

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7184645号

(P7184645)

(45)発行日 令和4年12月6日(2022.12.6)

(24)登録日 令和4年11月28日(2022.11.28)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62

Z

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 0 7 K 19/00

Z N A

C 0 7 K 14/725 (2006.01)

C 0 7 K 14/725

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/12

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

請求項の数 34 (全92頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-528669(P2018-528669)

(86)(22)出願日 平成28年12月2日(2016.12.2)

(65)公表番号 特表2019-501647(P2019-501647  
A)

(43)公表日 平成31年1月24日(2019.1.24)

(86)国際出願番号 PCT/US2016/064861

(87)国際公開番号 WO2017/096329

(87)国際公開日 平成29年6月8日(2017.6.8)

審査請求日 令和1年11月29日(2019.11.29)

(31)優先権主張番号 62/348,130

(32)優先日 平成28年6月9日(2016.6.9)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/262,911

(32)優先日 平成27年12月3日(2015.12.3)

最終頁に続く

(73)特許権者 516316897

ジュノー セラピューティクス インコー  
ポレイテッドアメリカ合衆国 9 8 1 0 9 ワシントン  
州 シアトル デクスター アベニュー ノ  
ース 4 0 0 スイート 1 2 0 0

(74)代理人 100102978

弁理士 清水 初志

(74)代理人 100102118

弁理士 春名 雅夫

(74)代理人 100160923

弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 修飾キメラ受容体ならびに関連する組成物および方法

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

参照キメラ受容体のジャンクション領域と比較して1つまたは複数のアミノ酸配列修飾を有する修飾されたジャンクション領域を含むバリエーションキメラ受容体であって、

該参照キメラ受容体は、ジャンクションにおいて連続した順序で接合されたCD28膜貫通ドメインおよび4-1BBシグナル伝達ドメインを含み、該参照キメラ受容体の該ジャンクション領域は、該ジャンクションのすぐC末側の最大15連続アミノ酸および該ジャンクションのすぐN末側の最大15連続アミノ酸を含み、かつ、

(i)前記1つまたは複数のアミノ酸配列修飾が、SEQ ID NO:5に示すナンバリングでアミノ酸残基27およびアミノ酸残基28に対応するドメイン間のジャンクションに隣接するアミノ酸残基の間に2個のアスパラギン(N)の挿入を含むか、または、

(ii)前記1つまたは複数のアミノ酸配列修飾が、アミノ酸の置換を含み、該アミノ酸の置換が、SEQ ID NO:5に示すナンバリングで、K28A、K28H、K28S、R31A、R31H、R31N、R31S、L34AおよびL34Sのなかから選択される置換に対応するか、または該置換であり、かつ、

該バリエーションキメラ受容体が、ヒト対象に投与したときに、参照キメラ受容体と比較して低減した免疫原性を呈し、該参照キメラ受容体が、CD28膜貫通ドメインおよび4-1BBシグナル伝達ドメインを含み、かつ、SEQ ID NO:5に示すアミノ酸配列を含む、バリエーションキメラ受容体。

## 【請求項2】

10

20

CD28膜貫通ドメインが、SEQ ID NO:2、103または104に示すアミノ酸の配列を含むか、あるいはSEQ ID NO:2、103または104に対して少なくとも95%の配列同一性を呈する配列を含むその機能的部分またはバリエーションを含む、

4-1BB共刺激シグナル伝達ドメインが、SEQ ID NO:3に示すアミノ酸の配列を含むか、あるいはSEQ ID NO:3に対して少なくとも95%の配列同一性を呈する配列を含むその機能的部分またはバリエーションを含む、

請求項1記載のバリエーションキメラ受容体。

【請求項3】

前記1つまたは複数のアミノ酸配列修飾が、SEQ ID NO:5に示すナンバリングでアミノ酸残基27およびアミノ酸残基28に対応するドメイン間のジャンクションに隣接するアミノ酸残基の間に2個のアスパラギン(N)の挿入を含む、請求項1または2記載のバリエーションキメラ受容体。

10

【請求項4】

アミノ酸の置換が、SEQ ID NO:5に示すナンバリングで、K28A、K28H、K28S、R31A、R31H、R31N、R31S、L34AおよびL34Sのなかから選択される置換に対応するか、または該置換である、請求項1または2記載のバリエーションキメラ受容体。

【請求項5】

アミノ酸の置換が、SEQ ID NO:5に示すナンバリングで、R31H、R31N、R31S、L34AおよびL34Sのなかから選択される置換に対応するか、または該置換である、請求項4記載のバリエーションキメラ受容体。

20

【請求項6】

アミノ酸の置換が、K28Q/R31A、K28Q/R31N、K28Q/R31S、K28Q/L34A、K28Q/L34S、R31N/L34A、R31N/L34S、K28Q/R31N/L34A、K28Q/R31N/L34Sのなかから選択されるアミノ酸の置換であるか、または該置換に対応する、請求項1~2および4~5のいずれか一項記載のバリエーションキメラ受容体。

【請求項7】

(i) SEQ ID NO:138 ~ 140、142 ~ 144、146 ~ 157および184のいずれかに示すアミノ酸の配列、または

(ii) SEQ ID NO:138 ~ 140、142 ~ 144、146 ~ 157および184のいずれかに示すアミノ酸の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を呈しかつ前記修飾を含むアミノ酸の配列を含む、その機能的バリエーション

30

のなかから選択される修飾されたジャンクション領域を含む、請求項1~6のいずれか一項記載のバリエーションキメラ受容体。

【請求項8】

(i) SEQ ID NO:114 ~ 115、118 ~ 120、122 ~ 134および183のいずれかに示すアミノ酸の配列、または

(ii) SEQ ID NO:114 ~ 115、118 ~ 120、122 ~ 134および183のいずれかに示すアミノ酸の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を呈しかつ前記修飾を含むアミノ酸の配列を含む、その機能的バリエーション

を含む、請求項1~7のいずれか一項記載のバリエーションキメラ受容体。

40

【請求項9】

前記低減した免疫原性が、低減したCD4+ T細胞免疫応答を含む、請求項1~8のいずれか一項記載のバリエーションキメラ受容体。

【請求項10】

前記低減した免疫原性が、低減したCD8+ T細胞免疫応答を含む、請求項1~9のいずれか一項記載のバリエーションキメラ受容体。

【請求項11】

参照キメラ受容体が細胞外リガンド結合ドメインをさらに含む、請求項1~10のいずれか一項記載のバリエーションキメラ受容体。

【請求項12】

50

キメラ抗原受容体（CAR）であり、リガンド結合ドメインが抗原結合ドメインである、請求項11記載のバリエーションキメラ受容体。

【請求項13】

抗原結合ドメインがscFvを含む、請求項12記載のバリエーションキメラ受容体。

【請求項14】

リガンド結合ドメインが、疾患または障害に関連する抗原に特異的に結合する、請求項11～13のいずれか一項記載のバリエーションキメラ受容体。

【請求項15】

疾患または障害が感染症または感染状態、自己免疫疾患、炎症性疾患、または腫瘍もしくはがんであり、

リガンド結合ドメインが、腫瘍抗原に特異的に結合し、かつ/または

リガンド結合ドメインが、ROR1、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、メソテリン、CEA、B型肝炎表面抗原、抗葉酸受容体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、ErbB3、ErbB4、FBP、胎児アセチルコリン受容体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R-アルファ、IL-13R-アルファ2、kdr、カッパ軽鎖、ルイスY、L1細胞接着分子、MAGE-A1、メソテリン、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、MART-1、gp100、腫瘍胎児性抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胎児性抗原（CEA）、前立腺特異抗原、PSMA、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、エフリンB2、CD123、CS-1、c-Met、GD-2、MAGE A3、CE7、ウィルムス腫瘍1（WT-1）およびサイクリンA1（CCNA1）からなる群より選択される抗原に特異的に結合する、

請求項14記載のバリエーションキメラ受容体。

【請求項16】

バリエーションキメラ受容体が活性化細胞質ドメインをさらに含む、請求項1～15のいずれか一項記載のバリエーションキメラ受容体。

【請求項17】

活性化細胞質ドメインがT細胞受容体（TCR）成分を含み、かつ/または免疫受容体チロシン活性化モチーフ（ITAM）を含む、請求項16記載のバリエーションキメラ受容体。

【請求項18】

活性化細胞質シグナル伝達ドメインが、CD3-ゼータ（CD3）鎖のゼータ鎖の細胞質シグナル伝達ドメインであるか、またはそれを含む、請求項16または17記載のバリエーションキメラ受容体。

【請求項19】

バリエーションキメラ受容体が、そのN末からC末に向かって順に、細胞外リガンド結合ドメイン、CD28膜貫通ドメイン、4-1BB細胞内共刺激ドメインおよび活性化細胞質シグナル伝達ドメインを含む、請求項1～18のいずれか一項記載のバリエーションキメラ受容体。

【請求項20】

請求項1～19のいずれか一項記載のバリエーションキメラ受容体をコードする核酸分子。

【請求項21】

請求項20記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項22】

前記ベクターが、ウイルスベクターである、請求項21記載のベクター。

【請求項23】

前記ベクターが、レトロウイルスベクターである、請求項21または22記載のベクター。

【請求項24】

前記ベクターが、レンチウイルスベクターまたはガンマレトロウイルスベクターである、請求項23記載のベクター。

【請求項25】

請求項20記載の核酸もしくは請求項21～24のいずれか一項記載のベクターを含む、または請求項1～19のいずれか一項記載のキメラ受容体を発現する、操作された細胞。

10

20

30

40

50

## 【請求項 26】

T細胞である、請求項25記載の操作された細胞。

## 【請求項 27】

CD4+ T細胞および / またはCD8+ T細胞である、請求項25または26記載の操作された細胞。

## 【請求項 28】

請求項25～27のいずれか一項記載の操作された細胞と薬学的に許容される緩衝液とを含む組成物。

## 【請求項 29】

対象における疾患または状態を処置するのに使用するための、請求項25～27のいずれか一項記載の細胞または請求項28記載の組成物を含む組成物。

10

## 【請求項 30】

キメラ受容体が前記疾患または状態と関連するリガンドまたは抗原に特異的に結合する、請求項29記載の組成物。

## 【請求項 31】

疾患または状態が、がん、腫瘍、自己免疫疾患もしくは自己免疫障害、または感染症である、請求項29または30記載の組成物。

## 【請求項 32】

対象における疾患または状態を処置するための医薬を製造するための、請求項25～27のいずれか一項記載の細胞または請求項28記載の組成物を含む組成物の使用。

20

## 【請求項 33】

キメラ受容体が前記疾患または状態と関連するリガンドまたは抗原に特異的に結合する、請求項32記載の使用。

## 【請求項 34】

疾患または状態が、がん、腫瘍、自己免疫疾患もしくは自己免疫障害、または感染症である、請求項32または33記載の使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

関連出願の相互参照

30

本願は、2016年6月9日に出願された「Modified Chimeric Receptors and Related Compositions and Methods」という名称の米国仮出願第62/348,130号および2015年12月3日に出願された「Modified Chimeric Receptors and Related Compositions and Methods」という名称の米国仮出願第62/262,911号に基づく優先権を主張し、前記米国仮出願のそれぞれの内容はその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

## 【0002】

配列表の参照による組み入れ

本願は、電子形式の配列表とともに出願されている。この配列表は、2016年11月30日に作成されたサイズ71,888バイトの735042004740SeqList.txtという名称のファイルとして提供される。この配列表の電子形式での情報は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

40

## 【0003】

分野

本開示は、いくつかの局面において、T細胞を含む養子療法用の細胞を操作するためのキメラ受容体、および遺伝子操作細胞に関する。いくつかの態様において、キメラ抗原受容体 (CAR) などのキメラ受容体は、ジャンクション領域において、そのような領域のペプチド断片が、ヒト白血球抗原 (HLA) に対して、より低い結合親和性を呈するように、かつ/または前記領域が、対象への投与後を含めて、低減した免疫原性を呈するように、1つまたは複数のアミノ酸修飾によって修飾されている。いくつかの局面において、本開示はさらに、そのようなキメラ受容体を発現する細胞を操作し生産するための方法および組

50

成物、それらの細胞を含有する組成物、およびそれらを対象に投与するための方法に関する。いくつかの態様において、キメラ受容体の特徴およびキメラ受容体を含有する操作された細胞の特徴は、増加したまたは改良された活性、効力および/または持続性を与える方法をもたらす。

#### 【背景技術】

#### 【0004】

#### 背景

キメラ抗原受容体 (CAR) などの組換え受容体を発現する操作された細胞を使った養子細胞療法には、さまざまな方法を利用することができる。そのような方法は、投与された細胞の、増強された増大および/または持続、細胞上に発現された受容体に対する免疫応答または他の望まれない帰結の低減から、恩恵を受けうる。そのような必要を満たす産物、組成物、方法および製造品が提供される。

10

#### 【発明の概要】

#### 【0005】

#### 概要

参照キメラ受容体と比較してジャンクション領域における1つまたは複数のアミノ酸配列修飾によって修飾されているバリエーションキメラ受容体が、ここに提供される。ここで、ジャンクション領域とは、2つのドメイン間のジャンクションの両側にある連続したアミノ酸の配列を含有する領域、すなわち2つのドメインにまたがる領域である。いくつかの態様では、参照キメラ受容体のジャンクション領域と比較して1つまたは複数のアミノ酸配列修飾を有する修飾されたジャンクション領域を含むバリエーションキメラ受容体が、ここに提供され、ここでは、参照キメラ受容体は、ジャンクションにおいて連続した順序で接合された第1ドメインおよび第2ドメインを含み、参照キメラ受容体のジャンクション領域は、ジャンクションのすぐC末側の最大15連続アミノ酸と、ジャンクションのすぐN末側の最大15連続アミノ酸とを含み、修飾されたジャンクション領域の8~15アミノ酸部分の配列を有するペプチド断片は、ヒト白血球抗原 (HLA) 分子に対して、参照キメラ受容体のジャンクション領域の対応する部分の配列を有するペプチド断片の同じHLA分子に対する結合親和性よりも低い、結合親和性を有する。いくつかの態様において、参照キメラ受容体のジャンクション領域の対応する部分のペプチド断片は、1000nM未満、500nM未満、または50nM未満の結合親和性を有する。

20

30

#### 【0006】

いくつかの態様では、参照キメラ受容体のジャンクション領域と比較して1つまたは複数のアミノ酸配列修飾を有する修飾されたジャンクション領域を含むバリエーションキメラ受容体が、ここに提供され、ここでは、参照キメラ受容体は、ジャンクションにおいて連続した順序で接合された第1ドメインおよび第2ドメインを含み、参照キメラ受容体のジャンクション領域は、ジャンクションのすぐC末側の最大15連続アミノ酸と、ジャンクションのすぐN末側の最大15連続アミノ酸とを含み、修飾されたジャンクション領域内の全ての8~15アミノ酸断片の、または全ての8、9、10、11、12、13、14、もしくは15アミノ酸断片の、ヒトHLA分子に対する結合親和性の平均は、参照キメラ受容体のジャンクション領域内の全ての8~15アミノ酸断片の、または全ての8、9、10、11、12、13、14、もしくは15アミノ酸断片の結合親和性の平均よりも低い。

40

#### 【0007】

いくつかの態様において、結合親和性または結合親和性の平均は、2分の1未満、5分の1未満、10分の1未満、25分の1未満、50分の1未満、100分の1未満である。

#### 【0008】

いくつかの態様では、参照キメラ受容体のジャンクション領域と比較して1つまたは複数のアミノ酸配列修飾を有する修飾されたジャンクション領域を含むバリエーションキメラ受容体が、ここに提供され、ここでは、参照キメラ受容体は、ジャンクションにおいて連続した順序で接合された第2ドメインに直接連結された第1ドメインを含み、参照キメラ受容体のジャンクション領域は、ジャンクションのすぐC末側の最大15連続アミノ酸と、ジャ

50

ンクシヨンのすぐN末側の最大15連続アミノ酸とを含み、ヒト白血球抗原（HLA）に対して1000nM未満の結合親和性を有する修飾されたジャンクシヨン領域の8～15アミノ酸部分の配列を有するペプチド断片の数は、同じHLAへの結合に関して同じ親和性を有する参照キメラ受容体のジャンクシヨン領域の8～15アミノ酸部分の配列を有するペプチド断片の数と比較して低減している。

【0009】

いくつかの態様では、HLAに対して500nM未満または50nM未満の結合親和性を呈する修飾されたジャンクシヨン領域内のペプチド断片の数が低減しているか、あるいは前記1000nM未満の結合親和性が、500nM未満または50nm未満の結合親和性である。いくつかの態様では、結合親和性がIC50であり、修飾されたジャンクシヨン領域のペプチド断片と参照キメラ受容体のジャンクシヨン領域のペプチド断片の結合の比較は、同じ標準ペプチドを基準とするものである。

10

【0010】

いくつかの態様において、参照キメラ受容体の第1ドメインおよび/または第2ドメインは天然ヒトタンパク質のドメインを含み、かつ/または第1ドメインおよび/もしくは第2ドメインは、細胞外結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、または細胞内シグナル伝達ドメインを含み、前記細胞内シグナル伝達ドメインは、任意で、共刺激シグナル伝達ドメインまたは活性化細胞質シグナル伝達ドメインである。いくつかの態様において、参照キメラ受容体の第1ドメインおよび第2ドメインは、ヒト対象においてインビボで同じ分子中には存在しない。

20

【0011】

いくつかの態様において、参照キメラ受容体の第1ドメインおよび第2ドメインは、それぞれ、細胞外リガンド結合ドメインおよびヒンジドメイン、ヒンジドメインおよび膜貫通ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン、ならびに細胞内共刺激シグナル伝達ドメインおよび活性化細胞質シグナル伝達ドメインであり、これらは係るドメインの機能的部分を含むことができる。いくつかの態様において、第1ドメインは膜貫通ドメインまたはその機能的部分であり、第2ドメインは共刺激シグナル伝達ドメインまたはその機能的部分である。

【0012】

いくつかの態様において、膜貫通ドメインはCD28膜貫通ドメインまたはその機能的部分もしくはバリエーションであり、共刺激シグナル伝達ドメインは4-1BBシグナル伝達ドメインまたはその機能的部分もしくはバリエーションである。

30

【0013】

いくつかの態様において、参照キメラ受容体のジャンクシヨン領域は、ジャンクシヨンのすぐC末側の最大13連続アミノ酸および/またはジャンクシヨンのすぐN末側の最大15連続アミノ酸を含む。いくつかの態様において、ペプチド断片は、8～15アミノ酸長または約8～約15アミノ酸長のアミノ酸の配列を含むか、あるいは、少なくとも8、9、10、11、12、13、14または15アミノ酸長であるか、少なくとも約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14または約15アミノ酸長であるか、8、9、10、11、12、13、14または15アミノ酸長であるか、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14または約15アミノ酸長である、アミノ酸の配列を含む。

40

【0014】

いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、第1ドメインに対して少なくとも95%の配列同一性を持つドメインおよび/または第2ドメインに対して少なくとも95%の配列同一性を持つドメイン、第1ドメインと配列が同一であるドメインおよび第2ドメインに対して少なくとも95%の配列同一性を持つドメイン、または第1ドメインに対して少なくとも95%の配列同一性を持つドメインおよび第2ドメインと配列が同一であるドメインを含み、バリエーションキメラ受容体中に存在するドメインの少なくとも一方または両方は、参照キメラ受容体の第1ドメインおよび/または第2ドメインと比較して、修飾されたジャンクシヨン領域を含む部分において修飾されている。

50

## 【0015】

いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、参照キメラ受容体に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を含み、かつ/またはバリエーションキメラ受容体は、参照キメラ受容体と比較して、最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個のアミノ酸修飾を含む。

## 【0016】

いくつかの態様において、CD28膜貫通ドメインは、SEQ ID NO:2、103または104に示すアミノ酸の配列を含むか、あるいはSEQ ID NO:2、103または104に対して少なくとも95%の配列同一性を呈する配列を含むその機能的部分またはバリエーションを含み、4-1BB共刺激シグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO:3に示すアミノ酸の配列を含むか、あるいはSEQ ID NO:3に対して少なくとも95%の配列同一性を呈する配列を含むその機能的部分またはバリエーションを含む。

## 【0017】

いくつかの態様において、第1ドメインおよび第2ドメインは全体として、SEQ ID NO:5に示すアミノ酸の配列を含むか、あるいはSEQ ID NO:5に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を呈するアミノ酸の配列を含むその機能的部分またはバリエーションを含む。いくつかの態様において、第1ドメインおよび第2ドメインは全体として、SEQ ID NO:5に示すアミノ酸の配列を含む。いくつかの態様では、1つまたは複数の修飾が、SEQ ID NO:5に示すナンバリングで、残基13～残基42の部分の中、またはアミノ酸残基15～アミノ酸残基40の部分の中にある。いくつかの態様において、1つまたは複数の修飾は、アミノ酸の挿入、置換または欠失を含み、かつ/または1つもしくは複数の修飾のそれぞれが、個別に、アミノ酸の挿入、置換、または欠失を含む。

## 【0018】

いくつかの態様において、参照キメラ受容体の第1ドメインおよび/または第2ドメインは膜貫通ドメインを含み、ここで、バリエーションキメラ受容体の1つまたは複数の修飾は、任意でCD28膜貫通ドメインである膜貫通ドメイン中の、疎水性アミノ酸残基における修飾もしくは疎水性アミノ酸残基の修飾もしくは疎水性部分内での修飾ではなく、それを含むこともなく;または1つもしくは複数の修飾は、任意でCD28膜貫通ドメインである膜貫通ドメイン内の疎水性アミノ酸残基の修飾を含み、それは、当該疎水性アミノ酸の、別の異なる疎水性アミノ酸残基による置換であるか、それを含み;または1つもしくは複数の修飾は、別の疎水性アミノ酸残基による置換以外の、任意でCD28膜貫通ドメインである膜貫通ドメイン中の、疎水性アミノ酸残基における修飾もしくは疎水性アミノ酸残基の修飾もしくは疎水性部分内での修飾ではなく、それを含むこともない。

## 【0019】

いくつかの態様において、1つまたは複数の修飾は、SEQ ID NO:5に示すナンバリングで残基28～残基42のアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基における修飾を含む。いくつかの態様において、アミノ酸修飾は挿入であり、バリエーションキメラ受容体は、任意でSEQ ID NO:5に示すナンバリングでアミノ酸残基27およびアミノ酸残基28に対応する、ドメイン間のジャンクションに隣接するアミノ酸残基間に挿入を含む。いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、1、2、3、4または5アミノ酸残基の挿入を含む。いくつかの態様において、挿入は、任意でアスパラギン(N)である任意のアミノ酸残基の挿入である。

## 【0020】

いくつかの態様において、1つまたは複数の修飾はアミノ酸の置換を含み、アミノ酸の置換は、SEQ ID NO:5に示すナンバリングでアミノ酸残基28、31または34から選択される1つまたは複数の残基における置換である。いくつかの態様において、アミノ酸の置換は、任意でロイシン(L)、アスパラギン(N)、グルタミン(Q)、アラニン(A)、セリン(S)またはヒスチジン(H)のなかから選択される、他の任意のアミノ酸残基への置

10

20

30

40

50

換である。いくつかの態様において、アミノ酸の置換は、SEQ ID NO:5に示すナンバリングで、K28A、K28H、K28L、K28Q、K28S、R31A、R31H、R31L、R31N、R31S、L34AおよびL34Sのなかから選択される。いくつかの態様において、アミノ酸の置換は、SEQ ID NO:5に示すナンバリングでL34AまたはL34Sに対応する単一のアミノ酸の置換を含まない。いくつかの態様において、アミノ酸の置換は、K28Q/R31A、K28Q/R31N、K28Q/R31S、K28Q/L34A、K28Q/L34S、R31N/L34A、R31N/L34S、K28Q/R31N/L34A、K28Q/R31N/L34Sのなかから選択される。

【0021】

いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、SEQ ID NO:137に対して100%未満であるがSEQ ID NO:137に対して85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%または96%より大きい配列同一性を含む修飾されたジャンクション領域を含み、前記修飾、例えば本明細書に記載のいずれかの修飾を含み;かつ/またはバリエーションキメラ受容体は、SEQ ID NO:5に対して100%未満であるがSEQ ID NO:5に対して85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%または96%より大きい配列同一性を有する配列を含み、前記修飾、例えば本明細書に記載のいずれかの修飾を含む。

10

【0022】

いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、(i) SEQ ID NO:138~157および184のいずれかに示すアミノ酸の配列; (ii) SEQ ID NO:138~157および184のいずれかに示すアミノ酸の配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を呈しかつ前記修飾を含むアミノ酸の配列を含む、その機能的バリエーション;または(iii) 該修飾を含む、(i) もしくは(ii) の機能的部分、のなかから選択される修飾されたジャンクション領域を含む。

20

【0023】

いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、(i) SEQ ID NO:114~134および183のいずれかに示すアミノ酸の配列; (ii) SEQ ID NO:114~134および183のいずれかに示すアミノ酸の配列に対して少なくとも95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を呈しかつ前記修飾を含むアミノ酸の配列を含む、その機能的バリエーション;または(iii) 該修飾を含む、(i) もしくは(ii) の機能的部分、を含む。

【0024】

いくつかの態様において、修飾されたジャンクション領域は、参照キメラ受容体のジャンクション領域と比較して、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個以下のアミノ酸修飾を含む。

30

【0025】

いくつかの態様において、第1ドメインまたは第2ドメインは膜貫通ドメインであり、バリエーションキメラ受容体中の対応するドメインは、実質上疎水性のハイドロパシープロファイルを含み、かつ/または正のGRAVY (ハイドロパシーの全体平均) 値を有する。いくつかの態様において、GRAVY値は、0、0.25、0.5、0.75、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2またはそれ以上を上回る。

【0026】

いくつかの態様において、第1ドメインまたは第2ドメインは細胞内シグナル伝達ドメインを含み、バリエーションキメラ受容体中の対応するドメインは、TRAFの活性化または細胞局在を誘導する能力を有し、かつ/またはTRAF媒介シグナル伝達を誘導する能力を有する。いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは4-1BB共刺激シグナル伝達ドメインであり、かつ/またはTRAFは、TRAF1、TRAF2またはTRAF3のなかから選択される。いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、それぞれSEQ ID NO:5に示すナンバリングで、49~52に対応する位置にアミノ酸TTQEを、かつ/または残基60~63に対応する位置にアミノ酸PEEEを含む。

40

【0027】

いくつかの態様において、HLAはHLAクラスIおよび/またはHLAクラスIIである。いく

50



つかの態様において、HLAクラスIは表1Aに示すHLA対立遺伝子から選択され、かつ/またはHLAクラスII対立遺伝子は表1Bに示すHLA対立遺伝子から選択される。いくつかの態様において、HLAクラスI対立遺伝子は、HLA-A\*02:01、HLA-A\*03:01、HLA-A\*11:01およびHLA-B\*08:01のなかから選択される。

#### 【0028】

いくつかの態様において、HLAは複数のHLA分子を含み、それら複数のHLA分子のうちの1つまたは複数に対する平均結合親和性は低くなり、かつ/またはそれら複数のHLA分子のうちの1つまたは複数に個別に結合するペプチド断片の数は低減する。いくつかの態様において、複数のHLA分子は、世界人口におけるまたは白人人口におけるHLAクラスI分子の50%超、60%超、70%超、80%超、90%超、95%超または99%超に相当する複数のHLAクラスI分子;世界人口におけるまたは白人人口におけるHLAクラスII分子の50%超、60%超、70%超、80%超、90%超、95%超または99%超に相当する複数のHLAクラスII分子;あるいは世界人口におけるまたは白人人口におけるHLAクラスI分子およびHLAクラスII分子の50%超、60%超、70%超、80%超、90%超、95%超または99%超に相当する複数のHLAクラスI分子およびHLAクラスII分子から選択される。

10

#### 【0029】

いくつかの態様において、結合親和性はインビトロで決定される。

#### 【0030】

いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、ヒト対象に投与したときに、参照キメラ受容体と比較して低減した免疫原性を呈し、任意で、該対象は該参照キメラ抗体の投与を受けたことがある。いくつかの態様において、低減した免疫原性には、低減したCD4+ T細胞免疫応答および/または低減したCD8+ T細胞免疫応答が含まれる。

20

#### 【0031】

いくつかの態様において、参照キメラ受容体は細胞外リガンド結合ドメインをさらに含み、かつ/またはバリエーションキメラ受容体は細胞外リガンド結合ドメインをさらに含む。いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体はキメラ抗原受容体(CAR)であり、リガンド結合ドメインが抗原結合ドメインである。いくつかの態様において、抗原結合ドメインは抗体または抗体断片である。いくつかの態様において、抗原結合ドメインは、一本鎖断片である抗体断片である。いくつかの態様において、断片は、柔軟な免疫グロブリンリンカーによって接合された抗体可変領域を含む。いくつかの態様において、抗体断片はscFvを含む。

30

#### 【0032】

いくつかの態様において、リガンド結合ドメインは、疾患または障害と関連する抗原に特異的に結合する。いくつかの態様において、疾患または障害は感染症または感染状態、自己免疫疾患、炎症性疾患、または腫瘍もしくはがんであり、リガンド結合ドメインは、腫瘍抗原に特異的に結合し、かつ/またはリガンド結合ドメインは、ROR1、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、メソテリン、CEA、B型肝炎表面抗原、抗葉酸受容体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、ErbB3、ErbB4、FBP、胎児アセチルコリン受容体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R-アルファ、IL-13R-アルファ2、kdr、カッパ軽鎖、ルイスY、L1細胞接着分子、MAGE-A1、メソテリン、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、MART-1、gp100、腫瘍胎児性抗原、TAG72、VEGF-R2、癌胎児性抗原(CEA)、前立腺特異抗原、PSMA、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、エフリンB2、CD123、CS-1、c-Met、GD-2、MAGE A3、CE7、ウィルムス腫瘍1(WT-1)およびサイクリンA1(CCN A1)を含む群から選択される抗原に特異的に結合する。

40

#### 【0033】

いくつかの態様において、参照キメラ受容体は活性化細胞質シグナル伝達ドメインをさらに含み、かつ/またはバリエーションキメラ受容体は活性化細胞質ドメインをさらに含む。いくつかの態様において、活性化細胞質ドメインはT細胞受容体(TCR)成分を含み、かつ/または免疫受容体チロシン活性化モチーフ(ITAM)を含む。いくつかの態様において、

50

活性化細胞質シグナル伝達ドメインは、CD3-ゼータ（CD3 ）鎖のゼータ鎖の細胞質シグナル伝達ドメイン、またはその機能的バリエーションもしくはシグナル伝達部分であるか、またはそれを含む。

【 0 0 3 4 】

いくつかの態様において、参照キメラ受容体は、そのN末からC末に向かって順に、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメインである第1ドメイン、細胞内共刺激ドメインである第2ドメイン、および活性化細胞質シグナル伝達ドメインを含み、かつ/またはバリエーションキメラ受容体は、そのN末からC末に向かって順に、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内共刺激ドメインおよび活性化細胞質シグナル伝達ドメインを含み、ここでは膜貫通ドメインと細胞内共刺激ドメインとがジャンクションにおいて連続した順序で接合されて、修飾されたジャンクション領域を形成している。

10

【 0 0 3 5 】

いくつかの態様では、本明細書に記載のバリエーションキメラ受容体のいずれかをコードする核酸分子が、ここに提供される。いくつかの態様では、前記核酸分子を含有するベクターが、ここに提供される。いくつかの態様において、ベクターはウイルスベクターである。いくつかの態様において、ベクターはレトロウイルスベクターであり、該レトロウイルスベクターは任意でレンチウイルスベクターまたはガンマレトロウイルスベクターである。

【 0 0 3 6 】

いくつかの態様において、本明細書に記載する態様のいずれかの核酸またはベクターを含むか、本明細書に記載するキメラ受容体のいずれかのキメラ受容体を発現する、操作された細胞が、ここに提供される。いくつかの態様において、操作された細胞はT細胞である。いくつかの態様において、操作された細胞は、CD4+ T細胞および/またはCD8+ T細胞である。

20

【 0 0 3 7 】

いくつかの態様では、本明細書に記載する態様のいずれかの操作された細胞と任意で薬学的に許容される緩衝液とを含む組成物が、ここに提供される。

【 0 0 3 8 】

いくつかの態様では、疾患または状態を有する対象に本明細書に記載する態様のいずれかの細胞または組成物を投与する工程を含む処置方法が、ここに提供される。いくつかの態様において、キメラ受容体は、前記疾患または状態と関連するリガンドまたは抗原に、特異的に結合する。いくつかの態様において、疾患または状態は、がん、腫瘍、自己免疫疾患もしくは自己免疫障害、または感染症である。

30

【 0 0 3 9 】

いくつかの態様において、組成物中の遺伝子操作されたT細胞は、対象において、参照キメラ受容体を発現する同じまたはほぼ同じ投薬量の参照細胞組成物が投与された対象においてよりも、増加したまたはより長期の増大および/または持続を呈する。いくつかの態様において、増加は少なくとも1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、または5倍である。いくつかの態様において、増加は、細胞の投与後、1ヶ月以内、2ヶ月以内、6ヶ月以内、または1年以内に観察される、または存在する。

【図面の簡単な説明】

40

【 0 0 4 0 】

（図1）図1は、ヒト対象における抗CD19 CAR発現細胞の投与の後の、CAR発現細胞に特異的な細胞溶解免疫応答の存在を検出する、例示的なクロム放出アッセイからの結果を示す。CAR発現（「CD19-CAR」）および非CAR発現（「モック」）の存在下での、CAR発現細胞の注入前（左パネル）および注入後（右パネル）の対象に由来する末梢血単核細胞（PBMC）を含有している混合リンパ球培養物についての結果が示される。「E/T」=エフェクター細胞と標的細胞との比。

（図2）図2は、例示的なヒト対象におけるCARの特定の領域を表すいくつかのオーバーラップペプチドに対する免疫応答を確認する例示的なELISpot分析からの結果を示す。「ペプチド」と共に表記された数字は、CAR配列の長さに沿った様々なオーバーラップ

50

ペプチドを表し、対応する領域がチャートの上に示される。

(図3) 図3は、アミノ酸配列  
CYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPF (SEQ ID NO: 6)

(残基1~15は例示的なCD28膜貫通ドメインに相当し、残基16~30は例示的な4-1BB共刺激ドメインに相当する)を有する例示的なジャンクション領域の一連の8mer~14merのオーバーラップペプチドを含む、キメラ受容体の例示的な領域のペプチドのHLA-A2:01との結合についての予測結合親和性のエピトープ親和性マップを示す。図は、CD28膜貫通ドメインと4-1BB共刺激ドメインとの間に挿入されたアスパラギン残基を含有しているアミノ酸配列

CYSLLVTVAFIIFWVNNKRGRKKLLYIFKQPF (SEQ ID NO: 13)

を有するバリエーションジャンクション領域の一連の8mer~14merのオーバーラップペプチドの予測結合親和性も示す。

(図4) 図4Aおよび図4Bは、集団内の個々のHLA対立遺伝子の頻度によって重み付けされた50nm未満の予測IC50を有する配列の長さに沿った各位置を含むデータセットにおける配列の総数を示す、それぞれ、HLAクラスIおよびHLAクラスIIの対立遺伝子についてのアルゴリズムに基づくT細胞エピトープ予測を示す。

(図5) 図5は、一連のバリエーションペプチドのHLAクラスIおよびHLAクラスIIの対立遺伝子についてのアルゴリズムに基づくT細胞エピトープ予測を示す。スコアは、実施例2に記載されるように決定され重み付けされた。三角および点線は、クラスI重み付けスコアを示す。丸および実線は、クラスII重み付けスコアを示す。

(図6) 図6は、SEQ ID NO:5の例示的なCD28-4-1BB配列のアミノ酸配列を示す。CD28膜貫通ドメインに相当するアミノ酸は、最初および最後の位置を示す矢印を有する実線によって示され；例示的な4-1BB共刺激ドメインのアミノ酸は、最初および最後の位置を示す矢印を有する破線によって示され；例示的なジャンクション領域のアミノ酸は、最初および最後の位置を示す矢印を有する破線および点線ならびにイタリック体によって示される。ジャンクション部位にすぐ隣接する2個のアミノ酸は、ボックスによって示される。K28、R31、およびL34を含む、いくつかの態様において、修飾の標的とされる例示的なアミノ酸は、太字であり、下線付きである。4-1BBによって媒介されるTRAFの結合およびシグナル伝達に関与し得る酸性残基の領域は、二重下線によって示される。

(図7) CD28由来の配列と4-1BB由来の配列との間のジャンクションをまたぐ領域 (SEQ ID NO:160に示す；カノニカル配列または「ネイティブ」配列) の一部分内の、またはR31H、R31N、もしくはL34A置換 (SEQ ID NO:5に示すナンバリングによる) を含有する対応する部分内の、15merオーバーラップペプチドのさまざまなMHCクラスII分子への相対的結合を示す図である。結合に関するREVEAL (登録商標) スコアを示す。個々のHLAクラスII対立遺伝子のスコアは、次に挙げるように、対応する文字で個別に表記されている: A: DPA1 \* 01:03; DPB1 \* 04:01; B: DRA \* 01:01; DRB1 \* 03:01; C: DRA \* 01:01; DRB1 \* 15:01; D: DRA \* 01:01; DRB1 \* 11:01; E: DPA1 \* 01:03; DPB1 \* 04:02; F: DPA1 \* 01:03; DPB1 \* 03:01; G: DPA1 \* 01:03; DPB1 \* 01:01; H: DPA1 \* 02:01; DPB1 \* 01:01; I: DPA1 \* 02:01; DPB1 \* 04:02; J: DRA \* 01:01; DRB1 \* 11:04; K: DRA \* 01:01; DRB1 \* 01:02; および L: DPA1 \* 02:01; DPB1 \* 15:01。

(図8) CD28-4-1BB接合部からの15merペプチドの、MHCクラスII分子への、インシリコで予測された結合と、インビトロで決定された結合とを示す図である。

(図9) 図9Aおよび図9Bは、操作されたCD4+ T細胞における、それぞれ表面上および細胞内での、修飾されたジャンクション領域を含有するバリエーションCARの発現を示す図である。Y軸は、抗イディオタイプ抗体を使った検出によるCARの表面発現を表す (表面I D)。X軸は、抗EGFR抗体を使った代用EGFRtマーカーの表面発現を表す (Erb)。

(図10) CD4+ T細胞とCD8+ T細胞の両方でCARの表面発現に関してフローサイトメトリーによって決定された平均蛍光強度 (MFI) を示す図である。

10

20

30

40

50

(図11) CD4+/CAR+細胞およびCD8+/CAR+細胞におけるIL-2およびIFN- $\gamma$ の細胞内例ベルを表すフローサイトメトリープロットを示す図である。

(図12) ネイティブジャンクション領域を持つCARを発現する細胞と比較した、修飾されたジャンクション領域を含有するバリエーションCARを発現する抗CD19CAR操作細胞の、連続的再刺激アッセイにおける増大を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0041】

詳細な説明

特に定義のない限り、本明細書において用いられる専門用語、注釈、ならびに他の技術用語および科学用語または専門語は全て、クレームされた対象が属する当業者に一般的に理解するものと同じ意味を有することが意図される。場合によっては、理解しやすいように、および/または容易に参照できるように、一般的に理解されている意味を有する用語が本明細書において定義される。本明細書における、このような定義の記載が、必ず、当技術分野において一般的に理解されているものと、かなり大きく異なると解釈することはしない。

【0042】

本願において言及された、特許文書、科学文献、およびデータベースを含む刊行物は全て、それぞれ個々の刊行物が個々に参照により組み入れられるのと同じ程度に、全ての目的のためにその全体が参照により組み入れられる。本明細書において示された定義が、参照により本明細書に組み入れられる特許、出願、公開された出願、および他の刊行物に示された定義と相違するか、または他の点で一致しない場合、参照により本明細書に組み入れられる定義ではなく、本明細書において示された定義が優先される。

【0043】

本明細書において用いられるセクションの見出しは、系統立ててまとめることだけを目的とし、説明された対象を限定すると解釈してはならない。

【0044】

#### 1. 概観

参照キメラ受容体と比較して1つまたは複数のアミノ酸配列相違を呈する組換え受容体、例えばキメラ抗原受容体などのキメラ受容体が提供される。いくつかの態様において、ここに提供するバリエーションキメラ受容体は、修飾されたジャンクション領域に由来するペプチド断片（例えば8～24アミノ酸長、例えば8～15または8～13アミノ酸長、例えば約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、もしくは約15アミノ酸長または8、9、10、11、12、13、14、もしくは15アミノ酸長のペプチド断片）が、ヒト白血球抗原（HLA）に対して、そのHLAに対する参照ジャンクション領域に由来する対応するペプチド断片の結合親和性と比較して、低い結合親和性を呈するように、参照キメラ受容体のジャンクション領域と比較して1つまたは複数の修飾（例えばアミノ酸の挿入、欠失またはアミノ酸の置換）を含有する修飾されたジャンクション領域を含有する。いくつかの態様では、対象への投与に続くバリエーションキメラ受容体に対する宿主免疫応答、例えば体液性または細胞媒介性の宿主免疫応答が、参照キメラ受容体と比較して低減する。いくつかの態様において、低減した免疫応答は、バリエーションキメラ受容体の修飾されたジャンクション領域を含有する領域に対する、低減した検出可能な免疫応答である。

【0045】

いくつかの態様において、キメラ抗原受容体などのキメラ受容体は、所望の抗原（例えば腫瘍抗原）に対する特異性を与えるリガンド結合ドメイン（例えば抗体または抗体断片）を細胞内シグナル伝達ドメインと結びつける1つまたは複数のドメインを含有する。いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、一次活性化シグナルを与えるT細胞活性化ドメインなどの活性化細胞内ドメイン部分である。いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、エフェクター機能を促進するために、共刺激シグナル伝達ドメインを含有または追加的に含有する。いくつかの態様において、キメラ受容体は、遺伝子操作によって免疫細胞に組み込まれた場合に、T細胞の活性を調整することができ

10

20

30

40

50

、場合によっては、T細胞の分化またはホメオスタシスを調整することができ、それによって、例えば養子細胞療法に使用するために、インビボでの寿命、生存および/または持続性が改良された遺伝子操作細胞をもたらす。

【0046】

養子細胞療法（関心対象の疾患または障害に特異的なキメラ受容体、例えばキメラ抗原受容体（CAR）および/または他の組換え抗原受容体を発現する細胞の投与を伴うもの、ならびに他の養子免疫細胞療法および養子T細胞療法を含む）は、がんならびに他の疾患および障害の処置に有効な場合がある。一定の状況では、利用可能な養子細胞療法のアプローチが、いつも全く申し分ないというわけではない場合もある。状況によっては、最適な効力は、投与された細胞が、ターゲット（例えばターゲット抗原）を認識しそれに結合する能力、対象、腫瘍、およびその環境内の適当な部位に輸送され、局在化し、その中にうまく進入する能力、活性化状態になって、増大する能力、さまざまなエフェクター機能（細胞傷害性の殺滅（cytotoxic killing）およびサイトカインなどのさまざまな因子の分泌を含む）を発揮する能力、持続（長期間を含む）する能力、一定の表現型状態（エフェクター、長寿命メモリー、低分化度、およびエフェクター状態など）に分化し、移行し、またはそれら一定の表現型状態へのリプログラミングにエンゲージする能力、クリアランスおよびターゲットリガンドまたはターゲット抗原への再曝露に続いて有効でロバストなりコール応答を与え、疲弊、アネルギー、最終分化、および/または抑制状態への分化を回避しまたは低減する能力に依存しうる。

【0047】

いくつかの例では、養子療法は、これらの点の全てにおいて、完全に満足できるわけではない。いくつかの局面において、ここに提供する態様は、投与された細胞および/またはコンストラクトに対する免疫応答が対象中で発生することによって、養子細胞療法の効力が制限されうるという知見に基づく。例えばいくつかの例では、投与された細胞が発現する組換え受容体に対する宿主免疫応答（これは、細胞を時期尚早に排除しうる）によって、キメラ受容体への曝露が制限されうる。養子細胞療法において投与された細胞が発現する受容体の領域に特異的な免疫応答は、免疫無防備状態にあることが多いB細胞悪性疾患を有する一定の対象でさえ、検出されることが、観察されている。例えば本明細書において示すように、CARで遺伝子操作された細胞を投与された対象は、そのCARの膜貫通ドメインと共刺激ドメインの間のジャンクションを含有するキメラ領域の免疫原性領域に対する特異的な免疫応答を発生させた。

【0048】

いくつかの局面において、免疫応答の発生は、養子療法の過程で、キメラ受容体を発現するT細胞の曝露または持続性を低減しうる。しかし、いくつかの例では、組換え受容体を発現する投与された細胞への、対象の曝露の増加（例えば細胞数の増加または長期間にわたる継続）が、養子細胞療法における効力および治療アウトカムを改良しうることを示す知見がある。複数の臨床治験においてさまざまなCD19発現がんを持つ対象への異なるCD19ターゲティングCAR発現T細胞の投与に続いて行われた予備分析では、CAR発現細胞への曝露の大きさおよび/または長さ処置アウトカムとの間の相関関係が明らかになった。そのようなアウトカムには、腫瘍量が大きいまたは相当量である個体でさえ、患者の生存および寛解が含まれた。

【0049】

さらに、いくつかの例では、獲得免疫または自然免疫のいずれかで、ひとたびそのような宿主免疫応答が発生すると、その後と同じ組換え受容体を発現する細胞を投与することによって対象の曝露を増加させまたは再処置を与えようとする企ては、実行可能でなくなるか、有効でなくなりうる。受容体に対してそのような免疫応答が発生してしまえば、同じ受容体または類似する抗原性エピトープを持つ受容体を発現する細胞の2回目またはそれ以降の投与は、細胞が有効にまたは実質的に増大しかつ/または持続する機会を得る前に、細胞の迅速な排除をもたらす。したがって、養子細胞療法に使用される操作された細胞の活性を破壊または妨害し、それによって処置の有効性を減縮しうる、不要な免疫応

答は、最小限に抑えることが有益であるだろう。

【0050】

一般に、キメラ受容体は、複数の異なるドメイン、例えば対象にとって内在性である分子中に存在する複数のドメインを含む。例えば、CARは、ターゲット抗原に特異的に結合する細胞外抗原認識ドメインと、ITAMを含む細胞内シグナル伝達ドメイン（例えばCD3-ゼータ細胞内シグナル伝達ドメイン）とを含む分子である。いくつかの態様において、細胞外抗原認識ドメインは、抗体または抗原結合性断片（例えばscFv）を含む。CARは、細胞外認識ドメインとシグナル伝達ドメインとの間に膜貫通ドメインおよび/またはエンドドメインも含有することができ、これらは、共刺激分子、例えばCD28または4-1BB共刺激分子の、膜貫通ドメインおよび/またはシグナル伝達ドメインを含むことができる。いくつかの例では、そのようなドメインをリンカーで接続することができる。

10

【0051】

いくつかの例において、前記複数のドメインは、対象中の内在性分子では、通常、互いに隣接して順に存在することがない。例えばいくつかの態様において、ジャンクションで接合されたキメラ受容体の第1ドメインと第2ドメインは、特にそれら2つのドメインが自然界では同じタンパク質中に互いに隣接して存在しない場合および/または合成リンカーによって分離されている場合に、対象中には存在しえない連続したアミノ酸の配列を作り出すことができる。いくつかの例では、これが、CARなどのキメラ受容体の配列のうち、2つのドメイン間のジャンクションを含有する部分に、宿主の内在性分子中に存在する配列とは同一でない非ネイティブ配列の存在をもたらしうる。

20

【0052】

いくつかの例では、2つのドメイン間のジャンクションをまたぐ潜在的ペプチドエピトープを含有するジャンクション領域が免疫原性であって、そのジャンクション領域を含有するキメラ受容体を対象に投与したときに、免疫応答の生成をもたらしうる。いくつかの態様において、ジャンクション領域は、例えば抗原提示との関連でHLA分子上でのディスプレイのためにプロセッシングされると、キメラ受容体の第1ドメインと第2ドメインとを接合するジャンクションのすぐC末側の約8～24アミノ（例えば8～15アミノ酸または8～13アミノ酸、例えば約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15アミノ酸、または8、9、10、11、12、13、14、15アミノ酸、またはそれ以上のアミノ酸）および/またはジャンクションのすぐN末側の約8～24アミノ酸（例えば8～15アミノ酸または8～13アミノ酸、例えば約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15アミノ酸、または8、9、10、11、12、13、14、15アミノ酸、またはそれ以上のアミノ酸）の、複数の個々のオーバーラップペプチド断片の連続配列を含むことができ、それらのペプチド断片はそれぞれ、2つのドメインのジャンクションを含むか、またぐことができる。したがって、いくつかの例において、ジャンクション領域は、HLA分子に対して結合親和性を呈し、かつ/または免疫応答を誘導する能力を有しうる複数の潜在的ペプチドエピトープを、含有することができる。

30

【0053】

いくつかの態様では、ペプチド断片が免疫応答によって認識されることで、そのようなペプチド配列に対する、例えば体液性または細胞媒介性の、検出可能な免疫応答を誘導または開始させる。いくつかの態様において、ペプチド断片は、T細胞受容体（TCR）による認識のために、細胞上に発現したMHC分子と会合または結合することができる。いくつかの態様において、ペプチドエピトープは、一定の条件下で、動物における免疫応答、例えばT細胞応答を引き出すことができる。例えば、いくつかの例において、MHC分子との関連においてT細胞エピトープを認識するTCRを発現するT細胞は、刺激された状態になり、それがT細胞の応答、例えばT細胞増殖、リンホカイン分泌、細胞傷害性応答、局所炎症反応、追加の免疫細胞の動員および/またはペプチドエピトープを含有するタンパク質（キメラ受容体など）に対する抗体の生産につながるB細胞の活性化などにつながる。任意のキメラ受容体のペプチドエピトープを同定することは、当業者の水準の範囲内である。

40

【0054】

50

いくつかの態様において、ここに提供する方法は、CARなどのバリエーションキメラ受容体を発現する細胞を投与された対象における免疫応答を、参照CARまたは非修飾CARなどの参照（非修飾）キメラ受容体を発現する細胞を投与された対象において生成する免疫応答と比較して、低減または軽減する。いくつかの態様において、対象は、例えばバリエーションキメラ受容体を発現する細胞の投与に続いて、バリエーションキメラ受容体またはキメラ受容体の修飾されたジャンクション領域に対する免疫応答を呈さないか、低減した免疫応答を呈するか、特定タイプまたは特定度合の免疫応答を呈する。免疫応答のタイプは、検出可能な免疫応答、体液性免疫応答、および/または細胞媒介性免疫応答でありうる。

#### 【0055】

いくつかの態様において、ここに提供する方法は、バリエーションCARなどのバリエーションキメラ受容体を発現する遺伝子操作されたT細胞の、対象に投与された場合の、持続性の増加を達成する。いくつかの態様において、持続性が増加した遺伝子操作細胞は、それを投与された対象において、より良い力価を呈する。いくつかの態様において、バリエーションCAR発現T細胞などの、バリエーションキメラ受容体を発現する遺伝子操作細胞の、投与後の対象における持続性は、代替的方法（例えば参照キメラ受容体または非修飾キメラ受容体を発現する遺伝子操作細胞の投与を伴う方法）によって達成されうるものと比較して大きい。いくつかの局面において、投与された細胞の持続性は、少なくとも、または少なくとも約、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、30倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、またはそれ以上増加する。

#### 【0056】

いくつかの態様において、投与された細胞の持続性の度合または程度を、対象への投与後に、検出し、定量することができる。例えばいくつかの局面では、対象の血液もしくは血清または器官または組織（例えば患部）におけるキメラ受容体を発現する細胞（例えばCAR発現細胞）の量を評価するために、定量PCR（qPCR）が使用される。いくつかの局面において、持続性は、DNA 1マイクログラムあたりの、受容体（例えばCAR）をコードするDNAまたはプラスミドのコピー数として定量されるか、試料（例えば血液または血清の試料）1マイクロリットルあたりの、または試料1マイクロリットルあたりの末梢血単核球（PBMC）もしくは白血球もしくはT細胞の総数あたりの、受容体発現細胞（例えばCAR発現細胞）の数として定量される。いくつかの態様では、受容体を発現する細胞を、一般に、その受容体に特異的な抗体を使って検出する、フローサイトメトリーアッセイも、行うことができる。機能的細胞の数またはパーセンテージを検出するために、例えば当該疾患もしくは状態の細胞または受容体によって認識される抗原を発現する細胞に結合し、かつ/またはそれらの細胞を中和し、かつ/またはそれらの細胞に対する応答、例えば細胞傷害性応答を誘導する能力を有する細胞の数またはパーセンテージを検出するために、細胞ベースのアッセイも使用することができる。そのような態様のいずれにおいても、対象中の投与された細胞と内在性細胞とを識別するために、組換え受容体（例えばCAR発現細胞）と関連する別のマーカーの発現の程度またはレベルを使用することができる。

#### 【0057】

バリエーションキメラ受容体を含有する組成物またはそのようなバリエーションキメラ受容体を発現する操作された細胞を含有する組成物も提供される。そのようなバリエーションキメラ受容体および組成物を対象に投与する方法、例えば養子細胞療法のために、バリエーションキメラ受容体を発現する細胞およびそのような細胞の組成物を対象に投与する方法も提供される。

#### 【0058】

### II. バリエーションキメラ受容体

参照キメラ受容体のジャンクション領域と比較して修飾されたジャンクション領域を含むバリエーションキメラ受容体が提供される。いくつかの態様において、ジャンクション領域は、第1のドメインと第2のドメインの間のジャンクションの各端部にアミノ酸の連続配列を含む領域である。いくつかの態様において、修飾されたジャンクション領域内に存在する1つまたは複数の修飾によって、バリエーションキメラ受容体は、1つまたは複数のアミノ酸

10

20

30

40

50

の相違（例えば変異）によって修飾された参照キメラ受容体の第1のドメインに対応するドメインおよび/または該参照キメラ受容体の第2のドメインに対応するドメインを含む。

【0059】

いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、参照キメラ受容体の第1のドメインと第2のドメインとを接合するジャンクションのすぐC末端側の8～24位のアミノ酸（例えば、8～15個または8～13個、例えば、約8個、約9個、約10個、約11個、約12個、約13個、約14個、約15個、または8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、またはそれ以上のアミノ酸）および/またはジャンクションのすぐN末端側の8～24位のアミノ酸（例えば、8～15個もしくは8～13個、例えば、約8個、約9個、約10個、約11個、約12個、約13個、約14個、約15個、または8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、またはそれ以上のアミノ酸）の1個または複数個のアミノ酸残基が、例えば、挿入、欠失、またはアミノ酸置換によって修飾されている、参照キメラ受容体のジャンクション領域と比較して修飾されたジャンクション領域を含有している。いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、参照キメラ受容体のジャンクション領域と比較して、修飾されたジャンクション領域において、最大1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、または20個のアミノ酸の違いまたは修飾を含有している。

10

【0060】

いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、参照キメラ受容体の第1のドメインに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはそれ以上の配列同一性を有するドメインを含有し、かつ/または参照キメラ受容体の第2のドメインに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはそれ以上の配列同一性を有するドメインを含有している。いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、参照キメラ受容体の第1のドメインと配列が同一であるドメインを含有し、かつ参照キメラ受容体の第2のドメインに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上の配列同一性を有するドメインを含有している。いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、参照キメラ受容体の第1のドメインに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上の配列同一性を有するドメインを含有し、かつ参照キメラ受容体の第2のドメインと配列が同一であるドメインを含有している。いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体に存在するドメインの少なくとも一方または両方が、修飾されたジャンクション領域を含有している部分において、参照キメラ受容体の第1のドメインおよび/または第2のドメインと比較して、修飾されている。

20

30

【0061】

いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、参照キメラ受容体に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上の配列同一性を有する。いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、参照キメラ受容体と比較して、最大1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、または20個のアミノ酸の違いまたは修飾（例えば、アミノ酸の挿入、欠失、または置換）を含有している。

40

【0062】

いくつかの態様において、参照キメラ受容体（例えば、参照CAR）の第1および/または第2のドメインは、天然内在性のヒトタンパク質のドメイン、または天然もしくは内在性のタンパク質のドメインもしくはその機能部分に対して100%の同一性を有するドメインである。いくつかの態様において、第1のドメインおよび第2のドメインは、ヒト対象においてインビボで同一分子に存在しない。いくつかの態様において、第1のドメインおよび

50



第2のドメインは、単一の天然または内在性のヒトタンパク質またはヒトポリペプチドに存在しない。

【0063】

いくつかの態様において、第1および/または第2のドメインは、細胞外結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、もしくは細胞内シグナル伝達ドメイン、もしくはそれらの機能性部分であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD28、4-1BB、もしくはICOSの共刺激シグナル伝達ドメインのような共刺激シグナル伝達ドメインであるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、T細胞受容体（TCR）成分であるかもしくはそれを含み、かつ/または免疫受容活性化チロシンモチーフ（ITAM）を含有しているドメインのような活性化細胞質シグナル伝達ドメインであるかもしくはそれを含む。いくつかのケースにおいて、活性化細胞質ドメインは、CD3 鎖の 鎖の細胞質シグナル伝達ドメインもしくはその機能性バリエーションもしくはシグナル伝達部分であるかまたはそれを含む。

10

【0064】

いくつかの態様において、参照キメラ受容体はCARである。いくつかの態様において、CARのようなキメラ受容体は、N末端からC末端へ順に、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含有している。いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、活性化シグナル伝達ドメイン（例えば、TCRのかつ/もしくはITAMを含有している成分、例えば、CD3 シグナル伝達ドメイン）であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激シグナル伝達ドメイン（例えば、CD28、4-1BB、もしくはICOSのシグナル伝達ドメイン）であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激シグナル伝達ドメインもしくは活性化シグナル伝達ドメインの一方のみを含有しているか、またはいずれかの順に両方のドメインを含有している。いくつかの態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激シグナル伝達ドメインおよび活性化シグナル伝達ドメインの両方を含有している。

20

【0065】

いくつかの態様において、参照キメラ受容体は、免疫原性である第1および第2のドメインのジャンクション領域を含有している。いくつかの態様において、免疫原性領域は、1種または複数種の（T細胞エピトープとも呼ばれる）ペプチドエピトープを含む。いくつかのケースにおいて、2個のドメインのジャンクションにかかる、可能性のあるペプチドエピトープを含有しているジャンクション領域は、免疫原性であり得、ジャンクション領域を含有しているキメラ受容体の対象への投与時に免疫応答の生成をもたらす得る。いくつかの態様において、ジャンクション領域は、例えば、HLA分子上でのディスプレイのための抗原提示に関連して一旦プロセッシングされると、キメラ受容体の第1のドメインと第2のドメインとを接合するジャンクションのすぐC末端側にある約8～24アミノ酸（例えば、8～15アミノ酸もしくは8～13アミノ酸、例えば、約8アミノ酸、約9アミノ酸、約10アミノ酸、約11アミノ酸、約12アミノ酸、約13アミノ酸、約14アミノ酸、約15アミノ酸、もしくは、8アミノ酸、9アミノ酸、10アミノ酸、11アミノ酸、12アミノ酸、13アミノ酸、14アミノ酸、15アミノ酸、もしくはそれ以上）および/またはジャンクションのすぐN末端側にある約8～24アミノ酸（例えば、8～15アミノ酸もしくは8～13アミノ酸、例えば、約8アミノ酸、約9アミノ酸、約10アミノ酸、約11アミノ酸、約12アミノ酸、約13アミノ酸、約14アミノ酸、約15アミノ酸、もしくは、8アミノ酸、9アミノ酸、10アミノ酸、11アミノ酸、12アミノ酸、13アミノ酸、14アミノ酸、15アミノ酸、もしくはそれ以上）の連続配列の複数の個々のオーバーラップペプチド断片を含み得る。ペプチド断片は、各々、2個のドメインのジャンクションを含むかまたはそれにかかっていてよい。従って、いくつかのケースにおいて、ジャンクション領域は、HLA分子に対する結合親和性を示し、かつ/または免疫応答を誘導することができる複数の可能性のあるペプチドエピトープを含有している。

30

40

【0066】

50

いくつかの態様において、キメラ受容体のジャンクション領域のような免疫原性領域を同定することができる。いくつかの態様において、MHC分子に結合する能力または一定の条件の下で免疫応答を誘発する能力によって、免疫原性領域を同定することができる。いくつかの態様において、9mer、10mer、11mer、12mer、13mer、14mer、または15merのような、8mer～20merのオーバーラップペプチドのような、キメラ受容体のオーバーラップペプチドを、下記のようなアルゴリズムまたはその他の計算法を使用して、MHC結合について査定することができる。いくつかの態様において、キメラ受容体（例えば、CAR）によって遺伝子操作された細胞を投与された対象のような、それが投与された対象において、免疫応答を査定することによって、免疫原性であるか否かを決定するため、キメラ受容体を査定することができる。免疫応答を査定する例示的な方法は、以下に記載される。

10

#### 【0067】

いくつかの態様において、少なくとも1種のペプチドエピトープは、細胞機構によってプロセシングされたペプチドを含むポリペプチドのペプチド断片と、いくつかのケースにおいて、複合体を形成することができる多形のペプチド結合部位または結合溝を含有している分子である、クラスIまたはクラスIIのタンパク質のような、主要組織適合性複合体（MHC）分子に結合することができる。いくつかの態様において、ペプチドエピトープは、ヒトMHC分子であるMHC分子に結合することができる。いくつかの態様において、MHC分子は、ヒト白血球抗原（HLA）分子である。いくつかの態様において、少なくとも1種のペプチドエピトープは、HLAクラスI分子またはHLAクラスII分子のようなHLA分子に対する結合親和性（例えば、IC50）を示す。いくつかの態様において、参照キメラ受容体のジャンクション領域は、1000nM未満、500nM未満、または50nM未満の結合親和性を示すペプチドエピトープを含有している。

20

#### 【0068】

いくつかの態様において、参照キメラ受容体のジャンクション領域の少なくとも1種または複数種のペプチドエピトープは、MHCクラスIIエピトープである。いくつかの態様において、MHCクラスII分子に結合するペプチドは、8～20アミノ酸長、例えば、10～17アミノ酸長、例えば10、11、12、13、14、15、16、もしくは17アミノ酸長、または少なくとも約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、もしくは約17アミノ酸長、または少なくとも10、11、12、13、14、15、16、もしくは17アミノ酸長、または約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、もしくは約17アミノ酸長、例えば約15アミノ酸長であってよい。いくつかの態様において、MHCクラスII分子に結合するペプチドは、20アミノ酸より長くてもよい。いくつかの態様において、ペプチドは、MHC II ペプチド結合溝に沿って拡張型（extended）コンフォメーションで存在する。いくつかの態様において、MHC II ペプチド結合溝は、両端が開放されている。いくつかの態様において、ペプチドは、少なくとも一部分、ペプチド結合溝を裏打ちする保存された残基との主鎖原子接触によって適所に保持される。いくつかの態様において、MHCクラスIIは、ヒト対象のような対象に存在することが公知である任意のMHCクラスII対立遺伝子タンパク質であってよいかまたはそれを含む、二量体である。いくつかの態様において、MHC対立遺伝子は、DR1、DR3、DR4、DR7、DR52、DQ1、DQ2、DQ4、DQ8、およびDP1であってよいが、これらに限定されない。いくつかの態様において、MHCクラスII対立遺伝子は、表1Bに示された任意のものであってよく、アイソタイプが一致する と の結合、または、異なる対立遺伝子の鎖と鎖を組み合わせた混合アイソタイプのヘテロ二量体を含む。いくつかの態様において、MHCクラスIIは、HLA-DPA1\*0103、HLA-DPA1\*0201、HLA-DPB1\*0101、HLA-DPB1\*0301、HLA-DPB1\*0401、HLA-DPB\*0402、HLA-DPB1\*1501、HLA-DRA\*0101、HLA-DRB1\*0101、HLA-DRB1\*0102、HLA-DRB\*0301、HLA-DRB\*0701、HLA-DRB\*0401、HLA-DRB1\*1101、HLA-DRB1\*1104、HLA-DRB\*1501、および/またはHLA-DQB1\*0201の中に由来する および/もしくは 対立遺伝子であるかまたはそれを含む、二量体であり得る。

30

40

#### 【0069】

50

いくつかの態様において、参照キメラ受容体のジャンクション領域の少なくとも1種のペプチドエピトープは、MHCクラスIエピトープである。いくつかの態様において、MHCクラスI分子に結合するペプチドは、7～15アミノ酸長であってよい。いくつかの態様において、MHCクラスI分子に結合するペプチドは、8～13アミノ酸長であってよい。いくつかの態様において、ペプチドの結合は、ペプチドの主鎖の原子と、全てのMHCクラスI分子のペプチド結合溝にある不変部位との間の接触によって、2個の末端において安定化される。いくつかの態様において、ペプチドのアミノ末端およびカルボキシ末端に結合する溝の両端に不変部位が存在する。いくつかの態様において、ペプチド長の変動は、ねじれによってペプチド骨格に適応する。いくつかの態様において、ねじれは、可動性を可能にすることができるプロリン残基またはグリシン残基を含む。いくつかの態様において、MHCクラスI対立遺伝子は、ヒト対象のような対象に存在することが公知の任意のものであってよい。いくつかの態様において、MHCクラスI対立遺伝子は、HLA-A2、HLA-A1、HLA-A3、HLA-A24、HLA-A28、HLA-A31、HLA-A33、HLA-A34、HLA-B7、HLA-B45、またはHLA-Cw8対立遺伝子である。いくつかの態様において、MHCクラスI対立遺伝子は、最も高頻度のMHCクラスI対立遺伝子に含まれる、表1Aに示された任意のものであってよい (Solberg et al., (2008) Hum Immunol. 2008 Jul; 69(7): 443-6)。いくつかの態様において、HLAクラスI対立遺伝子は、HLA-A\*02:01、HLA-A\*03:01、HLA-A\*11:01、またはHLA-B\*08:01である。

#### 【0070】

いくつかの態様において、MHCクラスI対立遺伝子は、いくつかの集団において、集団のおよそ50%によって発現されている、HLA-A2対立遺伝子である。いくつかの態様において、HLA-A2対立遺伝子は、HLA-A\*0201、\*0202、\*0203、\*0206、または\*0207遺伝子産物であってよい。いくつかのケースにおいて、異なる集団の間には亜型の頻度の違いが存在し得る。例えば、いくつかの態様において、HLA-A2陽性コーカサス人集団の95%超が、HLA-A\*0201であるが、中国人集団においては、頻度が、およそ23% HLA-A\*0201、45% HLA-A\*0207、8% HLA-A\*0206、および23% HLA-A\*0203であることが報告されている。いくつかの態様において、MHC分子は、HLA-A\*0201である。

#### 【0071】

いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、N末端からC末端へ順に、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、ならびに細胞内シグナル伝達ドメインの一部として各々単独でまたはいずれかの順に、共刺激シグナル伝達ドメイン（例えば、CD28、4-1BB、もしくはICOS）および/または活性化シグナル伝達ドメイン（例えば、TCRのかつ/もしくはITAMを含有している成分、例えば、CD3シグナル伝達ドメイン）を任意で含んでいてよい細胞内シグナル伝達ドメインを含有していてもよく、バリエーションキメラ受容体は、ジャンクションのいずれかの側（N末端側および/またはC末端側）にある8～24アミノ酸（例えば、8～15アミノ酸または8～13アミノ酸、例えば、約8アミノ酸、約9アミノ酸、約10アミノ酸、約11アミノ酸、約12アミノ酸、約13アミノ酸、約14アミノ酸、約15アミノ酸、または8アミノ酸、9アミノ酸、10アミノ酸、11アミノ酸、12アミノ酸、13アミノ酸、14アミノ酸、15アミノ酸、またはそれ以上）の連続部分の中の1個または複数個のアミノ酸残基において修飾を含有している。

#### 【0072】

いくつかの態様において、参照キメラ受容体の特色は、下記のサブセクション1に記載される任意のものであってよい。いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体の特色は、バリエーションキメラ受容体が、記載されたような修飾されたジャンクション領域における1個または複数個の修飾（例えば、挿入、欠失、または置換）を含有していること以外は、下記のサブセクション1に記載される任意のものであってもよい。

#### 【0073】

##### 1. キメラ受容体

CARを含む例示的な組換え受容体、組換えTCR、ならびに受容体を操作するための方法およびこのような受容体を細胞に導入するための方法には、例えば、国際特許出願公開番

10

20

30

40

50

号WO200014257、WO2013126726、WO2012/129514、WO2014031687、WO2013/166321、WO2013/071154、WO2013/123061、米国特許出願公開第US2002131960号、US2013287748、US20130149337、米国特許第6,451,995号、同第7,446,190号、同第8,252,592号、同第8,339,645号、同第8,398,282号、同第7,446,179号、同第6,410,319号、同第7,070,995号、同第7,265,209号、同第7,354,762号、同第7,446,191号、同第8,324,353号、および同第8,479,118号、ならびに欧州特許出願第EP2537416号に記載のもの、ならびに/またはSadelain et al., *Cancer Discov.* 2013 April; 3(4): 388-398; Davila et al. (2013) *PLoS ONE* 8(4): e61338; Turtle et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 2012 October; 24(5): 633-39; Wu et al., *Cancer*, 2012 March 18(2): 160-75に記載のものが含まれる。一部の態様において、前記遺伝子操作された抗原受容体には、米国特許第7,446,190号に記載のCARおよび国際特許出願公開番号WO/2014055668A1に記載のCARが含まれる。一部の態様において、提供されるキメラ受容体に関し、構築および導入または免疫細胞への移行のための類似の方法を用いることができる。いくつかの態様では、類似する構築方法、ならびに類似する、免疫細胞への導入または移入方法を、ここに提供するキメラ受容体に使用することができる。

#### 【0074】

いくつかの態様において、キメラ受容体は、抗原（またはリガンド）に結合する（例えば特異的に結合する）リガンド結合ドメインを含む。キメラ受容体が標的とする抗原には、養子細胞療法の標的となる疾患、状態、または細胞タイプとの関連において発現されるものが含まれる。疾患および状態には、増殖性、新生物性、および悪性の疾患および障害、例えばがんおよび腫瘍、例えば血液学的がん、免疫系のがん、例えばリンパ腫、白血病、および/または骨髄腫、例えばB、T、および骨髄性白血病、リンパ腫、ならびに多発性骨髄腫が含まれる。いくつかの態様において、抗原（またはリガンド）はポリペプチドである。いくつかの態様において、それは糖質または他の分子である。いくつかの態様において、抗原（またはリガンド）は、正常細胞もしくは正常組織または非標的細胞もしくは非標的組織と比較して、疾患または状態の細胞上に、例えば腫瘍細胞上または病原細胞上に、選択的に発現し、または過剰発現する。別の態様では、抗原が正常細胞上に発現し、かつ/または操作された細胞上に発現する。いくつかの態様において、抗原（またはリガンド）は腫瘍抗原またはがんマーカーである。いくつかの態様において、抗原（またはリガンド）は、オーファンチロシンキナーゼ受容体ROR1、tEGFR、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、BCMA、メソテリン、CEA、およびB型肝炎表面抗原、抗葉酸受容体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、3または4、FBP、胎児アセチルコリン受容体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R-アルファ、IL-13R-アルファ2、kdr、カップパ軽鎖、ルイスY、L1細胞接着分子、MAGE-A1、メソテリン、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、MART-1、gp100、腫瘍胎児性抗原、ROR1、TAG72、VEGF-R2、癌胎児性抗原（CEA）、前立腺特異抗原、PSMA、Her2/neu、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、エフリンB2、CD123、CS-1、c-Met、GD-2、およびMAGE A3、CE7、ウィルムス腫瘍1（WT-1）、サイクリン、例えばサイクリンA1（CCNA1）、および/またはビオチン化分子、および/またはHIV、HCV、HBVもしくは他の病原体が発現する分子であるか、それらを含む。いくつかの態様において、抗原は病原体特異的抗原である。いくつかの態様において、抗原は、ウイルス抗原（例えばHIV、HCV、HBVなどからのウイルス抗原）、細菌抗原、および/または寄生虫抗原である。

#### 【0075】

いくつかの態様では、特定抗原（またはマーカーまたはリガンド）、例えば養子治療の標的となるべき特定細胞タイプにおいて発現する抗原、例えばがんマーカー、および/または抑制応答（dampening response）を誘導するための抗原、例えば正常細胞タイプまたは非疾患細胞タイプ上に発現する抗原に対する特異性を持つキメラ受容体が構築される。したがって、キメラ受容体は、典型的には、その細胞外部分に、1つまたは複数のリガンド結合ドメインを含む。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 6 】

いくつかの態様において、キメラ受容体はCARである。いくつかの態様において、CARは、典型的には、その細胞外部分に、1つまたは複数の抗原結合分子、例えば1つまたは複数の抗原結合性断片、抗原結合性ドメイン、もしくは抗原結合性部分、または1つもしくは複数の抗体可変ドメイン、および/または抗体分子を含む。いくつかの態様において、CARは、1つまたは複数の、ある抗体分子の抗原結合部分、例えばモノクローナル抗体 (mAb) の可変重 (VH) 鎖および可変軽 (VL) 鎖から誘導される一本鎖抗体断片 (scFv) を含む。

## 【 0 0 7 7 】

「抗体」という用語は、本明細書では、最も広義に使用され、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を包含し、インタクト抗体および抗原に特異的に結合する能力を有する機能的 (抗原結合性) 抗体断片、例えばFab (fragment antigen binding) 断片、F (ab')<sub>2</sub>断片、Fab'断片、Fv断片、組換えIgG (rIgG) 断片、可変重鎖 (VH) 領域、一本鎖抗体断片、例えば一本鎖可変断片 (scFv)、および単一ドメイン抗体 (例えばsdAb、sdFv、ナノボディ) 断片を含む。この用語は、免疫グロブリンの遺伝子操作型および/または他の修飾型、例えばイントラボディ、ペプチボディ、キメラ抗体、完全ヒト抗体、ヒト化抗体、およびヘテロコンジュゲート抗体、多重特異性 (例えば二重特異性) 抗体、ダイアボディ、トリアボディ、およびテトラボディ、タンデム・ジ-scFv、タンデム・トリ-scFvを包含する。別段の言明がある場合を除き、「抗体」という用語は、その機能的抗体断片を包含すると理解されるべきである。この用語は、インタクト抗体、すなわち完全長抗体も包含し、任意のクラスまたはサブクラスの抗体、例えばIgGおよびそのサブクラス、IgM、IgE、IgA、ならびにIgDを含む。

## 【 0 0 7 8 】

いくつかの態様において、抗原結合タンパク質、抗体およびその抗原結合性断片は、完全長抗体の抗原を特異的に認識する。いくつかの態様において、抗体の重鎖および軽鎖は完全長であるか、または抗原結合部分 (Fab、F (ab')<sub>2</sub>、Fvまたは一本鎖Fv断片 (scFv)) であることができる。別の態様において、抗体重鎖定常領域は、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD、およびIgEから選ばれ、具体的には例えばIgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4から選ばれ、より具体的には、IgG1 (例えばヒトIgG1) である。別の態様において、抗体軽鎖定常領域は例えばカッパまたはラムダから選ばれ、具体的にはカッパである。

## 【 0 0 7 9 】

ここに提供する抗体には、抗体断片が含まれる。「抗体断片」とは、インタクトな抗体ではない分子であって、インタクトな抗体のうち、インタクトな抗体が結合する抗原に結合する部分を含む分子を指す。抗体断片の例として、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F (ab')<sub>2</sub>;ダイアボディ;線状抗体;可変重鎖 (VH) 領域、一本鎖抗体分子、例えばscFvおよび単一ドメインVH単一抗体;ならびに抗体断片から形成される多重特異性抗体が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。特定の態様において、抗体は、可変重鎖領域および/または可変軽鎖領域を含む一本鎖抗体断片、例えばscFvである。

## 【 0 0 8 0 】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、抗体重鎖または抗体軽鎖のうち、抗原への抗体の結合に関与するドメインを指す。ネイティブ抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメイン (それぞれVHおよびVL) は一般に類似する構造を有し、各ドメインは4つの保存されたフレームワーク領域 (FR) と3つのCDRとを含んでいる。例えばKindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007) を参照されたい。抗原結合特異性を付与するには単一のVHドメインまたはVLドメインで十分でありうる。さらにまた、特定の抗原に結合する抗体は、その抗原に結合する抗体からのVHドメインまたはVLドメインを使って、それぞれ相補的なVLドメインまたはVHドメインのライブラリーをスクリーニングすることにより、単離することができる。例えばPortolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993)、Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991)

10

20

30

40

50

)を参照されたい。

【0081】

単ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全部もしくは一部または抗体の軽鎖可変ドメインの全部もしくは一部を含む抗体断片である。一定の態様において、単ドメイン抗体はヒト単ドメイン抗体である。いくつかの態様において、CARは、抗原、例えばがんマーカーまたは腫瘍細胞もしくはがん細胞などの標的となるべき細胞または疾患の細胞表面抗原、例えば本明細書に記載の、または当技術分野において公知の、ターゲット抗原のいずれかに、特異的に結合する抗体重鎖ドメインを含む。

【0082】

抗体断片は、例えば限定するわけではないが、インタクトな抗体のタンパク質分解的消化および組換え宿主細胞による生産などといった、さまざまな技法によって作製することができる。いくつかの態様において、抗体は、組換え生産された断片、例えば自然には見いだされない編成を含む断片、例えば2つ以上の抗体領域または抗体鎖が合成リンカー（例えばペプチドリinker）で接合されているもの、および/または天然のインタクトな抗体の酵素消化では生産されえないものである。いくつかの態様において、抗体断片はscFvである。

【0083】

「ヒト化」抗体は、CDRアミノ酸残基の全てまたは実質上全てが非ヒトCDRに由来し、FRアミノ酸残基の全てまたは実質上全てがヒトFRに由来する抗体である。ヒト化抗体は、任意で、ヒト抗体由来の抗体定常領域の少なくとも一部分を含みうる。非ヒト抗体の「ヒト化型」とは、典型的には、親非ヒト抗体の特異性および親和性を保ちつつヒトに対する免疫原性を低減するためにヒト化を受けた、非ヒト抗体のパリアントを指す。いくつかの態様では、ヒト化抗体中のいくつかのFR残基が、例えば抗体の特異性または親和性を回復または改良するために、非ヒト抗体（例えばCDR残基の由来源である抗体）の対応残基で置換される。

【0084】

いくつかの態様において、CARは、細胞の表面に発現する抗原（例えばインタクト抗原）を特異的に認識する抗体または抗原結合性断片（例えばscFv）を含有する。

【0085】

いくつかの態様において、CARは、TCR様の抗体、例えばMHC-ペプチド複合体として細胞表面上に提示される細胞内抗原（例えば腫瘍関連抗原）を特異的に認識する抗体または抗原結合性断片（例えばscFv）を含有する。いくつかの態様において、MHC-ペプチド複合体を認識する抗体またはその抗原結合部分は、抗原受容体などの組換え受容体の一部として、細胞上に発現させることができる。抗原受容体には、キメラ抗原受容体（CAR）などの機能的非TCR抗原受容体が含まれる。一般に、ペプチド-MHC複合体に対してTCR様の特異性を呈する抗体または抗原結合性断片を含有するCARを、TCR様CARということもできる。

【0086】

いくつかの態様において、MHC-ペプチド複合体に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分は、有効量の、特異的MHC-ペプチド複合体を含有する免疫原で宿主を免疫することによって生産することができる。いくつかの例において、MHC-ペプチド複合体のペプチドは、MHCに結合する能力を有する抗原、例えば腫瘍抗原、例えばユニバーサル腫瘍抗原、骨髄腫抗原または後述する他の抗原の、エピトープである。いくつかの態様では、次に、免疫応答を引き出すために有効量の免疫原が宿主に投与され、ここでは、免疫原が、MHC分子の結合溝におけるペプチドの三次元的提示に対する免疫応答を引き出すのに十分な期間にわたって、その三次元形状を保つ。次に、宿主から収集された血清をアッセイして、MHC分子の結合溝におけるペプチドの三次元的提示を認識する所望の抗体が生産されているかどうかを決定する。いくつかの態様では、抗体が、MHC-ペプチド複合体を、MHC分子単独、関心対象のペプチド単独、およびMHCと無関係なペプチドとの複合体と、区別できることを確認するために、生産された抗体を評価することができる。次に、

10

20

30

40

50

所望の抗体を単離することができる。

【 0 0 8 7 】

いくつかの態様において、MHC-ペプチド複合体に特異的に結合する抗体またはその抗原結合部分は、ファージ抗体ライブラリーなどの抗体ライブラリーディスプレイ法を使用することによって生産することができる。いくつかの態様では、例えばライブラリーの構成要素が、1つまたは複数のCDRの1つまたは複数の残基において突然変異を起こしている、突然バリエーションのFab、scFVまたは他の抗体形態のファージディスプレイライブラリーを作製することができる。そのような方法の典型例は、当技術分野において公知である（例えば米国特許出願公開番号US20020150914、US2014/0294841、およびCohen CJ et al. (2003) J Mol. Recogn. 16:324-332を参照されたい）。

10

【 0 0 8 8 】

いくつかの態様では、CARの細胞外部分、例えばその抗体部分が、スペーサーを、例えば抗原認識成分（例えばscFv）と膜貫通ドメインとの間のスペーサー領域を、さらに含む。スペーサーは、免疫グロブリン定常領域またはそのバリエーションもしくは修飾型の少なくとも一部、例えば、ヒンジ領域、例えば、IgG4ヒンジ領域、および/もしくはCH1/CLおよび/もしくはFc領域であり得るか、またはそれを含む。一部の態様において、定常領域または一部はヒトIgG、例えば、IgG4またはIgG1の定常領域または一部である。スペーサーは、スペーサーが存在しない場合と比較して抗原結合後の前記細胞の応答性を高める長さのスペーサーでよい。一部の例では、スペーサーは長さが12アミノ酸もしくは約12アミノ酸であるか、または長さが12アミノ酸以下である。例示的なスペーサーには、少なくとも約10～229アミノ酸、約10～200アミノ酸、約10～175アミノ酸、約10～150アミノ酸、約10～125アミノ酸、約10～100アミノ酸、約10～75アミノ酸、約10～50アミノ酸、約10～40アミノ酸、約10～30アミノ酸、約10～20アミノ酸、または約10～15アミノ酸を有し、列挙された任意の範囲の端点間の任意の整数を含むスペーサーが含まれる。一部の態様において、スペーサー領域には、約12アミノ酸もしくはこれより少ないアミノ酸、約119アミノ酸もしくはこれより少ないアミノ酸、または約229アミノ酸もしくはこれより少ないアミノ酸がある。例示的なスペーサーには、IgG4ヒンジのみ、CH2およびCH3ドメインと連結したIgG4ヒンジ、またはCH3ドメインと連結したIgG4ヒンジが含まれる。例示的なスペーサーには、Hudecek et al. (2013) Clin. Cancer Res., 19:3153、国際特許出願公開番号WO2014031687、米国特許第8,822,647号、または米国特許出願公開第US2014/0271635号に記載のスペーサーが含まれるが、これに限定されない。

20

30

【 0 0 8 9 】

一部の態様において、定常領域または一部は、ヒトIgG、例えば、IgG4またはIgG1の定常領域または一部である。一部の態様において、スペーサーは、配列ESKYGPPCPPCP

(SEQ ID NO:1に示した)を有し、SEQ ID NO:158に示した配列によってコードされる。一部の態様において、スペーサーは、SEQ ID NO:107に示した配列を有する。一部の態様において、スペーサーは、SEQ ID NO:108に示した配列を有する。一部の態様において、定常領域または一部はIgDの定常領域または一部である。一部の態様において、スペーサーは、SEQ ID NO:109に示した配列を有する。一部の態様において、スペーサーは、SEQ ID NO:1、107、108、または109のいずれかに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはこれより多い配列同一性を示すアミノ酸配列を有する。

40

【 0 0 9 0 】

細胞外リガンド結合ドメイン、例えば抗原認識ドメインは、一般的に、1つまたは複数の細胞内シグナル伝達成分に、例えば、CARの場合にはTCR複合体などの抗原受容体複合体および/または別の細胞表面受容体を介したシグナルを通じた活性化を模倣するシグナル伝達成分に、連結される。一部の態様において、膜貫通ドメインは細胞外リガンド結合ド

50

メインおよび細胞内シグナル伝達ドメインに連結する。一部の態様において、CARは細胞外ドメインに融合された膜貫通ドメインを含む。一態様において、前記受容体、例えば、CARにおいて前記ドメインの1つと天然に結合している膜貫通ドメインが用いられる。場合によっては、膜貫通ドメインは、受容体複合体の他のメンバーとの相互作用を最小にするために、このようなドメインと、同じまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインとの結合を避けるように選択されるか、またはアミノ酸置換によって改変される。

#### 【0091】

膜貫通ドメインは、一部の態様では、天然供給源または合成供給源のいずれかに由来する。供給源が天然の場合、前記ドメインは、一部の局面では、任意の膜結合タンパク質または膜貫通タンパク質に由来する。膜貫通領域は、T細胞受容体の鎖、鎖、もしくは鎖、CD28、CD3、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154に由来する膜貫通領域を含む(すなわち、少なくとも、その膜貫通領域を含む)、および/またはその機能的バリエーションを含む膜貫通領域、例えば、その構造特性、例えば、膜貫通特性のかなりの部分を保持している膜貫通領域を含む。一部の態様において、膜貫通ドメインは、CD4、CD28、もしくはCD8、例えば、CD8に由来する膜貫通ドメイン、またはその機能的バリエーションである。代替的に、膜貫通ドメインは一部の態様では合成である。一部の局面において、合成膜貫通ドメインは、主に疎水性の残基、例えば、ロイシンおよびバリンを含む。一部の局面において、フェニルアラニン、トリプトファン、およびバリンのトリプレットが合成膜貫通ドメインの各末端に見られる。一部の態様において、連結は、リンカー、スペーサー、および/または膜貫通ドメインによるものである。

#### 【0092】

細胞内シグナル伝達ドメインの中には、天然抗原受容体を介したシグナル、このような受容体と共刺激受容体の組み合わせを介したシグナル、および/または共刺激受容体だけを介したシグナルを模倣するか、またはこれに似せる細胞内シグナル伝達ドメインがある。一部の態様において、短いオリゴペプチドリンカーまたはポリペプチドリンカー、例えば、長さが2~10アミノ酸のリンカー、例えば、グリシンおよびセリン、例えば、グリシン-セリンダブルット(doublet)を含むリンカーが、CARの膜貫通ドメインと細胞質シグナル伝達ドメインとの間に存在し、連結を形成する。

#### 【0093】

前記受容体、例えば、CARは、一般的には、少なくとも1種類の細胞内シグナル伝達成分を含む。一部の態様において、前記受容体は、TCR複合体の細胞内成分、例えば、T細胞活性化および細胞傷害性を媒介するTCR CD3鎖、例えば、CD3鎖を含む。従って、一部の局面において、抗原結合部分は1つまたは複数の細胞シグナル伝達モジュールに連結される。一部の態様において、細胞シグナル伝達モジュールには、CD3膜貫通ドメイン、CD3細胞内シグナル伝達ドメイン、および/または他のCD膜貫通ドメインが含まれる。一部の態様において、前記受容体、例えば、CARは、1種または複数種のさらなる分子、例えば、Fc受容体、CD8、CD4、CD25、またはCD16の一部をさらに含む。例えば、一部の局面において、CARまたは他のキメラ受容体には、CD3-ゼータ(CD3- $\zeta$ )またはFc受容体と、CD8、CD4、CD25、またはCD16とのキメラ分子が含まれる。

#### 【0094】

一部の態様において、CARまたは他のキメラ受容体が連結されると、前記受容体の細胞質ドメインまたは細胞内シグナル伝達ドメインは、免疫細胞、例えば、CARを発現するように操作されたT細胞の正常なエフェクター機能または応答の少なくとも1つを活性化する。例えば、ある状況では、CARは、T細胞の機能、例えば、細胞溶解活性またはTヘルパー活性、例えば、サイトカインまたは他の因子の分泌を誘導する。一部の態様において、抗原受容体成分または共刺激分子の細胞内シグナル伝達ドメインの切断部分は、例えば、エフェクター機能シグナルを伝達するのであれば、インタクトな免疫賦活鎖の代わりに用いられる。一部の態様において、細胞内シグナル伝達ドメインはT細胞受容体(TCR)の細胞質配列を含み、一部の局面では、天然の状況では、このような受容体と協調して、抗原受

10

20

30

40

50



容体結合後にシグナル伝達を開始するように働く補助受容体の細胞質配列も含む。

【 0 0 9 5 】

天然TCRの状況では、完全活性化には、一般的に、TCRを介したシグナル伝達だけでなく共刺激シグナルも必要とされる。従って、一部の態様において、完全活性化を促進するには、二次シグナルまたは共刺激シグナルを発生させるための成分もCARに含まれる。他の態様において、CARは、共刺激シグナルを発生させるための成分を含まない。一部の局面において、さらなるCARが同じ細胞において発現され、二次シグナルまたは共刺激シグナルを発生させるための成分を提供する。

【 0 0 9 6 】

T細胞活性化は、一部の局面では、2種類の細胞質シグナル伝達配列:TCRを介して抗原依存的一次活性化を開始する細胞質シグナル伝達配列(一次細胞質シグナル伝達配列)、および抗原非依存的に二次シグナルまたは共刺激シグナルを供給するように働く細胞質シグナル伝達配列(二次細胞質シグナル伝達配列)によって媒介されると説明される。一部の局面において、CARは、このようなシグナル伝達成分の一方または両方を含む。

【 0 0 9 7 】

一部の局面において、CARは、TCR複合体の一次活性化を調節する一次細胞質シグナル伝達配列を含む。刺激するように働く一次細胞質シグナル伝達配列は、免疫受容体活性化チロシンモチーフまたはITAMとして知られるシグナル伝達モチーフを含有してもよい。ITAMを含有する一次細胞質シグナル伝達配列の例には、TCR、FcR、CD3、CD3、およびCD3に由来する一次細胞質シグナル伝達配列が含まれる。一部の態様において、CARにある細胞質シグナル伝達分子は、CD3に由来する細胞質シグナル伝達ドメイン、その一部、または配列を含有する。

【 0 0 9 8 】

一部の態様において、CARは、共刺激受容体、例えば、CD28、4-1BB、OX40、DAP10、およびICOSのシグナル伝達ドメインおよび/または膜貫通部分を含む。一部の局面において、同じCARが活性化成分と共刺激成分を両方とも含む。

【 0 0 9 9 】

一部の態様において、あるCARには活性化ドメインが含まれるのに対して、別の抗原を認識する別のCARによって共刺激成分が提供される。一部の態様において、CARは活性化CARまたは刺激CAR、共刺激CARを含み、両方とも同じ細胞上に発現される(WO2014/055668を参照されたい)。一部の局面において、前記細胞は、1種または複数種の刺激CARもしくは活性化CARおよび/または共刺激CARを含む。一部の態様において、前記細胞は、阻害CAR(iCAR、Fedorov et al., Sci. Transl. Medicine, 5(215)(December, 2013)を参照されたい)、例えば、疾患もしくは状態に関連するおよび/または疾患もしくは状態に特異的な抗原以外の抗原を認識するCARをさらに含み、ここで、疾患標的化CARを通じて送達された活性化シグナルは、例えば、オフターゲット効果を小さくするための阻害性CARとそのリガンドとの結合によって、減弱または阻害される。

【 0 1 0 0 】

一部の態様において、組換え受容体、例えば、CARの細胞内シグナル伝達成分は、CD3細胞内ドメインと共刺激シグナル伝達領域を含む。ある特定の態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3(例えば、CD3-)細胞内ドメインと連結した、CD28膜貫通ドメインおよびシグナル伝達ドメインを含む。一部の態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3細胞内ドメインと連結した、キメラCD28およびCD137(4-1BB、TNFRSF9)共刺激ドメインを含む。

【 0 1 0 1 】

一部の態様において、CARは、細胞質部分に、1種または複数種の、例えば、2種類以上の共刺激ドメインおよび活性化ドメイン、例えば、一次活性化ドメインを含む。例示的なCARには、CD3-、CD28、および4-1BBの細胞内成分が含まれる。

【 0 1 0 2 】

一部の態様において、CARまたは他の抗原受容体は、受容体、例えば、切断型バージョン

10

20

30

40

50

ンの細胞表面受容体、例えば、切断型EGFR(tEGFR)を発現させるための細胞の形質導入または操作を確認するために用いられ得るマーカー、例えば、細胞表面マーカーをさらに含む。一部の局面において、マーカーは、CD34、NGFR、または上皮増殖因子受容体の全てまたは一部(例えば、切断型)(例えば、tEGFR)を含む。一部の態様において、マーカーをコードする核酸は、リンカー配列、例えば、切断可能なリンカー配列、例えば、T2Aをコードするポリヌクレオチドに機能的に連結される。例えば、マーカー、任意で、リンカー配列は、公開された特許出願番号WO2014031687に開示されるような任意のものでよい。例えば、マーカーは、任意で、リンカー配列、例えば、T2A切断可能なリンカー配列に連結された切断型EGFR(tEGFR)でもよい。切断型EGFR(例えば、tEGFR)の例示的なポリペプチドは、SEQ ID NO:111に示したアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:111と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の、もしくはこれより多い配列同一性を示すアミノ酸配列を含む。例示的なT2Aリンカー配列は、SEQ ID NO:110に示したアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:110と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の、もしくはこれより多い配列同一性を示すアミノ酸配列を含む。

#### 【0103】

一部の態様において、マーカーは、T細胞上に天然で見出されないか、もしくはT細胞の表面に天然で見出されない分子、例えば、細胞表面タンパク質、またはその一部である。

#### 【0104】

一部の態様において、前記分子は、非自己分子、例えば、非自己タンパク質、すなわち、前記細胞が養子移入される宿主の免疫系が「自己」と認識しない分子である。

#### 【0105】

一部の態様において、マーカーは治療機能を果たさない、および/または遺伝子操作するための、例えば、首尾良く操作された細胞を選択するためのマーカーとして使用する以外の効果を生じない。他の態様において、マーカーは治療用分子でもよく、何らかの望ましい効果を別の方法で発揮する分子、例えば、細胞がインビボで遭遇するリガンド、例えば、養子移入時に前記細胞の応答を強める、および/または弱めるための、ならびにリガンドに遭遇するための共刺激分子または免疫チェックポイント分子でもよい。

#### 【0106】

場合によっては、CARは、第一世代CAR、第二世代CAR、および/または第三世代CARと呼ばれる。一部の局面において、第一世代CARは、抗原が結合した時に、CD3鎖によって誘導されるシグナルしか生じないCARである。一部の局面において、第二世代CARは、このようなシグナルと共刺激シグナルを生じるCAR、例えば、CD28またはCD137などの共刺激受容体由来する細胞内シグナル伝達ドメインを含むCARである。一部の局面において、第三世代CARは、異なる共刺激受容体の複数の共刺激ドメインを含むCARである。

#### 【0107】

一部の態様において、キメラ抗原受容体は、抗体または抗体断片を含有する細胞外部分を含む。一部の局面において、キメラ抗原受容体は、抗体または断片を含有する細胞外部分と、細胞内シグナル伝達ドメインを含む。一部の態様において、抗体または断片はscFvを含み、細胞内ドメインはITAMを含有する。一部の局面において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3-ゼータ(CD3 )鎖の 鎖のシグナル伝達ドメインを含む。一部の態様において、キメラ抗原受容体は、細胞外ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインを連結する膜貫通ドメインを含む。一部の局面において、膜貫通ドメインはCD28の膜貫通部分を含む。一部の態様において、受容体、例えば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バリエーション、例えば、ヒトCD28の27アミノ酸膜貫通ドメイン(アクセッション番号:P10747.1)である。一部の態様において、キメラ抗原受容体はT細胞共刺激分子の細胞内ドメインを含有する。細胞外ドメインおよび膜貫通ドメインは直接的または間接的に連結することができる。一部の態様において、細胞外ドメインおよび膜貫通は、スペーサー、例えば、本明細書に記載の任意のスペーサーによって連結される

10

20

30

40

50

。一部の態様において、前記受容体は、膜貫通ドメインが得られた分子の細胞外部分、例えば、CD28細胞外部分を含有する。一部の態様において、キメラ抗原受容体は、例えば、膜貫通ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインとの間に、T細胞共刺激分子に由来する細胞内ドメインまたはその機能的バリエーションを含有する。一部の局面において、T細胞共刺激分子はCD28または41BBである。

【0108】

例えば、一部の態様において、CARは、抗体、例えば、抗体断片と、CD28の膜貫通部分もしくはその機能的バリエーションであるか、またはそれを含有する膜貫通ドメインと、CD28のシグナル伝達部分またはその機能的バリエーションおよびCD3のシグナル伝達部分またはその機能的バリエーションを含有する細胞内シグナル伝達ドメインを含有する。一部の態様において、CARは、抗体、例えば、抗体断片と、CD28の膜貫通部分もしくはその機能的バリエーションであるか、またはそれを含有する膜貫通ドメインと、4-1BBのシグナル伝達部分またはその機能的バリエーションおよびCD3のシグナル伝達部分またはその機能的バリエーションを含有する細胞内シグナル伝達ドメインを含有する。このような一部の態様において、前記受容体は、Ig分子、例えば、ヒトIg分子の一部、例えば、Igヒンジ、例えば、IgG4ヒンジを含有するスペーサー、例えば、ヒンジのみのスペーサーをさらに含む。

【0109】

一部の態様において、組換え受容体、例えば、CARの膜貫通ドメインは、ヒトCD28の膜貫通ドメイン(例えば、アクセッション番号P01747.1)またはそのバリエーション、例えば、SEQ ID NO:2に示したアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:2と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の、もしくはこれより多い配列同一性を示すアミノ酸配列を含む膜貫通ドメインであるか、あるいはこれを含む。一部の態様において、組換え受容体の一部を含有する膜貫通ドメインは、SEQ ID NO:104に示したアミノ酸配列、あるいはSEQ ID NO:104と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはこれより多い配列同一性、または少なくとも約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%、もしくはこれより多い配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0110】

一部の態様において、キメラ抗原受容体は、T細胞共刺激分子の細胞内ドメインを含む。一部の局面において、T細胞共刺激分子はCD28または41BBである。

【0111】

一部の態様において、組換え受容体、例えば、CARの細胞内シグナル伝達成分は、ヒトCD28の細胞内共刺激シグナル伝達ドメインまたはその機能的バリエーションもしくは部分、例えば、ネイティブCD28タンパク質の位置186-187においてLL GG置換のあるドメインを含有する。例えば、細胞内シグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO:112もしくは113に示したアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:112もしくは113と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の、もしくはこれより多い配列同一性を示すアミノ酸配列を含んでもよい。一部の態様において、細胞内ドメインは、4-1BBの細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン(例えば、(アクセッション番号Q07011.1)またはその機能的バリエーションもしくは部分、例えば、SEQ ID NO:3に示したアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:3と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の、もしくはこれより多い配列同一性を示すアミノ酸配列を含む。

【0112】

一部の態様において、組換え受容体、例えば、CARの細胞内シグナル伝達ドメインは、ヒトCD3刺激シグナル伝達ドメインまたはその機能的バリエーション、例えば、ヒトCD3のアイソフォーム3の112 AA細胞質ドメイン(アクセッション番号: P20963.2)、または米国特許第7,446,190号もしくは米国特許第8,911,993号に記載のCD3シグナル伝達

10

20

30

40

50

ドメインを含む。例えば、一部の態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO:4、105、もしくは159に示したアミノ酸配列、またはSEQ ID NO:4、105、もしくは159と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の、もしくはこれより多い配列同一性を示すアミノ酸配列を含む。

#### 【0113】

一部の局面において、スパーサーは、IgGのヒンジ領域しか含有せず、例えば、IgG4またはIgG1のヒンジ領域しか含有せず、例えば、SEQ ID NO:1に示した、ヒンジだけのスパーサーである。他の態様において、スパーサーは、任意で、CH2ドメインおよび/またはCH3ドメインに連結された、Igヒンジ、例えば、IgG4由来ヒンジであるか、これを含有する。一部の態様において、スパーサーは、例えば、SEQ ID NO:108に示した、CH2ドメインおよびCH3ドメインに連結されたIgヒンジ、例えば、IgG4ヒンジである。一部の態様において、スパーサーは、例えば、SEQ ID NO:107に示した、CH3ドメインだけに連結されたIgヒンジ、例えば、IgG4ヒンジである。一部の態様において、スパーサーは、グリシン-セリンリッチ配列もしくは他の可動性リンカー、例えば、公知の可動性リンカーであるか、またはこれを含む。

#### 【0114】

例えば、一部の態様において、CARは、抗体、例えば、scFvを含む、抗体断片と、スパーサー、例えば、免疫グロブリン分子の一部、例えば、重鎖分子のヒンジ領域および/または1つもしくは複数の定常領域を含有するスパーサー、例えば、Ig-ヒンジ含有スパーサーと、CD28由来膜貫通ドメインの全てまたは一部を含有する膜貫通ドメインと、CD28由来細胞内シグナル伝達ドメインと、CD3 シグナル伝達ドメインを含む。一部の態様において、CARは、抗原、例えば本明細書に記載の抗原に特異的に結合する、細胞外リガンド結合部分、例えば抗原結合部分、例えば抗体またはその断片、例えばsdAbおよびscFvと；スパーサー、例えば、任意のIg-ヒンジ含有スパーサーと；CD28の一部である膜貫通ドメインまたはそのバリエーションと；4-1BBのシグナル伝達部分を含む細胞内シグナル伝達ドメインまたはその機能的バリエーションと；CD3 シグナル伝達ドメインのシグナル伝達部分またはその機能的バリエーションとを含む。

#### 【0115】

いくつかの態様において、そのようなCAR構築物をコードする核酸分子は、例えば、CARをコードする配列の下流に、T2Aリボソームスキップ要素をコードする配列および/またはtEGFR配列をさらに含む。いくつかの態様において、配列は、それぞれSEQ ID NO:110および/もしくは111に示された、T2Aリボソームスキップ要素および/もしくはtEGFR配列、またはSEQ ID NO:110および/もしくは111に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸の配列をコードする。いくつかの態様において、抗原受容体（例えば、CAR）を発現するT細胞は、（例えば、同一の構築物から2種のタンパク質を発現させるため、T2Aリボソームスイッチによって分離されたCARおよびEGFRtをコードする構築物の導入によって）非免疫原性選択エピトープとしての短縮EGFR（EGFRt）を発現するように生成されてもよい。次いで、それは、そのような細胞を検出するためのマーカーとして使用され得る（例えば、米国特許第8,802,374号を参照すること）。

#### 【0116】

### 2. キメラ受容体の例示的な修飾

いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、記載されたような参照キメラ受容体のジャンクション領域における1個または複数個の修飾（例えば、挿入、欠失、または置換）を含有している修飾されたジャンクション領域を含有しており、参照キメラ受容体は、ジャンクションにおいて連続した順序で接合された、細胞外リガンド結合ドメインもしくはその一部であるかまたはそれを含む第1のドメインと、ヒンジドメインもしくはその一部であるかまたはそれを含む第2のドメインとを含有している。

## 【0117】

いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、記載されたような参照キメラ受容体のジャンクション領域における1個または複数個の修飾（例えば、挿入、欠失、または置換）を含有している修飾されたジャンクション領域を含有しており、参照キメラ受容体は、ジャンクションにおいて連続した順序で接合された、ヒンジドメインもしくはその一部であるかまたはそれを含む第1のドメインと、膜貫通ドメインもしくはその一部であるかまたはそれを含む第2のドメインとを含有している。

## 【0118】

いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、記載されたような参照キメラ受容体のジャンクション領域における1個または複数個の修飾（例えば、挿入、欠失、または置換）を含有している修飾されたジャンクション領域を含有しており、参照キメラ受容体は、ジャンクションにおいて連続した順序で接合された、膜貫通ドメインもしくはその一部であるかまたはそれを含む第1のドメインと、共刺激シグナル伝達ドメインもしくはその一部であるかまたはそれを含む第2のドメインとを含有している。

10

## 【0119】

いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、記載されたような参照キメラ受容体のジャンクション領域における1個または複数個の修飾（例えば、挿入、欠失、または置換）を含有している修飾されたジャンクション領域を含有しており、参照キメラ受容体は、ジャンクションにおいて連続した順序で接合された、共刺激シグナル伝達ドメインもしくはその一部であるかまたはそれを含む第1のドメインと、活性化細胞質シグナル伝達ドメインもしくはその一部であるかまたはそれを含む第2のドメインとを含有している。

20

## 【0120】

いくつかの態様において、参照キメラ受容体の第1のドメインは、膜貫通ドメインまたはその一部であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、膜貫通ドメインには、T細胞受容体の鎖、鎖、もしくは鎖、CD28、CD3、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154に由来する（即ち、それらの膜貫通領域を少なくとも含む）もの、および/またはそれらの構造的特性、例えば、膜貫通特性を有する実質的な部分を保持するもののような、それらの機能性バリエーションを含有している膜貫通領域が含まれる。いくつかの態様において、膜貫通ドメインは、CD4、CD28、もしくはCD8、例えば、CD8に由来する膜貫通ドメイン、またはそれらの機能性バリエーションである。いくつかの態様において、膜貫通ドメインは、ヒトタンパク質に由来するかまたはヒトである。いくつかの態様において、参照キメラ受容体の第2のドメインは、膜貫通ドメインに直接連結されているかもしくは接合されている共刺激シグナル伝達ドメインであるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、共刺激シグナル伝達ドメインは、CD28、4-1BB、OX40、DAP10、およびICOSのシグナル伝達ドメインであるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、共刺激ドメインは、ヒトタンパク質に由来するかまたはヒトである。

30

## 【0121】

いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、記載されたような参照キメラ受容体のジャンクション領域における1個または複数個の修飾（例えば、挿入、欠失、または置換）を含有している修飾されたジャンクション領域を含有しており、参照キメラ受容体は、ジャンクションにおいて連続した順序で接合された、CD28膜貫通ドメインもしくはその一部であるかまたはそれを含む第1のドメインと、4-1BB共刺激シグナル伝達ドメインもしくはその一部であるかまたはそれを含む第2のドメインとを含有している。いくつかの態様において、CD28膜貫通ドメインは、SEQ ID NO:2、103、もしくは104に示されたアミノ酸の配列であるかもしくはそれを含むか、またはSEQ ID NO:2、103、もしくは104に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはそれ以上の配列同一性を示す配列を含むそれらの機能性部分もしくはバリエーションである。いくつかの態様において、4-1BBシグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO:3に示されたアミノ酸の配列、またはSEQ ID

40

50

NO:3に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはそれ以上の配列同一性を示す配列を含むそれらの機能性部分もしくはバリエーションであるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、第1のドメインおよび第2のドメインは、共に、SEQ ID NO:5に示されたアミノ酸の配列、またはSEQ ID NO:5に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくはそれ以上の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含むそれらの機能性部分もしくはバリエーションを含むかまたは有する。いくつかの態様において、参照キメラ受容体の第1のドメインおよび第2のドメインは、共に、SEQ ID NO:5に示されたアミノ酸の配列を有するかまたは含む。

10

#### 【0122】

いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、SEQ ID NO:137に対して配列の同一性が100%より小さいがSEQ ID NO:137に対して85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、または96%より大きい同一性を有し、かつ、記載された任意のもののような修飾を含む、修飾されたジャンクション領域を含む。いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、SEQ ID NO:5に対して100%より小さい配列同一性を有するがSEQ ID NO:5に対して85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、または96%より大きい同一性を有し、かつ、記載された任意のもののような修飾を含む、アミノ酸の配列を有するかまたは含む。いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、SEQ ID NO:160に対して100%より小さい配列同一性を有するがSEQ ID NO:160に対して85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、または96%より大きい同一性を有し、かつ、記載された任意のもののような修飾を含む、アミノ酸の配列を有するかまたは含む。いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、各々記載された任意のもののような修飾を含む、SEQ ID NO:138~157および184のいずれかに示されたアミノ酸の配列、SEQ ID NO:138~157および184のいずれかに示されたアミノ酸の配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、もしくは96%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含むそれらの機能性バリエーション、またはそれらの機能性部分を有するかまたは含む。

20

#### 【0123】

いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、CD28膜貫通ドメインのような膜貫通ドメインにおいて、疎水性アミノ酸残基における修飾もしくは疎水性アミノ酸残基の修飾、または疎水性部分の中の修飾を含有していない。いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、CD28膜貫通ドメインのような膜貫通ドメインにおいて、疎水性アミノ酸残基における修飾もしくは疎水性アミノ酸残基の修飾、または疎水性部分の中の修飾を1個または複数個含有している。いくつかの態様において、1個または複数個の修飾は、疎水性アミノ酸のもう一つの異なる疎水性アミノ酸残基への置換であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、1個または複数個の修飾は、もう一つの疎水性アミノ酸残基への置換以外の、膜貫通ドメインにおける、疎水性アミノ酸残基における修飾もしくは疎水性アミノ酸残基の修飾、もしくは疎水性部分の中の修飾ではなく、それを含むこともない。

30

#### 【0124】

いくつかの場合において、膜貫通ドメインは、膜の脂質二重層と相互作用する1個または複数個のトリプトファン残基を含有している。いくつかのケースにおいて、1個または複数個のトリプトファン残基は、脂質水界面の近くに位置してよい。いくつかのケースにおいて、1個または複数個のトリプトファン残基は、膜貫通ドメインを膜内にアンカリングするかまたはそのアンカリングを支援する。例えば、de Jesus and Allen, *Biochim Biophys Acta*.2013 Feb;1828(2):864-76を参照すること。いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、CD28膜貫通ドメインのような膜貫通ドメインにおいてトリプトファン残基の一方または両方に修飾を含有していない。いくつかの態様において

40

50

、キメラ受容体は、各々、参照キメラ受容体におけるトリプトファンに相当する、SEQ ID NO:5のナンバリングで2位および/または26位に相当するアミノ酸位置に、修飾を含有していない。

#### 【0125】

いくつかの局面では、キメラ受容体またはその一部の疎水性を評価する。いくつかの態様では、GRAVY (ハイドロパシーの全体平均) などのプログラムを使って、キメラ受容体 (例えばバリエーションキメラ受容体) またはその一部分の全体的疎水性 (global hydrophobicity) を評価する。いくつかの態様では、ExPASy (スイス) から入手できるプログラムなどのプログラムを使って、キメラ受容体またはその一部分について、全体的疎水性スコアが決定される。いくつかの局面において、キメラ受容体は、膜貫通ドメインの全体的性質が疎水性であることを示す疎水性スコアを有しうる膜貫通ドメインを含む。いくつかの局面において、キメラ受容体は、膜貫通ドメイン以外の1つまたは複数のドメインが全体として疎水性であることを示す疎水性スコアを有しうる膜貫通ドメイン以外の1つまたは複数のドメインを含む。いくつかの局面では、所与のタンパク質配列 (例えばキメラ受容体またはその一部分) の個々のアミノ酸残基の疎水性が、ある疎水性尺度に基づいて算出される。例示的なアミノ酸疎水性尺度には、Kyte and Doolittle (1982)、Engelman et al. (1986)、Nozaki and Tanford (1971)、Miyazawa and Jernigan (1996)、Miyazawa and Jernigan (1999)、およびBlack and Mould (1991) によって計算され、かつ/または報告されたものがあるが、それらに限定されるわけではない。いくつかの態様において、疎水性尺度は、親水性の残基またはペプチドには0未満のスコアが与えられ、疎水性の残基またはペプチドには0を上回るスコアが与えられるように、報告または規格化される。したがっていくつかの局面において、膜貫通ドメインは、0を上回る全体的疎水性スコアを有しうるか、または0を上回る疎水性スコアを持つ個別残基で構成されうる。いくつかの態様において、残基、ペプチド、キメラ受容体、またはその部分への突然変異または修飾は、修飾されていない残基またはペプチドの疎水性スコアに関して、保存的である。

#### 【0126】

いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体またはその一部分、例えば修飾されたジャンクション領域を含有しかつ/または参照キメラ受容体の膜貫通ドメインに対応するバリエーションキメラ受容体中のドメインを含有する部分は、実質的に疎水性のハイドロパシープロファイルを有し、かつ/または正のGRAVY (ハイドロパシーの全体平均) 値を有する。いくつかの態様において、GRAVY値は、0、0.25、0.5、0.75、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2またはそれ以上より大きい。

#### 【0127】

いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、4-1BBシグナル伝達に関与するかまたはそのために必要なアミノ酸残基における修飾またはそれらのアミノ酸残基の修飾のような、共刺激シグナル伝達ドメインのシグナル伝達に関与するかまたはそのために必要なアミノ酸残基における修飾またはそれらのアミノ酸残基の修飾を含有していない。一般に、共刺激シグナル伝達は、TRAF分子との相互作用を含む。いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、TRAF分子と相互作用するか、またはTRAF分子との結合のための結合モチーフの一部であるアミノ酸残基における修飾またはそれらのアミノ酸残基の修飾を含有していない。いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、モチーフ(P/S/A/T)X(Q/E)Eを含む参照キメラ受容体の共刺激シグナル伝達ドメインのアミノ酸残基における修飾またはそれらのアミノ酸残基の修飾を含有していない。いくつかの態様において、TRAF分子は、TRAF1、TRAF2、および/またはTRAF3である。いくつかの態様において、参照キメラ受容体の共刺激シグナル伝達ドメインに相当するバリエーションキメラ受容体のドメインは、TRAFの活性化または細胞局在を誘導することができ、かつ/またはTRAFによって媒介されるシグナル伝達を誘導することができる。いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、各々SEQ ID NO:5に示されたナンバリングで49~52に相当する位置にアミノ酸TTQEを含有し、かつ/または残基60~63に相当する位置にア

ミノ酸PEEEを含有している。

【0128】

いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、SEQ ID NO:5に示されたナンバリングで残基13～42またはアミノ酸残基15～40の部分の中に1個または複数個のアミノ酸修飾を含有している。

【0129】

いくつかの態様において、修飾は、1個もしくは複数個のアミノ酸残基の挿入であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、1個または複数個の挿入は、ドメイン間のジャンクションに隣接しているアミノ酸残基の間になされる。いくつかの態様において、1個または複数個のアミノ酸挿入は、SEQ ID NO:5に示されたナンバリングでアミノ酸残基27と28との間になされる。いくつかの態様において、1個または複数個の挿入は、最大1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、または15個のアミノ酸残基の挿入を含んでいてよい。いくつかの態様において、挿入は、1個、2個、3個、4個、または5個のアミノ酸残基の挿入である。いくつかの態様において、挿入は、任意のアミノ酸残基になされる。いくつかの態様において、挿入は、アスパラギン(N)の挿入である。

【0130】

いくつかの態様において、修飾は、SEQ ID NO:5に示されたナンバリングで残基28、31、もしくは34に相当する残基における1個もしくは複数個のアミノ酸置換であるかまたはそれを含む。いくつかの態様において、アミノ酸置換は、任意の他のアミノ酸へのものであってよい。いくつかの態様において、アミノ酸置換は、ロイシン(L)、アスパラギン(N)、グルタミン(Q)、アラニン(A)、セリン(S)、またはヒスチジン(H)であるアミノ酸残基へのものである。いくつかの態様において、アミノ酸置換は、SEQ ID NO:5に示されたナンバリングでK28A、K28H、K28L、K28Q、K28S、R31A、R31H、R31L、R31N、R31S、L34A、およびL34Sのうちの1個もしくは複数個であるかまたはそれに相当する。

【0131】

いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、参照キメラ受容体のジャンクション領域と比較して、2個以上、例えば、最大2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、またはそれ以上のアミノ酸修飾を有する修飾されたジャンクション領域を含有している。いくつかの態様において、アミノ酸修飾は、SEQ ID NO:5に示されたナンバリングでK28A、K28H、K28L、K28Q、K28S、R31A、R31H、R31L、R31N、R31S、L34A、およびL34Sのうちの2個もしくはそれ以上に相当するアミノ酸置換を含む。いくつかの態様において、アミノ酸置換は、K28Q/R31A、K28Q/R31N、K28Q/R31S、K28Q/L34A、K28Q/L34S、R31N/L34A、R31N/L34S、K28Q/R31N/L34A、K28Q/R31N/L34Sの中から選択されるアミノ酸置換であるかまたはそれに相当する。

【0132】

いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、各々修飾を含む、SEQ ID NO:138～157および184のいずれかに示されたアミノ酸の配列を有する修飾されたジャンクション領域、または、SEQ ID NO:138～157および184のいずれかに示されたアミノ酸の配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、もしくは96%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含むそれらの機能性バリエーション、もしくはそれらの機能性部分を有するかまたは含む。

【0133】

いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、各々修飾を含む、SEQ ID NO:114～134および183のいずれかに示されたアミノ酸の配列、SEQ ID NO:114～134および183のいずれかに示されたアミノ酸の配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、もしくは96%の配列同一性を示すアミノ酸の配列を含むそれらの機能性バリエーション、もしくはそれらの機能性部分を有するかまたは含む。

10

20

30

40

50



## 【0134】

## 3. バリエーションキメラ受容体の特徴

いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、そのような領域のもしくはそのような領域に由来するペプチド断片が、ヒト白血球抗原（HLA）に対してより低い結合親和性を示し、かつ/または該領域が、例えば、対象への投与の後、低下した免疫原性を示すような、修飾されたジャンクション領域を含有している。

## 【0135】

いくつかの態様において、修飾されたジャンクション領域の8～15アミノ酸部分の配列を有するペプチド断片は、参照キメラ受容体のジャンクション領域の相当する部分の配列を有するペプチド断片の、同じヒト白血球抗原（HLA）分子に対する結合親和性より低い、HLA分子に対する結合親和性を有する。いくつかの態様において、参照キメラ受容体のジャンクション領域の相当する部分のペプチド断片は、1000nM未満、500nM未満、または50nM未満の結合親和性を有する。

10

## 【0136】

いくつかの態様において、修飾されたジャンクション領域の中の全ての8～15アミノ酸断片、または全ての8、9、10、11、12、13、14、もしくは15アミノ酸断片の、ヒトHLA分子に対する結合親和性の平均は、参照キメラ受容体のジャンクション領域の中の全ての8～15アミノ酸断片、または全ての8、9、10、11、12、13、14、もしくは15アミノ酸断片の結合親和性の平均より低い。いくつかの態様において、結合親和性または結合親和性の平均は、2分の1未満、5分の1未満、10分の1未満、25分の1未満、50分の1未満、または100分の1未満低い。

20

## 【0137】

いくつかの態様において、1000nM未満のヒト白血球抗原（HLA）に対する結合親和性を有する修飾されたジャンクション領域の8～15アミノ酸部分の配列を有するペプチド断片の数は、同一のHLAとの結合について同一の親和性を有する参照キメラ受容体のジャンクション領域の8～15アミノ酸部分の配列を有するペプチド断片の数と比較して、低下している。いくつかの態様において、500nM未満のヒト白血球抗原（HLA）に対する結合親和性を有する修飾されたジャンクション領域の8～15アミノ酸部分の配列を有するペプチド断片の数は、同一のHLAとの結合について同一の親和性を有する参照キメラ受容体のジャンクション領域の8～15アミノ酸部分の配列を有するペプチド断片の数と比較して、低下している。いくつかの態様において、50nM未満のヒト白血球抗原（HLA）に対する結合親和性を有する修飾されたジャンクション領域の8～15アミノ酸部分の配列を有するペプチド断片の数は、同一のHLAとの結合について同一の親和性を有する参照キメラ受容体のジャンクション領域の8～15アミノ酸部分の配列を有するペプチド断片の数と比較して、低下している。

30

## 【0138】

いくつかの態様において、結合親和性は、実験またはアルゴリズムによって決定され得る。いくつかの態様において、MHCに対するペプチドの結合親和性は、計算によって、例えば、定量的結合親和性モデルに基づくアルゴリズム（Lafuente and Reche(2009) *Current Pharmaceutical Design*, 15:3209-3220）を使用することによって、決定され得る。いくつかの態様において、結合親和性は、インビトロアッセイにおいて決定され得る。

40

## 【0139】

いくつかの態様において、MHC分子に対するペプチドの結合親和性の決定は、放射能または蛍光による競合結合アッセイを含む。例えば、Ettinger et al., *J. Immunol.* 160:2365(1998)を参照すること。いくつかの態様において、競合アッセイは、異なるペプチドの結合親和性の比較を与える。いくつかのMHC結合研究は、EBVによって形質転換された細胞株に由来する界面活性剤によって可溶化されたクラスI分子を利用している（例えば、Sette, A., et al., *Mol Immunol*, 31(11):813-22(1994)を参照すること）。いくつかの態様において、競合アッセイは、天然に負荷されたMHCを含み、関心対象のMHC分子は、界面活性剤による溶解物の中の他のMHC分子から精製されてもよいし、または他のMHC分

50

子との混合物として使用されてもよい。いくつかの態様において、当該MHC分子に対する高い親和性を有する放射標識ペプチドを同定することができる。いくつかの態様において、次いで、高親和性放射標識ペプチドと競合する能力によって、当該MHC分子に対する付加的な「試験」ペプチドの親和性を決定する。

#### 【0140】

いくつかの態様において、ペプチドの親和性の決定は、pH2~3で短期間インキュベートすることによって、適切なMHC対立遺伝子を発現する細胞からネイティブ結合ペプチドを「取り除く(stripped)」、例えば、「T2」細胞を使用した、再構成アッセイを含んでいてもよい。いくつかの態様において、同一のMHC対立遺伝子に対する推定MHC結合ペプチドの結合親和性を決定するため、取り除かれたMHCモノマーを、溶液中で、推定MHC結合ペプチド、 $\gamma$ 2ミクログロブリン、およびコンフォメーション依存性モノクローナル抗体と合わせることができる。いくつかの態様において、例えば、標識されたモノクローナルまたは蛍光標識された二次抗体のいずれかによって直接標識した後、試験結合ペプチドと共にインキュベートされた細胞と、試験結合ペプチドなしでインキュベートされた細胞との間の決定された蛍光強度の違いを、試験ペプチドの結合を決定するために使用することができる。

10

#### 【0141】

いくつかの態様において、MHC(例えば、HLA)分子に対する結合親和性は、参照ペプチドの結合の50%の障害が観察される結合アッセイにおけるペプチドの濃度である、IC50によって表される。いくつかのケースにおいて、そのようなアッセイは、IC50値がK<sub>D</sub>値に近似する条件(即ち、HLAタンパク質および標識されたペプチドの限界濃度)において実行され得る。いくつかの態様において、結合は、参照ペプチドに対して相対的に表され得る。

20

#### 【0142】

いくつかの態様において、結合親和性はインシリコの方法を使用して予測され得る。アルゴリズムまたはその他の計算の方法を使用してMHC結合についての結合親和性を予測するための例示的なインシリコの方法は、当技術分野において公知である(例えば、Marsh, et al., The HLA Factsbook(Academic Press, 2000)を参照すること)。いくつかの態様において、アルゴリズムは、関心対象のペプチドが所定のMHC分子に結合するか否かを予測するために使用され得る。例えば、Southwood, et al., J. Immunol. 160:3363(1998); Honeyman, et al., Nat. Biotechnol. 16:966-969(1998); Breisie, et al., Bioinformatics 14:121-131(1998)、および「SYFPEITHI」アルゴリズム(Hans-Georg Rammensee, et al., Immunogenetics(1999)50:213-219)、Zhang et al., PLoS ONE 7(2):e30483.doi:10.1371/journal.pone.0030483, the Immune Epitope and Analysis Resource(IEDB)(Peters B, et al. PLoS Biology 3:379(2005))、および「BIMAS」アルゴリズム(Parker, K.C., M.A. Bednarek, and J.E. Coligan. J. Immunol. 152:163(1994))を参照すること。

30

#### 【0143】

いくつかの態様において、IEDBから入手可能なものを含むアルゴリズム予測ツールは、ANN(Nielsen et al.(2003)Protein Sci., 12:1007-1017およびLundegaard et al.(2008)NAR, 36:W509-512)、SMM(Peters and Sette(2005)BMC Bioinformatics, 6:132)、およびcomblib(Sidney et al.(2008)Immuno Res. 4:2)、またはコンセンサスツール(Kim, et al.(2012)Immune epitope database analysis resource, NARを参照すること。上記のいずれかからの予測を組み合わせる)を使用した1種または複数種の予測を使用する。

40

#### 【0144】

いくつかの態様において、抗原プロセッシングの予測は、プロテアソーム切断についてのアルゴリズム(PaProC)を使用して達成され得る。Kuttler et al., J. Mol. Biol. 298(2000), 417-429およびNussbaum et al., Immunogenetics 53(2001), 87-94を参照すること。

50

## 【 0 1 4 5 】

いくつかの態様において、キメラ受容体（例えばCAR）、例えばバリエーションキメラ受容体（例えばバリエーションCAR）は、その分子に対する検出可能な免疫応答が対象への投与に続いて誘導されるかどうかを決定するために、評価することができる。いくつかの態様において、対象は、例えばキメラ受容体またはCARで遺伝子操作された細胞を投与することなどにより、CARなどのキメラ受容体で処置することができる。体液性または細胞媒介性のヒト応答の存在を評価することができる。いくつかの態様において、キメラ受容体（例えばCAR）のエピトープに特異的に結合しかつ/またはそれを中和する抗体の存在は、対象からの血清での、ELISpot、細胞内サイトカイン染色、ELISA（例えばサイトカイン用）、または細胞ベースの検出方法、例えばフローサイトメトリーによるものなどの方法によって同定することができる。いくつかの態様において、操作された細胞上で発現するキメラ受容体などのキメラ受容体に対する細胞媒介性免疫応答は、キメラ受容体を発現する細胞（例えば照射細胞）を刺激細胞として使用し、特異的に結合して細胞傷害性および/または混合リンパ球反応を誘導するCD8+ T細胞を検出するための細胞傷害性Tリンパ球（CTL）アッセイを使って、評価することができる。

10

## 【 0 1 4 6 】

いくつかの態様において、免疫応答は、キメラ受容体（例えばCAR）を投与された対象から単離された免疫細胞（例えばPBMC）を、オーバーラップしていて特定抗原の全長にわたるペプチドの合成ライブラリーで刺激することにより、インビトロアッセイで評価することができる。刺激された細胞における免疫応答は、限定するわけではないがELISpot、細胞内サイトカイン染色、細胞傷害性Tリンパ球アッセイおよび/または混合リンパ球反応などを含む方法を使って、評価することができる。いくつかの態様において、T細胞活性化は、T細胞増殖によって（例えば3H-チミジン取り込みを使って）、またはサイトカイン生産によって、測定される。TH1タイプのCD4+ T細胞活性化は、例えばIFN $\gamma$  生産によって検出することができ、IFN $\gamma$  生産は、ELISPOTアッセイなどの標準的技法によって検出することができる。

20

## 【 0 1 4 7 】

いくつかの態様では、酵素連結免疫スポット（ELISpot）アッセイを使用して、キメラ受容体に対する免疫応答を評価することができる。いくつかの局面において、ELISpotは、サイトカインまたはエフェクター分子に特異的なモノクローナル抗体をマイクロプレートに取り付けることによって、特異的サイトカインまたは他のエフェクター分子を分泌する個別の細胞の検出に適合させることができる。抗原によって刺激された細胞を固定化抗体と接触させることができる。細胞および結合していない任意の物質を洗い流した後、同じサイトカインまたは他のエフェクター分子に特異的な、タグ付きのポリクローナル抗体、またはより多くの場合、モノクローナル抗体を、ウェルに加えることができる。洗浄に続いて、ブルーブラック色の沈殿物（すなわちスポット）がサイトカイン局在の部位に形成されるように、タグ付き抗体に結合する着色剤を加えることができる。応答を定量化するために、スポットを手作業で、または自動ELISpotリーダーシステムで、カウントする。

30

## 【 0 1 4 8 】

いくつかの態様では、キメラ受容体に対する免疫応答を評価するために、CD8+ T細胞媒介性細胞傷害活性を使用することができる。いくつかの態様では、抗原で刺激された細胞（例えば脾細胞）を、 $^{51}\text{Cr}$ 標識細胞に対する細胞傷害性について、クロム放出アッセイによって分析することができる。このアッセイは、キラー細胞活性の結果として起こる細胞からの（生物学的）放射性クロムの放出を測定することができる。細胞は、インビトロで、抗原、例えばキメラ受容体で遺伝子操作された細胞（例えばCAR発現細胞）、例えばT細胞、ペプチド負荷T細胞および/または非形質導入（「モック」）T細胞（ターゲット）により、さまざまなエフェクター対ターゲット（E/T）比で、再刺激することができる。共インキュベーションに続いて、クロムの放出を定量し、各試料における最大達成可能溶解に対する百分率を決定することができる。特異的な細胞溶解活性が検出されない条件は

40

50

、寛容原性ペプチドとの共投与に続いて、キメラ受容体に対する特異的免疫応答が発生しなかったことを示す。この結果は、キメラ受容体に対する免疫原寛容 (immunogenic tolerance) を誘導することができる条件下での特異的ペプチドの投与に関する潜在的ヒットを示しうる。

#### 【0149】

いくつかの態様では、例えば寛容原性ペプチドとの共投与の存在下または非存在下での、キメラ受容体に対する免疫応答を評価するために、細胞内サイトカイン染色が使用される。脾細胞などの免疫細胞をマウスから単離し、CD8およびCD4の表面発現ならびに例えばIFNを含むサイトカインの細胞内発現を検出するために、抗体で染色することができる。T細胞がキメラ受容体に対する特異的免疫応答を生成しなかったことを細胞内サイトカイン染色が示す条件は、キメラ受容体に対する免疫原寛容を誘導することができる条件下での特異的ペプチドの投与に関する潜在的ヒットを示しうる。

#### 【0150】

いくつかの態様では、キメラ受容体に対する免疫応答を評価するために、クローナルシーケンシングが使用される。抗原に曝露したマウスまたは患者から単離されたT細胞のT細胞受容体を配列決定することができる (Arstila et al. (1999) Science 286, 958-961、WO 2012/083069を参照されたい)。クローナルTCR増大の不在は、T細胞がキメラ受容体に対する特異的免疫応答を生成させなかったことを示す。これは、キメラ受容体に対する免疫原寛容を誘導することができる条件下での特異的ペプチドの投与に関する潜在的ヒットを示しうる。

#### 【0151】

いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、参照キメラ受容体に対して生成する免疫応答と比較して低減した検出可能な免疫応答を呈する。いくつかの態様において、免疫応答は体液性免疫応答である。いくつかの態様において、免疫応答は細胞媒介性免疫応答である。いくつかの態様において、免疫応答は、1.2分の1未満、1.5分の1未満、2分の1未満、3分の1未満、4分の1未満、5分の1未満、6分の1未満、7分の1未満、8分の1未満、9分の1未満、10分の1未満、50分の1未満、100分の1未満、またはそれ未満に低減する。

#### 【0152】

いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体は、ヒト対象に投与されたときに、任意でその対象が参照キメラ受容体の投与を受けていた場合に、参照キメラ受容体 (例えば非修飾キメラ受容体または親キメラ受容体) と比較して、低減した免疫原性を呈する。いくつかの態様において、低減した免疫原性は、低減したCD4+ T細胞免疫応答および/または低減したCD8+ T細胞免疫応答を含む。いくつかの態様において、免疫原性は、1.2分の1未満、1.5分の1未満、2分の1未満、3分の1未満、4分の1未満、5分の1未満、6分の1未満、7分の1未満、8分の1未満、9分の1未満、10分の1未満、50分の1未満、100分の1未満、またはそれ未満に低減する。

#### 【0153】

いくつかの態様では、バリエーションキメラ受容体を発現する細胞の投与に続く対象におけるバリエーションキメラ受容体 (例えばCAR) 発現細胞の最大数、経時的なバリエーションキメラ受容体発現細胞数の曲線下面積 (AUC)、および/または検出可能なバリエーションキメラ受容体発現細胞の持続時間が、参照キメラ受容体を発現する細胞の投与を含む方法によって達成されるものと比較して大きい。いくつかの態様において、本方法は、対象の血液中に、少なくとも1マイクロリットルあたり10個または約10個のキメラ発現細胞、末梢血単核球 (PBMC) の総数の少なくとも50%、少なくとも、または少なくとも約、 $1 \times 10^5$  キメラ受容体発現細胞、またはDNA 1マイクログラムあたり少なくとも1,000、もしくは少なくとも2,000、もしくは少なくとも3,000、もしくは少なくとも4,000、もしくは少なくとも5,000コピーのCARコードDNAの、バリエーションキメラ受容体発現細胞の最大濃度または最大数をもたらす。いくつかの態様では、バリエーションキメラ受容体を発現する細胞の投与を開始した後、30日目、60日目、または90日目に、バリエーションキメラ受容体発現細胞

が、対象の血液または血清中に検出可能である。

【0154】

いくつかの態様において、参照キメラ受容体（アミノ酸の置換を含有しない非修飾キメラ受容体または親キメラ受容体）と比較して、バリエーションキメラ受容体は記載のとおり低減した免疫原性を呈するが、同時に、細胞傷害活性などの生物学的活性または生物学的機能も保っている。いくつかの態様において、細胞傷害活性などの生物学的活性は、抗原特異的に存在する。いくつかの態様において、バリエーションキメラ受容体の生物学的活性または機能的活性、例えば細胞傷害活性は、アミノ酸の置換を含有しない非修飾キメラ受容体または親キメラ受容体の生物学的活性または機能的活性（例えば細胞傷害活性）の少なくとも40%、50%、60%、70%、例えば典型的には、少なくとも75%、80%、85%、90%、95%である。

10

【0155】

いくつかの態様において、キメラ受容体の生物学的活性または機能的活性、例えば細胞傷害活性は、いくつかある公知の方法のいずれかを使って測定することができる。活性は、インビトロまたはインビボのいずれかで、評価または決定することができる。いくつかの態様では、細胞が対象（例えばヒト）に投与されると、活性を評価することができる。評価するパラメータには、操作されたもしくは天然のT細胞または他の免疫細胞の、抗原への、例えば、イメージングなどによるインビボでの、またはELISAもしくはフローサイトメトリーなどによるエクスピボでの、特異的結合が含まれる。一定の態様において、ターゲット細胞を破壊する操作された細胞の能力は、例えばKochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32 (7):689-702 (2009) およびHerman et al. J. Immunological Methods, 285 (1):25-40 (2004) に記載の細胞傷害性アッセイなど、当技術分野において公知の任意の適切な方法を使って測定することができる。一定の態様において、細胞の生物学的活性は、一定のサイトカイン、例えばCD107a、IFN $\gamma$ 、IL-2、およびTNFの発現および/または分泌をアッセイすることによって測定することもできる。いくつかの局面において、生物学的活性は、腫瘍量または腫瘍負荷量の低減などといった臨床アウトカムを評価することによって測定される。

20

【0156】

III. 核酸、ベクターおよび操作された細胞

遺伝子操作細胞を生産するための方法、核酸、組成物、およびキットが提供される。遺伝子操作は一般に、培養細胞を含有する組成物への、例えばレトロウイルス形質導入、トランスフェクション、または形質転換による、キメラ受容体をコードする核酸の導入を伴う。

30

【0157】

いくつかの態様において、核酸分子は、組換え受容体、例えばキメラ受容体、例えば上述したもののいずれかをコードする。そのような核酸分子を含有するベクターまたはコンストラクトも提供される。いくつかの態様において、ベクターまたはコンストラクトは、受容体をコードするヌクレオチドの発現を駆動するために、受容体をコードするヌクレオチドに機能的に連結された1つまたは複数のプロモーターを含有する。いくつかの態様において、プロモーターは、1つまたは2つ以上の核酸分子に機能的に連結される。

40

【0158】

いくつかの態様において、ベクターまたはコンストラクトは、1つまたは複数の核酸分子の発現を駆動する単一のプロモーターを含有することができる。いくつかの態様において、そのようなプロモーターは、多シストロン性（ニシストロン性、三シストロン性、例えば米国特許第6,060,273号参照）であることができる。例えばいくつかの態様では、転写単位を、単一のプロモーターからのメッセージによる遺伝子産物（例えば第1キメラ受容体および第2キメラ受容体をコードするもの）の同時発現を可能にするIRES（配列内リボソーム進入部位）を含有するニシストロン性単位として、操作することができる。あるいはいくつかの例では、自己切断性ペプチド（例えばT2A）またはプロテアーゼ認識部位（例えばフューリン）をコードする配列によって互いに分離された2つまたは3つの遺伝子

50

(例えば第1キメラ受容体および第2キメラ受容体をコードするもの)を単一のオープンリーディングフレーム(ORF)中に含有するRNAの発現を、単一のプロモーターが指示する。したがって前記ORFは単一のポリプロテインをコードし、そのポリプロテインは、翻訳中(T2Aの場合)または翻訳後に、個々のタンパク質に切断される。場合により、T2Aなどのペプチドは、リボソームが、2A要素のC末において、ペプチド結合の合成をスキップ(リボソームスキッピング)する原因となり、2A配列の最後とその下流にある次のペプチドとの分離をもたらす。2A切断ペプチドの例は、リボソームスキッピングを誘導するものを含めて、T2A、P2A、E2AおよびF2Aである。

#### 【0159】

細胞、例えば操作されたキメラ受容体、例えば本明細書に記載するものを含有する細胞も、提供される。そのような細胞の集団、そのような細胞を含有しかつ/またはそのような細胞が濃縮された組成物、例えばキメラ受容体を発現する細胞が、組成物中の全細胞またはT細胞もしくはCD8+もしくはCD4+細胞などの一定タイプの細胞の少なくとも50、60、70、80、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99パーセントまたはそれ以上を占めるものも提供される。本組成物には、例えば養子細胞療法のための、薬学的組成物および投与のための製剤が含まれる。また、対象、例えば患者に、細胞および組成物を投与するための治療方法も提供される。

#### 【0160】

従って、キメラ受容体を発現する遺伝子操作された細胞、例えばCARを含む細胞もまた提供される。前記細胞は通常、真核細胞、例えば、哺乳動物細胞であり、典型的にはヒト細胞である。一部の態様において、前記細胞は血液、骨髄、リンパ、またはリンパ系臓器に由来し、免疫系の細胞、例えば、自然免疫または適応免疫の細胞、例えば、リンパ球、典型的にはT細胞および/またはNK細胞を含む骨髄系細胞またはリンパ系細胞である。他の例示的な細胞には、幹細胞、例えば、人工多能性幹細胞(iPSC)を含む多分化能性幹細胞および多能性幹細胞が含まれる。前記細胞は、典型的には、初代細胞、例えば、対象から直接単離された、および/または対象から単離され、凍結された細胞である。一部の態様において、前記細胞には、T細胞または他の細胞タイプの1つまたは複数のサブセット、例えば、全T細胞集団、CD4+細胞、CD8+細胞、およびその部分母集団、例えば、機能、活性化状態、成熟度、分化能、増大、再循環、局在化、および/もしくは持続能力、抗原特異性、抗原受容体のタイプ、特定の臓器もしくは区画における存在、マーカーもしくはサイトカイン分泌プロファイル、ならびに/または分化の程度によって規定されるT細胞または他の細胞タイプの1つまたは複数のサブセットが含まれる。処置しようとする対象に関して、前記細胞は同種異系および/または自己由来でもよい。前記方法の中には既製の方法が含まれる。一部の局面において、例えば、既製の技術の場合、前記細胞は多能性および/または多分化能性であり、例えば、幹細胞、例えば、人工多能性幹細胞(iPSC)である。一部の態様において、前記方法は、対象から細胞を単離する工程、本明細書に記載された細胞を調製、処理、培養、および/または操作する工程、ならびに凍結保存前または凍結保存後に細胞を同じ患者に再導入する工程を含む。

#### 【0161】

T細胞ならびに/またはCD4+T細胞および/もしくはCD8+T細胞のサブタイプおよび部分母集団の中には、ナイーブT( $T_N$ )細胞、エフェクターT細胞( $T_{EFF}$ )、メモリーT細胞およびそのサブタイプ、例えば、幹細胞メモリーT( $T_{SCM}$ )、セントラルメモリー(central memory)T( $T_{CM}$ )、エフェクターメモリーT( $T_{EM}$ )、または高度に分化したエフェクターメモリーT細胞、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)、未熟T細胞、成熟T細胞、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、粘膜関連インバリアント(mucosa-associated invariant)T(MAIT)細胞、天然および適応性の調節性T(Treg)細胞、ヘルパーT細胞、例えば、TH1細胞、TH2細胞、TH3細胞、TH17細胞、TH9細胞、TH22細胞、濾胞ヘルパーT細胞、 / T細胞、ならびに / T細胞がある。

#### 【0162】

一部の態様において、前記細胞はナチュラルキラー(NK)細胞である。一部の態様におい

10

20

30

40

50

て、前記細胞は、単球または顆粒球、例えば、骨髓系細胞、マクロファージ、好中球、樹状細胞、マスト細胞、好酸球、および/または好塩基球である。

#### 【0163】

一部の態様において、前記細胞は、遺伝子操作を介して導入された1種または複数種の核酸を含み、それによって、このような核酸の組換え産物または遺伝子操作された産物を発現する。一部の態様において、前記核酸は異種である、すなわち、細胞または細胞から得られた試料に通常は存在せず、例えば、別の生物または細胞から得られたもの、例えば、操作されている細胞、および/またはこのような細胞が得られた生物に普通は見られないものである。一部の態様において、前記核酸は非天然であり、例えば、複数の異なる細胞タイプに由来する様々なドメインをコードする核酸のキメラ組み合わせを含む核酸を含む、天然に見られない核酸である。

10

#### 【0164】

操作のための細胞の調製

一部の態様において、操作された細胞の調製は、1つまたは複数の培養工程および/または調製工程を含む。キメラ受容体、例えばCARを導入するための細胞は、試料、例えば、生物学的試料、例えば、対象から得られた、または対象に由来する生物学的試料から単離されてもよい。一部の態様において、細胞が単離される対象は、疾患もしくは状態を有する対象、または細胞療法を必要とするか、もしくは細胞療法が投与される対象である。対象は、一部の態様では、特定の治療介入、例えば、細胞が単離、処理、および/または操作される養子細胞療法を必要とするヒトである。

20

#### 【0165】

従って、前記細胞は、一部の態様では、初代細胞、例えば、初代ヒト細胞である。前記試料には、対象から直接採取した組織、液体、および他の試料、ならびに1つまたは複数の処理工程、例えば、分離、遠心分離、遺伝子操作（例えば、ウイルスベクターを用いた形質導入）、洗浄、および/またはインキュベーションに起因する試料が含まれる。生物学的試料は、生物学的供給源から直接得られた試料でもよく、処理された試料でもよい。生物学的試料には、体液、例えば、血液、血漿、血清、脳脊髄液、滑液、尿および汗、組織および臓器試料が、これらから得られた処理済み試料を含めて含まれるが、これに限定されない。

#### 【0166】

一部の局面において、前記細胞が得られる、または単離される試料は血液もしくは血液由来試料であるか、アフエレーシスもしくは白血球搬出法による生成物であるか、またはこれから得られる。例示的な試料には、全血、末梢血単核球（PBMC）、白血球、骨髓、胸腺、組織生検材料、腫瘍、白血病、リンパ腫、リンパ節、消化管に関連するリンパ系組織、粘膜に関連するリンパ系組織、脾臓、他のリンパ系組織、肝臓、肺、胃、腸、結腸、腎臓、膵臓、乳房、骨、前立腺、子宮頸部、精巣、卵巣、扁桃腺、もしくは他の臓器、および/またはこれらに由来する細胞が含まれる。試料には、細胞療法、例えば、養子細胞療法の状況では、自己供給源および同種異系供給源に由来する試料が含まれる。

30

#### 【0167】

一部の態様において、前記細胞は細胞株、例えば、T細胞株に由来する。前記細胞は、一部の態様では、異種供給源から、例えば、マウス、ラット、非ヒト霊長類、またはブタから得られる。

40

#### 【0168】

一部の態様において、前記細胞の単離には、1つまたは複数の調製工程および/または親和性に基づかない細胞分離工程が含まれる。一部の例では、例えば、望ましくない成分を除去するために、望ましい成分を濃縮するために、細胞を溶解するか、または特定の試薬に対して感受性のある細胞を除去するために、1種または複数種の試薬の存在下で細胞が洗浄、遠心分離、および/またはインキュベートされる。一部の例では、細胞は、密度、粘着性、サイズ、特定の成分に対する感受性および/または耐性などの1つまたは複数の特性に基づいて分離される。

50

## 【 0 1 6 9 】

一部の例では、対象の循環血に由来する細胞は、例えば、アフェレーシスまたは白血球搬出法によって得られる。試料は、一部の局面では、T細胞、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球を含むリンパ球、赤血球、および/または血小板を含有し、一部の局面では、赤血球および血小板以外の細胞を含有する。

## 【 0 1 7 0 】

一部の態様において、例えば、血漿画分を除去するために、および後の処理工程のために前記細胞を適切な緩衝液または培地に入れるために、対象から収集した血球は洗浄される。一部の態様において、前記細胞はリン酸緩衝食塩水(PBS)で洗浄される。一部の態様において、洗浄溶液には、カルシウムおよび/もしくはマグネシウムならびに/または多くの、もしくは全ての二価カチオンが無い。一部の局面において、洗浄工程は半自動「フロースルー」遠心機(例えば、Cobe 2991 cell processor, Baxter)によって製造業者の説明書に従って成し遂げられる。一部の局面において、洗浄工程はタンジェント流(tangential flow)濾過(TFF)によって製造業者の説明書に従って成し遂げられる。一部の態様において、洗浄後に、前記細胞は、様々な生体適合性緩衝液、例えば、Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>を含まないPBSで再懸濁される。ある特定の態様において、血球試料の成分は除去され、前記細胞は培養培地に直接、再懸濁される。

10

## 【 0 1 7 1 】

一部の態様において、前記方法には、密度に基づく細胞分離方法、例えば、赤血球溶解による末梢血からの白血球の調製、およびPercoll勾配またはFicoll勾配による遠心分離が含まれる。

20

## 【 0 1 7 2 】

一部の態様において、単離方法には、細胞における、1種または複数種の特定の分子、例えば、表面マーカー、例えば、表面タンパク質、細胞内マーカー、または核酸の発現または存在に基づく様々な細胞タイプの分離が含まれる。一部の態様において、このようなマーカーに基づいて分離するための任意の公知の方法を使用することができる。一部の態様において、分離は親和性または免疫親和性に基づく分離である。例えば、単離は、一部の局面では、例えば、このようなマーカーに特異的に結合する抗体または結合パートナーとインキュベートし、その後、一般的に洗浄工程を行い、抗体または結合パートナーに結合している細胞を、抗体または結合パートナーに結合していない細胞から分離することによって、1種または複数種のマーカー、典型的には細胞表面マーカーの細胞発現または発現レベルに基づいて細胞および細胞集団を分離することを含む。

30

## 【 0 1 7 3 】

このような分離工程は、さらに使用するために、試薬に結合した細胞が保持される正の選択に基づいてもよく、および/または抗体または結合パートナーに結合していない細胞が保持される負の選択に基づいてもよい。一部の例では、さらに使用するために両画分とも保持される。一部の局面において、不均質な集団の中にある細胞タイプを特異的に特定する抗体が利用できない場合、望ましい集団以外の細胞によって発現されるマーカーに基づいて分離が最も良く行われるように、負の選択が特に有用な場合がある。

## 【 0 1 7 4 】

分離によって、特定のマーカーを発現する特定の細胞集団または細胞が100%濃縮または除去される必要はない。例えば、特定のタイプの細胞、例えば、マーカーを発現する細胞の正の選択または濃縮とは、このような細胞の数またはパーセントが増加することを指すが、このマーカーを発現しない細胞が完全に無くなる必要はない。同様に、特定のタイプの細胞、例えば、マーカーを発現する細胞の負の選択、除去、または枯渇とは、このような細胞の数またはパーセントが減少することを指すが、このような細胞が全て完全に取除かれる必要はない。

40

## 【 0 1 7 5 】

一部の例では、複数回の分離工程が行われ、この場合、ある工程に由来する正に選択された画分または負に選択された画分は別の分離工程、例えば、後の正の選択または負の選

50



択に供される。一部の例では、1回の分離工程で、例えば、それぞれが負の選択のために標的化されたマーカーに特異的な複数種の抗体または結合パートナーと細胞をインキュベートすることによって、同時に、複数種のマーカーを発現する細胞を枯渇することができる。同様に、様々な細胞タイプの表面に発現している複数種の抗体または結合パートナーと細胞をインキュベートすることによって、複数の細胞タイプを同時に正に選択することができる。

#### 【0176】

例えば、一部の局面において、特定のT細胞部分母集団、例えば、1種類もしくは複数種の表面マーカーが陽性の細胞または高レベルの1種類もしくは複数種の表面マーカーを発現する細胞、例えば、CD28<sup>+</sup>、CD62L<sup>+</sup>、CCR7<sup>+</sup>、CD27<sup>+</sup>、CD127<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD45RA<sup>+</sup>、および/またはCD45RO<sup>+</sup>T細胞が正の選択法または負の選択法によって単離される。

10

#### 【0177】

例えば、CD3<sup>+</sup>、CD28<sup>+</sup>T細胞は、CD3/CD28結合磁気ビーズ（例えば、DYNABEADS（登録商標）M-450 CD3/CD28 T Cell Expander）を用いて正に選択することができる。

#### 【0178】

一部の態様において、単離は、特定の細胞集団を正の選択によって濃縮することによって、または特定の細胞集団を負の選択によって枯渇させることによって行われる。一部の態様において、正の選択または負の選択は、それぞれ、正に選択された細胞または負に選択された細胞の表面に発現している1種類もしくは複数種の表面マーカー（マーカー<sup>+</sup>）または比較的高いレベルで発現している1種類もしくは複数種の表面マーカー（マーカー<sup>high</sup>）に特異的に結合する1種または複数種の抗体または他の結合剤と細胞をインキュベートすることによって成し遂げられる。

20

#### 【0179】

一部の態様において、T細胞は、非T細胞、例えば、B細胞、単球、または他の白血球の表面に発現しているマーカー、例えば、CD14の負の選択によってPBMC試料から分離される。一部の局面において、CD4<sup>+</sup>ヘルパーおよびCD8<sup>+</sup>細胞傷害性T細胞を分離するために、CD4<sup>+</sup>選択工程またはCD8<sup>+</sup>選択工程が用いられる。このようなCD4<sup>+</sup>集団およびCD8<sup>+</sup>集団は、1つまたは複数のナイーブ、メモリー、および/またはエフェクターT細胞部分母集団の表面において発現しているか、または比較的多量に発現しているマーカーを対象にした正の選択または負の選択によって部分母集団にさらに選別することができる。

30

#### 【0180】

一部の態様において、さらに、CD8<sup>+</sup>細胞は、ナイーブ、セントラルメモリー、エフェクターメモリー、および/またはセントラルメモリー幹細胞について、例えば、それぞれの部分母集団に関連する表面抗原に基づいた正の選択または負の選択によって濃縮または枯渇される。一部の態様において、効力を高めるために、例えば、長期生存、増大、および/または投与後の生着を改善するために、セントラルメモリーT（T<sub>CM</sub>）細胞の濃縮が行われる。一部の局面において、この効力は、このような部分母集団において特にロバストである。Terakura et al. (2012) Blood.1:72-82; Wang et al. (2012) J Immunother. 35 (9):689-701を参照されたい。一部の態様において、T<sub>CM</sub>が濃縮されたCD8<sup>+</sup>T細胞およびCD4<sup>+</sup>T細胞を組み合わせると効力がさらに高まる。

40

#### 【0181】

複数の態様において、メモリーT細胞は、CD8<sup>+</sup>末梢血リンパ球のCD62L<sup>+</sup>サブセットおよびCD62L<sup>-</sup>サブセットの両方に存在する。PBMCは、例えば、抗CD8抗体および抗CD62L抗体を用いて、CD62L<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>画分および/またはCD62L<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>画分について濃縮または枯渇することができる。

#### 【0182】

一部の態様において、セントラルメモリーT（T<sub>CM</sub>）細胞の濃縮は、CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD3、および/またはCD127の正の、または多量の表面発現に基づいている。一部の局面において、セントラルメモリーT（T<sub>CM</sub>）細胞の濃縮は、CD45RAおよ

50

び/またはグランザイムBを発現するか、または多量に発現する細胞を対象にした負の選択に基づいている。一部の局面において、 $T_{CM}$ 細胞が濃縮された $CD8^+$ 集団の単離は、 $CD4$ 、 $CD14$ 、 $CD45RA$ を発現する細胞の枯渇と、 $CD62L$ を発現する細胞を対象にした正の選択または濃縮によって行われる。一局面的において、セントラルメモリー $T$  ( $T_{CM}$ ) 細胞の濃縮は、 $CD4$ 発現に基づいて選択された細胞の負の画分から開始して行われ、この画分は、 $CD14$ および $CD45RA$ の発現に基づく負の選択と、 $CD62L$ に基づく正の選択に供される。このような選択は一部の局面では同時に行われ、他の局面では連続して、どちらの順序でも行われる。一部の局面において、 $CD4$ に基づく分離から正の画分および負の画分が両方とも保持され、この方法の後の工程において、任意で、1つまたは複数のさらなる正の選択工程または負の選択工程の後に用いられるように、 $CD8^+$ 細胞集団または部分母集団の調製において用いられた同じ $CD4$ 発現に基づく選択工程が、 $CD4^+$ 細胞集団または部分母集団を作製するのにも用いられる。

10

#### 【0183】

特定の例では、PBMC試料または他の白血球試料は $CD4^+$ 細胞の選択に供される。この場合、負の画分および正の画分が両方とも保持される。次いで、負の画分は、 $CD14$ および $CD45RA$ または $ROR1$ の発現に基づく負の選択と、セントラルメモリー $T$ 細胞に特徴的なマーカー、例えば、 $CD62L$ または $CCR7$ に基づく正の選択に供される。この場合、正の選択および負の選択はどちらの順序でも行われる。

#### 【0184】

$CD4^+$ Tヘルパー細胞は、細胞表面抗原を有する細胞集団を特定することによってナイーブ細胞、セントラルメモリー細胞、およびエフェクター細胞に選別される。 $CD4^+$ リンパ球は標準的な方法によって得ることができる。一部の態様において、ナイーブ $CD4^+$ Tリンパ球は、 $CD45RO^-$ 、 $CD45RA^+$ 、 $CD62L^+$ 、 $CD4^+$ T細胞である。一部の態様において、セントラルメモリー $CD4^+$ 細胞は $CD62L^+$ および $CD45RO^+$ である。一部の態様において、エフェクター $CD4^+$ 細胞は $CD62L^-$ および $CD45RO^-$ である。

20

#### 【0185】

一例では、負の選択によって $CD4^+$ 細胞を濃縮するために、モノクローナル抗体カクテルは、典型的には、 $CD14$ 、 $CD20$ 、 $CD11b$ 、 $CD16$ 、 $HLA-DR$ 、および $CD8$ に対する抗体を含む。一部の態様において、正の選択および/または負の選択のために細胞の分離を可能にするために、抗体または結合パートナーは固体支持体またはマトリックス、例えば、磁気ビーズまたは常磁性ビーズに結合される。例えば、一部の態様において、前記細胞および細胞集団は、免疫磁気（または親和性磁気（affinity magnetic））分離法を用いて分離または単離される（Methods in Molecular Medicine, vol. 58: Metastasis Research Protocols, Vol.2: Cell Behavior In Vitro and In Vivo, p 17-25 Edited by: S. A. Brooks and U. Schumacher（著作権）Humana Press Inc., Totowa, NJにおいて概説される）。

30

#### 【0186】

一部の局面において、分離しようとする細胞の試料または組成物は、小さな、磁化可能な、または磁気に反応する材料、例えば、磁気に反応する粒子または微粒子、例えば、常磁性ビーズ（例えば、DynalbeadsまたはMACSビーズ）とインキュベートされる。磁気に反応する材料、例えば、粒子は、一般的に、分離することが望ましい細胞または細胞集団、例えば、負に選択する、または正に選択することが望ましい細胞または細胞集団の表面に存在する分子、例えば、表面マーカーに特異的に結合する結合パートナー、例えば、抗体に直接的または間接的に取り付けられる。

40

#### 【0187】

一部の態様において、磁性粒子または磁気ビーズは、抗体または他の結合パートナーなどの特異的結合メンバーに結合される、磁気に反応する材料を含む。磁気分離方法において用いられる多くの周知の磁気に反応する材料がある。適切な磁性粒子には、参照により本明細書に組み入れられる、Molday, 米国特許第4,452,773号、および欧州特許明細書EP452342Bに記載の磁性粒子が含まれる。コロイドサイズの粒子、例えば、Owen 米国特

50

許第4,795,698号およびLiberti et al., 米国特許第5,200,084号に記載のコロイドサイズの粒子が他の例である。

【0188】

インキュベーションは、一般的に、磁性粒子または磁気ビーズに取り付けられている、抗体または結合パートナーまたはこのような抗体もしくは結合パートナーに特異的に結合する分子、例えば、二次抗体もしくは他の試薬が、もし細胞表面分子が試料中の細胞の表面に存在すれば細胞表面分子に特異的に結合する条件下で行われる。

【0189】

一部の局面において、試料は磁場の中に置かれ、磁気に反応する粒子または磁化可能な粒子が取り付けられている細胞は磁石に引き付けられるか、非標識細胞から分離される。正の選択の場合、磁石に引き付けられた細胞が保持される。負の選択の場合、引き付けられなかった細胞（非標識細胞）が保持される。一部の局面において、同じ選択工程の間に正の選択と負の選択の組み合わせが行われ、正の画分および負の画分が保持され、さらに処理されるか、またはさらなる分離工程を受ける。

【0190】

ある特定の態様において、磁気に反応する粒子は一次抗体または他の結合パートナー、二次抗体、レクチン、酵素、もしくはストレプトアビジンでコーティングされる。ある特定の態様において、磁性粒子は、1種または複数種のマーカーに特異的な一次抗体のコーティングを介して細胞に取り付けられる。ある特定の態様において、前記細胞はビーズではなく、一次抗体または結合パートナーで標識され、次いで、細胞タイプ特異的な二次抗体または他の結合パートナー（例えば、ストレプトアビジン）でコーティングされた磁性粒子が添加される。ある特定の態様において、ストレプトアビジンでコーティングされた磁性粒子が、ビオチン化した一次抗体または二次抗体と一緒に用いられる。

【0191】

一部の態様において、後でインキュベート、培養、および/または操作される細胞に、磁気に反応する粒子を取り付けたままにしておく。一部の局面において、患者に投与するために、前記粒子を細胞に取り付けたままにしておく。一部の態様において、磁化可能な粒子または磁気に反応する粒子は細胞から取り除かれる。磁化可能な粒子を細胞から取り除くための方法は公知であり、例えば、競合する非標識競合抗体、磁化可能な粒子、または切断可能なリンカーと結合体化した抗体などの使用を含む。一部の態様において、磁化可能な粒子は生分解性である。

【0192】

一部の態様において、親和性に基づく選択は、磁気活性化細胞選別（MACS）（Miltenyi Biotech, Auburn, CA）を介した選択である。磁気活性化細胞選別（MACS）システムは、磁化粒子が取り付けられている細胞を高純度で選択することができる。ある特定の態様において、MACSは、外部磁場が印加された後に、非標的種および標的種が連続して溶出されるモードで動作する。すなわち、取り付けられなかった種が溶出される間に、磁化粒子に取り付けられた細胞は所定の位置に保たれる。次いで、この第1の溶出工程が完了した後に、磁場に閉じ込められ、溶出しないようにされていた種は、このような種が溶出および回収が可能なように何らかのやり方で遊離される。ある特定の態様において、非標的細胞は標識され、不均質な集団細胞から枯渇される。

【0193】

ある特定の態様において、単離または分離は、前記方法の単離工程、細胞調製工程、分離工程、処理工程、インキュベーション工程、培養工程、および/または製剤化工程の1つまたは複数を行うシステム、装置、または器具を用いて行われる。一部の局面において、前記システムは、例えば、誤り、使用者の操作、および/または汚染を最小限にするために、これらの各工程を閉じた、または無菌の環境において行うのに用いられる。一例では、システムは、国際特許出願公開番号WO2009/072003またはUS20110003380A1に記載のシステムである。

【0194】

10

20

30

40

50

一部の態様において、システムまたは器具は、統合システム型もしくは自立型システムにおいて、および/または自動的に、もしくはプログラム可能なやり方で、単離工程、処理工程、操作工程、および製剤化工程の1つまたは複数、例えば、全てを行う。一部の局面において、システムまたは器具は、使用者が、処理工程、単離工程、操作工程、および製剤化工程の様々な局面をプログラムする、制御する、その転帰を評価する、および/または調整するのを可能にする、システムまたは器具と通信するコンピュータおよび/またはコンピュータプログラムを備える。

【0195】

一部の局面において、例えば、閉じた無菌のシステムにおいて細胞を臨床規模レベルで自動分離するために、分離工程および/または他の工程はCliniMACSシステム (Miltenyi Biotec) を用いて行われる。構成要素には、内蔵型マイクロコンピュータ、磁気分離ユニット、蠕動ポンプ、および様々なピンチ弁が含まれる場合がある。内蔵型コンピュータは一部の局面では機器の全構成要素を制御し、反復手順を統一された順序で行うようにシステムを命令する。磁気分離ユニットは、一部の局面では、可動性の永久磁石および選択カラム用のホルダを備える。蠕動ポンプはチューブセット全体にわたる流速を制御し、ピンチ弁と一緒に、緩衝液がシステムを制御されて流れ、細胞が絶え間なく懸濁されるのを確かなものにする。

【0196】

CliniMACSシステムは、一部の局面では、滅菌した非発熱性の溶液に溶解して供給される、抗体に結合した磁化可能な粒子を使用する。一部の態様において、細胞は磁性粒子で標識された後に、余分な粒子を除去するために洗浄される。次いで、細胞調製バッグがチューブセットに接続され、そして次にチューブセットは緩衝液含有バックおよび細胞収集バッグに接続される。チューブセットは、プレカラムおよび分離カラムを含む予め組み立てられた滅菌チューブからなり、使い捨て専用である。分離プログラムが開始した後に、システムは分離カラムに細胞試料を自動的にアプライする。標識された細胞はカラム内に保持されるのに対して、標識されなかった細胞は一連の洗浄工程によって除去される。一部の態様において、本明細書に記載の方法と共に使用するための細胞集団は標識されず、カラム内に保持されない。一部の態様において、本明細書に記載の方法と共に使用するための細胞集団は標識され、カラム内に保持される。一部の態様において、磁場が取り除かれた後に、本明細書に記載の方法と共に使用するための細胞集団はカラムから溶出され、細胞収集バッグ内に収集される。

【0197】

ある特定の態様において、分離工程および/または他の工程はCliniMACS Prodigyシステム (Miltenyi Biotec) を用いて行われる。CliniMACS Prodigyシステムには、一部の局面では、細胞を自動洗浄し、遠心分離によって分画する細胞処理ユニット (cell processing unit) が付いている。CliniMACS Prodigyシステムはまた、内蔵カメラと、供給源の細胞産物の巨視的な層を識別することによって最適な細胞分画エンドポイントを決定する画像認識ソフトウェアも備えている場合がある。例えば、末梢血は赤血球、白血球、および血漿の層に自動的に分離される。CliniMACS Prodigyシステムはまた、細胞培養プロトコル、例えば、細胞分化および増大、抗原添加、ならびに長期細胞培養を行う内臓型細胞発育チャンバーも備えている場合がある。インプットポートを用いると、培地を無菌的に取り出し、補充することができる。細胞は、内臓型顕微鏡を用いてモニタリングすることができる。例えば、Klebanoff et al. (2012) J Immunother. 35 (9): 651-660, Terakura et al. (2012) Blood. 117: 72-82、およびWang et al. (2012) J Immunother. 35 (9): 689-701を参照されたい。

【0198】

一部の態様において、本明細書に記載の細胞集団はフローサイトメトリーを介して収集および濃縮 (または枯渇) される。フローサイトメトリーでは、複数種の細胞表面マーカーについて染色された細胞は流体の流れに入って運ばれる。一部の態様において、本明細書に記載の細胞集団は、分取スケール (preparative scale) (FACS) 選別を介して収集

10

20

30

40

50

および濃縮（または枯渇）される。ある特定の態様において、本明細書に記載の細胞集団は、FACSに基づく検出系と組み合わせて微小電気機械システム（MEMS）チップを用いることによって収集および濃縮（または枯渇）される（例えば、WO2010/033140, Cho et al. (2010) Lab Chip 10, 1567-1573; および Godin et al. (2008) J Biophoton. 1 (5):355-376を参照されたい）。どちらの場合でも、細胞は複数種のマーカーで標識することができ、それによって、詳細に明らかにされたT細胞サブセットを高純度で単離することが可能になる。

#### 【0199】

一部の態様において、正の選択および/または負の選択のために分離を容易にするために、抗体または結合パートナーは1種または複数種の検出可能なマーカーで標識される。例えば、分離は蛍光標識抗体との結合に基づいてもよい。一部の例では、1種または複数種の細胞表面マーカーに特異的な抗体または他の結合パートナーの結合に基づく細胞の分離は、流体の流れの中で、例えば、分取スケール（FACS）および/または微小電気機械システム（MEMS）チップを備える蛍光標識細胞分取（FACS）によって、例えば、フローサイトメトリー検出系と組み合わせて行われる。このような方法を用いると、複数種のマーカーに基づいて正の選択および負の選択を同時に行うことができる。

10

#### 【0200】

一部の態様において、調製方法は、単離、インキュベーション、および/または操作の前または後に細胞を凍結、例えば、凍結保存するための工程を含む。一部の態様において、凍結工程およびその後の解凍工程によって、細胞集団の中にある顆粒球が取り除かれ、単球がある程度まで取り除かれる。一部の態様において、例えば、血漿および血小板を取り除く洗浄工程の後に、前記細胞は凍結溶液に懸濁される。様々な任意の公知の凍結溶液およびパラメータを一部の局面で使用することができる。一例は、20% DMSOおよび8% ヒト血清アルブミン（HSA）を含有するPBS、または他の適切な細胞凍結培地を使用することを伴う。次いで、DMSOおよびHSAの最終濃度がそれぞれ10%および4%になるように、これを培地で1:1に希釈する。次いで、細胞は通常、1分につき1°の速度で-80℃まで凍結され、液体窒素貯蔵タンクの気相の中で保管される。

20

#### 【0201】

一部の態様において、提供される方法は、発育工程、インキュベーション工程、培養工程、および/または遺伝子操作工程を含む。例えば、一部の態様において、枯渇された細胞集団および培養開始組成物をインキュベートおよび/または操作するための方法が提供される。

30

#### 【0202】

従って、一部の態様において、前記細胞集団は培養開始組成物中でインキュベートされる。インキュベーションおよび/または操作は、培養容器、例えば、ユニット、チャンバー、ウェル、カラム、チューブ、チューブセット、弁、バイアル、培養皿、バック、または細胞を培養もしくは発育するための他の容器の中で行われてもよい。

#### 【0203】

一部の態様において、前記細胞は遺伝子操作の前に、または遺伝子操作に関連してインキュベートおよび/または培養される。インキュベーション工程は、培養、発育、刺激、活性化、および/または増殖を含んでもよい。一部の態様において、前記組成物または細胞は刺激条件または刺激薬剤の存在下でインキュベートされる。このような条件は、遺伝子操作のために、例えば、組換え抗原受容体を導入するために、集団内の細胞の増殖、増大、活性化、および/もしくは生存を誘導するように、抗原曝露を模倣するように、ならびに/または細胞を初回刺激（prime）するように設計された条件を含む。

40

#### 【0204】

条件は、特定の培地、温度、酸素含有量、二酸化炭素含有量、時間、薬剤、例えば、栄養分、アミノ酸、抗生物質、イオン、および/または刺激因子、例えば、サイトカイン、ケモカイン、抗原、結合パートナー、融合タンパク質、組換え可溶性受容体、ならびに細胞を活性化するように設計された他の任意の薬剤のうち1つまたは複数を含んでもよい。

50

## 【0205】

一部の態様において、刺激条件または刺激薬剤には、TCR複合体の細胞内シグナル伝達ドメインを活性化することができる1種または複数種の薬剤、例えば、リガンドが含まれる。一部の局面において、この薬剤は、T細胞におけるTCR/CD3細胞内シグナル伝達カスケードをオンにするか、または開始する。このような薬剤には、例えば、ビーズなどの固体支持体に結合した、抗体、例えば、TCR成分および/もしくは共刺激受容体に特異的な抗体、例えば、抗CD3、抗CD28、ならびに/または1種類もしくは複数種のサイトカインが含まれ得る。任意で、増大方法は、抗CD3および/または抗CD28の抗体を（例えば、少なくとも約0.5ng/mlの濃度で）培養培地に添加する工程をさらに含んでもよい。一部の態様において、刺激薬剤には、IL-2および/またはIL-15、例えば、少なくとも約10単位/mLの濃度のIL-2が含まれる。

10

## 【0206】

一部の局面において、インキュベーションは、Riddellらへの米国特許第6,040,177号、Klebanoff et al. (2012) J Immunother. 35 (9): 651-660、Terakura et al. (2012) Blood. 117: 72-82、および/またはWang et al. (2012) J Immunother. 35 (9): 689-701に記載の技法などの技法に従って行われる。

## 【0207】

一部の態様において、T細胞を、（例えば、結果として生じた細胞集団が、増大させようとする初期集団内でTリンパ球1個につき少なくとも約5個、10個、20個、もしくは40個またはそれより多いPBMCフィーダー細胞を含有するように）フィーダー細胞、例えば、非分裂末梢血単核球（PBMC）を培養開始組成物に添加し、培養物を（例えば、T細胞の数を増大させるのに十分な時間にわたって）インキュベートすることによって増大させる。一部の局面において、非分裂フィーダー細胞は、線を照射したPBMCフィーダー細胞を含んでもよい。一部の態様において、細胞分裂を阻止するために、PBMCに約3000~3600ラドの範囲の線が照射される。一部の局面において、フィーダー細胞が培養培地に添加された後に、T細胞の集団が添加される。

20

## 【0208】

一部の態様において、刺激条件は、ヒトTリンパ球の増殖に適した温度、例えば、少なくとも約25℃、一般的には少なくとも約30度、および一般的には37℃または約37℃を含む。任意で、インキュベーションは、フィーダー細胞として非分裂性のEBV形質転換リンパ芽球様細胞（LCL）を添加する工程をさらに含んでもよい。LCLに、約6000~10,000ラドの範囲の線を照射することができる。LCLフィーダー細胞は、一部の局面では、LCLフィーダー細胞と初回Tリンパ球との比が少なくとも約10:1などの任意の適切な量で提供される。

30

## 【0209】

複数の態様において、抗原特異的T細胞、例えば、抗原特異的CD4+および/またはCD8+ T細胞は、ナイーブまたは抗原特異的なTリンパ球を抗原で刺激することによって得られる。例えば、サイトメガロウイルス抗原に対する抗原特異的T細胞株またはクローンは、感染対象からT細胞を単離し、前記細胞をインビトロで同じ抗原で刺激することによって作製することができる。

40

## 【0210】

遺伝子操作のためのベクターおよび方法

遺伝子操作された成分、例えば、抗原受容体、例えば、CARまたはTCRを導入するための様々な方法は周知であり、提供される方法および組成物と共に使用することができる。例示的な方法には、ウイルスベクター、例えば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、非ウイルスベクターまたはトランスポゾン、例えばSleeping Beautyトランスポゾンシステムを介した方法を含む、受容体をコードする核酸を移入するための方法が含まれる。遺伝子移入の方法には、形質導入、エレクトロポレーション、または、細胞への遺伝子移入をもたらすその他の方法が含まれ得る。

## 【0211】

50

一部の態様において、遺伝子移入は、最初に、細胞を刺激し、例えば、細胞を、例えば、サイトカインまたは活性化マーカーの発現によって測定されるような増殖、生存、および/または活性化などの応答を誘導する刺激と組み合わせ、その後、活性化された細胞に形質導入し、臨床用途に十分な数まで培養物中で増大させることによって成し遂げられる。

#### 【0212】

ある状況では、刺激因子(例えば、リンホカインまたはサイトカイン)の過剰発現が対象に対して毒性をもつ場合がある。従って、ある状況では、操作された細胞は、例えば、養子免疫治療において投与された時に、インビボで細胞を負の選択に対して感受性にする遺伝子セグメントを含む。例えば、一部の局面において、前記細胞は、細胞が投与された患者のインビボ状態が変化した結果として排除可能になるように操作される。負の選択が可能な表現型は、投与された薬剤、例えば、化合物に対する感受性を付与する遺伝子の挿入に起因してもよい。負の選択が可能な遺伝子には、ガンシクロビル感受性を付与する単純ヘルペスウイルスI型チミジンキナーゼ(HSV-I TK)遺伝子(Wigler et al., Cell 11:223, 1977);細胞ヒポキサンチンホスフリボシルトランスフェラーゼ(phosphoribosyltransferase)(HPRT)遺伝子、細胞アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(APRT)遺伝子、細菌シトシンデアミナーゼ、(Mullen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:33 (1992))が含まれる。

#### 【0213】

一部の態様において、組換え核酸は、組換え感染性ウイルス粒子、例えば、シミアンウイルス40(SV40)、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)に由来するベクターを用いて細胞に移入される。一部の態様において、組換え核酸は、組換えレンチウイルスベクターまたはレトロウイルスベクター、例えば、 $\gamma$ -レトロウイルスベクターを用いてT細胞に移入される(例えば、Koste et al. (2014) Gene Therapy 2014 Apr 3. doi: 10.1038/gt.2014.25; Carlens et al. (2000) Exp Hematol 28(10): 1137-46; Alonso-Camino et al. (2013) Mol Ther Nucl Acids 2, e93; Park et al., Trends Biotechnol. 2011 November; 29(11): 550-557を参照されたい)。

#### 【0214】

一部の態様において、レトロウイルスベクター、例えば、モロニー Maus 白血病ウイルス(MoMLV)、骨髄増殖性肉腫ウイルス(myeloproliferative sarcoma virus)(MPSV)、マウス胚性幹細胞ウイルス(MESV)、マウス幹細胞ウイルス(MSCV)、脾フォーカス形成ウイルス(SFFV)、またはアデノ随伴ウイルス(AAV)に由来するレトロウイルスベクターには末端反復配列(LTR)がある。ほとんどのレトロウイルスベクターはマウスレトロウイルスに由来する。一部の態様において、レトロウイルスには、任意の鳥類細胞供給源または哺乳動物細胞供給源に由来するレトロウイルスが含まれる。レトロウイルスは典型的に兩種指向性である。兩種指向性とは、レトロウイルスが、ヒトを含む、いくつかの種の宿主細胞に感染できることを意味する。一態様において、発現させようとする遺伝子はレトロウイルスgag配列、pol配列、および/またはenv配列に取って代わる。多数の例示的なレトロウイルス系が述べられている(例えば、米国特許第5,219,740号;同第6,207,453号;同第5,219,740号; Miller and Rosman(1989) BioTechniques 7:980-990; Miller, A. D. (1990) Human Gene Therapy 1:5-14; Scarpa et al. (1991) Virology 180:849-852; Burns et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-8037;およびBoris-Lawrie and Temin (1993) Cur. Opin. Genet. Develop. 3: 102-109)。

#### 【0215】

レンチウイルス形質導入法は公知である。例示的な方法は、例えば、Wang et al. (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701; Cooper et al. (2003) Blood. 101: 1637-1644; Verhoeven et al. (2009) Methods Mol Biol. 506: 97-114;およびCavalieri et al. (2003) Blood. 102(2): 497-505に記載されている。

#### 【0216】

一部の態様において、組換え核酸はエレクトロポレーションを介してT細胞に移入される(例えば、Chicaybam et al, (2013) PLoS ONE 8(3): e60298およびVan Tedeloo

10

20

30

40

50

et al. (2000) Gene Therapy 7(16): 1431-1437)を参照されたい)。一部の態様において、組換え核酸は転位を介してT細胞に移入される(例えば、Manuri et al. (2010) Hum Gene Ther 21(4): 427-437; Sharma et al. (2013) Molec Ther Nucl Acids 2, e74およびHuang et al. (2009) Methods Mol Biol 506: 115-126を参照されたい)。免疫細胞において遺伝物質を導入および発現する他の方法には、リン酸カルシウムトランスフェクション(例えば、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y.に記載)、プロトプラスト融合、カチオン性リポソームを介したトランスフェクション;タングステン粒子によって促進されるマイクロパーティクルボンバードメント(microparticle bombardment)(Johnston, Nature, 346: 776-777 (1990));およびリン酸ストロンチウムDNA共沈殿(Brash et al., Mol. Cell Biol., 7: 2031-2034 (1987))が含まれる。

10

#### 【0217】

組換え産物をコードする核酸を移入するための他のアプローチおよびベクターは、例えば、国際特許出願公開番号WO2014055668および米国特許第7,446,190号に記載のものである。

#### 【0218】

いくつかの態様において、細胞、例えばT細胞には、増大中または増大後に、例えばT細胞受容体(TCR)またはキメラ抗原受容体(CAR)をトランスフェクトすることができる。所望の受容体の遺伝子を導入するためのこのトランスフェクションは、例えば任意の適切なレトロウイルスベクターで実行することができる。次に、遺伝子修飾された細胞集団を、初期刺激(例えばCD3/CD28刺激)から解放し、次に第2タイプの刺激(例えば新たに導入された受容体を介した刺激)で刺激することができる。この第2タイプの刺激は、ペプチド/MHC分子の形態にある抗原刺激、遺伝子導入した受容体のコグネイト(架橋)リガンド(例えばCARの天然リガンド)または新しい受容体のフレームワーク内に(例えば受容体の定常領域を認識することによって)直接結合する任意のリガンド(抗体など)を含みうる。例えばCheadle et al., 「Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy」Methods Mol Biol, 2012; 907:645-66、またはBarrett et al., Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine Vol. 65:333-347 (2014)を参照されたい。

20

#### 【0219】

追加の核酸、例えば導入用遺伝子の中には、治療の効力を、例えば移入された細胞の生存性および/または機能を促進することなどによって改良するもの、細胞を選択および/または評価するための遺伝子マーカーを提供するための(例えばインビボでの生存または局在化を評価するための)遺伝子、例えばLupton S.D. et al., Mol. and Cell Biol., 11:6 (1991)およびRiddell et al., Human Gene Therapy 3:319-338 (1992)に記載されているようにインビボでの陰性選択に対する感受性を細胞に与えることなどによって、安全性を改良するための遺伝子が含まれる。また、優性陽性選択可能マーカーを陰性選択可能マーカーと融合することによって得られる二官能性選択可能融合遺伝子の使用を記載しているLuptonらによるPCT/US91/08442およびPCT/US94/05601の公開公報も参照されたい。例えばRiddellらの米国特許第6,040,177号の第14~17欄を参照されたい。

30

40

#### 【0220】

#### IV.組成物、製剤および投与の方法

CARなどのキメラ受容体を含有する組成物、および操作された細胞を含有する組成物、例えば薬学的組成物および薬学的製剤も提供される。例えば、当該抗原が発現する疾患、状態、および障害の処置における、または検出方法、診断方法、および予後方法においてそれら組成物を使用する方法、および前記処置または前記方法におけるそれらの組成物の使用も提供される。

#### 【0221】

#### 1.組成物/製剤

「薬学的製剤」という用語とは、「薬学的製剤」に含まれる活性成分の生物学的活性が

50



有効になるような形をとり、製剤が投与される対象に対して容認できないほどの毒性がある、さらなる成分を含有しない調製物を指す。

【0222】

「薬学的に許容される担体」とは、対象に無毒な、活性成分以外の、薬学的製剤中にある成分を指す。薬学的に許容される担体には、緩衝液、賦形剤、安定剤、または防腐剤が含まれるが、これに限定されない。

【0223】

一部の局面において、担体の選択は、一つには、特定の細胞および/または投与方法によって決定される。従って、様々な適切な製剤がある。例えば、薬学的組成物は防腐剤を含有してもよい。適切な防腐剤には、例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン、安息香酸ナトリウム、および塩化ベンザルコニウムが含まれ得る。一部の局面において、2種類以上の防腐剤の混合物が用いられる。防腐剤またはその混合物は典型的には全組成物の重量に対して約0.0001%～約2%の量で存在する。担体は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に記載されている。薬学的に許容される担体は、一般的に、使用される投与量および濃度でレシピエントに無毒であり、緩衝液、例えば、リン酸、クエン酸、および他の有機酸;アスコルビン酸およびメチオンを含む抗酸化物質;防腐剤(例えば、オクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム;塩化ヘキサメトニウム;塩化ベンザルコニウム;塩化ベンゼトニウム;フェノール、ブチルアルコールもしくはベンジルアルコール;アルキルパラベン、例えば、メチルパラベンもしくはプロピルパラベン;カテコール;レゾルシノール;シクロヘキサノール;3-ペンタノール;およびm-クレゾール);低分子量(約10残基未満)ポリペプチド;タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリン;親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン;アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリジン;単糖、二糖、およびグルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む他の炭水化物;キレート剤、例えば、EDTA;糖、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロース、もしくはソルビトール;塩を形成する対イオン、例えば、ナトリウム;金属錯体(例えば、Zn-タンパク質錯体);ならびに/または非イオン界面活性剤、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)を含むが、これに限定されない。

【0224】

一部の局面では、緩衝剤が前記組成物に含まれる。適切な緩衝剤には、例えば、クエン酸、クエン酸ナトリウム、リン酸、リン酸カリウム、ならびに様々な他の酸および塩が含まれる。一部の局面において、2種類以上の緩衝剤の混合物が用いられる。緩衝剤またはその混合物は典型的には全組成物の重量に対して約0.001重量%～約4重量%の量で存在する。投与可能な薬学的組成物を調製するための方法は公知である。例示的な方法は、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005)において、さらに詳細に説明されている。

【0225】

前記製剤または組成物はまた、前記細胞で処置されている特定の適応症、疾患、または状態に有用な複数種の活性成分、好ましくは、前記細胞を補う活性を有する活性成分も含有してよく、この場合、それぞれの活性は互いに悪影響を及ぼさない。このような活性成分は、所期の目的に有効な量で組み合わせられて適切に存在する。従って、一部の態様において、薬学的組成物は、他の薬学的に活性な薬剤または薬物、例えば、化学療法剤、例えば、アスパラギナーゼ、プスルファン、カルボプラチン、シスプラチン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、フルオロウラシル、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、メトトレキサート、パクリタキセル、リツキシマブ、ビンブラスチン、ビンクリスチンなどをさらに含む。

【0226】

薬学的組成物は、一部の態様では、疾患または状態を処置または予防するのに有効な量、例えば、治療の有効量または予防的有効量の細胞を含む。治療効力または予防効力は、一部の態様では、処置される対象を定期的に評価することによってモニタリングされる。

10

20

30

40

50

状態に応じた数日間またはそれ以上にわたる反復投与については、疾患症状の望ましい抑制が起こるまで処置が繰り返される。しかしながら、その他の投薬計画が有用であり得、かつ決定されてもよい。望ましい投与量は組成物の単回大量瞬時投与によって送達されてもよく、組成物の複数回大量瞬時投与によって送達されてもよく、組成物の連続注入投与によって送達されてもよい。

#### 【0227】

前記の細胞および組成物は、標準的な投与技法、製剤、および/または装置を用いて投与され得る。組成物の保存および投与のために、製剤および装置、例えば、注射器およびバイアルが提供される。前記細胞の投与は自家投与でもよく、または異種投与でもよい。例えば、ある対象から免疫応答性細胞または前駆細胞を入手し、同じ対象または異なる適合性の対象に投与することができる。末梢血に由来する免疫応答性細胞またはその子孫(例えば、インピボ、エクスピボ、またはインピトロで得られる)を、カテーテル投与を含む局所注射、全身注射、局所注射、静脈内注射、または非経口投与を介して投与することができる。治療用組成物(例えば、遺伝子組換えされた免疫応答性細胞を含有する薬学的組成物)が投与される時に、一般的に、注射用単位剤形(溶液、懸濁液、エマルジョン)の形で製剤化される。

10

#### 【0228】

製剤には、経口投与、静脈内投与、腹腔内投与、皮下投与、肺投与、経皮投与、筋肉内投与、鼻腔内投与、頬投与、舌下投与、または坐剤投与のための製剤が含まれる。一部の態様において、前記細胞集団は非経口投与される。本明細書で使用する「非経口」という用語は、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、直腸投与、腔投与、および腹腔内投与を含む。一部の態様において、前記細胞集団は、静脈内注射、腹腔内注射、または皮下注射による末梢全身送達を用いて対象に投与される。

20

#### 【0229】

組成物は、一部の態様では、滅菌した液体調製物、例えば、等張性水溶液、懸濁液、エマルジョン、分散液として提供されるか、または粘性のある組成物として提供され、これらは、一部の局面では、選択されたpHまで緩衝化されてもよい。液体調製物は、通常、ゲル、他の粘性のある組成物、および固体組成物より調製しやすい。さらに、液体組成物の方が、投与するのに、特に、注射によって投与するのに若干便利である。他方で、粘性のある組成物は、特定の組織との長い接触期間をもたらすように適切な粘性の範囲内で製剤化することができる。液体組成物または粘性のある組成物は、例えば、水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、ポリオール(polyoi)(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、液体ポリエチレングリコール)およびその適切な混合物を含有する、溶媒または分散媒でもよい担体を含んでもよい。

30

#### 【0230】

滅菌注射液は、細胞を溶媒の中に取り入れて、例えば、適切な担体、希釈剤、または賦形剤、例えば、滅菌水、生理食塩水、グルコース、デキストロースなどと混合して調製することができる。前記組成物は凍結乾燥させることもできる。前記組成物は、望ましい投与経路および調製物に応じて、補助物質、例えば、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、ゲル化または粘性を高める添加物、防腐剤、着香剤、および染料などを含有することができる。一部の局面では、適切な調製物を調製するために標準的な教科書が調べられる場合がある。

40

#### 【0231】

抗菌性防腐剤、抗酸化物質、キレート剤、および緩衝液を含む、前記組成物の安定性および無菌性を向上させる様々な添加物を添加することができる。微生物の作用は、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、およびソルビン酸などによって防止することができる。注射用薬学的剤形の長期吸収は、吸収を遅延する薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを使用することによって引き起こすことができる。

#### 【0232】

50

インビボ投与のために使用しようとする製剤は一般的に無菌である。無菌性は、例えば、滅菌濾過膜で濾過することによって、容易に成し遂げられ得る。

#### 【0233】

#### 2.投与の方法

がんを含む疾患、状態、および障害を処置または防止するために細胞、集団、および組成物を投与する方法、ならびにがんを含む疾患、状態、および障害を処置または防止するためのそのような細胞、集団、および組成物の使用が提供される。いくつかの態様において、細胞、集団、および組成物は、例えば養子T細胞療法などの養子細胞療法によって処置されるべき特定の疾患または状態を有する対象または患者に投与される。いくつかの態様において、ここに提供される細胞および組成物は、対象、例えば前記疾患または状態を有するかそのリスクがある対象に、投与される。いくつかの局面において、本方法は、それにより、疾患または状態の1つまたは複数の症状を、例えば操作されたT細胞によって認識される抗原を発現するがんの腫瘍量を減らすことなどによって、処置、例えば改善する。

10

#### 【0234】

養子細胞療法のために細胞を投与する方法は公知であり、ここに提供する方法および組成物と一緒に使用することができる。例えば養子T細胞療法は、Gruenbergらの米国特許出願公開第2003/0170238号、Rosenbergの米国特許第4,690,915号、Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol. 8 (10):577-85などに記載されている。例えばThemeli et al. (2013) Nat Biotechnol. 31 (10):928-933、Tsukahara et al. (2013) Biochem Biophys Res Commun 438 (1):84-9、Davila et al. (2013) PLoS ONE 8 (4):e61338を参照されたい。

20

#### 【0235】

本明細書にいう「対象」は哺乳動物、例えばヒトまたは他の動物であり、典型的にはヒトである。いくつかの態様において、細胞、細胞集団、または組成物が投与される対象、例えば患者は、哺乳動物、典型的には霊長類、例えばヒトである。いくつかの態様において、霊長類はサルまたは類人猿である。対象は、男性または女性であることができ、乳幼児、若年、青年、成人、および老人対象を含む、任意の適切な年齢であることができる。いくつかの態様において、対象は、齧歯類動物などの非霊長類哺乳動物である。

#### 【0236】

本明細書で使用する「処置」(およびその文法上の語尾変化、例えば、「処置する(treat)」または「処置する(treating)」)とは、疾患もしくは状態もしくは障害、あるいはこれらに関連する症状、副作用もしくは転帰、または表現型の完全または部分的な寛解または低減を指す。処置の望ましい治療効果には、疾患の発生または再発の阻止、症状の緩和、疾患のあらゆる直接的または間接的な病理学的結果の減少、転移の阻止、疾患進行速度の減少、疾患状態の寛解または軽減、および寛解または予後の改善が含まれるが、これに限定されない。この用語は、疾患の完治、またはあらゆる症状の完全な除去、または全ての症状もしくは転帰に及ぼす影響を意味しない。

30

#### 【0237】

本明細書で使用する「疾患の発症を遅らせる」とは、疾患(例えば、癌)の発症を延ばす、邪魔する、遅くする、減速する、安定化する、抑制する、および/または延期することを意味する。この遅れは、病歴および/または処置されている個体に応じて様々な長さの時間でよい。当業者に明らかなように、十分な、または大きな遅れは、実際には、個体が疾患を発症しない点では予防を含む。例えば、転移の発症などの末期癌を遅らせることができる。

40

#### 【0238】

本明細書で使用する「予防する」は、疾患の素因がある可能性があるがまだ疾患と診断されていない対象における疾患の発生または再発に関する予防を提供することを含む。一部の態様において、提供される細胞および組成物は、疾患の発症を遅らせるのに、または疾患の進行を遅くするのに用いられる。

50

【0239】

本明細書で使用する、機能または活性を「抑制する」ということは、関心対象の条件もしくはパラメータ以外は同じ条件と比較した時に、または別の条件と比較した時に機能または活性を低減することである。例えば、腫瘍成長を抑制する細胞は、前記細胞の非存在下での腫瘍成長の速度と比較して腫瘍成長の速度を低減する。

【0240】

投与の文脈において、薬剤、例えば、薬学的製剤、細胞、または組成物の「有効量」とは、望ましい結果、例えば、治療結果または予防結果を成し遂げるのに、必要な投与量/量で、かつ期間にわたって、有効な量を指す。

【0241】

薬剤、例えば、薬学的製剤または細胞の「治療的有效量」とは、望ましい治療結果、例えば、疾患、状態、もしくは障害を処置するための望ましい治療結果、および/または処置の薬物動態学的効果もしくは薬力学的効果を成し遂げるのに、必要な投与量で、かつ期間にわたって、有効な量を指す。治療的有效量は、対象の疾患状態、年齢、性別、および体重、ならびに投与される細胞集団などの要因に応じて変化する可能性がある。一部の態様において、提供される方法は、有効量、例えば、治療的有效量の前記細胞および/または組成物を投与する工程を伴う。

【0242】

「予防的有效量」とは、望ましい予防結果を成し遂げるのに、必要な投与量で、かつ期間にわたって、有効な量を指す。典型的には、疾患の前に、または疾患の初期段階に対象において予防用量が用いられるので、予防的有效量は治療的有效量より少ないが、必ず治療的有效量より少ないとは限らない。

【0243】

処置される疾患または状態は、抗原の発現が疾患、状態または障害の病因と関連し、かつ/または疾患、状態または障害の病因に関与する（例えばそのような疾患、状態、または障害を引き起こし、悪化させ、またはそのような疾患、状態、または障害に他の形で関与する）、任意の疾患または状態であることができる。例示的な疾患および状態として、悪性疾患または細胞の形質転換（例えばがん）、自己免疫疾患もしくは炎症性疾患、または感染症、例えば細菌病原体、ウイルス病原体もしくは他の病原体が引き起こすものと関連する疾患または状態を挙げることができる。処置することができるさまざまな疾患および状態と関連する抗原を含む例示的な抗原については上述した。特定の態様において、キメラ抗原受容体またはトランスジェニックTCRは、疾患または状態と関連する抗原に特異的に結合する。

【0244】

いくつかの態様において、疾患または状態は腫瘍、例えば固形腫瘍、リンパ腫、白血病、血液腫瘍、転移性腫瘍、または他のがんもしくは腫瘍タイプである。

【0245】

いくつかの態様において、疾患または状態は、限定するわけではないがウイルス感染、レトロウイルス感染、細菌感染、および原虫感染、免疫不全、サイトメガロウイルス（CMV）、エプスタイン・バー・ウイルス（EBV）、アデノウイルス、BKポリオーマウイルスなどの、感染症または感染状態である。いくつかの態様において、疾患または状態は、自己免疫性または炎症性の疾患または状態、例えば関節炎、例えば関節リウマチ（RA）、I型糖尿病、全身性エリテマトーデス（SLE）、炎症性腸疾患、乾癬、強皮症、自己免疫性甲状腺疾患、グレーブス病（Grave's disease）、クローン病、多発性硬化症、喘息、および/または移植と関連する疾患もしくは状態である。

【0246】

いくつかの態様において、疾患または障害と関連する抗原は、オーファンチロシンキナーゼ受容体ROR1、tEGFR、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、メソテリン、CEA、およびB型肝炎表面抗原、抗葉酸受容体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、0EPHa2、ErbB2、3、または4、FBP、胎児アセチルコリ

10

20

30

40

50

ンe受容体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R-アルファ、IL-13R-アルファ2、kdr、カップ軽鎖、ルイスY、L1細胞接着分子、MAGE-A1、メソテリン、MUC1、MUC16、PSC A、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、MART-1、gp100、腫瘍胎児性抗原、ROR1、TAG72、VEGF-R2、癌胎児性抗原（CEA）、前立腺特異抗原、PSMA、Her2/neu、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、エフリンB2、CD123、CS-1、c-Met、GD-2、およびMAGE A3、CE7、ウィルムス腫瘍1（WT-1）、サイクリン、例えばサイクリンA1（CCNA1）、および/またはビオチン化分子、および/またはHIV、HCV、HBVもしくは他の病原体が発現する分子からなる群より選択される。

#### 【0247】

したがって、ここに提供される方法および使用には、養子細胞療法のための方法および使用が包含される。いくつかの態様において、本方法は、対象、組織、または細胞への、例えば疾患、状態または障害を有するか、そのリスクがあるか、それを有すると疑われる者への、細胞または細胞を含有する組成物の投与を含む。いくつかの態様では、細胞、集団、および組成物が、例えば、養子T細胞療法などの養子細胞療法によって処置されるべき特定の疾患または状態を有する対象に投与される。いくつかの態様において、細胞または組成物は、対象、例えば疾患もしくは状態を有する対象またはそのリスクがある対象に投与され、疾患または状態の1つまたは複数の症状を改善する。

#### 【0248】

いくつかの態様において、細胞療法、例えば養子T細胞療法は、細胞が、細胞療法を受ける予定の対象から、またはそのような対象に由来する試料から、単離されかつ/または他の形で調製される、自家移入によって実行される。したがって、いくつかの局面において、細胞は処置を必要とする対象、例えば患者に由来し、細胞は、単離および加工後に、同じ対象に投与される。

#### 【0249】

いくつかの態様において、細胞療法、例えば養子T細胞療法は、細胞が、細胞治療を受ける予定の対象または最終的に細胞治療を受ける対象、例えば第1対象ではない対象から、単離されかつ/または他の形で調製される、同種異系移入によって実行される。そのような態様では、次に細胞が、同じ種の異なる対象、例えば第2対象に投与される。いくつかの態様において、第1対象および第2対象は遺伝子的に同一である。いくつかの態様において、第1対象および第2対象は遺伝的に類似している。いくつかの態様において、第2対象は、第1対象と同じHLAクラスまたはHLAスーパータイプを発現する。細胞は任意の適切な手段によって投与することができる。投薬および投与は、一つには、投与が短期間であるか長期間であるかに依存する。さまざまな投薬スケジュールには、単回投与またはさまざまな時点にわたる複数回投与、ポーラス投与、およびパルス注入などがあるが、それらに限定されるわけではない。

#### 【0250】

一定の態様において、細胞、または細胞のサブタイプの個々の集団は、細胞約100万～約1000億個の範囲で、かつ/または体重1キログラムにつき、その細胞量で、例えば細胞100万～約500億個（例えば細胞約500万個、細胞約2500万個、細胞約5億個、細胞約10億個、細胞約50億個、細胞約200億個、細胞約300億個、細胞約400億個、または前記の値のいずれか2つによって画定される範囲）、例えば細胞約1000万～約1000億個（例えば細胞約2000万個、細胞約3000万個、細胞約4000万個、細胞約6000万個、細胞約7000万個、細胞約8000万個、細胞約9000万個、細胞約100億個、細胞約250億個、細胞約500億個、細胞約750億個、細胞約900億個、または前記の値のいずれか2つによって画定される範囲）、および場合によっては細胞約1億個～細胞約500億個（例えば細胞約1億2000万個、細胞約2億5000万個、細胞約3億5000万個、細胞約4億5000万個、細胞約6億5000万個、細胞約8億個、細胞約9億個、細胞約30億個、細胞約300億個、細胞約450億個）、またはこれらの範囲内の任意の値で、かつ/または体重1キログラムにつきその量で、対象に投与される。ここでも、投薬量は、疾患もしくは障害および/または患者に特有の属性、および/または他の処置に依存して変動しうる。

10

20

30

40

50

## 【0251】

一部の態様において、前記細胞は、組み合わせ処置の一部として、例えば、別の治療介入、例えば、抗体または操作された細胞または受容体または薬剤、例えば、細胞傷害剤または治療剤と同時に、または任意の順番で連続して投与される。前記細胞は、一部の態様では、1種類もしくは複数種のさらなる治療剤と一緒に、または別の治療介入と共に、同時に、または任意の順番で連続して同時投与される。ある状況では、前記細胞は、前記細胞集団が1種類もしくは複数種のさらなる治療剤の効果を強化するような十分に短い期間で別の療法と一緒に同時投与されるか、または逆もまた同じである。一部の態様において、前記細胞は、1種または複数種のさらなる治療剤の前に投与される。一部の態様において、前記細胞は、1種または複数種のさらなる治療剤の後に投与される。一部の態様において、1種または複数種のさらなる薬剤は、例えば持続性を強化するために、サイトカイン、例えばIL-2を含む。一部の態様において、前記方法は、化学療法剤の投与を含む。

10

## 【0252】

前記細胞の投与に続いて、操作された細胞集団の生物学的活性は、一部の態様では、例えば多数の公知の方法の任意の方法によって、測定される。評価するパラメータには、インビボでは、例えば、画像化による、またはエクスピボでは、例えば、ELISAもしくはフローサイトメトリーによる、操作された、もしくは天然のT細胞または他の免疫細胞と抗原との特異的結合が含まれる。ある特定の態様において、操作された細胞が標的細胞を破壊する能力は、当技術分野において公知の任意の適切な方法、例えば、細胞傷害アッセイ、例えば、Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009)および Herman et al. J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004)に記載の細胞傷害アッセイを用いて測定することができる。ある特定の態様において、前記細胞の生物学的活性は、1つまたは複数のサイトカイン、例えば、CD107a、IFN $\gamma$ 、IL-2、およびTNFの発現および/または分泌をアッセイすることによって測定される。一部の局面において、生物学的活性は、臨床転帰、例えば、腫瘍負荷(tumor burden)または腫瘍量(tumor load)の低減を評価することによって測定される。

20

## 【0253】

ある特定の態様では、操作された細胞は、治療効力または予防効力が向上するように任意の数のやり方でさらに修飾される。例えば、集団によって発現される操作されたCARまたはTCRは、リンカーを介して標的化部分と直接的または間接的に結合体化することができる。化合物、例えば、CARまたはTCRを標的化部分に結合体化する手法は当技術分野において公知である。例えば、Wadwa et al., J. Drug Targeting 3: 111 (1995)および米国特許第5,087,616号を参照されたい。

30

## 【0254】

## V. 例示的な態様

提供される態様には、以下が含まれる。

1. 参照キメラ受容体のジャンクション領域と比較して1つまたは複数のアミノ酸配列修飾を有する修飾されたジャンクション領域を含むバリエーションキメラ受容体であって、

該参照キメラ受容体は、ジャンクションにおいて連続した順序で接合された第1ドメインおよび第2ドメインを含み、該参照キメラ受容体の該ジャンクション領域は、該ジャンクションのすぐC末側の最大15連続アミノ酸および/または該ジャンクションのすぐN末側の最大15連続アミノ酸を含み、

40

該修飾されたジャンクション領域の8~15アミノ酸部分の配列を有するペプチド断片は、ヒト白血球抗原(HLA)分子に対して、参照キメラ受容体のジャンクション領域の対応する部分の配列を有するペプチド断片の同じHLA分子に対する結合親和性よりも低い結合親和性を有する、

バリエーションキメラ受容体。

2. 参照キメラ受容体のジャンクション領域の対応する部分のペプチド断片が、1000nM未満、500nM未満または50nM未満の結合親和性を有する、態様1のバリエーションキメラ受容体。

50

3. 参照キメラ受容体のジャンクション領域と比較して1つまたは複数のアミノ酸配列修飾を有する修飾されたジャンクション領域を含むバリエーションキメラ受容体であって、

該参照キメラ受容体は、ジャンクションにおいて連続した順序で接合された第1ドメインおよび第2ドメインを含み、該参照キメラ受容体の該ジャンクション領域は、該ジャンクションのすぐC末側の最大15連続アミノ酸および/または該ジャンクションのすぐN末側の最大15連続アミノ酸を含み、

修飾されたジャンクション領域内の全ての8～15アミノ酸断片の、または全ての8、9、10、11、12、13、14、もしくは15アミノ酸断片の、ヒトHLA分子に対する結合親和性の平均は、参照キメラ受容体のジャンクション領域内の全ての8～15アミノ酸断片の、または全ての8、9、10、11、12、13、14、もしくは15アミノ酸断片の結合親和性の平均よりも低い、

10

バリエーションキメラ受容体。

4. 結合親和性または結合親和性の平均が、2分の1未満、5分の1未満、10分の1未満、25分の1未満、50分の1未満、100分の1未満である、態様1～3のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

5. 参照キメラ受容体のジャンクション領域と比較して1つまたは複数のアミノ酸配列修飾を有する修飾されたジャンクション領域を含むバリエーションキメラ受容体であって、

該参照キメラ受容体は、ジャンクションにおいて連続した順序で接合された第2ドメインに直接連結された第1ドメインを含み、

該参照キメラ受容体のジャンクション領域は、該ジャンクションのすぐC末側の最大15連続アミノ酸および/または該ジャンクションのすぐN末側の最大15連続アミノ酸を含み、

20

ヒト白血球抗原（HLA）に対して1000nM未満の結合親和性を有する該修飾されたジャンクション領域の8～15アミノ酸部分の配列を有するペプチド断片の数は、同じHLAへの結合に関して同じ親和性を有する該参照キメラ受容体の該ジャンクション領域の8～15アミノ酸部分の配列を有するペプチド断片の数と比較して低減している、

バリエーションキメラ受容体。

6. HLAに対して500nM未満または50nM未満の結合親和性を呈する修飾されたジャンクション領域内のペプチド断片の数が低減しているか、あるいは

前記1000nM未満の結合親和性が、500nM未満または50nm未満の結合親和性である、態様5のバリエーションキメラ受容体。

30

7. 結合親和性がIC50であり、修飾されたジャンクション領域のペプチド断片と参照キメラ受容体のジャンクション領域のペプチド断片の結合の比較が、同じ標準ペプチドを基準とするものである、態様1～6のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

8. 第1ドメインおよび/または第2ドメインが天然ヒトタンパク質のドメインを含み、かつ/または

第1ドメインおよび/または第2ドメインが細胞外結合ドメイン、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、または細胞内シグナル伝達ドメインを含み、前記細胞内シグナル伝達ドメインは、任意で、共刺激シグナル伝達ドメインまたは活性化細胞質シグナル伝達ドメインである、

態様1～7のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

40

9. 第1ドメインおよび第2ドメインが、ヒト対象においてインビボで同じ分子中には存在しない、態様1～8のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

10. 第1ドメインおよび第2ドメインが、それぞれ、細胞外リガンド結合ドメインおよびヒンジドメイン、ヒンジドメインおよび膜貫通ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内共刺激シグナル伝達ドメイン、ならびに細胞内共刺激シグナル伝達ドメインおよび活性化細胞質シグナル伝達ドメインであり、これらは係るドメインの機能的部分を含むことができる、態様1～9のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

11. 第1ドメインが膜貫通ドメインまたはその機能的部分であり、第2ドメインが共刺激シグナル伝達ドメインまたはその機能的部分である、態様1～10のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

50

12. 膜貫通ドメインがCD28膜貫通ドメインまたはその機能的部分もしくはバリエーションであり、共刺激シグナル伝達ドメインが4-1BBシグナル伝達ドメインまたはその機能的部分もしくはバリエーションである、態様11のバリエーションキメラ受容体。

13. 参照キメラ受容体のジャンクション領域が、ジャンクションのすぐC末側の最大13連続アミノ酸および/またはジャンクションのすぐN末側の最大15連続アミノ酸を含む、態様1～12のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

14. ペプチド断片が、8～15アミノ酸長または約8～約15アミノ酸長のアミノ酸の配列を含むか、あるいは少なくとも8、9、10、11、12、13、14または15アミノ酸長であるか、少なくとも約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14または約15アミノ酸長であるか、8、9、10、11、12、13、14もしくは15アミノ酸長であるか、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14または約15アミノ酸長であるアミノ酸の配列を含む、態様1～13のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

10

15. 第1ドメインに対して少なくとも95%の配列同一性を持つドメインおよび/または第2ドメインに対して少なくとも95%の配列同一性を持つドメイン、

第1ドメインと配列が同一であるドメインおよび第2ドメインに対して少なくとも95%の配列同一性を持つドメイン、または

第1ドメインに対して少なくとも95%の配列同一性を持つドメインおよび第2ドメインと配列が同一であるドメイン

を含み、

バリエーションキメラ受容体中に存在するドメインの少なくとも一方または両方は、参照キメラ受容体の第1ドメインおよび/または第2ドメインと比較して、修飾されたジャンクション領域を含む部分において修飾されている、

20

態様1～14のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

16. バリエーションキメラ受容体が、参照キメラ受容体に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を含み、かつ/または

バリエーションキメラ受容体が、参照キメラ受容体と比較して、最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個のアミノ酸修飾を含む、

態様1～15のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

30

17. CD28膜貫通ドメインが、SEQ ID NO:2、103または104に示すアミノ酸の配列を含むか、あるいはSEQ ID NO:2、103または104に対して少なくとも95%の配列同一性を呈する配列を含むその機能的部分またはバリエーションを含み、

4-1BB共刺激シグナル伝達ドメインが、SEQ ID NO:3に示すアミノ酸の配列を含むか、あるいはSEQ ID NO:3に対して少なくとも95%の配列同一性を呈する配列を含むその機能的部分またはバリエーションを含む、

態様12～16のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

18. 第1ドメインおよび第2ドメインが全体として、SEQ ID NO:5に示すアミノ酸の配列を含むか、あるいはSEQ ID NO:5に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を呈するアミノ酸の配列を含むその機能的部分またはバリエーションを含む、態様12～17のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

40

19. 第1ドメインおよび第2ドメインが全体としてSEQ ID NO:5に示すアミノ酸の配列を含む、態様12～18のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

20. 1つまたは複数の修飾が、SEQ ID NO:5に示すナンバリングで、残基13～残基42の部分の中、またはアミノ酸残基15～アミノ酸残基40の部分の中にある、態様12～19のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

21. 1つまたは複数の修飾が、アミノ酸の挿入、置換または欠失を含み、かつ/または1つもしくは複数の修飾のそれぞれが、個別に、アミノ酸の挿入、置換、または欠失を含む、態様1～20のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

50



22. 第1ドメインおよび/または第2ドメインが膜貫通ドメインを含み、

1つまたは複数の修飾が、任意でCD28膜貫通ドメインである膜貫通ドメイン中の、疎水性アミノ酸残基における修飾もしくは疎水性アミノ酸残基の修飾もしくは疎水性部分内での修飾ではなく、それを含むこともなく、または

1つもしくは複数の修飾が、任意でCD28膜貫通ドメインである膜貫通ドメイン内の疎水性アミノ酸残基の修飾を含み、それは、疎水性アミノ酸の別の異なる疎水性アミノ酸残基による置換であるか、それを含み、または

1つもしくは複数の修飾が、別の疎水性アミノ酸残基による置換以外の、任意でCD28膜貫通ドメインである膜貫通ドメイン中の、疎水性アミノ酸残基における修飾もしくは疎水性アミノ酸残基の修飾もしくは疎水性部分内での修飾ではなく、それを含むこともない、  
 態様1～21のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

10

23. 1つまたは複数の修飾が、SEQ ID NO:5に示すナンバリングで残基28～残基42のアミノ酸残基に対応するアミノ酸残基における修飾を含む、態様12～22のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

24. アミノ酸修飾が挿入であり、バリエーションキメラ受容体が、任意でSEQ ID NO:5に示すナンバリングでアミノ酸残基27およびアミノ酸残基28に対応するドメイン間のジャンクションに隣接するアミノ酸残基間に挿入を含む、態様1～23のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

25. 1、2、3、4または5アミノ酸残基の挿入を含む、態様24のバリエーションキメラ受容体。

20

26. 挿入が、任意でアスパラギン(N)である任意のアミノ酸残基の挿入である、態様24または態様25のバリエーションキメラ受容体。

27. 1つまたは複数の修飾がアミノ酸の置換を含み、アミノ酸の置換が、SEQ ID NO:5に示すナンバリングで28、31または34から選択される残基に対応する1つまたは複数の残基におけるアミノ酸の置換である、態様12～26のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

28. アミノ酸の置換が、任意で、ロイシン(L)、アスパラギン(N)、グルタミン(Q)、アラニン(A)、セリン(S)またはヒスチジン(H)のなかから選択される、他の任意のアミノ酸残基への置換である、態様27のバリエーションキメラ受容体。

29. アミノ酸の置換が、SEQ ID NO:5に示すナンバリングで、K28A、K28H、K28L、K28Q、K28S、R31A、R31H、R31L、R31N、R31S、L34AおよびL34Sのなかから選択される置換に対応するか、または該置換である、態様27または態様28のバリエーションキメラ受容体。

30

30. アミノ酸の置換が、SEQ ID NO:5に示すナンバリングでL34AまたはL34Sに対応する単一のアミノ酸の置換を含まない、態様27～29のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

31. アミノ酸の置換が、K28Q/R31A、K28Q/R31N、K28Q/R31S、K28Q/L34A、K28Q/L34S、R31N/L34A、R31N/L34S、K28Q/R31N/L34A、K28Q/R31N/L34Sのなかから選択されるアミノ酸の置換であるか、または該置換に対応する、態様27～30のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

32. SEQ ID NO:137に対して100%未満であるがSEQ ID NO:137に対して85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%または96%より大きい配列同一性を含む、修飾されたジャンクション領域を含み、かつ前記修飾を含み、かつ/または

40

SEQ ID NO:5に対して100%未満であるがSEQ ID NO:5に対して85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%または96%より大きい配列同一性を含む配列を含み、かつ該修飾を含む、

態様1～31のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

33. (i) SEQ ID NO:138～157および184のいずれかに示すアミノ酸の配列、

(ii) SEQ ID NO:138～157および184のいずれかに示すアミノ酸の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を呈しかつ前記修飾を含むアミノ酸の配列を含む、その機能的バ

50

リアント、または

(iii) 該修飾を含む、(i) もしくは(ii) の機能的部分

のなかから選択される修飾されたジャンクション領域を含む、態様1～32のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

34. (i) SEQ ID NO:114～134および183のいずれかに示すアミノ酸の配列、

(ii) SEQ ID NO:114～134および183のいずれかに示すアミノ酸の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を呈しかつ前記修飾を含むアミノ酸の配列を含む、その機能的バリエーション、または

(iii) 該修飾を含む、(i) もしくは(ii) の機能的部分

を含む、態様1～33のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

10

35. 修飾されたジャンクション領域が、参照キメラ受容体のジャンクション領域と比較して、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個以下のアミノ酸修飾を含む、態様1～34のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

36. 第1ドメインまたは第2ドメインが膜貫通ドメインであり、バリエーションキメラ受容体中の対応するドメインが、実質上疎水性のハイドロパシープロファイルを含み、かつ/または0、0.25、0.5、0.75、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2またはそれ以上を上回るGRAVY (ハイドロパシーの全体平均) 値を有する、態様1～35のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

37. 第1ドメインまたは第2ドメインが細胞内シグナル伝達ドメインを含み、バリエーションキメラ受容体中の対応するドメインが、TRAFの活性化または細胞局在を誘導する能力を有し、かつ/またはTRAF媒介シグナル伝達を誘導する能力を有する、態様1～36のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

20

38. 細胞内シグナル伝達ドメインが4-1BB共刺激シグナル伝達ドメインであり、かつ/またはTRAFが、TRAF1、TRAF2またはTRAF3のなかから選択される、態様37のバリエーションキメラ受容体。

39. それぞれSEQ ID NO:5に示すナンバリングで、49～52に対応する位置にアミノ酸TTQEを、かつ/または残基60～63に対応する位置にアミノ酸PEEEを含む、態様12～38のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

40. HLAはHLAクラスIおよび/またはHLAクラスIIである、態様1～39のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

30

41. HLAクラスIが表1Aに示すHLA対立遺伝子から選択され、かつ/またはHLAクラスII対立遺伝子が表1Bに示すHLA対立遺伝子から選択される、態様1～40のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

42. HLAクラスI対立遺伝子が、HLA-A\*02:01、HLA-A\*03:01、HLA-A\*11:01およびHLA-B\*08:01のなかから選択される、態様1～41のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

43. HLAが複数のHLA分子を含み、それら複数のHLA分子のうちの1つまたは複数に対する平均結合親和性が低くなり、かつ/またはそれら複数のHLA分子のうちの1つまたは複数に個別に結合するペプチド断片の数が低減している、態様3～42のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

40

44. 複数のHLA分子が、

世界人口におけるまたは白人人口におけるHLAクラスI分子の50%超、60%超、70%超、80%超、90%超、95%超または99%超に相当する複数のHLAクラスI分子、

世界人口におけるまたは白人人口におけるHLAクラスII分子の50%超、60%超、70%超、80%超、90%超、95%超または99%超に相当する複数のHLAクラスII分子、あるいは

世界人口におけるまたは白人人口におけるHLAクラスI分子およびHLAクラスII分子の50%超、60%超、70%超、80%超、90%超、95%超または99%超に相当する複数のHLAクラスI分子およびHLAクラスII分子

から選択される、態様43のバリエーションキメラ受容体。

50

45. 結合親和性がインビトロで決定される、態様1～44のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

46. ヒト対象に投与したときに、参照キメラ受容体と比較して低減した免疫原性を呈し、任意で、該対象が該参照キメラ受容体の投与を受けたことがある、態様1～45のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

47. 低減した免疫原性に、低減したCD4+ T細胞免疫応答および/または低減したCD8+ T細胞免疫応答が含まれる、態様46のバリエーションキメラ受容体。

48. 参照キメラ受容体が細胞外リガンド結合ドメインをさらに含み、かつ/またはバリエーションキメラ受容体が細胞外リガンド結合ドメインをさらに含む、態様11～47のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

49. キメラ抗原受容体 (CAR) であり、リガンド結合ドメインが抗原結合ドメインである、態様48のバリエーションキメラ受容体。

50. 抗原結合ドメインが抗体または抗体断片である、態様49のバリエーションキメラ受容体。

51. 抗原結合ドメインが、一本鎖断片である抗体断片である、態様50のバリエーションキメラ受容体。

52. 断片が、柔軟な免疫グロブリンリンカーによって接合された抗体可変領域を含む、態様50または態様51のバリエーションキメラ受容体。

53. 抗体断片がscFvを含む、態様50～52のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

54. リガンド結合ドメインが、疾患または障害と関連する抗原に特異的に結合する、態様48～52のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

55. 疾患または障害が感染症または感染状態、自己免疫疾患、炎症性疾患、または腫瘍もしくはがんであり、

リガンド結合ドメインが、腫瘍抗原に特異的に結合し、かつ/または

リガンド結合ドメインが、ROR1、Her2、L1-CAM、CD19、CD20、CD22、メソテリン、CEA、B型肝炎表面抗原、抗葉酸受容体、CD23、CD24、CD30、CD33、CD38、CD44、EGFR、EGP-2、EGP-4、EPHa2、ErbB2、ErbB3、ErbB4、FBP、胎児アセチルコリン受容体、GD2、GD3、HMW-MAA、IL-22R-アルファ、IL-13R-アルファ2、kdr、カップパ軽鎖、ルイスY、L1細胞接着分子、MAGE-A1、メソテリン、MUC1、MUC16、PSCA、NKG2Dリガンド、NY-ESO-1、MART-1、gp100、腫瘍胎児性抗原、TAG72、V EGF-R2、癌胎児性抗原 (CEA)、前立腺特異抗原、PSMA、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、エフリンB2、CD123、CS-1、c-Met、GD-2、MAGE A3、CE7、ウィルムス腫瘍1 (WT-1) およびサイクリンA1 (CCNA1) からなる群より選択される抗原に特異的に結合する、

態様54のバリエーションキメラ受容体。

56. 参照キメラ受容体が活性化細胞質シグナル伝達ドメインをさらに含み、かつ/またはバリエーションキメラ受容体が活性化細胞質ドメインをさらに含む、態様11～55のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

57. 活性化細胞質ドメインがT細胞受容体 (TCR) 成分を含み、かつ/または免疫受容体チロシン活性化モチーフ (ITAM) を含む、態様56のバリエーションキメラ受容体。

58. 活性化細胞質シグナル伝達ドメインが、CD3-ゼータ (CD3 ) 鎖のゼータ鎖の細胞質シグナル伝達ドメイン、またはその機能的バリエーションもしくはシグナル伝達部分であるか、またはそれを含む、態様56または態様57のバリエーションキメラ受容体。

59. 参照キメラ受容体が、そのN末からC末に向かって順に、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメインである第1ドメイン、細胞内共刺激ドメインである第2ドメイン、および活性化細胞質シグナル伝達ドメインを含み、かつ/または

バリエーションキメラ受容体が、そのN末からC末に向かって順に、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内共刺激ドメインおよび活性化細胞質シグナル伝達ドメインを含み、膜貫通ドメインと細胞内共刺激ドメインがジャンクションにおいて連続した順序で接合されて、修飾されたジャンクション領域を形成している、

10

20

30

40

50

態様11～58のいずれかのバリエーションキメラ受容体。

60. 態様1～59のいずれかのバリエーションキメラ受容体をコードする核酸分子。

61. 態様60の核酸分子を含むベクター。

62. ウイルスベクターである、態様61のベクター。

63. レトロウイルスベクターであり、該レトロウイルスベクターが任意でレンチウイルスベクターまたはガンマレトロウイルスベクターである、態様61または態様62のベクター。

64. 態様60の核酸もしくは態様61～63のいずれかのベクターを含む、または態様1～59のいずれかのキメラ受容体を発現する、操作された細胞。

65. T細胞である、態様64の操作された細胞。

66. CD4+ T細胞および/またはCD8+ T細胞である、態様64または態様65の操作された細胞。

67. 態様64～66のいずれかの操作された細胞と任意で薬学的に許容される緩衝液とを含む組成物。

68. 態様64～66のいずれかの細胞または態様67の組成物を、ある疾患または状態を有する対象に投与する工程を含む、処置の方法。

69. キメラ受容体が前記疾患または状態に関連するリガンドまたは抗原に特異的に結合する、態様68の方法。

70. 疾患または状態が、がん、腫瘍、自己免疫疾患もしくは自己免疫障害、または感染症である、態様68または態様69の方法。

71. 組成物中の操作されたT細胞が、前記対象において、参照キメラ受容体を発現する同じまたはほぼ同じ投与量の参照細胞組成物が投与された対象においてよりも、増加したまたはより長期の増大および/または持続を呈する、態様68～70のいずれかの方法。

72. 増加が少なくとも1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、または5倍である、態様71の方法。

73. 増加が、細胞の投与後、1ヶ月以内、2ヶ月以内、6ヶ月以内、または1年以内に観察される、または存在する、態様71または態様72の方法。

【0255】

#### VI. 定義

「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーをさすために交換可能に使用され、最小の長さに限定されない。提供される受容体およびその他のポリペプチド、例えば、リンカーまたはペプチドを含むポリペプチドは、天然アミノ酸残基および/または非天然アミノ酸残基を含むアミノ酸残基を含んでいてもよい。その用語には、ポリペプチドの発現後修飾、例えば、グリコシル化、シアリル化、アセチル化、およびリン酸化も含まれる。いくつかの局面において、タンパク質が所望の活性を維持する限り、ポリペプチドは、ネイティブまたは天然の配列と比べて修飾を含有していてもよい。これらの修飾は、例えば、部位特異的変異誘発を通じた計画的なものであってもよいし、または、例えば、タンパク質を産生する宿主の変異もしくはPCR増幅によるエラーを通じた偶発的なものであってもよい。

【0256】

本明細書にいう「配列同一性パーセント(%)」および「同一性パーセント」は、それがヌクレオチド配列(参照ヌクレオチド配列)に関して使用される場合には、最大の配列同一性パーセントが得られるように配列をアライメントし、必要であればギャップを導入した後に、参照配列中のヌクレオチド残基と同一である候補配列(例えば対象キメラ受容体、例えばバリエーションキメラ受容体)中のヌクレオチド残基のパーセンテージと定義される。配列同一性パーセントを決定するためのアライメントは、当技術分野における技量の範囲内にあるさまざまな方法で、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGNまたはMegalign(DNASTAR)ソフトウェアなどの公に利用可能なコンピュータソフトウェアを使って、達成することができる。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大アライメントを得るために必要な任意のアルゴリズムを含めて、配列をアライメントするための適当なパラメ

10

20

30

40

50

ータを決定することができる。

【0257】

本明細書において、領域の位置に関して「対応する」、例えば「に対応する位置における」、またはある領域またはアミノ酸位置が、開示された配列中の、例えば配列表に示す配列中の、ある領域またはアミノ酸位置「に対応する」との叙述は、GAPアルゴリズムなどの標準的なアライメントアルゴリズムを使って同一性が最大になるように、開示された配列とアライメントした後に同定される、アミノ酸位置を指す。例示的な、記載の対応する残基は、配列を、SEQ ID NO:5に示す例示的参照ジャンクション領域とアライメントすることによって、同定することができる。配列をアライメントすることにより、当業者は、対応する残基または対応する領域を、例えば保存された同一アミノ酸残基を目印として使用して、同定することができる。一般に、対応する部分または対応する領域を同定するには、最も高次の一致が得られるようにアミノ酸の配列をアライメントする（例えばComputational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988、Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993、Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994、Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987、およびSequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991、Carrillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48: 1073参照）。

10

20

【0258】

本明細書において使用する「ベクター」という用語は、それが連結された別の核酸を増殖させる能力を有する核酸分子を指す。この用語は、自己複製核酸構造としてのベクターも、それが導入された宿主細胞のゲノムに組み込まれるベクターも包含する。一定のベクターは、それらが機能的に連結された核酸の発現を指示する能力を有する。そのようなベクターを本明細書では「発現ベクター」という。ベクターには、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクターが含まれる。

【0259】

「宿主細胞」、「宿主細胞株」および「宿主細胞培養」という用語は可換的に使用され、外来核酸が導入されている細胞を指し、そのような細胞の子孫を包含する。宿主細胞は「形質転換体」および「形質転換細胞」を包含し、これには初代形質転換細胞とそこから派生する子孫が、継代数とは関係なく含まれる。子孫は、核酸の内容が親細胞と完全には同一ではなくて、突然変異を含有してもよい。元の形質転換細胞においてスクリーニングまたは選択の対象となったものと同じ機能または生物学的活性を有する突然変異形子孫は、ここに包含される。

30

【0260】

本明細書で使用する単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、特に文脈によってはっきり示されていない限り複数の指示物を含む。例えば、「1つの(a)」または「1つの(an)」は「少なくとも1つの」または「1つまたは複数の」を意味する。本明細書に記載の局面およびバリエーションは、「からなる」および/または「から本質的になる」局面およびバリエーションを含むことが理解される。

40

【0261】

本開示全体を通じて、クレームされた対象の様々な局面が範囲の形で示される。範囲の形での説明は単なる便宜および簡略のためであり、クレームされた対象の範囲に対する融通の利かない限定として解釈してはならないと理解されるはずである。従って、範囲の説明は、可能性のある全ての部分範囲(sub-range)ならびにその範囲内にある個々の数値を具体的に開示したとみなされるはずである。例えば、値の範囲が示された場合、その範囲の上限と下限との間の、間にあるそれぞれの値と、その述べられた範囲内にある他の任意の述べられた値または間にある値が、クレームされた対象に包含されると理解される。これらのさらに小さな範囲の上限および下限は、独立して、その小さな範囲に含まれてもよ

50

く、その述べられた範囲内にある、明確に除外されるあらゆる限界を条件としてクレームされた対象にも包含される。述べられた範囲が限界の一方または両方を含む場合、それらの含まれる限界のいずれかまたは両方を除外する範囲もまた、クレームされた対象に含まれる。このことは範囲の幅に関係なく適用される。

#### 【0262】

本明細書で使用する「約」という用語は、この技術分野の当業者に容易に分かる、それぞれの値の通常の誤差範囲を指す。本明細書における「約」のついた値またはパラメータについての言及は、その値またはパラメータそのものに向けられた態様を含む(およびその態様について説明している)。例えば、「約X」についての説明は「X」の説明を含む。

#### 【0263】

本明細書で使用する組成物とは、細胞を含む、2種類以上の産物、物質、または化合物の任意の混合物を指す。組成物は、溶液、懸濁液、液体、粉末、ペースト、水性、非水性、またはその任意の組み合わせでもよい。

#### 【実施例】

#### 【0264】

### VII. 実施例

以下の実施例は例示のためだけに含まれ、本発明の範囲を限定することを目的としない。

#### 【0265】

#### 実施例1：トランスジーン生成物に特異的な宿主免疫応答の分析

CD19特異的CARを発現する自己T細胞によって処置されたB細胞悪性腫瘍を有する4人の対象から、処置前および処置後の末梢血単核細胞(PBMC)試料を入手した。CARは、マウス抗体に由来する抗CD19 scFv、ヒンジドメイン、CD28膜貫通ドメイン、4-1BB細胞内シグナル伝達ドメイン、およびCD3 細胞内シグナル伝達ドメインを含んでいた。CAR発現T細胞に、T2Aリボソームスイッチドメインで隔てられた、CARをコードする核酸およびEGFRt代理マーカーをコードする核酸を含むレンチウイルスベクターを細胞に形質導入することによって、代理マーカーとして短縮EGFR(EGFRt)部分も発現させた。

#### 【0266】

対象から入手された注入前および注入後(42日目)のPBMCを、本質的に、Berger et al. Blood. 2006 March; 107(6): 2294-2302, Berger et al. J Virol. 2001 January 75(2): 799-808, Riddell et al. Nature Medicine. 1996 February 2(2): 216-223, Berger et al. Blood. 2005 February 105(4): 1640-1647によって記載されたようにして、特異的な抗CAR免疫応答の存在または欠如を検出するために査定した。簡単に説明すると、投与された細胞が発現するCARによって形質導入された自己の照射済み細胞(1:1または2:1の応答細胞対刺激細胞比の刺激細胞)によって、インビトロでPBMC(応答細胞)を刺激した。次いで、様々なエフェクター標的比(E/T)で、自己の<sup>51</sup>Cr標識CAR形質導入T細胞(「CD19 CAR」)および非形質導入(「モック」)T細胞(標的)に対する細胞傷害について、クロム放出アッセイにおいて培養物を査定した。コインキュベーションの後、クロムの放出を定量化し、各試料における最大の達成可能な溶解に対する百分率を決定した。

#### 【0267】

1人の例示的な患者に由来する試料についての結果が、図1に示され、注入前および注入後42日目のPBMCの細胞溶解活性が示される。注入前のPBMC由来培養物においては、CAR形質導入標的細胞に特異的な細胞溶解活性は検出されなかったが、査定された4人の対象のうちの2人において、注入後のPBMC試料に由来する培養物において、CAR特異的な溶解活性が検出された。これらの結果は、CAR発現T細胞の一回の注入の後に、CAR特異的な免疫応答が発達し得ることを示している。

#### 【0268】

特異的な免疫応答によって認識されるCARの領域を査定するため、エピトープマッピングを実施した。投与された細胞が発現するCARのおよそ500アミノ酸の配列の全長のオーバーラップする部分(11アミノ酸オーバーラップ)を表す配列を有する複数の15merペ

10

20

30

40

50

プチドの個々のプールの存在下で、注入前および注入後のPBMC試料を刺激した。CD8およびCD4の表面発現ならびにサイトカインの細胞内発現を検出するため、抗体によって細胞を染色した。各々10種のペプチドを含有し、集合的に125種の個々のオーバーラップペプチドを含む、23個のプールを、査定した。各ペプチドは、プールのうちの少なくとも2個において表される。

【0269】

この設計は、このアッセイにおいてヒットとして検出された複数個のプールに存在するペプチドが、免疫原性である可能性のあるペプチドヒットと見なされる、個々のペプチドに特異的な応答を査定するための分析グリッドの生成を可能にした。CAR特異的な免疫応答が検出された2人の患者について、それぞれ、6個および3個のペプチドヒットが同定された。

10

【0270】

これらの個々のヒットの各々について特異的な免疫応答の存在または欠如を査定するため、抗サイトカイン捕捉抗体を使用して、個々のELISpotアッセイを実施した (Berger et al.(2006); Berger et al.(2001); Riddell et al.(1996); およびBerger et al.(2005) (前記) を参照すること)。1人の患者についての例示的なアッセイの結果が、図2に示される。CARのscFvのV<sub>H</sub>部分の中の配列を有する (1人の患者については、FR1領域、CDR1領域、およびFR2領域の中、他方についてはFR3の中の領域を含む) ペプチドに対する特異的な免疫応答が、査定された両方の患者において検出された。第1の患者については、CARの膜貫通ドメインと共刺激ドメインとの間のジャンクションを各々含有している2種の15merオーバーラップペプチド (図2中、「融合部位」と表示される) に対しても、特異的な免疫応答が検出された。これらの2種の15merオーバーラップペプチドは、それぞれ、アミノ酸配列

20

AFIIFWVKRGRKKLL (SEQ ID NO: 8)

および

FWVKRGRKKLLYIFK (SEQ ID NO: 9)

を有していた。マウスscFv、CD28膜貫通ドメインおよび共刺激ドメイン、ならびにCD3

ドメインを有する異なるCARの投与の後の、類似した方法を使用した、もう一つの研究においても、1人の対象について、抗CD19 scFvのV<sub>H</sub>部分を含有しているプールに対して免疫応答が検出され、もう1人の対象について、ジャンクション部分を含有しているプールに対して検出された。

30

【0271】

このアッセイによって、他の領域の中のペプチドに対しては、患者における特異的な免疫応答は検出されなかった。例えば、このアッセイにおいて、scFvの他のCDRもしくはフレームワーク領域の中の配列を有するペプチド、共刺激ドメインもしくは膜貫通ドメインの領域の中にあるがその2つの間のジャンクションにかからないペプチド、またはCARのEGFRt領域もしくはCD3領域の中のペプチドに対しては、特異的な応答は検出されなかった。内在性配列に対する特異的な免疫応答は検出されなかった。

40

【0272】

実施例2: CARのジャンクション領域に由来するペプチドのHLAクラスIおよびHLAクラスIIとの結合についてのインシリコ分析

例示的なCAR配列の部分の中の一連のオーバーラップペプチド配列の各々について、MHC結合親和性および可能性のある免疫原性に関係のあるその他の特性を予測するためのインシリコ分析のため、Immune Epitope Database and analysis resource (IEDB) から入手可能なT細胞エピートプ予測ツールを使用した。部分には、免疫グロブリン由来ヒンジドメインを有するスパーサー、ヒトCD28膜貫通ドメイン、ヒト4-1BB共刺激ドメイン、およびヒトCD3シグナル伝達ドメインが含まれた。査定された部分において、ヒンジドメインはヒトIgG4ヒンジドメインであり、CD28膜貫通ドメインは、SEQ ID NO:2に

50

示された配列を含み、4-1BB共刺激ドメインは、SEQ ID NO:3に示された配列を含有していた。従って、この部分は、スパーサー領域と膜貫通ドメインとの間のジャンクション、膜貫通ドメインと共刺激ドメインとの間のジャンクション、および共刺激ドメインと細胞内シグナル伝達ドメインとの間のジャンクション（図3Aおよび3Bを参照すること）という、ヒト配列に由来する異なるドメインの間の3つのジャンクションを含有していた（これらのジャンクションは、ヒト対象への投与時のCARに対する可能性のある免疫原性の部位を表していた可能性がある）。

#### 【 0 2 7 3 】

T細胞へ提示される可能性を高める特定の特性を有し得る配列の部分の同定するため、27種の個々のHLAクラスI対立遺伝子および56種の個々のHLAクラスII対立遺伝子との結合の親和性を、それぞれ、（9mer結合コアを含有している）8～14アミノ酸長および15アミノ酸長の部分の長さに沿ったオーバーラップペプチドについて予測した。集会的には世界中の集団の99%超に存在するHLA対立遺伝子を表すこれらの対立遺伝子、および米国集団におけるそれらのおよその頻度が、表1Aおよび1Bにリストされる。

#### 【 0 2 7 4 】

（表1A）HLAクラスI

クラスI	対立遺伝子	集団内の頻度
1	HLA-A*01:01	12.94
2	HLA-A*02:01	42.88
3	HLA-A*02:03	0.19
4	HLA-A*02:06	1.55
5	HLA-A*03:01	13.50
6	HLA-A*11:01	11.60
7	HLA-A*23:01	8.30
8	HLA-A*24:02	22.56
9	HLA-A*26:01	5.36
10	HLA-A*30:01	6.29
11	HLA-A*30:02	5.21
12	HLA-A*31:01	6.87
13	HLA-A*32:01	3.71
14	HLA-A*33:01	2.62
15	HLA-A*68:01	6.36
16	HLA-A*68:02	4.79
17	HLA-B*07:02	12.96
18	HLA-B*08:01	9.23
19	HLA-B*15:01	6.54
20	HLA-B*35:01	13.03
21	HLA-B*40:01	9.79
22	HLA-B*44:02	7.22
23	HLA-B*44:03	8.96
24	HLA-B*51:01	8.51
25	HLA-B*53:01	7.26
26	HLA-B*57:01	3.49
27	HLA-B*58:01	4.82

#### 【 0 2 7 5 】



(表 1 B) HLAクラスII

クラスII	対立遺伝子	集団内の頻度	クラスII	対立遺伝子	集団内の頻度
1	HLA-DRB1*01:01	13.62	29	HLA-DQA1*01:02/DQB1*05:02	21.13
2	HLA-DRB1*15:01	22.86	30	HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02	30.74
3	HLA-DRB1*03:01	21.82	31	HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02	31.56
4	HLA-DRB1*04:01	15.54	32	HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:04	19.00
5	HLA-DRB1*11:01	10.92	33	HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01	80.58
6	HLA-DRB1*13:01	9.86	34	HLA-DQA1*02:01/DQB1*02:02	27.99
7	HLA-DRB1*07:01	19.84	35	HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:01	49.92
8	HLA-DRB1*01:01	4.06	36	HLA-DQA1*02:01/DQB1*03:03	23.32
9	HLA-DRB1*01:02	1.85	37	HLA-DQA1*03:03/DQB1*03:03	20.22
10	HLA-DRB1*04:02	6.28	38	HLA-DPA1*01:03/DPB1*01:01	99.83
11	HLA-DRB1*04:05	1.22	39	HLA-DPA1*01:03/DPB1*02:01	99.83
12	HLA-DRB1*04:07	2.78	40	HLA-DPA1*01:03/DPB1*03:01	99.82
13	HLA-DRB1*04:08	1.26	41	HLA-DPA1*01:03/DPB1*04:01	99.88
14	HLA-DRB1*08:04	0.86	42	HLA-DPA1*01:03/DPB1*04:02	99.86
15	HLA-DRB1*09:01	5.33	43	HLA-DPA1*01:03/DPB1*05:01	99.81
16	HLA-DRB1*10:01	2.78	44	HLA-DPA1*02:01/DPB1*01:01	23.54
17	HLA-DRB1*11:02	0.94	45	HLA-DPA1*02:01/DPB1*02:01	24.11
18	HLA-DRB1*11:03	0.74	46	HLA-DPA1*02:01/DPB1*03:01	17.63
19	HLA-DRB1*11:04	4.76	47	HLA-DPA1*02:01/DPB1*04:01	46.73
20	HLA-DRB1*15:02	0.78	48	HLA-DPA1*02:01/DPB1*04:02	38.04
21	HLA-DRB1*15:03	1.22	49	HLA-DPA1*02:01/DPB1*05:01	13.24
22	HLA-DRB1*16:01	4.06	50	HLA-DPA1*02:01/DPB1*06:01	8.59
23	HLA-DRB1*16:02	0.84	51	HLA-DPA1*02:01/DPB1*09:01	7.26
24	HLA-DRB3*02:02	0.00	52	HLA-DPA1*02:01/DPB1*11:01	9.98
25	HLA-DRB3*03:01	0.00	53	HLA-DPA1*02:01/DPB1*13:01	11.55
26	HLA-DRB5*01:01	0.00	54	HLA-DPA1*02:01/DPB1*14:01	7.98
27	HLA-DQA1*01:01/DQB1*05:01	30.57	55	HLA-DPA1*02:01/DPB1*15:01	7.73
28	HLA-DQA1*05:01/DQB1*02:01	76.17	56	HLA-DPA1*02:01/DPB1*17:01	10.40

## 【 0 2 7 6 】

ANNを使用したデータセットにおいて、各8～14アミノ酸ペプチドについてHLAクラスI分子との結合についてのIC50値を予測するため、IEDBから入手可能なアルゴリズムに基づくT細胞エピトープ予測ツールを使用し(Nielsen et al.(2003)Protein Sci.,12:1007-1017およびLundegaard et al.(2008)NAR,36:W509-512)、いくつかのケースにおいては、SMM(Peters and Sette(2005)BMC Bioinformatics,6:132)およびcomblib(Sidney et al.(2008)Immuno Res.4:2)またはコンセンサスツール(Kim,et al.(2012)Immune epitope database analysis resource、NARを参照すること(上記のいずれかからの予測の組み合わせ))を使用した1種または複数種の付加的な予測を使用した。データセット中の各15アミノ酸ペプチドについて、HLAクラスIIとの結合についてのIC50値を、NetMHCIIpan法(Karosiene et al.(2013)Immunogenetics 65(10):711; Nielsen et al.(2008)PLoS Comput Biol.4(7)e1000107)を使用して予測した。CARアミノ酸配列の部分の中の各々の個々の位置について、その位置を含み、50nm未満の予測IC50でクラスIまたはクラスIIの対立遺伝子のいずれかと結合すると予測された

データセット中の配列の総数を決定した。図4A (HLAクラスI) および4B (HLAクラスII) は、それぞれ、クラスIおよびクラスIIの対立遺伝子についての結果を示し、集団内の個々のHLA対立遺伝子の頻度によって重み付けされた、決定された総数に基づく、配列の長さに沿ったポジショナルカバレッジ (positional coverage) を示している。査定された領域全体の曲線下面積 (AUC) は、およそ、HLAクラスI結合について1321、HLAクラスII結合について2943であった。膜貫通-共刺激ドメイン領域についてのAUCは、およそ、HLAクラスI結合について931、HLAクラスII結合について2212であった。

#### 【0277】

図4Aおよび4Bに示されるように、配列のいくつかの部分が、MHC複合体に強く結合し、従って、T細胞による可能性のある認識のためのエピトープとして提示される可能性がより高い断片を含有していることが、この方法によって予測された。HLA対立遺伝子に対する結合親和性は、単独では、必ずしも免疫原性を予測しない。この例示的なCARの個々のドメイン (例えば、膜貫通、共刺激) はヒト由来であるため、(通常は互いに関連していない複数の領域にかかり、かつ/またはそのような領域の間のジャンクションを含むエピトープとは対照的に) ヒト対象への投与時に、これらの個々の領域のいずれかの中の単独のエピトープに対して免疫原性応答が発達する可能性は低かった。例えば、MHC分子に強く結合し、MHC分子の状況において提示されると予測されたペプチドについても、ペプチドが完全に内在性タンパク質に由来する場合、それは「自己」と認識され、従って、生産的な免疫応答を誘導し得ない。例えば、実施例1に記載された結果において、完全に単一の膜貫通ドメインまたは細胞質ドメインの中にあるいくつかの領域は、HLA結合親和性予測において高スコアであったが、類似したCAR配列のこれらのドメインのいずれかの中の単独のペプチド配列に対して、免疫応答は検出されなかった。従って、様々な「ホットスポット」が予測HLA結合親和性に関して観察されたが、その後の査定および改変は、より高い予測IC50値を有するのみならず、2種の異なるタンパク質に由来する異なるドメインの間のジャンクションにかかる、可能性のあるエピトープを含む区域に焦点を当てた。

#### 【0278】

具体的には、例示的なCARのCD28膜貫通ドメインと4-1BBシグナル伝達ドメインとのジャンクションにかかる、1種または複数種の可能性のあるペプチドエピトープを含むジャンクション領域を、さらに査定した。例示的なヒトCD28膜貫通ドメイン (SEQ ID NO: 2) および例示的なヒト4-1BB共刺激ドメイン (SEQ ID NO: 3) を含むSEQ ID NO: 5に示された配列に関して、査定されたジャンクション領域は、以下のようなCD28膜貫通ドメインおよび4-1BB共刺激ドメインにかかるジャンクションの両側の13アミノ酸を含有していた:

FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWYKRGKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSC

RFPEEEEGGCEL (SEQ ID NO: 5)

(26アミノ酸ジャンクション領域は太字で示され、ドメインの間のジャンクションのすぐC'側およびN'側の2個のアミノ酸は下線で示される)。査定された26アミノ酸ジャンクション領域は、SEQ ID NO: 137に示され、SEQ ID NO: 5に示されたアミノ酸の配列のアミノ酸残基15~40に相当する。

#### 【0279】

クラスIおよびクラスIIの対立遺伝子に高いIC50値で結合すると予測され、従って、この領域を含有しているCARに対する免疫原性を誘導する可能性を低下させる可能性が高いペプチド断片をもたらす、SEQ ID NO: 137に示された26アミノ酸ジャンクション領域の中の1個または複数個のアミノ酸修飾 (変異) を同定するため、インシリコモデリングを実施した。具体的には、(SEQ ID NO: 5のナンバリングで28位、31位、および34位に相当するアミノ酸位置における1個または複数個の変異に相当する) SEQ ID NO: 137のナンバリングで14位、17位、および20位に相当するアミノ酸位置における1個または複数個の変異を含有しているジャンクション領域のバリエーションペプチド断片について予測を行った。この例示的な研究においては、エピトープ全体の全ての可能な単一アミノ酸置換を予

測IC50値に対する影響について調査する、全ての高親和性エピトープのインシリコ変異誘発および結合予測の後、これらの残基がさらなる分析のために選択された。より大きいIC50予測（結合の減少）をもたらす残基を同定し、前記の残基を、置換に感受性があるものとして同定した。

#### 【0280】

査定された位置における1個または複数個のアミノ酸置換を各々含有している一連の異なるバリエーションジャンクション領域を、例示的なCAR配列の中の非変異ジャンクション領域と比較して査定した。膜貫通領域または共刺激シグナル伝達ドメインのいずれかの構造または機能に対して破壊的である可能性の低い、同定された位置におけるアミノ酸置換の例示的なサブセットを選択した。エピトープはオーバーラップしているため、一度に複数種のエピトープに影響することができる可能性のある置換も選択した。具体的には、個々のバリエーションジャンクション領域は、以下の修飾（アミノ酸置換）を含有していた：SEQ ID NO:5のナンバリングで、K28A、K28H、K28L、K28Q、K28S、R31A、R31H、R31L、R31N、R31S、L34A、L34S、K28Q/R31A、K28Q/R31N、K28Q/R31S、K28Q/L34A、K28Q/L34S、R31N/L34A、R31N/L34S、K28Q/R31N/L34A、K28Q/R31N/L34S。

#### 【0281】

IEDBから入手可能なT細胞エピトープ予測ツールを使用して、非バリエーションジャンクション領域およびバリエーションジャンクション領域について、重み付き免疫原性スコアを、クラスIおよびクラスIIの対立遺伝子について入手した。それぞれの（バリエーションまたは非バリエーション）26アミノ酸ジャンクション領域の中の（個々に27種のHLAクラスI対立遺伝子の各々のための）一連の8mer～14merオーバーラップペプチドおよび（個々に56種のHLAクラスII対立遺伝子の各々のための）一連の15merオーバーラップペプチドの各々について、予測IC50値を使用してスコアを導出し、個々のHLAクラスIおよびクラスIIの対立遺伝子の集団内の相対頻度に基づき重み付けした。より高い相対スコアは、より高度の予測される結合を示す。

#### 【0282】

結果は図5に示される。結果は、領域の中のアミノ酸を修飾することによって、CARジャンクション領域の中の全体的な予測HLAクラスI免疫原性スコアを減少させることが可能であることを証明している。結果は、HLAクラスII結合についての予測免疫原性スコアの実質的な増加をもたらすことなく、予測されたHLAクラスI結合親和性を低下させ（従って、予測免疫原性スコアを低下させ）ることが可能であることも確認する。従って、一般に、結果は、CARのCD28膜貫通ドメインと4-1BB共刺激ドメインとの間のジャンクションにかかる領域の中にアミノ酸修飾を作成し、この領域を有するが、この領域に修飾または修飾の組み合わせを含有している受容体と同じキメラ受容体のヒト対象への投与時の免疫原性の可能性の低下に一致するであろうヒトHLA結合についての予測親和性の全体的な低下を達成し得ることを示した。

#### 【0283】

実施例3：CARのジャンクション領域に由来するペプチドのHLAクラスIとの結合についてのインシリコ分析とインビトロ結合との比較

CD28と4-1BBとのジャンクションにかかる26アミノ酸ジャンクション領域の部分の中の例示的な9merオーバーラップペプチド配列について、いくつかのHLAクラスI対立遺伝子（A\*02:01、A\*03:01、A\*11:01、およびB\*08:01）に対する実際の結合親和性を、インビトロで査定した。具体的には、CD28膜貫通ドメインおよび4-1BB共刺激ドメインのドメイン間のジャンクション（下線で示された2個のアミノ酸を接合している結合）にかかる部分を含有している（SEQ ID NO:7に示される）配列

VAFIIFWVKRGRKKLL

に由来する一連の9merオーバーラップペプチドを査定した。さらに、実施例2に記載されるような、この領域における変異を各々含有している、この部分の多数の異なるバリエーション

トの各々の一連の9merオーバーラップペプチドも、査定した。

【0284】

様々な9merオーバーラップペプチドを合成し、それらの純度をMALDI-TOF質量分析によって試験した。次いで、各ペプチドが3成分MHCペプチド複合体を安定化することができる程度を測定するハイスループット結合アッセイであるREVEAL Epitope Discovery System (ProImmune, Oxford, United Kingdom) を使用して、結合特性を査定するため、合成ペプチドを組換えMHC分子と共にインキュベートした。各ペプチドを、HLAクラスI対立遺伝子の各々に関してこの能力について別々に試験し、陽性対照（関連対立遺伝子についての既知のT細胞エピトープ）について観察された程度に対してノーマライズした。結果は、100%に設定された陽性対照ペプチドに対して結合がノーマライズされたスコアとして報告される。この分析においては、50を超えるスコアを、一般に、強いまたは高親和性の結合を表すと見なした。

10

【0285】

実施例2に記載されたようなインシリコ予測法を使用して同一のペプチド:MHC複合体の結合について入手された予測結合 (IC50) 値と、結果を比較した。予測された最大IC50値が約50,000であったため、IC50値を対数変換し、 $\text{LOG}(50000)$  から差し引き、 $\text{LOG}(50000)$  で割って、ノーマライズされたインシリコスコアを得た ( $(\text{Log}(50000) - \log \text{IC}50) / \log(50000)$ )。この分析においては、2.0より大きいインシリコ結合予測スコアを、一般に、予測された強いまたは高親和性の結合を表すと見なした。

【0286】

結果は、表2A (HLA-A\*02:01およびHLA-A\*03:01) ならびに表2B (HLA-A\*11:01およびHLA-B\*08:01) に示される。一般に、インシリコ結合予測は、実際のインビトロ結合結果を予測する。いくつかのケースにおいて、比較的高い結合がインシリコで予測されるが、インビトロアッセイにおいては観察されない。

20

【0287】

結果は、インビトロアッセイにおいて測定される親和性を一般に予測する、予測結合親和性と一致していた。さらに、結果は、ジャンクション領域の中の修飾によるHLAに対する結合親和性の成功した低下を証明し、同一の残基を含有しているオーバーラップエピトープのうちのもう1種に対する結合親和性を増加させることなく（または低下させつつ）、可能性のあるオーバーラップエピトープのうち1種の予測または実際の結合親和性またはスコアの低下をもたらすよう、配列を修飾することが可能であることを証明した。いくつかの態様において、そのような変異または修飾は、特に有利であり得る。結果の非限定的な例として、SEQ ID NO:5に示されたナンバリングで修飾K28L、R31H、L34S、および/またはL34Aは、一般に、もう1種のHLA対立遺伝子に対するより高い結合親和性をもたらすことなく、かつ/またはもう1種のペプチドに対するより高い結合親和性をもたらすことなく、少なくとも1種のHLA対立遺伝子および/または査定された領域の中の少なくとも1種のペプチドについて予測または実際の結合親和性またはスコアの低下をもたらした。

30

【0288】

(表2A) バリエーションペプチドのインシリコおよびインビトロのMHC結合

40

オーバー ラップ 参照 ペプチド	ペプチド配列	変異	A*02:01			A*03:01			SEQ ID NO.
			IEDB IC50	インシリコ スコア	インビトロ スコア	IEDB IC50	イン シリコ	イン ビトロ	
1	VAFIIFWVK	なし	19617	0.41	0.70	262	2.28	1.50	16
2	AFIIFWVKR	なし	25314	0.30	0.50	17846	0.45	5.70	17
3	FIIFWVKRG	なし	7967	0.80	10.10	23693	0.32	1.40	18
4	IIFWVKRGR	なし	24769	0.31	1.70	406	2.09	24.30	19
5	IFWVKRGRK	なし	30463	0.22	4.50	3482	1.16	20.50	20
6	FWVKRGRKK	なし	28878	0.24	3.50	17327	0.46	2.20	21
7	WVKRGRKKL	なし	27956	0.25	1.40	22961	0.34	13.10	22
1	VAFIIFWVS	K28S	12273	0.61	70.60	22660	0.34	0.70	23
2	AFIIFWVSR	K28S	23924	0.32	4.50	18157	0.44	0.30	24
3	FIIFWVSRG	K28S	3382	1.17	0.20	21751	0.36	0.10	25
4	IIFWVSRGR	K28S	21442	0.37	2.60	155	2.51	25.30	26
5	IFWVSRGRK	K28S	30615	0.21	1.30	1880	1.42	39.20	27
6	FWVSRGRKK	K28S	28679	0.24	1.50	17832	0.45	2.90	28
7	WVSRGRKKL	K28S	23551	0.33	2.30	22394	0.35	2.10	29
1	VAFIIFWVL	K28L	1336	1.57	0.20	20145	0.39	0.00	30
2	AFIIFWVLR	K28L	22444	0.35	5.70	15583	0.51	0.30	31
3	FIIFWVLRG	K28L	2037	1.39	7.20	20853	0.38	0.10	32
4	IIFWVLRGR	K28L	17613	0.45	8.40	238	2.32	2.80	33
5	IFWVLRGRK	K28L	30293	0.22	2.90	3675	1.13	19.50	34
6	FWVLRGRKK	K28L	28857	0.24	3.30	16996	0.47	0.40	35
7	WVLRGRKKL	K28L	19522	0.41	2.40	23063	0.34	0.70	36
1	VAFIIFWVH	K28H	23252	0.33	3.10	10359	0.68	0.30	37
2	AFIIFWVHR	K28H	22819	0.34	0.30	18506	0.43	0.30	38
3	FIIFWVHRG	K28H	1691	1.47	37.30	22930	0.34	0.00	39
4	IIFWVHRGR	K28H	23573	0.33	4.70	326	2.19	30.10	40
5	IFWVHRGRK	K28H	29930	0.22	7.10	1062	1.67	37.80	41
6	FWVHRGRKK	K28H	28189	0.25	1.60	17052	0.47	3.60	42
7	WVHRGRKKL	K28H	25035	0.30	1.60	22278	0.35	3.40	43
1	VAFIIFWVA	K28A	2733	1.26	28.50	21010	0.38	0.00	44

10

20

30

40

50

2	AFIIFWVAR	K28A	23072	0.34	2.20	17755	0.45	0.50	45
3	FIFWVARG	K28A	1902	1.42		22486	0.35		102
4	IIFWVARGR	K28A	22077	0.36	9.60	206	2.39	18.60	46
5	IFWVARGRK	K28A	30251	0.22	1.00	3893	1.11	53.70	47
6	FWVARGRKK	K28A	28353	0.25	13.50	16210	0.49	5.00	48
7	WVARGRKKL	K28A	22630	0.34	8.80	22548	0.35	1.30	49
1	VAFIIFWVQ	K28Q	17921	0.45	5.30	22927	0.34	0.20	50
2	AFIIFWVQR	K28Q	24165	0.32	0.40	19279	0.41	0.20	51
3	FIFWVQRG	K28Q	4152	1.08	16.80	23136	0.33	0.40	52
4	IIFWVQRGR	K28Q	21783	0.36	5.80	231	2.34	18.00	53
5	IFWVQRGRK	K28Q	30704	0.21	6.10	3177	1.20	36.70	54
6	FWVQRGRKK	K28Q	29501	0.23	5.20	18619	0.43	6.40	55
7	WVQRGRKKL	K28Q	24480	0.31	8.10	23630	0.33	4.90	56
4	IIFWVKRGS	R31S	18902	0.42	13.60	19450	0.41	16.20	57
5	IFWVKRGSK	R31S	29391	0.23	2.40	3348	1.17	10.40	58
6	FWVKRGSKK	R31S	28317	0.25	1.90	14227	0.55	5.90	59
7	WVKRGSKKL	R31S	23485	0.33	3.00	22637	0.34	1.90	60
4	IIFWVKRGL	R31L	2692	1.27	82.20	16661	0.48	15.90	61
5	IFWVKRGLK	R31L	29250	0.23	2.40	1973	1.40	26.90	62
6	FWVKRGLKK	R31L	27554	0.26	9.40	14434	0.54	2.70	63
7	WVKRGLKKL	R31L	20709	0.38	24.50	22985	0.34	10.00	64
4	IIFWVKRGH	R31H	27453	0.26	5.30	1665	1.48	26.60	65
5	IFWVKRGHK	R31H	29806	0.22	2.20	3806	1.12	9.00	66
6	FWVKRGHKK	R31H	27689	0.26	2.60	16743	0.48	4.10	67
7	WVKRGHKKL	R31H	25923	0.29	3.90	22313	0.35	1.40	68
4	IIFWVKRGA	R31A	6107	0.91	85.90	16069	0.49	42.90	69
5	IFWVKRGAK	R31A	29354	0.23	13.80	3470	1.16	22.00	70
6	FWVKRGAKK	R31A	28151	0.25	4.30	17066	0.47	4.70	71
7	WVKRGAKKL	R31A	24746	0.31	4.70	22982	0.34	4.10	72
4	IIFWVKRGN	R31N	25979	0.28	9.30	18552	0.43	4.30	73
5	IFWVKRGNK	R31N	29978	0.22	3.50	2669	1.27	8.00	74
6	FWVKRGNKK	R31N	28430	0.25	8.70	17713	0.45	3.60	75
7	WVKRGNKKL	R31N	24790	0.30	2.40	22813	0.34	0.90	76
4	IIFWVQRGS	K28Q/R3 1S	14326	0.54	22.40	17741	0.45	4.50	77
5	IFWVQRGSK	K28Q/R3 1S	29540	0.23	33.50	3052	1.21	20.30	78
6	FWVQRGSKK	K28Q/R3 1S	28907	0.24	0.80	15992	0.50	1.90	79
7	WVQRGSKKL	K28Q/R3 1S	18121	0.44	4.40	23279	0.33	1.20	80
4	IIFWVQRGA	K28Q/R3 1A	2658	1.27	95.30	13467	0.57	2.70	81
5	IFWVQRGAK	K28Q/R3 1A	29482	0.23	11.70	3205	1.19	17.00	82
6	FWVQRGAKK	K28Q/R3 1A	28792	0.24	2.20	18649	0.43	2.70	83

10

20

30

40

50

7	WVQ <sup>R</sup> GAKKL	K28Q/R3 1A	20217	0.39	3.00	23651	0.33	2.00	84
4	IIFWVQ <sup>R</sup> GN	K28Q/R3 1N	23103	0.34	13.00	16590	0.48	3.60	85
5	IFWVQ <sup>R</sup> GNK	K28Q/R3 1N	30164	0.22	16.10	2438	1.31	23.20	86
6	FWVQ <sup>R</sup> GNKK	K28Q/R3 1N	29113	0.23	3.10	19165	0.42	1.30	87
7	WVQ <sup>R</sup> GNKKL	K28Q/R3 1N	19790	0.40	4.30	23457	0.33	1.50	88
7	WVKRGRKKS	L34S	30812	0.21	3.90	25365	0.29	0.90	89
7	WVKRGRKKA	L34A	28556	0.24	4.50	24086	0.32	0.90	90
7	WVQ <sup>R</sup> GNKKS	K28Q/L3 4S	26883	0.27	1.20	25680	0.29	0.70	91
7	WVQ <sup>R</sup> GNKKA	K28Q/L3 4A	21998	0.36	1.90	24564	0.31	1.20	92
1	VAFIIFWVR	K28R	20045	0.40	1.20	5746	0.94	0.70	100
2	AFIIFWVR	K28R	25059	0.30	1.40	17924	1.00		101

10

## 【 0 2 8 9 】

(表 2 B) バリエントペプチドのインシリコおよびインビトロのMHC結合

オーバーラップ 参照 ペプチド	ペプチド配列	変異	A*11:01			B*08:01			SEQ ID NO.
			IEDB IC50	イン シリコ スコア	イン ビトロ スコア	IEDB IC50	イン シリコ スコア	イン ビトロ スコア	
1	VAFIIFWVK	wt	19	3.42	109.20	15806	0.50	0.30	16
2	AFIIFWVKR	wt	3271	1.18	25.90	23244	0.33	1.90	17
3	FIIFWVKRG	wt	22946	0.34	0.40	18081	0.44	0.10	18
4	IIFWVKRGR	wt	706	1.85	54.50	23025	0.34	0.00	19
5	IFWVKRGRK	wt	9701	0.71	29.30	23513	0.33	0.40	20
6	FWVKRGRKK	wt	22175	0.35	6.50	21764	0.36	0.00	21
7	WVKRGRKKL	wt	24020	0.32	4.80	225	2.35	28.50	22
1	VAFIIFWVS	K28S	12403	0.61	25.10	13796	0.56	0.10	23
2	AFIIFWVSR	K28S	2175	1.36	54.00	21862	0.36	0.30	24
3	FIIFWVSRG	K28S	20651	0.38	5.10	17854	0.45	0.40	25
4	IIFWVSRGR	K28S	162	2.49	68.90	23445	0.33	0.00	26
5	IFWVSRGRK	K28S	5778	0.94	39.20	23448	0.33	0.00	27
6	FWVSRGRKK	K28S	21126	0.37	6.30	23067	0.34	0.00	28
7	WVSRGRKKL	K28S	23684	0.32	4.40	3208	1.19	6.20	29
1	VAFIIFWVL	K28L	14191	0.55	0.20	1196	1.62	0.00	30
2	AFIIFWVLR	K28L	850	1.77	17.20	23012	0.34	0.20	31
3	FIIFWVLRG	K28L	19162	0.42	2.40	17427	0.46	0.20	32
4	IIFWVLRGR	K28L	185	2.43	35.20	23298	0.33	0.40	33
5	IFWVLRGRK	K28L	6386	0.89	29.30	23324	0.33	0.00	34
6	FWVLRGRKK	K28L	21862	0.36	5.00	23437	0.33	0.00	35
7	WVLRGRKKL	K28L	23725	0.32	3.20	1342	1.57	4.00	36

20

30

40

1	VAFIIFWVH	K28H	1209	1.62	12.30	16202	0.49	0.00	37
2	AFIIFWVHR	K28H	4939	1.01	34.90	22682	0.34	0.30	38
3	FIFWVHRG	K28H	19850	0.40	0.90	17464	0.46	0.20	39
4	IIFWVHRGR	K28H	196	2.41	77.50	22662	0.34	0.20	40
5	IFWVHRGRK	K28H	7133	0.85	36.60	22030	0.36	0.10	41
6	FWVHRGRKK	K28H	22214	0.35	5.60	23778	0.32	0.00	42
7	WVHRGRKKL	K28H	23844	0.32	5.60	814	1.79	19.20	43
1	VAFIIFWVA	K28A	12499	0.60	2.80	5131	0.99	0.00	44
2	AFIIFWVAR	K28A	2784	1.25	51.80	21850	0.36	0.20	45
3	FIFWVARG	K28A	20922	0.38		18463	0.43		102
4	IIFWVARGR	K28A	239	2.32	70.60	23580	0.33	0.30	46
5	IFWVARGRK	K28A	8772	0.76	34.90	23612	0.33	0.00	47
6	FWVARGRKK	K28A	20762	0.38	8.90	23035	0.34	0.00	48
7	WVARGRKKL	K28A	23920	0.32	13.80	2821	1.25	32.40	49
1	VAFIIFWVQ	K28Q	15477	0.51	3.90	14875	0.53	0.20	50
2	AFIIFWVQR	K28Q	2174	1.36	15.00	23016	0.34	0.00	51
3	FIFWVQRG	K28Q	22161	0.35	1.50	17653	0.45	0.60	52
4	IIFWVQRGR	K28Q	361	2.14	72.80	23548	0.33	0.10	53
5	IFWVQRGRK	K28Q	9561	0.72	128.50	23670	0.32	0.00	54
6	FWVQRGRKK	K28Q	22394	0.35	5.70	22604	0.34	1.90	55
7	WVQRGRKKL	K28Q	23688	0.32	12.80	2512	1.30	45.10	56
4	IIFWVKRGS	R31S	18923	0.42	100.00	22325	0.35	0.40	57
5	IFWVKRGSK	R31S	7476	0.83	47.90	21691	0.36	1.20	58
6	FWVKRGSKK	R31S	19910	0.40	5.60	20823	0.38	0.10	59
7	WVKRGSKKL	R31S	24090	0.32	11.80	585	1.93	56.10	60
4	IIFWVKRGL	R31L	20182	0.39	32.40	17368	0.46	1.70	61
5	IFWVKRGLK	R31L	4201	1.08	61.10	23537	0.33	58.30	62
6	FWVKRGLKK	R31L	17309	0.46	25.30	20839	0.38	6.30	63
7	WVKRGLKKL	R31L	24095	0.32	22.10	765	1.82	65.70	64
4	IIFWVKRGH	R31H	7117	0.85	19.50	23227	0.33	0.10	65
5	IFWVKRGHK	R31H	10783	0.67	30.90	23461	0.33	3.20	66
6	FWVKRGHKK	R31H	17635	0.45	27.60	20754	0.38	0.40	67
7	WVKRGHKKL	R31H	23924	0.32	2.80	269	2.27	47.60	68
4	IIFWVKRGA	R31A	19134	0.42	22.60	19585	0.41	0.90	69
5	IFWVKRGAK	R31A	8311	0.78	69.70	21592	0.36	2.20	70
6	FWVKRGAKK	R31A	20234	0.39	13.20	21762	0.36	0.30	71
7	WVKRGAKKL	R31A	23857	0.32	4.60	1366	1.56	34.10	72
4	IIFWVKRGN	R31N	19351	0.41	42.10	22864	0.34	0.90	73
5	IFWVKRGNK	R31N	6780	0.87	45.90	24238	0.31	0.10	74
6	FWVKRGNKK	R31N	20732	0.38	7.30	21565	0.37	0.10	75
7	WVKRGNKKL	R31N	24036	0.32	4.10	1181	1.63	65.90	76
4	IIFWVQRGS	K28Q/R31S	18031	0.44	16.90	22961	0.34	0.10	77
5	IFWVQRGSK	K28Q/R31S	7300	0.84	103.30	22846	0.34	0.00	78
6	FWVQRGSKK	K28Q/R31S	20419	0.39	6.80	21853	0.36	0.00	79
7	WVQRGSKKL	K28Q/R31S	23740	0.32	5.90	5230	0.98	6.80	80

10

20

30

40

50



4	IIFWVQRGA	K28Q/R31A	18055	0.44	56.50	20759	0.38	0.20	81
5	IFWVQRGAK	K28Q/R31A	8237	0.78	61.30	22801	0.34	0.20	82
6	FWVQRGAKK	K28Q/R31A	20696	0.38	18.30	22612	0.34	0.00	83
7	WVQRGAKKL	K28Q/R31A	23552	0.33	3.80	8314	0.78	11.40	84
4	IIFWVQRGN	K28Q/R31N	18437	0.43	29.00	23425	0.33	0.00	85
5	IFWVQRGNK	K28Q/R31N	6566	0.88	67.50	24059	0.32	0.10	86
6	FWVQRGNKK	K28Q/R31N	21228	0.37	5.90	22436	0.35	0.00	87
7	WVQRGNKKL	K28Q/R31N	23751	0.32	10.70	7869	0.80	32.00	88
7	WVKRGRKKS	L34S	23906	0.32	6.70	10345	0.68	4.30	89
7	WVKRGRKKA	L34A	23864	0.32	3.10	1225	1.61	3.10	90
7	WVQRGNKKS	K28Q/L34S	23612	0.33	5.00	21235	0.37	0.00	91
7	WVQRGNKKA	K28Q/L34A	23576	0.33	0.80	14247	0.55	0.70	92
1	VAFIIFWVR	K28R	108	2.67	34.60	16290	0.49	0.10	100
2	AFIIFWVRR	K28R	3387	1.17	1.50	22717	0.34	0.30	101

## 【 0 2 9 0 】

実施例4：CARのジャンクション領域に由来するペプチドのHLA-A2:01との結合についての分析

免疫原性応答を誘導することができる可能性のあるCAR由来ペプチドを同定するため、CARのCD28膜貫通ドメインと4-1BB共刺激ドメインとの間のジャンクションを含有している非バリエーション（参照）配列の中の一連のオーバーラップペプチドをインシリコで査定した。結合についての親和性を予測するためのインシリコ分析を使用して、一般的なヒトMHCクラスI分子（HLA-A2:01）のペプチド溝に対する結合親和性を予測するため、アルゴリズムを使用した。図3に示されるように、CARの査定された部分は、下線によって示されたドメインのジャンクションにかかる残基と共に（SEQ ID NO:2に示された）CD28膜貫通ドメインの一部および（SEQ ID NO:3に示された）4-1BB共刺激ドメインの一部を含有している（SEQ ID NO:6に示された）配列

CYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPF

を有していた。予測されたHLA-A2:01結合親和性を、SEQ ID NO:6に示された配列の8～14アミノ酸の一連の140種のオーバーラップペプチドについてインシリコで査定した。ペプチドのうちの35種は、膜貫通ドメイン部分に由来する配列のみを含有しており；ペプチドのうちの35種は、共刺激ドメイン部分に由来する配列のみを含有しており、ペプチドのうちの70種は、ドメイン間のジャンクションを架橋するアミノ酸残基を含有しているジャンクションまたは融合領域の配列を有していた。この査定のため、0nM～50nMの解離定数でHLA-A2:01に結合すると予測されたペプチド断片を、高い親和性で結合すると予測されるものと見なした。51nM～1000nMの解離定数で結合すると予測されたペプチド断片を、低い親和性で結合すると予測されるものと見なした。1000nM～5000nMの予測親和性で結合すると予測されたペプチド断片を、極めて低い親和性で結合すると予測されるものと見なした。結果は図3に提示される。

## 【 0 2 9 1 】

図3に示されるように、ドメイン間のジャンクションにかかるオーバーラップ領域を含む配列を各々含有している、この領域の参照配列に由来するペプチドのうちの2種が、HLA-A2:01に対する低い結合親和性を示すと予測された。具体的には、配列FIIFWVKRGRKKLL（SEQ ID NO: 10）

を有する14merペプチドが、294nMの解離定数で結合すると予測され、FIIFWVKRGRKKL（SEQ ID NO: 11）

の配列を有する13merペプチドが、618nMの解離定数で結合すると予測された。これらのペプチドは、各々、SEQ ID NO:8に示され、実施例1において同定された15merペプチ

ドの部分を含んでいた。この配列の中のより短い8mer~12merペプチドは、HLA-A2:01との結合を示すと予測されなかった。アミノ酸配列  
IIFWVKRGRKKLL (SEQ ID NO: 12)

を含有しているもう一つの13merペプチドは、およそ3000nMの予測解離定数を有する極めて低い結合親和性を有すると予測された。2個のドメインの間のジャンクションを架橋する残りの断片は、いずれも、このアッセイによって、HLA-A2:01に対する結合親和性を示すと予測されなかった（全てが、5000nMよりはるかに大きく、ほとんどのケースにおいて、14,000nmより高いかまたは20,000nM以上の予測解離定数を有していた）。HLA-A2:01と結合すると予測されたペプチドの各々において、2個のジャンクションにかかる残基（VK）は、いずれも、それ自体、アンカー残基であると予測されず；むしろ、そのようなペプチドは、隣接しない位置にこれらの残基を含有していた。

【0292】

膜貫通ドメインに由来する配列のみを含有しているペプチドのうちのおよそ15種は、5000nM未満のHLA-A2:01に対する解離定数を有すると予測された。共刺激ドメインに由来する配列のみを含有している2種のペプチドは、5000nM未満のHLA-A2:01結合についての解離定数を有すると予測された。査定された配列の共刺激ドメインおよび膜貫通ドメインは、一般にヒト対象に対して免疫原性である可能性がより低い、内在性ヒト配列に由来する。例えば、実施例1に記載された研究において、CARのこれらのドメインのいずれかの中のペプチド配列に特異的な免疫応答は検出されなかった。従って、ジャンクション領域にかかる配列を含有しているペプチドのパリアントを査定した。

【0293】

HLA-A2:01に対する低下した結合親和性および/またはこのHLA対立遺伝子を有するヒト対象における低下した免疫原性を有すると予測されるパリアントペプチドを生成するため、SEQ ID NO:6に示された配列と比較して、ジャンクション領域に変異を含有しているパリアント配列を、インシリコで生成した。（非アンカー位置に）ジャンクションにかかる「VK」残基を含有しているペプチドは、HLA-A2:01に対する高い結合親和性を示すと予測されたため、CD28膜貫通ドメインと4-1BB共刺激ドメインとの間のジャンクションに2個のアスパラギン残基を挿入した。パリアントは、（SEQ ID NO:13に示された）配列  
CYSLLVTVAFIIFWVVNNKRGRKKLLYIFKQPF

（アスパラギン残基の挿入によって生成されたジャンクションに隣接する配列は、下線で示される）を含有していた。SEQ ID NO:13の例示的なパリアント配列を、同一の予測法によって査定した。このパリアント配列について予測結合親和性を査定するため、SEQ ID NO:13に示された配列の8~14アミノ酸の一連の154種のオーバーラップする断片を、前記のようなインシリコ分析によって査定した。35種のペプチドは膜貫通部分の配列のみを有し、35種のペプチドは共刺激ドメイン部分の配列のみを有し、84種のペプチドは挿入されたアスパラギン残基の一方または両方を含むドメインを架橋するアミノ酸を含有しているジャンクション領域配列を含有していた。

【0294】

結果は図3に示される。示されるように、全体として、ジャンクションを含有しているパリアント領域の中のオーバーラップペプチドのHLA-A2:01結合親和性は、集合的に、非パリアント配列と比較して、実質的に低下していた。具体的には、免疫原性であると以前に予測されたジャンクション領域の部分におけるペプチドのHLA-A2:01との結合についての予測解離定数は、実質的に低下していた。例えば、それぞれSEQ ID NO:10および11に示される同定されたペプチドと比較して、ジャンクションに隣接する改変された領域におけるアスパラギン残基を含むペプチドパリアント  
IIFWVNNKRGRKKLL (SEQ ID NO: 14)

IIFWVNNKRGRKK (SEQ ID NO: 15)

は、HLA-A2:01との検出可能な結合親和性を示さないと予測された。2種の14merペプチド

FIIFWVNNKRGRKK (SEQ ID NO:96)

および

IFWVNNKRGRKKLL (SEQ ID NO:97)

は、1000nM～5000nMの範囲内の極めて低い結合親和性を示すこのHLAとの結合についての解離定数を示すと予測された。修飾されたジャンクション領域配列を含有している他の全てのペプチドは、5000nMより大きく、大部分のケースにおいて、14,000nMより高いかまたは20,000nM以上の解離定数を示すと予測され、従って、この査定によってHLA-A2:01に対する結合親和性を示すと予測されなかった。さらに、ジャンクション領域配列の修飾は、共刺激ドメインまたは膜貫通ドメインの領域の中に、HLA-A2:01に対するより高い結合親和性を有すると予測される新しいペプチドを作出しなかった。

【0295】

実施例5：抗CD19 CARによって以前に処置された対象への抗CD22 CAR発現細胞の投与  
再発性/難治性CD22<sup>+</sup>B細胞急性リンパ芽球性白血病（ALL）を有する6人の対象へ、抗CD22キメラ抗原受容体（CAR）を発現する自己T細胞を投与した。CARは、ヒト抗CD22 scFv抗体、CD8 膜貫通ドメイン、4-1BB細胞内シグナル伝達ドメイン、およびCD3 細胞内シグナル伝達ドメインを含んでいた。

【0296】

全ての対象が、少なくとも1回の事前同種造血幹細胞移植を以前に受けたことがあり、かつ様々なCD19に対するCAR-T細胞治療のうちの1種による処置を受けたことがあった。対象のうちの5人は、CD19が検出されない（「CD19陰性」）ALLを再発しており、それ以外の1人の対象は、事前CD19 CAR療法に対する非応答者であった。

【0297】

表3は、処置された患者の特徴を要約する。

【0298】

（表3）患者の特徴

ID	年齢/性別	事前HCT	事前抗CD19 CAR	CD19陰性再発	CD22部位密度	HCT前の疾患負荷（吸引物での白血病%）
1	22/M	Y	Y	Y	2084	>95%
2	20/F	Y (2)	Y	Y	13452	5%
3	22/M	Y	Y	Y	846	>90%
4	22/M	Y	Y	N	2589	95%
5	7/F	Y	Y	Y	2839	32%
6	17/F	Y	Y	Y	2185	1%

HCT：造血細胞移植

【0299】

細胞の投与の前に、患者は、末梢血単核細胞（PBMC）を採集するための自己白血球アフェレーシスを受けた。CD3発現についてのイムノ親和性に基づく濃縮によって、採集されたPBMCからT細胞を単離し、抗CD3/CD28ビーズの存在下で培養した後、抗CD22 CARをコードするレンチウイルスベクターによって形質導入した。細胞を7～10日間培養した。対象は、-4日目、-3日目、および-2日目に、25mg/m<sup>2</sup>フルダラビンによる導入化学療法を受け、-2日目に900mg/m<sup>2</sup>シクロホスファミドを受けた（0日目に細胞注入）。各患者は、静脈注射によって、レシipientの体重1kg当たり3×10<sup>5</sup>個の形質導入T細胞の最初のCAR T細胞用量を受けた。登録された2番目の対象が、用量規制毒性（DLT）の基

10

20

30

40

50

準を満たすグレード3の下痢を発症し、そのため、全6人の対象を処置するための最初の用量レベルでの用量増大を行った。その後、この用量でDLTは見られなかった。2人の対象が、グレード1のサイトカイン放出症候群（CRS）を発症し、1人の対象が、グレード2のCRSを発症し、2人の対象において、CRSは存在しなかった。

#### 【0300】

末梢血、骨髓、または脳脊髄液におけるCAR-T細胞の数を、CD22-Fcと共に細胞をインキュベートすることによって、処置後のいくつかの時点で決定した。増大が観察された患者については、約7日目から、末梢血、骨髓、および脳脊髄液において、CAR-T細胞増大の証拠が見られた。最大またはピークのCAR-T細胞増大は、一般に、注入後、約12日目～約15日目に観察された。表7は、処置された対象についての各試料における全T細胞に対する百分率としての、この査定期間に観察された抗CD22 CAR-T細胞の最大またはピークに対する百分率を示す。注入後28日目（+/-4日）に臨床的な応答を評価した。

#### 【0301】

表4に示されるように、結果は、CAR-T細胞増大の程度と一般に相関している応答と一致していた。CAR-T細胞の増大を示さないかまたは低い増大を示した3人の対象は、疾患進行の証拠も示した。2人の他の対象は安定（stable disease）を有し、1人はMRDを伴わない完全寛解を有することが観察された。この対象において、フローサイトメトリーによるCAR持続は、注入後47日目まで検出され、注入後3ヶ月間、寛解が維持された。結果は、抗CD19 CAR療法を以前に受けたことがあり（例えば、エピトープ/抗原喪失のため、非応答性になった）対象における、安全で、実現可能で、臨床的に活性な抗CD22 CAR T細胞療法を証明している。

#### 【0302】

（表4）処置応答

ID	最大CAR増大（フロー）			CRS	最大応答
	PB	骨髓	CSF		
1	0	0	n/a	なし	PD
2	52.3%	19.5%	0%	グレード1	MRD陰性CR
3	73%	36%	32%	グレード1	SD
4	6%	1%	0%	グレード2	SD
5	0%	1.3%	0%	なし	PD
6	1.8%	2%	0%	なし	PD

PB：末梢血；CSF：脳脊髄液；CRS：サイトカイン放出症候群；PD：進行（progressive disease）；MRD：微小残存病変；CR：完全寛解；SD：安定。

#### 【0303】

実施例6: CARのジャンクション領域に由来するペプチドの、HLAクラスIIへの結合に関する、インシリコ分析とインビトロ結合の比較

一定のHLAクラスII対立遺伝子（DPA1\*01:03;DPB1\*04:01、DRA\*01:01;DRB1\*03:01、DRA\*01:01、DRB1\*15:01、DRA\*01:01;DRB1\*11:01、DPA1\*01:03;DPB1\*04:02、DPA1\*01:03;DPB1\*03:01、DPA1\*01:03;DPB1\*01:01、DPA1\*02:01;DPB1\*01:01、DPA1\*02:01;DPB1\*04:02、DRA\*01:01、DRB1\*11:04、DRA\*01:01、DRB1\*01:02、およびDPA1\*02:01;DPB1\*15:01）に対する実際の結合親和性を、実施例4で述べたCARのCD28由来の配列と4-1BB由来の配列との間のジャンクションをまたぐ領域の一部分内の例示的な15merオーバーラップペプチド配列に関して、インビトロで評価した。具体的には、評価は、CD28由来の膜貫通ドメインと4-1BB由来の共刺激ドメインの一部分を含有し、ドメイン間のジャンクションをまたぐ、配列 **CYSLLVTVAFIIFWYKRGGRKLLYIFKQPFMRPVQT**

（SEQ ID NO:160に示す）に由来する一連の15merオーバーラップペプチドの評価であ

る（2つのアミノ酸を接合する結合が下線で示されている）。加えて、この部分のいくつかの異なるバリエーション（各バリエーションは実施例2で述べたようにこの領域中に1つまたは複数の突然変異を含有する）のそれぞれの一連の15merオーバーラップペプチドも評価した。

#### 【0304】

さまざまな15merオーバーラップペプチドを合成し、MALDI-TOF質量分析によってそれらの純度を検証した。次に、実施例3で述べたようにREVEAL Epitope Discovery Systemを使って結合特性を評価するために、合成ペプチドを組換えMHC分子と共にインキュベートした。各ペプチドをHLAクラスII対立遺伝子のそれぞれに関してこの能力について個別に試験し、陽性対照（関連対立遺伝子に関する公知のT細胞エピトープ）について観察された割合に規格化した。スコアを各対立遺伝子について計算し、ここでは、100%に設定した陽性対照ペプチドに、結合を規格化した。これらのスコアに基づいて母集団における潜在的影響を、各ペプチドについて個々の対立遺伝子スコアの和として計算した。

10

#### 【0305】

結果を図7に示す。図示するように、結果は、ジャンクション領域内の修飾が、領域内の少なくとも1つのペプチドのHLAクラスII結合について、首尾よく低減をもたらすことを証明した。

#### 【0306】

ネイティブジャンクション領域内に存在する15merオーバーラップペプチドについて、結果を、実施例2で述べたインシリコ予測法を使って、同じペプチド:MHC複合体の結合について得られる結合（IC50）予測値と比較した。予測された最大IC50値は約50,000であったので、IC50値を対数変換し、 $\text{LOG}(50000)$  から差し引き、 $\text{LOG}(50000)$  で割ることによって、規格化されたインシリコスコアを得た（ $(\text{Log}(50000) - \log \text{IC50}) / \text{Log}(50000)$ ）。免疫原性スコア（個々のHLAクラスII対立遺伝子の母集団における相対頻度に基づいて重み付けしたもの）を、規格化されたインシリコ結合親和性および実際の結合親和性について得た。結果を図8に示す。概して、インビトロ結合予測は、実際のインビトロ結合結果を予測しており、場合によっては、過大に予測していた。

20

#### 【0307】

実施例7:修飾されたジャンクション領域を有するCARが形質導入されたT細胞の操作および特徴付け

30

（1）抗CD19 scFv、ヒンジドメイン、SEQ ID NO:5に示すジャンクション領域（ネイティブCD28に由来する膜貫通ドメインおよびネイティブ4-1BBに由来する細胞内シグナル伝達ドメインを含む）（「ネイティブ」ジャンクション領域とみなす）およびCD3-ゼータ細胞内シグナル伝達ドメインを含有する、実施例1に記載の元のキメラ抗原受容体（CAR）、または（2）CD28膜貫通ドメインと4-1BB共刺激シグナル伝達ドメインとの間のジャンクションをまたぐジャンクション領域に1つまたは複数の突然変異が導入された修飾されたジャンクション領域を個別に含有する、いくつかあるその特定バリエーションのうちの1つ、のどちらか一方をコードするレンチウイルスベクターによる初代T細胞の形質導入によって、CARで操作されたT細胞を作製した。特定のバリエーションCARのそれぞれは、（SEQ ID NO:5との比較で）K28Q/R31N/L34S、K28Q/R31N/L34A、R31N/L34S、R31N/L34A、K28Q/L34A、K28Q/R31S、K28Q/R31N、K28Q/R31A、L34S、L34A、R31S、R31N、R31A、K28S、K28Q、K28L、K28H、およびK28Aのなかから選択される突然変異を有する修飾されたジャンクション領域を含有した。

40

#### 【0308】

初代ヒトCD4+およびCD8+ T細胞を、免疫親和性ベースの選択によって、健康ドナーから得られたヒトPBMC試料から単離した。その結果得られた細胞を、各CARで操作する前に、抗CD3/抗CD28試薬と共に培養することによって刺激した。T2Aリボソームスイッチをコードする配列によって分離された、CARをコードする核酸と、形質導入の代用マーカーとして使用するための切断型EGFR（EGFRt）をコードする核酸とを含有するレンチウイルスベクターを使って、細胞に形質導入した。モック形質導入を陰性対照として使用

50

した。形質導入された細胞を、発現分析および細胞溶解活性アッセイに使用した。

#### 【0309】

##### A. CAR発現

細胞表面CAR発現（代用マーカーを介して示されるもの）を、ネイティブCARをコードする核酸または修飾CARのそれぞれをコードする核酸による形質導入後、17日目に評価した。CAR発現を証明するための代用物であるEGFRtを検出するために細胞を抗EGFR抗体で染色し、フローサイトメトリーによって評価した。修飾されたジャンクション領域を含有するさまざまなバリエーションCARを発現するように形質導入された細胞において、CAR発現は類似しており、ネイティブジャンクション領域を含有するCARの発現と同等であった。

10

#### 【0310】

##### B.細胞溶解活性

ネイティブCARまたはバリエーションCARを発現するように操作された細胞を、CD19抗原を発現するK562ターゲット細胞（K562-CD19）に対する細胞溶解活性について評価した。T細胞を、培養プレートのウェルにおいて、ターゲット細胞（K562-CD19）と共に、さまざまなエフェクター:ターゲット比（1:1、2:1および4:1のCAR:ターゲット比）でインキュベートした。1ウェルあたりのカスパーゼ陽性ターゲット細胞の数を測定することによって、操作されたT細胞の溶解活性を評価した。その結果、この研究では、修飾されたジャンクション領域を含有するさまざまなバリエーションCARを発現するT細胞が、「ネイティブ」ジャンクション領域を含有するCARを発現するT細胞と同程度に、ターゲット特異的にCD19発現ターゲット細胞を死滅させることが、明らかになった。

20

#### 【0311】

実施例8:修飾されたジャンクション領域を有するCARの表面発現および機能性の評価

（1）抗CD19 scFv、ヒンジドメイン、SEQ ID NO:5に示すネイティブジャンクション領域（ネイティブCD28に由来する膜貫通ドメインおよびネイティブ4-1BBに由来する細胞内シグナル伝達ドメインを含む）を含有する、実施例1に記載の元のキメラ抗原受容体（CAR）、または（2）SEQ ID NO:5との比較でK28L、R31H、L34A、もしくはL34Sのなかから選択される突然変異を有する修飾されたジャンクション領域を含有するそのバリエーション、のどちらか一方をコードする核酸による初代T細胞の形質導入によって、CARで操作されたT細胞を作製した。修飾されたジャンクション領域を含有するCARで操作されたT細胞の細胞表面CAR発現および機能的性質を評価した。

30

#### 【0312】

##### A.表面発現

CARの表面発現を直接的に評価するために、CARで操作されたT細胞を、CARが含有している抗CD19 scFvに特異的な抗イディオタイプ抗体で染色した。操作された細胞を、代用マーカーEGFRtの表面発現についても、抗EGFR抗体を使って評価した。CARの細胞内発現を検出するために、細胞をまず透過処理し、次に、抗イディオタイプ抗体および抗EGFR抗体を使って類似する条件下で染色した。CD4+サブセットまたはCD8+サブセットにおいて、CARおよび代用マーカーの発現を、フローサイトメトリーによって分析した。

#### 【0313】

40

図9Aおよび図9Bは、操作されたCD4+ T細胞において、修飾されたジャンクション領域を含有するバリエーションCARが、それぞれ表面および細胞内に発現したことを示している。バリエーションCARの表面発現のレベルは、ネイティブジャンクション領域を含有する非修飾CARの表面発現と類似しているか、それより高かった。CARと共形質導入された代用マーカーは、全ての操作された細胞において、同様に発現した。

#### 【0314】

CAR特異的抗イディオタイプ抗体を使って決定されるCAR表面発現の平均蛍光強度（MFI）を、CD4+細胞およびCD8+細胞に関してゲーティングして、操作されたT細胞において定量した。図10に示すように、CARの表面発現は、CD4+ T細胞でもCD8+ T細胞でも類似していた。L34A突然変異およびL34S突然変異を有する修飾されたジャンクション領域

50

を含有するバリエーションCARは、ネイティブジャンクション領域を持つCARと比較して増加した表面発現を呈した。

#### 【0315】

##### B. サイトカイン発現

ネイティブジャンクション領域またはさまざまな修飾されたジャンクション領域のどちらかを含有するCARを発現する抗CD19 CAR T細胞によるサイトカインの生産を評価した。操作されたT細胞を、ゴルジ阻害剤の存在下で、照射CD19形質導入K562ターゲット細胞（K562-CD19）またはCD19抗原を発現しない親K562細胞と共培養した。次いで、刺激後に細胞を固定し、透過処理し、CD4+/CAR+細胞およびCD8+/CAR+細胞において、細胞内IL-2およびIFN- $\gamma$  サイトカインレベルを、フローサイトメトリーによって評価した。

10

#### 【0316】

CD4+/CAR+細胞およびCD8+/CAR+細胞におけるIL-2およびIFN- $\gamma$  の細胞内レベルを表す例示的フローサイトメトリープロットを図11に示す。図示するとおり、L34AおよびL34SバリエーションCARを発現するCD4+/CAR+ T細胞およびCD8+/CAR+ T細胞では、抗原刺激後にIL-2の細胞内発現を呈する細胞のパーセンテージが、非修飾CARで操作された細胞と比較して大きかった。R31HおよびL34A CARバリエーションを発現するCD8+/CAR+ T細胞では、抗原刺激後にIFN- $\gamma$  サイトカイン発現が増加している細胞のパーセンテージが、非修飾CARで操作された細胞と比較して大きかった。理論に束縛されることは望まないが、サイトカイン発現レベルの増加は、R31HおよびL34AバリエーションCARに観察された表面発現量の上昇と、大まかに相関しうる。

20

#### 【0317】

##### C. CAR T細胞増大

反復刺激に続いてエクスピボで増大できる能力を有する細胞は、いくつかの局面において、CAR-T細胞の（例えば初期活性化に続く）持続能力を示すことができ、かつ/またはインビボでの機能を示す（Zhao et al. (2015) Cancer Cell, 28:415-28）。上述のように作製したCAR-T細胞を、照射ターゲット細胞（K562-CD19）と共に培養した。細胞を刺激し、3～4日ごとに収穫してカウントし、細胞数をラウンドごとに最初の播種密度に再設定してから、同じ培養条件を使って新しいターゲット細胞で再刺激した。17日間の培養期間中に合計5ラウンドの刺激を実行した。各刺激ラウンドについて、細胞の数を決定した。

30

#### 【0318】

図12に示すように、修飾されたジャンクション領域を含有するバリエーションCARを発現する細胞では、ネイティブジャンクション領域を持つCARを発現する細胞と比較して、抗CD19 CARで操作された細胞の同等な初期成長が観察された。再刺激の7日目以後、ネイティブジャンクション領域を含有するCARを発現する細胞では、細胞増大の度合は低下したが、バリエーションCARは、少なくとも再刺激の10日目までは、継続的または類似する増大を呈した。

#### 【0319】

本発明は、本発明の個々の局面の一例に過ぎないものとして意図される本明細書に開示された態様によって、その範囲を制限されず、機能的に等価である任意のものが、本発明の範囲に含まれる。本明細書に記載されたものに加えて、本発明のモデルおよび方法に対する様々な修飾が、上記の説明および教示から、当業者に明白になり、同様に、本発明の範囲に含まれることが意図される。そのような修飾またはその他の態様は、本発明の真の範囲および本旨を逸脱することなく実施され得る。

40

#### 【0320】

##### 配列

（表5）配列

50

SEQ ID NO	配列	注
1	ESKYGPPCPPCP	IgG4ヒンジ
2	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 膜貫通ドメイン
3	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	4-1BB 共刺激ドメイン (Q07011.1のアミノ酸 214~255) ヒト
4	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATK DTYDALHMQALPPR	CD3ζ細胞内シグナル 伝達ドメイン
5	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>KRGRKKLL</u> YIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	CD28-4-1BB
6	CYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPF	ペプチド
7	VAFIIFWVKRGRKKLL	ペプチド
8	AFIIFWVKRGRKKLL	ペプチド
9	FWVKRGRKKLLYIFK	ペプチド
10	FIIIFWVKRGRKKLL	ペプチド
11	FIIIFWVKRGRKKL	ペプチド
12	IIFWVKRGRKKLL	ペプチド
13	CYSLLVTVAFIIFWV <u>NN</u> KRGRKKLLYIFKQPF	バリエーション領域
14	IIFWVNNKRGRKKL	バリエーションペプチド
15	IIFWVNNKRGRKK	バリエーションペプチド
16	VAFIIFWVK	合成ペプチド
17	AFIIFWVKR	合成ペプチド
18	FIIIFWVKRG	合成ペプチド
19	IIFWVKRGR	合成ペプチド
20	IFWVKRGRK	合成ペプチド
21	FWVKRGRKK	合成ペプチド
22	WVKRGRKKL	合成ペプチド
23	VAFIIFWVS	合成ペプチド K28S
24	AFIIFWVSR	合成ペプチド K28S
25	FIIIFWVSRG	合成ペプチド K28S
26	IIFWVSRGR	合成ペプチド K28S
27	IFWVSRGRK	合成ペプチド K28S
28	FWVSRGRKK	合成ペプチド K28S
29	WVSRGRKKL	合成ペプチド K28S
30	VAFIIFWVL	合成ペプチド

10

20

30

40

50



		K28L
31	AFIIFWVLR	合成ペプチド K28L
32	FIIFWVLRG	合成ペプチド K28L
33	IIFWVLRGR	合成ペプチド K28L
34	IFWVLRGRK	合成ペプチド K28L
35	FWVLRGRKK	合成ペプチド K28L
36	WVLRGRKKL	合成ペプチド K28L
37	VAFIIFWVH	合成ペプチド K28H
38	AFIIFWVHR	合成ペプチド K28H
39	FIIFWVHRG	合成ペプチド K28H
40	IIFWVHRGR	合成ペプチド K28H
41	IFWVHRGRK	合成ペプチド K28H
42	FWVHRGRKK	合成ペプチド K28H
43	WVHRGRKKL	合成ペプチド K28H
44	VAFIIFWVA	合成ペプチド K28A
45	AFIIFWVAR	合成ペプチド K28A
46	IIFWVARGR	合成ペプチド K28A
47	IFWVARGRK	合成ペプチド K28A
48	FWVARGRKK	合成ペプチド K28A
49	WVARGRKKL	合成ペプチド K28A
50	VAFIIFWVQ	合成ペプチド K28Q
51	AFIIFWVQR	合成ペプチド K28Q
52	FIIFWVQRG	合成ペプチド K28Q
53	IIFWVQRGR	合成ペプチド K28Q
54	IFWVQRGRK	合成ペプチド K28Q
55	FWVQRGRKK	合成ペプチド K28Q
56	WVQRGRKKL	合成ペプチド

10

20

30

40

50

		K28Q
57	IIFWVKRGS	合成ペプチド R31S
58	IFWVKRGSK	合成ペプチド R31S
59	FWVKRGSKK	合成ペプチド R31S
60	WVKRGSKKL	合成ペプチド R31S
61	IIFWVKRGL	合成ペプチド R31L
62	IFWVKRGLK	合成ペプチド R31L
63	FWVKRGLKK	合成ペプチド R31L
64	WVKRGLKKL	合成ペプチド R31L
65	IIFWVKRGH	合成ペプチド R31H
66	IFWVKRGHK	合成ペプチド R31H
67	FWVKRGHKK	合成ペプチド R31H
68	WVKRGHKKL	合成ペプチド R31H
69	IIFWVKRGA	合成ペプチド R31A
70	IFWVKRGAk	合成ペプチド R31A
71	FWVKRGAkk	合成ペプチド R31A
72	WVKRGAkkL	合成ペプチド R31A
73	IIFWVKRGN	合成ペプチド R31N
74	IFWVKRGNK	合成ペプチド R31N
75	FWVKRGNKK	合成ペプチド R31N
76	WVKRGNKKL	合成ペプチド R31N
77	IIFWVQRGS	合成ペプチド K28Q/R31S
78	IFWVQRGSK	合成ペプチド K28Q/R31S
79	FWVQRGSKK	合成ペプチド K28Q/R31S
80	WVQRGSKKL	合成ペプチド K28Q/R31S
81	IIFWVQRGA	合成ペプチド K28Q/R31A

10

20

30

40

50

82	IFWVQRGAK	合成ペプチド K28Q/R31A
83	FWVQRGAKK	合成ペプチド K28Q/R31A
84	WVQRGAKKL	合成ペプチド K28Q/R31A
85	IIFWVQRGN	合成ペプチド K28Q/R31N
86	IFWVQRGNK	合成ペプチド K28Q/R31N
87	FWVQRGNKK	合成ペプチド K28Q/R31N
88	WVQRGNKKL	合成ペプチド K28Q/R31N
89	WVKRGRKKS	合成ペプチド L34S
90	WVKRGRKKA	合成ペプチド L34A
91	WVQRGNKKS	合成ペプチド K28Q/L34S
92	WVQRGNKKA	合成ペプチド K28Q/L34A
93	MGNSCYNIVATLLLVNLFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCP PNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHLGAG CSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVL VNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIIISFFLALTS TALLFLFFLTLLRFVSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF PEEEEGGCEL	4-1BB共刺激ドメイン (アクセッション番号 Q07011.1) ヒト
94	MLRLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSR EFRASLHKGLD SAVEVCVVYGNYSQQQLQVYSKTGFNC DGKLGNESVTFYLQNLVYNQTDI YFCKIEVMYPP PYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWVLVVGGLACYSLL VTVAFIIFWVR SKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	CD28膜貫通ドメイン (アクセッション番号 P10747) ヒト
95	MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTAL FLRVKFSRSADAPAYQQGQNLVYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGG KPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLST ATKDTYDALHMQALPPR	CD3ζ鎖 (アクセッション番号 P20963)ヒト
96	FIIFWVNNKRGRKK	合成ペプチド
97	IFWVNNKRGRKKLL	合成ペプチド
98	FIIFWVNNKRGRKK	合成ペプチド
99	IFWVNNKRGRKKLL	合成ペプチド
100	VAFIIFWVR	合成ペプチド K28R
101	AFIIFWVR	合成ペプチド K28R
102	FIIFWVARG	合成ペプチド K28A
103	MFWVLVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28膜貫通ドメイン (アクセッション番号 P10747のアミノ酸153~179) ヒト

10

20

30

40

50

104	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPFGPSKPFWVLVVVGGV LACYSLLVTVAFIIFWV	膜貫通を含むCD28 (アクセッション番号 P10747のアミノ酸 114～179) ヒト
105	RVKFSRSAEPPAYQQGQNLNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3ζ ヒト
106	GAATCTAAGTACGACCGCCCTGCCCTTGCCT	スパーサー(IgG4ヒンジ) (nt) ヒト
107	ESKYGPCCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLGLK	ヒンジ-CH3スパーサー ヒト
108	ESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK	ヒンジ-CH2-CH3スパーサー ヒト
109	RWPESPKAQASSVPTAQPPAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEKKKEKE KEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSD LKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSHSRLTLPRSLWNAGT SVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAQAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLC EVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVLRVP APSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSIVTDH	IgG-ヒンジ-Fc ヒト
110	LEGGEGGRGSLTTCGDVEENPGPR	T2A 人工
111	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFK NCTSIGDLHLIPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVEITGFLLIQA WPENRTDLHAFENLEIIRGRKQHQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISD GDVITISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQTKIISNRGENSCKATGQVCH ALCSPEGCWGPEDRCVSCRNVSRGREGVDKCNLLEGEPREFVENSECI QCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCFAGVMGENNT LVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNGPKIPSIATGMVGL LLLLVVALGIGLFM	tEGFR 人工
112	RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28細胞質ドメイン (P10747のアミノ酸 180～220) ヒト
113	RSKRSRGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28細胞質ドメイン バリエント (LL→GG) ヒト
114	FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>ARG</u> RKKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	CD28-4-1BB K28A バリエント
115	FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>HGR</u> RKKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	CD28-4-1BB K28H バリエント
116	FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>LGR</u> RKKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	CD28-4-1BB K28L バリエント
117	FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>QRG</u> RKKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	CD28-4-1BB K28Q バリエント

10

20

30

40

118	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>SRGRKKLLY</u> IFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	CD28-4-1BB K28S バリエント
119	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>KRGAKKLLY</u> IFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	CD28-4-1BB R31A バリエント
120	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>KRGHKKLLY</u> IFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	CD28-4-1BB R31H バリエント
121	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>KRGLKKLLY</u> IFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	CD28-4-1BB R31L バリエント
122	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>KRGNKKLLY</u> IFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	CD28-4-1BB R31N バリエント
123	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>KRGKKALY</u> IFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	CD28-4-1BB L34A バリエント
124	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>KRGKKSLY</u> IFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	CD28-4-1BB L34S バリエント
125	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>QRGAKKLLY</u> IFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	CD28-4-1BB K28Q/R31A バリエント
126	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>QRGNKKLLY</u> IFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	CD28-4-1BB K28Q/R31N バリエント
127	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>QRGSKLLY</u> IFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	CD28-4-1BB K28Q/R31S バリエント
128	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>QRGKKALY</u> IFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	CD28-4-1BB K28Q/L34A バリエント
129	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>QRGKKSLY</u> IFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	CD28-4-1BB K28Q/L34S バリエント
130	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>KRGNKKALY</u> IFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	CD28-4-1BB R31N/L34A バリエント
131	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>KRGNKKSLY</u> IFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	CD28-4-1BB R31N/L34S バリエント
132	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>QRGNKKALY</u> IFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	CD28-4-1BB K28Q/R31N/L34A バリエント
133	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWV <u>QRGNKKSLY</u> IFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	CD28-4-1BB K28Q/R31N/L34S バリエント
134	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVNN <u>KRGKKLLY</u> IFKQPFMRPVQ TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	NN挿入を含むバリエント ジャンクション領域を含む CD28-4-1BB
135	MFWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT TQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	CD28-4-1BB
136	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLEPGPSKPFWVLVVVGVL ACYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRF PEEEEGGCEL	CD28-4-1BB
137	SLLVTVAFIIFWV <u>KRGKKLLY</u> IFKQ	CD28-4-1BB ジャンクション領域
138	SLLVTVAFIIFWV <u>ARGKKLLY</u> IFKQ	CD28-4-1BBジャンクション 領域 K14A バリエント
139	SLLVTVAFIIFWV <u>HARGKKLLY</u> IFKQ	CD28-4-1BBジャンクション 領域 K14H バリエント

10

20

30

40

140	SLLVTVAFIIFWV <u>L</u> RGRKKLLYIFKQ	CD28-4-1BBジャンクション 領域 K14L バリエント
141	SLLVTVAFIIFWV <u>Q</u> RGRKKLLYIFKQ	CD28-4-1BBジャンクション 領域 K14Q バリエント
142	SLLVTVAFIIFWV <u>S</u> RGRKKLLYIFKQ	CD28-4-1BBジャンクション 領域 K14S バリエント
143	SLLVTVAFIIFWV <u>K</u> RGAKKLLYIFKQ	CD28-4-1BBジャンクション 領域 R17A バリエント
144	SLLVTVAFIIFWV <u>K</u> RGHKKLLYIFKQ	CD28-4-1BBジャンクション 領域 R17H バリエント
145	SLLVTVAFIIFWV <u>K</u> RGLKKLLYIFKQ	CD28-4-1BBジャンクション 領域 R17L バリエント
146	SLLVTVAFIIFWV <u>K</u> RGNKKLLYIFKQ	CD28-4-1BBジャンクション 領域 R17N バリエント
147	SLLVTVAFIIFWV <u>K</u> RGRKKALYIFKQ	CD28-4-1BBジャンクション 領域 L20A バリエント
148	SLLVTVAFIIFWV <u>K</u> RGRKKSLYIFKQ	CD28-4-1BBジャンクション 領域 L20S バリエント
149	SLLVTVAFIIFWV <u>Q</u> RGAKKLLYIFKQ	CD28-4-1BBジャンクション 領域 K14Q/R17A バリエント
150	SLLVTVAFIIFWV <u>Q</u> RGNKKLLYIFKQ	CD28-4-1BBジャンクション 領域 K14Q/R17N バリエント
151	SLLVTVAFIIFWV <u>Q</u> RGSKKLLYIFKQ	CD28-4-1BBジャンクション 領域 K14Q/R17S バリエント
152	SLLVTVAFIIFWV <u>Q</u> RGRKKALYIFKQ	CD28-4-1BBジャンクション 領域 K14Q/L20A バリエント
153	SLLVTVAFIIFWV <u>Q</u> RGRKKSLYIFKQ	CD28-4-1BBジャンクション 領域 K14Q/L20S バリエント
154	SLLVTVAFIIFWV <u>K</u> RGNKKALYIFKQ	CD28-4-1BBジャンクション 領域 R17N/L20A バリエント
155	SLLVTVAFIIFWV <u>K</u> RGNKKSLYIFKQ	CD28-4-1BBジャンクション 領域 R17N/L20S バリエント
156	SLLVTVAFIIFWV <u>Q</u> RGNKKALYIFKQ	CD28-4-1BBジャンクション 領域 K14Q/R17N/L20A バリエント
157	SLLVTVAFIIFWV <u>Q</u> RGNKKSLYIFKQ	CD28-4-1BBジャンクション 領域 K14Q/R17N/L20S バリエント
158	G A A T C T A A G T A C G G A C C G C C C T G C C	スペーサー (IgG4ヒンジ)

10

20

30

40

50

	C C C C T T G C C C T	(ヌクレオチド) ヒト
159	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRRGRDPGEMGGKP RRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATK DTYDALHMQALPPR	CD3ζ
160	CYSLLVTVAFIIFWVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT	ペプチド
161	CYSLLVTVAFIIFWV	合成ペプチド
162	LLVTVAFIIFWVKRG	合成ペプチド
163	TVAFIIFWVKRGRKK	合成ペプチド
164	FIIFWVKRGRKKLLY	合成ペプチド
165	FWVKRGRKKLLYIFK	合成ペプチド
166	KRGRKKLLYIFKQPF	合成ペプチド
167	RKKLLYIFKQPFMRP	合成ペプチド
168	LLYIFKQPFMRPVQT	合成ペプチド
169	TVAFIIFWVKRGHKK	合成ペプチド R31H
170	FIIFWVKRGHKKLLY	合成ペプチド R31H
171	FWVKRGHKKLLYIFK	合成ペプチド R31H
172	KRGHKKLLYIFKQPF	合成ペプチド R31H
173	HKKLLYIFKQPFMRP	合成ペプチド R31H
174	TVAFIIFWVKRGNKK	合成ペプチド R31N
175	FIIFWVKRGNKKLLY	合成ペプチド R31N
176	FWVKRGNKKLLYIFK	合成ペプチド R31N
177	KRGNKKLLYIFKQPF	合成ペプチド R31N
178	NKKLLYIFKQPFMRP	合成ペプチド R31N
179	FIIFWVKRGRKKALY	合成ペプチド L34A
180	FWVKRGRKKALYIFK	合成ペプチド L34A
181	KRGRKKALYIFKQPF	合成ペプチド L34A
182	RKKALYIFKQPFMRP	合成ペプチド L34A
183	FWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVKRGSKKLLYIFKQPFMRPVQTT QEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	CD28-4-1BB R31S バリエント
184	SLLVTVAFIIFWVKRGSKKLLYIFKQ	CD28-4-1BBジャンクション 領域 R31S バリエント

10

20

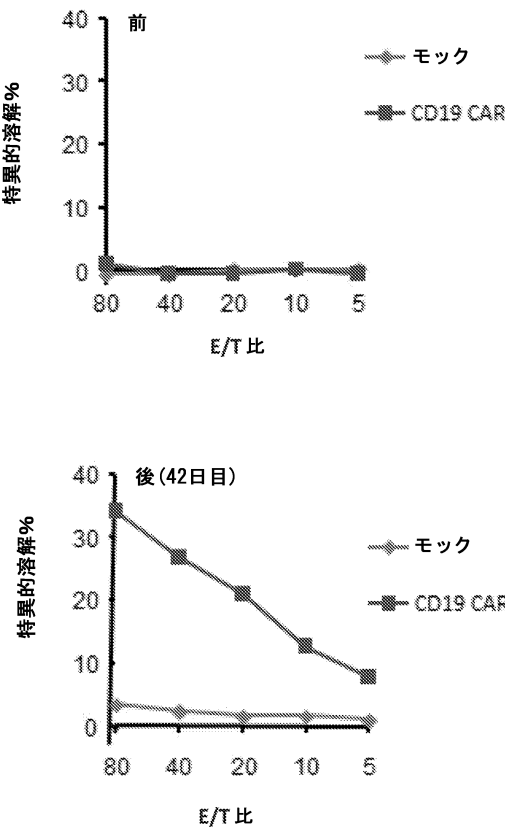
30

40

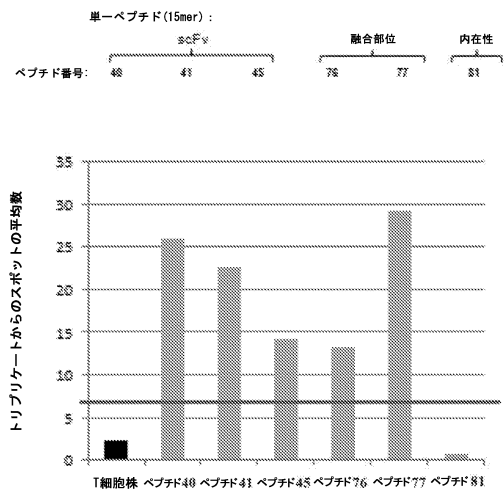
50

【図面】

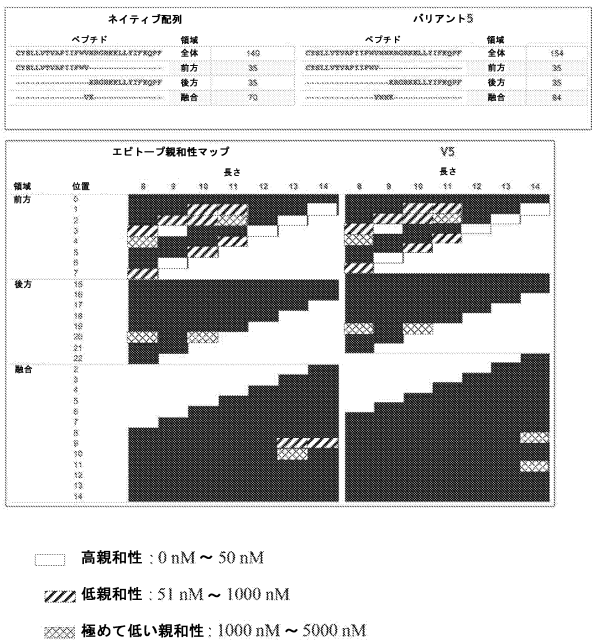
【図 1】



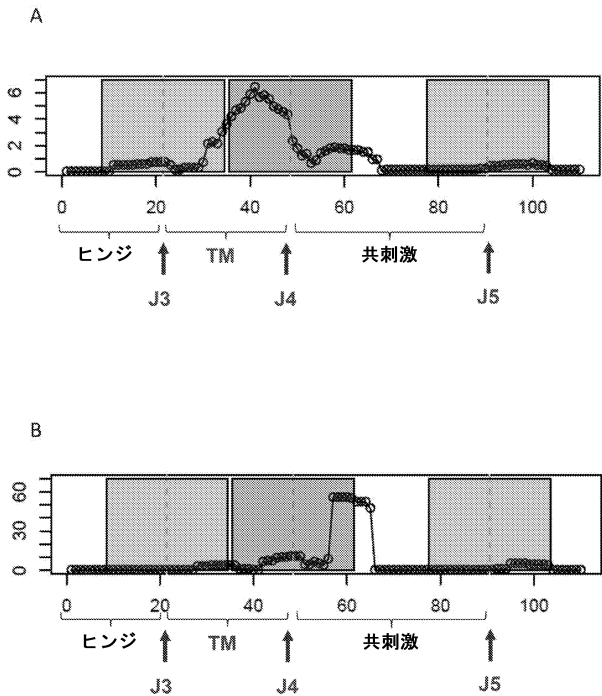
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

20

30

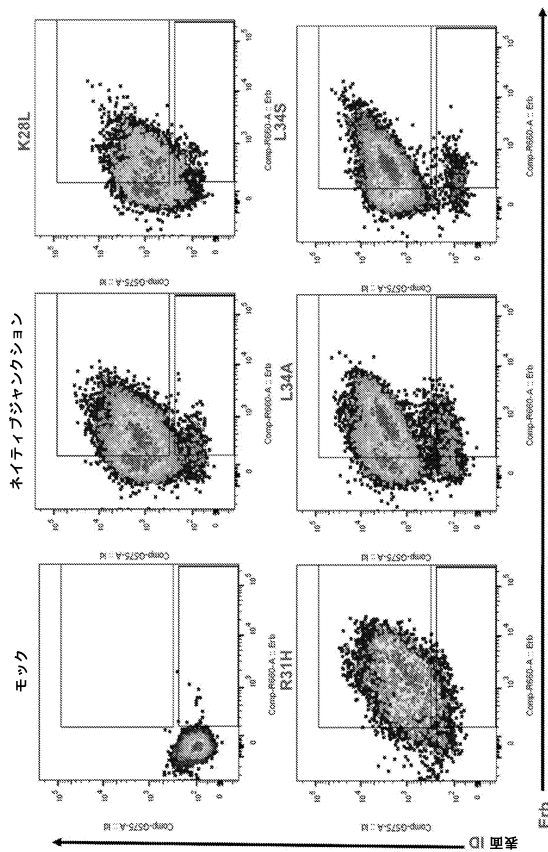
40

50

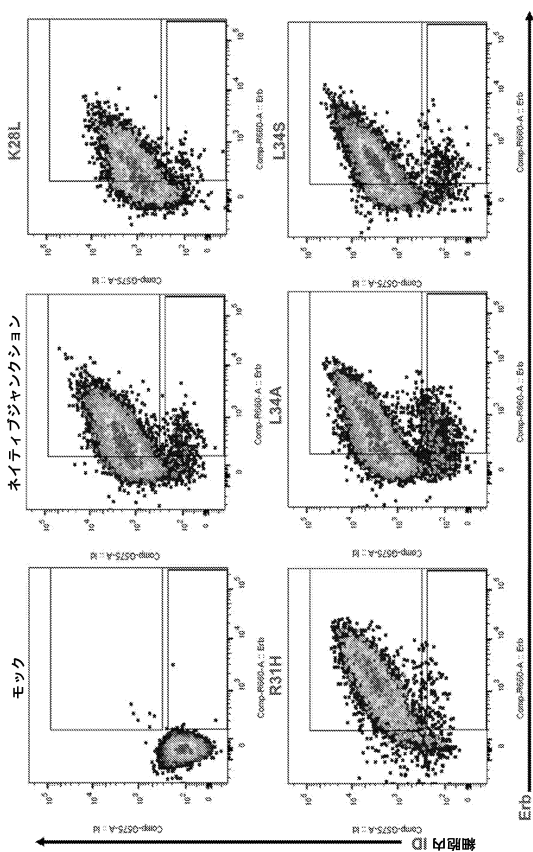




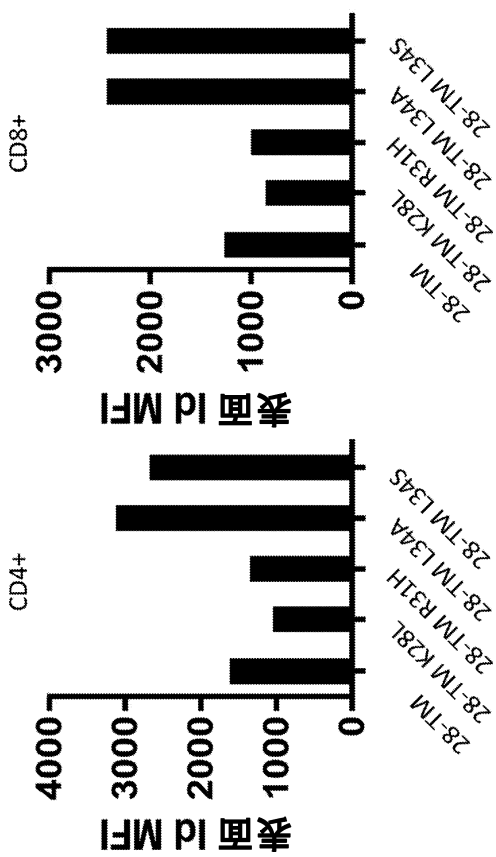
【図 9 A】



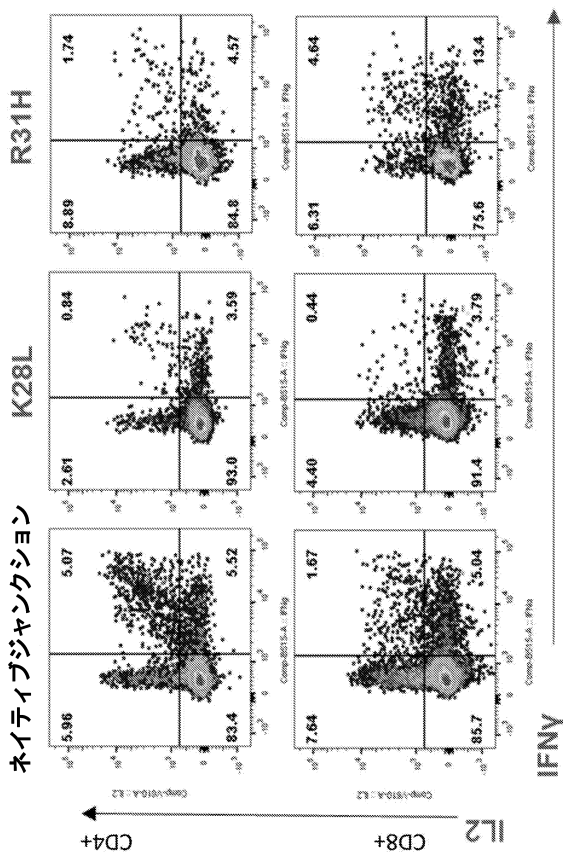
【図 9 B】



【図 10】



【図 11 - 1】



10

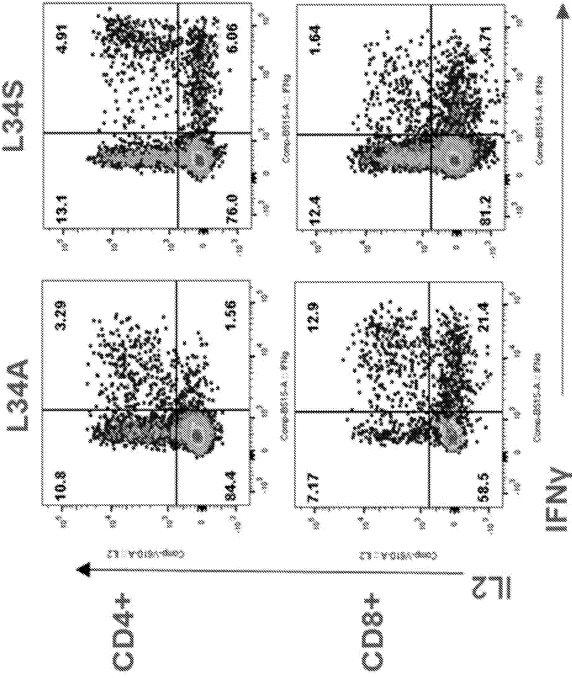
20

30

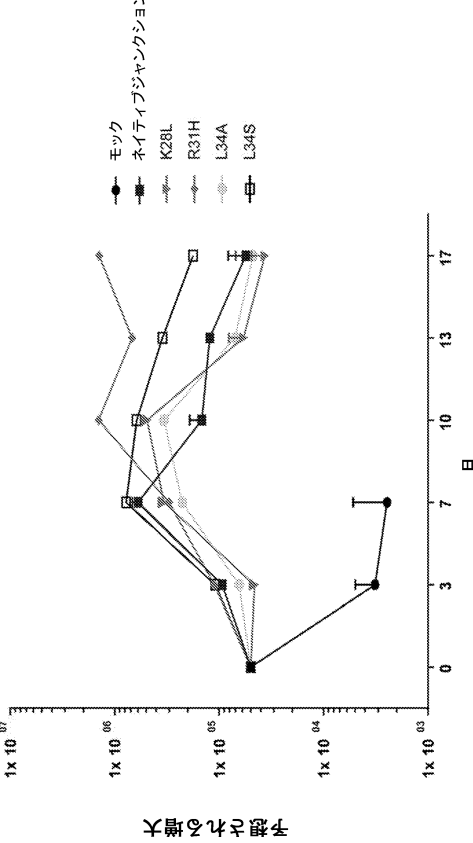
40

50

【図 1 1 - 2】



【図 1 2】



【配列表】

0007184645000001.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

C 0 7 K	16/30 (2006.01)	C 0 7 K	16/30	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	
C 0 7 K	16/18 (2006.01)	C 0 7 K	16/18	
C 1 2 N	15/867 (2006.01)	C 1 2 N	15/867	Z
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	5/0783 (2010.01)	C 1 2 N	5/0783	
A 6 1 P	31/00 (2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	37/00 (2006.01)	A 6 1 P	37/00	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17	Z
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

弁理士 井上 隆一

## (74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

## (74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

## (74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

## (74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

## (74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

## (74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

## (72)発明者 トンプソン ルカス ジェームス

アメリカ合衆国 9 8 1 0 9 ワシントン州 シアトル デクスター アベニュー ノース 4 0 0 ス  
イト 1 2 0 0

## (72)発明者 デュボーズ ロバート エフ.

アメリカ合衆国 9 8 1 0 9 ワシントン州 シアトル デクスター アベニュー ノース 4 0 0 ス  
イト 1 2 0 0

## (72)発明者 ブラーマンダム アルチャナ

アメリカ合衆国 9 8 1 0 9 ワシントン州 シアトル デクスター アベニュー ノース 4 0 0 ス  
イト 1 2 0 0

審査官 白井 美香保

## (56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 1 3 9 9 4 3 ( U S , A 1 )

国際公開第 2 0 1 4 / 1 4 4 6 2 2 ( W O , A 2 )

Frontiers in Immunology , 2013年 , Vol.4, Article 371 , p.1-7

## (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

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

C A P L U S / B I O S I S / M E D L I N E / W P I D S / E M B A S E ( 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