

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7018985号

(P7018985)

(45)発行日 令和4年2月14日(2022.2.14)

(24)登録日 令和4年2月3日(2022.2.3)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62

Z Z N A

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/12

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 0 7 K 19/00

C 0 7 K 16/30 (2006.01)

C 0 7 K 16/30

請求項の数 24 外国語出願 (全65頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-85861(P2020-85861)

(22)出願日 令和2年5月15日(2020.5.15)

(62)分割の表示 特願2019-537127(P2019-537127)
の分割

原出願日 平成30年1月9日(2018.1.9)

(65)公開番号 特開2020-156488(P2020-156488
A)

(43)公開日 令和2年10月1日(2020.10.1)

審査請求日 令和2年6月24日(2020.6.24)

(31)優先権主張番号 62/444,201

(32)優先日 平成29年1月9日(2017.1.9)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 517435353

レンティジェン・テクノロジー・インコ
ーポレイテッドL E N T I G E N T E C H N O L O G
Y , I N C .アメリカ合衆国、2 0 8 7 8 メリーラ
ンド州、ゲイザースバーグ、クロッパー
・ロード、9 1 0、スイート・2 0 0・
エス

(73)特許権者 514124403

ザ ユナイテッド ステイツ オブ アメリ
カ、 アズ リプレゼンテッド バイ ザ
セクレタリー、 デパートメント オブ
ヘルス アンド ヒューマン サービスズ
アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗メソセリン免疫療法によりがんを処置するための組成物および方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

R N A 操作された細胞の集団を生成する方法であって、*i n v i t r o* 転写された R N A または合成 R N A を細胞中に導入するステップを含み、前記 R N A が、配列番号 4、6、または 8 のアミノ酸配列を含むメソセリン抗原結合性ドメインを含む少なくとも 1 つの細胞外抗原結合性ドメイン、少なくとも 1 つのリンカードメイン、少なくとも 1 つの膜貫通ドメイン、および少なくとも 1 つの細胞内シグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体 (C A R) をコードする単離された核酸分子を含む、方法。

【請求項2】

哺乳動物 (ヒトを除く) における抗腫瘍免疫をもたらす方法であって、有効量の、配列番号 4、6、または 8 のアミノ酸配列を含むメソセリン抗原結合性ドメインを含む少なくとも 1 つの細胞外抗原結合性ドメイン、少なくとも 1 つのリンカードメイン、少なくとも 1 つの膜貫通ドメイン、および少なくとも 1 つの細胞内シグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体 (C A R) をコードする核酸分子を含むベクターを含む単離された細胞を、前記哺乳動物に投与するステップを含む、方法。

【請求項3】

哺乳動物 (ヒトを除く) においてがんを処置または予防する方法であって、配列番号 4、6、または 8 のアミノ酸配列を含むメソセリン抗原結合性ドメインを含む少なくとも 1 つの細胞外抗原結合性ドメイン、少なくとも 1 つのリンカードメイン、少なくとも 1 つの膜貫通ドメイン、および少なくとも 1 つの細胞内シグナル伝達ドメインを含む C A R を、前

記哺乳動物におけるがんを処置または予防するのに有効な量で前記哺乳動物に投与するステップを含む、方法。

【請求項 4】

前記少なくとも 1 つの膜貫通ドメインが、T 細胞受容体のアルファ、ベータもしくはゼータ鎖、C D 2 8、C D 3 イプシロン、C D 4 5、C D 4、C D 5、C D 8、C D 9、C D 1 6、C D 2 2、C D 3 3、C D 3 7、C D 6 4、C D 8 0、C D 8 6、C D 1 3 4、C D 1 3 7、C D 1 5 4 またはそれらの任意の組合せから選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

コードされる前記少なくとも 1 つのメソセリン抗原結合性ドメイン、前記少なくとも 1 つの細胞内シグナル伝達ドメイン、またはその両方が、前記少なくとも 1 つのリンカーまたはスペーサードメインによって膜貫通ドメインに接続されている、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 6】

コードされる前記少なくとも 1 つのリンカーまたはスペーサードメインが、C D 8 または C D 2 8 の細胞外ドメインに由来し、膜貫通ドメイン連結されている、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記メソセリン抗原結合性ドメインをコードする核酸配列が、配列番号 3、5、もしくは 7 を含む核酸配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

コードされる前記少なくとも 1 つの細胞内シグナル伝達ドメインが、C D 3 ゼータのシグナル伝達ドメインを含む、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 9】

コードされる前記少なくとも 1 つの細胞内シグナル伝達ドメインが、共刺激ドメイン、一次シグナル伝達ドメイン、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記共刺激ドメインが、O X 4 0、C D 7 0、C D 2 7、C D 2 8、C D 5、I C A M - 1、L F A - 1 (C D 1 1 a / C D 1 8)、I C O S (C D 2 7 8)、D A P 1 0、D A P 1 2 もしくは 4 - 1 B B (C D 1 3 7) の機能的シグナル伝達ドメイン、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項 9 に記載の方法。

30

【請求項 11】

前記少なくとも 1 つの膜貫通ドメインが、T 細胞受容体のアルファ、ベータもしくはゼータ鎖、C D 2 8、C D 3 イプシロン、C D 4 5、C D 4、C D 5、C D 8、C D 9、C D 1 6、C D 2 2、C D 3 3、C D 3 7、C D 6 4、C D 8 0、C D 8 6、C D 1 3 4、C D 1 3 7、C D 1 5 4 またはそれらの任意の組合せから選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 12】

コードされる前記少なくとも 1 つのメソセリン抗原結合性ドメイン、前記少なくとも 1 つの細胞内シグナル伝達ドメイン、またはその両方が、前記少なくとも 1 つのリンカーまたはスペーサードメインによって膜貫通ドメインに接続されている、請求項 2 に記載の方法。

40

【請求項 13】

コードされる前記少なくとも 1 つのリンカーまたはスペーサードメインが、C D 8 または C D 2 8 の細胞外ドメインに由来し、膜貫通ドメイン連結されている、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記メソセリン抗原結合性ドメインをコードする核酸配列が、配列番号 3、5、もしくは 7 を含む核酸配列を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 15】

コードされる前記少なくとも 1 つの細胞内シグナル伝達ドメインが、C D 3 ゼータのシグナル伝達ドメインを含む、請求項 2 に記載の方法。

50

【請求項 16】

コードされる前記少なくとも 1 つの細胞内シグナル伝達ドメインが、共刺激ドメイン、一次シグナル伝達ドメイン、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 17】

前記共刺激ドメインが、OX40、CD70、CD27、CD28、CD5、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)、DAP10、DAP12 もしくは 4-1BB (CD137) の機能的シグナル伝達ドメイン、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記少なくとも 1 つの膜貫通ドメインが、T 細胞受容体のアルファ、ベータもしくはゼータ鎖、CD28、CD3 イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154 またはそれらの任意の組合せから選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む、請求項 3 に記載の方法。

10

【請求項 19】

コードされる前記少なくとも 1 つのメソセリン抗原結合性ドメイン、前記少なくとも 1 つの細胞内シグナル伝達ドメイン、またはその両方が、前記少なくとも 1 つのリンカーまたはスペーサドメインによって膜貫通ドメインに接続されている、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 20】

コードされる前記少なくとも 1 つのリンカーまたはスペーサドメインが、CD8 または CD28 の細胞外ドメインに由来し、膜貫通ドメイン連結されている、請求項 19 に記載の方法。

20

【請求項 21】

前記メソセリン抗原結合性ドメインをコードする核酸配列が、配列番号 3、5、もしくは 7 を含む核酸配列を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 22】

コードされる前記少なくとも 1 つの細胞内シグナル伝達ドメインが、CD3 ゼータのシグナル伝達ドメインを含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 23】

コードされる前記少なくとも 1 つの細胞内シグナル伝達ドメインが、共刺激ドメイン、一次シグナル伝達ドメイン、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項 3 に記載の方法。

30

【請求項 24】

前記共刺激ドメインが、OX40、CD70、CD27、CD28、CD5、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)、DAP10、DAP12 もしくは 4-1BB (CD137) の機能的シグナル伝達ドメイン、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項 23 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

40

本出願は、米国特許法第 119 条 (e) の下で、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、2017 年 1 月 9 日出願の米国仮特許出願第 62/444,201 号に対する優先権の利益を主張する。

【0002】

配列表

本出願は、ASCII 形式で電子的に提出された、その全体にわたって参照により本明細書に組み込まれる配列表を含む。2018 年 1 月 8 日に作成された前記 ASCII コピーは Sequence Listing.txt と名付けられ、48.0 キロバイトのサイズである。

【0003】

50

連邦政府による資金提供を受けた研究または開発に関する記載

本発明は、アメリカ合衆国保健福祉省の機関であるアメリカ国立衛生研究所との Cooperative Research and Development Agreement の実施において創出された。米国政府は本発明に対し一定の権利を有する。

【0004】

本開示の分野

本出願は、がんの分野、特に、メソセリン抗原結合性ドメイン、およびこのようなメソセリン抗原結合性ドメインを含むキメラ抗原受容体 (CAR)、およびその使用方法に関する。

【背景技術】

【0005】

背景

がんは、ヒトの健康に対する最も致命的な脅威の1つである。米国だけで、がんは毎年ほぼ130万人の新たな患者が罹患し、心血管疾患に次いで2番目に多い死因であり、死亡数の約4分の1を占めている。固形腫瘍が、これらの死亡のほとんどの原因である。ある特定のがんの医学的処置においては顕著な進歩があったものの、全てのがんについての5年全生存率は過去20年間で約10%しか改善しなかった。がんまたは悪性腫瘍は、制御されずに迅速に転移および成長し、処置を非常に困難にする。

【0006】

メソセリンは40 kDaの、グリコシルホスファチジルイノシトールに連結した膜糖タンパク質であり、その正常な個体における発現は、胸膜、腹膜および心膜を覆う中皮細胞に限定される。一方、メソセリンは悪性中皮腫、卵巣、胃、肺、および膵臓腺癌、ならびに胆管癌ならびにトリプルネガティブ乳がんを含むいくつかの固形腫瘍により過剰発現される (Ordóñez NG、Am J Surg Pathol 1993年; 27巻: 1418~28頁、Hassan R、Laszik ZG、Lerner M、Raffeld M、Postier R、Brackett D. Am J Clin Pathol 2005年; 124巻: 838~45頁; Chou Jら、Breast Cancer Res Treat 2012年; 133巻: 799~804頁)。メソセリンの生物学的機能はいまだ不明である。しかし、メソセリンは腫瘍細胞における血漿糖タンパク質であるCA125に結合し、メソセリンが腹膜および胸膜転移に寄与する可能性があることが示唆される (Kanekoら、2009年、J Biol Chem 284巻: 3739~3749頁; Rumpら、2004年、J Biol Chem 279巻: 9190~9198頁)。メソセリン発現は、上皮卵巣がん (EOC) 患者の化学療法抵抗性、無病生存期間の短縮および全生存率の悪化と関連する (Chengら、2009年、Br J Cancer 100巻: 1144~1153号)。したがって、メソセリンは免疫ベースの療法における魅力的な標的となる。腫瘍での発現頻度に基づくと、抗メソセリン療法の主要標的は、Raffit Hassan、Mitchell Ho. Eur J Cancer. 2008年1月; 44巻 (1号): 46~53頁で概説される、中皮腫および膵臓腺癌 (100%近い腫瘍が抗原を発現)、それに続いて卵巣がん (67~100%の腫瘍が抗原を発現) および肺腺癌 (41~53%がメソセリン陽性) である。メソセリンを標的化する最初のがん治療用抗体であるK1は、マウスハイブリドーマ由来であった [Chang K、Pastan I、Willingham MC. Int J Cancer 1992年; 50巻: 373~81頁]。次いで、SS1と呼ばれる、より親和性が高い抗メソセリン抗体がファージディスプレイおよびホットスポット突然変異誘発により開発された [Chowdhury PS、Viner JL、Beers R、Pastan I. Proc Natl Acad Sci U S A 1998年; 95巻: 669~74頁; Chowdhury PS、Pastan I、Nat Biotech 1999年; 17巻: 568~72頁]。

【0007】

キメラ抗原受容体 (CAR) は、3つの本質的な単位を含むハイブリッド分子である: (

10

20

30

40

50

1) 細胞外抗原結合性モチーフ、(2) 連結／膜貫通モチーフ、および(3) 細胞内T細胞シグナル伝達モチーフ (Long AH、Haso WM、Orentas RJ. *Lessons learned from a highly-active CD2-specific chimeric antigen receptor*. *Oncoimmunology*. 2013年; 2巻(4号): e23621頁)。CARの抗原結合性モチーフは一般に、免疫グロブリン(Ig)分子の最小の結合性ドメインである単鎖断片可変(scFv)を基にして作られる。代替の抗原結合性モチーフとして、例えば、受容体リガンド(即ち、IL-13は、腫瘍が発現するIL-13受容体に結合するように操作されている)、インタクトな免疫受容体、ライブラリー由来ペプチド、および自然免疫系エフェクター分子(例えば、NKG2D)も操作されている。CAR発現のための代替の細胞標的(例えば、NKまたはガンマデルタT細胞)も開発中である(Brown CEら *Clin Cancer Res*. 2012年; 18巻(8号): 2199~209頁; Lehner Mら *PLoS One*. 2012年; 7巻(2号): e31210頁)。CARベクターを形質導入するための最も活性なT細胞集団を定義すること、最適な培養および増殖の技術を決定的ること、ならびにCARタンパク質構造自体の分子の詳細を定義することに関して、いまだにかなりの労力を要している。

【0008】

CARの連結モチーフは、IgGの定常ドメインなどの比較的安定な構造ドメインとするか、または伸長された可撓性リンカーとなるように設計することができる。IgGの定常ドメインに由来するものなどの構造モチーフを使用して、scFv結合性ドメインをT細胞の細胞膜表面から離れて延在させることができる。これは、結合性ドメインが腫瘍細胞表面膜に特に近い一部の腫瘍標的にとって重要であり得る(例えば、ジシアロガングリオシドGD2にとって; Orentasら、未公開の観察)。今日まで、CARにおいて使用されるシグナル伝達モチーフは常にCD3-ζ鎖を含んでいるが、それは、このコアモチーフが、T細胞活性化のための重要なシグナルであるからである。最初に報告された第2世代CARは、CD28シグナル伝達ドメインおよびCD28膜貫通配列を特徴としていた。このモチーフは、CD137(4-1BB)シグナル伝達モチーフを含有する第3世代CARでも同様に使用された(Zhao Yら *J Immunol*. 2009年; 183巻(9号): 5563~74頁)。新たなテクノロジーの進歩に伴い、抗CD3および抗CD28抗体に連結されたビーズによるT細胞の活性化、ならびにCD28由来のカノニカルな「シグナル2」の存在がCAR自体によってコードされる必要はもはやなくなった。ビーズ活性化を使用して、第3世代ベクターは、*in vitro*アッセイにおいて第2世代ベクターよりも優れているわけではないことが見出され、また、白血病のマウスモデルにおいては第2世代ベクターを超える明らかな利益は得られなかった(Haso W、Lee DW、Shah NN、Stetler-Stevenson M、Yuan CM、Pastan IH、Dimitrov DS、Morgan RA、FitzGerald DJ、Barrett DM、Wayne AS、Mackall CL、Orentas RJ. *Anti-CD22-chimeric antigen receptors targeting B cell precursor acute lymphoblastic leukemia*, *Blood*. 2013年; 121巻(7号): 1165~74頁; Kochenderfer JNら *Blood*. 2012年; 119巻(12号): 2709~20頁)。これは、第2世代CD28/CD3-ζ(Lee DWら *American Society of Hematology Annual Meeting*. New Orleans, LA; 12月7~10日、2013年)およびCD137/CD3-ζシグナル伝達形式(Porter DLら *N Engl J Med*. 2011年; 365巻(8号): 725~33頁)のCD19特異的CARの臨床的成功によって裏付けられている。CD137に加えて、OX40などの他の腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバーも、CARが形質導入されたT細胞において重要な持続シグナルを提供することができる(Yvon Eら *Clin Cancer Res*. 2009年; 15巻(18号): 5852~60頁)。

10

20

30

40

50

CAR T細胞集団が培養された培養条件も等しく重要である。

【0009】

がんに対するCAR療法により広範で有効な適応における現在の課題は、説得力のある標的の不足に関する。細胞表面抗原への結合因子を創出することは、現在容易に達成可能であるが、正常組織を見逃しながら腫瘍に対して特異的な細胞表面抗原を発見することは、依然として厄介な課題である。CAR発現T細胞により高い標的細胞特異性を与えるための1つの潜在的な方法は、コンビナトリアルCARアプローチを使用することである。1つのシステムでは、CD3-ζとCD28シグナル単位が、同じ細胞において発現される2つの異なるCAR構築物間で分割される；別のシステムでは、2つのCARが、同じT細胞において発現されるが、一方はより低い親和性を有し、したがって第2のCARの完全な活性のために代替的CARが最初に結合されることを必要とする（Lanitis Eら Cancer Immunol Res. 2013年；1巻（1号）：43～53頁；Kloss CCら Nat Biotechnol. 2013年；31巻（1号）：71～5頁）。免疫療法剤としての単一のscFvベースのCARの生成のための第2の課題は、腫瘍細胞の不均一性である。少なくとも1つのグループは、標的抗原陰性集団の成長を回避することを期待して、エフェクター細胞集団が複数の抗原（HER2、IL-13Ra、EphA2）を同時に標的化する、神経膠芽腫のためのCAR戦略を開発している（Hegde Mら Mol Ther. 2013年；21巻（11号）：2087～101頁）。

10

【0010】

T細胞ベースの免疫療法は、合成生物学における新たな領域になっている；複数のプロモーターおよび遺伝子産物は、これらの高度に強力な細胞を腫瘍微小環境に導くことが想定され、ここで、T細胞は、負の調節シグナルを免れることができ、かつ有効な腫瘍死滅を媒介できる。誘導性カスパーゼ9構築物のAP1903との薬物誘導性二量体化を介した望ましくないT細胞の排除は、T細胞集団を制御できる強力なスイッチが薬理的に開始され得る1つの方法を実証している（Di Stasi Aら N Engl J Med. 2011年；365巻（18号）：1673～83頁）。デコイ受容体の発現によるトランスフォーミング成長因子-βの負の調節効果に対して免疫性であるエフェクターT細胞集団の創出は、エフェクターT細胞が最適な抗腫瘍活性のために操作され得る程度をさらに実証している（Foster AEら J Immunother. 2008年；31巻（5号）：500～5頁）。

20

30

【0011】

したがって、CARは、内因性T細胞受容体と類似した様式でT細胞活性化を誘発できるようであるが、今日までのこのテクノロジーの臨床適用に対する主要な障害は、CAR+T細胞の限定的なin vivo増殖、注入後の細胞の迅速な消失、および期待外れの臨床活性である。マウス起源の抗ヒトメソセリンCAR（SS1と呼ばれる）を保有するヒトT細胞が、in vitroでMHC非依存性のエフェクター機能を示し、免疫不全マウスにおいてin vivoでヒト中皮腫異種移植片の退行を誘導することを示した最近の研究（Carpenitoら、2009年、Proc Natl Acad Sci USA 106巻：3360～3365頁）を含む、メソセリン陽性腫瘍を標的化するいくつかの試みがその他のグループによりなされてきたが、バイスタンダー細胞に対する毒性、有効性の欠如、または局在化された腫瘍送達の必要性を含む、この手法に対するいくつかの難題が明らかとなった。したがって、上述の欠点なしに意図した治療的特質を示し得るCARを使用するがんの処置のための組成物および方法を発見する、当該分野における緊急かつ長年にわたる要求が存在する。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明は、CAR組成物、ならびにがんならびに他の疾患および／または状態を処置するために使用され得る治療的方法を提供することによって、これらの要求に対処する。特に

50

、本明細書に開示および記載される本発明は、メソセリン発現の調節不全と関連する疾患、障害または状態の処置に使用可能なCARを提供し、ここでCARは、形質導入T細胞において高い表面発現を示し、高度の細胞溶解ならびに形質導入T細胞の*in vivo*での増殖および持続を示すメソセリン抗原結合性ドメインを含む。

【課題を解決するための手段】

【0013】

概要

新規の抗メソセリン抗体またはその抗原結合性ドメイン、およびこのようなメソセリン抗原結合性ドメインを含むキメラ抗原受容体（CAR）、および受容体を発現する宿主細胞（例えばT細胞）、および受容体をコードする核酸分子が本明細書で提供される。CARは、形質導入T細胞での高い表面発現、高度の細胞溶解ならびに形質導入T細胞の*in vivo*での増殖および持続を示す。例えば対象におけるがんを処置するための、開示されるCAR、宿主細胞、および核酸分子を使用する方法も提供される。

【0014】

したがって、一態様において、配列番号1、3、5および7からなる群から選択される核酸配列を含む、ヒト抗メソセリン抗体またはその断片をコードする単離されたポリヌクレオチドが提供される。

【0015】

一実施形態において、完全ヒト抗メソセリン抗体またはその断片をコードする単離されたポリヌクレオチドが提供され、抗体またはその断片は、Fab断片、F(ab')₂断片、Fv断片、および単鎖Fv（scFv）からなる群から選択される断片を含む。

【0016】

一実施形態において、完全ヒト抗メソセリン抗体またはその断片をコードする単離されたポリヌクレオチドが提供され、抗体またはその断片は、配列番号2、4、6、および8からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0017】

一態様において、N末端からC末端へ、配列番号1、3、5および7からなる群から選択される核酸配列を含むヌクレオチド配列によりコードされる少なくとも1つのメソセリン抗原結合性ドメイン、少なくとも1つの膜貫通ドメイン、および少なくとも1つの細胞内シグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体（CAR）をコードする、単離された核酸分子が提供される。

【0018】

一実施形態では、コードされる細胞外メソセリン抗原結合性ドメインが、メソセリンに結合する抗体の少なくとも1つの単鎖可変断片を含む、CARをコードする単離された核酸分子が提供される。

【0019】

別の実施形態では、コードされる細胞外メソセリン抗原結合性ドメインが、メソセリンに結合する抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域を含む、CARをコードする単離された核酸分子が提供される。

【0020】

さらに別の実施形態では、コードされるCAR細胞外メソセリン抗原結合性ドメインが、メソセリンに結合する少なくとも1つのリポカリンベースの抗原結合性抗原（アンチカリン）をさらに含む、CARをコードする単離された核酸分子が提供される。

【0021】

一実施形態では、コードされる細胞外メソセリン抗原結合性ドメインが、リンカードメインによって膜貫通ドメインに接続される、単離された核酸分子が提供される。

【0022】

別の実施形態では、コードされるメソセリン細胞外抗原結合性ドメインに、リーダーまたはシグナルペプチドをコードする配列が先行する、CARをコードする単離された核酸分子が提供される。

【0023】

さらに別の実施形態では、配列番号1、3、5および7からなる群から選択される核酸配列を含むヌクレオチド配列によりコードされる少なくとも1つのメソセリン抗原結合性ドメインを含むCARをコードする、単離された核酸分子が提供され、CARは、CD19、CD20、CD22、ROR1、メソセリン、CD33、CD38、CD123 (IL3RA)、CD138、BCMA (CD269)、GPC2、GPC3、FGFR4、c-Met、PSMA、糖脂質F77、EGFRvIII、GD-2、NY-ESO-1 TCR、MAGE A3 TCR、またはそれらの任意の組合せを含むがこれらに限定されない抗原を標的化する細胞外抗原結合性ドメインをさらにコードする。

【0024】

ある特定の実施形態では、さらにコードされる細胞外抗原結合性ドメインが、抗CD19 scFV抗原結合性ドメイン、抗CD20 scFV抗原結合性ドメイン、抗CD22 scFV抗原結合性ドメイン、抗ROR1 scFV抗原結合性ドメイン、抗メソセリン scFV抗原結合性ドメイン、抗CD33 scFV抗原結合性ドメイン、抗CD38 scFV抗原結合性ドメイン、抗CD123 (IL3RA) scFV抗原結合性ドメイン、抗CD138 scFV抗原結合性ドメイン、抗BCMA (CD269) scFV抗原結合性ドメイン、抗GPC2 scFV抗原結合性ドメイン、抗GPC3 scFV抗原結合性ドメイン、抗FGFR4 scFV抗原結合性ドメイン、抗c-Met scFV抗原結合性ドメイン、抗PSMA scFV抗原結合性ドメイン、抗糖脂質F77 scFV抗原結合性ドメイン、抗EGFRvIII scFV抗原結合性ドメイン、抗GD-2 scFV抗原結合性ドメイン、抗NY-ESO-1 TCR scFV抗原結合性ドメイン、抗MAGE A3 TCR scFV抗原結合性ドメイン、または85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するそのアミノ酸配列、あるいはそれらの任意の組合せを含む、CARをコードする単離された核酸分子が提供される。

【0025】

一態様では、本明細書で提供されるCARはリンカーまたはスペーサードメインをさらに含む。

【0026】

一実施形態では、細胞外メソセリン抗原結合性ドメイン、細胞内シグナル伝達ドメイン、またはその両方が、リンカーまたはスペーサードメインによって膜貫通ドメインに接続される、CARをコードする単離された核酸分子が提供される。

【0027】

一実施形態では、コードされるリンカードメインが、CD8またはCD28の細胞外ドメインに由来し、膜貫通ドメインに連結される、CARをコードする単離された核酸分子が提供される。

【0028】

別の実施形態では、コードされるCARが、T細胞受容体のアルファ、ベータもしくはゼータ鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、およびCD154、またはそれらの組合せからなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む膜貫通ドメインをさらに含む、CARをコードする単離された核酸分子が提供される。

【0029】

さらに別の実施形態では、コードされる細胞内シグナル伝達ドメインが、CD3ゼータ細胞内ドメインをさらに含む、CARをコードする単離された核酸分子が提供される。

【0030】

一実施形態では、コードされる細胞内シグナル伝達ドメインが、CD3ゼータ細胞内ドメインに対してC末端側に配置される、CARをコードする単離された核酸分子が提供される。

【0031】

別の実施形態では、コードされる少なくとも1つの細胞内シグナル伝達ドメインが、共刺激ドメイン、一次シグナル伝達ドメイン、またはそれらの組合せを含む、CARをコードする単離された核酸分子が提供される。

【0032】

さらなる実施形態では、コードされる少なくとも1つの共刺激ドメインが、OX40、CD70、CD27、CD28、CD5、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)、DAP10、DAP12および4-1BB (CD137) の機能的シグナル伝達ドメイン、またはそれらの組合せを含む、CARをコードする単離された核酸分子が提供される。

【0033】

一実施形態では、リーダー配列またはシグナルペプチドをさらに含み、リーダーまたはシグナルペプチドのヌクレオチド配列が配列番号9のヌクレオチド配列を含む、CARをコードする単離された核酸分子が提供される。

【0034】

さらに別の実施形態では、コードされるリーダー配列が配列番号10のアミノ酸配列を含む、CARをコードする単離された核酸分子が提供される。

【0035】

一態様では、N末端からC末端へ、少なくとも1つの細胞外メソセリン抗原結合性ドメイン、少なくとも1つの膜貫通ドメイン、および少なくとも1つの細胞内シグナル伝達ドメインを含むキメラ抗原受容体 (CAR) が本明細書で提供される。

【0036】

一実施形態では、細胞外メソセリン抗原結合性ドメインが、抗原に結合する抗体の少なくとも1つの単鎖可変断片、または抗原に結合する抗体の少なくとも1つの重鎖可変領域、またはそれらの組合せを含む、CARが提供される。

【0037】

別の実施形態において、少なくとも1つの膜貫通ドメインが、T細胞受容体のアルファ、ベータもしくはゼータ鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137およびCD154、またはそれらの組合せからなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む、CARが提供される。

【0038】

一部の実施形態において、CARが、CD19、CD20、CD22、ROR1、メソセリン、CD33、CD38、CD123 (IL3RA)、CD138、BCMA (CD269)、GPC2、GPC3、FGFR4、c-Met、PSMA、糖脂質F77、EGFRvIII、GD-2、NY-ESO-1 TCR、MAGE A3 TCR、または85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するそのアミノ酸配列、またはそれらの任意の組合せを含む細胞外抗原結合性ドメインをさらにコードする、CARが提供される。

【0039】

一実施形態では、細胞外抗原結合性ドメインが、抗CD19 scFV抗原結合性ドメイン、抗CD20 scFV抗原結合性ドメイン、抗CD22 scFV抗原結合性ドメイン、抗ROR1 scFV抗原結合性ドメイン、抗メソセリン scFV抗原結合性ドメイン、抗CD33 scFV抗原結合性ドメイン、抗CD38 scFV抗原結合性ドメイン、抗CD123 (IL3RA) scFV抗原結合性ドメイン、抗CD138 scFV抗原結合性ドメイン、抗BCMA (CD269) scFV抗原結合性ドメイン、抗GPC2 scFV抗原結合性ドメイン、抗GPC3 scFV抗原結合性ドメイン、抗FGFR4 scFV抗原結合性ドメイン、抗c-Met scFV抗原結合性ドメイン、抗PSMA scFV抗原結合性ドメイン、抗糖脂質F77 scFV抗原結合性ドメイン、抗EGFRvIII scFV抗原結合性ドメイン、抗GD-2 scFV抗原結合性ドメイン、抗NY-ESO-1 TCR scFV抗原結合性ドメイン、抗MAGE A3 TCR s

10

20

30

40

50

c F V 抗原結合性ドメイン、または 85%、90%、95%、96%、97%、98% もしくは 99% の同一性を有するそのアミノ酸配列、またはそれらの任意の組合せを含む、CAR が提供される。

【0040】

別の実施形態では、少なくとも 1 つの細胞内シグナル伝達ドメインが共刺激ドメインおよび一次シグナル伝達ドメインを含む、CAR が提供される。

【0041】

さらに別の実施形態では、少なくとも 1 つの細胞内シグナル伝達ドメインが、OX40、CD70、CD27、CD28、CD5、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)、DAP10、DAP12、および 4-1BB (CD137)、またはそれらの組合せからなる群から選択されるタンパク質の機能的シグナル伝達ドメインを含む共刺激ドメインを含む、CAR が提供される。

10

【0042】

一実施形態では、CAR をコードする核酸配列は配列番号 11 (pLTG1901 EF1a MH1P-CD8TM-4-1BB-CD3ゼータ核酸配列 (図2A)) の核酸配列を含む。一実施形態では、核酸配列は配列番号 12 (pLTG1901 EF1a MH1P-CD8TM-4-1BB-CD3ゼータアミノ酸配列 (図2A)) のアミノ酸配列を含む CAR をコードする。

【0043】

別の実施形態では、CAR をコードする核酸配列は配列番号 13 (pLTG1902 EF1a MH2P CD8TM-4-1BB-CD3ゼータ核酸配列 (図2B)) の核酸配列を含む。一実施形態では、核酸配列は配列番号 14 (pLTG1902 EF1a MH2P CD8TM-4-1BB-CD3ゼータアミノ酸配列 (図2B)) のアミノ酸配列を含む CAR をコードする。

20

【0044】

別の実施形態では、CAR をコードする核酸配列は配列番号 15 (pLTG1903 EF1a MH6P CD8TM-4-1BB-CD3ゼータ核酸配列 (図2C)) の核酸配列を含む。一実施形態では、核酸配列は配列番号 16 (pLTG1903 EF1a MH6P CD8TM-4-1BB-CD3ゼータアミノ酸配列 (図2C)) のアミノ酸配列を含む CAR をコードする。

30

【0045】

別の実施形態において、CAR をコードする核酸配列は、配列番号 17 の核酸配列 (pLTG1904 EF1a M1-4S CD8TM-4-1BB-CD3ゼータ核酸配列 (図2D)) を含む。一実施形態において、核酸配列は、配列番号 18 のアミノ酸配列 (pLTG1904 EF1a M1-4S CD8TM-4-1BB-CD3ゼータアミノ酸配列 (図2D)) を含む CAR をコードする。

【0046】

一態様では、本明細書で開示される CAR は、診断、がん患者の無増悪生存期間などの処置転帰のモニタリングおよび／もしくは予測における使用のため、またはかかる処置の進行をモニタリングするために、検出可能なマーカーを発現または含有するように改変される。

40

【0047】

一実施形態では、開示された CAR をコードする核酸分子は、ウイルスベクターなどのベクター中に含有され得る。ベクターは、DNA ベクター、RNA ベクター、プラスミドベクター、コスミドベクター、ヘルペスウイルスベクター、麻疹ウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、もしくはレトロウイルスベクター、またはそれらの組合せである。

【0048】

ある特定の実施形態では、ベクターは、誘導性プロモーター、組織特異的プロモーター、構成的プロモーター、自殺プロモーターまたはそれらの任意の組合せであるプロモーター

50

をさらに含む。

【0049】

さらに別の実施形態では、CARを発現するベクターは、自殺スイッチによって、CAR T細胞の発現を制御するため、またはCAR-T細胞を排除するために、1または複数の作動可能なエレメントを含むようにさらに改変され得る。自殺スイッチには、例えば、アポトーシス誘導性シグナル伝達カスケード、または細胞死を誘導する薬物が含まれ得る。好ましい実施形態では、CARを発現するベクターは、チミジンキナーゼ（TK）またはシトシンデアミナーゼ（CD）などの酵素を発現するようにさらに改変され得る。

【0050】

別の態様では、CARをコードする核酸分子を含む宿主細胞もまた提供される。一部の実施形態では、宿主細胞は、T細胞、例えば、対象から得られた初代T細胞である。一実施形態では、宿主細胞はCD8+T細胞である。

【0051】

さらに別の態様では、抗腫瘍有効量のヒトT細胞集団を含む医薬組成物であって、T細胞がキメラ抗原受容体（CAR）をコードする核酸配列を含み、CARが、配列番号2、4、6、および8のアミノ酸配列を含むメソセリン抗原結合性ドメインを含む少なくとも1つの細胞外抗原結合性ドメイン、少なくとも1つのリンカードメイン、少なくとも1つの膜貫通ドメイン、および少なくとも1つの細胞内シグナル伝達ドメインを含み、T細胞ががんを有するヒトのT細胞である、医薬組成物が提供される。がんは、とりわけ血液学的がん、例えば、白血病（例えば、慢性リンパ性白血病（CLL）、急性リンパ性白血病（ALL）もしくは慢性骨髄性白血病（CML））、リンパ腫（例えば、マントル細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫またはホジキンリンパ腫）または多発性骨髄腫、あるいはそれらの組合せを含む。

【0052】

一実施形態において、CARの少なくとも1つの膜貫通ドメインが、T細胞受容体のアルファ、ベータもしくはゼータ鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137およびCD154、またはそれらの組合せからなる群から選択されるタンパク質の膜貫通ドメインを含む、医薬組成物が提供される。

【0053】

別の実施形態では、ヒトのがんは、口腔および咽頭がん（舌、口、咽頭、頭頸部）、消化器系がん（食道、胃、小腸、結腸、直腸、肛門、肝臓、肝内胆管、胆嚢、膵臓）、呼吸器系がん（喉頭、肺および気管支）、骨および関節のがん、軟組織がん、皮膚がん（黒色腫、基底細胞癌および扁平上皮癌）、小児腫瘍（神経芽細胞腫、横紋筋肉腫、骨肉腫、ユーイング肉腫）、中枢神経系の腫瘍（脳腫瘍、星状細胞腫、神経膠芽腫、神経膠腫）、ならびに乳房、生殖系（子宮頸部、子宮体、卵巣、外陰部、陰、前立腺、精巣、陰茎、子宮内膜）、泌尿器系（膀胱、腎臓および腎盂、尿管）、眼および眼窩、内分泌系（甲状腺）ならびに脳および他の神経系のがん、またはそれらの任意の組合せを含む成人癌を含む、医薬組成物が提供される。

【0054】

さらに別の実施形態では、がんを有するヒトのヒトT細胞の集団の抗腫瘍有効量を含む医薬組成物であって、がんが、1または複数の化学療法剤に対して非応答性の難治性がんである、医薬組成物が提供される。がんは、造血がん、骨髄異形成症候群、膵がん、頭頸部がん、皮膚腫瘍、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）における微小残存病変（MRD）、CLL（慢性リンパ性白血病）、CML（慢性骨髄性白血病）、非ホジキンリンパ腫（NHL）を含む成人B細胞悪性疾患、小児B細胞悪性疾患（B細胞系譜ALL（急性リンパ性白血病）を含む）、多発性骨髄腫、肺がん、乳房がん、卵巣がん、前立腺がん、結腸がん、黒色腫もしくは他の血液学的がんおよび固形腫瘍、またはそれらの任意の組合せを含む。

【0055】

別の態様では、CAR含有T細胞（以下「CAR T細胞」）を作製する方法が提供される。この方法は、メソセリンに特異的に結合する開示されるCARをコードするベクターまたは核酸分子をT細胞に形質導入し、それによって、CAR T細胞を作製することを含む。

【0056】

さらに別の態様では、RNA操作された細胞の集団を生成する方法であって、開示されるCARをコードする核酸分子の*in vitro*転写されたRNAまたは合成RNAを対象の細胞中に導入し、CAR細胞を生成することを含む方法が提供される。

【0057】

さらに別の態様において、細胞でのメソセリン発現と関連する疾患、障害または状態を診断する方法であって、a)細胞をヒト抗メソセリン抗体またはその断片と接触させるステップであって、抗体またはその断片が配列番号2、4、6および8からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、ステップ、ならびにb)メソセリンの存在を検出するステップであって、メソセリンの存在が、メソセリン発現と関連する疾患、障害または状態を診断する、ステップを含む方法が提供される。

【0058】

一実施形態において、メソセリン発現と関連する疾患、障害または状態は、造血がん、骨髓異形成症候群、膵がん、頭頸部がん、皮膚腫瘍、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）における微小残存病変（MRD）、CLL（慢性リンパ性白血病）、CML（慢性骨髄性白血病）、非ホジキンリンパ腫（NHL）を含む成人B細胞悪性疾患、小児B細胞悪性疾患（B細胞系譜ALL（急性リンパ性白血病）を含む）、多発性骨髄腫、肺がん、乳房がん、卵巣がん、前立腺がん、結腸がん、黒色腫もしくはその他の血液学のがんおよび固形腫瘍、またはそれらの任意の組合せを含むがんである。

【0059】

別の実施形態において、哺乳動物におけるメソセリンと関連する疾患のリスクを診断、予後診断、または決定する方法であって、a)試料をヒト抗メソセリン抗体またはその断片と接触させるステップであって、抗体またはその断片が配列番号2、4、6および8からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、ステップ、ならびにb)メソセリンの存在を検出するステップであって、メソセリンの存在が、哺乳動物におけるメソセリンと関連する疾患を診断する、ステップを含む、哺乳動物由来の試料におけるメソセリン発現を検出するステップを含む方法が提供される。

【0060】

別の実施形態において、メソセリン依存性のT細胞阻害を阻害する方法であって、細胞をヒト抗メソセリン抗体またはその断片と接触させるステップであって、抗体またはその断片が配列番号2、4、6および8からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、ステップを含む方法が提供される。一実施形態において、細胞は、メソセリンを発現する腫瘍細胞、腫瘍関連マクロファージ、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される。

【0061】

別の実施形態において、メソセリンを発現する細胞により媒介されるT細胞阻害を遮断し、哺乳動物における腫瘍増殖を阻害するように腫瘍微小環境を変化させる方法であって、単離された抗メソセリン抗体またはその断片を含む有効量の組成物を哺乳動物に投与するステップであって、抗体またはその断片が、配列番号2、4、6および8からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、ステップを含む方法が提供される。一実施形態において、細胞は、メソセリンを発現する腫瘍細胞、腫瘍関連マクロファージ、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される。

【0062】

別の実施形態において、哺乳動物における抗腫瘍または抗がん免疫応答の免疫抑制を阻害、抑制または防止する方法であって、単離された抗メソセリン抗体またはその断片を含む有効量の組成物を哺乳動物に投与するステップであって、抗体またはその断片が、配列番号2、4、6および8からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、ステップを含む方

10

20

30

40

50

法が提供される。一実施形態において、抗体またはその断片は、第1の細胞とT細胞の間の相互作用を阻害し、第1の細胞は、メソセリンを発現する腫瘍細胞、腫瘍関連マクロファージ、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される。

【0063】

別の態様では、哺乳動物において抗腫瘍免疫を誘導する方法であって、開示されるCARをコードするベクターまたは核酸分子が形質導入された治療有効量のT細胞を哺乳動物に投与するステップを含む、方法が提供される。

【0064】

別の実施形態では、哺乳動物においてがんを処置または予防する方法であって、1つまたは複数の開示されるCARを、哺乳動物におけるがんを処置または予防するのに有効な量で哺乳動物に投与するステップを含む、方法が提供される。方法は、対象において、CARの抗原結合性ドメインと、メソセリンおよび／または1つまたは複数の上述の抗原の細胞外ドメインとの免疫複合体を形成するのに十分な条件下で、メソセリンおよび／または1つまたは複数の上述の抗原に特異的に結合する開示されるCARを発現する治療有効量の宿主細胞を対象に投与するステップを含む。

【0065】

さらに別の実施形態では、腫瘍抗原の上昇した発現と関連する疾患、障害または状態を有する哺乳動物を処置する方法であって、抗腫瘍有効量のT細胞集団を含む医薬組成物を対象に投与するステップを含み、T細胞がキメラ抗原受容体(CAR)をコードする核酸配列を含み、CARが、配列番号2、4、6、もしくは8のアミノ酸配列、またはそれらの任意の組合せを含む少なくとも1つの細胞外メソセリン抗原結合性ドメイン、少なくとも1つのリンカーまたはスペーサドメイン、少なくとも1つの膜貫通ドメイン、少なくとも1つの細胞内シグナル伝達ドメインを含み、T細胞ががんを有する対象のT細胞である、方法が提供される。

【0066】

さらに別の実施形態では、それを必要とする対象におけるがんを処置する方法であって、抗腫瘍有効量のT細胞集団を含む医薬組成物を対象に投与するステップを含み、T細胞がキメラ抗原受容体(CAR)をコードする核酸配列を含み、CARが配列番号2、4、6、もしくは8のアミノ酸配列、またはそれらの任意の組合せを含む少なくとも1つのメソセリン抗原結合性ドメイン、少なくとも1つのリンカーまたはスペーサドメイン、少なくとも1つの膜貫通ドメイン、少なくとも1つの細胞内シグナル伝達ドメインを含み、T細胞ががんを有する対象のT細胞である、方法が提供される。上述の方法の一部の実施形態では、少なくとも1つの膜貫通ドメインが、T細胞受容体の膜貫通アルファ、ベータもしくはゼータ鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137およびCD154、またはそれらの組合せを含む。

【0067】

さらに別の実施形態では、がんと診断されたヒトにおいて、遺伝子操作されたT細胞の持続性の集団を生成するための方法が提供される。一実施形態では、方法は、CARを発現するように遺伝子操作されたT細胞をヒトに投与するステップであって、CARが配列番号2、4、6、もしくは8のアミノ酸配列、またはそれらの任意の組合せを含む少なくとも1つのメソセリン抗原結合性ドメイン、少なくとも1つの膜貫通ドメイン、および少なくとも1つの細胞内シグナル伝達ドメインを含み、遺伝子操作されたT細胞の持続性の集団、またはT細胞の子孫の集団が、投与の後少なくとも1カ月、2カ月、3カ月、4カ月、5カ月、6カ月、7カ月、8カ月、9カ月、10カ月、11カ月、12カ月、2年または3年にわたって、ヒトにおいて持続する、ステップを含む。

【0068】

一実施形態では、ヒト中の子孫T細胞は、メモリーT細胞を含む。別の実施形態では、T細胞は自家T細胞である。

【0069】

本明細書に記載される方法の態様および実施形態の全てにおいて、腫瘍抗原の上昇した発現と関連する上述のがん、疾患、障害または状態のいずれかは、本明細書に開示される C A R のうち 1 または複数を使用して、処置または予防または寛解され得る。

【0070】

さらに別の態様では、上記キメラ抗原受容体 T 細胞を作製するためのキット、または上記対象において、腫瘍抗原の上昇した発現と関連するがん、疾患、障害もしくは状態のいずれかを予防、処置もしくは寛解するためのキットであって、上に開示された核酸分子、ベクター、宿主細胞もしくは組成物のいずれか 1 つまたはそれらの任意の組合せを含むコンテナ、およびキットを使用するための指示書を含むキットが提供される。

【0071】

C A R、宿主細胞、核酸ならびに方法は、本明細書に詳細に記載される具体的な態様および実施形態を超えて有用であることが理解される。本開示の前述の特色および利点は、添付の図面を参照して進む以下の詳細な説明からより明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【0072】

【図 1】新規の細胞外メソセリン抗原結合性ドメイン配列を有する C A R の一般的なドメイン構造を示す概略図である。キメラ抗原受容体は、細胞外メソセリン結合性 S c F v ドメイン、C D 8 スペーサーおよび膜貫通ドメイン、細胞内シグナル伝達 C D 1 3 7 共刺激ドメインならびに C D 3 ζ シグナル伝達ドメインから構成される。

【図 2 A】新規の細胞外メソセリン抗原結合性ドメイン配列を含むいくつかのキメラ抗原受容体 (C A R) を示す図である。C A R についての一般的な図式は、N 末端から C 末端まで、シグナルペプチド、抗メソセリン s c F v、細胞外リンカー、膜貫通部、4-1 B B、C D 3 ゼータを含む。図 2 A は、p L T G 1 9 0 1 E F 1 a M H 1 P メソセリン s c F v バインダー C D 8 T M-4-1 B B-C D 3 ゼータ核酸配列を含む C A R を発現するレンチウイルスベクター、およびコードされるアミノ酸配列を示す。

【図 2 B】新規の細胞外メソセリン抗原結合性ドメイン配列を含むいくつかのキメラ抗原受容体 (C A R) を示す図である。C A R についての一般的な図式は、N 末端から C 末端まで、シグナルペプチド、抗メソセリン s c F v、細胞外リンカー、膜貫通部、4-1 B B、C D 3 ゼータを含む。図 2 B は、p L T G 1 9 0 2 E f 1 a M H 2 P メソセリン s c F v バインダー C D 8 T M-4-1 B B-C D 3 ゼータ核酸配列を含む C A R を発現するレンチウイルスベクター、およびコードされるアミノ酸配列を示す。

【図 2 C】新規の細胞外メソセリン抗原結合性ドメイン配列を含むいくつかのキメラ抗原受容体 (C A R) を示す図である。C A R についての一般的な図式は、N 末端から C 末端まで、シグナルペプチド、抗メソセリン s c F v、細胞外リンカー、膜貫通部、4-1 B B、C D 3 ゼータを含む。図 2 C は、p L T G 1 9 0 3 E f 1 a M H 6 P メソセリン s c F v バインダー C D 8 T M-4-1 B B-C D 3 ゼータ核酸配列を含む C A R を発現するレンチウイルスベクター、およびコードされるアミノ酸配列を示す。

【図 2 D】新規の細胞外メソセリン抗原結合性ドメイン配列を含むいくつかのキメラ抗原受容体 (C A R) を示す図である。C A R についての一般的な図式は、N 末端から C 末端まで、シグナルペプチド、抗メソセリン s c F v、細胞外リンカー、膜貫通部、4-1 B B、C D 3 ゼータを含む。図 2 D は、p L T G 1 9 0 4 E f 1 a M 1-4 S メソセリン s c F v バインダー C D 8 T M-4-1 B B-C D 3 ゼータ核酸配列を含む C A R を発現するレンチウイルスベクター、およびコードされるアミノ酸配列を示す。

【図 3】T 細胞における抗メソセリン C A R の発現を示すグラフである。2 人の健康なドナー (A および B) 由来の初代ヒト T 細胞に、抗メソセリン C A R 構築物 p L T G 1 9 0 1、p L T G 1 9 0 2、p L T G 1 9 0 3 および p L T G 1 9 0 4 をそれぞれコードするレンチウイルスベクターを形質導入した。モック対照は、レンチウイルス形質導入非存在下で増殖させた T 細胞を構成する。培養 10 日目に、C A R の表面発現をフローサイトメトリーにより評価した。抗メソセリン C A R の表面発現の検出を容易にするため、抗ヒト F (a b') 2-P E 試薬を使用した。

10

20

30

40

50

【図4】抗メソセリン s c F v 結合性モチーフ、C D 8 膜貫通ドメインおよび 4-1 B B / C D 3-ゼータ鎖シグナル伝達モチーフを含む C A R の抗腫瘍活性を示すグラフである。抗メソセリン C A R T 細胞を、ホタルルシフェラーゼを安定に発現する標的株に対する *in vitro* 死滅アッセイで試験した。A 4 3 1-メソセリン陰性、A 4 3 1-M S L N-メソセリン陽性。C A R T 細胞は、2 人の健康なドナー（パネル A および B）の血液由来であった。C A R T および腫瘍細胞を、表示するエフェクター対標的（E:T）比で 3 連で組み合わせ、一晩共培養した。次いで、各ウェルにおける生存腫瘍細胞の発光を、方法に記載されるように評価した。このアッセイでの陰性対照は p L T G 1 3 9 8-G F P であり、モック形質導入 T 細胞が陰性対照である。バーは各群についての標準偏差を表す。

10

【発明を実施するための形態】

【0073】

詳細な説明

定義

本明細書で使用する場合、単数形「1つの (a)」、「1つの (an)」および「この (the)」とは、文脈が明らかに他を示さない限り、単数形および複数形の両方を指す。例えば、用語「1つの抗原」は、単数または複数の抗原を含み、語句「少なくとも1つの抗原」と等価とみなされ得る。本明細書で使用する場合、用語「含む (comprise)」とは、「含む (includes)」を意味する。したがって、「1つの抗原を含む (comprising)」とは、他の要素を排除することなく、「1つの抗原を含む (including)」を意味する。語句「および/または」とは、「および」または「または」を意味する。核酸またはポリペプチドについて与えられた任意のおよび全ての塩基サイズまたはアミノ酸サイズ、ならびに全ての分子量または分子質量値は、特記しない限り、おおよそであり、便宜的に提供されていることをさらに理解すべきである。本明細書に記載されるものと類似または等価な多くの方法および材料が使用され得るが、特に適切な方法および材料が以下に記載される。矛盾する場合、用語の説明を含む本明細書が支配する。さらに、材料、方法および実施例は、例示にすぎず、限定を意図しない。種々の実施形態の再検討を容易にするために、以下の用語の説明が提供される。

20

【0074】

用語「約」とは、測定可能な値、例えば、量、時間的持続期間などに言及する場合、特定された値から $\pm 20\%$ 、または一部の例では $\pm 10\%$ 、または一部の例では $\pm 5\%$ 、または一部の例では $\pm 1\%$ 、または一部の例では $\pm 0.1\%$ の変動を包含することを意味し、かかる変動は、開示される方法を実施するために適切である。

30

【0075】

特記しない限り、本明細書の技術用語は、従来の用法に従って使用される。分子生物学における一般的用語の定義は、Oxford University Press によって刊行された Benjamin Lewin、Genes VII、1999 年；Blackwell Science Ltd. によって刊行された Kendrew ら（編）The Encyclopedia of Molecular Biology、1994 年；および VCH Publishers, Inc. によって刊行された Robert A. Meyers（編）、Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference、1995 年；および他の類似の参考文献中に見出すことができる。

40

【0076】

本開示は、メソセリン抗体またはその断片、およびこのようなメソセリン抗原結合性ドメインを有するキメラ抗原受容体 (CAR) を提供する。CAR の機能的活性の増強は、CAR を発現する T 細胞の機能的活性の増強に直接関連する。これらの 1 つまたは複数の改変の結果として、CAR は、形質導入された CAR 発現 T 細胞の *in vivo* での T 細胞増殖および持続レベルの増大と共に、高度のサイトカイン誘導性細胞溶解および形質導入 T 細胞での細胞表面発現の両方を示す。

50

【0077】

様々なタンパク質ドメインに由来する機能性部分を組み合わせる独自の能力が、キメラ抗原受容体（CAR）の重要かつ革新的な特色である。これらのタンパク質ドメイン各々の選択は、これらの具体的な組合せ方と同様に、重要な設計特色である。各設計ドメインは、様々なCARプラットフォームでリンパ球の機能を操作するのに使用可能な必須の構成要素である。例えば、細胞外結合性ドメインの選択によって、それ以外の場合では無効のCARを有効にすることができる。

【0078】

CARの細胞外抗原結合性ドメインを作り出すのに使用される、免疫グロブリン由来のタンパク質配列の非可変フレームワーク構成要素は、完全に中立であるか、自己会合してT細胞を代謝疲弊の状態にすることがあり、そのためこのCARを発現する治療的T細胞が極度に無効となる。このことは、このCARドメインの抗原結合機能とは無関係に起こる。さらに、細胞内シグナル伝達ドメイン（複数可）の選択によっても、免疫療法に使用される治療的リンパ球集団の活性および耐久性が決定され得る。これらの細胞外および細胞内ドメインによって、標的抗原と結合する能力および活性化シグナルをT細胞に伝達する能力がそれぞれ、CAR設計の重要な側面である一方で、細胞外抗原結合性断片の供給源の選択が、CARの有効性に対して顕著な効果を有し、それゆえにCARの機能および臨床的有用性において決定的な役割を有し得ることも明らかとなっている。

【0079】

驚くべきことにかつ予想外に、ここで、宿主において抗マウス免疫応答およびCAR T排除を誘導する傾向がある抗メソセリンCARを生成する、マウス由来のメソセリンScFv抗原結合性断片を使用するのではなく（マウス由来のSS1 ScFv配列を使用する、UPennの資金提供を受けた臨床試験、NCT02159716を参照）、CARに完全ヒト細胞外メソセリンScFv抗原結合性ドメインを使用することでも、CARを発現するT細胞の機能的活性が決定されることが発見された。本明細書で開示されるCARは、細胞において高レベルで発現される。CARを発現する細胞は、*in vivo*で高い増殖速度を有し、多量のサイトカインを産生し、CARが結合するメソセリン抗原を表面に有する細胞に対し高い細胞傷害活性を有する。ヒト細胞外メソセリン抗原結合性ドメインの使用により、*in vivo*でより良好に機能するCARの生成がもたらされ、一方で宿主免疫応答での抗CAR免疫の誘導およびCAR T細胞集団の死滅が回避される。完全ヒト細胞外メソセリンScFv抗原結合性ドメインを発現するCARは、i) マウス由来の結合性配列で見られる、CAR Tの持続および機能不足の防止；ii) 有効となるべきCARの局所（即ち、胸膜内）送達がないこと；ならびにiii) メソセリンに対し高親和性および低親和性を有するバインダー両方に基づいてCAR T細胞設計を生成する能力、を含む優れた活性／特性を示す。この最後の特性により、腫瘍には正常な組織よりもメソセリンが多く発現していることで、親和性がより小さいバインダーは正常な組織よりも腫瘍に対しより大きい特異性を有することができ、それによりオンターゲットな腫瘍以外への毒性およびバースタンダー細胞の死滅が防止され得るため、研究者は、CAR T産物の毒性に対する有効性、および／または組織特異性をよりよく調整することができる。

【0080】

CAR、抗体およびその抗原結合性断片、コンジュゲート、ヌクレオチド、発現、ベクターおよび宿主細胞、開示されたCARを使用する処置の方法、組成物およびキットのさらなる記載と共に、それらの細胞外メソセリン抗原結合性ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインの記載を含む本発明のCARの詳細な記載は以下である。

【0081】

A. キメラ抗原受容体（CAR）

本明細書で開示されるCARは、メソセリンに結合することが可能な少なくとも1つのメソセリン抗原結合性ドメイン、少なくとも1つの膜貫通ドメイン、および少なくとも1つの細胞内ドメインを含む。

【0082】

キメラ抗原受容体（CAR）は、膜貫通ドメインを介してT細胞シグナル伝達ドメインに連結された、抗体の抗原結合性ドメイン（例えば、単鎖可変断片（scFv））を含有する、人工的に構築されたハイブリッドタンパク質またはポリペプチドである。CARの特徴には、非MHC拘束様式で、モノクローナル抗体の抗原結合特性を活用して、選択された標的に向かってT細胞の特異性および反応性を再指向させるそれらの能力が含まれる。非MHC拘束的な抗原認識は、CARを発現するT細胞に、抗原プロセッシングと無関係に抗原を認識する能力を与え、そうして、腫瘍エスケープの主要な機構を迂回する。さらに、T細胞中で発現される場合、CARは、有利なことに、内因性T細胞受容体（TCR）のアルファ鎖およびベータ鎖と二量体化しない。

10

【0083】

本明細書に開示するように、CARの細胞内T細胞シグナル伝達ドメインには、例えば、T細胞受容体シグナル伝達ドメイン、T細胞共刺激シグナル伝達ドメイン、またはその両方が含まれ得る。T細胞受容体シグナル伝達ドメインとは、T細胞受容体の細胞内ドメイン、例えば、限定としてではなく、CD3ゼータタンパク質の細胞内部分などを含む、CARの一部を指す。共刺激シグナル伝達ドメインとは、抗原に対するリンパ球の効率的な応答に必要とされる、抗原受容体またはそれらのリガンド以外の細胞表面分子である共刺激分子の細胞内ドメインを含む、CARの一部を指す。

【0084】

1. 細胞外ドメイン

一実施形態では、CARは、さもないければ抗原結合性ドメインまたは部分と呼ばれる標的的特異的結合エレメントを含む。ドメインの選択は、標的細胞の表面を規定するリガンドの型および数に依存する。例えば、抗原結合性ドメインは、特定の疾患状態と関連する標的細胞上の細胞表面マーカーとして作用するリガンドを認識するように選択され得る。したがって、CAR中の抗原結合性ドメインに対するリガンドとして作用し得る細胞表面マーカーの例には、ウイルス、細菌および寄生生物感染、自己免疫疾患ならびにがん細胞と関連するものが含まれる。

20

【0085】

一実施形態では、CARは、腫瘍細胞上の抗原に特異的に結合する所望の抗原結合性ドメインを操作することによって、目的の腫瘍抗原を標的化するように操作され得る。腫瘍抗原は、免疫応答、特にT細胞媒介性免疫応答を惹起する、腫瘍細胞によって産生されるタンパク質である。抗原結合性ドメインの選択は、処置される特定の型のがん依存する。腫瘍抗原は、例えば、神経膠腫関連抗原、癌胎児性抗原（CEA）、ベータ-ヒト絨毛性ゴナドトロピン、アルファフェトプロテイン（AFP）、レクチン反応性AFP、サイログロブリン、RAGE-1、MN-CAIX、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、RU1、RU2（AS）、腸カルボキシルエステラーゼ、mut hsp70-2、M-CSF、プロスターゼ（prostase）、前立腺特異的抗原（PSA）、PAP、NY-ESO-1、LAGE-1a、p53、プロステイン（prostain）、PSMA、Her2/neu、サバイビンおよびテロメラーゼ、前立腺癌腫瘍抗原-1（PCTA-1）、MAGE、ELF2M、好中球エラスターゼ、エフリンB2、CD22、インスリン様成長因子（insulin growth factor）（IGF）-I、IGF-II、IGF-II受容体ならびにメソセリンが含まれる。本明細書に開示される腫瘍抗原は、例として含まれるにすぎない。このリストは、排他的である意図はなく、さらなる例が、当業者に容易に明らかである。

30

【0086】

一実施形態では、腫瘍抗原は、悪性腫瘍と関連する1または複数の抗原性がんエピトープを含む。悪性腫瘍は、免疫攻撃のための標的抗原として機能し得るいくつかのタンパク質を発現する。これらの分子には、組織特異的抗原、例えば、黒色腫におけるMART-1、チロシナーゼおよびGP100、ならびに前立腺がんにおける前立腺酸性ホスファターゼ（PAP）および前立腺特異的抗原（PSA）が含まれるがこれらに限定されない。

50

他の標的分子は、癌遺伝子HER-2/Neu/ErbB-2などの形質転換関連分子の群に属する。標的抗原のさらに別の群は、癌胎児性抗原(CEA)などのがん胎児性抗原である。B細胞リンパ腫では、腫瘍特異的イディオタイプ免疫グロブリンが、個々の腫瘍に独自の真に腫瘍特異的な免疫グロブリン抗原を構成する。B細胞分化抗原、例えば、CD19、CD20およびCD37は、B細胞リンパ腫における標的抗原の他の候補である。これらの抗原の一部(CEA、HER-2、CD19、CD20、イディオタイプ)は、限定的な成功で、モノクローナル抗体による受動免疫療法の標的として使用されている。

【0087】

好ましい一実施形態において、腫瘍抗原はメソセリンであり、メソセリン発現と関連する腫瘍は、高レベルの細胞外タンパク質メソセリンを発現する肺中皮腫、卵巣および膵がん、またはそれらの任意の組合せを含む。

【0088】

腫瘍抗原の型は、腫瘍特異的抗原(TSA)または腫瘍関連抗原(TAA)でもあり得る。TSAは、腫瘍細胞に独自であり、身体中の他の細胞上には存在しない。TAAは、腫瘍細胞に独自ではなく、その代り、抗原に対する免疫学的寛容の状態を誘導できない条件下で正常細胞上でも発現される。腫瘍上での抗原の発現は、免疫系が抗原に応答できるようにする条件下で生じ得る。TAAは、免疫系が未熟であり応答できない胎児発生の間に正常細胞上で発現される抗原であり得、または正常細胞上では非常に低いレベルで通常存在するが、腫瘍細胞上ではかなり高いレベルで発現される抗原であり得る。

【0089】

TSAまたはTAAの非限定的な例には、以下が含まれる：分化抗原、例えば、MART-1/MelanA(MART-I)、gp100(Pmel 17)、チロシナーゼ、TRP-1、TRP-2および腫瘍特異的多系列抗原、例えば、MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15；過剰発現された胚抗原、例えば、CEA；過剰発現された癌遺伝子および変異した腫瘍サプレッサー遺伝子、例えば、p53、Ras、HER-2/neu；染色体転座から生じる独自の腫瘍抗原；例えば、BCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR；ならびにウイルス抗原、例えば、エプスタイン・バーウイルス抗原EBVAおよびヒトパピローマウイルス(HPV)抗原E6およびE7。他の大きいタンパク質ベースの抗原には、TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、RAGE、NY-ESO、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、PSA、TAG-72、CA 19-9、CA 72-4、CAM 17.1、NuMa、K-ras、ベーターカテニン、CDK4、Mum-1、p 15、p 16、43-9F、5T4、791Tgp72、アルファーフエトプロテイン、ベーターHCG、BCA225、BTAA、CA 125、CA 15-3/CA 27.29/BCAA、CA 195、CA 242、CA-50、CAM43、CD68/P1、CO-029、FGF-5、G250、Ga733/EpCAM、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB/70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90/Mac-2結合タンパク質/シクロフィリンC関連タンパク質、TAAL6、TAG72、TLPおよびTPSが含まれる。

【0090】

一実施形態では、CARの抗原結合性ドメイン部分は、CD19、CD20、CD22、ROR1、CD33、c-Met、PSMA、糖脂質F77、EGFRvIII、GD-2、MY-ESO-1 TCR、MAGE A3 TCRなどを含むがこれらに限定されない抗原を標的化する。

【0091】

好ましい実施形態において、CARの抗原結合性ドメイン部分は、細胞外メソセリン抗原を標的化する。

【0092】

好ましい一実施形態において、細胞外メソセリンScFv抗原結合性ドメインをコードす

10

20

30

40

50

る単離された核酸分子は、配列番号1のヌクレオチド配列、または85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するその配列を含む。一実施形態において、コードされる細胞外メソセリンScFv抗原結合性ドメインが配列番号2のアミノ酸配列、または配列番号2のアミノ酸配列に対し85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、単離された核酸分子が提供される。

【0093】

好ましい一実施形態において、細胞外メソセリンScFv抗原結合性ドメインをコードする単離された核酸分子は、配列番号3のヌクレオチド配列、または85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するその配列を含む。一実施形態において、コードされる細胞外メソセリンScFv抗原結合性ドメインが配列番号4のアミノ酸配列、または配列番号4のアミノ酸配列に対し85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、単離された核酸分子が提供される。

10

【0094】

好ましい一実施形態において、細胞外メソセリンScFv抗原結合性ドメインをコードする単離された核酸分子は、配列番号5のヌクレオチド配列、または85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するその配列を含む。一実施形態において、コードされる細胞外メソセリンScFv抗原結合性ドメインが配列番号6のアミノ酸配列、または配列番号6のアミノ酸配列に対し85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、単離された核酸分子が提供される。

20

【0095】

好ましい一実施形態において、細胞外メソセリンScFv抗原結合性ドメインをコードする単離された核酸分子は、配列番号7のヌクレオチド配列、または85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するその配列を含む。一実施形態において、コードされる細胞外メソセリンScFv抗原結合性ドメインが配列番号8のアミノ酸配列、または配列番号8のアミノ酸配列に対し85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、単離された核酸分子が提供される。

30

【0096】

本明細書に記載される特異的なメソセリンScFv抗原結合性断片または抗原バインダーの生成および結合の特徴を実施例1に示す。

【0097】

本明細書で開示されるメソセリン特異的CARについての種々の実施形態では、一般的図式が図1に示され、N末端からC末端へ、シグナルまたはリーダーペプチド、抗メソセリンscFv、細胞外リンカー、CD8膜貫通部、4-1BB、CD3ゼータを含み、太字テキストは連結ドメインのクローニング部位を表す。

【0098】

一実施形態において、CARをコードする核酸配列は、配列番号11の核酸配列を含み、配列番号12 [pLTG1901:EF1a MH1P-CD8TM-4-1BB-CD3ゼータ (pLTG1901) (図2Aに示す)] に示すアミノ酸配列を含むCARをコードする。

40

【0099】

一実施形態において、CARをコードする核酸配列は、配列番号11の核酸配列、または85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するその配列を含み、配列番号12に示すアミノ酸配列、または85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するその配列 [pLTG1901:EF1a MH1P-CD8TM-4-1BB-CD3ゼータ (pLTG1901) (図2Aに示す)] を含むCARをコードする。

50

【0100】

別の実施形態において、CARをコードする核酸配列は、配列番号13の核酸配列を含み、配列番号14 [pLTG1902:Ef1a MH2P-CD8TM-4-1BB-CD3ゼータ (pLTG1902) (図2Bに示す)] に示すアミノ酸配列を含むCARをコードする。

【0101】

別の実施形態において、CARをコードする核酸配列は、配列番号13の核酸配列、または85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するその配列を含み、配列番号14に示すアミノ酸配列、または85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するその配列 [pLTG1902:Ef1a MH2P-CD8TM-4-1BB-CD3ゼータ (pLTG1902) (図2Bに示す)] を含むCARをコードする。

10

【0102】

別の実施形態において、CARをコードする核酸配列は、配列番号15の核酸配列を含み、配列番号16 [pLTG1903:Ef1a-MH6P-CD8TM-4-1BB-CD3ゼータ (pLTG1903) (図2Cに示す)] に示すアミノ酸配列を含むCARをコードする。

【0103】

別の実施形態において、CARをコードする核酸配列は、配列番号15の核酸配列、または85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するその配列を含み、配列番号16に示すアミノ酸配列、または85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するその配列 [pLTG1903:Ef1a-MH6P-CD8TM-4-1BB-CD3ゼータ (pLTG1903) (図2Cに示す)] を含むCARをコードする。

20

【0104】

さらに別の実施形態において、CARをコードする核酸配列は、配列番号17の核酸配列を含み、配列番号18 [pLTG1904:Ef1a-M1-4S-CD8TM-4-1BB-CD3ゼータ (pLTG1904) (図2Dに示す)] に示すアミノ酸配列を含むCARをコードする。

【0105】

さらに別の実施形態において、CARをコードする核酸配列は、配列番号17の核酸配列、または85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するその配列を含み、配列番号18に示すアミノ酸配列、または85%、90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するその配列 [pLTG1904:Ef1a-M1-4S-CD8TM-4-1BB-CD3ゼータ (pLTG1904) (図2Dに示す)] を含むCARをコードする。

30

【0106】

メソセリンScFv抗原バインダーを含むCARの表面発現について、以下の実施例2に示し表2に要約する。メソセリンScFv抗原バインダーを含む各CARについての発現レベルは、CAR検出のためにフィコエリトリン (PE) とコンジュゲートされた抗ヒトF(ab')₂抗体断片を使用する、2人の健康なドナー由来のLV形質導入T細胞のフローサイトメトリー分析により決定した (実施例2、図3参照)。抗メソセリンCAR構築物1901および1903 (実線) は、T細胞表面では検出されなかった。一方、抗メソセリンCAR1902および1904 (実線) は、CAR T表面発現も細胞溶解活性も有しないGFP対照構築物 (1398、陰付き線) と比較して高い表面発現を示した。同様に、陰性対照である非形質導入T細胞 (モック群、図示しない) でもCAR発現が検出されず、使用された検出方法の特異性がさらに実証された。 (実施例2、図3および表2参照)。

40

【0107】

実施例2および図4にそれぞれ示すように、以下のCARを発現するレンチウイルスベク

50

ター（LV）を作り出し、抗白血病活性について試験すると、メソセリン s c F v 抗原結合性ドメインを含む CAR の予想外の高い細胞溶解活性が実証された。各実験的 CAR は、4-1BB / CD3-ゼータ鎖シグナル伝達モチーフ、およびそこに特記される特異的な抗メソセリン結合性モチーフ / ドメインを含む。A431-MSLN 細胞株を、細胞溶解アッセイにおける標的として使用した。CD8 リンカーおよび膜貫通領域ならびに 4-1BB / CD3-ゼータ鎖シグナル伝達モチーフにインフレイムで接続された抗メソセリン結合性 S c F v を特徴とする CAR-T 構築物のうち 3 つが、x 軸に表示されるエフェクター対標的（E：T）比で強い溶解活性を示した（図 4 参照、pLTG1902 および pLTG1904、それぞれ白三角および白丸）。驚くべきことに、構築物 pLTG1903 の表面発現はフローサイトメトリーで裏付けられなかったが、この CAR 構築物で強い細胞溶解活性が見られた（白菱形）。さらに、これもフローサイトメトリーで T 細胞表面において検出不能であった構築物 pLTG1901（黒三角）は、ほとんど溶解活性を示さず（図 4 参照、pLTG1901、黒三角）、ヒト由来のメソセリン s c F v 抗原結合性ドメイン全てが、それらが作り出された CAR 環境の状況において必ずしも同様に振る舞うわけではないことが実証された。

【0108】

任意の特定の作用機構に限定する意図はないが、本発明の例示的な CAR と関連する増強された治療機能の可能な理由には、例えば、限定としてではなく、a) より効率的なシグナル伝達を可能にする、原形質膜内での改善された側方の動き、b) 脂質ラフトなどの原形質膜マイクロドメイン内の優れた位置、および T 細胞活性化と関連する膜貫通シグナル伝達カスケードと相互作用するより高い能力、c) 抑制的もしくは下方調節性の相互作用から離れる優先的な動きによる、原形質膜内の優れた位置、例えば、CD45 などのホスファターゼとあまり近接していないこと、もしくはそれとのより少ない相互作用、ならびに d) T 細胞受容体シグナル伝達複合体（即ち、免疫シナプス）への優れたアセンブリ、またはそれらの任意の組合せが含まれると考えられる。

【0109】

本開示は、例示的な細胞外メソセリン s c F v 抗原結合性ドメインを用いて例示しているが、本明細書に記載される CAR において使用するためのメソセリン抗原結合性ドメインを得るのに、メソセリン s c F v 抗原結合性ドメイン内のその他のヌクレオチドおよび／またはアミノ酸バリエーションを使用してもよい。

【0110】

標的化される所望の抗原に依存して、CAR は、所望の抗原標的に対して特異的な適切な抗原結合ドメインを含むようにさらに操作され得る。例えば、CD19 が標的化される所望の抗原である場合、CD19 に対する抗体が、CAR 中への抗原結合ドメイン取込みとして使用され得る。

【0111】

例示的な一実施形態では、CAR の抗原結合性ドメイン部分は、CD19 をさらに標的化する。好ましくは、CAR 中の抗原結合性ドメインは、抗 CD19 s c F v であり、ここで、抗 CD19 s c F v の核酸配列は、配列番号 29 に示される配列を含む。一実施形態では、抗 CD19 s c F v は、配列番号 30 のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む。別の実施形態では、CAR の抗 CD19 s c F v 部分は、配列番号 30 に示されるアミノ酸配列を含む。

【0112】

本発明の一態様では、例えば、限定としてではなく、レトロウイルス科（例えば、ヒト免疫不全ウイルス、例えば、HIV-1 および HIV-LP）、ピコルナウイルス科（例えば、ポリオウイルス、A 型肝炎ウイルス、エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウイルス、ライノウイルスおよびエコーウイルス）、風疹ウイルス、コロナウイルス、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス、エボラウイルス、パラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器多核体ウイルス、インフルエンザウイルス、B 型肝炎ウイルス、パルボウイルス、アデノウイルス科、ヘルペスウイルス科 [例えば、1 型および

2型単純ヘルペスウイルス（HSV）、水痘帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス（CMV）ならびにヘルペスウイルス]、ポックスウイルス科（例えば、天然痘ウイルス、ワクシニアウイルスおよびポックスウイルス）もしくはC型肝炎ウイルスに由来する抗原、またはそれらの任意の組合せを含む非TSAまたは非TAAに結合することが可能なCARが提供される。

【0113】

本発明の別の態様では、Staphylococci、Streptococcus、Escherichia coli、PseudomonasまたはSalmonellaの細菌株に由来する抗原に結合することが可能なCARが提供される。特に、感染性細菌、例えば、Helicobacter pylori、Legionella pneumophila、Mycobacteria sps.の細菌株（例えば、M. tuberculosis、M. avium、M. intracellulare、M. kansasiiまたはM. gordonea）、Staphylococcus aureus、Neisseria gonorrhoeae、Neisseria meningitidis、Listeria monocytogenes、Streptococcus pyogenes、A群Streptococcus、B群Streptococcus（Streptococcus agalactiae）、Streptococcus pneumoniaeもしくはClostridium tetaniに由来する抗原、またはそれらの組合せに結合することが可能なCARが提供される。

【0114】

2. 膜貫通ドメイン

膜貫通ドメインに関して、CARは、CARの細胞外メソセリン抗原結合性ドメインに融合された1つまたは複数の膜貫通ドメインを含む。

【0115】

膜貫通ドメインは、天然供給源または合成供給源のいずれかに由来し得る。供給源が天然である場合、ドメインは、任意の膜結合型または膜貫通タンパク質に由来し得る。

【0116】

本明細書に記載されるCARにおいて特に使用される膜貫通領域は、T細胞受容体のアルファ、ベータまたはゼータ鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154に由来し得る（即ち、それらの膜貫通領域（複数可）を少なくとも含み得る）。あるいは、膜貫通ドメインは、合成であり得、その場合、ロイシンおよびバリンなどの疎水性残基を優勢に含む。好ましくは、フェニルアラニン、トリプトファンおよびバリンの三つ組が、合成膜貫通ドメインの各末端において見出される。任意選択で、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、好ましくは2アミノ酸長と10アミノ酸長との間が、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での連結を形成し得る。グリシン-セリン二つ組は、特に適切なリンカーを提供する。

【0117】

一実施形態では、CAR中のドメインの1つと天然に関連する膜貫通ドメインが、上記膜貫通ドメインに加えて使用される。

【0118】

一部の場合には、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化するために、かかるドメインの、同じまたは異なる表面膜タンパク質の膜貫通ドメインへの結合を回避するために、選択され得るまたはアミノ酸置換により得る。

【0119】

一実施形態では、本発明のCAR中の膜貫通ドメインは、CD8膜貫通ドメインである。一実施形態では、CD8膜貫通ドメインは、配列番号19の核酸配列を含む。一実施形態では、CD8膜貫通ドメインは、配列番号20のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む。別の実施形態では、CD8膜貫通ドメインは、配列番号20のアミノ酸配列を含む。

【0120】

一実施形態において、コードされる膜貫通ドメインは、配列番号20のアミノ酸配列の少なくとも1つ、2つもしくは3つの改変（例えば、置換）であるが20、10もしくは5以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列、または配列番号20のアミノ酸配列に対し95～99%の同一性を有する配列を含む。

【0121】

一部の場合には、CARの膜貫通ドメインは、CD8アルファヒンジドメインを含む。一実施形態では、CD8ヒンジドメインは、配列番号21の核酸配列を含む。一実施形態では、CD8ヒンジドメインは、配列番号22アミノ酸配列をコードする核酸配列を含む。別の実施形態において、CD8ヒンジドメインは、配列番号22のアミノ酸配列、または95～99%の同一性を有するその配列を含む。

10

【0122】

一実施形態では、コードされるリンカードメインが、CD8の細胞外ドメインに由来し、膜貫通CD8ドメイン、膜貫通CD28ドメイン、またはそれらの組合せに連結される、単離された核酸分子が提供される。

【0123】

3. スペーサードメイン

CARでは、スペーサードメインは、細胞外ドメインと膜貫通ドメインとの間、または細胞内ドメインと膜貫通ドメインとの間に配置され得る。スペーサードメインは、膜貫通ドメインを細胞外ドメインと連結させるように、および／または膜貫通ドメインを細胞内ドメインと連結させるように機能する、任意のオリゴペプチドまたはポリペプチドを意味する。スペーサードメインは、最大で300アミノ酸、好ましくは10～100アミノ酸、最も好ましくは25～50アミノ酸を含む。

20

【0124】

いくつかの実施形態では、リンカーは、存在する場合には、リンカーのサイズを増加させ、その結果、エフェクター分子または検出可能なマーカーと抗体または抗原結合性断片との間の距離が増加される、スペーサーエレメントを含み得る。例示的なスペーサーは、当業者に公知であり、これには、米国特許第7,964,566号、米国特許第7,498,298号、米国特許第6,884,869号、米国特許第6,323,315号、米国特許第6,239,104号、米国特許第6,034,065号、米国特許第5,780,588号、米国特許第5,665,860号、米国特許第5,663,149号、米国特許第5,635,483号、米国特許第5,599,902号、米国特許第5,554,725号、米国特許第5,530,097号、米国特許第5,521,284号、米国特許第5,504,191号、米国特許第5,410,024号、米国特許第5,138,036号、米国特許第5,076,973号、米国特許第4,986,988号、米国特許第4,978,744号、米国特許第4,879,278号、米国特許第4,816,444号および米国特許第4,486,414号、ならびに米国特許出願公開第20110212088号および米国特許出願公開第20110070248号中に列挙されるものが含まれ、その各々は、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0125】

スペーサードメインは、好ましくは、抗原とのCARの結合を促進し、細胞中へのシグナル伝達を増強する配列を有する。結合を促進すると予測されるアミノ酸の例には、システイン、荷電アミノ酸、ならびに潜在的グリコシル化部位中のセリンおよびスレオニンが含まれ、これらのアミノ酸は、スペーサードメインを構成するアミノ酸として使用され得る。

40

【0126】

スペーサードメインとして、CD8アルファ（NCBI RefSeq: NP_001759.3）のヒンジ領域であるアミノ酸番号118～178（配列番号23）、CD8ベータ（GenBank: AAA35664.1）のアミノ酸番号135～195、CD4（NCBI RefSeq: NP_000607.1）のアミノ酸番号315～396、またはCD28（NCBI RefSeq: NP_006130.1）のアミノ酸番号1

50

37～152の全体または一部が使用され得る。また、スパーサードメインとして、抗体H鎖またはL鎖の定常領域の一部（CH1領域またはCL領域、例えば、配列番号24に示されるアミノ酸配列を有するペプチド）が使用され得る。さらに、スパーサードメインは、人工的に合成された配列であり得る。

【0127】

さらに、CARでは、シグナルペプチド配列が、N末端に連結され得る。シグナルペプチド配列は、多くの分泌タンパク質および膜タンパク質のN末端に存在し、15～30アミノ酸の長さを有する。細胞内ドメインとして上で言及されるタンパク質分子の多くは、シグナルペプチド配列を有するので、これらのシグナルペプチドがCARのためのシグナルペプチドとして使用され得る。一実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号10に示されるアミノ酸配列を含む。

【0128】

4. 細胞内ドメイン

CARの細胞質ドメインまたはさもないと細胞内シグナル伝達ドメインは、CARが中に置かれた免疫細胞の正常なエフェクター機能のうち少なくとも1つの活性化を担う。用語「エフェクター機能」とは、細胞の特殊化した機能を指す。例えば、T細胞のエフェクター機能は、サイトカインの分泌を含む細胞溶解活性またはヘルパー活性であり得る。したがって、用語「細胞内シグナル伝達ドメイン」とは、エフェクター機能シグナルを伝達し、特殊化した機能を実行するように細胞を指示する、タンパク質の部分を指す。通常は細胞内シグナル伝達ドメイン全体が使用され得るが、多くの場合、鎖全体を使用する必要はない。細胞内シグナル伝達ドメインの短縮された部分が使用される限りにおいて、かかる短縮された部分は、それがエフェクター機能シグナルを伝達する限り、インタクトな鎖の代わりに使用され得る。したがって、用語、細胞内シグナル伝達ドメインとは、エフェクター機能シグナルを伝達するのに十分な、細胞内シグナル伝達ドメインの任意の短縮された部分を含むことを意味する。

【0129】

CARでの使用のための細胞内シグナル伝達ドメインの好ましい例には、抗原受容体係合後にシグナル伝達を開始させるように協力して作用するT細胞受容体（TCR）および共受容体の細胞質配列、ならびにこれらの配列の任意の誘導体もしくはバリエーション、および同じ機能的能力を有する任意の合成配列が含まれる。

【0130】

TCR単独を通じて生成されるシグナルが、T細胞の完全な活性化には不十分であること、および二次または共刺激シグナルもまた必要とされることは公知である。したがって、T細胞活性化は、2つの別個のクラスの細胞質シグナル伝達配列によって媒介されると言われ得る：TCRを介した抗原依存的な一次活性化を開始させるもの（一次細胞質シグナル伝達配列）および二次または共刺激シグナルを提供するように抗原依存的に作用するもの（二次細胞質シグナル伝達配列）。

【0131】

一次細胞質シグナル伝達配列は、刺激性の方法または阻害性の方法のいずれかで、TCR複合体の一次活性化を調節する。刺激性の様式で作用する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として公知のシグナル伝達モチーフを含有し得る。

【0132】

本明細書に開示されるCARにおいて特に使用される一次細胞質シグナル伝達配列を含有するITAMの例には、TCRゼータ（CD3ゼータ）、FcRガンマ、FcRベータ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79bおよびCD66dに由来するものが含まれる。ITAMの具体的な非限定的な例には、CD3ゼータ（NCBI RefSeq: NP_932170.1）のアミノ酸番号51～164、FcイプシロンRIガンマ（NCBI RefSeq: NP_004097.1）のアミノ酸番号45～86、FcイプシロンRIベータ（NCBI RefSeq

10

20

30

40

50

q : NP_000130.1) のアミノ酸番号 201~244、CD3 ガンマ (NCBI RefSeq : NP_000064.1) のアミノ酸番号 139~182、CD3 デルタ (NCBI RefSeq : NP_000723.1) のアミノ酸番号 128~171、CD3 イプシロン (NCBI RefSeq : NP_000724.1) のアミノ酸番号 153~207、CD5 (NCBI RefSeq : NP_055022.2) のアミノ酸番号 402~495、0022 (NCBI RefSeq : NP_001762.2) のアミノ酸番号 707~847、CD79a (NCBI RefSeq : NP_001774.1) のアミノ酸番号 166~226、CD79b (NCBI RefSeq : NP_000617.1) のアミノ酸番号 182~229、および CD66d (NCBI RefSeq : NP_001806.2) のアミノ酸番号 177~252 の配列を有するペプチド、ならびにこれらのペプチドが有するのと同じ機能を有するそれらのバリエーションが含まれる。本明細書に記載される NCBI RefSeq ID または GenBank のアミノ酸配列情報に基づくアミノ酸番号は、各タンパク質の前駆体 (シグナルペプチド配列などを含む) の全長に基づいて番号付けされる。一実施形態では、CAR 中の細胞質シグナル伝達分子は、CD3 ゼータに由来する細胞質シグナル伝達配列を含む。

【0133】

好ましい実施形態では、CAR の細胞内ドメインは、それ自体で、または CAR の状況で有用な任意の他の所望の細胞質ドメイン (複数可) と組み合わせ、CD3-ゼータシグナル伝達ドメインを含むように設計され得る。例えば、CAR の細胞内ドメインは、CD3 ゼータ鎖部分および共刺激シグナル伝達領域を含み得る。共刺激シグナル伝達領域とは、共刺激分子の細胞内ドメインを含む CAR の一部分を指す。共刺激分子は、抗原に対するリンパ球の効率的な応答のために必要とされる、抗原受容体またはそれらのリガンド以外の細胞表面分子である。かかる共刺激分子の例には、CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、および CD83 と特異的に結合するリガンドなどが含まれる。かかる共刺激分子の具体的な非限定的な例には、CD2 (NCBI RefSeq : NP_001758.2) のアミノ酸番号 236~351、CD4 (NCBI RefSeq : NP_000607.1) のアミノ酸番号 421~458、CD5 (NCBI RefSeq : NP_055022.2) のアミノ酸番号 402~495、CD8 アルファ (NCBI RefSeq : NP_001759.3) のアミノ酸番号 207~235、CD83 (GenBank : AA35664.1) のアミノ酸番号 196~210、CD28 (NCBI RefSeq : NP_006130.1) のアミノ酸番号 181~220、CD137 (4-1BB、NCBI RefSeq : NP_001552.2) のアミノ酸番号 214~255、CD134 (OX40、NCBI RefSeq : NP_003318.1) のアミノ酸番号 241~277 および ICOS (NCBI RefSeq : NP_036224.1) のアミノ酸番号 166~199 の配列を有するペプチド、ならびにこれらのペプチドが有するのと同じ機能を有するそれらのバリエーションが含まれる。したがって、本明細書の開示は、4-1BB を共刺激シグナル伝達エレメントとして主に例示するが、他の共刺激エレメントが本開示の範囲内である。

【0134】

CAR の細胞質シグナル伝達部分内の細胞質シグナル伝達配列は、ランダムにまたは特定された順序で、互いに連結され得る。任意選択で、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、好ましくは 2 アミノ酸長と 10 アミノ酸長との間が、連結を形成し得る。グリシン-セリンダブレットは、特に適切なリンカーを提供する。

【0135】

一実施形態では、細胞内ドメインは、CD3-ゼータのシグナル伝達ドメインおよび CD28 のシグナル伝達ドメインを含むように設計される。別の実施形態では、細胞内ドメインは、CD3-ゼータのシグナル伝達ドメインおよび 4-1BB のシグナル伝達ドメインを含むように設計される。さらに別の実施形態では、細胞内ドメインは、CD3-ゼータ

のシグナル伝達ドメインならびにCD28および4-1BBのシグナル伝達ドメインを含むように設計される。

【0136】

一実施形態では、CAR中の細胞内ドメインは、4-1BBのシグナル伝達ドメインおよびCD3-ゼータのシグナル伝達ドメインを含むように設計され、ここで、4-1BBのシグナル伝達ドメインは、配列番号25に示される核酸配列を含み、CD3-ゼータのシグナル伝達ドメインは、配列番号27に示される核酸配列を含む。

【0137】

一実施形態では、CAR中の細胞内ドメインは、4-1BBのシグナル伝達ドメインおよびCD3-ゼータのシグナル伝達ドメインを含むように設計され、ここで、4-1BBのシグナル伝達ドメインは、配列番号26のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含み、CD3-ゼータのシグナル伝達ドメインは、配列番号28のアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む。

【0138】

一実施形態では、CAR中の細胞内ドメインは、4-1BBのシグナル伝達ドメインおよびCD3-ゼータのシグナル伝達ドメインを含むように設計され、ここで、4-1BBのシグナル伝達ドメインは、配列番号26に示されるアミノ酸配列を含み、CD3-ゼータのシグナル伝達ドメインは、配列番号28に示されるアミノ酸配列を含む。

【0139】

5. CARのさらなる記載

本明細書で開示されるCARの機能的部分もまた、本発明の範囲内に明示的に含まれる。用語「機能的部分」とは、CARに関して使用する場合、本明細書に開示されるCARの1または複数の任意の一部または断片を指し、この一部または断片は、それがその一部であるCAR（親CAR）の生物学的活性を保持する。機能的部分は、例えば、親CARと類似の程度、同じ程度、またはより高い程度まで、標的細胞を認識する能力、または疾患を検出、処置もしくは予防する能力を保持する、CARの一部を包含する。親CARに関して、機能的部分は、例えば、親CARの約10%、25%、30%、50%、68%、80%、90%、95%またはそれ超を構成し得る。

【0140】

機能的部分は、その部分のアミノ末端もしくはカルボキシ末端において、または両方の末端において、さらなるアミノ酸を含み得、このさらなるアミノ酸は、親CARのアミノ酸配列中には見出されない。望ましくは、さらなるアミノ酸は、例えば、標的細胞を認識し、がんを検出し、がんを処置または予防するなどの、機能的部分の生物学的機能を妨害しない。より望ましくは、さらなるアミノ酸は、親CARの生物学的活性と比較して、その生物学的活性を増強する。

【0141】

本明細書に開示されるCARの機能的バリエントが、本開示の範囲内に含まれる。用語「機能的バリエント」とは、本明細書で使用する場合、親CARに対する実質的なまたは著しい配列同一性または類似性を有するCAR、ポリペプチドまたはタンパク質を指し、この機能的バリエントは、それがそのバリエントであるCARの生物学的活性を保持する。機能的バリエントは、例えば、親CARと類似の程度、同じ程度、またはより高い程度まで、標的細胞を認識する能力を保持する、本明細書に記載されるCAR（親CAR）のバリエントを包含する。親CARに関して、機能的バリエントは、例えば、親CARに対して、少なくとも約30%、50%、75%、80%、90%、98%またはそれ超、アミノ酸配列が同一であり得る。

【0142】

機能的バリエントは、例えば、少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する親CARのアミノ酸配列を含み得る。あるいは、またはさらに、機能的バリエントは、少なくとも1つの非保存的アミノ酸置換を有する親CARのアミノ酸配列を含み得る。この場合、非保存的アミノ酸置換は、機能的バリエントの生物学的活性を妨害も阻害もしないことが好ま

10

20

30

40

50

しい。非保存的アミノ酸置換は、機能的バリエーションの生物学的活性を増強し得、その結果、機能的バリエーションの生物学的活性は、親 C A R と比較して増加される。

【0143】

C A R のアミノ酸置換は、好ましくは、保存的アミノ酸置換である。保存的アミノ酸置換は、当該分野で公知であり、これには、ある特定の物理的および／または化学的特性を有する1つのアミノ酸が、同じまたは類似の化学的または物理的特性を有する別のアミノ酸に交換されるアミノ酸置換が含まれる。例えば、保存的アミノ酸置換は、酸性／負に荷電した別の極性アミノ酸（例えば、A s p または G l u）を置換する酸性／負に荷電した極性アミノ酸、非極性側鎖を有する別のアミノ酸（例えば、A l a、G l y、V a l、H e、L e u、M e t、P h e、P r o、T r p、C y s、V a l など）を置換する非極性側鎖を有するアミノ酸、塩基性／正に荷電した別の極性アミノ酸（例えば、L y s、H i s、A r g など）を置換する塩基性／正に荷電した極性アミノ酸、極性側鎖を有する別の非荷電アミノ酸（例えば、A s n、G i n、S e r、T h r、T y r など）を置換する極性側鎖を有する非荷電アミノ酸、ベータ分岐側鎖を有する別のアミノ酸（例えば、H e、T h r および V a l）を置換するベータ分岐側鎖を有するアミノ酸、芳香族側鎖を有する別のアミノ酸（例えば、H i s、P h e、T r p および T y r）を置換する芳香族側鎖を有するアミノ酸などであり得る。

10

【0144】

C A R は、本明細書に記載される特定されたアミノ酸配列（単数または複数）から本質的になり得、その結果、他の構成要素、例えば、他のアミノ酸は、機能的バリエーションの生物学的活性を著しくは変化させない。

20

【0145】

C A R（機能的部分および機能的バリエーションを含む）は、任意の長さであり得る、即ち、任意の数のアミノ酸を含み、但し、C A R（またはその機能的部分もしくは機能的バリエーション）は、それらの生物学的活性、例えば、抗原に特異的に結合する能力、哺乳動物において罹患細胞を検出する能力、または哺乳動物において疾患を処置もしくは予防する能力などを保持する。例えば、C A R は、約 50 ～ 約 5000 アミノ酸長、例えば、50、70、75、100、125、150、175、200、300、400、500、600、700、800、900、1000 またはそれ超アミノ酸長であり得る。

【0146】

C A R（本発明の機能的部分および機能的バリエーションを含む）は、1 または複数の天然に存在するアミノ酸の代わりに合成アミノ酸を含み得る。かかる合成アミノ酸は、当該分野で公知であり、これには、例えば、アミノシクロヘキサンカルボン酸、ノルロイシン、 α -アミノ n -デカン酸、ホモセリン、 S -アセチルアミノメチル-L-システイン、トランス-3-ヒドロキシプロリンおよびトランス-4-ヒドロキシプロリン、4-アミノフェニルアラニン、4-ニトロフェニルアラニン、4-クロロフェニルアラニン、4-カルボキシフェニルアラニン、 β -フェニルセリン、 β -ヒドロキシフェニルアラニン、フェニルグリシン、 α -ナフチルアラニン、シクロヘキシルアラニン、シクロヘキシルグリシン、インドリン-2-カルボン酸、1, 2, 3, 4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸、アミノマロン酸、アミノマロン酸モノアミド、 N' -ベンジル- N' -メチル-L-リシン、 N' , N' -ジベンジル-L-リシン、6-ヒドロキシリシン、オルニチン、 α -アミノシクロペンタンカルボン酸、 α -アミノシクロヘキサンカルボン酸、 α -アミノシクロヘプタンカルボン酸、 α -(2-アミノ-2-ノルボルナン)-カルボン酸、 γ -ジアミノ酪酸、 β -ジアミノプロピオン酸、ホモフェニルアラニンおよび α -tert-ブチルグリシンが含まれる。

30

40

【0147】

C A R（機能的部分および機能的バリエーションを含む）は、グリコシル化、アミド化、カルボキシル化、リン酸化、エステル化、 N -アシル化、例えばジスルフィド架橋を介した環化、もしくは酸付加塩へ変換および／または任意選択で二量体化もしくは重合、あるいはコンジュゲートされ得る。

50

【0148】

CAR（その機能的部分および機能的バリエーションを含む）は、当該分野で公知の方法によって得られ得る。CARは、ポリペプチドまたはタンパク質を作製する任意の適切な方法によって作製され得る。ポリペプチドおよびタンパク質をデノボ合成する適切な方法は、Chanら、Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis、Oxford University Press、Oxford、United Kingdom、2000年；Peptide and Protein Drug Analysis、Reid, R. 編、Marcel Dekker, Inc.、2000年；Epitope Mapping、Westwoodら編、Oxford University Press、Oxford、United Kingdom、2001年；および米国特許第5,449,752号などの参考文献に記載されている。また、ポリペプチドおよびタンパク質は、標準的な組換え法を使用し、本明細書に記載される核酸を用いて組換え産生可能である。例えば、Sambrook et al.、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、3rd ed.、Cold Spring Harbor Press、Cold Spring Harbor、NY 2001；およびAusubel et al.、Current Protocols in Molecular Biology、Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons、NY、1994を参照のこと。さらに、一部のCAR（機能性部分およびその機能性バリエーションを含む）は、植物、細菌、昆虫、哺乳動物、例えばラット、ヒトなどの供給源から単離および／または精製することができる。単離および精製方法は当該分野で周知である。あるいは、本明細書に記載されるCAR（機能性部分およびその機能性バリエーションを含む）を、企業が商業的に合成することもできる。この点で、CARは合成であっても、組換えであっても、単離されていても、かつ／または精製されていてもよい。

【0149】

B. 抗体および抗原結合性断片

一実施形態は、CAR、CARを発現するT細胞、本明細書で開示された抗原のうち1または複数に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性ドメインもしくは部分をさらに提供する。本明細書で使用する場合、「CARを発現するT細胞」または「CAR T細胞」とは、CARを発現するT細胞を意味し、例えば、CARの抗体由来の標的化ドメインによって決定される抗原特異性を有する。

【0150】

本明細書で使用する場合、「抗原結合性ドメイン」は、抗体およびその抗原結合性断片を含み得る。用語「抗体」は、最も広い意味で本明細書において使用され、それらが所望の抗原結合活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多特異的抗体（例えば、二重特異的抗体）、およびそれらの抗原結合性断片を含むがこれらに限定されない種々の抗体構造を包含する。抗体の非限定的な例には、例えば、当該分野で公知のインタクトな免疫グロブリン、ならびに抗原に対する結合親和性を保持するそのバリエーションおよび断片が含まれる。

【0151】

「モノクローナル抗体」は、実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体である、即ち、集団を構成する個々の抗体は、微量で存在し得る可能な天然に存在する変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原性エピトープに対するものである。修飾語「モノクローナル」は、抗体の実質的に均質な集団から得られるという抗体の特徴を示すのであって、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とすると解釈すべきではない。一部の例では、モノクローナル抗体は、単一クローンのBリンパ球によって産生された抗体、または単一の抗体（またはその抗原結合性断片）の抗体の軽鎖および重鎖可変領域をコードする核酸がトランスフェクトされた細胞、もしくはその子孫によって産生された抗体である。一部の例では、モノクローナル抗体は、対象から単離される。モノクローナル抗体は、抗原結合または他の免疫グロブリン機能に対する影響を実質的

に有さない保存的アミノ酸置換を有し得る。モノクローナル抗体の産生の例示的な方法は公知であり、例えば、Harlow & Lane、Antibodies, A Laboratory Manual、第2版 Cold Spring Harbor Publications、New York (2013年)を参照のこと。

【0152】

典型的には、免疫グロブリンは、ジスルフィド結合によって相互接続された重(H)鎖および軽(L)鎖を有する。免疫グロブリン遺伝子は、カッパ、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロンおよびミュー定常領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変ドメイン遺伝子を含む。2つの型の軽鎖、ラムダ(λ)およびカッパ(κ)が存在する。抗体分子の機能的活性を決定する5つの主要な重鎖クラス(またはアイソタイプ): IgM、IgD、IgG、IgAおよびIgEが存在する。

10

【0153】

各重鎖および軽鎖は、定常領域(または定常ドメイン)および可変領域(または可変ドメイン)を含有する;例えば、Kindtら Kuby Immunology、第6版、W. H. Freeman and Co.、91頁(2007年)を参照のこと)。いくつかの実施形態では、重鎖および軽鎖の可変領域は、組み合わさって、抗原に特異的に結合する。さらなる実施形態では、重鎖可変領域のみが必要とされる。例えば、重鎖のみからなる天然に存在するラクダ科動物(camelid)抗体は、軽鎖の非存在下で機能的かつ安定である(例えば、Hamers-Castermanら、Nature、363巻: 446~448頁、1993年;Sheriffら、Nat. Struct. Biol.、3巻: 733~736頁、1996年を参照のこと)。「VH」または「VH」への言及は、抗原結合性断片、例えば、Fv、scFv、dsFvまたはFabのものを含む、抗体重鎖の可変領域を指す。「VL」または「VL」への言及は、Fv、scFv、dsFvまたはFabのものを含む、抗体軽鎖の可変ドメインを指す。

20

【0154】

軽鎖および重鎖の可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」とも呼ばれる3つの超可変領域によって中断された「フレームワーク」領域を含有する(例えば、Kabatra、Sequences of Proteins of Immunological Interest、U. S. Department of Health and Human Services、1991年を参照のこと)。異なる軽鎖または重鎖のフレームワーク領域の配列は、種内で比較的保存されている。構成成分である軽鎖および重鎖の組み合わされたフレームワーク領域である抗体のフレームワーク領域は、3次元空間にCDRを位置付けアラインさせるように機能する。

30

【0155】

CDRは主に、抗原のエピトープへの結合を担う。所与のCDRのアミノ酸配列境界は、Kabatra(「Sequences of Proteins of Immunological Interest」、第5版 Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、MD、1991年;「Kabata」番号付けスキーム)、Al-Lazikaniら、(JMB 273巻、927~948頁、1997年;「Chothia」番号付けスキーム)、およびLefrancら(「IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains」、Dev. Comp. Immunol.、27巻: 55~77頁、2003年;「IMGT」番号付けスキーム)に記載されるものを含む、いくつかの周知のスキームのいずれかを使用して容易に決定され得る。各鎖のCDRは、典型的には、CDR1、CDR2およびCDR3(N末端からC末端へ)と呼ばれ、典型的には、特定のCDRが位置する鎖によっても同定される。したがって、VH CDR3は、それが見出される抗体の重鎖の可変ドメイン由来のCDR3であるが、VL CDR1は、それが見出される抗体の軽鎖の可変ドメイン由来のCDR1である。軽鎖CDRは、LCDR1、LC

40

50

DR2およびLCDR3と呼ばれる場合もある。重鎖CDRは、LCDR1、LCDR2およびLCDR3と呼ばれる場合もある。

【0156】

「抗原結合性断片」は、同族抗原を特異的に認識する能力を保持する全長抗体の部分、ならびにかかる部分の種々の組合せである。抗原結合性断片の非限定的な例には、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；ディアボディ(diabody)；直鎖状抗体；単鎖抗体分子(例えば、scFv)；および抗体断片から形成された多特異的抗体が含まれる。抗体断片には、抗体全体の改変によって産生された抗原結合性断片、または組換えDNA方法論を使用してde novoで合成された抗原結合性断片が含まれる(例えば、KontermannおよびDubel(編)、Antibody Engineering、1～2巻、第2版、Springer Press、2010年を参照のこと)。

10

【0157】

単鎖抗体(scFv)は、適切なポリペプチドリinkerによって連結された1または複数の抗体(複数可)のVHおよびVLドメインを遺伝学的に融合された単鎖分子として含有する遺伝子操作された分子である(例えば、Birdら、Science、242巻：423～426頁、1988年；Hustonら、Proc. Natl. Acad. Sci.、85巻：5879～5883頁、1988年；Ahmadら、Clin. Dev. Immunol.、2012年、doi：10.1155/2012/980250；Marbry、IDrugs、13巻：543～549頁、2010年を参照のこと)。scFv中のVHドメインおよびVLドメインの分子内配向は、典型的には、scFvによって決定的ではない。したがって、両方の可能な配置(VHドメインーリンカードメインーVLドメイン；VLドメインーリンカードメインーVHドメイン)を有するscFvが使用され得る。

20

【0158】

dsFvでは、重鎖および軽鎖の可変鎖は、鎖の会合を安定化させるために、ジスルフィド結合を導入するように変異されている。VHおよびVLドメインが、単一のポリペプチド鎖上で発現されるが、同じ鎖上の2つのドメイン間のペアリングを可能にするには短すぎるリンカーを使用し、それによって、そのドメインを別の鎖の相補的ドメインとペアリングさせ、2つの抗原結合部位を創出する、二価の二重特異的抗体であるディアボディもまた含まれる(例えば、Holligerら、Proc. Natl. Acad. Sci.、90巻：6444～6448頁、1993年；Poljakら、Structure、2巻：1121～1123頁、1994年を参照のこと)。

30

【0159】

抗体は、キメラ抗体(例えば、ヒト化マウス抗体)およびヘテロコンジュゲート抗体(例えば、二重特異的抗体)などの、遺伝子操作された形態もまた含む。Pierce Catalog and Handbook、1994～1995年(Pierce Chemical Co.、Rockford、IL)；Kuby、J.、Immunology、第3版、W. H. Freeman & Co.、New York、1997年もまた参照のこと。

40

【0160】

天然に存在しない抗体は、固相ペプチド合成を使用して構築され得、組換え産生され得、または、例えば、参照により本明細書に組み込まれるHuseら、Science 246巻：1275～1281頁(1989年)に記載されるように、可変重鎖および可変軽鎖からなるコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることによって得られ得る。例えば、キメラ、ヒト化、CDR移植、単鎖および二機能性抗体を作製するこれらおよび他の方法は、当業者に周知である(WinterおよびHarris、Immunol. Today 14巻：243～246頁(1993年)；Wardら、Nature 341巻：544～546頁(1989年)；HarlowおよびLane、上記、1988年；Hilyardら、Protein Engineering：A practi

50

cal approach (IRL Press 1992年) ; Borrabeck、Antibody Engineering、第2版 (Oxford University Press 1995年) ; その各々は、参照により本明細書に組み込まれる)。

【0161】

参照抗体と「同じエピトープに結合する抗体」とは、競合アッセイにおいてその抗原への参照抗体の結合を50%以上遮断する抗体を指し、逆に、参照抗体は、競合アッセイにおいてその抗原への抗体の結合を50%以上遮断する。抗体競合アッセイは公知であり、例示的な競合アッセイが本明細書で提供される。

【0162】

「ヒト化」抗体または抗原結合性断片は、ヒトフレームワーク領域および非ヒト（例えば、マウス、ラットまたは合成）抗体または抗原結合性断片由来の1または複数のCDRを含む。CDRを提供する非ヒト抗体または抗原結合性断片は、「ドナー」と呼ばれ、フレームワークを提供するヒト抗体または抗原結合性断片は、「アクセプター」と呼ばれる。一実施形態では、全てのCDRが、ヒト化免疫グロブリン中のドナー免疫グロブリン由来である。定常領域は、存在する必要はないが、存在する場合には、ヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一、例えば、少なくとも約85~90%、例えば、約95%以上同一であり得る。したがって、ヒト化抗体または抗原結合性断片の全ての部分は、おそらくはCDRを除いて、天然ヒト抗体配列の対応する部分と実質的に同一である。

【0163】

「キメラ抗体」は、典型的には異なる種のものである2つの異なる抗体に由来する配列を含む抗体である。一部の例では、キメラ抗体は、1つのヒト抗体由来の1または複数のCDRおよび／またはフレームワーク領域ならびに別のヒト抗体由来のCDRおよび／またはフレームワーク領域を含む。

【0164】

「完全ヒト抗体」または「ヒト抗体」は、ヒトゲノム由来の（またはヒトゲノムに由来する）配列を含むが、別の種由来の配列を含まない抗体である。一部の実施形態では、ヒト抗体は、ヒトゲノム由来の（またはヒトゲノムに由来する）CDR、フレームワーク領域および（存在する場合には）Fc領域を含む。ヒト抗体は、例えば、ファージディスプレイによって、ヒトゲノムに由来する配列に基づいて配列を創出するためのテクノロジーを使用して、またはトランスジェニック動物を使用して、同定および単離され得る（例えば、Barbasら Phage display: A Laboratory Manual、第1版 New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press、2004年 Print. ; Lonberg、Nat. Biotech.、23巻: 1117~1125頁、2005年 ; Lonenberg、Curr. Opin. Immunol.、20巻: 450~459頁、2008年を参照のこと）。

【0165】

抗体は、1または複数の結合部位を有し得る。1よりも多い結合部位が存在する場合、これらの結合部位は、互いに同一であってもよく、異なってもよい。例えば、天然に存在する免疫グロブリンは、2つの同一の結合部位を有し、単鎖抗体またはFab断片は、1つの結合部位を有するが、二重特異的または二機能性抗体は、2つの異なる結合部位を有する。

【0166】

CARの任意の機能的部分に結合する能力について抗体を試験する方法は、当該分野で公知であり、これには、任意の抗体-抗原結合アッセイ、例えば、ラジオイムノアッセイ (RIA)、ELISA、ウェスタンブロット、免疫沈降および競合阻害アッセイなどが含まれる（例えば、Janewayら、以下、米国特許出願公開第2002/0197266号A1、および米国特許第7,338,929号を参照のこと）。

【0167】

また、CAR、CARを発現するT細胞、抗体またはその抗原結合性部分は、検出可能な標識、例えば、放射性同位体、フルオロフォア（例えば、フルオレセインイソチオシアネ

10

20

30

40

50

ート（F I T C）、フィコエリトリン（P E））、酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ）および元素粒子（例えば、金粒子）などを含み得る。

【0168】

C. コンジュゲート

C A R、C A Rを発現するT細胞、または本明細書に開示された抗原のうち1もしくは複数に対して特異的なモノクローナル抗体もしくはその抗原結合性断片は、当業者に公知のいくつかの手段を使用して、エフェクター分子または検出可能なマーカーなどの薬剤にコンジュゲートされ得る。共有結合および非共有結合の両方の手段が使用され得る。コンジュゲートには、本明細書に開示された抗原のうち1または複数に特異的に結合する抗体または抗原結合性断片へのエフェクター分子または検出可能なマーカーの共有結合的連結が存在する分子を含むがこれらに限定されない。当業者は、化学療法剤、抗血管新生剤、毒素、放射活性剤、例えば、125I、32P、14C、3Hおよび35S、ならびに他の標識、標的部分およびリガンドなどを含む（がこれらに限定されない）種々のエフェクター分子および検出可能なマーカーが使用され得ることを理解する。

【0169】

特定のエフェクター分子または検出可能なマーカーの選択は、特定の標的分子または細胞、および所望の生物学的効果に依存する。したがって、例えば、エフェクター分子は、特定の標的細胞（例えば、腫瘍細胞）の死をもたらすために使用される細胞毒であり得る。

【0170】

エフェクター分子または検出可能なマーカーを抗体または抗原結合性断片に結合させるための手順は、エフェクターの化学構造に従って変動する。ポリペプチドは、典型的には、種々の官能基；例えば、カルボン酸（COOH）、遊離アミン（-NH₂）またはスルフヒドリル（-SH）基を含有し、これらは、エフェクター分子または検出可能なマーカーの結合を生じるための、抗体上の適切な官能基との反応のために利用可能である。あるいは、抗体または抗原結合性断片は、さらなる反応性官能基を曝露または結合するために誘導体化される。誘導体化は、Pierce Chemical Company、Rockford、ILから入手可能なものなどの、いくつかの公知のリンカー分子のいずれかの結合を含み得る。リンカーは、抗体または抗原結合性断片をエフェクター分子または検出可能なマーカーに結合させるために使用される任意の分子であり得る。リンカーは、抗体または抗原結合性断片およびエフェクター分子または検出可能なマーカーの両方への共有結合を形成することが可能である。適切なリンカーは、当業者に周知であり、これには、直鎖もしくは分岐鎖炭素リンカー、複素環式炭素リンカーまたはペプチドリリンカーが含まれるがこれらに限定されない。抗体または抗原結合性断片およびエフェクター分子または検出可能なマーカーがポリペプチドである場合、リンカーは、それらの側基を介して（例えば、システインへのジスルフィド連結を介して）構成成分アミノ酸に、または末端アミノ酸のアルファ炭素のアミノおよびカルボキシル基に結合され得る。

【0171】

いくつかの実施形態では、リンカーは、存在する場合には、リンカーのサイズを増加させ、その結果、エフェクター分子または検出可能なマーカーと抗体または抗原結合性断片との間の距離が増加される、スペーサーエレメントを含み得る。例示的なスペーサーは、当業者に公知であり、これには、米国特許第7,964,566号、米国特許第7,498,298号、米国特許第6,884,869号、米国特許第6,323,315号、米国特許第6,239,104号、米国特許第6,034,065号、米国特許第5,780,588号、米国特許第5,665,860号、米国特許第5,663,149号、米国特許第5,635,483号、米国特許第5,599,902号、米国特許第5,554,725号、米国特許第5,530,097号、米国特許第5,521,284号、米国特許第5,504,191号、米国特許第5,410,024号、米国特許第5,138,036号、米国特許第5,076,973号、米国特許第4,986,988号、米国特許第4,978,744号、米国特許第4,879,278号、米国特許第4,816,444号および米国特許第4,486,414号、ならびに米国特許出願公開第201

10212088号および米国特許出願公開第20110070248号中に列挙されるものが含まれ、その各々は、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる。

【0172】

一部の実施形態では、リンカーは、細胞内条件下で切断可能であり、その結果、リンカーの切断は、細胞内環境中で、抗体または抗原結合性断片からエフェクター分子または検出可能なマーカーを放出させる。さらに他の実施形態では、リンカーは切断不能であり、エフェクター分子または検出可能なマーカーは、例えば、抗体分解によって放出される。一部の実施形態では、リンカーは、細胞内環境中（例えば、リソソームまたはエンドソームまたはカベオラ内）に存在する切断剤によって切断可能である。リンカーは、例えば、リソソームまたはエンドソームプロテアーゼを含むがこれらに限定されない細胞内ペプチダーゼまたはプロテアーゼ酵素によって切断されるペプチドリンカーであり得る。一部の実施形態では、ペプチドリンカーは、少なくとも2アミノ酸長または少なくとも3アミノ酸長である。しかし、リンカーは、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15アミノ酸長、例えば、1～2、1～3、2～5、3～10、3～15、1～5、1～10、1～15アミノ酸長であり得る。プロテアーゼには、カテプシンBおよびDならびにプラスミンが含まれ得、その全ては、ジペプチド薬物誘導体を加水分解して、標的細胞の内側での活性薬物の放出を生じることが公知である（例えば、DubowchikおよびWalker、1999年、Pharm. Therapeutics 83巻：67～123頁を参照のこと）。例えば、チオール依存的プロテアーゼであるカテプシンBによって切断可能なペプチドリンカーが使用され得る（例えば、フェニルアラニン-ロイシンまたはグリシン-フェニルアラニン-ロイシン-グリシンリンカー）。かかるリンカーの他の例は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,214,345号に記載されている。具体的な実施形態では、細胞内プロテアーゼによって切断可能なペプチドリンカーは、バリン-シトルリン（Citrulline）リンカーまたはフェニルアラニン-リシンリンカーである（例えば、バリン-シトルリンリンカーを用いたドキソルビシンの合成を記載する米国特許第6,214,345号を参照のこと）。

【0173】

他の実施形態では、切断可能なリンカーは、pH感受性、即ち、ある特定のpH値において加水分解に対して感受性である。典型的には、pH感受性リンカーは、酸性条件下で加水分解可能である。例えば、リソソームにおいて加水分解可能な酸不安定性リンカー（例えば、ヒドラゾン、セミカルバゾン、チオセミカルバゾン、シス-アコニットアミド（cis-aconitic amide）、オルトエステル、アセタール、ケタールなど）が使用され得る（例えば、米国特許第5,122,368号；米国特許第5,824,805号；米国特許第5,622,929号；DubowchikおよびWalker、1999年、Pharm. Therapeutics 83巻：67～123頁；Nevilleら、1989年、Biol. Chem. 264巻：14653～14661頁を参照のこと）。かかるリンカーは、血液中などの中性のpH条件下で比較的安定であるが、リソソームのおよそのpHであるpH5.5または5.0を下回るpHでは不安定である。ある特定の実施形態では、加水分解可能なリンカーは、チオエーテルリンカー（例えば、アシルヒドラゾン結合を介して治療剤に結合されたチオエーテルなど）である（例えば、米国特許第5,622,929号を参照のこと）。

【0174】

他の実施形態では、リンカーは、還元条件下で切断可能である（例えば、ジスルフィドリンカー）。種々のジスルフィドリンカーが当該分野で公知であり、これには、例えば、SATA（N-スクシンイミジル-S-アセチルチオアセテート）、SPDP（N-スクシンイミジル-3-（2-ピリジルジチオ）プロピオネート）、SPDB（N-スクシンイミジル-3-（2-ピリジルジチオ）ブチレート）およびSMPT（N-スクシンイミジル-オキシカルボニル-アルファ-メチル-アルファ-（2-ピリジル-ジチオ）トルエン）-、SPDBおよびSMPTを使用して形成され得るものが含まれる（例えば、Thorpeら、1987年、Cancer Res. 47巻：5924～5931頁；Wa

10

20

30

40

50

wrzynczakら、Immunconjugates: Antibody Conjugates in Radioimager y and Therapy of Cancer (C. W. Vogel編、Oxford U. Press、1987年) ; Phillipsら、Cancer Res. 68巻: 9280~9290頁、2008年を参照のこと)。米国特許第4, 880, 935号もまた参照のこと。

【0175】

さらに他の具体的な実施形態では、リンカーは、マロネートリンカー (Johnsonら、1995年、Anticancer Res. 15巻: 1387~93頁)、マレイミドベンゾイルリンカー (Lauら、1995年、Bioorg-Med-Chem. 3巻 (10号): 1299~1304頁) または3'-N-アミドアナログ (Lauら、1995年、Bioorg-Med-Chem. 3巻 (10号): 1305~12頁) である。

【0176】

さらに他の実施形態では、リンカーは切断不能であり、エフェクター分子または検出可能なマーカーは、抗体分解によって放出される (その全内容が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2005/0238649号を参照のこと)。

【0177】

いくつかの実施形態では、リンカーは、細胞外環境中での切断に対して抵抗性である。例えば、コンジュゲートが細胞外環境中 (例えば、血漿中) に存在する場合、コンジュゲートのサンプル中のリンカーの約20%以下、約15%以下、約10%以下、約5%以下、約3%以下、または約1%以下が切断される。リンカーが細胞外環境中での切断に対して抵抗性であるか否かは、例えば、目的のリンカーを含有するコンジュゲートを、所定の期間 (例えば、2、4、8、16または24時間) にわたって血漿と共にインキュベートし、次いで、血漿中に存在する遊離のエフェクター分子または検出可能なマーカーの量を定量することによって決定され得る。コンジュゲート中で使用され得る種々の例示的なリンカーは、WO2004-010957、米国特許出願公開第2006/0074008号、米国特許出願公開第20050238649号および米国特許出願公開第2006/0024317号に記載されており、その各々は、その全内容が参照により本明細書に組み込まれる。

【0178】

いくつかの実施形態では、CARのコンジュゲート、CARを発現するT細胞、抗体またはその抗原結合性部分、および1または複数の小分子毒素、例えば、カリチアマイシン、マイタンシノイド (maytansinoid)、ドラスタチン、アウリスタチン (auristatin)、トリコテシンおよびCC1065ならびに毒素活性を有するこれらの毒素の誘導体が提供される。

【0179】

マイタンシノイド毒素部分としての使用に適切なマイタンシン (maytansine) 化合物は、当該分野で周知であり、公知の方法に従って天然供給源から単離され得、遺伝子操作技術 (Yuら (2002年) PNAS 99巻: 7968~7973頁を参照のこと)、または公知の方法に従って合成により調製されたマイタンシノール (maytansinol) およびマイタンシノールアナログを使用して産生され得る。マイタンシノイドは、チューブリン重合を阻害することによって作用する有糸分裂阻害剤である。マイタンシンは、東アフリカの低木Maytenus serrataから最初に単離された (米国特許第3, 896, 111号)。引き続いて、ある特定の微生物もまた、マイタンシノールおよびC-3マイタンシノールエステルなどのマイタンシノイドを産生することが発見された (米国特許第4, 151, 042号)。合成マイタンシノールならびにその誘導体およびアナログは、例えば、米国特許第4, 137, 230号; 米国特許第4, 248, 870号; 米国特許第4, 256, 746号; 米国特許第4, 260, 608号; 米国特許第4, 265, 814号; 米国特許第4, 294, 757号; 米国特許第4, 307, 016号; 米国特許第4, 308, 268号; 米国特許第4, 308, 269号; 米国特許第4, 309, 428号; 米国特許第4, 313, 946号; 米国特許第4, 31

10

20

30

40

50

5, 929号; 米国特許第4, 317, 821号; 米国特許第4, 322, 348号; 米国特許第4, 331, 598号; 米国特許第4, 361, 650号; 米国特許第4, 364, 866号; 米国特許第4, 424, 219号; 米国特許第4, 450, 254号; 米国特許第4, 362, 663号; および米国特許第4, 371, 533号に開示されており, その各々は, 参照により本明細書に組み込まれる。マイタンシノイドを含有するコンジュゲート、それを作製する方法、およびそれらの治療的使用は、例えば、米国特許第5, 208, 020号; 米国特許第5, 416, 064号; 米国特許第6, 441, 163号および欧州特許E P O 4 2 5 2 3 5 B 1に開示されており、それらの開示は、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

【0180】

さらなる毒素が、CAR、CARを発現するT細胞、抗体またはその抗原結合性部分と共に使用され得る。例示的な毒素には、Pseudomonas外毒素(PE)、ヒマ毒、アブリン、ジフテリア毒素およびそのサブユニット、リボトキシン(ribotoxin)、リボヌクレアーゼ、サポリンおよびカリチアマイシン、ならびにボツリヌス毒素A~Fが含まれる。これらの毒素は、当該分野で周知であり、多くは、商業的供給源(例えば、Sigma Chemical Company、St. Louis、MO)から容易に入手可能である。企図される毒素には、これらの毒素のバリエーションも含まれる(例えば、米国特許第5, 079, 163号および米国特許第4, 689, 401号を参照のこと)。

【0181】

サポリンは、リボソーム複合体の60S部分を不活性化することによってタンパク質合成を破壊する、Saponaria officinalisに由来する毒素である(Stirpeら、Bio/Technology、10巻: 405~412頁、1992年)。しかし、この毒素は、細胞中への特異的進入のための機構を有さず、したがって、細胞によって効率的に取り込まれるために、内在化される細胞表面タンパク質を認識する抗体または抗原結合性断片へのコンジュゲートを必要とする。

【0182】

ジフテリア毒素は、Corynebacterium diphtheriaeから単離される。典型的には、免疫毒素における使用のためのジフテリア毒素は、非特異的毒性を低減または排除するために変異される。完全な酵素活性を有するが非特異的毒性が顕著に低減された、CRM107として公知の変異体は、1970年代以降公知であり(LairdおよびGroman、J. Virol. 19巻: 220頁、1976年)、ヒト臨床試験において使用されてきた。米国特許第5, 792, 458号および米国特許第5, 208, 021号を参照のこと。

【0183】

ヒマ毒は、Ricinus communis(トウゴマ)由来のレクチンRCA60である。ヒマ毒の例については、米国特許第5, 079, 163号および米国特許第4, 689, 401号を参照のこと。Ricinus communisアグルチニン(RCA)は、それぞれ、およそ65kDおよび120kDの分子量に従って、RCA60およびRCA120と称される2つの形態で存在する(NicholsonおよびBlaustein、J. Biochim. Biophys. Acta 266巻: 543頁、1972年)。A鎖は、タンパク質合成の不活性化および細胞の死滅を担う。B鎖は、ヒマ毒を細胞表面ガラクトース残基に結合させ、細胞質ゾル中へのA鎖の輸送を促進する(Olsnesら、Nature 249巻: 627~631頁、1974年および米国特許第3, 060, 165号)。

【0184】

リボヌクレアーゼもまた、免疫毒素としての使用のために標的化分子にコンジュゲートされてきた(Suzukiら、Nat. Biotech. 17巻: 265~70頁、1999年を参照のこと)。例示的なリボトキシン、例えば、 α -サルシン(α -sarcin)およびレストリクトシン(restrictocin)は、例えば、Rathoreら、Gene 190巻: 31~5頁、1997年; ならびにGoyalおよびBatra

10

20

30

40

50

、Biochem. 345巻2部：247～54頁、2000年で議論されている。カリチアマイシンは、Micromonospora echinosporaから最初に単離されたものであり、DNA中にアポトシスをもたらす二本鎖切断を生じさせて、エンジン抗腫瘍抗生物質ファミリーのメンバーである（例えば、Leeら、J. Antibiot. 42巻：1070～87頁、1989年を参照のこと）。この薬物は、臨床試験中の免疫毒素の毒性部分である（例えば、Gillespieら、Ann. Oncol. 11巻：735～41頁、2000年を参照のこと）。

【0185】

アブリンは、Abrus precatorius由来の毒性レクチンを含む。毒性素であるアブリンa、b、cおよびdは、約63kDおよび67kDの分子量を有し、2つのジスルフィド連結されたポリペプチド鎖AおよびBから構成される。A鎖はタンパク質合成を阻害する；B鎖（アブリン-b）は、D-ガラクトース残基に結合する（Funatsuら、Agr. Biol. Chem. 52巻：1095頁、1988年；およびOlsones、Methods Enzymol. 50巻：330～335頁、1978年を参照のこと）。

【0186】

CAR、CARを発現するT細胞、本明細書に開示された抗原のうち1または複数に対して特異的なモノクローナル抗体、その抗原結合性断片はまた、検出可能なマーカー；例えば、ELISA、分光光度法、フローサイトメトリー、顕微鏡法または画像診断技術（例えば、コンピューター断層撮影（CT）、コンピューター体軸断層撮影（computed axial tomography）（CAT）スキャン、磁気共鳴画像法（MRI）、核磁気共鳴画像法（NMRI）、磁気共鳴断層撮影（MTR）、超音波、光ファイバー試験および腹腔鏡下試験）による検出が可能な検出可能なマーカーとコンジュゲートされ得る。検出可能なマーカーの具体的な非限定的な例には、フルオロフォア、化学発光剤、酵素的連結、放射活性同位体および重金属または化合物（例えば、MRIによる検出のための超常磁性酸化鉄ナノ結晶）が含まれる。例えば、有用な検出可能なマーカーには、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、5-ジメチルアミン-1-ナフタレンスルホニル（naphthalenesulfonyl）塩化物、フィコエリトリン、ランタニドリン光体などを含む蛍光化合物が含まれる。ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質（GFP）、黄色蛍光タンパク質（YFP）などの生物発光マーカーもまた使用される。CAR、CARを発現するT細胞、抗体またはその抗原結合性部分は、検出のために有用な酵素、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、β-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼなどにもコンジュゲートされ得る。CAR、CARを発現するT細胞、抗体またはその抗原結合性部分が、検出可能な酵素とコンジュゲートされる場合、それは、識別できる反応産物を産生するために酵素が使用するさらなる試薬を添加することによって検出され得る。例えば、薬剤西洋ワサビペルオキシダーゼが存在する場合、過酸化水素およびジアミノベンジジンの添加が、視覚的に検出可能な着色反応産物をもたらす。CAR、CARを発現するT細胞、抗体またはその抗原結合性部分はまた、ビオチンとコンジュゲートされ得、アビジンまたはストレプトアビジンの結合の間接的な測定を介して検出され得る。アビジン自体が酵素または蛍光標識とコンジュゲートされ得ることに留意すべきである。

【0187】

CAR、CARを発現するT細胞、抗体またはその抗原結合性部分は、ガドリニウムなどの常磁性薬剤とコンジュゲートされ得る。超常磁性酸化鉄などの常磁性薬剤もまた、標識として使用される。抗体は、ランタニド（例えば、ユーロピウムおよびジスプロシウム）およびマンガンともコンジュゲートされ得る。抗体または抗原結合性断片はまた、二次レポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体への結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）で標識され得る。

【0188】

CAR、CARを発現するT細胞、抗体またはその抗原結合性部分はまた、放射標識され

10

20

30

40

50

たアミノ酸とコンジュゲートされ得る。放射標識は、診断目的および治療目的の両方のために使用され得る。例えば、放射標識は、x線、発光スペクトルまたは他の診断技術によって本明細書に開示された抗原および抗原発現細胞のうち1または複数を検出するために使用され得る。さらに、放射標識は、対象における腫瘍の処置のため、例えば、神経芽細胞腫の処置のために、毒素として治療的に使用され得る。ポリペプチドのための標識の例には、以下の放射性同位体または放射性ヌクレオチド (radio nucleotide) が含まれるがこれらに限定されない： ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 。

【0189】

かかる検出可能なマーカーを検出する手段は、当業者に周知である。したがって、例えば、放射標識は、写真フィルムまたはシンチレーションカウンターを使用して検出され得、蛍光マーカーは、発せられた照明を検出するために光検出器を使用して検出され得る。酵素標識は、典型的には、酵素に基質を提供し、基質に対する酵素の作用によって産生された反応産物を検出することによって検出され、発色標識は、着色標識を単純に可視化することによって検出される。

【0190】

D. ヌクレオチド、発現、ベクターおよび宿主細胞

本明細書に記載されるCAR、抗体またはその抗原結合性部分（その機能的部分および機能的バリエーションを含む）のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む核酸が、本発明の一実施形態によってさらに提供される。本発明の核酸は、本明細書に記載されるリーダー配列、抗原結合性ドメイン、膜貫通ドメインおよび／または細胞内T細胞シグナル伝達ドメインのいずれかをコードするヌクレオチド配列を含み得る。

【0191】

一部の実施形態では、ヌクレオチド配列は、コドン改変され得る。特定の理論に束縛されないが、ヌクレオチド配列のコドン最適化は、mRNA転写物の翻訳効率を増加させると考えられる。ヌクレオチド配列のコドン最適化は、ネイティブコドンを、同じアミノ酸をコードするが、細胞内でより容易に利用可能なtRNAによって翻訳され得る別のコドンに置換し、そうして翻訳効率を増加させることを含み得る。ヌクレオチド配列の最適化はまた、翻訳を妨害する二次mRNA構造を低減させ得、そうして翻訳効率を増加させる。

【0192】

本発明の実施形態では、核酸は、本発明のCARの抗原結合性ドメインをコードするコドン改変されたヌクレオチド配列を含み得る。本発明の別の実施形態では、核酸は、本明細書に記載されるCAR（その機能的部分および機能的バリエーションを含む）のいずれかをコードするコドン改変されたヌクレオチド配列を含み得る。

【0193】

「核酸」は、本明細書で使用する場合、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」および「核酸分子」を含み、一般に、一本鎖または二本鎖の、合成のまたは天然供給源から得られた（例えば、単離および／または精製された）ものであり得、天然、非天然または変更されたヌクレオチドを含有し得、未改変のオリゴヌクレオチドのヌクレオチド間に見出されるホスホジエステルの代わりに、天然、非天然または変更されたヌクレオチド間連結、例えば、ホスホロアミデート (phosphoramidate) 連結またはホスホロチオエート連結を含有し得る、DNAまたはRNAのポリマーを意味する。一部の実施形態では、核酸は、いずれの挿入、欠失、逆位および／または置換も含まない。しかし、一部の場合には、本明細書で議論されるように、核酸は、1または複数の挿入、欠失、逆位および／または置換を含むことが適切であり得る。

【0194】

組換え核酸は、天然に存在しない配列を有するもの、または配列の2つのさもなければ分離されたセグメントの人工的な組合せによって作製される配列を有するものであり得る。この人工的な組合せは、化学的合成によって、またはより一般的には、例えばSambrookら、上記に記載されるものなどの遺伝子操作技術による、核酸の単離されたセグメ

10

20

30

40

50

ントの人工的操作によって達成される場合が多い。核酸は、当該分野で公知の手順を使用する化学的合成および／または酵素的ライゲーション反応に基づいて構築され得る。例えば、Sambrookら、上記およびAusubelら、上記を参照のこと。例えば、核酸は、天然に存在するヌクレオチド、または分子の生物学的安定性を増加させるように、もしくはハイブリダイゼーションの際に形成される二重鎖の物理的安定性を増加させるように設計された種々に改変されたヌクレオチド（例えば、ホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチド）を使用して化学合成され得る。核酸を生成するために使用され得る改変型ヌクレオチドの例には、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-（カルボキシヒドロキシメチル）ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、ベーター-D-ガラクトシルキューオシン（galactosylqueosine）、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-置換されたアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、ベーター-D-マンノシルキューオシン（mannosylqueosine）、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸（v）、ウブトキシシン（wybutoxosine）、シュードウラシル、キューオシン（queosine）、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、3-（3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル）ウラシルおよび2,6-ジアミノプリンが含まれるがこれらに限定されない。あるいは、本発明の核酸のうち1または複数は、Integrated DNA Technologies（Coralville, IA, USA）などの会社から購入できる。

【0195】

核酸は、CARまたはその機能的部分もしくは機能的バリエーションのいずれかをコードする任意の単離または精製されたヌクレオチド配列を含み得る。あるいは、ヌクレオチド配列は、配列のいずれかと縮重するヌクレオチド配列、または縮重配列の組合せを含み得る。

【0196】

一実施形態は、本明細書に記載される核酸のいずれかのヌクレオチド配列と相補的であるヌクレオチド配列、または本明細書に記載される核酸のいずれかのヌクレオチド配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む、単離または精製された核酸もまた提供する。

【0197】

ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列は、高いストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズし得る。「高いストリンジェンシーの条件」とは、ヌクレオチド配列が、非特異的ハイブリダイゼーションよりも検出可能に強い量で、標的配列（本明細書に記載される核酸のいずれかのヌクレオチド配列）に特異的にハイブリダイズすることを意味する。高いストリンジェンシーの条件には、ヌクレオチド配列と一致したいくつかの小領域（例えば、3～10塩基）を偶然に有するランダム配列から、正確に相補的な配列を有するポリヌクレオチド、またはいくつかの散在するミスマッチしか含有しないポリヌクレオチドを識別する条件が含まれる。相補性のかかる小領域は、14～17またはそれよりも多い塩基の全長相補体よりも容易に融解され、高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーションは、それらを容易に識別可能にする。比較的高いストリンジェンシーの条件には、例えば、約0.02～0.1MのNaClまたは等価物によって、約50～70℃の温度で提供されるような、低塩および／または高温条件が含まれる。かかる高いストリンジェンシーの条件は、存在するとしても、ヌクレオチド配列と鋳型または標的鎖との間のミスマッチをほとんど忍容せず、本発明のCARのいずれかの発現を検出

するのに特に適切である。一般に、条件は、漸増量のホルムアミドの添加によって、よりストリンジェントにされ得ることが理解される。

【0198】

本明細書に記載される核酸のいずれかに対して、少なくとも約70%またはそれ超、例えば、約80%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%または約99%同一であるヌクレオチド配列を含む核酸もまた提供される。

【0199】

一実施形態では、核酸は、組換え発現ベクター中に取り込まれ得る。これに関して、一実施形態は、核酸のいずれかを含む組換え発現ベクターを提供する。本明細書の目的のために、用語「組換え発現ベクター」とは、構築物が、mRNA、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む場合、およびベクターが、mRNA、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドが細胞内で発現されるのに十分な条件下で細胞と接触させられる場合に、宿主細胞によるmRNA、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドの発現を可能にする、遺伝子改変されたオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド構築物を意味する。ベクターは、全体としては天然に存在しない。

【0200】

しかし、ベクターの一部は、天然に存在し得る。組換え発現ベクターは、一本鎖または二本鎖の、合成または一部天然供給源から得られたものであり得、天然、非天然または変更されたヌクレオチドを含有し得る、DNAおよびRNAを含むがこれらに限定されない任意の型のヌクレオチドを含み得る。組換え発現ベクターは、天然に存在するもしくは天然に存在しないヌクレオチド間連結、またはその両方の型の連結を含み得る。好ましくは、天然に存在しないまたは変更されたヌクレオチドまたはヌクレオチド間連結は、ベクターの転写も複製も邪魔しない。

【0201】

一実施形態では、組換え発現ベクターは、任意の適切な組換え発現ベクターであり得、任意の適切な宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトするために使用され得る。適切なベクターには、プラスミドおよびウイルスなどの、繁殖および増殖のためもしくは発現のため、またはその両方のために設計されたものが含まれる。ベクターは、pUCシリーズ (Fermentas Life Sciences、Glen Burnie、MD)、pBluescriptシリーズ (Stratagene、La Jolla、CA)、pETシリーズ (Novagen、Madison、WI)、pGEXシリーズ (Pharmacia Biotech、Uppsala、Sweden) およびpEXシリーズ (Clontech、Palo Alto、CA) からなる群から選択され得る。

【0202】

バクテリオファージベクター、例えば、λUTI 0、λUTI 1、λZapII (Stratagene)、EMBL4およびλNM1 149もまた使用され得る。植物発現ベクターの例には、pBIOL、pBI101.2、pBHOL.3、pBI121およびpBIN19 (Clontech) が含まれる。動物発現ベクターの例には、pEUK-Cl、pMAMおよびpMAMneo (Clontech) が含まれる。組換え発現ベクターは、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であり得る。レンチウイルスベクターは、特に、Miloneら、Mol. Ther. 17巻(8号):1453~1464頁(2009年)に提供されるような自己不活性化レンチウイルスベクターを含む、レンチウイルスゲノムの少なくとも一部分に由来するベクターである。クリニックにおいて使用され得るレンチウイルスベクターの他の例には、例えば、限定としてではなく、Oxford BioMedica plcのLENTIVECTOR (登録商標) 遺伝子送達テクノロジー、LentigenのLENTIMAX (商標) ベクター系などが含まれる。非臨床型のレンチウイルスベクターもまた利用可能であり、当業者に公知である。

【0203】

いくつかのトランスフェクション技術が、当該分野で一般に公知である（例えば、Grahamら、Virology、52巻：456～467頁（1973年）；Sambrookら、上記；Davisら、Basic Methods in Molecular Biology、Elsevier（1986年）；およびChuら、Gene、13巻：97頁（1981年）を参照のこと）。

【0204】

トランスフェクション方法には、リン酸カルシウム共沈（例えば、Grahamら、上記を参照のこと）、培養細胞中への直接的マイクロインジェクション（例えば、Capechi、Cell、22巻：479～488頁（1980年）を参照のこと）、エレクトロポレーション（例えば、Shigekawaら、BioTechniques、6巻：742～751頁（1988年）を参照のこと）、リポソーム媒介性遺伝子移入（例えば、Manninoら、BioTechniques、6巻：682～690頁（1988年）を参照のこと）、脂質媒介性形質導入（例えば、Feignerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、84巻：7413～7417頁（1987年）を参照のこと）および高速微小推進剤（high velocity microprojectile）を使用する核酸送達（例えば、Kleinら、Nature、327巻：70～73頁（1987年）を参照のこと）が含まれる。

【0205】

一実施形態では、組換え発現ベクターは、例えば、Sambrookら、上記およびAusubelら、上記に記載される、標準的な組換えDNA技術を使用して調製され得る。環状または直鎖状である発現ベクターの構築物は、原核生物または真核生物宿主細胞において機能的な複製系を含有するように調製され得る。複製系は、例えば、ColEI、2μプラスミド、λ、SV40、ウシパピローマウイルスなどに由来し得る。

【0206】

組換え発現ベクターは、ベクターがDNAベースであるかRNAベースであるかを考慮に入れて、必要に応じて、ベクターが導入される宿主細胞の型（例えば、細菌、真菌、植物または動物）に特異的な調節配列、例えば、転写および翻訳開始および終結コドンを含み得る。組換え発現ベクターは、クローニングを容易にするための制限部位を含み得る。

【0207】

組換え発現ベクターは、形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞の選択を可能にする、1または複数のマーカー遺伝子を含み得る。マーカー遺伝子には、殺生物剤耐性、例えば、抗生物質、重金属などに対する耐性、原栄養性を提供するための栄養要求性宿主における補完などが含まれる。本発明の発現ベクターに適切なマーカー遺伝子には、例えば、ネオマイシン／G418耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ヒスチジノール耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子およびアンピシリン耐性遺伝子が含まれる。

【0208】

組換え発現ベクターは、CAR（その機能的部分および機能的バリエーションを含む）をコードするヌクレオチド配列に、またはCARをコードするヌクレオチド配列に対して相補的なもしくはかかるヌクレオチド配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列に作動可能に連結したネイティブまたは非ネイティブのプロモーターを含み得る。プロモーターの選択、例えば、強い、弱い、誘導性、組織特異的および発生特異的は、当業者の技術範囲内である。同様に、ヌクレオチド配列をプロモーターと組み合わせることもまた、当業者の技術範囲内である。プロモーターは、非ウイルスプロモーターまたはウイルスプロモーター、例えば、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、SV40プロモーター、RSVプロモーター、またはマウス幹細胞ウイルスの末端反復配列において見出されるプロモーターであり得る。

【0209】

組換え発現ベクターは、一過性の発現のため、安定な発現のため、またはその両方のために設計され得る。また、組換え発現ベクターは、構成的発現または誘導性発現のために作製され得る。

【0210】

さらに、組換え発現ベクターは、自殺遺伝子を含むように作製され得る。本明細書で使用する場合、用語「自殺遺伝子」とは、自殺遺伝子を発現する細胞を死なせる遺伝子を指す。自殺遺伝子は、この遺伝子が発現される細胞に薬物などの薬剤に対する感受性を付与する遺伝子、または細胞が薬剤と接触した場合もしくは薬剤に曝露された場合にその細胞を死なせる遺伝子であり得る。自殺遺伝子は、当該分野で公知であり（例えば、Suicide Gene Therapy: Methods and Reviews、Springer、Caroline J. (Cancer Research UK Centre for Cancer Therapeutics at the Institute of Cancer Research、Sutton、Surrey、UK)、Humana Press、2004年を参照のこと）、これには、例えば、単純ヘルペスウイルス（HSV）チミジンキナーゼ（TK）遺伝子、シトシンデアミナーゼ（daminase）、プリンヌクレオシドホスホリラーゼおよびニトロレダクターゼが含まれる。

10

【0211】

一実施形態は、本明細書に記載される組換え発現ベクターのいずれかを含む宿主細胞をさらに提供する。本明細書で使用する場合、用語「宿主細胞」とは、本発明の組換え発現ベクターを含有し得る任意の型の細胞を指す。宿主細胞は、真核生物細胞、例えば、植物、動物、真菌もしくは藻類であり得る、または原核生物細胞、例えば、細菌もしくは原生生物であり得る。宿主細胞は、培養細胞または初代細胞であり得る、即ち、ヒトなどの生物から直接単離され得る。宿主細胞は、接着細胞または懸濁細胞、即ち、懸濁物中で成長する細胞であり得る。適切な宿主細胞は、当該分野で公知であり、これには、例えば、DH5a E. coli細胞、チャイニーズハムスター卵巢細胞、サルVERO細胞、COS細胞、HEK293細胞などが含まれる。組換え発現ベクターを増幅または複製することを目的とすると、宿主細胞は、原核生物細胞、例えば、DH5a細胞であり得る。組換えCARを産生することを目的とすると、宿主細胞は、哺乳動物細胞であり得る。宿主細胞は、ヒト細胞であり得る。宿主細胞は任意の細胞型のものであり得、任意の型の組織に起源し得、任意の発生段階のものであり得るが、宿主細胞は、末梢血リンパ球（PBL）または末梢血単核球（PBMC）であり得る。宿主細胞は、T細胞であり得る。

20

【0212】

本明細書の目的のために、T細胞は、任意のT細胞、例えば、培養T細胞、例えば、初代T細胞、または培養T細胞株、例えば、Jurkat、SupT1など由来のT細胞、または哺乳動物から得られたT細胞であり得る。哺乳動物から得られる場合、T細胞は、血液、骨髄、リンパ節、胸腺または他の組織もしくは体液を含むがこれらに限定されない多数の供給源から得られ得る。T細胞はまた、富化または精製され得る。T細胞は、ヒトT細胞であり得る。T細胞は、ヒトから単離されたT細胞であり得る。T細胞は、CD4+/CD8+二重陽性T細胞、CD4+ヘルパーT細胞、例えば、Th1およびTh2細胞、CD8+T細胞（例えば、細胞傷害性T細胞）、腫瘍浸潤性細胞、メモリーT細胞、ナイーブT細胞などを含むがこれらに限定されない、任意の型のT細胞であり得、任意の発生段階のものであり得る。T細胞は、CD8+T細胞またはCD4+T細胞であり得る。

30

【0213】

一実施形態では、本明細書に記載されるCARは、適切な非T細胞において使用され得る。かかる細胞は、免疫エフェクター機能を有する細胞、例えば、多能性幹細胞から生成されたNK細胞およびT様細胞などである。

40

【0214】

本明細書に記載される少なくとも1つの宿主細胞を含む細胞の集団もまた、一実施形態によって提供される。細胞の集団は、いずれの組換え発現ベクターも含まない少なくとも1つの他の細胞、例えば宿主細胞（例えば、T細胞）、またはT細胞以外の細胞、例えば、B細胞、マクロファージ、好中球、赤血球、肝細胞、内皮細胞、上皮細胞、筋肉細胞、脳細胞などに加えて、記載される組換え発現ベクターのいずれかを含む宿主細胞を含む不均一な集団であり得る。あるいは、細胞の集団は、実質的に均質な集団であり得、ここで、

50

集団は主に、組換え発現ベクターを含む（例えば、それらから本質的になる）宿主細胞を含む。集団はまた、細胞のクローン性集団であり得、ここで、集団の全ての細胞は、組換え発現ベクターを含む単一の宿主細胞のクローンであり、その結果、集団の全ての細胞は、その組換え発現ベクターを含む。本発明の一実施形態では、細胞の集団は、本明細書に記載される組換え発現ベクターを含む宿主細胞を含むクローン性集団である。

【0215】

CAR（その機能的部分およびバリエーションを含む）、核酸、組換え発現ベクター、宿主細胞（その集団を含む）および抗体（その抗原結合性部分を含む）は、単離および／または精製され得る。例えば、精製（または単離）された宿主細胞の調製物は、宿主細胞が身体内のその天然環境中の細胞よりも純粋である調製物である。かかる宿主細胞は、例えば、標準的な精製技術によって産生され得る。一部の実施形態では、宿主細胞の調製物は精製され、その結果、宿主細胞は、調製物の総細胞含量の少なくとも約50%、例えば、少なくとも約70%を示す。例えば、純度は、少なくとも約50%であり得、約60%、約70%もしくは約80%よりも上であり得、または約100%であり得る。

【0216】

E. 処置の方法

本明細書で開示されるCARは、哺乳動物において疾患を処置または予防する方法において使用されることが企図される。これに関して、一実施形態は、CAR、核酸、組換え発現ベクター、宿主細胞、細胞の集団、抗体および／もしくはその抗原結合性部分、ならびに／または医薬組成物を、哺乳動物においてがんを処置または予防するのに有効な量で哺乳動物に投与するステップを含む、哺乳動物においてがんを処置または予防する方法を提供する。

【0217】

一実施形態は、本明細書に開示されるCARを投与するステップの前に、哺乳動物をリンパ枯渇させる（*lymphodepleting*）ステップをさらに含む。リンパ枯渇の例には、非骨髓破壊的リンパ枯渇性化学療法、骨髓破壊的リンパ枯渇性化学療法、全身照射などが含まれ得るがこれらに限定されない。

【0218】

宿主細胞、または細胞の集団が投与される方法を目的として、細胞は、哺乳動物にとって同種または自家である細胞であり得る。好ましくは、細胞は、哺乳動物にとって自家である。本明細書で使用する場合、同種とは、材料が導入される個体と同じ種の異なる動物に由来する任意の材料を意味する。1または複数の遺伝子座において遺伝子が同一でない場合、2以上の個体は、互いに同種であると言われる。一部の態様では、同じ種の個体由来の同種材料は、抗原性に相互作用するのに十分に遺伝的に異なり得る。本明細書で使用する場合、「自家」とは、個体に後に再導入される、同じ個体に由来する任意の材料を意味する。

【0219】

本明細書で言及される哺乳動物は、任意の哺乳動物であり得る。本明細書で使用する場合、用語「哺乳動物」とは、齧歯目の哺乳動物、例えば、マウスおよびハムスター、ならびにウサギ（*Logomorpha*）目の哺乳動物、例えば、ウサギを含むがこれらに限定されない任意の哺乳動物を指す。哺乳動物は、ネコ（*Feline*）（ネコ（*cat*））およびイヌ（*Canine*）（イヌ（*dog*））を含む食肉目由来であり得る。哺乳動物は、ウシ（*Bovine*）（ウシ（*cow*））およびブタ（*Swine*）（ブタ（*pig*））を含む偶蹄目由来、またはウマ（*Equine*）（ウマ（*horse*））を含む奇蹄目（*Perssodactyla*）のものであり得る。哺乳動物は、霊長目、新世界ザル（*Ceboid*）目もしくはサル（*Simoïd*）目（サル（*monkey*））または類人猿（*Anthropoid*）目（ヒトおよび類人猿（*ape*））のものであり得る。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【0220】

これらの方法に関して、がんは、急性リンパ性がん、急性骨髄性白血病、胞巣状横紋筋肉

10

20

30

40

50

腫、膀胱がん（例えば、膀胱癌）、骨がん、脳がん（例えば、髄芽腫）、乳房がん、肛門、肛門管もしくは肛門直腸のがん、眼のがん、肝内胆管のがん、関節のがん、頸部、胆嚢もしくは胸膜のがん、鼻、鼻腔もしくは中耳のがん、口腔のがん、外陰部のがん、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性がん（*chronic myeloid cancer*）、結腸がん、食道がん、子宮頸がん、線維肉腫、消化管カルチノイド腫瘍、頭頸部がん（例えば、頭頸部扁平上皮癌）、ホジキンリンパ腫、下咽頭がん、腎臓がん、喉頭がん、白血病、液性腫瘍、肝臓がん、肺がん（例えば、非小細胞肺癌および肺腺癌）、リンパ腫、中皮腫、肥満細胞腫、黒色腫、多発性骨髄腫、上咽頭がん、非ホジキンリンパ腫、Bー慢性リンパ性白血病、ヘアリー細胞白血病、急性リンパ性白血病（ALL）およびバーキットリンパ腫、卵巣がん、膵がん、腹膜、網および腸間膜のがん、咽頭がん、前立腺がん、直腸がん、腎がん、皮膚がん、小腸がん、軟組織がん、固形腫瘍、滑膜肉腫、胃がん、精巣がん、甲状腺がんならびに尿管がんのいずれかを含む任意のがんであり得る。

10

【0221】

用語「処置する」および「予防する」ならびにそれらから派生した単語は、本明細書で使用する場合、100%または完全な処置または予防を必ずしも意味しない。むしろ、当業者が潜在的な有益な効果または治療効果を有すると認識する、種々の程度の処置または予防が存在する。これに関して、この方法は、任意の量または任意のレベルの、哺乳動物におけるがんの処置または予防を提供し得る。

【0222】

さらに、この方法によって提供される処置または予防には、処置または予防されているがんなどの疾患の1または複数の状態または症状の処置または予防が含まれ得る。また、本明細書の目的のために、「予防」は、疾患、またはその症状もしくは状態の発病を遅延させることを包含し得る。

20

【0223】

別の実施形態は、哺乳動物におけるがんの存在を検出する方法であって、（a）哺乳動物由来の1または複数の細胞を含む試料を、CAR、核酸、組換え発現ベクター、宿主細胞、細胞の集団、抗体および／もしくはその抗原結合性部分、または医薬組成物と接触させ、それによって、複合体を形成するステップ、ならびに（b）複合体を検出するステップであって、複合体の検出が、哺乳動物におけるがんの存在を示す、ステップを含む方法を提供する。

30

【0224】

試料は、任意の適切な方法、例えば、生検または剖検によって得られ得る。生検は、個体からの組織および／または細胞の取り出しである。かかる取り出しは、取り出された組織および／または細胞に対する実験を実施するために、個体から組織および／または細胞を収集することであり得る。この実験には、個体がある特定の状態もしくは疾患状態を有するかどうか、および／またはある特定の状態もしくは疾患状態に罹患しているかどうかを決定するための実験が含まれ得る。状態または疾患は、例えば、がんであり得る。

【0225】

哺乳動物における増殖障害、例えばがんの存在を検出する方法の実施形態に関して、哺乳動物の細胞を含む試料は、細胞全体、その溶解物、または細胞全体溶解物の画分、例えば、核もしくは細胞質画分、タンパク質全体画分、または核酸画分を含む試料であり得る。試料が細胞全体を含む場合、これらの細胞は、哺乳動物の任意の細胞、例えば、血液細胞または内皮細胞を含む任意の臓器または組織の細胞であり得る。

40

【0226】

接触させるステップは、哺乳動物に関して *in vitro* または *in vivo* で起こり得る。好ましくは、接触させるステップは、*in vitro* である。

【0227】

また、複合体の検出は、当該分野で公知の多くの方法によって行われ得る。例えば、本明細書に記載される、本明細書に開示されるCAR、ポリペプチド、タンパク質、核酸、組換え発現ベクター、宿主細胞、細胞の集団、または抗体もしくはその抗原結合性部分は、

50

検出可能な標識、例えば、上に開示される放射性同位体、フルオロフォア（例えば、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、フィコエリトリン（PE））、酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ）および元素粒子（例えば、金粒子）などで標識され得る。

【0228】

標的細胞を認識する能力および抗原特異性についてCARを試験する方法は、当該分野で公知である。例えば、Clayら、J. Immunol. 163巻：507～513頁（1999年）は、サイトカイン（例えば、インターフェロン- γ 、顆粒球／単球コロニー刺激因子（granulocyte/monocyte colony stimulating factor）（GM-CSF）、腫瘍壊死因子 α （TNF- α ）またはインターロイキン2（IL-2））の放出を測定する方法を教示している。さらに、CAR機能は、Zhaoら、J. Immunol. 174巻：4415～4423頁（2005年）に記載されるように、細胞傷害性の測定によって評価され得る。

10

【0229】

別の実施形態は、本発明のCAR、核酸、組換え発現ベクター、宿主細胞、細胞の集団、抗体もしくはその抗原結合性部分、および／または医薬組成物の使用、哺乳動物におけるがんなどの増殖障害の処置または予防を提供する。がんは、本明細書に記載されるがんのいずれかであり得る。

【0230】

局所および全身投与を含む任意の投与方法が、開示された治療剤のために使用され得る。例えば、外用、経口、静脈内などの血管内、筋内、腹腔内、鼻腔内、皮内、くも膜下腔内および皮下投与が使用され得る。特定の投与様式および投薬レジメンは、症例の特徴（例えば、対象、疾患、関与する疾患状態、および処置が予防的かどうか）を考慮して、担当の臨床医によって選択される。1よりも多い薬剤または組成物が投与されている場合、1または複数の投与経路が使用され得る；例えば、化学療法剤は、経口投与され得、抗体もしくは抗原結合性断片またはコンジュゲートまたは組成物は、静脈内投与され得る。投与方法には、CAR、CAR T細胞、コンジュゲート、抗体、抗原結合性断片または組成物が、非毒性の医薬的に許容される担体、例えば、水、食塩水、リンゲル溶液、デキストロース溶液、5%ヒト血清アルブミン、固形油、オレイン酸エチルまたはリポソーム中に提供される注射が含まれる。一部の実施形態では、開示された化合物の局所投与は、例えば、腫瘍が除去された組織の領域、または腫瘍発達の傾向があると疑われる領域に、抗体または抗原結合性断片を適用することによって使用され得る。一部の実施形態では、治療有効量の抗体または抗原結合性断片を含む医薬調製物の持続性の腫瘍内（または腫瘍近傍）放出が有益であり得る。他の例では、コンジュゲートが、角膜に点眼薬として外用で、または目に硝子体内で適用される。

20

30

【0231】

開示された治療剤は、正確な投薬量の個々の投与に適切な単位剤形で製剤化され得る。さらに、開示された治療剤は、単一の用量でまたは複数用量のスケジュールで投与され得る。複数用量のスケジュールは、処置の主要な過程が、1よりも多い別々の用量、例えば1～10用量と、その後の、組成物の作用を維持または強化するために必要に応じて引き続く時間間隔で与えられる他の用量とによるものであり得るスケジュールである。処置は、数日～数カ月またはさらには数年の期間にわたる、1日用量または複数の1日用量の化合物（複数可）を含み得る。したがって、投薬レジメンはまた、処置される対象の特定の要求に基づいて少なくとも一部決定され、投与する実務者の判断に依存する。

40

【0232】

抗体またはコンジュゲートの典型的な投薬量は、約0.01～約30mg/kg、例えば、約0.1～約10mg/kgの範囲であり得る。

【0233】

特定の例では、対象には、複数の1日投薬スケジュールで、例えば、少なくとも2連続日、10連続日など、例えば、数週間、数カ月または数年の期間にわたって、コンジュゲ

50

ト、抗体、組成物、CAR、CAR T細胞またはさらなる薬剤のうち1または複数を含む治療組成物が投与される。一例では、対象には、少なくとも30日、例えば、少なくとも2カ月、少なくとも4カ月、少なくとも6カ月、少なくとも12カ月、少なくとも24カ月または少なくとも36カ月の期間にわたって、コンジュゲート、抗体、組成物またはさらなる薬剤が投与される。

【0234】

一部の実施形態では、開示された方法は、開示された抗体、抗原結合性断片、コンジュゲート、CARまたはCARを発現するT細胞と組み合わせて、手術、放射線療法および／または化学療法薬を（例えば、連続的に、実質的に同時にまたは同時に）対象に提供することを含む。かかる薬剤および処置の方法および治療的投薬量は、当業者に公知であり、熟練の臨床医によって決定され得る。さらなる薬剤についての調製および投薬スケジュールは、製造業者の指示に従って使用され得る、または当業者によって実験的に決定される通りであり得る。かかる化学療法についての調製および投薬スケジュールは、Chemotherapy Service、(1992年) M. C. Perry編、Williams & Wilkins、Baltimore、Mdにも記載されている。

【0235】

一部の実施形態では、併用治療は、治療有効量のさらなるがん阻害剤の、対象への投与を含み得る。併用治療で使用され得るさらなる治療剤の非限定的な例には、微小管結合剤、DNAインターカレーターまたはクロスリンカー、DNA合成阻害剤、DNAおよびRNA転写阻害剤、抗体、酵素、酵素阻害剤、遺伝子調節因子ならびに血管新生阻害剤が含まれる。これらの薬剤（治療有効量で投与される）および処置は、単独でまたは組み合わせて使用され得る。例えば、任意の適切な抗がん剤または抗血管新生剤は、本明細書に開示されるCAR、CAR-T細胞、抗体、抗原結合性断片またはコンジュゲートと組み合わせて投与され得る。方法およびかかる薬剤の治療的投薬量は、当業者に公知であり、熟練の臨床医によって決定され得る。

【0236】

さらなる化学療法剤には、アルキル化剤、例えば、ナイトロジェンマスタード（例えば、クロラムブシル、クロルメチン、シクロホスファミド、イホスファミドおよびメルファラン）、ニトロソウレア（例えば、カルムスチン、ホテムスチン、ロムスチンおよびストレプトゾシン）、白金化合物（例えば、カルボプラチン、シスプラチン、オキサリプラチンおよびBBR3464）、ブスルファン、ダカルバジン、メクロレタミン、プロカルバジン、テモゾロミド、チオテパおよびウラムスチン（uramustine）；代謝拮抗薬、例えば、葉酸（例えば、メトトレキサート、ペメトレキセドおよびラルチトレキセド）、プリン（例えば、クラドリビン、クロファラビン、フルダラビン、メルカプトプリンおよびチオグアニン）、ピリミジン（例えば、カペシタビン）、シタラビン、フルオロウラシルおよびゲムシタビン；植物アルカロイド、例えば、ポドフィルム（例えば、エトポシドおよびテニポシド）、タキサン（例えば、ドセタキセルおよびパクリタキセル）、ビンカ（例えば、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシンおよびビノレルビン）；細胞傷害性／抗腫瘍抗生物質、例えば、アントラサイクリンファミリーのメンバー（例えば、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、ミトキサントロンおよびバルルビシン）、ブレオマイシン、リファンピシン、ヒドロキシウレアおよびマイトマイシン；トポイソメラーゼ阻害剤、例えば、トポテカンおよびイリノテカン；モノクローナル抗体、例えば、アレムツズマブ、ベバシズマブ、セツキシマブ、ゲムツズマブ、リツキシマブ、パニツムマブ、ベルツズマブおよびトラスツズマブ；腫瘍親和性感光色素、例えば、アミノレブリン酸、アミノレブリン酸メチル、ポルフィマーナトリウムおよびベルテポルフィン；ならびに他の薬剤、例えば、アリトレチノイン、アルトレタミン、アムサクリン、アナグレリド、三酸化ヒ素、アスパラギナーゼ、アキシチニブ、ベキサロテン、ベバシズマブ、ボルテゾミブ、セレコキシブ、デニロイキンジフチトクス、エルロチニブ、エストラムスチン、ゲフィチニブ、ヒドロキシカルバミド、イマチニブ、ラパチニブ、パゾパニブ、ペントスタチン、マソプロコール、ミトタン、ペグアスパルガーゼ、タモキ

シフェン、ソラフェニブ、スニチニブ、ベムラフェニブ（vemurafenib）、バンデタニブおよびトレチノインが含まれるがこれらに限定されない。かかる薬剤の選択および治療的投薬量は、当業者に公知であり、熟練の臨床医によって決定され得る。

【0237】

併用療法は、相乗作用を提供し得、相乗的であることが証明され得る、即ち、活性成分が一緒に使用される場合に達成される効果は、それらの化合物を別々に使用することから生じ得る効果の合計よりも大きい。相乗効果は、活性成分が、（１）共製剤化され、併用される単位投薬製剤と同時に投与もしくは送達される場合；（２）別々の製剤として交互にもしくは並行して送達される場合；または（３）一部の他のレジメンによる場合に、達成され得る。交互に送達される場合、相乗効果は、それらの化合物が、例えば、別々のシリ

10

【0238】

一実施形態では、本明細書に開示された抗原のうち１もしくは複数に特異的に結合する抗体もしくは抗原結合性断片またはそのコンジュゲートの有効量が、抗がん処置後に腫瘍を有する対象に投与される。投与された抗体もしくは抗原結合性断片またはコンジュゲートがそれぞれのがん細胞上で発現された抗原と免疫複合体を形成するのに十分な量の時間が経過した後で、免疫複合体が検出される。免疫複合体の存在（または非存在）は、処置の有効性を示す。例えば、処置の前に採取された対照と比較した免疫複合体の増加は、その処置が有効でないことを示し、処置の前に採取された対照と比較した免疫複合体の減少は、その処置が有効であることを示す。

20

【0239】

F．バイオ医薬組成物

担体（例えば、医薬的に許容される担体）中に、開示されたCAR、またはCARを発現するT細胞、抗体、抗原結合性断片、コンジュゲート、CAR、または本明細書に開示された１もしくは複数の抗原に特異的に結合するCARを発現するT細胞のうち１または複数を含む、遺伝子治療、免疫療法および／または細胞療法における使用のためのバイオ医薬組成物または生物製剤組成物（本明細書で以下「組成物」）が、本明細書で提供される。これらの組成物は、対象への投与のために単位投薬形態で調製され得る。所望の転帰を達成するための投与の量およびタイミングは、処置を行う臨床医の裁量である。これらの組成物は、全身（例えば、静脈内）または局所（例えば、腫瘍内）投与のために製剤化され得る。一例では、開示されたCAR、またはCARを発現するT細胞、抗体、抗原結合性断片、コンジュゲートは、静脈内投与などの非経口投与のために製剤化される。本明細書に開示されるCAR、またはCARを発現するT細胞、コンジュゲート、抗体もしくは抗原結合性断片を含む組成物は、腫瘍、例えば、限定としてではなく、神経芽細胞腫の、例えば、処置および検出などのために使用される。一部の例では、これらの組成物は、癌の処置または検出に有用である。本明細書に開示されるCAR、またはCARを発現するT細胞、コンジュゲート、抗体もしくは抗原結合性断片を含む組成物は、例えば、病理学的血管新生の検出にも使用される。

30

40

【0240】

投与のための組成物には、水性担体などの医薬的に許容される担体中に溶解されたCAR、またはCARを発現するT細胞、コンジュゲート、抗体もしくは抗原結合性断片の溶液が含まれ得る。例えば緩衝食塩水などの種々の水性担体が使用され得る。これらの溶液は無菌であり、一般に、望ましくない物質を含まない。組成物は、従来の周知の無菌化技術によって無菌化され得る。組成物は、生理学的条件に近づくのに必要な医薬的に許容される補助的物質、例えば、pH調整剤および緩衝剤、毒性調整剤、アジュバント薬剤など、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなどを含有し得る。これらの製剤中のCAR、またはCARを発現するT細胞、抗体もしくは抗原結合性断片またはコンジュゲートの濃度は、広く変動し得、選択された特定

50

の投与様式および対象の要求に従って、液量、粘度、体重などに主に基づいて選択される。遺伝子治療、免疫療法および／または細胞療法における使用のためのかかる投薬形態を調製する実際の方法は、当業者に公知であり、または明らかとなる。

【0241】

静脈内投与のための典型的な組成物は、1日当たり対象1人当たり約0.01～約30 mg/kgの抗体もしくは抗原結合性断片またはコンジュゲート（あるいは対応する用量のCAR、またはCARを発現するT細胞、抗体もしくは抗原結合性断片を含むコンジュゲート）を含む。投与可能な組成物を調製するための実際の方法は、当業者に公知または明らかであり、Remington's Pharmaceutical Science、第19版、Mack Publishing Company、Easton、PA（1995年）などの刊行物中により詳細に記載されている。

10

【0242】

CAR、またはCARを発現するT細胞、抗体、抗原結合性断片、またはコンジュゲートは、凍結乾燥形態で提供され得、投与前に無菌水で再水和され得るが、これらは、既知の濃度の無菌溶液中でも提供される。次いで、CAR、またはCARを発現するT細胞、抗体もしくは抗原結合性断片またはコンジュゲートの溶液が、0.9%塩化ナトリウム、USPを含有する注入バッグに添加され、一部の場合には、0.5～15 mg/体重kgの投薬量で投与される。抗体または抗原結合性断片およびコンジュゲート薬物の投与では、当該分野でかなりの経験が利用可能である；例えば、抗体薬物は、1997年のRituxan（登録商標）の承認以降、米国で市販されている。CAR、またはCARを発現するT細胞、抗体、抗原結合性断片およびそれらのコンジュゲートは、静注または静脈内ボラスではなく、緩徐な注入によって投与され得る。一例では、より高い負荷用量が、より低いレベルで投与される引き続く維持用量と共に投与される。例えば、4 mg/kgの初期負荷用量の抗体または抗原結合性断片（または対応する用量の、抗体もしくは抗原結合性断片を含むコンジュゲート）が、およそ90分の期間にわたって注入され得、その後、以前の用量が十分に忍容された場合に30分の期間にわたって注入される4～8週間にわたる2 mg/kgの毎週の維持用量が注入され得る。

20

【0243】

制御放出非経口製剤は、インプラント、油性注射として、または粒状の系として作製され得る。タンパク質送達系の広い概説については、Banga, A. J., Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, PA（1995年）を参照のこと。粒状の系には、ミクロスフェア、マイクロ粒子、マイクロカプセル、ナノカプセル、ナノスフェアおよびナノ粒子が含まれる。マイクロカプセルは、中心コアとして、細胞毒または薬物などの治療的タンパク質を含有する。ミクロスフェアでは、治療薬は、粒子の至る所に分散される。約1 μmよりも小さい粒子、ミクロスフェアおよびマイクロカプセルは一般に、それぞれ、ナノ粒子、ナノスフェアおよびナノカプセルと呼ばれる。毛細管は、ナノ粒子だけが静脈内投与されるように、およそ5 μmの直径を有する。マイクロ粒子は、典型的には、直径がおよそ100 μmであり、皮下または筋肉内投与される。例えば、Kreuter, J., Colloidal Drug Delivery Systems, J. Kreuter編、Marcel Dekker, Inc., New York, NY、219～342頁（1994年）；ならびにTiceおよびTabibi, Treatise on Controlled Drug Delivery, A. Kydonieus編、Marcel Dekker, Inc. New York, NY、315～339頁（1992年）を参照のこと。

30

40

【0244】

ポリマーは、本明細書に開示されるCAR、またはCARを発現するT細胞、抗体もしくは抗原結合性断片またはコンジュゲート組成物のイオン制御された放出のために使用され得る。制御された薬物送達に使用される種々の分解性および非分解性ポリマーマトリック

50

スは、当該分野で公知である (Langer, Accounts Chem. Res. 26 巻: 537~542 頁、1993 年)。例えば、ブロックコポリマーである poloxamer 407 は、低温で粘性であるがなお可動性の液体として存在するが、体温では半流動性ゲルを形成する。これは、組換えインターロイキン-2 およびウレアーゼの製剤化および持続性送達のための有効なビヒクルであることが示されている (Johnston ら、Pharm. Res. 9 巻: 425~434 頁、1992 年; および Pecra ら、J. Parent. Sci. Tech. 44 巻 (2 号): 58~65 頁、1990 年)。あるいは、ヒドロキシアパタイトが、タンパク質の制御された放出のための微小担体として使用されてきた (Ijntema ら、Int. J. Pharm. 112 巻: 215~224 頁、1994 年)。さらに別の態様では、リポソームが、脂質カプセル化薬物の制御された放出および薬物標的化に使用される (Betageri ら、Liposome Drug Delivery Systems, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA (1993 年))。治療的タンパク質の制御された送達のための多数のさらなる系が公知である (米国特許第 5,055,303 号; 米国特許第 5,188,837 号; 米国特許第 4,235,871 号; 米国特許第 4,501,728 号; 米国特許第 4,837,028 号; 米国特許第 4,957,735 号; 米国特許第 5,019,369 号; 米国特許第 5,055,303 号; 米国特許第 5,514,670 号; 米国特許第 5,413,797 号; 米国特許第 5,268,164 号; 米国特許第 5,004,697 号; 米国特許第 4,902,505 号; 米国特許第 5,506,206 号; 米国特許第 5,271,961 号; 米国特許第 5,254,342 号および米国特許第 5,534,496 号を参照のこと)。

【0245】

G. キット

一態様では、本明細書に開示される CAR を使用するキットもまた提供される。例えば、対象における腫瘍を処置するためのキットまたは本明細書に開示される CAR のうち 1 もしくは複数を発現する CAR T 細胞を作製するためのキット。キットは、典型的には、本明細書に開示される、開示された抗体、抗原結合性断片、コンジュゲート、核酸分子、CAR または CAR を発現する T 細胞を含む。開示された抗体、抗原結合性断片、コンジュゲート、核酸分子、CAR または CAR を発現する T 細胞のうち 1 よりも多くが、キット中に含まれ得る。

【0246】

キットは、コンテナ、およびコンテナ上のまたはコンテナに関連したラベルまたは添付文書を含み得る。適切なコンテナには、例えば、瓶、バイアル、シリンジなどが含まれる。コンテナは、ガラスまたはプラスチックなどの種々の材料から形成され得る。コンテナは、典型的には、開示された抗体、抗原結合性断片、コンジュゲート、核酸分子、CAR または CAR を発現する T 細胞のうち 1 または複数を含む組成物を保持する。いくつかの実施形態では、コンテナは、無菌アクセスポートを有し得る (例えば、コンテナは、皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグまたはバイアルであり得る)。ラベルまたは添付文書は、その組成物が特定の状態を処置するために使用されることを示す。

【0247】

ラベルまたは添付文書は、典型的には、例えば、腫瘍を処置もしくは予防する方法、または CAR T 細胞を作製する方法における、開示された抗体、抗原結合性断片、コンジュゲート、核酸分子、CAR または CAR を発現する T 細胞の使用のための指示書をさらに含む。添付文書は、典型的には、治療的製品の使用に関する、適応症、用法、投薬量、投与、禁忌および／またはかかる警告についての情報を含む、治療的製品の市販の包装中に習慣的に含まれる指示書を含む。教材は、電子的形態 (例えば、コンピューターディスクセットまたはコンパクトディスク) で書かれ得、または視覚的 (例えば、動画ファイル) であり得る。キットは、キットが設計される特定の適用を容易にするためのさらなる構成要素もまた含み得る。したがって、例えば、キットは、標識を検出する手段 (例えば、酵素

標識のための酵素基質、蛍光標識を検出するためのフィルターセット、二次抗体などの適切な二次標識など)をさらに含み得る。キットは、特定の方法の実施のために慣用的に使用される緩衝液および他の試薬をさらに含み得る。かかるキットおよび適切な内容物は、当業者に周知である。

【実施例】

【0248】

本発明は以下の実施例によってさらに例証され、これらの実施例は決して本発明の範囲に制約を課すものとして解釈すべきではない。反対に、その様々な他の実施形態、変更形態、および均等物に頼らなければならない、これらは本明細書の記載を読んだ後、本発明の精神および／または添付の特許請求の範囲から逸脱せずに、当業者の念頭に浮かび得ることは容易に理解される。

【0249】

実施例1

メソセリン抗原結合性ドメインの同定

ファージディスプレイした完全ヒト s c F v ライブラリーからのメソセリン特異的抗体の単離

材料および方法：

a) ファージディスプレイしたヒト s c F v メソセリン特異的抗体の産生

50人の健康なドナーの末梢血B細胞から構築されたナイーブヒト s c F v (免疫グロブリンの組換え単鎖断片可変) ファージディスプレイライブラリー (およそその多様性、1010種の独自の特異性) (Z. Y. Z h u および D. S. D i m i t r o v、未公開データ) を、組換えヒトメソセリンに特異的な s c F v の選択に使用した。ファージディスプレイした s c F v 1012種の増幅されたライブラリーを、体積 $5 \times 100 \mu\text{l}$ のコーティングされたメソセリン5、3、および $1 \mu\text{g}$ とともにインキュベートし、第1、第2および第3のラウンドそれぞれのバイオパニング中に96ウェルプレートのウェル5つに等しく分配し室温で2時間置いた。各ラウンドのインキュベーション後に、0.05% T w e e n 20を含むリン酸緩衝生理食塩水 (P B S T) で、第1のラウンドでは5回、その後のラウンドでは10回ウェルを洗浄して非特異的に結合したファージを除去し、結合したファージを T G 1 コンピテント細胞と 37°C で1時間混合し、感染させた細胞からファージを増幅させて次のラウンドのバイオパニングに使用した。第3のラウンドのバイオパニング後、感染させた T G 1 細胞から380のクローンをランダムに選び、それぞれを、自動 B i o R o b o t i c s B i o P i c k コロニーピッキングシステム (G e n o m i c S o l u t i o n s、A n n A r b o r、M I) を使用することにより、96ウェルプレート中の、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ カルベニシリンおよび0.2% グルコースを含む2 Y T 培地 $150 \mu\text{l}$ に接種した。細菌培養物が600nmでの光学密度 (O D 600) 0.5に到達した後、感染多重度 (M O I) 10のヘルパーファージ M 13 K 07 および $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ (最終濃度) のカナマイシンを培地に添加し、プレートを振とう機において 250rpm で、 30°C で一晩さらにインキュベートした。ファージ上清を体積比4:1で、P B S 中3% 脱脂乳溶液と混合し、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) に使用して、高メソセリン結合親和性を有する s c F v を提示するファージのクローンを同定した。上清を、96ウェルプレート中で1ウェルあたり50ngのコーティングされた組換えヒトメソセリンとともに室温で2時間インキュベートし、P B S T で5回洗浄し、(4°C で一晩インキュベートした後、P B S 中3% 脱脂乳溶液でブロッキングし、0.05% T w e e n 20を含むP B S で3回洗浄した。) メソセリンに結合したファージを、西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートされたヤギ抗 M 13 抗体を使用して検出した。抗体とともにインキュベートした後、ウェルを洗浄することにより、非特異的に結合した抗体を除去し、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン (T M B) 基質を添加し、450nmでの溶液吸光度 (A 450) を測定した。A 450が1.0を超える、メソセリンに結合したクローンをさらなる特徴決定のために選択した。

【0250】

b) 選択された可溶性 s c F v の発現および精製

選択されたクローンの V H および V L を DNA 配列決定し、独自の配列を有するクローンによりコードされる s c F v を下記のように発現させ、精製した。これらのクローンから抽出されたプラスミドを、H B 2 1 5 1 細胞の形質転換に使用した。新しく形質転換された細胞を含むプレートから単一コロニーを選び、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリンおよび 0.2% グルコースを含む 2 Y T 培地 200 ml に接種し、250 rpm で振とうしながら 37°C でインキュベートした。600 nm での培養物 OD が 0.90 に到達すると、最終濃度 0.5 mM でイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシドを添加し、培養物を 30°C で一晩さらにインキュベートした。8,000 $\times$ g で 20 分間遠心分離した後、細菌ペレットを収集し、0.5 mU ポリミキシン B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を含む P B S 緩衝液に再懸濁した。50 rpm で回転させながら室温で 30 分間インキュベートした後、再懸濁したペレットを 25,000 $\times$ g で 25 分間、4°C で遠心分離し、上清を、N i - N T A 樹脂を使用して供給業者のプロトコール (Q i a g e n) に従って s c F v 精製に使用した。

【0251】

c) E L I S A 結合アッセイ

P B S で $2\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈された組換えヒトメソセリン 50 μl を、96 ウェルプレートに 4°C で一晩コーティングした。H i s および F l a g タグを有する精製された s c F v (上記より) を段階希釈し、標的タンパク質でコーティングされたウェルに添加した。洗浄後、1:3000 に希釈された、H R P とコンジュゲートされた抗 F l a g 抗体を R T で 1 時間添加した。洗浄後、3、3、5、5'-テトラメチルベンジジン (T M B) 基質を添加し、室温で 10 分間インキュベートした後、1 N H₂ S O₄ を添加して反応を停止させ、O. D. を 450 nm で読み取って、s c F v の、メソセリンに結合する相対的能力を定量化した。

【0252】

結果：

E L I S A 結合アッセイの結果に基づき、組換えヒトメソセリンに特異的な別々の s c F s クローン 4 種を同定し、それぞれヒト抗メソセリン S c F v バインダー M H 1 P、M H 2 P、M H 6 P および M 1 - 4 S と標識した。M H 1 P、M H 2 P、M H 6 P および M 1 - 4 S ヒト抗メソセリン S c F v バインダーを発現するキメラ抗原受容体の生成について、以下の実施例 2 で概説する。

【0253】

実施例 2

抗メソセリン完全ヒト S c F v 結合性配列を発現する C A R

この実施例では、4 種の新規の完全ヒト S c F v バインダー配列由来の抗メソセリン C A R T 細胞について記載する。新規の抗メソセリン C A R T 構築物は、初代ヒト T 細胞における高レベルの発現、およびメソセリン陽性腫瘍細胞に対する特異的かつ強力な細胞溶解活性を実証した。

【0254】

材料および方法：

(a) 細胞株

A 4 3 1 ヒト扁平上皮癌細胞株を、A m e r i c a n T i s s u e C u l t u r e C o l l e c t i o n (A T C C、M a n a s s a s、V A) から購入した。親 A 4 3 1 株およびそのサブクローンを、10% 熱不活化ウシ胎児血清を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (A T C C) で培養した。

【0255】

ホタルルシフェラーゼをコードするレンチウイルスベクター (L e n t i g e n T e c h n o l o g y、I n c.、G a i t h e r s b u r g、M D) を野生型 A 4 3 1 細胞に安定に形質導入し、その後限界希釈してルシフェラーゼ陽性クローンを選択することで、ルシフェラーゼを発現する A 4 3 1 サブクローンを生成した。同様に、A 4 3 1 - M S L

10

20

30

40

50

Nサブクローンは、ヒトメソセリン遺伝子アイソフォーム1 (RefSeq ID NM_005823.4) をコードするレンチウイルスベクターをA431ルシフェラーゼ陽性クローンに形質導入し、その後メソセリン陽性クローンを選択することで得られた。

【0256】

(b) キメラ抗原受容体 (CAR) の創出－発現ベクター

CARの抗原結合性ドメイン、scFv、配列は、ヒト抗メソセリンScFvバインダーMH1P、MH2P、MH6PおよびM1-4Sに由来していた。バインダーscFvをインフレームで、CD8a連結および膜貫通ドメイン (UniProt配列ID P01732、aa 138-206)、次いで4-1BB (CD137、aa 214-255、UniProt配列ID Q07011) シグナル伝達ドメインおよびCD3ゼータシグナル伝達ドメイン (CD247、aa 52-163、Ref配列ID: NP_000725.1) に連結することにより、CAR T構築物を生成した。CAR構築物配列を第3世代のレンチウイルスプラスミド骨格 (Lentigen Technology Inc.、Gaithersburg、MD) にクローニングした。HEK293T細胞の一過性トランスフェクションによりレンチウイルスベクター (LV) を含む上清を生成し、レンチウイルスベクターを含む上清を遠心処理することによりベクターをペレットにして、-80℃で保存した。

【0257】

(c) 初代T細胞精製および形質導入

正常なドナー由来のヒト初代T細胞を、製造業者のプロトコール (Miltenyi Biotec、Bergisch Gladbach、Germany) に従って、CD4+およびCD8+細胞を免疫磁性ビーズで選択した後にバフィーコートから精製し、密度0.3~2×10⁶細胞/mlで、40 IU/ml IL-2を添加したTexMACS培地で培養し、CD3/CD28MACS (登録商標) GMP TransAct試薬 (Miltenyi Biotec) で活性化し、3日目に10 µg/ml 硫酸プロタミン (Sigma-Aldrich、St. Louis、MO) 存在下で一晩、CAR構築物をコードするレンチウイルスベクターを形質導入し、4日目に培地を交換した。5日目に、200 IU/ml IL-2を添加したTexMACS培地に培養物を移し、10~13日目の採取まで繁殖させた。

【0258】

(d) 免疫エフェクターアッセイ (CTLおよびサイトカイン)

細胞媒介性の細胞傷害性を決定するため (CTLアッセイ)、ホタルルシフェラーゼが安定に形質導入された標的細胞5,000個を種々のエフェクター対標的比でCAR T細胞と組み合わせ、一晩インキュベートした。SteadyGlo試薬 (Promega、Madison WI) を各ウェルに添加し、生じた発光を秒あたりのカウントとして定量化した (試料CPS)。標的のみのウェル (最大CPS) および1% Tween-20を加えた標的のみのウェル (最小CPS) を使用してアッセイ範囲を決定した。特異的な溶解のパーセントを $(1 - (\text{試料CPS} - \text{最小CPS}) / (\text{最大CPS} - \text{最小CPS}))$ として算出した。

【0259】

(e) フローサイトメトリー分析。

細胞染色では、CAR T形質導入細胞50万個を培養物から採取し、0.5% ウシ血清アルブミン (Miltenyi Biotec) を添加した低温のAutoMACS緩衝液で2回洗浄して、1:200希釈のF(ab')₂断片-PEヤギ抗ヒトIgG試薬 (Jackson ImmunoResearch Laboratories、West Grove、PA) で染色し、4℃で30分間インキュベートすることによりCAR表面発現を検出した。陰性対照として非形質導入細胞を使用した。全ての研究で、死滅した細胞は7AAD染色 (BD Biosciences、San Jose、CA) により除外した。細胞を2回洗浄し、フローサイトメトリーによる定量分析前に染色緩衝液200 µlで再懸濁させた。MACSQuant (登録商標) 10 Analyzer (Milte

10

20

30

40

50

ny i B i o t e c) でフローサイトメトリー分析を実施し、M A C S Q u a n t i f y ソフトウェア (M i l t e n y i B i o t e c) を使用してデータプロットを生成した。

【0260】

結果：

新規の抗メソセリン完全ヒト S c F v 結合性配列を評価するため、配列 M H 1 P、M H 2 P、M H 6 P または M 1 - 4 S のうち各 1 つを腫瘍抗原結合性ドメインとして組み込む C A R 構築物を設計した。各 C A R 設計では、腫瘍標的化ドメインの後に、ヒト C D 8 タンパク質由来のリンカーおよび膜貫通ドメイン、4 - 1 B B 共刺激ドメインならびに C D 3 ゼータシグナル伝達ドメインが続いた (表 1)。

【0261】

【表 1】

表 1: メソセリンを標的化する C A R 構築物のリスト

pLTG1901 Efla MH1P -CD8TM-4-1BB-CD3 ゼータ
pLTG1902 : Efla MH2P -CD8TM-4-1BB-CD3 ゼータ
pLTG1903 : Efla- MH6P -CD8TM-4-1BB-CD3 ゼータ
pLTG1904 : Efla- M1-4S -CD8TM-4-1BB-CD3 ゼータ

【0262】

抗メソセリンキメラ抗原受容体が形質導入された T 細胞は、表面発現および細胞溶解活性を実証する。

【0263】

a) 抗メソセリン C A R の表面発現

4 種の新規の抗メソセリン C A R を評価するため、ヒト E f l a プロモーターの制御下で、C A R 構築物 M H 1 P、M H 2 P、M H 6 P および M 1 - 4 S をコードするレンチウイルスベクター (L V) を、材料および方法に記載されるように生成した。次いで、2 人の別々の健康なドナー由来のヒト初代 T 細胞に、C A R をコードする 4 種のレンチウイルスベクターを形質導入した。同じドナー由来の非形質導入細胞 (モック) または同じドナー由来の G F P 形質導入細胞は、陰性対照として機能した。

【0264】

培養 0 日目に、材料および方法に記載されるように、I L - 2 の存在下で T r a n s A c t C D 3 C D 2 8 試薬で T 細胞を活性化した。培養 10 日目に、T 細胞表面における抗メソセリン C A R の発現をやぎ抗ヒト F (a b ') 2 - P E 試薬により検出し、フローサイトメトリーにより分析した。抗メソセリン C A R 構築物 p L T G 1 9 0 2 および p L T G 1 9 0 4 は、高い表面 C A R 発現を実証した。予想外に、この方法では構築物 p L T G 1 9 0 1 および p L T G 1 9 0 3 を T 細胞表面で検出することができなかった。

【0265】

b) 抗メソセリン C A R の細胞溶解アッセイ

生成された C A R T 細胞の細胞溶解機能を実証するため、ヒトメソセリンを安定に発現する A 4 3 1 - M S L N 株を使用して、ルシフェラーゼベースの死滅アッセイを実施した。メソセリン陰性である A 4 3 1 親株を、死滅特異性対照として使用した。C A R T 細胞および標的細胞をエフェクター対標的 (E : T) 比 20、10 および 5 で組み合わせ、一晚コインキュベートして、次いで材料および方法に記載されるように、発光により細胞死

10

20

30

40

50

滅を評価した（図3）。CAR T構築物pLTG1902、pLTG1903およびpLTG1904は、A431-MSLN株に対して強い、比に依存的な細胞毒性を示したが、陰性対照GFP構築物pLTG1398、およびモック（同じドナー由来の非形質導入T細胞）は細胞溶解性ではなかった。また、メソセリン陰性A431株でも細胞溶解が観察されず、観察された死滅効果がメソセリン特異的であることが示された。特に、CAR pLTG1901はT細胞表面で検出されず（図2）、A431-MSLN細胞に対して細胞溶解活性を示さなかった。一方、こちらもフローサイトメトリーでT細胞表面において検出されなかったCAR pLTG1903はA431-MSLN株に対する強い細胞毒性を実証し、この構築物がT細胞内でも発現されることが示唆された。CAR pLTG1903で得られた結果は、細胞表面発現と、*in vitro*での腫瘍細胞死滅能力との相関関係が予測不可能であることを実証した。

10

【0266】

要約すれば、新規の完全ヒト抗メソセリンCAR構築物pLTG1902、pLTG1903およびpLTG1904の高い機能性（表2）が実証された。構築物pLTG1901は、フローサイトメトリーで検出可能な表面発現がなかったことと一致して、細胞溶解効果を有しなかった。

【0267】

【表2】

表2—発現および機能の概要-抗メソセリン ScFv CAR

20

実験群	発現	細胞溶解
モック(非形質導入対照)	検出されず	なし
pLTG1398 GFP	N/A/検出されず	なし
pLTG1901 CAR	検出されず	なし
pLTG1902 CAR	高	高
pLTG1903 CAR	検出されず	高
pLTG1904 CAR	高	高

30

【0268】

本文中に引用したそれぞれの出願と特許、および（訴訟中のそれぞれの交付済特許、「出願引用文書」を含めた）それぞれの出願と特許中で引用されたそれぞれの文書または参考文献、およびこれらの出願と特許のいずれかに対応するおよび／またはその優先権を主張するそれぞれのPCTと外国出願または特許、およびそれぞれの出願引用文書中で引用もしくは参照されたそれぞれの文書は、ここで明確に参照により本明細書に組み込まれ、本発明を実施する際に利用することができる。より一般的には、文書または参考文献は本文中、特許請求の範囲の前の参考文献一覧中、または本文自体中のいずれかに引用され、それぞれのこれらの文書または参考文献（「本明細書中引用参考文献」）、および（任意の製造者の仕様書、説明書などを含めた）それぞれの本明細書中引用参考文献中に引用されたそれぞれの文書または参考文献は、ここで明確に参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0269】

一部の具体的実施形態の前述の記載によって、他者が、本発明の知識を適用することによって、一般的概念から逸脱せずに、具体的実施形態などの様々な適用例に関して容易に変更または適合させることができるのに十分な情報を与え、したがってこのような適合および変更形態は、開示した実施形態の均等物の意味および範囲内と理解すべきであり、理解することが意図されている。本明細書で利用する語句または述語は、限定の目的ではなく

50

記載の目的であることは理解される。図面および記載中、例示的实施形態を開示しており、特異的用語が利用された可能性はあるが、他に言及しない限り、それらは限定の目的ではなく一般のおよび叙述的な意味でのみ使用され、したがって特許請求の範囲もそのように限定されない。さらに当業者は、本明細書で論じた方法の、ある特定ステップは別の順序で順に並べることができ、またはステップを組み合わせてすることができることを理解する。したがって、添付の特許請求の範囲は本明細書で開示した詳細な実施形態に限られないことが意図される。当業者は、ごく普通の実験を使用した、本明細書に記載した本発明の実施形態の多くの均等物を理解し、把握することができる。このような均等物は以下の特許請求の範囲によって包含される。

【0270】

配列表への参照

本出願は、タイトル「配列表」のPDFファイルにより、アメリカ合衆国特許商標庁に電子的に提出された配列表を含む。配列表は参照により組み込まれる。

【0271】

本開示の配列

以下に列挙する核酸およびアミノ酸配列は、37 C. F. R. 1. 822で規定されるように、ヌクレオチド塩基用の標準的な略語、およびアミノ酸用の3文字コードを使用して示される。各核酸配列のうち一方の鎖のみが示されているが、相補鎖は、示される鎖を参照することによって含まれるものと理解される。添付の配列表では：

配列番号1は、メソセリン抗原ScFv結合性ドメインMH1Pのヌクレオチド配列である。

```
caggtacagctgcagcagtcaggtccaggactggtgaagccctcgcggaccctc
tcactcacctgtgccatctccggggacagtgtctctagcaacagtgtgcttggaactgg
atcaggcagtcacccatcgagaggccttgagtggctgggaaggacatactacaggtccaag
tggtataatgattatgcagtatctgtgaaaagtcgaataaccatcaaccagacacatcc
aagaaccagttctccctgcagctgaactctgtgactcccaggacacggctgtgtattac
tgtgcaagaggggaagggtggtgaagaagggtggtgcttttgatatctggggccaagggaca
atggtcaccgtctcttcaggaggtggcgggtctggtggaggcggtagcggcggtggcgga
tcctctcttgagctgactcaggaccctgctgtgtctgtggccttgggacagacagtcagg
atcacatgccaaaggagacagcctcagaagctattatgcaagctggtaccagcagaagcca
ggacaggctcctgtacttgtcatctatggtaaaaacaaccggccctcagggatcccagac
cgattctctggctcctcctcaggcaacacagcttccttgacctcactggggctcaggcg
gaagatgagggtgaatattactgtagctccagcactcgtaatcatgtgttcttcggcaga
Gggaccaagggtcacccgtcctaggt
```

配列番号2は、メソセリン抗原ScFv結合性ドメインMH1Pのアミノ酸配列である。

```
Q V Q L Q S G P G L V K P S R T L
S L T C A I S G D S V S S N S A A W N W
I R Q S P S R G L E W L G R T Y Y R S K
W Y N D Y A V S V K S R I T I N P D T S
K N Q F S L Q L N S V T P E D T A V Y Y
C A R G K G G K K G G A F D I W G Q G T
M V T V S S G G G S G G G S G G G G
S S S E L T Q D P A V S V A L G Q T V R
I T C Q G D S L R S Y Y A S W Y Q Q K P
G Q A P V L V I Y G K N N R P S G I P D
R F S G S S S G N T A S L T I T G A Q A
E D E A E Y Y C S S S T R N H V F F G R
G T K V T V L G
```

配列番号3は、メソセリン抗原ScFv結合性ドメインMH2Pのヌクレオチド配列である。

gaggtgcagctggtgcagctctgggggaggcttggtacagcctggcaggtcccag
 agactctcctgtgcagcctctggattcacctttgatgattatgcatgactgggtccgg
 caagctccaggaaggcctggagtgggtctcaggtattagttggaatagtggtagcata
 ggctatgcggactctgtgaaggccgattcacctatctccagagacaacgccaagaactcc
 ctgtatctgcaaatgaacagctctgagagctgaggacacggccttgattactgtgcaaaa
 gatatttcgtcgtcagctggtaacgcttttgatatctggggccaagggaacatggtcacc
 gtctcttcaggagggtggcgggtctggtggaggcggtagcggcggtggcggtatcctctct
 gagctgactcaggaccctgctgtgtctgtggccttgggacagacagtcaggatcacatgc
 caaggagacagactcagaagctattatgcaagctggtaccagcagaagccaggacaggcc
 cctgtacttgtcatctatggtaaaaacaaccggccctcagggatcccagaccgcttctct
 ggctccgactcaggagacacagcttcccttgaccatcactggggctcaggcggaagatgag
 gctgactattactgtcactcccgtgacagtggtggtaaccatgtggtattcggcgaggagc
 Acccagctgaccgtcctcggt

10

配列番号 4 は、メソセリン抗原 S c F v 結合性ドメイン M H 2 P のアミノ酸配列である。

E V Q L V Q S G G G L V Q P G R S Q
 R L S C A A S G F T F D D Y A M H W V R
 Q A P G K G L E W V S G I S W N S G S I
 G Y A D S V K G R F T I S R D N A K N S
 L Y L Q M N S L R A E D T A L Y Y C A K
 D I S S S A G N A F D I W G Q G T M V T
 V S S G G G G S G G G G S G G G G S S S
 E L T Q D P A V S V A L G Q T V R I T C
 Q G D R L R S Y Y A S W Y Q Q K P G Q A
 P V L V I Y G K N N R P S G I P D R F S
 G S D S G D T A S L T I T G A Q A E D E
 A D Y Y C H S R D S G G N H V V F G G G
 T Q L T V L G

20

配列番号 5 は、メソセリン抗原 S c F v 結合性ドメイン M 1 - 4 S のヌクレオチド配列である。

gaggtccagctggtacagctctgggggaggcttggtacagcctgggggggtccctg
 agactctcctgtgcagcctctggattcacctttgatgattatgcatgactgggtccgg
 caagctccaggaaggcctggagtgggtctcaggtattagttggaatagtggtagcata
 ggctatgcggactctgtgaaggccgattcacctatctccagagacaacgccaagaactcc
 ctgtatctgcaaatgaacagctctgagagctgaggacacggccttgattactgtgcaaaa
 gatttatcgtcagtggtggaccctttaactactggggccagggcacccttggtcaccgtc
 tcctcaggagggtggcgggtctggtggaggcggtagcggcggtggcggtatcctctctgag
 ctgactcaggaccctgctgtgtctgtggccttgggacagacagtcaggatcacatgccaa
 ggagacagcctcagaagctattatgcaagctggtaccagcagaagccaggacaggccctc
 gtacttgtcatctatggtaaaaacaaccggccctcagggatcccagaccgattctctggc
 tccagctcaggaaacacagcttcccttgaccatcactggggctcaggcgaggatgaggct
 gactattactgtaactcccgggacagcagtggttaaccatctggtattcggcgaggagcacc
 Cagctgaccgtcctcggt

30

配列番号 6 は、メソセリン抗原 S c F v 結合性ドメイン M 1 - 4 S のアミノ酸配列である。

E V Q L V Q S G G G L V Q P G G S L
 R L S C A A S G F T F D D Y A M H W V R
 Q A P G K G L E W V S G I S W N S G S I
 G Y A D S V K G R F T I S R D N A K N S
 L Y L Q M N S L R A E D T A L Y Y C A K
 D L S S V A G P F N Y W G Q G T L V T V
 S S G G G G S G G G G S G G G G S S S E

40

50

L T Q D P A V S V A L G Q T V R I T C Q
 G D S L R S Y Y A S W Y Q Q K P G Q A P
 V L V I Y G K N N R P S G I P D R F S G
 S S S G N T A S L T I T G A Q A E D E A
 D Y Y C N S R D S S G N H L V F G G G T
 Q L T V L G

配列番号 7 は、メソセリン抗原 S c F v 結合性ドメイン MH 6 P のヌクレオチド配列である。

caggtccagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtg
 aaggtctcctgcaaggcttctggatacaccttcaccggctactatatgcactgggtgcga
 caggccccctggacaagggttgagtgatgggacggatcaaccctaacagtggtggcaca
 aactatgcacagaagtttcaggggcagggtcaccatgaccaggaacacgtccatcagcaca
 gcctacatggagctgagcaggctgagatctgacgacacggccgtgtattactgtgcgaga
 tccggctactactacgggttgacgtctggggccaagggaccacgggtcaccgtctcctca
 ggaggtggcgggtctggtggaggcggttagcggcggatccagctctgtgttgacg
 cagccgccctcagcgtctgggacccccgggcagcggtcaccatctctgttctggaagt
 cgctccaacatcgaagaacactgtcaactggtatcaacaactcccaggactggcccc
 aaactcatcatccagaggagtgatcagcgccctcagggggtccctgaccgattctctggc
 tccaagtctgtcacctcagcctccctggccatcagtgggctccgggtccgaggatgaggct
 gattattactgcggaacatgggataacagcctgagtgcttatgtcttcggaactgggacc
 aagctgaccgtcctaggt

10

20

配列番号 8 は、メソセリン抗原 S c F v 結合性ドメイン MH 6 P のアミノ酸配列である。

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V
 K V S C K A S G Y T F T G Y Y M H W V R
 Q A P G Q G L E W M G R I N P N S G G T
 N Y A Q K F Q G R V T M T R N T S I S T
 A Y M E L S R L R S D D T A V Y Y C A R
 S G Y Y Y G L D V W G Q G T T V T V S S
 G G G G S G S G G S G G G G S Q S V L T
 Q P P S A S G T P G Q R V T I S C S G S
 R S N I G R N T V N W Y Q Q L P G L A P
 K L I I Q R S D Q R P S G V P D R F S G
 S K S V T S A S L A I S G L R S E D E A
 D Y Y C G T W D N S L S A Y V F G T G T
 K L T V L G

30

配列番号 9 は、リーダー／シグナルペプチド配列のヌクレオチド配列である。

atgctgctgctggtgaccagcctgctgctgtgcgaactgccgcatccggcgtttctgctgattccg

配列番号 10 は、リーダー／シグナルペプチド配列のアミノ酸配列である。

MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP

配列番号 11 は、p L T G 1 9 0 1 E F 1 a M H 1 P — — C D 8 T M — 4 — 1 B B — C
 D 3 ゼータ核酸配列のヌクレオチド配列である。

40

ATGCTGCTGCTGGTGACCGCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTTTCTGCTG
 ATTCCGCAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCGGACCCTC
 TCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGCTGCTTGGAAGTGG
 ATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAA
 G

TGGTATAATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGTCGAATAACCATCAACCCAGACACATCC
 AAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTAC
 TGTGCAAGAGGGAAGGGTGGTAAGAAGGGTGGTGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGAC
 A

50

ATGGTCACCGTCTCTTCAGGAGGTGGCGGGTCTGGTGGAGGCGGTAGCGGCGGTGGCGG
ATCCTCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCA
GG
ATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGCTATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCC
A
GGACAGGCTCCTGTACTTGTCTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGAC
CGATTCTCTGGCTCCTCCTCAGGCAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCG
GAAGATGAGGCTGAATATTACTGTAGCTCCAGCACTCGTAATCATGTGTTCTTCGGCAGA
GGGACCAAGGTCACCGTCTCGGTGCGGCCGCAACTACCACCCCTGCCCTCGGGCCGCG
ACTCCGGCCCCAACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTGCGCCCCGAAGCTTGCCGCCCG
GCCGCGGGTGGAGCCGTGCATACCGGGGGCTGGACTTTGCCTGCGATATCTACATTTGG
GCCCCGCTGGCCGGCACTTGCGGCGTGCTCCTGCTGTGCTGGTCATCACCCCTTTACTGC
AAGAGGGGCCGGAAGAAGCTGCTTTACATCTTCAAGCAGCCGTTTCATGCGGCCCGTGCA
G
ACGACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGCAGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGGATG
C
GAACTGCGCGTCAAGTTCTCACGGTCCGCCGACGCCCCCGCATATCAACAGGGGCCAGAAT
CAGCTCTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCG
A
CGCGGACGCGACCCGGAGATGGGGGGGAAACCACGGCGGAAAAACCTCAGGAAGGAC
TGTAACAACGAACTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTACTCAGAAATCGGGATGAAG
GGA
GAGCGGAGGAGGGGAAAGGGTCACGACGGGCTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACTAA
GGATACCTACGATGCCTTGCATATGCAAGCACTCCCACCCCGG

配列番号 12 は、p L T G 1 9 0 1 E F 1 a M H 1 P - - C D 8 T M - 4 - 1 B B - C
D 3 ゼータアミノ酸配列のアミノ酸配列である。

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPQVQLQQSGPGLVKPSRTLSTCAISGDSVSSNSAAWNW
IRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYY
CARGKGGKKGGAFDIWGGQGTMTVTVSSGGGGSGGGGSSSELTQDPAVSVALGQTVR
ITCQGDLSRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQA
EDEAEYYCSSSTRNHVFFGRGTKVTVLGAAATTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRP
AAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQ
TTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDR
RGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGLYQGLSTA
TK
DTYDALHMQALPPR

配列番号 13 は、p L T G 1 9 0 2 E f 1 a M H 2 P C D 8 T M - 4 - 1 B B - C D
3 ゼータ核酸配列のヌクレオチド配列である（図 2 B）。

ATGCTGCTGCTGGTGACCAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTTTCTGCTG
ATTCCGGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCA
G
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGG
CAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTAGCAT
A
GGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCC
CTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAAA
GATATTTTCGTGCTCAGCTGGTAACGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACC
GTCTCTTCAGGAGGTGGCGGGTCTGGTGGAGGCGGTAGCGGCGGTGGCGGATCCTCTTCT
GAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATCACATGC
CAAGGAGACAGACTCAGAAGCTATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGC

10

20

30

40

50

C
CCTGTACTTGTCATCTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGCTTCTCT
GGCTCCGACTCAGGAGACACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGA
G
GCTGACTATTACTGTCACTCCCGTGACAGTGGTGGTAACCATGTGGTATTCGGCGGAGGC
ACCCAGCTGACCGTCCTCGGTGCGGCCGCAACTACCACCCCTGCCCTCGGGCGCCGACT
CCGGCCCCAACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTGCGCCCCGAAGCTTGCCGCCCGGCC
GCGGGTGGAGCCGTGCATACCGGGGGCTGGACTTTGCCTGCGATATCTACATTTGGGCC
CCGCTGGCCGGCACTTGCGGCGTGCTCCTGCTGTGCTGGTCATCACCCCTTTACTGCAAG
AGGGGCCGGAAGAAGCTGCTTTACATCTTCAAGCAGCCGTTTCATGCGGCCCGTGCAAGC
ACTCAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGAGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGGATGCGA
A
CTGCGCGTCAAGTTCTCACGGTCCGCCGACGCCCCGCATATCAACAGGGCCAGAATCAG
CTCTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGACG
C
GGACGCGACCCGGAGATGGGGGGGAAACCACGGCGGAAAAACCCTCAGGAAGGACTGT
AC
AACGAACTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTACTCAGAAATCGGGATGAAGGGAG
AG
CGGAGGAGGGGAAAGGGTCACGACGGGCTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGA
T
ACCTACGATGCCTTGTCATATGCAAGCACTCCCACCCCGG
配列番号14は、pLTG1902 E f 1 a MH2P CD8TM-4-1BB-CD
3ゼータアミノ酸配列のアミノ酸配列である(図2B)。
MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLVQSGGGLVQPGRSQRLSCAASGFTFDDYAMHWVR
QAPGKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAK
DISSSAGNAFDIWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSSELTQDPAVSVALGQTVRITC
QGDRLSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSDSGDTASLTITGAQAEDE
ADYYCHSRDSGGNHVVFVGGGTQLTVLGAAATTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPA
AGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQT
TQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR
GRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTAT
KD
TYDALHMQALPPR
配列番号15は、pLTG1903 E f 1 a MH6P CD8TM-4-1BB-CD
3ゼータ核酸配列のヌクレオチド配列である(図2C)。
ATGCTGCTGCTGGTGACCGCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTTTCTGCTG
ATTCCGCAGGTCCAGCTGGTGACGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGT
G
AAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCGGCTACTATATGCACTGGGTGCGA
CAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGACGGATCAACCCTAACAGTGGTGGCAC
A
AACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGAACACGTCCATCAGCAC
A
GCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAG
A
TCCGGCTACTACTACGGTTTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
GGAGGTGGCGGGTCTGGTGGAGGCGGTAGCGGCGGTGGCGGATCCAGTCTGTGTTGAC
GCAGCCGCCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCGAGCGGGTCACCATCTCTTGTCTGGAA
GTCGCTCCAACATCGGAAGAAACACTGTCAACTGGTATCAACAACCTCCCAGGACTGGCC

10

20

30

40

50

CCC

AAACTCATCATCCAGAGGAGTGATCAGCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGC
TCCAAGTCTGTACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCT
GATTATTACTGCGGAACATGGGATAACAGCCTGAGTGCTTATGTCTTCGGAACCTGGGACC
AAGCTGACCGTCTCTCGGTGCGGCCGCAACTACCACCCCTGCCCCCTCGGCCGCCGACTCCG
GCCCCAACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTGCGCCCCGAAGCTTGCCGCCCGGCCGCG
GGTGGAGCCGTGCATACCCGGGGGCTGGACTTTGCTGCGATATCTACATTTGGGCCCCG
CTGGCCGGCACTTGCGGCGTGCTCCTGCTGTGCTGGTCATCACCTTTACTGCAAGAGG
GGCCGGAAGAAGCTGCTTTACATCTTCAAGCAGCCGTTTCATGCGGCCCGTGACAGACT
CAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGAGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGGATGCGAACT
G

10

CGCGTCAAGTTCTCACGGTCCGCCGACGCCCCCGCATATCAACAGGGCCAGAATCAGCTC
TACAACGAGCTGAACCTGGGAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGACGCGG
A

CGCGACCCGGAGATGGGGGGGAAACCACGGCGGAAAAACCCTCAGGAAGGACTGTACAA
C

GAACTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTACTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGC
GG

AGGAGGGGAAAGGGTCACGACGGGCTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATAC
C

20

TACGATGCCTTGATATGCAAGCACTCCACCCCGG

配列番号16は、pLTG1903 E f 1 a M H 6 P C D 8 T M - 4 - 1 B B - C D
3ゼータアミノ酸配列のアミノ酸配列である(図2C)。

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVR
QAPGQGLEWMGRINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTNRTSISTAYMELSLRSDDTAVYYC
AR

SGYYYGLDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSS
RSNIGRNTVNWYQQLPGLAPKLIIQRSDQRPSPVPDRFSGSKSVTSASLAISGLRSEDEA
DYCYGTWDNSLSAYVFGTGKLTVLGAAATTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA
GGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT
QEEDGCSCRFPEEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRRG
RDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHGLYQGLSTATK
DT

30

YDALHMQALPPR

配列番号17は、pLTG1904 E f 1 a M 1 - 4 S C D 8 T M - 4 - 1 B B - C
D 3ゼータ核酸配列のヌクレオチド配列である(図2D)。

ATGCTGCTGCTGGTGACCGCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTTTCTGCTG
ATTCCGGAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGG
CAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTAGCAT
A

40

GGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCC
CTGTATCTGCAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAAA
GATTTATCGTCAGTGGCTGGACCTTTAACTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTC
TCCTCAGGAGGTGGCGGGTCTGGTGGAGGCGGTAGCGGCGGTGGCGGATCCTCTTCTGA
G

CTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGATCACATGCCAA
GGAGACAGCCTCAGAAGCTATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCC
T

GTA CT TGT CAT CT AT GGT AAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCAGACCGATTCTCTGGC

50

TCCAGCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAGGATGAGGCT
 GACTATTACTGTAACCTCCCGGGACAGCAGTGGTAACCATCTGGTATTCGGCGGAGGCACC
 CAGCTGACCGTCCTCGGTGCGGCCGCAACTACCACCCCTGCCCCCTCGGCCGCCGACTCCG
 GCCCCAACCATCGCAAGCCAACCCCTCTCCTTGCGCCCCGAAGCTTGCCGCCCGGCCGCG
 GGTGGAGCCGTGCATACCCGGGGGCTGGACTTTGCCTGCGATATCTACATTTGGGCCCCG
 CTGGCCGGCACTTGCGGCGTGCTCCTGCTGTCGCTGGTCATCACCTTTACTGCAAGAGG
 GGCCGGAAGAAGCTGCTTTACATCTTCAAGCAGCCGTTTCATGCGGCCCGTGACAGCAGCT
 CAGGAAGAGGACGGATGCTCGTGCGATTCCCTGAGGAGGAAGAGGGGGGATGCGAACT
 G
 CGCGTCAAGTTCTCACGGTCCGCCGACGCCCCCGCATATCAACAGGGGCCAGAATCAGCTC
 TACAACGAGCTGAACCTGGGAAGGAGAGAGGAGTACGACGTGCTGGACAAGCGACGCGG
 A
 CGCGACCCGGAGATGGGGGGGAAACCACGGCGGAAAAACCCTCAGGAAGGACTGTACAA
 C
 GAACTCCAGAAAGACAAGATGGCGGAAGCCTACTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGC
 GG
 AGGAGGGGAAAGGGTCACGACGGGCTGTACCAGGGACTGAGCACCGCCACTAAGGATAC
 C
 TACGATGCCTTG CATATGCAAGCACTCCCACCCCGG

10

配列番号 18 は、p L T G 1 9 0 4 E f 1 a M 1 - 4 S C D 8 T M - 4 - 1 B B - C
 D 3 ゼータアミノ酸配列のアミノ酸配列である（図 2 D）。

20

MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPEVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVR
 QAPGKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAK
 DLSSVAGPFNYWGQGT LVT VSSGGGGSGGGSGGGSSSELTQDPAVSVALGQTVRITCQ
 GDSLRSYYASWYQKPGQAPV LVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEA
 DYYCNSRDSSGNHLVFGGGTQLTVLGAAATTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAA
 GGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTT
 QEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRG
 RDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATK
 DT

30

YDALHMQALPPR

配列番号 19 は、DNA C D 8 膜貫通ドメインのヌクレオチド配列である。

atctacatct ggcgccctt ggccgggact tgtggggtcc ttctcctgtc actggttatc accctttact gc

配列番号 20 は、C D 8 膜貫通ドメインのアミノ酸配列である。

Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu
 Val Ile Thr Leu Tyr Cys

配列番号 21 は、DNA C D 8 ヒンジドメインのヌクレオチド配列である。

accacgacgc cagcgccgcg accaccaaca ccggcgccca ccatcgcgtc gcagcccctg
 tccctgcgcc cagaggcgtg ccggccagcg gcggggggcg cagtgcacac gagggggctg
 gacttcgcct gtgat

40

配列番号 22 は、C D 8 ヒンジドメインのアミノ酸配列である。

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
 Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
 Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr

配列番号 23 は、C D 8 . アルファ (N C B I R e f S e q : N P . s u b . - - 0 0
 1 7 5 9 . 3) のアミノ酸番号 1 1 8 ~ 1 7 8 ヒンジ領域のアミノ酸配列である。

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

配列番号 24 は、ヒト I g G C L 配列のアミノ酸配列である。

50

Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
 Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
 Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
 Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
 Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
 Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
 Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

配列番号 25 は、4-1BB の DNA シグナル伝達ドメインのヌクレオチド配列である。

aaacggggca gaaagaaact cctgtatata ttcaaacaac catttatgag accagtacaa
 actactcaag aggaagatgg ctgtagctgc cgatttccag aagaagaaga aggaggatgt
 gaactg

10

配列番号 26 は、4-1BB のシグナル伝達ドメインのアミノ酸配列である。

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

配列番号 27 は、CD3- ζ の DNA シグナル伝達ドメインのヌクレオチド配列である。

agagtgaagt tcagcaggag cgcagacgcc cccgcgtaca agcagggcca gaaccagctc
 tataacgagc tcaatctagg acgaagagag gactacgatg ttttgacaa gagacgtggc
 cgggaccctg agatgggggg aaagccgaga aggaagaacc ctcaggaagg cctgtacaat
 gaactgcaga aagataagat ggccggaggcc tacagtgaga ttgggatgaa aggcgagcgc
 cggaggggca aggggcacga tggcctttac cagggtctca gtacagccac caaggacacc
 tacgacgccc ttcacatgca ggccctgccc cctcgc

20

配列番号 28 は、CD3- ζ のアミノ酸配列である。

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

30

配列番号 29 は、Scvfc d19 のヌクレオチド配列である。

gacatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacatcagttgca
 gggcaagtca ggacattagt aaatatttaa attggtatca gcagaaacca gatggaactg ttaaactcct
 gatctacat acatcaagat tacactcagg agtcccatca aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat
 tattctctca

ccattagcaa cctggagcaa gaagatatg ccacttactt ttgccaacag ggtaatacgc ttccgtacac
 gttcggaggg gggaccaagc tggagatcac aggtggcggg ggctcgggcg gtggtgggtc ggggtggc
 ggc ggatctgagg tgaaactgca ggagtcagga cctggcctgg tggcgccctc acagagcctg tccg
 tcacat gcaactgtctc aggggtctca ttacccgact atggtgtaag ctggattcgc cagcctccac gaa
 aggggtct ggagtggctg ggagtaatat ggggtagtga aaccacatac tataattcag ctctcaaact ca
 gactgacc atcatcaagg acaactccaa gagccaagtt ttcttaaaaa tgaacagtct gcaaactgat g
 acacagcca ttactactg tgccaacat tattactacg gtggtagcta tgctatggac tactggggcc a
 aggaacctc agtcaccgtc tctca

40

配列番号 30 は、Scvfc d19 のアミノ酸配列である。

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val
 Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln L
 ys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly V
 al Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser As
 n Leu Glu Gln

50

【図 2 B】

pLTG1902 Ef1a MH2P CD8TM-4-1BB-CD3 ゼータ核酸配列

ATGCTGCTGCTGGTGACCAAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTTTCTGCT
GATTCGCGAGGTGCAAGCTGGTGCAAGCTTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTTCC
CAGAGACTCTCCTGTGAGGCTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCATGCACTGGGTG
CGGCAAGCTCCAGGGAAGGCTTGGAGTGGGCTCAGGATATTAGTTGGAATAGTGGTA
GCATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAG
AACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGCTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTTGATTACTGT
GCAAAAGATATTTCTGCTGCAAGCTGGTAAAGCCTTTTGTATATCTGGGGCCAAAGGACAAT
GGTCAACGCTCTCTCAGGAGGTGGCGGCTCTGGTGAGGCGGTAGCGGCGGTGGCGG
ATCCTCTCTGAGCTGACTCAGGACCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCA
GGATCACATGCCAAGGAGACAGCTCAGAACTATTATGCAAGCTGGTACCAAGCAGAAG
CCAGGACAGGCCCTGTACTTGTCTATGTGTAATAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCC
AGACCGCTTCTCTGGCTCCGACTCAGGAGACACAGCTTCTTGACCATCACTGGGGGCTC
AGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTCACTCCCGTGTGACAGTGGTGGTAACCATGTG
GTATTTCGGCGGAGGACCCAGCTGACCGTCTCTCGGTGCGGCCCAACTACCAACCCCTG
CCCTCTGGCGCGGACTCCGGCCCAACCATGCAAGCCCAACCCCTCTCCTTGGCGCC
CGAAGCTTGGCGCGGCGGCTGGAGTGGGCTGCAATCCGGGGGCTGCACTTTG
CTGGATATCTACATTTGGGCGCGGCTGGCGGCACTTGGCGGCTGCTCTGCTGTCG
CTGGTCACTACCCCTTTACTGCAAGAGGGCGCGGAAGAGCTGCTTTACATCTTCAAGCA
GCCGTTCTGCGGCCGCTGAGACGACTCAGGAAGAGGAGCGGATGCTGTCAGATTC
CCTGAGGAGGAAGAGGGGATGCGAAGTGGCGCTCAAGTTCTCACGGTCCCGCCGAC
GCCCGCCGATATCAACAGGCCAGAATCAGCTCTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGGA
GAGAGGATGACAGCTGCTGCGACAGCGGAGCGGACCGGAGCTGAGGCTGGGAGGA
AACCAGCGCGGAAAAACCTCAGGAAGGAGCTGTACAACGAGCTCCAGAAAGACAAGATG
GCGGAAGCTACTCAGAAATCGGGATGAAGGAGAGCGGAGGAGGGAAGGGTCAAC
GACGGGCTGTACAGGAGGACTGAGCAGCCGCCACTAAGGATACCTACGATGCTTGCATAT
GCAAGCACTCCACCCCGG (配列番号 13)

pLTG1902 Ef1a MH2P CD8TM-4-1BB-CD3 ゼータアミノ酸配列

MLLLVTSLLLCELPHAPFLIPEVQLVQSGGGLVQPGSRQLSCAASGTFDDYAMHWWR
QAPGKLEWWSGISWNSISYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAK
DISSAGNADFIWGGGTMTVTSSGGGSGGGGSGGGSSSELTDQPAVSVALGQTVRITC
QDRLRSYIYASWYQKPGQAPVLVIYKNNRPSGIPDRFSGSSGNTASLTITGAQAEDA
ADYYCHSRDSSGNHVFGGGTQLTVLGAATTTAPRPPPTAPTASQPLSLRPEACRPA
AGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQT
QEEDGCSGRFPEEEEGGCELVRKFSRSDAPAYQQGQNLNELNGRREYDVLDKRRG
GRDPEMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIMGKERRRGKGDGLYQLSLATKD
DYDALHMQALPPR (配列番号 14)

FIGURE 2B

【図 2 C】

pLTG1903 Ef1a MH6P CD8TM-4-1BB-CD3 ゼータ核酸配列

ATGCTGCTGCTGGTGACCAAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTTTCTGCT
GATTCGCGAGGTGCAAGCTGGTGCAAGCTTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTTCC
CAGAGACTCTCCTGTGAGGCTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCATGCACTGGGTG
CGGCAAGCTCCAGGGAAGGCTTGGAGTGGGCTCAGGATATTAGTTGGAATAGTGGTA
GCATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAG
AACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGCTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTTGATTACTGT
GCAAAAGATATTTCTGCTGCAAGCTGGTAAAGCCTTTTGTATATCTGGGGCCAAAGGACAAT
GGTCAACGCTCTCTCAGGAGGTGGCGGCTCTGGTGAGGCGGTAGCGGCGGTGGCGG
ATCCTCTCTGAGCTGACTCAGGACCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCA
GGATCACATGCCAAGGAGACAGCTCAGAACTATTATGCAAGCTGGTACCAAGCAGAAG
CCAGGACAGGCCCTGTACTTGTCTATGTGTAATAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCC
AGACCGCTTCTCTGGCTCCGACTCAGGAGACACAGCTTCTTGACCATCACTGGGGGCTC
AGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTCACTCCCGTGTGACAGTGGTGGTAACCATGTG
GTATTTCGGCGGAGGACCCAGCTGACCGTCTCTCGGTGCGGCCCAACTACCAACCCCTG
CCCTCTGGCGCGGACTCCGGCCCAACCATGCAAGCCCAACCCCTCTCCTTGGCGCC
CGAAGCTTGGCGCGGCGGCTGGAGTGGGCTGCAATCCGGGGGCTGCACTTTG
CTGGATATCTACATTTGGGCGCGGCTGGCGGCACTTGGCGGCTGCTCTGCTGTCG
CTGGTCACTACCCCTTTACTGCAAGAGGGCGCGGAAGAGCTGCTTTACATCTTCAAGCA
GCCGTTCTGCGGCCGCTGAGACGACTCAGGAAGAGGAGCGGATGCTGTCAGATTC
CCTGAGGAGGAAGAGGGGGGATGCGAAGTGGCGCTCAAGTTCTCACGGTCCCGCCGAC
GCCCGCCGATATCAACAGGCCAGAATCAGCTCTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGGA
GAGAGGATGACAGCTGCTGCGACAGCGGAGCGGACCGGAGCTGAGGCTGGGAGGA
AACCAGCGCGGAAAAACCTCAGGAAGGAGCTGTACAACGAGCTCCAGAAAGACAAGATG
GCGGAAGCTACTCAGAAATCGGGATGAAGGAGAGCGGAGGAGGGAAGGGTCAAC
GACGGGCTGTACAGGAGGACTGAGCAGCCGCCACTAAGGATACCTACGATGCTTGCATAT
GCAAGCACTCCACCCCGG (配列番号 15)

pLTG1903 Ef1a MH6P CD8TM-4-1BB-CD3 ゼータアミノ酸配列

MLLLVTSLLLCELPHAPFLIPEVQLVQSGAEVKKPGASVKYSKASGYFTGYMHWWR
QAPGGLLEWWMGRINPNSGGTNYAKFKQGRVTMTNRTSISTAYMELSRISRLSDTAVYYCAR
SGYYYGLDWWGQGTIVTVSSGGGSGGGGSGGGGSSQSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSG
SRNIGRNTNWNWYQQLPGLAPKLIQRSDQRPSSGVPDRFSGSKVTSASLAISSGLRSEDA
DYCGTWDNSLSAYVFGTGLTKLTVLGAATTTAPRPPPTAPTASQPLSLRPEACRPA
AGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQT
QEEDGCSGRFPEEEEGGCELVRKFSRSDAPAYQQGQNLNELNGRREYDVLDKRRG
RDPEMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIMGKERRRGKGDGLYQLSLATKD
DYDALHMQALPPR (配列番号 16)

FIGURE 2C

【図 2 D】

pLTG1904 Ef1a M1-4S CD8TM-4-1BB-CD3 ゼータ核酸配列

ATGCTGCTGCTGGTGACCAAGCCTGCTGCTGTGCGAACTGCCGCATCCGGCGTTTCTGCT
GATTCGCGAGGTGCAAGCTGGTGCAAGCTTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGCTCC
CTGAGACTCTCCTGTGAGGCTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCATGCACTGGGTG
CGGCAAGCTCCAGGGAAGGCTTGGAGTGGGCTCAGGATATTAGTTGGAATAGTGGTA
GCATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAG
AACTCCCTGTATCTGCAAAATGAACAGCTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTTGATTACTGT
GCAAAAGATATTTCTGCTGCAAGCTGGTGAACCCCTTTAACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGT
CACCGCTTCTCAGGAGGTGGCGGCTCTGGTGAGGCGGTAAGCGCGGTGGCGGATC
CTCTTCTGAGCTGACTCAGGACCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAAGGA
TCACATGCCAAGGAGAGACAGCTCAGAACTATTATGCAAGCTGGTACCAAGCAGAAGCCA
GGACAGGCCCTGTACTTGTCTATGTGTAATAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAAG
CGGATCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAGACACAGCTTCTTGACCATCACTGGGGCTCAGG
CGGAGGATGAGGCTGACTATTACTGTAACTCCCGGACAGCAGTGGTAACCATCTGGTA
TTCGGCGGAGGCCACCCAGCTGACCGCTCCTCGTGGCGGCCCAACTACCAACCCCTGCC
CTCGGCCCGGACTCCGGCCCAACCATGCAAGCCCAACCCCTCTCCTTGGCGCCCGA
AGCTTGGCGGCCCGGCCGCGGCTGGAGCGGTGCAATCCCGGGGCTGCACTTTGCTCTG
CGATATCTACATTTGGGCCCGGCTGCGGCGCACTTGGCGGCTGCTCTGCTGTGCTG
GTCATCACCTTTACTGCAAGAGGGGCGGGAAGAGCTGCTTTACATCTTCAAGCAGCC
GTTGATCGGGCCGCTGCAAGCAGCTCAGGAAGAGGACGAGTGGTGTGAGATTCCTG
GAGGAGGAAGAGGGGGGATGCCAAGTGGCGCTCAAGTTCTCACGGTTCGCCGACGCC
CCCGCATATCAACAGGGCCAGAATCAGCTCTACAACGAGCTGAACCTGGGAAGGAGAG
AGGAGTACGACGTGCTGAGACAAGCGACCGGAGCGGACCGGAGATGGGGGGGAAAC
CAGCGCGGAAAAACCTCAGGAAGGACTGTACAACGAACTCCAGAAAGACAAGATGGC
GGAAGCCTACTCAGAAATCGGGATGAAGGGAGAGCGGAGGAGGGGAAAGGGTCAACGA
CGGGCTGTACAGGAGGACTGAGCAGCCGCCACTAAGGATACCTACGATGCTTGCATATG
AAGCACTCCACCCCGG (配列番号 17)

pLTG1904 Ef1a M1-4S CD8TM-4-1BB-CD3 ゼータアミノ酸配列

MLLLVTSLLLCELPHAPFLIPEVQLVQSGGGLVQPGSLRLSCAASGTFDDYAMHWWR
QAPGKLEWWSGISWNSISYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAK
DLSSVAGFPNYYGGGTIVTVSSGGGSGGGGSGGGSSSELTDQPAVSVALGQTVRITC
QDGLRSYIYASWYQKPGQAPVLVIYKNNRPSGIPDRFSGSSGNTASLTITGAQAEDA
DYCCNSRDSGNHVFGGGTQLTVLGAATTTAPRPPPTAPTASQPLSLRPEACRPA
AGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCKRGRKLLYIFKQPFMRPVQT
QEEDGCSGRFPEEEEGGCELVRKFSRSDAPAYQQGQNLNELNGRREYDVLDKRRG
RDPEMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIMGKERRRGKGDGLYQLSLATKD
DYDALHMQALPPR (配列番号 18)

FIGURE 2D

【図 3】

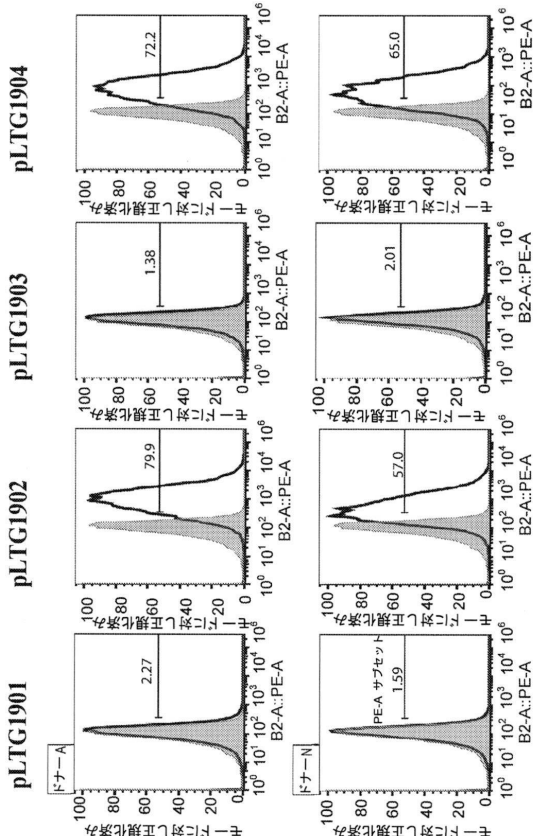


FIGURE 3

10

20

30

40

50

【図 4】

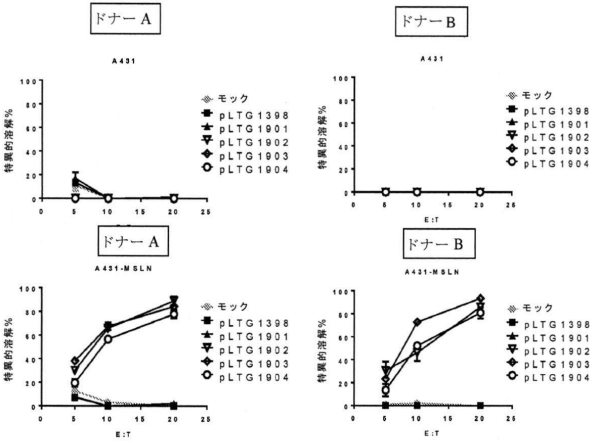


FIGURE 4

【配列表】

0007018985000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K	14/705 (2006.01)	C 0 7 K	14/705	
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	E
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 K	35/13 (2015.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/13	
		A 6 1 K	35/17	Z

5 2 ロックビル, エグゼクティブ ブールバード 6 0 1 1, スイート 3 2 5, オフィス オ
ブ テクノロジー トランスファー

(74)代理人 110001195

特許業務法人深見特許事務所

(72)発明者 オレンタス, リマス

アメリカ合衆国、2 0 0 0 8 ワシントン、ディストリクト・オブ・コロンビア、コネチカット・
アベニュー・ノース・ウエスト、3 6 0 1、アパートメント・6 2 1

(72)発明者 シュナイダー, ディナ

アメリカ合衆国、2 0 8 5 4 メリーランド州、ポトマック、インバーネス・リッジ・ロード、7
9 2 3

(72)発明者 ドロブリク, ボロ

アメリカ合衆国、2 1 0 4 2 メリーランド州、エリコット・シティ、ゴールデン・オーク・ドラ
イブ、1 2 6 3 7

(72)発明者 ディミトロフ, ディミタ・エス

アメリカ合衆国、2 1 7 0 2 メリーランド州、フレデリック、ストーリントン・ドライブ、1 0
1 9

(72)発明者 チュー, ゾンユイ

アメリカ合衆国、2 1 7 0 2 メリーランド州、フレデリック、カリントン・ウェイ、2 5 0 1

審査官 太田 雄三

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 5 / 0 9 0 2 3 0 (WO, A 1)

国際公開第 2 0 1 3 / 0 6 3 4 1 9 (WO, A 2)

国際公開第 2 0 1 5 / 1 8 8 1 4 1 (WO, A 2)

米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 0 3 1 6 2 4 (US, A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0

C 0 7 K 1 9 / 0 0

C 0 7 K 1 6 / 0 0

C 1 2 N 5 / 0 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 / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

J a p i o - G P G / F X