）（図1B）である。これらのプラスミドをレトロウイルス内へとパックし、CD4⁺ T細胞及びCD8⁺ T細胞を感染させるために用いた。これらの構築物の膜局在を確認するために、細胞をTCRβ及びCD3について、並びにFcRIアルファについて染色した（FcγRI、CD64）。共焦点解析は、両構築物において、FcRIがT細胞膜上に均一に局在することを示した（図2A～図2B）。いくつかの実施形態の治療戦略が、腫瘍結合抗体ありでの上述の構築物を発現する再注入自己T細胞に基づいているので、誘導したT細胞の殺滅活性を、B16細胞上の黒色腫抗原gp75を結合するaTRP-1抗体あり又はなしでヒストンH2B-tdTomatoを発現するB16細胞上でインビトロで評価した。（図4A～図4B及び図5A～図5C）。

10

20

30

40

50

【0494】

まず、B16-H2B-tdTomatoを1ウェルあたり24個～50,000個の細胞の範囲の連続濃度で培養し、Incucyteで撮像し、カメラによって捕捉された視野における赤色蛍光核を検出及び計数するIncucyte解析ツールによって計数した。図3のグラフは、培養された細胞量と1視野において計数された細胞数との間にある直接的な相関を示す。結果として、Incucyte撮像システムを用いて、抗TRP-1抗体及び、0.5：1から16：1までの範囲の異なるエフェクター：標的比で培養されたアルファ-2A-ガンマ又はアルファ-ガンマ-2A-ガンマを発現するT細胞によって、B16-H2B-tdTomatoの殺滅を評価した。48時間後の代表的な画像（図4A）及び標的細胞数（図4B）は、アルファ-2A-ガンマを感染させたCD8⁺ T細胞及びCD4⁺ T細胞の両方が腫瘍細胞を、エフェクター：標的比が8：1以上のとき、殺滅したことを示す。アルファ-ガンマ-2A-ガンマ構築物は、Alpha-2A-ガンマと比較して非常により強力であり、2：1のエフェクター：標的比において標的細胞の殺滅を誘導した（図5A～図5C）。

【0495】

まとめると、これらの結果は、標的細胞が抗体で被覆されているときはいつでも、同時のFcγRIを経たシグナル伝達及びFcRγシグナル伝達鎖が従来のCD4⁺ T細胞及びCD8⁺ T細胞において殺滅能を発揮することができることを実証している。加えて、比較は、アルファ-2A-ガンマ構築物を上回るアルファ-ガンマ-2A-ガンマ構築物の利点を示している。

【0496】

B16-H2B-tdTomato標的細胞が、その赤色核によって識別することができ、感染細胞が、pMIGIIベクターバックボーンから生じるGFPを発現するので、当該細胞の活性は、リアルタイムで監視することができた。実際、腫瘍細胞殺滅の大部分は、感染T細胞のGFP発現によって明らかになるように、感染T細胞が介在していた（図6A）。アルファ-ガンマ-2A-ガンマを感染させたマウス起源のCD4⁺ T細胞及びCD8⁺ T細胞における並びにヒトJurkat T細胞におけるFcRIの外來性発現を評価するために、細胞をGFP及びFcRI（CD64）発現についてフローサイトメトリーによって解析した（図6B）。解析は、マウスCD4⁺細胞及びCD8⁺細胞並びにヒトJurkat T細胞株がいずれも、GFPレベルとCD64発現との間に正の相関を有することを示した。

【0497】

次に、抗TRP-1抗体あり又はなしでの、アルファ-ガンマ-2A-ガンマ感染したCD4⁺ T細胞及びCD8⁺ T細胞の殺滅活性をさらに、共培養の60時間後にB16腫瘍細胞数を計数することによってインビトロで評価した（図7）。Incucyte画像作成装置によって計数されたB16-H2B-tdTomato標的細胞の数を、単

独で培養された対照の B 1 6 - H 2 B - t d T o m a t o 標的細胞との比較で示す。最も重要なことに、C D 4 + T 細胞及び C D 8 + T 細胞は、未感染 T 細胞と比較して高い殺滅能を発揮した。

【 0 4 9 8 】

加えて、本発明者らは、F c R I アルファ鎖からガンマ鎖を分離すると観察されるもの（例えば、アルファ-2 A-ガンマ及びアルファ-ガンマ-2 A-ガンマ）と比較可能な、ガンマ鎖へ融合した F c R I アルファ鎖が腫瘍細胞殺滅を促進することができるかどうかを試験した。それゆえ、図 8 A に示すように、F c R I アルファ鎖細胞外 D 1 ドメイン～D 2 ドメインを、シグナル伝達細胞内ガンマと一緒に、C D 8 a の C D 8 ヒンジドメイン及び膜貫通ドメインへ融合させてクローニングした（本明細書ではアルファ-C D 8 -ガンマと記述、配列番号 5 ～ 6）。さらに、本発明者らは、本明細書でアルファ-ガンマ-2 A-ガンマ（変異）と示される、ガンマ鎖の膜貫通ドメインに突然変異したシステイン残基を有する配列を用いることによって、アルファ-ガンマ-2 A-ガンマにおいて二量体を形成しなければならないかどうかを試験した（配列番号 7 ～ 8、図 8 A）。次いで、C D 8 + T 細胞にアルファ-2 A-ガンマ構築物（配列番号 2）、アルファ-C D 8 -ガンマ構築物（配列番号 6）、アルファ-ガンマ-2 A-ガンマ構築物（配列番号 4）、又はアルファ-ガンマ-2 A-ガンマ（変異）構築物（配列番号 8）を感染させ、抗 T R P - 1 抗体あり又はなしで、B 1 6 - H 2 B - t d T o m a t o と共培養した。抗 T R P - 1 抗体単独で、或いは未修飾の C D 8 + T 細胞又はアルファ-2 A-ガンマ、アルファ-C D 8 -ガンマ、アルファ-ガンマ-2 A-ガンマ、若しくはアルファ-ガンマ-2 A-ガンマ（変異）を導入した C D 8 + T 細胞である T 細胞の共培養後に処理した B 1 6 - H 2 B - t d T o m a t o 標的細胞の代表的な画像を示す（図 8 B）。標的細胞数を概算した（図 8 C）。抗 T R P - 1 抗体と組み合わせたアルファ-2 A-ガンマ及びアルファ-ガンマ-2 A-ガンマに感染した T 細胞は腫瘍細胞殺滅を誘導したのに対し、アルファ-C D 8 -ガンマ及びアルファ-ガンマ-2 A-ガンマ（変異）に感染した T 細胞は、ほぼ不活性であった（図 8 B ～ 図 8 C）。加えて、腫瘍細胞殺滅は、抗 T R P - 1 及びアルファ-ガンマ-2 A-ガンマに感染した T 細胞を用いた組み合わせ処理のとき最も顕著であった。図 8 C は、疑似を用いたときの約 7 5 0 個の B 1 6 細胞の値を示す。対照的に、アルファ-2 A-ガンマは、約 5 7 5 個の B 1 6 細胞で、より大きな低減を結果として生じた（図 8 C）。アルファ-ガンマ-2 A-ガンマは、約 4 6 0 個の B 1 6 細胞で、最も大きな腫瘍細胞殺滅を有していた（図 8 C）。

【 0 4 9 9 】

その後、別の黒色腫細胞株を殺滅するアルファ-ガンマ-2 A-ガンマ感染細胞の能力を評価した。この目的のために、H 2 B - t d T o m a t o を発現する Y u m m 1 . 7 黒色腫細胞を 4 8 時間、アルファ-ガンマ-2 A-ガンマを発現する C D 8 + T 細胞とともに、抗 T R P - 1 抗体あり又はなしでインキュベートした。B 1 6 細胞を用いた結果と一致して、Y u m m 1 . 7 腫瘍細胞の有意な殺滅を、抗 T R P - 1 の添加のとき、観察した（図 9）。

【 0 5 0 0 】

その後、黒色腫以外の腫瘍細胞型を殺滅するアルファ-ガンマ-2 A-ガンマ感染細胞の能力を評価した。この目的のために、B A L B / c マウスから得られた A 2 0 B 細胞リンパ腫を、アルファ-ガンマ-2 A-ガンマ構築物に感染した同系の C D 8 + T 細胞とともに、及び抗 C D 2 0 抗体とともに一晚インキュベートした。図 1 0 A は、T 細胞を T C R β について染色し且つ A 2 0 リンパ腫細胞を B 2 2 0 について染色した共培養物の共焦点顕微鏡画像を示す。フローサイトメトリーによる A n n e x i n V 染色による A 2 0 細胞死の解析は、アルファ-ガンマ-2 A-ガンマ感染 T 細胞及び抗 C D 2 0 抗体とともに培養すると、約 2 0 % の殺滅を示した（図 1 0 B）。

【 0 5 0 1 】

加えて、アルファ-ガンマ-2 A-ガンマ感染 T 細胞による腫瘍細胞殺滅に介在する、抗 T R P - 1 以外の腫瘍結合抗体の能力を評価した。この目的のために、アルファ-ガン

マー 2 A - ガンマ構築物を発現する C D 8 + T 細胞を、腫瘍細胞を結合する抗 C D 4 4 抗体と一緒に B 1 6 細胞とともに培養した。実際、抗 C D 4 4 は、腫瘍細胞殺滅を誘導し、抗 T R P 1 抗体によって誘導されるものに匹敵した (図 1 1)。

【 0 5 0 2 】

同じ様式で、p M I G I I ベクターにおいてアルファ 2 A - ガンマ又はアルファ ガンマ 2 A - ガンマに感染した、健常ドナー P B M C から得られたヒト T 細胞 (図 1 4 A ~ 図 1 4 B) を、抗 H E R 2 抗体トラスツズマブとともに (図 1 4 E ~ 図 1 4 F) H E R 2 又は E G F R をその膜上に発現する (図 1 4 C)、H T - 2 9 H 2 B - t d T o m a t o 標的細胞と共培養した (4 : 1 のエフェクター : 標的比)。アルファ 2 A - ガンマ及びアルファ ガンマ 2 A - ガンマはいずれも、トラスツズマブを H E R 2 発現細胞へ添加すると、殺滅活性が観察されなかった E G F R 発現細胞 (図 1 4 F) と比較して、殺滅活性を示した (図 1 4 E)。しかしながら、48 時間の共培養で生標的細胞の数によってわかるように、アルファ ガンマ 2 A - ガンマは、アルファ 2 A - ガンマよりも強い活性を示した。次に、ヒト T 細胞に p M S V G . 1 ベクターにおいてアルファ ガンマ 2 A - ガンマを担持するレトロウイルスを感染させた (図 1 5 A)。アルファ ガンマ 2 A - ガンマ感染細胞を、その殺滅活性について、トラスツズマブのあり又はなしで H E R 2 を発現する H T - 2 9 H 2 B t d T o m a t o 細胞へ添加したとき (図 1 5 B)、或いは、セツキシマブのあり又はなしで E G F R を発現する H T - 2 9 H 2 B t d T o m a t o 細胞へ添加したとき (図 1 5 C)、疑似感染細胞と比較した。いずれの場合においても、アルファ ガンマ 2 A - ガンマ感染で疑似感染ではない細胞は、腫瘍結合抗体を添加したときにのみ、殺滅活性を誘発することができた。殺滅活性に加えて、アルファ ガンマ 2 A - ガンマ発現 T 細胞の活性をサイトカイン放出によって評価した。この目的のために、アルファ ガンマ 2 A - ガンマ感染細胞又は疑似感染細胞を、異なるエフェクター : 標的比でトラスツズマブと一緒に H E R 2 発現 H T - 2 9 H 2 B t d T o m a t o と共培養し、T N F α (図 1 5 D) 及び I F N γ (図 1 5 E) を E L I S A によって測定した。結果は、アルファ ガンマ 2 A - ガンマエフェクター対標的細胞の数と放出されるサイトカインのレベルとの間にある相関を示すのに対し、標的細胞と共培養する疑似感染細胞は、サイトカイン放出を結果として生じなかった。次いで、標的細胞を標的とする抗体に対するアルファ ガンマ 2 A - ガンマ活性の特異性を評価するために、アルファ ガンマ 2 A - ガンマ発現ヒト T 細胞を関連抗体又は無関連抗体と一緒に、H T - 2 9 H 2 B t d T o m a t o H E R 2 発現細胞と共培養した (図 1 5 F)。共培養の 48 時間後、H E R - 2 結合抗体であるトラスツズマブのみが、標的細胞の殺滅を誘発したが、セツキシマブ又はレツキシマブ (R e t u x i m a b) はそうではなかった。まとめると、これらの結果はさらに、F c γ R I 及び F c R γ シグナル伝達鎖を経た同時のシグナル伝達が、標的細胞を抗体で被覆したときはいつでも、T 細胞において殺滅能力を発揮することができること、及び、アルファ ガンマ 2 A - ガンマ構築物は、アルファ 2 A - ガンマ構築物と比較してより強力且つ効能があることを確認した。

【 0 5 0 3 】

実施例 2

細胞内ドメインに融合した F c R γ 及び F c γ R I を外来的に発現する T 細胞は、インビボでの抗腫瘍効果を有する

アルファ ガンマ 2 A - ガンマにインビボで感染した T 細胞の抗腫瘍活性を試験するために、 2×10^5 個の B 1 6 細胞を C 5 7 B L / 6 マウスへ皮下注射した。いったん腫瘍が触知可能な大きさに到達すると、マウスに $300 \mu\text{g}$ の抗 T R P - 1 抗体を皮下注射し、アルファ ガンマ 2 A - ガンマに感染した 2×10^6 個の C D 3 + 細胞を静脈内注射した。対照として、腫瘍担持マウスを未処置のままにしておくか、抗体プラス未感染 C D 3 + T 細胞で処理するか、又は抗 T R P - 1 抗体なしでアルファ ガンマ 2 A - ガンマ感染 C D 3 + T 細胞で処理するかのいずれかとした。結果は、アルファ ガンマ 2 A - ガンマ感染 C D 3 + T 細胞及び抗 T R P - 1 抗体の両方を用いて処置したマウスにおいてのみ、腫瘍量の増加は示さなかった (図 1 2)。

【0504】

ヒト対象におけるアルファガンマ-2A-ガンマに感染したT細胞の抗腫瘍活性を実証するために、PBMCをFicoll-Hypaque（リンパ球分離培地，Axis-Shield Diagnostics, Scotland）を用いた密度勾配によるアフェレーシス生成物から単離する。次いで、細胞を、ヒト血清、IL-2、及び抗CD3モノクローナル抗体OKT-3を含有する培地中で培養する。数日間の増殖に続いて、細胞をアルファガンマ-2A-ガンマレトロウイルスベクターで誘導し、次いで、IL-2を補充した完全培地中で、導入した細胞を1～2週間培養する。これらの細胞を次に、この細胞を必要とする対象へ、病的細胞を標的とする抗体と組み合わせて注入する。

【0505】

10

実施例3

CD4⁺ T細胞及びCD8⁺ T細胞の細胞内ドメインへ融合したFcRγ及び抗EGFR scFvの外來性発現は、有効な腫瘍細胞溶解を誘導する

以下の構築物をクローニングする。すなわち、細胞外D3ドメインへ融合した抗EGFR scFv、並びにFcRγ、T2Aスキップペプチド、及びFcRγの細胞内ドメインへ融合したFcγRIの膜貫通ドメイン（配列番号37～38）であり、本明細書ではscFv-アルファガンマ-2A-ガンマとして記述されている（図13）。プラスミドをレトロウイルス内へとパックし、CD4⁺ T細胞及びCD8⁺ T細胞を感染させるために用いる。次いで、誘導したT細胞の殺滅活性をEGFR発現腫瘍細胞、例えば、ヒストンH2B-tetTomatoを発現するH29結腸癌細胞においてインビトロで評価する。共培養及び殺滅は、Incucyte画像作成装置による撮像後に評価する。

20

【0506】

実施例4

γδT細胞及びNK細胞におけるFcRγの細胞内ドメインへ融合したFcRγ及びFcγRIの外來性発現

γδT細胞又はNK細胞など、αβ T細胞以外のエフェクター細胞はまた、アルファガンマ-2A-ガンマを発現するよう遺伝子操作することもできる。γδT細胞における発現を実証するために、健常ドナー由来のPBMCをIL-2及びゾレドロン酸とともにインキュベートして、γδT細胞集団を増殖した。培養の8日間後に、EasySep（商標）Human Gamma/Delta T Cell Isolation Kitを用いて細胞を分離し、アルファガンマ-2A-ガンマpMIGII構築物を導入した。感染細胞を共焦点顕微鏡法によって撮像した（図17）。γδ T細胞を特異的抗γδ TCR抗体によって同定し、導入細胞のみがpMIGIIベクターに由来するGFP発現を示した。GFP発現を細胞膜上のCD64染色と関連づけた。NK細胞における発現を実証するために、NK-92細胞にpMSVG.2ベクターにおいてアルファガンマ-2A-ガンマを担持するレトロウイルスを感染させた。感染細胞のみが、フローサイトメトリー解析において高レベルのCD64を示した（図18A）。次いで、細胞をNKマーカーであるCD56について及びアルファガンマ-2A-ガンマに由来するCD64について染色し、抗焦点顕微鏡法によって撮像した（図18B）。

30

【0507】

40

本発明は、その具体的な実施形態とともに説明されてきたが、多くの変更、改変、及び変化が当業者に明らかであろうことは明白である。したがって、添付の特許請求の範囲の趣旨及び広範な範囲内に収まるかかる変更物、改変物、及び変化物を包含することは企図されている。

【0508】

本明細書で言及される公表物、特許、及び特許出願はすべて、各個々の公表物、特許又は特許出願が参照により本明細書に援用するよう具体的且つ個々に示されている場合と同程度まで、その全体が本明細書内への参照により本明細書に援用される。加えて、本出願におけるいかなる参考文献の引用又は同定も、かかる参考文献が本発明に対する従来技術として利用可能であるという承認として解釈されないものとする。節の見出しが使用され

50

ている程度まで、当該見出しは、必要に制限するものとは解釈されないものとする。加えて、本出願のいかなる優先権文書も本明細書によりその全体が参照により本明細書に援用される。

【配列表フリーテキスト】

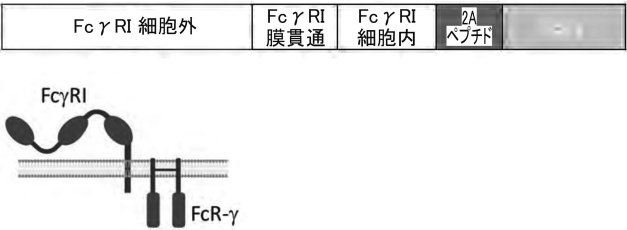
【0509】

- 配列番号1： アルファ-2A-ガンマ構築物のアミノ酸配列（マウス由来）
- 配列番号2： アルファ-2A-ガンマ構築物の核酸配列（マウス由来）
- 配列番号3： アルファ-ガンマ2A-ガンマ構築物のアミノ酸配列（マウス由来）
- 配列番号4： アルファ-ガンマ2A-ガンマ構築物の核酸配列（マウス由来）
- 配列番号5： アルファ-CD8-ガンマ構築物のアミノ酸配列（マウス由来） 10
- 配列番号6： アルファ-CD8-ガンマ構築物のアミノ酸配列（マウス由来）
- 配列番号7： アルファ-ガンマ-2A-ガンマ（変異）構築物のアミノ酸配列（マウス由来）
- 配列番号8： アルファ-ガンマ-2A-ガンマ（変異）構築物の核酸配列（マウス由来）
- 配列番号9： 単鎖DNAオリゴヌクレオチド
- 配列番号10： 単鎖DNAオリゴヌクレオチド
- 配列番号25： OX40細胞内ドメインのアミノ酸配列
- 配列番号26： 41BB細胞内ドメインのアミノ酸配列
- 配列番号27： IL-2R共通ガンマ細胞内アミノ酸配列 20
- 配列番号28： TNFR2細胞内シグナル伝達ドメインのアミノ酸配列
- 配列番号29： IL-12Rb1細胞内アミノ酸配列
- 配列番号30： IL-12Rb2細胞内アミノ酸配列
- 配列番号31： IL-23R細胞内アミノ酸配列
- 配列番号32： IFNgR1細胞内アミノ酸配列
- 配列番号33： IFNgR2細胞内アミノ酸配列
- 配列番号34： IL-2Rb細胞内アミノ酸配列
- 配列番号35： IL-1R1細胞内アミノ酸配列
- 配列番号36： IL-1AcP細胞内アミノ酸配列
- 配列番号37： scFv-アルファ-ガンマ-2A-ガンマ構築物のアミノ酸配列（ヒト由来） 30
- 配列番号38： scFv-アルファ-ガンマ-2A-ガンマ構築物の核酸配列（ヒト由来）
- 配列番号41： 抗EFGR可変重鎖のアミノ酸配列
- 配列番号42： 抗EFGR可変軽鎖のアミノ酸配列
- 配列番号43： 抗EFGRscFvのアミノ酸配列
- 配列番号53： リンカーアミノ酸配列、1～5位は1～4回の繰り返し、6～10位は不在でもよい、11～15位は不在でもよい、16～20位は不在でもよい
- 配列番号54： リンカーアミノ酸配列
- 配列番号55： リンカーアミノ酸配列 40
- 配列番号56： リンカーアミノ酸配列
- 配列番号57： リンカーアミノ酸配列、1～5位は1～3回の繰り返し、6～10位は不在でもよい、11～15位は不在でもよい
- 配列番号58： リンカーアミノ酸配列
- 配列番号59： リンカーアミノ酸配列
- 配列番号62： アルファ-2A-ガンマ構築物の核酸配列（ヒト由来）
- 配列番号63： アルファ-ガンマ2A-ガンマ構築物のアミノ酸配列（ヒト由来）
- 配列番号64： CD64の細胞外ドメイン（D1+D2+D3）のアミノ酸配列（ヒト）
- 配列番号65： CD64の細胞外ドメイン（D1+D2+D3）の核酸配列（ヒト） 50

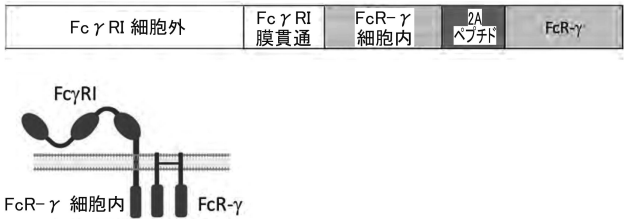
- 配列番号 6 6 : C D 6 4 の膜貫通ドメインの核酸配列 (ヒト)
- 配列番号 6 7 : F c R ガンマ鎖の T M の核酸配列 (ヒト)
- 配列番号 6 8 : F c R ガンマ鎖の E C の核酸配列 (ヒト)
- 配列番号 6 9 : F c R ガンマ鎖の E C のアミノ酸配列 (ヒト)
- 配列番号 7 0 : F c R ガンマ鎖の E C + T M + I C の核酸配列 (ヒト)
- 配列番号 7 1 : F c R ガンマ鎖の E C + T M + I C のアミノ酸配列 (ヒト)
- 配列番号 7 2 : C D 8 A シグナルペプチドの核酸
- 配列番号 7 3 : C D 8 A シグナルペプチドのアミノ酸
- 配列番号 7 4 : シグナル配列の核酸
- 配列番号 7 5 : シグナル配列のアミノ酸
- 配列番号 7 6 : T 2 A ペプチドの核酸
- 配列番号 7 7 : T 2 A ペプチドのアミノ酸

【図面】

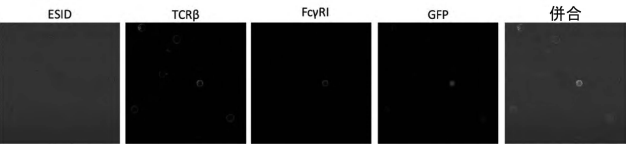
【図 1 A】



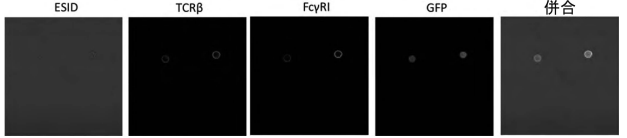
【図 1 B】



【図 2 A】



【図 2 B】



10

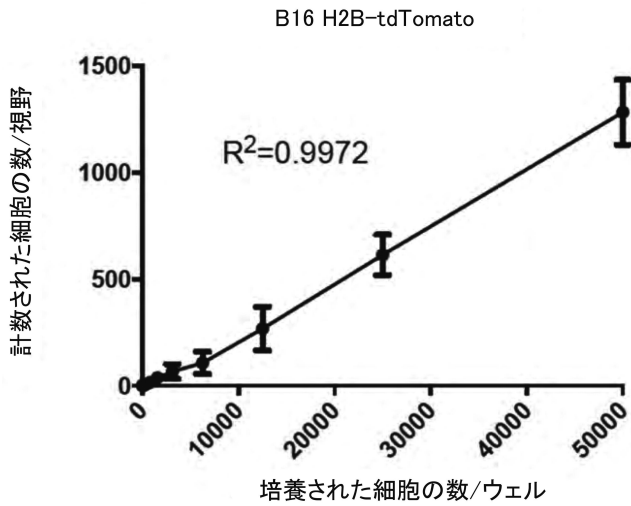
20

30

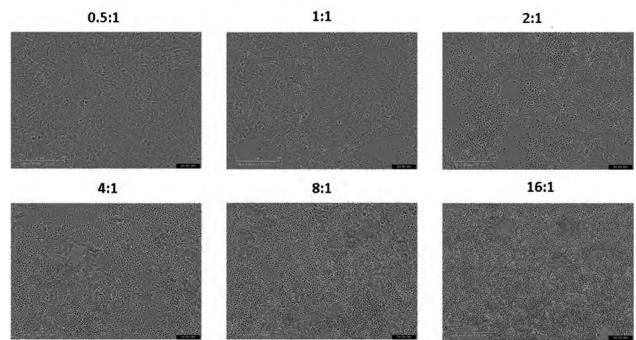
40

50

【図 3】

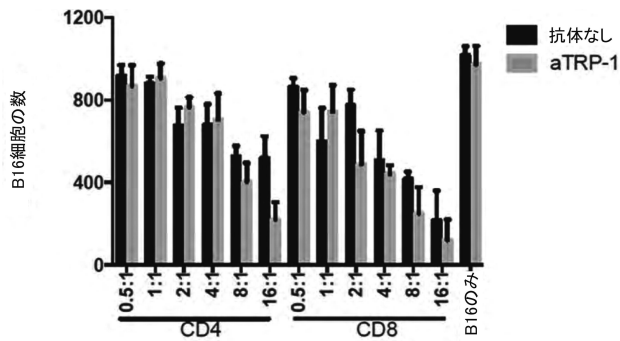


【図 4 A】

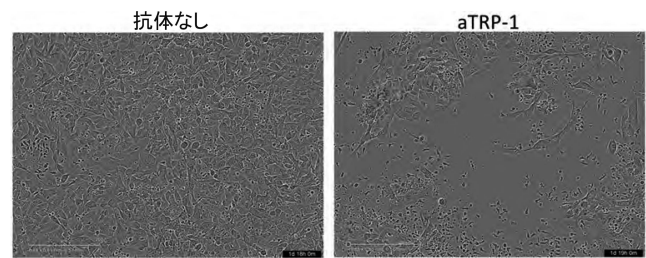


10

【図 4 B】

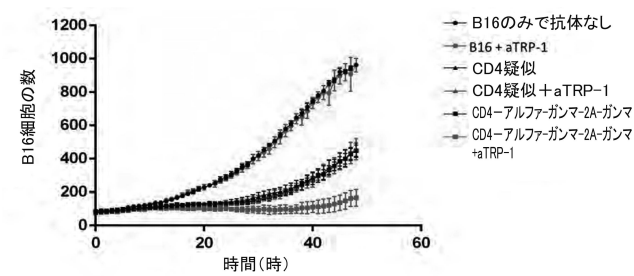


【図 5 A】

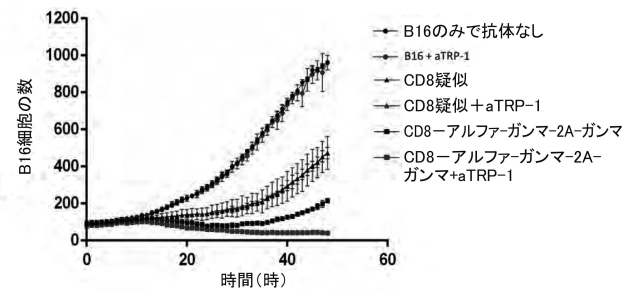


20

【図 5 B】



【図 5 C】

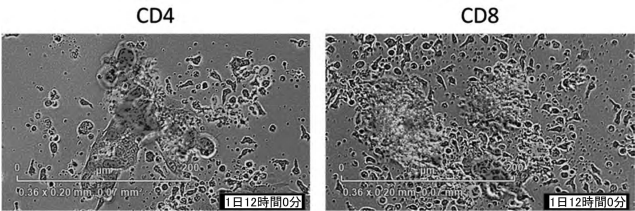


30

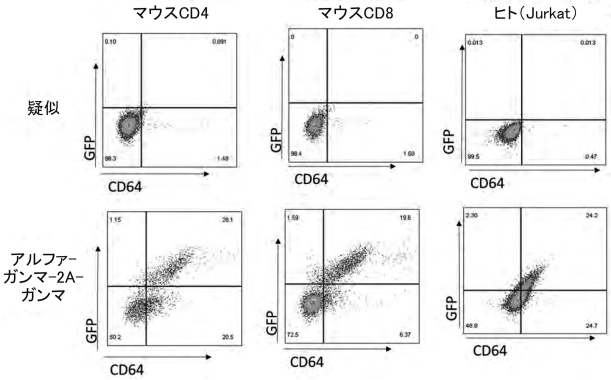
40

50

【図 6 A】

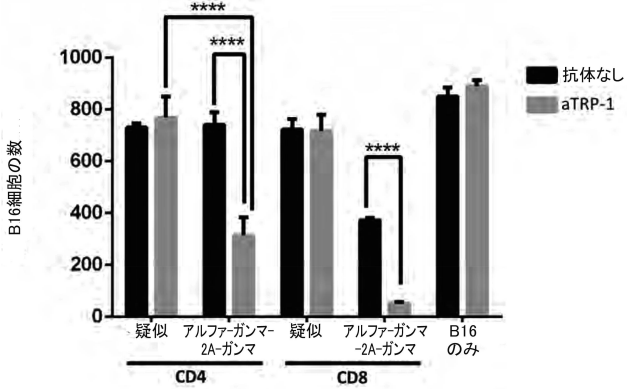


【図 6 B】



10

【図 7】



【図 8 A】



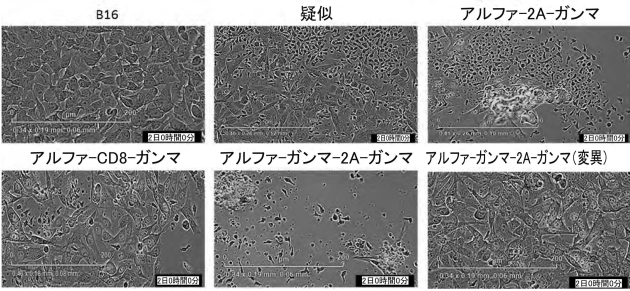
20

30

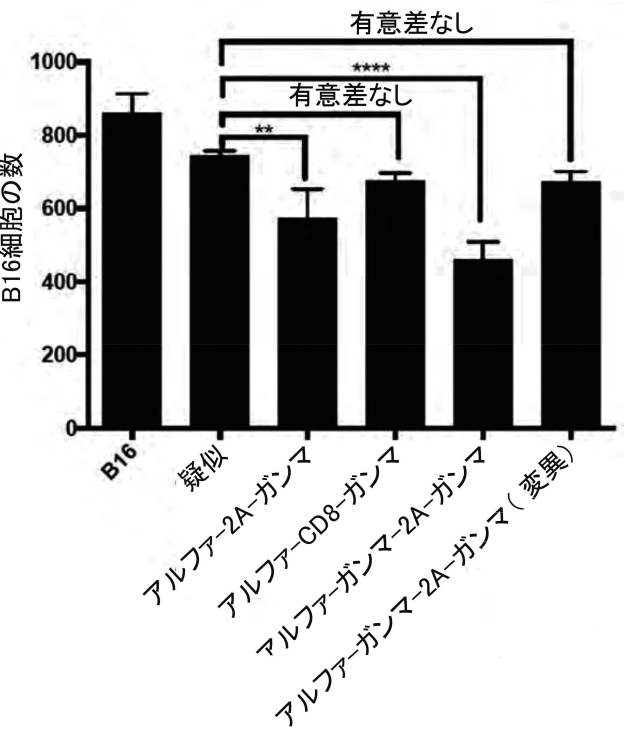
40

50

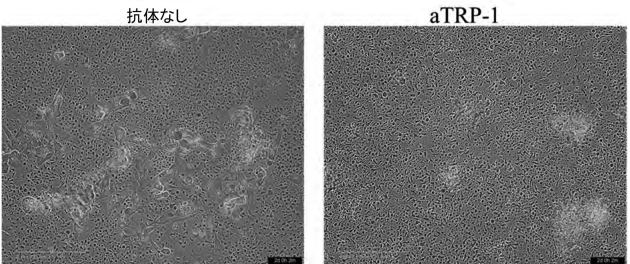
【図 8 B】



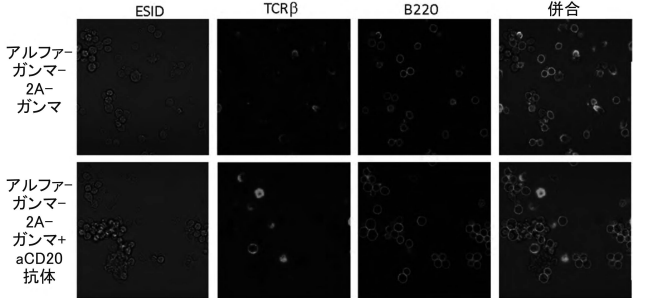
【図 8 C】



【図 9】



【図 10 A】



10

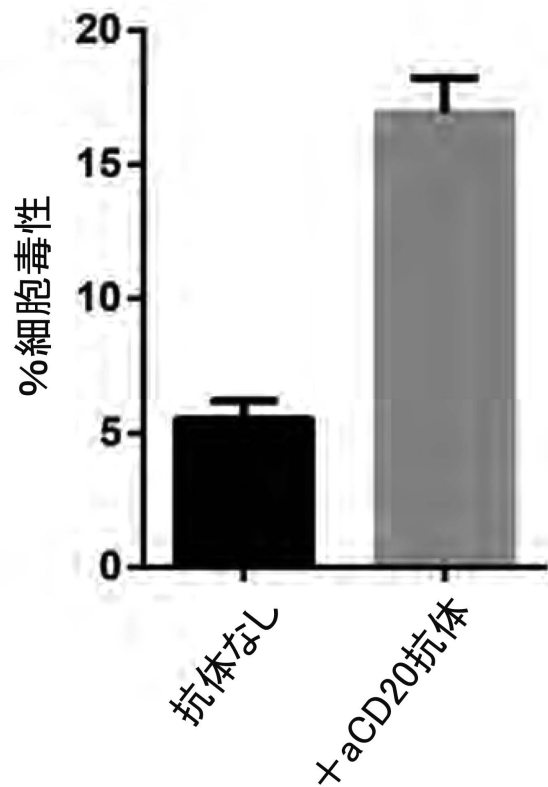
20

30

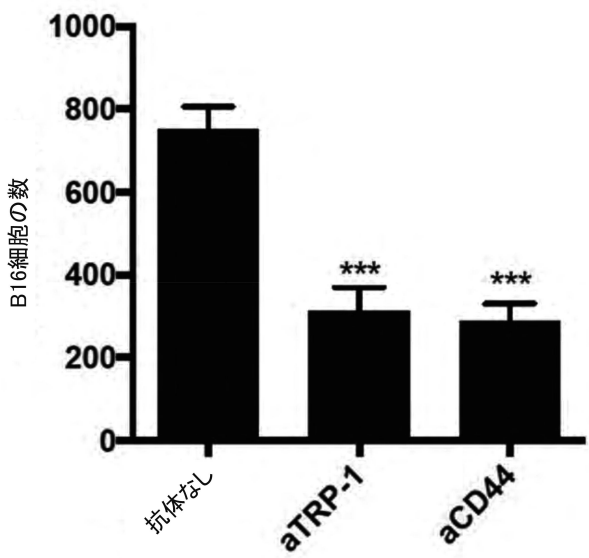
40

50

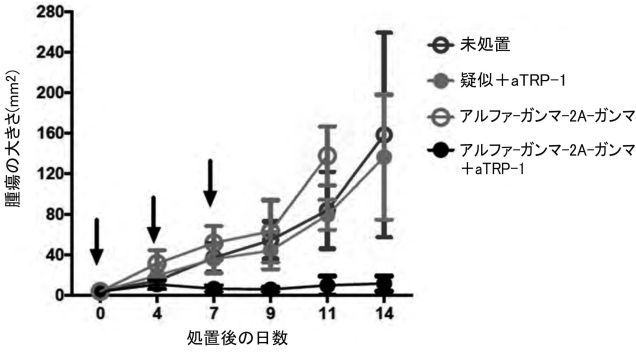
【図 1 0 B】



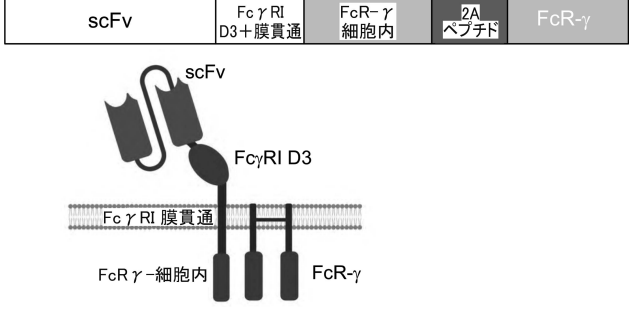
【図 1 1】



【図 1 2】



【図 1 3】



10

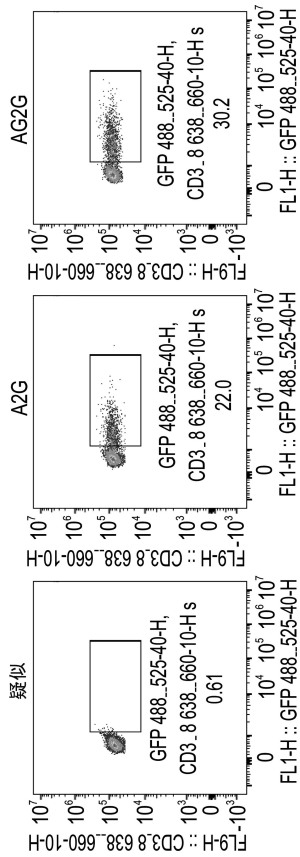
20

30

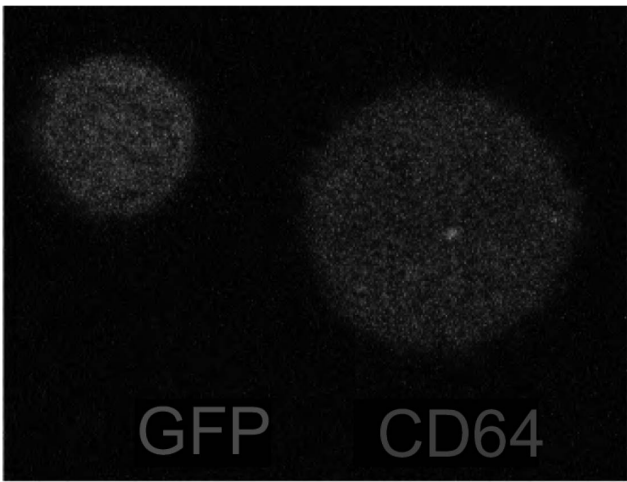
40

50

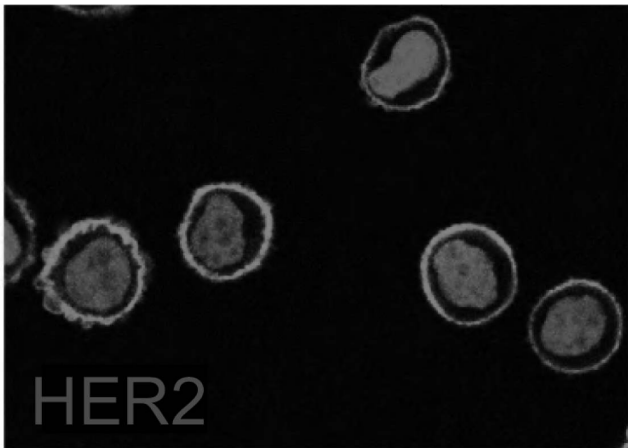
【図 1 4 A】



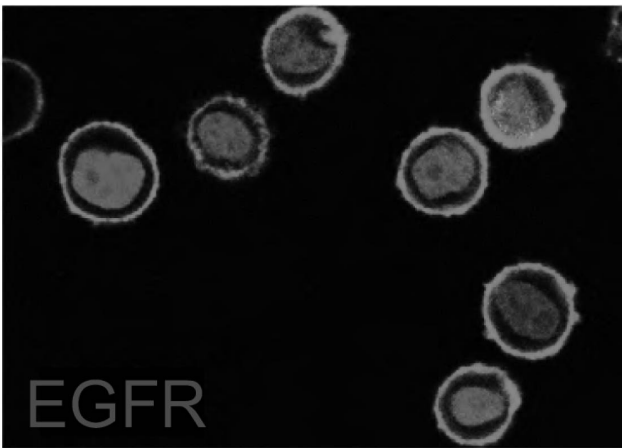
【図 1 4 B】



【図 1 4 C】



【図 1 4 D】



10

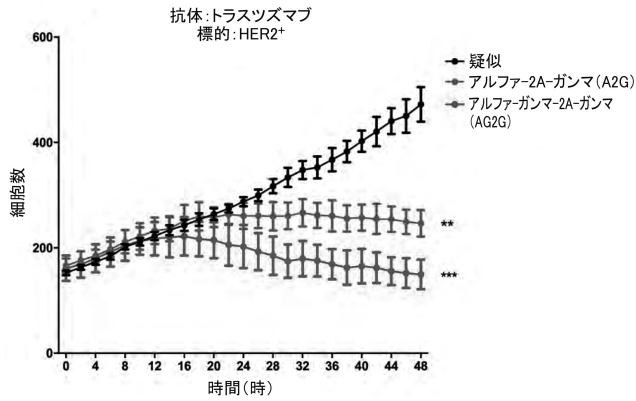
20

30

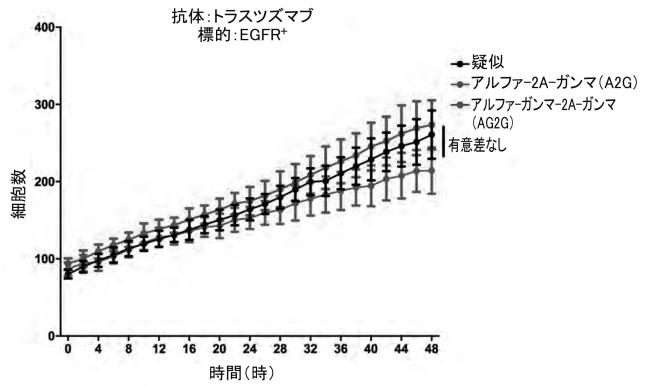
40

50

【図 1 4 E】

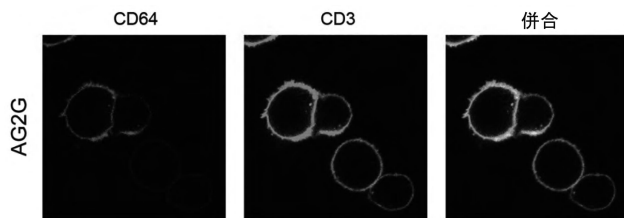


【図 1 4 F】

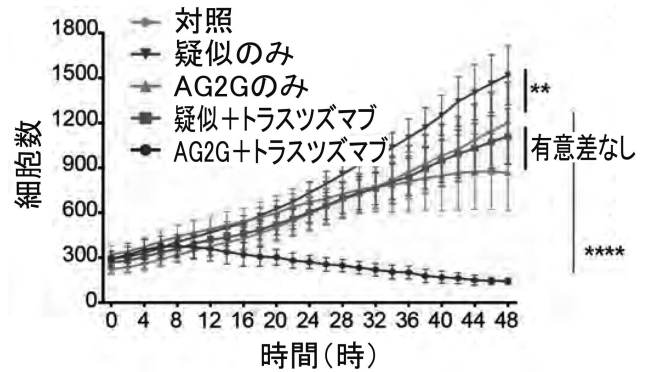


10

【図 1 5 A】

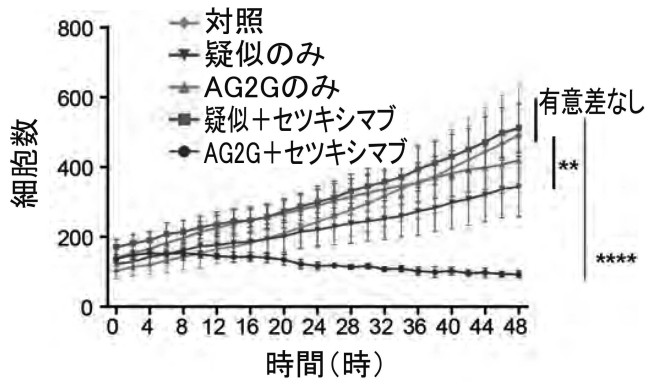


【図 1 5 B】

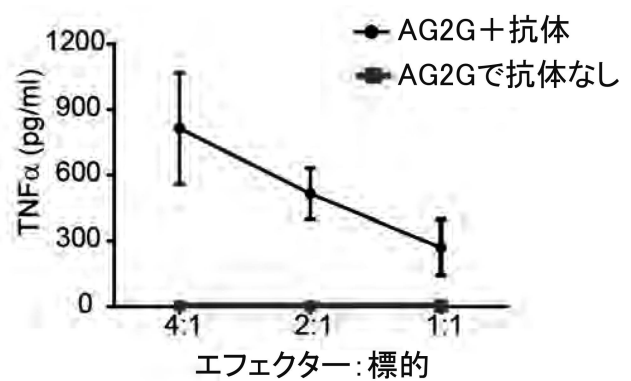


20

【図 1 5 C】



【図 1 5 D】

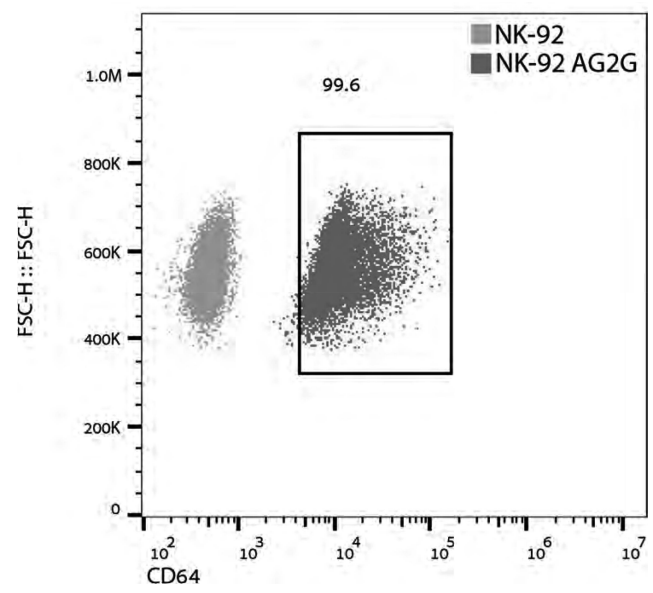


30

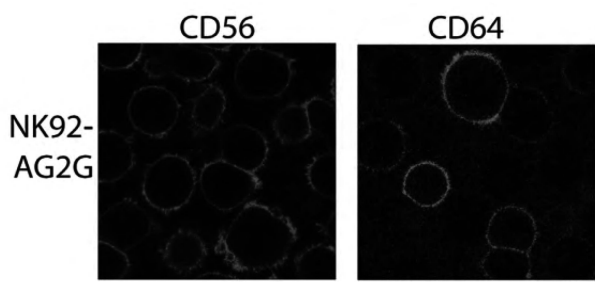
40

50

【図 1 8 A】



【図 1 8 B】



10

【配列表】

2023530182000001.app

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IL2021/050763

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER See extra sheet.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC (20210101) C07K 14/735, C12N 5/10, C12N 15/62, A61K 39/395, A61K 38/17 CPC (20130101) C07K 14/70535, C12N 5/10, C12N 15/62, A61K 39/395, A61K 38/17		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See extra sheet.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014039523 A1 CELLECTIS [FR]; SMITH JULIANNE [FR] et al; 13 May 2014 (2014/05/13) page 1 first para, page 7 first para., page 18 first para., example 6, table 15, FIG 4A (csm1), example 6 on page 84, FIGs 23, 24, 25A-C, 26, page 15 second para., page 15 third para., page 19 fourth para., para. spanning pages 19 and 20, page 20 fourth para., page 22 third para, page 24 first para, page 44 first para, page 58 fifth para.	1,2,4-9,11-13,15,16, 18-28
Y	page 1 first para, page 7 first para., page 18 first para., example 6, table 15, FIG 4A (csm1), example 6 on page 84, FIGs 23, 24, 25A-C, 26, page 15 second para., page 15 third para., page 19 fourth para., para. spanning pages 19 and 20, page 20 fourth para., page 22 third para, page 24 first para, page 44 first para, page 58 fifth para., page 45 first para	3,10,14,17,29-41
Y	Snyder, Kristin M., et al. "Expression of a recombinant high affinity IgG Fc receptor by engineered NK cells as a docking platform for therapeutic mAbs to target cancer cells." Frontiers in immunology 9 (2018): 2873. [online] [retrieved on 2021-08-17]. Retrieved from the Internet: <URL: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.02873/full ><doi: 10.3389/fimmu.2018.02873> 06 Dec 2018 (2018/12/06) abstract, page 9 first para, Fig 3D, para. spanning pages 5-6, page 6, left column, page 10, para spanning left and right columns,	3,10,14,17,29-41
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 Aug 2021		Date of mailing of the international search report 23 Aug 2021
Name and mailing address of the ISA: Israel Patent Office Technology Park, Bldg.5, Malcha, Jerusalem, 9695101, Israel Email address: pctoffice@justice.gov.il		Authorized officer RON-COHEN Yael Telephone No. 972-73-3927142

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (revised January 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IL2021/050763

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. ☒ forming part of the international application as filed:
 ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/IL2021/050763

Patent document cited search report			Publication date	Patent family member(s)		Publication Date	
WO	2014039523	A1	13 May 2014	WO	2014039523	A1	13 Mar 2014
				AR	096274	A1	16 Dec 2015
				AU	2013266733	A1	15 Jan 2015
				AU	2013266733	B2	05 Jul 2018
				AU	2013266734	A1	15 Jan 2015
				AU	2013266734	B2	22 Nov 2018
				AU	2013312838	A1	12 Mar 2015
				AU	2013312838	B2	29 Nov 2018
				AU	2014266830	A1	26 Nov 2015
				AU	2014266830	B2	02 Jul 2020
				AU	2014266833	A1	24 Dec 2015
				AU	2014266833	B2	02 Jul 2020
				AU	2014267436	A1	12 Nov 2015
				AU	2014267436	B2	04 Jul 2019
				AU	2014273085	A1	10 Dec 2015
				AU	2014273085	B2	22 Oct 2020
				AU	2014273490	A1	17 Dec 2015
				AU	2014273490	B2	09 May 2019
				AU	2014351797	A1	09 Jun 2016
				AU	2014351797	B2	11 Mar 2021
				AU	2018236867	A1	18 Oct 2018
				AU	2018236867	B2	21 Jan 2021
				AU	2019201818	A1	04 Apr 2019
				AU	2021201200	A1	11 Mar 2021
				AU	2021201967	A1	29 Apr 2021
				BR	112015004522	A2	21 Nov 2017
				CA	2874609	A1	28 Nov 2013
				CA	2874611	A1	28 Nov 2013
				CA	2883502	A1	13 Mar 2014
				CA	2883502	C	04 May 2021

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (revised January 2019)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/IL2021/050763

Patent document cited search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication Date
		CA 2911292 A1	20 Nov 2014
		CA 2912373 A1	20 Nov 2014
		CA 2912375 A1	20 Nov 2014
		CA 2913830 A1	04 Dec 2014
		CA 2913830 C	29 Jun 2021
		CA 2913869 A1	04 Dec 2014
		CA 2931267 A1	28 May 2015
		CN 104718284 A	17 Jun 2015
		CN 104769103 A	08 Jul 2015
		CN 104769103 B	08 Jun 2018
		CN 105378067 A	02 Mar 2016
		CN 105378068 A	02 Mar 2016
		CN 105431532 A	23 Mar 2016
		CN 105431532 B	06 Apr 2021
		CN 105765061 A	13 Jul 2016
		CN 108998418 A	14 Dec 2018
		CN 109897100 A	18 Jun 2019
		CN 111676196 A	18 Sep 2020
		DK 2893004 T3	04 Feb 2019
		DK 2997132 T3	09 Nov 2020
		DK 3004337 T3	13 Nov 2017
		DK 3309248 T3	02 Aug 2021
		EA 201501109 A1	30 Jun 2016
		EA 036200 B1	14 Oct 2020
		EA 201492222 A1	29 May 2015
		EA 201990575 A2	31 Jul 2019
		EA 201990575 A3	29 Nov 2019
		EP 2855666 A1	08 Apr 2015
		EP 2855666 B1	04 Dec 2019
		EP 2855667 A1	08 Apr 2015
		EP 2893004 A1	15 Jul 2015

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (revised January 2019)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/IL2021/050763

Patent document cited search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication Date
		EP 2893004 B1	24 Oct 2018
		EP 2997132 A1	23 Mar 2016
		EP 2997132 B1	12 Aug 2020
		EP 2997133 A1	23 Mar 2016
		EP 2997141 A1	23 Mar 2016
		EP 3004337 A1	13 Apr 2016
		EP 3004337 B1	02 Aug 2017
		EP 3004339 A2	13 Apr 2016
		EP 3004339 B1	07 Jul 2021
		EP 3071687 A1	28 Sep 2016
		EP 3071687 B1	31 Jul 2019
		EP 3276000 A2	31 Jan 2018
		EP 3276000 A3	21 Feb 2018
		EP 3279315 A2	07 Feb 2018
		EP 3279315 A3	28 Feb 2018
		EP 3309248 A1	18 Apr 2018
		EP 3309248 B1	09 Jun 2021
		EP 3473707 A1	24 Apr 2019
		EP 3546572 A1	02 Oct 2019
		ES 2645393 T3	05 Dec 2017
		ES 2714523 T3	28 May 2019
		ES 2828669 T3	27 May 2021
		HK 1208879 A1	18 Mar 2016
		HK 1212728 A1	17 Jun 2016
		HK 1222678 A1	07 Jul 2017
		HK 1222679 A1	07 Jul 2017
		HK 1223399 A1	28 Jul 2017
		HK 1245321 A1	24 Aug 2018
		HK 1253706 A1	28 Jun 2019
		IL 237576 D0	30 Apr 2015
		IL 237576 A	29 Aug 2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (revised January 2019)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/IL2021/050763

Patent document cited search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication Date
		IL 245725 D0	31 Jul 2016
		IL 245725 A	29 Apr 2021
		IN 10991DEN2014 A	25 Sep 2015
		JP 2015528298 A	28 Sep 2015
		JP 6352920 B2	04 Jul 2018
		JP 2015523064 A	13 Aug 2015
		JP 6463671 B2	06 Feb 2019
		JP 2015525065 A	03 Sep 2015
		JP 6463672 B2	06 Feb 2019
		JP 2016520074 A	11 Jul 2016
		JP 6491643 B2	03 Apr 2019
		JP 2016525888 A	01 Sep 2016
		JP 6608807 B2	20 Nov 2019
		JP 2018011603 A	25 Jan 2018
		JP 6655049 B2	26 Feb 2020
		JP 2016520318 A	14 Jul 2016
		JP 6670743 B2	25 Mar 2020
		JP 2019122382 A	25 Jul 2019
		JP 6854307 B2	07 Apr 2021
		JP 2016520308 A	14 Jul 2016
		JP 6875124 B2	19 May 2021
		JP 2016524464 A	18 Aug 2016
		JP 2016538861 A	15 Dec 2016
		JP 2018183167 A	22 Nov 2018
		JP 2019047801 A	28 Mar 2019
		JP 2019058189 A	18 Apr 2019
		JP 2019176869 A	17 Oct 2019
		JP 2020018323 A	06 Feb 2020
		KR 20150083991 A	21 Jul 2015
		KR 102141259 B1	05 Aug 2020
		KR 20160030103 A	16 Mar 2016

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (revised January 2019)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/IL2021/050763

Patent document cited search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication Date
		KR 102220382 B1	25 Feb 2021
		KR 20150029651 A	18 Mar 2015
		KR 102247979 B1	04 May 2021
		KR 20160030480 A	18 Mar 2016
		KR 102248157 B1	03 May 2021
		KR 20160029017 A	14 Mar 2016
		KR 20160103002 A	31 Aug 2016
		KR 20210050590 A	07 May 2021
		MA 37681 A2	30 Jun 2016
		MA 37681 A3	29 Jun 2018
		MA 37681 B2	29 Jul 2020
		MA 38630 A1	31 Jul 2017
		MX 2015002760 A	29 Oct 2015
		MX 367730 B	04 Sep 2019
		MX 2014014364 A	22 Sep 2015
		MX 370265 B	09 Dec 2019
		MX 2015015638 A	28 Oct 2016
		MX 2015015639 A	28 Oct 2016
		MX 2015015662 A	16 Sep 2016
		MX 2016006177 A	19 Aug 2016
		NZ 703281 A	27 Jan 2017
		PH 12015502479 A1	22 Feb 2016
		PH 12015502479 B1	22 Feb 2016
		PT 2893004 T	21 Jan 2019
		RU 2015112125 A	27 Oct 2016
		RU 2663725 C2	08 Aug 2018
		RU 2016118634 A	27 Dec 2017
		RU 2689558 C1	28 May 2019
		RU 2015153241 A	21 Jun 2017
		RU 2015153241 A3	01 Mar 2018
		RU 2725542 C2	02 Jul 2020

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (revised January 2019)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/IL2021/050763

Patent document cited search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication Date
		RU 2015153250 A	19 Jun 2017
		RU 2727447 C2	21 Jul 2020
		RU 2015153245 A	21 Jun 2017
		RU 2015153245 A3	01 Mar 2018
		RU 2736616 C2	19 Nov 2020
		SG 10201708896W A	29 Nov 2017
		SG 10201806573T A	27 Sep 2018
		SG 11201407802W A	29 Jan 2015
		SG 11201501471V A	30 Mar 2015
		SG 11201508805U A	27 Nov 2015
		TW 201502139 A	16 Jan 2015
		TW 1636992 B	01 Oct 2018
		UA 118106 C2	26 Nov 2018
		UA 118652 C2	25 Feb 2019
		US 2016184362 A1	30 Jun 2016
		US 9855297 B2	02 Jan 2018
		US 2016272999 A1	22 Sep 2016
		US 9890393 B2	13 Feb 2018
		US 2017360835 A1	21 Dec 2017
		US 10286007 B2	14 May 2019
		US 2014134142 A1	15 May 2014
		US 10342829 B2	09 Jul 2019
		US 2018021379 A1	25 Jan 2018
		US 10363270 B2	30 Jul 2019
		US 2015203817 A1	23 Jul 2015
		US 10426795 B2	01 Oct 2019
		US 2019216853 A1	18 Jul 2019
		US 10517896 B2	31 Dec 2019
		US 2018237798 A1	23 Aug 2018
		US 10584352 B2	10 Mar 2020
		US 2016361359 A1	15 Dec 2016

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (revised January 2019)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/IL2021/050763

Patent document cited search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication Date
		US 10813951 B2	27 Oct 2020
		US 2020277625 A1	03 Sep 2020
		US 10870864 B2	22 Dec 2020
		US 2016145337 A1	26 May 2016
		US 10874693 B2	29 Dec 2020
		US 2021060080 A1	04 Mar 2021
		US 11007224 B2	18 May 2021
		US 2021060079 A1	04 Mar 2021
		US 11077144 B2	03 Aug 2021
		US 2013315884 A1	28 Nov 2013
		US 2015017136 A1	15 Jan 2015
		US 2016102324 A1	14 Apr 2016
		US 2016120905 A1	05 May 2016
		US 2016120906 A1	05 May 2016
		US 2018360883 A1	20 Dec 2018
		US 2019209616 A1	11 Jul 2019
		US 2021000869 A9	07 Jan 2021
		US 2019216854 A1	18 Jul 2019
		US 2020181643 A1	11 Jun 2020
		US 2020281979 A1	10 Sep 2020
		US 2021147868 A1	20 May 2021
		US 2021220405 A1	22 Jul 2021
		WO 2013176915 A1	28 Nov 2013
		WO 2013176916 A1	28 Nov 2013
		WO 2013176916 A8	16 Oct 2014
		WO 2014184143 A1	20 Nov 2014
		WO 2014184741 A1	20 Nov 2014
		WO 2014184744 A1	20 Nov 2014
		WO 2014191128 A1	04 Dec 2014
		WO 2014191521 A2	04 Dec 2014
		WO 2014191521 A3	16 Apr 2015

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (revised January 2019)

10

20

30

40

50

International application No.
PCT/IL2021/050763

Patent document cited search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication Date
		WO 2015075195 A1	28 May 2015
		ZA 201508068 B	28 Jul 2021

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IL2021/050763

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

IPC (20210101) C07K 14/735, C12N 5/10, C12N 15/62, C07K 16/28, A61P 35/00, A61P 37/04, A61K 39/395, A61K 38/17, A61K 35/17

CPC (20130101) C07K 14/70535, C07K 2319/00, C07K 2317/622, C12N 5/10, C12N 15/62, C07K 16/2803, A61P 35/00, A61P 37/04, A61K 39/39558, A61K 38/1774, A61K 35/17

B. FIELDS SEARCHED:

* Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Databases consulted: BLAST, Esp@cenet, Google Patents, CAPLUS, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, PubMed, Google Scholar, DWPI, Similari (AI-based)

Search terms used: multi subunit protein, Fc receptor common ? chain, Fc gamma receptor, CD64, Fc?R, Fc portion of IgG, extracellular binding domain, transmembrane domain, activating signal, 2A linker, skipping peptide, target cell, T cell, natural killer cells, NK cell, immune cell, antibody, scFv, cancer, killing capacity, cytotoxicity, sequence search, applicant

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 K 35/17 (2015.01)
 A 6 1 K 47/68 (2017.01)
 C 0 7 K 14/705 (2006.01)
 C 1 2 N 15/12 (2006.01)
 C 1 2 N 15/13 (2006.01)
 C 1 2 N 5/078 (2010.01)
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/395
 A 6 1 K 39/395
 A 6 1 K 35/17
 A 6 1 P 43/00 1 0 5
 A 6 1 K 47/68
 C 0 7 K 14/705
 C 1 2 N 15/12
 C 1 2 N 15/13
 C 1 2 N 5/078
 A 6 1 K 48/00

4 H 0 4 5

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
 E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
 CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
 E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
 G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
 TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

イスラエル国 テルーアビブ ピー. オー. ボックス 3 9 2 9 6 ラモット アット テル アビブ
 ユニバーシティ リミテッド内

(72)発明者

ラソウルニリアナ ダイアナ

イスラエル国 テルーアビブ ピー. オー. ボックス 3 9 2 9 6 ラモット アット テル アビブ
 ユニバーシティ リミテッド内

(72)発明者

タル リオール

イスラエル国 テルーアビブ ピー. オー. ボックス 3 9 2 9 6 ラモット アット テル アビブ
 ユニバーシティ リミテッド内

F ターム (参考)

4B065 AA94X AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44
 4C076 AA95 CC26 CC27 CC41 EE59
 4C084 AA13 MA02 NA05 ZB211 ZB261 ZC751
 4C085 AA13 AA14 BB01 BB12 BB36 BB42 BB50 CC03 CC31 DD62
 EE03 GG04
 4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 CA04 MA02 NA05 ZB21 ZB26 ZC75
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA41 DA50 DA76 EA22 EA28 FA72
 FA74