

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7679298号

(P7679298)

(45)発行日 令和7年5月19日(2025.5.19)

(24)登録日 令和7年5月9日(2025.5.9)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62

Z Z N A

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00

1 2 1

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 K 45/00

請求項の数 46 (全43頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-542091(P2021-542091)

(86)(22)出願日 令和1年10月1日(2019.10.1)

(65)公表番号 特表2022-513321(P2022-513321 A)

(43)公表日 令和4年2月7日(2022.2.7)

(86)国際出願番号 PCT/US2019/054144

(87)国際公開番号 WO2020/072546

(87)国際公開日 令和2年4月9日(2020.4.9)

審査請求日 令和4年9月30日(2022.9.30)

(31)優先権主張番号 62/739,826

(32)優先日 平成30年10月1日(2018.10.1)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 517171347

アディセット セラピューティクス, イ
ンク.アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
65, レッドウッド シティ, ブリッジ
パークウェイ 1000

(74)代理人 110002077

園田・小林弁理士法人

(72)発明者 サトバエフ, ダウレット カディル

アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
25, メンロー パーク, コンスティ
テューション ドライブ 200, シー
／オー アディセット バイオ, インコ
ーポレイテッド

(72)発明者 ヘルマン, マリッサ アン

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 固形腫瘍を治療するための遺伝子操作している $\gamma\delta$ -T細胞及び遺伝子操作していない $\gamma\delta$ -T細胞に関する組成物及び方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

 $\delta 1 \gamma \delta$ T細胞であって、

(a)キメラ抗原受容体(CAR)をコードする核酸であって、前記CARが、

(i)固形腫瘍細胞の表面で発現される腫瘍関連抗原(TAA)に特異的に結合する結合ドメイン、

(ii)CD8 α ヒンジドメイン、(iii)CD8 α 膜貫通ドメイン、

(iv)4-1BB共刺激シグナル伝達領域及びCD27共刺激シグナル伝達領域から選択される、共刺激シグナル伝達領域、及び

(v)CD3 ζ シグナル伝達ドメイン

を含む核酸；又は

(b)(a)の核酸にコードされるアミノ酸配列を含むCARを含むポリペプチドを含み、

前記ポリペプチドの前記結合ドメイン又は前記核酸にコードされるCARを、前記 $\delta 1 \gamma \delta$ T細胞の表面上に機能的に発現する、 $\delta 1 \gamma \delta$ T細胞。

【請求項2】

前記腫瘍関連抗原がタンパク質-ペプチド複合体であり、前記タンパク質がMHCタンパク質であり、かつ前記結合ドメインが、HLAに制限された様式で前記複合体と結合す

る、請求項 1 に記載の $\delta 1 \gamma \delta T$ 細胞。

【請求項 3】

前記 (i) ~ (v) が、5' から 3' の順序である、請求項 1 又は 2 に記載の $\delta 1 \gamma \delta T$ 細胞。

【請求項 4】

前記 TAA が Tyr D の隣接領域を含む、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の $\delta 1 \gamma \delta T$ 細胞。

【請求項 5】

前記 Tyr D の隣接領域が、少なくとも 4 及び 12 以下の Tyr D の隣接するアミノ酸を含む、請求項 4 に記載の $\delta 1 \gamma \delta T$ 細胞。

【請求項 6】

前記 Tyr D の隣接領域が、7、8 又は 9 の Tyr D の隣接するアミノ酸を含む、請求項 4 に記載の $\delta 1 \gamma \delta T$ 細胞。

【請求項 7】

前記 Tyr D の隣接領域が、Tyr D₃₆₉₋₃₇₇ である、請求項 6 に記載の $\delta 1 \gamma \delta T$ 細胞。

【請求項 8】

TAA ペプチド MHC 複合体に特異的に結合する前記結合ドメインが、HLA-A2 / Tyr D₃₆₉₋₃₇₇ に特異的に結合する、請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の $\delta 1 \gamma \delta T$ 細胞。

【請求項 9】

前記結合ドメインが、
 a) TSGMGVS (配列番号 33) を含む CDRH1 と、
 b) HIYWDDDKRYNPSLKS (配列番号 34) を含む CDRH2 と、
 c) KDYGSSSFYAMHY (配列番号 35) を含む CDRH3 と、
 d) KASQDIHNYIA (配列番号 36) を含む CDRL1 と、
 e) YTSTLQP (配列番号 37) を含む CDRL1 と、
 f) LQYDNLWT (配列番号 38) を含む CDRL2 と
 を含む抗体によって結合されるエピトープと特異的に結合する、又は前記抗体と競合する、請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載の $\delta 1 \gamma \delta T$ 細胞。

【請求項 10】

前記結合ドメインが、固形腫瘍細胞の表面で発現される GPC3 内のエピトープに特異的に結合する、請求項 1 に記載の $\delta 1 \gamma \delta T$ 細胞。

【請求項 11】

前記結合ドメインが、以下の相補性決定領域 (CDR) :
 a) DYEMH (配列番号 39) (もしくは GYTFTDYEMH (配列番号 40)) の配列を含む CDRH1、
 b) ALDPKGTGDTAYSQKFKG (配列番号 41) の配列を含む CDRH2、
 c) FYSYTY (配列番号 42) の配列を含む CDRH3、
 d) RSSQS L V H S N R N T Y L H (配列番号 43) の配列を含む CDRL1、
 e) KVS N R F S (配列番号 44) の配列を含む CDRL2、及び
 f) SQNTHVPPT (配列番号 45) の配列を含む CDRL3
 を含む抗体と同じ GPC3 エピトープと結合する、且つ／又は前記抗体と GPC3 のエピトープへの結合のために競合する、
 前記 CDR を含む、請求項 10 に記載の $\delta 1 \gamma \delta T$ 細胞。

【請求項 12】

前記 CAR が、
 a) 配列番号 1 (PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY) もしくは配列番号 2 (TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY) を含む CD8 α ヒンジドメイン、

10

20

30

40

50

b) 配列番号 3 (IWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC) を含む CD 8 α 膜貫通ドメイン、及び／又は

c)

(i) 配列番号 4 (RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPKRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP PR) もしくは、

(ii) 配列番号 5 (RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPKRRKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP PR) を含む CD 3 ζ シグナル伝達ドメイン

を含む、請求項 1 から 11 のいずれか 1 項に記載の δ 1 γ δ T 細胞。

【請求項 13】

前記 CAR が、

a) 配列番号 6 (KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL) を含む 4-1BB 共刺激シグナル伝達領域、もしくは

b) 配列番号 7 (QRRKYRSNKGESPVPEAPECHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP) を含む CD 27 共刺激シグナル伝達領域を含み、又は、

前記核酸が、配列番号 6 を含む前記 4-1BB 共刺激シグナル伝達領域及び配列番号 7 を含む前記 CD 27 共刺激シグナル伝達領域をコードする、請求項 12 に記載の δ 1 γ δ T 細胞。

【請求項 14】

前記核酸が、さらに

a) 分泌されたサイトカイン

b) 分泌された一般的なガンマ鎖インターロイキン

c) 分泌された IL-15 又は、

d) 分泌された共通ガンマ鎖インターロイキン、及びインターロイキン又はインターロイキン分泌シグナルのアミノ末端のマルチストロン性リンカー領域

をコードする、請求項 1 から 13 のいずれか 1 項に記載の δ 1 γ δ T 細胞。

【請求項 15】

c) における分泌された IL-15 が、

配列番号 14 の配列、

配列番号 12 の分泌シグナル配列に動作可能に連結された配列番号 14 の配列、又は

配列番号 26 の分泌シグナル配列に動作可能に連結された配列番号 14 の配列

を含む、請求項 14 に記載の δ 1 γ δ T 細胞。

【請求項 16】

d) における分泌された共通ガンマ鎖インターロイキンが IL-15 であり、マルチストロン性リンカー領域が、配列番号 15~17、25 もしくは 27~30 又はそれらの組み合わせのいずれか 1 つの配列を含む、あるいは、内部リボソーム侵入部位をコードする、請求項 14 に記載の δ 1 γ δ T 細胞。

【請求項 17】

マルチストロン性リンカー領域が、配列番号 31 又は 32 の配列を含む、請求項 14 に記載の δ 1 γ δ T 細胞。

【請求項 18】

a) 分泌シグナルが、配列番号 12 もしくは配列番号 26 の配列を含み、

b) sIL15 ドメインが、配列番号 14 の配列を含み、

c) P2A 切断配列が、配列番号 15 もしくは配列番号 25 の配列を含み、

d) フェーリン切断配列が、配列番号 16 の配列を含み、且つ／又は

e) 前記 CAR が、アミノからカルボキシの順序で、配列番号 17、配列番号 12 及び配

10

20

30

40

50

列番号 14 の配列を含む、
請求項 14 に記載の $\delta 1 \gamma \delta T$ 細胞。

【請求項 19】

a) における分泌シグナルが、配列番号 12 の配列を含む、請求項 18 に記載の $\delta 1 \gamma \delta T$ 細胞。

【請求項 20】

a) 前記結合ドメインが、H L A - A 2 / T y r D 3 6 9 - 3 7 7 に特異的に結合し、前記核酸が、配列番号 8 又は配列番号 18 に記載のポリペプチドをコードし、又は

b) 前記結合ドメインが G P C 3 に特異的に結合し、前記核酸が配列番号 20 又は 22 に記載のポリペプチドをコードする、請求項 1 から 19 のいずれか 1 項に記載の $\delta 1 \gamma \delta T$ 細胞。

10

【請求項 21】

前記核酸が、配列番号 9、配列番号 19、配列番号 21、23 又は 24 の配列を含む、請求項 20 に記載の $\delta 1 \gamma \delta T$ 細胞。

【請求項 22】

複数の、請求項 1 から 21 のいずれか 1 項に記載の $\delta 1 \gamma \delta T$ 細胞を含む、細胞集団。

【請求項 23】

少なくとも 10^8 の $\delta 1 \gamma \delta T$ 細胞を含む、請求項 22 に記載の細胞集団。

【請求項 24】

10^8 の $\delta 1 \gamma \delta T$ 細胞から 10^{11} の $\delta 1 \gamma \delta T$ 細胞を含む、請求項 22 に記載の細胞集団。

20

【請求項 25】

少なくとも 60 % の $\delta 1 \gamma \delta T$ 細胞を含む、請求項 22 から 24 のいずれか 1 項に記載の細胞集団。

【請求項 26】

60 % から 95 % の $\delta 1 \gamma \delta T$ 細胞を含む、請求項 25 に記載の細胞集団。

【請求項 27】

請求項 1 から 21 のいずれか 1 項に記載の $\delta 1 \gamma \delta T$ 細胞又は請求項 22 から 26 のいずれか 1 項に記載の細胞集団を作製する方法であって、前記方法が、請求項 1 から 21 のいずれか 1 項に記載の核酸で $\delta 1 \gamma \delta T$ 細胞（複数可）をトランスフェクトすることを含む、方法。

30

【請求項 28】

前記方法がレトロウイルス形質導入を含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

レトロウイルス形質導入が、ガンマレトロウイルス形質導入である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

e x v i v o での前記 $\delta 1 \gamma \delta T$ 細胞（複数可）の増殖を含み、前記 e x v i v o での増殖が、前記核酸のトランスフェクションの前及び／又は後に実施される、請求項 27 から 29 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 31】

薬学的に受容可能な賦形剤と、請求項 1 から 21 のいずれか 1 項に記載の $\delta 1 \gamma \delta T$ 細胞又は請求項 22 から 26 のいずれか 1 項に記載の細胞集団とを含む、薬学的組成物。

【請求項 32】

固形腫瘍細胞を殺傷するための医薬であって、腫瘍細胞の殺傷に有効な量である、請求項 1 から 21 のいずれか 1 項に記載の $\delta 1 \gamma \delta T$ 細胞、請求項 22 から 26 のいずれか 1 項に記載の細胞集団、又は請求項 31 に記載の薬学的組成物を含む、医薬。

【請求項 33】

治療上有効な量である、前記 $\delta 1 \gamma \delta T$ 細胞（複数可）又は前記薬学的組成物が、前記固形腫瘍細胞を含む宿主生物に導入される、請求項 32 に記載の医薬。

50

【請求項 3 4】

治療上有効な量である、前記 $\delta 1 \gamma \delta$ T 細胞（複数可）又は前記薬学的組成物が、前記固形腫瘍細胞を含む宿主生物に導入され、一般的なガンマ鎖サイトカイン（複数可）を上昇させる 1 つ又は複数の剤が、同時に又は順次に投与される、請求項 3 3 に記載の医薬。

【請求項 3 5】

前記一般的なガンマ鎖サイトカイン（複数可）を上昇させる 1 つ又は複数の剤を投与することが、前記 $\delta 1 \gamma \delta$ T 細胞（複数可）の導入と同時に、又は順次に、導入した前記 $\delta 1 \gamma \delta$ T 細胞（複数可）の増殖、細胞毒性活性、持続性、又はそれらの組み合わせを増大させるのに有効な量の一般的なガンマ鎖サイトカイン（複数可）を投与することを含む、請求項 3 4 に記載の医薬。

10

【請求項 3 6】

一般的なガンマ鎖サイトカイン（複数可）が、IL-2 及び／又は IL-15 である、請求項 3 5 に記載の医薬。

【請求項 3 7】

前記一般的なガンマ鎖サイトカイン（複数可）を上昇させる 1 つ又は複数の剤が、前記 $\delta 1 \gamma \delta$ T 細胞（複数可）を導入する前及び／又は導入後に、導入した前記 $\delta 1 \gamma \delta$ T 細胞（複数可）の増殖、細胞毒性活性、持続性、又はそれらの組み合わせを増大させるのに有効な量の一般的なガンマ鎖サイトカイン（複数可）を含む、請求項 3 5 に記載の医薬。

【請求項 3 8】

前記一般的なガンマ鎖サイトカイン（複数可）を上昇させる 1 つ又は複数の剤が、前記 $\delta 1 \gamma \delta$ T 細胞（複数可）を導入する前のリンパ球を枯渇化させる、請求項 3 2 から 3 7 のいずれか 1 項に記載の医薬。

20

【請求項 3 9】

前記一般的なガンマ鎖サイトカイン（複数可）を上昇させる 1 つ又は複数の剤が、導入した前記 $\delta 1 \gamma \delta$ T 細胞（複数可）からの 1 種又は複数種の一般的なガンマ鎖サイトカイン（複数可）の分泌を誘導する、請求項 3 2 から 3 8 のいずれか 1 項に記載の医薬。

【請求項 4 0】

前記医薬が、対照の生物と比較して、前記宿主生物の *in vivo* 腫瘍量を減少させ、及び／又は前記宿主生物の平均生存時間を増加させ、前記対照の生物が、前記 $\delta 1 \gamma \delta$ T 細胞（複数可）又は前記薬学的組成物を用いて処置されない、請求項 3 3 から 3 7 のいずれか 1 項に記載の医薬。

30

【請求項 4 1】

前記医薬が、治療が必要な対象のがんを治療するための医薬である、請求項 3 2 から 4 0 のいずれか 1 項に記載の医薬。

【請求項 4 2】

固形腫瘍細胞がんを治療することを必要とする対象において固形腫瘍細胞がんを治療するための医薬の製造方法であって、請求項 1 から 2 1 のいずれか 1 項に記載の $\delta 1 \gamma \delta$ T 細胞、請求項 2 2 から 2 6 のいずれか 1 項に記載の細胞集団、又は請求項 3 1 に記載の薬学的組成物が、固形腫瘍細胞を殺傷するために用いられることを特徴とする、製造方法。

【請求項 4 3】

治療が必要な対象のがんを治療するための薬学的組成物であって、治療上有効量の請求項 1 から 2 1 のいずれか 1 項に記載の $\delta 1 \gamma \delta$ T 細胞を含み、前記がんが、Tyrod又はGPC3の細胞表面発現を示す固形腫瘍細胞を含む、薬学的組成物。

40

【請求項 4 4】

一般的なガンマ鎖サイトカイン（複数可）を上昇させる 1 つ又は複数の剤が、 $\delta 1 \gamma \delta$ T 細胞の投与と同時に又は順次に投与される、請求項 4 3 に記載の薬学的組成物。

【請求項 4 5】

前記 $\delta 1 \gamma \delta$ T 細胞の複数回投与が実施され、前記複数回投与の間隔が、少なくとも 1 週間である、請求項 4 3 又は 4 4 に記載の薬学的組成物。

【請求項 4 6】

50

前記 $\gamma\delta$ T細胞の複数回投与が6か月に1回を超えない、請求項43又は44に記載の薬学的組成物。

【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、2018年10月1日出願の米国仮出願第62/739826号の優先権を主張し、その内容は、あらゆる目的のために本明細書全体に組み込まれる。

【0002】

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、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。2020年1月8日に作成された上記のASCIIコピーは、ADC-0006-PCT_SL.txtという名前で、サイズは48406バイトである。

【背景技術】

【0003】

養子免疫細胞療法は、基本的なリンホカイン活性化及び／または腫瘍浸潤に焦点を当てた初期から、キメラ抗原受容体(CAR)などの遺伝子操作された抗原受容体を発現させるために、これらの免疫細胞を遺伝子操作するようなごく最近の戦略まで、30年間以上、絶え間なく繰り返し受けられてきた。その中で、これらのアプローチの治癒上の可能性についていくつかのヒント及び兆候が見られていたが、まだ行うべきことが多く存在している。特に、CAR-Tリンパ球による腫瘍根絶の成功は、CAR-T細胞の持続性及びエフェクター機能に依存するが、そのどちらかが過剰になると、患者の移植片対宿主効果が誘発される可能性がある。さらに、特に固形組織には、利用可能な陽性刺激がなく、阻害性環境が存在するという問題がある。したがって、当技術分野では、有効性と安全性のバランスをとることを目的として、T細胞とNK細胞の両方、特に $\alpha\beta$ T細胞で無数の共刺激戦略を試験している。注目すべきことに、 $\alpha\beta$ T細胞と比較して、 $\gamma\delta$ T細胞の共刺激要件に関する現状の理解の欠如を考慮すると、 $\gamma\delta$ T細胞へのこれらの様々なアプローチの任意の実際の翻訳は、よく見ても不確実である。例えば、Ribot et al., 「Searching for “signal 2”: costimulation requirements of $\gamma\delta$ T cells」、Cell. Mol. Life Sci. (2011) 68:2345-2355を参照のこと。

【0004】

したがって、細胞の特異性または選択性を改善するために、例えば移植片対宿主(GVH)効果を低減または回避することにより、細胞の安全性を改善するために、例えばエフェクター機能の抑制を回避して、固形腫瘍細胞に対する有効性を改善するためにならびに対象への投与時の細胞の活性及び／または生存を改善するために、改善された戦略が依然として必要である。そのようなニーズを満たす方法、細胞、組成物、キット及びシステムを提供する。

【発明の概要】

【0005】

本発明の態様は、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする単離した核酸配列であって、そこにおいてCARが、腫瘍関連抗原(TAA)ペプチド及びMHCタンパク質を含むタンパク質-ペプチド複合体と特異的に結合する結合ドメインを含み、そこにおいてこの複合体は、固形腫瘍細胞の表面上で発現され、任意で、そこにおいて、この結合ドメインは、HLA制限された上で、複合体と結合する単離した核酸配列と、CD8 α ヒンジドメインと、CD8 α 膜貫通ドメインと、4-1BB共刺激シグナル伝達領域及びCD27共刺激シグナル伝達領域から選択される共刺激シグナル伝達領域と、CD3 ζ シグナル伝達ドメインとを含む。本発明の態様は、本明細書に記載の遺伝子操作していない $\gamma\delta$ T細胞、ならびに本明細書に記載されるCARコンストラクトをコードする核酸を含む遺伝子操作している $\gamma\delta$ T細胞をさらに含み、そこにおいて $\gamma\delta$ T細胞は、 $\gamma\delta$ T細胞の表面上の

10

20

30

40

50

CARをコードする核酸を機能的に発現する。

【0006】

本発明の態様は、本明細書に記載される通りの複数の $\gamma\delta$ T細胞をさらに含む。本発明の態様は、本明細書に記載の $\gamma\delta$ T細胞または複数の $\gamma\delta$ T細胞を作製する方法をさらに含む。本発明の態様は、本明細書に記載される、薬学的に受容可能な賦形剤及び $\gamma\delta$ T細胞または複数の $\gamma\delta$ T細胞を含む医薬組成物をさらに含む。本発明の態様は、本明細書に記載される通りの腫瘍細胞傷害に有効な量である $\gamma\delta$ T細胞または本明細書に記載される複数の $\gamma\delta$ T細胞と、固形腫瘍細胞を接触させることをさらに含む。

【0007】

一態様において、本発明は、キメラ抗原受容体(CAR)をコードする単離した核酸配列を提供し、そこにおいて、CARは、(a)腫瘍関連抗原(TAA)ペプチド及びMHCタンパク質を含むタンパク質-ペプチド複合体と特異的に結合する結合ドメインであって、そこにおいて、複合体が固形腫瘍細胞の表面で発現し、任意で、そこにおいて結合ドメインがHLA制限された上で複合体と結合する結合ドメインと、(b)CD8 α ヒンジドメインなどのヒンジドメインと、(c)CD8 α 膜貫通ドメインなどの膜貫通ドメインと、(d)共刺激シグナル伝達領域または共刺激シグナル伝達領域の組み合わせであって、任意で、そこにおいて、共刺激シグナル伝達領域(複数可)が、4-1BB(CD137)共刺激シグナル伝達領域及びCD27共刺激シグナル伝達領域から選択される共刺激シグナル伝達領域(複数可)と、(e)CD3 ζ シグナル伝達ドメインなどのシグナル伝達ドメインとを含む。いくつかの実施形態において、前述の要素(a)~(e)は、単離した核酸のセンス鎖上に5'から3'の順でコードされている。

【0008】

いくつかの実施形態において、TAAは、Ty r Dの隣接領域を含む。いくつかの実施形態において、Ty r Dの隣接領域は、少なくとも4、または少なくとも約4及び12以下、または約12以下のTy r Dの隣接するアミノ酸、好ましくは7、8または9または好ましくは約7、8または9のTy r Dの隣接するアミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、Ty r Dの隣接領域は、Ty r D₃₆₉₋₃₇₇である。いくつかの実施形態において、TAAペプチドMHC複合体に特異的に結合する結合ドメインは、HLA-A2/Ty r D₃₆₉₋₃₇₇に特異的に結合する。

【0009】

いくつかの実施形態において、結合ドメインは、TSGMGVS(配列番号33)を含むCDRH1、HIYWDDKRYNP SLKS(配列番号34)を含むCDRH2、KDYGSSFYAMHY(配列番号35)を含むCDRH3、KASQDIHNYIA(配列番号36)を含むCDRL1、YTSTLQP(配列番号37)を含むCDRL1及びLQYDNLWT(配列番号38)を含むCDRL2を含む抗体に結合したエピトープと特異的に結合する、またはその抗体と競合する。

【0010】

別の態様において、結合ドメインは、固形腫瘍細胞の表面で発現する腫瘍関連抗原(TAA)と特異的に結合し、任意で、そこにおいて、この抗原は、タンパク質-ペプチド複合体であり、そこにおいて、タンパク質はMHCタンパク質であり、そこにおいて、結合ドメインは、HLAに制限された上でタンパク質-ペプチド複合体と結合し、さらに、単離した核酸配列のコードされたCARは、(b)CD8 α ヒンジドメインなどのヒンジドメインと、(c)CD8 α 膜貫通ドメインなどの膜貫通ドメインと、(d)共刺激シグナル伝達領域または共刺激シグナル伝達領域の組み合わせであって、任意で、そこにおいて、共刺激シグナル伝達領域が、4-1BB(CD137)共刺激シグナル伝達領域及びCD27共刺激シグナル伝達領域から選択される、共刺激シグナル伝達領域または共刺激シグナル伝達領域の組み合わせと、(e)CD3 ζ シグナル伝達ドメインなどのシグナル伝達ドメインとを含む。いくつかの実施形態において、前述の要素(a)~(e)は、単離した核酸のセンス鎖上に5'から3'の順でコードされている。

【0011】

いくつかの実施形態において、結合ドメインは、固形腫瘍細胞の表面で発現するGPC3内のエピトープに特異的に結合する。いくつかの実施形態において、結合ドメインは、以下の相補性決定領域(CDR)を含む抗体と同じGPC3エピトープと結合する以下のCDRを含み、及び／または以下のCDR: DYEMH (配列番号39) (またはGYTFDYEMH (配列番号40))の配列を含むCDRH1、ALDPKTGDTAYSQKFKG (配列番号41)の配列を含むCDRH2、FYSYTY (配列番号42)の配列を含むCDRH3、RSSQSLVHSNRNTYLH (配列番号43)の配列を含むCDRL1、KVSNRFS (配列番号44)の配列を含むCDRL2及び／またはSQNTHVPPT (配列番号45)の配列を含むCDRL3を含む抗体とGPC3のエピトープに結合するために競合する。

【0012】

いずれか1つの前述の態様のいくつかの実施形態または本明細書に記載されるCARコード核酸の実施形態またはそのいずれかにおいて、コードしたCARは、配列番号1 (PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY) もしくは配列番号2 (TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY) を含むCD8 α ヒンジドメインまたは配列番号3 (IWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC) を含むCD8 α 膜貫通ドメイン及び／またはCD3 ζ シグナル伝達ドメインを含む。場合によっては、CD3 ζ シグナル伝達ドメインは、配列番号4 (RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMG GKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR) または配列番号5 (RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNEELNLGRREEYD VLDKRRGRDPEMG GKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR) の配列を含む。

【0013】

いくつかの実施形態において、CARは、配列番号6 (KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL) を含む4-1BB共刺激シグナル伝達領域または、配列番号7 (QRRKYRSNKGESPVPEAPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP) を含むCD27共刺激シグナル伝達領域または、配列番号6を含む4-1BB共刺激シグナル伝達領域及び配列番号7を含むCD27共刺激シグナル伝達領域をコードする核酸配列を含む。

【0014】

前述のいずれか1つまたは本明細書に記載される通りのいくつかの実施形態において、単離した核酸は、分泌されたサイトカイン、もしくは分泌された一般的なガンマ鎖インターロイキンまたは、IL-15などの分泌された一般的なガンマ鎖インターロイキンをコードし、好ましくは、IL-15などのこの分泌された一般的なガンマ鎖インターロイキンは、分泌シグナル配列 (例えば、配列番号12または26の分泌シグナル) に動作可能に連結されたインターロイキンポリペプチド配列を含む。いくつかの実施形態において、単離した核酸は、分泌されたIL-15をコードし、好ましくは、そこにおいてIL-15は、配列番号14の配列を含み、より好ましくは、そこにおいてIL-15は、配列番号12の分泌シグナル配列に動作可能に連結された14の配列を含む、またはそこにおいてIL-15は、配列番号26の分泌シグナル配列に動作可能に連結された配列番号14の配列を含む。場合によっては、分泌されたサイトカイン、一般的なガンマ鎖インターロイキン及び／またはIL-15は、結合領域、ヒンジ及び膜貫通ドメイン、シグナル伝達ドメイン及び／または共刺激エンドドメインにカルボキシ末端がコードされている。場合によっては、分泌されたサイトカイン、一般的なガンマ鎖インターロイキン及び／またはIL-15は、結合領域、ヒンジ及び膜貫通ドメイン、シグナル伝達ドメイン及び／または共刺激エンドドメインのセンス鎖3'にコードされる。

【0015】

いくつかの実施形態において、核酸は、CAR及び分泌されたサイトカイン、一般的なガンマ鎖サイトカイン、または別々のポリペプチドとしてIL-15の翻訳を容易にするように構成されたマルチシストロン性リンカー領域をコードする。いくつかの実施形態において、マルチシストロン性リンカー領域は、自己切断配列及び／または切断ポリペプチド配列をコードする。場合によっては、自己切断配列は、P2A、F2A、T2A、またはE2A自己切断配列である。場合によっては、切断配列は、フューリン切断配列である。場合によっては、切断配列（例えば、フューリン切断配列）は、自己切断配列のアミノ末端である。いくつかの実施形態において、マルチシストロン性リンカー領域は、内部リボソーム侵入部位をコードする。いくつかの実施形態において、核酸は、インターロイキンもしくはサイトカインまたはインターロイキンもしくはサイトカイン分泌シグナルに、マルチシストロン性リンカー領域のアミノ末端をコードし、好ましくは、そこにおいてこのマルチシストロン性リンカー領域は、配列番号15～17、25もしくは27～30またはそれらの組み合わせのいずれか1つの配列を含む、または例えば配列番号31もしくは32の内部リボソーム侵入部位をコードする。

【0016】

いくつかの実施形態において、分泌シグナルは、配列番号12または配列番号26の配列、好ましくは配列番号12を含み、及び／またはsIL15ドメインは、配列番号14の配列を含み、及び／またはP2A切断配列は、配列番号15または配列番号25の配列を含み、及び／またはフューリン切断配列は、配列番号16の配列を含み、及び／またはCARは、アミノからカルボキシの順序で、配列番号17、配列番号12、及び配列番号14の配列を含む。

【0017】

いくつかの実施形態において、結合ドメインは、HLA-A2／Ty r D369-377に特異的に結合し、核酸は、配列番号8または配列番号18をコードする。いくつかの実施形態において、結合ドメインは、GPC3に特異的に結合し、核酸は、配列番号20または22をコードする。いくつかの実施形態において、核酸は、配列番号9、配列番号19、配列番号21、23または24の配列を含む。

【0018】

別の態様において、本発明は、前述の核酸のいずれか1つによりコードされるポリペプチドの1つなどのCAR結合ドメインを含むポリペプチド、または本明細書に記載のポリペプチドを提供する。

【0019】

別の態様において、本発明は、例えば、前述のポリペプチドを含むまたは本明細書に記載のCARをコードする核酸を含む、 $\gamma\delta$ 、T細胞を提供し、そこにおいて、細胞は、ポリペプチドの結合ドメインまたは細胞の表面上でCARをコードする核酸を機能的に発現する。いくつかの実施形態において、細胞は、腫瘍関連抗原（TAA）の細胞表面発現を示す固形腫瘍細胞に対して、*in vitro*及び／または*in vivo*の細胞傷害活性を示す。いくつかの実施形態において、これらの細胞の固形腫瘍細胞傷害活性は、CARコンストラクトを含まない対照の細胞において、*in vitro*及び／または*in vivo*の固形腫瘍細胞傷害活性の生来のレベルよりも大きい。いくつかの実施形態において、細胞は、HLAクラスI⁺固形腫瘍細胞に対して固形腫瘍細胞傷害活性が増大する。いくつかの実施形態において、固形腫瘍細胞傷害活性または固形腫瘍細胞傷害活性の増大は、固形腫瘍細胞との最初の接触後、約、少なくとも、または少なくとも約6日から180日間持続する。

【0020】

いくつかの実施形態において、細胞は、腫瘍関連抗原（TAA）の細胞表面発現を示す固形腫瘍細胞との接触に应答して増殖する。いくつかの実施形態において、細胞の表面上でCARをコードする核酸を機能的に発現しない、対照の細胞と比較して、細胞は、腫瘍関連抗原（TAA）の細胞表面発現を示す固形腫瘍細胞との接触に应答して増殖が増大する。いくつかの実施形態において、細胞は、腫瘍関連抗原（TAA）の細胞表面発現を示

10

20

30

40

50

す固形腫瘍細胞を含む宿主生物において増殖する。いくつかの実施形態において、細胞の細胞増殖または細胞増殖の増大は、固形腫瘍細胞との最初の接触後、約、少なくとも、または少なくとも約6日から180日間持続する。いくつかの実施形態において、細胞は、1種または複数種の炎症誘発性サイトカインを発現し、任意で、そこにおいて、1種または複数種の炎症誘発性サイトカインは、固形腫瘍細胞との接触後に、好ましくは細胞表面でCARをコードした核酸を機能的に発現しない対照である細胞よりも多い量の腫瘍壊死因子アルファ及び／またはインターフェロンガンマを含む。

【0021】

いくつかの実施形態において、同種異系宿主に投与された $\alpha\beta$ T細胞によって示される移植片対宿主応答と比較して、同種異系宿主に導入される場合、細胞で示される移植片対宿主応答が、低下、実質的な低下、実質的にない、またはなくなる。いくつかの実施形態において、同種異系宿主が投与された $\alpha\beta$ T細胞によって示された移植片対宿主応答と比較して、同種異系宿主が導入された場合、例えば、 $\gamma\delta$ 、T細胞で示される移植片対宿主応答が、低下、実質的な低下、実質的にない、またはなくなる。いくつかの実施形態において、T細胞は γ T細胞である。いくつかの実施形態において、T細胞は δ T細胞である。いくつかの実施形態において、T細胞は $\gamma\delta$ T細胞である。いくつかの実施形態において、T細胞は、 $\delta 1$ 、 $\delta 2$ 、 $\delta 3$ または $\delta 4$ T細胞であり、好ましくは $\delta 2-\delta$ T細胞、より好ましくは $\delta 1\delta$ T細胞である。いくつかの実施形態において、T細胞は、 $\delta 1$ 、 $\delta 2$ 、 $\delta 3$ または $\delta 4\gamma\delta$ T細胞であり、好ましくは $\delta 2-\gamma\delta$ T細胞、より好ましくは $\delta 1\gamma\delta$ T細胞である。

【0022】

別の態様において、本発明は、例えば $\gamma\delta$ 、T細胞などの前述の細胞のいずれか1つの複数、または本明細書に記載される通りの例えば $\gamma\delta$ 、T細胞などの複数の細胞を提供する。いくつかの実施形態において、複数は、例えば、 10^8 の $\gamma\delta$ 、T細胞などの少なくとも約 10^8 の細胞、好ましくは例えば $\gamma\delta$ 、T細胞の約 10^8 の細胞から、例えば、 $\gamma\delta$ 、T細胞の約 10^{11} の細胞を含む。いくつかの実施形態において、複数は、例えば $\gamma\delta$ T細胞などの少なくとも60%、80%、または約60%もしくは80%から約90%もしくは95%の $\delta 1$ 、 $\delta 2$ 、 $\delta 3$ 、または $\delta 4$ 細胞、好ましくは $\delta 1$ または $\delta 2\gamma\delta$ T細胞、より好ましくは $\delta 2-\gamma\delta$ T細胞、最も好ましくは $\delta 1\gamma\delta$ T細胞である組成物を含む。

【0023】

いくつかの実施形態において、本発明は、本明細書に記載される通りの例えば $\gamma\delta$ 、T細胞、または本明細書に記載される通りの $\gamma\delta$ 、T細胞などの複数の細胞などの細胞を作製する方法を提供し、そこにおいて、この方法は、本明細書に記載される通り単離した核酸配列を含むコンストラクトを有する細胞（複数可）をトランスフェクトすることを含む。場合によっては、この方法は、例えば、ガンマ、レトロウイルス形質導入を含む。場合によっては、この方法は、*ex vivo*での細胞（複数可）の増殖を含み、そこにおいて、この*ex vivo*での増殖は、単離した核酸配列のトランスフェクションの前及び／または後に実施される。場合によっては、この方法は、*ex vivo*での細胞（複数可）の増殖を含み、そこにおいて、この*ex vivo*での増殖は、単離した核酸配列のトランスフェクションの前及び後に実施される。場合によっては、この方法は、*ex vivo*での細胞（複数可）の増殖を含み、そこにおいて、この*ex vivo*での増殖は、単離した核酸配列のトランスフェクションの後に実施される。いくつかの実施形態において、この方法は、トランスフェクションの約30日以内に、本明細書に記載のCARを機能的に発現する、例えば $\gamma\delta$ 、T細胞などの約 10^8 の細胞から、例えば $\gamma\delta$ 、T細胞などの約 10^{11} の細胞を作製することを含む。

【0024】

別の態様において、本発明は、薬学的に受容可能な賦形剤及び本明細書に記載される例えば $\gamma\delta$ 、T細胞（複数可）などの本明細書に記載される通りの細胞または複数の細胞を含む医薬組成物を提供する。

【0025】

別の態様において、本発明は、固形腫瘍細胞を殺傷する方法を提供し、この方法は、腫瘍細胞殺傷に有効な量の、上述の細胞もしくは複数の細胞または医薬組成物、または本明細書に記載される通りの細胞もしくは複数の細胞または医薬組成物と、固形腫瘍細胞を接触させることを含む。場合によっては、細胞または複数の細胞は、例えば、 $\gamma\delta$ 、T細胞（複数可）である。

【0026】

いくつかの実施形態において、この方法は、固形腫瘍細胞を含む宿主生物に、治療上有効な量の、例えば、 $\gamma\delta$ 、T細胞（複数可）などの細胞または医薬組成物を導入することを含む。いくつかの実施形態において、方法には、固形腫瘍細胞を含む宿主生物に、治療上有効な量である、例えば、 $\gamma\delta$ 、T細胞（複数可）などの細胞またはその医薬組成物を導入し、同時にまたは連続して、一般的なガンマ鎖サイトカイン（複数可）を上昇させる1つまたは複数の方法を投与することを含む。

【0027】

いくつかの実施形態において、一般的なガンマ鎖サイトカイン（複数可）を上昇させる1つまたは複数の投与方法は、細胞（複数可）の導入と同時に、または一般的なガンマ鎖サイトカイン（複数可）の有効量を連続して投与することで、その導入した細胞（複数可）の増殖、細胞毒性活性、持続性、またはその組み合わせを増大させ、好ましくは、そこにおいてこの方法はIL-2を投与することを含み、より好ましくは、そこにおいて、この方法は、IL-15を投与することを含む。いくつかの実施形態において、一般的なガンマ鎖サイトカイン（複数可）を上昇させる1つまたは複数の方法は、一般的なガンマ鎖サイトカイン（複数可）の有効な量を投与することで、細胞（複数可）を導入する前及び／または導入後に、導入した細胞（複数可）の増殖、細胞毒性活性、持続性、またはその組み合わせを増大させることを含む。

【0028】

いくつかの実施形態において、一般的なガンマ鎖サイトカイン（複数可）を上昇させる1つまたは複数の方法は、 $\gamma\delta$ T細胞（複数可）を導入する前のリンパ球の枯渇化を含む。いくつかの実施形態において、一般的なガンマ鎖サイトカイン（複数可）を上昇させる1つまたは複数の方法は、導入した細胞（複数可）からの1種または複数種の一般的なガンマ鎖サイトカイン（複数可）の分泌を含む。いくつかの実施形態において、この方法は、対照の生物と比較して、宿主生物のin vivo腫瘍量を減少させ、及び／または宿主生物の平均生存時間を増加させ、そこにおいて、対照の生物は、細胞（複数可）または医薬組成物とともに処置しない。いくつかの実施形態において、この方法は、治療が必要な対象のがんを治療する方法である。

【0029】

別の態様において、本発明は、腫瘍細胞殺傷に有効な量である、上述の細胞または、本明細書に記載の通りの細胞（例えば $\gamma\delta$ T細胞など）、複数のそのような細胞または治療が必要な対象の固形腫瘍細胞癌を治療するための薬剤を製造する際のそのような細胞を含む医薬組成物のいずれか1つの使用を提供する。別の態様において、本発明は、治療が必要な対象のがんを治療する方法を提供し、この方法は、治療上有効量の細胞を投与することを含み、そこにおいて、がんは、TyrodまたはGPC3の細胞表面発現を示す固形腫瘍細胞を含む。

【0030】

いくつかの実施形態において、この方法は、細胞の投与と同時に、または連続して、一般的なガンマ鎖サイトカイン（複数可）を上昇させる1つまたは複数の方法を投与することを含む。いくつかの実施形態において、この方法は、細胞の複数回投与を実施することを含み、そこにおいて、この複数回投与の間の間隔は、少なくとも約1週間、好ましくは少なくとも約2、3、4、5、6、7、8または12週間、及び／または6か月または12か月に1回以下である。

【0031】

別の実施形態において、本発明は、前述の方法または本明細書に記載の方法のいずれか1つを用いるための医薬組成物を提供する。

【0032】

参照による援用

本明細書で言及される全ての出版物、特許及び特許出願は、各出版物、特許または特許出願が、参照により組み込まれるために、個別的かつ具体的に示された場合と同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】1つの共刺激シグナル伝達エンドドメイン（左）または2つの共刺激シグナル伝達エンドドメイン（右）を含むキメラ抗原受容体（CAR）の実施形態の概略図を示す。本明細書で用いる共刺激シグナル伝達エンドドメインは、共刺激エンドドメイン（costimulation endodomain）または共刺激エンドドメイン（costimulatory endodomain）とも呼ばれる。模範的なCARにおいて有用である模範的な共刺激シグナル伝達エンドドメインには、CD28、CD137（4-1BB）、CD278（ICOS）、CD27、CD134（OX40）、TLR2及びそれらの組み合わせが含まれるがこれらに限定されない。

10

【図2】526及びWM266.1-Luc黒色腫細胞株に対する、本明細書に記載の遺伝子操作している $\gamma\delta$ T細胞及び遺伝子操作していない $\gamma\delta$ T細胞のin vitro細胞毒性を示す。

20

【図3】皮下WM266.4細胞NOD scidガンマ（NSG）マウスモデルにおける本明細書に記載の $\gamma\delta$ T細胞のin vivoでの治療有効性を示す。

【図4】例えば固形腫瘍を治療するために、遺伝子操作された $\gamma\delta$ CAR-T細胞及び遺伝子操作していない $\gamma\delta$ CAR-T細胞を製造するための製造工程を示す。

【図5】対照CARコンストラクトまたはチロシナーゼポリペプチドを標的とするコンストラクトで形質導入したV δ 1T細胞の細胞毒性活性を示す。

【図6】可溶性IL-15（sIL15）（配列番号14）及びコドン最適化（WO2007/037780A2）sIL15などの抗グリピカン3（GPC3）とのV δ 1細胞の形質導入効率を示す。

【図7】様々なレベルのGPC3発現を伴う肝臓癌細胞株パネルに対する抗GPC3CARコンストラクトで形質導入していないまたは形質導入しているかのどちらかのV δ 1T細胞の細胞毒性活性を示す。

30

【発明を実施するための形態】

【0034】

定義：

本明細書を解釈する目的のために、下の定義を適用するが、適当と認められる場合には、単数形で用いられる用語はその複数形も含み、逆もまた同様である。説明される任意の定義が、参照により本明細書に組み込まれる任意の文書と矛盾する場合には、下記に説明する定義が優先されるものとする。別段に定義されない限り、本明細書で用いられる全ての技術的及び科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者により一般に理解されるものと同じ意味を有する。

40

【0035】

本明細書で用いられる用語「約」は、量、時間的な持続期間などの測定可能な値を指す場合には、開示される方法を実施するためにその変動が適切であるように、特定値から $\pm 20\%$ または $\pm 10\%$ 、より好ましくは $\pm 5\%$ 、さらにより好ましくは $\pm 1\%$ 及びさらにより好ましくは $\pm 0.1\%$ の変動を包含するように意図される。

【0036】

本明細書で用いられる用語「 $\gamma\delta$ T細胞（ガンマデルタT細胞）」は、1つの γ 鎖及び1つの δ 鎖で構成される、異なるT細胞受容体（TCR）、すなわち $\gamma\delta$ TCRがそれらの表面で発現するT細胞のサブセットを指す。「 $\gamma\delta$ T細胞」という用語は、ナイーブ、

50

エフェクターメモリ、セントラルメモリ及び最終分化型 $\gamma\delta$ T細胞と同様に、特に、 $V\delta 1$ 及び $V\delta 2$ 、 $V\delta 3$ $\gamma\delta$ T細胞を含むがこれらに限定されない $\gamma\delta$ T細胞の全てのサブセットを含む。さらなる例として、「 $\gamma\delta$ T細胞」という用語は、 $V\gamma 2$ 、 $V\gamma 3$ 、 $V\gamma 5$ 、 $V\gamma 8$ 、 $V\gamma 9$ 、 $V\gamma 10$ 及び $V\gamma 11$ $\gamma\delta$ T細胞と同様に、 $V\delta 4$ 、 $V\delta 5$ 、 $V\delta 7$ 及び $V\delta 8$ $\gamma\delta$ T細胞を含む。いくつかの実施形態において、 $\gamma\delta$ T細胞は、 $V\delta 1^-$ 、 $V\delta 2^-$ または $V\delta 1^-$ 及び $V\delta 2^-$ である。遺伝子操作した及び遺伝子操作していない $\gamma\delta$ T細胞及び／またはそれらのサブタイプを作製及び用いるための組成物及び方法には、US 2016/0175358、WO 2017/197347、US 9499788、US 2018/0169147、US 9907820、US 2018/0125889 及び US 2017/0196910 に記載されているものが含まれるが、これらに限定されない。これらのそれぞれの内容は、この遺伝子操作した及び遺伝子操作していない $\gamma\delta$ T細胞及び／またはそれらのサブタイプを作製及び用いるための組成物及び方法などが、あらゆる目的のために参照により組み込まれる。本出願はさらに、任意で機能性 TCR を形成するために第2のポリペプチドと組み合わせ、1つの γ 鎖または1つの δ 鎖を発現する T細胞、または他の遺伝子操作された白血球もしくはリンパ球について考察する。1つの γ 鎖または1つの δ 鎖を発現するこのような遺伝子操作された白血球またはリンパ球は、本方法において用いられてもよく、または本明細書に記載の組成物中に存在してもよい。

【0037】

本明細書で用いる用語「Tリンパ球」または「T細胞」は、CD3 (CD3+) 及び T細胞受容体 (TCR+) を発現する、または発現した免疫細胞を指す。T細胞は細胞性免疫において中心的な役割を果たす。CD3 及び TCR を「発現した」T細胞は、CD3 及び／または TCR 細胞表面の発現を排除するように遺伝子操作されている。

【0038】

本明細書で用いる用語「TCR」または「T細胞受容体」は、アルファ-ベータもしくはガンマ-デルタ受容体またはそれらの組み合わせを形成する二量体異種細胞表面シグナル伝達タンパク質を指す。 $\alpha\beta$ TCR は、MHC 分子により提示される抗原を認識するが、 $\gamma\delta$ TCR は MHC の提示とは独立して抗原を認識することが可能である。

【0039】

「MHC」(主要組織適合遺伝子複合体) という用語は、細胞表面の抗原提示タンパク質をコードする遺伝子のサブセットを指す。ヒトの場合、これらの遺伝子はヒト白血球抗原 (HLA) 遺伝子と言う。本明細書では、略語 MHC または HLA は、区別なく用いられる。

【0040】

本明細書で用いる「活性化」は、検出可能な細胞増殖を誘導するために十分に刺激された T細胞の状態を指す。活性化は、誘導されたサイトカイン産生及び検出可能なエフェクター機能と関連している可能性もある。「活性化 T細胞」という用語は、中でも、細胞分裂を起こしている T細胞を指す。

【0041】

本明細書で用いる用語「抗体」は、抗原と特異的に結合する免疫グロブリン分子を指す。抗体は、天然由来または組換え源由来の無処置の免疫グロブリンであり得て、さらに無処置の免疫グロブリンの免疫反応性部分であり得る。典型的には、抗体は免疫グロブリン分子の四量体である。本発明の抗体は、例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、Fv、Fab 及び F(ab)₂、ならびに一本鎖抗体及びヒト化抗体を含む様々な形態で存在し得る (Harlow et al., 1999, In: Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow et al., 1989, In: Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N. Y.; Houston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; Bird et al., 1988, Science 242: 423-426)。

【0042】

「抗体フラグメント」という用語は、無処置の抗体の一部を指し、無処置の抗体の抗原決定可変領域を指す。抗体フラグメントの例としては、Fab、Fab'、F(ab')₂及びFvフラグメント、線状抗体、scFv抗体及び抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0043】

本明細書で用いる「抗体重鎖」は、自然に存在するコンフォメーションで抗体分子に存在する2種類のポリペプチド鎖のうち大きい方を指す。

【0044】

本明細書で用いる「抗体軽鎖」は、自然に存在するコンフォメーションで抗体分子に存在する2種類のポリペプチド鎖のうち小さい方を指す。κ及びλ軽鎖は、2つの主要な抗体軽鎖アイソタイプを指す。

【0045】

本明細書で用いる用語「合成抗体」は、例えば、本明細書に記載される通りバクテリオファージにより発現される抗体のように組換えDNA技術を用いて作製される抗体を意味する。また、この用語は、抗体をコードするDNA分子を合成することで作製され、そのDNA分子は抗体タンパク質または抗体を指定するアミノ酸配列を発現する抗体を意味すると解釈されるべきであり、そこにおいて、DNAまたはアミノ酸配列は、利用可能で、当技術分野で周知の合成DNAまたはアミノ酸配列技術を用いて得られる。

【0046】

本明細書で用いる用語「抗原」または「Ag」は、免疫応答を誘発する分子として定義される。この免疫応答には、抗体産生もしくは特定の免疫適格細胞の活性化のどちらか、またはその両方を含み得る。当業者は、タンパク質またはペプチドを含む任意の高分子が抗原として役立ち得ることを理解するであろう。さらに、抗原は組換えまたはゲノムDNAに由来し得る。したがって、熟練者は、免疫応答を誘発するタンパク質をコードするヌクレオチド配列または部分ヌクレオチド配列を含む任意のDNAは、本明細書で用いられる用語「抗原」をコードすることを理解するであろう。さらに、当業者は、抗原が遺伝子の完全長ヌクレオチド配列によりのみコードされる必要がないことを理解するであろう。本発明が、これに限定されないが、1種以上の遺伝子の部分ヌクレオチド配列の使用を含み、さらにこれらのヌクレオチド配列が、所望の免疫応答を誘発させるために様々な組み合わせで配置されることは、容易に明らかである。さらに、熟練者は、抗原が「遺伝子」によりコードされる必要が全くないことを理解するであろう。抗原が産生される、合成される、または生体試料由来であり得ることは容易に明らかである。このような生体試料には、組織試料、腫瘍試料、細胞、または生体液が含まれ得るが、これらに限定されない。

【0047】

「エピトープ」という用語は、免疫グロブリンまたはT細胞受容体に特異的に結合することが可能な、任意のタンパク質決定因子、脂質または炭水化物決定因子を含む。エピトープ決定基は通常、アミノ酸、脂質または糖側鎖などの分子の活性表面群からなり、通常、特定の3次元構造特性ならびに特定の電荷特性を有する。平衡解離定数(K_D)が $10^{-6} \sim 10^{-12}$ Mの範囲にある場合、抗体は抗原に特異的に結合するとされている。

【0048】

本明細書で用いる用語「キメラ抗原受容体(CAR)」は、例えば、人工T細胞受容体、T体、一本鎖免疫受容体、キメラT細胞受容体、またはキメラ免疫受容体を指す場合があり、また特定の免疫エフェクター細胞に人工的な特異性を移植する、遺伝子操作された受容体を包含する。CARは、モノクローナル抗体の特異性をT細胞に付与するために用いられてもよく、それにより、例えば、養子細胞療法で用いるために、多数の特異的T細胞を産生させることが可能である。特定の実施形態において、CARは、例えば、腫瘍関連抗原に対する細胞の特異性を方向付ける。いくつかの実施形態において、CARは、細胞内活性化ドメイン(標的の腫瘍細胞などの標的細胞と標的部分の結合時にT細胞を活性化させることが可能になる)、膜貫通ドメイン及び長さが変化し得る細胞外ドメインを含

10

20

30

40

50

み、さらに疾病または疾患に関連する、例えば腫瘍－抗原結合領域を含む。特定の態様において、CARは、CD3－ゼータ膜貫通ドメイン及びエンドドメインに融合した、モノクローナル抗体由来の一本鎖可変フラグメント（scFv）の融合を含む。他のCARデザインの特異性は、受容体のリガンド（ペプチドなど）またはデクチンなどのパターン認識受容体に由来する場合がある。特定の場において、抗原認識ドメインの間隔を変えて、活性化誘導細胞死を減らすことが可能である。特定の場において、CARは、CD3ζ、FcR、CD27、CD28、CD137、DAP10／12及び／またはOX40、ICOS、TLR（例えば、TLR2）などのような共刺激シグナル伝達を追加するためのドメインを含む。場合によっては、分子は、共刺激分子、イメージング（例えば、陽電子放出断層撮影）用のレポーター遺伝子、プロドラッグを付加する際に、T細胞を条件付きで切除する遺伝子産物、ホーミング受容体、ケモカイン、ケモカイン受容体、サイトカイン及びサイトカイン受容体などのCARと共に共発現され得る。さらに、当業者は、共刺激ドメインが遺伝子の完全長ヌクレオチド配列によりのみコードされる必要がないことを理解するであろう。本発明が、これに限定されないが、1種以上の遺伝子の部分ヌクレオチド配列の使用を含み、さらにこれらのヌクレオチド配列が、所望の免疫応答を誘発させるために様々な組み合わせで配置されることは、容易に明らかである。

【0049】

本明細書で用いる用語「抗腫瘍効果」は、腫瘍体積の減少、腫瘍細胞数の減少、転移数の減少、平均余命の増加または、がん状態に関連する様々な生理的症状の改善により、明らかになり得る生物学的効果を指す。また、「抗腫瘍効果」は、そもそも腫瘍の発生を予防する本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、細胞及び抗体の能力によって明らかにされ得る。

【0050】

「自己抗原」という用語は、本発明では、免疫系により異物であると誤って認識される任意の自己抗原を意味する。自己抗原は、細胞タンパク質、リン酸化タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞脂質、核酸、細胞表面受容体を含む糖タンパク質を含むが、これらに限定されない。

【0051】

本明細書で用いる用語「自己由来」は、後に再導入される個体と同じ個体に由来する任意の材料を指すように意図される。

【0052】

本明細書で用いる用語「同種異系」は、後に同じ種の別の動物に導入される、動物に由来する任意の材料を指すように意図される。

【0053】

「治療上有効な量」という用語は、研究者、獣医師、医師または他の臨床医に求められている、組織、系または対象の生物学的または医学的応答を誘発する、組成物の量を指す。「治療上有効な量」という用語は、投与された場合に、治療中の疾患または疾病（例えば、固形癌）の兆候または症状について、その発症を予防するため、またはその兆候もしくは症状の1つもしくは複数がある程度緩和するために十分な組成物の量を含む。治療上有効な量は、組成物、疾病及びその重症度ならびに治療される対象の年齢、体重などに依存して変化する。

【0054】

本明細書で用いる用語である、疾病を「治療する」とは、対象が経験する疾病または疾患の少なくとも1つの兆候または症状について、頻度または重症度を低下させることを意味する。

【0055】

1種または複数種の治療薬と「併用した場合の」投与は、同時（併用）及び任意の順序の連続した投与を含む。

【0056】

本明細書で用いる用語「薬学的に受容可能な」は、化合物の生物学的活性または特性を

10

20

30

40

50

抑制せず、かつ比較的無毒性である塩、担体または希釈剤などの材料を指すが、これらに限定されない。換言すれば、この材料は、所望されない生物学的効果を引き起こすこと、またはそれが含まれる組成物の構成成分のいずれとも有害な形で作用することもなく、個体に投与され得る。

【0057】

「コードする」は、ヌクレオチドの定義される配列（すなわち、rRNA、tRNA及びmRNA）またはアミノ酸の定義された配列のどちらかを有する生物学的方法で、他のポリマー及び高分子を合成するためのテンプレートとしての役割を果たすための遺伝子、cDNA、またはmRNAなどのポリヌクレオチド中のヌクレオチドの特定の配列の固有の特性と、それから得られる生物学的特性とを指す。したがって、その遺伝子に対応するmRNAの転写及び翻訳が、細胞または他の生物学的システムにおいてタンパク質を作製する場合、その遺伝子はタンパク質をコードする。mRNAの配列と同一で、通常、配列表で提供されるヌクレオチド配列であるコード鎖と、遺伝子またはcDNAの転写のテンプレートとして使用される非コード鎖の両方が、その遺伝子またはcDNAのタンパク質または他の産物をコードすると言うことが可能である。

【0058】

「単離した」とは、自然状態から変化または除去したことを意味する。例えば、生きている動物中に自然に存在する核酸またはペプチドは「単離」されないが、その自然状態の共存物質から部分的または完全に分離された同じ核酸またはペプチドは「単離」される。単離した核酸またはタンパク質は、実質的に精製された形態で存在することができ、または、例えば、宿主細胞などの非天然環境に存在し得る。

【0059】

特に明記しない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」は、相互の縮重バージョンでありかつ同じアミノ酸配列をコードする全ヌクレオチド配列を含む。タンパク質及びRNAをコードするヌクレオチド配列はイントロンを含み得る。

【0060】

「患者」、「対象」、「個体」などの用語は、本明細書では区別なく用いられ、本明細書に記載の方法に従順な任意の動物を指す。特定の非限定的実施形態において、患者、対象または個体は、ヒトである。

【0061】

抗体に関して、本明細書で用いられる用語「特異的に結合する」は、特定の抗原を認識するが、試料中の他の分子を実質的に認識または結合しない抗体を意味する。例えば、1つの種から得た抗原に特異的に結合する抗体は、1種または複数種の種から得たその抗原とも結合し得る。しかし、そのような異種間の反応性は、それ自体が特性に応じた抗体の分類を変えるものではない。別の例において、抗原に特異的に結合する抗体は、抗原の様々な対立遺伝子と結合し得る。しかし、このような交差反応性は、それ自体が特性に応じた抗体の分類を変えるものではない。場合によっては、「特異的結合 (specific binding)」または「特異的に結合すること (specifically binding)」という用語は、抗体、タンパク質またはペプチドと第2の化学種との相互作用に関して用いられ得るが、この相互作用は、化学種の特定の構造（例えば、抗原決定基またはエピトープ）の存在に依存する、例えば、抗体は、通常タンパク質というよりは特定のタンパク質構造を認識及び結合することを意味する。抗体がエピトープ「A」に特異的である場合、標識した「A」及び抗体を含む反応において、エピトープA（または、遊離の非標識のA）を含む分子が存在すると、抗体に結合する標識Aの量は減少する。

【0062】

いくつかの実施形態において、特異的結合は、少なくとも約 1×10^{-8} M以下の平衡解離定数によって特徴付けられ得る（例えば、 K_D が小さいほど結合は強くなる）。2つの分子が特異的に結合するかどうかを決定するための方法は、当技術分野で周知であり、例えば、平衡透析、表面プラズモン共鳴などが含まれる。さらに、第1の抗原及び1種もしくは複数種の付加的抗原に結合する多重特異性抗体、または抗原の2つの異なる領域に

結合する二重特異性抗体は、それにもかかわらず、本明細書で使用される「特異的に結合する」抗体と見なされる。

【0063】

固形腫瘍は、少なくとも約10または少なくとも約100の腫瘍細胞の腫瘍塊を含む腫瘍である。固形腫瘍には、軟部組織腫瘍、原発性固形腫瘍、または転移性病変が含まれる。

【0064】

固形腫瘍の例には、例えば、肝臓、肺、乳房、リンパ、胃腸（結腸など）、尿生殖路（腎臓、尿路上皮細胞など）、前立腺及び咽頭などに影響を及ぼすものなどの様々な臓器系の肉腫、腺癌及び細胞癌を含む。腺癌には、ほとんどの結腸癌、直腸癌、腎細胞癌、肝臓癌、肺の非小細胞癌、小腸癌及び食道癌などの悪性腫瘍が含まれる。一実施形態において、がんは、進行期黒色腫などの黒色腫である。前述のがんの転移性病変も、本発明の方法及び組成物を用いて治療または予防することが可能である。治療され得る他のがんの例には、骨癌、膵臓癌、皮膚癌、頭頸癌、皮膚または眼内悪性黒色腫、子宮癌、卵巣癌、直腸癌、肛門部癌、胃癌、精巣癌、子宮癌、卵管癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、膣癌、外陰癌、食道癌、小腸癌、内分泌癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎皮質癌、軟部肉腫、尿道癌、陰茎癌、小児固形腫瘍、膀胱癌、腎臓癌または尿管癌、腎盂癌、中枢神経系（CNS）腫瘍、原発性CNSリンパ腫、脊髄軸椎腫瘍、脳幹膠腫、下垂体腺腫、カポジ肉腫、類上皮癌、扁平細胞癌、アスベストに起因するものを含む環境に起因するがん及びこれらのがんの組み合わせが含まれる。好ましい実施形態において、固形腫瘍細胞は、Ty r Dまたはそのフラグメントを発現、または過剰発現する。いくつかの実施形態において、固形腫瘍細胞は、Ty r Dフラグメントを含むHLA：ペプチド複合体を発現または過剰発現する。いくつかの実施形態において、Ty r Dフラグメントは、Ty r D₃₆₉₋₃₇₇である。いくつかの実施形態において、HLAは、HLA-A2などのクラスIのHLAである。いくつかの実施形態において、固形腫瘍細胞は、HLA-A2/Ty r D₃₆₉₋₃₇₇を発現または過剰発現する。

【0065】

いくつかの実施形態において、固形腫瘍細胞は、グリピカン3（GPC3）を発現または過剰発現する。いくつかの実施形態において、固形腫瘍細胞は、US7919086、WO2014/180306、WO2018/019772、WO2016/049459、WO2003/000883、WO2006/046751、WO2007/047291、WO2016/086813、WO2016/047722、WO2016/036973、Cancer Res. 2008; 68: 9832-9838、Proc Natl Acad Sci USA. 2013 Mar 19; 110(12): E1083-91で記載の抗GPC3抗体、T細胞受容体またはキメラ抗原受容体により特異的に結合されるGPC3のエピトープを発現または過剰発現するが、これらのそれぞれの内容は、あらゆる目的のために、全体が特に結合ドメイン、抗体、抗体フラグメント、相補性決定領域、この相補性決定領域を含むポリペプチド、この相補性決定領域をコードする核酸及びエピトープ特異性、ならびにそこに記載されているエピトープ特異性を決定するためのアッセイが参照により組み込まれる。いくつかの実施形態において、固形腫瘍細胞は、抗GPC3抗体GC33によって特異的に結合されるグリピカン3のエピトープを発現または過剰発現する。いくつかの実施形態において、固形腫瘍は、GPC3フラグメントを含むHLA：ペプチド複合体を発現または過剰発現する。いくつかの実施形態において、HLAは、HLA-A2などのクラスIのHLAである。いくつかの実施形態において、固形腫瘍は、GPC3₁₄₄₋₁₅₂ペプチドを含むHLA：ペプチド複合体を発現または過剰発現する。いくつかの実施形態において、固形腫瘍は、GPC3₂₉₈₋₃₀₆ペプチドを含むHLA：ペプチド複合体を発現または過剰発現する。Oncology. 2012 Nov 1; 1(8): 1448-1450を参照のこと。

【0066】

「発現カセット」は、発現される転写物またはポリペプチドをコードする核酸に操作可能に連結された発現制御配列を含む核酸を指す。発現カセットは、発現に十分なシス作用

10

20

30

40

50

エレメントを含み、発現のための他のエレメントは、宿主細胞により、または *in vitro* 発現システムにおいて供給され得る。発現カセットは、コスミド、プラスミド（例えば、リボソーム中のネイキッドもしくはリボソームに含まれるもの）、またはウイルス（例えば、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルス）などのベクターの構成成分であり得る。発現カセットは、 $\gamma\delta$ T細胞などの宿主細胞に存在し得る。

【0067】

範囲：本開示全体を通して、本発明の様々な態様は、範囲形式で提示され得る。範囲形式での説明は、単に便宜上及び簡潔にするためのものであり、本発明の範囲に対する柔軟性のない制限として解釈されるべきではないことを理解されたい。したがって、範囲の説明は、その範囲内の個々の数値だけでなく、全ての可能な部分範囲を具体的に開示していると思なされるべきである。例えば、1から6などの範囲の記述は、1から3、1から4、1から5、2から4、2から6、3から6などの部分範囲、ならびに、1、2、2.7、3、4、5、5.3及び6などの範囲内の個々の数字を具体的に開示していると思なされるべきである。これは、範囲の幅に関係なく適用される。

【0068】

キメラ抗原受容体コンストラクト：

本発明の態様には、CARをコードする核酸、ならびにそのような核酸を含むコンストラクト及びベクターが含まれる。場合によっては、核酸は、例えば、異種性の、発現カセットの構成成分である。いくつかの実施形態において、核酸は、例えば、異種性の、レトロウイルスベクターの構成成分である。いくつかの実施形態において、核酸は、例えば異種性の、 $\alpha\beta$ または $\gamma\delta$ T細胞、好ましくは、 $\gamma\delta$ T細胞の構成成分である。いくつかの実施形態において、核酸は、例えば異種性の、 γ^+ T細胞及び／または δ^+ T細胞の構成成分である。いくつかの実施形態において、核酸は、例えば異種性の、 α^- T細胞及び／または β^- T細胞の構成成分である。

【0069】

本明細書に記載されているのは、固形腫瘍細胞の表面で発現される腫瘍関連抗原（TAA）に特異的に結合するCAR結合ドメインをコードする核酸である。模範的なTAAは、チロシナーゼ（TyroD）またはそのペプチドフラグメントである。場合によっては、TAAはグリピカン3またはそのペプチドフラグメントである。場合によっては、TAAはクラスIのHLA分子などのHLA分子に結合したペプチドである。クラスIのHLA分子（本明細書ではHLA制限チロシナーゼエピトープ、HLA制限チロシナーゼエピトープ及びMHC制限チロシナーゼ抗原とも互換的に呼ぶ）に結合するチロシナーゼペプチドは、チロシナーゼ酵素（Genebank Accession No: NP_000363.1）由来であり、通常は8～10のアミノ酸の長さで、HLA分子中の対応する結合ポケットと相互作用する2または3のアンカー残基を介して重鎖 $\alpha 1 \sim \alpha 2$ の溝に結合する。

【0070】

チロシナーゼは、膜に結合するN-結合型糖タンパク質であり、メラニン合成の重要な酵素である。これは、全ての正常なメラノサイト及びほぼ全ての黒色腫の腫瘍試料で発現する（H. Takeuchi, et al., 2003; S. Reinke, et al., 2005）。この酵素に由来するペプチドは、MHCクラスI分子に提示され、黒色腫患者の自己由来の細胞溶解性Tリンパ球によって認識される[T. Wolfel, et al., 1994; Brichard, et al., 1993; Renkvist et al, Cancer immunology immunotherapy 2001 50:3-15; Novellino L, et al., March 2004 update. Cancer Immunol Immunotherapy. 54:187-207, 2005]。腫瘍関連抗原（TAA）に由来する別の腫瘍チロシナーゼHLA制限ペプチドは、Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei TumoriのWebサイト（www.istitutotumori

10

20

30

40

50

. m i . i t) で確認が可能である。

【0071】

MHCクラスI制限チロシナーゼの抗原ペプチドの非限定的な例は、WO2008/120202で提供されており、WO2008/120202の表139などのその全体が、参照により本明細書に組み込まれる。本発明のいくつかの実施形態によれば、チロシナーゼ抗原ペプチドは、TyrD₃₆₉₋₃₇₇ペプチドである。TyrD内のエピトープであるTyrDに特異的に結合する結合ドメインは、HLA（クラスIのHLAなど）に制限された上で結合するものを含むがこれらに限定されず、WO2016/199140、WO2016/199141、US9688739、同時係属出願中のPCT/IB2017/053539で記載されているものを含むが、これらに限定されない。このそれぞれの内容は、例えば、HLA制限またはHLA非依存で、TyrDまたはTyrD内のエピトープに特異的に結合する結合ドメインを同定、作製及び用いるための組成物及び方法を含むがこれらに限定されない全体が、あらゆる目的のために参照により組み込まれる。

【0072】

クラスIのHLA分子（本明細書ではHLA制限GPC3エピトープ、HLA制限GPC3エピトープ及びMHC制限GPC3抗原とも互換的に呼ぶ）に結合するGPC3ペプチドは、グリピカン3タンパク質（Genebank Accession No: NM_001164617.2）由来であり、通常は8～10のアミノ酸の長さで、HLA分子中の対応する結合ポケットと相互作用する2または3のアンカー残基を介して重鎖α1～α2の溝に結合する。

【0073】

本明細書で使用される場合、TyrDに特異的に結合する、及び／またはTyrD内のエピトープに特異的に結合する、結合ドメイン、CAR、またはCAR T細胞には、TyrDペプチドフラグメントに特異的に結合する結合ドメイン、CAR、またはCAR T細胞が含まれるが、これらに限定されない。TyrDペプチドフラグメントに特異的に結合する結合ドメイン、CAR、またはCAR T細胞は、HLA制限された上で参照のTyrDペプチドフラグメントに特異的に結合することが可能である。同様に、本明細書で使用される場合、細胞の表面でTyrDを発現する細胞は、ペプチド：HLA複合体などの細胞の表面でTyrDペプチドフラグメントを発現または過剰発現する細胞を含む。

【0074】

本明細書で使用される場合、GPC3に特異的に結合する、及び／またはGPC3内のエピトープに特異的に結合する結合ドメイン、CAR、またはCAR T細胞には、GPC3ペプチドフラグメントに特異的に結合する結合ドメイン、CAR、またはCAR T細胞が含まれるが、これらに限定されない。GPC3ペプチドフラグメントに特異的に結合する結合ドメイン、CAR、またはCAR T細胞は、HLA制限された上で参照のGPC3ペプチドフラグメントに特異的に結合することが可能である。同様に、本明細書で使用される場合、細胞の表面でTyrDを発現する細胞は、ペプチド：HLA複合体などの細胞の表面でGPC3ペプチドフラグメントを発現または過剰発現する細胞を含む。

【0075】

いくつかの実施形態において、結合ドメインは、細胞の表面上で完全長の機能的ポリペプチドで発現されるように抗原に結合する。いくつかの実施形態において、結合ドメインは、MHC：抗原複合体において提示されるように、抗原に結合する。いくつかの実施形態において、結合ドメインは、HLAに制限された上で抗原に結合する。MHC：抗原複合体に対して特異性を示す結合ドメインは、例えば、WO/2016/199140及びWO/2016/199141に記載されている。

【0076】

いくつかの実施形態において、単離した核酸は、TSGMGVS（配列番号33）を含むCDRH1、HIYWDDKRYNPSLKS（配列番号34）を含むCDRH2、KDYGSSSFYAMHY（配列番号35）を含むCDRH3、KASQDIHNYIA（配列番号36）を含むCDRL1、YTSTLQP（配列番号37）を含むCDRL1、

及び／または L Q Y D N L W T（配列番号 38）を含む C D R L 2 を有する抗 T y r D 結合ドメインをコードする。

【0077】

いくつかの実施形態において、単離した核酸は、D Y E M H（配列番号 39）（または G Y T F T D Y E M H（配列番号 40））を含む C D R H 1、A L D P K T G D T A Y S Q K F K G（配列番号 41）を含む C D R H 2、F Y S Y T Y（配列番号 42）を含む C D R H 3、R S S Q S L V H S N R N T Y L H（配列番号 43）を含む C D R L 1、K V S N R F S（配列番号 44）を含む C D R L 2、及び／または S Q N T H V P P T（配列番号 45）を含む C D R L 3 を有する抗 G P C 3 結合ドメインをコードする。

【0078】

本開示は、本明細書で提供される配列と結合するために競合する抗 T y r D 結合ドメインまたは抗 G P C 3 結合ドメインについても考察する。既知の方法を用いることにより、抗 T y r D 結合ドメインが、参照抗体もしくは結合ドメインと同じエピトープに結合する、またはその参照抗体もしくは結合ドメインと結合するために競合するかどうかを決定することが可能である。例えば、試験抗体が参照結合ドメインと同じエピトープに結合するかどうかを決定するためには、参照結合ドメインを飽和条件下で T y r D に結合させることで可能になる。次に、T y r D 分子に結合する試験結合ドメインの能力を評価することが可能である。この試験する結合ドメインが、参照結合ドメインとの飽和結合に続いて T y r D に結合することが可能である場合、この試験結合ドメインは、参照結合ドメインとは異なるエピトープに結合すると結論付けられる。一方で、試験結合ドメインが、参照結合ドメインとの飽和結合に続いて T y r D に結合できない場合、この試験結合ドメインは、参照結合ドメインにより結合されるエピトープと同じエピトープに結合し得る。

【0079】

結合ドメインが、参照結合ドメインと結合するために競合する場合、上述した結合方法論は、2つの方向で実施される。第1の方向では、参照結合ドメインを飽和条件下で T y r D に結合させ、続いて T y r D 分子への試験結合ドメインの結合を評価する。第2の方向では、試験結合ドメインを飽和条件下で T y r D 分子に結合させ、続いて T y r D 分子への参照結合ドメインの結合を評価する。両方の方向において、第1の（飽和）結合ドメインのみが T y r D 分子に結合可能である場合は、試験結合ドメイン及び参照結合ドメインは、T y r D への結合のために競合すると結論付けられる。当業者により理解されるように、参照結合ドメインと結合するために競合する結合ドメインは、必ずしも参照結合ドメインと同一のエピトープに結合し得るとは限らないが、重複するまたは隣接するエピトープに結合することにより参照結合ドメインの結合を立体的に遮断し得る。抗 T y r D 結合ドメインとの競合及びエピトープ結合を決定するための上述した方法は、同様に、抗 T y r D 結合ドメインに適用され得る。

【0080】

2つの結合ドメインが、それぞれが抗原への他方の結合を競争的に阻害（ブロック）する場合、同じまたは重複するエピトープに結合する。つまり、1倍、5倍、10倍、20倍、または100倍過剰な一方の結合ドメインは、競合的結合アッセイで測定される通り、他方の結合を少なくとも50%、例えば75%、90%、さらには99%阻害する（例えば、J u n g h a n s e t a l . , C a n c e r R e s . 1 9 9 0 5 0 : 1 4 9 5 - 1 5 0 2 を参照のこと）。その代わりに、一方の結合ドメインの結合を減少または排除する抗原の本質的に全てのアミノ酸変異が他方の結合を減少または排除する場合、2つの結合ドメインは同じエピトープを有する。一方の結合ドメインの結合を減少または排除するいくつかのアミノ酸変異が、他方の結合を減少または排除する場合、2つの結合ドメインは重複したエピトープを有する。

【0081】

さらに日常的な実験（例えば、ペプチド変異及び結合分析）を実施することで、観察された試験結合ドメインの結合の欠如が、実際に参照結合ドメインと同じエピトープへの結合によるものであるか、または立体的障害（または他の現象）が、観察された結合の欠如

10

20

30

40

50

の原因であるかどうかを確かめることが可能である。この種の実験は、E L I S A、R I A、表面プラズモン共鳴、フローサイトメトリー、または当技術分野で利用可能な他の任意の定量的または定性的結合アッセイを用いて実施され得る。

【0082】

本開示は、C D Rまたはフレームワーク領域において、本明細書で提供される配列に対して「実質的同一性」または「実質的類似性」を有する抗体及びC A Rを提供する。用語「実質的同一性」または「実質的に同一」は、核酸またはそのフラグメントを指す場合、他の核酸（または他の核酸の相補鎖）と至適に整列させた場合、以下で述べるようにF A S T A、B L A S TまたはG A Pなどの任意の既知の配列同一性のアルゴリズムにより測定される通り、ヌクレオチド配列の同一性が、例えば、ヌクレオチド塩基の少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、または100%存在することを示す。参照核酸分子と実質的同一性を有する核酸分子は、特定の例において、参照核酸分子によりコードされるポリペプチドと同じまたは実質的に類似のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードし得る。

【0083】

ポリペプチドに適用する場合、用語「実質的類似性」または「実質的に類似の」は、デフォルトのギャップウエイトを用いるプログラムG A PまたはB E S T F I Tなどにより至適に整列させた場合、2つのペプチド配列が少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、または100%の配列同一性を共有していることを意味する。いくつかの態様において、同一ではない残基の位置は、保存的なアミノ酸の置換により異なる。「保存的なアミノ酸の置換」とは、アミノ酸残基が、類似した化学特性（電荷または疎水性など）を有する側鎖（R基）を有する別のアミノ酸残基により置換されることである。概して、保存的なアミノ酸の置換は、タンパク質の機能特性を実質的に変化させない。2つまたは複数のアミノ酸配列が、保存的置換により互いに異なる場合、同一性のパーセントまたは程度は、置換の保存的な性質により修復するように上方調整されてもよい。この調整を行う方法は、当業者に周知である。例えば、P e a r s o n (1 9 9 4) M e t h o d s M o l . B i o l . 2 4 : 3 0 7 - 3 3 1を参照のこと。そしてこれは、本明細書に参照により組み込まれる。類似の化学特性の側鎖を有するアミノ酸基の例には、1) 脂肪族側鎖：グリシン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン、2) 脂肪族ヒドロキシル側鎖：セリン及びスレオニン、3) アミド含有側鎖：アスパラギン及びグルタミン、4) 芳香族側鎖：フェニルアラニン、チロシン及びトリプトファン、5) 塩基性側鎖：リジン、アルギニン及びヒスチジン、6) 酸性側鎖：アスパラギン酸及びグルタミン酸ならびに7) 硫黄含有側鎖：システインとメチオニンが含まれる。好ましい保存的なアミノ酸の置換基は、バリンーロイシンーイソロイシン、フェニルアラニンーチロシン、リジンーアルギニン、アラニンーバリン、グルタメートーアスパルテート及びアスパラギンーグルタミンである。その代わりに、保存的な置換は、G o n n e t e t a l . (1 9 9 2) S c i e n c e 2 5 6 : 1 4 4 3 4 5で開示されている、P A M 2 5 0対数尤度行列に正の値を有する任意の変化であり、参照により本明細書に組み込まれる。「適度に保存的な」置換とは、P A M 2 5 0対数尤度行列で負でない値を有する任意の変化である。

【0084】

ポリペプチドの配列同一性及び／または類似性は、典型的には、配列分析ソフトウェア

を用いて測定される。タンパク質分析ソフトウェアは、保存的なアミノ酸の置換を含む種々の置換、削除及びその他の修飾に割り当てられた類似性を測定する際に用いる、類似する配列をマッチングさせる。例えば、GCGソフトウェアはデフォルトのパラメータを用いられ得るGAP及びBESTFITなどのプログラムを含み、生命体の様々な種の相同的ポリペプチドなどの近縁種であるポリペプチドの間または、野生型タンパク質とその変異タンパク質の間の配列相同性または配列同一性を測定する。例えば、GCG Version 6.1を参照のこと。ポリペプチド配列は、デフォルトのまたは推奨のパラメータ、つまりGCG Version 6.1のプログラムでFASTAを用いても比較され得る。FASTA (FASTA2及びFASTA3など) は、クエリ配列と検索配列と間の最適なオーバーラップ領域のアラインメント及び配列同一性パーセントを提供する (Pearson (2000) 上記)。配列は、ギャップ開始ペナルティが12、ギャップ拡張ペナルティが2、BLOSUM行列が62のアフィンギャップ検索を用いてSmith-Waterman相同性検索アルゴリズムを用いて比較し得る。様々な生命体から得た大量の配列を含むデータベースと、本明細書に開示される配列を比較する場合、他の好ましいアルゴリズムは、デフォルトのパラメータを用いるコンピュータプログラムBLAST、特にBLASTPまたはTBLASTNである。例えば、Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410及び(1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402を参照のこと。この各内容は、参照により組み込まれる。

【0085】

本明細書では、1つまたは複数の置換（保存的な置換など）を有する本明細書で開示されたHCVR、LCVR及び／またはCDRアミノ酸配列のいずれかの変異体を含む抗Ty rD CARまたは抗GPC3CARを提供する。例えば、本開示は、本明細書で開示されたHCVR、LCVR及び／またはCDR（例えばHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2またはLCDR3）アミノ酸配列のいずれかと比較して、例えば、20以下、19以下、18以下、17以下、16以下、15以下、14以下、13以下、12以下、11以下、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、2以下または1のアミノ酸置換を備えたHCVR、LCVR及び／またはCDRアミノ酸配列を有する抗Ty rD CARを含む。例えば、抗Ty rD CARは、本明細書で開示されるHCVR、LCVR、及び／またはCDR（例えば、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2またはLCDR3）アミノ酸配列のいずれかと比べて、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1のアミノ酸置換（保存的なアミノ酸の置換など）を含み得る。

【0086】

同様に、本開示は、本明細書で開示されたHCVR、LCVR及び／またはCDR（例えばHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2またはLCDR3）アミノ酸配列のいずれかと比較して、例えば、20以下、19以下、18以下、17以下、16以下、15以下、14以下、13以下、12以下、11以下、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、2以下または1のアミノ酸置換を備えたHCVR、LCVR及び／またはCDRアミノ酸配列を有する抗GPC3CARを含む。例えば、抗GPC3CARは、本明細書で開示されるHCVR、LCVR、及び／またはCDR（例えば、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2またはLCDR3）アミノ酸配列のいずれかと比べて、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1のアミノ酸置換（保存的なアミノ酸の置換など）を含み得る。

【0087】

本明細書に記載の模範的な結合ドメインは、典型的には、アミノ末端からカルボキシ末端の順に、重鎖領域とそれに続く軽鎖領域（VH-VL）を含む。結合ドメインにおけるVH領域及びVL領域の特定の順序が明示的または暗黙的に説明されている場合、本開示

は、例えば、 $s c F V$ または $s c F v$ 結合ドメインを含むCARにおいてVH及びVL領域の順番が反転している代替の実施形態を記述しているようにも理解される。したがって、VH-VLの順序の説明は、例えば、 $s c F V$ または $s c F v$ 結合ドメインを含むCARにおける代替のVL-VHの順序も説明するものである。さらに、VL-VHの順序の説明は、例えば、 $s c F V$ または $s c F v$ 結合ドメインを含むCARにおける代替のVH-VLの順序も説明するものである。

【0088】

概して、本明細書に記載のCARをコードする核酸は、結合ドメインを膜貫通ドメインに連結させるペプチドリinkerをコードする細胞外リンカー部を含む。模範的なリンカー部分には、CD8 α ヒンジドメインをコードするリンカー部分、例えば、配列番号1 (PTPAPTIIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY) または配列番号2 (TTTTAPRP PTPAPTIIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY) が含まれるが、これらに限定されない。典型的には、ペプチドリinkerをコードする領域 (例えば、CD8 α ヒンジドメイン) は、結合ドメインをコードする領域の3'及び膜貫通ドメインをコードする領域の5'である。

【0089】

本明細書に記載のCARをコードする核酸は、膜貫通ドメインを含む。膜貫通ドメインは、細胞外抗原結合ドメイン、例えばヒンジを、1種または複数種の細胞内シグナル伝達成分に連結することが可能である。例えば、膜貫通ドメインは、抗原結合ドメイン、例えばヒンジを、CD3 ζ シグナル伝達ドメイン及び任意に1つまたは2つの共刺激エンドドメインと連結することが可能である。模範的な膜貫通ドメインには、CD8 α 膜貫通ドメイン、例えば、配列番号3 (IWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC) が含まれるが、これらに限定されない。典型的には、膜貫通ドメイン (例えば、CD8 α 膜貫通ドメイン) をコードする領域は、ペプチドリinker (例えば、CD8 α ヒンジドメイン) をコードする領域の3'であり、1つまたは複数の細胞質ドメインをコードする領域の5'である。

【0090】

いくつかの実施形態において、単離した核酸は、1種または複数種の細胞質ドメインを含む細胞質領域をコードする。細胞質領域をコードする領域は、典型的には、膜貫通ドメインをコードする領域の3'である。細胞質ドメインは、典型的には、 $\gamma \delta T$ 細胞増殖、細胞毒性活性及び／または炎症誘発性サイトカイン発現 (例えば、TNF- α またはIFN γ) の活性化シグナルを提供するシグナル伝達ドメインである。模範的な細胞質ドメインは、CD3 ζ シグナル伝達ドメインである。いくつかの実施形態において、CD3 ζ シグナル伝達ドメインは、配列番号4 (RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR) であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態において、CD3 ζ シグナル伝達ドメインは、配列番号5 (RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR) であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態において、細胞質領域は、例えば配列番号4及び5からそれぞれ独立して選択された、複数 (例えば、2、3、4、5、または6) のCD3 ζ シグナル伝達ドメインなどの複数 (例えば、2、3、4、5、または6) のシグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態において、細胞質領域は、複数 (例えば、2、3、4、5、または6) の非CD3 ζ シグナル伝達ドメイン及びCD3 ζ シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態において、細胞質領域は、非CD3 ζ シグナル伝達ドメイン及び複数の (例えば、2、3、4、5、または6) CD3 ζ シグナル伝達ドメインを含む。代用または追加のシグナル伝達ドメインが含まれるが、これに限定されない。

【0091】

細胞質領域は、1種または複数種の共刺激エンドドメインを含み得る。1種または複数種の共刺激エンドドメインをコードする領域は、シグナル伝達ドメインをコードする領域の5'または3'であり得る。いくつかの実施形態において、1種または複数種の共刺激エンドドメインをコードする領域は、シグナル伝達ドメインをコードする領域の5'であり得る。いくつかの実施形態において、1種または複数種の共刺激エンドドメインをコードする領域は、シグナル伝達ドメインの領域の5'であり、1種または複数種の共刺激エンドドメインをコードする付加的な領域は、シグナル伝達ドメインの3'である。模範的な共刺激エンドドメインには、CD28、CD137(4-1BB)、CD278(ICOS)、CD27、CD134(OX40)及びTLR2共刺激エンドドメインならびにそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

10

【0092】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の $\gamma\delta$ -T細胞の増殖、持続性及び／または細胞毒性活性を増加させるために、追加のシグナル伝達様式を含むことが可能である。例えば、いくつかの実施形態において、CARコンストラクトは、単離した核酸の3'末端で可溶性の一般的なガンマ鎖サイトカインをコードすることが可能である。一般的なガンマ鎖サイトカインコード領域は、T2Aリンカーコード領域を介してCARコンストラクトの5'部に連結することができ、その結果、一般的なガンマ鎖サイトカインは、CARポリペプチドから切断され、細胞によって分泌される。

【0093】

いくつかの実施形態において、コンストラクトは、少なくとも1種の4-1BB共刺激エンドドメインと、任意で、4-1BB、ICOS、CD28及びCD27共刺激エンドドメインから選択される第2の共刺激エンドドメインとをコードする。いくつかの実施形態において、コンストラクトは、少なくとも2種の4-1BB共刺激エンドドメインあるいは4-1BB、ICOS、CD28及びCD27から選択される1、2、3、もしくは4またはそれ以上の共刺激エンドドメインと組み合わせた2種の4-1BB共刺激エンドドメインをコードする。いくつかの実施形態において、4-1BB共刺激エンドドメインは、配列番号6(KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL)を含む。

20

【0094】

いくつかの実施形態において、コンストラクトは、1種のCD27共刺激エンドドメインと、任意で、4-1BB、ICOS、CD28及びCD27共刺激エンドドメインから選択される第2の共刺激エンドドメインとをコードする。いくつかの実施形態において、コンストラクトは、CD27共刺激エンドドメイン及び4-1BB共刺激エンドドメインをコードする。いくつかの実施形態において、コンストラクトは、2種のCD27共刺激エンドドメインをコードする。いくつかの実施形態において、CD27共刺激エンドドメインは、配列番号7(QRRKYRSNKGESPVPEAPCHYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP)を含む。

30

【0095】

いくつかの実施形態において、コンストラクトは、T細胞(CAR-T細胞など)の活性化、細胞毒性及び／または持続性を支持するサイトカインなどのC末端ポリペプチドの分泌を促進するように動作可能に連結された分泌シグナル、例えば、配列番号12(MALPVTAALLPLALLHAARP)をコードする。いくつかの実施形態において、分泌シグナルは、配列番号26(MRISKPHLRSISIQKYLCLLNSHFLTEAGIHVFILGCFSA GLPKTEA)の分泌シグナルである。いくつかの実施形態において、コンストラクトは、IL-15などの一般的なガンマ鎖サイトカインまたはその活性フラグメント、例えば、配列番号14(NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCCKVTAMKCFLLLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS)の分泌を促進するように動作可能に連結された、配列番号12などの分泌シグナルをコードする。sIL15をコードするコドン最

40

50

適化核酸配列を含む、他の I L - 1 5 配列は、W O 2 0 0 7 / 0 3 7 7 8 0 に開示されている。模範的な一般的なガンマ鎖サイトカインには、I L - 2 及び I L - 1 5 が含まれる。いくつかの実施形態において、一般的なガンマ鎖サイトカインは、I L - 2、I L - 7 及び I L - 1 5 から選択される。

【0096】

いくつかの実施形態において、コンストラクトは、1 種または複数種のマルチシストロン性リンカー領域を、例えば、シグナル伝達ドメイン及び／または共刺激エンドドメインと、サイトカインの分泌を促進するように動作可能に連結された分泌シグナルとの間でコードする。マルチシストロン性リンカー領域は、単一の転写産物からの複数の別個のポリペプチドの生成を容易にするポリペプチド配列または R N A 配列の領域である。いくつかの実施形態において、マルチシストロン性リンカー領域は、切断配列をコードする。好適な切断配列には、P 2 A、F 2 A、E 2 A、もしくは T 2 A 切断配列などの自己切断配列及び／またはフーリンなどの内因性プロテアーゼにより切断される配列が含まれる。

【0097】

いくつかの実施形態において、切断配列は P 2 A 切断配列である。いくつかの実施形態において、切断配列はフーリン切断配列である。いくつかの実施形態において、切断配列は P 2 A 及びフーリン切断配列である。いくつかの実施形態において、切断配列は配列番号 1 5 (S G S G A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P) の P 2 A 切断配列である。いくつかの実施形態において、切断配列は配列番号 1 6 (R A K R) のフーリン切断配列である。いくつかの実施形態において、切断配列は配列番号 1 7 (R A K R S G S G A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P) の P 2 A + フーリン切断配列である。いくつかの実施形態において、切断配列は配列番号 2 5 (G S G A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P) の P 2 A 切断配列である。

【0098】

いくつかの実施形態において、切断配列は配列番号 2 7 (A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P) の P 2 A 切断配列であるまたはその P 2 A 切断配列を含む。いくつかの実施形態において、切断配列は配列番号 2 8 (V K Q T L N N F D L L K L A G D V E S N P G P) の F 2 A 切断配列であるまたはその F 2 A 切断配列を含む。いくつかの実施形態において、切断配列は配列番号 2 9 (Q C T N Y A L L K L A G D V E S N P G P) の E 2 A 切断配列であるまたはその E 2 A 切断配列を含む。いくつかの実施形態において、切断配列は配列番号 3 0 (E G R S L L T C G D V E E N P G P) の T 2 A 切断配列であるまたはその T 2 A 切断配列を含む。ある態様において、複数の自己切断配列は、シグナル伝達及び／または共刺激ドメインのカルボキシ末端、ならびにコードされた分泌サイトカイン（例えば、I L - 1 5 などの一般的なガンマ鎖サイトカイン）のアミノ末端をコードされ得て、そこにおいて、複数の自己切断配列は、好ましくは P 2 A 切断配列、T 2 A 切断配列、E 2 A 切断配列及び F 2 A 切断配列からなる群から独立して選択される。ある態様において、1 種または複数種の自己切断配列と、内因性プロテアーゼにより切断された 1 種または複数種の配列は、本明細書に記載のコンストラクトでコードされる。特定の実施形態においては、内因性プロテアーゼ認識部位は、自己切断配列のアミノ末端にコードされる。

【0099】

いくつかの実施形態において、マルチシストロン性リンカー領域は、内部リボソーム侵入部位をコードする。模範的な内部リボソーム侵入部位は、配列番号 3 1 (C T A A C G T T A C T G G C C G A A G C C G C T T G G A A T A A G G C C G G T G T G C G T T T G T C T A T A T G T T A T T T T C C A C C A T A T T G C C G T C T T T T G G C A A T G T G A G G C C C G G A A A C C T G G C C C T G T C T T C T T G A C G A G C A T T C C T A G G G G T C T T T C C C C T C T C G C C A A A G G A A T G C A A G G T C T G T T G A A T G T C G T G A A G G A A G C A G T T C C T C T G G A A G C T T C T T G A A G A C A A A C A A C G T C T G T A G C G A C C C T T T G C A G G C A G C G G A A C C C C C C A C C T G G C G A C A G G T G C C T C T G C G G

CCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCA
CAACCCCAAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAA
GAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCT
GAAGGATGCCCAGAAGGTACCCCATTTGTATGGGATCTGAT
CTGGGGGCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTGTAGTCGA
GGTTAAAAAAACGTCTAGGCCCCCCCGAACACGGGGGACGT
GGTTTTCTTTGAAAAACACGATGATA)によりコードされる。

【0100】

別の模範的な内部リボソーム侵入部位は、配列番号32 (AGCAGGTTTCCCC
AACTGACACAAAACGTGCAACTTTGAAACTCCGCGCTGGTCT
TTCCAGGTCTAGAGGGGTAAACACTTTGTACTGCGTTTGGC
TCCACGCTCGATCCACTGGCGAGTGTTAGTAACAGCACTG
TTGCTTCGTAGCGGAGCATGACGGCCGTGGGAACCTCCTCC
TTGGTAACAAGGACCCACGGGGGCCAAAAGCCACGCCACACA
CGGGCCCGTTCATGTGTGCAACCCAGCACGGCGACTTTTAC
TGCGAAACCCACTTTAAAGTGACATTGAAACTGGTACCCA
CACACTGGTGACAGGCTAAGGATGCCCTTCAGGTACCCCG
AGGTAAACACGCGACACTCGGGATCTGAGAAGGGGACTGGG
GCTTCTATAAAAGCGCTCGGTTTAAAAAGCTTCTATGCCCT
GAATAGGTGACCGGAGGTGCGGCACCTTTCCTTTGCAATTA
CTGACCAC)によりコードされる。

【0101】

さらに好適な内部リボソーム侵入部位には、Nucleic Acids Res. 20
10 Jan; 38 (Database issue): D131-6. doi: 10.1
093/nar/gkp981 Epub 2009 Nov 16に記載されているもの
、iresite.orgに記載されているもの、WO2018/215787に記載さ
れているもの、GenBank accession No. KP019382.1に記載
されている配列及びGenBank accession No. LT727339.1に
記載されているIRESエレメントが含まれるがこれらに限定されず、これらの内容は、
あらゆる目的のために、その全体が特に、本明細書に記載の内部リボソーム侵入部位及び
その使用が参照により本明細書に組み込まれる。

【0102】

切断自己切断及びIRESエレメントなどの付加的マルチストロン性リンカー領域は
、US2018/0360992及びUS8865467に開示されている。

【0103】

いくつかの実施形態において、単離した核酸は、配列番号8 (MSVPTQVLGLL
LLWLTDARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDIHN
YIAWYQQKPKGKAPKLLIHYTSTLQPGVPSRFSGSGSGTDF
TFTISSSLQPEDIATYYCLQYDNLWTFGQGTKVEIKRGGGG
SGGGGSGGGGQITLKE SGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSL
TSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLT
ITKDTSKNQVVLTMNTMDPVDATYYCARKDYGSSSFYAMH
YWGQGT LVTVSSTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACR
PAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLY
CKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGG
CEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVL DK
RRGRDPEMGGKPKRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGM
KGERRRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR)、hD
11抗Ty rD結合ドメイン(抗Ty rD₃₆₉₋₃₇₇)、CD8αヒンジ及び膜貫通領
域、4-1BB共刺激エンドドメインならびにCD3ζシグナル伝達ドメインを含むhD

11-CD8-BBzポリペプチドをコードする。

【0104】

いくつかの実施形態において、抗Ty r D₃₆₉₋₃₇₇-CD8-BBzポリペプチドをコードする単離した核酸は、配列番号：9 (ATGTCCGTGCCTACCCAGGTGCTGGGCTGCTGCTGTGGCTGACCGACGCCAGATGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCACTGTAGGAGACAGAGTCAACCATCACTTGCAAGGCGAGTCAAGGACATTCAACAACCTATATAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCCACTATACATCCACTTTGCAACCAGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGAAAGTGGATCTGGGGACAGATTTTACTTTTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAACATATTACTGTCTACAGTATGATAATCTCTGGACGTTTCGGTCAAGGCACCAAGGTGGAAATCAAACGGGGTGGAGGTGGATCTGGAGGAGGAGGATCCGGGTGGAGGAGGTCAGATCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCCTACGCTGGTGAAACCCACACAGACCCCTCACGCTGACCTGCACCTTCTCTGGGTTCTCACTCAGCACTAGTGGAAATGGGTGTGTCTCTGGATCCGTCAGCCCCCAGGAAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCACACATTTATTGGGATGATGATAAGCGCTACAACCCATCTCTGAAGAGCAGGCTCACCATCACCAAGGACACCTCCAAAAACCAAGGTGGTCCTTACAATGACCAACATGGACCCCTGTGGACACAGCCACATATTACTGTGCACGAAAGGACTACGGTAGTAGCTTCTATGCTATGCACTACTGGGGTCAAGGAACCCCTAGTCAACGTGTCGAGTACCAACGACGCCAGCGCCGCGACCAACCAACACCGGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTTCGCCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGGCCGGGACTTGTGGGGTCCCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTTACTGCAAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTTCCAGAAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACCTGAGAGTGAAGTTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGGTACGATGTTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCCTGAGATGGGGGGAAGGCCGAGAGAAAGGAAGAACCCCTCAGGAAGGCCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGGCCTACA GTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGGCAAGGGGCACGATGGCCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA)の配列を含む。

【0105】

いくつかの実施形態において、単離した核酸は、CD8 α ヒンジ領域をコードするコドン最適化配列を含む。模範的なコドン最適化CD8 α ヒンジ領域核酸配列には、配列番号10 (ACCACCAACCCCTGCACCAAGGCCCCCGACTCCCGCGCCACCATCGCGTCACA GCCTCTTAGCCTGCGACCGGAAGCATGCAGACCAGCTGCCGGGGGGGGCCGTGCATACGAGAGGTTTGGACTTTCGCCCTGCGAT)が含まれるが、これに限定されない。いくつかの実施形態において、CD8 α ヒンジ領域は、以下の配列番号11 (ACCACGACGCCAGCG CCGCGACCAACCAACACCGGCGCCCCACCATCGC

10

20

30

40

50

GTCGCAGCCCCCTGTCCCTGCGCCCCAGAGGCGTGCCGGGCCA
GCGGCGGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGGCTGGACTTTCG
CCTGTGAT)によりコードされる。

【0106】

いくつかの実施形態において、単離した核酸は、配列番号18 (MSVPTQVLGL
LLWLTDARCDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDIH
NYIAWYQQKPGKAPKLLIHYTSTLQPGVPSRFSGSGSGTD
FTFTISSLQPEDIATYYCLQYDNLWTFGQGTKVEIKRGGG
GSGGGGSGGGGGQITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSL
STSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRSL
TITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARKDYGSSSFYAM
HYWGQGT LVTVSSTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC
RPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITL
YCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEEG
GCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE LNLGRREEYDVL D
KRRGRDPEMGGKPKRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIG
MKGERRRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRRAK
RSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMALPVTALLPLALLL
HAARPNWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSC
KVTAMKCFLLLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLS
SNGNVTESGCKECEEL E EKNIKEFLQS FVHIVQMFIN TS*
)、抗TyrD hD11 (抗TyrD₃₆₉₋₃₇₇) 結合ドメイン、CD8αヒンジ及
び膜貫通領域、4-1BB共刺激エンドドメイン、CD3ζシグナル伝達ドメイン、フ
ーリン-P2A切断配列ならびにIL-15ドメインに動作可能に連結された分泌シグ
ナルを含むhD11-CD8-BBz-sIL15ポリペプチドをコードする。

【0107】

いくつかの実施形態において、hD11-CD8-BBz-sIL15ポリペプチドを
コードする単離した核酸は、配列番号19 (ATGTCCGTGCCTACCCAG G
TGCTGGGCGCTGCTGCTGCTGTGGCTGACCGACGCCAGATG
CGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCA
TCTGTAGGAGACAGAGTCAACCATCACTTGCAAGGCGAGT C
AGGACATTCAACA ACTATATAGCTTGGTATCAGCAGAAACC
AGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCCACTATACATCCACT
TTGCAACCAGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGAAGTGGAT
CTGGGGACAGATTTTACTTTTCACCATCAGCAGCCTGCAGCC
TGAAGATATTGCAACATATTACTGTCTACAGTATGATAAT
CTCTGGACGTTTCGGTCAAGGCACCAAGGTGGAAATCAAAC
GGGGTGGAGGTGGATCTGGAGGAGGAGGATCCGGGTGGAGG
AGGTCAGATCACCTTGAAGGAGTCTGGTCTTACGCTGGTG
AAACCCACACAGACCCTCACGCTGACCTGCACCTTCTCTG
GGTTCTCACTCAGCACTAGTGGAAATGGGTGTGTCTCTGGAT
CCGTCAGCCCCCAGGAAAGGCCCTGGAGTGGCTTGCACAC
ATTTATTGGGATGATGATAAGCGCTACAACCCATCTCTGA
AGAGCAGGCTCACCATCACCAAGGACACCTCCAAAAACCA
GGTGGTCTTTACAATGACCAACATGGACCCTGTGGACACA
GCCACATATTACTGTGCACGAAAGGACTACGGTAGTAGCT
TCTATGCTATGCACTACTGGGGTCAAGGAACCCCTAGTCAC
CGTGTCGAGTACCACCAACCCTGCACCAAGGCCCCCGACT
CCCGCGCCCAACCATCGCGTCAACAGCCTCTTAGCCTGCGAC
CGGAAGCATGCAGACCAGCTGCCGGGGGGGGCCGTGCATAC

10

20

30

40

50

GAGAGGTTTGGACTTCGCCTGCGATATCTACATCTGGGGCG
CCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCCCTTCTCCTGTCACTGG
TTATCACCCCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCT
GTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACT
ACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAG
AAGAAGAAGGAGGATGTGAAGTGAAGTTTCAGCAG
GAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAG
CTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACG
ATGTTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGG
GGGAAGGCCGAGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCCTG
TACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCCTACA
GTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGG
GCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAG
GACACCTACGACGCCCTTACATGCAAGGCCCTGCCCCCTC
GCCGCGCGAAGCGATCAGGCGAGCGGGGCGACAAATTTTCAG
CCTTCTGAAACAAGCAGGCGACGTGGAAGAAAACCCCGGT
CCAATGGCCTTACCAGTGACCGCCCTTGCTCCTGCCGCTGG
CCTTGCTGCTCCACGCCCGCCAGGCCGAAGTGGGTGAATGT
AATAAGTGATTTGAAAAAAATTGAAGATCTTATTCAATCT
ATGCATATTGATGCTACTTTATATACGGAAAGTGATGTTTC
ACCCAGTTGCAAAGTAACAGCAATGAAGTGCTTTCTCTT
GGAGTTACAAGTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATGCAAGT
ATTCATGATACAGTAGAAAATCTGATCATCCTAGCAAACA
ACAGTTTGTCTTCTAATGGGAATGTAACAGAATCTGGATG
CAAAGAATGTGAGGAAGTGGAGGAAAAAATATTAAAGAA
TTTTTGCAGAGTTTTGTACATATTGTCCAATGTTTCATCA
ACACTTCTTGA) の配列を含む。

【0108】

いくつかの実施形態において、単離した核酸は、配列番号20 (MSVPTQVLGL
LLWLTDARCQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
DYEMHWVRQAPGQGLEWMGALDPKLTGTAYTSQKFKGRVTL
TADKSTSTAYMELSSLTSEDTAVYYCTRFYSYTYWGQGT
LTVVSSGGGGSGGGGGSGGGGGDVVMTQSPLSLPVTPGEPAS
ISCRSSQSLVHNSNRNTYLHWY LQKPGQSPQLLIYKVS
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQ
NTHVPPTFGQGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSL
RPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLS
LVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF
PEEEEGGC ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR
REEYDVLDRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMA
EAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ
ALPPR*)、GC33抗GPC3結合ドメイン、CD8 α ヒンジ
及び膜貫通領域、4-1BB共刺激エンドドメインなら
びにCD3 ζ シグナル伝達ドメインを含むポリペプチ
ドをコードする。

【0109】

いくつかの実施形態において、GC33-CD8-BB ζ ポリペプチドをコードする単
離した核酸は、配列番号21 (ATGTCCGTGCCTACCCAGG
TGCTGGGCCCTGCTGCTGCTGTGGCTGACCGACGCCAGAT
GCCCAAGTGCAGCTGGTCCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAAA
AGCCTGGCGCCAGCGTGAAAGGTGTCCTGCAAGGCCTCTGG
CTACACCTTCACCGACTACGAGATGCACTGGGTGCGGCAGG
CCCCCTGG

ACAGGGCCTGGAATGGATGGGCGCTCTGGACCCCAAGACC
GGCGACACCGCTTATAGCCAGAAGTTCAAGGGCAGAGTGA
CCCTGACAGCTGATAAGAGCACAAAGCACCGCCTACATGGA
ACTGAGCAGCCTGACCAGCGAGGACACCGCCGTGTACTAC
TGCACCAAGATTCTACAGCTACACCTACTGGGGCCAGGGGA
CCCTGGTGACAGTGTCTAGCGGTGGAGGTGGATCTGGAGG
AGGAGGATCCGGTGGAGGAGGTGATGTGGTGTATGACCCAG
AGCCCTCTGAGCCTGCCTGTGACCCCTGGAGAGCCTGCCA
GCATCAGCTGCAGAAGCAGCCAATCTCTGGTGCACAGCAA
CCGGAACACATACCTGCACTGGTACCTGCAGAAACCTGGC
CAGAGCCCCCAGCTGCTGATCTACAAGGTGTCCAACAGAT
TCAGCGGCGTGCCTGATAGATTTCAGCGGATCTGGCAGCGG
CACCGACTTCAACCCTGAAGATCTCTAGAGTGGAAAGCCGAG
GACGTGGGCGTGTACTACTGCAGCCAGAACACCCACGTGC
CCCCCACCTTCGGCCAGGGCACAAAGCTGGAAATCAAGAC
CACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCCAAC
ATCGCGTCGCAGCCCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCC
GGCCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGGCTGGA
CTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGG
ACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTT
ACTGCAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAA
ACAACCATTATTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAA
GATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAGGAG
GATGTGAACCTGAGAGTGAAGTTTCAGCAGGAGCGCAGACGC
CCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACAGCTCTATAACGAG
CTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTTGGACA
AGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGCA
GAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACCTG
CAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGA
TGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGGCAAGGGGACACGATGGCCT
TTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGAC
GCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA) の配列を含む。
【0110】

10

20

30

いくつかの実施形態において、単離した核酸は、配列番号22 (MSVPTQVLGL
LLWLTDARCQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT
DYEMHWVRQAPGQGLEWMGALDPKLTGTAYTSQKFKGRVTL
TADKSTSTAYMELSSLTSEDVAVYYCTRFYSYTYWGQGT
LVTSSSGGGSGGGGGSDVVMQTSPSLPVTPEPASIS
SCRSSQSLVHSNRNTYLHWYLLQKPGQSPQLLIYKVSNRFS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQNTHTVPP
TFGQGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP
AAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC
KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC
ELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDR
RGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMK
GERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPRGSGAT
NFSLLKQAGDVEENPGPMALPVTALLPLALLHAARPNW
VNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKC
FLLLELQVISLES GDASIHDTVENLIILANNSLSSNGNVTE
SGCKECEEELEEKNIKEFLQS FVHIVQMFINTS*)、GC33抗

40

50

G P C 3 結合ドメイン、C D 8 α ヒンジ及び膜貫通領域、4-1 B B 共刺激エンドドメイン、C D 3 ζ シグナル伝達ドメイン、フューリン及びP 2 A 切断領域ならびにI L 1 5 ドメインに動作可能に連結された分泌シグナルを含むポリペプチドをコードする。

【0111】

いくつかの実施形態において、G C 3 3 - C D 8 - B B z - s I L 1 5 ポリペプチドをコードする単離した核酸は、配列番号23 (A T G T C C G T G C C T A C C C A G G T G C T G G G C C T G C T G C T G T G G C T G A C C G A C G C C A G A T G C C A A G T G C A G C T G G T C C A G A G C G G C G C C G A G G T G A A A A A G C C T G G C G C C A G C G T G A A G G T G T C C T G C A A G G C C T C T G G C T A C A C C T T C A C C G A C T A C G A G A T G C A C T G G G T G C G G C A G G C C C C T G G A C A G G G C C T G G A A T G G A T G G G C G C T C T G G A C C C C A A G A C C G G C G A C A C C G C T T A T A G C C A G A A G T T C A A G G G C A G A G T G A C C C T G A C A G C T G A T A A G A G C A C A A G C A C C G C C T A C A T G G A A C T G A G C A G C C T G A C C A G C G A G G A C A C C G C C G T G T A C T A C T G C A C C A G A T T C T A C A G C T A C A C C T A C T G G G G C C A G G G G A C C C T G G T G A C A G T G T C T A G C G G T G G A G G T G G A T C T G G A G G A G G A G G A T C C G G T G G A G G A G G T G A T G T G G T G A T G A C C C A G A G C C C T C T G A G C C T G C C T G T G A C C C C T G G A G A G C C T G C C A G C A T C A G C T G C A G A A G C A G C C A A T C T C T G G T G C A C A G C A A C C G G A A C A C A T A C C T G C A C T G G T A C C T G C A G A A A C C T G G C C A G A G C C C C C A G C T G C T G A T C T A C A A G G T G T C C A A C A G A T T C A G C G G C G T G C C T G A T A G A T T C A G C G G A T C T G G C A G C G G C A C C G A C T T C A C C C T G A A G A T C T C T A G A G T G G A A G C C G A G G A C G T G G G C G T G T A C T A C T G C A G C C A G A A C A C C C A C G T G C C C C C A C C T T C G G C C A G G G C A C A A A G C T G G A A A T C A A G A C C A C G A C G C C A G C G C C G C G A C C A C C A A C A C C G G C G C C C A C C A T C G C G T C G C A G C C C C T G T C C C T G C G C C C A G A G G C G T G C C G G C C A G C G G C G G G G G G C G C A G T G C A C A C G A G G G G C T G G A C T T C G C C T G T G A T A T C T A C A T C T G G G C G C C C T T G G C C G G G A C T T G T G G G G T C C T T C T C C T G T C A C T G G T T A T C A C C C T T T A C T G C A A A C G G G G C A G A A A G A A A C T C C T G T A T A T A T T C A A A C A A C C A T T T A T G A G A C C A G T A C A A A C T A C T C A A G A G G A A G A T G G C T G T A G C T G C C G A T T T C C A G A A G A A G A A G A A G A G G A G G A T G T G A A C T G A G A G T G A A G T T C A G C A G G A G C G C A G A C G C C C C G C G T A C C A G C A G G G C C A G A A C C A G C T C T A T A A C G A G C T C A A T C T A G G A C G A A G A G A G G A G T A C G A T G T T T T G G A C A A G A G A C G T G G C C G G G A C C C T G A G A T G G G G G G A A A G C C G C A G A G A A G G A A G A A C C C T C A G G A A G G C C T G T A C A A T G A A C T G C A G A A A G A T A A G A T G G C G G A G G C C T A C A G T G A G A T T G G G A T G A A A G G C G A G C G C C G G A G G G G C A A G G G G C A C G A T G G C C T T T A C C A G G G T C T C A G T A C A G C C A C C A A G G A C A C C T A C G A C G C C C T T C A C A T G C A G G C C C T G C C C C C T C G C G G T A G C G G G G C T A C G A A C T T C T C C C T T C T T A A A C A A G C G G G A G A C G T G G A A G A A A A T C C C G G A C C T A T G G C C T T A C C A G T G A C C G C C T T G C T C C T G C C G C T G G C C T T G C T G C T C C A C G C C G C C A G G C C G A A C T G G G T G A A T G T A A T A A G T G A T T T G A A A A A A A T T G A A G A T C T T A T T C A A T C T A T G C A T A T T G A T G C T A C T T T A T A T A C G G A A A G T G A T G T T C A C C C C A G T T G C A A A G T A A C A G C A A T G A A G T G C T T T C T C T T G G A G T T A C A A G T T A T T T C A C T T G A G T C C G G A G A T G C A A G T A T T C A T G A T A C A G T A G A A A T C

10

20

30

40

50

TGATCATCCTAGCAAACAACAGTTTGTCTTCTAATGGGAA
TGTAACAGAATCTGGATGCAAAGAATGTGAGGAACTGGAG
GAAAAAAATATTAAAGAATTTTTTGCAGAGTTTTTGTACATA
TTGTCCAAATGTTTCATCAACAACCTTCTTGA)の配列を含む。

【0112】

いくつかの実施形態において、GC33-CD8-BBz-sIL15ポリペプチドを
コードする単離した核酸は、配列番号24(ATGTCCGTGCCTACCCAGGT
GCTGGGCTGCTGCTGCTGTGGCTGACCGACGCCAGATGC
CAAGTGCAGCTGGTCCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAAAAGC
CTGGCGCCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCTCTGGCTA
CACCTTCAACCGACTACGAGATGCACTGGGTGCGGCAGGCC
CCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCGCTCTGGACCCCA
AGACCGGCGACACCGCTTATAGCCAGAAGTTCAAGGGCAG
AGTGACCCCTGACAGCTGATAAGAGCACAAGCACCGCCTAC
ATGGAACCTGAGCAGCCTGACCAAGCGAGGACACCGCCGTGT
ACTACTGCACCAGATTCTACAGCTACACCTACTGGGGCCA
GGGGACCCCTGGTGACAGTGTCTAGCGGTGGAGGTGGATCT
GGAGGAGGAGGATCCGGTGGAGGAGGTGATGTGGTGATGA
CCCAGAGCCCTCTGAGCCTGCCTGTGACCCCTGGAGAGCC
TGCCAGCATCAGCTGCAGAAGCAGCCAATCTCTGGTGCAC
AGCAACCGGAACACATACCTGCACTGGTACCTGCAGAAAC
CTGGCCAGAGCCCCCAGCTGCTGATCTACAAGGTGTCCAA
CAGATTCAAGCGGCGTGCCCTGATAGATTCAAGCGGATCTGGC
AGCGGCACCGACTTCAACCTGAAGATCTCTAGAGTGGAAAG
CCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCAGCCAGAACACCCA
CGTGCCCCCACCCTTCGGCCAGGGCACAAAGCTGGAAATC
AAGACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGC
CCACCATCGCGTCGCAGCCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGC
GTGCCGGGCCAGCGGCGGGGGGGCGCAGTGACACGAGGGGG
CTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGGCCCTTGG
CCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCTCTGTCACTGGTTATCAC
CCTTTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATA
TTCAAACAACCATTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAG
AGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGA
AGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAAGTTCAGCAGGAGCGCA
GACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAAGCTCTATA
ACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTT
GGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCCTGAGATGGGGGGGAAAG
CCGCAGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATG
AACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGAT
TGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGACGAT
GGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCT
ACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCGGTAG
CGGGGCTACGAACCTTCTCCCTTCTTAAACAAGCGGGAGAC
GTGGAAGAAAAATCCCGGACCTATGGCCTTACCAGTGACCG
CCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAG
GCCGAACCTGGGTGAATGTGATCAGCGATCTGAAGAAGATC
GAGGATCTGATCCAGTCCATGCACATCGATGCCACCCCTGT
ATACCGAGAGCGATGTGCACCCAGCTGCAAGGTGACCGC
CATGAAGTGCTTTCTGCTGGAGCTGCAGGTGATCTCCCTG

10

20

30

40

50

G A G T C C G G A G A T G C C A G C A T C C A C G A T A C C G T G G A G A A T C
T G A T C A T C C T G G C C A A C A A C A G C C T G T C C T C C A A T G G C A A
T G T G A C C G A G T C G G G A T G C A A G G A G T G C G A G G A G C T G G A G
G A G A A G A A T A T C A A G G A G T T T C T G C A G A G C T T T G T A C A T A
T T G T C C A A A T G T T C A T C A A C A C T T C T T G A) の配列を含む。

【0113】

いくつかの実施形態において、単離した核酸は、直鎖状核酸である。いくつかの実施形態において、単離した核酸は、プラスミドベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ウイルスベクター、レトロウイルスベクター（ガンマレトロウイルスベクターなど）、またはレンチウイルスベクターなどのベクターである。いくつかの実施形態において、単離した核酸、または例えば、結合ドメイン膜貫通ドメイン及び1種または複数種のシグナル伝達及び／または共刺激エンドドメインを含む、単離した核酸の連続した一部は、宿主 $\gamma\delta$ T細胞などの宿主細胞のゲノムに組み込まれる。模範的な実施形態において、単離した核酸はレトロウイルスベクターである。

10

【0114】

$\gamma\delta$ T細胞：

本発明の態様は、本明細書に記載の単離した核酸を機能的に発現し、それにより $\gamma\delta$ T細胞の表面でCARを発現する $\gamma\delta$ T細胞を含む。

【0115】

本発明の態様は、腫瘍関連抗原（TAA）の細胞表面発現を示す固形腫瘍細胞に対して *in vitro* または *in vivo* の細胞毒性活性を有する $\gamma\delta$ T細胞を代用的または追加的に含み得る。場合によっては、細胞毒性活性は生来の活性である。場合によっては、細胞毒性は、固形腫瘍細胞の表面で発現するTAAに特異的に結合する結合ドメインを有するCARコンストラクトの存在に起因して、少なくとも部分的に、有意に（>約25%）、または完全にある。場合によっては、この $\gamma\delta$ T細胞において、 $\gamma\delta$ T細胞の固形腫瘍細胞傷害活性が、対照 $\gamma\delta$ T細胞における *in vitro* 及び／または *in vivo* の固形腫瘍細胞傷害活性の生来のレベルより大きいことを示す。場合によっては、対照 $\gamma\delta$ T細胞はCARコンストラクトを含まない。場合によっては、対照 $\gamma\delta$ T細胞は、本明細書に記載の結合ドメイン、本明細書に記載のヒンジ領域、本明細書に記載の膜貫通ドメイン、本明細書に記載のシグナル伝達ドメイン及び／または本明細書に記載の共刺激エンドドメインを欠くCARコンストラクトを含む。

20

30

【0116】

場合によっては、細胞毒性は、Ty r Dまたは、Ty r D₃₆₉₋₃₇₇などのTy r D内のエピトープに特異的に結合する結合ドメインを有するCARコンストラクトの存在に起因して、少なくとも部分的に、有意に（>約25%）、または完全にある。場合によっては、細胞毒性は、HLAに制限された（例えばクラスIのHLAに制限された）上で、Ty r D、またはTy r D₃₆₉₋₃₇₇などのTy r D内のエピトープに特異的に結合する結合ドメインを有するCARコンストラクトの存在に起因して、少なくとも部分的に、有意に（>約25%）、または完全にある。場合によっては、細胞毒性は、HLA-A2／Ty r D₃₆₉₋₃₇₇に特異的に結合する結合ドメインを有するCARコンストラクトの存在に起因して、少なくとも部分的に、有意に（>約25%）、または完全にある。場合によっては、 $\gamma\delta$ T細胞は、Ty r Dまたはそのペプチドフラグメントと特異的に結合する、本明細書に記載の単離した核酸によりコードされるCARを機能的に発現する。

40

【0117】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の $\gamma\delta$ T細胞は、HLAに制限された（例えば、HLAクラスIに制限された）細胞毒性を示し得る。他の実施形態においては、ほとんど（>50%）、実質的に全て（>90%）、または全ての細胞毒性活性は、HLAに制限（例えば、HLAクラスIに制限）されない。HLAに制限される細胞毒性活性は、HLA（例えば、HLAクラスI）（null）腫瘍細胞株に対する *in vitro* 細胞毒性を、HLA+（例えば、HLAクラスI+）腫瘍細胞株に対する *in vit*

50

r o細胞毒性と比較することにより評価することが可能である。いくつかの実施形態において、HLAに制限される細胞毒性活性は、T細胞受容体様結合ドメインの使用により、少なくとも部分的に、有意に(>25%)、または完全に提供される。結合ドメインのようなT細胞受容体は、MHC分子と複合体の中の細胞の表面に提示されたときに抗原を特異的に認識する結合ドメインである。T細胞受容体様結合ドメインは、例えば、WO2016/199141にさらに記載されている。

【0118】

本明細書に記載の $\gamma\delta$ T細胞は、強力及び／または持続的な固形腫瘍細胞傷害活性を示すことが可能である。場合によっては、固形腫瘍細胞傷害活性は、固形腫瘍細胞との最初の接触から少なくとも約6日から120日間、または少なくとも約6日から180日間持続する可能性がある。場合によっては、本明細書に記載の $\gamma\delta$ T細胞またはその子孫の固形腫瘍細胞傷害活性は、固形腫瘍細胞との最初の接触からまたは本明細書に記載の $\gamma\delta$ T細胞の投与から、少なくとも約6日から120日、または少なくとも約6日から180日間持続することが可能である。この持続的な固形腫瘍細胞傷害活性は、*in vitro*、*in vivo*、または*in vitro*と*in vivo*の両方で示され得る。

【0119】

本発明の態様は、腫瘍関連抗原(TAA)の細胞表面発現または過剰発現を示す細胞との接触に応じて増殖する $\gamma\delta$ T細胞を代用的または追加的に含み得る。腫瘍関連抗原(TAA)の細胞表面発現を示す細胞は、正常な内皮細胞などの正常な細胞であってもよい。腫瘍関連抗原(TAA)の細胞表面発現または過剰発現を示す細胞は、固形腫瘍細胞であってもよい。場合によっては、増殖は生来の活性である。場合によっては、増殖は、細胞の表面で発現するTAAに特異的に結合する結合ドメインを有するCARコンストラクトの存在に起因して、少なくとも部分的に、有意に(>約20%もしくは>約25%)、または完全にある。場合によっては、 $\gamma\delta$ T細胞は、対照 $\gamma\delta$ T細胞と比較して、*in vitro*及び／または*in vivo*のより高いレベルの増殖を示す。場合によっては、対照 $\gamma\delta$ T細胞はCARコンストラクトを含まない。場合によっては、対照 $\gamma\delta$ T細胞は、本明細書に記載の結合ドメイン、本明細書に記載のヒンジ領域、本明細書に記載の膜貫通ドメイン、本明細書に記載のシグナル伝達ドメイン及び／または本明細書に記載の共刺激エンドドメインを欠くCARコンストラクトを含む。

【0120】

場合によっては、増殖は、Ty r DまたはTy r D内のエピトープに特異的に結合する結合ドメインを有するCARコンストラクトの存在に起因して、少なくとも部分的に、有意に(>約20%もしくは>約25%)、または完全にある。場合によっては、Ty r Dの細胞表面発現を示す細胞との接触に応じて増殖を示す $\gamma\delta$ T細胞は、本明細書に記載の単離した核酸によりコードされるTy r D特異的CARを機能的に発現する。

【0121】

本明細書に記載の $\gamma\delta$ T細胞は、腫瘍関連抗原(TAA)の細胞表面発現または過剰発現を示す細胞を含む宿主生物において強力及び／または持続的な増殖を示すことが可能である。場合によっては、増殖は、腫瘍関連抗原(TAA)の細胞表面発現または過剰発現を示す細胞との最初の接触から、または $\gamma\delta$ T細胞の宿主生物への投与日から、少なくとも約6日から120日間、または少なくとも約6日から180日間持続し得る。場合によっては、腫瘍関連抗原(TAA)の細胞表面発現または過剰発現を示す細胞を含む宿主生物における、本明細書に記載の $\gamma\delta$ T細胞またはその子孫の増殖は、細胞との最初の接触から、または $\gamma\delta$ T細胞の宿主生物への最初の投与日から、少なくとも約6日から120日間、または少なくとも約6日から180日間持続し得る。場合によっては、宿主生物中の増殖は、Ty r DまたはTy r D内のエピトープに特異的に結合する結合ドメインを有するCARコンストラクトの存在に起因して、少なくとも部分的に、有意に(>約20%もしくは>約25%)、または完全にある。場合によっては、Ty r Dの細胞表面発現を示す細胞を含む宿主生物中の増殖を示す $\gamma\delta$ T細胞は、本明細書に記載の単離した核酸によりコードされるTy r D特異的CARを機能的に発現する。

【0122】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の $\gamma\delta$ T細胞は、細胞表面のTy r Dまたはそのペプチドフラグメントを発現または過剰発現する細胞との接触後に、腫瘍壊死因子アルファまたはインターフェロンガンマなどの炎症誘発性サイトカインを発現、または持続的に発現する。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の $\gamma\delta$ T細胞は、例えば、細胞表面のTy r Dまたはそのペプチドフラグメントを発現または過剰発現する細胞を含む宿主生物中などの、細胞表面のTy r Dまたはそのペプチドフラグメントを発現または過剰発現する細胞との接触後に、腫瘍壊死因子アルファまたはインターフェロンガンマなどの炎症誘発性サイトカインを発現、または持続的に発現する。

【0123】

いくつかの実施形態において、 $\gamma\delta$ T細胞または $\gamma\delta$ T細胞を含む医薬組成物は、同種異系宿主に導入されたときに、移植片対宿主応答を実質的に示さない、または示さない。いくつかの実施形態において、 $\gamma\delta$ T細胞または $\gamma\delta$ T細胞を含む医薬組成物は、同種異系宿主に導入されたときに、移植片対宿主応答を臨床的に受容可能なレベルで示す。いくつかの実施形態において、臨床的に受容可能なレベルとは、治療上有効な治療を達成するために $\gamma\delta$ T細胞治療の中止を必要としない移植片対宿主応答の量である。いくつかの実施形態において、移植片対宿主応答（GvHD）の臨床的に受容可能なレベルは、適用可能なIBMT R評価尺度により、グレードCよりも重症度が低い急性応答である。急性移植片対宿主反応の重症度は、皮膚、肝臓及び消化管の関与の程度を評価することで決定される。個々の臓器の病変のステージが組み合わされて、予後的意義を有する全体的なグレードが作製される。グレードI（A）GvHDは軽度の疾病、グレードII（B）GvHDは中等度、グレードIII（C）は重度、グレードIV（D）は生命を脅かすものと見なす。IBMT Rグレーディングシステムでは、急性GvHDの重症度を次のように定義している（Rowlings et al., Br J Haematol 1997; 97: 855）：

●グレードA－肝臓や胃腸の病変がなく、ステージ1の皮膚病変のみ（体の<25%の斑状丘疹状皮疹）

●グレードB－ステージ2の皮膚病変、ステージ1から2の腸または肝臓の病変

●グレードC－任意の臓器系のステージ3の病変（全身性紅皮症、ビリルビン $6.1\sim 15.0\text{mg/dL}$ 、下痢 $1500\sim 2000\text{mL/日}$ ）

●グレードD－任意の臓器系のステージ4の病変（水疱の形成を伴う全身性紅皮症、ビリルビン $>15\text{mg/dL}$ 、下痢 $>2000\text{mL/日}$ または疼痛またはイレウス）。

Schoemans et al., Bone Marrow Transplantation volume 53, pages 1401–1415 (2018) の表1及び表2も参照のこと。また、これは急性GvHDを評価及びグレーディングするための基準も開示している。

【0124】

いくつかの実施形態において、 $\gamma\delta$ T細胞、または $\gamma\delta$ T細胞を含む医薬組成物は、同種異系宿主に投与された、対照 $\alpha\beta$ T細胞または対照 $\alpha\beta$ T細胞を含む対照医薬組成物により示された移植片対宿主応答と比較して、同種異系宿主に導入された場合、移植片対宿主応答の減少または実質的な減少を示す。場合によっては、対照 $\alpha\beta$ T細胞は、同種異系の遺伝子操作していない対照 $\alpha\beta$ T細胞である。場合によっては、対照 $\alpha\beta$ T細胞は、CARを含まない、または参照 $\gamma\delta$ T細胞と同じCARを含まない。

【0125】

本明細書に記載の $\gamma\delta$ T細胞は、 $\delta 1$ 、 $\delta 2$ 、 $\delta 3$ もしくは $\delta 4$ $\gamma\delta$ T細胞、またはそれらの組み合わせであり得る。場合によっては、 $\gamma\delta$ T細胞は、ほとんど（ $>50\%$ ）、実質的に（ $>90\%$ ）、本質的に全て、または完全に $\delta 2$ - $\gamma\delta$ T細胞である。場合によっては、 $\gamma\delta$ T細胞は、ほとんど（ $>50\%$ ）、実質的に（ $>90\%$ ）、本質的に全て、または完全に $\delta 1$ $\gamma\delta$ T細胞である。

【0126】

10

20

30

40

50

$\gamma\delta$ T細胞は、同種異系または自己由来ドナーから入手可能である。 $\gamma\delta$ T細胞は、*ex vivo*で、部分的または完全に精製または精製されないかつ増幅され得る。*ex vivo*の増殖のための方法及び組成物には、WO 2017/197347に記載のものが含まれるが、これに限定されない。この増殖は、CARコンストラクトが $\gamma\delta$ T細胞（複数可）に導入される前もしくは後、または前後に実施され得る。

【0127】

本明細書に記載の $\gamma\delta$ T細胞は、養子細胞移植で用いるために、例えば、凍結保存して保存され得る。

【0128】

腫瘍細胞を阻害または殺傷する方法

固形腫瘍細胞に対して細胞毒性活性を有する、1種もしくは複数種の遺伝子操作していない $\gamma\delta$ T細胞集団、遺伝子操作した $\gamma\delta$ T細胞集団及び／またはそれらの混合物を、任意の順序でまたは同時に対象に投与し得る。同時に投与される場合、本発明の複数の遺伝子操作していない $\gamma\delta$ T細胞集団、遺伝子操作した $\gamma\delta$ T細胞集団及び／またはそれらの混合物は、静脈内注射などの単一の統一された形態で、または複数の静脈内注入、皮下注射または錠剤などの複数の形態で提供され得る。本発明の遺伝子操作していない $\gamma\delta$ T細胞集団、遺伝子操作された $\gamma\delta$ T細胞集団及び／またはそれらの混合物は、単一のパッケージまたは複数のパッケージと一緒にまたは別々に包装され得る。本発明の遺伝子操作していない $\gamma\delta$ T細胞集団、遺伝子操作された $\gamma\delta$ T細胞集団及び／またはそれらの混合物の1つまたはその全ては、複数の用量で与えられ得る。同時に投与されない場合、複数の投与間のタイミングは、約1週間、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、または約1年まで変化し得る。場合によっては、本発明の遺伝子操作していない濃縮された $\gamma\delta$ T細胞集団、遺伝子操作した濃縮された $\gamma\delta$ T細胞集団及び／またはそれらの混合物は、対象への投与後に*in vivo*で、対象の体内で増殖し得る。1種または複数種の遺伝子操作していない $\gamma\delta$ T細胞集団、1種または複数種の遺伝子操作した $\gamma\delta$ T細胞集団及び／またはそれらの混合物を凍結して、同じ細胞調製物での複数の処置をするための細胞を提供することが可能である。本開示の1種または複数種の遺伝子操作していない $\gamma\delta$ T細胞集団、1種または複数種の遺伝子操作した $\gamma\delta$ T細胞集団及び／またはそれらの混合物ならびにそれを含む医薬組成物は、キットとして包装され得る。キットは、遺伝子操作していない $\gamma\delta$ T細胞集団、遺伝子操作した $\gamma\delta$ T細胞集団及び／またはそれらの混合物ならびにそれを含む組成物の使用に関する指示（書面による指示など）を含み得る。

【0129】

場合によっては、固形癌を治療する方法は、遺伝子操作していない $\gamma\delta$ T細胞集団、遺伝子操作した $\gamma\delta$ T細胞集団及び／またはそれらの混合物の治療上有効な量を対象に投与することを含み、そこにおいて、投与することで、固形癌を治療する。いくつかの実施形態において、遺伝子操作していない $\gamma\delta$ T細胞集団、遺伝子操作した $\gamma\delta$ T細胞集団及び／またはそれらの混合物の治療上有効な量は、少なくとも約10秒、30秒、1分、10分、30分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、12時間、24時間、2日、3日、4日、5日、6日、1週間、2週間、3週間、1か月、2か月、3か月、4か月、5か月、6か月、または1年投与される。いくつかの実施形態において、遺伝子操作していない $\gamma\delta$ T細胞集団、遺伝子操作した $\gamma\delta$ T細胞集団及び／またはそれらの混合物の治療上有効な量は、少なくとも1週間投与される。いくつかの実施形態において、遺伝子操作していない $\gamma\delta$ T細胞集団、遺伝子操作した $\gamma\delta$ T細胞集団及び／またはそれらの混合物の治療上有効な量は、少なくとも2週間投与される。

【0130】

本明細書に記載の遺伝子操作していない $\gamma\delta$ T細胞集団、遺伝子操作した $\gamma\delta$ T細胞集団及び／またはそれらの混合物は、疾病もしくは症状の発生前、発生中もしくは発生後に投与することが可能であり、 $\gamma\delta$ T細胞集団を含む医薬組成物を投与するタイミングは変化し得る。例えば、 $\gamma\delta$ T細胞集団は、予防薬として用いることが可能であり、疾病もしくは症状が発生する可能性を低減するために、症状または疾病の傾向が見られる対象に連

10

20

30

40

50

続的に投与することが可能である。初回投与は、本明細書に記載の任意の製剤を用いる本明細書に記載の任意の経路によるなどの実用的な任意の経路を介して行われ得る。いくらかの実施例において、本開示の $\gamma\delta$ T細胞集団の投与は、静脈内投与である。 $\gamma\delta$ T細胞集団の1回または複数回の投与量は、固形癌の発症後、実行可能になり次第すぐと、例えば、約24時間から約48時間、約48時間から約1週間、約1週間から約2週間、約2週間から約1か月、約1か月から約3か月の免疫病を治療するために必要な時間の間投与され得る。いくつかの実施形態において、 $\gamma\delta$ T細胞集団の1回または複数回の投与量は、がんの発症後と、他の治療の前後とに何年も投与され得る。

【0131】

いくつかの実施形態において、 $\gamma\delta$ T細胞集団は、一般的なガンマ鎖サイトカイン（複数可）を上昇させる1つまたは複数の方法で同時にまたは連続して投与される。本明細書で使用される「一般的なガンマ鎖サイトカイン（複数可）を上昇させる1つまたは複数の方法」は、少なくとも1つの一般的なガンマ鎖サイトカインのレベルが対象において上昇するように、対象の生理的状态を変化させる方法または方法の組み合わせを指す。いくつかの実施形態において、この方法は、IL-2、IL-7及びIL-15からなる群から選択される1種以上の一般的なガンマ鎖サイトカイン（複数可）のレベルを上昇させ、好ましくは、そこにおいて、この方法は対象におけるIL-15のレベルを上昇させる。いくつかの実施形態において、この方法はリンパ球の枯渇化を含む。いくつかの実施形態において、この方法は、対象に1種または複数種の一般的なガンマ鎖サイトカイン（複数可）を投与することを含む。場合によっては、IL-2、IL-7及び／またはIL-15、好ましくはIL-15が投与される。いくつかの実施形態において、この方法は、投与された $\gamma\delta$ T細胞などから、一般的なガンマ鎖サイトカイン（複数可）を分泌することを含む。場合によっては、IL-2、IL-7及び／またはIL-15、好ましくはIL-15が分泌される。

【0132】

いくつかの実施形態において、一般的なガンマ鎖サイトカイン（複数可）を上昇させる1つまたは複数の投与方法は、 $\gamma\delta$ T細胞（複数可）を導入する前のリンパ球の枯渇化を含む。いくつかの実施形態において、一般的なガンマ鎖サイトカイン（複数可）を上昇させる1つまたは複数の投与方法は、 $\gamma\delta$ T細胞（複数可）の導入と同時に、または一般的なガンマ鎖サイトカイン（複数可）の有効量を連続して投与することで、その導入した $\gamma\delta$ T細胞（複数可）の増殖、細胞毒性活性、持続性、またはその組み合わせを増大させることを含み、好ましくは、そこにおいてこの方法は、IL-2またはその1種もしくは複数種のみメティックを投与することを含み、より好ましくは、そこにおいてこの方法は、IL-15またはその1種もしくは複数種のみメティックを投与することを含む。一般的なガンマ鎖サイトカイン（複数可）の投与量は、 $\gamma\delta$ T細胞（複数可）を導入する前及び／または導入後に、導入した $\gamma\delta$ T細胞（複数可）の増殖、細胞毒性活性、持続性、またはその組み合わせを増大し得る。IL-15の模範的な量には、24時間ごとに0.01~10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ / 用量の間が含まれるがこれに限定されない。IL-2の模範的な量には、8~48時間ごとに約 3×10^6 と約 2.2×10^6 ユニットが含まれるが、これらに限定されない。例えば、RCCでのIL2の投薬計画は、最大14回の投与で15分間にわたって注入される600,000国際単位/ kg (0.037 mg/kg) 静注、8時間おきである。

【0133】

いくつかの実施形態において、一般的なガンマ鎖サイトカイン（複数可）を上昇させる1つまたは複数の投与方法は、 $\gamma\delta$ T細胞（複数可）の投与前と、 $\gamma\delta$ T細胞（複数可）の導入との同時の投与前と、またはその導入した $\gamma\delta$ T細胞（複数可）の増殖、細胞毒性活性、持続性、またはそれらの組み合わせを増大させるために有効な一般的なガンマ鎖サイトカイン（複数可）の連続した投与前とのリンパ球の枯渇化を含む。

【実施例】

【0134】

実施例 1

1 x 10⁶ / mL のヒト PBMC を、24 ウェルプレート (Costar) に、IL-2 (100 U / mL) 存在下で 5 日間、プレコートした抗 Vδ1 抗体 D1-08 または D1-35 でプレコートし、改変した培養培地で活性化させた。5 日目に、細胞培養物を、レトロネクチンの存在下で抗 TyrD キメラ抗原受容体 (配列番号 8) をコードする γ-レトロウイルスコンストラクトで形質導入させた。6 日目に、細胞を改変した培養培地に戻し、必要に応じてフィーディング及び IL-2 の補充によりさらに増殖させた。17、18、または 19 日目に細胞を回収し、AutoMACS (登録商標) キット (Miltenyi Biotec) を用いて、残存する αβ T 細胞を枯渇させた。γδ 細胞集団の純度と形質導入効率を、FACS により評価した。並行して、形質導入していない細胞培養物を、レトロウイルスの上清を添加することなく、同じ方法で増殖させた。図 2 に示す通り、形質導入していない増殖 Vδ1 細胞は、チロシナーゼを発現し、Tyr369-377 ペプチドを提示することが知られている、526 及び WM266.1-Luc 黒色腫細胞株に対してある程度の細胞毒性を誘発した。この細胞毒性は、抗 TyrD CAR の導入によって増強された。細胞毒性は、示した E / T 比で 18 時間共培養した後に、発光基質 D-ルシフェリン (Perkin Elmer) を添加後、96 ウェルプレートで全発光測定により測定した。

【0135】

実施例 2

WM266.4-Luc 細胞 (動物あたり 4 x 10⁶) を NSG マウス (Jackson Labs) に皮下移植した。腫瘍が 100 ~ 200 mm³ のサイズに達したら、動物を 6 x 10⁶ の抗 TyrD CAR + Vδ1 細胞で治療した。動物には、試験が終わるまで週に 3 回、IL-2 (60000 U / 用量) を同時に投与した。結果を図 3 に示す。図 3 に示す通り、抗 TyrD CAR + Vδ1 細胞を投与された動物は、腫瘍量の強力な制御を示した。

【0136】

実施例 3

Tyr CAR コンストラクトを上述の通りに Vδ1 T 細胞に導入して、細胞を増殖させ、WM266.4-Luc 細胞に対する細胞毒性アッセイで試験した。対照、非 TyrD 標的 CAR コンストラクトを対照として用いた。結果は図 5 に示すが、抗 TyrD CAR コンストラクトによってもたらされる細胞毒性が増大している。

【0137】

実施例 4

IL-2 (100 U / mL) 存在下で 5 日間抗 Vδ1 抗体 D1-08 または D1-35 でプレコートした 24 ウェルプレート (Costar) で、成長培地中の 1 x 10⁶ / mL のヒト PBMC を活性化させた。5 日目に、細胞培養物は、レトロネクチンの存在下で、抗 GPC3 キメラ抗原受容体 (配列番号 20 (GC33CAR) または配列番号 22 (GC33CAR + sIL15 及び GC33CAR + CO sIL15)) をコードする γ-レトロウイルスコンストラクトで形質導入させた。GC33CAR は、配列番号 21 の核酸配列によってコードされる。GC33CAR + sIL15 は、配列番号 23 の核酸配列によってコードされ、GC33CAR + CO sIL15 は、コドン最適化された sIL15 コード領域を含み、配列番号 24 の核酸配列によってコードされる。6 日目に、細胞を成長培地に戻し、必要に応じてフィーディング及び IL-2 の補充によりさらに増殖させた。17、18、または 19 日目に細胞を回収し、AutoMACS (登録商標) キット (Miltenyi Biotec) を用いて、残存する αβ T 細胞を枯渇させた。γδ 細胞集団の純度と形質導入効率を、FACS により評価した (図 6)。手短に言えば、CAR-T 細胞は、1 μg / mL の可溶性遺伝子組換えビオチン化 GPC3 (R&D Systems) で細胞をインキュベートすることにより染色した。結合の検出は、ストレプトアビジン-PE を製造元が推奨する 1 : 500 の希釈率で用いて実施した。

【0138】

並行して、形質導入していない細胞培養物を、レトロウイルスの上清を添加することなく、同じ方法で増殖させた。増殖した細胞を、GPC3陽性（HepG2、Hep3B、PLC/PRF/5）の*in vitro*細胞毒性アッセイで試験した。図7に示す通り、形質導入していない増殖Vδ1細胞は、GPC3を発現することが知られている、肝臓癌に対してある程度の細胞毒性を誘発する。この細胞毒性は、タンデムに発現するように遺伝子操作したsIL15サイトカインの有無にかかわらず、GPC3CARの導入によって強化される。細胞毒性は、示したE/T比で18時間共培養した後に、発光基質D-ルシフェリン（Perkin Elmer）を添加後、96ウェルプレートで全発光測定により測定した。

【0139】

前述は本発明の原理を単に例示したものに過ぎない。当業者であれば、本明細書では明示的に説明または図示していないが、本発明の原理を具体化し、その趣旨及び範囲内に含まれる様々な構成を考案することが可能であろうことが理解されよう。さらに、本明細書中に列挙した全ての実施例及び条件付き言語は、主に、本発明の原理及び本技術を促進するために本発明者らが寄与する概念への読者の理解を支援することを意図したものであり、そのような具体的に列挙した実施例及び条件に限定されるものではないと解釈すべきである。さらに、本発明の原理、態様及びそれらの特定の実施例を列挙する本明細書中の全ての記述は、その構造的等価物と機能的等価物の両方を包含することを意図している。さらに、そのような均等物は、現在公知の等価物及び将来開発される等価物の両方、すなわち構造にかかわらず同じ機能を発揮するように開発された任意の要素を含むことが意図されている。したがって、本発明の範囲は、本明細書に示し、記載した模範的な態様に限定されることを意図されてはいない。むしろ、本発明の範囲及び趣旨は、添付の特許請求の範囲により具体化される。

10

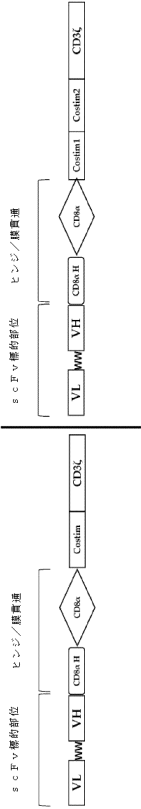
20

30

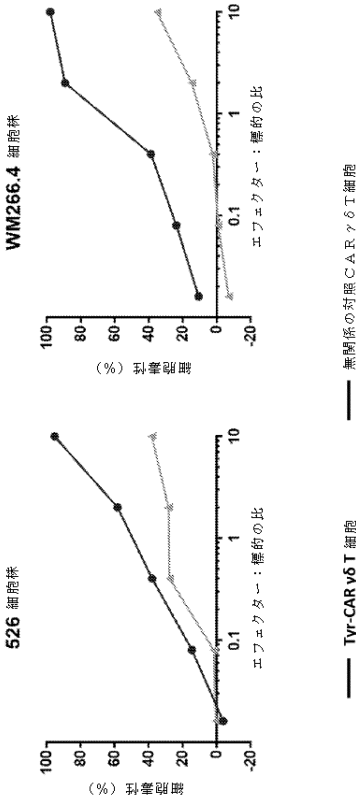
40

50

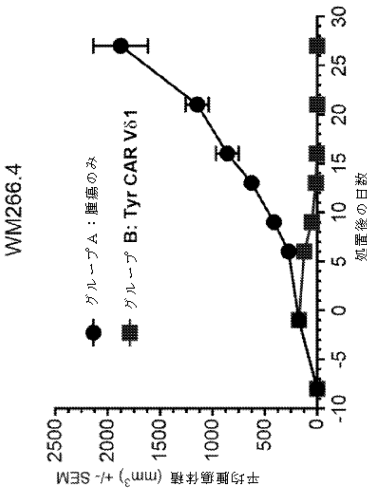
【図面】
【図 1】



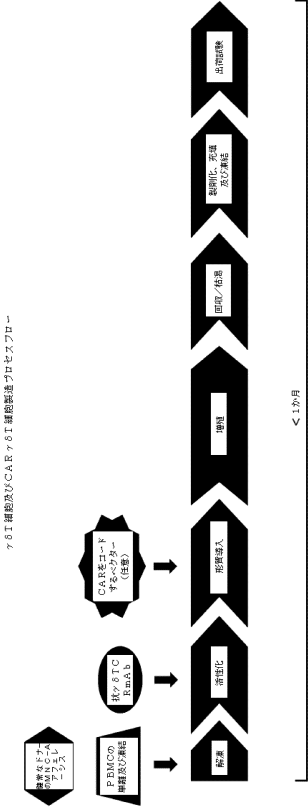
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

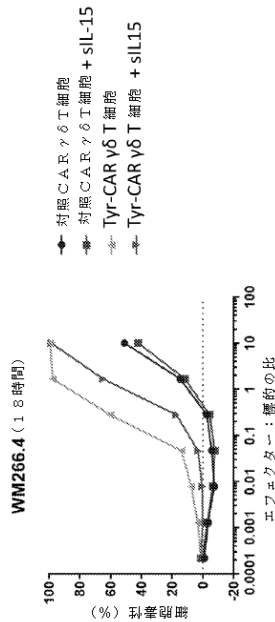
20

30

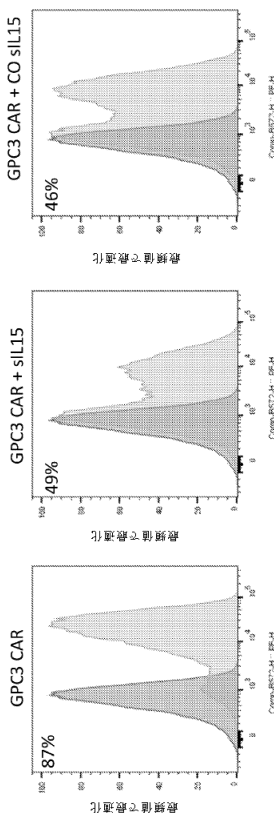
40

50

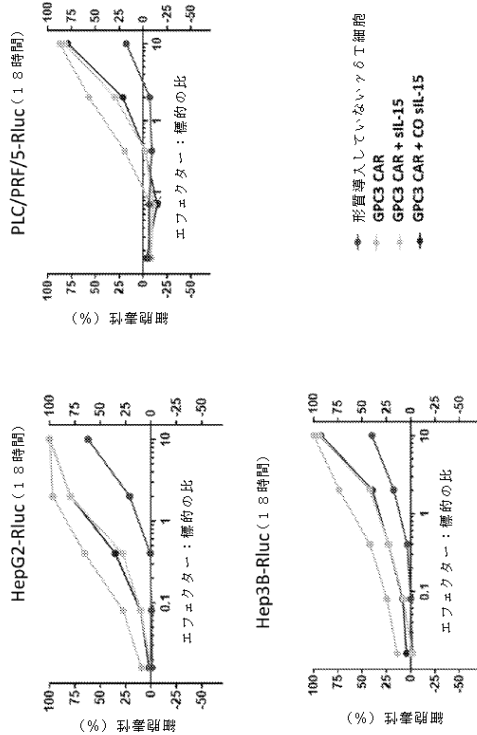
【図 5】



【図 6】



【図 7】



10

20

30

40

50

【配列表】
0007679298000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	38/20 (2006.01)	A 6 1 K	38/20	
A 6 1 K	39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00	H
A 6 1 K	35/17 (2025.01)	A 6 1 K	35/17	
C 1 2 N	5/0783(2010.01)	C 1 2 N	5/0783	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	
C 0 7 K	16/30 (2006.01)	C 0 7 K	16/30	
C 0 7 K	14/705 (2006.01)	C 0 7 K	14/705	

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 2 5, メンロー パーク, コンスティテューション ド
ライブ 2 0 0, シー/オー アディセット バイオ, インコーポレイテッド

(72)発明者 ロメロ, ジェーソン マイケル

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 2 5, メンロー パーク, コンスティテューション ド
ライブ 2 0 0, シー/オー アディセット バイオ, インコーポレイテッド

(72)発明者 ジン, イフォン フランク

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 2 5, メンロー パーク, コンスティテューション ド
ライブ 2 0 0, シー/オー アディセット バイオ, インコーポレイテッド

(72)発明者 アン, ジリ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 2 5, メンロー パーク, コンスティテューション ド
ライブ 2 0 0, シー/オー アディセット バイオ, インコーポレイテッド

(72)発明者 ヤコボヴィッツ, アヤ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 2 5, メンロー パーク, コンスティテューション ド
ライブ 2 0 0, シー/オー アディセット バイオ, インコーポレイテッド

審査官 野村 英雄

(56)参考文献 中国特許出願公開第1 0 8 5 8 8 0 2 3 (C N, A)

国際公開第2 0 1 8 / 1 3 8 5 2 2 (W O, A 1)

特表2 0 1 8 - 5 2 7 8 8 4 (J P, A)

国際公開第2 0 1 7 / 1 4 7 3 8 3 (W O, A 1)

国際公開第2 0 1 8 / 1 3 1 5 8 6 (W O, A 1)

国際公開第2 0 1 8 / 0 1 9 7 7 2 (W O, A 1)

特表2 0 1 8 - 5 2 7 0 0 8 (J P, A)

特表2 0 1 8 - 5 1 2 1 6 1 (J P, A)

特表2 0 1 8 - 5 1 4 2 0 4 (J P, A)

国際公開第2 0 1 7 / 1 9 7 3 4 7 (W O, A 1)

国際公開第2 0 1 8 / 1 4 7 8 0 5 (W O, A 1)

米国特許出願公開第2 0 1 8 / 0 2 0 0 2 9 9 (U S, A 1)

米国特許出願公開第2 0 1 8 / 0 1 2 5 8 8 9 (U S, A 1)

米国特許出願公開第2 0 1 4 / 0 3 2 2 2 1 6 (U S, A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B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 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0

C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

P u b M e d