(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2017-530724
(P2017-530724A)
(43)公表日　平成29年10月19日(2017.10.19)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B065
C07K 14/705	(2006.01)	C07K	14/705		4C084
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00		4C087
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10		4H045
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 31 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-530422 (P2017-530422)
(86)(22)出願日　平成27年8月26日 (2015.8.26)
(85)翻訳文提出日　平成29年4月24日 (2017.4.24)
(86)国際出願番号　PCT/EP2015/069527
(87)国際公開番号　WO2016/030414
(87)国際公開日　平成28年3月3日 (2016.3.3)
(31)優先権主張番号　14182945.7
(32)優先日　平成26年8月29日 (2014.8.29)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)

(71)出願人　517071070
ジェモアブ　モノクローナルズ　ゲゼルシャフト　ミット　ベシュレンクテル　ハフツング
GEMoaB Monoclonals GmbH
ドイツ連邦共和国　ドレスデン　タッツベルク　４７
Tatzberg 47, D-01307 Dresden, Germany
(74)代理人　100114890
弁理士　アインゼル・フェリックス＝ラインハルト
(74)代理人　100098501
弁理士　森田　拓

最終頁に続く

(54)【発明の名称】多様な多重抗原のターゲティングのための汎用的キメラ抗原受容体を発現する免疫細胞および該免疫細胞の製造方法ならびに該免疫細胞の、癌、感染症および自己免疫疾患の治療のための使用

(57)【要約】
本発明は、免疫細胞を基礎とする抗癌治療薬および該治療薬の癌の治療における使用方法に関する。

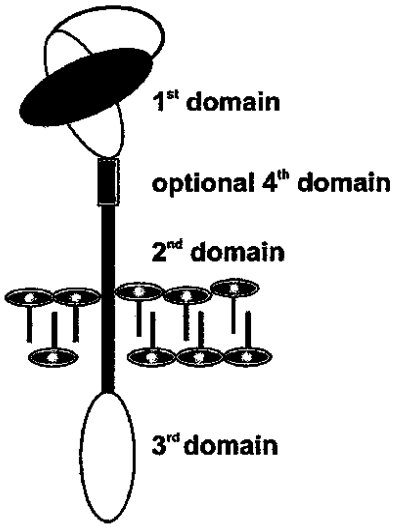


Fig. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
汎用的キメラ抗原受容体をコードする核酸であって、該受容体は、３つのドメインを含み、
－　１つ目のドメインは、タグ結合ドメインであり、
－　２つ目のドメインは、細胞外ヒンジおよび膜貫通ドメインであり、
－　３つ目のドメインは、シグナル伝達ドメインであり、
ここで、タグ結合ドメインは、いずれかのヒト核タンパク質から誘導されたタグに結合する、核酸。
【請求項２】
請求項１に記載の核酸であって、前記タグは、配列番号１４に記載のヒト核Ｌａタンパク質由来の短い線状エピトープ（Ｅ５Ｂ９）である、核酸。
【請求項３】
請求項１または２に記載の核酸であって、前記タグ結合ドメインは、抗体またはその抗原結合フラグメントであり、ここで、該タグ結合ドメインは、抗ＬａエピトープｓｃＦｖ、好ましくは配列番号３および４に記載の抗ＬａエピトープｓｃＦｖを構成する、核酸。
【請求項４】
請求項１から３までのいずれか１項に記載に記載の核酸であって、前記ヒンジ領域および膜貫通領域は、ヒトＣＤ２８分子、ＣＤ８ａ鎖、ＮＫ細胞受容体、好ましくはナチュラルキラー群ＮＫＧ２Ｄのヒンジ領域および膜貫通領域、または抗体の定常領域の部分ならびにそれらの種々のヒンジドメインおよび膜貫通ドメインの組み合わせから選択される、核酸。
【請求項５】
請求項１から４までのいずれか１項に記載の核酸であって、前記シグナル伝達ドメインは、ＣＤ２８、ＣＤ１３７（４１ＢＢ）、ＣＤ１３４（ＯＸ４０）、ＤＡＰ１０およびＣＤ２７の細胞質領域、プログラム細胞死－１（ＰＤ－１）、細胞傷害性Ｔリンパ球抗原４（ＣＴＬＡ－４）ならびにＣＤ３鎖、ＤＡＰ１２およびＴ細胞活性化誘発Ｆｃ受容体の細胞質領域から選択される、核酸。
【請求項６】
請求項１から５までのいずれか１項に記載の核酸であって、前記受容体は、該受容体の細胞外部分における短いペプチドリンカーである４つ目のドメインを含む、核酸。
【請求項７】
請求項１から６までのいずれか１項に記載の配列番号１に記載の核酸。
【請求項８】
ある特定のヒト細胞表面タンパク質またはタンパク質複合体に特異的な結合部とタグとから構成されるターゲットモジュールであって、前記タグは、いずれかのヒト核タンパク質、好ましくはヒト核Ｌａタンパク質から誘導される、ターゲットモジュール。
【請求項９】
請求項８に記載のターゲットモジュールであって、ターゲットモジュールの結合部は、表面抗原ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ１０、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ３３、ＣＤ３８、ＣＤ４４、ＣＤ５２、ＣＤ９９、ＣＤ１２３、ＣＤ２７４、ＴＩＭ－３、上皮増殖因子受容体ファミリーのメンバーおよびそれらの突然変異体、エフリン受容体ファミリーのメンバー、前立腺特異抗原ＰＳＣＡまたはＰＳＭＡ、胎児性抗原、血管内皮増殖因子ファミリーのメンバー、上皮細胞接着分子ＥｐＣＡＭ、アルファフェトプロテインＡＦＰ、ムチンタンパク質ファミリーのメンバー、濾胞刺激ホルモン受容体、ヒト高分子量メラノーマ関連抗原、葉酸結合タンパク質ＦＢＰ、葉酸受容体α、ＮＫＧ２Ｄ受容体のリガンド、上皮糖タンパク質ファミリーのメンバー、ジシアロガングリオシド、炭酸脱水酵素ファミリーのメンバー、炭水化物抗原ファミリーのメンバー、ＧＴＰアーゼのＲｈｏファミリーのメンバー、高移動度タンパク質のメンバーおよびそれらの突然変異体に結合する抗体またはそれらのフラグメントを含み、かつターゲットモジュー

ルの結合部は、アルファ鎖およびベータ鎖もしくはガンマ鎖およびデルタ鎖のＴ細胞受容体またはそれの断片から構成されており、これには自己反応性Ｔ細胞受容体由来の受容体が含まれ、ここで、そのようなＴ細胞受容体由来の結合部は、ヒト白血球抗原クラスＩおよびＩＩタンパク質複合体によって提示されるペプチドを認識し、そこに結合する、ターゲットモジュール。

【請求項１０】

請求項８または９に記載のターゲットモジュールであって、該ターゲットモジュールの結合部は、タンパク質およびタンパク質複合体へのリガンド、サイトカイン受容体に結合するリガンド、ＮＫＧ２Ｄ受容体のリガンドまたはＥＧＦＲファミリーのメンバーへのリガンドを含む、ターゲットモジュール。

【請求項１１】

請求項８から１０までのいずれか１項に記載のターゲットモジュールであって、該ターゲットモジュールの結合部は、二重特異的および多重特異的な抗原特異性を含み、その特異性は、ＰＳＣＡおよびＰＳＭＡ抗原への結合、ＣＤ１９およびＣＤ２０抗原への結合、ＣＤ１９、ＣＤ２０およびＣＤ２２抗原への結合、ＣＤ３３およびＣＤ１２３抗原への結合、ＣＤ３３およびＣＤ９９への結合、ＣＤ３３およびＴＩＭ－３への結合、ｅｒｂ－１およびｅｒｂ－２への結合、ＰＳＣＡ、ならびにｅｒｂ－２への結合を含む、ターゲットモジュール。

【請求項１２】

請求項８から１１までのいずれか１項に記載のターゲットモジュールであって、ターゲットモジュールの結合部は、Ｌａ／ＳＳＢ抗原に結合する抗体またはそれらのフラグメントを含み、好ましくは配列番号２８、２９、３０、３１および３２に記載のターゲットモジュール。

【請求項１３】

請求項８から１２までのいずれか１項に記載のターゲットモジュールをコードする核酸であって、好ましくは配列番号１０、１７、２０、２３および２６に記載の配列を有する、核酸。

【請求項１４】

請求項１から７までのいずれか１項に記載の核酸を含む細胞またはベクター。

【請求項１５】

請求項１４に記載の細胞であって、前記細胞は、Ｔ細胞、ナチュラルキラー細胞、細胞傷害性Ｔリンパ球および制御性Ｔ細胞を含む免疫細胞の群から選択される、細胞。

【請求項１６】

キットであって、

－　請求項１４に記載のベクターと、

－　請求項８から１２までのいずれか１項に記載のターゲットモジュールおよび／または請求項１３に記載の核酸をコードするベクターと、

を含む、キット。

【請求項１７】

請求項１４に記載のＵｎｉＣＡＲ発現免疫細胞および／または請求項８から１２までのいずれか１項に記載のターゲットモジュールを含む、被験体に投与するための製剤。

【請求項１８】

請求項１４または１５に記載の細胞および請求項８から１２までのいずれか１項に記載のターゲットモジュールの、哺乳動物における汎用的キメラ抗原受容体に媒介される免疫反応を刺激するための使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、免疫細胞を基礎とする治療薬および該治療薬の、癌、感染症および自己免疫疾患の治療における使用方法に関する。

【０００２】
発明の背景
キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）は、抗原特異性を与える結合部と、免疫受容体から得られた１または幾つかのシグナル伝達鎖とからなる人工的な受容体である（Ｃａｒｔｅｌｌｉｅｒｉら，Ｊ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．ｄｏｉ：１０．１１５５／２０１０／９５６３０４（２０１０））。これらの２つの主要なＣＡＲドメインは、細胞形質膜中でＣＡＲを係留する膜貫通型ドメインを含む連結ペプチド鎖によって連結されている。免疫細胞、特にＴリンパ球およびＮＫリンパ球は、それらの形質膜中に挿入されたＣＡＲを発現するように遺伝子改変され得る。そのようなＣＡＲで改変された免疫細胞が、ＣＡＲ結合部の適切な標的を発現しているまたは該標的をまとっている他の細胞または組織構造体に出くわすと、該ＣＡＲ結合部が標的抗原に結合したらすぐに、ＣＡＲ改変免疫細胞は、その標的へと架橋される。架橋はＣＡＲシグナル伝達鎖を介してシグナル経路の誘導を引き起こし、それが、ＣＡＲが接合された免疫細胞の生物学的特性を変化させることとなる。例えば、ＣＤ４＋およびＣＤ８＋のエフェクターＴ細胞におけるＣＡＲトリガリングは、それぞれの標的細胞の殺傷を最終的に引き起こすこととなる溶解性化合物およびサイトカインの分泌のような典型的なエフェクター機能を活性化することとなる。キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）で操作された免疫細胞の養子移入は、近年では、不治で悪性のものであろうと感染症または自己免疫疾患を治療するための高い可能性を持つ治療選択肢として考えられている。初めての臨床試験は、この治療戦略の安全性と実現可能性の両方を実証した（Ｌａｍｅｒｓら Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２４ ｅ２０－ｅ２２（２００６）、Ｋｅｒｓｈａｗら Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１２ ６１０６－６１１５（２００６））。最近の進行中の試験においては、Ｂ細胞由来の末期腫瘍を患う患者の大多数が、ＣＤ１９特異的なＣＡＲを携えた自己Ｔ細胞を用いた数ヶ月継続する治療に対して完全なまたは少なくとも部分的な応答を示した（Ｂｒｅｎｔｊｅｎｓら Ｂｌｏｏｄ．１１８ ４８１７－４８２８（２０１１），Ｓｃｉ．Ｔｒａｎｓｌ．Ｍｅｄ．２０（５） ｄｏｉ：１０．１１２６／ｓｃｉｔｒａｎｓｌｍｅｄ．３００５９３０（２０１３）、Ｋａｌｏｓら ２０１１ Ｓｃｉ．Ｔｒａｎｓｌ．Ｍｅｄ．３（９５） ｄｏｉ：１０．１１２６／ｓｃｉｔｒａｎｓｌｍｅｄ．３００２８４２、Ｇｒｕｐｐら Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３６８：１５０９－１５１８（２０１３））。
【０００３】
しかしながら、従来のＣＡＲ技術は、この治療方式を臨床治療のために広く適用し得る前に解決する必要のある多くの重大な問題点を伴っている。先ず第一に、幾つかの安全性の問題点に取り組む必要がある。これまでは、従来のＣＡＲで操作されたＴ細胞の免疫応答は、患者に注入した後に制御することが困難であった。特に健康な組織での予想外のターゲット遺伝子発現は、健康な細胞に対して、該操作されたＴ細胞の迅速かつ厳しい免疫反応を誘発することがあり、それは重度の副作用を引き起こし得た（Ｌａｍｅｒｓら Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２４ ｅ２０－ｅ２２（２００６）、Ｍｏｒｇａｎら Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．１８：ｐ．８４３－８５１（２０１０））。従来のＣＡＲ技術のもう一つの欠点は、操作されたＴ細胞の単独の抗原へのリターゲティングの制限である。そのような単独療法アプローチは、治療の間にターゲット抗原を消失した腫瘍エスケープ変異体の発生のリスクをはらむ。従来のＣＡＲ Ｔ細胞療法で数ヶ月後にある腫瘍エスケープ変異体の発生は、臨床試験で既に観察されている（Ｇｒｕｐｐら Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３６８：１５０９－１５１８（２０１３））。
【０００４】
国際公開第２０１２０８２８４１号パンフレット（ＷＯ２０１２０８２８４１Ａ２）は、汎用的な抗タグキメラ抗原受容体を発現するＴ細胞および細胞関連疾患、例えば癌の治療方法を開示している。
【０００５】
更に、国際公開第２０１３０４４２２５号パンフレット（ＷＯ２０１３０４４２２５Ａ１）は、多様な多重抗原のターゲティングのためのＴ細胞によって発現される汎用的な免

疫受容体を開示している。

【０００６】

それらの方法は両方とも、汎用的な抗タグ免疫受容体を発現する改変Ｔ細胞の使用を記載している。これらのＴ細胞は、表面抗原を結合するとともにそれぞれタグを有するモジュールを追加適用することによって疾患関連の細胞表面抗原へとリダイレクトすることができる。前記方法から生ずる問題は、外因性タグを用いる遺伝子改変されたＴ細胞のリダイレクションが、おそらく免疫原性となりうることであり、そのことは、患者を危険にさらし、治療効果に悪影響を及ぼすこととなる。

【０００７】

従って、本発明の課題は、核タンパク質を基礎とする外因性タグを使用して、安全かつ効果的に多様な疾患に対するリダイレクションを可能にする遺伝子改変された免疫細胞を提供することである。本発明の更なる課題は、多様な細胞関連疾患の治療方法であって、治療の長さと強さを簡単に調節可能な治療方法を提供することである。

【０００８】

発明の概要

本発明は、汎用的なモジュール式の抗タグキメラ抗原受容体（ＵｎｉＣＡＲ）系であって、ＵｎｉＣＡＲが接合された免疫細胞の多重抗原に対するリターゲティングを可能にする系を提供する。該系は、様々な抗原を認識することが可能な免疫細胞を作出するための遺伝子療法プラットフォームを使用し、これは、免疫細胞を基礎とする療法、特にＴ細胞およびＮＫ細胞を基礎とする療法のために、広範かつ有益な臨床的な影響を及ぼす。

【０００９】

第一の態様においては、本発明は、汎用的キメラ抗原受容体をコードする単離された核酸配列であって、該受容体は、３つのドメインを含み、１つ目のドメインは、タグ結合ドメインであり、２つ目のドメインは、細胞外ヒンジと膜貫通ドメインとを含む連結ペプチド鎖であり、３つ目のドメインは、シグナル伝達ドメインであり、ここで前記タグ結合ドメインは、いずれかのヒト核タンパク質から誘導されたタグに結合する、当該核酸配列を提供する。特に適切なタグは、核抗原由来のペプチド配列であって、これは、生理学的条件下での天然の（native）タンパク質の状況では、対応するタグ結合ドメインによって接近および結合され得ないペプチド配列である。更に、該ペプチド配列は、自己免疫患者における自己抗体の標的となるべきではなく、したがって、前記タグが、汎用的キメラ受容体の状況において免疫原性となる可能性は低くなる。任意の４つ目のドメインは、ＵｎｉＣＡＲの細胞外部分における短鎖ペプチドリンカーであり、それは、その４つ目のドメインに特異的に結合するモノクローナル抗体（ｍａｂ）に対する線状エピトープを構成する。この追加のドメインは、ＵｎｉＣＡＲ系の機能性のためには必要とされないが、本発明に追加的な臨床的恩恵を与えることがある。好ましくは、本発明は、本発明による汎用的キメラ抗原受容体をコードする単離された核酸配列であって、該核酸配列が人工的なキメラ融合タンパク質をコードし、かつ該核酸配列がｃＤＮＡとして提供される核酸配列を提供する。

【００１０】

更なる一態様においては、本発明は、ある特定のヒト細胞表面タンパク質またはタンパク質複合体に特異的な結合部とタグとから構成されるターゲットモジュールであって、前記タグがいずれかのヒト核タンパク質から誘導されるターゲットモジュールを提供する。

【００１１】

更なる一態様においては、本発明は、本発明によるターゲットモジュールをコードする核酸を提供する。好ましくは、本発明は、本発明によるターゲットモジュールをコードする単離された核酸配列であって、該単離された核酸がｃＤＮＡとして提供される核酸配列を提供する。

【００１２】

更なる態様においては、本発明は、３つのドメインを含む本発明による汎用的キメラ抗原受容体をコードする核酸を含む細胞であって、ここで１つ目のドメインがタグ結合ドメ

インであり、２つ目のドメインが細胞外ヒンジと膜貫通ドメインを含む連結ペプチド鎖であり、３つ目のドメインがシグナル伝達ドメインであり、ここで前記タグ結合ドメインがいずれかのヒト核タンパク質から誘導されたタグに結合する細胞を提供する。

【００１３】

更なる態様においては、本発明は、本発明による汎用的キメラ抗原受容体をコードする核酸を含むベクターであって、該汎用的キメラ抗原受容体は、３つのドメインを含み、１つ目のドメインがタグ結合ドメインであり、２つ目のドメインが細胞外ヒンジと膜貫通ドメインを含む連結ペプチド鎖であり、かつ３つ目のドメインがシグナル伝達ドメインであり、ここで前記タグ結合ドメインがいずれかのヒト核タンパク質から誘導されたタグに結合するベクターを提供する。

【００１４】

更なる一態様においては、本発明は、本発明による汎用的キメラ抗原受容体および本発明によるターゲットモジュールをコードする核酸配列を含む本発明によるベクターおよび／または本発明によるターゲットモジュールをコードする単離された核酸配列をコードするベクターを含むキットを提供する。

【００１５】

本発明は、本発明による細胞およびターゲットモジュールと、医薬品に許容可能な希釈剤またはキャリヤーと共に含有する医薬組成物を更に包含する。好ましくは、該医薬組成物は、静脈内投与に適した形で存在する。

【００１６】

好ましくは、前記組成物は、本発明による汎用的キメラ抗原受容体および本発明によるターゲットモジュールをコードする核酸を含む細胞を含む。

【００１７】

本発明による医薬組成物は、様々な投与形を含む。該医薬組成物は、好ましくは非経口的に、特に好ましくは静脈内で投与される。本発明の一実施形態においては、非経口医薬組成物は、注射に適した投与形で存在する。従って、特に好ましい組成物は、医薬品に許容可能な希釈剤またはキャリヤー中に存在する細胞およびターゲットモジュールの溶液、エマルジョンまたは懸濁液である。

【００１８】

キャリヤーとしては、好ましくは、水、緩衝水、０．４％生理食塩水、０．３％グリシンおよび類似の溶剤が使用される。溶液は滅菌溶液である。医薬組成物は、従来のよく知られた技術によって滅菌される。前記組成物は、好ましくは医薬品に許容可能な賦形剤、例えば、ほぼ生理学的条件をもたらし、および／またはターゲットモジュールの安定性を高めるために必要とされる賦形剤であり、例えばｐＨ値を調整するための剤および緩衝剤、毒性を調整するための剤等、好ましくは、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウムおよび乳酸ナトリウムから選択される剤を含有する。用途に応じた、これらの製剤における本発明によるターゲットモジュールの濃度は様々である。該濃度は、好ましくは０．０１質量％未満、好ましくは少なくとも０．１質量％、更に好ましくは１質量％から５質量％の間であり、それらの濃度は、主として流体容量、粘度等に基づいて選ばれるか、または各々の投与方式に応じて選ばれる。

【００１９】

医薬組成物は、製造条件および貯蔵条件下で滅菌かつ安定でなければならない。該組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、分散液として、リポソームにおいて、またはこの目的のために適した当業者（artesian）によって知られる他の規則構造体において製剤化することができる。

【００２０】

本発明による細胞およびターゲットモジュールは、好ましくは、非経口投与のために適した組成物中に導入される。好ましくは、該医薬組成物は、０．００１ｍｇ／ｍｌから５００ｍｇ／ｍｌの間の抗体、特に好ましくは０．００１ｍｇ／ｍｌから２５０ｍｇ／ｍｌの間のターゲットモジュールを、特に１ミリモル／ｌ（ｍＭ）～５００ミリモル／ｌ（ｍ

Ｍ）の緩衝剤と一緒に含有する注射可能な緩衝溶液である。注射可能な溶液は、液体形で存在してよい。該緩衝剤は、好ましくは５．０～７．０のｐＨ値（特に好ましくは６．０のｐＨ）のヒスチジン（好ましくは１ｍＭ～５０ｍＭ、特に好ましくは５ｍＭ～１０ｍＭ）であってよい。

【００２１】

他の適切な緩衝剤は、明確に制限されるものではないが、コハク酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウムまたはリン酸カリウムを含む。好ましくは、０ｍＭ～３００ｍＭの、特に好ましくは１５０ｍＭの塩化ナトリウムが、液体投与形のために使用される。液体投与形においては、安定化剤は、好ましくは使用され、特に好ましくは１ｍＭから５０ｍＭの間のＬ－メチオニン（好ましくは５ｍＭから１０ｍＭの間）が使用される。

【００２２】

一日当たり１ｍ^{2}につき送達される典型的な投与速度は、１μｇから１０００ｍｇの間であり、好ましくは１０μｇから１ｍｇの間であり、その際、投与量は、一日または一週間当たり１回以上、または連続的に数週間の期間にわたり投与される。

【００２３】

更なる一態様においては、本発明は、本発明による汎用的キメラ抗原受容体および本発明によるターゲットモジュールをコードする核酸配列を含む本発明による細胞の、哺乳動物における汎用的キメラ抗原受容体に媒介される免疫応答を刺激するための使用を提供する。好ましくは、本発明は、本発明による汎用的キメラ抗原受容体および本発明によるターゲットモジュールをコードする核酸配列を含む本発明による細胞の、薬物としての、より好ましくは癌または自己免疫疾患の治療のための薬物としての使用を提供する。自己免疫疾患は、体内に通常存在する物質および組織に対する身体の異常な免疫応答（自己免疫）から生ずる。

【００２４】

本発明は、本発明による細胞およびターゲットモジュールの、癌または自己免疫疾患の場合に治療的および／または予防的に使用するための薬物を製造するための使用を更に含む。

【００２５】

本発明は、また本発明による細胞およびターゲットモジュールを投与することによる、癌または自己免疫疾患を伴うヒトの治療方法を包含する。

【００２６】

治療用途のためには、本発明による細胞およびターゲットモジュールの薬理学的に有効な量を含有する滅菌医薬組成物が、上述の病気の治療のために患者に投与される。

【００２７】

本発明を、以下の図面および実施形態をもとにより詳細に説明するが、本発明はそれらに制限されるものではない。

【図面の簡単な説明】

【００２８】

【図１】汎用的キメラ抗原受容体（ＵｎｉＣＡＲ）の概略図を示している。

【図２】抗原特異的免疫細胞のリターゲティングのための汎用的キメラ抗原受容体（ＵｎｉＣＡＲ）プラットフォームの概略図を示している。

【図３】レンチウイルスベクターｐＬＶＸ－ＥＦ１α－ＩＲＥＳ－ＺｓＧｒｅｅｎ１の概略マップを示している。

【図４】レンチウイルスパッケージングプラスミドｐｓＰＡＸ２の概略マップを示している。

【図５】エンベローププラスミドｐＭＤ２．Ｇの概略マップを示している。

【図６】任意の４つ目のドメインに対するモノクローナル抗体を使用することによって検出されたＵｎｉＣＡＲ表面発現を示すグラフを示している。

【図７】前立腺幹細胞抗原および前立腺膜抗原を発現する腫瘍細胞に対するＵｎｉＣＡＲ

で操作されたＴ細胞のエフェクター機能のグラフを示している。
【図８】種々のターゲットモジュールについての濃度－応答曲線のグラフを示している。
【図９】急性骨髄性白血病に対するＵｎｉＣＡＲで操作されたＴ細胞のエフェクター機能のグラフを示している。
【図１０】同時に２種の抗原に対するＵｎｉＣＡＲが接合されたＴ細胞のリダイレクションを示すグラフを示している。
【図１１】二重特異性αＣＤ１２３－ＣＤ３３ターゲットモジュールのインビボ薬物動力学を示すグラフを示している。
【発明を実施するための形態】
【００２９】
発明の詳細な説明
エフェクター細胞
本発明の方法で使用されるエフェクター細胞は、自家、同系または同種異系であってよく、その選択は、治療されるべき疾患およびその治療のために利用できる手段に依存する。該方法で使用できるエフェクター細胞の適切な集団には、細胞溶解活性、食細胞活性または免疫抑制活性を有するあらゆる免疫細胞、例えばＴ細胞、例えば制御性Ｔ細胞、ＮＫ細胞およびマクロファージが含まれる。一態様において、エフェクター細胞は、ある特定のＨＬＡ背景に由来し、かつ自家または同種異系の系において使用される。エフェクター細胞は、いずれかの起源から、例えば治療される被験体の腫瘍外植片または治療される被験体の腫瘍内細胞から単離することができる。以下で、用語「エフェクター細胞」とは、あらゆる種類の上述の免疫細胞であって、それらの細胞表面上にＵｎｉＣＡＲを発現するように遺伝子改変された細胞を指す。
【００３０】
汎用的キメラ抗原受容体（ＵｎｉＣＡＲ）
本発明の方法で使用されるエフェクター細胞によって発現されるＵｎｉＣＡＲは、ＵｎｉＣＡＲを発現する免疫細胞のモジュール式の、高い柔軟性の、および厳密に制御可能なリターゲティングを抗原特異的な様式で可能にする。該方法で使用されるＵｎｉＣＡＲのために必要とされるのは、（ｉ）該ＵｎｉＣＡＲが、ターゲットモジュールに結合されうる特定のタグについて結合特異性を有し、該ターゲットモジュールが、細胞表面タンパク質または細胞外構造体にも結合することと、（ｉｉ）免疫細胞が、ＵｎｉＣＡＲを発現するように操作されうること、だけである。
【００３１】
該ＵｎｉＣＡＲは、３つのドメインを含む（図１）。１つ目のドメインは、タグ結合ドメインである。このドメインは、一般的に、ＵｎｉＣＡＲを含むポリペプチドのアミノ末端部に存在する。タグ結合ドメインをアミノ末端に配置することで、該タグ結合ドメインは、標的細胞に結合されるタグの付いたターゲットモジュールに制約なく接近できるようになる。該タグ結合ドメインは、一般的に、しかしそれらに制限されるものではないが、抗体またはその抗原結合フラグメントである。抗体またはフラグメントの個性は、タグの付いたターゲットモジュールのタグの個性によってのみ制限される。そのタグは、任意のヒト核タンパク質であって、それに対する抗体または他の結合ドメインが得られるものに由来することができる。抗体は、任意の種の動物から、けれども好ましくは哺乳動物、例えばヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ウマ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、イヌまたはネコから得ることができる。好ましくは、該抗体は、ヒト抗体またはヒト化抗体である。使用できる具体的な抗体のクラスに制限はなく、例えばＩｇＧ１抗体、ＩｇＧ２抗体、ＩｇＧ３抗体、ＩｇＧ４抗体、ＩｇＭ抗体、ＩｇＡ１抗体、ＩｇＡ２抗体、ＩｇＤ抗体およびＩｇＥ抗体が含まれる。抗体フラグメントには、単鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）、単鎖抗体、Ｆ（ａｂ’）２フラグメント、ＦａｂフラグメントおよびＦａｂ発現ライブラリーによって生成されるフラグメントが含まれ、唯一の制限は、抗体フラグメントが、選択されたタグを結合する能力を維持しているということである。抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体またはキメラ抗体、例えば非ヒト抗体の抗原結

合領域（例えばＦ（ａｂ’）２または超可変領域）が本質的にヒトの分子を生成するための組換えＤＮＡ技術によってヒト抗体の骨格へと移入された抗体であってもよい。抗原結合フラグメント、例えばｓｃＦｖは、前記抗体から製造することができる。選択されたタグに対する抗体は、様々な宿主、例えばそれらに制限されるものではないが、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、ヒトを、特定のタンパク質または該タンパク質の免疫原性特性を維持する如何なる部分、断片もしくはオリゴペプチドで注射することによって免疫化することによって作製することができる。

【００３２】

宿主の種に依存して、免疫学的応答を高めるために様々なアジュバントを使用することができる。そのようなアジュバントには、それらに制限されないが、Ｅ．コリ由来の無毒化された非耐熱性トキシン、フロイントアジュバント、無機ゲル、例えば水酸化アルミニウムおよび表面活性物質、例えばリゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、スカシガイヘモシアニンおよびジニトロフェノールが含まれる。ＢＣＧ（バチルス・カルメット・ゲラン）およびコリネバクテリウム・パルブム（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｐａｒｖｕｍ）も潜在的に有用なアジュバントである。抗体およびそのフラグメントは、抗体分子の製造を提供する任意の技術を使用して、例えばモノクローナル抗体作製のための培養における連続細胞系統によって製造することができる。そのような技術には、それらに制限されないが、ＫｏｅｈｌｅｒとＭｉｌｓｔｅｉｎによって初めて記載されたハイブリドーマ技術（Ｎａｔｕｒｅ　２５６：４９５－４９７（１９７５））、ヒトＢ細胞ハイブリドーマ技術（Ｋｏｓｂｏｒら、Ｉｍｍｕｎｏｌ　Ｔｏｄａｙ　４：７２（１９８３）、Ｃｏｔｅら、Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ　８０：２０２６－２０３０（１９８３））およびＥＢＶハイブリドーマ技術（Ｃｏｌｅら、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ　ａｎｄ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ，Ａｌａｎ　Ｒ．　Ｌｉｓｓ　Ｉｎｃ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ　Ｎ．Ｙ．，ｐｐ　７７－９６（１９８５））が含まれる。「キメラ抗体」の作製のために開発された技術、すなわちマウス抗体遺伝子をヒト抗体遺伝子へとスプライシングして適切な抗原特異性および生物学的活性を有する分子を得る技術を使用することもできる（Ｍｏｒｒｉｓｏｎら、Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ　８１：６８５１－６８５５（１９８４）；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒら、Ｎａｔｕｒｅ　３１２：６０４－６０８（１９８４）；Ｔａｋｅｄａら、Ｎａｔｕｒｅ　３１４：４５２－４５４（１９８５））。選択的に、単鎖抗体の作製のために記載される技術を、タグ特異的単鎖抗体の作製に応用することができる。

【００３３】

一態様においては、該タグ結合ドメインは、単鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）である。ｓｃＦｖは、抗体の重鎖（ＶＨ）および軽鎖（ＶＬ）の可変領域であって、一般的には１０アミノ酸～約２５アミノ酸の短いペプチドを介して結合されている。リンカーは、ＶＨのＮ末端とＶＬのＣ末端とを連結するか、またはその逆のいずれであってもよい。

【００３４】

前記のように、該タグ結合ドメインの結合特異性は、標的構造体を結合するのに使用されるタンパク質へと結合されるタグの個性に依存することとなる。

【００３５】

好ましい一実施形態においては、前記タグは、ヒト核Ｌａタンパク質由来の短い線状エピトープ（Ｅ５Ｂ９）であり、該タグ結合ドメインは、抗体または抗体由来の抗原結合フラグメント、例えばそれぞれのＬａエピトープ（５Ｂ９）に結合する単鎖可変フラグメント（ｓｃＦｖ）を構成しうる。５Ｂ９抗ＬａエピトープのＵｎｉＣＡＲ系における使用は、該抗ＬａエピトープｓｃＦｖが、細胞表面に通常の生理学的条件下で結合される天然のＬａタンパク質と相互作用しないため有利である。このように、ＵｎｉＣＡＲを発現する免疫細胞、例えばＴ細胞またはＮＫ細胞と、天然のＬａ上の５Ｂ９エピトープとの望ましくない相互作用は起こりえない。これは、サイトカインストームまたはサイトカイン放出症候群（ＣＲＳ）として様々な呼ばれ方がされるサイトカインの毒性レベルの放出のようなＵｎｉＣＡＲを発現する免疫細胞による制御不能なオンターゲットのオフサイト毒性の

危険性を最小限にする。それぞれのモノクローナル抗体と変性Ｌａタンパク質とのウェスタンブロットにおける反応性が確認されたが、免疫沈降実験において天然のＬａタンパク質との反応性は確認されなかった（図３）。更に、シェーグレン症候群および全身性エリテマトーデスの患者は様々なＬａエピトープに対して自己抗体を作出するが、Ｅ５Ｂ９に対する自己抗体は同定されなかった。それは、このエピトープが免疫原性でないことを示唆している（Ｙｉａｎｎａｋｉら、Ｃｌｉｎ　Ｅｘｐ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１１２（１）：１５２－８（１９９８））。

【００３６】

ＵｎｉＣＡＲの２つ目のドメインは、細胞外ヒンジおよび膜貫通型（ＴＭ）ドメインである。該ヒンジドメインは、ＵｎｉＣＡＲを、その特定のタグへの最適な結合のためにエフェクター細胞の表面から突出させることを可能にする。該膜貫通型（ＴＭ）ドメインは、エフェクター細胞の細胞膜中にＵｎｉＣＡＲを係留する。例示的なヒンジドメインおよび膜貫通型（ＴＭ）ドメインには、それらに制限されないが、ヒトＣＤ２８分子、ＣＤ８ａ鎖、ＮＫ細胞受容体、例えばナチュラルキラー群２Ｄ（ＮＫＧ２Ｄ）のヒンジ領域および膜貫通領域、または抗体の定常領域の部分ならびに様々なヒンジドメインおよび膜貫通型（ＴＭ）ドメインの組み合わせが含まれる。

【００３７】

３つ目のドメインは、存在する場合には、シグナル伝達ドメインである。このドメインは、エフェクター細胞が細胞または細胞外構造体に架橋すると、ＵｎｉＣＡＲを有するエフェクター細胞中に細胞シグナルを伝達する。エフェクターと標的細胞との間の架橋は、（ｉ）標的細胞または標的細胞外構造体にあるその特定の結合部に結合し、かつタグを有するターゲットモジュールの存在に左右され、かつ依存し、そして（ｉｉ）該エフェクターの表面上に発現されるＵｎｉＣＡＲは、ターゲットモジュール中に含まれるタグを認識し、かつそこに結合することができる。エフェクター細胞の活性化は、サイトカインまたはケモカインの誘導ならびにエフェクター細胞の細胞溶解活性、食細胞活性もしくは抑制活性の活性化を含む。例示的なエフェクター細胞シグナル伝達ドメインには、それらに制限されないが、Ｔ細胞生存および増殖を増強する作用を有するＣＤ２８、ＣＤ１３７（４１ＢＢ）、ＣＤ１３４（ＯＸ４０）、ＤＡＰ１０およびＣＤ２７の細胞質領域；プログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ－１）および細胞傷害性Ｔリンパ球抗原４（ＣＴＬＡ－４）のような阻害性受容体、ならびにＴ細胞活性化およびＮＫ細胞活性化を誘導するＣＤ３鎖（例えばＣＤ３ゼータ）、ＤＡＰ１２およびＦｃ受容体の細胞質領域が含まれる。１つまたは１つより多くのシグナル伝達ドメインが、ＵｎｉＣＡＲに含まれてよく、２、３、４またはそれより多くの免疫細胞活性化ドメインまたは共刺激ドメインが含まれる。

【００３８】

更なる一実施形態においては、前記ＵｎｉＣＡＲは、該ＵｎｉＣＡＲの細胞外部の短いペプチドリンカーである４つ目のドメインを含む（図１）。該ドメインはその機能性のために必要とされ、４つ目のドメインは、妥当な親和性を有する特異的なモノクローナル抗体の結合を可能にする線状エピトープを形成する。１つまたは１つより多くの線状エピトープが４つ目のドメインに含まれていてよく、かつ該エピトープは、タグ結合ドメイン中に、タグ結合ドメインと細胞外リンカーとの間に、または細胞外ヒンジドメインの一体部分中にリンカーとして配置されていてよい。その任意の４つ目のドメインの助力により、ＵｎｉＣＡＲが接合された免疫細胞は、特異的に刺激されうるため、ＵｎｉＣＡＲが接合された免疫細胞は、優先的に増殖し、そして接合されていない免疫細胞と比較してインビトロでもインビボでもより長期に存続する。４つ目のドメインは、混合された細胞集団からのＵｎｉＣＡＲが接合された免疫細胞を精製するために使用することもできる。該ドメインは、ＵｎｉＣＡＲが接合された免疫細胞に媒介される免疫応答を抑制するためと、ＵｎｉＣＡＲが接合された免疫細胞をインビボで排除するために使用することもできる。

【００３９】

エフェクター細胞の細胞表面で発現を可能とするために、シグナルペプチド（時として、シグナル配列、標的シグナルまたはリーダーペプチドとも呼ばれる）は、ＵｎｉＣＡＲ

核酸配列のＮ末端のタグ結合ドメインの上流に置かれる。シグナルペプチドは、翻訳と同時または翻訳の後のいずれかで、分泌経路のタンパク質を標的とする。この目的のために、様々な種のタンパク質由来のシグナルペプチドを利用できるが、有利にはＣＤ２８、ＣＤ８アルファ、ＩＬ－２もしくはヒト起源の抗体の重鎖もしくは軽鎖由来のリーダーペプチドが、免疫原性反応を避けるために使用される。

【００４０】

ターゲットモジュール

ターゲットモジュールは、ある特定のヒト細胞表面タンパク質またはタンパク質複合体に特異的な結合部とタグとから構成される。ターゲットモジュールは、ＵｎｉＣＡＲを発現するエフェクター細胞の投与の前に、またはそれと同時に、またはその後に被験体へと投与される。あるいは、ＵｎｉＣＡＲを発現するエフェクター細胞には、レシピエント中に注入する前にターゲットモジュールをまとっていてよい。ターゲットモジュールの結合部には、それらに制限されるものではないが、表面抗原、例えばＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ１０、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ３３、ＣＤ３８、ＣＤ４４、ＣＤ５２、ＣＤ９９、ＣＤ１２３、ＣＤ２７４およびＴＩＭ－３、上皮増殖因子受容体ファミリー（ｅｒｂ１、ｅｒｂ２、ｅｒｂ３、ｅｒｂ４およびそれらの突然変異体）のメンバー、エフリン受容体ファミリー（ＥｐｈＡ１～１０、ＥｐｈＢ１～６）のメンバー、いわゆる前立腺特異抗原（例えば前立腺幹細胞抗原ＰＳＣＡ、前立腺特異的膜抗原ＰＳＭＡ）、胎児性抗原（例えば癌胎児性抗原ＣＥＡ、胎児型アセチルコリン受容体）、血管内皮増殖因子ファミリー（ＶＥＧＦＲ１～３）のメンバー、上皮細胞接着分子ＥｐＣＡＭ、アルファフェトプロテインＡＦＰ、ムチンタンパク質ファミリー（例えばＭＵＣ１、ＭＵＣ１６）のメンバー、濾胞刺激ホルモン受容体（ＦＳＨＲ）、ヒト高分子量メラノーマ関連抗原（ＨＭＷ－ＭＡＡ）、葉酸結合タンパク質ＦＢＰ、葉酸受容体α、ＮＫＧ２Ｄ受容体のリガンド、上皮糖タンパク質ファミリー（例えばＥＧＰ－２、ＥＧＰ－４）のメンバー、ジシアロガングリオシド（例えばＧＤ２、ＧＤ３）、炭酸脱水酵素ファミリー（例えばＣＡＩＸ）のメンバー、ならびに炭水化物抗原ファミリー（Ｌｅｙ）のメンバーとともに、挙げられたタンパク質およびタンパク質ファミリーの突然変異体を含む抗原に結合する抗体またはそれらのフラグメントが含まれる。更に、ターゲットモジュールの結合部には、それらに制限されないが、細胞質抗原または核抗原、例えばＬａ／ＳＳＢ抗原、ＧＴＰアーゼのＲｈｏファミリーのメンバー、高移動度タンパク質のメンバー等に結合する抗体またはそれらのフラグメントが含まれる。同様に、ターゲットモジュールの結合部は、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）またはその断片のアルファ鎖およびベータ鎖またはガンマ鎖およびデルタ鎖から構成されていてよい。そのようなＴＣＲに由来する結合部は、ヒト白血球抗原クラス（ＨＬＡ）ＩおよびＩＩタンパク質複合体によって提示されるタンパク質を認識し、そこに結合する。例は、それらに制限されないが、ＥＧＦＲファミリー、サバイビン、ｓｒｙ様高移動度ボックス（ＳＯＸ）タンパク質ファミリー、メラノーマ関連抗原（例えば自己免疫原性癌／精巣抗原ＮＹ－ＥＳＯ－１、メラノーマ抗原ファミリーＡ　ＭＡＧＥＡのメンバー、メラノーマＰＲＡＭＥにおいて主として発現される抗原）、ならびに白血病関連抗原（例えばウィルムス腫瘍遺伝子１　ＷＴ１）に由来するペプチドに特異的なＴＣＲである。ターゲットモジュールの結合部は、更に受容体とも呼ばれるタンパク質およびタンパク質複合体に対するリガンドを含んでもよい。そのようなリガンドは、それらに制限されないが、サイトカイン受容体（例えばＩＬ－１３受容体）、ＮＫＧ２Ｄ受容体のリガンド、ＥＧＦＲファミリーメンバーへのリガンド、または自己反応性ＴＣＲに結合しうる。

【００４１】

ターゲットモジュールの結合部は、単独抗原特異性（単独特異的）、２、３またはそれより多くの抗原特異性（二重および多重特異的）を含んでよい。二重および多重抗原特異性のための例には、それらに制限されるものではないが、ＰＳＣＡおよびＰＳＭＡ抗原、ＣＤ１９およびＣＤ２０抗原、ＣＤ１９、ＣＤ２０およびＣＤ２２抗原、ＣＤ３３およびＣＤ１２３抗原、ＣＤ３３およびＣＤ９９抗原、ＣＤ３３およびＴＩＭ－３、ｅｒｂ－１

および－２、ＰＳＣＡおよびｅｒｂ－２、ならびに更なる組み合わせに結合するターゲットモジュールが含まれる。ターゲットモジュールの結合部は、一価結合部位だけでなく、二価および多価結合部位を含んでもよい。二価および多価のターゲティング戦略のための例には、それらに制限されるものではないが、ＰＳＣＡ、ＣＤ１９およびＣＤ３３の異なるエピトープを認識する２つのｓｃＦｖを導入するターゲットモジュール、ならびにｅｒｂ１受容体の種々のエピトープを認識するリガンド－ｓｃＦｖ組み合わせを導入するターゲットモジュールが含まれる。

【００４２】

ターゲットモジュールは、標的抗原結合に関与しない追加のリガンドを有してもよく、それらは、更にペイロードとも呼ばれる。そのようなペイロードは、それらに制限されるものではないが、ターゲットモジュールのＮ末端またはＣ末端に融合された共刺激リガンドまたはサイトカイン、特にＣＤ２８、ＣＤ１３７（４１ＢＢ）、ＣＤ１３４（ＯＸ４０）およびＣＤ２７の細胞外ドメイン、ならびに全て異なる種類の免疫細胞を刺激するものであるＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１７およびＩＬ－２１を含んでよい。他のペイロードは、標的細胞および隣接細胞に細胞死を誘導する放射性核種または化学的化合物であってよい。

【００４３】

方法

哺乳動物における汎用的キメラ抗原受容体に媒介される免疫応答を刺激するための方法であって、

－　哺乳動物に、汎用的キメラ抗原受容体を発現するように遺伝子改変されたエフェクター細胞の有効量を投与すること、ここで、前記汎用的キメラ抗原受容体は、３つのドメインを含み、１つ目のドメインは、タグ結合ドメインであり、２つ目のドメインは、細胞外ヒンジおよび膜貫通ドメインであり、３つ目のドメインは、シグナル伝達ドメインであり、タグ結合ドメインは、いずれかのヒト核タンパク質から誘導されるタグに結合する、

－　ある特定のヒト細胞表面タンパク質またはタンパク質複合体に特異的な結合部とタグとから構成されるターゲットモジュールを投与すること、ここで、前記タグは、いずれかのヒト核タンパク質から誘導される、

ここで、前記ターゲットモジュールは、該汎用的キメラ抗原受容体を発現するエフェクター細胞の投与前、または投与と同時に、または投与後に被験体へと投与される、方法。

【００４４】

好ましい一実施形態においては、前記エフェクター細胞およびターゲットモジュールは、ヒトに投与される。

【００４５】

ＵｎｉＣＡＲエフェクター細胞の作製

本発明の一実施形態においては、免疫細胞は、ＵｎｉＣＡＲを発現するように様々な方法によって遺伝子改変されてよい。一般的に、ＵｎｉＣＡＲと遺伝子操作された免疫細胞中でのその発現を保証するために必要とされる全てのエレメントをコードするポリヌクレオチドベクターが細胞中に導入される。ベクターの導入は、それらに制限されるものではないが、核酸のエレクトロポレーションもしくはトランスフェクションによって、またはウイルスベクター系の助力により、例えばそれらに制限されるものではないが、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス、泡沫状ウイルスもしくはレンチウイルスによる遺伝子導入によって実施することができる。

【００４６】

更なる一実施形態においては、レンチウイルスによる遺伝子導入は、免疫細胞中でのＵｎｉＣＡＲの安定的発現のために、まず選択されたＵｎｉＣＡＲをコードするレンチウイルスベクターを構築することによって適用することができる。例示されるレンチウイルスベクターには、それらに制限されるものではないが、図３に示されるベクターｐＬＶＸ－ＥＦ１アルファ　ＵｎｉＣＡＲ　２８／ζ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ、Ｔａｋａｒａ　Ｂｉｏ　Ｇｒｏｕｐ）であって、これは、該ベクターのレンチウイルス部がヒト免疫不全ウイルス

（ＨＩＶ）から誘導されたものであるベクターが含まれる。
【００４７】
記載の用途に関しては、ＭＳＣ／ＩＲＥＳ／ＺｘＧｒｅｅｎＩ部を、ＵｎｉＣＡＲ構築物によって置き換えた。図３に関しては、使用される略語は以下の通りである：
５’ＬＴＲ：５’長末端反復、ＰＢＳ：プライマー結合部位、Ψ：パッケージングシグナル、ＲＲＥ：Ｒｅｖ応答エレメント、ｃＰＰＴ／ＣＴＳ：セントラルポリプリン配列／セントラルターミネーション配列、ＰＥＦ１α：ヒト伸長因子１αプロモーター、ＭＣＳ：マルチクローニングサイト、ＩＲＥＳ：リボソーム内部進入部位、ＺｓＧｒｅｅｎ１：ヒトコドン最適化されている、ＷＰＲＥ：ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント、３’ＬＴＲ：３’長末端反復、ｐＵＣ：複製起点、Ａｍｐｒ：アンピシリン耐性遺伝子；β－ラクタマーゼ。
【００４８】
レンチウイルス粒子は、典型的には、ヒト胎児由来腎臓（ＨＥＫ）２９３Ｔ（ＡＣＣ６３５）細胞をＵｎｉＣＡＲをコードするレンチウイルスベクタープラスミドで一過性トランスフェクションし、そして群特異抗原（ｇａｇ）およびポリメラーゼ（ｐｏｌ）をコードする図４に示されるプラスミド（例えばｐｓＰＡＸ２、ａｄｄｇｅｎｅ　ｐｌａｓｍｉｄ　１２２６０）と、図５に示されるエンベロープをコードするプラスミド（例えばｐＭＤ２．Ｇ、ａｄｄｇｅｎｅ　ｐｌａｓｍｉｄ　１２２５９）で同時トランスフェクションすることによって作製される。トランスフェクション後に、該パッケージングプラスミドは、ＨＩＶ－１のＧａｇとＰｏｌのタンパク質を発現する。図４で使用される略語は、以下の通りである：
ＣＭＶｅｎｈ：ＣＭＶエンハンサーおよびプロモーター、ＳＤ：スプライスドナー、ＳＡ：スプライスアクセプター、Ｇａｇ：群特異抗原、Ｐｒｏ：プロテアーゼタンパク質をコードする前駆タンパク質、Ｐｏｌ：逆転写酵素およびインテグラーゼをコードするタンパク質、ＲＲＥ：ｒｅｖ応答エレメント、Ａｍｐ：アンピシリン。
【００４９】
プラスミドＭＤ２．Ｇ（図５）は、水疱性口内炎ウイルスの糖タンパク質（ＶＳＶ－Ｇ）をコードする。ＶＳＶ－Ｇタンパク質は、広い範囲の哺乳動物細胞の形質導入のためにレンチウイルスベクターに使用される。図５で使用される略語は、以下の通りである：
ＣＭＶ：ＣＭＶエンハンサーおよびプロモーター、ｂｅｔａ－ｇｌｏｂｉｎ　ｉｎｔｒｏｒ：ベータグロビンイントロン、ｂｅｔａ－ｇｌｏｂｉｎ　ｐＡ：ベータグロビンポリアデノシンテール。
【００５０】
種々のウイルス種由来の様々なエンベロープがこの目的のために使用できる。レンチウイルスベクターは、効果的には、それらに制限されるものではないが、両種性マウス白血病ウイルス（ＭＬＶ）のエンベロープ糖タンパク質（Ｅｎｖ）または水疱性口内炎ウイルスのＧタンパク質（ＶＳＶ－Ｇ）、プロトタイプフォーミーウイルス（ＰＦＶ）の改変エンベロープまたはテナガザル白血病ウイルス（ＧａＬＶ）およびＭＬＶ由来のキメラエンベロープ糖タンパク質変異体を有するシュードタイプであってよい。トランスフェクションされたＨＥＫ２９３Ｔ細胞からの上清は、トランスフェクション後２４時間～９６時間で採取することができ、ウイルス粒子は、必ずする必要はないが、該上清から超遠心分離または他の方法によって濃縮してよい。免疫細胞のレンチウイルス形質導入のためには、様々な確立されたプロトコールを適用することができる。一つの態様において、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）または単離されたＴ細胞は、溶液か、またはプラスチック細胞培養皿もしくは磁性ビーズにコーティングされた状態のいずれかのＣＤ３複合体に特異的なモノクローナル抗体、例えばクローンＯＫＴ３またはＵＣＨＴ１で活性化させることができる。ＰＢＭＣまたは単離されたＴ細胞の活性化は、共刺激経路を、それらに制限されるものではないがＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ１３４もしくはＣＤ１３７の単独または様々な組み合わせでの特異的なモノクローナル抗体またはリガンドと、それらに制限されるものではないがインターロイキン（ＩＬ）－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５およびＩＬ－

２１のような外因性組換えサイトカインを供給することで刺激することによって更に高めることができる。濃縮されたウイルス粒子または濃縮されていないウイルス粒子が、活性化ＣＤ３抗体および／または組換えサイトカインを単回投与または多回投与として初期投与した後２４時間～９６時間でＰＢＭＣまたはＴ細胞培養に添加される。Ｔ細胞の安定な形質導入は、ウイルス上清の最終投与後３日目以降から、ＵｎｉＣＡＲの表面発現に関するタグを含むターゲットモジュールでの染色後に、またはＵｎｉＣＡＲの４つ目のドメインに対するモノクローナル抗体での染色後にフローサイトメトリーで測定されうる。ＵｎｉＣＡＲ形質導入されたＴ細胞は、該細胞を組換えサイトカインを供給しつつ培養し、そして抗ＣＤ３モノクローナル抗体を活性化することによってインビトロで増殖させることができる。

【００５１】

該ＵｎｉＣＡＲが任意の４つ目のドメイン、つまりはモノクローナル抗体のための線状エピトープを形成するペプチド配列を有する場合には、ＵｎｉＣＡＲを発現するように遺伝子改変された免疫細胞は、４つ目のＵｎｉＣＡＲドメインに結合するモノクローナル抗体またはその抗体フラグメントを培養皿の表面にコーティングするか、または細胞培養へと、それらに制限されるものではないがＵｎｉＣＡＲが接合されたエフェクター細胞１～４つに対して１つのビーズという規定の比率で添加される任意の種類のビーズにコーティングすることによってインビトロで特異的に増殖させることができる。表面コーティングされたモノクローナル抗体のＵｎｉＣＡＲペプチドドメインへの結合は、細胞表面に発現されるＵｎｉＣＡＲの架橋と、ＵｎｉＣＡＲのシグナルドメインによって特異的に惹起されるシグナル経路の活性化に導く免疫シナプスの形成とを誘発する。これにより、誘発されたシグナル経路に応じて、増殖の強化がもたらされ、ＵｎｉＣＡＲを有する免疫細胞の活性化誘導細胞死に対する持続的な耐性が導かれ、従って、混合された集団におけるＵｎｉＣＡＲ遺伝子改変された免疫細胞の富化に導くことができる。

【００５２】

任意の４つ目のドメイン、つまりはモノクローナル抗体のための線状エピトープを形成するペプチド配列は、混合された集団からＵｎｉＣＡＲ発現免疫細胞を富化および精製するために更に使用することができる。富化および精製を、４つ目のＵｎｉＣＡＲドメインに結合するモノクローナル抗体またはその抗体フラグメントの助力により行うことで、セルソーティングのためにＵｎｉＣＡＲ発現細胞に印を付けることができるか、またはＵｎｉＣＡＲ発現免疫細胞を細胞単離に利用できる小粒子に一過的に結合させることができる。一つの態様において、ＵｎｉＣＡＲが接合された免疫細胞は、４つ目のドメインを認識するモノクローナル抗体と一緒にインキュベートされる。次に、任意の４つ目のドメインに結合するモノクローナル抗体の種特異的およびアイソタイプ特異的な重鎖および軽鎖に対する抗体またはそれらのフラグメントと結合された磁性ビーズが添加される。こうして、ＵｎｉＣＡＲ発現免疫細胞と磁性ビーズとは結合され、そして磁界において他の免疫細胞から捕捉および分離することができる。

【００５３】

本発明の更なる一実施形態においては、任意の４つ目のドメインは、図６に示されるようにＵｎｉＣＡＲ表面発現の検出のために使用することができる。図６（Ａ）は、ＵｎｉＣＡＲ表面発現が、任意の４つ目のドメインに対するモノクローナル抗体を使用し、次いで、蛍光色素結合された抗種二次抗体で染色することによって検出することができることを示している。任意の４つ目のドメインを追加的に使用することで、ＵｎｉＣＡＲ免疫細胞投与において図６）に示されるように、ＵｎｉＣＡＲが接合されたＴ細胞を高い純度まで精製することができる。

【００５４】

ＵｎｉＣＡＲ発現免疫細胞投与

ＵｎｉＣＡＲ発現免疫細胞の集団は、当業者に公知の技術を使用して被験体に投与するために製剤化されてよい。

【００５５】

ＵｎｉＣＡＲ発現免疫細胞の集団を含む製剤は、医薬品に許容可能な１種以上の賦形剤を含んでよい。該製剤中に含まれる賦形剤は、例えばＵｎｉＣＡＲを含むタグ結合ドメインの性質、使用される免疫細胞の集団、および投与方式に依存して種々の目的を有することとなる。一般的に使用される賦形剤の例には、制限されるものではないが、生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、注射用水（water-for-infection）、グリセロール、エタノールおよびそれらの組み合わせ、安定化剤、可溶化剤および界面活性剤、緩衝剤および保存剤、等張剤、増量剤ならびに潤滑剤が含まれる。ＵｎｉＣＡＲ発現免疫細胞の集団を含む製剤は、一般的に、非ヒト成分のいずれか、例えば動物血清（例えばウシ血清アルブミン）の不存在下に調製および培養されることとなる。

【００５６】

製剤は、ＵｎｉＣＡＲ発現免疫細胞の１つの集団または１つより多くの集団、例えば２、３、４、５、６またはそれより多くの集団を含んでよい。ＵｎｉＣＡＲが接合された免疫細胞の種々の集団は、タグ結合ドメインの個性、シグナル伝達ドメインの個性、サブポピュレーションの個性、作出および培養の様式、またはそれらの組み合わせに基づいて様々であってよい。例えば、製剤は、１つまたは１つより多くの、例えば２、３、４、５、６またはそれより多くの異なるタグ付きタンパク質を認識し、かつそこに結合するＵｎｉＣＡＲ発現Ｔ細胞およびＮＫ細胞の集団を含んでよい。

【００５７】

ＵｎｉＣＡＲ免疫細胞の１つ以上の集団を含む製剤は、被験体へと当業者に公知の様式および技術を使用して投与することができる。例示される様式には、それに制限されるものではないが、静注が含まれる。他の様式には、制限されるものではないが、腫瘍内、皮内、皮下（ｓ．ｃ．、ｓ．ｑ．、ｓｕｂ－Ｑ、Ｈｙｐｏ）、筋内（ｉ．ｍ．）、腹腔内（ｉ．ｐ．）、動脈内、髄内、心臓内、関節内（関節）、髄液包内（滑液領域）、頭蓋内、髄腔内およびくも膜下（髄液）が含まれる。該製剤の非経口注射または注入のために有用なあらゆる公知のデバイスをそのような投与の実施のために使用することができる。注射は、バルク注射または連続流注射として実施することができる。

【００５８】

被験体に投与されるＵｎｉＣＡＲ発現免疫細胞の１つ以上の集団を含む製剤は、特定の適応症または疾患の治療および／または予防のために有効な多くのＵｎｉＣＡＲ発現免疫細胞を含む。このように、ＵｎｉＣＡＲ発現免疫細胞の治療に有効な集団は、本発明の方法を実施するときに被験体に投与される。被験体に投与されるＵｎｉＣＡＲ発現免疫細胞の数は、場所、起源、個性、疾患の程度および重度、治療されるべき個人の年齢および状態等に依存して広い限度の間で変動することとなる。一般的に、約１×１０^{4}から約１×１０^{10}の間のＵｎｉＣＡＲ発現免疫細胞を含む製剤が投与される。殆どの場合に、該製剤は、約１×１０^{5}から約１×１０^{9}の間のＵｎｉＣＡＲ発現免疫細胞、約５×１０^{5}から約５×１０^{8}までのＵｎｉＣＡＲ発現免疫細胞、または約１×１０^{6}から約１×１０^{9}までのＵｎｉＣＡＲ発現免疫細胞を含み得る。医師は、最終的に使用すべき適切な投与量を決定する。有害事象の場合に、ＵｎｉＣＡＲが接合された免疫細胞は、個体から、それぞれの抗体に関する線状エピトープを形成するＵｎｉＣＡＲのペプチドドメイン（４つ目のドメイン）に対するモノクローナル抗体の投与によって減少させることができる。

【００５９】

ターゲットモジュールの作製

ターゲットモジュールは、２つのドメイン、つまりはある特定のヒト細胞表面タンパク質またはタンパク質複合体に特異的な結合部と、ＵｎｉＣＡＲのタグ結合ドメインを指向するタグとを含む。ターゲットモジュールは、当業者に公知の技術によって作製できる。これらの技術には、制限されるものではないが、原核細胞もしくは真核細胞における組換え発現またはポリペプチド鎖の人工的合成が含まれる。

【００６０】

一つの態様においては、ターゲットモジュールは、生物学的に活性な形で多量の組換えタンパク質を合成するのに適したチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ、ＡＣＣ－１１０

）細胞中で発現されうる。ターゲットモジュールをコードする核酸配列は、制限されるものではないが、ネイキッド核酸トランスフェクション、エレクトロポレーションまたはウイルス遺伝子導入のような確立された遺伝子工学技術によってＣＨＯ細胞中に導入することができる。高生産性の単一細胞クローンは、親系統から、例えばジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）選択システムを使用して選択することができる。このシステムにおいては、ＤＨＦＲ欠損ＣＨＯ細胞突然変異体（例えばＣＨＯ亜系統ＤＸＢ１１またはＤＧ４４）は、ターゲットモジュールをコードする核酸配列に加えてＤＨＦＲ遺伝子の機能的コピーを同時トランスフェクションすることによって遺伝子改変される。次いでクローン選択を、グリシン、ハイポキサンチンおよびチミジンを欠いた培地中での増殖によって実施する。高生産性のクローンは、細胞を、高濃度のメトトレキサート（ＭＴＸ）、つまりはＤＨＦＲ活性を遮断する葉酸類似体中で細胞を培養することによって更に選択することができる。遺伝子改変された細胞はＤＨＦＲ活性の低下に対処せねばならず、それはＤＨＦＲの単一コピーが存在するだけではレスキューできないので、ＤＨＦＲ遺伝子の増幅されたコピーを有するクローンが、これらの条件下で好まれる。ＤＨＦＲと対象の遺伝子との間の遺伝的つながりは、導入遺伝子も同時に増幅されることを保証し、こうして高生産性細胞クローンを獲得する機会が高められる。選択された細胞クローンは、有利にはいずれかの動物血清の不存在下で良好な製造条件下で増殖される。ターゲットモジュールは、細胞培養上清から、沈降または超遠心分離のような予備工程を含む確立された分取タンパク質精製法およびサイズ排除クロマトグラフィーもしくはイオン交換クロマトグラフィーのような様々な精製技術によって単離されうる。一つの態様においては、ターゲットモジュールの核酸配列は、ポリヒスチジンタグを形成する６個～８個の連続的なヒスチジンアミノ酸に関するコーディング配列を有する。該ポリヒスチジンは、ニッケルおよびコバルトのような二価の金属イオンに強力に結合する。細胞培養上清を、固定化したニッケルイオンを含むカラムを通過させることができ、固定化したニッケルイオンはポリヒスチジンタグを結合するが、タグがついていない全てのタンパク質はカラムを通過する。ターゲットモジュールは、カラムへの結合のためのポリヒスチジンと競合するイミダゾールで、または樹脂についてのタグの親和性を下げるｐＨの低下によって溶出させることができる。

【００６１】

ターゲットモジュールの投与

１つのターゲットモジュールまたは１つより多くの、例えば２、３、４またはそれより多くのターゲットモジュールは、被験体に投与するために当業者に公知の技術を使用して製剤化することができる。

【００６２】

１つまたは１つより多くのターゲットモジュールを含有する製剤は、１種以上の医薬品に許容可能な賦形剤を含んでよい。該製剤中に含まれる賦形剤は、例えばターゲットモジュールの性質および投与方式に依存して種々の目的を有することとなる。一般的に使用される賦形剤の例には、制限されるものではないが、生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、注射用水（water-for-infection）、グリセロール、エタノールおよびそれらの組み合わせ、安定化剤、可溶化剤および界面活性剤、緩衝剤および保存剤、等張剤、増量剤ならびに潤滑剤が含まれる。ターゲットモジュールを含む製剤は、一般的に、いずれかの非ヒト成分、例えば動物血清（例えばウシ血清アルブミン）の不存在下に調製および培養されることとなる。

【００６３】

製剤は、１つのターゲットモジュールまたは１つより多くの、例えば２、３、４、５、６またはそれより多くのターゲットモジュールを含んでよい。ターゲットモジュールは、結合部の個性、タグの個性、作出様式またはそれらの組み合わせに基づき変えることができる。例えば、製剤は、１つまたは１つより多くの、例えば２、３、４、５、６またはそれより多くの異なるヒト細胞表面タンパク質、タンパク質複合体または細胞外マトリックス構造体を認識し、かつそこに結合するターゲットモジュールを含んでよい。

【００６４】

ＵｎｉＣＡＲ発現免疫細胞の１つ以上の集団を含む製剤は、被験体に投与する前にＵｎｉＣＡＲ発現免疫細胞にターゲットモジュールをまとわせるために、１つ以上のターゲットモジュールを含む製剤と一緒にエクスビボでインキュベートすることができる。あるいは、１つ以上のターゲットモジュールを含む製剤は、被験体に直接投与してよく、または両方の戦略の組み合わせを選択することができる。経路および投与量は、場所、起源、個性、疾患の程度および重度、治療されるべき個人の年齢および状態等に依存して広い限度の間で変動することとなる。医師は、最終的に使用すべき適切な投与経路および投与量を決定する。

【００６５】

ターゲットモジュールを含む製剤は、特定の適応症または疾患の治療および／または予防のために有効な量で被験体に投与される。一日当たり１m^2につき送達される典型的な投与速度は、１μｇから１０００ｍｇの間であり、好ましくは１０μｇから１ｍｇの間であり、その際、投与量は、一日または一週間当たり１回以上、または連続的に数週間の期間にわたり投与される。しかしながら、被験体に投与される製剤中のターゲットモジュールの量は、場所、起源、個性、癌の程度および重度、治療されるべき個人の年齢および状態等に依存して広い限度の間で変動することとなる。医師は、最終的に使用すべき適切な投与量を決定する。

【００６６】

本発明は、癌、感染症または自己免疫疾患を有する被験体の治療方法であって、治療を必要とする被験体に、癌細胞に結合するターゲットモジュールの１種以上の製剤を投与することと、前記ターゲットモジュールに結合して細胞死を誘導するＵｎｉＣＡＲ発現免疫細胞の１つ以上の治療に有効な集団を投与することを含む治療方法に関する。

【００６７】

用語「癌」は、広く解釈されるものと意図され、それは、異常な細胞増殖および／または細胞分裂の全ての態様を包含する。例には、癌腫、例えば制限されるものではないが、腺癌、扁平上皮癌、腺扁平上皮癌、退形成性癌、大細胞癌、小細胞癌および皮膚、胸部、前立腺、膀胱、膣、頚、子宮、肝臓、腎臓、膵臓、脾臓、肺、気管、気管支、結腸、小腸、胃、食道、胆嚢の癌；肉腫、例えば制限されるものではないが、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、悪性血管内皮種、悪性神経鞘腫、骨肉腫、軟部組織肉腫、ならびに骨、軟骨、脂肪、筋肉、血管および造血組織の癌；リンパ腫および白血病、例えば制限されるものではないが、成熟Ｂ細胞新生物、例えば慢性リンパ球性白血病／小リンパ球性リンパ腫、Ｂ細胞前リンパ球性白血病、リンパ腫および形質細胞新生物、成熟Ｔ細胞および成熟キラー（ＮＫ）細胞新生物、例えばＴ細胞前リンパ球性白血病、Ｔ細胞大顆粒リンパ球性白血病、アグレッシブＮＫ細胞白血病、ならびに成人Ｔ細胞白血病／リンパ腫、ホジキンリンパ腫、および免疫不全関連リンパ増殖性疾患；胚細胞腫瘍、例えば制限されるものではないが、精巣癌および卵巣癌；芽腫、例えば制限されるものではないが、肝芽腫、髄芽腫、腎芽腫、神経芽腫、膵芽腫、胸膜肺芽腫および網膜芽種が含まれる。その用語には、良性腫瘍も含まれる。

【００６８】

本明細書で使用される場合に、用語「治療する」、「治療している」、および「治療」は、それらの通常かつ慣例の意味を有し、その用語には、被験体における癌の阻止、癌の寛解または癌の症状の重度および／または頻度の低下、および／または、被験体における癌細胞の増殖、分裂、伝播もしくは増殖または癌の進行（例えば新たな腫瘍の発生）の阻害の１つ以上が含まれる。治療とは、本発明の方法が実行されていない被験体に対しての約１％～約１００％だけの阻止、寛解、低下または阻害を意味する。好ましくは、その阻止、寛解、低下または阻害は、本発明の方法が実行されていない被験体に対して約１００％、９９％、９８％、９７％、９６％、９５％、９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１０％、５％または１％である。

【００６９】

ＵｎｉＣＡＲ発現免疫細胞の集団を含む製剤とターゲットモジュールの製剤との両方の

投与頻度は、治療される疾病、ＵｎｉＣＡＲ発現免疫細胞およびターゲットモジュールを含むエレメント、ならびに投与様式を含む要因に依存して変動し得る。それぞれの製剤は、独立して、一日４回、３回、２回もしくは１回、１日おきに、３日おきに、４日おきに、５日おきに、６日おきに、１週間に１回、８日おきに、９日おきに、１０日おきに、２週間おきに、１ヶ月おきに、そして２ヶ月おきに投与してよい。

【００７０】

治療の期間は、治療される疾病に基づくものであり、所属医師によって最良の決定がなされる。しかしながら、治療の継続は、何日間、何週間、または何ヶ月にもわたり継続するように検討される。

【００７１】

本発明は、治療方法に柔軟性を与え、その結果として、ターゲットモジュールおよびＵｎｉＣＡＲ発現免疫細胞の１つ以上の集団の１種以上の製剤は、被験体にどのような順序で投与してもよい。このように、ターゲットモジュールの１種以上の製剤は、被験体へと、ＵｎｉＣＡＲ発現免疫細胞の１つ以上の集団の前に、その後に、またはそれと同時に投与することができる。あるいは、ターゲットモジュールおよび／またはＵｎｉＣＡＲ発現免疫細胞の１つ以上の集団の１つ以上の製剤が被験体に投与される場合に、その投与は交互であってよい。例えば、ターゲットモジュールの第一の製剤を投与し、それに引き続きＵｎｉＣＡＲ発現免疫細胞の第一の集団を投与し、その次にタグ付きタンパク質の第二の製剤を投与し、次いでＵｎｉＣＡＲ発現免疫細胞の第二の集団を投与してよい。

【００７２】

また本発明は、ＵｎｉＣＡＲ発現免疫細胞の集団が、ＵｎｉＣＡＲ発現免疫細胞を被験体に投与する前にターゲットモジュールで覆われる方法も含む。

【００７３】

本発明の実施形態のそれぞれにおいては、治療を受ける被験体は、ヒトまたは非ヒト動物、例えば非ヒトの霊長類、トリ、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、伴侶動物、例えばイヌ、ネコもしくは齧歯類または他の哺乳動物である。

【００７４】

一実施形態においては、ＵｎｉＣＡＲ遺伝子操作されたＴ細胞は、生検、例えば前立腺、膀胱、脾臓および胸部の腫瘍由来の生検において頻繁に検出されるＰＳＣＡおよび／またはＰＳＭＡを発現する腫瘍細胞に対して特異的にリダイレクトされうる（図７）。ヒトＴ細胞は、模擬的に形質導入（白いバー）されたか、またはＵｎｉＣＡＲをコードするレンチウイルスベクターであって、ＣＤ２８／ＣＤ３ゼータの２つのシグナル伝達ドメインを含むもの（黒いバー）またはシグナル伝達ドメインを全て欠いているもの（網掛けされたバー）またはＥＧＦＰマーカータンパク質だけを発現するもの（ストライプのバー）で形質導入された。操作されたヒトＴ細胞およびターゲットモジュールの存在下での前立腺幹細胞抗原（ＰＣ３－ＰＳＣＡ）または前立腺膜抗原（ＰＣ３－ＰＳＭＡ）のいずれかを発現するように遺伝子操作された前立腺腫瘍細胞（ＰＣ３）の特異的溶解を、５１Ｃｒ放出アッセイで分析した。Ｔ細胞を、エフェクター対ターゲット比（ｅ：ｔ）５：１または１：１で５１Ｃｒ負荷ＰＣ３標的細胞と一緒にインキュベートした。ＰＳＣＡに特異的なターゲットモジュール（ＴＭ）（αＰＳＣＡ　ＴＭ）またはＰＳＭＡに特異的なターゲットモジュール（ＴＭ）（αＰＳＭＡ　ＴＭ）を、１５ｎＭｏｌの濃度で添加した。２０時間の培養後に、標的細胞溶解（クロム放出）を測定した。プロットは、３つの個別のＴ細胞ドナーを用いた実験からの平均および標準偏差を示す（図７Ａ）。同様に、ＰＳＣＡ抗原とＰＳＭＡ抗原の両方を発現するＬＮＣａｐ－４－２Ｂ腫瘍幹細胞に対するＵｎｉＣＡＲ操作されたＴ細胞の殺傷能は、ＰＳＣＡ　ＴＭまたはＰＳＭＡ　ＴＭ（１ｎＭｏｌ）のいずれかの存在下で、指摘したｅ：ｔ比で５１Ｃｒ放出アッセイによって裏付けられた。３つの個別のＴ細胞ドナーを用いた実験からの平均および標準偏差が示されている（図７Ｂ）。図７Ｂからの実験を、より低い１：２のｅ：ｔ比で、１ｎＭｏｌのＰＳＣＡ特異的ＴＭかもしくはＰＳＭＡ特異的ＴＭのいずれかを添加するか、または両方のＴＭを１ｎＭｏｌの全体濃度で組み合わせて繰り返した。５１Ｃｒ放出によって測定される特異的な溶

解を、２４時間および４８時間後に測定した。３つの個別の健康なＴ細胞ドナーを用いた実験からの平均および標準偏差が示されている（図７Ｃ）。この実験は、２つの異なるＴＭの組み合わせが腫瘍細胞に対するＵｎｉＣＡＲリダイレクトされたＴ細胞の殺傷能を、単独の抗原リターゲティング戦略と比較して、二重標的試料における両方のＴＭの全体量が単独抗原リターゲティング対照試料におけるそれぞれのＴＭの全体量と等しいとしても改善することを実証している（図７Ｃ）。更に、ヒトＴ細胞は、対応するＴＭの存在下で抗原発現腫瘍細胞に架橋するとすぐに、ＵｎｉＣＡＲを備えたヒトＴ細胞は、炎症性および増殖性サイトカインを分泌する（図７Ｄ）。ヒトＴ細胞を、ＰＳＣＡ抗原またはＰＳＭＡ抗原のいずれかを発現するＰＣ３細胞と一緒に、ＰＳＣＡまたはＰＳＭＡに特異的なＴＭの存在下または不在下にインキュベートした。２４時間の培養後に、細胞不含の上清を採取し、引き続きＴ細胞特異的サイトカインの放出について市販されているＥＬＩＳＡキットを使用して分析した。図７Ｃ、Ｄについての統計的分析は、非パラメトリック一元配置ＡＮＯＶＡ（クルスカル－ウォリスの検定）および事後のダンの多重比較検定を使用して実施した（**ｐ＜０．０１）。

【００７５】

更なる一実施形態においては、図８は、種々の起源の腫瘍細胞の表面上の様々な抗原に結合するターゲットモジュールの存在下でのＵｎｉＣＡＲ遺伝子改変されたヒトＴ細胞についての濃度－応答曲線を示している。ヒトＴ細胞を、ＣＤ２８／ＣＤ３ゼータの２つのシグナル伝達ドメインを含むＵｎｉＣＡＲをコードするレンチウイルスベクターで形質導入した。ＵｎｉＣＡＲが接合されたＴ細胞を、５：１のｅ：ｔ比で、ＰＳＣＡ抗原またはＰＳＭＡ抗原のいずれかを発現するように遺伝子操作された５１Ｃｒ負荷ＰＣ３標的細胞と一緒にインキュベートした。ＰＳＣＡに特異的なターゲットモジュール（ＴＭ）（αＰＳＣＡ　ＴＭ）またはＰＳＭＡに特異的なターゲットモジュール（ＴＭ）（αＰＳＭＡ　ＴＭ）を、濃度を高めつつ添加した（図７Ａ）。半数効果濃度（ＥＣ５０）は、両方のＴＭについて約１２ｐＭｏｌと測定された。追加の実験を、図７Ａと同様に実施したが、１：１のｅ：ｔ比を選択し、ターゲット腫瘍細胞として急性骨髄性白血病細胞系統ＭＯＬＭ－１３を使用した。ＣＤ３３抗原に特異的なＴＭ（αＣＤ３３　ＴＭ）またはＣＤ１２３抗原に特異的なＴＭ（αＣＤ１２３　ＴＭ）を、濃度を高めつつ添加し、そしてαＣＤ３３　ＴＭについては１３７ｐＭｏｌのＥＣ５０値が、そしてαＣＤ１２３　ＴＭについては４５ｐＭｏｌのＥＣ５０値が測定された。これらの実験は、ＵｎｉＣＡＲが接合されたＴ細胞が、癌療法について承認されたモノクローナル抗体薬物について実験的に測定されるＥＣ５０値の１０倍から１００倍も低い非常に低濃度のＴＭで有効であることを裏付けている（例えば、Ｈｅｒｔｅｒら　Ｍｏｌ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｔｈｅｒ　１２（１０）：２０３１－２０４２（２０１３））。

【００７６】

更なる一実施形態においては、図９は、ＵｎｉＣＡＲで操作されたＴ細胞が急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）芽細胞を効果的に殺傷しうることを裏付けている。ヒトＴ細胞を、模擬的に形質導入（ｗｔ、菱形）したか、またはＵ－ＣＡＲをコードするレンチウイルスベクターであって、ＣＤ２８／ＣＤ３ゼータの２つのシグナル伝達ドメインを含むもの（ＣＡＲ　２８／ζ、白丸と黒丸）またはシグナル伝達ドメインを全て欠いているもの（ＣＡＲ　Ｓｔｏｐ、上向きの三角形）またはＥＧＦＰマーカータンパク質だけを発現するもの（ｖｃ、下向きの三角形）で形質導入した。Ｔ細胞を、２×１０^{4}のＡｌｅｘａ　ｅＦｌｕｏｒ　６７４標識された３種のＡＭＬ細胞系統（ＭＯＬＭ－１３、ＭＶ４－１１、ＯＣＩ－ＡＭＬ３）由来の標的細胞と一緒に、０．１ｎＭｏｌのＣＤ３３特異的ターゲットモジュール（ＴＭ）（αＣＤ３３　ＴＭ、上方のパネル）またはＣＤ１２３特異的ターゲットモジュール（ＴＭ）（αＣＤ１２３　ＴＭ、下方のパネル）の存在下（＋）または不在下（－）に１：１のｅ：ｔ比で２４時間にわたりインキュベートした（図９Ａ）。ヨウ化プロピジウム（ＰＩ）陰性であるが、Ａｌｅｘａ　ｅＦｌｕｏｒ　６７４陽性の生存標的細胞の数を、フローサイトメトリーによってＭＡＣＳＱｕａｎｔ（登録商標）アナライザを使用して測定した。生存白血病標的細胞の数を、標的細胞を有するがＴ細胞を一切含まな

い対照試料に正規化した。この実験は、ＵｎｉＣＡＲが接合されたＴ細胞が、対応するＴＭと架橋した後に、ＣＤ３３についてはＭＯＬＭ－１３では高く、ＭＶ４－１，１では中程度で、ＯＣＩ－ＡＭＬ３では低いが、ＣＤ１２３については抗原密度はそれらの３つの細胞系統について逆の順序である抗原密度とは独立してＡＬＭ芽細胞を効果的に溶解することを裏付けている。更に、ＡＭＬ芽細胞は、ＵｎｉＣＡＲが接合されたＴ細胞によって、ＴＭに媒介された架橋に際して患者試料に典型的に見られる低いｅ：ｔ比でさえも排除される（図９Ｂ）。実験の構成は図９Ａと同様であったが、１：５の低いｅ：ｔ比を選択した。ＰＩ陰性の生存Ｔ細胞および標的細胞の数を、フローサイトメトリーによってＭＡＣＳＱｕａｎｔ（登録商標）アナライザを使用して指摘された時点で測定した。生存白血病標的細胞の数を、標的細胞を有するがＴ細胞を欠いた対照試料に正規化した（図９Ｂ）。ＣＡＲに媒介されるシグナル伝達を介して活性化されると、ＵｎｉＣＡＲが接合されたＴ細胞は、図９Ｃに示されるように増殖し始める。実験の構成は、図９Ｂについて記載される通りであり、Ｔ細胞数は、フローサイトメトリーによってＭＡＣＳＱｕａｎｔ（登録商標）アナライザを使用して測定した。Ｔ細胞増殖は、１４４時間後の試料中に存在するＴ細胞（ｄ６）の、実験開始時に播種された数（ｄ０）に対する比率として計算した。図８Ａおよび図８Ｂについての統計的分析は、非パラメトリック一元配置ＡＮＯＶＡ（クルスカル－ウォリスの検定）および事後のダンの多重比較検定を使用して実施した。図９Ａについては、統計的に有意な結果が示され、図９Ｂについては、図の下の表に結果が示されている（ｎｓ＝有意差無し、*ｐ＜０．０５、**ｐ＜０．０１、***ｐ＜０．００１）。

【００７７】

更なる一実施形態においては、図１０は、同時に２種の抗原に対するＵｎｉＣＡＲが接合されたＴ細胞のリダイレクションを示している。そのモジュール式の性質のため、ＵｎｉＣＡＲ技術は、ＵｎｉＣＡＲが接合された免疫細胞（例えばＴ細胞）のリダイレクションを、２つの抗原に対して同時にまたは逐次に、２つの個別のＴＭ（ＴＭ１＋ＴＭ２、図１０Ａの左側）を使用して、または二重特異的な単鎖タンデム構築物として配列された組み合わされた二重特異的なＴＭ（ＴＭ１－２、図１０Ａの右側）を使用して可能にする（図１０Ａ）。２つの抗原を標的とする二重特異的なＴＭの使用は、ＵｎｉＣＡＲが接合されたＴ細胞のＡＭＬ細胞系統に対するＣＤ３３とＣＤ１２３の組み合わせに特異的なリターゲティングに関する濃度－応答曲線によって裏付けられるように２つの単独抗原に特異的なＴＭの組み合わせを使用するよりも更に効果的でありうる（図１０Ｂ）。ヒトＴ細胞を、ＣＤ２８／ＣＤ３ゼータの２つのシグナル伝達ドメインを含むＵｎｉＣＡＲをコードするレンチウイルスベクターで形質導入した。ＵｎｉＣＡＲが接合されたＴ細胞を、１：１のｅ：ｔ比で、Ｃｒ５１標識されたＭＯＬＭ－１３（４種の異なる健康なヒトのドナーからのＴ細胞を用いた実験からの平均、三角形）およびＯＣＩ－ＡＭＬ３（２種の異なる健康なヒトのドナーからのＴ細胞を用いた実験からの平均、白丸）と一緒に２４時間にわたりインキュベートした。ＣＤ３３に特異的なターゲットモジュール（ＴＭ）（αＣＤ３３　ＴＭ）、ＣＤ１２３に特異的なターゲットモジュール（ＴＭ）（αＣＤ１２３　ＴＭ）または二重特異的なＣＤ３３－ＣＤ１２３のＴＭ（αＣＤ１２３－ＣＤ３３　ＴＭ）を、濃度を高めつつ添加した。ＥＣ５０値は、以下のように測定された：αＣＤ３３＋αＣＤ１２３　ＴＭ：ＥＣ５０　ＭＯＬＭ－１３＝７０．２ｐＭｏｌ、ＥＣ５０　ＯＣＩ－ＡＭＬ３＝８０．２　ｐＭｏｌ、αＣＤ３３－αＣＤ１２３　ＴＭ：ＥＣ５０　ＭＯＬＭ－１３＝２．９ｐＭｏｌ、ＥＣ５０　ＯＣＩ－ＡＭＬ３＝１１．７ｐＭｏｌ。次に、健康なヒトのドナーとＡＭＬ患者の両方の由来のＵｎｉＣＡＲが接合されたＴ細胞が、ＡＭＬ細胞系統に対してと同様に、急性転化における患者から単離されたＡＭＬ芽細胞に対しても効果的にリダイレクトされうることを裏付けることができた（図１０Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ）。ヒトＴ細胞を、模擬的に形質導入（図１０Ｃにおける黒丸、図１０Ｅ、Ｆにおける白いバー）したか、またはＵｎｉＣＡＲをコードするレンチウイルスベクターであって、ＣＤ２８／ＣＤ３ゼータの２つのシグナル伝達ドメインを含むもの（図１０Ｃ、Ｄにおける三角形、図１０Ｅ、Ｆにおける黒いバー）またはシグナル伝達ドメインを全て欠いているもの（図１０Ｃ、Ｄにおける菱形、Ｅ、Ｆにおけるグレーのバー）で形質導入した。ＡＭＬ細

胞の高効率の排除は、ＵｎｉＣＡＲが接合されたＴ細胞によって、αＣＤ３３　ＴＭとαＣＤ１２３　ＴＭとの組み合わせの存在下かまたは二重標的のαＣＤ１２３－ＣＤ３３　ＴＭの存在下であるが、それらのＴＭの不在下ではない場合に媒介され、それは改めて、ＵｎｉＣＡＲが接合されたＴ細胞の抗原特異的リダイレクションに関して、ＴＭを介した架橋が不可欠であることを裏付けている（図１０Ｃ、Ｄ、Ｅ）。Ｔ細胞を、２×１０^{4}のＡｌｅｘａ　ｅＦｌｕｏｒ　６７４標識された３種のＡＭＬ細胞系統（ＭＯＬＭ－１３、ＭＶ４－１１、ＯＣＩ－ＡＭＬ３）由来の標的細胞と一緒に、全体量１００ｐＭｏｌのＴＭの存在下（＋）もしくは不在下（－）に１：５のｅ：ｔ比で１４４時間にわたりインキュベートした。ＴＭは、４８時間後に一新された。ＰＩ陰性であるが、Ａｌｅｘａ　ｅＦｌｕｏｒ　６７４陽性の生存標的細胞の数を、フローサイトメトリーによってＭＡＣＳＱｕａｎｔ（登録商標）アナライザを使用して測定し、そして標的細胞を有するが一切のＴ細胞を有さない対照試料と比較した（図１０Ｃ、白丸）。Ｔ細胞増殖は、図１０Ｄにおいて、１４４時間後の試料中に存在するＴ細胞（ｄ６）の、実験開始時に播種された数（ｄ０）に対する比率として計算した。６人のドナーでの実験からの結果が示され、平均と標準偏差が示される。これらの結果は、ＴＭに媒介された架橋に際してのＵｎｉＣＡＲシグナル伝達を介した活性化が、標的細胞の殺傷を引き起こすだけでなく、更にＵｎｉＣＡＲが接合されたＴ細胞がＣＤ２８／ＣＤ３ζの組み合わさったＵｎｉＣＡＲシグナル伝達鎖による増殖刺激を受け取って、分割し始めることを説得力をもって裏付けている。次に、健康なドナーからの遺伝子改変されたＴ細胞を、５×１０^{4}のＡｌｅｘａ　ｅＦｌｕｏｒ　６７４標識されたＡＭＬ患者由来の白血病細胞と一緒に、０．５ｎＭｏｌのＴＭの存在下（＋）または不在下（－）に１：１のｅ：ｔ比でインキュベートした（図１０Ｅ）。Ａｌｅｘａ　ｅＦｌｕｏｒ　６７４陽性の生存標的細胞の数を、フローサイトメトリーによってＭＡＣＳＱｕａｎｔ（登録商標）アナライザを使用して２４時間後（左側のパネル）と４８時間後（右側のパネル）に測定した。生存白血病標的細胞の数を、標的細胞を有するがＴ細胞を一切含まない対照試料に正規化した。図９Ｅにおける５組の実験からの結果は、ＵｎｉＣＡＲ操作されたＴ細胞が患者由来のＡＭＬ芽細胞を時間に伴って溶解しうることを裏付けている。また、ＡＭＬ患者由来のＵｎｉＣＡＲ遺伝子改変されたＴ細胞が、ＡＭＬ抗原特異的ＴＭの添加によってＡＭＬ細胞を攻撃し溶解することを可能にすることも裏付けることができた。改変されたＴ細胞を、２×１０^{4}のＡｌｅｘａ　ｅＦｌｕｏｒ　６７４標識された３種のＡＭＬ細胞系統（ＭＯＬＭ－１３、ＭＶ４－１１、ＯＣＩ－ＡＭＬ３）由来の標的細胞と一緒に、全体量０．５ｎＭｏｌのＴＭの存在下（＋）もしくは不在下（－）に１：１のｅ：ｔ比で２４時間にわたりインキュベートした。ＰＩ陰性であるが、Ａｌｅｘａ　ｅＦｌｕｏｒ　６７４陽性の生存標的細胞の数を、フローサイトメトリーによってＭＡＣＳＱｕａｎｔ（登録商標）アナライザを使用して測定した。

【００７８】

更なる一実施形態においては、図１１は、二重特異性αＣＤ１２３－ＣＤ３３ターゲットモジュールのインビボ薬物動力学を示すグラフを示している。ＮＳＧ　マウス（ＮＯＤ／ＳＣＩＤ　ＩＬ２Ｒγ－／－）に、２５０μｇ／体重ｇのαＣＤ１２３－ＣＤ３３　ＴＭを静脈内（図１１Ａ中のｉ．ｖ．）または腹腔内（図１１Ｂ中のｉ．ｐ．）のいずれかで注射し、そして血清試料を指摘された時点で採取した。キャプチャーＥＬＩＳＡは、試料中のＴＭの濃度を測定するために使用した。結果は、平均および標準偏差を示している（ｎ＝３）。半減衰時間を、静注の場合に、指数的１フェーズ減衰モデル（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍソフトウェア）を使用して測定した。

【００７９】

更なる一実施形態においては、配列番号１による汎用的キメラ抗原受容体をコードする単離された核酸配列が提供される。単離された核酸配列は、配列番号２に記載のヒトＩＬ－２ｍリーダーペプチドを、配列番号３に記載のヒト化抗Ｌａ　５Ｂ９可変領域重鎖、配列番号４に記載のヒト化抗Ｌａ　５Ｂ９可変領域軽鎖、配列番号５に記載のＬａ　７Ｂ６エピトープ、配列番号６～８に記載のヒトＣＤ２８、例えば配列番号６に記載の結合モチーフが突然変異されたヒトＣＤ２８細胞外部分、配列番号７に記載のＣＤ２８膜貫通ドメ

インおよび配列番号８に記載の突然変異された内在化モチーフを含むヒトＣＤ２８細胞内部分ならびに配列番号９に記載のヒトＣＤ３ゼータ細胞内ドメインをコードしている。

【００８０】

配列番号１に記載の単離された核酸配列のタンパク質発現の産物は、配列番号２７において得ることができる。配列番号３に記載のヒト化抗Ｌａ　５Ｂ９可変領域重鎖の核酸配列は、配列番号３３によるタンパク質をコードするが、配列番号４に記載のヒト化抗Ｌａ　５Ｂ９可変領域軽鎖は、配列番号３４に記載のタンパク質をコードしている。

【００８１】

配列番号５に記載のヒトＬａ　７Ｂ６エピトープの核酸配列は、配列番号３５に記載のタンパク質ドメインをコードしている。

【００８２】

本発明の更なる一実施形態においては、前立腺特異抗体ＰＳＣＡのための結合部位を有するターゲットモジュールをコードしている単離された核酸配列は、配列番号１０で提供される。単離された核酸配列は、配列番号１１に記載のリーダーペプチドＩｇＧカッパ、配列番号１２に記載の抗ＰＳＣＡ　ｓｃＦｖのヒト化軽鎖、配列番号１３に記載の抗ＰＳＣＡ　ｓｃＦｖのヒト化重鎖、配列番号１４に記載のＬａ　５Ｂ９エピトープ、配列番号１５に記載のｍｙｃタグおよび配列番号１６に記載のｈｉｓタグをコードしている。

【００８３】

配列番号１０に記載の核酸のタンパク質発現の産物は、配列番号２８から得ることができる。配列番号１２に記載の抗ＰＳＣＡ　ｓｃＦｖのヒト化軽鎖の核酸配列は、配列番号３６に記載のタンパク質ドメインをコードしているが、配列番号１３に記載の抗ＰＳＣＡ　ｓｃＦｖのヒト化重鎖は、配列番号３７に記載のタンパク質ドメインをコードしている。配列番号１４に記載のＬａ　５Ｂ９エピトープは、配列番号４４に記載のタンパク質をコードしている。

【００８４】

本発明の更なる一実施形態においては、前立腺特異抗体ＰＳＭＡのための結合部位を有するターゲットモジュールをコードしている単離された核酸配列は、配列番号１７で提供される。単離された核酸配列は、配列番号１１に記載のリーダーペプチドＩｇＧカッパ、配列番号１８に記載の抗ＰＳＭＡ　ｓｃＦｖのヒト化重鎖、配列番号１９に記載の抗ＰＳＭＡ　ｓｃＦｖのヒト化軽鎖、配列番号１４に記載のＬａ　５Ｂ９エピトープ、配列番号１５に記載のｍｙｃタグおよび配列番号１６に記載のｈｉｓタグをコードしている。

【００８５】

配列番号１７に記載の核酸のタンパク質発現の産物は、配列番号２９から得ることができる。配列番号１８に記載の抗ＰＳＭＡ　ｓｃＦｖのヒト化重鎖の核酸配列は、配列番号３８に記載のタンパク質ドメインをコードしているが、配列番号１９に記載の抗ＰＳＭＡ　ｓｃＦｖのヒト化軽鎖は、配列番号３９に記載のタンパク質ドメインをコードしている。配列番号１４に記載のＬａ　５Ｂ９エピトープは、配列番号４４に記載のタンパク質をコードしている。

【００８６】

本発明の更なる一実施形態においては、抗ＣＤ３３抗原のための結合部位を有するターゲットモジュールをコードする単離された核酸配列は、配列番号２０で提供される。単離された核酸配列は、配列番号１１に記載のリーダーペプチドＩｇＧカッパ、配列番号２１に記載の抗ＣＤ３３　ｓｃＦｖのヒト化軽鎖、配列番号２２に記載の抗ＣＤ３３　ｓｃＦｖのヒト化重鎖、配列番号１４に記載のＬａ　５Ｂ９エピトープ、配列番号１５に記載のｍｙｃタグおよび配列番号１６に記載のｈｉｓタグをコードしている。

【００８７】

配列番号２０に記載の核酸のタンパク質発現の産物は、配列番号３０から得ることができる。配列番号２１に記載の抗ＣＤ３３　ｓｃＦｖのヒト化軽鎖の核酸配列は、配列番号４０に記載のタンパク質ドメインをコードしているが、配列番号２２に記載の抗ＣＤ３３　ｓｃＦｖのヒト化重鎖は、配列番号４１に記載のタンパク質ドメインをコードしている

。配列番号１４に記載のＬａ　５Ｂ９エピトープは、配列番号４４に記載のタンパク質をコードしている。

【００８８】

本発明の更なる一実施形態においては、抗ＣＤ１２３抗原のための結合部位を有するターゲットモジュールをコードする単離された核酸配列は、配列番号２３で提供される。単離された核酸配列は、配列番号１１に記載のリーダーペプチドＩｇＧカッパ、配列番号２４に記載の抗ＣＤ１２３　ｓｃＦｖのヒト化重鎖、配列番号２５に記載の抗ＣＤ１２３　ｓｃＦｖのヒト化軽鎖、配列番号１４に記載のＬａ　５Ｂ９エピトープ、配列番号１５に記載のｍｙｃタグおよび配列番号１６に記載のｈｉｓタグをコードしている。

【００８９】

配列番号２３に記載の核酸のタンパク質発現の産物は、配列番号３１から得ることができる。配列番号２４に記載の抗ＣＤ１２３　ｓｃＦｖのヒト化重鎖の核酸配列は、配列番号４２に記載のタンパク質ドメインをコードしているが、配列番号２５に記載の抗ＣＤ１２３　ｓｃＦｖのヒト化軽鎖は、配列番号４３に記載のタンパク質ドメインをコードしている。配列番号１４に記載のＬａ　５Ｂ９エピトープは、配列番号４４に記載のタンパク質をコードしている。

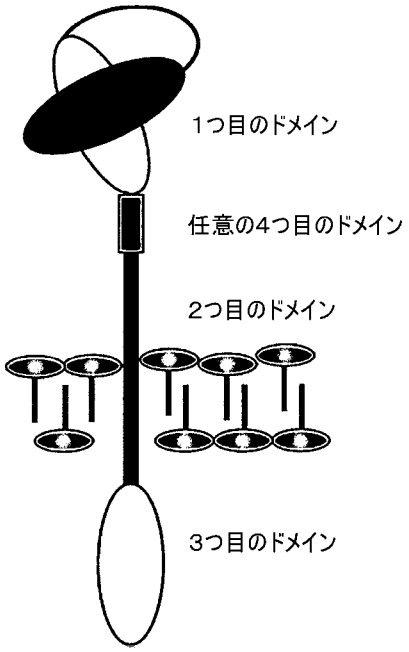
【００９０】

本発明の更なる一実施形態においては、抗ＣＤ１２３－抗ＣＤ３３抗原のための結合部位を有するターゲットモジュールをコードする単離された核酸配列は、配列番号２６で提供される。単離された核酸配列は、配列番号１１に記載のリーダーペプチドＩｇＧカッパ、配列番号２４に記載の抗ＣＤ１２３　ｓｃＦｖのヒト化重鎖、配列番号２５に記載の抗ＣＤ１２３　ｓｃＦｖのヒト化軽鎖、配列番号１４に記載のＬａ　５Ｂ９エピトープ、配列番号２２に記載の抗ＣＤ３３　ｓｃＦｖのヒト化重鎖、配列番号２１に記載の抗ＣＤ３３　ｓｃＦｖのヒト化軽鎖、配列番号１５に記載のｍｙｃタグおよび配列番号１６に記載のｈｉｓタグをコードしている。

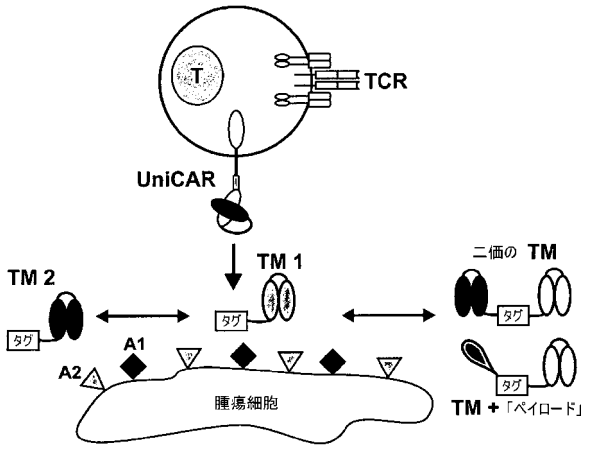
【００９１】

配列番号２６に記載の核酸のタンパク質発現の産物は、配列番号３２から得ることができる。配列番号２４に記載の抗ＣＤ１２３　ｓｃＦｖのヒト化重鎖の核酸配列は、配列番号４２に記載のタンパク質ドメインをコードしているが、配列番号２５に記載の抗ＣＤ１２３　ｓｃＦｖのヒト化軽鎖は、配列番号４３に記載のタンパク質ドメインをコードしている。配列番号１４に記載のＬａ　５Ｂ９エピトープは、配列番号４４に記載のタンパク質をコードしている。配列番号２２に記載の抗ＣＤ３３　ｓｃＦｖのヒト化重鎖の核酸配列は、配列番号４１に記載のタンパク質ドメインをコードしているが、配列番号２１に記載の抗ＣＤ３３　ｓｃＦｖのヒト化軽鎖は、配列番号４０に記載のタンパク質ドメインをコードしている。

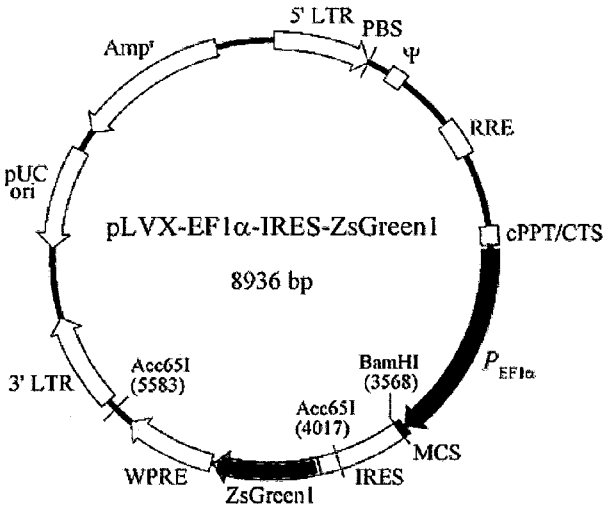
【図１】


1つ目のドメイン
任意の4つ目のドメイン
2つ目のドメイン
3つ目のドメイン

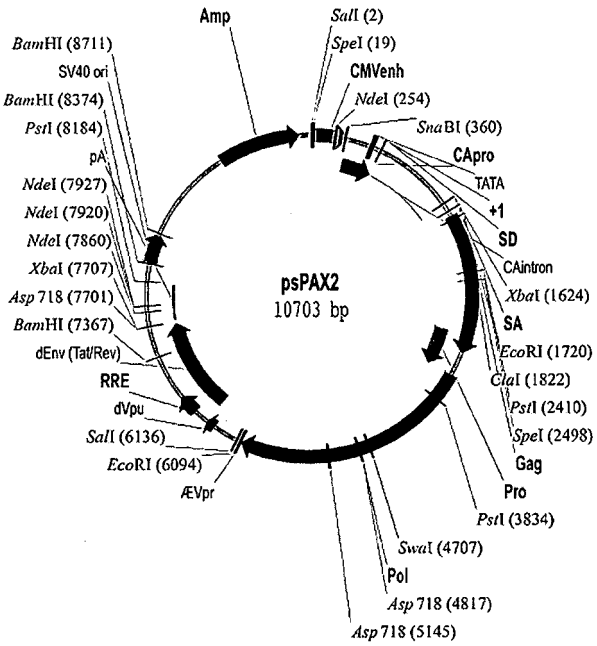
【図２】


T
TCR
UniCAR
TM 1
TM 2
二価の TM
タグ
A1
A2
腫瘍細胞
TM + 「ペイロード」

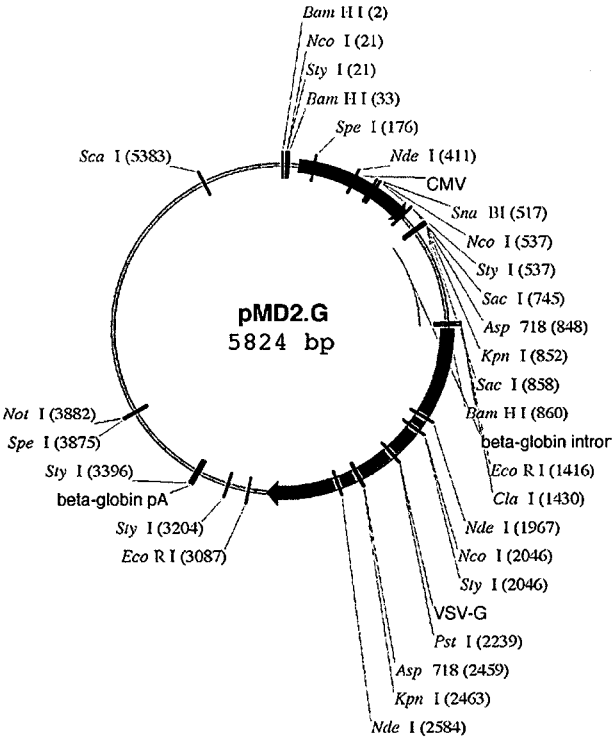
【図３】


5' LTR
PBS
Ψ
RRE
cPPT/CTS
pLVX-EF1α-IRES-ZsGreen1
8936 bp
BamHI (3568)
Acc65I (4017)
Acc65I (5583)
3' LTR
WPRE
ZsGreen1
IRES
MCS
pUC ori
Amp'

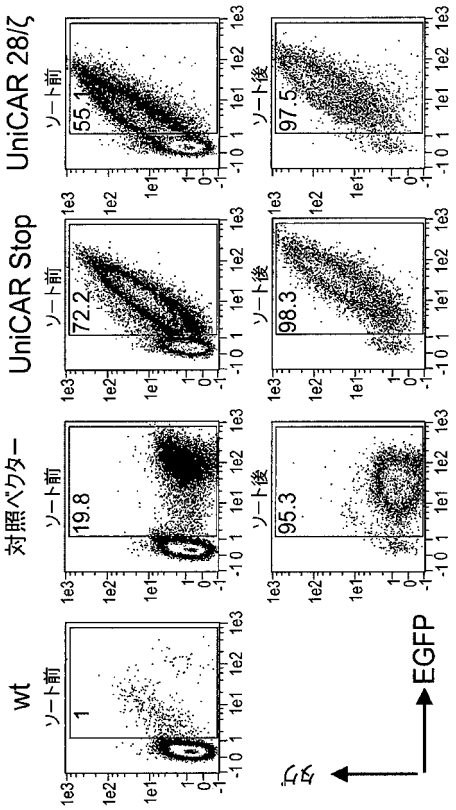
【図４】


Amp
SalI (2)
SpeI (19)
CMVenh
NdeI (254)
SnaBI (360)
CApro
TATA
+1
SD
CAintron
XbaI (1624)
SA
EcoRI (1720)
ClaI (1822)
PstI (2410)
SpeI (2498)
Gag
Pro
PstI (3834)
SwaI (4707)
Pol
Asp718 (4817)
Asp718 (5145)
psPAX2
10703 bp
BamHI (8711)
SV40 ori
BamHI (8374)
PstI (8184)
pA
NdeI (7927)
NdeI (7920)
NdeI (7860)
XbaI (7707)
Asp718 (7701)
BamHI (7367)
dEnv (Tat/Rev)
RRE
dVpu
SalI (6136)
EcoRI (6094)
ÆVpr

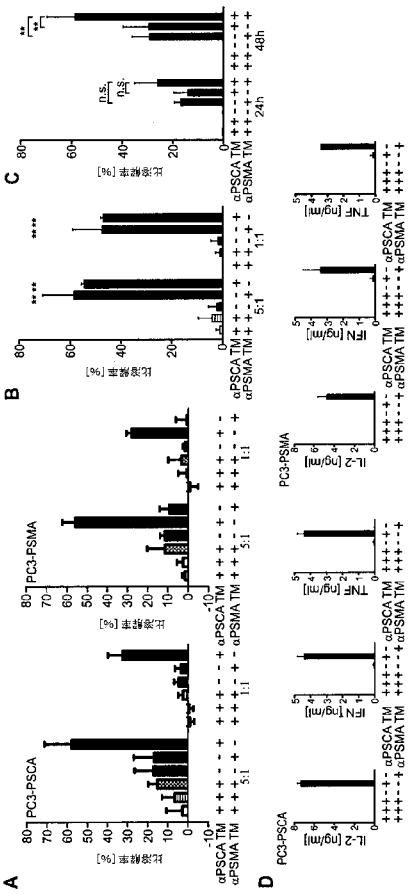
【図５】


pMD2.G
5824 bp
Bam H I (2)
Nco I (21)
Sty I (21)
Bam H I (33)
Spe I (176)
Nde I (411)
CMV
Sna BI (517)
Nco I (537)
Sty I (537)
Sac I (745)
Asp 718 (848)
Kpn I (852)
Sac I (858)
Bam H I (860)
beta-globin intror
Eco R I (1416)
Cla I (1430)
Nde I (1967)
Nco I (2046)
Sty I (2046)
VSV-G
Pst I (2239)
Asp 718 (2459)
Kpn I (2463)
Nde I (2584)
Sca I (5383)
Not I (3882)
Spe I (3875)
Sty I (3396)
beta-globin pA
Sty I (3204)
Eco R I (3087)

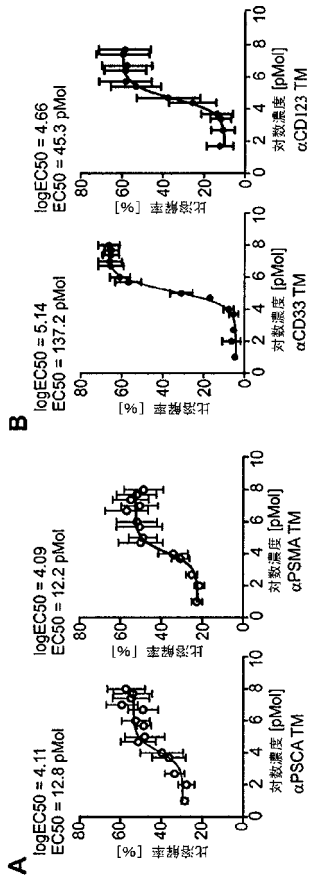
【図６】


UniCAR 28/ζ
UniCAR Stop
対照ベクター
wt
ソート前
ソート後
1
19.8
72.2
55.1
95.3
98.3
97.5
EGFP
対数

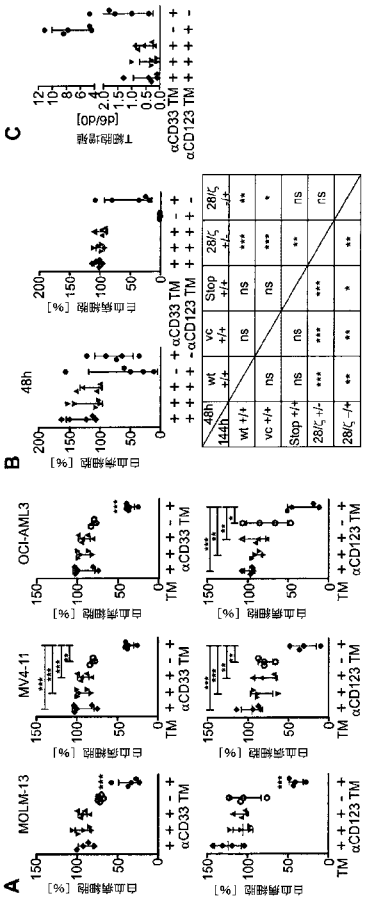
【図７】


A
B
C
D
PC3-PSCA
PC3-PSMA
比溶解率 [%]
IFN [ng/ml]
TNF [ng/ml]
IL-2 [ng/ml]
αPSCA TM
αPSMA TM
24h
48h
n.s.
1:1
5:1

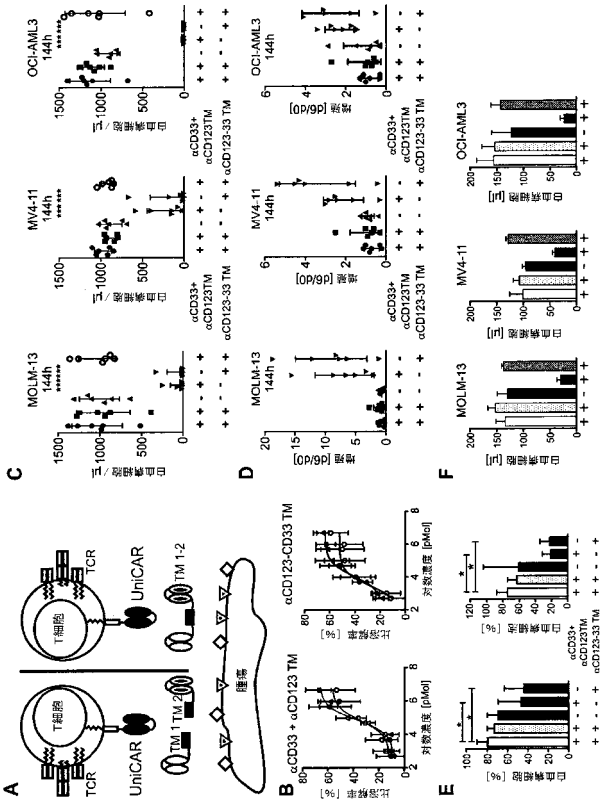
【図８】


A
B
logEC50 = 4.11
EC50 = 12.8 pMol
logEC50 = 4.09
EC50 = 12.2 pMol
logEC50 = 5.14
EC50 = 137.2 pMol
logEC50 = 4.66
EC50 = 45.3 pMol
比溶解率 [%]
対数濃度 [pMol]
αPSCA TM
αPSMA TM
αCD33 TM
αCD123 TM

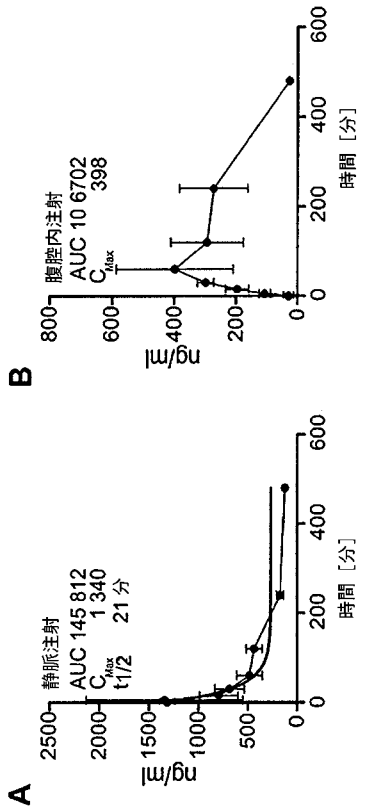
【図９】



【図１０】



【図１１】



【配列表】
2017530724000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/069527

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/725
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/044225 A1 (UNIV PENNSYLVANIA [US]; SCHOLLER NATHALIE [US]; URBANSKA KATARZYNA [US]) 28 March 2013 (2013-03-28) cited in the application abstract page 3, line 3 - line 26 page 4, line 1 - line 21 -----	1-18
X	WO 2013/074916 A1 (UNIV TEXAS [US]) 23 May 2013 (2013-05-23) abstract page 15, paragraph 75 page 19, paragraphs 88,89 -----	1-18
	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
23 September 2015	12/10/2015

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Grötzinger, Thilo

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/069527

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/126712 A1 (UNIV PENNSYLVANIA [US]) 29 August 2013 (2013-08-29) abstract page 25, line 1 - line 29 page 26, line 33 - page 27, line 10 -----	1-18
X	WO 2012/082841 A2 (UNIV MARYLAND [US]; DAVILA EDUARDO [US]; TAMADA KOJI [US]) 21 June 2012 (2012-06-21) cited in the application abstract page 3, paragraph 11 page 13, paragraph 48 -----	1-18
A	PARK JAE H ET AL: "Adoptive immunotherapy for B-cell malignancies with autologous chimeric antigen receptor modified tumor targeted T cells", DISCOVERY MEDICINE, US , vol. 9, no. 47 30 March 2010 (2010-03-30), pages 277-288, XP002690051, ISSN: 1944-7930 Retrieved from the Internet: URL:http://www.discoverymedicine.com/Jae-H-Park/2010/03/30/adoptive-immunotherapy-for-b-cell-malignancies-with-autologous-chimeric-antigen-receptor-modified-tumor-targeted-t-cells/ [retrieved on 2013-01-10] the whole document -----	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2015/069527

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013044225 A1	28-03-2013	US 2014234348 A1	21-08-2014
		WO 2013044225 A1	28-03-2013
WO 2013074916 A1	23-05-2013	US 2014349402 A1	27-11-2014
		WO 2013074916 A1	23-05-2013
WO 2013126712 A1	29-08-2013	AU 2013222267 A1	31-07-2014
		CA 2863799 A1	29-08-2013
		CN 104159909 A	19-11-2014
		EA 201491572 A1	30-12-2014
		EP 2817318 A1	31-12-2014
		JP 2015513399 A	14-05-2015
		KR 20140127816 A	04-11-2014
		US 2015024482 A1	22-01-2015
		WO 2013126712 A1	29-08-2013
WO 2012082841 A2	21-06-2012	AU 2011343887 A1	04-07-2013
		CA 2821080 A1	21-06-2012
		EP 2651442 A2	23-10-2013
		JP 2014504294 A	20-02-2014
		US 2013287752 A1	31-10-2013
		WO 2012082841 A2	21-06-2012

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ　31/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/00	
Ａ６１Ｐ　37/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/06	
Ａ６１Ｋ　35/17	*(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/17	Ｚ
Ａ６１Ｋ　38/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/02	

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

(74)代理人　100116403
弁理士　前川　純一
(74)代理人　100135633
弁理士　二宮　浩康
(74)代理人　100162880
弁理士　上島　類
(72)発明者　ミヒャエル　バッハマン
ドイツ連邦共和国　ケルクハイム　ディンゲスヴェーク　４
(72)発明者　アーミン　エーニンガー
ドイツ連邦共和国　ドレスデン　プラットライテ　９

Ｆターム(参考)　4B065 AA93Y AA94X AB01 BA02 CA24 CA44
4C084 AA02 BA03 BA44 CA53 NA05 NA06 ZB082 ZB262 ZB322
4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 CA04 DA31 ZB08 ZB26 ZB32
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA50 EA22 EA28 FA74