

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7698655号
(P7698655)

(45)発行日 令和7年6月25日(2025.6.25)

(24)登録日 令和7年6月17日(2025.6.17)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00 Z N A
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 N	15/867 (2006.01)	C 1 2 N	15/867 Z
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02
請求項の数 43 (全69頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2022-547960(P2022-547960)	(73)特許権者	500213834
(86)(22)出願日	令和3年2月5日(2021.2.5)		メモリアル スローン ケタリング キャ
(65)公表番号	特表2023-514148(P2023-514148		ンサー センター
	A)		アメリカ合衆国 1 0 0 6 5 ニューヨー
(43)公表日	令和5年4月5日(2023.4.5)		ク州 ニューヨーク ヨーク アベニュー
(86)国際出願番号	PCT/US2021/016713		1 2 7 5
(87)国際公開番号	WO2021/158850	(74)代理人	100078282
(87)国際公開日	令和3年8月12日(2021.8.12)		弁理士 山本 秀策
審査請求日	令和6年1月25日(2024.1.25)	(74)代理人	100113413
(31)優先権主張番号	62/970,401		弁理士 森下 夏樹
(32)優先日	令和2年2月5日(2020.2.5)	(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
		(74)代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
		(74)代理人	230113332
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 C D 2 8 変異を有するキメラ抗原受容体およびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および変異型 Y M N M モチーフを含む C D 2 8 ポリペプチドを含む少なくとも1つの共刺激シグナリングドメインを含む細胞内シグナリングドメインを含むキメラ抗原受容体 (C A R) であって、前記変異型 Y M N M モチーフが、 Y K N I (配列番号 2 6)、Y E N V (配列番号 2 2) または Y S N V (配列番号 2 3) に記されるアミノ酸配列からなる、C A R。

【請求項2】

a) 前記 C D 2 8 ポリペプチドが、天然型 Y M N M モチーフを含む C D 2 8 分子と比較して、ホスホイノシチド 3 - キナーゼ (P I 3 K) の p 8 5 サブユニットの動員を減少させている；および／または

b) P I 3 K の p 8 5 サブユニットが前記変異型 Y M N M モチーフに結合しない、請求項 1 に記載の C A R。

【請求項3】

前記変異型 Y M N M モチーフが、成長因子受容体結合受容体 2 (G r b 2) および／または S h c の下流の G r b 2 関連アダプター (G A D S) に結合する、請求項 1 から 2 のいずれか 1 項に記載の C A R。

【請求項4】

前記変異型 Y M N M モチーフが、P I 3 K の p 8 5 サブユニットに結合することができるメチオニン残基の数を制限することによって、P I 3 K シグナリングを調節することが

できる、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の C A R。

【請求項 5】

前記細胞外抗原結合ドメインが抗原に結合する、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の C A R。

【請求項 6】

前記抗原が、腫瘍抗原または病原体抗原である、請求項 5 に記載の C A R。

【請求項 7】

前記抗原が腫瘍抗原である、請求項 5 または 6 に記載の C A R。

【請求項 8】

前記腫瘍抗原が、C D 1 9、メソテリン、A X L、T I M 3、H V E M、M U C 1 6、
M U C 1、C A 1 X、C E A、C D 8、C D 7、C D 1 0、C D 2 0、C D 2 2、C D 3
0、C L L 1、C D 3 3、C D 3 4、C D 3 8、C D 4 1、C D 4 4、C D 4 9 f、C D
5 6、C D 7 0、C D 7 4、C D 9 9、C D 1 2 3、C D 1 3 3、C D 1 3 8、E G P－
2、E G P－4 0、E p C A M、E r b－B、F B P、胎児アセチルコリン受容体、葉酸
受容体－ α 、G D 2、G D 3、H E R－2、h T E R T、I L－1 3 R－ α 2、 κ －軽鎖
、K D R、L e Y、L 1 細胞接着分子、M A G E－A 1、M A G E A 3、C T 8 3 (K K
－L C－1 としても公知)、p 5 3、M A R T 1、G P 1 0 0、プロテイナーゼ 3 (P R
1)、チロシナーゼ、サバイビン、h T E R T、E p h A 2、N K G 2 D リガンド、N Y
－E S O－1、がん胎児性抗原 (h 5 T 4)、P S C A、P S M A、R O R 1、T A G－
7 2、V E G F－R 2、W T－1、B C M A、C D 4 4 V 6、N K C S 1、E G F 1 R、
E G F R－V I I I、A D G R E 2、C C R 1、L I L R B 2、P R A M E、H P V E
6 がんタンパク質、および H P V E 7 がんタンパク質からなる群から選択される、請求項
7 に記載の C A R。

【請求項 9】

前記腫瘍抗原が C D 1 9 である、請求項 8 に記載の C A R。

【請求項 10】

前記変異型 Y M N M モチーフが、Y K N I (配列番号 2 6) に記されるアミノ酸配列か
らなる、請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の C A R。

【請求項 11】

前記細胞外抗原結合ドメインが C D 1 9 に結合する、請求項 1 0 に記載の C A R。

【請求項 12】

配列番号 5 5 に記されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 1 に記載の C A R。

【請求項 13】

前記変異型 Y M N M モチーフが、Y E N V (配列番号 2 2) に記されるアミノ酸配列か
らなる、請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の C A R。

【請求項 14】

前記細胞外抗原結合ドメインが C D 1 9 に結合する、請求項 1 3 に記載の C A R。

【請求項 15】

配列番号 5 3 に記されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 4 に記載の C A R。

【請求項 16】

前記変異型 Y M N M モチーフが、Y S N V (配列番号 2 3) に記されるアミノ酸配列か
らなる、請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の C A R。

【請求項 17】

前記細胞外抗原結合ドメインが C D 1 9 に結合する、請求項 1 6 に記載の C A R。

【請求項 18】

配列番号 5 7 に記されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 7 に記載の C A R。

【請求項 19】

請求項 1 から 1 8 のいずれか 1 項に記載の C A R を含む細胞。

【請求項 20】

免疫応答性細胞である、請求項 1 9 に記載の細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 2 1】

リンパ系の細胞または骨髄系の細胞である、請求項 1 9 または 2 0 に記載の細胞。

【請求項 2 2】

T 細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、およびリンパ系細胞が分化され得る幹細胞からなる群から選択される、請求項 1 9 から 2 1 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 2 3】

T 細胞である、請求項 1 9 から 2 2 のいずれか 1 項に記載の細胞。

【請求項 2 4】

前記 T 細胞が、細胞傷害性 T リンパ球（CTL）、 $\gamma\delta$ T 細胞、腫瘍反応性リンパ球、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）、制御性 T 細胞、およびナチュラルキラー T（NKT）細胞からなる群から選択される、請求項 2 2 または 2 3 に記載の細胞。

10

【請求項 2 5】

請求項 1 9 から 2 4 のいずれか 1 項に記載の細胞を含む組成物。

【請求項 2 6】

薬学的に許容され得る賦形剤をさらに含む医薬組成物である、請求項 2 5 に記載の組成物。

【請求項 2 7】

新生物もしくは腫瘍、および／または病原体感染を処置および／または予防するためのものである、請求項 2 5 または 2 6 に記載の組成物。

【請求項 2 8】

対象の腫瘍負荷を軽減するための、請求項 2 5 から 2 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

20

【請求項 2 9】

前記対象における腫瘍細胞の数が減少され、腫瘍サイズが減少され、および／または前記腫瘍が根絶させられることを特徴とする、請求項 2 8 に記載の組成物。

【請求項 3 0】

新生物または腫瘍を処置および／または予防するための、請求項 2 5 から 2 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 3 1】

新生物または腫瘍を有する対象の生存を延長するための、請求項 2 5 から 2 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

30

【請求項 3 2】

前記新生物および／または腫瘍が、B 細胞白血病、B 細胞リンパ腫、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、慢性リンパ性白血病（CLL）、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、急性骨髄性白血病（AML）および混合表現型急性白血病（MPAL）からなる群から選択される、請求項 2 8 から 3 1 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 3 3】

抗原特異的細胞を生産するための方法であって、請求項 1 から 1 8 のいずれか 1 項に記載の CAR をコードする核酸分子を細胞に導入することを含む、方法。

【請求項 3 4】

前記核酸分子がベクター上に存在する、請求項 3 3 に記載の方法。

40

【請求項 3 5】

前記ベクターがレトロウイルスベクターである、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

請求項 1 から 1 8 のいずれか 1 項に記載の CAR をコードする核酸分子。

【請求項 3 7】

配列番号 5 4、配列番号 5 6、または配列番号 5 8 に記されるヌクレオチド配列を含む、請求項 3 6 に記載の核酸分子。

【請求項 3 8】

請求項 3 6 または 3 7 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 3 9】

50

前記ベクターがγ-レトロウイルスベクター（γ-retroviral vector）である、請求項38に記載のベクター。

【請求項40】

請求項38または39に記載の核酸分子を発現する宿主細胞。

【請求項41】

T細胞である、請求項40記載の宿主細胞。

【請求項42】

請求項1から18のいずれか1項に記載のCAR、請求項19から24のいずれか1項に記載の細胞、請求項25から32のいずれか1項に記載の組成物、請求項36もしくは37に記載の核酸分子、または請求項38もしくは39に記載のベクターを含むキット。

【請求項43】

新生物、腫瘍および／または病原体感染を処置および／または予防するための書面による説明書をさらに含む、請求項42に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、2020年2月5日に出願された米国仮特許出願第62／970,401号に基づく優先権を主張し、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれ、かつこの仮特許出願に基づく優先権を主張している。

配列表

【0002】

本出願は、EFS-Webを介してASCII形式で提出された配列表を含み、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。2021年2月4日に作成された前記ASCIIのコピーは、072734.1189_ST25.txtと命名され、サイズは70,968バイトである。

【0003】

1. 技術分野

本開示は、癌および病原体に対する免疫応答を増強するための、方法および組成物を提供する。本開示は、変異型CD28細胞内モチーフ、すなわち変異型YMNモチーフを含むキメラ抗原受容体（CAR）に関する。本開示の主題はまた、CARを含む細胞および細胞を含む組成物、ならびに疾患を処置するための、例えば癌を処置するための細胞および組成物の使用を提供する。

【背景技術】

【0004】

2. 背景技術

細胞ベースの免疫療法は、癌の処置のための治療可能性を有する療法である。T細胞および他の免疫細胞は、選択された抗原に特異的な、天然もしくは改変T細胞受容体（TCR）、またはキメラ抗原受容体（CAR）と呼ばれる、抗原に対する合成受容体をコードする遺伝物質の導入によって腫瘍抗原を標的とするように改変され得る。患者の操作されたCAR T細胞は、多様な液性および固形悪性腫瘍に対する顕著な有効性を実証している。

【0005】

臨床で使用されているおよび前臨床開発中のCARは、主にCD28または4-1BBなどの共刺激シグナリングドメインを使用する。CD28は、共刺激分子としてのその役割を介してT細胞活性化において重要な役割を果たす膜貫通タンパク質であり、CD28ベースのCAR構築物の不可欠なパーツである。持続性、特にこれらのCARの機能的持続性は、より良い転帰に関連することが示されている。既存のCARと比較して、増強された増殖および持続性を有する、ならびに／または改善された効率および活性を有する、改善されたCARに対する満たされていないニーズが存在する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

3. 発明の要旨

本開示の主題は、変異型CD28細胞内モチーフ、すなわち変異型YMNMMモチーフを含むキメラ抗原受容体(CAR)を提供する。

【0007】

本開示は、細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および変異型YMNMMモチーフを含むCD28ポリペプチドを含む少なくとも1つの共刺激シグナリングドメインを含む細胞内シグナリングドメインを含む、キメラ抗原受容体(CAR)を提供する。

【0008】

ある特定の実施形態では、CD28ポリペプチドは、天然型YMNMMモチーフを含むCD28分子と比較して、ホスホイノシチド3-キナーゼ(PI3K)のp85サブユニットの動員を減少させている。ある特定の実施形態では、PI3Kのp85サブユニットは、変異型YMNMMモチーフに結合しない。ある特定の実施形態では、変異型YMNMMモチーフは、YxNx(配列番号21)に記されるアミノ酸配列からなり、xはメチオニン(M)ではない。ある特定の実施形態では、変異型YMNMMモチーフは、YENV(配列番号22)、YSNV(配列番号23)、YKNL(配列番号24)、YENQ(配列番号25)、YKNI(配列番号26)、YINQ(配列番号27)、YHNK(配列番号28)、YVNQ(配列番号29)、YLNP(配列番号30)、YLNT(配列番号31)、YDND(配列番号66)、YENI(配列番号67)、YENL(配列番号68)、YKNQ(配列番号72)、YKNV(配列番号73)、またはYANG(配列番号87)に記されるアミノ酸配列からなる。ある特定の実施形態では、変異型YMNMMモチーフは、YSNV(配列番号23)、YENV(配列番号22)、またはYKNI(配列番号26)に記されるアミノ酸配列からなる。ある特定の実施形態では、変異型YMNMMモチーフは、YSNV(配列番号23)に記されるアミノ酸配列からなる。ある特定の実施形態では、変異型YMNMMモチーフは、成長因子受容体結合受容体2(Grb2)および/またはShcの下流のGrb2関連アダプター(GADS)に結合する。

【0009】

ある特定の実施形態では、変異型YMNMMモチーフは、Grb2および/またはGADSに結合しない。ある特定の実施形態では、変異型YMNMMモチーフは、YMXM(配列番号20)に記されるアミノ酸配列からなり、xはアスパラギン酸(N)ではない。ある特定の実施形態では、変異型YMNMMモチーフは、YMDM(配列番号32)、YMPM(配列番号79)、YMRM(配列番号37)、またはYMSM(配列番号80)に記されるアミノ酸配列からなる。ある特定の実施形態では、変異型YMNMMモチーフは、YMDM(配列番号32)に記されるアミノ酸配列からなる。ある特定の実施形態では、変異型YMNMMモチーフは、YbXM(配列番号33)に記されるアミノ酸配列からなり、xはアスパラギン酸(N)ではなく、bはメチオニン(M)ではない。ある特定の実施形態では、変異型YMNMMモチーフは、YTHM(配列番号34)、YVLM(配列番号35)、YIAM(配列番号36)、YVEM(配列番号83)、YVKM(配列番号85)、またはYVPM(配列番号86)に記されるアミノ酸配列からなる。ある特定の実施形態では、変異型YMNMMモチーフは、YMXb(配列番号65)に記されるアミノ酸配列からなり、xはアスパラギン酸(N)ではなく、bはメチオニン(M)ではない。ある特定の実施形態では、変異型YMNMMモチーフは、YMAP(配列番号77)に記されるアミノ酸配列からなる。ある特定の実施形態では、PI3Kシグナリングのp85サブユニットは、変異型YMNMMモチーフに結合する。

【0010】

ある特定の実施形態では、変異型YMNMMモチーフは、Grb2および/もしくはGADSまたはPI3Kのp85サブユニットに結合しない。ある特定の実施形態では、変異型YMNMMモチーフは、Ybxb(配列番号43)に記されるアミノ酸配列からなり、x

10

20

30

40

50

はアスパラギン酸（N）ではなく、bはメチオニン（M）ではない。ある特定の実施形態では、変異型YMNMMモチーフは、YGGG（配列番号44）、YAAA（配列番号45）、YFFF（配列番号46）、YETV（配列番号69）、YQQQ（配列番号70）、YHAE（配列番号71）、YLDL（配列番号74）、YLIP（配列番号75）、YLRV（配列番号76）、YTAV（配列番号82）、またはYVHV（配列番号84）に記されるアミノ酸配列からなる。ある特定の実施形態では、変異型YMNMMモチーフは、YGGG（配列番号44）に記されるアミノ酸配列からなる。

【0011】

ある特定の実施形態では、変異型YMNMMモチーフは、PI3Kのp85サブユニットに結合することができるメチオニン残基の数を制限することによって、PI3Kシグナリングを調節することができる。ある特定の実施形態では、変異型YMNMMモチーフは、YMNx（配列番号38）またはYxNM（配列番号39）に記されるアミノ酸配列からなり、xはメチオニン（M）ではない。ある特定の実施形態では、変異型YMNMMモチーフは、YMNv（配列番号40）、YENM（配列番号41）、およびYMNQ（配列番号42）、YMNl（配列番号78）、またはYsNM（配列番号81）に記されるアミノ酸配列からなる。

【0012】

ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは抗原に結合する。ある特定の実施形態では、抗原は、腫瘍抗原または病原体抗原である。ある特定の実施形態では、抗原は、腫瘍抗原である。ある特定の実施形態では、腫瘍抗原は、CD19、メソテリン、AXL、TIM3、HVEM、MUC16、MUC1、CAIX、CEA、CD8、CD7、CD10、CD20、CD22、CD30、CLL1、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD49f、CD56、CD70、CD74、CD99、CD123、CD133、CD138、EGP-2、EGP-40、EPCAM、ErbB（例えば、ErbB2、ErbB3、ErbB4）、FBP、胎児アセチルコリン受容体、葉酸受容体-α、GD2、GD3、HER-2、hTERT、IL-13R-α2、κ-軽鎖、KDR、LeY、L1細胞接着分子、MAGE-A1、ERBB2、MAGEA3、CT83（KK-LC-1としても公知）、p53、MART1、GP100、プロテイナーゼ3（PR1）、チロシナーゼ、サバイビン、hTERT、EphA2、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、がん胎児性抗原（h5T4）、PSCA、PSMA、ROR1、TAG-72、VEGF-R2、WT-1、BCMA、CD44v6、NKS1、EGF1R、EGFR-VIII、ADGRE2、CCR1、LILRB2、PRAME、HPV E6がんタンパク質、およびHPV E7がんタンパク質からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、腫瘍抗原はCD19である。

【0013】

ある特定の実施形態では、変異型YMNMMモチーフは、YMDM（配列番号32）に記されるアミノ酸配列からなる。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、CD19に結合する。ある特定の実施形態では、CARは、配列番号51に記されるアミノ酸配列を含む。

【0014】

ある特定の実施形態では、変異型YMNMMモチーフは、YKNI（配列番号26）に記されるアミノ酸配列からなる。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、CD19に結合する。ある特定の実施形態では、CARは、配列番号55に記されるアミノ酸配列を含む。

【0015】

ある特定の実施形態では、変異型YMNMMモチーフは、YENV（配列番号22）に記されるアミノ酸配列からなる。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、CD19に結合する。ある特定の実施形態では、CARは、配列番号53に記されるアミノ酸配列を含む。

【0016】

ある特定の実施形態では、変異型 Y M N M モチーフは、Y S N V（配列番号 64）に記されるアミノ酸配列からなる。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、C D 19 に結合する。ある特定の実施形態では、C A R は、配列番号 57 に記されるアミノ酸配列を含む。

【0017】

ある特定の実施形態では、変異型 Y M N M モチーフは、Y G G G（配列番号 63）に記されるアミノ酸配列からなる。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、C D 19 に結合する。ある特定の実施形態では、C A R は、配列番号 61 に記されるアミノ酸配列を含む。

【0018】

本開示の主題はまた、本明細書に記載の C A R を含む細胞を提供する。ある特定の実施形態では、細胞は免疫応答性細胞である。ある特定の実施形態では、細胞は、リンパ系の細胞または骨髄系の細胞である。ある特定の実施形態では、細胞は、T 細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、およびリンパ系細胞が分化され得る幹細胞からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、細胞は T 細胞である。ある特定の実施形態では、T 細胞は、細胞傷害性 T リンパ球（C T L）、 $\gamma \delta$ T 細胞、腫瘍浸潤リンパ球（T I L）、制御性 T 細胞、ナチュラルキラー T（N K T）細胞、および腫瘍反応性リンパ球からなる群から選択される。

【0019】

さらに、本開示の主題は、本明細書に記載の細胞を含む組成物を提供する。ある特定の実施形態では、組成物は、薬学的に許容され得る賦形剤をさらに含む医薬組成物である。ある特定の実施形態では、組成物は、新生物および／または病原体感染を処置および／または予防するためのものである。

【0020】

本開示の主題は、対象における腫瘍負荷を軽減する方法をさらに提供する。ある特定の実施形態では、方法は、本明細書に記載の細胞または本明細書に記載の組成物を、対象に投与することを含む。ある特定の実施形態では、方法は、対象における腫瘍細胞の数を減少させ、腫瘍サイズを減少させ、および／または腫瘍を根絶する。

【0021】

本開示の主題は、新生物を処置および／または予防する方法をさらに提供する。ある特定の実施形態では、方法は、本明細書に記載の細胞または本明細書に記載の組成物を、対象に投与することを含む。

【0022】

本開示の主題は、新生物を有する対象の生存を延長する方法をさらに提供する。ある特定の実施形態では、方法は、本明細書に記載の細胞または本明細書に記載の組成物を、対象に投与することを含む。

【0023】

ある特定の実施形態では、新生物および／または腫瘍は、B 細胞白血病、B 細胞リンパ腫、急性リンパ芽球性白血病（A L L）、慢性リンパ性白血病（C L L）、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、急性骨髄性白血病（A M L）、および混合表現型急性白血病（M P A L）からなる群から選択される。

【0024】

本開示の主題は、抗原特異的細胞を生産するための方法をさらに提供する。ある特定の実施形態では、方法は、本明細書に記載の C A R をコードする核酸配列を細胞に導入することを含む。ある特定の実施形態では、核酸配列はベクター上に存在する。ある特定の実施形態では、ベクターはレトロウイルスベクターである。

【0025】

さらに、本開示の主題は、本明細書に記載の C A R をコードする核酸分子を提供する。ある特定の実施形態では、核酸分子は、配列番号 52、配列番号 54、配列番号 56、または配列番号 58 に記されるヌクレオチド配列を含む。本開示の主題は、本明細書に記載

10

20

30

40

50

の核酸分子を含むベクターをさらに提供する。ある特定の実施形態では、ベクターはγ-レトロウイルスベクター (r e c t o r) である。

【0026】

本開示の主題は、本明細書に記載の核酸分子を発現する宿主細胞をさらに提供する。ある特定の実施形態では、宿主細胞はT細胞である。

【0027】

さらに、本開示の主題は、本明細書に記載のCAR、本明細書に記載の細胞、本明細書に記載の組成物、本明細書に記載の核酸分子、または本明細書に記載のベクターを含むキットを提供する。ある特定の実施形態では、キットは、新生物、および／または病原体感染を処置および／または予防するための書面による説明書をさらに含む。

10

4. 図面の簡単な説明

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1】図1は、生理学的なCD28シグナリングの概略図である。

【0029】

【図2】図2は、CD28へのPI3Kp85結合を調節するためのCD28改変の概略図である。

【0030】

【図3】図3A～図3Dは、CD28-YKNI変異CAR T細胞がインビトロで強力な殺滅能力を有したことを示し、これはある特定のCAR T細胞に匹敵した。切断型EGFRドメイン (E t a h 1 9) を発現するヒトCD19標的化CAR T細胞を、異なるエフェクター：腫瘍比でGFP-f f l シフェラーゼ (N A L M 6 g L) を発現するCD19+NALM6細胞と共培養した。腫瘍細胞の溶解 (非シグナリングCAR T細胞に対して) を24時間後に生物発光によって測定した。h28Z：CD28ベース+CD3Zシグナリングドメイン；hBBZ：4-1BBベース+CD3Zシグナリングドメイン；h28h1XX：CD28ベース+変異型ITAM2およびITAM3を有するCD3Zシグナリングドメイン；hYKNI Z：変異型CD28ベース (Y M N M → Y K N I) +CD3Zシグナリングドメイン。p S t i m x # は刺激後を指し、数字は事前の刺激の数を指し示す。図3Aは、製造後の腫瘍細胞の溶解の結果を示す。図3Bは、1回刺激後の腫瘍細胞の溶解の結果を示す。図3Cは、2回刺激後の腫瘍細胞の溶解の結果を示す。図3Dは、4回刺激後の腫瘍細胞の溶解の結果を示す。

20

【0031】

【図4-1】図4A～図4Nは、変異CD28 CAR T細胞が異なる炎症促進性サイトカイン分泌プロファイルを実証したことを示す。ヒトCD19標的化CAR T細胞を単独で培養、1：1のエフェクター：腫瘍比でCD19+NALM6細胞と共培養した。24時間後に、上清を回収し、ビーズベースのマルチプレックスアッセイを利用してサイトカインを測定した。図4A～図4Gは、ドナーVからのサイトカインプロファイルを示し、図4H～図4Nは、ドナーIVからのサイトカインプロファイルを示す。(図4A、図4H) GMCSF；(図4B、図4I) IFN-γ；(図4C、図4J) IL-13；(図4D～図4K) IL-17；(図4E～図4L) IL-9；(図4F～図4M) IL-2；(図4G～図4N) TNF-α。

30

【図4-2】同上。

【図4-3】同上。

【図4-4】同上。

【図4-5】同上。

【図4-6】同上。

【図4-7】同上。

【0032】

【図5】図5は、CD28-YKNI変異CAR T細胞が、反復抗原曝露に応答した増殖の量的差異を何ら有していなかったことを示す。ヒトCD19標的化CAR T細胞を

40

50

、1：5のE：T比および50,000 CAR T細胞/mLの濃度でNALM6と共培養した。概ね5日ごとに、CAR T細胞を計数し、フローサイトメトリーによって特徴付け、開始数の腫瘍細胞を培養物に添加して戻した（矢印によって指し示されている）。

【0033】

【図6】図6は、CD28-YKNI変異CAR T細胞が、CD28およびCD28-1xx CAR T細胞と比較して、反復抗原遭遇の状況下においてメモリー表現型を保持したことを示す。ヒトCD19標的化CAR T細胞を、1：5のE：T比および50,000 CAR T細胞/mLの濃度でNALM6と共培養した。概ね5日ごとに、CAR T細胞を計数し、メモリー表現型（CD62L+）に関してフローサイトメトリーによって特徴付け、開始数のNALM6腫瘍細胞を培養物に添加して戻した（矢印によって指し示されている）。

10

【0034】

【図7】図7は、CD28-YKNI変異CAR T細胞が、CD28およびCD28-1xx CAR T細胞と比較して、反復抗原遭遇の状況下において比較的バランスのとれたCD8：CD4比を保持したことを示す。ヒトCD19標的化CAR T細胞を、1：5のE：T比および50,000 CAR T細胞/mLの濃度でNALM6と共培養した。概ね5日ごとに、CAR T細胞を計数し、CD4/CD8分布に関してフローサイトメトリーによって特徴付け、開始数のNALM6腫瘍細胞を培養物に添加して戻した（矢印によって指し示されている）。

20

【0035】

【図8-1】図8は、CD28-YKNI変異CAR T細胞が、単回または複数回活性化後に、より低い幼若化を実証したことを示す。CAR T細胞を、1：5の初期E：T（1回刺激、青色）でNALM6 g Lと共培養した。並行して、CAR T細胞を、合計5回の刺激（12時間ごとに1回刺激；赤色）のために、同じ量の腫瘍で反復刺激した。共培養の開始からおおよそ10日後に、サイズ/幼若化（前方散乱によって評価）をフローサイトメトリーによって評価した。

【図8-2】同上。

【0036】

【図9】図9A～図9Bは、ドナーAおよびBにおける単回または複数回刺激の9日後にCAR T細胞において測定された代謝プロファイルを示す。酸素消費速度（OCR）（図9A）および細胞外酸性化速度（ECAR）（図9B）を、刺激されたCAR T細胞において測定した。

30

【0037】

【図10-1】図10A～図10Bは、CD28-YKNI変異CAR T細胞が、単回または複数回刺激の状況において、より低いレベルの共阻害分子を発現したことを示す。LAG3およびPD1（図10A）ならびにTIM-3およびPD1（図10B）の発現を、CD28-YKNI変異CAR T細胞（ah19hYKNIhZ）および野生型CAR T細胞（ah19h28hZ）において、単回または複数回刺激のもとで測定した。

【図10-2】同上。

【図10-3】同上。

【図10-4】同上。

40

【0038】

【図11】図11は、CD28-YKNI変異CD19標的化CAR T細胞が、インビボで標準的なCD28ベースのCAR T細胞を凌駕したことを示す。NCGマウスに10⁶個のNALM6 g f p⁺ f f LUC⁺腫瘍細胞を接種し、4日後にCAR T細胞で処置した。生存率をグラフ化した。CAR T細胞は、2人の異なる健常ドナーに由来した。

【0039】

【図12】図12は、CD28に対して改変されたPI3Kp85およびGrb2/GADS結合能を有する例示的なCD28変異体の概略図である。

【0040】

50

【図13】図13は、CD28-YKNI変異CAR T細胞が24時間殺滅アッセイにおいて同等の殺滅能力を実証したことを示す。切断型EGFRドメイン（E t a h 19）を発現するヒトCD19標的化CAR T細胞を、異なるエフェクター：腫瘍比でGFP-f f l u c +腫瘍細胞（NALM6 g l）を発現するCD19+NALM6細胞と共培養し、腫瘍細胞の溶解（非シグナリングCAR T細胞に対して）を24時間後に生物発光によって測定した。

【0041】

【図14】図14は、CD28-Yxxx変異CD19標的化CAR T細胞（YKNI、YENV、およびYMDM）が、インビトロで標準的なCD28ベースのCAR T細胞を凌駕したことを示す。ヒトCD19標的化CAR T細胞を、1：5のE：T比および25,000 CAR T細胞/mLの開始濃度でNALM6と共培養した。CAR+およびNALM6の濃度を毎日測定し、6日間にわたってプロットした。

10

【0042】

【図15-1】図15は、CD28変異体が良好な疲弊免疫表現型を実証したことを示す。CAR T細胞を、1：5の初期E：T（1回刺激）でNALM6 g lと共培養した。並行して、CAR T細胞を、合計5回の刺激（12時間ごとに1回刺激）のために、同じ量の腫瘍で反復刺激した。共培養の開始からおおよそ10日後に、疲弊マーカー（TIM3およびPD1）をフローサイトメトリーによって評価した。

【図15-2】同上。

【0043】

20

【図16】図16は、 1×10^6 個のNALM6 g f p + f f l u c +腫瘍細胞を接種し、異なるCAR T細胞で処置したNCGマウスの生存曲線を示す。

【0044】

【図17】図17は、 1×10^6 個のNALM6 g f p + f f l u c +腫瘍細胞を接種し、異なるCAR T細胞で処置したNCGマウスの生存曲線を示す。

【0045】

【図18-1】図18は、 1×10^6 個のNALM6 g f p + f f l u c +腫瘍細胞を接種し、異なるCAR T細胞で処置したNCGマウスの生物発光画像を示す。生物発光を毎週測定した。

【図18-2】同上。

30

【図18-3】同上。

【図18-4】同上。

【図18-5】同上。

【0046】

【図19-1】図19は、CD28-Yxxx変異CD19標的化CAR T細胞がインビトロで強力な長期細胞傷害能力を実証したことを示す。ヒトCD19標的化CAR T細胞（菱形印を伴う線）を、1：15のE：T比でNALM6 g l（丸印を伴う線）と共培養した。CAR+T細胞およびNALM6の濃度を毎日測定し、細胞/mLで7日間にわたってプロットした。

【図19-2】同上。

40

【0047】

【図20】図20は、CD28-Yxxx変異CD19標的化CAR T細胞が良好な疲弊免疫表現型を表したことを示す。CAR T細胞を、1：15または1：30のE：T比でNALM6 g lと共培養した。5日後に、CAR T細胞におけるLAG3、TIM3およびPD1を含む疲弊マーカーの発現をフローサイトメトリーによって評価した。

【0048】

【図21】図21は、CD28-Yxxx変異CD19標的化CAR T細胞を受けたNCGマウスの生存曲線を示す。NCGマウスに 1×10^6 個のNALM6 g f p + f f l u c +腫瘍細胞を接種し、4日後に500,000個のCAR T細胞で処置した。CAR T細胞は、2人の異なる健常ドナーに由来した。

50

【0049】

【図22】図22は、CD28-Yxxx変異CD19標的化CAR T細胞を受けたNCGマウスの生存曲線を示す。NCGマウスに 1×10^6 個のNALM6 gfp⁺ffLU C⁺腫瘍細胞を接種し、4日後に200,000個のCAR T細胞で処置した。CAR T細胞は、単一の健常ドナーに由来した。

【0050】

【図23】図23は、CD28-Yxxx変異CD19標的化CAR T細胞が、抗原密度とは無関係にインビトロで増強された増殖を表したことを示す。ヒトCD19標的化CD28-Yxxx変異CAR T細胞を、高または低CD19抗原密度のいずれか、1:1のE:T比でNALM6 gLと共培養した。6日ごとに、CAR⁺T細胞を計数し、合計3回の刺激のためにNALM6 gLで再刺激した。

10

【0051】

【図24-1】図24A~図24Cは、CD28-Yxxx変異CD19標的化CAR T細胞が、抗原への曝露時に独特のサイトカイン分泌プロファイルを実証したことを示す。ヒトCD19標的化CD28-Yxxx変異CAR T細胞を、NALM6 gLと共培養した。24時間後に、上清を回収し、インターロイキン-2 (図24A)、TNF- α (図24A)、GM-CSF (図24B)、インターフェロン- γ (図24B)、IL-9 (図24C)、およびIL-17 (図24C)を含むサイトカインを、Luminex ビーズベースのマルチプレックスアッセイによって測定した。

【図24-2】同上。

20

【図24-3】同上。

【発明を実施するための形態】

【0052】

5. 詳細な説明

本開示の主題は、変異型YMN Mモチーフを含むCD28ポリペプチドを含む少なくとも1つの共刺激シグナリングドメインを含むキメラ抗原受容体(CAR)を提供する。CD28ポリペプチドは、天然型YMN Mモチーフを含むCD28分子と比較して、ホスホイノシチド3-キナーゼ(PI3K)シグナリングのp85サブユニットの動員を減少させている。ある特定の実施形態では、PI3Kシグナリングのp85サブユニットは、変異型YMN Mモチーフに結合しない。ある特定の実施形態では、PI3Kシグナリングのp85サブユニットは変異型YMN Mモチーフに結合せず、成長因子受容体結合受容体2(Grb2)および/またはShcの下流のGrb2関連アダプター(GADS)は変異型YMN Mモチーフに結合する。ある特定の実施形態では、Grb2および/またはGADSは、変異型YMN Mモチーフに結合しない。ある特定の実施形態では、Grb2および/またはGADSは変異型YMN Mモチーフに結合せず、PI3Kシグナリングのp85サブユニットは変異型YMN Mモチーフに結合する。

30

【0053】

本開示の主題はまた、本開示のCARを含む細胞(例えば、免疫応答性細胞、例えば、T細胞またはNK細胞)を提供する。本開示の主題は、標的抗原に対する免疫応答を誘導および/もしくは増強するために、ならびに/あるいは新生物もしくは腫瘍、および/または病原体感染を処置および/または予防するために、本開示の細胞を使用する方法をさらに提供する。本開示の主題は、変異型CD28細胞内モチーフ(すなわち、変異型YMN Mモチーフ)を含むCARを含む細胞が、天然型CD28細胞内モチーフ(すなわち、天然型YMN Mモチーフ)を含むCARを含む細胞と比較して、増強された抗腫瘍効果を呈するという発見に少なくとも部分的に基づく。

40

【0054】

本開示の非限定的な実施形態は、本明細書および実施例によって説明される。

【0055】

限定ではなく、開示を明確にする目的のために、詳細な説明は以下のサブセクションに分割されている：

50

- 5. 1. 定義；
- 5. 2. キメラ抗原受容体（CAR）；
- 5. 3. 細胞；
- 5. 4. 組成物およびベクター；
- 5. 5. ポリペプチド；
- 5. 6. 製剤および投与；
- 5. 7. 処置の方法；ならびに
- 5. 8. キット
- 5. 1. 定義

【0056】

他に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術および科学用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有する。以下の参考文献は、当業者に、本開示の主題で使用される用語の多くの一般的な定義を提供する：Singletonら、*Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*（第2版、1994）；The Cambridge Dictionary of Science and Technology（Walker編、1988）；The Glossary of Genetics、第5版、R. Riegerら（編）、Springer Verlag（1991）；およびHale&Marham、*The Harper Collins Dictionary of Biology*（1991）。

【0057】

本明細書で使用される場合、「約（about）」または「およそ（approximately）」という用語は、当業者によって決定される特定の値の許容され得る誤差範囲内を意味し、これは値がどのように測定または決定されるか、すなわち測定システムの制限に部分的に依存するであろう。例えば、「約」は、当技術分野の慣例に従って、3または3を超える標準偏差内を意味し得る。あるいは、「約」は、所与の値の最大20%、例えば最大10%、最大5%、または最大1%の範囲を意味し得る。あるいは、特に生物学的システムまたはプロセスに関して、この用語は、一桁以内、例えば、値の5倍以内または2倍以内を意味し得る。

【0058】

「免疫応答性細胞」とは、免疫応答において機能する細胞、またはその前駆体もしくは子孫を意味する。ある特定の実施形態では、免疫応答性細胞はリンパ系の細胞である。リンパ系の細胞の非限定的な例としては、T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、B細胞、およびリンパ系細胞が分化され得る幹細胞が挙げられる。ある特定の実施形態では、免疫応答性細胞は骨髄系の細胞である。

【0059】

「免疫応答性細胞を活性化する」とは、免疫応答の開始をもたらす細胞におけるシグナル伝達の誘導またはタンパク質発現の変化を意味する。例えば、リガンド結合および免疫受容体抑制性チロシンモチーフ（ITAM）に応答してCD3鎖がクラスターを形成すると、シグナル伝達カスケードが生産される。ある特定の実施形態では、内因性TCRまたは外因性CARが抗原に結合すると、結合した受容体付近の多くの分子（例えば、CD4またはCD8、CD3 $\gamma/\delta/\epsilon/\zeta$ など）のクラスター化を含む免疫シナプスの形成が起こる。膜結合シグナリング分子のこのクラスター化は、CD3鎖内に含まれるITAMモチーフがリン酸化されることを可能にする。このリン酸化は次に、NF- κ BおよびAP-1などの転写因子を最終的に活性化するT細胞活性化経路を開始する。これらの転写因子は、T細胞媒介性免疫応答を開始するために、T細胞の全体的な遺伝子発現を誘導して、増殖およびマスターレギュレーターT細胞タンパク質の発現のためのIL-2産生を増加させる。

【0060】

「免疫応答性細胞を刺激する」とは、堅牢で持続的な免疫応答をもたらすシグナルを意味する。様々な実施形態では、これは、免疫細胞（例えば、T細胞）の活性化後に起こる

10

20

30

40

50

か、またはCD28、CD137(4-1BB)、OX40、CD40およびICOSを含むがこれらに限定されない受容体に媒介されて同時に起こる。複数の刺激シグナルを受けることは、堅牢で長期的なT細胞媒介性免疫応答を始動するために重要であり得る。T細胞は急速に阻害されるようになり得、抗原に対して非応答性になり得る。これらの共刺激シグナルの効果は変動し得るが、それらは一般に、完全かつ持続的な根絶に向けて、抗原に対して堅牢に応答する長寿命、増殖性、および抗アポトーシスT細胞を生成するために遺伝子発現の増加をもたらす。

【0061】

本明細書で使用される「抗原認識受容体」という用語は、抗原への結合に応答して免疫応答性細胞(例えば、T細胞)を活性化することができる受容体を指す。

【0062】

本明細書で使用される場合、「CDR」とは、免疫グロブリン重鎖および軽鎖の超可変領域である抗体の相補性決定領域のアミノ酸配列として定義される。例えば、Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、4th U. S. Department of Health and Human Services、National Institutes of Health(1987)を参照されたい。一般に、抗体は、可変領域に3つの重鎖および3つの軽鎖CDRすなわちCDR領域を含む。CDRは、抗原またはエピトープへの抗体の結合のために、接触残基の大部分を提供する。ある特定の実施形態では、CDR領域は、Kabatシステム(Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U. S. Department of Health and Human Services(1991); NIH Publication番号91-3242)を使用して記述される。ある特定の実施形態では、CDRは、IMGTナンバリングシステムに従って特定される。本明細書で使用される場合、「一本鎖可変断片」または「scFv」という用語は、 $V_H::V_L$ ヘテロ二量体を形成するように共有結合した免疫グロブリンの重鎖(V_H)および軽鎖(V_L)の可変領域の融合タンパク質である。 V_H および V_L は、直接接合されているか、または V_H のN末端を V_L のC末端と、または V_H のC末端を V_L のN末端とを接続するペプチドをコードするリンカー(例えば、10、15、20、25個のアミノ酸)によって接合されている。リンカーは、通常、柔軟性のためにグリシンが豊富であり、溶解性のためにセリンまたはトレオニンが豊富である。リンカーは、通常、柔軟性のためにグリシンが豊富であり、溶解性のためにセリンまたはトレオニンが豊富である。

【0063】

「リンカー」とは、本明細書で使用される場合、2つまたはそれを超えるポリペプチドまたは核酸が互いに接続されるように共有結合する機能的グループ(例えば、化学物質またはポリペプチド)を意味するものとする。本明細書で使用される場合、「ペプチドリンカー」とは、2つのタンパク質を一緒にカップリングするために(例えば、 V_H および V_L ドメインをカップリングするために)使用される1つまたはそれを超えるアミノ酸を指す。

【0064】

定常領域の除去およびリンカーの導入にもかかわらず、scFvタンパク質は元の免疫グロブリンの特異性を保持する。一本鎖Fvポリペプチド抗体は、Hustonら、Proc Nat Acad Sci USA(1988); 85:5879-5883、; 米国特許第5,091,513号、同第5,132,405号および同第4,956,778号; ならびに米国特許出願公開第20050196754号および同第20050196754号によって記載されるような V_H および V_L コード配列を含む核酸から発現され得る。阻害活性を有するアゴニスト性scFvが記載されている(Zhaoら、Hybridoma(Larchmt)2008; 27(6):455-51; Peterら、J Cachexia Sarcopenia Muscle(2013); 4(1):79-86; Shiehら、J Immunol(2009); 183(4):2277-85; Giomarelliら、Thromb Haemost(2007); 97(6):9

10

20

30

40

50

55-63; Fifeら、J C I (2006); 116 (8): 2252-61; Br
ocksら、Immunotechnology、(1997); 3 (3): 173-8
4; Moosmayerら、The Immunol (1995); 2 (10): 31
-40)。刺激活性を有するアゴニスト性 s c F v が記載されている (Pete
rら、J Biol Chem (2003); 25278 (38): 36740-7; Xieら、N
at Biotech (1997); 15 (8): 768-71; Ledbetterら
、Crit Rev Immunol (1997); 17 (5-6): 427-55; Ho
ら、BioChem Biophys Acta (2003); 1638 (3): 257-
66)。

【0065】

本明細書で使用される場合、「親和性」という用語は、結合強度の尺度を意味する。親和性は、抗体の結合部位と抗原決定基との間の立体化学的適合の近さ、それらの間の接触エリアのサイズ、ならびに／または荷電基および疎水性基の分布に依存し得る。抗原に対する抗体の親和性を計算するための方法は、様々な抗原結合実験、例えば機能アッセイ（例えば、フローサイトメトリーアッセイ）を含むがこれらに限定されず、当技術分野で公知である。

【0066】

本明細書で使用される「キメラ抗原受容体」または「CAR」という用語は、免疫応答性細胞を活性化することができる細胞内シグナリングドメインに融合された細胞外抗原結合ドメイン、および膜貫通ドメインを含む分子を指す。ある特定の実施形態では、CARの細胞外抗原結合ドメインは s c F v を含む。s c F v は、抗体の可変重および軽領域の融合に由来し得る。代替的または追加的に、s c F v は、F a b ' s（抗体からの代わりに、例えば、F a b ライブラリから得られる）に由来し得る。ある特定の実施形態では、s c F v は、膜貫通ドメインに、次いで細胞内シグナリングドメインに融合される。

【0067】

本明細書で使用される場合、「核酸分子」という用語は、目的のポリペプチドをコードする任意の核酸分子を含む。そのような核酸分子は、内因性核酸配列と100%相同または同一である必要はないが、実質的な同一性を呈し得る。

【0068】

「実質的に同一」または「実質的に相同」とは、参照アミノ酸配列（例えば、本明細書に記載のアミノ酸配列のいずれか1つ）または参照核酸配列（例えば、本明細書に記載の核酸配列のいずれか1つ）に対して、少なくとも約50%同一または相同であることを呈するポリペプチドまたは核酸分子を意味する。ある特定の実施形態では、そのような配列は、比較のために使用されるアミノ酸配列または核酸配列に対して、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または少なくとも約100%同一または相同である。

【0069】

2つの配列間の同一性パーセントは、2つの配列の最適なアラインメントのために導入する必要があるギャップの数および各ギャップの長さを考慮した、配列によって共有される同一の位置の数（すなわち、相同性% = 同一位置の数 / 位置の総数 × 100）の関数である。配列の比較および2つの配列間の同一性パーセントの決定は、数学的アルゴリズムを使用して達成することができる。

【0070】

配列同一性は、配列解析ソフトウェア（例えば、Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer

10

20

30

40

50

Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705、BLAST、BESTFIT、GAP、またはPILEUP/PRETTYBOXプログラム)を使用して測定することができる。そのようなソフトウェアは、様々な置換、欠失および/または他の改変に対して相同性の程度を割り当てることによって、同一または類似の配列とマッチさせる。保存的置換は、典型的には、以下の群内の置換を含む：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；リジン、アルギニン；およびフェニルアラニン、チロシン。同一性の程度を決定するための例示的なアプローチでは、BLASTプログラムを使用することができ、 $e-3$ と $e-100$ との間の確率スコアは密接に関連する配列を指し示す。

10

【0071】

2つのアミノ酸配列間の相同性または同一性パーセントは、PAM120加重残基表 (weight residue table)、12のギャップ長ペナルティおよび4のギャップペナルティを使用して、ALIGNプログラム (バージョン2.0) に組み込まれているE. MeyersおよびW. Millerのアルゴリズム (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)) を使用して決定することができる。さらに、2つのアミノ酸配列間の相同性または同一性パーセントは、Blossum62マトリックスまたはPAM250マトリックスのいずれか、ならびに16、14、12、10、8、6、または4のギャップ重みおよび1、2、3、4、5、または6の長さ重みを使用して、GCGソフトウェアパッケージ (www.gcg.comで入手可能) 中のGAPプログラムに組み込まれているNeedlemanおよびWunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)) アルゴリズムを使用して決定することができる。

20

【0072】

追加的または代替的に、本開示の主題のアミノ酸配列は、例えば関連配列を同定するために、公開データベースに対して検索を行うための「クエリ配列」としてさらに使用することができる。そのような検索は、Altschulら (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10のXBLASTプログラム (バージョン2.0) を使用して行うことができる。XBLASTプログラム、スコア=50、ワード長=3を用いてBLASTタンパク質検索を行うことにより、本明細書に開示される指定の配列 (例えば、scFv m903、m904、m905、m906、およびm900の重鎖可変領域配列および軽鎖可変領域配列) に対して相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較目的用にギャップのあるアラインメントを得るために、Altschulら、(1997) Nucleic Acids Res. 25 (17):3389-3402に記載されているように、Gapped BLASTを利用することができる。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム (例えば、XBLASTおよびNBLAST) のデフォルトパラメータを使用することができる。

30

【0073】

「有効量」とは、処置時に有益なまたは所望の臨床結果に影響を及ぼすのに十分な量である。有効量は、1回またはそれを超えるドーズで対象に投与することができる。ある特定の実施形態では、有効量は、疾患の進行を緩和、改良、安定化、逆転もしくは遅延させるか、または疾患の病理学的重大さを低減させるのに十分な量であり得る。有効量は、症例ごとに医師によって決定することができ、当業者の技術の範囲内である。有効量を達成するために適切な投与量を決定する場合、いくつかの因子が通常考慮される。これらの因子には、対象の年齢、性別および体重、処置される症状、症状の重症度ならびに投与される細胞の形態および有効濃度が含まれる。

40

【0074】

「調節する」とは、正または負に変更することを意味する。例示的な調節には、約1%、約2%、約5%、約10%、約25%、約50%、約75%、または約100%の変化

50

が含まれる。

【0075】

「増加する」とは、少なくとも約5%正に変更することを意味する。変更は、約5%、約10%、約25%、約30%、約50%、約75%、約100%またはそれを超えるものであり得る。

【0076】

「低減する」とは、少なくとも約5%負に変更することを意味する。変更は、約5%、約10%、約25%、約30%、約50%、約75%、約100%でさえもあり得る。

【0077】

「単離された」、「精製された」、または「生物学的に純粋な」という用語は、その天然の状態で見られるような通常それに付随する構成要素が、様々な程度までなくなっている物質を指す。「単離する」とは、元の供給源または周囲からの分離の程度を表す。「精製する」とは、単離よりも高い分離度を表す。「精製された」または「生物学的に純粋な」タンパク質は、いかなる不純物もタンパク質の生物学的特性に実質的に影響を与えないか、または他の有害な結果を引き起こさないように、他の材料を十分には含まない。すなわち、核酸またはペプチドは、組換えDNA技術によって生産される場合、細胞材料、ウイルス材料、または培養培地を実質的に含まないか、または化学合成される場合、化学的前駆物質または他の化学物質を実質的に含まない場合、精製される。純度および均一性は、典型的には、分析化学技術、例えばポリアクリルアミドゲル電気泳動または高速液体クロマトグラフィーを使用して決定される。「精製された」という用語は、核酸またはタンパク質が電気泳動ゲルで本質的に1つのバンドを生じることを表し得る。改変、例えばリン酸化またはグリコシル化に供することができるタンパク質の場合、異なる改変が、別々に精製され得る異なる単離されたタンパク質を生じる可能性がある。

【0078】

「単離された細胞」とは、細胞に天然に付随する分子および／または細胞の構成要素から分離された細胞を意味する。

【0079】

本明細書で使用される「抗原結合ドメイン」という用語は、細胞上に存在する特定の抗原決定基または抗原決定基のセットに特異的に結合することができるドメインを指す。

【0080】

「新生物」とは、細胞または組織の病的な増殖およびその後の他の組織または器官への遊走または他の組織または器官の浸潤を特徴とする疾患を意味する。新生物形成の成長は、典型的には制御されず、進行性であり、正常細胞の繁殖を誘発しないか、または停止を引き起こすであろう条件下で起こる。新生物は、膀胱、骨、脳、乳房、軟骨、グリア、食道、卵管、胆嚢、心臓、腸、腎臓、肝臓、肺、リンパ節、神経組織、卵巣、脾臓、前立腺、骨格筋、皮膚、脊髄、脾臓、胃(stomach)、精巣、胸腺、甲状腺、気管、泌尿生殖路、尿管、尿道、子宮、および腔からなる群から選択される器官、またはその組織もしくは細胞型を含むがこれらに限定されない様々な細胞型、組織、または器官に影響を及ぼし得る。新生物形成には、肉腫、癌腫または形質細胞腫(形質細胞の悪性腫瘍)などの癌が含まれる。

【0081】

「シグナル配列」または「リーダー配列」とは、分泌経路への進入を指示する、新たに合成されたタンパク質のN末端に存在するペプチド配列(例えば、5、10、15、20、25または30個のアミノ酸)を意味する。

【0082】

「含む(comprises)」、「含む(comprising)」という用語は、米国特許法においてそれらに帰する広い意味を有するように意図されており、「含む(includes)」、「含む(including)」などを意味し得る。

【0083】

本明細書で使用される場合、「処置」とは、処置されている個体または細胞の疾患経過

10

20

30

40

50

を変更させようとする臨床的介入を指し、予防のために、または臨床病理の経過中のいずれかに行われ得る。処置の治療効果には、以下に限定されないが、疾患の発生または再発の予防、症候の軽減、疾患の直接的または間接的な病理学的重大さの低減、転移の予防、疾患進行速度の低下、疾患状態の改良または緩和、ならびに寛解または予後の改善が含まれる。疾患または障害の進行を防止することによって、処置は、罹患したもしくは診断された対象または障害を有すると疑われる対象における障害による悪化を防止することができるが、処置はまた、障害のリスクがあるまたは障害を有すると疑われる対象における障害の発症または障害の症候を予防することができる。

【0084】

本明細書における「個体」または「対象」は、脊椎動物、例えば、ヒトまたは非ヒト動物、例えば、哺乳動物である。哺乳動物には、ヒト、霊長類、家畜、スポーツ動物、げっ歯類およびペットが含まれるが、これらに限定されない。非ヒト動物対象の非限定的な例としては、マウス、ラット、ハムスター、およびモルモットなどのげっ歯類；ウサギ；イヌ；ネコ；ヒツジ；ブタ；ヤギ；ウシ；ウマ；ならびに類人猿およびサルなどの非ヒト霊長類が挙げられる。本明細書で使用される「免疫無防備状態」という用語は、免疫不全を有する対象を指す。対象は、日和見感染、通常は健康な免疫系を有する人には疾患を引き起こさないが、機能が不十分であるかまたは免疫系が抑制されている人に影響を及ぼし得る生物によって引き起こされる感染に対して非常に脆弱である。

【0085】

本開示の主題の他の態様は、以下の開示に記載され、本開示の主題の範囲内である。

5. 2. キメラ抗原受容体 (CAR)

【0086】

ある特定の実施形態では、本開示は、細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および変異型CD28細胞内モチーフ、すなわち変異型YMNモチーフを含むCD28ポリペプチドを含む少なくとも1つの共刺激シグナリングドメインを含む細胞内シグナリングドメインを含むキメラ抗原受容体 (CAR) を提供する。

【0087】

CARは、免疫エフェクター細胞に目的の特異性をグラフトまたは付与する操作された受容体である。CARを使用して、モノクローナル抗体の特異性をT細胞にグラフトすることができ；レトロウイルスベクターによって促進されるそれらのコード配列の移入を伴う。

【0088】

3世代のCARが存在する。「第一世代」CARは、典型的には、細胞質性／細胞内シグナリングドメインに融合された膜貫通ドメインに融合された細胞外抗原結合ドメイン（例えば、scFv）から構成される。「第一世代」CARは、デノボ抗原認識を提供することができ、HLA媒介抗原提示とは無関係に、単一融合分子内のそれらのCD3ζ鎖シグナリングドメインを介してCD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞の両方の活性化を引き起こすことができる。「第二世代」CARは、様々な共刺激分子（例えば、CD28、4-1BB、ICOS、OX40）からの細胞内シグナリングドメインをCARの細胞質性尾部に付加して、T細胞に追加のシグナルを提供する。「第二世代」CARは、共刺激（例えば、CD28または4-1BB）および活性化（CD3ζ）の両方を提供するものを含む。「第三世代」CARは、複数の共刺激（例えば、CD28および4-1BB）および活性化（CD3ζ）の両方を提供するものを含む。ある特定の実施形態では、抗原認識受容体は第二世代CARである。ある特定の実施形態では、CARは、抗原に結合する細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナリングドメインを含み、細胞内シグナリングドメインは共刺激シグナリングドメインを含む。ある特定の実施形態では、CARは、ヒンジ (hinger) / スペーサー領域をさらに含む。ある特定の実施形態では、抗原認識受容体は、複数の共刺激シグナリングドメインを含む第三世代CARである。

【0089】

ある特定の実施形態では、CARは、細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナリングドメインを含み得、細胞外抗原結合ドメインは、腫瘍抗原または病原体抗原であり得る抗原に特異的に結合する。

5.2.1. 抗原

【0090】

ある特定の実施形態では、CARは、腫瘍抗原または病原体抗原に結合する。

【0091】

ある特定の実施形態では、CARは腫瘍抗原に結合する。本明細書に記載の腫瘍関連実施形態では、任意の腫瘍抗原（例えば、抗原性ペプチド）を使用することができる。抗原の供給源には、癌タンパク質が含まれるが、これに限定されない。抗原は、ペプチドとして、またはインタクトなタンパク質もしくはその一部分として発現され得る。インタクトなタンパク質またはその一部分は、天然型または変異誘発され得る。ある特定の実施形態では、抗原は、腫瘍組織において発現される。腫瘍抗原の非限定的な例としては、メソテリン、AXL、TIM3、HVEM、CD19、MUC16、MUC1、CAIX、CEA、CD8、CD7、CD10、CD20、CD22、CD30、CLL1、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD49f、CD56、CD70、CD74、CD99、CD123、CD133、CD138、EGP-2、EGP-40、EpCAM、Erb-B（例えば、Erb-B2、Erb-B3、Erb-B4）、FBP、胎児アセチルコリン受容体、葉酸受容体-α、GD2、GD3、HER-2、hTERT、IL-13R-α2、κ-軽鎖、KDR、LeY、L1細胞接着分子、MAGE-A1、MAGEA3、CT83（KK-LC-1としても公知）、p53、MART1、GP100、プロテイナーゼ3（PR1）、チロシナーゼ、サバイビン、hTERT、EphA2、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、がん胎児性抗原（h5T4）、PSCA、PSMA、ROR1、TAG-72、VEGF-R2、WT-1、BCMA、CD44V6、NKCS1、EGF1R、EGFR-VIII、ADGRE2、CCR1、LILRB2、PRAME、HPV E6がんタンパク質、およびHPV E7がんタンパク質が挙げられる。ある特定の実施形態では、腫瘍抗原はCD19である。

【0092】

ある特定の実施形態では、CARはCD19ポリペプチドに結合する。ある特定の実施形態では、CARはヒトCD19ポリペプチドに結合する。ある特定の実施形態では、ヒトCD19ポリペプチドは、配列番号1に記されるアミノ酸配列またはその一部分を含む。配列番号1を以下に提供する。

【化1】

PEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLLKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQ
MGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAK
DRPEIWEGEPPCLPPRDSLNQSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKD
DRPARDMWVWMTGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWK [配列番号
1]

【0093】

ある特定の実施形態では、CARは、CD19（例えば、ヒトCD19）の細胞外ドメインに結合する。

【0094】

ある特定の実施形態では、CARは、例えば、病原体感染または他の感染性疾患の処置および／または予防に使用するために、病原体抗原に結合する。病原体の非限定的な例としては、疾患を引き起こすことができる、ウイルス、細菌、真菌、寄生生物および原虫が挙げられる。

【0095】

ウイルスの非限定的な例としては、Retroviridae（例えば、ヒト免疫不全

ウイルス、例えば、HIV-1 (HDTV-IIII、LAVEもしくはHTLV-IIII / LAV、またはHIV-IIII、；およびHIV-LPなどの他の分離株；Picornaviridae (例えば、ポリオウイルス、A型肝炎ウイルス；エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス)；Caliciviridae (Calciviridae) (例えば、胃腸炎を引き起こす株)；Togaviridae (例えば、ウマ脳炎ウイルス、風疹ウイルス)；Flaviviridae (Flaviridae) (例えば、デングウイルス、脳炎ウイルス、黄熱ウイルス)；Coronaviridae (Coronaviridae) (例えばコロナウイルス)；Rhabdoviridae (例えば、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス)；Filoviridae (例えば、エボラウイルス)；Paramyxoviridae (例えば、パラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス)；Orthomyxoviridae (例えば、インフルエンザウイルス)；Bunyaviridae (Bungaviridae) (例えば、ハンタウイルス、ブンガウイルス、フレボウイルスおよびナイラウイルス)；Arenaviridae (Arenaviridae) (出血熱ウイルス)；Reoviridae (例えば、レオウイルス、オルビウイルスおよびロタウイルス)；Birnaviridae；Hepadnaviridae (B型肝炎ウイルス)；Parvoviridae (Parvovirida) (パルボウイルス)；Papovaviridae (パピローマウイルス、ポリオーマウイルス)；Adenoviridae (ほとんどのアデノウイルス)；Herpesviridae (単純ヘルペスウイルス (HSV) 1および2、水痘帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス (CMV)、ヘルペスウイルス)；Poxviridae (例えば、天然痘ウイルス、ワクチニアウイルス、ポックスウイルス)；およびIridoviridae (例えば、アフリカ豚熱ウイルス)；ならびに未分類のウイルス (例えば、デルタ肝炎 (B型肝炎ウイルスの欠陥サテライトであると考えられる) のエージェント、非A型、非B型肝炎 (クラス1 = 内部感染、クラス2 = 非経口感染 (すなわち、C型肝炎) のエージェント)；ノーウォークおよび関連ウイルス、ならびにアストロウイルス)、ヒトパピローマウイルス (すなわち、HPV)、JCウイルス、エプスタイン・バー・ウイルス、メルケル細胞ポリオーマウイルスが挙げられる。

【0096】

細菌の非限定的な例としては、Pasteurella、ブドウ球菌 (Staphylococci)、レンサ球菌 (Streptococcus)、大腸菌 (Escherichia coli)、Pseudomonas種、およびSalmonella種が挙げられる。感染性細菌の具体例としては、Helicobacter pylori、Borelia burgdorferi、Legionella pneumophila、Mycobacteria種 (例えば、M. tuberculosis、M. avium、M. intracellulare、M. kansasii、M. goodii)、Staphylococcus aureus、Neisseria gonorrhoeae、Neisseria meningitidis、Listeria monocytogenes、Streptococcus pyogenes (A群 Streptococcus)、Streptococcus agalactiae (B群 Streptococcus)、Streptococcus (viridans 群)、Streptococcus faecalis、Streptococcus bovis、Streptococcus (anaerobic種)、Streptococcus pneumoniae、病原性Campylobacter種、Enterococcus種、Haemophilus influenzae、Bacillus anthracis、Corynebacterium diphtheriae、Corynebacterium種、Erysipelothrix rhusiopathiae、Clostridium perfringens、Clostridium tetani、Enterobacter aerogenes、Klebsiella pneumoniae、Pasteurella multocida、Bacteroides種、Fus

obacterium nucleatum, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia*, *Clostridium difficile*, および *Actinomyces israelii*. が挙げられる。
【0097】

ある特定の実施形態では、病原体抗原は、サイトメガロウイルス (CMV) 中に存在するウイルス抗原、エプスタイン・バール・ウイルス (EBV) 中に存在するウイルス抗原、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 中に存在するウイルス抗原、またはインフルエンザウイルス中に存在するウイルス抗原である。

5. 2. 2. CARの細胞外抗原結合ドメイン

【0098】

ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは *scFv* を含む。ある特定の実施形態では、*scFv* はヒト *scFv* である。ある特定の実施形態では、*scFv* はヒト化 *scFv* である。ある特定の実施形態では、*scFv* はマウス *scFv* である。ある特定の実施形態では、*scFv* は、*scFv* ファージライブラリを抗原-Fc 融合タンパク質でスクリーニングすることによって同定される。

【0099】

ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは Fab を含む。ある特定の実施形態では、Fab は架橋されている。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは $F(ab)_2$ を含む。前述の分子のいずれかは、異種配列との融合タンパク質に含まれて、細胞外抗原結合ドメインを形成してもよい。

【0100】

ある特定の実施形態では、CARの細胞外抗原結合ドメイン (例えば、*scFv*) は、約 1×10^{-6} M またはそれ未満の解離定数 (K_d) で抗原に結合する。ある特定の実施形態では、 K_d は、約 1×10^{-6} M もしくはそれ未満、約 1×10^{-7} M もしくはそれ未満、約 1×10^{-8} M もしくはそれ未満、または約 1×10^{-9} M もしくはそれ未満である。ある特定の非限定的な実施形態では、 K_d は約 1×10^{-8} M またはそれ未満である。ある特定の非限定的な実施形態では、 K_d は約 1×10^{-9} M またはそれ未満である。

【0101】

CARの細胞外抗原結合ドメインの結合は、例えば、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA)、FACS分析、バイオアッセイ (例えば、成長阻害)、またはウエスタンブロットアッセイによって確認することができる。これらのアッセイの各々は、一般に、目的の複合体に特異的な標識された試薬 (例えば、抗体、または *scFv*) を用いることによって、特定の目的のタンパク質-抗体複合体の存在を検出する。例えば、*scFv* を、放射性標識することができ、ラジオイムノアッセイ (RIA) で使用することができる (例えば、参照により本明細書に組み込まれる Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, 1986年3月を参照)。放射性同位体は、 γ カウンターやシンチレーションカウンターなどの手段またはオートラジオグラフィーによって検出することができる。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、蛍光マーカーで標識される。蛍光マーカーの非限定的な例としては、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、青色蛍光タンパク質 (例えば、EBFP、EBFP2、Azurite、および mKalamal)、シアン蛍光タンパク質 (例えば、ECFP、Cerulean、および CyPet)、および黄色蛍光タンパク質 (例えば、YFP、Citrine、Venus、および YPet) が挙げられる。一実施形態では、ヒト *scFv* は、GFP で標識される。

【0102】

ある特定の実施形態では、CDRは、IMGTナンバリングシステムに従って特定される。

10

20

30

40

50

【0103】

ある特定の実施形態では、CARの細胞外抗原結合ドメイン（例えば、scFv）は、配列番号2に記されるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、CD19ポリペプチド（例えば、ヒトCD19ポリペプチド、例えば、アミノ酸配列配列番号1を有するヒトCD19ポリペプチドまたはその一部分）に特異的に結合する。

【0104】

ある特定の実施形態では、CARの細胞外抗原結合ドメイン（例えば、scFv）は、配列番号3に記されるアミノ酸配列に対して、少なくとも約80%（例えば、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%）相同または同一であるアミノ酸配列を含むV_Hを含む。例えば、CARの細胞外抗原結合ドメイン（例えば、scFv）は、配列番号3に記されるアミノ酸配列に対して、約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約100%相同または同一であるアミノ酸配列を含むV_Hを含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号3に記されるアミノ酸配列を含むV_Hを含む。配列番号3を以下の表1に提供する。

【0105】

ある特定の実施形態では、CARの細胞外抗原結合ドメイン（例えば、scFv）は、配列番号4に記されるアミノ酸配列に対して、少なくとも約80%（例えば、少なくとも約81%、少なくとも約82%、少なくとも約83%、少なくとも約84%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%）相同または同一であるアミノ酸配列を含むV_Lを含む。例えば、CARの細胞外抗原結合ドメイン（例えば、scFv）は、配列番号4に記されるアミノ酸配列に対して、約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約100%相同または同一であるアミノ酸配列を含むV_Lを含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、配列番号4に記されるアミノ酸配列を含むV_Hを含む。配列番号4を以下の表1に提供する。

【0106】

ある特定の実施形態では、CARの細胞外抗原結合ドメインは、配列番号3に記されるアミノ酸配列を含むV_H、および配列番号4に記されるアミノ酸配列を含むV_Lを含む。ある特定の実施形態では、V_HおよびV_Lは、リンカーを介して連結される。ある特定の実施形態では、リンカーは、配列番号5に記されるアミノ酸配列を含む。配列番号5を以下に提供する。

【化2】

GGGGSGGGGSGGGGS [配列番号 5]

【0107】

ある特定の実施形態では、CARの細胞外抗原結合ドメイン（例えば、scFv）は、配列番号6に記されるアミノ酸配列またはその保存的改変を含むV_H CDR1、配列番号7に記されるアミノ酸配列またはその保存的改変を含むV_H CDR2、および配列番号8に記されるアミノ酸配列またはその保存的改変を含むV_H CDR3を含む。配列番号6～8を表1に提供する。

【0108】

ある特定の実施形態では、CARの細胞外抗原結合ドメイン（例えば、scFv）は、配列番号9に記されるアミノ酸配列またはその保存的改変を含むV_L CDR1、配列番号10に記されるアミノ酸配列またはその保存的改変を含むV_L CDR2、および配列番号11に記されるアミノ酸配列またはその保存的改変を含むV_L CDR3を含む。配列番号9～11を表1に提供する。

【0109】

ある特定の実施形態では、CARの細胞外抗原結合ドメイン（例えば、scFv）は、配列番号6に記されるアミノ酸配列またはその保存的改変を含むV_H CDR1、配列番号7に記されるアミノ酸配列またはその保存的改変を含むV_H CDR2、配列番号8に記されるアミノ酸配列またはその保存的改変を含むV_H CDR3、配列番号9に記されるアミノ酸配列またはその保存的改変を含むV_L CDR1、配列番号10に記されるアミノ酸配列またはその保存的改変を含むV_L CDR2、および配列番号11に記されるアミノ酸配列またはその保存的改変を含むV_L CDR3を含む。

【0110】

ある特定の実施形態では、CARの細胞外抗原結合ドメイン（例えば、scFv）は、配列番号6に記されるアミノ酸配列を含むV_H CDR1、配列番号7に記されるアミノ酸配列を含むV_H CDR2、配列番号8に記されるアミノ酸配列を含むV_H CDR3、配列番号9に記されるアミノ酸配列を含むV_L CDR1、配列番号10に記されるアミノ酸配列を含むV_L CDR2、および配列番号11に記されるアミノ酸配列を含むV_L CDR3を含む。

表1

【表1】

抗原	CD19		
CDRs	1	2	3
V _H	GYAFSS [配列番号 6]	YPGDGD [配列番号 7]	KTISSVVD [配列番号 8]
V _L	NVGTNVA [配列番号 9]	SATYRN [配列番号 10]	FCQQYNRY [配列番号 11]
完全なV _H	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPQGGLWIGQIYPGDGDTNY NGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDYFDYWGQGTITVTV SS [配列番号 3]		
完全なV _L	DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPD RFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKR [配列番号 4]		
scFv	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPQGGLWIGQIYPGDGDTNY NGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDYFDYWGQGTITVTV SSGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQS PKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTK LEIKR [配列番号 2]		

【0111】

本明細書で使用される場合、「保存的配列改変」という用語は、アミノ酸配列を含む本開示のCAR（例えば、CARの細胞外抗原結合ドメイン）の結合特性に有意には影響を及ぼさないか、または変更させないアミノ酸改変を指す。保存的改変には、アミノ酸の置換、付加および欠失が含まれ得る。改変は、部位特異的変異誘発およびPCR媒介変異誘

発などの当技術分野で公知の標準的な技術によって、本開示のCARのヒトscFvに導入することができる。アミノ酸は、電荷および極性などの物理化学的特性によって、群に分類することができる。保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基が同じ群内のアミノ酸で置き換えられたものである。例えば、アミノ酸は電荷によって分類することができる：正に荷電したアミノ酸にはリジン、アルギニン、ヒスチジンが含まれ、負に荷電したアミノ酸にはアスパラギン酸、グルタミン酸が含まれ、中性電荷のアミノ酸にはアラニン、アスパラギン、システイン、グルタミン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、およびバリンが含まれる。さらに、アミノ酸は極性によって分類することができる：極性アミノ酸には、アルギニン（塩基性極性）、アスパラギン、アスパラギン酸（酸性極性）、グルタミン酸（酸性極性）、グルタミン、ヒスチジン（塩基性極性）、リジン（塩基性極性）、セリン、トレオニン、およびチロシンが含まれ；非極性アミノ酸には、アラニン、システイン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、およびバリンが含まれる。したがって、CDR領域内の1個またはそれを超えるアミノ酸残基を同じ群からの他のアミノ酸残基で置き換えることができ、変更した抗体を、本明細書に記載の機能アッセイを使用して、保持された機能（すなわち、上記（c）から（l）に記される機能）について試験することができる。ある特定の実施形態では、指定の配列またはCDR領域内の1個以下、2個以下、3個以下、4個以下、5個以下の残基が変更される。

【0112】

指定の配列（例えば、配列番号3および4）に対して、少なくとも約80%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%（例えば、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、または約99%）の相同性または同一性を有するV_Hおよび／またはV_Lアミノ酸配列は、特定の配列（複数可）と比較して置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含み得るが、標的抗原（例えば、CD19）に結合する能力は保持する。ある特定の実施形態では、合計で1～10個のアミノ酸が、特定の配列（例えば、配列番号3および4）において置換、挿入および／または欠失される。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、細胞外抗原結合ドメインのCDR（例えば、FR）の外側の領域で起こる。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、配列（配列番号3および4）の翻訳後修飾を含む、配列番号3および4からなる群から選択されるV_Hおよび／またはV_L配列を含む。

5.2.3. CARの膜貫通ドメイン

【0113】

ある特定の非限定的な実施形態では、CARの膜貫通ドメインは、膜の少なくとも一部分に広がる疎水性アルファヘリックスを含む。異なる膜貫通ドメインは、異なる受容体安定性をもたらす。抗原認識後、受容体クラスターおよびシグナルが細胞に伝えられる。ある特定の実施形態では、CARの膜貫通ドメインは、CD8、CD28、CD3ζ、CD4、4-1BB、OX40、ICOS、CD84、CD166、CD8a、CD8b、ICAM-1、CTLA-4、CD27、CD40、NKGD2、もしくはそれらの組合せの天然型または改変型膜貫通ドメインを含む。

【0114】

ある特定の実施形態では、CARの膜貫通ドメインは、CD28ポリペプチド（例えば、CD28の膜貫通ドメインまたはその一部分）を含む。ある特定の実施形態では、CARの膜貫通ドメインは、ヒトCD28の膜貫通ドメインまたはその一部分を含む。ある特定の実施形態では、CD28ポリペプチドは、NCBI参照番号：NP_006130（配列番号12）を有するアミノ酸配列またはその断片に対して、少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または100%相同または同一であるアミノ酸配列を含むかもしくはそれからなり、および／または必要に応じて最

大1つまたは最大2つまたは最大3つの保存的アミノ酸置換を含んでもよい。ある特定の
実施形態では、CD28ポリペプチドは、配列番号12の連続する部分であるアミノ酸配
列を含むかまたはそれからなり、少なくとも20個、または少なくとも30個、または少
なくとも40個、または少なくとも50個、および最大220個のアミノ酸長である。あ
る特定の実施形態では、CD28ポリペプチドは、配列番号12のアミノ酸1～220位
、1～50位、50～100位、100～150位、150～200位、153～179
位、または200～220位のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の
実施形態では、CARの膜貫通ドメインは、配列番号12のアミノ酸153～179位を含
むか、またはそれらからなるCD28ポリペプチドを含む。配列番号12を以下に提供す
る。

10

【化3】

```
1   MLRLLALNL FPSIQVTGNK ILVKQSPMLV AYDNAVNLSC KYSYNLFSRE FRASLHKGLD
61  SAVEVCVVYG NYSQQLQVYS KTGFNC DGKL GNESVT FYLQ NLYVNQTDIY FCKIEVMYPP
121 PYLDNEKSNG TIIHVKGKHL CPSPLFPGPS KPFWLVVVG GVLACYSLLV TVAFIIFWVR
181 SKRSRL LHS D YMNMTPRRPG PTRKHYQPYA PPRDFAAYRS [ 配列番号 12]
```

【0115】

配列番号12のアミノ酸153～179位をコードする例示的なヌクレオチド配列は、
以下に提供される配列番号13に記されている。

20

【化4】

```
TTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTAT
TTTCTGGGTG[ 配列番号 13]
```

【0116】

ある特定の実施形態では、CARの膜貫通ドメインは、マウスCD28の膜貫通ドメイ
ンまたはその一部分を含む。ある特定の実施形態では、CD28ポリペプチドは、NCB
I参照番号：NP__031668.3（配列番号14）を有する配列に対して、少なくと
も約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または10
0%相同または同一であるアミノ酸配列またはその断片を含むかもしくはそれからなり、
および／または必要に応じて最大1つまたは最大2つまたは最大3つの保存的アミノ酸置
換を含んでもよい。非限定的なある特定の実施形態では、CD28ポリペプチドは、配列
番号14の連続する部分であるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、少なくと
も20個、または少なくとも30個、または少なくとも40個、または少なくとも50個、お
よび最大218個のアミノ酸長である。ある特定の実施形態では、CD28ポリペプチド
は、配列番号14のアミノ酸1～220位、1～50位、50～100位、100～15
0位、150～200位、151～177位、または200～218位のアミノ酸配列を
含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、CARの膜貫通ドメインは、配列
番号14のアミノ酸151～177位を含むか、またはそれらからなるCD28ポリペプ
チドを含む。配列番号14を以下に提供する。

30

【化5】

```
1   MTLRLLFLAL NFFSVQVTEN KILVKQSPLL VVDSNEVSLS CRYSYNLLAK EFRASLYKGV
61  NSDVEVCVGN GNFTYQPQFR SNAEFNC DGD FDNETVTFRL WNLHVNHTDI YFCKIEFYMP
121 PPYLDNERSN GTIIHIKEKH LCHTQSSPKL FWALVVVAGV LFCYGLLVTV ALCVIWTNSR
181 RNRL LQSDYM NMTPRRPGLT RKPYPYAPA R DFAAYRP [ 配列番号 14]
```

40

【0117】

ある特定の実施形態では、CARの膜貫通ドメインは、CD8ポリペプチド（例えば、
CD8の膜貫通ドメインまたはその一部分）を含む。ある特定の実施形態では、CARの

50

膜貫通ドメインは、ヒトCD8の膜貫通ドメインまたはその一部分を含む。ある特定の実施形態では、CD8ポリペプチドは、NCBI参照番号：NP_001139345.1（配列番号15）を有する配列に対して、少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約100%相同または同一であるアミノ酸配列またはその断片を含むかもしくはそれからなり、および／または必要に応じて最大1つまたは最大2つまたは最大3つの保存的アミノ酸置換を含んでもよい。ある特定の実施形態では、CD8ポリペプチドは、配列番号15の連続する部分であるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、少なくとも20個、または少なくとも30個、または少なくとも40個、または少なくとも50個、および最大235個のアミノ酸長である。ある特定の実施形態では、CD8ポリペプチドは、配列番号15のアミノ酸1～235位、1～500位、50～100位、100～150位、150～200位、137～209位、または200～235位のアミノ酸配列を含むかまたはそれを有する。ある特定の実施形態では、CARの膜貫通ドメインは、配列番号15のアミノ酸137～209位を含むか、またはそれらからなるCD8ポリペプチドを含む。配列番号15を以下に提供する。

【化6】

```
MALPVTALLPLIALLLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLFQPRGAAASPTFLIL
YLSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPA
PRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRR
VCKCPRPVVKSGDKPSLSARYV [ 配列番号 15]
```

【0118】

ある特定の実施形態では、CARの膜貫通ドメインは、マウスCD8の膜貫通ドメインまたはその一部分を含む。ある特定の実施形態では、CD8ポリペプチドは、NCBI参照番号：AAA92533.1（配列番号16）を有する配列に対して、少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約100%相同または同一であるアミノ酸配列またはその断片を含むかもしくはそれからなり、および／または必要に応じて最大1つまたは最大2つまたは最大3つの保存的アミノ酸置換を含んでもよい。ある特定の実施形態では、CD8ポリペプチドは、配列番号16の連続する部分であるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、少なくとも約20個、または少なくとも約30個、または少なくとも約40個、または少なくとも約50個、または少なくとも約60個、または少なくとも約70個、または少なくとも約100個、または少なくとも約200個、および最大247個のアミノ酸長である。ある特定の実施形態では、CD8ポリペプチドは、配列番号16のアミノ酸1～247位、1～500位、50～1000位、100～1500位、150～2000位、151～219位、または200～247位のアミノ酸配列を含むかまたはそれを有する。ある特定の実施形態では、CARの膜貫通ドメインは、配列番号16のアミノ酸151～219を含むか、またはそれらからなるCD8ポリペプチドを含む。配列番号16を以下に提供する。

【化7】

```
1 MASPLTRFLS LNLMLGESI ILGSGEAKPQ APELRIFPKK MDAELGQKVD LVCEVLGVS
61 QGCSWLFQNS SSKLPQPTFV VYMASSHNKI TWDEKLNSSK LFSVRDNTN KYVLTLNKF
121 KENEGYYFCS VISNSVMYFS SVVPVLQVN STTTKPVLR TSPVHPTGTS QPQRPEDCRP
181 RGSVKGTGLD FACDIYIWAP LAGICVAPLL SLIITLICYH RSRKRVCKCP RPLVRQEGKP
241 RPSEKIV [ 配列番号 16]
```

【0119】

ある特定の実施形態では、CARは、細胞外抗原結合ドメインを膜貫通ドメインに連結するスペーサー領域をさらに含む。スペーサー領域は、CARの活性化活性を維持しながら抗原認識を促進するように、抗原結合ドメインが異なる方向に配向することを可能にする

るのに十分に柔軟であり得る。

【0120】

ある特定の実施形態では、CARのヒンジ／スペーサー領域は、CD8、CD28、CD3 ζ 、CD40、4-1BB、OX40、CD84、CD166、CD8a、CD8b、ICOS、ICAM-1、CTLA-4、CD27、CD40、NKGD2、合成ポリペプチド（免疫応答に関連するタンパク質に基づかない）、もしくはそれらの組合せの天然型または改変型ヒンジ領域を含む。ヒンジ／スペーサー領域は、IgG1由来のヒンジ領域、または免疫グロブリンのCH₂CH₃領域およびCD3の一部、CD28ポリペプチドの一部（例えば、配列番号12または14の一部）、CD8ポリペプチドの一部（例えば、配列番号15または16の一部）、前述のいずれかに対して、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または少なくとも約100%相同または同一である前述のいずれかの変形体、または合成スペーサー配列であり得る。

10

5.2.4. CARの細胞内シグナリングドメイン

【0121】

ある特定の実施形態では、CARは細胞内シグナリングドメインを含む。ある特定の実施形態では、CARの細胞内シグナリングドメインはCD3 ζ ポリペプチドを含む。CD3 ζ は、細胞（例えば、リンパ系の細胞、例えばT細胞）を活性化または刺激することができる。野生型（「天然型」）CD3 ζ は、3つの機能的免疫受容体活性化チロシンモチーフ（ITAM）、3つの機能的塩基性リッチストレッチ（BRS）領域（BRS1、BRS2およびBRS3）を含む。CD3 ζ は、抗原が結合した後、活性化シグナルを細胞（例えば、リンパ系の細胞、例えば、T細胞）に伝える。CD3 ζ 鎖の細胞内シグナリングドメインは、内因性TCRからのシグナルの一次伝達物質である。

20

【0122】

ある特定の実施形態では、CARの細胞内シグナリングドメインは、天然型CD3 ζ を含む。ある特定の実施形態では、CD3 ζ ポリペプチドは、NCBI参照番号：NP_932170（配列番号17）を有する配列に対して、少なくとも約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約100%相同または同一であるアミノ酸配列またはその断片を含むかもしくはそれからなり、および／または必要に応じて最大1つまたは最大2つまたは最大3つの保守的アミノ酸置換を含んでもよい。ある特定の実施形態では、CD3 ζ ポリペプチドは、配列番号17の連続する部分であるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、少なくとも20個、または少なくとも30個、または少なくとも40個、または少なくとも50個、および最大164個のアミノ酸長である。ある特定の実施形態では、CD3 ζ ポリペプチドは、配列番号17のアミノ酸1～164位、1～50位、50～100位、52～164位、100～150位、または150～164位のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。ある特定の実施形態では、CARの細胞内シグナリングドメインは、配列番号17のアミノ酸52～164位を含むか、またはそれからなるCD3 ζ ポリペプチドを含む。配列番号17を以下に提供する。

30

【化8】

```
1  MKWKALFTAA ILQAQLPITE AQSFGLLDPK LCYLLDGILF IYGVILTALF LRVKFSRSAD
61  APAYQQGQNG LYNELNLGRR EEYDVLDRR GRDPEMGGKP QRRKNPQEGY YNELQKDKMA
121 EAYSEIGMKG EERRGKGHDG LYQGLSTATK DTYDALHMQA LPPR [ 配列番号 17]
```

40

【0123】

ある特定の実施形態では、CARの細胞内シグナリングドメインは、配列番号18に記載されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなるCD3 ζ ポリペプチドを含む。配列番号18を以下に提供する。

50

【化 9】

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPFMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY
SEIGMKGERRRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR [配列番号 18]

【0124】

ある特定の実施形態では、CARの細胞内シグナリングドメインは、少なくとも1つの共刺激シグナリングドメインをさらに含む。ある特定の実施形態では、少なくとも1つの共刺激シグナリングドメインは、少なくとも1つの共刺激分子またはその一部分を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも1つの共刺激シグナリングドメインは、少なくとも1つの共刺激分子の細胞内ドメインまたはその一部分を含む。

10

【0125】

本明細書で使用される場合、「共刺激分子」は、抗原に対するリンパ球の効率的な応答を提供することができる抗原受容体またはそのリガンド以外の細胞表面分子を指す。ある特定の実施形態では、共刺激分子は、最適なリンパ球活性化をもたらし得る。共刺激分子の非限定的な例としては、CD28、4-1BB、OX40、ICOS、DAP-10、CD27、CD40、NKGD2、CD2、FN14、HVEM、LTBR、CD28H、TNFR1、TNFR2、BAFF-R、BCMA、TACI、TROY、RANK、CD40、CD27、CD30、EDAR、XEDAR、GITR、DR6、およびNGFR、ならびにそれらの組合せが挙げられる。共刺激分子は、共刺激リガンドに結合することができ、これは、その受容体に結合すると、共刺激応答（すなわち、CARがその標的抗原に結合する場合にもたらされる刺激に影響を及ぼす細胞内応答）を生じる、細胞表面上に発現されるタンパク質である。

20

【0126】

ある特定の実施形態では、少なくとも1つの共刺激シグナリングドメインは、変異型Y MNMモチーフを含むCD28ポリペプチドを含む。

【0127】

CD28は、共刺激分子としてのその機能を通じてT細胞活性化において重要な役割を果たす膜貫通タンパク質である。CD28は、分化クラスター28、Tp44、およびCD28分子としても公知である。CD28は、CD28の効果的なシグナリングのために重要な細胞内モチーフを含む細胞内ドメインを保有する。ある特定の実施形態では、CD28細胞内ドメインは、TCR刺激後のシグナリング経路を調節する細胞内サブドメイン（「細胞内モチーフ」としても公知）を含む。

30

【0128】

CD28は、3つの細胞内モチーフ：Y MNMモチーフならびに2つのプロリンに富んだモチーフ：PRRPモチーフおよびPYAPモチーフを含む。CD28細胞内モチーフは、それらのSH2またはSH3ドメインを介してこれらのモチーフと相互作用する、いくつかのアダプター分子のドッキング部位として役立ち得る。そのような相互作用は、遺伝子発現を調節する転写因子で終結する下流のシグナルを伝達する。例えば、天然型Y MNMモチーフは、ホスホイノシチド3-キナーゼ（PI3K）のp85サブユニットに結合する。天然型Y MNMモチーフはまた、成長因子受容体結合タンパク質2（Grb2）および／またはGrb2関連アダプタータンパク質2（GADS）に結合する。Grb2はGab1およびGab2に結合し、次にPI3Kのp85サブユニットを動員することができる。

40

【0129】

ある特定の実施形態では、天然型Y MNMモチーフは、Y MNM（配列番号19）に記されるアミノ酸配列からなる。ある特定の実施形態では、天然型Y MNMモチーフは、コンセンサス配列Y M x M（配列番号20）を介してPI3Kのp85サブユニットに結合し、xはアスパラギン酸（N）ではない。ある特定の実施形態では、天然型Y MNMモチーフは、コンセンサス配列Y x N x（配列番号21）を介してGrb2および／またはGADSに結合し、xはメチオニン（M）ではない。

50

【0130】

ある特定の実施形態では、本開示の変異型YMNMMモチーフを含むCD28ポリペプチドは、天然型YMNMMモチーフを含むCD28分子と比較して、PI3Kのp85サブユニットの動員を減少させている。

【0131】

ある特定の実施形態では、PI3Kのp85サブユニットは変異型YMNMMモチーフに結合せず、それによってCD28ポリペプチドへのPI3Kのp85サブユニットの動員を減少させる。PI3Kのp85サブユニットの結合をブロックする変異型YMNMMモチーフは、Grb2および／またはGADSへのその結合を保持する。したがって、Grb2／GADSの下流シグナリングはインタクトのままであり、例えばIL-2分泌をもたらす下流シグナリングはインタクトのままである。そのような変異型YMNMMモチーフは、「GADS／Grb2許容変異体」と呼ばれる。

10

【0132】

ある特定の実施形態では、変異型YMNMMは、PI3Kのp85サブユニットに結合するが、Grb2および／またはGADSには結合しない。PI3K p85の結合が保持されるので、PI3Kの下流シグナリングはインタクトで保持される。Grb2／GADSの結合がブロックされるので、Gab1およびGab2へのGrb2の結合によって引き起こされるPI3K p85サブユニットの動員が減少またはブロックされる。さらに、Grb2／GADSの下流シグナリングはブロックされる。そのような変異型YMNMMモチーフは、「PI3K許容性変異体」と呼ばれる。

20

【0133】

ある特定の実施形態では、変異型YMNMMは、PI3Kのp85サブユニットに結合せず、Grb2および／またはGADSには結合しない。そのような変異型YMNMMモチーフは、「非機能性変異体」と呼ばれる。非機能性変異体は、YMNMMモチーフでのCD28へのPI3K、Grb2、またはGADSの結合をもたらさないが、これらのシグナリング分子がCD28分子の他の場所に結合することを排除しない。

【0134】

ある特定の実施形態では、変異型YMNMMは、YMNMMモチーフ中に存在する2個のメチオニン残基のうちのただ1個のメチオニン残基を保持する（すなわちYMXxまたはYxxM）。これらのモチーフは、PI3Kのp85サブユニットに結合できるメチオニン残基の数を制限することによって、PI3Kを介したシグナリングを調節する可能性がある。そのような変異型YMNMMモチーフは、「ハイブリッド「HEMI」変異体」と呼ばれる。

30

5.2.4.1. GADS／Grb-2許容変異体

【0135】

ある特定の実施形態では、変異型YMNMMモチーフは、GADS／Grb-2許容変異体である。ある特定の実施形態では、変異型YMNMMモチーフは、YxNx（配列番号21）に記されるアミノ酸配列からなり、xはメチオニン（M）ではない。ある特定の実施形態では、xは、アミノ酸A、R、N、D、C、E、Q、G、H、I、K、F、P、S、T、W、Y、V、およびLからなる群から選択される。ある特定の実施形態では、変異型YMNMMモチーフは、YENV（配列番号22）、YSNV（配列番号23）、YKNL（配列番号24）、YENQ（配列番号25）、YKNI（配列番号26）、YINQ（配列番号27）、YHNK（配列番号28）、YVNQ（配列番号29）、YLNP（配列番号30）、YLNT（配列番号31）、YDND（配列番号66）、YENI（配列番号67）、YENL（配列番号68）、YKNQ（配列番号72）、YKNV（配列番号73）、またはYANG（配列番号87）に記されるアミノ酸配列からなる。ある特定の実施形態では、変異型YMNMMモチーフは、YSNV（配列番号23）に記されるアミノ酸配列からなる。ある特定の実施形態では、変異型YMNMMモチーフは、YKNI（配列番号26）に記されるアミノ酸配列からなる。ある特定の実施形態では、変異型YMNMMモチーフは、YENV（配列番号22）に記されるアミノ酸配列からなる。ある特定の

40

50

実施形態では、変異型 Y M N M モチーフは、Y K N L（配列番号 24）に記されるアミノ酸配列からなる。

5.2.4.2. P I 3 K 許容性変異体

【0136】

ある特定の実施形態では、変異型 Y M N M モチーフは、P I 3 K 許容性変異体である。ある特定の実施形態では、変異型 Y M N M モチーフは、Y M x M（配列番号 20）に記されるアミノ酸配列からなり、x はアスパラギン酸（N）ではない。ある特定の実施形態では、x は、アミノ酸 A、R、D、C、E、Q、G、H、I、K、M、F、P、S、T、W、Y、V、および L からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、変異型 Y M N M モチーフは、Y M D M（配列番号 32）、Y M P M（配列番号 79）、Y M R M（配列番号 37）、または Y M S M（配列番号 80）に記されるアミノ酸配列からなる。ある特定の実施形態では、変異型 Y M N M モチーフは、Y M D M（配列番号 32）に記されるアミノ酸配列からなる。

10

【0137】

ある特定の実施形態では、変異型 Y M N M モチーフは、Y b x M（配列番号 33）に記されるアミノ酸配列からなり、x はアスパラギン酸（N）ではなく、b はメチオニン（M）ではない。ある特定の実施形態では、x は、アミノ酸 A、R、D、C、E、Q、G、H、I、K、M、F、P、S、T、W、Y、V、および L からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、b は、アミノ酸 A、R、N、C、E、Q、G、H、I、K、N、F、P、S、T、W、Y、V、および L からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、変異型 Y M N M モチーフは、Y T H M（配列番号 34）、Y V L M（配列番号 35）、Y I A M（配列番号 36）、Y V E M（配列番号 83）、Y V K M（配列番号 85）、または Y V P M（配列番号 86）に記されるアミノ酸配列からなる。

20

【0138】

ある特定の実施形態では、変異型 Y M N M モチーフは、Y M x b（配列番号 65）に記されるアミノ酸配列からなり、x はアスパラギン酸（N）ではなく、b はメチオニン（M）ではない。ある特定の実施形態では、x は、アミノ酸 A、R、D、C、E、Q、G、H、I、K、M、F、P、S、T、W、Y、V、および L からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、b は、アミノ酸 A、R、N、C、E、Q、G、H、I、K、N、F、P、S、T、W、Y、V、および L からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、変異型 Y M N M モチーフは、Y M A P（配列番号 77）に記されるアミノ酸配列からなる。

30

【0139】

ある特定の変異型 Y M N M モチーフは、Mol Cell Proteomics. 2010 11月; 9(11): 2391-404; Virology. 2015 5月; 0: 568-577 に記載されており、その両方が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

5.2.4.3. ハイブリッド「H E M I」変異体

【0140】

ある特定の実施形態では、変異型 Y M N M モチーフは、ハイブリッド「H E M I」変異体である。ある特定の実施形態では、変異型 Y M N M モチーフは、Y M N x（配列番号 38）または Y x N M（配列番号 39）に記されるアミノ酸配列からなり、x はメチオニン（M）ではない。ある特定の実施形態では、x は、アミノ酸 A、R、N、C、E、Q、G、H、I、K、N、F、P、S、T、W、Y、V、および L からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、変異型 Y M N M モチーフは、Y M N V（配列番号 40）、Y E N M（配列番号 41）、Y M N Q（配列番号 42）、Y M N L（配列番号 78）、または Y S N M（配列番号 81）に記されるアミノ酸配列からなる。

40

5.2.4.4. 非機能性変異体

【0141】

ある特定の実施形態では、変異型 Y M N M モチーフは、非機能性変異体である。ある特

50

定の実施形態では、変異型 Y M N M モチーフは、アミノ酸配列 Y b x b (配列番号 43) からなり、x はアスパラギン酸 (N) ではなく、b はメチオニン (M) ではない。ある特定の実施形態では、x は、A、R、D、C、E、Q、G、H、I、K、M、F、P、S、T、W、Y、V、および L からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、b は、A、R、N、D、C、E、Q、G、H、I、K、F、P、S、T、W、Y、V、および L からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、変異型 Y M N M モチーフは、Y G G G (配列番号 44)、Y A A A (配列番号 45)、Y F F F (配列番号 46)、Y E T V (配列番号 69)、Y Q Q Q (配列番号 70)、Y H A E (配列番号 71)、Y L D L (配列番号 74)、Y L I P (配列番号 75)、Y L R V (配列番号 76)、Y T A V (配列番号 82)、または Y V H V (配列番号 84) に記されるアミノ酸配列からなる。ある特定の実施形態では、変異型 Y M N M モチーフは、Y G G G (配列番号 44) に記されるアミノ酸配列からなる。

10

【0142】

ある特定の実施形態では、C A R の細胞内シグナリングドメインは、Y E N V (配列番号 22) に記されるアミノ酸配列からなる変異型 Y M N M モチーフを含む C D 28 ポリペプチドを含む共刺激シグナリングドメインを含み、C D 28 ポリペプチドは配列番号 47 に記されるアミノ酸配列からなる。配列番号 47 を以下に提供する。

【化10】

RSKRSRLHSDYENVTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS [配列番号 47]

20

【0143】

ある特定の実施形態では、C A R の細胞内シグナリングドメインは、Y K N I (配列番号 26) に記されるアミノ酸配列からなる変異型 Y M N M モチーフを含む C D 28 ポリペプチドを含む共刺激シグナリングドメインを含み、C D 28 ポリペプチドは配列番号 48 に記されるアミノ酸配列からなる。配列番号 48 を以下に提供する。

【化11】

RSKRSRLHSDYKNITPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS [配列番号 48]

【0144】

ある特定の実施形態では、C A R の細胞内シグナリングドメインは、Y M D M (配列番号 32) に記されるアミノ酸配列からなる変異型 Y M N M モチーフを含む C D 28 ポリペプチドを含む共刺激シグナリングドメインを含み、C D 28 ポリペプチドは配列番号 49 に記されるアミノ酸配列からなる。配列番号 49 を以下に提供する。

30

【化12】

RSKRSRLHSDYMDMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS [配列番号 49]

【0145】

ある特定の実施形態では、C A R の細胞内シグナリングドメインは、Y G G G (配列番号 44) に記されるアミノ酸配列からなる変異型 Y M N M モチーフを含む C D 28 ポリペプチドを含む共刺激シグナリングドメインを含み、C D 28 ポリペプチドは配列番号 63 に記されるアミノ酸配列からなる。配列番号 63 を以下に提供する。

40

【化13】

RSKRSRLHSDYGGGTTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS [配列番号 63]

【0146】

ある特定の実施形態では、C A R の細胞内シグナリングドメインは、Y S N V (配列番号 23) に記されるアミノ酸配列からなる変異型 Y M N M モチーフを含む C D 28 ポリペプチドを含む共刺激シグナリングドメインを含み、C D 28 ポリペプチドは配列番号 64 に記されるアミノ酸配列からなる。配列番号 64 を以下に提供する。

50

【化 1 4】

RSKRSRLHSDYSNVTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS [配列番号 64]

【0 1 4 7】

ある特定の実施形態では、CARの細胞内シグナリングドメインは、変異型YMNMMモチーフ（本明細書に開示される）を含むCD28ポリペプチドを含む第1の共刺激シグナリングドメイン、および共刺激分子の細胞内ドメインを含む第2の共刺激シグナリングドメインを含む。ある特定の実施形態では、共刺激分子は、4-1BB、OX40、ICOS、DAP-10、CD30、CD271、BAFFR、BCMA、DR3、FN14、HVEM、LTBR、RANK、TACI、TNFR1、TNFR2、TROY、EPO

10

【0 1 4 8】

ある特定の実施形態では、第2の共刺激シグナリングドメインは、4-1BBポリペプチド（例えば、4-1BBの細胞内ドメインまたはその一部分）を含む。ある特定の実施形態では、4-1BBポリペプチドは、NCBI Ref. 番号：NP_001552（配列番号50）を有するアミノ酸配列に対して、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%、少なくとも約100%相同または同一であるアミノ酸配列またはその断片を含むかもしくはそれからなり、および／または必要に応じて最大1つまたは最大2つまたは最大3つの保存的アミノ酸置換を含んでもよい。ある特定の実施形態では、4-1BBポリペプチドは、配列番号50の連続する部分であるアミノ酸配列を含むかまたはそれからなり、少なくとも20個、または少なくとも30個、または少なくとも40個、または少なくとも50個、または少なくとも100個、または少なくとも150個、または少なくとも150個、および最大255個のアミノ酸長である。ある特定の実施形態では、4-1BBポリペプチドは、配列番号50のアミノ酸1～255位、1～50位、50～100位、100～150位、150～200位、214～255位、または200～255位のアミノ酸配列を含むかまたはそれからなる。配列番号50を以下に提供する。

20

【化 1 5】

1 MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR
61 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC
121 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE
181 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLEF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG
241 CSCRFPEEEE GGCEL [配列番号 50]

30

5. 2. 5. 例示的なCAR

【0 1 4 9】

ある特定の実施形態では、CARはCD19標的化CARである。ある特定の実施形態では、CARは、(a) ヒトCD19に結合し、配列番号6に記されるアミノ酸配列を含むV_H CDR1、配列番号7に記されるアミノ酸配列を含むV_H CDR2、配列番号8に記されるアミノ酸配列を含むV_H CDR3、配列番号9に記されるアミノ酸配列を含むV_L CDR1、配列番号10に記されるアミノ酸配列を含むV_L CDR2、および配列番号11に記されるアミノ酸配列を含むV_L CDR3を含む細胞外抗原結合ドメイン；(b) CD28の膜貫通ドメインまたはその一部分を含む膜貫通ドメイン、ならびに(c) (i) CD3ζポリペプチド、および(ii) 変異型YMNMMモチーフを含むCD28ポリペプチドを含む共刺激シグナリングドメインを含む細胞内シグナリングドメインを含む。ある特定の実施形態では、変異型YMNMMモチーフは、YMDM（配列番号32）、YKNI（配列番号26）、YENV（配列番号22）、YSNV（配列番号23）、

40

50

Y K N L（配列番号 24）、または Y G G G（配列番号 44）に記されるアミノ酸配列からなる。ある特定の実施形態では、V_Hおよび V_Lは、配列番号 5 に記されるアミノ酸配列を有するリンカーを介して連結される。

【0150】

ある特定の実施形態では、例示的な C D 19 標的化 C A R は、Y M D M（配列番号 32）に記されるアミノ酸配列からなる変異型 Y M N M モチーフを含む。ある特定の実施形態では、例示的な C D 19 標的化 C A R は、以下に提供される配列番号 51 に記されるアミノ酸配列からなる。

【化16】

EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPQGQLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLT
ADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDYFDYWGQGTITVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSDIELT
QSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNAVWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTIT
NVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGP
SKPFWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMDMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPGEGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY
SEIGMKGERRRGKGGHGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR [配列番号 51]

10

【0151】

配列番号 51 のアミノ酸配列をコードする例示的なヌクレオチド配列は、以下に提供される配列番号 52 に記されている。

20

【化17】

GAGGTGAAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGTCCTCAGTGAAGATTTCTCTGCAAGGC
TTCTGGCTATGCATTAGTACTGAGTGAAGTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGA
TTGGACAGATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTCAAGCCACACTGACT
GCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCGGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTT
CTGTGCAAGAAAGACCATTAGTTCGGTAGTAGATTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCA
CCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGACATTGAGCTCACC
CAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGT
GGGTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACCACTGATTTACTCGGCAACCT
ACCGGAACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACT
AACGTGCAGTCTAAAGACTTGGCAGACTATTTCTGTCAACAATATAACAGGTATCCGTACACGTCCGGAGG
GGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGGGGCGGCCGAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATG
AGAAGAGCAATGGAACATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCT
TCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGC
CTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGGATATGACTCCCC
GGCGCCCCGGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC
AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCT
CAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAA
AGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTAC
AGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTAC
AGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC [配列番号 52]

30

40

【0152】

ある特定の実施形態では、例示的な C D 19 標的化 C A R は、Y E N V（配列番号 22）に記されるアミノ酸配列からなる変異型 Y M N M モチーフを含む。ある特定の実施形態では、例示的な C D 19 標的化 C A R は、以下に提供される配列番号 53 に記されるアミ

50

【化 1 8】

10

配列番号 53 のアミノ酸配列をコードする例示的なヌクレオチド配列は、以下に提供される配列番号 54 に記されている。

20

30

40

【化 2 0 - 1】

50

【化 2 0 - 2】

QSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVDPDRFTGSGSGTDFTLTIT
 NVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLFPGP
 SKPFWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIIFWVRSKRSRLHSDYKNITPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
 RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAY
 SEIGMKGERRRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR [配列番号 55]

【0155】

配列番号 55 のアミノ酸配列をコードする例示的なヌクレオチド配列は、以下に提供さ
 れる配列番号 56 に記されている。

10

【化 2 1】

GAGGTGAAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCCTCAGTGAAGATTTCTTGCAAGGC
 TTCTGGCTATGCATTAGTACTGAGTGAAGTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGA
 TTGGACAGATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTCAAGCCACACTGACT
 GCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCGGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTT
 CTGTGCAAGAAAGACCATTAGTTCGGTAGTAGATTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACACGGTCA
 CCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGACATTGAGCTCACC
 CAGTCTCCAAAATTATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGT
 GGGTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACCACTGATTTACTCGGCAACCT
 ACCGGAACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACT
 AACGTGCAGTCTAAAGACTTGGCAGACTATTTCTGTCAACAATATAACAGGTATCCGTACACGTCCGGAGG
 GGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGGGCGGCCGAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATG
 AGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCT
 TCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGC
 CTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAATAAAAACATTACTCCCC
 GCCGCCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC
 AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCT
 CAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAA
 AGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTAC
 AGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTAC
 AGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCTGCCCCCTCGC [配列番号 56]

20

30

【0156】

ある特定の実施形態では、例示的な CD 19 標的化 CAR は、アミノ酸配列 YSNV (
 配列番号 23) からなる変異型 YMN Mモチーフを含む。ある特定の実施形態では、例示
 的な CD 19 標的化 CAR は、以下に提供される配列番号 57 に記されるアミノ酸配列か
 らなる。

40

【化 2 2】

EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNVKQRPQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLT
ADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDYFYFDYWGQGTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIELT
QSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVDPDRFTGSGSGTDFTLTIT
NVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLEFPGP
SKPFWVLVVVGVLACYSLLVTVAFTIIFWVRSKRSRLHSDYSNVTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY
SEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR [配列番号 57]

10

【0157】

配列番号 57 のアミノ酸配列をコードする例示的なヌクレオチド配列は、以下に提供される配列番号 58 に記されている。

【化 2 3】

GAGGTGAAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGC
TTCTGGCTATGCATTAGTAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGA
TTGGACAGATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGAAAGTTCAAGGGTCAAGCCACACTGACT
GCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCGGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTT
CTGTGCAAGAAAGACCATTAGTTCGGTAGTAGATTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCA
CCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGACATTGAGCTCACC
CAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGT
GGGTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACCACTGATTTACTCGGCAACCT
ACCGGAACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACT
AACGTGCAGTCTAAAGACTTGGCAGACTATTTCTGTCAACAATATAACAGGTATCCGTACACGTCCGGAGG
GGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGGGCGGCCCAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATG
AGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCTATTTCCCGGACCT
TCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGC
CTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACTCAAATGTTACTCCCC
GCGGCCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC
AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCT
CAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAA
AGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTAC
AGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTAC
AGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC [配列番号 58]

20

30

【0158】

ある特定の実施形態では、例示的な CD 19 標的化 CAR は、アミノ酸配列 YKNL (配列番号 24) からなる変異型 YMN Mモチーフを含む。ある特定の実施形態では、例示的な CD 19 標的化 CAR は、以下に提供される配列番号 59 に記されるアミノ酸配列からなる。

40

【化 2 4】

EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNVVKQRPQGLEWIGQIYPGDGDTNNGKFKGQATLT
ADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDYFYFDYWQGTTVTVSSGGGSGGGGSGGGSDIELT
QSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVDPDRFTGSGSGTDFTLTIT
NVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLEFPGP
SKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYKNLTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY
SEIGMKGERRRGKGHGGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR [配列番号 59]

10

【0159】

配列番号 59 のアミノ酸配列をコードする例示的なヌクレオチド配列は、以下に提供される配列番号 60 に記されている。

【化 2 5 - 1】

GAGGTGAAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGC
TTCTGGCTATGCATTCAGTAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGA
TTGGACAGATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGAAAGTTCAAGGGTCAAGCCACACTGACT
GCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCGGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTT

20

【化 2 5 - 2】

CTGTGCAAGAAAGACCATTAGTTCGGTAGTAGATTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCA
CCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGAGGTGGATCTGACATTGAGCTCACC
CAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGT
GGGTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACCACTGATTTACTCGGCAACCT
ACCGGAACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCACT
AACGTGCAGTCTAAAGACTTGGCAGACTATTTCTGTCAACAATATAACAGGTATCCGTACACGTCCGGAGG
GGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGGGCGGCCGAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATG
AGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCT
TCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGC
CTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACAAAACTTGACTCCCC
GGCGCCCCGGGCCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCCTATCGCTCC
AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCT
CAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAA
AGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTAC
AGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTAC
AGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC [配列番号 60]

30

40

【0160】

ある特定の実施形態では、例示的な CD 19 標的化 CAR は、アミノ酸配列 YGGG (配列番号 44) からなる変異型 YMNMMモチーフを含む。ある特定の実施形態では、例示的な CD 19 標的化 CAR は、以下に提供される配列番号 61 に記されるアミノ酸配列からなる。

50

【化 2 6】

EVKLQQSGAELVRPGSSVKISKASGYAFSSYWMNVKQRPQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLT
ADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVVDYFYDYGQGTTVTVSSGGGSGGGSGGGSDIELT
QSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVDPDRFTGSGSGTDFTLTIT
NVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGKLEIKRAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPFGP
SKPFWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYGGGTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAY
SEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR [配列番号 61]

10

【0161】

配列番号 61 のアミノ酸配列をコードする例示的なヌクレオチド配列は、以下に提供される配列番号 62 に記されている。

【化 2 7 - 1】

GAGGTGAAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGC
TTCTGGCTATGCATTCAGTAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGA
TTGGACAGATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAAGTTCAAGGGTCAAGCCACACTGACT
GCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCGGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTT
CTGTGCAAGAAAGACCATTAGTTCGGTAGTAGATTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCA
CCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGATCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGACATTGAGCTCACC
CAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGT
GGGTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAATCTCCTAAACCACTGATTTACTCGGCAACCT
ACCGGAACAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTACTCTCACCATCACT
AACGTGCAGTCTAAAGACTTGGCAGACTATTTCTGTCAACAATATAACAGGTATCCGTACACGTCCGGAGG
GGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGGGCGGCCCAATTGAAGTTATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATG

20

【化 2 7 - 2】

AGAAGAGCAATGGAACCATTATCCATGTGAAAGGGAAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCT
TCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGC
CTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACGGTGGAGGGACTCCCC
GCGGCCCCGGGCCCCACCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCC
AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCT
CAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAA
AGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTAC
AGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTAC
AGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGC [配列番号 62]

30

40

5. 3. 細胞

【0162】

本開示の主題は、本開示のCAR（例えば、セクション 5. 2 に開示されているもの）を含む細胞を提供する。ある特定の実施形態では、細胞は、リンパ系の細胞および骨髄系の細胞からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、細胞は免疫応答性細胞である。ある特定の実施形態では、免疫応答性細胞はリンパ系の細胞である。

【0163】

ある特定の実施形態では、細胞はリンパ系の細胞である。リンパ系の細胞は、抗体の産生、細胞免疫系の調節、血液中の異物の検出、宿主への外来細胞の検出などを提供するこ

50

とができる。リンパ系の細胞の非限定的な例としては、T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、B細胞、樹状細胞、およびリンパ系細胞が分化され得る幹細胞が挙げられる。ある特定の実施形態では、幹細胞は、多能性幹細胞（例えば、胚性幹細胞）である。

【0164】

ある特定の実施形態では、細胞はT細胞である。T細胞は、胸腺で成熟し、主に細胞性免疫を担うリンパ球であり得る。T細胞は、適応免疫系に関与している。本開示の主題のT細胞は、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、メモリーT細胞（セントラルメモリーT細胞、幹細胞様メモリーT細胞（または幹様メモリーT細胞）、および2種類のエフェクターメモリーT細胞：例えば、TEM細胞およびTEMRA細胞、制御性T細胞（サプレッサーT細胞としても公知）、腫瘍反応性リンパ球、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）、ナチュラルキラーT細胞、粘膜関連インバリアントT細胞、および $\gamma\delta$ T細胞を含むがこれらに限定されない任意の種類のT細胞であり得る。細胞傷害性T細胞（CTLまたはキラーT細胞）は、感染した体細胞または腫瘍細胞の死を誘導することができるTリンパ球のサブセットである。患者自身のT細胞は、CARの導入によって特異的抗原を標的とするように遺伝的に改変されてもよい。ある特定の実施形態では、免疫応答性細胞はT細胞である。T細胞は、 $CD4^+$ T細胞または $CD8^+$ T細胞であり得る。ある特定の実施形態では、T細胞は $CD4^+$ T細胞である。ある特定の実施形態では、T細胞は $CD8^+$ T細胞である。

10

【0165】

ある特定の実施形態では、細胞はNK細胞である。ナチュラルキラー（NK）細胞は、細胞性免疫の一部であり、自然免疫応答中に作用するリンパ球であり得る。NK細胞は、標的細胞に対する細胞傷害効果を行うために事前の活性化を要しない。

20

【0166】

本開示の主題のヒトリンパ球の種類には、末梢ドナーリンパ球が含まれるが、これらに限定されない。例えば、Sadelainら、Nat Rev Cancer（2003）；3：35-45（CARを発現するように遺伝的に改変された末梢ドナーリンパ球を開示）、Morgan, R. A. ら、2006 Science 314：126-129（ α および β ヘテロ二量体を含む全長腫瘍抗原認識T細胞受容体複合体を発現するように遺伝的に改変された末梢ドナーリンパ球を開示）、Panelliら、J Immunol（2000）；164：495-504；Panelliら、J Immunol（2000）；164：4382-4392（腫瘍生検における腫瘍浸潤リンパ球（TIL）に由来するリンパ球培養物を開示）、およびDupontら、Cancer Res（2005）；65：5417-5427；Papanicolaouら、Blood（2003）；102：2498-2505（人工抗原提示細胞（AAPC）またはパルス樹状細胞を用いて、インビトロで選択的に増殖させた抗原特異的末梢血白血球を開示）に開示されているもの。

30

【0167】

細胞（例えば、T細胞）は、自己、非自己（例えば、同種異系）、または操作された前駆体もしくは幹細胞からインビトロで誘導され得る。

【0168】

本開示の主題の細胞は、骨髄系の細胞であり得る。骨髄系の細胞の非限定的な例としては、単球、マクロファージ、好中球、樹状細胞、好塩基球、好中球、好酸球、巨核球、マスト細胞、赤血球、血小板、および骨髄系細胞が分化させ得る幹細胞が挙げられる。ある特定の実施形態では、幹細胞は、多能性幹細胞（例えば、胚性幹細胞または人工多能性幹細胞）である。

40

【0169】

ある特定の実施形態では、本開示の細胞は、腫瘍微小環境を調節することができる。腫瘍は、免疫認識および排除から自身を保護するために、悪性細胞によって一連の機構を含む宿主免疫応答に敵対する微小環境を有する。この「敵対的な腫瘍微小環境」は、浸潤制御性 $CD4^+$ T細胞（Treg）、骨髄由来サプレッサー細胞（MDSC）、腫瘍関連マ

50

クロファージ (TAM)、TGF- β を含む免疫抑制性サイトカイン、および活性化T細胞によって発現される免疫抑制性受容体 (CTLA-4およびPD-1)を標的とするリガンドの発現を含む様々な免疫抑制因子を含む。免疫抑制のこれらの機構は、寛容の維持および不適切な免疫応答の抑制において役割を果たすが、腫瘍微小環境内では、これらの機構は有効な抗腫瘍免疫応答を妨げる。集合的に、これらの免疫抑制因子は、標的腫瘍細胞との遭遇時に、養子移入されたCAR改変型T細胞の顕著なアネルギーまたはアポトーシスのいずれかを誘導することができる。

【0170】

ある特定の実施形態では、細胞がCARを発現するように、細胞を本開示のCARで形質導入することができる。

【0171】

ある特定の実施形態では、細胞は、免疫抑制活性または免疫刺激活性を有するポリペプチドに結合する可溶性一本鎖可変断片 (scFv)をさらに含む。ある特定の実施形態では、免疫抑制活性は、免疫応答の減少をもたらす細胞 (例えば、活性化された免疫応答性細胞)におけるシグナル伝達の誘導またはタンパク質発現の変化を指す。それらの結合を介して免疫応答を抑制または減少させることが公知のポリペプチドには、CD47、PD-1、CTLA-4、ならびにSIRP α 、PD-L1、PD-L2、B7-1、およびB7-2を含むそれらの対応するリガンドが含まれる。そのようなポリペプチドは、腫瘍微小環境に存在し、新生物形成細胞に対する免疫応答を阻害する。様々な実施形態では、免疫抑制性ポリペプチドおよび／またはそれらのリガンドの相互作用を阻害、ブロックまたは拮抗することは、免疫応答性細胞の免疫応答を増強する。

【0172】

ある特定の実施形態では、免疫刺激活性は、免疫応答の増加をもたらす細胞 (例えば、活性化された免疫応答性細胞)におけるシグナル伝達の誘導またはタンパク質発現の変化を指す。免疫刺激活性には、炎症促進活性が含まれ得る。それらの結合を介して免疫応答を刺激または増加させることが公知なポリペプチドには、CD28、OX-40、4-1BB、ならびにB7-1、B7-2、OX-40L、および4-1BBLを含むそれらの対応するリガンドが含まれる。そのようなポリペプチドは、腫瘍微小環境に存在し、新生物形成細胞に対する免疫応答を活性化する。様々な実施形態では、炎症促進性ポリペプチドおよび／またはそれらのリガンドの促進、刺激または作動することは、免疫応答性細胞の免疫応答を増強する。

【0173】

CAR、および免疫抑制活性または免疫刺激活性を有するポリペプチドに結合する可溶性scFvを含む細胞は、参照によりその全体が組み込まれる国際公開第2014/134165号に開示されている。

【0174】

ある特定の実施形態では、細胞は、外因性CD40Lをさらに含む。CARおよび外因性CD40Lを含む細胞は、国際公開第2014/134165号に開示されている。

【0175】

さらに、ある特定の実施形態では、細胞は、IL-18を発現するように操作される。ある特定の実施形態では、細胞は、外因性IL-18ポリペプチドまたはその断片をさらに含む。ある特定の実施形態では、細胞は、IL-18遺伝子座に、改変型プロモーター／エンハンサーをさらに含み、これは、IL-18遺伝子発現を増加させることができる (例えば、IL-18遺伝子発現を駆動するように配置された構成的または誘導性プロモーター)。CARを含み、IL-18を発現するように操作された、例えば、外因性IL-18ポリペプチドもしくはその断片または改変型プロモーター／エンハンサーをIL-18遺伝子座に含む細胞は、参照によりその全体が組み込まれる国際公開第2018/027155号に開示されている。

【0176】

追加的または代替的に、細胞は、IL-33を発現するように操作される。ある特定の

10

20

30

40

50

実施形態では、細胞は、外因性 I L - 3 3 ポリペプチドまたはその断片をさらに含む。ある特定の実施形態では、細胞は、I L - 3 3 遺伝子座に、改変型プロモーター／エンハンサーをさらに含み、これは、I L - 3 3 遺伝子発現を増加させることができる（例えば、I L - 3 3 遺伝子発現を駆動するように配置された構成的または誘導性プロモーター）。C A R を含み、I L - 3 3 を発現するように操作された、例えば、外因性 I L - 3 3 ポリペプチドもしくはその断片または改変型プロモーター／エンハンサーを I L - 3 3 遺伝子座に含む細胞は、参照によりその全体が組み込まれる国際公開第 2 0 1 9 / 0 9 9 4 7 9 号に開示されている。

【 0 1 7 7 】

追加的または代替的に、細胞は、I L - 3 6 を発現するように操作される。ある特定の実施形態では、細胞は、外因性 I L - 3 6 ポリペプチドまたはその断片をさらに含む。ある特定の実施形態では、細胞は、I L - 3 6 遺伝子座に、改変型プロモーター／エンハンサーをさらに含み、これは、I L - 3 6 遺伝子発現を増加させることができる（例えば、I L - 3 6 遺伝子発現を駆動するように配置された構成的または誘導性プロモーター）。C A R を含み、I L - 3 6 を発現するように操作された、例えば、外因性 I L - 3 6 ポリペプチドもしくはその断片または改変型プロモーター／エンハンサーを I L - 3 6 遺伝子座に含む細胞は、参照によりその全体が組み込まれる国際公開第 2 0 1 9 / 0 9 9 4 8 3 号に開示されている。

5 . 4 . 組成物およびベクター

【 0 1 7 8 】

本開示の主題は、本開示の C A R（例えば、セクション 5 . 2 に開示されているもの）を含む組成物を提供する。そのような組成物を含む細胞も提供される。

【 0 1 7 9 】

ある特定の実施形態では、本開示の C A R は、プロモーターに作動可能に連結された核酸分子によってコードされる。

【 0 1 8 0 】

さらに、本開示の主題は、本開示の C A R（例えば、セクション 5 . 2 に開示されているもの）をコードするポリヌクレオチドを含む核酸組成物を提供する。そのような核酸組成物を含む細胞も提供される。

【 0 1 8 1 】

ある特定の実施形態では、核酸組成物は、本開示の C A R をコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターをさらに含む。

【 0 1 8 2 】

ある特定の実施形態では、プロモーターは内因性または外因性である。ある特定の実施形態では、外因性プロモーターは、伸長因子（E F）- 1 プロモーター、サイトメガロウイルス前初期プロモーター（C M V）プロモーター、シミアンウイルス 4 0 初期プロモーター（S V 4 0）プロモーター、ホスホグリセリン酸キナーゼ（P G K）プロモーター、およびメタロチオネインプロモーターから選択される。ある特定の実施形態では、プロモーターは誘導性プロモーターである。ある特定の実施形態では、誘導性プロモーターは、N F A T 転写応答エレメント（T R E）プロモーター、C D 6 9 プロモーター、C D 2 5 プロモーター、および I L - 2 プロモーターから選択される。

【 0 1 8 3 】

組成物および核酸組成物は、当技術分野で公知の方法によって、または本明細書に記載されるように、対象に投与され得るか、またはおよび／細胞に送達され得る。細胞（例えば、T 細胞または N K 細胞）の遺伝的改変は、実質的に均一な細胞組成物を組換え D N A 構築物で形質導入することによって達成することができる。ある特定の実施形態では、レトロウイルスベクター（例えば、ガンマレトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクター）が、D N A 構築物を細胞に導入するために用いられる。例えば、抗原認識受容体をコードするポリヌクレオチドをレトロウイルスベクターにクローニングすることができ、その内因性プロモーター、レトロウイルスの長い末端反復、または目的の標的細胞型に

10

20

30

40

50

特異的なプロモーターから発現を駆動することができる。非ウイルスベクターも同様に使用され得る。

【0184】

本開示のCARを含むように細胞を最初に遺伝的に改変するために、レトロウイルスベクターを形質導入に用いることができるが、任意の他の適切なウイルスベクターまたは非ウイルス送達系を使用することができる。抗原認識受容体は、単一のマルチシストロニック発現カセット、単一ベクターの複数の発現カセット、または複数のベクターで構築することができる。ポリシストロニック発現カセットを作成するエレメントの例としては、様々なウイルスおよび非ウイルスの内部リボソーム進入部位（IRES、例えば、FGF-1 IRES、FGF-2 IRES、VEGF IRES、IGF-II IRES、NF-κB IRES、RUNX1 IRES、p53 IRES、A型肝炎IRES、C型肝炎IRES、ペスチウイルスIRES、アフトウイルスIRES、ピコルナウイルスIRES、ポリオウイルスIRESおよび脳心筋炎ウイルスIRES）ならびに切断可能なリンカー（例えば、2Aペプチド、例えば、P2A、T2A、E2AおよびF2Aペプチド）が挙げられるが、これらに限定されない。レトロウイルスベクターと適切なパッケージング株との組合せも適しており、カプシドタンパク質はヒト細胞を感染させるために機能的であろう。PA12（Millerら、（1985）Mol Cell Biol（1985）；5：431-437）；PA317（Millerら、Mol Cell Biol（1986）；6：2895-2902）；およびCRIP（Danosら、Proc Natl Acad Sci USA（1988）；85：6460-6464）を含むが、これらに限定されない、様々な両種性ウイルス産生細胞株が公知である。非両種性粒子、例えば、VSVG、RD114またはGALVエンベロープおよび当技術分野で公知の他の任意のものでシュードタイプ化された粒子も適している。

【0185】

形質導入の可能な方法にはまた、産生細胞との細胞の直接共培養（Bregniら、Blood（1992）；80：1418-1422）、または適切な成長因子およびポリカチオンを含むまたは含まないウイルス上清単独または濃縮ベクターストックとの培養（Xuら、Exp Hemat（1994）；22：223-230；およびHughesら、J Clin Invest（1992）；89：1817）が含まれる。

【0186】

他の形質導入ウイルスベクターを使用して、細胞を改変することができる。ある特定の実施形態では、選定されたベクターは、高い感染効率および安定した組込みおよび発現を呈する（例えば、Cayouetteら、Human Gene Therapy、8：423-430、1997；Kidoら、Current Eye Research、15：833-844、1996；Bloomerら、Journal of Virology、71：6641-6649、1997；Naldiniら、Science、272：263-267、1996；およびMiyoshiら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94：10319、1997を参照）。使用することができる他のウイルスベクターには、例えば、アデノウイルス、レンチウイルス、およびアデノ随伴ウイルスベクター（adeno-associated viral vectors）、ワクシニアウイルス、ウシパピローマウイルス、またはヘルペスウイルス、例えば、エプスタイン・バー・ウイルス（例えば、Miller、Human Gene Thera（1990）；15：14；Friedman、Science 244：1275-1281、1989；Eglitisら、BioTechniques（1988）；6：608-614；Tolstoshevら、Cur Opin Biotechnol（1990）；1：55-61；Sharp、The Lancet（1991）；337：1277-78；Cornettaら、Nucleic Acid Research and Molecular Biology、36：311-22、1987；Anderson、Science（1984）；226：401-409；Moen、Blood Cells 17：407-16、1991；Millerら、Biotechnol（

1989) ; 7 : 980 - 90 ; LeGal La Salleら、Science (1993) ; 259 : 988 - 90 ; およびJohnson、Chest (1995) 107 : 77S - 83Sのベクターも参照) が含まれ得る。レトロウイルスベクターは特によく開発されており、臨床の状況で使用されている (Rosenbergら、N Engl J Med (1990) ; 323 : 370, 1990 ; Andersonら、米国特許第5, 399, 346号)。

【0187】

非ウイルスのアプローチは、細胞の遺伝的改変にも用いられ得る。例えば、リポフェクションの存在下で核酸を投与することによって (Feignerら、Proc Natl Acad Sci U. S. A. (1987) ; 84 : 7413 ; Onoら、Neurosci Lett (1990) ; 17 : 259 ; Brighamら、Am J Med Sci (1989) ; 298 : 278 ; Staubingerら、Methods in Enzymol (1983) ; 101 : 512、Wuら、J Biol Chem (1988) ; 263 : 14621 ; Wuら、J Biol Chem (1989) ; 264 : 16985)、または外科的条件下でのマイクロインジェクションによって (Wolffら、Science (1990) ; 247 : 1465)、核酸分子を細胞に導入することができる。遺伝子移入のための他の非ウイルス的手段には、リン酸カルシウム、DEAEデキストラン、エレクトロポレーション、およびプロトプラスト融合を使用したインビトロでのトランスフェクションが含まれる。リポソームはまた、細胞へのDNAの送達に潜在的に有益であり得る。対象の罹患した組織への正常遺伝子の移植は、正常核酸をエキソビオで培養可能な細胞型 (例えば、自己または異種の初代細胞またはその子孫) に移入し、その後、細胞 (またはその派生物) を標的組織に注射するか、または全身注射することによっても達成することができる。組換え受容体は、トランスポザーゼまたは標的化ヌクレアーゼ (例えば、ジンクフィンガーヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、またはTALENヌクレアーゼ、CRISPR) を使用して誘導または得ることもできる。一過性発現は、RNAエレクトロポレーションによって得てもよい。

【0188】

任意の標的化ゲノム編集方法を使用して、本開示の抗原認識受容体を細胞または対象に送達することもできる。ある特定の実施形態では、CRISPRシステムを使用して、本明細書に開示される本開示の抗原認識受容体を送達する。ある特定の実施形態では、ジンクフィンガーヌクレアーゼを使用して、抗原認識受容体を送達する。ある特定の実施形態では、TALENシステムを使用して、本開示の抗原認識受容体を送達する。

【0189】

クラスター化された規則的な間隔の短い回文反復 (CRISPR) システムは、原核細胞で発見されたゲノム編集ツールである。ゲノム編集に利用される場合、システムは、Cas9 (crRNAをそのガイドとして利用してDNAを改変することができるタンパク質)、CRISPR RNA (crRNA、それを宿主DNAの正しいセクションに導くようにCas9によって使用されるRNAを、tracrRNA (一般にヘアピンループ形態) に結合する領域と共に含み、Cas9と活性複合体を形成する)、トランス活性化crRNA (tracrRNA、crRNAに結合し、Cas9と活性複合体を形成する)、およびDNA修復テンプレート (特定のDNA配列の挿入を可能にする細胞修復プロセスをガイドするDNA) の任意のセクションを含む。CRISPR/Cas9は、プラスミドを用いて、標的細胞をトランスフェクトすることが多い。crRNAは、Cas9が細胞内の標的DNAを同定し、標的DNAに直接結合するために使用する配列であるため、用途ごとに設計する必要がある。CAR発現カセットを有する修復テンプレートはまた、挿入配列のための切断およびコードの両側の配列と重複しなければならないため、用途ごとに設計する必要がある。複数のcrRNAおよびtracrRNAと一緒にパッケージして、単一ガイドRNA (sgRNA) を形成することができる。このsgRNAは、細胞にトランスフェクトされるために、Cas9遺伝子と一緒に接合され、プラスミドに作製され得る。

【0190】

ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）は、ジンクフィンガーDNA結合ドメインをDNA切断ドメインと組み合わせることによって生成される人工的制限酵素である。ジンクフィンガードメインは、ジンクフィンガーヌクレアーゼがゲノム内の所望の配列を標的化することを可能にする特定のDNA配列を標的化するように操作することができる。個々のZFNのDNA結合ドメインは、典型的には、複数の個々のジンクフィンガーリピートを含み、それぞれが複数の塩基対を認識することができる。新しいジンクフィンガードメインを生成する最も一般的な方法は、既知の特異性のより小さいジンクフィンガー「モジュール」を組み合わせることである。ZFNにおける最も一般的な切断ドメインは、EⅠ型制限エンドヌクレアーゼFokⅠ由来の非特異的切断ドメインである。内因性相同組換え（HR）マシナリーおよびCAR発現カセットを有する相同DNAテンプレートを使用し、ZFNを使用してCAR発現カセットをゲノムに挿入することができる。標的配列がZFNによって切断されると、HRマシナリーは、損傷した染色体と相同DNAテンプレートとの間の相同性を探索し、次いで染色体の2つの開裂した末端の間でテンプレートの配列をコピーし、それによって相同DNAテンプレートがゲノムに組み込まれる。

【0191】

転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）は、DNAの特定の配列を切断するように操作することができる制限酵素である。TALENシステムは、ZFNとほぼ同じ原理で動作する。それらは、転写活性化因子様エフェクターDNA結合ドメインをDNA切断ドメインと組み合わせることによって生成される。転写活性化因子様エフェクター（TALE）は、特定のヌクレオチドに対して強い認識を有する2つの可変可能な位置を有する33～34個のアミノ酸反復モチーフから構成される。これらのTALEのアレイをアSEMBルすることによって、TALE DNA結合ドメインは、所望のDNA配列に結合し、それによってヌクレアーゼがゲノム内の特定の位置で切断するようにガイドするように操作することができる。ポリヌクレオチド治療法で使用するためのcDNA発現は、任意の適切なプロモーター（例えば、ヒトサイトメガロウイルス（CMV）、シミアンウイルス40（SV40）、またはメタロチオネインプロモーター）から導かれ、任意の適切な哺乳動物調節エレメントまたはイントロン（例えば、伸長因子1aエンハンサー／プロモーター／イントロン構造）によって調節され得る。例えば、所望であれば、特定の細胞型における遺伝子発現を選好的に指示することが公知のエンハンサーを使用して、核酸の発現を指示することができる。使用されるエンハンサーには、組織または細胞特異的エンハンサーとして特徴付けられるものが含まれ得るが、これらに限定されない。あるいは、ゲノムクローンが治療用構築物として使用される場合、調節は、同族調節配列によって、または所望であれば、上記のプロモーターまたは調節エレメントのいずれかを含む異種供給源に由来する調節配列によって媒介され得る。

【0192】

ゲノム編集エージェント／システムを送達するための方法は、必要に応じて異なり得る。ある特定の実施形態では、選択されたゲノム編集方法の構成要素は、1つまたはそれを超えるプラスミドにおいてDNA構築物として送達される。ある特定の実施形態では、構成要素はウイルスベクターを介して送達される。一般的な送達方法には、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、遺伝子銃、インペルフエクション、静水圧、連続注入、超音波処理、マグネトフェクション、アデノ随伴ウイルス、ウイルスベクターのエンベロープタンパク質シュードタイピング、複製適格ベクターのシスおよびトランス作用エレメント、単純ヘルペスウイルス、および化学的ビヒクル（例えば、オリゴヌクレオチド、リポプレックス、ポリマーソーム、ポリプレックス、デンドリマー、無機ナノ粒子、および細胞膜透過性ペプチド）が含まれるが、これらに限定されない。

5.5. ポリペプチド

【0193】

本開示の主題は、配列の変更を生じさせることによって、アミノ酸配列または核酸配列を最適化するための方法を提供する。そのような変更には、ある特定の変異、欠失、挿入

、または翻訳後修飾が含まれ得る。本開示の主題は、本明細書に開示される任意の天然に存在するポリペプチド（限定されないが、CD19、CD8、CD28、4-1BBおよびCD3を含む）の類似体をさらに含む。類似体は、アミノ酸配列の差異、翻訳後修飾、またはその両方によって、本明細書に開示される天然に存在するポリペプチドと異なり得る。類似体は、本開示の主題の天然に存在するアミノ酸配列の全部または一部に対して、少なくとも約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%またはそれを超える相同を呈し得る。配列比較の長さは、少なくとも5個、10個、15個もしくは20個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも25個、50個、もしくは75個のアミノ酸残基、または100個を超えるアミノ酸残基である。ここでも、同一性の程度を決定するための例示的なアプローチでは、BLASTプログラムを使用することができ、 e^{-3} と e^{-100} との間の確率スコアは密接に関連する配列を指し示す。改変には、ポリペプチドのインビボおよびインビトロでの化学的誘導体化、例えばアセチル化、カルボキシル化、リン酸化、またはグリコシル化が含まれる。そのような改変は、ポリペプチドの合成中またはプロセシング中または単離された改変酵素による後続の処置において起こり得る。類似体はまた、一次配列の変更によって天然に存在するポリペプチドとは異なり得る。これらには、天然および誘導型（例えば、Sambrook、FritschおよびManiatis、Molecular Cloning: A Laboratory Manual（第2版）、CSH Press、1989、またはAusubelら、前述に記載されているように、照射もしくは硫酸エタンメチルへの曝露または部位特異的変異誘発によってランダム変異誘発から生じる）の両方の遺伝的バリエーションが含まれる。L-アミノ酸以外の残基（例えば、D-アミノ酸または非天然もしくは合成アミノ酸、例えば、 β または γ アミノ酸）を含む環化ペプチド、分子および類似体も含まれる。

【0194】

全長ポリペプチドに加えて、本開示の主題は、本明細書に開示されるポリペプチドのいずれかの断片も提供する。本明細書で使用される場合、「断片」という用語は、少なくとも5個、10個、13個、または15個のアミノ酸を意味する。ある特定の実施形態では、断片は、少なくとも20個の連続するアミノ酸、少なくとも30個の連続するアミノ酸、または少なくとも50個の連続するアミノ酸を含む。ある特定の実施形態では、断片は、少なくとも60〜80個、100個、200個、300個またはそれを超える連続するアミノ酸を含む。断片は、当業者に公知の方法によって生成され得るか、または通常のタンパク質プロセシング（例えば、生物学的活性のために要求されない新生ポリペプチドからのアミノ酸の除去、または選択的mRNAスプライシングもしくは選択的タンパク質プロセシング事象によるアミノ酸の除去）から生じ得る。

5.6. 製剤および投与

【0195】

本開示の主題はまた、本開示の細胞を含む組成物を提供する。本開示の細胞を含む組成物は、滅菌液体調製物、例えば、等張水溶液、懸濁液、エマルジョン、分散液、または粘性組成物として好都合に準備され得、選択されたpHに緩衝され得る。液体調製物は、通常、ゲル、他の粘性組成物、および固体組成物よりも調製が容易である。さらに、液体組成物は、特に注射によって投与するのに幾分好都合である。一方、粘性組成物は、特定の組織とのより長い接触期間を実現するために、適切な粘度範囲内で製剤化することができる。液体または粘性組成物は担体を含むことができ、例えば、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液状ポリエチレングリコールなど）およびそれらの適切な混合物を含有する溶媒または分散媒体であり得る。

【0196】

滅菌の注射可能な溶液は、遺伝的に改変された細胞を、求められる量の適切な溶媒に、所望に応じて様々な量の他の成分と共に組み込むことによって調製することができる。そのような組成物は、滅菌水、生理食塩水、グルコース、デキストロースなどの適切な担体

、希釈剤、または賦形剤と混和していてもよい。組成物はまた、凍結乾燥され得る。組成物は、投与経路および所望の調製物に応じて、湿潤剤、分散剤、または乳化剤（例えば、メチルセルロース）、pH緩衝剤、ゲル化または増粘添加剤、保存剤、香味剤、着色剤などの補助物質を含有し得る。参照により本明細書に組み込まれる「REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE」、第17版、1985などの標準的なテキストを参考にして、過度の実験を行うことなく適切な調製物を調製することができる。

【0197】

抗菌保存剤、抗酸化剤、キレート剤、および緩衝剤を含む、組成物の安定性および無菌性を高める様々な添加剤を添加することができる。微生物の作用の防止は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸などによって確実にすることができる。注射可能な医薬品形態の長期吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの使用によってもたらされ得る。しかしながら、本開示の主題によれば、使用される任意のビヒクル、希釈剤、または添加剤は、遺伝的に改変された細胞と適合性でなければならない。

【0198】

組成物は等張性であり得る、すなわち、それらは血液および涙液と同じ浸透圧を有し得る。組成物の所望の等張性は、塩化ナトリウム、または他の薬学的に許容され得る薬剤、例えばデキストロース、ホウ酸、酒石酸ナトリウム、プロピレングリコールまたは他の無機もしくは有機溶質を使用して達成され得る。塩化ナトリウムは、特にナトリウムイオンを含有する緩衝液用であり得る。

【0199】

組成物の粘度は、所望であれば、薬学的に許容され得る増粘剤を使用して、選択されたレベルに維持することができる。例えば、メチルセルロースは、容易かつ経済的に入手可能であり、取り扱いが簡単である。他の適切な増粘剤には、例えば、キサンタンガム、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボマーなどが含まれる。増粘物質の濃度は、選択された薬剤に依存し得る。重要な点は、選択された粘度を達成するであろう量を使用することである。明らかに、適切な担体および他の添加剤の選択は、正確な投与経路および特定の剤形、例えば液状剤形（例えば、組成物が、溶液、懸濁液、ゲルまたは他の液状形態、例えば、時間放出形態または液体充填形態に製剤化されるかどうか）の性質に依存するだろう。

【0200】

本開示の細胞を含む組成物は、抗原に対する免疫応答を誘導および／もしくは増強するため、ならびに／または新生物形成を処置および／もしくは予防するために、対象に全身的にまたは直接的に供給することができる。ある特定の実施形態では、本開示の細胞またはそれを含む組成物は、目的の器官（例えば、新生物形成によって影響を受ける器官）に直接注射される。あるいは、本開示の細胞またはそれを含む組成物は、例えば循環系（例えば、腫瘍血管系）への投与によって、目的の器官に間接的に供給される。増殖剤および分化剤は、インビトロまたはインビボで細胞（例えば、T細胞またはNK細胞）の産生を増加させるために、細胞または組成物の投与前、投与中または投与後に供給され得る。

【0201】

本開示の細胞は、任意の生理学的に許容され得るビヒクル中で、通常は血管内に投与することができるが、細胞が再生および分化のための適切な部位（例えば、胸腺）を見出すことができる骨または他の好都合な部位に導入することもできる。

【0202】

投与される細胞の数量は、処置されている対象によって異なり得る。ある特定の実施形態では、約 10^4 個と約 10^{10} 個との間、約 10^4 個と約 10^7 個との間、約 10^5 個と約 10^7 個との間、約 10^5 個と約 10^9 個との間、約 10^5 個と約 10^{10} 個との間、または約 10^6 個と約 10^8 個との間の本開示の細胞が、対象に投与される。より有効な細胞は、さらに少ない数で投与されてもよい。通常、少なくとも約 1×10^5 個の細胞が投与され、最終的には約 1×10^{10} 個またはそれを超える数に達する。ある特定の実施形

態では、少なくとも約 1×10^5 個、約 2×10^5 個、約 5×10^5 個、約 1×10^6 個、約 5×10^6 個、約 1×10^7 個、約 5×10^7 個、約 1×10^8 個、約 5×10^8 個、約 1×10^9 個、または約 5×10^9 個の本開示の細胞が、対象に投与される。ある特定の実施形態では、約 10^5 個と約 10^6 個との間の本開示の細胞が、対象に投与される。ある特定の実施形態では、約 1×10^5 個の本開示の細胞が、対象に投与される。ある特定の実施形態では、約 2×10^5 個の本開示の細胞が、対象に投与される。ある特定の実施形態では、約 5×10^5 個の本開示の細胞が、対象に投与される。ある特定の実施形態では、約 1×10^6 個の本開示の細胞が、対象に投与される。有効用量と考えられ得るものの正確な決定は、特定の対象のサイズ、年齢、性別、体重、および症状を含む、各対象に個別の因子に基づき得る。投与量は、本開示および当技術分野の知識から、当業者によって容易に確認することができる。

10

【0203】

本開示の細胞は、精製された細胞の集団を含み得る。当業者は、蛍光活性化細胞選別（FACS）などの様々な周知の方法を使用して、集団中の本開示の細胞の割合を容易に決定することができる。本開示の免疫応答性細胞を含む集団における純度の適切な範囲は、約50%～約55%、約5%～約60%、および約65%～約70%である。ある特定の実施形態では、純度は、約70%～約75%、約75%～約80%、または約80%～約85%である。ある特定の実施形態では、純度は、約85%～約90%、約90%～約95%、および約95%～約100%である。投与量は、当業者によって容易に調整され得る（例えば、純度の低下は、投与量の増加を要する可能性がある）。細胞は、注射、カテーテルなどによって導入することができる。

20

【0204】

当業者は、組成物中のおよび方法で投与される細胞ならびに任意の添加剤、ビヒクル、および／または担体の量を容易に決定することができる。典型的には、任意の添加剤（活性細胞（複数可）および／または薬剤（複数可）に加えて）は、リン酸緩衝生理食塩水中0.001～50%（重量）溶液の量で存在し、活性成分は、マイクログラムからミリグラムのオーダー、例えば約0.0001～約5重量%、約0.0001～約1重量%、約0.0001～約0.05重量%または約0.001～約20重量%、約0.01～約10重量%、または約0.05～約5重量%で存在する。動物またはヒトに投与される任意の組成物に対して、以下を決定することができる：適切な動物モデル、例えばマウスなどのげっ歯類における致死量（LD）およびLD50を決定することなどによる毒性；適切な応答を誘発する組成物（複数可）の投与量、組成物（複数可）中の構成要素の濃度および組成物（複数可）を投与するタイミング。そのような決定は、当業者の知識、本開示および本明細書で引用される文献からの過度の実験を要しない。また、連続投与の時間は、過度の実験なしに確認することができる。

30

【0205】

ある特定の実施形態では、組成物は、本開示の細胞および薬学的に許容され得る担体を含む医薬組成物である。

【0206】

組成物の投与は、自家または異種であり得る。例えば、細胞は、1つの対象から得られ得、同じ対象または異なる適合する対象に投与され得る。末梢血由来細胞またはその子孫（例えば、インビボ、エクスピボまたはインビトロ由来）を投与することができる。本開示の組成物（例えば、本開示の細胞を含む医薬組成物）を投与する場合、それは単位投与量の注射可能な形態（溶液、懸濁液、エマルジョン）で製剤化され得る。

40

【0207】

本開示の細胞および組成物は、経口投与、静脈内投与、皮下投与、節内投与、腫瘍内投与、髄腔内投与、胸膜内投与、骨内投与、腹腔内投与、胸膜投与、および対象への直接投与を含むがこれらに限定されない、当技術分野で公知の任意の方法によって投与することができる。

5.7. 処置の方法

50

【0208】

本開示の主題は、免疫応答の誘導および／または増加を必要とする対象において、免疫応答を誘導および／または増加させるための方法を提供する。本開示の細胞およびそれを含む組成物は、治療または医薬に使用することができる。本開示の主題は、細胞（例えば、T細胞、例えばCD4⁺T細胞またはCD8⁺T細胞）またはそれを含む組成物を使用する様々な方法を提供する。例えば、本開示の細胞およびそれを含む組成物は、対象における腫瘍負荷を軽減するために使用することができる。本開示の細胞は、対象における腫瘍細胞の数を減少させ、腫瘍サイズを減少させ、および／または腫瘍を根絶することができる。本開示の細胞およびそれを含む組成物は、対象における新生物または腫瘍を処置および／または予防するために使用することができる。本開示の細胞およびそれを含む組成物は、新生物または腫瘍に罹患している対象の生存を延長するために使用することができる。本開示の細胞およびそれを含む組成物は、対象における病原体感染を処置および／または予防するために使用することができる。そのような方法は、所望の効果、例えば、既存の症状の緩和または再発の防止を達成するために、本開示の細胞またはそれを含む組成物（例えば、医薬組成物）を投与することを含む。処置のために、投与される量は、所望の効果を生じるのに有効な量である。有効量は、1回または一連の投与で供給することができる。有効量は、ボラスまたは連続灌流によって供給することができる。

10

【0209】

本開示の主題は、細胞（例えば、T細胞）またはそれを含む組成物を使用する様々な方法を提供する。例えば、本開示の主題は、対象における腫瘍負荷を軽減する方法を提供する。ある特定の実施形態では、腫瘍負荷を軽減する方法は、本開示の細胞またはそれを含む組成物を対象に投与することを含む。本開示の細胞は、対象における腫瘍細胞の数を減少させ、腫瘍サイズを減少させ、および／または腫瘍を根絶することができる。

20

【0210】

腫瘍は固形腫瘍であり得る。固形腫瘍の非限定的な例としては、中皮腫、肺癌、膵臓癌、卵巣癌、乳癌、結腸直腸癌、胸膜腫瘍、グリア芽腫、食道癌、胃癌（gastric cancer）、滑膜肉腫、胸腺癌腫、子宮内膜癌腫、胃癌（stomach cancer）、黒色腫、肝細胞癌腫、腎細胞癌腫、軟部組織肉腫、および胆管癌腫が挙げられる。

【0211】

本開示の主題はまた、新生物を有する対象の生存を増加または延長する方法を提供する。ある特定の実施形態では、新生物を有する対象の生存を増加または延長する方法は、本開示の免疫応答性細胞またはそれを含む組成物を対象に投与することを含む。方法は、対象における腫瘍負荷を軽減または根絶することができる。さらに、本開示の主題は、本開示の細胞またはそれを含む組成物を対象に投与することを含む、対象における免疫応答を増加させるための方法を提供する。本開示の主題は、本開示の細胞またはそれを含む組成物を対象に投与することを含む、対象における新生物を処置および／または予防するための方法をさらに提供する。

30

【0212】

新生物または腫瘍の非限定的な例としては、B細胞白血病、B細胞リンパ腫、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、慢性リンパ性白血病（CLL）、急性骨髄性白血病（AML）、多発性骨髄腫、リンパ腫（ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫）、グリア芽腫、骨髄異形成症候群（MDS）、および慢性骨髄性白血病（CML）、骨癌、腸の癌、肝臓癌、皮膚癌、頭頸部の癌、黒色腫（皮膚のまたは眼内悪性黒色腫）、腎癌（例えば、明細胞癌腫）、咽頭癌、前立腺癌（例えば、ホルモン抵抗性前立腺癌）、血液癌（例えば、白血病、リンパ腫および骨髄腫）、子宮癌、直腸癌、肛門領域の癌、膀胱癌、脳の癌、胃癌（stomach cancer）、精巣癌、卵管の癌腫、子宮内膜の癌腫、子宮頸部の癌腫、膣の癌腫、外陰部の癌腫、白血病（例えば、急性白血病、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、急性骨髄芽球性白血病、急性前骨髄球性白血病、急性単球性白血病、急性赤白血病、慢性白血病、慢性骨髄性白血病、真性赤血球増加症、小腸の癌、内分泌系の癌、甲状腺の癌、副甲状腺の癌、副腎の癌、軟部組織の肉腫、尿道の癌、陰茎の癌、小

40

50

児の固形腫瘍、リンパ球性リンパ腫、膀胱の癌、腎臓または尿管の癌、腎盂の癌腫、中枢神経系（CNS）の新生物、原発性CNSリンパ腫、腫瘍血管新生、脊髄軸腫瘍、脳幹グリオーマ、下垂体腺腫、カボジ肉腫、類表皮癌、扁平上皮癌、T細胞リンパ腫、アスベストによって誘発されるものを含む環境的に誘発される癌、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症を含む、重鎖病、ならびに肉腫および癌腫などの固形腫瘍（例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、扁平上皮癌腫、基底細胞癌腫、腺癌腫、汗腺癌腫、脂腺癌腫、乳頭癌腫、乳頭腺癌腫、嚢胞腺癌腫、髄様癌腫、気管支癌腫、肝細胞腫、胆管（bile duct）癌腫、絨毛癌腫、セミノーマ、胚性癌腫、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、唾液腺癌、子宮癌、精巣癌、膀胱癌腫、上皮癌腫、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、乏突起膠腫（oligodendroglioma）、神経鞘腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽腫、および網膜芽腫）が挙げられる。

10

【0213】

ある特定の実施形態では、腫瘍または新生物は、B細胞白血病、B細胞リンパ腫、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、慢性リンパ性白血病（CLL）、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、急性骨髄性白血病（AML）、および混合表現型急性白血病（MPAL）からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、CARはCD19に結合する。

【0214】

本開示の主題はまた、病原体感染を有する対象の生存を増加または延長する方法を提供する。ある特定の実施形態では、方法は、本開示の免疫応答性細胞またはそれを含む組成物を対象に投与することを含む。非限定的な病原体感染には、HIVおよび真菌感染が含まれる。

20

【0215】

対象は進行した形態の疾患を有し得、その場合、処置の目的は、疾患進行の軽減もしくは逆転、および／または副作用の改良を含み得る。対象は、既に処置されている症状の病歴を有し得、その場合、治療目的は、典型的には再発のリスクの減少または遅延を含む。

【0216】

免疫学的合併症（「悪性T細胞形質転換」として公知）、例えば移植片対宿主病（GvHD）のリスクを回避または最小化するために、または健康な組織が腫瘍細胞と同じ標的抗原を発現して、GvHDと同様の転帰をもたらしている場合に、本開示の細胞（例えば、T細胞）にさらなる改変が導入され得る。この問題に対する潜在的な解決策は、本開示の細胞に自殺遺伝子を操作することである。適切な自殺遺伝子には、単純ヘルペスウイルススチミジンキナーゼ（HSVtk）、誘導性カスパーゼ9自殺遺伝子（iCasp-9）、および切断型ヒト上皮成長因子受容体（EGFRt）ポリペプチドが含まれるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、自殺遺伝子はEGFRtポリペプチドである。EGFRtポリペプチドは、抗EGFRモノクローナル抗体（例えば、セツキシマブ）を投与することによって、T細胞排除を可能にすることができる。EGFRtは、CARの上流に共有結合され得る。自殺遺伝子は、本開示のCARをコードする核酸を含むベクター内に含めることができる。このように、悪性T細胞形質転換（例えば、GVHD）中での、自殺遺伝子を活性化するように設計されたプロドラッグ（例えば、プロドラッグ（例えば、iCasp-9を活性化することができるAP1903）の投与は、CARを発現する自殺遺伝子活性化細胞においてアポトーシスを引き起こす。本開示の、例えばCARへの自殺遺伝子の組込みは、非常に短い期間内に大部分の受容体発現細胞を排除する能力を伴って、さらなるレベルの安全性を与える。自殺遺伝子が組み込まれた本開示の細胞（例えば、T細胞）は、細胞注入後の所与の時点で先行して排除され得るか、または毒性の最も早い徴候で根絶され得る。

30

40

5.8. キット

【0217】

50

本開示の主題は、対象における免疫応答を誘導および／もしくは増強し、対象における新生物もしくは腫瘍を処置および／もしくは予防し、対象における腫瘍負荷を軽減し、対象において新生物を有する対象の生存を増加もしくは延長し、ならびに／または病原体感染を処置および／もしくは予防するためのキットを提供する。ある特定の実施形態では、キットは、本開示の細胞またはそれを含む組成物を含む。ある特定の実施形態では、キットは滅菌容器を含み；そのような容器は、箱、アンプル、ボトル、バイアル、チューブ、バッグ、パウチ、ブリスターパック、または当技術分野で公知の他の適切な容器形態であり得る。そのような容器は、プラスチック、ガラス、ラミネート紙、金属箔、または医薬を保持するのに適した他の材料から作製され得る。ある特定の非限定的な実施形態では、キットは、本開示のCARをコードする核酸分子を含む。

10

【0218】

所望であれば、細胞および／または核酸分子は、細胞または核酸分子を、新生物形成を有するかまたは発症するリスクがある対象に投与するための説明書と共に提供される。説明書は、一般に、新生物形成の処置および／または予防のための組成物の使用に関する情報を含む。ある特定の実施形態では、説明書は、以下のうちの少なくとも1つを含む：治療剤の説明；新生物形成の処置または予防のための投与量スケジュールおよび投与；注意；警告；指示；反適応（counter-indications）；過剰投与情報；有害反応；動物薬理学；臨床研究；および／または参考文献。説明書は、容器（存在する場合）に直接印刷されてもよく、または容器に貼付された標識として、または容器内または容器と共に供給される別個のシート、パンフレット、カード、またはフォルダとして印刷されてもよい。

20

【実施例】

【0219】

6. 実施例

本開示の主題は、限定のためではなく、本開示の主題の例示として提供される以下の実施例を参照することによって、より良く理解されるであろう。

実施例1：CD28変異CAR T細胞のインビトロおよびインビボ特徴付け

【0220】

CD28が（YMNMにおけるYMxMコンセンサスの存在を介して）PI3K p85サブユニットに直接結合するだけでなく、Grb2（YxNxコンセンサスモチーフに結合する）がGab1およびGab2に結合し、これが次にPI3K p85サブユニットを動員し、下流シグナリングを開始することができるので、PI3Kシグナリングは冗長であると思われる。

30

【0221】

CD28分子に癒着することができるアダプター分子の数が多様であることを考えると、T細胞の機能的転帰（すなわち、エフェクター細胞傷害性、サイトカイン分泌、活性化、生存、メモリー形成および疲弊）は、これらのアダプター分子のCD28への結合に由来する下流シグナリングカスケードの合計の結果である可能性が最も高い。したがって、これらのCD28モチーフの改変は、シグナリングを変更させ、エフェクター機能の強化および／または機能不全の軽減をもたし得る様々なアダプター分子の結合を許容するかまたは制限し得る。T細胞の最終分化におけるPI3Kシグナリングの関わりを考えると、このシグナリング経路の冗長性はエフェクター機能にとって有害である可能性があり、それを調節することは有益である可能性がある（図1）。

40

【0222】

CD28のYMNMモチーフが結合パートナー（アダプター分子）を決定する能力、およびそれらのパートナーがPI3K、Grb2、およびGADSに由来するいくつかのシグナリングカスケードを介してT細胞の運命を決定する能力を考えて、これらのアダプター分子のCD28への結合を許容するかまたは除外するいくつかのCD28変異を作成した（図2、図12）。

CD28-YKNI変異CAR T細胞の特徴付け

50

【0223】

CD28-YKNI変異CAR T細胞を作成した。切断型EGFRドメイン(Et a h 19)を発現する種々のヒトCD19標的化CAR T細胞を、種々のエフェクター：腫瘍比でGFP-f f lシフェラーゼを発現するCD19+NALM6細胞(NALM6 g L)と共培養した。腫瘍細胞の溶解(非シグナリングCAR T細胞に対して)を、24時間後に生物発光によって測定した。CD28-YKNI変異CAR T細胞は、インビトロで強力な殺滅能力を有することが見出された(図3A～図3D)。

【0224】

ヒトCD19標的化CAR T細胞を単独で培養、1：1のエフェクター：腫瘍比でCD19+NALM6細胞と共培養した。24時間後に、上清を回収し、ビーズベースのマルチプレックスアッセイを利用してサイトカインを測定した。CD28-YKNI変異CAR T細胞は、独特のサイトカイン分泌プロファイルを示した(図4A～図4N)。

【0225】

種々のヒトCD19標的化CAR T細胞を、1：5のE：T比および50,000 CAR T細胞/mLの濃度でNALM6と共培養した。概ね5日ごとに、CAR T細胞を計数し、フローサイトメトリー、メモリー表現型(CD62L+)およびCD4/CD8分布によって特徴付けた。開始数の腫瘍細胞を異なる時点で培養物に添加して戻した。CD28-YKNI変異CAR T細胞はまた、インビトロで強力な殺滅増殖能を有した(図5)。CD28-YKNI変異CAR T細胞は、CD28およびCD28-1xx CAR T細胞と比較して、反復抗原遭遇の状況下においてメモリー表現型を保持した(図6)。CD28-YKNI変異CAR T細胞は、CD28およびCD28-1xx CAR T細胞と比較して、反復抗原遭遇の状況下において比較的バランスのとれたCD8：CD4比を保持した(図7)。

【0226】

CD28-YKNI変異CAR T細胞は、単回および複数回刺激の後で拘束された活性化プロファイルを実証した。CAR T細胞を、1：5の初期E：T(1回刺激)でNALM6 g Lと共培養した。並行して、CAR T細胞を、合計5回の刺激(12時間ごとに1回刺激)のために、同じ量の腫瘍で反復刺激した。共培養の開始からおよそ10日後に、サイズ/幼若化(前方散乱によって評価)をフローサイトメトリーによって評価した。CD28-YKNI変異CAR T細胞は、単回または複数回活性化後に、より低い幼若化を実証した(図8)。

【0227】

CD28-YKNI変異CAR T細胞の代謝プロファイルを、単回または複数回刺激の9日後に測定した。CD28-YKNI変異CAR T細胞は、単回または複数回刺激の後で有意により低い基礎呼吸を実証した(図9A)。有意により高い基礎酸素消費速度(OCR)が、白血病抗原で5回刺激した後のEt a h 19 h 28 ZおよびEt a h 19 h 28 Z p 33において測定されたが、わずか1回刺激した後にはこの差異は存在しなかった。細胞の基礎酸素消費の増加は、主なエネルギー生成機構として酸化的リン酸化に優先的に依存することを示唆し、増強されたCAR T細胞増殖のために要する代謝要求を説明した。これは、腫瘍抗原によるさらなる刺激後(例えば、刺激1回と比較した刺激5回)の基礎OCRの増加でさらに確認された。

【0228】

CD28-YKNI変異CAR T細胞はまた、単回または複数回刺激の後で有意により低い乳酸産生を実証した(図9B)。細胞外酸性化速度(ECAR)は、解糖中の乳酸産生の測定可能な代用物である。刺激されたCAR T細胞における基礎ECARの増加は、解糖系活性の増加を示唆し、これは、典型的には抗原で活性化されたT細胞で測定される。Et a h 19 h M U T h ZにおけるECARの増加が観察されたが、最小であり、この改変を有するT細胞が有意な刺激を経験しなかったことを示唆した。

【0229】

CAR T細胞を、1：5の初期E：T(1回刺激)でNALM6 g Lと共培養した。

10

20

30

40

50

並行して、CAR T細胞を、合計5回の刺激（12時間ごとに1回刺激）のために、同じ量の腫瘍で反復刺激した。共培養の開始からおよそ10日後に、疲弊マーカー（LAG3およびPD1）をフローサイトメトリーによって評価した。CD28-YKNI変異CAR T細胞は、より低いレベルの共阻害分子（LAG3およびPD1、TIM-3およびPD1）を発現し、単回または複数回刺激の状況において（図10A～図10B）

【0230】

変異ベースのCAR T細胞のインビボ抗腫瘍効果を測定した。NCGマウスに 10^6 個のNALM6 gfp⁺ffLUC⁺腫瘍細胞を接種し、4日後にCAR T細胞で処置した。CAR T細胞は、2人の異なる健常ドナーに由来した。CD28-YKNI変異CD19標的化CAR T細胞は、インビボで標準的なCD28ベースのCAR T細胞を凌駕した（図11）。

他のCD28変異CAR T細胞の特徴付け

【0231】

切断型EGFRドメイン（Etha19）を発現する種々のヒトCD19標的化CD28変異CAR T細胞（CD28-YKNI、CD28-YMDM、CD28-YGGG、CD28-YENV、CD28-YKNL、およびCD28-YSNV）CD28を、種々のエフェクター：腫瘍比でGFP-ffルシフェラーゼを発現するCD19+NALM6細胞（NALM6 gL）と共培養し、腫瘍細胞の溶解（非シグナリングCAR T細胞に対して）を24時間後に生物発光によって測定した。CD28-YKNI変異CAR T細胞は、24時間殺滅アッセイにおいて同等の殺滅能力を示した（図13）。

【0232】

種々のヒトCD19標的化CAR T細胞を、1：5のE：T比および25,000 CAR T細胞/mLの開始濃度でNALM6と共培養した。CAR+およびNALM6の濃度を毎日測定し、6日間にわたってプロットした。CD28-Yxxx変異CD19標的化CAR T細胞（YKNI、YENV、およびYMDM）は、インビトロで標準的なCD28ベースのCAR T細胞を凌駕した（図14）。CD28変異体は、インビトロで強力な長期細胞傷害能力を表した。

【0233】

CAR T細胞を、1：5の初期E：T（1回刺激）でNALM6 gLと共培養した。並行して、CAR T細胞を、合計5回の刺激（12時間ごとに1回刺激）のために、同じ量の腫瘍で反復刺激した。共培養の開始からおよそ10日後に、疲弊マーカー（TIM3およびPD1）をフローサイトメトリーによって評価した。CD28変異体は、良好な疲弊免疫表現型を実証した（図15）。

【0234】

CD28-Yxxx変異CD19標的化CAR T細胞（YKNI、YENV、およびYMDM）は、インビトロで標準的なCD28ベースのCAR T細胞を凌駕した（図16～図18）。NCGマウスに $1e6$ 個のNALM6 gfp⁺ffLUC⁺腫瘍細胞を接種し、4日後にCAR T細胞で処置した。生存率をグラフ化した。生物発光を毎週測定した。CAR T細胞は、単一の健常ドナーに由来した。

実施例2：CD28変異CAR T細胞の特徴付け

【0235】

YENV、YKNI、YGGG、YMDMおよびYSNV CD19標的化CAR T細胞を含むCD28-Yxxx変異CD19標的化CAR T細胞を作成した。これらのCD28変異CAR T細胞のインビトロおよびインビボでの特徴を特徴付けた。

【0236】

CD28-Yxxx変異CD19標的化CAR T細胞を、1：15のE：T比でNALM6 gLと共培養した。NALM6の濃度を毎日測定し、7日間にわたってプロットし、細胞/mLでプロットした。CD28-Yxxx変異CD19標的化CAR T細胞（CD28-YENV、CD28-YKNI、CD28-YGGG、CD28-YMDMおよびCD28-YSNV）は、標準的なCD28ベースのCAR T細胞を凌駕し、イン

10

20

30

40

50

ビトロで強力な長期細胞傷害能力を実証したことが観察された（図19）。

【0237】

CD28-Yxxx変異CD19標的化CAR T細胞を、1:15および1:30のE:T比でNALM6gLと共培養した。5日後に、疲弊マーカー（LAG3、TIM3およびPD1）発現CAR T細胞をフローサイトメトリーによって評価した。CD28-Yxxx変異CD19標的化CAR T細胞は、良好な疲弊免疫表現型を有した（図20）。

【0238】

CD28変異CAR T細胞のインビボ抗腫瘍効果を示すために、NCGマウスに 1×10^6 個のNALM6gfp⁺ffLUC⁺腫瘍細胞を接種し、4日後に500,000個または200,000個のCAR T細胞で処置した。CD28-Yxxx変異CD19標的化CAR T細胞は、インビボで増強された腫瘍制御を実証し、標準的なCD28ベースのCAR T細胞を凌駕した（図21および図22）。

【0239】

CD28-Yxxx変異CD19標的化CAR T細胞は、抗原密度とは無関係にインビトロで増強された増殖を表した。ヒトCD19標的化CD28-Yxxx変異CAR T細胞を、高または低CD19抗原密度のいずれか、1:1のE:T比でNALM6gLと共培養した。6日ごとに、CAR+T細胞を計数し、合計3回の刺激のためにNALM6gLで再刺激した。CD28-Yxxx変異CD19標的化CAR T細胞は、高および低抗原密度の両方のCD19腫瘍細胞の状況下において、インビトロで標準的なCD28ベースのCAR T細胞に対して増強された増殖を示した（図23）。

【0240】

CD28-Yxxx変異CD19標的化CAR T細胞のサイトカイン分泌プロファイルを測定した。ヒトCD19標的化CD28-Yxxx変異CAR T細胞を、NALM6gLと共培養した。24時間後に、上清を回収し、インターロイキン-2、TNF- α 、GM-CSF、インターフェロン- γ 、IL-9、およびIL-17を含むサイトカインを、Luminexビーズベースのマルチプレックスアッセイによって測定した。CD28-Yxxx変異CD19標的化CAR T細胞は、抗原への曝露時に独特のサイトカイン分泌プロファイルを実証した（図24A～図24C）。

【0241】

本開示の主題およびその利点のいくつかを詳細に説明してきたが、本開示の趣旨および範囲から逸脱することなく、本明細書において様々な変化、置換および変更を行うことができることを理解されたい。さらに、本出願の範囲は、本明細書に記載されるプロセス、機械、製造、および物質の組成物、ならびに方法の特定の実施形態に限定されることを意図しない。当業者が、本開示の主題の開示から容易に理解するであろうように、本開示の主題に従って、本明細書に記載の対応する実施形態と実質的に同じ機能を実行するか、または実質的に同じ結果を達成する、現在存在するか、または今後開発される、プロセス、機械、製造、物質の組成物、または方法が利用されてもよい。したがって、添付の特許請求の範囲は、そのようなプロセス、機械、製造、物質の組成物、または方法を特許請求の範囲内に含むことを意図している。

【0242】

様々な特許、特許出願、刊行物、製品説明、プロトコル、および配列アクセッション番号が本出願を通して引用され、その開示はあらゆる目的のために参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目1)

細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および変異型YMNMMモチーフを含むCD28ポリペプチドを含む少なくとも1つの共刺激シグナリングドメインを含む細胞内シグナリングドメインを含むキメラ抗原受容体（CAR）。

(項目2)

前記CD28ポリペプチドが、天然型YMNMMモチーフを含むCD28分子と比較して、ホスホイノシチド3-キナーゼ（PI3K）のp85サブユニットの動員を減少させている、項目1に記載のCAR。

(項目3)

PI3Kのp85サブユニットが変異型YMNMMモチーフに結合しない、項目1または2に記載のCAR。

(項目4)

前記変異型YMNMMモチーフが、YxNx（配列番号21）に記されるアミノ酸配列からなり、xがメチオニン（M）ではない、項目3に記載のCAR。

(項目5)

前記変異型YMNMMモチーフが、YENV（配列番号22）、YSNV（配列番号23）、YKNL（配列番号24）、YENQ（配列番号25）、YKNI（配列番号26）、YINQ（配列番号27）、YHNK（配列番号28）、YVNQ（配列番号29）、YLNP（配列番号30）、YLNT（配列番号31）、YDND（配列番号66）、YENI（配列番号67）、YENL（配列番号68）、YKNQ（配列番号72）、YKNV（配列番号73）、またはYANG（配列番号87）に記されるアミノ酸配列からなる、項目3または4に記載のCAR。

(項目6)

前記変異型YMNMMモチーフが、YSNV（配列番号23）、YENV（配列番号22）、またはYKNI（配列番号26）に記されるアミノ酸配列からなる、項目3から5のいずれか1項に記載のCAR。

(項目7)

前記変異型YMNMMモチーフが、YSNV（配列番号23）に記されるアミノ酸配列からなる、項目3から6のいずれか1項に記載のCAR。

(項目8)

前記変異型YMNMMモチーフが、成長因子受容体結合受容体2（Grb2）および／またはShcの下流のGrb2関連アダプター（GADS）に結合する、項目3から7のいずれか1項に記載のCAR。

(項目9)

前記変異型YMNMMモチーフが、Grb2および／またはGADSに結合しない、項目1または2に記載のCAR。

(項目10)

前記変異型YMNMMモチーフが、YMxM（配列番号20）に記されるアミノ酸配列からなり、xがアスパラギン酸（N）ではない、項目9に記載のCAR。

(項目11)

前記変異型YMNMMモチーフが、YMDM（配列番号32）、YMPM（配列番号79）、YMRM（配列番号37）、またはYMSM（配列番号80）に記されるアミノ酸配列からなる、項目9または10に記載のCAR。

(項目12)

前記変異型YMNMMモチーフが、YMDM（配列番号32）に記されるアミノ酸配列からなる、項目9から11のいずれか1項に記載のCAR。

(項目13)

前記変異型YMNMMモチーフが、YbxM（配列番号33）に記されるアミノ酸配列からなり、xがアスパラギン酸（N）ではなく、bがメチオニン（M）ではない、項目9に記載のCAR。

(項目14)

前記変異型YMNMMモチーフが、YTHM（配列番号34）、YVLM（配列番号35）、YIAM（配列番号36）、YVEM（配列番号83）、YVKM（配列番号85）、またはYVPM（配列番号86）に記されるアミノ酸配列からなる、項目13に記載のCAR。

10

20

30

40

50

(項目 15)

前記変異型 Y M N M モチーフが、Y M x b (配列番号 65) に記されるアミノ酸配列からなり、x がアスパラギン酸 (N) ではなく、b がメチオニン (M) ではない、項目 9 に記載の C A R。

(項目 16)

前記変異型 Y M N M モチーフが、Y M A P (配列番号 77) に記されるアミノ酸配列からなる、項目 15 に記載の C A R。

(項目 17)

P I 3 K シグナリングの p 85 サブユニットが、変異型 Y M N M モチーフに結合する、項目 9 から 16 のいずれか 1 項に記載の C A R。

(項目 18)

前記変異型 Y M N M モチーフが、G r b 2 および／もしくは G A D S または P I 3 K の p 85 サブユニットに結合しない、項目 1 または 2 に記載の C A R。

(項目 19)

前記変異型 Y M N M モチーフが、Y b x b (配列番号 43) に記されるアミノ酸配列からなり、x がアスパラギン酸 (N) ではなく、b がメチオニン (M) ではない、項目 18 に記載の C A R。

(項目 20)

前記変異型 Y M N M モチーフが、Y G G G (配列番号 44)、Y A A A (配列番号 45)、Y F F F (配列番号 46)、Y E T V (配列番号 69)、Y Q Q Q (配列番号 70)、Y H A E (配列番号 71)、Y L D L (配列番号 74)、Y L I P (配列番号 75)、Y L R V (配列番号 76)、Y T A V (配列番号 82)、または Y V H V (配列番号 84) に記されるアミノ酸配列からなる、項目 19 に記載の C A R。

(項目 21)

前記変異型 Y M N M モチーフが、Y G G G (配列番号 44) に記されるアミノ酸配列からなる、項目 18 から 20 のいずれか 1 項に記載の C A R。

(項目 22)

前記変異型 Y M N M モチーフが、P I 3 K の p 85 サブユニットに結合することができるメチオニン残基の数を制限することによって、P I 3 K シグナリングを調節することができる、項目 1 または 2 に記載の C A R。

(項目 23)

前記変異型 Y M N M モチーフが、Y M N x (配列番号 38) または Y x N M (配列番号 39) に記されるアミノ酸配列からなり、x がメチオニン (M) ではない、項目 22 に記載の C A R。

(項目 24)

前記変異型 Y M N M モチーフが、Y M N V (配列番号 40)、Y E N M (配列番号 41)、および Y M N Q (配列番号 42)、Y M N L (配列番号 78)、または Y S N M (配列番号 81) に記されるアミノ酸配列からなる、項目 22 または 23 に記載の C A R。

(項目 25)

前記細胞外抗原結合ドメインが抗原に結合する、項目 1 から 24 のいずれか 1 項に記載の C A R。

(項目 26)

前記抗原が、腫瘍抗原または病原体抗原である、項目 25 に記載の C A R。

(項目 27)

前記抗原が腫瘍抗原である、項目 25 または 26 に記載の C A R。

(項目 28)

前記腫瘍抗原が、C D 19、メソテリン、A X L、T I M 3、H V E M、M U C 16、M U C 1、C A 1 X、C E A、C D 8、C D 7、C D 10、C D 20、C D 22、C D 30、C L L 1、C D 33、C D 34、C D 38、C D 41、C D 44、C D 49 f、C D 56、C D 70、C D 74、C D 99、C D 123、C D 133、C D 138、E G P -

10

20

30

40

50

2、EGP-40、EpCAM、Erb-B、FBP、胎児アセチルコリン受容体、葉酸受容体-α、GD2、GD3、HER-2、hTERT、IL-13R-α2、κ-軽鎖、KDR、LeY、L1細胞接着分子、MAGE-A1、MAGEA3、CT83（KK-LC-1としても公知）、p53、MART1、GP100、プロテイナーゼ3（PR1）、チロシナーゼ、サバイビン、hTERT、EphA2、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、がん胎児性抗原（h5T4）、PSCA、PSMA、ROR1、TAG-72、VEGF-R2、WT-1、BCMA、CD44V6、NKCS1、EGF1R、EGFR-VIII、ADGRE2、CCR1、LILRB2、PRAME、HPV E6がんタンパク質、およびHPV E7がんタンパク質からなる群から選択される、項目27に記載のCAR。

10

(項目29)

前記腫瘍抗原がCD19である、項目28に記載のCAR。

(項目30)

前記変異型YMNMMモチーフが、YMDM（配列番号32）に記されるアミノ酸配列からなる、項目1から29のいずれか1項に記載のCAR。

(項目31)

前記細胞外抗原結合ドメインがCD19に結合する、項目30に記載のCAR。

(項目32)

配列番号51に記されるアミノ酸配列を含む、項目31に記載のCAR。

(項目33)

前記変異型YMNMMモチーフが、YKNI（配列番号26）に記されるアミノ酸配列からなる、項目1から29のいずれか1項に記載のCAR。

20

(項目34)

前記細胞外抗原結合ドメインがCD19に結合する、項目33に記載のCAR。

(項目35)

配列番号55に記されるアミノ酸配列を含む、項目34に記載のCAR。

(項目36)

前記変異型YMNMMモチーフが、YENV（配列番号22）に記されるアミノ酸配列からなる、項目1から29のいずれか1項に記載のCAR。

(項目37)

前記細胞外抗原結合ドメインがCD19に結合する、項目36に記載のCAR。

30

(項目38)

配列番号53に記されるアミノ酸配列を含む、項目37に記載のCAR。

(項目39)

前記変異型YMNMMモチーフが、YSNV（配列番号64）に記されるアミノ酸配列からなる、項目1から29のいずれか1項に記載のCAR。

(項目40)

前記細胞外抗原結合ドメインがCD19に結合する、項目39に記載のCAR。

(項目41)

配列番号57に記されるアミノ酸配列を含む、項目40に記載のCAR。

40

(項目42)

前記変異型YMNMMモチーフが、YGGG（配列番号63）に記されるアミノ酸配列からなる、項目1から29のいずれか1項に記載のCAR。

(項目43)

前記細胞外抗原結合ドメインがCD19に結合する、項目42に記載のCAR。

(項目44)

配列番号61に記されるアミノ酸配列を含む、項目43に記載のCAR。

(項目45)

項目1から44のいずれか1項に記載のCARを含む細胞。

(項目46)

50

免疫応答性細胞である、項目 4 5 に記載の細胞。

(項目 4 7)

リンパ系の細胞または骨髄系の細胞である、項目 4 5 または 4 6 に記載の細胞。

(項目 4 8)

T 細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞、およびリンパ系細胞が分化され得る幹細胞からなる群から選択される、項目 4 5 から 4 7 のいずれか 1 項に記載の細胞。

(項目 4 9)

T 細胞である、項目 4 5 から 4 8 のいずれか 1 項に記載の細胞。

(項目 5 0)

前記 T 細胞が、細胞傷害性 T リンパ球 (CTL)、 $\gamma\delta$ T 細胞、腫瘍反応性リンパ球、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL)、制御性 T 細胞、およびナチュラルキラー T (NKT) 細胞からなる群から選択される、項目 4 8 または 4 9 に記載の細胞。

10

(項目 5 1)

項目 4 5 から 5 0 のいずれか 1 項に記載の細胞を含む組成物。

(項目 5 2)

薬学的に許容され得る賦形剤をさらに含む医薬組成物である、項目 5 1 に記載の組成物。

(項目 5 3)

新生物もしくは腫瘍、および／または病原体感染を処置および／または予防するためのものである、項目 5 1 または 5 2 に記載の組成物。

(項目 5 4)

対象の腫瘍負荷を軽減する方法であって、項目 4 5 から 5 0 のいずれか 1 項に記載の細胞または項目 5 1 から 5 3 のいずれか 1 項に記載の組成物を前記対象に投与することを含む、方法。

20

(項目 5 5)

前記対象における腫瘍細胞の数を減少させ、腫瘍サイズを減少させ、および／または前記腫瘍を根絶する、項目 5 4 に記載の方法。

(項目 5 6)

新生物または腫瘍を処置および／または予防する方法であって、項目 4 5 から 5 0 のいずれか 1 項に記載の細胞または項目 5 1 から 5 3 のいずれか 1 項に記載の組成物を前記対象に投与することを含む、方法。

30

(項目 5 7)

新生物または腫瘍を有する対象の生存を延長する方法であって、項目 4 5 から 5 0 のいずれか 1 項に記載の細胞または項目 5 1 から 5 3 のいずれか 1 項に記載の組成物を前記対象に投与することを含む、方法。

(項目 5 8)

前記新生物および／または腫瘍が、B 細胞白血病、B 細胞リンパ腫、急性リンパ芽球性白血病 (ALL)、慢性リンパ性白血病 (CLL)、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、急性骨髄性白血病 (AML) および混合表現型急性白血病 (MPAL) からなる群から選択される、項目 5 4 から 5 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5 9)

抗原特異的細胞を生産するための方法であって、項目 1 から 4 4 のいずれか 1 項に記載の CAR をコードする核酸分子を細胞に導入することを含む、方法。

40

(項目 6 0)

前記核酸分子がベクター上に存在する、項目 5 9 に記載の方法。

(項目 6 1)

前記ベクターがレトロウイルスベクターである、項目 6 0 に記載の方法。

(項目 6 2)

項目 1 から 4 4 のいずれか 1 項に記載の CAR をコードする核酸分子。

(項目 6 3)

配列番号 5 2、配列番号 5 4、配列番号 5 6、または配列番号 5 8 に記されるヌクレオ

50

チド配列を含む、項目 6 2 に記載の核酸分子。

(項目 6 4)

項目 6 2 または 6 3 に記載の核酸分子を含むベクター。

(項目 6 5)

前記ベクターが γ -レトロウイルスベクター (γ -retroviral vector) である、項目 6 4 に記載のベクター。

(項目 6 6)

項目 6 4 または 6 5 に記載の核酸分子を発現する宿主細胞。

(項目 6 7)

T 細胞である、項目 6 6 記載の宿主細胞。

(項目 6 8)

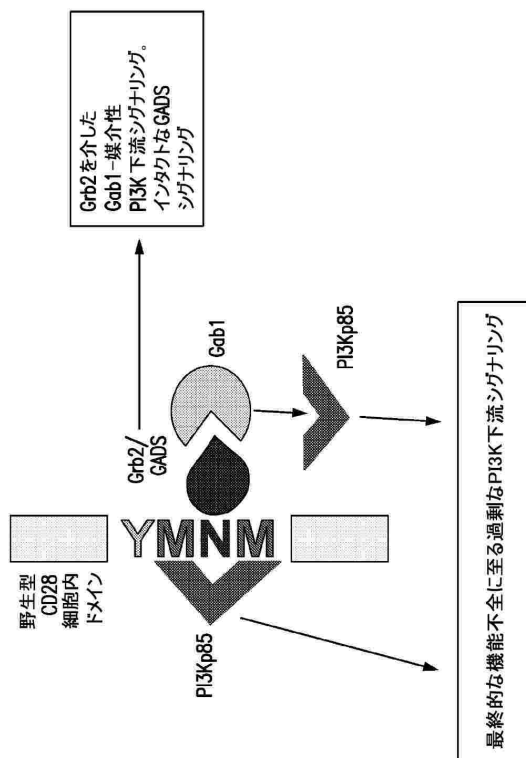
項目 1 から 4 4 のいずれか 1 項に記載の CAR、項目 3 5 から 4 0 のいずれか 1 項に記載の細胞、項目 5 1 から 5 3 のいずれか 1 項に記載の組成物、項目 6 2 もしくは 6 3 に記載の核酸分子、または項目 6 4 もしくは 6 5 に記載のベクターを含むキット。

(項目 6 9)

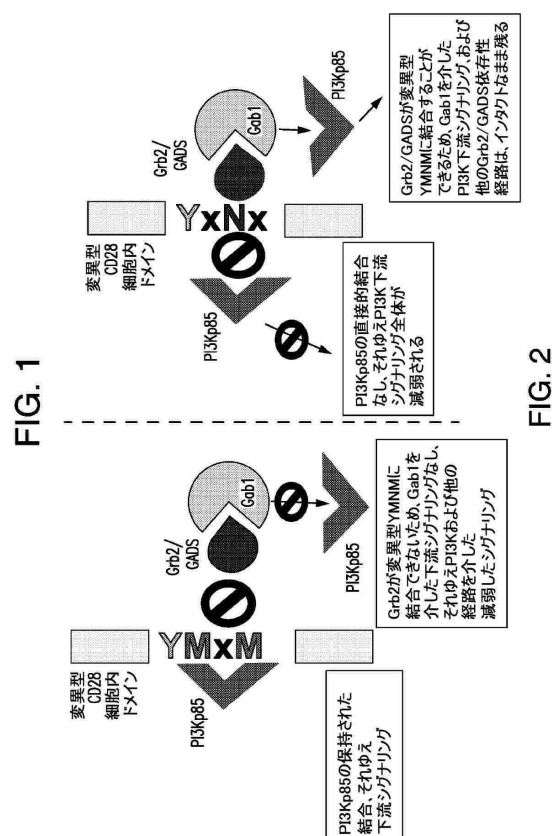
新生物、腫瘍および／または病原体感染を処置および／または予防するための書面による説明書をさらに含む、項目 6 8 に記載のキット。

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

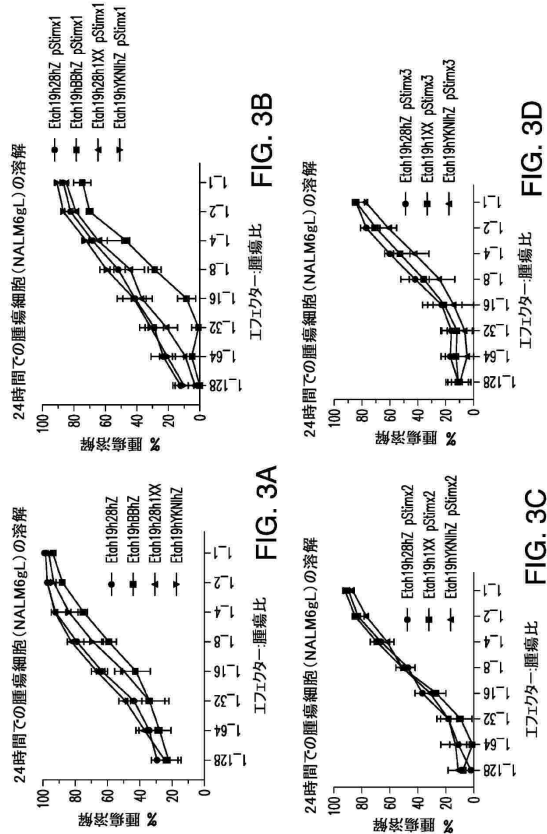
20

30

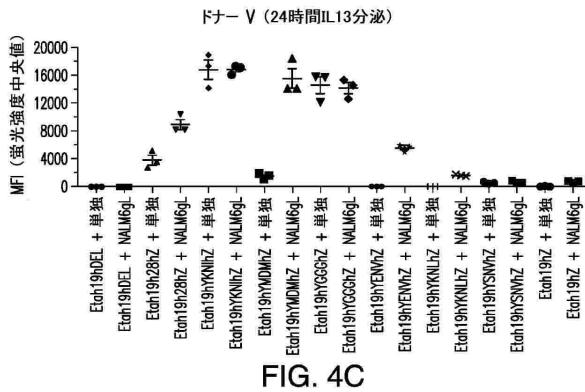
40

50

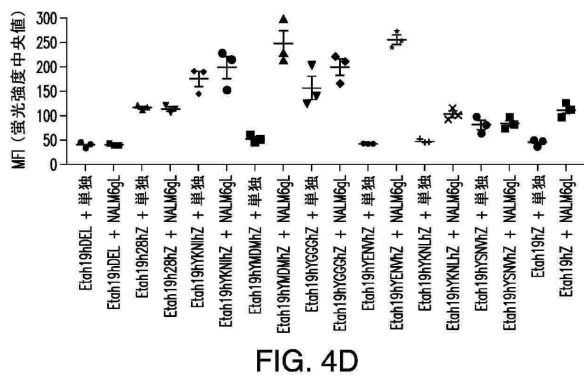
【圖 3】



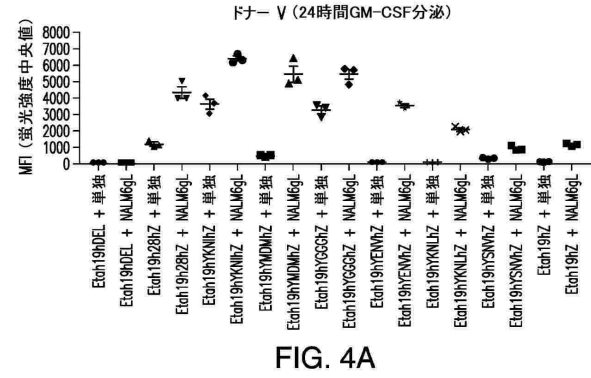
【圖 4-2】



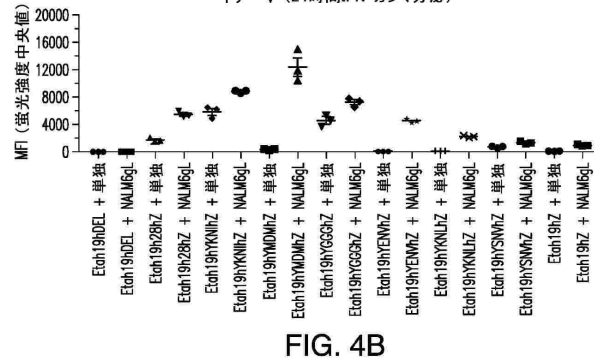
ドナー V (24時間IL17分泌)



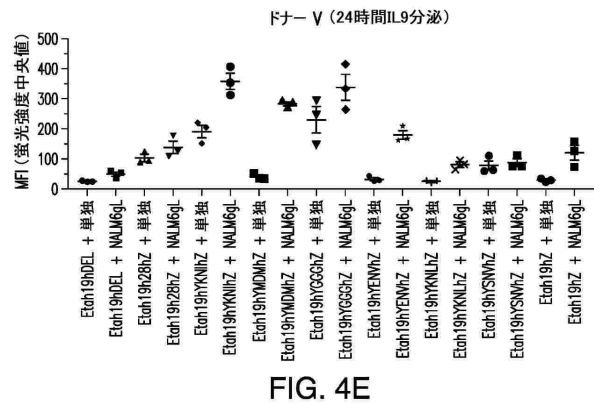
【図 4-1】



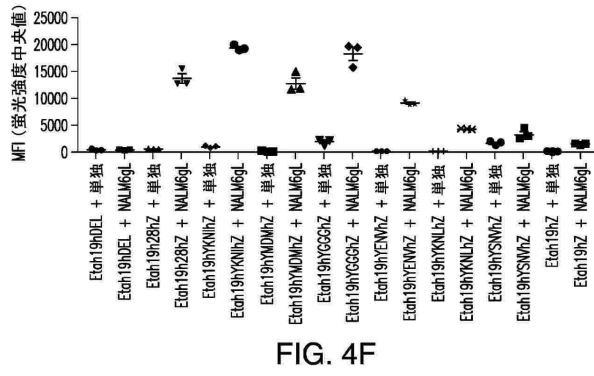
ドナー V (24時間IFN-ガンマ分泌)



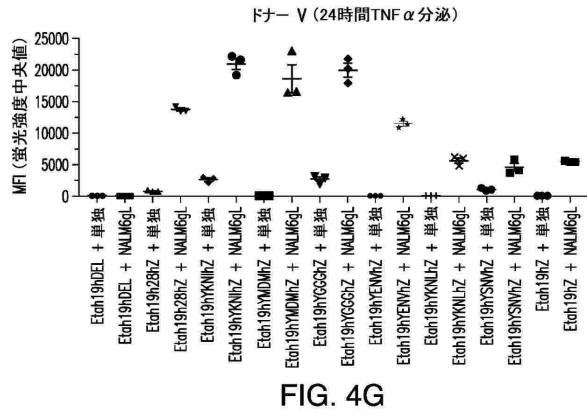
【圖 4-3】



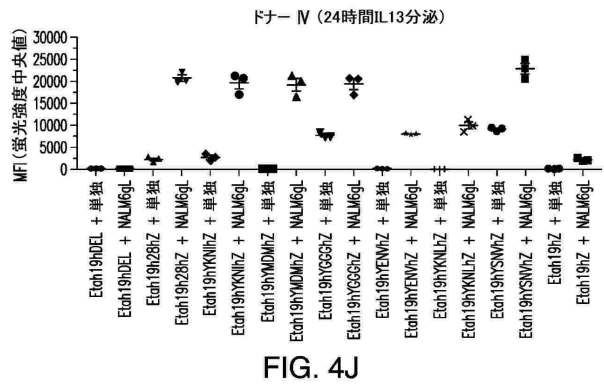
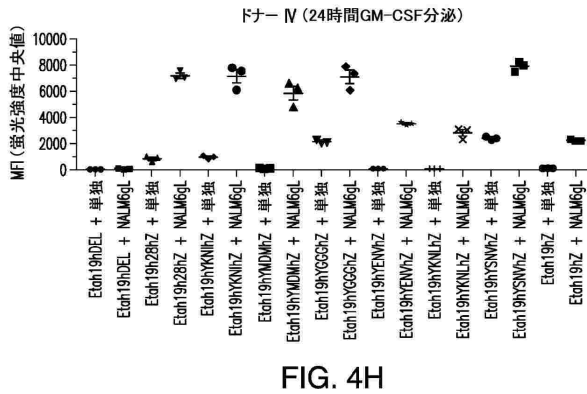
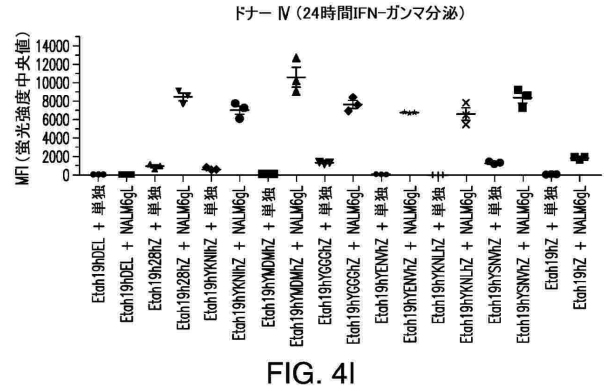
トナー V (24時間IL2分泌)



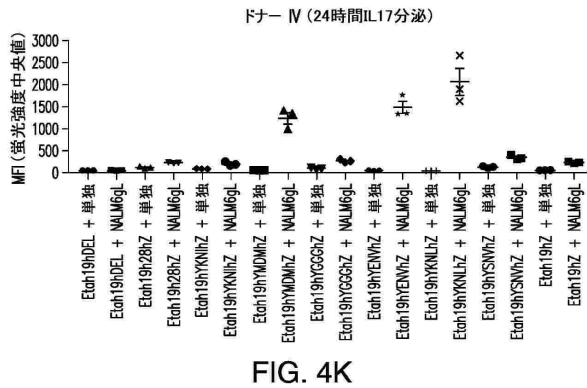
【図 4 - 4】



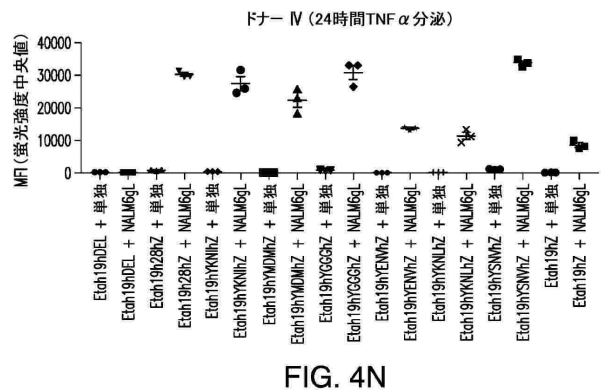
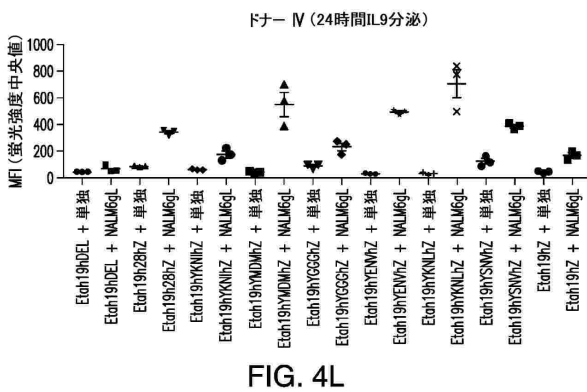
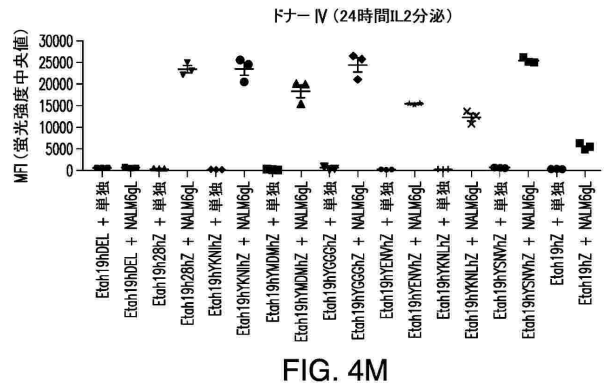
【図 4 - 5】



【図 4 - 6】



【図 4 - 7】



10

20

30

40

50

【図 5】

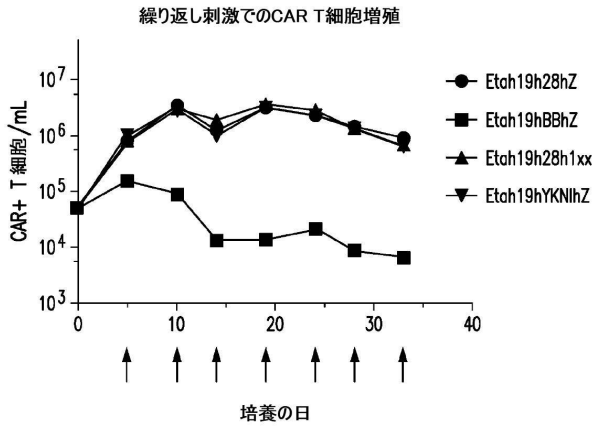


FIG. 5

【図 6】

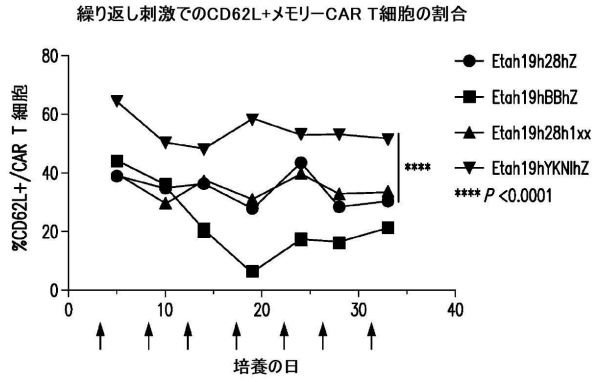


FIG. 6

【図 7】

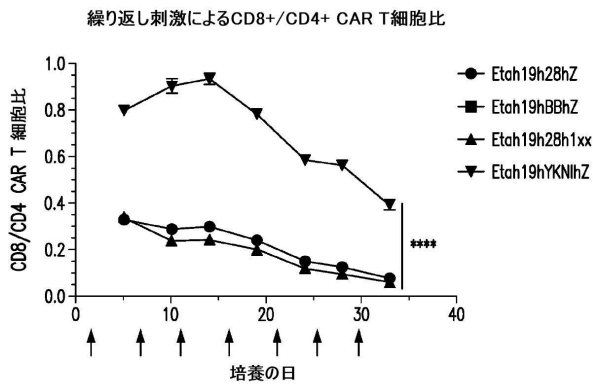


FIG. 7

【図 8 - 1】

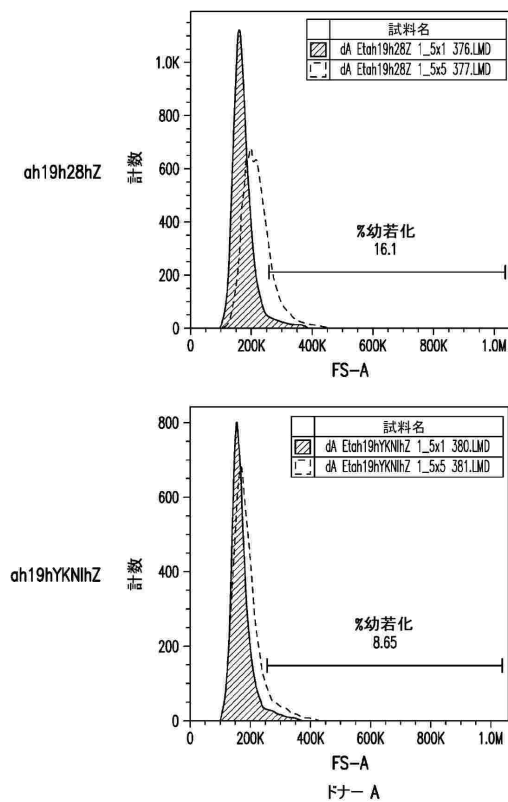


FIG. 8

【図 8 - 2】

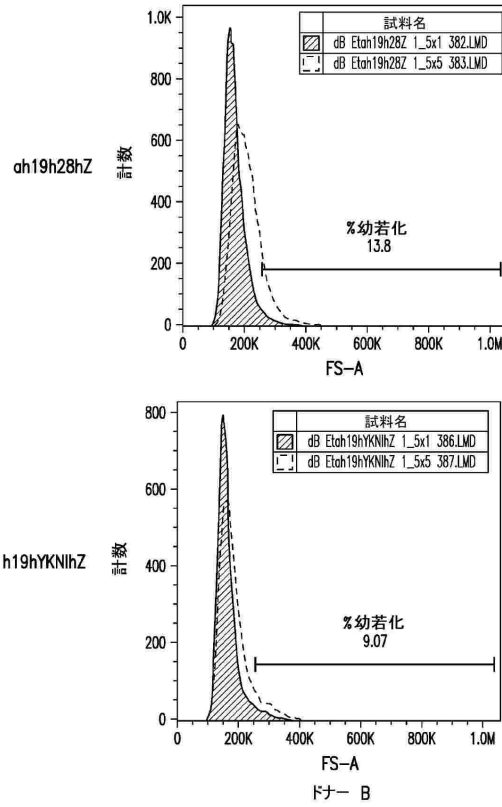


FIG. 8 続き

【図 9】

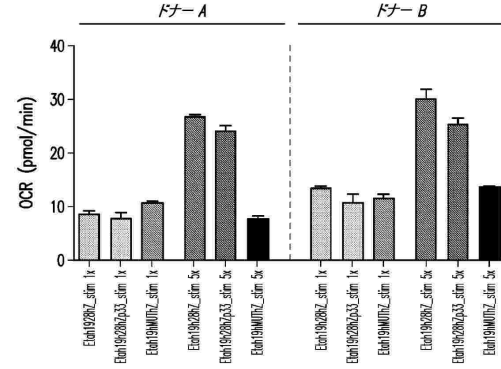


FIG. 9A

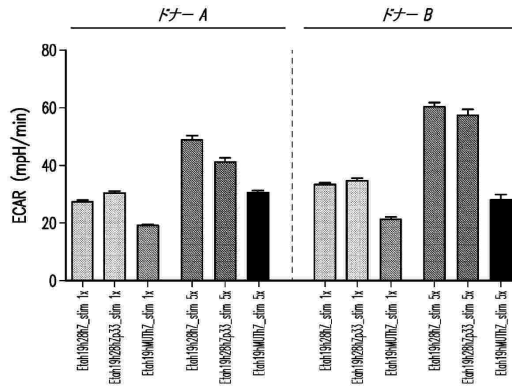


FIG. 9B

【図 10 - 1】

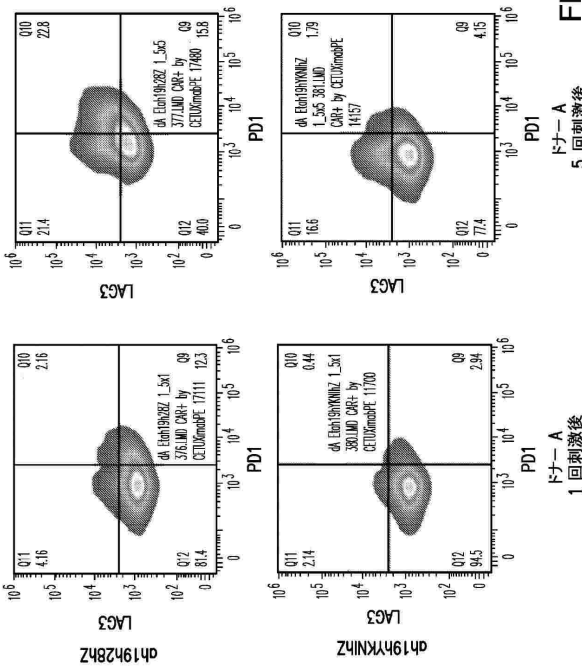


FIG. 10A

【図 10 - 2】

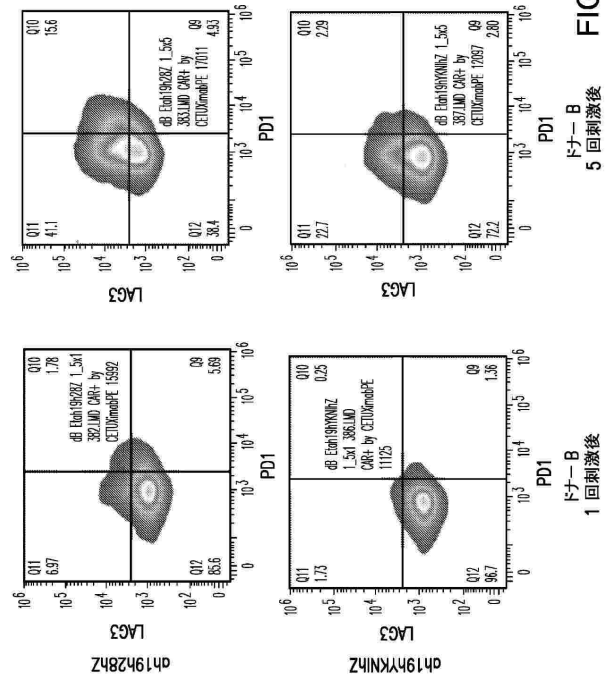


FIG. 10A 続き

10

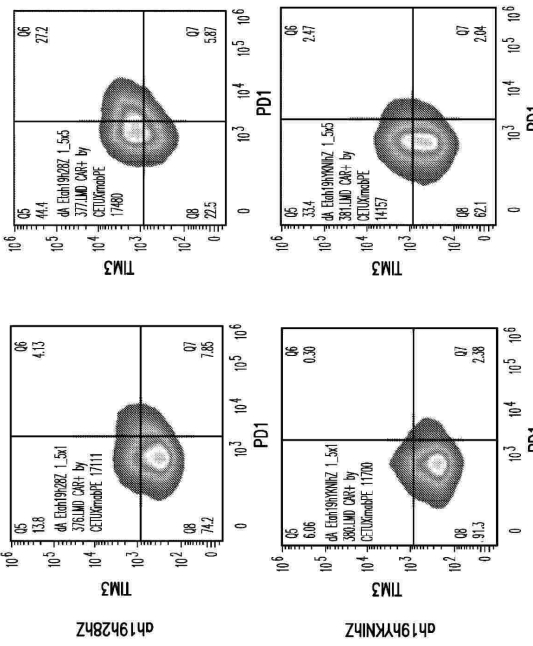
20

30

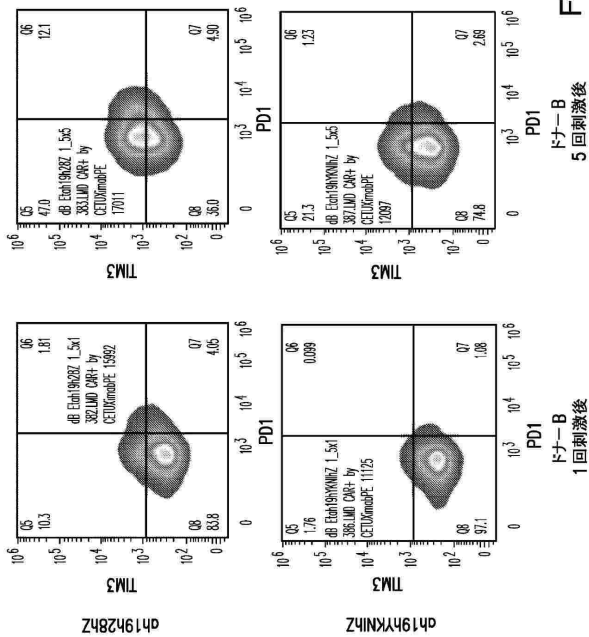
40

50

【図 10 - 3】



【図 10 - 4】



【図 11】

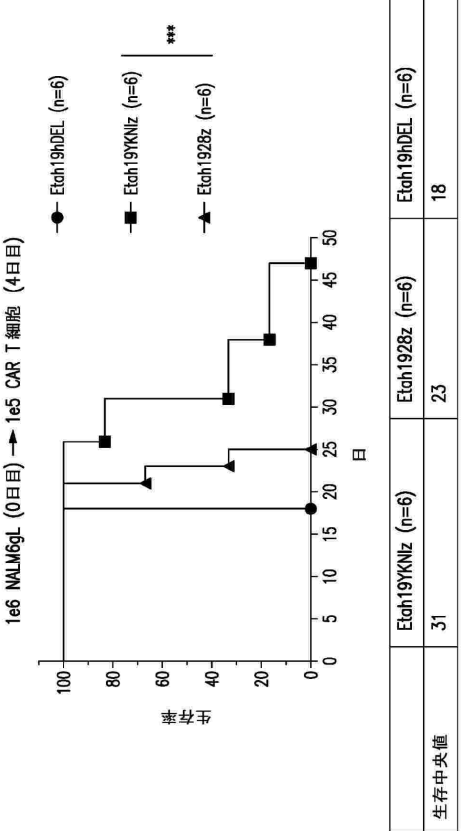


FIG. 11

【図 12】

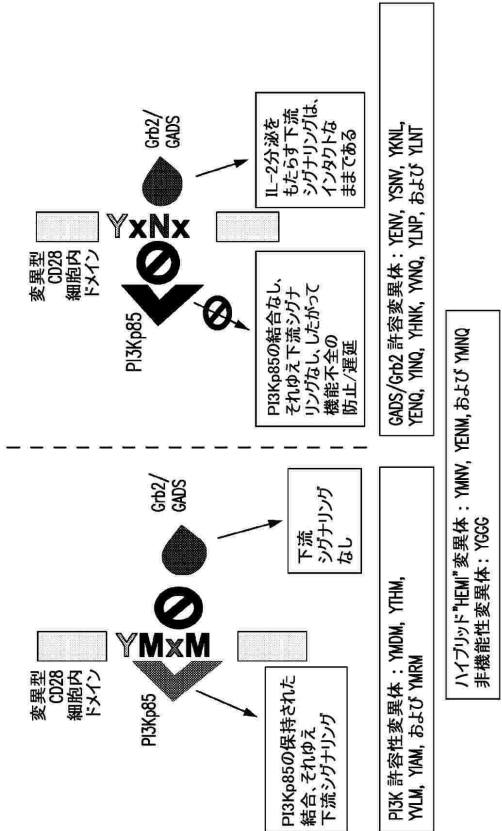


FIG. 12

【図 1 3】

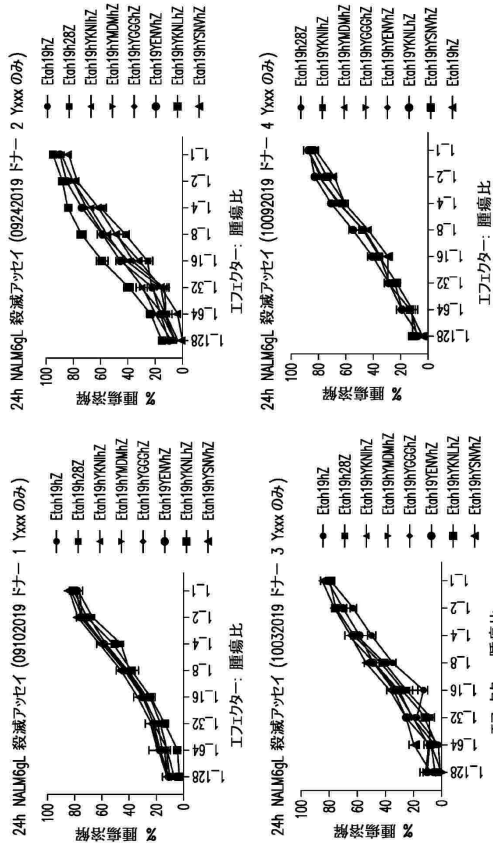


FIG. 13

【図 1 5 - 1】

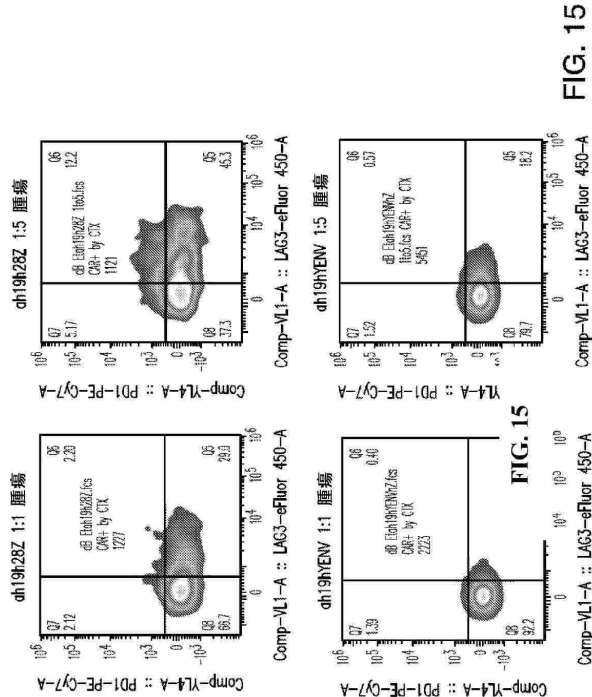


FIG. 15

【図 1 4】

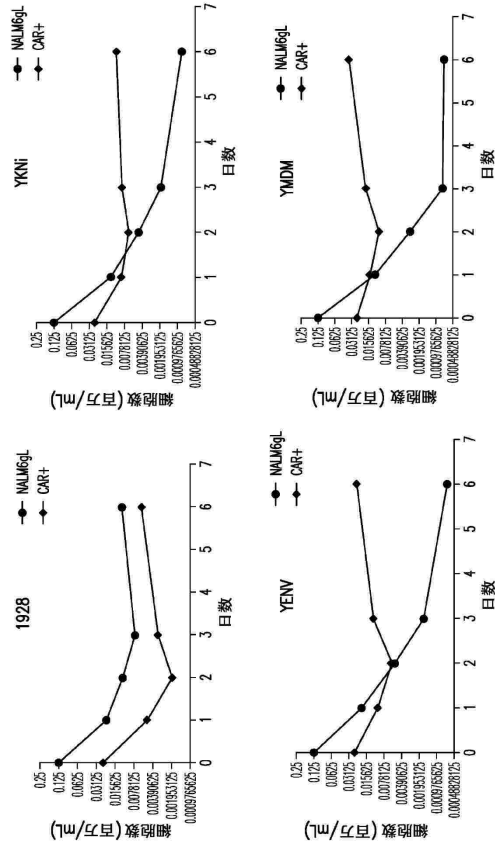


FIG. 14

【図 1 5 - 2】

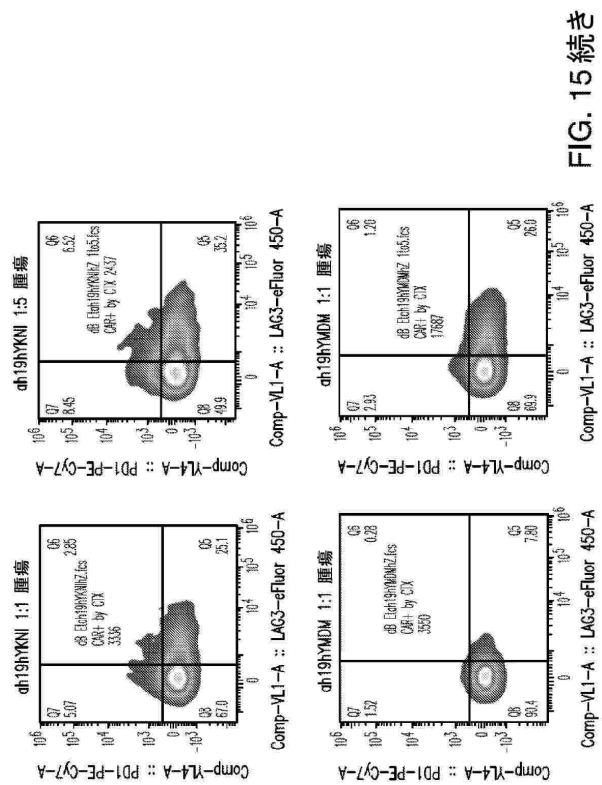
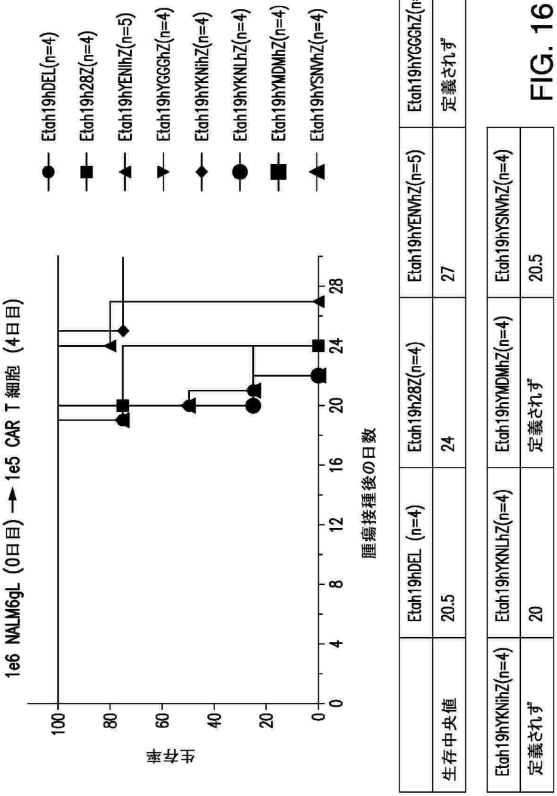
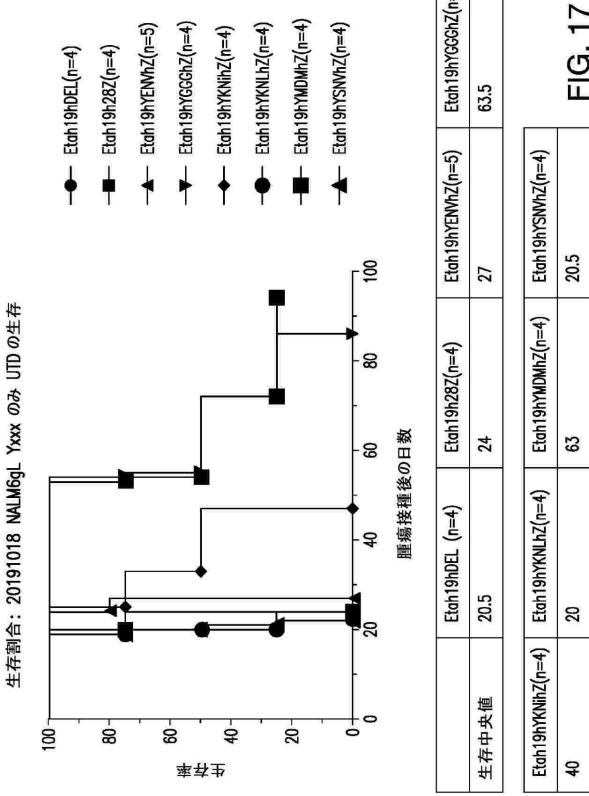


FIG. 15 続き

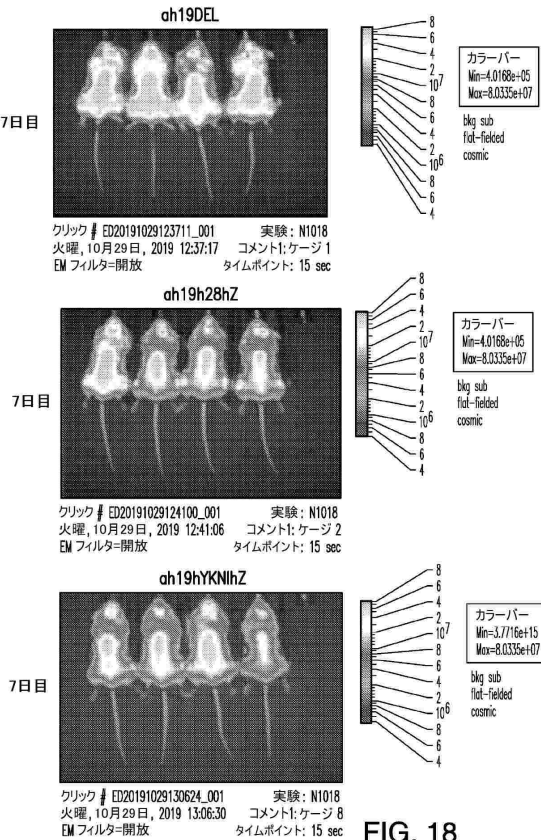
【図 16】



【図 17】



【図 18 - 1】



【図 18 - 2】

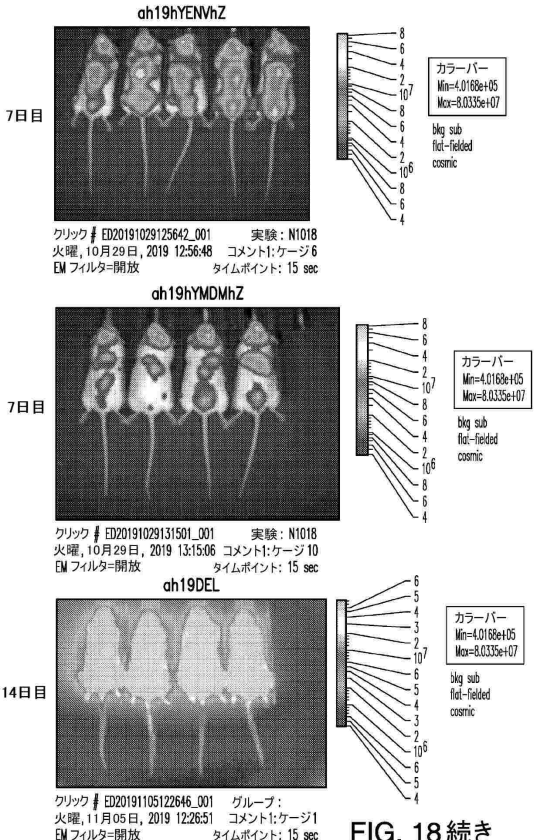


FIG. 18

FIG. 18 続き

10

20

30

40

50

【図 18-3】

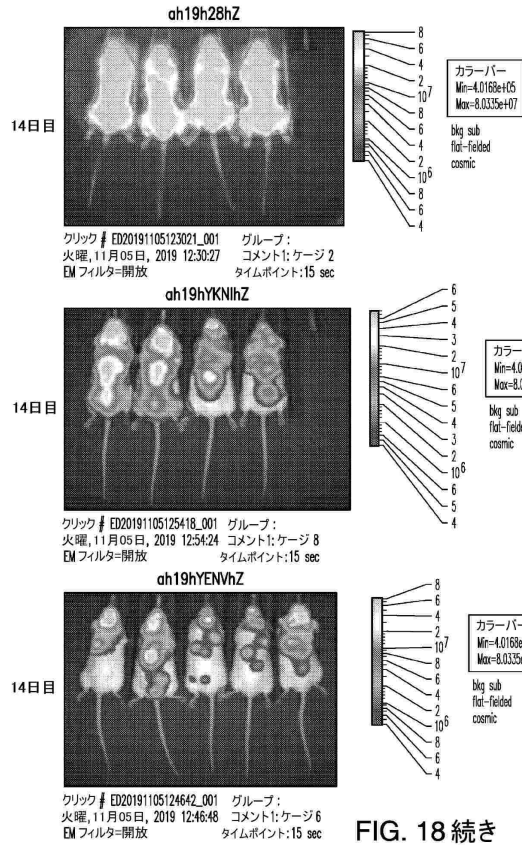


FIG. 18 続き

【図 18-4】

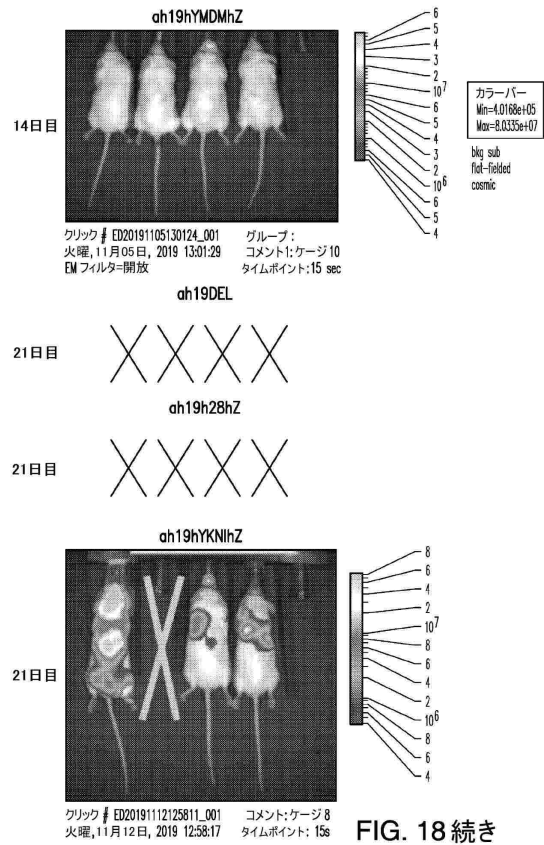


FIG. 18 続き

【図 18-5】

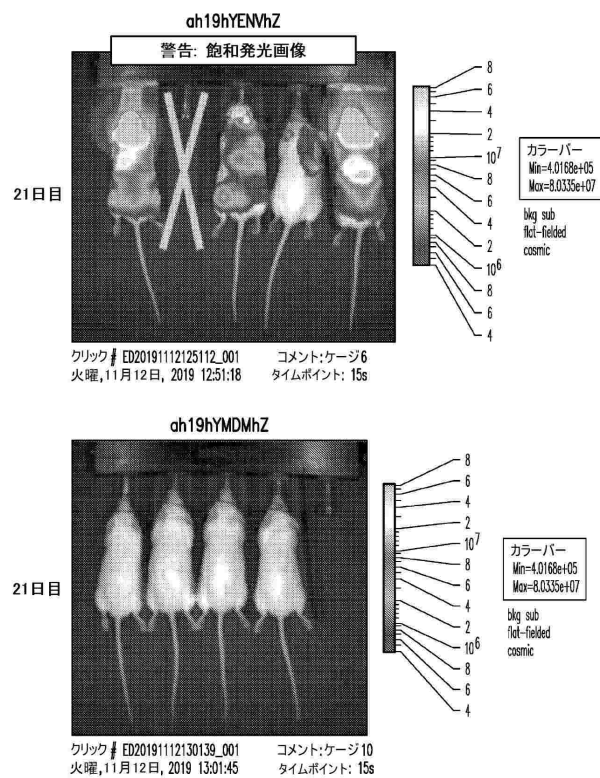


FIG. 18 続き

【図 19-1】

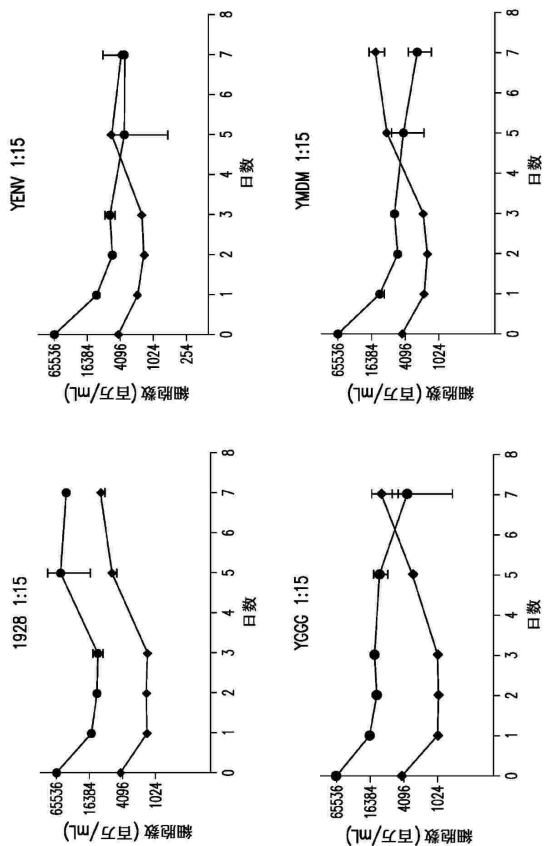


FIG. 19

10

20

30

40

50

【図 19-2】

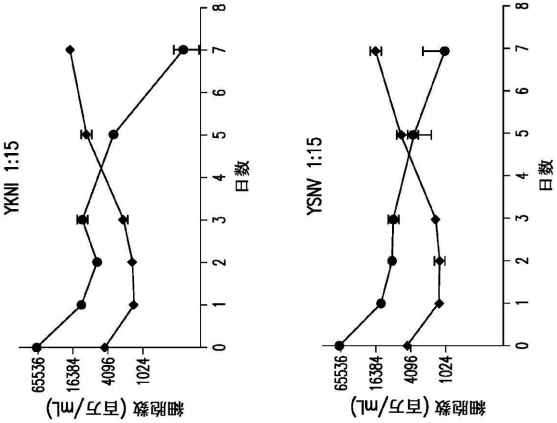


FIG. 19 続き

【図 20】

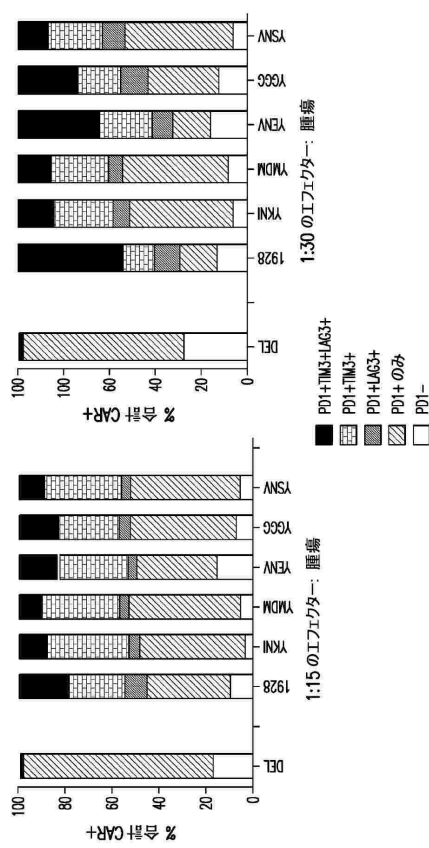


FIG. 20

【図 21】

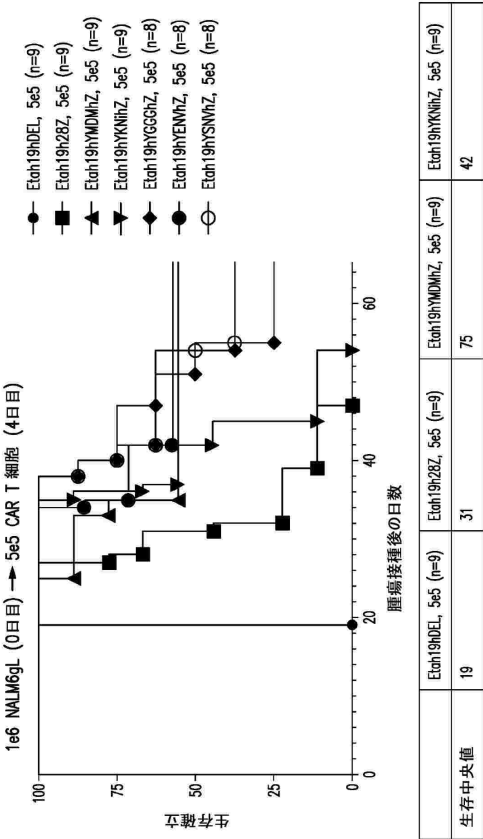


FIG. 21

【図 22】

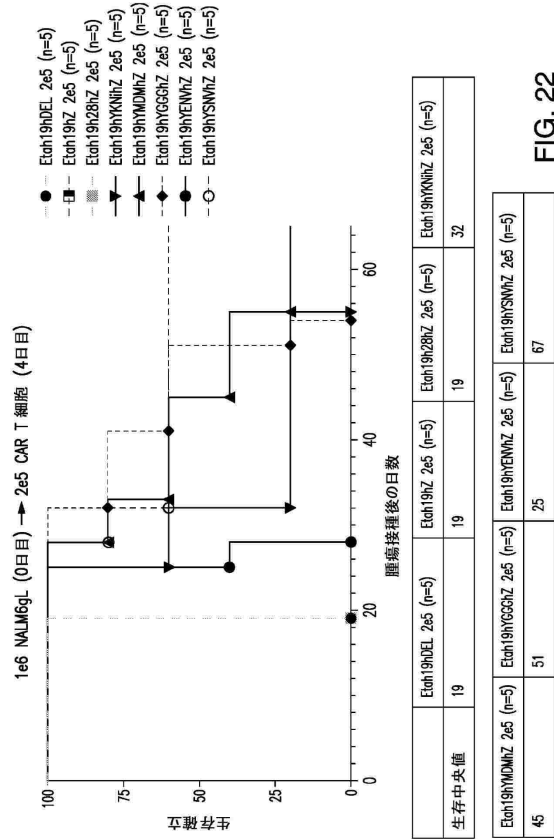


FIG. 22

【図 2 3】

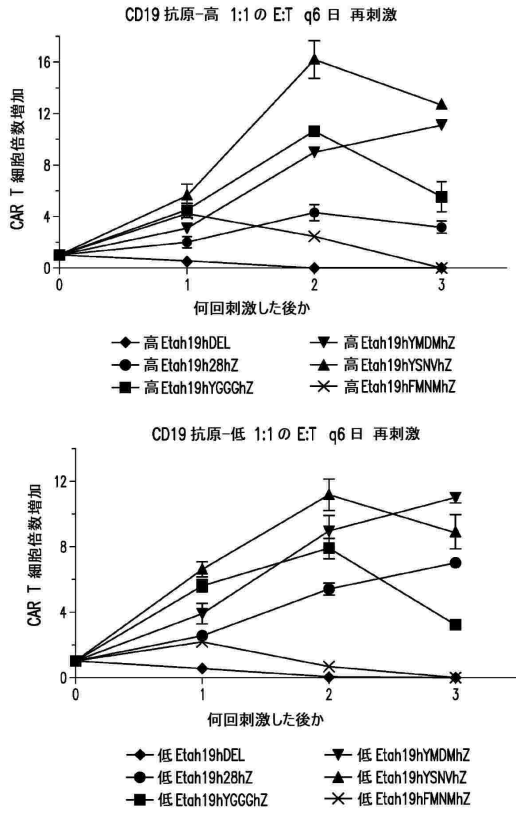


FIG. 23

【図 2 4 - 1】

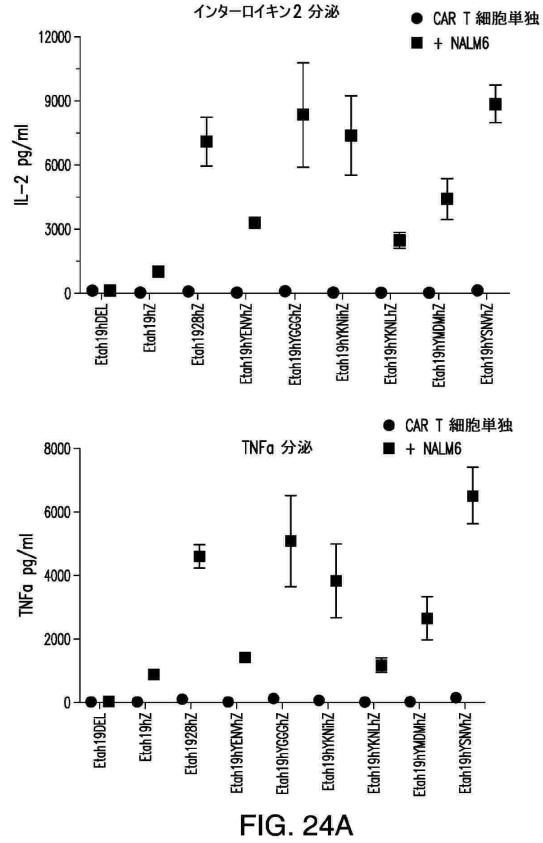


FIG. 24A

【図 2 4 - 2】

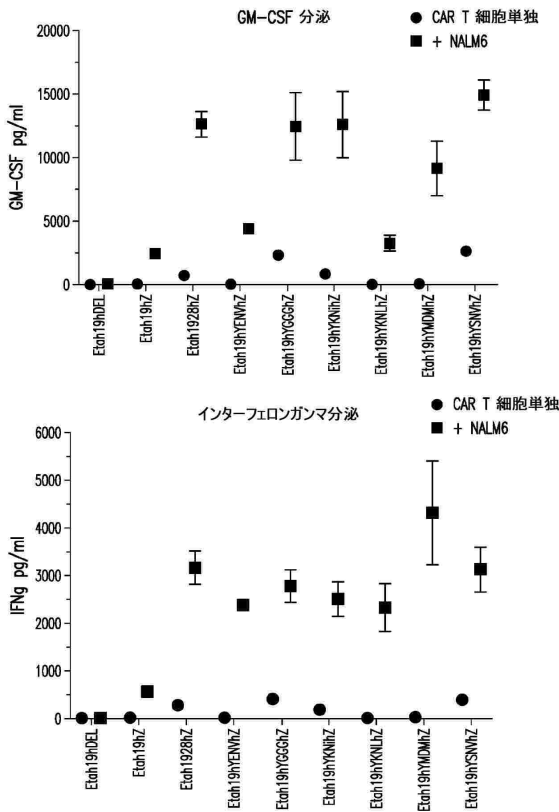


FIG. 24B

【図 2 4 - 3】

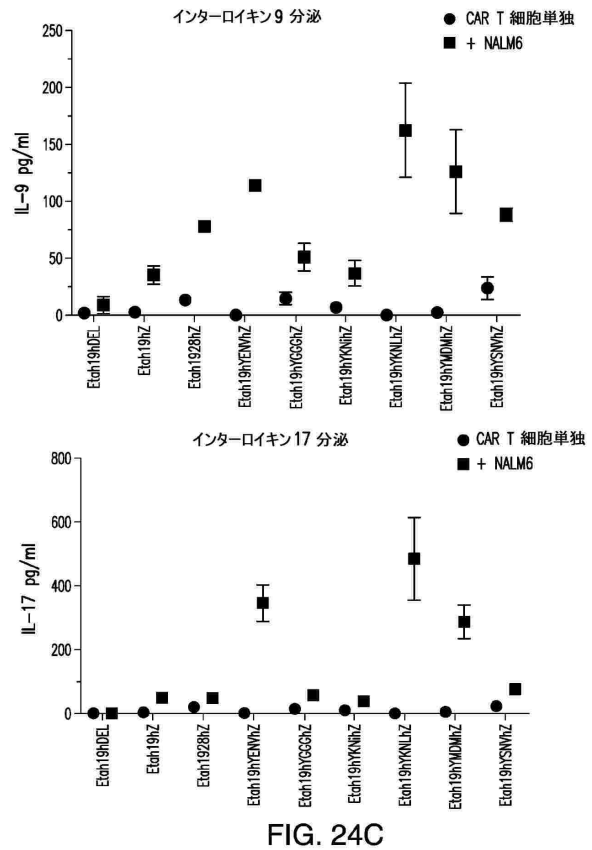


FIG. 24C

10

20

30

40

50

【配列表】
0007698655000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 K	35/17	(2025.01)	A 6 1 K	35/17	
C 1 2 N	15/62	(2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/63	
C 0 7 K	14/705	(2006.01)	C 0 7 K	14/705	
C 0 7 K	16/30	(2006.01)	C 0 7 K	16/30	
C 1 2 N	5/0783	(2010.01)	C 1 2 N	5/0783	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ダニヤン, アンソニー

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 0 2 2 , ニューヨーク, イースト 6 0 ティーエイチ ストリート 3 0 3 , アパートメント 1 2 シー

(72)発明者 ブレントジェンズ, レニアー ジェイ.

アメリカ合衆国 ニュージャージー 0 7 0 7 8 , ショート ヒルズ, オールド ショート ヒルズ ロード 1 4 0

審査官 井関 めぐみ

(56)参考文献

国際公開第 2 0 1 8 / 1 4 0 7 2 5 (WO, A 1)

国際公開第 2 0 1 9 / 0 1 0 3 8 3 (WO, A 1)

Yohsuke HARADA et al., "Novel Role of Phosphatidylinositol 3-Kinase in CD28-mediated C o stimulation", Journal of Biological Chemistry, 2001年03月, Vol. 276, No. 12, p.9003-9008, DOI: 10.1074/jbc.M005051200

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 6 2

C 0 7 K 1 9 / 0 0

C 1 2 N 5 / 1 0

C 1 2 N 1 5 / 8 6 7

A 6 1 P 3 5 / 0 0

A 6 1 P 3 5 / 0 2

A 6 1 P 3 1 / 0 0

A 6 1 K 3 5 / 1 7

A 6 1 K 3 9 / 3 9 5

C 0 7 K 1 4 / 7 0 5

C 0 7 K 1 6 / 3 0

C 1 2 N 5 / 0 7 8 3

C 1 2 P 2 1 / 0 8

C 1 2 P 2 1 / 0 2

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q