

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-520106

(P2022-520106A)

(43)公表日 令和4年3月28日(2022.3.28)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 B 0 6 3
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	Z N A 4 B 0 6 4
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z 4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z 4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全107頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2021-547416(P2021-547416)	(71)出願人	504043048
(86)(22)出願日	令和2年2月14日(2020.2.14)		ユニバーシティ オブ サザン カリフォルニア
(85)翻訳文提出日	令和3年10月6日(2021.10.6)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 0 0
(86)国際出願番号	PCT/US2020/018441		1 5 , ロサンゼルス, サウス オリーブ
(87)国際公開番号	WO2020/168298		ストリート 1 1 5 0 , スイート 2 3
(87)国際公開日	令和2年8月20日(2020.8.20)		0 0
(31)優先権主張番号	62/806,632	(74)代理人	100078282
(32)優先日	平成31年2月15日(2019.2.15)		弁理士 山本 秀策
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100113413
(31)優先権主張番号	62/815,961		弁理士 森下 夏樹
(32)優先日	平成31年3月8日(2019.3.8)	(74)代理人	100181674
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 飯田 貴敏
(31)優先権主張番号	62/924,151	(74)代理人	100181641
	最終頁に続く		弁理士 石川 大輔
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 L Y M-1 および L Y M-2 抗体組成物ならびに改善された C A R 構築物

(57)【要約】

本明細書において、新規抗体およびこれらの抗体の抗原結合ドメインを含むキメラ抗原受容体 (C A R) 細胞を提供する。同様に、それら、抗体および C A R をコードするベクターまたはプラスミドを含む組成物、ならびにそれらを産生する方法、またはそれらを使用してがんを検出もしくは処置するための方法、ならびに前記方法を実行するためのキットも提供する。一態様では、本開示は、配列番号 2 もしくは 6 のいずれか 1 つのアミノ酸配列またはその各々の均等物を含む重鎖 (H C) 免疫グロブリン可変ドメイン配列; および/あるいは配列番号 4 もしくは 8 のいずれか 1 つのアミノ酸配列またはその各々の均等物を含む軽鎖 (L C) 免疫グロブリン可変ドメイン配列を含む、またはそれから本質的になる、またははなおさらにそれからなる抗体を提供する。

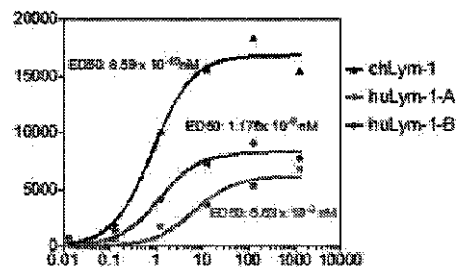


FIG. 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

(i) 配列番号 2 もしくは 6 のいずれか 1 つのアミノ酸配列またはその各々の均等物を含む重鎖 (H C) 免疫グロブリン可変ドメイン配列; および / あるいは

(i i) 配列番号 4 もしくは 8 のいずれか 1 つのアミノ酸配列またはその各々の均等物を含む軽鎖 (L C) 免疫グロブリン可変ドメイン配列を含む抗体。

【請求項 2】

前記重鎖 (H C) 免疫グロブリン可変ドメイン配列が配列番号 2 のアミノ酸配列を含み、前記軽鎖 (L C) 免疫グロブリン可変ドメイン配列が配列番号 4 のアミノ酸配列またはその各々の均等物を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

前記重鎖 (H C) 免疫グロブリン可変ドメイン配列が配列番号 2 のアミノ酸配列を含み、前記軽鎖 (L C) 免疫グロブリン可変ドメイン配列が配列番号 8 のアミノ酸配列またはその各々の均等物を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 4】

前記重鎖 (H C) 免疫グロブリン可変ドメイン配列が配列番号 6 のアミノ酸配列を含み、前記軽鎖 (L C) 免疫グロブリン可変ドメイン配列が配列番号 4 のアミノ酸配列またはその各々の均等物を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 5】

前記重鎖 (H C) 免疫グロブリン可変ドメイン配列が配列番号 6 のアミノ酸配列を含み、前記軽鎖 (L C) 免疫グロブリン可変ドメイン配列が配列番号 8 のアミノ酸配列またはその各々の均等物を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 6】

(i) 配列番号 10 のアミノ酸配列もしくはその均等物を含む重鎖 (H C) 免疫グロブリン可変ドメイン配列; および / または

(i i) 配列番号 12 のアミノ酸配列もしくはその均等物を含む軽鎖 (L C) 免疫グロブリン可変ドメイン配列を含む抗体。

【請求項 7】

請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗体の抗原結合性断片。

【請求項 8】

配列番号 2、4、6、8、10、もしくは 12 のいずれか 1 つのアミノ酸配列、またはその各々の均等物を含むポリペプチド。

【請求項 9】

(a) 請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗体の抗原結合ドメイン、(b) ヒンジドメイン、(c) 膜貫通ドメイン、および (d) 細胞内シグナル伝達ドメインまたは D A P ドメインを含むキメラ抗原受容体 (C A R)。

【請求項 10】

1 つまたは複数の共刺激シグナル伝達領域をさらに含む、請求項 9 に記載の C A R。

【請求項 11】

前記 D A P ドメインが D A P 10 および / または D A P 12 である、請求項 9 または 10 に記載の C A R。

【請求項 12】

前記 H C および L C 可変ドメインの後に挿入されたペプチド A V P P Q Q W A L S をさらに含む、請求項 9 から 11 のいずれか一項に記載の C A R。

【請求項 13】

本明細書に開示される配列のいずれか 1 つまたはその各々の均等物から選択される配列を含み、必要に応じてプロモーターおよび / またはエンハンサーエレメントに動作可能に連結されている、単離された核酸配列。

10

20

30

40

50

【請求項 14】

請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 7 に記載の抗原結合性断片、請求項 8 に記載のポリペプチド、または請求項 9 から 12 のいずれか一項に記載の C A R をコードする単離された核酸配列。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の単離された核酸配列を含むベクター。

【請求項 16】

請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 7 に記載の抗原結合性断片、請求項 8 に記載のポリペプチド、請求項 9 から 12 のいずれか一項に記載の C A R、請求項 13 もしくは 14 に記載の単離された核酸、および／または請求項 15 に記載のベクターを含む単離された細胞。

10

【請求項 17】

免疫細胞である、請求項 16 に記載の単離された細胞。

【請求項 18】

前記免疫細胞が T 細胞またはナチュラルキラー（N K）細胞である、請求項 17 に記載の単離された細胞。

【請求項 19】

担体と、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 7 に記載の抗原結合性断片、請求項 8 に記載のポリペプチド、請求項 9 から 12 のいずれか一項に記載の C A R、請求項 13 もしくは 14 に記載の単離された核酸、請求項 15 に記載のベクター、および／または請求項 16 から 18 のいずれか一項に記載の単離された細胞のうちの 1 つまたは複数とを含む組成物。

20

【請求項 20】

C A R 発現細胞を産生する方法であって、

（i）請求項 9 から 12 のいずれか一項に記載の C A R をコードする核酸配列を、免疫細胞集団に導入するステップ、および

（i i）ステップ（i）の前記核酸配列による形質導入が成功しており、それによって C A R 発現細胞を産生する免疫細胞の亜集団を選択するステップを含む方法。

30

【請求項 21】

前記免疫細胞が T 細胞または N K 細胞である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記免疫細胞集団が、内因性の免疫細胞受容体の発現を低減または削除するように改変されている、請求項 20 または 21 に記載の方法。

【請求項 23】

それを必要とする対象における腫瘍の成長を阻害する、および／またはがんを処置する、および／またはがんの再発を防止する方法であって、有効量の、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 7 に記載の抗原結合ドメイン、請求項 8 に記載のポリペプチド、または請求項 9 から 12 のいずれか一項に記載の C A R を前記対象に投与するステップを含む方法。

40

【請求項 24】

1 つまたは複数の抗がん治療薬、チェックポイント阻害剤、制御性 T 細胞（T r e g）、骨髓由来サプレッサー細胞（M D S C）、フルオロウラシル（5 - F U）、ヒストンデアセチラーゼ（H D A C）阻害剤、I L - 12 処置、C p G（T L R 9 アゴニスト）、および／またはインターフェロン遺伝子刺激因子（S T I N G）経路アゴニストを投与するステップをさらに含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

腫瘍またはがん細胞が、L y m 1 および／もしくは L y m 2、または C D 19 を発現または過剰発現する、請求項 23 または 24 に記載の方法。

【請求項 26】

50

がん細胞またはがん幹細胞の増殖を阻害する方法であって、前記細胞に、有効量の、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 7 に記載の抗原結合ドメイン、請求項 8 に記載のポリペプチド、または請求項 9 から 12 のいずれか一項に記載の C A R を接触させるステップを含む方法。

【請求項 27】

対象が治療に応答する可能性があるか応答する可能性がないかを決定する方法であって、患者から単離された試料に、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗体、または請求項 7 に記載の抗原結合性断片、請求項 8 に記載のポリペプチドを接触させるステップを含み、前記抗体、抗原結合性断片、またはポリペプチドとの間に複合体が存在すれば、前記対象が前記治療に応答する可能性があることを示し、複合体が存在しなければ、前記対象が前記治療に応答する可能性がないことを示す、方法。

10

【請求項 28】

対象における治療をモニタリングする方法であって、前記対象から単離した試料に、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 7 に記載の抗原結合性断片、または請求項 8 に記載のポリペプチドのうちの 1 つまたは複数を接触させるステップ、および前記試料中の複合体を検出するステップを含む方法。

【請求項 29】

請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 7 に記載の抗原結合性断片、請求項 8 に記載のポリペプチド、または請求項 9 から 12 のいずれか 1 つに記載の C A R のうちの 1 つまたは複数と、使用説明書とを含むキット。

20

【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、米国特許法第 119 条 (e) の下で、2019 年 2 月 15 日、2019 年 3 月 8 日、および 2019 年 10 月 21 日にそれぞれ提出された米国仮特許出願第 62/806,632 号、第 62/815,961 号、および第 62/924,151 号の優先権を主張し、これら各々の全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本開示は、一般に、ヒト免疫学の分野、詳細にはがん免疫療法に関する。

30

【背景技術】

【0003】

背景技術に関する以下の考察は、単に読者が本開示を理解するのに助けるために提供されており、本開示に対する先行技術を記載または構成すると認めるものではない。本開示を通して、様々な刊行物がアラビア数字によって参照されており、その完全な文献引用は、特許請求の範囲の直前に見出される。これらの参考文献、ならびに本明細書において参照した技術文献および特許文献は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0004】

L y m-1 および L y m-2 は、ヒト B 細胞、樹状細胞、ならびに B 細胞由来リンパ腫および白血病の表面上に主に発現されることが公知である M H C クラス I I H L A-D R 分子に対するものである。

40

マウスモノクローナル抗体 L y m-1 および L y m-2 (Epstein AL, et al., 1987, Cancer Res. 47: 830-840) は当初、大部分のヒト B 細胞悪性疾患の細胞表面上に発現される H L A-D r 抗原を標的とするように開発された。(Rose et al., 1996, Cancer Immunol Immunother 43(1): 26-30) は後に、ヒト H L A-D r の軽鎖上の不連続な部位である L y m-1 結合エピトープを同定した。L y m-2 は、L y m-1 とは競合せず、したがって H L A-D r 抗原上の異なるエピトープに結合する。L y m-1 は、ヒトにおいてびまん性大細胞型リンパ腫の処置のための I-131 放射標識医薬品およびネイキッド抗体として試験されており、有効かつ安全であることが見出されている (DeNardo SJ et al., 1988, Antibody, Immunoconjugate

50

s, and Radiopharmaceuticals 1:17-33; DeNardo, S.J. et al., 1988, Int. J. Cancer 3:96-101; および Hu E. et al., 1989, Hematologic Oncology 7:155-166)。CD19 および CD20 などの他の B 細胞抗原に対する抗体とは異なり、Lym-1 は、ヒトリンパ腫細胞の表面上の脂質ラフトにおける抗原の局在化により、結合すると腫瘍細胞のアポトーシスを生じるが、Lym-2 は生じない (Epstein AL, et al., 1987, Cancer Res. 47: 830-840)。加えて、Lym-1 および Lym-2 抗原は、いかなる程度にも脱落もインターナライズもされず、正常な循環する B 細胞およびリンパ節結合 B 細胞では、リンパ腫細胞と比較して 1 / 4 の濃度で発現されるに過ぎない。

【先行技術文献】

10

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献 1】Epstein AL, et al., 1987, Cancer Res. 47: 830-840

【非特許文献 2】Rose et al., 1996, Cancer Immunol Immunother 43(1): 26-30

【非特許文献 3】DeNardo SJ et al., 1988, Antibody, Immunoconjugates, and Radiopharmaceuticals 1:17-33

【非特許文献 4】DeNardo, S.J. et al., 1988, Int. J. Cancer 3:96-101

【非特許文献 5】Hu E. et al., 1989, Hematologic Oncology 7:155-166

【非特許文献 6】Epstein AL, et al., 1987, Cancer Res. 47: 830-840

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

上記の特徴のために、Lym-1 および Lym-2 は、抗原陽性白血病およびリンパ腫の処置のために使用することができる理想的な標的化抗体である。近年、Lym-1 および Lym-2 の両方が、有効なヒト CAR T 細胞を生成するために使用されており、これらの悪性腫瘍の免疫療法のための重要な新規組成物として特許取得済みである。本開示は、親抗体より抗原に対して低い親和性を有する新たに産生されたヒト化 Lym-1 および Lym-2 が、B 細胞悪性腫瘍の処置のための臨床的に有効なヒト CAR T 細胞を生成するために使用することができ、および NSG マウスに異種移植した場合に転移性の抗原陽性腫瘍に対して有効であることを実証する。これらのデータは、B 細胞腫瘍を有する患者を処置することが可能なヒト CAR T 細胞を生成するために、これらのヒト化抗体構築物を使用する潜在性に関して重要な情報を提供する。

30

【0007】

最近、遺伝子操作されたキメラ抗原受容体 (CAR) T 細胞による自家処置を使用して B 細胞リンパ腫および白血病において前例のない結果が得られたことにより、いくつかの研究所がこのアプローチを固形腫瘍に適用し始めている。CAR 改変細胞は、モノクローナル抗体の HLA 非依存的標的化特異性と、活性化 T 細胞の細胞溶解活性、増殖、およびホーミング特性とを組み合わせるが、チェックポイント抑制には応答しない。抗原発現標的を直接殺滅するそれらの能力のために、CAR 細胞は、いかなる抗原陽性細胞または組織に対しても非常に毒性であり、非常に特異的な抗体によって CAR を構築することが必要である。一態様では、本明細書において所望の安全性および有効性プロファイルを有する新規抗体、CAR、ならびにその診断的および治療的な使用方法を開示する。

40

【0008】

一態様では、本開示は、配列番号 2 もしくは 6 のいずれか 1 つのアミノ酸配列またはその各々の均等物を含む重鎖 (HC) 免疫グロブリン可変ドメイン配列; および / あるいは配列番号 4 もしくは 8 のいずれか 1 つのアミノ酸配列またはその各々の均等物を含む軽鎖 (LC) 免疫グロブリン可変ドメイン配列を含む、またはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる抗体を提供する。別の態様では、本明細書において、配列番号 10 のアミノ酸配列もしくはその均等物を含む重鎖 (HC) 免疫グロブリン可変ドメイン配列

50

；および／または配列番号 12 のアミノ酸配列もしくはその均等物を含む軽鎖（L C）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含む、またはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる抗体を開示する。

【0009】

一態様では、本開示の抗体は、I g A、I g D、I g E、I g G、または I g M 抗体である。抗体の定常領域もまた多様であり得る。例えば抗体は、任意のアイソタイプ：I g A（I g A 1、I g A 2）、I g D、I g E、I g G（I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4）、または I g M の F c 領域を備え得る。一実施形態では、本開示の抗体の定常領域は、I g G 1 定常領域または I g カッパ定常領域である。1つの特定の態様では、本開示の抗体はさらに、検出可能マーカーまたは精製マーカーを含み得る、またはあるいはそれから本質的になり得る、またはなおさらにそれからなり得る。本明細書においてまた、上記の単離された細胞を培養するステップを含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる本開示の抗体を産生する方法であって、単離された細胞が必要に応じて哺乳動物細胞である、方法も提供する。

10

【0010】

本明細書においてさらに、開示される抗体の抗原結合性断片を提供する。本明細書に提供される抗体の態様の一部では、抗体断片は、F a b、F（a b）' 2、F a b'、s c F v、および F v からなる群から選択される。さらなる態様では、本開示は、本明細書に開示される単離された抗体またはその断片、および検出可能なまたは精製標識を単独で、または抗原もしくはその断片と組み合わせて提供する。さらに本明細書において、この抗原／抗体複合体を含む、またはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる e x v i v o の細胞を提供する。

20

【0011】

本開示は、配列番号 2、4、6、8、10、もしくは 12 のいずれか 1つのアミノ酸配列、またはその各々の均等物を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなるポリペプチドを提供する。さらに、本明細書に開示される抗体またはその断片のアミノ酸配列、およびそれらをコードする単離されたポリヌクレオチドを含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる単離されたポリペプチドを提供する。

【0012】

なおさらに、本明細書に開示される抗体およびその断片をコードする単離された核酸を提供する。一態様では、単離された核酸配列は、配列番号 1、3、5、7、9、および 11、またはその各々の均等物を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。一態様では、ポリヌクレオチド配列は、プロモーターおよび／またはエンハンサーエレメントに動作可能に連結される。それらはまた、ベクターもしくは適切な宿主細胞、および／または診断的もしくは治療的使用に適した担体と組み合わせることができる。一態様では、核酸は、ポリペプチドおよびタンパク質の組換え産生のために宿主細胞に含有される。宿主細胞は真核細胞または原核細胞であり得る。

30

【0013】

本開示の態様は、（a）本明細書に開示される抗体のいずれかの抗原結合ドメイン、（b）ヒンジドメイン、（c）膜貫通ドメイン、および（d）細胞内シグナル伝達ドメインを含む、またはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなるキメラ抗原受容体（C A R）に関する。一態様では、C A R はさらに、1つまたは複数の共刺激シグナル伝達領域を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。別の態様では、本開示の C A R は、第 1 世代 C A R、第 2 世代 C A R、第 3 世代 C A R、または第 4 世代 C A R である。

40

【0014】

同様に、本明細書において、（a）抗原結合ドメイン（例えば、抗 L y m 抗体の）、（b）ヒンジドメイン、（c）膜貫通ドメイン、ならびに（d）D A P 10 および／または D A P 12 ドメインを含む、またはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる

50

キメラ抗原受容体 (CAR) も提供する。さらなる態様では、CAR はまた、抗原結合ドメインの後に直接挿入された少なくとも 10 アミノ酸のエピトープ「AVPPQQWALS」も含む。抗原結合ドメインは、任意の適切な種、例えば哺乳動物、マウス、ラット、または例えばヒトに由来し得る。

【0015】

本開示は、(a) 抗体、例えば抗 L y m 抗体、ヒト化抗 L y m 抗体、または抗 C D 1 9 抗体の抗原結合ドメイン、(b) ヒンジドメイン、(c) 膜貫通ドメイン、ならびに (d) D A P 1 0 および／または D A P 1 2 の膜貫通ドメインの 1 つまたは複数を含む細胞内シグナル伝達ドメインを含む、またはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる CAR 構築物を提供する。抗体の非制限的な例としては、任意の適切な種に由来し得る抗 L y m-1、抗 h u L y m-1 もしくは L y m 2、抗 L y m-2 抗体、または抗 C D 1 9 抗体が挙げられる。構築物はさらに、上記のエレメント (a) ~ (d) を連結する 1 つまたは複数のリンカーポリペプチドを含み得る、またはそれから本質的になり得る、またはなおさらにそれからなり得る。さらなる態様では、CAR はさらに、抗原結合ドメインのアミノ末端に位置するリーダーペプチドを含む、それから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。一実施形態では、ヒンジドメインは、C D 8 α または I g G 1 ヒンジドメインである。別の態様では、膜貫通ドメインは、C D 8 α 膜貫通ドメインを含む。さらなる態様では、CAR はまた、抗原結合ドメインの後に直接挿入された少なくとも 10 アミノ酸のエピトープ「AVPPQQWALS」も含む。抗原結合ドメインは、任意の適切な種、例えば哺乳動物、マウス、ラット、または例えばヒトに由来し得る。

10

20

【0016】

特定の実施形態では、CAR は、本開示の任意の抗体のいずれかの抗原結合ドメインまたはその断片 (例えば、s c F v)、C D 8 α ヒンジドメインまたは I g G 1 ヒンジドメイン、C D 8 α 膜貫通ドメイン、ならびに D A P 1 0 および／または D A P 1 2 膜貫通ドメインを含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。さらなる態様では、CAR は、D A P 1 0 および D A P 1 2 膜貫通ドメインを含む。

【0017】

1 つの特定の態様では、本開示の抗体または CAR はさらに、検出可能なマーカーまたは精製マーカーを含み得る、またはあるいはそれから本質的になり得る、またはなおさらにそれからなり得る。

30

【0018】

別の実施形態では、本開示の CAR は、C D 8 α または I g G 1 ヒンジドメインを含み、またはあるいはそれから本質的になり、またはなおさらにそれからなり、膜貫通ドメインは、C D 2 8 または C D 8 α 膜貫通ドメインを含み、1 つまたは複数の共刺激シグナル伝達領域は、C D 2 7、C D 2 8、4-I B B (C D 1 3 7)、O X 4 0、C D 3 0、C D 4 0、P D-1、I C O S、リンパ球機能関連抗原-1 (L F A-1)、C D 2、C D 7、C D 2 7、L I G H T、N K G 2 C、および B 7-H 3 から選択され、ならびに細胞内シグナル伝達ドメインは C D 3 ゼータシグナル伝達ドメインを含む。

【0019】

同様に本明細書において、CAR (例えば、抗 L y m CAR または抗 C D 1 9) 発現細胞を産生する方法であって、本明細書に開示される CAR をコードする核酸配列を、免疫細胞集団に導入するステップ、およびステップ (i) の前記核酸配列による形質導入が成功しており、それによって CAR 発現細胞を産生する免疫細胞の亜集団を選択するステップを含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる方法も提供する。

40

【0020】

本開示の態様は、本開示の CAR を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる単離された細胞、およびそのような細胞を産生する方法に関する。

【0021】

50

同様に本明細書において、本開示の抗体またはC A Rをコードする単離された核酸配列を含む、またはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなるベクターも提供する。一態様では、本開示は、前記抗体またはC A R構築物をコードする単離された核酸配列を含む、またはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなるベクターを提供する。

【0022】

別の態様では、本開示は、担体と、本開示の抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、C A R、単離された核酸、ベクター、および／または単離された細胞のうちの1つまたは複数を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる組成物を提供する。

【0023】

本開示のさらに他の方法の態様は、それを必要とする対象における腫瘍の成長を阻害する、および／またはがんを処置する、および／またはがんの再発を防止する方法であって、本明細書に提供される、有効量のC A R（例えば、抗L y mまたはC D 1 9）発現細胞、本明細書に提供される、有効量の抗体、有効量のその抗原結合性断片、および／または有効量のポリペプチドを対象に投与するステップを含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる方法に関する。一態様では、C A Rは、処置または阻害されるがんまたは腫瘍細胞上に発現された抗原に対する抗原結合ドメインを発現する。一態様では、C A R発現細胞は、処置される対象に対して自己または同種であり、必要に応じて、第1選択治療、第2選択治療、第3選択治療、第4選択治療、または第5選択治療である。別の態様では、腫瘍またはがん細胞は、C A Rが結合する抗原、例えば、C D 1 9、L y m 1および／またはL y m 2を発現または過剰発現する。さらなる態様では、がんまたは腫瘍は、癌腫、肉腫、または白血病の群から選択される。1つの特定の態様では、腫瘍またはがんは、B細胞リンパ腫または白血病である。一実施形態では、腫瘍は固形腫瘍である。固形腫瘍は、黒色腫、大腸癌、乳癌、および／または脳腫瘍であり得る。一態様では、処置されるがんは、癌腫、肉腫、神経芽腫、子宮頸がん、肝細胞がん、中皮腫、神経膠芽腫、骨髄腫、リンパ腫、白血病、腺腫、腺癌、神経膠腫、神経膠芽腫、網膜芽腫、星細胞腫、乏突起膠腫、髄膜腫、または黒色腫である。

【0024】

方法は、対象、例えばヒト、非ヒト霊長類（例えば、類人猿、テナガザル、チンパンジー、オランウータン、サル、マカク等）、家畜動物（例えば、イヌおよびネコ）、農場動物（例えば、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ）、および実験動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、モルモット）を処置するために有用である。哺乳動物は、任意の年齢または任意の発達段階（例えば、成体、若年、こども、幼体、または子宮内哺乳動物）であり得る。哺乳動物は、雄性または雌性であり得る。ある特定の実施形態では、対象は、新生物障害、新生物、腫瘍、悪性腫瘍、またはがんを有するまたは有することが疑われる。

【0025】

本明細書に開示される方法はさらに、対象にC A R治療以外の抗腫瘍治療を投与するステップを含み得る、またはあるいはそれから本質的になり得る、またはなおさらにそれからなり得る。

【0026】

本開示はまた、がん細胞またはがん幹細胞の増殖を阻害する方法であって、細胞に、本開示の、有効量のC A R発現細胞、有効量の抗体、有効量の抗原結合性断片、および／または有効量のポリペプチドを接触させるステップを含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる方法にも関する。C A Rは、抗L y m-1、抗L y m-2、または抗C D 1 9発現C A Rであり得る。

【0027】

本明細書においてさらに、対象が治療に応答する可能性があるか応答する可能性がないかを決定する方法であって、患者から単離された試料に、本開示の抗体、抗原結合性断片、および／またはポリペプチドを接触させるステップ、ならびに試料中の抗体-細胞複合体

10

20

30

40

50

、抗原結合性断片－細胞複合体、および／またはポリペプチド－細胞複合体を検出するステップを含み、またはあるいはそれから本質的になり、またはなおさらにそれからなり、複合体が存在すれば、対象が治療に応答する可能性があることを示し、複合体が存在しなければ、対象が治療に応答する可能性がないことを示す、方法を提供する。抗体、抗原結合性断片、および／またはポリペプチドは、検出可能に標識され得る。同様に本明細書において、本開示の、有効量の抗体またはCARを、治療に応答する可能性があるとして決定された対象に投与するステップをさらに含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる方法を開示する。

【0028】

本開示はさらに、対象における治療をモニタリングする方法であって、対象から単離された試料に、本開示の抗体または抗原結合性断片を接触させるステップ、および試料中の抗体－細胞複合体を検出するステップを含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる方法に関する。前記方法は、本開示の、有効量のCAR発現細胞、有効量の抗体、有効量の抗原結合性断片、および／または有効量のポリペプチドを対象に投与する前および／または後に実施することができる。CARは、抗Lym-1、抗Lym-2、または抗CD19発現CARであり得る。一態様では、CAR、抗体、またはその抗原結合性断片は、検出可能に標識される。別の態様では、試料は、喀痰、血清、血漿、リンパ、囊胞液、尿、便、脳脊髄液、腹水、血液、または組織のうちの1つまたは複数を含む。

【0029】

同様に、本明細書において、本開示の方法を実行するためのキット、および本開示の方法を実行するための使用説明書も提供される。キットは、本開示の、抗体、CAR、抗原結合性断片、ポリペプチド、単離された核酸、ベクター、単離された細胞、および／または組成物のうちの1つまたは複数と、使用説明書とを含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】図1は、2つのヒト化Lym-1抗体がエピトープ陽性細胞に対して別個の結合能を有することを示す。5×10⁵個のRaji細胞を表記の抗体の0.013～1300nMの増加濃度と共にインキュベートした。(AF488)コンジュゲートヤギ抗ヒトIgGによる検出後、平均蛍光強度(MFI)をフローサイトメトリーによって定量した。

【0031】

【図2】図2は、CAR T細胞の産生の成功を示す。10日目に、CAR T細胞調製物をビオチン－抗Lym-1抗体によって標識した後、APC－ストレプトアビジンによって検出した。モックT細胞を陰性対照とした。

【0032】

【図3】図3A～3Cは、両方のヒト化Lym-1に基づくCAR-T細胞がRaji異種移植片において完全な寛解を誘導したことを示す。100万個のRaji/Luc-GFP細胞を、8～10週齢の雄性NSGマウスにi.v.注射した(0日目)。ルシフェラーゼ活性を6日目に測定し、処置前の腫瘍負荷を評価した。(図3A)7日目、PBS 100μl中の1000万個のモックT細胞およびCAR T細胞(50% CAR陽性)を、無作為に生成した担癌マウスの群(n=5)にi.v.注射した。(図3B)背側および腹側の画像からの平均生物発光輝度を定量および要約する。(図3C)対照群および実験群のマウスの生存を示す Kaplan-Meier プロット。

【0033】

【図4】図4は、機能的なヒト化Lym-1抗体の産生を示す。5×10⁵個のARH-77細胞を表記の抗体の2.218～266nMの増加濃度と共にインキュベートした。(AF488)コンジュゲートヤギ抗ヒトIgGによる検出後、平均蛍光強度(MFI)をフローサイトメトリーによって定量した。

10

20

30

40

50

【0034】

【図5】図5は、huLym-1およびhuLym-2 CAR-T細胞の産生の成功を示す。10日目に、CAR-T細胞調製物を、ビオチン-プロテイン-Lによって標識した後、APC-ストレプトアビジンによって検出した。モックT細胞を陰性対照とした。

【0035】

【図6】図6は、huLym-2 CARがエプト陽性細胞株に対して細胞傷害性の増加を示したことを示す。モックT細胞またはCAR-T細胞を、ARH-77 eGFP/Lucと共にエフェクター/標的(E/T)比2~0.25でインキュベートした。細胞傷害性を共培養の17時間後にルシフェラーゼ活性に基づいて測定した。

【0036】

【図7】図7は、41BB3zおよびDAP10-12に基づくCAR-T細胞構築物の概略図を示す。

【0037】

【図8】図8は、CAR-T細胞の産生の成功を示す。10日目に、CAR-T細胞調製物を、ビオチン-抗Lym-1抗体によって標識した後、APC-ストレプトアビジンによって検出した。モックT細胞を陰性対照とした。

【0038】

【図9】図9A~9Bは、huLym-1-B-DAP形質導入CAR-T細胞の安定な遺伝子発現および細胞増殖を示す。初代ヒトT細胞を、0日目に抗CD3/CD28 Dynabeadsによって活性化し、3日目に各構築物を形質導入した。各群において100万個のT細胞を、抗CD3/CD28によって7日目および14日目に再刺激した。(図9A)モックT細胞およびCAR-T細胞調製物中の絶対細胞数を、4日目、7日目、8日目、および12日目に計数した。(図9B)CAR発現を、7日目、14日目、および21日目に測定した。

【0039】

【図10】図10は、Raji細胞に対するエプト駆動性の細胞傷害性を示す。モックT細胞またはCAR-T細胞を、Raji-eGFP/Lucと共にエフェクター/標的(E/T)比2~0.25でインキュベートした。細胞傷害性を、共培養の17時間後にルシフェラーゼ活性に基づいて測定した。

【0040】

【図11】図11A~11Dは、モック処置およびCAR処置マウスにおける腫瘍負荷の背側生物発光イメージングおよび体重変化を示す。100万個のRaji/Luc-eGFP細胞を、8~10週齢の雄性NSGマウスにi.v.注射した(0日目)。ルシフェラーゼ活性を7日目に測定し、処置前の腫瘍負荷を評価した。8日目に、PBS 100ul中の100万個のモックT細胞およびCAR-T細胞を、無作為に生成した担癌マウスの群(n=5)にi.v.注射した。(図11A)例としての生物発光画像。(図11B)マウスの生存のカプラン-マイヤープロット。(図11C)背側および腹側画像の平均生物発光輝度を定量および要約する。(図11D)処置したマウスの経時的な体重のプロット。0日目の各マウスの体重を参照として使用して、パーセント体重変化を計算した。マウスの体重をデジタルスケールによって週に2回測定した。

【0041】

【図12】図12は、DAP-CD19 CAR-T細胞を使用してNSGマウスにおける播種性のRajiリンパ腫を処置する実験を示す。マウスにRajiをi.v.注射し、8日後、huLym-1-DAP、CD19第2世代、またはCD19-DAPのCAR-T細胞100万個によって処置した。次に、マウスを、生物発光によって毎週撮像し、第2世代構築物を有するCD19 CAR-T細胞が全て死滅したが、CD19-DAP CAR構築物を有する細胞は21日目でもなおも生存していたが、マウスはこの用量ではなおも腫瘍を有することを示している。

【0042】

【図13】図13A~13Cは、4-1BB3z細胞内ドメインを有するLym-1およ

10

20

30

40

50

び huLym-1-B CAR がいずれも Raji 腫瘍を *in vivo* で根絶することを示す。(図 13 A) *in vivo* 研究のスケジュールの概略図。(図 13 B) 0 日目に 10^6 個の Raji-eGFP/Luc 細胞を接種し、その後 6 日目に 5×10^6 個のモック T 細胞、Lym-1-BB3z CAR T 細胞、huLym-1-B-BB3z CAR T 細胞、または PBS 100 μ l による処置を行った NSG マウスの生物発光画像。各 NSG マウスの背側および腹側画像の生物発光シグナルを合計し、経時的にプロットした(マウス $n=5$ 匹/群、データは示していない)。(図 13 C) カプラン-マイヤー生存曲線(* $p < 0.001$ 、ログランク検定による)。

【0043】

【図 14】図 14 A~14 F は、huLym-1-B CAR T 細胞増大に及ぼす細胞内シグナル伝達ドメインの影響を示す。(図 14 A) 形質導入および再刺激後のモック T 細胞または CAR 陽性 T 細胞の *in vitro* 増大(ドナー 5 人のプールした結果)。

(図 14 B) 表記の日での T 細胞調製物における CAR 発現。T 細胞を、7 日目および 14 日目に α -CD2/CD3/CD28 抗体に基づく刺激剤によって再活性化した。(図 14 C) 形質導入および再刺激後のモック T 細胞または CAR 陽性 T 細胞の *in vitro* 増大(ドナー 3 人のプールした結果)。(図 14 D) 表記の日での T 細胞調製物における CAR 発現。T 細胞を、7 日目および 14 日目に α -CD2/CD3/CD28 刺激剤によって再活性化した(ドナー 3 人からの代表的な結果)。(図 14 E) 形質導入および再刺激後のモック T 細胞または CAR 陽性 T 細胞の *in vitro* 増大(ドナー 3 人のプールした結果)。(図 14 F) 表記の日での T 細胞調製物における CAR 発現。T 細胞を、7 日目および 14 日目に α -CD2/CD3/CD28 刺激剤によって再活性化した(ドナー 5 人からの代表的な結果)。

【0044】

【図 15】図 15 A~15 B は、リガンド依存性のトニックシグナル伝達が、huLym-1-B-BB3z CAR T 細胞における増殖障害に関する優勢な機構であることを示す。(図 15 A) 9 日目のモック T 細胞または CAR 形質導入 T 細胞を、アネキシン V および死細胞(Sytox-Green)染色に関して評価した(2 人のドナーからの代表的な結果)。(図 15 B) CD19-BB3z CAR T 細胞を、Cell trace far-red 色素によって予め標識し、その後モック T 細胞または表記の CAR T 細胞と 1:1 の比で一晩共培養した。次に CD19-BB3z CAR T 細胞を、アネキシン V および Sytox-Green 染色に供し、huLym-1-B-BB3z または huLym-1-B-DAP CAR T 細胞による潜在的な仲間殺しを測定した(2 人のドナーからの代表的な結果)。

【0045】

【図 16】図 16 A~16 B は、huLym-1-B-DAP CAR T 細胞が、活性化誘導細胞死の低減を示したことを示す。モック、huLym-1-B-BB3z、および huLym-1-B-DAP CAR T 細胞を、 α -CD2/3/28 刺激剤の存在下で、または K562 細胞もしくは Raji 細胞と共に一晩培養した。モックおよび CAR T 細胞をアネキシン V および Sytox Green(死細胞色素)染色に供した。

(図 16 A) 3 人のドナーのうち 1 人からの代表的なプロット。(図 16 B) 生存細胞におけるアネキシン V 陽性細胞のパーセンテージを以下の式によって定量した: $Q3 / (Q3 + Q4)$ (ドナー 3 人からのプール、* $P < 0.05$ 、スチューデント t 検定による。棒グラフは平均値 $\pm$ SD を示す)。

【0046】

【図 17-1】図 17 A~17 C は、huLym-1-B-DAP が、B リンパ球および白血病細胞株のパネルに対してエフェクター機能を示したことを示す。(図 17 A) ヒトリンパ腫 B 細胞株のパネルと 1:1 のエフェクターの標的に対する比で一晩共培養した場合の、モック、huLym-1-B-DAP、および huLym-1-B-BB3z から放出されたサイトカイン。分泌されたサイトカインの定量を、pg/細胞 10000 個(GM-CSF)または ng/細胞 10000 個(IL-2 および INF- γ)に正規化す

10

20

30

40

50

る（ $n=3$ のテクニカルレプリケート、ドナー2人からの代表的な結果）。（図17B）モック、huLym-1-B-DAP、およびhuLym-1-B-BB3zの細胞傷害性を測定するために、腫瘍細胞を、Cell trace far-red色素によって予め標識した後、エフェクター細胞と1:1の比で共培養した；各時点での生存腫瘍細胞をゲート設定した。（図17C）生存腫瘍細胞のパーセンテージを定量し、プロットした。溶解パーセントを、（1時間での%腫瘍-48時間での%腫瘍）/（1時間での%腫瘍）として計算する（ $n=3$ のテクニカルレプリケート、2人のドナーからの代表的な結果を示す。棒グラフは平均値±SDを示す）。

【図17-2】図17A~17Cは、huLym-1-B-DAPが、Bリンパ球および白血病細胞株のパネルに対してエフェクター機能を示したことを示す。（図17A）ヒトリリンパ腫B細胞株のパネルと1:1のエフェクターの標的に対する比で一晩共培養した場合の、モック、huLym-1-B-DAP、およびhuLym-1-B-BB3zから放出されたサイトカイン。分泌されたサイトカインの定量を、pg/細胞10000個（GM-CSF）またはng/細胞10000個（IL-2およびINF- γ ）に正規化する（ $n=3$ のテクニカルレプリケート、ドナー2人からの代表的な結果）。（図17B）モック、huLym-1-B-DAP、およびhuLym-1-B-BB3zの細胞傷害性を測定するために、腫瘍細胞を、Cell trace far-red色素によって予め標識した後、エフェクター細胞と1:1の比で共培養した；各時点での生存腫瘍細胞をゲート設定した。（図17C）生存腫瘍細胞のパーセンテージを定量し、プロットした。溶解パーセントを、（1時間での%腫瘍-48時間での%腫瘍）/（1時間での%腫瘍）として計算する（ $n=3$ のテクニカルレプリケート、2人のドナーからの代表的な結果を示す。棒グラフは平均値±SDを示す）。

【0047】

【図18】図18A~18Bは、Lym-1エピトープが、huLym-1-B-DAP CAR T細胞の存在下で有意にダウンレギュレートしないことを示す。モックT、huLym-1-B-DAP、およびCD19-BB3zを、Bリンパ球および白血病細胞株のパネルと共に1:2の比で共培養した。一晩共培養後、B細胞株を、CD22、Lym-1、およびCD19に対する抗体によって標識した。

【0048】

【図19】図19A~19Dは、CARシグナル伝達ドメインが抗原のモジュレーションに影響を及ぼさないことを示す。（図19A）モックT、CD19-BB3z、CD19-DAP、huLym-1-B-BB3z、およびhuLym-1-B-DAP CAR T細胞を、Raji-eGFP/Luc細胞と共におよそ1:2の比で一晩共培養した。次に、残存している生存Raji細胞におけるCD19抗原およびLym-1エピトープ発現を、フルオロフォアコンジュゲートモノクローナル抗体によってフローサイトメトリーを介して測定した。（図19B）残存Raji細胞におけるLym-1エピトープおよびCD19抗原発現の平均蛍光強度（MFI）の散布図。（図19C）一晩共培養後の生存Raji細胞のパーセンテージ、および（図19D）濃度（ $n=3$ のテクニカルレプリケート、ドナー2人からの代表）。

【0049】

【図20】図20A~20Fは、huLym-1-B-DAP CARが、低用量で無腫瘍生存を媒介したことを示す。（図20A）モックおよびCD19-DAP T細胞を、Raji-eGFP/Luc細胞と1:2の比で一晩共培養した。次に、CD19抗原およびLym-1エピトープ発現を、フルオロフォアコンジュゲートモノクローナル抗体によってフローサイトメトリーを介して測定した（3回のレプリケートからの代表）。（図20B）in vivo研究の概略プロトコール。（図20C） 10^6 個のRaji-eGFP/Lucを0日目に接種し、その後8日目に表記の用量でモック、huLym-1-B-DAP、CD19-BB3z、またはCD19-DAP CAR T細胞による処置を行ったNSGマウスの生物発光画像（群あたりマウス $n=5$ 匹）。（図20D） Kaplan-Meier生存曲線（ ns =ログランク（マンテル-コックス）検定により有意差な

し)。(図20E) 10^6 個のRaji-eGFP/Lucを0日目に接種した後、8日目に 10^6 個のモック、CD19-BB3z、またはCD19-DAP CAR T細胞による処置を行ったNSGマウスの生物発光画像(群あたりマウス $n=5$ 匹)。この実験は、同じモックT細胞対照群の使用を示す図25Eにおける1つとして並べて実施した。

(図20F) カプラン-マイヤー生存曲線($P=0.002$ 、ログランク(マンテル-コックス)検定による)。

【0050】

【図21】図21A~21Cは、CAR開発の候補体としてのhuLym-1-Bの選択を示す。(図21A) Raji細胞に対する12個のヒト化Lym-1抗体のパネルの結合能。抗体は全て、ヒトIgG1アイソフォームで発現された。huLym-1-60は、chLym-1と同じ配列を有する。hu51は、施設内で産生されたヒトIgG1のアイソタイプ対照である。Raji細胞を、表記の濃度と共に30分間インキュベートした後、AF-488コンジュゲートヤギ抗ヒトIgGによって検出した。平均蛍光強度(MFI)をフローサイトメトリーによって評価し、抗体の示差的結合を比較した。(図21B) フローサイトメトリーを介した、Raji細胞における施設内で産生したhuLym-1-BおよびキメラLym-1(chLym-1)の結合能。ここで使用した二次抗体は、APCコンジュゲートマウス抗ヒトIgGモノクローナル抗体であった。(図21C) chLym-1陽性および陰性細胞株のパネルに対するchLym-1およびhuLym-1-Bの結合。これらの測定に関して、APCコンジュゲートマウス抗ヒトIgGモノクローナル抗体を二次抗体として使用した。

【0051】

【図22】図22A~22Hは、BB3z-CD3zシグナル伝達ドメインを有するLym-1およびhuLym-1-B CAR T細胞が、増殖障害にもかかわらず、培養において細胞傷害性であることを示す。(図22A) CAR構築物の概略図。261タグは、ヒト胎盤増殖因子に由来する10アミノ酸の線状エピトープである。(図22B) CAR-T産生および増大のスケジュール。(図22C) モックT細胞または形質導入した初代ヒトT細胞における7日目でのCAR発現のフローサイトメトリー分析; CAR発現を、261タグに対するDyLight650コンジュゲート抗体によって測定した。(図22D) 表記のエフェクターの標的に対する比(E:T)でのLym-1エピトープ陰性(K562)および陽性(Raji)細胞株に対するCAR T細胞の細胞傷害性; 9日目のCAR T細胞を使用して細胞傷害性を測定した。このアッセイでは7日目に再刺激を実施しなかった($n=3$ のテクニカルレプリケート、ドナー3人の代表)。(図22E) *in vitro*で培養したモックT細胞またはCAR陽性T細胞の7~14日の増大倍率(ドナー6人からのプールした結果。 ns -有意差なし、* $P<0.001$ 、スチューデントt検定による)。(図22F) 9日目でのCD3ζのリン酸化を示す代表的なプロット(7日目で刺激なし; ドナー $n=3$)。(図22G) 再刺激前の7日目および14日目での代表的なCARおよび阻害性受容体発現。(図22H) ドナー3人からプールしたモックT細胞またはCAR陽性T細胞における阻害性受容体のパーセンテージの定量(* $P<0.05$ 、スチューデントt検定による。散布図および棒グラフは平均値 $\pm$ SDを示す)。

【0052】

【図23】図23A~23Gは、huLym-1-B-BB3z CAR T細胞の増殖障害が、T細胞上の弱く発現されたLym-1エピトープに関連し、ITAM CD3ζによって媒介されることを示す。(図23A) huLym-1-Bの可変重鎖のCDR3における2つのアミノ酸突然変異の導入は、huLym-1-Bmut抗体またはhuLym-1-Bmut-BB3z CARを生成する; CARにおけるCD3ζ部分の3つ全てのITAMにおけるチロシン(Y)からフェニルアラニン(F)への突然変異は、huLym-1-B-BB3z活性を削除する(huLym-1-B-BB3z Y-F)。(図23B) Raji細胞に対するchLym-1、huLym-1-B、およびhuLym-1-Bmutの結合能。ここで使用した二次抗体は、AF-488コンジュゲートヤギ抗

ヒトIgGであった；ED50を各曲線上に注釈する。（図23C）50万個の活性化T細胞を10 μ g/100 μ lの表記の抗体によって染色後、APC-抗huIgGによって検出した。平均蛍光強度を計算してプロットした；散布図は、MFIの中央値を示す。各カラードットは1人のドナーを表す。（図23D）*in vitro*で培養したモックT、huLym-1-BBB3zY-F、およびhuLym-1-Bmut-BBB3zCAR陽性T細胞の7日目から14日目までの増大倍率（ドナー3人からプールした結果。ns、スチューデントt検定による有意差なし、散布図は、平均値 $\pm$ SDを示す）。（図23E）9日目でCD3 ζ のリン酸化を示す代表的なプロット；CAR発現をDyLight650コンジュゲート抗261タグ抗体によって検出した（ドナーn=2）。（図23F）7日目および14日目でのCARならびにPD-1およびLAG-3発現の代表的なプロット。（図23G）ドナー3人からプールしたモックT細胞またはCAR陽性T細胞におけるPD-1およびLAG-3のパーセンテージの定量（*P<0.05、スチューデントt検定による。棒グラフは平均値 $\pm$ SDを示す）。

10

20

30

40

50

【0053】

【図24】図24A~24Gは、BB3zとDAPシグナル伝達との置き換えが、huLym-1-B CAR T細胞における増殖の問題に取り組んだことを示す。（図24A）左のパネルは、ITIMおよびITAMのコンセンサスアミノ酸（AA）を例証し、右のパネルはDAP12およびCD3 ζ におけるITAMのAAを示す。影部分は、DAP12のITAMにおけるITIMコンセンサスの存在を強調する。（図24B）細胞内シグナル伝達ドメインとしてBB3zまたはDAPを有するhuLym-1-B CARの概略図。（図24C）7~14日目でのモック、huLym-1-B-DAP、およびhuLym-1-B-BBB3z CAR陽性T細胞の*in vitro*増大（ドナー5人からプールした結果。ns、スチューデントt検定による有意差なし）。（図24D）9日目のCD3 ζ リン酸化（p-CD3 ζ ）を示す代表的なプロット（ドナー3人の代表）。（図24E）モックT細胞およびCAR陽性T細胞におけるp-CD3 ζ の定量（ドナーn=3）。（図24F）7日目および14日目での代表的なCARおよび阻害性受容体発現（ドナーn=3、*P<0.05、スチューデントt検定による）。（図24G）モックT細胞およびCAR陽性T細胞における阻害性受容体のパーセンテージの定量（ドナー3人からプールした；ns、有意差なし；*P<0.05、スチューデントt検定による。散布図および棒グラフは平均値 $\pm$ SDを示す）。

【0054】

【図25】図25A~25Fは、huLym-1-B-DAP CAR T細胞が*in vivo*でそのBB3z相対物より優れた抗腫瘍有効性を媒介することを示す。（図25A）Lym-1陽性（Raji、左のパネル）または陰性（K562、右のパネル）細胞に対するモック、huLym-1-B-DAP、またはhuLym-1-B-BBB3zの細胞傷害性。（図25B）K562またはRajiと1:1のエフェクターの標的に対する比で共培養した場合の、モック、huLym-1-B-DAP、またはhuLym-1-B-BBB3zのサイトカイン放出。分泌されたサイトカインの定量を、pg/細胞10,000個（GM-CSF）またはng/細胞10,000個（IL-2およびINF- γ ）に正規化する（n=3のテクニカルレプリケート。ドナー3人からの代表的な結果）。（図25C）改変プロトコールによる*in vivo*研究の概略図。（図25D、図25E）10⁶個のRaji-eGFP/Lucを0日目に接種し、その後8日目に1 $\times$ 10⁶個のモック、huLym-1-B-DAP、またはhuLym-1-B-BBB3z CAR T細胞を処置したNSGマウスの生物発光画像（群あたりマウスn=5匹）。異なるドナーからの2つの独立した研究。（図25F）カプラン-マイヤー生存曲線（P=0.000325、ログランク（マンテル-コックス）検定による。2つの独立した研究からプールした。棒グラフは平均値 $\pm$ SDを示す）。

【0055】

【図26】図26A~26Dは、Lym-1エピトープがhuLym-1-B-DAP CAR T細胞に応答してダウンレギュレートしないことを示す。（図26A）モックT

、CD19-BB3z、およびhuLym-1-B-DAP CAR T細胞を、Raji-eGFP/Luc細胞と共に1:2の比で一晩共培養し、次にCD19抗原およびLym-1エピトープ発現をフルオロフォアコンジュゲートモノクローナル抗体によってフローサイトメトリーを介して測定した。(3つのレプリケートからの代表)。(図26B) RajiにおけるLym-1エピトープおよびCD19抗原発現の平均蛍光強度(MFI)の散布図(n=3のテクニカルレプリケート)。(図26C) 10⁶個のRaji-eGFP/Lucを0日目に接種し、その後8日目に1×10⁶個のモック、CD19-BB3z、またはhuLym-1-B-DAP CAR T細胞によって処置したNSGマウス。16日目に、骨髓試料を収集し、フルオロフォアコンジュゲートモノクローナル抗体によってフローサイトメトリーを介してLym-1エピトープおよびCD19抗原発現に関して評価した。(図26D) RajiにおけるLym-1エピトープおよびCD19抗原発現の平均蛍光強度(MFI)の散布図(群あたりマウスn=5匹、*P<0.001; ns、クラスカル-ウォリス検定による有意差なし、散布図は平均値±SDを示す)。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0056】

本開示は、記載される特定の態様が当然のこととして変化し得ることから、それらに限定されないと理解すべきである。同様に、本明細書で使用される用語は、特定の態様を記載する目的のために過ぎず、本開示の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ制限されることから制限的ではないと意図されると理解すべきである。加えて、本開示の全体において本開示内で、様々な技術的および特許刊行物が引用によってまたはアラビア数字によって参照されているが、その完全な引用は特許請求の範囲の直前に見出される。これらの刊行物の開示は、当技術分野の現状をさらに説明するために参照により本明細書に組み込まれる。

【0057】

特に定義していない限り、本明細書で使用される全ての科学技術用語は、本技術が属する当業者によって一般的に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書に記載される方法および材料と類似または均等な任意の方法および材料を、本技術の実践または試験において使用することができるが、好ましい方法、デバイス、および材料を以下に記載する。本明細書において引用した全ての技術的および特許刊行物は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。本明細書におけるいかなるものも、本技術が先行発明に基づいてそのような開示の日付を早める権利がないと自認したと解釈すべきではない。

【0058】

本技術の実践は、特に示していない限り、当業者の範囲内である組織培養、免疫学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、および組換えDNAの従来技術を用いる。例えば、Sambrook and Russell eds.(2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition; the series Ausubel et al. eds.(2007) Current Protocols in Molecular Biology; the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); MacPherson et al.(1991) PCR 1: A Practical Approach (IRL Press at Oxford University Press); MacPherson et al.(1995) PCR 2: A Practical Approach; Harlow and Lane eds.(1999) Antibodies, A Laboratory Manual; Freshney(2005) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 5th edition; Gait ed.(1984) Oligonucleotide Synthesis; 米国特許第4,683,195号; Hames and Higgins eds.(1984) Nucleic Acid Hybridization; Anderson(1999) Nucleic Acid Hybridization; Hames and Higgins eds.(1984) Transcription and Translation; Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press(1986)); Perbal(1984) A Practical Guide to Molecular Cloning; Miller and Calos eds.(1987) Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides ed.(2003) Gene

Transfer and Expression in Mammalian Cells; Mayer and Walker eds.(1987) Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology(Academic Press, London); および Herzenberg et al. eds(1996) Weir's Handbook of Experimental Immunologyを参照されたい。

【0059】

全ての数値の指定、例えば範囲を含む、pH、温度、時間、濃度、および分子量は、概算であり、それらは必要に応じて1.0もしくは0.1の増加によって、またはあるいは±15%の変動によって、もしくはあるいは10%、もしくはあるいは5%、もしくはあるいは2%の変動によって(+)または(-)に変動する。必ずしも明白に述べていないが、全ての数値の指定は、用語「約」がその前にあると理解すべきである。同様に、必ずしも明白に述べていないが、本明細書に記載される試薬は、単なる例示であり、そのようなものの均等物は当技術分野で公知であると理解すべきである。

10

【0060】

明白に列挙されておらず、それ以外であると意図されていなければ、本技術がポリペプチド、タンパク質、ポリヌクレオチド、または抗体について言及する場合、そのようなものの均等物または生物学的均等物は、本技術の範囲内であると意図されると推論される。

定義

【0061】

本明細書および特許請求の範囲において使用される場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、文脈がそれ以外であることを明白に示していない限り、複数形を含む。例えば、用語「細胞」は、その混合物を含む複数の細胞を含む。

20

【0062】

本明細書で使用される場合、用語「動物」は、例えば哺乳動物および鳥類を含むカテゴリーの、生きている多細胞脊椎生物を指す。用語「哺乳動物」は、ヒトおよび非ヒト哺乳動物の両方を含む。

【0063】

用語「対象」、「宿主」、「個体」、および「患者」は、本明細書において互換的に使用され、動物、典型的に哺乳動物を指す。任意の適した哺乳動物を、本明細書に記載される方法、細胞、または組成物によって処置することができる。哺乳動物の非制限的な例としては、ヒト、非ヒト霊長類(例えば、類人猿、テナガザル、チンパンジー、オランウータン、サル、マカク等)、家畜動物(例えば、イヌおよびネコ)、農場動物(例えば、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ)、および実験動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、モルモット)が挙げられる。一部の実施形態では、哺乳動物はヒトである。哺乳動物は、任意の年齢または任意の発達段階(例えば、成体、若年、こども、幼体、または子宮内哺乳動物)であり得る。哺乳動物は、雄性または雌性であり得る。哺乳動物は、妊娠中の雌性であり得る。一部の実施形態では、対象はヒトである。一部の実施形態では、対象は、がんまたは新生物障害を有するまたは有することが疑われる。

30

【0064】

「真核細胞」は、モネラ界を除く生物界の全てを含む。それらは、膜結合性の核を通して容易に区別することができる。動物、植物、真菌、および原生生物は、その細胞が内部の膜および細胞骨格によって複雑な構造に組織化される真核生物または生物である。最も特徴的な膜結合構造は核である。特に列挙していない限り、用語「宿主」は、例えば酵母、高等植物、昆虫、および哺乳動物細胞を含む、真核細胞宿主を含む。真核細胞または宿主の非制限的な例としては、サル、ウシ、ブタ、マウス、ラット、鳥類、は虫類、およびヒトが挙げられる。

40

【0065】

「原核細胞」は通常、核または他の任意の膜結合オルガネラを欠如し、2つのドメイン、細菌、および古細菌に分類される。染色体DNAに加えて、これらの細胞はまた、エピソームと呼ばれる環状ループに遺伝情報を含むことができる。細菌細胞は非常に小さく

50

、ほぼ動物ミトコンドリアのサイズ（直径約1～2 μmおよび長さ10 μm）である。原核細胞は、3つの主要な形状：桿状、球状、およびらせん状を特徴とする。真核細胞のような精巧な複製プロセスを経る代わりに、細菌細胞は二分裂によって分裂する。例としては、これらに限定されないが、*Bacillus* 細菌、*E. coli* 細菌、および *Salmonella* 細菌が挙げられる。

【0066】

本明細書で使用される場合、用語「抗体」は、集合的に免疫グロブリンまたは免疫グロブリン様分子を指し、これには例として、これらに限定されないが、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM、その組合せ、ならびに任意の脊椎動物、例えば哺乳動物、例えばヒト、ヤギ、ウサギ、およびマウスにおける免疫応答の際に産生される類似の分子、ならびに非ヒト哺乳動物腫、例えばサメ免疫グロブリンが挙げられる。それ以外であることを特に明記している場合を除き、用語「抗体」は、インタクト免疫グロブリン、ならびに目的の分子（または目的の非常に類似の分子の群）に特異的に結合して、他の分子に対する結合を実質的に排除する（例えば、目的の分子に関する結合定数が、生物試料中の他の分子の結合定数より少なくとも 10^3 M^{-1} より高い、少なくとも 10^4 M^{-1} より高い、または少なくとも 10^5 M^{-1} より高い抗体および抗体断片）「抗体断片」または「抗原結合性断片」を含む。用語「抗体」はまた、遺伝子操作型、例えばキメラ抗体（例えば、ヒト化マウス抗体）、ヘテロコンジュゲート抗体（例えば、二特異性抗体）も含む。同様に、*Pierce Catalog and Handbook* (1994–1995) (*Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.*) ; *Kuby, J.* (1997) *Immunology*, 3rd Ed., *W.H. Freeman & Co., New York* も参照されたい。抗体の「抗原結合性断片」は、抗体の標的抗原に対して特異的に結合能を保持する抗体の部分である。

【0067】

抗体構造に関して、免疫グロブリンは、ジスルフィド結合によって相互接続された重（H）鎖および軽（L）鎖を有する。2つのタイプの軽鎖、すなわちラムダ（λ）およびカッパ（κ）が存在する。主な重鎖クラス（またはアイソタイプ）は5つあり、これらは抗体分子の機能的活性を決定する：IgM、IgD、IgG、IgA、およびIgE。各々の重鎖および軽鎖は、定常領域および可変領域（領域はまた「ドメイン」としても公知である）を含有する。抗体の定常領域もまた多様であり得る。例えば抗体は、任意のアイソタイプ：IgA（IgA1、IgA2）、IgD、IgE、IgG（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）、またはIgMのFc領域を備え得る。定常領域配列の非制限的な例としては、配列番号19～27またはその各々の均等物が挙げられる。

【0068】

組み合わせると、重鎖および軽鎖可変領域は、抗原に特異的に結合する。軽鎖および重鎖可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」とも呼ばれる3つの超可変領域によって中断される「フレームワーク」領域を含有する。フレームワーク領域およびCDRの程度は定義されている（参照により本明細書に組み込まれる、*Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, 1991を参照されたい）。*Kabat*のデータベースは現在、オンラインで維持されている。異なる軽鎖または重鎖のフレームワーク領域の配列は、種内で比較的保存されている。抗体のフレームワーク領域、すなわち構成成分の軽鎖および重鎖の組合せフレームワーク領域は、大部分がβシート立体構造をとり、CDRは、βシート構造を接続する、一部の例ではその一部を形成するループを形成する。このように、フレームワーク領域は、鎖間の非共有結合相互作用によってCDRの正しい方向への配置を提供する足場を形成するように作用する。*Lym1*および*Lym2* CDRの非制限的な例は、米国特許出願第15／173,534号に提供される。

【0069】

CDRは、抗原のエピトープに対する結合に主に関与する。各々の鎖のCDRは典型的には、N末端から開始して順に番号を付けられ、特定のCDRが位置する鎖によっても典型

10

20

30

40

50

的に同定されるCDR1、CDR2、およびCDR3と呼ばれる（重鎖領域はCDHRと標識され、軽鎖領域はCDLRと標識される）。このように、CDHR3は、それが見出される抗体の重鎖の可変ドメインからのCDR3である一方、CDLR1は、それが見出される抗体の軽鎖の可変ドメインからのCDR1である。TNT抗体は、TNT関連抗原に対して一意的な特異的VH領域およびVL領域配列を有し、したがって特異的CDR配列を有する。異なる特異性（すなわち、異なる抗原に関して異なる組合せ部位）を有する抗体は、異なるCDRを有する。CDRは抗体毎に異なるが、抗原結合に直接関係するのは、CDR内のごく限定された数のアミノ酸位置である。CDR内のこれらの位置は、特異性決定残基（SDR）と呼ばれる。

【0070】

用語「ヒト化」は、抗体を参照して使用する場合、抗体のアミノ酸配列が、アクセプターヒト免疫グロブリン分子における所望の抗原に特異的に結合する1つまたは複数の相補性決定領域（CDR）の非ヒトアミノ酸残基（例えば、マウス、ラット、ヤギ、ウサギ等）と、CDRに隣接するアミノ酸残基であるFvフレームワーク領域（FR）における1つまたは複数のヒトアミノ酸残基とを有することを意味する。そのような抗体は典型的には、低減された免疫原性を有し、したがって1つまたは複数のCDRが得られたまたはそれに基づく非ヒト親抗体と比較して、ヒトにおいてより長い半減期を有する。

【0071】

本明細書で使用される場合、用語「抗原」は、特異的液性免疫または細胞性免疫の産物、例えば抗体分子またはT細胞受容体によって特異的に結合され得る化合物、組成物、または物質を指す。抗原は、例えばハプテン、単純な中間代謝物、糖（例えば、オリゴ糖）、脂質、およびホルモン、ならびに高分子、例えば複合糖質（例えば、多糖類）、リン脂質、およびタンパク質を含む任意のタイプの分子であり得る。一般的なカテゴリーの抗原としては、これらに限定されないが、ウイルス抗原、細菌抗原、真菌抗原、原虫および他の寄生虫抗原、腫瘍抗原、自己免疫疾患、アレルギーおよび移植片拒絶に関する抗原、毒素、ならびに他の雑多な抗原が挙げられる。

【0072】

本明細書で使用される場合、用語「抗原結合ドメイン」は、抗原標的に特異的に結合することができる任意のタンパク質またはポリペプチドドメインを指す。

【0073】

用語「キメラ抗原受容体」（CAR）は、本明細書で使用される場合、抗原に結合することが可能な細胞外ドメイン、細胞外ドメインが由来するポリペプチドとは異なるポリペプチドに由来する膜貫通ドメイン、および少なくとも1つの細胞内ドメインを含む融合タンパク質を指す。「キメラ抗原受容体（CAR）」は、時に「キメラ受容体」、「Tボディ」、または「キメラ免疫受容体（CIR）」と呼ばれる。「抗原に結合することが可能な細胞外ドメイン」は、ある特定の抗原に結合することができる任意のオリゴペプチドまたはポリペプチドを意味する。「細胞内ドメイン」は、シグナルを伝達して細胞における生物プロセスの活性化または阻害を引き起こすドメインとして機能することが公知の任意のオリゴペプチドまたはポリペプチドを意味する。ある特定の実施形態では、細胞内ドメインは、一次シグナル伝達ドメインに加えて1つまたは複数の共刺激シグナル伝達ドメインを含み得る、またはあるいはそれから本質的になり得る、またはなおさらにそれを含み得る。「膜貫通ドメイン」は、細胞膜にまたがることが公知であり、細胞外ドメインとシグナル伝達ドメインとを連結するように機能することが可能な任意のオリゴペプチドまたはポリペプチドを意味する。キメラ抗原受容体は必要に応じて、細胞外ドメインと膜貫通ドメインとの間のリンカーとして作用する「ヒンジドメイン」を含み得る。そのようなドメインの非制限的な例を、本明細書において以下に提供し、例えば：

【0074】

ヒンジドメイン：IgG1重鎖ヒンジ配列：

【0075】

CTCGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCACCGTGCCCG

10

20

30

40

50

【0076】

膜貫通ドメイン：CD28膜貫通領域：

【0077】

TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAAC
AGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTG

【0078】

細胞内ドメイン：4-1BB共刺激シグナル伝達領域：

【0079】

AAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCACT
ACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAG
GAGGATGTGAACTG

【0080】

細胞内ドメイン：CD28共刺激シグナル伝達領域：

【0081】

AGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCG
CCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAG
CCTATCGCTCC

【0082】

細胞内ドメイン：CD3ゼータシグナル伝達領域：

【0083】

AGAGTGAAGTTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCA
GCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGA
GACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAA
GGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGG
GATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCA
GTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGGCCCTGCCCCCTCGC
TAA

である。

【0084】

各々の例示的なドメイン構成要素のさらなる実施形態は、上記で開示された核酸配列によってコードされるタンパク質と少なくとも70%、またはあるいは少なくとも80%のアミノ酸配列同一性、好ましくは90%の配列同一性、より好ましくは少なくとも95%の配列同一性を共有する類似の生物機能を有する他のタンパク質を含む。さらに、そのようなドメインの非制限的な例を本明細書に提供する。

【0085】

本明細書で使用される場合、「第1世代CAR」は、抗原に結合することが可能な細胞外ドメイン、細胞外ドメインが由来するポリペプチドとは異なるポリペプチドに由来する膜貫通ドメイン、および少なくとも1つの細胞内ドメインを含むCARを指す。「第2世代CAR」は、1つの共刺激ドメイン（例えば、4-1BBまたはCD28）をさらに含む第1世代CARを指す。「第3世代CAR」は、2つの共刺激ドメイン（例えば、CD27、CD28、ICOS、4-1BB、またはOX40）をさらに含む第1世代CARを指す。「第4世代CAR」（「TRUCK」としても公知）は、追加の因子（例えば、炎症促進性サイトカインIL-12）を分泌するようにさらに操作されたCAR T細胞を指す。これらのCAR技術および細胞治療に関する概説は、Maus, M. et al. Clin. Cancer Res. 22(3): 1875-84(2016)に見出される。

【0086】

本明細書で使用される場合、用語「シグナルペプチド」または「シグナルポリペプチド」は、新たに合成された分泌性のまたは膜ポリペプチドまたはタンパク質のN末端に通常存在するアミノ酸配列を意図する。これは、ポリペプチドを、細胞膜を超えてまたは細胞膜内に方向付けるように作用し、その後除去される。そのような例は当技術分野で周知であ

10

20

30

40

50

る。非制限的な例は、米国特許第 8, 853, 381 号および第 5, 958, 736 号に記載されるものである。

【0087】

本明細書で調節ポリヌクレオチドを参照して使用される場合、用語「動作可能に連結された」は、特異的タンパク質が調節ポリヌクレオチドに結合すると、連結されたポリヌクレオチドが転写されるように、調節ポリヌクレオチドと、それが連結されるポリヌクレオチド配列との間の会合を指す。

【0088】

「組成物」は、典型的に活性剤、例えば CAR T 細胞または CAR NK 細胞、抗体、化合物、および不活性（例えば、検出可能な作用剤または標識）または活性な天然に存在するまたは天然に存在しない担体、例えばアジュバント、希釈剤、結合剤、安定化剤、緩衝液、塩類、親油性溶媒、保存剤、アジュバント等の組合せを意図し、薬学的に許容される担体を含む。担体はまた、薬学的賦形剤、および添加剤タンパク質、ペプチド、アミノ酸、脂質、および炭水化物（例えば、単糖、ジ、トリ、テトラオリゴ糖、およびオリゴ糖；誘導体化糖、例えばアルジトール、アルドン酸、エステル化糖等、および多糖類、または糖ポリマーを含む糖）も含み、単独でまたは組み合わせて、単独または重量もしくは体積で 1 ~ 99.99 % を含んで存在することができる。例示的なタンパク質賦形剤としては、血清アルブミン、例えばヒト血清アルブミン（HSA）、組換えヒトアルブミン（rHA）、ゼラチン、カゼイン等が挙げられる。緩衝能に関して機能することができる代表的なアミノ酸／抗体構成要素としては、アラニン、アルギニン、グリシン、アルギニン、ベタイン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、システイン、リシン、ロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、アスパルテーム等が挙げられる。炭水化物賦形剤もまた、この技術の範囲内であると意図され、その例としては、これらに限定されないが、単糖、例えばフルクトース、マルトース、ガラクトース、グルコース、D-マンノース、ソルボース等；二糖、例えばラクトース、スクロース、トレハロース、セロビオース等；多糖、例えばラフィノース、メレジトース、マルトデキストリン、デキストラン、デンプン等；ならびにアルジトール、例えばマンニトール、キシリトール、マルチトール、ラクチトール、キシリトール、ソルビトール（グルシトール）、およびミオイノシトールが挙げられる。

【0089】

細胞、処置、治療、作用剤、薬物、および薬学的製剤を含む、本開示に従って使用される組成物は、投与を容易にするためおよび投薬量を均一にするために単位投薬剤形に包装することができる。用語「単位用量」または「投薬量」は、対象において使用するために適した物理的に個別の単位を指し、各単位はその投与、すなわち適切な経路およびレジメンに関連して所望の応答を生じるように計算された組成物の既定量を含有する。投与される量は、処置の回数および単位用量の両方に従い、所望の結果および／または保護に依存する。組成物の正確な量はまた、医師の判断にも依存し、各個体に対して特異的である。用量に影響を及ぼす要因としては、対象の身体状況および臨床状況、投与経路、意図される処置の目標（症状の軽減または治癒）、ならびに特定の組成物の効力、安定性、および毒性が挙げられる。製剤化されると、溶液は、投薬製剤と適合する様式、および治療的または予防的に有効な量で投与される。製剤は、多様な投薬剤形で、例えば本明細書に記載される注射可能溶液のタイプで容易に投与される。

【0090】

用語「コンセンサス配列」は、本明細書で使用される場合、複数の配列のシリーズを整列させることによって決定され、その複数の配列の各々の対応する位置でアミノ酸または塩基の優勢な選択を表す理想的な配列を定義するアミノ酸または核酸配列を指す。複数の配列のシリーズの配列に応じて、そのシリーズのコンセンサス配列は、ゼロ、1つ、少数、またはそれより多くの置換によって配列の各々とは異なり得る。同様に、複数の配列のシリーズの配列に応じて、1つより多くのコンセンサス配列がそのシリーズに関して決定され得る。コンセンサス配列の生成は、集中的数理解析に供されている。様々なソフトウェ

10

20

30

40

50

アプログラムを使用してコンセンサス配列を決定することができる。

【0091】

本明細書で使用される場合、用語「CD8 α ヒンジドメイン」は、この名称に関連する特定のタンパク質断片、および本明細書で示されるCD8 α ヒンジドメイン配列と少なくとも70%、またはあるいは少なくとも80%のアミノ酸配列同一性、またはあるいは少なくとも90%の配列同一性、またはあるいは少なくとも95%の配列同一性を共有する類似の生物機能を有する他の任意の分子を指す。ヒト、マウス、および他の種のCD8 α ヒンジドメインの例としての配列は、Pinto, R.D. et al.(2006) Vet. Immunol. Immunopathol. 110:169-177に提供される。CD8 α ヒンジドメインに関連する配列は、Pinto, R.D. et al.(2006) Vet. Immunol. Immunopathol. 110:169-177に提供される。そのような非制限的な例としては：

10

ヒトCD8アルファヒンジドメイン；

PAKPTTTTPAPRPPTTAPPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH
TRGLDFACDIY

マウスCD8アルファヒンジドメイン；

KVNSTTTTKPVLRTTPSPVHPTGTSTQPQRPEDCRPRGSAVKGT
GLDFACDIY

ネコCD8アルファヒンジドメイン；

PVKPTTTTPAPRPPTTQAPITTSQRVSLRPGTCQPSAGSTVE
ASGLDLSACDIY、およびその各々の均等物が挙げられる。

20

【0092】

本明細書で使用される場合、用語「CD8 α 膜貫通ドメイン」は、この名称に関連する特定のタンパク質断片、および本明細書で示されるCD8 α 膜貫通ドメイン配列と少なくとも70%、またはあるいは少なくとも80%のアミノ酸配列同一性、またはあるいは少なくとも90%の配列同一性、またはあるいは少なくとも95%の配列同一性を共有する類似の生物機能を有する他の任意の分子を指す。ヒトT細胞表面糖タンパク質CD8アルファ鎖（NCBI参照配列：NP_001759.3）のアミノ酸183～203位、またはマウスT細胞表面糖タンパク質CD8アルファ鎖（NCBI参照配列：NP_001074579.1）のアミノ酸197～217位、およびラットT細胞表面糖タンパク質CD8アルファ鎖（NCBI参照配列：NP_113726.1）のアミノ酸190～210位に関連する断片配列は、CD8 α 膜貫通ドメインの追加の例としての配列を提供する。記載のNCBIの各々に関連する配列は以下のように提供される：

30

ヒトCD8アルファ膜貫通ドメイン：IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT；

マウスCD8アルファ膜貫通ドメイン：IWAPLAGICVALLLSLIIITLI；

ラットCD8アルファ膜貫通ドメイン：IWAPLAGICAVLLLSLVITLI、
およびその各々の均等物。

【0093】

本明細書で使用される場合、用語「CD28膜貫通ドメイン」は、この名称に関連する特定のタンパク質断片、および本明細書で示されるCD28膜貫通ドメイン配列と少なくとも70%、またはあるいは少なくとも80%のアミノ酸配列同一性、少なくとも90%の配列同一性、またはあるいは少なくとも95%の配列同一性を共有する類似の生物機能を有する他の任意の分子を指す。GenBank受託番号：XM_006712862.2およびXM_009444056.1に関連する断片配列は、CD28膜貫通ドメインの追加の非制限的な例としての配列を提供する。記載の受託番号の各々に関連する配列は本明細書に組み込まれる。

40

【0094】

本明細書で使用される場合、用語「4-1BB共刺激シグナル伝達領域」は、この名称に関連する特定のタンパク質断片、および本明細書で示される4-1BB共刺激シグナル伝達領域配列と少なくとも70%、またはあるいは少なくとも80%のアミノ酸配列同一性、またはあるいは90%の配列同一性、またはあるいは少なくとも95%の配列同一性を

50

共有する類似の生物機能を有する他の任意の分子を指す。4-1BB共刺激シグナル伝達領域の例示的な配列は、米国特許出願公開第2013/0266551A1号（米国特許出願第13/826,258号として提出）に提供される。米国特許出願第13/826,258号に開示される関連する4-1BB共刺激シグナル伝達領域の配列を以下に開示する：

【0095】

4-1BB共刺激シグナル伝達領域：

K R G R K K L L Y I F K Q P F M R P V Q T T Q E E D G C S C R F P E E E E G G C E L、およびその各々の均等物。

【0096】

本明細書で使用される場合、用語「CD28共刺激シグナル伝達領域」は、この名称に関連する特定のタンパク質断片、および本明細書で示されるCD28共刺激シグナル伝達領域配列と少なくとも70%、またはあるいは少なくとも80%のアミノ酸配列同一性、またはあるいは90%の配列同一性、またはあるいは少なくとも95%の配列同一性を共有する類似の生物機能を有する他の任意の分子を指す。CD28共刺激領域は、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインを含む。CD28共刺激シグナル伝達ドメインの例示的な配列は、米国特許第5,686,281号；Geiger, T.L. et al.(2001) Blood 98: 2364-2371；Hombach, A. et al.(2001) J Immunol. 167:6123-6131；Maher, J. et al.(2002) Nat Biotechnol. 20:70-75；Haynes, N.M. et al.(2002) J Immunol. 169:5780-5786；Haynes, N.M. et al.(2002) B blood 100:3155-3163に提供される。非制限的な例としては、以下のCD28配列の残基114～220：MLRLLALNL FPSIQVTGNK ILVKQSPMLV AYDNAVNLS C KYSYNLFSRE FRASLHKGLDSAVEVCVVYG NYSQQLQVYS KTGFNCDGKL GNESVTFYLQ NLYVNQTDIY FCKIEVMYPPPYLDNEKSNG TIIHVKGKHL CP SPLFPGPS KPFWVLVVVG GVLACYSLLVTVAFIIFWVR SKRSRLHSD YNMNTPRRPG PTRKHYQPYA PPRDFAAYRS、およびその均等物が挙げられる。

【0097】

本明細書で使用される場合、用語「ICOS共刺激シグナル伝達領域」は、この名称に関連する特定のタンパク質断片、および本明細書で示されるICOS共刺激シグナル伝達領域配列と少なくとも70%、またはあるいは少なくとも80%のアミノ酸配列同一性、好ましくは90%の配列同一性、より好ましくは少なくとも95%の配列同一性を共有する類似の生物機能を有する他の任意の分子を指す。ICOS共刺激シグナル伝達領域の非制限的な例としての配列は、米国特許出願公開第2015/0017141A1号に提供され、例示的なポリヌクレオチド配列を以下に提供する。

【0098】

ICOS共刺激シグナル伝達領域：

【0099】

ACAAAAAAGAAAGTATTCATCCAGTGTGCACGACCCTAACGGTGAATACATGTTTCAT GAGAGCAGTGAACACAGCCAAAAAATCCAGACTCACAGATGTGACCCTA

【0100】

本明細書で使用される場合、用語「OX40共刺激シグナル伝達領域」は、この名称に関連する特定のタンパク質断片、および本明細書で示されるOX40共刺激シグナル伝達領域配列と少なくとも70%、またはあるいは少なくとも80%のアミノ酸配列同一性、またはあるいは90%の配列同一性、またはあるいは少なくとも95%の配列同一性を共有する類似の生物機能を有する他の任意の分子を指す。OX40共刺激シグナル伝達領域の非制限的な例としての配列は、米国特許出願公開第2012/20148552A1号に開示され、以下に提供される例示的な配列を含む。

【0101】

OX40共刺激シグナル伝達領域：

【0102】

10

20

30

40

50

AGGGACCAG AGGCTGCCCC CCGATGCCCA CAAGCCCCCT GGGGGAGGCA G
TTTCCGGAC CCCCATCCAA GAGGAGCAGG CCGACGCCCA CTCCACCCTG G
CCAAGATC

【0103】

本明細書で使用される場合、用語「CD3ゼータシグナル伝達ドメイン」は、この名称に関連する特定のタンパク質断片、および本明細書で示されるCD3ゼータシグナル伝達ドメイン配列と少なくとも70%、またはあるいは少なくとも80%のアミノ酸配列同一性、またはあるいは90%の配列同一性、またはあるいは少なくとも95%の配列同一性を共有する類似の生物機能を有する他の任意の分子を指す。CD3ゼータシグナル伝達ドメインの例としての配列は、米国特許出願第13／826,258号（米国特許出願公開第2013／0266551号として公開）に提供される。CD3ゼータシグナル伝達ドメインに関連する配列は以下：

10

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQE
GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
、およびその均等物として記載される。

【0104】

本明細書で使用される場合、用語「T2A」および「2Aペプチド」は、互換的に使用され、任意の2Aペプチドもしくはその断片、任意の2A様ペプチドもしくはその断片、またはXが一般的に自己切断であると考えられる任意のアミノ酸を指すコンセンサスポリペプチドモチーフD-V／I-E-X-N-P-G-Pを含有する比較的短いペプチド配列（起源のウイルスに応じて20アミノ酸長の次元の）において必須のアミノ酸を含む人工ペプチドを指す。

20

【0105】

本明細書で使用される場合、用語「自殺遺伝子」は、細胞のアポトーシスを誘導することが可能な遺伝子であり、非制限的な例としては、HSV-TK（単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ）、シトシンデアミナーゼ、ニトロレダクターゼ、カルボキシエステラーゼ、シトクロムP450またはPNP（プリンヌクレオシドホスホリラーゼ）、切断型EGFR、または誘導型カスパーゼ（「iCasp」）が挙げられる。自殺遺伝子は、多様な経路に沿って機能し得、一部の例では低分子などの誘導剤によって誘導可能であり得る。例えば、iCasp自殺遺伝子は、誘導剤に結合するように最適化されたタンパク質に動作可能に連結されたカスパーゼタンパク質の部分を含み、自殺遺伝子を含む誘導剤を細胞に導入すると、カスパーゼの活性化および前記細胞のその後のアポトーシスをもたらす。

30

【0106】

本明細書で使用される場合、用語「CARの発現および／または活性化を制御するためのスイッチ機構」は、細胞外、膜貫通、および細胞内ドメインを指し、細胞外ドメインは、標的細胞上でまたは標的細胞によって発現される標的抗原以外の分子に対して特異的な標識、結合ドメイン、またはタグを含む標的的特異的結合エレメントを含む。CARの特異性は、標的抗原結合ドメイン、およびCAR上の標識、結合ドメイン、またはタグによって認識されるまたはそれらに結合するドメインを含む第2の構築物によって提供される。例えば、WO2013／044225号、WO2016／000304号、WO2015／057834号、WO2015／057852号、WO2016／070061号、米国特許第9,233,125号、米国特許出願公開第2016／0129109号を参照されたい。このように、CARを発現するT細胞を対象に投与することができるが、これは特異的結合ドメインを含む第2の組成物が投与されるまでその標的抗原に結合することができない。

40

【0107】

本明細書で使用される場合、用語「B細胞」は、適応免疫系の液性免疫におけるリンパ球のタイプを指す。B細胞は、主に抗体を作製するように機能し、抗原提示細胞として作用し、サイトカインを放出し、および抗原相互作用による活性化後にメモリーB細胞を発達

50

させる。B細胞は、他のリンパ球、例えばT細胞とは、細胞表面上のB細胞受容体の存在によって区別することができる。B細胞は、単離され得るか、または市販の供給源から得ることができる。市販のB細胞株の非制限的な例としては、株AHH-1(ATCC(登録商標)CRL-8146(商標))、BC-1(ATCC(登録商標)CRL-2230(商標))、BC-2(ATCC(登録商標)CRL-2231(商標))、BC-3(ATCC(登録商標)CRL-2277(商標))、CA46(ATCC(登録商標)CRL-1648(商標))、DG-75[D.G.-75](ATCC(登録商標)CRL-2625(商標))、DS-1(ATCC(登録商標)CRL-11102(商標))、EB-3[EB3](ATCC(登録商標)CCL-85(商標))、Z-138(ATCC #CRL-3001)、DB(ATCC CRL-2289)、Toledo(ATCC CRL-2631)、Pfeiffer(ATCC CRL-2632)、SR(ATCC CRL-2262)、JM-1(ATCC CRL-10421)、NFS-5 C-1(ATCC CRL-1693)；NFS-70 C10(ATCC CRL-1694)、NFS-25 C-3(ATCC CRL-1695)、およびSUP-B15(ATCC CRL-1929)が挙げられる。さらなる例としては、これらに限定されないが、未分化および大細胞リンパ腫に由来する細胞株、例えば、DEL、DL-40、FE-PD、JB6、Karpas299、Ki-JK、Mac-2APly1、SR-786、SU-DHL-1、-2、-4、-5、-6、-7、-8、-9、-10、および-16、DOHH-2、NU-DHL-1、U-937、Granda519、USC-DHL-1、RL；ホジキンリンパ腫、例えば、DEV、HD-70、HDL-2、HD-MyZ、HKB-1、KM-H2、L428、L540、L1236、SBH-1、SUP-HD1、SU/RH-HD-1が挙げられる。そのような市販の細胞株の非制限的な例示的な供給源としては、American Type Culture CollectionまたはATCC(www.atcc.org/)、およびGerman Collection of Microorganisms and Cell Cultures(<https://www.dsmz.de/>)が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0108】

本明細書で使用される場合、用語「T細胞」は、胸腺において成熟するリンパ球のタイプを指す。T細胞は、細胞媒介性免疫において重要な役割を果たし、他のリンパ球、例えばB細胞とは細胞表面上のT細胞受容体の存在によって区別される。T細胞は、単離され得るか、または市販の供給源から得ることができる。「T細胞」は、ヘルパーT細胞(CD4+細胞)、細胞傷害性T細胞(CD8+細胞)、ナチュラルキラーT細胞、制御性T細胞(Treg)、およびガンマーデルタT細胞を含む、CD3を発現する全てのタイプの免疫細胞を含む。「細胞傷害性細胞」は、CD8+T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、および好中球を含み、これらの細胞は細胞傷害性応答を媒介することが可能である。市販のT細胞株の非制限的な例としては、株BCL2(AAA) Jurkat(ATCC(登録商標)CRL-2902(商標))、BCL2(S70A) Jurkat(ATCC(登録商標)CRL-2900(商標))、BCL2(S87A) Jurkat(ATCC(登録商標)CRL-2901(商標))、BCL2 Jurkat(ATCC(登録商標)CRL-2899(商標))、Neo Jurkat(ATCC(登録商標)CRL-2898(商標))、TALL-104細胞傷害性ヒトT細胞株(ATCC #CRL-11386)が挙げられる。さらなる例としては、これらに限定されないが、成熟T細胞株、例えばDeglis、EBT-8、HPB-Mlp-W、HUT78、HUT102、Karpas384、Ki225、My-La、Se-Ax、SKW-3、SMZ-1、およびT34；ならびに未成熟T細胞株、例えばALL-SIL、Be13、CCRF-CEM、CML-T1、DND-41、DU.528、EU-9、HD-Mar、HPB-ALL、H-SB2、HT-1、JK-T1、Jurkat、Karpas45、KE-37、KOPT-K1、K-T1、L-KAW、Loucy、MAT、MOLT-1、MOLT3、MOLT-4、MOLT13、MOLT-16、MT-1、MT

-ALL、P12/Ichikawa、Peer、PER0117、PER-255、PF-382、PFI-285、RPMI-8402、ST-4、SUP-T1~T14、TALL-1、TALL-101、TALL-103/2、TALL-104、TALL-105、TALL-106、TALL-107、TALL-197、TK-6、TLBR-1、-2、-3、および-4、CCRF-HSB-2 (CCL-120.1)、J.RT3-T3.5 (ATCC TIB-153)、J45.01 (ATCC CRL-1990)、J.CaM1.6 (ATCC CRL-2063)、RS4;11 (ATCC CRL-1873)、CCRF-CEM (ATCC CRM-CCL-119) ; ならびに皮膚T細胞リンパ腫株、例えば、HuT78 (ATCC CRM-TIB-161)、MJ[G11] (ATCC CRL-8294)、HuT102 (ATCC TIB-162) が挙げられる。REH、NAL-1、KM-3、L92-221を含むがこれらに限定されないヌル細胞型白血病株は、他の白血病およびリンパ腫に由来する細胞株、例えばK562赤白血病、THP-1単球性白血病、U937リンパ腫、HEL赤白血病、HL60白血病、HMC-1白血病、KG-1白血病、U266骨髓腫と同様に、免疫細胞の別の市販の供給源である。そのような市販の細胞株の非制限的な例示的な供給源としては、American Type Culture CollectionまたはATCC (<http://www.atcc.org/>) およびGerman Collection of Microorganisms and Cell Cultures (<https://www.dsmz.de/>) が挙げられる。

10

20

【0109】

本明細書で使用される場合、用語「NK細胞」は、ナチュラルキラー細胞としても公知であり、骨髓を起源とし、自然免疫系において重要な役割を果たすリンパ球のタイプを指す。NK細胞は、細胞表面上に抗体および主要組織適合遺伝子複合体が存在しない場合であっても、ウイルス感染細胞、腫瘍細胞、または他のストレスを受けた細胞に対して急速な免疫応答を提供する。NK細胞は、単離され得るか、または市販の供給源から得ることができる。市販のNK細胞株の非制限的な例としては、株NK-92 (ATCC (登録商標) CRL-2407 (商標))、NK-92MI (ATCC (登録商標) CRL-2408 (商標)) が挙げられる。さらなる例としては、これらに限定されないが、NK株HANK1、KHYG-1、NKL、NK-YS、NOI-90、およびYTが挙げられる。そのような市販の細胞株の非制限的な例示的な供給源としては、American Type Culture CollectionまたはATCC (<http://www.atcc.org/>) およびGerman Collection of Microorganisms and Cell Cultures (<https://www.dsmz.de/>) が挙げられる。

30

【0110】

本明細書で使用される場合、用語「CRISPR」は、clustered regularly interspaced short palindromic repeats (クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート) 経路に依存する配列特異的遺伝子操作技術を指す。CRISPRを使用して、遺伝子編集および／または遺伝子調節を行うことができ、ならびに単純に特異的ゲノム位置にタンパク質を標的化することができる。「遺伝子編集」は、標的ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が、ポリヌクレオチド配列に対する欠失、挿入、一本鎖もしくは二本鎖切断、または塩基置換の導入を通して変化する遺伝子操作のタイプを指す。一部の態様では、CRISPR媒介遺伝子編集は、非相同末端結合 (NHEJ) または相同組換えを利用して編集を実施する。遺伝子調節は、タンパク質またはRNAなどの特異的遺伝子産物の産生の増加または減少を指す。

40

【0111】

用語「gRNA」または「ガイドRNA」は、本明細書で使用される場合、CRISPR技術を用いる遺伝子編集のために特異的ポリヌクレオチド配列を標的化するために使用されるガイドRNA配列を指す。標的特異性のためにgRNAおよびドナー治療ポリヌクレオチドを設計する技術は、当技術分野で周知である。例えば、Doench, J., et al.

50

Nature biotechnology 2014; 32(12):1262-7、Mohr, S. et al.(2016) FEBS Journal 283: 3232-38、およびGraham, D., et al. Genome Biol. 2015; 16: 260を参照されたい。gRNAは、CRISPR RNA (crRNA) およびトランス活性化CRISPR RNA (tracrRNA) を含む融合ポリヌクレオチド；またはCRISPR RNA (crRNA) およびトランス活性化CRISPR RNA (tracrRNA) を含むポリヌクレオチドを含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。一部の態様では、gRNAは合成である (Kelley, M. et al.(2016) J of Biotechnology 233(2016) 74-83)。

【0112】

用語「Cas9」は、この名称で呼ばれるCRISPR関連エンドヌクレアーゼを指す。非制限的な例示的なCas9としては、Staphylococcus aureus Cas9、ヌクレアーゼデッドCas9、ならびにオルトログおよびその各々の生物学的均等物が挙げられる。オルトログとしては、これらに限定されないが、Streptococcus pyogenes Cas9 (「spCas9」)、Streptococcus thermophiles、Legionella pneumophila、Neisseria lactamica、Neisseria meningitidis、Francisella novicidaからのCas9；ならびにAcidaminococcus spp. およびFrancisella novicida U112を含む様々な細菌種からのCpf1 (Cas9と類似のカッティング機能を実施する) が挙げられる。

【0113】

本明細書で使用される場合、用語「核酸配列」および「ポリヌクレオチド」は、互換的に使用され、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドのいずれかの任意の長さのヌクレオチドのポリマー型を指す。このように、この用語は、これらに限定されないが、一本鎖、二本鎖、または多重鎖のDNAまたはRNA、ゲノムDNA、cDNA、DNA-RNAハイブリッド、あるいはプリンおよびピリミジン塩基、または他の天然の、化学改変もしくは生化学改変された、非天然の、または誘導体化ヌクレオチド塩基を含むポリマーを含む。

【0114】

用語「コードする」は、核酸配列に適用される場合、その天然の状況にある場合または当業者に周知の方法によって操作された場合に、転写および／または翻訳されて、ポリペプチドおよび／またはその断片のためのmRNAを産生することができる場合に、ポリペプチドを「コードする」と言われるポリヌクレオチドを指す。アンチセンス鎖は、そのような核酸の相補体であり、コード配列をそこから推定することができる。

【0115】

本明細書で使用される場合、用語シグナルペプチドまたはシグナルポリペプチドは、新たに合成された分泌性のまたは膜ポリペプチドまたはタンパク質のN末端に通常存在するアミノ酸配列を意図する。これは、ポリペプチドを、細胞膜を超えてまたは細胞膜内に方向付けるように作用し、その後除去される。そのような例は当技術分野で周知である。非制限的な例は、米国特許第8,853,381号および第5,958,736号に記載されるものである。

【0116】

本明細書で使用される場合、用語「ベクター」は、プラスミド、ウイルス、コスミド、ファージ、BAC、YAC等を含むがこれらに限定されない、異なる宿主間を移動するように設計された核酸構築物を指す。「ウイルスベクター」は、in vivo、ex vivo、またはin vitroのいずれかで宿主細胞に送達されるポリヌクレオチドを含む組換えにより産生されたウイルスまたはウイルス粒子として定義される。一部の実施形態では、プラスミドベクターは市販のベクターから調製され得る。他の実施形態では、ウイルスベクターは、当技術分野で公知の技術に従って、バキュロウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、AAV等から産生され得る。一実施形態では、ウイルスベクターは

、レンチウイルスベクターである。ウイルスベクターの例としては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、アルファウイルスベクター等が挙げられる。感染性のタバコモザイクウイルス（TMV）に基づくベクターは、タンパク質を製造するために使用することができ、タバコの葉にグリフィスシンを発現することが報告されている（O'Keefe et al.(2009) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 106(15):6099-6104）。アルファウイルスベクター、例えばセムリキ森林ウイルスに基づくベクターおよびシンドビスウイルスに基づくベクターもまた、遺伝子治療および免疫療法において使用するために開発されている。Schlesinger & Dubensky(1999) Curr. Opin. Biotechnol. 5:434-439およびYing et al.(1999) Nat. Med. 5(7):823-827を参照されたい。遺伝子移入がレトロウイルスベクターによって媒介される態様では、ベクター構築物は、レトロウイルスゲノムまたはその一部およびCARをコードするポリヌクレオチドなどの目的の遺伝子を含むポリヌクレオチドを指す。遺伝子移入において使用するためにベクターの近代的使用に関するさらなる詳細は、例えば、Kotterman et al.(2015) Viral Vectors for Gene Therapy: Translational and Clinical Outlook Annual Review of Biomedical Engineering 17に見出され得る。プロモーターおよびその中にポリヌクレオチドを動作可能に連結することができるクロニングサイトの両方を含むベクターは、当技術分野で周知である。そのようなベクターは、*in vitro*または*in vivo*でRNAを転写することが可能であり、Agilent Technologies (Santa Clara, Calif.) およびPromega Biotech (Madison, Wis.)などの供給源から市販されている。

10

20

【0117】

本明細書で使用される場合、用語「単離された細胞」は、一般的に組織の他の細胞から実質的に分離されている細胞を指す。用語は、原核細胞および真核細胞を含む。

【0118】

「免疫細胞」としては、例えば、骨髄で産生される造血幹細胞（HSC）に由来する白血球（blood cell）（白血球（leukocyte））、リンパ球（T細胞、B細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞）、および骨髄由来細胞（好中球、好酸球、好塩基球、単球、マクロファージ、樹状細胞）が挙げられる。「T細胞」は、ヘルパーT細胞（CD4+細胞）、細胞傷害性T細胞（CD8+細胞）、ナチュラルキラーT細胞、制御性T細胞（Treg）、およびガンマデルタT細胞を含む、CD3を発現する免疫細胞の全てのタイプを含む。「細胞傷害性細胞」は、CD8+T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、および好中球を含み、これらの細胞は細胞傷害性応答を媒介することが可能である。

30

【0119】

本明細書で使用される場合、語句「免疫応答」またはその均等物「免疫学的応答」は、細胞媒介性の応答（例えば、抗原特異的T細胞またはその分泌産物によって媒介される）の発生を指す。細胞性免疫応答は、ウイルス感染症を処置または防止するため、抗原特異的Breg細胞、TC1、CD4+ヘルパーT細胞、および／もしくはCD8+細胞傷害性T細胞、ならびに／または疾患により生成された自己制御性T細胞およびB細胞「メモリー」細胞を増大させるために、クラスIまたはクラスII MHC分子に関連するポリペプチドエピトープの提示によって誘発される。応答はまた、他の構成要素の活性化も伴い得る。一部の態様では、用語「免疫応答」は、免疫細胞の制御性ネットワークの形成を包含するために使用され得る。このように、用語「制御性ネットワーク形成」は、免疫細胞、好ましくはT細胞、より好ましくは制御性T細胞が、例えばB細胞またはその非制限的な例が樹状細胞、単球、およびマクロファージである抗原提示細胞などの、しかしこれらに限定されない他の免疫細胞のさらなる分化をトリガするように誘発された免疫応答を指し得る。ある特定の実施形態では、制御性ネットワークの形成は、B細胞が制御性B細胞へと分化することを伴う。ある特定の実施形態では、制御性ネットワークの形成は、寛容原性抗原提示細胞の形成を伴う。

40

【0120】

50

用語「形質導入する」または「形質導入」は、キメラ抗原受容体細胞の産生に適用される場合、外来のヌクレオチド配列が細胞に導入されるプロセスを指す。一部の実施形態では、この形質導入はベクターを介して行われる。

【0121】

本明細書で使用される場合、細胞に関連する場合の用語「自己」は、単離され、同じ対象（レシピエントまたは宿主）に戻すように注入される細胞を指す。「同種」は、非自己細胞を指す。

【0122】

「有効量」または「有効な量」は、哺乳動物または他の対象を処置するために投与される場合、疾患のそのような処置を行うために十分である作用剤（例えば、HLA-DRCAR細胞）の量、または2つもしくはそれより多くの作用剤の組み合わせた量を指す。「有効量」は、作用剤、疾患およびその重症度、ならびに処置される対象の年齢、体重等に応じて変化する。

【0123】

本明細書で使用される場合、「がん」は、異常な制御されない複製を示す細胞が対象に存在することによって特徴付けられる疾患状況であり、用語「腫瘍」と互換的に使用される。

【0124】

「固形腫瘍」は、通常、嚢胞または液体領域を含有しない異常な組織塊である。固形腫瘍は良性または悪性であり得る。異なるタイプの固形腫瘍は、それらを形成する細胞のタイプから名付けられる。固形腫瘍の例としては、肉腫、癌腫、およびリンパ腫が挙げられる。

【0125】

用語「B細胞リンパ腫または白血病」は、リンパ系または骨髄の組織（issues）において形成し、がん内の細胞を体の他の部分に浸潤するまたは広がる能力によって宿主生物に対して病的にする悪性の形質転換を受けたがんのタイプを指す。

【0126】

本明細書で使用される場合、用語「含む」は、組成物および方法が列挙されたエレメントを含むが他を排除しないことを意味すると意図される。「から本質的になる」は、組成物および方法を定義するために使用される場合、意図される使用の組合せに対して本質的に重要ないかなる他のエレメントも排除することを意味する。例えば、本明細書において定義されるエレメントから本質的になる組成物は、単離および精製方法による微量の夾雑物、ならびに薬学的に許容される担体、例えばリン酸緩衝食塩水、保存剤等を排除しない。「からなる」は、他の成分の微量より多くのエレメントおよび本明細書に開示される組成物を投与するための実質的な方法ステップを排除することを意味する。これらの移行句の各々によって定義される態様は、本開示の範囲内である。

【0127】

本明細書で使用される場合、用語「検出可能マーカー」は、検出可能なシグナルを直接または間接的に産生することが可能な少なくとも1つのマーカーを指す。このマーカーの非網羅的なリストは、例えば比色測定、蛍光、発光によって検出可能なシグナルを産生する酵素、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、発色団、例えば蛍光、発光色素、電子顕微鏡によってまたは導電率、電流計、電圧計、インピーダンスなどのその電気的特性によって検出される電子密度を有する基、検出可能な基、例えばその分子が、その物理的および／または化学的特性の検出可能な改変を誘導するために十分なサイズである基が挙げられ、そのような検出は、光学的方法、例えば回折、表面プラズモン共鳴、表面変化、接触角変化、または原子力分光法、トンネル効果、もしくは放射活性分子、例えば ^{32}P 、 ^{35}S 、もしくは ^{125}I などの物理的方法によって達成可能である。

【0128】

本明細書で使用される場合、用語「精製マーカー」は、精製または同定にとって有用な少

10

20

30

40

50

なくとも1つのマーカーを指す。このマーカーの非網羅的なリストは、His、lacZ、GST、マルトース結合タンパク質、NusA、BCCP、c-myc、CaM、FLAG、GFP、YFP、チェリー、チオレドキシン、ポリ(NANP)、V5、Snap、HA、キチン結合タンパク質、Softag1、Softag3、Strep、またはS-タンパク質を含む。適した直接または間接的蛍光マーカーは、FLAG、GFP、YFP、RFP、dTomato、チェリー、Cy3、Cy5、Cy5.5、Cy7、DNBP、AMCA、ビオチン、ジゴキシゲニン、Tamra、テキサスレッド、ローダミン、Alexa fluors、FITC、TRITC、または他の任意の蛍光色素もしくはハプテンを含む。

【0129】

本明細書で使用される場合、用語「発現」は、ポリヌクレオチドがmRNAに転写されるプロセスおよび／またはそれによって転写されたmRNAがその後ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質に翻訳されるプロセスを指す。ポリヌクレオチドがゲノムDNAに由来する場合、発現は、真核細胞におけるmRNAのスプライシングを含み得る。遺伝子の発現レベルは、細胞または組織試料中のmRNAまたはタンパク質の量を測定することによって決定され得る。一態様では、1つの試料からの遺伝子の発現レベルを、対照または参照試料からのその遺伝子の発現レベルと直接比較してもよい。別の態様では、1つの試料からの遺伝子の発現レベルを、化合物を投与後の同じ試料からのその遺伝子の発現レベルと直接比較してもよい。

【0130】

本明細書で使用される場合、2つまたはそれより多くの核酸またはポリペプチド配列の文脈において使用される場合の「相同性」または「同一な」、パーセント「同一性」または「類似性」は、明記された領域（例えば、本明細書に記載される抗体をコードするヌクレオチド配列または本明細書に記載される抗体のアミノ酸配列）に対して同じであるか、または同じであるヌクレオチドもしくはアミノ酸残基の明記されたパーセンテージ、例えば少なくとも60%同一性、好ましくは少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはそれより高い同一性を有する2つまたはそれより多くの配列または小配列を指す。相同性は、比較目的のために整列させることができる各々の配列における位置を比較することによって決定することができる。比較される配列における位置が同じ塩基またはアミノ酸によって占有されている場合、分子はその位置で相同である。配列間の相同性の程度は、配列によって共有されるマッチする位置または相同な位置の数の関数である。アライメントおよびパーセント相同性または配列同一性は、当技術分野で公知のソフトウェアプログラム、例えばCurrent Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1987) Supplement 30, section 7.7.18, Table 7.7.1に記載されるプログラムを使用して決定することができる。好ましくは、デフォルトパラメーターをアライメントのために使用する。好ましいアライメントプログラムは、デフォルトパラメーターを使用するBLASTである。特に、好ましいプログラムは、以下のデフォルトパラメーター：遺伝子コード＝標準；フィルター＝なし；ストランド＝両方；カットオフ＝60；期待値＝10；行列＝BLOSUM62；記載＝配列50位；選別＝HIGH SCORE；データベース＝非重複、GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS translations+Swiss Protein+SPupdate+PIRを使用するBLASTNおよびBLASTPである。これらのプログラムの詳細は、以下のインターネットアドレス：ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLASTで見出され得る。用語「相同性」または「同一な」、パーセント「同一性」または「類似性」はまた、試験配列の相補体を指すか、またはそれに適用することができる。これらの用語はまた、欠失および／または付加を有する配列、ならびに置換を有する配列も含む。本明細書に記載されるように、好ましいアルゴリズムは、ギャップ等を考慮に入れることができる。好ましくは、同一性は、少なくとも約25アミノ酸長またはヌクレオチド長である領域、またはより好ましくは少なくとも50～100

10

20

30

40

50

アミノ酸長またはヌクレオチド長にわたって存在する。「無関係な」または「非相同な」配列は、本明細書に開示される配列の1つと40%未満の同一性、またはあるいは25%未満の同一性を共有する。

【0131】

語句「第1選択」、または「第2選択」、または「第3選択」は、患者が受ける処置の順序を指す。第1選択治療レジメンは、最初に与えられる処置であり、第2または第3選択治療はそれぞれ、第1選択治療の後または第2選択治療の後に与えられる処置である。米国国立がん研究所は、第1選択治療を「疾患または状態の最初の処置」と定義している。がんを有する患者では、一次処置は、手術、化学療法、放射線療法、またはこれらの治療の組合せであり得る。第1選択治療はまた、当業者に「一次治療および一次処置」とも呼ばれている。National Cancer Instituteのウェブサイト、www.cancer.gov、最終訪問日2008年5月1日を参照されたい。典型的には、患者が第1選択治療に対して正の臨床応答または亜臨床応答を示さなかった場合、または第1選択治療を中止した場合に、患者には、その後の化学療法レジメンが与えられる。

10

【0132】

一態様では、抗体の「均等物」または「生物学的均等物」という用語は、ELISAまたは他の適した方法によって測定した場合に、抗体がそのエピトープタンパク質またはその断片に選択的に結合する能力を意味する。生物学的に均等な抗体としては、これらに限定されないが、参照抗体と同じエピトープに結合する抗体、ペプチド、抗体断片、抗体バリ

20

【0133】

明白に列挙されていなくとも、および特に意図されていなくとも、本開示がポリペプチド、タンパク質、ポリヌクレオチド、抗体またはその断片に関する場合、そのようなものの均等物または生物学的均等物は、本開示の範囲内であると意図されると推論すべきである。本明細書で使用される場合、用語「その生物学的均等物」は、参照タンパク質、抗体もしくはその断片、ポリペプチド、または核酸に言及する場合の「その均等物」と同義であると意図され、最小の相同性を有するが、なおも所望の構造または機能性を維持する均等物を意図する。本明細書に具体的に列挙されていない限り、上記のいずれもその均等物を含むと企図される。例えば、均等物は、参照タンパク質、ポリペプチド、抗体もしくはその断片、または核酸に対して少なくとも約70%の相同性もしくは同一性、または少なくとも80%の相同性もしくは同一性、およびあるいは、または少なくとも約85%、またはあるいは少なくとも約90%、またはあるいは少なくとも約95%、またはあるいは少なくとも98%のパーセント相同性または同一性を意図する、および／あるいは実質的に均等な生物活性を示す。あるいはポリヌクレオチドを参照する場合、その均等物は、参照ポリヌクレオチドまたはその相補体とストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドである。

30

【0134】

語句「均等なポリペプチド」または「均等なペプチド断片」は、例証されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたは例証されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドのその相補体と、高ストリンジエンシーでハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされ、標準的なまたは対照の生物活性と比較して*in vivo*で類似の生物活性、例えばおよそ100%、またはあるいは90%より高い、またはあるいは85%より高い、またはあるいは70%より高い活性を示すタンパク質、ポリヌクレオチド、またはペプチド断片を指す。本開示の範囲内の追加の実施形態は、60%より高い、またはあるいは65%より高い、またはあるいは70%より高い、またはあるいは75%より高い、またはあるいは80%より高い、またはあるいは85%より高い、またはあるいは90%より高い、またはあるいは95%より高い、またはあるいは97%より高い、またはあるいは98%より高い、または99%の配列相同性を有することによって同定される。パーセンテージ相同性は、適切な条件下でのBLAST実行などのプログラムを使用して配

40

50

列比較することによって決定することができる。一態様では、プログラムは、デフォルトパラメーターの下で実行される。

【0135】

別の配列に対してある特定のパーセンテージ（例えば、80%、85%、90%、または95%）の「配列同一性」を有するポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチド領域（またはポリペプチドもしくはポリペプチド領域）は、整列させた場合に、塩基（またはアミノ酸）のそのパーセンテージが2つの配列の比較において同じであることを意味する。アライメントおよびパーセント相同性または配列同一性は、当技術分野で公知のソフトウェアプログラム、例えばCurrent Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1987) Supplement 30, section 7.7.18, Table 7.7.1に記載されるプログラムによって決定することができる。好ましくは、デフォルトパラメーターをアライメントのために使用する。好ましいアライメントプログラムは、デフォルトパラメーターを使用するBLASTである。特に、好ましいプログラムは、以下のデフォルトパラメーター：遺伝子コード＝標準；フィルター＝なし；ストランド＝両方；カットオフ＝60；期待値＝10；行列＝BLOSUM62；記載＝配列50位；選別＝HIGH SCORE；データベース＝非重複、GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS translations+SwissProtein+SPupdate+PIRを使用するBLASTNおよびBLASTPである。これらのプログラムの詳細は、以下のインターネットアドレス：ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLASTで見出され得る。

10

20

【0136】

「ハイブリダイゼーション」は、1つまたは複数のポリヌクレオチドが、ヌクレオチド残基の塩基間での水素結合を介して安定化される複合体を形成するように反応する反応を指す。水素結合は、ワトソン-クリック塩基対形成、フーグスティーン結合、または他の任意の配列特異的様式で起こり得る。複合体は、二重鎖構造を形成する2つの鎖、多重鎖複合体を形成する3つまたはそれより多くの鎖、単一の自己ハイブリダイズ鎖、またはこれらの任意の組合せを含み得る。ハイブリダイゼーション反応は、より集中的なプロセスにおけるステップ、例えばPCR反応の開始またはリボザイムによるポリヌクレオチドの酵素的切断を構成し得る。

【0137】

ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の例としては：約25℃～約37℃のインキュベーション温度；約6×SSC～約10×SSCのハイブリダイゼーション緩衝液濃度；約0%～約25%のホルムアミド濃度；および約4×SSC～約8×SSCの洗浄溶液が挙げられる。中等度のハイブリダイゼーション条件の例としては：約40℃～約50℃のインキュベーション温度；約9×SSC～約2×SSCの緩衝液濃度；約30%～約50%のホルムアミド濃度；および約5×SSC～約2×SSCの洗浄溶液が挙げられる。高ストリンジェンシー条件の例としては：約55℃～約68℃のインキュベーション温度；約1×SSC～約0.1×SSCの緩衝液濃度；約55%～約75%のホルムアミド濃度；および約1×SSC、0.1×SSC、または脱イオン水の洗浄溶液が挙げられる。一般的に、ハイブリダイゼーションのインキュベーション時間は、5分～24時間であり、洗浄ステップは1、2回、またはそれより多く、および洗浄インキュベーション時間は約1、2、または15分である。SSCは、0.15M NaClおよび15mMクエン酸緩衝液である。他の緩衝系を使用してSSCの均等物を用いることができると理解される。

30

40

【0138】

「腫瘍組織タイプに対応する正常な細胞」は、腫瘍組織と同じ組織タイプからの正常な細胞を指す。非制限的な例は、肺腫瘍を有する患者からの正常な肺細胞、または結腸腫瘍を有する患者からの正常な結腸細胞である。

【0139】

用語「単離された」は、本明細書で使用される場合、他の材料を実質的に含まない分子ま

50

たは生物材料または細胞材料を指す。一態様では、用語「単離された」は、天然起源に存在する他のDNAもしくはRNA、またはタンパク質もしくはポリペプチド、または細胞もしくは細胞オルガネラ、または組織もしくは臓器からそれぞれ分離された、核酸、例えばDNAもしくはRNA、またはタンパク質もしくはポリペプチド（例えば、抗体またはその誘導体）、または細胞もしくは細胞オルガネラ、または組織もしくは臓器を指す。用語「単離された」はまた、細胞材料、ウイルス材料、または組換えDNA技術によって産生された場合には培養培地、または化学合成された場合には化学前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まない核酸またはペプチドも指す。その上、「単離された核酸」は、断片として天然に存在せず、天然の状況で見出されない核酸断片も含むことを意味する。用語「単離された」はまた、本明細書において、他の細胞タンパク質から単離されたポリペプチドを指すために使用され、精製ポリペプチドおよび組換えポリペプチドの両方を包含することを意味する。用語「単離された」はまた、本明細書において、他の細胞または組織から単離された細胞または組織を指すために使用され、培養および操作された細胞または組織の両方を包含することを意味する。

10

【0140】

本明細書で使用される場合、用語「モノクローナル抗体」は、Bリンパ球の単一のクローンによって、または単一の抗体の軽鎖および重鎖遺伝子がトランスフェクトされている細胞によって産生される抗体を指す。モノクローナル抗体は、当業者に公知の方法によって、例えば骨髓腫細胞と免疫脾細胞との融合からハイブリッド抗体形成細胞を作製することによって産生される。モノクローナル抗体は、ヒト化モノクローナル抗体を含む。

20

【0141】

用語「タンパク質」、「ペプチド」、および「ポリペプチド」は、互換的に使用され、その最も広い意味において2つまたはそれより多いサブユニットアミノ酸、アミノ酸アナログ、またはペプチド模倣体の化合物を指す。サブユニットは、ペプチド結合によって連結され得る。別の態様では、サブユニットは、他の結合、例えばエステル、エーテル等の結合によって連結され得る。タンパク質またはペプチドは、少なくとも2つのアミノ酸を含有しなければならず、タンパク質またはペプチド配列を含み得るアミノ酸の最大数に制限はない。本明細書で使用される場合、用語「アミノ酸」は、グリシンならびにDおよびL光学異性体の両方、アミノ酸アナログ、ならびにペプチド模倣体を含む天然および／または非天然、または合成アミノ酸のいずれかを指す。

30

【0142】

用語「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」は、互換的に使用され、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドまたはそのアナログのいずれかである任意の長さのヌクレオチドのポリマー型を指す。ポリヌクレオチドは、任意の三次元構造を有し得、既知または未知の任意の機能を実施し得る。以下はポリヌクレオチドの非制限的な例である：遺伝子または遺伝子断片（例えば、プローブ、プライマー、EST、またはSAGEタグ）、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA（mRNA）、トランスファーRNA、リボソームRNA、RNAi、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、核酸プローブ、およびプライマー。ポリヌクレオチドは、改変ヌクレオチド、例えばメチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログを含み得る。存在する場合、ヌクレオチド構造に対する改変を、ポリヌクレオチドのアセンブリ前または後に付与することができる。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド構成要素によって中断され得る。ポリヌクレオチドは、重合化後に例えば標識構成要素とのコンジュゲーションによってさらに改変することができる。用語はまた、二本鎖および一本鎖分子の両方を指す。特に明記していない場合または必要でない場合、ポリヌクレオチドであるこの技術の任意の態様は、二本鎖型および二本鎖を構成することが公知であるまたは予想される2つの相補的な一本鎖型の各々の両方を包含する。

40

【0143】

本明細書で使用される場合、用語「精製された」は、絶対的な純度を必要とせず、むしろ

50

相対的な用語として意図される。このように、例えば精製された核酸、ペプチド、タンパク質、生物学的複合体、または他の活性化合物は、タンパク質または他の夾雑物から全体がまたは部分的に単離されたものである。一般的に、本開示内で使用するための実質的に精製されたペプチド、タンパク質、生物学的複合体、または他の活性化合物は、混合する前の調製物に、またはペプチド、タンパク質、生物学的複合体、もしくは他の活性化合物と医薬担体、賦形剤、緩衝液、吸収増強剤、安定化剤、保存剤、アジュバント、もしくは治療的投与のための完全な医薬製剤中の他の補助成分との製剤に存在する全ての高分子種の80%より多くを含む。より典型的には、ペプチド、タンパク質、生物学的複合体、または他の活性化合物は、他の製剤成分との混合前の精製調製物に存在する全ての高分子種の90%より多く、しばしば95%より多くを表すように精製される。他の例では、精製調製物は、本質的に均一であり得、他の高分子種は従来の技術によって検出可能ではない。

10

【0144】

本明細書で使用される場合、用語「特異的に結合する」は、少なくとも 10^{-6} Mの結合親和性での抗体と抗原との間の接触を意味する。ある特定の態様では、抗体は、少なくとも約 10^{-7} M、好ましくは 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、または 10^{-12} Mの親和性で結合する。

【0145】

本明細書で使用される場合、用語「組換えタンパク質」は、組換えDNA技術によって産生されるポリペプチドであって、一般的にポリペプチドをコードするDNAが適した発現ベクターに挿入され、次にこれを使用して宿主細胞を形質転換し、異種タンパク質を産生する、ポリペプチドを指す。

20

【0146】

本明細書で使用される場合、対象における疾患を「処置する」または「処置」は、(1) 疾患の素因を有するもしくはまだ疾患の症状を示していない対象において症状もしくは疾患が起こるのを防止すること；(2) 疾患を阻害するもしくはその発生を停止させること；または(3) 疾患もしくは疾患の症状を回復させるもしくは退行を引き起こすことを指す。当技術分野で理解されているように、「処置」は、臨床結果を含む有益なまたは所望の結果を得るためのアプローチである。本技術の目的に関して、有益なまたは所望の結果は、これらに限定されないが、1つまたは複数の症状の軽減または回復、状態（疾患を含む）の程度の減少、状態（疾患を含む）の状況の安定化（すなわち、悪化していない）、状態（疾患を含む）の遅延または鈍化、状態（疾患を含む）の進行、回復、または緩和、状況および寛解（部分的であるか全体であるか）、検出可能であるか検出不能であるか、のうちの1つまたは複数を含み得る。疾患ががんである場合、以下の臨床エンドポイントは、処置の非制限的な例である：腫瘍負荷の低減、腫瘍成長の鈍化、より長い全生存、より長い腫瘍無増悪期間、腫瘍の転移の阻害または転移の低減。一態様では、処置は予防を除外する。

30

【0147】

本明細書で使用される場合、細胞、組織、または臓器に関して用語「過剰発現する」は、対照細胞、対照組織（issue）、または臓器において産生される量より多くの量までタンパク質を発現する。過剰発現されるタンパク質は、宿主細胞に対して内因性または宿主細胞に対して外因性であり得る。

40

【0148】

本明細書で使用される場合、用語「リンカー配列」は、1～10アミノ酸、またはあるいは8アミノ酸、またはあるいは6アミノ酸、またはあるいは5アミノ酸を含み、これが1～10回、またはあるいは1～約8回、またはあるいは1～約6回、またはあるいは約5回、または4回、またはあるいは3回、またはあるいは2回繰り返され得る任意のアミノ酸配列に関する。例えば、リンカーは、3回繰り返されるペンタペプチドからなる最大15アミノ酸残基を含み得る。リンカー配列の非制限的な例は、当技術分野で公知であり、例えば、GGGGSGGGSGGGG（およびその均等物）；トリペプチドEFM；ま

50

たはG l u - P h e - G l y - A l a - G l y - L e u - V a l - L e u - G l y - G l y - G l n - P h e - M e t、およびその各々の均等物である。一態様では、リンカー配列は、g l y - g l y - g l y - g l y - s e rの3コピーを含む(G l y c i n e 4 S e r i n e) 3フレキシブルポリペプチドリンカー、およびその均等物である。

【0149】

本明細書で使用される場合、用語「エンハンサー」は、本明細書で使用される場合、発現される核酸配列に関連してその位置および方向とは無関係に核酸配列の転写を増強する、改善する、または回復する配列エレメントを指す。エンハンサーは、単一のプロモーターからの転写または1つより多くのプロモーターからの同時の転写を増強し得る。転写を改善するこの機能性が保持されるかまたは実質的に保持される(例えば、野生型活性、すなわち全長の配列の活性の少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%)限り、野生型エンハンサー配列の任意の切断型、突然変異型、またはそうでなければ改変されたバリエーションもまた、上記の定義内である。

10

【0150】

用語「プロモーター」は、本明細書で使用される場合、コード配列、例えば遺伝子の発現を調節する任意の配列を指す。プロモーターは例えば、構成的、誘導型、抑圧性、または組織特異的であり得る。「プロモーター」は、転写の開始および速度が制御されるポリヌクレオチド配列の領域である制御配列である。これは、調節タンパク質および分子がRNAポリメラーゼおよび他の転写因子などに結合し得る遺伝子エレメントを含有し得る。

【0151】

本明細書で使用される場合、用語「WPRE」または「ウッドチャック肝炎ウイルス(WHP)転写後調節エレメント」は、この名称に関連する特定のヌクレオチド断片、および本明細書に示されるWPRE配列と少なくとも70%、またはあるいは少なくとも80%のアミノ酸配列同一性、好ましくは90%の配列同一性、より好ましくは少なくとも95%の配列同一性を共有する類似の生物機能を有する他の任意の分子を指す。例えば、WPREは、ウッドチャック肝炎ウイルスゲノム配列(GenBank受託番号J04514)に存在するヒトB型肝炎ウイルス転写後調節エレメント(HBVPRE)と類似の領域、およびこのゲノム配列の1093~1684位の592ヌクレオチドが転写後調節領域に対応する領域を指す(Donello, J.E. et al.(1998) Journal of Virology 72:5085-5092)。レトロウイルスベクターを使用する分析から、目的の遺伝子の3'末端非翻訳領域に挿入されたWPREが、タンパク質の産生量を5~8倍増加させることが明らかとなった。同様に、WPREの導入がmRNA分解を抑制することも報告されている(Zufferey, R. et al.(1999) Journal of Virology 73:2886-2892)。広い意味で、mRNAを安定化することによってアミノ酸翻訳の効率を増加させるWPREなどのエレメントもまた、エンハンサーであると考えられる。

20

30

【0152】

用語「接触させる」は、2つまたはそれより多くの間の直接または間接的な結合または相互作用を意味する。直接相互作用の特定の例は結合である。間接的相互作用の特定の例は、1つの実体が中間分子に作用し、次にこれが、第2の参照実体に作用する場合である。本明細書で使用される場合、接触は、溶液中、固相、in vitro、ex vivo、細胞内、およびin vivoを含む。in vivoでの接触は、投与することまたは投与と呼ぶことができる。

40

【0153】

用語「導入する」は、キメラ抗原受容体細胞などの改変細胞を産生する方法に適用される場合、それによって外来の(すなわち、外部のまたは細胞外)作用剤が宿主細胞に導入され、それによって外来の作用剤を含む細胞を産生するプロセスを指す。核酸を導入する方法としては、これらに限定されないが、形質導入、レトロウイルス遺伝子移入、トランスフェクション、電気穿孔、形質転換、ウイルス感染、および当技術分野で公知の他の組換えDNA技術が挙げられる。一部の実施形態では、形質導入は、ベクター(例えば、ウイルスベクター)を介して行われる。一部の実施形態では、トランスフェクションは、化学

50

担体、DNA／リボソーム複合体、またはミセル（例えば、Lipofectamine（Invitrogen））を介して行われる。一部の実施形態では、ウイルス感染は、細胞に、目的のポリヌクレオチド（例えば、AAV）を含むウイルス粒子を感染させることを介して行われる。一部の実施形態では、導入は、CRISPR媒介遺伝子編集または転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）媒介遺伝子編集をさらに含む。非核酸の外來の作用剤（例えば、可溶性因子、サイトカイン、タンパク質、ペプチド、酵素、増殖因子、シグナル伝達分子、低分子阻害剤）を導入する方法は、これらに限定されないが、細胞を外來の作用剤の存在下で培養すること、細胞に作用剤を接触させること、細胞に作用剤および賦形剤を含む組成物を接触させること、ならびに細胞に作用剤を含む小胞またはウイルス粒子を接触させることを含む。

10

【0154】

用語「培養する」は、細胞の増大および増殖に都合がよい条件下の培養培地中で細胞を成長させることを指す。用語「培養培地」または「培地」は、当技術分野で認識され、一般的に生きている細胞の培養のために使用される任意の物質または調製物を指す。用語「培地」は、細胞培養に関連して使用される場合、細胞周囲の環境の構成要素を含む。培地は、固体、液体、気体様、または相および材料の混合物であり得る。培地は、液体増殖培地および細胞成長を維持しない液体培地を含む。培地はまた、寒天、アガロース、ゼラチン、およびコラーゲン基質などのゼラチン様培地も含む。例示的な気体様培地としては、ペトリ皿または他の固体もしくは半固体支持体上で成長する細胞が曝露される気体様の相を含む。用語「培地」はまた、それがたとえまだ細胞と接触していなくとも、細胞培養において使用するために意図される材料も指す。言い換えれば、培養のために調製された栄養に富む液体も培地である。同様に、水または他の液体と混合すると細胞培養にとって適するようになる粉末混合物も「粉末培地」と名付けられ得る。「合成培地」は、化学的に定義された（通常精製された）構成要素から作製される培地を指す。「合成培地」は、酵母エキスおよびビーフブロスなどの特徴付けが不良な生物学的抽出物を含有しない。「リッチ培地」は、特定の種のほとんどまたは全ての生存形態の成長を支持するように設計された培地を含む。リッチ培地はしばしば、複雑な生物学的抽出物を含む。「高密度培養の成長に適した培地」は、他の条件（例えば、温度および酸素移動速度）がそのような成長を許容する場合に、細胞培養物が3またはそれより高いOD600に達することを可能にする任意の培地である。用語「基本培地」は、いかなる特定の栄養補助剤も必要としない、多くのタイプの微生物の成長を促進する培地を指す。ほとんどの基本培地は、一般的に4つの基本的な化学基：アミノ酸、炭水化物、無機塩、およびビタミンで構成される。基本培地は一般的に、それに血清、緩衝液、増殖因子、脂質等の補助剤が添加される、より複雑な培地の基礎として役立つ。一態様では、増殖培地は、その自己再生能を維持しながら本開示の細胞の成長および増大を支持するために必要な増殖因子を有する複合培地であり得る。基本培地の例としては、これらに限定されないが、イーグル基本培地、最小基礎培地、ダルベッコ改変イーグル培地、培地199、栄養混合物ハムF-10およびハムF-12、マッコイ5A、ダルベッコMEM／F-12、RPMI1640、ならびにイスコフ改変ダルベッコ培地（IMDM）が挙げられる。

20

30

【0155】

本明細書で使用される場合、「細胞集団」は、表現型および／または遺伝子型が同一（クローン性）または非同ーである1つより多くの細胞のコレクションを意図する。

40

【0156】

本明細書で使用される場合、「実質的に均一な」細胞集団は、予め選択したマーカー、表現型、またはゲノム形質によって測定した場合に少なくとも70%、またはあるいは少なくとも75%、またはあるいは少なくとも80%、またはあるいは少なくとも85%、またはあるいは少なくとも90%、またはあるいは少なくとも95%、またはあるいは少なくとも98%同一の表現型を有する集団である。一態様では、集団はクローン性集団である。

【0157】

50

本明細書で使用される場合、「不均一な」細胞集団は、予め選択したマーカー、表現型、またはゲノム形質によって測定した場合に最大69%、またはあるいは最大60%、またはあるいは最大50%、またはあるいは最大40%、またはあるいは最大30%、またはあるいは最大20%、またはあるいは最大10%、またはあるいは最大5%、またはあるいは最大4%、またはあるいは最大3%、またはあるいは最大2%、またはあるいは最大61%、またはあるいは最大0.5%同一の表現型を有する集団である。

【0158】

「凍結保護剤」は、当技術分野で公知であり、これらに限定されないが、例えばスクロース、トレハロース、およびグリセロールが挙げられる。生物系において低い毒性を示す凍結保護剤が一般的に使用される。

10

【0159】

省略語のリスト

CAR：キメラ抗原受容体

HLA：組織適合遺伝子リンパ球抗原

Ip：腹腔内

IRES：配列内リボソーム進入部位

MFI：平均蛍光強度

MOI：感染多重度

PBMC：末梢血単核球

PBS：リン酸緩衝食塩水

scFv：一本鎖可変断片

WPRE：ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント

本開示を実施するための形態

20

【0160】

CAR T細胞は、一本鎖抗体断片（scFv）またはリガンドが、T細胞活性化を容易にすることが可能なT細胞シグナル伝達ドメインに結合している遺伝子操作された自己T細胞である（Maher, J.(2012) ISRN Oncol. 2012:278093; Curran, K.J. et al.(2012) J. Gene Med. 14:405-415; Fedorov, V.D. et al.(2014) Cancer J. 20:160-165; Barrett, D.M. et al.(2014) Annu. Rev. Med. 65:333-347）。CARは、モノクローナル抗体のHLA非依存的標的化特異性を、活性化T細胞の細胞傷害活性およびホーミング特性と組み合わせる。これらの特性によって、腫瘍が宿主免疫応答を回避するために用いる2つの一般的な方法である、低減されたHLA発現またはダウンレギュレートされた抗原処理経路を有する標的細胞の認識が可能となる（Jakobsen, M.K. et al.(1995) J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 17:222-228; Lou, Y. et al.(2008) Clin. Cancer Res. 14:1494-1501; Singh, R. et al.(2007) Cancer Res. 67:1887-1892）。CAR改変T細胞は、がんを含む様々な疾患における新規治療薬として前臨床および臨床の設定で非常に有望であることが示されている。

30

【0161】

本開示は、Lym1およびLym2に対して特異的な抗体ならびにその使用および産生に関連する方法および組成物を提供する。加えて、本開示は、一部の態様では本開示の抗体の抗原結合ドメインであるLym1、Lym2、またはCD19に対して特異的な抗原結合ドメインを含むキメラ抗原受容体（CAR）細胞、ならびにその使用および産生に関連する方法および組成物を提供する。

40

【0162】

これらの原理および発見と一貫して、本開示は以下の実施形態を提供する。

抗体およびその断片

【0163】

抗体の全般的構造は、当技術分野で公知であり、ここではごく簡単に要約する。免疫グロブリン単量体は、ジスルフィド結合によって接続された2つの重鎖および2つの軽鎖を含

50

む。各々の重鎖は、それがジスルフィド結合を介して直接結合される軽鎖の1つと対を形成する。各々の重鎖は、定常領域（抗体のアイソタイプに応じて変化する）および可変領域を含む。可変領域は、CDRH1、CDRH2、およびCDRH3と呼ばれ、フレームワーク領域内で支持される3つの超可変領域（または相補性決定領域）を含む。各軽鎖は、定常領域および可変領域を含み、可変領域は、重鎖の可変領域と類似の様式でフレームワーク領域によって支持される3つの超可変領域（CDRL1、CDRL2、およびCDRL3と呼ばれる）を含む。

【0164】

重鎖および軽鎖の各対の超可変領域は、相互に協調して標的抗原に結合することが可能な抗原結合部位を提供する。重鎖および軽鎖の対の結合特異性は、重鎖および軽鎖のCDR1、CDR2、およびCDR3の配列によって定義される。このように、特定の結合特異性を生じるCDR配列のセット（すなわち、重鎖および軽鎖のCDR1、CDR2、およびCDR3の配列）が決定されると、CDR配列のセットを基本的に、同じ抗原結合特異性を有する異なる抗体を提供するために、任意の抗体定常領域に連結された任意の他の抗体フレームワーク領域内の適切な位置に挿入することができる。

10

【0165】

一実施形態では、本開示は、重鎖（HC）免疫グロブリン可変ドメイン配列および軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる単離された抗体であって、Lym1またはLym2のエピトープに結合する単離された抗体を提供する。

20

【0166】

これらの原理および発見と一貫して、本開示は、以下の実施形態を提供する。配列番号2もしくは6のいずれか1つのアミノ酸配列またはその各々の均等物を含む重鎖（HC）免疫グロブリン可変領域配列、および／あるいは配列番号4もしくは8のいずれか1つのアミノ酸配列またはその各々の均等物を含む軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる抗体。一態様では、重鎖（HC）免疫グロブリン可変ドメイン配列は、配列番号2のアミノ酸配列を含み、またはあるいはそれから本質的になり、またはなおさらにそれからなり、軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列は、配列番号4のアミノ酸配列またはその各々の均等物を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。別の態様では、重鎖（HC）免疫グロブリン可変ドメイン配列は、配列番号2のアミノ酸配列を含み、またはあるいはそれから本質的になり、またはなおさらにそれからなり、軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列は、配列番号8のアミノ酸配列またはその各々の均等物を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。さらなる態様では、重鎖（HC）免疫グロブリン可変ドメイン配列は、配列番号6のアミノ酸配列を含み、またはあるいはそれから本質的になり、またはなおさらにそれからなり、軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列は、配列番号4のアミノ酸配列またはその各々の均等物を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。なおさらなる態様では、重鎖（HC）免疫グロブリン可変ドメイン配列は、配列番号6のアミノ酸配列を含み、またはあるいはそれから本質的になり、またはなおさらにそれからなり、軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列は、配列番号8のアミノ酸配列またはその各々の均等物を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。同様に、本明細書において、その配列が本明細書に開示される、ある特定のアミノ酸が突然変異した抗体も提供される。

30

40

【0167】

1つの特定の実施形態では、抗体は、配列番号10のアミノ酸配列もしくはその均等物を含む、もしくはあるいはそれから本質的になる、もしくはなおさらにそれからなる重鎖（HC）免疫グロブリン可変ドメイン配列、および／または配列番号12のアミノ酸配列もしくはその均等物を含む、もしくはあるいはそれから本質的になる、もしくはなおさらにそれからなる軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含む、またはあるいはそれ

50

から本質的になる、またはなおさらにそれからなる。

【0168】

一態様では、本開示の抗体は、IgA、IgD、IgE、IgG、またはIgM抗体である。抗体の定常領域もまた多様であり得る。例えば抗体は、任意のアイソタイプ：IgA（IgA1、IgA2）、IgD、IgE、IgG（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）またはIgMのFc領域を備え得る。定常領域配列の非制限的な例としては、配列番号19～27またはその各々の均等物が挙げられる。一実施形態では、本開示の抗体の定常領域は、IgG1定常領域またはIg kappa定常領域である。一部の実施形態では、本技術の免疫グロブリン関連組成物は、配列番号19～27と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、または100%同一である重鎖定常領域を含む。

10

【0169】

均等物は、ポリペプチドと少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するポリペプチド、またはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの相補体と高ストリンジエンシー条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドを含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。

【0170】

同様に、本明細書において、本明細書に開示される抗体のいずれかと結合に関して競合する抗体も提供される。一部の実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体またはヒト化抗体である。ある特定の態様では、本開示の抗体は、ポリクローナル抗体、すなわち異なるアミノ酸配列を有する複数のタイプの抗体の混合物である。一態様では、本開示の抗体は、少なくとも 10^{-6} Mの結合親和性を有する。ある特定の態様では、抗体は、少なくとも約 10^{-7} Mの親和性、およびあるいは少なくとも約 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、または 10^{-12} Mの親和性で結合する。

20

【0171】

一部の実施形態では、重鎖可変領域のCDRH1配列は、本明細書に開示されるHC配列のいずれか1つのCDHR1領域のアミノ酸配列またはその均等物、その後にカルボキシ末端に追加の50アミノ酸、またはあるいは約40アミノ酸、またはあるいは約30アミノ酸、またはあるいは約20アミノ酸、またはあるいは約10アミノ酸、またはあるいは約5アミノ酸、またはあるいは約4、または3、または2、または1アミノ酸を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。

30

【0172】

一部の実施形態では、重鎖可変領域のCDRH2配列は、本明細書に開示されるHC配列のいずれか1つのCDHR2領域のアミノ酸配列またはその均等物、その後にカルボキシ末端に追加の50アミノ酸、またはあるいは約40アミノ酸、またはあるいは約30アミノ酸、またはあるいは約20アミノ酸、またはあるいは約10アミノ酸、またはあるいは約5アミノ酸、またはあるいは約4、または3、または2、または1アミノ酸を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。

【0173】

一部の実施形態では、重鎖可変領域のCDRH3配列は、本明細書に開示されるHC配列のいずれか1つのCDHR3領域のアミノ酸配列またはその均等物、その後にカルボキシ末端に追加の50アミノ酸、またはあるいは約40アミノ酸、またはあるいは約30アミノ酸、またはあるいは約20アミノ酸、またはあるいは約10アミノ酸、またはあるいは約5アミノ酸、またはあるいは約4、または3、または2、または1アミノ酸を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。

40

【0174】

一部の実施形態では、軽鎖可変領域のCDRL1配列は、本明細書に開示されるLC配列のいずれか1つのCDLR1領域のアミノ酸配列またはその均等物、その後にカルボキシ末端に追加の50アミノ酸、またはあるいは約40アミノ酸、またはあるいは約30アミノ酸、またはあるいは約20アミノ酸、またはあるいは約10アミノ酸、またはあるいは

50

約 5 アミノ酸、またはあるいは約 4、または 3、または 2、または 1 アミノ酸を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。

【0175】

一部の実施形態では、軽鎖可変領域の C D R L 2 配列は、本明細書に開示される L C 配列のいずれか 1 つの C D L R 2 領域のアミノ酸配列またはその均等物、その後カルボキシ末端に追加の 50 アミノ酸、またはあるいは約 40 アミノ酸、またはあるいは約 30 アミノ酸、またはあるいは約 20 アミノ酸、またはあるいは約 10 アミノ酸、またはあるいは約 5 アミノ酸、またはあるいは約 4、または 3、または 2、または 1 アミノ酸を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。

【0176】

一部の実施形態では、軽鎖可変領域の C D R L 3 配列は、本明細書に開示される L C 配列のいずれか 1 つの C D L R 3 領域のアミノ酸配列またはその均等物、その後カルボキシ末端に追加の 50 アミノ酸、またはあるいは約 40 アミノ酸、またはあるいは約 30 アミノ酸、またはあるいは約 20 アミノ酸、またはあるいは約 10 アミノ酸、またはあるいは約 5 アミノ酸、またはあるいは約 4、または 3、または 2、または 1 アミノ酸を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。

【0177】

本技術の別の態様では、抗体は以下の特徴の 1 つまたは複数を含む：

(a) 軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列は、本開示の軽鎖配列のいずれかの軽鎖可変ドメインの C D R と少なくとも 85 % 同一である 1 つまたは複数の C D R を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる；

(b) 重鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列は、本開示の重鎖配列のいずれかの重鎖可変ドメインの C D R と少なくとも 85 % 同一である 1 つまたは複数の C D R を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる；

(c) 軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列は、本開示の軽鎖配列のいずれかの軽鎖可変ドメインと少なくとも 85 % 同一である；

(d) H C 免疫グロブリン可変ドメイン配列は、本開示の軽鎖配列のいずれかの重鎖可変ドメインと少なくとも 85 % 同一である；

(e) 抗体は、本開示の配列のいずれかによって結合されるエピトープと重複するエピトープに結合する。C D R が突然変異している一態様では、均等な抗原結合ドメインは、親または野生型版から変化しているアミノ酸を保持しなければならない。

【0178】

他の態様では、本明細書に提供される抗体の C D R における 1 つまたは複数のアミノ酸残基は、別のアミノ酸に置換される。置換は、アミノ酸の同じファミリー内の置換であるという意味において「保存的」であり得る。天然に存在するアミノ酸は以下の 4 つのファミリーに分類され得、保存的置換はそれらのファミリー内で起こる：

1) 塩基性側鎖を有するアミノ酸：リシン、アルギニン、ヒスチジン；

2) 酸性側鎖を有するアミノ酸：アスパラギン酸、グルタミン酸；

3) 非荷電極性側鎖を有するアミノ酸：アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン；

4) 非極性側鎖を有するアミノ酸：グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン、システイン。

【0179】

別の態様では、1 つまたは複数のアミノ酸残基が、抗体の 1 つまたは複数の C D R に付加され、またはそこから欠失される。そのような付加または欠失は、C D R の N 末端もしくは C 末端で、または C D R 内の位置で起こる。

【0180】

アミノ酸の付加、欠失、または置換によって抗体の C D R のアミノ酸配列を変化させることによって、標的抗原に対する結合親和性の増加などの様々な効果が得られ得る。C D R が突然変異している一態様では、均等な抗原結合ドメインは、親または野生型版から変化

10

20

30

40

50

しているアミノ酸を保持しなければならない。

【0181】

そのような変化したCDR配列を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる本開示の抗体はなおも、本開示の抗体と類似の特異度および感度プロフィールでLym1またはLym2に結合すると認識される。これは、結合アッセイによって試験され得る。

【0182】

本明細書に提供される抗体の態様の一部では、HCおよびLC可変ドメイン配列は、同じポリペプチド鎖の構成要素である。本明細書に提供される抗体の態様の一部では、HCおよびLC可変ドメイン配列は、異なるポリペプチド鎖の構成要素である。

10

【0183】

一部の態様では、抗体は、本明細書に開示される抗体のいずれか1つと少なくとも80%同一である重鎖定常領域を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。

【0184】

一部の態様では、抗体は、本明細書に開示される抗体のいずれか1つと少なくとも80%同一である軽鎖定常領域を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。

【0185】

1つの特定の態様では、本開示の抗体はさらに、検出可能マーカーまたは精製マーカーを含み得る、またはあるいはそれから本質的になり得る、またはなおさらにそれからなり得る。

20

【0186】

本明細書においてさらに、開示される抗体の抗原結合性断片が提供される。本明細書に提供される抗体の態様の一部では、抗体断片は、Fab、F(ab)'₂、Fab'、scFv、およびFvからなる群から選択される。

【0187】

本明細書に提供される抗体の一部の態様では、抗体は、迅速な結合および細胞取り込みならびに／または遅い放出を容易にするために構造的改変を含有する。一部の態様では、抗体は、迅速な結合および細胞取り込みならびに／または遅い放出を容易にするために抗体のCH2重鎖定常領域に欠失を含有する。一部の態様では、Fab断片は、迅速な結合および細胞取り込みならびに／または遅い放出を容易にするために使用される。一部の態様では、F(ab)'₂断片は、迅速な結合および細胞取り込みならびに／または遅い放出を容易にするために使用される。

30

【0188】

抗体、その断片および均等物を、使用および／または保存のための製剤を提供するために、担体、例えば薬学的に許容される担体または他の作用剤と組み合わせることができる。

抗体を調製する方法

【0189】

本明細書において、上記の単離された細胞を培養することを含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる本開示の抗体を産生する方法であって、単離された抗体が必要に応じて哺乳動物である方法が提供される。

40

【0190】

抗体、その製造、および使用は、周知であり、例えば、Harlow, E. and Lane, D., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999に開示されている。抗体は、当技術分野で公知の標準的な方法を使用して生成され得る。抗体の例としては、（これらに限定されないが）モノクローナル抗体、一本鎖抗体、および抗体の機能的断片が挙げられる。そのような抗体を生成する方法は当技術分野で公知であり、例えば、Collarini et al. (2009) J. Immunol. 183(10):6338-6345, Carter, P. et al. (1992) P

50

roc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4285-4289、および Baldi L. et al. (2005) Biotechnol. Prog. 21:148-153を参照されたい。

【0191】

抗体は、広範囲の宿主、例えばヤギ、ウサギ、ラット、マウス、ヒト、およびその他において産生され得る。一態様では、抗体は、例えば本明細書で開示される重鎖および軽鎖のCDRをコードするポリヌクレオチドを宿主細胞において発現させること、細胞を成長させること、およびそれらを発現させた後ポリヌクレオチドによって発現された抗体を精製することによって調製される。ポリヌクレオチドは、ベクターに挿入することができ、調節配列、例えば抗DCKL1抗体のCDRをコードするポリヌクレオチドに動作可能に連結された発現系に関して選択されるプロモーターおよびエンハンサーをさらに含み得る。

10

【0192】

抗体は、免疫原性特性を有する標的抗原またはその断片もしくはオリゴペプチドを注射することによって調製することができる。宿主の種に応じて、免疫学的応答を増加させるために様々なアジュバントを添加し、使用してもよい。そのようなアジュバントとしては、これらに限定されないが、フロイント、水酸化アルミニウムなどの鉱物ゲル、および界面活性物質、例えばリゾレシチン、プルロニック（登録商標）ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性乳液、キーホールリンペットヘモシアニン、およびジニトロフェノールが挙げられる。ヒトにおいて使用されるアジュバントの中で、BCG (*Bacille Calmette-Guerin*) および *Corynebacterium parvum* は、特に有用である。このように (This)、本開示はまた、単離されたポリペプチドおよびアジュバントも提供する。

20

【0193】

ある特定の態様では、本開示の抗体は、ポリクローナル抗体、すなわち異なるアミノ酸配列を有する複数のタイプの抗体の混合物である。一態様では、ポリクローナル抗体は、異なるCDRを有する複数のタイプの抗体の混合物を含む。そのため、異なる抗体を産生する細胞の混合物を培養し、得られた培養物から精製された抗体を使用することができる (WO 2004/061104号を参照されたい)。

【0194】

モノクローナル抗体の産生：モノクローナル抗体は、培養における連続的な細胞株によって抗体分子の産生を提供する任意の技術を使用して調製され得る。そのような技術としては、これらに限定されないが、ハイブリドーマ技術（例えば、Kohler & Milstein, *Nature* 256: 495-497 (1975)）；トリオーマ技術；ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（例えば、Kozbor, et al., *Immunol. Today* 4: 72 (1983)を参照されたい）、およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのEBVハイブリドーマ技術（例えば、Cole, et al., Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985)を参照されたい）が挙げられる。ヒトモノクローナル抗体は、本技術の実践において利用することができ、ヒトハイブリドーマを使用することによって（例えば、Cote, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 2026-2030 (1983)を参照されたい）、またはヒトB細胞をエプスタインバーウイルスによって *in vitro* で形質転換することによって（例えば、Cole, et al., Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985)を参照されたい）産生することができる。例えば、抗体の領域をコードする核酸集団を単離することができる。抗体の保存された領域をコードする配列に由来するプライマーを利用するPCRを使用して、集団から抗体の一部をコードする配列を増幅し、その後増幅された配列から抗体またはその断片、例えば可変ドメインをコードするDNAを再構築する。そのような増幅された配列をまた、ファージまたは細菌上に融合ポリペプチドを発現および表示させるために、他のタンパク質、例えばバクテリオファージコートタンパク質または細菌細胞表面タンパク質をコードするDNAに融合させることができる。次に、増幅された配列を発現させて、Lym1またはLym2ポリペプチド上に存在する抗原またはエピトープに関して、例えば発現された抗体またはその断片の親和性に基づいて、さらに選択または単離することができる。

30

40

50

【0195】

あるいは、モノクローナル抗体を発現するハイブリドーマは、例えば本明細書に開示される抗体またはその断片のいずれかのアミノ酸配列を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる単離されたポリペプチドによって対象を免疫すること、その後ルーチンの方法を使用して対象の脾臓からハイブリドーマを単離することによって調製することができる。例えば、Milstein et al., (Galfre and Milstein, Methods Enzymol 73: 3-46(1981)) を参照されたい。標準的な方法を使用してハイブリドーマをスクリーニングすると、様々な特異性（すなわち、異なるエピトープに対して）および親和性を有するモノクローナル抗体が産生される。所望の特性、例えば L y m 1 または L y m 2 結合を有する選択されたモノクローナル抗体を、（i）ハイブリド 10
ーマによって発現されるように使用することができ、（ii）ポリエチレングリコール（PEG）などの分子に結合させてその特性を変更することができ、または（iii）モノクローナル抗体をコードする c D N A を様々な方法で単離、シーケンシング、および操作することができる。一態様では、モノクローナル抗体は、不死化細胞に融合されたヒト重鎖トランスジーンおよび軽鎖トランスジーンを含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなるゲノムを有するトランスジェニック非ヒト動物、例えばトランスジェニックマウスから得た B 細胞を含むハイブリドーマによって産生される。ハイブリドーマ技術は、当技術分野で公知の技術を含み、Harlow et al., Antibodi 20
es: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 349(1988); Hammerling et al., Monoclonal Antibodies And T-Cell Hybridomas, 563-681(1981)において教示されている。

【0196】

ファージディスプレイ技術：上記のように、本開示の抗体は、組換え D N A およびファージディスプレイ技術の適用を通して産生することができる。例えば、抗体は、当技術分野で公知の様々なファージディスプレイ法を使用して調製することができる。ファージディスプレイ法では、機能的な抗体ドメインが、それらをコードするポリヌクレオチド配列を有するファージ粒子の表面上に表示される。所望の結合特性を有するファージを、抗原、典型的には固相表面またはビーズに結合したまたは捕捉された抗原によって直接選択することによって、レパートリーまたはコンビナトリアル抗体ライブラリ（例えば、ヒトまたはマウス）から選択する。これらの方法において使用されるファージは、典型的には、f 30
d および M 1 3 を含む繊維状ファージであり、F a b、F_v、またはジスルフィド安定化 F_v 抗体ドメインは、ファージ遺伝子 I I I または遺伝子 V I I I タンパク質のいずれかに組換えにより融合される。加えて、F a b 発現ライブラリ（例えば、Huse, et al., Science 246: 1275-1281, 1989 を参照されたい）構築のために方法を適合させて、L y m 1 または L y m 2 ポリペプチド、例えばポリペプチドまたはその誘導体、断片、アナログ、もしくはホモログに対して所望の特異性を有するモノクローナル F a b 断片を迅速かつ有効に同定することができる。本開示の単離されたヒト化抗体を作製するために使用することができるファージディスプレイ法の他の例は、Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85: 5879-5883(1988); Chaudhary et al., P 40
roc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87: 1066-1070(1990); Brinkman et al., J. Immunol. Methods 182: 41-50(1995); Ames et al., J. Immunol. Methods 184: 177-186(1995); Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 24: 952-958(1994); Persic et al., Gene 187: 9-18(1997); Burton et al., Advances in Immunology 57: 191-280(1994); P C T / G B 9 1 / 0 1 1 3 4 ; W O 9 0 / 0 2 8 0 9 号 ; W O 9 1 / 1 0 7 3 7 号 ; W O 9 2 / 0 1 0 4 7 号 ; W O 9 2 / 1 8 6 1 9 号 ; W O 9 3 / 1 1 2 3 6 号 ; W O 9 5 / 1 5 9 8 2 号 ; W O 9 5 / 2 0 4 0 1 号 ; W O 9 6 / 0 6 2 1 3 号 ; W O 9 2 / 0 1 0 4 7 号 (M e d i c a l R e s e a r c h C o u n c i l e t a l .) ; W O 9 7 / 0 8 3 2 0 号 (M o r p h o s y s) ; W O 9 2 / 0 1 0 4 7 号 (C A T / M R C) ; W O 9 1 / 1 7 2 7 1 号 (A f f y m a x) ; ならびに米国特許第 5, 6 9 8, 4 2 6 号、第 5, 50

223, 409号、第5, 403, 484号、第5, 580, 717号、第5, 427, 908号、第5, 750, 753号、第5, 821, 047号、第5, 571, 698号、第5, 427, 908号、第5, 516, 637号、第5, 780, 225号、第5, 658, 727号、および第5, 733, 743号に開示される方法を含む。

【0197】

ジスルフィド結合を介してポリペプチドを結合させることによってバクテリオファージ粒子表面上にポリペプチドを表示するために有用な方法は、Lohningの米国特許第6, 753, 136号に記載されている。上記の参考文献に記載されているように、ファージの選択後、ファージからの抗体コード領域を単離し、これを使用してヒト抗体を含む抗体全体、または他の任意の所望の抗原結合性断片を生成し、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母、および細菌を含む任意の所望の宿主において発現させることができる。例えば、Fab、Fab'、およびF(ab')₂断片を組換えにより産生する技術もまた、WO92/22324号；Mullinax et al., BioTechniques 12: 864-869(1992)；Sawai et al., AJRI 34: 26-34(1995)；およびBetter et al., Science 240: 1041-1043(1988)に開示される技術などの当技術分野で公知の方法を使用して用いることができる。

【0198】

一般的に、ディスプレイベクターにクローニングされるハイブリッド抗体またはハイブリッド抗体断片は、抗体または抗体断片がファージまたはファージミド粒子の表面上に存在することから、良好な結合活性を維持するバリエーションを同定するために適切な抗原に対して選択することができる。例えば、Barbas III et al., Phage Display, A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001)を参照されたい。しかし、他のベクターフォーマットをこのプロセス、例えば選択および／またはスクリーニングのための溶解ファージベクター（改変T7またはラムダZap系）への抗体断片ライブラリのクローニングのために使用することができる。

【0199】

代替の抗体産生法：抗体はまた、リンパ球集団においてin vivo産生を誘導することによって、または組換え免疫グロブリンライブラリもしくは非常に特異的な結合試薬のパネルをスクリーニングすることによって(Orlandi et al., PNAS 86: 3833-3837(1989)；Winter, G. et al., Nature, 349: 293-299(1991))産生され得る。

【0200】

あるいは、一本鎖抗体を産生するための技術を使用してもよい。一本鎖抗体(scFv)は、リンカーペプチド（典型的におよそ5～25アミノ酸長）によって接続された重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む。そのような技術の非制限的な例は、Carter, P. et al.(1992) Proc. Natl. Acad. Sci.USA89,4285-4289、およびBaldi L. et al.(2005) Biotechnol. Prog. 21:148-153に開示される。scFvでは、重鎖および軽鎖の可変領域は、同じ抗体または異なる抗体に由来し得る。scFvは、組換え技術、例えばscFvをコードするベクターをE. coliなどの宿主生物において発現させることによって合成され得る。scFvをコードするDNAは、上記の抗体の重鎖または重鎖の可変領域をコードするDNAおよび軽鎖または軽鎖の可変領域をコードするDNAから選択されるDNAの完全なまたは所望のアミノ酸配列をコードする部分DNAを鋳型として使用して、その両方の末端を定義するプライマー対を使用するPCRによって増幅を実施することによって、ならびにリンカーの両方の末端を重鎖および軽鎖にそれぞれライゲーションするために、ポリペプチドリンカー部分をコードするDNAおよびその両方の末端を定義するプライマー対を組み合わせる増幅をさらに実施することによって得ることができる。scFvをコードするDNAを含有する発現ベクターおよび発現ベクターによって形質転換された宿主は、当技術分野で公知の従来の方

【0201】

抗原結合性断片、例えば抗体分子のペプシン消化によって產生することができる F (a b ')₂ 断片および F (a b ')₂ 断片のジスルフィド架橋を還元することによって生成することができる F a b 断片も同様に生成され得る。あるいは、所望の特異性を有するモノクローナル F a b 断片の迅速かつ容易な同定を可能にする F a b 発現ライブラリを構築してもよい (Huse et al., Science, 256: 1275-1281(1989))。

【0202】

抗体の改変。本開示の抗体は、抗原の親和性を増加させるために多重化され得る。多重化される抗体は、1つのタイプの抗体または同じ抗原の複数のエピトープを認識する複数の抗体であり得る。抗体を多重化する方法として、I g G C H 3 ドメインの2つの s c F_v 分子との結合、ストレプトアビジンとの結合、ヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフの導入等を例証することができる。

10

【0203】

本明細書に開示される抗体組成物は、これらの抗体のいずれかと別の作用剤との間に形成されたコンジュゲート (イムノコンジュゲート) の形態であり得る。一態様では、本明細書に開示される抗体は、放射活性材料にコンジュゲートされる。別の態様では、本明細書に開示される抗体は、ポリエチレングリコール (P E G) などの様々なタイプの分子に結合し得る。

【0204】

抗体スクリーニング。所望の特異性を有する抗体を同定するために、様々なイムノアッセイをスクリーニングに使用してもよい。確立された特異性を有するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれかを使用する競合的結合または免疫放射測定アッセイのための複数のプロトコルが、当技術分野において周知である。そのようなイムノアッセイは典型的には、L y m 1 もしくは L y m 2 またはその任意の断片もしくはオリゴペプチドと、その特異的抗体との間の複合体形成の測定を伴う。2つの干渉しない L y m 1 または L y m 2 エピトープに対して特異的なモノクローナル抗体を利用する2部位のモノクローナル抗体に基づくイムノアッセイを使用してもよいが、競合的結合アッセイもまた用いてもよい (Maddox et al., J. Exp. Med., 158: 1211-1216(1983))。

20

【0205】

潜在的な抗体の自動免疫組織化学 (I H C) スクリーニングを、V e n t a n a M e d i c a l S y s t e m s , I n c (V M S I) D i s c o v e r y X T およびスライドガラス上のホルマリン固定パラフィン包埋ヒト組織を使用して実施することができる。組織試料を最初に、脱パラフィン化し、抗原を回収し、その後、潜在的な抗体および検出抗体を添加する。検出抗体を、V M S I からの発色団検出試薬を使用して可視化する。染色したスライドガラスを顕微鏡下で手作業によりスクリーニングする。正確な一次抗体染色パターンを有する試料を、潜在的候補体として選択する。

30

【0206】

抗体の精製。本明細書に開示される抗体は、均一になるまで精製することができる。抗体の分離および精製は、従来のタンパク質分離および精製方法を用いることによって実施することができる。

【0207】

単なる例として、抗体を、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析、分取用ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等の使用を適切に選択および組み合わせることによって、分離および精製することができる。Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1996); Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)。

40

【0208】

クロマトグラフィーの例としては、アフィニティクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマト

50

グラフィー、および吸着クロマトグラフィーが挙げられる。一態様では、クロマトグラフィーは、液体クロマトグラフィー、例えばHPLCまたはFPLCを用いることによって実施することができる。

【0209】

一態様では、プロテインAカラムまたはプロテインGカラムを、アフィニティクロマトグラフィーに使用してもよい。他の例示的なカラムとしては、プロテインAカラム、Hyper D、POROS、セファロースF.F. (Pharmacia) 等が挙げられる。

単離されたポリペプチドおよびポリヌクレオチド

【0210】

本開示は、配列番号2、4、6、8、10、もしくは12のいずれか1つのアミノ酸配列、またはその各々の均等物を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなるポリペプチドを提供する。さらに、本明細書に開示される抗体またはその断片のアミノ酸配列、およびそれらをコードする単離されたポリヌクレオチドを含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる単離されたポリペプチドを提供する。

【0211】

なおさらに、本明細書に開示される抗体およびその断片をコードする単離された核酸を提供する。一態様では、単離された核酸配列は、配列番号1、3、5、7、9、および11、またはその各々の均等物を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。一態様では、ポリヌクレオチド配列は、プロモーターおよび／またはエンハンサーエレメントに動作可能に連結される。それらはまた、ベクターもしくは適切な宿主細胞、および／または診断的もしくは治療的使用に適した担体と組み合わせることができる。一態様では、核酸は、ポリペプチドおよびタンパク質の組換え産生のために宿主細胞に含有される。宿主細胞は真核細胞または原核細胞であり得る。

【0212】

一態様では、単離されたポリペプチドまたはポリヌクレオチドはさらに、標識もしくは選択マーカー、および／または連続するポリペプチド配列（例えば、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH) 担体タンパク質）、あるいはポリヌクレオチドの場合には、ポリペプチドもしくはポリヌクレオチドに動作可能に連結された配列をコードするポリヌクレオチドを含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、様々な担体、例えばリン酸緩衝食塩水と組み合わせることができる。さらに、単離されたポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる宿主細胞、例えば原核細胞または真核細胞、例えば細菌、酵母、哺乳動物（ラット、サル、ハムスター、またはヒト）が提供される。宿主細胞を担体と組み合わせることができる。

キメラ抗原受容体

【0213】

本明細書において、(a) 本明細書に開示される抗体のいずれかの抗原結合ドメイン、(b) ヒンジドメイン、(c) 膜貫通ドメイン、および (d) 細胞内シグナル伝達ドメインを含む、またはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなるキメラ抗原受容体 (CAR) が提供される。一態様では、CARはさらに、1つまたは複数の共刺激シグナル伝達領域を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。別の態様では、本開示のCARは、第1世代CAR、第2世代CAR、第3世代CAR、または第4世代CARである。1つの特定の態様では、本開示の抗体はさらに、検出可能マーカーまたは精製マーカーを含み得る、またはあるいはそれから本質的になり得る、またはなおさらにそれからなり得る。

【0214】

本開示は、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む細胞活性化部分を含む、それからなる、またはそれから本質的になる、Lym1またはLym2に結合するCARを提供する。細胞外ドメインは、そうでなければ抗体結合ドメインと呼ばれる

標的特異的結合エレメントを含む。細胞内ドメインまたは細胞質ドメインは、少なくとも1つの共刺激シグナル伝達領域およびゼータ鎖部分を含む。一態様では、本開示のCARは、配列番号14、16、もしくは18、またはその各々の均等物を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなるアミノ酸配列によってコードされる。別の態様では、本開示のCARは、配列番号13、15、もしくは17のポリヌクレオチド配列、またはその各々の均等物を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。

【0215】

スペーサドメイン：CARは必要に応じてさらに、最大300アミノ酸、好ましくは10～100アミノ酸、より好ましくは25～50アミノ酸のスペーサドメインを含み得る、またはあるいはそれから本質的になり得る、またはなおさらにそれからなり得る。例えば、スペーサーは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50アミノ酸であり得る。スペーサドメインは、例えば、任意の免疫グロブリン、例えばIgA、IgD、IgE、IgG、もしくはIgM、またはそのバリエーションのヒトFcドメイン、CH3ドメイン、またはヒンジ領域の一部を含み得る。例えば、一部の実施形態は、S228P、L235E、および／またはN297Q突然変異（Kababのナンバリングに従う）を有するまたは有しないIgG4ヒンジを含み得る。追加のスペーサーとしては、これらに限定されないが、CD4、CD8、およびCD28ヒンジ領域が挙げられる。

【0216】

抗原結合ドメイン：ある特定の態様では、本開示は、本明細書に提供される抗体のいずれかに対して特異的な抗原結合ドメインを含む、それからなる、またはあるいはそれから本質的になるCARを提供する。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、標的特異的抗体（すなわち、抗Lym1または抗Lym2抗体）の断片、例えばscFvを含む、それからなる、またはそれから本質的になる。本開示のCARはさらに、MUC-16に対する抗体またはメソセリンに対する抗体に由来する抗原結合ドメインを含み得る、またはあるいはそれから本質的になり得る、またはなおさらにそれからなり得る。

【0217】

scFv領域は、短いリンカーペプチドによって接続された免疫グロブリンの重鎖（VH）および軽鎖（VL）の可変領域を含み得る。リンカーペプチドは、1～50アミノ酸、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50アミノ酸であり得る。一部の実施形態では、リンカーは、グリシンに富むが、同様にセリンまたはスレオニンも含有し得る。

【0218】

膜貫通ドメイン。膜貫通ドメインは、天然または合成起源のいずれかに由来し得る。起源が天然である場合、ドメインは、任意の膜結合または膜貫通タンパク質に由来し得る。本開示における特定の使用の膜貫通領域は、CD8、CD28、CD3、CD45、CD4、CD5、CDS、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、TCRに由来し得る。あるいは、膜貫通ドメインは合成であり得、この場合、ロイシンおよびバリンなどの疎水性の残基を主に含む。好ましくは、フェニルアラニン、トリプトファン、およびバリンのトリプレットが、合成膜貫通ドメインの各々の末端に見出される。必要に応じて、好ましくは2～10アミノ酸長の短いオリゴまたはポリペプチドリンカーが、CARの膜貫通ドメインと細胞質シグナル伝達ドメインとの間の連結を形成し得る。グリシン-セリンダブレットは、特に適したリンカーを提供する。

【0219】

細胞質ドメイン。CARの細胞質ドメインまたは細胞内シグナル伝達ドメインは、CARが存在している免疫細胞の従来のエフェクター機能の少なくとも1つの活性化に関与する。細胞内シグナル伝達ドメインは、エフェクター機能シグナルを形質導入し、その特定の機能を実施するように免疫細胞を方向付けるタンパク質の部分を目指す。完全なシグナル伝達ドメイン、またはその切断部分は、切断部分がエフェクター機能シグナルを形質導入するために十分である限り、使用してもよい。T細胞受容体（TCR）および共受容体の細胞質配列、ならびにその誘導体またはバリエーションは、CARにおいて使用するための細胞内シグナル伝達ドメインとして機能することができる。本開示における特定の使用の細胞内シグナル伝達ドメインは、FcR、TCR、CD3、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66dに由来し得る。一部の実施形態では、CARのシグナル伝達ドメインは、CD3（シグナル伝達ドメインを含む、またはそれから本質的になる、またはそれからなる。

10

【0220】

TCRを通して生成されたシグナルは、単独ではT細胞の完全な活性化にとって不十分であることから、二次または共刺激シグナルもまた必要であり得る。このように、CD27、CD28、4-1BB（CD137）、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1（LFA-1）、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、またはCD83に特異的に結合するリガンドを含むがこれらに限定されない少なくとも1つの共刺激シグナル伝達分子の細胞内領域もまた、CARの細胞質ドメインに含まれ得る。本開示のCARは、1つまたは複数の共刺激ドメインを含み得る、またはそれから本質的になり得る、またはそれからなり得る。例えば、CARは、シグナル伝達ドメイン（例えば、CD3（シグナル伝達ドメイン））に加えて1つ、2つ、またはそれより多くの共刺激ドメインを含み得る、またはそれから本質的になり得る、またはそれからなり得る。

20

【0221】

一実施形態では、キメラ抗原受容体の細胞活性化部分は、CD8タンパク質、CD28タンパク質、4-1BBタンパク質、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、LFA-1、CD2、CD7、CD27、LIGHT、NKG2C、B7-H3、およびCD3ゼータタンパク質からなる群から選択される1つまたは複数のタンパク質またはその断片を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなるT細胞シグナル伝達ドメインである。

30

【0222】

特定の実施形態では、CARは、本開示の抗体のいずれかの抗原結合ドメインまたはその断片（例えば、scFv）、CD8αまたはIgG1ヒンジドメイン、CD8α膜貫通ドメイン、少なくとも1つの共刺激シグナル伝達領域、およびCD3ゼータシグナル伝達ドメインを含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおそれからなる。さらなる実施形態では、共刺激シグナル伝達領域は、CD28共刺激シグナル伝達領域および4-1BB共刺激シグナル伝達領域のいずれかまたは両方を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおそれからなる。

40

【0223】

特定の実施形態では、CARはさらに、HC可変領域とLC可変領域との間に位置するリンカーポリペプチドを含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおそれからなる。一態様では、CARのリンカーポリペプチドは、nが1～6の整数である配列（GGGS）nのポリペプチドを含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおそれからなる。

【0224】

一部の実施形態では、CARは、検出可能マーカーまたは精製マーカーを含み得る、またはそれから本質的になり得る、またはそれからなり得る。

【0225】

50

スイッチ機構。一部の実施形態では、CARはまた、CARの発現および／または活性化を制御するためのスイッチ機構も含み得る、またはそれから本質的になり得る、またはそれからなり得る。例えば、CAR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得る、それからなり得る、またはそれから本質的になり得、細胞外ドメインは、標的細胞上にまたは標的細胞によって発現される標的抗原以外の分子に対して特異的である標識、結合ドメイン、またはタグを含む標的特異的結合エレメントを含む。そのような実施形態では、CARの特異性は、標的抗原結合ドメイン、およびCAR上の標識、結合ドメイン、またはタグによって認識されるまたはそれらに結合するドメインを含む、それからなる、またはそれから本質的になる第2の構築物によって提供される。例えば、WO2013/044225号、WO2016/000304号、WO2015/057834号、WO2015/057852号、WO2016/070061号、米国特許第9,233,125号、米国特許出願公開第2016/0129109号を参照されたい。このように、CARを発現するT細胞は、対象に投与することができるが、特異的結合ドメインを含む第2の組成物が投与されるまで、その標的抗原に結合することができない。

10

20

30

40

50

【0226】

本開示のCARは、同様に、そのシグナル伝達機能を活性化するために多量体化（例えば、米国特許出願公開第2015/0368342号、米国特許出願公開第2016/0175359号、米国特許出願公開第2015/0368360号）、および／またはT細胞応答を誘発するために外因性のシグナル、例えば低分子薬（米国特許出願公開第2016/0166613号、Yung et al., Science, 2015）も必要とし得る。

【0227】

さらに、本開示のCARは、処置後にCAR T細胞の細胞死を誘導するための（Budd et al., PLoS One, 2013）、または標的抗原に結合後のCARの発現をダウンレギュレートするための（WO2016/011210号）「自殺スイッチ」を含み得る、またはそれから本質的になり得る、またはそれからなり得る。

DAP CAR細胞

【0228】

一態様では、本明細書において、エピトープ特異的DAP10および／またはDAP12依存的にエフェクター細胞の機能をリダイレクトする新規キメラ抗原受容体（CAR）を提供する。Lym-1陽性パーキットリンパ腫異種移植片を有するマウスにおいて、ヒト化Lym-1抗体であるhuLym-1-Bからの認識ドメインを有する新規CARを評定した。この新規構築物は、huLym-1-B-DAP CARと呼ばれ、初代ヒトT細胞の形質導入後、第2世代Lym-1-41BB3zCAR T細胞と比較してin vitroでの細胞増殖の増加、in vivoでの有意に低い毒性、および優れた腫瘍制御を示すことが見出された。このように、本開示のCARは、処置の有害な副作用を低減することによって、および抗腫瘍細胞傷害性を改善することによって、多様なヒトがんおよび関連疾患を処置するためにヒトCAR T細胞の臨床での使用を改善するように設計される。抗Lym CARは例示的であり、他の抗原結合ドメイン、例えば抗CD19を、Lym抗原結合ドメインの代わりに置換することができる。他の抗原結合ドメインとしては、例えば、抗CD-20、抗HER、抗EGFR、抗IL13、抗メソセリン、抗CD123、抗BCMA、抗MUC1、抗CD38、抗CD138、抗CD70、抗EpCAM、抗CD133、抗CEA、抗CD5 抗GD2、抗PSMA、抗黄体形成ホルモン受容体（LHR）、抗B7-H4、抗HLA、抗HLA-G、ならびにPCT／米国特許出願公開2016/0243573号；PCT／米国特許出願公開第2016/0243613号；およびPCT／米国特許出願公開第2016/0243543号に記載されるドメインが挙げられる。

【0229】

DAP CAR T細胞構築物の臨床での有用性を実証するために、huLym-1 DAP CAR T細胞構築物を、ヒトB細胞悪性腫瘍、例えばパーキットリンパ腫、びま

ん性および濾胞性リンパ腫、ならびにB細胞慢性リンパ芽球性白血病のサブセットを標的化することが以前に示されているマウスLym-1抗体の一本鎖結合部位を使用して調製した。(Rose LM et al., 1996, Cancer Immunol Immunother 43(1): 26-30)は、マウスLym-1が、広く多様なヒトB細胞腫瘍において発現されるHLA-Dr分子の軽鎖上の不連続なエピトープに結合することを示した。B細胞悪性腫瘍上で発現される標的と比較して発現する結合部位の数が約1/4である他のB細胞標的、例えばCD19、CD20、およびCD22とは異なり、正常なB細胞のみがこの抗原を発現することから、これはCAR T細胞治療の良好な標的であるように思われた(Epstein AL et al., 1987, Cancer Res. 47:830-840)。加えて、Lym-1によって認識されるHLA-Drヒト抗原は、脱落すること、インターナライズされることもなく、ヒトリンパ腫細胞の表面に対する良好かつ安定な結合を可能にする。これはまた、Lym-1陽性腫瘍のイメージングおよび処置のためのI-131放射標識抗体としてヒトにおいて広範に研究され、I-131の治療用量であっても安全であることが示された(DeNardo SJ et al., 1988, Antibody, Immunoconjugates, and Radiopharmaceuticals 1:17-33; DeNardo, S.J. et al., 1988, Int. J. Cancer 3:96-101)。最後に、Huら(Hu E et al., 1989, Hematologic Oncology 7:155-166)がネイキッドLym-1を使用して実施した臨床研究は、抗CD20(リツキサン)によって現在処置されている患者において見られる低ガンマグロブリン血症などの明白な毒性を示さなかった。

10

20

30

40

50

【0230】

Juneら(June CH et al., 2018, Science 359:1361-1365)によって最近概説されたように、本出願人のT細胞受容体シグナル伝達機構の初期の理解により設計されているCAR T細胞は、ヒト造血悪性腫瘍の処置にとって顕著な成功を収めている。YescartaおよびKymiriahなどの抗CD19 CAR T細胞産物のFDA承認を含む初期の成功にもかかわらず、これらの試薬の基本構造および標的化の改善が集中的に研究されている。CAR T細胞治療に関連する主要な毒性により、ある程度その使用が制限されなければならず、注意深い患者の管理を必要とする。最も一般的な毒性であるサイトカイン放出症候群(CRS)は、注入したCAR T細胞によって放出されたサイトカインによって引き起こされる全身の炎症応答によって引き起こされる。CRSは、広範な可逆性の臓器機能障害を引き起こし得、低血圧のための初期の介入および同時感染の処置を必要とする。加えて、トシリズマブによるIL-6受容体遮断はなおも、CRSの主な薬理治療である。加えて、CAR T細胞治療は、全脳症ならびに局在欠陥、例えば失語症、振せん、運動失調、片側不全麻痺、および頭蓋神経麻痺の両方を引き起こし得る(Brudno JN and Kochenderfer JN (2016) Blood 127:3321-3330)。処置の選択肢としては、特にトシリズマブに不応性の患者に関してコルチコステロイドの使用が挙げられる。

【0231】

SrivastavaおよびRiddell(Srivastava S and Riddell SR(2015) Trends in Immunology 36(8):494-502)によって概説されるように、何人かの研究者らが有効性および毒性問題に取り組んでいる。具体的には、研究者らは、(A)特異性および安全性を改善するために、CAR T細胞上の2つの認識部位、1つはCD30に結合し、他方は41BBモチーフに結合する認識部位を使用する分割トリガ機構の使用、(B)細胞傷害性T細胞と腫瘍標的細胞との間の特殊な制約を最適化するためのscFvの立体配置の変更、(C)条件的に発現されたCAR T細胞の産生、(D)CAR T細胞を産生するための異なる細胞タイプ、例えば中でもメモリーT細胞およびNK細胞の使用、(E)TCR-CD3:共受容体複合体を模倣するためのT細胞抗原連結体(TAC)の使用(Helsen CW et al.(2018) Nature Communications 9(1):3049)、および(F)ICOSなどのシグナル伝達のための他の共刺激モチーフ(Guedan S. et al.,(2018) JCI insight 3(1))を調査している。TAC法は有望であるが、CD3に接続するためにDaRPin配列の使用を必要とし、その分子

生物学を複雑にする。それにもかかわらず、これらの研究および以下に示す研究は、CAR T細胞治療のCRCおよび他の毒性が、CAR T細胞の*in vivo*での最適な有効性にとって必要ではないことを初めて示している。要約すると、CAR T細胞治療の際に現在見られるCRCおよび他の一般的な毒性を切り離す方法は可能であり得、これらの治療に関する本出願人の認識を、生命を脅かす毒性を欠如するように変更することができる。CAR T細胞に関する今後の研究に関して、キメラ受容体T細胞治療の安全性および有効性を増加させるための方法およびアプローチは、LiおよびZhao (Li H et al., (2017) Protein & Cell 8(8):573-589) によって概説されている。固形腫瘍の治療に関しては、D'Aloiaら (D'Aloia MM et al., (2018) Cell Death and Disease 9:282-293) によって記載されるように他の問題が起こっており、成功するためには、骨髄ならびに循環する白血病およびリンパ腫の処置にとって必要なパラメーターを超える追加のパラメーターを達成する必要がある。具体的には、腫瘍血管への遊走および腫瘍血管を通しての浸透、抗原に遭遇するまでの増殖の持続、ならびに抑制性の腫瘍の微小環境に対する抵抗性を、静脈内投与されるCAR T細胞が最終的に腫瘍に入ると有効に作用するように対処する必要がある。

10

20

30

40

50

【0232】

本明細書に開示されるDAP構築CAR T細胞は、標準的な刺激方法に応答しないCAR T細胞であっても増殖および細胞成長を可能にし、同じ結合エピトープを使用する第2世代構築物より強力な産物（10分の1の細胞を必要とする）であることが示されており、より少ない毒性（体重減少がほとんどない）を示す。これらの属性により、DAP CAR T細胞は、ヒト造血悪性腫瘍およびおそらく固形腫瘍の両方にとって成功するおよび安全な細胞治療剤の生成において重要な前進であり得る。

キメラ抗原受容体

【0233】

本明細書において、(a) 抗原結合ドメイン（例えば、抗Lym抗体（例えば、ヒト化抗Lym抗体）または抗CD19抗体の）、(b) ヒンジドメイン、(c) 膜貫通ドメイン、ならびに(d) DAP10および／またはDAP12細胞内シグナル伝達ドメインを含む、またはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなるキメラ抗原受容体（CAR）を提供する。抗Lymヒト化抗Lym抗体は、抗Lym1または抗Lym2抗体、例えばヒト抗Lym1またはヒト抗Lym2抗体であり得る。さらなる態様では、抗体は、抗CD19抗体またはその抗原結合性断片である。別の態様では、ヒンジドメインは、CD8αヒンジドメインまたはIgGヒンジドメインを含む。膜貫通ドメインは、天然または合成起源のいずれかに由来し得る。起源が天然である場合、ドメインは、任意の膜結合または膜貫通タンパク質に由来し得る。本開示における特定の使用の膜貫通領域は、CD8、CD28、CD3、CD45、CD4、CD5、CD55、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、TCRに由来し得る。あるいは、膜貫通ドメインは合成であり得、この場合、ロイシンおよびバリンなどの疎水性残基を主に含む。好ましくは、フェニルアラニン、トリプトファン、およびバリンのトリプレットが、合成膜貫通ドメインの各々の末端に見出される。必要に応じて、好ましくは2～10アミノ酸長の短いオリゴまたはポリペプチドリンカーが、CARの膜貫通ドメインと細胞質シグナル伝達ドメインとの間の連結を形成し得る。グリシン-セリンダブレットは、特に適したリンカーを提供する。特定の実施形態では、膜貫通ドメインは、CD8α膜貫通ドメインを含む。エレメントは、任意の種類、例えばヒトまたはマウスのエレメントであり得る。1つの特定の態様では、本開示のCARはさらに、検出可能マーカーまたは精製マーカーを含み得る、またはあるいはそれから本質的になり得る、またはなおさらにそれからなり得る。さらなる態様では、CARはさらに、シグナルペプチドを含む。

【0234】

一態様では、本開示のCARは、以下に示すCARアミノ酸配列またはその各々の均等物を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなるアミノ酸

配列を含む。

【0235】

CARは、必要に応じて最大300アミノ酸、好ましくは10～100アミノ酸、より好ましくは25～50アミノ酸のスペーサドメインをさらに含み得る、またはあるいはそれから本質的になり得る、またはなおさらにそれからなり得る。例えば、スペーサは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50アミノ酸であり得る。

【0236】

ある特定の態様では、本開示は、抗CD19抗体の、またはLym-1もしくはLym-2抗体の抗原結合ドメインを含む、それからなる、またはあるいはそれから本質的になるCARを提供する。一部の実施形態では、抗原結合ドメインは、標的特異的抗体（例えば、抗CD19、抗Lym1または抗Lym2抗体）の断片、例えばscFvを含む、それからなる、またはそれから本質的になる。

【0237】

一態様では、抗原結合ドメインはscFV領域である。scFV領域は、短いリンカーペプチドによって接続された免疫グロブリンの重鎖（V_H）および軽鎖（V_L）の可変領域を含み得る。リンカーペプチドは、1～50アミノ酸、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50アミノ酸であり得る。一部の実施形態では、リンカーは、グリシンに富むが、同様にセリンまたはスレオニンも含有し得る。

【0238】

特定の実施形態では、CARは、本開示の抗体またはその断片（例えば、scFv）のいずれかの抗原結合ドメイン、CD8αヒンジドメインまたはIgG1ヒンジドメイン、CD8α膜貫通ドメイン、ならびにDAP10および／またはDAP12ドメインのいずれかを含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおそれからなる。さらなる態様では、CARは、DAP10および／またはDAP12ドメインを含む。

【0239】

特定の実施形態では、CARはさらに、抗体のHC可変領域とLC可変領域との間に位置するリンカーポリペプチドを含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおそれからなる。一態様では、CARのリンカーポリペプチドは、nが1～6の整数である配列（GGGGS）_nのポリペプチドを含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおそれからなる。

【0240】

一部の実施形態では、CARはさらに、検出可能マーカーまたは精製マーカーを含み得る、またはそれから本質的になり得る、またはそれからなり得る。

【0241】

スイッチ機構。一部の実施形態では、CARはまた、CARの発現および／または活性化を制御するためのスイッチ機構も含み得る、またはそれから本質的になり得る、またはそれからなり得る。例えば、CAR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得る、それからなり得る、またはそれから本質的になり得、細胞外ドメインは、標的細胞上にまたは標的細胞によって発現される標的抗原以外の分子に対して特異的である標識、結合ドメイン、またはタグを含む標的特異的結合エレメントを含む。そのような実施形態では、CARの特異性は、標的抗原結合ドメイン、およびCAR上の標識、結合ドメイン、またはタグによって認識されるまたはそれらに結合するドメインを含む、それからなる、またはそれから本質的になる第2の構築物によって提供される。例えば、WO2013/044225号、WO2016/000304号、WO2015/057

10

20

30

40

50

834号、WO2015/057852号、WO2016/070061号、米国特許第9,233,125号、米国特許出願公開第2016/0129109号を参照されたい。このように、CARを発現するT細胞は、対象に投与することができるが、特異的結合ドメインを含む第2の組成物が投与されるまで、その標的抗原に結合することができない。

【0242】

本開示のCARは、同様に、そのシグナル伝達機能を活性化するために多量体化（例えば、米国特許出願公開第2015/0368342号、米国特許出願公開第2016/0175359号、米国特許出願公開第2015/0368360号を参照されたい）、および／またはT細胞応答を誘発するために外因性のシグナル、例えば低分子薬（米国特許出願公開第2016/0166613号、Yung et al., Science, 2015）も必要とし得る。

10

【0243】

さらに、本開示のCARは、処置後にCAR T細胞の細胞死を誘導するための、または標的抗原に結合後のCARの発現をダウンレギュレートするための（WO2016/011210号）「自殺スイッチ」を含み得る、またはそれから本質的になり得る、またはそれからなり得る。

単離された細胞

【0244】

同様に、本明細書において、本明細書に開示されるCARをコードする核酸配列を免疫細胞集団に導入すること、および核酸配列の形質導入に成功している免疫細胞の亜集団を選択し、それによって抗Lym CAR発現細胞を産生することを含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる抗Lym CAR発現細胞を産生する方法も提供する。

20

【0245】

本開示の態様は、本開示のCARを含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる単離された細胞、およびそのような細胞を産生する方法に関する。細胞は原核細胞または真核細胞である。一態様では、細胞はT細胞またはNK細胞である。真核細胞は、任意の好ましい種、例えば動物細胞、哺乳動物細胞、例えば、ヒト、ネコ、またはイヌ細胞に由来し得る。

30

【0246】

本開示の一部の態様では、本明細書に記載されるCARをコードする核酸配列を形質導入された単離された細胞集団は、NK前駆細胞集団および／またはT細胞前駆細胞集団である。前駆細胞の形質導入は、CAR T細胞および／またはCAR NK細胞へと分化することが可能な長命な細胞集団をもたらす。T細胞前駆体としては、これらに限定されないが、HSC、長期HSC、MPP、CLP、LMPP/ELP、DN1、DN2、DN3、DN4、DPが挙げられる。NK前駆体としては、これらに限定されないが、HSC、長期HSC、MPP、CMP、GMP、プロ-NK、プレ-NK、およびiNK細胞が挙げられる。特定の態様では、単離された細胞集団は、成熟T細胞およびT細胞前駆体の両方を含み、対象への移植のために、短命なエフェクターCAR T細胞および長命なCAR T細胞前駆体の両方を提供する。別の態様では、単離された細胞集団は、成熟NK細胞およびNK前駆体の両方を含み、対象への移植のために、短命なエフェクターCAR NK細胞および長命なCAR NK前駆体の両方を提供する。

40

【0247】

特定の実施形態では、単離された細胞は、本明細書に提供される抗体の抗原結合ドメイン、CD8αヒンジドメイン、CD8α膜貫通ドメイン、CD28共刺激シグナル伝達領域および／または4-1BB共刺激シグナル伝達領域、ならびにCD3ゼータシグナル伝達ドメインを含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる外因性のCARを含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。

50

【0248】

別の態様では、CARは、(a) 抗原結合ドメイン（例えば、抗Lym抗体または抗CD19抗体の）、(b) ヒンジドメイン、(c) 膜貫通ドメイン、ならびに(d) DAP10および／またはDAP12細胞内シグナル伝達ドメインを含む、またはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。抗Lym抗体は、抗Lym1または抗Lym2抗体、例えば、ヒト抗Lym1またはヒト抗Lym2抗体であり得る。さらなる態様では、抗体は、抗CD19抗体またはその抗原結合性断片である。別の態様では、ヒンジドメインは、CD8αヒンジドメインまたはIgGヒンジドメインを含む。膜貫通ドメインは、天然起源または合成起源のいずれかに由来し得る。起源が天然である場合、ドメインは、任意の膜結合または膜貫通タンパク質に由来し得る。本開示における特定の使用のための膜貫通領域は、CD8、CD28、CD3、CD45、CD4、CD5、CD5、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、TCRに由来し得る。あるいは、膜貫通ドメインは合成であり得、この場合、ロイシンおよびバリンなどの疎水性残基を主に含む。好ましくはフェニルアラニン、トリプトファン、およびバリンのトリプレットが、合成膜貫通ドメインの各々の末端に見出される。必要に応じて、好ましくは2～10アミノ酸長の短いオリゴまたはポリペプチドリinkerが、CARの膜貫通ドメインと細胞質シグナル伝達ドメインとの間の連結を形成し得る。グリシン-セリンダブレットは、特に適したリンカーを提供する。特定の実施形態では、膜貫通ドメインは、CD8α膜貫通ドメインを含む。エレメントは、任意の種、例えばヒトまたはマウスのエレメントであり得る。1つの特定の態様では、本開示のCARはさらに、検出可能マーカーまたは精製マーカーを含み得る、またはあるいはそれから本質的になり得る、またはなおさらにそれからなり得る。さらなる態様では、CARはさらに、シグナルペプチドを含む。

10

20

【0249】

ある特定の実施形態では、単離された細胞は、T細胞、例えば動物T細胞、哺乳動物T細胞、ネコT細胞、イヌT細胞、またはヒトT細胞である。ある特定の実施形態では、単離された細胞は、NK細胞、例えば、動物NK細胞、哺乳動物NK細胞、ネコNK細胞、イヌNK細胞、またはヒトNK細胞である。

【0250】

一部の実施形態では、本開示のCARを発現するT細胞は、内因性のTCRの発現を低減または削除するようにさらに改変され得る。内因性のTCRの低減または削除は、オフターゲット効果を低減させ、T細胞の有効性を増加させることができる。機能的TCRの発現を安定に欠如するT細胞は、多様なアプローチを使用して産生され得る。T細胞は、完全なT細胞受容体を複合体としてインターナライズし、選別し、および分解し、半減期は休止期T細胞で約10時間であり、刺激されたT細胞では3時間である(von Essen, M. et al. 2004. J. Immunol. 173:384-393)。TCR複合体が適切に機能するためには、TCR複合体を構成するタンパク質の適切な化学量論比を必要とする。TCR機能はまた、ITAMモチーフを有する2つの機能するTCRゼータタンパク質も必要とする。そのMHC-ペプチドリグランドとの係合によるTCRの活性化は、同じT細胞上のいくつかのTCRの係合を必要とし、その全てが適切にシグナル伝達をしなければならない。このように、TCR複合体が適切に会合しないまたは最適にシグナル伝達をすることができないタンパク質によって脱安定化される場合、T細胞は、細胞応答を開始するために十分に活性化されない。

30

40

【0251】

したがって、一部の実施形態では、TCR発現は、RNA干渉（例えば、shRNA、siRNA、miRNA等）、CRISPR、または初代T細胞において特異的TCR（例えば、TCR-αおよびTCR-β）および／またはCD3鎖をコードする核酸を標的とする他の方法を使用して削除され得る。これらのタンパク質の1つまたは複数の発現を遮断することによって、T細胞はもはやTCR複合体の重要な構成要素の1つまたは複数を生産せず、それによってTCR複合体を脱安定化させ、機能的TCRの細胞表面発現を防

50

止する。一部のTCR複合体は、RNA干渉を使用する場合、細胞表面にリサイクルすることができるが、RNA（例えば、shRNA、siRNA、miRNA等）は、TCRタンパク質の新規産生を防止し、完全なTCR複合体の分解および除去をもたらす、機能的TCR発現の安定な欠損を有するT細胞の産生をもたらす。

【0252】

初代T細胞における阻害性RNA（例えば、shRNA、siRNA、miRNA等）の発現は、任意の従来の発現系、例えばレンチウイルス発現系を使用して達成することができる。レンチウイルスは、休止期の初代T細胞の標的化にとって有用であるが、必ずしも全てのT細胞がshRNAを発現するわけではない。これらのT細胞の一部は、T細胞の機能的活性を変更するためにTCR発現の十分な阻害を可能にするためにRNAの十分量を発現しないことがある。このように、ウイルスの形質導入後に中等度から高いTCR発現を保持するT細胞を、例えば細胞の選別または分離技術によって除去することができ、それによって残存するT細胞は、細胞表面TCRまたはCD3を欠損し、機能的TCRまたはCD3の発現が欠損している単離されたT細胞集団の増大を可能にする。

10

【0253】

初代T細胞におけるCRISPRの発現は、従来のCRISPR/Cas系および標的TCRに対して特異的なガイドRNAを使用して達成することができる。適した発現系、例えばレンチウイルスまたはアデノウイルス発現系が当技術分野で公知である。阻害剤RNAの送達と同様に、CRISPR系を使用して、休止期初代T細胞またはCAR細胞治療にとって適した他の免疫細胞を特異的に標的化することができる。さらに、CRISPR編集が成功しない限りにおいて、細胞を、上記で開示される方法に従って成否に関して選択することができる。例えば、上記のように、ウイルスの形質導入後に中等度から高いTCR発現を保持するT細胞を、例えば細胞選別または分離技術によって除去することができ、それによって残存T細胞は、細胞表面TCRまたはCD3を欠損し、機能的TCRまたはCD3の発現が欠損している単離されたT細胞集団の増大を可能にする。CRISPR編集構築物は、内因性のTCRのノックアウトおよび本明細書に開示されるCAR構築物のノックインの両方において有用であり得るとさらに認識される。したがって、CRISPR系は、これらの目的の1つまたは両方を達成するために設計することができると認識される。

20

【0254】

上記の技術の多くをT細胞に関連して説明しているが、本明細書に記載される使用ならびに生成および改変の方法は、T細胞に限定されず、B細胞、NK細胞、および関連する幹細胞などの免疫細胞が挙げられるがこれらに限定されない、任意の関連する細胞に拡大され得ると認識される。

30

【0255】

単離された細胞の起源：本明細書に開示される細胞の増大および遺伝子改変の前に、細胞を、例えば自家細胞治療を伴う実施形態では対象から、または例えばAmerican Type Culture Collection (ATCC) から入手可能な市販の培養物から得てもよい。

【0256】

細胞は、末梢血単核球、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位からの組織、腹水、胸膜浸出液、脾臓組織、および腫瘍を含む、対象における複数の起源から得ることができる。

40

【0257】

関連する細胞を単離する方法は、当技術分野で周知であり、本出願に容易に適合させることができる。例示的な方法を以下の実施例に記載する。本開示に関連する使用のための単離方法としては、これらに限定されないが、Life TechnologiesのDynabeads（登録商標）システム；STEMcell TechnologiesのEasySep（商標）、RoboSep（商標）、RosetteSep（商標）、SepMate（商標）；Miltenyi BiotecのMACS（商標）細胞分離キ

50

ット、ならびに他の市販の細胞分離および単離キットが挙げられる。免疫細胞および前駆体の特定の亜集団は、一意的な細胞表面マーカーに対して特異的なそのようなキットにおいて利用可能な蛍光活性化細胞選別（FACS）、ビーズ、または他の結合剤の使用を通して単離され得る。例えば、MACS（商標）CD4+およびCD8+ MicroBeadsを使用して、CD4+およびCD8+ T細胞を単離してもよい。

【0258】

あるいは、細胞は、市販の細胞培養物を通して得てもよく、これらとしては、これらに限定されないが、T細胞に関して、株BCL2（AAA）Jurkat（ATCC（登録商標）CRL-2902（商標））、BCL2（S70A）Jurkat（ATCC（登録商標）CRL-2900（商標））、BCL2（S87A）Jurkat（ATCC（登録商標）CRL-2901（商標））、BCL2 Jurkat（ATCC（登録商標）CRL-2899（商標））、Neo Jurkat（ATCC（登録商標）CRL-2898（商標））；およびNK細胞に関して、株NK-92（ATCC（登録商標）CRL-2407（商標））、NK-92MI（ATCC（登録商標）CRL-2408（商標））が挙げられる。

10

【0259】

一部の態様では、対象に、対象から細胞を得る前に末梢血への前駆細胞動員を誘導するための条件付けレジメンを投与してもよい。例えば、対象は、有効量の、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、フィルグラスチム（Neupogen）、サルグラモスチム（Leukine）、ペグフィルグラスチム（Neulasta）、およびモゾビル（Plerixafor）のうちの少なくとも1つを、対象から細胞を単離する前または単離と同時に最大2週間投与してもよい。動員された前駆細胞は、例えば、条件付けレジメンの投与後1～14日後のロイコフェレーシスを含む、当技術分野で公知の方法によって対象から得ることができる。

20

【0260】

T細胞の活性化および増大：所望のCARを発現するためにT細胞を遺伝子改変する前または後によらず、細胞を、米国特許第6,352,694号；第6,534,055号；第6,905,680号；第6,692,964号；第5,858,358号；第6,887,466号；第6,905,681号；第7,144,575号；第7,067,318号；第7,172,869号；第7,232,566号；第7,175,843号；第5,883,223号；第6,905,874号；第6,797,514号；第6,867,041号に記載される方法などの一般的に公知の方法を使用して、活性化および増大させることができる。Lym1またはLym2抗原によるex vivoでの刺激は、選択されたCAR発現細胞亜集団を活性化および増大することができる。あるいは、細胞を、Lym1またはLym2抗原との相互作用によってin vivoで活性化してもよい。

30

【0261】

関連する細胞を活性化する方法は当技術分野で周知であり、本出願に容易に適合させることができる。例示的な方法を以下の実施例に記載する。本開示に関連して使用するための単離方法としては、これらに限定されないが、Life TechnologiesのDynabeads（登録商標）システムの活性化および増大キット；BD BiosciencesのPhosflow（商標）活性化キット、Miltenyi BiotecのMACS（商標）活性化／増大キット、ならびに関連する細胞の活性化部分に対して特異的な他の市販の細胞キットが挙げられる。免疫細胞の特定の亜集団を、そのようなキットにおいて利用可能なビーズまたは他の作用剤の使用を通して活性化または増大させてもよい。例えば、 α -CD3/ α -CD28 Dynabeads（登録商標）を使用して、単離されたT細胞集団を活性化および増大させてもよい。

40

【0262】

同様に、本明細書において、本開示の抗体、CAR、単離された核酸、および／またはベクターを含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる単

50

離された細胞を開示する。

ポリヌクレオチドおよびベクター

【0263】

CARは、ベクターを使用して調製され得る。本開示の態様は、本明細書に開示されるCARをコードする単離された核酸配列、ならびにCARをコードする単離された核酸配列およびその相補体およびその各々の均等物を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなるベクターに関する。

【0264】

例示的なベクターの調製および前記ベクターを使用するCAR発現細胞の生成を、以下の実施例に詳細に考察する。要約すると、CARをコードする天然または合成の核酸の発現は、典型的には、CARポリペプチドまたはその一部をコードする核酸をプロモーターに作動可能に連結すること、および構築物を発現ベクターに組み込むことによって達成される。ベクターは、真核細胞の複製および組み込みにとって適し得る。

【0265】

一部の実施形態では、単離された核酸配列は、本明細書に提供される抗体の抗原結合ドメイン、CD8 α ヒンジドメイン、CD8 α 膜貫通ドメイン、CD28共刺激シグナル伝達領域および／または4-1BB共刺激シグナル伝達領域、ならびにCD3ゼータシグナル伝達ドメインを含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなるCARをコードする。特定の実施形態では、単離された核酸配列は、(a)本開示の抗体の抗原結合ドメインの後に(b)CD8 α ヒンジドメイン、(c)CD8 α 膜貫通ドメインの後に(d)CD28共刺激シグナル伝達領域、および／または4-1BB共刺激シグナル伝達領域の後に(e)CD3ゼータシグナル伝達ドメインをコードする配列を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。

【0266】

別の態様では、CARは、(a)抗原結合ドメイン(例えば、抗Lym抗体または抗CD19抗体の)、(b)ヒンジドメイン、(c)膜貫通ドメイン、ならびに(d)DAP10および／またはDAP12ドメインを含む、またはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。抗Lym抗体は、抗Lym1または抗Lym2抗体、例えばヒト抗Lym1またはヒト抗Lym2抗体であり得る。さらなる態様では、抗体は、抗CD19抗体またはその抗原結合性断片である。別の態様では、ヒンジドメインはCD8 α ヒンジドメインまたはIgGヒンジドメインを含む。膜貫通ドメインは、天然起源または合成起源のいずれかに由来し得る。一態様では、配列AVPPQQWALSを含むペプチドが、抗原結合ドメインの後に挿入される。起源が天然である場合、ドメインは、任意の膜結合または膜貫通タンパク質に由来し得る。本開示における特定の使用の膜貫通領域は、CD8、CD28、CD3、CD45、CD4、CD5、CDS、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、TCRに由来し得る。あるいは、膜貫通ドメインは合成であり得、この場合、ロイシンおよびバリンなどの疎水性残基を主に含む。好ましくは、フェニルアラニン、トリプトファン、およびバリンのトリプレットが、合成膜貫通ドメインの各々の末端に見出される。必要に応じて、好ましくは2~10アミノ酸長の短いオリゴまたはポリペプチドリンカーが、CARの膜貫通ドメインと細胞質シグナル伝達ドメインとの間の連結を形成し得る。グリシン-セリンダブレットは、特に適したリンカーを提供する。特定の実施形態では、膜貫通ドメインは、CD8 α 膜貫通ドメインを含む。エレメントは、任意の種、例えばヒトまたはマウスのエレメントであり得る。1つの特定の態様では、本開示のCARはさらに、検出可能マーカーまたは精製マーカーを含み得る、またはあるいはそれから本質的になり得る、またはなおさらにそれからなり得る。さらなる態様では、CARはさらに、シグナルペプチドを含む。

【0267】

一部の実施形態では、単離された核酸配列は、抗体の抗原結合ドメインをコードする配列またはエンハンサーの上流にコザックコンセンサス配列を含む、またはあるいはそれから

10

20

30

40

50

本質的になる、またはなおさらにそれからなる。一部の実施形態では、単離された核酸は、抗生物質耐性を付与するポリヌクレオチドを含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。1つの特定の実施形態では、CARをコードする単離された核酸はさらに、CARの発現および／または活性化を制御するためのスイッチ機構を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。

【0268】

一部の実施形態では、単離された核酸配列は、抗体の抗原結合ドメインの上流に位置するポリヌクレオチド配列をコードするシグナルペプチドを含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。

【0269】

1つの特定の実施形態では、単離された核酸配列は、抗体の抗原結合ドメインの上流に位置する2A自己切断ペプチド(T2A)をコードするポリヌクレオチド配列を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。

【0270】

一部の実施形態では、単離された核酸配列は、ベクターに含まれる。ある特定の実施形態では、ベクターはプラスミドである。他の実施形態では、ベクターはウイルスベクターである。特定の実施形態では、ベクターはレンチウイルスベクターである。

【0271】

例示的なベクターの調製および前記ベクターを使用するCAR発現細胞の生成を、以下の実施例に詳細に考察する。要約すると、CARをコードする天然または合成の核酸の発現は、典型的には、CARポリペプチドまたはその一部をコードする核酸をプロモーターに作動可能に連結すること、および構築物を発現ベクターに組み込むことによって達成される。ベクターは、真核細胞の複製および組み込みにとって適し得る。ベクターおよび／または外因性核酸を含む細胞を産生する方法は、当技術分野で周知である。例えば、Sambrook et al. (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)を参照されたい。

【0272】

いくつかの態様では、ベクターは、野生型ウイルスに由来するまたはそれに基づく。さらなる態様では、ベクターは、野生型レンチウイルスに由来するまたは基づく。そのような例としては、これらに限定されないが、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、ウマ伝染性貧血ウイルス(EIAV)、サル免疫不全ウイルス(SIV)、およびネコ免疫不全ウイルス(FIV)が挙げられる。あるいは、マウス白血病ウイルス(MLV)などの他のレトロウイルスを、ベクター骨格の基礎として使用することができると企図される。本開示に従うウイルスベクターは、特定のウイルスの構成要素に限定される必要はないことは明白である。ウイルスベクターは、2つまたはそれより多くの異なるウイルスに由来する構成要素を含み得、同様に合成の構成要素も含み得る。ベクター構成要素は、標的細胞特異性などの所望の特徴を得るために操作することができる。

【0273】

本開示の組換えベクターは、霊長類および非霊長類に由来し得る。霊長類のレンチウイルスの例としては、ヒト後天性免疫不全症候群(AIDS)の原因物質であるヒト免疫不全ウイルス(HIV)、およびサル免疫不全ウイルス(SIV)が挙げられる。非霊長類レンチウイルス群としては、プロトタイプの「スローウイルス」であるビスナ／マエディウイルス(VMV)、ならびに関連するヤギ関節炎－脳炎ウイルス(CAEV)、ウマ伝染性貧血ウイルス(EIAV)、ならびに近年記載されたネコ免疫不全ウイルス(FIV)およびウシ免疫不全ウイルス(BIV)が挙げられる。先行技術の組換えレンチウイルスベクターは当技術分野で公知であり、例えば参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,924,123号；第7,056,699号；第7,419,829号および第7,442,551号を参照されたい。

【0274】

米国特許第6,924,123号は、ある特定のレトロウイルス配列が標的細胞ゲノムへ

10

20

30

40

50

の組み込みを容易にすることを開示している。この特許は、各々のレトロウイルスゲノムが、ビリオンタンパク質および酵素をコードする *gag*、*pol*、および *env* と呼ばれる遺伝子を含むことを教示している。これらの遺伝子は、両端に長末端反復 (LTR) と呼ばれる領域が隣接する。LTR は、プロウイルス組み込みおよび転写に参与する。それらはまた、エンハンサー-プロモーター配列としても作用する。言い換えれば、LTR は、ウイルス遺伝子の発現を制御することができる。レトロウイルス RNA のカプシド形成は、ウイルスゲノムの 5' 末端に位置する *psi* 配列によって起こる。LTR そのものは同一の配列であり、これを、U3、R、および U5 と呼ばれる 3 つのエLEMENT に分割することができる。U3 は、RNA の 3' 末端に対して一意的な配列に由来する。R は、RNA の両方の末端で反復される配列に由来し、U5 は、RNA の 5' 末端に対して一意的な配列に由来する。3 つのエLEMENT のサイズは、異なるレトロウイルスにおいてかなり異なり得る。ウイルスゲノムの場合、ポリ (A) 付加部位 (終止) は、右側の LTR における R と U5 との間の境界にある。U3 は、細胞タンパク質、および一部の例ではウイルス転写活性化剤タンパク質に応答するプロモーターおよび複数のエンハンサー配列を含む、プロウイルスの転写制御ELEMENT のほとんどを含有する。

10

20

30

40

50

【0275】

構造遺伝子 *gag*、*pol*、および *env* そのものに関して、*gag* はウイルスの内部構造タンパク質をコードする。*gag* タンパク質は、タンパク質分解により処理されて成熟タンパク質 MA (基質)、CA (カプシド)、および NC (ヌクレオカプシド) となる。*pol* 遺伝子は、逆転写酵素 (RT) をコードし、これは、ゲノムの複製を媒介する RNA アーゼ H およびインテグラーゼ (IN) に会合した DNA ポリメラーゼを含有する。

【0276】

ウイルスベクター粒子の産生に関して、ベクター RNA ゲノムは、宿主細胞においてそれをコードする DNA 構築物から発現される。ベクターゲノムによってコードされない粒子の構成要素は、宿主細胞において発現される追加の核酸配列 (通常、*gag/pol* および *env* 遺伝子のいずれかまたは両方を含む「パッケージングシステム」) によってトランスフェクションによって宿主細胞に導入してもよく、またはそれらを宿主細胞ゲノムに組み込んでよく、またはそれらを混合した方法で提供してもよい。関係する技術は当業者に公知である。

【0277】

本開示において使用するためのレトロウイルスベクターとしては、これらに限定されないが、Invitrogen の pLenti シリーズバージョン 4、6、および 6.2; LentiGen Corp. が製造する「ViraPower」システム; City of Hope Research Institute の研究所が生成および使用する pHIV-7-GFP; Clontech が製造する「Lenti-X」レンチウイルスベクター pLVX; Sigma-Aldrich が製造する pLKO.1-puro; Open Biosystems が製造する pLemiR; ならびに Charite Medical School, Institute of Virology (CBF)、Berlin, Germany の研究所が生成および使用する pLV が挙げられる。

【0278】

外因性の核酸を宿主細胞に導入するためにまたはそうでなければ細胞を本開示の阻害剤に曝露するために使用される方法によらず、宿主細胞における組換え DNA 配列の存在を確認するために多様なアッセイを実施してもよい。そのようなアッセイとしては、例えば当業者に周知の「分子生物学」アッセイ、例えばサザンブロットリングおよびノザンブロットリング、RT-PCR、ならびに PCR; 「生化学」アッセイ、例えば特定のペプチドの存在または非存在を、例えば免疫学的手段 (ELISA およびウェスタンブロット) によって、または本開示の範囲内に入る作用剤を同定するために本明細書に記載のアッセイによって検出することが挙げられる。

【0279】

パッケージングベクターおよび細胞株：C A Rを、パッケージングベクターおよび細胞株を使用することによってレンチウイルスまたはレトロウイルスパッケージングシステムにパッケージングすることができる。パッケージングプラスミドとしては、これらに限定されないが、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、およびアデノ随伴ウイルスベクターが挙げられる。パッケージングベクターは、遺伝子材料の細胞への送達を容易にするエレメントおよび配列を含有する。例えば、レトロウイルス構築物は、複製インコンピテントレトロウイルスベクターをパッケージングするために、および複製コンピテントヘルパーウイルスを産生することなく高い力価で複製インコンピテントレトロウイルスベクターをパッケージングすることが可能なビリオンタンパク質を産生するために必要な全てのビリオンタンパク質をトランスでコードする複製インコンピテントレトロウイルスゲノムに由来する少なくとも1つのレトロウイルスヘルパーDNA配列を含むパッケージングプラスミドである。レトロウイルスDNA配列は、ウイルスのウイルス5'LTRのネイティブエンハンサーおよび／またはプロモーターをコードする領域を欠如し、ヘルパーゲノムのパッケージングに関与するpsi機能配列および3'LTRの両方を欠如するが、外来ポリアデニル化部位、例えばSV40ポリアデニル化部位、ならびにウイルスの産生が望ましい細胞タイプにおいて効率的な転写を方向付ける外来のエンハンサーおよび／またはプロモーターをコードする。レトロウイルスは、白血病ウイルス、例えばモロニーマウス白血病ウイルス(MMLV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、またはテナガザル白血病ウイルス(GALV)である。外来のエンハンサーおよびプロモーターは、ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)前初期(IE)エンハンサーおよびプロモーター、モロニーマウス肉腫ウイルス(MMSV)のエンハンサーおよびプロモーター(U3領域)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)のU3領域、脾フォーカス形成ウイルス(SFFV)のU3領域、またはネイティブモロニーマウス白血病ウイルス(MMLV)に結合したHCMV IEエンハンサーであり得る。レトロウイルスパッケージングプラスミドは、例えば、第1のヘルパー配列が同種指向性MMLVまたはGALVのgagおよびpolタンパク質をコードするcDNAを含有し、第2のヘルパー配列がenvタンパク質をコードするcDNAを含有する、プラスミドに基づく発現ベクターによってコードされる2つのレトロウイルスヘルパーDNA配列からなり得る。宿主範囲を決定するEnv遺伝子は、異栄養性、両種指向性、同種指向性、ポリトロピック(ミンクフォーカス形成)もしくは10A1マウス白血病ウイルスenvタンパク質、またはテナガザル白血病ウイルス(GALV envタンパク質、ヒト免疫不全ウイルスenv(gp160)タンパク質、水疱性口内炎(Vesicular Stomatitis)ウイルス(VSV)Gタンパク質、ヒトT細胞白血病(HTLV)I型およびII型env遺伝子産物をコードする遺伝子、上記のenv遺伝子の1つまたは複数の組合せに由来するキメラエンベロップ遺伝子、あるいは上記のenv遺伝子産物の細胞質および膜貫通ならびに所望の標的細胞上の特異的表面分子に対するモノクローナル抗体をコードするキメラエンベロップ遺伝子に由来し得る。

【0280】

パッケージングプロセスでは、パッケージングプラスミドおよびレトロウイルスベクターを、ウイルスを産生することが可能な第1の哺乳動物細胞集団、例えばヒト胎児腎細胞、例えば293細胞(ATCC No. CRL 1573、ATCC, Rockville Md.)に一過性に同時トランスフェクトして、高い力価の組換えレトロウイルス含有上清を産生する。本開示の別の方法では、この一過性にトランスフェクトされた第1の細胞集団を次に、哺乳動物標的細胞、例えばヒトリンパ球と共培養し、標的細胞に外来遺伝子を高い効率で形質導入する。本開示のなお別の方法では、上記の一過性にトランスフェクトした第1の細胞集団からの上清を、哺乳動物標的細胞、例えばヒトリンパ球または造血幹細胞と共にインキュベートし、標的細胞に外来遺伝子を高い効率で形質導入する。

【0281】

別の態様では、パッケージングプラスミドを、ウイルスを産生することが可能な第1の哺乳動物細胞集団、例えばヒト胎児腎細胞、例えば293細胞において安定に発現させる。

レトロウイルスまたはレンチウイルスベクターを、選択可能マーカーとの同時トランスフェクション、またはシュドタイプウイルスによる感染のいずれかによって細胞に導入する。いずれの場合でも、ベクターは組み込まれる。あるいは、ベクターを、エピソームとして維持されるプラスミドに導入することができる。高い力価の組換えレトロウイルス含有上清が産生される。

処置および診断の方法

【0282】

一態様では、本明細書において、担体と、本開示の抗体、抗原結合性断片、ポリペプチド、CAR、単離された核酸、ベクター、および／または単離された細胞のうちの1つまたは複数を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる組成物を提供する。本開示の抗体およびポリヌクレオチド、ベクター、または宿主細胞はまた、多くの異なる担体に結合させることができる。このように、本開示はまた、抗体および活性または不活性である別の物質を含有する組成物も提供する。周知の担体の例としては、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および変性セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、および磁鉄鉱が挙げられる。担体の性質は、本開示の目的に関して可溶性または不溶性のいずれかであり得る。当業者は、抗体に結合するための他の適した担体を承知しているか、またはルーチンの実験を使用してそれを確認することができる。腫瘍からの凍結切片を、h u L y m-1またはh u L y m-2によって染色し、患者にh u L y m-1もしくはh u L y m-2 CAR T細胞または抗体による処置を行う前に、腫瘍が抗原陽性であることを実証する。L y m-1およびL y m-2抗原はいずれも、切片のパラフィン包埋によって破壊されることから、凍結切片を実施する必要がある。

【0283】

本開示の抗体またはその断片を使用して、腫瘍およびがんを処置してもよい。本明細書に提供される抗L y m CAR発現細胞、本明細書に提供される抗体、その抗原結合性断片、および／またはポリペプチドは、単独で、または希釈剤、公知の抗がん治療薬、および／もしくは他の構成要素、例えばサイトカイン、もしくは免疫刺激性である他の細胞集団と組み合わせて投与され得る。それらは、第1選択治療、第2選択治療、第3選択治療、またはさらなる治療として投与され得る。そのため、本開示の抗体を他の治療（例えば、化学療法、放射線、手術等）と組み合わせてもよい。追加の治療の非制限的な例としては、化学療法または生物療法が挙げられる。本開示のCAR T細胞または抗体がより有効となるように腫瘍の微小環境を変更するために、CAR T細胞および／または抗体治療の前またはその間のチェックポイント阻害剤が有用であり得る。追加の治療のさらに非制限的な例としては、サプレッサー細胞、例えば制御性T細胞（T r e g）および骨髓由来サプレッサー細胞（M D S C）を欠失または阻害する方法が挙げられ、同様に有用であり得る。T r e gは、低用量シクロホスファミドによって欠失させることができ、M D S Cは低用量フルオロウラシル（5-FU）化学療法またはまだ知られていない方法によって欠失させることができる。加えて、追加の治療の他の非制限的な例としては、腫瘍細胞をCAR T細胞治療により感受性にするすることができる抗原のアップレギュレーションが挙げられる。H L A-D Rのアップレギュレーションは、ヒストンデアセチラーゼ（H D A C）阻害剤、I L-12処置、C p G（T L R 9アゴニスト）、およびインターフェロン遺伝子刺激因子（S T I N G）経路アゴニストを使用することによって行われ得る。適切な処置レジメンは、処置する医師または獣医師によって決定される。

【0284】

本明細書に提供される抗L y m CAR発現細胞、本開示の抗体、その抗原結合性断片、および／またはポリペプチドは、単独で、または希釈剤、公知の抗がん治療薬、および／もしくは他の構成要素、例えばサイトカインもしくは免疫刺激性である他の細胞集団と組み合わせて投与され得る。

【0285】

一実施形態では、本明細書において、それを必要とする対象における腫瘍の成長を阻害す

10

20

30

40

50

る、および／またはがんを処置する、および／またはがんの再発を防止する方法であって、本明細書に提供される、有効量のCAR発現細胞、本明細書に提供される、有効量の抗体、有効量のその抗原結合性断片、および／または有効量のポリペプチドを対象に投与するステップを含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる方法を開示する。一態様では、CAR発現細胞は、処置される対象に対して自己または同種であり、必要に応じて、第1選択治療、第2選択治療、第3選択治療、第4選択治療、または第5選択治療である。

【0286】

別の態様では、腫瘍またはがん細胞は、CD19、Lym1、および／またはLym2を発現または過剰発現する。さらなる態様では、がんまたは腫瘍は、癌腫、肉腫、リンパ腫、または白血病の群から選択される。1つの特定の態様では、腫瘍またはがんは、B細胞リンパ腫または白血病である。一実施形態では、腫瘍は固形腫瘍である。固形腫瘍は、黒色腫、大腸癌、乳癌、および／または脳腫瘍であり得る。一態様では、処置されるがんは、癌腫、肉腫、神経芽腫、子宮頸がん、肝細胞がん、中皮腫、神経膠芽腫、骨髄腫、リンパ腫、白血病、腺腫、腺癌、神経膠腫、神経膠芽腫、網膜芽腫、星細胞腫、乏突起膠腫、髄膜腫、または黒色腫である。

10

【0287】

方法は、対象、例えばヒト、非ヒト霊長類（例えば、類人猿、テナガザル、チンパンジー、オランウータン、サル、マカク等）、家畜動物（例えば、イヌおよびネコ）、農場動物（例えば、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ）、および実験動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、モルモット）を処置するために有用である。哺乳動物は、任意の年齢または任意の発達段階（例えば、成体、若年、こども、幼体、または子宮内哺乳動物）であり得る。哺乳動物は、雄性または雌性であり得る。ある特定の実施形態では、対象は、新生物障害、新生物、腫瘍、悪性腫瘍、またはがんを有するまたは有することが疑われる。

20

【0288】

本明細書に開示される方法はさらに、対象にCAR治療以外の抗腫瘍治療を投与するステップを含み得る、またはあるいはそれから本質的になり得る、またはなおさらにそれからなり得る。

【0289】

したがって、本開示の方法の態様は、それを必要とする対象における腫瘍の成長を阻害するための、および／またはそれを必要とする患者におけるがんを処置するための方法に関する。

30

【0290】

本開示はまた、がん細胞またはがん幹細胞の増殖を阻害する方法であって、細胞に、本開示の、有効量の抗Lym CAR発現細胞、有効量の抗体、有効量の抗原結合性断片、および／または有効量のポリペプチドを接触させるステップを含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる方法にも関する。

【0291】

本明細書においてさらに、対象が治療に応答する可能性があるか応答する可能性がないかを決定する方法であって、患者から単離された試料に、本開示の抗体、抗原結合性断片、および／またはポリペプチドを接触させるステップ、ならびに試料中の抗体-細胞複合体、抗原結合性断片-細胞複合体、および／またはポリペプチド-細胞複合体を検出するステップを含み、またはあるいはそれから本質的になり、またはなおさらにそれからなり、複合体が存在すれば、対象が治療に応答する可能性があることを示し、複合体が存在しなければ、対象が治療に応答する可能性がないことを示す、方法を提供する。抗体、抗原結合性断片、および／またはポリペプチドは、検出可能に標識され得る。

40

【0292】

同様に本明細書において、本開示の、有効量の抗体またはCARを、治療に応答する可能性があるか決定された対象に投与するステップをさらに含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる方法を開示する。

50

【0293】

本明細書に開示される治療は、第1選択治療、第2選択治療、第3選択治療、第4選択治療、または第5選択治療であり得る。

【0294】

本開示はさらに、対象における治療をモニタリングする方法であって、対象から単離された試料に、本開示の抗体または抗原結合性断片を接触させるステップ、および試料中の抗体-細胞複合体を検出するステップを含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる方法に関する。方法は、本開示の、有効量のCAR発現細胞、有効量の抗体、有効量の抗原結合性断片、および／または有効量のポリペプチドを対象に投与する前および／または後に実施することができる。一態様では、抗体またはその抗原結合性断片は、検出可能に標識される。別の態様では、試料は、喀痰、血清、血漿、リンパ、囊胞液、尿、便、脳脊髄液、腹水、血液、または組織のうちの1つまたは複数を含む。

10

【0295】

さらなる態様では、本明細書において、がんまたは腫瘍細胞集団に対する免疫応答を刺激する方法であって、本開示の抗体、その抗原結合性断片、および／またはポリペプチドを、免疫応答を刺激するために有効な量で対象に投与するステップを含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる方法を提供する。一態様では、対象は、がんまたは腫瘍の処置を受けている、受けたことがある、またはそれを必要としている。別の態様では、がんは、低反応性であると特徴付けられている。さらなる態様では、がんまたは腫瘍細胞に対する免疫応答を刺激する方法であって、標的細胞集団に本開示の抗体を接触させるステップを含み、またはあるいはそれから本質的になり、またはなおさらにそれからなり、接触させるステップが*in vitro*または*in vivo*である、方法を提供する。直接相互作用の特定の例は結合である。間接的相互作用の特定の例は、1つの実体が中間分子に作用し、次に第2の参照実体に作用する場合である。本明細書で使用される場合、接触は、溶液中、固相、*in vitro*、*ex vivo*、細胞内、および*in vivo*を含む。*in vivo*での接触は、投与することまたは投与と呼ぶことができる。別の態様では、がんまたは腫瘍は、低反応性であると特徴付けられる。一態様では、抗体は、がんまたは腫瘍細胞に対する特異的結合に関して選択される。細胞は、任意の種の細胞、例えば哺乳動物細胞またはヒト細胞であり得る。それらは、対象（例えば、生検から）または培養細胞から単離することができる。別の態様では、がんまたは腫瘍細胞は、Lym1またはLym2を発現または過剰発現する。

20

30

【0296】

同様に、本明細書において、対象において抗腫瘍免疫を提供する方法であって、本明細書に提供されるCAR発現細胞、抗体、その抗原結合性断片、および／またはポリペプチドを、対象に免疫を提供するために有効な量で投与するステップを含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる方法を提供する。本明細書に提供されるCAR発現細胞、抗体、その抗原結合性断片、および／またはポリペプチドは、がんの素因を有するまたはがんの症状をまだ示していない対象において症状またはがんが起こるのを防止するために提供される。

40

【0297】

一部の実施形態では、本明細書に提供されるCAR発現細胞、抗体、その抗原結合性断片、および／またはポリペプチドは、腫瘍組織の切除によって形成された内腔（すなわち、内腔内送達）または切除前の腫瘍に直接（すなわち、腫瘍内送達）送達または投与される。一部の実施形態では、本開示の抗体は、静脈内、髄腔内、腹腔内、筋肉内、皮下、または他の適した投与手段によって投与され得る。

【0298】

本開示の医薬組成物は、処置または防止される疾患に対して適切な方法で投与され得る。投与の量および頻度は、患者の状態、患者の疾患のタイプおよび重症度などの要因によって決定されるが、適切な投薬量は臨床試験によって決定され得る。

50

【0299】

上記の方法に関して、有効量が投与され、細胞または集団の投与は、任意の症状を減弱させるまたは追加の症状が生じるのを防止するように作用する。投与ががんの再発または転移の可能性を防止または低減することを目的とする場合、細胞または組成物は、任意の目に見えるまたは検出可能な症状の前に投与することができる。投与経路としては、これらに限定されないが、経口（例えば、錠剤、カプセル剤、または懸濁剤）、局所、経皮、鼻腔内、膣、直腸、皮下 静脈内、動脈内、筋肉内、骨内、腹腔内、硬膜外、および髄腔内が挙げられる。

【0300】

方法は、（１）疾患の素因を有するまたはまだ症状を示していない対象において症状または疾患が起こるのを防止すること；（２）疾患を阻害することまたはその発生を停止させること；あるいは（３）疾患または疾患の症状を回復させるまたはその退行もしくは再発を引き起こすことのうちの１つあるいは複数を提供する。当技術分野で理解されるように、「処置」は、臨床結果を含む有益なまたは所望の結果を得るためのアプローチである。本技術の目的に関して、有益なまたは所望の結果は、これらに限定されないが、１つまたは複数の症状の軽減または回復、状態（疾患を含む）の程度の減少、状態（疾患を含む）の状況の安定化（すなわち、悪化していない）、状態（疾患を含む）の遅延または鈍化、状態（疾患を含む）の進行、回復または緩和、状況および寛解寛解（部分的または全体）、検出可能であるか検出不能であるか、のうちの１つまたは複数を含み得る。本開示の組成物および方法を含む処置は、第１選択治療、第２選択治療、第３選択治療、第４選択治療、第５選択治療であり得、単独の治療として、または他の適切な治療、例えば手術による切除、化学療法、放射線療法と組み合わせて使用されると意図される。一態様では、処置は予防を排除する。

キット

【0301】

１つの特定の態様では、本開示は、本開示の方法を実行するためのキットおよび本開示の方法を実行するための使用説明書を提供する。キットは、本開示の抗体、CAR、抗原結合性断片、ポリペプチド、単離された核酸、ベクター、単離された細胞および／または組成物、ならびに使用説明書のうちの１つまたは複数を含む、またはあるいはそれから本質的になる、またはなおさらにそれからなる。

【0302】

キットは、生物試料、例えば喀痰、血清、血漿、リンパ、囊胞液、尿、便、脳脊髄液、腹水、または血液が挙げられるがこれらに限定されない任意の体液、および体組織の生検試料を含む生物試料中にLym1またはLym2ポリペプチドの存在を検出するために有用である。試験試料はまた、腫瘍細胞、腫瘍に隣接する正常細胞、腫瘍組織タイプに対応する正常細胞、血液細胞、末梢血リンパ球、またはその組合せであり得る。上記の方法において使用される試験試料は、アッセイフォーマット、検出法の性質、およびアッセイされる試料として使用される組織、細胞、または抽出物に基づいて変化する。細胞のタンパク質抽出物または膜抽出物を調製する方法は、当技術分野で公知であり、利用されるシステムと適合性である試料を得るために容易に適合させることができる。

【0303】

キット構成要素（例えば、試薬）を、適した容器に包装することができる。キットはまた、緩衝剤、保存剤、またはタンパク質安定化剤も含み得る、またはあるいはそれから本質的になり得る、またはなおさらにそれからなり得る。キットはさらに、検出可能な標識を検出するために必要な構成要素、例えば酵素または基質を含み得る、またはあるいはそれから本質的になり得る、またはなおさらにそれからなり得る。キットはまた、アッセイして試験試料と比較することができる対照試料または一連の対照試料も含み得る。キットの各々の構成要素を、個々の容器内に封入することができ、様々な容器の全てが、キットを使用して実施したアッセイの結果を解釈するための使用説明書と共に単一の包装内にあり得る。本開示のキットは、キット容器上またはキット容器内に書面の製品を含み得る

。書面の製品は、キットに含有される試薬を使用する方法を説明する。

【0304】

したがって、これらの提案されたキットの構成要素は、当業者によって使用するために通常の方法で包装され得る。例えば、これらの提案されたキットの構成要素は、溶液中にまたは液体分散液等として提供され得る。

【実施例】

【0305】

実験方法

（実験番号1）

ヒト化Lym-1およびLym-2抗体の特徴付け

10

2つのヒト化Lym-1抗体および1つのヒト化Lym-2抗体を、CDRグラフティンによって産生した。ヒト化抗体は、その親キメラ抗体より低い結合能を示した（図1および図4）。

huLym-1-A形質導入初代ヒトT細胞のin vitroでの発現および機能の評価

【0306】

huLym-1-A、huLym-1-B、およびhuLym-2 CARは、抗Lym-1イディオタイプ抗体またはプロテイン-Lによって検出する場合、初代ヒトT細胞において発現させることができる（図2および図5）。ARH-77に対するhuLym-2 CAR媒介エピトープ特異的殺滅を図4に示す。

huLym-1 CAR-T細胞はRaji異種移植片において完全な寛解を誘導した

20

【0307】

Lym-1およびhuLym-1 CAR-T細胞によって処置したマウスでは、バックグラウンドの生物発光のみが検出され、抗腫瘍効果は60日の実験期間を通して持続した（図3A～図3C）。T細胞およびPBSをモック形質導入したマウス5匹では、腫瘍負荷が進行し、全てのマウスを後肢麻痺により27日までに殺し、生存期間の中央値は20日であった（図3A、図3C）。

細胞株

【0308】

ARH-77細胞株を、American Type Tissue Collection (ATCC、Manassas、VA) から購入した。ARH-77 eGFP/Luc細胞株は、親ARH-77にeGFP/Lucウイルスを形質導入することによって研究所内で生成した。Raji/Luc-GFP細胞は、University of California、Los AngelesのDr. Yvonne Y. Chenから寄贈された。細胞株は全て、10%透析FCS (dFCS、Hyclone、Logan、UT)、2%グルタミン、および1%ペニシリン/ストレプトマイシン (Geminil Bio-Products、West Sacramento、CA) を補充したRPMI-1640中で培養した。レンチウイルス産生のために使用したHEK-293 LTV細胞 (Cell Biolabs Inc、San Diego、CA) は、10% dFCS、2%グルタミン、および1%ペニシリン/ストレプトマイシンを補充したDMEM (Corning、Manassas、VA) 中で培養した。JurkatヒトTリンパ腫細胞は、ATCCから得て、10% FCS、1%グルタミン、および1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含有するRPMI-1640培地中での培養において維持した。

30

40

ヒト化抗体の特徴付け

【0309】

ヒト化Lym-1およびLym-2の結合能をそれぞれ、フローサイトメトリー分析によってRajiおよびARH-77細胞株に対して評価した。各々の状況で、洗浄緩衝液100ul中の 5×10^5 個の標的細胞を、抗体の漸増濃度と共に4℃で30分間インキュベートした。次に細胞を洗浄緩衝液 (2% FBS、PBS) によって2回洗浄した後、(AF488)-コンジュゲートヤギ抗ヒトIgG (Thermo-fisher) 2ug

50

を添加した。次に標識細胞を、4℃でさらに30分間インキュベートした。平均蛍光強度(MFI)を測定し、フローサイトメトリーによって定量した。

ベクターの構築およびレンチウイルスの調製

【0310】

Lym-1-41BB3zCAR、huLym-1-A-41BB3zCAR、huLym-1-B-41BB3zCAR、およびhuLym-2-41BB3zCARのコード遺伝子を、EcoRIおよびMluI制限部位を通してレンチウイルスベクターpLVX-EF1α-IRES-ZsGreen(Clontech、Mountain View、CA)にライゲーションした。レンチウイルスは、パッケージングプラスミドpSPAX2およびpMD2.G(Addgene)からなるCAR導入ベクターおよびHEK-293LTV細胞株の一過性の同時トランスフェクションによって産生した。ウイルス粒子を含有する上清をトランスフェクションの24および48時間後に収集し、合わせて濾過し、超遠心分離によって濃縮した。次いで沈降させたウイルスを、1%BSAおよび7%トレハロースを補充したPBS中に再懸濁させて、アリコートにし、-80℃で保存した。10⁶個のJurkat T細胞にウイルスベクターの10倍連続希釈液を形質導入することによって、ウイルス価を測定した。形質導入の48時間後、細胞を、研究所で開発したビオチン標識抗Lym-1イディオタイプ抗体またはビオチン標識プロテインL(Genescript)によって標識し、APCコンジュゲートストレプトアビジン(BioLegend)によって検出した。10~20%の範囲で積極的に形質導入された細胞を使用して、ウイルス形質導入単位(TU)を以下の式によって計算した：

$$TU/mL = (\text{播種した細胞 } 10^6 \text{ 個} \times \% \text{陽性細胞} \times 1,000) / \mu\text{Lウイルスベクター}$$

初代T細胞の単離および形質導入

【0311】

ヒトバフィーコート調製物をZenbio Inc.(Research Triangle Park、NC)から購入し、使用して、形質導入手順のための初代血液単核球細胞(PBMC)を得た。Ficoll-Paque(Life Technologies, Inc.)を製造元のプロトコルに従って使用してPBMCを単離した後、T細胞ネガティブ選択キット(Stem Cell Technologies、Seattle、WA)を使用してT細胞単離手順を行った。次に、単離された細胞を、T細胞培地(43%Clicks、43%RPMI 1640、2%Glutamax、10%dFCS、1%非必須アミノ酸溶液、および1%ペニシリン/ストレプトマイシン溶液)中で培養した。形質導入の3日前に、抗CD3/CD28ビーズ(Life Technologies, Inc.)を1:1の比で添加することによってT細胞を活性化した後、レンチウイルス(MOI=15)およびLentiblast(OZ Bioscience、San Diego、CA)と共に800gで90分間遠心分離することによって形質導入した。形質導入を1回実施した後、24時間後に培地を交換し、その後細胞を、新しいT細胞培地を補充した24ウェルG-Rexプレート(Wilson Wolf、St Paul、MN)に移した。形質導入後10日目に、T細胞をアッセイのために使用した。CARウイルス形質導入効率を、ビオチン化抗Lym-1イディオタイプ抗体を使用した後にAPCコンジュゲートストレプトアビジンによる検出によって、10日目にフローサイトメトリーによって評定した。モック形質導入を、上記の通りであるが生存ウイルスベクターの非存在下で陰性対照として実施した。

細胞傷害性

【0312】

形質導入されたエフェクターCAR T細胞調製物を、モックT細胞の添加によってCAR T細胞が50%陽性となるように調整した。これらの調整された調整物を、サイトカインを添加せずに平底96ウェルプレートにおいて各々10万個のRajiLuc/GFP細胞と共に、CAR T細胞の標的に対する比2:1、1:1、0.5:1、および0.25:1で24時間インキュベートした。エフェクター細胞を含まないRaji細胞

胞からの発光の読み取りデータを対照として使用した。20万個のRaji Luc-e GFPの2倍連続希釈液を使用して検量線を作成し、生存細胞を発光の読み取りデータと相関させた。24時間インキュベーション後の生存標的細胞数を、発光シグナルの読み取りデータを検量線と相関させることによって計算した。細胞溶解のパーセンテージを以下の式によって計算した：

【化1】

$$\text{溶解\%} = \left(\frac{\text{対照におけるRajiの数} - \text{エフェクターにおけるRajiの数}}{\text{対照におけるRajiの数}} \right) \times 100\%$$

NOD Scid-IL2Rガンマヌル (NSG) マウスにおけるRaji/Luc-e GFP異種移植片の研究

【0313】

マウス実験は全て、USC動物実験委員会 (Animal Care and Use Committee) (プロトコル番号20585) によって承認された。Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) から購入した8週齢の雄性NSGマウスを、USC動物施設において滅菌ケージに収容した。PBS100μl中の100万個のRaji/Luc-GFP細胞を、インスリンシリンジを使用して側方尾静脈を介して静脈内注射 (i.v.) した (0日目とする)。ルシフェラーゼ活性を、生物発光イメージングを介して7日目に測定し、腫瘍負荷を評価した。8日目に、100万個のモックT細胞、Lym-1-41BB3zCAR、huLym-1-B-41BB3zCAR、およびhuLym-1-B-DAPCARを、PBS100μl中で調製し、インスリンシリンジを使用してi.v.注射した。マウスの体重を週に2回測定し、腫瘍の進行を、USC Core Molecular Imaging CenterにおいてIVISイメージングシステムを使用する生物発光イメージングによってモニタリングした。

(実験番号2)

細胞株

【0314】

Raji/Luc-GFP細胞は、University of California、Los AngelesのDr. Yvonne Y. Chenから寄贈された。細胞株は全て、10%透析FCS (dFCS、Hyclone、Logan、UT)、2%グルタミン、および1%ペニシリン/ストレプトマイシン (Gemini Bio-Products, West Sacramento, CA) を補充したRPMI-1640中で培養した。レンチウイルス産生のために使用したHEK-293 LTV細胞 (Cell Biolabs Inc, San Diego, CA) を、10%dFCS、2%グルタミン、および1%ペニシリン/ストレプトマイシンを補充したDMEM (Corning, Manassas, VA) 中で培養した。JurkatヒトTリンパ腫細胞は、American Type Tissue Collection (Manassas, VA) から得て、10%FCS、1%グルタミン、および1%ペニシリン/ストレプトマイシンを含有するRPMI-1640培地中での培養において維持した。

ベクターの構築およびレンチウイルスの調製

【0315】

Lym-1-41BB3zCAR、huLym-1-B-41BB3zCAR、およびhuLym-1-B-DAPCARのコード遺伝子を、EcoRIおよびMluI制限部位を通してレンチウイルスベクターpLVX-EF1α-IRES-ZsGreen (Clontech, Mountain View, CA) にライゲーションした。レンチウイルスは、パッケージングプラスミドpsPAX2およびpMD2.G (Addgene) からなるCAR導入ベクターおよびHEK-293 LTV細胞 (8) の一過性の同時トランスフェクションによって産生した。ウイルス粒子を含有する上清をトランスフェクションの24および48時間後に収集し、合わせて濾過し、超遠心分離によって濃縮した。次

いで沈降させたウイルスを、1% BSAおよび7%トレハロースを補充したPBS中に再懸濁させて、アリコートにし、-80℃で保存した。10⁶個のJurkat T細胞にウイルスベクターの10倍連続希釈液を形質導入することによって、ウイルス価を測定した。形質導入の48時間後、細胞を、本出願人の研究所で開発したビオチン標識抗Lym-1イディオタイプ抗体によって標識し、APCコンジュゲートストレプトアビジン（BioLegend）によって検出した。10~20%の範囲で積極的に形質導入された細胞を使用して、ウイルス形質導入単位（TU）を以下の式によって計算した：TU/mL = (播種した細胞10⁶個 × %陽性細胞 × 1,000) / μLウイルスベクター。

初代T細胞の単離および形質導入

【0316】

ヒトバフィーコート調製物をZenbio Inc. (Research Triangle Park, NC) から購入し、使用して、形質導入手順のための初代血液単核球細胞（PBMC）を得た。Ficoll-Paque（Life Technologies, Inc.）を製造元のプロトコールに従って使用してPBMCを単離した後、T細胞ネガティブ選択キット（Stem Cell Technologies, Seattle, WA）を使用してT細胞単離手順を行った。次に、単離された細胞を、T細胞培地（43% Clicks、43% RPMI 1640、2% Glutamax、10% dFCS、1% 非必須アミノ酸溶液、および1% ペニシリン／ストレプトマイシン溶液）中で培養した。形質導入の3日前に、抗CD3／CD28ビーズ（Life Technologies, Inc.）を1：1の比で添加することによってT細胞を活性化した後、レンチウイルス（MOI=15）およびLentiblast（OZ Bioscience, San Diego, CA）と共に800gで90分間遠心分離することによって形質導入した。形質導入を1回実施した後、24時間後に培地を交換し、その後細胞を、新しいT細胞培地を補充した24ウェルG-Rexプレート（Wilson Wolf, St Paul, MN）に移した。形質導入後10日目に、T細胞をアッセイのために使用した。CARウイルス形質導入効率を、ビオチン化抗Lym-1イディオタイプ抗体を使用した後にAPCコンジュゲートストレプトアビジンによる検出によって、10日目にフローサイトメトリーによって評定した。モック形質導入を、上記の通りであるが生存ウイルスベクターの非存在下で陰性対照として実施した。

細胞傷害性

【0317】

形質導入されたエフェクターCAR T細胞調製物を、モックT細胞の添加によってCAR T細胞が50%陽性となるように調整した。これらの調整された調製物を、サイトカインを添加せずに平底96ウェルプレートにおいて各々10万個のRaji Luc/e GFP細胞と共に、CAR T細胞の標的に対する比2：1、1：1、0.5：1、および0.25：1で24時間インキュベートした。エフェクター細胞を含まないRaji細胞からの発光の読み取りデータを対照として使用した。20万個のRaji Luc/e GFPの2倍連続希釈液を使用して検量線を作成し、生存細胞を発光の読み取りデータと相関させた。24時間インキュベーション後の生存標的細胞数を、発光シグナルの読み取りデータを検量線と相関させることによって計算した。細胞溶解のパーセンテージを以下の式によって計算した：

【0318】

【化2】

$$\text{溶解\%} = \left(\frac{\text{対照におけるRajiの数} - \text{エフェクターにおけるRajiの数}}{\text{対照におけるRajiの数}} \right) \times 100\%$$

NOD Scid-IL2Rガンマヌル（NSG）マウスにおけるRaji／Luc-e GFP異種移植片の研究

【0319】

マウス実験は全て、USC動物実験委員会（プロトコール番号20585）によって承認

された。Jackson Laboratoriesから購入した8週齢の雄性NSGマウスを、USC動物施設において滅菌ケージに収容した。PBS 100 μ l中の100万個のRaji/Luc-GFP細胞を、インスリンシリンジを使用して側方尾静脈を介して静脈内注射(i.v.)した(0日目とする)。ルシフェラーゼ活性を、生物発光イメージングを介して7日目に測定し、腫瘍負荷を評価した。8日目に、100万個のモックT細胞、Lym-1-41BB3zCAR、huLym-1-B-41BB3zCAR、およびhuLym-1-B-DAPCARを、PBS 100 μ l中で調製し、インスリンシリンジを使用してi.v.注射した。マウスの体重を週に2回測定し、腫瘍の進行を、USC Core Molecular Imaging CenterにおいてIVI-Sイメージングシステムを使用する生物発光イメージングによってモニタリングした。huLym-1-B-DAPCAR形質導入初代ヒトT細胞のin vitroでの発現および機能の評定

10

【0320】

huLym-1-B-DAPCAR構築物は、CD8aヒンジおよび細胞膜の固定を可能にする膜貫通ドメイン(TM)の後に、DAP10-DAP12の方向のDAP10およびDAP12の細胞質領域で構成された(図7)。CAR T細胞の特異性は、huLym-1-B抗体から得たscFvに対するものである。この新規構築物は、抗Lym-1イディオタイプ抗体によって検出した場合に初代ヒトT細胞での発現に成功し(図8)、Lym-1陽性細胞株Raji、EBV陽性アフリカバーキットリンパ腫細胞株に対して細胞傷害性を示す(図10)。より重要なことに、DAPCARを形質導入したT細胞は、モックT細胞と類似の増殖プロファイルを有し、抗CD3/CD28ビーズによる繰り返し刺激後にトランスジーン発現を保持した(図9A~9B)。しかし、重要なことは、41BB3zに基づくCAR-T細胞が、CAR陽性集団中で漸減を示すことであった(図9A~9B)。

20

huLym-1-B-DAPCAR T細胞はRaji異種移植片において優れた腫瘍制御を示した

【0321】

異なる構築物の抗腫瘍効果を、Raji-eGFP/Luc異種移植片モデルにおいて評価した。これらの研究では、各群の効力の差をより良好に評価することができるように、10分の1の数のCAR T細胞を使用した。これらのin vivo研究の結果を図10に示し、以下を示す。モックT細胞群におけるマウスは全て、22日目までに腫瘍進行により死亡した(図11A~11D)。これに対し、CAR T細胞処置群のマウスは、有意な改善および生存率を示した(図11B)。しかし、マウスLym-1-41BB3z群では、腫瘍が21日目より後に進行し(図11A)、最終的に後肢の麻痺を引き起こした。この群では、マウス2匹のみが44日目まで生存した(図11B)。huLym-1-B-41BB3zCAR T細胞処置マウスでは、劇的な腫瘍の進行が21日目より後に認められたが、42日目以後後肢の麻痺を発症したマウスは1匹のみであり、4匹中2匹のマウスは、生物発光イメージングによって証明されるように44日目までに非常に高い腫瘍負荷を有した(図11A~11C)。対照的に、huLym-1-B-DAPCAR T細胞は、より一貫した腫瘍の制御を誘導し、44日目までに後肢の麻痺を発症したマウスはいなかった(図11A~11C)。加えて、huLym-1-B-DAPCARでは、4-1BB-CD3ζシグナル伝達ドメインを使用する第2世代CAR T細胞によって処置した群と比較して、有意に低い体重減少(体重減少5%対20%)を有した。これらの結果は、第2世代に基づくCAR-T細胞と比較して、この新規DAP構築物のより安全かつより有効なプロファイルを示唆する。

30

40

(実験番号3)

【0322】

本実験は、CAR T細胞のDAPシグナル伝達部分の有用性およびLym-1陽性腫瘍を処置するための細胞治療モダリティの開発を実証する。

マウス

50

【0323】

マウスの実験は、USC動物実験委員会（IACUC20585）によって承認され、Jackson Laboratoriesから購入した、またはUSC動物施設においてIACUC20697の下で交配させた8～13週齢のNSGマウス（雌および雄）を伴った。

サイトカインおよび抗体

【0324】

chLym-1、IL-7-Fc、IL-15-Fc、およびDyLight650抗261タグ抗体を、本出願人の研究所において開発し、調製した。使用した市販の抗体は：Alexa488ヤギ抗ヒトIgG（H+L）（ThermoFisher、カタログ番号A-11013）、Alexa Fluor647抗ヒトIgG Fc（Biolegend、カタログ番号409320）、フィコエリスリン（PE）抗ヒトリン酸化CD3ζ（pY142）（BD Sciences、カタログ番号558448）、PEマウス抗ヒトCD22（Biolegend、カタログ番号302506）、PEマウス抗ヒトCD19（Biolegend、カタログ番号302254）、PEマウス抗ヒトPD-1（Biolegend、カタログ番号329906）、PEマウス抗ヒトLAG-3（Biolegend、カタログ番号369306）であった。

試薬

【0325】

これらの研究を実施するために使用した試薬は：RPMI-1640（Genesee Scientific、ロット番号0519108）、DMEM（Genesee Scientific、ロット番号05191016）、透析したウシ胎仔血清（dFCS）（Hyclone、カタログ番号SH30079.03）、GlutaMAX（ThermoFisher、カタログ番号35050-061）、ペニシリン／ストレプトマイシン（Corning、カタログ番号30-002-CI）、非必須アミノ酸（Genesee Scientific、カタログ番号25-536）、Click's培地（SIGMA、カタログ番号C5572-500ML）、EcoRI（NEB、カタログ番号R3101M）、MluI（NEB、カタログ番号R3198L）、pSPAX2（Addgene、カタログ番号12260）、pMD2.G（Addgene、カタログ番号12259）、Xfect（Clontech、カタログ番号631418）、Ficoll-Paque（Life Technologies、カタログ番号GE17-1440-02）、EasySepヒトT細胞単離キット（STEMCELL、カタログ番号19051）、D-（+）-トレハロース二水和物（SIGMA、カタログ番号90210-50G）、Lentiblast（OZBiosciences、カタログ番号LB01500）、24ウェルG-Rexプレート（Wilson Wolf、カタログ番号80240M）、DynabeadsヒトT活性化因子CD3／CD28（ThermoFisher、カタログ番号11131D）、ImmunoCultヒトCD3／CD28／CD2 T細胞活性化因子（STEM CELL、カタログ番号10970）、IL-2 ELISAキット（ThermoFisher、カタログ番号EH2IL2）、GM-CSF ELISAキット（ThermoFisher、カタログ番号EHGMCSF）、およびINF-ガンマELISAキット（ThermoFisher、カタログ番号EHIFN）、細胞内染色透過洗浄緩衝液（Biolegend、カタログ番号421002）、およびFluoroFix緩衝液（Biolegend、カタログ番号422101）、Sytox Green（ThermoFisher、カタログ番号S7020）、CountBright絶対細胞数計測用ビーズ（ThermoFisher、カタログ番号C36950）を含む。

細胞

【0326】

Jurkat、K562、Daudi、Karpas-299、B35M、BALL-1、Chevallier、およびRaji細胞株を、American Type Cu

10

20

30

40

50

ulture Collection (ATCC) から得た。SU-DHL-6 (Epstein AL et al, 1974, 1851-72 doi 10.1002/1097-0142(197412)34:6<1851::aid-cncr2820340602>3.0.co;2-4)、SU-DHL-10 (1851-72 doi 10.1002/1097-0142(197412)34:6<1851::aid-cncr2820340602>3.0.co;2-4)、および NU-DHL-1 (Epstein AL et al, 1985, 619-27 doi 10.1002/ijc.2910350509) ヒトリンパ腫細胞株は、本出願人の施設内において作製した。Raji-eGFP/Luc細胞は、University of California, Los AngelesのDr Yvonne Y. Chenから寄贈された。リンパ腫株は全て、10%透析ウシ胎仔血清(dFCS)、1%GlutaMAX、および1%ペニシリン/ストレプトマイシンを補充したRPMI-1640において培養した。HEK-293 LTV細胞(Cell Biolabs、カタログ番号LTV-100)は、10%dFCS、1%GlutaMax、1%非必須アミノ酸、および1%ペニシリン/ストレプトマイシンを補充したDMEMにおいて培養した。初代ヒトT細胞を、ヒトバフィーコート(Zen-Bio、CAR#SER-BC-SDS)から濃縮し、50ng/mL IL-7-Fcおよび100ng/mL IL-15-Fcを補充したT細胞培地(43%Click's培地、43%RPMI-1640、10%dFCS、2%GlutaMAX、1%非必須アミノ酸、1%ペニシリン/ストレプトマイシン)中で培養した。使用した細胞株は全て、Mycofluor Mycoplasma検出キット(ThermoFisher、カタログ番号M7006)を使用してマイコプラズマの汚染に関してルーチンに試験した。

10

20

ヒト化Lym-1結合研究

【0327】

図21A、図21B、および図23B: 100μl中に0.013nM~1300nMの範囲の濃度の抗体を、20万個のRaji細胞と共に4℃で30分間インキュベートした後、洗浄緩衝液(PBS中に2%FBS)によって3回洗浄した。次に結合抗体を、濃度5ug/mLのAlexa Fluor (AF) 488コンジュゲートヤギ抗ヒトIgG (H+L) 二次抗体、または試料あたり5μlのAF647コンジュゲート抗ヒトIgG Fcと共に30分間インキュベートした。細胞を2回洗浄し、フローサイトメトリー分析に供した。平均蛍光強度(MFI)を記録し、プロットして抗体結合を評定した。図1c および3cでの染色に関して、抗体10μgを100μl中で20万個の細胞と共に4℃

30

ベクターの構築およびレンチウイルスの調製

【0328】

CARのコード遺伝子は、Integrated DNA Technologies (IDT) が合成し、EcoRIおよびMluI制限部位を通してレンチウイルスベクター pLVX-EF1α-IRES-ZsGreen (Clontech) にライゲーションした。全てのCAR構築物に関して、ヒト胎盤増殖因子に由来する10アミノ酸のエピトープ「AVPPQQWALS」(261-タグ)をscFv配列の直後に挿入した。レンチウイルスを、すでに記載されているように(Zheng L et al, 2017, doi 10.3390/ijms18122773) Xfectプロトコールに従ってHEK-293LTVの一過性のトランスフェクションによって産生した。簡単に説明すると、導入ベクターのみをpSPAX2およびpMD2.G(分子比2:1:1)と混合し、HEK-293LTV細胞に同時トランスフェクトした。ウイルス粒子を含有する上清をトランスフェクションの24および48時間後に収集し、合わせて濾過し、20,000gで2時間の超遠心分離によって濃縮した。次に、沈降させたウイルスを、1%BSAおよび7%トレハロースを補充したPBS中に再懸濁させ、アリコートにし、-80℃で保存した。10⁶個のJurkat T細胞にウイルスベクターの10倍連続希釈液を形質導入することによって、

40

50

ウイルス価を測定した。形質導入の48時間後、Jurkat細胞を洗浄し、トランスジェンの発現に関してフローサイトメトリーによって分析した。10～20%の範囲で積極的に形質導入された細胞を使用して、ウイルス形質導入単位(TU)を以下の式によって計算した： $TU/mL = (\text{播種した細胞} \times 10^6 \text{個} \times \% \text{陽性細胞} \times 1,000) / \mu\text{l}$ ウイルスベクター。

初代T細胞の単離、形質導入、および分析

【0329】

ヒトバフィーコート調製物をZenbio Inc. から購入し、T細胞濃縮のための初代血液単核球細胞(PBMC)を得た。Ficoll-Paqueを使用してPBMCを単離した後、EasySepヒトT細胞単離キットを使用するT細胞単離を、製造元のプロトコールに従って行った。次に、単離された細胞を、T細胞培地中で培養した。0日目に、DynabeadsヒトT活性化因子CD3/CD28を1:1の比で添加することによってT細胞を活性化し、3日目にレンチウイルス(MOI=10)およびLentiblastと共に1200gで45分間遠心分離することによって形質導入した。形質導入を1回実施した後、24時間後に培地を交換し、その後細胞を、新しいT細胞培地を補充した24ウェルG-Rexプレートに移した。形質導入効率を、Dylight650コンジュゲート抗261タグ抗体を使用して7日目にフローサイトメトリーによって評定した。再刺激に関して、7日目にImmunoCultヒトCD3/CD28/CD2 T細胞活性化因子20μlを、100万個のT細胞と共にT細胞培地2ml中に添加し、9日目にT細胞培地5mlを添加した。12日目に、沈降した細胞の上方のおよそ5ml培地を除去し、新しいT細胞培地5mlを添加した。14日目に、7日目と同じ手順によって追加の再刺激を行ってもよい。本出願人の実験では、dynabeads CD3/CD28刺激因子は主にCD4+ T細胞の増大を促進したが、ImmunoCultヒトCD3/CD28/CD2 T細胞活性化因子は、バランスのとれたCD4+およびCD8+ T細胞の増大をもたらしたことから、再刺激のためにImmunoCultを使用した。全ての細胞計数に関して、Countess自動細胞カウンター(Invitrogen)を使用した。モックまたはCAR T細胞におけるPD-1およびLAG-3発現を、再刺激の7および14日前に評価した。50万個の細胞を、Dylight650コンジュゲート抗261タグ抗体およびPEコンジュゲート抗ヒトPD-1または抗LAG-3と共にインキュベートした。次に標識細胞をフロー分析に供した。「モックT細胞」は、3日目の形質導入ステップでウイルスを添加しなかったことを除き、上記の手順を通して実行されたT細胞を指す。

細胞傷害アッセイ

【0330】

発光に基づく細胞傷害アッセイ：7日目で再刺激していない9日目からのCAR T細胞を、モックT細胞の添加によってCAR T細胞が50%陽性となるように調整した。これらの調整された調製物を、サイトカインを添加せずに平底96ウェルプレートにおいて10万個の標的細胞とCAR T細胞の様々な比で24時間インキュベートした。エフェクター細胞を含まない標的細胞からの発光の読み取りデータを対照として使用した。20万個の標的細胞の2倍連続希釈液を使用して検量線を作成し、生存細胞を発光の読み取りデータと相関させた。24時間インキュベーション後の生存標的細胞数を、発光シグナルの読み取りデータを検量線と相関させることによって計算した。細胞溶解のパーセンテージを以下の式によって計算した：

【化3】

$$\text{溶解\%} = \left(\frac{\text{対照におけるRajiの数} - \text{エフェクターにおけるRajiの数}}{\text{対照におけるRajiの数}} \right) \times 100\%$$

【0331】

フローサイトメトリーに基づく細胞傷害アッセイ：2×10⁵個のCAR T細胞を、24ウェルプレートにおいて標的細胞と1:1の比でインキュベートした。混合後1時間お

よび48時間での生存標的細胞のパーセンテージを記録し、これを使用して以下の式によって溶解%を計算した：

【化4】

$$\text{溶解\%} = \left(\frac{\text{1時間での生存標的細胞\%} - \text{48時間での生存標的細胞\%}}{\text{1時間での生存標的細胞\%}} \right) \times 100\%.$$

サイトカイン分泌アッセイ

【0332】

7日目に再刺激していない9日目のモックまたはCAR T細胞を、サイトカイン分泌アッセイのために使用した。2×10⁵個のエフェクター細胞および標的細胞を、96ウェルプレートにおいてサイトカインを添加せずに1：1の比で24時間共培養した。上清を収集し、製造元の使用説明書に従って酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）に供した。

CD3-ζリン酸化アッセイ

【0333】

7日目に再刺激していない9日目のモックまたはCAR T細胞50万個を固定した後、DyLightコンジュゲート抗261タグ抗体2μgによって染色した。標識細胞を、製造元の使用説明書に従って透過処理した。次に、透過処理した細胞を、試料あたりPEコンジュゲート抗ヒトリン酸化CD3ζ抗体5μlによって染色した。試料を洗浄し、フローサイトメトリー分析に供した。

抗原のダウンレギュレーション実験

【0334】

ex vivo実験：7日目に再刺激していない9日目のモックまたはCAR T細胞を、このアッセイのために使用した。腫瘍細胞（4×10⁵個）を、2×10⁵個のCAR T細胞と共に、サイトカインを補充していないT細胞培地2ml中、E：T比1：2で24時間共培養した。細胞を有する培地100μlを収集し、CD22、Lym-1、CD19、およびSytox Greenに関して染色した。Raji-eGFP/Lucでは、CD22を使用する代わりにGFPを使用して、腫瘍細胞を同定した。室温で20分間インキュベーション後、PBS400μlおよび計数ビーズ25μlを各チューブに添加した。次いで、試料をフローサイトメトリー分析に供した。平均蛍光強度をFlowJoソフトウェアによって定量した。

NOD Scid-IL2Rガンマヌル（NSG）マウスにおけるRaji/Luc-eGFP異種移植片研究

【0335】

PBS100μl中100万個のRaji/Luc-eGFP細胞を、側方尾静脈を介してi.v.注射した（0日目とする）。ルシフェラーゼ活性を、6日目に生物発光イメージング（BLI）を介して測定し、腫瘍負荷を評価した。同じ日に500万個のモックTまたはCAR T細胞をPBS100μl中で調製し、インスリンシリンジを使用してi.v.注射した。腫瘍の進行を、表記の日にUSC Molecular Imaging CenterでXenogen IVIS 200を使用することによって、またはUSC Translational Research LaboratoryでIVIS Lumina Series I IIを使用することによってモニタリングした。マウスを、気化したイソフルランによって麻酔し、イメージングの前にD-ルシフェリン（50mg/kg）を、腹腔内注射を介して投与した。一部の実験では、図の説明文に明記したように、第1のBLI測定を7日目に実施した後、様々な量のモックまたはCAR T細胞を8日目に注射した。全ての研究において、9日目（7日目で再刺激していない）のモックまたはCAR T細胞を使用し、後肢麻痺を安楽死のエンドポイントとして使用した。生存データを Kaplan-Meier プロットによって示し、ログランク検定によって分析する。

統計分析

【0336】

GraphPad Prismソフトウェアを使用してグラフをプロットした。データを、SPSSソフトウェア（IBM）を使用して分析した。統計分析法を図の説明文に示す。特に明記していない限り、データは平均値±SDとして表記し、 $p < 0.05$ は有意であると考えられた。

結果

ヒト化Lym-1抗体の選択

【0337】

本出願人は、Lym-1-B-BB3z CAR T細胞が、播種性のRaji腫瘍を有するマウスにおいて完全な寛解を誘導したことを実証した（Zheng L et al, 2017, doi 10.3390/ijms18122773）。これらの有望な結果により、将来の患者の研究のためにCAR T細胞において使用する場合のLym-1 ScFvの潜在的免疫原性を低減するために、抗体のヒト化を実施した。ヒト化は、Oak BioScienceに外注し、12個のヒト化抗体のパネルが本発明者らに提供された（図21A）。それらの抗体のRaji細胞に対する結合能を、フローサイトメトリーによって測定し、各試験濃度で最高の結合を示したhuLym-1-B抗体を、CAR T細胞の開発のために選択した（図21A）。次に、本出願人は、これらの評定を助けるために施設内で提供された配列による一過性の発現を使用してhuLym-1-B抗体を産生した。chLym-1と比較すると、huLym-1-Bは、低減されたMFIおよびおよそ2倍高いED50でRaji細胞に結合する（図21B）。Raji細胞に対するその結合と同様に、huLym-1-Bは、ほとんどのLym-1陽性細胞株においてchLym-1よりわずかに低いMFIを示す（図21C）。chLym-1およびhuLym-1-BはいずれもK562細胞に結合せず、huLym-1-Bが親Lym-1抗体の特異性と類似の特異性を保持することを示した（図21C）。

huLym-1-BB3z CAR T細胞は非常に機能的であるがなおも増大障害を有する【0338】

Lym-1エピトープに対するCARを生成するために、Lym-1またはhuLym-1-Bに由来するScFvを、4-1BBおよびCD3ζシグナル伝達ドメインを有する従来の第2世代CARフレームワークに融合した（図22A）。ヒト胎盤増殖因子に由来する10アミノ酸のエピトープ「AVPPQQWALS」（261タグ）を、ScFvとCD8aヒンジとの間に挿入し、施設内抗体（DyLight650コンジュゲート抗261タグ抗体）を使用することによるCAR検出を可能にした（図22A）。いずれの構築物も、同等の形質導入効率でヒト初代T細胞において発現に成功した（図22C）。本出願人は、次にLym-1陰性K562-eGFP/LucおよびLym-1陽性Raji-eGFP/Luc細胞株におけるLym-1-およびhuLym-1-B-BB3z CAR Tのエピトープ特異的細胞傷害性を評価した。Lym-1-またはhuLym-1-B-BB3z CAR Tを発現するT細胞は、一晚共培養後Rajiを効率的に溶解したが、K562細胞と共培養すると細胞傷害性の増加は観察されず、2つのCAR T細胞のエピトープ特異的細胞傷害性を示している（図22D）。加えて、Lym-1-およびhuLym-1-B-BB3z CAR T細胞はいずれも500万個の用量で、NSGマウスにおける播種性のRaji-eGFP/Luc腫瘍を根絶し、少なくとも60日の無腫瘍生存をもたらした（図13）。しかし、 α -CD2/CD3/CD28刺激に対する応答では、Lym-1-およびhuLym-1-B-BB3z CAR T細胞は増大の障害を示した（図22E）。7~14日目では、モックT細胞はおよそ30倍増加したが、これに対しLym-1-およびhuLym-1-B-BB3z CAR T細胞では平均で4倍未満の増加であった（図22E）。さらに、CD3ζリン酸化の増加が、Lym-1-およびhuLym-1-B-BB3z CAR陽性細胞において観察されたが、同じ調製物における非形質導入T細胞では観察されず、CAR形質導入細胞の活性化が弱いことを示した（図22F、図22G）。これらの結果と一貫して、huLym-1-B-BB3z CAR陽性T細胞はまた、PD-1およびLAG-3の発現の増加も明らかにした（図22H、図22I）。CAR T細胞における増強されたCD3ζリン

10

20

30

40

50

酸化および阻害性受容体発現は、増殖障害が基礎レベル活性化の増加から生じ、すなわちトニックシグナル伝達から生じることを示唆した。h u L y m-1-B-B B 3 z C A R T細胞は、i n v i t r oおよびi n v i v oで強い活性を示したが、最適な治療用量を生成するためには広範囲のe x v i v o増大が必要であることから、限定的な増殖は、臨床応用のためのh u L y m-1-B-B B 3 z C A R T細胞の産生に疑念を抱かせるであろう。

h u L y m-1-B-B B 3 z C A R T細胞のe x v i v oでの増大障害は抗原依存的である

【0339】

本出願人の研究所において生成されたF M C 6 3 S c F vからなるC D 1 9-B B 3 z C A R T細胞は、h u L y m-1-B-B B 3 zと同じC A Rフレームワークを有する構築物であるが、h u L y m-1-B-B B 3 z C A R T細胞調製物について認められた増大の障害を示さなかった(Zheng L et al, 2017, doi 10.3390/ijms18122773)。この差は、原因がh u L y m-1-B S c F vに関係することを示唆した。L y m-1は、H L A-D Rのいくつかのサブタイプにおいてコンフォメーションエピトープを認識するが(Rose LM et al, 1999, 789-97)、ヒトT細胞上でのL y m-1の結合は報告されていない。本出願人は、活性化T細胞上でのこれまで報告されていないまばらなL y m-1エピトープ発現がリガンド依存的トニックシグナル伝達を誘導するために十分であること、またはそのいずれかがh u L y m-1-B-B B 3 z C A R T細胞の増大の障害を引き起こし得るC A R媒介仲間殺しをもたらすと仮定した。この仮説を試験するために、活性化T細胞に対するL y m-1およびh u L y m-1-B結合を注意深く評価したところ、小さいがしかし実際の量の結合が検出された(図23C)。この仮説をさらに試験するために、2つのC A R構築物を生成した。1つの構築物では、2点突然変異を可変重鎖のC D R 3領域に導入し、h u L y m-1-Bの結合能を破壊し、h u L y m-1-B m u t-B B 3 z C A Rを構築した(図23A)。C D R 3において2つの突然変異を有するh u L y m-1-Bの抗体版(h u L y m-1-B m u t)も同様に産生した。h u L y m-1-B m u tは、R a j i細胞に対して測定した場合に、h u L y m-1-Bよりおよそ25倍高いE D 5 0を有し(E D 5 0、 1.4×10^{-7} 対 5.9×10^{-9} 、図23B)、アイソタイプと比較してT細胞に対する結合の増強を示さなかった(図23C)。C D 3ζリン酸化は、h u L y m-1-B m u t-B B 3 z C A R T細胞の約5%において見出され、P D-1およびL A G-3は、7日目に一過性にアップレギュレートされ(図23E~23G)、h u L y m-1-B m u t-B B 3 z C A R T細胞調製物は増大の障害を示さず、エピトープ認識が障害のために必要であることを示唆した(図23G)。

【0340】

C A Rシグナル伝達が増大の障害にとって必要であるか否かを決定するために、第2の構築物、すなわちC A R-C D 3ζドメインの3つのI T A Mにおける6つ全てのチロシンがフェニルアラニンに変換されたh u L y m-1-B-B B 3 z Y-Fを生成した(図23A)。h u L y m-1-B-B B 3 z Y-F C A R T細胞は、C D 3ζリン酸化の増加もP D-1およびL A G-3アップレギュレーションも示さず、モックT細胞と同程度に効率的に増大され、C A R-C D 3ζを伴うシグナル伝達が障害にとって必要であることを示した(図23G)。

【0341】

本出願人は、次に、仲間殺しがh u L y m-1-B-B B 3 z C A R T細胞の増大の減損の実質的な原因であるか否かを調べた。本出願人は、h u L y m-1-B-B B 3 z C A R T細胞が、同じ調製物中のC A R陰性集団(約10%)より劇的に増強された自然発生アポトーシス(約56%)を示すことを見出した(図14A)。加えて、本出願人は、h u L y m-1-B-B B 3 z C A R T細胞と一晚共培養した場合に、C D 1 9-B B 3 z C A R T細胞のアポトーシスの顕著な増加を観察しなかった(図14B)。併せて考慮すると、これらの結果は、仲間殺しの代わりに、h u L y m-1-B-B B

3 z CAR-T細胞の *ex vivo* 増殖障害の主な原因が、リガンド依存的 CAR トニックシグナル伝達であるという仮説を支持する。

BB3z を DAP に置き換えると huLym-1-B CAR T細胞の効率的な *ex vivo* 増大を可能にする

【0342】

次に本出願人は、DAPシグナル伝達ドメインを使用して、huLym-1-B-DAP CARを構築した(図24A、図24B)。huLym-1-B-DAP CARは、ヒト初代T細胞においてhuLym-1-BB3z CARと均等な形質導入効率で発現に成功した(図24D)。重要なことに、huLym-1-B-DAP CAR T細胞の *ex vivo* 増大は障害されなかった(図24C)。加えて、huLym-1-B-BB3z CAR T細胞と比較すると、huLym-1-B-DAP CAR T細胞は、培養において自然発生のアネキシンV染色の増強を示さず(図14A)、Raji細胞と共に培養するとより低いAICDを示した(図15)。本出願人は、huLym-1-B-BB3z CARの約30%という平均値と比較して、huLym-1-B-DAP CAR T細胞の約10%がCD3ζリン酸化を示すことを見出した(図24D、図24E)。huLym-1-B-DAP CAR T細胞におけるCD3ζリン酸化の基礎レベルと一貫して、14日目ではPD-1およびLAG-3発現もまたモックT細胞より高かったが、huLym-1-B-BB3z CAR T細胞より有意に低かった(図24F、図24G)。併せて考慮すると、これらのデータは、huLym-1-B-DAP CAR T細胞が、トニックシグナル伝達および正常な増大を減損させたことを実証した。huLym-1-B-DAP CAR T細胞は *in vitro* および *in vivo* の両方で高度に機能的である

【0343】

huLym-1-B-DAP CAR T細胞のエフェクター機能を *in vitro* で評価するために、Lym-1エピトープ陰性(K562)および陽性(Raji)細胞株に应答した細胞傷害性およびサイトカイン放出を評価した。huLym-1-B-DAP CAR T細胞は、エフェクターの標的に対する比の増加に比例してRaji細胞を溶解し、2:1の比で一晩共培養後では約80%の殺滅に達した(図25A)。K562細胞を標的細胞として使用した場合、細胞傷害性の増強は明白ではなかった(図25A)。これらの知見と一貫して、huLym-1-B-DAP CAR T細胞はまた、Raji細胞と共培養した場合に複数のサイトカインを分泌したが、K562細胞と共培養した場合では分泌しなかった(図25B)。加えて、本出願人は、多様なLym-1エピトープ発現を有するヒトリンパ腫および白血病B細胞株のパネルに対してhuLym-1-B-DAP CAR T細胞の機能を評価した。非常に多様なサイトカイン放出にもかかわらず、huLym-1-B-DAP CAR T細胞は、均等な細胞傷害性を示した(図16)。これらのデータは、huLym-1-B-DAP CAR T細胞が親Lym-1抗体のこの特異性を保持したことを実証した。

【0344】

本出願人は次に、NSGマウスにおける播種性Raji腫瘍に対するhuLym-1-B-DAP CAR T細胞の *in vivo* 抗腫瘍有効性を調べた。DAPシグナル伝達ドメインによって付与される機能の改善をさらに明らかにするために、500万個ではなくて100万個のみのCAR T細胞を注射し、腫瘍負荷を増加させるために、チャレンジ処置をRaji細胞注射後6日目ではなくて8日目に行った。この改変プロトコルを使用して、100万個のhuLym-1-B-BB3z CAR T細胞は、Raji腫瘍を削除することができず、全てのマウスは51日目までに腫瘍進行のために死亡した(図25F、図25E、図25F)。これに対し、100万個のhuLym-1-B-DAP CAR T細胞による処置は、持続的な腫瘍の制御および有意に良好な生存をもたらした(図25F)。

Lym-1エピトープは、huLym-1-B-DAP CARとの係合後急速にダウンレギュレートしない

10

20

30

40

50

【0345】

CD19を標的とするCAR T細胞（CD19CAR）によるB細胞悪性腫瘍の処置では再発がしばしば観察され、このダウンレギュレーションは、CD19CAR治療に対する抵抗性を可能にする重要な機構を表す（Majzner RG et al, 2018, 1219-26 doi 10.1158/2159-8290.cd-18-0442）。抗原逃避を補うための1つの戦略は、現在臨床で調査されているCD22の標的化などの組合せ標的化を使用することである（Fry TJ et al, 2018, 20-8 doi 10.1038/nm.4441）。あるいは、ダウンレギュレートする傾向が低い抗原に対するCAR T細胞は、抗原逃避を低減させ、治療有効性を改善することができる。huLym-1-B-DAP CAR T細胞がLym-1エピトープのダウンレギュレーションを促進するか否かを決定するために、本出願人は、Raji細胞をモック、huLym-1-B-DAP CAR、またはCD19-BB3z CAR T細胞と共培養した。24時間以内に、huLym-1-B-DAP CARおよびCD19-BB3z CAR T細胞はいずれも、Raji細胞の成長を阻害した（図26C、図26D）。しかし、RajiをCD19-BB3z CAR T細胞と共培養すると顕著なCD19抗原のダウンレギュレーションが起こったが、huLym-1-B-DAP CAR T細胞と共培養した場合にはCD19のダウンレギュレーションもLym-1エピトープのダウンレギュレーションも明白ではなかった（図26A、図26B）。類似の結果は、ヒトBリンパ腫細胞株のパネルについても得られた（図17）。その差がBB3zドメインではなくてDAPシグナル伝達ドメインの使用によるものであるか否かを決定するために、CD19-DAP CAR T細胞を生成し、Rajiと共培養した。Raji細胞におけるCD19抗原のダウンレギュレーションはなおも起こった（図18）。これに対し、それらをhuLym-1-B-BB3zまたはhuLym-1-B-DAP CAR T細胞のいずれかと共培養した場合には、Raji細胞において有意なLym-1エピトープのダウンレギュレーションは観察されなかった（図18）。これらの結果は、標的のダウンレギュレーションが、CAR構築物のシグナル伝達ドメインではなくて抗原の特性に起因することを示している。

【0346】

エピトープのダウンレギュレーションをin vivoで評価するために、CD19およびLym-1エピトープ発現を、CAR T細胞治療を受けたマウスの骨髄から得たRaji細胞において測定した。ex vivoで認められるように、Raji細胞を有するNSGマウスをCD19-BB3z CARによって処置した場合、Raji細胞における有意なCD19抗原のダウンレギュレーションもまた認められた（図26B）。重要なことに、Lym-1エピトープもCD19抗原も、huLym-1-B-DAP CAR T細胞処置の間にダウンレギュレートされなかった（図26B）。播種性のRajiを有するNSGマウスにおけるhuLym-1-B-DAP、CD19-BB3z、およびCD19-DAP CAR T細胞のin vivoでの抗腫瘍有効性をまた、0日目に10⁶個のRaji細胞を静脈内に注射した後、8日目にモックまたはCAR T細胞の様々な用量を静脈内注射するプロトコールにおいて特徴付けた。1回用量の200万個のhuLym-1-B-DAP CAR T細胞処置により、少なくとも90日間の無腫瘍生存期間がもたらされた（図19B、図19C）。これに対し、CD19-BB3zまたはCD19-DAP CAR T細胞によって処置したNSGマウスのほとんどにおいて高い腫瘍負荷が存在し、200万個の細胞用量の場合、全てのマウスが79日目までに死亡した（図19B、図19C）。その上、この実験モデルでは、CD19 CAR T細胞の用量を500万個に増加させても、無腫瘍生存を達成することはできなかった（図19B、図19C）。要約すると、Lym-1エピトープは、huLym-1-B-DAP CAR T細胞処置の圧力下でダウンレギュレートしないことが見出され、この特色は、CD19-CAR T細胞と比較してhuLym-1-DAP CAR T細胞の優れたin vivo有効性に寄与している可能性がある。

考察

【0347】

CD19 CAR T細胞の臨床試験は、再発したおよび抵抗性のB細胞悪性腫瘍を処置するためにこの細胞治療モダリティの使用が有望であることを実証した。その高い初回完全奏功率にもかかわらず、CD19陰性腫瘍またはCD19-low腫瘍を有する処置した実質的な一部の患者が再発し (Majzner RG et al., (2018), 1219-26 doi 10.1158/2159-8290.cd-18-0442)、追加の有効な標的を同定する必要性を示している。本明細書において、本出願人は、ほとんどのヒトB細胞リンパ腫および白血病において高度に発現されているLym-1エピトープに対する操作されたヒトCAR T細胞の設計および開発を記載している (DeNardo GL et al., (1998), 239-54 doi 10.1089/cbr.1998.13.239; DeNardo GL et al., (1999), 1-11 doi 10.1089/hyb.1999.18.1)。従来の4-1BB3zシグナル伝達ドメインをDAPに交換することによって、本出願人は、T細胞上のhuLym-1-B-CARおよびLym-1エピトープの持続的相互作用 (トニックシグナル伝達) によって誘導されるhuLym-1-B-CAR T細胞のex vivoでの増殖障害を回避することができた。その上、huLym-1-B-DAP CAR T細胞は、in vitroでの細胞傷害性の増加、サイトカイン放出、およびCAR T細胞の低減された用量であっても強力なin vivoでの腫瘍制御によって証明されるように、エピトープ駆動性のエフェクター機能を示した。さらに、B細胞株上のLym-1エピトープもCD19抗原も、huLym-1-B-DAP CAR T細胞の存在下でダウンレギュレートされなかった。これらの知見は、huLym-1-B-DAP CAR T細胞が、臨床で探索すべき有望な細胞治療産物であるように思われることを示している。

10

20

30

40

50

【0348】

これらの研究の間に、本出願人は、Lym-1エピトープを標的とするhLym-1-B-BB3z CAR T細胞の増大の障害を観察したが、そのような限定的な増大は、結合能に障害を有するhuLym-1-B-BB3z CAR T細胞 (huLym-1-Bmut-BB3z) でもCD3ζ活性が除去されたhuLym-1-B-BB3z CAR T細胞 (huLym-1-B-BB3z Y-F) でも見出されなかった。これらのデータは、限定的な増大がhuLym-1-B-BB3z CAR構築物におけるCD3ζITAMシグナル伝達部分のリガンド依存的活性化によって媒介されたことを示唆した。この知見は、CD28共刺激ドメインを有する第2世代CARが、GD2 (Long AH et al., (2015), 581-90 doi 10.1038/nm.3838) およびErbb2 (Zhao Y et al., (2009), 5563-74 doi 10.4049/jimmunol.0900447) に向け直され、限定的な増大、活性化誘導細胞死 (AICD)、進行性の消耗および不良なin vivoでの有効性は、非拘束のCAR-CD3ζ活性化が原因であるとした過去の報告と一貫する。いずれの場合においても、CD28共刺激ドメインを4-1BBからのシグナル伝達ドメインに置き換えると、十分には理解されていない機序を通して慢性的なCAR-CD3ζシグナル伝達によって誘導される有害な作用を軽減した。しかし、本出願者の実験では、4-1BB共刺激ドメインはなおも、huLym-1-B-BB3z CAR T細胞のin vitroでの増大が不良な調製物をもたらした。

【0349】

ITAMの定性的に異なる機能は、Combadiereら (Combadiere B et al., (1996), 2109-17) によって初めて考証され、彼らはCD3ζにおける第1および第3のITAMのリン酸化が、T細胞において第2のITAMのリン酸化より大きいアポトーシスを刺激したことを報告した。この知見と一貫して、マウスB細胞リンパ腫モデルにおいて、Kochenderferらは、突然変異した第1および第3のCAR-CD3ζITAMを有する抗マウスCD19 CAR T細胞が、アポトーシスに対して抵抗性であり、3つの機能的ITAMを有するCD19CARより良好な抗リンパ腫有効性を媒介することができることを実証した (Kochenderfer JN et al., (2010), 3875-86 doi 10.1182/blood-2010-01-265041)。Feuchtら (Feucht J et al., (2018), doi 10.1038/s41591-018-0290-5) による最近の研究は、CD19CARのCD3ζ部分における第2および第3のITAMの機能を除去すること

が、優先的なセントラルメモリーの分化をもたらし、T細胞消耗を減少させ、*in vivo*での持続を増加させたことを見出した。これらのデータは、各々のITAMが定性的に異なり、CARシグナル伝達ドメインにおけるITAMの選択が、CAR T細胞の運命を制御するアプローチであることを示唆している。

【0350】

他の研究者ら (Long AH et al., (2015), 581-90 doi 10.1038/nm.3838 ; Zhao Y et al., (2009), 5563-74 doi 10.4049/jimmunol.0900447.) からの証拠および本報告は、慢性的に最適下のCAR-CD3ζ ITAM活性化が、CAR T細胞の異常な表現型の原因であるという仮説を支持した。したがって本出願人は、T細胞活性化能を保持しながらCAR-CD3ζ部分を置換するために他のITAM含有モチーフを使用することによって、これらの有害な効果を軽減することを求めた。本出願人は、DAP12が異なる強度の刺激に応答して別個のシグナル出力を提供し得るITIMおよびITAMモチーフの両方を細胞内ドメインに有することから、DAP12を選択した (Peng Q et al., (2010), 38 doi 10.1126/scisignal.2000500)。DAP12は、細胞外領域に認識ドメインを有しない。KIR2DS2 (Wang E et al., (2015), 815-26 doi 10.1158/2326-6066.cir-15-0054)、TREM1 (Chen B et al., (2019), 1043-55 doi 10.2217/imt-2019-0017)、およびNKp44 (Campbell KS et al., (2004), 899-906) などのその関連する受容体は、標的認識および細胞溶解の向け直しの原因である。Tengら (Teng MW et al., (2005), 38235-41 doi 10.1074/jbc.M505331200) およびWangら (Wang E et al., (2015), 815-26 doi 10.1158/2326-6066.cir-15-0054) は、マウスまたはヒトT細胞のいずれかにおけるDAP12とその関連するscFv改変受容体との異所性の同時発現が、腫瘍の根絶を抗原特異的に媒介したことを実証し、DAP12の活性化がT細胞の細胞傷害性を駆動するために十分であることを示した。同じ概念はまた、DAP12の共受容体としてscFv改変TREM1を使用した最近の論文によっても実証された (Chen B et al., (2019), 1043-55 doi 10.2217/imt-2019-0017)。本出願人のCAR構築物の設計では、多重鎖フォーマットを使用する代わりに、本出願人は、CD3ζシグナル伝達ドメインをDAP12と直接置換し、DAP10を共刺激として使用した。得られたhuLym-1-B-DAP CARは、huLym-1-B-BB3zにおいて認められた*in vitro*増大問題に取り組み、最も重要なことにhuLym-1-B-DAP CARは、たとえこの2つが*in vitro*で均等な細胞傷害性を示したとしても、huLym-1-B-BB3z CARより有意に良好な*in vivo*有効性を媒介した (図25)。これらの結果は、*in vitro*での細胞傷害性が*in vivo*での有効性を反映するために不十分であるという知見をさらに支持し (Long AH et al., (2015), 581-90 doi 10.1038/nm.3838)、シグナル伝達ドメインがCAR T細胞の*in vivo*での機能に対する影響を強調する。

【0351】

本出願人の結果は、Lym-1エピトープがCD19とは異なり、CARの係合時に急速にダウンレギュレートしないことを実証する。CAR T細胞トロゴサイトーシスは抗原のダウンレギュレーションにおいて役割を有し得るが (Hamieh M et al., (2019), 112-6 doi 10.1038/s41586-019-1054-1)、本出願人は、huLym-1-DAP CAR T細胞と共培養した場合にヒトBリンパ腫細胞株のパネルにおいて均等なLym-1エピトープダウンレギュレーションを観察せず、迅速なCD19抗原ダウンレギュレーションが他の機構を伴い得ることを示唆した (図26; 図18)。抗CD19抗体との架橋は、受容体媒介エンドサイトーシス (Ingle GS et al., (2008), 46-58 doi 10.1111/j.1365-2141.2007.06883.x) を通してCD19抗原のダウンレギュレーションを誘導することができ、CD19 CARとCD19抗原との間の相互作用が、表面CD19抗原ダウンレギュレーションに寄与し得ることを示している。CD19 CAR T細胞の圧力下での腫瘍細胞におけるCD19のダウンレギュレーションは

可逆的プロセスであるが (Schneider D et al., (2017), 42 doi 10.1186/s40425-017-0246-1)、一過性の抗原ダウンレギュレーションは、CD19CAR T細胞の抗腫瘍有効性を減損せず、腫瘍の免疫逃避を促進する (Hamieh M et al., (2019), 112-6 doi 10.1038/s41586-019-1054-1)。この仮説と一貫して、CD19-BB3zもCD19-DAP CARも、改変された動物プロトコールにおいて最大500万個の用量で無腫瘍生存を誘導することができなかったが、huLym-1-B-DAP CAR T細胞は、急速かつ持続的な腫瘍制御を媒介し、より低用量の細胞200万個で無腫瘍生存をもたらした (図19B、図19C)。興味深いことに、CD19-DAP CARによる処置は、細胞100万個の用量レベルでCD19-BB3zより有意に良好な生存を誘導したが (図19D)、いずれのCARも、より高い細胞用量 (200万個および500万個) では均等な有効性を示した (図19B、図19C)。注目すべきは、CAR T細胞の用量にかかわらず、CD19-DAP CARでは41日目より前に後肢麻痺は観察されなかった (図19)。これに対し、CD19-BB3z CAR処置マウスでは、後肢麻痺のより早期の発症 (20~30日目) が繰り返し認められた (図19)。基礎となる機序およびこの差の有意性はなおも調査中である。

10

【0352】

要約すると、本出願人の研究は、huLym-1-B-DAP CAR T細胞がLym-1陽性B細胞リンパ腫を処置するために有望であることを示している。DAPシグナル伝達ドメインが、均等なまたはより高い抗腫瘍有効性を保持しながらCD3ζに基づくCARにおけるリガンド依存的シグナル伝達によって誘導される増殖障害を回避することができるという知見は、CAR設計に関する刺激ドメイン選択の重要性を強調し、T細胞におけるトニックシグナル伝達によって誘導される有害な作用に取り組むための新規CAR構造フォーマットを同定する。さらに、DAPシグナル伝達ドメインは、トニックシグナル伝達が弱いという証拠がなくとも他のCAR T細胞調製物の機能を改善し得る。最後に、本出願人の報告は、CARが係合しても急速にダウンレギュレートしないエピトープを標的化することがまた、持続的なCAR T細胞有効性にも寄与し得ることを示唆している。

20

実施形態

【0353】

以下の実施形態は、本開示の様々な態様を具体的に説明する。

30

【0354】

- a. 配列番号2もしくは6のいずれか1つのアミノ酸配列またはその各々の均等物を含む重鎖 (HC) 免疫グロブリン可変ドメイン配列; および/あるいは
 - b. 配列番号4もしくは8のいずれか1つのアミノ酸配列またはその各々の均等物を含む軽鎖 (LC) 免疫グロブリン可変ドメイン配列
- を含む抗体。

【0355】

重鎖 (HC) 免疫グロブリン可変ドメイン配列が配列番号2のアミノ酸配列を含み、軽鎖 (LC) 免疫グロブリン可変ドメイン配列が配列番号4のアミノ酸配列またはその各々の均等物を含む、本明細書に記載の抗体。

40

【0356】

重鎖 (HC) 免疫グロブリン可変ドメイン配列が配列番号2のアミノ酸配列を含み、軽鎖 (LC) 免疫グロブリン可変ドメイン配列が配列番号8のアミノ酸配列またはその各々の均等物を含む、本明細書に記載の抗体。

【0357】

重鎖 (HC) 免疫グロブリン可変ドメイン配列が配列番号6のアミノ酸配列を含み、軽鎖 (LC) 免疫グロブリン可変ドメイン配列が配列番号4のアミノ酸配列またはその各々の均等物を含む、本明細書に記載の抗体。

【0358】

重鎖 (HC) 免疫グロブリン可変ドメイン配列が配列番号6のアミノ酸配列を含み、軽鎖

50

(L C) 免疫グロブリン可変ドメイン配列が配列番号 8 のアミノ酸配列またはその各々の均等物を含む、本明細書に記載の抗体。

【0359】

a. 配列番号 10 のアミノ酸配列もしくはその均等物を含む重鎖 (H C) 免疫グロブリン可変ドメイン配列；および／または

b. 配列番号 12 のアミノ酸配列もしくはその均等物を含む軽鎖 (L C) 免疫グロブリン可変ドメイン配列

を含む抗体。

【0360】

I g A、I g D、I g E、I g G、または I g M 抗体である、本明細書に記載の抗体。

10

【0361】

定常領域を含む、本明細書に記載の抗体。

【0362】

定常領域が、I g A、I g D、I g E、I g G、または I g M 定常領域を含む、本明細書に記載の抗体。

【0363】

定常領域が、I g G 1 定常領域または I g カッパ定常領域である、本明細書に記載の抗体。

【0364】

本明細書に記載の抗体と結合に関して競合する抗体。

20

【0365】

ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、またはヒト化抗体である、本明細書に記載の抗体。

【0366】

均等物が、ポリペプチドと少なくとも 80 % のアミノ酸同一性を有するポリペプチド、またはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの相補体と高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドを含む、本明細書に記載の抗体。

【0367】

本明細書に記載の抗体の抗原結合性断片。

30

【0368】

F a b、F (a b ') 2、F a b '、s c F v、および F v からなる群から選択される、本明細書に記載の抗原結合性断片。

【0369】

配列番号 2、4、6、8、10、もしくは 12 のいずれか 1 つのアミノ酸配列、またはその各々の均等物を含むポリペプチド。

【0370】

(a) 抗体の抗原結合ドメイン、(b) ヒンジドメイン、(c) 膜貫通ドメイン、および (d) 細胞内シグナル伝達ドメインまたは D A P ドメインを含むキメラ抗原受容体 (C A R)。

40

【0371】

(a) 抗体の抗原結合ドメイン、(b) ヒンジドメイン、(c) 膜貫通ドメイン、ならびに (d) 細胞内 D A P 10 および／または D A P 12 ドメインを含むキメラ抗原受容体 (C A R)。一態様では、(d) は、細胞内 D A P 10 および D A P 12 ドメインを含む。別の態様では、抗体は、抗 L y m 1、抗 L y m 2、または抗 C D 19 抗体から選択される。さらなる態様では、抗原結合ドメインは、抗体の H C 可変ドメインと L C 可変ドメインとの間に位置するリンカーポリペプチド、例えば n が 1 ～ 6 の整数である配列 (G G G G S) n のポリペプチドを含む。C A R は、(a) から (d) の間に位置するリンカーポリペプチドをさらに含み得る。

【0372】

50

抗体の抗原結合ドメインのアミン末端に位置するシグナルポリペプチドをさらに含む、本明細書に記載の C A R。

【0373】

1つまたは複数の共刺激シグナル伝達領域をさらに含む、本明細書に記載の C A R。

【0374】

ヒンジドメインが、C D 8 α または I g G 1 ヒンジドメインを含み、膜貫通ドメインが C D 2 8 もしくは C D 8 α 膜貫通ドメインを含み、1つまたは複数の共刺激シグナル伝達領域が、C D 2 7、C D 2 8、4-I B B (C D 1 3 7)、O X 4 0、C D 3 0、C D 4 0、P D-1、I C O S、リンパ球機能関連抗原-1 (L F A-1)、C D 2、C D 7、C D 2 7、L I G H T、N K G 2 C、および B 7-H 3 から選択され；ならびに細胞内シグナル伝達ドメインが C D 3 ゼータシグナル伝達ドメインを含む、本明細書に記載の C A R。

10

【0375】

H C 可変ドメインと L C 可変ドメインとの間に位置するリンカーポリペプチドをさらに含む、本明細書に記載の C A R。

【0376】

D A P ドメインが D A P 1 0 および／または D A P 1 2 である、本明細書に記載の C A R。

【0377】

H C 可変ドメインと L C 可変ドメインの後に挿入されたペプチド A V P P Q Q W A L S をさらに含む、本明細書に記載の C A R。

20

【0378】

検出可能マーカーまたは精製マーカーをさらに含む、本明細書に記載の抗体または本明細書に記載の C A R。

【0379】

本明細書に開示される配列のいずれか1つ、またはその各々の均等物から選択される配列を含み、必要に応じてプロモーターおよび／またはエンハンサーエレメントに動作可能に連結されている、単離された核酸配列。

【0380】

本明細書に記載の抗体または C A R をコードする単離された核酸配列。

30

【0381】

抗体の抗原結合ドメインの上流に位置するシグナルペプチドポリヌクレオチド配列をさらに含む、本明細書に記載の単離された核酸配列。

【0382】

C A R をコードする単離された核酸が、抗体の抗原結合ドメインまたはエンハンサーの上流に位置するコザックコンセンサスポリヌクレオチド配列をさらに含む、本明細書に記載の単離された核酸配列。

【0383】

C A R をコードする単離された核酸が、抗体の抗原結合ドメインの上流に位置する 2 A 自己切断ペプチド (T 2 A) をコードするポリヌクレオチド配列をさらに含む、本明細書に記載の単離された核酸配列。

40

【0384】

C A R をコードする単離された核酸が、抗生物質耐性をコードするポリヌクレオチド配列をさらに含む、本明細書に記載の単離された核酸配列。

【0385】

C A R をコードする単離された核酸が、C A R の発現および／または活性化を制御するためのスイッチ機構をさらに含む、本明細書に記載の単離された核酸配列。

【0386】

本明細書に記載の単離された核酸配列を含むベクター。

【0387】

50

プラスミドまたはウイルスベクターである、本明細書に記載のベクター。

【0388】

レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、およびアデノ随伴ウイルスベクターからなる群から選択される、本明細書に記載のベクター。

【0389】

CRISPRベクターである、本明細書に記載のベクター。

【0390】

本明細書に記載の抗体、および／またはCAR、および／または単離された核酸、および／またはベクターを含む単離された細胞。一態様では、単離された細胞は免疫細胞、例えばである。

【0391】

担体と、本明細書に記載の抗体、および／または抗原結合性断片、および／またはポリペプチド、および／またはCAR、および／または単離された核酸、および／またはベクター、および／または単離された細胞のうちの1つまたは複数とを含む組成物。

【0392】

本明細書に記載の単離された細胞を培養するステップを含む、本明細書に記載の抗体を産生する方法であって、単離された細胞が必要に応じて哺乳動物細胞である、方法。

【0393】

抗Lym CAR発現細胞を産生する方法であって、本明細書に記載の抗Lymを発現するCARをコードする核酸配列を、免疫細胞集団に導入するステップ、および前記核酸配列による形質導入が成功している免疫細胞の亜集団を選択するステップを含む方法。一態様では、免疫細胞はT細胞またはNK細胞である。一態様では、免疫細胞集団は、内因性の免疫細胞受容体の発現を低減または削除するように改変されており、例えば免疫細胞集団は、RNA干渉またはCRISPRを用いる方法を使用して改変された。

【0394】

それを必要とする対象における腫瘍の成長を阻害する、および／またはがんを処置する、および／またはがんの再発を防止する方法であって、本明細書に開示される方法に従って生成された有効量のCAR発現細胞、本明細書に記載の有効量の抗体、本明細書に記載の有効量の抗原結合性断片、および／または本明細書に記載の有効量のポリペプチドのうちの1つまたは複数に対象に投与するステップを含む方法。これらの方法は、腫瘍の切除または従来の化学療法などの従来の治療と組み合わせることができる。

【0395】

それを必要とする対象における腫瘍の成長を阻害する、および／またはがんを処置する、および／またはがんの再発を防止する方法であって、本明細書に記載の方法に従って生成された、有効量の1つまたは複数のCAR発現細胞、本明細書に記載の有効量の抗体、本明細書に記載の有効量の抗原結合性断片、および／または本明細書に記載の有効量のポリペプチドを、抗がん治療薬、チェックポイント阻害剤、制御性T細胞(Treg)、骨髄由来サプレッサー細胞(MDSC)、フルオロウラシル(5-FU)、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)阻害剤、IL-12処置、CpG(TLR9アゴニスト)、および／またはインターフェロン遺伝子刺激因子(STING)経路アゴニストと組み合わせて対象に投与するステップを含む方法。

【0396】

CAR発現細胞が処置される対象に対して自己または同種であり、必要に応じて、第1選択治療、第2選択治療、第3選択治療、第4選択治療、または第5選択治療である、本明細書に記載の方法。一態様では、腫瘍またはがん細胞は、CD19、Lym1、および／またはLym2を発現または過剰発現する。別の態様では、がんまたは腫瘍は、癌腫、肉腫、または白血病の群から選択される。さらなる態様では、腫瘍またはがんは、B細胞リンパ腫または白血病である。さらなる態様では、腫瘍は固形腫瘍である。別の態様では、固形腫瘍は、黒色腫、大腸癌、乳癌、および／または脳腫瘍である。別の態様では、対象はヒト、動物、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ヒツジ、マウス、ウマ、またはウシである。

10

20

30

40

50

さらなる態様では、方法は、対象に C A R 治療以外の抗腫瘍治療を投与するステップをさらに含む。

【0397】

がん細胞またはがん幹細胞の増殖を阻害する方法であって、細胞に、本明細書に記載される方法に従って生成された、有効量の C A R 発現細胞、本明細書に記載の有効量の抗体、本明細書に記載の有効量の抗原結合性断片、および／または本明細書に記載の有効量のポリペプチドを接触させるステップを含む方法。

【0398】

対象が治療に応答する可能性があるか応答する可能性がないかを決定する方法であって、患者から単離された試料に、本明細書に記載の抗体、本明細書に記載の抗原結合性断片、および／または本明細書に記載のポリペプチドを接触させるステップ、ならびに試料中の抗体－細胞複合体、抗原結合性断片－細胞複合体、および／またはポリペプチド－細胞複合体を検出するステップを含み、複合体が存在すれば、対象が治療に応答する可能性があることを示し、複合体が存在しなければ、対象が治療に応答する可能性がないことを示す、方法。一態様では、抗体、抗原結合性断片、および／またはポリペプチドは、検出可能に標識される。

10

【0399】

本明細書に記載の、有効量の抗体または本明細書に記載の C A R のうちの 1 つまたは複数を、治療に応答する可能性があるとして決定された対象に投与するステップをさらに含む、本明細書に記載の方法。治療は、第 1 選択治療、第 2 選択治療、第 3 選択治療、第 4 選択治療、または第 5 選択治療である。

20

【0400】

対象における治療をモニタリングする方法であって、対象から単離された試料に、本明細書に記載の抗体またはその抗原結合性断片を接触させるステップ、および試料中の抗体－細胞複合体を検出するステップを含む方法。抗体が抗 L y m 抗体である場合、方法は、本明細書に記載されるように生成された、有効量の 1 つまたは複数の抗 L y m C A R 発現細胞、本明細書に記載の有効量の抗体量、本明細書に記載の有効量の抗原結合性断片、および／または本明細書に記載の有効量のポリペプチドを投与する前および／または後に実施される。一態様では、抗体またはその抗原結合性断片は、検出可能に標識される。別の態様では、試料は、喀痰、血清、血漿、リンパ、囊胞液、尿、便、脳脊髄液、腹水、血液、または組織のうちの 1 つまたは複数を含む。

30

【0401】

本明細書に記載の抗体、本明細書に記載の C A R、本明細書に記載の抗原結合性断片、本明細書に記載のポリペプチド、本明細書に記載の単離された核酸、本明細書に記載のベクター、本明細書に記載の単離された細胞、および／または本明細書に記載の組成物のうちの 1 つまたは複数と、使用説明書とを含むキット。使用説明書は、本明細書に記載の方法を実行するための指示を提供する。

均等論

【0402】

特に定義していない限り、本明細書で使用した全ての科学技術用語は、本技術が属する当業者によって一般的に理解される意味と同じ意味を有する。

40

【0403】

本明細書に例示的に記載される本技術は適切には、本明細書に具体的に開示されていない任意のエレメント、または複数のエレメント、制限または複数の制限の非存在下で実践され得る。このように、例えば用語「含む (c o m p r i s i n g)」、「含む (i n c l u d i n g)」、「含有する」等は、拡大的に制限なく読むべきである。加えて、本明細書で用いた用語および表現は、説明の用語として使用されており、制限の用語ではなく、そのような用語および表現の使用において、示されて記載される特色の任意の均等物またはその一部を排除することを意図しないが、様々な改変が特許請求される本技術の範囲内で可能であることが認識される。

50

【0404】

このように、本明細書に提供される材料、方法、および実施例は、好ましい態様の代表であり、例示的であり、本技術の範囲の制限であると意図されないと理解すべきである。

【0405】

本技術を、本明細書において広く一般的に記載してきた。一般的な開示内に入るより狭い種および垂属分類の各々もまた、本技術の一部を形成する。これは、切除された材料が本明細書において具体的に列挙されているか否かにかかわらず、属から任意の主題を除去する条件または負の制限を伴う本技術の一般的説明を含む。

【0406】

加えて、本技術の特色または態様がマーカッシュ群に関して記載されている場合、当業者は、本技術はまた、それによってマーカッシュ群の任意の個々のメンバーまたはメンバーの亜群の観点で記載されていることを認識するであろう。

【0407】

本明細書において言及した全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、各々が個々に参照により本明細書に組み込まれているのと同程度に、その全体が参照により明白に本明細書に組み込まれる。矛盾する場合、定義を含む本明細書が優先する。

【0408】

他の態様は、以下の特許請求の範囲に記載される。

配列表

配列番号 1 h u L y m - 1 - A V H

【化5】

GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGCGGACTTGTGAAGCCTGGCGGATCTCTG
AGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTTAGCCTGACATCTTATGGCGTGCAGTGGG
TCCGACAGGCCCCCTGGAAGGACTGGAATGGCTGGTGGTCATTGGAGCGACG
GCAGCACACCTACAACAGCGCCCTGAAGTCCCGGTTACCATCAGCAGAGACA
ACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCG
CCGTGTACTATTGTGCCAGCCACTACGGCTCTACCCTGGCCTTTGCTTCTTGGGGC
CAGGGCACACTGGTCACAGTTTCTAGC

配列番号 2 h u L y m - 1 - A V H アミノ酸

【化6】

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSLSYGVHWVRQAPGKGLEWLVVIWSDGS
TTYSALKSRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASHYGSTLAFASWGQGT
LTVSS

配列番号 3 h u L y m - 1 - A V L

【化7】

GATATTGTGCTGACACAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCTTCTCCTGGACAGAGAG
TGACCATCAGCTGCAGAGCCAGCGTGAACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTATCA
GCAGAAGCCCGGACAGGCTCCTAAGCTGCTGGTGTACAACGCCAAGATTCTGGC
CGAGGGCGTGCCCGATAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCCTG
ACAATCTCTGGCCTGCAGCCTGAGGACGAGGCCGATTACTATTGCCAGCACCACT
ATGGCACCTTCACCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAG

配列番号 h u L y m - 1 - A V L アミノ酸

【化8】

DIVLTQSPSSLSASPGQRVTISCRASVNIYSYLAWYQQKPGQAPKLLVYNKILAEV
PDRFSGSGSGTDFLTISGLQPEDEADYYCQHGYGTFGGGTKLEIK 4

配列番号 5 h u L y m - 1 - B V H

10

20

30

40

50

【化 9】

GAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCAGATCTCTG
AGACTGACCTGTACCGCCAGCGGCTTTAGCCTGACAAGCTATGGCGTGCACTGG
GTCCGACAGCCTCCAGGCAAAGGACTGGAATGGCTGGCCGTGATTTGGAGCGAC
GGCAGCACCATACAAACAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCAGCAAGGAC
AACAGCAAGAGCCAGGTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACAC
CGCCGTGTACTATTGCGCCAGACACTACGGCTCTACCCTGGCCTTTGCTTCTTGG
GGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTTCTTCT

配列番号 6 h u L y m - 1 - B V H アミノ酸

【化 10】

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLTCTASGFSLSYGVHWVRQPPGKGLEWLAVIWSGGS
TTYNSALKSRLTISKDNSKSQVYLQMNSLRAEDTAVYYCARHYGSTLAFASWGQGT
LVTVSS

10

配列番号 7 h u L y m - 1 - B V L

【化 11】

GACATCCAAATGACCCAAAGCCCTTCCTCCCTAAGTGCGTCTGTCGGGGATCGTG
TGACCATAACGTGTAGAGCTTCCGTTAATATATACAGTTATTTGGCCTGGTATCA
ACAAAAACCAGGTAAGGCCCAAATCTGCTTATTTACAACGCAAAAATACTTGC
TGAGGGCGTTCCATCTAGATTCAGCGGGAGTGGAAGTGGTACAGATTTTACGCTT
ACCATAAGTTCCTGCAACCTGAGGACTTCGCCTCTTACTACTGTCAACATCATT
ATGGGACGTTTACCTTTGGGCAAGGGACTAAGGTGGAGATAAAG

20

配列番号 8 h u L y m - 1 - B V L アミノ酸

【化 12】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASVNIYSYLAWYQQKPGKAPNLLIYNKILAEGV
PSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFASYCQHHYGTFTFGQGTKVEIK

配列番号 9 h u L y m - 2 V H

【化 13】

GAGGTGCAACTGGTCGAATCCGGTGGCGGCCTTATCCAACCCGGTCGGTCTCTTC
GCTTGTCTCTGTTCTGGTAGTGGCTTCACTTTCAGTAACTACTGGATGAACTGGGTC
AGGCAGGCTCCCGGTAAGGGGTTGGAATGGGTAGGTGAAATCAGGTTCAAGTCT
CATAACTATGCTACCCATTTTGCTGAAAGTGTTAAGGGACGTTTTACTATTAGCA
GAGACGACTACAAGTCTGTAGTGTACCTTCAGATGAATTCCTCCGGTCCGAAGA
TACCGCCGTATATTACTGTACTCGGAGAATTGGTAACTCTGACTATGACTGGTGG
TATTTTGACGTCTGGGGCCAAGGCACTATGGTTACCGTCAGCTCA

30

配列番号 10 h u L y m - 2 V H アミノ酸

【化 14】

EVQLVESGGGLIQPGRSLRLSCSGSGFTFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVGEIRFKSH
NYATHFAESVKGRFTISRDDYKSVVYLQMNSLRSEDTAVYYCTRRIGNSDYDWWYF
DVWGQGTMTVSS

40

配列番号 11 h u L y m - 2 V L

50

【化 1 5】

GAGATCGTGCTGACACAGAGCCCTTCTAGCCTGTCTGCCAGCGTGGGCGACAGA
GTGACCATCACCTGTAAAGCCAGCCAGAACGTGGGCAACAACGTGGCCTGGTAT
CAGCAGAAACCTGGCAAGGTGCCCAAGCTGCTGATCTACAGCGCCAGCTACAGA
TACAGCGGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCC
TGACCATATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACGTGGCCACCTACTACTGCCAGCAGTA
CAACACATACCCCTTCACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAG

配列番号 1 2 h u L y m - 2 V L アミノ酸

【化 1 6】

EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVGNVVAWYQQKPGKVPKLLIYSASYRYS
G
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQYNTYPFTFGQGTKVEIK

10

配列番号 1 3 h u L y m - 1 - A C A R

【化 1 7】

ATGGCCCTGCCTGTTACGGCCCTGCTGCTCCCGCTGGCCCTTTTGTTCATGCAGC
CAGGCCGGAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGCGGACTTGTGAAGCCTGGCGG
ATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTTAGCCTGACATCTTATGGCGTG
CACTGGGTCCGACAGGCCCTGGAAAAGGACTGGAATGGCTGGTGGTCATTTGG
AGCGACGGCAGCACCACTACAACAGCGCCCTGAAGTCCCGTTTACCATCAGC
AGAGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGA
GGACACCGCCGTGTACTATTGTGCCAGCCACTACGGCTCTACCCTGGCCTTTGCT
TCTTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTTCTAGCGGAGGCGGAGGATCAGGT
GGCGGTGGATCTGGCGGTGGTGGTTCTGATATTGTGCTGACACAGAGCCCCAGC
AGCCTGTCTGCTTCTCCTGGACAGAGAGTGACCATCAGCTGCAGAGCCAGCGTG
AACATCTACAGCTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGACAGGCTCCTAAG
CTGCTGGTGTACAACGCCAAGATTCTGGCCGAGGGCGTGCCCGATAGATTTTCTG
GCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACAATCTCTGGCCTGCAGCCTGAGGA
CGAGGCCGATTACTATTGCCAGCACCCTATGGCACCTTCACCTTCGGCGGAGGC
ACCAAGCTGGAAATCAAGACCACGACGCCAGCGCCTAGGCCACCAACACCGGCG
CCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCG
GCGGGGGGGCGCAGTGACACGAGGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATC
TGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCT
TTACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATG
AGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCAGAA

20

30

【化 1 8】

GAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGC
CCCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACG
AAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGG
GGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGA
AAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGG
AGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGAC
ACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

40

配列番号 1 4 h u L y m - 1 - A C A R アミノ酸

50

【化 1 9】

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSLSYGVH
WVRQAPGKGLEWLVIWSDGSTTYSALKSRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA
VYYCASHYGSTLAFASWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPSSLSASP
GQRVTISCRASVNIYSYLAWYQQKPGQAPKLLVYNKILAEQVPSDFSGSGSGTDFT
LTISGLQPEDEADYYCQHHYGTFTFGGGTKLEIKTTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPE
ACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQ
PFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLG
RREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRR
KGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

配列番号 1 5 h u L y m - 1 - B C A R

【化 2 0】

ATGGCCCTGCCTGTTACGGCCCTGCTGCTCCCGCTGGCCCTTTTGTTCATGCAGC
CAGGCCGGAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCAG
ATCTCTGAGACTGACCTGTACCGCCAGCGGCTTTAGCCTGACAAGCTATGGCGTG
CACTGGGTCCGACAGCCTCCAGGCAAAGGACTGGAATGGCTGGCCGTGATTG
AGCGACGGCAGCACCATACAACAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCAGC
AAGGACAACAGCAAGAGCCAGGTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGA
GGACACCGCCGTGTACTATTGCGCCAGACACTACGGCTCTACCCTGGCCTTTGCT
TCTTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTTCTTCTGGAGGCGGAGGATCAGGTG
GCGGTGGATCTGGCGGTGGTGGTTCTGACATCCAAATGACCCAAAGCCCTTCCTC
CCTAAGTGCCTGTGTCGGGGATCGTGTGACCATAACGTGTAGAGCTTCCGTAAAT
ATATACAGTTATTTGGCCTGGTATCAACAAAAACCAGGTAAGGCCCCAAATCTGC
TTATTTACAACGCAAAAATACTTGCTGAGGGCGTTCCATCTAGATTCAGCGGGAG
TGGAAGTGGTACAGATTTTACGCTTACCATAAGTTCACTGCAACCTGAGGACTTC
GCCTCTTACTACTGTCAACATCATTATGGGACGTTTACCTTTGGGCAAGGGACTA
AGGTGGAGATAAAGACCACGACGCCAGCGCCTAGGCCACCAACACCGGCGCCCCA
CCATCGCGTTCGACGCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGG
GGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGG
CGCCCTTGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCCCTTAC
TGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGA
CCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAA
GAAGAAGGAGGATGTGAAGTGAAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCC
CGCGTACAAGCAGGGCCAGAACAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAG
AGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGG
AAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAG
ATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGG
GGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACC
TACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

20

30

配列番号 1 6 h u L y m - 1 - B C A R アミノ酸

【化 2 1】

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGSLRLTCTASGFSLSYGVHW
VRQPPGKGLEWLAVIWSGSTTYSALKSRLTISKDNSKSQVYLQMNSLRAEDTAV
YYCARHYGSTLAFASWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV
GDRVTITCRASVNIYSYLAWYQQKPGKAPNLLIYNKILAEQVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFASYCQHHYGTFTFGQGTKEIKTTTPAPRPPTPAPTASQPLSLRPEAC
RPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPF
MRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRR
EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRKG
GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

40

配列番号 1 7 h u L y m - 2 C A R

50

【化 2 2】

ATGGCCCTGCCTGTTACGGCCCTGCTGCTCCCGCTGGCTCTTTTGTTCATGCAGC
 CAGGCCGGAGGTGCAACTGGTCAATCCGGTGGCGGCCTTATCCAACCCGGTGC
 GTCTCTTCGCTTGTCTGTTCTGGTAGTGGCTTCACTTTCAGTAACTACTGGATGA
 ACTGGGTCAGGCAGGCTCCCGGTAAGGGGTTGGAATGGGTAGGTGAAATCAGGT
 TCAAGTCTCATAACTATGCTACCCATTTTGTCTGAAAGTGTTAAGGGACGTTTACT
 ATTAGCAGAGACGACTACAAGTCTGTAGTGTACCTTCAGATGAATTCACCTCCGGT
 CCGAAGATACCGCCGTATATTACTGTACTCGGAGAATTGGTAACTCTGACTATGA
 CTGGTGGTATTTTGACGTCTGGGGCCAAGGCACTATGGTTACCGTCAGCTCAGGA
 GGCGGAGGTTCTGGCGGCGGAGGAAGTGGTGGCGGAGGCTCTGAGATCGTGCTG
 ACACAGAGCCCTTCTAGCCTGTCTGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCT
 GTAAAGCCAGCCAGAACGTGGGCAACAACGTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCTG
 GCAAGGTGCCCAAGCTGCTGATCTACAGCGCCAGCTACAGATACAGCGGCGTGC
 CCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGACCATATCTAG
 CCTGCAGCCTGAGGACGTGGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAACACATACCC
 CTTACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGGCCGTTTCTCCACAGCA
 GTGGGGCCCTGTCTACCACGACGCCAGCGCCTAGGCCACCACCAACACCGGCGCC
 CACCATCGCGTCGCAGCCCCGTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGC
 GGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTG
 GGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTT
 ACTGCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGA
 GACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAG
 AAGAAGAAGGAGGATGTGAAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCC
 CCCGCGTACAAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGA
 AGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGG
 GGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAA
 AGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGA
 GGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACA
 CCTACGACGCCCTTACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC

10

20

配列番号 18 h u L y m - 2 C A R ア ミ ノ 酸

【化 2 3】

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLIQPGRSLRLSCSGSGFTFSNYWMNW
 VRQAPGKGLEWVGEIRFKSHNYATHFAESVKGRFTISRDDYKSVVYLQMNSLRSED
 TAVYYCTRRIGNSDYDWWYFDVWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQS
 PSSLSASVGDRTITCKASQNVGNNAWYQQKPKGVKLLIYSASYRYSVPSRFSG
 SGSGTDFLTITSLQPEDVATYYCQQYNTYPFTFGQGTKVEIKAVPPQWALSTTTTPA
 PRPPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSL
 VITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADA

30

【化 2 4】

PAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD
 KMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

配列番号 19 ヒト I g D 定常領域、UniProt: P01880

40

【化 2 5】

APTKAPDVFPIISGCRHPKDNSPVVLACLITGYHPTSVTVTWYMGTSQPQRTFPEIQ
 RRDSYYMTSSQLSTPLQQWRQGEYKCVVQHTASKSKKEIFRWPESPKAQASSVPTA
 QPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVY
 LLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNG
 SQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAQAPVKLSLNLASS
 DPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPPQGSTTFWAWSVL
 RVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVS YVTDHGPMK

配列番号 20 ヒト I g G 1 定常領域、UniProt: P01857

50

【化 2 6】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号 2 1 ヒト Ig G 2 定常領域、UniProt: P01859

【化 2 7】

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCAPPVA
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

配列番号 2 2 ヒト Ig G 3 定常領域、UniProt: P01860

【化 2 8】

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRC
PEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFR
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

20

配列番号 2 3 ヒト Ig M 定常領域、UniProt: P01871

【化 2 9】

GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITLSWKYKNNSDISSTRGFPSV
LRGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVS
FVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSGVTTDQVQAEAKESG
PTTYKVTSTLTIKESDWLGQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPS
FASIFLTKSTKLTVLTDLTYSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEAS
ICEDDWNSGERFTCTVTHTDLPSPKQTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESA
TITCLVTGFSPADVQVQWQMRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEE
WNTGETYTCVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY

30

配列番号 2 4 ヒト Ig G 4 定常領域、UniProt: P01861

【化 3 0】

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVNHHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAEFLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR

40

【化 3 1】

EEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

配列番号 2 5 ヒト Ig A 1 定常領域、UniProt: P01876

50

【化 3 2】

ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIACL̄VQGFFP̄QEPLSVTWSESGQGVTARNFPPSQD
 ASGDLYTTSSQLTLPATQCLAGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPVPPSTPPTPSPSTPP
 TPSPSCCHPRLSLHRPALEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGVTFTWTPSSGKSAVQGP
 PERDLCGCYSVSSVLPGCAEPWNHKGFTFTCTAAYPESKTPLTATLSKSGNTFRPEVH
 LLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYL TWASRQEPSQG
 TTTFAVTSILRVAAEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLAGKPTHVNVSVV
 MAEVDGTCY

配列番号 26 ヒト Ig A 2 定常領域、Uniprot: P01877

【化 3 3】

ASPTSPKVFPLSLDSTPDGNVVIACL̄VQGFFP̄QEPLSVTWSESGQNVARNFPPSQD
 ASGDLYTTSSQLTLPATQCPDGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPVPPPPPCCHPRLSL
 HRPALDLLLLGSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSGKSAVQGPPEERDLCGCYSVS
 SVLPGCAQPWNHGETFTCTAAHPELK TPLTANITKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNE
 LVTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYL TWASRQEPSQGTTFVAVTSILRV
 AEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRMAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY

10

配列番号 27 ヒト Ig カッパ 定常領域、Uniprot: P01834

【化 3 4】

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
 QDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20

配列番号 28 DAP-CAR フレーム DNA 配列

【化 3 5】

CCACGACGCCAGCGCCTAGGCCTCCAACACCAGCTCCAACAATCGCCAGCCAGC
 CTCTGTCTCTGAGGCCAGAAGCTTGTAGACCTGCTGCTGGCGGAGCCGTGCATAC
 AAGAGGACTGGATTTTCGCCTGCGACATCTACATCTGGGCCCTCTGGCTGGAACA
 TGTGGCGTTCTGCTGCTGAGCCTGGTCATCACCTGTACTGCCTGTGTGCCCCGGC
 CTAGAAGATCCCCTGCTCAGGATGGCAAGGTGTACATCAACATGCCCGGCAGAG
 GCTACTTCCTGGGCAGACTGGTTCCTAGAGGAAGAGGCGCTGCCGAAGCCGCCA
 CAAGAAAGCAGAGAATCACCGAGACAGAGAGCCCCCTACCAAGAGCTGCAGGGC
 CAGAGATCCGACGTGTACAGCGACCTGAATACCCAGCGGCCTTACTACAAGTGA

30

1 ~ 135 : CD8 a ヒンジ

136 ~ 207 : CD8 a 膜貫通

208 ~ 276 : DAP10

277 ~ 435 : DAP12

配列番号 29 DAP-CAR フレーム アミノ酸

【化 3 6】

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGV
 LLLSLVITLYCLCARPRRSPAQDGKVIYNMPGRGYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRI
 TETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYK*

40

1 ~ 45 : CD8 a ヒンジ

46 ~ 69 : CD8 a 膜貫通

70 ~ 92 : DAP10

93 ~ 144 : DAP12

配列番号 30 hu Lym-1-B-DAPCAR DNA 配列

50

【化 3 7】

ATGGCCCTGCCTGTTACGGCCCTGCTGCTCCCGCTGGCCCTTTTGTTCATGCAGC
 CAGGCCGGAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCAG
 ATCTCTGAGACTGACCTGTACCGCCAGCGGCTTTAGCCTGACAAGCTATGGCGTG
 CACTGGGTCCGACAGCCTCCAGGCAAAGGACTGGAATGGCTGGCCGTGATTTGG
 AGCGACGGCAGCACCATACAACAGCGCCCTGAAGTCCCGGCTGACCATCAGC
 AAGGACAACAGCAAGAGCCAGGTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGA
 GGACACCGCCGTGTACTATTGCGCCAGACACTACGGCTCTACCCTGGCCTTTGCT
 TCTTGGGGGCCAGGGCACACTGGTCACCGTTTCTTCTGGAGGCGGAGGATCAGGTG
 GCGGTGGATCTGGCGGTGGTGGTTCTGACATCCAAATGACCCAAAGCCCTTCCTC
 CCTAAGTGCCTCTGTCTGGGGATCGTGTGACCATAACGTGTAGAGCTTCCGTAAAT
 ATATACAGTTATTTGGCCTGGTATCAACAAAAACCAGGTAAGGCCCCAAATCTGC
 TTATTTACAACGCAAAAATACTTGCTGAGGGCGTTCCATCTAGATTCAGCGGGAG
 TGGAAGTGGTACAGATTTTACGCTTACCATAAGTTCACTGCAACCTGAGGACTTC
 GCCTCTTACTACTGTCAACATCATTATGGGACGTTTACCTTTGGGCAAGGGACTA
 AGGTGGAGATAAAGACCACGACGCCAGCGCCTAGGCCTCCAACACCAGCTCCAA
 CAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGCCAGAAGCTTGTAGACCTGCTGCTGG
 CGGAGCCGTGCATACAAGAGGACTGGATTTTCGCTGCGACATCTACATCTGGGC
 CCCTCTGGCTGGAACATGTGGCGTTCTGCTGCTGAGCCTGGTCATCACCTGTAC
 TGCCTGTGTGCCCGGCCTAGAAGATCCCCTGCTCAGGATGGCAAGGTGTACATCA
 ACATGCCCGGCAGAGGCTACTTCCTGGGCAGACTGGTTCCTAGAGGAAGAGGCG
 CTGCCGAAGCCGCCACAAGAAAGCAGAGAATCACCGAGACAGAGAGCCCCTAC
 CAAGAGCTGCAGGGCCAGAGATCCGACGTGTACAGCGACCTGAATACCCAGCGG
 CCTTACTACAAGTGA

10

20

1 ~ 63 : C D 8 a リーダー配列

64 ~ 780 : h u L y m - 1 - B S c F v

781 ~ 915 : C D 8 a ヒンジ

916 ~ 987 : C D 8 a 膜貫通

988 ~ 1056 : D A P 10

1057 ~ 1215 : D A P 12

配列番号 31 h u L y m - 1 - B - D A P C A R アミノ酸

【化 3 8】

30

MALPVTALLLPLALLLHAARPEVQLVESGGGLVQPGRSLRLTCTASGFSLTSYGVHW
 VRQPPGKGLEWLAVIWSDGSTTYNSALKSRLTISKDNSKSQVYLQMNSLRAEDTAV
 YYCARHYGSTLAFASWGQGLVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASV
 GDRVITITCRASVNIYSYLAWYQQKPGKAPNLLIYNKILAEVPSRFSGSGSGTDFTL
 TISSLPEDFASYYCQHHYGTFTFGQGTKVEIKTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC
 RPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLSLVITLYCLCARPRRSPAQDGKV
 YINMPGRGYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITETESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRP
 YYK*

1 ~ 21 : C D 8 a リーダー配列

22 ~ 260 : h u L y m - 1 - B S c F v

261 ~ 305 : C D 8 a ヒンジ

306 ~ 329 : C D 8 a 膜貫通

330 ~ 352 : D A P 10

353 ~ 404 : D A P 12

配列番号 32 抗 C D 19 - 261 タグ - B B 3 z C A R - D N A 配列

40

50

【化 3 9】

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCG
 CCAGGCCGGACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGG
 AGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAA
 TTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAAGTGTAAACTCCTGATCTACCATACATCA
 AGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGAT
 TATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCC
 AACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAGATCA
 CAGGCGGCGGAGGCTCCGGCGGCGGAGGAAGCGGCGGCGGCGGATCTGAGGTG
 AAAGTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTC
 ACATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAGCTGGATTTCGCC
 AGCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCA
 CATACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCAA
 GAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAAGTATGACACAGCCATTTAC
 TACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGCC
 AAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCGTGCCCCCCCAGCAGTGGGCCCTGAG
 CACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCA
 GCCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGCGCAGCGGCGGGGGGCGCAGTGCA
 CACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGCCCGG
 ACTTGTGGGGTCTTCTCCTGTCACTGGTTATCACCTTTACTGCAAACGGGGCA
 GAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAAACTA
 CTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAGGAGGAT
 GTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACAAGCAGG
 GCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATG
 TTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGG
 AAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGA
 GGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGGCAAGGGGACG
 ATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCA
 CATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAA

10

20

1 ~ 6 3 : C D 8 a リーダー

6 4 ~ 7 8 9 : F M C 6 3 S c F v

7 9 0 ~ 8 1 9 : 2 6 1 タグ

8 2 0 ~ 9 5 4 : C D 8 a ヒンジ

9 5 5 ~ 1 0 2 6 : C D 8 a 膜貫通

1 0 2 7 ~ 1 1 5 2 : 4 - 1 B B

1 1 5 3 ~ 1 4 8 8 : C D 3 z

配列番号 3 3 抗 C D 1 9 - 2 6 1 タグ - B B 3 z C A R - A A

30

40

【化 4 0】

MALPVTALLLPLALLLHAARPDIMTQTSSLSASLGDRVITISCRASQDISKYLNWY
 QQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLP
 YTFGGGTKLEITGGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLP
 DYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWIGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQT
 DDTAIYYCAKHYYGGSYAMDYWGQTSVTVSSAVPPQQWALSTTTPAPRPPTPAP
 TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKR
 GRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQ
 NQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYS
 EIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR*

1 ~ 2 1 : C D 8 a リーダー

2 2 ~ 2 6 3 : F M C 6 3 - S c F v

2 6 4 ~ 2 7 3 : 2 6 1 タグ

2 7 4 ~ 3 1 8 : C D 8 a ヒンジ

3 1 9 ~ 3 4 2 : C D 8 a 膜貫通

3 4 3 ~ 3 8 4 : 4 - 1 B B

50

3 8 5 ~ 4 9 5 : C D 3 z

配列番号 3 4 抗 C D 1 9 - 2 6 1 タグ - D A P C A R D N A 配列

【化 4 1】

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCG
CCAGGCCGGACATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGG
AGACAGAGTCAACATCAGTTGCAGGGCAAGTCAGGACATTAGTAAATATTTAAA
TTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAAGTGTAAACTCCTGATCTACCATACATCA
AGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGAT
TATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCC
AACAGGGTAATACGCTTCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAGATCA
CAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGTGGGTGGCGGCGGATCTGAGGTGA
AACTGCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCGTCA
CATGCACTGTCTCAGGGGTCTCATTACCCGACTATGGTGTAAAGCTGGATTGCGCA
GCCTCCACGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTAGTGAAACCAC
ATACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGACCATCATCAAGGACAACCTCCAAG
AGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCATTTACT
ACTGTGCCAAACATTATTACTACGGTGGTAGCTATGCTATGGACTACTGGGGCCA
AGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCGTGCCCCCCCAGCAGTGGGCCCTGAGC
ACCACGACGCCAGCGCCTAGGCCTCCAACACCAGCTCCAACAATCGCCAGCCAG

10

【化 4 2】

CCTCTGTCTCTGAGGCCAGAAGCTTGTAGACCTGCTGCTGGCGGAGCCGTGCATA
CAAGAGGACTGGATTTTCGCTGCGACATCTACATCTGGGCCCCCTCTGGCTGGAAC
ATGTGGCGTTCTGCTGCTGAGCCTGGTCATCACCTGTACTGCCTGTGTGCCCGG
CCTAGAAGATCCCCTGCTCAGGATGGCAAGGTGTACATCAACATGCCCCGGCAGA
GGCTACTTCTGGGCAGACTGGTTCTAGAGGAAGAGGCGCTGCCGAAGCCGCC
ACAAGAAAGCAGAGAATCACCGAGACAGAGAGCCCCCTACCAAGAGCTGCAGGG
CCAGAGATCCGACGTGTACAGCGACCTGAATACCCAGCGGCCTTACTACAAATG
A

20

1 ~ 6 3 : C D 8 a リーダー

6 4 ~ 7 8 9 : F M C 6 3 S c F v

7 9 0 ~ 8 1 9 : 2 6 1 タグ

8 2 0 ~ 9 5 4 : C D 8 a ヒンジ

9 5 5 ~ 1 0 2 6 : C D 8 a 膜貫通

1 0 2 7 ~ 1 0 9 5 : D A P 1 0

1 0 9 6 ~ 1 2 5 4 : D A P 1 2

配列番号 3 5 抗 C D 1 9 - 2 6 1 タグ - D A P C A R A A 配列

【化 4 3】

MALPVTALLLPLALLLHAARPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWY
QQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLP
YTFGGGTTKLEITGGGSGGGGSGGGGSEVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLP
DYGVSWIRQPPRKLEWLGVWGSSETTYNSALKSRLTIHKDNSKSQVFLKMNSLQT
DDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSAVPPQQWALSTTTPAPRPPTPAP
TIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCLC
ARPRRSPAQDGKVYINMPGRGYFLGRLVPRGRGAEEAATRKQRITETESPYQELQG
QRSDVYSDLNTQRPYYK*

40

1 ~ 2 1 : C D 8 a リーダー

2 2 ~ 2 6 3 : F M C 6 3 - S c F v

2 6 4 ~ 2 7 3 : 2 6 1 タグ

2 7 4 ~ 3 1 8 : C D 8 a ヒンジ

3 1 9 ~ 3 4 2 : C D 8 a 膜貫通

3 4 3 ~ 3 6 5 : D A P 1 0

50

366~417: DAP12

【図面】

【図1】

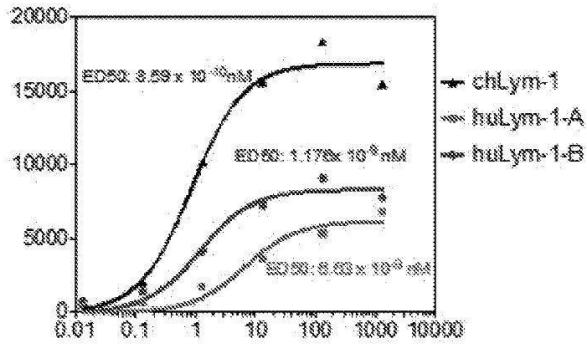


FIG. 1

【図2】

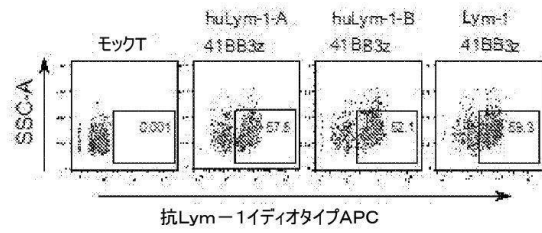
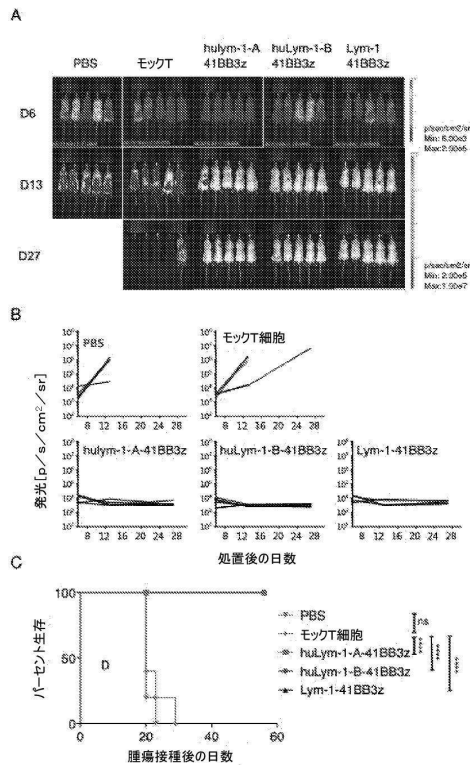


FIG. 2

10

【図3】



FIGS. 3A-3C

【図4】

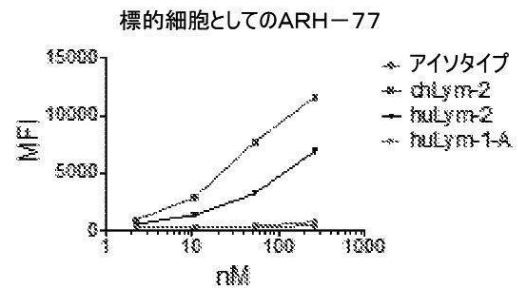


FIG. 4

20

30

40

50

【 図 5 】

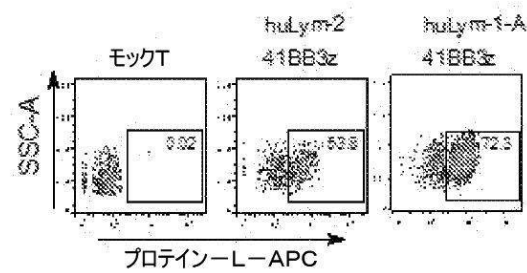


FIG. 5

【 図 6 】

標的細胞としてのARH-77 eGFP/Luc

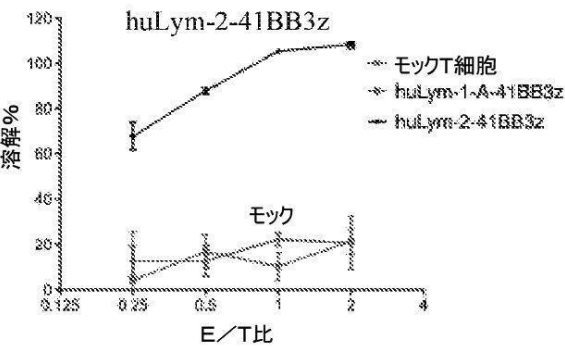


FIG. 6

【 図 7 】

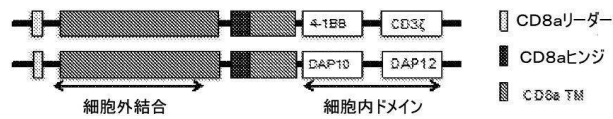


FIG. 7

【 図 8 】

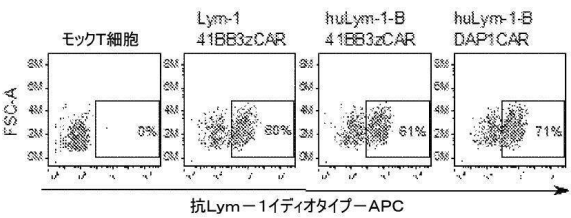


FIG. 8

10

20

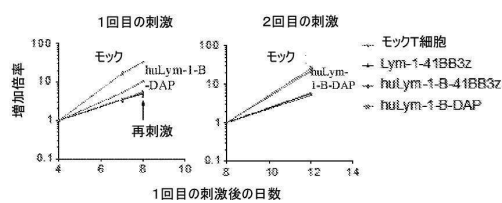
30

40

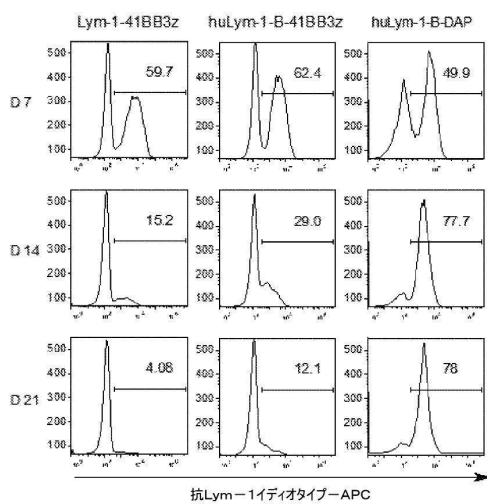
50

【圖 9】

A



iii)



FIGS. 9A – 9B

【図 10】

標的細胞としてのRaji-eGFP/Luc

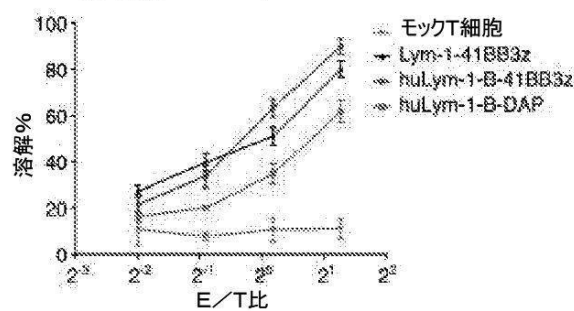


FIG. 10

10

20

【図 1 1】

A

MockT Lym-1-41BB3z huLym-1-β-41BB3z huLym-1-β-DAP

D7
D16
D21
D30
D44

Color scale:
Scale = 100
Unit = 10⁴

Color scale:
Scale = 100
Unit = 10⁴

B

パーセント生存

腫瘍接種後の日数

● MockT
◆ Lym-1-41BB3z
● huLym-1-β-41BB3z
▲ huLym-1-β-DAP

C

MockT Lym-1-41BB3z huLym-1-β-41BB3z huLym-1-β-DAP

発光 (photons/cm²/sec)

腫瘍接種後の日数

D

MockT Lym-1-41BB3z huLym-1-β-41BB3z huLym-1-β-DAP

パーセント体重変化

腫瘍接種後の日数

FIGS. 11A – 11D

【図 12】

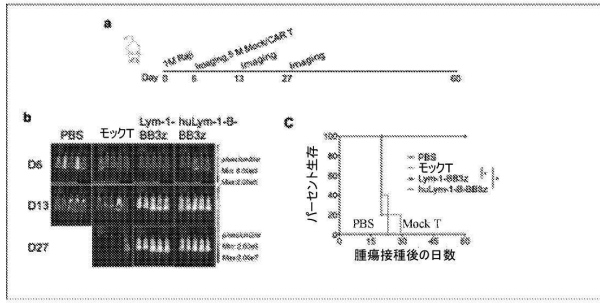
Figure 1 shows fluorescence images of Drosophila wing discs, divided into ventral (腹側) and dorsal (背側) views. The images are arranged in a grid, showing the expression of various markers in the wing discs. The genotypes are: hulym-1 hulym-1, hulym-1 hulym-1, hulym-1 hulym-1, hulym-1 hulym-1, CD19-1, and CD19-1. The images show the expression of various markers in the wing discs. A scale bar is present in the bottom right corner.

FIG. 12

30

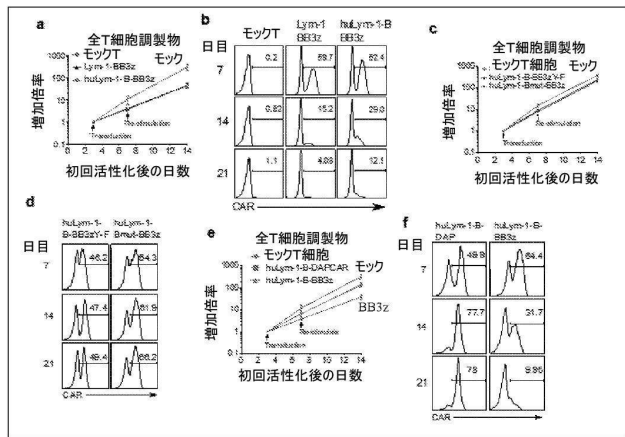
40

【図 1 3】



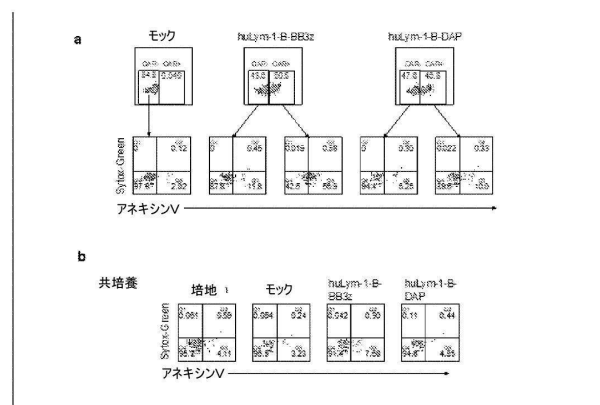
FIGS. 13A – 13C

【図 1 4】



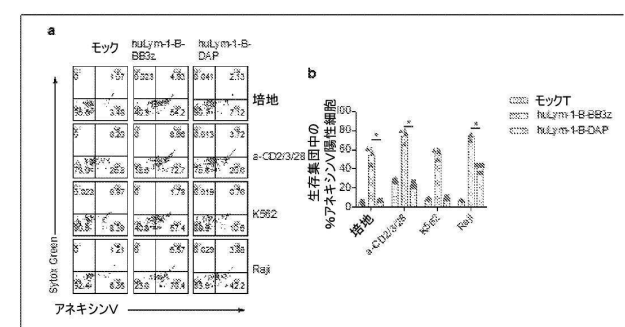
FIGS. 14A – 14F

【図 1 5】



FIGS. 15A – 15B

【図 1 6】



FIGS. 16A – 16B

10

20

30

40

50

【図 17-1】

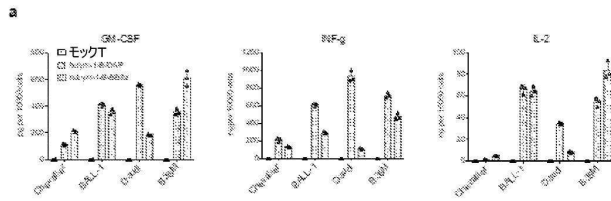
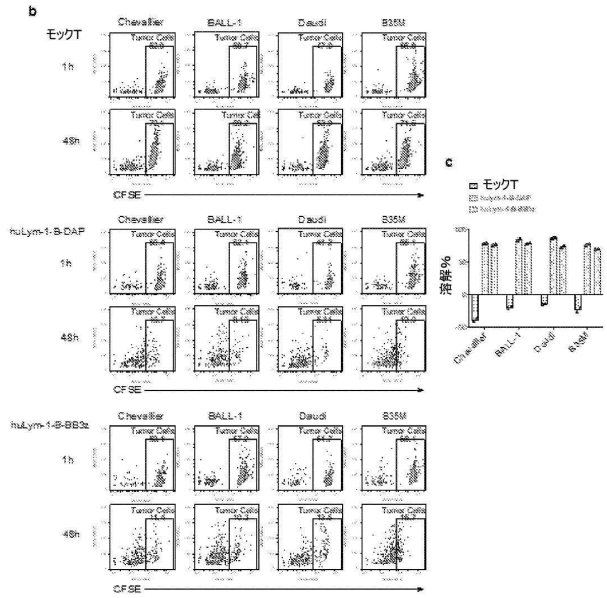


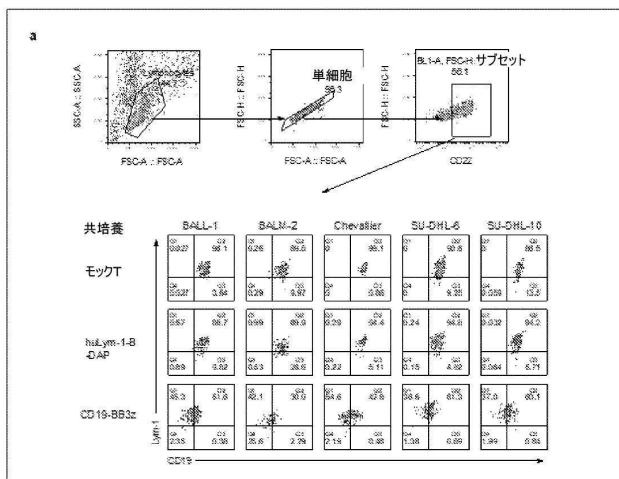
FIG. 17A

【図 17-2】



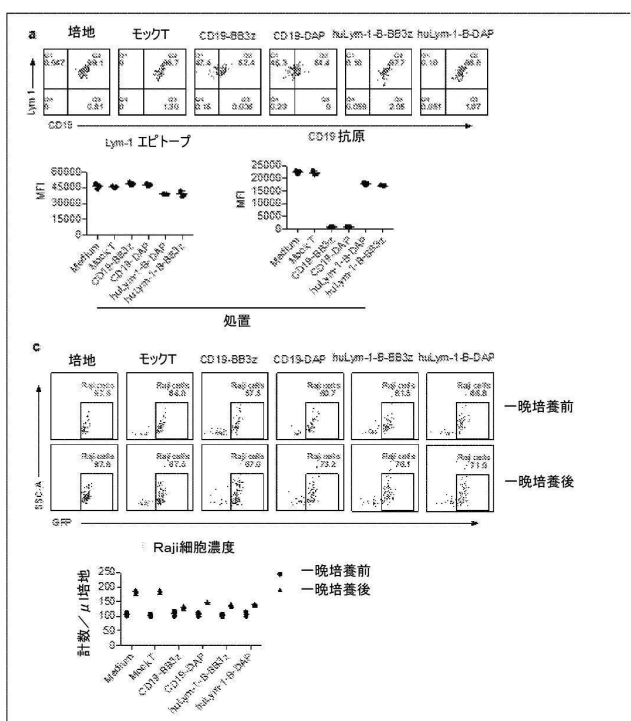
FIGS. 17B-17C

【図 18】



FIGS. 18A-18B

【図 19】



FIGS. 19A-19D

10

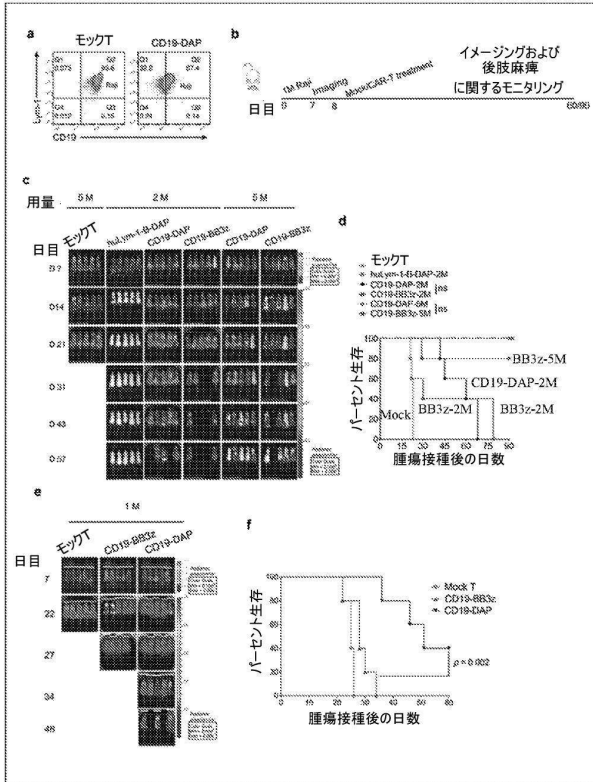
20

30

40

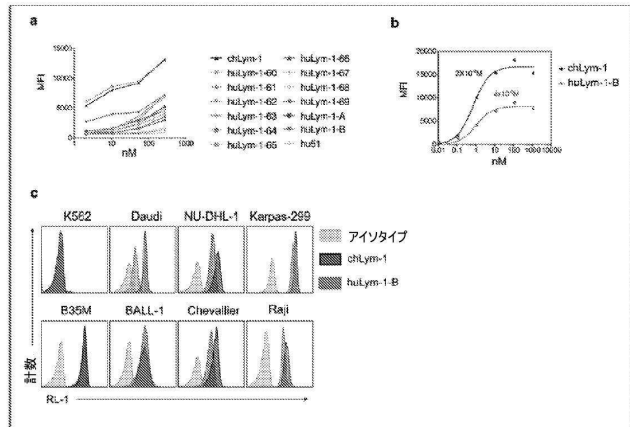
50

【図 20】



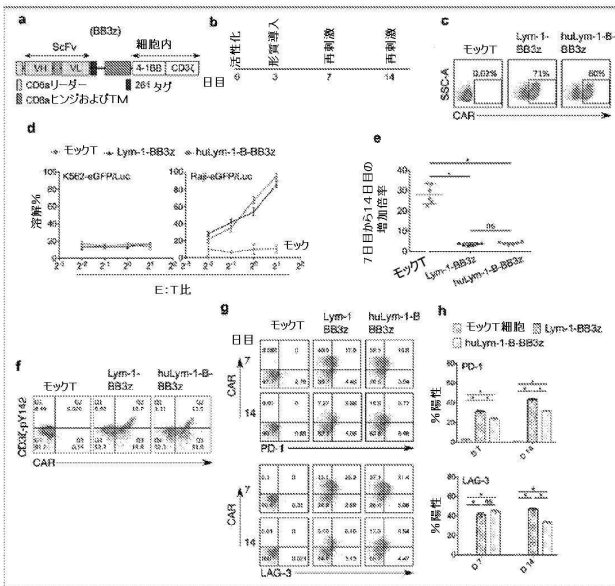
FIGS. 20A – 20F

【図 21】



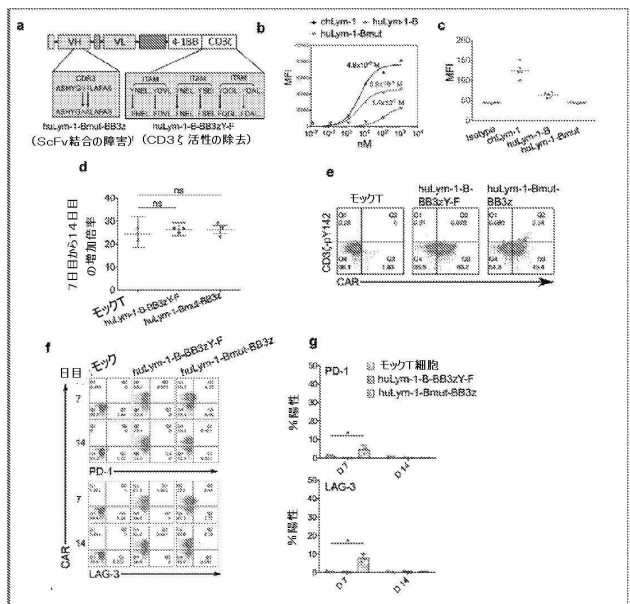
FIGS. 21A – 21C

【図 22】



FIGS. 22A – 22H

【図 23】



FIGS. 23A – 23G

10

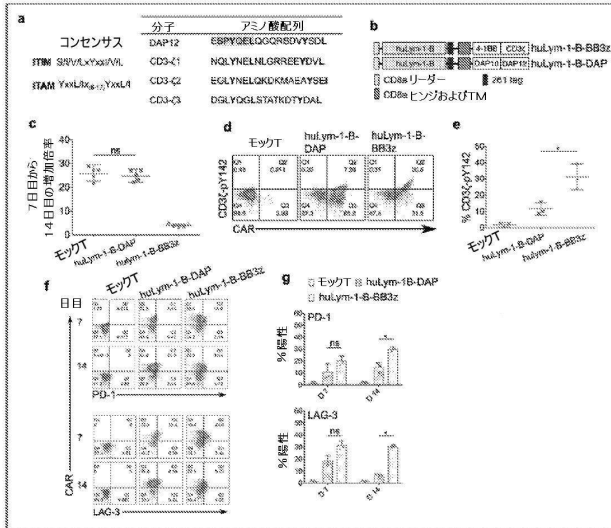
20

30

40

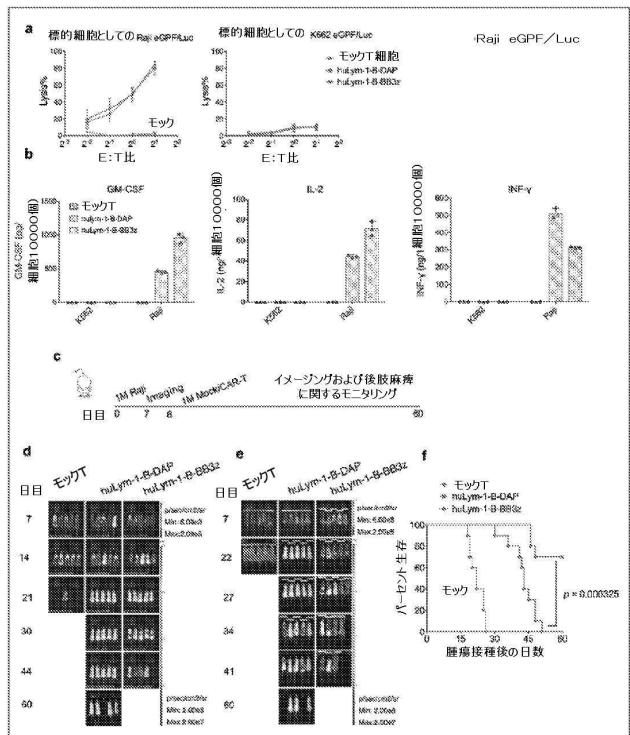
50

【図 2 4】



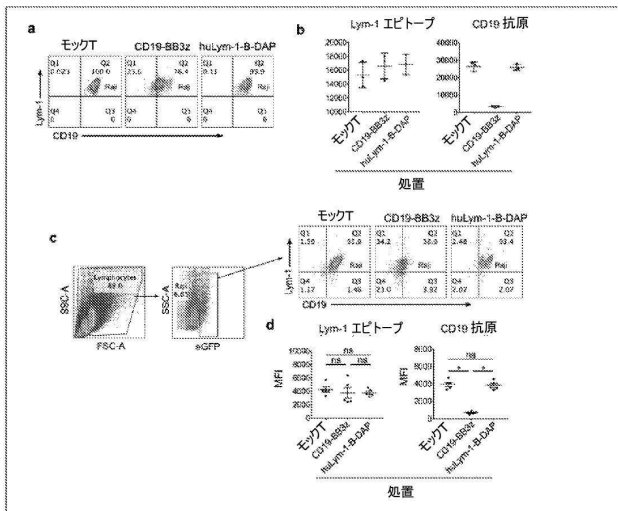
FIGS. 24A – 24G

【図 2 5】



FIGS. 25A – 25F

【図 2 6】



FIGS. 26A – 26D

【配列表】

2022520106000001.xml

10

20

30

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和3年10月14日(2021.10.14)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2022520106000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2020/018441

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

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

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2020/018441

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 23-25
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 23-25 pertain to methods for treatment of the human body and thus relate to a subject-matter which this International Searching Authority is not required to search under PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☒ Claims Nos.: 15, 17, 18, 21, 24
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 15, 17, 18, 21, 24 are regarded to be unclear because they refer to claims 14, 16, 17, 20, 23 which does not comply with PCT Rule 6.4(a).
3. ☒ Claims Nos.: 12, 14, 16, 19, 20, 22, 23, 25-27, 29
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

30

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

40

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2020/018441**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****C07K 16/28(2006.01)i, C07K 14/725(2006.01)i, C12N 5/0783(2010.01)i, C12N 15/62(2006.01)i, A61K 39/00(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 16/28; A61K 39/395; A61K 47/00; C07H 21/04; C07K 16/18; C12N 5/10; C12P 21/00; G01N 33/574; C07K 14/725; C12N 5/0783; C12N 15/62; A61K 39/00; A61P 35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean utility models and applications for utility models
Japanese utility models and applications for utility modelsElectronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
eKOMPASS(KIPO internal) & keywords: LYM-1, LYM-2, chimeric antigen receptor cell, immunoglobulin**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2016-0355590 A1 (EPSTEIN, A. L.) 08 December 2016 claims 1, 2, 23, 38	1-11, 13, 28
A	US 2009-0041758 A1 (GLASER, S. et al.) 12 February 2009 the whole document	1-11, 13, 28
A	US 2009-0252729 A1 (FARRINGTON, G. K. et al.) 08 October 2009 the whole document	1-11, 13, 28
A	EP 0313873 A1 (AMERICAN CYANAMID COMPANY) 03 May 1989 the whole document	1-11, 13, 28
A	US 2009-0130712 A1 (MCKENNA, S. D. et al.) 21 May 2009 the whole document	1-11, 13, 28

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 August 2020 (31.08.2020)

Date of mailing of the international search report

01 September 2020 (01.09.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR

International Application Division
Korean Intellectual Property Office
189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Jung, Da Won

Telephone No. +82-42-481-5373



INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US2020/018441

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2016-0355590 A1	08/12/2016	AU 2018-270474 A1	04/01/2018
		CA 2987992 A1	08/12/2016
		CN 107847601 A	27/03/2018
		EP 3302559 A1	11/04/2018
		JP 2018-524973 A	06/09/2018
		WO 2016-197064 A1	08/12/2016
US 2009-0041758 A1	12/02/2009	EP 1641826 A2	05/04/2006
		EP 1641827 A2	05/04/2006
		JP 2007-535296 A	06/12/2007
		JP 2007-535297 A	06/12/2007
		JP 2010-273686 A	09/12/2010
		JP 2010-280683 A	16/12/2010
		JP 5068072 B2	07/11/2012
		JP 5091476 B2	05/12/2012
		US 2005-0163782 A1	28/07/2005
		US 2005-0163783 A1	28/07/2005
		US 7700097 B2	20/04/2010
		US 8603473 B2	10/12/2013
		WO 2005-000898 A2	06/01/2005
		WO 2005-000898 A3	09/09/2005
		WO 2005-000899 A2	06/01/2005
		WO 2005-000899 A3	11/08/2005
US 2009-0252729 A1	08/10/2009	CN 101802197 A	11/08/2010
		EP 2158318 A2	03/03/2010
		JP 2010-528588 A	26/08/2010
		JP 5398703 B2	29/01/2014
		KR 10-2010-0021601 A	25/02/2010
		US 2011-0243966 A1	06/10/2011
		WO 2008-143954 A2	27/11/2008
EP 0313873 A1	03/05/1989	WO 2008-143954 A3	19/03/2009
		EP 0313873 B1	28/09/1994
		EP 0313874 A2	03/05/1989
		EP 0313874 A3	09/05/1990
		EP 0313874 B1	13/04/1994
		JP 01-193282 A	03/08/1989
		JP 02-096599 A	09/04/1990
		JP 2720933 B2	04/03/1998
		JP 2820256 B2	05/11/1998
		KR 10-0133130 B1	17/04/1998
		KR 10-1989-0006244 A	12/06/1989
		KR 10-1989-0006245 A	12/06/1989
		KR 10-1997-0011385 B1	10/07/1997
US 2009-0130712 A1	21/05/2009	EP 1957541 A2	20/08/2008
		JP 2009-516513 A	23/04/2009
		US 7820165 B2	26/10/2010

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersInternational application No.
PCT/US2020/018441

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		WO 2007-062037 A2	31/05/2007
		WO 2007-062037 A3	01/11/2007

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類		F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	4 C 0 8 7
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	4 H 0 4 5
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17	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	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	E
G 0 1 N	33/574 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
C 1 2 N	5/0783 (2010.01)	G 0 1 N	33/574	D
C 0 7 K	14/705 (2006.01)	C 1 2 N	5/0783	
		C 0 7 K	14/705	

(32)優先日 令和1年10月21日(2019.10.21)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

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

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 エプスタイン, アラン エル.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 0 0 1 5, ロサンゼルス, サウス オリーブ ストリート 1 1 5 0, スイート 2 3 0 0, ユニバーシティ オブ サザン カリフォルニア 気付

(72)発明者 フー, ペイシェン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 0 0 1 5, ロサンゼルス, サウス オリーブ ストリート 1 1 5 0, スイート 2 3 0 0, ユニバーシティ オブ サザン カリフォルニア 気付

(72)発明者 ジェン, ロン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 0 0 1 5, ロサンゼルス, サウス オリーブ ストリート 1 1 5 0, スイート 2 3 0 0, ユニバーシティ オブ サザン カリフォルニア 気付

F ターム (参考) 4B063 QA19 QQ79 QR48 QR77 QS33

4B064 AG20 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01

4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA44

4C084 AA19 NA05 ZB261 ZB262 ZC751

4C085 AA13 AA14 BB11 CC08 CC22 DD23 DD62 EE01 EE03

4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 CA04 CA05 DA18 NA14 ZB26

4H045 AA10 AA20 AA30 BA41 CA40 DA76 EA20 FA74