

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7664180号
(P7664180)

(45)発行日 令和7年4月17日(2025.4.17)

(24)登録日 令和7年4月9日(2025.4.9)

(51)国際特許分類	F I	
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	Z N A
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11	Z
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z
請求項の数 25 (全63頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2021-563352(P2021-563352)	(73)特許権者	519089657
(86)(22)出願日	令和2年4月24日(2020.4.24)		アロジーン セラピューティクス, イン
(65)公表番号	特表2022-532996(P2022-532996 A)		コーポレイテッド
(43)公表日	令和4年7月21日(2022.7.21)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4
(86)国際出願番号	PCT/US2020/029775		0 8 0 サウス サンフランシスコ イー
(87)国際公開番号	WO2020/219848	(74)代理人	100094569
(87)国際公開日	令和2年10月29日(2020.10.29)		弁理士 田中 伸一郎
審査請求日	令和5年4月20日(2023.4.20)	(74)代理人	100103610
(31)優先権主張番号	62/839,455		弁理士 吉 田 和彦
(32)優先日	平成31年4月26日(2019.4.26)	(74)代理人	100109070
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100119013
(31)優先権主張番号	63/005,041		弁理士 山崎 一夫
(32)優先日	令和2年4月3日(2020.4.3)	(74)代理人	100123777
最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 リツキシマブ耐性キメラ抗原受容体およびその用途

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 9 と少なくとも 9 0 % 同一である抗 C D 1 9 キメラ抗原受容体 (C A R) を含むポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドは、リツキシマブ結合部位を含まず、前記ポリヌクレオチドは哺乳動物 T 細胞に前記抗 C D 1 9 キメラ抗原受容体 (C A R) を発現することができる短い E F 1 a プロモーターを含み、前記短い E F 1 a プロモーターは配列番号 3 9 の核酸配列を含まず、配列番号 1 6 の核酸配列を含む、単離ポリヌクレオチド。

【請求項 2】

前記プロモーターが、配列番号 1 6 の核酸配列からなる、請求項 1 に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 3】

前記ポリペプチドが、安全スイッチをさらに含む、請求項 1 または 2 に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 4】

前記安全スイッチが、リンカーペプチドを使用して前記抗 C D 1 9 C A R に連結される、請求項 3 に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 5】

前記安全スイッチが、 T 2 A リンカーを使用して前記抗 C D 1 9 C A R に連結される、請求項 3 に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 6】

前記安全スイッチが抗体結合部位を含む、請求項 3 ~ 5 のいずれか一項に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 7】

前記安全スイッチが変異 CD 20 ミモトープを含む、請求項 3 ~ 5 のいずれか一項に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 8】

前記ポリペプチドが CD 3 4 エピトープを含む、請求項 3 ~ 7 のいずれか一項に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 9】

前記 CD 3 4 エピトープが Q B E N D - 1 0 エピトープである、請求項 8 に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 10】

前記ポリペプチドが、CD 8 ヒンジ/膜貫通ドメインをさらに含む、請求項 3 ~ 9 のいずれか一項に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 11】

配列番号 1 ~ 7 のいずれか一つと少なくとも 95%、96%、98%、99% または 100% 同一である核酸配列を含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 12】

配列番号 8 ~ 14 のいずれか一つと少なくとも 95%、96%、98%、99% または 100% 同一であるポリペプチドをコードする、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の単離ポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 14】

前記ベクターがレトロウイルスベクター、DNA ベクター、プラスミド、RNA ベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルス関連ベクター、レンチウイルスベクター、またはそれらの任意の組み合わせである、請求項 13 に記載のベクター。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の単離ポリヌクレオチドを含む操作された免疫細胞であって、リツキシマブ結合部位を発現しない、操作された免疫細胞。

【請求項 16】

請求項 13 または 14 に記載のベクターを含む操作された免疫細胞であって、リツキシマブ結合部位を発現しない、操作された免疫細胞。

【請求項 17】

前記免疫細胞が、T 細胞、腫瘍浸潤リンパ球 (T I L)、NK 細胞、TCR 発現細胞、樹状細胞、または NK - T 細胞である、請求項 15 または 16 のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞。

【請求項 18】

前記細胞が自己 T 細胞である、請求項 17 に記載の操作された免疫細胞。

【請求項 19】

前記細胞が同種 T 細胞である、請求項 17 に記載の操作された免疫細胞。

【請求項 20】

前記細胞が、配列番号 3 の核酸配列と少なくとも 95%、96%、98%、99% または 100% 同一であるポリヌクレオチドを含む、請求項 15 ~ 19 のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞。

【請求項 21】

前記細胞がリツキシマブに耐性である、請求項 15 ~ 20 のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 2 2】

請求項 1 5 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞を含む、医薬組成物。

【請求項 2 3】

請求項 1 5 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の操作された免疫細胞を対象に投与することを
含む、前記対象における疾患または障害を治療する方法において使用するための、請求項
2 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 4】

前記疾患または障害が、非ホジキンリンパ腫（NHL）である、請求項 2 3 に記載の医
薬組成物。

【請求項 2 5】

前記対象が、リツキシマブで治療されたか、または現在治療されている、請求項 2 3 ま
たは 2 4 に記載の医薬組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2019年4月26日に提出された米国仮特許出願第62/839,455号および2020年4月3日に提出された米国仮特許出願第63/005,041号の優先権の利益を主張するものであり、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0002】

本開示は、CD19に結合する抗原結合分子、それをコードするポリヌクレオチド、およびそれを使用して患者における癌を治療する方法を含むキメラ抗原受容体（CAR）に関する。

【0003】

配列表

本出願は、ASCII形式で電子的に提出された配列表を含み、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。2020年4月21日に作成されたこのASCIIコピーは、AT-028_03WO_SL.txtと名付けられ、サイズは81,460バイトである。

30

【背景技術】

【0004】

悪性腫瘍関連抗原を認識するように遺伝子改変された免疫細胞の養子移入は、癌を治療するための新しいアプローチとして有望視されている（例えば、Brennerら、*Current Opinion in Immunology*、22（2）：251-257（2010）；Rosenbergら、*Nature Reviews Cancer*、8（4）：299-308（2008）を参照されたい）。免疫細胞は、キメラ抗原受容体（CAR）、CD19抗原認識部分からなる融合タンパク質およびT細胞活性ドメインを発現するように遺伝子改変され得る（例えば、Eshharら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、90（2）：720-724（1993）、およびSadelainら、*Curr. Opin. Immunol.*、21（2）：215-223（2009）を参照されたい）。CARを含有する免疫細胞、例えば、CAR-T細胞（CAR-T）は、標的細胞を認識および殺傷する能力を保持または強化しながら、抗原特異性を有するように操作される。

40

【0005】

CD19の異常な発現を伴う癌、特に悪性腫瘍に対する治療に対するニーズがある。本明細書では、このニーズに対処する方法および組成物が提供されている。

【発明の概要】

【0006】

CD19に特異的に結合するCD19抗原結合ドメインを含むキメラ抗原受容体（CA

50

R)、これらのCARをコードするポリヌクレオチド、およびこれらのCD19特異的CARを発現する免疫細胞、例えば、CAR-T細胞が本明細書において提供される。また、これらのCD19特異的CAR、およびこれらのCD19特異的CARを含む免疫細胞を作製し、使用方法も提供される。

【0007】

一態様では、本開示は、配列番号9に対し少なくとも70%同一である抗CD19キメラ抗原受容体(CAR)を含むポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチドを提供し、ポリペプチドはリツキシマブ結合部位を含まず、ポリヌクレオチドは哺乳類T細胞において抗CD19キメラ抗原受容体(CAR)を発現することができる短いEF1aプロモーターを含む。

10

【0008】

いくつかの実施形態では、短いEF1aプロモーターは、配列番号15の核酸配列内にイントロン配列を含まない。いくつかの実施形態では、イントロンは、配列番号39の核酸配列を含む。

【0009】

いくつかの実施形態では、プロモーターは、配列番号16の核酸配列を含む。

【0010】

いくつかの実施形態では、プロモーターは、配列番号15の核酸配列を含む全長EF1aプロモーターである。

【0011】

いくつかの実施形態では、プロモーターは、配列番号15の核酸配列を含み、ポリヌクレオチドは、配列番号8~14のいずれか一つと少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、98%、99%または100%同一であるポリペプチドをコードする。

20

【0012】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、安全スイッチをさらに含む。

【0013】

いくつかの実施形態では、安全スイッチは、リンカーペプチドを使用してCD19 CARに連結される。

【0014】

いくつかの実施形態では、安全スイッチは、T2Aリンカーを使用して抗CD19 CARに連結される。

30

【0015】

いくつかの実施形態では、安全スイッチは、抗体結合部位を含む。

【0016】

いくつかの実施形態では、安全スイッチは、変異CD20ミモトープを含む。

【0017】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、CD8ヒンジ/膜貫通ドメインをさらに含む。

【0018】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、CD34エピトープを含む。

40

【0019】

いくつかの実施形態では、CD34エピトープは、QBEND-10エピトープである。

【0020】

いくつかの実施形態において、単離ポリヌクレオチドは、配列番号1~7のいずれか一つと少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、98%、99%または100%同一である核酸配列を含む。

【0021】

いくつかの実施形態において、単離ポリヌクレオチドは、配列番号8~14のいずれか一つと少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、98%、99%または100%同一であるポリペプチドをコードする。

50

【 0 0 2 2 】

別の態様では、本開示は、本明細書に記載される単離ポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。

【 0 0 2 3 】

いくつかの実施形態では、ベクターは、レトロウイルスベクター、DNAベクター、プラスミド、RNAベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルス関連ベクター、レンチウイルスベクター、またはそれらの任意の組み合わせである。

【 0 0 2 4 】

一態様では、本開示は、本明細書に記載される単離ポリヌクレオチドを含む操作された免疫細胞を提供する。

10

【 0 0 2 5 】

いくつかの実施形態では、本開示は、配列番号3と少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、98%、99%または100%同一である核酸配列を含むポリヌクレオチドを含む操作された免疫細胞を提供する。

【 0 0 2 6 】

いくつかの実施形態では、本開示は、表1に示されるように、抗CD19 CAR v1.2、v1.3、v1.4、v1.5、またはv1.6レンチウイルス構築物と少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、98%、99%、または100%同一であるポリヌクレオチドを含む操作された免疫細胞を提供する。

【 0 0 2 7 】

いくつかの実施形態では、本開示は、表1に示されるように抗CD19 CAR v1.2レンチウイルス構築物と少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、98%、99%、または100%同一であるポリヌクレオチドを含む操作された免疫細胞を提供する。

20

【 0 0 2 8 】

いくつかの実施形態では、本開示は、シグナル配列の有無に関わらず、配列番号9または配列番号10に対し、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、98%、99%または100%同一であるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む操作された免疫細胞を提供する。

【 0 0 2 9 】

いくつかの実施形態では、本開示は、配列番号3の核酸配列を含むポリヌクレオチドを含む操作された免疫細胞を提供するものであり、これは配列番号16の核酸を含むEF1aの短いプロモーターによって駆動される。

30

【 0 0 3 0 】

いくつかの実施形態では、本開示は、シグナル配列の有無に関わらず、配列番号9または配列番号10のポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチドを含む操作された免疫細胞を提供するものであり、これは配列番号16の核酸を含むEF1aの短いプロモーターによって駆動される。いくつかの実施形態では、プロモーターは、EF1a遺伝子の第一のイントロンを含まない。

【 0 0 3 1 】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、リツキシマブのミモトープを含まない。

40

【 0 0 3 2 】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、図1に示されるCD19 CAR v1.2レンチウイルス構築物(ALL0-501Aとも呼ぶこともできる)を含むポリヌクレオチドを含む。

【 0 0 3 3 】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、本明細書に記載されるベクターを含む。

【 0 0 3 4 】

50

いくつかの実施形態では、免疫細胞は、T細胞、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）、NK細胞、TCR発現細胞、樹状細胞、またはNK-T細胞である。

【0035】

いくつかの実施形態では、細胞は自己T細胞である。

【0036】

いくつかの実施形態では、細胞は、同種T細胞である。

【0037】

一態様では、本開示は、本明細書に記載される操作された免疫細胞を提供し、細胞はリツキシマブに耐性である。

【0038】

別の態様では、本開示は、本明細書に記載の操作された免疫細胞を含む医薬組成物を提供する。

【0039】

一態様では、本開示は、本明細書に記載の操作された免疫細胞、または本明細書に記載の医薬組成物を対象に投与することを含む、それを必要とする対象において疾患または障害を治療する方法を提供する。

【0040】

いくつかの実施形態では、疾患または障害は、非ホジキンリンパ腫（NHL）である。

【0041】

いくつかの実施形態では、対象は、リツキシマブで治療を受けたことがある、または現在治療を受けている。

【0042】

一態様では、本開示は、本明細書に記載のキメラ抗原受容体を発現する操作された免疫細胞または操作された免疫細胞を含む医薬組成物を含む製造物品を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0043】

【図1】図1は、リツキシマブ耐性CD19キメラ抗原受容体の概略図を示す。

【0044】

【図2A - 2B】図2Aおよび2Bは、リツキシマブ耐性CAR発現ベクターで形質導入された汎T細胞からの5日目のCAR発現を示すフローサイトメリーのプロットを示す。図2Aは、ドナー541および604由来の細胞上のCAR発現を示す。図2Bは、ドナー410由来の細胞上のCARおよびCD34発現を示す。ドナー2593で類似の特性が観察された（データは示さず）。

【0045】

【図3B】図3は、13日目の4名のドナーすべてからの正規化された細胞増殖および最終的なCAR発現を示す。

【0046】

【図4A - 4D】図4A～4Dは、リツキシマブ耐性CAR発現ベクターで形質導入されたドナー541（図4A）、604（図4B）、410（図4C）、2593（図4D）からの汎T細胞の経時的な細胞増殖およびCAR発現を示す。

【0047】

【図5A - 5D】図5A～5Dは、リツキシマブ耐性CAR発現ベクターで形質導入されたドナー541（図5A）、604（図5B）、410（図5C）、2593（図5D）からの汎T細胞の5、9、および13日目のCD4/CD8の比を示す。

【0048】

【図6A - 6D】図6A～6Dは、リツキシマブ耐性CAR発現ベクターで形質導入されたドナー541（図6A）、604（図6B）、410（図6C）、2593（図6D）からの汎T細胞の9日目の表現型および活性を示す。

【0049】

【図7】図7は、9日目に4名のドナーすべてから平均したTIM3およびPD1染色を

10

20

30

40

50

使用して測定された表現型、活性化%CD8+、およびアネルギーを示す。

【0050】

【図8A-8D】図8A~8Dは、リツキシマブ耐性CAR発現ベクターで形質導入されたドナー541(図8A)、604(図8B)、410(図8C)、2593(図8D)からの汎T細胞の13日目の表現型および活性を示す。

【0051】

【図9】図9は、13日目に4名のドナーすべてからのTIM3およびPD1染色を使用して測定された表現型、活性化%CD8+、およびアネルギーを示す。

【0052】

【図10】図10は、各CAR構築物について標的細胞としてRaji細胞を使用した平均短期(24時間)殺傷アッセイを示す。 10

【0053】

【図11A-11D】図11A~11Dは、A549-CD19+細胞を標的細胞として使用した平均長期殺傷アッセイを示し、それぞれのCAR構築物について、E:Tは、8:1(図11A)、4:1(図11B)、2:1(図11C)、および1:1(図11D)であった。

【0054】

【図12】図12は、リツキシマブ耐性レンチウイルス構築物(ALLO-501v1.2およびv1.3)またはリツキシマブ感受性レンチウイルス構築物(ALLO-501v1.0)のレンチウイルス調製物の連続希釈で汎T細胞を形質導入した後の5日目のCAR+T細胞%のレベルを示す。 20

【0055】

【図13A-13B】図13A~13Bは、Raji細胞を担持するNSGマウス腫瘍モデルで試験した場合の、リツキシマブ耐性CAR発現ベクター(ALLO-501v1.2)またはリツキシマブ感受性CAR発現ベクター(ALLO-501v1.0)で形質導入したドナー541(図13A)および604(図13B)に由来する汎T細胞のインビボ有効性を示す。

【発明を実施するための形態】

【0056】

キメラ抗原受容体(CAR)療法は、癌治療に対する有望なアプローチである。本明細書にv1.0として記載されるCAR構築物は、安全スイッチとしての役割を果たす合成ペプチドRQR8を発現する例示的な抗CD19 CARである。RQR8は、リツキシマブ結合性ミモトープを2個含有している。有害事象の場合、患者はリツキシマブで治療されて、循環血中の抗-CD19 v1.0のレベルを枯渇させてもよい。また、リツキシマブは、いくつかの非ホジキンリンパ腫(NHL)の適応症における標準治療として使用され、高用量で投与される。リツキシマブの半減期が長いため、抗CD19 v1.0は、循環しているリツキシマブのレベルが低濃度に達するまで患者に投与することができない。リツキシマブ耐性CD19 CAR療法により、以前にリツキシマブで治療された患者は、リツキシマブのレベルが減少するのを待つことなく、かつ患者がアフレーシスを受けることなく、CAR-T療法をすぐに受けることができる。CD20結合抗体リツキシマブに耐性である抗CD19キメラ抗原受容体(CAR)が本明細書に提供される。新規のCAR構築物は、CARの発現および活性を保持しながらリツキシマブの結合を除去するように設計される。 30

【0057】

I. キメラ抗原受容体

本明細書で使用される場合、キメラ抗原受容体(CAR)は、標的抗原(例えば、癌細胞上の標的抗原)を特異的に認識するタンパク質である。標的抗原に結合すると、CARは免疫細胞を活性化して、その抗原を有する細胞(例えば、癌細胞)を攻撃および破壊することができる。CARはまた、共刺激ドメインまたはシグナル伝達ドメインを組み込み、それらの効力を増加させることができる。Krauseら、J. Exp. Med.、V 40

olume 188、No. 4、1998(619-626); Finneyら、Journal of Immunology、1998、161:2791-2797、Songら、Blood 119:696-706(2012); Kalosら、Sci. Transl. Med. 3:95(2011); Porterら、N. Engl. J. Med. 365:725-33(2011)、および Gross et al.、Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 56:59-83(2016); 米国特許第7,741,465号、および第6,319,494号を参照されたい。

【0058】

本明細書に記載されるキメラ抗原受容体は、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインを含み、細胞外ドメインは、CD19に特異的に結合するCD19抗原結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、CD19特異的CARは、5'から3'の以下の要素を含む：シグナル配列、CD19抗原結合ドメイン（例えば、4G7に由来するscFv）、ヒンジおよび膜貫通領域、ならびに一つ以上の連続シグナル伝達ドメイン。いくつかの実施形態では、抗体結合ドメインは、CD19に結合して、CD19の発現に関連する血液癌を治療する。

10

【0059】

同種抗CD19 CAR v1.0に使用されるキメラ抗原受容体(CAR)のscFv部分は、マウス抗ヒトCD19抗体クローン4G7に由来する。4G7は、CD19を認識するCD19モノクローナル抗体である。4G7から形成された単鎖可変断片(scFv)は、いくつかのキメラ抗原受容体(CAR)の標的化構成要素を含む(WO2014184143A1を参照)。いくつかの実施形態では、CD19モノクローナル抗体4G7に由来するscFvは、可動性リンカーによって一緒に連結された、CD19モノクローナル抗体4G7免疫グロブリンガンマ1重鎖(GenBank:CAD88275.1、配列番号17)の一部と、CD19モノクローナル抗体4G7免疫グロブリンカッパ軽鎖(GenBank:CAD88204.1、配列番号35)の一部とを含む。(Peippm., D. Saul, ら、2004. Efficient eukaryotic expression of fluorescent scFv fusion proteins directed against CD antigens for FACS applications. J. Immunol. Methods 285:265-280)。いくつかの実施形態では、scFvは、可動性リンカーによって一緒に連結された、CD19モノクローナル抗体4G7免疫グロブリンガンマ1重鎖の可変断片と、抗CD19モノクローナル抗体4G7免疫グロブリンカッパ軽鎖の可変断片とを含む。

20

30

【0060】

CD19モノクローナル抗体4G7免疫グロブリンガンマ1重鎖(シグナル配列は下線付き)

【0061】

MEWSWIFLFLLLSGTAGVHSEVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQ
KPGQGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARG
TYYYSRVFDYWGQGTTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPV
TVTWNQSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKI
VPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDD
VEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKG
RPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMD
TDGSYFVYSKLNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPGK(配列番号17)

40

【0062】

CD19モノクローナル抗体4G7免疫グロブリンカッパ軽鎖(シグナル配列は下線付き)

【0063】

MRCIAEFLGLLVLVWIPGAIGDIVMTQAAPSIPVTPGESVVISCRSSKSLNNSGNTYLYWF
LQRPQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPF

50

TFGAGTKLELKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRENC (配列番号 18)

【0064】

いくつかの実施形態では、s c F v は、配列番号 17 および / または配列番号 18 のアミノ酸配列の一部を含む。いくつかの実施形態では、s c F v は、配列番号 34 および / または配列番号 35 のアミノ酸配列の可変領域と、少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、または少なくとも 99% の配列同一性を含む。本明細書では、4 G 7 に由来する抗 CD 19 s c F v に特異的に結合する抗体を含む抗原結合分子、ならびにこれらの配列を含む分子、およびそのような分子を提示する細胞が開示されている。抗原結合分子のヒト化形態もまた、本開示の形態として形成される。これらの抗原結合分子の適用および用途も開示されている。

10

【0065】

a. 抗原結合ドメイン

上述のように、本明細書に記載の CD 19 CAR は、抗原結合ドメインを含む。本明細書で使用される「抗原結合ドメイン」は、特定の標的抗原に結合する任意のポリペプチドを意味し、例えば、特定の標的抗原は、CD 19 タンパク質またはその断片でもよい。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、腫瘍細胞上の CD 19 抗原に結合する。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、過増殖性疾患に關与する細胞上の CD 19 抗原に結合する。

20

【0066】

いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、可変重鎖、可変軽鎖、および / または一つ以上の CDR を含む。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、単鎖可変断片 (s c F v) であり、軽鎖 CDR CDR 1、CDR 2 および CDR 3、および重鎖 CDR CDR 1、CDR 2 および CDR 3 を含む。抗原結合ドメインのバリエーション (例えば、CDR のバリエーション、VH および / または VL) も本開示の範囲内であり、例えば、可変軽鎖および / または可変重鎖であって、各々、本明細書に記載の抗原結合ドメイン配列のアミノ酸配列と少なくとも 70~80%、80~85%、85~90%、90~95%、95~97%、97~99%、または 99% 超の同一性を有する。いくつかの例では、こうした分子は、少なくとも一つの重鎖および一つの軽鎖を含むが、他の例では、バリエーション形態は、二つの可変軽鎖および二つの可変重鎖 (またはそれらのサブ部分) を含む。当業者は、周知の技術を使用して、本明細書に記載する抗原結合ドメインの好適なバリエーションを決定することができる。特定の実施形態では、当業者は、活性に重要とは考えられない領域を標的化することによって、活性を破壊することなく変化させることができる、分子の適切な領域を特定することができる。

30

【0067】

特定の実施形態では、抗原結合ドメインのポリペプチド構造は、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、ミニボディ、ドメイン抗体、合成抗体 (本明細書では「抗体模倣体」と呼称される場合もある)、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体融合体 (本明細書では「抗体コンジュゲート」と呼称される場合もある)、およびそれらの断片をそれぞれ含むが、これらに限定されない、抗体に基づく。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、アビマーを含むか、またはアビマーからなる。

40

【0068】

CD 19 抗原結合ドメインは、第二の標的に結合するよりも、一つの標的に結合する場合に、より強く結合する場合に「選択性」とあると言われる。いくつかの実施形態では、CD 19 抗原結合ドメインは s c F v である。

【0069】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載される CD 19 キメラ抗原受容体 (CAR) のいずれか一つをコードする単離ポリヌクレオチドに関する。いくつかの実施形態では、本開示は、表 1 に記載される CD 19 CAR をコードする単離ポリヌクレオ

50

チドに関する。また、ポリヌクレオチドを含むベクター、およびポリヌクレオチドを作製する方法も本明細書において提供される。

[表 1]

表 1. 例示的な CD 19 標的 CAR のポリヌクレオチド配列

配列番号	説明	配列
1	抗CD19 CAR_v1.0	ATGCTGACCAGCCTGTGTGCTGGATGGCCCTGTGCCTGCTGGGCGCCGAC CACGCCGATGCCTGCCCTACAGCAACCCAGCCTGTGCAGCGAGGGGGC GGCAGCGAGCTGCCACCCAGGGCACCTTCTCAAAGTGTCCACCAACGTG AGCCAGCCAAAGCCACCACCACCGCCTGTCTTATCCAATCCTTCCCTG TGTAGCGGAGGGGAGGCAGCCAGCCAGCCAGCCTCCACCCAGCCCC ACCATCGCCAGCCAGCCTCTGAGCCTGAGACCCGAGGCCTGCCGCCAGCC GCCGGCGGCCCTGCACACCAGAGGCCTGGATTTCGCCTGGCATATCTAC ATCTGGGCCCCACTGGCCGGCACCTGTGGCGTGTGTGCTGAGCCTGGTG ATCACCCTGACTGCAACCACCGCAACCGCAGGCGCGTGTGCAAGTGGCCC AGGCCCGTGGTGAAGCCGAGGGCAGAGGCAGCCTGCTGACCTGCCGGGAC GTGGAGGAGAACCAGGCCCATGGAGACCACCCCTGCTGCTGTGGGTG CTGCTGTGTGGGTGCCAGGCAGCAGCCGGCGAGGTGCAGTGCAGCAGAGC GGACCCGAGCTGATCAAGCCAGGCGCCAGCGTGAAGATGAGCTGCAAGGCC AGCGGCTACACCTTACCAGCTACGTGATGCACTGGGTGAAGCAGAAGCCA GGCCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCTACATCAACCCCTACAACGAGCGCAC AAGTACAACGAGAAGTCAAGGGCAAGGCCACCCCTGACCAGCGACAAGAGC AGCAGCACCGCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCC GTGTACTACTGCCCCAGAGGCACCTACTACTACGGCAGCCGGGTGTTGAC TACTGGGGCCAGGGCACCACCTGACCGTGAAGTCTGGCGGAGGCGGCTCT GCGGAGGGCGCTCTGGCGGAGGGCGCAGCAGCATCGTGATGACCAGGCT GCCCCAGCATCCCCGTGACCCAGCGGAGCGTGAGCATCAGCTGCCGG AGCAGCAAGAGCCTGCTGAACAGCAACGGCAACACCTACCTGACTGGTTC CTGCAGCGCCAGGCCAGAGCCCCAGCTGTGATCTACCGGATGAGCAAC CTGGCCAGCGGCGTGCCTGACCGGTTCAAGCGCAGCGGCGAGCGGCCACCGCC TTCACCCTGCGGATCAGCCGGGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTACTACT TGCATGCAGCACCTGGAGTACCCCTTCACTTCGGAGCCGGCACAAGCTG GAGCTGAAGCGGTCCGATCCCACCACCACCCAGCCCAAGGCCACCTACC CCTGCCCCAACCATCGCCAGCCAGCCCTGAGCCTGCCGGCTGAAGCCTGC AGCCTGCGCGCGGAGGAGCCGTGCACACAAGGGCCCTGCACTTCCGCTGC GACATCTATATCTGGGCCCCCTGGCCGGGACATCGGGGTGCTGTGTG TCCCTGGTGATTACACTGTATTGCAAACGGGGCCGGAAGAAGTGTGTAC ATCTTCAAGCAGCCCTTATGCGGCCGTGCAGACCACCCAGGAGGAGGAC GGCTGCAGCTGCCGGTCCCCGAGGAAGAGGAGGCGGCTGCAGCTGCCG GTGAAGTTCAGCCGAGCGCCGACGCCACCCAGCCTACCAGCAGGGCCAGAAC CAGCTGTACAACGAGCTGAACCTGGGACCGCGGAGGAGTACGACCTGCTG GACAAGCGGGGGACGGGACCCCGAGATGGCGGCAAGCCTGCCCGGAAG AATCCCAGGAGGCGCTGTACAACGAGCTGCAGAAGGCAAGATGGCCGAG GCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGCGAGCGGCCCGGGCAAGGGCCAC GACGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACCGCCACCAAGGACACCTACGAGCC CTGCACATGCAGGCCCTGCCACCCCGGTGA
2	抗CD19 CAR_v1.1	ATGGAGACCACCCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGTGCAGGC AGCACCGGCAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGACCCGAGCTGATCAAGCCA GGCAGCGGTGAAGATGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCAGC TACGTGATGCACTGGGTGAAGCAGAAGCCAGGCCAGGGCCTGGAGTGGATC GGCTACATCAACCCCTACAACGAGCGCCACCAAGTACAACGAGAAGTCAAG

10

20

30

40

		<p>GGCAAGGCCACCCTGACCAGCGACAAGAGCAGCAGCACCAGCCCTACATGGAG CTGAGCAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCGTGTACTACTGCGCCAGAGGC ACCTACTACTACGGCAGCCGGGTGTTCCACTACTGGGGCCAGGGCACCACC CTGACCCTGAGCTCTGCGCGAGCGGGCTCTGGCGGAGGCGGGCTCTGGCGGA GGCGGCAGCGACATCGTGATGACCCAGGCTGCCCCAGCATCCCCTGACC CCAGGCGAGAGCGTGAGCATCAGCTGCCGGAGCAGCAAGAGCCTGCTGAAC AGCAACGGCAACACCTACCTGTACTGGTTCCTGCAGCGGCCAGGCCAGAGC CCCCAGCTGCTGATCTACCGGATGAGCAACCTGGCCAGCGGGCTGCCCGAC CGGTTACGGCGCAGCGGCAGCGGCACCGCCTTACCCTGCCGATCAGCCGG GTGGAGCCCGAGGACGTGGCCCTGTACTACTGCATGCAGCACCTGGAGTAC CCCTTACCCTTCGGAGCCGGCACCAGCTGGAGCTGAAGCGGTCCGATCCC ACCACCACCCAGCCACCGGCCACCTACCCTGCCCAACCATCGCCAGC CAGCCCTGAGCCTGCCGCTGAAGCCTGCAGGCTGCCGCGGAGGAGCC GTGCACACAAGGGCCCTGGACTTCGCTGCAGCATCTATATCTGGGCCCC CTGGCCGGGACATGCGGGGTGCTGCTGCTGCCCTGGTGATTACACTGTAT TGCAAACGGGGCCGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCCTTCATG CGGCCGTGCAGACCACCCAGGAGGAGGACGGCTGCAGCTGCCGGTTCGCC GAGGAAGAGGAAGGCGGCTGCGAGCTGCGGGTGAAGTTCAGCCGGAGCGCC GACGCCCCAGCCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTACAACGAGCTGAAC CTGGGACCGCGGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGGGCGGGACCGGGAC CCCCAGATGGCGGCAAGCTCCTGCCGGAAGAATCCCAGGAGGGCCTGTAC AACGAGCTGCAGAAGGACAAGATGGCCGAGGCTACAGCGAGATCGGCATG AAGGGCGAGCGGGCCCGGGCAAGGGCCACGACGGCTGTACCAGGGCCTG AGCACCGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCA CCCCGGTGA</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
3	抗CD19 CAR_v1.2	<p>ATGGAGACAGATACCCTGCTGCTGTTGGGTGCTGCTGCTGTTGGGTGCTGGC TCCACAGGAGAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGACCAGAGCTGATCAAGCCT GGAGCATCCGTGAAGATGTCTTGCAAGGCCAGCGGTATAACATTCACCAGC TACGTGATGCACCTGGGTGAAGCAGAAGCCTGCCAGGGCTGGAGTGGATC GGCTATATCAATCCATACAACGACGGCACCAGTATAATGAGAAGTTTAAAG GGCAAGGCCACACTGACCTCTGATAAGAGCTCCTCTACAGCCTACATGGAG CTGAGCTCCCTGACCTCTGAGGACAGCGCGTGTACTATTGGCCAGAGGC ACATACTATTACGGCAGCAGGGTGTTCGATTACTGGGGCCAGGGCACCACA CTGACCCTGTCTAGCGGAGGAGGAGGCTCCGGAGGAGGAGGCTCTGGCGGC GGCGGCAGCGACATCGTGATGACACAGGCAGCACCAGCATCCCAGTGACC CCTGGCGAGAGCGTGTCCATCTTGTGGTCCCTAAGTCCCTGCTGAAC TCTAATGGCAACACCTATCTGTACTGGTTCCTGCAGCGGCCCGGACAGTCC CCACAGCTGCTGATCTATAGGATGAGCAACCTGGCATCCGGAGTGCCTGAT CGCTTCAGCGGCTCCGGCTCTGGAACAGCCTTACCCTGAGGATCTCTCGG GTGGAGGCAGAGGACGTGGCGTGTATTACTGCATGCAGCACCTGGAGTAC CCCTTACATTTGGCGCAGGAACCAAGCTGGAGCTGAAGCGGAGCGACCCC ACCACAACCCCTGCACCACGGCCCCCTACACCAGCACCTACCATCGCATCT CAGCCTACTGAGCCTGGCGCCGAGGCTGTAGGCTGCAGCAGGAGGAGCA GTGCACACCAGGGCCCTGGACTTCGCTGCGATATCTATATCTGGGCACCA CTGGCAGGAACATGTGGCGTGTGCTGCTGAGCCTGGTCATCACCCCTGTAT TGCAAGAGAGGCAGGAAGAAGCTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCTTTTATG CGGCCAGTGCAGACAACCCAGGAGGAGGATGGCTGCTCCTGTAGATTCCCA GAGGAGGAGGAGGAGGATGTGAGCTGCGCGTGAAGTTTAGCCGGTCCGCC GACGCACCAGCATATCAGCAGGGCCAGAATCAGCTGTACAATGAGCTGAAC</p>	<p>30</p> <p>40</p> <p>50</p>

		CTGGGCCGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGATAAGAGGAGGGGAAGGGAC CCCGAGATGGGAGGCAAGCCACGGAGAAAAGAATCCCAGGAGGGCCTGTAT AACGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATG AAGGGAGAGAGGGCCCGGGCAAGGGACACGACGGCCTGTATCAGGGCCTG TCCACAGCCACCAAGGACACCTACGATGCCCTGCACATGCAGGCCCTGCCA CCAAGGTGA
4	抗CD19 CAR_v1.3	ATGGGAACAAGCCTGCTGTGCTGGATGGCTCTGTGCCTGTGGGGCCGAC CACGCTGACGCCCTCCGGGGGGGGGGCTCTCCTGCCCTAGGCCCCCTACA CCTGCACCAACCATCGCATCCAGCCACTGTCTCTGCGCCCTGAGGCCTGC CGGCAGCAGCAGGAGGAGTGCACACCCGCGCCCTGGACTTCGCCTGC GATATCTATATCTGGGCACCACTGGCAGGCACATGTGGCGTGTCTGTCTG AGCCTGGTTCATCACCTGTACTGCAATCACAGGAACCGGAGAAGGGTGTGC AAGTGTCCCCGGCCTGTGGTGAGAGCAGAGGGAAGGGGAGCCTGTGACA TGTGGCGACGTGGAGGAGAATCCAGGCCCTATGGAGACAGATACCTGTCTG CTGTGGGTGCTGCTGTGTGGGTGCCCGGCAGCACCGAGAGTGCAGCTG CAGCAGTCCGACCAGAGCTGATCAAGCCTGGAGCCAGCGTGAAGATGTCC TGTAAGGCCTCTGGCTATACATTACCAGCTACGTGATGCACCTGGGTGAAG CAGAAGCCTGGCCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCTATATCAATCCATACAA CACGAGCACAAGTATAACGAGAAGTTAAGGGCAAGGCCACACTGACCTCC GATAAGAGCTCCTCTACAGCCTACATGGAGCTGAGCTCCCTGACCTCTGAG GACAGCGCCGTGTACTATTGCGCCAGAGGCACATACTATTACGGCTTAGG GTGTTCCGATTACTGGGGCCAGGGCACCACACTGACCGTGTCTAGCGGAGGA GGAGCCAGCGGAGGAGGAGGCTCCCGCGCGGGCGGCTGTGACATCTGTGATG ACACAGGCAGCACCATCCATCCCAGTGACCCCTGGCGAGAGCGTGTCCATC TCTTGTCCGCTCTAAGAGCCTGCTGAACTCCAATGGCAACACCTATCTG TACTGGTTTCTGCAGCGCCCGGACAGAGCCACAGCTGCTGATCTATAGG ATGTCTAATCTGGCAAGCGCGTCCCGATCGCTTCAGCGGCTCCGGCTCT GGCACAGCCTTTACCCTGAGGATCTCCCGCTGGAGGCAGAGGACCTGGGC GTGATTACTGCATGCAGCACCTGGAGTACCCCTTCAATTTGGCGCAGGC ACCAAGCTGGAGCTGAAGCGGAGGACCCACCAACCCCTGCACCACGG CCACCCACACCAGCACCTACTATTGCATCCAGCCACTGAGCCTGCGGGCC GAGGCCTGTAGGCCTGCCCGCGGGCGGAGTGCACACCCGGGGCTGGAC TTTGCCTGCGATATCTACATCTGGGCACCTCTGGCCGGCACATGCGGCGTG CTGTTACTGAGCCTGGTTCATCACCCTGTATTGCAAGCGGGGCAGAAAGAAG CTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCTTTATGCGGCCAGTGCAGACAACCCAG GAGGAGGATGGCTGCTCCTGTAGATTCCAGAGGAGGAGGAGGAGGATGT GAGCTCCGCGTGAAGTTAGCCGGTCCCGACGCACCAGCATATCAGCAG GGCCAGAACCAGCTGTACAATGAGCTGAACCTGGCCGGAGAGAGGAGTAT GACGTGCTGGATAAGAGACGGGGCCGGGACCCCGAGATGGGAGGCAAGCCA CGCCCGAAGAATCCCAGGAGGGCCTGTATAACGAGCTGCAGAAGGATAAG ATGGCCGAGGCCACAGCGAGATCGGCATGAAGGGAGAGAGAAGGGCGGGC AAGGGACACGACGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACAGCAACAAAAGACACC TACGACGCACTGCACATGCAGGCTCTGCCCCCTCGGTAA
5	抗CD19 CAR_v1.4	ATGGGAACCTCTCTGCTGTGCTGGATGGCTCTGTGCCTGTGGGGCCGAT CACGCTGACGCAAGTGGCGGGGGGGGTCCGAAGTCCACACAGGGCACCC TTCTCCAACGTGAGCACCAACGTGAGCTCCGGCGGAGGAGGCAGCCCTGCA CCAAGGCCCTACACCAGCACCTACCATCGCATCTCAGCCACTGAGCCTG CGCCCCGAGGCTGCCGGCTGCAGCAGGCGGGCCCTGCACACCCGCGGC

10

20

30

40

50

		<p>CTGGACTTTGCCTGCGATATCTATATCTGGGCACCTCTGGCAGGCACATGT GGCGTGTGCTGCTGAGCCTGGTCATCACCCCTGTAAGTCAATCACAGGAAC CGGAGAAGGGTGTGCAAGTGTCCACGGCCCGTGGTGAGAGCAGAGGGAAGG GGCTCCCTGCTGACATGTGGCGCCTGGAGGAGAATCCTGGCCCAATGGAG ACAGATACCCCTGCTGCTGTGGTCTGCTGCTGTGGGTGCCCGCTCCACC GGAGAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGACCAGAGCTGATCAAGCCAGGAGCA TCCCTGAAGATGTCTTGTAAAGGCCAGCGGCTATACATTACCAGCTACGTG ATGCACTGGGTGAAGCAGAAGCCAGGACAGGGCCTGGAGTGGATCGGCTAT ATCAATCCTTACAACGACGGCACCAGTATAACGAGAAGTTAAGGGCAAG GCCACACTGACCTCTGATAAGTCTAGCTCCACAGCCTACATGGAGCTGTCT AGCCTGACCAGCGAGGACTCCGCGGTGTAATTTGCGCCAGAGGCACATAC TATTACGGCAGCAGGGTGTTCGATTACTGGGCCAGGGCACCACACTGACC GTGTCTCTGGAGGAGGAGGCTCCGGAGGAGGAGGCTCTGGCGGGCGGC AGCGACATCGTGATGACACAGGCAGCACCCTCCATCCAGTACCCAGGC GAGTCTGTGAGCATCTCCTGTGGAGCTCCAAGTCCCTGCTGAATCTAAT GGCAACACCTATCTGTAAGTCTGACTGACGCGGCCCGGACAGTCCCCACAG CTGCTGATCTATAGGATGAGCAATCTGGCCTCCGGCGTCCAGATCGCTTC TCTGGCAGCGCTCCGGCACAGCCTTTACCCTGAGGATCTCTCGCGTGGAG GCAGAGGACCTGGCGGTATTACTGTCATGCAGCACCTGGAGTACCCATTTC ACATTTGGCGCAGGCACCAAGCTGGAGCTGAAGCGGAGCGACCCACCACA ACCCAGCACCTCGGCCACCCACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC CTGAGCCTGGCGCCGAGGCTGTAGGCCCGCAGGAGGAGCAGTGCAC ACCCGGGGCCTGGACTTCGCTGCGATATCTACATCTGGGCACCAGTGGCC GGCACATCGCGCGTGTGTTACTGAGCCTGGTCAACCCCTGATTGCAAG CGGGCAGAAAAGAAGCTGCTGTACATCTTCAAGCAGCCCTTTATCGGGCCT GTGCAGACAACCCAGGAGGAGGATGGCTGCTCCTGTAGATTCCTGAGGAG GAGGAGGAGGATGTGAGTGTGCGCTGAAGTTTCTCGGAGCGCCGACGCA CCAGCATATCAGCAGGGACAGAACCAGCTGTACAATGAGCTGAACCTGGGC CGGAGAGAGGAGTATGACGTGCTGGATAAGAGACGGGGCCGGACCCCGAG ATGGGAGGCAAGCCTCGCCGGAAGAATCCACAGGAGGGCCTGTATAACGAG CTGCAGAAGGATAAGATGGCCGAGGCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGGA GAGAGAAGGGCGGGCAAGGGACACGACGGCCTGTACCAGGGCCTGAGCACA GCAACAAAAGACACCTACGACGCACTGCACATGCAGGCTCTGCCACCAAGA TGA</p>	<p>10</p> <p>20</p>
6	抗CD19 CAR_v1.5	<p>ATGGGGACCTCACTGCTGTGCTGGATGGTCTGTGCTGCTGGGGCCGAC CACGCTGACGCTGCTCTGGGGGGGGGGGCTCATGCTCCGAGGAGGA GGCTCTGAGCTGCCAACCAGGGCACATTCTCAACGTGAGCACCACAGTG TCTCCTGCCAAGCCAACCAACCGCATGCAGCGGGAGGAGGAGGAGCAGC TGTTCCGGCGGGCGGCAGCCCTGCCCAAGGCCCTTACCAGCACCT ACAACTCGCATCTCAGCCTCTGAGCCTGCGCCAGAGGCTGTGGCCCGCA GCAGGAGGAGCAGTGCACACCCGGGCTGGACTTTGCTGCGATATCTAT ATCTGGGCACCACTGGCAGGCACCTGTGGCGTGTGCTGCTGAGCCTGGTC ATCACCTGTAAGTCAATCACAGGAACCGGAGAAGGGTGTGCAAGTGTCCA CGGCCCTGGTGAGAGCAGAGGGAAGGGCTCTCTGCTGACCTGTGGCGAC GTGGAGGAGAATCTGGCCCTATGGAGACAGATACACTGCTGCTGTGGGTG CTGCTGCTGTGGTGGCCGACAGCAGGAGGAGTGCAGCTGCAGCAGTCC GGACTGAGCTGATCAAGCCAGGGCCTCCGTGAAGATGTCTTGAAGGCC AGCGGCTATACCTTCAACAAGTACGTGATGCAGTGGGTGAAGCAGAAGCCA GGCCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCTATATCAATCCCTACAACGACGGCACC</p>	<p>30</p> <p>40</p>

		<p>AAGTATAACGAGAAGTTTAAGGGCAAGGCCACCCTGACAAGCGATAAGAGC TCCTCTACCGCTACATGGAGCTGAGCTCCCTGACAAGCGAGGACTCCGCC GTGTACTATTGCCAGAGGCACCTACTATTACGGCTCCAGGGTGTTCGAT TACTGGGGCCAGGGCACAACCCTGACAGTGTCTAGCGGAGGAGGAGCCAGC GGAGGAGGAGGCTCCGGCGGGCGGCTCTGACATCGTGATGACCCAGGCA GCACCATCCATCCCTGTGACACCAGGCGAGTCTGTGAGCATCTCTGTCCG TCCTTAAGTCCCTGCTGAACTCTAATGGCAACACCTATCTGTAAGTGT CTGCAGCGGGCCGGACAGTCTCCTCAGCTGCTGATCTATAGGATGAGCAAT CTGGCTCCCGCGTGCCTGATCGCTTCTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGCC TTTACACTGAGGATCAGCCGCGTGGAGGCAGAGGACGTTGGCGGTGATTAC TGCATGACGACCTGGAGTACCCTTTACCTTTGGCGCCGGCACAAGCTG GAGCTGAAGCGGAGCGACCCCAACACACACAGCAGCTCCGGCCACCCACC CCAGCACCAACAATCGCATCTCAGCCACTGAGCCTCCGGCCGAGGCCCTGT AGGCCAGCCGCGGGCGGCGAGTGCACACCCGGGGCTGGACTCGCCTGC GATATCTACATCTGGGCCCTCTGGCCGGCACCTGGCGGTGTGTTACTG AGCCTGGTATCACCCTGTATTGCAAGCGGGCAGAAAGAAGTGTGTAC ATCTTCAAGCAGCCCTTCAATGCGGCCGTGCAGACCACAGGAGGAGGAT GGCTGCTCCTGTAGATTCCAGAGGAGGAGGAGGAGGATGTGAGCTCGGC GTGAAGTTTTCTCGGAGCGCCGACGCACCTGCATATCAGCAGGACAGAAC CAGCTGTACAATGAGCTGAACCTGGGCGGAGAGAGGAGTATGACGTGCTG GATAAGAGACGGGGCCGGGACCCCGAGATGGGAGGCAAGCCCGCCGGAAG AATCCTCAGGAGGCCCTGTATAACGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCCGAG GCCTACAGCGAGATCGGCATGAAGGAGAGAGAAGCGCGGCAAGGGCCAC GACGGCCTGTACCAGGGCCTGTCCACAGCAACAAGGATACTTATGACGCT CTGCACATGCAGGCTCTGCCCTCCGTGA</p>	10 20
7	抗CD19 CAR_v1.6	<p>ATGGGAACCAGCCTGCTGTGCTGGATGGCACTGTGCCTGCTGGGAGCAGAC CACGCCGATGCCGAAGTGCCTACTCAGGGGACATTTCTAATGTGAGCACC AACGTGAGCTCTGGAGGAGGAGGCTCCGAGCTGCCAACCAGGGCACATTC TCTAATGTGAGCACAACGTGTCTCCGCCAAGCCTACCACAACCGCCGAA CTGCCATCCAGGGCACATTTTCCAACGTGTCTACCAACGTGTCTAGCGGA GGAGGAGGCTCCCCGCACCTAGGCCCTACCAGCACCACAATCGCA AGCCAGCCTCTGCTCCCTGCGCCAGAGGCATGCAGGCCAGCAGGAGGGA GCAGTGCACACCCGGCGCTGGACTTTGCTGCGATATCTATATCTGGCA CCACTGGCAGGAACCTGTGGCGTGTGCTGTCTCTGGTCATCACCCCTG TACTGCAATCACAGAAACCGGAGAAGGGTGTGCAAGTGTCTCCGGCCAGTG GTGAGAGCAGAGGGAAGGGGACGCTGCTGACCTGTGGCGACGTGGAGGAG AATCCCGGCCCTATGGAGACAGATACTGCTGTGGTGTGCTGCTGCTG TGGGTGCCAGGCTCTACAGGAGAGGTGCAGTGCAGCAGAGCGGACCTGAG CTGATCAAGCCAGGGCCTCTGTGAAGATGAGCTGCAAGGCCCTCCGGCTAT ACCTTACAAGCTACGTGATGCACTGGGTGAAGCAGAAGCCAGGCCAGGGC CTGGAGTGGATCGGCTATATCAATCCCTACAACGACGGCACCAGTATAAC GAGAAGTTTAAGGGCAAGGCCACCCTGACATCCGATAAGAGCTCTCTACC GCCTACATGGAGCTGAGCTCCCTGACATCCGAGGACTCTGCCGTGACTAT TGGCCAGAGGCACCTACTATTACGGCTCTAGGGTGTTCGATTACTGGGGC CAGGGCACAACCTGACAGTGTCTAGCGGAGGAGGAGGCTCTGGAGGAGGA GGCAGCGCGGGCGGAGGCTCCGACATCGTGATGACCCAGGAGCACCATCC ATCCCAGTGACACCTGGCGAGAGCGTGTCCATCTCTTGTAGGCTCTTAAG TCTCTGTGAACAGCAATGGCAACACCTATCTGTAAGTGTTCGACGCGG CCCGACAGAGCCCTCAGCTGCTGATCTATAGGATGTCCAATCTGGCCTCT</p>	30 40

10

20

30

40

50

		GGAGTGCCTGATCGCTTCAGCGGCTCCGGCTCTGGAACCGCCTTTACACTG AGGATCTCCC CGCTGGAGGCAGAGGACGTGGGCGTGTATTACTGCATGCAG CACCTGGAGTACCCTTTACCTTTGGCGCCGGCACAAAGCTGGAGCTGAAG CGGAGCGACCCCAACACACCAGCACCCCGGCCACCAACCCCTGCCCT ACAATCGCAAGCCAGCCACTGTCCCTGCGGCCGAGGCCTGTAGACCTGCC GCCGGCGGCGCCGTCCATACCCGCGGCTGGATTTGCGCTGCGATATCTAC ATTTGGGCCCTCTGGCCGGCACTTGGGCGTGTGCTGCTGAGCCTGGTC ATCACCTGTATTGCAAGCGGGCAGAAAGAAGCTGCTGTACATCTTCAAG CAGCCCTTCATGCGCCCGTCCAGACCACACAGGAGGAGGATGGCTGCTCC TGTAGATCCCAGAGGAGGAGGAGGGAGGATGTGAGCTGCCCGTGAAGTTT AGCCGGTCCGCGACGCACCTGCATATCAGCAGGGCCAGAACCAGCTGTAC AATGAGCTGAACCTGGGCCGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGATAAGAGA AGGGGACGGGACCCCGAGATGGGAGGCAAGCCCGCCGGAAGAATCCTCAG GAGGGCCTGTATAACGAGCTGCAGAAGGATAAGATGGCCGAGGCCTACAGC GAGATCGGCATGAAGGGAGAGAGAAGGCGCGCAAGGGACACGACGGCCTG TATCAGGGCCTGTCCACCGCCACAAAGGACACCTACGATGCCCTGCACATG CAGGCCCTGCCTCAAGATGA
--	--	---

10

20

【0070】

b. 安全スイッチおよびモノクローナル抗体特異的エピトープ
安全スイッチ

有害事象は、免疫細胞（一つまたは複数のCARを含有する）をリツキシマブ結合エピトープ以外の自殺遺伝子で形質導入することによって最小化され得ることがわかる。また、誘導性「オン」または「促進剤」スイッチを免疫細胞に組み込むことが望ましい場合もある。適切な技術としては、誘導性カスパーゼ-9（U.S. Appl. 2011/0286980）またはチミジンキナーゼの使用を、細胞が本開示のCAR構築物で形質導入される前、後、または同時に含む。自殺遺伝子および/または「オン」スイッチを導入するための追加の方法には、TALENS、亜鉛フィンガー、RNAi、siRNA、shRNA、アンチセンス技術、および当技術分野で公知の他の技術が含まれる。

30

【0071】

本開示によれば、追加のオン-オフまたは他のタイプの制御スイッチ技術が本明細書に組み込まれることができる。これらの技術は、こうしたドメイン二量体化の二量体化ドメインおよび任意のアクチベーターの使用を採用することができる。これらの技術には、例えば、特定の細胞におけるFKBP/ラパログ二量体化システムを利用するWuら、Science 2014 350 (6258) によって記載されるものが含まれ、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。追加の二量体化技術は、例えば、FeganらChem. Rev. 2010、110、3315-3336、ならびに米国特許第5,830,462号、第5,834,266号、第5,869,337号、および第6,165,787号に記載されており、その内容も参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。追加の二量体化対には、シクロスポリン-A/シクロフィリン、受容体、エストロゲン/エストロゲン受容体（任意選択でタモキシフェンを使用する）、グルコシルコイド/グルコシルコイド受容体、テトラサイクリン/テトラサイクリン受容体、ビタミンD/ビタミンD受容体が含まれ得る。二量体化技術のさらなる例は、例えば、WO2014/127261、WO2015/090229、US2014/0286987、US2015/0266973、US2016/0046700、米国特許第8,486,693号、US2014/0171649、およびUS2012/0130076に記載されており、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

40

【0072】

50

いくつかの実施形態では、本開示のCAR免疫細胞（例えば、CAR-T細胞）は、リツキシマブ結合を欠損している自殺ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、自殺ペプチドは、変異型RQR8配列を含む。例えば、WO2013153391Aを参照のこと、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。ポリヌクレオチドを含むCAR免疫細胞（例えば、CAR-T細胞）では、自殺ポリペプチドは、CAR免疫細胞（例えば、CAR-T細胞）の表面で発現される。いくつかの実施形態では、自殺ポリペプチドは、配列番号19に示されるアミノ酸配列を含む

CPYSNPSLCSGGGGSELPTQGTFNSVSTNVSPAKPTTTACPYNSLCSGGGGSP APRPP
TPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLL LVITLYC
NHRNRRRVCKCPRPVV（配列番号19）。

10

【0073】

自殺ポリペプチドはまた、アミノ末端にシグナルペプチド、例えば、MGTSLLCW
MALCLLGADHADA（配列番号20）も含み得る。いくつかの実施形態では、自殺ポリペプチドは、配列番号21に示されるアミノ酸配列を含み、配列番号20のシグナル配列を含む。

MGTSLLCW MALCLLGADHADACPYNSLCSGGGGSELPTQGTFNSVSTNVSPAKPTTT
ACPYNSLCSGGGGSPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI
WAPLAGTCGVLLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVV（配列番号21）。

【0074】

特定の実施形態では、自殺ペプチドは、リツキシマブの結合を低減または除去する一つ以上の変異残基、挿入残基、または欠失残基を含むアミノ酸配列を含む。

20

【0075】

自殺ポリペプチドがCAR免疫細胞（例えば、CAR-T細胞）の表面に発現されると、ポリペプチドの自殺遺伝子エピトープに結合する抗体が細胞の溶解が生じさせる。CD19特異的CAR免疫細胞（例えば、CAR-T細胞）の欠失は、例えば自殺剤を患者に投与することによって、インビボで発生し得る。導入された細胞を削除するという決定は、例えば、許容できないレベルの毒性が検出される場合など、導入された細胞に起因する、患者に検出される望ましくない効果から生じ得る。本明細書で使用される場合、「自殺剤」は、CAR免疫細胞に結合し、CAR発現免疫細胞の溶解を引き起こす分子を指す。

【0076】

いくつかの実施形態では、自殺ポリペプチドは、細胞の表面上に発現される。いくつかの実施形態では、自殺ポリペプチドは、CAR構築物に含まれる。いくつかの実施形態では、自殺ポリペプチドはCD19 CAR構築物の一部ではない。

30

【0077】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるCD19特異的CARのいずれか一つの細胞外ドメインは、モノクローナル抗体に特異的な（すなわち、モノクローナル抗体によって特異的に認識される）一つまたは複数のエピトープを含み得る。これらのエピトープは、本明細書ではmAb特異的エピトープとも呼称される。mAb特異的エピトープの例は、国際特許公開第WO2016/120216号に開示されており、その全体が本明細書に組み込まれる。これらの実施形態では、CARの細胞外ドメインは、CD19に特異的に結合する抗原結合ドメインと、一つ以上のモノクローナル抗体（mAb）に結合する一つ以上のエピトープとを含む。mAb特異的エピトープを含むCARは、単鎖または複数鎖であり得る。

40

【0078】

本明細書に記載されるCARの細胞外ドメインにおけるモノクローナル抗体に特異的なエピトープの含有は、CARを発現する操作された免疫細胞のソーティングおよび枯渇を可能にする。いくつかの実施形態では、この機能はまた、CARを発現する操作された免疫細胞の投与によって枯渇された内因性CD19発現細胞の回復を促進する。いくつかの実施形態において、枯渇を可能にすることは、例えば、対象への投与時に、有害な効果の場合の安全スイッチを提供する。

50

【 0 0 7 9 】

したがって、いくつかの実施形態では、本開示は、m A b 特異的エピトープを含む C A R に授けられた操作された免疫細胞をソーティングおよび/または枯渇する方法、ならびに内因性 C D 1 9 発現細胞の回復を促進する方法に関する。

【 0 0 8 0 】

いくつかのエピトープ - モノクローナル抗体結合を使用して、モノクローナル抗体特異的エピトープを含む C A R を生成することができ、特に、非限定的な例として C D 3 4 エピトープ / Q B E N D - 1 0 などの医療使用または G M P の製造における使用のために既に承認されている C A R を生成することができる。

【 0 0 8 1 】

本開示はまた、m A b 特異的エピトープを発現する C D 1 9 特異的 C A R に授けられた操作された免疫細胞をソーティングする方法、およびこれらの C A R に授けられた操作された免疫細胞の活性化が、前述の C A R の外部リガンド結合ドメインを標的とする抗体を使用して細胞を枯渇させることによって調節される治療方法を包含する。表 2 は、本開示の C A R の細胞外ドメインに挿入され得る、例示的なミモトープ配列を提供する。

[表 2]

表 2 : 例示的なミモトープ配列

<u>リツキシマブ</u>		
ミモトープ	配列番号 22	CPYSNPSLC
<u>パリビズマブ</u>		
エピトープ	配列番号 23	NSELLSLINDMPITNDQKKLMSNN
<u>セツキシマブ</u>		
ミモトープ1	配列番号 24	CQFDLSTRRLKC
ミモトープ2	配列番号 25	CQYNLSSRALKC
ミモトープ3	配列番号 26	CVWQRWQKSYVC
ミモトープ4	配列番号 27	CMWDRFSRWYKC
<u>ニボルマブ</u>		
エピトープ1	配列番号 28	SFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDR
エピトープ2	配列番号 29	SGTYLCGAISLAPKAQIKE
<u>QBEND-10</u>		
エピトープ	配列番号 30	ELPTQGTFNSVSTNVS
<u>アレムツズマブ</u>		
エピトープ	配列番号 31	GQNDTSQTSSPS

【 0 0 8 2 】

特定の実施形態では、C A R は、表 2 に本明細書に記載するエピトープまたはミモトープアミノ酸配列に対し、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、または 1 0 0 % 同一であるエピトープまたはミモトープアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、C A R は、配列番号 2 2 ではない、または含まないエピトープまたはミモトープアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、C A R は、配列番号 3 0 のアミノ酸配列を含むエピトープまたはミモトープを含む。

【 0 0 8 3 】

c . ヒンジドメイン

本開示の C A R の細胞外ドメインは、「ヒンジ」ドメイン（またはヒンジ領域）を含み

得る。CAR中の膜貫通ドメインを、CAR中の細胞外抗原結合ドメインに連結するように機能する任意のポリペプチドに対する用語を一般的に含む。特に、ヒンジドメインを使用して、細胞外抗原結合ドメインに対してより柔軟性およびアクセス可能性を提供することができる。

【0084】

ヒンジドメインは、最大300個のアミノ酸を含むことができ、いくつかの実施形態では10~100個のアミノ酸、またはいくつかの実施形態では25~50個のアミノ酸を含む。ヒンジドメインは、CD8、CD4、CD28、4-1BB、またはIgGの細胞外部領域（特に、IgGのヒンジ領域の全てまたは一部、すなわち、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgD、IgE、IgM等の免疫グロブリンのメンバーのいくつかもしくはすべてまたはその断片を含み得ることが理解される）または抗体重鎖定常領域のすべてまたは一部に由来する天然の分子のすべてまたは一部から生じることができる。あるいは、ヒンジドメインは、天然由来のヒンジ配列に対応する合成配列であってもよく、または完全合成ヒンジ配列であってもよい。いくつかの実施形態において、前述のヒンジドメインは、ヒトCD8鎖（例えば、NP_001139345.1）の一部である。別の特定の実施形態では、前述のヒンジドメインおよび膜貫通ドメインは、ヒトCD8鎖の一部を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のCARのヒンジドメインは、CD8、IgG1、IgG4、PD-1、またはFcRIIIのサブ配列、特にCD8、IgG1、IgG4、PD-1、またはFcRIIIのいずれかのヒンジ領域を含む。いくつかの実施形態では、ヒンジドメインは、ヒトCD8ヒンジ、ヒトIgG1ヒンジ、ヒトIgG4、ヒトPD-1、またはヒトFcRIIIヒンジを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるCARは、scFv、CD8ヒトヒンジおよび膜貫通ドメイン、CD3シグナル伝達ドメイン、および4-1BBシグナル伝達ドメインを含む。表3は、本明細書に提供される例示的なヒンジのアミノ酸配列を提供する。

10

20

[表3]

表3：例示的なヒンジ

ドメイン	アミノ酸配列	配列番号
FcγRIII αヒンジ	GLAVSTISSFFPPGYQ	32
CD8α ヒンジ	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVIITRGLD FACD	33
IgG1ヒンジ	EPKSPDKTIITCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDITLMIARTP EVTCTVVVDVSHIEDPEVKFNWYVDGVEVIINAKTKPREEQY NSTYRVSVLTVLIHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYVTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSQVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	34

30

40

【0085】

特定の実施形態では、ヒンジ領域は、表3に本明細書に記載するヒンジドメインアミノ酸配列に対し、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0086】

d. 膜貫通ドメイン

本開示のCARは、CARの細胞外ドメインに融合された膜貫通ドメインを用いて設計される。これは同様に、CARの細胞内ドメインに融合され得る。いくつかの例では、膜

50

貫通ドメインは、アミノ酸置換によって選択または改変されて、かかるドメインの、同じまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインへの結合を回避し、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小化することができる。いくつかの実施形態では、短いリンカーは、CARの細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内ドメインのいずれかまたは一部の間に結合を形成することができる。いくつかの実施形態では、リンカーはグリシンリピート配列を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、(GGGGS)_nを含み、nは、1、2、3、4、または5(配列番号41)である。

【0087】

本明細書に開示されるCARの好適な膜貫通ドメインは、(a)例えば、例えば、Tヘルパー(T_H)細胞、細胞傷害性T(T_C)細胞、T調節性(T_{reg})細胞、またはナチュラルキラー(NK)細胞などのリンパ球細胞などの免疫細胞の表面で発現する能力、および/または(b)標的細胞に対して免疫細胞の細胞応答を指示するために、細胞外抗原結合ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインと相互作用して細胞応答を誘導する能力を有する。

10

【0088】

膜貫通ドメインは、天然源または合成源のいずれかに由来し得る。供給源が天然である場合、ドメインは、任意の膜結合タンパク質または膜貫通タンパク質に由来し得る。

【0089】

本開示における特定の使用の膜貫通領域は、CD28、OX-40、4-1BB/CD137、CD2、CD7、CD27、CD30、CD40、プログラム死-1(PD-1)、誘導性T細胞共刺激体(ICOS)、リンパ球機能関連抗原-1(LFA-1、CD1-1a/CD18)、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD247、CD276(B7-H3)、LIGHT、(TNFSF14)、NKG2C、Igアルファ(CD79a)、DAP-10、Fcガンマ受容体、MHCクラス1分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリンタンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子(SLAMタンパク質)、活性化NK細胞受容体、BTLA、トールリガンド受容体、ICAM-1、B7-H3、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL-2Rベータ、IL-2Rガンマ、IL-7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、TNFR2、TRANSCENDANCE/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、PSGL1、CD100(SEMA4D)、CD69、SLAMF6(NTB-A、Ly108)、SLAM(SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME(SLAMF8)、SELPLG(CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、CD83と特異的に結合するリガンドと、を含み、またはそれらの任意の組み合わせに由来する(含むまたは対応する)。

20

30

40

【0090】

非限定的な例として、膜貫通領域は、特にFc受容体IIIまたはCDタンパク質において、例えば、CD3複合体を構成する、またはポリペプチド、IL-2受容体p55(a鎖)、p75(鎖)、または鎖、Fc受容体のサブユニット鎖に由来してもよく、またはT細胞受容体の一部であってもよい。あるいは、膜貫通ドメインは合成であってもよく、主にロイシンおよびバリンなどの疎水性残基を含み得る。いくつかの実施形態において、前述の膜貫通ドメインは、ヒトCD8鎖(例えば、NP_001139345.1)に由来する。

50

【0091】

いくつかの実施形態では、本開示のCAR中の膜貫通ドメインは、CD8 膜貫通ドメインである。いくつかの実施形態では、本開示のCAR中の膜貫通ドメインは、アミノ酸配列IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT(配列番号35)を含むCD8 膜貫通ドメインである。いくつかの実施形態では、CD8 膜貫通ドメインは、配列番号35の膜貫通アミノ酸配列をコードする核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、本開示のCAR中のヒンジおよび膜貫通ドメインは、アミノ酸配列TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT(配列番号36)を含むCD8 ヒンジおよび膜貫通ドメインである。

10

【0092】

e. 細胞内ドメイン

本開示のCARの細胞内(細胞質)ドメインは、CARを含む免疫細胞の正常なエフェクター機能の少なくとも一つの活性化を提供することができる。T細胞のエフェクター機能は、例えば、サイトカインの分泌を含む細胞溶解活性またはヘルパー活性を指すことができる。いくつかの実施形態では、CARで使用するための活性化細胞内シグナル伝達ドメインは、例えば、限定されないが、抗原受容体の係合後にシグナル伝達を開始するように協働して作用するT細胞受容体および共受容体の細胞質配列、ならびにこれらの配列の任意の誘導体またはバリエーション、ならびに同じ機能を有する任意の合成配列であってもよい。

20

【0093】

適切な(例えば活性化)細胞内ドメインとして、限定されないが、CD28、OX-40、4-1BB/CD137、CD2、CD7、CD27、CD30、CD40、プログラム死-1(PD-1)、誘導性T細胞共刺激体(ICOS)、リンパ球機能関連抗原-1(LFA-1、CD1-1a/CD18)、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD247、CD276(B7-H3)、LIGHT、(TNFSF14)、NKG2C、Igアルファ(CD79a)、DAP-10、Fcガンマ受容体、MHCクラス1分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリンタンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子(SLAMタンパク質)、活性化NK細胞受容体、BTLA、トールリガンド受容体、ICAM-1、B7-H3、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM(LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80(KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL-2Rベータ、IL-2Rガンマ、IL-7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、TNFR2、TRANSCENDANT/RANKL、DNAM1(CD226)、SLAMF4(CD244、2B4)、CD84、CD96(Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9(CD229)、CD160(BY55)、

30

40

【0094】

本開示のCARの細胞内ドメインは、上述の活性化ドメインに加えて、共刺激シグナル伝達ドメイン(本明細書では、共刺激分子として交換可能に示される)を組み込み、それらの効力を増加させることができる。共刺激ドメインは、本明細書に記載される活性化分子によって提供される一次シグナルに加えてシグナルを提供することができる。

50

【0095】

本開示の範囲内の適切な共刺激ドメインは、例えば、CD28、OX40、4-1BB / CD137、CD2、CD3（アルファ、ベータ、デルタ、イプシロン、ガンマ、ゼータ）、CD4、CD5、CD7、CD9、CD16、CD22、CD27、CD30、CD33、CD37、CD40、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1（LFA-1（CD11a / CD18））、CD247、CD276（B7-H3）、LIGHT（腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー14；TNFSF14）、NKG2C、Igアルファ（CD79a）、DAP-10、Fcガンマ受容体、MHCクラスI分子、TNFR、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子、BTLA、Tollリガンド受容体、ICAM-1、B7-H3、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM（LIGHTR）、KIRDS2、SLAMF7、NKp80（KLRF1）、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD8アルファ、CD8ベータ、IL-2Rベータ、IL-2Rガンマ、IL-7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD1-1d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD1-1a、LFA-1、ITGAM、CD1-1b、ITGAX、CD1-1c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、TNFR2、TRANSCENDANCE / RANKL、DNAM1（CD226）、SLAMF4（CD244、2B4）、CD84、CD96（Tactile）、CEACAM1、CRTAM、Ly9（CD229）、CD160（BY55）、PSGL1、CD100（SEMA4D）、CD69、SLAMF6（NTB-A、Ly108）、SLAM（SLAMF1、CD150、IPO-3）、BLAME（SLAMF8）、SELPLG（CD162）、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG / Cbp、CD19a、CD83リガンド、またはその断片もしくは組み合わせに由来し得ることが理解される。上記に列挙されていない追加の共刺激性分子またはその断片は、本開示の範囲内にあることが理解される。

10

20

【0096】

いくつかの実施形態では、CARの細胞内 / 細胞質ドメインは、41BB / CD137ドメインをそれ自体で含むように設計されてもよく、または本開示のCARの文脈で有用な任意の他の所望の細胞内ドメインと組み合わせられてもよい。41BB / CD137の完全な天然アミノ酸配列は、NCBI参照配列：NP_001552.2に記載される。完全な天然41BB / CD137核酸配列は、NCBI参照配列：NM_001561.5に記載される。

30

【0097】

いくつかの実施形態では、CARの細胞内 / 細胞質ドメインは、CD28ドメインをそれ自体で含むように設計されてもよく、または本開示のCARの文脈で有用な任意の他の所望の細胞内ドメインと組み合わせられてもよい。CD28の完全な天然アミノ酸配列は、NCBI参照配列：NP_006130.1に記載される。完全な天然CD28核酸配列は、NCBI参照配列：NM_006139.1に記載される。

40

【0098】

いくつかの実施形態では、CARの細胞内 / 細胞質ドメインは、CD3ゼータドメインをそれ自体で含むように設計されてもよく、または本開示のCARの文脈で有用な任意の他の所望の細胞内ドメインと組み合わせられてもよい。いくつかの実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号38に示されるアミノ酸配列と少なくともも約70%、少なくとも80%、少なくとも90%、95%、97%、または99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するCD3シグナル伝達ドメインを含み得る。例えば、CARの細胞内ドメインは、CD3ゼータ鎖部分および共刺激シグナル伝達分子の一部分を含み得る。本開示のCARの細胞内シグナル伝達部分内の細胞内シグナル伝達配列は、ランダムまたは特定の順序で互いに連結することができる。いくつかの実施形態では、細

50

胞内ドメインは、CD3ゼータの活性化ドメインおよびCD28のシグナル伝達ドメインを含むように設計される。

【0099】

いくつかの実施形態では、細胞内ドメインは、CD3ゼータの活性化ドメインおよび4-1BBのシグナル伝達ドメインを含むように設計される。いくつかの実施形態では、4-1BB（細胞内ドメイン）は、アミノ酸配列

KRGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL(配列番号37)を含む。

【0100】

CD3ゼータアミノ酸配列は、配列番号38を含み得る。

LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR(配列番号38)。

10

【0101】

いくつかの実施形態では、本開示のCARの細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激分子のドメインを含む。いくつかの実施形態では、本開示のCARの細胞内シグナル伝達ドメインは、41BB(GenBank:AAA53133)およびCD28(NP_006130.1)の断片からなる群から選択される共刺激分子の一部を含む。いくつかの実施形態では、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号37および配列番号38に示されるアミノ酸配列と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、95%、97%、または99%の配列同一性を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、本開示のCARの細胞内シグナル伝達ドメインは、配列番号37に示されるアミノ酸配列と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、95%、97%、または99%の配列同一性、および/または配列番号38に示されるアミノ酸配列と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、95%、97%、または99%の配列同一性を含むアミノ酸配列を含む。

20

【0102】

例示的な実施形態では、本開示のCARは、N末端からC末端にかけて：CD8シグナル配列、CD19scFv、CD8ヒンジおよび膜貫通領域、41BB細胞質シグナル伝達ドメイン、およびCD3細胞質シグナル伝達ドメインを含む。

【0103】

III. CARを含む免疫細胞

a. 免疫細胞

本開示のCAR(例えば、CAR-T細胞)を発現する操作された免疫細胞が本明細書に提供される。

30

【0104】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、CARの集団を含み、各CARは異なる細胞外抗原結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、CARの集団を含み、各CARは細胞外抗原結合ドメインを含む。

【0105】

操作された免疫細胞は、同種または自己であり得る。

40

【0106】

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、T細胞(例えば、炎症性Tリンパ球細胞傷害性Tリンパ球、調節性Tリンパ球、ヘルパーTリンパ球、腫瘍浸潤リンパ球(TIL))、NK細胞、NK-T細胞、TCR発現細胞、樹状細胞、キラー樹状細胞、マスト細胞、またはB細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、CD4+T-リンパ球およびCD8+T-リンパ球からなる群から生じることができる。いくつかの例示的な実施形態では、操作された免疫細胞はT細胞である。いくつかの例示的な実施形態では、操作された免疫細胞はガンモデルタT細胞である。いくつかの例示的な実施形態では、操作された免疫細胞はマクロファージである。

【0107】

50

いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、例えば限定されないが幹細胞に由来し得る。幹細胞は、成体幹細胞、非ヒト胚性幹細胞、より詳細には、非ヒト幹細胞、臍帯血幹細胞、前駆細胞、骨髄幹細胞、人工多能性幹細胞、分化全能性幹細胞、または造血幹細胞であり得る。

【0108】

いくつかの実施形態では、細胞は、末梢血から取得または調製される。いくつかの実施形態では、細胞は、末梢血単核細胞（P B M C）から取得または調製される。いくつかの実施形態では、細胞は、骨髄から取得または調製される。いくつかの実施形態では、細胞は、臍帯血から取得または調製される。いくつかの実施形態では、細胞はヒト細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、エレクトロポレーション、ソノポレーション、バイオリスティック（例えば、Gene Gun）、脂質トランスフェクション、ポリマートランスフェクション、ナノ粒子、ウイルストランスフェクション（例えば、レトロウイルス、レンチウイルス、AAV）またはポリプレックスからなる群から選択される方法を使用して、核酸ベクターによってトランスフェクトまたは形質導入される。

10

【0109】

いくつかの実施形態では、本開示のCD19特異的CARをその細胞表面膜で発現する操作された免疫細胞は、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%より大きい幹細胞メモリーおよび中央メモリー細胞の割合を含む。いくつかの実施形態では、本開示のCD19特異的CARをその細胞表面膜で発現する操作された免疫細胞は、約10%～約100%、約10%～約90%、約10%～約80%、約10%～約70%、約10%～約60%、約10%～約50%、約10%～約40%、約10%～約30%、約10%～約20%、約15%～約100%、約15%～約90%、約15%～約80%、約15%～約70%、約15%～約60%、約15%～約50%、約15%～約40%、約15%～約30%、約20%～約100%、約20%～約90%、約20%～約80%、約20%～約70%、約20%～約60%、約20%～約50%、約20%～約40%、約20%～約30%、約30%～約100%、約30%～約90%、約30%～約80%、約30%～約70%、約30%～約60%、約30%～約50%、約30%～約40%、約40%～約100%、約40%～約90%、約40%～約80%、約40%～約70%、約40%～約60%、約40%～約50%、約50%～約100%、約50%～約90%、約50%～約80%、約50%～約70%、約50%～約60%、約60%～約100%、約60%～約90%、約60%～約80%、約60%～約70%、約70%～約90%、約70%～約80%、約80%～約100%、約80%～約90%、約90%～約100%、約25%～約50%、約75%～約100%、または約50%～約75%の幹細胞メモリーおよび中央メモリー細胞の割合を含む。

20

30

【0110】

いくつかの実施形態では、免疫細胞は、本明細書に記載されるCARのいずれか一つを発現する炎症性Tリンパ球である。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、本明細書に記載されるCARのいずれか一つを発現する細胞傷害性Tリンパ球である。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、本明細書に記載されるCARのいずれか一つを発現する制御Tリンパ球である。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、本明細書に記載されるCARのいずれか一つを発現するヘルパーTリンパ球である。

40

【0111】

増殖および遺伝子改変の前に、細胞源は、様々な非限定的な方法を介して対象から取得することができる。細胞は、末梢血単核細胞、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、幹細胞またはiPSC由来T細胞またはNK細胞、感染部位由来の組織、腹水、胸水、脾臓組織、および腫瘍を含む、多数の非限定的な供給源から取得することができる。いくつかの実施形態では、当分野の当業者に利用可能かつ公知の任意の数のT細胞株を使用することができる。いくつかの実施形態では、細胞は、健康なドナー、癌と診断された患者、または感染症と診断された患者に由来することができる。いくつかの実施形態では、細胞

50

は、異なる表現型特徴を示す細胞の混合集団の一部であってもよい。

【0112】

また、上述の方法のいずれかに従って、形質転換された免疫細胞（例えば、T細胞）から得られた細胞株が本明細書に提供される。また、本明細書では、免疫抑制治療に耐性の改変細胞が提供される。いくつかの実施形態では、本開示による単離細胞は、CARをコードするポリヌクレオチドを含む。

【0113】

本開示の免疫細胞は、免疫細胞の遺伝子改変の前または後のいずれかで、概して既知である方法を使用して、活性化および増殖することができる。概して、本開示の操作された免疫細胞は、例えば、CD3 TCR複合体および共刺激分子をT細胞の表面で刺激する

10

【0114】

いくつかの実施形態では、T細胞集団は、例えば、抗CD3抗体もしくはその抗原結合断片、または表面に固定化された抗CD28抗体と接触することによって、またはカルシウムイオンフォアと組み合わせたタンパク質キナーゼC活性化因子（例えば、プリオスタチン）と接触することによって、インピトロで刺激することができる。T細胞の表面上のアクセサリー分子の共刺激には、アクセサリー分子に結合するリガンドが使用される。例えば、T細胞の集団は、T細胞の増殖を刺激するのに適切な条件下で、抗CD3抗体および抗CD28抗体と接触することができる。抗CD3抗体および抗CD28抗体は、ビーズもしくはプレートまたは他の基材上に配置され得る。T細胞培養に適切な条件には、適切な培地（例えば、最小必須培地またはRPMI培地1640、またはX-vivo 15、（Lonza））が含まれ、増殖および生存率に必要な因子を含有し得、血清（例えば、ウシ胎児またはヒト血清）、インターロイキン-2（IL-2）、インスリン、IFN-、IL-4、IL-7、GM-CSF、IL-10、IL-2、IL-15、TGFβ、およびTNFまたは当業者に周知の細胞増殖のための任意のその他の添加物が挙げられる。細胞の増殖のための他の添加物としては、限定されるものではないが、界面活性剤、プラスマネート、およびN-アセチル-システインおよび2-メルカプトエタノール等の還元剤が挙げられる。培地は、追加のアミノ酸、ピルビン酸ナトリウム、およびビタミンを有するRPMI 1640、AIM-V、DMEM、MEM、α-MEM、F-12、X-Vivo 15、およびX-Vivo 20、Optimizerを富含むことができ、血清を含まないか、または適切な量の血清（または血漿）もしくは定義されたホルモンのセット、および/またはT細胞（例えば、IL-7および/またはIL-15）の増殖に十分な量のサイトカインが補充される。例えばペニシリンおよびストレプトマイシンなどの抗生物質は、実験培養物にのみ含まれ、対象に注入される細胞の培養物には含まれない。標的細胞は、例えば、適切な温度（例えば、37）および雰囲気（例えば、空気+5%のCO₂）などの増殖を支持するために必要な条件下で維持される。様々な刺激時間に曝露されたT細胞は、異なる特徴を呈する場合がある。

20

30

40

いくつかの実施形態では、本開示の細胞は、組織または細胞と共培養することによって増殖することができる。細胞はまた、インピボで、例えば、対象に細胞を投与した後の対象の血液中で増殖され得る。

【0115】

いくつかの実施形態では、本開示による操作された免疫細胞は、一つ以上の破損された遺伝子または不活化された遺伝子を含み得る。いくつかの実施形態では、本開示による操作された免疫細胞は、CD52、CD19、GR、PD-1、CTLA-4、LAG3、TIM3、BTLA、BY55、TIGIT、B7H5、LAIR1、SIGLEC10、2B4、HLA、TCR、およびTCRからなる群から選択される一つの破損または不活化された遺伝子を含み、および/またはCAR、多鎖CAR、および/またはpT

50

導入遺伝子を発現する。いくつかの実施形態では、単離細胞は、多鎖CARを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、本開示による単離細胞は、以下からなる群から選択される二つの破損または非活性化遺伝子を含む：CD52およびGR、CD52およびTCR、CDR52およびTCR、CD19およびCD52、CD19およびTCR、CD19およびTCR、GRおよびTCR、GRおよびTCR、TCRおよびTCR、PD-1およびTCR、PD-1およびTCR、CTLA-4およびTCR、CTLA-4およびTCR、LAG3およびTCR、LAG3およびTCR、TIM3 and TCR、Tim3およびTCR、BTLAおよびTCR、BTLAおよびTCR、BY55およびTCR、BY55およびTCR、TIGITおよびTCR、TIGITおよびTCR、B7H5およびTCR、B7H5およびTCR、LAIR1およびTCR、LAIR1およびTCR、SIGLEC10およびTCR、SIGLEC10およびTCR、2B4およびTCR、2B4およびTCR および/またはCAR、多鎖CARおよびpT 導入遺伝子を発現する。いくつかの実施形態では、本方法は、細胞内にエンドヌクレアーゼを導入することによって、選択的なDNA切断によって遺伝子を選択的に不活化することができることにより、一つ以上の遺伝子を破壊または不活化することを含む。いくつかの実施形態では、エンドヌクレアーゼは、例えば、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、メガTALヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、転写アクチベーター様エフェクターヌクレアーゼ(TALEヌクレアーゼ)、またはCRIPR(例えば、Cas9)エンドヌクレアーゼであってもよい。

10

20

【0116】

いくつかの実施形態では、TCRは、TCR 遺伝子および/またはTCR 遺伝子を破壊または不活化することによって、本開示による細胞内で機能しない。いくつかの実施形態では、個体由来する改変細胞を取得する方法が提供され、ここにおいて、細胞は、主要組織適合複合体(MHC)シグナル伝達経路とは独立して増殖することができる。MHCシグナル伝達経路から独立して増殖することができる改変細胞は、本方法によって取得され易いので、本開示の範囲に含まれる。本明細書に開示される改変細胞は、宿主対移植片(HvG)拒絶反応および移植片対宿主病(GvHD)に対するそれを必要とする患者の治療に使用することができ、したがって、本開示の範囲内において、宿主対移植片(HvG)拒絶反応および移植片対宿主病(GvHD)に対してそれを必要とする患者を治療する方法は、破壊されたまたは不活化されたTCR 遺伝子および/またはTCR 遺伝子を含む改変細胞の有効量を前述の患者に投与することによって前述の患者を治療することを含む。

30

【0117】

いくつかの実施形態では、免疫細胞は、一つ以上の化学療法剤に耐性であるように操作される。化学療法薬は、例えば、プリンヌクレオチド類似体(PNA)であってもよく、したがって、養子免疫療法と化学療法とを組み合わせた癌治療に適した免疫細胞を作る。例示的なPNAとしては、例えば、クロファラビン、フルダラビン、シクロホスファミド、およびシタラビンが単独でまたは組み合わせて含まれる。PNAは、デオキシシチジンキナーゼ(dCK)によってモノリン酸PNA、ジリン酸PNA、およびトリリン酸PNAに代謝される。それらの三リン酸形態は、DNA合成のためにATPと競合し、アポトーシス促進剤として作用し、トリヌクレオチド生成に関与するリボヌクレオチドレダクターゼ(RNR)の強力な阻害剤である。破損または不活化されたdCK遺伝子を含むCD19特異的CAR-T細胞が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、dCKノックアウト細胞は、例えば、mRNAの電気穿孔によって、dCK遺伝子に対して特異的TALヌクレアーゼをコードするポリヌクレオチドを使用したT細胞のトランスフェクションによって作製される。dCKノックアウトCD19特異的CAR-T細胞は、例えばクロロファラビンおよび/またはフルダラビンを含むPNAに対して耐性であり、CD19発現細胞に対するT細胞細胞傷害活性を維持する。

40

【0118】

50

いくつかの実施形態では、本開示の単離された細胞または細胞株は、pT またはその機能的バリエーションを含み得る。いくつかの実施形態では、単離された細胞または細胞株は、TCR 遺伝子を破壊または不活化することによってさらに遺伝子改変され得る。

【0119】

本開示はまた、本明細書に記載されるCARポリヌクレオチドのいずれかを含む操作された免疫細胞を提供する。

【0120】

c. 作製方法

本明細書では、本開示のCARおよびCAR含有免疫細胞を作製する方法が提供される。本開示によるポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、抗原結合ドメイン、免疫細胞、組成物などの作製には、様々な公知の技術を利用することができる。

10

【0121】

ポリヌクレオチドおよびベクター

いくつかの実施形態では、CARは、プラスミドベクターを介して導入遺伝子として免疫細胞内に導入され得る。いくつかの実施形態では、プラスミドベクターはまた、例えば、ベクターを受容した細胞の識別および/または選択を提供する選択マーカ含有してよい。

【0122】

CARポリペプチドは、細胞内へのCARポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの導入後に細胞内で*in situ*で合成され得る。あるいは、CARポリペプチドは、細胞の外部で産生され、次いで細胞内に導入され得る。ポリヌクレオチド構築物を細胞内に導入する方法は、当該技術分野で公知である。いくつかの実施形態では、(例えばレンチウイルスベクターを使用して)安定的形質転換方法を使用して、ポリヌクレオチド構築物を細胞のゲノム内に統合することができる。他の実施形態では、一過性形質転換法を使用して、ポリヌクレオチド構築物、および細胞のゲノム内に組み込まれていないポリヌクレオチド構築物を一過性に発現することができる。他の実施形態では、ウイルス媒介方法を使用することができる。ポリヌクレオチドは、例えば、組換えウイルスベクター(例えば、レトロウイルス、アデノウイルス)、リポソームなどの任意の適切な手段によって細胞内に導入され得る。一過性形質転換方法には、例えば、限定されるものではないが、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、または粒子衝撃が含まれる。ポリヌクレオチドは、例えばプラスミドベクターまたはウイルスベクターなどのベクターに含まれてもよい。

20

30

【0123】

いくつかの実施形態では、CD19抗原結合ドメイン、少なくとも一つの共刺激性分子、および活性化ドメインをコードする第一のポリヌクレオチドに動作可能に連結されたプロモーターを含む単離核酸が提供される。いくつかの実施形態では、核酸構築物は、ウイルスベクター内に含有される。いくつかの実施形態では、ウイルスベクターは、レトロウイルスベクター、マウス白血病ウイルスベクター、SFGベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノ関連ウイルス(AAV)ベクター、ヘルペスウイルスベクター、およびワクシニアウイルスベクターからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、核酸はプラスミド内に含有される。

40

【0124】

一態様では、本開示は、哺乳類T細胞においてCAR導入遺伝子を発現することができるプロモーターを含むポリヌクレオチド配列を提供する。いくつかの実施形態では、プロモーターはEF1aプロモーターである。天然のEF1aプロモーターは、アミノアシルtRNAのリポソームへの酵素送達に関与する伸長因子-1複合体のアルファサブユニットの発現を駆動する。EF1aプロモーターは、哺乳類発現プラスミドに広く使用されており、レンチウイルスベクターにクローニングされた導入遺伝子からのCAR発現の駆動に効果的であることが示されている。例えば、Miloneら、Mol. Ther. 17(8): 1453-1464(2009)を参照されたい。いくつかの実施形態において

50

、 E F 1 a プロモーターは、配列番号 1 5 として提供される配列を含む。

GCGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAA
GTTGGGGGGAGGGGTTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACT
GGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATA
TAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACA
GGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCGCCGGGCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTG
CCTTGAATTACTTCCACGCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTT
GGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGA
GTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCCGCGCTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCC
TGCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGC
TTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCCGT
TTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTCCGGCGAGGC
GGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCCT
GCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCCGGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCC
CGGTCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAG
CTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCACACAAAGGA
AAAGGGCCTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGT
CCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGCTTTTAGGTTGGGGGGAGG
GGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTT
GGCACTTGATGTAATTCCTTGGAAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTC
AAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTCAGGTGTCGTGA (配列番号 1 5)

10

20

【 0 1 2 5 】

上に示す E F 1 a プロモーター配列は、 E F 1 a 遺伝子の第一のエクソン（太字）および第一のイントロン（下線、配列番号 3 9 ）、続いて第二のエクソンの N 末端部分を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に提供されるポリヌクレオチドは、短い E F 1 a プロモーターを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるポリヌクレオチドは、配列番号 1 5 の核酸配列より短い E F 1 a プロモーターを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるポリヌクレオチドは、 E F 1 a 遺伝子の第一のイントロンを含まない E F 1 a プロモーターを含む。いくつかの実施形態において、本明細書に提供されるポリヌクレオチドは、配列番号 3 9 の核酸配列を含まない E F 1 a プロモーターを含む。

30

【 0 1 2 6 】

いくつかの実施形態において、プロモーターは、配列番号 1 6 として提供される配列を含む。

40

GCGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAA
GTTGGGGGGAGGGGTTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACT
GGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTAT
ATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACA
G (配列番号 1 6)

【 0 1 2 7 】

本明細書に記載される免疫細胞のインビトロ操作または遺伝子改変の前に、細胞は対象から取得することができる。 C D 1 9 C A R を発現する細胞は、同種プロセスまたは自

50

己プロセスに由来し得る。

【0128】

原材料

いくつかの実施形態では、免疫細胞は、T細胞を含む。T細胞は、末梢血単核細胞（P B M C）、骨髓、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位からの組織、腹水、胸水、脾臓組織、および腫瘍を含む、多数の供給源から取得することができる。特定の実施形態では、T細胞は、F I C O L L（商標）分離などの当業者に公知の任意の数の技術を使用して、対象から採取された血液の単位から取得することができる。

【0129】

細胞は、アフエレーシスによって個体の循環血液から取得することができる。アフエレーシス産物は、典型的には、T細胞、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球、赤血球、および血小板を含むリンパ球を含有する。特定の実施形態では、アフエレーシスによって収集される細胞は、血漿画分を除去するために洗浄され、後続の処理のために適切な緩衝剤または培地中に置かれ得る。

10

【0130】

特定の実施形態では、T細胞は、赤血球を溶解し、単球を枯渇させることによって、例えば、P E R C O L L（商標）勾配を通した遠心分離を使用して、P B M Cから単離される。T細胞（例えば、C D 2 8 +、C D 4 +、C D 5 +、C D 4 5 R A -、およびC D 4 5 R O + T細胞またはC D 2 8 +、C D 4 +、C D 5 +、C D 4 5 R A -、C D 4 5 R O +、およびC D 6 2 L + T細胞）の特定の亜集団は、当技術分野で公知のポジティブまたはネガティブ選択技術によってさらに単離され得る。例えば、ネガティブ選択によるT細胞集団の濃縮は、ネガティブ選択細胞に特有の表面マーカーに向けられた抗体の組み合わせを用いて達成することができる。本明細書で使用するための一つの方法は、ネガティブに選択された細胞に存在する細胞表面マーカーに向けられたモノクローナル抗体のカクテルを使用する、負磁気免疫付着（i m m u n o a d h e r e n c e）またはフローサイトメトリーを介した細胞ソーティングおよび/または選択である。例えば、ネガティブ選択によってC D 4 +細胞について濃縮するために、モノクローナル抗体カクテルは、典型的には、C D 1 4、C D 2 0、C D 1 1 b、C D 1 6、H L A - D R、およびC D 8に対する抗体を含む。フローサイトメトリーおよび細胞ソーティングを使用して、本開示で使用するための対象となる細胞集団を単離することもできる。

20

30

【0131】

P B M Cは、本明細書に記載される方法を使用して、免疫細胞（C A RまたはT C Rなど）との遺伝子改変に直接使用することができる。特定の実施形態では、P B M Cを単離した後、Tリンパ球をさらに単離ことができ、細胞傷害性およびヘルパーTリンパ球の両方を、遺伝子改変および/または増殖の前または後に、ナイーブ、メモリー、およびエフェクターT細胞亜群に分類することができる。

【0132】

いくつかの実施形態では、C D 8 +細胞は、これらのタイプのC D 8 +細胞のそれぞれに関連する細胞表面抗原を特定することによって、ナイーブ、幹細胞メモリー、中央メモリー、およびエフェクター細胞へとさらにソートされる。いくつかの実施形態では、中央メモリーT細胞の表現型マーカーの発現は、C D 4 5 R O、C D 6 2 L、C C R 7、C D 2 8、C D 3、およびC D 1 2 7を含み、グランザイムBに対して陰性である。いくつかの実施形態では、幹細胞メモリーT細胞は、C D 4 5 R O -、C D 6 2 L +、C D 8 + T細胞である。いくつかの実施形態では、中央メモリーT細胞は、C D 4 5 R O +、C D 6 2 L +、C D 8 + T細胞である。いくつかの実施形態では、エフェクターT細胞は、C D 6 2 L、C C R 7、C D 2 8、およびC D 1 2 7に対して陰性であり、グランザイムBおよびパーフォリンに対して陽性である。特定の実施形態では、C D 4 + T細胞は、さらに亜集団に分類される。例えば、C D 4 + Tヘルパー細胞は、細胞表面抗原を有する細胞集団を特定することによって、ナイーブ、中央メモリー、およびエフェクター細胞に分類することができる。

40

50

【 0 1 3 3 】

幹細胞由来免疫細胞

いくつかの実施形態では、免疫細胞は、胚性幹（E S）細胞または人工多能性幹（i P S）細胞に由来し得る。適切なH S C、E S細胞、i P S細胞、および他の幹細胞は、不死細胞株を培養するか、または患者から直接単離することができる。幹細胞を単離、発現、および/または培養するための様々な方法が当技術分野で公知であり、本発明の実践に使用することができる。

【 0 1 3 4 】

いくつかの実施形態では、免疫細胞は、再プログラムされたT細胞に由来する人工多能性幹細胞（i P S C）である。いくつかの実施形態では、原料物質は、T細胞または非T細胞に由来する誘導多能性幹細胞（i P S C）であってもよい。原料物質は胚性幹細胞とすることができる。原料物質は、B細胞、または末梢血単核細胞単離物、造血前駆細胞、造血幹細胞、間葉幹細胞、脂肪幹細胞、または任意の他の体細胞タイプの任意の他の細胞であってもよい。

10

【 0 1 3 5 】

単離細胞の遺伝子改変

T細胞などの免疫細胞は、公知の方法を使用した単離後に遺伝子改変され得るか、または遺伝子改変される前に、インビトロで免疫細胞を活性化および増殖（または前駆細胞の場合に分化）させることができる。いくつかの実施形態では、単離された免疫細胞は、内因性T C R および/またはC D 5 2の発現を低減または除去するように遺伝子改変される。いくつかの実施形態では、細胞は、遺伝子編集技術（例えば、C R I S P R / C a s 9、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ（Z F N）、T A L E N、M e g a T A L、メガヌクレアーゼ）を使用して遺伝子改変され、内因性タンパク質（例えば、T C R および/またはC D 5 2）の発現を低減または除去する。別の実施形態では、T細胞などの免疫細胞は、本明細書に記載されるキメラ抗原受容体（例えば、C A Rをコードする一つ以上のヌクレオチド配列を含むウイルスベクターで形質導入される）で遺伝子改変され、次いでインビトロで活性化および/または拡大される。T細胞を活性化および増殖させる方法は当該技術分野で公知であり、例えば、米国特許第6,905,874号、米国特許第6,867,041号、米国特許第6,797,514号、およびP C T W O 2 0 1 2 / 0 7 9 0 0 0に記載され、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。概して、このような方法は、I L - 2などの適切なサイトカインを有する培養培地に、ビーズまたは他の表面に一般的に付着した抗C D 3抗体および抗C D 2 8抗体などの刺激分子および共刺激性分子と、P B M Cまたは単離されたT細胞を接触させることをさらに含む。このビーズに結合された抗C D 3抗体および抗C D 2 8抗体は、「サロゲート」抗原提示細胞（A P C）としての役目を果たす。一つの例は、ヒトT細胞の生理学的活性化のためのC D 3 / C D 2 8 アクチベーター / 刺激因子であるD y n a b e a d s（登録商標）システムである。他の実施形態では、米国特許第6,040,177号、米国特許第5,827,642号、およびW O 2 0 1 2 1 2 9 5 1 4に記載される方法、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、を使用して、T細胞は活性化および刺激されて、フィーダー細胞および適切な抗体およびサイトカインと増殖することができる。

20

30

40

【 0 1 3 6 】

本開示の構築物および操作された免疫細胞を作製するための特定の方法は、P C T 出願P C T / U S 1 5 / 1 4 5 2 0に記載されており、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【 0 1 3 7 】

P B M Cは、NK細胞またはNK T細胞などの他の細胞傷害性リンパ球をさらに含む得ることが理解されよう。本明細書に開示されるキメラ受容体のコード配列を担持する発現ベクターは、ヒトドナーT細胞、NK細胞、またはNK T細胞の集団に導入され得る。発現ベクターを担持する形質導入に成功したT細胞は、フローサイトメトリーを使用してソートされてC D 3 陽性T細胞を単離し、次いでさらに増殖されて、抗C D 3抗体およびI

50

L - 2 または本明細書の別に記載される当技術分野で既知の他の方法を使用した細胞活性化に加えて、これらのCAR発現T細胞の数を増加させることができる。標準的な手順は、ヒト対象における使用のための保管および/または調製のためのCARを発現するT細胞の凍結保存に使用される。一実施形態では、T細胞のインビトロ形質導入、培養、および/または増殖は、胎児仔ウシ血清および胎児ウシ血清などの非ヒト動物由来産物の非存在下で実施される。

【0138】

ポリヌクレオチドのクローニングのために、ベクターを宿主細胞（単離された宿主細胞）に導入して、ベクター自体の複製を可能にし、それによってその中に含有されるポリヌクレオチドのコピーを増幅することができる。クローニングベクターは、配列構成要素を概して含むことができ、限定されるものではないが、複製の起源、プロモーター配列、転写開始配列、エンハンサー配列、および選択マーカを含み得る。これらの要素は、当業者によって適宜選択され得る。例えば、複製の起源は、宿主細胞中のベクターの自律的複製を促進するために選択され得る。

10

【0139】

特定の実施形態では、本開示は、本明細書に提供されるベクターを含有する単離された宿主細胞を提供する。ベクターを含有する宿主細胞は、ベクター中に含有されるポリヌクレオチドの発現またはクローニングに有用であり得る。適切な宿主細胞には、原核細胞、真菌細胞、酵母細胞、または哺乳類の細胞などの高等真核細胞が含まれるが、これらに限定されない。この目的のために好適な原核細胞は、例えば、グラム陰性またはグラム陽性の生物体等の真正細菌、例えば、大腸菌属等の *Enterobacteriaceae*、例えば、大腸菌、エンテロバクター属、エルウィニア属、クレブシエラ属、プロテウス属、サルモネラ属、例えば、サルモネラ・チフィリウム、セラチア属、例えば、霊菌 (*Serratia marcescans*)、および赤痢菌属、ならびに枯草菌 (*B. subtilis*) および *B. licheniformis* 等の桿菌、緑膿菌等のシュードモナス属、およびストレプトマイセス属を含むが、これらに限定されない。

20

【0140】

ベクターは、限定されるものではないが、DEAE-デキストラン媒介送達、リン酸カルシウム沈殿法、カチオン性脂質媒介送達、リボソーム媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、微粒子銃、受容体媒介遺伝子送達、ポリリジン、ヒストン、キトサン、およびペプチドによって媒介される送達を含む、当技術分野で公知の任意の適切な方法を使用して宿主細胞に導入され得る。対象となるベクターの発現のための細胞のトランスフェクションおよび形質転換のための標準的な方法は、当該技術分野で周知である。さらなる実施形態では、異なる発現ベクターの混合物は、免疫エフェクター細胞のドナー集団を遺伝子改変する際に使用することができ、各ベクターは、本明細書に開示される異なるCARをコードする。結果として生じる形質導入免疫エフェクター細胞は、操作された細胞の混合集団を形成し、操作された細胞の割合は、一つ以上の異なるCARを発現する。

30

【0141】

【0142】

いくつかの実施形態では、ベクターはレンチウイルスベクターを含む。CARコード配列を含むレンチウイルスベクターをレンチウイルスパッケージング細胞株に導入することができ、パッケージング細胞株によって産生されるレンチウイルスを、T細胞の形質導入に使用して、CAR-T細胞を生成することができる。CARをコードするレンチウイルスを作製するために、HEK-293T細胞を、6ウェルプレートのウェル当たり10%のFBS (HyClone社またはJR Scientific社) で補充された2mLのDMEM (Gibco社) 中、0日目に、40万個の細胞/mLで播種することができる。1日目に、レンチウイルスパッケージングベクターの1.5ugのpsPAX2、0.5ugのpMD2G、および0.5ugの適切な移入CARベクターを、6ウェルプレートのウェル当たり250uLのOpti-MEM (Gibco社) 中に混合することによってレンチウイルスを調製することができる(「DNAミックス」)。250uLのO

40

50

pti-MEM中の10uLのリポフェクタミン2000(Invitrogen社)を室温で5分間インキュベートし、次いでDNAミックスに添加することができる。混合物を室温で20分間インキュベートすることができ、500uLの総容量をHEK-293Tを含有するウェルの側面にゆっくりと添加した。CAR含有レンチウイルス産生および形質導入の一般的な方法は、当技術分野で一般的に公知であり、例えば、Miloneら、Leukemia、2018、32:1529-1541; Sanberら、Construction of stable packaging cell lines for clinical lentiviral vector production、Nature 2015、DOI:10.1038、Roddieら、Cytotherapy 2019、21:327-340を参照されたい、それらすべては参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。一つの実施形態では、本開示は、CARまたはCD19タンパク質を標的にするTCRを発現する遺伝子操作された細胞を保存する方法を提供する。これは、細胞が解凍時に生存し続けるように、免疫細胞を凍結保存することを伴う。CARを発現する免疫細胞の画分は、当該技術分野で公知の方法によって凍結保存され、悪性腫瘍に罹患した患者の将来の治療のためのそのような細胞の永久的な供給源を提供することができる。必要な場合、凍結保存された形質転換免疫細胞を解凍し、増殖させ、増殖させて、より多くのそのような細胞を得ることができる。

10

【0143】

いくつかの実施形態では、細胞は、まずその培養培地から細胞を回収し、次いで治療有効量での投与(医薬的に許容可能な担体)に適した培地および容器システムで細胞を洗浄および濃縮することによって製剤化される。適切な注入媒体は、任意の等張性媒体製剤、典型的には生理食塩水、Normosol(商標)R(Abbott社)またはPlasma-Lyte(商標)A(Baxter社)であるが、水中の5%デキストロースまたはリンゲル乳酸も利用することができる。注入培地は、ヒト血清アルブミンで補充され得る。

20

【0144】

同種CAR T細胞

同種CAR T療法、またはAlloCARs(商標)を製造するためのプロセスは、健康なドナーから健康な、選択された、スクリーニングされた、および試験されたT細胞を採取することを含む。次に、T細胞は、血液学的腫瘍または固形腫瘍に発現される特定の細胞表面タンパク質(例えばCD19)を認識するCARを発現するように操作される。同種T細胞は、移植片対宿主病(GvHD)のリスクを減少させ、同種拒絶反応を予防するように遺伝子編集される。T細胞受容体遺伝子(例えば、TCR、TCR)は、GvHDを避けるためにノックアウトされる。CD52遺伝子をノックアウトして、抗-CD52抗体治療に対してCAR T産物を抵抗性にするすることができる。したがって抗-CD52抗体治療は、宿主免疫系を抑制し、CAR Tが生着したままで完全な治療的効果を達成できるように使用することができる。次いで、操作されたT細胞は精製工程を受け、最終的に患者に送達するためにバイアル中で凍結保存される。

30

【0145】

自家CAR T細胞

自家キメラ抗原受容体(CAR)T細胞療法は、患者自身の細胞(例えば、T細胞を含む白血球)を収集し、T細胞を遺伝子操作して、一つ以上の特定の癌細胞の細胞表面に発現された標的を認識し、癌細胞を殺すCARを発現することを含む。次いで、操作された細胞を凍結保存し、その後患者に投与する。

40

【0146】

IV. 治療方法

本開示は、患者における望ましくないおよび/または増加したCD19レベルに関連する病態を治療または予防する方法を含み、有効量の少なくとも一つのCAR、または本明細書に開示されるCARを含む免疫細胞を、それを必要とする患者に投与することを含む。

【0147】

50

癌を含む疾患または障害を治療するための方法が提供される。いくつかの実施形態では、本開示は、対象におけるT細胞介在性免疫反応の生成に関し、本出願の操作された免疫細胞の有効量を対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、T細胞介在性免疫反応は、標的細胞に対して向けられる。いくつかの実施形態では、操作された免疫細胞は、キメラ抗原受容体(CAR)を含む。いくつかの実施形態では、標的細胞は腫瘍細胞である。いくつかの態様では、本開示は、悪性腫瘍を治療または予防するための方法を含み、前述の方法は、それを必要とする対象に、本明細書に記載の少なくとも一つの単離された抗原結合ドメインの有効量を投与することを含む。いくつかの態様では、本開示は、悪性腫瘍を治療または予防するための方法を含み、前述の方法は、それを必要とする対象に、少なくとも一つの免疫細胞の有効量を投与することを含み、免疫細胞は、少なくとも一つのキメラ抗原受容体、T細胞受容体、および/または本明細書に記載の単離された抗原結合ドメインを含む。

10

【0148】

本開示の免疫細胞を含有するCARは、CD19の異常発現に関与する悪性腫瘍を治療するために使用することができる。いくつかの実施形態では、本開示の免疫細胞を含有するCARを使用して、癌を治療することができる。本明細書で使用される場合、用語「癌」は、固形腫瘍および血液生腫瘍を含むが、これらに限定されない。「癌」という用語は、限定されないが、膀胱、骨または血液、脳、乳房、子宮頸部、胸部、結腸、子宮内膜、食道、眼、頭部、腎臓、肝臓、リンパ節、肺、口、首、卵巣、脾臓、前立腺、直腸、胃、精巣、喉、および子宮の癌を含む、皮膚組織、器官、血液、および血管の疾患を指す。特異的な癌としては、限定されるものではないが、以下が挙げられる：進行悪性腫瘍、アミロイドーシス、神経芽腫、髄膜腫、血管周囲細胞腫、多脳転移酵素、多形神経膠芽腫、神経膠芽腫、脳幹神経膠腫、予後不良な悪性脳腫瘍、悪性神経膠腫、再発性神経膠腫、未分化星状細胞腫、退形成乏突起膠腫、神経内分泌腫瘍、直腸腺癌、デュークスC&D結腸直腸癌、切除不能な結腸直腸癌、転移性肝細胞癌、カボジ肉腫、核型急性骨髄芽球性白血病、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、皮膚T細胞リンパ腫、皮膚B細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、低悪性度濾胞性リンパ腫、悪性黒色腫、悪性中皮腫、悪性胸水中皮腫症候群、腹膜癌、乳頭漿液性癌、婦人科肉腫、軟部組織肉腫、強皮症、皮膚血管炎、ランゲルハンス細胞組織球症、平滑筋肉腫、進行性の骨化線維異形成症、ホルモン抵抗性前立腺がん、切除された高リスク軟部組織肉腫、切除不能な肝細胞癌、ワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症、くすぶり型骨髄腫、緩徐進行性骨髄腫、卵管癌、アンドロゲン非依存性前立腺癌、アンドロゲン依存性ステージIV非転移性前立腺癌、ホルモン非感受性前立腺癌 化学療法非感受性前立腺がん 乳頭状甲状腺癌、濾胞性甲状腺癌、甲状腺髄様癌、および平滑筋腫。特定の実施形態では、癌は転移性である。別の実施形態では、癌は、化学療法または放射線に対して難治性または抵抗性である。

20

30

【0149】

例示的な実施形態では、例えば、CAR含有免疫細胞、例えば、本開示のCAR-T細胞は、NHLを治療するために使用される。

【0150】

また、対象における腫瘍のサイズを縮小する方法であって、本開示の操作された細胞を対象に投与することを含み、細胞は、CD19抗原結合ドメインを含むキメラ抗原受容体を含み、腫瘍上のCD19抗原に結合する。

40

【0151】

いくつかの実施形態では、対象は、固形腫瘍、またはリンパ腫または白血病などの血液悪性腫瘍を有する。いくつかの実施形態では、操作された細胞は腫瘍床に送達される。いくつかの実施形態では、癌は、対象の骨髄中に存在する。いくつかの実施形態では、操作された細胞は、自己免疫細胞、例えば、自己T細胞である。いくつかの実施形態では、操作された細胞は、同種免疫細胞、例えば、同種T細胞である。いくつかの実施形態では、操作された細胞は、異種免疫細胞、例えば、異種T細胞である。いくつかの実施形態では、本出願の操作された細胞は、インピボでトランスフェクトまたは形質導入される。他の

50

実施形態では、本出願の操作された細胞は、エクスピボでトランスフェクトまたは形質導入される。本明細書で使用される場合、用語「インビトロ細胞」は、エクスピボで培養される任意の細胞を指す。

【0152】

「治療有効量」、「有効用量」、「有効量」または治療剤の「治療有効用量」の治療薬、例えば、操作されたCAR T細胞は、単独で、または別の治療剤と組み合わせて使用された場合、疾患の発症に対して対象を保護する、または疾患の症状の重症度の減少によって示されるまたは疾患退縮を促進する、疾患無症状期間の頻度および期間を増加させる、または疾患による機能障害もしくは障害を予防する任意の量である。疾患退縮を促進する治療剤の能力は、例えば、臨床試験中のヒト対象において、ヒトにおける有効性を予測する動物モデルシステムにおいて、またはインビトロアッセイにおける薬剤の活性をアッセイすることによって、当業者に公知の様々な方法を用いて評価することができる。

10

【0153】

用語「患者」および「対象」は互換的に使用され、ヒトおよび非ヒト動物の対象、ならびに正式に診断された障害を有するもの、正式に認識された障害を有していないもの、医学的な注意を引くもの、障害を発症するリスクを有するものなどを含む。

【0154】

用語「治療する」および「治療」は、治療的治療、予防的治療、および対象が障害または他のリスク因子を発症するリスクを減少させる用途を含む。治療は、障害の完全な治癒を必要とせず、症状または根底にあるリスク因子を減少させる実施形態を包含する。用語「予防する」は、事象の可能性の100%除去を必要としない。むしろ、化合物または方法の存在下で事象の発生の可能性が低減されたことを示す。

20

【0155】

組成物中の細胞の所望の治療量は、概して、少なくとも2個の細胞（例えば、少なくとも1個のCD8+中央メモリーT細胞および少なくとも1個のCD4+ヘルパーT細胞サブセット）であるか、またはより典型的には 10^2 細胞超、最大 10^6 個、最大 10^8 細胞または 10^9 細胞を含み、 10^{10} 細胞以上とすることができる。細胞数は、組成物が意図される望ましい使用、およびその中に含まれる細胞のタイプに依存する。所望の細胞の密度は、典型的には、 10^6 細胞/ml超であり、概して、 10^7 細胞/ml超、概して、 10^8 細胞/ml超である。臨床的に意義のある数の免疫細胞を、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、または 10^{12} 細胞に累積的に等しいか、またはそれを超える複数の注入に分配することができる。本開示のいくつかの態様では、特に、注入されたすべての細胞は特定の標的抗原（CD19）に再配向されるため、 10^6 /キログラム（患者あたり $10^6 \sim 10^{11}$ ）の範囲のより少ない細胞数を投与することができる。CAR治療は、これらの範囲内の用量で複数回投与することができる。細胞は、療法を受けている患者に対し、自己、同種、または異種であり得る。

30

【0156】

いくつかの実施形態では、CAR T細胞の治療有効量は約 1×10^5 細胞/kg、約 2×10^5 細胞/kg、約 3×10^5 細胞/kg、約 4×10^5 細胞/kg、約 5×10^5 細胞/kg、約 6×10^5 細胞/kg、約 7×10^5 細胞/kg、約 8×10^5 細胞/kg、約 9×10^5 細胞/kg、 2×10^6 細胞/kg、約 3×10^6 細胞/kg、約 4×10^6 細胞/kg、約 5×10^6 細胞/kg、約 6×10^6 細胞/kg、約 7×10^6 細胞/kg、約 8×10^6 細胞/kg、約 9×10^6 細胞/kg、約 1×10^7 細胞/kg、約 2×10^7 細胞/kg、約 3×10^7 細胞/kg、約 4×10^7 細胞/kg、約 5×10^7 細胞/kg、約 6×10^7 細胞/kg、約 7×10^7 細胞/kg、約 8×10^7 細胞/kg、または約 9×10^7 細胞/kgである。

40

【0157】

いくつかの実施形態では、CAR+/CAR-T+/TCR+細胞の標的用量は、 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^8$ 細胞/kg、例えば、 2×10^6 細胞/kgの範囲である。この範囲を超える用量および下回る用量は、特定の対象に適切であり得、必要に応じて、適切な用量

50

レベルを医療従事者によって決定することができる。さらに、本開示に従って細胞の複数回用量を提供することができる。

【0158】

いくつかの態様では、本開示は、本明細書に記載の少なくとも一つの抗原結合ドメインと、薬学的に許容可能な賦形剤とを含む医薬組成物を含む。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、追加の活性薬剤をさらに含む。

【0159】

本開示のCAR発現細胞集団は、単独で、または希釈剤と組み合わせて、および/またはIL-2もしくは他のサイトカインもしくは細胞集団などの他の構成要素と組み合わせて医薬組成物として投与することができる。本開示の医薬組成物は、本明細書に記載のT細胞などのCARまたはTCR発現細胞集団を、一つ以上の薬学的または生理学的に許容可能な担体、希釈剤、または賦形剤と組み合わせて含むことができる。こうした組成物は、中性緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水などの緩衝剤、グルコース、マンノース、スクロースまたはデキストランなどの炭水化物、マンニトール、タンパク質、ポリペプチドまたはグリシンなどのアミノ酸、抗酸化剤、EDTAまたはグルタチオンなどのキレート剤、アジュバント（例えば水酸化アルミニウム）、および保存剤を含み得る。本開示の組成物は、静脈内投与のために製剤化されることが好ましい。

【0160】

医薬組成物（溶液、懸濁液など）は、以下のうちの一つ以上を含み得る：注射用水などの滅菌希釈剤、生理食塩水、好ましくは、生理食塩水、リンゲル液、等張性塩化ナトリウム、溶媒または懸濁媒として役立つ合成モノグリセリドまたはジグリセリドなどの固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の溶媒、ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌剤と、アスコルビン酸または亜硫酸ナトリウムなどの抗酸化剤、エチレンジアミン四酢酸などのキレート剤と、酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩などの緩衝剤、塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの張性の調整のための薬剤。非経口調製物は、アンプル、使い捨てシリンジ、またはガラス製もしくはプラスチック製の複数回用量バイアルに封入されうる。注射用医薬組成物は、滅菌であることが好ましい。

【0161】

いくつかの実施形態は、患者に投与すると、その細胞表面で本明細書に記載されるCD19特異的CARのいずれか一つを発現する操作された免疫細胞は、患者の内因性CD19発現細胞を減少させ、死滅させ、または溶解することができる。一実施形態では、本明細書に記載のCD19特異的CARのいずれか一つを発現する操作された免疫細胞によってCD19を発現する細胞株のCD19発現内因性細胞または細胞の減少または溶解の割合は、少なくとも約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%超である。一実施形態では、本明細書に記載のCD19特異的CARのいずれか一つを発現する操作された免疫細胞によるCD19を発現する細胞株のCD19発現内因性細胞または細胞の減少または溶解の割合は、約5%～約95%であり、約10%～約95%であり、約10%～約90%であり、約10%～約80%であり、約10%～約70%であり、約10%～約60%であり、約10%～約50%であり、約10%～約40%であり、約20%～約90%であり、約20%～約80%であり、約20%～約70%であり、約20%～約60%であり、約20%～約50%であり、約25%～約75%であり、または約25%～約60%である。一実施形態では、内因性CD19発現細胞は、内因性CD19発現骨髄細胞である。

【0162】

一実施形態は、本開示のCD19特異的CARをその細胞表面膜で発現する操作された免疫細胞による標的細胞、例えばCD19を発現する細胞株の減少または溶解の割合を、本明細書に開示されるアッセイを使用して測定することができる。

【0163】

10

20

30

40

50

方法は、一つ以上の化学療法剤を投与することをさらに含むことができる。特定の実施形態では、化学療法剤は、リンパ球枯渇（前処理）化学療法である。例えばシクロホスファミドの特定の有益な用量（ $200\text{ mg/m}^2/\text{日} \sim 2000\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $100\text{ mg/m}^2/\text{日} \sim 約2000\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、例えば、約 $100\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $200\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $300\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $400\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $500\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $600\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $700\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $800\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $900\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $1000\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $1500\text{ mg/m}^2/\text{日}$ または約 $2000\text{ mg/m}^2/\text{日}$ ）および特定用量のフルダラビン（ $20\text{ mg/m}^2/\text{日} \sim 900\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $10\text{ mg/m}^2/\text{日} \sim 約900\text{ mg/m}^2/\text{日}$ ；例えば、約 $10\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $20\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $30\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $40\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $40\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $50\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $60\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $70\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $80\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $90\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $100\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 、約 $500\text{ mg/m}^2/\text{日}$ または約 $900\text{ mg/m}^2/\text{日}$ ）を患者に投与することを含むT細胞療法を必要とする患者を条件づける方法である。好ましい用量レジメンは、患者に治療有効量の操作されたT細胞を患者に投与する前に、約 $300\text{ mg/m}^2/\text{日}$ のシクロホスファミドと約 $30\text{ mg/m}^2/\text{日}$ のフルダラビンを3日間投与することを含む、患者の治療を含む。

【0164】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、CD52抗体の投与をさらに含む。いくつかの実施形態では、CD52抗体は、約 13 mg/日 の静脈投与用量で投与される。

【0165】

他の実施形態では、抗原結合ドメイン、形質導入（または他の方法で操作された）細胞、および化学療法剤は、それぞれ、対象の疾患または病態を治療するために有効な量で投与される。

【0166】

特定の実施形態では、本明細書に開示されるCAR発現免疫エフェクター細胞を含む組成物は、任意の数の化学療法剤と併せて投与することができる。化学療法剤の例としては、チオテパおよびシクロホスファミド（CYTOXAN（商標））などのアルキル化剤；アルキルスルホン酸塩、例えばブスルファン、インプロスルファンおよびピポスルファン；アジリジン、例えばベンゾドパ、カルボコン、メテウレドパ、およびウレドパ；エチルエニミンおよびメチルアメラミンであって、アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスファミド、トリエチレンチオホスファミドおよびトリメチロールオメラミンの再開を含み；窒素マスタード、例えばクロラムブシル、クロルナファジン、コロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロルエタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベンピシン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード、カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチン等のニトロソウレア；抗生物質、例えば、アラシノミシン、アクチノマイシン、アントラマイシン、アザセリン、プレオマイシン、サクチノマイシン、カリチアマイシン、カラピシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、ドキシソルピシン、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、クエラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、チュベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシン；抗代謝産物、例えばメトトレキサートおよび5 - フルオロウラシル（5 - FU）；葉酸類似体、例えばデノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトレキサート；例えばフルダラビンなどのプリン類似体、6 - メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン；ピリミジン類似体、例えばアンシタピン、アザシチジン、6 - アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、フロキシウリジン、5 - FU；アンドロゲン、例えばカルステロン、ドロモスタノロンプロピオン酸塩、エピチオスタンオール、メピチオスタン、テストステロン

；抗副腎、例えば、アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸補充剤、例えば、フロリン酸、アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸、アムサクリン；ベストラブシル；ピサントレン；エダトラキセート、デフファミン；デメコルシン；ジアジコン；エルホルミチン；酢酸エリプチニウム、エトグルシド；硝酸ガリウム、ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン；ミトグアゾン、ミトキサントロン；モビダモール；ニトラクリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルピシン；ポドフィリン酸、2 - エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK（登録商標）、ラゾキササン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸、トリアジコン；2, 2', 2' - トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ピンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトプロニトール；ミタルアクトール；ピボプロマン；ガシトシン；アラビノシド（Ara - C）、シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド、例えば、パクリタキセル（TAXOL（商標）、Bristol - Myers Squibb）およびドセタキセル（TAXOTERE（登録商標）、Rhône - Poulenc Rorer）；クロラムブシル；ゲムシタピン；6 - チオグアニン；プラチナ類似体、例えば、メルカプトプリン、メトトレキサート、シスプラチンおよびカルボプラチン；ピンラスチン；プラチナ；エトポシド（VP - 16）、イホスファミド；マイトマイシンC；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ピノレルピン；ナベルピン；ノバントロン；テニポシド；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロネート；CPT - 11；トポイソメラーゼ阻害剤RF S 2000；ジフルオロメチルオミチン（DMFO）；タルグレチン（商標）（ベキサロテン）などのレチノイン酸誘導体、パンレチン（商標）、（アリトレチノイン）；ONTAK（商標）（デニロイキンジフチトックス）；エスペラマイシン、カペシタピン；ならびに前述のいずれかの薬学的に許容可能な塩、酸または誘導体が挙げられる。この定義には、例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン、アロマトーゼ阻害4（5） - イミダゾール、4 - ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY 117018、オナプリストン、およびトレミフェン（フェアストン）などの抗エストロゲン；ならびにフルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、ロイプロリドおよびゴセレリンなどの抗アンドロゲンなどの腫瘍に対するホルモン作用を調節または阻害する抗ホルモン剤；ならびに前述のいずれかの薬学的に許容可能な塩、酸または誘導体も含まれる。化学療法剤の組み合わせはまた、適切な場合に投与され、CHOP、すなわちシクロホスファミド（シトキササン（登録商標））、ドキシソルピシン（ヒドロキシドキシソルピシン）、ピンクリスチン（オンコピン（登録商標））、およびプレドニゾンを含むが、これらに限定されない。

【0167】

いくつかの実施形態では、化学療法剤は、操作された細胞、ポリペプチド、または核酸の投与後、同時に、または1週間以内に投与される。他の実施形態では、化学療法剤は、操作された細胞、ポリペプチド、または核酸の投与後、1 ~ 4週間、または1週間 ~ 1か月、1週間 ~ 2か月、1週間 ~ 3か月、1週間 ~ 6か月、1週間 ~ 9か月、または1週間 ~ 12か月で投与される。他の実施形態では、化学療法剤は、細胞、ポリペプチド、または核酸を投与する少なくとも1か月前に投与される。いくつかの実施形態では、方法は、二つ以上の化学療法剤を投与することをさらに含む。

【0168】

様々な追加の治療薬を、本明細書に記載される組成物と併せて使用することができる。例えば、潜在的に有用な追加の治療薬としては、ニボルマブ（オブジーボ（登録商標））、ペムブロリズマブ（キイトルーダ（登録商標））、ペムブロリズマブ、ピジリズマブ、およびアテゾリズマブなどのPD - 1阻害剤が挙げられる。

【0169】

本開示と組み合わせた使用に適した追加の治療薬には、限定されるものではないが、イブルチニブ（イムブルピカ（登録商標））、オフアツムマブ（アーゼラ（登録商標））、リツキシマブ（リツキササン（登録商標））、ペバシズマブ（アパスチン（登録商標））、トラスツズマブ（ハーセプチン（登録商標））、トラスツズマブエムタンシン（カドサイラ（登録商標））、イマチニブ（グリベック（登録商標））、セツキシマブ（アービタックス

10

20

30

40

50

(登録商標)、パニツムマブ)(ベクティビックス(登録商標))、カツマキソマブ、イブリツモマブ、オフアツムマブ、トシツモマブ、ブレンツキシマブ、アテムツズマブ、ゲムツズマブ、エルロチニブ、ゲフィチニブ、バンデタニブ、アフアチニブ、ラバチニブ、ネラチニブ、アキシチニブ、マシチニブ、パゾパニブ、スニチニブ、ソラフェニブ、トセラニブ、レスタウルチニブ、アキシチニブ、セジラニブ、レンバチニブ、ニンテダニブ、パゾパニブ、レゴラフェニブ、セマキサニブ、ソラフェニブ、スニチニブ、チボザニブ、トセラニブ、バンデタニブ、エントレクチニブ、カボザンチニブ、イマチニブ、ダサチニブ、ニロチニブ、ボナチニブ、ラドチニブ、ボスチニブ、レスタウルチニブ、ルキソリチニブ、パクリチニブ、コビメチニブ、セルメチニブ、トラメチニブ、ビニメチニブ、アレクチニブ、セリチニブ、クリゾチニブ、アフリベルセプト、アジボチド、デニロイキンジフチトックス、エベロリムスおよびテムシロリムスなどのmTOR阻害剤、ソニデギブおよびピスモデギブなどのヘッジホッグ阻害剤、CDK阻害剤(バルボシクリブ)などのCDK阻害剤が挙げられる。

10

【0170】

いくつかの実施形態では、CAR含有免疫細胞を含む組成物は、サイトカイン放出症候群(CRS)または神経毒性を予防するための治療レジメンで投与することができる。サイトカイン放出症候群(CRS)または神経毒性を予防するための治療レジメンには、レンジルマブ、トシリズマブ、心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)、アナキンラ、iNOS阻害剤(例えば、L-NILまたは1400W)が含まれ得る。追加の実施形態では、CAR含有免疫細胞を含む組成物は、抗炎症剤で投与することができる。抗炎症剤または薬剤には、以下に限定されないが、ステロイドおよびグルココルチコイド(ベタメタゾン、ブデソニド、デキサメタゾン、酢酸ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、プレドニゾン、トリアムシノロン)、アスピリン、イブプロフェン、ナプロキセン、メトトレキサート、スルファサラジン、レフルノミド、抗TNF薬、シクロホスファミドおよびミコフェノール酸を含む非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)が挙げられる。例示的なNSAIDとしては、イブプロフェン、ナプロキセン、ナプロキセンナトリウム、Cox-2阻害剤、およびシアル酸が挙げられる。例示的な鎮痛剤としては、アセトアミノフェン、オキシコドン、プロボルキシフェン塩酸塩のトラマドールが挙げられる。例示的なグルココルチコイドとしては、コルチゾン、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、またはプレドニゾンが挙げられる。例示的な生物学的応答調節剤としては、細胞表面マーカー(例えば、CD4、CD5など)に対する分子、サイトカイン阻害剤、例えばTNF拮抗薬(例えば、エタネルセプト(ENBREL(登録商標))、アDMIN(HUMIRA(登録商標))、およびインフリキシマブ(REMICADE(登録商標)))、ケモカイン阻害剤、および接着分子阻害剤が挙げられる。生物学的応答調節剤は、モノクローナル抗体ならびに分子の組み換え型を含む。例示的なDMARDには、アザチオプリン、シクロホスファミド、シクロスポリン、メトトレキサート、ペニシラミン、レフルノミド、スルファサラジン、ヒドロキシクロロキン、金(経口(オーラノフィン)および筋肉内)およびミノサイクリンが挙げられる。

20

30

【0171】

特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、サイトカインと併せて投与される。サイトカインの例としては、リンホカイン、モノカイン、および従来のポリペプチドホルモンが挙げられる。サイトカインには、ヒト成長ホルモンなどの成長ホルモンが含まれ、N-メチオニルヒト成長ホルモン、およびウシ成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；レラクシン；プロレラクシン；卵胞刺激ホルモン(FSH)などの糖タンパク質ホルモン、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、および黄体形成ホルモン(LH)；肝増殖因子(HGF)；線維芽細胞増殖因子(FGF)；プロラクチン；胎盤ラクトゲン；ミューラー阻害物質、マウスゴナドトロピン関連ペプチド；インヒピン；アクチビン；血管内皮成長因子；インテグリン；トロンボポエチン(TPO)；NGF-ベータなどの神経成長因子(NGF)；血小板成長因子；TGF-アルファおよび

40

50

TGF-βなどの形質転換成長因子(TGF)；インスリン様成長因子-Iおよび-II；エリスロポエチン(EPO)；骨誘導因子；インターフェロン-α、β、および-γ；マクロファージ-CSF(M-CSF)などのコロニー刺激因子(CSF)；顆粒球-マクロファージ-CSF(GM-CSF)；および顆粒球-CSF(G-CSF)；インターロイキン(IL)、例えばIL-1、IL-1α、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-15、IL-21；TNF-αまたはTNF-βなどの腫瘍壊死因子；ならびにLIFおよびキットリガンド(KL)を含む他のポリペプチド因子を含む。本明細書で使用される場合、サイトカインという用語は、天然源または組換え細胞培養由来のタンパク質、ならびに天然配列サイトカインの生物学的に

10

【0172】

V. ソートおよび枯渇の方法

いくつかの実施形態では、免疫細胞集団のインビトロでのソーティング方法が提供され、免疫細胞集団のサブセットは、モノクローナル抗体に特異的なエピトープ(例えば、例示的なミモトープ配列)を含むCD19特異的CARのいずれか一つを発現する操作された免疫細胞を含む。方法は、免疫細胞集団をエピトープに特異的なモノクローナル抗体と接触させることと、モノクローナル抗体に結合する免疫細胞を選択して、CD19特異的CARを発現する操作された免疫細胞に富む細胞集団を得ることとを含む。

【0173】

いくつかの実施形態では、前述のエピトープに特異的な前述のモノクローナル抗体は、フルオロフォアに任意でコンジュゲートされる。この実施形態では、モノクローナル抗体に結合する細胞を選択する工程は、蛍光活性化細胞ソーティング(FACS)によって行うことができる。

20

【0174】

いくつかの実施形態では、前述のエピトープに特異的な前述のモノクローナル抗体は、磁性粒子に任意でコンジュゲートされる。この実施形態では、モノクローナル抗体に結合する細胞を選択する工程は、磁気活性化細胞ソーティング(MACS)によって行うことができる。

【0175】

いくつかの実施形態では、CARを発現する免疫細胞をソーティングする方法で使用されるmAbは、アレムツズマブ、イブリツモマブチウキセタン、ムロモナブ-CD3、トシツモマブ、アプシキシマブ、バシリキシマブ、プレントキシマブ ベドチン、セツキシマブ、インフリキシマブ、リツキシマブ、ベバシズマブ、セルトリズマブベゴル、ダクリズマブ、エクリズマブ、エファリズマブ、ゲムツズマブ、ナタリズマブ、オマリズマブ、パリピズマブ、ラニピズマブ、トシリズマブ、トラスツズマブ、ベドリズマブ、アドミタミン、ベリムマブ、カナキヌマブ、デノスマブ、ゴリムマブ、イピリムマブ、オフアツムマブ、パニツムマブ、QBEND-10および/またはウステキヌマブから選択される。いくつかの実施形態では、前述のmAbはリツキシマブである。別の実施形態では、前述のmAbはQBEND-10である。

30

【0176】

いくつかの実施形態では、上述のCAR発現免疫細胞をインビトロでソーティングする方法を使用する場合に取得される、CAR発現免疫細胞集団は、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%のCAR発現免疫細胞を含む。いくつかの実施形態では、CAR発現免疫細胞のインビトロソーティング方法を使用する場合に取得されたCAR発現免疫細胞の集団は、少なくとも85%のCAR発現免疫細胞を含む。

40

【0177】

いくつかの実施形態では、上述のCAR発現免疫細胞のインビトロ選別方法を使用した場合に得られたCAR発現免疫細胞の集団は、初期(非ソーティング)細胞集団と比較して、インビトロでの細胞傷害活性の増加を示す。いくつかの実施形態では、前述の細胞傷

50

害活性は、インビトロで10%、20%、30%、または50%増加する。いくつかの実施形態では、免疫細胞はT細胞である。

【0178】

いくつかの実施形態では、mAbは、支持体または表面上に以前に結合されている。固体支持体の非限定的な例としては、ビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、プラスチック接合プレート、ガラス接合プレート、セラミック接合プレート、カラム、または細胞培養バッグを挙げることができる。

【0179】

レシピエントに投与されるCAR発現免疫細胞は、供給源集団からインビトロで濃縮され得る。供給源集団の拡大の方法には、密度遠心分離、免疫磁気ビーズ精製、親和性クロマトグラフィー、および蛍光活性化細胞ソーティングの組み合わせを使用して、CD34抗原などの抗原を発現する細胞を選択することが含まれ得る。

10

【0180】

フローサイトメトリーを使用して、細胞集団内の特定の細胞型を定量化することができる。概して、フローサイトメトリーは、主に光学的手段によって細胞の構成要素または構造特徴を定量化するための方法である。構造特徴を定量化することによって異なる細胞タイプを区別することができるため、フローサイトメトリーおよび細胞ソーティングを使用して、混合物中の異なる表現型の細胞をカウントおよびソートすることができる。

【0181】

フローサイトメトリー解析には、二つの主要な工程、1)一つ以上の標識マーカーで選択された細胞タイプを標識すること、および2)集団内の細胞の総数に対して標識細胞の数を決定すること、を伴う。いくつかの実施形態では、細胞型を標識する方法は、特定の細胞型によって発現されるマーカーに標識された抗体を結合することを含む。抗体は、蛍光化合物で直接標識されるか、または例えば、第一の抗体を認識する蛍光標識された第二の抗体で間接的に標識され得る。

20

【0182】

いくつかの実施形態では、CARを発現するT細胞をソーティングするために使用される方法は、磁気活性化細胞ソーティング(MACS)である。磁気活性化細胞ソーティング(MACS)は、超常磁性ナノ粒子およびカラムを使用して、その表面抗原(CD分子)に応じて様々な細胞集団を分離するための方法である。MACSを使用して、純細胞集団を取得することができる。単一細胞懸濁液中の細胞は、マイクロビーズで磁気標識され得る。試料は、強磁性球体からなるカラムに適用され、細胞にやさしいコーティングで覆われ、細胞の迅速かつ穏やかな分離を可能にする。標識されていない細胞は通過し、一方で磁気標識された細胞はカラム内に保持される。フロースルーは、非標識細胞画分として収集され得る。洗浄工程の後、カラムは分離器から除去され、磁気標識された細胞はカラムから溶出される。

30

【0183】

T細胞などの特定の細胞集団の精製のための詳細なプロトコルは、Basu Sら(2010)に見ることができる。(Basu S, Campbell HM, Dittel BN, Ray A. Purification of specific cell population by fluorescence activated cell sorting (FACS). J Vis Exp. (41):1546)を参照されたい。

40

【0184】

いくつかの態様では、本開示は、インビボ枯渇によってCD19特異的CAR発現免疫細胞を枯渇させる方法を提供する。インビボ枯渇は、阻害または除去によってCAR発現免疫細胞の増殖を止めることを目指して、哺乳類生物体に治療薬(例えば、CAR上のエピトープに結合する分子)を投与することを含み得る。

【0185】

本発明の一態様は、mAb特異的エピトープを含むCD19 CARを発現する操作された免疫細胞をインビボで枯渇させる方法に関し、前述の操作された免疫細胞または前述

50

のCAR発現免疫細胞を少なくとも一つのエピトープ特異的mAbと接触させることを含む。本発明の別の態様は、前述の操作された免疫細胞をエピトープ特異的抗体と接触させることによってキメラscFv（例えば、mAb特異的エピトープの挿入によって形成される）を含む、CAR発現免疫細胞をインビボで枯渇させる方法に関する。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、T細胞であり、および/または抗体はモノクローナル抗体である。

【0186】

一つの実施形態によると、免疫操作された細胞のインビボでの枯渇は、本開示のインビボ方法を使用して以前にソーティングされた操作された免疫細胞上で実施される。この場合、注入されたmAbを使用することができる。いくつかの実施形態では、mAb特異的抗原は、CD20抗原であり、エピトープ特異的mAbは、リツキシマブである。いくつかの実施形態では、本発明は、患者において、mAb特異的エピトープ（CAR発現免疫細胞）を含むCARを発現する操作された免疫細胞をインビボで枯渇させる方法に関し、前述のCAR発現免疫細胞を少なくとも一つのエピトープ特異的mAbに接触させることを含む。

10

【0187】

いくつかの実施形態では、前述の操作された免疫細胞または前述のCAR発現免疫細胞を少なくとも一つのエピトープ特異的mAbと接触させる工程は、患者にエピトープ特異的mAb（例えば、リツキシマブ）を注入することを含む。いくつかの実施形態では、患者に投与されるエピトープ特異的mAbの量は、患者におけるCAR発現免疫細胞の少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%を除去するのに十分である。

20

【0188】

いくつかの実施形態では、前述の操作された免疫細胞または前述のCAR発現免疫細胞を少なくとも一つのエピトープ特異的mAbと接触させる工程は、患者に375 mg/m²のリツキシマブを1回または数回、注入することを含む。いくつかの実施形態では、mAb（例えば、リツキシマブ）は、週に1回投与される。

【0189】

いくつかの実施形態では、mAb特異的エピトープ（CAR発現免疫細胞）を含むCARを発現する免疫細胞が、エピトープ特異的mAbを使用した補体依存性細胞傷害（CDC）アッセイで枯渇すると、生存するCAR発現免疫細胞の量が減少する。いくつかの実施形態では、生存するCAR発現免疫細胞の量は、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%減少する。いくつかの実施形態では、前述のmAb特異的エピトープは、CD20エピトープまたはミモトープであり、および/またはエピトープ特異的mAbは、リツキシマブである。

30

【0190】

特定の実施形態では、CAR操作された免疫細胞のインビボでの枯渇は、二重特異性抗体を注入することによって実施される。定義により、二重特異性モノクローナル抗体（BsAb）は、二つの異なるモノクローナル抗体の断片から構成され、結果として二つの異なるタイプの抗原に結合する、人工タンパク質である。これらのBsAbおよびその免疫療法における使用は、Muller D and Kontermann R.E. (2010) Bispecific Antibodies for Cancer Immunotherapy, *BioDrugs* 24(2): 89-98に概要が説明されている。

40

【0191】

別の特定の実施形態によると、注入された二重特異性mAbは、キメラscFvを発現する操作された免疫細胞に担持されたmAb特異的エピトープと、エフェクターおよび細胞傷害細胞（例えば、リンパ球、マクロファージ、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞（NK細胞）、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）などの免疫細胞）の表面抗原との両方を結合することができる。そうすることで、BsAbによって誘発される操作された免疫細胞の

50

枯渴は、抗体依存性細胞傷害 (ADCC) を介して起こり得る。(Deo Y M, Sundarapandiyam K, Keler T, Wallace PK, and Graziano RF, (2000), Journal of Immunology, 165 (10): 5954 - 5961)。

【0192】

いくつかの実施形態では、細胞傷害性薬剤は、CAR発現免疫細胞を枯渴させるために使用され得るエピトープ特異的mAbに結合される。モノクローナル抗体の標的化能力と細胞傷害性薬剤の癌死滅能力を組み合わせることによって、抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)は、薬剤単独の使用と比較して、健康な組織と罹患組織との間の感受性の区別を可能にする。いくつかのADCについて市場承認が下り、特にリンカー上でそれらを作製するための技術は、(Payne, G. (2003) Cancer Cell 3: 207 - 212; Trailら(2003) Cancer Immunol. Immunother. 52: 328 - 337; Syrigos and Epeneto (1999) Anticancer Research 19: 605 - 614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Drug Del. Rev. 26: 151 - 172、米国特許第4,975,278号)に記載されている。

10

【0193】

いくつかの実施形態では、注入されるエピトープ特異的mAbは、補体依存性細胞傷害(CDC)を促進することができる分子と事前にコンジュゲートされる。したがって、補体系は、病原体を生物から除去する抗体の能力を助けるか、または補完する。刺激されると、細胞殺傷膜攻撃複合体の応答および活性化の大規模な増幅として、活性化カスケードが駆動する。異なる分子を使用して、グリカン等のmAbを結合することができる[Courtois, A, Gac-Breton, S., Berthou, C, Guezennec, J., Bordron, A. and Boisset, C. (2012), Complement dependent cytotoxicity activity of therapeutic antibody fragments can be acquired by immunogenic glycan coupling, Electronic Journal of Biotechnology ISSN: 0717 - 3458; <http://www.ejbiotechnology.info> DOI: 10.2225/vol15-issue5)。

20

【0194】

VI. キットおよび製造物品

本出願は、本明細書に記載のCARまたはCD19 CARを含有する免疫細胞を含有するCD19のいずれか一つ、ならびにその医薬組成物を含むキットを提供する。いくつかの例示的な実施形態では、本開示のキットは、対象にリンパ枯渴レジメント(Lymphodepletion regiment)およびCAR-Tレジメンを投与するための同種のCD19 CAR含有T細胞およびCD52抗体を含む。

【0195】

本出願はまた、本明細書に記載される治療用組成物またはキットのうちのいずれか一つを含む製造物品を提供する。製造物品の例としては、バイアル(例えば、密封バイアル)が挙げられる。

40

【実施例】

【0196】

実施例1: リツキシマブ耐性CD19 CAR免疫細胞の生成

図1および表4に示すように、リツキシマブ結合部位を発現しないリツキシマブ耐性抗CD19キメラ抗原受容体構築物が生成された。レンチウイルスベクター構築物をウイルスパッケージング細胞株に導入し、レンチウイルスを含有する抗CD19 CARをアロジーン(Allogene)で作製した。

【0197】

4名のヒトドナーからの汎T細胞(541、604、410、および2593)を解凍

50

し、IL-2 (100 IU/ml) の存在下で、大規模 T 細胞 TransAct (商標) (1:15 の比率) で 1.5×10^6 細胞/ml で活性化した。2 日後、表 4 に記載されるベクターを含む 2 ml の新鮮なレンチウイルスを用いて、 1.5×10^6 細胞 (3 ml) を形質導入した。修飾されたベクターの概略図を図 1 に示す。IL-2 (100 IU/ml) を、0、2、5、7、9、および 12 日目に添加した。 6×10^6 個の総細胞を、5 日目に 6 ウェル G-Rep Plate に移し、9 および 12 日目に培地交換を行った。細胞を 13 日目に凍結させた。

[表 4]

表 4 : リツキシマブ耐性 CD19 CAR ベクター

ベクター:	名前:
抗CD19 CAR v1.0	pCLS-m4G7 CAR(RQR8安全スイッチ付き)
抗CD19 CAR v1.1	pCLS-4G7_CAR(v1.0と同じEF1aプロモーター配列)
抗CD19 CAR v1.2	pCLS-EF1a(短い)-4G7(co)
抗CD19 CAR v1.3	pCLS-(デルタRQR)8-4G7(co)(v1.0と同じEF1aプロモーター配列)
抗CD19 CAR v1.4	pCLS-1Q8-4G7(co)(v1.0と同じEF1aプロモーター配列)
抗CD19 CAR v1.5	pCLS-LQL8-4G7(co)(v1.0と同じEF1aプロモーター配列)
抗CD19 CAR v1.6	pCLS-Q38-4G7(co)(v1.0と同じEF1aプロモーター配列)

10

20

co = コドン最適化

【 0 1 9 8 】

フローサイトメトリー実験を、リンパ球、生きている CD3+、CAR+、CD4/CD8、および下流マーカーでゲーティングされた形質導入細胞上で行った。ヒト形質導入チェックおよび CD34 パネルを、CD3、CD4、CD8、生存率、CD34、および抗 CD19 CAR (4G7 抗-Id) に対する抗体に対する抗イディオタイプを使用し、5 日目および 13 日目に実施した。図 2 A および 2 B は、抗 CD19 CAR 抗 Id 抗体を使用して、表 4 に示される CAR 発現ベクターで形質導入された汎 T 細胞から、5 日目に CAR 発現を実証するフローサイトメトリーのプロットを示す。

【 0 1 9 9 】

ヒト表現型および活性化パネルを用いたフローサイトメトリーを、9 日目および 13 日目に実施した。パネルには、CD3、CD4、CD8、生存率、CD45RO、CD62L、CD25、4-1BB、PD-1、抗-CD19 CAR に対する抗体に対する抗イディオタイプ、および TIM3 が含まれた。細胞は、13 日目に、4 名のドナーすべてからの細胞増殖および最終的な CAR 発現について正規化された (図 3)。図 3 のデータは、v1.2 がより高い形質導入率 (% CAR+) を示したが、v1.2 形質導入細胞が、例えば、v1.0 および v1.1 と比較して、より低いレベルの CAR 発現 (CAR MFI) を示したことを示す。リツキシマブ耐性 CAR 発現ベクターで形質導入されたドナー 541 (図 4 A)、604 (図 4 B)、410 (図 4 C)、2593 (図 4 D) からの汎 T 細胞の経時的な細胞増殖および CAR 発現を示す。

【 0 2 0 0 】

リツキシマブ耐性 CAR 発現ベクターで形質導入されたドナー 541 (図 5 A)、604 (図 5 B)、410 (図 5 C)、2593 (図 5 D) からの汎 T 細胞の 5、9、および 13 日目の CD4/CD8 の比を測定した。図 6 A ~ 6 D は、リツキシマブ耐性 CAR 発現ベクターで形質導入されたドナー 541 (図 6 A)、604 (図 6 B)、410 (図 6 C)、2593 (図 6 D) からの汎 T 細胞の 9 日目の表現型および活性を示す。図 7 は、9 日目に 4 名のドナーすべてから平均した TIM3 および PD1 染色を使用して測定された表現型、活性化 % CD8+、および T 細胞アネルギーを示す。リツキシマブ耐性 CAR 発現ベクターで形質導入されたドナー 541 (図 8 A)、604 (図 8 B)、410 (図 8 C)、2593 (図 8 D) からの汎 T 細胞の 13 日目の表現型および活性を測定した。

30

40

50

図9は、13日目に4名のドナーすべてからのTIM3およびPD1染色を使用して測定された表現型、活性化%CD8+、およびT細胞アネルギーを示す。

【0201】

実施例2：短期および長期のインビトロ殺傷アッセイ

実施例1からの形質導入CAR細胞を、短期および長期の殺傷能力について試験した。Raji細胞(2:1のE-to-T)とのCAR T細胞の共培養物を、後のLuminescenceアッセイ用に調製した。標的細胞としてRaji細胞を使用した平均短期(24時間)殺傷アッセイを、各CAR構築物について決定した(図10)。図11A~11Dは、A549-CD19+細胞を標的細胞として使用した平均長期殺傷アッセイを示し、それぞれのCAR構築物について、E:Tは、8:1(図11A)、4:1(図11B)、2:1(図11C)、および1:1(図11D)であった。

10

【0202】

殺傷アッセイ結果を、表現型特性との相関について分析した。1:1のE-to-Tでの7日目の殺傷率は、13日目のCAR+CD4+41BB+、CAR+CD4+Tim3+(p=0.0352)、CAR+CD4+TEM+(p=0.0328)、CAR+CD8+PD-1+(p=0.0269)および%CAR発現と負に相関する(p=0.0245)。1:1のE-to-Tでの7日目の殺傷率は、CAR+CD8+TSCM+と正に相関する。1:1のE-to-Tでの9日目の殺傷率は、13日目のCAR+CD4+Tim3+、CAR+CD4+TEM+(p=0.0031)、CAR+CD8+Tcm+(p=0.0182)、および%CAR発現と負に相関する(p=0.0469)。1:1のE-to-Tでの9日目の殺傷率は、CAR+CD8+TSCM+、CAR+CD8+Tim3-PD-1-(p=0.0318)、およびCAR+CD4+TSCM+(p=0.0289)と正に相関する。

20

【0203】

実施例3：異なるレンチウイルス構築物を含有するレンチウイルスの力価の分析

この実験では、レンチウイルスベクター構築物をウイルスパッケージング細胞株に導入し、レンチウイルスを含有する抗CD19 CARを作製し、実施例1と同様のプロトコル下で、Lentigen(Gaithersburg, MD)で、力価を決定した。

【0204】

レンチウイルス力価は、ウイルスタンパク質p24レベルの物理的力価を測定するか、または形質導入力価を測定するかのいずれかによって評価された。安全スイッチRQR8をレンチウイルス構築物v1.0から除去すると、ウイルス力価が有意に低下したことが予想外に判明した(表5のv1.0をv1.1と比較)。v1.1のEF1aプロモーターを、v1.2(EF1a(短い)プロモーター)のように短いまたは短縮型EF1aプロモーターで置換した場合、力価が改善された。

30

[表5]

表5 リツキシマブ感受性および耐性のCD19 CAR構築物を有するレンチウイルスのウイルス力価

構築物	物理的力価p24	形質導入力価
抗CD19 CAR v1.0	9293ng/mL	1.9 x 10 ⁹ TU/mL ¹
抗CD19 CAR v1.1	2464ng/mL	5.4 x 10 ⁸ TU/mL
抗CD19 CAR v1.2	8208ng/mL	7 x 10 ⁹ TU/mL
抗CD19 CAR v1.3	4494ng/mL	7 x 10 ⁸ TU/mL
抗CD19 CAR v1.4	9686ng/mL	2.4 x 10 ⁹ TU/mL

40

¹TU = 形質導入ユニット

【0205】

抗CD19 CAR v1.0、v1.2、およびv1.3のレンチウイルス調製物の頑

50

健性を分析するために、ウイルス滴定アッセイを実施した。v 1 . 0、v 1 . 2、および v 1 . 3 のレンチウイルス調製物の連続体積希釈を、汎 T 細胞の形質導入後 5 日目に C A R + T 細胞 % について分析した。結果は、低希釈 (例えば、1 0 % v / v) で、三つの構築物すべてが類似の許容可能な形質導入効率を示したことを示す。しかしながら、希釈度の増加 (例えば、3 . 3 %、1 . 1 % v / v) では、リツキシマブ耐性抗 C D 1 9 C A R 構築物 v 1 . 3 の形質導入効率は、他のリツキシマブ耐性抗 C D 1 9 C A R 構築物 v 1 . 2 と比較して、より顕著に低下した。図 1 2 を参照されたい。構築物 v 1 . 2 を、インピボ分析のために選択した。

【 0 2 0 6 】

実施例 4 : インピボ力価アッセイ

この実験では、マウス腫瘍モデルにおける A L L O - 5 0 1 v 1 . 0 と比較して、A L L O - 5 0 1 v 1 . 2 のインピボでの抗腫瘍力価が分析された。ルシフェラーゼレポーター遺伝子を担持する C D 1 9 陽性 R a j i 細胞を N S G マウスに注射した。v 1 . 0 または v 1 . 2 のレンチウイルス構築物を含むレンチウイルスを、二つのドナー 5 4 1 および 6 0 4 の汎 T 細胞に形質導入した。N S G マウスは、1 0 万個のルシフェラーゼ R a j i 細胞を尾静脈注射により接種した。接種後 4 日目に、R a j i 担持 N S G マウスに、C A R 構築物を指示用量で投与した。R a j i の生着および進行を、ルシフェラーゼ基質の腹腔内注射により評価し、続いて累積ルシフェラーゼシグナルを測定した。結果を図 1 3 A (ドナー 5 4 1) および図 1 3 B (ドナー 6 0 4) に示す。

【 0 2 0 7 】

本開示の教示は、様々な用途、方法、キット、および組成物を参照して記載されてきたが、本明細書の教示および以下の特許請求の範囲発明から逸脱することなく、様々な変更および修正を行うことができることが理解されよう。前述の実施例は、開示された教示をより良く例示するために提供され、本明細書に提示される教示の範囲を限定することを意図するものではない。本教示は、これらの例示的な実施形態の観点で説明されてきたが、当業者であれば、これらの例示的な実施形態の数多くの変形および修正が、過度の実験なしに可能であることを容易に理解するであろう。こうした変形および修正はすべて、本発明の教示の範囲内である。

[表 6]

10

20

30

40

50

配列番号チャート

配列番号	説明	配列
1	ALLO-501_v1.0	atgctgaccagcctgctgtgctggatggccctgtgcctgctgggcgcccac cacgccgatgcttgccttacagcaaccccagcctgtgcagcggaggcggc ggcagcagctgcccaccagggcaccttcccaacgtgccaccaacgtg agcccagccaagcccaccaccgctgtccttattccaalccttcccgtg ttagcggaggaggagcagcccagccccagacctcccaccagcccc accatgccagccagcctctgagcctgagaccgaggcctgccgcccagcc gccggcggcggcgtgcacaccagaggcctggatttgcctgcgatactac atctgggcccactggccggcaccctgtggcgtgctgctgagcctggig atcaccctgtactgcaaccaccgcaaccgagcgcgtgtgcaagtgccc aggcccgtggtagagccgaggcagaggcagcctgtgtgacctggcggcag gtggaggagaaccaggcccaaggagaccgacacctgtgtgtgtgggtg ctgtgtgtgtgggtgccaggcagcaccggcagggtgcagctgcagcagagc ggaccgagctgatcaagccaggcgcagcgtgaagatgagctgcaaggcc agcggctacaccttaccagctacgtgatgcactgggtgaagcagaagcca ggcaggccctggagtggatcggctacatacaaccccacaacgacggcacc aagtacaacgagaagttcaagggaaggccacctgaccagcgacaagagc agcagcaccgctacatggagctgagcagcctgaccagcgaggacagcggc gtgtactactgcccagaggcaccctactactacggcagcgggtgttcgac tactggggccaggcaccacctgaccgtgagctctggcggaggcggctct ggcggaggcggctctggcggaggcggcagcagacatcgtgatgaccagcct gccccagcatccccgtgacccaggcagagcgtgagcattcagctgccgg agcagcaagagcctgtgaacagcaacggcaacacctacctgtactggttc ctgcagcggcaggccagagccccagctgtgtgaltaccggatgagcaac ctggccagcggcgtgcccaccggctcagcggcagcggcagcggcaccgct ttaccctgcccagcagccgggtggaggccgaggacgtggcggtgtactac tgcattgcagcaccggagtaccttacccttggagcggcaccaggctg gactgaagcggteggatcccaccaccaccccagccccacggccacctacc cctgccccaacatcgccagccagccccagcctgagcctggggctgaagcctgc agcctgcccggaggagccgtgcacacaaggggcctggacttgccttgc gacatctatactgggccccctggccgggacatggcgggtgtgtgtgtg tccctgggtgattacactgtattgcaaacggggccggaagaagctgtgtac atctcaagcagcccttcaatggcggcctgagaccaccaggaggaggac gctgcagctgcccgttcccaggaagaggaaggcggctgagagctgagg gtagaagttcagccggagcggcagcggcagcctaccagcaggccagaaac cagctgtacaacgagctgaacctgggacggcgggaggagtacagctgtg gacaagcggcgggacgggaccccagatggcggcaagcctgcccgaag aatccccaggaggcctgtacaacgagctgcagaaggacaagatggccgag gcctacagcgagatcgccatgaaggcggcggcggcggcggcggcggcggc gacggcctgtaccaggcctgagcaccgccaccaaggacacctacgacgccc ctgcacatgcaggccctgccaccccggtaga
2	ALLO-501_v1.1	atggagaccgacacctgtctgtgtgggtgtgtgtgtgtgggtgccaggc agcaccggcgggtgcagctgcagcagagcggaccggagctgatcaagcca ggcgccagcgtgaagatgagctgcaagccagcggctacaccttaccagc tacgtgatgcactgggtgaagcagaagccaggccaggcctggagtggatc

10

20

30

40

50

		<p>ggctacatcaaccctacaacgacggcaccacagtaacgagaagtcaag ggcaaggccaccctgaccagcgacaagagcagcagcaccgccacatggag ctgagcagccctgaccagcaggacagcggcctgctactactgcccagagc acctactactacggcagccgggtgctgactactgggccagggcaccacc ctgaccctgagctctggcggaggcggctctggcggaggcggctctggcggg ggcggcagcgacatcgtgatgaccagcctgccccagcattccccgacc ccaggcagagcgtgagcctcagctgcccagcagcaagagcctgctgaac agcaacggcaacacctaccctgactggctccctgagcggccaggccagagc ccccagctgctgactaccggatgagcaacctggccagcggcctgcccagc cggctcagcggcagcggcagcggcaccgctcaccctgaggatcagccgg gtggaggccgaggagctggcgtgctactactgcatgagcaccctggaglac ccctaccctcggagccggcaccacagctggagctgaagcggctggatccc accaccaccagcaccacggccaccaccctgccccaacctcggcagc cagccccctgagcctgcccctgaagcctgagcggctgcccggaggagcc gtgcacacaaggggcctggactcggctgagcactctatactgggcccc ctggccgggacatgcccggctgctgctgctgctcctgggtgattacactg tgaaacggggccggaagaagctgctgctactctcaagcagccctcctg cggccctgagaccaccagggaggagcggctgagcctgcccgtcccc gaggaagaggaaggcggctgagcctgcccgtgaagctcagccggagcggc gacccccagcctaccagcaggccagaccagcctgacaacgagctgaac ctgggacggcgggaggatcagcctgctggacaagcggcgggagcgggac cccagatggggcggcaagcctgcccggagaatccccaggaggggctgctac aacgagctgcagaaggacaagatggccgaggccctacagcagatcggcatg aaggcggagcggcggcgggcaaggccacgagcggcctgaccaggggctg agcaccggccacaaggacacctacgagcggcctgacatgagcggcctgcca ccccggctga</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
3	ALLO-501_v1.2	<p>atggagacagataccctgctgctgctgggtgctgctgctgctgggtgcttggc tccacaggagaggtgagcctgagcagctctggaccagagctgatcaagcct ggagcctccgtgaagatgctctgcaaggccagcggctatactaccagc ctacgtgatgacctgggtgaagcagaagcctggccagggcctggagtgatc ggctatacattccatacaacgacggcaccacagtaaaagagaagctaaag ggcaaggccacactgacctctgataagagctcctctacagcctacatggag ctgagctccctgacctctgaggacagcggcctgctactatgcccagaggc acatactatfacggcagcagggtgctgctactgaggccagggcaccaca ctgaccgtgctctagcggaggaggagcctccggaggaggagcctgcccggc ggcggcagcgacatcgtgatgacacagcagcaccacagcctccagctgacc cctggcagagcgtgctcactctctgctggctccttaagctccctgctgaac tctaattggcaacacctatctgctactggctctgagcggccggcagctcc ccacagctgctgactataggaatgagcaacctggcctccggagtgctgat cgctcagcggctccggctcgggaacagccttaacctgaggatctctgg gtggagcagaggagcgtggcgtgctatctgcatgagcaccctggagtae ccctcactatggcaggaaccaagctggagctgaagcggagcagcccc accacaaccctgaccacggccccctacaccagcactaccatcgcatct cagccactgagcctgcccggaggcctgtaggctgagcagcaggaggagca gtgcacaccaggggctggactcggctgagatactatactgggcaacca ctggcaggaacatgaggcgtgctgctgctgagcctggctacaccctgctat tgaagagaggcaggaagaagctgctgctacatctcaagcagcctttatg cggccagctgagacaaccaggaggagatggctgctcctgtagattccca gaggaggaggaggaggatgctgagctgcccgtgaagtttagccggtccggc</p>	<p>30</p> <p>40</p> <p>50</p>

		gacgcaccagcatalatcagcaggccagaatcagcigtacaaigagc tgaac ctgggcccggagagaggagtacgacgtctggataagaggagggaaggac cccagatgggaggaagccacggagaaagaa tcccaggaggcc tgtat aacgagctgcagaagga taagatggccgaggcc tacagcgagatcgccatg aaggagagaggcccggggcaaggacacgacggcc tgtatcaggccctg tccacagccaccaaggacacctacgatgccctgcacatgcaggccctgcca ccaaggiga
4	ALLO-501_v1.3	atgggaacaagcctgctgtctggatggctctgtgcttctggggccgac cacgctgacgctcccgggggggggctctccctgcccc taggccccctaca ccctgcaccaaccatcgcatcccagccactgtctctgcgcccc tagggcctgc cggccagcagcaggaggagcagtgccaccccggcctggacttcgccc tgc gatactatactcgggaccactggcaggcacatgtggcgtgctgctgctg agcctggctatcaccctgtactgcaatcacaggaaccggagaagggtgtgc aagtgtcccggcctgtggtagagcagagggaaggggcagcctgctgaca tgtggcgacgtggaggagaa tccaggccctatggagacagataccctgctg ctgtgggtgctgctgctgtgggtgccggcagcaccggagagggtgcagctg cagcagtcggaccagagctgatacaagcctggagccagcgtgaagatgtcc tgttaaggcctctggctatacatcaccagctacgtgatgcactgggtgaag cagaagcctggccaggccctggagtggatcggctatacaatccatacaac gacggcacaaglataacgagaagtttaagggaaggccacactgacctcc gataagagctccctacagccatacaggagctgagctccctgacctctgag gacagcgcctgtactatitgcgccagaggcacatacattacggctctagg gtgtcgatctacggggccaggccaccacactgacctgtctagcggaggga ggaggcagcggaggaggagcctccggcggcggcggccttgacatcgtgatg acacaggcagcaccatccatcccagtgacccccggcgagagcgtgtccatc cttgtcggtcccttaagagcctgctgaactccaatggcaaacctatctg tactggtttctgcagcggccccggacagagcccacagctgctgataatagg atgtctaactggcaaggcggctgcccgatcgtctcagcggctccggctct ggcacagcctttaccctgaggatctcccggctggaggcagaggacgtgggc gtgtatctacgtcagcagcctggagtaccccttcacattggcgcaggc accaagctggagctgaagcggagcagccccaccacaacccctgcaccacgg ccaccacacaccagcaccctactatgcatcccagccactgagcctggggccc gaggcctgtaggctgcccggcggcggcagctgcaaccccggggcctggac tttgccctgcgatactacatctgggcacctgcccggcacatgcggcgtg ctgttacgagcctggctatcaccctgtatgcaagcggggcagaaagaag ctgctgtacatctcaagcagcctttatgcccagctgcagacaaccag gaggaggatggctgctcctgtagatcccagaggaggaggaggagga tgl gagctgcccgtgaagtttagccggctccggcagcaccagcatalcagcag ggccagaaccagctgtacaatgagctgaacctgggcccggagagaggat gacgtctggataagagacggggccgggaccccagatgggaggcaagcca cgccggaagaa tcccaggaggccctgtataacgagctgcagaaggataag atggccgaggcctacagcgagatcgcca tgaaggagagagaaggcggc aagggacacagcggcctgtaccaggccctgagcacagcaaaaaagacacc tacgacgcactgcacatgcagcctctgccccctcggtaa
5	>ALLO-501_v1.4	atgggaacctctctgctgtctggatggctctgtgcttctggggccgac cacgctgacgcaagtggcgggggggggtccgaactgccacacaggccacc ttctcaacgtgagcaccacgtgagctccggcggaggaggcagccctgca ccaaggccccctacaccagcaccctacca tgcatactcagccactgagcctg

10

20

30

40

50

		<p>ggccaggccctggagtggatcggctataatccctacaacgacggcacc aagtataacgagaagtttaagggaaggccaccctgacaagcgaataagagc tccttaccgctacatggagctgagcctccctgacaagcaggacccgcc gtgtactatlgccagagggaccctactatcaggctccagggtgtcga tactggggccaggccacaaccctgacagtgtctagcggaggaggaggcagc ggaggaggagctccggcggcggcggcctgacalctgatgaccaggca gcaccatccatccctgtgacaccaggcagctgtgagcatctccctgctg tcctctaagtccctgctgaactctaatggcaacacctatctgtactggttt ctgcagcggccggacagctcctcagctgctgactataggatgagcaat ctggccctccggcgtgctgactcctcctggcagcggctccggcaccgcc tttacactgaggatcagccgctggaggcagaggacgtggcggtgtatc tgcattgacgacctggagtacctttcacccttggcggcggcacaagctg gagctgaagcggagcagcccccacaaccacaccagcaccctggccaccacc ccagcacaacaatcgcatctcagccactgagcctggggccgaggcctgt aggccagccggcggcggcagtgacacccggggcctggactcggctgc gatactacatctgggcccctcggccggcaccctggcggtgttactg agcctggctcatcaccctgtattgcaagcggggcagaaaagaagctgtgtac alctcaagcagcccttcaatggcccctgacagaccacacaggaggaggat ggctgctcctgtagatccagaggaggaggaggaggatgtgagctgctg gtgaagtctcctggagcggcagcaccctgcatacagcaggacagaaac cagctgtacaatgagctgaaccctggggcggagagaggagatgacgtgctg gataagagacggggccgggaccggagatgggaggcaagcccgccggaag aatctcaggaggccctgtataacgagctgcagaaggaataagatggccgag gcttacagcagatcggcattgaaggagagagaaggcggcgaaggccac gacggcctgtaccaggccctgcccagcaacaagaatctatgacgct ctgcacatgcaggtctgccccctcggiga</p>	<p>10</p> <p>20</p>
7	ALLO-501_v1.6	<p>atgggaaccagcctgctgtgctggatggcactgtgctgctgggagcagac cacgccgatgccgaactgcttactcaggggacatctcttaatgtgagcacc aacgtgagctctggaggaggagcctccgagctgcccaaccaggccacatct cttaatgtgagcacaacgtgtctcccccgaagctaccacaaccgccgaa ctgectaccagggcacaatttccaacgtgtctaccaacgtgtctagegga ggaggaggctccccgcaccctaggcccccctaccagcaccacaacaatcgca agccagcctctgtccctgcccagaggcattgcaggccagcagcaggaggga gcagctgacaccccgccggcctggactttgcttgcgatactatactgggca ccactggcaggaacctgtggcgtgctgctgctctctggctatcaccctg tactgcaatcacagaaccggagaagggtgtgcaagtgctcctggccagtg gtgagagcagagggaaggggcagcctgctgacctgtggcagctggaggag aatccggcccctatggagacagatacactgctgctgtgggtgctgctgctg tgggtgcccaggctctacaggagaggctgagctgacagagcggacctgag ctgataaagccaggcgcctctgtgaagatgagctgcaaggcctccggctat accttacaagctacgtgatgcactgggtgaagcagaagccaggccaggcc ctggagtggatcggctataatccctacaacgacggcaccacaagataaac gagaagtttaagggaaggccaccctgacatccgataagagctccctacc gcttacaaggagctgagctccctgacatccgaggactctgcccgtactat tggccagaggcaccctactatcaggctctagggtgttcgattactggggc cagggcacaaccctgacagtgtctagcggaggaggagccttggaggaggga ggcagcggcggcggaggctccgacatcgtgatgaccaggcagcaccatcc atcccagtgacacctggcgagagcgtgtccatctctgtaggctccctaaag ctctgctgacagcaatggcaacacctatctgtactgggttctgcagcgg</p>	<p>30</p> <p>40</p> <p>50</p>

		<pre> ccccgacagagcccicagctgctgataataggatgtccaaictggccctt ggagtgcctgatcgcttcagcggtccggctctggaaccgctttacactg aggatcctcccgctggaggcagaggacgtggcgctgtattactgcatgcag cacttggagtacccttccacttggcgccggcacaagaictggagctgaag cggagcagcccacaaccacaccagcaccggccaccaaccctggccct acaatcgcaagccagccactgtccctgcgcccgaggcctglagacctgcc ggcgccggcgccgtccataaccgcgccctggatttcgctgcatatctac atttggccctctggccggcacttgcggcgtgctgctgctgagcctggctc atcaccctgtattgcaagcggggcagaagaagctgctgtacatctcaag cagcccttcatgcgccctgctgagaccacacaggaggaggaaggctgctcc ttagalcccagaggaggaggaggaggaaggctgagcctgctgctgaagttt agccggtccgcccagcaccctgcatatcagcaggccagaaccagctgtac aatgagctgaacctggccggagagaggagtagcagctgctggataagaga aggggacgggaccggagatgggaggcaagccccggcgaagaaacctcag gagggcctgtataacgagctgcagaagataagatggccgagcctacagc gagatcggcctgaaggagagagaaggcggcgaaggacacgagcggctg tatcaggcctgtccaccgccacaaggacacctacgatgccctgcacatg cagggcctgctccaagatga </pre>	10
8	ALLO-501_v1.0(またはALLO-501) 例示的なシグナル配列は下線付きである。	<pre> <u>MLTSLLCWMLCLLGADHAD</u>CPYSNP^{SL}CSGGGSELPTQGTFSNVSTNV SPAKPTTAC^{PYSNP}SLCSGGGSPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVI^{TL}YCNHRNRRRVCKCP RPVVRA [EGRGSLLTCGDVEENPGP] <u>METD</u>LLLWVLLWVPGSTGEVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYFTS YVMHWVKQKPGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGKATLSDKSSSTAYME LSSLTSEDSAVYYCARGTYYYGSRVFDYWGGTTLTVSSGGGGSGGGSGG GGSDIVMTQAAPSI^{PVTPGESVS}ISCRSSKLLNSNGNTLYWFLQRPQGS PQLLIYRMSNLASGV^{PDFRSGSGGTAFTLR}ISRVEADVGVYYCMQHLEY PFTFGAGTKLELKRSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVI^{TL}YCKRGRKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFP^{EEEEGGCEL}RVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELN LGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR </pre>	20
9	ALLO-501_v1.1	<pre> <u>METD</u>LLLWVLLWVPGSTGEVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYFTS YVMHWVKQKPGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGKATLSDKSSSTAYME LSSLTSEDSAVYYCARGTYYYGSRVFDYWGGTTLTVSSGGGGSGGGSGG GGSDIVMTQAAPSI^{PVTPGESVS}ISCRSSKLLNSNGNTLYWFLQRPQGS PQLLIYRMSNLASGV^{PDFRSGSGGTAFTLR}ISRVEADVGVYYCMQHLEY PFTFGAGTKLELKRSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGA VHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVI^{TL}YCKRGRKLLYIFKQPFM RPVQTTQEEDGCSCRFP^{EEEEGGCEL}RVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELN LGRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM KGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR </pre>	30
10	ALLO-501_v1.2	<pre> <u>METD</u>LLLWVLLWVPGSTGEVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYFTS YVMHWVKQKPGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGKATLSDKSSSTAYME LSSLTSEDSAVYYCARGTYYYGSRVFDYWGGTTLTVSSGGGGSGGGSGG GGSDIVMTQAAPSI^{PVTPGESVS}ISCRSSKLLNSNGNTLYWFLQRPQGS PQLLIYRMSNLASGV^{PDFRSGSGGTAFTLR}ISRVEADVGVYYCMQHLEY </pre>	40

10

20

30

40

50

		PFTFGAGTKLELKRSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
11	ALLO-501_v1.3	MGTSLLCWMALCLLGADHADASGGGGSPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIITLYCNHRNRRRVCPCPRPVVRAEGRGSLTTCGDVEENPGMETDTLLWVLLWVPGSTGEVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYFTTSYVMHWKQKPGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGTYYYGSRVFDYWGQTTTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVMTQAAPSIPTVTPGESVSI SCRSSKSLNSNGNTYLYWFLQRPQSPQLLIYRMSNLASGVDRFSGSGGTAFTRLIRSRVEAEDVGYYCMQHLEYPTFTFGAGTKLELKRSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
12	ALLO-501_v1.4	MGTSLLCWMALCLLGADHADASGGGGSELPTQGTFSNVSTNVSSGGGGSPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIITLYCNHRNRRRVCPCPRPVVRAEGRGSLTTCGDVEENPGMETDTLLWVLLWVPGSTGEVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYFTTSYVMHWKQKPGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGTYYYGSRVFDYWGQTTTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVMTQAAPSIPTVTPGESVSI SCRSSKSLNSNGNTYLYWFLQRPQSPQLLIYRMSNLASGVDRFSGSGGTAFTRLIRSRVEAEDVGYYCMQHLEYPTFTFGAGTKLELKRSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
13	ALLO-501_v1.5	MGTSLLCWMALCLLGADHADACSGGGGSCSGGGSELPTQGTFSNVSTNVSPAKPTTACSGGGGSCSGGGSPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIITLYCNHRNRRRVCPCPRPVVRAEGRGSLTTCGDVEENPGMETDTLLWVLLWVPGSTGEVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYFTTSYVMHWKQKPGGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGTYYYGSRVFDYWGQTTTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVMTQAAPSIPTVTPGESVSI SCRSSKSLNSNGNTYLYWFLQRPQSPQLLIYRMSNLASGVDRFSGSGGTAFTRLIRSRVEAEDVGYYCMQHLEYPTFTFGAGTKLELKRSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVIITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
14	ALLO-501_v1.6	MGTSLLCWMALCLLGADHADAELPTQGTFSNVSTNVSSGGGGSELPTQGTFSNVSTNVSPAKPTTAAELPTQGTFSNVSTNVSSGGGGSPAPRPPTPAPTIA

10

20

30

40

50

		<p>SQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITL YCNHRNRRRVCKCPRPVVRAEGRGSLTCDVEENPGMETDTLLWVLL WVPGSTGEVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWKQKPGQG LEWIGYINPYNDGTYNEKFKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYY CARGTYYYGSRVFDYWGQTTLTVSSGGGSGGGSGGGSDIVMTQAAPS IPVTPGESVSI SCRSSKSLNSNGNTYLYWFLQRPQSPQLLIYRMSNLAS GVPDRFSGSGSFTAFLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLELK RSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY IWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEDGCS CRFPBEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLRREYDVLDR RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRKGHDGL YQGLSTATKDTYDALHMALPPR</p>	10
15	EF1アルファ_(長_1189)_プロモーター _GRCh38.p12_(v1.0_v1.1_v1.3_v1.4_v1.5_v1.6)	<p>gcgtgaggctccggcgcccgctcagtgggcagagcgcacatcgccacagtc cccgagaagtgggggaggggctggcaatgaaaccggtgcttagagaagg tggcgcgggtaaacgggaaagtgaigtctgtactggctccgcttttt cccgagggtgggggagaaccgtatataagtgtagtagtcccgtagaagctt CTTTTCGCAACGGGTTTCCGCCAGAACACAGtaagtgcctgtgtggt tcccgcgggctggcctctttacgggttatggcccctgcgtgcttgaatt acttccacgcccctggctgcagtaegtgalctctgaltcccgagcttcgggt tggaaagtgggtgggagagtgcaggccctgcgcttaaggagccccctcgcc tcgtgcttgagtgaggtcggcctgggctgggctggggccgcccgtgcgaat ctggtggcaccctcgcgctgtctcgtctcttcgataagctcttagccat tlaaaattttgatgacctgctgcgacgcttttttcggcaagatagct tgaatgcgggccaagatctgcacactggatattcgggttttggggccgc ggcggcgacggggcccgtgcgtcccagcgcacatgtcggcgaggcggg cctgcgagcgggcccaccgagaatcggacggggtagtctcaagctggccg gccctgcttggtgctggcctcgcgcccggctgatacgcgccgcccctgggc ggcaaggctggcccggctggcaccagttgcgtgagcggaaagatggccgct tcccggccctgctgcaggagctcaaaatggaggacgggcgctcgggaga gcggcggggtgagtcaccacacaaagaaaggcccttccgctccagc cgctgcttcatgtgactccacggagtaaccggcgcccgtccaggcaccctga ttagtctcagagctttggagtagctgctcttaggttggggggaggggtt ttatgcgatggagttccccacactgagtggtgggagactgaagttaggcc agcttggcacttgatgtaaltctccttggaaatttgcctttttgagttgg atcttgggtcatctcaagcctcagacagtggttcaaaatttttcttcc atctcagGTGTCGTGA</p>	20
16	>EF1アルファ_(短_237)_プロモーター _GRCh38.p12_(v1.2)	<p>gcgtgaggctccggcgcccgctcagtgggcagagcgcacatcgccacagtc cccgagaagtgggggaggggctggcaatgaaaccggtgcttagagaagg tggcgcgggtaaacgggaaagtgaigtctgtactggctccgcttttt cccgagggtgggggagaaccgtatataagtgtagtagtcccgtagaagctt CTTTTCGCAACGGGTTTCCGCCAGAACACAG</p>	30
17	4G7免疫グロブリン ガンマ1重鎖	<p>MEWSWIFLFLLSGTAGVHSEVQLQQSGPELIKPGASVKMSCKASGYTFTSY VMHWKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTYNEKFKGKATLTSKSSSTAYMEL SSLTSEDSAVYYCARGTYYYGSRVFDYWGQTTLTVSSAKTTPPSVYPLAP GSAAQTNMVTLCGLVKGYFPEPVTVTWNSSGLSSGVHTFPAVLQSDLYTL SSSVTVPSSTWVSETVTCNVHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVS SVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCTVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQT QPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPALIEKTI SKTK</p>	40

10

20

30

40

50

		GRPKAPQVYTIIPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENY KNTQPIMDTDGSYFVYSKLVNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSL HSPGK
18	4G7免疫グロブリン カッパ軽鎖	MRCLAEFLGLLVLWIPGAIGDIVMTQAAPSIPTVPGESVSI SCRSSKSLN SNGNTLYWFLQRPGQSPQLLIYRMSNLASGVDRFSGSGSGTAFTLRISR VEAEDVGVYYCMQHLEYPFTFGAGTKLELKRADAAPTIVSIFPPSSEQLTSG GASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKSTYSMSSTL TLTKDEYERHNSYTCETHKSTSPIVKSFNRNEC
19	RQR8	CPYSNPSLCSGGGSELPTQGTFSNVSTNVSPAKPTTTACPYSNPSLCSGG GGSP APRPPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGT CGVLLLSLVITLYCNHRNRVCKCPRPVV
20	自殺ペプチドシグ ナル配列	MGTSLLCWMALCCLGADHADA
21	シグナル配列およ びRQR8	MGTSLLCWMALCCLGADHADACPYSNPSLCSGGGSELPTQGTFSNVSTNV SPAKPTTTACPYSNPSLCSGGGSPAPRPPPTAPTIASQPLSLRPEACRPA AGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRVCKC RPVV
22	リツキシマブ ミモ トープ	CPYSNPSLC
23	パリビズマブエピ トープ	NSELLSLINDMPITNDQKKLMSNN
24	セツキシマブ ミモ トープ1	CQFDLSTRRLKC
25	セツキシマブ ミモ トープ2	CQYNLSSRALKC
26	セツキシマブ ミモ トープ3	CVWQRWQKSYVC
27	セツキシマブ ミモ トープ4	CMWDRFSRWYKC
28	ニボルマブ エピト ープ1	SFVLNWRMSPSNQTDKLAAPPEDR
29	ニボルマブ エピト ープ2	SGTYLCGAI SLAPKAQIKE
30	QBEND-10 エピト ープ	ELPTQGTFSNVSTNVS
31	アレムツズマブ エ ピトープ	GQNDTSQTSSPS
32	Fc γ RIII α ヒンジ	GLAVSTISSFFPPGYQ
33	CD8 α ヒンジ	TTTPAPRPPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD
34	IgG1 ヒンジ	EPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLSPGK
35	CD8 α 膜貫通	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT
36	CD8 α ヒンジ/膜貫 通	TTTPAPRPPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAP LAGTCGVLLLSLVIT

10

20

30

40

50

37	41BB (細胞内ドメイン)	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL
38	CD3と細胞質シグナル伝達ドメイン	LRVKFSRSADAPAYQQQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTY DALHMQUALPPR
39	EF1a第一イントロン	GTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGCCTGGCCTCTTACGGGTTATGGC CCTTGCGTGCCCTGAATTACTTCCACGCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCT TGATCCCGAGCTTCGGGTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGGC TTAAGGAGCCCCCTTCGCCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTG GGGCCGCCCGTGC GAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGTGCTTT CGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTT TTTCTGGCAAGATAGTCTTGAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTAT TTCGGTTTTTTGGGGCCGGGGCGGCACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCAC ATGTTCCGGCAGGGCGGGCCCTGCGAGCGGGCCACCGAGAATCGGACGGGG GTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGGCGTG TATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGCTCGGCACCAGTTGCGTG AGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGCCCTGCTGCAGGGAGTCAAAATGGAG GACCGGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAATCACCCACAAAAGGAAAAG GGCCTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGC GCCGTCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTGCTTTT AGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTCCCCACACTGAGTGGGT GGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCCTTGGAAAT TGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGT TCAAAGTTTTTTCTTCCATTTAG
40	LQL8	CSGGGGGSCSGGGSELPTQGTFSNVSTNVSPAKPTTACSGGGGSCSGG GGSPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAP LAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVV

10

20

30

40

50

【図面】
【図 1】

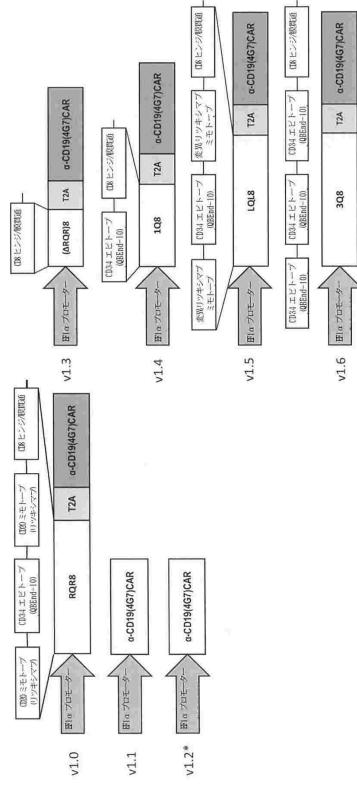


図 1

【図 2 B】

5 日目 CAR および CD84 発現 (ドナー410)

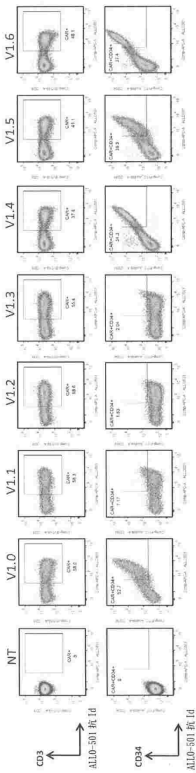


図 2 B

【図 2 A】

5 日目 CAR 発現 (541 および 604)

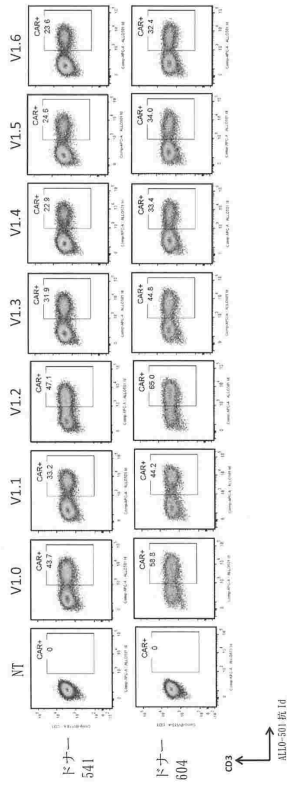


図 2 A

【図 3】

正規化された細胞増殖および最終的な CAR 発現 (4 名のドナー)

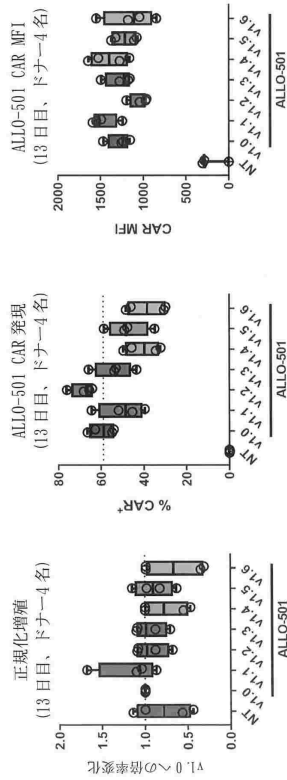


図 3

10

20

30

40

50

【 図 4 A 】

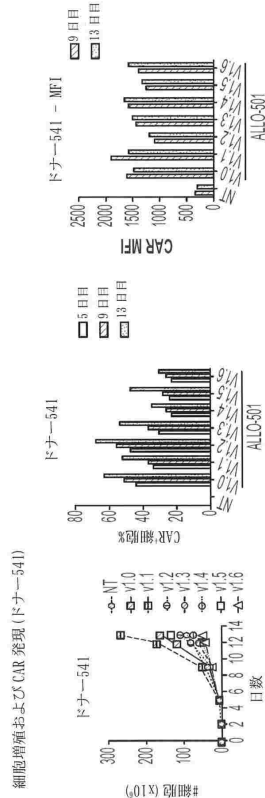


図 4 A

【 図 4 B 】

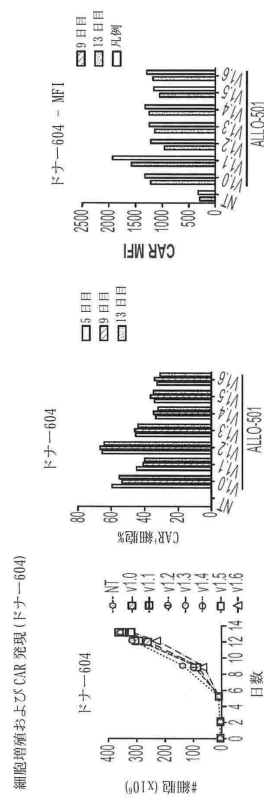


図 4 B

【 図 4 C 】

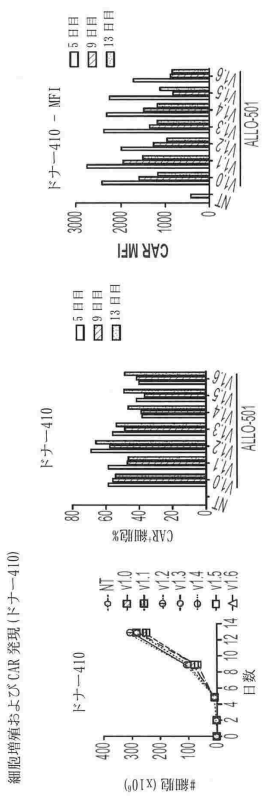


図 4 C

【 図 4 D 】

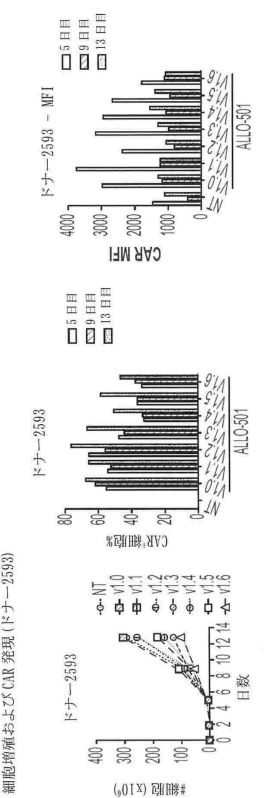


図 4 D

10

20

30

40

50

【図 5 A】

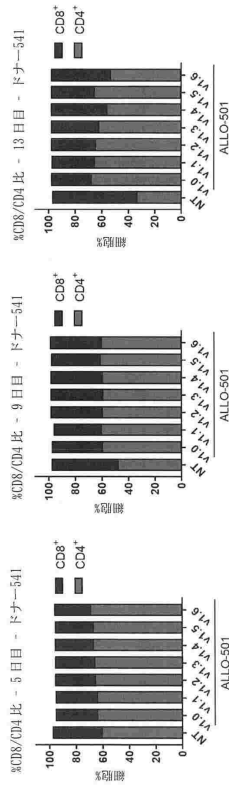


図 5 A

【図 5 B】

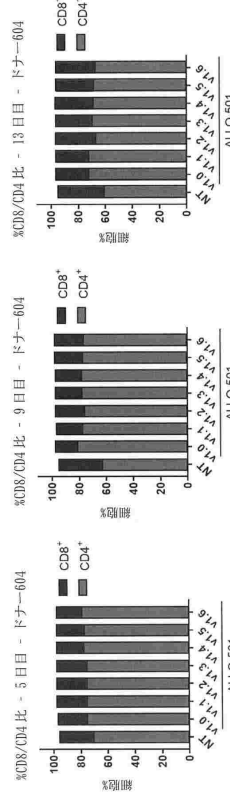


図 5 B

10

20

【図 5 C】

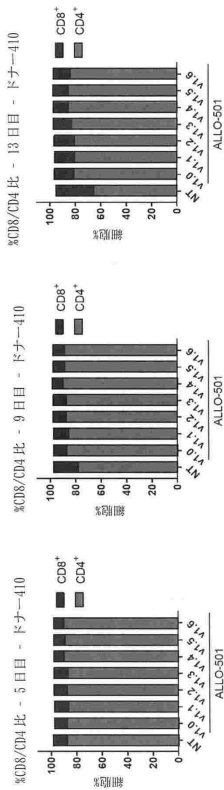


図 5 C

【図 5 D】

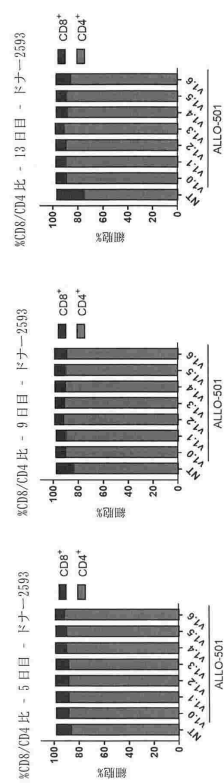


図 5 D

30

40

50

【 図 6 A 】

9 日目 表現型および活性化

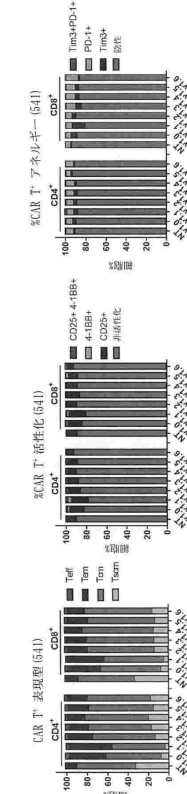


図 6 A

【 図 6 B 】

9 日目 表現型および活性化

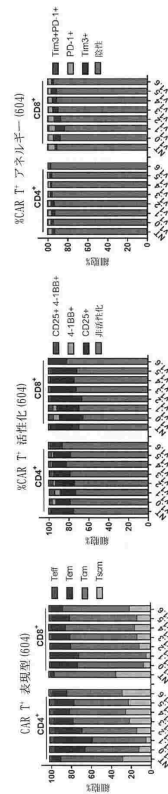


図 6 B

【 図 6 C 】

9 日目 表現型および活性化

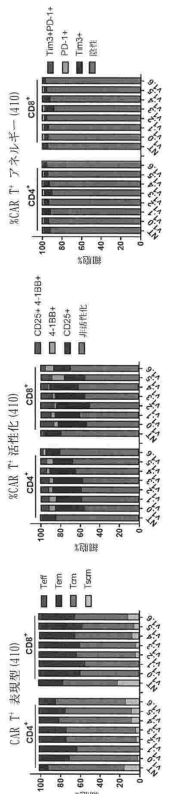


図 6 C

【 図 6 D 】

9 日目 表現型および活性化

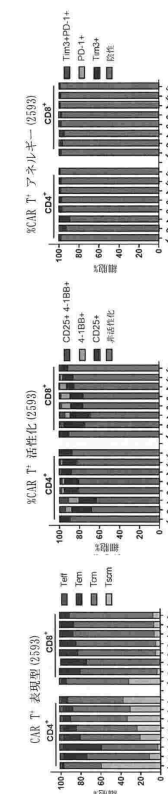


図 6 D

10

20

30

40

50

【 図 7 】

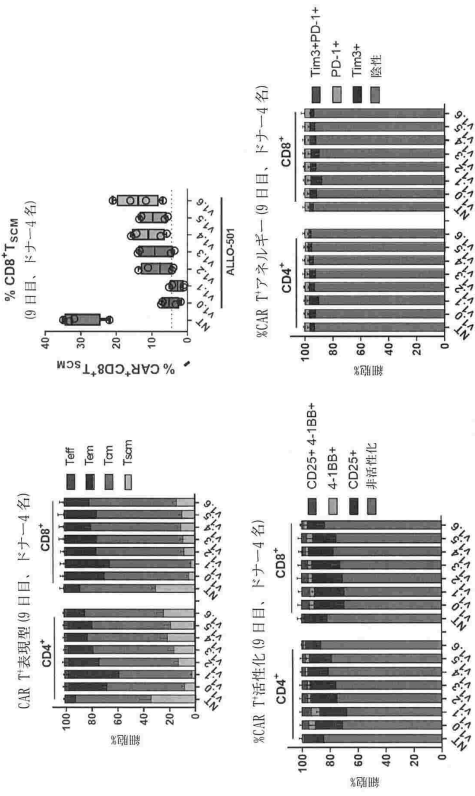


図 7

【 図 8 A 】

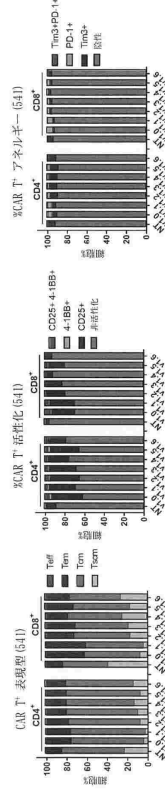


図 8 A

【 図 8 B 】

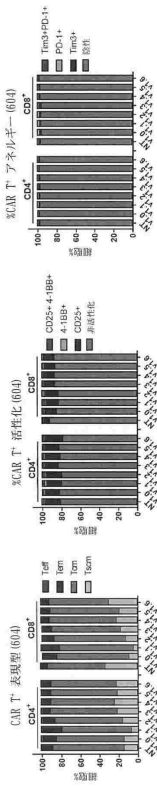


図 8 B

【 図 8 C 】

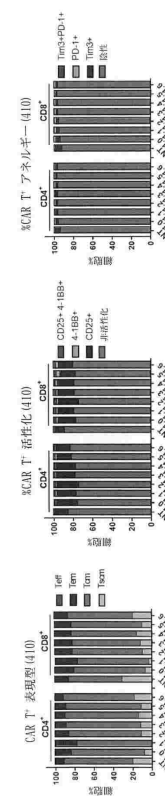


図 8 C

10

20

30

40

50

【 図 8 D 】

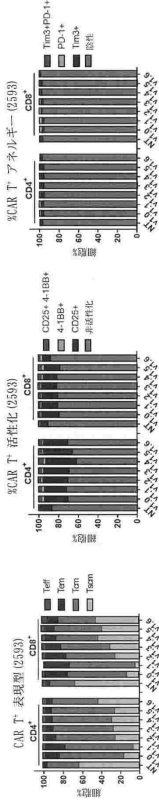


図 8 D

【 図 9 】

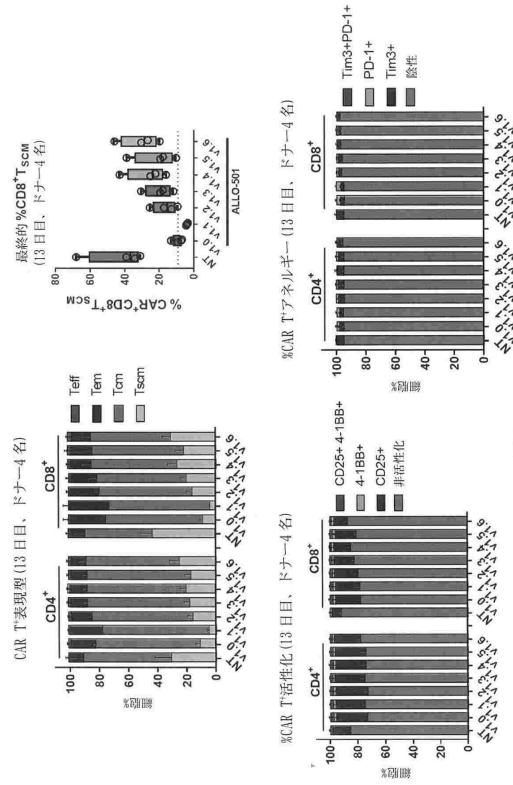


図 9

【 図 1 0 】

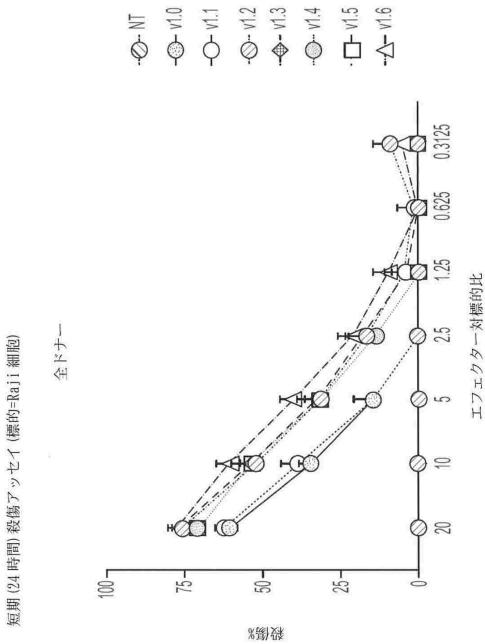


図 1 0

【 図 1 1 A - 1 1 B 】

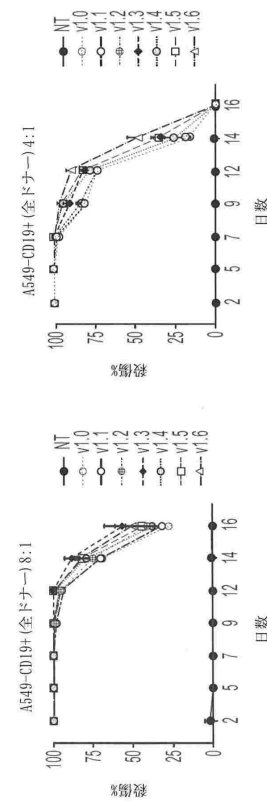


図 1 1 A

図 1 1 B

10

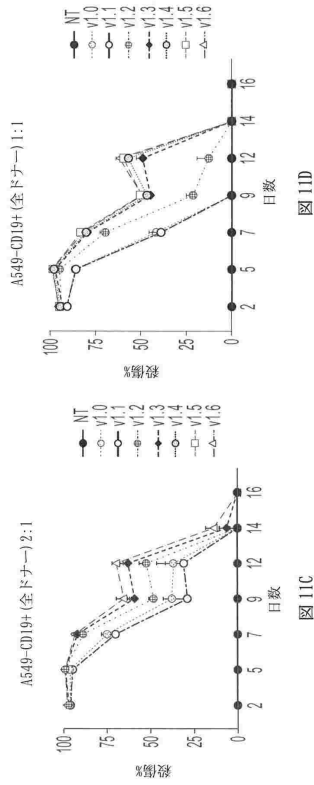
20

30

40

50

【 図 1 1 C - 1 1 D 】



【 図 1 2 】

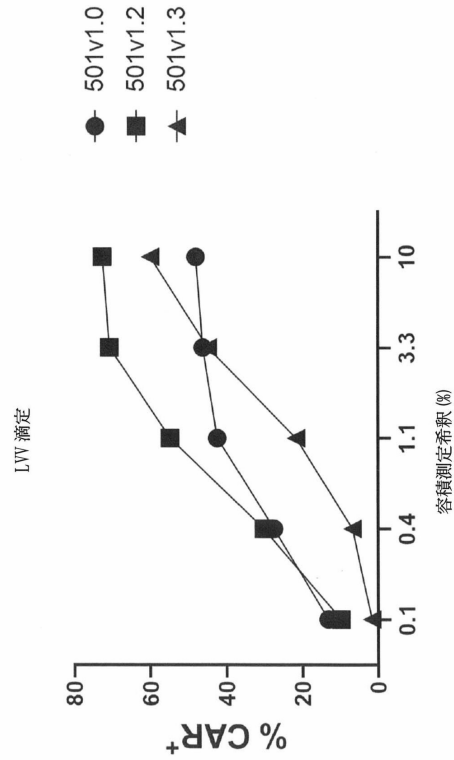


図 1 2

10

20

【 図 1 3 A - 1 3 B 】

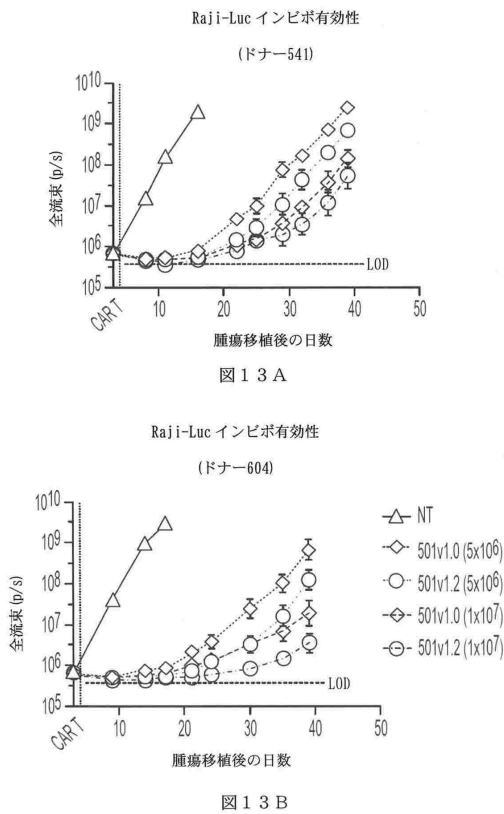


図 1 3 A

図 1 3 B

30

40

50

【配列表】

0007664180000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 1 2 N 5/0783(2010.01)
 C 1 2 N 5/0784(2010.01)
 A 6 1 K 35/17 (2025.01)
 A 6 1 K 35/12 (2015.01)
 A 6 1 P 35/02 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 C 0 7 K 14/725 (2006.01)

F I

C 1 2 N 5/10
 C 1 2 N 5/0783
 C 1 2 N 5/0784
 A 6 1 K 35/17
 A 6 1 K 35/12
 A 6 1 P 35/02
 A 6 1 P 35/00
 C 0 7 K 14/725

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796

弁理士 服部 博信

(72)発明者 パーテル トーマス チャールズ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 8 0 サウス サンフランシスコ イースト グランド ア
 ベニュー 2 1 0 アロジーン セラピューティクス インコーポレイテッド内

(72)発明者 サス バーブラ ジョンソン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 8 0 サウス サンフランシスコ イースト グランド ア
 ベニュー 2 1 0 アロジーン セラピューティクス インコーポレイテッド内

(72)発明者 レオナルド マーク ダブリュ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 8 0 サウス サンフランシスコ イースト グランド ア
 ベニュー 2 1 0 アロジーン セラピューティクス インコーポレイテッド内

審査官 小林 薫

(56)参考文献

特表 2 0 1 6 - 5 2 0 0 7 4 (J P , A)
 特表 2 0 1 9 - 5 0 9 7 3 8 (J P , A)
 米国特許出願公開第 2 0 1 7 / 0 1 7 3 1 2 4 (U S , A 1)
 特表 2 0 1 7 - 5 3 2 0 1 8 (J P , A)
 国際公開第 2 0 1 8 / 1 7 8 3 7 7 (W O , A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
 C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
 C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T
 N)
 G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q
 U n i P r o t / G e n e S e q